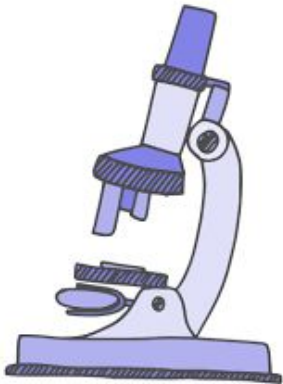


Tous droits réservés Tutorat Santé Brestois ©
Toute diffusion et reproduction, totale ou
partielle, de ce document est interdite

PASS/L.AS

Méthodes d'études de la cellule



Stage de Pré-Rentrée 2023
Pôle Biologie

Inspiré des cours du Professeur Montier et du Professeur
Perrin



Petit message d'avertissement avant de commencer :

Nous vous rappelons que ce diaporama, réalisé par des étudiants, est une aide et **non un support de cours officiel** et ne peut donc pas être considéré comme un ouvrage de référence lors de l'examen de PASS ou de L.AS.

Il se base sur le **cours de l'année précédente** qui peut être **amené à être modifié** dans sa forme et son contenu au bon vouloir du professeur.



Have fun ;)

Sommaire

- 1. Introduction
- 2. Définitions
- 3. Microscopes optiques
 - A. Microscopes
 - B. Compléments optiques
 - C. Préparations
- 4. Microscopes électroniques
 - A. Généralités
 - B. MET
 - C. MEB
- 5. Autres techniques



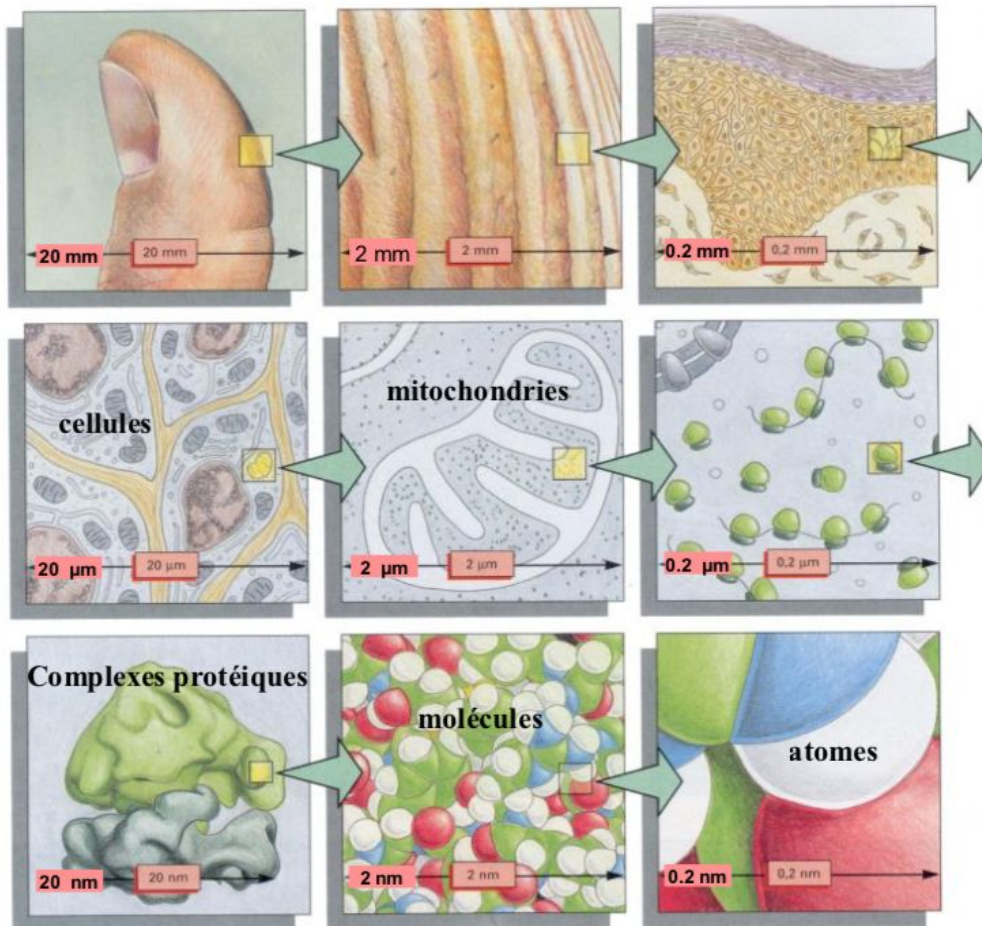
1. Introduction

Différents microscopes pour différentes échelles :

- Cellule eucaryote : **10 à 30 μm**
- Virus : **100 nm**
- Mitochondrie / bactérie : **1 μm**



Tailles



2. Définitions

Limite de résolution : distance la plus petite possible qui doit séparer 2 objets pour que l'on puisse les observer en 2 éléments distincts dans les meilleures conditions possibles

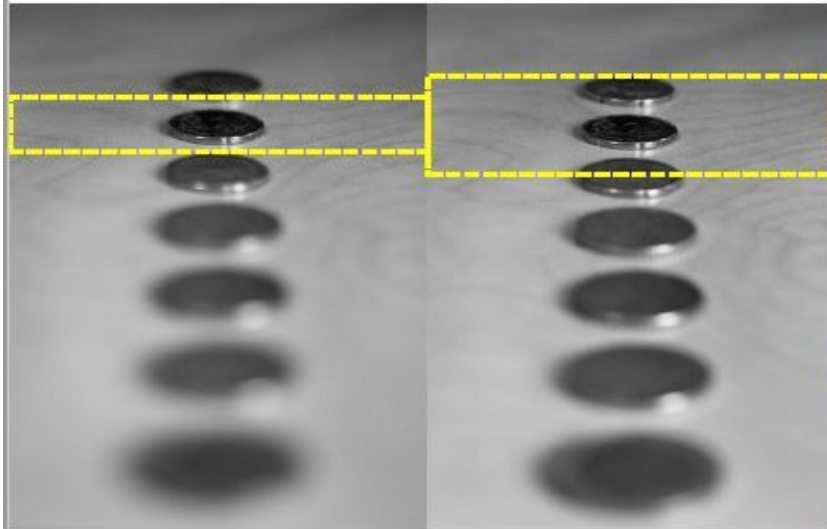
Grossissement utile : le grossissement représente le rapport théorique qu'il y a entre les dimensions d'un objet vu à l'œil nu et vu à travers un instrument

Profondeur de champ : Zone comprise entre le premier et le dernier plan net de l'image

