Méthodes d'études de la cellule

Aurore Perrin, MCU-PH

(aurore.perrin@chu-brest.fr)

Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, UBO, Brest

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

<u>Microscopes à lumière ou microscopes photoniques</u>

-> divers types de microscopes à lumière :

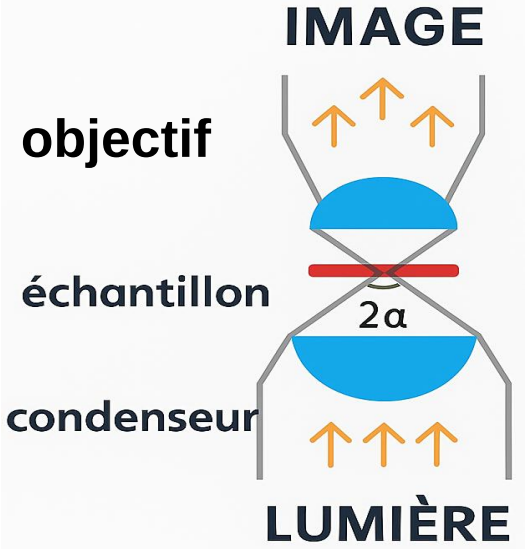
- microscopes par transmission : observation directe des structures dont les dimensions vont jusqu'à environ 0,2 µm

- 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 :

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

l = 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 éclairement, âge observateur...

Source image : Thegreenj~commonswiki

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

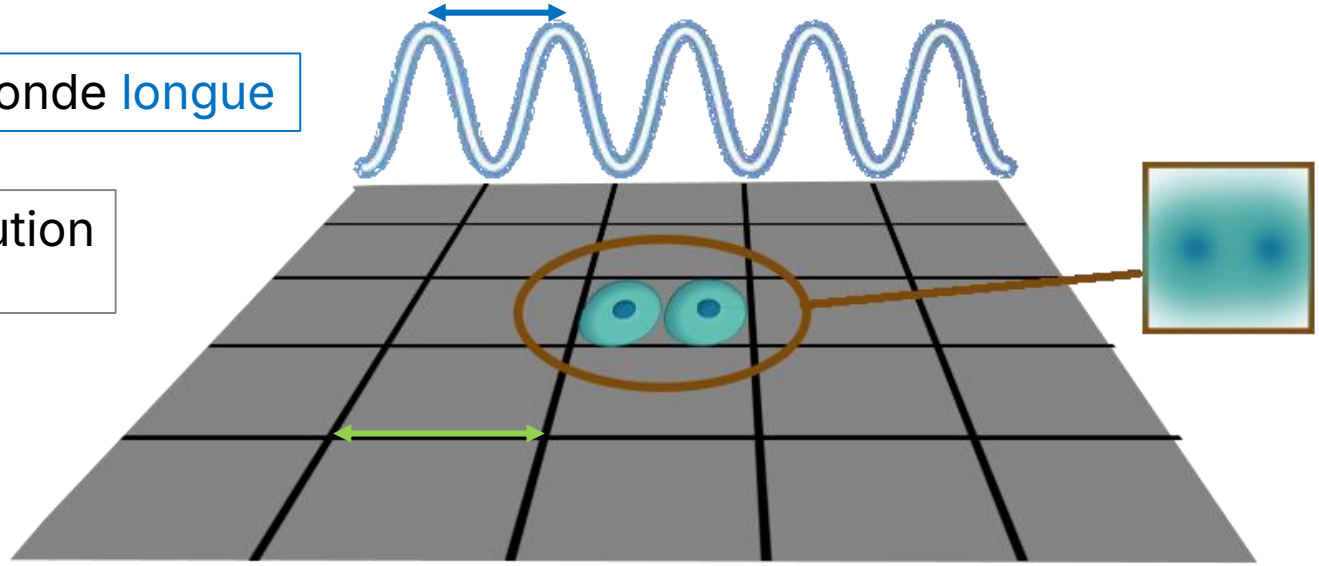
Plus la limite de résolution tend vers l'infiniment petit = plus la distance minimale pour distinguer 2 objets est faible, meilleure est la résolution

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)

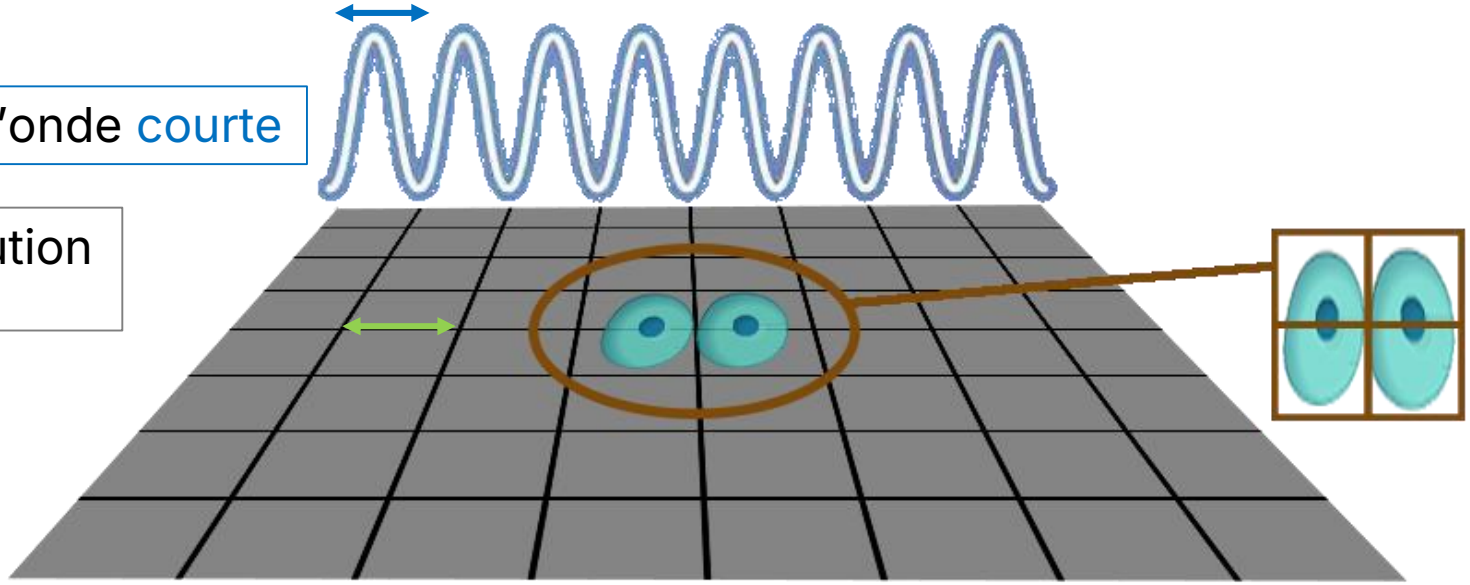
Limite de résolution



Longueur d'onde courte

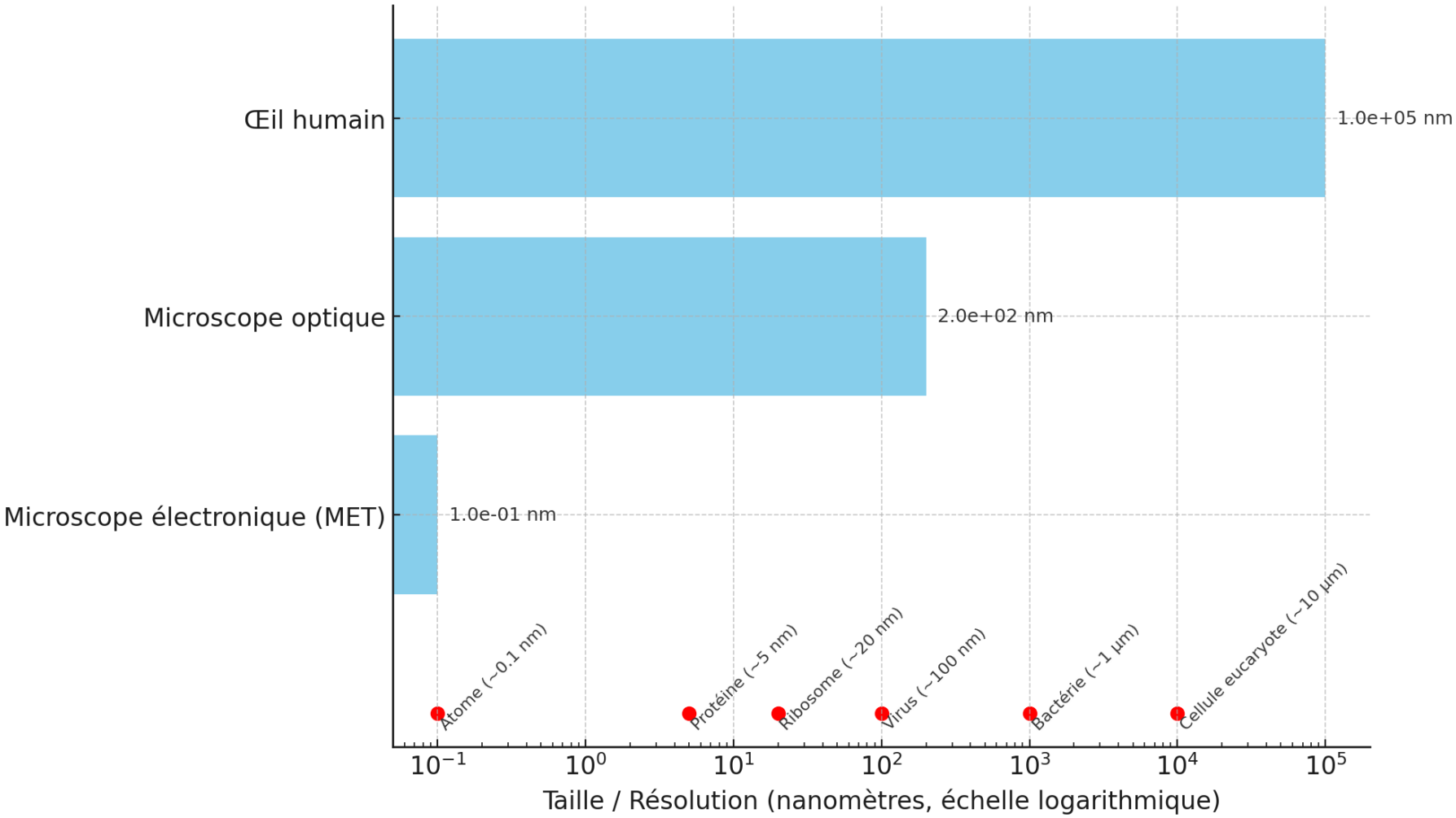
Forte résolution
(64 cases)

Limite de résolution



Plus de cases = plus d'informations spatiales = meilleure capacité à discriminer des structures proches

Résolution de différents systèmes d'observation et tailles d'objets biologiques



Ne pas chercher à retenir les valeurs numériques de cette diapositive, diagramme présenté juste pour illustration

