

Méthodes d'études de la cellule

Aurore Perrin, MCU-PH

I- Introduction

Cellule : unité trop petite pour être observée par l'œil humain

Besoin d'outils pour grossir les éléments d'une cellule

Gamme importante de microscopes

Microscopes à lumière ou microscopes photoniques

-> divers types de microscopes à lumière :

- microscopes par transmission : observation directe des structures dont les dimensions vont jusqu'à environ $0,2 \mu\text{m}$
- microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase : donnent des informations indirectes sur l'ultrastructure des cellules
- le microscope confocal à balayage

Utilise la lumière **visible** (390 à 760 nm)

< 390 nm : *Ultraviolet*

> 760 nm : *Infrarouge*

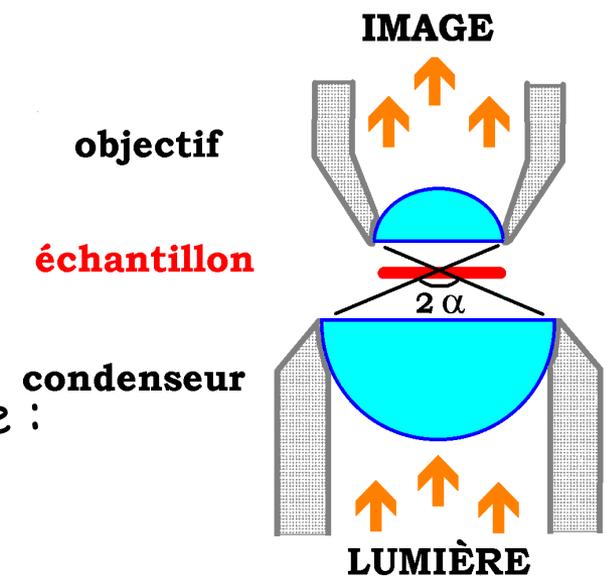
résolution (=pouvoir de résolution) microscope photonique :

$$R = 0,61 \left(\frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} \right)$$

λ = longueur d'onde

n = plus petit indice de réfraction du trajet optique

α = demi-angle d'ouverture de la lentille



œil humain : env 75 μm (pour des objets observés à une distance de 25 cm)
-> Varie selon contraste objet, conditions éclairément, âge observateur...



Ne pas confondre "limite de résolution" et "résolution"

Résolution (= pouvoir de résolution) : distance la plus petite entre 2 objets pour qu'ils puissent être distingués

Limite de résolution : distance la plus petite entre 2 objets pour qu'ils puissent être distingués dans les meilleures conditions d'observation possibles

Plus la longueur d'onde est courte, plus la limite de résolution est faible donc meilleure est la résolution

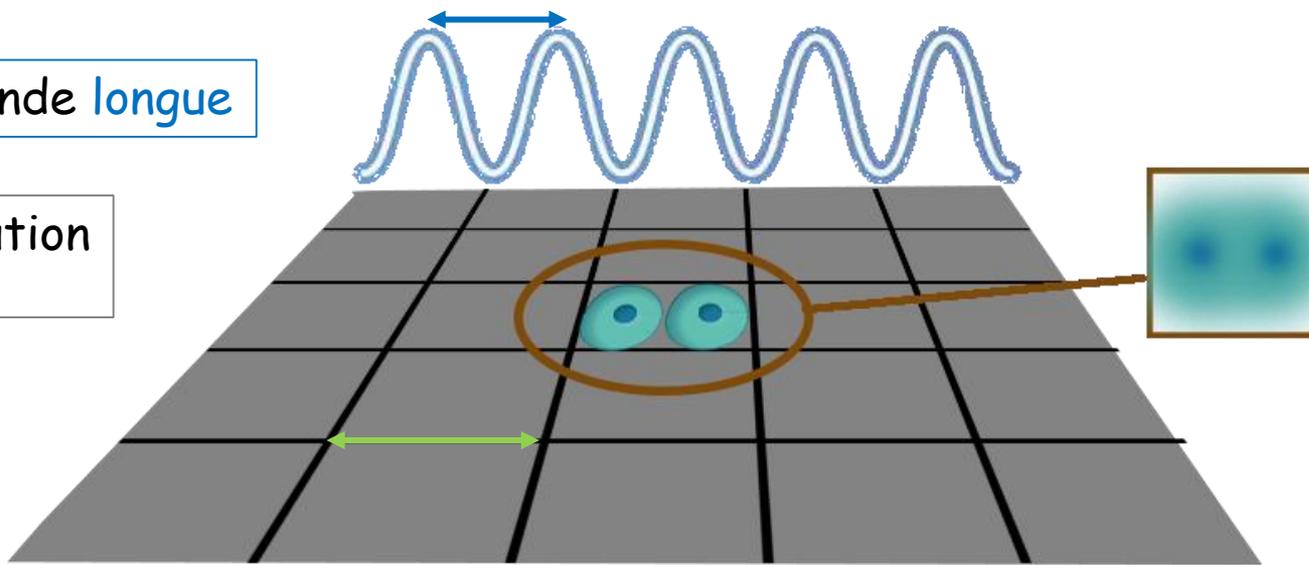
Plus la limite de résolution tend vers l'infiniment petit = plus la distance minimale pour distinguer 2 objets est faible, meilleure est la résolution

Microscope électronique : résolution meilleure que celle d'un microscope photonique (longueur d'onde d'un électron plus courte que celle d'un photon)

Longueur d'onde **longue**

Faible résolution
(25 cases)

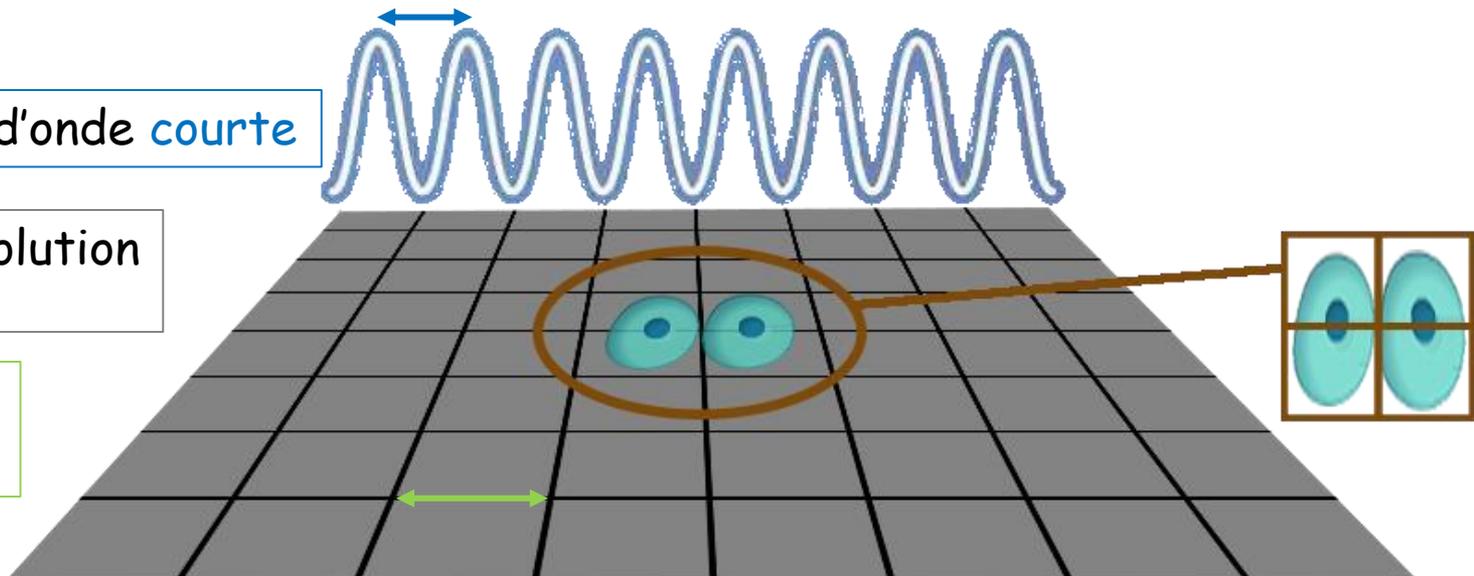
Limite de
résolution



Longueur d'onde **courte**

Forte résolution
(64 cases)

Limite de
résolution



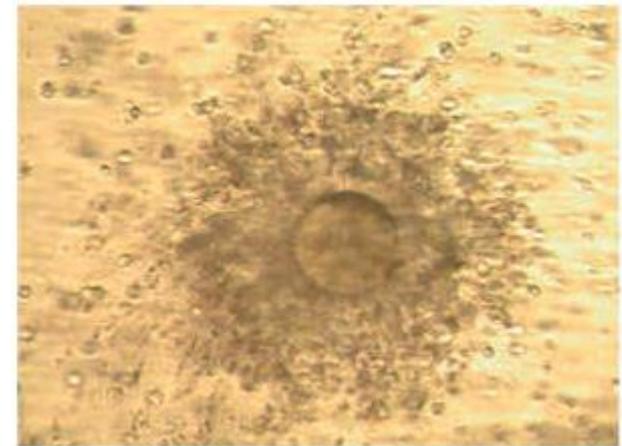
II- Matériels d'observation

A- Loupe binoculaire

Observation | en lumière réfléchie (objets opaques)
| en transparence

Limite de résolution : env $2 \mu\text{m}$

Grossissement utile : env 200x



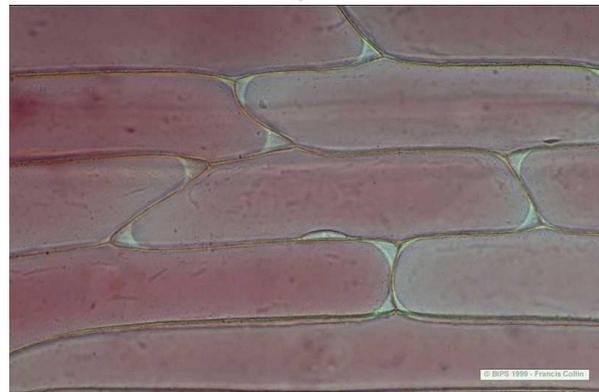
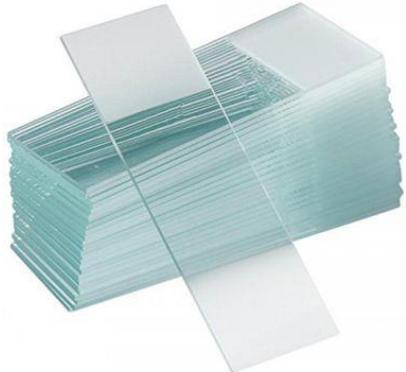
B- Microscope photonique classique (microscope droit)

