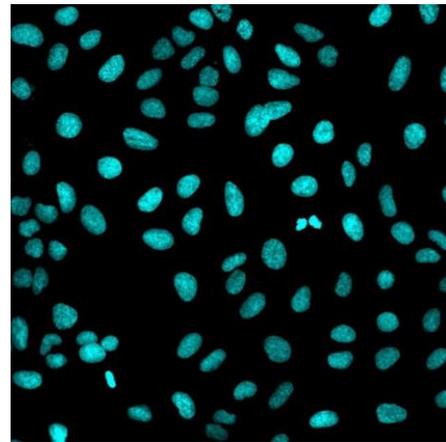


I. le marquage cellulaire

Le marquage cellulaire est un test multiplexé haut contenu à base d'images et utilisé pour le profilage cytologique. Dans un test de marquage de cellules, jusqu'à six colorants fluorescents sont utilisés pour marquer les différents composants de la cellule, notamment le noyau, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le cytosquelette, l'appareil de Golgi et l'ARN. L'objectif est de « peindre » (marquer) la cellule autant que possible afin de capturer une image représentative de la cellule entière.

Le logiciel d'analyse d'images automatisé est utilisé pour extraire des mesures caractéristiques de chaque cellule. Le nombre de mesures uniques est généralement compris entre 100 et 1000 par cellule. Ces mesures incluent généralement l'intensité, la texture, la forme, la taille, ainsi que la proximité d'un objet par rapport à sa structure adjacente, ce qui fournit une indication sur la relation spatiale entre les organites. Ensemble, ces mesures forment le profil phénotypique.



Noyau Colorant : Hoechst 33342

1. utilisation du marquage cellulaire

Le profil phénotypique d'une cellule révèle l'état biologique spécifique d'une cellule. Plus spécifiquement, il peut être utilisé pour :

- interroger des perturbations biologiques car la morphologie cellulaire est influencée par des facteurs tels que le métabolisme, l'état génétique et épigénétique de la cellule, et des facteurs environnementaux.
- il peut être utilisé pour caractériser des cellules saines par rapport à des cellules malades. Comme un profil phénotypique est une agrégation d'un grand nombre de mesures, il est plus sensible aux écarts ou aux variations des caractéristiques extraites du test de marquage cellulaire.
- un profil phénotypique peut capturer certaines caractéristiques des cellules qui peuvent ne pas être évidentes à l'oeil nu.

- Avec le marquage cellulaire, nous espérons que l'analyse d'images regroupe les cellules semblables par rapport aux cellules différentes, ou les cellules malades par rapport aux cellules saines.

2. Protocole général du test de marquage cellulaire

1. **Étalement des cellules** dans un appareil de laboratoire (plaque à 384 puits)
2. **Traitement des cellules** avec une perturbation chimique ou génétique (p. ex., ARNi, CRISPR/Cas9) ou des virus.
3. **Marquage** avec des colorants fluorescents (p. ex., Hoechst, phalloïdine, MitoTracker)
4. **Acquisition** d'images des cellules avec un système d'imagerie haut contenu
5. **Analyse des images** des cellules pour extraire les caractéristiques et mesures en utilisant un logiciel d'analyse d'images automatisé
6. **Dérivation de profils** morphologiques à partir des mesures.

II. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage (immunocoloration), qui utilise des anticorps, ou immunoglobulines, ainsi que des fluorochromes, liés chimiquement à une substance fluorescente pour démontrer la présence d'une molécule donnée

L'anticorps marqué est mis à réagir contre une préparation biologique et l'échantillon ainsi traité est exposé à une source lumineuse à ondes courtes (ultraviolette ou bleue) sélectionnée au moyen d'un monochromateur. Cette lumière à ondes courtes génère un phénomène de fluorescence dans la molécule marqueur qui à son tour émet de la lumière à une longueur d'onde plus longue (verte, jaune ou orange). Cette lumière émise peut être facilement quantifiée par photométrie ou, dans le cas de préparations histologiques, elle peut être observée au moyen d'un microscope à fluorescence. Dans le cas de l'utilisation de l'immunofluorescence comme méthode de coloration pour la microscopie optique, la fluorescence révèle la localisation au niveau cellulaire ou subcellulaire de la molécule cible.