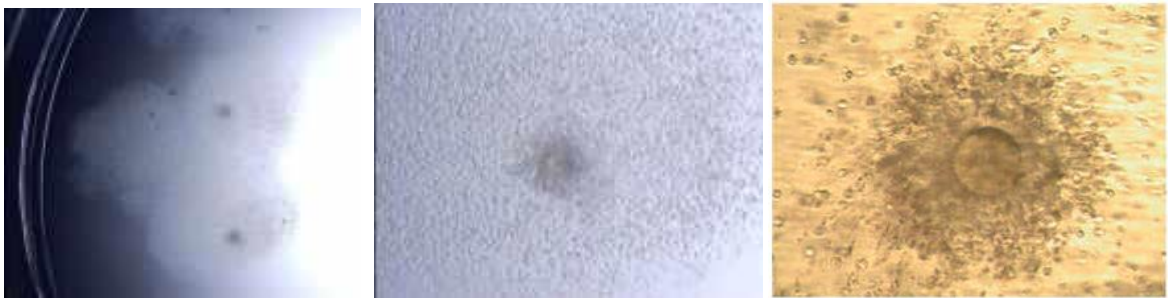
II- Matériels d'observation

A- Loupe binoculaire

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

Limite de résolution : env 2 µm

Grossissement utile : env 200x



Complexe cumulus-oophorus ~ 1 mm – Diamètre ovocyte ~0,1 mm

https://www.planetesante.ch/Magazine/Grossesse/Infertilite-et-PMA/Le-cycle-FIV

http://old.oriade.fr/fertilite/techniques_pma.htm

B- Microscope photonique classique (microscope droit)

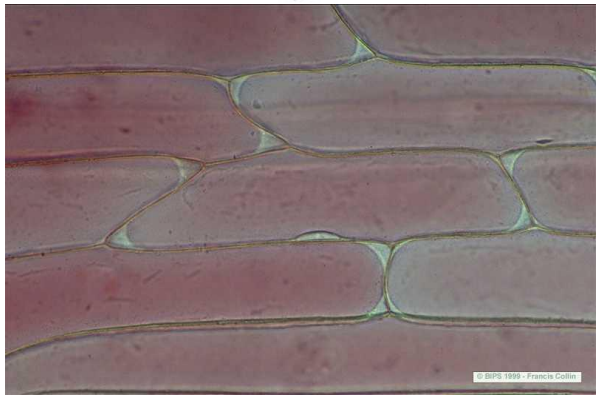
Limite de résolution : env jusqu'à 0,2 µm

-> Cellules, noyaux, bactéries visibles ; ribosomes, virus, protéines ... non visibles

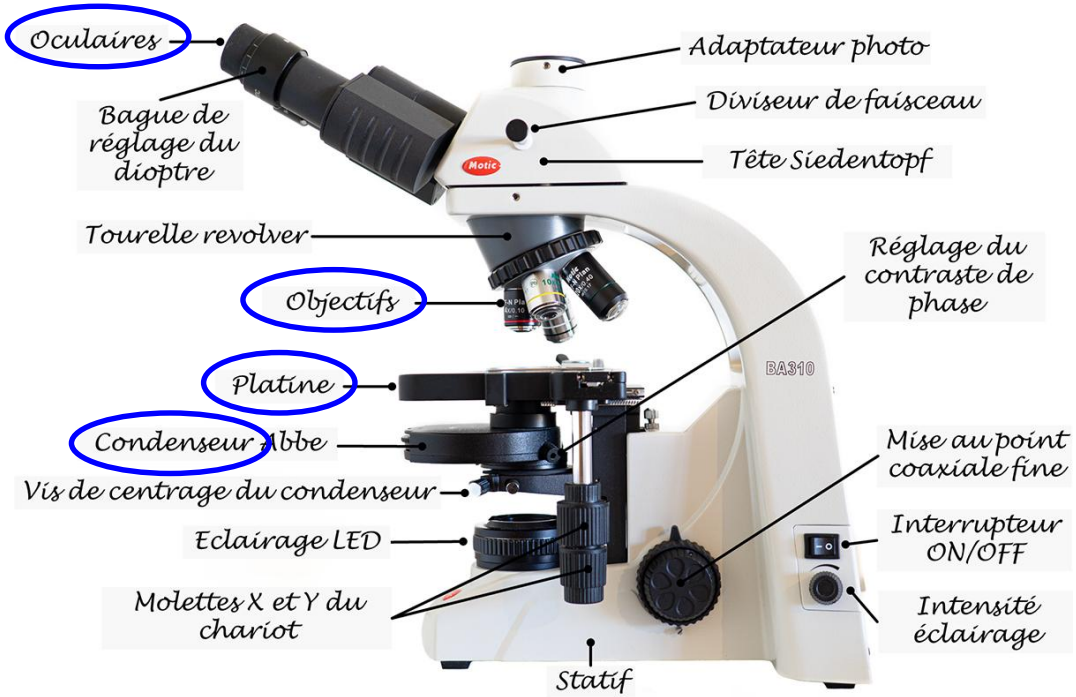
Observation en transparence

Faible épaisseur (< 10 µm)

Grossissement utile : env 40 à 1250 x (objectif : 4 à 100 x, oculaire : 10 à 12,5)



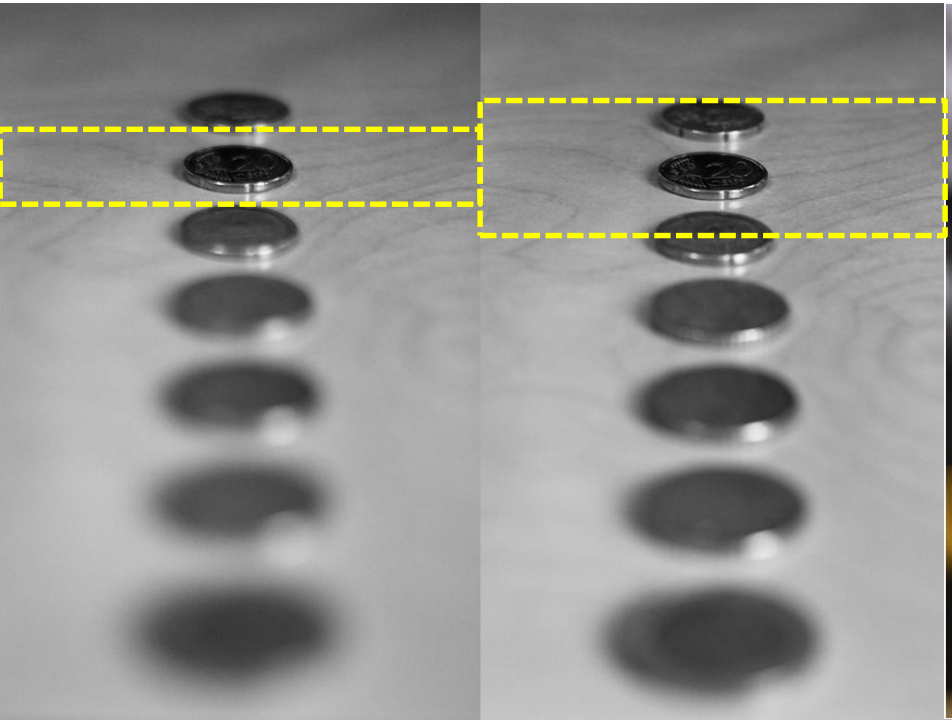
Cellule d'épiderme de bulbe d'oignon rouge



https://www.nirgal.net/microscopie/sub_description_fonction_microscope.html

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 : x25 -> Profondeur de champ : 25 µm
G : x1000 -> Profondeur de champ : 0,6 µm ↓ -

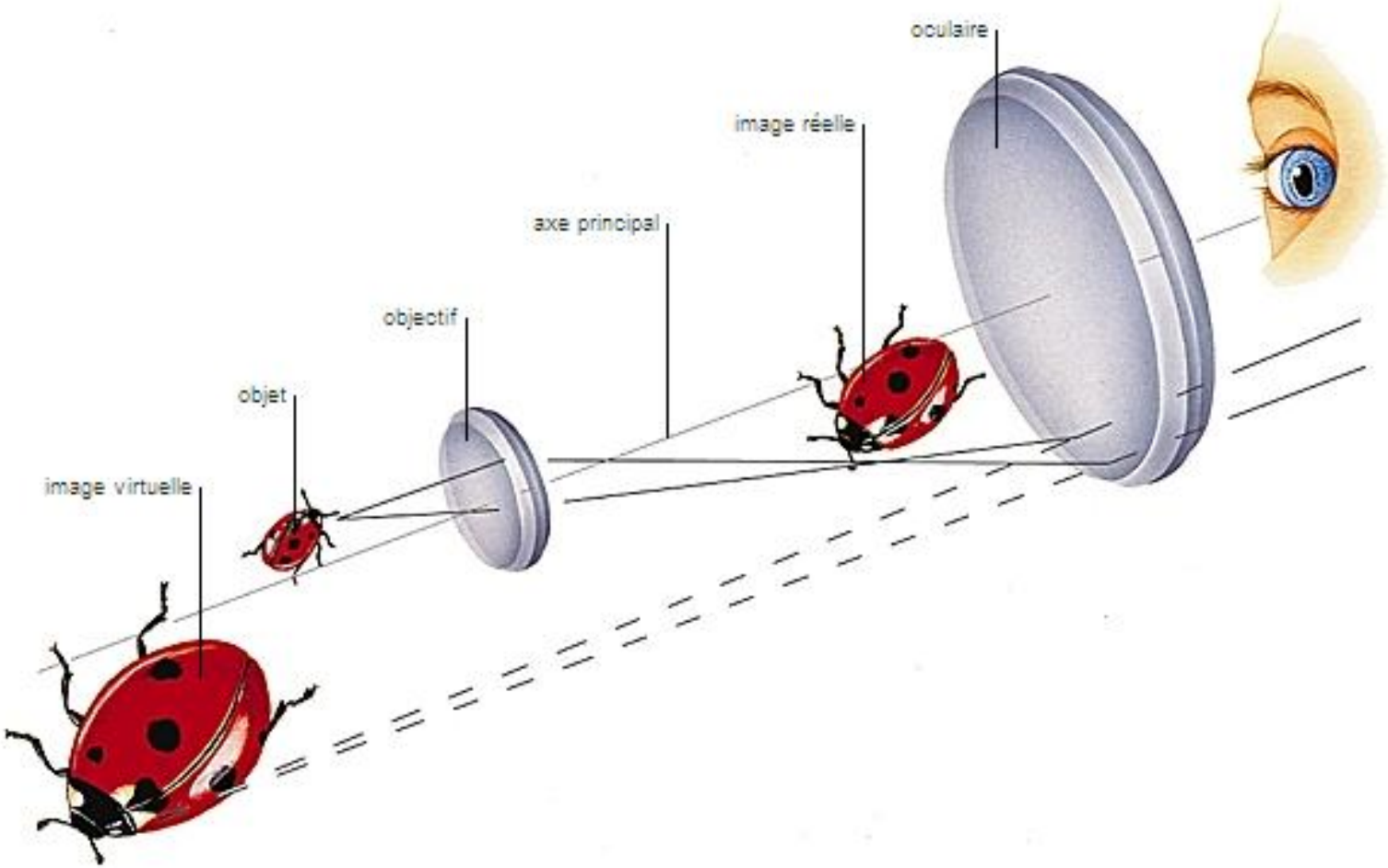
http://www.microscopes24.fr/Euromex-microscope-binoculaire-BioBlue-avec-eclairage-LED-BB.4260

