

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	5
PREMIÈRE PARTIE : GLUT-1 : un transporteur membranaire du glucose	6
I. La famille des protéines transporteurs de glucose	6
II. Les différentes classes de transporteurs GLUT.....	9
III. GLUT-1 : Relation structure/fonction	13
A. <i>Structure</i>	13
B. <i>Fonction du transporteur GLUT-1</i>	17
IV. Expression des transporteurs GLUT-1 chez la souris	22
A. <i>Répartition connue des récepteurs GLUT-1 dans les tissus de souris</i>	22
1. GLUT-1 dans les nerfs.....	22
2. GLUT-1 dans le cerveau.....	22
3. GLUT-1 dans le tractus gastro-intestinal de la souris	23
4. Autres localisations de GLUT-1	25
B. <i>Régulation de la fonction et de l'expression de GLUT-1</i>	26
DEUXIEME PARTIE : MARQUAGE ET ANALYSE DES COUPES HISTOLOGIQUES ..	27
I. Objectifs de l'expérience.....	27
II. Matériel et méthode.....	28
A. <i>Animaux utilisés</i>	28
B. <i>Préparation des échantillons en paraffine</i>	29
a) Fixation	29
b) Inclusion en paraffine	29
c) Réalisation des coupes.....	29
C. <i>Préparation des échantillons au cryostat</i>	30
a) Conservation des échantillons.....	30
b) Coupe et fixation.....	30
D. <i>Immunomarquage</i>	31
a) Matériel	31
b) Descriptif de l'anticorps utilisé pour l'étude	31

c) Protocole de marquage	32
III. Résultats des immunomarquages effectués en suivant les recommandations du fournisseur de l'anticorps primaire.....	35
A. Etudes des témoins	35
1. Sang humain.....	35
2. Sang de souris	37
3. Thymus humain.....	38
B. Etude multi-tissulaire sur souris.....	39
1. Prélèvements inclus en paraffine	39
a) Cervelet.....	39
b) Cœur	40
c) Cerveau	41
d) Œsophage	42
e) Estomac (zone malpighienne).....	43
f) Estomac (zone fundique)	44
g) Duodénum	45
h) Jéjunum.....	46
i) Gros intestin.....	47
j) Hypophyse	48
k) Foie	49
l) Glande lacrymale	50
m) Glande mammaire	51
n) Muscle.....	51
o) Nœud lymphatique.....	52
p) Œil.....	53
q) Ovaire.....	54
r) Pancréas.....	55
s) Parathyroïde	56
t) Poumon.....	57
u) Rate.....	58
v) Rein	59
w) Surrénale.....	61
x) Utérus	63

2. Prélèvements coupés au cryostat	64
a) Cervelet.....	64
b) Foie	66
c) Rein	67
d) Rate.....	68
e) Pancréas.....	69
f) Poumon.....	70
g) Surrénale.....	71
h) Ovaire.....	72
i) Peau du flanc	73
j) Peau interscapulaire	74
k) Glande mammaire	75
l) Glande mandibulaire	76
m) Cæcum	77
n) Iléon	78
o) Jéjunum.....	79
<i>C. Résultats obtenus par les deux techniques de marquage</i>	<i>80</i>
<i>D. Comparaison des deux techniques de préparation et discussion.....</i>	<i>85</i>
IV. Etude d'une sélection d'organes à partir d'un protocole affiné	87
1. Prélèvements inclus en paraffine	87
a) Cerveau	87
b) Œil.....	88
c) Glande surrénale.....	89
2. Coupe au cryostat	90
a) Cerveau	90
b) Œil.....	91
c) Glande surrénale.....	92
<i>B. Résumé des résultats obtenus avec l'étude restreinte</i>	<i>93</i>
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	102
LISTE DES FIGURES.....	103

LISTE DES TABLEAUX.....	106
Annexes	107

Liste des annexes :

Annexe 1 : Référence pour l'anticorps anti-GLUT1

Annexe 2 : Référence pour l'anticorps utilisé pour le contrôle isotypique de lapin

Annexe 3 : Cycles de coloration avec le module DISCOVERY XT

Annexe 4 : Correspondance entre les codes donnés par la nomenclature IUAPC (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée) et les acides aminés

INTRODUCTION

Dans le cadre d'un travail de recherche financé par l'Institut National du Cancer (INCa), effectué en collaboration avec un laboratoire du Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) de Montpellier et un laboratoire de l'Institut Curie de Paris, une étude préliminaire a été réalisée consistant à effectuer une cartographie immunohistochimique d'un transporteur membranaire du glucose (GLUT-1) chez la souris, avec un anticorps spécifique.

Dans un premier temps, les caractéristiques structurales et fonctionnelles de GLUT-1 ont été présentées. Nous avons ensuite décrit la répartition de GLUT-1 au sein des tissus à l'aide des données issues de la littérature.

Dans un second temps, le travail de thèse a consisté tout d'abord à vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé sur le modèle murin. Il s'agissait ensuite de cartographier les récepteurs GLUT-1 chez la souris en microscopie optique grâce à l'étude de coupes histologiques marquées par immunohistochimie. Deux séries de lames ont été préparées. Pour l'une les tissus ont été préparés en paraffine et pour la seconde les tissus ont été congelés pour une coupe au cryostat. Les résultats obtenus avec les deux techniques ont fait l'objet d'une comparaison et ont été mis en relation avec les données de la littérature.

PREMIÈRE PARTIE : GLUT-1 : un transporteur membranaire du glucose

I. La famille des protéines transporteurs de glucose

Le glucose fournit une importante source d'énergie pour les êtres vivants en permettant la synthèse de l'ATP lorsqu'il est glycolysé (figure 1). Le glucose est également un précurseur de la synthèse des glycoprotéines, des triglycérides et du glycogène^[28].

Le glucose est une molécule polaire, ce qui rend impossible sa diffusion à travers la membrane plasmique hydrophobe. Il existe un transporteur spécifique pour l'absorption de ce sucre^[28].

La découverte de transporteurs de glucose à travers des membranes cellulaires fut réalisée en 1960 à Prague par Robert K. Crane, qui décrivit pour la première fois dans l'histoire de la biologie un cotransporteur (en l'occurrence le transporteur Glucose/Sodium) qui effectue un transport spécialisé^{[17] [28]}.

La diffusion facilitée (également appelée transport facilité) correspond au passage spontané de molécules ou d'ions à travers une membrane biologique à l'aide de molécules de transport selon le gradient de concentration. Ce processus ne consomme pas d'énergie et ne relève donc pas du type du transport actif. Les molécules polaires sont transportées à l'aide de protéines qui forment des canaux transmembranaires à travers la membrane. Ces canaux peuvent s'ouvrir et se refermer afin de réguler le flux d'ions et de petites molécules polaires. Pour les molécules de taille plus importante, le transport à travers la membrane est permis par des perméases qui peuvent changer de conformation^{[17] [28]}.

Plus généralement on sait maintenant que la diffusion facilitée des monosaccharides, passive, à travers les membranes cellulaires est en grande partie médiée par des protéines spécialisées : la famille des transporteurs GLUT (ou famille SLC2A).

La famille des transporteurs glucose sodium-dépendant (SGLT) permet le transport de glucose contre-gradient. Il s'agit pour cette famille d'un co-transport actif qui nécessite un apport d'énergie^{[17] [28]}.

Actuellement 13 isoformes GLUT/SLC ont été identifiées chez la souris (14 chez l'homme) et sont divisées en trois groupes sur la base des similarités de séquences d'acides aminés^[17] :

La classe I comprend : GLUT- 1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4.

La classe II est composée de : GLUT-5 (un transporteur du fructose), GLUT-7 (qui permet le transport du glucose hors du réticulum), GLUT-9, GLUT-11.

La classe III comprend : GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-12, et le transporteur H⁺/myoinositol HMIT (*SLC2A13*).

Il existe par ailleurs six isoformes de la famille des transporteurs de glucose sodium-dépendant (SLGT 1 à SLGT 6). La famille SGLT est exprimée de manière prédominante dans les cellules épithéliales polarisées de la muqueuse de l'intestin grêle et dans les tubules proximaux du rein ^{[28] [42]}.

Contrairement à la spécificité tissulaire très restreinte des transporteurs de glucose Na⁺-dépendant, toutes les cellules de mammifère contiennent un ou plusieurs membres de la famille des transporteurs passifs de glucose. Ces transporteurs de glucose sont caractérisés par un degré élevé de stéréosélectivité, prévoyant le transport bidirectionnel de glucose, avec une diffusion passive uniquement selon son gradient de concentration ^[28]. Ces transporteurs passifs du glucose fonctionnent de manière à réguler le mouvement du glucose entre les espaces extracellulaires et intracellulaires à l'intérieur du corps, assurant ainsi un apport relativement constant du glucose nécessaire au métabolisme ^[28].

Les transporteurs de glucose de type GLUT sont des protéines membranaires retrouvées chez tous les mammifères. Les protéines GLUT contiennent 12 sous-unités hélicoïdales dont les extrémités C et N-terminales sont toutes deux dans le cytoplasme ^{[28] [43]}.

Les transporteurs GLUT participent au transport du glucose essentiellement mais aussi à celui d'autres hexoses en fonction de leur conformation. Chaque isoforme de transporteur de glucose joue un rôle spécifique dans le métabolisme du glucose. Les isoformes diffèrent entre elles par leur expression dans les tissus et leur spécificité de substrat, la cinétique de transport du glucose et les mécanismes de régulation de leur expression ^[28].

Chez certaines espèces, quelques types cellulaires, comme les hépatocytes ou parfois les cellules musculaires, intestinales et rénales, peuvent synthétiser elles-mêmes du glucose par la néoglucogenèse. Il peut être stocké sous forme de glycogène qui pourra en cas de besoin métabolique être clivé et donner du glucose ^[28].

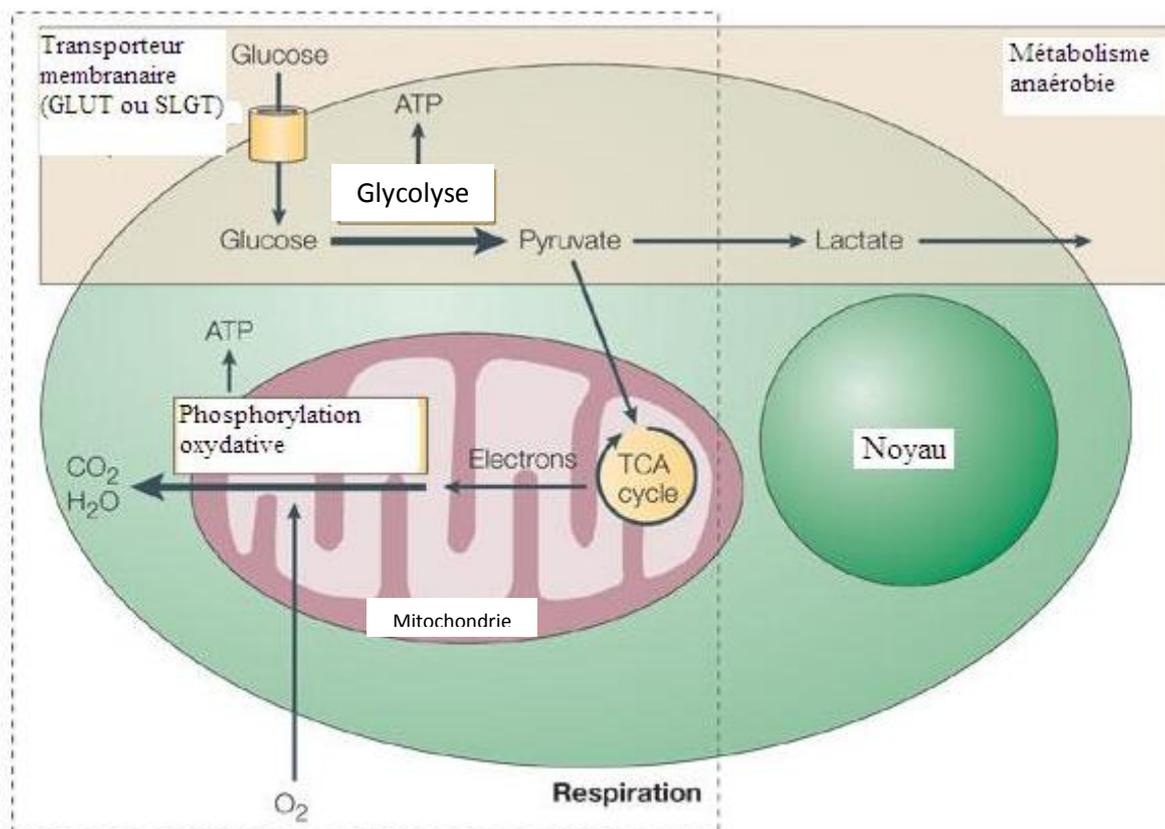
Le métabolisme du glucose peut s'effectuer selon deux voies : une voie anaérobie et une voie oxydative ou aérobie (figure 1). Le métabolisme anaérobie est un processus cytosolique qui se produit principalement dans les tissus qui ont besoin de générer rapidement de l'énergie, tels que les muscles. Lors de ce processus, connu sous le nom de glycolyse, le glucose se décompose notamment en dihydroxyacétone et glycéraldéhyde, pour générer de l'ATP et du pyruvate. Le métabolisme anaérobie peut répondre à des demandes brusques en énergie, mais est peu efficace et le rendement thermodynamique (en ce qui concerne la production d'ATP) lors de la dégradation du glucose est faible. Les rendements de la glycolyse sont de deux équivalents ATP par molécule de glucose, alors que la voie mitochondriale permet d'en former 38. Cependant, l'accumulation de pyruvate peut être

canalisée dans le cycle de Krebs oxydatif et servir plus tard à reconstituer de l'ATP ou encore générer des acides aminés et d'autres éléments de construction cellulaire.

Le métabolisme aérobie ou oxydatif utilise le cycle de Krebs au sein des mitochondries ainsi que le cycle des pentoses. Cette organisation rend possible la formation d'une importante quantité d'énergie utilisable par la cellule sous la forme d'ATP et de NADH par molécule de glucose entrée dans le système ^[31]. La figure 1 présente de manière schématique quelques rôles du glucose dans le métabolisme énergétique de la cellule avec notamment la production d'ATP à l'aide de la glycolyse et du cycle de Krebs. Les voies métaboliques dans lesquelles sont impliqués le glucose et ses dérivés ne seront pas détaillées dans ce document.

Figure 1 : Schéma simplifié de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative ^[36].

TCA désigne le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs

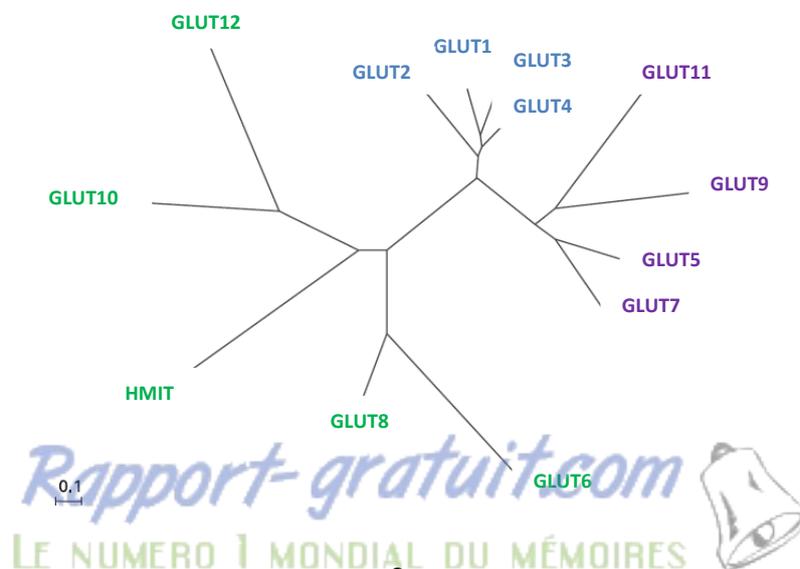


II. Les différentes classes de transporteurs GLUT

Les transporteurs GLUT utilisent les gradients de concentration de glucose et d'autres sucres pour le transport d'hexoses entre les milieux extra et intracellulaire. Ces transporteurs sont situés sur la membrane plasmique. Ils présentent des spécificités de substrat propres à chacun, des cinétiques différentes et des profils d'expression dépendant du tissu. Le premier transporteur à être isolé a été GLUT-1^[25]. Une identification d'autres membres de la famille GLUT s'en est suivie sur une période de 5 ans et a permis de découvrir trois autres transporteurs de glucose (GLUT-2 à GLUT-4) ainsi qu'un transporteur de fructose (GLUT-5)^[40].

La constitution de banques d'ADNc associée au quasi-achèvement du séquençage du génome humain, a conduit à l'identification des huit autres membres de la famille GLUT^[17]. La découverte de ces nouveaux gènes a en grande partie été réalisée par des organismes indépendants. La nomenclature alors utilisée pour nommer les transporteurs de cette famille s'est rapidement complexifiée, provoquant initialement une certaine confusion. Un consensus a été atteint depuis^[16] et les treize membres ont été nommés GLUT-1 à 12 et HMIT (H⁺/myo-inositol transporter). Il est admis que tous les membres de la famille ont maintenant été identifiés^[17]. Les comparaisons de séquences de tous les membres a permis de révéler la présence de « signatures » de transporteur de glucose avec notamment de nombreux résidus glycines et tryptophanes, considérés comme étant essentiels pour la fonction de transport^[17]. La famille GLUT est composée de trois sous-classes (I-III). La famille élargie des transporteurs de glucose peut être représentée sur un dendrogramme (figure 2) à partir de l'analyse des séquences d'acides aminés qui les composent. On retrouve les trois classes de protéines GLUT représentées par le code de couleurs suivant : bleu, classe I ; rouge, classe II ; vert, la classe III. La barre d'échelle représente 0,1 substitution d'acides aminés par position.

Figure 2 : Dendrogramme des transporteurs de glucose de la famille GLUT^[40]



La **classe I** contient les protéines GLUT-1 à GLUT-4. Celles-ci ont été caractérisées en termes de structure, fonction et de distribution dans les tissus ^[40].

GLUT-1 est exprimé en particulier dans le cerveau (y compris dans la barrière hémato-encéphalique) et dans les érythrocytes. Chez l'homme, les transporteurs GLUT-1 sont présents dans la majeure partie des tissus fœtaux ^{[24] [44]}. Puis chez l'adulte on les retrouve avec une forte expression dans les érythrocytes et dans les tissus de barrière ^{[13] [29]}, comme les cellules endothéliales bordant la barrière hémato-encéphalique. Dans les érythrocytes humains, un taux constant de glucose autour de 5 mM est maintenu permettant la réalisation de leur métabolisme très consommateur d'énergie. Les protéines GLUT-1 représentent 10% de la masse des protéines d'un érythrocyte humain ^{[24] [27]}. Des niveaux modérés d'expression sont également observés dans le tissu adipeux, le muscle et le foie. Le niveau d'expression de GLUT-1 est augmenté lors de bas niveau de glucose circulant et diminué si le niveau de glucose circulant est élevé (rétroaction ou feedback négatif) ^[40].

GLUT-2 est exprimé principalement dans les cellules bêta du tissu pancréatique, dans le foie et les reins. Dans les cellules bêta, GLUT-2 est supposé jouer un rôle dans le mécanisme de détection du glucose, tandis que dans le foie, GLUT-2 est exprimé sur la membrane des hépatocytes et permet le transport bidirectionnel du glucose. GLUT-2 se trouve également à la surface basolatérale des tubules rénaux proximaux et dans les entérocytes, où il fait partie de la voie de diffusion transcellulaire du glucose et du fructose ^[40].

GLUT-3 a une forte affinité pour le glucose et on le trouve préférentiellement dans les tissus ayant une grosse demande en glucose, en particulier le cerveau ^[31].

Le transporteur de glucose insulino-sensible, GLUT-4, se trouve dans le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux, où il permet notamment de réduire l'élévation postprandiale du niveau de glucose plasmatique ^[30]. L'insuline agit en stimulant la translocation de vésicules intracellulaires spécifiques contenant GLUT-4 à la membrane plasmique, ce qui permet une hausse immédiate de 10 à 20 fois du transport de glucose à travers la membrane ^{[5] [35]}. Des modèles de souris *knock-out* pour GLUT-4 (de manière localisée ou globalement) ont montré lors de certaines études des liens avec la physiopathologie du diabète de type II ^{[1] [19] [31] [46]}.

Seulement 38% de tous les acides aminés sont conservés entre GLUT-1 et GLUT-4. En général, le plus grand degré d'identité de séquence d'acides aminés se situe dans les domaines transmembranaires et l'écart le plus grand dans le domaine hydrophile et les extrémités N- et C-terminales ^[40].

Dans les transporteurs de **classe II**, on trouve en premier lieu le transporteur de fructose GLUT-5, et également GLUT-7, GLUT-9 (ainsi que GLUT-11) ^[40].

GLUT-5 est exprimé principalement dans l'intestin grêle, les testicules et les reins.

GLUT-7 est le moins connu de la famille. Le gène permettant son expression n'est pas caractérisé mais son existence repose sur une forte homologie de séquence et il est situé sur le chromosome 1. Les sites d'expression de GLUT-7 restent peu connus^[17]. L'expression de GLUT-9 est importante dans le foie et les reins. Deux variants d'épissage ont été décrits pour GLUT-11, avec un épissage variable de l'exon 2, qui se traduit par des formes longues et des formes plus courtes de la protéine (respectivement 503 et 493 résidus d'acides aminés)^[10]^[33]. Les deux variants d'épissage sont exprimés de manière spécifique dans les tissus. Une faible affinité pour le transport du glucose est démontrée pour la forme courte de GLUT-11, avec une concurrence du glucose par le fructose, le transporteur étant exprimé principalement dans le cœur et le muscle squelettique^[33]. La forme longue de GLUT-11, qui n'est pas exprimée dans le cœur ni dans le muscle squelettique, est par ailleurs détectée dans le foie, les poumons, la trachée et le cerveau. Il a été démontré qu'elle permettait l'augmentation du transport du fructose lorsqu'elle est exprimée dans des cellules ovariennes de hamster chinois^[41]. Il est donc probable que le fructose soit le principal substrat transporté à l'aide de GLUT-11^[31].

La **classe III** de transporteur GLUT est composée de cinq membres : GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-12 et HMIT.

Les protéines de cette classe possèdent un site caractéristique de glycosylation sur la boucle 9. Ce site de glycosylation, dont l'importance fonctionnelle a été démontrée pour GLUT-1^[18], se trouve sur la boucle 1 dans les deux autres classes. La localisation intracellulaire de GLUT-6 et GLUT-8 est due à des motifs de di-leucine présents dans leur extrémité N-terminale et dans les deux cas, un traitement à base d'insuline a montré qu'il n'induisait pas la translocation de ces protéines à la surface de la cellule^[15]. GLUT-6 est exprimé dans la rate, les leucocytes et le cerveau^[21], tandis que GLUT-8 est présent dans le testicule, le cerveau, le tissu adipeux^[9]^[21].

GLUT-10 ne contient pas de motif di-leucine (mais il contient une variante C-terminale de ce motif). Son expression est rapportée dans les tissus musculo-squelettique et cardiaque insulino-sensibles, et son association avec un gène de prédisposition au diabète de type II sur le chromosome 20 en fait une cible d'étude particulièrement intéressante^[8]^[23]. GLUT-10 a également été signalé comme étant exprimé dans le foie et le pancréas^[23]^[8]. Des analyses fonctionnelles montrant le transport de glucose ont été réalisées pour GLUT-6, GLUT-8 et GLUT-10^[8]^[9]^[21]. Par ailleurs, il a été montré que HMIT est un transporteur H⁺ / myo-inositol couplé, exprimé de manière prédominante dans le cerveau^[39]^[40].

Il existe donc différents substrats pour les transporteurs de la famille GLUT^[38]. Cela soulève notamment la question de l'identité du substrat primaire pour le transporteur GLUT-12 qui est encore peu caractérisé et qui est exprimé dans le cœur, l'intestin grêle, la prostate et qui est sensible à l'insuline^[32].

Le tableau 1 récapitule l'ensemble de ces patrons d'expression.

Tableau 1 : La famille des transporteurs GLUT chez l'homme ^[31]

a) Lorsque deux substrats peuvent être transportés, celui qui possède l'affinité la plus élevée est indiqué en premier.

b) La liste des Km (constante de Michaelis) a été établie à l'aide d'ovocytes modifiés qui exprimaient le transporteur considéré à sa surface et a été mesurée pour la recapture du D-glucose.

GLUT	Classe	Nom du gène	Substrat^a	Expression	Km^b
GLUT1	1	<i>SLC2A1</i>	Glucose	Erythrocytes, cellules endothéliales de barrière, cerveau, gros intestin, estomac, muscle lisse	5mM
GLUT2	1	<i>SLC2A2</i>	Glucose Fructose	Foie, îlots pancréatiques	11mM
GLUT3	1	<i>SLC2A3</i>	Glucose	Cerveau, neurones	1mM
GLUT4	1	<i>SLC2A4</i>	Glucose	Muscles cardiaque et squelettique, adipocytes	5mM
GLUT5	2	<i>SLC2A5</i>	Fructose	Intestin, testicules, rein	6mM
GLUT7	2	<i>SLC2A7</i>	ND	Intestin	0.3mM
GLUT9	2	<i>SLC2A9</i>	Urate Glucose	Foie, rein	0.3mM
GLUT11	2	<i>SLC2A11</i>	Glucose Fructose	Muscles cardiaque et squelettique	0.2mM
GLUT6	3	<i>SLC2A6</i>	Glucose	Rate, leucocytes, cerveau	Km élevé
GLUT8	3	<i>SLC2A8</i>	Glucose Fructose	Testicules, blastocytes, cerveau	2.4mM
GLUT10	3	<i>SLC2A10</i>	Glucose	Foie, pancréas	0.3mM
GLUT12	3	<i>SLC2A12</i>	Glucose	Placenta, tissu mammaire, testicules	4-5mM
HMIT	3	<i>SLC2A13</i>	Myo-Inositol, H ⁺	Cerveau	0.1mM

III. GLUT-1 : Relation structure/fonction

A. Structure

GLUT-1 fut le premier transporteur de glucose à être identifié. Son poids moléculaire chez l'humain est de 53,935 kDa et son point isoélectrique est de 9,04. La protéine est composée de 493 acides aminés. Le symbole du gène codant pour *GLUT-1* dans la nomenclature international est *SLC2A1* pour l'homme et *Slc2a1* pour la souris ^[31].

Les protéines peuvent être analysées en fonction de leur structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire ^[31].

La séquence primaire de la protéine GLUT-1 chez l'homme et la souris est présentée sur le tableau 2.

Tableau 2 : Séquence des acides aminés constituant la protéine GLUT-1 chez l'homme (Homo sapiens) ^[50] et chez la souris (Mus musculus) ^[51]

La séquence est donnée de l'extrémité N-terminale (1^{er} acide aminé) vers l'extrémité C-terminale (492^{ème} acide aminé). La correspondance entre les lettres de la séquence et les acides aminés est rappelée par l'annexe 4. Les acides aminés qui diffèrent entre les séquences humaine et murine sont présentés en rouge.

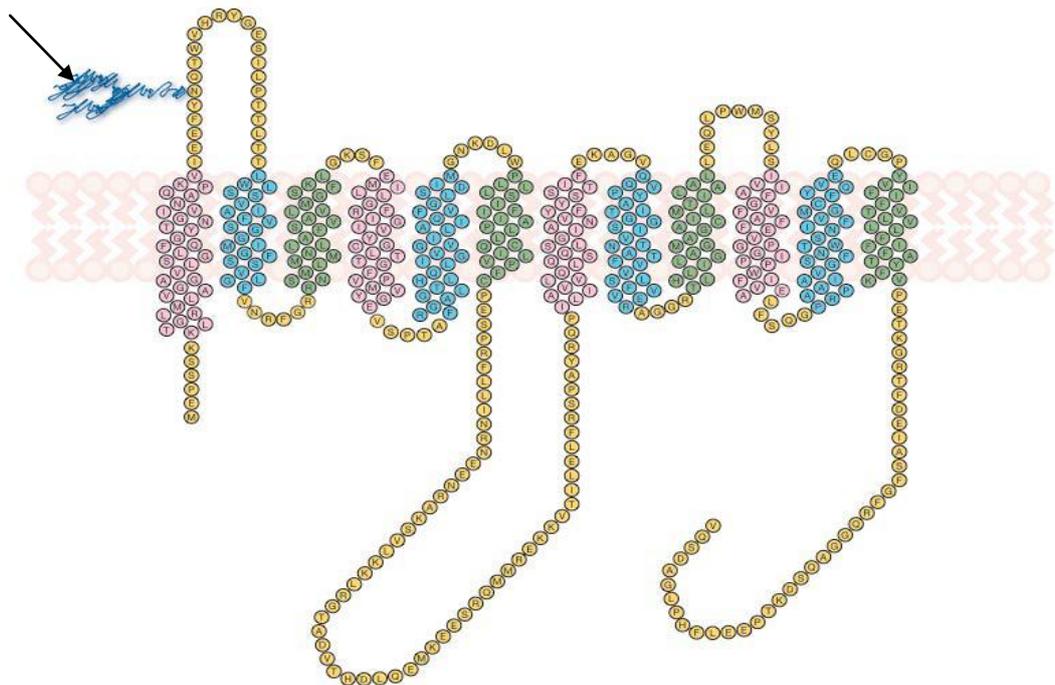
Numéro de l'acide aminé à partir de l'extrémité N-terminale	Séquence d'acides aminés
<u>Homme</u>	
1	mepssskltg rlmlavggav lgslqfgynt gvinapqkvi eefynqtwvh rygesilptt
61	lttlwslsva ifsvggmigs fsvglfvnrf grrnsmlmmn llafvsavlm gfsklgksfe
121	mlilgrfiig vycglttgfv pmyvgevstpr alrgalgtlh qlgivvgili aqvfgldsim
181	gnkdlwplll siifipallq civlpfcpe prfllinrne enraksvlkk lrgtadvthd
241	lqemkeesrq mmrekkvtil elfrspayrq piliavvlql sqqlsginav fyystsifek
301	agvqqpvvat igsgivntaf tvvslfvver agrrtlhlig lagmagcail mtialalleq
361	lpwmsylsiv aifgfvaaffe vggppipwfi vaelfsqgpr paaiavagfs nwtsnfivgm
421	cfqyveqlcg pyvfiiiftvl lvlffiftyf kvpetkgrtf deiasgfrqg gasqsdktpe
481	elfhplgads qv
<u>Souris</u>	
1	m d p sssk v tg rlmlavggav lgslqfgynt gvinapqkvi eefynqtw nh ryge pi p s t t
61	lttlwslsva ifsvggmigs fsvglfvnrf grrnsmlmmn llafv a avlm gfsklgksfe
121	mlilgrfiig vycglttgfv pmyvgevstpr alrgalgtlh qlgivvgili aqvfgldsim
181	gn a dlwplll sv ifipallq ci llpfcpe prfllinrne enraksvlkk lrgtadv t r d
241	lqemke e grq mmrekkvtil elfrspayrq piliavvlql sqqlsginav fyystsifek
301	agvqqpvvat igsgivntaf tvvslfvver agrrtlhlig lagmagc v l mtialalle r
361	lpwmsylsiv aifgfvaaffe vggppipwfi vaelfsqgpr paaiavagfs nwtsnfivgm
421	cfqyveqlcg pyvfiiiftvl lvlffiftyf kvpetkgrtf deiasgfrqg gasqsdktpe
481	elfhplgads qv

La séquence d'acides aminés de la protéine GLUT-1 de la souris diffère de 14 acides aminés de celle de l'homme ^{[50] [51]}. Les deux séquences sont identiques sur les 131 derniers aminés.

Des analyses à partir de la séquence d'acides aminés issue de l'ADNc de GLUT-1 ont permis de décrire cette protéine comme composée de 12 hélices transmembranaires avec deux extrémités N-terminale et C-terminale orientées vers l'intérieur de la cellule (figure 3). En outre, une seule N-glycosylation extracellulaire est présente, située entre les hélices 1 et 2. On peut noter la présence d'une grande boucle intracellulaire située entre les hélices transmembranaires 6 et 7 ^{[31] [45]}. Les informations sur la structure tertiaire de GLUT-1 sont limitées, dans la mesure où l'hydrophobicité d'une majeure partie de la protéine ainsi que la relative liberté de conformation des boucles intracytoplasmiques rendent la protéine difficile à cristalliser ^[45].

Figure 3 : La structure secondaire de la protéine GLUT-1 humaine ^[31]

Motif de N-glycosylation



Des études utilisant des digestions enzymatiques par des protéases ont confirmé l'orientation cytoplasmique de l'extrémité carboxy-terminale et la présence d'une boucle hydrophile s'étendant entre les domaines membranaires 6 et 7. Plus récemment, la présence de 12 domaines transmembranaires a été confirmée par mutagenèse dirigée ^{[40] [31]}.

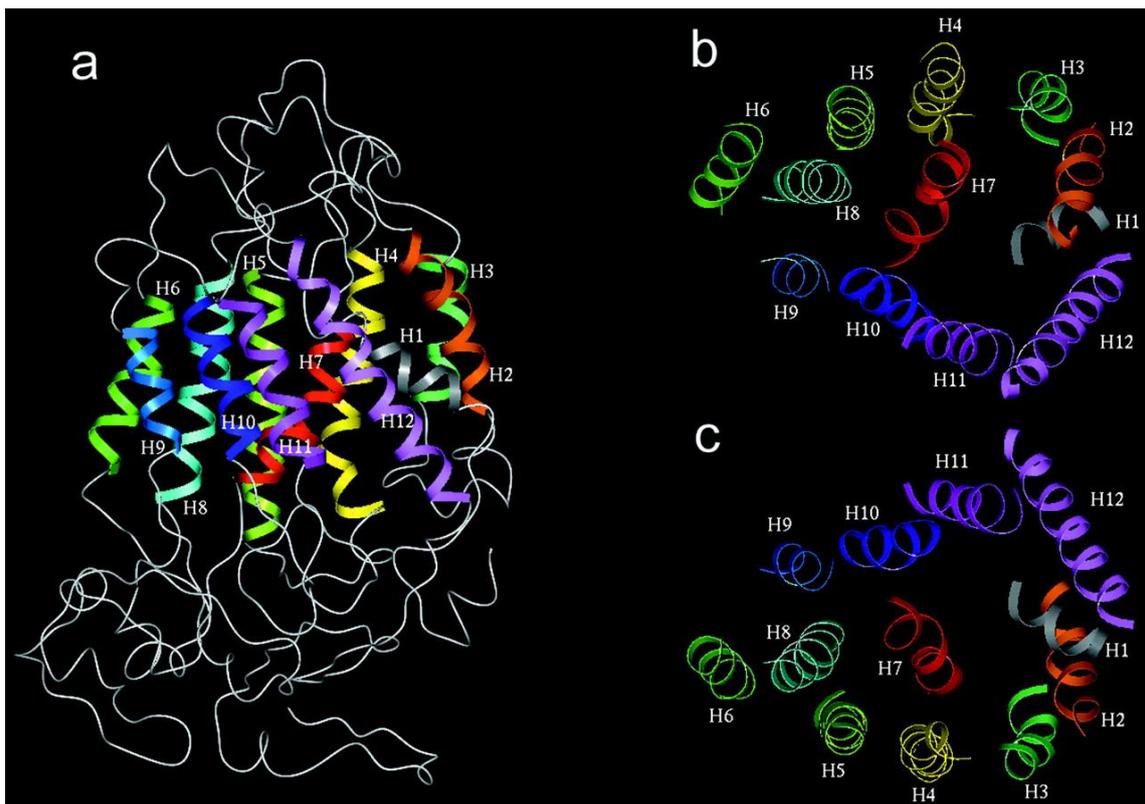
L'expression de GLUT-1 dans des ovocytes de Xenope a confirmé l'orientation de chaque région cytoplasmique hydrophile de la protéine ^[31].

