

# Méthodes d'étude de la cellule

## Etude morphologique

### Le microscope optique (ou photonique)

#### Notions théoriques

- **Indice de réfraction  $n$**   $n = c/v$
- **Dioptre** : Interface entre deux milieux translucides d'indices de réfraction différents
- **Lentille optique** : système optique centré formée de 2 dioptres dont l'un, au moins, est sphérique
- **Pouvoir de séparation** (ou de résolution) : distance minimale entre 2 points pour pouvoir les observer

0,2  $\mu m$  pour les meilleurs MO

0,2  $nm$  pour les MET

$$= \frac{0,61 \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

$\lambda$  : longueur d'onde du rayonnement utilisé

$n$  : indice de réfraction du milieu dans lequel est placé l'objet

$\alpha$  : demi-angle du cône de vision de l'objet par le système optique

- **Microscope** : composé d'au moins 2 lentilles convergentes (objectif et oculaire)

Caractérisé par son **grossissement** (ou puissance) et son **pouvoir de résolution**

Un microscope peut travailler en :

**Transmission** : la lumière traverse l'objet à étudier (celui-ci doit être translucide)

- **Absorption** : donne une image « colorée » en lumière blanche ou en nuance d'intensité en lumière monochromatique
- **Contraste de phase** : application de la théorie ondulatoire (diffraction de la lumière)  
Ne s'applique que pour des préparations « ayant du relief » (pas de coupes de tissus)

**Réflexion** (loupe binoculaire ou stéréomicroscope, microscope à fond noir, MEB)

Donne une image « en relief » de la surface des objets et non de leur structure interne

Ne s'applique que pour des préparations « ayant du relief » (pas de coupes de tissus)

Nécessite « un éclairage latéral » de l'objet

**Réémission** : microscopie en fluorescence (microscopes bi et multiphotoniques)

Nécessite des puissances d'illumination importantes

## Utilisation du microscope optique

### ❖ Examens de tissus fixés en coupe

#### Fixation

Utilisation de **fixateurs** : aldéhydes (formol, glutaraldéhydes) ou sels oxygénés de métaux lourds (bichromates, tétroxyde d'osmium  $\text{OsO}_4$ )

Entraîne la mort cellulaire et permet l'immobilisation des structures et l'inactivation des enzymes

#### Déshydratation (car paraffine hydrophobe)

Substance plongée dans des bains d'alcool de degré croissants

#### Enrobage ou Inclusion

Substance plongée dans le xylène (solvant organique miscible à l'alcool et à la paraffine) puis dans la **paraffine**

#### Coupe au microtome

Coupes de quelques microns

Formation d'un ruban de coups sériés

Recueillies sur lame de verre (porte-objet)

#### Réhydratation

Coupes déparaffinées et plongées dans des bains d'alcool de degrés décroissants

Permet la coloration des coupes

#### Coloration

- **Colorants signalétiques** : permettent de repérer le volume et la forme des cellules
  - Hématoxyline (noyau en bleu violet)
  - Eosine (cytoplasme rose)
  - Bleus de méthylène, de toluidine

*Association de 2 colorants* : HE (Hématoxyline-Eosine)

*Association de 3 colorants* : Trichrome de Masson (HE + Vert de méthyle) (colore le collagène)

MGG (coloration de référence en hématologie)

*Association de 4 colorants* : Tétrachrome de Herlant

Colorants acides : fixation sur régions acidophiles ou éosinophiles (= régions basiques)

Colorants basiques : fixation sur régions basophiles (= régions acides)

- **Colorants cytochimiques ou histochimiques** : coloration des substances de façon spécifique

#### Observation

Ajout de baume de Canada ou résine synthétique sur lame porte-objet (= substance de même indice que le verre) + couvre-objet

Objectif « à sec » ou « à immersion » avec de l'huile de cèdre pour atténuer les effets des dioptries

## ❖ Extemporannée et coupe à congélation

Congélation avec du CO<sub>2</sub> liquide sur la platine porte-objet

**Coupe au cryotome** plus épaisses (15  $\mu\text{m}$ )

### Utilisation

- **Extemporannées** : utilisées en péropérateur (coupe congelée et colorée)
- **Cytoenzymologie** : étude de l'activité des enzymes (car enzymes toujours actives)

## ❖ Examens de cellules sur frottis

Objets déjà translucides

Fixation pas systématique (désiccation peut suffire)

Absence de coupe = enzymes inactives

Coloration signalétique ou cytochimique possible

## ❖ Examens de cellules vivantes

Utilisation d'un microscope inversé (puissance max.  $\times 40$ ) : microscope à fond clair, contraste de phase, fluorescence, pas de ME !!

