

Chap. II. Techniques d'études de la cellule

Diverses techniques ont été utilisées pour étudier la cellule :

- Etudes morphologiques (Techniques Microscopiques)
- Etudes physico-chimiques (Techniques de fractionnement des constituants cellulaires dont Centrifugation, etc...).

L'évolution de ces techniques d'étude a permis de mieux comprendre la biologie cellulaire.

I- Techniques microscopiques

- La majorité des cellules sont petites et transparentes à la lumière visible et ne peuvent être décelé par l'œil humain: le pouvoir séparateur de l'œil est de l'ordre de 200 µm (à 25 cm, l'œil distingue 2 points voisins de 0,2 mm).
- La découverte des microscopes et la mise au point de préparation du matériel ☐ augmenter le pouvoir séparateur de l'œil, et éliminer la transparence du matériel.

1. Préparation de l'échantillon pour l'examen

a. Étude des cellules encore vivantes:

- * La microchirurgie (examen vital) : introduction de microinstruments (microsondes, microaiguilles) ☐ informations sur les propriétés physico-chimiques de la cellule.
- * La culture des cellules animales et végétales après leur isolement (examen supravital) : obtention d'un clone (Population de cellules provenant d'une seule cellule parentale).
- * Les colorants vitaux des structures de la cellule (Ex. Réaction à l'acide périodique spécifique des sucres; réaction de Feulgen pour l'ADN).

b. Étude des cellules préalablement tuées:

Agents chimiques ou physiques (congélation) qui "fixent" la cellule ☐ Une analyse morphologique complète, on utilise:

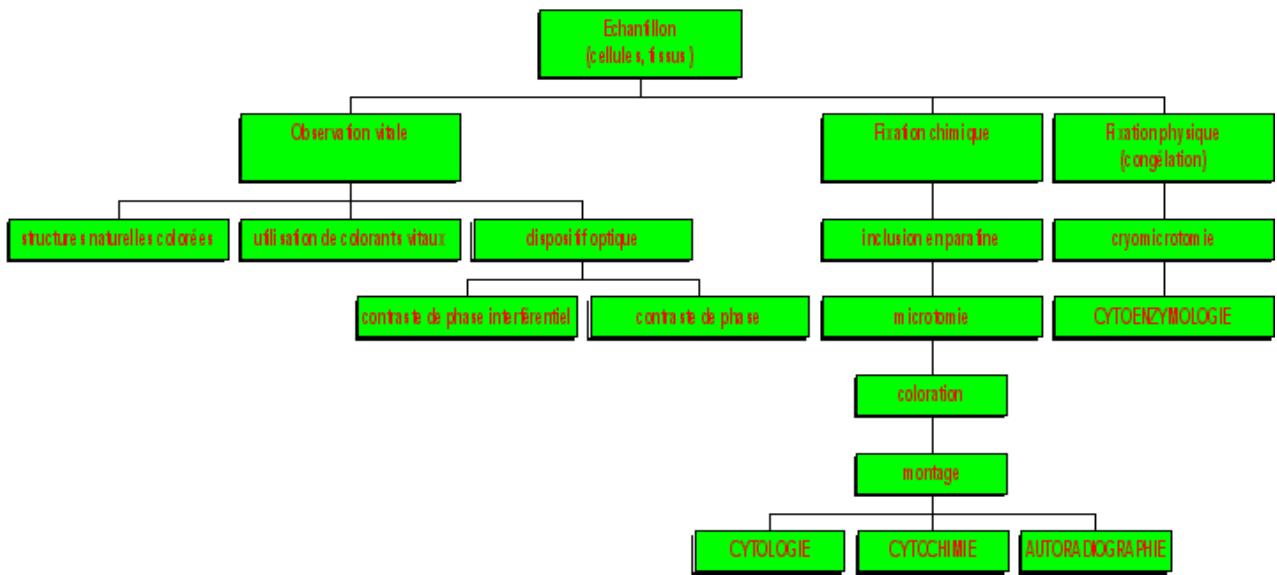
* Un fixateur chimique: colorant qui cause la mort de la cellule, mais conserve la structure et la composition de celle-ci. Ex. Lugol (acide) pour noyaux et chromosomes ; et pour enzymes: l'acétone et la formaldéhyde,..

