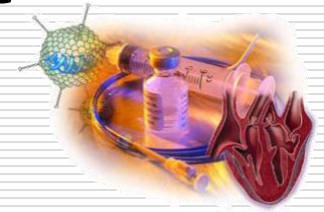




Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire : *Analyse de l'expression des gènes et techniques d'histologie*

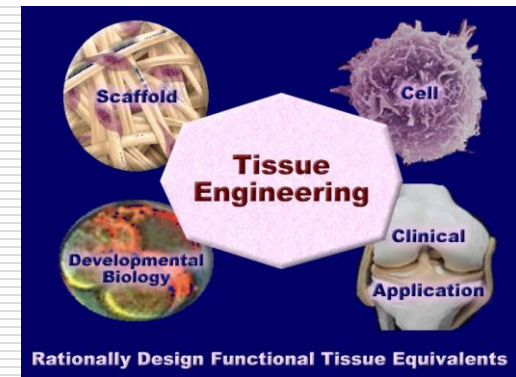


Ingénierie du cartilage

Christel HENRIONNET, *UMR 7365 IMoPA*

Laboratoire Ingénierie Moléculaire, cellulaire et Physiopathologie
Biopôle, 9 Avenue de la Forêt de Haye, Campus Biologie-
santé,

54 505 Vandoeuvre-les-Nancy.



La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire sont les constituants principaux du secteur de la médecine régénératrice

Médecine régénératrice

Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus

Thérapie cellulaire

Les thérapies cellulaires préviennent ou traitent les pathologies humaines par l'administration de cellules qui ont été choisies, multipliées et pharmacologiquement traitées ou modifiées en dehors du corps (*ex vivo*)

L'ingénierie tissulaire a pour but d'améliorer ou de remplacer les fonctions biologiques grâce à la combinaison de cellules, de matériaux, et de facteurs biochimiques appropriés

- Les traitements caractéristiques faisant appel à l'ingénierie tissulaire sont :
 - Tissu non vivant traité (ex: valves cardiaques)
 - Tissu issu d'une autre partie du corps du patient lui-même ou d'un
 - autre patient (ex: transplantation)
 - Reconstruction d'organes *ex-vivo*

L'ingénierie tissulaire employant souvent les cellules vivantes comme «matériel de base», elle recoupe de fait les applications des thérapies cellulaires

La but de la thérapie cellulaire est de remplacer, réparer, ou d'augmenter la fonction des tissus ou organes endommagés

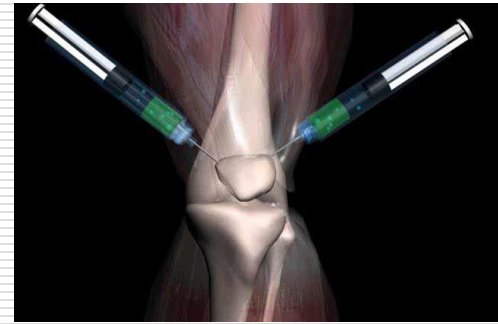
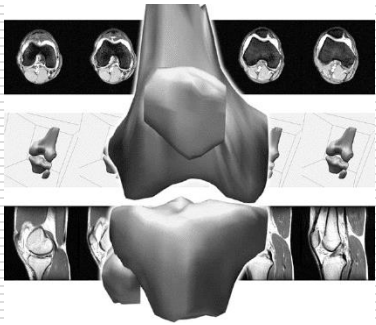
Les cellules peuvent provenir :

- ☐ Du patient
- ☐ D'un donneur
- ☐ D'une autre espèce
- ☐ D'une lignée cellulaire

Il existe deux principales stratégies de traitement en thérapie cellulaire :

- ☐ Utilisation de cellules souches pouvant se substituer aux cellules ciblées
- ☐ Utilisation de cellules saines pouvant produire une substance dont a besoin l'organisme

Grâce à leurs meilleures capacités de différenciation / de prolifération, les cellules souches adultes (embryonnaires) sont au centre de la recherche et du développement de nouveaux traitements

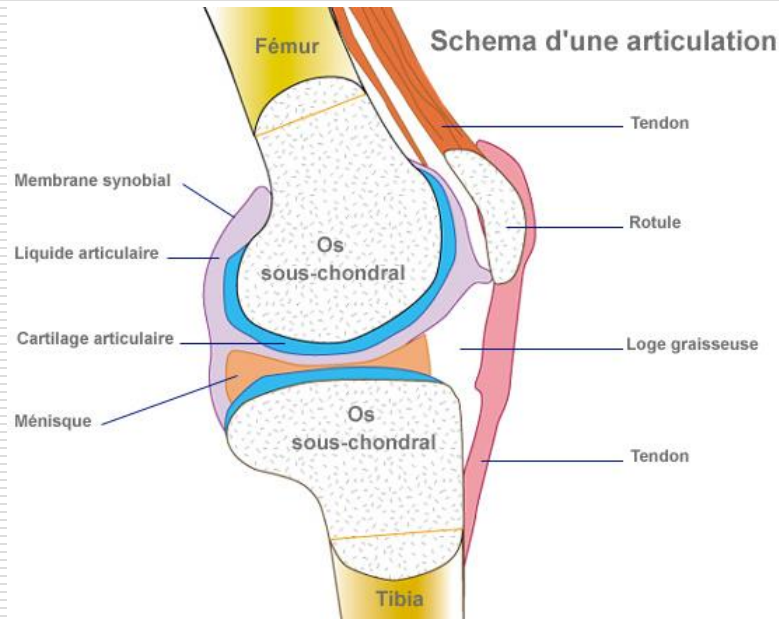


Tissue engineering Pour la réparation du cartilage

Etat de l'art

Tissue engineering : Actuellement et en développement

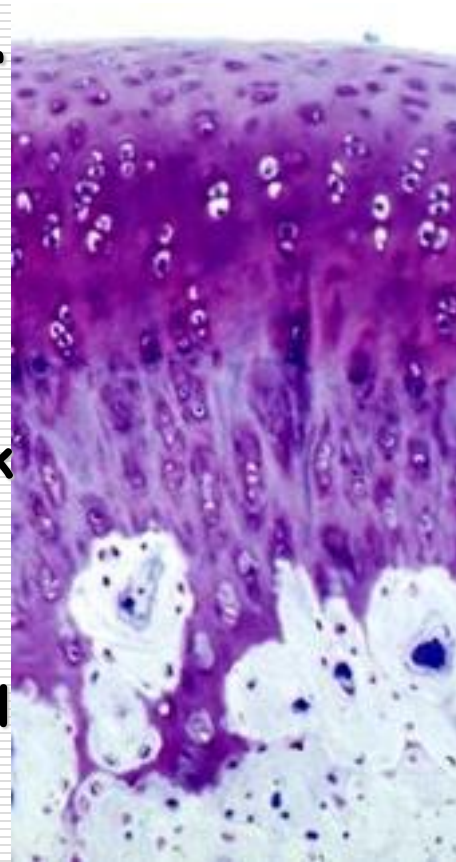
Cartilage, Un tissu hautement spécialisé



**Articular
Surface**

Tidemark

**Subchondral
Bone**



**Superficial
Zone**

**Middle
Zone**

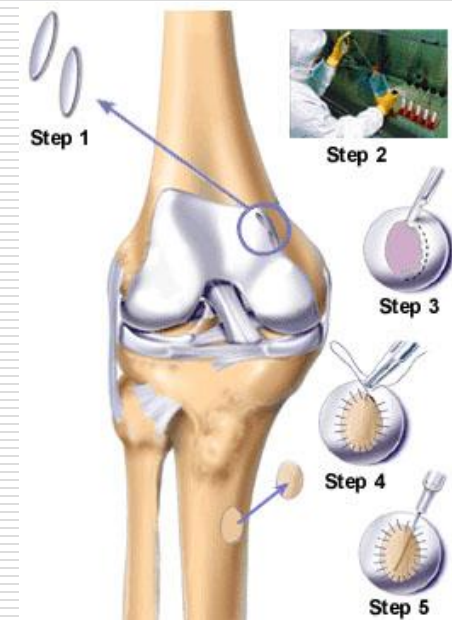
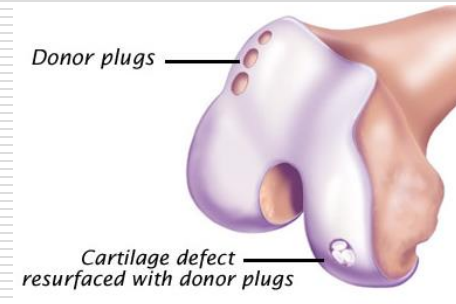
**Deep
Zone**

**Calcified
Cartilage**

Traitements Actuels



- ❑ Lavage arthroscopique
- ❑ Stimulation de la moelle osseuse
 - Perforations sous-chondrales
 - Microfracture
 - Osteotomie
- ❑ Greffes perioste/perichondre



➔ **Implantation de chondrocytes autologues**

STRUCTURE DU CARTILAGE

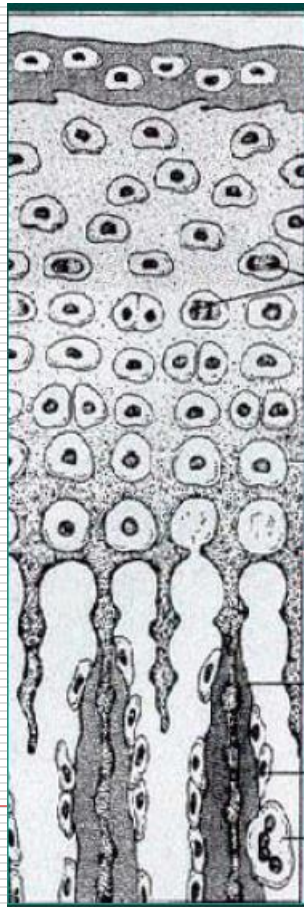
❑ Pourquoi ces limitations? tissu complexe

Surface articulaire
(Col I, III)

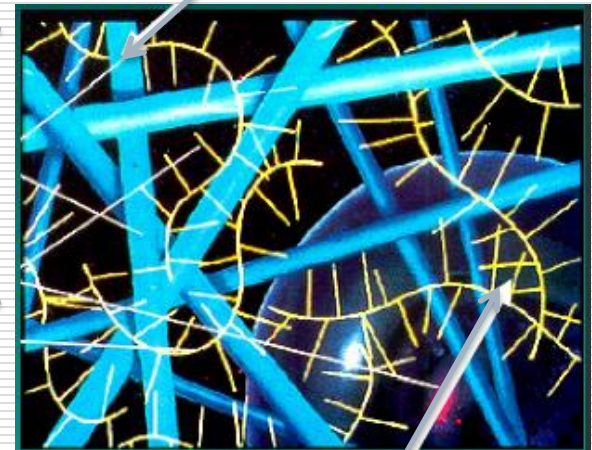
Zone de réserve
et de prolifération
(Col II, IX, XI)

Zone d'hypertrophie
et de calcification
(Col X, II, IX, XI)

Os sous-chondral



Collagènes
Structure Force



Protéoglycannes
Résistance à la compression

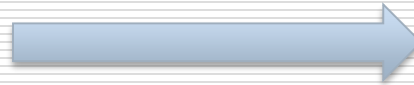
Avec le temps, le cartilage articulaire perd ses capacités d'auto régénération

STRATEGIES POUR LA REPARATION DU CARTILAGE

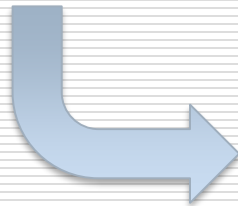
Chondrocytes
autologues



Transfert de gènes
pour des facteurs
recombinants
(BMPs - TGF β)



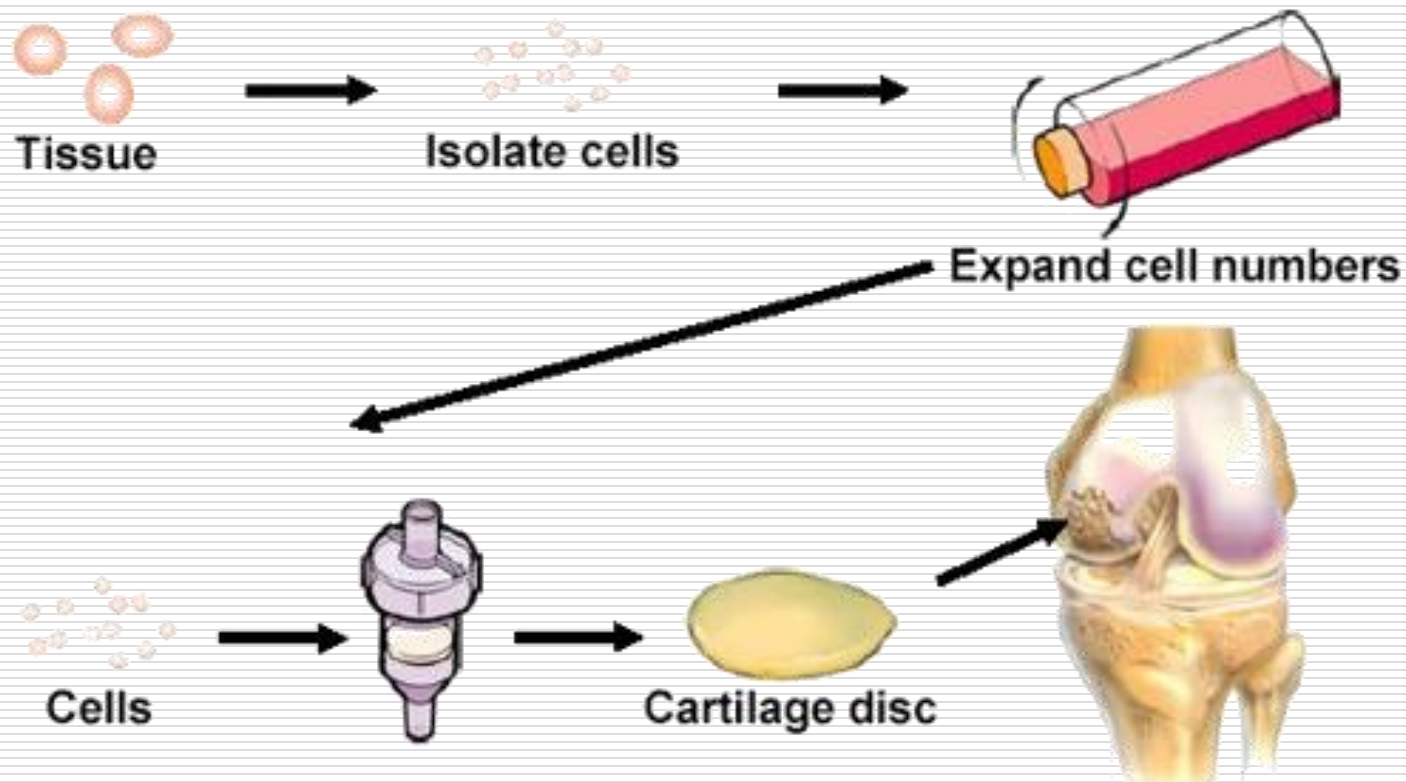
*Ingénierie
cellulaire*



Cellules souches
mésenchymateuses



L'ingénierie tissulaire du cartilage nécessite 3 composants: Cellules, biomatériaux, et l'environnement.



Tissue engineering: Sources cellulaires

□ **Chondrocytes**

- Capables de synthétiser les composants de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire hyalin (Collagenes, proteoglycanes,...)