Il existe plusieurs modèles de microscopes qui peuvent être utilisés pour l'analyse de préparations histologiques marquées par immunofluorescence. Le plus simple de tous est le microscope à épifluorescence, bien que le microscope confocal soit également largement utilisé. Il est également possible d'utiliser différents types de techniques microscopiques à haute résolution.

1. Utilisation l'immunofluorescence

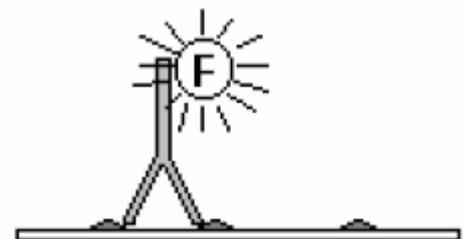
En tant que technique de coloration, peut être utilisée

- dans des coupes de tissus
- des lignées cellulaires cultivées
- des cellules individuelles et des sécrétions contenant des cellules en suspension (par exemple des expectorations) afin d'analyser la présence et la distribution de protéines, de glucides et de petites molécules.
- combinaison avec d'autres techniques de coloration fluorescente qui n'utilisent pas d'anticorps, comme le DAPI pour marquer l'ADN.
- utilisée dans des échantillons d'origine biologique ainsi que dans des échantillons non biologiques, à condition qu'ils soient dans un milieu favorable à la liaison d'anticorps.

2. type l'immunofluorescence

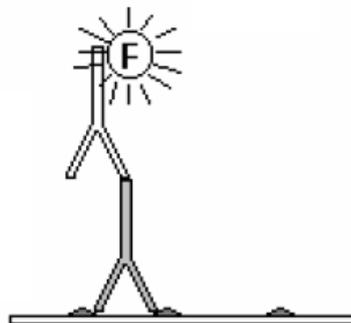
2.1. L'immunofluorescence primaire ou directe

Ce type utilise un anticorps unique lié chimiquement à un fluorochrome. L'anticorps reconnaît la molécule cible et s'y lie directement. Si la région où la molécule cible est déposée est utilisée comme technique de coloration immunohistochimique, elle peut être identifiée sous le microscope à fluorescence comme une zone claire. Cette technique présente certains avantages par rapport aux IFI (indirects). Il réduit le nombre d'étapes nécessaires, donc il est plus rapide et par contre il est moins sensible aux interférences dues à la réactivité croisée des anticorps ou à des réactions non spécifiques, qui tendent à augmenter le bruit de fond de la technique.



2.2. L'immunofluorescence secondaire ou indirecte

Ce type utilise deux anticorps, l'anticorps primaire est celui qui reconnaît et se lie à la molécule cible, tandis que l'anticorps secondaire qui est celui marqué avec le fluorophore, reconnaît le primaire et s'y lie. Cette technique est légèrement plus complexe que l'IFD, nécessite plus d'étapes et est plus susceptible de subir des interférences, mais en retour, elle est beaucoup plus flexible qu'une technique directe et parce qu'il est possible pour un anticorps primaire d'unir plus d'un anticorps secondaire, implique un effet d'amplification qui augmente également la sensibilité de la technique. Cette technique est possible, car les anticorps se composent de deux parties, une région variable (qui est celle qui reconnaît l'antigène) et une région constante (qui est celle reconnue par l'anticorps secondaire).



3. Microimmunofluorescence

Il s'agit d'une technique sérologique utilisée pour détecter les anticorps dans le sérum du patient. Cela fonctionne sur le même principe que celle de l'immunofluorescence indirecte mais est réalisée sur des lames en Téflon comportant de nombreux puits parsemés d'antigènes. Cette technique est utilisée pour le sérodiagnostic de la fièvre Q, de la fièvre pourprée méditerranéenne, la détection des IgG, IgA et IgM. Anticorps contre la Chlamydia, la toxoplasmose, le typhus épidémique, etc.