Six des 12 hélices alpha transmembranaires de GLUT-1 forment un canal transmembranaire permettant au glucose de se lier par des liaisons hydrogènes et de se déplacer à l'intérieur de ce canal (figure 4 et 5). Chaque hélice alpha est formée de 20 acides aminés et a un caractère amphiphatique (une extrémité est hydrophile, l'autre hydrophobe) ^[31] ^[45].

Dans le cerveau humain, on trouve deux sous-types de protéines GLUT-1. Les GLUT-1 de 45 kDa sont présents dans les astrocytes autour des neurones ^[3]. Les GLUT-1 de 55 kDa sont quant à eux présents dans les capillaires et sont responsables du transport du glucose à travers la barrière hémato-encéphalique. Sa déficience peut entraîner une baisse du glucose dans le liquide cébrospinal (moins de 60 mg/dL) et être à l'origine de convulsions ^[2] ^[15].

Figure 4 : Représentation tridimensionnelle de GLUT-1 chez l'homme ^[47]

- a) En vue de côté, les hélices sont colorées, et les boucles sont blanches. L'inclinaison des 12 hélices transmembranaires, leurs positions relatives, et la conformation générale sont apparent.
- b) vue depuis la face extracellulaire.
- c) vue depuis la face cytoplasmique.

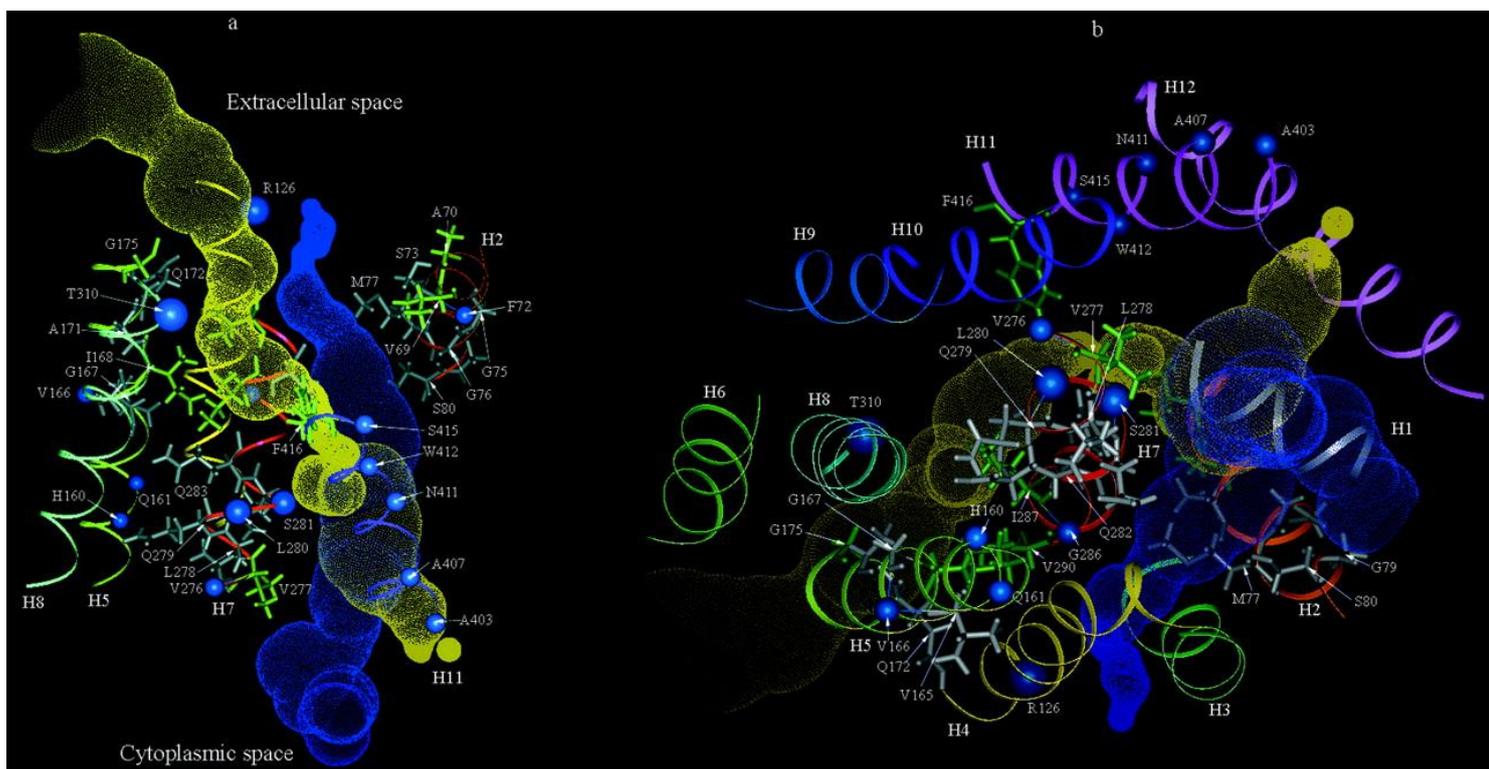


Des travaux de recherche ^[31] ont permis de mieux caractériser la conformation tridimensionnelle du canal permettant le transport du glucose (figure 5).

Figure 5 : Représentation tridimensionnelle de GLUT-1 chez l'homme avec matérialisation des canaux au sein desquels passent les substrats ^[47].

Sur cette figure on peut observer une représentation de l'espace situé au sein du canal principal (en jaune plein) et le canal auxiliaire (en bleu). Les hélices sont colorées et les boucles sont de couleur blanche, comme dans la figure 4.

- a) vue de côté, montrant les hélices 2, 4, 5, 7, 8, et 11. Toutes les autres boucles et les hélices sont omises pour la clarté de la figure.
- b) vue depuis la face cytoplasmique ; boucles omises. Les grandes boules bleues représentent les sites de mutations pathogènes ; les petites boules bleues représentent les sites indispensables au transport du glucose



GLUT-1 est aussi utilisé comme transporteur pour la vitamine C (acide L-déhydroascorbique) chez les mammifères qui ne sont pas capable de la synthétiser eux-mêmes ^[2].

Chez les mammifères qui sont capables de synthétiser cette vitamine, GLUT-4 est le plus souvent exprimé à la place de GLUT-1 dans les tissus ^[2].

B. Fonction du transporteur GLUT-1

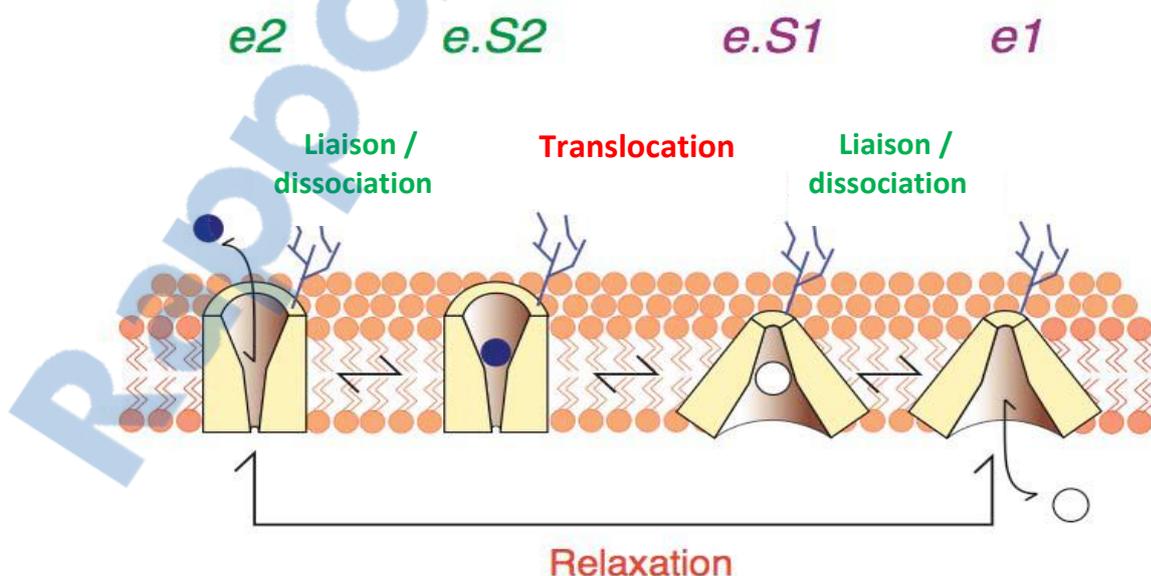
Les analyses cinétiques du transport du glucose ont suggéré que les transporteurs GLUT fonctionnaient par alternance de changements de conformation, exposant de manière alternative les sites de liaison aux hexoses sur les surfaces externe et interne du transporteur. Ainsi, GLUT-1 possède à la fois des sites extracellulaires et intracellulaires de liaison aux hexoses.

Modèle de transport « single carrier » ou transporteur simple

Dans le modèle du transporteur simple porteur, un monomère de la protéine peut prendre la forme de deux isomères de conformation au sein de la membrane « e1 » et « e2 » (figure 6). La conformation e2 permet la fixation du sucre sur la surface extracellulaire de la membrane plasmique. L'importation du glucose se produit lorsqu'un sucre se lie à e2. La conformation peut alors changer. La protéine passe ensuite par deux états transitoires « e.S2 » et « e.S1 » au cours de la translocation du substrat à travers le canal formé par la protéine au sein de la membrane. Le sucre est finalement libéré dans l'état « e1 » à l'intérieur du cytosol. « e2 » est également appelé site d'entrée et « e1 » site de sortie ^[31].

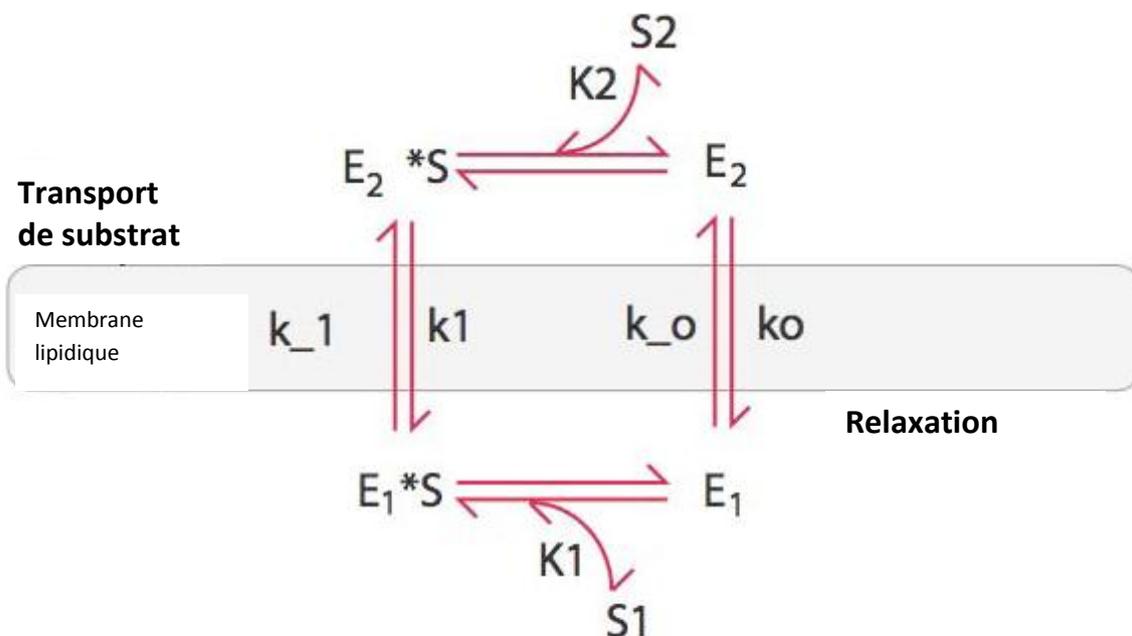
Des changements de conformation « translocation-like » entre e1 et e2 peuvent se produire avec ou sans sucre présent, mais à un moment donné une protéine ne peut afficher qu'un seul site de liaison du sucre, soit e1 soit e2 ^[31].

Figure 6 : Le modèle de transporteur simple ^[31]



Le modèle de King-Altman (figure 7) permet de chiffrer plus précisément le transport de glucose par GLUT-1 ainsi de les changements de conformation de la protéine.

Figure 7 : Le diagramme de King-Altman (diagramme du modèle de transporteur simple) ^[31]
 Ce modèle contient tous les états répertoriés du modèle de transporteur simple. k_1 et k_{-1} sont des constantes de réaction entre deux états permettant d'évaluer le taux de translocation de l'enzyme avec le substrat chargé. Les constantes de réaction à vide sont exprimées par k_o et k_{-o} . La constante d'affinité pour la liaison du substrat à E1 est K_1 , et la constante d'affinité correspondant pour E2 est K_2 . A partir de ces expressions, des modèles mathématiques peuvent être utilisés pour exprimer le taux global de flux de sucre dans n'importe quelle direction ^[31].

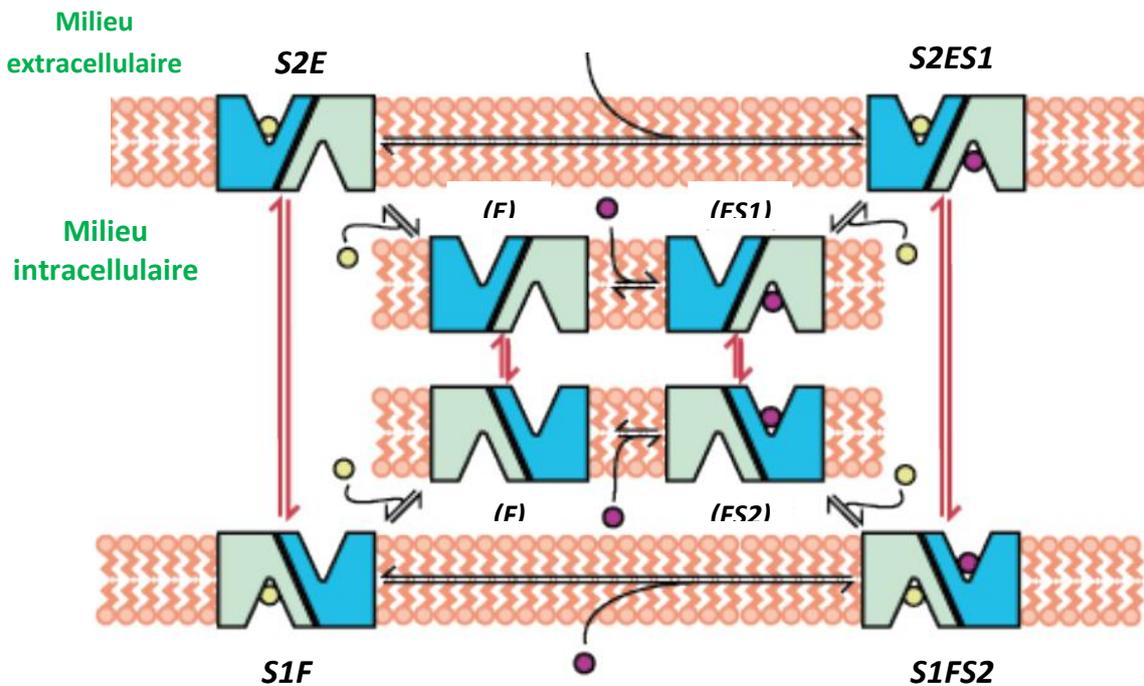


Modèle de transport alternatif

Certains auteurs ont constaté que la présence de concentrations croissantes d'un inhibiteur du site e2, par exemple le maltose, augmente le K_i (constante d'affinité pour l'inhibiteur) pour un inhibiteur du site e1, ce qui est tout à fait incompatible avec l'inhibition compétitive prédite par le modèle simple transporteur ^[7]. La situation inverse est également vraie, l'augmentation de la concentration d'un inhibiteur de e1, tel que la cytochalasine B, augmente le K_i pour le maltose de manière hyperbolique. Le modèle de transporteur simple prévoit qu'un inhibiteur au site de liaison cytoplasmique e2 devrait permettre de réduire le nombre de sites extracellulaires disponibles pour l'inhibiteur du site e1, et vice-versa. Cependant, le modèle de transporteur simple ne peut pas rendre compte de la commutation

allostérique entre les conformations e1 et e2. Des modèles plus complexes comme celui présenté en figure 8 ont donc été décrits ^[31].

Figure 8 : Représentation graphique de la translocation du substrat et des changements de conformation au sein d'un modèle de transport alternatif pour GLUT-1 ^[31]



Il y a quatre conformations possibles permettant la translocation de substrat. Dans les conformations S1F et S2E, il n'y a qu'un substrat fixé sur les deux sites de liaison disponibles. Dans le cas S2E, le substrat est fixé sur la face extracellulaire de la membrane plasmique. Dans le cas S1F, le substrat est sur la face cytosolique de la membrane.

En ce qui concerne les deux conformations restantes, deux substrats se déplacent simultanément dans des directions opposées avec S2ES1 qui représente le dimère avec sa sous-unité gauche vers l'extérieur de la cellule, tandis que S1FS2 représente son équivalent fonctionnel après que les deux monomères ont changé d'orientation ^[31].

Cinétique enzymatique du transporteur GLUT-1 (principe)

Le transport de glucose à travers la membrane des érythrocytes humains a été évalué à 50 000 fois la perméabilité naturelle des membranes pour cet hexose ^[28].

On peut distinguer ces différents sites de liaison en utilisant par exemple la cytochalasine B qui est un inhibiteur de haute affinité du transport du glucose. La cytochalasine B se lie à un domaine endocellulaire de GLUT. Le modèle de transport bidirectionnel du glucose par les transporteurs GLUT est corroboré par la capacité de la cytochalasine B à inhiber de manière

compétitive la sortie du glucose de la cellule et à être un inhibiteur non compétitif de l'entrée de glucose depuis le milieu extracellulaire. Par ailleurs, la suppression du domaine carboxy-terminal des transporteurs GLUT verrouille la conformation du transporteur dans la position permettant l'entrée de glucose^{[31] [45]}.

GLUT-1 est une protéine possédant une activité de diffusion facilitée dont la cinétique est de type Michaelis-Menten, pouvant être décrite par l'équation^[48] :

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

où V est la cinétique initiale de la réaction en fonction du substrat, Vmax la cinétique maximale pouvant être obtenue avec une saturation de substrat, [S] la concentration en substrat, et Km la constante de Michaelis. Km correspond à la quantité de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la cinétique maximale de la réaction.

Rappelons également l'équation décrivant la diffusion^[48] $E + S \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} E + P$

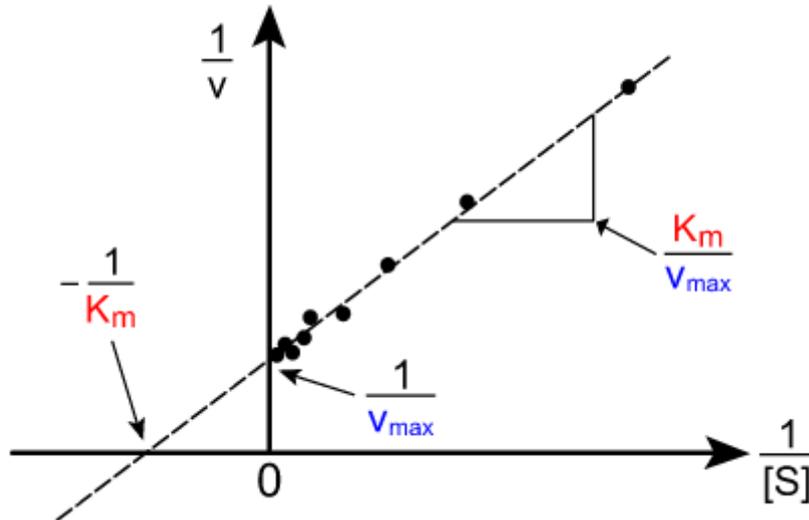
où E désigne le transporteur (GLUT-1 dans le cas présent), S l'ose entrant (le glucose extracellulaire) et P l'ose entré (le glucose ayant traversé la membrane et devenu intracellulaire) et ES le couple transporteur-ose. k1, k2, k3, k4 sont les constantes de vitesse des réactions.

Afin de déterminer les caractéristiques de la réaction (Km et Vmax) il est nécessaire de recourir à la linéarisation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{max}} \quad [48]$$

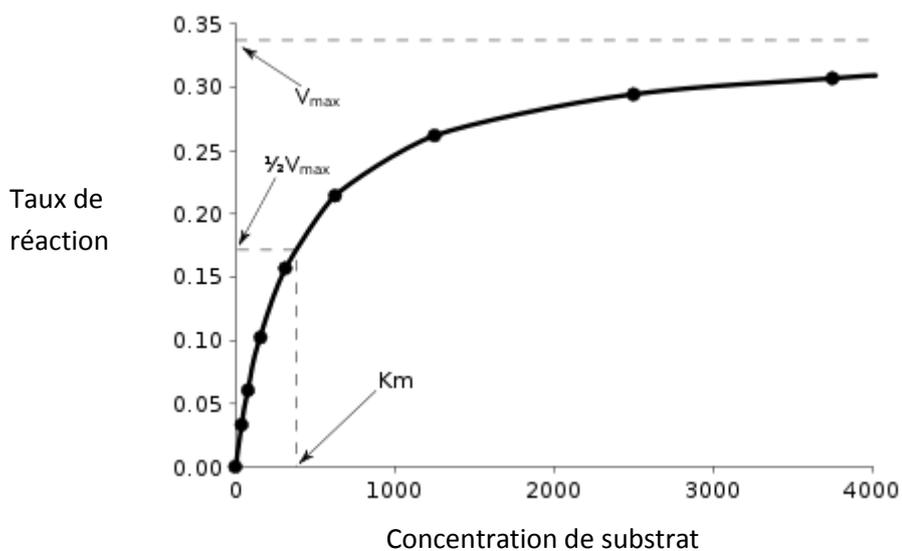
Les constantes Km et Vmax peuvent ainsi être lues sur la représentation graphique 1/vi = f(1/[S]). Cette équation peut être modélisée par une droite (figure 9 ci-dessous) dont la pente est Km/Vmax et l'ordonnée à l'origine est 1/Vmax.

Figure 9 : Représentation de la linéarisation graphique de Lineweaver-Burk ^[48]



La cinétique enzymatique en fonction de la quantité d'ose est donc pour les transporteurs GLUT représentée sous la forme d'une branche d'hyperbole avec une cinétique maximale qui ne peut être dépassée même en augmentant la concentration en ose ^[48] (figure 10).

Figure 10 : Exemple de courbe représentant une cinétique enzymatique de Michaelis-Menten ^[48]



IV. Expression des transporteurs GLUT-1 chez la souris

A. Répartition connue des récepteurs GLUT-1 dans les tissus de souris

1. GLUT-1 dans les nerfs

GLUT-1 est exprimé de manière préférentielle chez la souris dans les espaces périneuraux et dans l'endothélium des vaisseaux sanguins endoneuraux. La présence clef de GLUT-1 permet l'apport d'une quantité adéquate de glucose aux fibres nerveuses et aux cellules de Schwann à travers l'endothélium des vaisseaux endoneuraux et dans les espaces périneuraux ^[28]. Dans ces régions l'expression de GLUT-1 est faible après la naissance et augmente jusqu'au sevrage ^{[24] [26]}.

2. GLUT-1 dans le cerveau

On trouve une quantité importante de récepteur GLUT-1 dans le cerveau de la souris et particulièrement dans le cortex frontal et dans le cortex moteur (ce qui coïncide avec la forte demande en glucose de ces régions).

L'analyse par Western blot a révélé la présence de GLUT-1 dans le cerveau. On trouve notamment deux types de transporteurs GLUT-1 de poids moléculaire 45 kDa et 55 kDa. Celui de 55 kDa est principalement présent dans les microvaisseaux ^[2], tandis que les préparations de membrane cérébrale pour des tissus contenant peu de vaisseaux semblent contenir les protéines de plus petit poids moléculaire. Un produit intermédiaire (de 46 kDa à 48 kDa) de GLUT-1 a été localisé au sein des plexus choroïdes ^[2].

Ces différences de masse moléculaire de GLUT-1 s'expliquent toutes par des différences spécifiques dans la N-glycosylation. Les conséquences de la variabilité des états de la partie glycosylée sur la fonction de GLUT-1 n'ont pas encore été établies. Par ailleurs des études histologiques par double marquage (hybridation *in situ* et immunohistochimie) ont également localisé l'ARNm de *GLUT-1* dans les cellules gliales caractérisées par un marqueur spécifique ^[2].

Chez les rongeurs, en période fœtale et néonatale, le cerveau s'appuie essentiellement sur l'expression de GLUT-1 dans tous les types de cellules pour ses besoins en glucose ; les neurones semblent apparemment convertir l'expression de GLUT-1 en GLUT-3 environ 10 jours après la naissance ^[24].

3. GLUT-1 dans le tractus gastro-intestinal de la souris

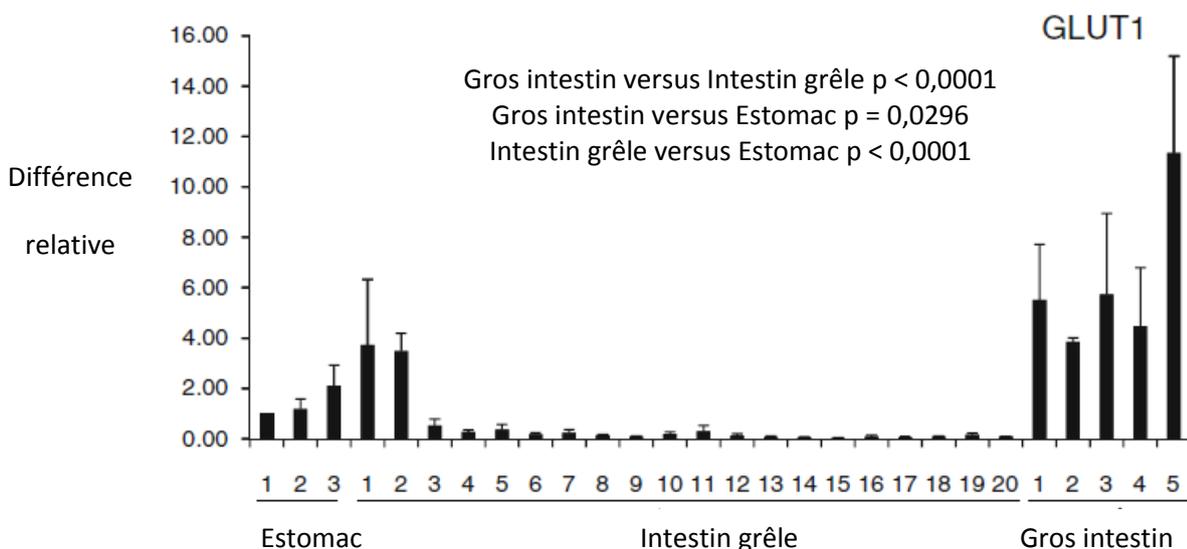
L'ARNm de *GLUT-1* a été retrouvé à un niveau considérable dans l'estomac et le gros intestin, mais en quantité négligeable dans l'intestin grêle ^[42] (figure 11).

L'intestin grêle chez les mammifères joue un rôle central dans la digestion et l'absorption des éléments nutritifs, par exemple les glucides, les protéines et les graisses. Les longues chaînes de glucides, tel que l'amidon dans la lumière de l'intestin grêle, sont digérées par l'alpha-amylase en de plus courtes chaînes (oligo- et/ou disaccharides), elles-mêmes encore clivées en monosaccharides par des enzymes de l'intestin grêle, tels que la maltase et la saccharase ^[12] qui sont présents dans le plateau strié des entérocytes.

L'immunohistochimie a démontré la localisation polarisée de transporteurs d'hexoses dans le gros intestin : SGLT1 sur la surface luminale et GLUT-1 du côté basal des cellules épithéliales ^[42].

Figure 11 : Expression du gène GLUT-1 selon les différentes portions du tube digestif de souris analysées par RT-PCR ^[42]

Les résultats sont exprimés en différences relatives. La valeur 1 est donnée par défaut à la quantité d'ADNc pour *GLUT-1* obtenue dans le premier segment de l'estomac analysé. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne associée à l'écart type. Les valeurs de P sont issues des tables d'analyses statistiques ^[42].



En hybridation *in situ*, un signal est retrouvé de façon importante le long de l'épithélium du gros intestin en surface et dans la partie supérieure de la région de cryptes ; un signal plus faible a été retrouvé dans la profondeur des cryptes^[42] (figure 12).

Dans l'estomac, le signal marquant la présence de l'ARNm de GLUT-1 a été trouvé dans les cryptes. L'analyse immunohistochimique a révélé la localisation de la protéine GLUT-1 sur la membrane basolatérale dans les cellules épithéliales de surface du gros intestin^[42].

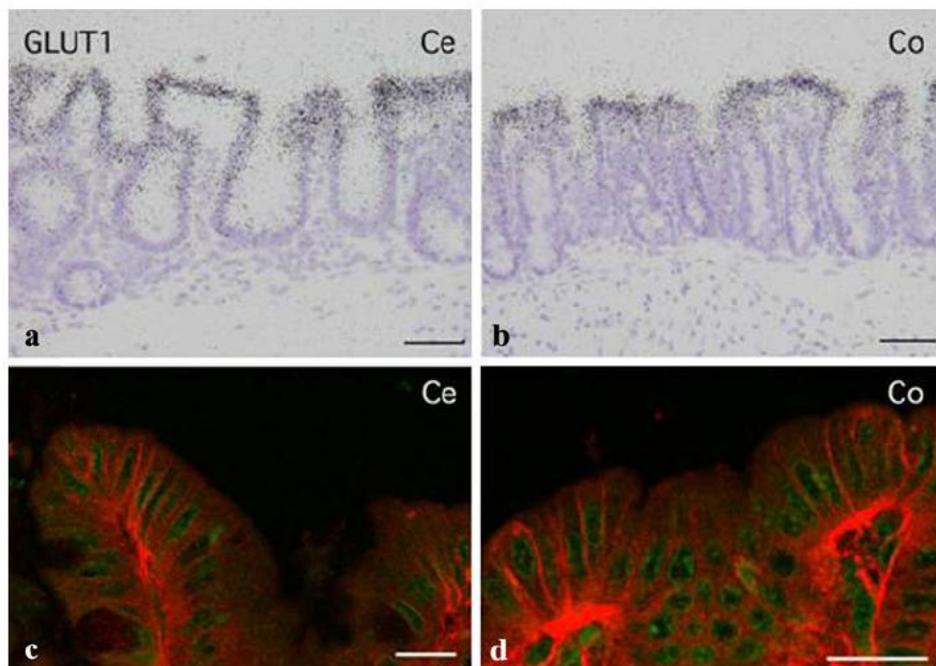
Cependant, il n'a pas été détecté d'immunoréactivité spécifique pour GLUT-1 dans la muqueuse gastrique^[42].

Figure 12 : Expression des l'ARNm (a, b) et de la protéine GLUT-1 (c, d) dans le gros intestin^[42]

Les signaux pour l'ARN de GLUT-1 se rassemblent à la surface de l'épithélium et dans la région supérieure des cryptes dans le cæcum (a) et dans le côlon (b).

Sur (c) et (d) le signal marquant la présence de GLUT-1 est en rouge et les noyaux cellulaires sont en vert. L'immunoréactivité de GLUT-1 est principalement observée sur la membrane basolatérale à la surface de l'épithélium cæcal (c) et colique (d).

Barre d'échelle 50µm (a, b), 20 µm (c,d)



L'expression de l'ARNm de *GLUT-1* dans la muqueuse gastrique a été démontrée à la fois par hybridation *in situ* et par RT-PCR^[42].

Les cellules épithéliales des cryptes gastriques contenaient une immunoréactivité diffuse pour GLUT-1 dans le cytoplasme basal. Il est généralement admis que GLUT-1 est un

transporteur unidirectionnel et essentiellement responsable de l'absorption du glucose pour les activités cellulaires fondamentales ^[37]. Par conséquent, la présence de GLUT-1 dans l'estomac peut être impliquée dans l'absorption du glucose dans la circulation sanguine et la récupération d'énergie pour certaines cellules gastriques ^[37].

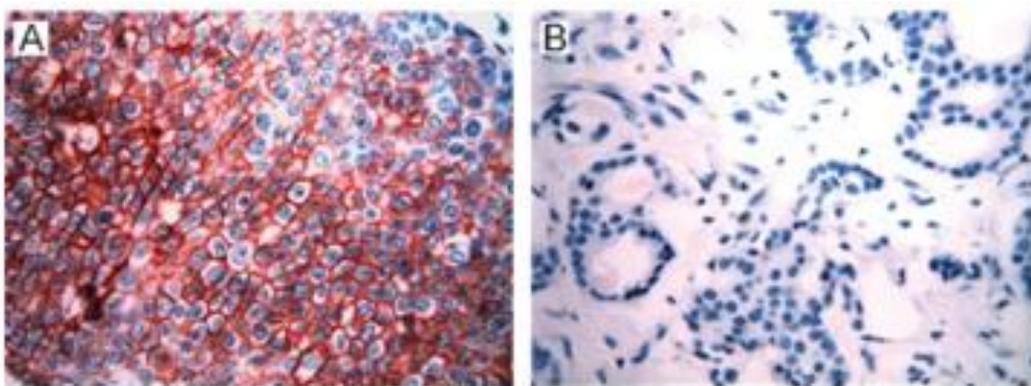
4. Autres localisations de GLUT-1

Les souris adultes n'expriment pas GLUT-1 dans leur hématies à la différence de l'homme ^[24]. On retrouve également GLUT-1 dans les cellules mésangiales du glomérule rénal (expression régulée par l'angiotensine II) ^{[24] [26]}. GLUT-1 a par ailleurs été retrouvé dans les ovocytes et les embryons de souris ^[28]. GLUT-1 est exprimé dans les testicules du rat et de l'homme, mais ne l'est pas chez la souris (qui exprime préférentiellement GLUT-2 et GLUT-3 dans ce tissu) ^[20]. Expression de GLUT-1 dans les tissus lésés chez l'homme

GLUT-1 semble être le transporteur de glucose prédominant dans de nombreux types de cancers. Il est fortement exprimé dans les carcinomes des glandes mammaires et dans d'autre type de carcinomes ^[14] (figure 13).

Figure 13 : Marquage immunohistochimique de GLUT-1 dans des carcinomes mammaires ^[14]
^[43] GLUT-1 : marron ; Noyaux : bleu.

- A. Carcinome mammaire "basal-like" montrant une forte coloration membranaire pour GLUT-1 dans les cellules tumorales (grossissement × 400).
- B. Autre type de cancer du sein montrant des cellules tumorales sans coloration pour GLUT-1 (grossissement × 400)



Dans cette étude, il a été trouvé une corrélation significative entre l'expression de GLUT-1 et la présence de carcinomes mammaires "basal-like". GLUT-1 a été exprimé dans 42 cas (76,4%) des 55 individus atteints, alors que seulement 55 (23,8%) de 231 individus atteints d'autres types de cancers du sein exprimaient GLUT-1 (P <.001) ^[14].