=> Plus le grossissement augmente, plus la profondeur de champ diminue



2. Définitions



A 50 cm du personnage



A 1,50 m du personnage

Grossissement et profondeur de champ sont inversement proportionnels



3. Microscopes optiques

= microscopes photoniques

= microscopes à lumière

Pouvoir de résolution = $0,2 \mu\text{m} = 200 \text{ nm}$



3. Microscopes optiques

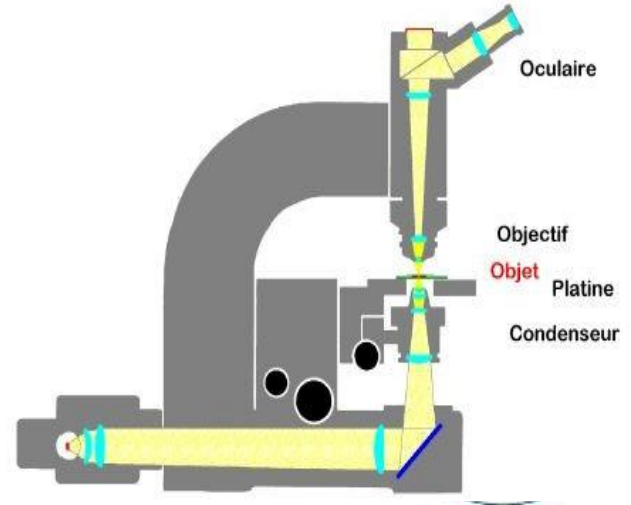
A. Microscopes

- Le microscope **photonique classique** ou microscope **droit**

Objectif : x4, 10, 20, 40, 100 → agrandit et renverse

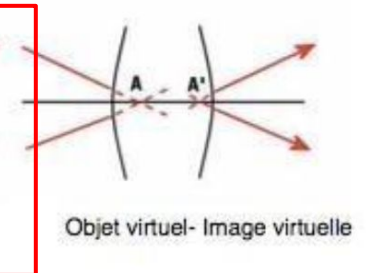
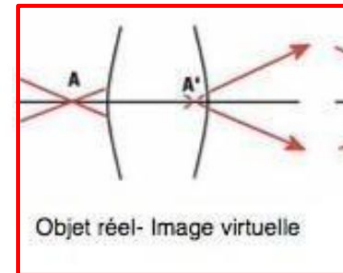
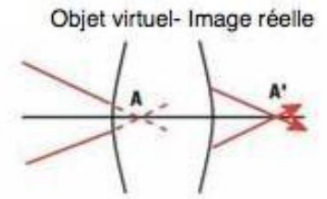
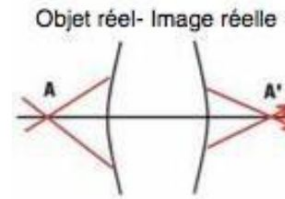
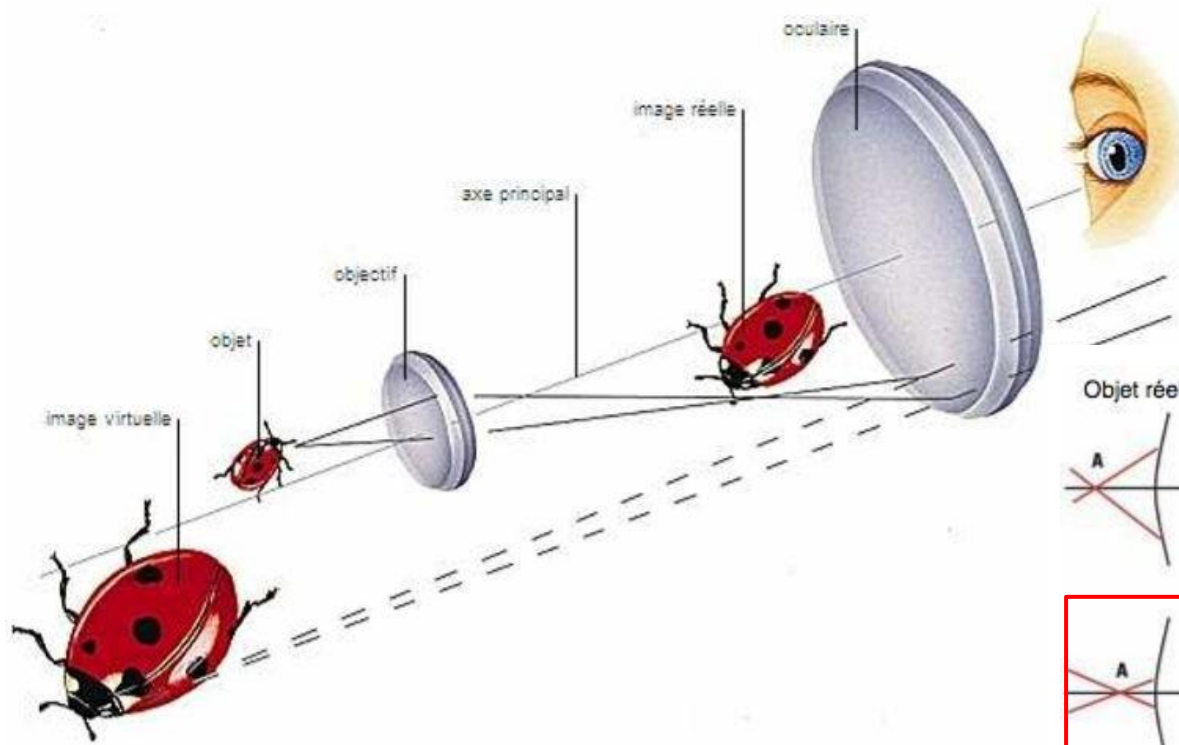
Oculaire : x10, 12.5 → agrandit

- Donc l'oeil voit une image agrandie et renversée
- Grossissement total = entre **40 et 1250x**



3. Microscopes optiques

L'oeil voit donc une image agrandie, virtuelle et renversée

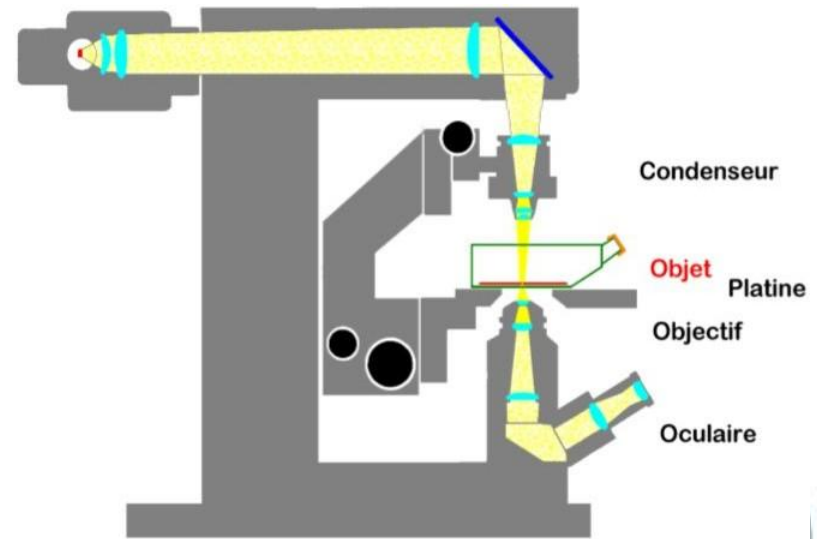


3. Microscopes optiques

A. Microscopes

- Microscopes photoniques inversés

Utilisé pour les cultures cellulaires



3. Microscopes optiques

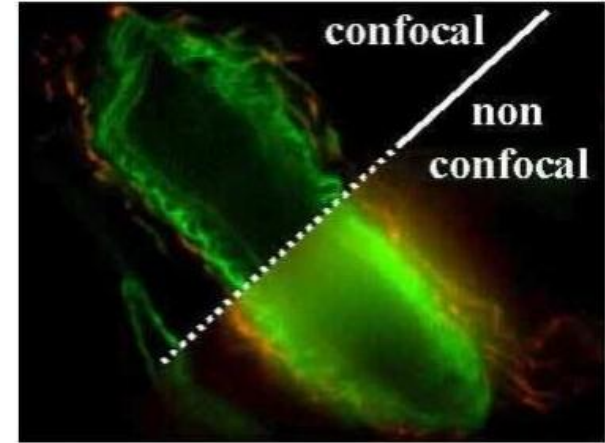
A. Microscopes

- Microscope confocal

L'objet est éclairé par un **balayage LASER**.