III. Marquage et modification des protéines

Les technologies de marquage et de modification des protéines incluent l'ajout de fluorophores, de biotine ou d'autres petites molécules pour observer les interactions entre protéines et le repliement des protéines, et étudier leur structure et leur fonction biologique générales.

1. Marquage par fluorescence

l'incorporation de marqueurs fluorescents (la protéine fluorescente verte GFP) sur des anticorps permet la détection et la quantification de complexes protéiques hautement spécifiques dans les tissus, ou l'immobilisation directionnelle des complexes anticorps/protéine pour des tests ELISA et des analyses par western blot. Toutefois,

l'utilisation de la GFP présente un inconvénient majeur : elle risque de perturber la fonction de la protéine par l'incorporation de marqueurs protéiques supplémentaires de même taille. Pour contourner cette difficulté, les chercheurs peuvent utiliser des marqueurs fluorescents de plus petite taille que la GFP ou la biotine, ou incorporer des acides aminés non naturels qui contiennent une fonction bi-orthogonale.

2. Conjugaison protéine/enzyme

L'incorporation d'enzymes ou de sondes uniques est une autre méthode utilisée par les chercheurs pour marquer les protéines. Les enzymes couramment utilisées pour la conjugaison protéine/enzyme incluent la phosphatase alcaline et la peroxydase de raifort (HRP pour "Horseradish Peroxidase"). Les technologies de marquage des protéines par conjugaison à une enzyme présentent de nombreux avantages : le signal peut être amplifié, différents signaux de sortie sont possibles et de nombreux substrats sont disponibles pour chaque enzyme. Les principaux signaux de sortie sont la fluorescence, la chimiluminescence et la colorimétrie. La diversité de ces signaux de sortie les rend appropriés pour les applications de détection par immunohistochimie (IHC) et par immunofluorescence (IF) sur cellules et tissus.

3. la technologie de dégradation ciblée

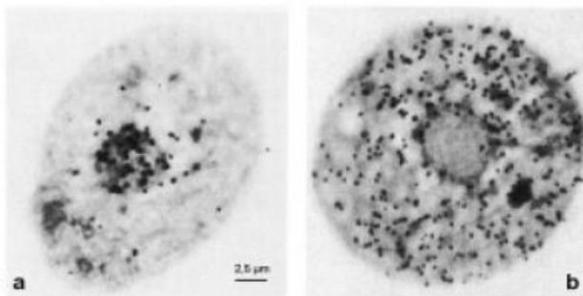
Dans les domaines de la recherche sur les maladies et de la recherche pharmaceutique, la technologie de dégradation ciblée des protéines fait actuellement l'objet d'études approfondies pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux candidats-médicaments. La technique des chimères ciblant la protéolyse utilise des molécules bifonctionnelles conçues pour se lier, d'un côté, à une protéine cible de la maladie, et de l'autre, à une ligase E3 afin d'éliminer la protéine de la cellule. La "multi-spécificité" de ces molécules pour de nombreuses cibles thérapeutiques et leur capacité à les cibler pour les dégrader en utilisant les mécanismes intracellulaires de dégradation des protéines en font une puissante technologie de marquage des protéines pour la recherche sur les maladies.

IV. Autoradiographie

Cette technique permet de suivre et de localiser des substances au sein d'un organisme. Elle repose sur l'utilisation de produits radioactifs qui possèdent 2 propriétés essentielles :

- ils sont utilisés par les êtres vivants exactement comme leurs isotopes non radioactifs.