Une mutation du gène *GLUT-1* est également responsable de la maladie de De Vivo, caractérisée par une hypoglycorachie résultant d'un défaut de transport de glucose à travers la barrière hémato-encéphalique ^[34].

GLUT-1 est utilisé par certains rétrovirus comme récepteur afin de pénétrer dans les cellules cibles ^{[14] [22]}.

B. Régulation de la fonction et de l'expression de GLUT-1

Le transport de glucose par GLUT-1 est modulé par d'autres sucres qui rentrent en compétition de trois façons :

- 1) Sucres qui rentrent en compétition pour la liaison sur le même site (la concurrence cis)
- 2) Fixation allostérique de sucres à des sites de liaison différents de la protéine du même côté de la membrane (cis-allostérie)
- 3) Liaison allostérique de sucre du côté opposé de la membrane considérée (trans-allostérie)

Les différents inhibiteurs ne seront pas étudiés ici en détail. Citons uniquement les plus largement étudiés : la cytochalasine B, la forskoline, la phlorétine et l'ATP.

L'expression de GLUT-1 est par ailleurs régulée par divers mécanisme ^[11]. Notamment, lors d'hypoxie, le facteur de transcription HIF est surexprimé et induit l'expression de GLUT-1 et d'un groupe de gènes participant à la glycolyse ^{[4] [6]}.

DEUXIEME PARTIE : MARQUAGE ET ANALYSE DES COUPES HISTOLOGIQUES

I. Objectifs de l'expérience

Le but de notre expérience était de cartographier l'expression de GLUT-1 chez la souris à l'aide d'un anticorps spécifique anti-GLUT1 de lapin, avec comme étape préliminaire de vérifier la spécificité de l'anticorps choisi sur les tissus de souris.

L'anticorps retenu était un anticorps polyclonal de lapin (Thermoscientific rev 090309D). Cet anticorps n'est pour le moment validé que pour marquer les récepteurs GLUT-1 chez l'homme et le rat.

Des lames préparées avec divers tissus de souris ont été réalisées et marquées avec cet anticorps anti-GLUT1. Pour chaque lame marquée avec l'anticorps anti-GLUT1, il a été réalisé un témoin pour lequel l'anticorps anti-GLUT1 a été remplacé par un contrôle isotypique.

Ce contrôle isotypique ne devait pas présenter de marquage pour que l'analyse de la lame correspondante avec le marquage anti-GLUT1 fût interprétable.

Les marquages obtenus sur les différents tissus avec l'anticorps anti-GLUT1 ont ensuite été comparés aux données déjà connues (cf. Première partie) afin de voir si les résultats obtenus étaient compatibles avec ce qui est communément décrit dans la littérature.

Pour réaliser cette expérience deux séries de lames ont été réalisées à l'aide de deux techniques différentes :

- Une série de lames a été préparée après inclusion du tissu en paraffine.
- Une seconde série de lames était constituée de coupe au cryostat (tissu congelé).

Les échantillons ont ensuite été marqués à l'aide de l'anticorps marqueur de GLUT-1 (cf. protocole ci-dessous).

Il s'agissait ensuite de conclure quant à la spécificité du marquage par l'anticorps anti-GLUT1 sur les différents tissus utilisés lors de l'expérience.

Les résultats obtenus par les deux techniques ont ensuite fait l'objet d'une comparaison. Un récapitulatif des tissus spécifiquement marqués par ces techniques a alors été réalisé.

II. Matériel et méthode

A. Animaux utilisés

Critère de sélection :

Deux souris ont été utilisées pour cette expérience. Il s'agissait de deux souris de type *nude* (lignée de souris issue de mutation génétique pour lesquelles l'épithélium thymique ne se développe pas), obtenues auprès de l'Institut Curie (Paris).

Les caractéristiques de ces souris étaient :

Souris n°1 Souris *nude* femelle (âgée de 6 semaines au moment du sacrifice).

L'Institut Curie nous a fourni 4 flacons avec du formol à 10% contenant les prélèvements de cette souris :

Flacon A : sternum, rate, fémur, poumon, trachée, thyroïde, rein et muscle squelettique,

Flacon B : glande mammaire, tissu cutané interscapulaire, peau du tronc et foie,

Flacon C : Tête, encéphale, hypophyse, yeux,

Flacon D : Estomac, duodénum, pancréas, jéjunum, iléon, cæcum, colon et nœud lymphatique mésentérique.

Souris n°2 Souris *nude* femelle (âgée de 6 semaines au moment du sacrifice).

Les organes de cette souris ont été congelés au laboratoire de l'ENVA. Les prélèvements pour les coupes au cryostat ont été réalisés sur cette seconde souris.

B. Préparation des échantillons en paraffine

a) **Fixation**

La fixation a pour but d'empêcher la destruction spontanée par autolyse des structures tout en respectant au mieux leur morphologie. Elle permet la réalisation de préparations permanentes.

Un des critères essentiels pour le choix du fixateur est la pénétration rapide au sein du tissu. L'épaisseur du tissu à couper doit permettre l'action rapide du fixateur. Le fixateur choisi lors de la préparation de ces lames a été le formol à 10% neutre tamponné (fixateur classiquement utilisé).

Les tissus ont été immergés 24 heures dans le formol, puis 24 heures dans de l'alcool à 70° avant d'être recoupés. Il a été utilisé un volume de fixateur dix fois plus important que le volume de la pièce à couper.

b) **Inclusion en paraffine**

L'inclusion en paraffine a pour but de donner à l'échantillon une consistance suffisante pour permettre la coupe au microtome. Elle se traduit par le remplacement de l'eau du tissu par de la paraffine et se réalise en plusieurs étapes :

- *Passage dans le formol 4% (afin de parfaire la fixation)*

- *Déshydratation* : à l'aide de trois bains successifs d'alcool éthylique : un bain d'alcool à 70°, un bain d'alcool à 95° et quatre bains d'alcool à 100°.

- *Agent éclaircissant ou étape de substitution* : remplacement de l'alcool contenu dans les organes par un solvant miscible à la paraffine. Il doit être miscible au déshydratant et à l'agent d'inclusion. Notre protocole comportait trois bains successifs de toluène (solvant organique).

Ces étapes ont été réalisées au sein d'un automate au laboratoire d'Anatomie-Pathologique de l'ENVA selon un protocole standard.

c) **Réalisation des coupes**

Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un microtome et mesuraient 4 micromètres d'épaisseur.

C. Préparation des échantillons au cryostat

a) Conservation des échantillons

Les prélèvements ont été congelés dans des vapeurs d'azote liquide, enrobés dans de l'OCT (*OCT embedding matrix*, Cell path Ltd, UK) puis stockés à -20°C.

Cette technique préserve les antigènes mais les tissus ne sont pas fixés préalablement à la coupe et la morphologie cellulaire est moins bien préservée qu'après la fixation et inclusion en paraffine.

b) Coupe et fixation

Après coupe, les lames ont été plongées dans un mélange alcool-acétone (50%/50%) à -20°C pendant 10 minutes

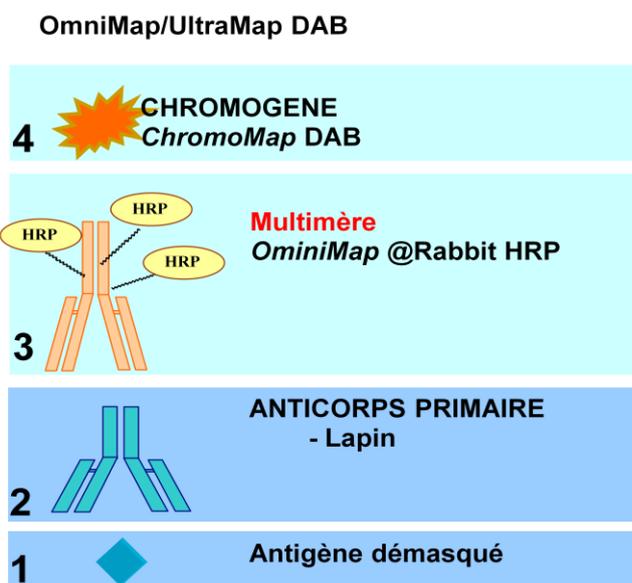
Les coupes réalisées mesuraient 6 micromètres d'épaisseur environ. Les tissus étant enrobés dans de l'OCT, après la coupe au cryostat (Leica CM 3050 S) les lames ont été stockées à température ambiante.

D. Immunomarquage

a) Matériel

Les immunomarquages ont été effectués sur un automate Discovery XT (Roche-Ventana©). Ces marquages ont été réalisés à l'aide d'un système de détection sans biotine « *biotin free* » (figure 14). Le multimère « OmniMap » se fixait sur des anticorps de lapin. Ce multimère était lui-même couplé à l'enzyme HRP (*Horseradish Peroxidase*). La révélation a été réalisée par le kit ChromoMap DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride). La contre-coloration a été réalisée par l'hématoxyline.

Figure 14 : Principe de l'immunomarquage effectué par l'automate Discovery XT (documentation fournie par le constructeur Roche-Ventana ©)



b) Descriptif de l'anticorps utilisé pour l'étude

L'anticorps utilisé était un anticorps polyclonal de lapin spécifique de GLUT-1 produit par la firme Thermo SCIENTIFIC (Thermoscientific rev 090309D. Annexe 1). L'anticorps est dirigé vers un épitope situé à l'extrémité C-terminale de la protéine GLUT-1 de lapin. La réactivité de l'anticorps est valide pour l'homme et le rat selon le fournisseur de l'anticorps (Annexe 1). L'antigène ayant servi à la production de cet anticorps correspond à la partie C-terminale de GLUT-1 humain. Compte-tenu de l'homologie des derniers acides aminés de GLUT-1 entre l'homme et la souris, nous pouvions prédire que cet anticorps reconnaîtrait la protéine GLUT-1 chez la souris.

Le contrôle isotypique était une préparation d'IgG de lapin non immunisé produite par Thermo SCIENTIFIC (Thermoscientific rev 041910D. Annexe 2).

c) **Protocole de marquage**

Dans un premier temps, deux séries de lames ont été réalisées (figure 15 et 16). Sur une série nous avons utilisé l'anticorps anti-GLUT1 dilué au 1/200^{ème} (dilution choisie après divers essais afin de permettre une observation de qualité au microscope optique). Sur la seconde série un contrôle isotypique de lapin a été utilisé. Pour chaque coupe colorée avec l'anticorps anti-GLUT1, une coupe sériée adjacente a été colorée avec le contrôle isotypique. Le prétraitement des lames était réalisé à l'aide de tampon citrate pH 6 (selon les recommandations du fournisseur de l'anticorps primaire).

Dans un second temps, un autre protocole de marquage a été utilisé. Deux séries de lames ont à nouveau été réalisées. La dilution choisie de l'anticorps primaire anti-GLUT1 était cette fois de 1/800^{ème}. Pour chaque coupe colorée avec l'anticorps anti-GLUT1, une coupe sériée adjacente a été colorée avec le contrôle isotypique. Le prétraitement des lames a été réalisé à l'aide d'EDTA pH 8.

Dans les deux cas, la concentration du contrôle isotypique a été ajustée afin d'avoir la même concentration que celle de l'anticorps primaire anti-GLUT1.

La comparaison de ces deux séries de lames a permis de savoir si la fixation des anticorps anti-GLUT1 était spécifique. En cas de marquage spécifique, les lames de la première série étaient marquées mais pas les secondes.

Ces colorations ont été appliquées d'une part sur les tissus inclus en paraffine (figure 15) et d'autre part sur les tissus coupés au cryostat (figure 16). Les deux types de préparations ont ensuite été comparés.

CHOIX DES TEMOINS

Témoin positif :

Nous avons choisi comme témoin positif mon propre sang. Le sang a été déposé sur une lame Superfrost+ et un frottis a été réalisé. Il a ensuite été fixé par un mélange alcool/acétone (50%/50%).

Le cerveau de souris a pu également servir de témoin positif (choix issu des données de la littérature, le cerveau de souris étant censé être marqué). Les prélèvements de cerveau de souris examinés sur une lame avec anticorps anti-Ig G de lapin ne devaient pas présenter de marquage.

Témoin négatif :

Le sang de souris a servi de témoin négatif. Le sang de souris n'est en théorie (contrairement au sang humain) pas coloré par l'anticorps en raison de la faible présence de transporteur GLUT-1 au sein des érythrocytes murins.

Du thymus humain, fixé dans le formol, inclus en paraffine, a également servi de témoin à la fois positif et négatif pour le marquage en paraffine. Les cellules suivantes étaient censées être marquées : globules rouges, lymphocytes activés, certaines cellules épithéliales, et les autres cellules composant le tissu n'étaient pas supposées être marquées.

Les protéines GLUT-1 sont membranaires, le marquage pour être valide devait être membranaire pour tous les tissus considérés.

Figure 15 : Protocole de coloration des lames préparées au cryostat

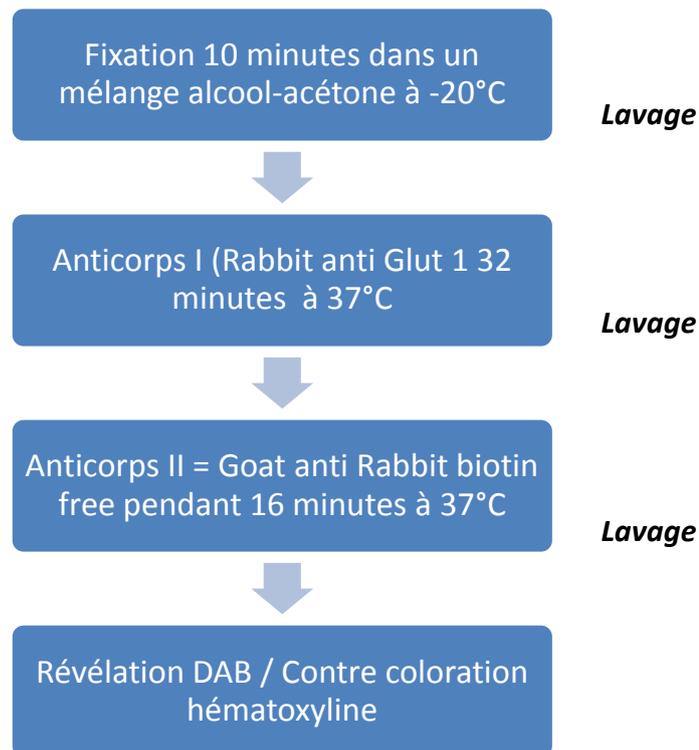
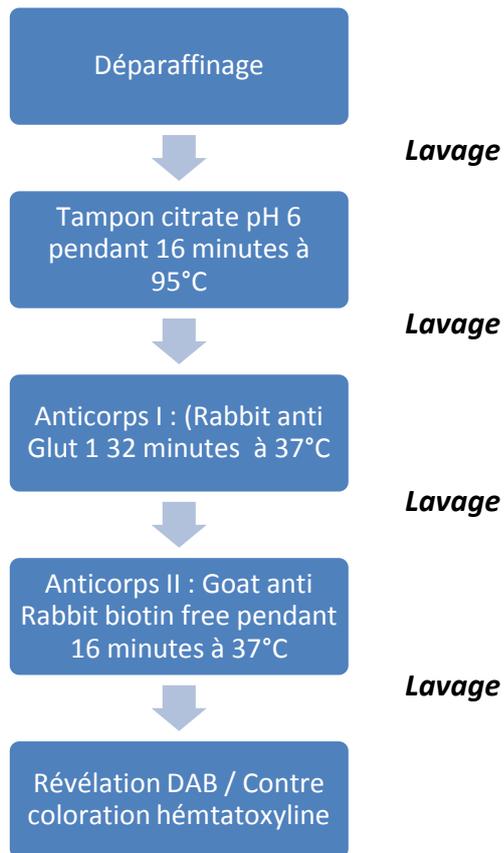


Figure 16 : Protocole de préparation des prélèvements inclus en paraffine



III. Résultats des immunomarquages effectués en suivant les recommandations du fournisseur de l'anticorps primaire

Les photographies obtenues dans cette section ont été prises par une caméra numérique fixée sur un microscope optique. L'objectif microscopique (MO) est indiqué pour chaque photographie. Pour les illustrations présentées ci-dessous, nous avons noté « bruit de fond » lorsque l'ensemble de lame est coloré de façon diffuse. Le marquage est considéré comme non spécifique lorsque certains éléments sont colorés sur un fond non ou peu coloré avec l'anticorps anti-GLUT1 (ou que la coloration est retrouvée dans une localisation inattendue) et lorsque le même résultat est obtenu avec le contrôle isotypique.

A. Etudes des témoins

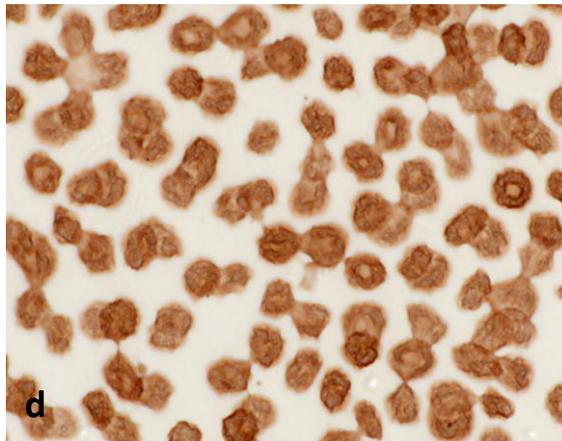
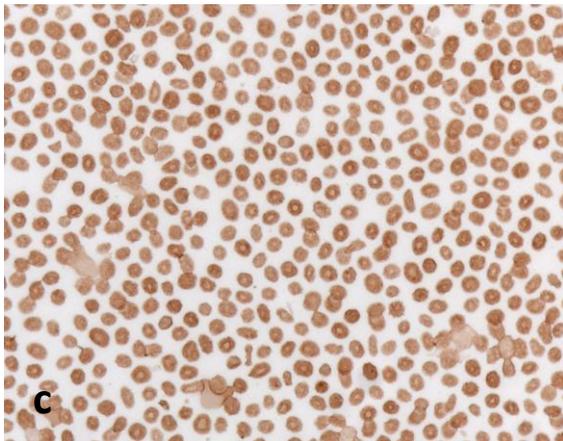
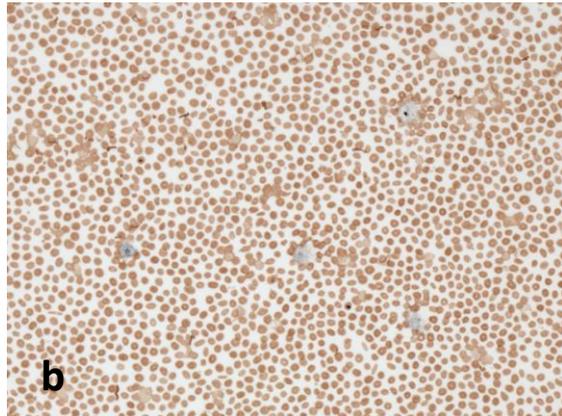
1. Sang humain

Le témoin positif a été réalisé à partir de sang humain. Les érythrocytes humains possédant un nombre important de protéines GLUT-1 à leur surface, le résultat attendu était un marquage important.

L'analyse du contrôle isotypique indiquait que le marquage était interprétable. Les hématies humaines étaient marquées spécifiquement par l'anticorps anti-GLUT1 (figure 17).

Figure 17 : Marquage immunohistochimique de lame de sang humain

- a. Microscopie optique X20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond observable sur le frottis. Les noyaux des cellules lymphoïdes étaient colorés en bleu par l'hématoxyline. Pas de marquage des hématies.
- b. MO X 20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1 dilué au 1/200^{ème}. Pas de bruit de fond. Marquage brun homogène des hématies. Marquage (bleuté) des noyaux des cellules lymphoïdes par l'hématoxyline.
- c. MOx40 Idem b.
- d. MOX100 idem b.

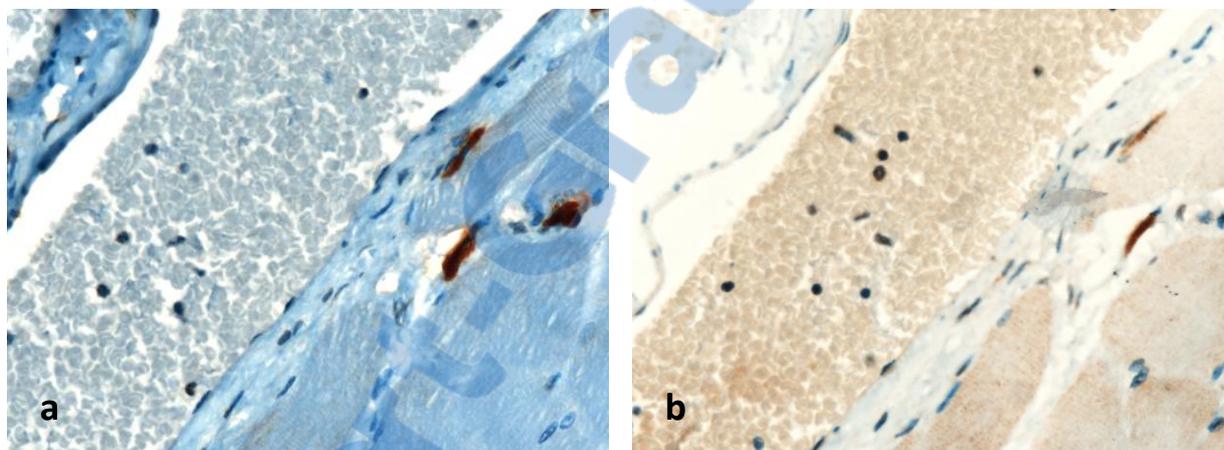


2. Sang de souris

Sur les coupes histologiques du témoin négatif (sang de souris), nous n'avons observé aucun marquage spécifique pour GLUT1 (figure 18).

Figure 18 : Marquage immunohistochimique de sang de souris observable dans une veine d'un tissu musculaire préparé en paraffine

- MO X20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Marquage non spécifique de cellules fusiformes (possiblement des macrophages) dans le tissu.
- MO X20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1 dilué au 1/200^{ème}. Discret bruit de fond. Marquage très modéré non significatif des hématies et cellules musculaires.

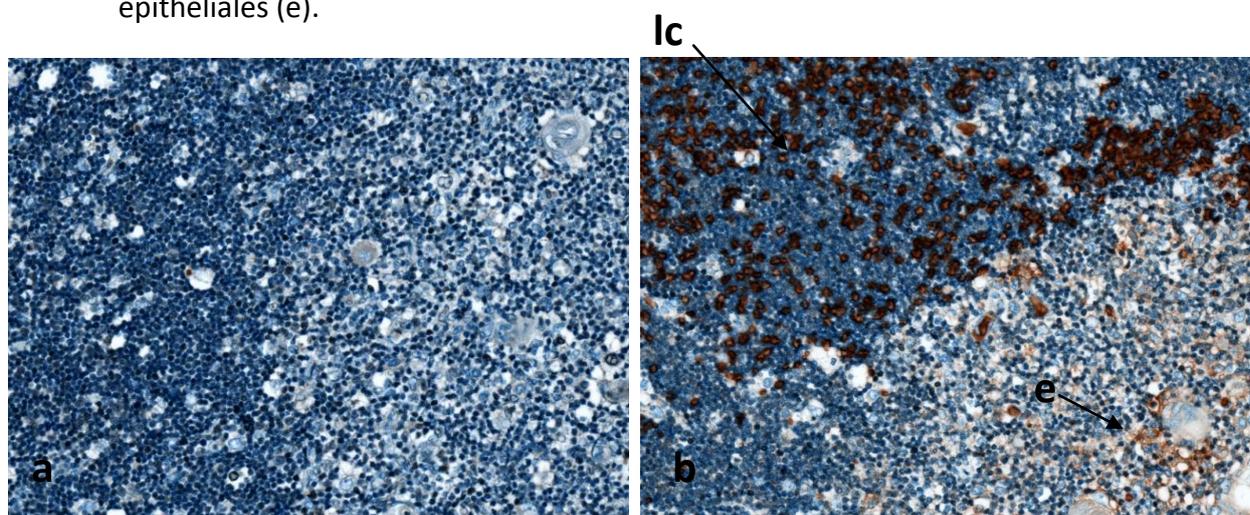


3. Thymus humain

Sur ces coupes histologiques de thymus humain, nous avons observé un marquage spécifique des globules rouges, des lymphocytes activés et de certaines cellules épithéliales (figure 19).

Figure 19 : Coupes histologiques de thymus humain préparées par inclusion en paraffine

- MO X20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Absence de marquage.
- MO X20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1 dilué au 1/200^{ème}. Marquage des globules rouges, lymphocytes corticaux (lc) et de certaines cellules épithéliales (e).



Les résultats obtenus pour les témoins négatifs et positifs correspondaient à ceux attendus. Nous avons donc pu procéder à l'étude multi-tissulaire.

B. Etude multi-tissulaire sur souris

1. Prélèvements inclus en paraffine

a) Cervelet

Sur ces coupes histologiques de cervelet, nous avons observé un marquage non spécifique des cellules de Purkinje et un marquage douteux de toutes les couches du cervelet (figure 20).

Figure 20 : Coupes histologiques de cervelet de souris préparées par inclusion en paraffine

- MOX10. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Cellules de Purkinje marquées non spécifiquement. Peu de bruit de fond.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Cellules de Purkinje marquées non spécifiquement. Peu de bruit de fond.
- MOX10. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond important. Cellules de Purkinje (P) marquées non spécifiquement. Marquage de toutes les couches du cervelet : zone grise (couche granuleuse (g), couche moléculaire (m)) et substance blanche (sb). Marquage plus accentué de la couche granuleuse.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Cellules de Purkinje marquées non spécifiquement. Marquage de toutes les couches du cervelet. Marquage plus accentué de la couche granuleuse.

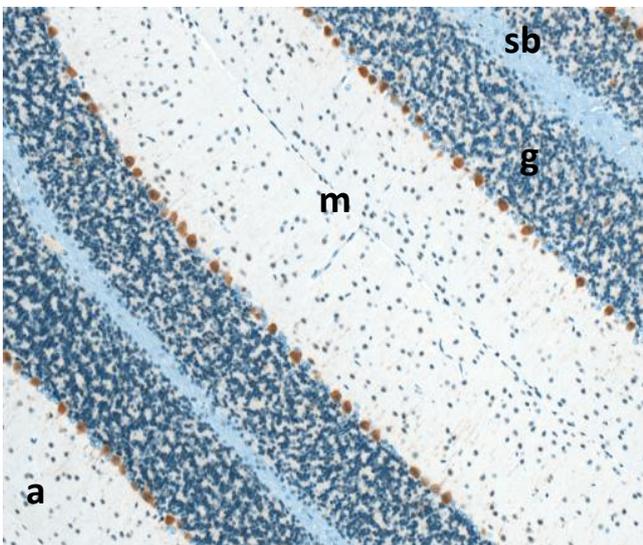
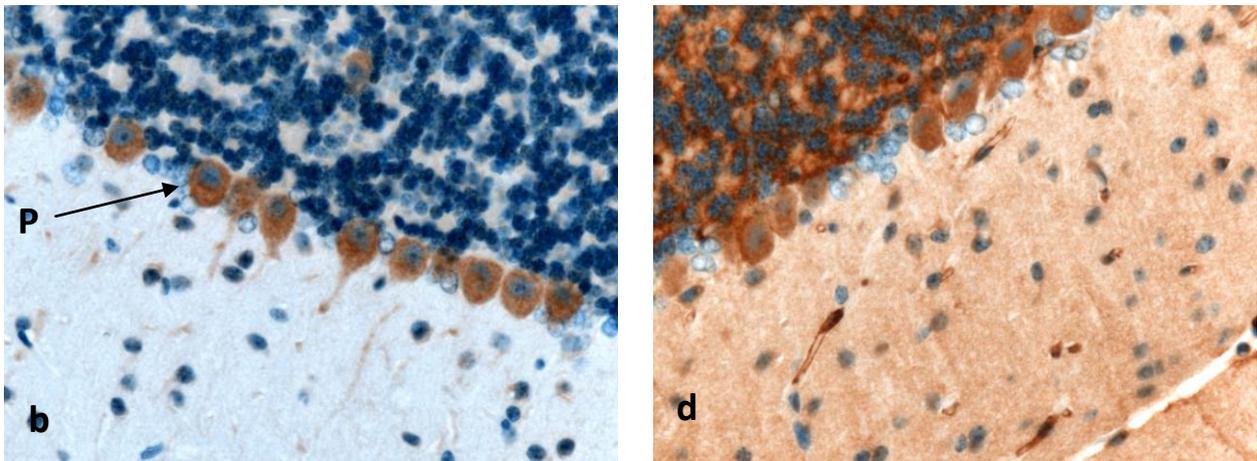


Figure 20 (suite) : Coupes histologiques de cervelet de souris préparées par inclusion en paraffine

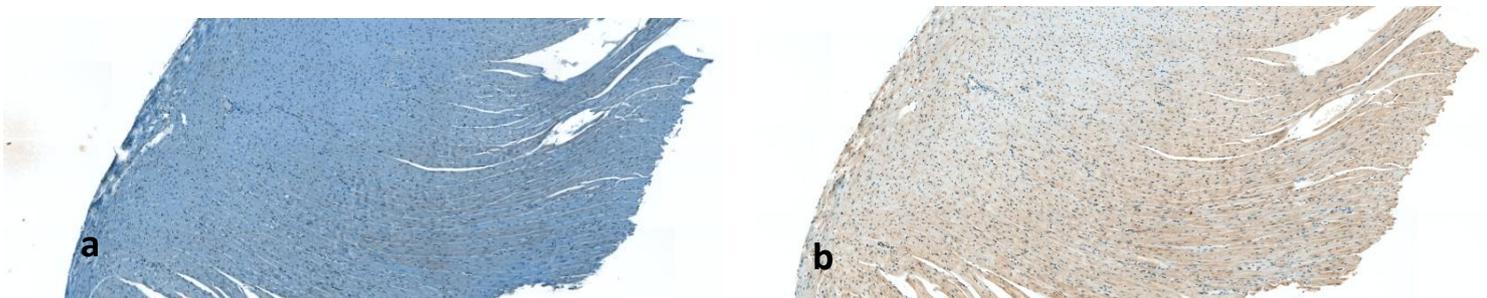


b) Cœur

Sur les coupes histologiques de cœur, nous n'avons pas observé de coloration spécifique avec l'anticorps anti-GLUT1 (figure 21).

Figure 21 : Coupes histologiques de cœur préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de coloration des structures.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. L'ensemble des cellules du tissu présentait une discrète coloration brune à la fois intracellulaire et membranaire. Nous avons donc un bruit de fond observable sur les structures représentées et une absence de coloration spécifique.

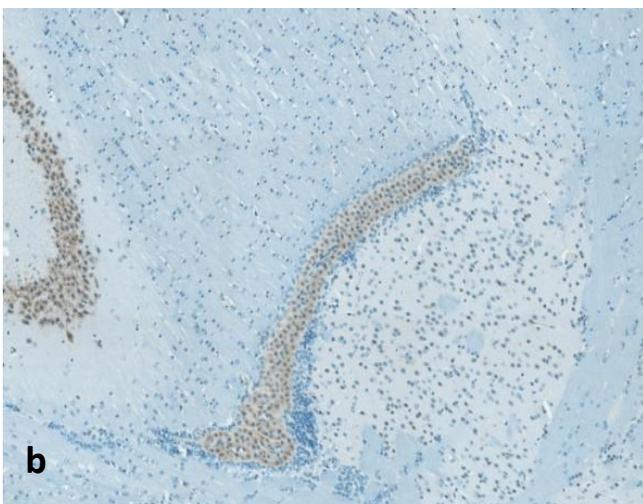
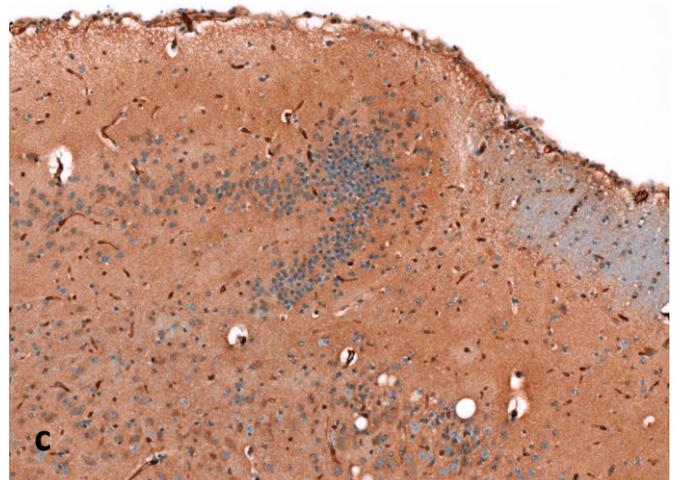
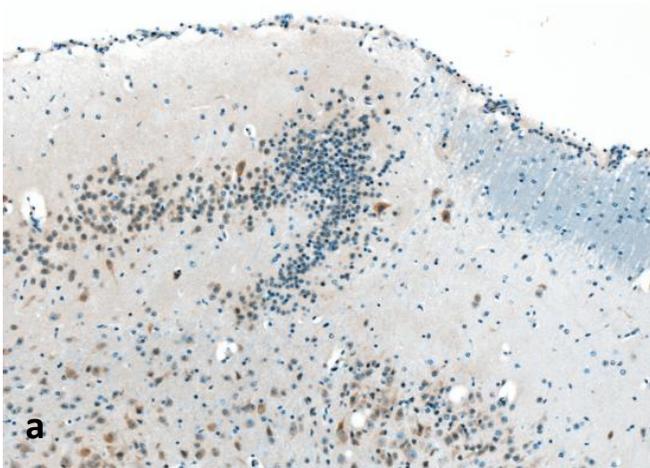


c) **Cerveau**

Les lames de cerveau marquées à l'aide du contrôle isotypique de lapin présentaient peu de bruit de fond. Les lames marquées par l'anticorps anti-GLUT1 étaient donc analysables. On retrouvait sur ces lames un marquage spécifique de l'épithélium épendymaire.

Figure 22 : Coupes histologiques de cerveau préparées par inclusion en paraffine

- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond très modéré. Coloration non spécifique de certaines cellules.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Discret marquage non spécifique des cellules de l'épendyme.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. La majorité des membranes cellulaires sont discrètement marquées.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond. Marquage spécifique de l'épithélium épendymaire (flèche). Nombreuses structures présentant une discrète coloration.

