Laboratoire CarMeN
Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition
Unité Mixte de Recherche : INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon1, INSA de Lyon

Bases en Sciences de la Vie

Histologie

Dr Baptiste Panthu

Faculté de Médecine Lyon-Est

Jeudi 8 octobre 2026

Sources:

-Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater (young, Lowe, Stevens, Heath)

-Histologie fondamentale de Junquiera (Mescher)

-Histologie humaine A. Stevens et J Lowe. Ed. Elsevier

-Histologie Moléculaire de la Cellule. J Poirier et al. Ed Masson

-Histologie. Bases fondamentales. B. Mace et Collège. Ed. Omniscience

-https://www.chec.works/atlasweb/



PLAN

Les techniques d'histologies: 2 x 2h

I- Introduction

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

III- Les analyses moléculaires *in situ*

IV- Les techniques d'imagerie

Les tissus fondamentaux: 2 x 2h

I- Les tissus conjonctifs

II- Les épithélium

III- Le muscle

IV- Le tissu nerveux

PLAN: Les techniques d'histologies

I- Introduction

A) Définitions, place de l'histologie et du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

Définition

grec histos : « tissu », logos : « science »

Spécialité médicale et biologique
qui étudie au microscope
la structure des tissus

Malphighi-1657/1661

Hooke-1665

XVIII^{ème} Science Descriptive

XIX^{ème} Science Intégrative :

Anatomie, Biochimie, Physiologie
Anatomie Pathologique

⇓

1819- Histologie
Mayer et Heusinger

« Théorie Cellulaire »

Schwann-1838

« Structure/Fonction »

⇑

Description Morphologique
(des structures histologiques).

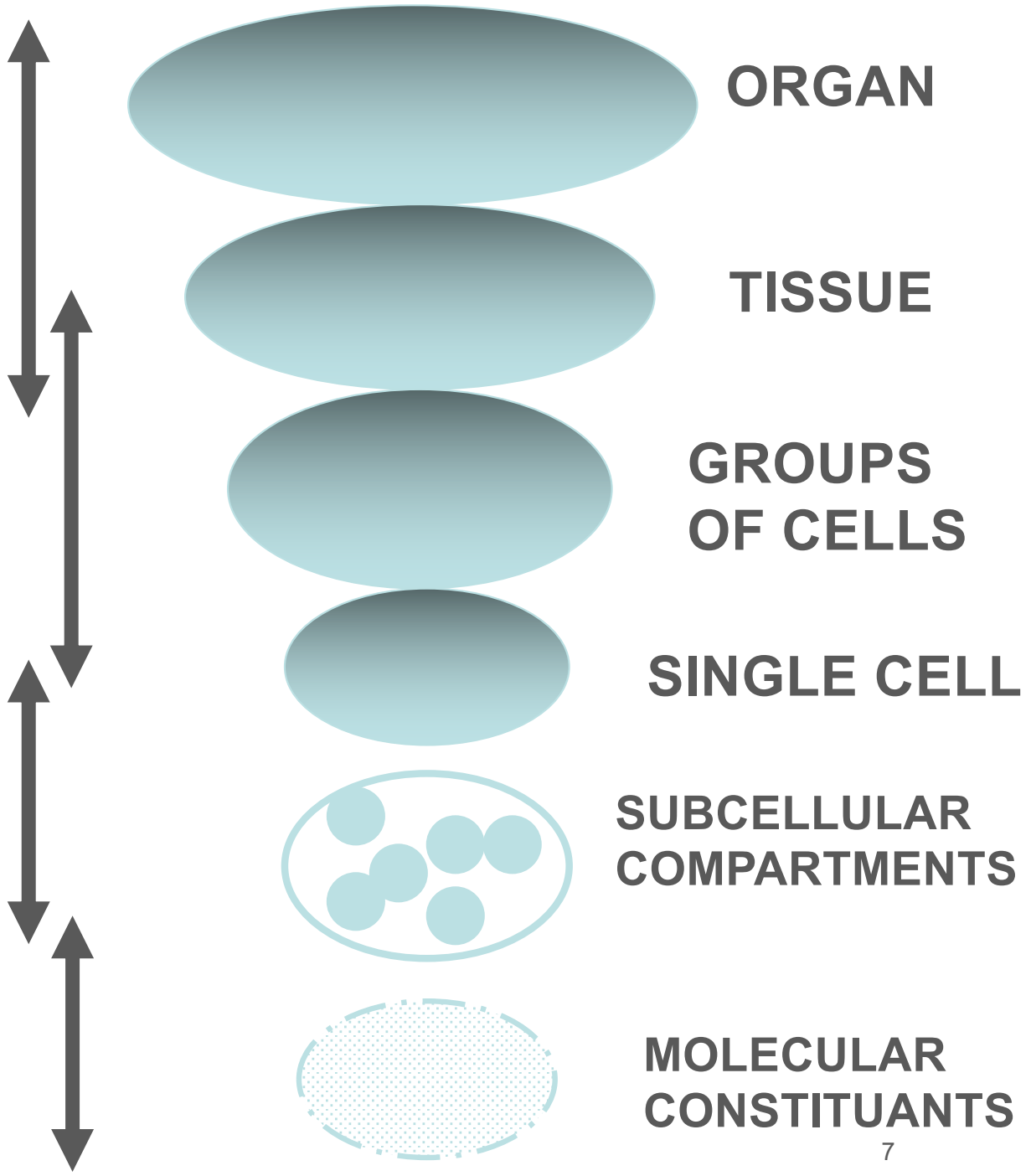
AVANT

RADIOLOGY
ENDOSCOPY
HISTOLOGY

HISTOLOGY

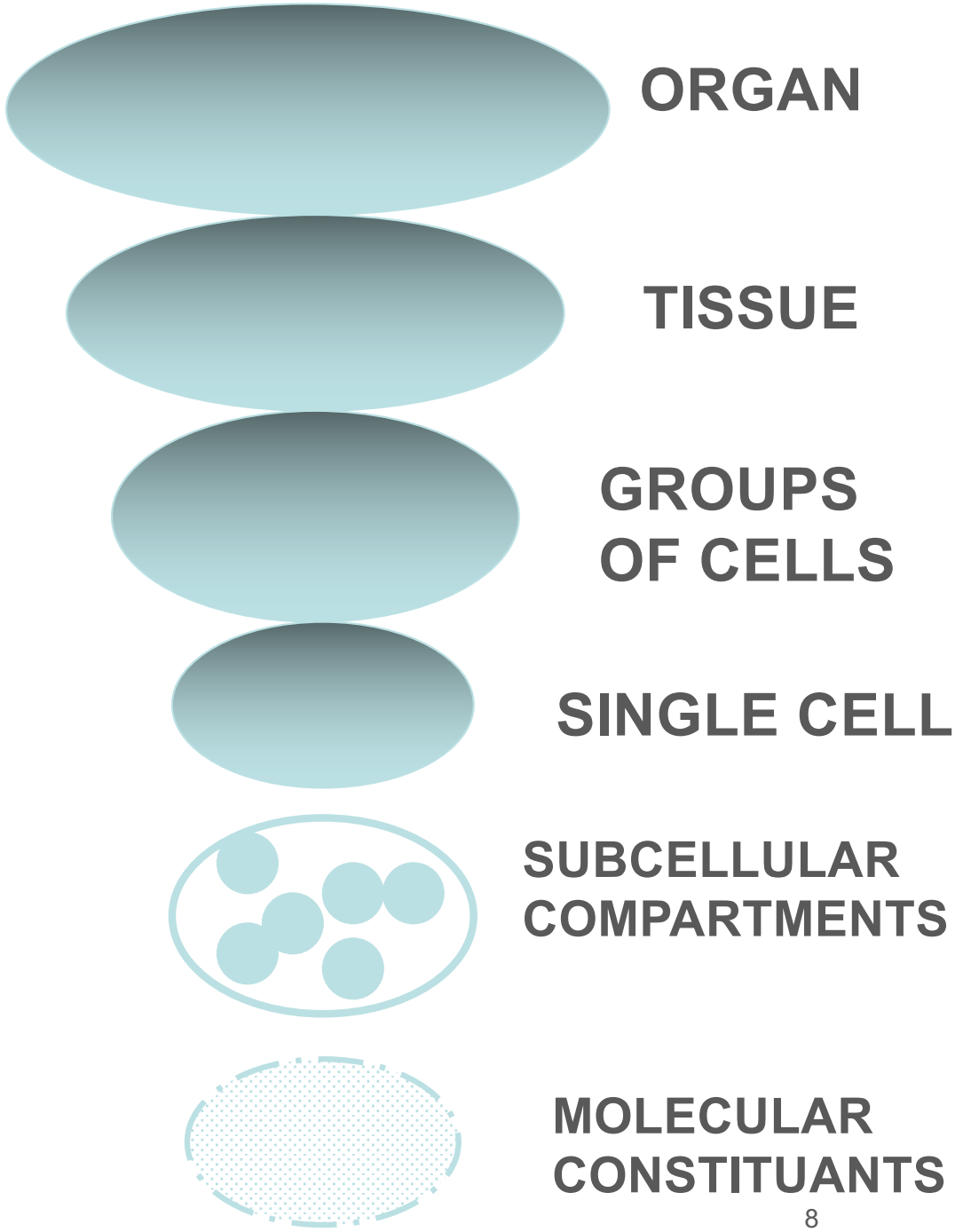
HISTOLOGY
CELL BIOLOGY

CELL BIOLOGY
MOLECULAR
BIOLOGY



BIENTÔT/ En ce moment

RADIOLOGY
ENDOSCOPY
HISTOLOGY
CELL BIOLOGY
MOLECULAR BIOLOGY



Le but histologique:
"Voir (observer) et interpréter ce qui est vu …"

La démarche histologique, en 4 étapes:

1) Le choix du matériel biologique

2) La (ou les) technique(s) permettant de visualiser les structures ou les phénomènes que l'on veut étudier

3) La production des images de ces structures ou phénomènes par des moyens optiques

4) L'interprétation de ces images

Visualiser *in situ*

Ou? Qui?

→ *les organes*
les tissus
les cellules
les organites
…

Quoi ?

→ *les acides nucléiques*
les protéines
les lipides
les sucres
…

Comment ?

Rendre visible ce que l'on veut observer

→ **techniques adaptées**

Pourquoi ?

-Relations dans l'organisation du vivant
-Associer Structure-fonction
-Faire de la recherche - Diagnostiquer

Savoir décrire

- les techniques d'étude histologique

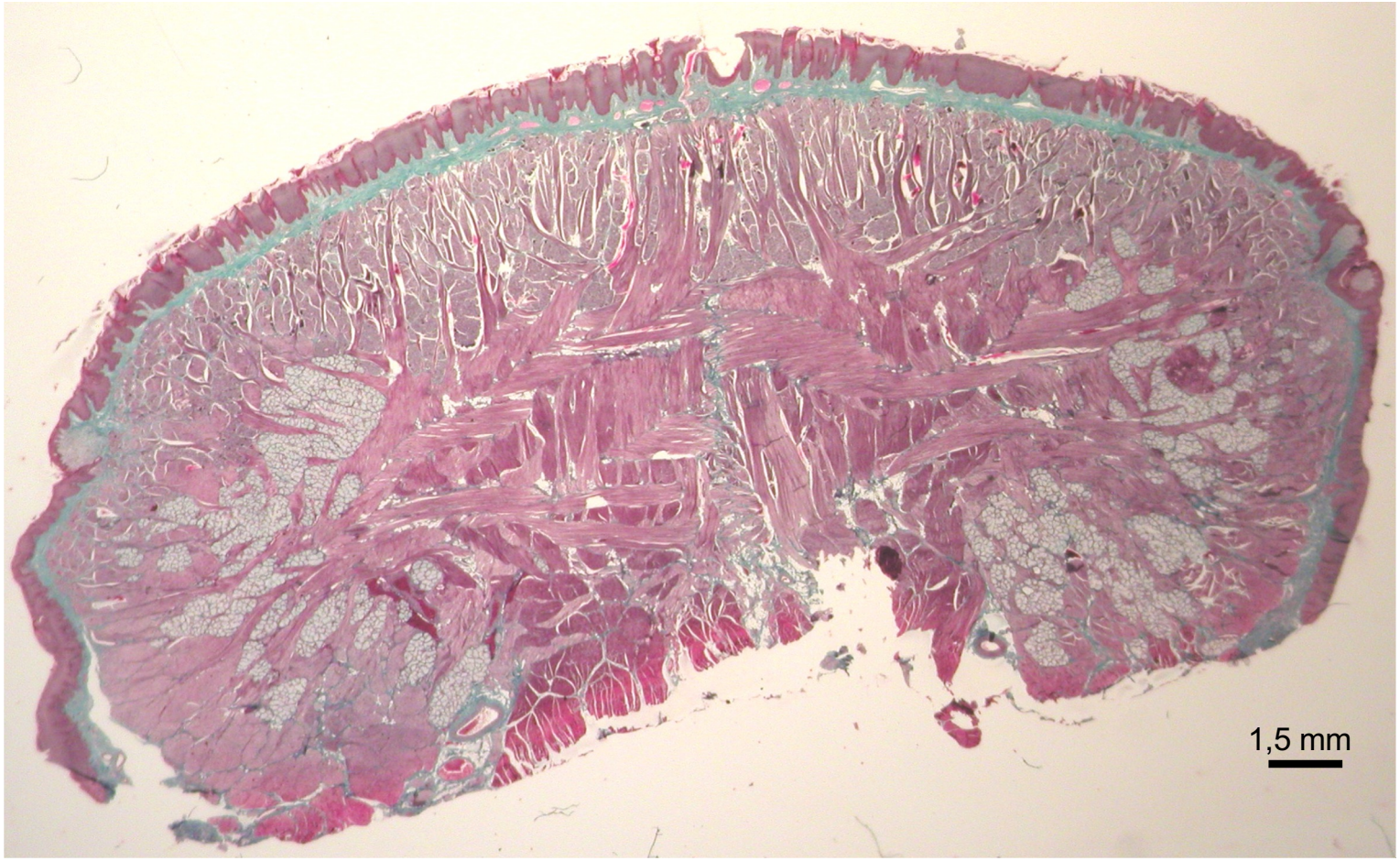
- les techniques d'analyse moléculaire *in situ*

Savoir reconnaitre la technique de marquage utilisée à partir d'une illustration morphologique

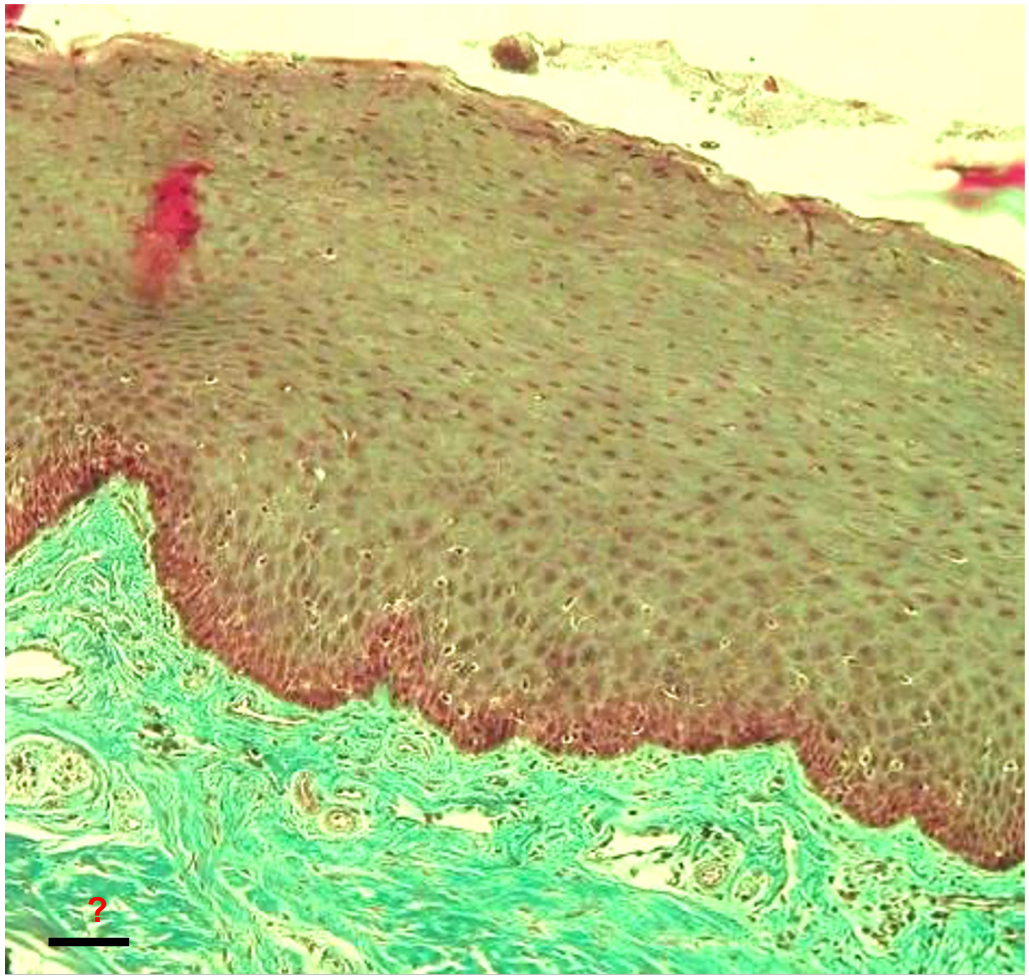
Comprendre l'intérêt et les limites de chaque technique

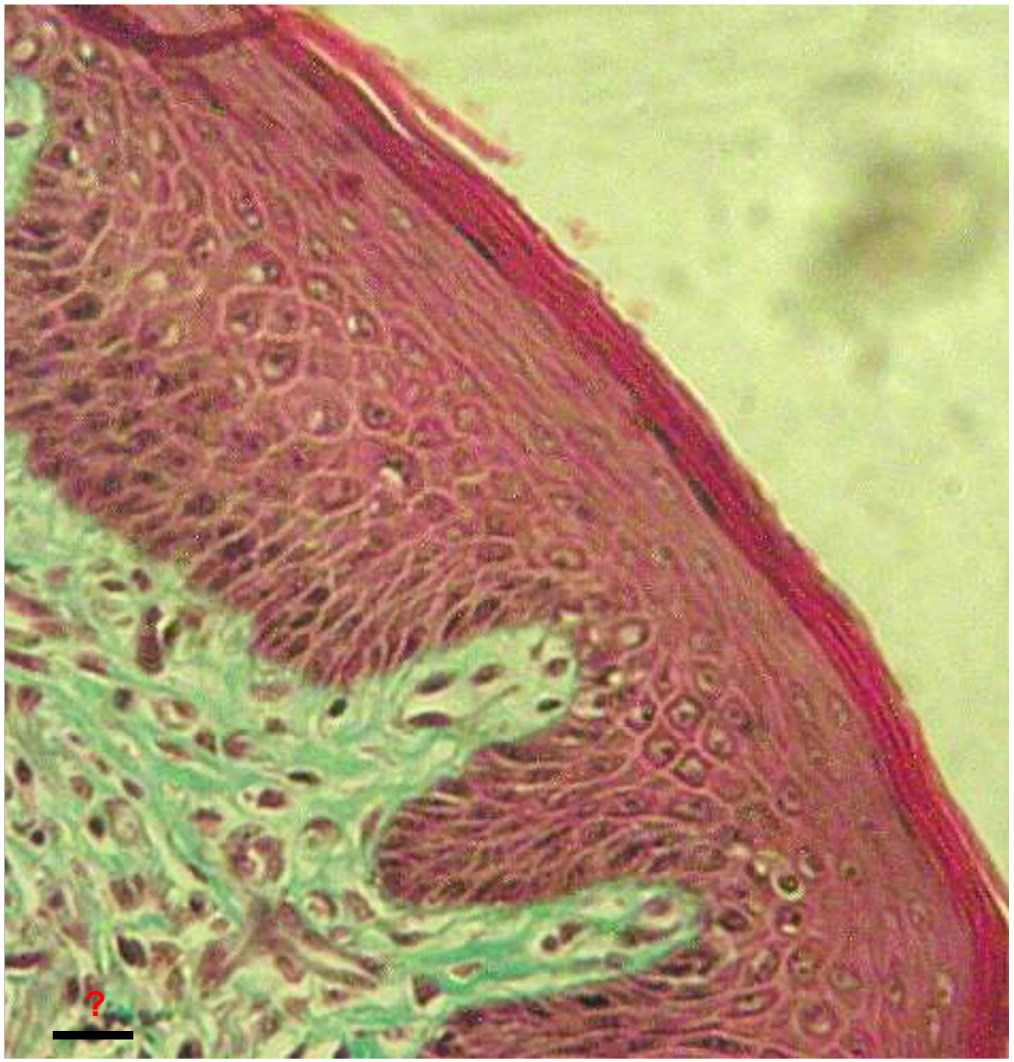
-quel est cet organe?
-quelles sont ses fonctions?
-quel diagnostique?

Questions à décliner à toutes les échelles

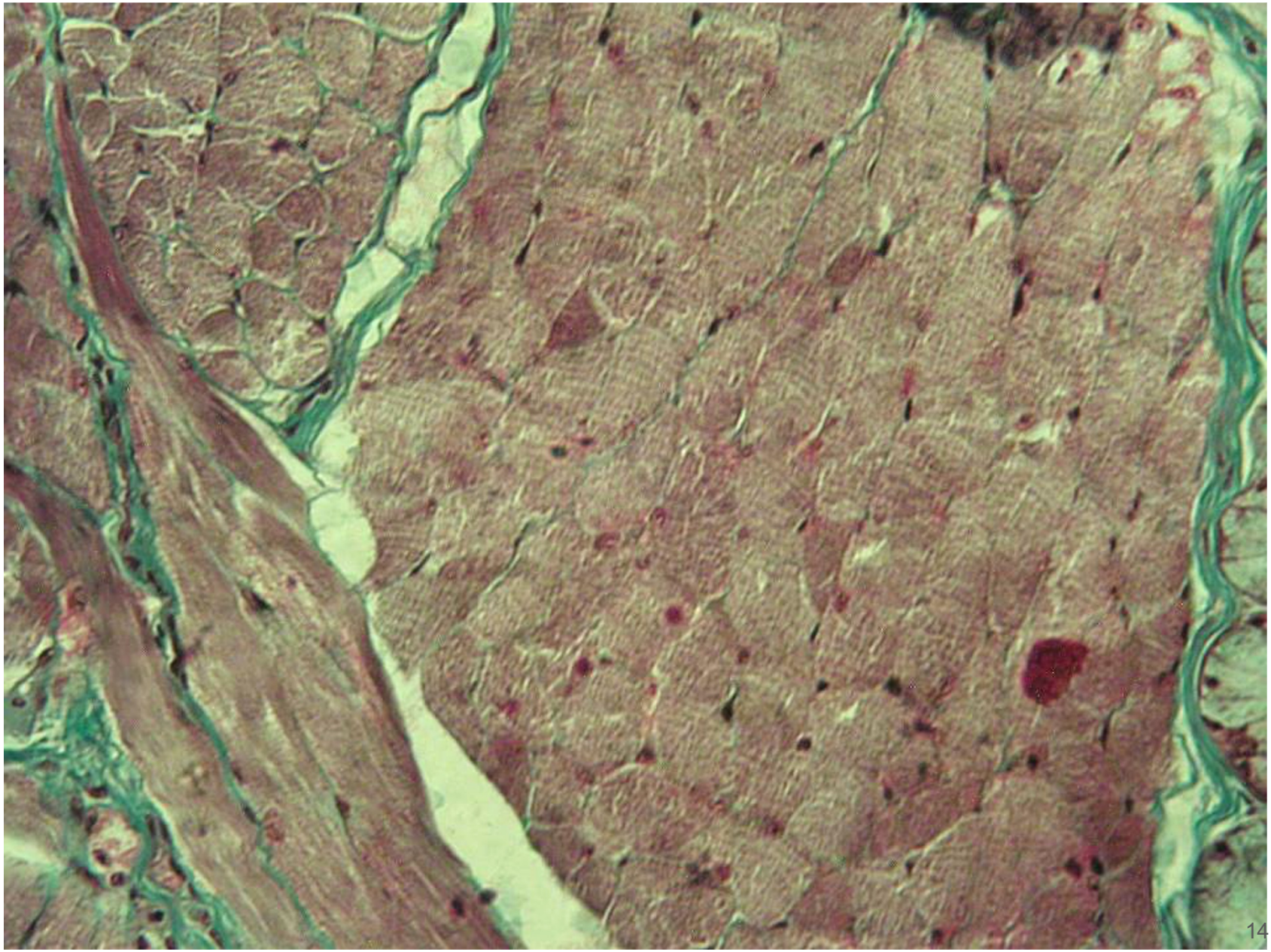


-quel est ce tissu? Ces tissus?

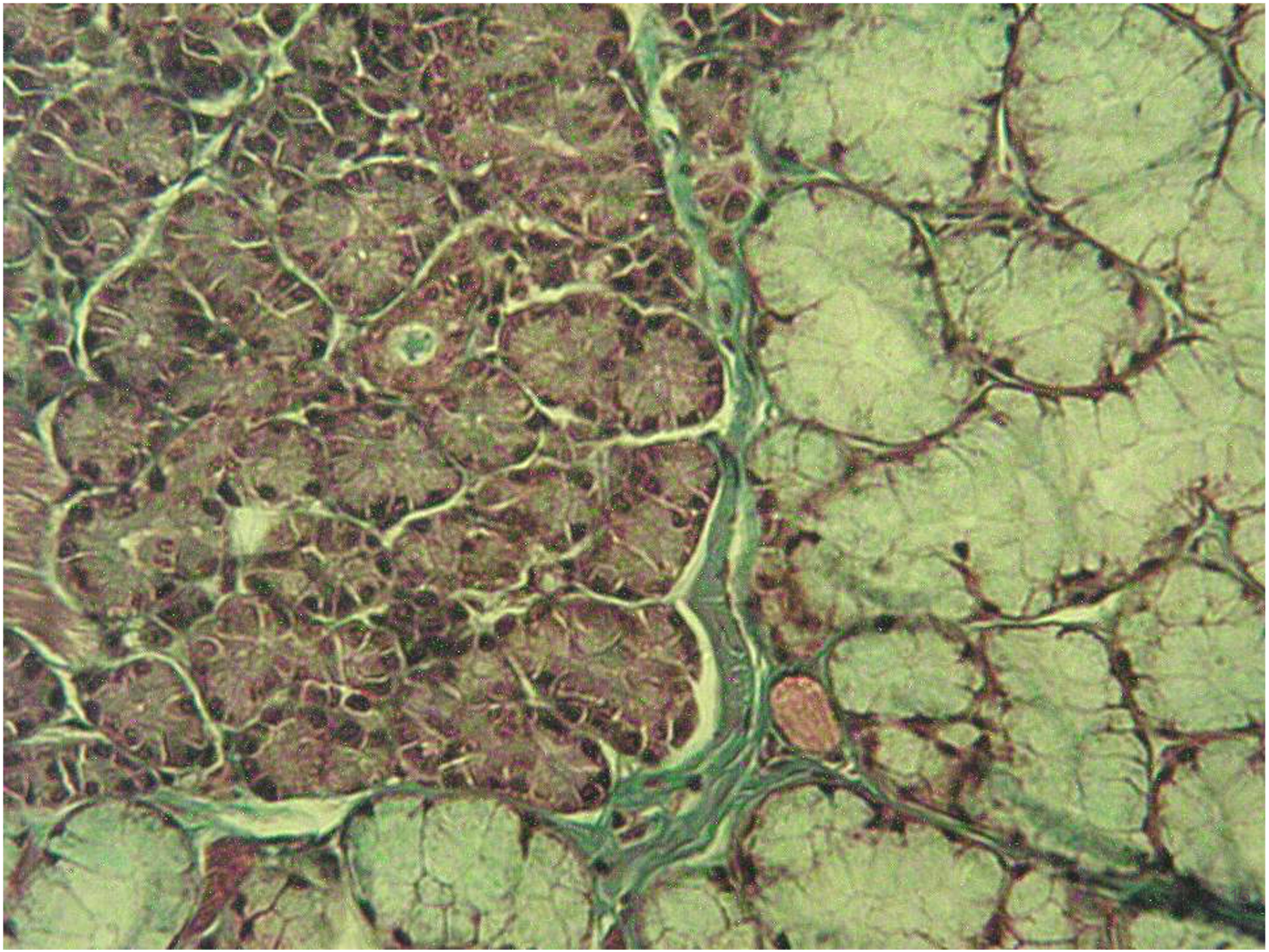




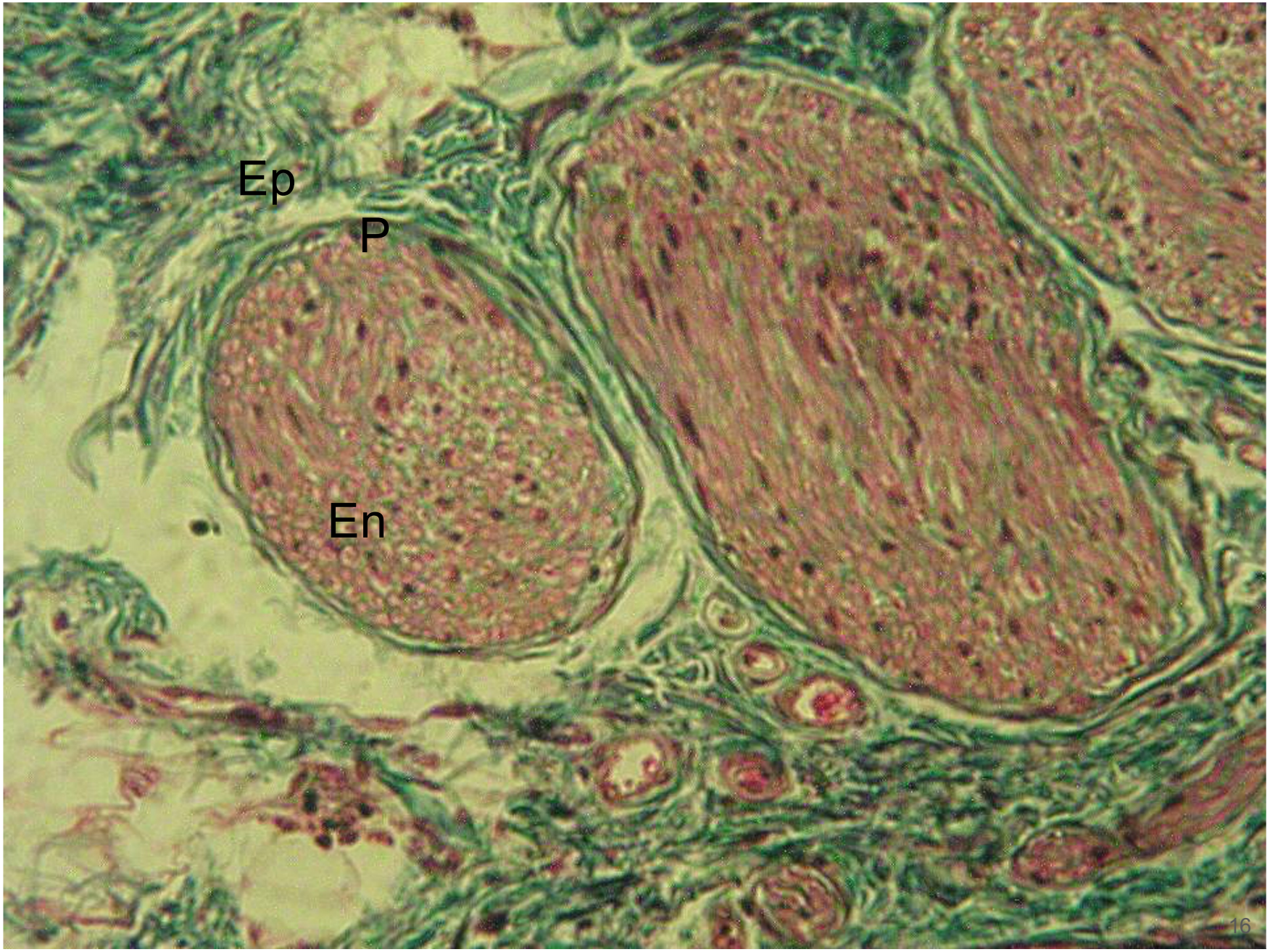
I- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs



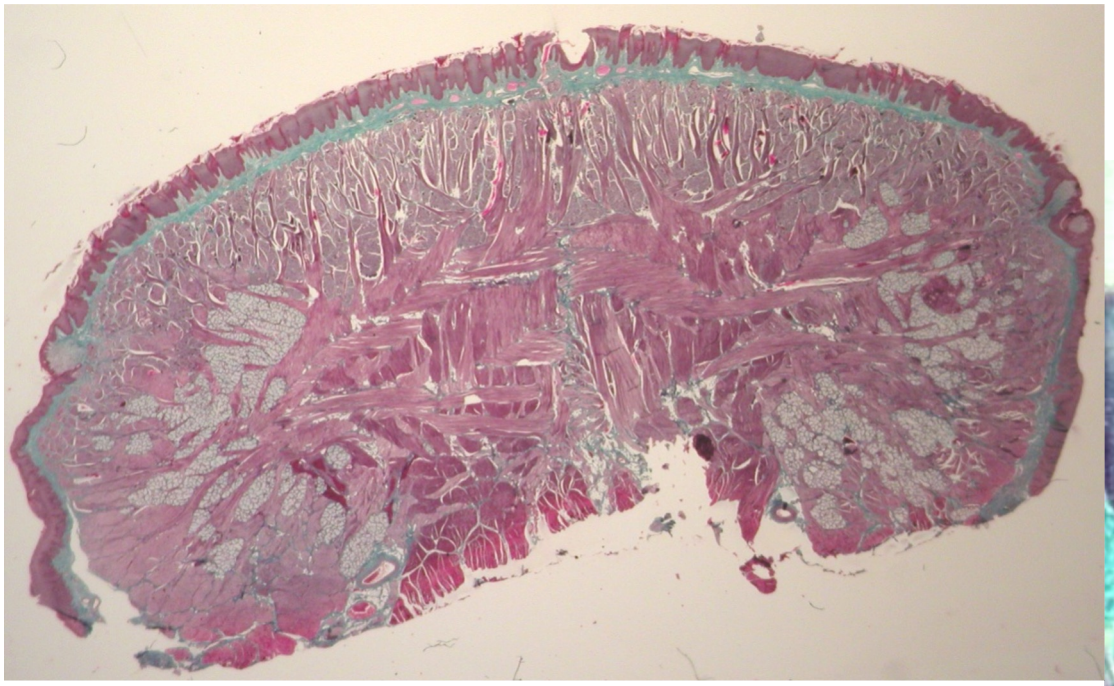
I- A) définition, place de l’histologie, place du cours, repères, objectifs

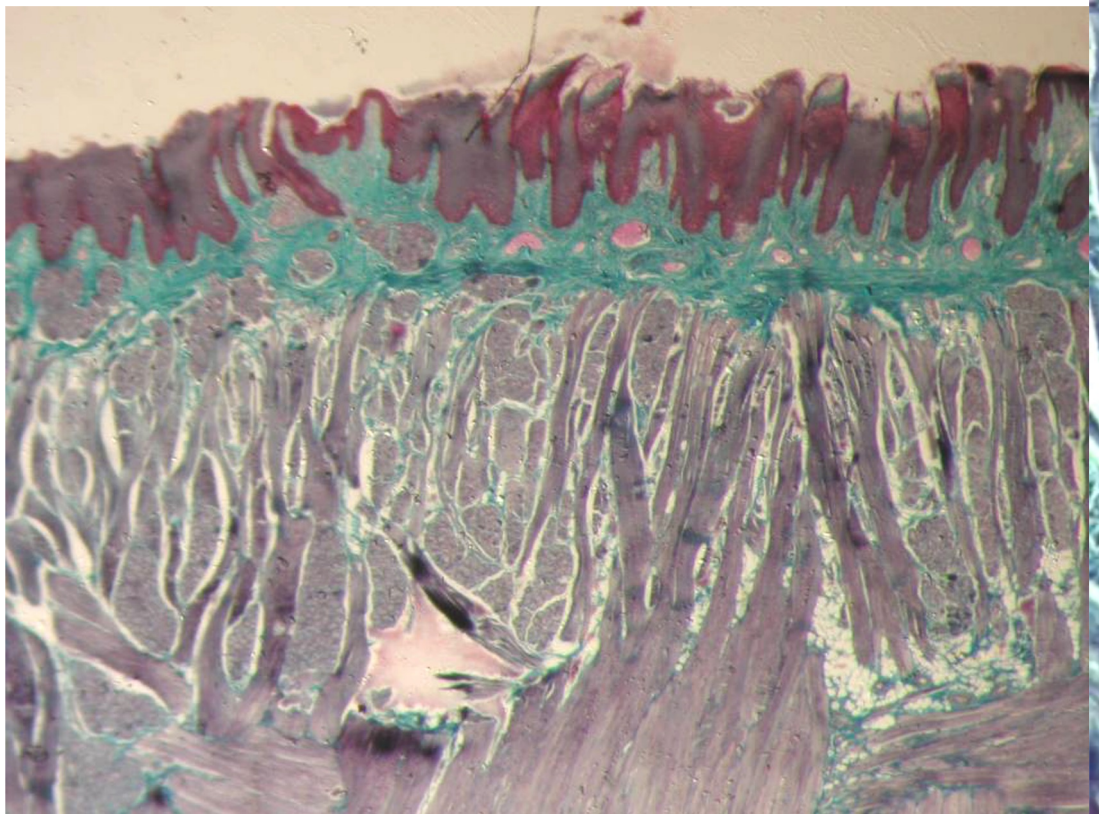


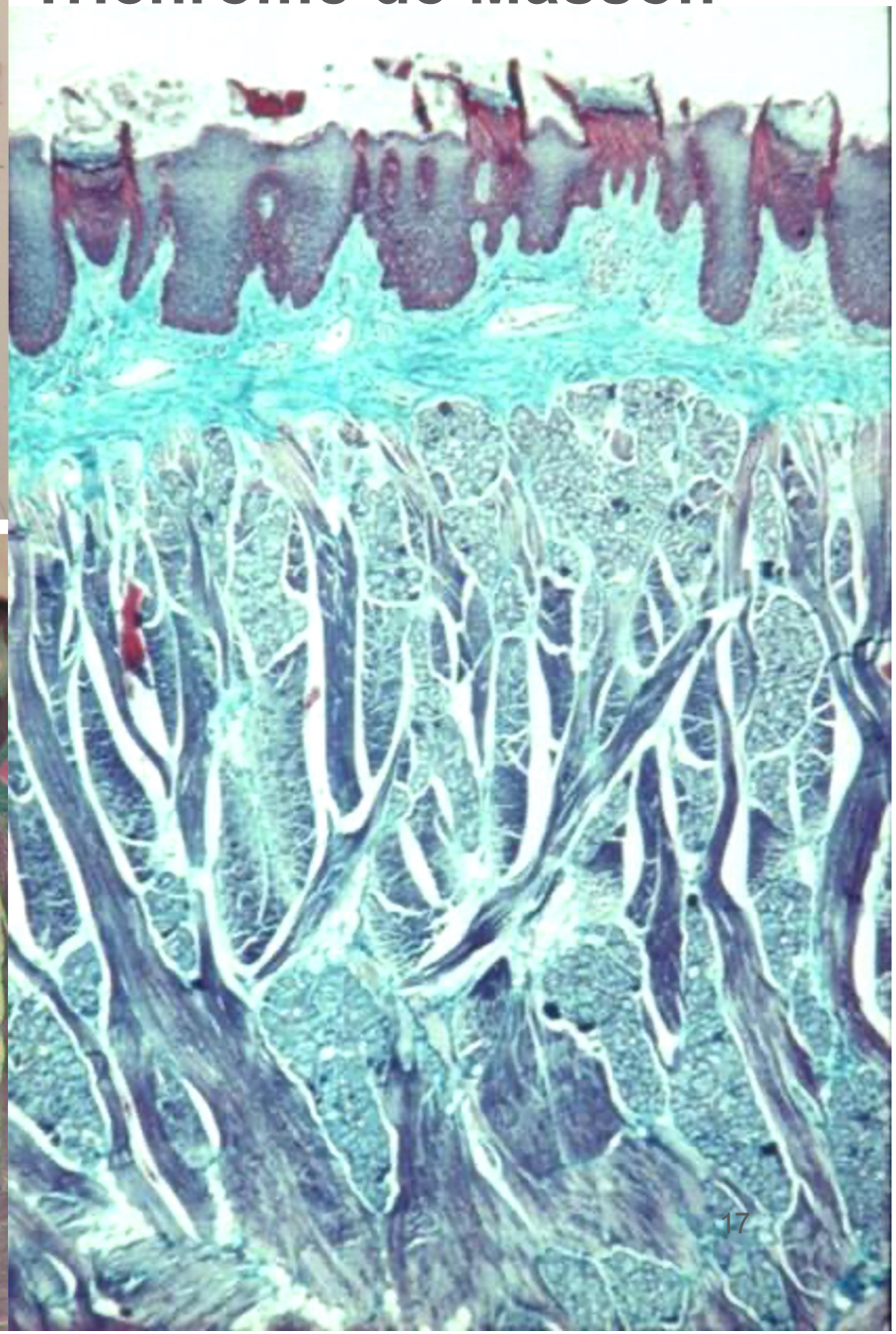
I- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs



COUPE DE LANGUE
Trichrome de Masson







PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

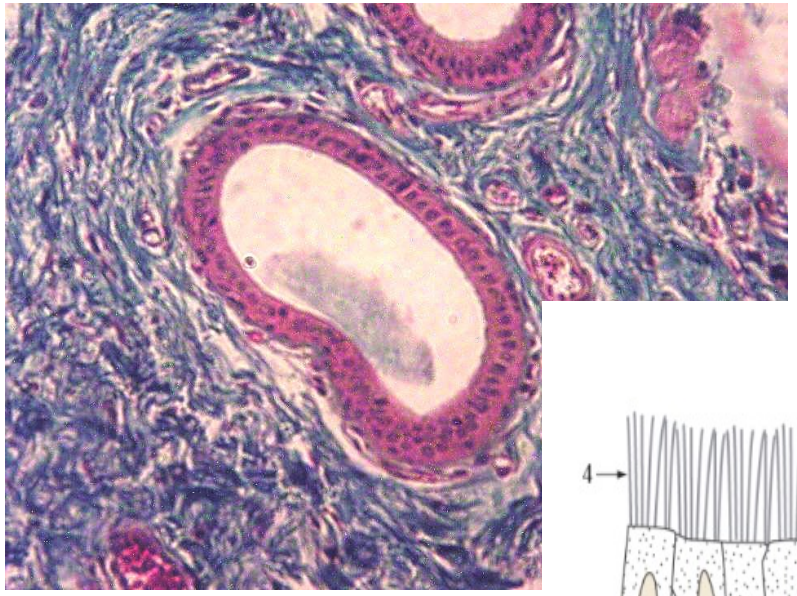
C) Microscopie électronique

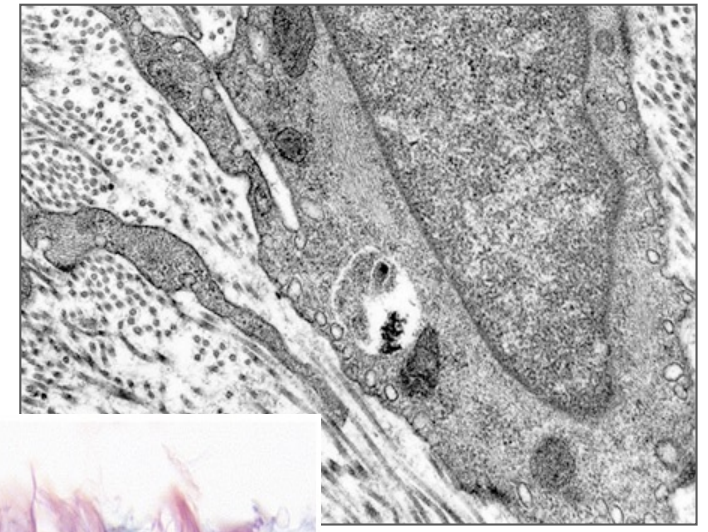
D) Microscopie en champ proche

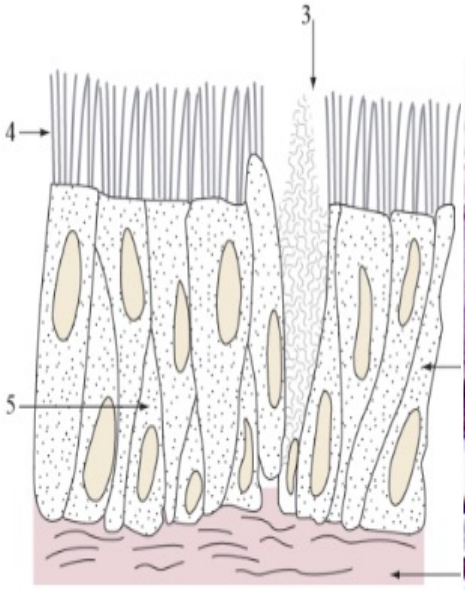
La Cellule

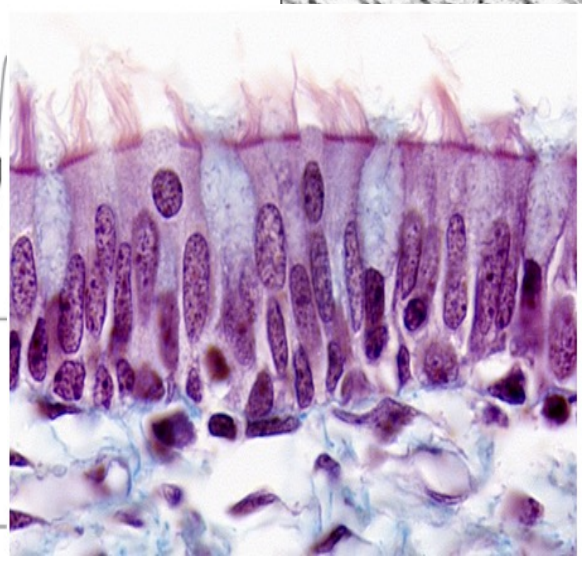
Unité Structurelle et Fonctionnelle du Vivant

« Plus petite quantité de matière vivante capable de subsister à l'état autonome et de se reproduire »



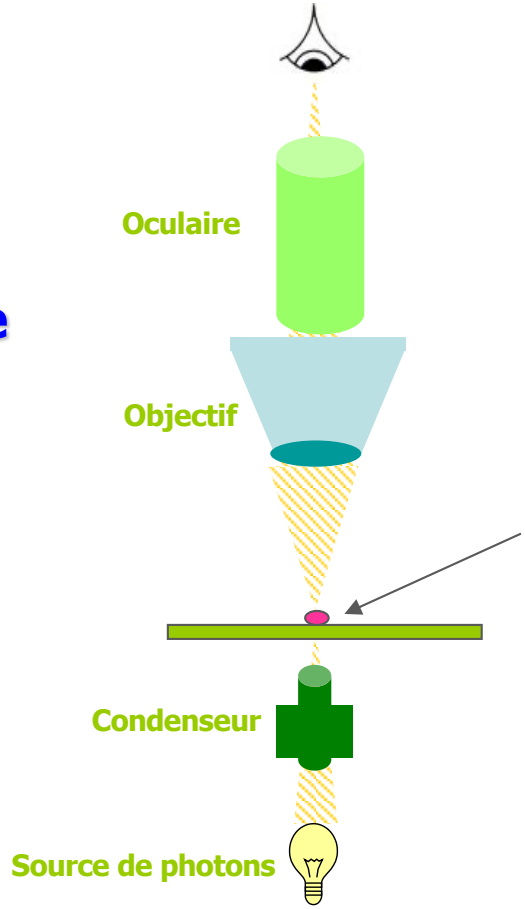




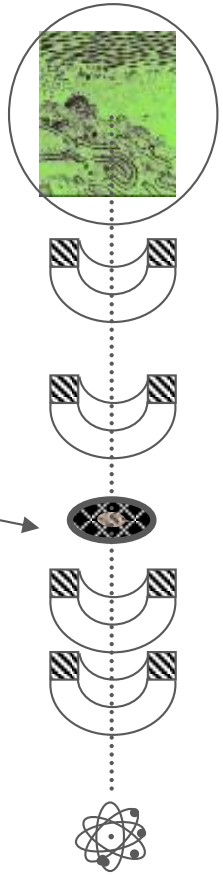


I- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

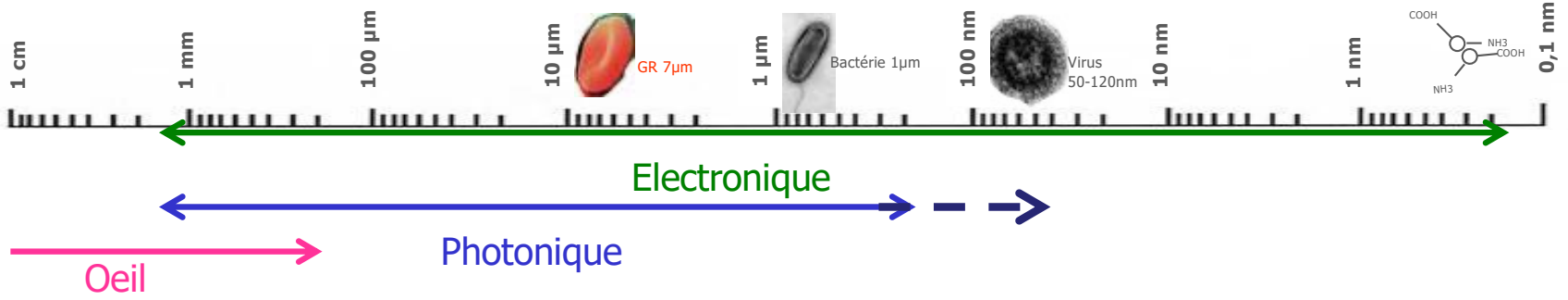
Photonique ou Optique
(lentilles de verre)



Échantillon



Electronique
(lentilles électromagnétiques)



- Grandes Etapes de l'Imagerie Cellulaire

- **Etude *in situ* des Constituants Biochimiques**

Caractérisation & Localisation

- Histochimie

(Réaction chimique / « Préparations histologiques »)

- Histoenzymologie

(Réaction enzymatique / « Préparations histologiques »).

