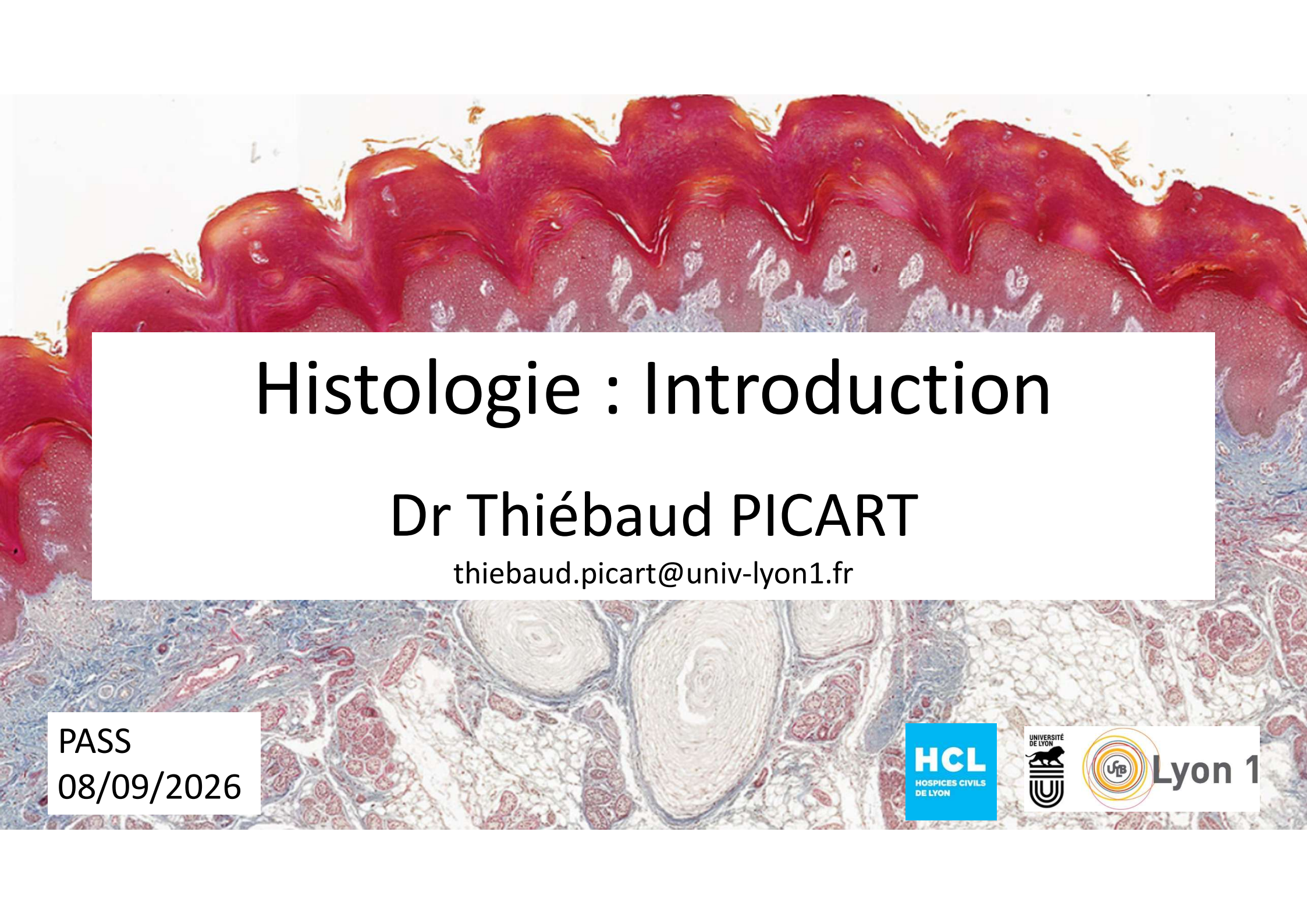




Histologie : Introduction

Dr Thiébaud PICART

thiebaud.picart@univ-lyon1.fr

PASS
08/09/2026



Histologie : Introduction

Plan

I. Qu'est ce que l'Histologie ?

II. Les tissus

1. *Définition*
2. *Les 4 tissus fondamentaux*

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

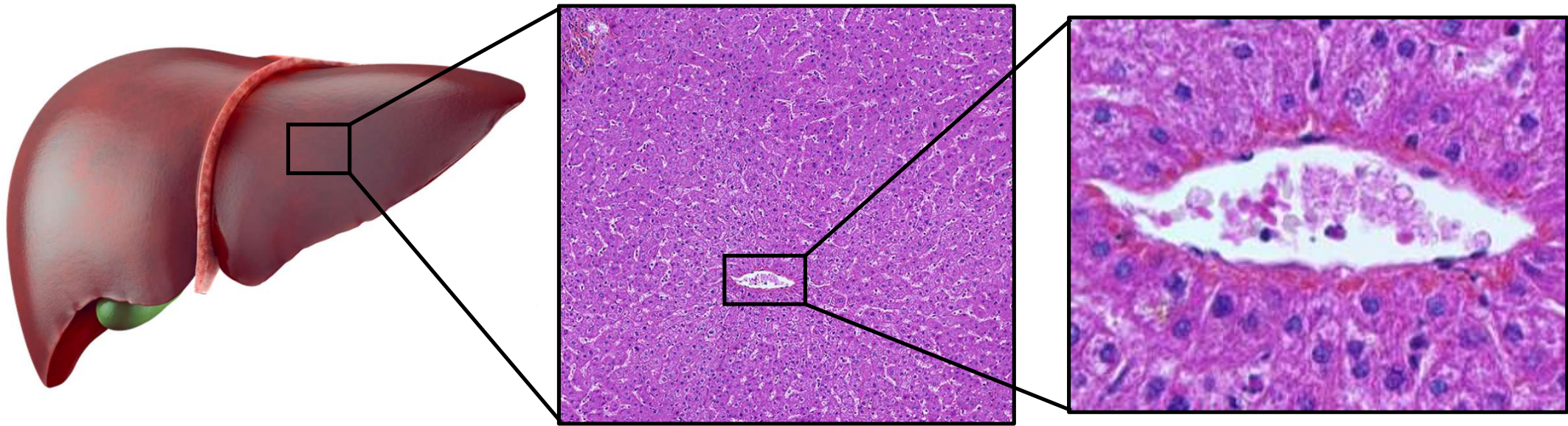
1. *Définition*
2. *Mécanismes de la différenciation cellulaire*
3. *Contrôle de la différenciation cellulaire*

Histologie : Introduction

Objectifs

- Savoir définir la notion de tissu
- Connaître les 4 tissus fondamentaux
- Savoir expliquer la notion de différenciation cellulaire

I. Qu'est ce que l'Histologie ?



Appareil → Organes

Tissu

Cellule

Exemple : le foie

Epithélium

« Unité fondamentale
du vivant »

I. Qu'est ce que l'Histologie ?

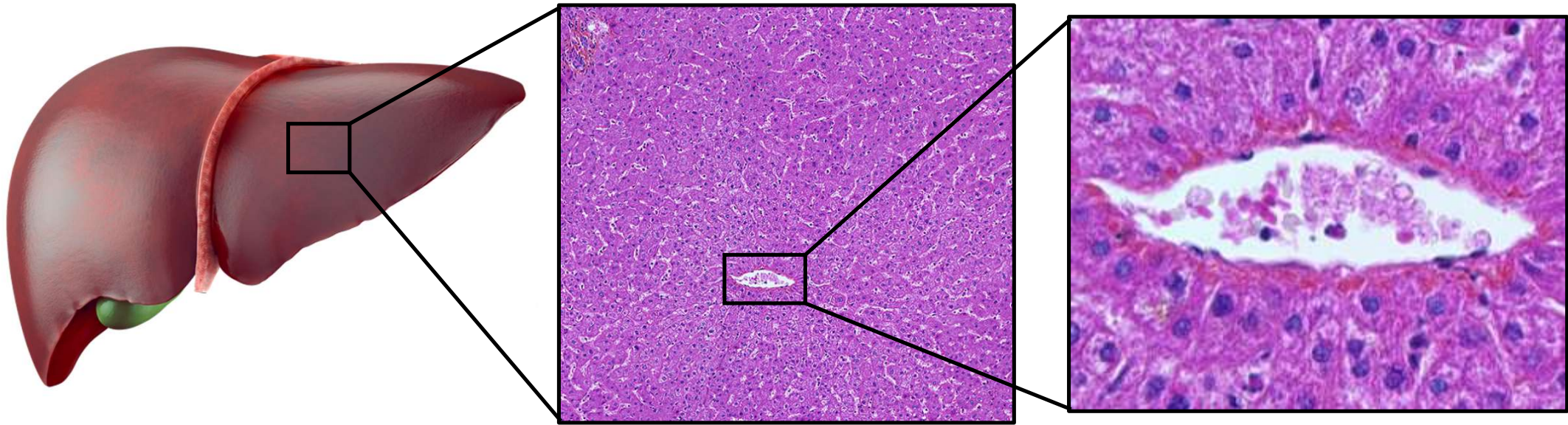
- **Histologie**

- Du grec ancien : ιστός = tissu λόγος = discours
- Branche de la biologie et de la médecine qui étudie les tissus biologiques à l'échelle microscopique
 - *Histologie générale* : description de la constitution des tissus
 - *Histologie spéciale* : étude de l'organisation de différents tissus entre eux pour former des organes plus complexes
- Discipline morphologique, à mi-chemin entre l'Anatomie, la Biologie Cellulaire, la Biochimie et la Physiologie ➔ **Relation structure - fonction**
- Microscopie et méthodes d'étude spécifiques (cours dédié)

- **Cytologie**

- Branche de l'Histologie, étudiant spécifiquement la cellule

I. Qu'est ce que l'Histologie ?



Appareil → Organes

Exemple : le foie

Tissu

Epithélium

Cellule

« Unité fondamentale
du vivant »

→ Anatomie

→ Histologie
= « Microanatomie »

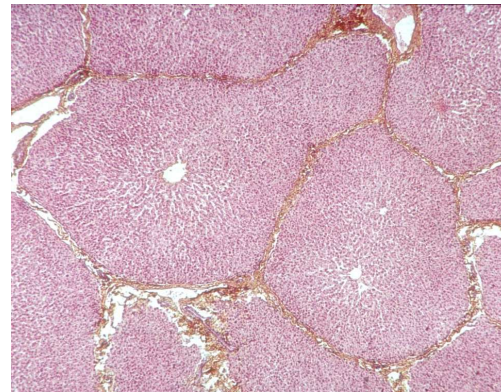
→ Cytologie /
Cytophysiologie

I. Qu'est ce que l'Histologie ?

- **Intérêts**

- Comprendre comment l'organisation d'un tissu peut être perturbée en cas de lésion
- Comprendre comment le fonctionnement d'un tissu peut être modifié en cas de pathologie

Exemple :



Foie normal



Fibrose hépatique

- Développement de nouvelles perspectives thérapeutiques : greffes cellulaires et tissulaires

Histologie: Introduction

Plan

I. Qu'est ce que l'Histologie ?

II. Les tissus

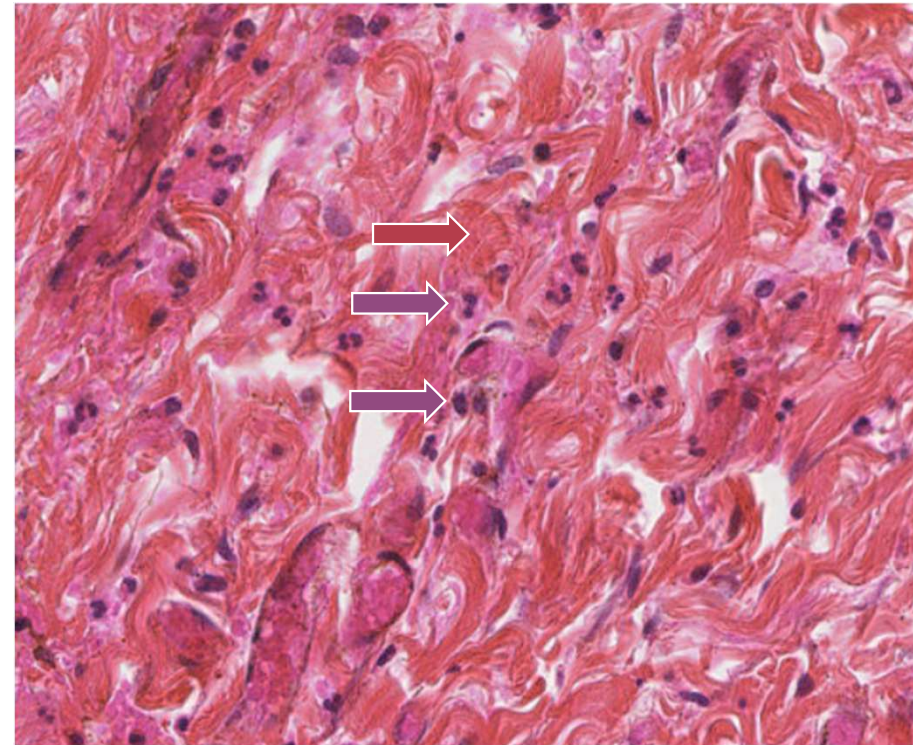
1. *Définition*

2. *Les 4 tissus fondamentaux*

II. Les tissus

1. Définition

- Ensemble coopératif et organisé de cellules spécialisées qui forment une association territoriale et fonctionnelle
- Constitution :
 - Cellules
 - Matrice Extra-Cellulaire (MEC)
 - ➔ Sécrétée par les cellules
 - ➔ Constituée par de l'eau, de petites molécules dissoutes (sels minéraux, sucres, polypeptides) et des macromolécules protéiques, parfois organisées en fibres
 - ➔ « Substance fondamentale » = partie non observable de la MEC (par opposition aux fibres)



Exemple : Intestin grêle (adventice) – Atlas CHEC

II. Les tissus

1. Définition

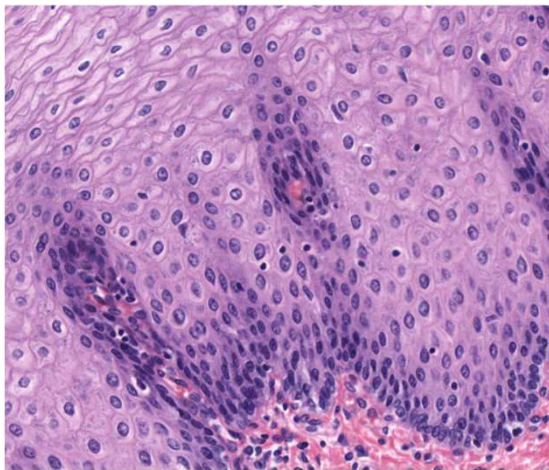
- Ensemble coopératif et organisé de cellules spécialisées qui forment une association territoriale et fonctionnelle
- Constitution :
 - Cellules
 - Matrice Extra-Cellulaire (MEC)
- Éléments variables d'un tissu à l'autre :
 - Nature des cellules
 - Composition moléculaire de la MEC
 - Proportion relative des cellules et de la MEC

II. Les tissus

2. Les 4 tissus fondamentaux

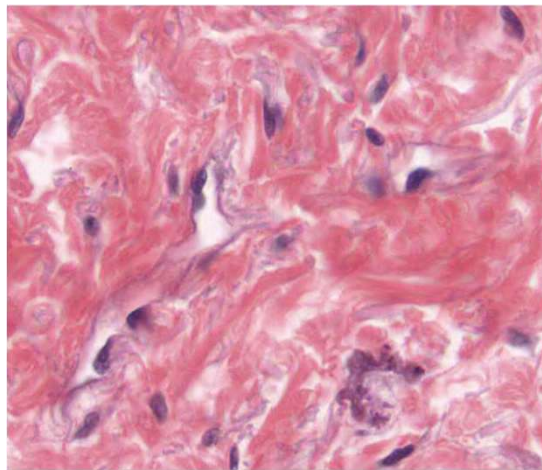
- Organes des mammifères = formés par **quatre** grandes catégories de tissus fondamentaux
- Tissus fondamentaux : se différencient les uns des autres par des **caractéristiques fonctionnelles et morphologiques**

Tissu épithélial



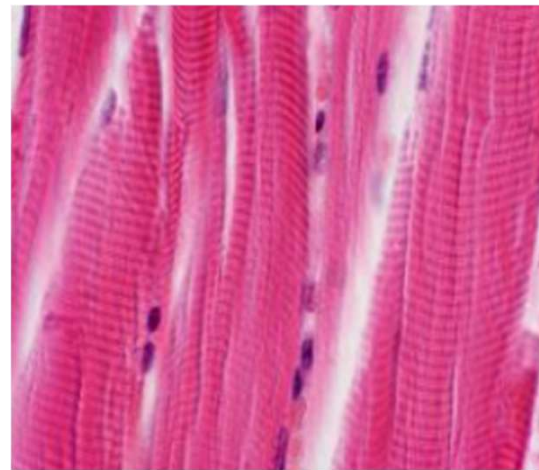
➔ Dr PICART

Tissu conjonctif



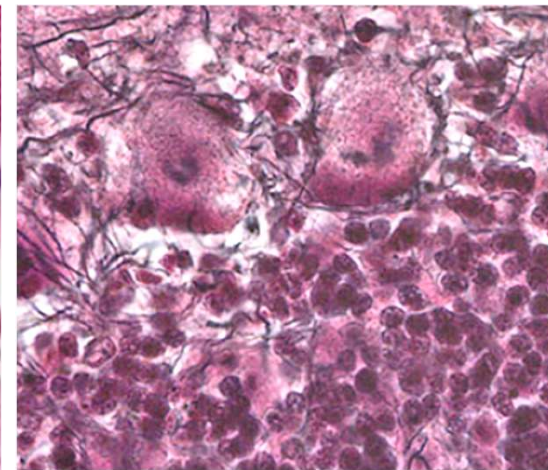
➔ Dr PIATON

Tissu musculaire



➔ Dr NATAF

Tissu nerveux



➔ Dr NATAF

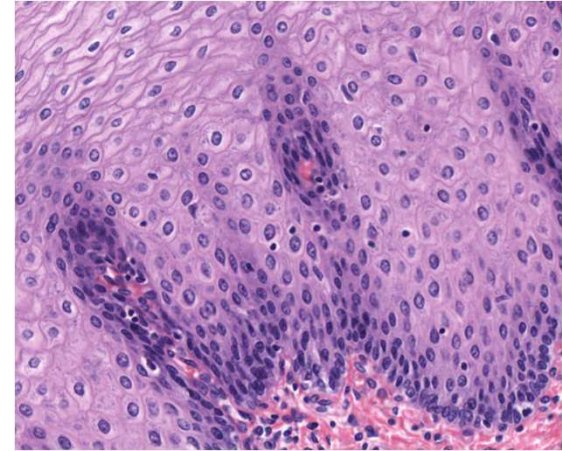
II. Les tissus

2. Les 4 tissus fondamentaux

a) Tissu épithélial

- Constitué par des cellules jointives établissant des jonctions entre elles
- 2 types d'épithélium :
 - *Epithélium de revêtement* (surface du corps, cavités)
 - Exemple : l'épiderme (couche superficielle de la peau)
 - *Epithélium glandulaire*
 - Exemple : épithélium pancréatique

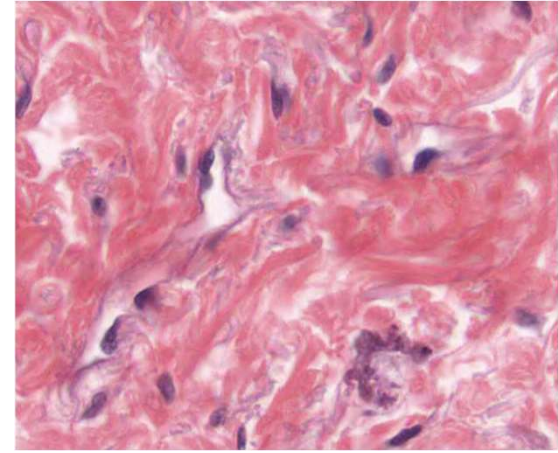
➔ Fonctions : protection, absorption, sécrétion, échanges



II. Les tissus

2. Les 4 tissus fondamentaux

b) Tissu conjonctif



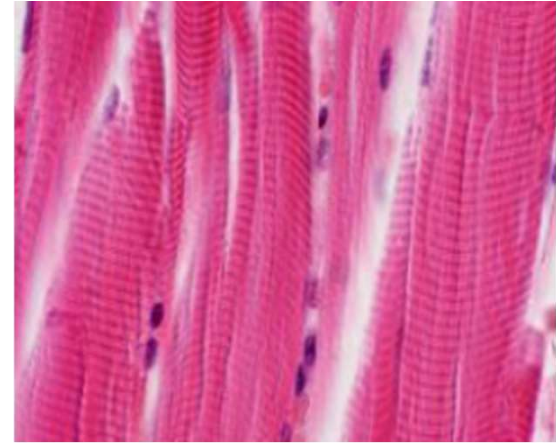
- Constitué par des cellules entourées d'une matrice extracellulaire généralement abondante
- Différentes catégories :
 - Tissu conjonctif non spécialisé
 - Tissu adipeux
 - Tissus squelettiques : tissu osseux, tissu cartilagineux
 - Sang

➔ Fonctions : protection, soutien, liaison, stockage, transport

II. Les tissus

2. *Les 4 tissus fondamentaux*

c) Tissu musculaire



- **Contraction** grâce à l'organisation, au sein du cytoplasme, d'éléments du cytosquelette (actine et myosine), capables de produire une contraction unidirectionnelle
- Différentes catégories :
 - Tissu musculaire strié (exemple : biceps)
 - Tissu musculaire lisse (exemple : myomètre = muscle utérin)
 - Tissu musculaire cardiaque

➔ **Fonction : contraction ➔ mouvement**

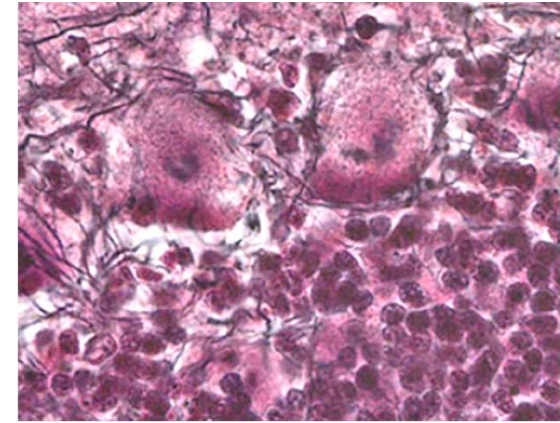
II. Les tissus

2. *Les 4 tissus fondamentaux*

d) Tissu nerveux

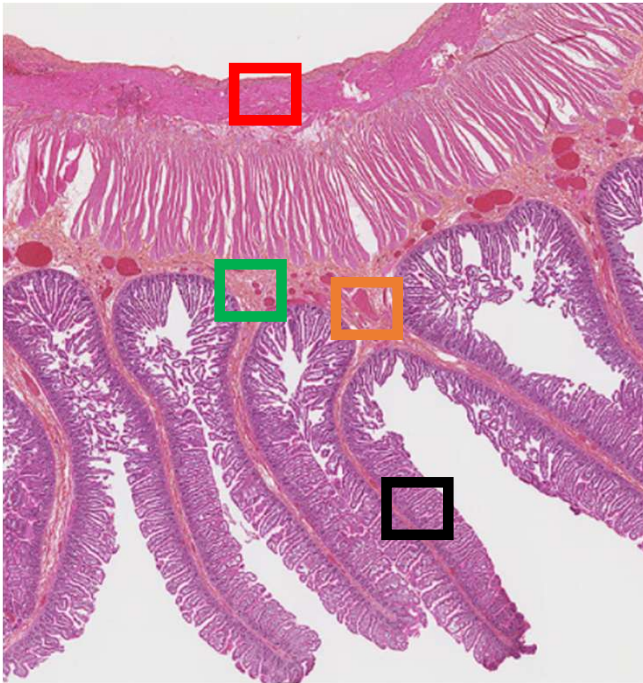
- Spécialisé dans le **traitement d'informations** sous forme de message électrique
- Caractéristiques : excitabilité, conductivité et communication
- Différentes catégories :
 - Système nerveux central : cerveau et moelle épinière
 - Système nerveux périphérique : nerfs