Objectif

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

Oculaires

http://www2.ac-lille.fr/myconord/micro/descript06.htm



Ligne continue : direction rayons lumineux de l'image réelle
Ligne en pointillés : direction rayons lumineux de l'image virtuelle

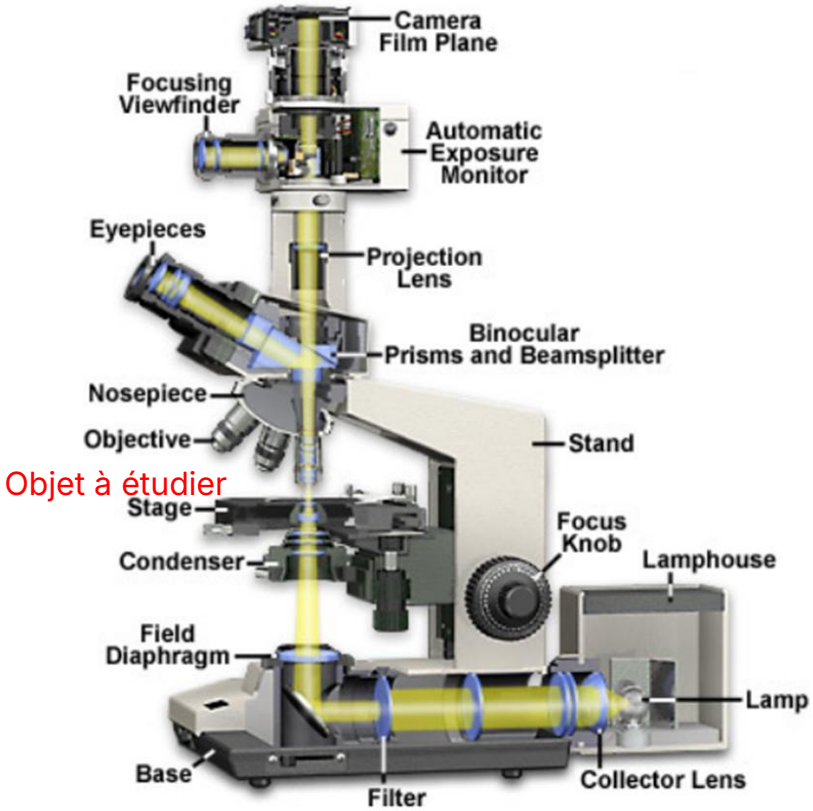
http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Microscope_optique/1003212

Caractéristiques de l'image

Œil
↑
Oculaire
↑
Objectif
↑
Préparation
↑
Lampe

Grossissement G2
Grossissement G1

-> Grossissement = G1 x G2



Exemple :

Oculaire x10
Objectif x100

Grossissement = 10 x 100 = 1000

Taille de l'image = taille réelle x grossissement

C- Microscope photonique inversé

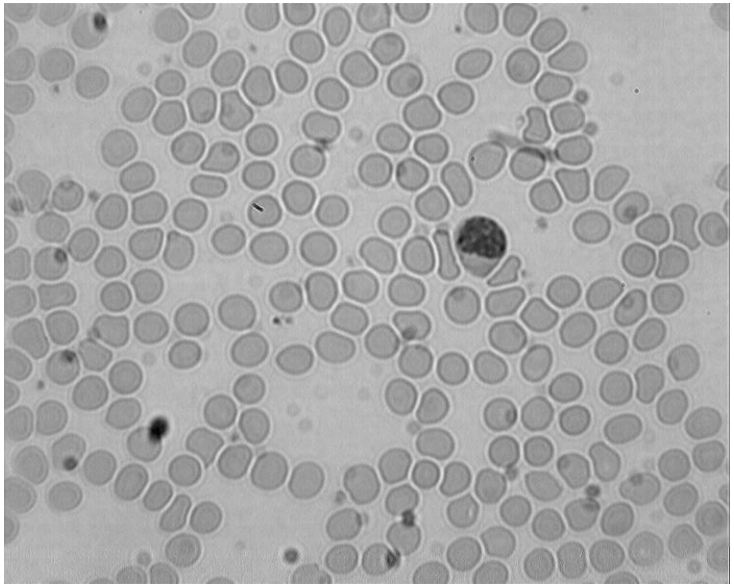
Limite de résolution : env 0,2 µm

Observation en transparence

Grossissement utile : env 40 à 1250 x

Permet d'observer des cultures cellulaires ...

https://www.gfmer.ch/Livres/FIV_atlas/FIV_ICSI.htm



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellules_de_sang_humain_au_microscope_optique.jpg

Caractéristiques de l'image

Lampe

↓

Préparation

↓

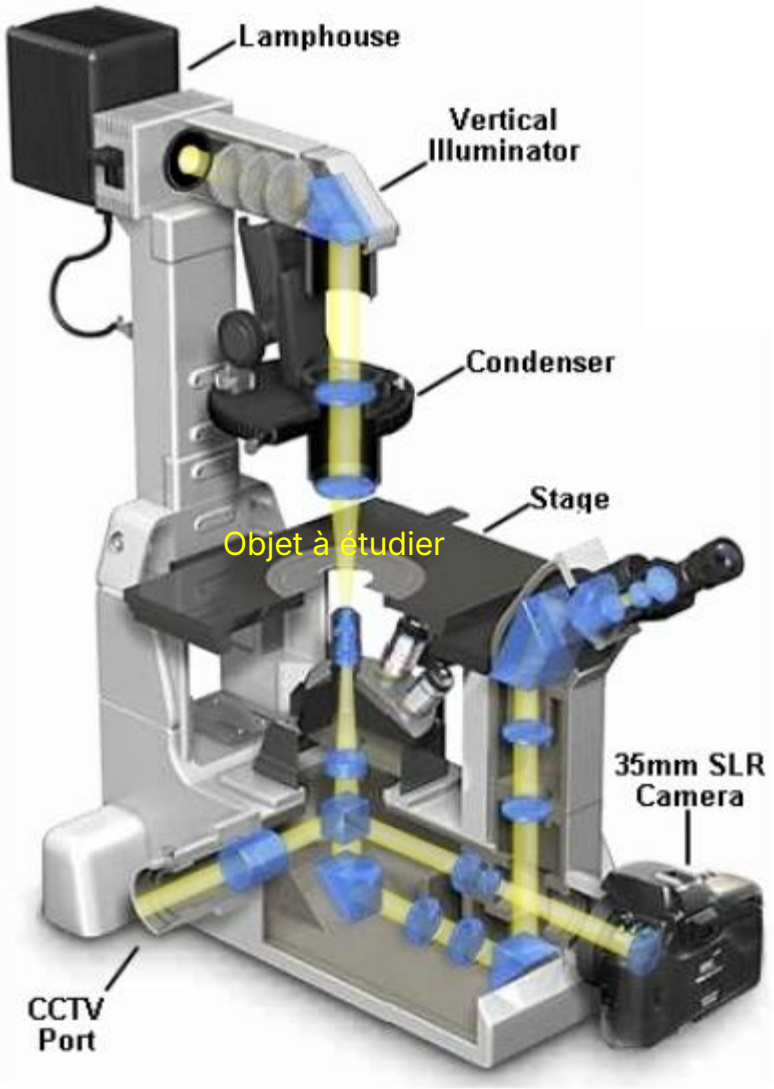
Objectif

↓

Oculaire

↓

Œil



Exemple :

Oculaire x10
Objectif x100

Grossissement = 10 x 100 = 1000

Taille de l'image = taille réelle x grossissement

D- Le microscope confocal

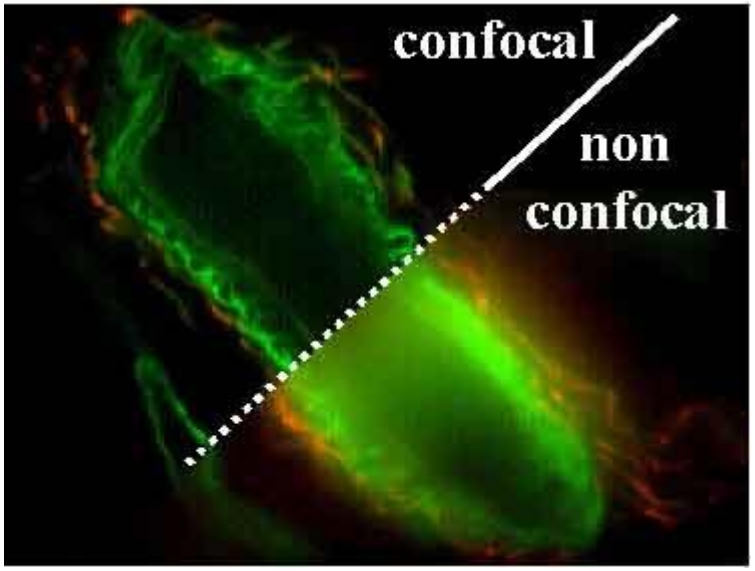
Eclairage de l'objet par balayage d'un faisceau lumineux émis par laser

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



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

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

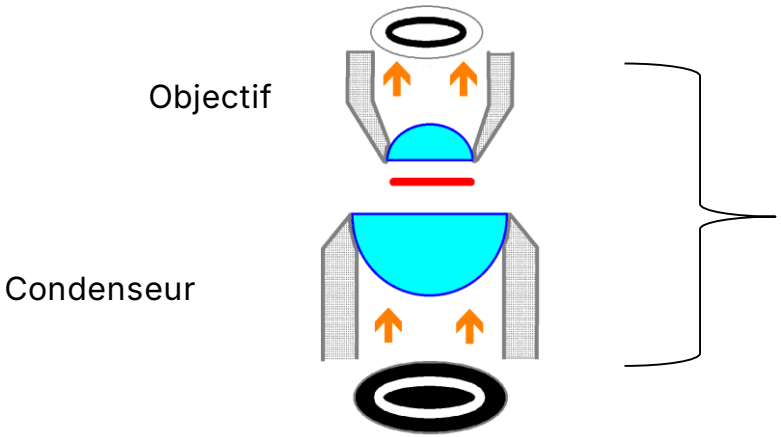
III- Les compléments optiques

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

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

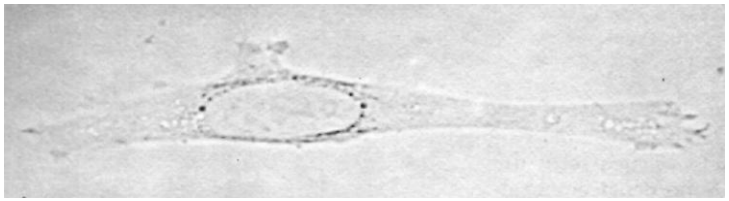


Très peu de lumière directe passe

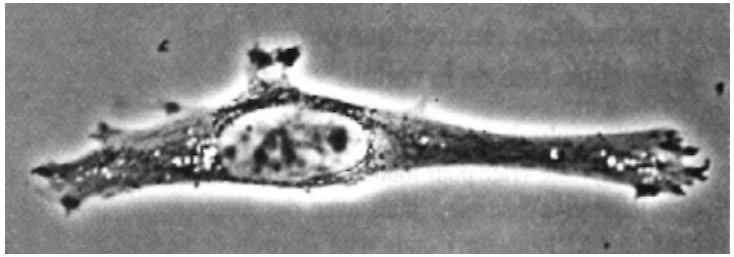
Zones échantillon modifient phase lumière -> lumière déviée non stoppée par anneaux (lumière réfractée)