- **Analyse Moléculaire *in situ***
  - Immunohistologie → Protéines
  - Hybridation *in situ* → Acides nucléiques
  - Autoradiographie → Macromolécules
- **Description Morphologique des Structures histologiques**
  - Techniques de MO et ME

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

Différents Types d'Echantillons Hospitaliers

- **Cellules Vivantes**
- **Prélèvements Cytologiques**
- **Prélèvements Tissulaires**

- **Cellules Vivantes (ou Cellules en culture)**

→ Culture *in vitro*

Cellules qui, dans des conditions particulières, peuvent se multiplier en-dehors d'un organisme

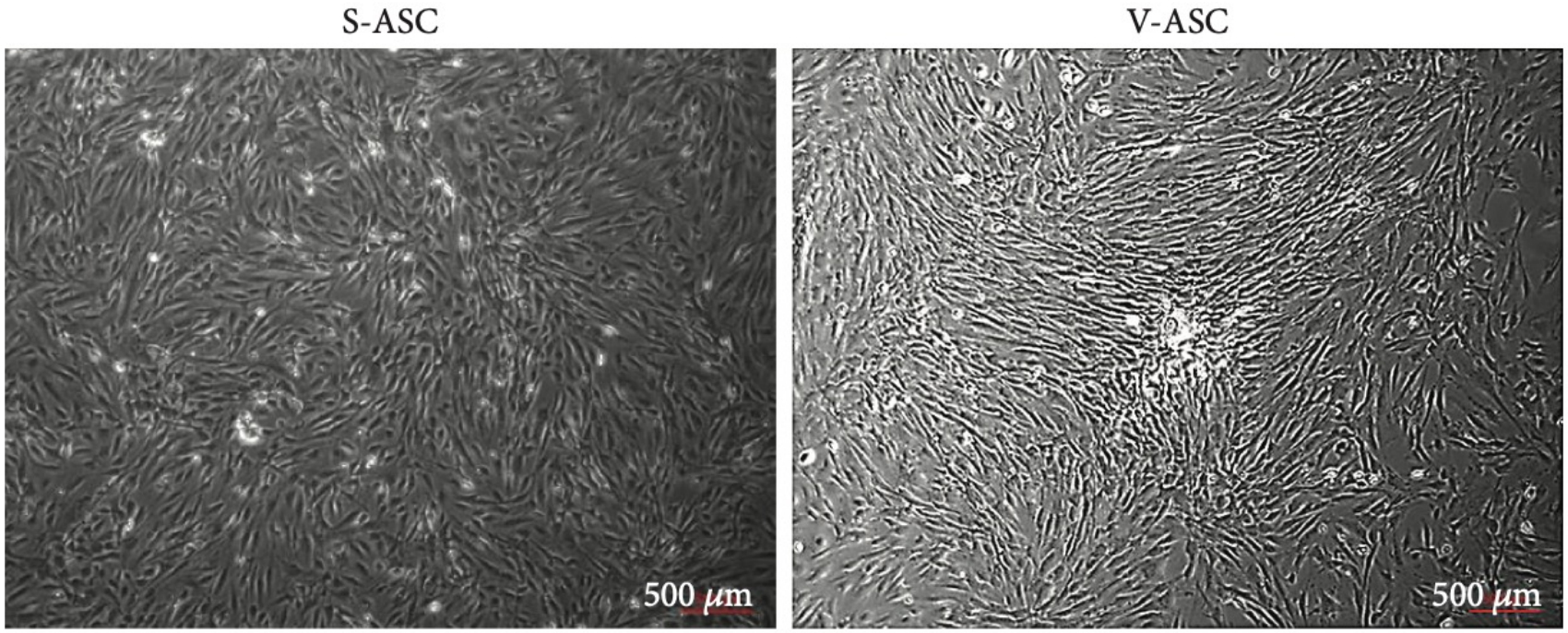
Cellules souches provenant du patient lui-même ou d'un donneur

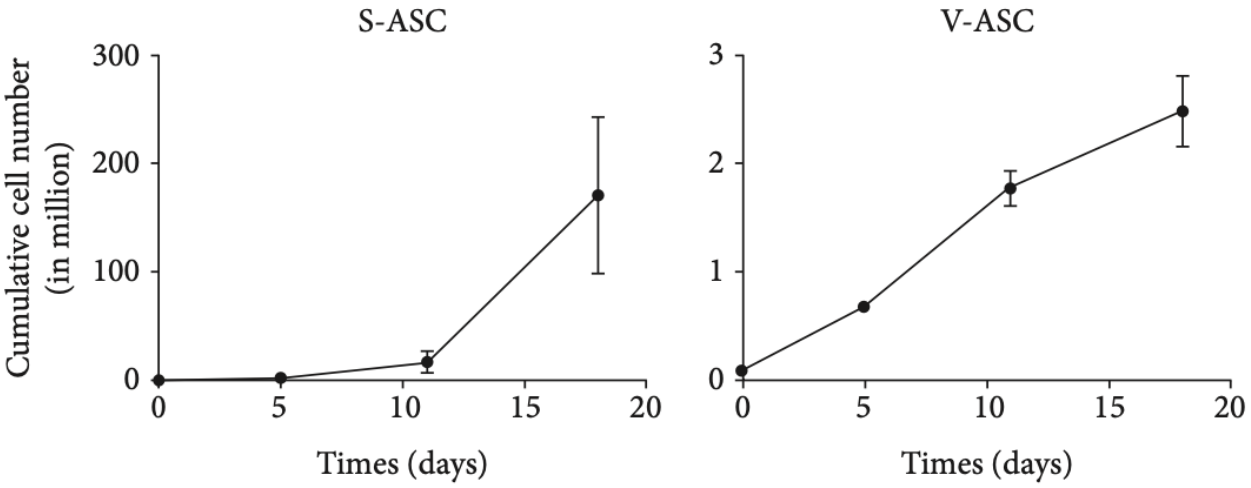
⇓

Thérapie cellulaire :

Cellules « Thérapeutiques » en culture *in vitro*.

- **Exemple cellules souches adipocytaires**





Lefevre, Panthu et al. 2019 Stem Cell International

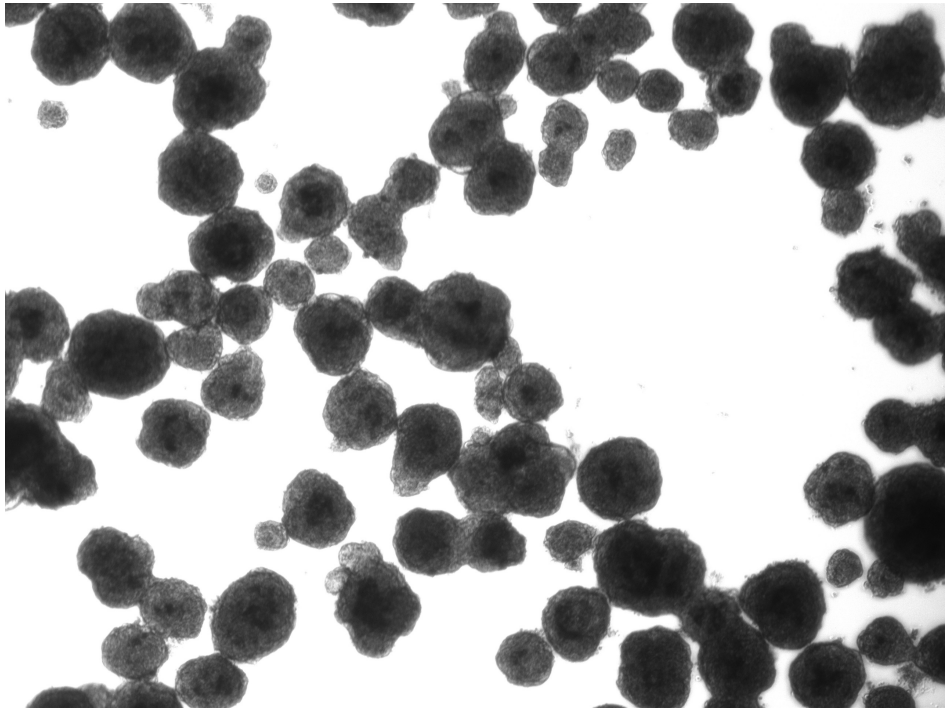
→ Culture *ex vivo*
Cellules provenant directement d'un organisme et simplement maintenues en survie

Cellules prélevées sur un patient, et maintenus en survie

↓

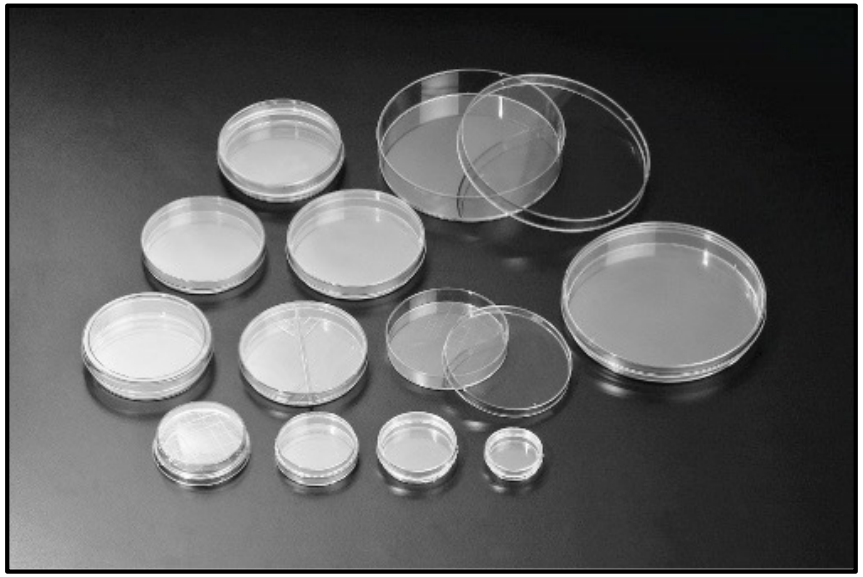
Greffe

Perrier, Panthu et al. 2022 Nutrients

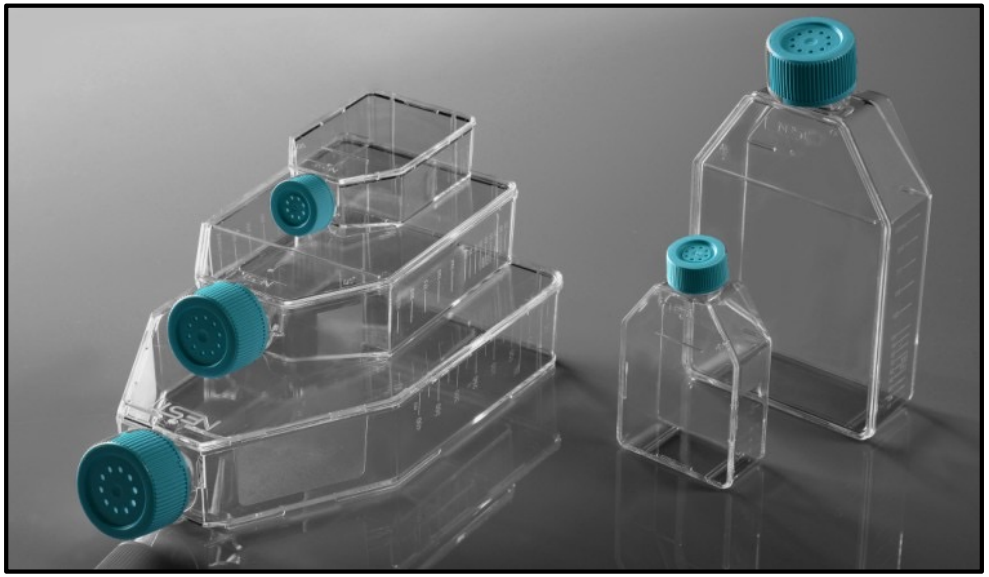


Ilots pancréatiques en culture avant greffe

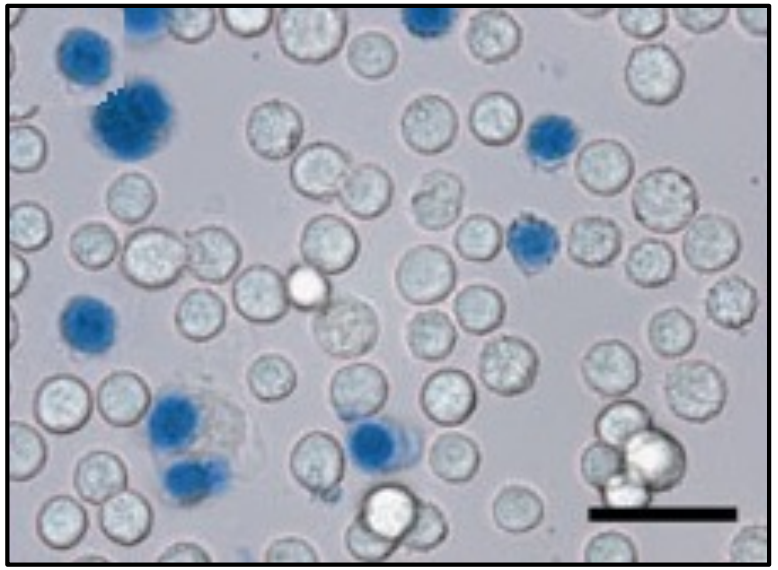
Boîtes de Pétri



Flacons de Culture







Coloration bleu Trypan

- **Prélèvements Cytologiques**

○ Prélèvements Liquides

Biologiques - Pathologiques - d'Exploration

○ Produits de Raclage, et de Brossage

e.g., Frottis cervico-vaginaux -
Brossage bronchique

⇓

Cellules isolées ou petits amas cellulaires.

Prélèvements Liquides
ou Produits de Raclage et de Brossage
⇓
Cellules en suspension recueillies
↓
Etalement sur lame
↓
Séchage à l'air,
suivi d'une coloration de routine
↓
Microscopie optique standard
directement sur lame.

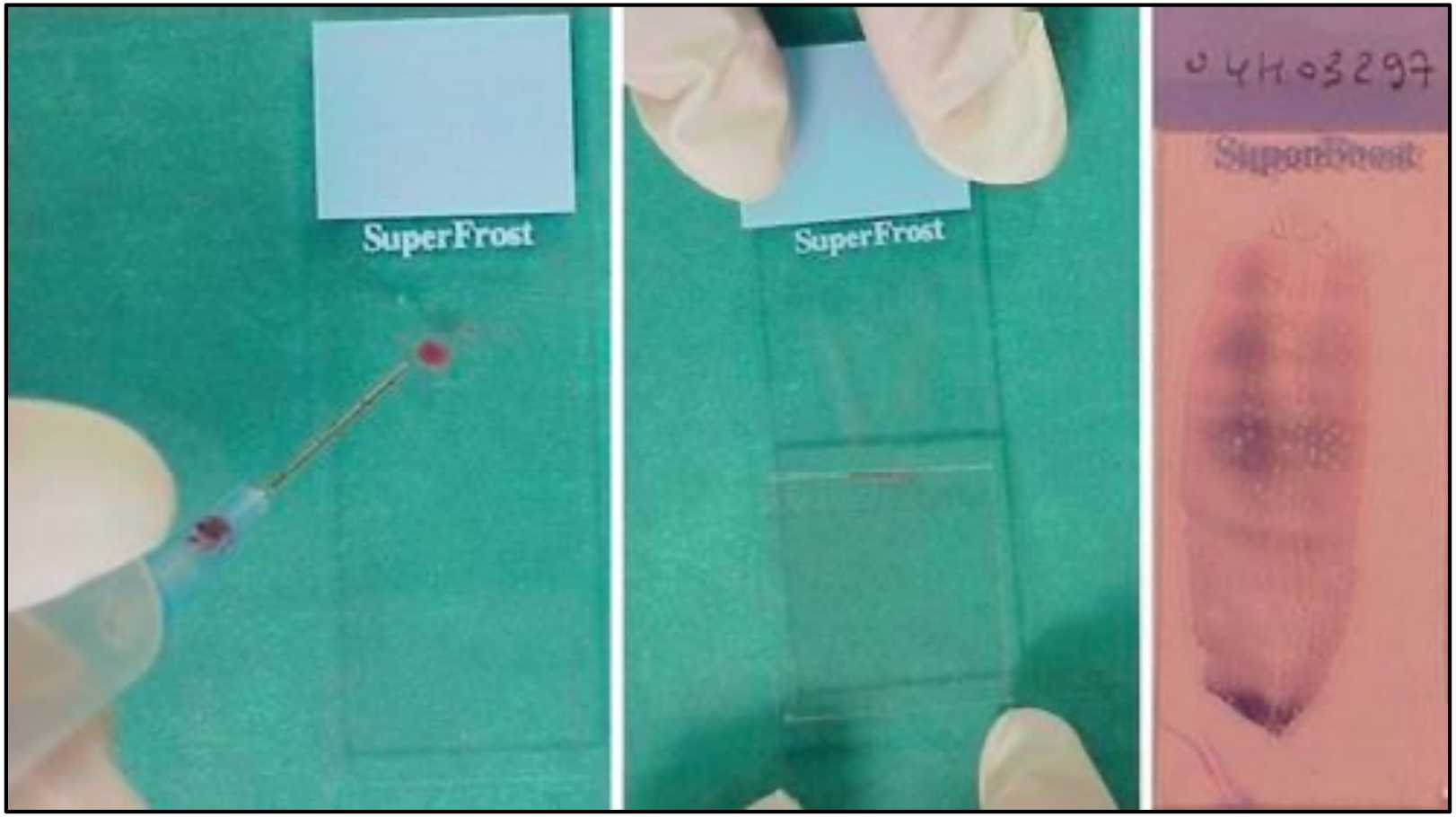


Fig. gauche : Dépôt du prélèvement liquide à l'aiguille sur une lame

Au centre : Etalement de la goutte par une lamelle

Fig. droite : Etalement cytologique après coloration.

Apposition d'un tissu sur une lame

⇓

Echantillon solide

Tranche de section - Application sur lame par pression :
« apposition » ou « empreinte »

↓

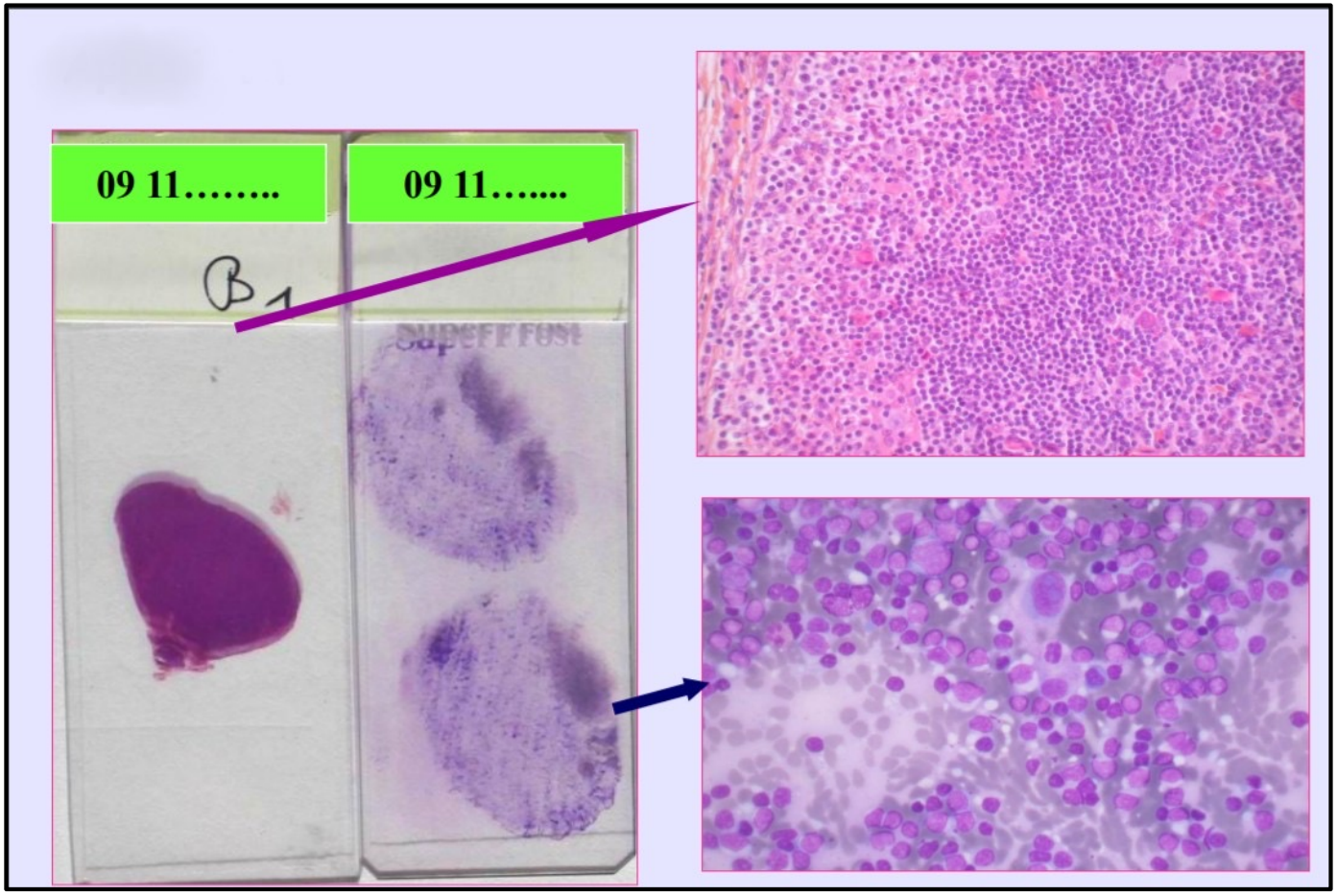
Prélèvements cytologiques
(et non tissulaires !)

↓

Séchage à l'air,
suivi d'une coloration de routine

↓

Microscopie optique standard
directement sur lame.



Comparaison
Coupe d'un fragment tissulaire
vs. Apposition d'une tranche de section tissulaire..

Prélèvements Tissulaires

PRELEVEMENT 1cm³

⇩

FIXATION Formol

⇩

⇩

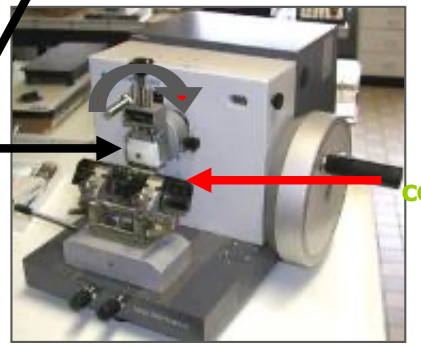
⇩

INCLUSION Paraffine



Bloc paraffine avec échantillon inclus

COUPE 3 à 10 µm





COLORATION (HES,…)





- **Prélèvements Tissulaires**

○ Biopsie

⇓

* par (cyto)ponction (aiguille)

* par endoscopie

* par biopsie chirurgicale (extemporané)

○ Pièce opératoire (après chirurgie)

○ Autopsie judiciaire - Autopsie médicale

I- C) Préparation des échantillons



Prélèvement - Enregistrement

Numéro d'identification unique (prélèvements, blocs et lames)

⇓

Identité du patient - Nature/lieu/date du prélèvement -

Circonstances cliniques -

Aspect macroscopique ou endoscopique des lésions -

Antécédents du patient

I- C) Préparation des échantillons



Prélèvement - Examen macroscopique

Echantillonnage - Mesure - Poids - Photographies.

- Fixation en Microscopie Optique

- Formol
(solution aqueuse de formaldéhyde)

- Ethanol ; Méthanol

- Acide acétique + Méthanol

- Mélanges à base de Formol :
Formol + Acide picrique
→ **Liquide de Bouin**.

- Glutaraldehyde

- Osmium (Acide osmique, tétroxyde d'osmium OsO_4)

- Mélange Glutaraldehyde/Osmium/Formol

• Fonctions des Fixateurs

* Immobilisation et conservation des structures histologiques

Précipitation des protéines → Image à l'instant t

* Prévention de l'autolyse cellulaire et du développement bactérien

→ Empêcher la dégradation du prélèvement (Evénements post-mortem)

• Conditions de Fixation

* Fixation rapide du tissu
→ Délai post mortem !

* Fixation par immersion : Morceaux d'organes de petit volume, sont immergés dans un très grand volume de fixateur

* Temps de fixation : Fonction de la taille de la pièce

- Inclusion/Congélation/Enrobage

- Donner une consistance assez ferme au tissu pour la réalisation de coupes « peu épaisses » et régulières

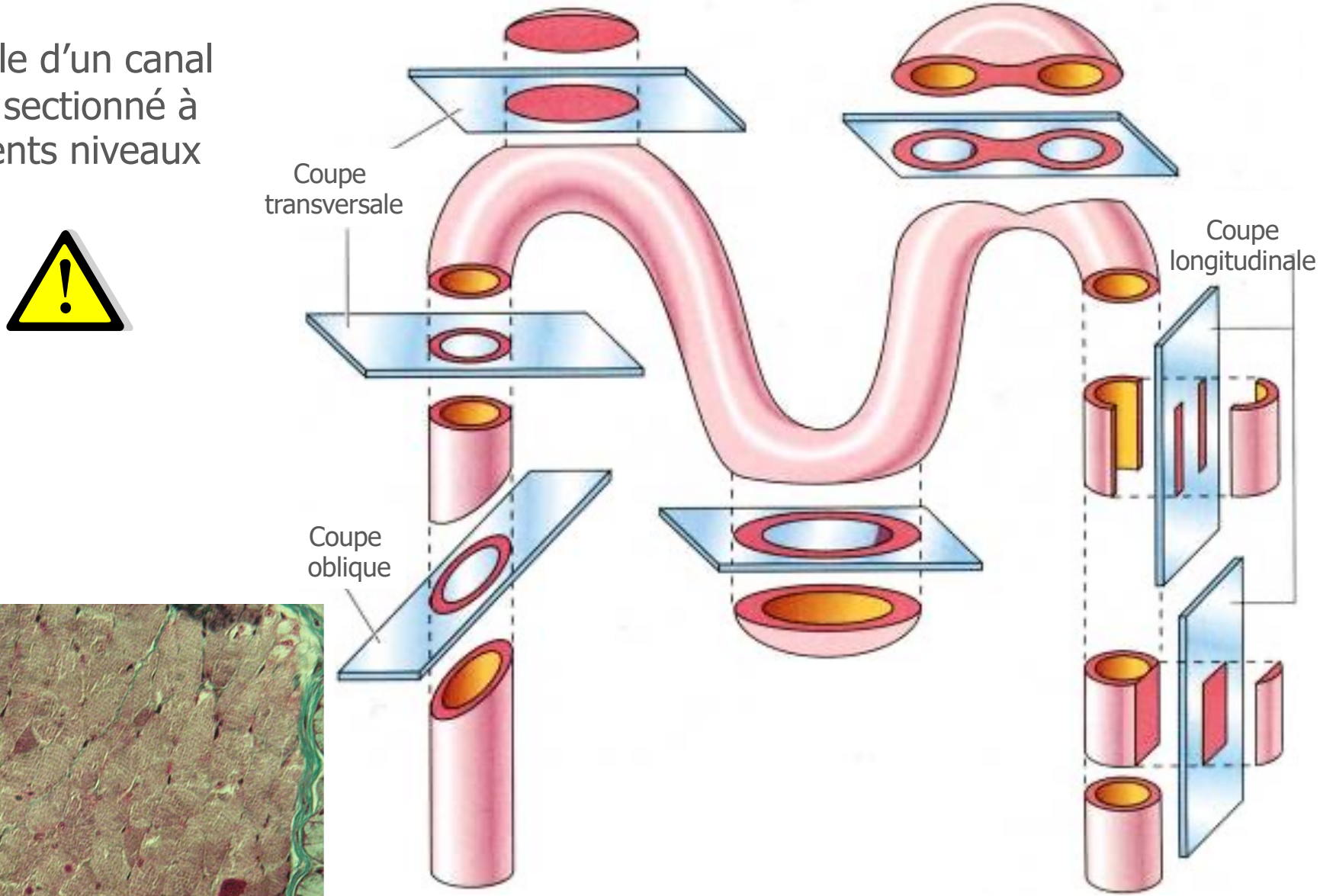
- Biobanque (tumorothèque, histothèque)

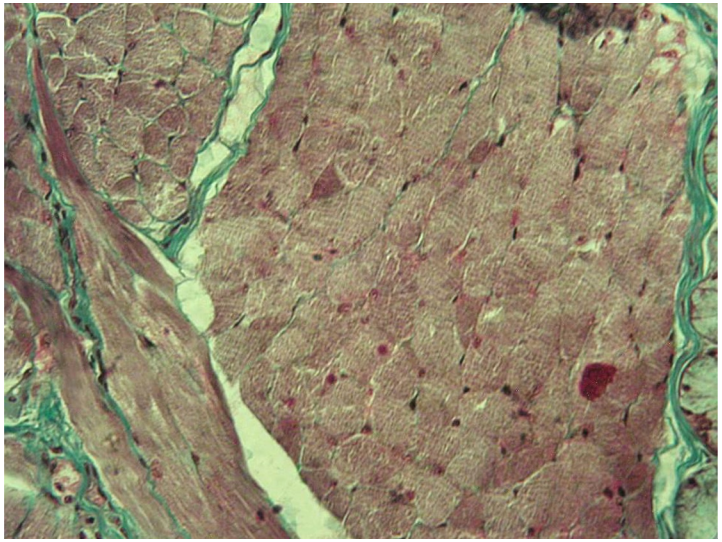
Coupes

- Coupe en Paraffine
- Coupe en Résine
- Coupe en Congélation
- Coupe au Vibratome.

Incidences de coupes

Exemple d'un canal creux sectionné à différents niveaux





Coupe en Paraffine

Technique de Référence pour la morphologie

Microscopie optique

- **Etapes d'Inclusion**

  - Déshydratation par passage dans des bains d'alcool de degré croissant

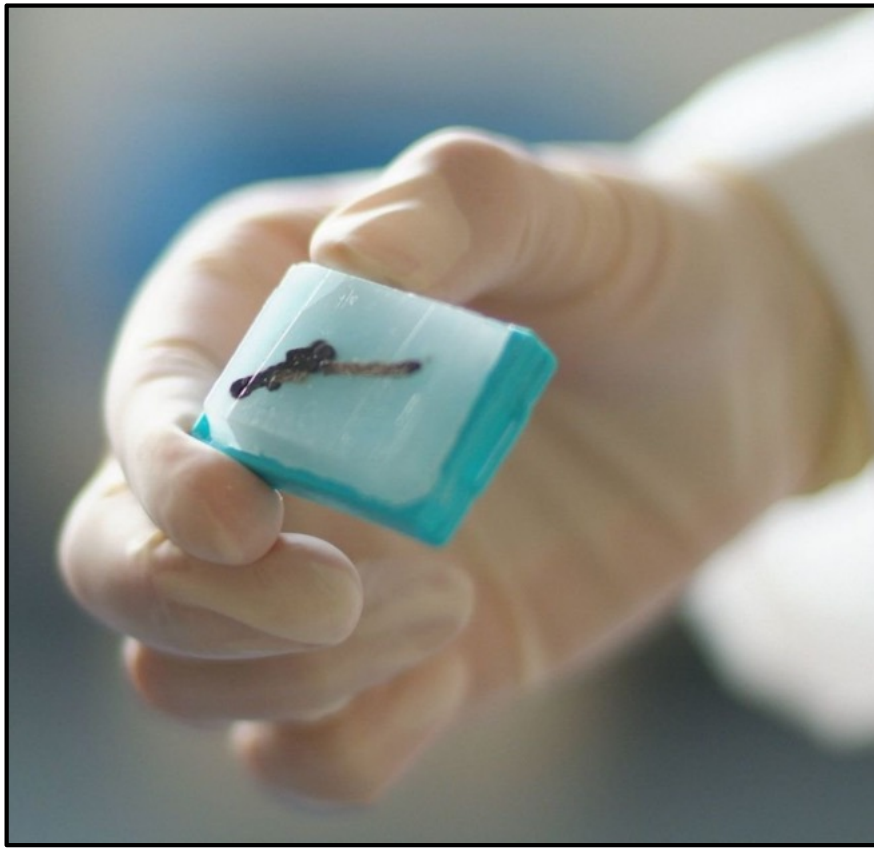
(70%, 90% et 100%)

  - Puis de Toluène

(Solvant milieu d'inclusion)

  - Puis milieu d'inclusion

Paraffine ou Paraplast
50-60°C

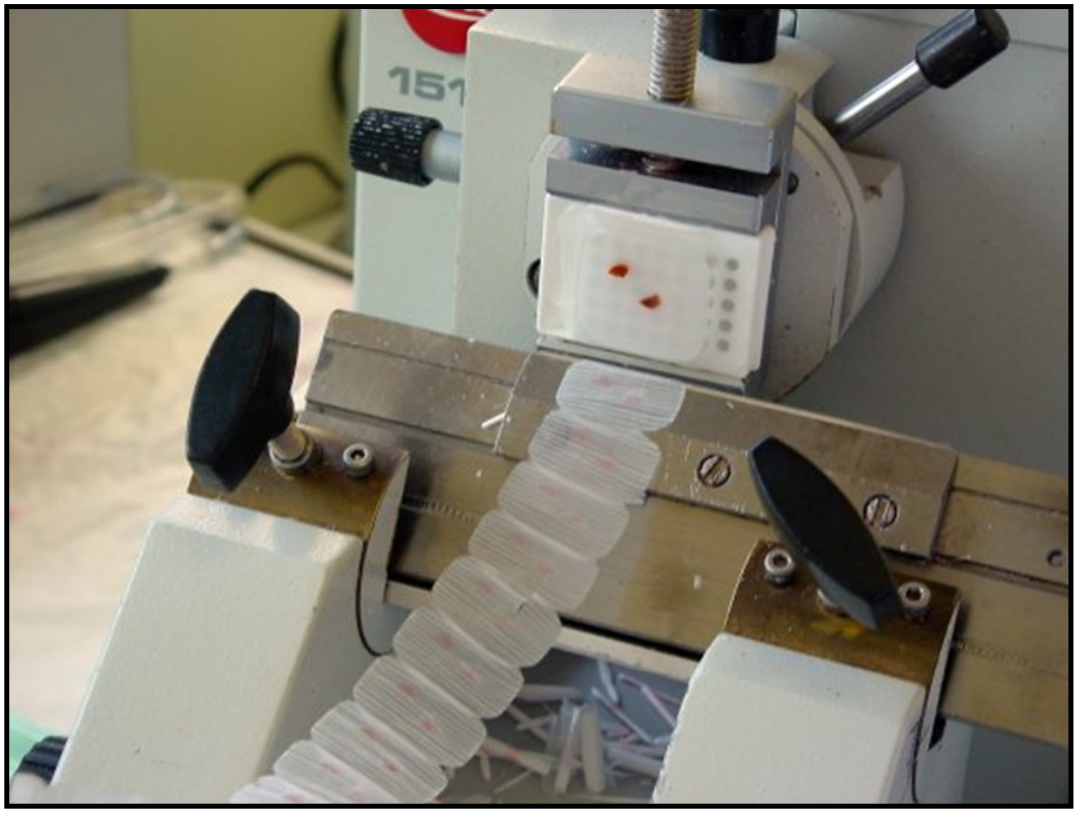


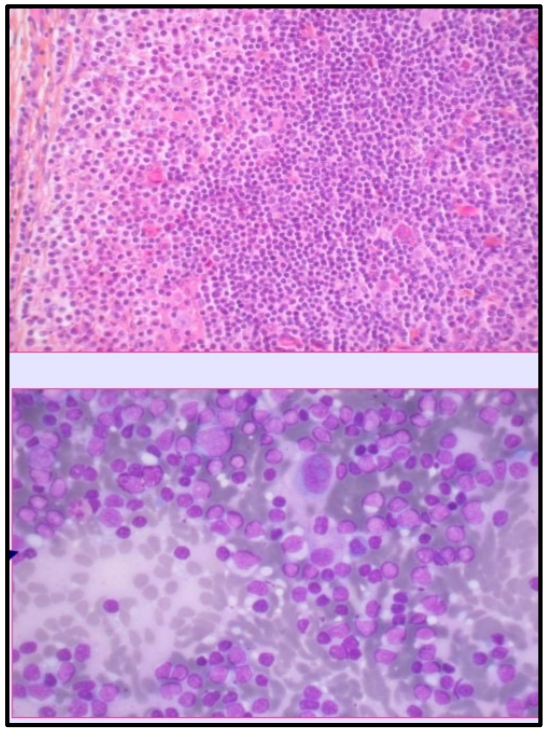
  - Après refroidissement

→ Bloc solide → Coupes en paraffine.

• Coupe en Paraffine

Bloc de Paraffine :
Microtome rotatif
à avance mécanique
⇓
Coupes de 3-5 μm (peu épaisses),
déposées sur
des lames de verre pré-gélatinées.

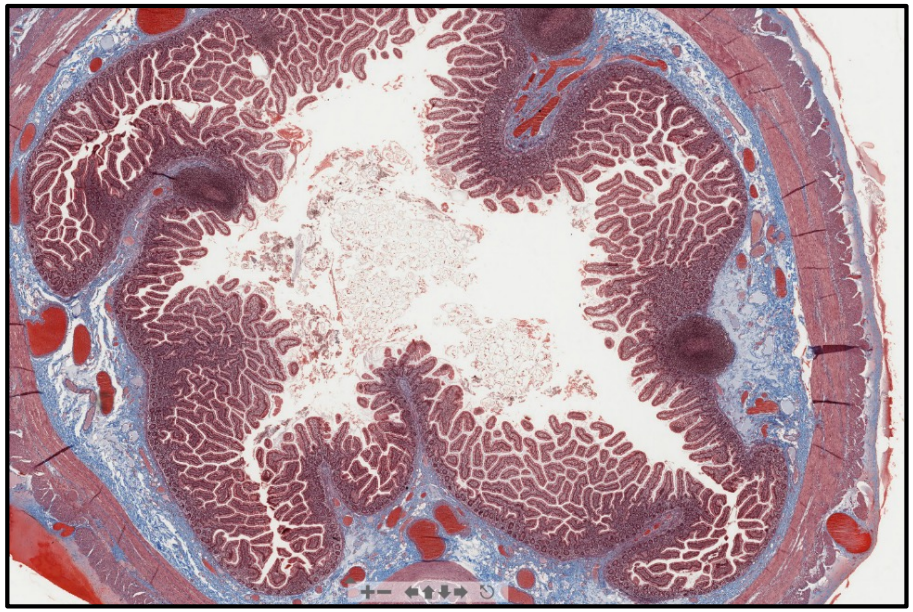


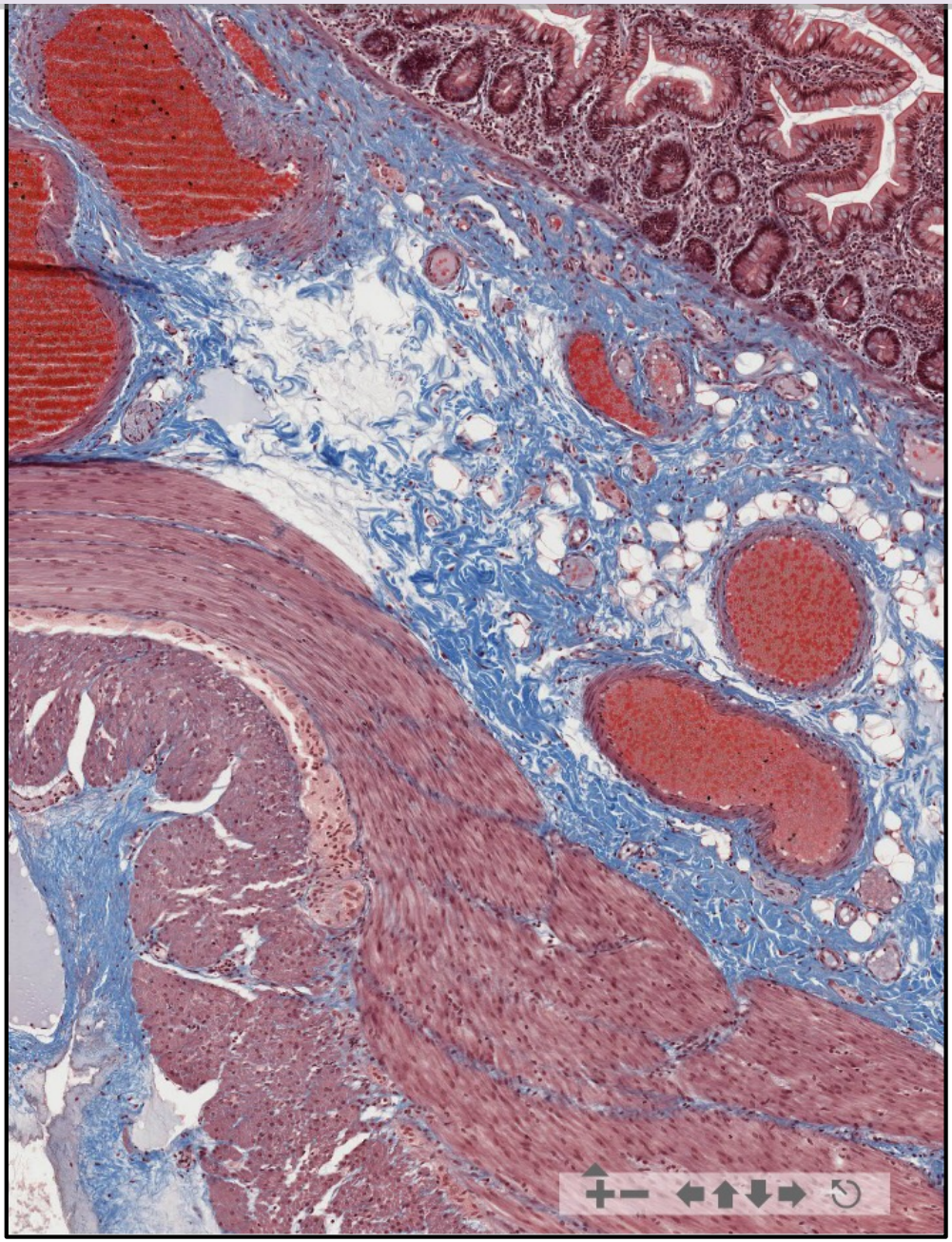


Couteau en acier, ou lames jetables

→ Ruban de coupes (régulières)

I- C) Préparation des échantillons





Coupe en Paraffine - Iléon

Trichrome de Masson.



Biobanque - Conservation des blocs en Paraffine

A disposition des pathologistes.



Tumorothèque

Conservation des échantillons 30 ans.

Coupe en Résine

Technique de Référence pour la morphologie

Microscopie(s) optique et électronique.

• Etapes d'Inclusion

- Déshydratation par passage dans des bains d'alcool de degré croissant (70%, 90% et 100%)

- Puis d'Oxyde de Propylène (Solvant milieu d'inclusion)

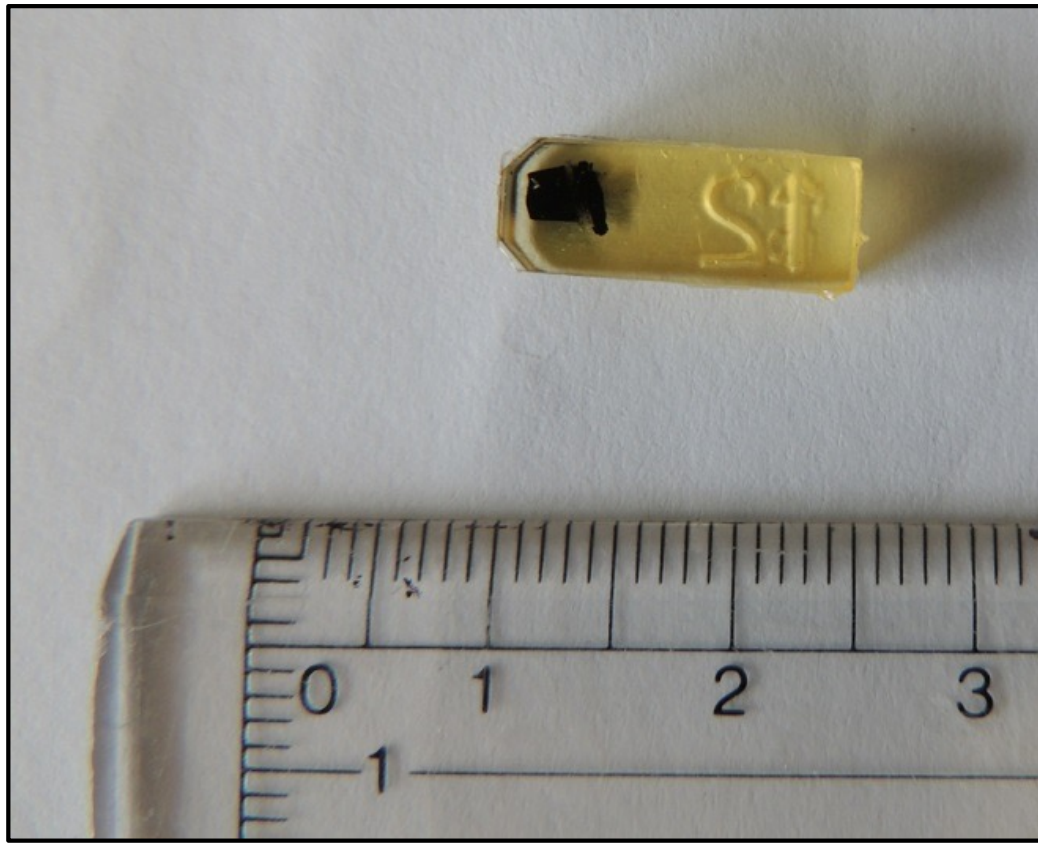
- Puis milieu d'inclusion

Résine Epoxy, Araldite ou Epon - 60°C

- Bloc solide

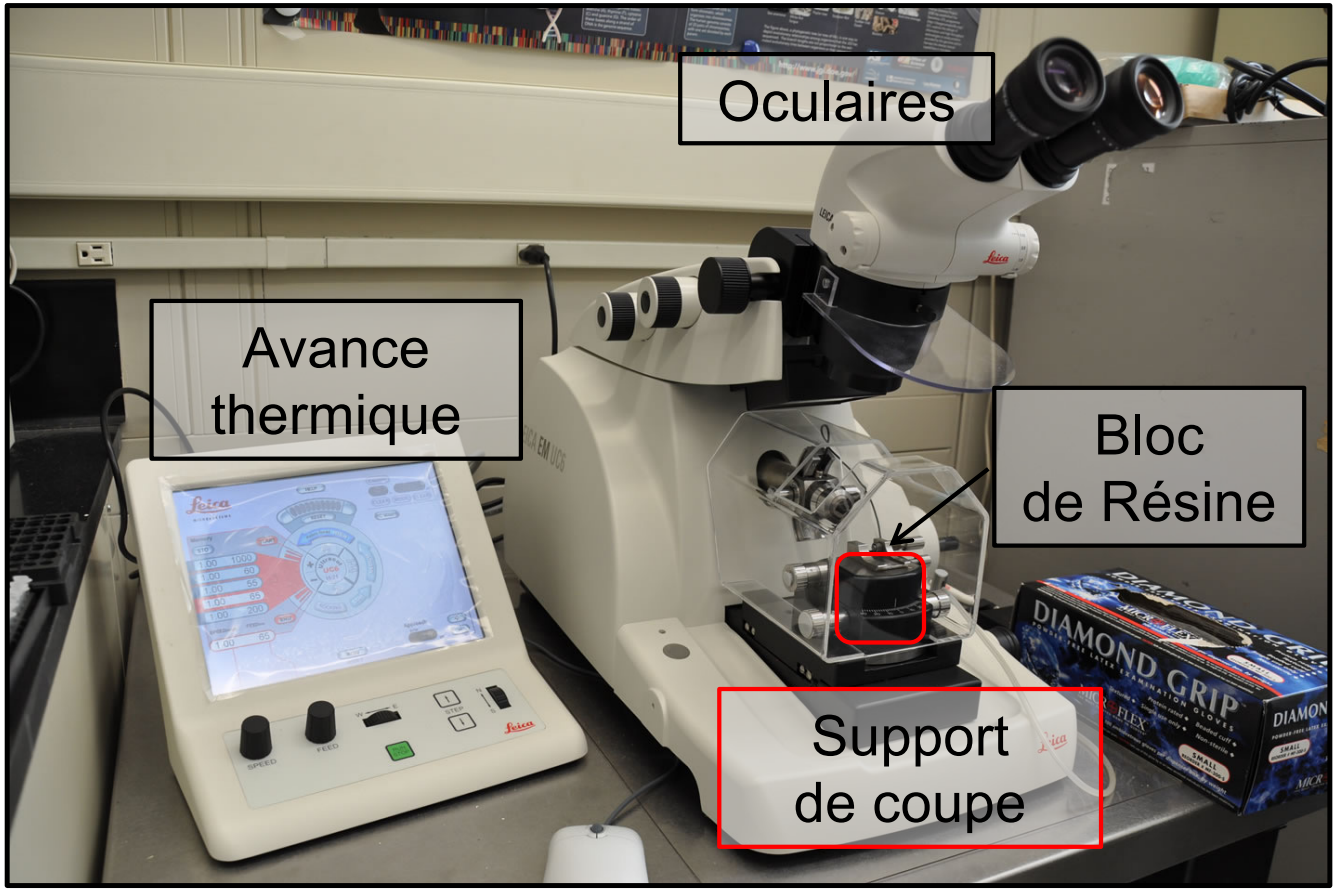
→ Coupes semi-fines en MO

→ Coupes (ultra)fines en ME.