➔ **Fonction : réception, traitement et transmission d'informations**

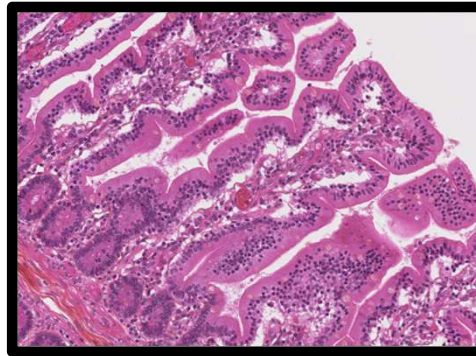


II. Les tissus

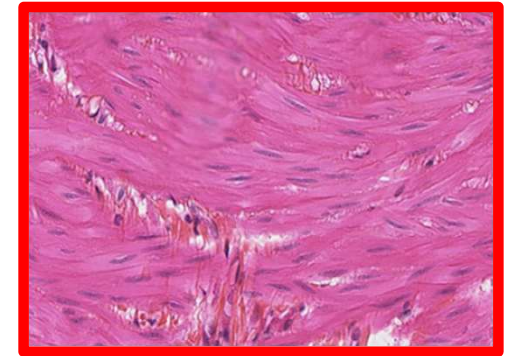
2. Les 4 tissus fondamentaux



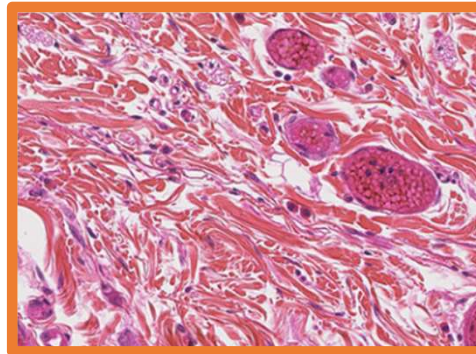
Coupe de jéjunum (intestin grêle)



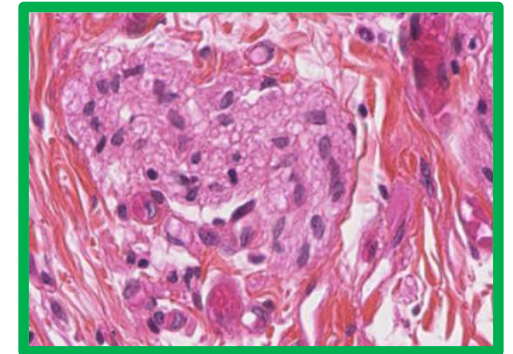
**T. épithélial : Absorption
des nutriments**



**T. musculaire :
Progression des aliments**



**T. Conjonctif : Structure,
Soutien, Transport**

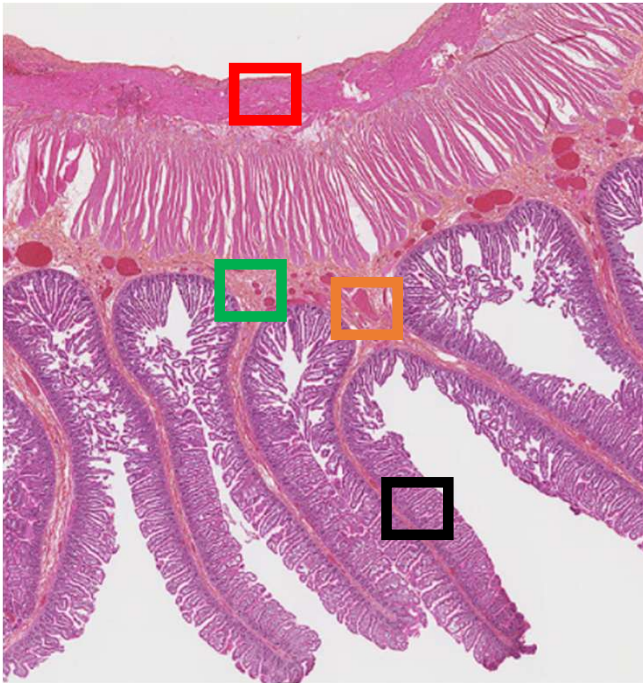


**T. nerveux : Contrôle
de la motricité**

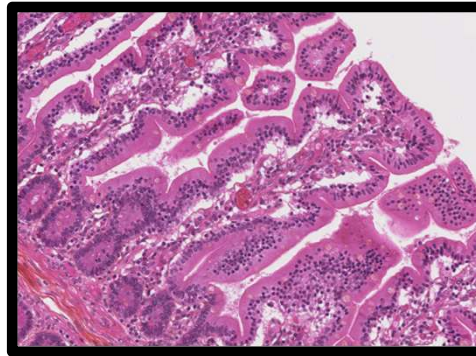
➔ **Relation structure - fonction**

II. Les tissus

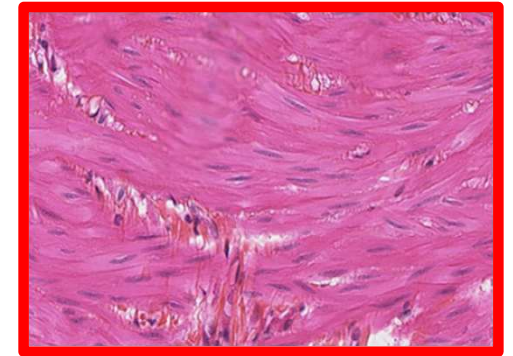
2. Les 4 tissus fondamentaux



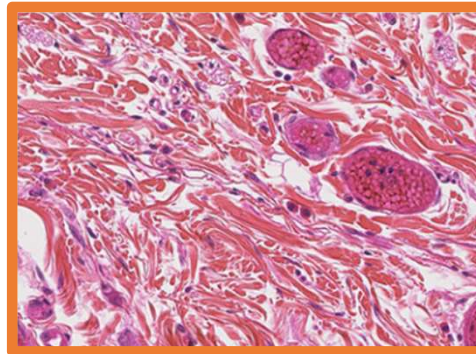
Coupe de jéjunum (intestin grêle)



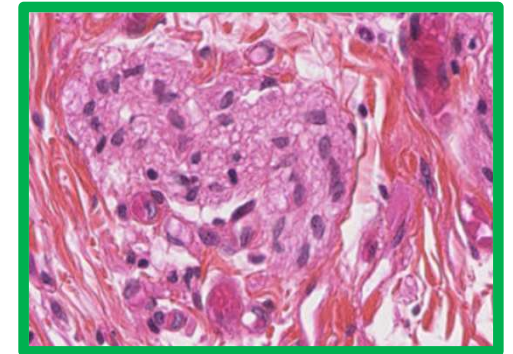
**T. épithélial : Absorption
des nutriments**



**T. musculaire :
Progression des aliments**



**T. Conjonctif : Structure,
Soutien, Transport**



**T. nerveux : Contrôle
de la motricité**

- Cellules d'un tissu = spécialisées pour réaliser une (ou quelques) fonction(s) élémentaire(s)
 - ➔ Types cellulaires stables présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles particulières : **cellules différenciées**

Histologie: Introduction

Plan

I. Qu'est ce que l'Histologie ?

II. Les tissus

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

1. *Définition*
2. *Mécanismes de la différenciation cellulaire*
3. *Contrôle de la différenciation cellulaire*
4. *Caractéristiques observables*

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

1. Définition

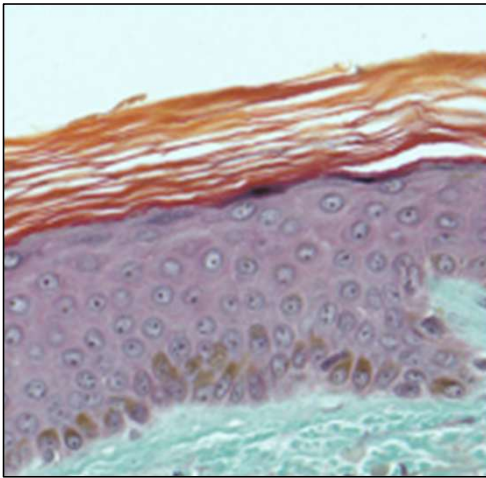
- **Différenciation cellulaire = processus par lequel une cellule acquiert progressivement des caractéristiques particulières qui lui permettent d'assurer une fonction spécifique**
- Au sein d'un tissu :
 - Cellules qui ne présentent pas encore toutes les caractéristiques des cellules différenciées de ce tissu
 - Evolution possible uniquement vers la formation des types cellulaires caractéristiques de ce tissu → **Cellules déterminées / engagées**
 - Si évolution possible vers un seul type cellulaire → **Cellules souches unipotentes**
 - Si évolution possible vers plusieurs types cellulaires → **Cellules souches multipotentes**
 - (Chez l'embryon, **cellules souches totipotentes** → évolution possible vers tous types)
 - Processus de différenciation en deux étapes :
 - Acquisition de l'état déterminé (pendant la vie embryonnaire)
 - Différenciation terminale à partir d'une cellule engagée

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

1. Définition

- **Différenciation cellulaire = processus par lequel une cellule acquiert progressivement des caractéristiques particulières qui lui permettent d'assurer une fonction spécifique**
- Exemple de l'épiderme

Superficie



Profondeur

➔ Cellules différenciées : kératinocytes

➔ Cellules basales : cellules souches épidermiques capables de s'auto-renouveler et de donner naissance aux kératinocytes

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

2. *Mécanismes de la différenciation cellulaire*

- Programme d'expression génique : expression spécifique et coordonnée d'un ensemble de gènes permettant l'acquisition d'un phénotype particulier.
 1. *Gènes ubiquitaires* : exprimés par tous les types cellulaires
 - ➔ Maintenance de la machinerie cellulaire
 - ➔ Exemples : les enzymes de la glycolyse, du cycle de Krebs, de la synthèse des protéines...)
 2. *Gènes spécifiques du type cellulaire*

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

2. Mécanismes de la différenciation cellulaire

- Plusieurs niveaux de contrôle de la transcription de l'ADN jusqu'à la destruction des protéines
- Point de contrôle majeur : **régulation de la transcription (ADN → ARNm)**
 - Facteurs de transcription = protéines se fixent spécifiquement sur les régions régulatrices de certains gènes
 - Modulation de l'activité de l'ARN polymérase
 - Modification locale de la condensation de la chromatine
 - Gènes transcrits dans une cellule à un instant donné (et donc son état de différenciation) = dépendants de l'ensemble des facteurs de transcription présents et actifs dans cette cellule

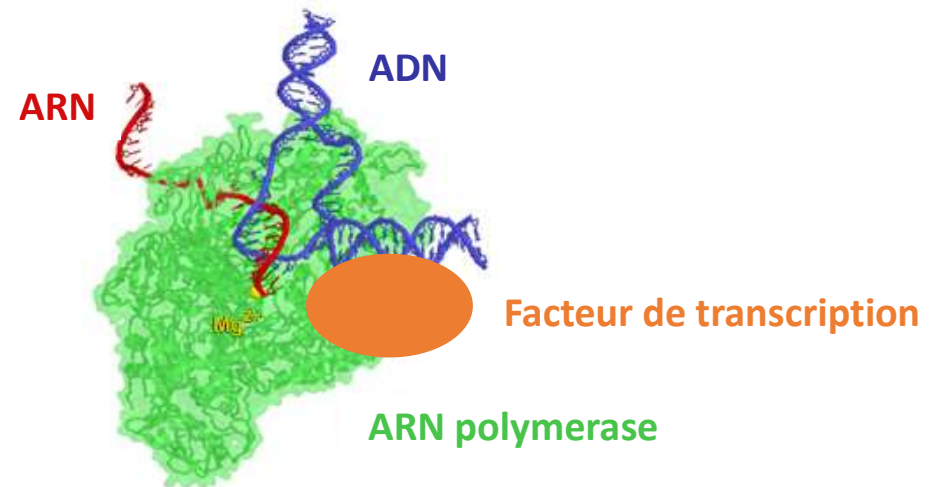
III. Différenciation et spécialisation cellulaire

2. Mécanismes de la différenciation cellulaire

- Plusieurs niveaux de contrôle de la transcription de l'ADN jusqu'à la destruction des protéines
- Point de contrôle majeur : **régulation de la transcription (ADN → ARNm)**

Exemples :

- **MyoD** : différenciation musculaire
- **HNF4α** : différenciation des cellules hépatiques (hépatocytes)



III. Différenciation et spécialisation cellulaire

3. Contrôle de la différenciation cellulaire

a) Au cours du développement embryonnaire

- Diversification progressive des différents types cellulaires grâce à des communications intercellulaires modifiant l'ensemble des facteurs de transcription présents et actifs dans la cellule
- Boucles de rétrocontrôle positif : effets perdurant après la disparition du signal extracellulaire
 - Exemple : MyoD → Activation de gènes musculaires et d'autres facteurs de différenciation
→ Renforcement du programme musculaire
 - Etat déterminé = état stable transmissible aux cellules issues d'une mitose
- Effets non irréversibles : les boucles de rétrocontrôle peuvent être interrompues par un nouveau signal
 - Exemple : facteurs de Yamanaka (OCT4 + SOX2 + KLF4 + c-MYC) → reprogrammation des cellules vers un état pluripotent

III. Différenciation et spécialisation cellulaire

3. Contrôle de la différenciation cellulaire

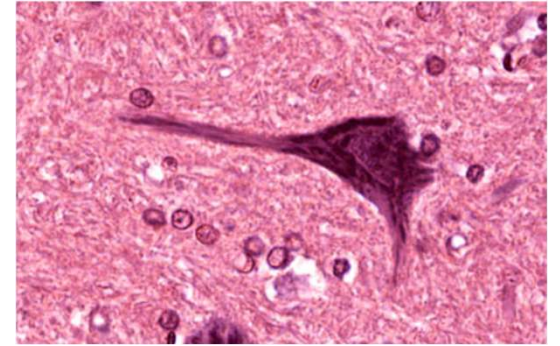
b) Après la naissance

- Renouvellement constant de certains tissus (peau, épithélium intestinal...)
 - Equilibre entre prolifération cellulaire et différenciation terminale
 - Durée de vie cellulaire déterminée
 - ➔ Conservation de caractéristiques constantes : **homéostasie tissulaire**
- 3 compartiments cellulaires distincts :
 1. **Cellules souches** : auto-renouvellement de manière infinie. Peu de divisions cellulaires.
 2. **Cellules amplifiantes** : non différenciées. Divisions actives ➔ Renouvellement des tissus. Evolution vers l'état différencié. Pas d'auto-renouvellement infini.
 3. **Cellules en cours de différenciation terminale** : expression d'un programme spécifique pour réaliser une fonction particulière. Diminution des capacités de prolifération ➔ Cellules « post-mitotiques », ne se divisant plus (Exemples : neurones, cardiomyocytes).
- ➔ **Equilibre entre ces 3 compartiments grâce aux mitoses asymétriques et aux communications intercellulaires**

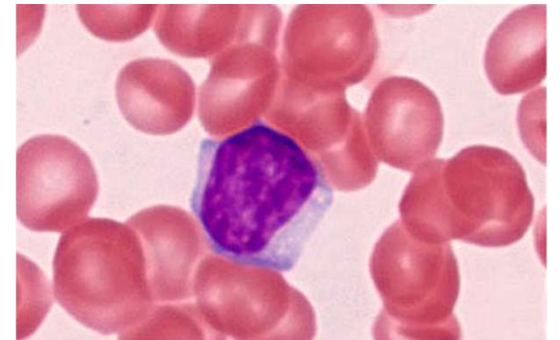
III. Différenciation et spécialisation cellulaire

4. Caractéristiques observables

- Taille de la cellule
- Forme de la cellule
- Ratio nucléo-cytoplasmique
- Condensation de la chromatine
- Présence de granules de sécrétion
- Propriétés tinctoriales (acidophile, basophile, cf Méthodes)
- Colorations spéciales (cf Méthode)



Exemple : neurone
(Moelle épinière)



Exemple : frottis sanguin
**Lymphocyte : ratio
nucléo-cytoplasmique
élevé**

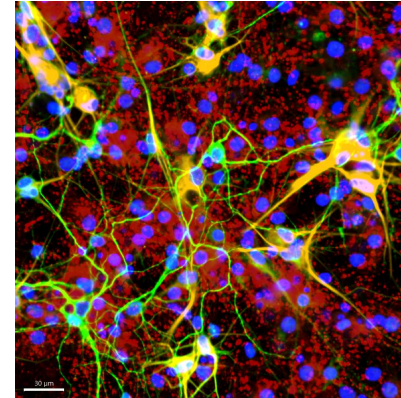
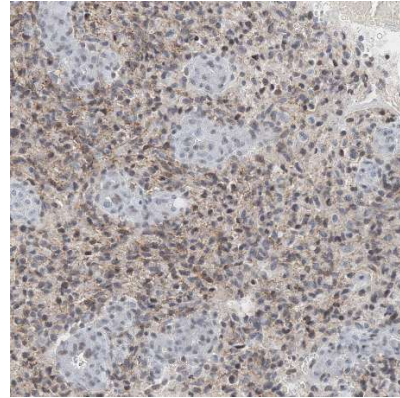
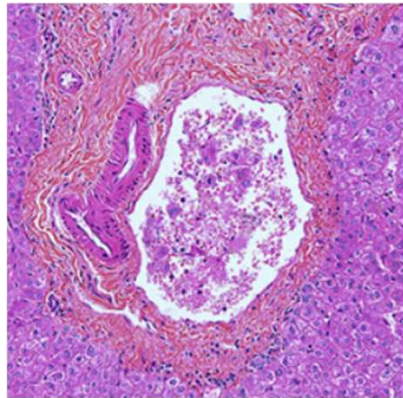
Take-home messages

- Histologie : étude de l'organisme à l'échelle tissulaire
- Les cellules s'organisent en 4 tissus fondamentaux
- Les tissus sont constitués de cellules différenciées et spécialisées → Homéostasie tissulaire
- La structure des tissus est adaptée à une fonction particulière : **relation structure - fonction**

Sources

- Histologie Moléculaire de la Cellule. J Poirier et al. Ed Masson
- Histologie. Bases fondamentales. B. Mace et Collège. Ed. Omniscience
- Histologie. JP Dadoune
- Atlas d'Histologie du CHEC (Collège des Histologistes, Embryologues et Cytogénéticiens)
- Site web : [Histology Guide - virtual microscopy laboratory](#)

Méthodes en Histologie



Dr Thiébaud PICART

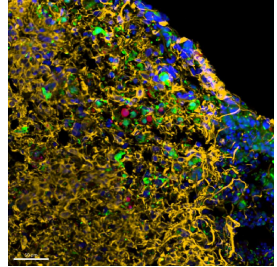
thiebaud.picart@univ-lyon1.fr

PASS

08/09/2026



Méthodes en Histologie



Plan

I. Introduction

1. *Principes généraux*
2. *Techniques de préservation des tissus*

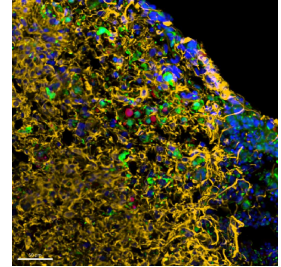
II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. *Les colorations standards*
2. *L'Histochimie*
3. *L'Histo-Enzymologie*

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. *L'Immuno-Histologie*
2. *L'Hybridation in situ*
3. *L'Autoradiographie*

Méthodes en Histologie



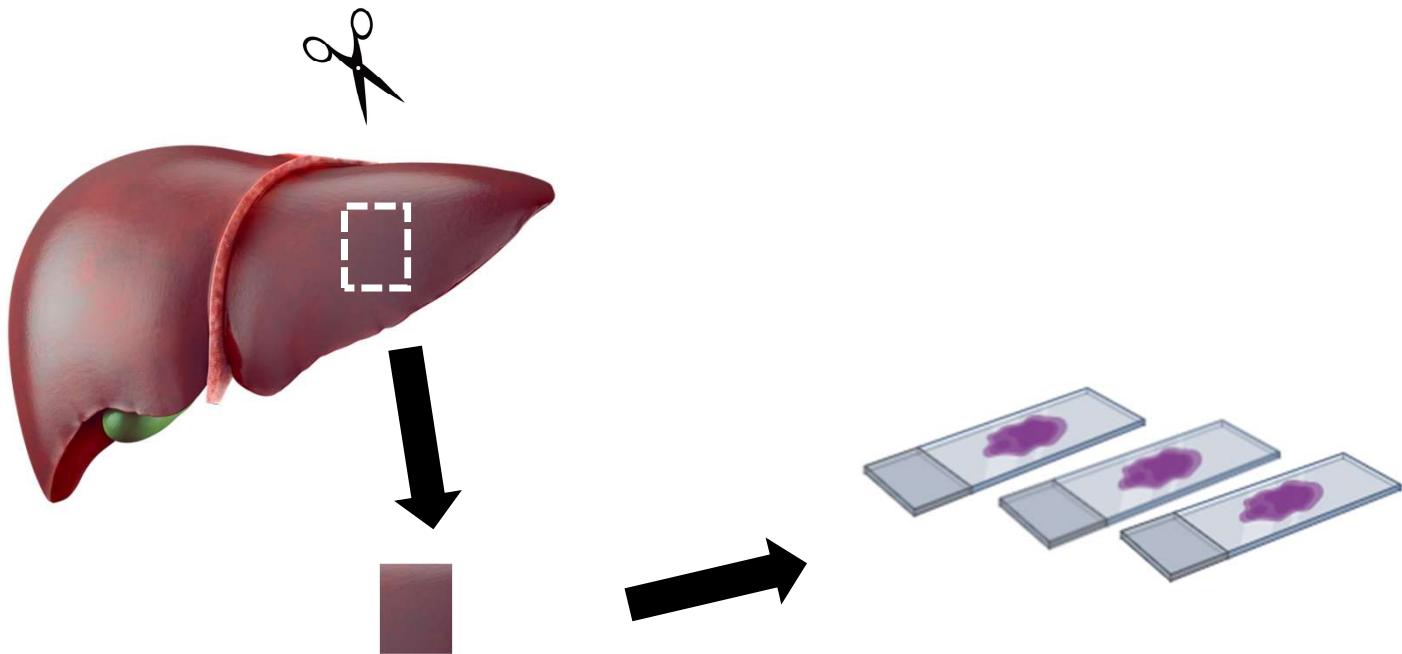
Objectifs

- Savoir décrire :
 - ✓ Les techniques d'étude *in situ* des constituants biochimiques
 - ✓ Les techniques d'analyse moléculaire *in situ*
- Comprendre l'intérêt (et les limites) de chaque technique de marquage
- Savoir reconnaître la technique de marquage utilisée à partir d'une illustration morphologique

I. Introduction

1. Principes généraux

Comment étudier l'histologie du foie ?



