Université Abdelmalek Essaadi
Faculté des Sciences de Tétouan
Département de Biologie

METHODES D'ETUDES

DE

LA CELLULE

Filière SVT (S1)

Annéeuniversitaire: 2014-15

Pr MGHARA Zaynab

Méthodes d'étude de la cellule

Chapitre II. Méthodes d'étude de la cellule •

- Microscopes
- Méthodes d'étude chimique (chromatographie, électrophorèse)
- Méthodes d'étude physique (autoradiographie, fluorescence)
- Culture des cellules
- Technique de l'ADN recombinant

Méthodes d'étude de la cellule

Travaux dirigés

TD1

- Méthodes d'étude de la cellule (complément de cours et exercices)
- Microscope photonique – Microscopes électroniques à transmission et à balayage

TD2

- Méthodes d'étude de la cellule (complément de cours et exercices)
- Fractionnement cellulaire (centrifugations) – Cultures cellulaires.

TD3

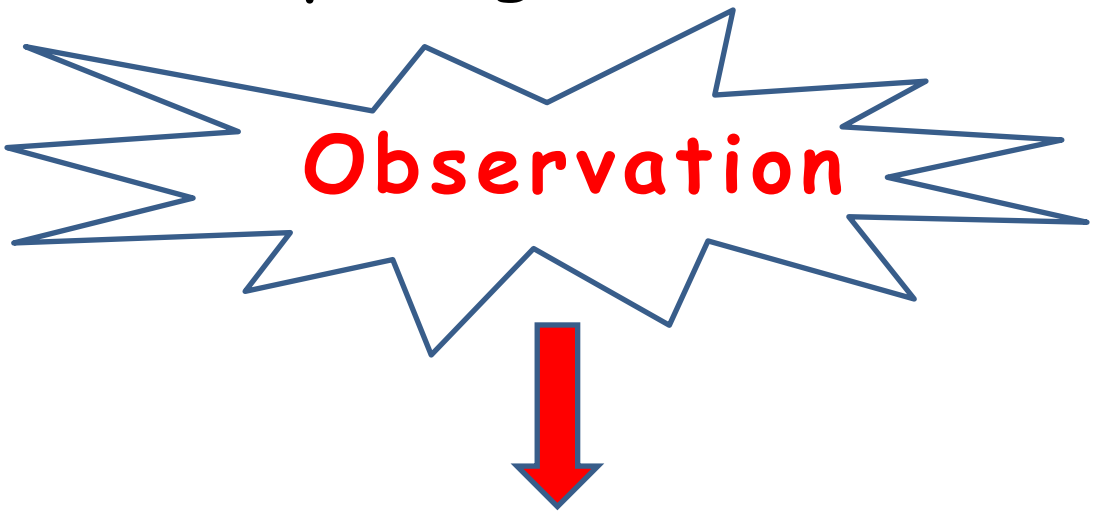
- Méthodes d'étude de la cellule (complément de cours et exercices)
- Techniques de marquage radioactif

Les méthodes d'étude de la cellule

1. Méthodes Morphologiques
2. Méthodes Physico-chimiques et Biochimiques
3. Méthodes Physiologiques

I. Méthodes Morphologiques

Etude de la morphologie cellulaire et tissulaire



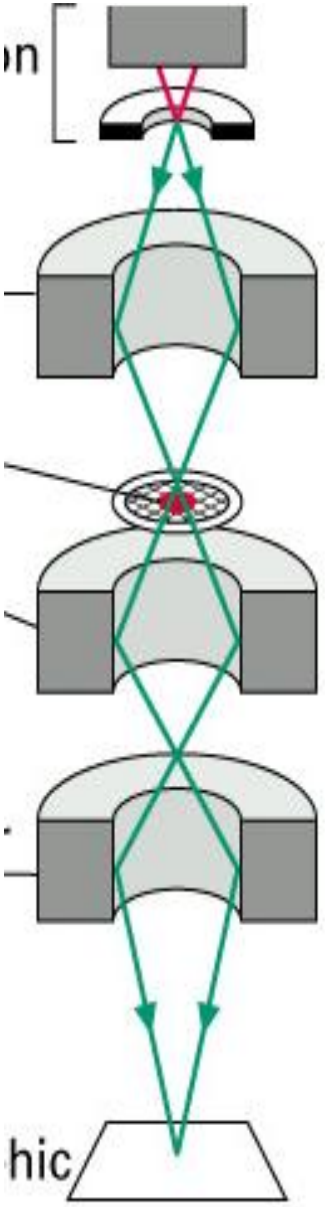
Moyens optiques et physiques permettant d'obtenir des images agrandies des cellule