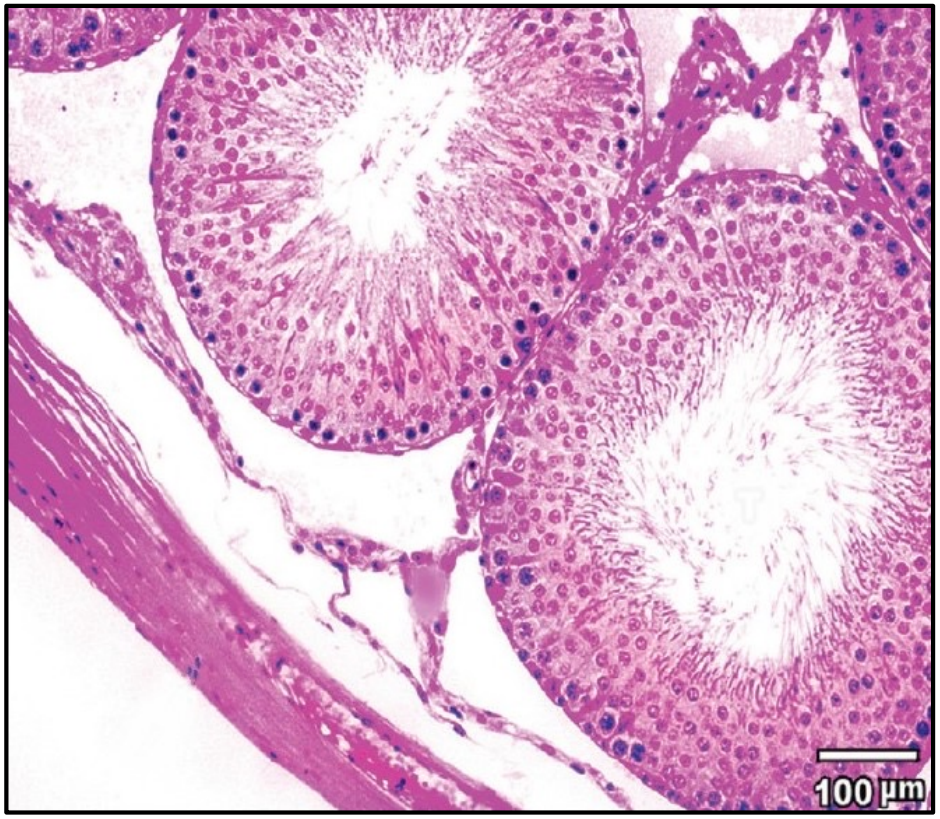


• Coupe en Résine

Coupes semi-fines de 1 µm,
déposées sur des lames de verre pré-gélatinées.

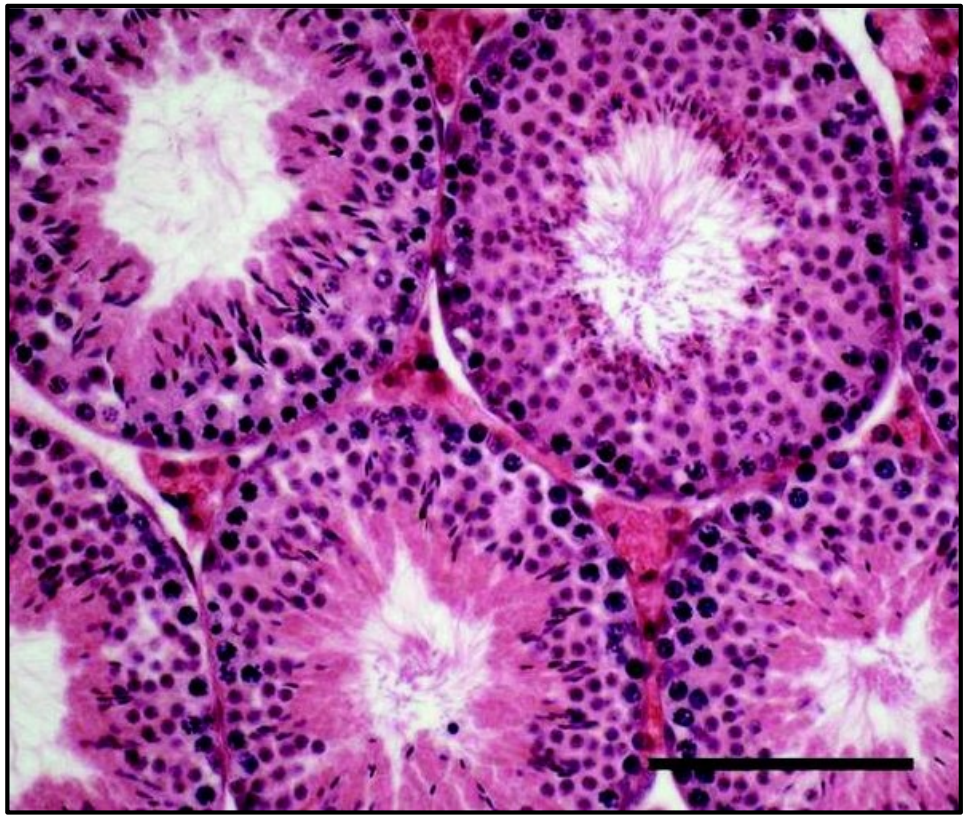


Ultramicrotome.



Coupe en Paraffine - Testicule

Coloration HE



Coupe en Résine - Testicule

Coloration HE

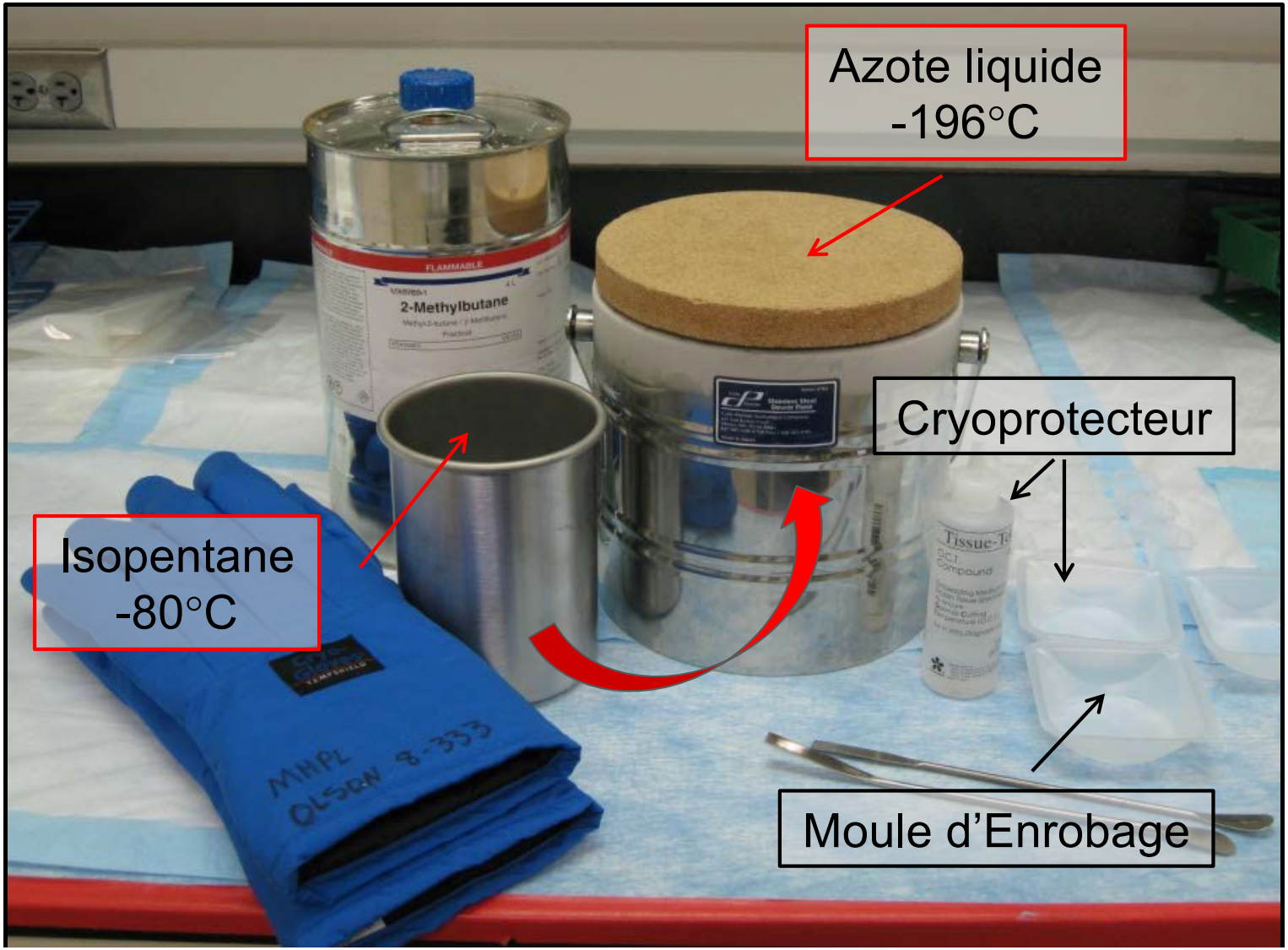
Coupe en Congélation

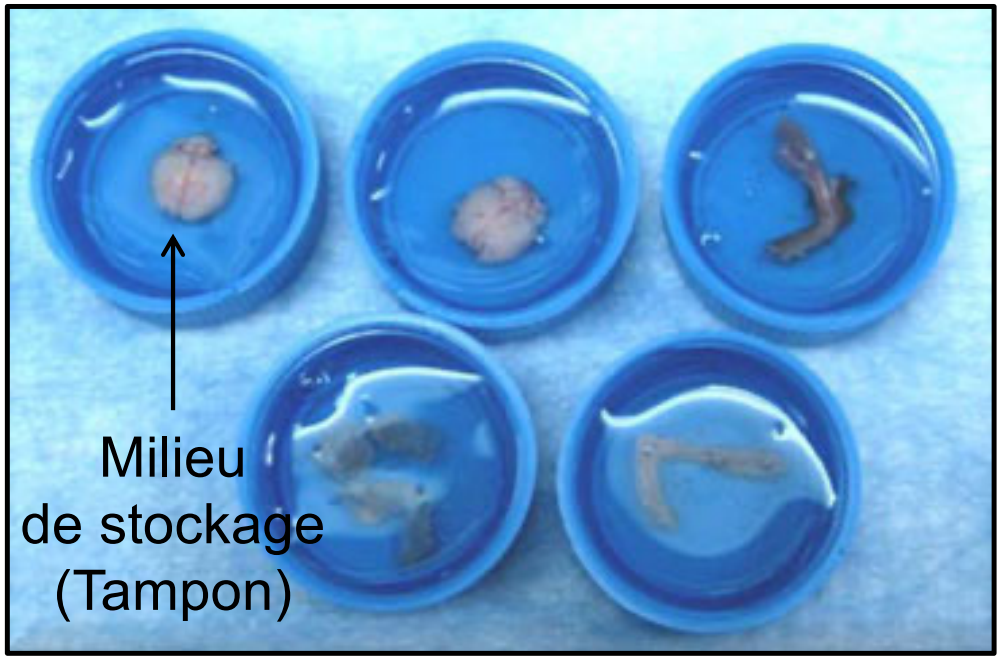
Technique de référence pour une meilleure préservation
des propriétés antigéniques des protéines,
et de de la conservation des lipides

Au détriment de la Morphologie !

Microscopie optique

• Etapes de Congélation



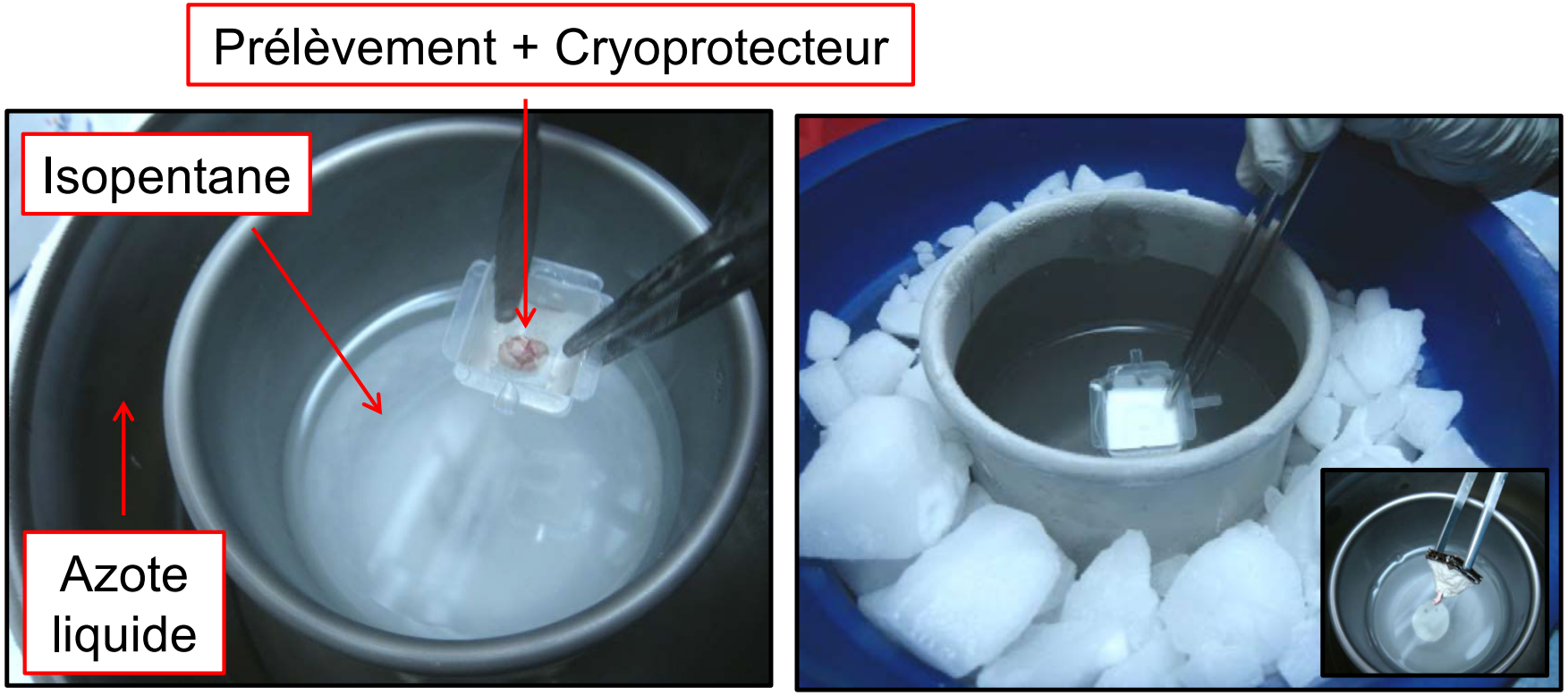




Protection du prélèvement avant congélation

Enrobage par le cryoprotecteur

[glycols et résines].

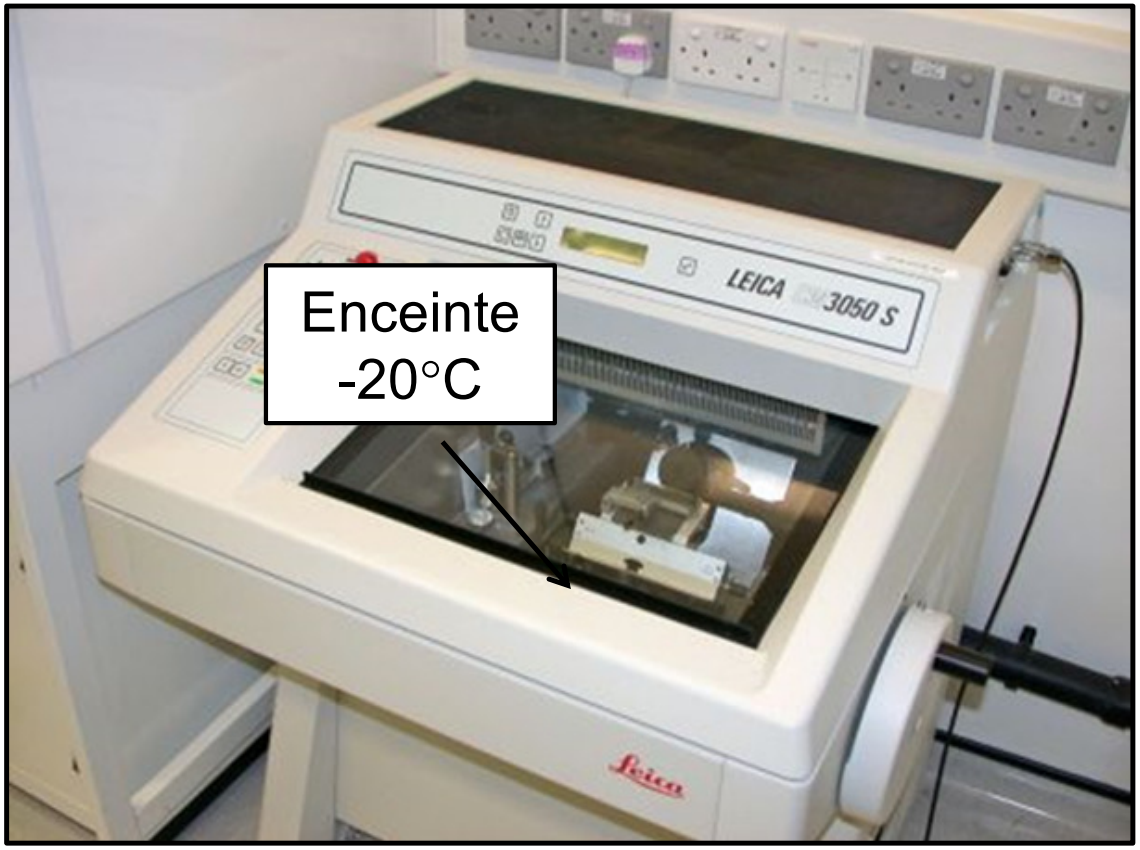


Congélation du prélèvement

Conservation des blocs - 80°C ou sur support de coupe.

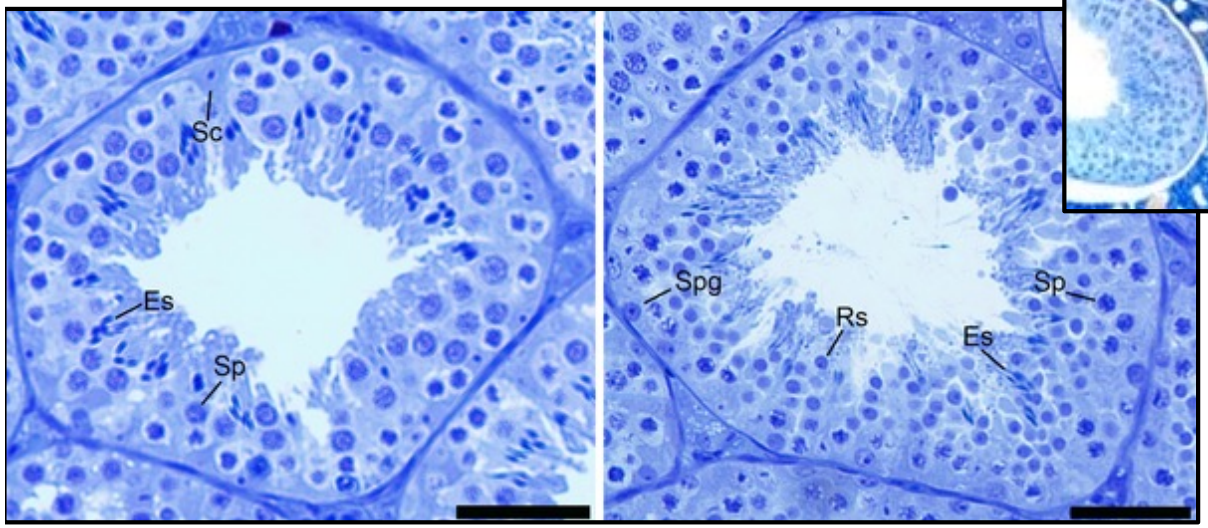
• Coupe en Congélation

Prélèvement congelé sur support :
Microtome (cryostat) réfrigéré,
à avance mécanique
⇓
Coupes de 20 µm (« épaisses »),
déposées sur des
lames de verre pré-gélatinées.



Cryostat rotatif en enceinte réfrigérée.

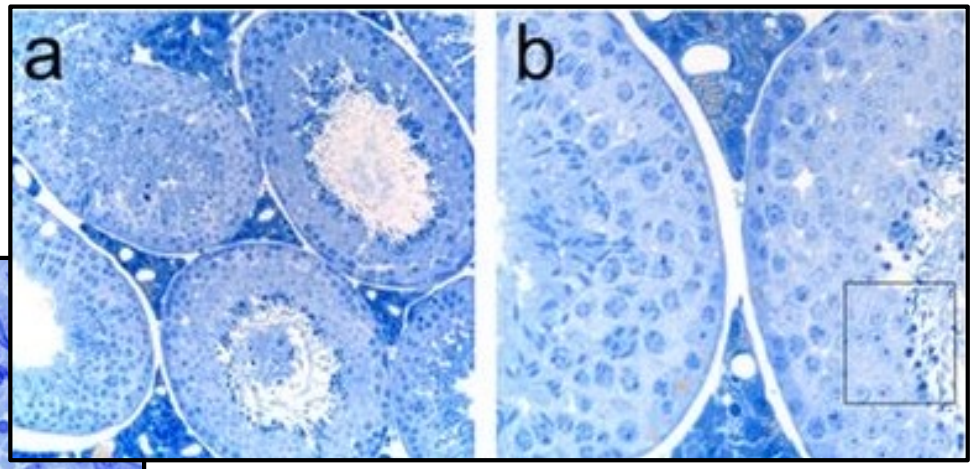
I- C) Préparation des échantillons



Coupe en Résine - Testicule

Bleu de Toluidine

[Sc, Cellule de Sertoli ; Spg, spermatogonie ; Sp, spermatocyte ; Es, spermatide allongée ; Rs, spermatide ronde].



Coupes en Congélation - Testicule

Bleu de Toluidine.



Conservation d'échantillons -80° C → Analyses omiques

Coupe au Vibratome

Technique de Référence pour une meilleure préservation
des propriétés antigéniques, des protéines,
et de de la conservation des lipides

Au détriment de la Morphologie !

Microscopies optique et électronique

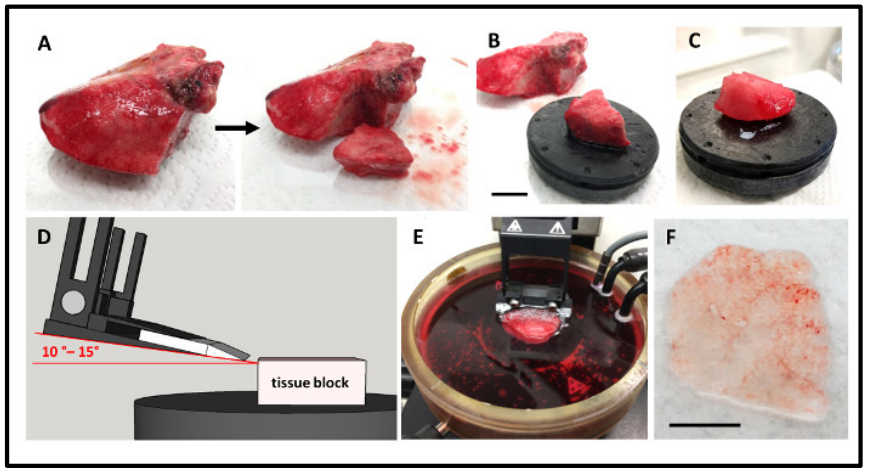
Technique de référence pour l'observation
de tissus complexes
⇓
criblage systématique

• Coupe au Vibratome

Prélèvement collé sur support : Microtome à lame vibrante
à avance automatique
⇓
Coupes « épaisses » (50-500 µm)
et maintenues en solution.

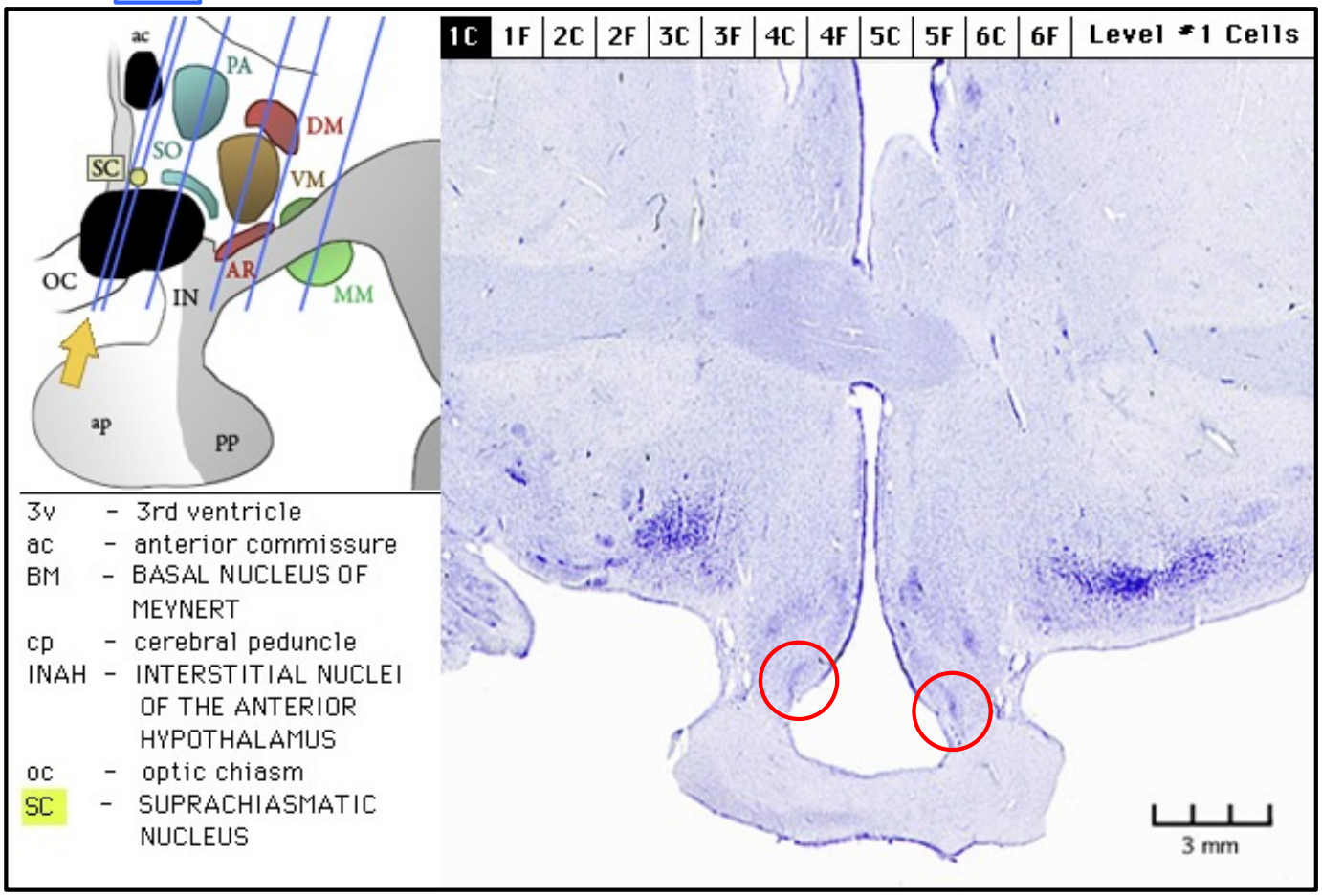


Vibratome = marque déposée



Poumon -
Prélèvement (A)
est fragmenté (B),
puis collé sur support (C).

I- C) Préparation des échantillons

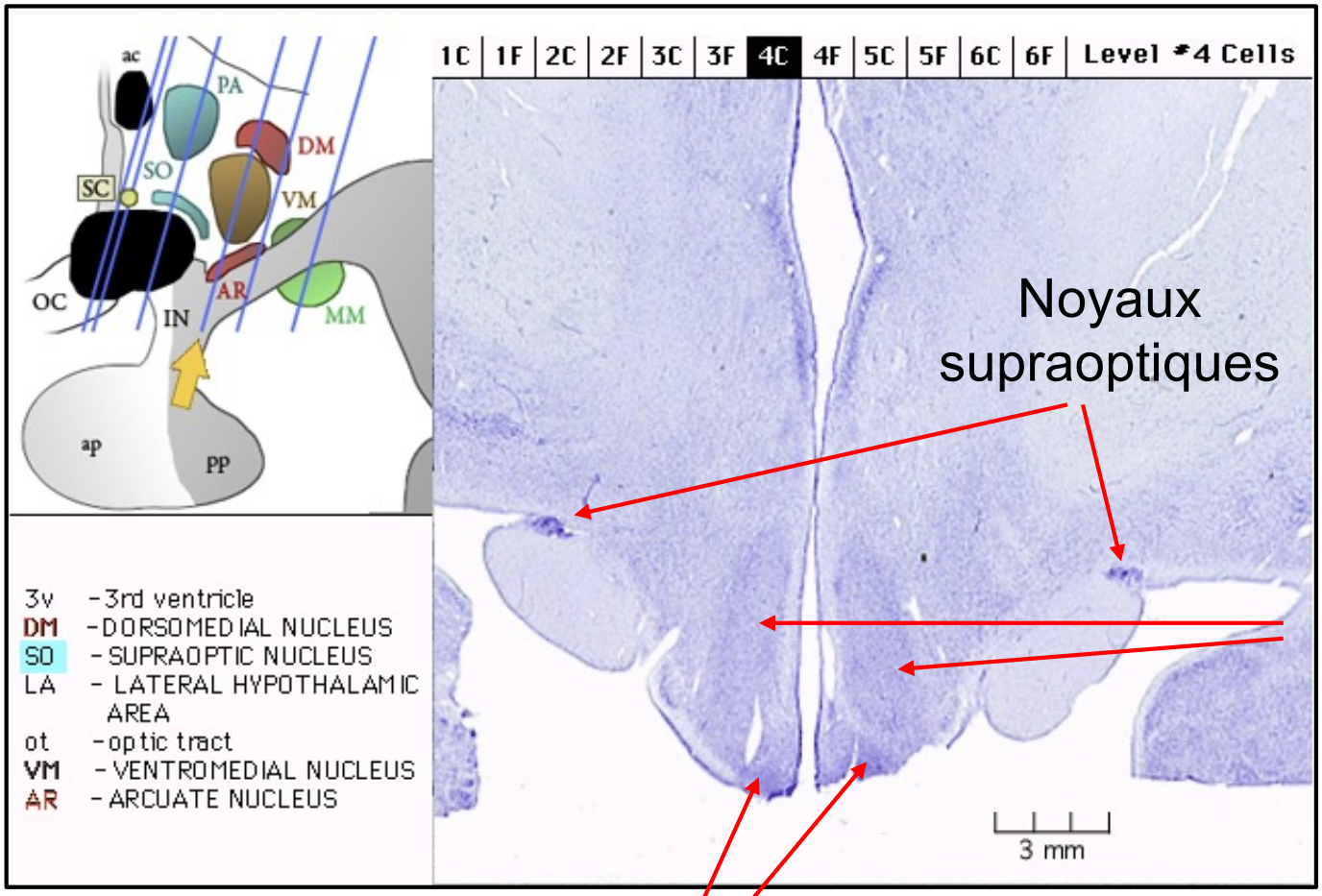


Coupe coronale
à travers
la partie antérieure
de l'hypothalamus
coupant la
commissure antérieure
et le chiasma optique.

Coloration Bleu de Méthylène

Mise en évidence des noyaux suprachiasmatiques (◯)

I- C) Préparation des échantillons



Noyaux supraoptiques

Noyaux ventro-médians

Noyaux arqués (infundibulaires)

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

Principe de la Coloration

Augmenter les « contrastes »

⇓

Mise en évidence des différents composants cellulaires et tissulaires en MO.

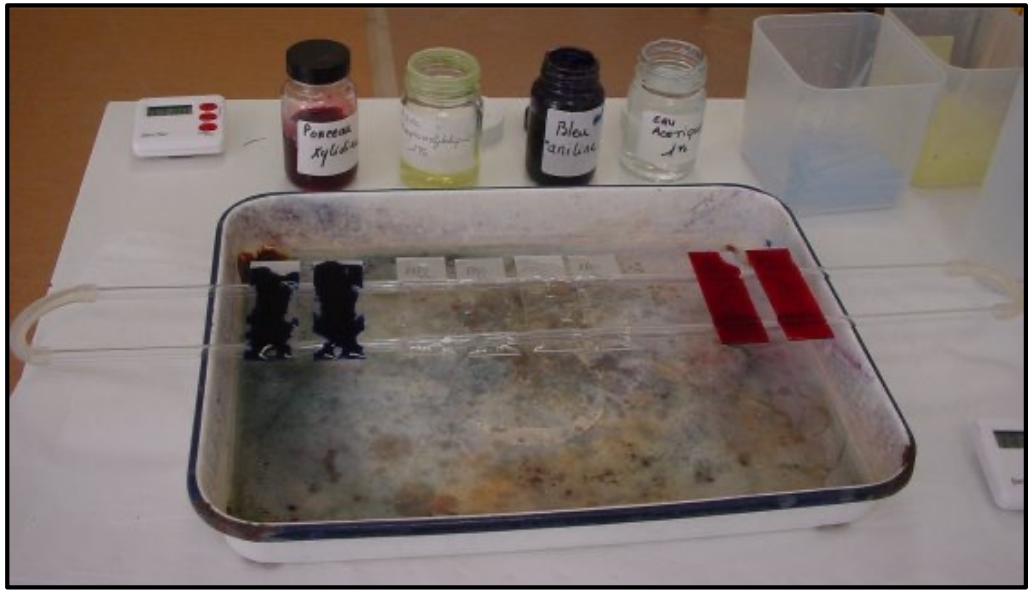
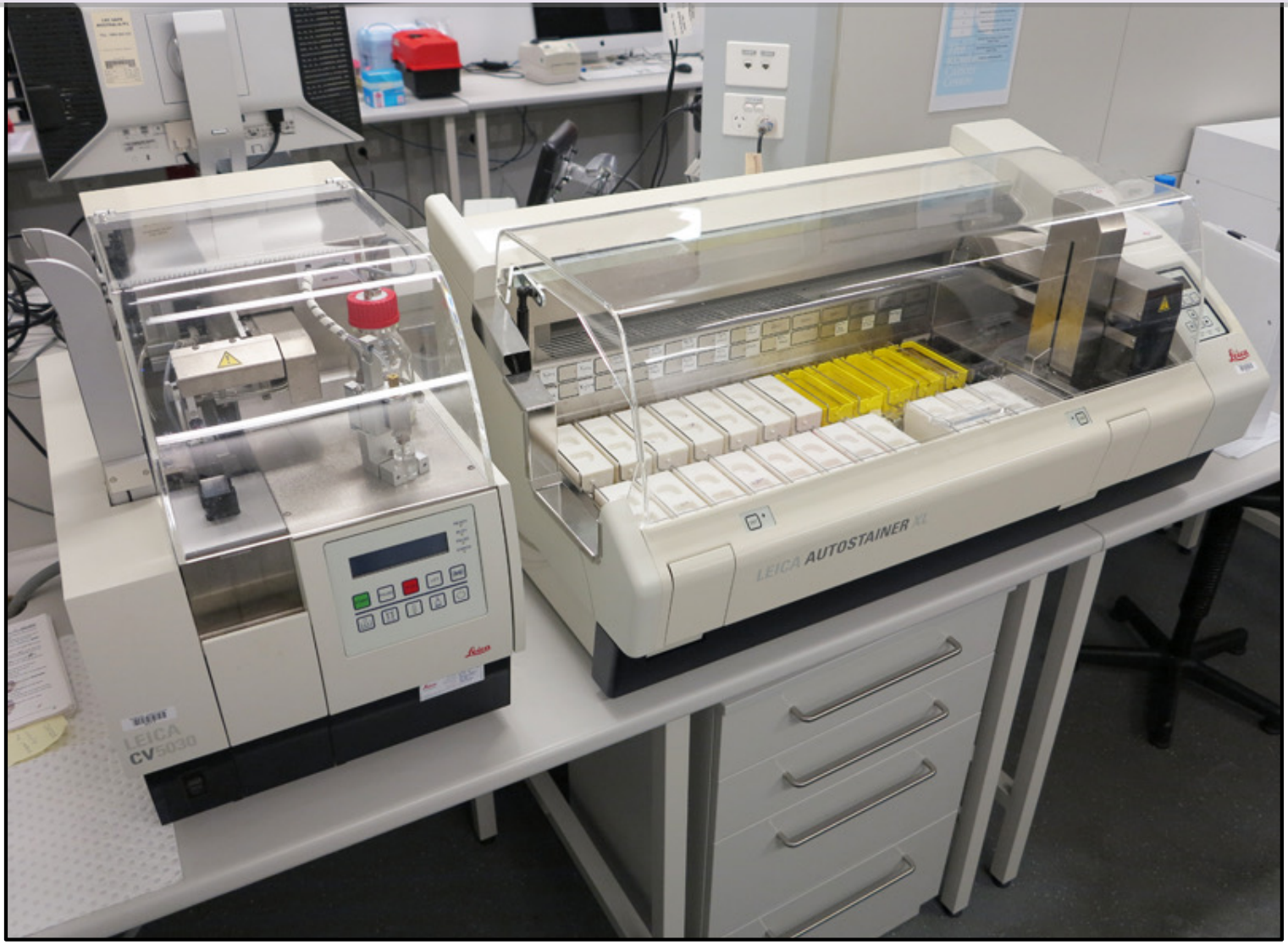




Fig. gauche - Coloration individuelle des coupes
Fig. droite - Coloration en bacs de coloration dans un automate.

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques



Automate de coloration.

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

II. A) Colorations standards

Produit capable de **teindre** une substance d'une manière durable

Propriétés:

→ Groupement qui lui confère la **couleur** : groupement **chromophore**

→ Groupement permettant une fixation permanente sur la substance: groupement **auxochrome**

Colorants acides

Ex: éosine

Se fixe aux molécules basiques
→ ***Protéines***

Colore les cytoplasmes en rose

Colorants basiques

Ex: hématoxyline

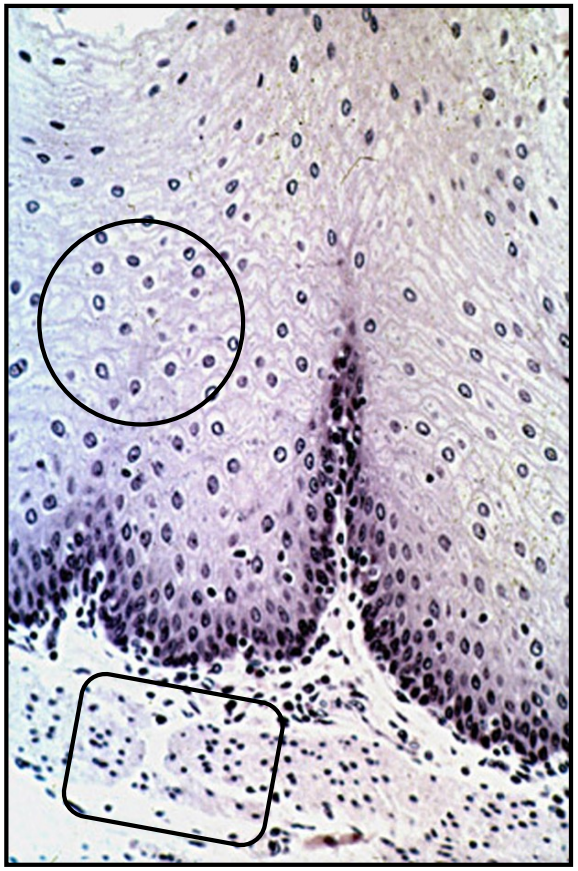
Se fixe aux molécules acides
→ ***Acides nucléiques***

→ ***Colore les noyaux en bleu***

II. A) Colorations standards

Coloration générale: la plus utilisée = HES

- → hématoxyline ⟶ **noyau**
- → éosine ⟶ **cytoplasme**
- → +/- safran ⟶ **matrice extracellulaire/collagène**



Coloration H

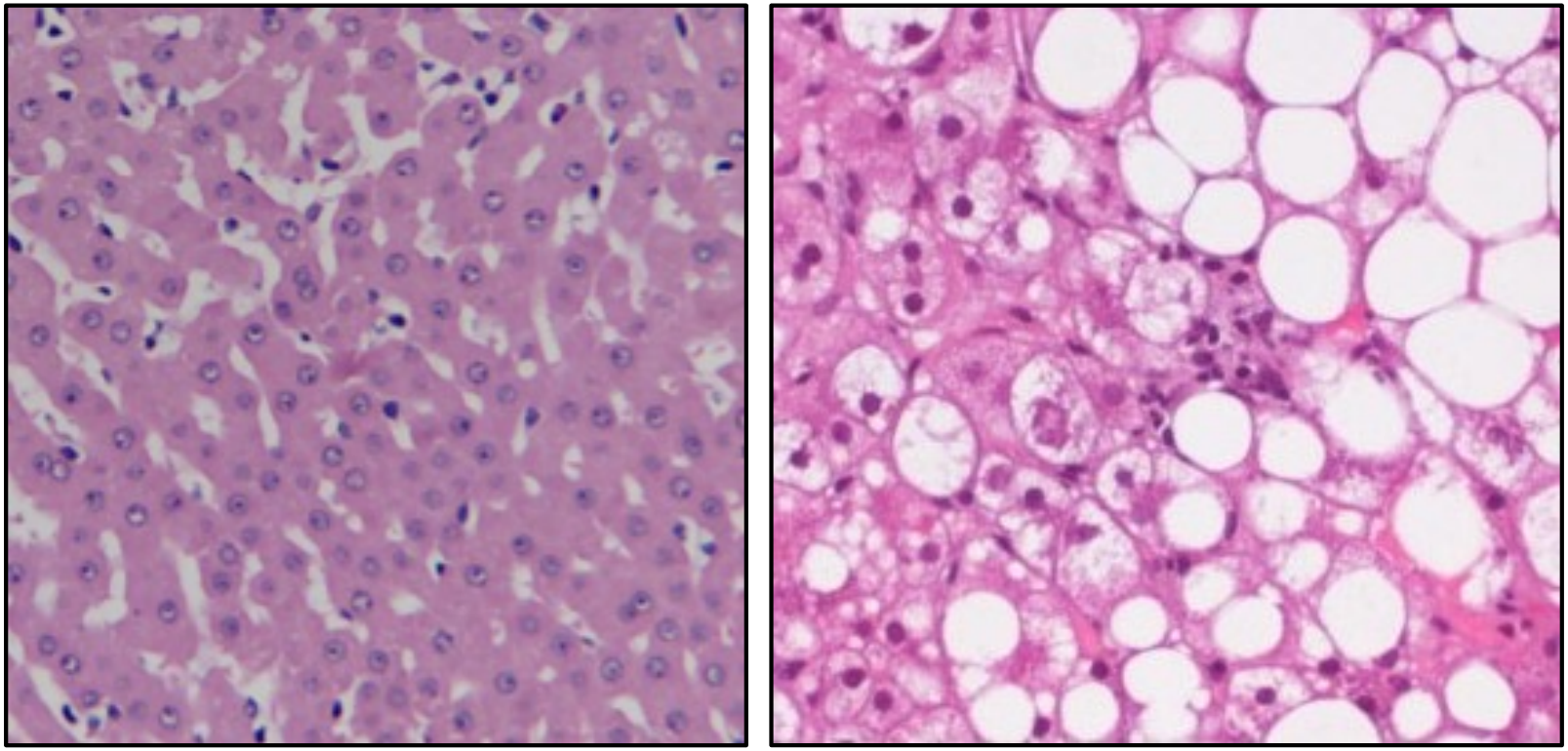


Coloration HE



Coloration HES

II. A) Colorations standards

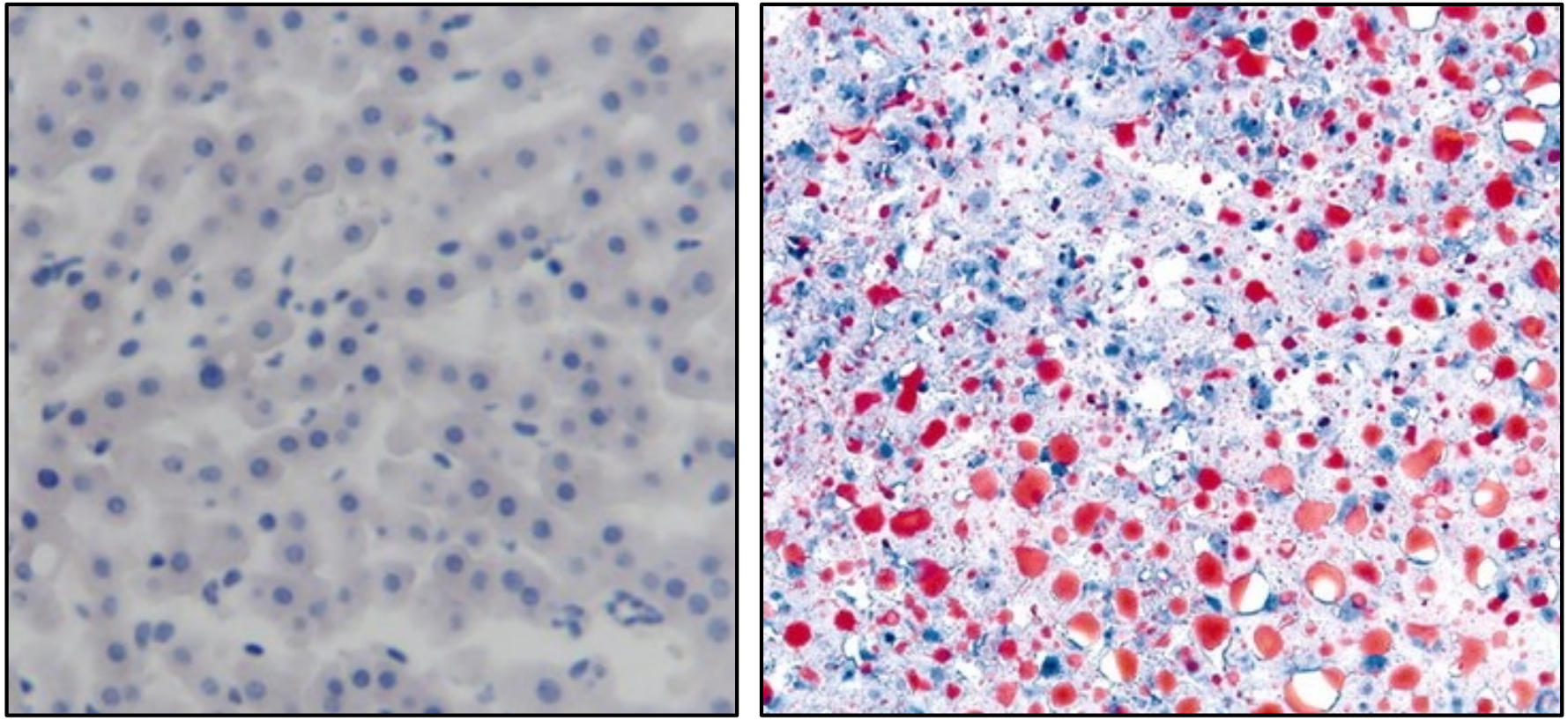


Foie - Congélation - Coloration HE

Fig. gauche : Foie normal

Fig. droite : Foie pathologique.

II. A) Colorations standards



Foie - Congélation - Coloration Oil Red O

Fig. gauche : Foie normal

Fig. droite : Foie pathologique.