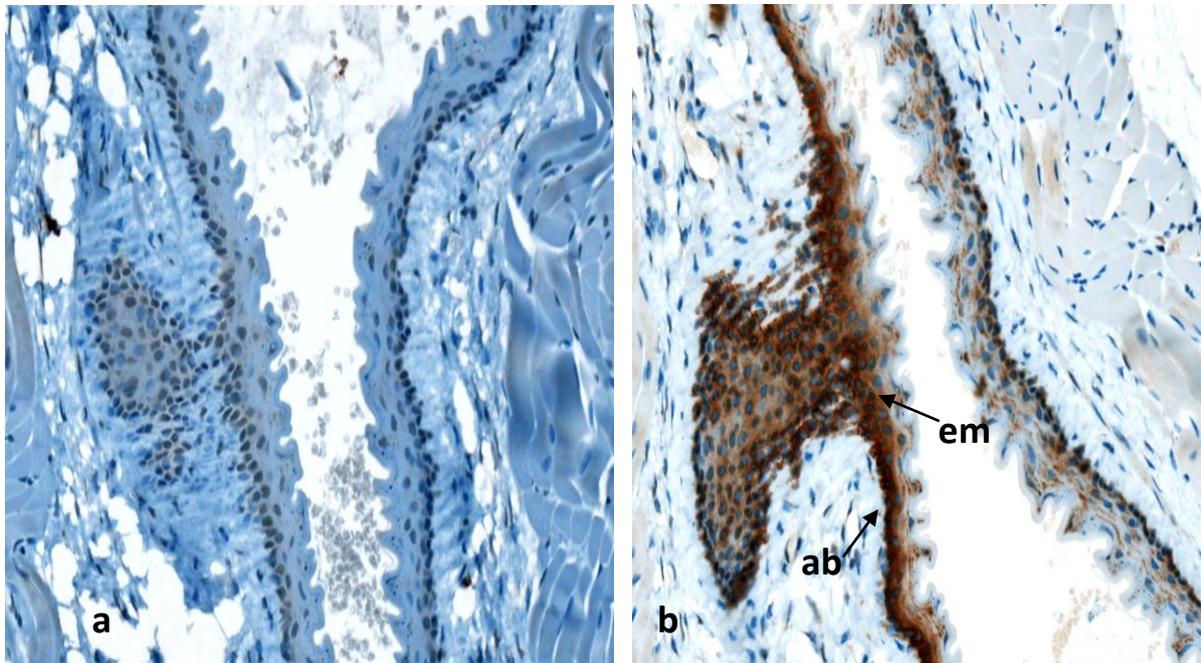


d) Œsophage

Nous avons observé pour l'œsophage un marquage spécifique de l'assise basale et de l'épithélium malpighien de l'œsophage (figure 23).

Figure 23 : Coupes histologiques d'œsophage préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage cellulaire.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coloration de l'assise basale (ab) et de l'épithélium malpighien (em).

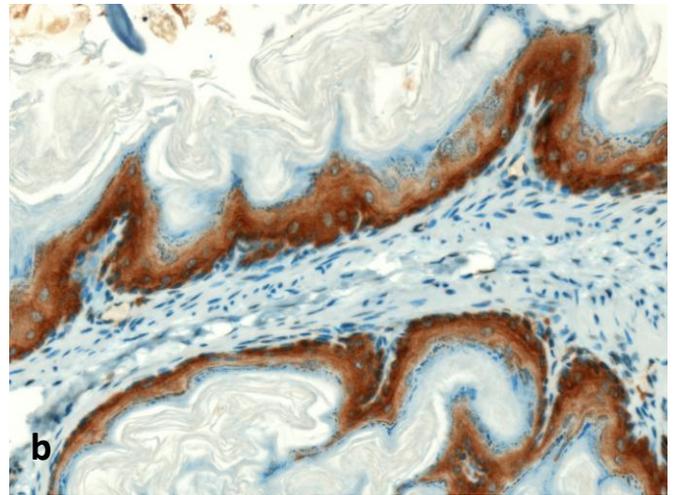
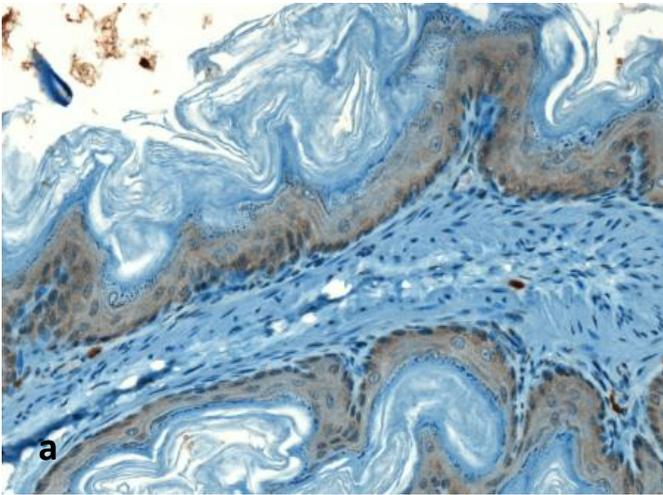


e) **Estomac (zone malpighienne)**

Sur ces coupes histologiques d'estomac, nous avons observé une coloration spécifique de l'épithélium en zone malpighienne (figure 24).

Figure 24 : Coupes histologiques d'estomac (en zone malpighienne) préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coloration modérée de l'épithélium. Pas de bruit de fond.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coloration marquée de l'épithélium en zone malpighienne. Pas de bruit de fond.

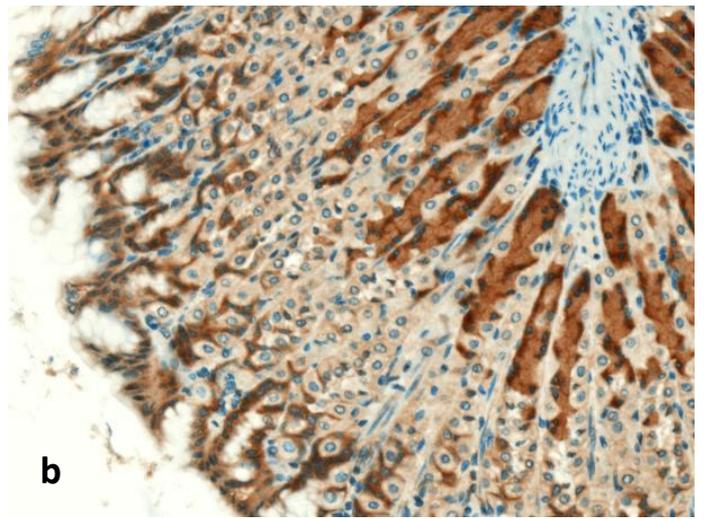
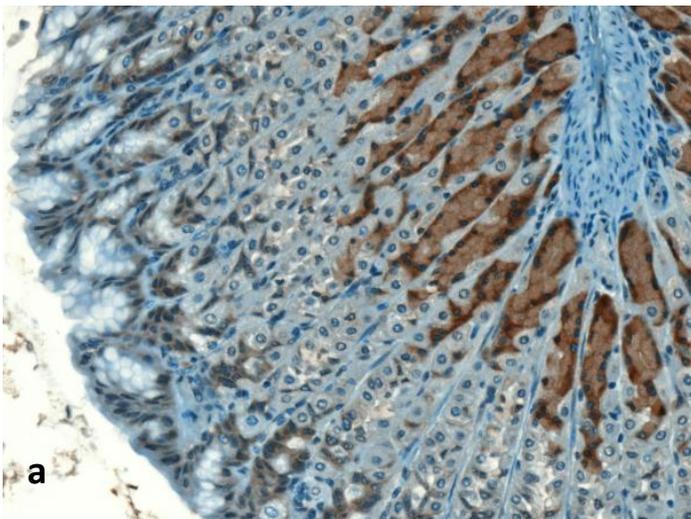


f) **Estomac (zone fundique)**

Sur les coupes histologiques d'estomac en zone fundique, nous avons observé une coloration non spécifique de l'épithélium de surface, plus marquée dans le fond des glandes fundiques (figure 25).

Figure 25 : Coupes histologiques d'estomac en zone fundique préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique de l'épithélium de surface, plus marqué dans le fond des glandes fundiques.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret marquage non spécifique de l'épithélium de surface, plus marqué dans le fond des glandes fundiques.

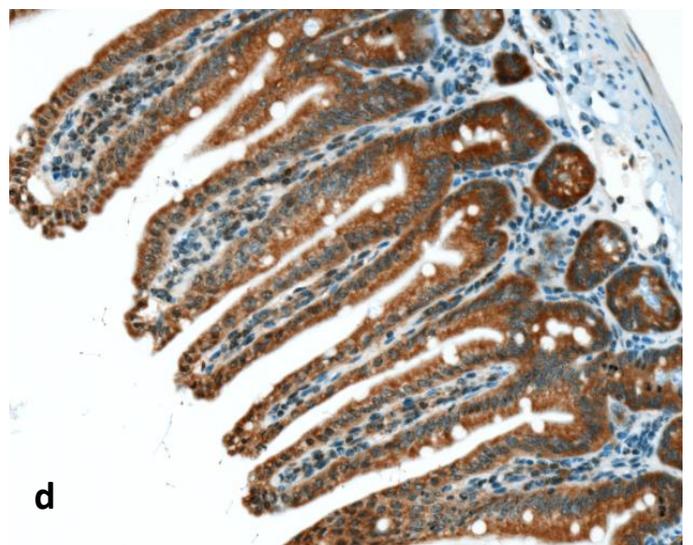
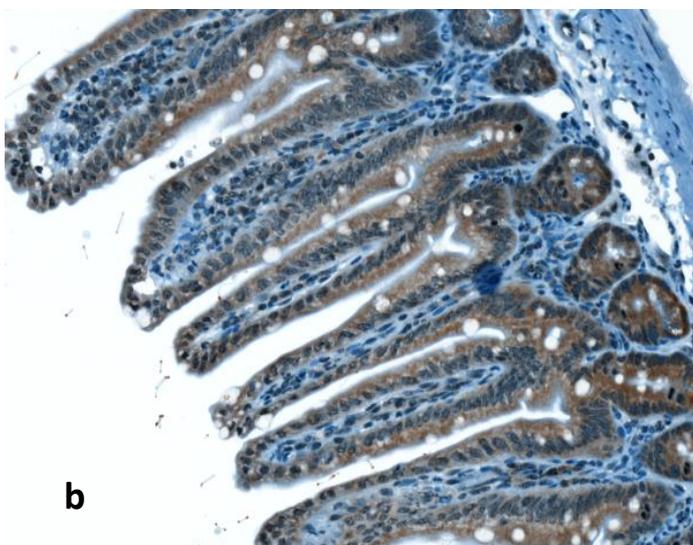
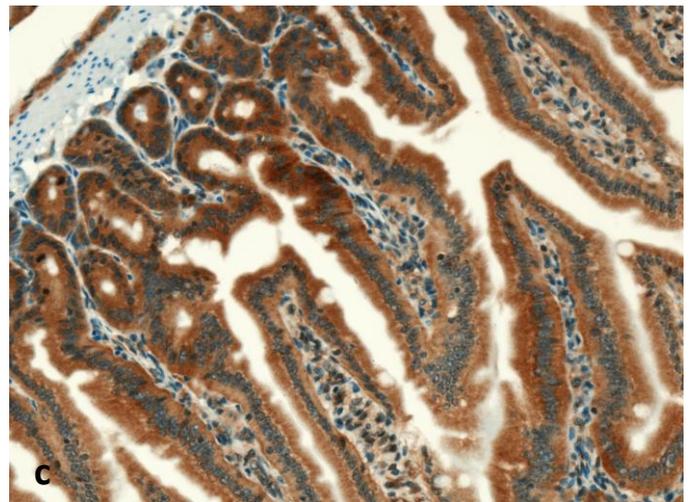
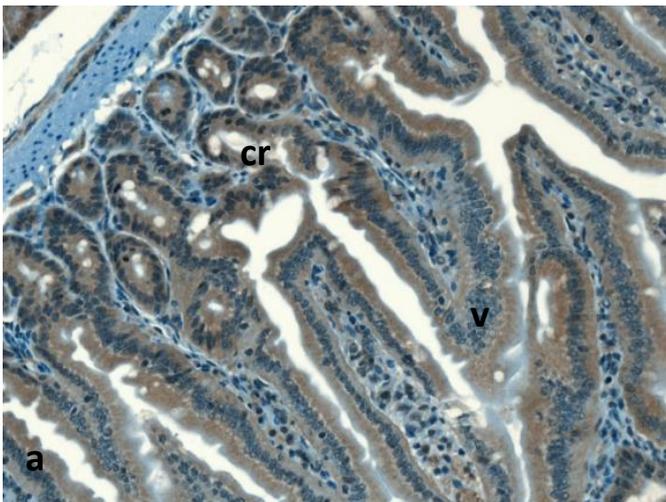


g) **Duodénum**

Sur les coupes histologiques de duodénum, un marquage douteux de l'épithélium des villosités et des cryptes était observable (figure 26).

Figure 26 : Coupes histologiques de duodénum préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique de l'épithélium des villosités (v) et des cryptes (cr).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique de l'épithélium des villosités et des cryptes.
- c. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coloration marquée de l'épithélium des villosités et des cryptes. Pas de bruit de fond
- d. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coloration marquée de l'épithélium des villosités et des cryptes. Pas de bruit de fond.

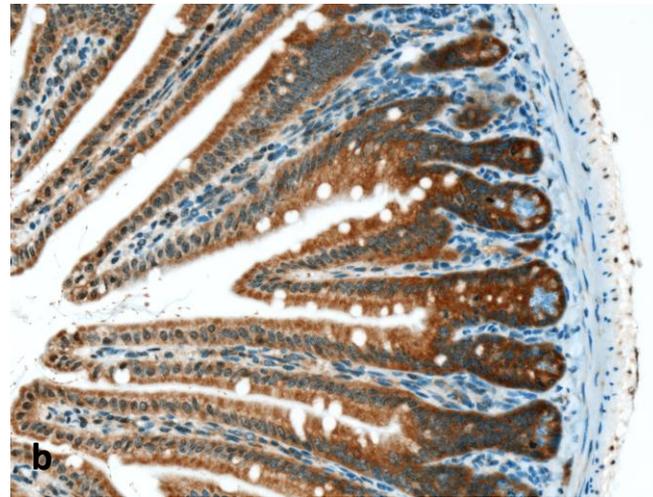
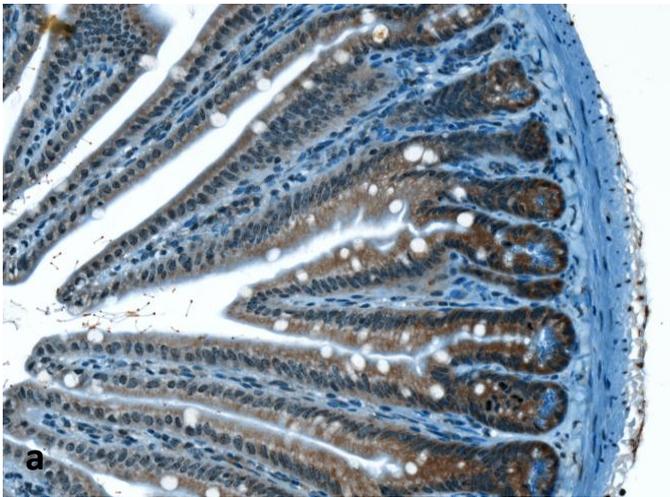


h) Jéjunum

Sur ces coupes histologiques de jéjunum, nous avons observé une coloration douteuse des cellules des villosités et des cryptes (figure 27).

Figure 27 : Coupes histologiques de jéjunum préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Marquage non spécifique des cryptes.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage douteux des cellules des villosités et des cryptes.

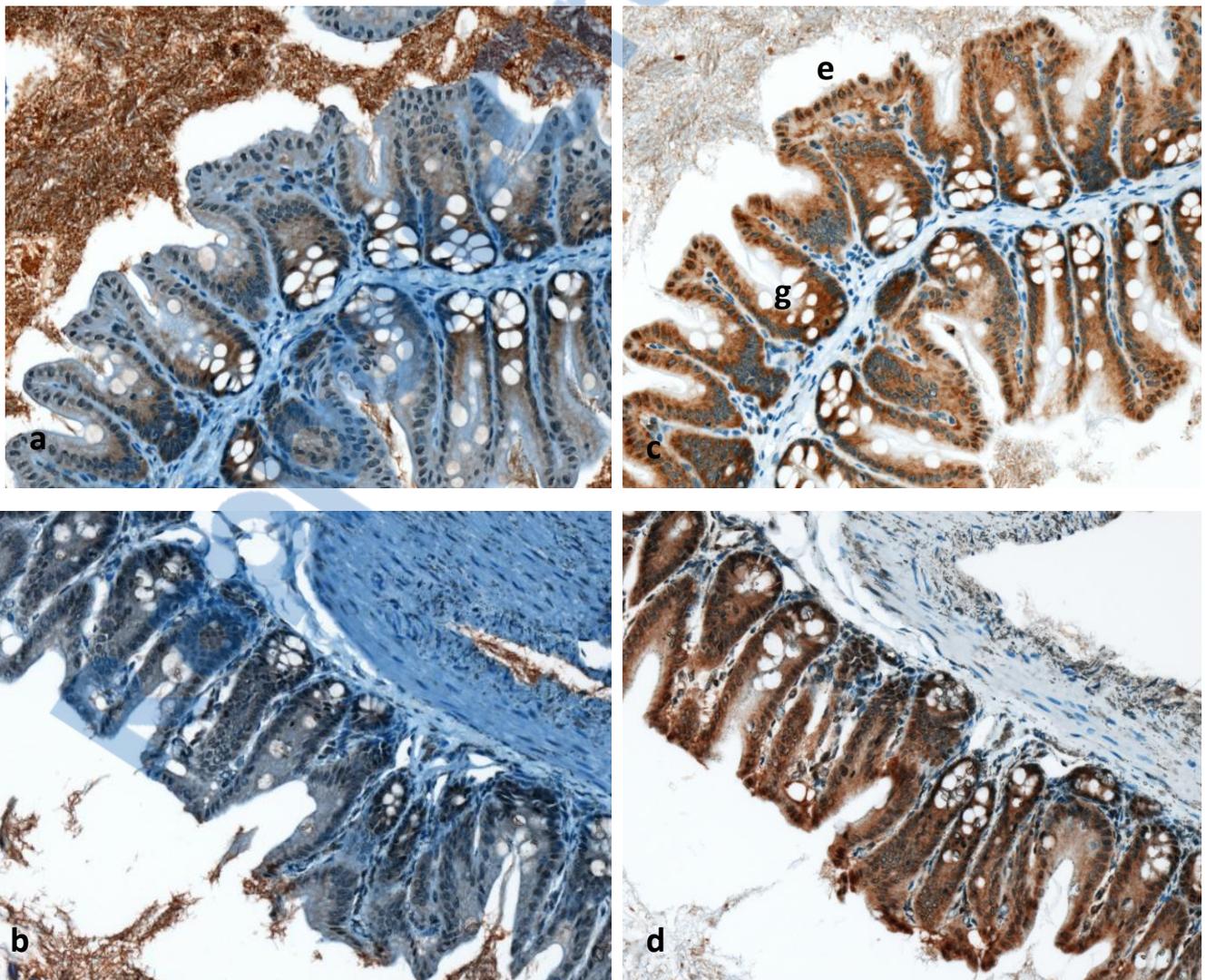


i) Gros intestin

Sur les coupes histologiques de gros intestin, nous avons observé un marquage douteux de l'épithélium glandulaire (figure 28).

Figure 28 : Coupes histologiques de gros intestin préparées par inclusion en paraffine

- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique de l'épithélium.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique de l'épithélium.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage de l'épithélium de revêtement (e) et des glandes (g).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Pas de bruit de fond. Marquage de l'épithélium de revêtement et des glandes.

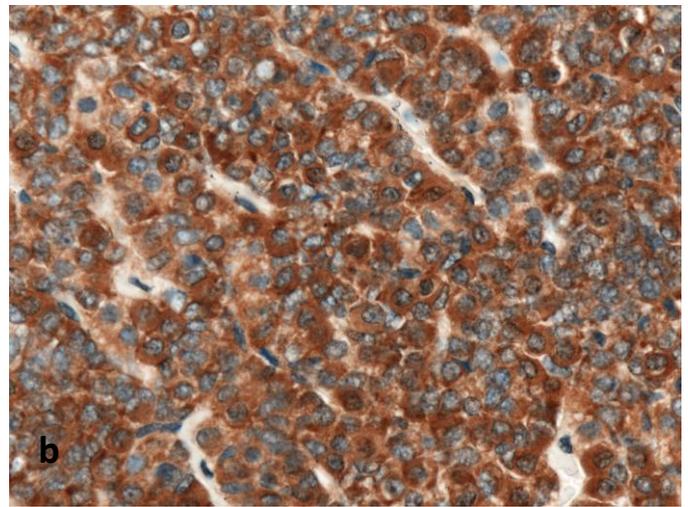
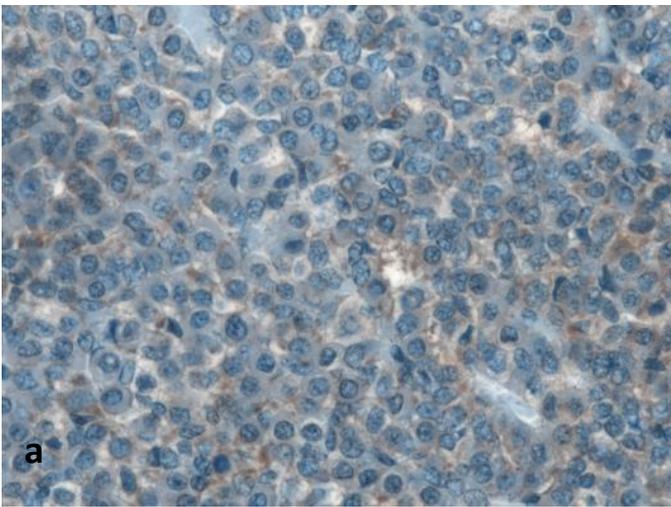


j) Hypophyse

Sur les coupes histologiques d'hypophyse, nous avons observé un marquage significatif de la grande majorité des cellules hypophysaires présentes (figure 29).

Figure 29 : Coupes histologiques d'adénohypophyse préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond modéré. Pas de marquage cellulaire.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anti-GLUT1. Marquage significatif de la grande majorité des cellules hypophysaires présentes.

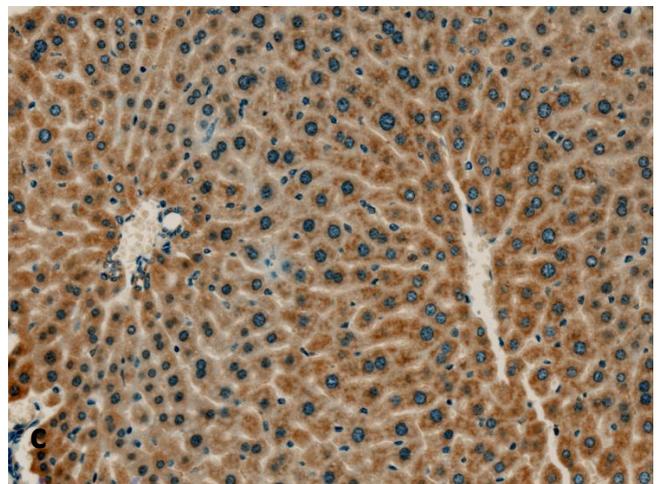


k) **Foie**

Sur les coupes histologiques de foie, nous avons observé un marquage non spécifique des hépatocytes (figure 30).

Figure 30 : Coupes histologiques de foie préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond important. Marquage non spécifique de la plupart des structures hépatiques
- b. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond important. Marquage de la plupart des structures hépatiques
- c. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage de la totalité des hépatocytes dans ce lobule hépatique.

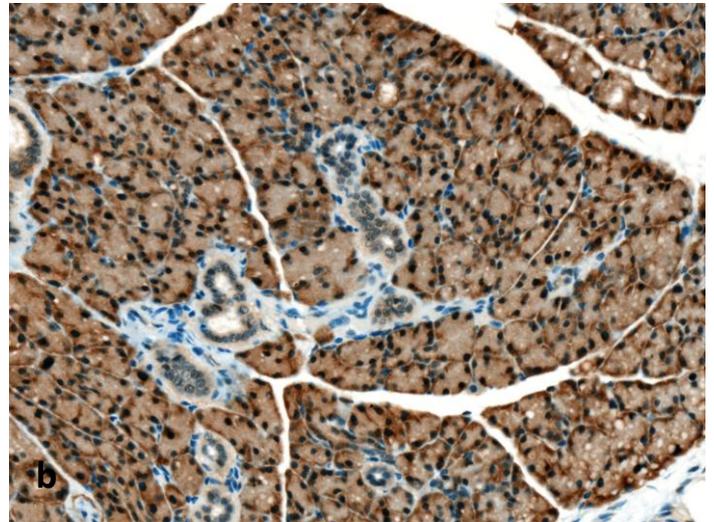
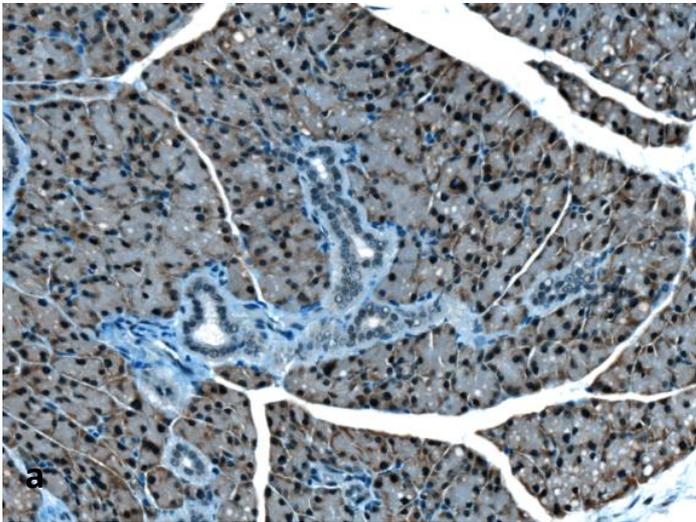


1) **Glande lacrymale**

Sur les coupes histologiques, nous avons observé un marquage douteux des cellules composant la glande lacrymale (figure 31).

Figure 31 : Coupes histologiques de glande lacrymale préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret marquage non spécifique des cellules composant la glande lacrymale.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond important. Marquage douteux des cellules composant la glande lacrymale.

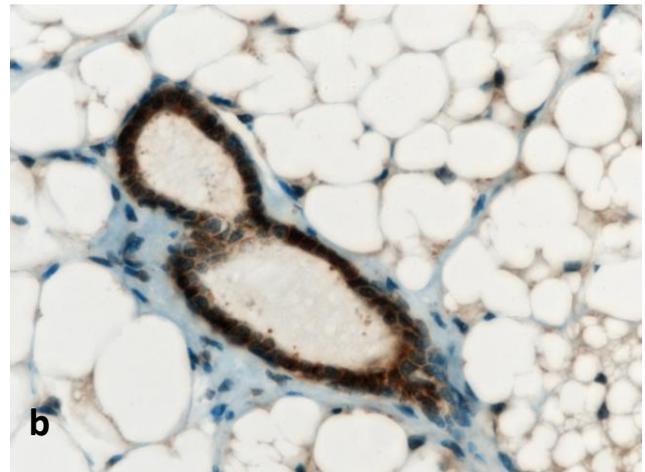
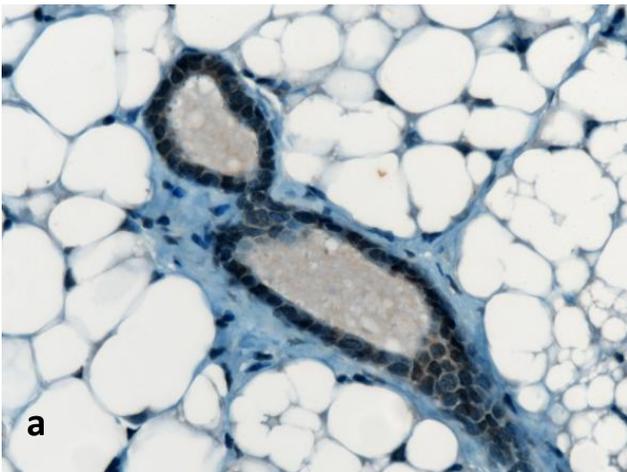


m) **Glande mammaire**

Les marquages pour GLUT-1 pour la glande mammaire étaient non analysables (figure 32).

Figure 32 : Coupes histologiques de glande mammaire préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Marquage non spécifique des cellules des canaux galactophores.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage des cellules des canaux galactophores.

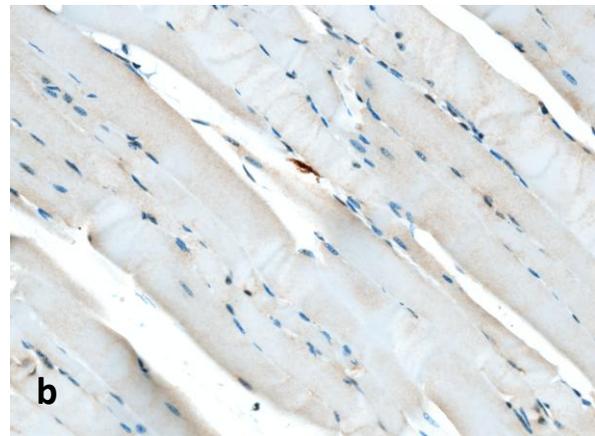
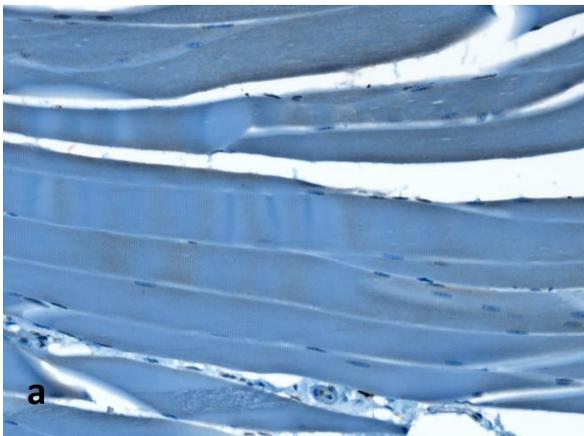


n) **Muscle**

Les coupes histologiques de muscle ne présentaient pas de marquage spécifique (figure 33).

Figure 33 : Coupes histologiques de muscle préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Pas de marquage.

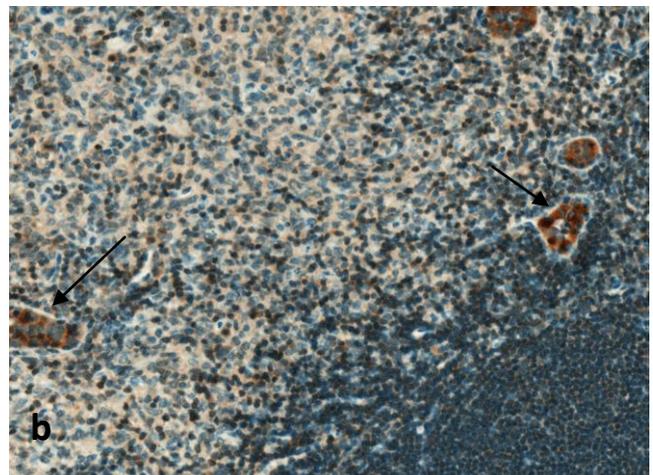


o) **Nœud lymphatique**

Les coupes histologiques de nœud lymphatique présentait un marquage spécifique pour l'endothélium vasculaire des veinules épithélioïdes. Les autres types cellulaires n'étaient pas marqués (figure 34).

Figure 34 : Coupes histologiques de nœud lymphatique préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage cellulaire.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage de l'endothélium de certains vaisseaux (veinules épithélioïdes, repérées par des flèches)

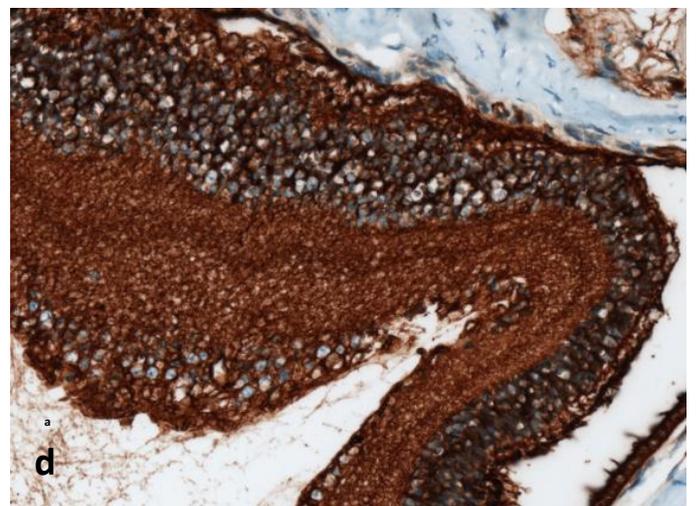
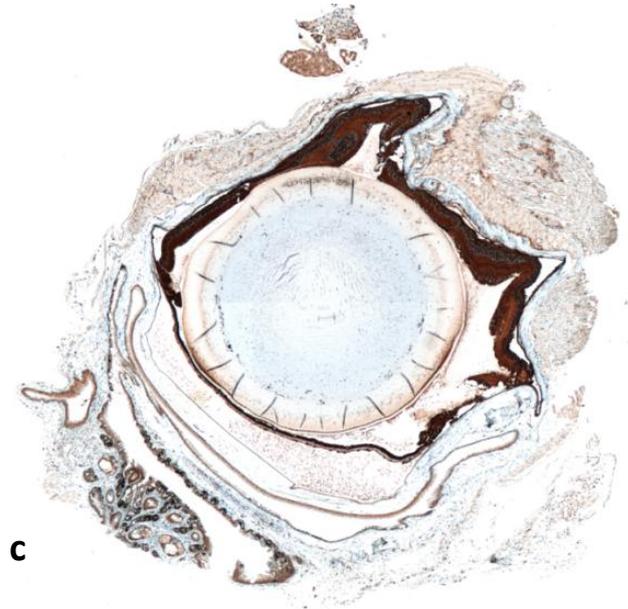
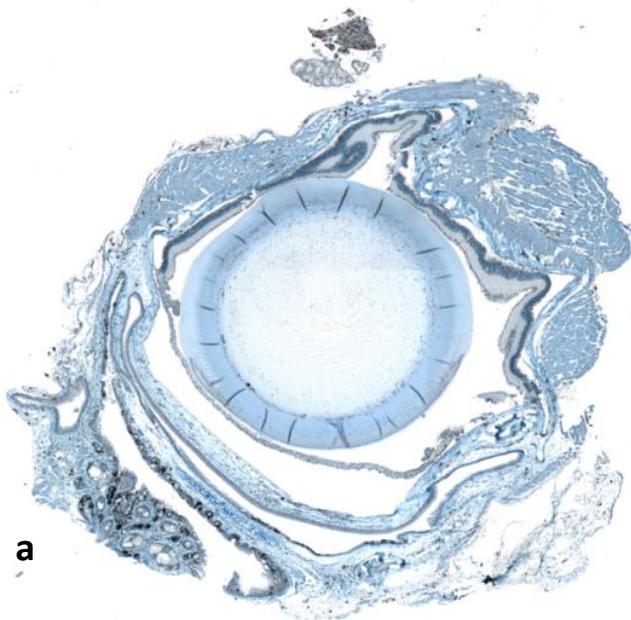


p) **Œil**

Sur les coupes histologiques d'œil, nous avons observé un marquage spécifique de la rétine (figure 35).

Figure 35 : Coupes histologiques d'œil préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage.
- c. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Fort marquage de la rétine.
- d. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Fort marquage de la rétine (feuillets artificiellement décollés).