Possibilité de reconstructions tridimensionnelles.

Améliore la résolution lors d'une utilisation de la fluorescence.



<http://www.univ-rouen.fr/bfrnic/ifrmb/orincioe.htm>



3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

Permettent d'observer les cellules, transparentes à l'**état frais**.

Soit on adapte le microscope (compléments optiques), soit on modifie l'objet (colorants, etc.).



Fibroblastes en culture



3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

- Contraste de phase

+ de contraste, perte de résolution, apparition d'un halo.

Particulièrement utilisé pour les cellules vivantes.



Fibroblastes en culture observé
en contraste de phase

3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

- **Contraste interférentiel**

Crée des interférences lumineuses en lumière polarisée
Meilleure résolution mais **fausse impression de relief**



1 Fibroblastes en culture observés
en contraste interférentiel



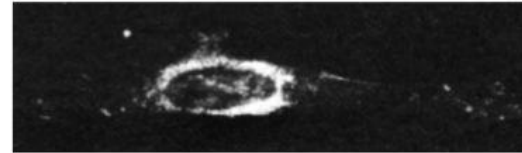
3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

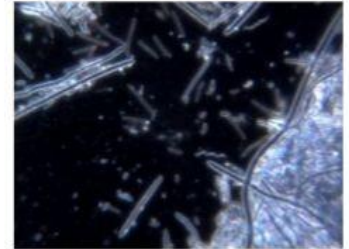
- Fond noir

Améliore fortement le contraste.

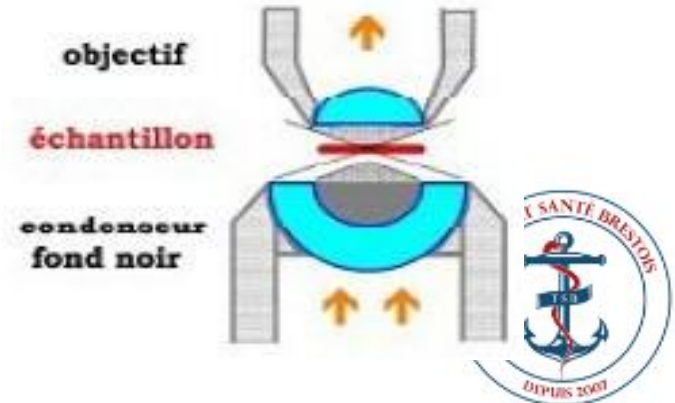
Utilisé pour la bactériologie.



Fibroblastes en culture observés en fond noir



Bactéries de plaque sous-gingivale d'un patient



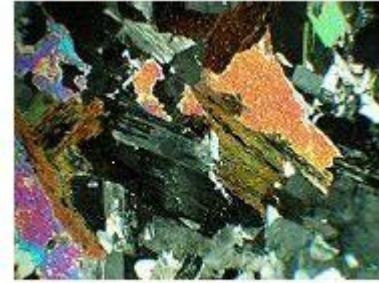
3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

- **Polarisation**

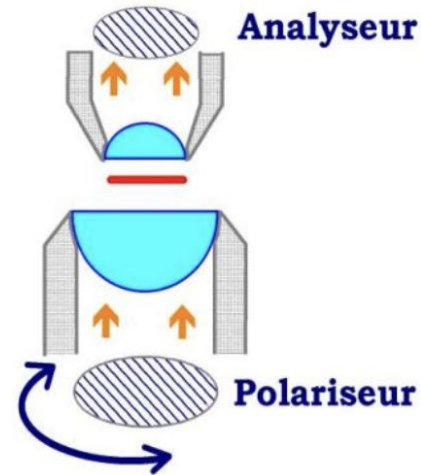
2 lames : un **analyseur** et un **polariseur**

Utilisé en **minéralogie**.



Lame mince de granite

Thomas Bresson



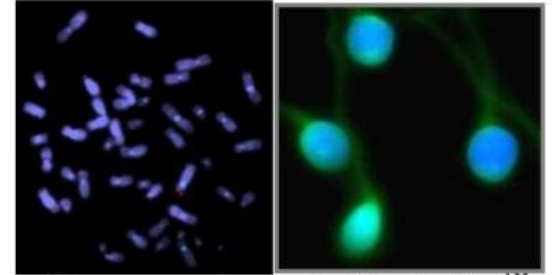
3. Microscopes optiques

B. Compléments optiques

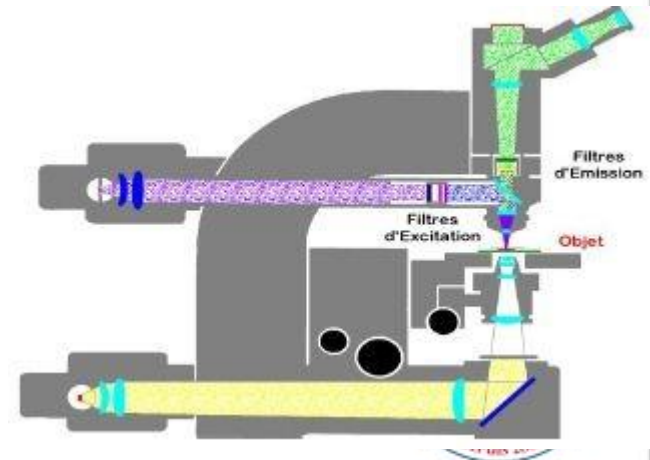
- **Epifluorescence**

Utilisée pour les **objets fluorescents**

Fluorescence : capacité d'une molécule à émettre des photons de plus faible énergie que les photons de la lumière incidente du microscope.



Chromosomes et spermatozoïdes émettant une fluorescence bleue grâce au DAPI



3. Microscopes optiques

C. Préparations

Il existe deux types de matériel biologique :

- Les **cellules isolées**, qui sont **étalées**, **fixées** puis **colorées** -> **ETAFIXCO**
- Les **tissus biologiques**, qui sont **fixés**, **inclus**, **coupés** puis **colorés** -> **FIXINCOUCO**

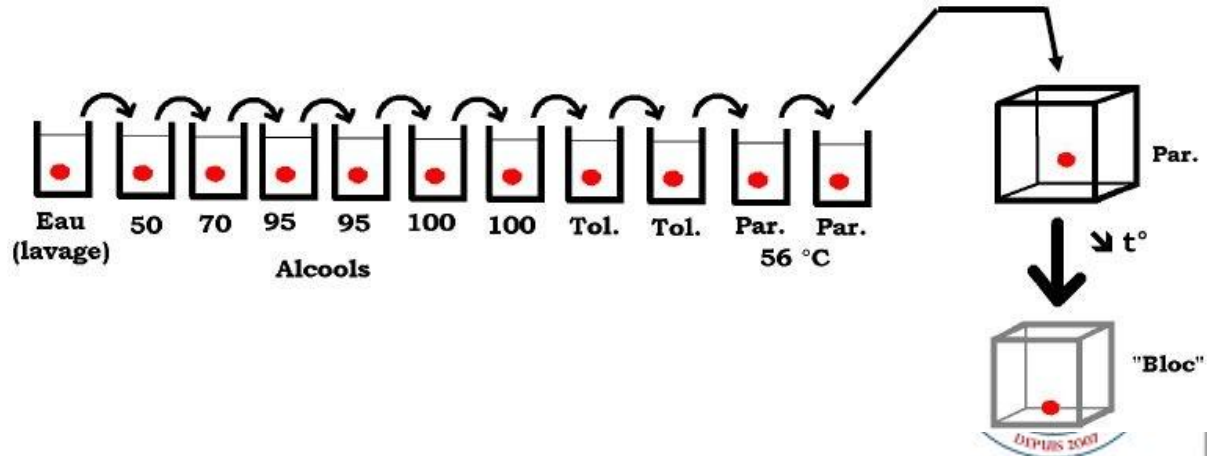


3. Microscopes optiques

C. Préparations

Fixation : Arrête les réactions biologiques et biochimiques, fige le matériel et le durcit.

