

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

But: étudier les lois qui régissent le fonctionnement de la cellule.

Outils: Les biotechnologies

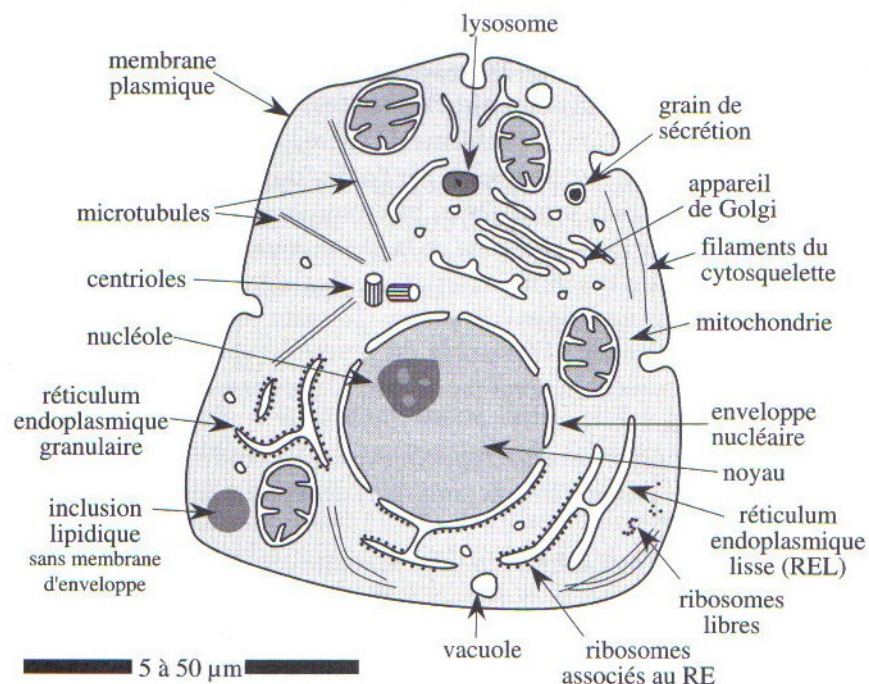
Historique:

- Deuxième moitié du 20^{ème} siècle: invention du microscope.
- Hooke en 1650 observe des coupes de Liège et observe une cellule
- Schleiden et Schwann en 1830 établissent les 2 premières règles de la biologie cellulaire:
 - **Tous les organismes sont constitués de plusieurs cellules.**
 - **La cellule est l'unité fondamentale de la vie.**
- Virchow établit 30 ans plus tard la 3^{ème} règle de la biologie cellulaire:
 - **Une cellule est créée à partir d'une cellule préexistante.**
- Zeist: fin XIX^{ème} siècle fait évoluer le microscope optique (MO) avec la lentille.
- 1930: Microscope interférentiel permettant d'observer des cellules vivantes
- 1930: Microscope électronique (ME)
- 1945: Première description des organites cellulaires
- 1945: Immunofluorescence
- 1988: Microscope confocal

Le résultat final dépend de l'outil et de l'interprétation faite à partir de l'observation

Il existe deux types de cellules, différenciées par la présence ou non de matériel génétique dans un noyau:

- Les Eucaryotes ont le matériel génétique dans un noyau, les cellules eucaryotes sont unis et pluri-cellulaires
- Les Procaryotes dont le matériel génétique est libre. Ce sont des organismes unicellulaires.



Structure générale d'une cellule eucaryote:

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

- **La membrane cytoplasmique** joue plusieurs rôles:
 - Barrière vis-a-vis de l'environnement mais perméable: il y a passage selectif de divers ions
 - Permet l'absorption d'élément extracellulaire par invagination ou endocytose
 - Permet l'excretion de substance intra-cellulaire par exocytose.
 - Zone d'interaction avec l'environnement qui se fait de différentes manières:
 - la membrane présente des récepteurs où peuvent se fixer des ligands qui déclencheront des réactions
 - la zone d'adhérence à la MeC ou a une autre cellule voisine
 - Forme des expansions grâce au cytosquelette aux rôles variés: déplacement et detection de l'environnement.
- **Dans le noyau:** l'ADN est sous forme de **chromatine dense (hétérochromatine)** ou **chromatine claire (euchromatine)**.
Il présente une condensation à contenu importante en ARN: **le nucléole**.
Le noyau a une double membrane perforée permettant une communication entre le nucléoplasme et le cytoplasme. Les échanges se feront dans les deux sens
Dans le noyau se fait la transcription en ARN qui passe dans le cytoplasme où il sera traduit en Protéines grâce aux Ribosomes.
- **Le fond cytoplasmique** est constitué de **Cytosol ou Hyaloplasme**, qui est un gel dans lequel sont dissous un certains nombres de molécules et ou vont se trouver les differents organites cellulaires.
- **Les éléments membranaires:**
 - **Réticulum endoplasmique granuleux (REG)** présentant des ribosomes à sa surface, est responsable de la synthèse des protéines membranaires, les protéines des lysosomes ainsi que les protéines destinées à l'exportation
Les Ribosomes libres synthétisent des protéines qui resteront dans le cytoplasme. Ce qui est synthétisé dans le REG sera impacté dans l'appareil de Golgi.
 - **L'appareil de Golgi** est un empilement de saccules formant les Lysosomes (appareil de digestion) ou grain de sécrétion dont le contenu est destiné à l'exportation
 - **Le système endosomique:** Ensemble du système qui forme le carrefour entre ce qui arrive de la Mb cytoplasmique et ce qui dérive de Golgi. On parle de **système endo-lysosomal**.
 - **Les mitochondries** sont à l'origine de la respiration cellulaire et de la production d'énergie, son système membranaire comporte des Peroxysomes.
- **Le cytosquelette** est l'ensemble de filaments et tubes formés par des protéines qui s'associent entres elles. Il est composé de: Microfilaments d'actine, Filaments Intermédiaire, Microtubules.

Cette architecture cellulaire est fortement lié au fonctionnement intra-cellulaire:
ex: une cellule qui produit beaucoup de protéines aura beaucoup de ribosomes.

Ces structures sont plus ou moins développées selon la fonction de la cellule observée.
➔ corrélation entre la morphologie cellulaire et la fonction de la cellule.

Morphologie/Structure <=> Fonction/Metabolisme <=> Environnement

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

I. Les Microscopes Optiques (MO)

1. Microscope optique (MO) ou photonique

Il est constitué de bas en haut:

- **La lumière** placée tout en bas.
- Le **condenseur** qui condense la lumière sur la préparation
- La **platine** sur laquelle repose l'échantillon
- L'**objectif** qui permet d'agrandir l'image 4-10-40x
- L'**oculaire** qui agrandit 10 x l'image.

Le grossissement va donc de 40 à 400x. Les contraintes sont établies par:

- La qualité des lentilles de verre
- La capacité de la lumière à traverser l'échantillon à observer.

La préparation doit donc être fine:

- Dans le cas d'un étalement cellulaire (frotti sanguin): on dépose la goutte de sang sur une lame, et à l'aide d'une lamelle on étale la goutte jusqu'à obtenir une monocouche de 1-2 microns d'épaisseur.
- Pour une culture cellulaire: les cellules se multiplient et le cytoplasme est assez fin.
- En cas de prélèvement de tissus, celui ci doit être coupé une fois durci, et cela peut se faire de deux manières:
 - Congélation du tissu qui pourra ensuite être coupé à l'aide d'un **Cryostat**.
 - Enrobage dans une inclusion de **Paraffine**, ce qui est plus long et peut détruire les cellules si on ne les fixe pas au **Formaldéhyde** ou **Formol** qui va stabiliser les protéines en formant des liens entre elles. Les Lipides eux ne seront pas conservés.

La paraffine est solide à température ambiante, mais est liquide à 55°C, insoluble dans l'eau. Ainsi, le prélèvement doit être d'abord baigné dans des **solutions d'éthanol** à concentrations de plus en plus élevées. L'alcool se substituera à l'eau.

Cependant, la paraffine n'est pas totalement miscible avec l'éthanol. L'échantillon sera alors baigné dans du **Toluène**, après quoi il sera baigné dans de la paraffine qui va elle-même se substituer au toluène.

Le bloc sera coupé à l'aide d'un **Microtome** qui est un appareil constitué d'un support sur lequel repose l'échantillon sur lequel passe la lame d'un couteau.