Mais

- Pas assez de cellules, dédifférentiation très rapide en culture

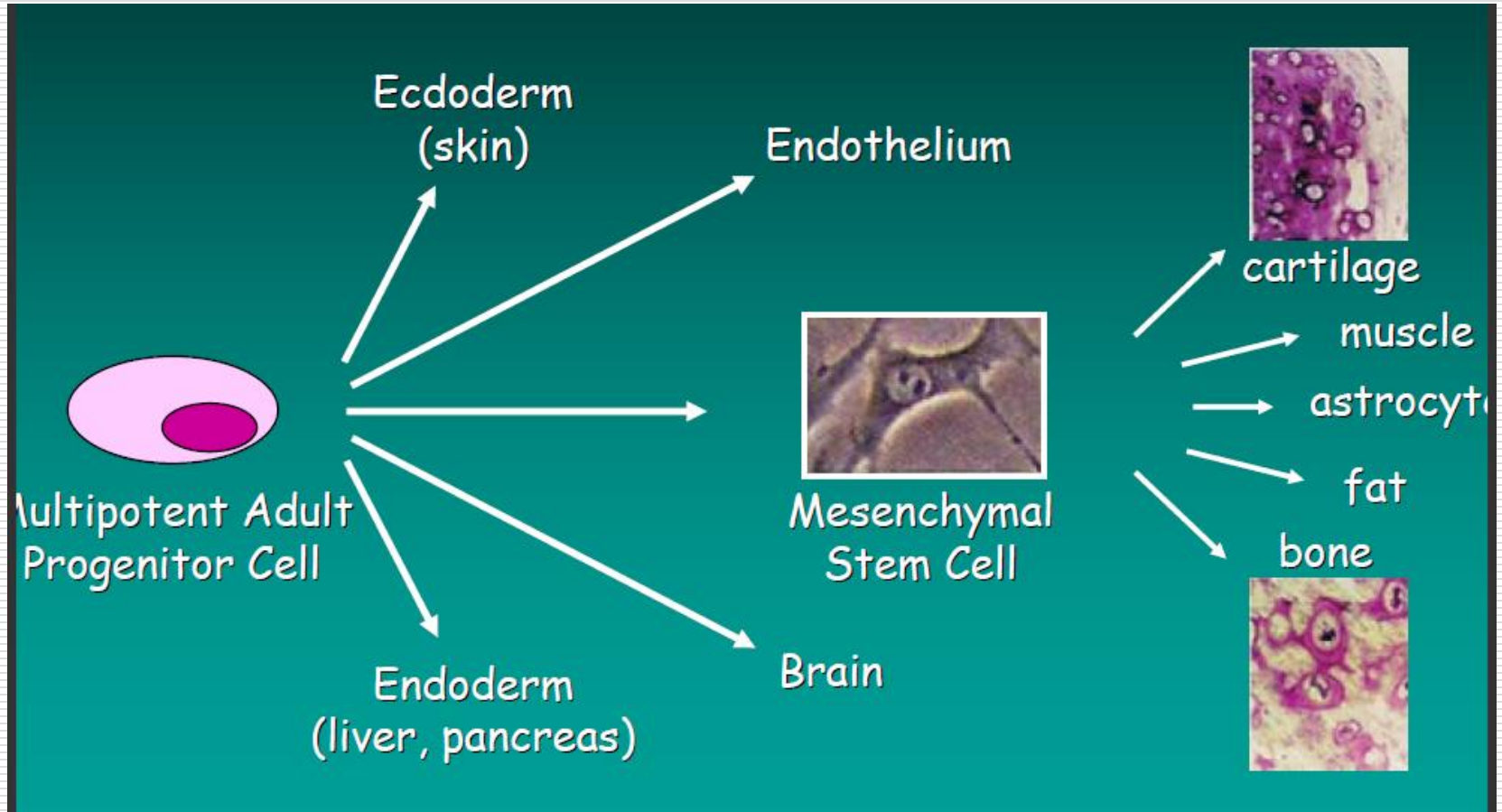
□ **Cellules souches mésenchymateuse (moelle osseuse)**

- Grand nombre de cellules disponible
- Potentiel de différenciation important dont la différenciation chondrocytaire

Mais

- Difficile à déterminer le bon cocktail de différenciation et surtout difficulté à contrôler cette différenciation (pas assez, ou beaucoup trop)
-

Potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses



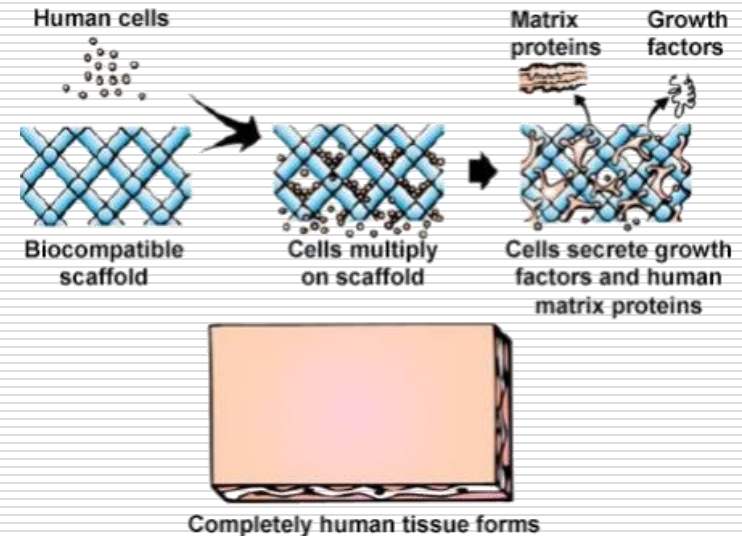
Tissue engineering: Comment reconstruire une matrice ?

Biomatériaux : Servent de support aux cellules, tout en limitant la prolifération (composites / hybrides / fonctionnalisés), mais surtout doivent être capables de reproduire la composition zonale du cartilage.

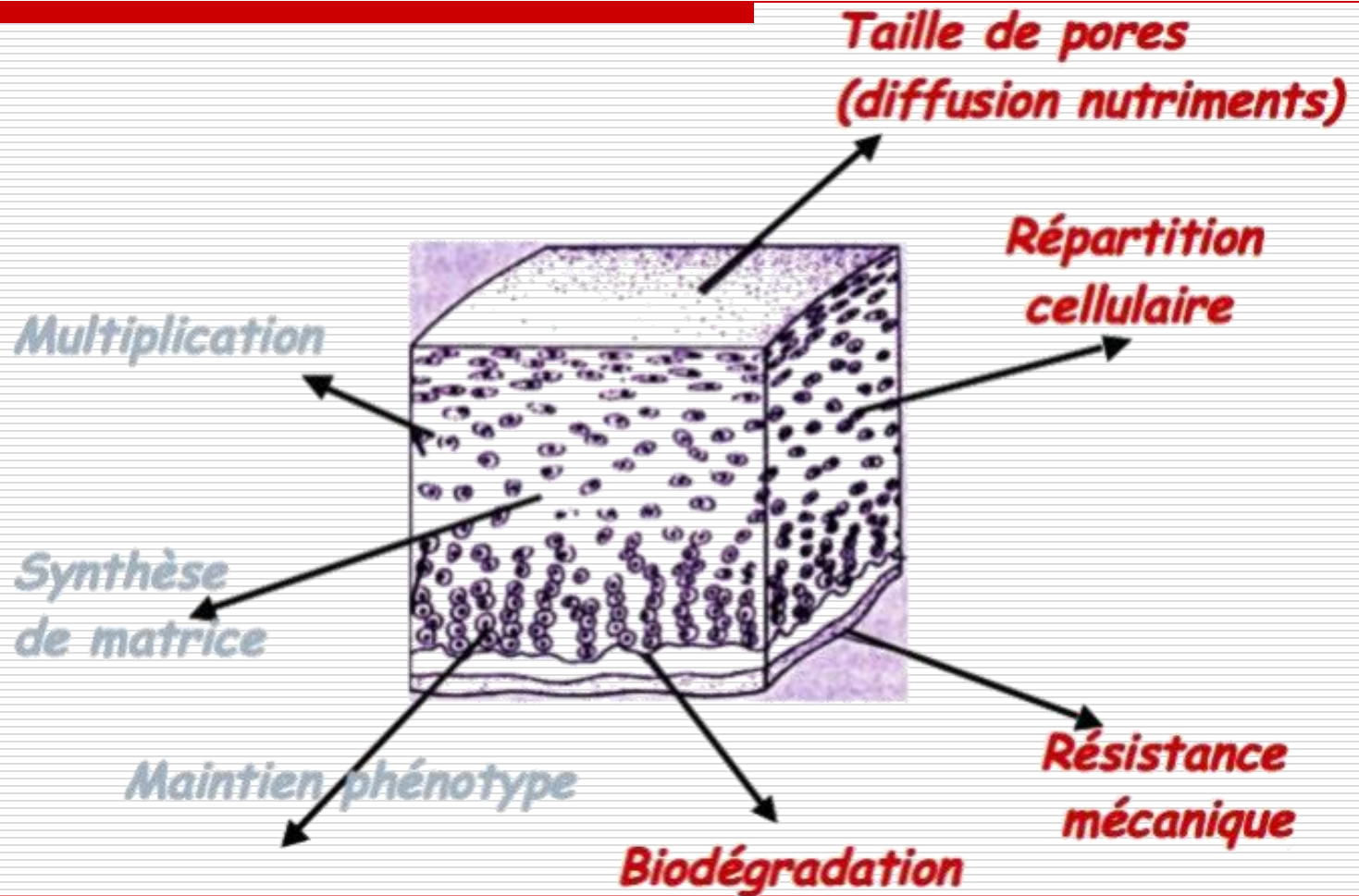
Composite: Association de plusieurs matériaux, (biocompatible, résorbable, structuring)

Hybride: Association de matériaux et de cellules, (chondrocytes, périosteal cells, mesenchymal stem cells)

Fonctionnalisé: obtention d'une synthèse de matrice extracellulaire par bio-activateurs (facteurs de croissance, tension en oxygène, contraintes mécaniques,..)



Propriétés d'un biomatériau idéal pour la régénération du cartilage

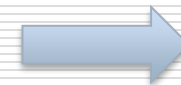
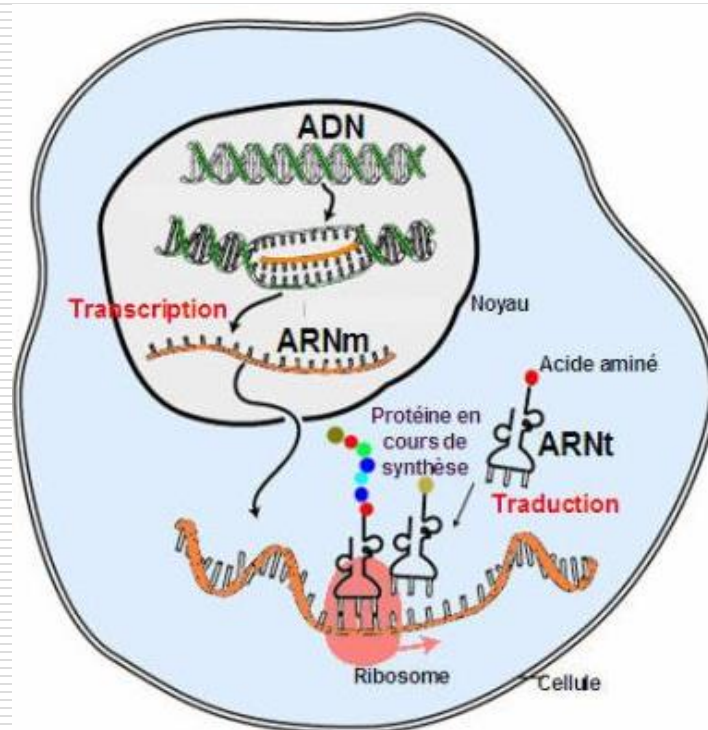
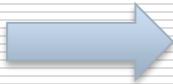


Comment favoriser l'environnement ?

- ❑ Facteurs de croissance (TGF, BMPs, ...)
 - ❑ Stimulation mécanique (hydrostatic pressure, tension strains,...) leading to mechano-transduction
 - ❑ Conditions de culture hypoxiques (2-5 % O₂)
 - ❑ Molécules (Chondroitin sulfate, Hyaluronic acid, glycomimetics, ...)
-

Contrôle du phénotype

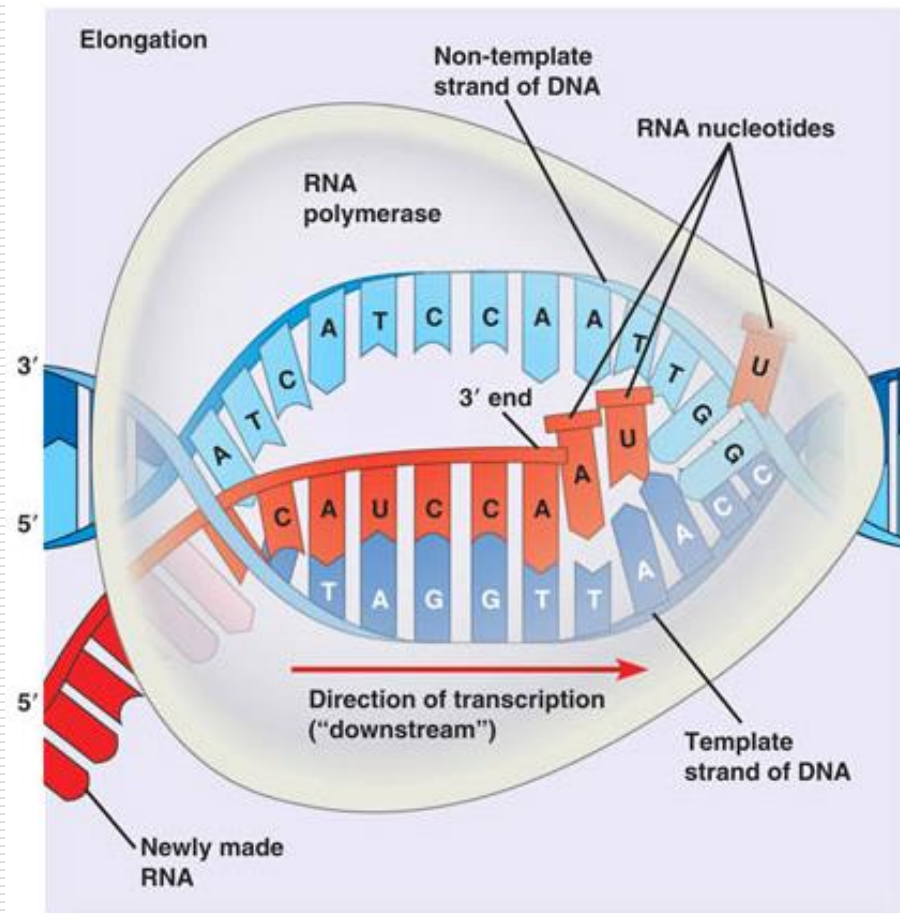
1 tissu



1 fonction

Du gène à la protéine

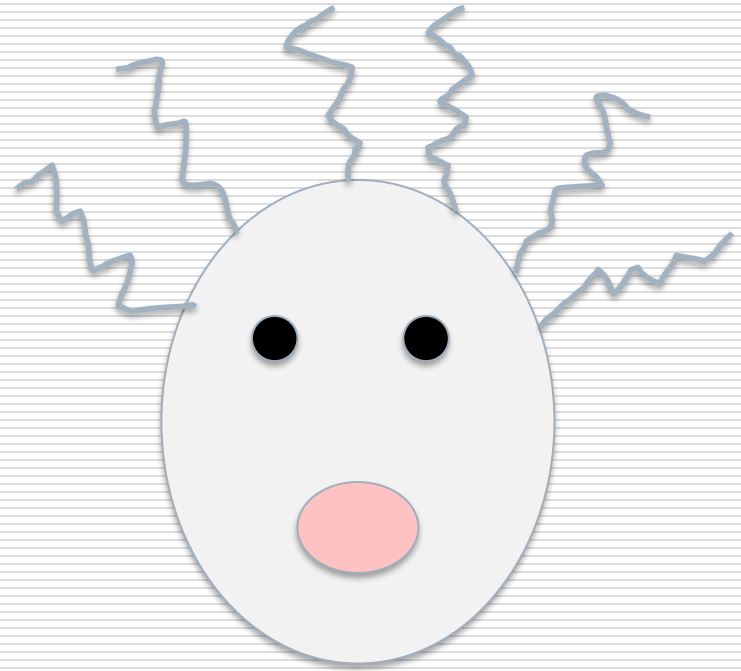
Biologie moléculaire appliquée aux maladies articulaire