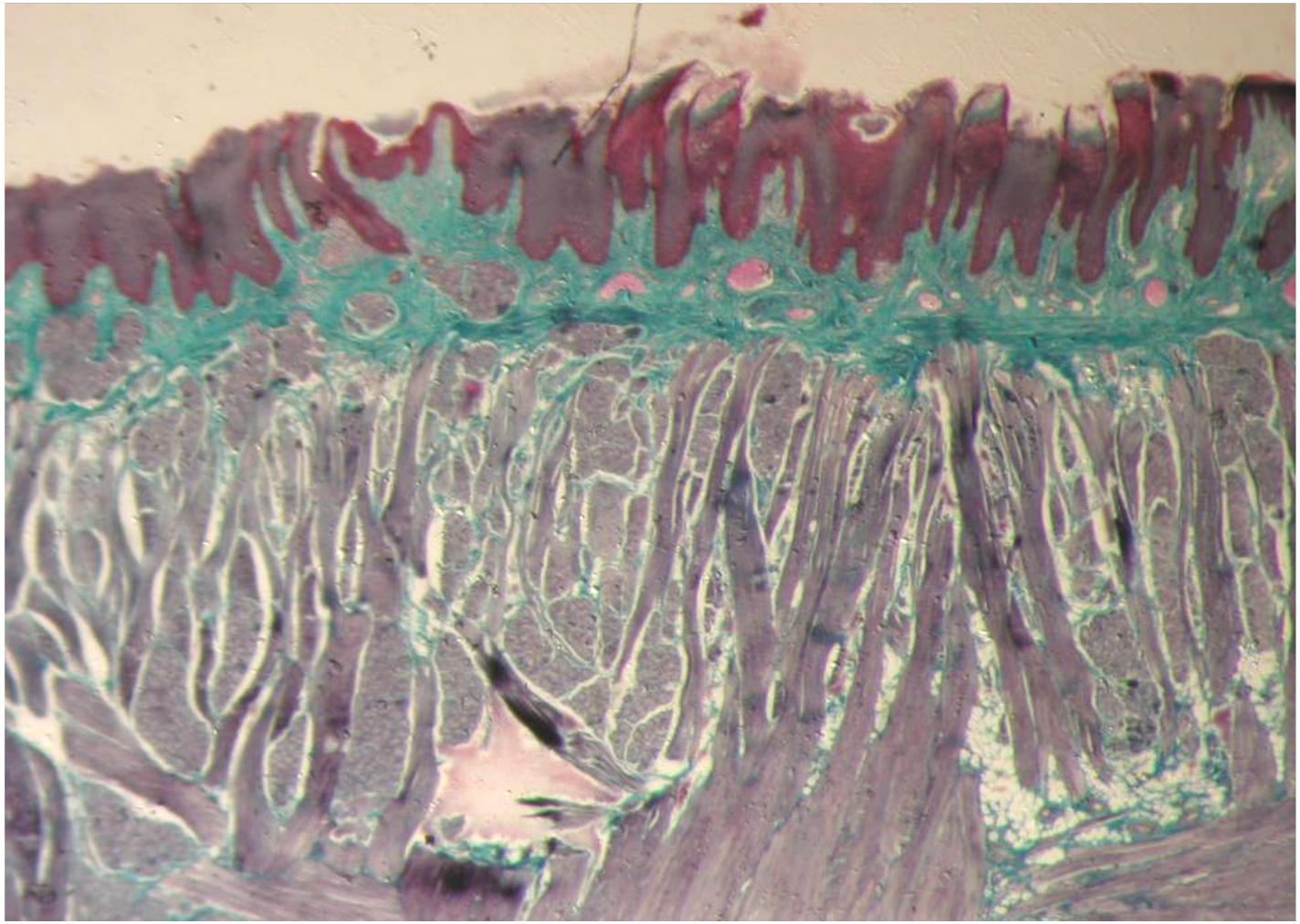
II. A) Colorations standards

Coloration fréquente = Trichrome de Masson

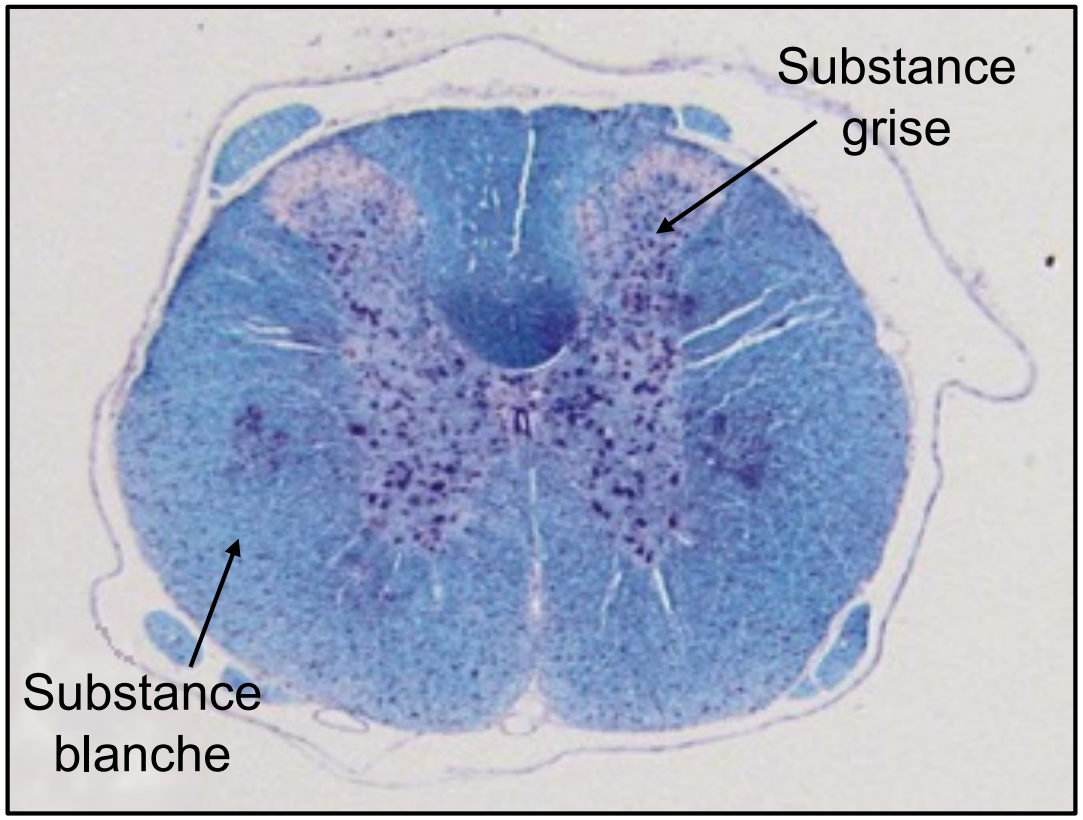
→ hématoxyline ⟶ **noyau**

→ **rouge ponceau** ⟶ **cytoplasme**

→ **vert lumière, bleu d'aniline** ⟶ **collagène**



II. A) Colorations standards

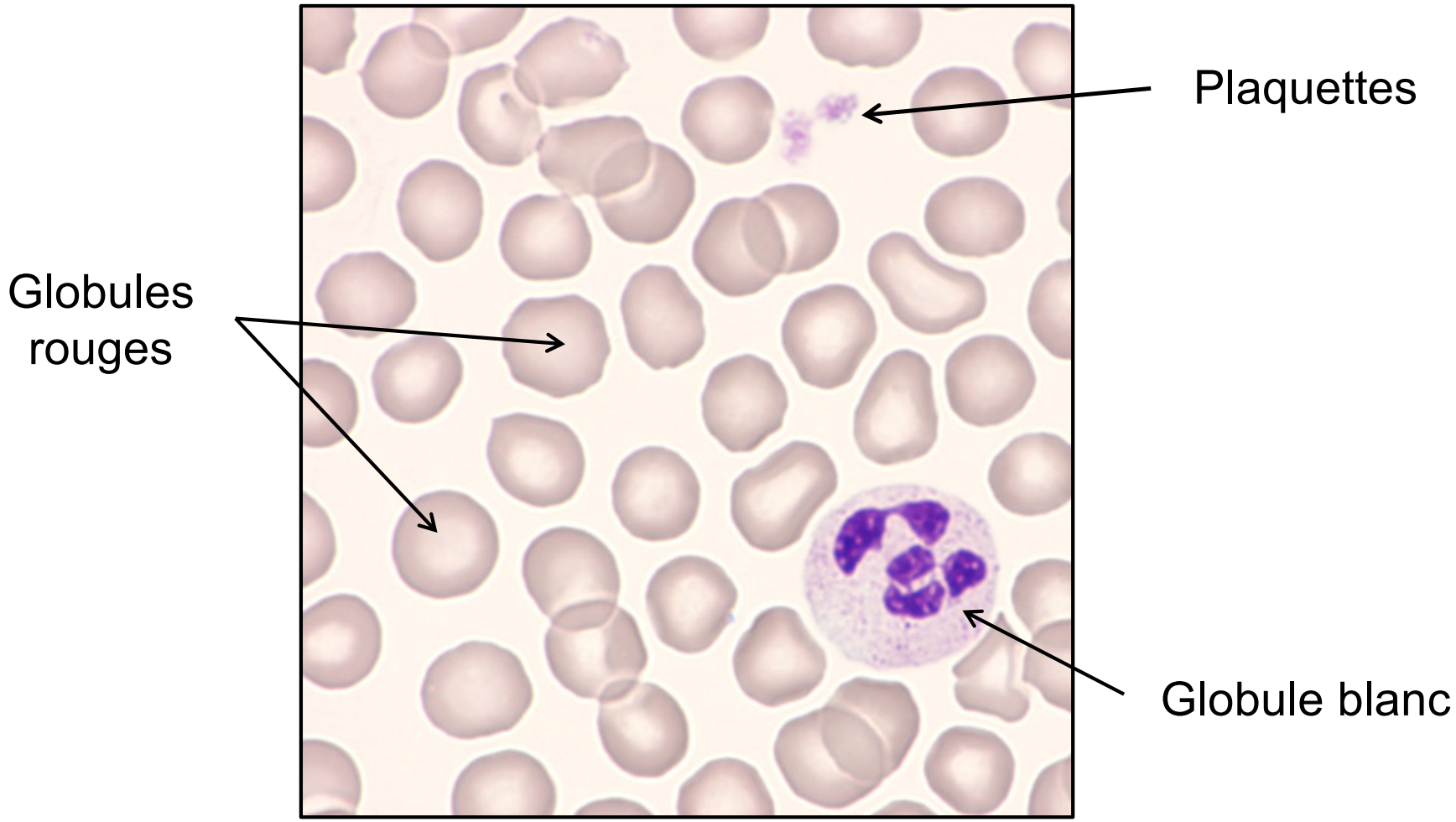


Violet de crésyl (coloration de Nissl) - Moelle épinière CT
Ou bleu de méthylène: fixe ADN ou ARN

Corps cellulaires → Substance grise

Fibres myélinisées → Substance blanche.

II. A) Colorations standards



May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Différencier les cellules sanguines [GR - Plaquettes - GB].

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

II. B) Histochimie

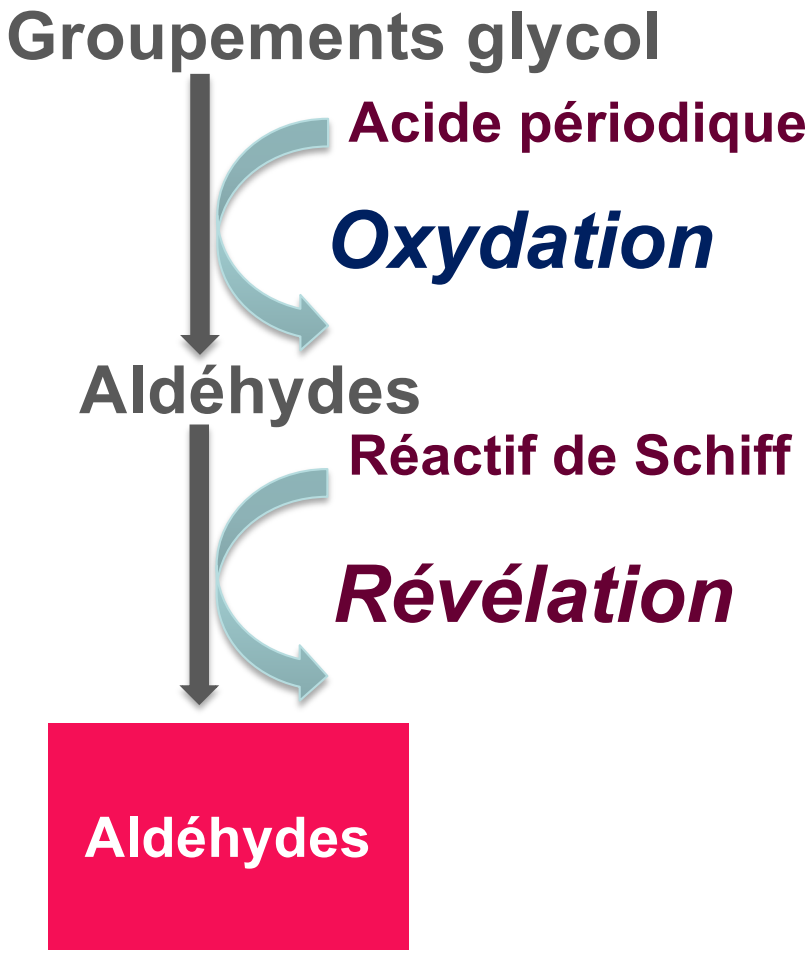
*Techniques basées sur **REACTIONS BIOCHIMIQUES***

→ Déceler et localiser divers constituants biochimiques

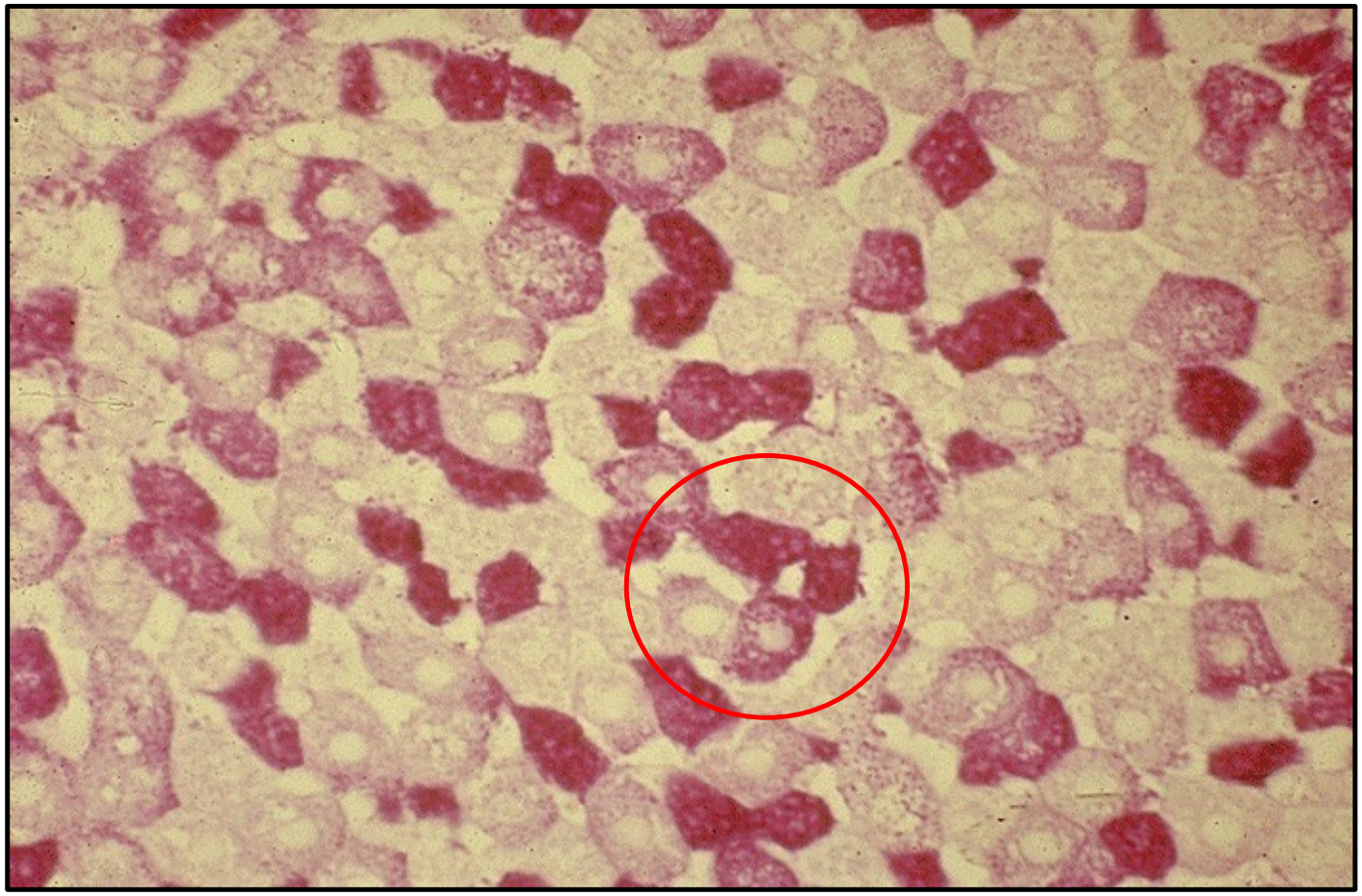
Lipides
Protéines
Acides nucléiques
Glucides
Métaux

II. B) Histochimie

Exemple: **P**eriodic **A**cid **S**chiff **PAS** → **Glycogène**, **Protéoglycanes**, **Mucines**, **Polysaccharides**



II. B) Histochimie



Foie - Inclusion Paraffine

Coloration PAS^{+}

→ Mise en évidence du glycogène.

II. B) Histochimie



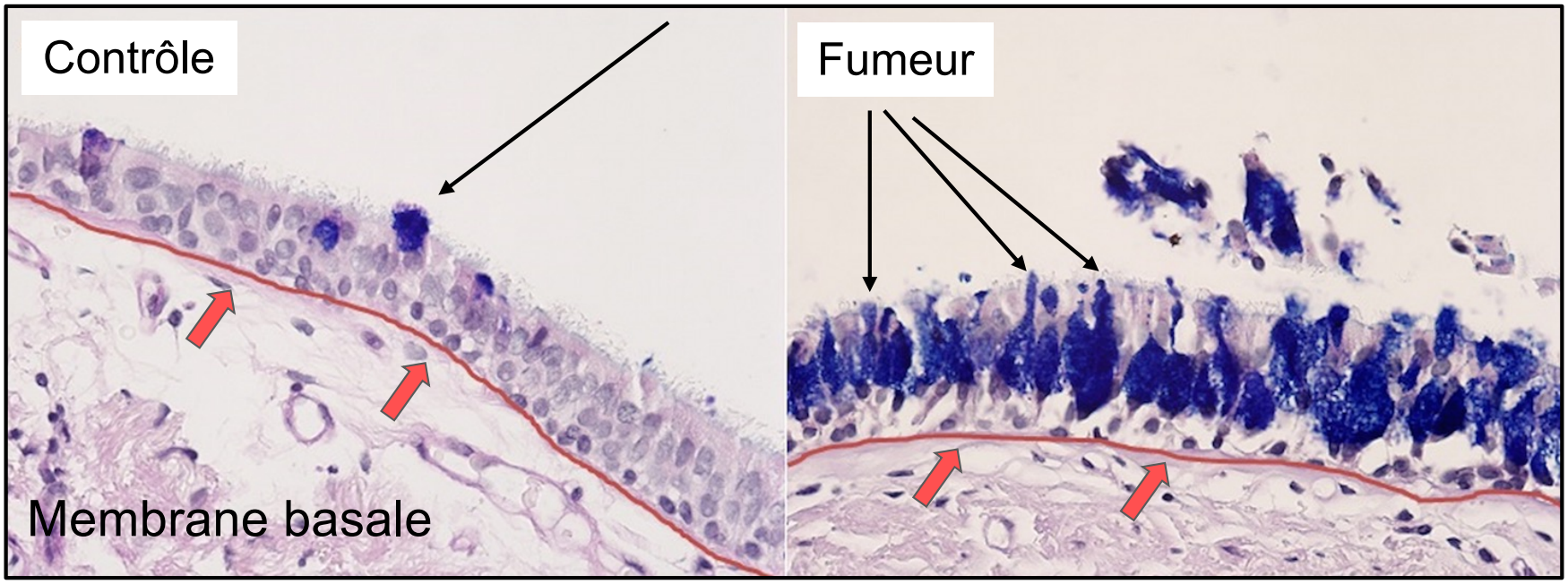
Intestin - Inclusion Paraffine

Coloration PAS^+

→ Mise en évidence de certaines glycoprotéines dans les cellules caliciformes (mucines).

II. B) Histochimie

Cellules caliciformes

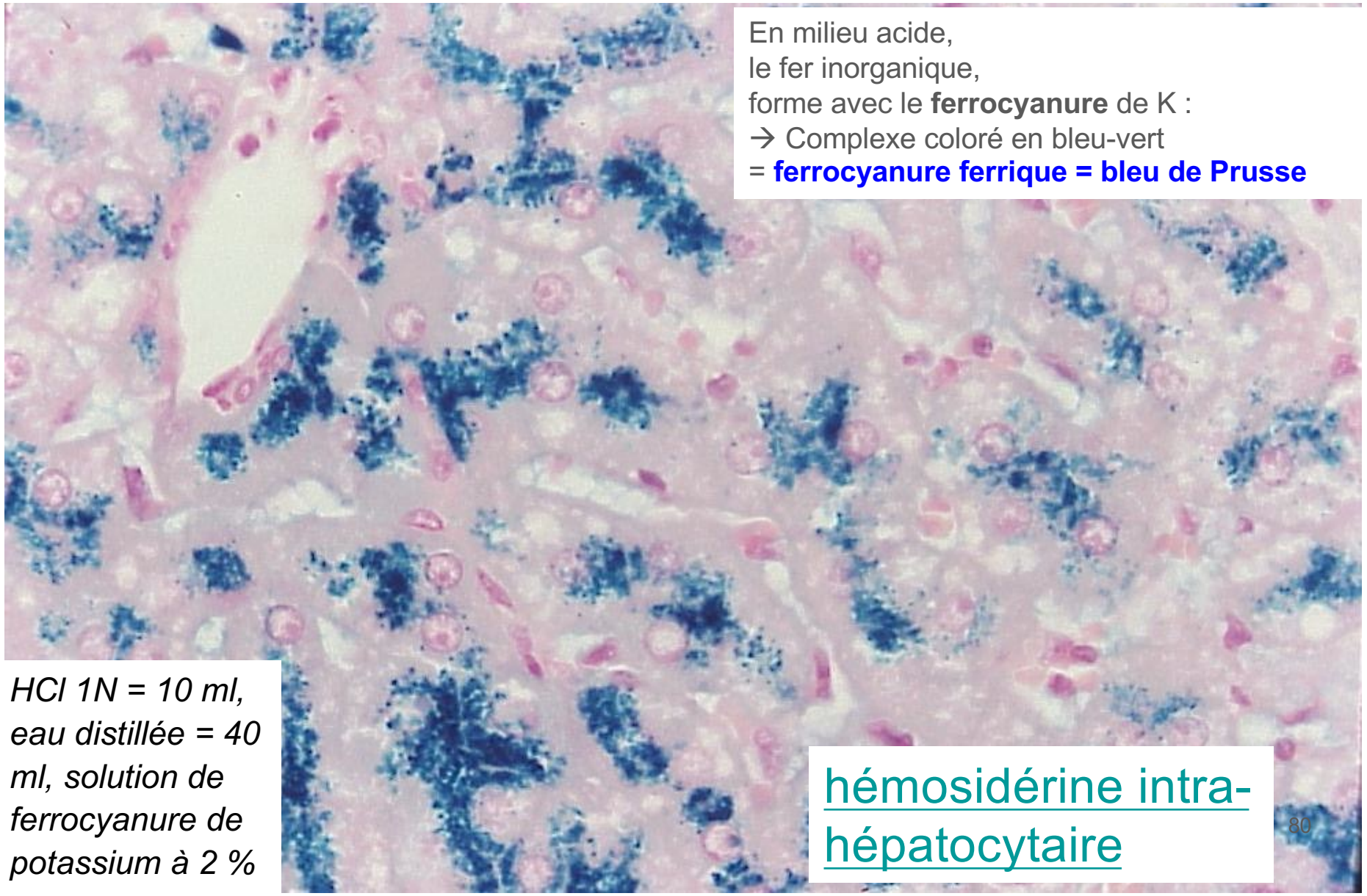


Biopsies muqueuses endo-bronchiques - Inclusion Paraffine
Membrane basale - Coloration PAS^{+}
Cellules caliciformes - Coloration Bleu Alcian.

Examen histologique simple (*i.e.,* Coupe en Paraffine)
en aveugle de la clinique le plus souvent, permet une orientation clinique
⇓
Diagnostic peut justifier cependant une technique particulière
(*i.e.,* Coupe en Résine).

II. B) Histochimie

Exemple: **Coloration de Perls** ➡ **Fer ferrique Fe^{3+}**



En milieu acide,
le fer inorganique,
forme avec le **ferrocyanure** de K :
→ Complexe coloré en bleu-vert
= **ferrocyanure ferrique = bleu de Prusse**

HCl 1N = 10 ml, eau distillée = 40 ml, solution de ferrocyanure de potassium à 2 %

hémosidérine intra-hépatocytaire

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

II. C) Histoenzymologie

= techniques histochimiques enzymatiques

Identifier
Localiser

Sites d'action enzyme particulière

→ Visualiser la distribution tissulaire d'enzymes spécifiques

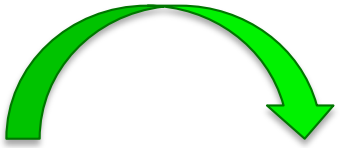
Déceler et localiser ***in situ*** des activités enzymatiques

Mettre en évidence
le produit de l'action enzymatique sur un substrat donné

Incubation

Enzyme tissulaire + substrat

→ produit insoluble



Précipitation

II. C) Histoenzymologie

Sur tissu frais ou congelé!

Exemple: ***enzymes mitochondriales*** *(pathologie musculaire)*

Ex: SDH (succinate déshydrogénase) à pH = 7,4
Révèle une activité enzymatique spécifique des mitochondries

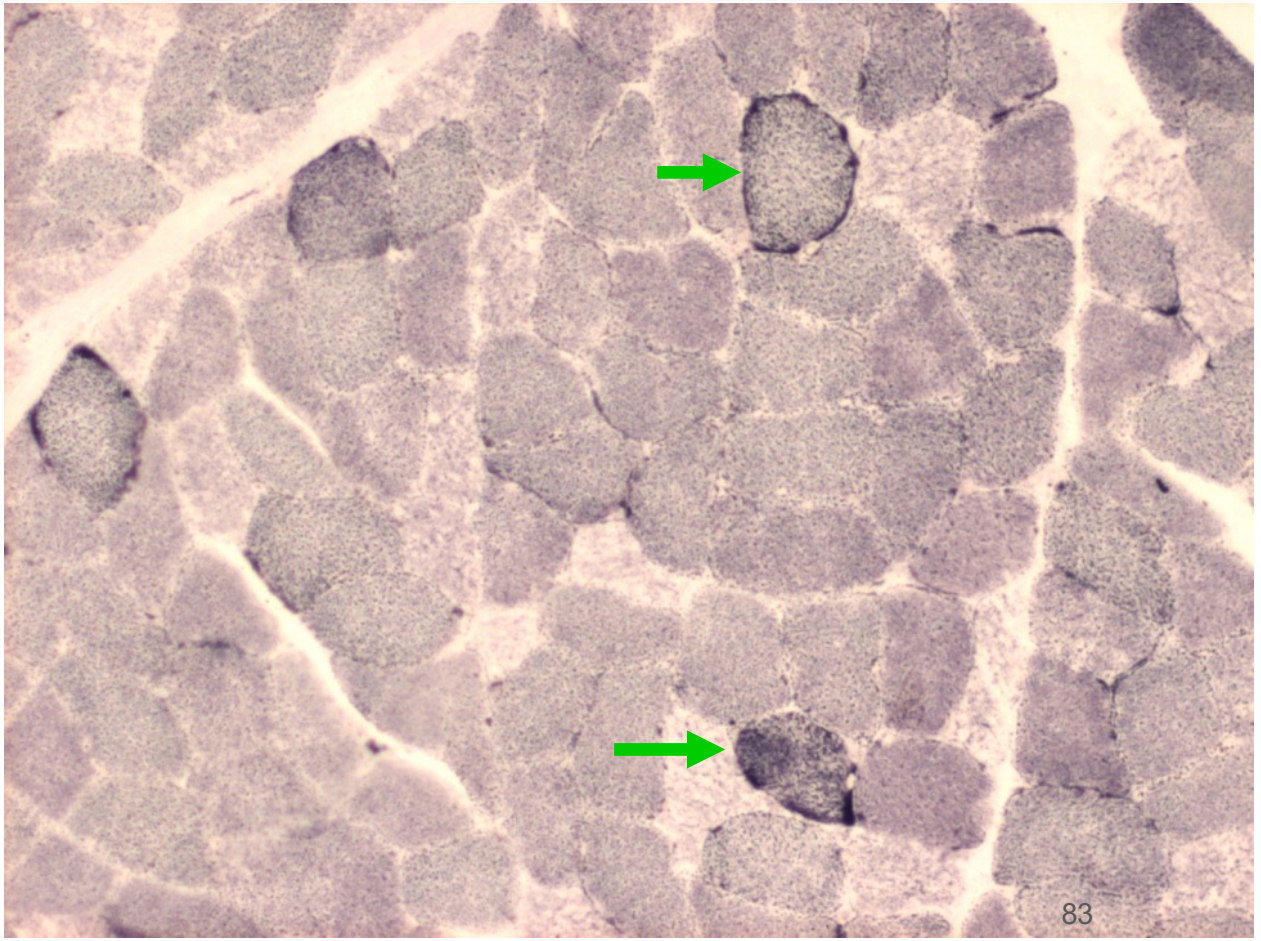
Succinate + SDH-FAD
→ fumarate + SDH-FADH2

SDH-FADH2 + NBT oxydé
→ SDH FAD + NBT réduit

Excès de marquage

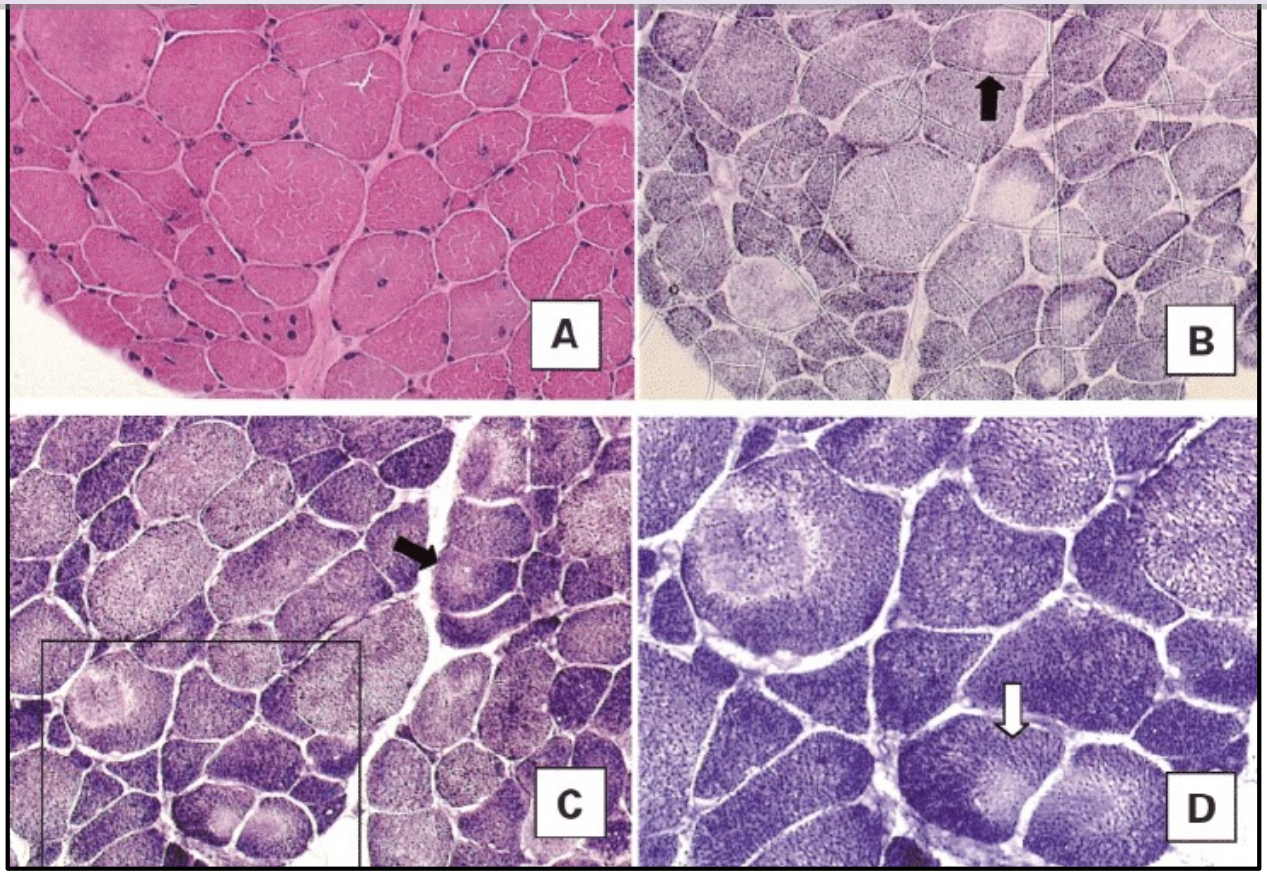
↕

Prolifération mitochondriale



nitro bleu de tetrazolium

II. C) Histoenzymologie



Morphological findings in a deltoid muscle biopsy of the proband.
Biopsy of individual II3 was performed at 14 years of age

Fresh frozen cryostat sections - Hematein-Eosin (A) ;
Succinate Dehydrogenase (SDH) (B) ; NADH-tetrazolium reductase (C) (D)

Human Molecular Genetics 12(10): 1171-8, 2003.

II. C) Histoenzymologie

*Exemple: détection des **phosphatases***

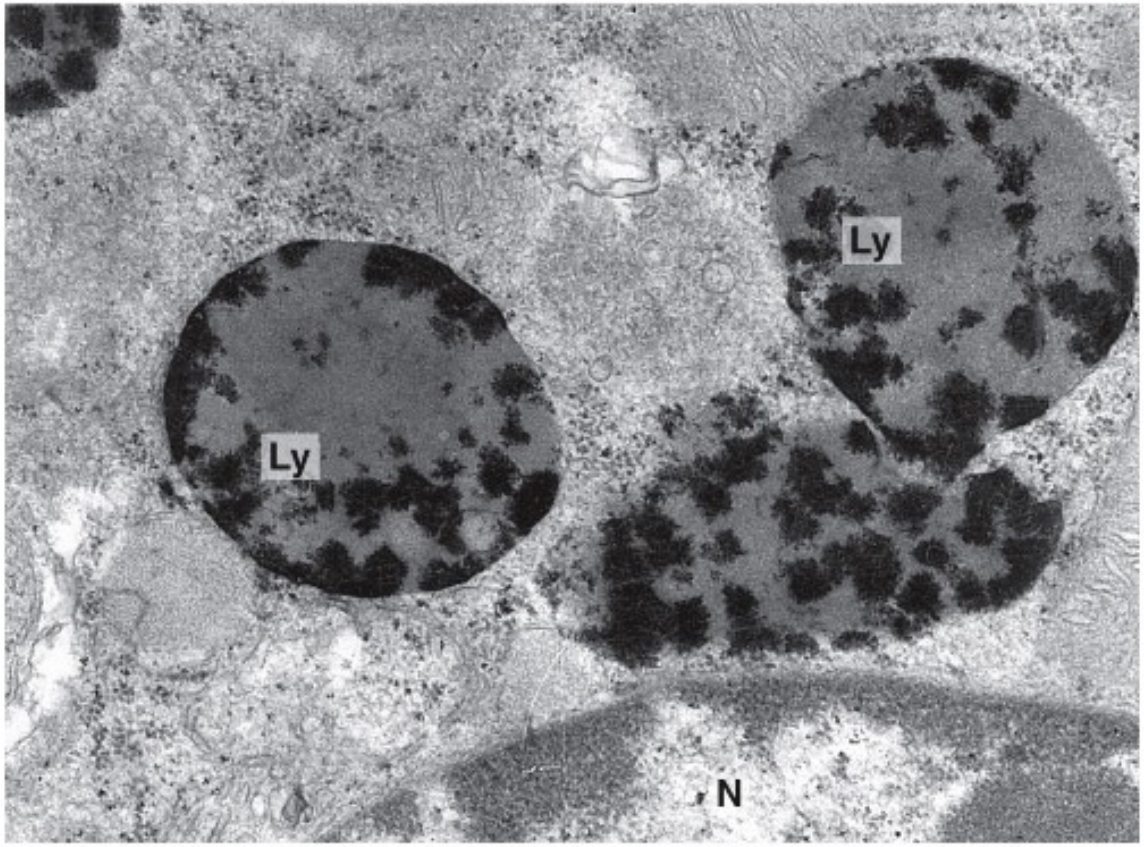
*Ex: phosphatases acides → **lysosomes***

En microscopie électronique

organelles recouvertes

d'un matériel dense aux électrons

≈ phosphate précipité



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

Cellule rénale (Rat)

BILAN INTERMEDIAIRE

I- Introduction

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie → Focus sur le produit de réaction, générique, on apporte le catalyseur non biologique

C) Histoenzymologie → Focus sur l'enzyme qui effectue la réaction, spécifique, on apporte un révélateur de son produit de réaction

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie → Ciblage d'une protéine, très spécifique,
Immunohistochimie ne précise que le moyen de détection

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

III. Les analyses moléculaires in situ

Quoi ?

A) Immunohistologie → ***les protéines***

B) Hybridation *in situ* → ***les gènes (ADN / ARN) leurs transcrits (ARNm)***

C) Autoradiographie → ***Sites de synthèse des molécules biologiques***

III. A) Immunohistologie

1) Historique

2) Principes biochimiques

3) Les différents types d'anticorps utilisés

polyclonaux vs. monoclonaux

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

a) Couplages directs

b) Méthodes indirectes

c) Systèmes d'amplification (couplages indirects)

5) Difficultés.. *et quelques solutions*

III. A) Immunohistologie

1) Historique



« At the end of my internship I had a six month 's gap before my next appointment […] and I was lucky enough to spend them in Berlin. This was the summer of 1939 […].

In strange cities, visitors have many hours alone. […] One afternoon I was thinking about rheumatic fever. […] I considered that it might be easier to find the antigen than the antibody […].

The notion of labelling an antibody molecule with a visible label was perfectly obvious in such a context »

A.H. ***Coons****, et al.*

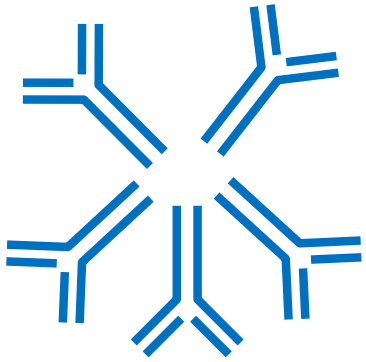
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the ***use of fluorescent antibody*** *J Immunol* ***1942****; 45:159*

2) Principes chimiques

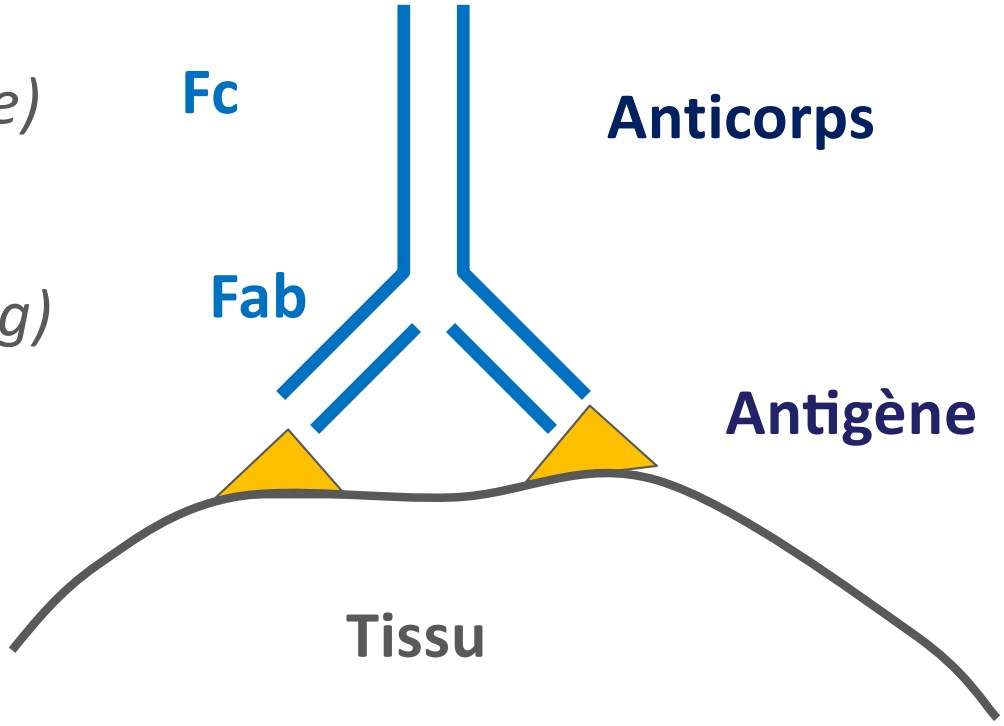
Anticorps utilisés: en général de la **classe des IgG**, parfois des IgM

(Fragment, crystallize)

(Fragment, antigen binding)



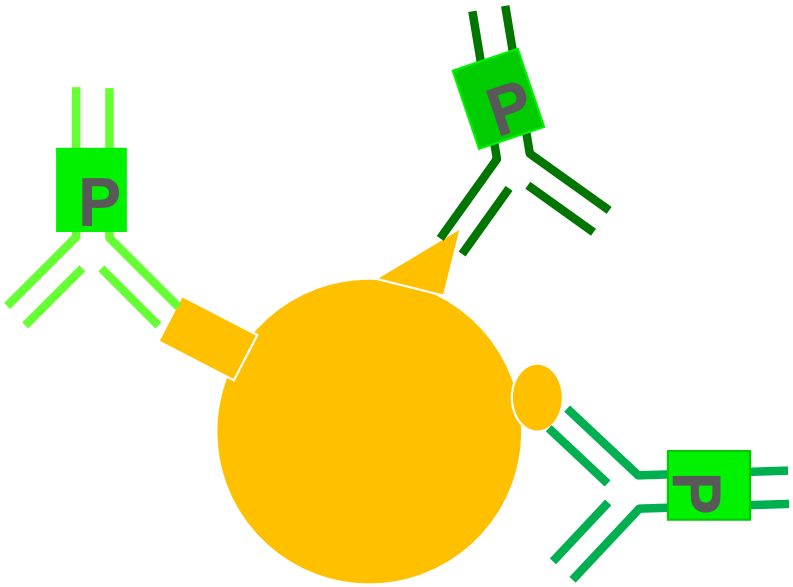
IgM = pentamère



III. A) Immunohistologie

3) Les différents types d'anticorps utilisé

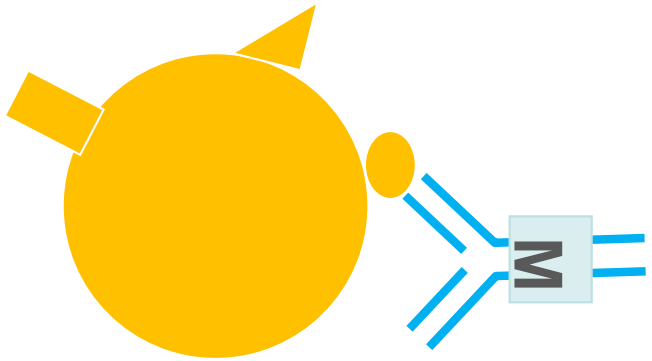
Polyclonaux



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

Souvent obtenus chez le lapin
+/- purifiés

Monoclonaux

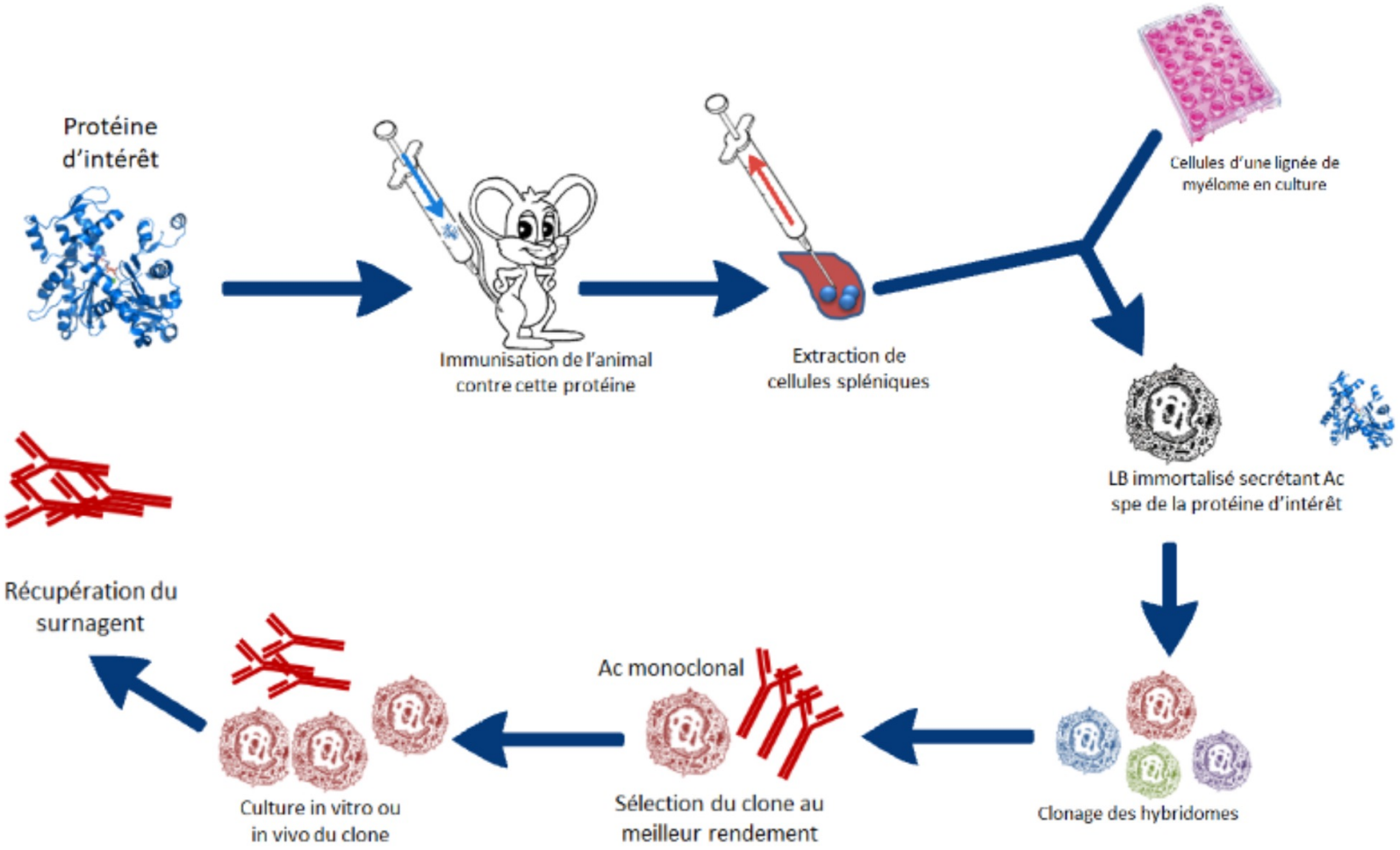


Anticorps monoclonal
dirigé sélectivement
contre 1 épitope de l'antigène

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

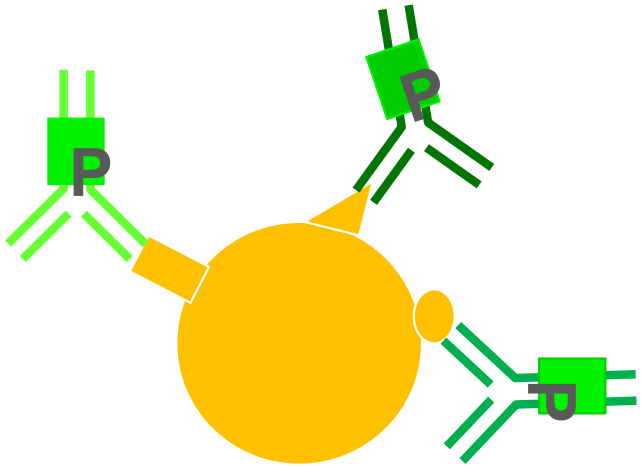
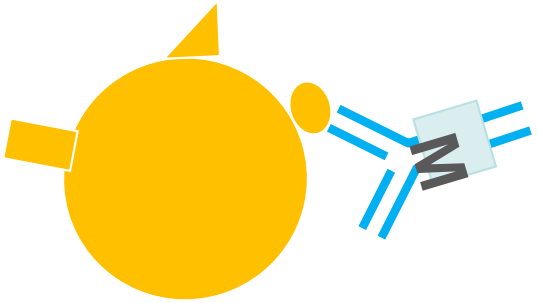
3) Les différents types d'anticorps utilisé

synthèse des anticorps **Monoclonaux**



III. A) Immunohistologie

3) Les différents types d'anticorps utilisé

	Polyclonaux	Monoclonaux
		
AVANTAGES	Sensibilité	Spécificité
INCONVENIENTS	Ac non spécifiques Є sérum → moindre spécificité	"Conditions-dépendants" Moins sensibles