* La cryodessiccation: congélation rapide l'échantillon dans un bain d'azote liquide (-160° à -190°C), puis déshydratation ou dessiccation sous vide à une T° de -30° à -40°C ☐ morphologie cellulaire conservée et même maintien de la vie (spermatozoïde).

2 autres étapes sont nécessaires pour analyse au microscope:

* L'inclusion: dans une substance solide (paraffine ou celloïdine). Le tissu fixé est d'abord déshydraté (bain d'alcool), dans un solvant intermédiaire (xylème ou toluène pour la paraffine, éthanol éther pour la celloïdine). Pour le microscope électronique, l'inclusion se fait dans des résines très dures (les méthacrylates et les résines époxy).

* Préparation des coupes minces: Des tranches plus au moins fines sont réalisées à l'aide d'un **microtome**. Épaisseur exigée 2 à 5 µm pour la microscopie photonique et 50 à 80 nm pour la microscope électronique.



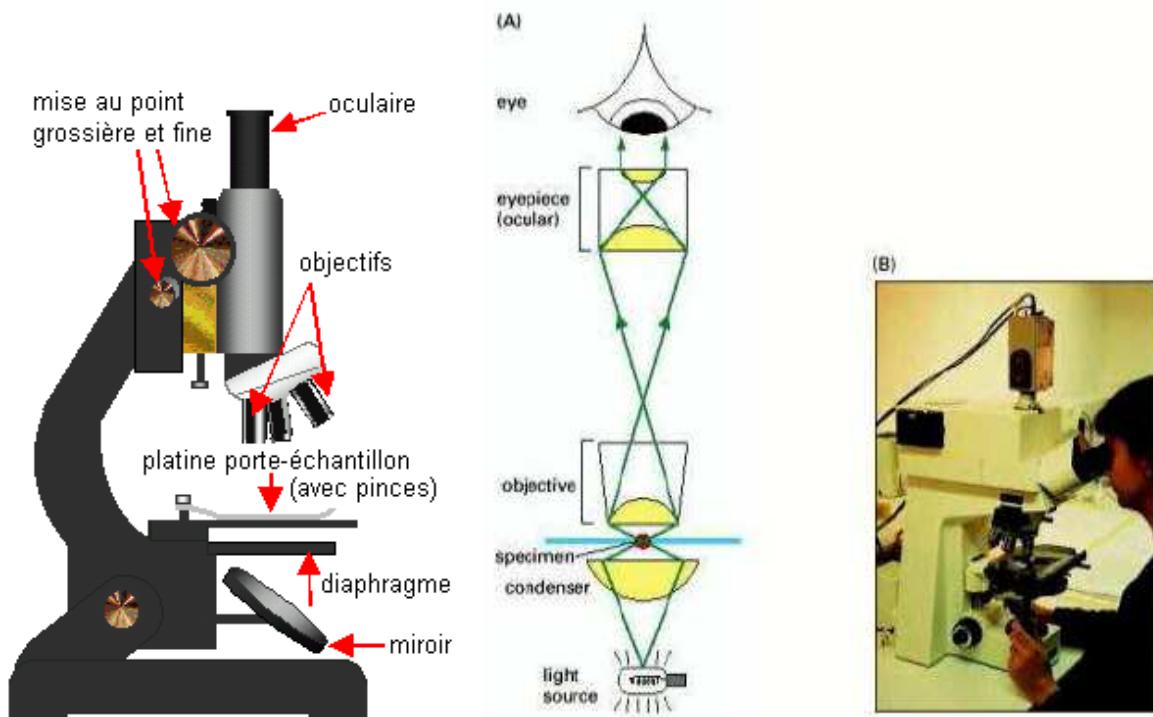
Etapes de préparation des échantillons en microscopie optique

2. Microscope optique

Définition : outil permettant l'examen d'objets agrandis en présence de photons (UV & visible).
Pouvoir séparateur amené à $0,2 \mu\text{m}$ en lumière visible. Grossissement 1000 fois et plus.