Préparation de l'échantillon
Fixation ou congélation

Inclusion - Coupe
Montage- Coloration



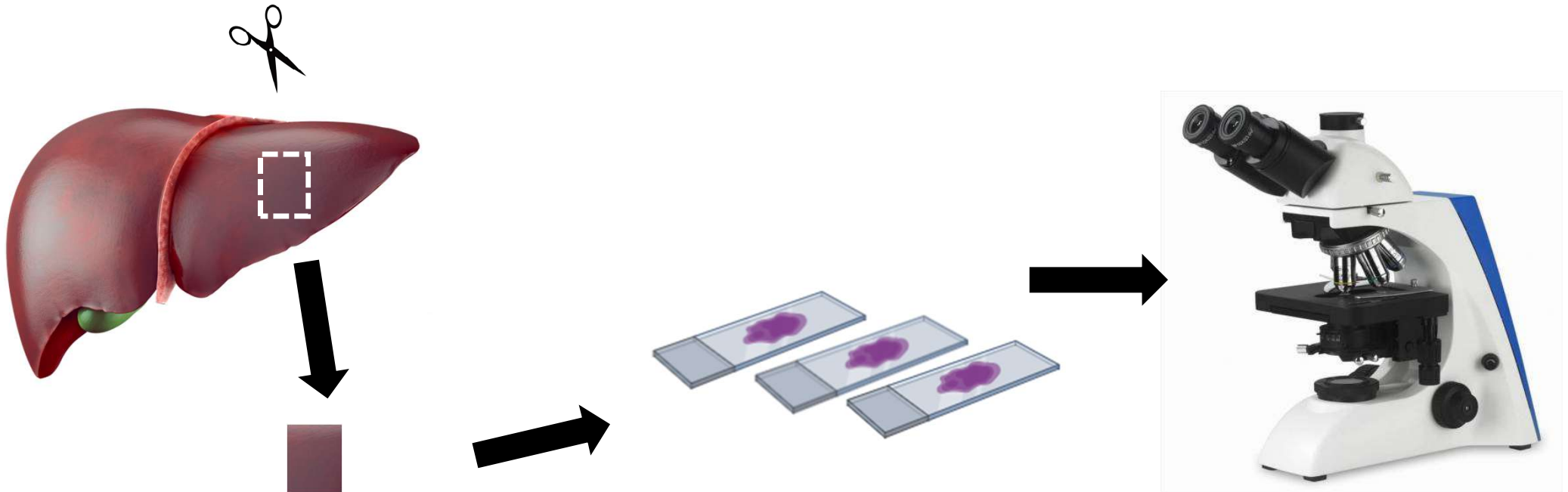
Inclusion en paraffine



I. Introduction

1. Principes généraux

Comment étudier l'histologie du foie ?



Préparation de l'échantillon
Fixation ou congélation

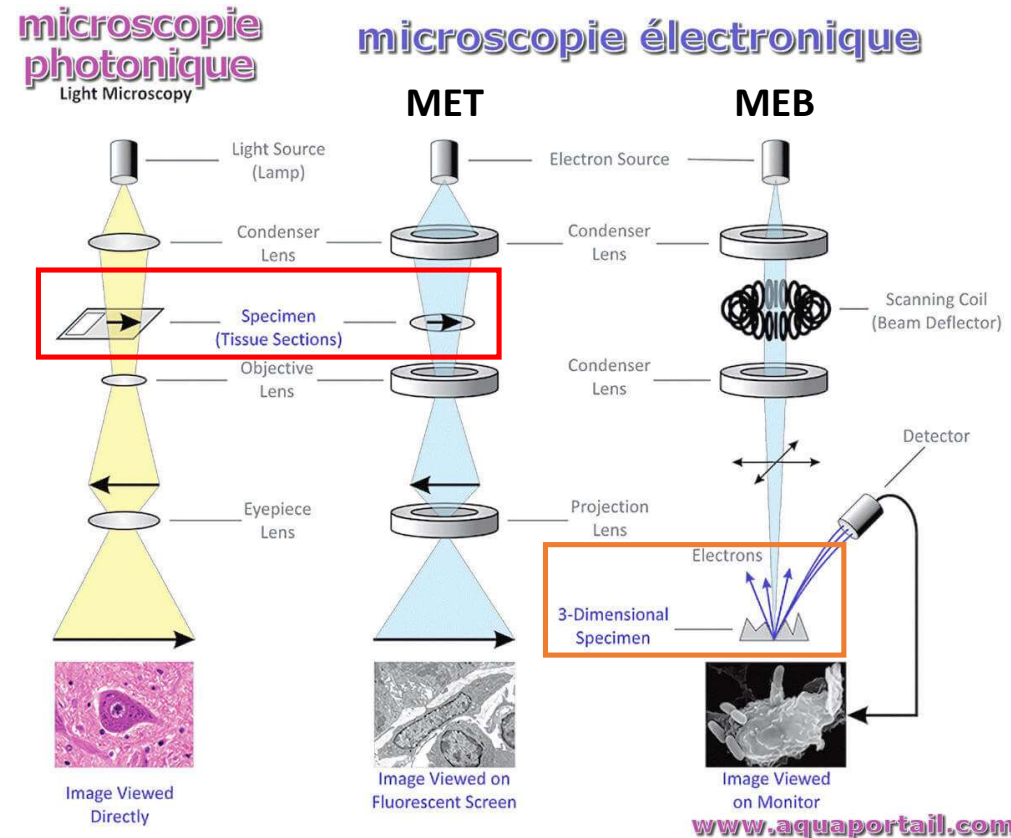
Inclusion - Coupe
Montage- Coloration

Microscopie :
images agrandies

I. Introduction

1. Principes généraux

- Microscopie optique → **photons** (transmission)
- Microscopie **électronique** (électrons)
 - A transmission (MET)
 - A balayage (MEB)
- Transmission :
 - **Objet** traversé par les rayons ($\neq$ MEB)
→ Coupe mince (3-10 μm)
 - Image formée par la modification des rayons au cours du passage à travers l'objet
 - Détection de différences d'absorption entre les différents constituants de l'objet
 - 2D ($\neq$ MEB)
 - Différences d'absorption = établies par des colorations



I. Introduction

1. Principes généraux

Techniques : Visualiser *in situ*

Où ?

- ✓ Tissus
- ✓ Cellules
- ✓ Organites
- ✓ Matrice extracellulaire

Pourquoi ?

- ✓ Déterminer leur situation et leur configuration
 - ✓ Architecture
 - ✓ Interactions moléculaires

Quoi ?

- ✓ Gènes
- ✓ ARNm
- ✓ Protéines
- ✓ Glucides
- ✓ Lipides...

Comment ?

Rendre visible ce que l'on veut observer

→ **Techniques adaptées**

I. Introduction

2. Techniques de préservation des tissus



a) Congélation (cryopréservation)

- Préservation des cellules et des tissus par un agent physique (**le froid**)
- Bonne conservation des **molécules** mais modification de la structure (artefacts de congélation)



b) Fixation

- Préservation des cellules et des tissus par un agent chimique (**fixateur**)
- Bonne conservation de la **structure** mais modification de certaines molécules (acides nucléiques, lipides...)

I. Introduction

2. Techniques de préservation des tissus

Fixation

- **Agents fixateurs**

- ✓ **Aldéhydes**

- ❖ Formaldéhyde
- ❖ Paraformaldéhyde
- ❖ Glutaraldéhyde

- ✓ **Alcools**

- ❖ Ethanol
- ❖ Méthanol

- ✓ **Acétone**

- **Solutions de fixation**

- ✓ **Formol**

- ❖ Formaldéhyde

- ✓ **Liquide de Bouin**

- ❖ Formaldéhyde + éthanol

- ✓ **AFA (Alcool-Formol-Acide Acétique)**



Pol Bouin

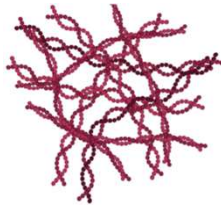


I. Introduction

2. Techniques de préservation des tissus

Fixation : Altérations chimiques

- **Protéines : réticulation**



Fixateurs aldéhydiques

- ✓ **Conséquences Positives (+)**

- ❖ Inhibition de la dégradation enzymatique

- ✓ **Conséquences Négatives (-)**

- ❖ Diminution de l'accessibilité des constituants moléculaires aux marquages

- **Acides nucléiques**



Fixateurs aldéhydiques

- ✓ **Mutations chimiques**

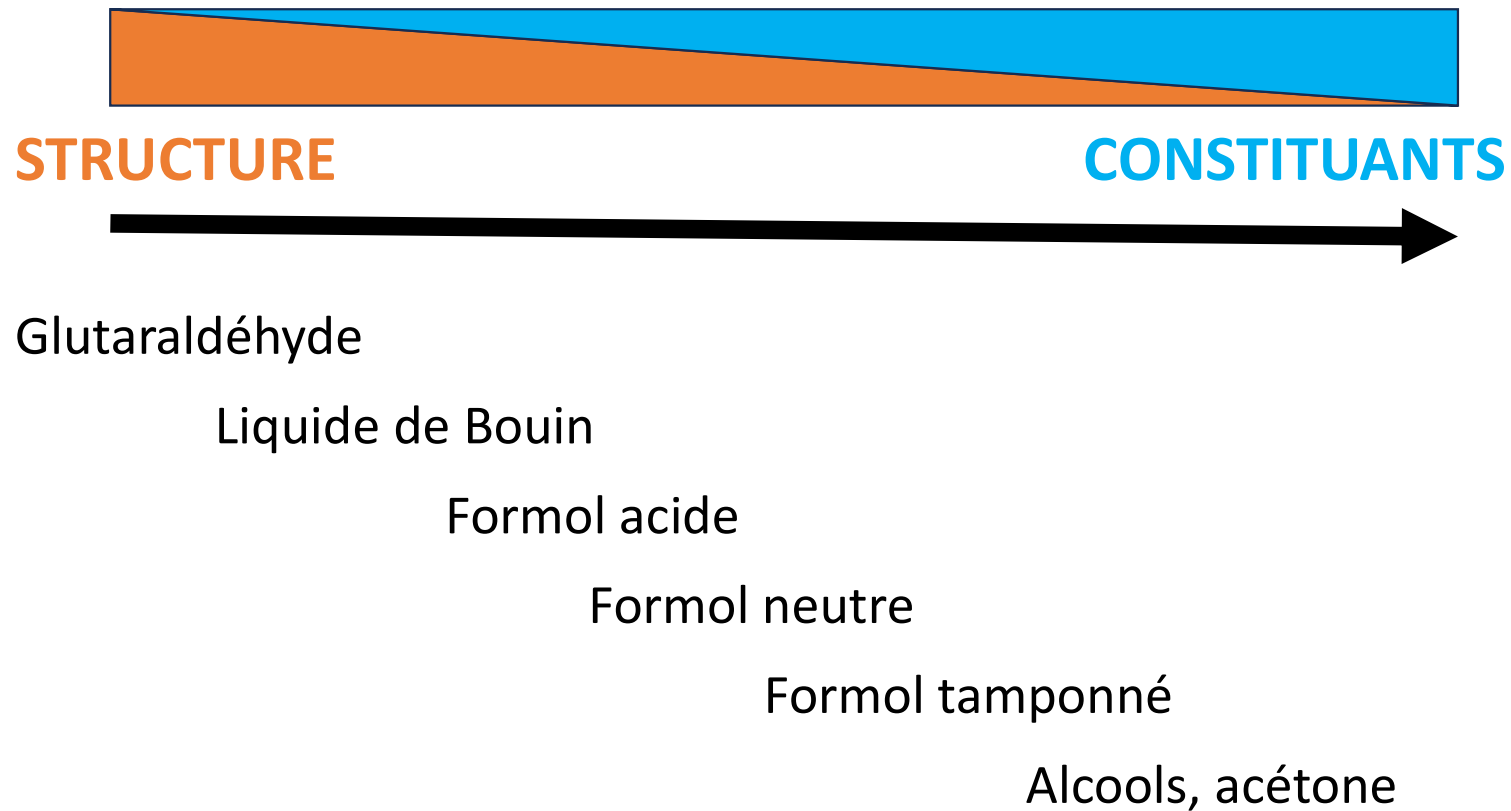
Fixateurs acides

- ✓ **Hydrolyse acide**

I. Introduction

2. *Techniques de préservation des tissus*

Agents et solutions de fixation

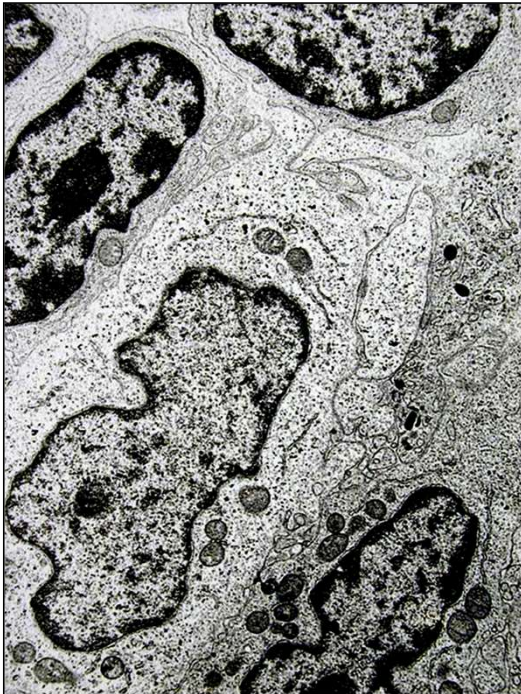


I. Introduction

2. *Techniques de préservation des tissus*

Effets sur les caractères structuraux

Exemples : Aspects en microscopie électronique



Glutaraldéhyde



Formol tamponné

<https://doi.org/10.1051/medsci/201026119>

➔ Importance de choisir un fixateur adapté à la technique

I. Introduction

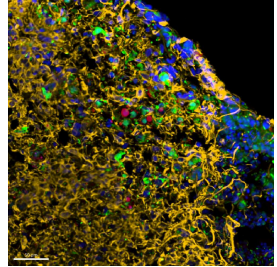
2. Techniques de préservation des tissus

Analyse moléculaire *in situ*

En pratique :

	Congélation	Fixation	
		Acide	Neutre
ADN	+++	-	+ / ++
ARN	+	-	+
Protéines	++	++	+++
Lipides	+++	Dissouts	Dissouts
Glucides	+	+	+

Méthodes en Histologie



Plan

I. Introduction

1. *Principes généraux*
2. *Techniques de préservation des tissus*

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. *Les colorations standards*
2. *L'Histochimie*
3. *L'Histo-Enzymologie*

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Objectif : Description morphologique des biostructures (microscopie à transmission)

➔ Produits capables de **teindre** une substance de manière durable



Colorants acides
Anioniques (charge négative)
Sels de Na ou Ca
Ex : Eosine = sel de Na

Colorent notamment les cytoplasmes cellulaires
en rose

Substances **acidophiles/éosinophiles**



Colorants basiques
Cationiques (charge positive)
Chlorures ou sulfates
Ex : Hématoxyline ou hémalun

Colorent les substances telles que les noyaux
en bleu

Substances **basophiles/cyanophiles**

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Objectif : Description morphologique des biostructures (microscopie à transmission)

➔ Produits capables de **teindre** une substance de manière durable

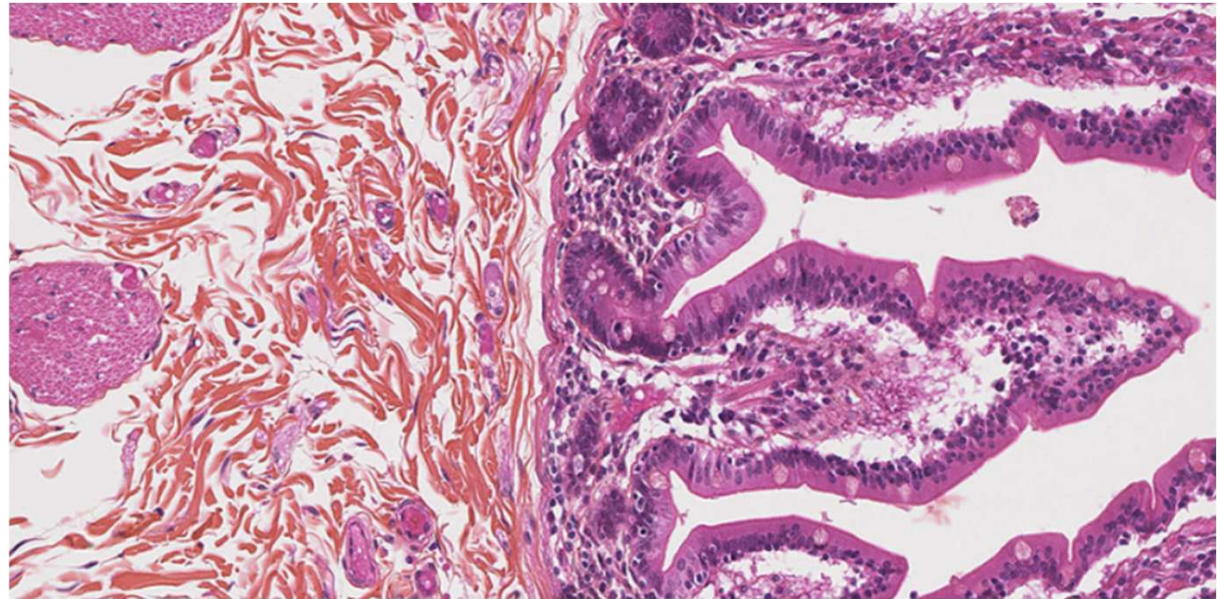


II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Coloration générale : la plus utilisée = HES

- ✓ Hématoxyline → Noyau
- ✓ Eosine → Cytoplasme
- ✓ +/- Safran → Matrice extra-cellulaire / collagène



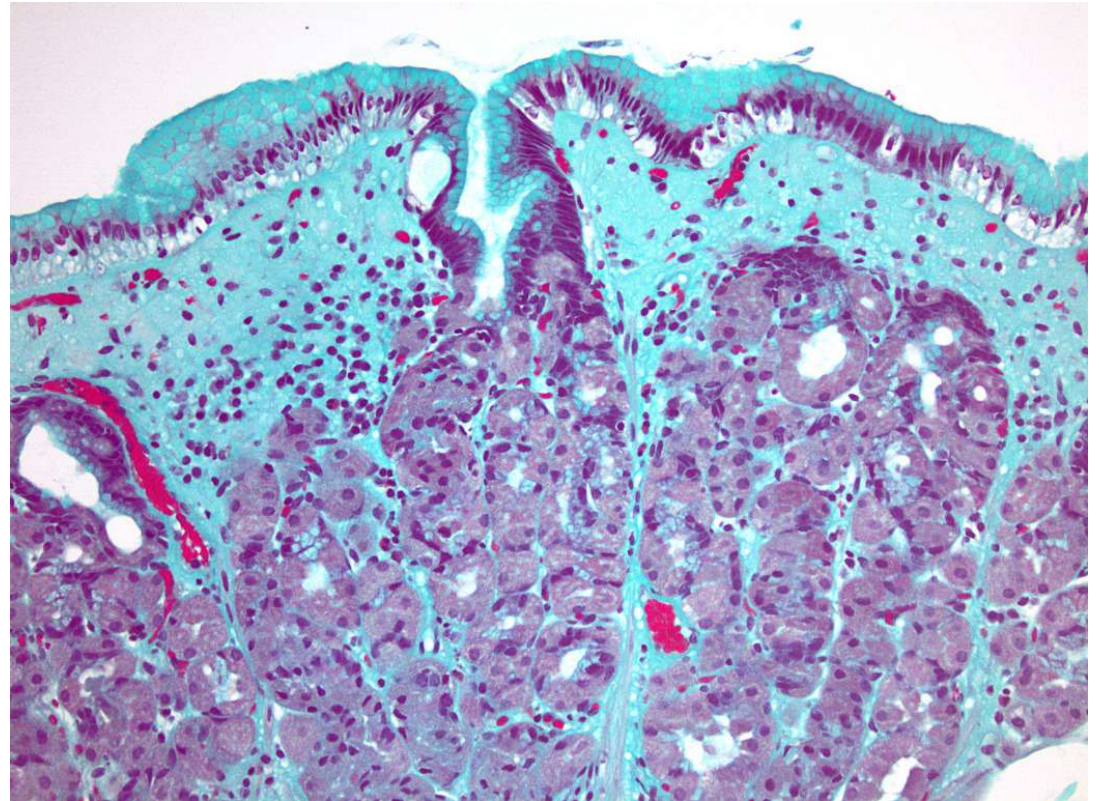
Atlas du CHEC : coupe de Jéjunum

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Coloration fréquente : trichrome de Masson

- ✓ Hématoxyline → Noyau
- ✓ Fuchsine acide → Cytoplasme
- ✓ Vert lumière → Collagène