Microscopes

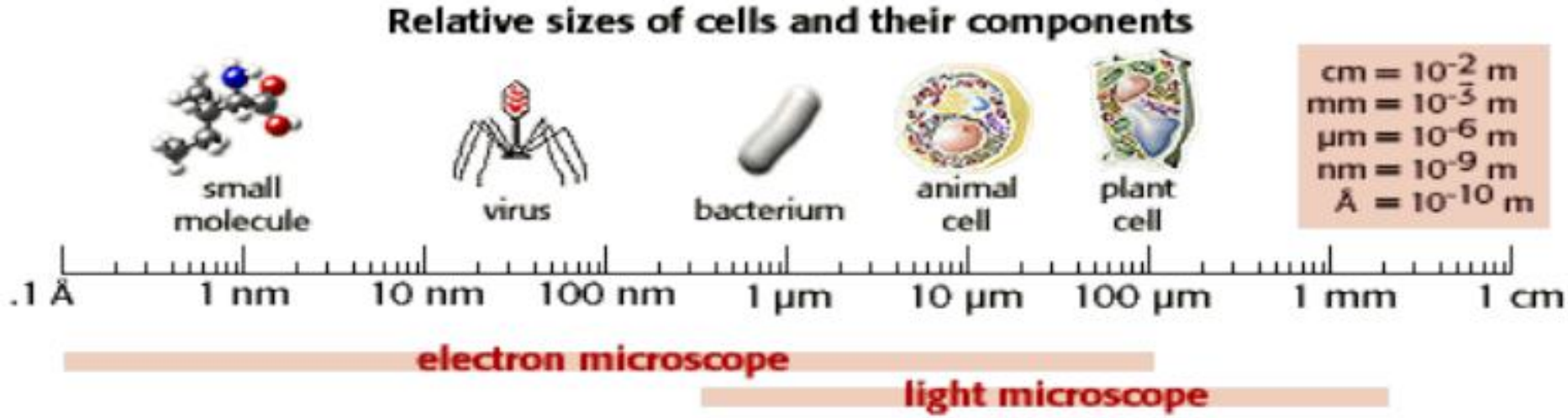
M. Photoniques

M. Electroniques

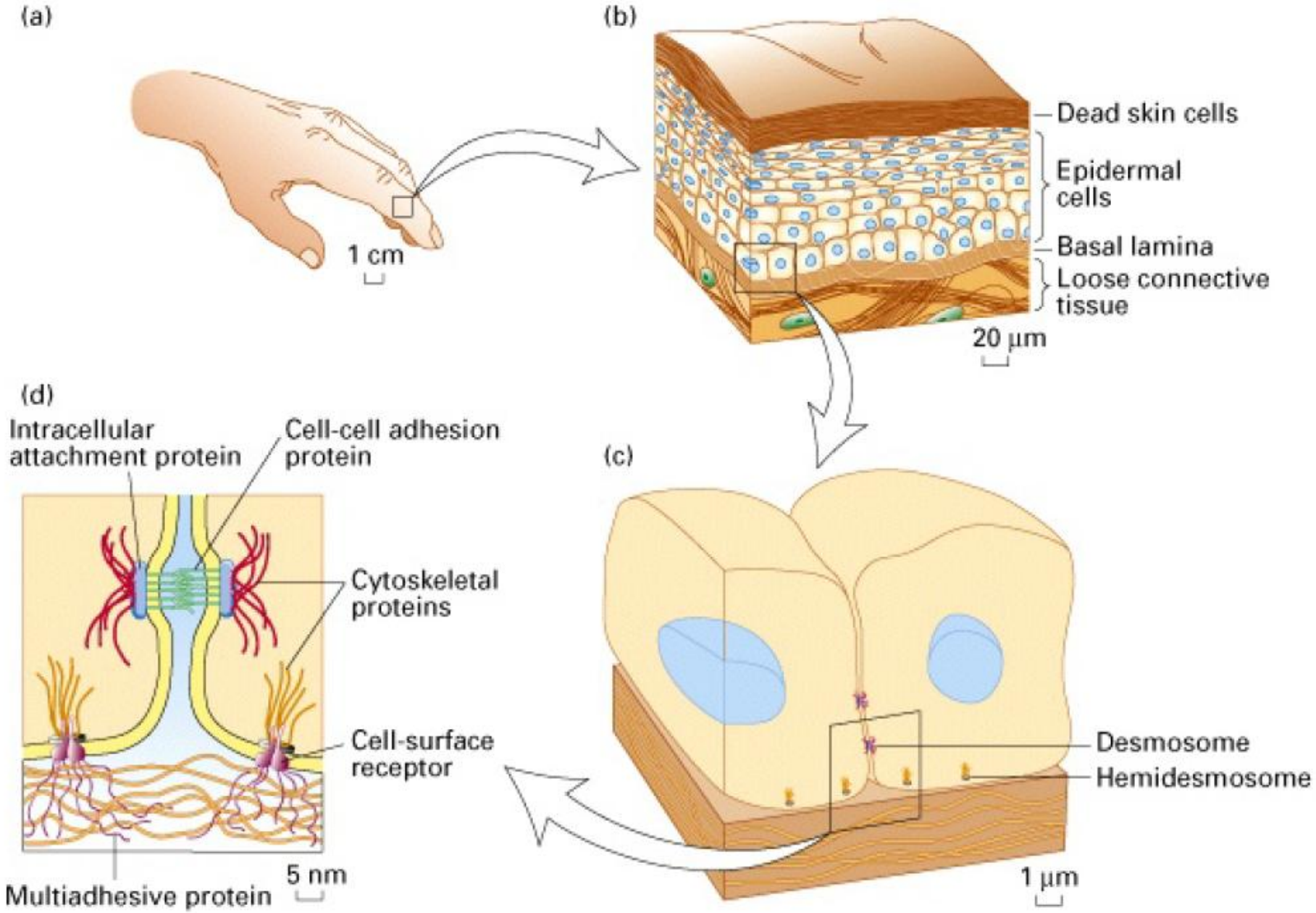
microscope optique



microscope électronique



Echelle de taille et puissance des microscopes


(a)
1 cm
(b)
Dead skin cells
Epidermal cells
Basal lamina
Loose connective tissue
20 µm
(c)
Desmosome
Hemidesmosome
1 µm
(d)
Intracellular attachment protein
Cell-cell adhesion protein
Cytoskeletal proteins
Cell-surface receptor
Multiadhesive protein
5 nm