Limite de résolution : env jusqu'à 0,2 μm

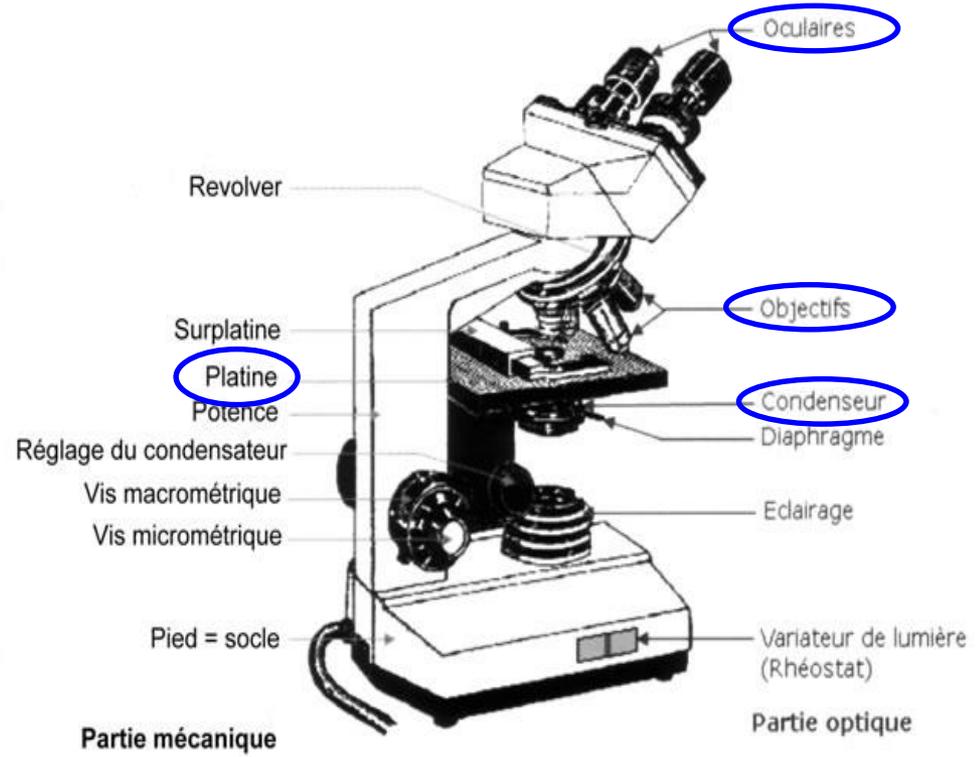
Observation en transparence

Faible épaisseur (< 10 μm)

Grossissement utile : env 40 à 1250 x



Cellule d'épiderme de bulbe d'oignon rouge

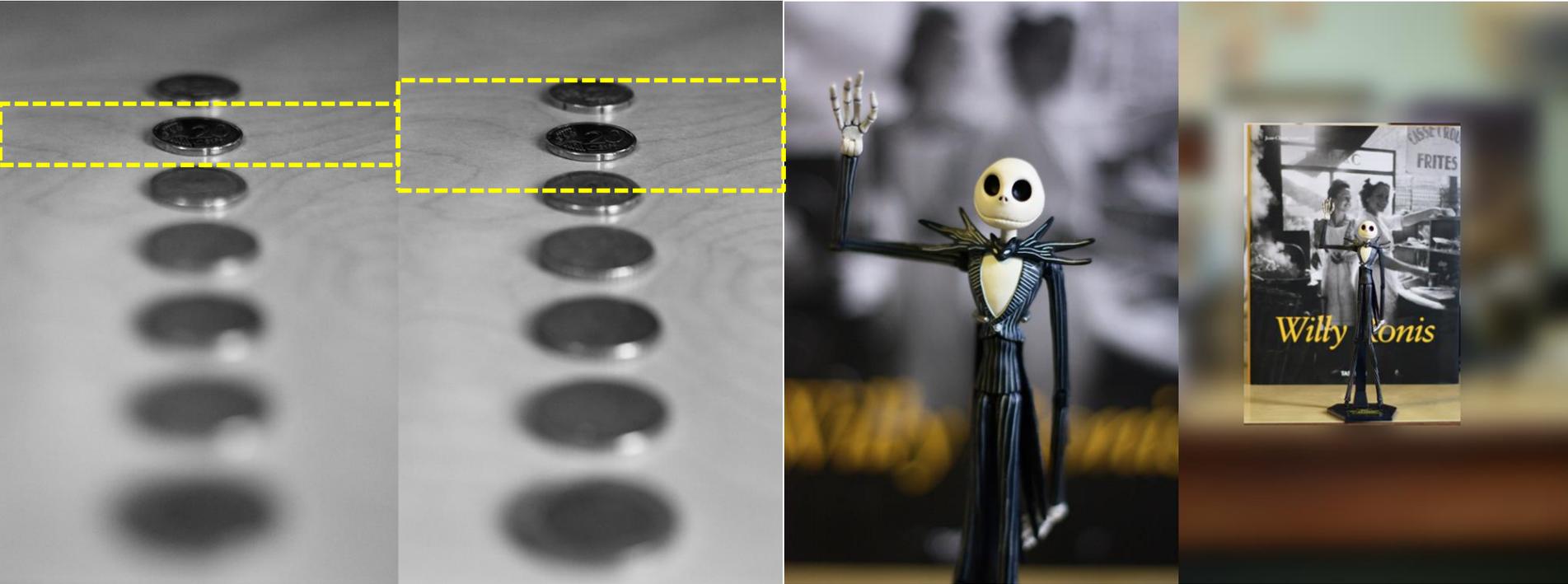


LES PARTIES D'UN MICROSCOPE PHOTONIQUE

<http://www.microbiologie-medicale.fr/examenmicroscopique/microscope.htm>

Profondeur de champ

= Zone comprise entre le premier et le dernier plan net de l'image



A 50 cm du personnage

A 1,50 m du personnage

Proximité de l'échantillon = profondeur de champ faible
-> Fort grossissement = profondeur de champ faible

$G : \times 25 \rightarrow$ Profondeur de champ : $25 \mu\text{m}$
 $G : \times 1000 \rightarrow$ Profondeur de champ : $0,6 \mu\text{m}$



Surplatine

Chariot
=
platine

Condenseur

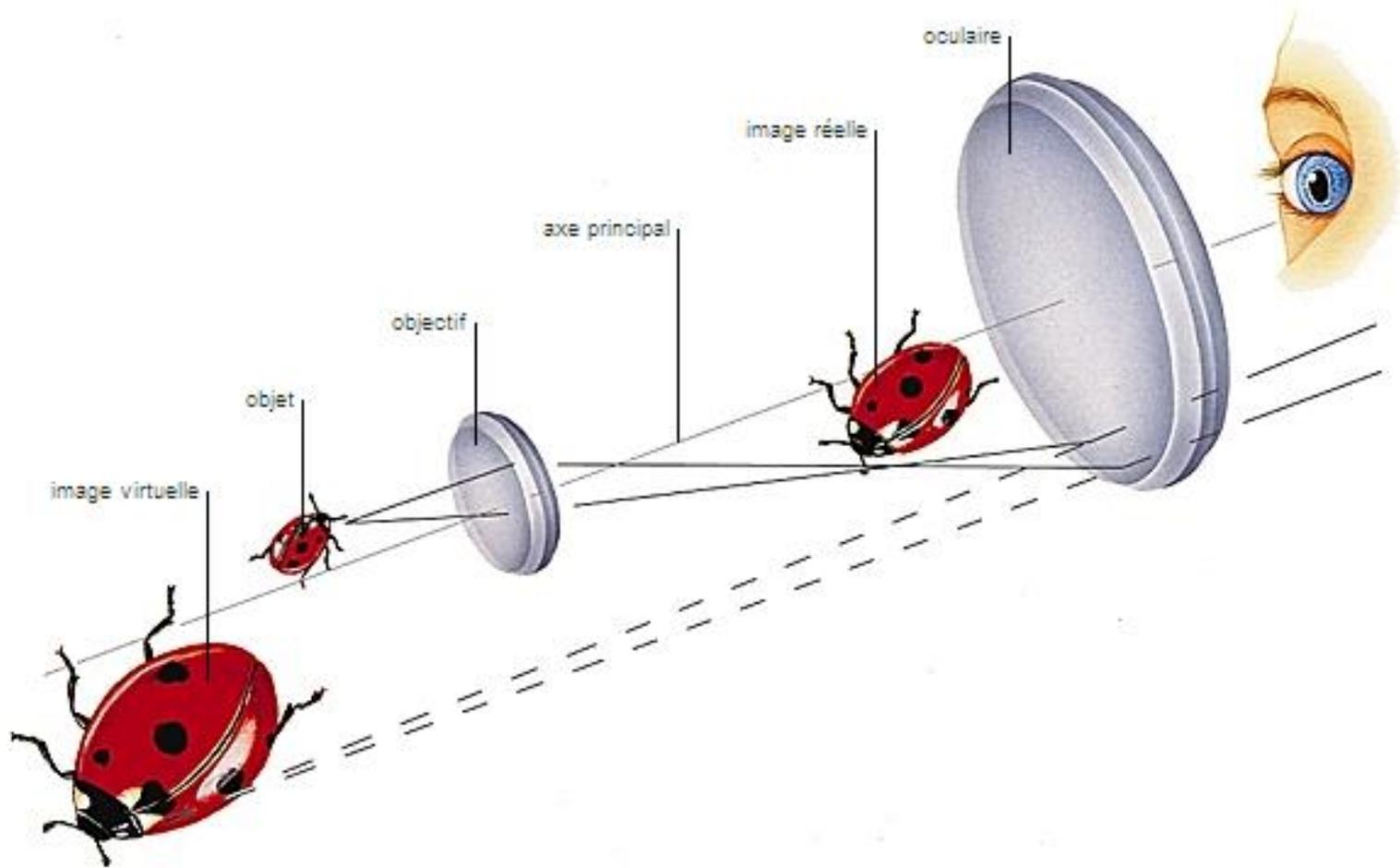


Objectif

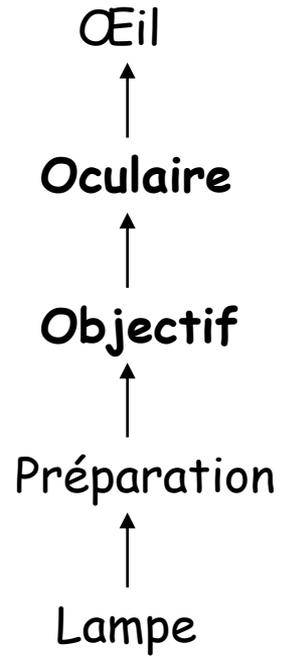
Objectif à immersion : lentille baigne dans un liquide de réfraction proche de celui du verre -> augmente le pouvoir de résolution