L'épaisseur de la coupe est d'environ 4-8 microns. Ces coupes seront transférées sur une lame.

Cependant, cette coupe est tellement fine qu'il y a **trop peu de contraste**, il faudra alors la colorer à l'hématoxyline-éosine (hématoxyline pour le noyau, éosine pour le cytoplasme et la MeC) par exemple. Mais **on ne peut pas colorer la lame puisqu'enrobée par la paraffine**.

On suit alors le procédé inverse: déparaffination et réhydratation.

On va alors protéger cette coupe en la mettant dans un **milieu de montage** qui doit être transparent, et qui sera **soit aqueux soit non miscible à l'eau mais avec les solvants** (et donc refaire la déshydratation).

Ces cellules sont figées/mortes: aucune activité ne pourra être relevée.

2. Microscope à contraste de phase

Il utilise le fait que lorsque la lumière traverse la cellule, elle rencontre des structures qui vont devier ses ondes, donc celles-ci vont sortir soit en phase, soit déphasées. Cette différence sera à l'origine d'un léger contraste qui fera apparaître le noyau et les chromosomes.

Elle permet l'étude de cellules vivantes.

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

3. Microscope à fluorescence

Utilisé pour détecter des molécules fluorescentes qui absorbent la lumière à une certaine longueur d'onde et émettent à une longueur d'onde plus élevée. Des filtres vont permettre d'observer des molécules lumineuses sur fond noir. Il faut donc un microscope qui soit doté de 2 filtres:

- le premier qui ne laisse passer que la longueur d'onde d'absorption
- le deuxième qui ne laisse que la longueur d'onde d'émission.

La fluorescence peut-être:

- **Naturelle**, émise par certains constituants de la cellule
- Rapportée par des molécules fluorescentes fixées, ou molécule utilisée comme détecteur: **Immunofluorescence**.

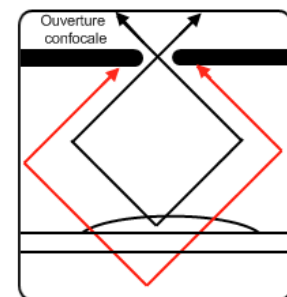
On peut utiliser deux enzymes:

- **Fluoriscine**: qui absorbe le **Bleu** et émet dans le **Vert**.
- **Rhodamine**: absorbe **Vert** et donne du **Rouge**.

4. Microscope Confocale

Le microscope à fluorescence détecte la fluorescence de l'endroit sur lequel on a mis au point ainsi que tout l'environnement l'entourant (comprendre: les différentes couches), il y aura alors **un bruit de fond**.

Le microscope confocale ne recueille que la lumière émise au point sur lequel on s'est focalisé. La lumière émise va traverser l'ouverture d'un diaphragme (ouverture confocale) qui ne laissera traverser que la lumière venant d'un point précis.



Le laser va balayer l'objet point par point sur un plan, puis par plan successif. Un ordinateur va recréer l'image finale. En chaque point, l'image sera nette.



L'épaisseur d'une couche est au minimum de 5 microns, ainsi, certains détails peuvent échapper à l'observateur.

L'ensemble de ces systèmes ont une limite: la résolution qui est limitée par:

- la longueur d'onde de la lumière
- du système optique
- de l'indice de réfraction du milieu entre la préparation et l'objectif (Note: les Objectifs à Immersion sont baignés dans l'huile et permettent un agrandissement x100)
- le cône de lumière entre l'objet et la lentille (donné par la moitié de l'angle, soit $\sim 70^\circ$)

La résolution maximale théorique est de 0,2 microns, or les organites ont une taille inférieure à 0,2 microns.

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

II. La microscopie Electronique (ME)

Elle est similaire au microscope optique, sauf qu'elle utilise des Electrons et les lentilles sont électromagnétiques. La colonne surmontant l'installation est occupée par une cathode qui enverra les électrons, un système de refroidissement, et un système permettant de faire le vide (car les électrons ne voyagent pas dans l'air).