Inclusion en paraffine :



3. Microscopes optiques

C. Préparations

Coupe : à l'aide d'un microtome

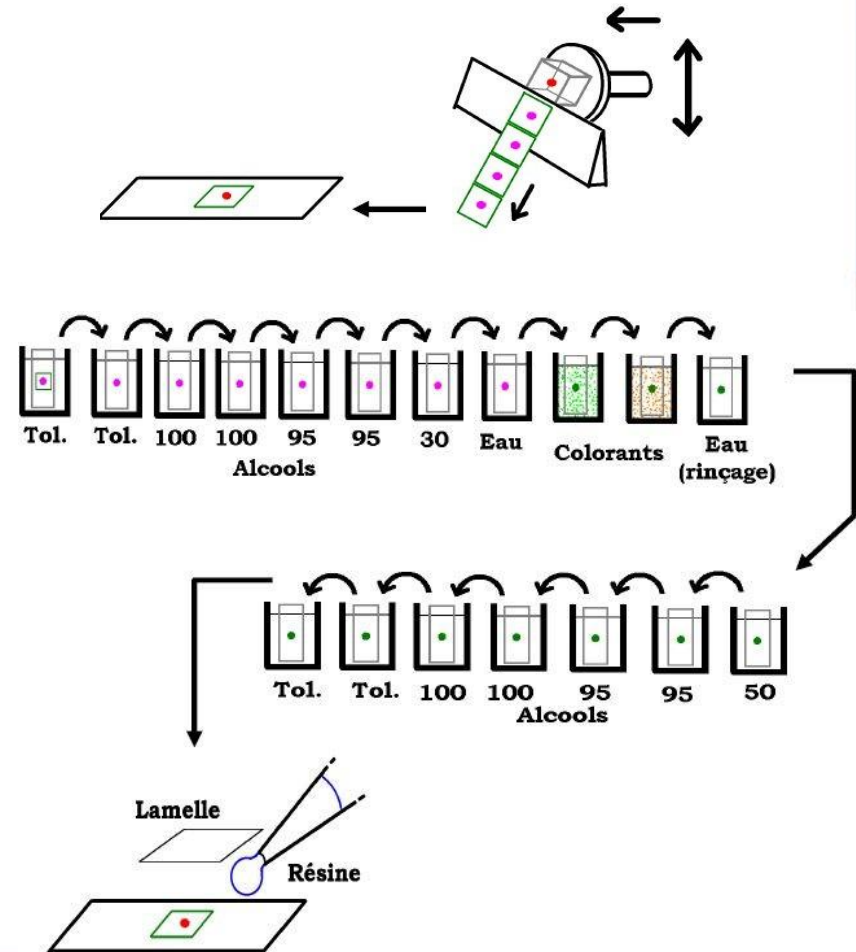
Coloration :

1/ Hydratation

2/ Coloration

3/ Déshydratation

4/ Résine



3. Microscopes optiques

C. Préparations

Classique

- ❑ excellente conservation
- ❑ image de qualité ++
- ❑ préparation longue
- ❑ activités biologiques arrêtées
- ❑ modification/disparition de certaines molécules

Congélation

- ❑ conservation moindre
- ❑ image de moins bonne qualité
- ❑ préparation rapide
- ❑ maintien de l'activité biochimique
- ❑ maintien des molécules non observables en histologie classique



3. Microscopes optiques

C. Préparations

- **Colorations**

Colorations vitales = colorations pouvant se faire sur des tissus dont les cellules restent vivantes durant l'étude (elles sont donc peu ou pas toxiques).

≠

Coloration générales ⇒ colorations exploitant la métachromasie, c'est-à-dire la propriété d'un colorant à changer de couleur en fonction du pH des molécules sur lesquelles il est fixé.

Coloration basique ≠ Coloration acide



3. Microscopes optiques

C. Préparations

- Colorations histochimiques

PAS = sucre

Feulgen-Rosenbeck = ADN

Précipitation de sels d'argent = mélanine, amines biogènes, neurofibrilles

Perl's = fer



3. Microscopes optiques

C. Préparations

- Histo-enzymologie

Cette technique s'effectue sur du **matériel frais ou venant d'être décongelé**.

Met en évidence l'**activité enzymatique** du matériel observé.

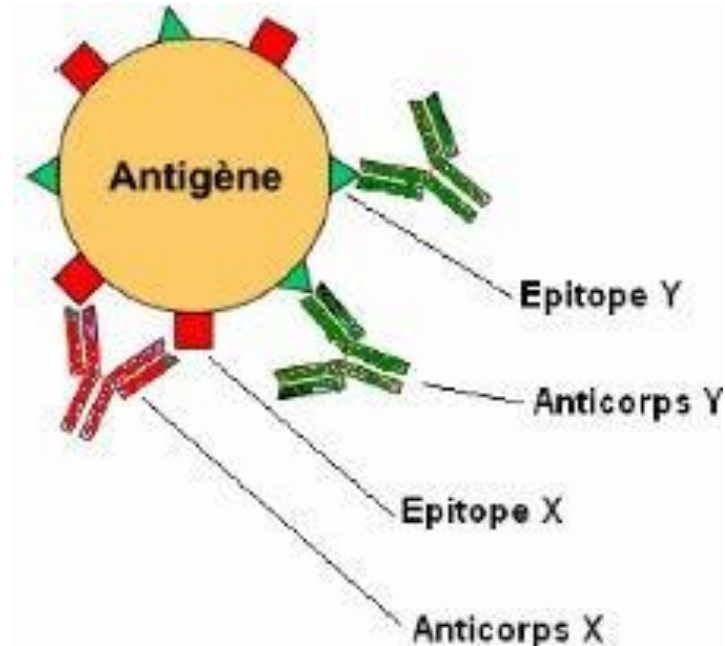


3. Microscopes optiques

C. Préparations

- Immuno-histochimie

Met en évidence la **spécificité Ag/Ac.**



3. Microscopes optiques

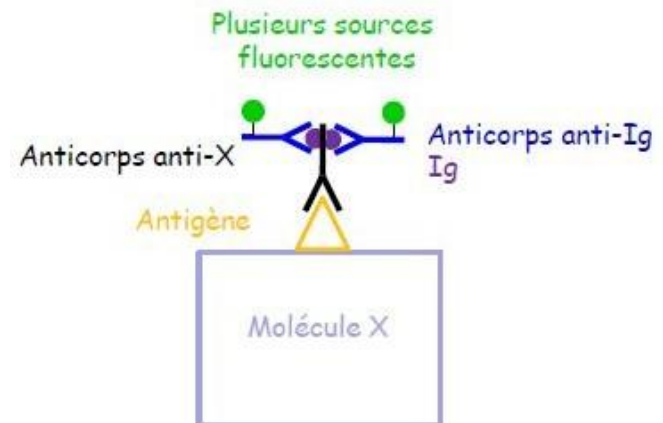
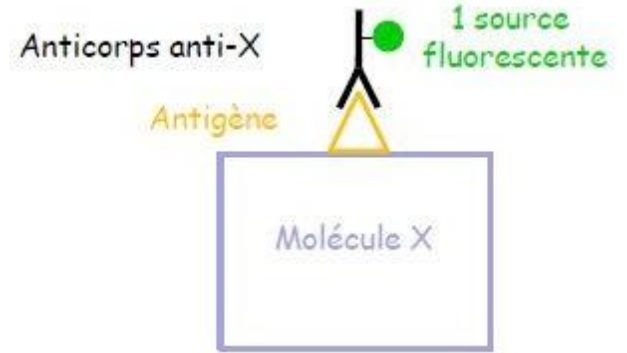
C. Préparations

- Immuno-histochimie : immunofluorescence

Immunofluorescence **directe**

Immunofluorescence **indirecte**

(+ *spécifique et + fluorescent*)



4. Microscopes électroniques

A. Généralités

Ce microscope utilise non plus la lumière mais un faisceau d'électrons.