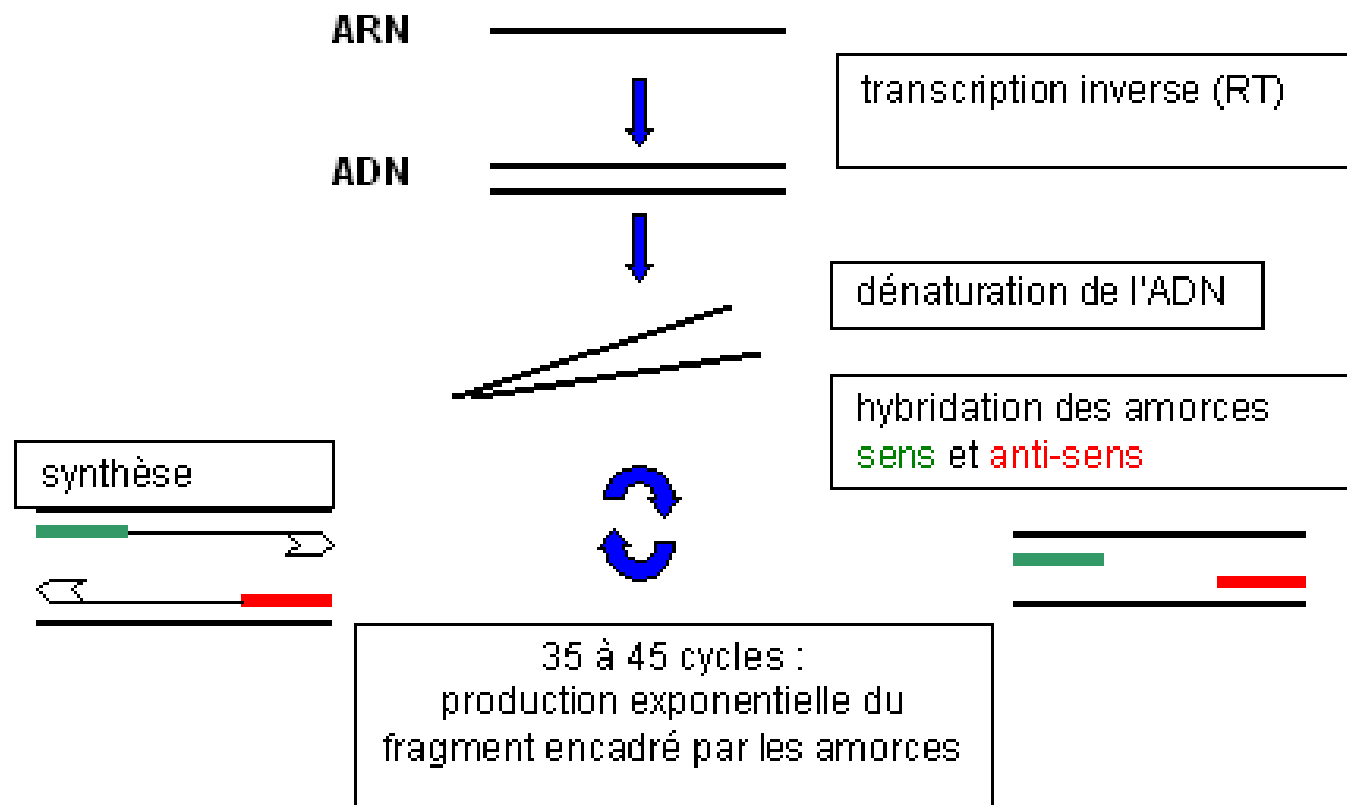
Analyse de l'expression des gènes

La PCR en temps réel

Biologie moléculaire

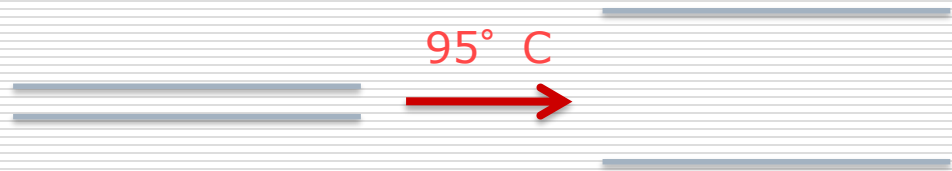


Extraction d'ARN, reverse transcription, PCR

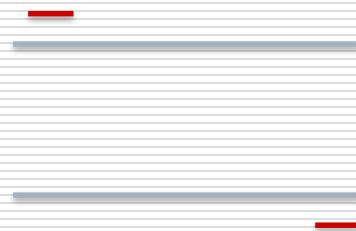


Amplification PCR

☐ Dénaturation

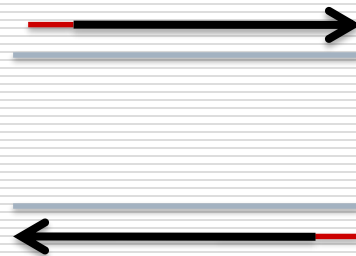


☐ Hybridation



$t^{\circ} = T_m$

☐ Extension



t° dépend de la polymérase employée

Analyse de l'expression des ARNm par PCR

□ Matériel

- ARN total extrait à partir de tissu/cellules



la qualité

- Transcriptase inverse (RT) pour obtenir le brin d'ADN complémentaire (ADNc)

- Primers  bien les choisir

- Amplification
-

La méthode de PCR : une vue d'ensemble

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

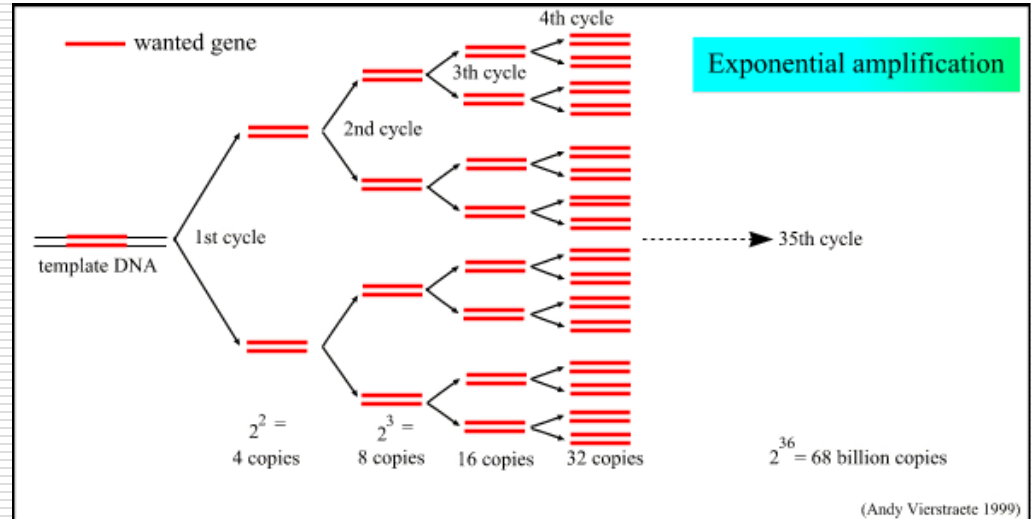
forward and reverse primers !!!

Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

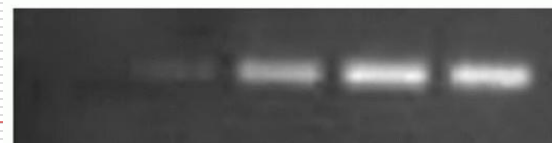
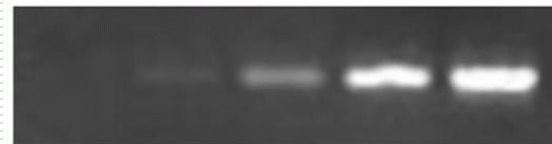
only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)