Décalages de phase = variations contraste = zones claires/sombres

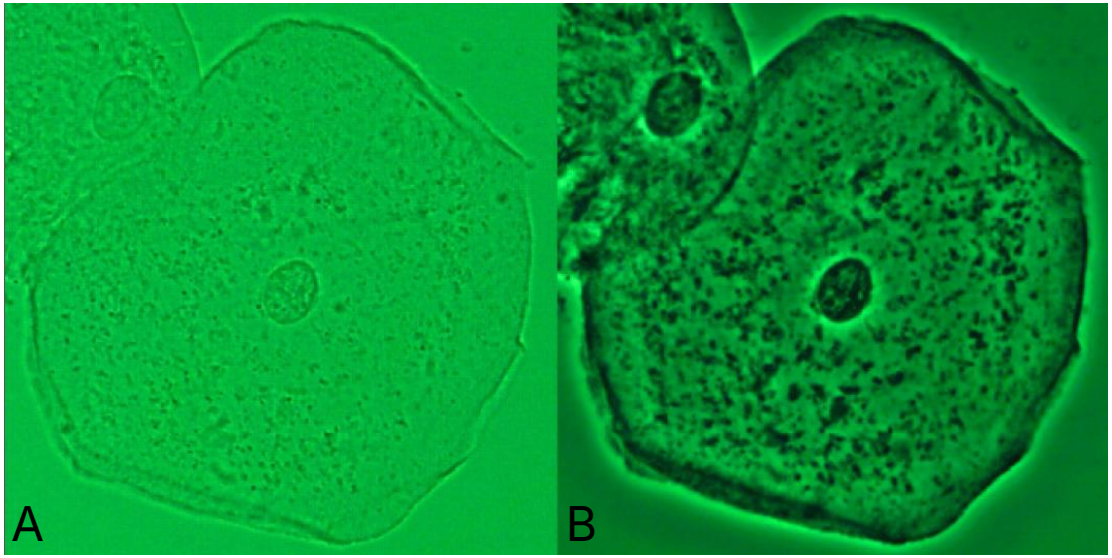
Production d'un halo



Fibroblaste en culture sans complément optique



Fibroblaste en culture observé en contraste de phase



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

http://www.cours.fmed.ulaval.ca/a06/fileadmin/cours/template/BIO11134/documents/documents/Cytol-PPT-CH1-2006.pdf

B- Contraste interférentiel

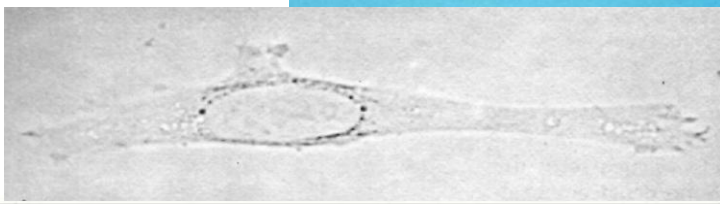
Lumière polarisée scindée en 2 faisceaux

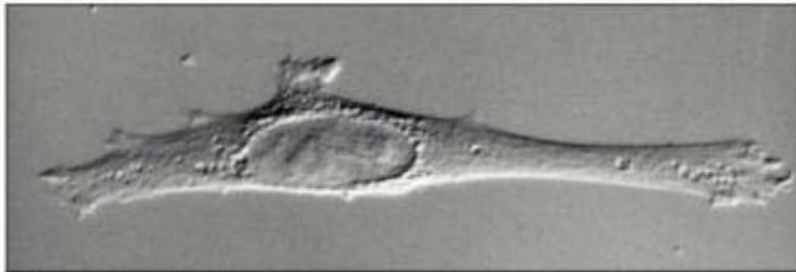
Différence de vitesse selon structures traversées

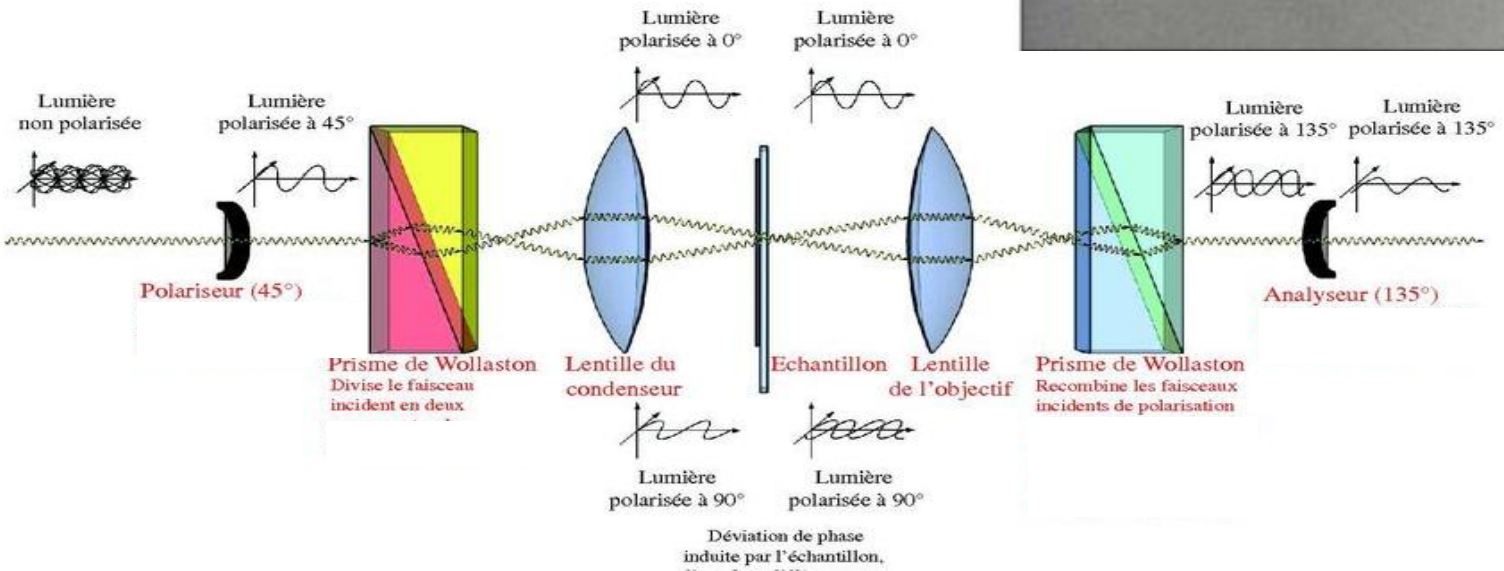
Entraîne décalages de phase

Recombinaison des faisceaux -> interférences

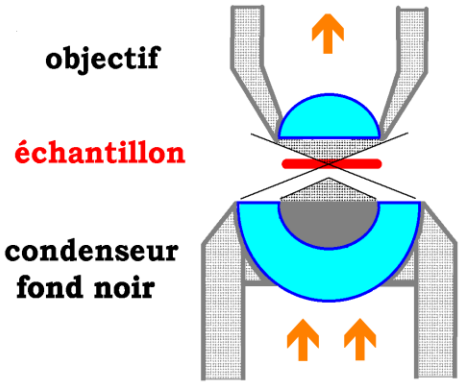
Variations de contraste -> impression de relief

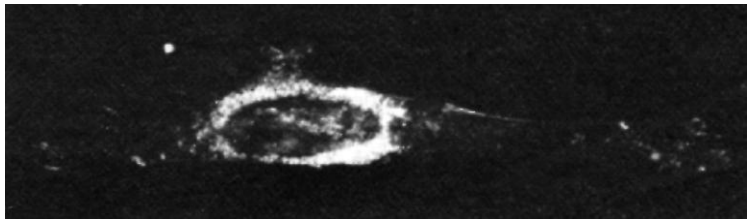




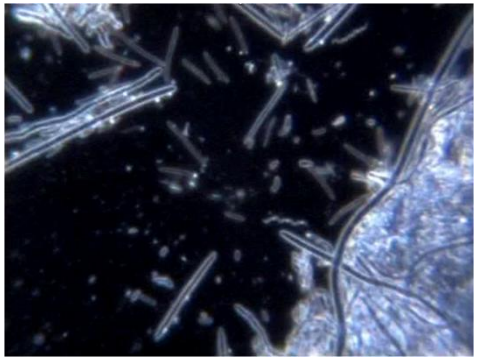


C- Fond noir



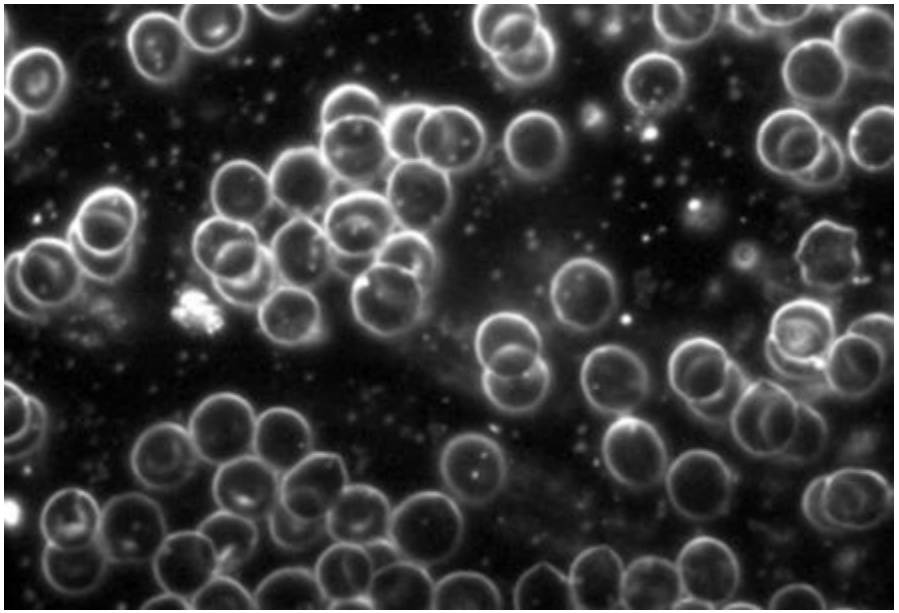


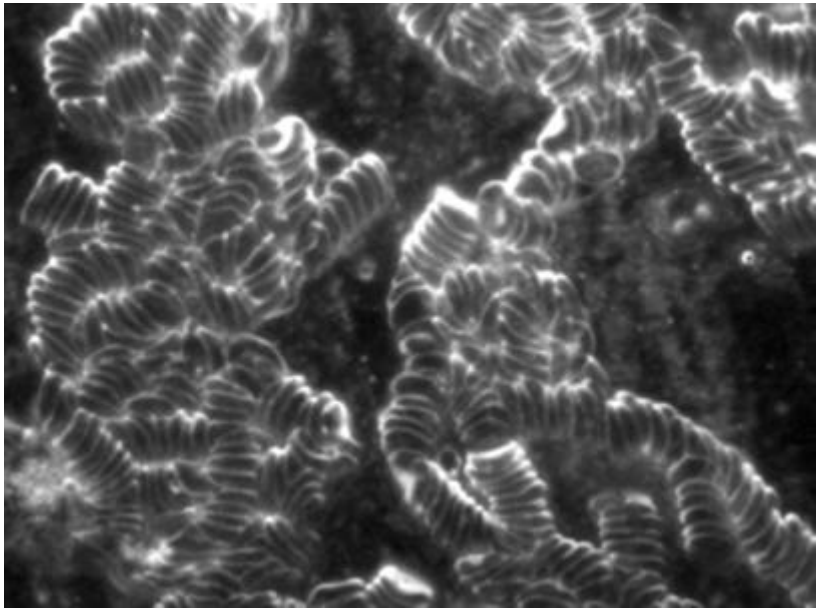
Fibroblaste en culture observé en fond noir