4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

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

a) Couplages directs

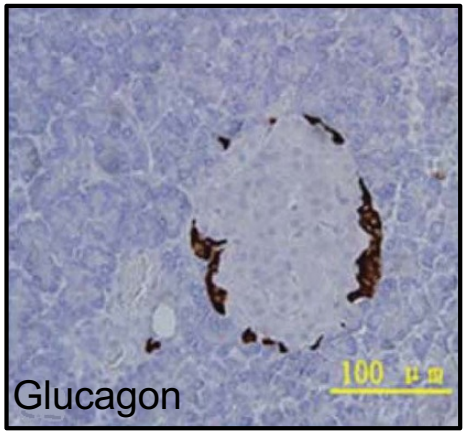
b) Méthodes indirectes

c) Systèmes d'amplification (couplages indirects)

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

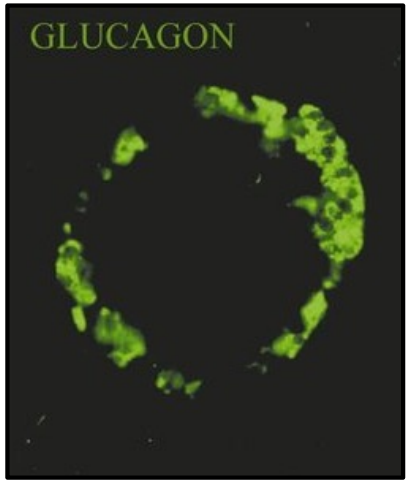
Anticorps fixé (IgG) sur le peptide/protéine d'intérêt :
Complexe Antigène-Anticorps
⇑
REVELATION
Anticorps (IgG) couplé avec,

soit enzyme
(Immunoenzymologie, en MO)



Peroxydase,
révélée par la diaminobenzidine (DAB)

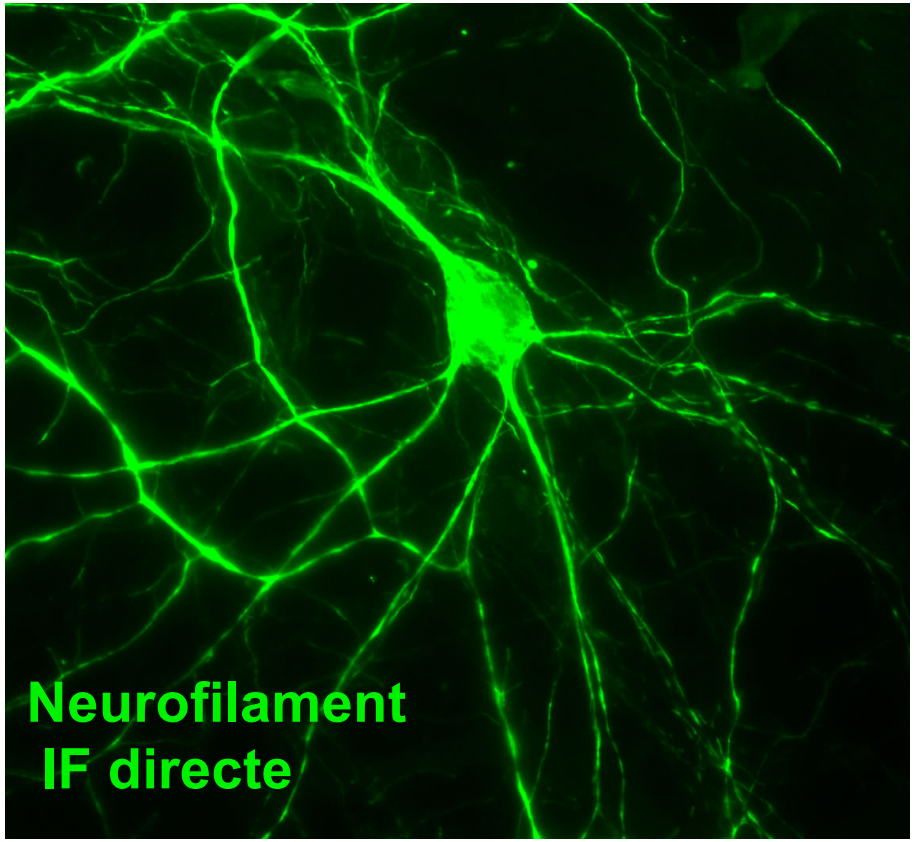
soit fluorochrome
(Immunofluorescence, en MO)



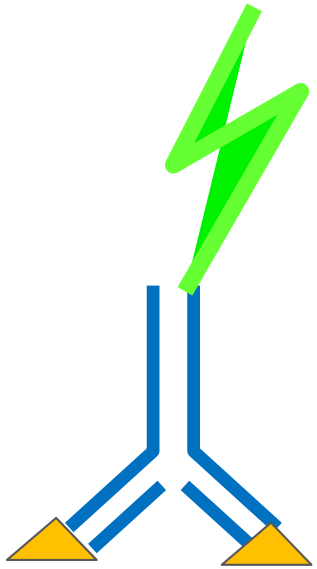
Fluorescéine : FITC
[Fluorescein IsoThioCyanate]
[$\lambda_{excitation}$= 488 nm ; $\lambda_{émission}$= 580 nm]

4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

Historiquement la première solution



Fluorochrome :
Molécule capable d'émettre une lumière fluorescente sous l'action d'une excitatrice
Couplage direct ou indirect du fluorochrome à l'Ac



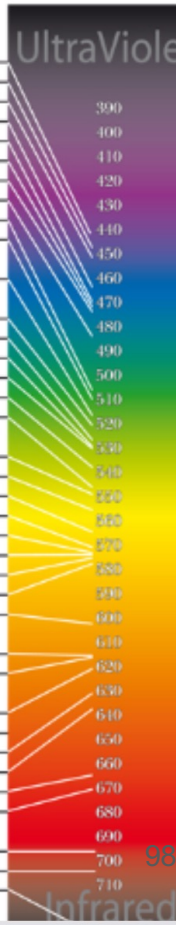
4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

Couplage de l'anticorps à une composé fluorescent (= fluorochrome)
-> immunofluorescence

Nombreuses variétés de fluorochromes
-> permet la réalisation de co-marquages

	Absorption	Emission
FITC Fluoresceine IsoThioCyanate	495 nm	525 nm
TRICT Tetraméthyl Rodhamine IsoThioCyanate	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++ 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 (Pararosanoline)	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



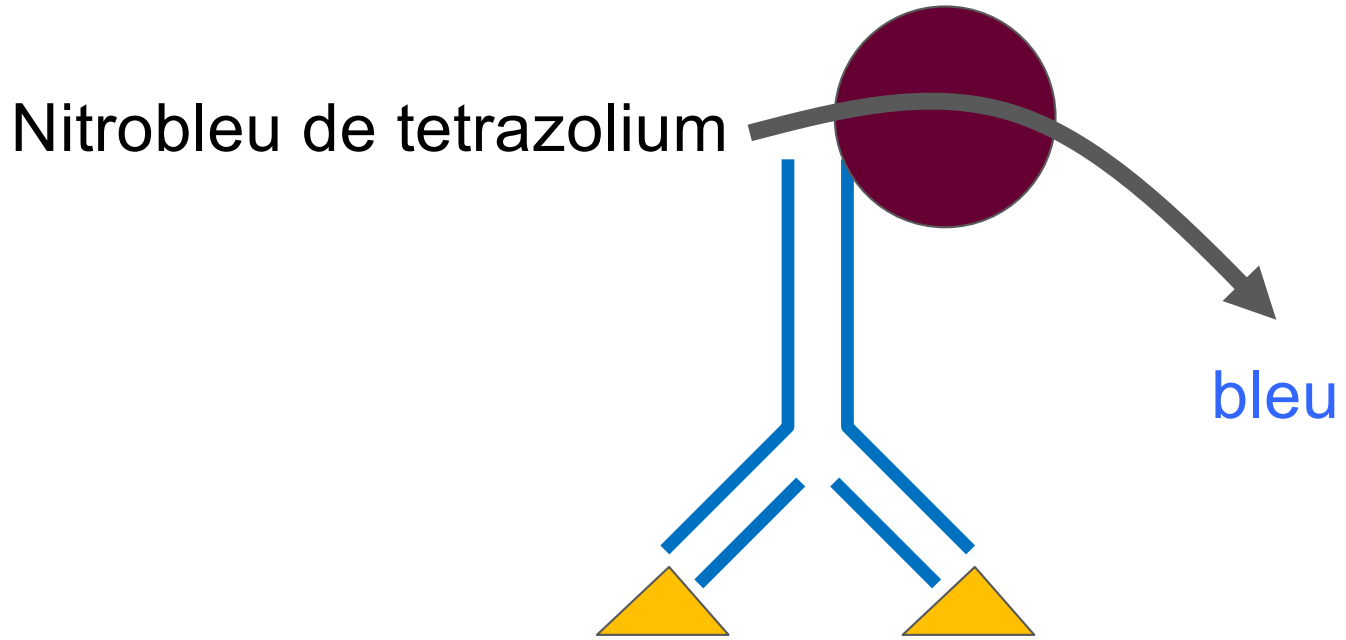
4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

→ Couplage de l'Ac à une enzyme

La plus utilisée: la peroxydase du raifort

Mais aussi:

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

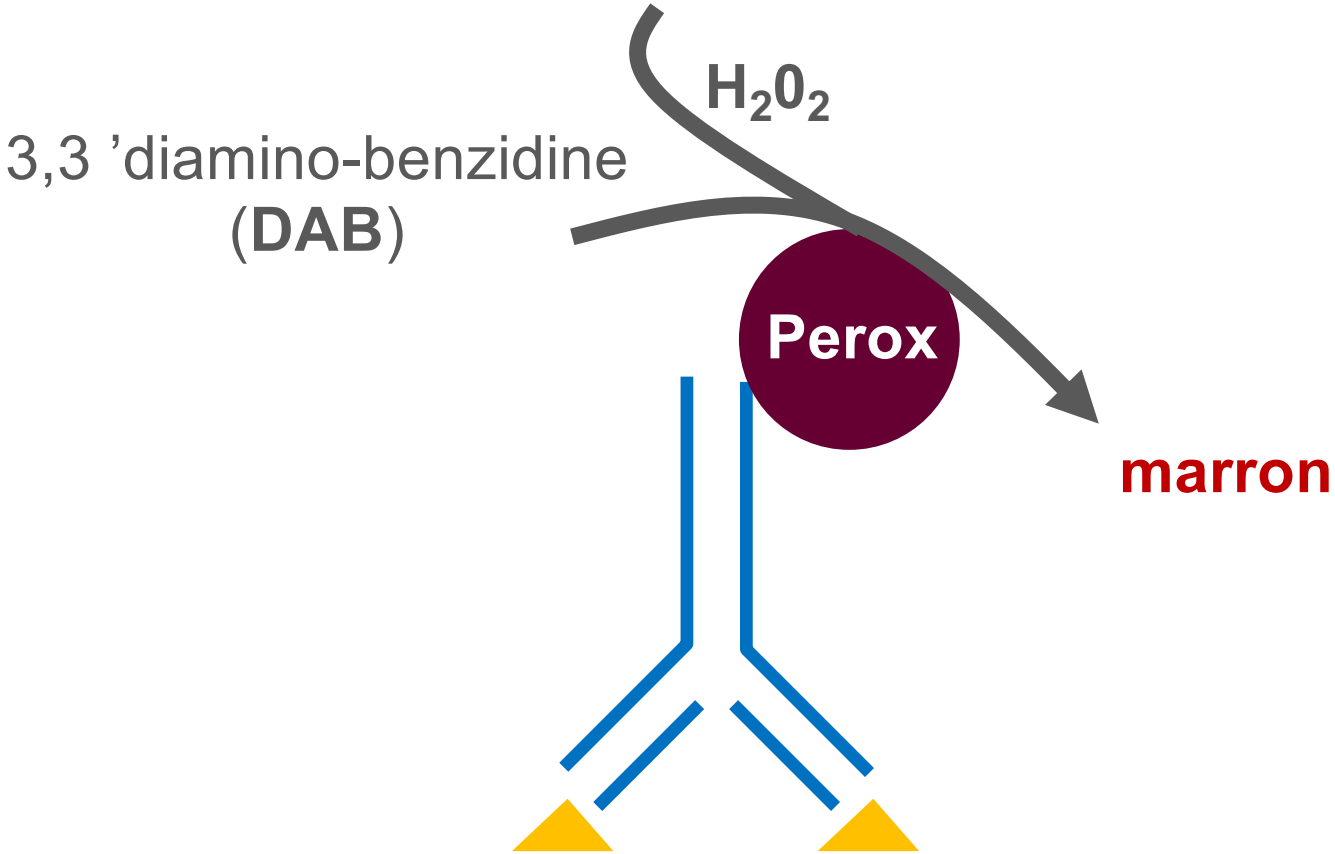


4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

→ Couplage direct de l'Ac à une enzyme

Réaction enzymatique dans le tissu → un composé insoluble

*Exemple: **peroxydase** révélée par le **DAB***

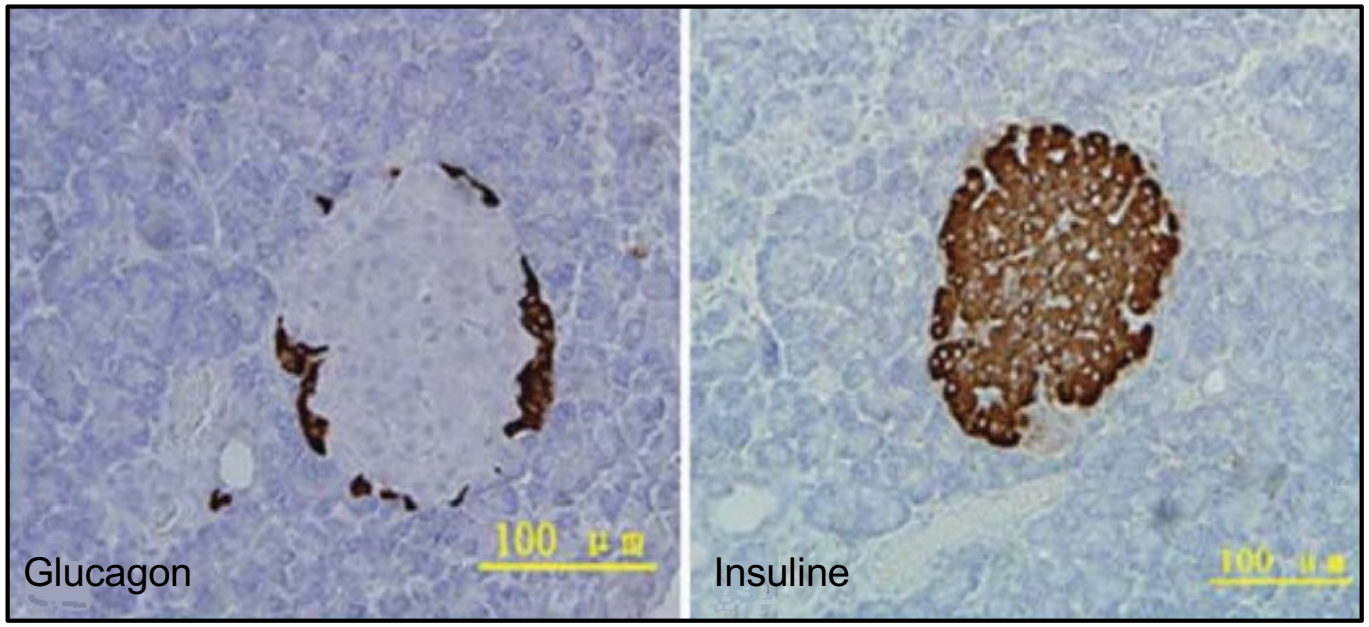


III. A) Immunohistologie

- Révélation par une enzyme

* Peroxydase,
révélée par la diaminobenzidine (DAB)

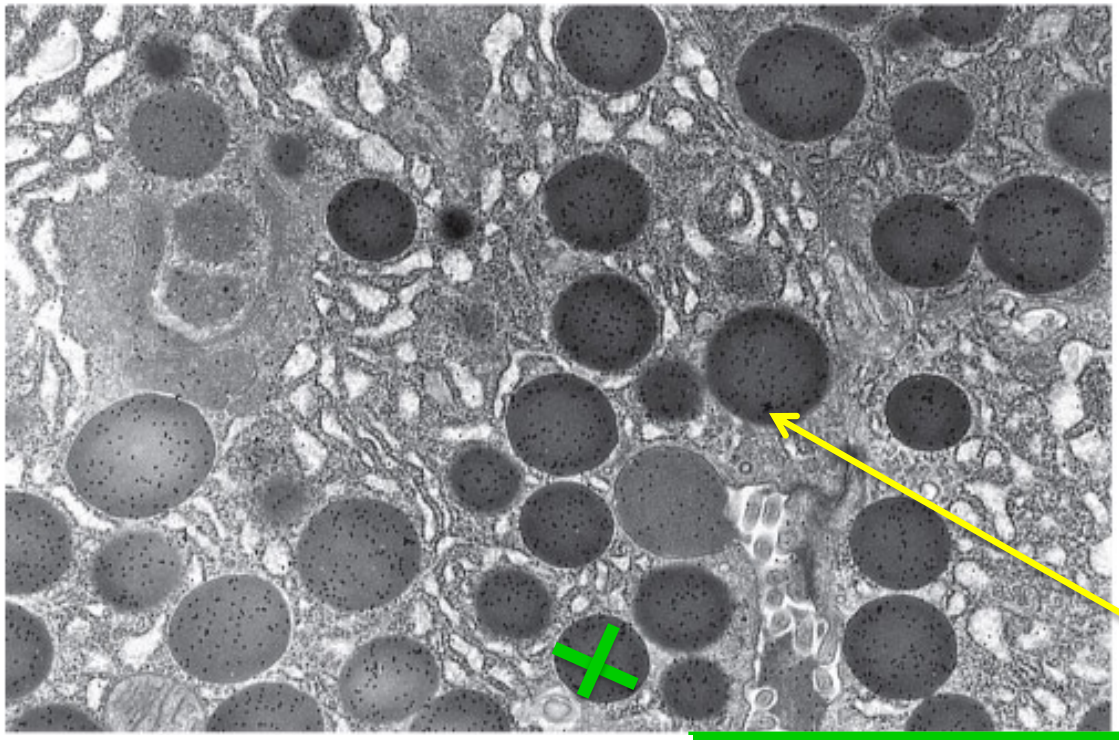
* Phosphatase alcaline,
révélée par le nitrobleu de tétrazolium



4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

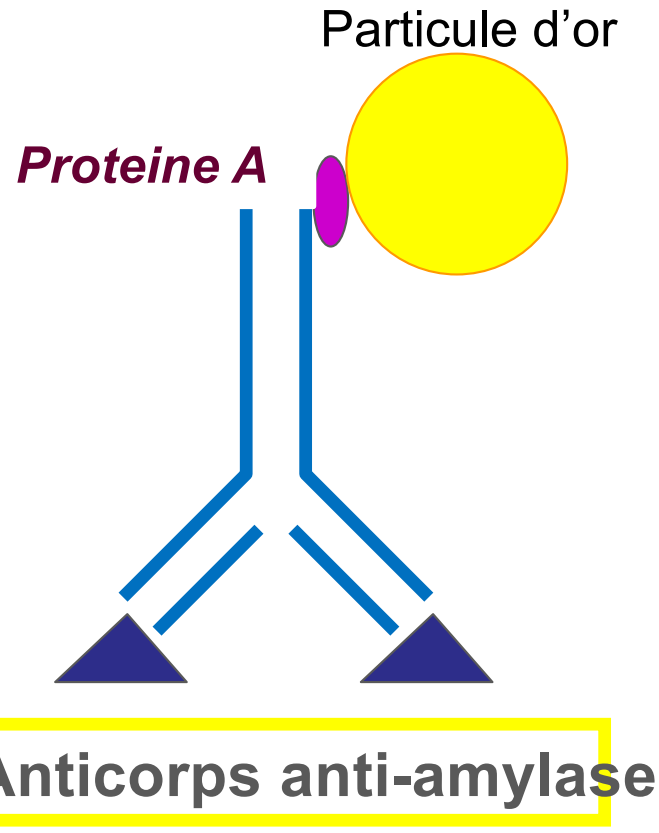
a) Couplages directs

En ME → révélation par de l'or colloïdal



Pancréas exocrine

Granule de sécrétion



4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

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

a) Couplages directs

b) Méthodes indirectes

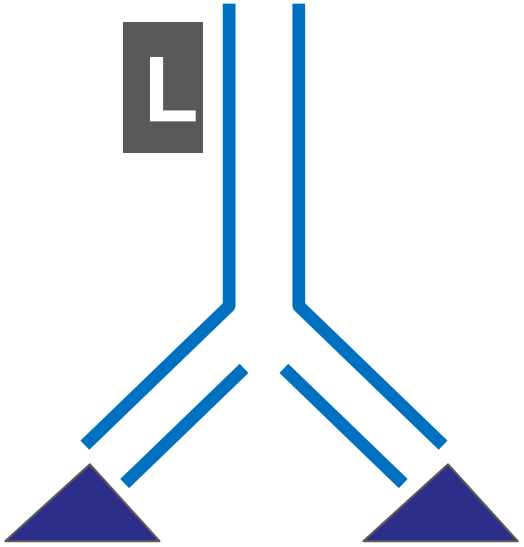
c) Systèmes d'amplification (couplages indirects)

4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

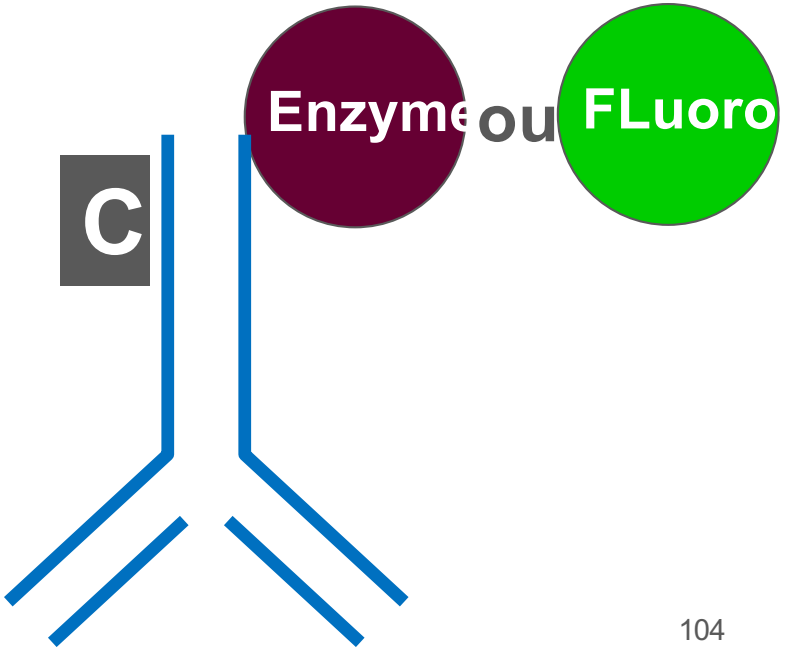
b) Méthodes indirectes

Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

Anticorps de **L**apin dirigé contre l'antigène à détecter



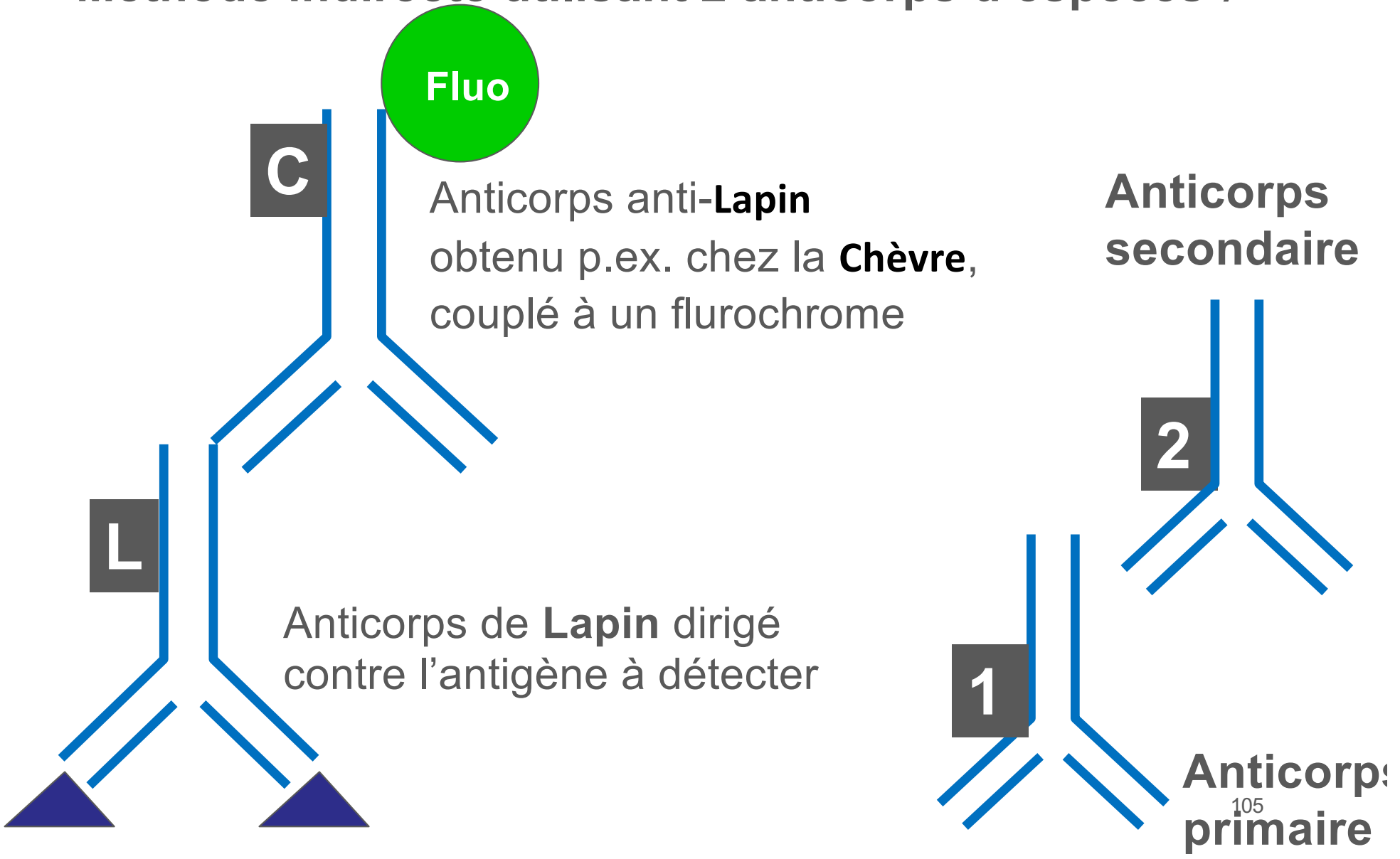
Anticorps anti-**L**apin obtenu par ex. chez la **C**hèvre, couplé à l'**enzyme**/**fluorochrome**



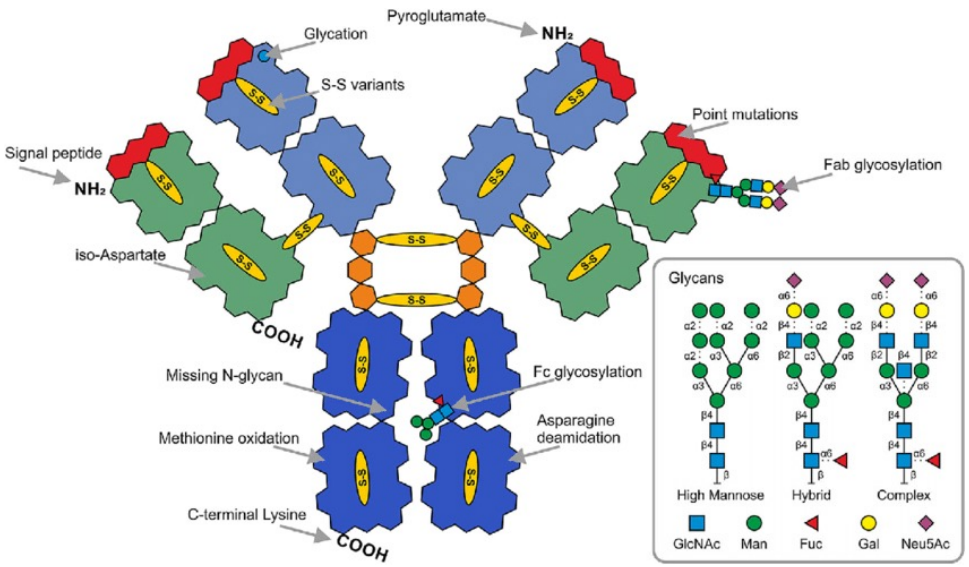
III. A) Immunohistologie

b) Méthodes indirectes

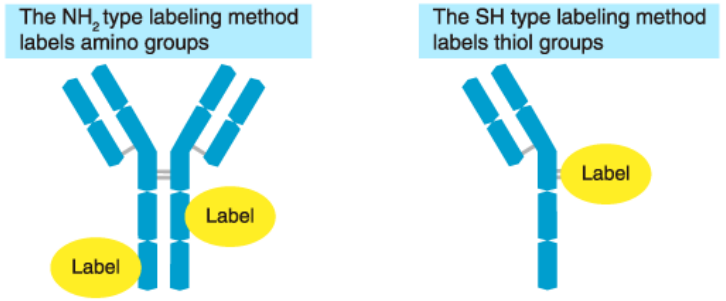
Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

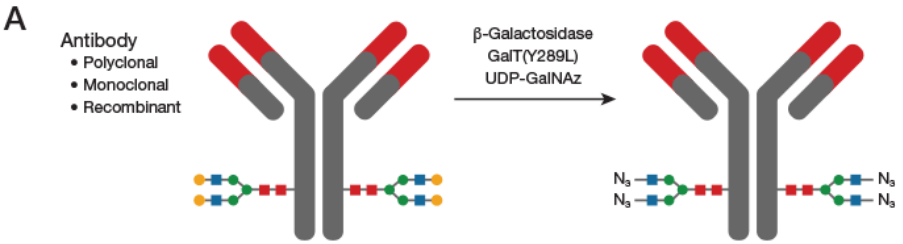


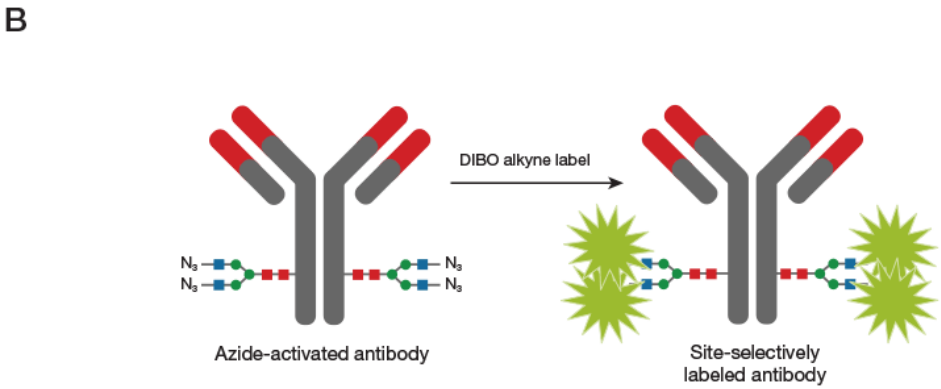
III. A) Immunohistologie



Couplage enzyme ou fluorochrome sur anticorps

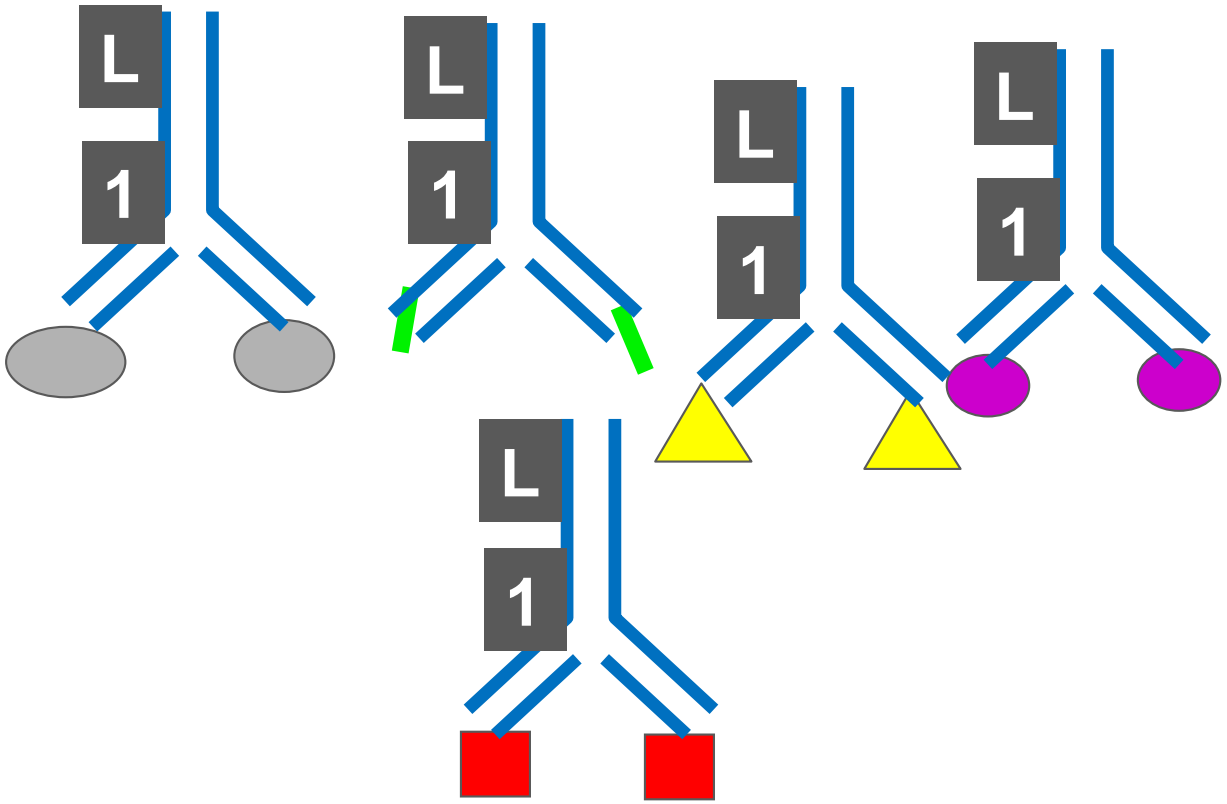


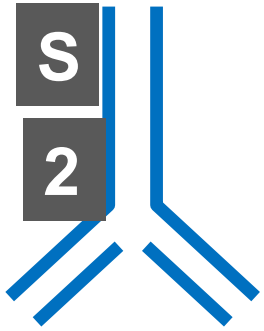




Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

Avantage? **1) gain de temps et amplification**



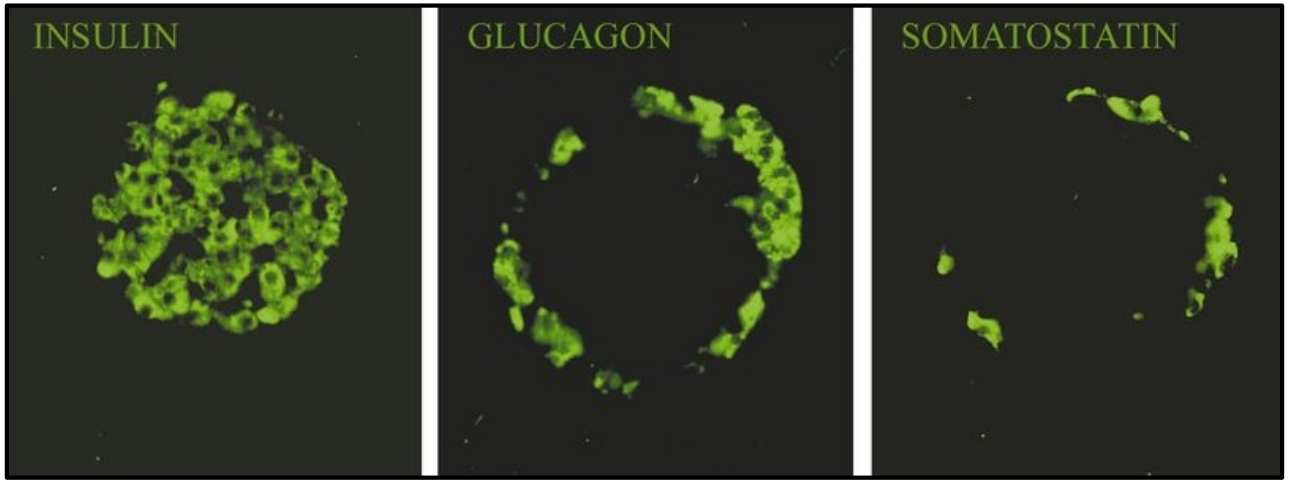


Peuvent être visualisés par le même secondair

De nombreux Ac primaires obtenus dans 1 espèce (ex: **L**apin)

b) Méthodes indirectes

Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

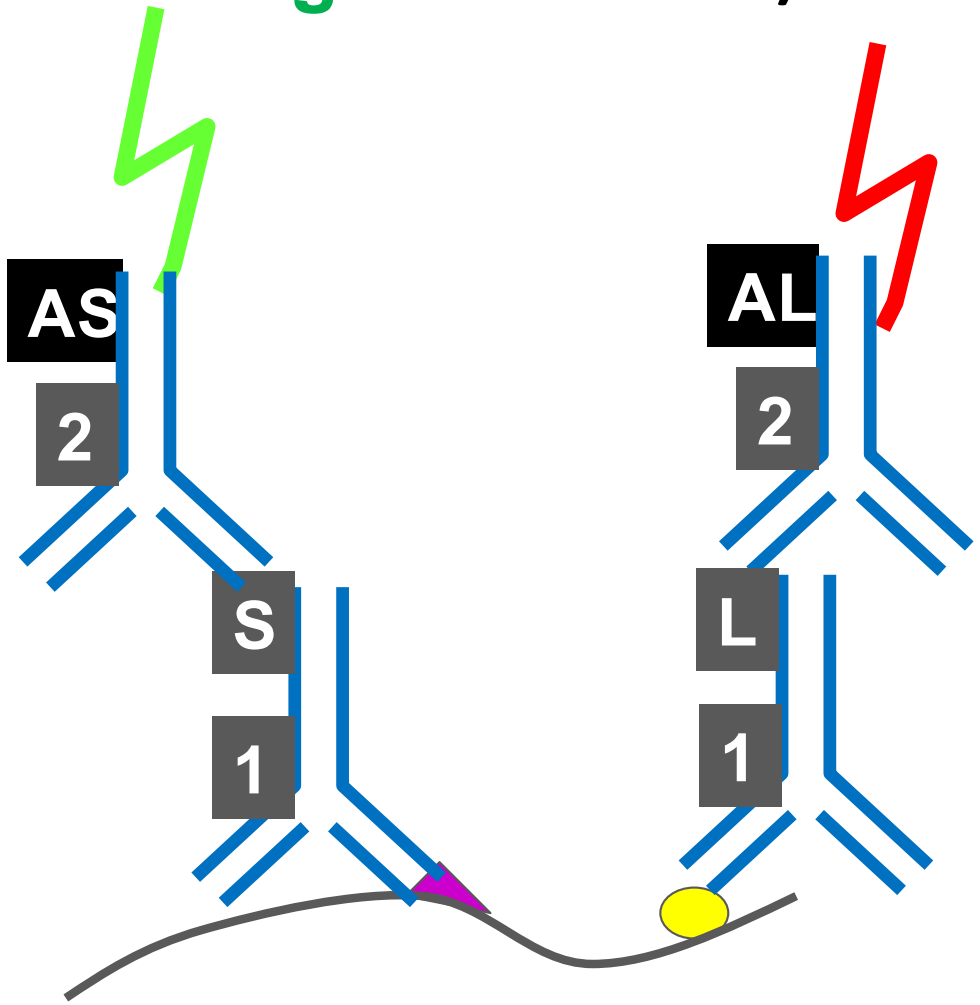


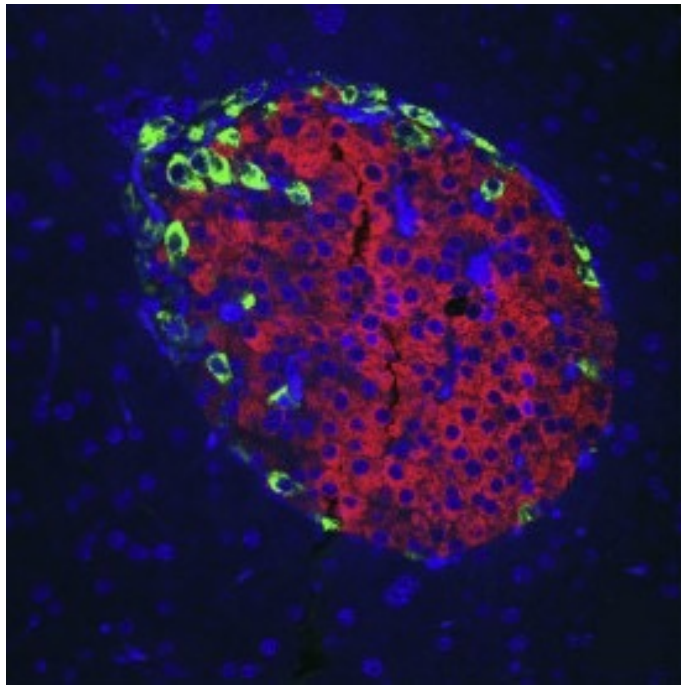
Ac I spécifique
Ac II couplé FITC

Méthode indirecte utilisant 2 anticorps d'espèces ≠

Avantage ?

2) Double marquage





INSULIN GLUCAGON

III. A) Immunohistologie

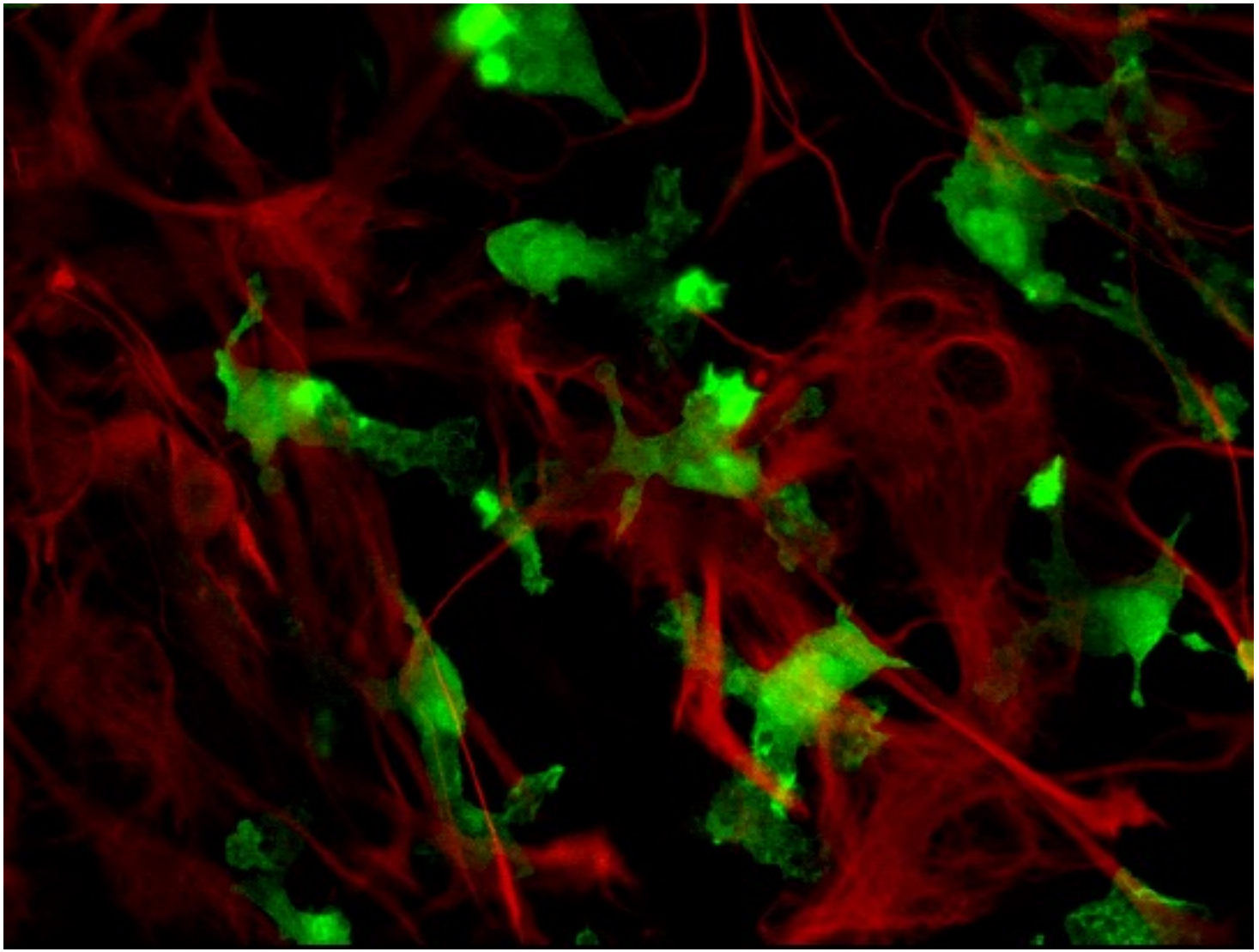
Double marquage en immunofluorescence (microscopie confocale)

Vert Anti-Iba1

microglie

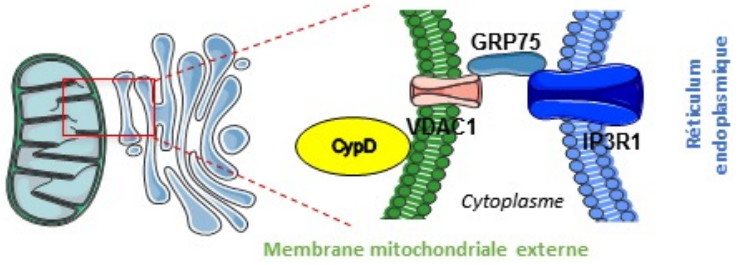
Rouge Anti-GFAP

astrocytes

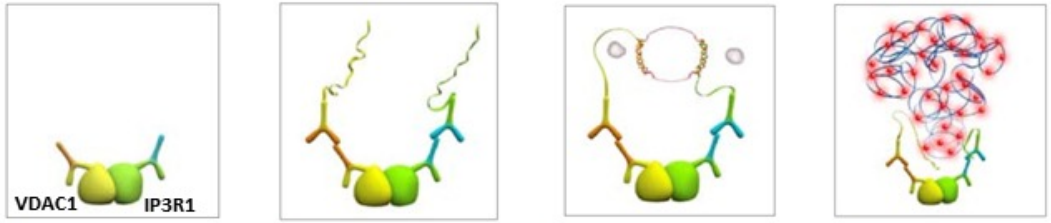


4) Les moyens de révélation du complexe antigène-anticorps

c) Systèmes d'amplification (dans les méthodes indirectes)

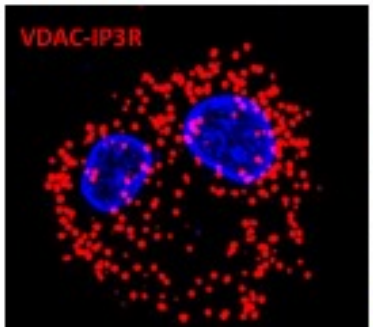


Paires utilisées:
VDAC1-IP3R1
GRP75-IP3R1
CYPD-IP3R1



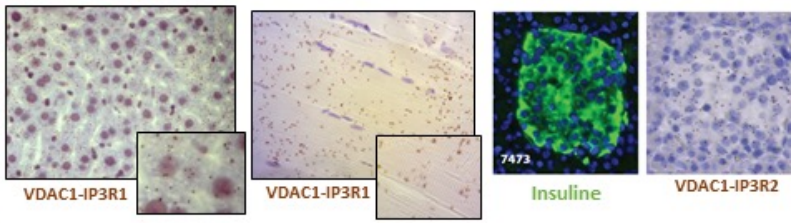
E. Détection

Oligonucléotides couplésto à la fluorescence



Tubbs E. et al. Diabetes 2014
Tubbs E et al. JoVE 2016
Thivolet C et al. PLoS One 2017

Oligonucléotides couplés à la peroxidase



Coupes de foie et de muscle en paraffine Coupe de pancréas en paraffir

Exemple du PLA: proximity ligation assay

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- **B) Hybridation *in situ***
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

III. B) Hybridation *in situ*

A) Immunohistochimie

B) Hybridation in situ

C) Autoradiographie

Quoi ?