Oculaires

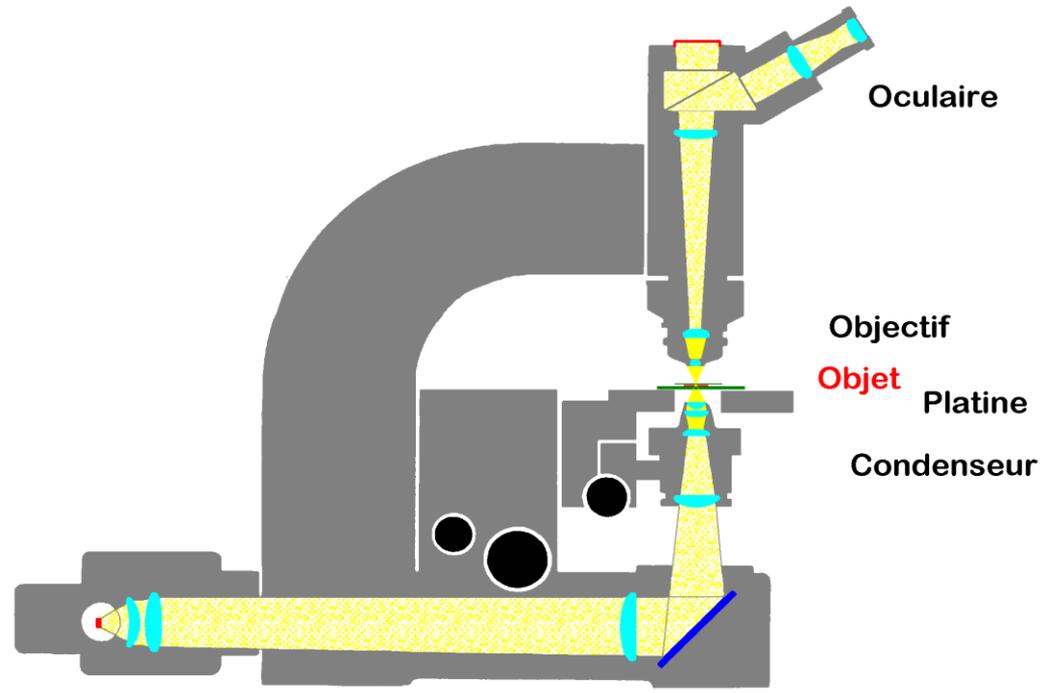


Caractéristiques de l'image



Grossissement G_2
Grossissement G_1

-> $Grossissement = G_1 \times G_2$



Exemple :

Oculaire x10
Objectif x100

$Grossissement = 10 \times 100 = 1000$

Taille de l'image = taille réelle x grossissement

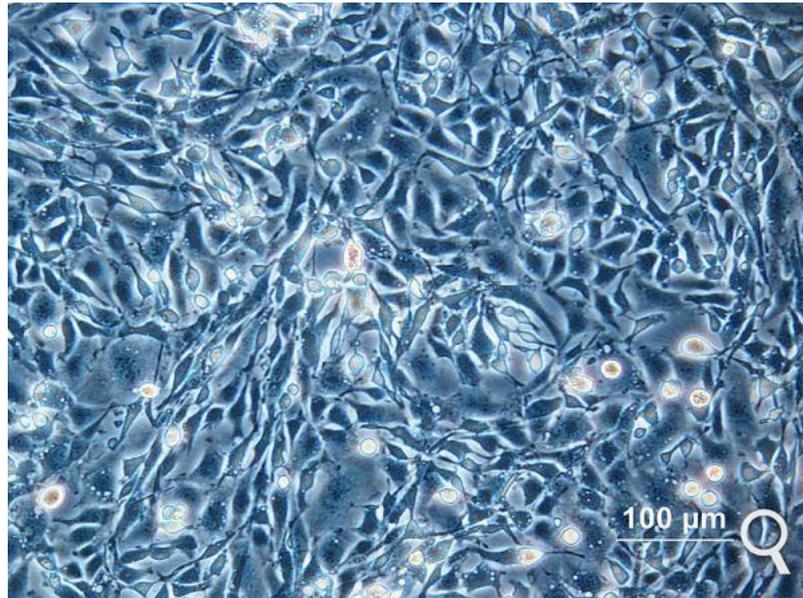
C- Microscope photonique inversé

Limite de résolution : env $0,2 \mu\text{m}$

Observation en transparence

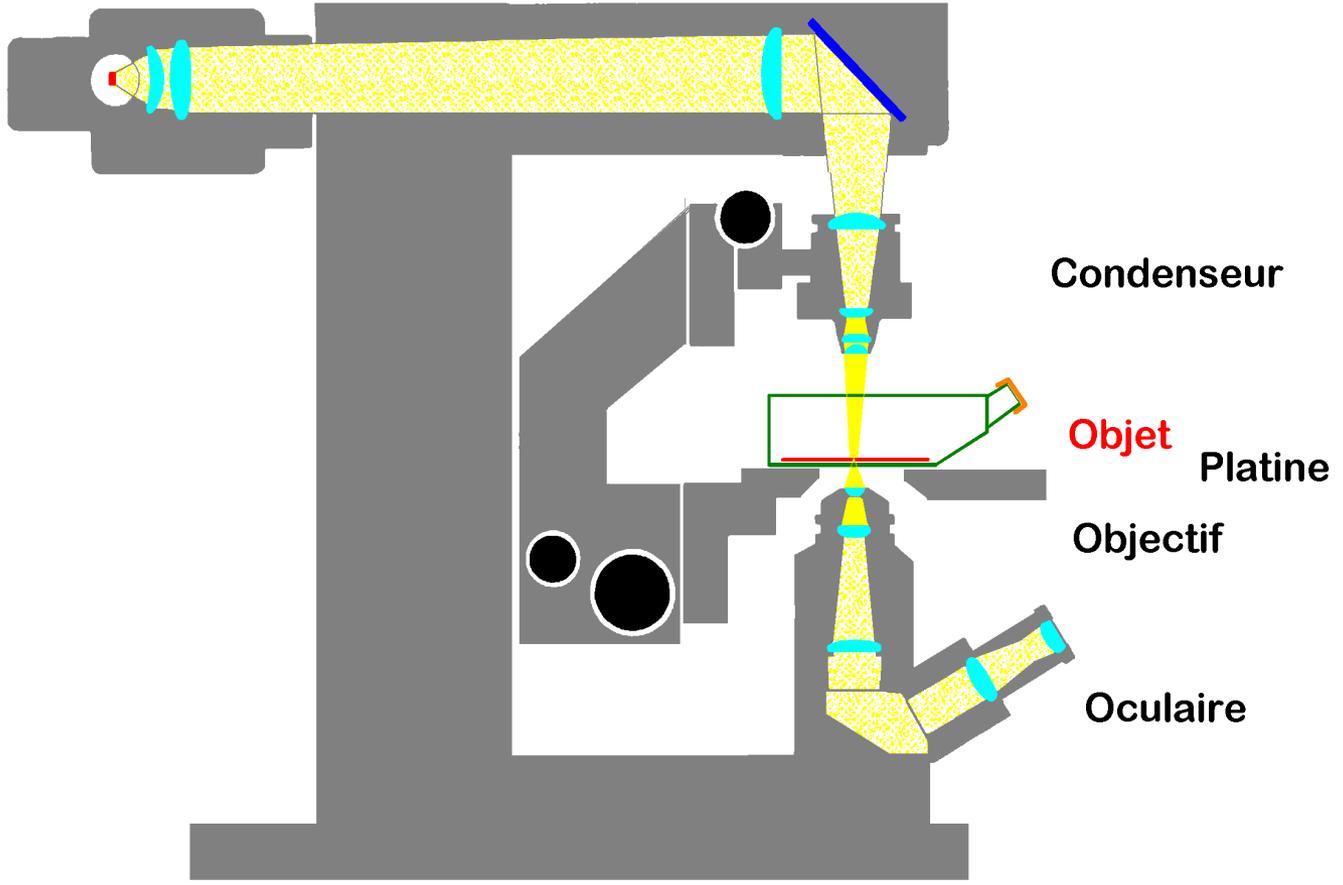
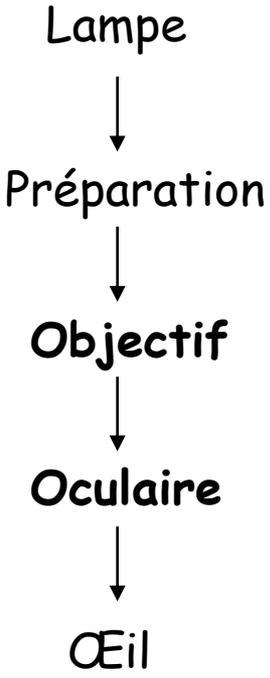
Grossissement utile : env 40 à 1250 x

Permet d'observer des cultures cellulaires, des embryons ...