Bactéries de plaque sous-gingivale d'un patient

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





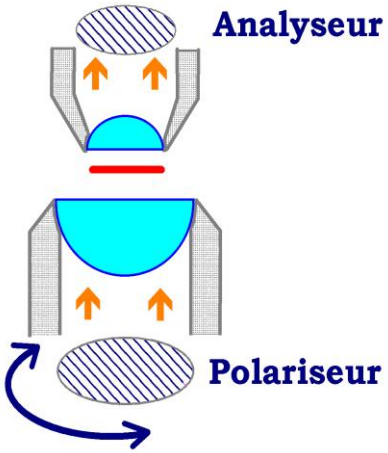
http://www.optivital.fr/microscope-a-fond-noir

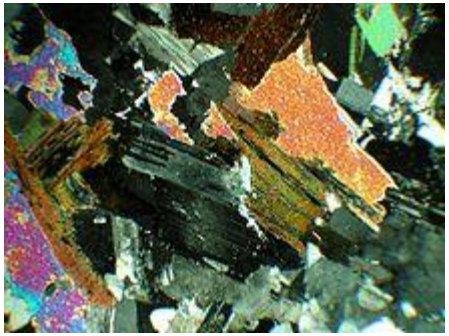
D- Polarisation

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

Visualise les structures qui polarisent la lumière

Cristaux (acide urique...)



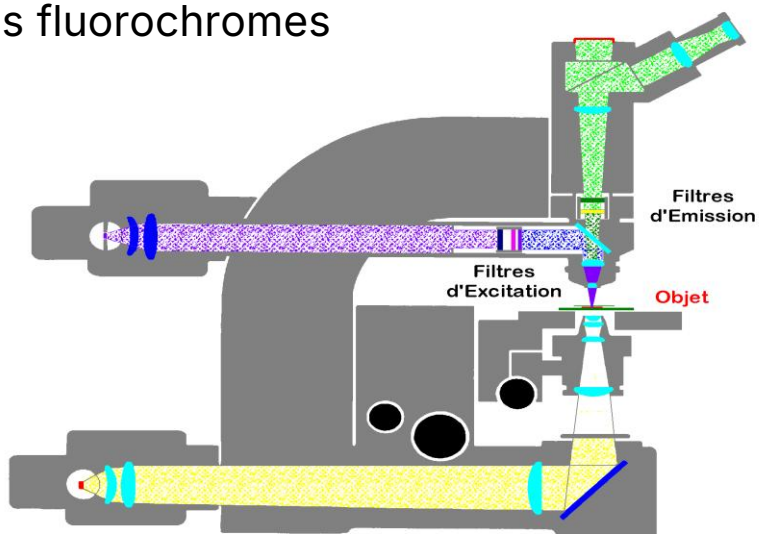


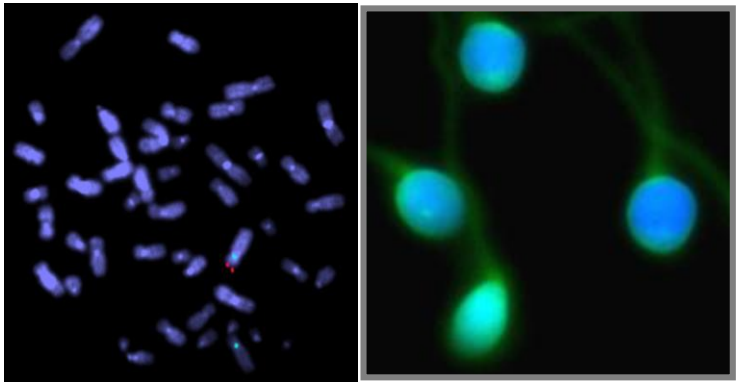
Lame mince de granite

Thomas Bresson

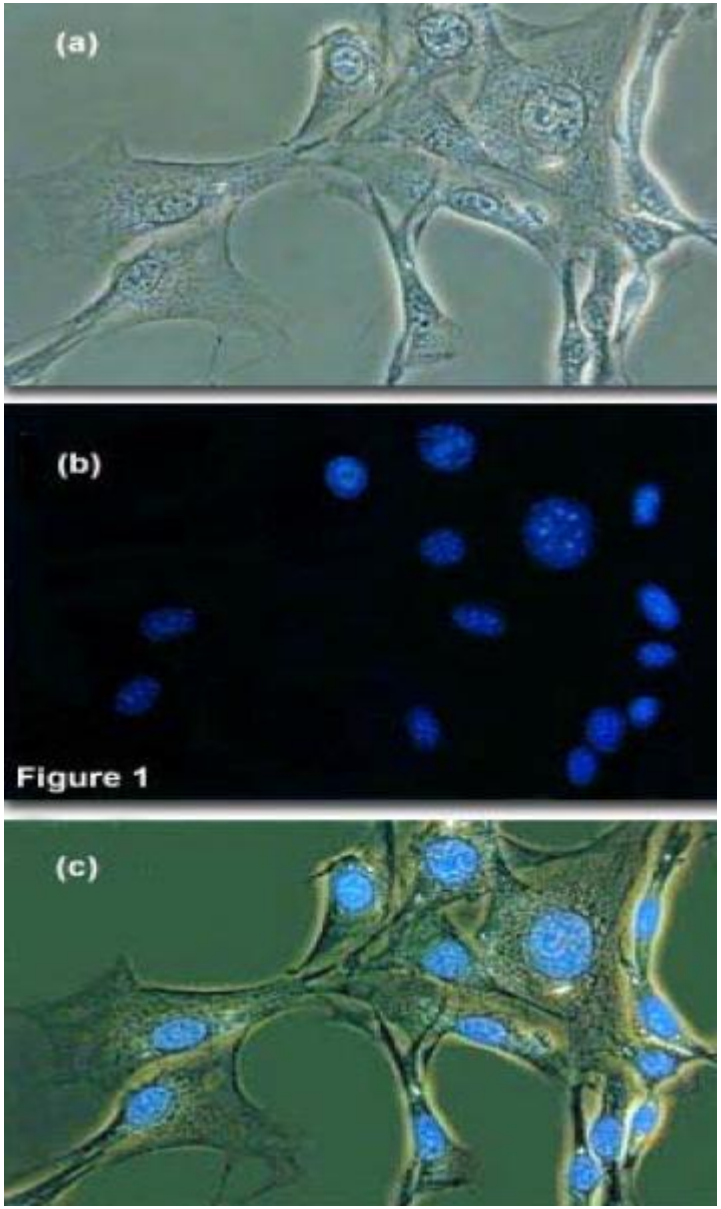
E- Epifluorescence

Pour les objets auto-fluorescents et pour les fluorochromes





Chromosomes et spermatozoïdes émettant une fluorescence bleue grâce au DAPI



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)

http://www.cours.fmed.ulaval.ca/a06/fileadmin/cours/template/BIO11134/documents/documents/Cytol-PPT-CH1-2006.pdf

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 (tétroxyde d'osmium)(M.E.)

} Pontage chimique entre protéines (liaisons covalentes)

En Pratique :

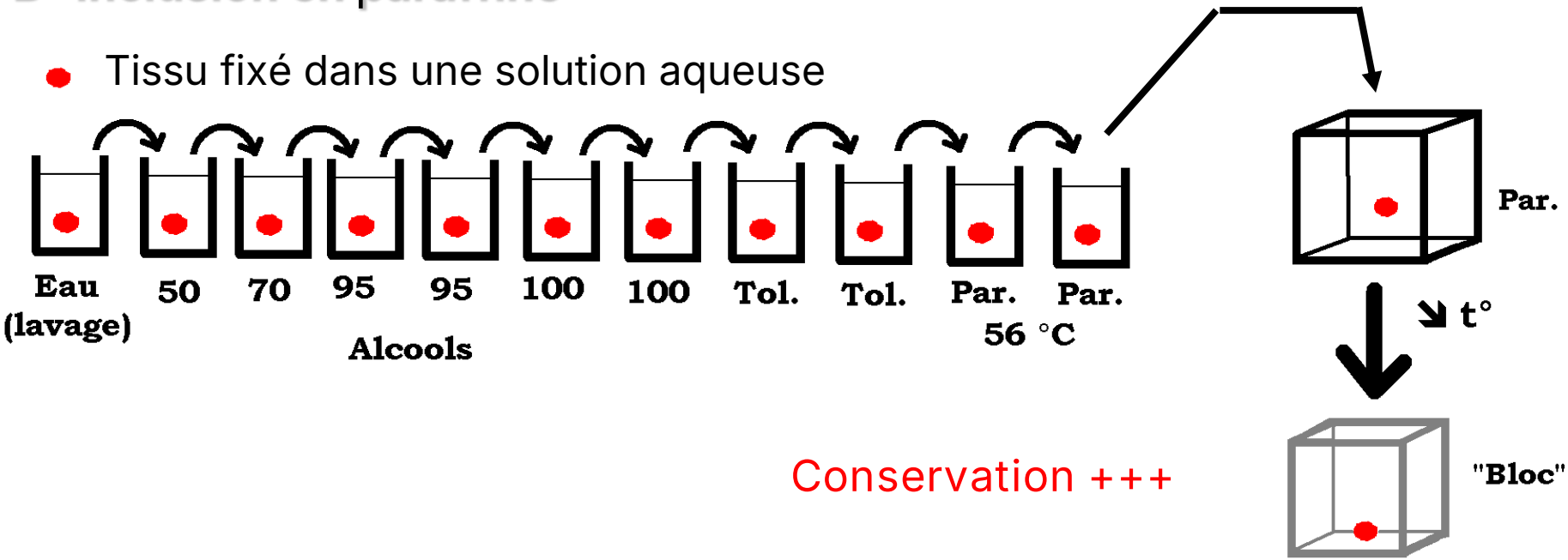
Formol tamponné

Liquide De Bouin
(Ac. picrique + Formol + Ac. Acétique)