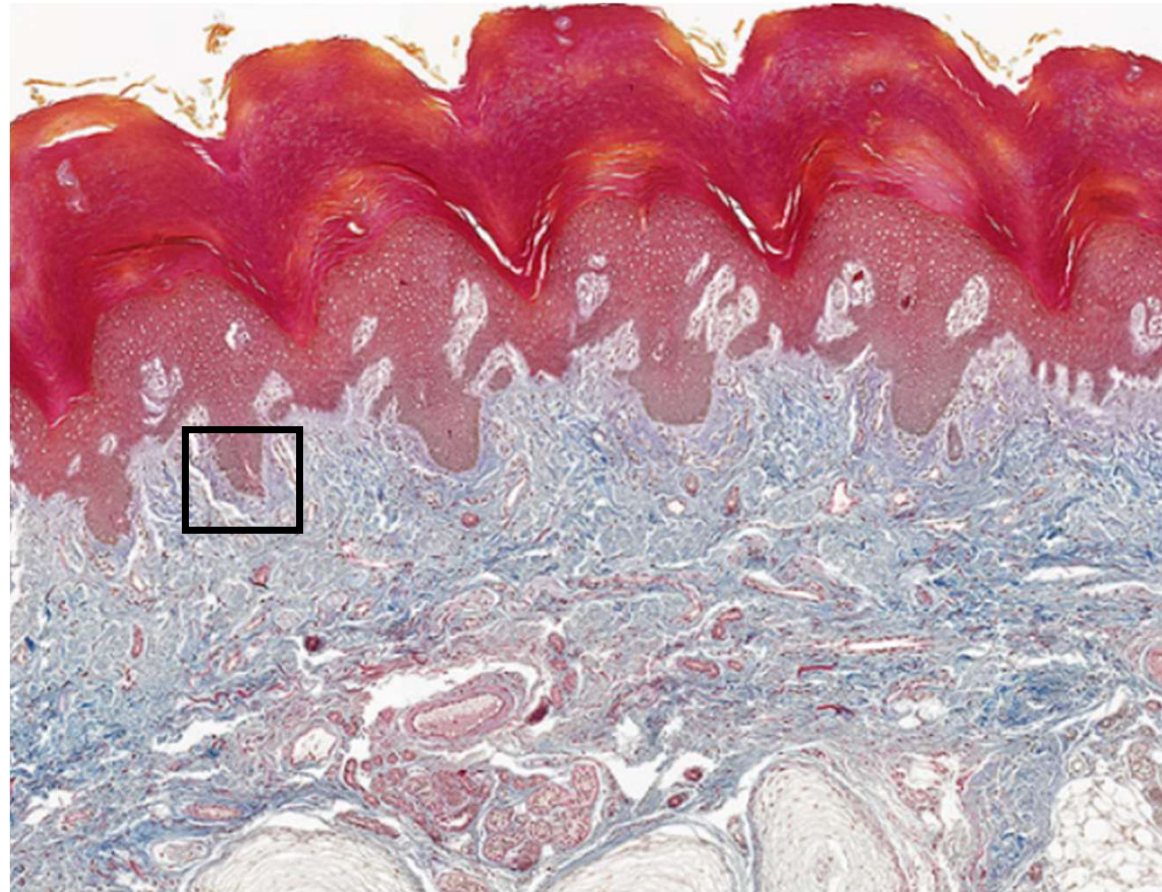
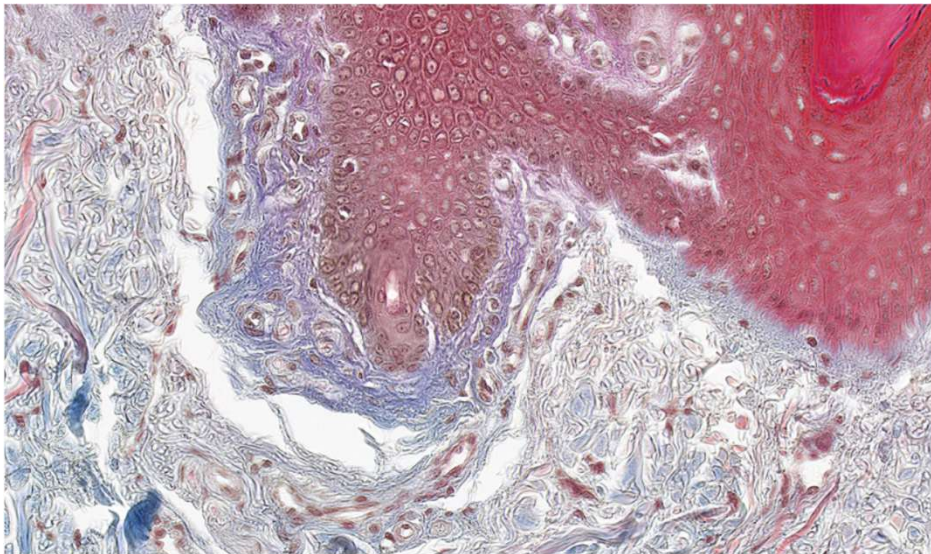
Laboratoire d'Histologie, Lyon Est : coupe d'estomac

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Coloration fréquente : trichrome de Masson

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| ✓ Hématoxyline | ➔ Noyau |
| ✓ Fuchsine acide | ➔ Cytoplasme |
| ✓ <u>Bleu d'aniline</u> | ➔ <u>Collagène</u> |



Atlas du CHEC, coupe de peau épaisse

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

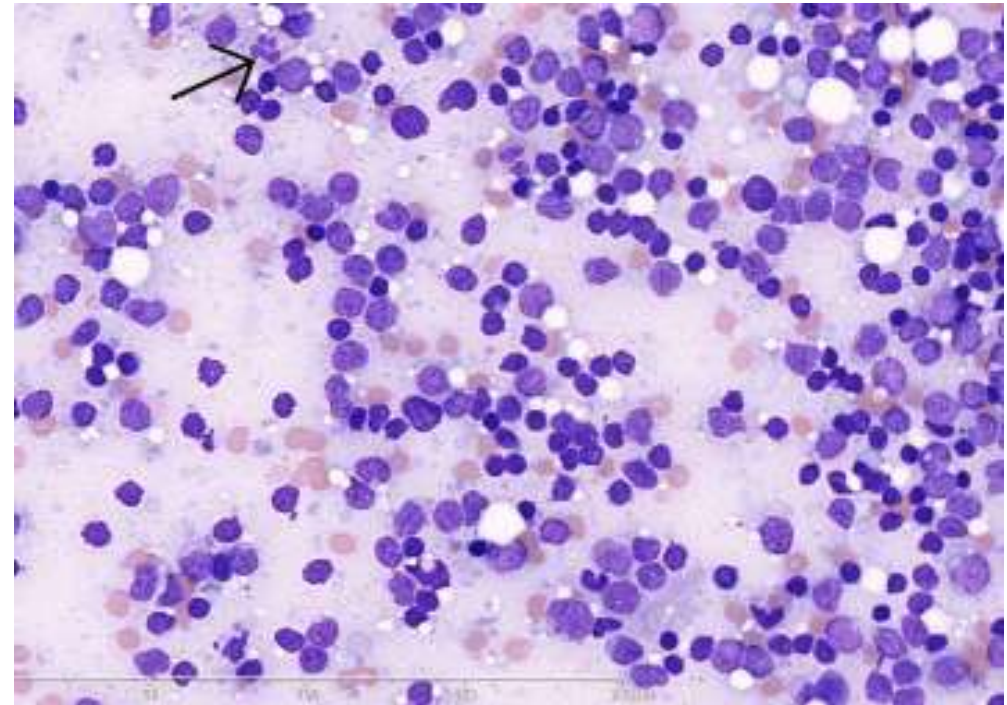
Coloration fréquente en cytologie : May Grunwald Giemsa

✓ Bleu de méthylène

➔ Noyau

✓ Giemsa (Eosine et azur de méthylène)

➔ Cytoplasme



Piaton E et al, Annales de Pathologie, 2015

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

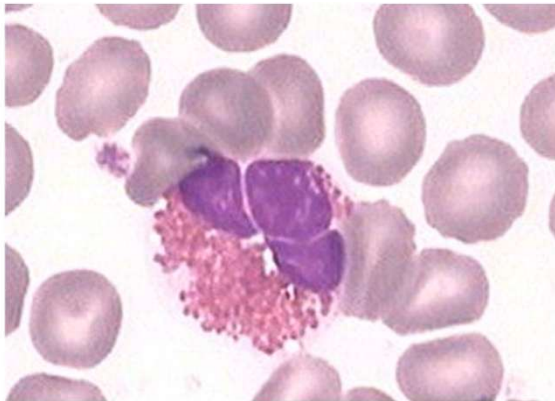
Coloration fréquente en cytologie : May Grunwald Giemsa

✓ Bleu de méthylène

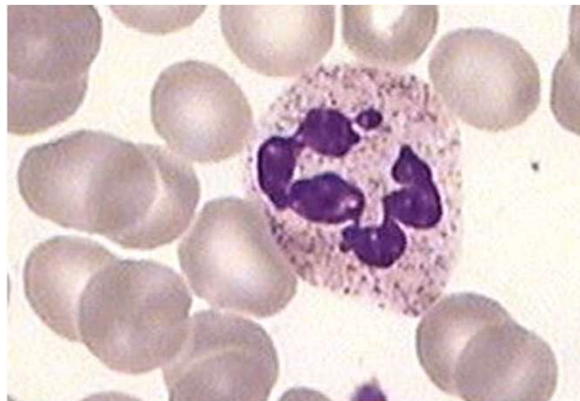
➔ Noyau

✓ Giemsa (Eosine et azur de méthylène)

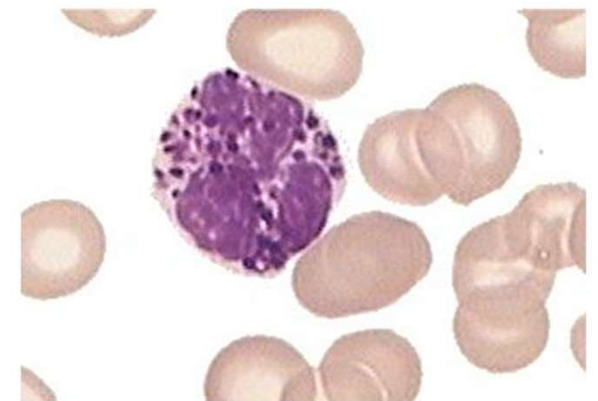
➔ Cytoplasme



Polynucléaire Eosinophile



Polynucléaire Neutrophile



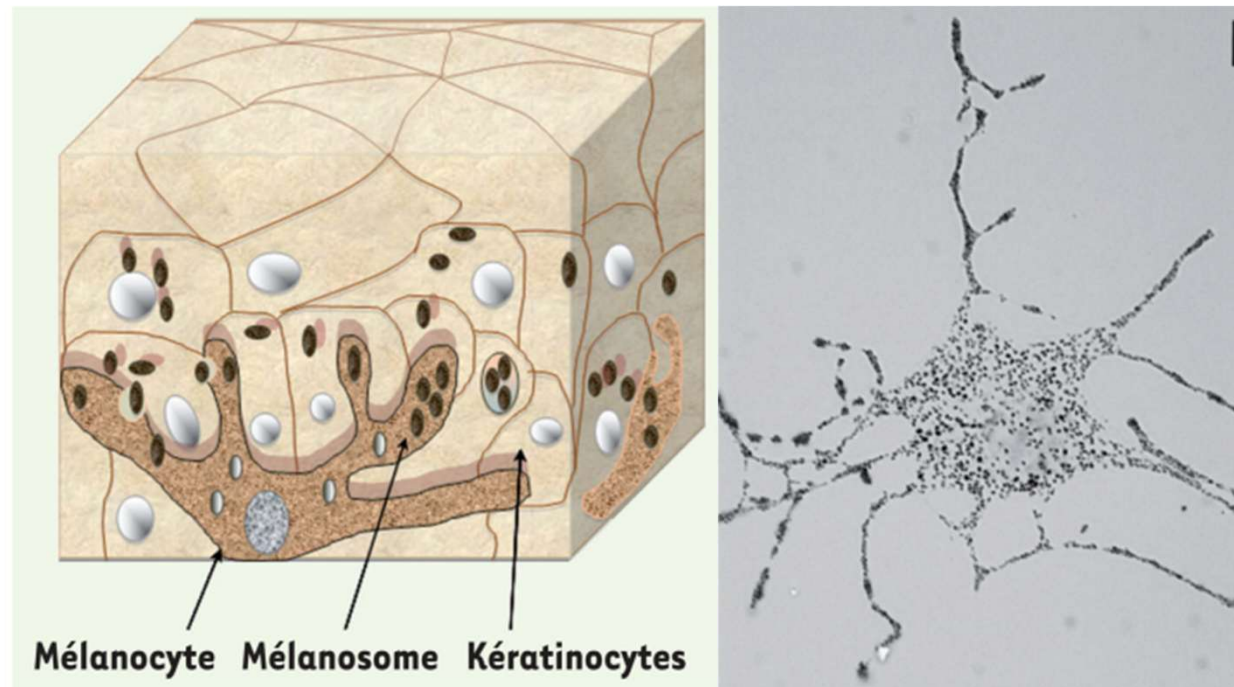
Polynucléaire Basophile

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Technique spéciale : l'imprégnation argentique

- Pallie le manque de colorabilité des prolongements cytoplasmiques
 - ✓ **Mélanine** (Technique de Fontana Masson)



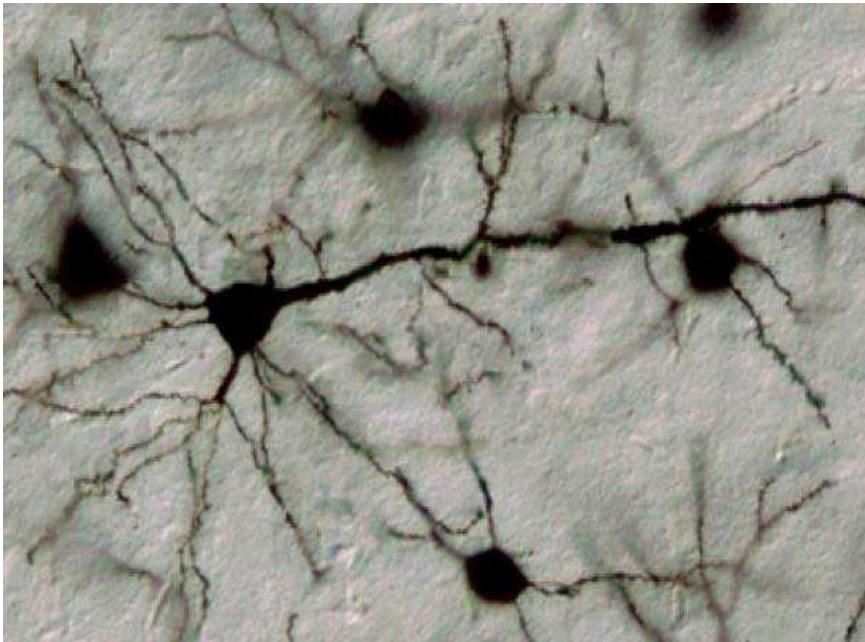
Delevoye C, Med Sci (Paris), 2011

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

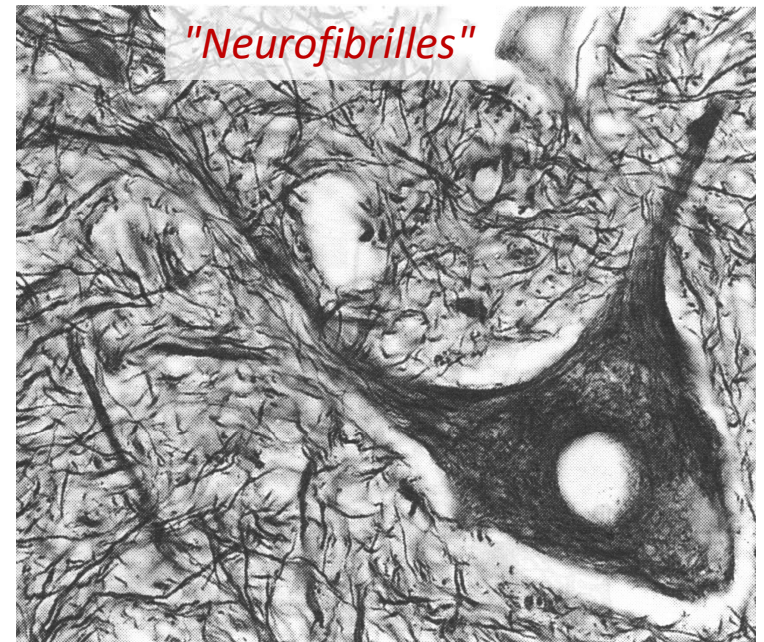
1. Les colorations standards

Technique spéciale : l'imprégnation argentique

- Pallie le manque de colorabilité des prolongements cytoplasmiques
 - ✓ **Mélanine** (Technique de Fontana Masson)
 - ✓ **Neurofibrilles** (Méthode de Golgi)



<http://www.conncad.com/gallery/>



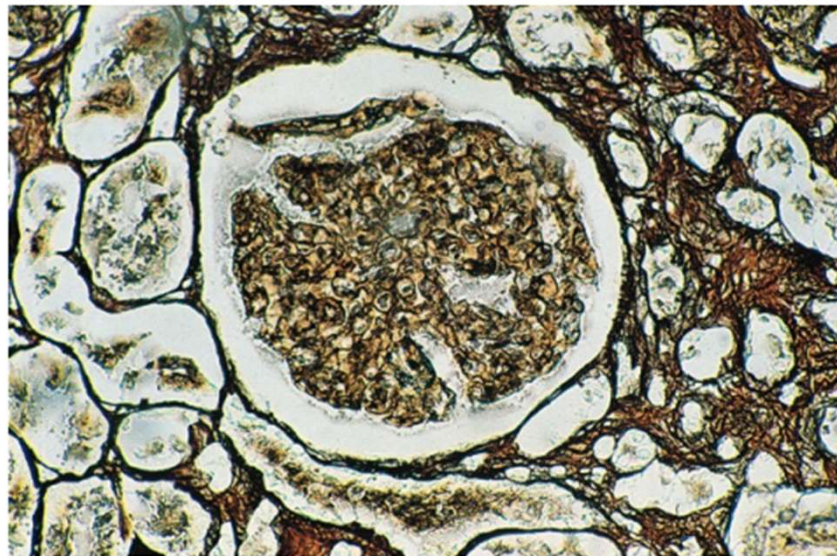
Histologie, Dadoune JP, 2^{ème} édition

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. Les colorations standards

Technique spéciale : l'imprégnation argentique

- Pallie le manque de colorabilité des prolongements cytoplasmiques
 - ✓ **Mélanine** (Technique de Fontana Masson)
 - ✓ **Neurofibrilles** (Méthode de Golgi)
 - ✓ **Réticuline = collagène III** (Coloration de Marinhozzi)



Coupe de rein



Coupe de foie

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

2. *L'Histochimie*

Objectif : Déceler et localiser divers constituants biochimiques

Techniques basées sur des **REACTIONS BIOCHIMIQUES**

- ✓ Lipides
- ✓ Protéines
- ✓ **Glucides**
- ✓ Acides nucléiques
- ✓ **Métaux**

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

2. L'Histochimie

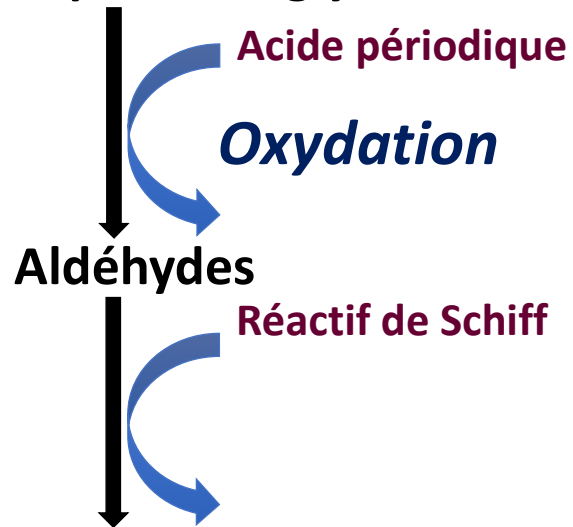
Exemple n°1 : Periodic Acid Schiff **PAS**