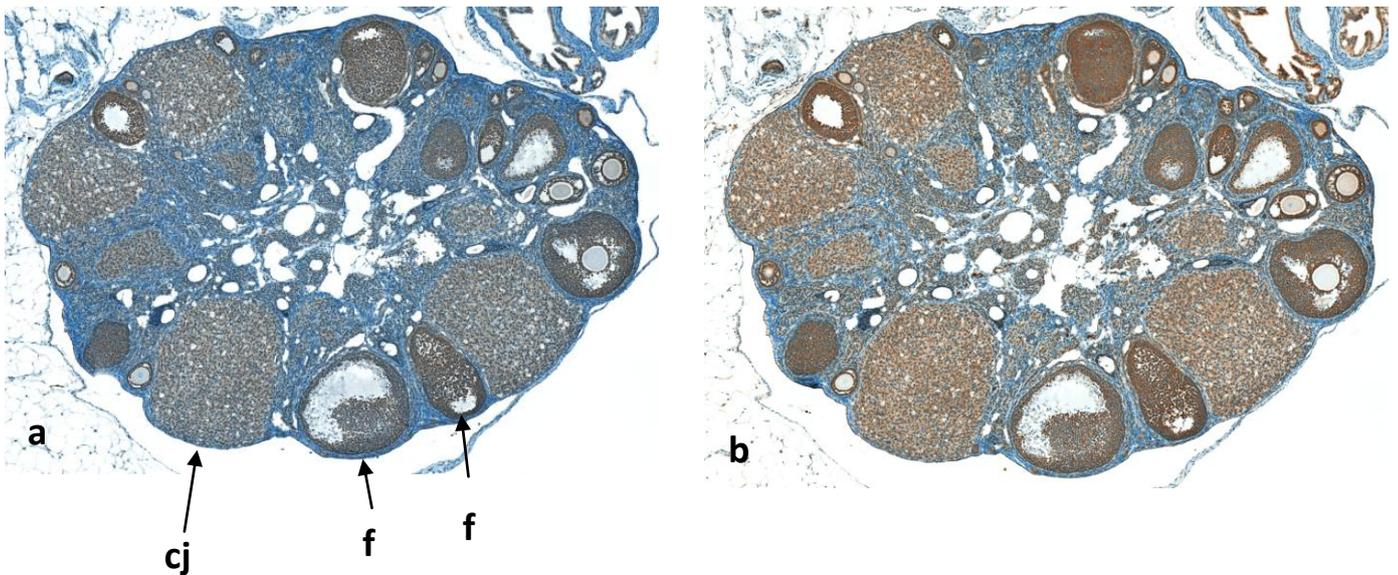


q) **Ovaire**

Nous avons observé sur les coupes histologiques d'ovaire un marquage douteux des follicules (figure 36).

Figure 36 : Coupes histologiques d'ovaire préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond modéré. Discret marquage non spécifique des follicules à divers stades (f) et corps jaunes (cj).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond important. Marquage douteux des follicules (tous stades) et corps jaunes. Pas de marquage du stroma ovarien.



r) **Pancréas**

Sur ces coupes histologiques de pancréas, nous avons observé un marquage non spécifique des îlots de Langerhans (figure 37).

Figure 37 : Coupes histologiques de pancréas préparées par inclusion en paraffine

- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Présence d'un bruit de fond discret. Marquage non spécifique des îlots de Langerhans (flèche).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Présence d'un discret bruit de fond. Marquage non spécifique des îlots de Langerhans (flèche).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Présence d'un bruit de fond discret. Pas de marquage cellulaire.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Présence d'un bruit de fond important. Marquage non spécifique des îlots de Langerhans (flèche).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Présence d'un bruit de fond modéré. Marquage non spécifique des îlots de Langerhans (flèche).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Présence d'un bruit de fond important. Pas de marquage cellulaire.

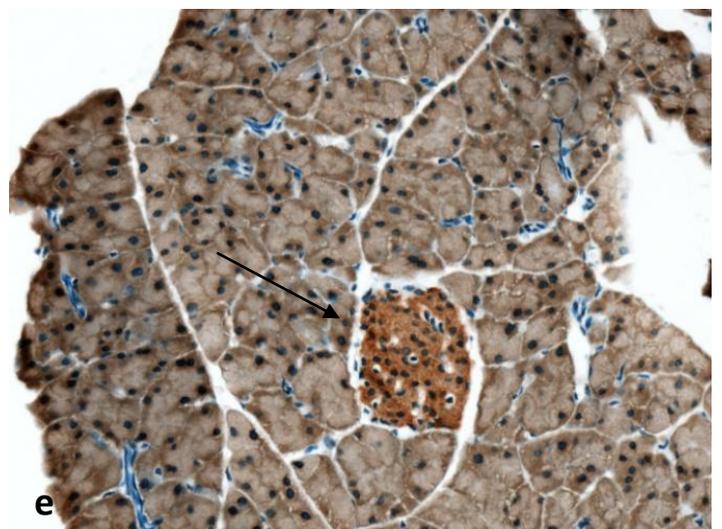
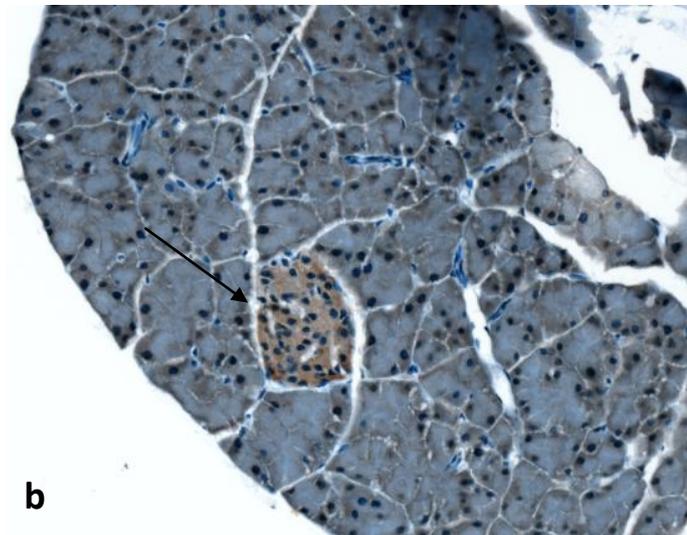
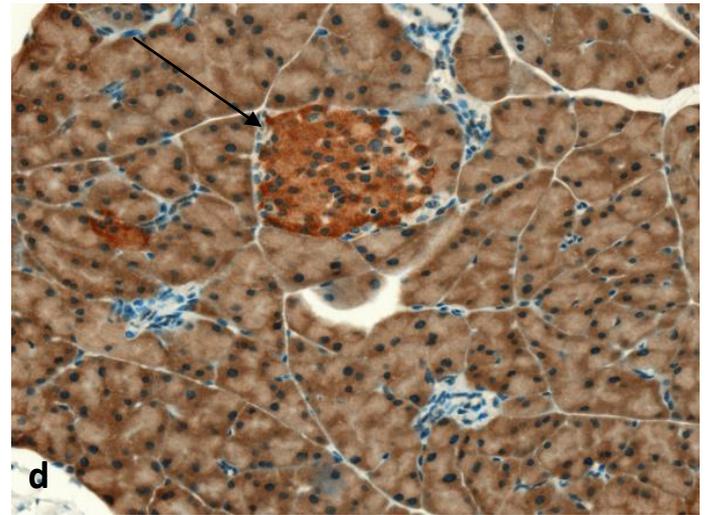
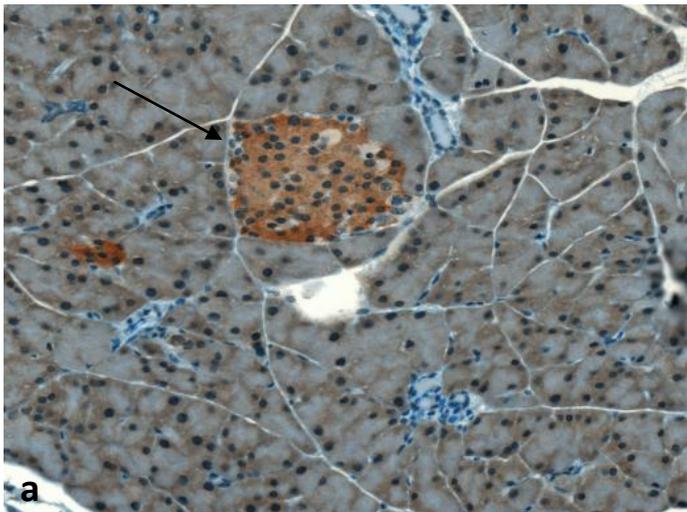
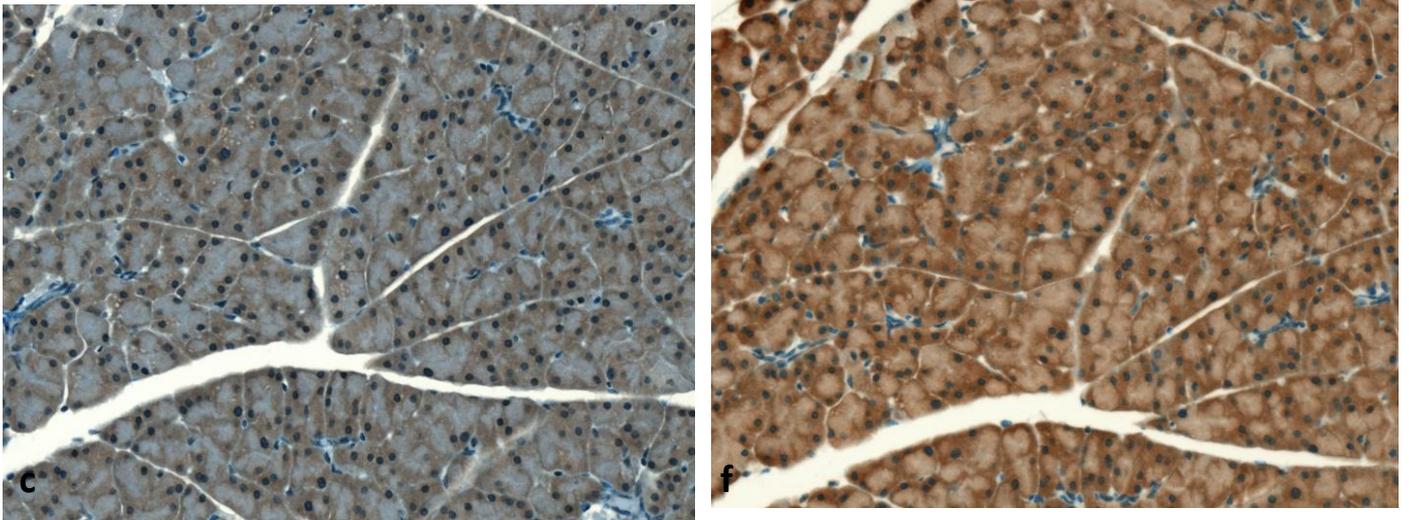


Figure 37 (suite) : Coupes histologiques de pancréas préparées par inclusion en paraffine

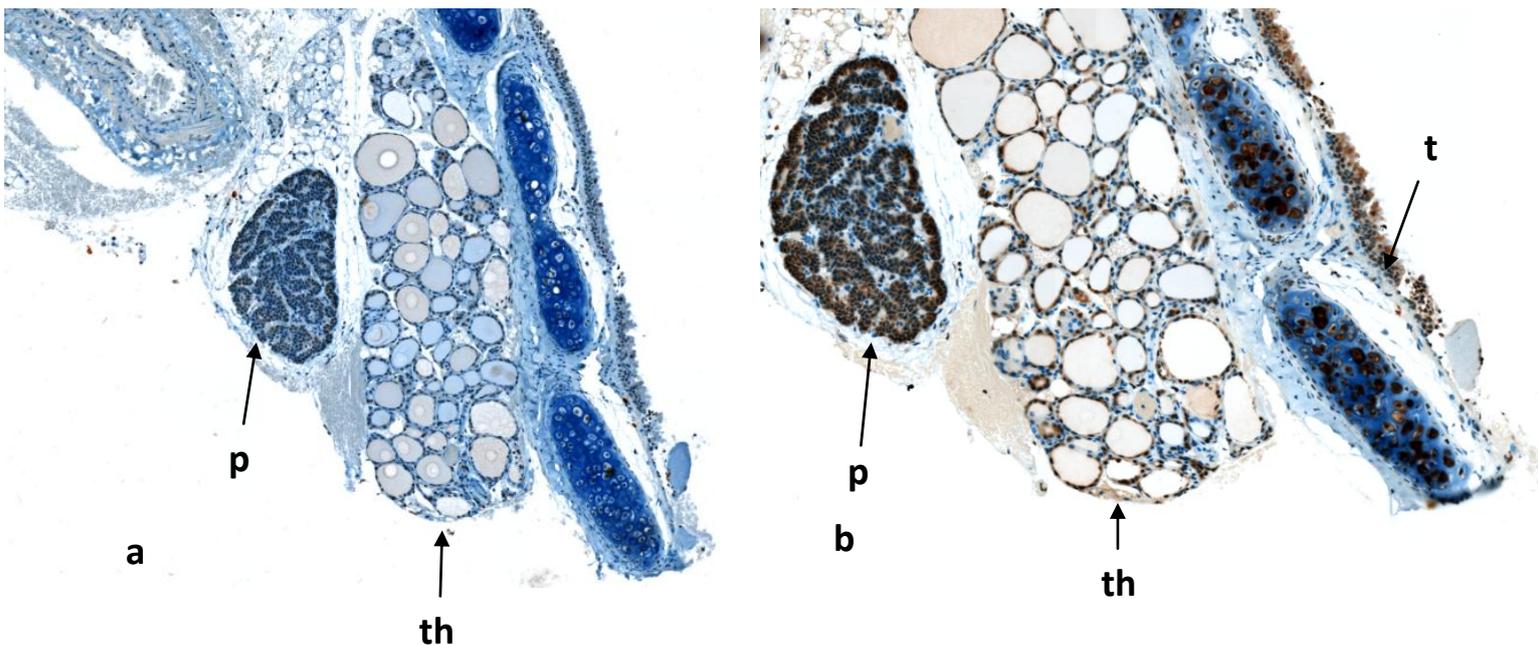


s) **Parathyroïde**

Sur les coupes histologiques de thyroïde, de parathyroïde et de trachée, nous avons observé un marquage spécifique de l'épithélium trachéal, des cellules de la parathyroïde et des thyrocytes (figure 38).

Figure 38 : Coupes histologiques de parathyroïde, thyroïde et trachée préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage dans la thyroïde (th) et la parathyroïde (p).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage important des cellules de la parathyroïde (p), de l'épithélium trachéal (t) et des thyrocytes (th).

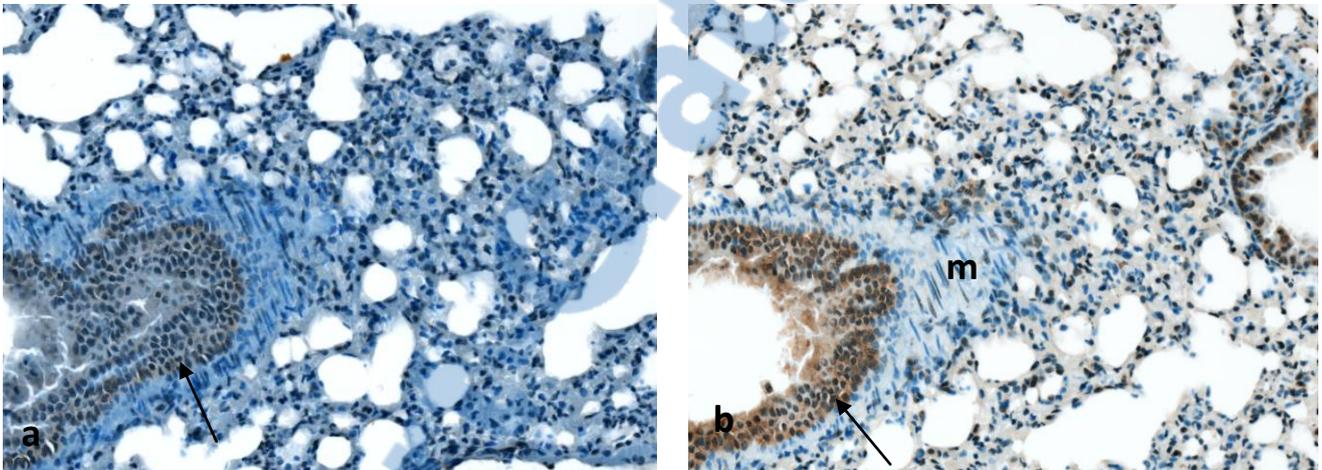


t) **Poumon**

Sur les coupes histologiques de poumon, nous avons observé un marquage douteux de l'épithélium des bronchioles (figure 39).

Figure 39 : Coupes histologiques de poumon préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Discret marquage non spécifique de l'épithélium des bronchioles (flèche).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage douteux de l'épithélium des bronchioles (flèche). Pas de marquage des fibres musculaires lisses (m).

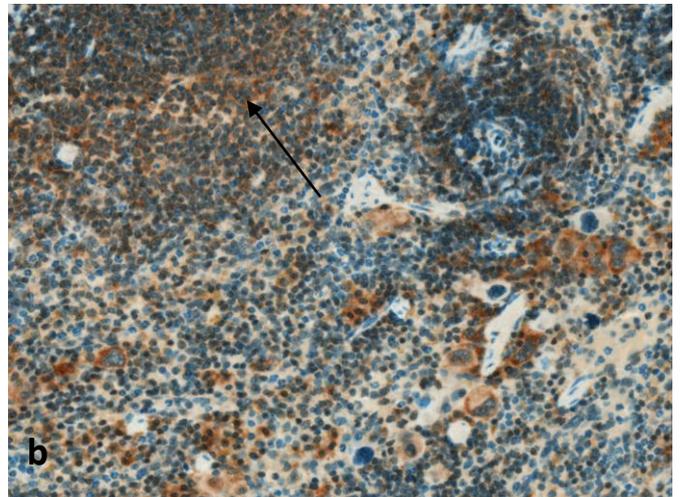
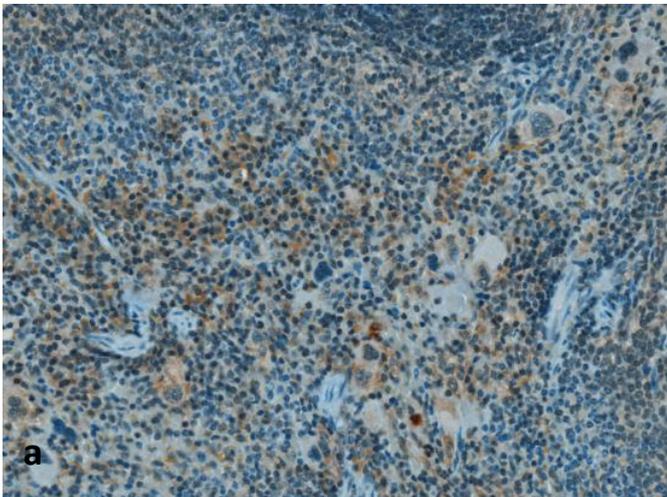


u) **Rate**

Sur les coupes histologiques de rate, nous avons observé un marquage douteux des cellules de la pulpe rouge (figure 40).

Figure 40 : Coupes histologiques de rate préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond modéré. Marquage discrètement plus accentué des cellules de la pulpe rouge (flèche).



v) **Rein**

Sur les coupes histologiques de rein, nous avons observé un marquage spécifique des tubules de la médulla rénale. Les glomérules rénaux ne semblaient pas marqués (figure 41).

Figure 41 : Coupes histologiques de rein préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond modéré.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Pas de marquage cellulaire. Coupe située dans le cortex rénale.
- c. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coupe située dans la médulla rénale. Présence d'un bruit de fond discret.
- d. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage significatif de la médulla rénale (flèche).
- e. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coupe située dans le cortex rénal. Marquage modéré de l'épithélium cubique des tubules rénaux (tr). Les glomérules rénaux (gr) ne sont pas marqués.
- f. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coupe située dans la médulla rénale. Marquage de l'épithélium cubique des tubules rénaux.

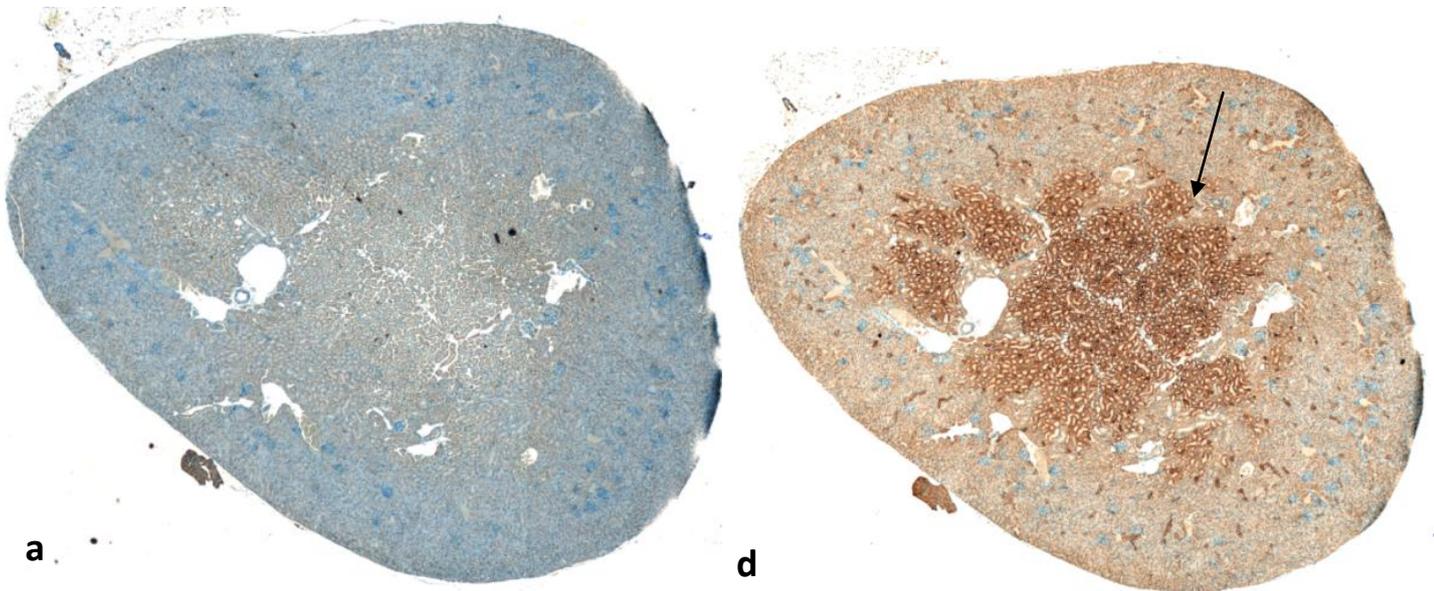
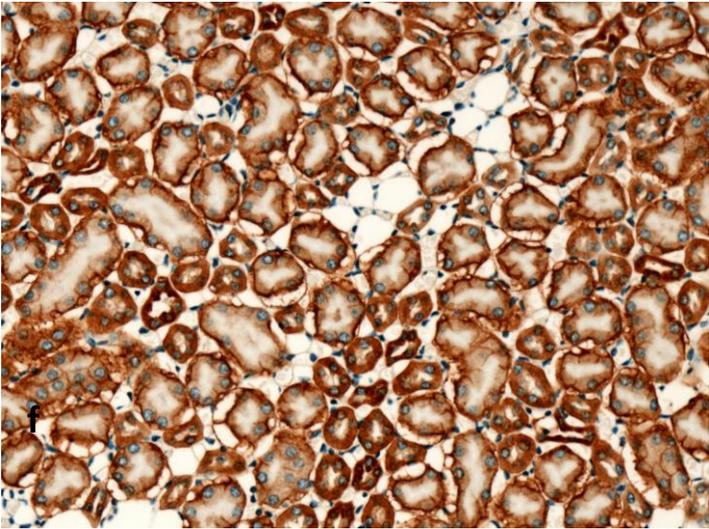
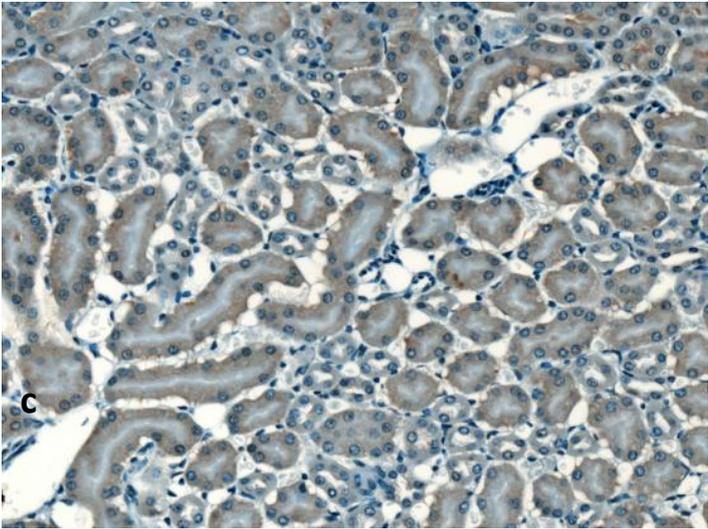
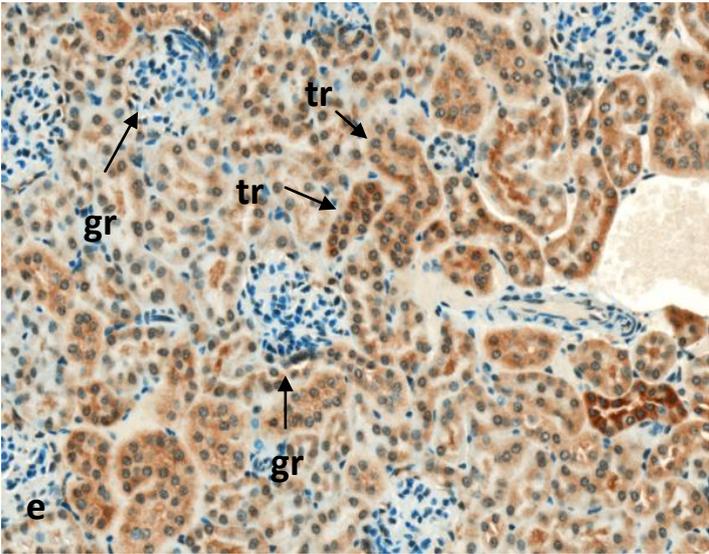
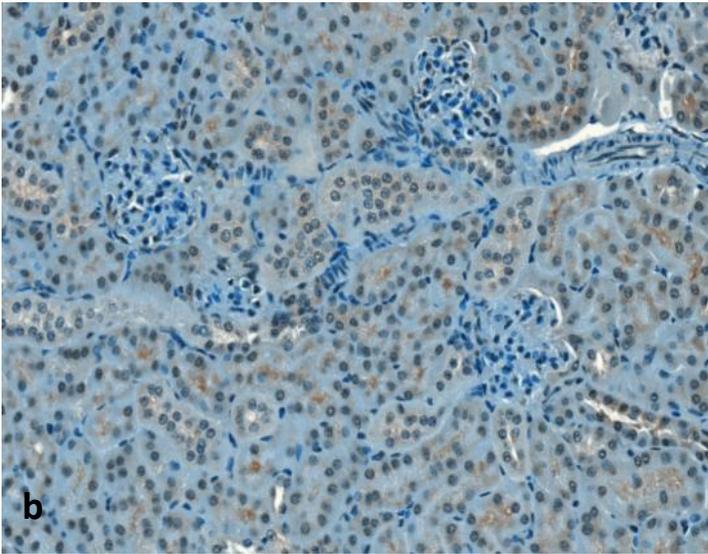


Figure 41 (suite) : Coupes histologiques de rein préparées par inclusion en paraffine



w) **Surrénale**

Sur les coupes histologiques de glande surrénale, nous avons observé un marquage spécifique des cellules de la médullo-surrénale et un marquage douteux des cellules de la zone corticale en périphérie de la zone fasciculée essentiellement (figure 42).

Figure 42 : Coupes histologiques de surrénale préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Peu de bruit de fond. Pas de marquage de tissus
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coupe située dans la médullo-surrénale. Pas de bruit de fond, pas de marquage.
- c. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond, Discret marquage de la corticosurrénale en périphérie de la zone fasciculée (flèche).
- d. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage spécifique de la médulla (m) et douteux de la partie externe du cortex (c) (zone glomérulée essentiellement). En légende (x) représente la zone X.
- e. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage des cellules de la médullo-surrénale.
- f. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage douteux des cellules de la périphérie de la zone fasciculée (flèche).

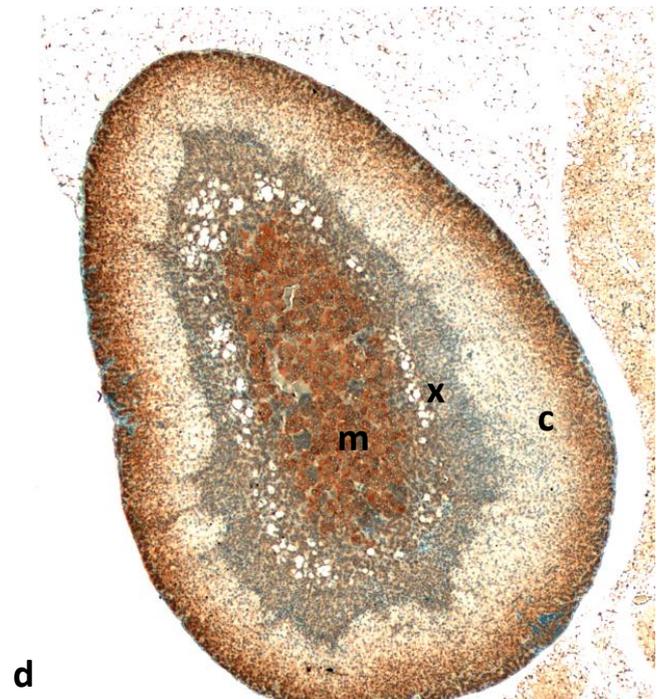
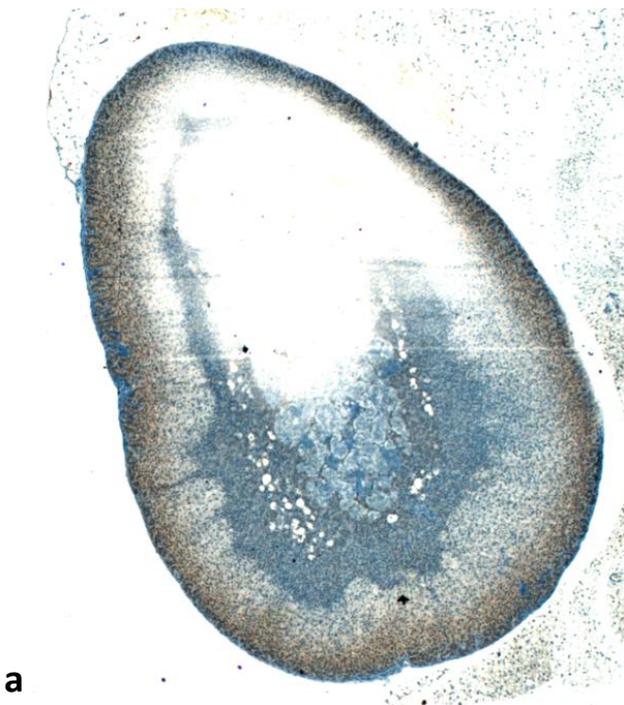
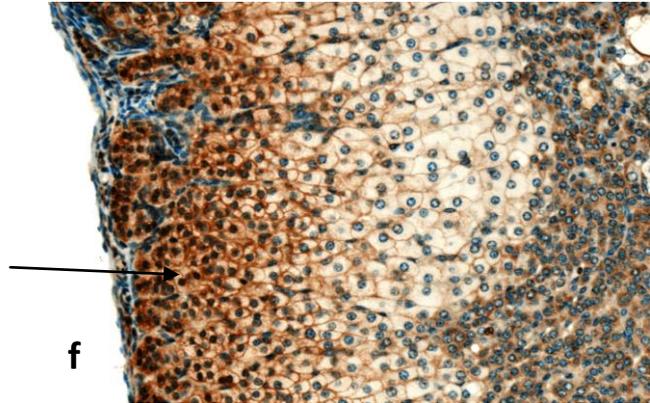
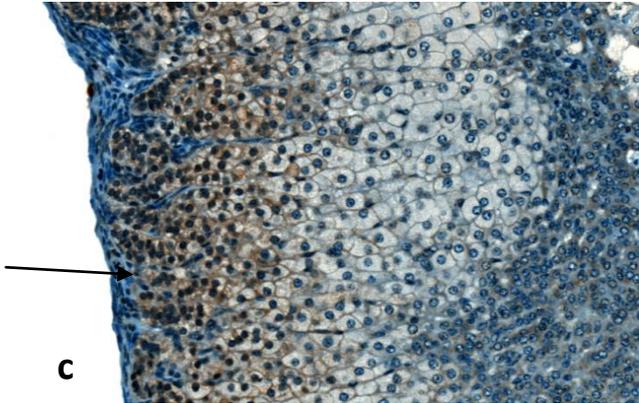
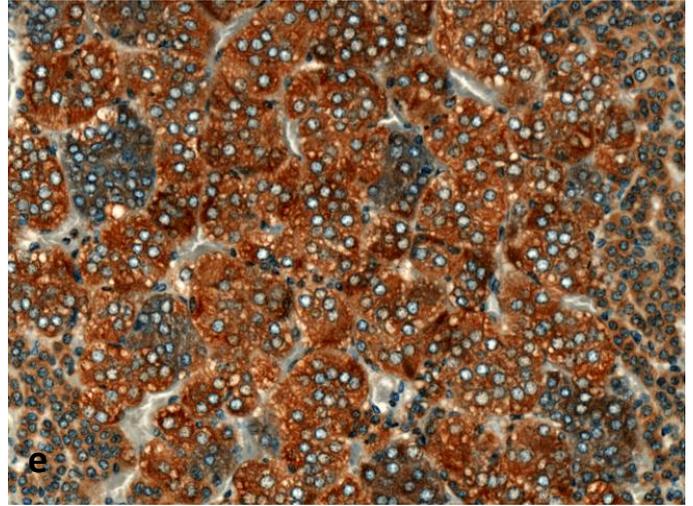
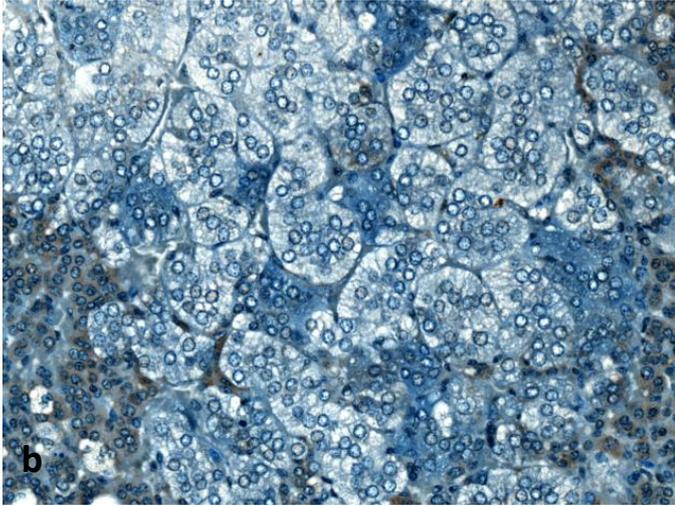


Figure 42 (suite) : Coupes histologiques de surrénale préparées par inclusion en paraffine

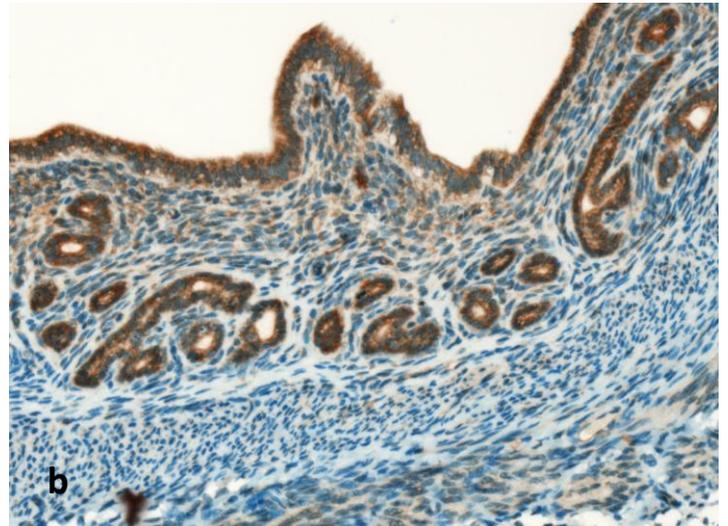
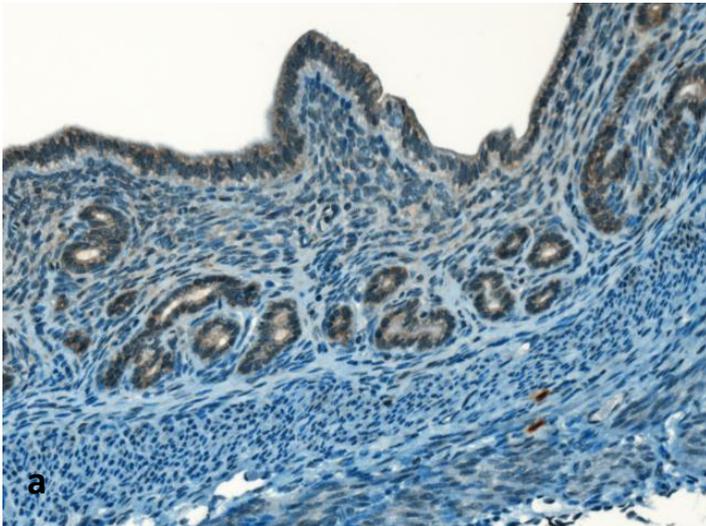


x) **Utérus**

Sur les coupes histologiques d'utérus, nous avons observé un marquage douteux des vaisseaux sanguins et de l'épithélium utérin (figure 43).