Carnoy
(Acide acétique + Méthanol)

B- Inclusion en paraffine

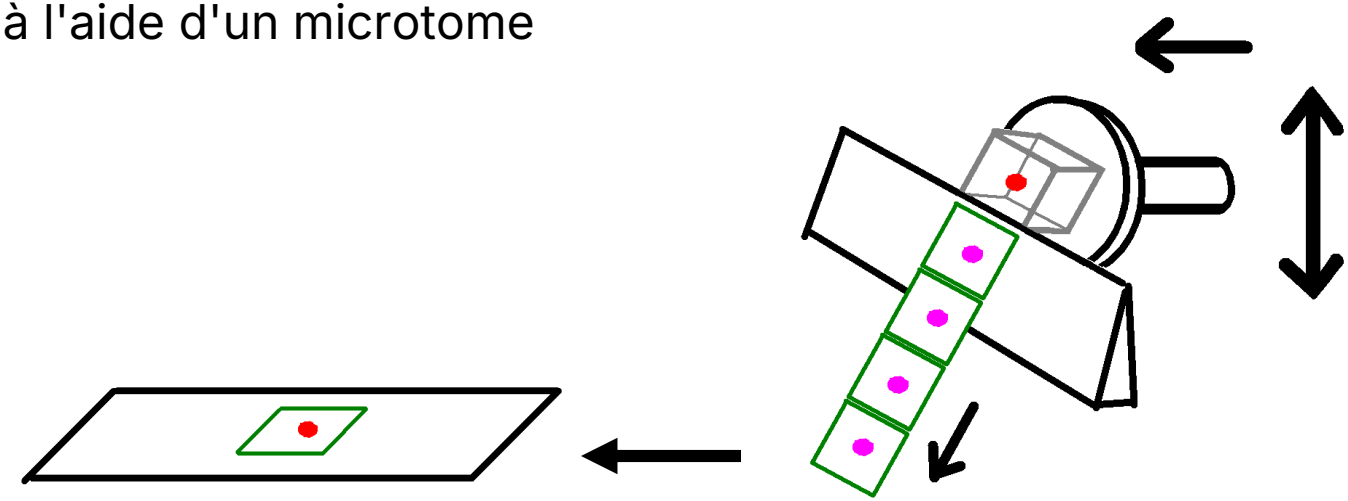
- Tissu fixé dans une solution aqueuse



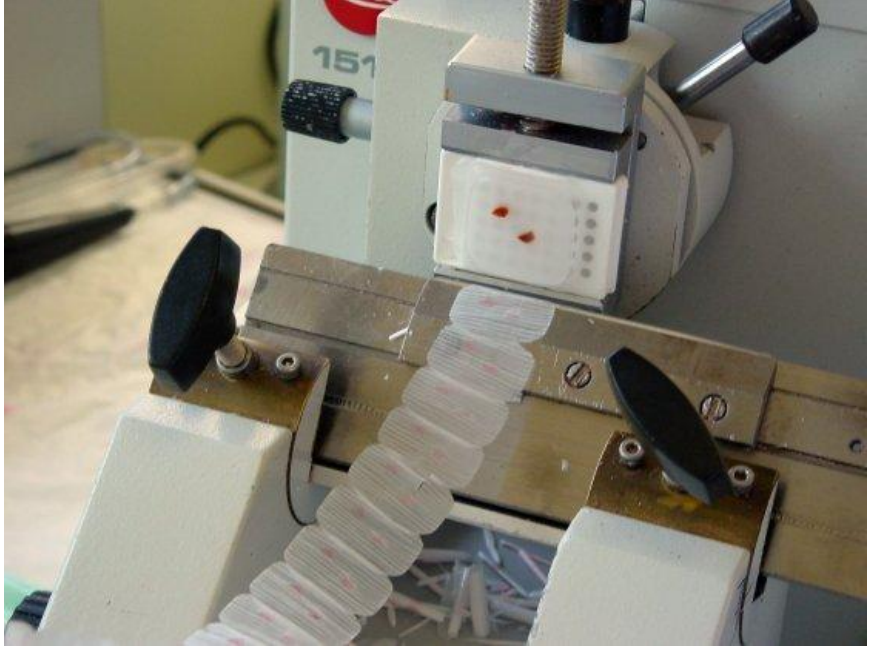
Conservation +++

C- Coupes : (4 à 6 µm)

à l'aide d'un microtome



Inclusion de tissus en paraffine



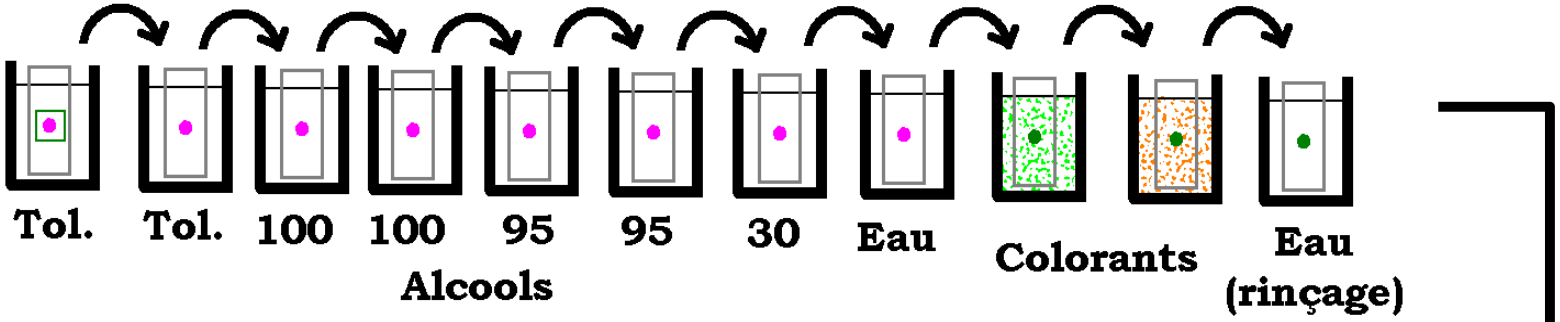
Coupes au microtome

Ruban de coupes

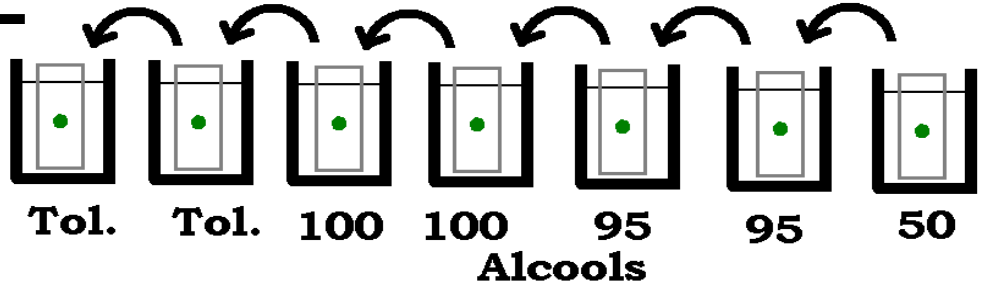
Dépôts des tranches sur lames

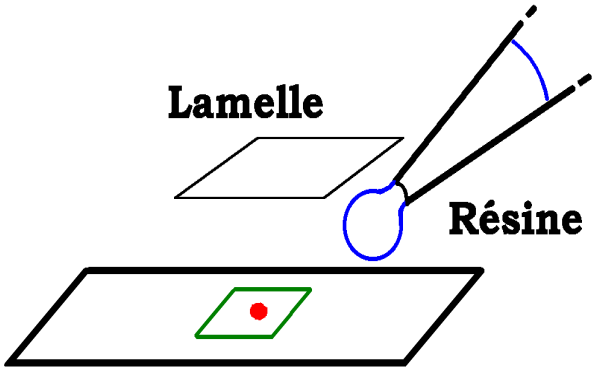
http://www.microscopies.com/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-3/COUPARAF%20.htm

D- Coloration

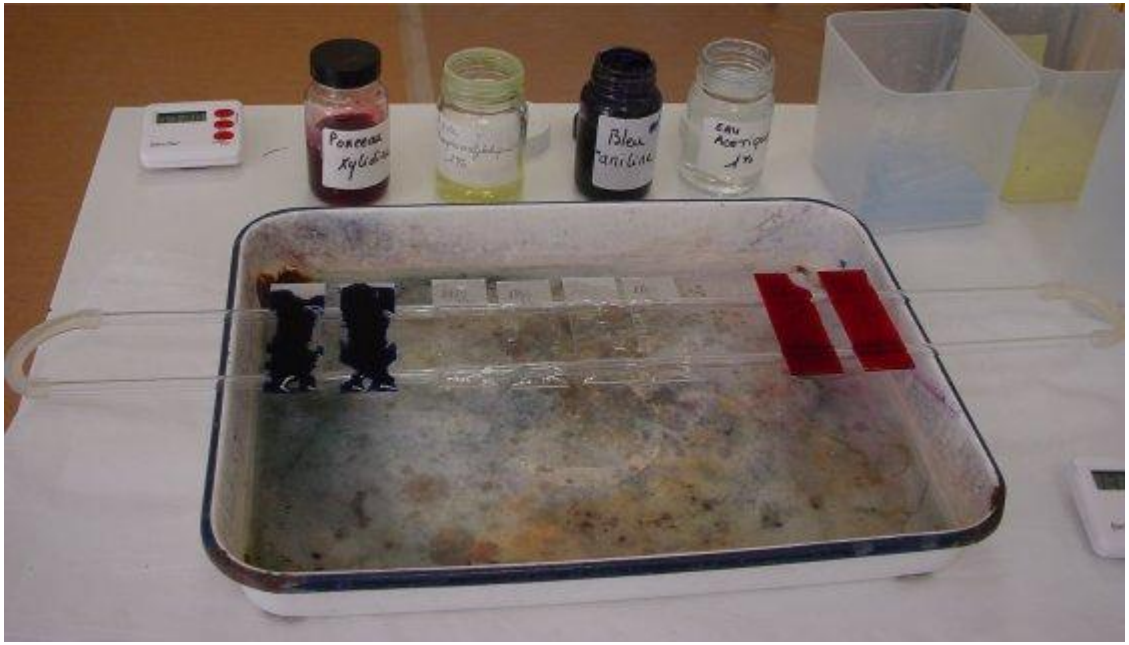


E- Montage :





BUTS | Optique
Conservation



Coloration

Montage définitif avec collage des lamelles

http://www.microscopies.com/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-3/COUPARAF%20.htm

F- Synthèse

Avantages : Conservation des structures

Qualité des images

Inconvénients :

36 à 48 h de préparation

Elimination des lipides

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

Arrêt activités bio (enzymatiques ...)