Plusieurs types:

- * Ceux qui donnent une observation directe des structures cellulaires: microscope à transmission et à contraste de phase.
- * Ceux qui donnent des informations indirectes de la structure cellulaire: microscope à fond noir et mic. polarisant.



Microscope photonique

2. 1. Microscope à fond claire

Description

Partie mécanique: *Statif, Tube binoculaire, Tube porte objectif*

Partie optique: *Source lumineuse, Système condenseur – diaphragme, Objectifs 4x/10x/40x/100x, Oculaires 10x/...*

Principe de formation de l'image

Objectif à image agrandie inversée réelle

Oculaire à image intermédiaire agrandie inversée virtuelle

Caractéristiques essentielles du microscope

Ouverture numérique : *Produit du sinus de l'angle incident maximal possible pour un rayon et de l'indice optique du milieu incident.* $ON = n \cdot \sin a$

Limite de séparation : *la limite de résolution (transverse) d d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, peut être exprimée simplement à l'aide de la longueur d'onde d'illumination λ , de l'indice de réfraction n en sortie d'objectif, et du demi angle du cône de lumière maximum accessible α .*

$$d = \frac{0.61 * \lambda}{ON}$$

Pouvoir de résolution : $1/d$

Grossissement : $G = g_1 \cdot g_2$

Applications: Histologie, Hématologie, Parasitologie, Bactériologie

2. 2. Microscope à fond noir

Principe

Éclairage par un condenseur à fond noir

Aucune lumière ne pénètre dans l'objectif

Observations des contours de la cellule par diffraction

Applications en Bactériologie

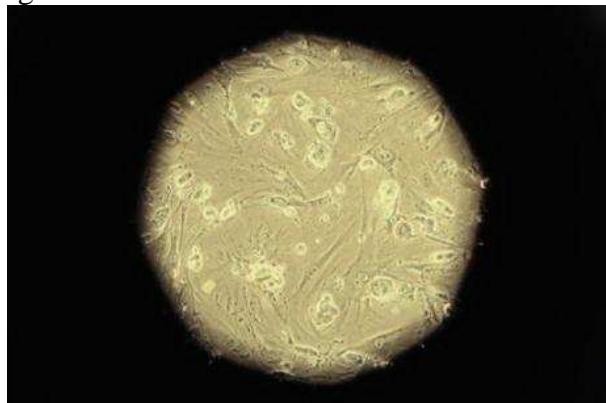


Image obtenue par microscopie à fond noir.

2. 3. Microscope à contraste de phase

Principe

Objectif avec anneau de phase intégré

Modification de la phase des rayons lumineux à variation d'intensité lumineuse

Applications: Observation de cellules vivantes



Image obtenue par microscopie à contraste de phase

2. 4. Microscope à fluorescence

Principe de la fluorescence

C'est l'émission de lumière suite à l'absorption de photons, $E = h \cdot n = h \cdot c/l \cdot 12 > 11$

Différents types de fluorescence:

Primaire : produite naturellement par certaines substances biologiques (ex : chlorophylle)

Secondaire : obtenue artificiellement en liant un composé non fluorescent avec un composé fluorescent (fluorochromes)

Les microscopes à fluorescence sont: A lumière transmise ou lumière réfléchie (épifluorescence)

Applications: Bactériologie (cytométrie sur filtre), Immunofluorescence

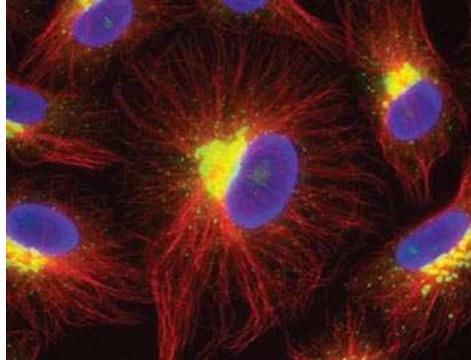


Image obtenue par microscopie à fluorescence

2. 5. Microscope confocal

Principe: Ce microscope permet de collecter l'image réfléchie au niveau d'un plan focal et d'éliminer les images du dessus (dessous) de ce plan par balayage laser