Figure 43 : Coupes histologiques d'utérus préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Discret marquage non spécifique des vaisseaux sanguins et de l'épithélium utérin.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond modéré. Marquage douteux des vaisseaux sanguins et de l'épithélium utérin.



2. Prélèvements coupés au cryostat

a) Cervelet

Sur les coupes histologiques de cervelet, nous avons observé un marquage douteux de toutes les couches du cervelet (substance blanche, couche granuleuse et couche moléculaire). Les cellules de Purkinje n'étaient pas marquées. Les endothéliums des vaisseaux étaient marqués de manière spécifique (figure 44).

Figure 44 : Coupes histologiques de cervelet préparées au cryostat

- MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond, pas de marquage.
- MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Pas de bruit de fond. Marquage de l'ensemble du cervelet : substance blanche (sb), substance grise (couche granuleuse (g) et couche moléculaire(m)).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Fort marquage des cellules endothéliales (flèches).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage des cellules endothéliales des vaisseaux (flèches). Les cellules de Purkinje (P) n'étaient pas marquées.

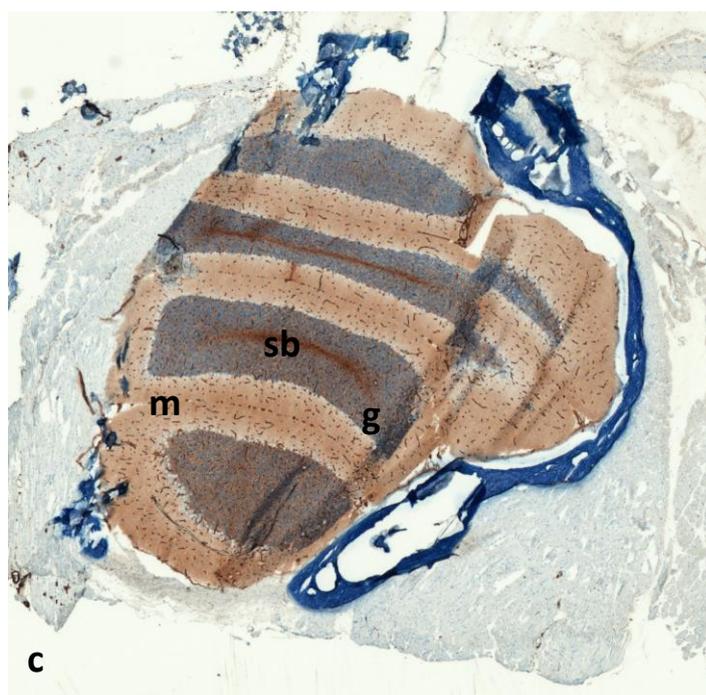
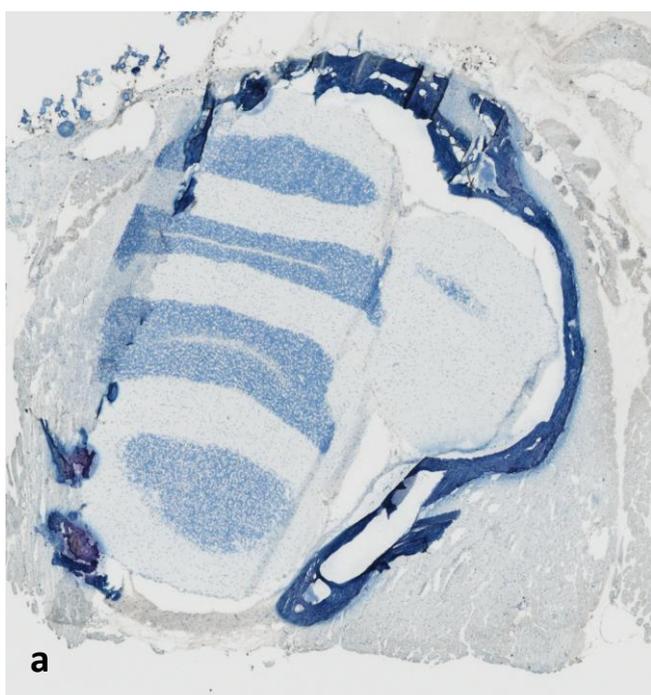
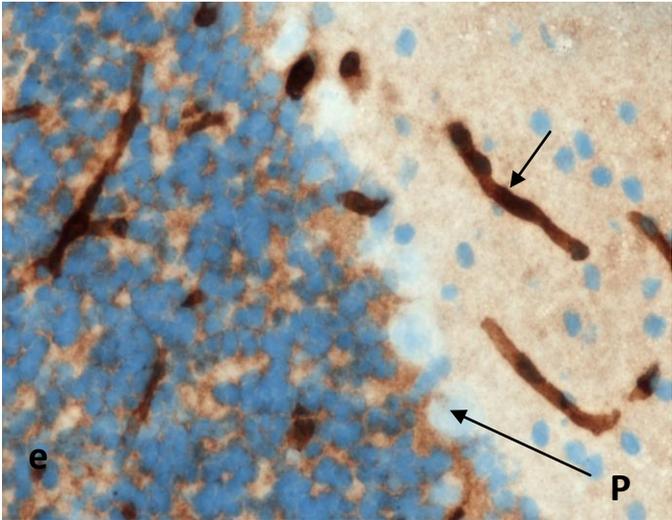
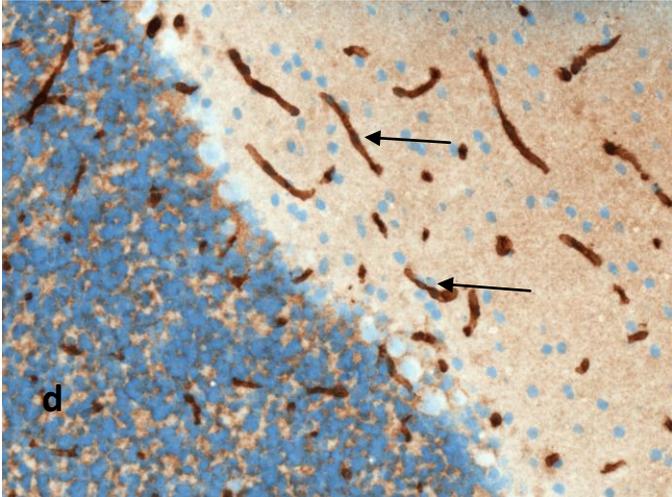
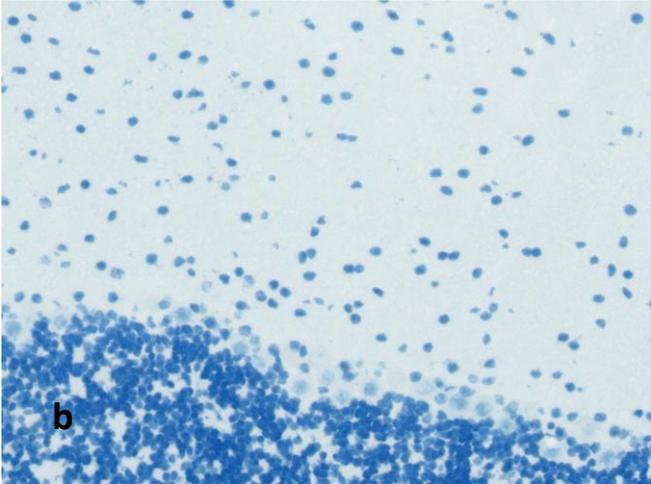


Figure 44 (suite) : Coupes histologiques de cervelet préparées au cryostat

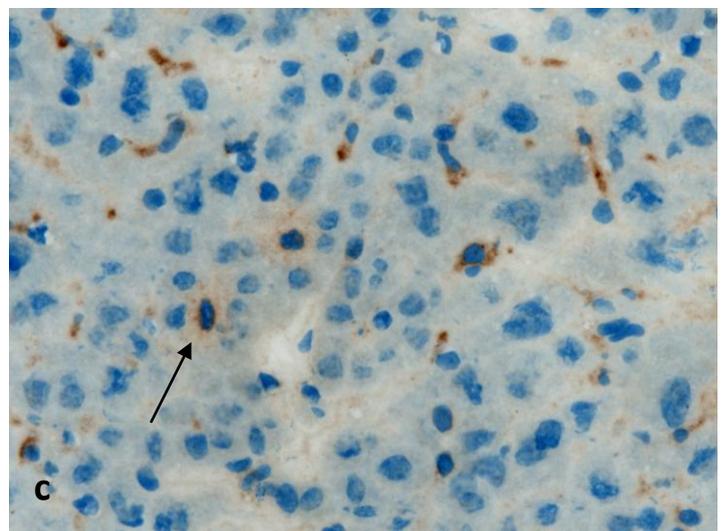
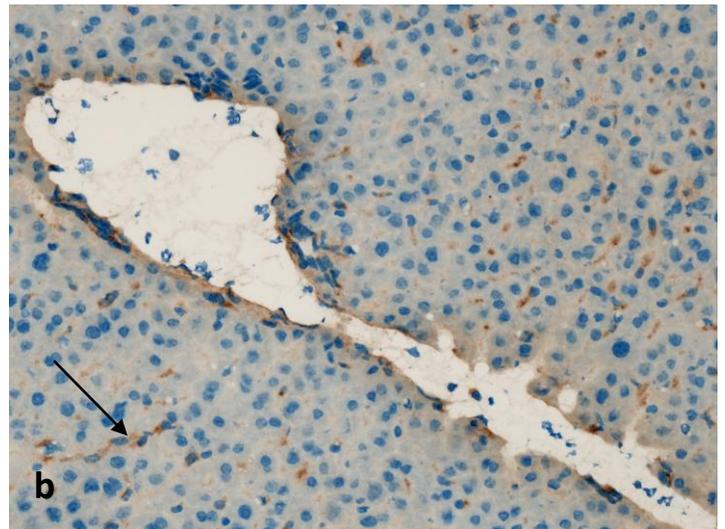
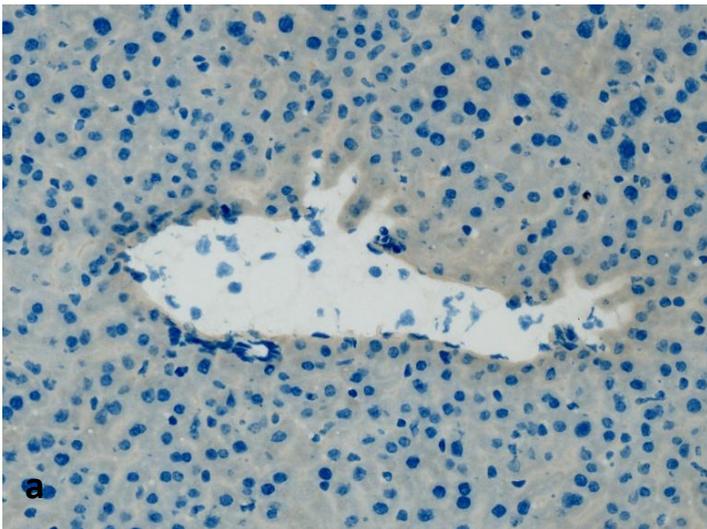


b) **Foie**

Sur les coupes histologiques de foie, nous n'avons pas observé de marquage spécifique (figure 45).

Figure 45 : Coupes histologiques de foie préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage discret de l'endothélium des vaisseaux (flèche).
- c. MOX40. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Discret marquage de certaines cellules (cellules endothéliales et/ou cellules de Kupffer, flèche).

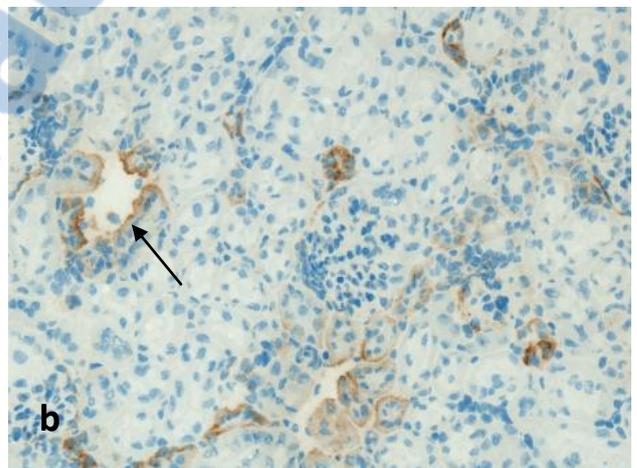
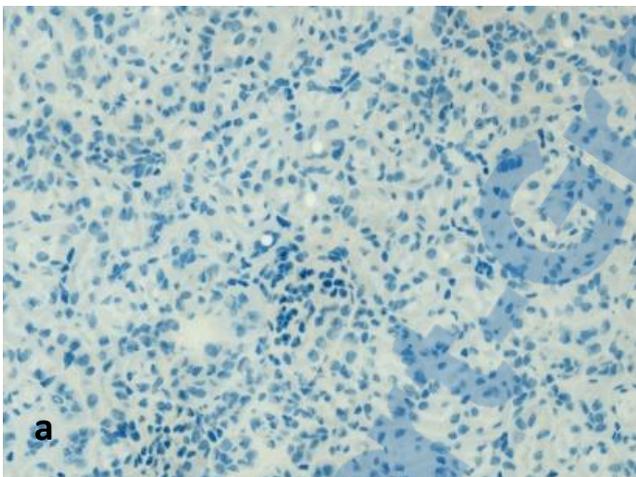


c) **Rein**

Sur les coupes histologiques de rein, nous avons observé un marquage spécifique de l'épithélium de certains néphrons (figure 46).

Figure 46 : Coupes histologiques de rein préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage de quelques certains tubules (flèche).

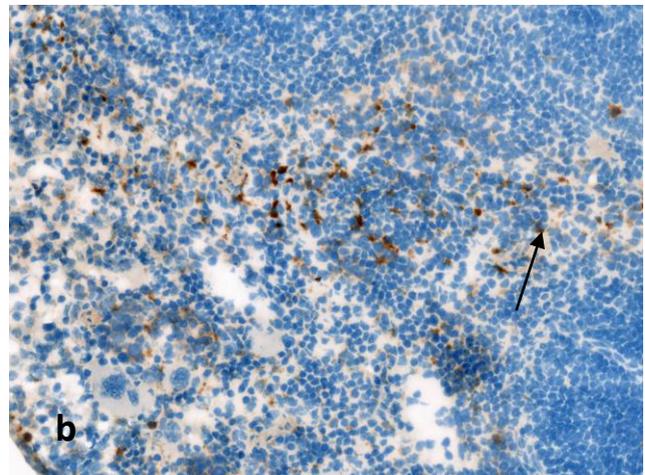
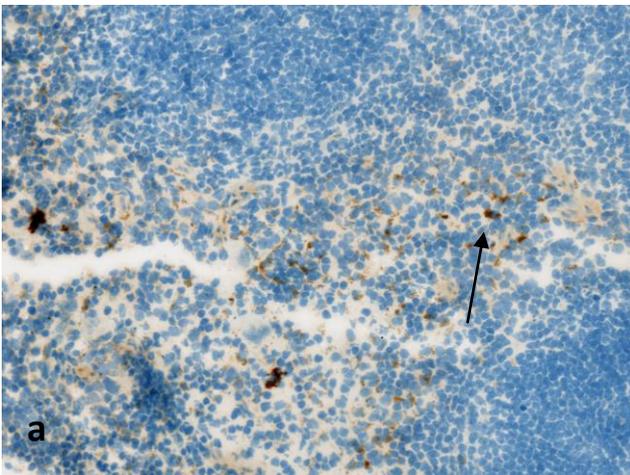


d) **Rate**

Sur les coupes histologiques de rate, nous n'avons pas observé de marquage spécifique (figure 47).

Figure 47 : Coupes histologiques de rate préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Marquage non spécifique de cellules de la pulpe rouge (flèche).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage non spécifique de cellules de la pulpe rouge (flèche).

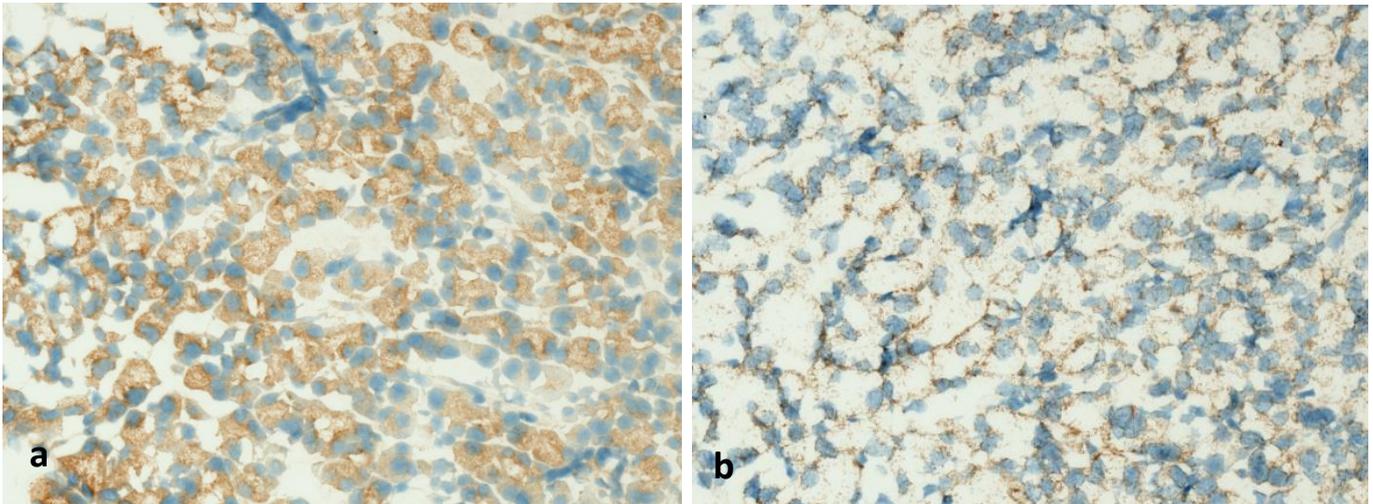


e) **Pancréas**

Dans le pancréas, le contrôle isotypique de lapin présentait un marquage non spécifique trop important, ces coupes histologiques n'étaient pas interprétables (figure 48).

Figure 48 : Coupes histologiques de pancréas préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Bruit de fond important. Pas de marquage interprétable.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Bruit de fond important. Pas de marquage interprétable.

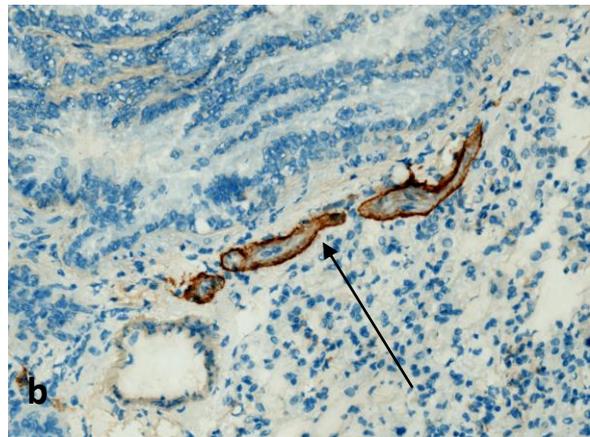
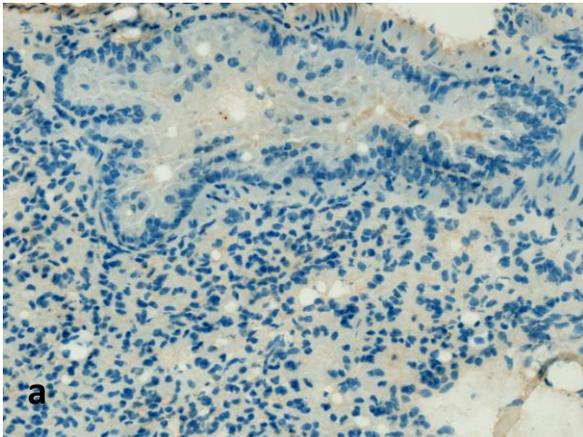


f) **Poumon**

Sur les coupes histologiques de poumon, nous avons observé un marquage spécifique périneural uniquement (figure 49).

Figure 49 : Coupes histologiques de poumon préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage périneural (flèche).

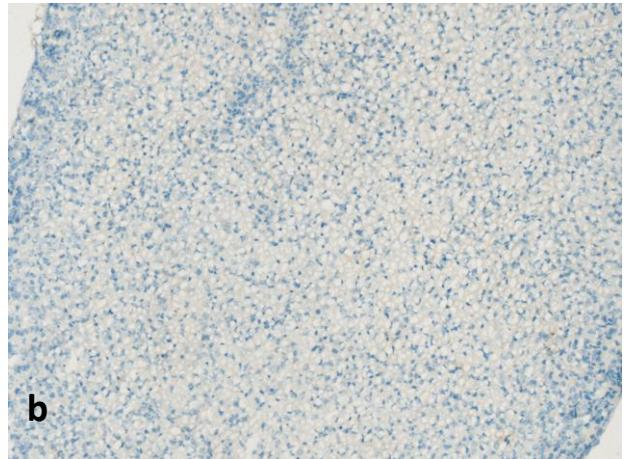
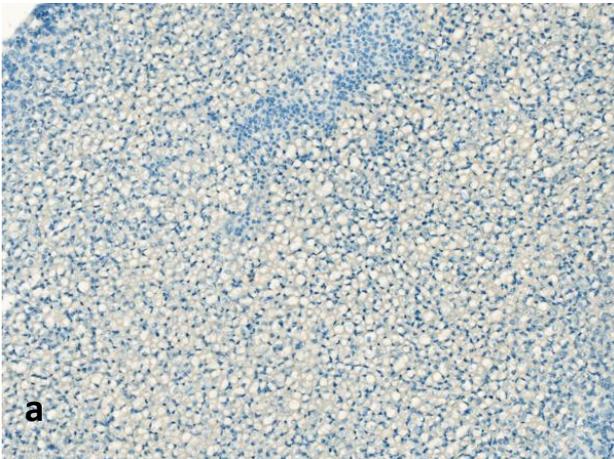


g) **Surrénale**

Sur les coupes histologiques de glande surrénale, nous n'avons pas observé de marquage spécifique (figure 50). Cependant, la médullo-surrénale n'était pas présente sur ces coupes.

.Figure 50 : Coupes histologiques de surrénale préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coupe située dans la cortico-surrénale. Pas de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coupe située dans la cortico-surrénale. Pas de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.

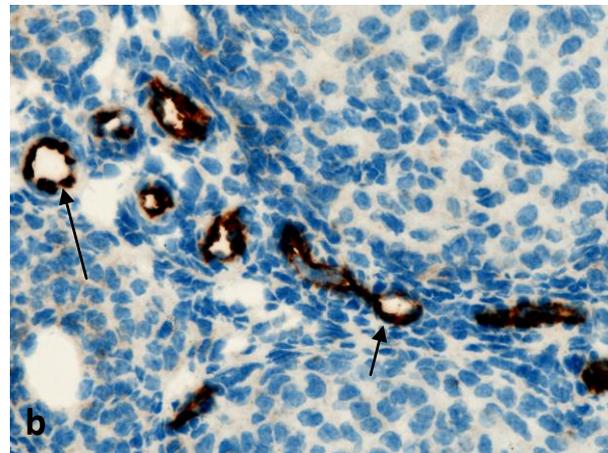
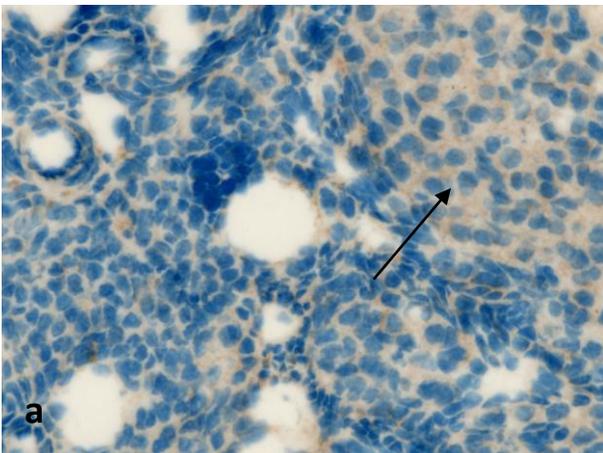


h) Ovaire

Sur les coupes histologiques d'ovaire, nous avons observé un marquage spécifique de l'endothélium de certains vaisseaux (figure 51).

Figure 51 : Coupes histologiques d'ovaire préparées au cryostat

- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret de bruit de fond. Coloration diffuse de la matrice du corps jaune (flèches).
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Coloration de l'endothélium de certains vaisseaux (flèches).

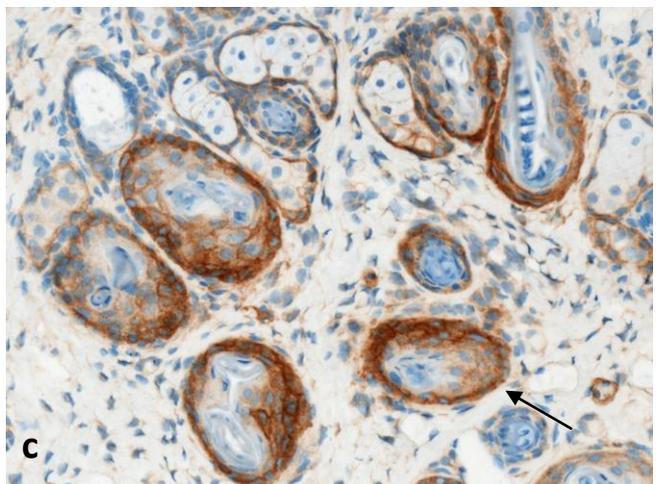
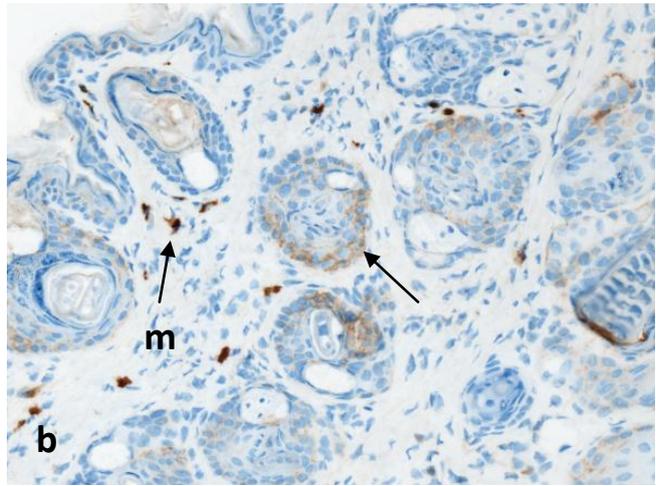
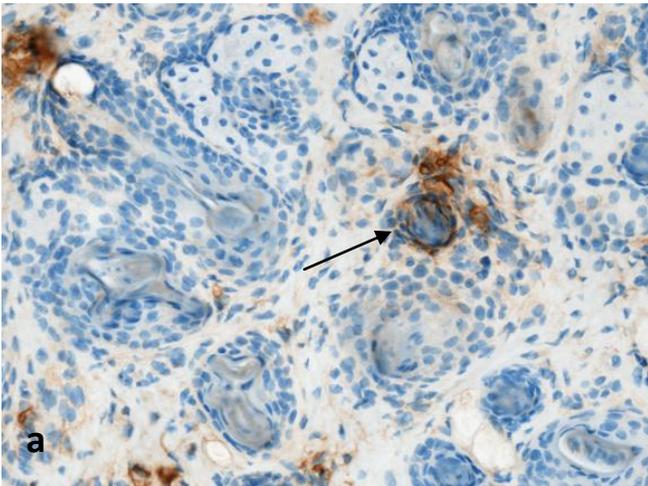


i) **Peau du flanc**

Sur les coupes histologiques de peau du flanc, nous avons observé un marquage (douteux) des cellules de la base des bulbes pileux (figure 52).

Figure 52 : Coupes histologiques de peau du flanc préparées au cryostat

- a. MOX10. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Marquage non spécifique des cellules de la base d'un bulbe pileux (flèche).
- b. MOX10. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Pas de bruit de fond. Discret marquage des cellules à la base des bulbes pileux (flèche). Mélanocytes (m) présents.
- c. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage des cellules à la base des bulbes pileux (flèche).

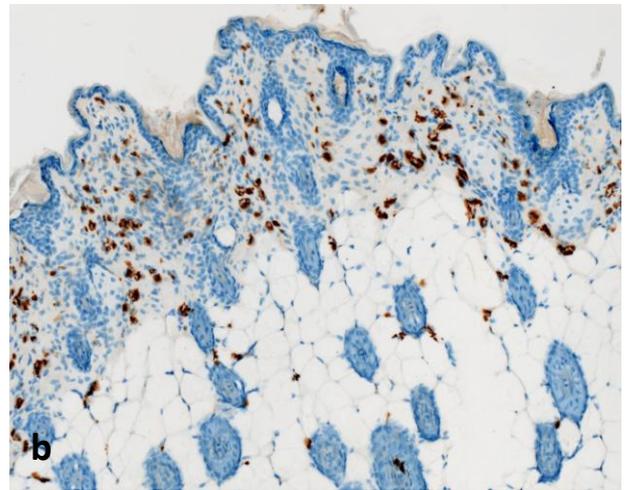
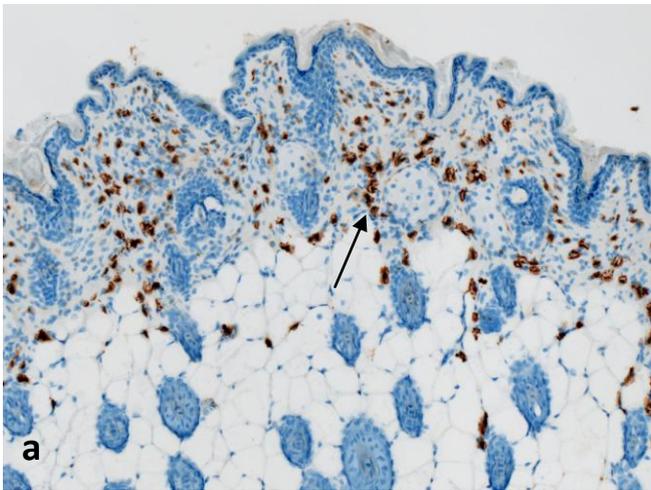


j) **Peau interscapulaire**

Sur les coupes histologiques de peau du flanc, nous avons observé un marquage non spécifique des mélanocytes (figure 53).

Figure 53 : Coupes histologiques de peau interscapulaire préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Coloration des mélanocytes (flèche).
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Pas de bruit de fond. Coloration des mélanocytes.

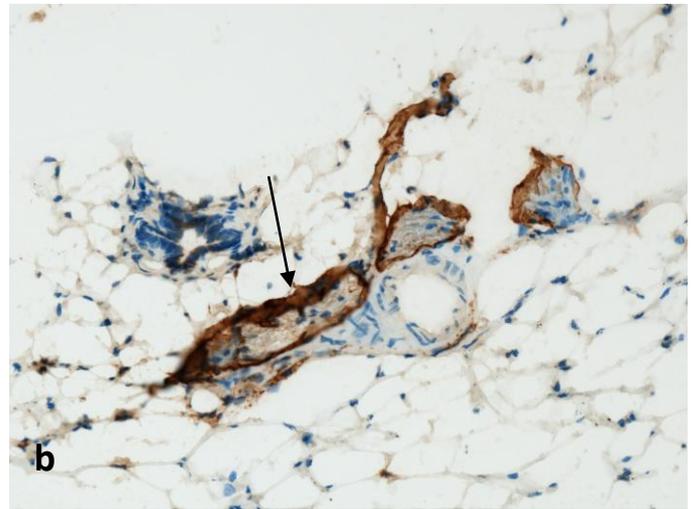
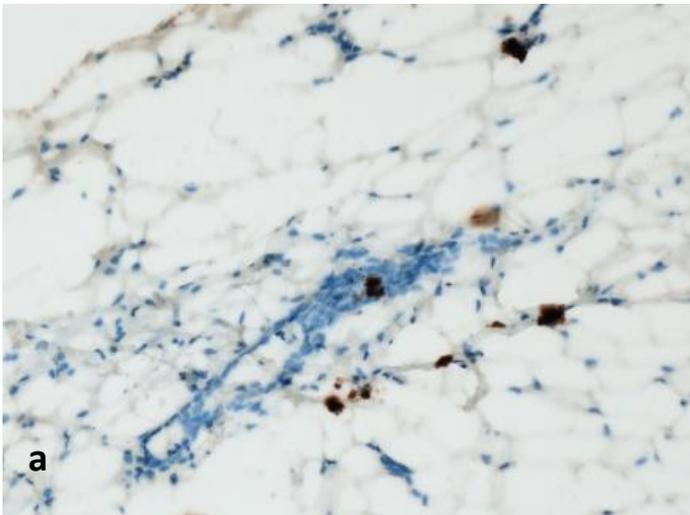


k) **Glande mammaire**

Sur ces coupes histologiques de glande mammaire, nous avons observé un marquage périneural spécifique et pas d'autre marquage spécifique (figure 54)

Figure 54 : Coupes histologiques de glande mammaire préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Pas de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage périneural (flèche).