→ ***les gènes (ADN / ARN)***
leurs transcrits (ARNm)

Principe

Sonde nucléique marquée = Complémentaire



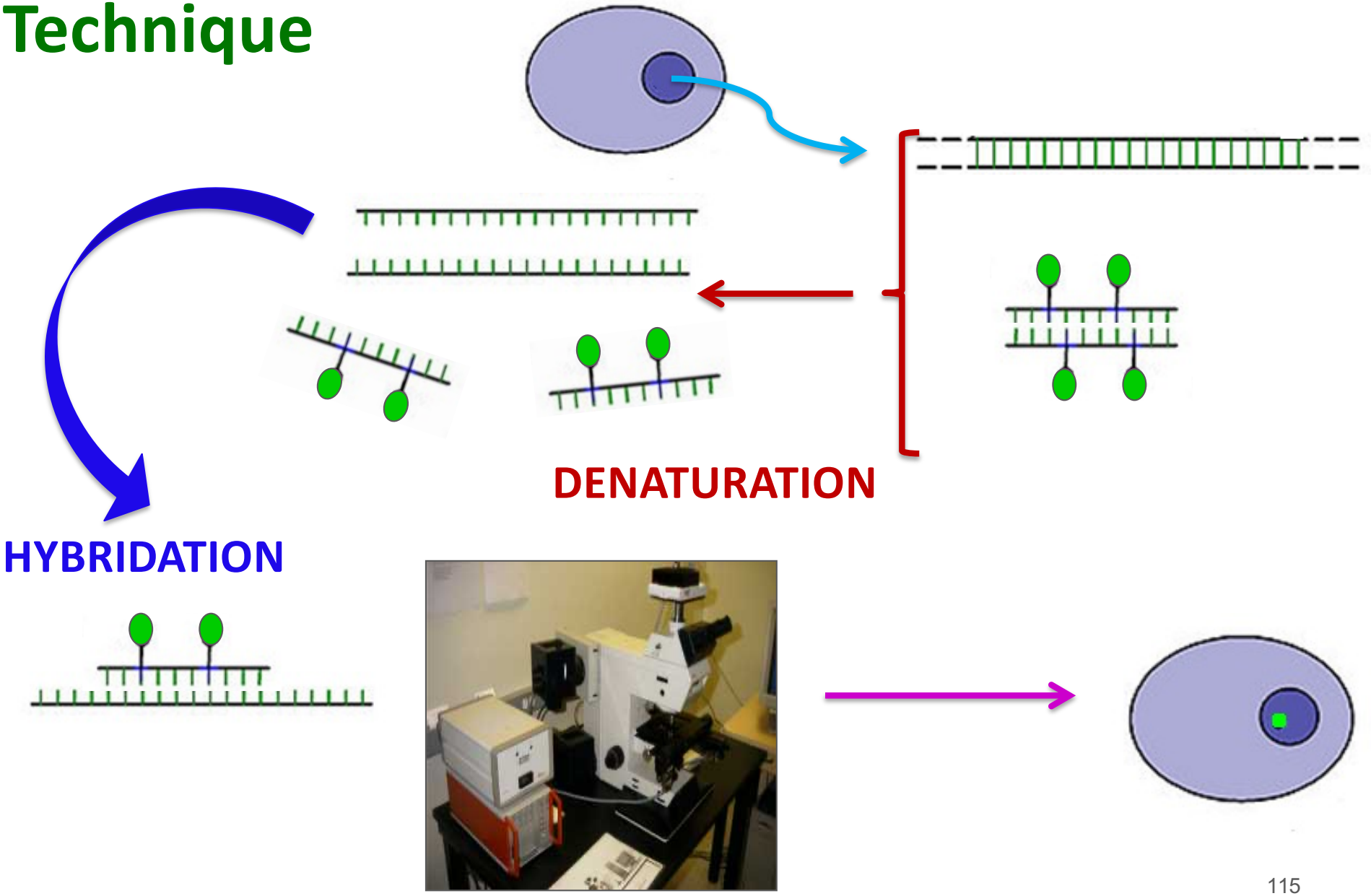
→ détecter et localiser une séquence spécifique d'ADN/ARN

Nature des sondes :

ADN, ADNc, ARN (riboprobes), oligonucléotides

III. B) Hybridation *in situ*

Technique



Technique

Révélation des hybrides

1) Hybridation radioactive

– Principe:
  - Marquages des sondes par isotopes radioactifs (^{32}P, ^{3}H)
  - Révélation des hybrides par autoradiographie

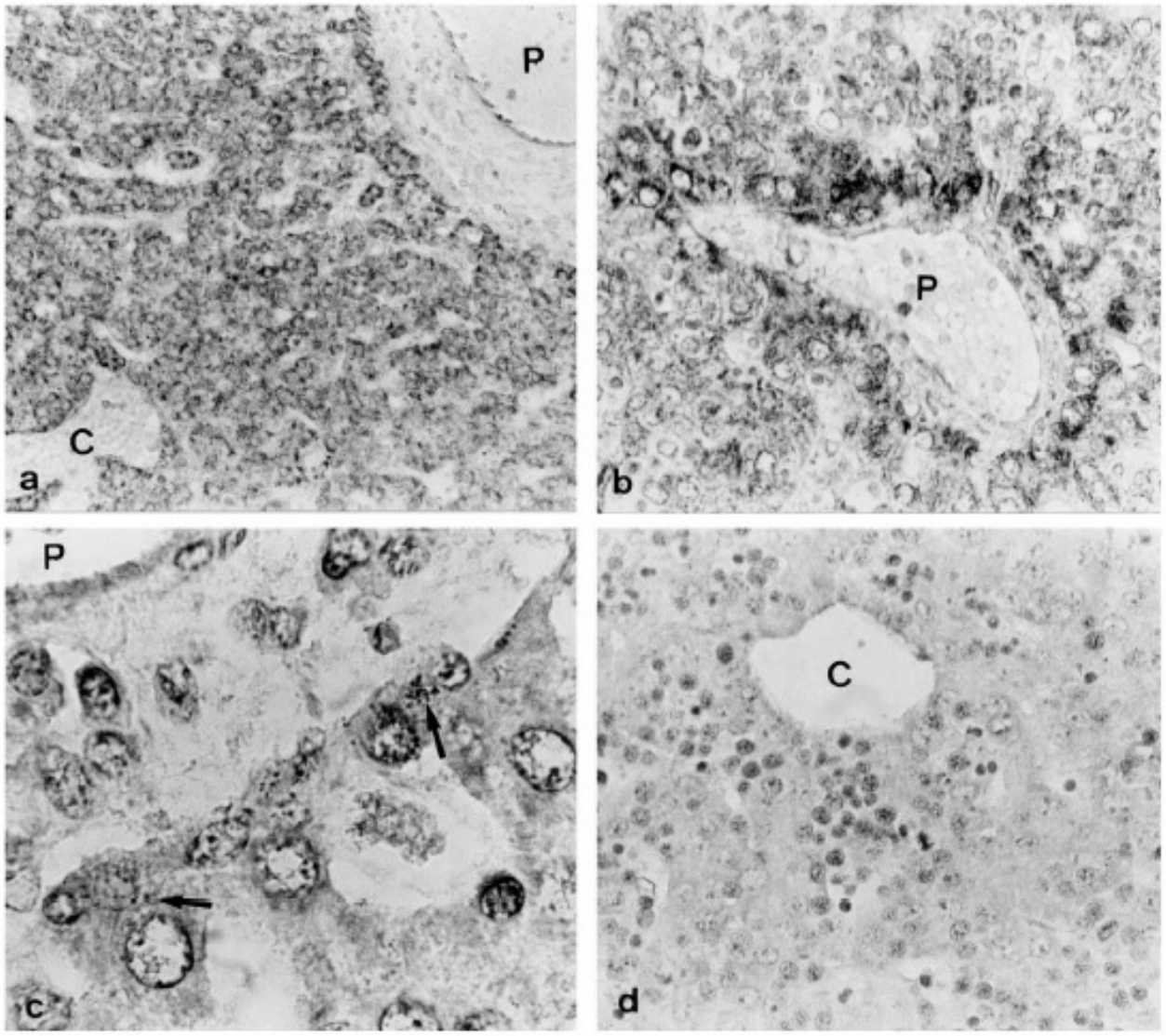
– Avantages:
  - Sensibilité

– Limites
  - Logistique

cf C) Autoradiographie

III. B) Hybridation *in situ*

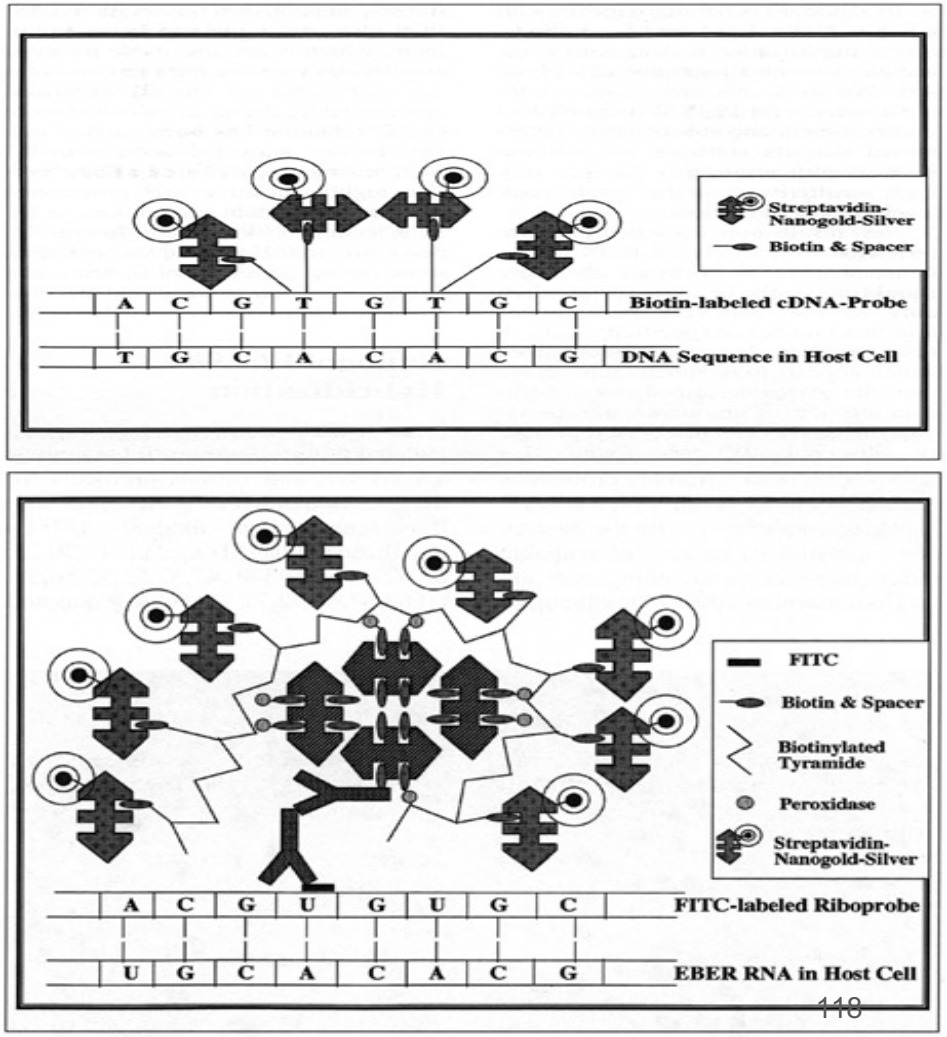
ARNm exprimé spécifiquement dans cellule hépatique



III. B) Hybridation *in situ*

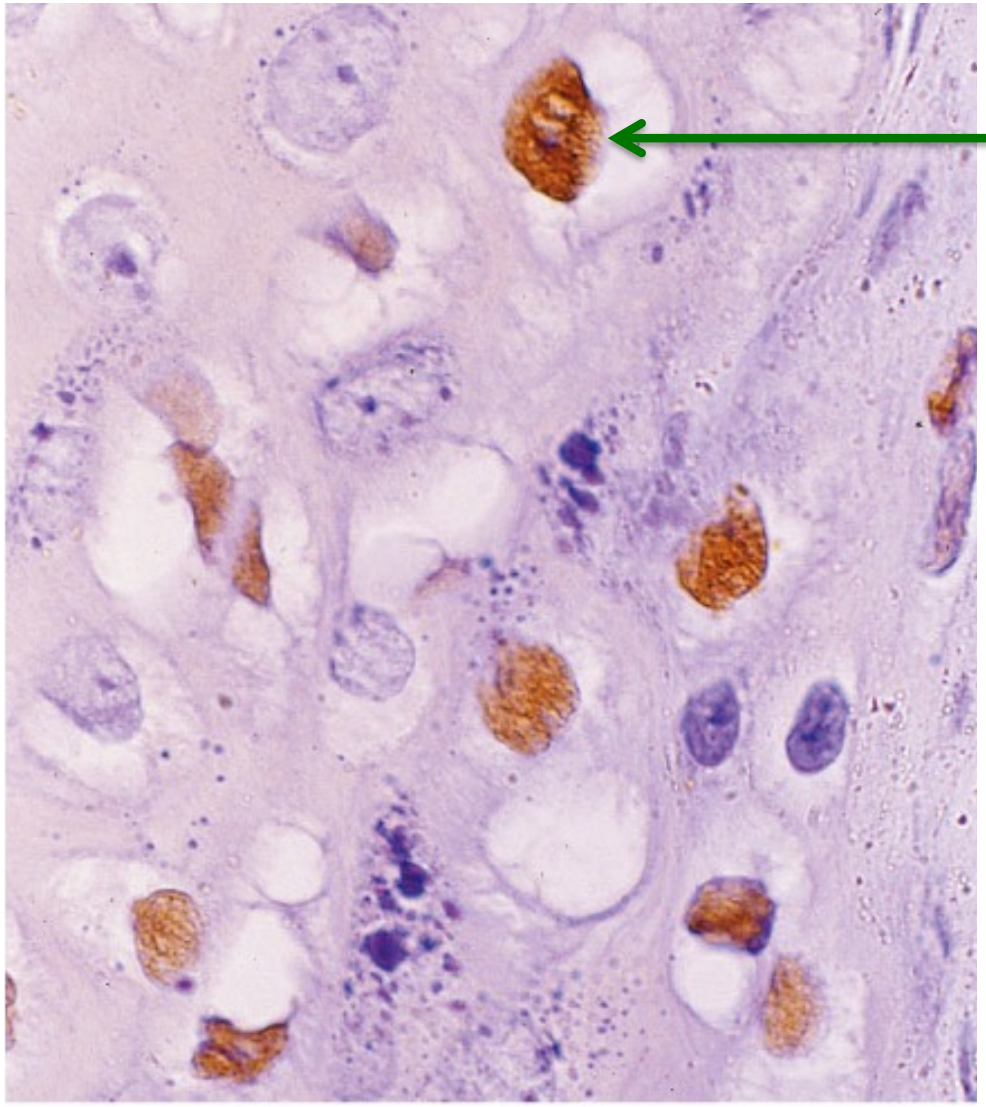
Révélation des hybrides

- Hybridation non radioactive
  - Marqueurs directs:
    - Fluorescéine
  - Marqueurs indirects:
    - Digoxygénine
      - Ac anti-DGX
    - Biotine
      - Streptavidine/Perox
      - Streptavidine/Métaux



III. B) Hybridation *in situ*

Exemple: détection du papillomavirus type 2
Biopsie (tumeur épithéliale cervicale)

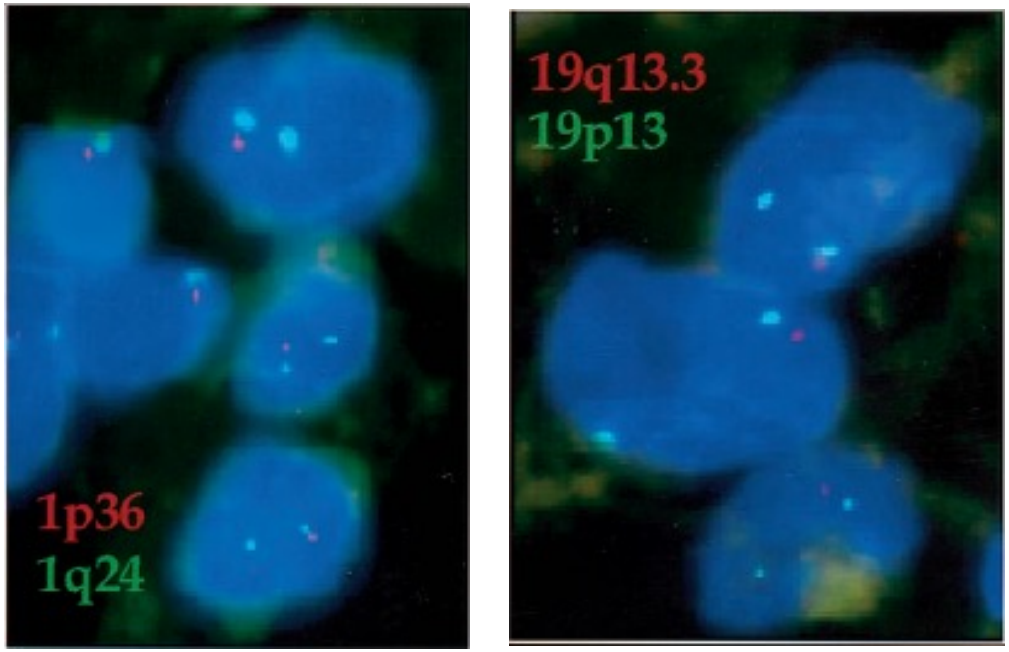


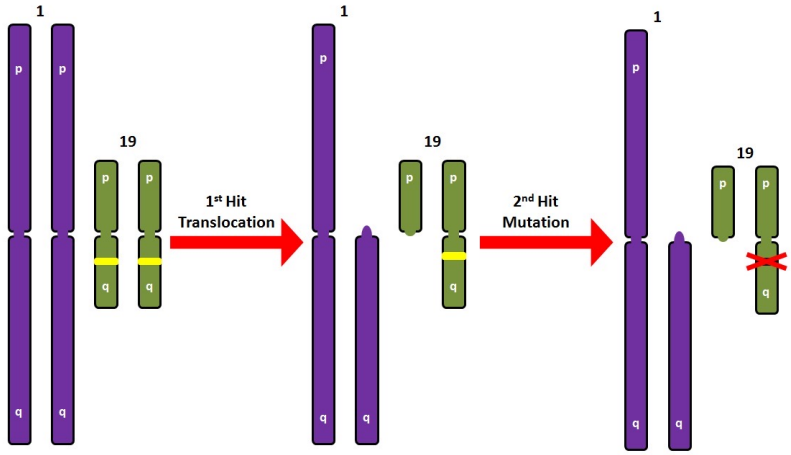
ADN viral (HPV)

Cytogénétique moléculaire *in situ*
révélée par sondes fluorescentes

FISH

Exemple: détection de la co-délétion 1p/19q *dans les gliomes*





Smith et al., 2000

Sur noyaux interphasiques

Cytogénétique moléculaire

FISH

Exemple:

Caryotype 24 couleurs:
chromosome painting



Cowell et al., 2004

Translocation t(X;17) (gliome)

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

III. C) Autoradiographie

A) Immunohistochimie

B) Hybridation in situ

C) Autoradiographie → ***Quoi ?***

Sites de synthèse des molécules biologiques

III. C) Autoradiographie

Principe

Précurseurs de macromolécules

Marquées avec des isotopes radioactifs



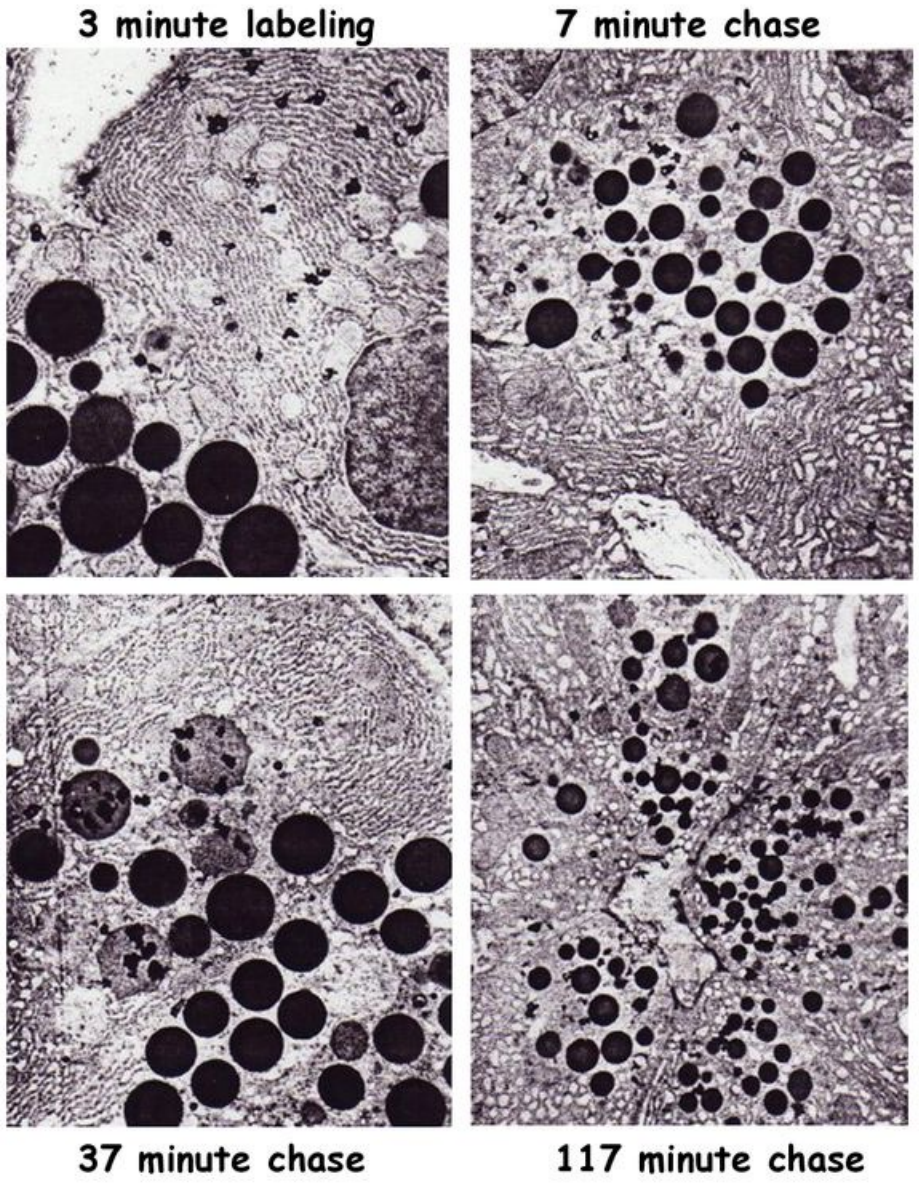
→ détecter et localiser un site de synthèse/
suivre le cheminement de la macromolécule

III. C) Autoradiographie

Delineation of secretory pathway:

Pulse chase autoradiography in pancreatic exocrine cells

Experiment from Jamieson and Palade, 1967



Marquage S35→ protéines

III. C) Autoradiographie

Expérience de Jamieson et Palade

Suivi à la leucine tritiée, grains de zymogène radioactifs.



3 minutes:
grains d'argent sur le RE

20 minutes:
grains d'argent sur l'appareil de Golgi

90 minutes:
grains d'argent sur les vésicules sécrétrices

Figure 2: Suivi de l'exocytose des grains de zymogène. (d'après le Alberts)

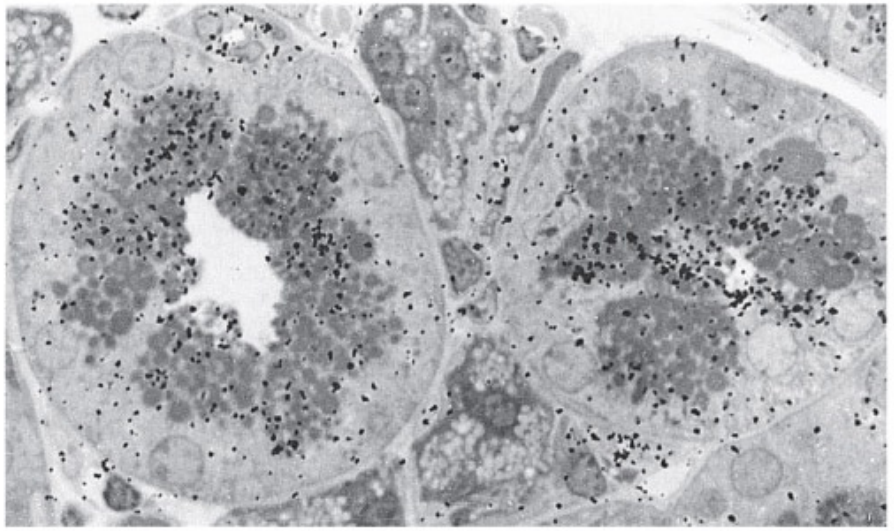
III. C) Autoradiographie

Exemple: Glande sous-mandibulaire (souris)

Microscopie électronique fucose : **glycoprotéine salivaire**

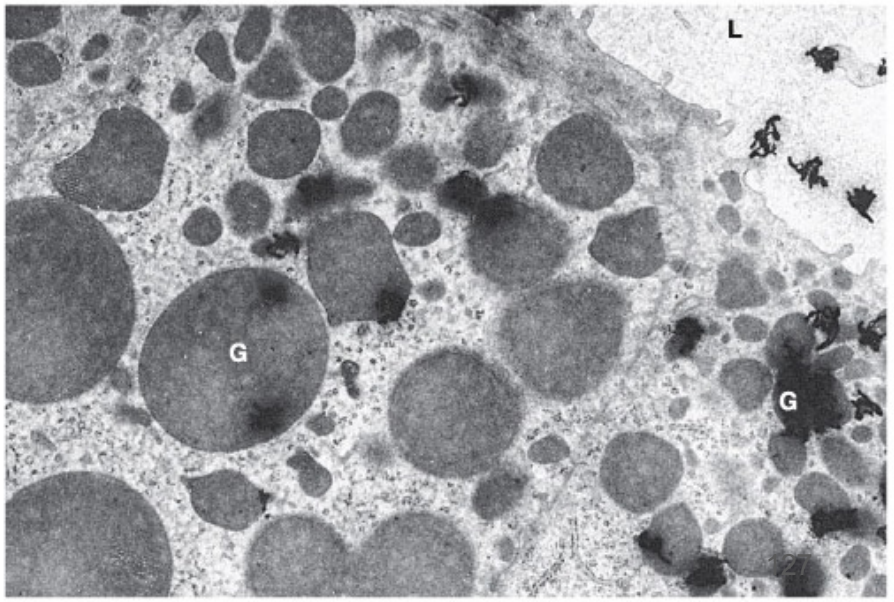
Microscopie photonique

[^{3}H] fucose 8h avant



A

Microscopie électronique



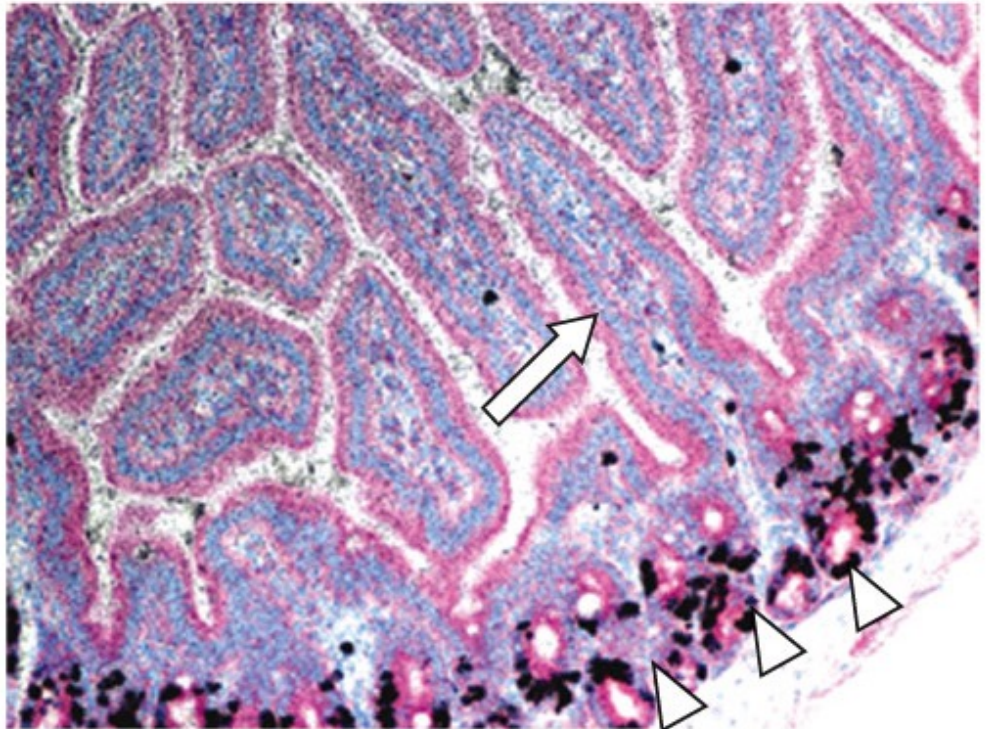
III. C) Autoradiographie

Exemple: Intestin (souris)

[^{3}H] thymidine
1h avant sacrifice

Synthèse d'ADN =
Cellule en cycle

Localisation au niveau de la basse des cryptes



BILAN INTERMEDIAIRE

I- Introduction

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie → Focus sur le produit de réaction, générique, on apporte le catalyseur non biologique

C) Histoenzymologie → Focus sur l'enzyme qui effectue la réaction, spécifique, on apporte un révélateur de son produit de réaction

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie → Ciblage d'une protéine, très spécifique,
Immunohistochimie ne précise que le moyen de détection

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

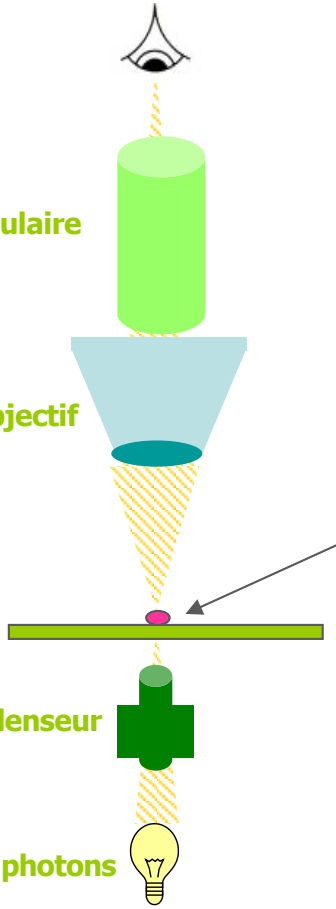
B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

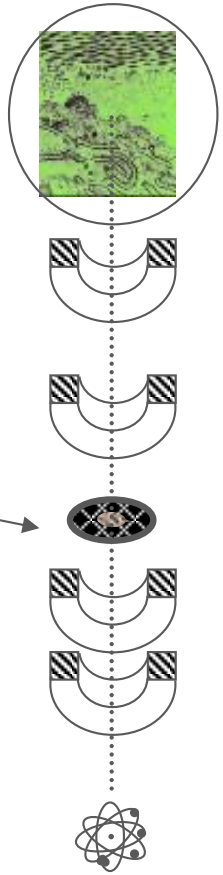
D) Microscopie en champ proche

IV- Les techniques d'imagerie

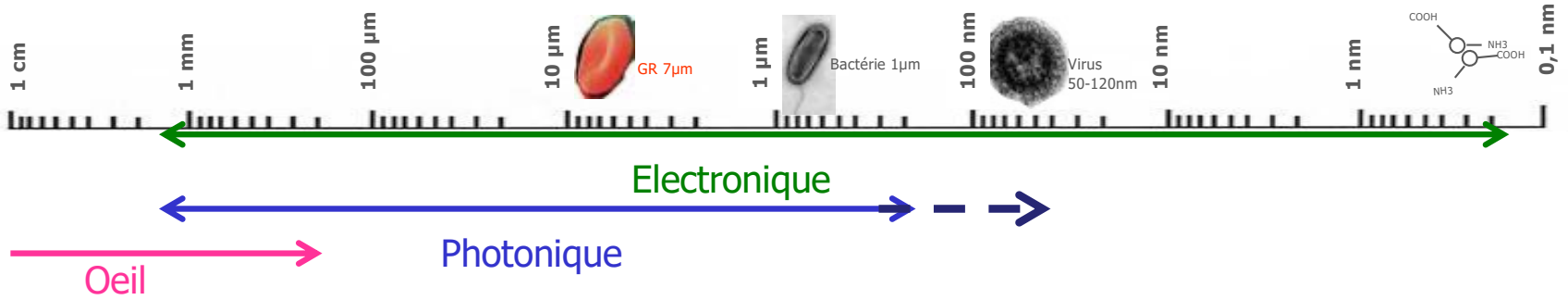
Photonique ou Optique
(lentilles de verre)



Échantillon



Electronique
(lentilles électromagnétiques)





Microscope du type utilisé par Galileo et modifié par Marcello Malpighi vers 1635

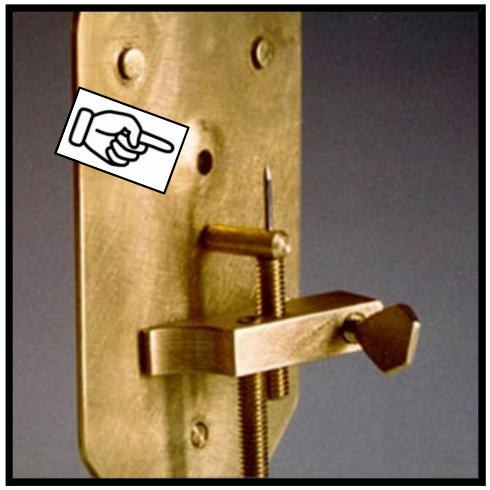




Microscope conçu par Christopher Cock et utilisé par Robert Hook vers 1665



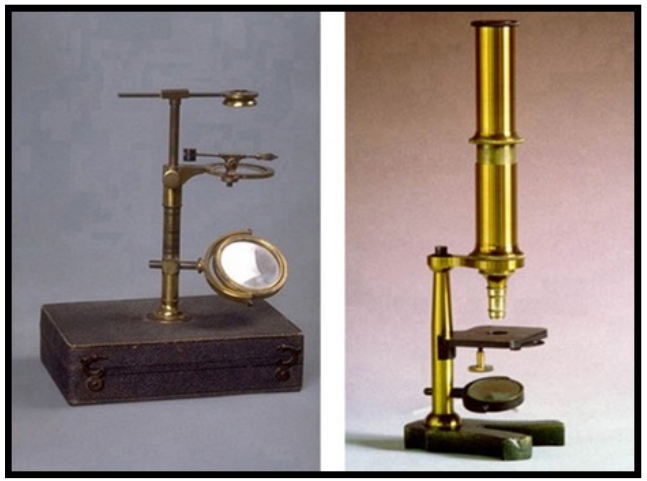
Microscope utilisé à Londre vers 1715 par John Marshall.



Microscope simple :
Lentille oculaire
x 300

Microscope composé :
Lentille oculaire - Objectif(s) - Miroir

Monoculaire





Binoculaire

x 400/1500

Source lumineuse interne



PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

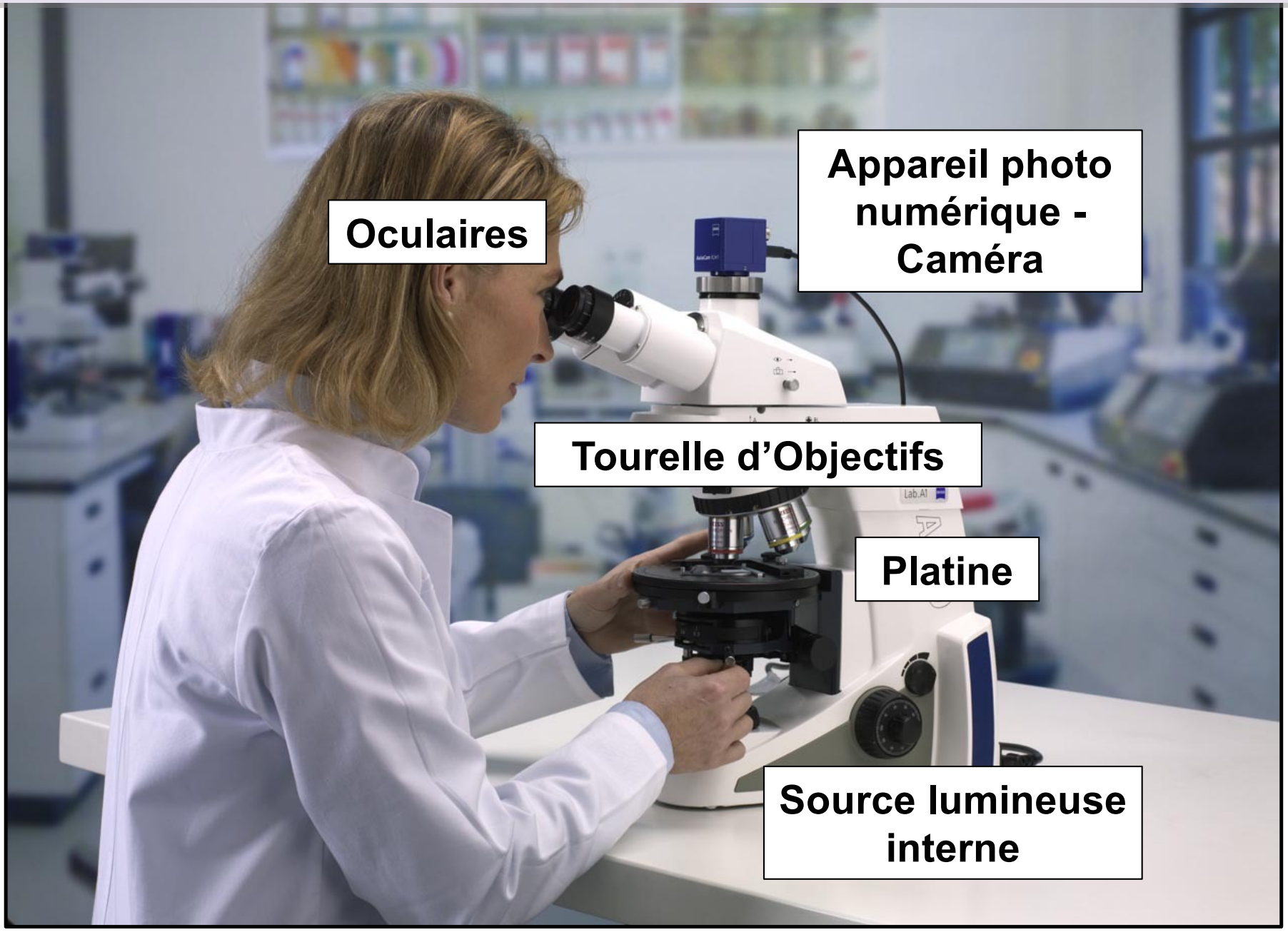
III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

IV- A) Microscopie optique



- Microscope Optique

à Contraste de Phase Inversé

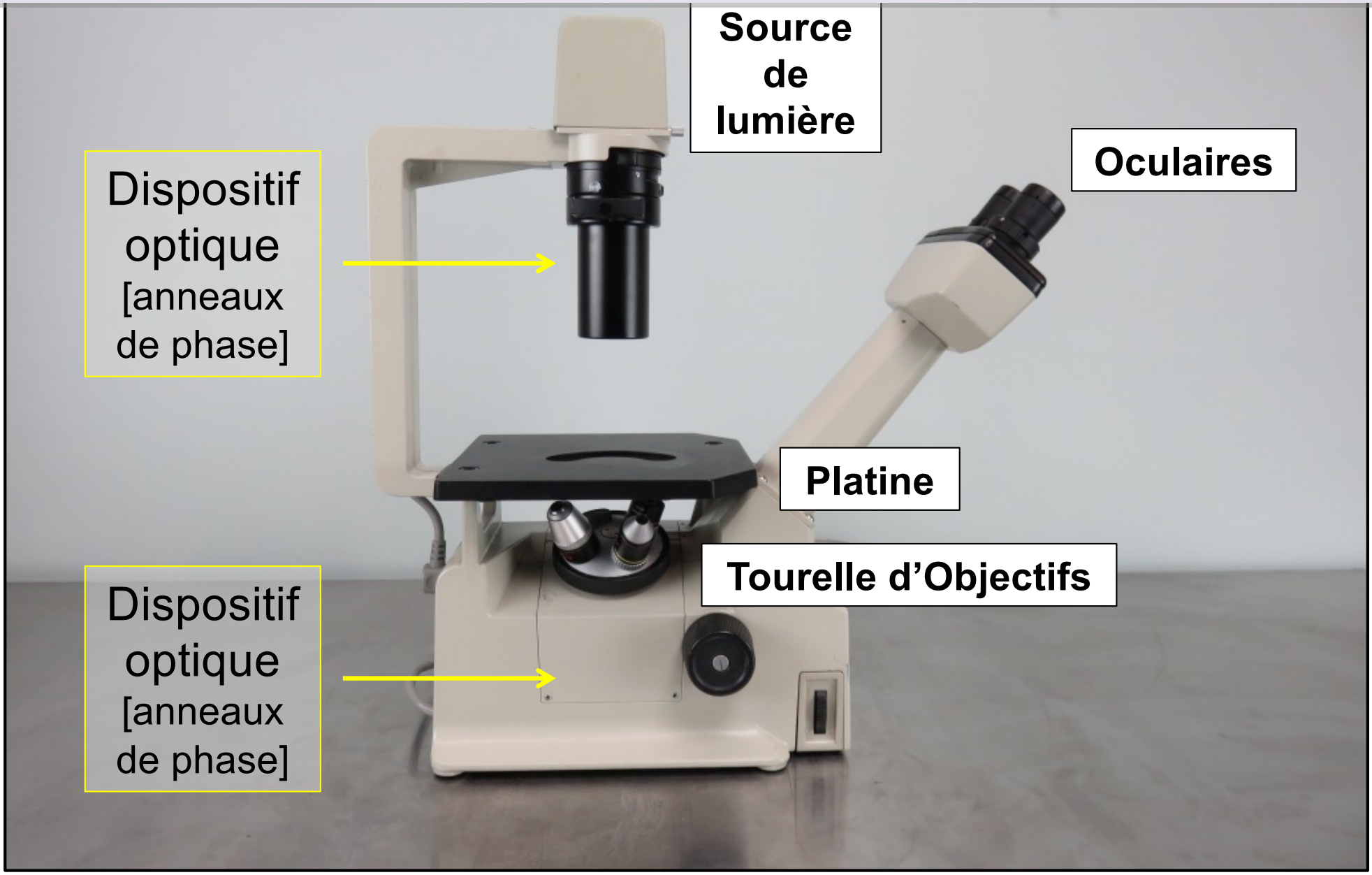
- Lumière visible, photonique
[λ 400-800 nm]

- Microscope inversé
(sous la platine)

⇓

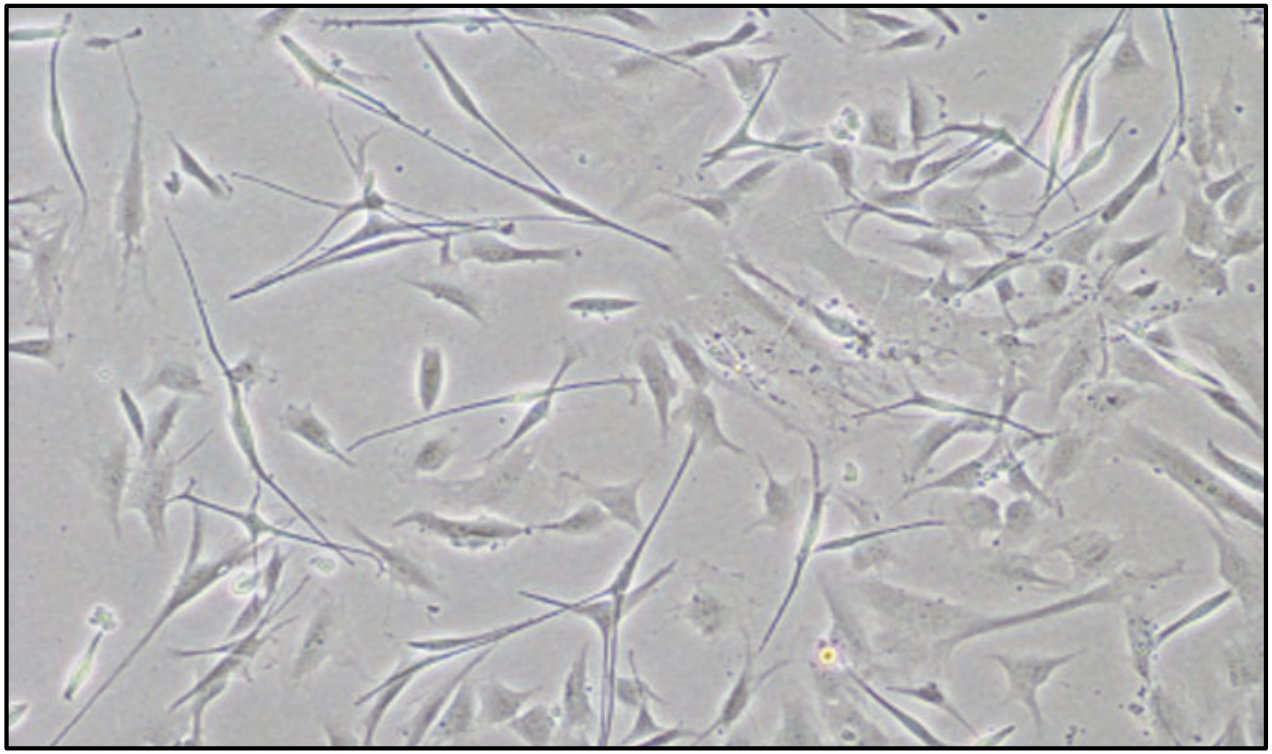
Identifier diverses structures
[cellules vivantes, préparations non colorées).

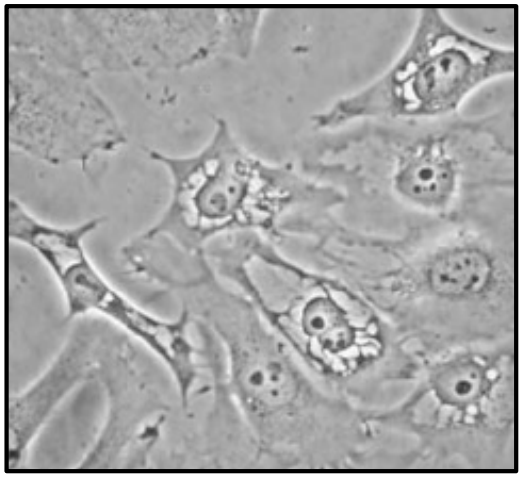
IV- A) Microscopie optique



Microscope optique à contraste de phase.

IV- A) Microscopie optique

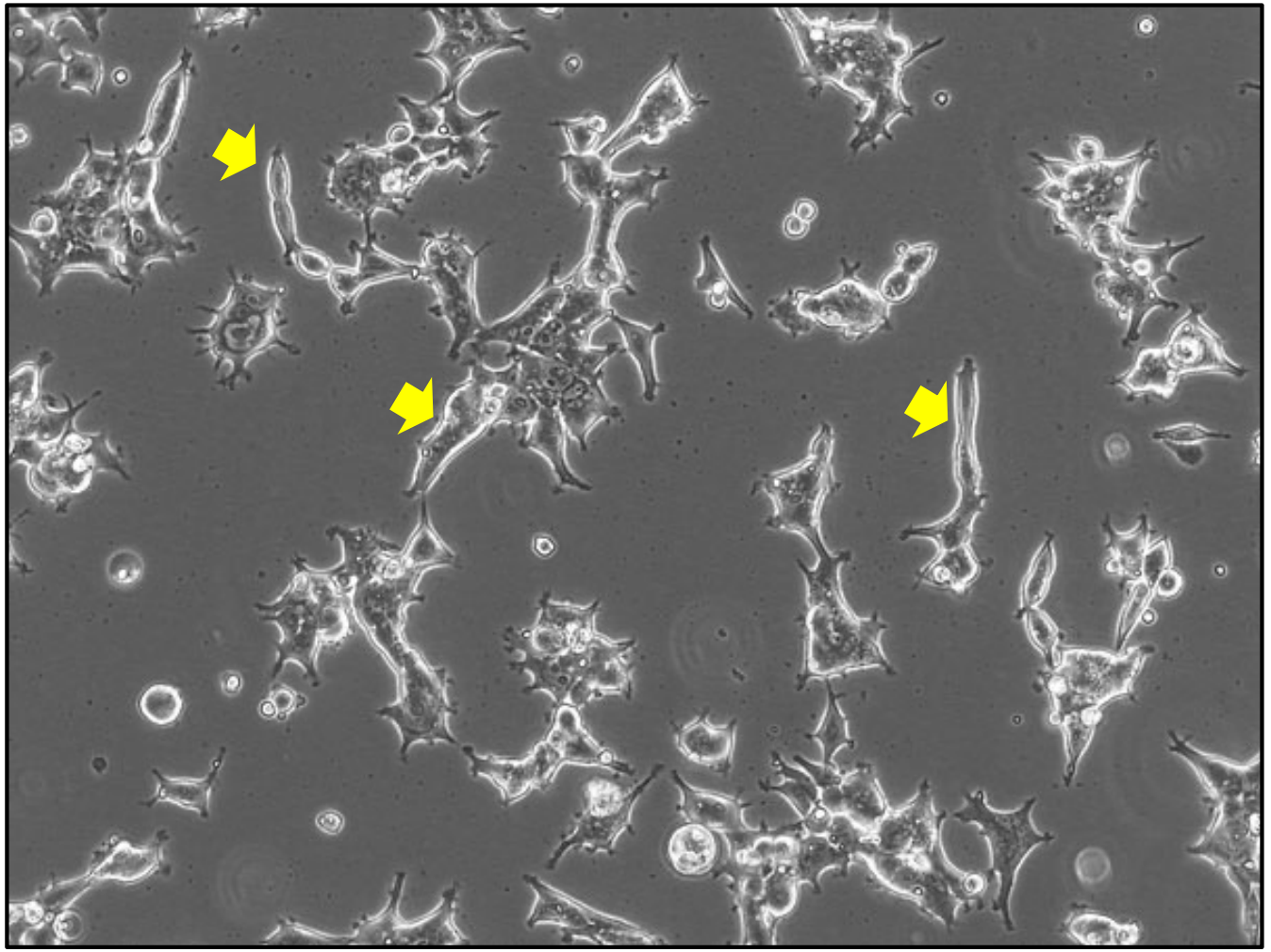




Culture cellulaire - MO à contraste de phase inversé

Identification de diverses structures !