Le grossissement est réglé par les tensions appliquées sur les lentilles. Il y aura :

- Une lentille de **condensation**
- **L'échantillon**
- Une lentille d'**objectif**
- Le **projectif** qui projète l'image sur un écran fluorescent
- En dessous il y aura une plaque qui permet la **capture d'image**.

Les contraintes sont déterminées par :

- l'épaisseur de l'objet qui doit être encore plus fin que 5 microns
- les électrons font des contrastes et pas des colorations, donc l'image sera en noir et blanc.

1. Comment avoir une coupe ultrafine de 60-100 nm d'épaisseur ?

On peut observer les organites qui doivent être fixé très rapidement, sinon ils seront détruit.

- Fixation au **Glutaraldéhyde**, qui fixe les **protéines** très rapidement
- Post fixation à l'**Acide Osmique** qui fixe les **lipides**.
- **Déshydratation** en passant par un solvant
- Le bloc doit être très rigide pour pouvoir être coupé finement, il y a donc une inclusion en résine: **Epon** ou **Araldite** semi-liquide à froid.
- La résine est **chauffé à 60°C** environ où elle polymérise
- L'échantillon enrobé sera de l'ordre du millimètre cube
- On découpe l'échantillon avec un **Ultra-microtome** plus sensible (avec un pas de 50nm). Le couteau est fait de diamant et dont le fil fait 3mm.
- **La coupe est maintenant ultra-fine avec une épaisseur de 100nm.**
- Les coupes sont regroupées sur des grilles à maillage adapté.

La coupe flotte à la surface d'une cuve d'eau où elle sera récupérée

Avant de couper avec l'ultramicrotome, on vérifie que l'échantillon est intéressant en faisant une coupe **semi-fine**. La coupe semi-fine aura une épaisseur de 0.5 microns, et pourra être colorée et observé au Microscope Optique.

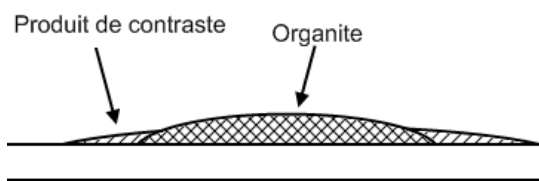
2. Comment augmenter la visibilité ?

On peut augmenter le contraste en utilisant les sels de métaux :

- **Citrate de Plomb**
- **Acetate d'Uranyle**

Les électrons sont arrêtés par les métaux et l'image en tiendra compte

a. Coloration négative



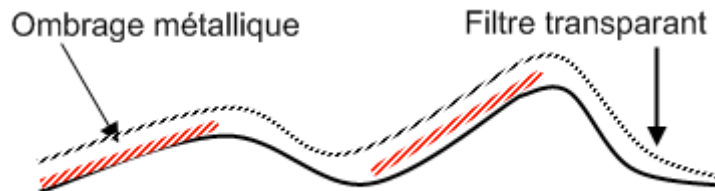
Coloration de petits objets isolés et déposés sur une grille recouverte d'un filtre.

Le produit de contraste vient se mouler autour des objets, le MeT affichera alors une image en négatif (en marquant les contours).

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

b. Ombrage métallique

Il met en évidence de petits éléments dans une cellule (ex: molécules protéique de la membrane cellulaire). Le métal chauffé se dépose sur un coté de la structure.



Une fois déposé, il faudra solidariser la structure en appliquant un **filtre transparent**. L'échantillon pourra ensuite être détruit, et on ne gardera que la réplique qu'on passera au MET. On aura alors une image en contraste avec impression de relief.

L'ombrage métallique est souvent associé aux techniques suivante:

1. La cryofracture

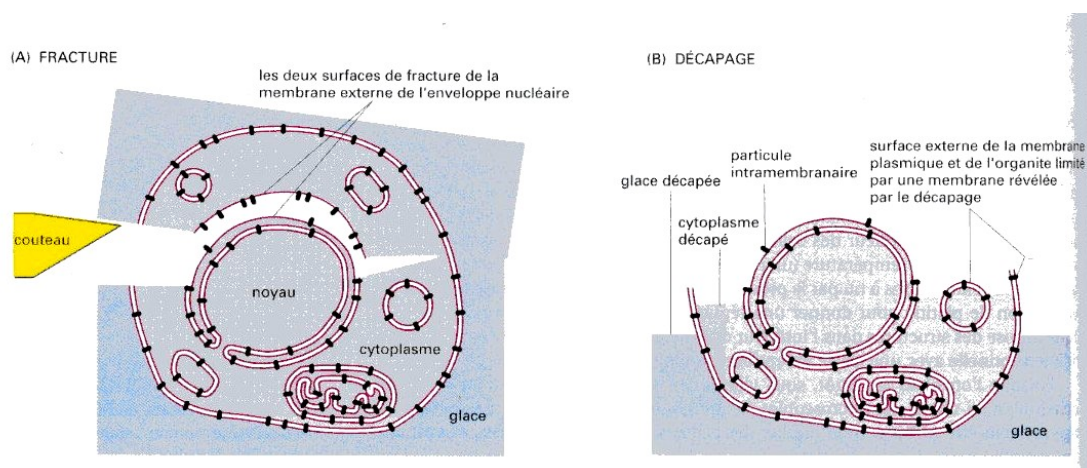
Un échantillon est trempé dans de l'Azote liquide (pour le refroidir), puis cassé à l'aide d'un couteau. La cassure se fera préférentiellement entre les deux feuillets d'une membrane.

Ainsi les faces internes des deux feuillets de la membrane pourront être examiné. Grâce à l'ombrage métallique on pourra déterminer la concentration en protéines !

2. Le cryodécapage

On sublime l'eau du cytoplasme et on fait ainsi apparaître une partie du feuillet externe de la membrane.

Cette technique est utilisé pour faire apparaître le **Cytosquelette**.



Le pouvoir de résolution du MET est dépendant de la longueur d'onde de l'électron.

Résolution maximale théorique : 0.1 nanomètre.

Grossissement: 3 000x (une partie de la cellule) à 100 000x (focalisation sur une structure précise, dont les membranes).

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

III. La microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Destiné à l'étude des surface cellulaire, il permet de voir la forme des objets. Son principe de base est similaire au microscope à transmission.

Source d'électron: cathode, série de lentilles (voir disposition précédente)

Les cellules entières seront fixées puis métallisées (afin de maintenir la forme de la cellule), et le tout sera balayé par un faisceau d'électron.

Lors du balayage, il y aura une réflexion des électrons, qui seront détecté par un détecteur à scintillation et transformation en impulsion électrique par un photomultiplicateur. Ces impulsions électrique seront transformé.

L'image affiché sera en relief.

Ce MEB ne permet que de voir des surfaces et non la structure interne des cellules.

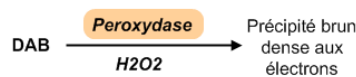
IV. Que peut-on observer

➤ Une observation générale

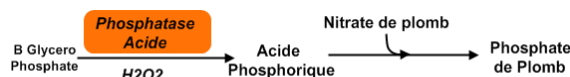
- ◆ Coloration signalétique par Hematoxyline-eosine.
- ◆ Etudes de cellules vivantes, utile pour les mitoses, avec le Microscope à contraste de phase.
- ◆ Les organites intracellulaires, le MET est requis.
- ◆ Observer les différenciations des surfaces: le MEB.

➤ Localisation moléculaire

- ◆ **Histochimie:** permet de mettre en évidence dans les cellules des constituant chimique spécifique (Glucides, acides nucléiques, lipides....) la réaction histochimique la plus connue est la PAS (Acide Periodique de Schiff). Dans cette réaction, on oxyde les glycol par l'acide Periodique transformé alors en Aldéhyde, puis on met en évidence les aldéhydes par le réactif de Schiff. La coloration est Rouge Pourpre.
- ◆ **Histoenzymologie:** permet de travailler en MO et ME. Detecte dans une cellule une enzyme spécifique par la formation d'un produit à partir d'un substrat que l'on ajoute à la préparation.
Au MO, le produit devra être coloré
ex: mise en evidence de la Peroxydase par le DAB (di amino benzidine)



Au ME: localisation de phosphatase acide dans les lysosomes, actif à un pH=5.



Précipité de phosphate de plomb visible au ME

Dans la plupart des cas il faut des fixations légères, donc tissus frais et qui a maintenu l'activité enzymatique.