Glycogène
Protéoglycanes
Mucines
Polysaccharides

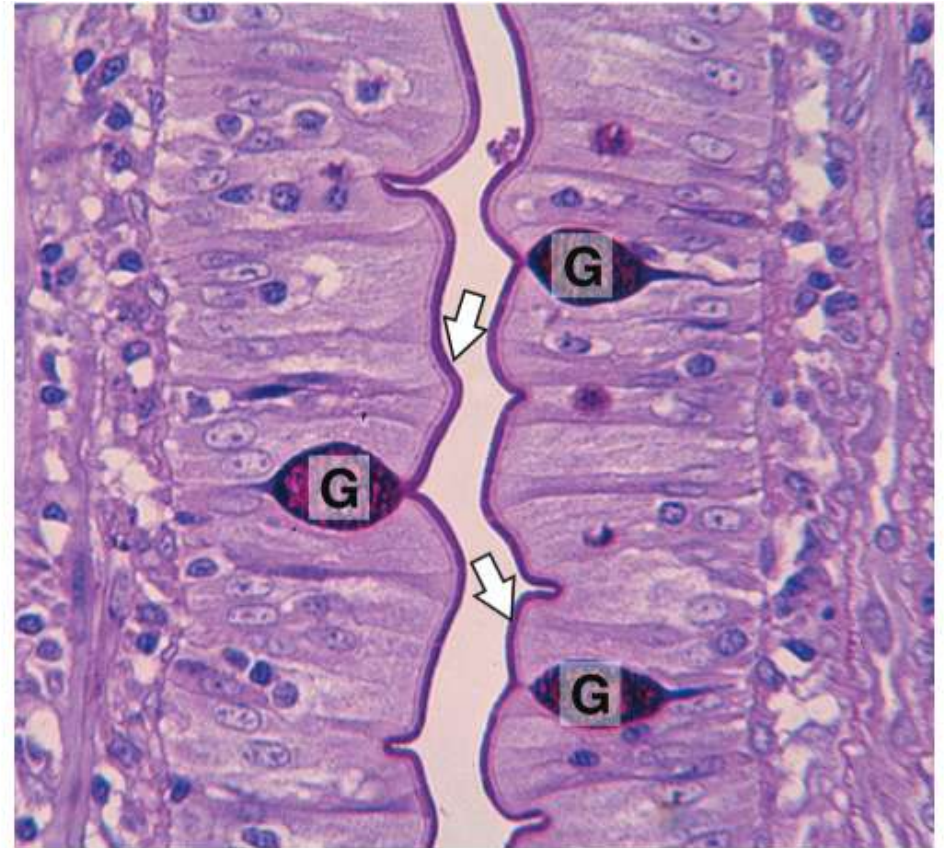
= glucides

Groupements glycol



Aldéhydes

Ex : Villosités intestinales
Bordure en brosse et
cellules caliciformes PAS+



II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

2. L'Histochimie

Exemple n°1 : Periodic Acid Schiff **PAS**

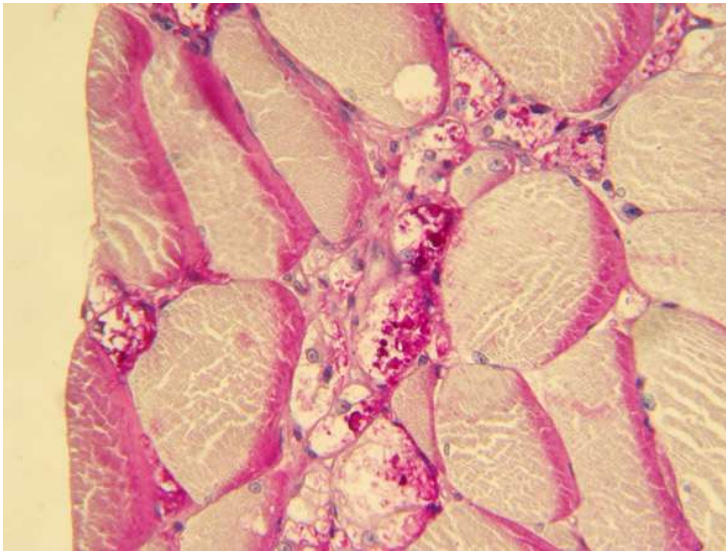
Glycogène

Protéoglycanes

Mucines

Polysaccharides

= glucides



Ex : Muscle
strié

PAS

➔ GLYCOGENE

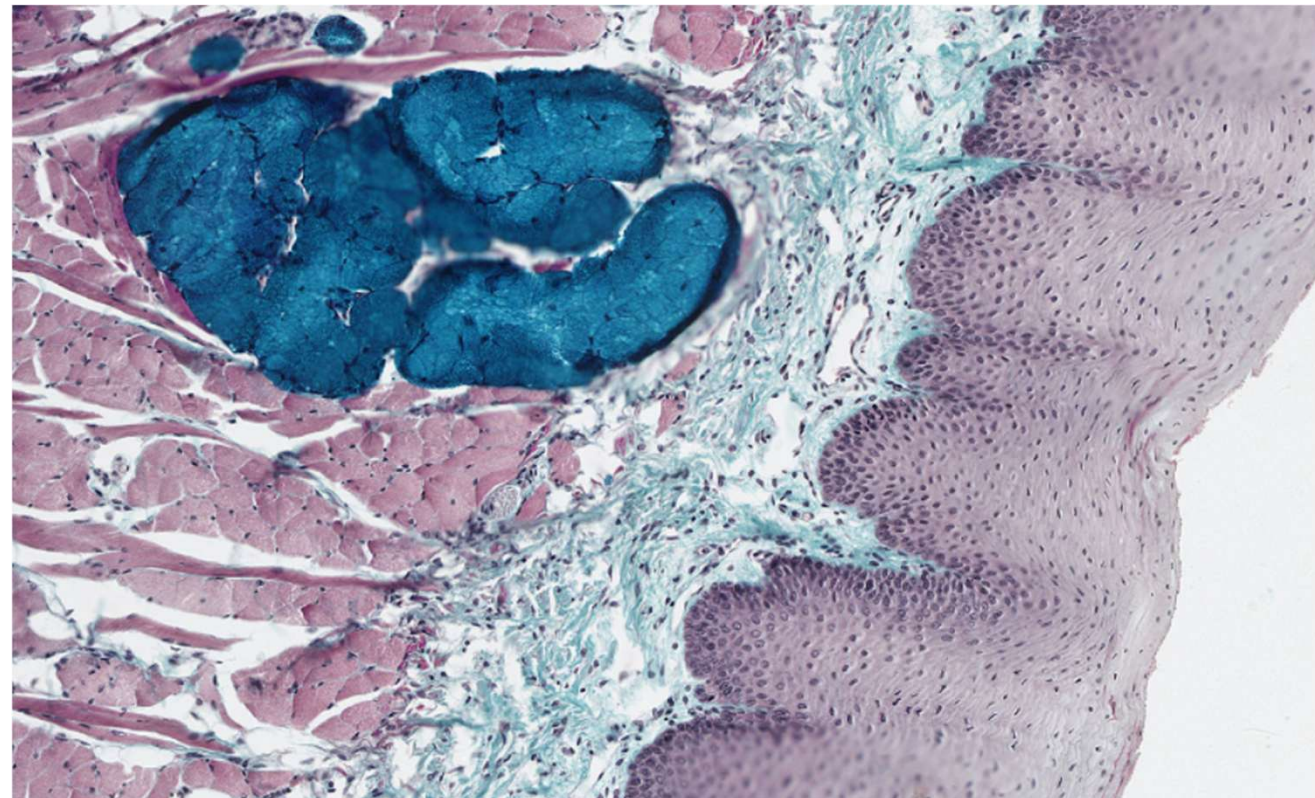
II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

2. L'Histochimie

Exemple n°2 : **Bleu alcian** : révèle les mucines acides

→ **Bleues** sur fond rosé

Ex : Langue colorée au
Trichrome de Masson +
bleu Alcian



Atlas du CHEC

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

2. L'Histochimie

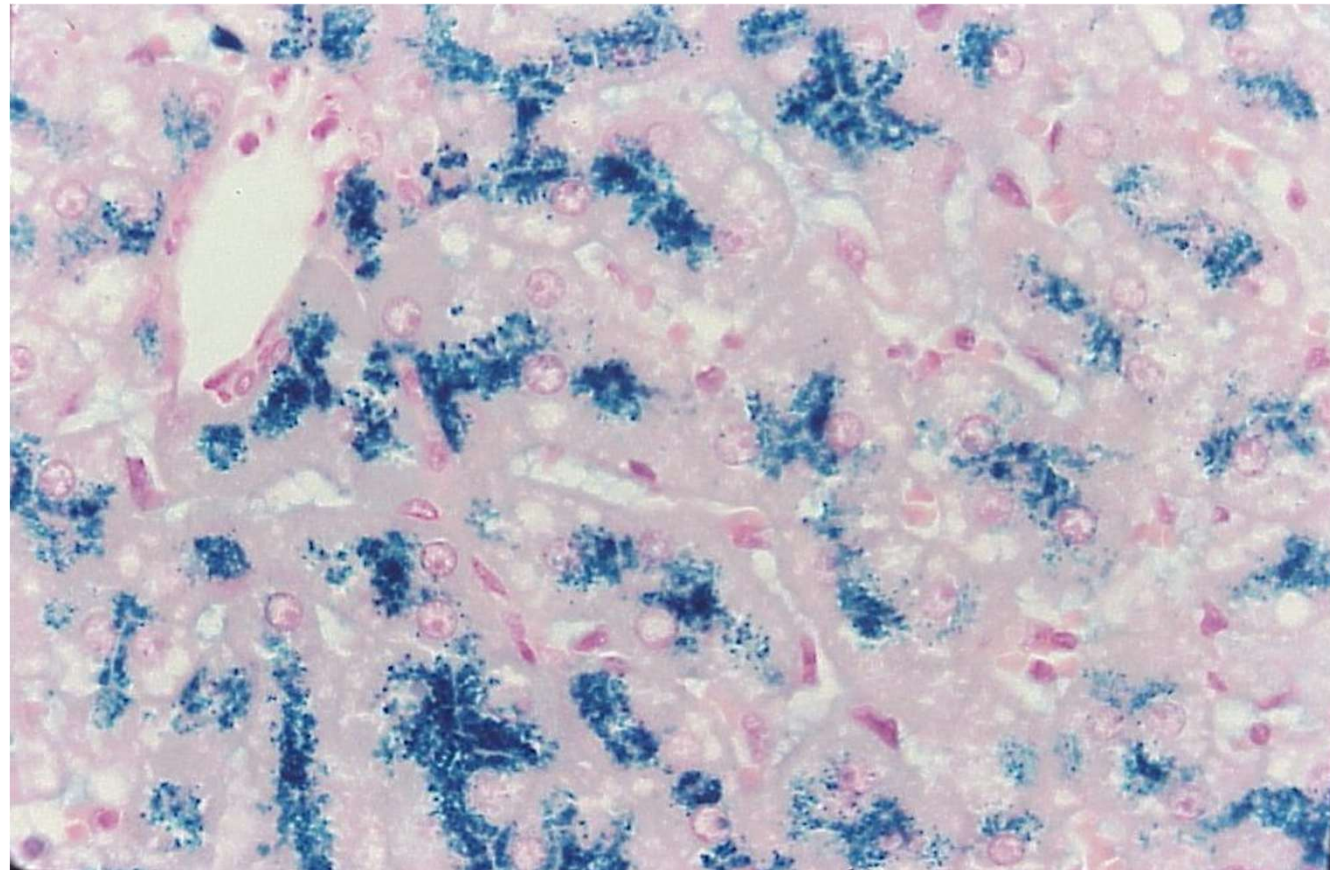
Exemple n°3 : **Coloration de Perls**

➔ Fer ferrique Fe^{3+}

*Solution de ferrocyanure
de potassium à 2 %*

En milieu acide,
fer + **ferrocyanure** de K :

➔ Complexe coloré en bleu-vert



Hémosidérine intra-hépatocytaire

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

3. L'Histo-Enzymologie

= Techniques histochimiques enzymatiques



Site d'action d'une enzyme particulière

Identifier

Localiser

Objectif : Observer et visualiser la distribution tissulaire d'enzymes spécifiques



Déceler et localiser *in situ* des activités enzymatiques



Mettre en évidence

le **produit** de l'action enzymatique sur un substrat donné

Incubation

Enzyme tissulaire + substrat

➔ **Produit insoluble et coloré**



Précipitation

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

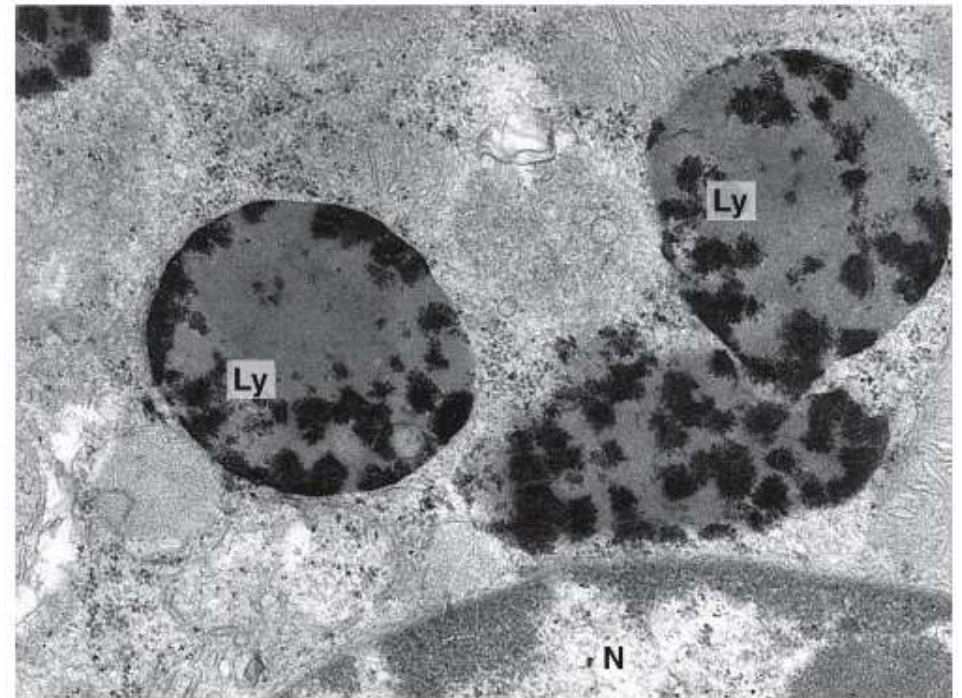
3. L'Histo-Enzymologie

Exemple: détection des **phosphatases** (présentes dans les lysosomes)

En microscopie électronique

Organelles recouvertes d'un matériel dense aux électrons

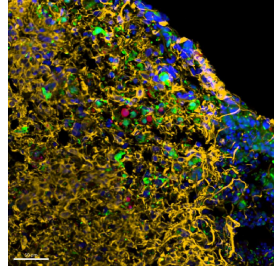
= phosphate précipité



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
All rights reserved.

Néphrocyte (Rat)

Méthodes en Histologie



Plan

I. Introduction

1. *Principes généraux*
2. *Techniques de préservation des tissus*

II. Les études *in situ* des constituants biochimiques

1. *Les colorations standards*
2. *L'Histochimie*
3. *L'Histo-Enzymologie*

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. *L'Immuno-Histologie*
2. *L'Hybridation in situ*
3. *L'Autoradiographie*

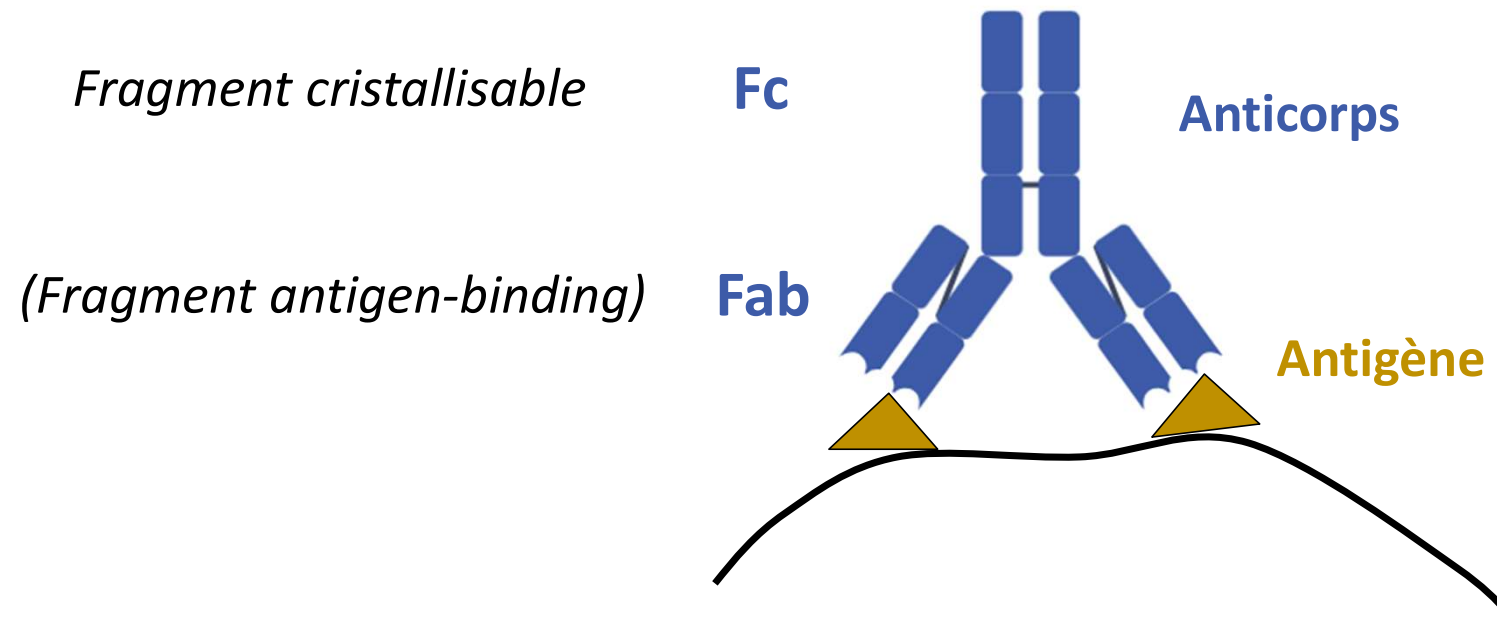
III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

Objectif : localiser et visualiser des protéines spécifiques (= antigènes = Ag) directement au sein des cellules d'une coupe de tissu biologique, en utilisation un anticorps (= Ac).

Deux étapes :

1. Incubation du tissu avec l'anticorps → Fixation de complexes Ag-Ac
2. Révélation des complexes Ag-Ac



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

Objectif : localiser et visualiser des protéines spécifiques (= antigènes = Ag) directement au sein des cellules d'une coupe de tissu biologique, en utilisation un anticorps (Ac).

Deux étapes :

1. Incubation du tissu avec l'anticorps → Fixation de complexes Ag-Ac
2. Révélation des complexes Ag-Ac

a) Principes biochimiques

b) Les différents types d'anticorps utilisés

Polyclonaux vs. Monoclonaux

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

- ❖ Couplages directs
- ❖ Méthodes indirectes
- ❖ Systèmes d'amplification (méthodes indirectes)

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

a) Principes biochimiques

- Anticorps utilisés : en général de la classe des **IgG**
parfois des **IgM**

} Produits par
les lymphocytes B

Fragment cristallisable

Fc

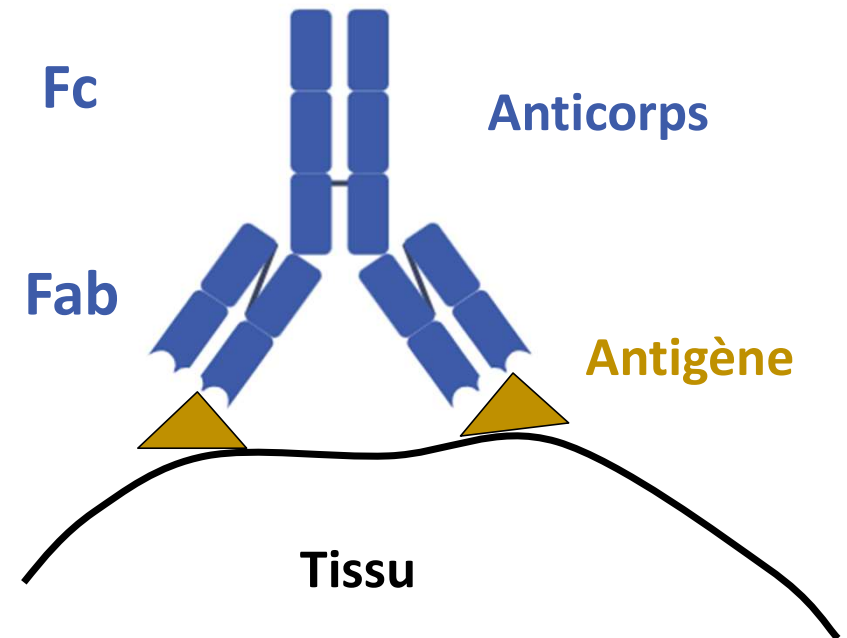
Anticorps

(Fragment antigen-binding)

Fab

Antigène

IgM = Pentamère



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

a) Principes biochimiques

Constante de dissociation K_d

$$K_d = \frac{[Ag] \times [Ac]}{[AgAc]} \approx 10^{-7} \text{ à } 10^{-11} \text{ mole / litre}$$

- ➔ Mesure l'affinité entre un Ac et son Ag
 - ➔ Si K_d = faible, l'affinité est forte
 - ➔ Si K_d = élevée, l'affinité est faible
- ➔ Chaque couple Ac-Ag possède une K_d caractéristique (mais qui est en réalité variable en fonction des conditions expérimentales)

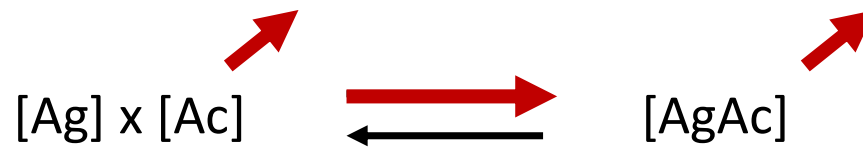
III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

a) Principes biochimiques

Constante de dissociation K_d

$$K_d = \frac{[Ag] \times [Ac]}{[AgAc]} \approx 10^{-7} \text{ à } 10^{-11} \text{ mole / litre}$$



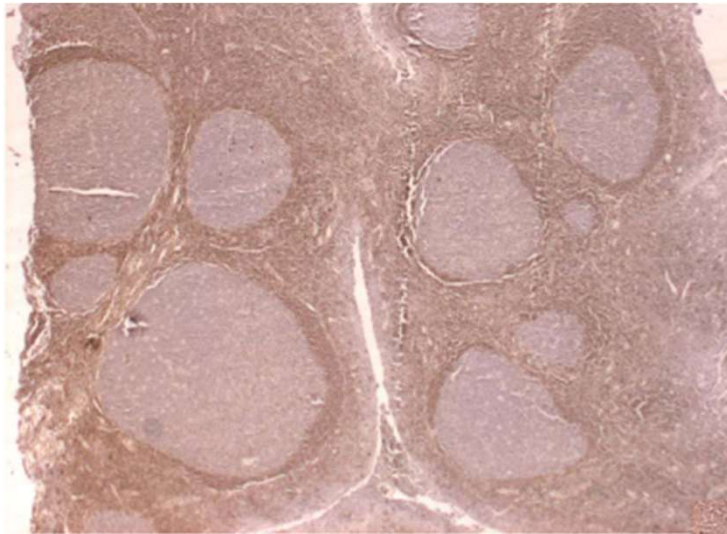
Des concentrations élevées d'anticorps :

- Accélèrent la réaction
- Mais favorisent le marquage non spécifique

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

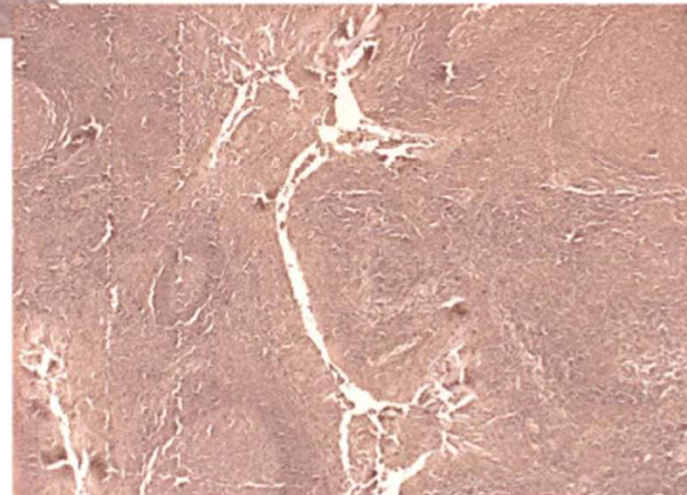
a) Principes biochimiques



Ganglion lymphatique

← Anticorps anti-BCL2 : **1/500**

Anticorps anti-BCL2 : **1/100** →
(Augmentation du bruit de fond)
Pas d'individualisation des structures



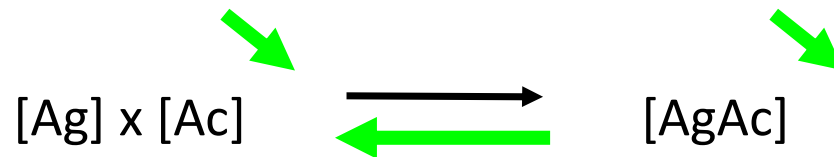
III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

a) Principes biochimiques

Constante de dissociation K_d

$$K_d = \frac{[Ag] \times [Ac]}{[AgAc]} \approx 10^{-7} \text{ à } 10^{-11} \text{ mole / litre}$$



Des concentrations basses d'anticorps

- Ralentissent la réaction
- Favorisent le marquage spécifique

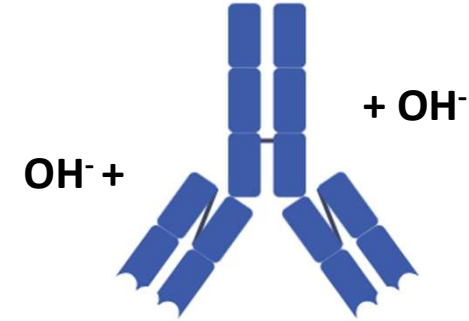
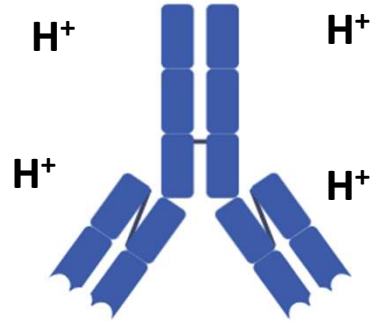
III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

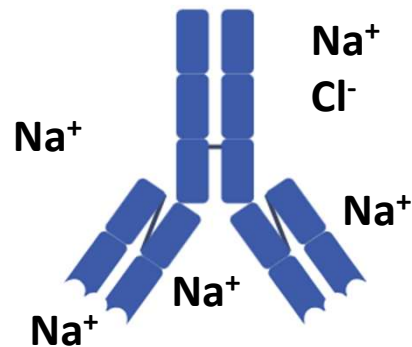
a) Principes biochimiques

Éléments modifiant la liaison des anticorps

✓ Le pH



✓ La force ionique



Les pH extrêmes et les forces ioniques élevées diminuent la liaison Ag-Ac.