Applications: Neurobiologie

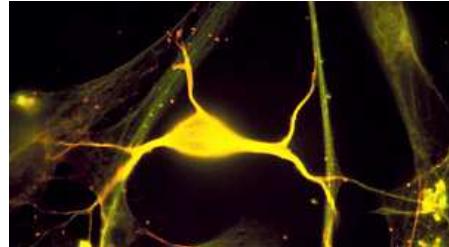


Image obtenue par microscopie confocal

3. Microscopes électroniques

Principe

Etude de l'**ultrastructure** biologique : utilise les électrons émis par une cathode, et accélérée par une forte différence de potentiel, l'image prend forme sur l'écran fluorescent et dépend de la dispersion des électrons par les noyaux atomiques contenus dans l'objet: pouvoir séparateur de 0,5 nm (5 Å). Agrandissement de 10^6 et plus.

Types:

Microscope électronique à transmission

Principe: On diminue la limite de séparation en diminuant la longueur d'onde d'excitation à utilisation des électrons à la place des photons

Caractéristiques 1. $d = 1$ nm 2. $G = de 1400x à 500 000x$

Description

Canon à électrodes

Accélérateur d'électrons

Lentille électromagnétique

Écran fluorescent de visualisation

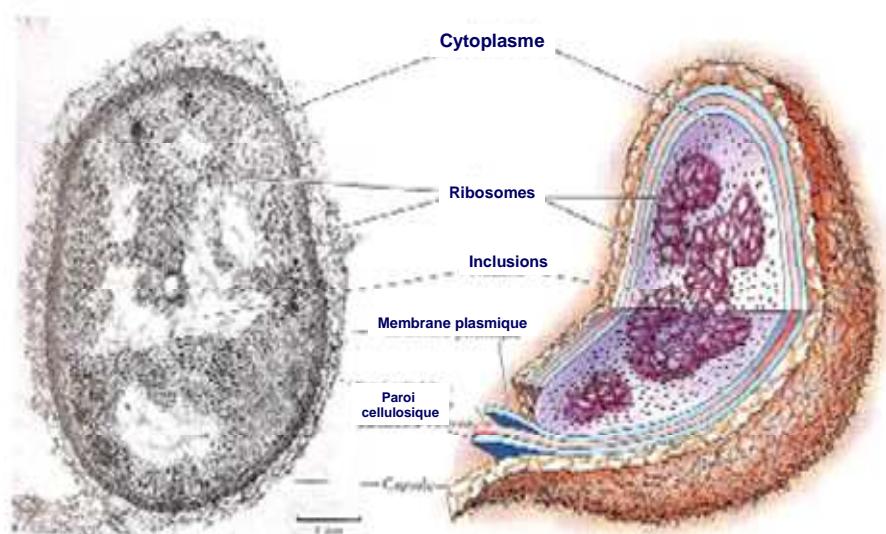
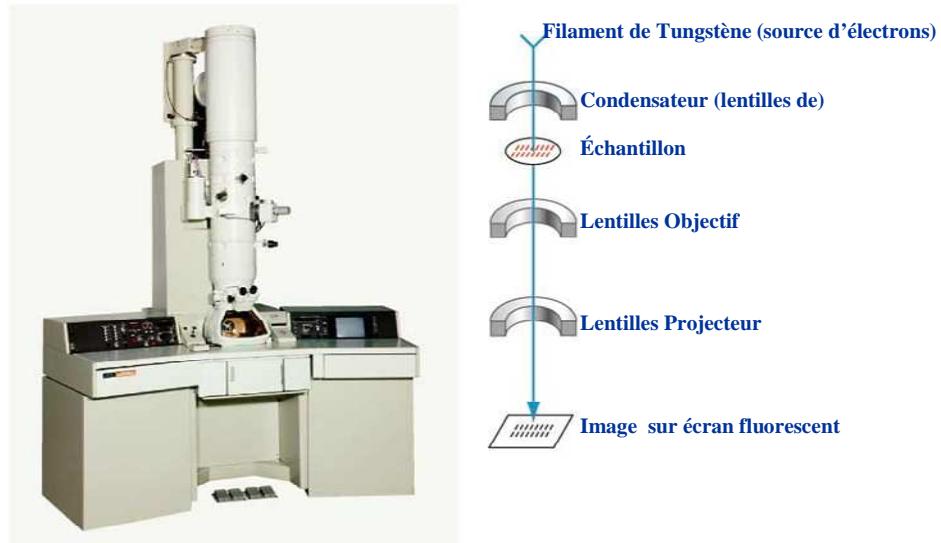
Microscope électronique à balayage