Échelles de taille des tissus

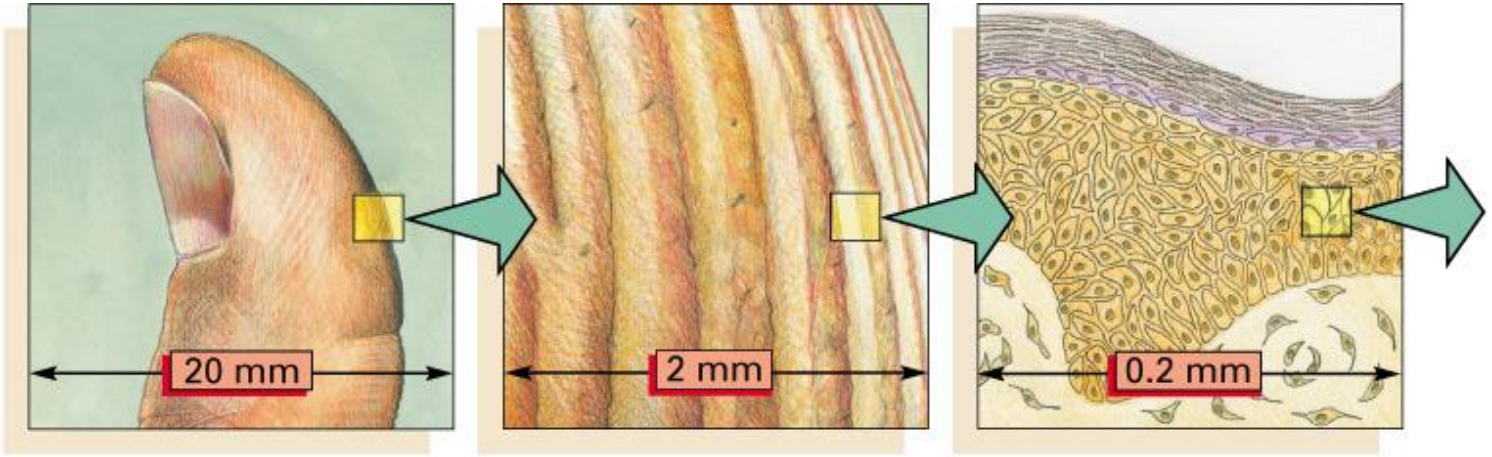


Figure 9–1 part 1 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