IV- A) Microscopie optique



Culture cellulaire - MO à contraste de phase inversé

Artefacts en halo.

- Microscope Optique

à Contraste de Phase Interférentiel

- Lumière visible, photonique
[λ 400-800 nm]

- Microscope inversé,

avec deux dispositifs optiques
[dédoublement du faisceau de lumière,
puis recombinaison]

⇓

Supprimer les artefacts en halo
Impression de relief

IV- A) Microscopie optique



Microscope optique à contraste de phase interférentiel

Artéfacts en halo	Impression de relief

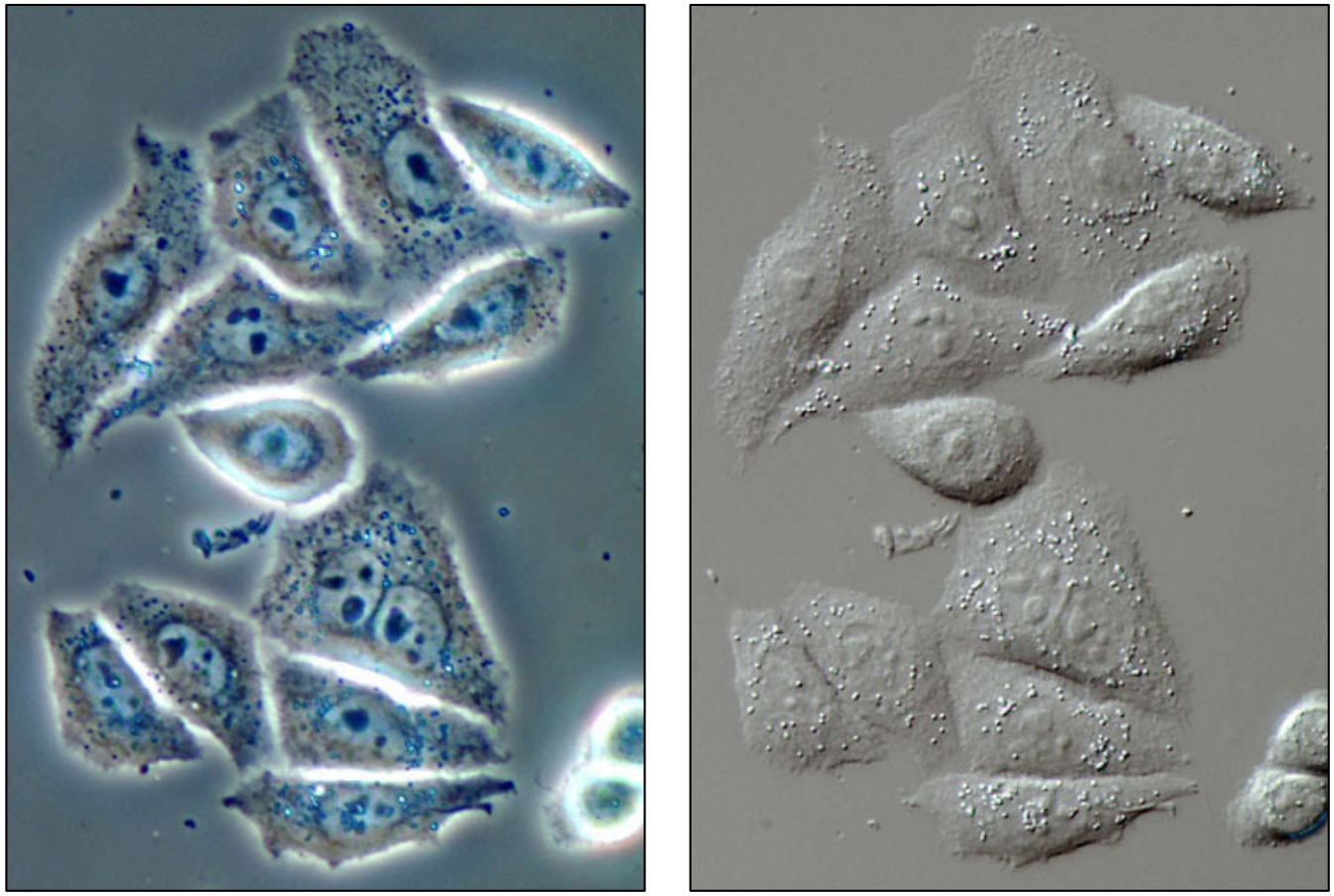


Fig. gauche - Microscope à contraste de phase inversé

Fig. droite - Microscope à contraste de phase interférentiel.

- Champ d'application

Etude de cellules vivantes

⇓

Modèles d'études :

Cultures cellulaires

↓

Observation

de préparations non colorées !

≠ Approche tissulaire (Etude *in vivo*)

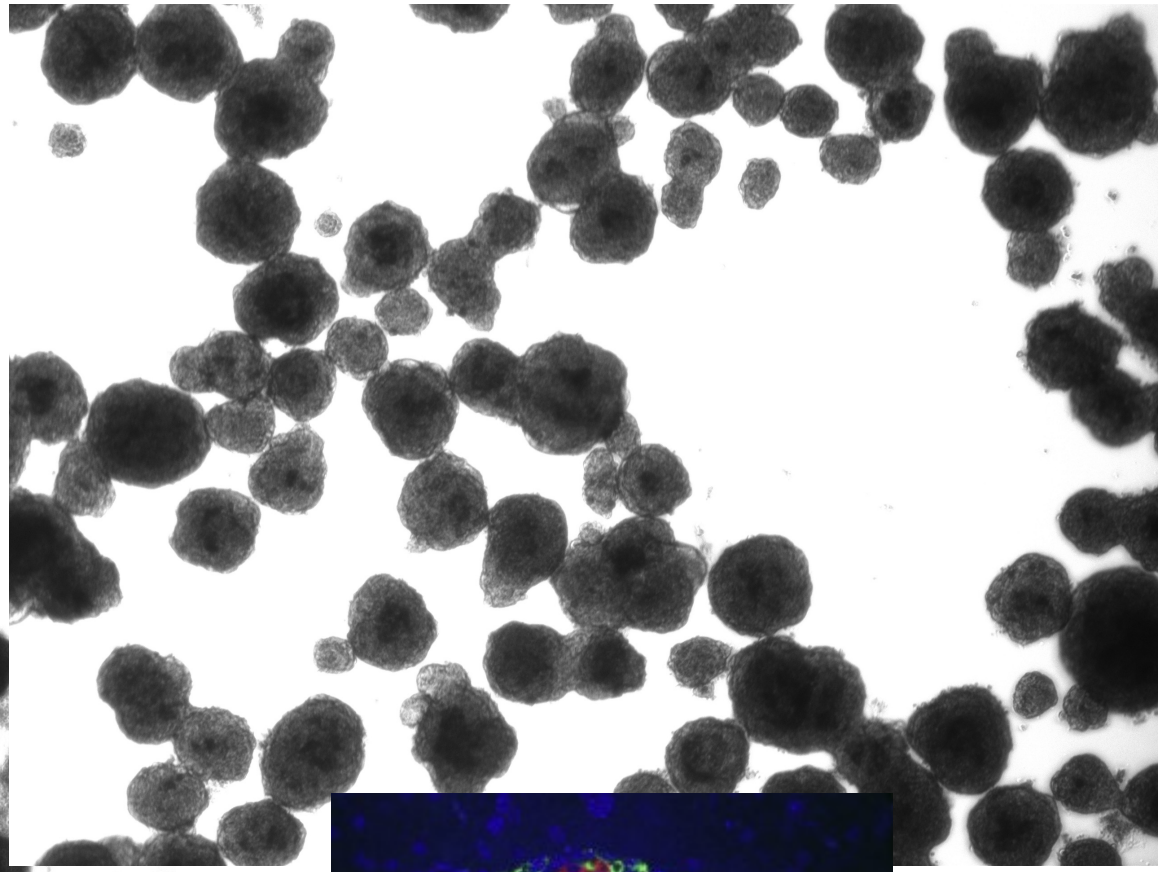
↓

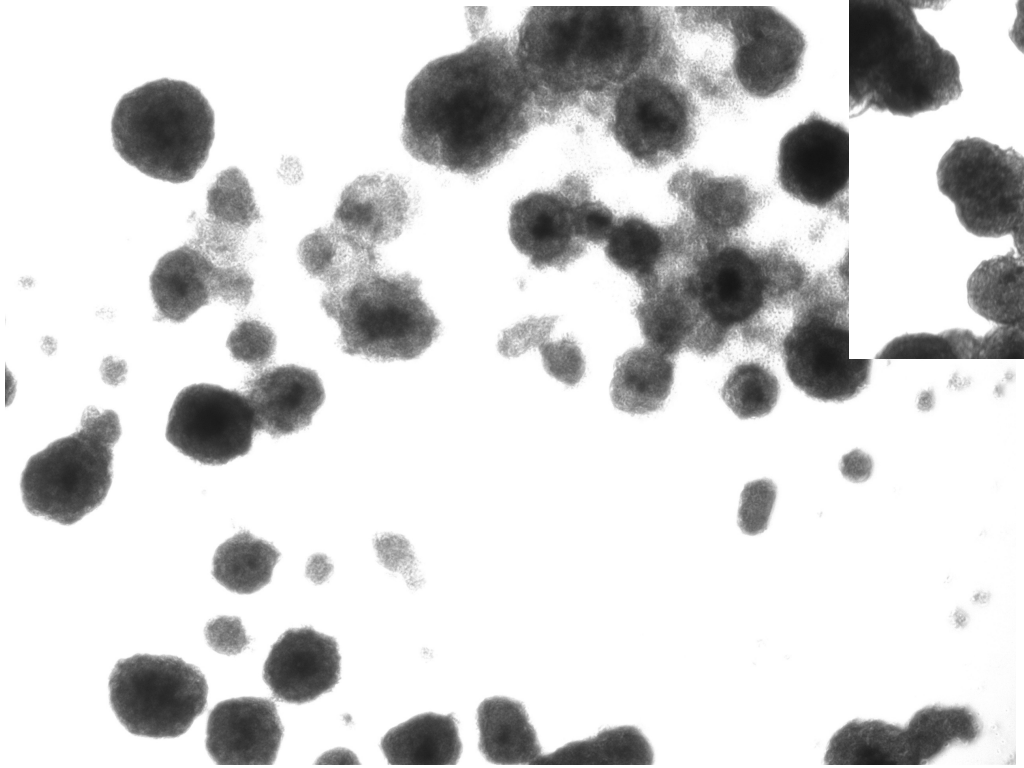
Observation

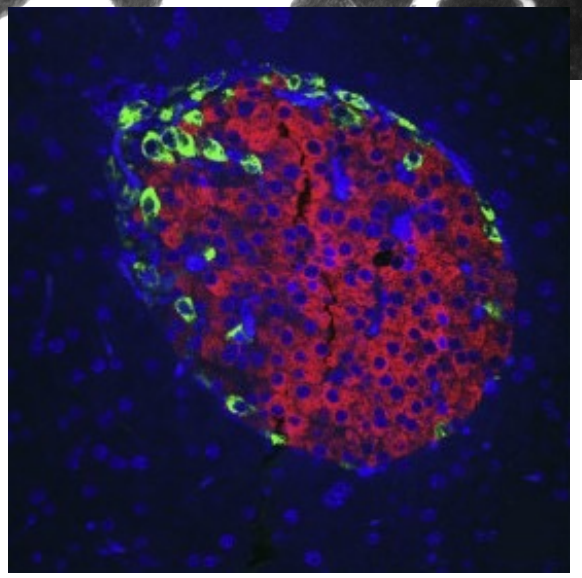
de préparations colorées !

IV- A) Microscopie optique

Vérification qualité d'ilots pancréatiques pour greffe ou recherche







○ Origine des Prélèvements

Du bloc opératoire ou service spécialisé CHU
[cultures *in vitro* ou *ex vivo*]

↓

↓ Etapes

↓

Enceinte de travail :
Pièce de culture -

Milieu stérile

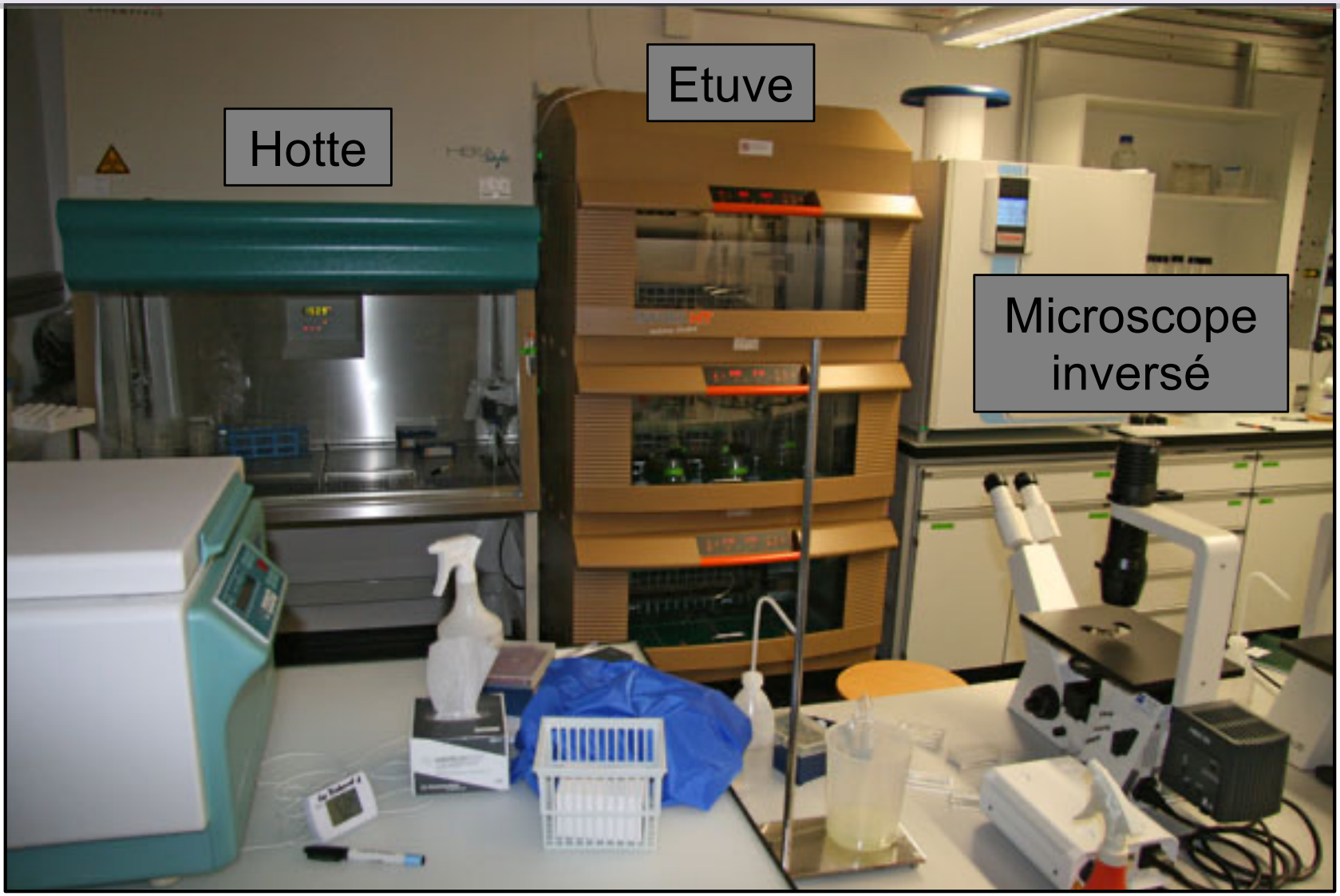
IV- A) Microscopie optique



Enceinte de travail : Pièce de culture

Enceinte « stérile ».

IV- A) Microscopie optique



Matériels utilisés en pièce de culture.

IV- A) Microscopie optique



Laboratoire P3

Pièce de culture - Hotte

* Principe de Précaution :
« Envisager le pire pour soi et les autres ! »

* Principe de Confinement :
« Toujours enfermé ! ».

IV- A) Microscopie optique



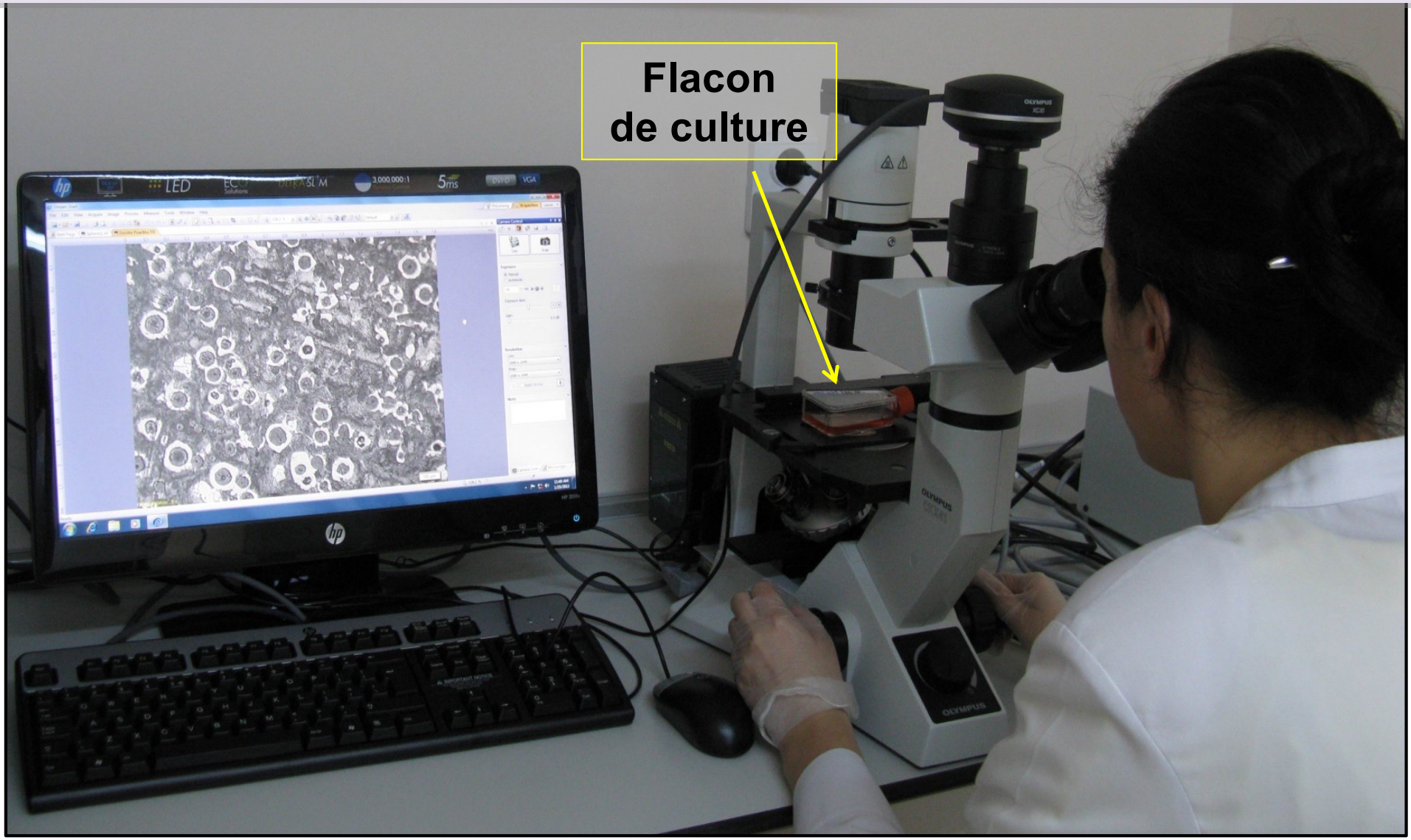
Laboratoire P4

« Prévenir
toute émission »

Sas de décontamination - Portes étanches - Bâtiment blindé - Décontamination chimique et stérilisation des effluents liquides - Sécurité anti-incendie - Dalle parasismique

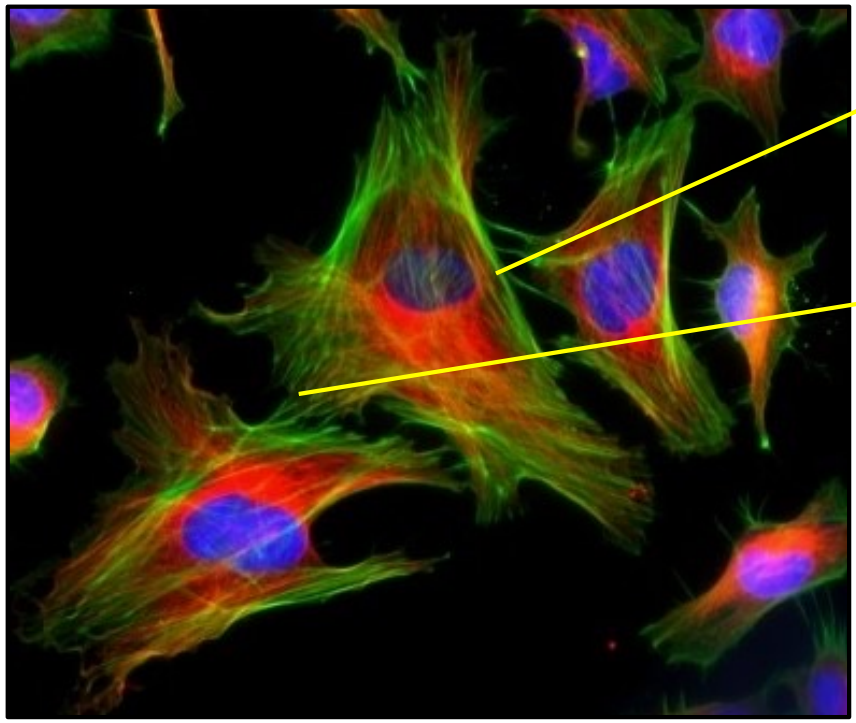
Virus Ebola, Lassa, Marburg.

IV- A) Microscopie optique



Surveillance d'une culture *in vitro* - Milieu stérile.

IV- A) Microscopie optique





Fluorescence
en dehors du plan focal

Culture *in vitro*

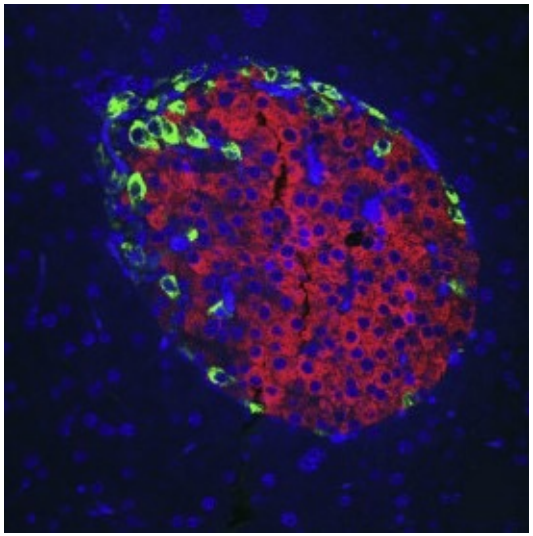
Fluorochromes de différentes affinités

⇓

Noyau (marquage bleu)

Cytosquelette (marquages rouge & vert)

Résolution à fort grossissement !



○ Inconvénient de la microscopie en fluorescence

Halo de lumière autour des structures fluorescentes
[Limites de résolution]

Ce phénomène limite la possibilité de distinguer des points proches, et/ou situés sur différents plans focaux.

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

• Microscope Confocal

- Microscope à fluorescence inversé ou non inversé

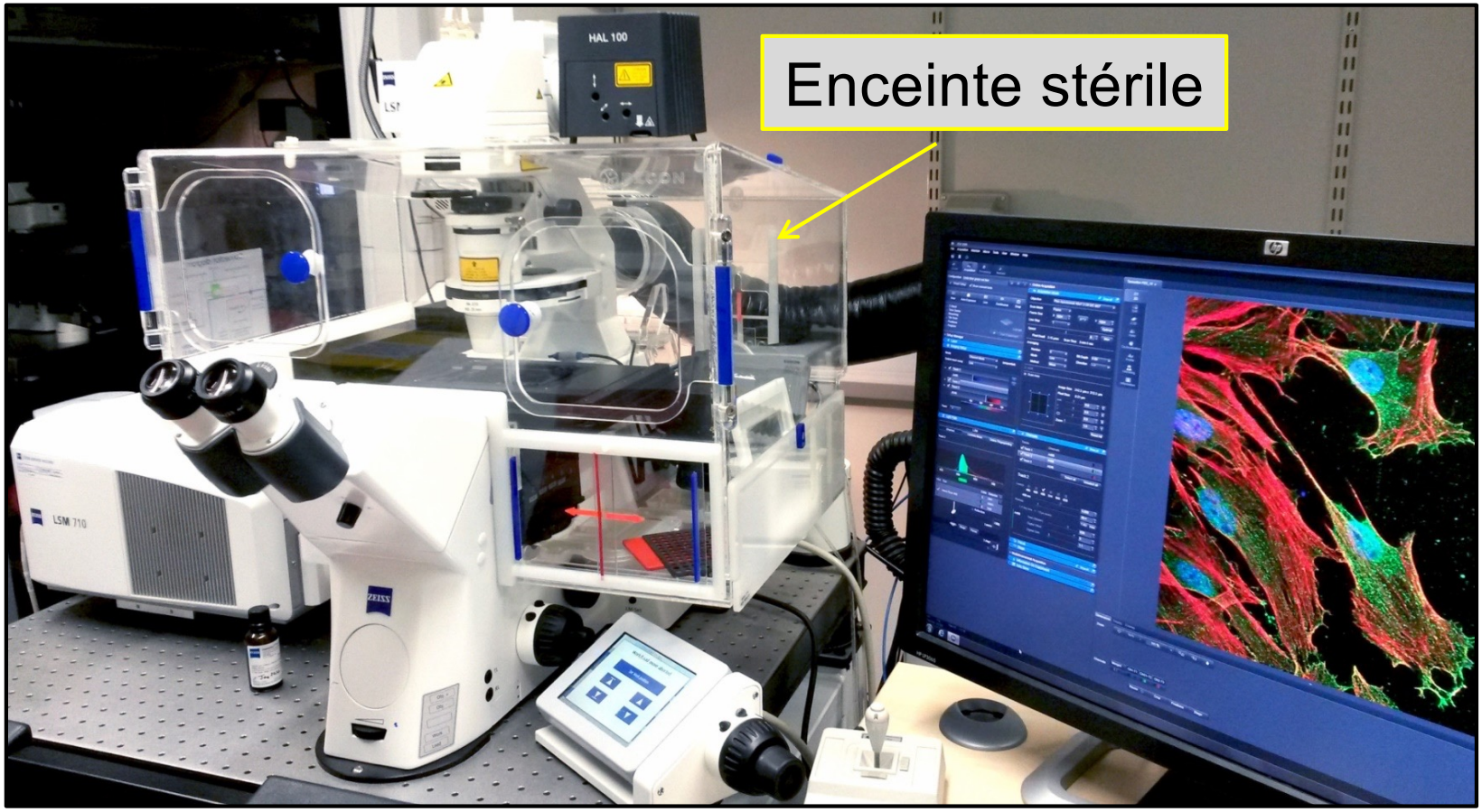
1) Balayage laser

→ Emission intense et focalisée du fluorochrome

2) Diaphragme de détection

→ Capter la fluorescence provenant du plan focal : coupe(s) optique(s)

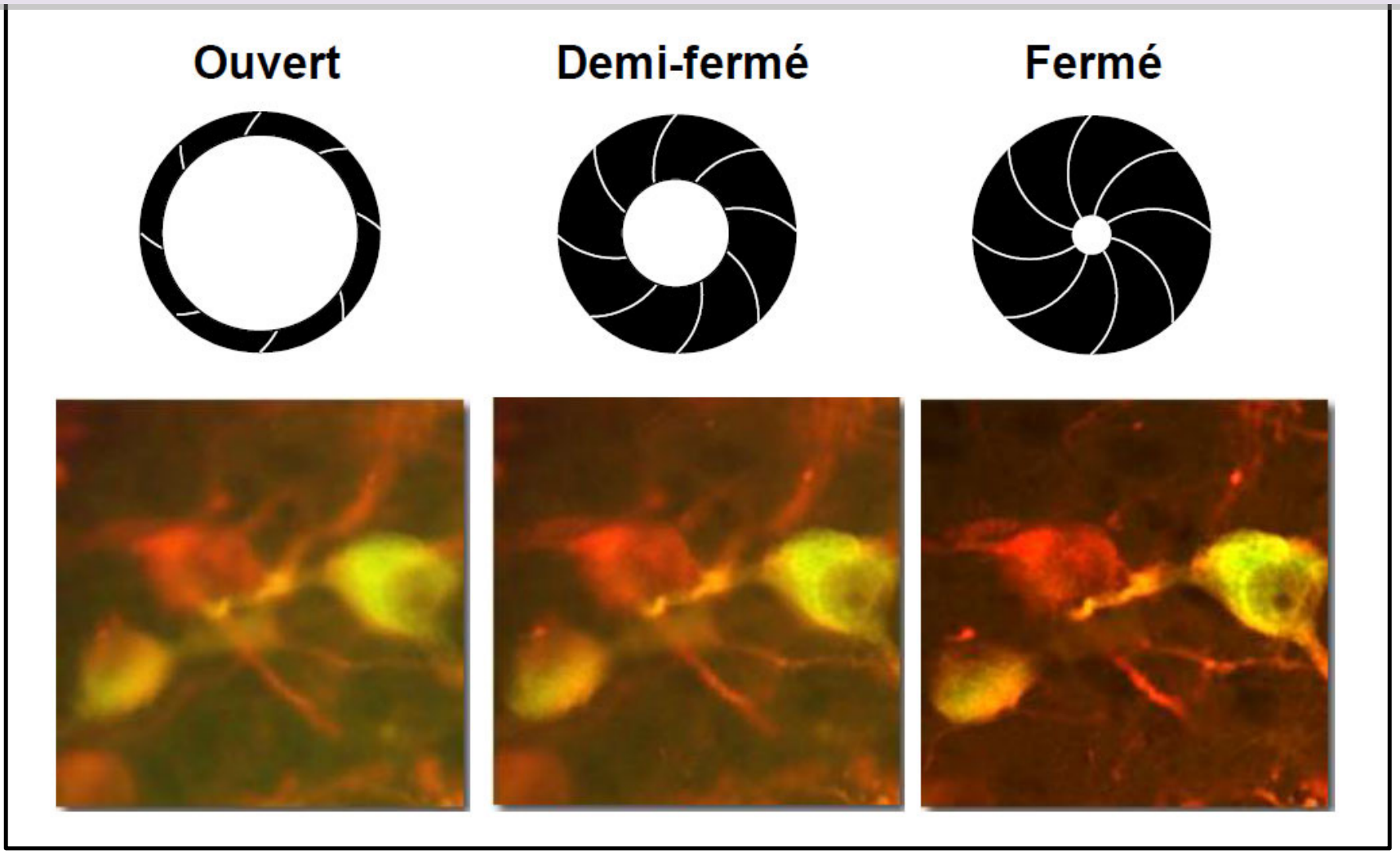
IV- B) Microscopie optique nouvelle génération



Microscope confocal inversé - Pièce de culture

Enceinte stérile.

IV- B) Microscopie optique nouvelle génération



Diaphragme de détection ouvert : image floue

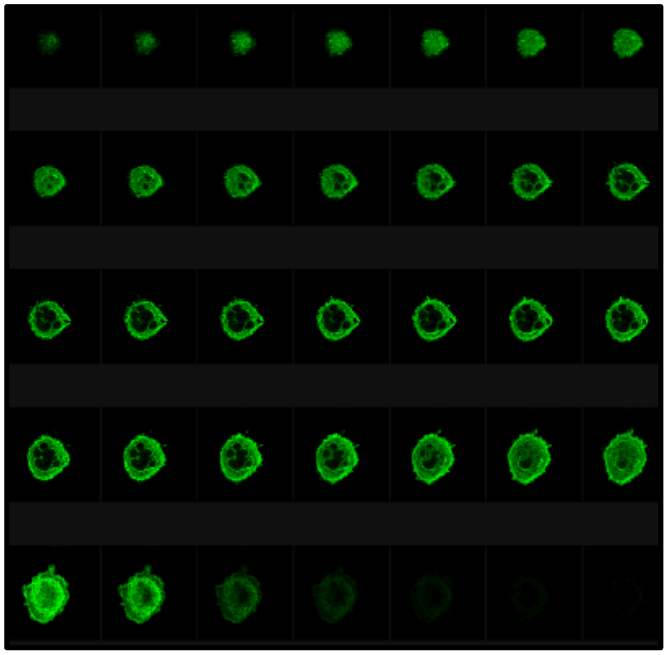
Diaphragme de détection fermé : image nette.

3) Motorisation de la platine selon les trois axes x, y et z

→ Analyse dans l'épaisseur de l'échantillon

4) Logiciel de traitement d'images

→ Images numériques



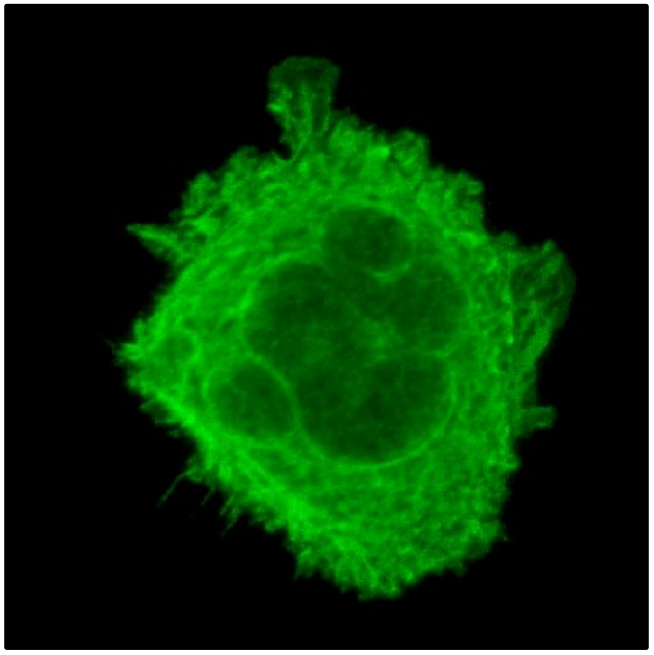


Fig. gauche : 40 coupes optiques d'une cellule

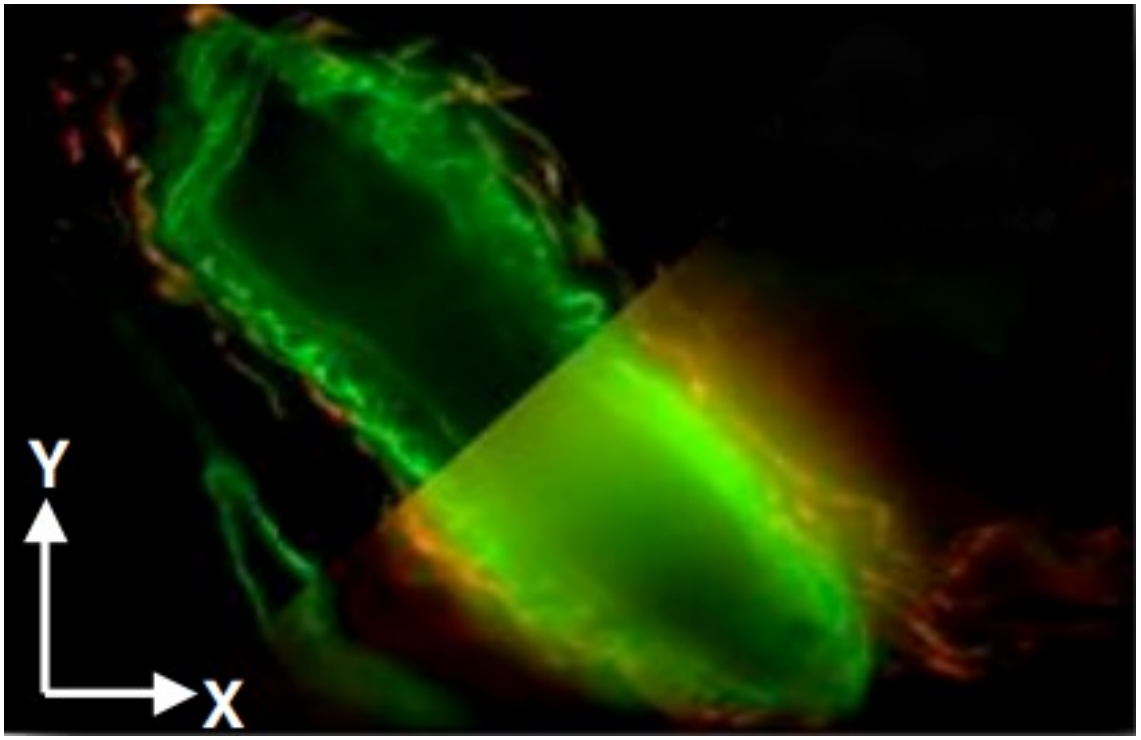
Fig. droite : reconstruction en 3D

○ Intérêts du microscope confocal

* Améliorer la résolution du MO
→ Image plus nette

* Permettre une analyse 3D

* Reconstruction 3D.



Microscope confocal vs Microscope à fluorescence.

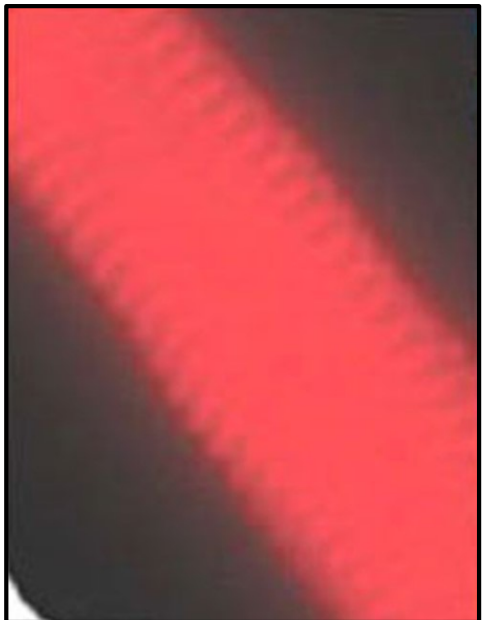
○ Limitation de ces principes

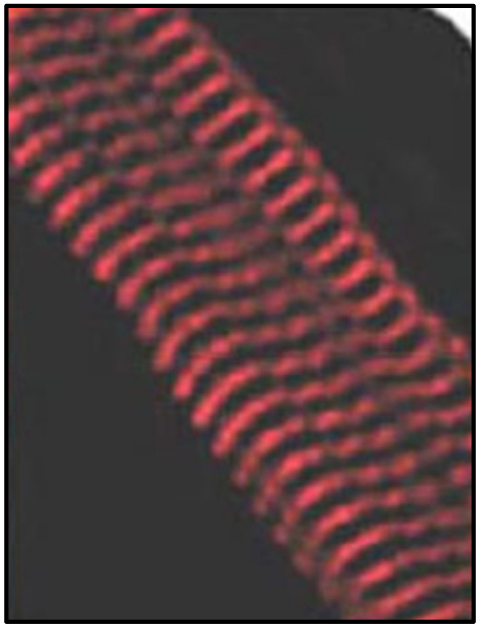
Pouvoir Séparateur en MO : 200 nm

1) Amélioration de la résolution des images

- Traitement ultérieur des images par des algorithmes, dit de « débruitage d'ondelettes » (« bruit de fond »)

Microscopie confocale à déconvolution.



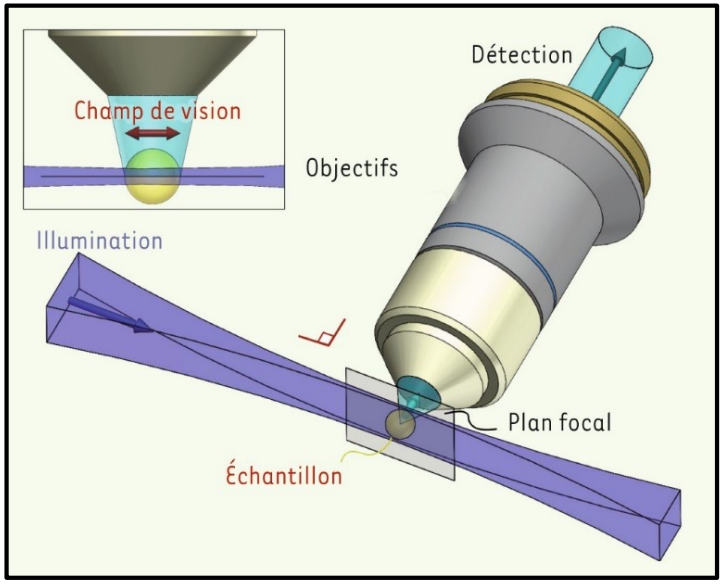


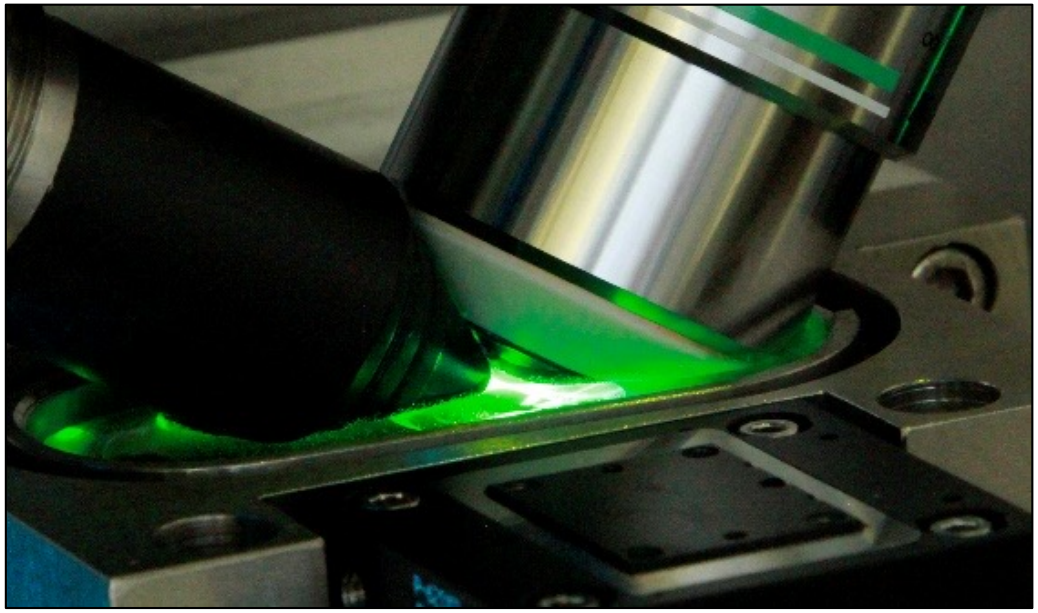
Fibre musculaire

Fig. gauche - Microscopie confocale

Fig. droite - Microscopie confocale à déconvolution.

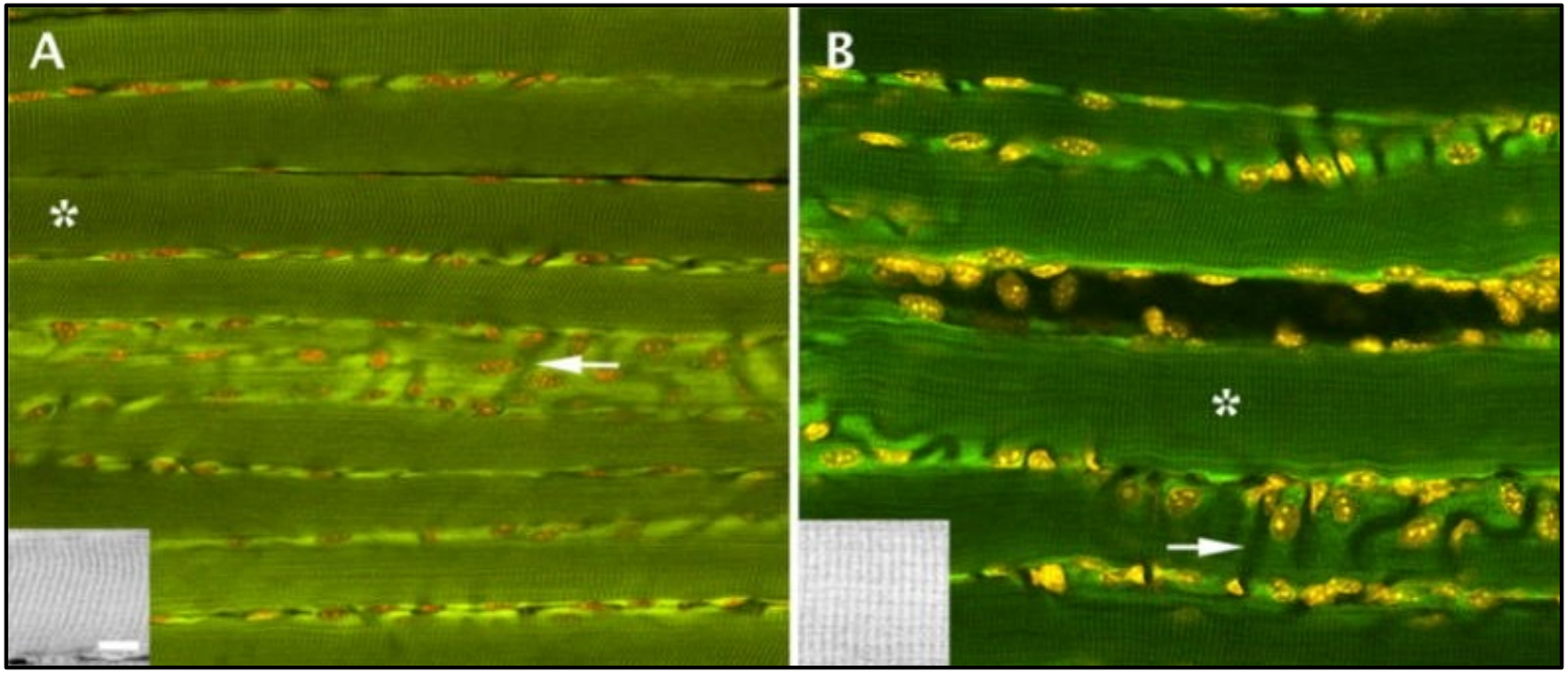
Microscopie confocale à feuille de lumière.





- Systèmes d'illumination et de détection placés à la perpendiculaire l'un de l'autre les rendant ainsi indépendants

IV- B) Microscopie optique nouvelle génération



Fibres musculaires

Fig. gauche - Microscopie confocale à déconvolution

Fig. droite - Microscopie confocale à feuille de lumière.

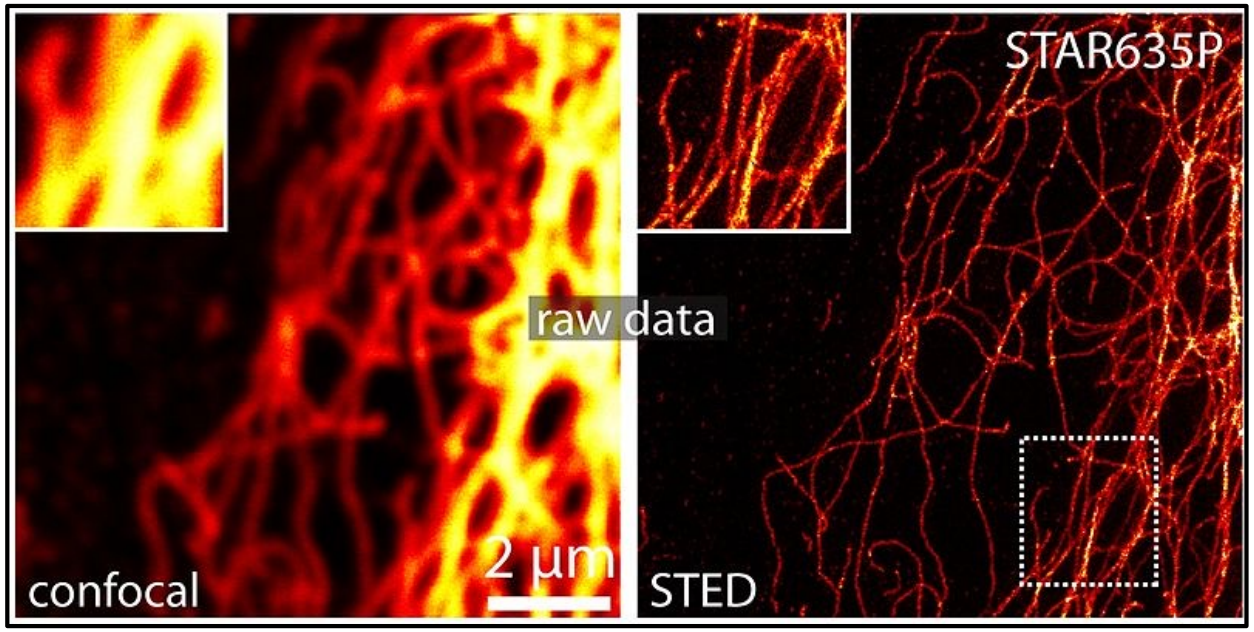
IV- B) Microscopie optique nouvelle génération

2) Amélioration du microscope confocal à balayage laser (multiphoton)

* Confocal mono- ou bi-photon : 200 nm $\rightarrow$ 160-180 nm

* Microscope à deux objectifs colinéaires - Deux objectifs de microscope croisés $\rightarrow$ 130 nm

* Microscopie STED (Déplétion par Emission Stimulée: laser qui annihile toute fluo autour du point ciblé)
$\rightarrow$ 40/80 nm.