Principe: Les cellules sont traitées par des sels de métaux lourds. Les électrons émis par la cathode vont balayer la surface de la cellule

Caractéristiques 1. $d = 10 \text{ nm}$ 2. $G = 20\,000\times$

Applications: Biologie cellulaire

Microscope Électronique



Aspect de la cellule bactérienne au microscope électronique à transmission

3. Préparation des échantillons

Coloration positive

1. Fixation chimique
2. Déshydratation
3. Inclusion dans la résine
4. Coupes de 50 à 100 nm
5. Dépôt de sels de métaux lourds à augmentation du contraste

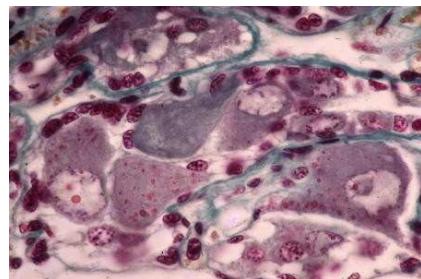


Image obtenue par coloration positive

Coloration négative

- Les sels de métaux lourds se déposent après évaporation de l'eau autour des particules

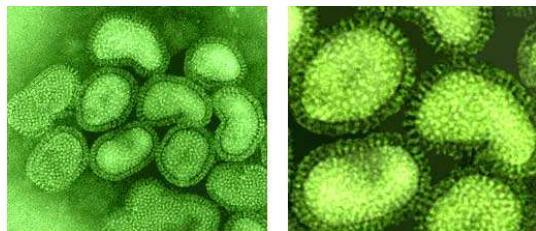


Image obtenue par coloration négative

Ombrage de particules & réplique de surface

- Réalisation de répliques quand la surface est trop épaisse pour être traversée par les électrons

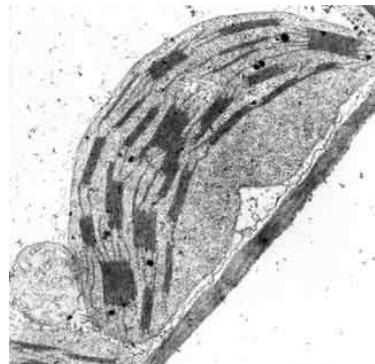


Image obtenue par ombrage

Cryodécapage & cryofracture associée à la microscopie à balayage. Obtention des répliques (impression de relief) des ultrastructures cellulaires

Cryofracture

- Fixation par Congélation des organites dans l'azote liquide à -196°C.
- Fracture du bloc: Clivage tangentiel des membranes en leur milieu.
- Réplique par ombrage

Cryodécapage

- Congélation ultra rapide
- Fracture de l'échantillon
- Sublimation de l'eau sous vide
- Réplique
- Vaporisation: La surface fracturée est vaporisée par un métal lourd (or ou platine) puis par du carbone (pour renforcer la coupe).