X1 X10 X100

Échelles de taille de la cellule

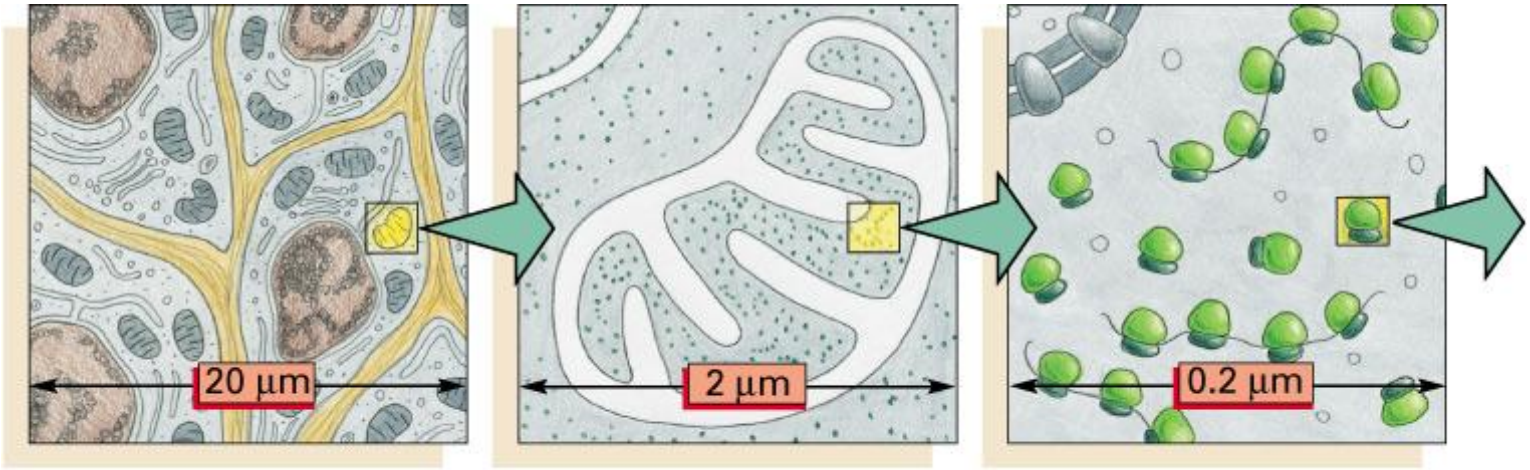
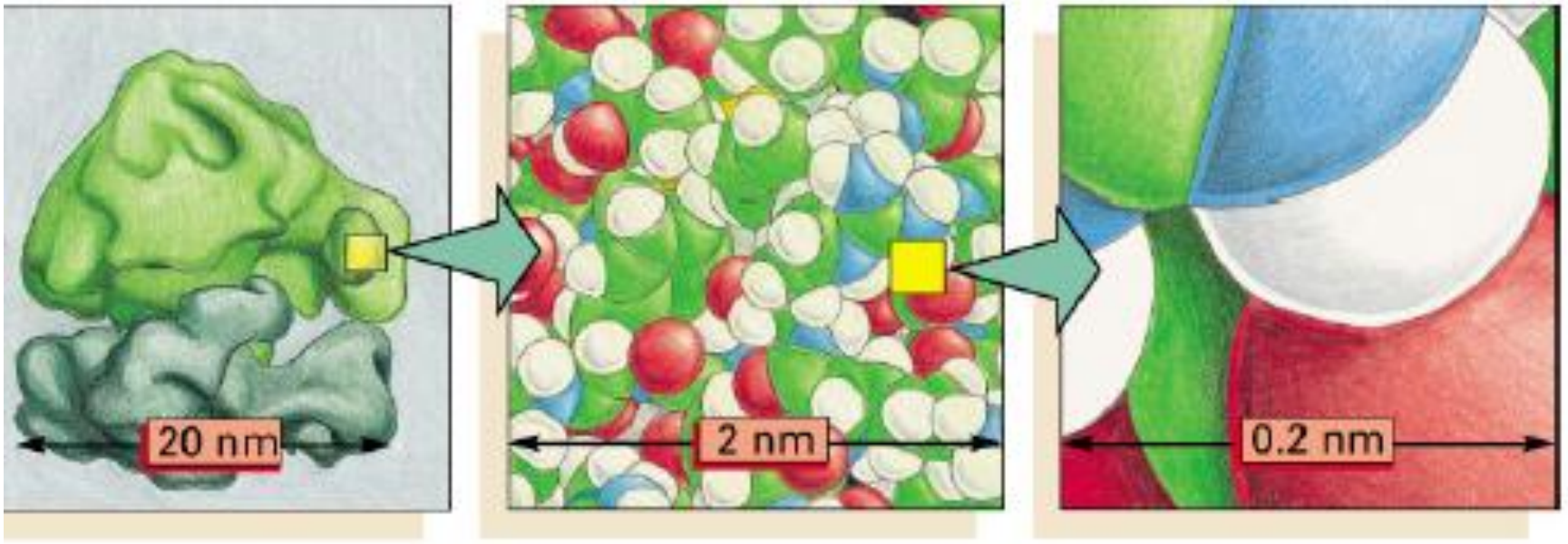