Culture cellulaire

Caractéristiques de l'image



D- Le microscope confocal

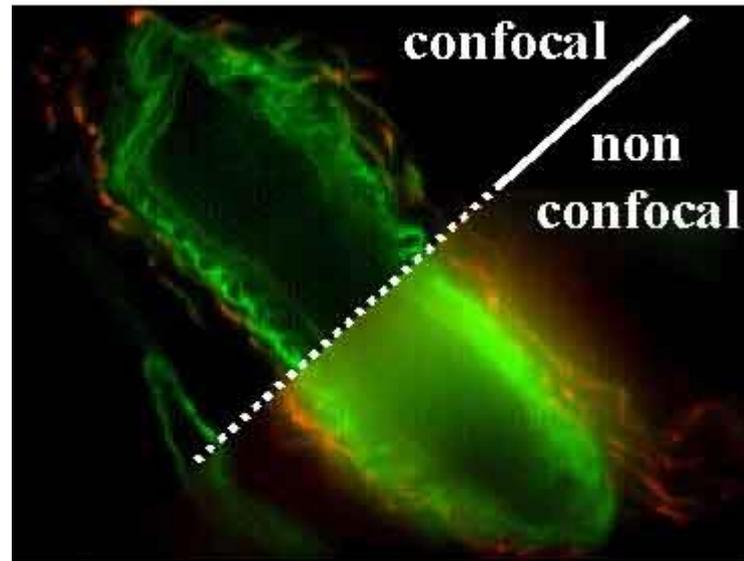
Eclairage de l'objet par balayage d'un faisceau lumineux émis par laser

Résolution améliorée

Utilisable en fluorescence

Traitement informatique : reconstitution 3D

But de la microscopie confocale à balayage laser : éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasite le plan focal



Perte de résolution due à l'excitation des fluorochromes se situant hors plan focal -> bruit de fond

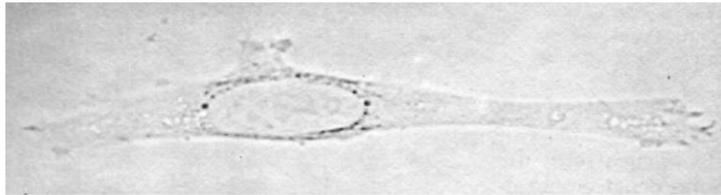
<http://www.univ-rouen.fr/pfrric/ifrmp/principe.htm>

III- Les compléments optiques

Matériel biologique relativement transparent

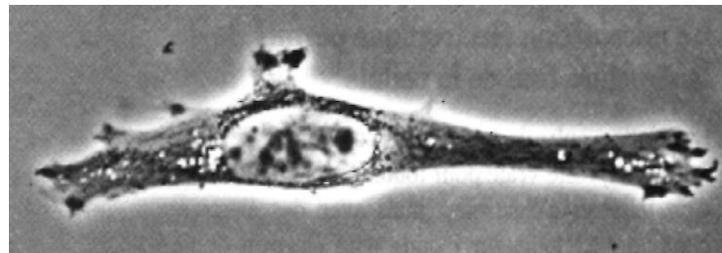
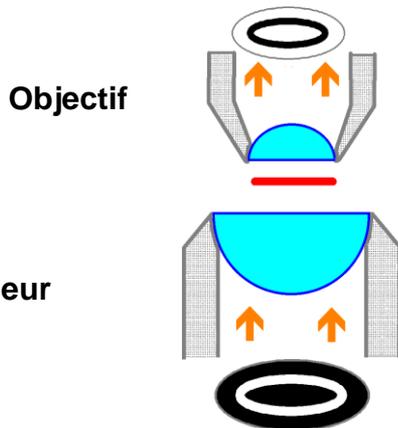
Peu visible à l'état frais, réfringent (renvoie la lumière et dévie les rayons lumineux)

Nécessité d'améliorations optiques et/ou de colorations

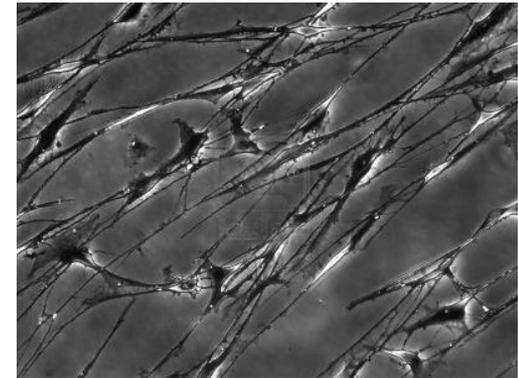


Fibroblastes en culture

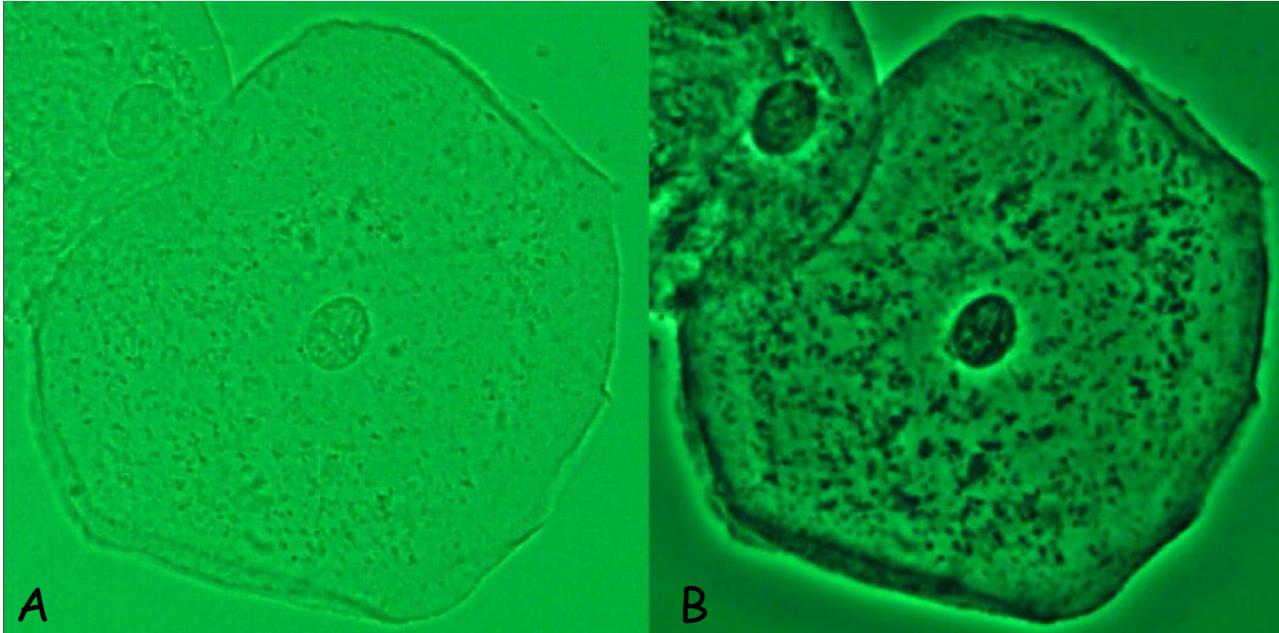
A- Contraste de phase (sélectionne la lumière déviée par l'objet)



Fibroblastes en culture observé en contraste de phase



Cellules de Schwann
15

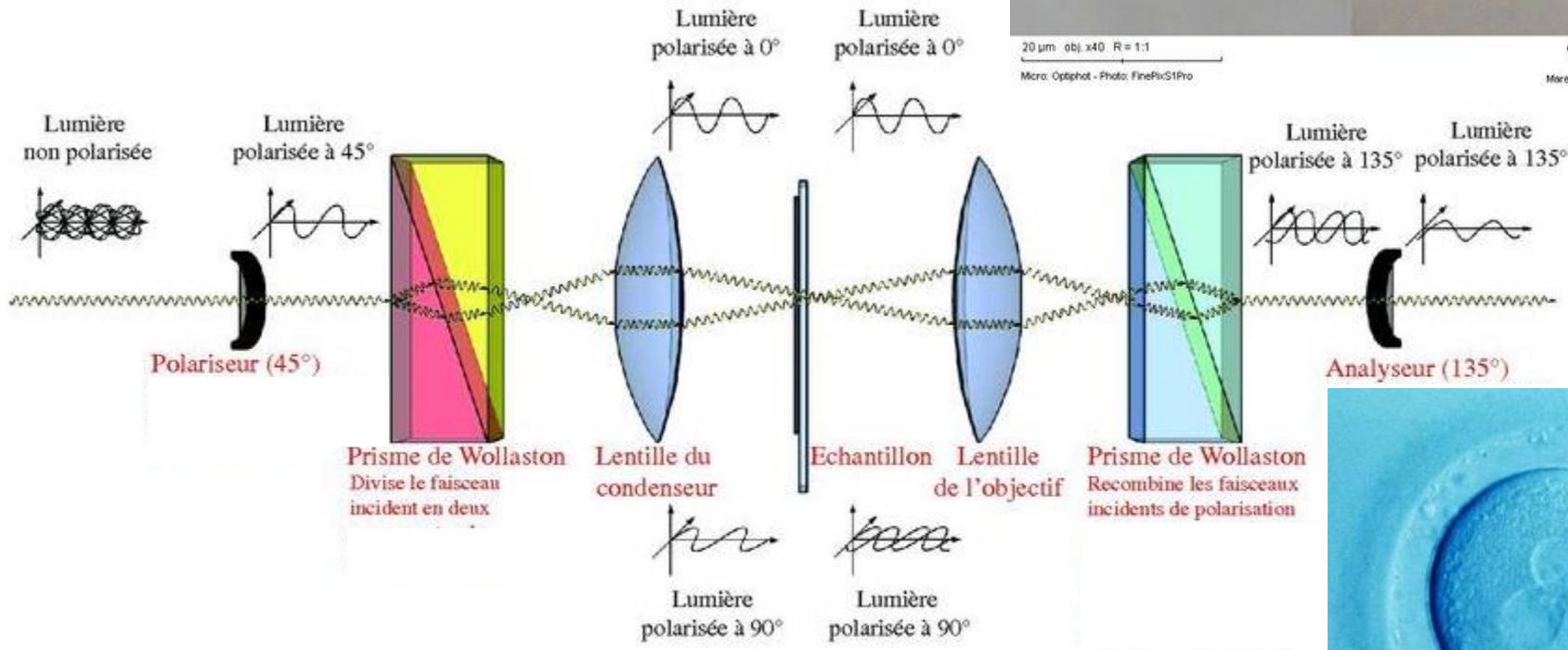


Cellules obtenues en microscopie ordinaire (A) et en contraste de phase (B)

B- Contraste interférentiel

Crée interférences lumineuses en lumière polarisée

Dédoublage du faisceau incident puis recombinaison



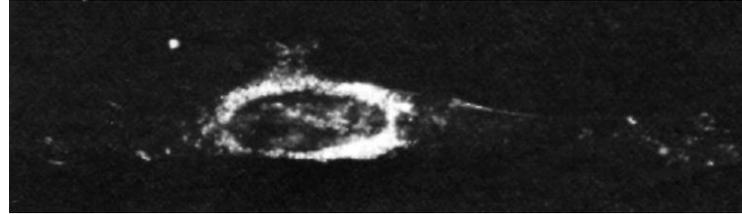
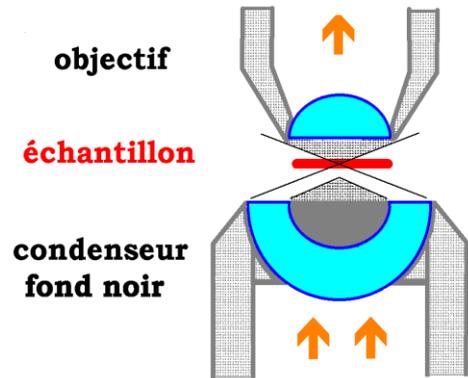
Déviations de phase induites par l'échantillon, d'ampleur différente pour les deux faisceaux (selon la structure de l'échantillon).