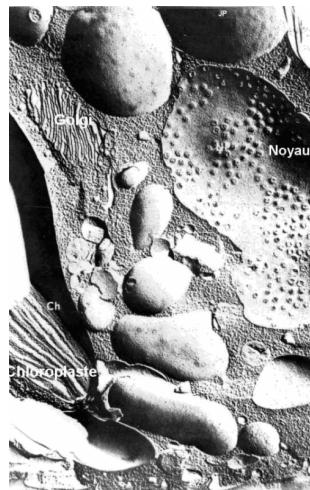


Image obtenue par cryodécapage

II. Les techniques de fractionnement des constituants cellulaires (fractionnement cellulaire)

Préparation de l'homogénat cellulaire

1. Méthodes permettant la rupture de la membrane plasmique
 - a. Mécanique : broyage
 - b. Choc osmotique
 - c. Congélations décongélations successives
 - d. Ultra-sons
 - e. Attaque enzymatique
2. Précautions à respecter pour obtenir un bon homogénat
 - a. Liquide isotonique
 - b. Basse température
 - c. En présence d'agents réducteurs
 - d. PH neutre

Séparation des organites

Par centrifugation différentielle: Augmentation de la vitesse et du temps

Par centrifugation en gradient de densité (ultracentrifugation): Principe : séparation des organites en fonction de leur constante de sédimentation, fonction de leur masse molaire:

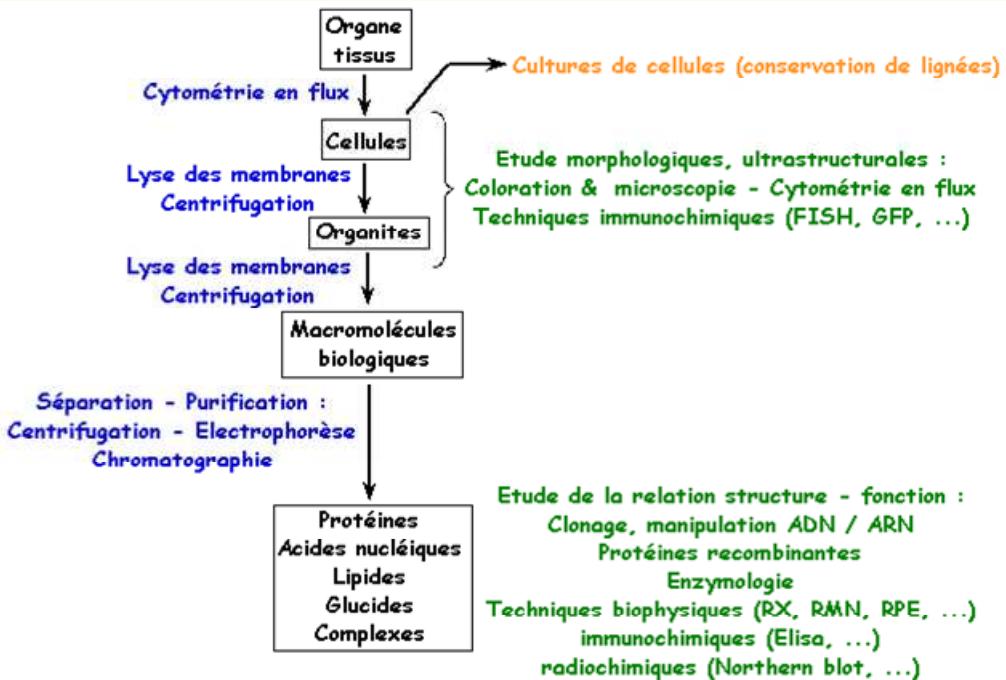
1. Séparation en solution de saccharose de 5 à 20 %
2. Dépôt des organites en surface
3. Centrifugation : arrêt de la migration quand les organites rencontrent une couche de saccharose de densité supérieure à la leur
4. Séparation des organites en fractions (= aliquotes)

Suivi de la séparation des fractions

Utilisation de marqueurs moléculaires des organites: Ce sont des enzymes caractéristiques de ces organites. On peut aussi évaluer la purification par microscopie