Modification conformation des protéines

https://www.aufeminin.com/bienetre/sport-en-famille-s2429995.html

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° - 20°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

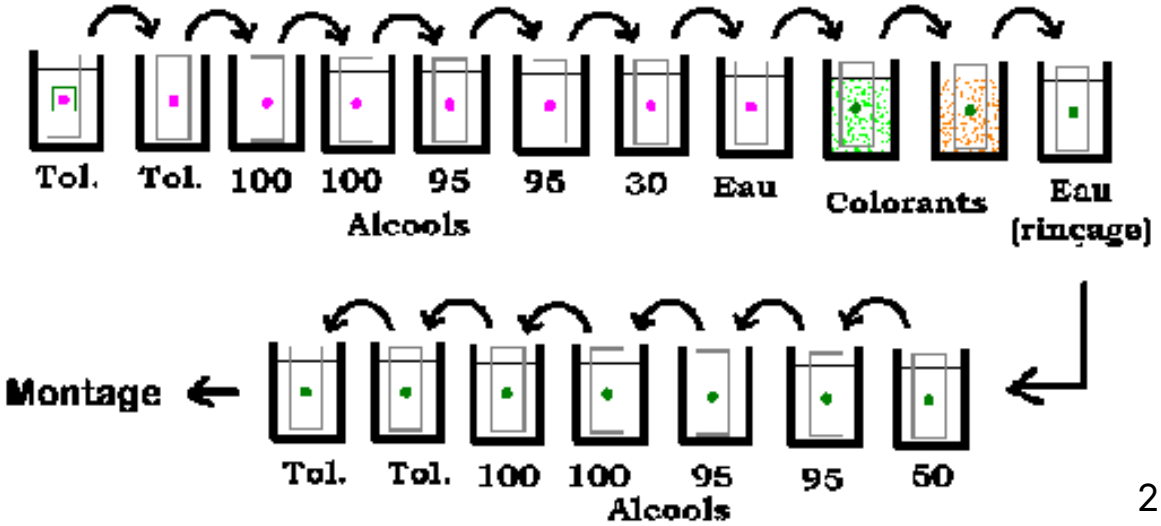
Colorants phagocytés (encre de Chine : cell mononucléées syst phagocytaire ...)

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*)

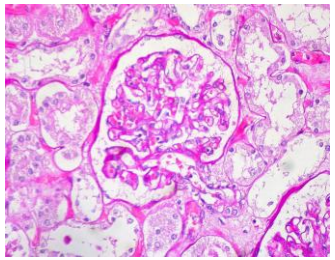
<u>En pratique :</u>

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

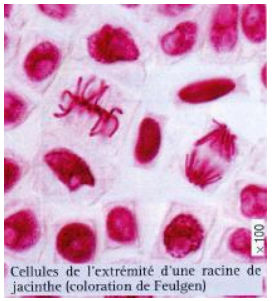
Frottis sanguins : méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG)

C- Colorations histochimiques

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



Feulgen-Rossenbeck → ADN (dosage par photométrie)

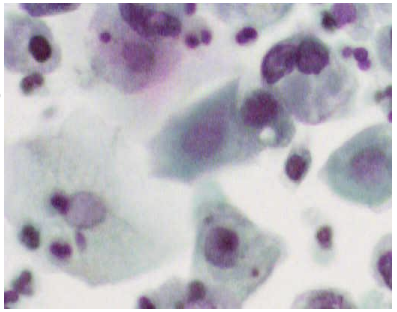


Colorations argentiques (variées)

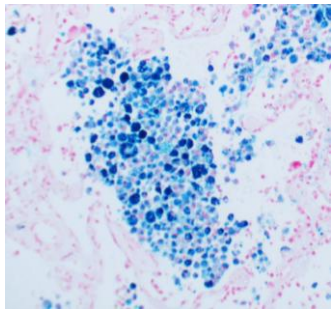
→ Mélanine

→ Amines biogènes

→ Neurofibrilles

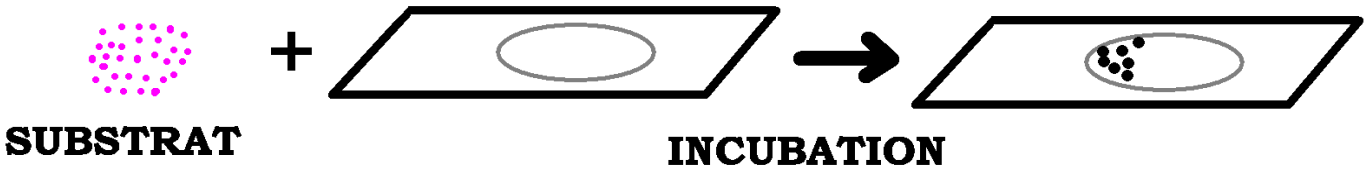


Perls → Fer



D- Histo-enzymologie

Sur matériel frais



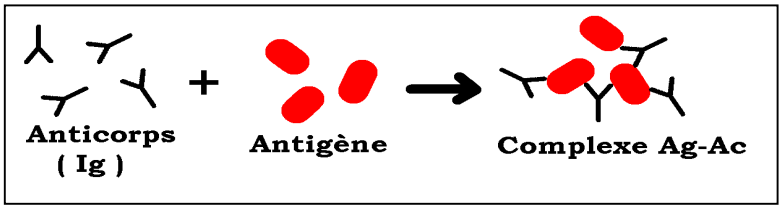
Pour peroxydases, phosphatases, estérases, etc…

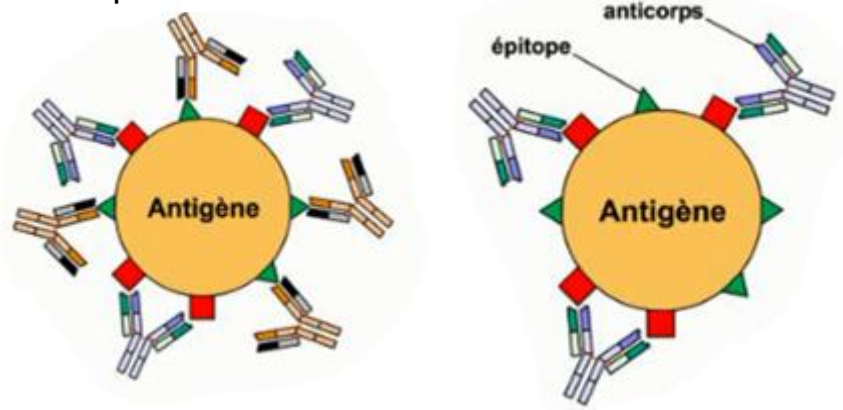
E- Immuno-histochimie SPÉCIFICITÉ +++

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

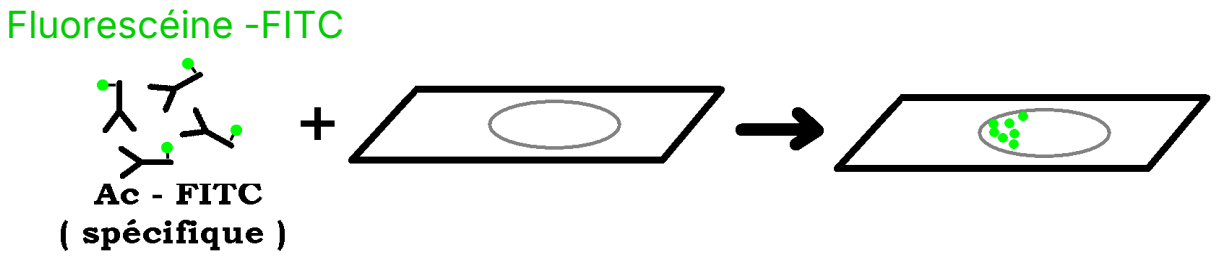
Monoclonaux : Produits par un clone de plasmocytes (L_B différenciés) de l'animal puis fusion avec lignée cellulaire de lymphocytes tumoraux pour production importante *in vitro*

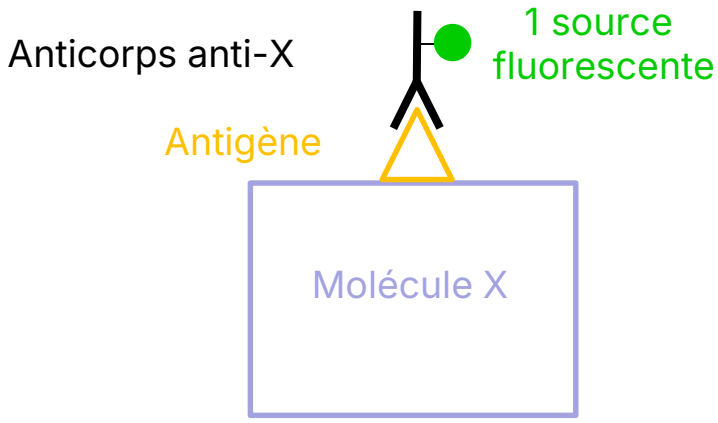




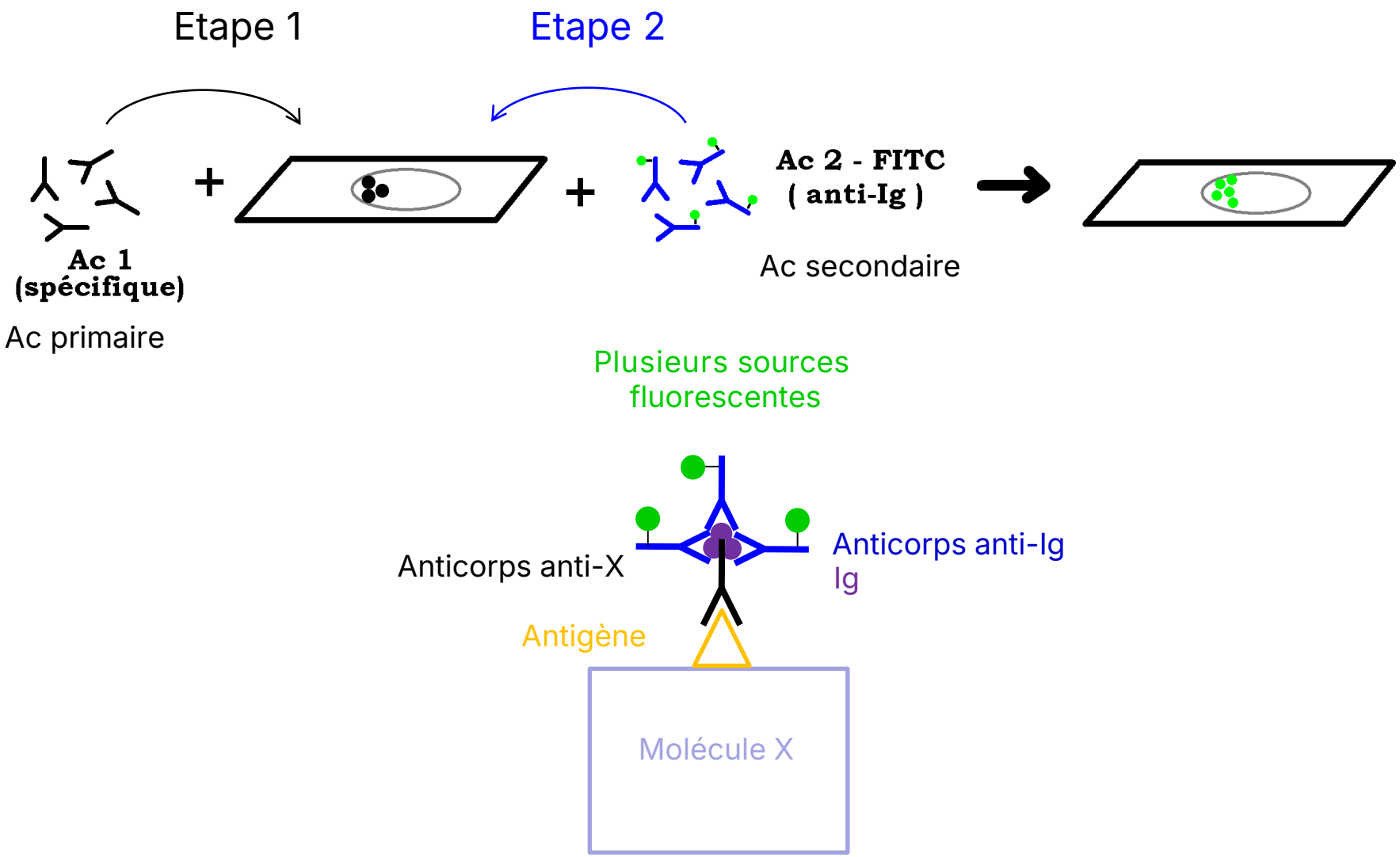
https://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps#Anticorps_monoclonaux