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

- ◆ **Immunocytochimie / Immunohistochimie**: permet de détecter des molécules/protéines/glycoprotéines *in situ* en utilisant la reconnaissance spécifique entre un anticorps et un antigène.
Les anticorps (ou immunoglobuline) sont produits par les plasmocytes, qui sont le stade de différenciation terminale des lymphocytes B.
Ces immunoglobulines sont de 5 variétés IgG IgA IgM IgE. Seul les IgG seront utilisées. Chaque Ig reconnaît un épitope sur l'Ag ou site antigénique, formé par quelques acides aminés. Une protéine aura donc de nombreux sites antigéniques.
Les anticorps peuvent être:

- **Polyclonaux**: ceux utilisés au départ, produits dans le cas d'une infection.
 - On injecte à un animal (lapin) la protéine contre laquelle on veut produire des anticorps. Cette protéine aura plusieurs sites antigéniques.
 - L'animal développe plusieurs clones de Lymphocytes B, chaque clone reconnaissant un site antigénique différent.
 - On prélève ensuite le sang.
 - On cherche l'Ac spécifique par réaction: Ag-Ac.
 - On prend la protéine et la fixe sur des billes placées dans une colonne de purification
 - On fait couler le sérum de l'animal sur ces billes
 - Les Ac non spécifiques tomberont, alors que les Ac spécifiques seront retenus
 - Il suffira de détacher les Ac pour avoir le produit purifiéC'est la manière la plus rapide
- **Monoclonaux**: Lorsqu'on utilise un Ac monoclonal, on aura une seule variété d'Ac, provenant d'un seul clone.
 - On injecte à l'animal (la souris) la protéine, l'animal développera des clones dirigés contre les épitopes.
 - On prélève les **Lymphocytes B** (de la rate généralement) qu'on met en culture. Cependant les lymphocytes ne se multiplient pas.
 - Il faut hybrider avec des cellules à capacité de multiplication infinie (dérivée de tumeur/myelome). On obtient des lymphocytes qui vont être détruits, d'autres seront hybrides, et d'autres uniquement tumorales, ces dernières devront être éliminées via un milieu dans lequel ils ne pourront pas proliférer.
 - Les cellules obtenues pourront créer des anticorps spécifiques et proliférer.
 - Il faut ensuite tester différents hybrides: on les repique individuellement et on teste leur réactivité.
 - On aura alors la production de manière infinie du même anticorps.

On les utilise pour purifier des cellules (tri cellulaire), pour purifier des protéines (avec le système de billes), expérimentation pour neutraliser les protéines *in vivo*, pour voir l'effet des protéines sur certains mécanismes.

On les utilise aussi en thérapeutique, les Ac seront dirigés contre des récepteurs membranaires (récepteurs aux facteurs de croissance) qui sont présents sur des cellules cancéreuses.

La détection *in situ* d'un Ag localisé dans une cellule est rendue possible grâce à la réaction spécifique Ag-Ac. Il faut donc avoir une préparation (coupe en paraffine, coupe au cryostat, coupes flottantes obtenues à partir d'un tissu fixé mais non enrobé par de la paraffine).

Si on fait une congélation il y aura apparition de cristaux qui vont détruire la cellule, on doit d'abord **Cryoprotéger** en utilisant une solution élevée de **Sucrose**.

Le **Vibratome** permet de faire des coupes sans congélations, la lame de rasoir vibrante avance dans le tissu.

Les coupes seront recueillies dans un milieu qui permettra de faire la réaction cytochimique.

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

On doit utiliser des marqueurs visibles: **Fluorochrome**, **Enzyme** (peroxydase), **DAB** (coloré ET dense aux électrons), **Or colloïdale** dense aux électrons à diamètre variable allant de 1-20 nm qu'on peut encore amplifier la réaction avec des sels d'argent.