Figure 9–1 part 2 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

1000X **1.10^4 X** **1.10^5 X**

Échelles de taille des molécules



RIBOSOME **MOLECULES** **ATOME**

1.10^6 X **1.10^7 X** **1.10^8 X**

invisible au microscope

Petite Histoire de la Microscopie

➢ Les premières données certaines que l'on possède sur le pouvoir grossissant des lentilles convexes, en l'occurrence les loupes, remontent au XIIe siècle. **Roger BACON** moine franciscain anglais, (XIIIe siècle)

➢ 1665 : **Robert Hooke** découvre des **cellules dans du liège** en utilisant les premiers microscopes.

➢ 1677 : **Antoine van Leeuwenhoek**, connu pour ses améliorations du Microscope.

➢ Zeiss: fin XIXème siècle fait évoluer le microscope optique (MO) avec la lentille.

➢ 1930: Microscope interférentiel permettant d'observer des cellules vivantes

➢ 1930: Microscope électronique (ME)

➢ 1945: Première description des organites cellulaires

➢ 1945: Immunofluorescence

➢ 1988: Microscope confocal

La microscopie : Méthode d'étude morphologique et d'investigation fonctionnelle :

Rappels :

La microscopie est une méthode morphologique et d'investigation fonctionnelle. L'observation est restreinte aux objets laissant passer :

→ La lumière pour la microscopie photonique :

- Cellules vivantes (1 à quelques couches),
- Coupes fines de tissu : 5 à 10 µm.

→ Les électrons pour la microscopie électronique à transmission :

- Coupes ultrafines : 50 à 100 nm de tissu,
- Objet entier : virus isolés, macromolécules isolées.

Les méthodes morphologiques d'étude de la cellule

Les techniques microscopiques *(Histologie)*

I. La microscopie photonique

A. Microscope à fond clair

1. Généralités
2. Description
3. Principe
4. Caractéristiques
5. Conditions d'utilisation
6. Préparation d'échantillons biologiques
7. Application