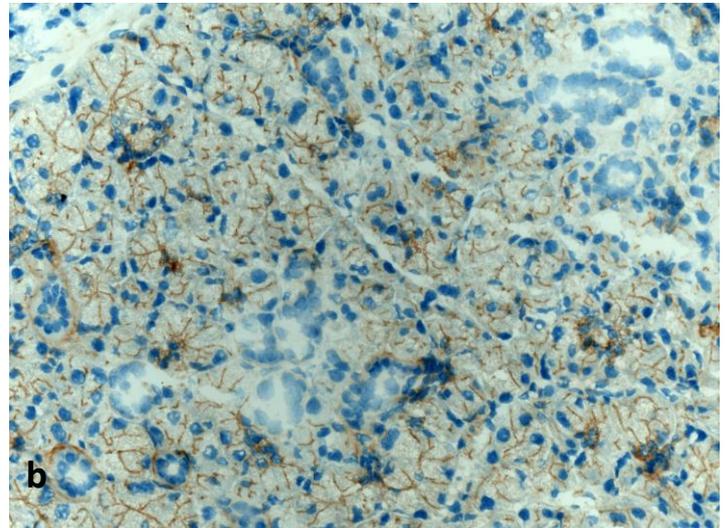
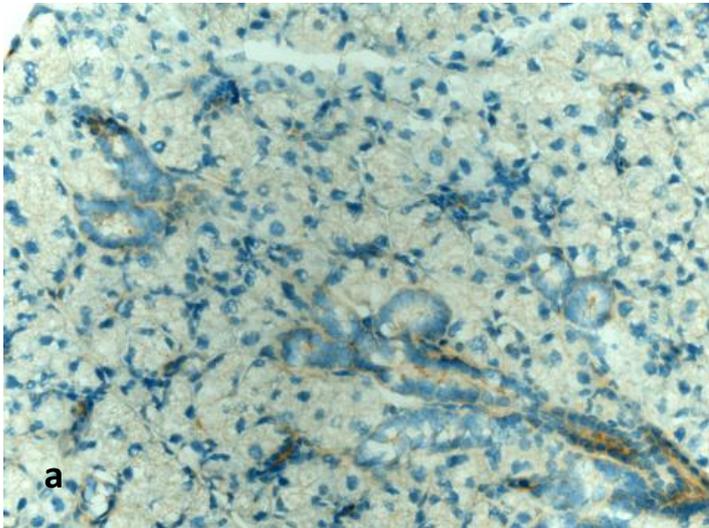


1) **Glande mandibulaire**

Sur ces coupes histologiques de glande mandibulaire, nous avons observé un marquage qui semble spécifique des membranes des cellules acineuses (figure 55).

Figure 55 : Coupes histologiques de glande mandibulaire préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage des cellules acineuses. Marquage uniquement membranaire.

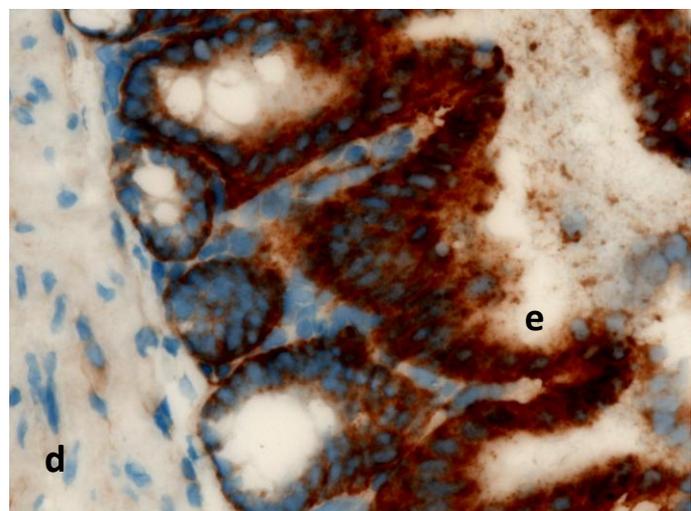
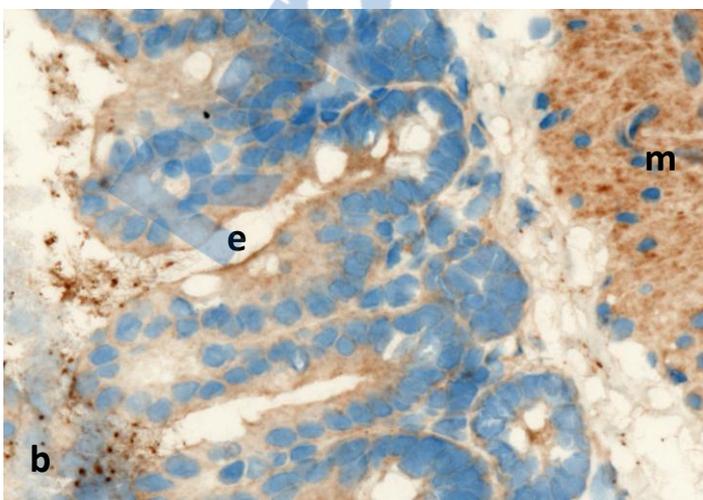
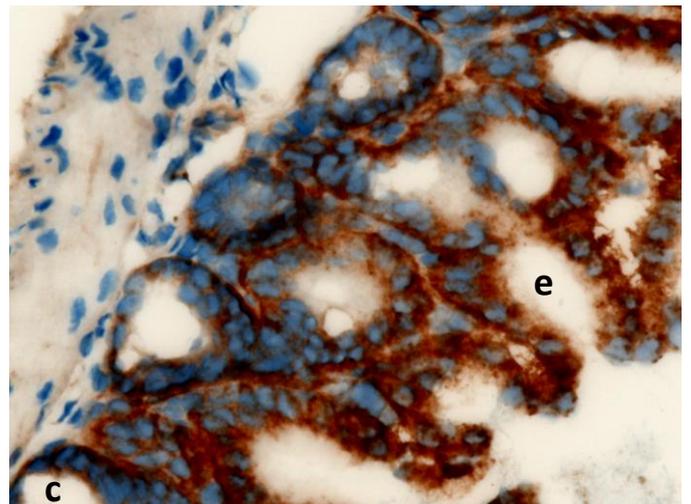
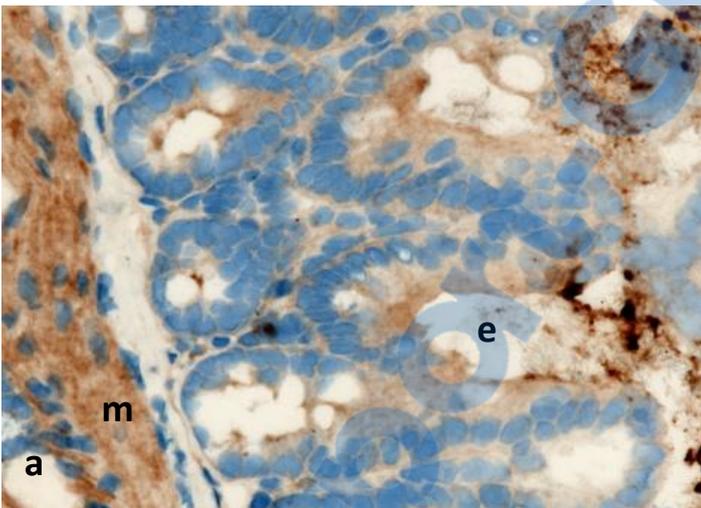


m) **Cæcum**

Sur les coupes histologiques de cæcum, nous avons observé un marquage spécifique de l'épithélium glandulaire (figure 56).

Figure 56 : Coupes histologiques de cæcum préparées au cryostat

- MOX40. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Discret marquage non spécifique de la musculature (m) et de l'épithélium glandulaire (e).
- MOX40. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Discret marquage non spécifique de la musculature (m) et l'épithélium glandulaire (e).
- MOX40. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage de l'épithélium glandulaire (e).
- MOX40. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Marquage l'épithélium des glandulaire (e).

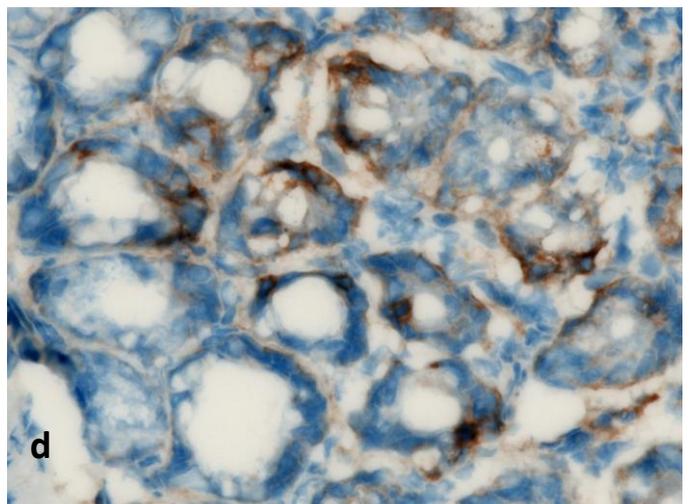
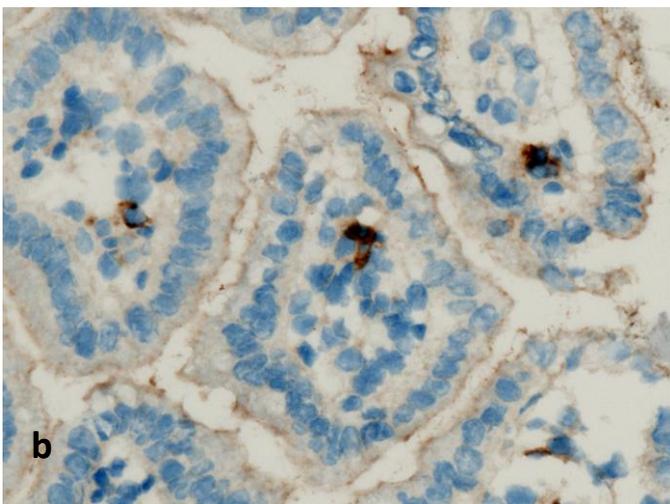
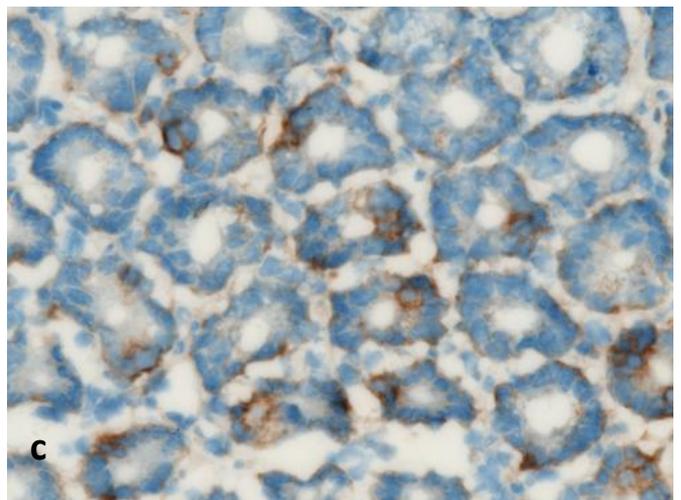
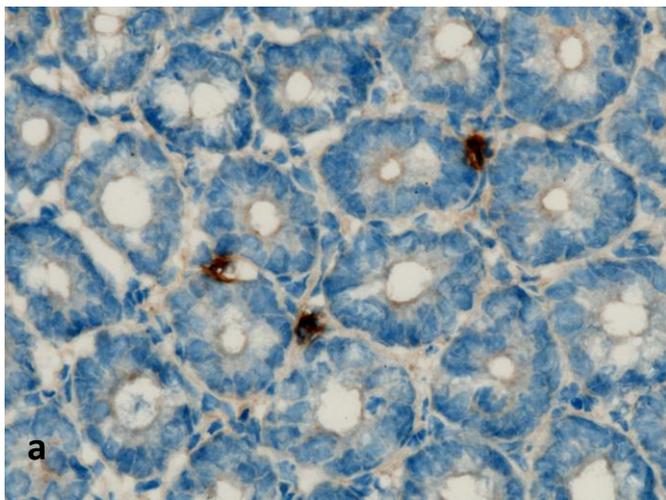


n) **Iléon**

Sur les coupes histologiques d'iléon, nous n'avons pas observé de marquage spécifique (figure 57).

Figure 57 : Coupes histologiques d'iléon préparées au cryostat

- a. MOX40. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Marquage non spécifique de quelques cellules du stroma (macrophages).
- b. MOX40. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Marquage non spécifique de quelques cellules du stroma (macrophages).
- c. MOX40. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- d. MOX40. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Pas de marquage spécifique.

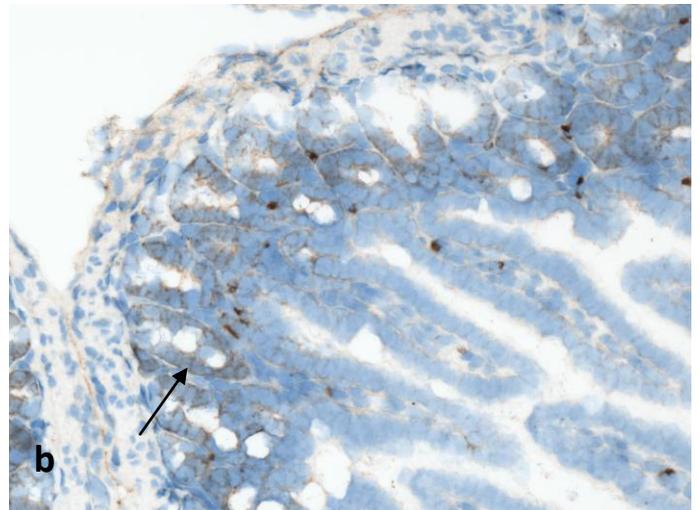
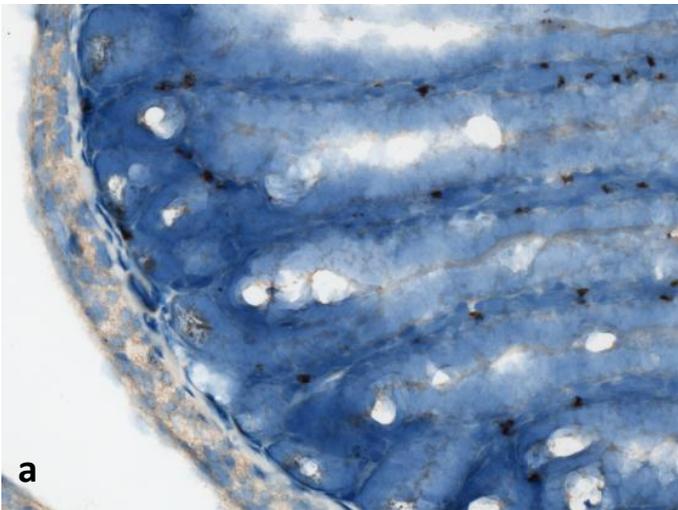


o) **Jéjunum**

Sur les coupes histologiques de jéjunum, nous n'avons pas observé de marquage spécifique (figure 58).

Figure 58 : Coupes histologiques de jéjunum préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Discret bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Discret bruit de fond. Discret marquage des cellules intestinales à la base des villosités (flèche).



C. Résultats obtenus par les deux techniques de marquage

Les résultats obtenus ont été classés en trois catégories (tableau 3 et 4).

Dans la première catégorie, « **pas de marquage spécifique** », ont été classés les tissus pour lesquels aucun marquage avec l'anticorps anti-GLUT1 n'a été constaté ou pour lesquels le marquage par le contrôle isotypique s'est montré positif.

Dans la seconde catégorie, « **marquage douteux** », ont été classés les tissus pour lesquels un marquage discret a été constaté avec l'anticorps anti-GLUT1 (trop discret pour affirmer avec certitude la présence d'un réel marquage anti-GLUT1) ou pour lesquels le marquage anti GLUT1 constaté ne semblait pas être membranaire.

Dans la troisième catégorie, « **marquage spécifique** », ont été classés les tissus sur lesquels un fort marquage membranaire avec l'anticorps anti-GLUT1 a été observé.

Les résultats pour certains tissus présentés dans les tableaux 3 et 4 ne sont pas illustrés par des photographies dans la précédente partie du document.

Tableau 3 : Résultats obtenus pour les lames préparées en paraffine

** signifie que les gaines périneurales sont marquées*

*** signifie que les endothéliums vasculaires sont marqués*

Tissu d'origine	Pas de marquage spécifique	Marquage douteux	Marquage spécifique
Artère			Marquage de l'endothélium vasculaire (intima et media)
Cerveau			Epithélium de l'épendyme **
Cervelet	Marquage aspécifique : Cellules de Purkinje	Tout le tissu cérébelleux	
Cœur	Pas de marquage spécifique		
Colon		Epithélium colique	
Duodénum		Epithélium des cryptes et des villosités	
Estomac (zone malpighienne)			Epithélium muqueux

Tableau 3 (suite) : Résultats obtenus pour les lames préparées en paraffine

Estomac (zone fundique)		Epithélium du fond des glandes fundiques	
Foie	Marquage aspécifique : Hépatocytes		
Glande lacrymale	Pas de marquage spécifique	**	
Glande mammaire	Pas de marquage spécifique		
Glande salivaire	Pas de marquage spécifique		
Hypophyse			Cellules adénohypophysaires
Jéjunum		Epithélium des villosités et des cryptes	
Muscle	Pas de marquage spécifique		
Nerf			*
Nœud lymphatique	Pas de marquage spécifique		**
Œil			Cellules de la rétine
Œsophage			Epithélium malpighien et assise basale
Ovaire	Marquage aspécifique : Follicules et corps jaunes		**
Pancréas	Marquage aspécifique : îlots de Langherans		
Parathyroïde			Oui (cellules claires et sombres plus que cellules oxyphiles)
Poumon		Epithélium des bronchioles	
Rate		Cellules de la pulpe rouge	

Tableau 3 (suite) : Résultats obtenus pour les lames préparées en paraffine

Rein			Tubules marqués (marquage plus fort dans la médullaire rénale). Les glomérules rénaux n'étaient pas marqués.
Sang souris	Pas de marquage spécifique		
Surrénales			Médullo-surrénale et des cellules de la zone corticale (fasciculée essentiellement)
Thyroïde			Thyréocytes
Utérus		Follicules et corps jaunes	

Tableau 4 : Résultats obtenus pour les lames préparées au cryostat

* signifie que les gaines périneurales sont marquées

** signifie que les endothéliums vasculaires sont marqués

Tissu d'origine	Pas de marquage spécifique	Marquage douteux	Marquage spécifique
Cæcum			Epithélium glandulaire
Cervelet		Toutes les couches du cervelet (substance blanche, zone granulaire, zone moléculaire) mais pas les cellules de Purkinje	**
Diaphragme	Pas de marquage spécifique		*
Foie	Pas de marquage spécifique		
Glande lacrymale	Pas de marquage spécifique		*
Glande mammaire	Pas de marquage spécifique		
Glande mandibulaire			Acini séreux
Iléon	Pas de marquage spécifique		
Jéjunum	Pas de marquage spécifique		
Langue	Pas de marquage spécifique		*
Muscle strié	Pas de marquage spécifique		
Nerf sciatique			*
Nœud lymphatique mésentérique	Pas de marquage spécifique		
Ovaire	Pas de marquage spécifique		**
Pancréas	Pas de marquage spécifique		

Tableau 4 (suite) : Résultats obtenus pour les lames préparées au cryostat

* signifie que les gaines périneurales sont marquées

** signifie que les endothéliums vasculaires sont marqués

Peau du flanc		Base des bulbes pileux	
Peau interscapulaire	Pas de marquage spécifique		
Poumon	Pas de marquage spécifique du tissu pulmonaire		*
Rate	Pas de marquage spécifique		
Rectum	Pas de marquage spécifique		
Rein			Epithélium cubique de certains néphrons
Sang humain			Erythrocytes
Surrénale	Pas de marquage spécifique		
Urètre	Pas de marquage spécifique		

D. Comparaison des deux techniques de préparation et discussion

Les résultats obtenus avec les deux techniques de préparation sont récapitulés dans le tableau 5 ainsi que les données de la littérature scientifique sur la présence de GLUT-1 dans les tissus considérés (lorsque disponibles, cf. première partie de ce document).

Tableau 5 : Comparaison des résultats obtenus et des données de la littérature

Tissu d'origine	Données issues de la littérature concernant la présence de GLUT-1 dans les tissus murins considérés	Marquage avec la préparation en paraffine	Marquage avec la préparation au cryostat
Cæcum	Présence de GLUT-1 [31] [42]	Non analysé	Epithélium glandulaire
Cerveau	Présence abondante : Microvaisseaux, plexus choroïdes et astroglie [28] [31]	Epithélium de l'épendyme, cellules endothéliales.	Non analysé
Cervelet	Absence de données	Toutes les couches du cervelet mais pas les cellules de Purkinje (marquage douteux)	Tout le tissu cérébelleux (en particulier la zone grise) (marquage douteux)
Duodénum	Absence de GLUT-1	Pas de marquage spécifique	Pas de marquage spécifique
Estomac	Présence de GLUT-1 [31] [42]	Marquage de l'épithélium malpighien	Non analysé
Glande mammaire	Présence discrète de GLUT-1 (accentuée lors de tumeur mammaire) [14]	Non analysé	Pas de marquage spécifique
Gros intestin	Présence de GLUT-1 (surface et partie supérieures des cryptes) [31] [42]	Marquage de l'épithélium colique	Non analysé
Hypophyse	Absence de données	Oui (cellules adénohypophysaires)	Non analysé
Œil	Absence de données	Cellules de la rétine	Non analysé

Tableau 5 (suite) : Comparaison des résultats obtenus et des données de la littérature

Parathyroïde	Absence de données	Oui	Non analysé
Rein	Absence de données	Néphrons marqués à l'exception des tubes contournés proximaux et des glomérules Tubes collecteurs marqués	Epithélium cubique de certains néphrons
Sang souris	GLUT-1 absent ^[24]	Pas de marquage	Pas de marquage
Surrénales	Absence de données	Médullo-surrénale et des cellules de la zone corticale (fasciculée essentiellement)	Absence de marquage spécifique. La médullo-surrénale n'a pas été analysée à cette dilution.
Thyroïde	Absence de données	Thyréocytes	Non analysé

Conclusion de la première série d'immunomarquages :

Cette première série d'immunomarquages, effectuée selon les préconisations techniques du fournisseur de l'anticorps primaire, a donné des marquages non spécifiques et des bruits de fond plus ou moins marqués selon les tissus, rendant difficile l'interprétation des lames marquées avec l'anticorps anti-GLUT1. Néanmoins plusieurs organes présentaient des marquages forts, vraisemblablement spécifiques. Pour confirmer cette spécificité, nous avons augmenté la dilution (1/800^{ème} contre 1/200^{ème} avec la première technique) et adapté le prétraitement (le tampon EDTA pH 8 remplaçait le tampon citrate pH 6 préconisé par le fournisseur de l'anticorps). Le but était de diluer suffisamment le contrôle isotypique pour supprimer le bruit de fond et les marquages non spécifiques en espérant conserver un marquage spécifique avec l'anticorps anti-GLUT1. Nous nous sommes limités, pour cette étude affinée, au cerveau, à la surrénale et à l'œil.

Les images obtenues avec ces nouvelles conditions de marquages sont présentées ci-dessous.

IV. Etude d'une sélection d'organes à partir d'un protocole affiné

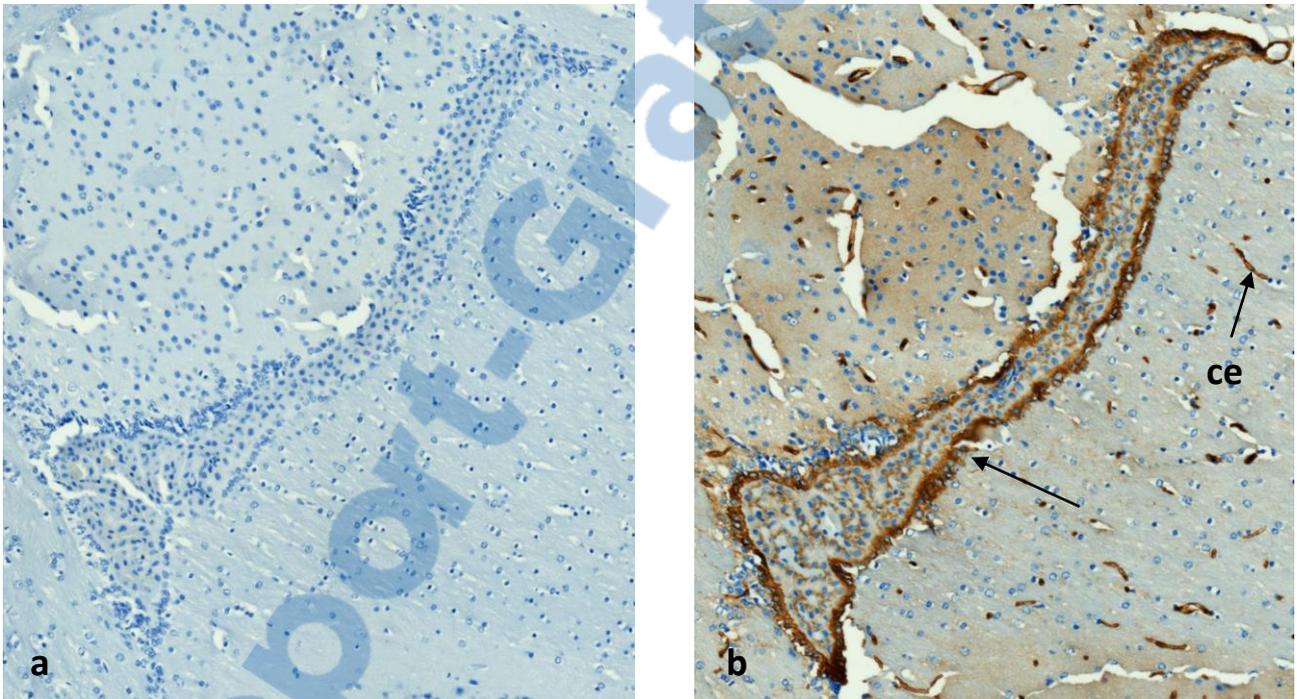
1. Prélèvements inclus en paraffine

a) Cerveau

Sur les coupes histologiques de cerveau, nous avons observé un marquage spécifique de l'épithélium épendymaire et des cellules endothéliales (figure 59).

Figure 59 : Coupes histologiques de cerveau préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage spécifique de l'épithélium épendymaire (flèche) et des cellules endothéliales (ce).

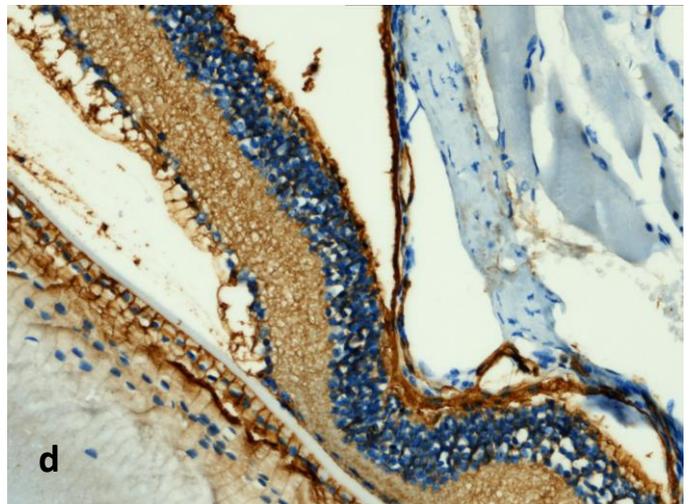
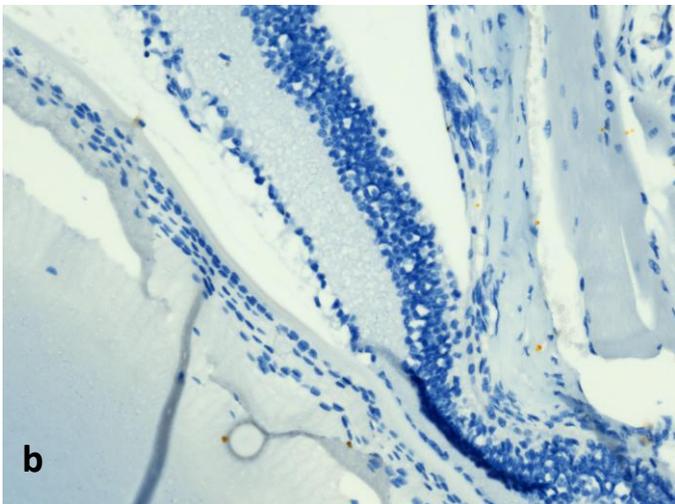
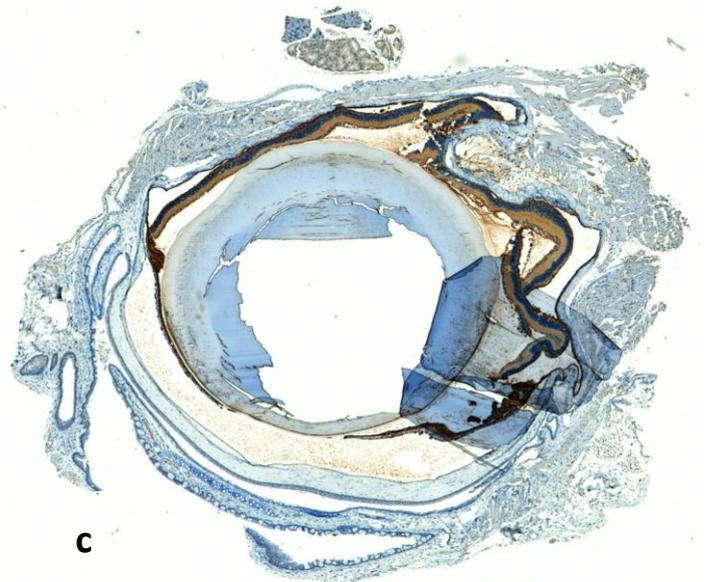
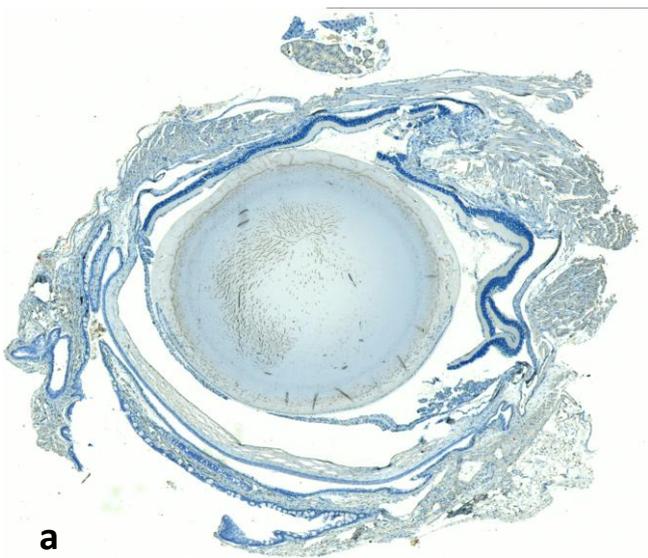


b) **Œil**

Sur les coupes histologiques d'œil, nous avons observé un marquage spécifique de la rétine (figure 60).

Figure 60 : Coupes histologiques d'œil préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coupe située au niveau de la rétine. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- c. MOX2,5. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage spécifique de la rétine.
- d. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage spécifique de la rétine.

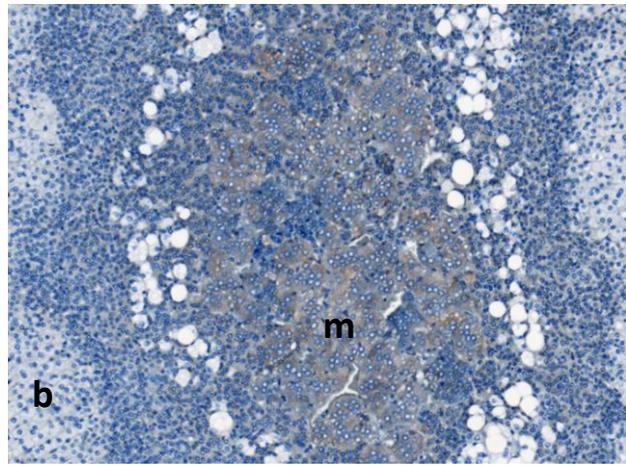
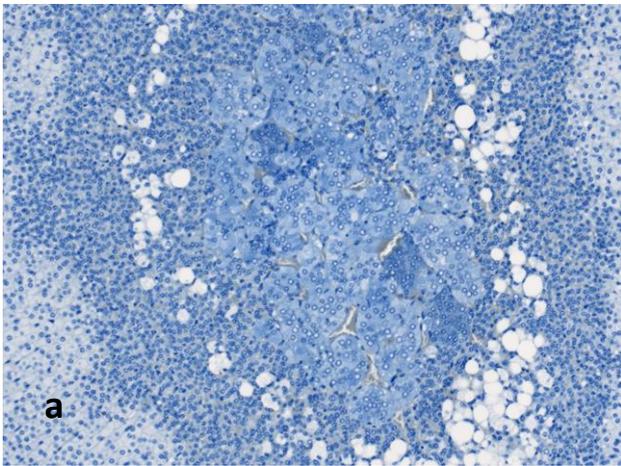


c) **Glande surrénale**

Sur les coupes histologiques de glande surrénale, nous avons observé un marquage faiblement positif de la médullo-surrénale (figure 61).

Figure 61 : Coupes histologiques de glande surrénale préparées par inclusion en paraffine

- a. MOX10. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX10. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage faiblement positif de la médullo-surrénale (m).



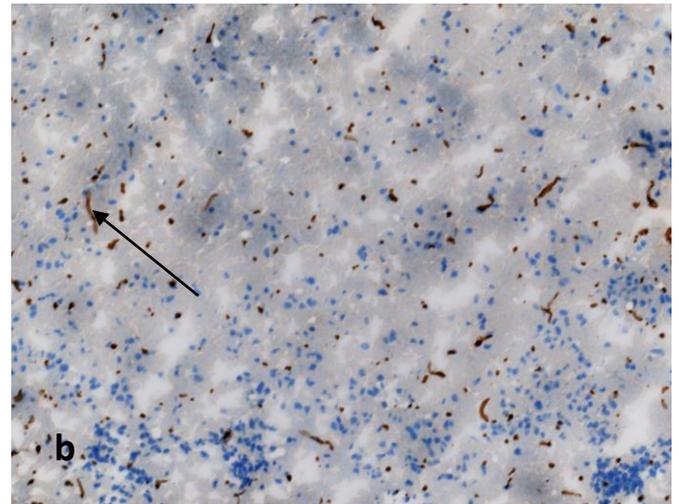
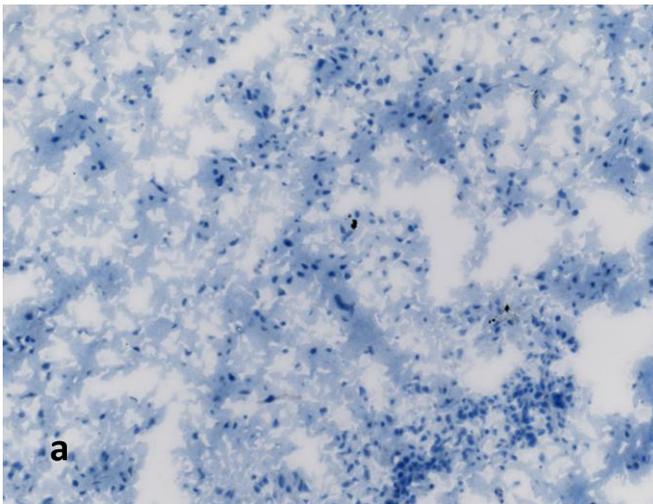
2. Coupe au cryostat

a) Cerveau

Sur les coupes histologiques de cerveau, nous avons observé un marquage spécifique des cellules endothéliales (figure 62). L'épendyme n'était pas représenté sur la coupe.