Applications

Utilisation de systèmes cellulaires. Ex : synthèses protéiques in vitro

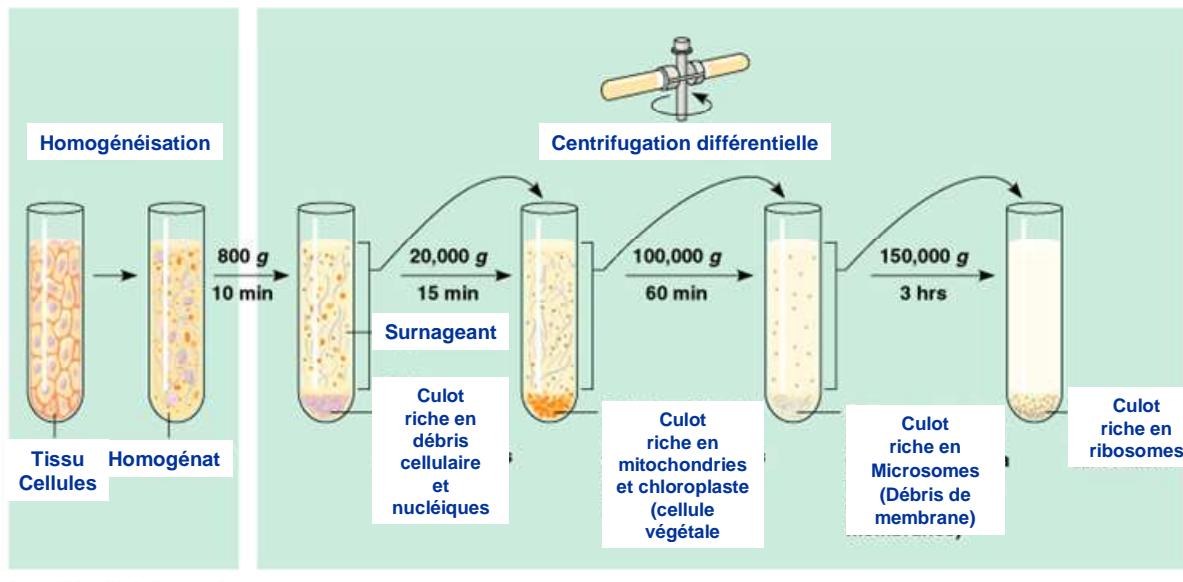


Synopsis général des techniques pour aller de l'observation des tissus à la purification et l'analyse des macromolécules biologiques