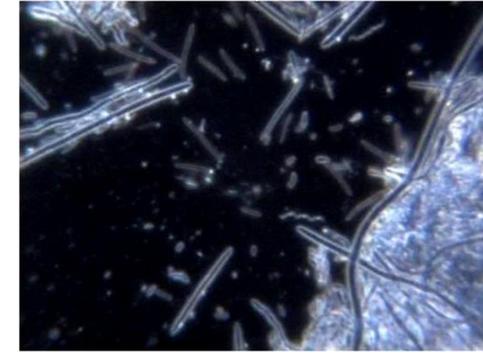
20 μ m obj. x40 R=1:1
Micro: Optiphot - Photo: FinePixS1Pro
Cycloidium sp copepod
Prép: Eau - Col: Aucune
Mère - Dominique Volzin - 17/10/2008



C- Fond noir

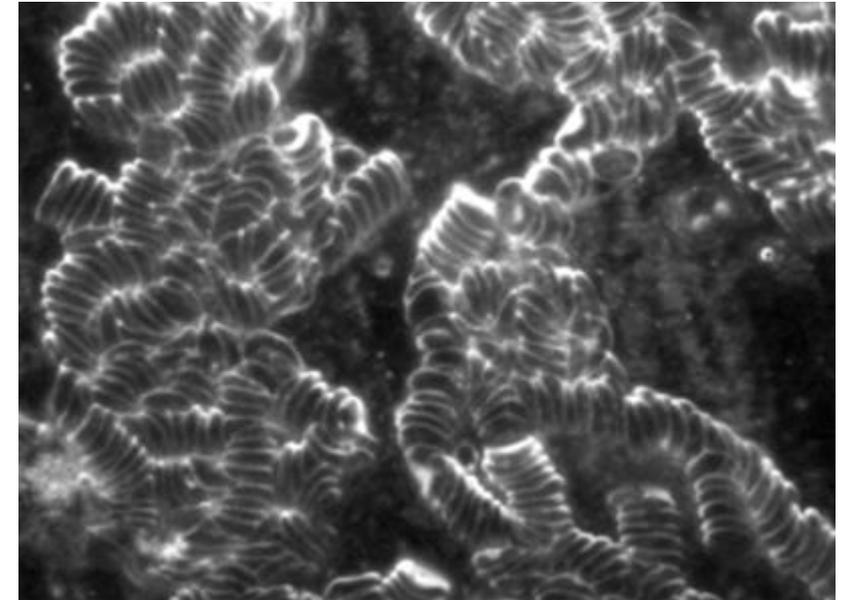
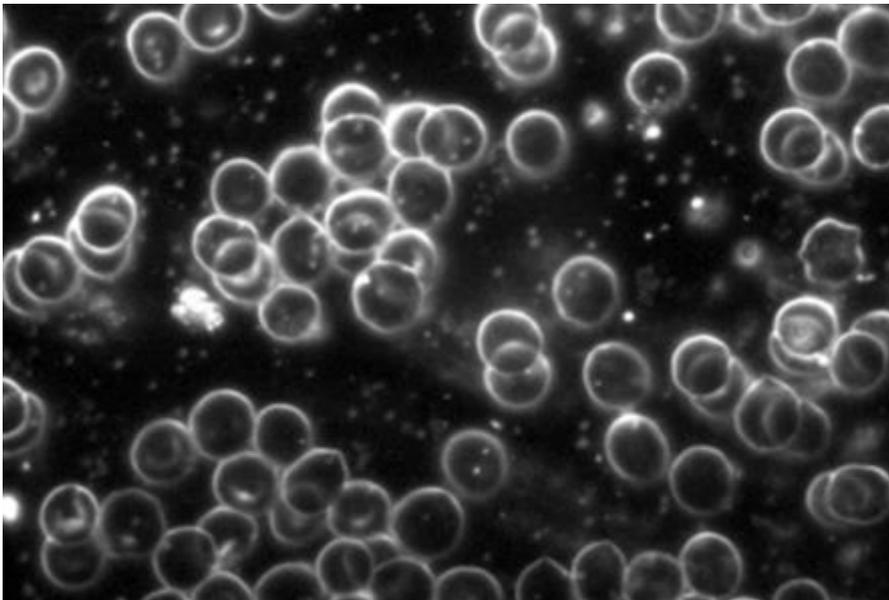


Fibroblastes en culture observés
en fond noir



Bactéries de plaque sous-
gingivale d'un patient

<http://www.parosphere.org/accueil/articles-de-fond/ecologie-de-la-bouche-2-5>



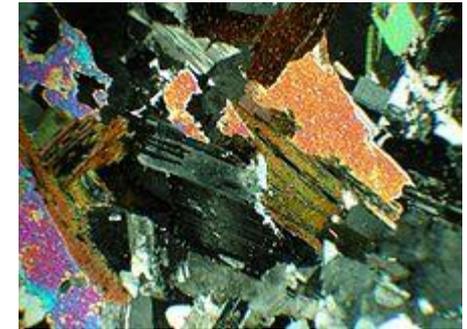
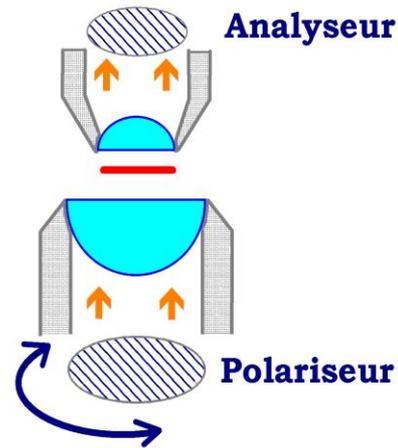
<http://www.optivital.fr/microscope-a-fond-noir>

D- Polarisation

Détection des variations de polarisation de la lumière après traversée de l'échantillon

Visualise les structures qui polarisent la lumière

Cristaux (acide urique...)

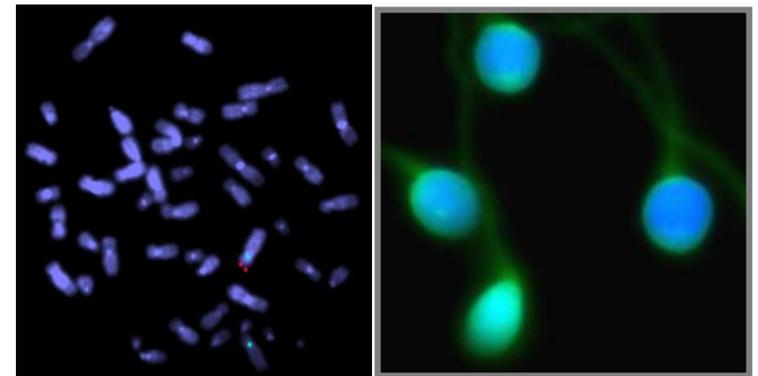
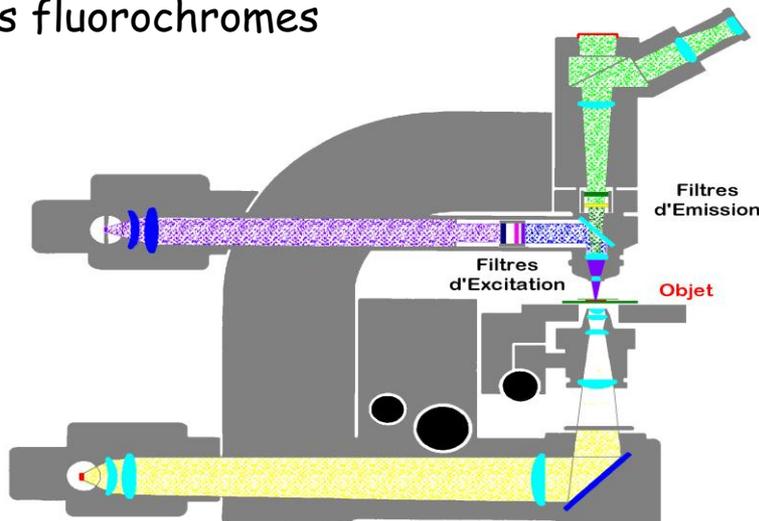


Lame mince de granite

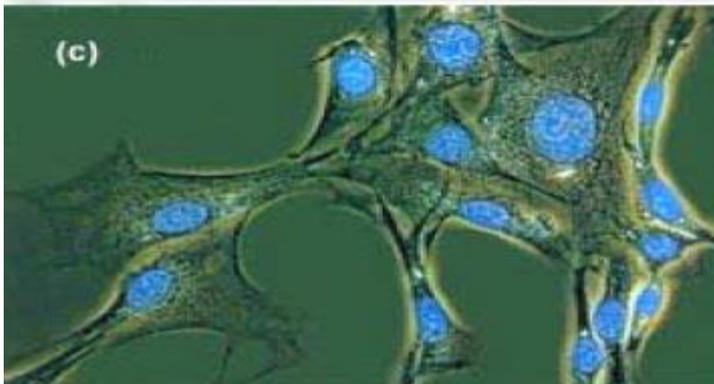
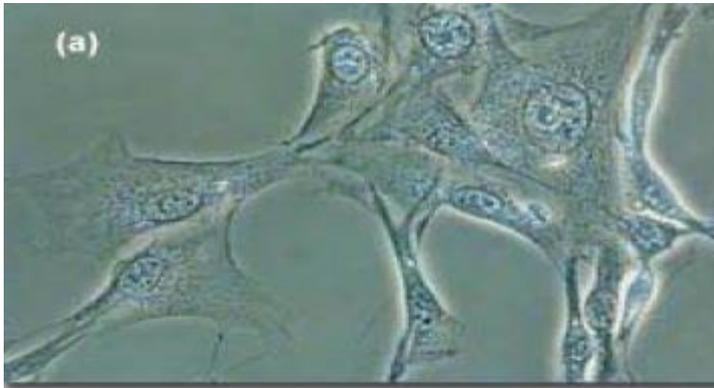
Thomas Bresson

E- Epifluorescence

Pour les objets auto-fluorescents et pour les fluorochromes



Chromosomes et spermatozoïdes émettant une fluorescence bleue grâce au DAPI 19



Combinaison (c) de la microscopie à contraste de phase (a) et à épifluorescence (b) pour améliorer la visualisation de cellules (l'ADN en b est coloré avec un agent fluorescent, le DAPI)

IV- Préparation pour microscopie photonique

Cellules isolées : étalement, fixation, coloration

Tissus biologiques : fixation, inclusion, coupe, coloration

A- Fixation : Préservation des structures

Alcools (méthanol, éthanol)
Acides (acétique)

Coagulation protéines

Aldéhydes (Formol, Glutaraldéhyde)
Acide picrique
Oso4 (M.E.)