Platine chauffante : permet une plus longue période d'observation

### Observation

- **Méthodes physiques** : Microscope à contraste de phase
- **Méthodes chimiques** : **Colorants vitaux** (car majorité des colorants toxiques pour la cellule)
  - Vert Janus B (spécifique des mitochondries)
  - Protéines fluorescentes (GFP)
  - Bleu de Trypan (coloration des cellules mortes)

## Les différents microscopes optiques

- **Microscope en fond clair** (microscope normal en transmission)

NB : Fond clair = technique histologique usuelle

Autres techniques = techniques spéciales

- **Stéréomicroscopes** (ou loupes binoculaires)

Observation de la surface des objets « en relief »

Faible grossissement ( $\times 80$ )

- **Microscopes à contraste de phase**

- **Microscope à contraste différentiel**

Application particulière du contraste de phase

- **Microscope à fond noir**

Condenseur spécial avec incidence rasante

Observation d'objets très petits mais forme et dimension non discernables dû à la lumière émise

- **Microscope à lumière polarisée** (très peu utilisé en biologie)

- **Microscopie en fluorescence**

Amélioration du pouvoir de résolution ( $\lambda$  petit  $\rightarrow$  UV) mais la fluorescence annule le gain en pouvoir de résolution

Fixation d'un fluorochrome

Permet la localisation de substances spécifiques

- **Microscopie confocale et déconvolution**

Profondeur de champs d'un microscope = épaisseur de la préparation nette à l'image (diminue avec la puissance de l'objectif)

**Déconvolution** : utilisation d'une fonction mathématique

**Microscope confocal** : sténopé placé sur le plan image du plan focal de l'objectif (plans confocaux)

L'utilisation d'un laser permet l'observation de coupe pouvant atteindre  $100 \mu m$

- **Microscopie bi et multiphotonique**

Excitation des fluorochromes par des IR (pénètrent des objets très épais)

Pas de lésions des tissus

Observation d'objets de  $0,5 mm$  d'épaisseur

## Le microscope électronique

Un faisceau d'électrons primaires contactant un objet génère :

- Des électrons transmis et qui sont mis à profit dans le MET
- Des électrons secondaires, de faible énergie et de haute résolution, mis à profit dans le MEB
- Des électrons rétrodiffusés, de haute énergie et de basse résolution, utilisés uniquement dans le MEB

Nécessité de travailler dans le vide

Préparation extrêmement fine (50 nm)

Lames de verre remplacées par des grilles

### Microscope électronique à transmission MET

Lentilles remplacées par des bobines elm : Variation de puissance continue

1<sup>ère</sup> bobine : condensateur

2<sup>ème</sup> bobine : objectif

3<sup>ème</sup> bobine : projection de l'image

### Préparation à observer

**Fixation** au **glutaraldéhyde** puis post fixation à l'**acide osmique** OsO<sub>4</sub>

**Déshydratation**

**Inclusion** avec **résine époxy** (araldite, cyanolite ou métacrylate)

**Coupe avec un ultramicrotome** (couteau d'acier remplacé par couteau de verre ou de diamant)  
recueillies sur des grilles

**Coloration** avec des **métaux lourds**

- **Colorants signalétiques** : imprégnation des coupes après inclusion avec Citrate de plomb ou Acétate d'uranyle
- **Colorants spécifiques** : imprégnation des coupes avant inclusion, fixation d'anticorps sur les substances à étudier

Observation rapide car les coupes souffrent de la puissance du faisceau d'électrons

## Microscope électronique à balayage MEB

Observation de la surface des objets

Pas besoins d'inclusion, ni de coupe

Fixation et déshydratation : rétracte les échantillons d'où l'utilisation de CO<sub>2</sub> liquide pour redonner leur volume initial

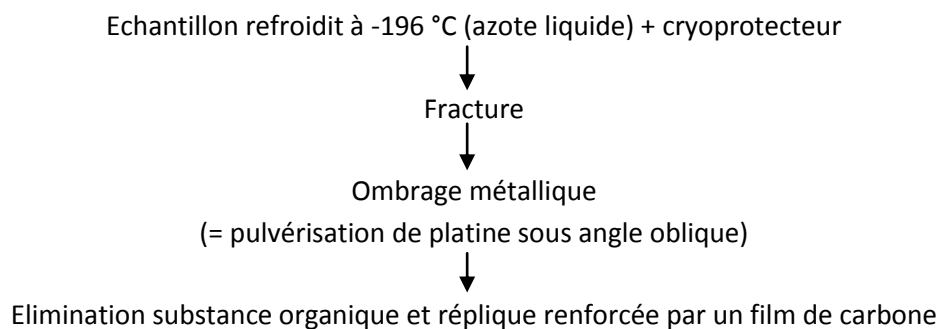
Ombrage métallique : rend la production d'électrons secondaires sensible uniquement à la topographie de l'objet étudié

### Comparaison entre ces techniques

Grossissement utile du MET = 500 000 et du MEB = 100 000

MET et MEB complémentaires pour une étude

## Cryofracture et cryodécapage



**Cryofracture** : fracture sur zone de moindre résistance (ex : zone hydrophobe de la MP)

**Cryodécapage** : après fracture, élimination de l'eau par sublimation puis observation de différentes structures (ex : cytosquelette)

# Localisation des constituants cellulaires

## Cellules vivantes

- **Protéines fluorescentes : GFP et dérivées**

GFP placé sur le gène de la protéine : obtention d'une protéine chimère marquée  
On peut suivre le devenir de la protéine par microscopie en fluorescence