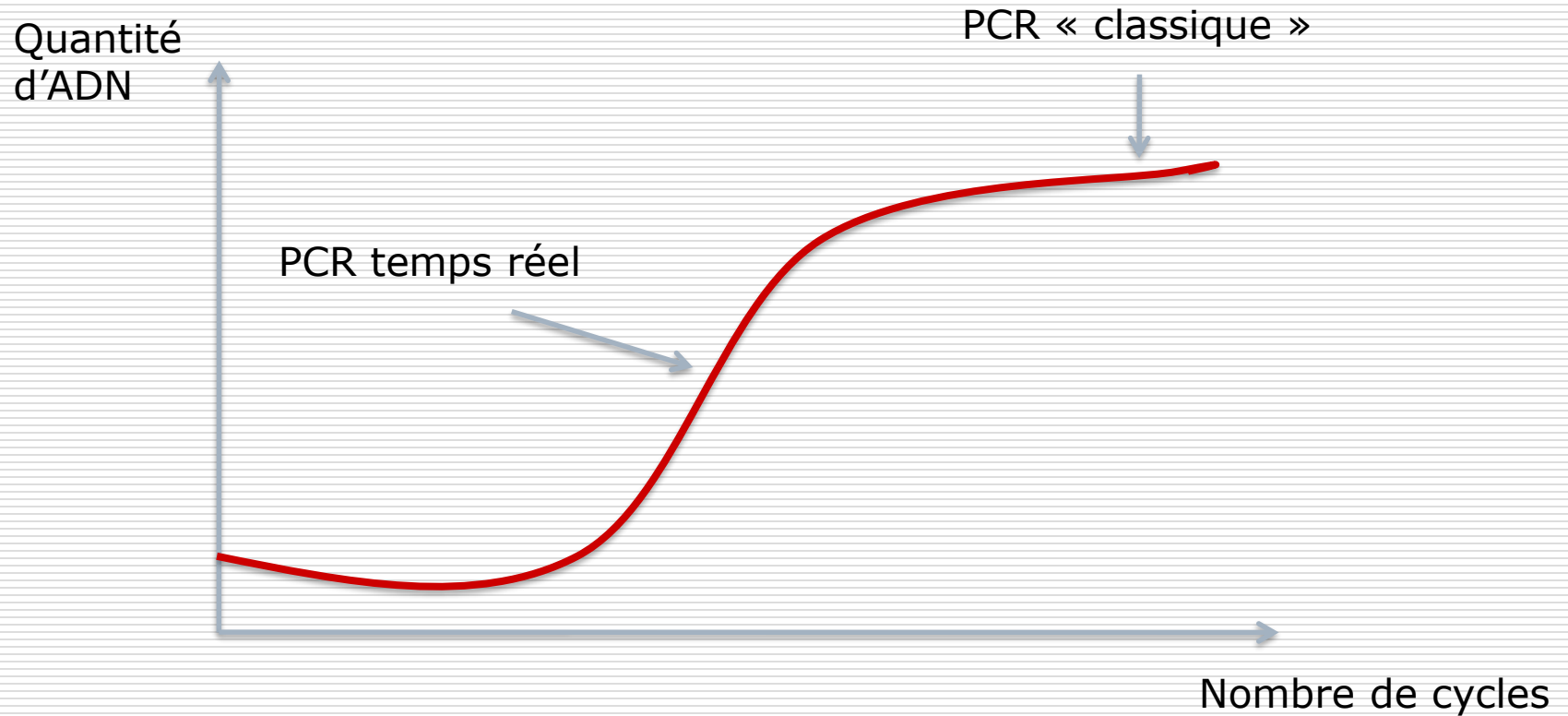
No. of cycles

24	27	30	33	36
----	----	----	----	----



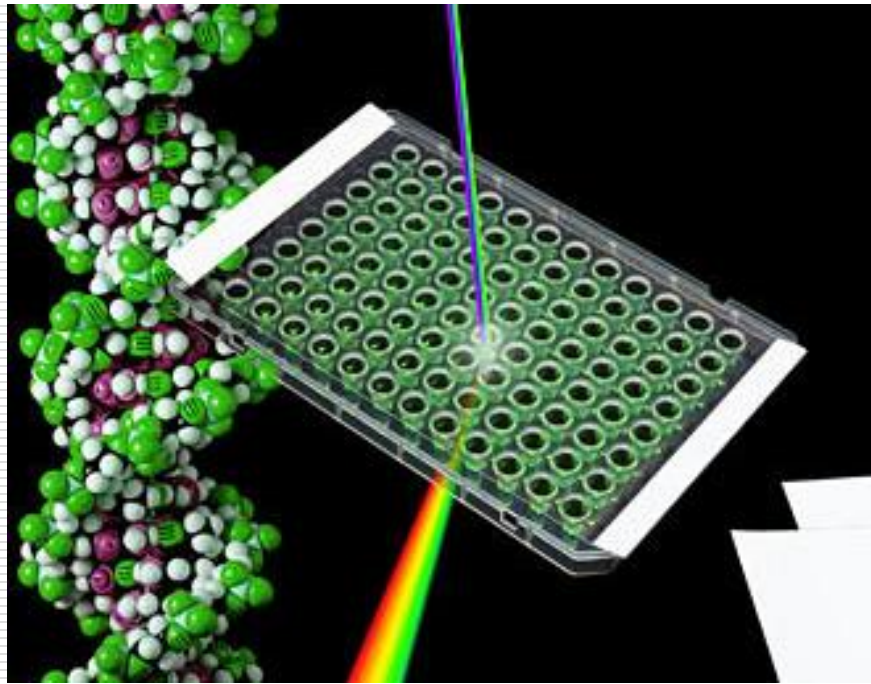
Visualisation en point final

PCR « classique » versus PCR en temps réel

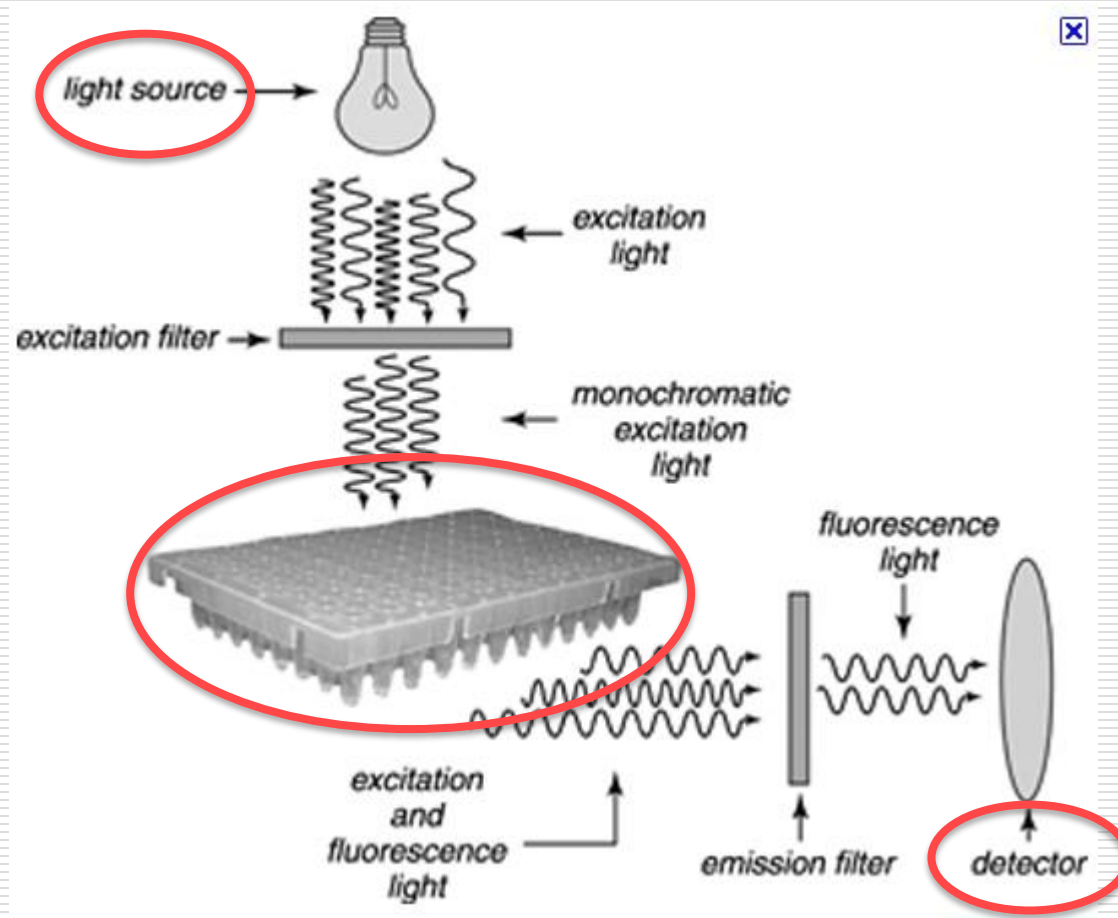


La PCR en temps réel

- De la fluorescence est ajoutée au mix de PCR



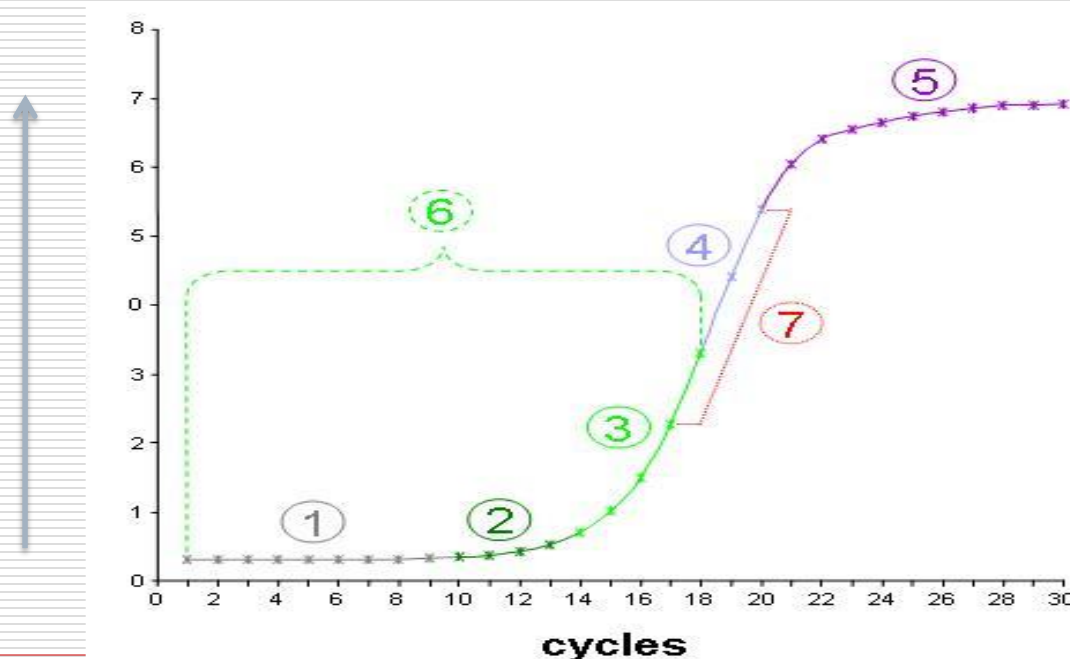
La PCR en temps réel



La PCR en temps réel est une cinétique

- ❑ Détection de la fluorescence associée à l'amplification à chaque cycle de PCR
- ❑ Pas d'analyse sur gel à la fin de la PCR
- ❑ Analyse informatisée de la cinétique de fluorescence

Augmentation
de la
fluorescence



Avantages de la PCR en temps réel

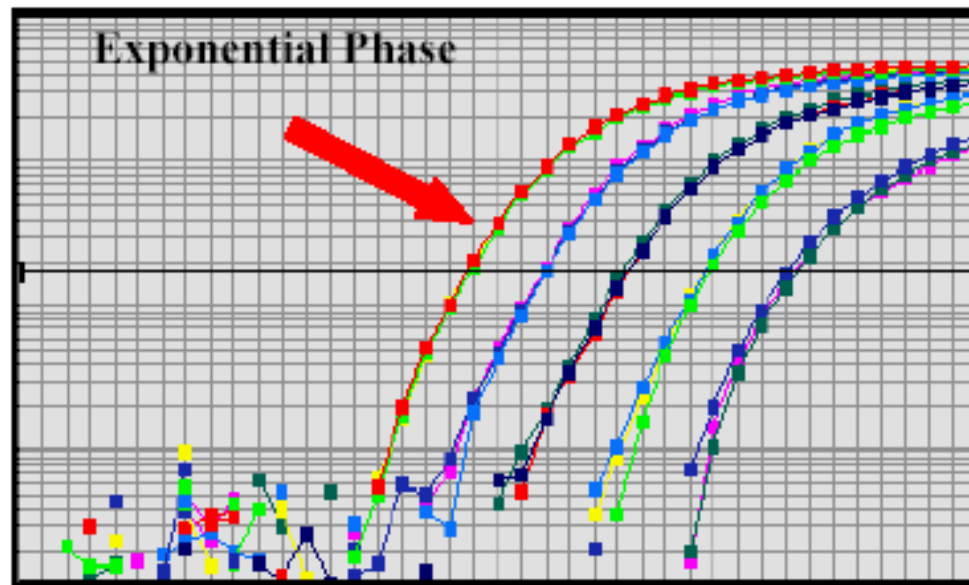
- ❑ Pas gênée par une amplification non spécifique
 - ❑ Amplification suivie au cours du temps
 - ❑ Pas de manipulation des produits de PCR à la fin de la manip (pas de risques de contamination)
 - ❑ Cycles ultra-rapides (30 minutes à 2 hours)
 - ❑ Possibilité de mettre en évidence des variations énormes (jusqu'à 10^{10} -fold)
 - ❑ Nécessite jusqu'à 1000 fois moins d'ARN au départ
 - ❑ La détection est capable de mettre en évidence un fold de 2
 - ❑ Confirmation de l'amplification spécifique par l'analyse de la courbe de fusion
 - ❑ Plus spécifique, plus sensible et plus reproductible
 - ❑ Pas plus chère que la PCR conventionnelle (hors équipement)
-

Désavantages de la PCR en temps réel

- ☐ Pas idéale pour les multiplex
 - ☐ Nécessite une bonne technicité
 - ☐ Equipement coute assez cher
-
- ☐ Variations intra et inter-manips
 - ☐ Résultats dépendent surtout de la qualité des ARN
 - ☐ Risque de contamination du DNA
-

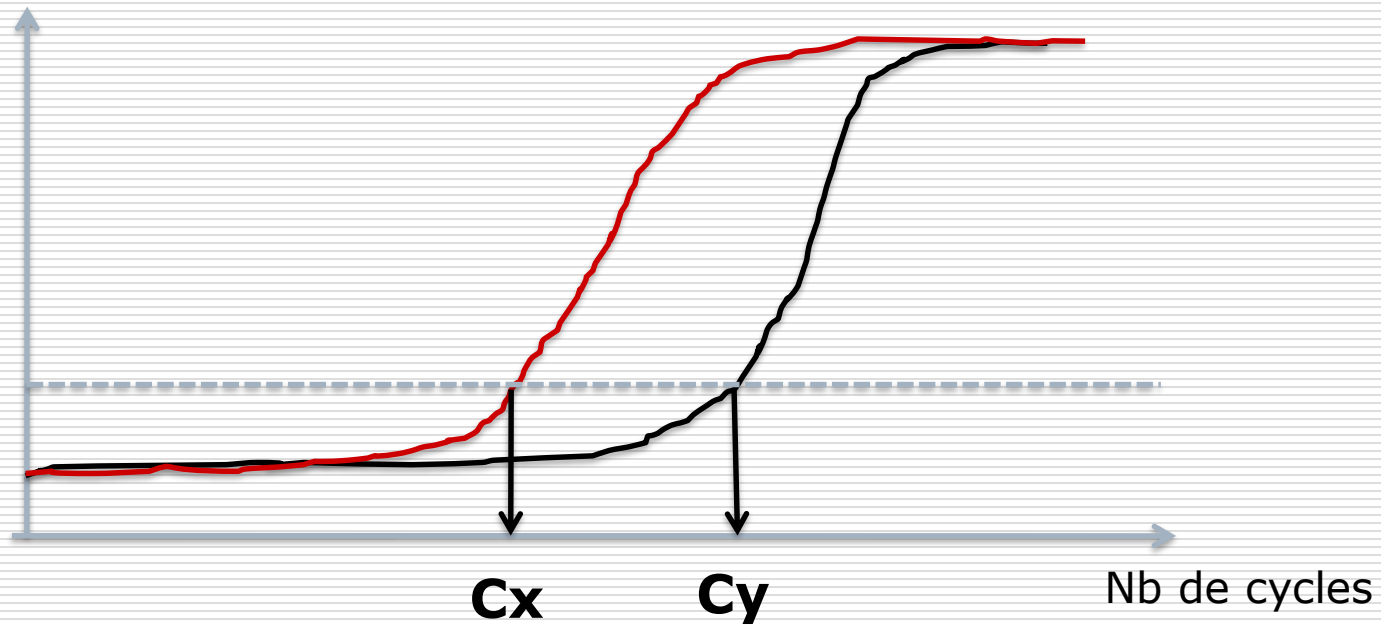
Principes de la PCR en temps réel

- Basée sur la detection et la quantification d'un reporter fluorescent
- La première augmentation significative de la quantité de produite de PCR est directement corrélée avec la quantité de cible ARN présente dans l'échantillon



Monitoring de la fluorescence

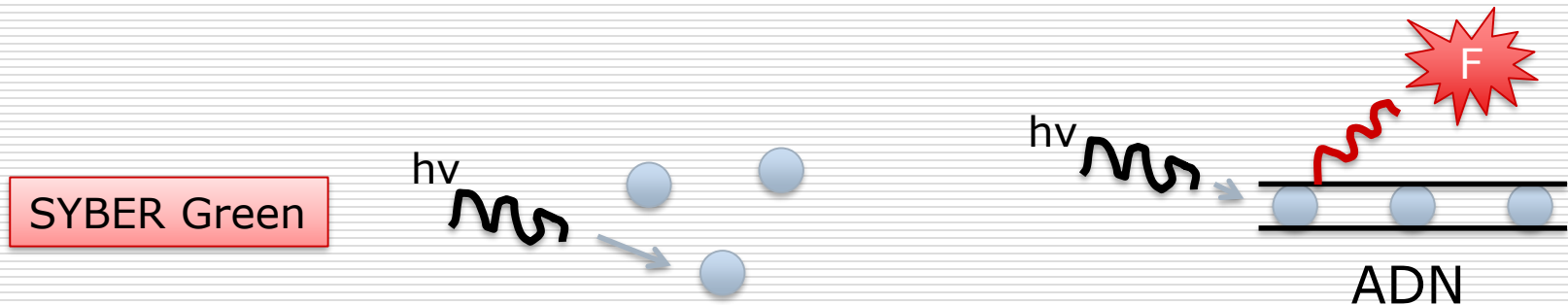
Fluorescence



Génération de la fluorescence

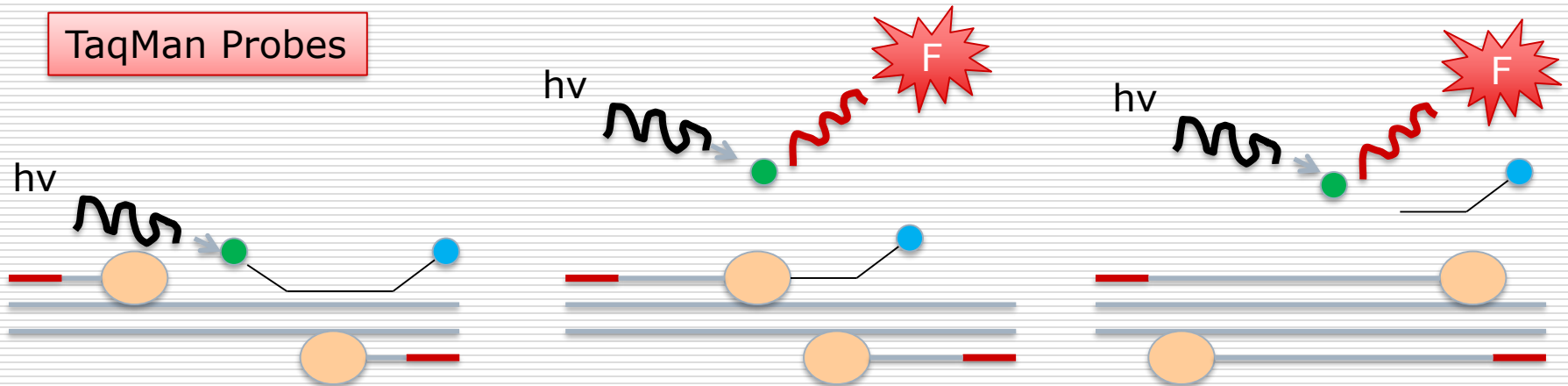
Avant Amplification

Après Amplification



La fluorescence du Syber green augmente énormément lorsqu'il est incorporé à de l'ADN double brin. Durant la phase d'extension, de plus en plus de Syber green est incorporé dans l'ADN, ce qui augmente la fluorescence à chaque cycle. C'est cette fluorescence que l'on détecte à la fin de chaque cycle de PCR.