Pontage chimique entre
protéines (liaisons
covalentes)

En Pratique :

Formol tamponné

Liquide De Bouin

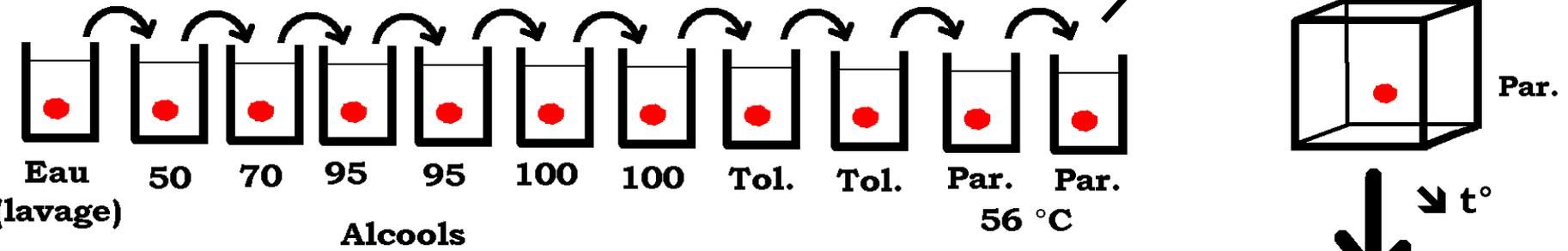
(Ac. picrique + Formol + Ac. Acétique)

Carnoy

(Acide acétique + Méthanol)

B- Inclusion en paraffine

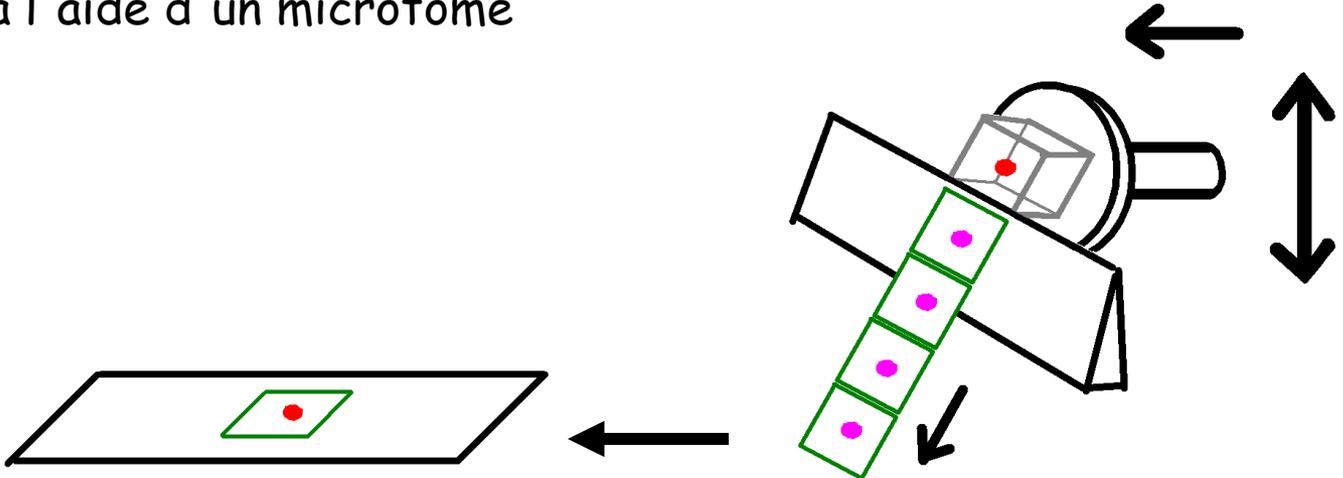
● Tissu fixé dans une solution aqueuse



Conservation +++

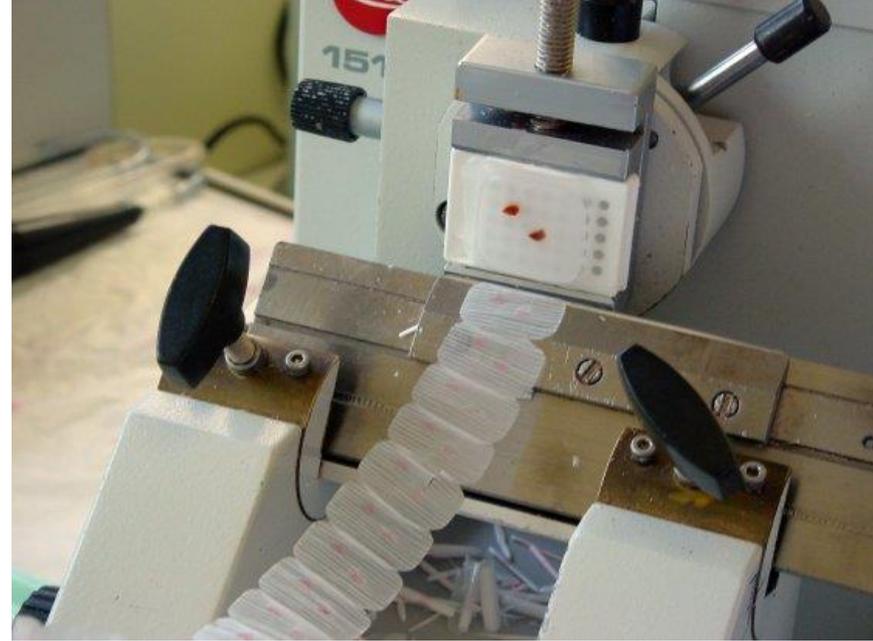
C- Coupes : (4 à 6 μm)

à l'aide d'un microtome





Inclusion de tissus en paraffine



Coupes au microtome

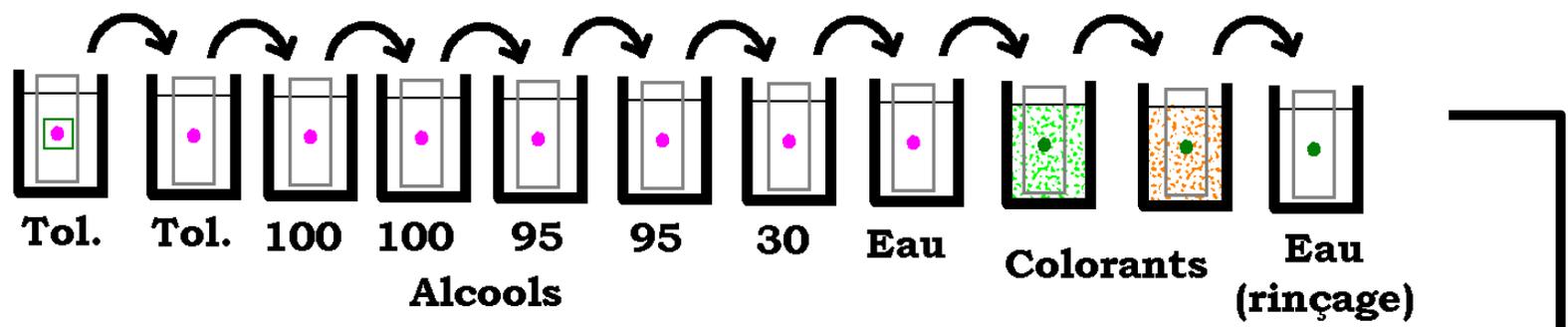


Ruban de coupes

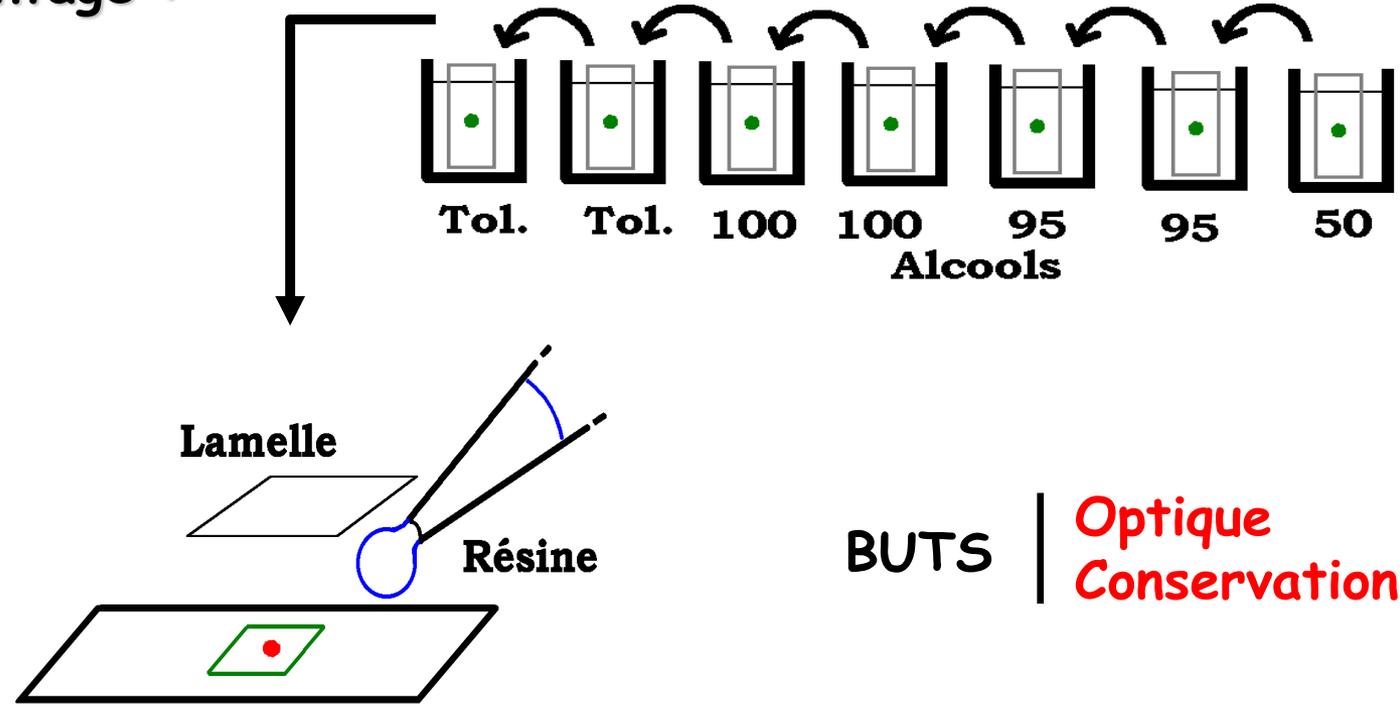


Dépôts des tranches sur lames

D- Coloration



E- Montage :



BUTS | **Optique**
Conservation



Coloration



Montage définitif avec collage
des lamelles

F- Synthèse

Avantages :

Conservation des structures

Qualité des images

36 à 48 h de préparation

Elimination des lipides

Elimination des petites molécules (ac. am., monosaccharides...)