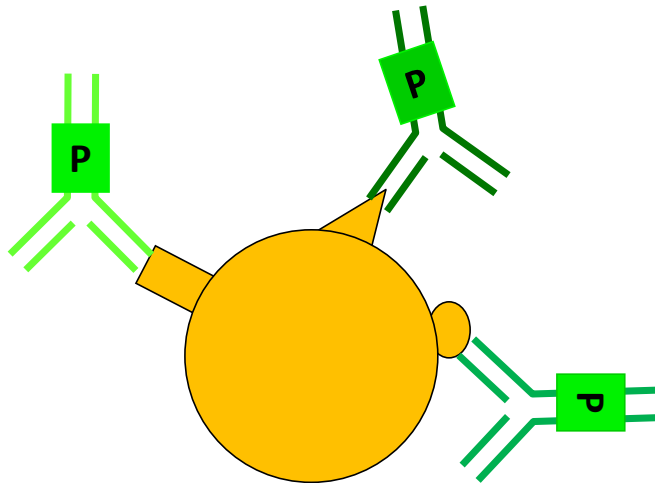
➔ Variabilité de K_d

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

b) Les différents types d'anticorps utilisés

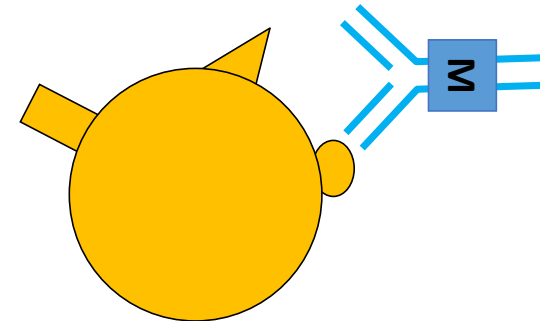
Polyclonaux



Sérum : contenant ≠ anticorps dirigés
contre ≠ épitopes de l'antigène

Souvent obtenus chez le lapin
+/- purifiés

Monoclonaux



Anticorps monoclonal
dirigé sélectivement contre 1 épitope de l'antigène

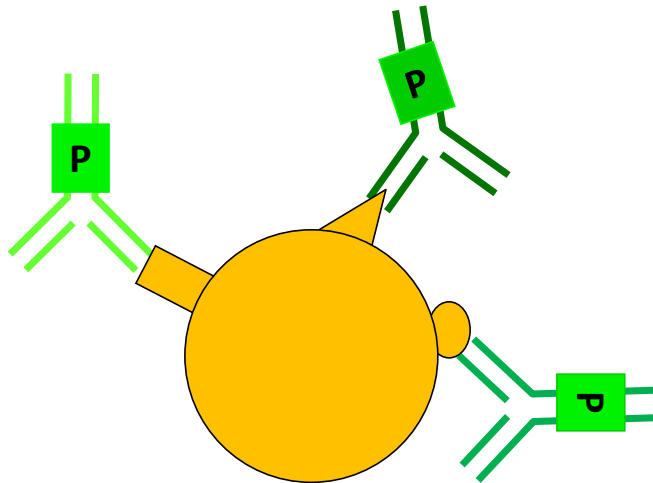
Souvent obtenus chez la souris, à partir
de cultures de lymphocytes B immortalisés

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

b) Les différents types d'anticorps utilisés

Polyclonaux



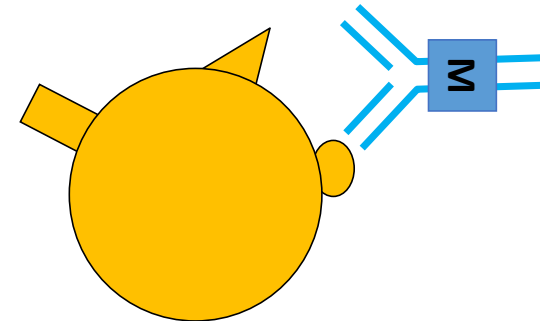
AVANTAGES

Sensibilité
Résistance

INCONVENIENTS

Ac non spécifiques € sérum
→ Moindre spécificité

Monoclonaux



Spécificité

"Conditions-dépendants"
Moins sensibles

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

Comment révéler la présence de l'anticorps couplé à l'antigène ?

- ❖ **Couplages directs**
- ❖ **Méthodes indirectes**
- ❖ **Systèmes d'amplification (méthodes indirectes)**

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

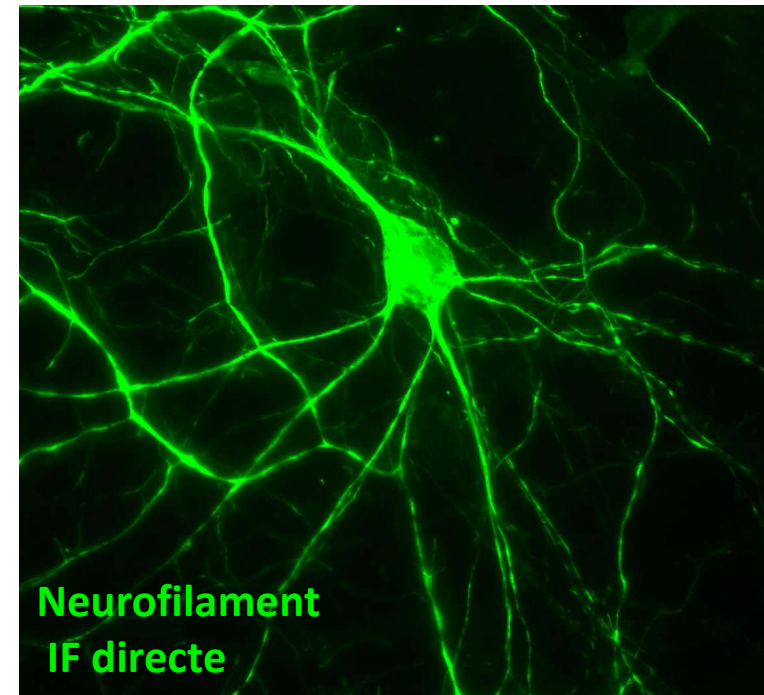
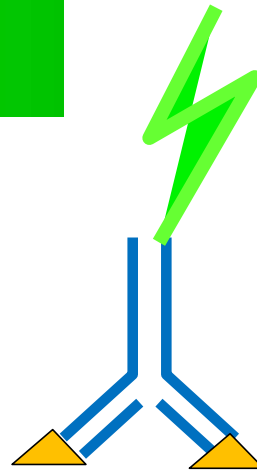
c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Couplages directs

Immunofluorescence (IF)

→ Couplage direct (ou indirect) de l'Ac à un composé fluorescent
= Fluorochrome
(molécule capable d'émettre une lumière fluorescente sous l'action d'une lumière excitatrice)

Historiquement la première solution



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Couplages directs

Immunofluorescence (IF)

→ Couplage direct (ou indirect) de l'Ac à un composé fluorescent
= Fluorochrome

Nombreuses variétés de fluorochromes permettant la réalisation de comarquages

FITC
Fluoresceine IsoThioCyanate

TRITC
Tetraméthyl Rodhamine
IsoThioCyanate

Absorption	Emission
495 nm	525 nm
545 nm	575 nm

Fluorophore	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fast Blue	360	440
Alexa Fluor® 350	346	445
AMCA	350	450
Bisbenzamide	360	461
Aequorin	Ca ²⁺ photoprotein	469
Hoechst 33258	360	470
ACMA UV	412, 430	471, 474
Hoechst 33342	343	483
Cy2	489	506
GFP Wild type Non UV ex.	475	509
GFP Wild type UV ex.	395	509
Alexa Fluor® 488	494	517
Calcein	496	517
Fluorescein (FITC/DTAF)	495	520
Fluoro-Jade® B	480	525
Lucifer yellow	425	528
JC-1	514	529
Fluoro-Gold (Hydroxystilbamidine)	361	536
Alexa Fluor® 430	430	545
Eosin	524	545
6-JOE UV	520	548
Alexa Fluor® 532	530	555
Cy3	548	562
Alexa Fluor® 546	554	570
Alexa Fluor® 555	555	571
TRITC	547	572
B-phycoerythrin	545, 565	575
R-phycoerythrin	480, 545, 565	578
Rhodamine	539, 574	602
Alexa Fluor® 568	578	602
Texas Red®	589	615
Alexa Fluor® 594	590	617
Propidium Iodide (PI)	536	617
Ethidium Bromide	493	620
Feulgen (Pararosaniline)	570	625
Acid Fuchsin	540	630
Alexa Fluor® 633	621	639
Alexa Fluor® 647	649	666
Cy5	650	670
PE-Cy5 conjugates	480, 565, 650	670
Alexa Fluor® 660	668	698
Alexa Fluor® 680	684	707
PE-Cy7 conjugates	480, 565, 743	767
Cy7	743	767

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Couplages directs

➔ Couplage direct de l'Ac à une enzyme

Exemple : **Péroxydase** révélée par la **DAB**

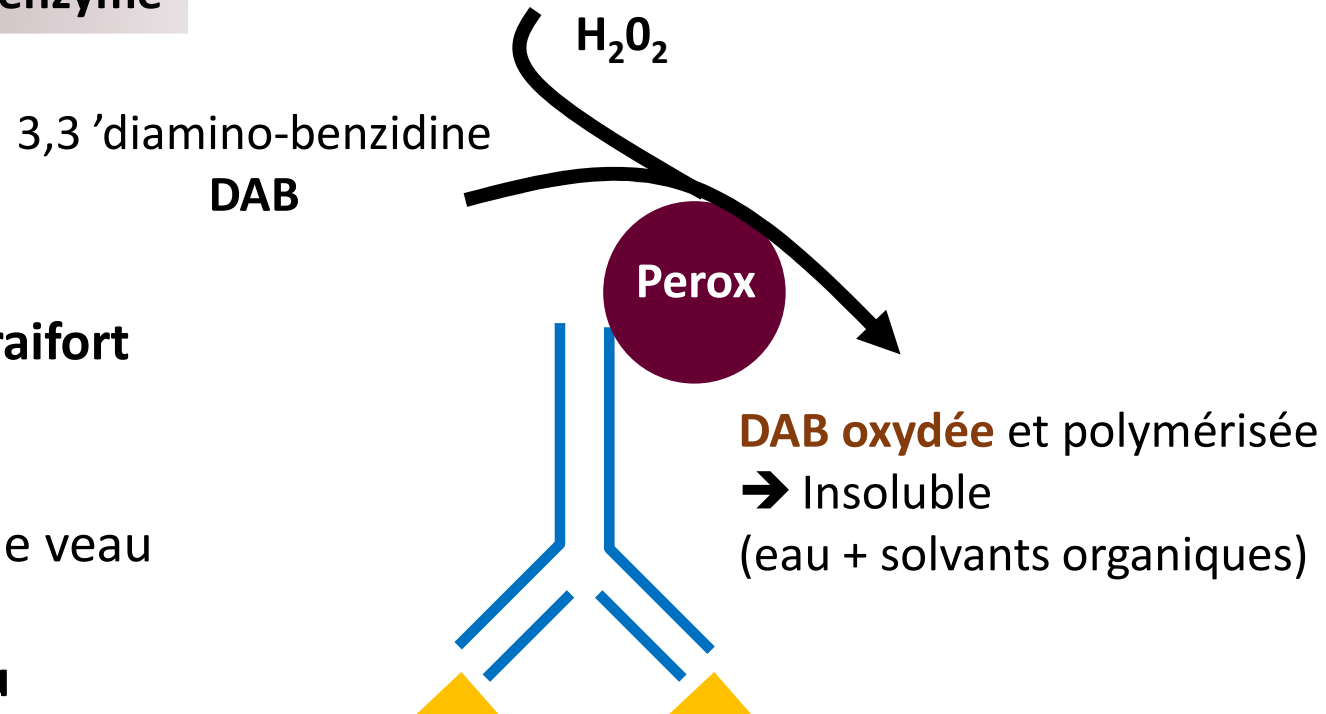
La plus utilisée : la **peroxydase** du raifort

Mais aussi :

la **phosphatase alcaline** d'intestin de veau

Réaction enzymatique dans le tissu

➔ Composé insoluble



III. Les analyses moléculaires *in situ*

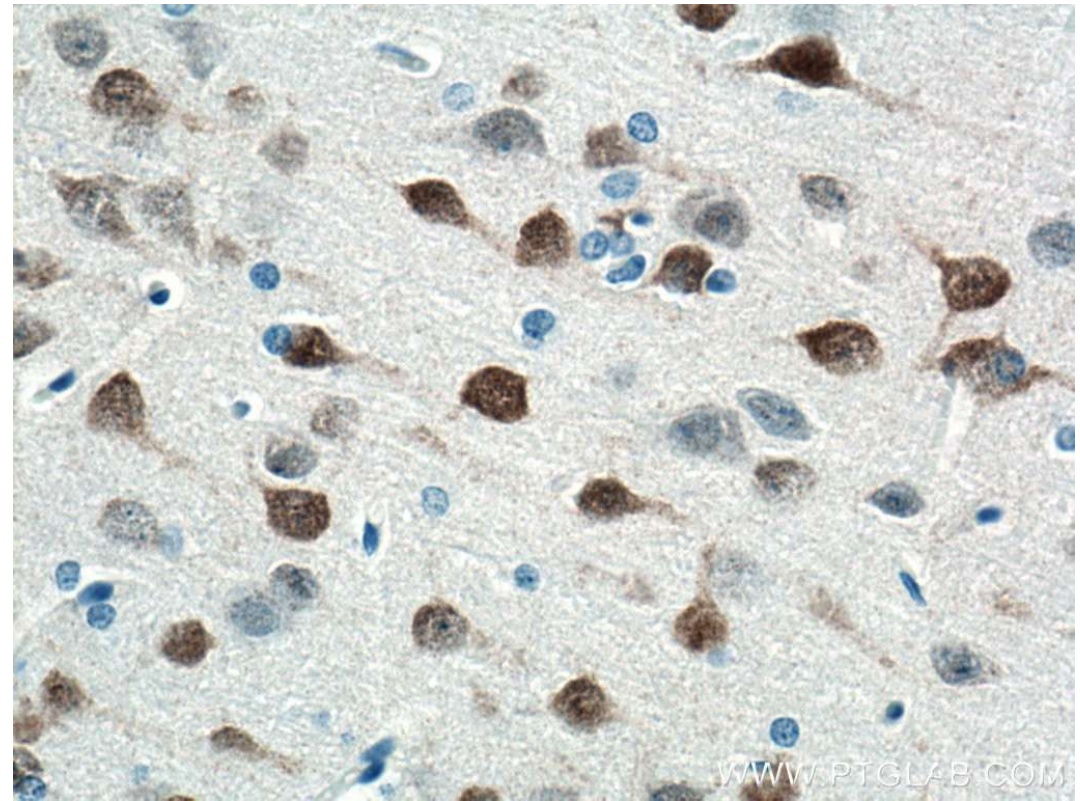
1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Couplages directs

Exemple : Marquage anti-NeuN par technique d'IHC sur une coupe de cortex cérébral

➔ Mise en évidence des **neurones**



III. Les analyses moléculaires *in situ*

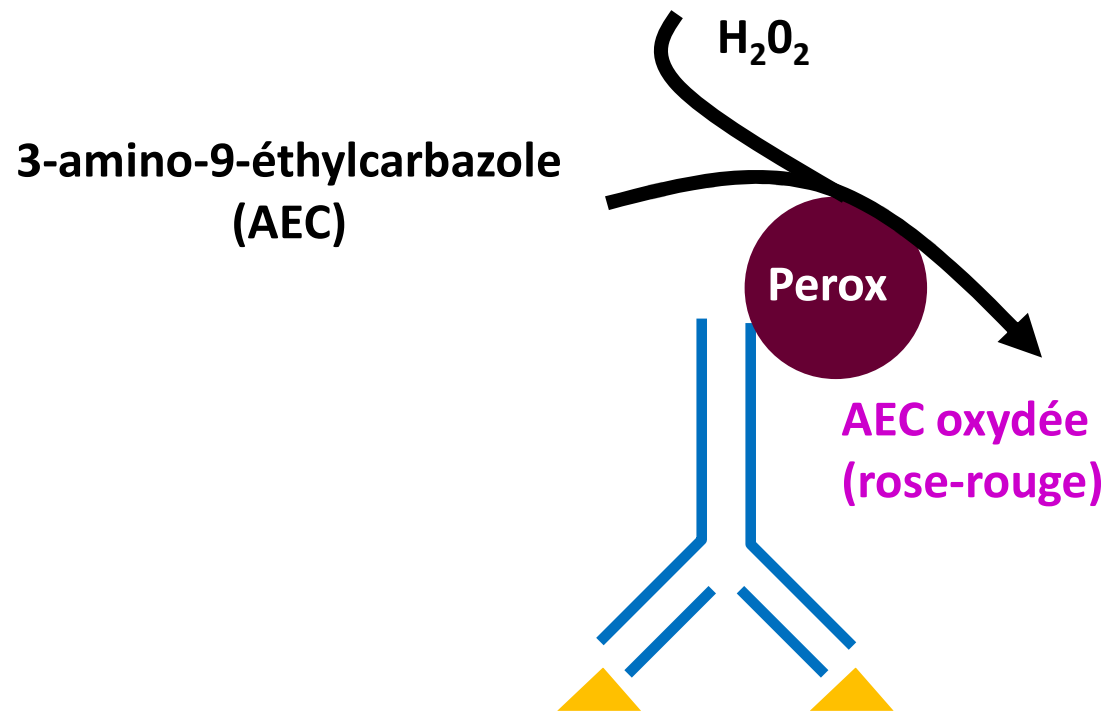
1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

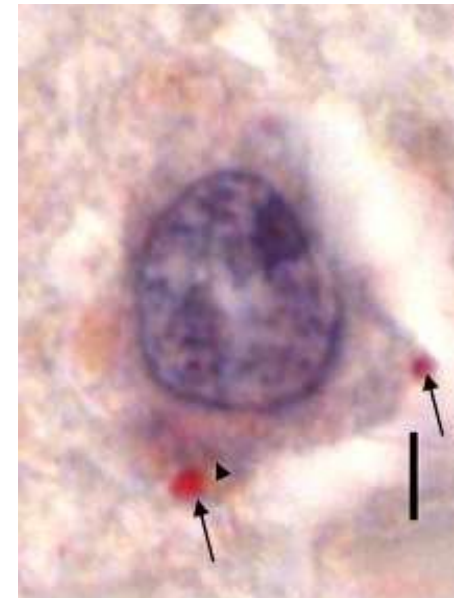
❖ Couplages directs

➔ Couplage direct de l'Ac à une enzyme

Exemple: **Péroxydase** révélée par l'**AEC**



*Anti-Rab5
révélé par AEC*



Pr V DESESTRET

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

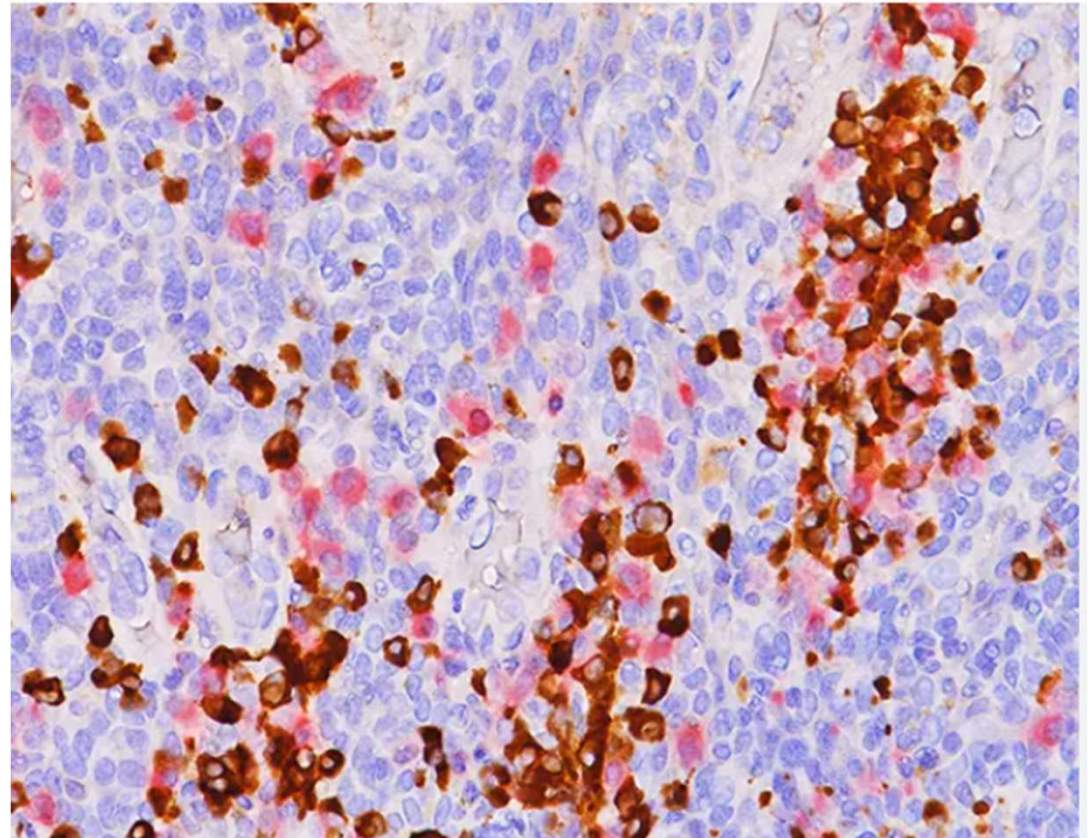
❖ Couplages directs

Intérêt : Doubles marquages

Amygdale

Chaînes légères Kappa

Chaînes légères Lambda



<https://biocare.net>

III. Les analyses moléculaires *in situ*

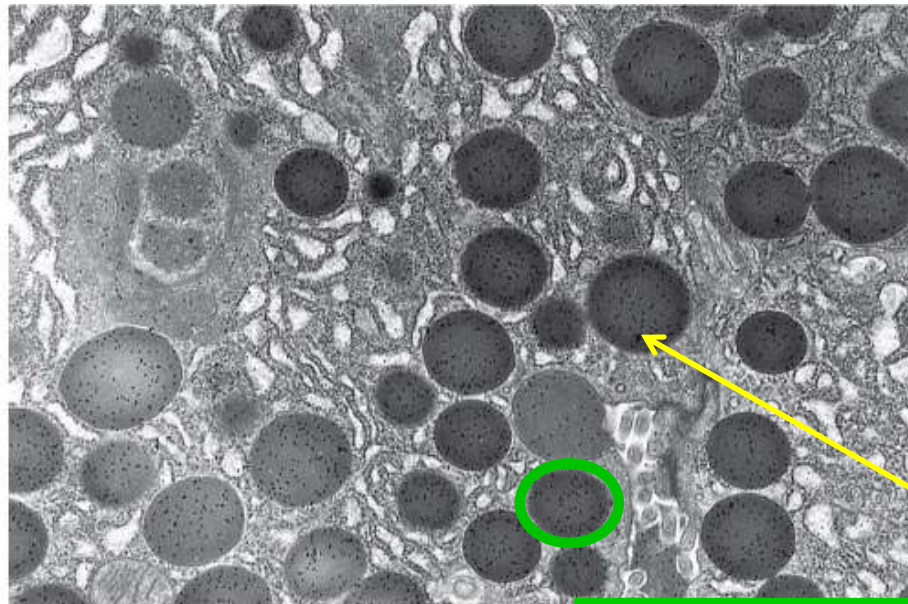
1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

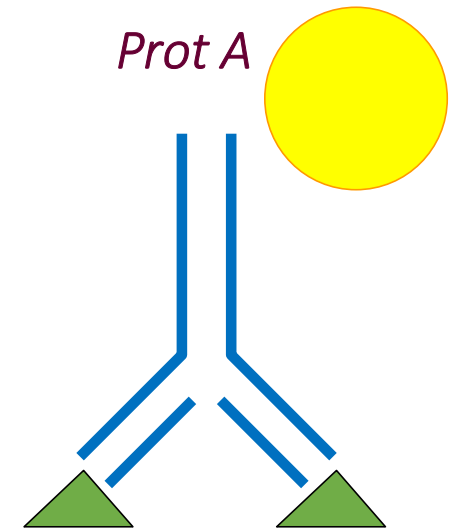
❖ Couplages directs

En MET → Révélation par de l'or colloïdal

Pancréas



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
All rights reserved.