La réaction pourra se faire de 2 manières:

- **Méthode directe:** L'Ac spécifique ou primaire, va directement être couplé avec le marqueur. Signal visible que lorsqu'on a une quantité importante d'Ag dans la cellule.
Cette méthode est surtout utilisée en diagnostic, si un patient a un dépôt d'Ac dans un endroit donné, et on utilisera des Ac animal dirigé vers l'Ig humaine
 - **Méthode indirecte** par amplification de signal.
 - Utilisation **d'Ac secondaire** marqué, dirigé contre le premier Ac fixé à l'Ag.
 - Utilisation du système **Streptavidine – Biotine**. La streptavidine est une glycoprotéine qui pourra fixer 4 fois une petite vitamine: la biotine.
 - L'Ac primaire spécifique sera monté d'un Ac secondaire portant de la biotine qui cherchera à s'attacher avec de la Streptavidine (marquée).
 - **Contrainte:** l'Ag doit être préservé et il faut travailler à des concentrations adéquat de telle sorte que l'on ait un rapport du signal spécifique sur le bruit de fond (réaction aspécifique) faible. Il faut aussi éviter des faux positifs: reconnaissance de molécules non-intéressantes.
- ◆ **Détections des acides nucléiques:** *Hybridation in situ*, permettant de détecter des séquences d'ADN ou d'ARN messager par la complémentarité des acides nucléiques.
 - ◆ **Autoradiographie:** utilisant des radio-isotopes (*Tricium par ex*). Ces particules vont impressionner un film photographique placé au dessus de l'échantillon qu'on va observer. L'échantillon devra être fait dans le noir (vu le développement photo). A chaque endroit où se trouve le radio-isotope, il y aura une image latente.
Cette technique est utilisée pour étudier la liaison entre une molécule et son récepteur: on injecte la protéine/molécule marquée avec du radio-isotope, puis on attend que la liaison se fasse entre la protéine et son récepteur, puis on prélève, on coupe et on observe où s'est fixé la protéine, qui révélera la position des récepteurs. Très utilisé dans l'*hybridation in situ* et dans l'étude de la prolifération cellulaire.
 - ◆ **Etude de la prolifération cellulaire:** on injecte à un animal de la **Thymidine Triciée** qui va s'incorporer dans l'ADN (dans les phases de synthèse de l'ADN et donc toute les cellules en phase de synthèse vont l'incorporer). On relèvera alors le nombre de noyau marqué par la Thymidine Triciée.

COURS 01 - LES MÉTHODES D'OBSERVATION EN BIOLOGIE CELLULAIRE

- **Techniques de séparation et de purification** concernant les cellules entière ou alors, les organites cellulaire:
 - ◆ **Le tri cellulaire:** On cherche à obtenir une variété de cellules aussi pure que possible pour l'étudier.
 - On réduit d'abord le tissus en une suspension de cellules, grâce à des enzymes qui élimine la MeC
 - Séparer les cellules si elles sont jointives grâce à des Chélateurs du Calcium, car celui ci intervient de manière importante dans les liaisons cellulaires.
 - Les cellules sont de types variées. Parmi ces cellules on en cherche une seule variété, il faut purifier cette préparation en utilisant des Ac qui reconnaîtront de manière spécifique des protéines portées uniquement par les cellules qui nous interesse.
 - **Fixation des Ac sur un support** et de passage de la préparation sur ce support. Les cellules seront arrêté sur les Ac, alors que les cellules en suspension ne nous interesse pas.
 - **Cytomètre à flux (Cytométrie de flux):** les Ac portent cette fois ci un fluorochrome, et seront couplé à leur Ag. La suspension sera passée dans une colonne qui débouche sur un interstice d'un diamètre d'une cellule. Les cellules passeront l'une après l'autre devant un détecteur de fluorescence et l'appareil va pouvoir placer les cellules dans une gouttelette chargé positivement ou négativement en fonction de la detection du fluorochrome. Les cellules passeront devant un deflecteur qui déviera les gouttelettes chargée dans un sens ou dans l'autre. Système extrêmement rapide.
- **Observation des organites:**
 - ◆ **Il faut fractionner les structures** intracellulaires:
 - Destruction des membranes cytoplasmique par **broyage** grâce à un piston qui laminera le long de la paroi, on travaille généralement dans la glace pour préserver les petites structures
 - Eclatement des cellules dans un milieu **hypotonique:** Appel d'eau dans la cellule qui amène à l'éclatement, c'est un choc Osmotique
 - Utilisation **d'Ultrason**
 - ◆ L'homogénat obtenu devra maintenant être fractionné par **Ultra centrifugation dite Différentielle** ou on augmente la vitesse et le temps.