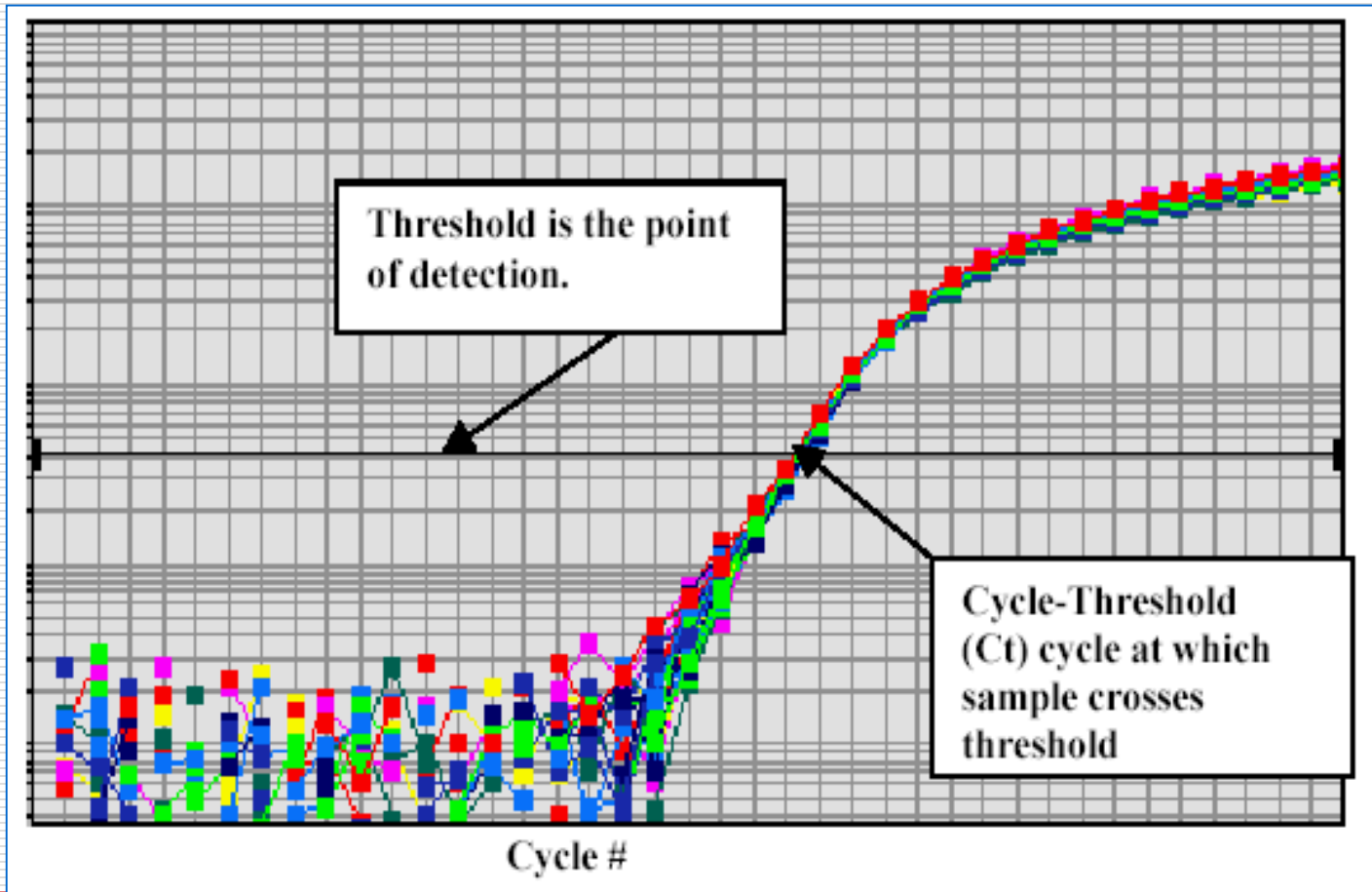
Génération de la fluorescence



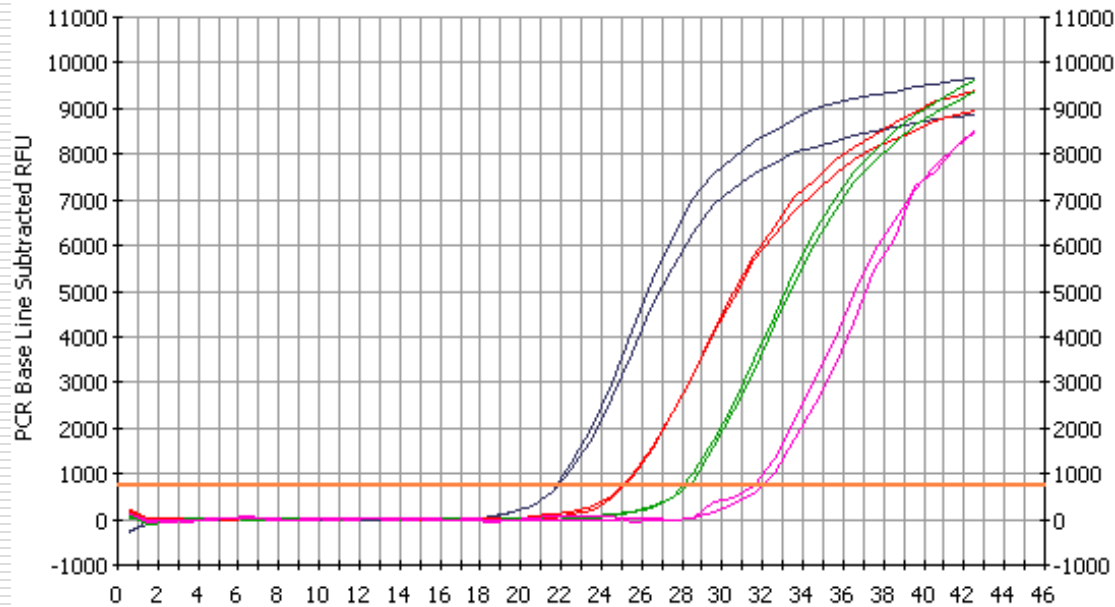
Activité 5' nucléase de l'ADN polymérase (étape d'extension)

La sonde à hydrolysée est conjuguée à un quencher fluorochrome fixé sur toute la longueur de la sonde. Lors de l'élongation et de l'extention, cette sonde est hydrolysée par la Taq polymérase. Il en résulte une séparation entre le reporter et le quencher fluorochrome, dont la fluorescence devient alors détectable. A chaque cycle de PCR, la fluorescence est augmentée due à l'accumulation exponentielle du quencher fluorochrome libre

Qu'est ce que le Ct?

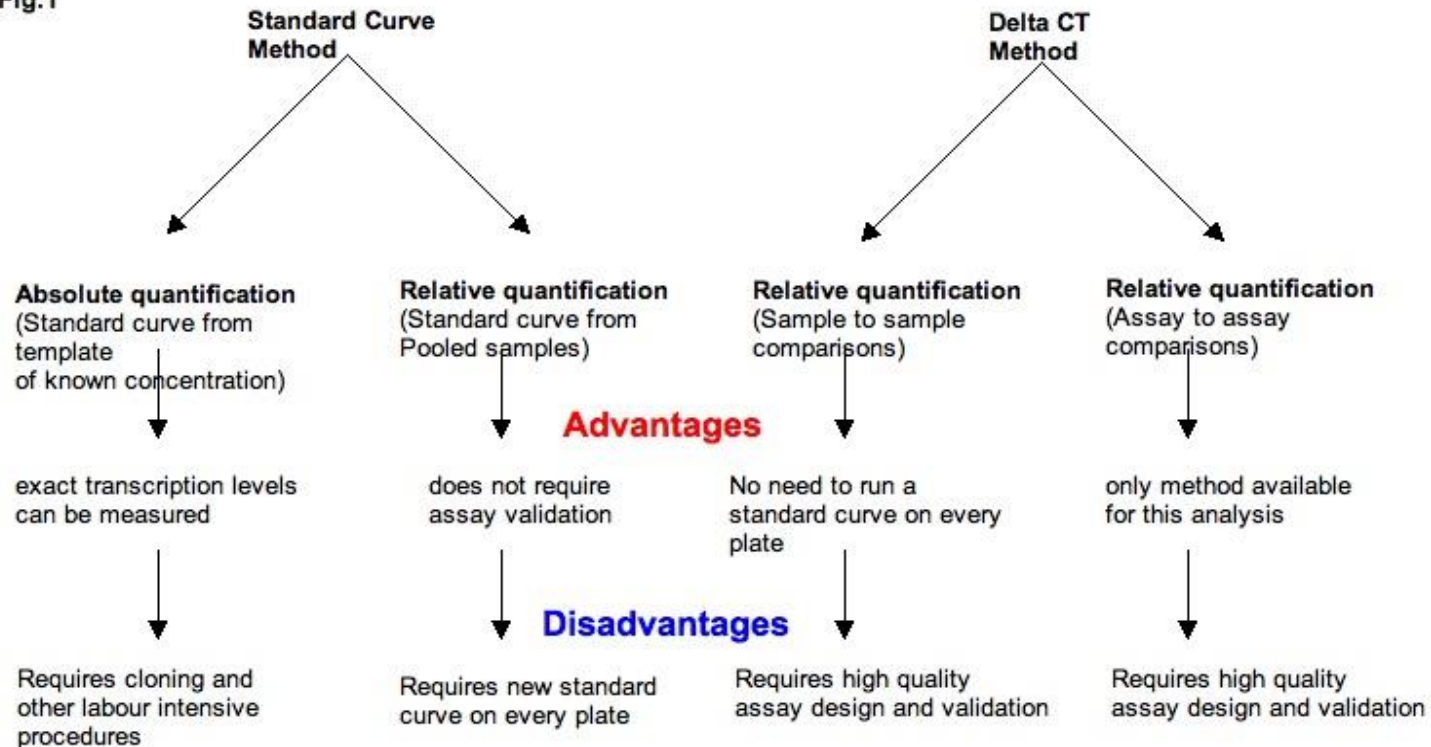


Courbes standard / Détermination



Comment calculer ?...

Fig.1

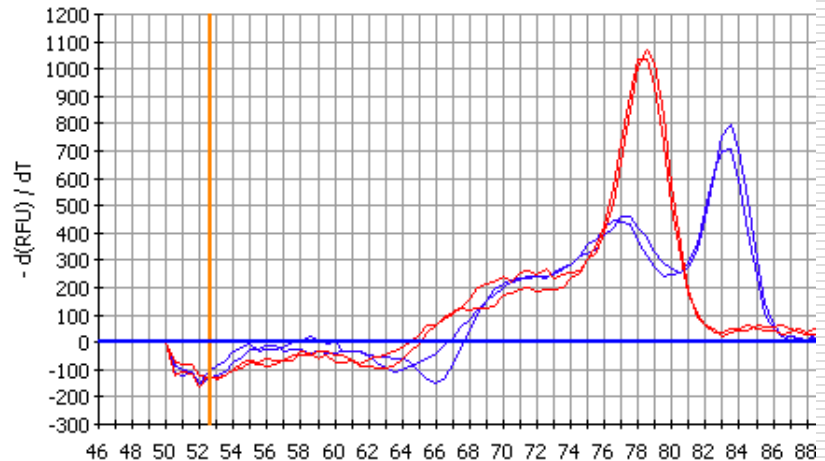
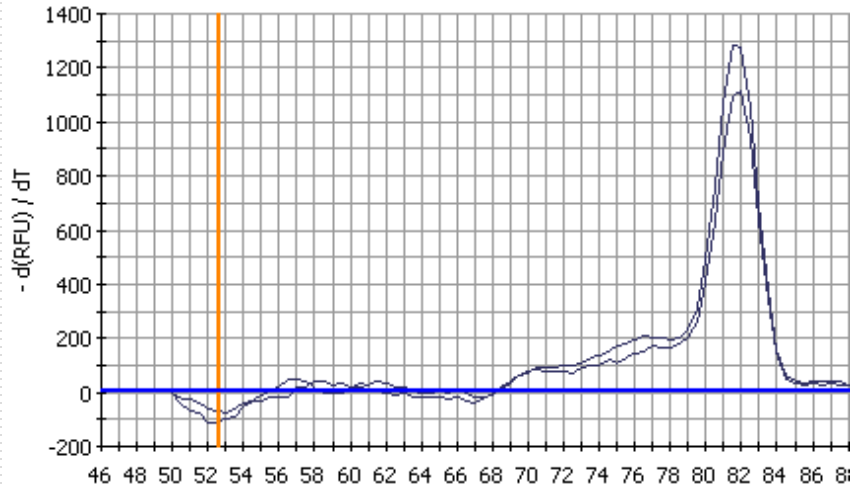


Absolute quantitation using the Standard curve method

Relative quantitation using the Standard curve method

Relative quantitation using the Delta CT method

Choix des primers

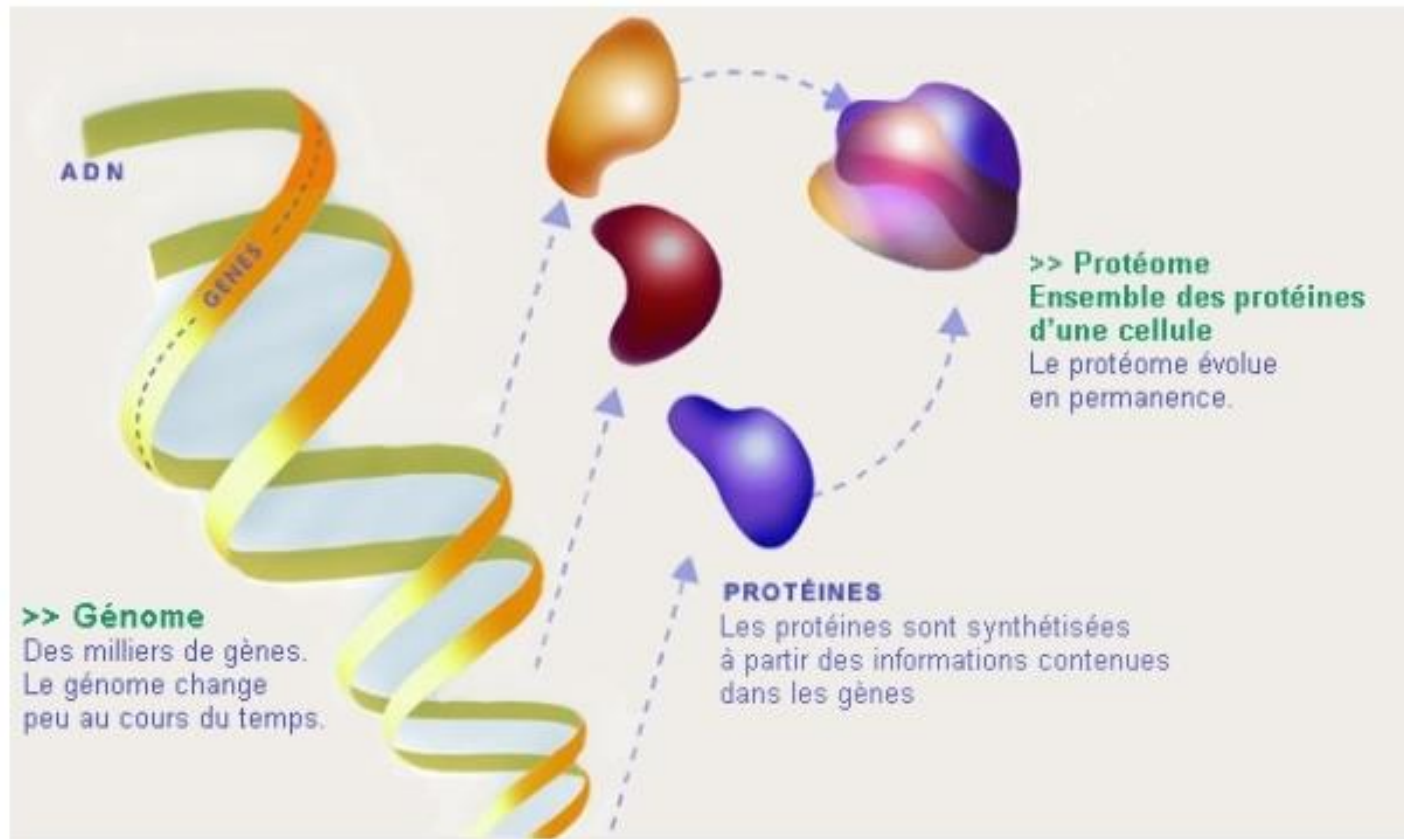


Un seul pic doit être observé

Le désavantage du Syber green est qu'il se fixe sur tout les doubles brins d'ADN présents dans la réaction, comme les dimers de primers et tous les autres produits non spécifiques. Ceci aboutit souvent à une surestimation de la concentration de la cible

Pour une réaction de PCR avec un seul produit et des amorces très bien dessinées, le Syber green marche extrêmement bien avec une spécificité et une sensibilité très grande (même pour des cycles très tardifs)

Méthode d'études en histologie



Analyse de l'expression des protéines

But de l'histologie

- ❑ Connaître le circuit de prise en charge d'un prélèvement histologique
 - ❑ Connaître les techniques histologiques et cytologiques de routine
 - ❑ Connaître les techniques spécialisées et leur principes généraux
-

Généralités

- ❑ Histologie : « science des tissus ».
- ❑ Le concept de tissu, de derme a été inauguré fin XVII/début XVIII, **sans MICROSCOPE** (juste grâce à des travaux de dissection anatomique)
- ❑ Puis la notion de « cellule » est apparue et vers 1840, le microscope optique est perfectionné avec de grandes améliorations de l'optique.
- ❑ Des lentilles sont ensuite fabriquées pour obtenir des images proches de la réalité

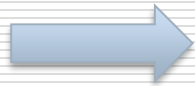
1 tissu est constitué de cellules.