Anticorps anti-amylase

Granule de sécrétion

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

Comment révéler la présence de l'anticorps couplé à l'antigène ?

- ❖ Couplages directs
- ❖ Méthodes indirectes
- ❖ Systèmes d'amplification (méthodes indirectes)

III. Les analyses moléculaires *in situ*

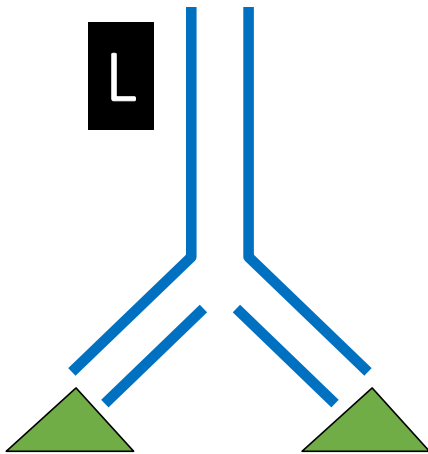
1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

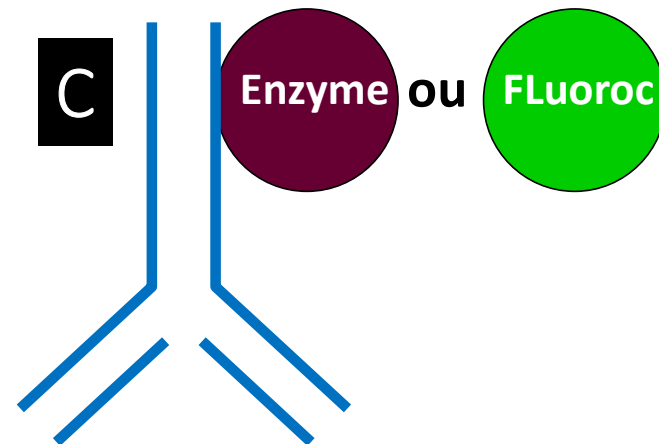
❖ Méthodes indirectes

Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

Anticorps de Lapin dirigé
contre l'antigène à détecter



Anticorps anti-Lapin obtenu par ex. chez la Chèvre,
couplé à l'**enzyme**/**fluorochrome**

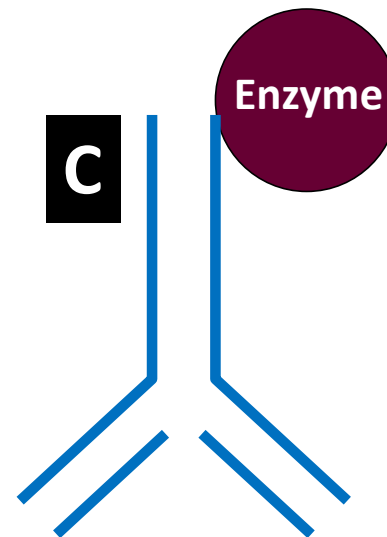
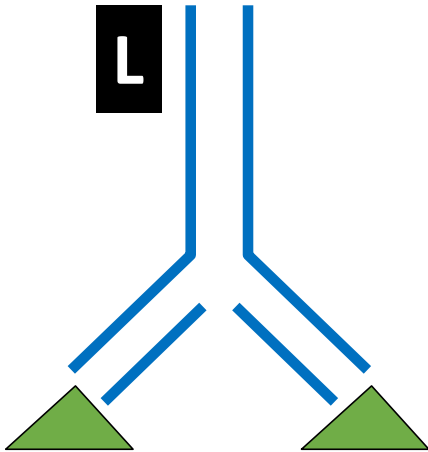


III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Méthodes indirectes



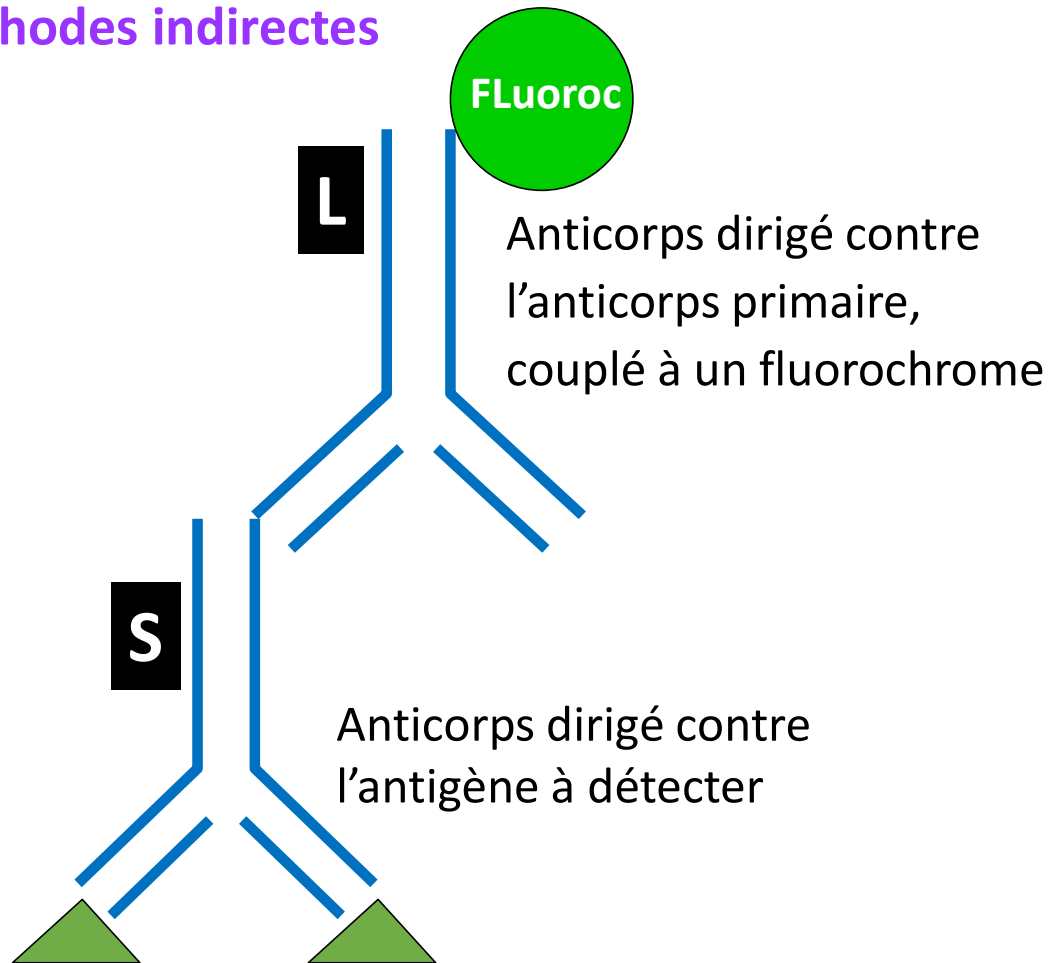
Ou...

III. Les analyses moléculaires *in situ*

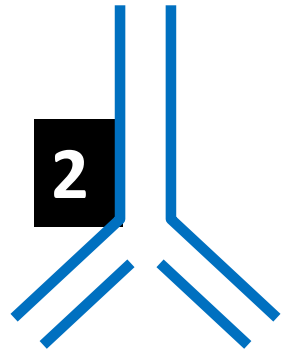
1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

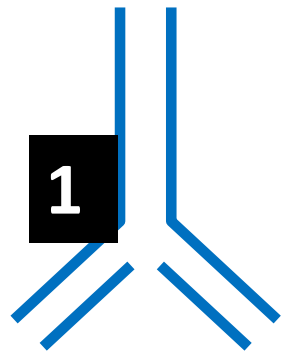
❖ Méthodes indirectes



Anticorps secondaire



Anticorps primaire



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

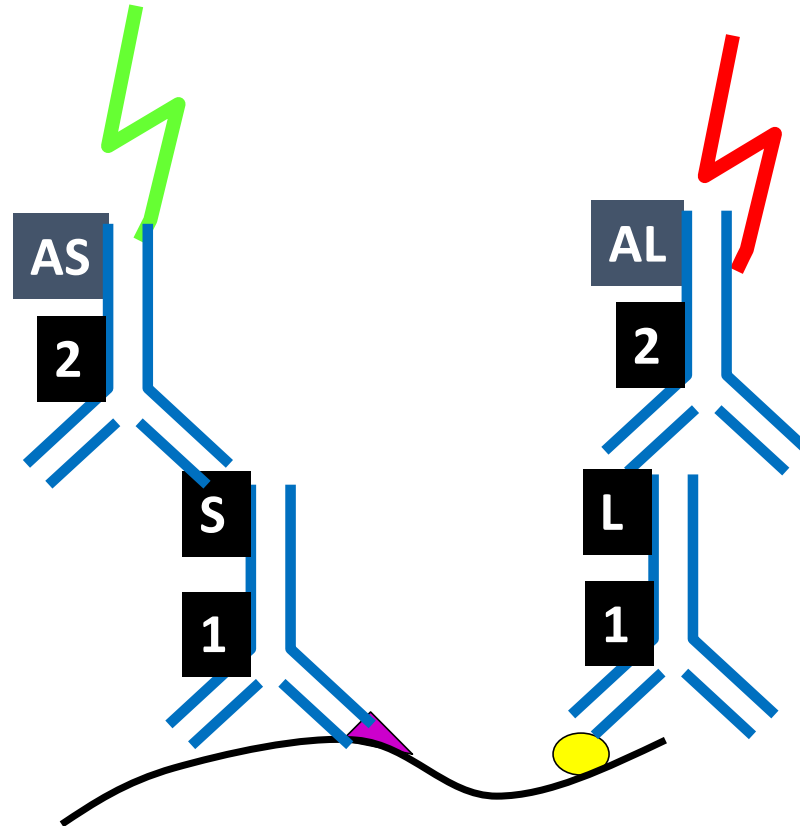
c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

❖ Méthodes indirectes

Avantages ?

1) "Pratique"

2) Double marquage



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

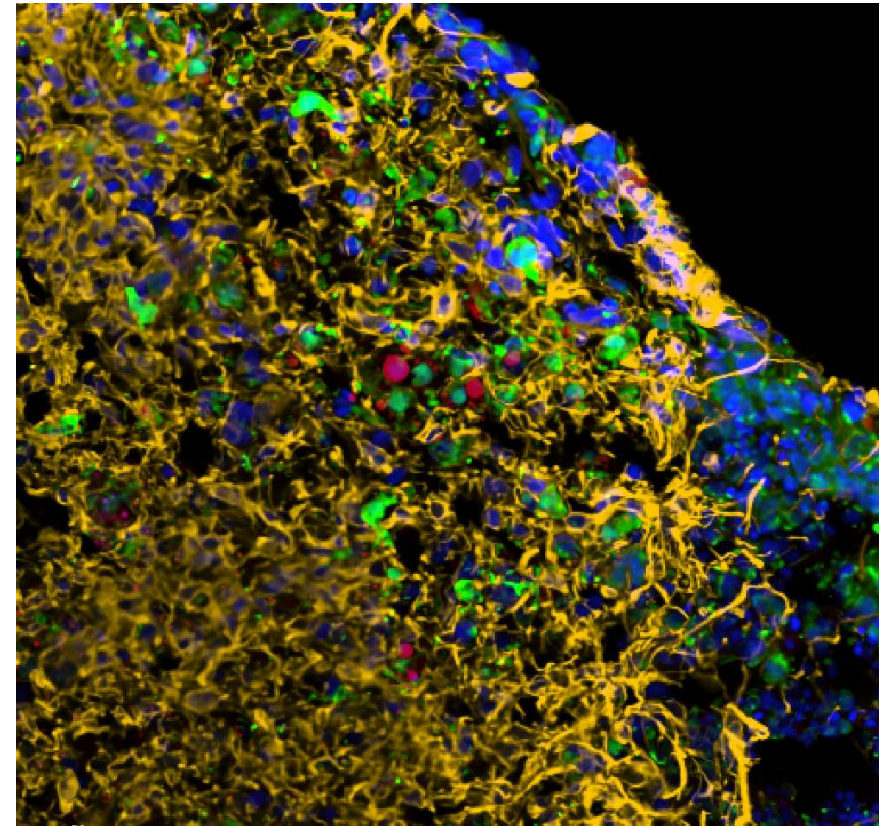
❖ Méthodes indirectes

Avantages ?

1) "Pratique"

2) Double marquage

Culture tumorale
Anti GFAP : Cellules tumorales
Anti IBA1 : Cellules microgliales
Anti Interleukine 6



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

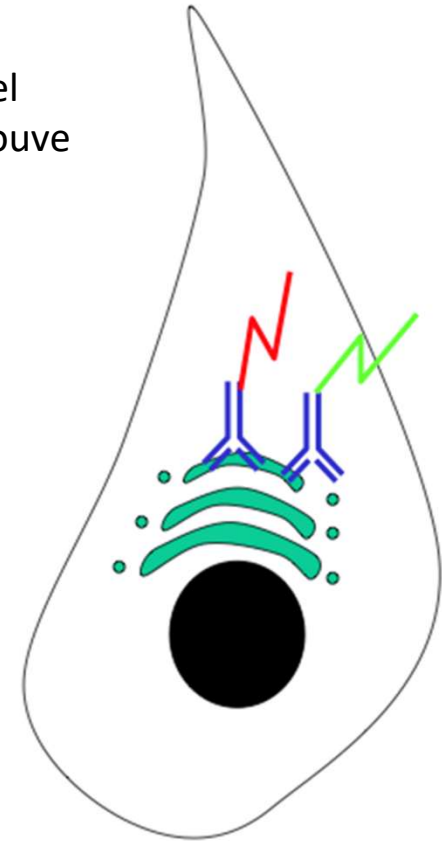
❖ Méthodes indirectes

Avantages ?

1) "Pratique"

2) Double marquage

Déterminer dans quel
organite cellulaire se trouve
un antigène



III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. *L'Immuno-histologie*

c) *Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps*

❖ Méthodes indirectes

Avantages ?

1) "Pratique"

2) Double marquage

3) Permettent des amplifications efficaces

III. Les analyses moléculaires *in situ*

1. L'Immuno-histologie

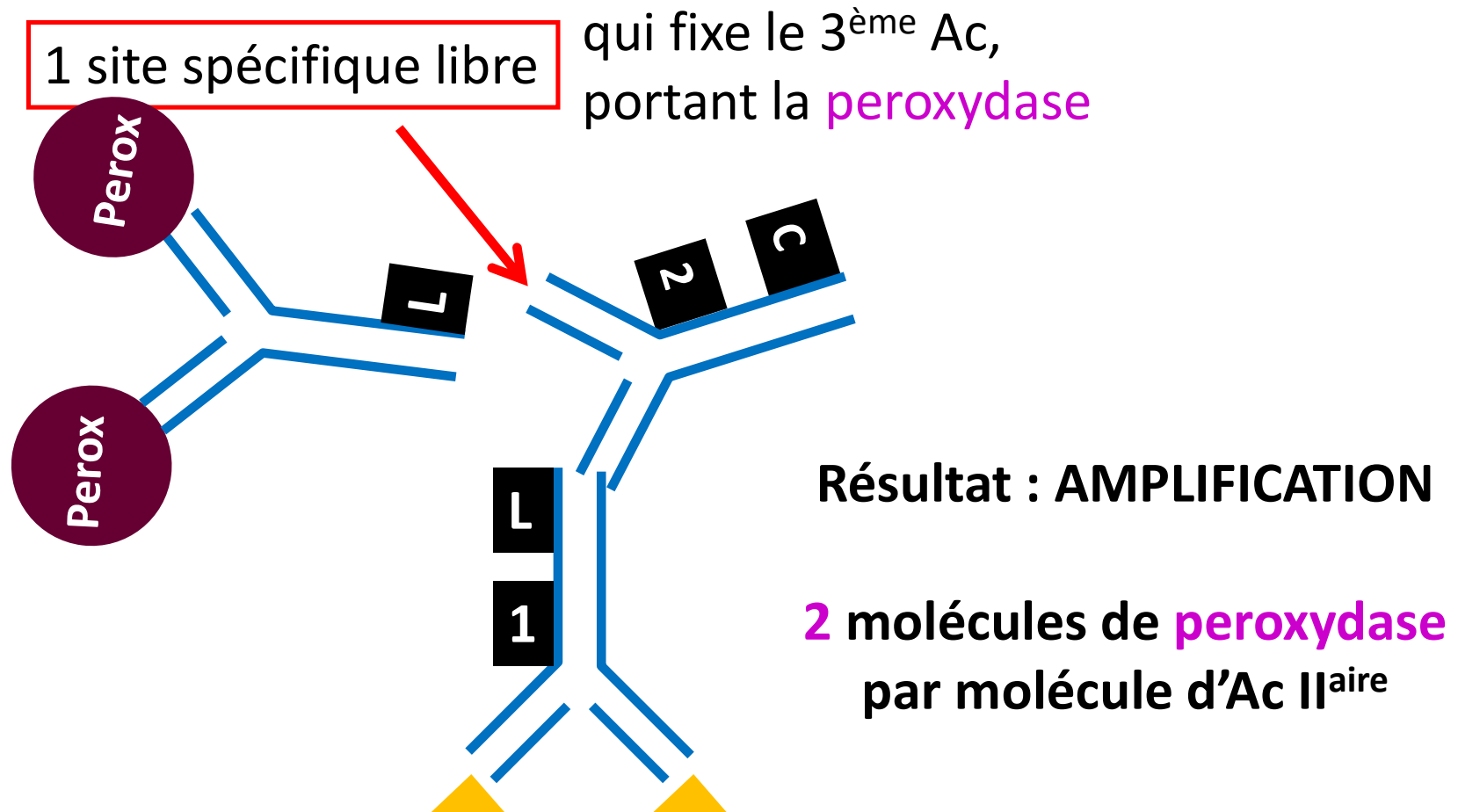
c) Les différents moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

Comment révéler la présence de l'anticorps couplé à l'antigène ?