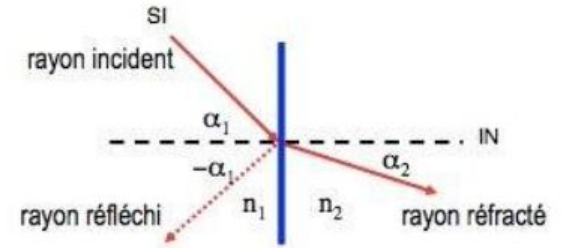
2 types : **MET** (microscope électronique à transmission) et **MEB** (microscope électronique à balayage)

Pouvoir de résolution = 2 nm (rappel : R du MO = 200 nm)



4. Microscopes électronique

A. Généralités



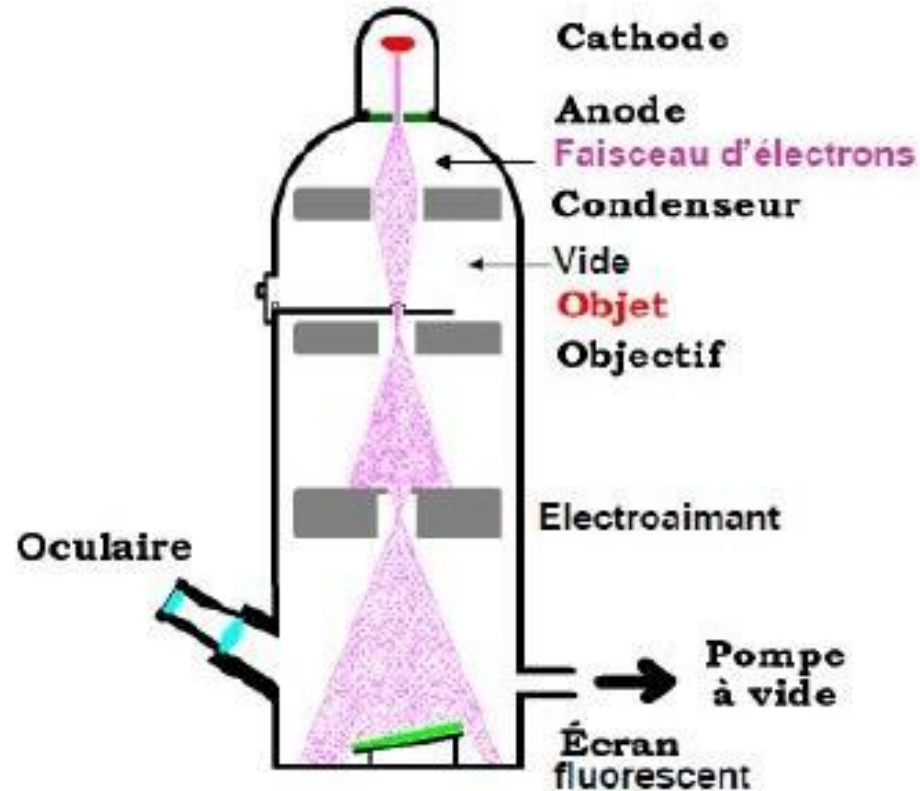
Microscope électronique à transmission : le faisceau d'électrons **traverse** l'objet.

Microscope électronique à balayage : le faisceau d'électrons ne traverse pas l'objet mais est **réfléchi** sur la surface de ce dernier.



4. Microscopes électronique

B. MET



4. Microscopes électronique

B. MET - Préparations

1. **Fixation** au glutaraldéhyde (protéines) ou au tétroxyde d'osmium (lipides)
2. **Inclusion** en résine (\neq paraffine pour MO)
3. **Coupes** à l'ultra-microtome
4. **Coloration** (agents de contraste)



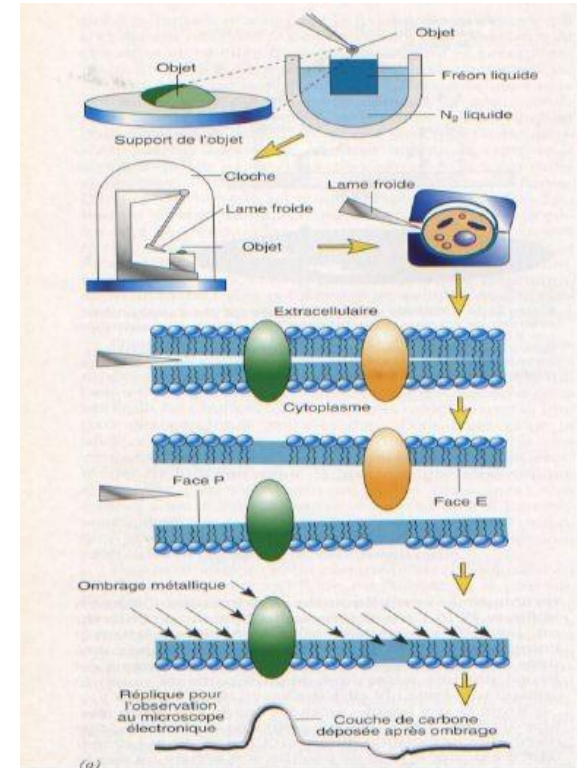
4. Microscopes électronique

B. MET - Préparations

- **Cryofracture**

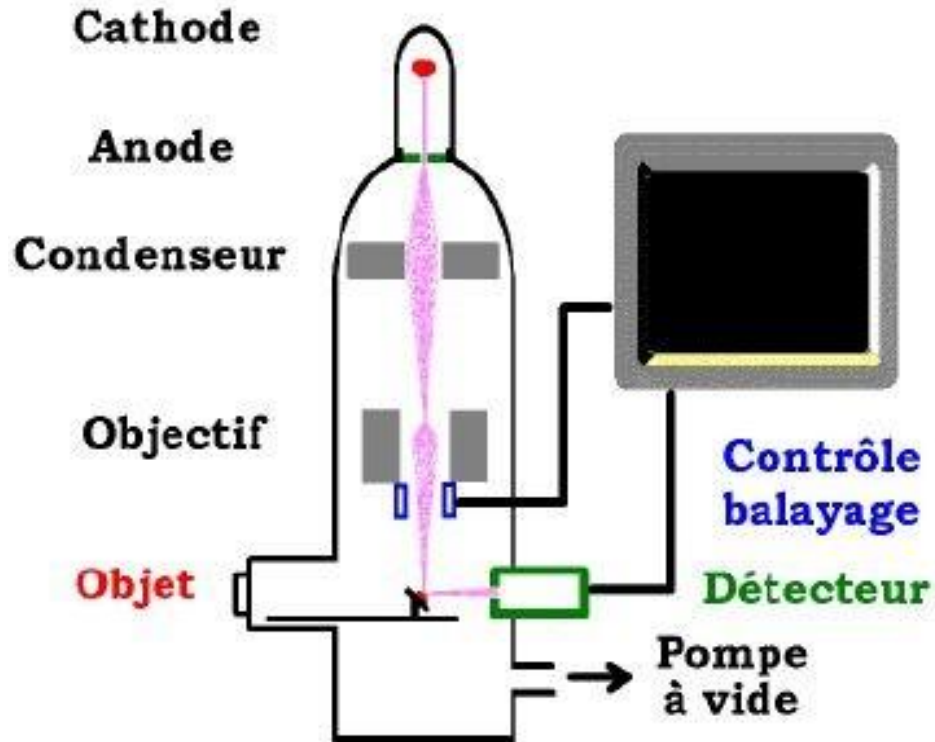
Utilisée pour les **membranes cellulaires**.