Ces cellules produisent une MEC (matrice extracellulaire)

Objectifs de l'histologie

- ❑ Morphologie des cellules
- ❑ Fonctionnement des cellules
- ❑ Mise en évidence des protéines, d'ADN ou d'ARNm

On distingue ainsi 4 familles de tissus :



- Les épithéliums
- Les tissus conjonctifs
- Les tissus musculaires
- Les tissus nerveux

Ils sont fonction de la composition de la MEC, de la nature des cellules et de la proportion de celles-ci par rapport à la MEC

Les Préparations tissulaires

Principes généraux

- échantillonnage du prélèvement,
 - fixation,
 - déshydratation,
 - inclusion (paraffine, résine),
 - coupe,
 - colorations,
 - observation.
-

Le prélèvement

- ❑ Le plus rapidement possible
 - ❑ Pièces opératoires qui doivent être recoupées très rapidement
 - ❑ Biopsies sans recoupes
 - ❑ UTILISATION D'INSTRUMENTS BIEN TRANCHANTS (pour ne pas écraser les tissus et éviter les artéfacts)
-

Les coupes histologiques

- ❑ 5 μm d'épaisseur,
 - ❑ quelques centimètres de largeur et longueur,
 - ❑ nombreuses colorations possibles,
 - ❑ montées entre lame et lamelle,
 - ❑ grandissement de 10 à 1000 fois
-

La fixation

☐ **Conserver les structures**

- ☐ - Immobilisation des constituants tissulaires / cellulaires
 - ☐ - Préviend l'autolyse cellulaire
 - ☐ - Préviend la putréfaction bactérienne
 - ☐ - Permet la technique histologique et les colorations ultérieures
-

Techniques de fixation

- ❑ Immersion dans le fixateur
 - la technique la plus utilisée (routine).

 - ❑ Perfusion intravasculaire ou intraluminale
 - très bonne fixation,
 - délicate à mettre en place,
 - pour la recherche.
-

Rôle du fixateur

- Précipitation, polymérisation, coagulation des protéines
 - Mise en place des liaisons covalentes
 - Tue les cellules
 - Blocage des réactions enzymatiques
-

Il n'y a pas de fixateur idéal

- ☐ Il faut le choisir en fonction de ses avantages et inconvénients.
 - ☐ Parmi des centaines disponibles !
-

Le formol seul (formaldéhyde dilué) dans l'eau courante, ou tamponné

- bon marché,
- incolore,
- permet la fixation de grosses pièces,
- permet l'immunohistologie

MAIS

- allergisant,
 - carcinogène.
-

Les fixateurs contenant du formol (1)

- AFA (Acide acétique Formol Alcool)
 - très rapide (risques de surfixation),
 - permet les marquages immunohistologiques.

MAIS

- peu pénétrant.

idéal pour les biopsies

Les fixateurs contenant du formol (2)

- Bouin (Acide acétique Formol Acide picrique)
 - rapide,
 - pénétrant,
 - légères rétractions tissulaires,
 - très belles colorations topographiques,

MAIS

- ne permet que difficilement l'immunohistologie,
 - coloré : tache ! (et ne part qu'avec l'épiderme).
-

Idéal pour voir des gg. lymphatiques

Deshydratation

L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine.

Mais ces milieux ne sont pas miscibles entre eux.

On procède donc par étapes en remplaçant :

- l'eau par un alcool,
 - l'alcool par un solvant organique,
 - le solvant par la paraffine
-

Déshydratation : Souvent automatique



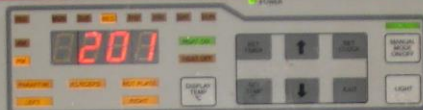
Les bacs contiennent :

- ☐ des alcools (5 bains),
- ☐ des solvants organiques (5 bains),
- ☐ de la paraffine chaude (3 bains).

L'inclusion

- Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu, celui-ci doit être très fin,
 - Besoin d'obtenir une consistance solide
 - Utilisation de paraffine liquide (56 – 58 ° C): la chaleur provoque l'évaporation du solvant. Les espaces libérés sont remplis par la paraffine
-

 Tissue-Tek® TEC



 Tissue-Tek®



Un moule est rempli de paraffine liquide



Démoulage, après refroidissement



La Microtomie

- Isoler des coupes dans le bloc de paraffine,
 - Un microtome fait avancer le bloc sur un rasoir : Le bloc avance d'environ 2 à 3 μm à chaque fois (en microscopie classique, les coupes mesurent environ 5 μm)
-

Mise en place du bloc sur le microtome



Confection des coupes : le ruban



Etallement et collage sur des lames de verre

- On chauffe une plaque chauffante (36°C)
 - La paraffine chauffée va donc coller à la lame
 - Le prélèvement va ainsi être également fixé sur la lame
-

Dépliage des coupes sur eau à 36 ° C



Séchage des coupe après étalement

La microscopie électronique : adaptations nécessaires

- Un faisceau d'électrons remplace le faisceau de photons
- Rapidité de fixation indispensable (glutaraldéhyde)
- Déshydratation avec de l'oxyde de propylène
- Inclusion dans des résines synthétiques d'époxy (stable au bombardement électronique)
- Coupes avec un rasoir de verre ou de diamant (coupe de 80 μm)
- Observation par des techniques de contrastes des tissus

La cryohistologie

- Utilisation d'un microtome à congélation (environ -18°C / -25°C).
 - Principalement utilisée pour les lipides : observation très rapide
 - Utilisée pour des examens extemporanés (au bloc opératoire), associée à des techniques de coloration rapides mais moins efficaces.
-

Les différentes colorations



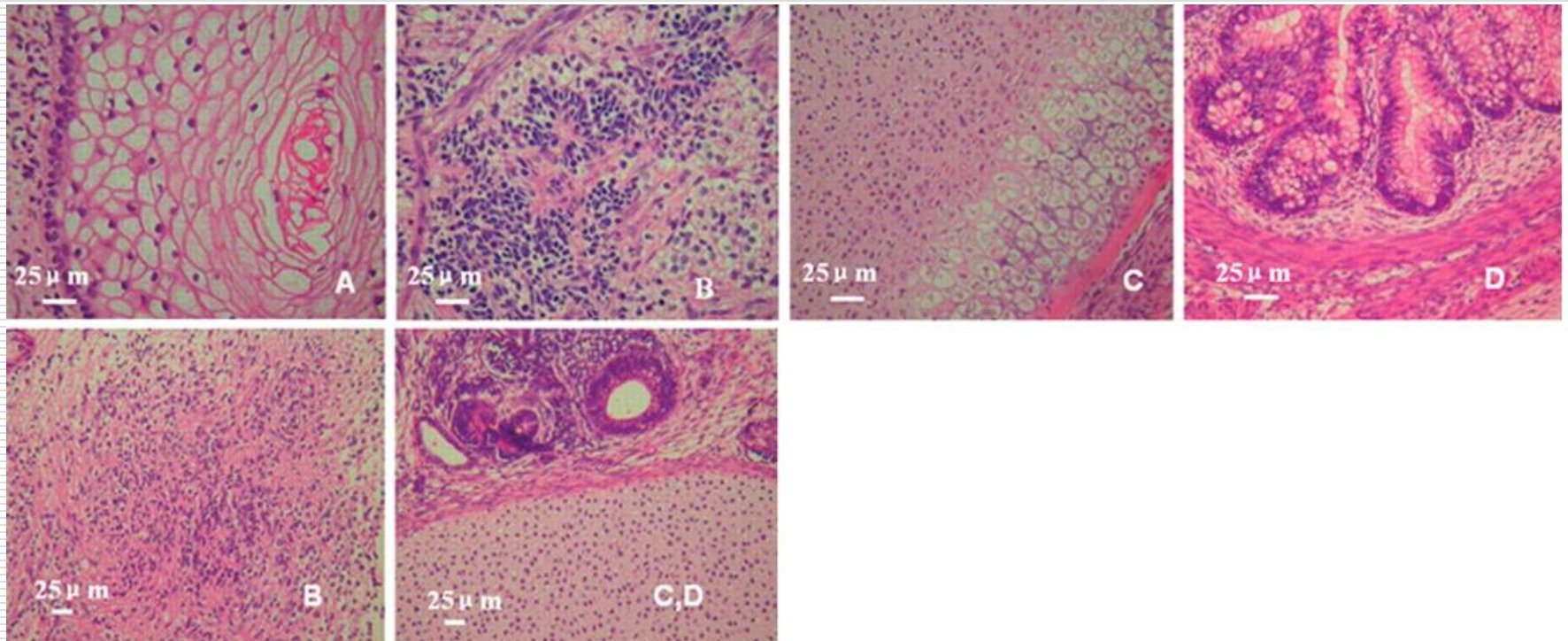
**AVANT ...ET ENCORE DANS
CERTAINS LABOS**



L'AUTOMATE...LA REVOLUTION

Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

STRUCTURE GLOBALE : Coloration de routine



Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

	Colorant	Affinité pour
Hématox	Basique	Acides nucléiques
Eosine	Acide	Protéines
Safran		Fibres de collagène

Coloration May-Grunwald-Giemsa (MGG)

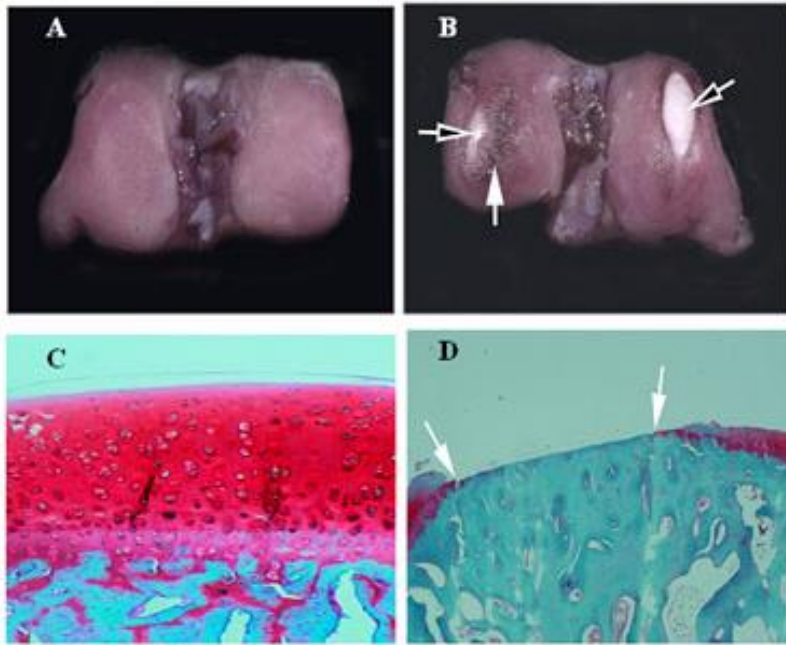
HEMATOLOGIE : Coloration de routine

- Frottis sanguin
 - Ponction de liquide inflammatoire
 - Coupes d'organes lymphoïdes ou hématologiques
-

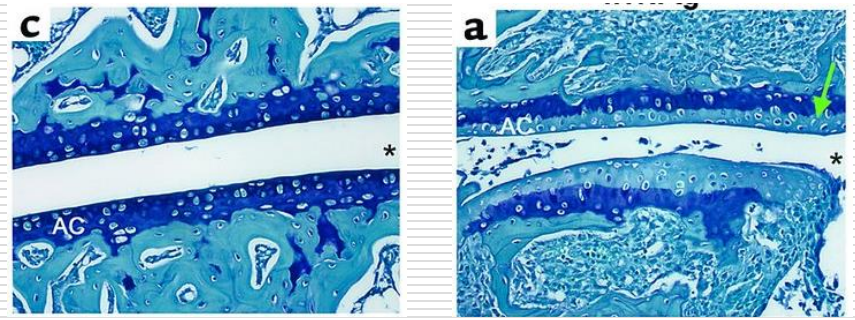
Autres colorations appliquées au cartilage articulaire

LES PROTEOGLYCANES

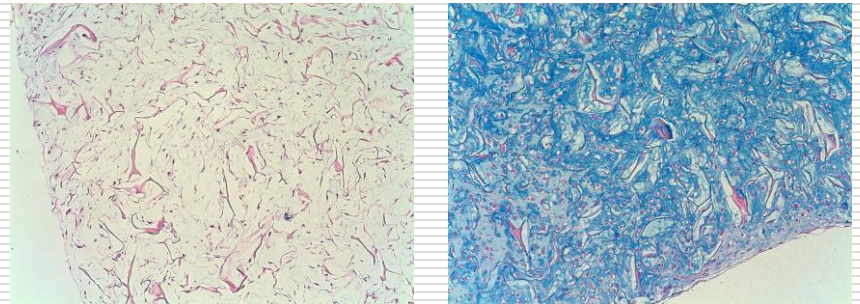
Safranin O :



Bleu de Toluidine :