- **FRAP** (application dérivée des GFP)

*Intérêts* : Marquage spécifique d'une protéine et pas de manip. Radioactive

*Inconvénients* : Uniquement applicable aux protéines

Illumination très forte de la protéine qui détruit sa fluorescence

- **Etude du retour de la fluorescence** : cheminement de la protéine dans la cellule

- **Sondes métaboliques**

Petites molécules repérables dans la cellule

**FURA2, Quin AM** : indicateur concentration en calcium intracellulaire

**Carboxyfluorescéine** : indicateur du pH intracellulaire

**Rhodamine 123** : marque les mitochondries actives

## Cellules mortes

### ❖ Méthodes cytochimiques

#### **Réaction au PAS : Mise en évidence des polysaccharides**

**Réactif de Schiff** : coloration en rouge en contact avec aldéhyde

- Ouverture des polysaccharides (cycles) par oxydation à l'acide per-iodique  $IO_4H$  : génère 2 aldéhydes
- Application du réactif de Schiff

#### **Réaction de Feulgen : Mise en évidence de l'ADN**

- Ouverture du désoxyribode de l'ADN par hydrolyse à l'acide chlorydrique à chaud (dépurine l'ADN)
- Application du réactif de Schiff

#### **Réaction de Perls : Recherche de fer**

Utilisation de ferrocyanure de potassium

Très utilisé en hématologie (diagnostic des anémies)

## ❖ Cyto ou Histoenzymologie

Couplage avec une réaction enzymatique

*Exemple* : couplage avec le PAS pour présence ou non de glycogène

- On fait agir une  $\alpha$  amylase salivaire (dégradation du glycogène)
- Application au PAS
  - Si coloration : pas de glycogène
  - Si aucune coloration : présence de glycogène

On peut aussi mettre en évidence la présence d'une enzyme

*Exemple* : En présence de  $H_2O_2$ , le DAB donne un produit coloré en présence de peroxydases

## ❖ Marquage par affinité

*Exemple* : La **phalloïdine** est spécifique de l'actine

## Immunocytochimie

Emploi d'anticorps marqués préalablement

**Méthode directe** : on ne fixe qu'un révélateur sur l'anticorps

**Méthode indirecte** : plusieurs révélateurs fixés sur un anticorps (ex: immunofluorescence indirecte)

Plus de sensibilité mais légère perte de spécificité

Marquage des anticorps primaires ou secondaires :

- En microscopie optique

**Immunoenzymologie** : marquage par une enzyme (péroxydase ou phosphatase alcaline)

**Immunofluorescence** : marque par un fluorochrome

- En microscopie électronique

Ferritine : protéine de stockage du fer intracellulaire

Billes d'or colloïdal : marquage simultané de différents anticorps

## ❖ Marquage métabolique : Autoradiographie

Basé sur la propriété des substances radioactives d'impressionner les plaques photographiques dans l'obscurité

*Intérêts* : Marquage des protéines (précurseur = AA) et des acides nucléiques (précurseurs = nucléotide)

*Inconvénients* : Marquage non sélectif et utilisation de substances radioactives



# Séparation des cellules

## Obtention de cellules isolées à partir de tissus vivant (biopsies)

Digestion modérée par des protéases, en présence d'un chélateur du calcium

## Numération des cellules (2 types d'automates)

- **Compte-globule** : système basé sur la mesure d'impédance (résistance)

Permet de compter les cellules et d'évaluer leur taille

Dispositif utilisé pour réaliser les numérations sanguines

- **Cytomètre de flux**

Permet de compter les cellules, de quantifier les marqueurs cellulaires et de trier les cellules

## Séparation de cellules isolées

**Adhérence au support de culture** : cellules non adhérentes éliminées

**Expression de marqueurs membranaires** repérés par des anticorps couplés à

- Un fluorochrome : **FACS**
- Une bille magnétique : **MACS**

## Culture cellulaire

# Séparation des composants cellulaires

## Lyse cellulaire

**Lyse ménagée** (« lyse douce ») pour ne pas détruire les organites cellulaires

**Lyse mécanique**

## Séparation des différents organites

Centrifugation ou sédimentation accélérée : séparation des organites selon leur coefficient de sédimentation

- **Centrifugation différentielle** : centrifugations successives avec augmentation de la puissance
- **Ultracentrifugation** : technique sur gradient de densité
  - Vélocité** : densité des particules  $>$  densité maximale du gradient  
Au cours de la centrifugation, les particules se classent en bandes successives en fonction de leur vitesse de sédimentation
  - A l'équilibre ou isopicnique** : densité des particules  $<$  densité maximale du gradient  
Au cours de la centrifugation, les particules migrent jusqu'à la zone de densité qui leur correspond

Récupération des organites et particules séparés

- Par aspiration douce à partir de la surface libre du gradient
- Par écoulement libre en perçant un petit trou à la base du tube
- Par aspiration spécifique en perçant latéralement le tube à hauteur de la bande

Les vésicules exprimant des antigènes spécifiques en surface peuvent faire l'objet d'un tri par FACS ou MACS