Grâce à la congélation, on peut séparer les 2 héli-couches de la membrane. On réalise un ombrage/réplique sur chaque moitié pour visualiser l'intérieur de la membrane.



4. Microscopes électronique

C. MEB - Préparations



4. Microscopes électronique

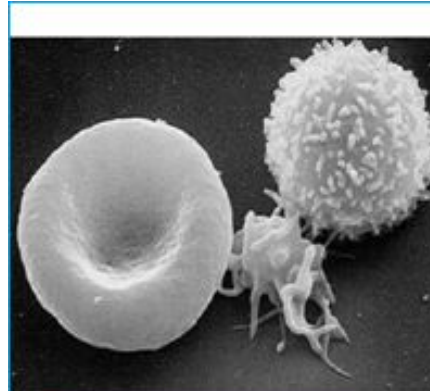
C. MEB - Préparations

1°/ **Fixation**

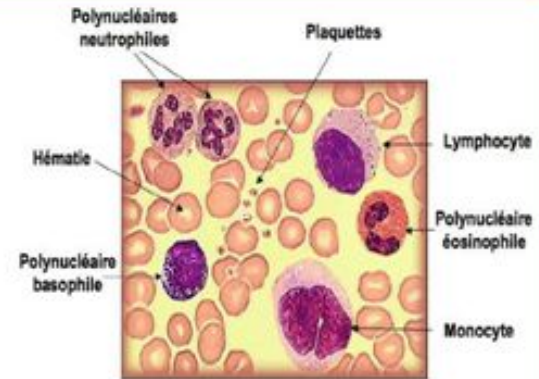
2°/ **Dessiccation**

3°/ **Métallisation** (or, platine)

4°/ **Observation**



Microscope électronique
A balayage

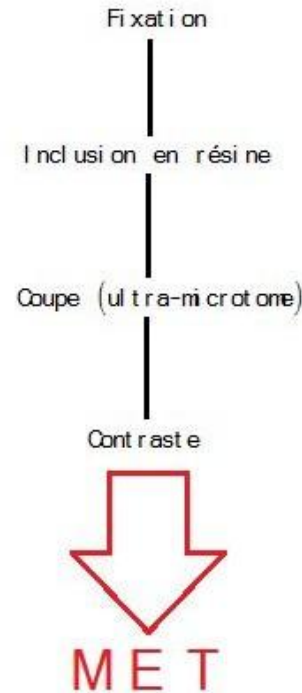
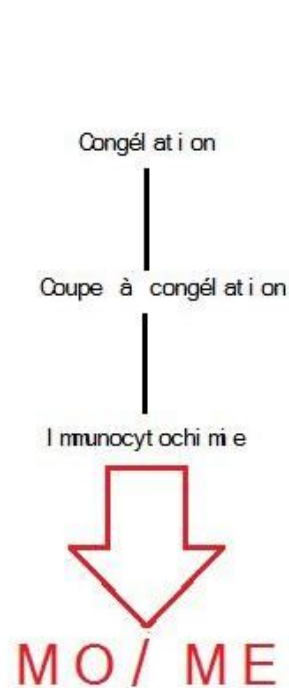
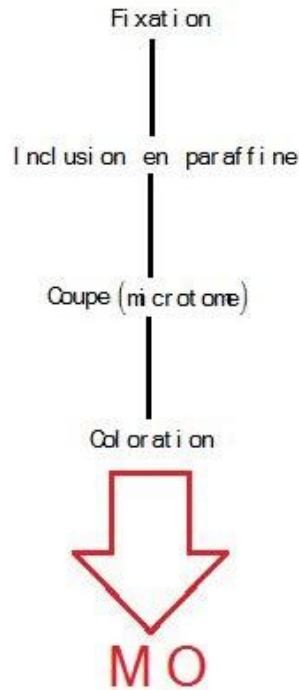


Microscope optique Biofaculte

!! PAS DE COUPE POUR LE MEB



Résumé des étapes de préparations MO/ME



5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

Isolement des cellules à partir d'un tissu.

2 possibilités : dissociation mécanique ou enzymatique.

Une fois les cellules isolées du tissu, il faut les trier :

- ❑ grâce à leurs **propriétés physiques** (taille, adhérence, densité, etc.).
- ❑ grâce à des **anticorps spécifiques**.

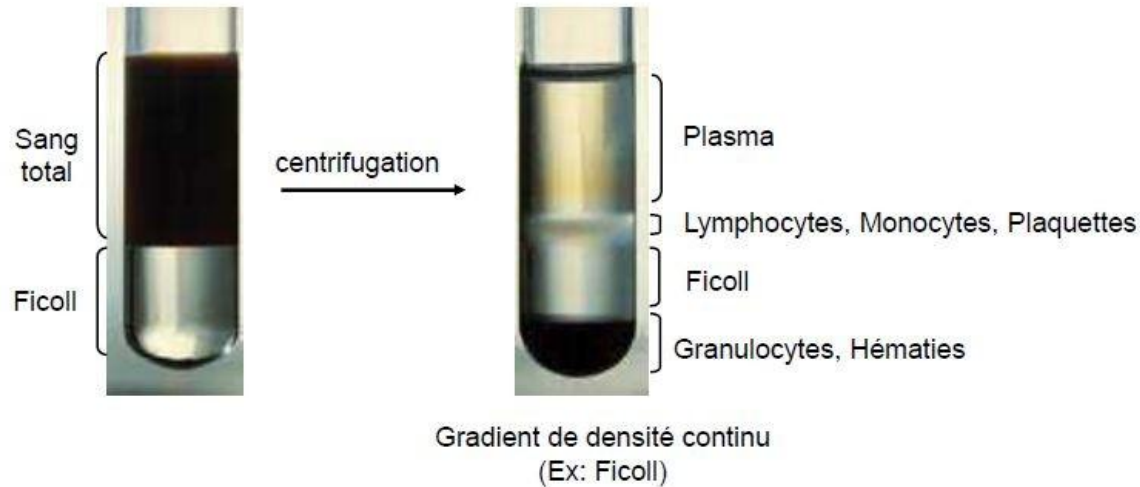
On les isole par **microdissection LASER**.