- Ils émettent un rayonnement qui peut être repéré par l'utilisation d'une émulsion photographique. On fournit à l'organisme un composé radioactif (contenant le plus souvent du ^{14}C ou du ^3H = tritium) soit par injection directe ou par incubation de cellules : c'est le « pulse ». On réalise des coupes dans les tissus à étudier, ou on prélève les cellules en culture. On fixe le matériel et les composants radioactifs non incorporés sont éliminés par lavage. On recouvre le matériel d'une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'Ag). On maintient le tout plusieurs jours ou plusieurs semaines à l'obscurité. Pendant ce laps de temps, les rayonnements émis par les éléments radioactifs vont transformer l'AgBr en Ag métallique. C'est le « chase ». On développe le film pour faire apparaître en noir les zones impressionnées (présence des grains d'argent opaques). L'observation simultanée du matériel permet de localiser les molécules ayant incorporé l'élément radioactif (molécules marquées).



a. Autoradiographie après 15 min de culture sur milieu contenant de l'uracile radioactif. b. Autoradiographie après culture sur milieu radioactif pendant 15 minutes puis transfert sur un milieu de culture

non radioactif pendant une heure et demi.

L'ARN est formé dans le noyau (a) mais, contrairement à l'ADN, on le retrouve peu après dans le cytoplasme (b). On peut donc observer que l'ARN radioactif se déplace.

V. Le marquage des acides nucléiques

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, northern,). On distingue le marquage dit « chaud » utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages « froids » qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

1. Marquage radioactif « chaud »

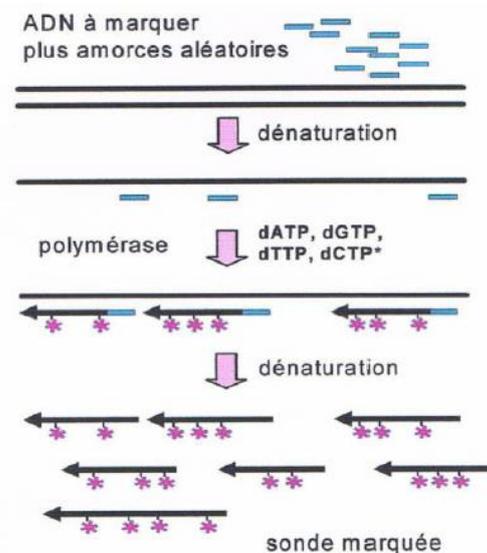
On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin). On dispose de plusieurs isotopes radioactifs qu'on pourra incorporer dans la sonde. On peut utiliser : ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H

Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation in situ. On peut aussi réaliser un marquage en 5' : avec la T4 polynucléotide kinase. La radioactivité est aussi utile pour le marquage des oligonucléotides de synthèse.

1.1. Le marquage des sondes double brins.

1.1.1. Marquage par amorçage au hasard (Random Printing)

Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit $4^6 = 4096$ nucléotides). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité

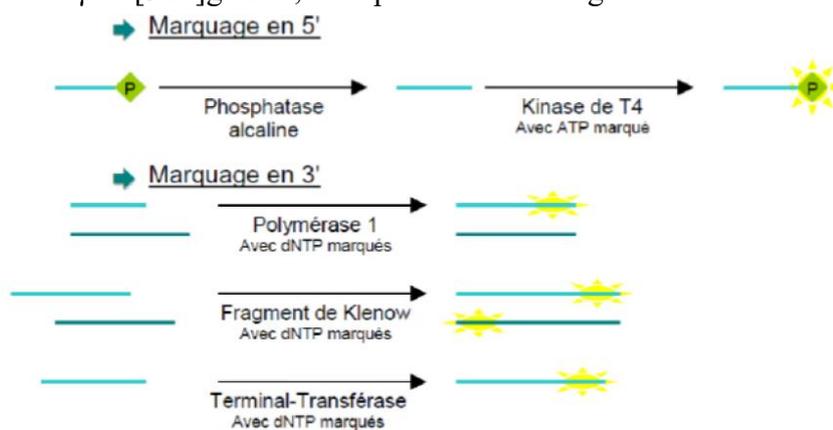


des deux fragments en présence de désoxynucléotides triphosphates marqués au ^{32}P . Des ADN polymérases par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

L'ADN à marquer est dénaturé, puis hybridé à in mélange d'héxa- ou de nonanucléotides synthétiques de séquence aléatoire. Ces oligonucléotides, présents à haute concentration, servent d'amorce à une réaction de polymérisation en présence du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et de désoxynucléotides triphosphate, dont l'un au moins est marqué.