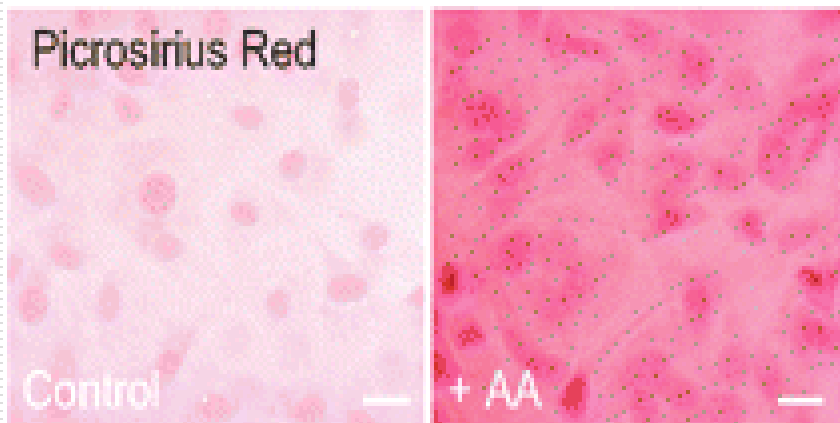
Bleu Alcian:



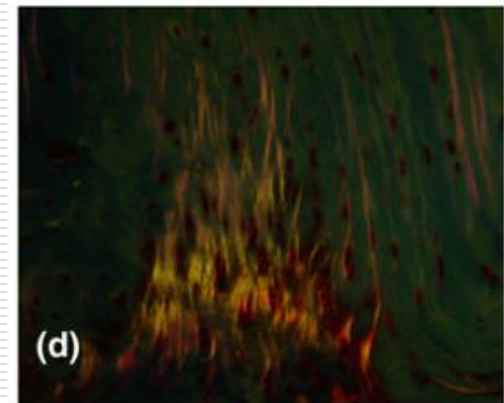
Autres colorations appliquées au cartilage articulaire

LES COLLAGENES

Rouge Sirius:

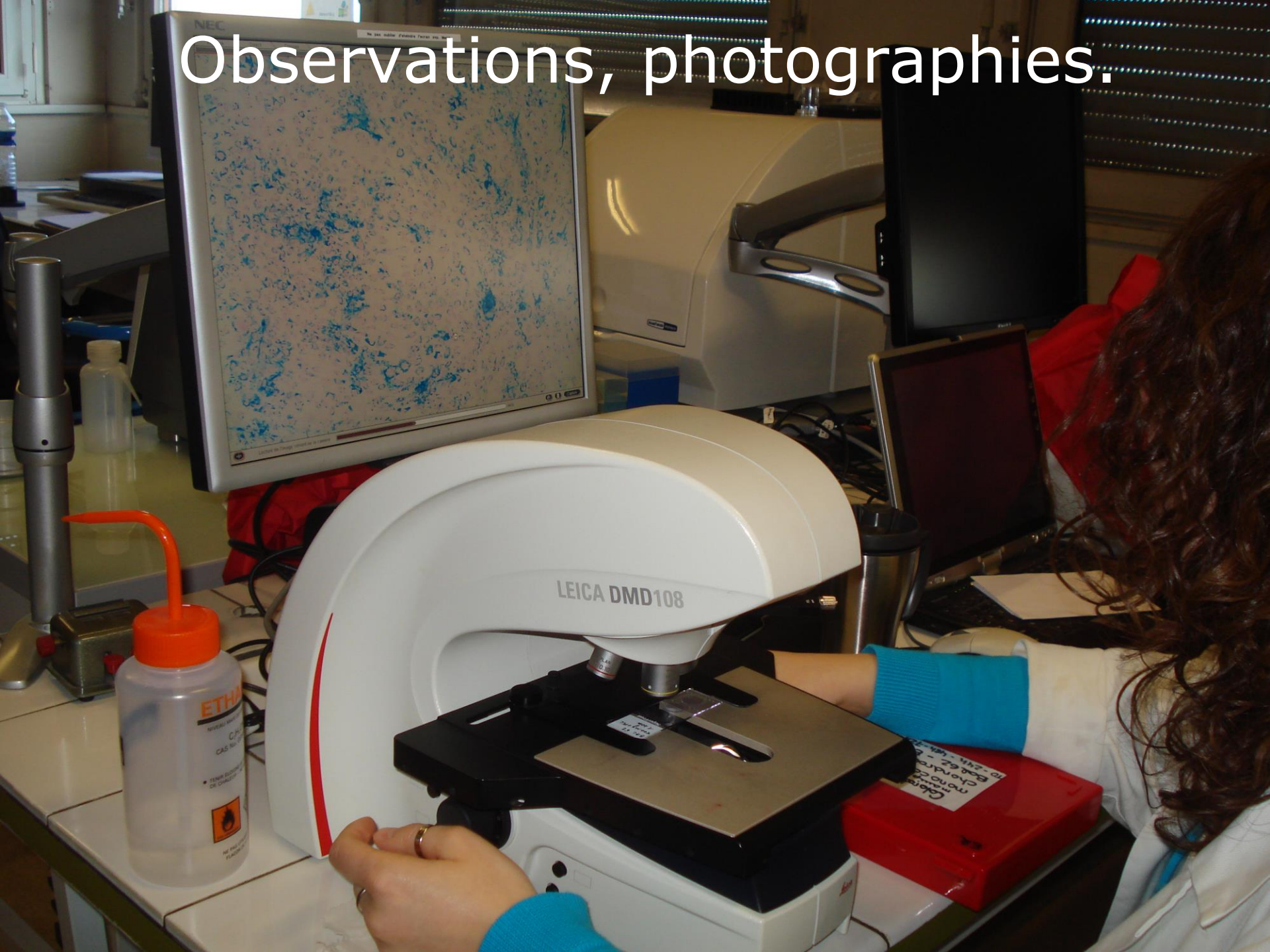


Lumière polarisée:



+ Trichrome de Masson : Mise en évidence du collagène de type I

Observations, photographs.



La microscopie

LE MICROSCOPE OPTIQUE

- Les préparations sont généralement colorées et observées par trans-illumination.
 - Grandissement = Grandissement objectif X grandissement oculaire
 - Les objets inférieurs à $0,1 - 0,2 \mu\text{m}$ ne sont pas distinguables : c'est la LIMITE de LA MICROSCOPIE OPTIQUE
-

La microscopie

LE MICROSCOPE A CONTRASTE DE PHASE

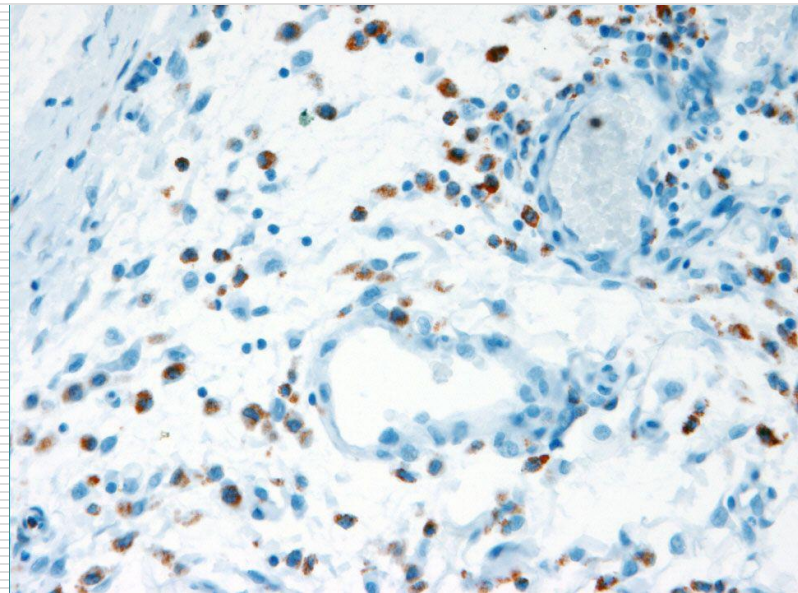
- La lumière va se déplacer différemment dans les différentes structures.
 - La lumière va plus vite dans l'air que dans l'eau que dans le verre.
 - Révélation surtout d'objets peu opaques (recherche dans le domaine dentaire de la flore bactérienne)
-

La microscopie

LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE

- Propriété de certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie.
 - Formation d'une image par détection de cette lumière émise.
-

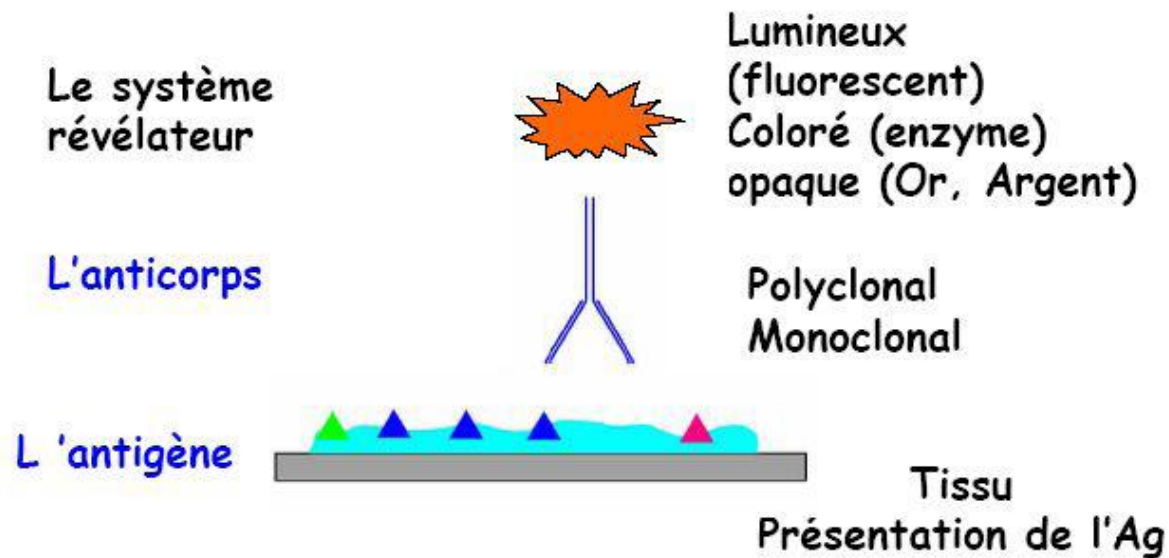
Les techniques d'immunohistochimie



Intérêts

- ❑ Détection spécifique de protéines sur matériel cytologique ou sur coupes tissulaires
 - ❑ Localisation (+/- quantification) d'une protéine dans une cellule ou un tissu
-

Principes



Accès des Ac à l'Ag : la fixation

Elle dépend énormément de ce qu'on veut cibler comme antigène !!!!

Et le résultat dépend donc énormément de la fixation choisie !!!!!

Accès des Ac à l'Ag : Démasquage Antigénique

☐ Enzymatique

- Trypsine 0,1% TA
- Pronase 0,1% 37° C
- Pepsine 0,4% 37° C

☐ A la chaleur

- tampon citrate four à micro-ondes
 - tampon EDTA
 - bain-marie ++
 - étuve
-

Accès des Ac à l'Ag : Perméabilisation des membranes

□ Cellules entières

- Détergents non ioniques
 - ✓ Triton 0,1 %
 - ✓ Saponine 0.1-0.01 %
-

Les anticorps

❑ Anticorps polyclonaux

- *Avantages*
 - ✓ plusieurs Ac contre un seul Ag
 - ✓ plus « sensible »
 - ✓ Fixation moins critique
 - ✓ mise en oeuvre rapide
 - *Inconvénients*
 - ✓ Spécificité moindre : reconnaît différents déterminants d'un même Ag
 - ✓ Affinité et spécificité variable selon le lot
-

Les anticorps

❑ Anticorps monoclonaux

- *Avantages*
 - ✓ Mono-spécificité (un épitope)
 - ✓ Affinité homogène
 - ✓ Production régulière, sans variabilité
 - *Inconvénients*
 - ✓ Réalisation plus difficile
 - ✓ Plus grande sensibilité à la qualité de la fixation
-

Les anticorps

❑ Fragments Fab ou F(ab')₂

Obtention : Digestion ménagée, purification

- *Avantages*
 - ✓ Taille moindre : meilleure pénétration
 - ✓ Pas de fixation Fc non spécifique
-

Révéléateur

❑ Fluorescence

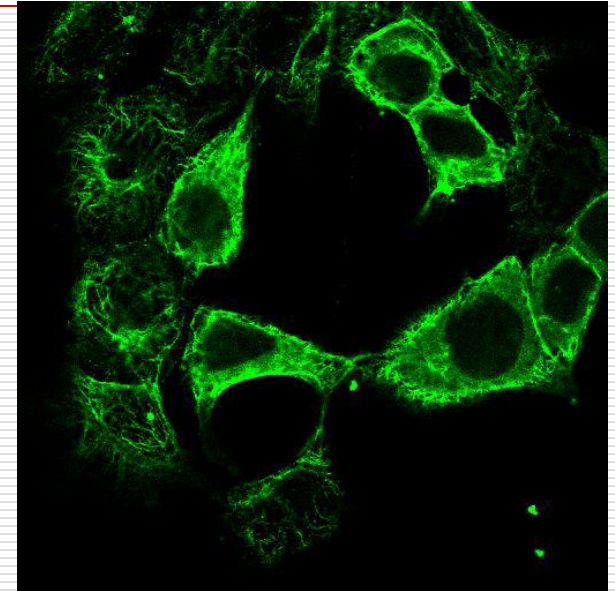
Principe absorption-émission

	Absorption (nm)	Emission (nm)	couleur
FITC (isothiocyanate fluorescéine)	490	520	vert
RITC (isothiocyanate rhodamine)	520+550	575	orange- rouge
TRITC (isothiocyanate tétraméthylrhodamine)	520+550	575	orange- rouge
DAPI			bleu

Révélateur

❑ La fluorescence

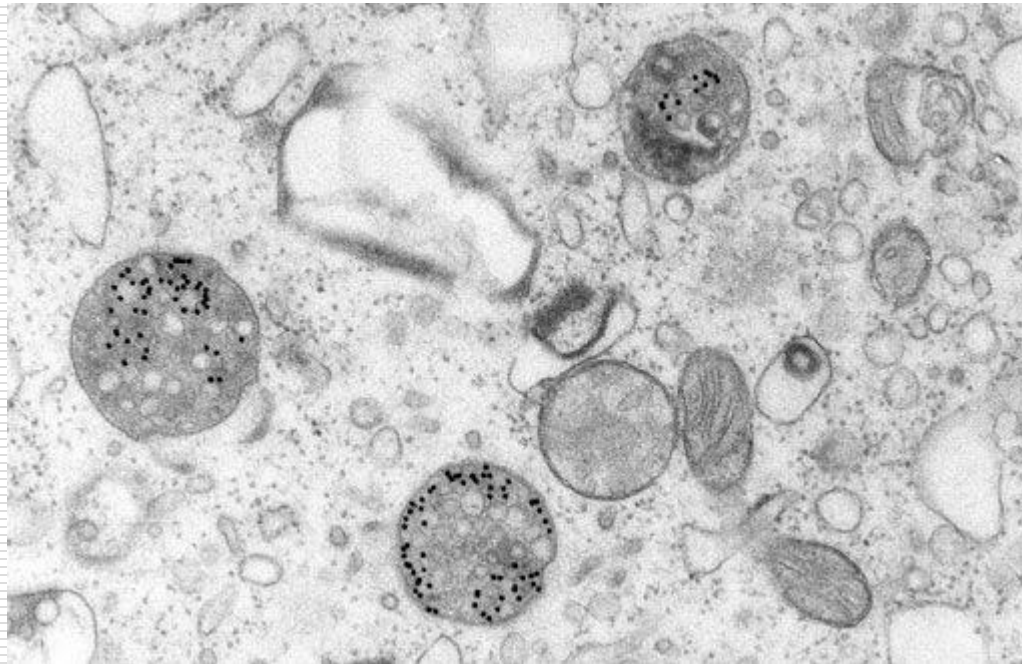
- *Avantages*
 - ✓ Protocoles Rapides
 - ✓ Grande sensibilité
 - ✓ Colocalisations possibles
 - ✓ Confocal
- *Inconvénients*
 - ✓ Montage aqueux : disparaît au cours du temps
 - ✓ Sensibilité à la lumière : stockage à 4 ° C
 - ✓ Extinction du signal sous UV
 - ✓ Microscope spécialement équipé, chambre noire
 - ✓ Marche mal en paraffine