Arrêt activités bio (enzymatiques ...)

Modification des protéines

Inconvénients :



L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE étudie ainsi les lésions des tissus et des organes (biopsies et pièces opératoires)

G- Coupes en congélation

Tissu congelé, non fixé

Coupe avec cryo-microtome ($t^{\circ} - 20^{\circ}C$)

Coloration rapide (ex. Bleu de toluidine)

Avantages : **RAPIDITÉ** : examen extemporané

Maintient l'activité biochimique

Histo-enzymologie

Immuno-histologie

Conserve les lipides

Colorants des lipides : ex: noir soudan

Inconvénients : Qualité médiocre

V- Méthodes de visualisation en microscopie photonique

A- Colorations vitales

Utilisables avec des cellules vivantes

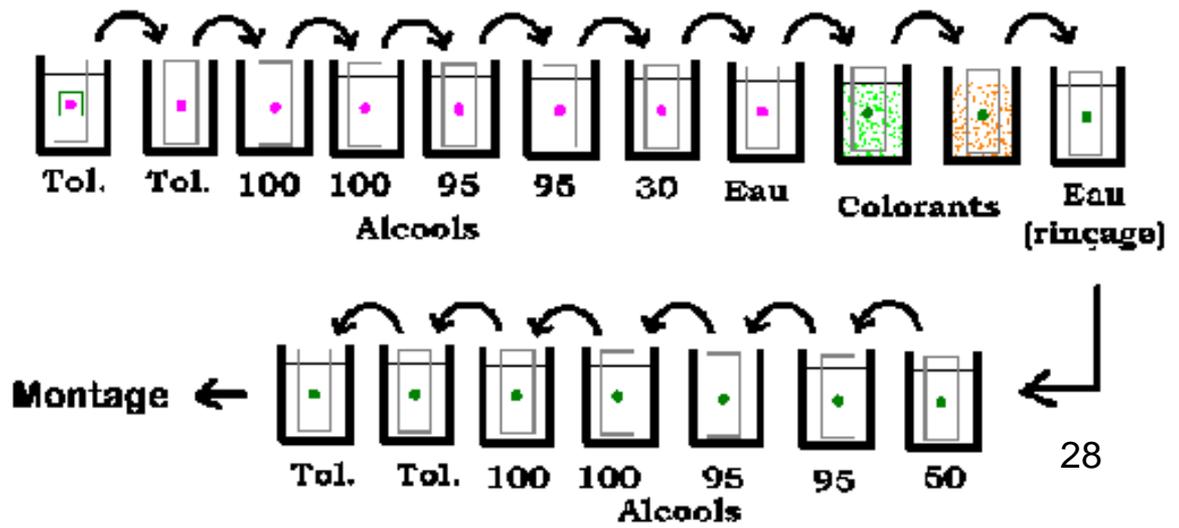
Colorants phagocytés (encre de Chine : cell mononucléées syst phagocytaire ...)

Colorants qui diffusent à travers les membranes (bleu de Nil)

Colorants qui colorent cellules mortes par perméabilité membranaire

B- Colorations générales

Rôle du ph +++



Colorants **ACIDES** (érythrosine, éosine, orange G...)

↔ Molécules basiques (prot cytopl.)
Structures "**acidophiles**"

Colorants **BASIQUES** (hématéine, bleu de toluidine, ...)

↔ Molécules acides (ac. nucléique)
Structures "**basophiles**"

Métachromasie = | Modification de couleur suivant
les molécules fixées au colorant
(Ex. Bleu de toluidine, *acridine orange* -colorant
fluo)

En pratique :

Coupes : hématéine-éosine -HE- hématéine-éosine safran -HES

Frottis sanguins : méthode de may grünwald-giemsà (MGG)

C- Colorations histochimiques

P.A.S. (Per-iodic Acid Schiff) (Fuchsine) → Sucres

Feulgen-Rosenbeck → ADN (dosage par photométrie)

Colorations argentiques (variées) → Mélanine
→ Amines biogènes
→ Neurofibrilles

Perl's → Fer

D- Histo-enzymologie

Sur matériel frais



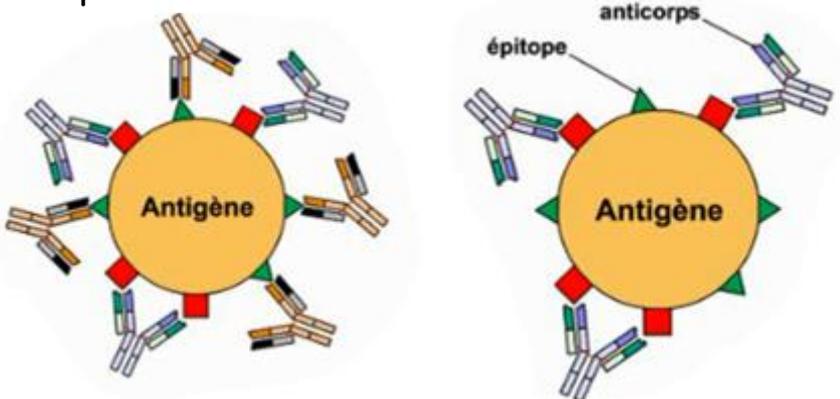
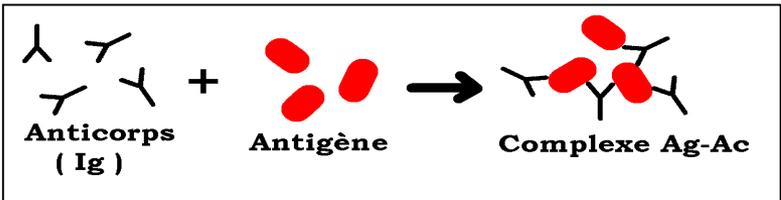
Pour peroxydases, phosphatases, estérases, etc...

E- Immuno-histochimie **SPÉCIFICITÉ +++**

Anticorps (appartiennent à famille des immunoglobulines-Ig) produits par les lymphocytes B

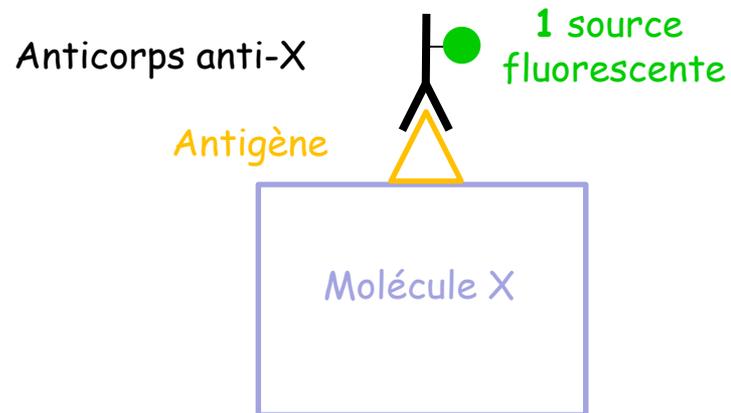
Polyclonaux : Obtention d'Ac par immunisation d'un animal -> extrait à partir du sérum

Monoclonaux : Produits par un clone de plasmocytes (L_B différenciés) de l'animal puis fusion avec lignée cellulaire de lymphocytes tumoraux pour production importante *in vitro*