5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

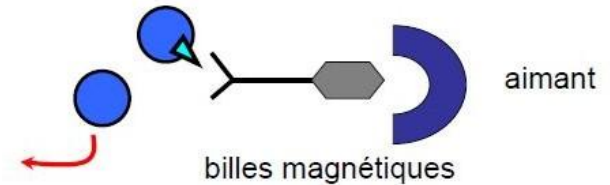
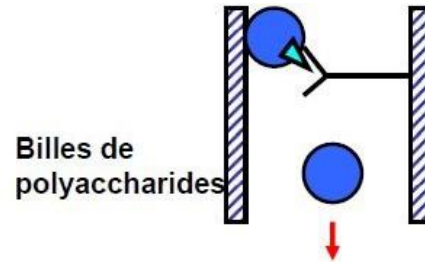
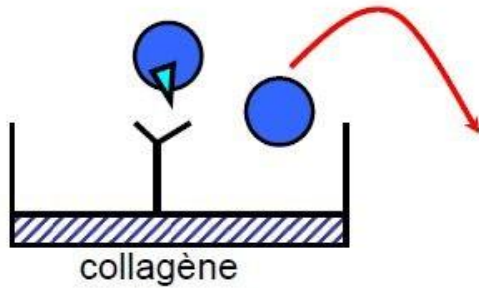
- Centrifugation sur gradient de densité



5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

- Ac couplés à un support



5. Autres méthodes d'exploration

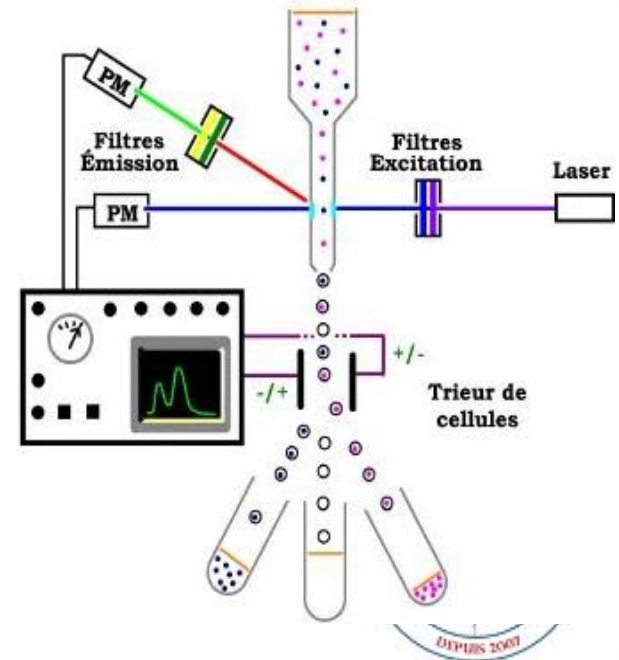
A. Isolement et culture des cellules

- Cytométrie en flux

Cette technique permet de **trier**, sur plusieurs paramètres, des cellules vivantes très rapidement.

Les cellules peuvent ensuite être remises en culture.

Etude du cycle cellulaire ++

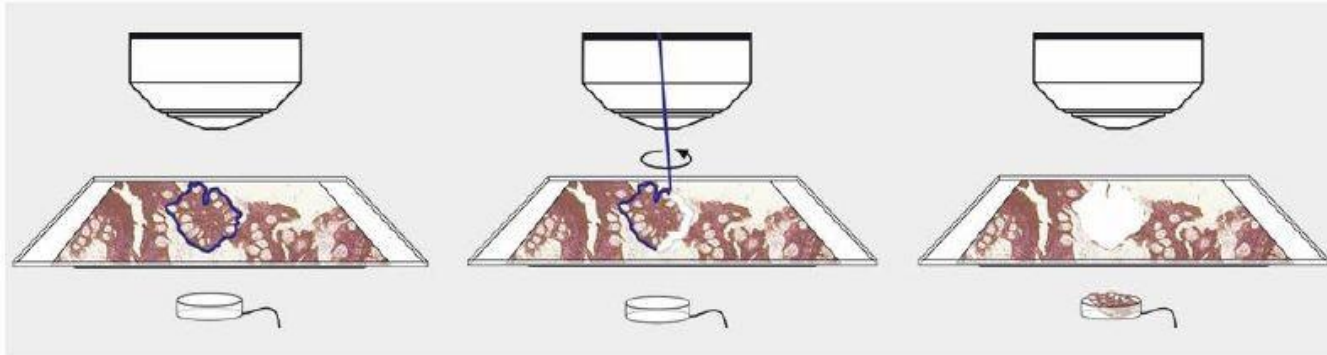


5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

- **Microdissection LASER**

Permet de **prélever** quelques cellules dans une coupe de tissu.



5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

- **Culture**

Indicateurs colorés pour mesurer le pH :

- ❑ Orange → pH < 7
- ❑ Rouge → pH entre 7,2 et 7,4
- ❑ Violet → pH = 7,8

PH bas = milieu acide = divisions ++

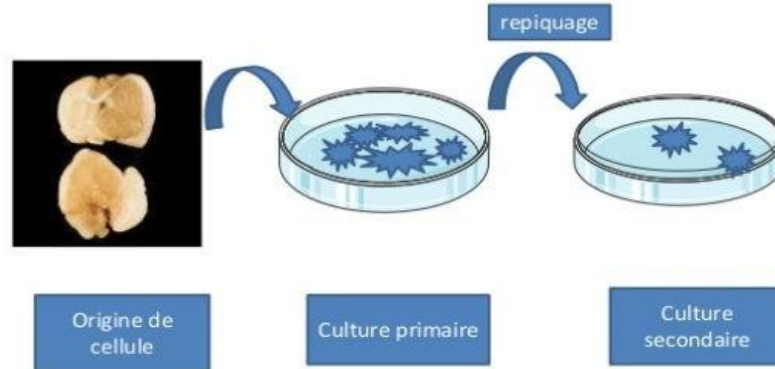


5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

- **Culture**

On appelle “**culture primaire**” la culture des cellules qui proviennent directement d'un tissu. Le repiquage des cultures primaires donne lieu à des **cultures secondaires**, qui conserveront leurs caractéristiques d'origine.



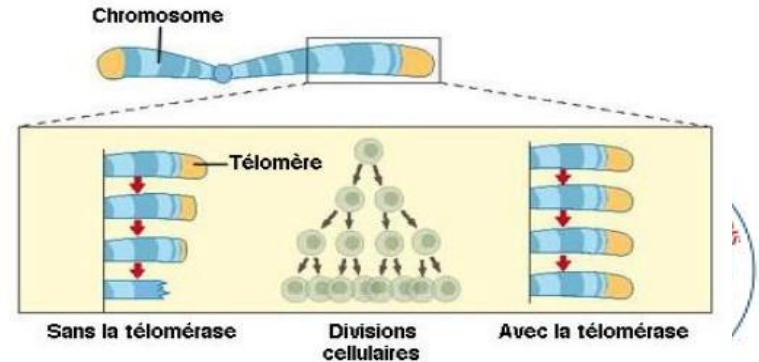
5. Autres méthodes d'exploration

A. Isolement et culture des cellules

- Culture

Une cellule normale a un **nombre de divisions limité** par les **téломères**. En effet, à chaque division, on perd des dizaines de nucléotides.

Une cellule tumorale possède la “**téломérase**” qui produit des téломères. Ces cultures sont donc immortelles (avec O₂ et nutriments à volonté).