Révéléteur

❑ Marquage à l'or colloïdal

Application à la MET



Révéléateur

❑ Marqueur enzymatique

- *Enzymes*
 - ✓ HRP : peroxydase
 - ✓ Phosphatase alcaline
 - ✓ b-galactosidase
 - *Substrat*
 - ✓ chromogènes
-

Révélateur

Enzyme	Chromogène	coloration	Compatib.
HRP :	DAB (3.3 ' Diaminobenzydine)	brun	H2O, EtOH
	AEC (3 Amino 9 Ethyl Carbazole)	rouge	H2O
	4 Chloro 1 Naphtol	bleu	H2O
AP :	Fast blue	bleu	H2O, EtOH
	Fast red	rouge	H2O

Révélateur : marquage enzymatique

- ***Avantages***

- ✓ Visualisation aisée, microscopie optique
- ✓ Grande sensibilité
- ✓ Différentes couleurs et contre colorations
- ✓ Stables si déshydratées
- ✓ Double marquage avec vision simultanée

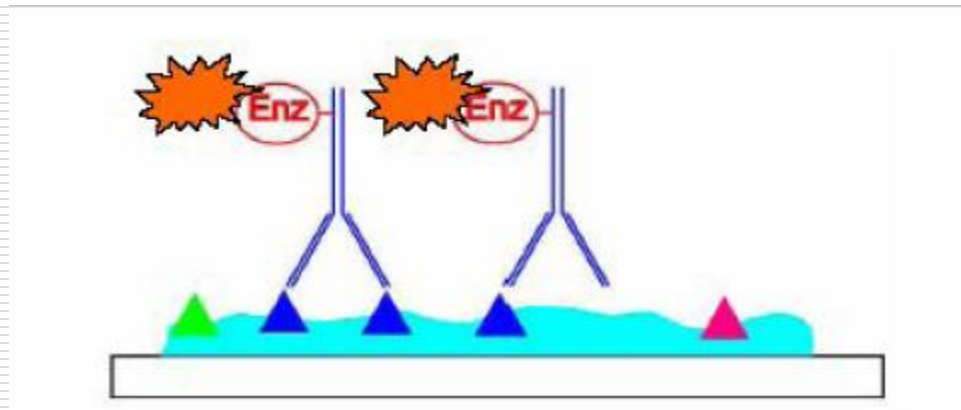
- ***Inconvénients***

- ✓ Protocoles longs
 - ✓ Pas de colocalisation
 - ✓ Contraste insuffisant si [Ag] faible
 - ✓ Substrats potentiellement carcinogènes
 - ✓ Diffusion du précipité (précision)
-

Amplification du signal

❑ **Technique directe non amplifiée**

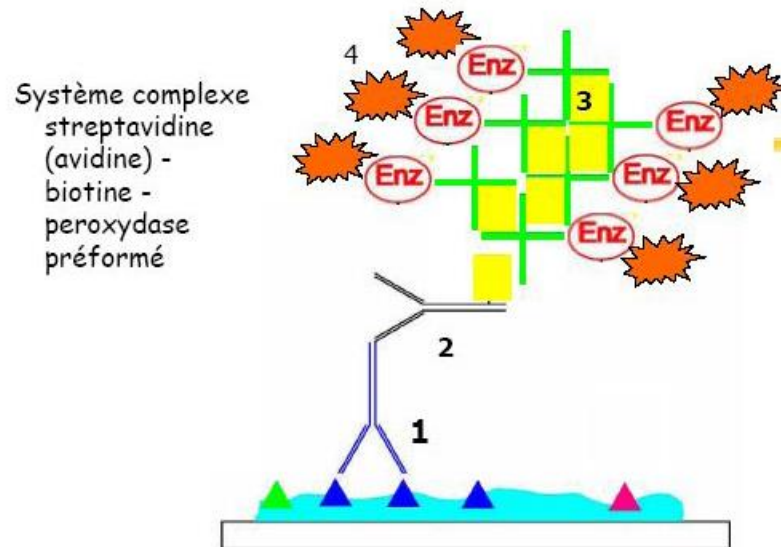
- *Avantages*
 - ✓ Peu d'étapes
 - ✓ peu de bruit de fond
- *Inconvénient*
 - ✓ Peu sensible



Amplification du signal

❑ Technique indirecte amplifiée

- Biotine – streptavidine (avidine)
- Complexes streptavidine (avidine) – biotine – peroxydase préformé



Amplification du signal

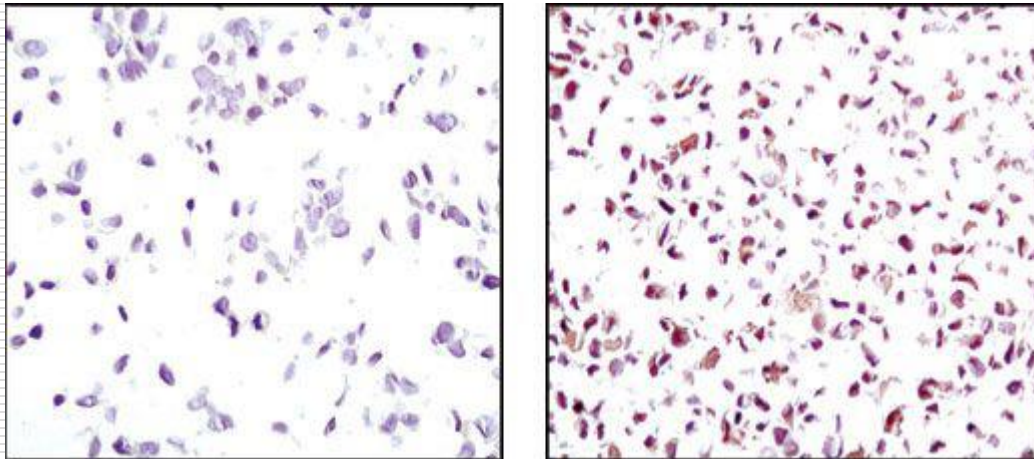
❑ **Technique indirecte amplifiée**

- *Avantages*
 - ✓ Liaison biotine-streptavidine irréversible (covalente)
 - ✓ Amplification considérable possible
 - *Inconvénient*
 - ✓  bruit de fond
 - ✓ Biotines endogènes
-

Analyse de la technique

❑ S'assurer que la technique a fonctionné

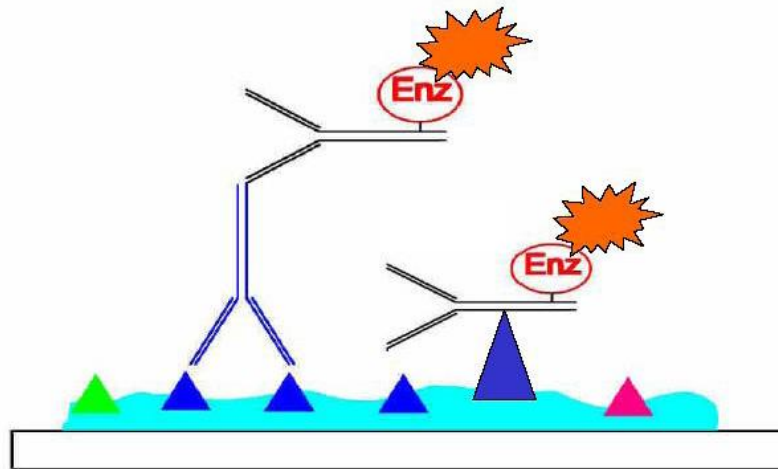
- *Importance des contrôles*



Analyse de la technique

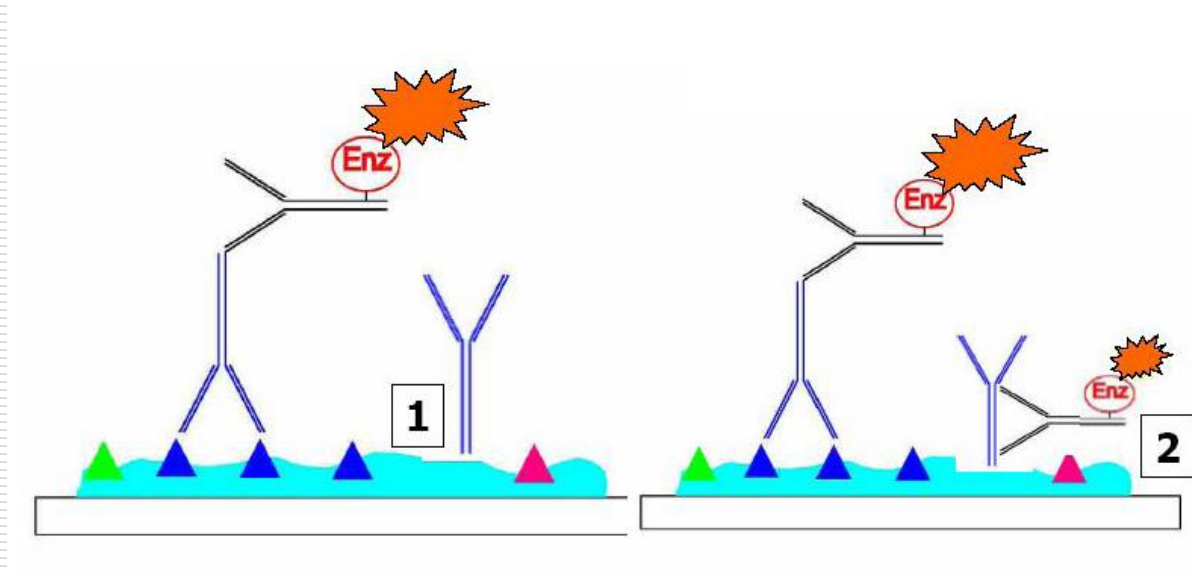
❑ Spécificité du marquage ? → Bruit de fond

- *Fixation non spécifique de l'Ac IIaire*



Fixation non spécifique de l'AC IIaire

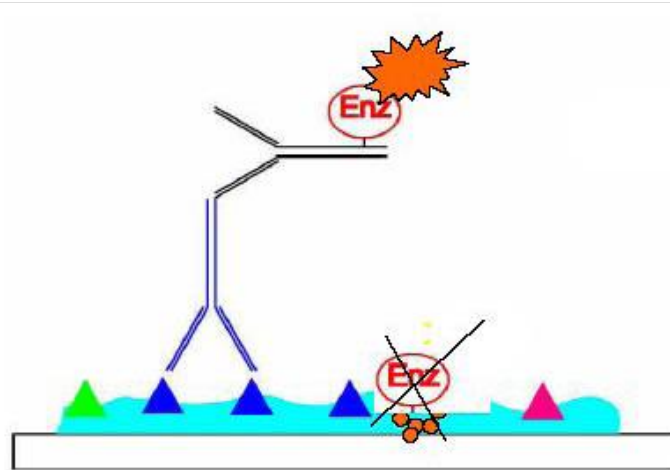
Analyse de la technique



*Solution : Pré-incubation avec sérum
isotypique à l'AcIIaire*

Analyse de la technique

❑ **Chromogène** = substrat d'enzyme endogènes
: peroxydases



*Solution : Pré-incubation avec un inhibiteur
des peroxydases endogènes : H₂O₂*

Contrôle du marquage

☐ Contrôles positifs

- Témoins externes
- Témoins internes

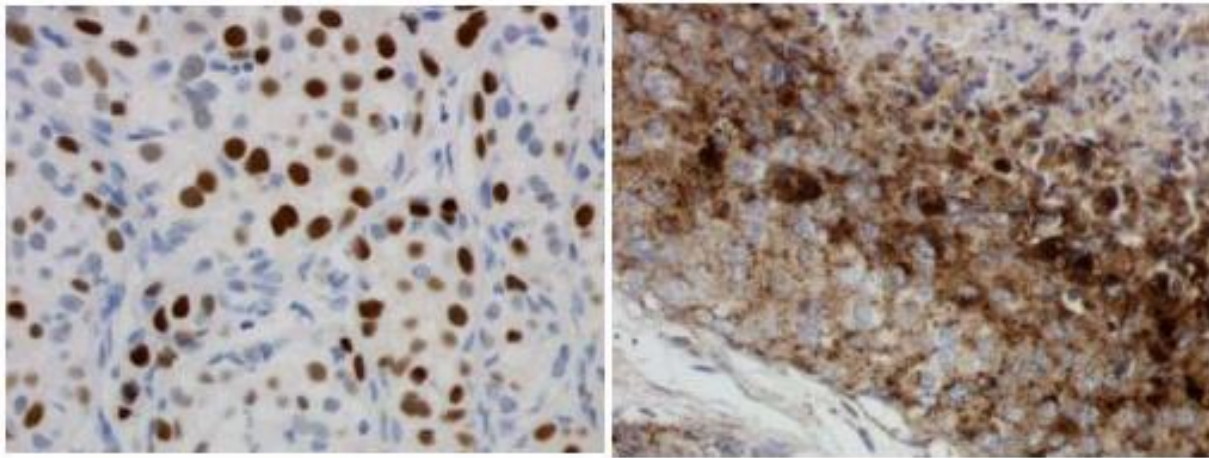
☐ Contrôles négatifs

- sans incubation avec Ac spécifique
 - Incubation avec un AcIaire de même isotype à la même [] dirigé contre un Ag absent du tissu (mAb)
 - Incubation avec sérum correspondant à l'Ac Iiaire
 - Incubation de l'Ac sur un tissu ne renfermant pas l'Ag
-

Analyse du résultat

❑ Analyse qualitative

- Quelles cellules sont positives ??
- Quelle est la localisation du marquage ??

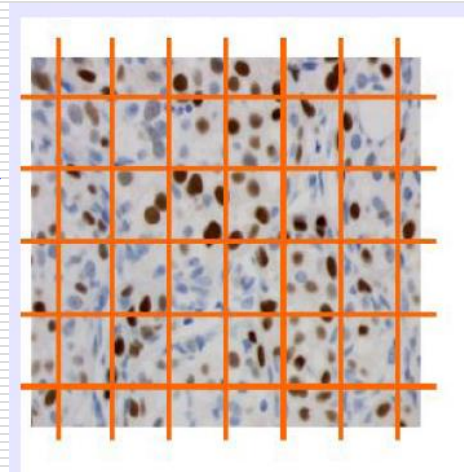


Analyse du résultat

❑ Analyse semi-qualitative

- Compteur + grille
- sur une zone (la + marquée ?)
- Sur l'ensemble de la préparation

Long et fastidieux



Analyse du résultat

❑ Analyse quantitative : analyseur d'images

- Standardisation
- Même épaisseur de coupe
- Même zone d'analyse
- Mêmes conditions de marquage : température, dilution, temps d'incubation