1- Immunofluorescence directe





2- Immunofluorescence indirecte

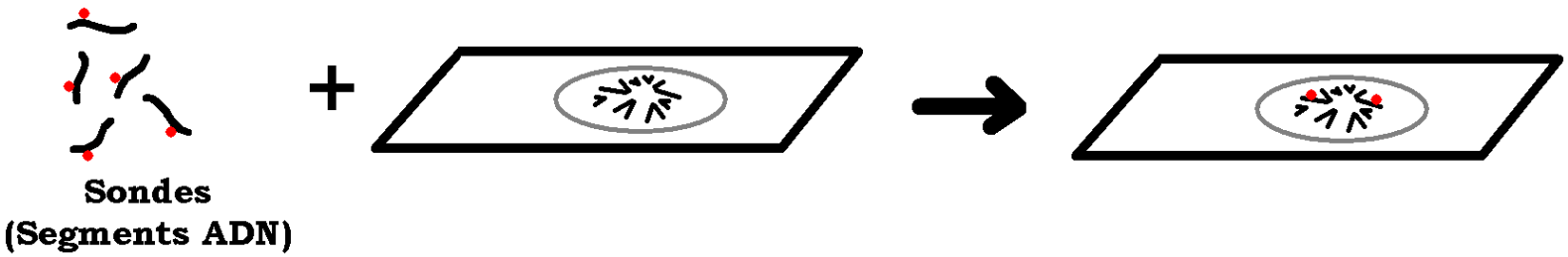


F- Hydridation *in situ*

Localisation de segments d'ADN (ARN) par <u>sondes</u>

(Fragments d'ADN de séquence complémentaire)

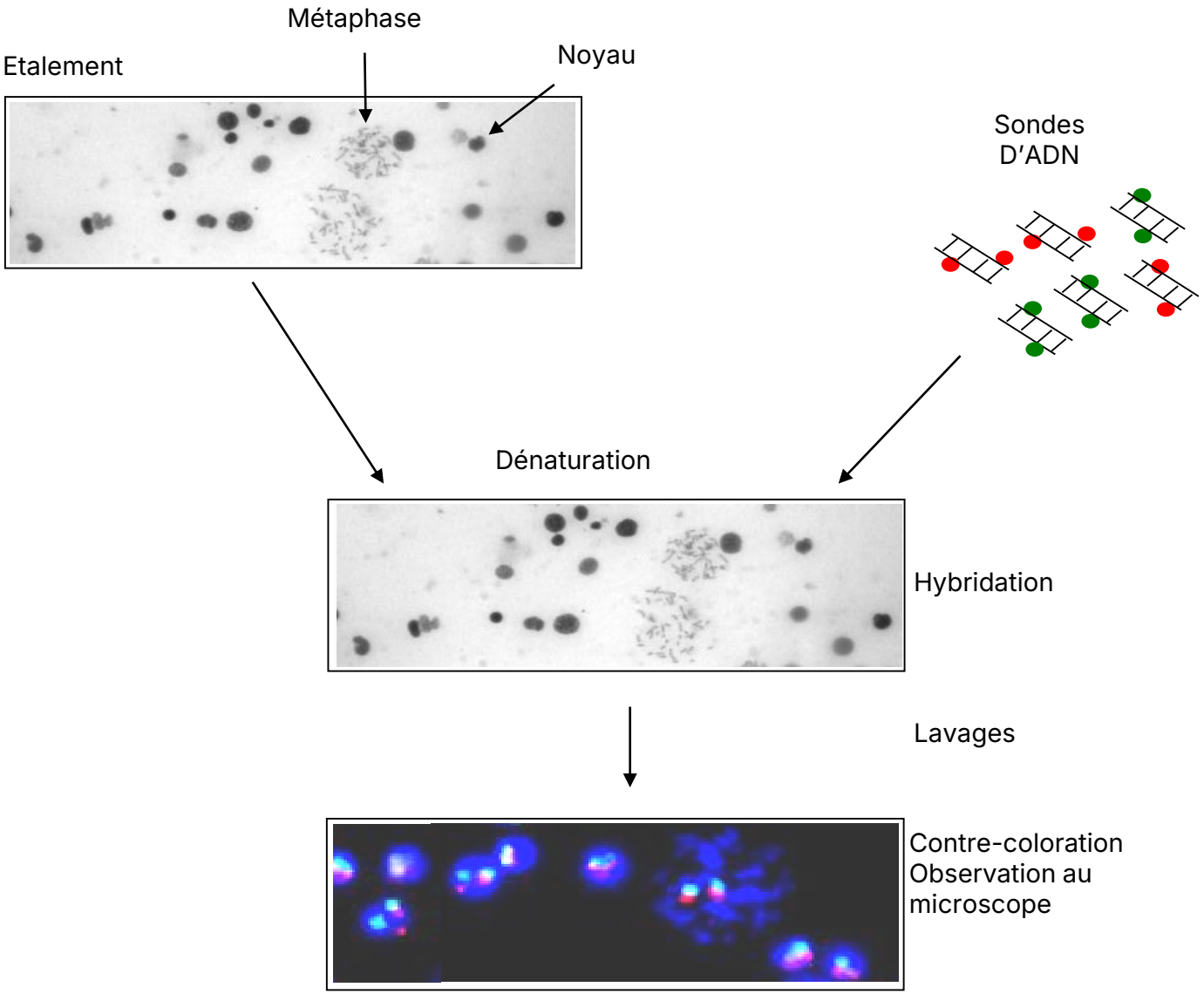
Par ex. Sur chromosomes de cellules en mitose



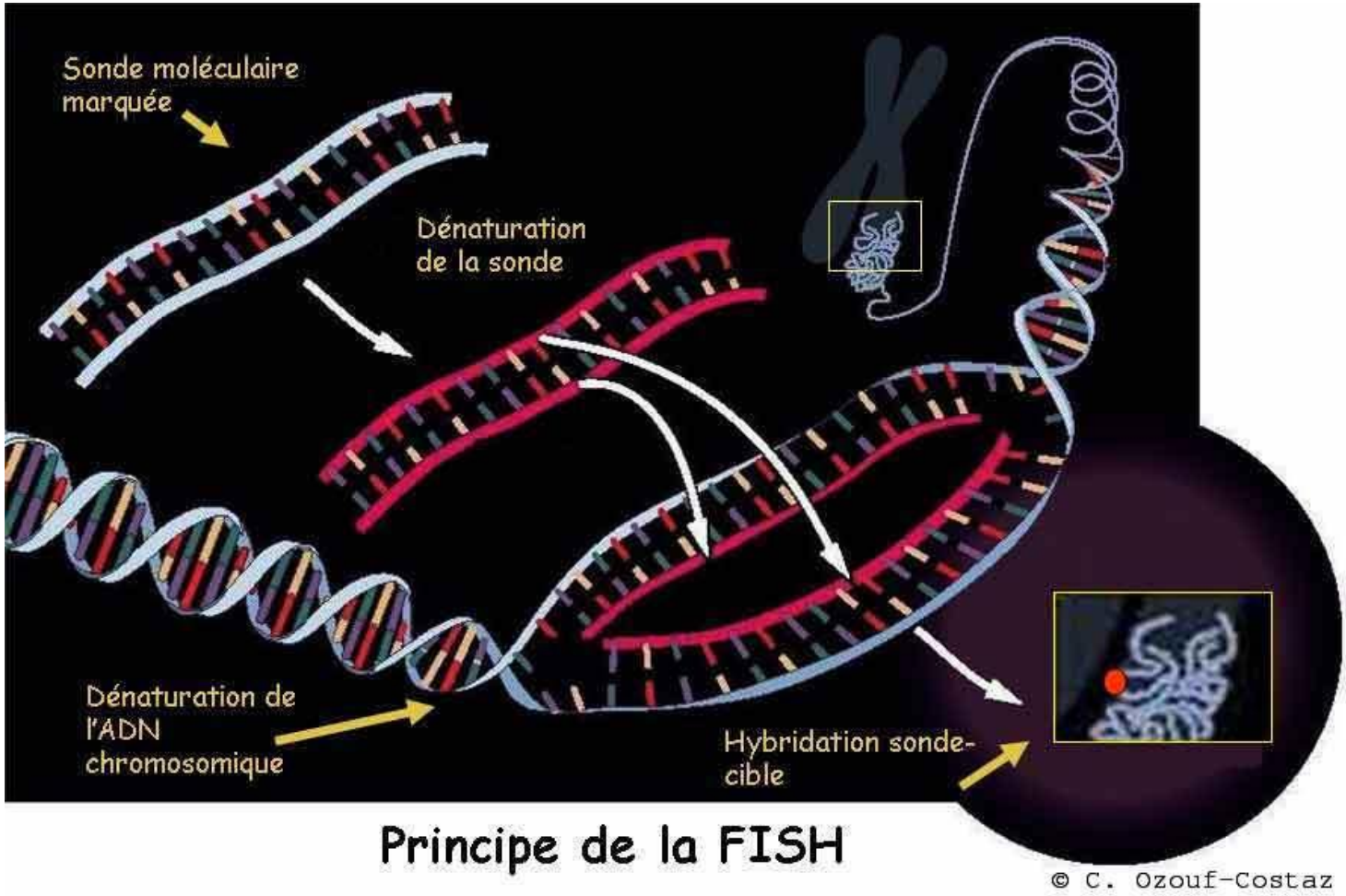
Marquage des sondes par : Isotopes (rarement utilisés)

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

Hybridation *in situ* fluorescente



Hybridation *in situ* fluorescente



Principe de la FISH

Contact : aurore.perrin@chu-brest.fr