Comparaison Confocal/Microscopie STED

Mise en évidence de la vimentine (FI Tissu conjonctif).

IV- B) Microscopie optique nouvelle génération

- Applications du microscope confocal Spécialités Médicales

- Ophtalmologie - Dermatologie

Biopsie optique [cornée, mélanomes]

- Gynécologie - Urologie

Endomicroscope confocal [cancers de l'ovaire et de la vessie ; tumeurs pancréatiques].





Mélanome de Dubreuilh: prolifération de cellules dendritiques organisées en faisceaux denses hyper-reflétants autour des follicules pileux.

PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

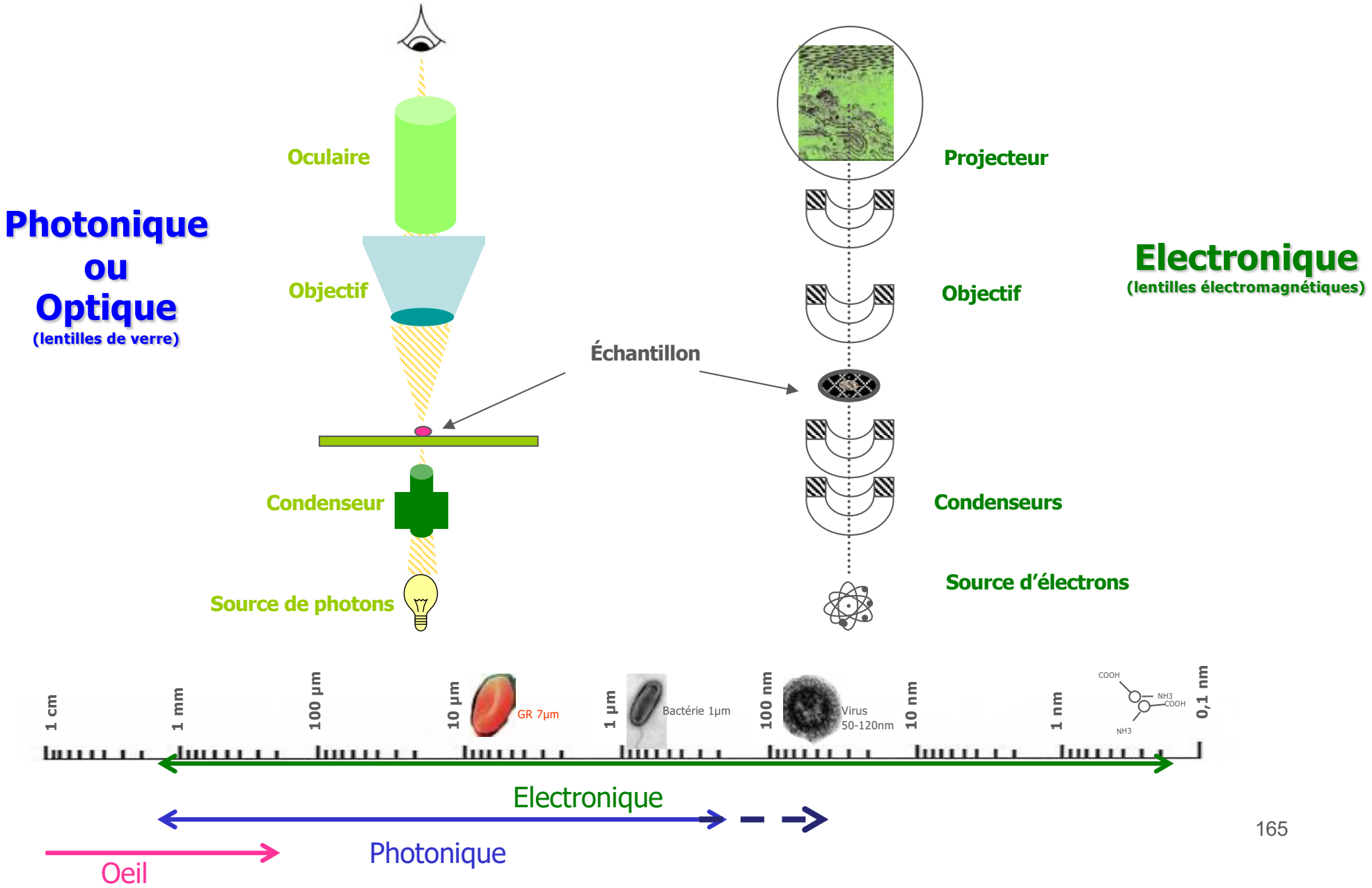
A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche

IV- Les techniques d'imagerie



IV- C) Microscopie électronique

- **Microscopie Electronique à Transmission MET**

  - Faisceau d'électrons dans une colonne sous vide

→ Résolution 50 nm [MO : 200 nm]

  - Coupe ultrafine - Osmium (fixateur, ombrage métallique)

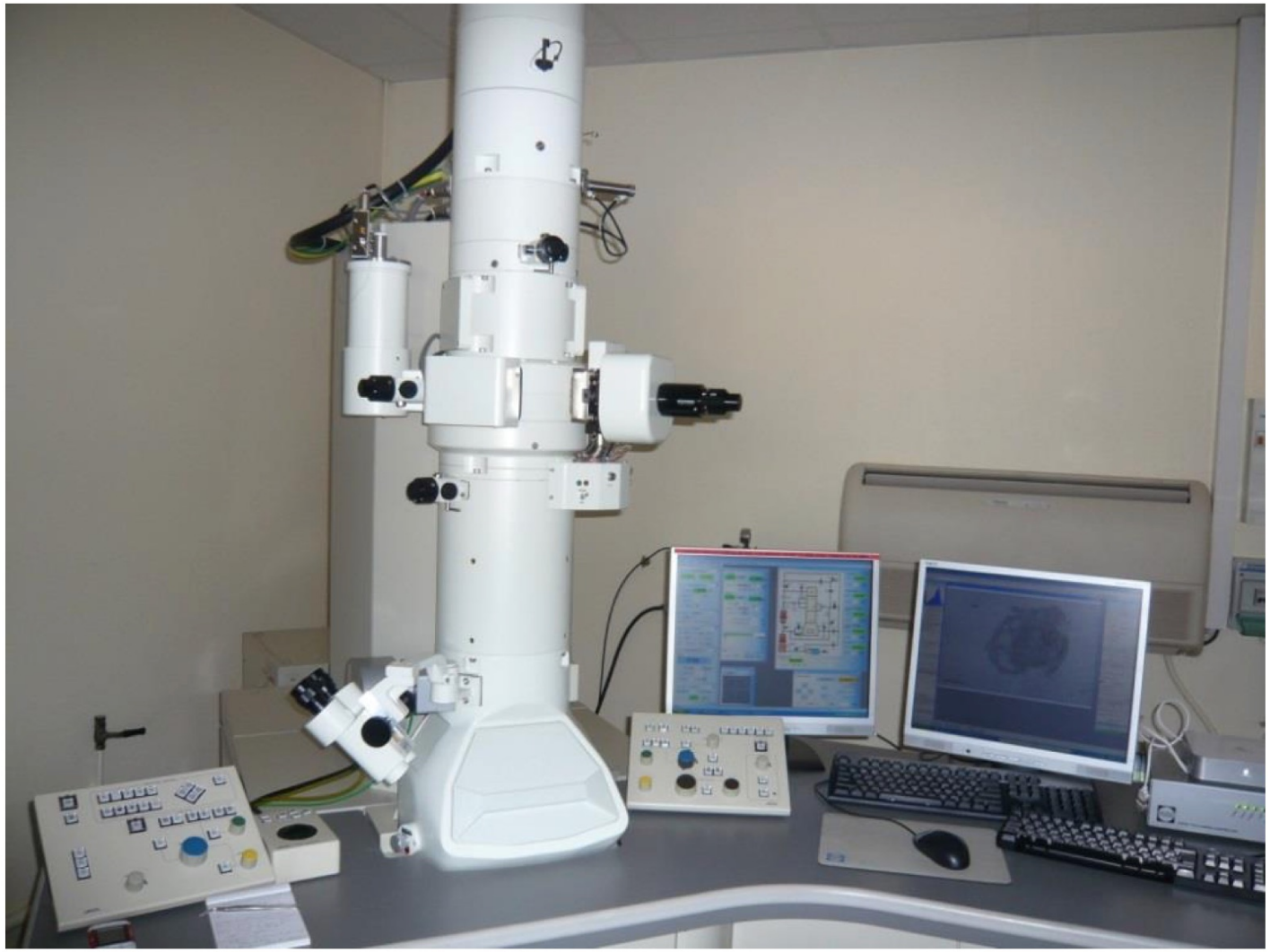
→ Résolution 1 nm

  - Résolution 0,1 nm (1 Angström)

Grossissement de travail : x 30 000-100 000.

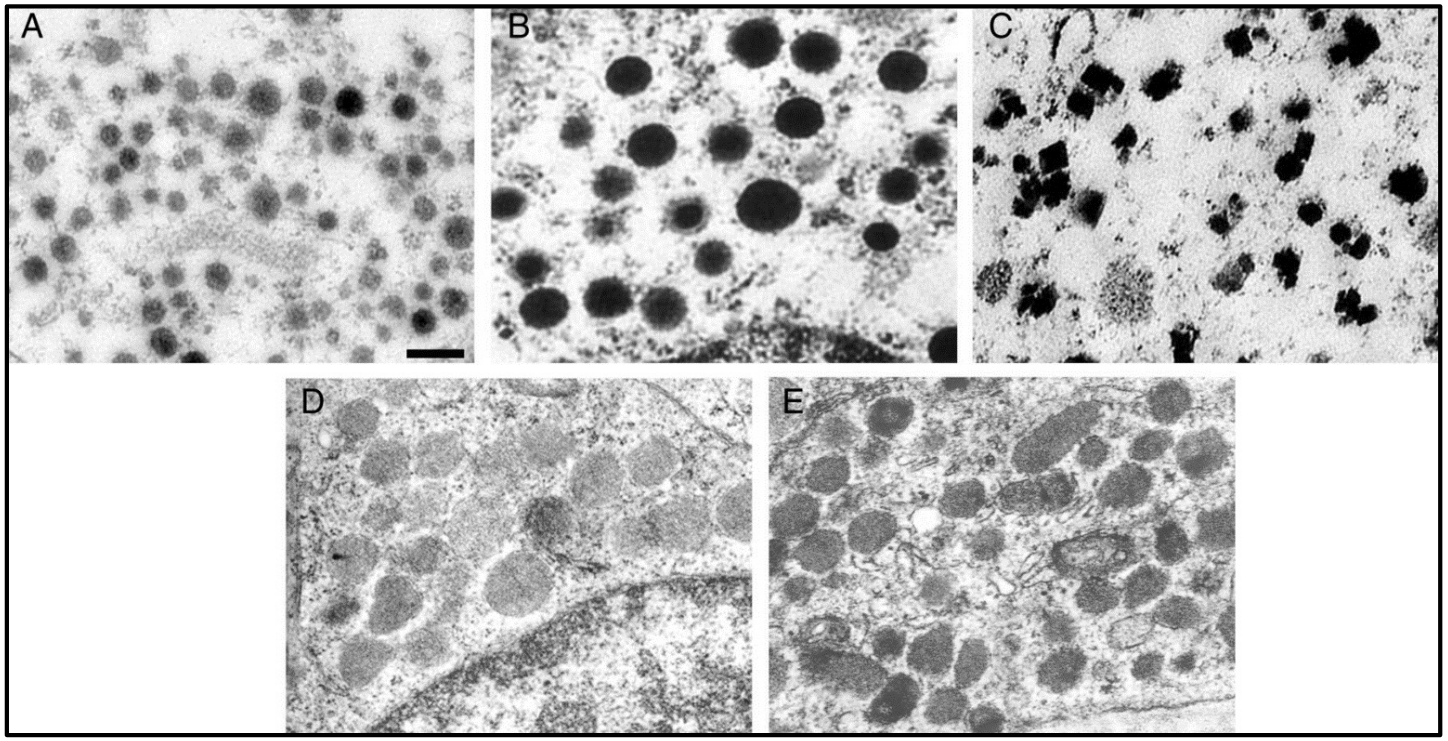
MET JEOL JEM1400

Microscope Electronique à Transmission (MET).



CIQLE:
Centre d'imagerie quantitative Lyon-Est

IV- C) Microscopie électronique

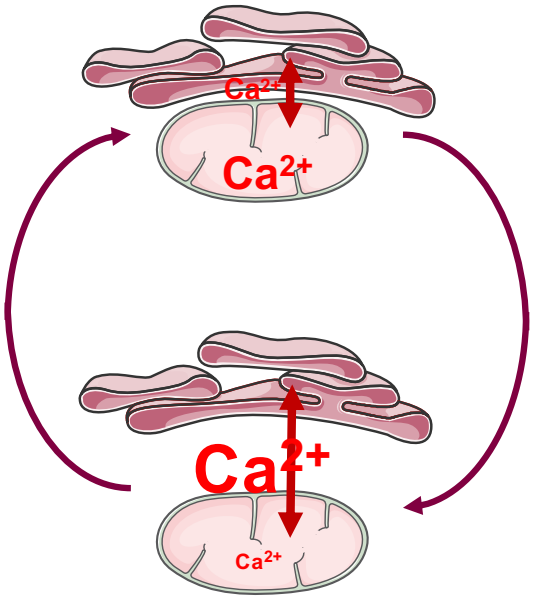


Transmission electron micrographs of islet cell secretory granules

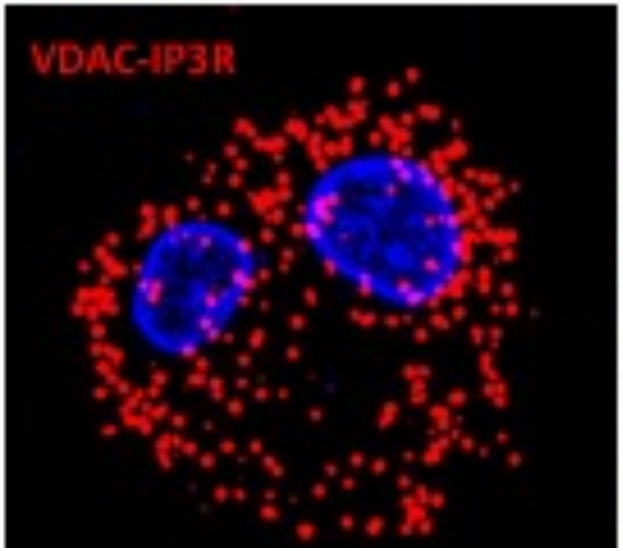
Secretory granules from islet cells :
(A)Ghrelin cell - (B) Glucagon cell -
(C) Insulin cell - (D) Somatostatin cell - (E) PP-cell.

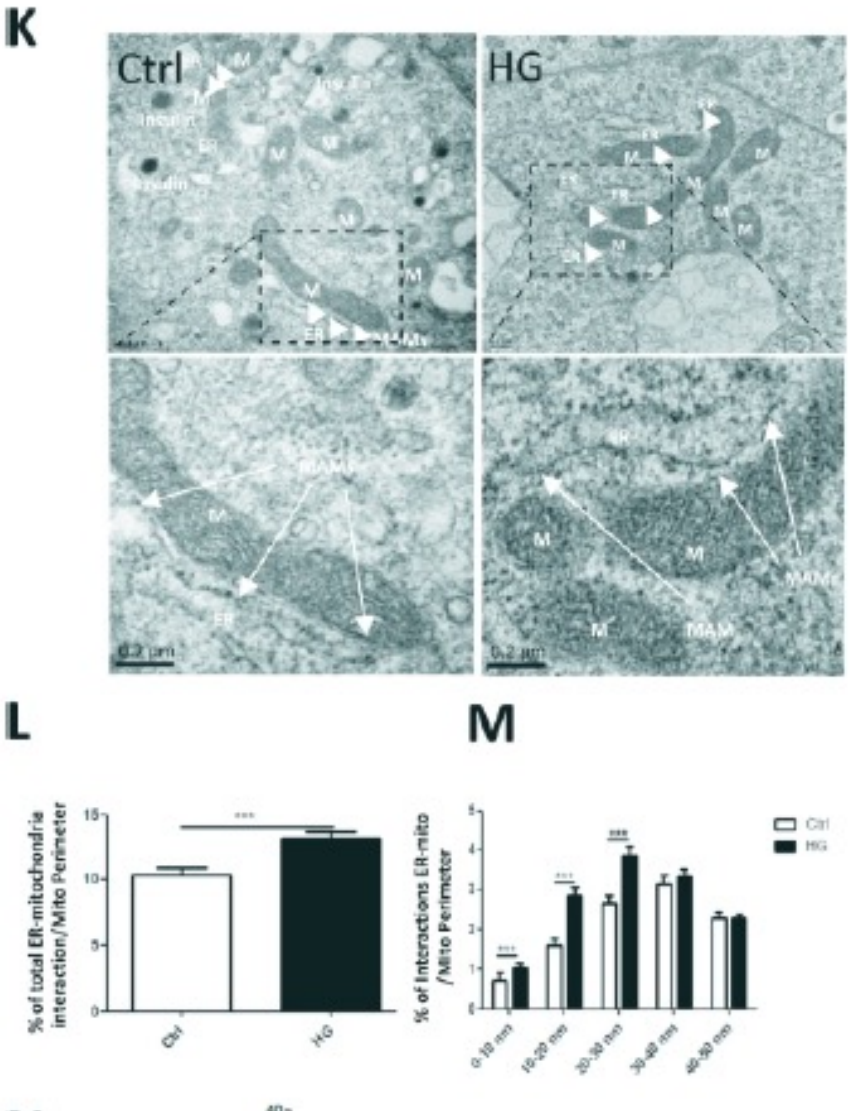
Scale bar=250 nm, in A for all images.

IV- C) Microscopie électronique



PLA





Dingreville et al. Diabetes 2019

- **Limites de la ME**

* Champ observable restreint

* Fonctionnement sous vide

→ ≠ Cellules vivantes !

* Préparation minutieuse des prélèvements ≈ 1 semaine

[≠ Examen Extemporané]

* Technique longue, difficile, onéreuse, personnel hautement qualifié

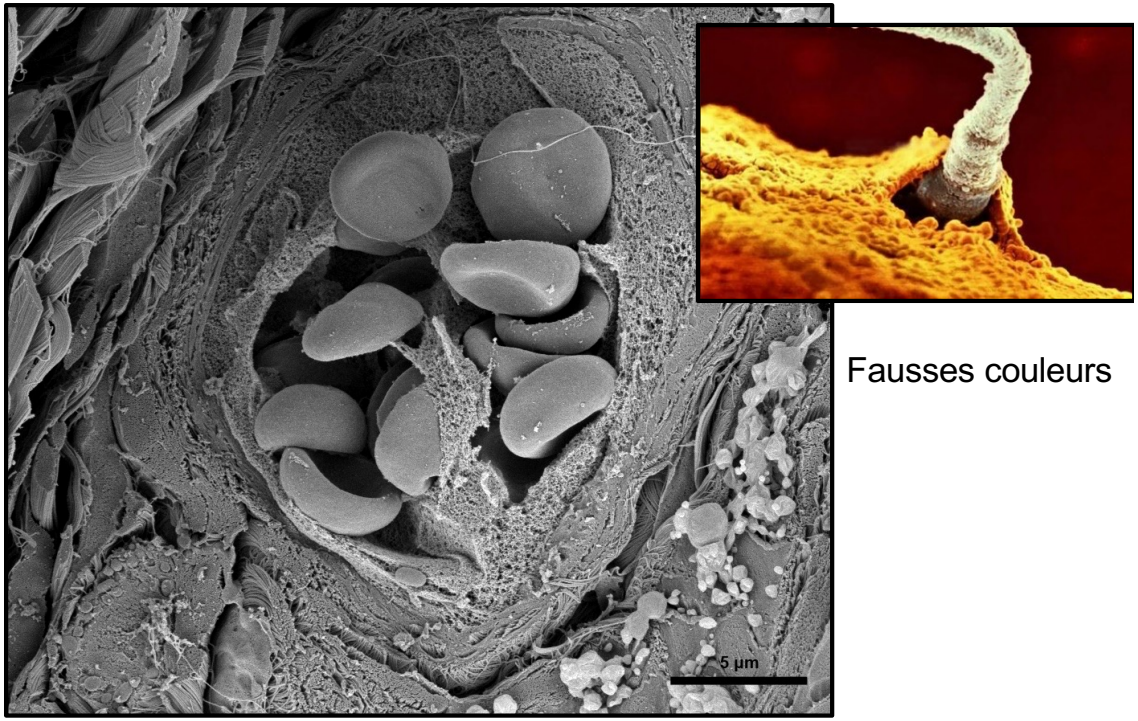
[« Désertée » les CHU]. Plateformes telle que le CIQLE

• Microscopie Electronique à Balayage MEB

○ Faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon entier
Morphologie en 3D.



Microscope Electronique à Balayage [2m80 - 2,5 T].



Fausses couleurs

Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Globules rouges.

- **Limites de la MEB**

* Champ observable restreint

* Fonctionnement sous vide :

→ ≠ Cellules vivantes !

* Préparation minutieuse des prélèvements ≈ 1 jour

[≠ Examen Extemporané !]

* Résolution 20 nm ! [0,1 nm MET]

→ Recherche scientifique. vulgarisation

PLAN

I- Introduction

- A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs
- B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage
- C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

- A) Colorations standards
- B) Histochimie
- C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

- A) Immunohistologie
- B) Hybridation *in situ*
- C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

- A) Microscopie optique
- B) Microscopie optique nouvelle génération
- C) Microscopie électronique
- D) Microscopie en champ proche

IV- D) Microscopie en champ proche

Basée sur la détection d'un signal entre une sonde et la surface de l'échantillon
Interactions à courte portée
[Prix Nobel Chimie 2014].

- **Microscope à Effet Tunnel**
(Scanning Tunneling Microscope, STM)

[Echelle atomique ← Mécanique quantique]



IV- D) Microscopie en champ proche

- **Deux « Electrodes »**

* Sonde, pointe très fine scannant la surface de l'échantillon

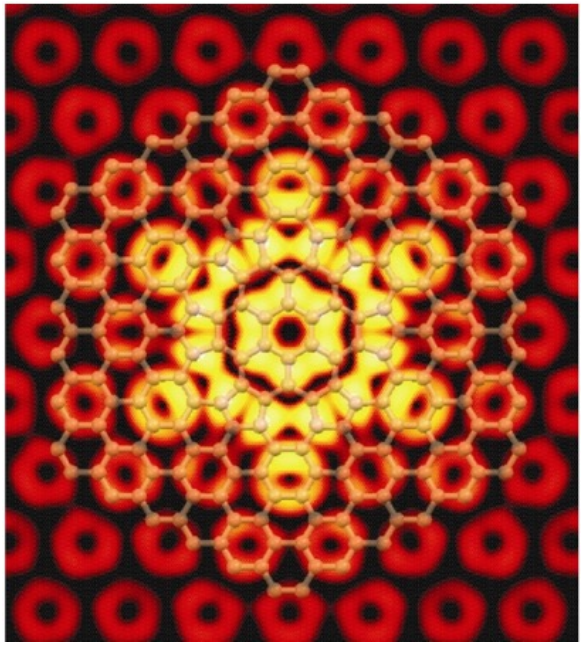
* Surface de l'échantillon.

- **Effet Tunnel**

* Mesure du courant due au passage d'électrons entre les deux « électrodes »

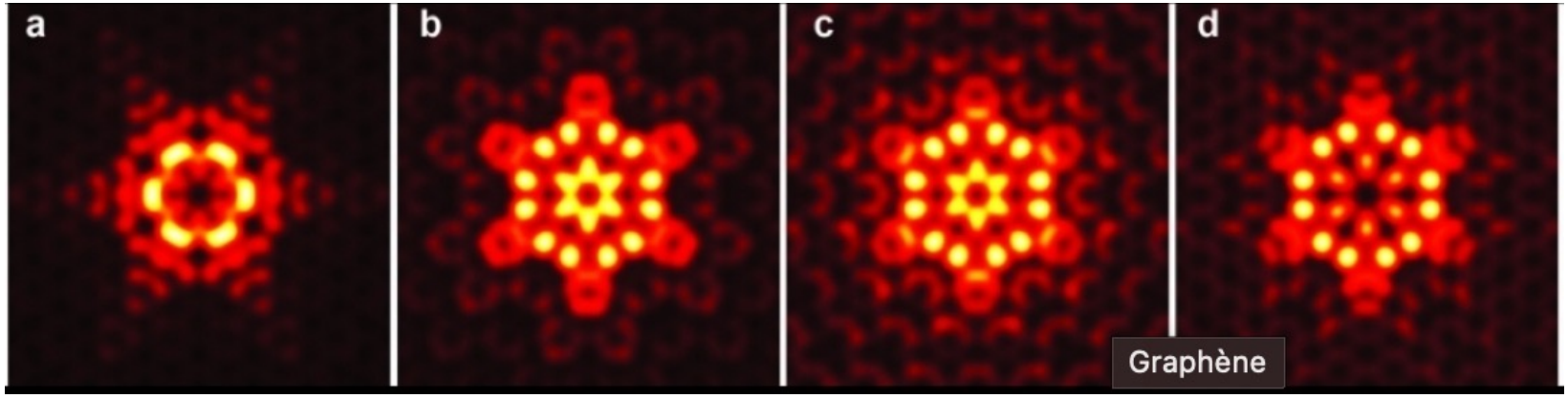
* Traitement de l'image pour donner le relief.

Microscope à Effet Tunnel



Une cristallisation en 2D

Le graphène viole les lois de fourrier
→conduction de chaleur



Sciences et avenir mai 2011

- **Limites du STM**

* Validation d'une « signature » électronique

→ Environnement parfaitement contrôlé

* Travail sous vide et à très basse température

→ ≠ Cellules vivantes

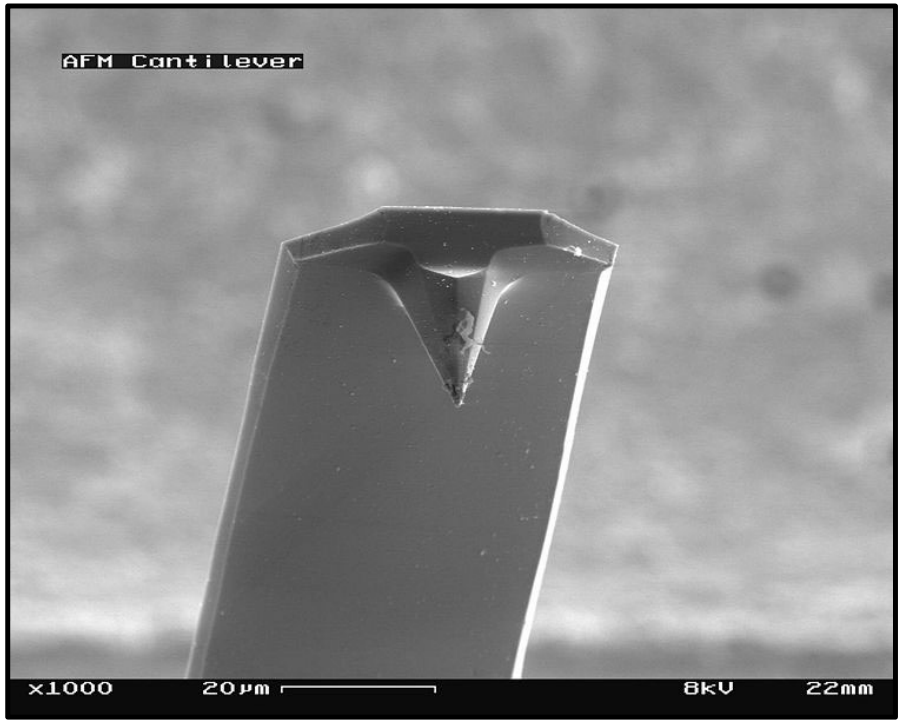
* Analyse de surfaces conductrices

→ ≠ Structures biologiques

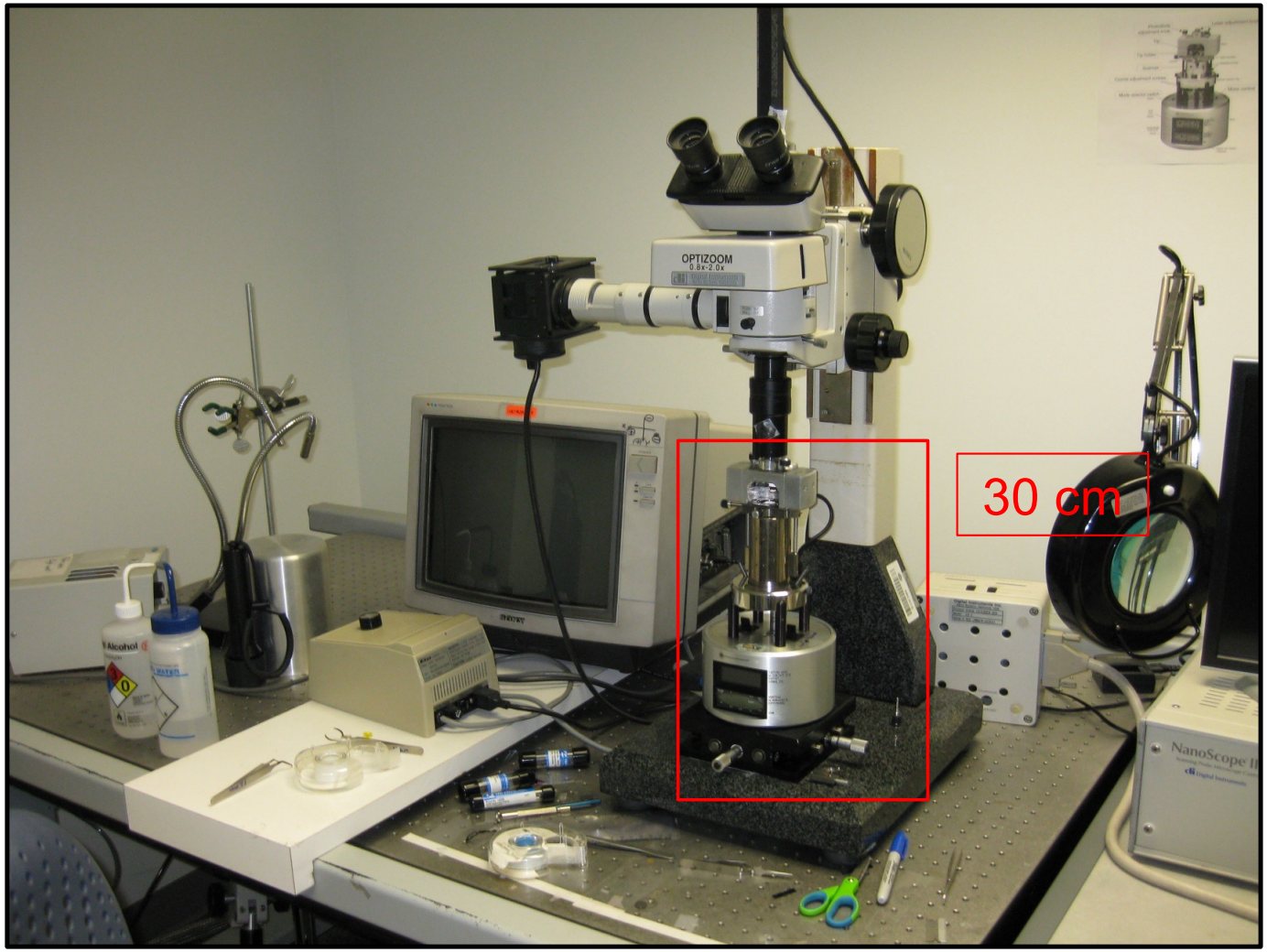
- **Microscope à Force Atomique AFM**

Evolution du concept de l'effet tunnel.

- **Deux « Electrodes »**
- Sonde, pointe très fine placée sur un levier flexible scannant la surface de l'échantillon
- Traitement de l'image pour donner le relief.



IV- D) Microscopie en champ proche



- **Limites**

* Validation d'une « signature » électronique

→ Environnement parfaitement contrôlé !

* Temps d'analyse « long » [1 – 10 min]

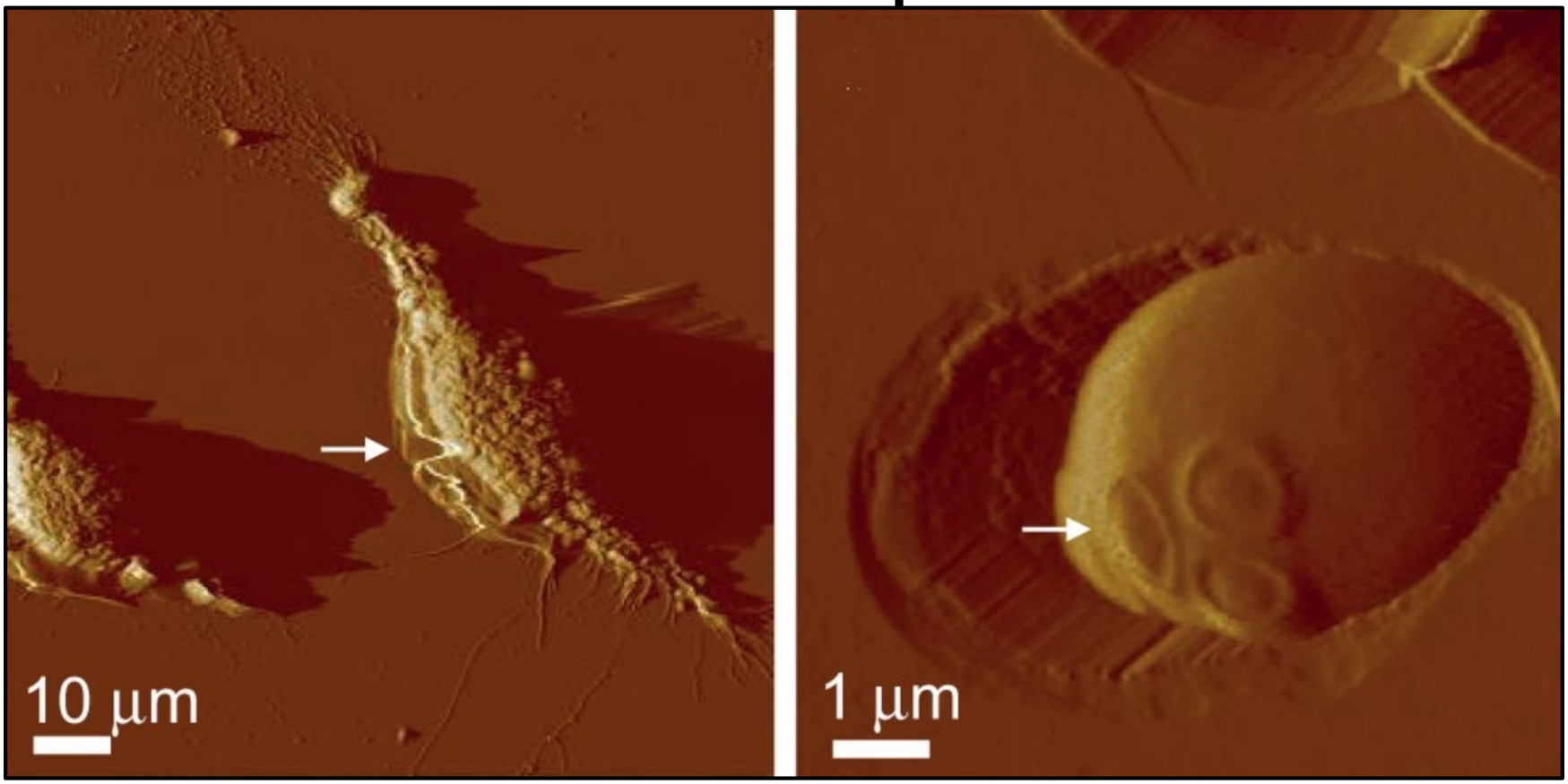
→ Dégradation de l'échantillon par la sonde

* Analyse de surfaces conductrices, mais non-conductrices dans certains cas :

- En milieu liquide : Culture *in vitro* !

- Sur fragment tissulaire à l'air

En milieu liquide

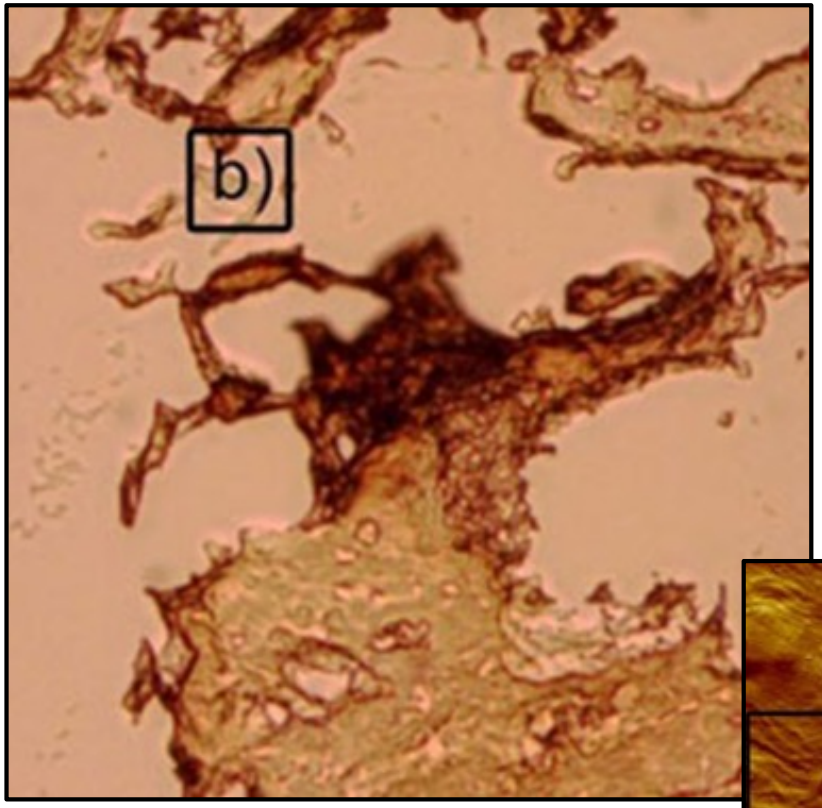


Imagerie de cellules vivantes

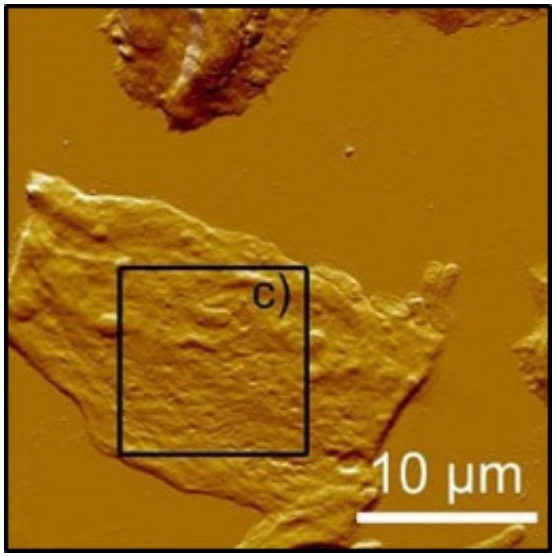
Etude de protéines de surface cellulaire
en résolution moléculaire.

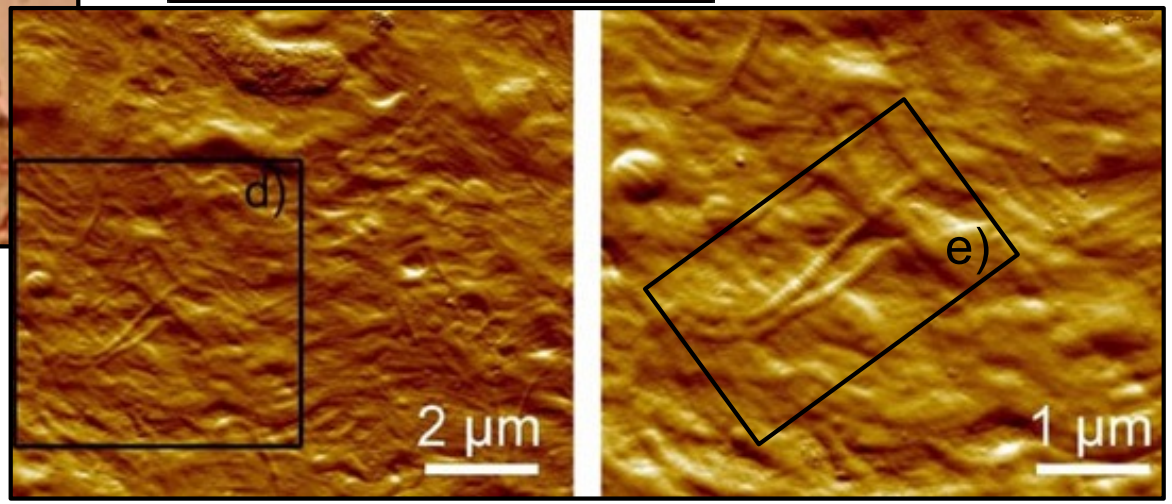
Sur fragment tissulaire à l'air

En médecine légale, dans le cadre de l'expertise judiciaire



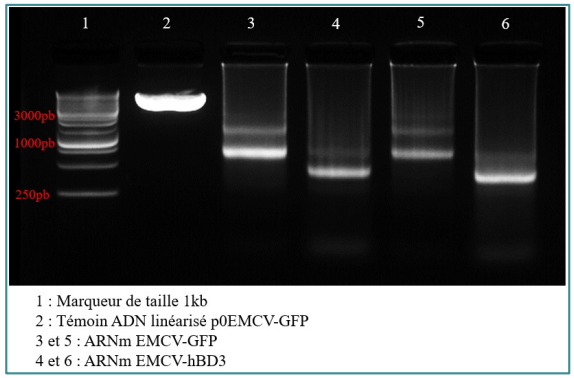
Fragment b) → Observation en AFM.

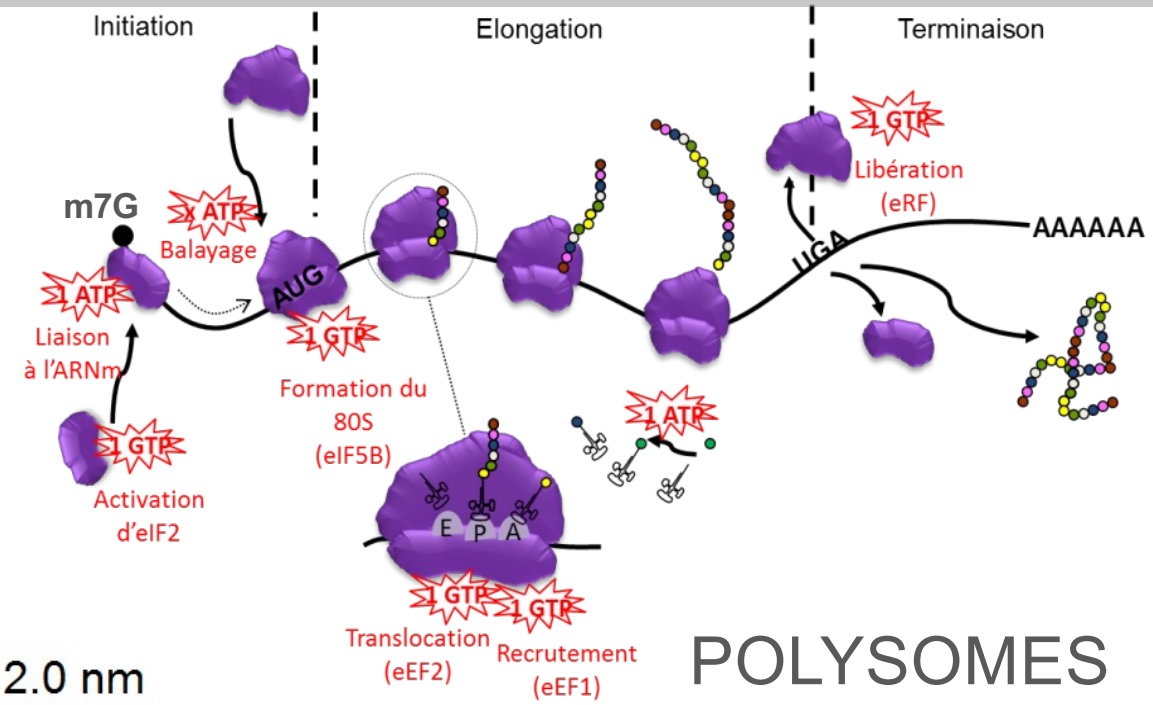




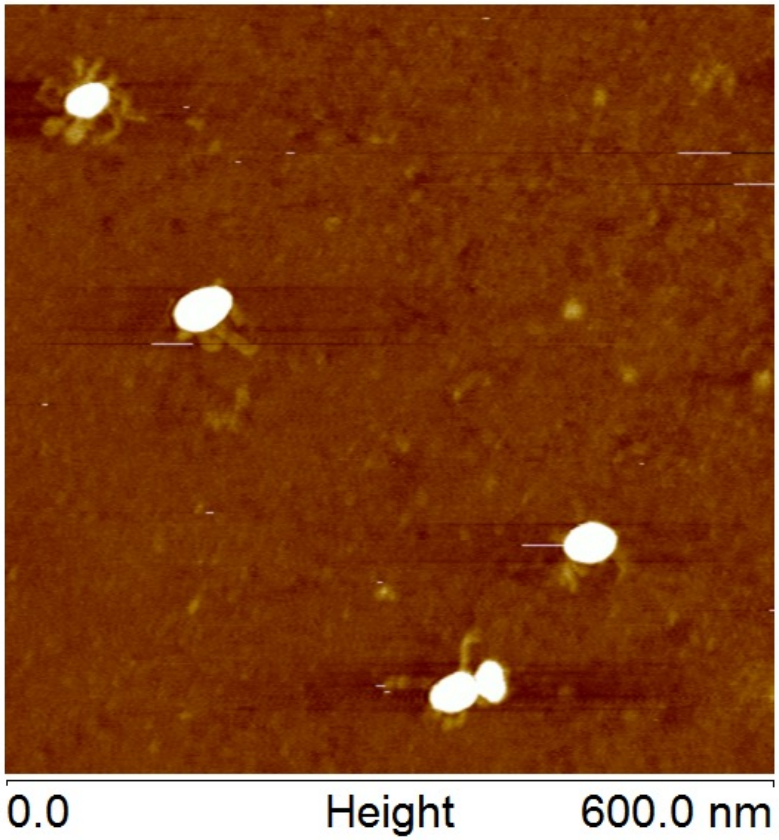
Collagène → Fragment de peau
Résolution AFM ≈ 125 nm

IV- D) Microscopie en champ proche



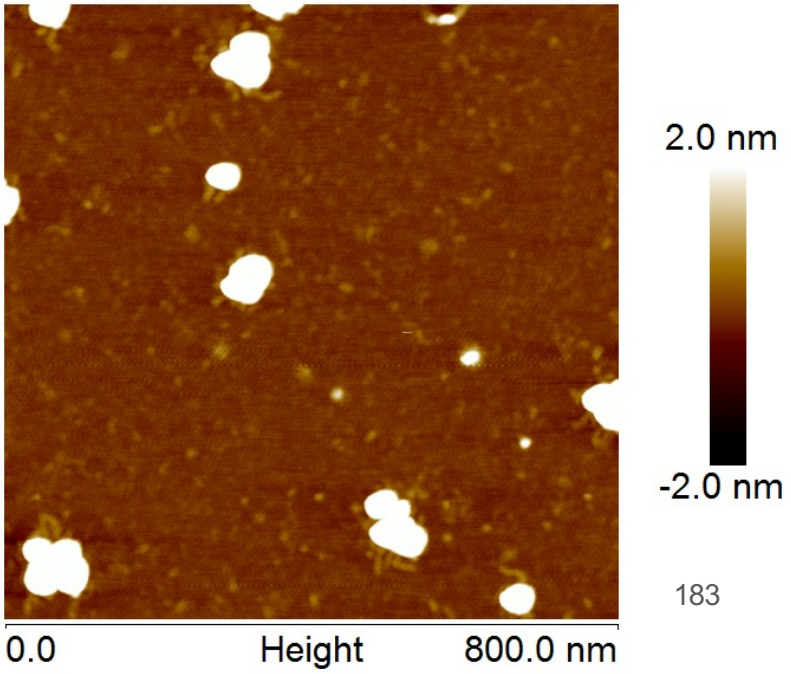


MONOSOMES





POLYSOMES



PLAN

I- Introduction

A) définition, place de l'histologie, place du cours, repères, objectifs

B) Les grands concepts: outils d'imagerie, marquage

C) Préparation des échantillons

II- Les études *in situ* des constituants biochimiques

A) Colorations standards

B) Histochimie

C) Histoenzymologie

III- Les analyses moléculaires *in situ*

A) Immunohistologie

B) Hybridation *in situ*

C) Autoradiographie

IV- Les techniques d'imagerie

A) Microscopie optique

B) Microscopie optique nouvelle génération

C) Microscopie électronique

D) Microscopie en champ proche