Figure 62 : Coupes histologiques de cerveau préparées au cryostat

- MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Coloration des cellules endothéliales (flèche).

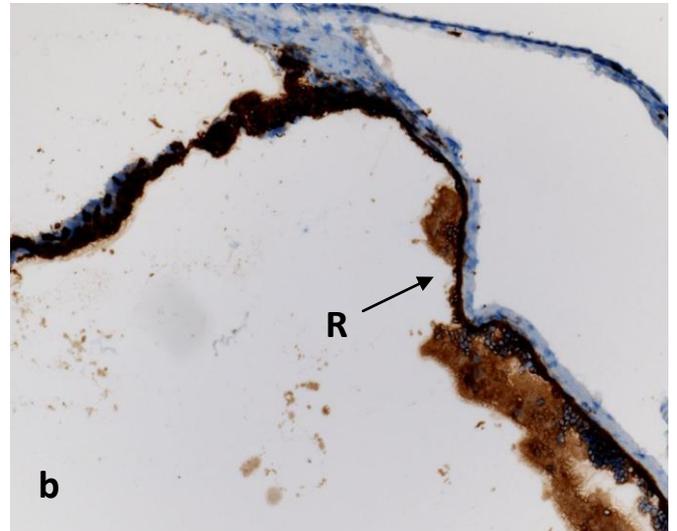
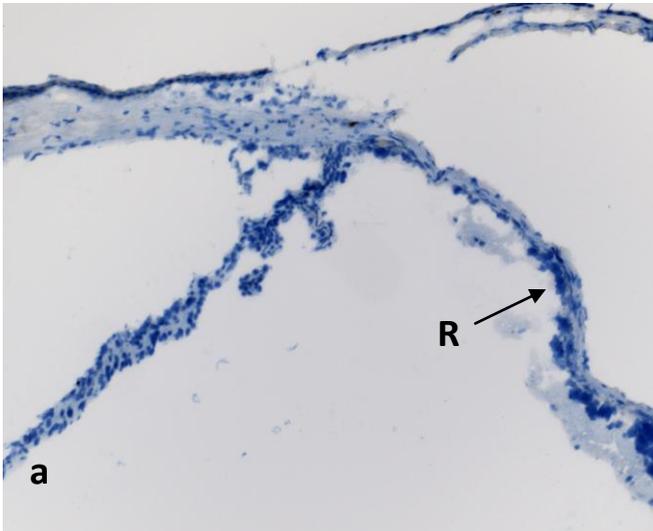


b) **Œil**

Sur les coupes histologiques d'œil, nous avons observé un marquage spécifique de la rétine (figure 63).

Figure 63 : Coupes histologiques d'œil préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Coupe montrant la rétine (R). Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage spécifique de la rétine (R).

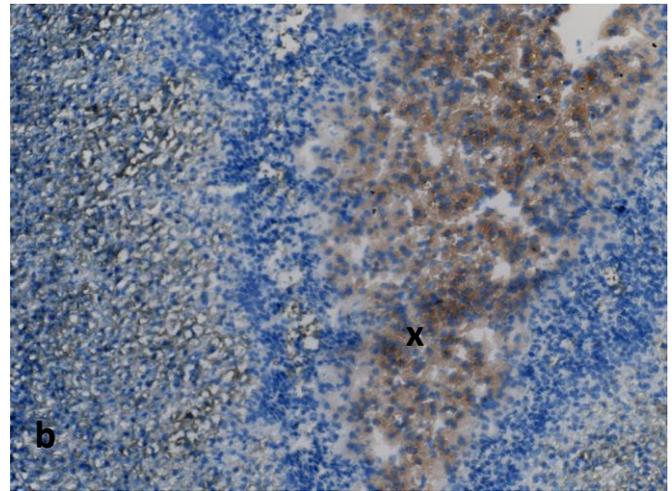
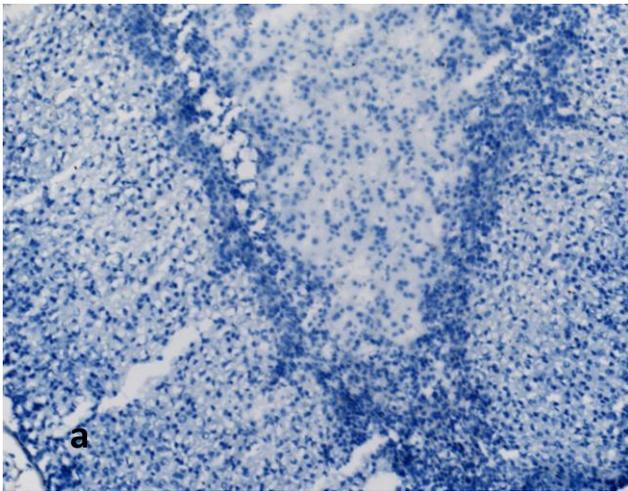


c) **Glande surrénale**

Sur les coupes histologiques de glande surrénale, nous avons observé un marquage douteux de la zone X. La médullo-surrénale n'est pas représentée sur la coupe (figure 64).

Figure 64 : Coupes histologiques de glande surrénale préparées au cryostat

- a. MOX20. Anticorps primaire utilisé : contrôle isotypique de lapin. Absence de bruit de fond. Pas de marquage spécifique.
- b. MOX20. Anticorps primaire utilisé : anticorps anti-GLUT1. Marquage douteux des cellules de la zone X (x).



Cette nouvelle méthode de marquage avec un anticorps dilué au 1/800^{ème} a mis en évidence un marquage spécifique faiblement positif de la médullosurrénale et fortement positif de l'épithélium de l'épendyme et de la rétine. Ces tissus étaient déjà marqués spécifiquement par le premier marquage.

B. Résumé des résultats obtenus avec l'étude restreinte

Les résultats obtenus avec les nouvelles conditions de marquage, dans le cadre de l'étude restreintes aux tissus que nous avons trouvé marqués spécifiquement avec la première technique, sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des résultats obtenus avec l'étude restreinte

Tissu d'origine	Œil	Cerveau	Médullo-surrénale
Paraffine	Marquage spécifique de la rétine	Marquage spécifique de l'épithélium de l'épendyme et des cellules endothéliales	Marquage faiblement positif de la médullo-surrénale
Cryostat	Marquage spécifique de la rétine	Marquage spécifique des cellules endothéliales. L'épendyme n'était pas visible sur le plan de coupe	La médullo-surrénale n'était pas visible sur ce plan de coupe

Sur l'ensemble des tissus analysés, l'œil semblait constituer l'organe le plus facile à utiliser comme témoin positif (marquage spécifique de la rétine et organe facile à prélever) pour des marquages ultérieurs à l'aide d'anticorps anti-GLUT1.

CONCLUSION

Notre étude consistait à identifier des tissus de souris marqués spécifiquement par un anticorps anti-GLUT1, afin de servir de témoins positifs pour des études ultérieures. De nombreux tissus de souris ont été analysés. Deux techniques de préparation des coupes histologiques avant marquage ont été réalisées : inclusion en paraffine et/ou coupe au cryostat pour la plupart des tissus.

Nous avons tout d'abord validé la spécificité du marquage par cet anticorps sur des tissus témoins (sang humain, sang de souris, thymus humain). Puis nous avons analysé les tissus de souris à notre disposition. Les conditions de marquage pour cette analyse multi-tissulaire étaient celles préconisées par le fournisseur de l'anticorps anti-GLUT1. Les lames marquées avec le contrôle isotypique, ajusté à la dilution de l'anticorps primaire, présentaient souvent des marquages non spécifiques, rendant difficile l'interprétation des lames correspondantes marquées avec l'anticorps primaire.

Cette étude multi-tissulaire a par ailleurs montré que certains tissus étaient fortement marqués à la fois en paraffine et en cryostat : la rétine, la médullo-surrénale, l'épithélium de l'épendyme.

Afin de confirmer les résultats positifs obtenus pour ces tissus, nous avons dilué l'anticorps primaire et ajusté la concentration du contrôle. Le but de ces nouvelles conditions de marquage était de confirmer que nous obtenions toujours un marquage spécifique pour ces tissus d'intérêt avec un contrôle qui ne présentait pas de bruit de fond. La rétine, l'épithélium de l'épendyme et la médullo-surrénale étaient toujours marqués spécifiquement dans ces nouvelles conditions de marquage et le bruit de fond du contrôle isotypique était réduit pour chacun.

Les données de la littérature sur la localisation de GLUT-1, bien qu'incomplètes pour un nombre important de tissus, semblaient le plus souvent corrélées à la localisation observée des marquages spécifiques lors de notre expérience.

Par ailleurs, nous avons pu comparer les deux techniques de préparation des coupes histologiques que nous avons utilisées lors de cette étude. La plupart des résultats obtenus pour les tissus analysés à la fois en paraffine et en cryostat concordaient.

Nous trouvions cependant des divergences entre les deux techniques pour certains tissus dans l'intensité du marquage. Quelques rares tissus divergent quant au type de tissu marqué (périphérie de la zone fasciculée de la glande surrénale par exemple).

Il est également notable que, pour certains tissus, nous observions un marquage non spécifique très important par le contrôle isotypique avec une technique mais pas avec l'autre, rendant les lames non interprétables, du moins à la concentration initiale. Le

contrôle isotypique pour le foie, par exemple, présentait un bruit de fond très important par inclusion en paraffine et n'en présentait pas avec une coupe au cryostat.

Au terme de cette étude, le globe oculaire, et notamment la rétine, semblait constituer l'organe le plus facile à utiliser comme témoin positif (marquage spécifique de la rétine et organe facile à prélever) pour des marquages ultérieurs à l'aide d'anticorps anti-GLUT1.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E *et al.* (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver, *Nature* **409**, 729–733.
- 2 Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC *et al.* (1997) Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *The Journal of clinical investigation*, **100**(11), 2842-2848.
- 3 Barros LF, Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Moldenhauer H *et al.* (2009) Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes, *Journal of neurochemistry*, **109 Suppl** , 94-100.
- 4 Behrooz A et Ismail-Beigi F (1997) Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation, *The Journal of biological chemistry*, **272**(9), 5555-62.
- 5 Bryant NJ, Govers R et James DE (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 267–277.
- 6 Busk M, Toustrup K, Sørensen BS, Alsner J, Horsman MR, Jakobsen S *et al.*(2011) In vivo identification and specificity assessment of mRNA markers of hypoxia in human and mouse tumors, *BioMed Central cancer*, **11**(1), 63.
- 7 Cloherty EK, Heard KS, et Carruthers A (1996) Human erythrocyte sugar transport is incompatible with available carrier models, *Biochemistry* **35**, 10411-10421.
- 8 Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL et Bowden DW (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1, *Molecular Genetics and Metabolism* **74**, 186–199.
- 9 Doege H, Bocianski A, Joost HG et Schurmann A (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of Horizons in Nutritional Science 7 sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes, *Biochemical Journal* **350**, 771–776.
- 10 Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG *et al.* (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle, *Biochemical Journal* **359**, 443–449.
- 11 Gamelli RL, Liu H, He LK et Hofmann CA (1996) Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice, *Journal of leukocyte biology*, **59**(5), 639-47.

- 12 Hoffman LR et Chang EB (1991) Determinants of regional sucrase-isomaltase expression in adult rat small intestine, *J. Biol. Chem.* **266**, 21815-21820.
- 13 Hudson AW, Ruiz M et Birnbaum MJ (1992) Isoform-specific subcellular targeting of glucose transporters in mouse fibroblasts, *The Journal of cell biology*, **116**(3), 785-97.
- 14 Hussein, Y.R. et al. (2011) Translational Oncology Glut-1 Expression Correlates with Basal-like Breast Cancer 1, *Epidemiology*, **4**(6), 321-327.
- 15 Ibberson M, Uldry M et Thorens B (2000) GLUT1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4607-4612.
- 16 Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT *et al.* (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators, *American Journal of Physiology* **282**, 974-976.
- 17 Joost HG et Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review), *Molecular Membrane Biology* **18**, 247-256.
- 18 Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, Tsukuda K *et al.* (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 24632-24636.
- 19 Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R et Charron MJ (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4, *Nature* **377**, 151-155.
- 20 Kokk K, Veräjänkorva E, Wu XK, Tapfer H, Põldoja E et Pöllänen P (2004) Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in the mouse, rat and human testis, *Medicina*, **4**(2), 156-160.
- 21 Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW et Al-Hasani H (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells, *Biochemical Journal* **358**, 517-522.
- 22 Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M et Battini JL (November 2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV, *Cell* **115** (4), 449-59.
- 23 McVie-Wylie AJ, Lamson DR et Chen YT (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility, *Genomics* **72**, 113-117.
- 24 Montel-Hagen A, Blanc L, Jacquet C, Boyer-Clavel M, Vidal M, Sitbon M *et al.* (2008) The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis, *Blood*, **112**(12), pp.4729-38.

- 25 Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris *et al.* (1985), Sequence and structure of a human glucose transporter, *Science* **229**, 941–945.
- 26 Nose A, Mori Y, Uchiyama-Tanaka Y, Kishimoto N, Maruyama K, Matsubara H *et al.* 2003. Regulation of glucose transporter (GLUT1) gene expression by angiotensin II in mesangial cells: involvement of HB-EGF and EGF receptor transactivation. *Hypertension research, official journal of the Japanese Society of Hypertension*, **26**(1), pp.67-73.
- 27 Ogura K, Sakata M, Yamaguchi M, Kurachi H, Murata Y, Iwasaka T *et al.* (1999) High concentration of glucose decreases glucose transporter-1 expression in mouse placenta in vitro and in vivo, *The Journal of endocrinology*, **160**(3), 443-52.
- 28 Olson AL et Pessin JE (1996) Structure, fonction, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family, *Annu Rev Nutr* **16**, 235-256.
- 29 Park JL, Heilig CW et Brosius FC (2004) GLUT1-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent vascular relaxation, *European journal of pharmacology*, **496**(1-3), 213-214.
- 30 Rayner DV, Thomas ME et Trayhurn P (1994) Glucose transporters (GLUTs 1–4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **72**, 476–479.
- 31 Robichaud TK (2008) GLUT1 Structure Function; Context, Ligand Cooperativity and Mutagenesis Studies : A Dissertation. Mutagenesis, *GSBS Dissertation*. 393.
- 32 Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC *et al.* (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein- GLUT-12, *American Journal of Physiology* **282**, 733–738.
- 33 Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S *et al.* (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 1218–1224.
- 34 Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M et Karnieli E (2004) The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression, *Cancer Research* **64**(7), 2627-2633.
- 35 Shepherd PR, Gibbs EM, Wesslau C, Gould GW et Kahn BB (1992) Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* **41**, 1360–1365.
- 36 Sitkovsky M et Lukashev D (2005) Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1[alpha] and adenosine receptors, *Nat Rev Immunol*, **5**, 712-721.

- 37 Takata K, Hirano H et Kasahara M (1997) Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int. Rev. Cytol.* **172**,1–530.
- 38 Turk E et Wright EM (1997) Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family, *Journal of Membrane Biology* **159**, 1–20.
- 39 Uldry M, Ibberson M, Horisberger J-D, Chatton J-Y, Riederer BM et Thorens B (2001) Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain, *EMBO Journal* **20**, 4467–4477.
- 40 Wood IS et Trayhurn P (2003) Horizons in Nutritional Science Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Journal of Clinical Investigation* **2**, 3-9.
- 41 Wu X, Li W, Sharma V, Godzik A et Freeze HH (2002) Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues, *Molecular Genetics and Metabolism* **76**, 37–45.
- 42 Yoshikawa T et Inoue R (2011) Comparative expression of hexose transporters (SGLT1 , GLUT1 , GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract, *Histochemistry and Cell Biology*, **135**(2), 183-194.
- 43 Young CD, Lewis SA, Rudolph MC, Ruehle MD, Jackman MR et Yun UJ (2011) Modulation of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Expression Levels Alters Mouse Mammary Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo, *PLoS one* **6**(8), 23205.
- 44 Zhang R, Alper S, Thorens B, and Verkman AS (1991), Evidence from oocyte expression that the erythrocyte water channel is distinct from band 3 and the glucose transporter, *J. Clin. Invest* **88**, 1553–1558.
- 45 Zuniga FA, Shi G, Haller JF, Rubashkin A, Flynn DR et Iserovich P *et al.* (2001) A Three-dimensional Model of the Human Facilitative Glucose Transporter Glut1, *Biochemistry* **276**(48), 44970 -44975.
- 46 Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB *et al.* (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nature Medicine* **6**, 924–928.
- 47 <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=13501&showAllSites=true>, Cell Signaling Technology Inc. 2003 – 2012. Date de consultation : 3 avril 2012.
- 48 http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89quation_de_Michaelis-Menten, Dernière modification le 2 octobre 2012. Date de consultation : 4 octobre 2012.
- 49 <http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/umvf/anapath/disciplines/niveaudiscipline/niveaumodule/chapitre1/esp1.0>

4.htm, Rousselet MC, Hénin D et Josset P, Association Française des Enseignants en Cytologie et Anatomie Pathologique. Date de consultation : 3 avril 2012.

50 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_006507.2, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 [*Homo sapiens*]. Date de consultation : 15 novembre 2012.

51 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EDL30474.1>, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 [*Mus musculus*]. Date de consultation : 15 novembre 2012.

52 http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_amin%C3%A9, Acide aminé. Dernière modification : 20 octobre 2012. Date de consultation : 15 novembre 2012.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ATP : Adénosine triphosphate

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride

GLUT : « Glucose transporter »

kDa : Kilo Dalton

Km : Constante de Michaelis

Ig : Immunoglobuline

INCa : Institut National du Cancer

M : Moles. mM : Millimoles

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

RT-PCR : « Retro-Transcription Polymerase Chain Reaction »

SLC : « Solute carrier family »

SGLT : « Sodium glucose transporter protein »

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Rôles du glucose dans le métabolisme énergétique de la cellule

Figure 2 : Dendrogramme des transporteurs de glucose de la famille GLUT

Figure 3 : La structure secondaire de la protéine GLUT-1 humaine

Figure 4 : Représentation tridimensionnelle de GLUT-1.

Figure 5 : Représentation tridimensionnelle de GLUT-1 avec matérialisation des canaux au sein desquels passent les substrats.

Figure 6 : Le modèle de transporteur simple

Figure 7 : Le diagramme de King-Altman (diagramme du modèle de transporteur simple)

Figure 8 : Représentation graphique de la translocation du substrat et des changements de conformation au sein d'un modèle de transport alternatif pour GLUT-1

Figure 9 : Représentation de la linéarisation graphique de Lineweaver-Burk.

Figure 10 : Exemple de courbe représentant une cinétique enzymatique de Michaelis-Menten

Figure 11 : Expression de l'expression du gène GLUT-1 selon les différentes portions du tube digestif de souris analysées par PCR en temps réel

Figure 12 : Expression des l'ARNm et de la protéine GLUT-1 dans le gros intestin

Figure 13 : Carcinomes mammaires "basal-like" (carcinome canalaire infiltrant non spécifié autrement)

Figure 14 : Principe de l'immunomarquage effectué par l'automate Discovery XT

Figure 15 : Protocole de coloration des lames préparées au cryostat

Figure 16 : Protocole de préparation des prélèvements inclus en paraffine

Figure 17 : Marquage immunohistochimique de lame de sang humain

Figure 18 : Marquage immunohistochimique de sang de souris observable dans une veine d'un tissu musculaire préparées en paraffine

Figure 19 : Coupes histologiques de thymus humain préparées par inclusion en paraffine

Figure 20 : Coupes histologiques de cervelet préparées par inclusion en paraffine

Figure 21 : Coupes histologiques de cœur préparées par inclusion en paraffine

Figure 22 : Coupes histologiques de cerveau préparées par inclusion en paraffine

Figure 23 : Coupes histologiques de d'œsophage préparées par inclusion en paraffine

Figure 24 : Coupes histologiques d'estomac (en zone malphigienne) préparées par inclusion en paraffine

Figure 25 : Coupes histologiques d'estomac (en zone fundique) préparées par inclusion en paraffine

Figure 26 : Coupes histologiques de duodénum préparées par inclusion en paraffine

Figure 27 : Coupes histologiques de jéjunum préparées par inclusion en paraffine

Figure 28 : Coupes histologiques de gros intestin préparées par inclusion en paraffine

Figure 29 : Coupes histologiques d'adénohypophyse préparées par inclusion en paraffine

Figure 30 : Coupes histologiques de foie préparées par inclusion en paraffine

Figure 31 : Coupes histologiques de glande lacrymale préparées par inclusion en paraffine

Figure 32 : Coupes histologiques de glande mammaire préparées par inclusion en paraffine

Figure 33 : Coupes histologiques de muscle préparées par inclusion en paraffine

Figure 34 : Coupes histologiques de nœud lymphatique préparées par inclusion en paraffine

Figure 35 : Coupes histologiques d'œil préparées par inclusion en paraffine

Figure 36 : Coupes histologiques d'ovaire préparées par inclusion en paraffine

Figure 37 : Coupes histologiques de pancréas préparées par inclusion en paraffine

Figure 38 : Coupes histologiques de parathyroïde préparées par inclusion en paraffine

Figure 39 : Coupes histologiques de poumon préparées par inclusion en paraffine

Figure 40 : Coupes histologiques de rate préparées par inclusion en paraffine

Figure 41 : Coupes histologiques de rein préparées par inclusion en paraffine

Figure 42 : Coupes histologiques de surrénale préparées par inclusion en paraffine

Figure 43 : Coupes histologiques d'utérus préparées par inclusion en paraffine

Figure 44 : Coupes histologiques de cervelet préparées au cryostat

Figure 45 : Coupes histologiques de foie préparées au cryostat

Figure 46 : Coupes histologiques de rein préparées au cryostat

Figure 47 : Coupes histologiques de rate préparées au cryostat

Figure 48 : Coupes histologiques de pancréas préparées au cryostat

Figure 49 : Coupes histologiques de poumon préparées au cryostat

Figure 50 : Coupes histologiques de surrénale préparées au cryostat

Figure 51 : Coupes histologiques d'ovaire préparées au cryostat

Figure 52 : Coupes histologiques de peau du flanc préparées au cryostat

Figure 53 : Coupes histologiques de peau interscapulaire préparées au cryostat

Figure 54 : Coupes histologiques de glande mammaire préparées au cryostat

Figure 55 : Coupes histologiques de glande mandibulaire préparées au cryostat

Figure 56 : Coupes histologiques de cæcum préparées au cryostat

Figure 57 : Coupes histologiques d'iléon préparées au cryostat

Figure 58 : Coupes histologiques de jéjunum préparées au cryostat

Figure 59 : Coupes histologiques de cerveau préparées par inclusion en paraffine

Figure 60 : Coupes histologiques d'œil préparées par inclusion en paraffine

Figure 61 : Coupes histologiques de glande surrénale préparées par inclusion en paraffine

Figure 62 : Coupes histologiques de cerveau préparées au cryostat

Figure 63 : Coupes histologiques d'œil préparées au cryostat

Figure 64 : Coupes histologiques de glande surrénale préparées au cryostat

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : La famille des transporteurs de glucose chez l'homme

Tableau 2 : Séquence des acides aminés constituant la protéine GLUT-1 chez l'homme (*Homo sapiens*) et chez la souris (*Mus musculus*)

Tableau 3 : Résultats obtenus pour les tissus analysés selon le marquage observé (lames préparées en paraffine)

Tableau 4 : Résultats obtenus pour les tissus analysés selon le marquage observé (lames préparées en cryostat)

Tableau 5 : Comparaison des résultats obtenus et des données de la littérature

Tableau 6 : Résumé des résultats obtenus avec l'étude restreinte.

Annexe 1 : Référence pour l'anticorps anti-GLUT1

Thermo
SCIENTIFIC

RESEARCH USE ONLY DATA SHEET

Rev 090309D

Clinical customers please refer to IVD / ASR Data Sheet

GLUT-1

Rabbit Polyclonal Antibody

Cat. #RB-9052-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #RB-9052-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Description:

Glucose is fundamental to the metabolism of mammalian cells. Several glucose transporter protein (Glut) isoforms have been identified and shown to function in response to insulin and IGF-1 induced signaling. GLUT-1 is detectable in many human tissues including those of the colon, lung, stomach, esophagus, and breast. GLUT-1 immunoreactivity in some cancers, including transitional cell carcinoma of the urinary bladder, has been associated with aggressive behavior.

Comments: This antibody is excellent for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Mol. Wt. of Antigen: 55kDa, 45kDa depending on the extent of glycosylation.

Epitope: c-terminal

Species Reactivity: Human and Rat. Others not tested.

Immunogen:

A synthetic peptide derived from C-terminal of human GLUT-1

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunofluorescence
- Western Blotting (2-4µg/ml for 2hrs)
- Immunohistology (Formalin/paraffin)
(1:200 for for 20 minutes at RT using the LP system, for 30 minutes at RT using the UltraVision or UltraVision ONE detection systems)
- [Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]
- **Staining tips:** If the staining is too light, use lower dilution or longer time.
If the staining is too strong, use higher dilution or shorter time.

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Rat brain lysate. Breast carcinoma, squamous cell carcinoma, non-small-cell lung carcinoma, esophageal carcinoma

Cellular Localization: Membrane and focal cytoplasmic

Storage and Stability:

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As:

Antibody fraction purified from rabbit anti-serum. Prepared in 10mM PBS, pH 7.6, with 0.2% BSA and 15mM sodium azide.

or

Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.

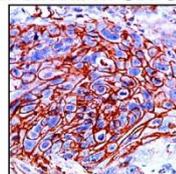
Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only



Human breast ca. stained with anti-GLUT-1, Cat# RB-9052-P

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
<http://www.thermo.com/labvision>



Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation



Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Annexe 2 : Référence pour l'anticorps utilisé pour le contrôle isotypique de lapin



DATA SHEET

Rev 041910D

Negative Control for Rabbit IgG Ab-1

Rabbit Polyclonal Antibody

Cat. #NC-100-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 1.0mg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #NC-100-P1ABX or -PABX (0.5ml or 1.0ml at 1.0 mg/ml) (Purified Ab without BSA and Azide)

Cat. #NC-100-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Comments: This IgG was purified from serum collected from a rabbit prior to immunization. It does not react with any antigen of human or animal cells. The serum was purified under the same experimental conditions as for the other rabbit polyclonal antibodies of NeoMarkers. In order to serve as a true negative control, this IgG should be used under the identical conditions and at the same concentration as NeoMarkers' other purified rabbit polyclonal IgG antibodies.

Applications:

Negative control for:

- Flow Cytometry
- ELISA
- Gel Supershift
- Immunofluorescence
- Immunoprecipitation
- Western Blotting
- Immunohistology (Frozen and formalin/paraffin)

Supplied As:

1mg/ml of IgG purified from rabbit serum by Protein A chromatography and prepared in 10mM PBS, pH 7.4, with 0.2% BSA and 0.09% sodium azide. Also available without BSA and azide at 1mg/ml,

or

Prediluted antibody which is ready-to-use for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Storage and Stability:

Ab with sodium azide is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Antibody WITHOUT sodium azide is stable for 36 months when stored at below 0°C.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. NeoMarkers makes no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
<http://www.thermo.com/labvision>



Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation



Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Annexe 3: Cycles de coloration avec le module DISCOVERY XT

Cycle de coloration terminé

Ecole National Veterinaire Alfort, 7, Avenue du General de Gaulle Maisons-Alfort

Numéro du cycle 1099

Opérateur Connexions désactivées

Nom du module Address #0

Cycle démarré le 22/06/2011 09:36:54

Type Module Discovery XT

Cycle achevé le 22/06/2011 12:27:57

Numéro	Reagent	Lot	Quantité	Stock	Quantité	Code	Date
14	BLUING REAGENT	493289	30	105	105	A05810	02/06/2012
16	HEMATOXYLIN II	130438	30	41	41	812850	07/07/2011
18	Inhibitor CM	57506	30	66	66	A06630 **	31/07/2012
19	DAB CM	56996	30	66	66	A06630 **	31/07/2012
20	H2O2 CM	56927	30	66	66	A06630 **	31/07/2012
21	Copper CM	57026	30	66	66	A06630 **	31/07/2012
24	OMap anti-Rb HRP	53963	30	66	66	B00516	31/01/2012

N°	Reagent	Lot	Quantité	Stock	Quantité	Code	Date
1	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
2	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
3	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
4	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
5	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
6	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
7	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
8	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
9	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
10	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
11	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
12	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
13	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
14	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
15	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
16	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
17	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
18	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
19	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
20	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
21	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
22	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
23	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
24	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
25	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
26	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
27	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
28	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
29	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		
30	RB-O Glut1 cryo	131			+/-		

Informations relatives au déroulement du cycle		
Message	Date/Heure	Contrôlé par
CC1 bouteilles non pleines.	22/06/2011 09:32:56	Connexions désactivées

Cycle de coloration terminé

Ecole National Veterinaire Alfort, 7, Avenue du General de Gaulle Maisons-Alfort

Numéro du cycle 1098 *Thèse Thibault* Opérateur Connexions désactivées
 Nom du module Address #0 Cycle démarré le 21/06/2011 10:11:57
 Type Module Discovery XT Cycle achevé le 21/06/2011 13:49:42

Code	Description	Quantité	Unité	Lot	Expire	Statut	Date
4	Inhibitor CM	57506	6	96	96	A06630 **	31/07/2012
5	DAB CM	56996	6	96	96	A06630 **	31/07/2012
6	H2O2 CM	56927	6	96	96	A06630 **	31/07/2012
7	Copper CM	57026	6	96	96	A06630 **	31/07/2012
10	OMap anti-Rb HRP	53963	6	96	96	B00516	31/01/2012
14	BLUING REAGENT	493289	6	135	135	A05810	02/06/2012
16	HEMATOXYLIN II	130438	6	71	71	812850	07/07/2011

Code	Description	Quantité	Unité	Lot	Expire	Statut	Date
15	RB-O Glut1	61		Foie Souris 105		+/-	
16	RB-O Glut1	61		Cerveau Souris 105		+/-	
17	RB-O Glut1	61		Thymus Humain		+/-	
21	RB-O Glut1	61		Thymus Humain		+/-	
22	RB-O Glut1	61		Cerveau Souris 105		+/-	
23	RB-O Glut1	61		Foie Souris 105		+/-	

1/200^e cc
ss Ac

Informations relatives au déroulement du cycle		
Message	Date/Heure	Contrôlé par
CC1 bouteilles non pleines.	21/06/2011 10:07:57	Connexions désactivées
12-0: Le cycle de coloration est terminé	21/06/2011 13:49:52	Connexions désactivées

Cycle de coloration terminé

Ecole National Veterinaire Alfort, 7, Avenue du General de Gaulle Maisons-Alfort

Numéro du cycle 1097 *Thèse Thibault* Opérateur Connexions désactivées
 Nom du module Address #0 Cycle démarré le 20/06/2011 14:34:00
 Type Module Discovery XT *↳ INTERNE? TRANSPORTABLE?* Cycle achevé le 20/06/2011 17:22:42

Code	Description	Quantité	Unité	Lot	Expire	Statut	Date
14	BLUING REAGENT	493289	6	141	141	A05810	02/06/2012
16	HEMATOXYLIN II	130438	6	77	77	812850	07/07/2011
18	Inhibitor CM	57506	6	102	102	A06630 **	31/07/2012
19	DAB CM	56996	6	102	102	A06630 **	31/07/2012
20	H2O2 CM	56927	6	102	102	A06630 **	31/07/2012
21	Copper CM	57026	6	102	102	A06630 **	31/07/2012
24	OMap anti-Rb HRP	53963	6	102	102	B00516	31/01/2012

Code	Description	Quantité	Unité	Lot	Expire	Statut	Date
8	RB-O Glut1 cryo	131		Sang Thibault		+/-	
9	RB-O Glut1 cryo	131		Foie Souris		+/-	
10	RB-O Glut1 cryo	131		Cerveau Souris		+/-	
14	RB-O Glut1 cryo	131		Cerveau Souris		+/-	
15	RB-O Glut1 cryo	131		Foie Souris		+/-	
16	RB-O Glut1 cryo	131		Sang Thibault		+/-	

1/200^e
ss Ac

Informations relatives au déroulement du cycle		
Message	Date/Heure	Contrôlé par
12-0: Le cycle de coloration est terminé	20/06/2011 17:22:52	Connexions désactivées

Annexe 4 : Correspondance entre les codes donnés par la nomenclature IUAPC (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée) et les acides aminés ^[52]

Code	Acide aminé
A	Alanine
C	Cystéine
D	Acide aspartique
E	Acide glutamique
F	Phénylalanine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
K	Lysine
L	Leucine
M	Méthionine
N	Asparagine
O	Pyrrolysine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Sérine
T	Thréonine
U	Sélénocystéine
V	Valine
W	Tryptophane
Y	Tyrosine

ESSAI DE CARTOGRAPHIE IMMUNOHISTOCHIMIQUE D'UN TRANSPORTEUR DU GLUCOSE (GLUT-1) CHEZ LA SOURIS À L'AIDE D'UN ANTICORPS SPÉCIFIQUE

NOM et prénom : STEINER Thibault

Résumé :

Dans le cadre d'un travail de recherche financé par l'Institut National du Cancer (INCa), effectué en collaboration avec un laboratoire du Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) de Montpellier et un laboratoire de l'Institut Curie de Paris, une étude préliminaire a été réalisée consistant à effectuer une cartographie immunohistochemie d'un transporteur membranaire du glucose (GLUT 1) chez la souris, avec un anticorps spécifique.

Le travail de thèse consistait en premier lieu à vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé sur le modèle murin. Il s'agissait ensuite de cartographier les récepteurs GLUT-1 chez la souris en microscopie optique grâce à l'étude de coupes histologiques marquées par immunohistochemie. Deux séries de lames ont été préparées. Pour l'une les tissus ont été préparés en paraffine et pour la seconde les tissus ont été congelés pour une coupe au cryostat. Les résultats obtenus avec les deux techniques ont fait l'objet d'une comparaison et ont été mis en relation avec les données de la littérature.

Mots clés : IMMUNOCHIMIE, GLUT-1, GLUT1, SLC2A1, CARTOGRAPHIE, ANTICORPS, PARAFFINE, CRYOSTAT, IMMUNOHISTOCHIMIE, SOURIS, RONGEUR.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Jean-Jacques FONTAINE

Assesseur : Dr Fanny PILOT-STORCK

ATTEMPT OF MAPPING OF A GLUCOSE TRANSPORTER (GLUT-1) IN MOUSE CELL USING A SPECIFIC ANTIBODY

SURNAME and given name : STEINER Thibault

Summary

As part of a research project funded by INCa (Institut National du Cancer) and conducted in collaboration with a CNRS (Centre National pour la Recherche Scientifique) laboratory of Montpellier and a laboratory at the Curie Institute in Paris, a preliminary study was initiated that consisted in performing an immunohistochemical mapping of a membrane transporter of glucose (GLUT-1) in mice with a specific antibody.

The work consisted primarily in verifying the specificity of the antibody used in the murine model. It was used to map GLUT-1 receptors on stained slides of mice using light microscopy. Two sets of slides were prepared. In the first one, tissues were embedded in paraffin wax and cut using a microtome. In the second one, tissue samples were frozen and cut with a cryostat. The results obtained with both techniques are compared and they are linked with the literature data.

Keywords : IMMUNOHISTOCHEMISTRY, HISTOLOGY, GLUT-1, GLUT1, SLC2A1, ANTIBODIES, PARAFFIN, CRYSTAT, MICE.

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Jean-Jacques FONTAINE

Assessor : Dr. Fanny PILOT-STORCK