Techniques et Buts

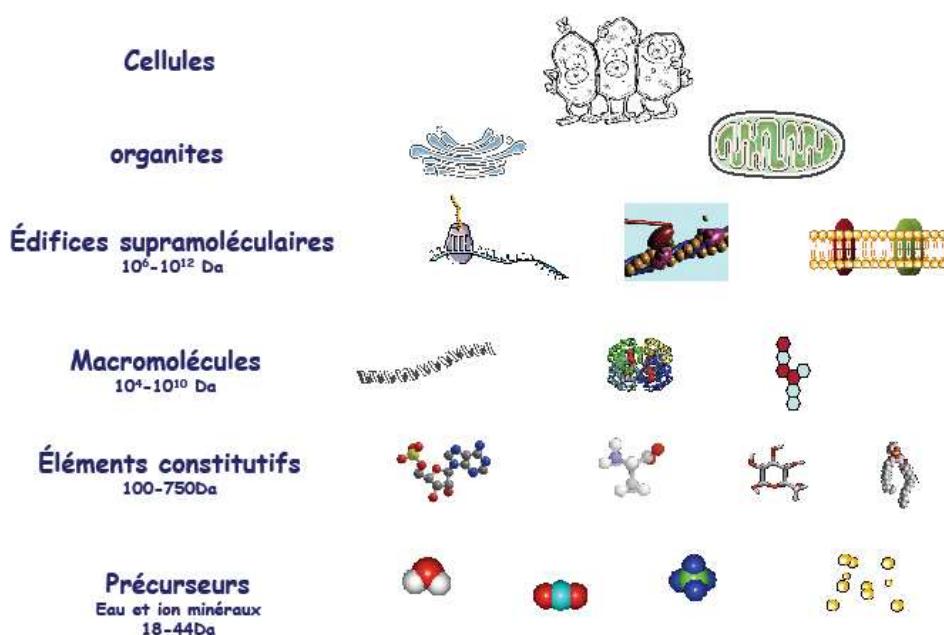
Techniques	But
coupes de tissus (microtome) - <u>isolation de cellules</u>	Prélèvement
coloration - <u>histologie</u> - <u>immunohistochimie</u>	observation microscopique - cytologie
cytométrie en flux	tri des cellules - observation de différents marqueurs phénotypiques - apoptose
culture cellulaire	multiplication des cellules - sauvegarde des cellules
immunohistochimie	localisation intracellulaire - mise en évidence d'organites, de macromolécules typiques
lyse des cellules (détecteurs, chlorure guanidinium, <u>lysosome</u>, ...)	rupture de la membrane plasmique - extraction de macromolécules ou d'organites
ultracentrifugation en gradient de densité (sucrose)	séparation des cellules en fonction de la constante de sédimentation (Svedberg)
ultracentrifugation différentielle	séparation et purification des organites
techniques de chromatographie (échange d'ions, gel de filtration, affinité, ...)	séparation et purification des macromolécules biologiques (surtout protéines)
immunocytochimie (ELISA, <u>EIA</u>, "radioimmunoassay", ...)	localisation cellulaire des macromolécules biologiques
electrophorèse sur gel d'agarose	analyse de l'ADN (tailles et formes des fragments)
electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives ou dénaturantes (SDS)	analyse des protéines (masse molaire / nombre de sous-unité / structure quaternaire)
méthodes de dosage spectrophotométrique (absorption à 280 nm, méthode de Bradford, méthode de Lowry ...)	détermination de la concentration des protéines
dosage enzymatique	mesure de l'activité catalytique des enzymes
construction de banques et clonage d'ADNc	surexpression de protéines recombinantes

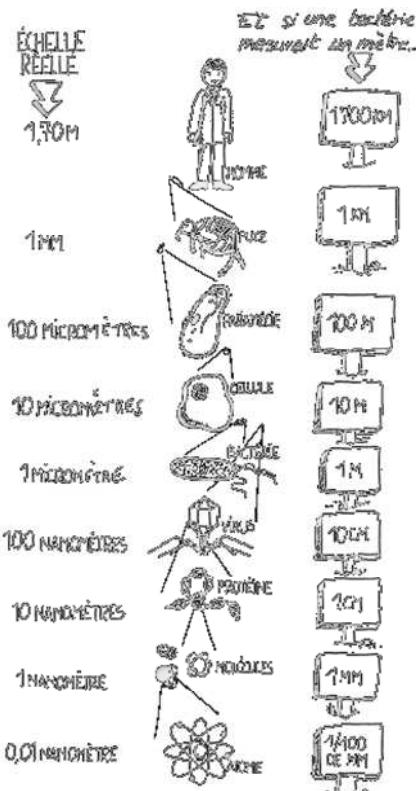
Centrifugation



Isolement à partir d'une population de cellules un organite bien défini pour lui subir des méthodes d'analyse physiques ou biochimiques de ses constituants moléculaires.

Organisation des Biomolécules : quelques exemples





Échelles de taille en Biologie

4000 ans	Durée de vie des plus vieux arbres
1 an	Durée de vie d'une souris
1 mois	Durée de vie d'une drosophile
2 jours	Reproduction d'une cellule animale en culture
20 min	Reproduction d'une bactérie
20 sec	Synthèse d'une protéine
1 ms	Réaction enzymatique
10 ps	Interaction initiale d'un photon avec l'œil ou les chloroplastes

Spatiales

Temporelles