- ❖ Couplages directs
- ❖ Méthodes indirectes
- ❖ Systèmes d'amplification (méthodes indirectes)

Exemple de système d'amplification : La méthode Peroxydase-anti-Peroxydase ou PAP

→ Utilise 3 anticorps



III. Les analyses moléculaires *in situ*

2. *L'hybridation in situ*

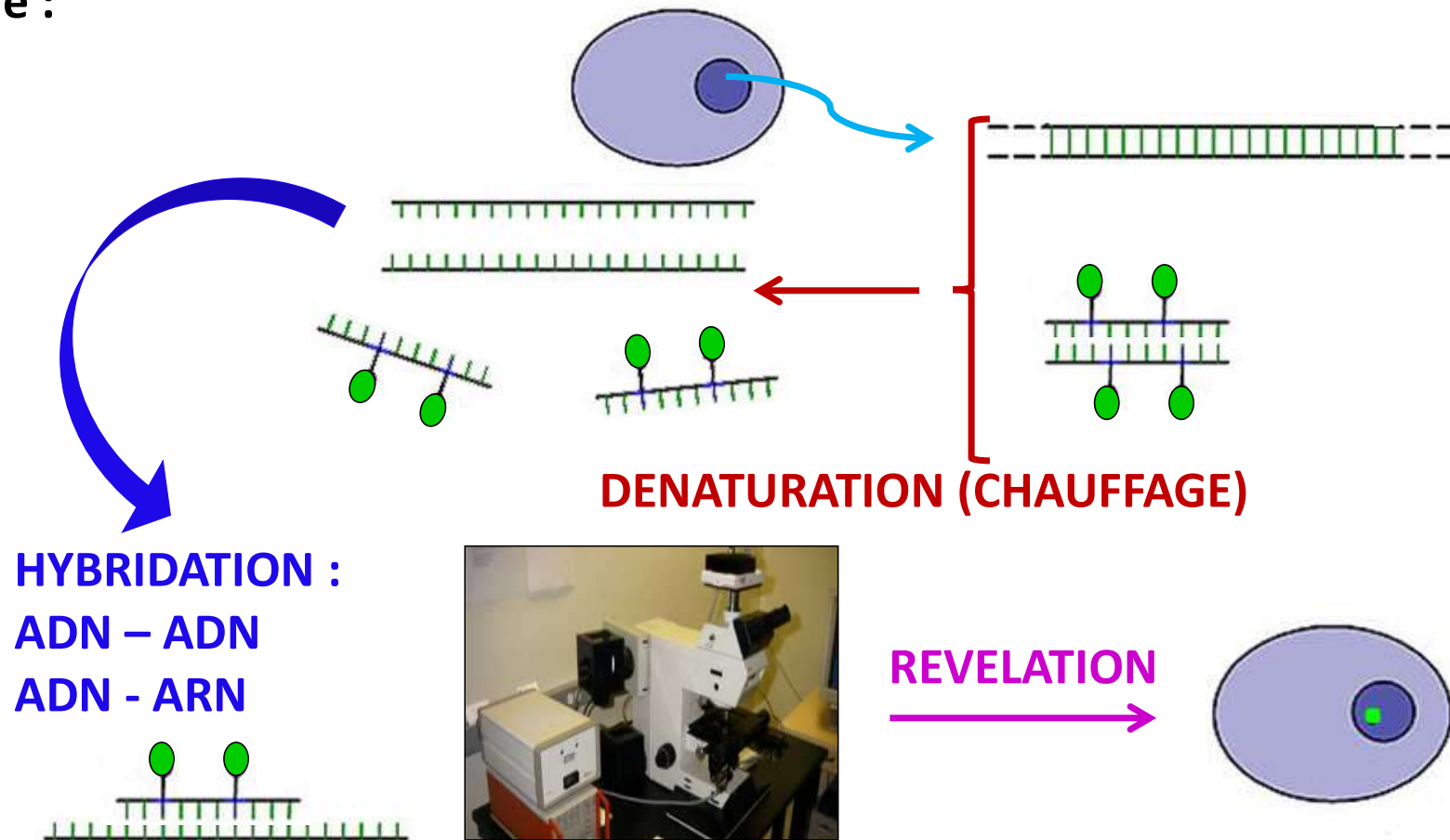
Objectif : détecter et localiser une séquence spécifique d'ADN/ARN directement dans une cellule ou un tissu

- Basée sur la notion de **complémentarité** de deux chaînes d'acides nucléiques
- Utilisation d'une **sonde nucléique marquée**
- Nature des sondes :
 - ADN
 - ADNc (ADN complémentaire, transcrit *in vitro* à partir de l'ARN)
 - ARNm (ribosondes)
 - Oligonucléotides (courts, 15-20 nucléotides)

III. Les analyses moléculaires *in situ*

2. L'hybridation *in situ*

- Technique :



III. Les analyses moléculaires *in situ*

2. *L'hybridation in situ*

a) *Révélation par hybridation non radioactive*

- Principe: marquage de la sonde par un marqueur permettant la visualisation des hybrides en microscopie optique (lumière blanche ou fluorescence) ou électronique
- Avantages: Sécurité et simplicité
- Limites : Sensibilité

III. Les analyses moléculaires *in situ*

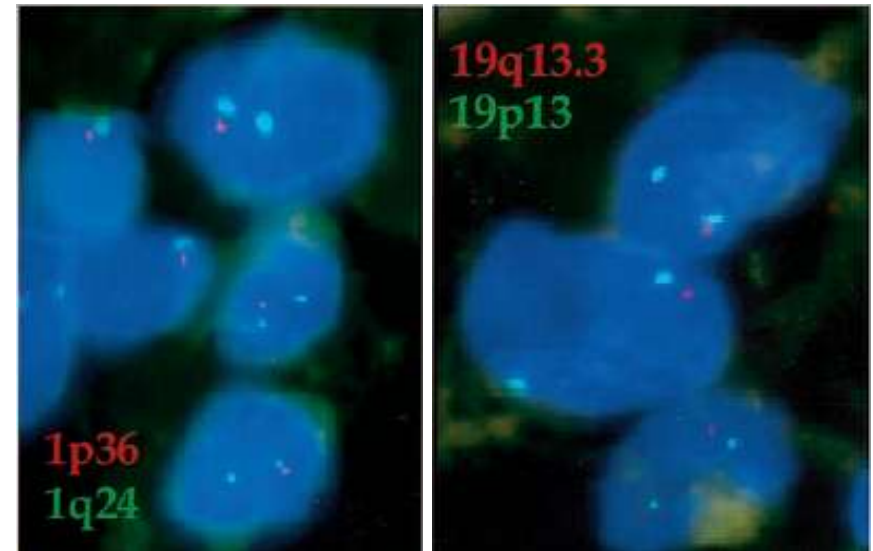
2. L'hybridation *in situ*

a) Révélation par hybridation non radioactive

- Marqueurs directs:
 - Couplage à un fluorochrome
 - ➔ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)



Exemple : détection de la
codélétion 1p19q
dans les tumeurs cérébrales

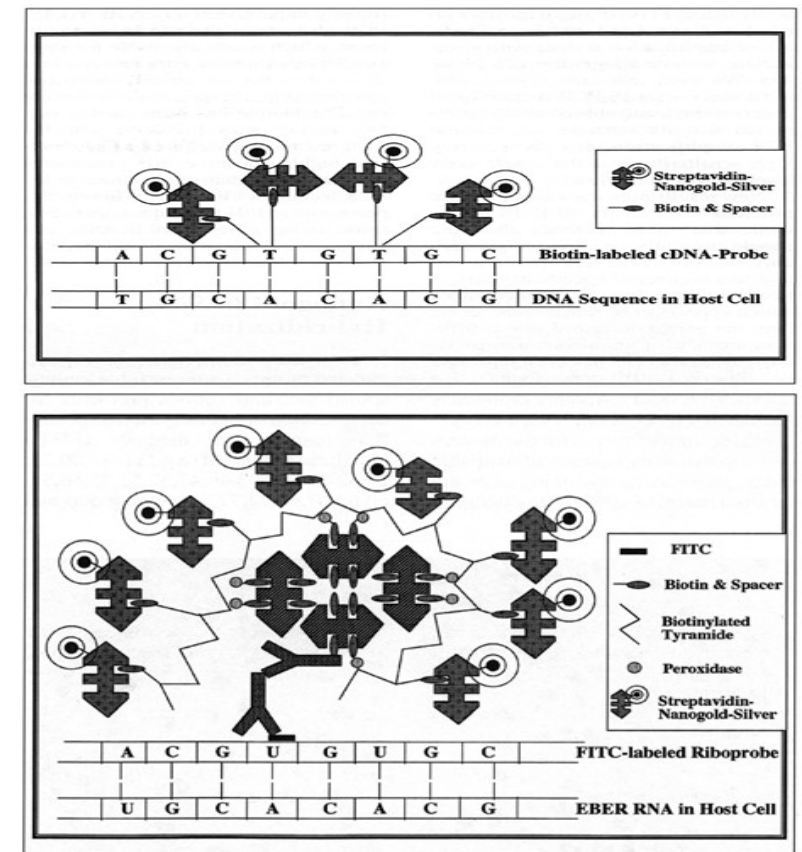


III. Les analyses moléculaires *in situ*

2. L'hybridation *in situ*

a) Révélation par hybridation non radioactive

- Marqueurs directs:
 - Couplage à un fluorochrome
→ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
- Marqueurs indirects:
 - Couplage à la digoxigénine
→ Ac anti-DGX
 - Couplage à la biotine
→ Streptavidine/Peroxydase
→ Streptavidine/Métaux (or en ME)



III. Les analyses moléculaires *in situ*

2. L'hybridation *in situ*

a) Révélation par hybridation non radioactive

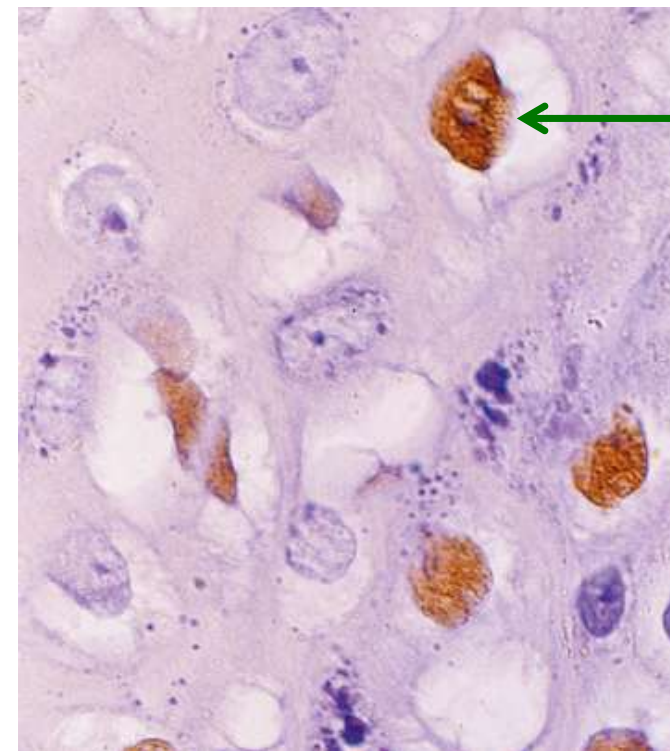
- Marqueurs directs:
 - Couplage à un fluorochrome
→ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
- Marqueurs indirects:
 - Couplage à la digoxigénine
→ Ac anti-DGX
 - Couplage à la biotine
→ Streptavidine/Peroxydase
→ Streptavidine/Métaux (or en ME)

Exemple : détection du papillomavirus de type 2 dans une biopsie de col utérin

Sonde couplée à la biotine

Ajout du complexe avidine / peroxydase

Réaction enzymatique



ADN viral
(HPV)

III. Les analyses moléculaires *in situ*

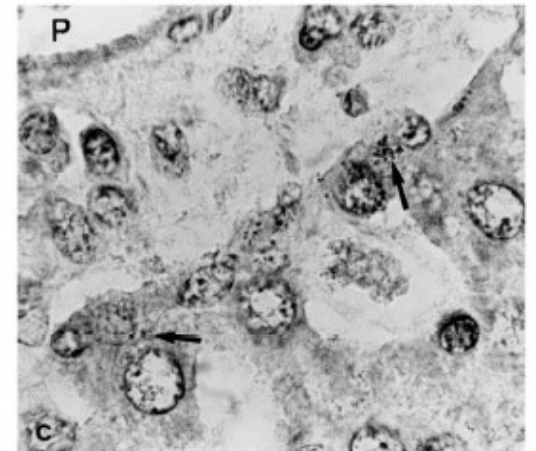
2. L'hybridation *in situ*

b) Révélation par hybridation radioactive

- Marquages des sondes par isotopes radioactifs (^{32}P , ^3H)
- Révélation des hybrides par autoradiographie
- Avantage : Sensibilité
- Limites : Logistique

➔ 3. L'autoradiographie

Exemple : ARNm exprimé
spécifiquement dans cellule
hépatique

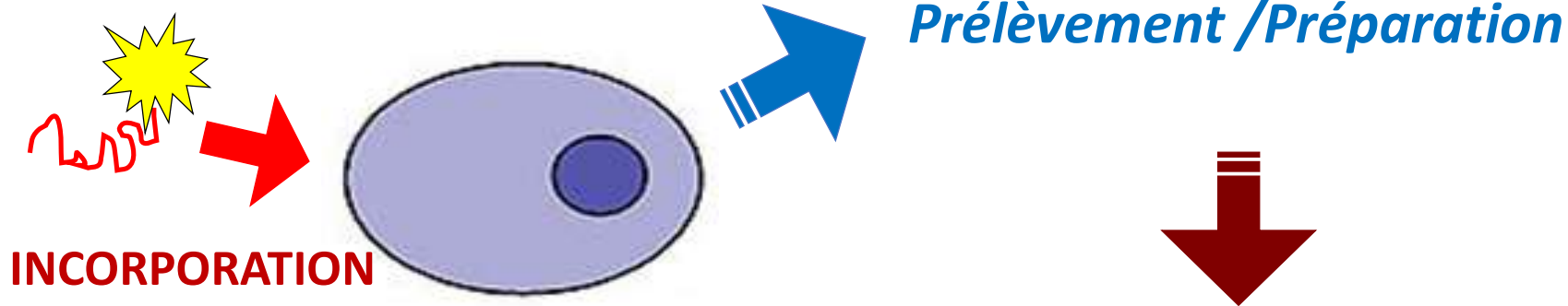


III. Les analyses moléculaires *in situ*

3. L'autoradiographie

Objectif : visualiser *in situ* le site de synthèse de molécules biologiques ou suivre le cheminement d'une macromolécule

Technique



Précurseurs de
macromolécules marquées
avec des
isotopes radioactifs

**AUTORADIOGRAPHIE
+ développement du film**



III. Les analyses moléculaires *in situ*

3. L'autoradiographie

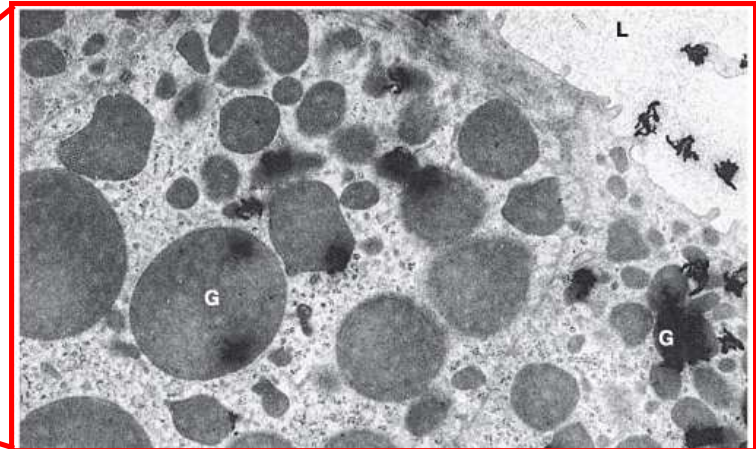
Exemple n°1 : Glande sous-mandibulaire (souris)

- Incorporation de [^3H] fucose 8h avant sacrifice
- Fucose : **intégration dans certaines glycoprotéines salivaires**
➔ Visualisation du site de synthèse

Microscopie photonique



Microscopie électronique

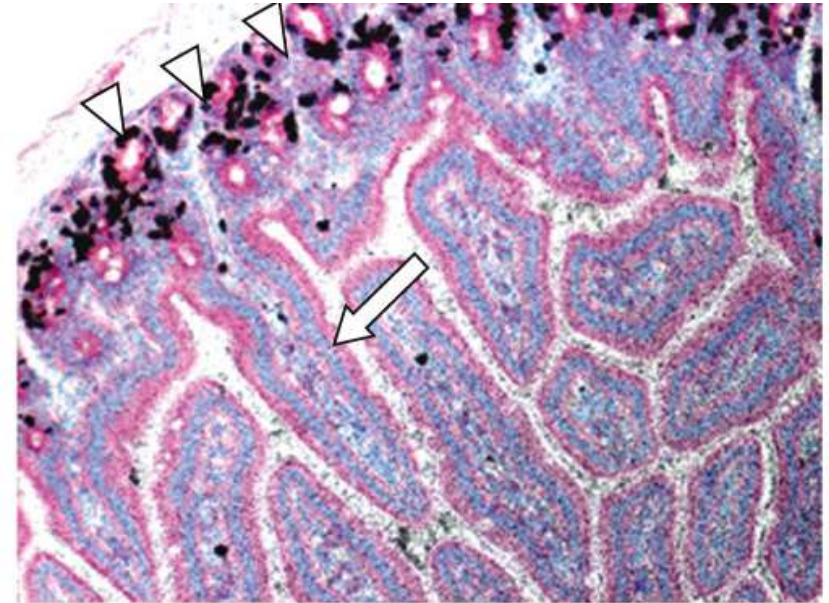


III. Les analyses moléculaires *in situ*

3. L'autoradiographie

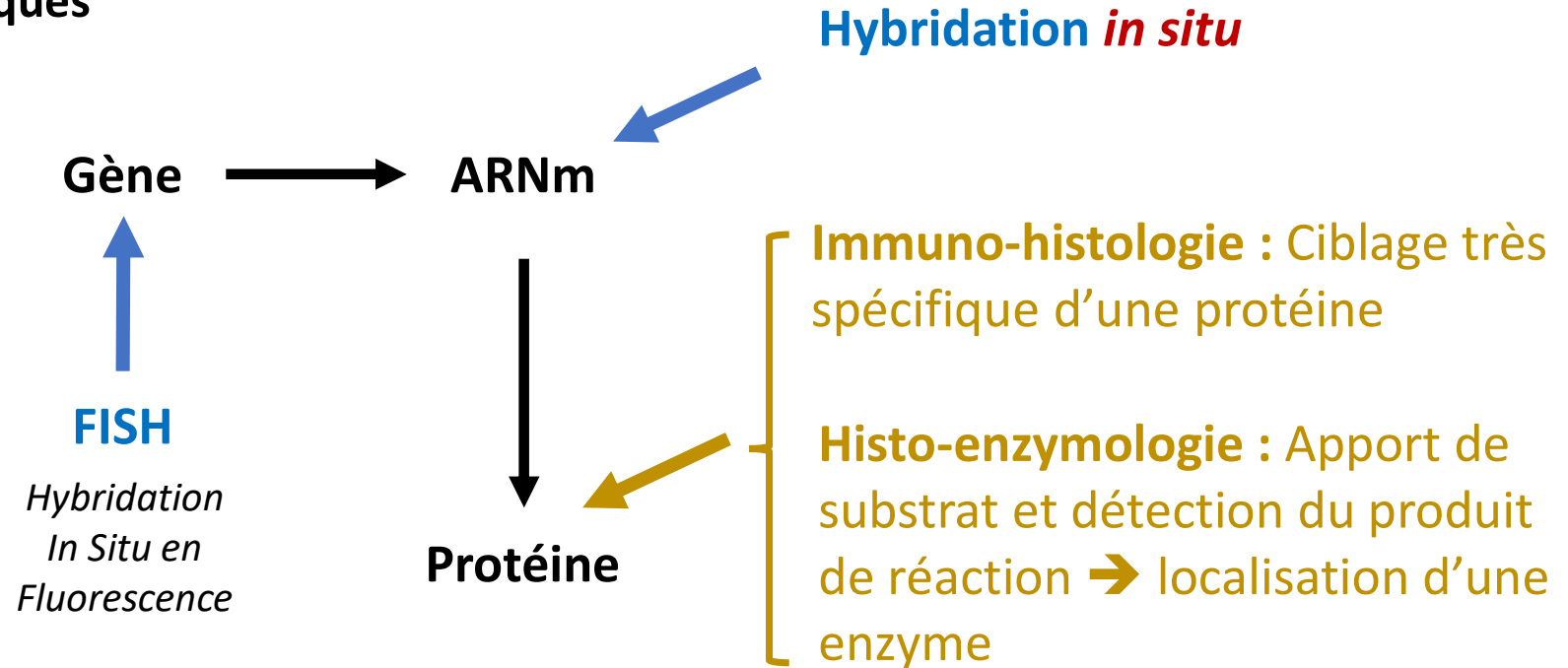
Exemple n°2 : Intestin (souris)

- Incorporation de [^3H] thymidine 1h avant sacrifice
- Synthèse d'ADN = Marquage des *cellules en cycle*



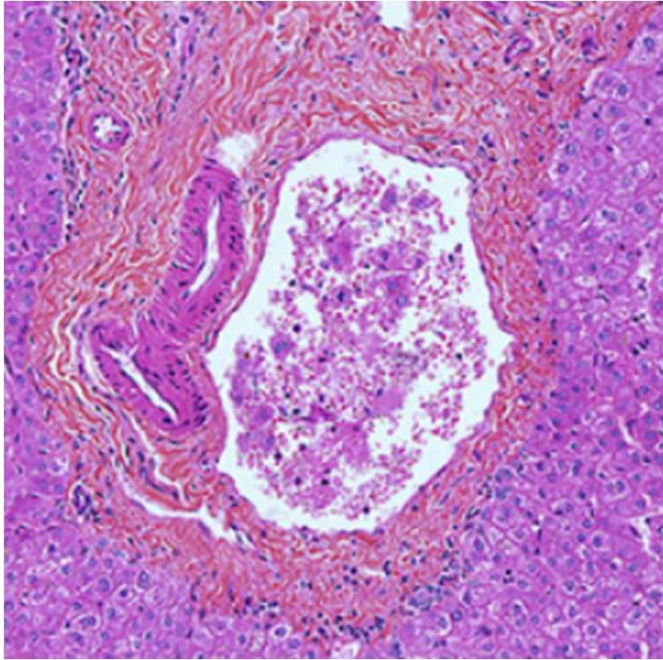
Take-home messages

- Protéines et acides nucléiques

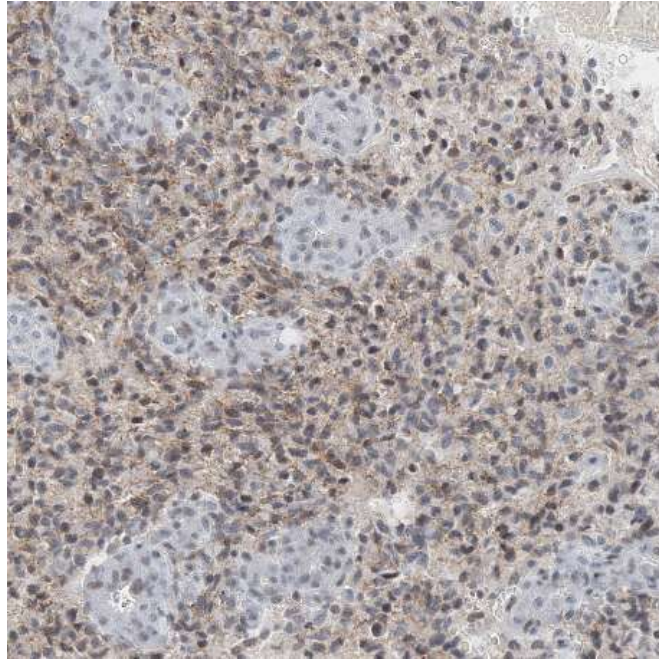


- **Glucides** → Histo-chimie (= détection d'un constituant grâce à une réaction biochimique)
- **Lipides** → Histo-chimie
→ Nouveaux outils microscopiques

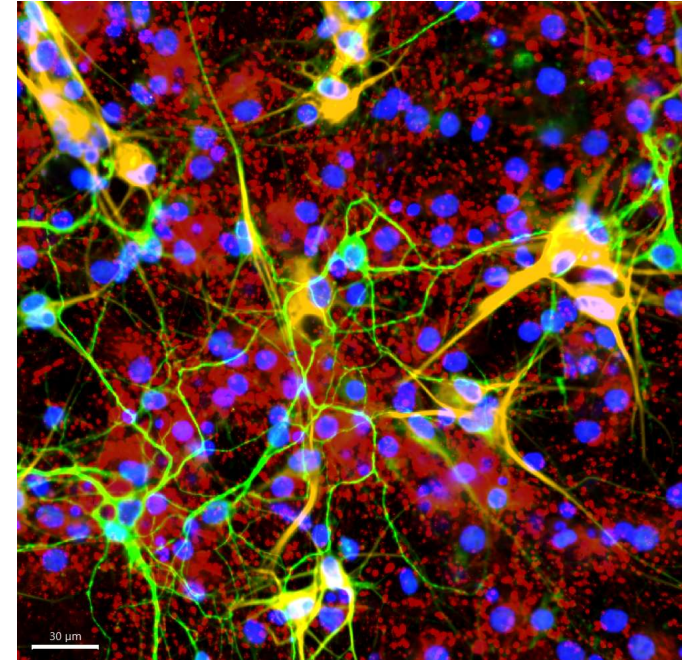
?



Coloration HES



Immuno-histochimie



Immuno-fluorescence

Sources

- Histologie Moléculaire de la Cellule. J Poirier et al. Ed Masson
- Histologie. Bases fondamentales. B. Mace et Collège. Ed. Omniscience
- Histologie humaine A. Stevens et J Lowe. Ed. Elsevier
- <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia>
- Basic Histology. L.C. Junqueira 11^{ème} Ed.
- Cours M2R J.Y Scoazec (UCBL) UE. Imagerie cellulaire et tissulaire
- Cours Immunohistochimie C. Duyckaerts (UPMC)
- <https://www.fun-mooc.fr/courses/course-v1>