5. Autres méthodes d'exploration

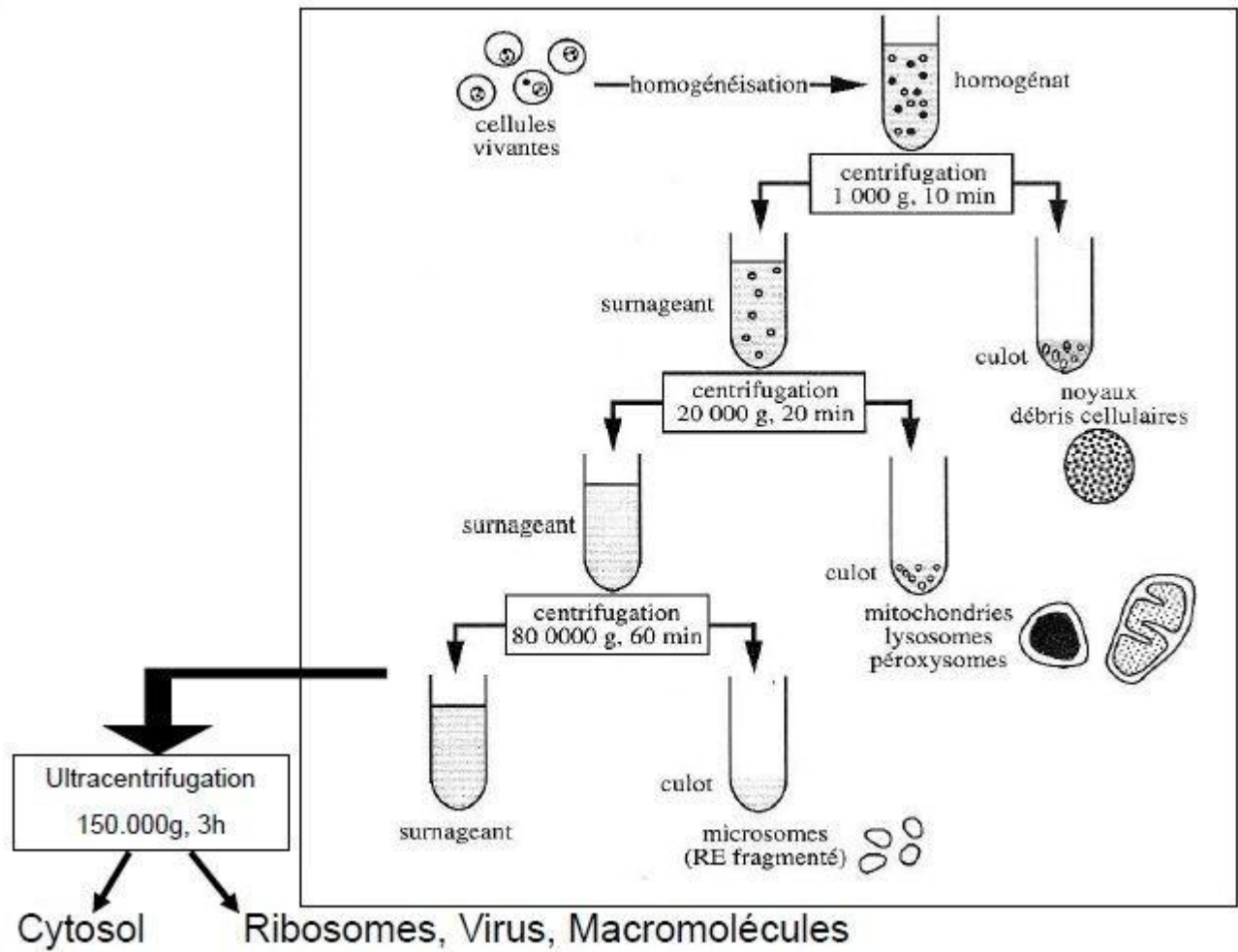
B. Exploration moléculaire

- **Fractionnement subcellulaire**

Il permet de **séparer**, **isoler** et **purifier** les organites et les macromolécules **sans les altérer** afin d'étudier leurs fonctions respectives.

On commence par rompre les membranes plasmiques par choc osmotique, ultrasons ou choc mécanique.



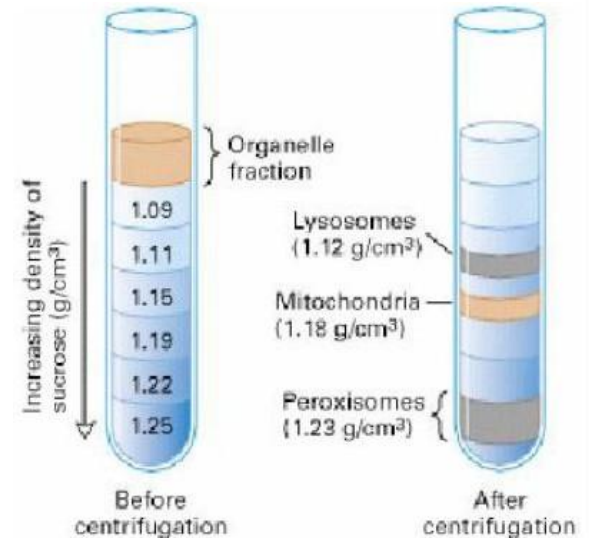


5. Autres méthodes d'exploration

B. Exploration moléculaire

- **Fractionnement subcellulaire**

La séparation des organites peut aussi se faire en un seul temps grâce au gradient de sucrose.



5. Autres méthodes d'exploration

B. Exploration moléculaire

- **Fractionnement subcellulaire**

La centrifugation dépend du **coefficient de sédimentation** = vitesse à laquelle un constituant sédimente. Il s'exprime en **Svedberg** (S).

Il est caractéristique de la taille et de la forme de l'objet mais pas de son poids
++

!! Les unités S ne sont pas additives !!



5. Autres méthodes d'exploration

B. Exploration moléculaire

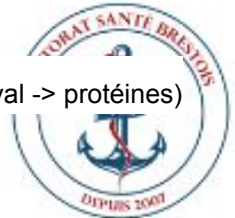
- **Analyse cellulaire des acides nucléiques**

1°/ **Electrophorèse** (séparation en f° du poids)

2°/ **Hybridation** avec un sonde spécifique fluorescente :

- **Southern Blot** = sonde qui détecte l'ADN
- **Northern Blot** = sonde qui détecte l'ARN
- **Western Blot** = sonde qui détecte les protéines (Western -> cowboy -> cheval -> protéines)

3°/ **Révélation**



5. Autres méthodes d'exploration

B. Exploration moléculaire

- **Etude des cellules vivantes**

Les **protéines chimères fluorescentes** sont des protéines artificielles couplées à un fluorochrome.

On construit un gène codant pour la protéine voulue et on le couple avec de la **GFP** (green fluorescent protein), puis on introduit ce gène dans la cellule. Il va ainsi être traduit en protéine fluorescente et on va pouvoir visualiser son trajet, ses actions, etc.

L'observation se fait souvent par le **microscope confocal**.



VRAI ou FAUX

A propos de la profondeur de champ, plus le grossissement augmente, plus la profondeur de champ diminue.

VRAI ou FAUX

VRAI

Bien connaître les différents rapports entre les différentes données, et comprendre comment elles évoluent les unes par rapport aux autres.

VRAI ou FAUX

A propos des microscopes électroniques à transmission, lors d'une préparation : dans l'ordre nous faisons une fixation, inclusion, coloration et enfin une coupe.

VRAI ou FAUX

FAUX

Non, la première étape est la fixation au glutaraldéhyde. Puis nous réalisons une inclusion dans une résine et ensuite nous réalisons la coupe grâce à l'ultra-microtome. Pour finir nous appliquons une coloration. FIX-IN-COU-COI.

VRAI ou FAUX

Il n'y a pas de coupe pour les microscopes électroniques à balayage (MEB)

VRAI ou FAUX

VRAI.

Attention il n'y a pas de coupe pour le MEB, les 4 étapes sont :

- Fixation,
- Désiccation,
- Métallisation,
- Observation.

C'est fini les amis !