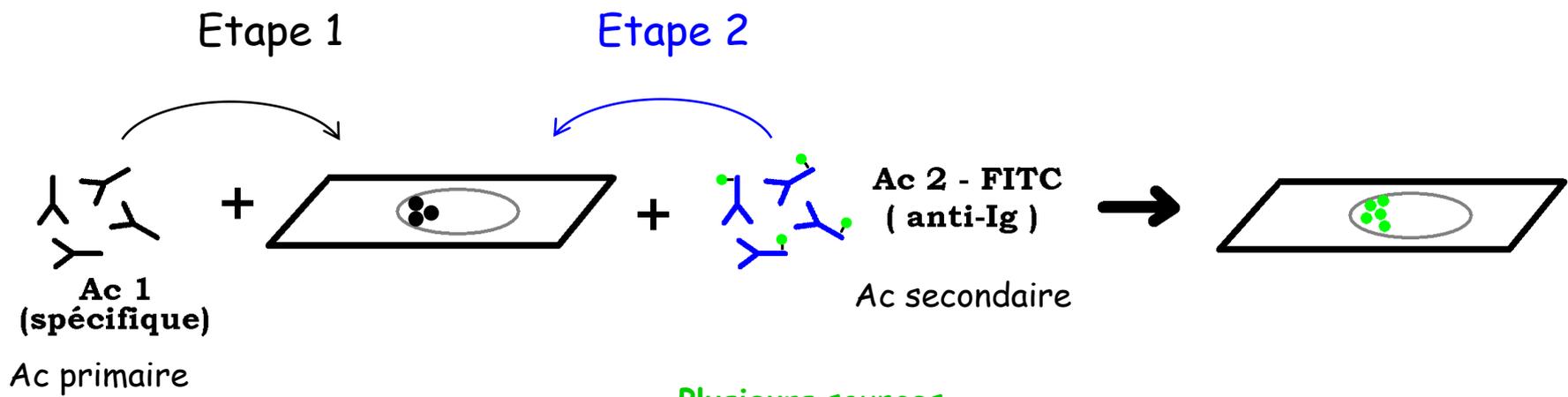


1- Immunofluorescence directe

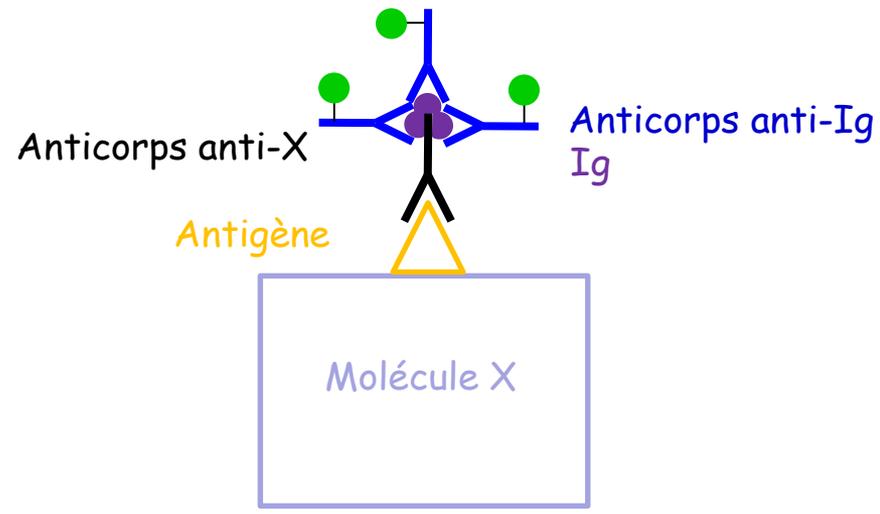
Fluorescéine -FITC



2- Immunofluorescence indirecte



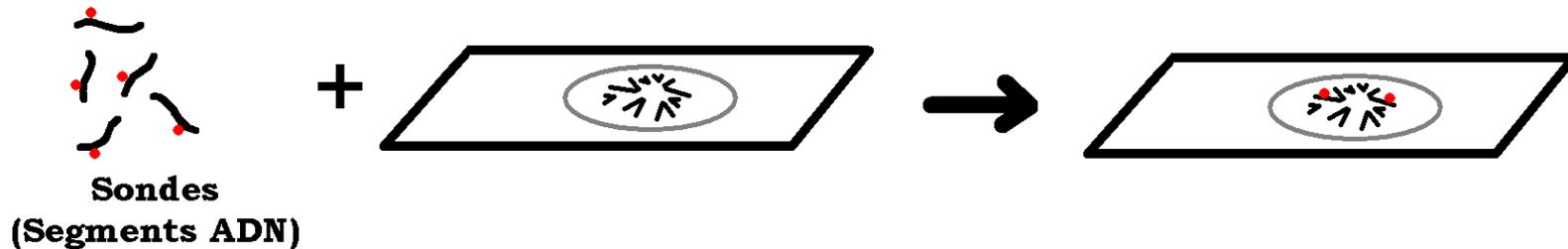
Plusieurs sources fluorescentes



F- Hydridation *in situ*

Localisation de segments d'ADN (ARN) par sondes
(Fragments d'ADN de séquence complémentaire)

Par ex. Sur chromosomes de cellules en mitose

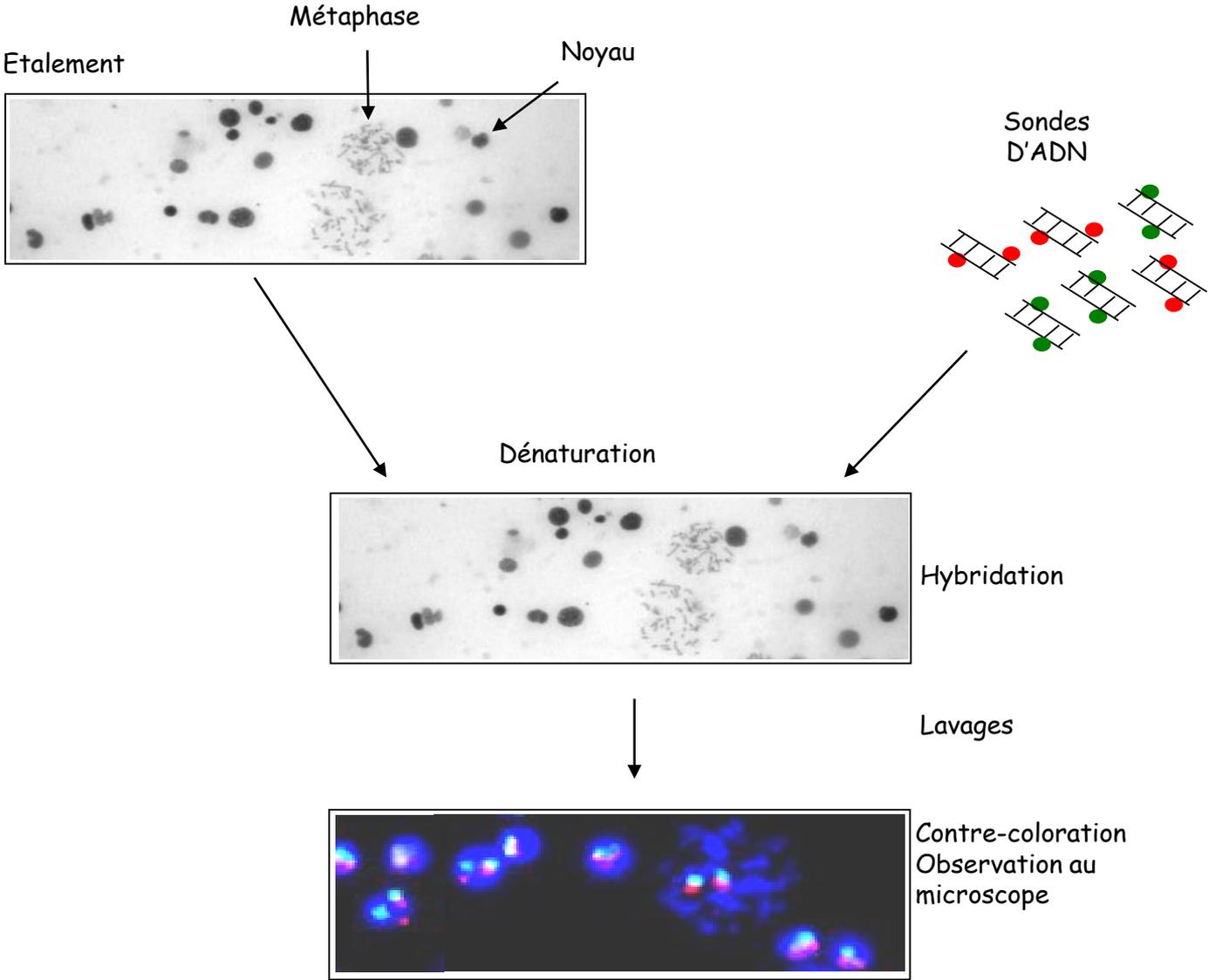


Marquage des sondes par :

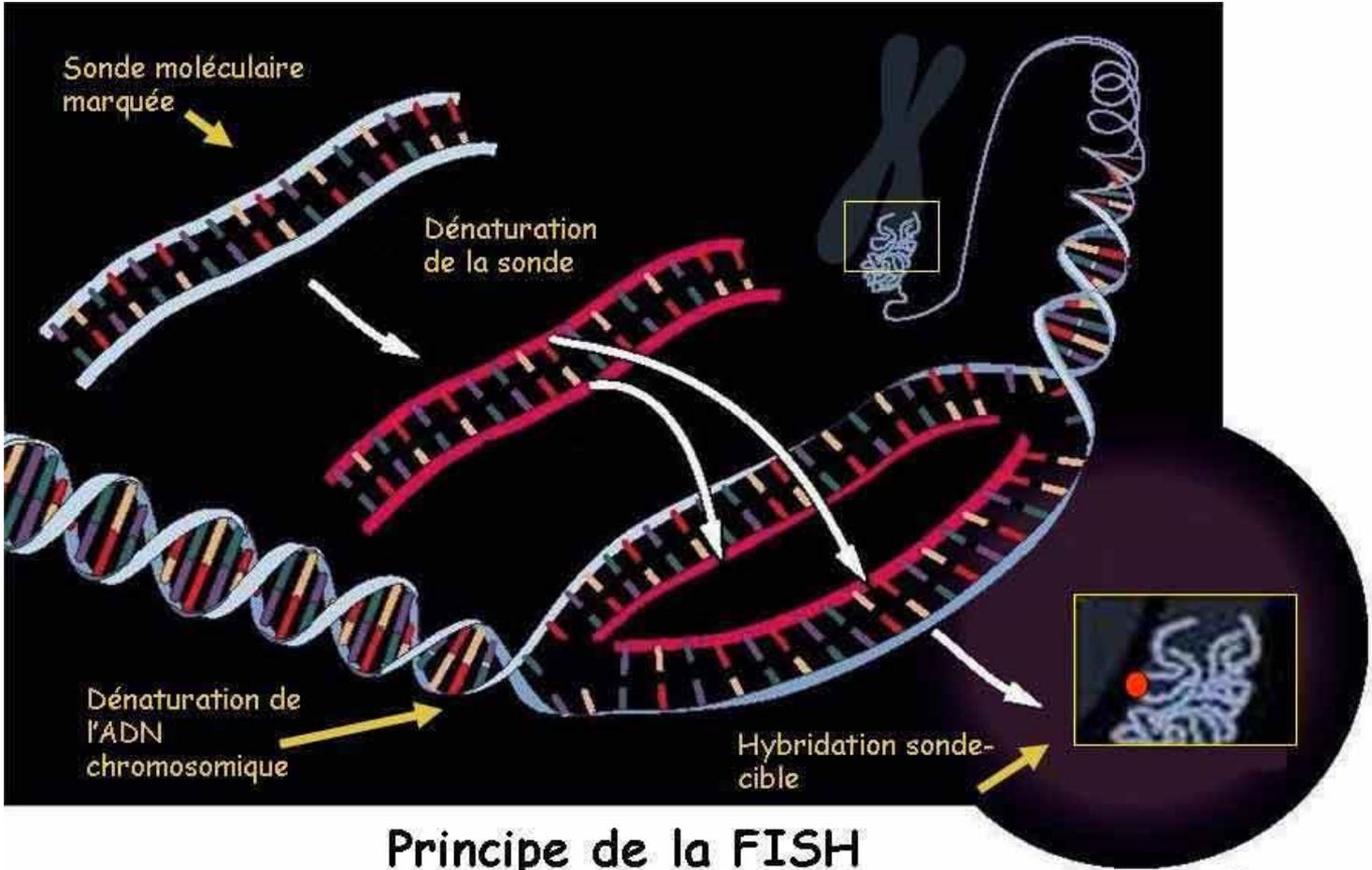
Isotopes (rarement utilisés)

Colorants fluorescents = FISH
(Fluorescent *in situ* hybridization)

Hybridation *in situ* fluorescente



Hybridation *in situ* fluorescente



© C. Ozouf-Costaz

Contact : aurore.perrin@chu-brest.fr