1.1.2. Marquage en 3' ou en 5' :

Pour un marquage en 3' on peut utiliser : une ADN polymérase (fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse), une exonucléase, ou une terminal transférase. L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'E. coli infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP avec du ^{32}P en position γ ou $[\text{32P}]\text{g-ATP}$, il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radio-actif en position γ sur l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5'- sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.

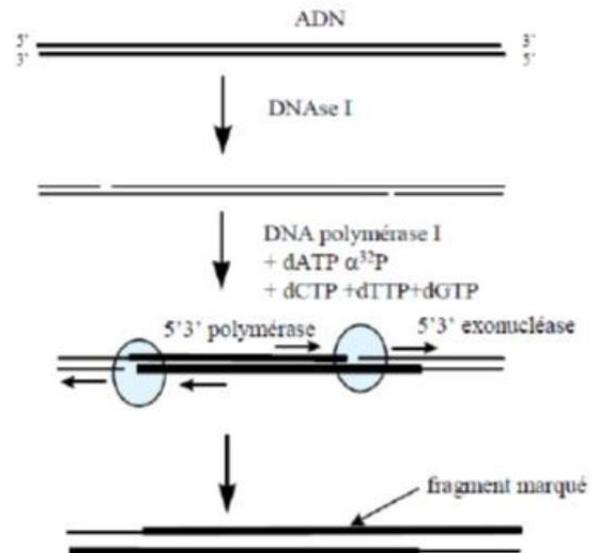


1.1.3. Marquage par translation de coupure (Nick Translation) :

Utilise 2 enzymes :

- DNase I dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simples brin dans le fragment d'intérêt. DNA pol. I pour dégrader l'ADN dans le sens 5'-3' au niveau de ces coupures et re-polymériser en présence d'un nucléotide chaud « nucléotide qui porte un marquage radioactif ».
- On digère le fragment d'ADN par la DNase I de E. coli qui coupe après les pyrimidines, mais d'une façon ménagée de façon à ne faire que quelques coupures au hasard sur le fragment. Ces coupures sur un seul des brins sont

appelées des nicks, elles libèrent des extrémités 5' OH à l'intérieur du fragment. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (^{32}P). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au ^{32}P . Cette technique est appelée "technique de nick translation". La difficulté de cette méthode est de réaliser la digestion ménagée pour initier la polymérisation. Si la digestion est trop forte, il y a trop de nick, certains se trouvent à proximité l'un de l'autre sur les deux brins et on obtient uniquement des petits morceaux d'ADN, si elle est trop faible, un grand nombre de molécules ne sont pas marquées. De plus l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I attaque le fragment d'ADN par l'extrémité et on obtient un raccourcissement du fragment. Cette méthode « historique » n'est plus utilisée et a été remplacée par le « Random priming »



1.2. Le marquage des sondes simples brin

- d'ADN : sondes à activité spécifique importante (Southern, Northern Blot) protection contre la nucléase S1, hybridation in situ. Avantage : ne se renature pas sur elle-même lors de l'hybridation.
- d'ARN (ribosondes). rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN, plus stables pour hybridation in situ.

2. Marquages froids (fluorescence ; colorimétrie ; chimioluminescence)

2.1. Marquage indirect

Les deux types de marquage froid les plus souvent utilisés sont les marquages à la biotine et à la digoxigénine. Ces deux composés sont fixés sur un nucléotide, lui-même incorporé à la sonde.

Ce marquage est appelé colorimétrique (Colorants : biotine, digoxigénine, fluoresceine) Exemple : l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP

(HorseRadish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie.

2.2.Marquage direct « Fluorophore »

Le nucléotide portant le marqueur est incorporé directement. Groupe chimique qui fluoresce quand il est exposé à une longueur d'onde donnée : Fluorescéïne, Cy5, Cy3, Rhodamine, Texas Red.