La microscopie photonique

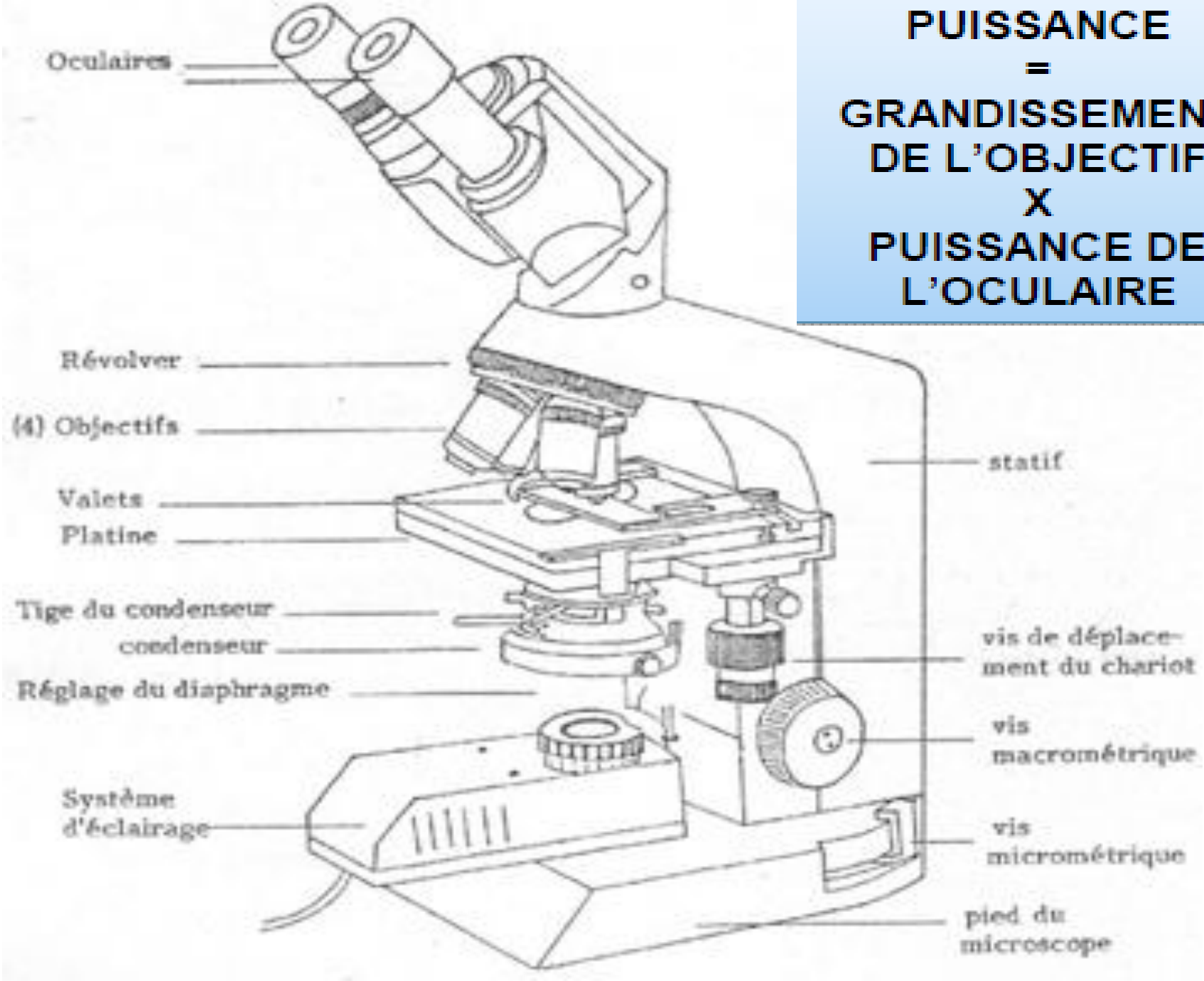
1- Généralités

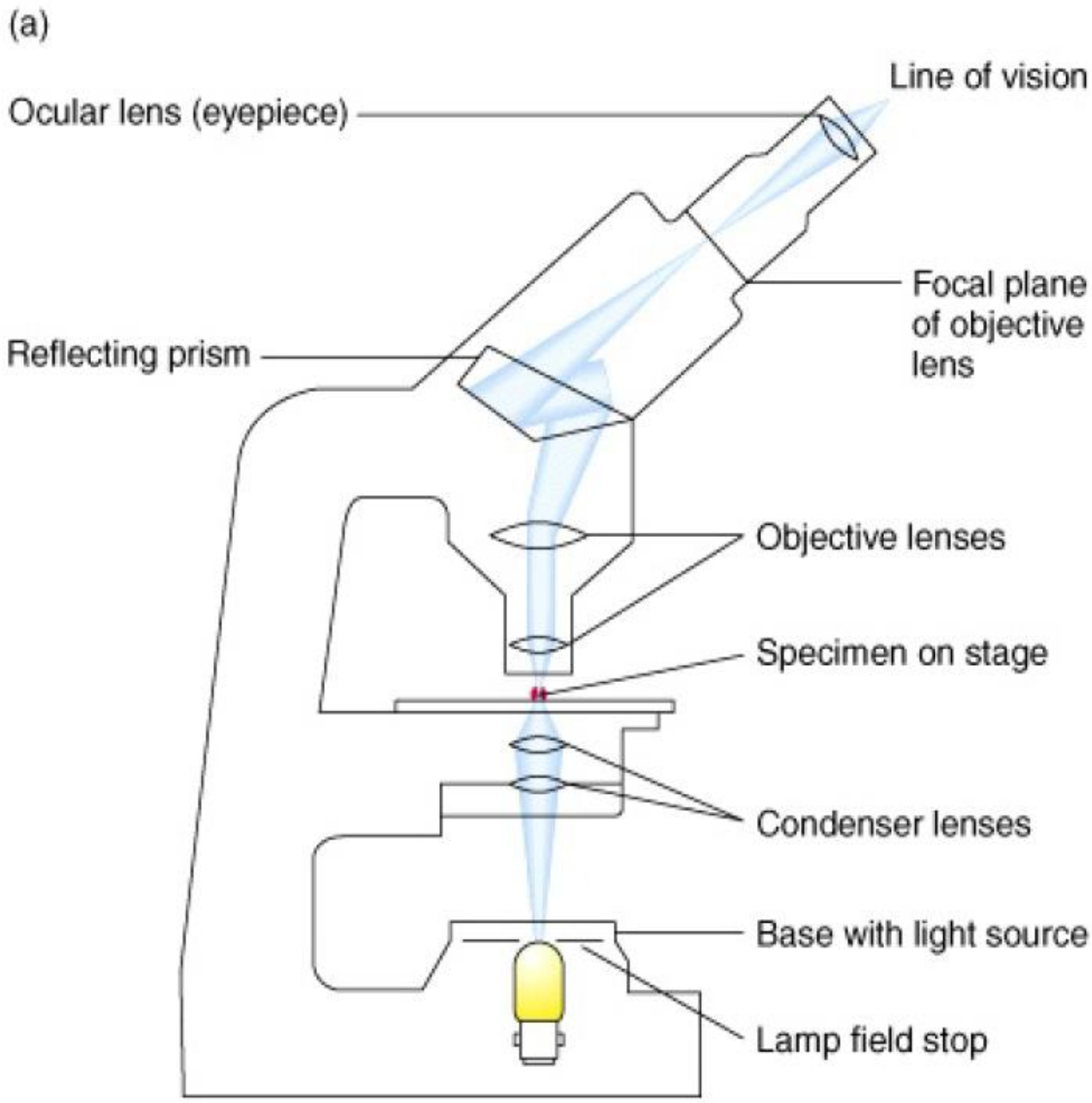
- Définition : examen d'objets agrandis en présence de photons (UV & visible)

- Domaines d'application : jusqu'à 0.2 µm

LIMITE DE RÉSOLUTION: 0.2µm

PUISSANCE
=
GRANDISSEMENT DE L'OBJECTIF
X
PUISSANCE DE L'OCULAIRE





De: Lodish et al., 4ème éd., Fig. 5-2

I. La Microscopie Optique (MO)

2. Description du Microscope optique (MO) ou photonique

Il est constitué de bas en haut:

- **La lumière** placée tout en bas**.**
- Le **condenseur** qui condense la lumière sur la préparation
- La **platine** sur laquelle repose l'échantillon
- L'**objectif** qui permet d'agrandir l'image 4-10-40x
- L'**occulaire** qui agrandit 10 x l'image.

Le grossissement va donc de 40 à 400x.

Les contraintes sont établies par:

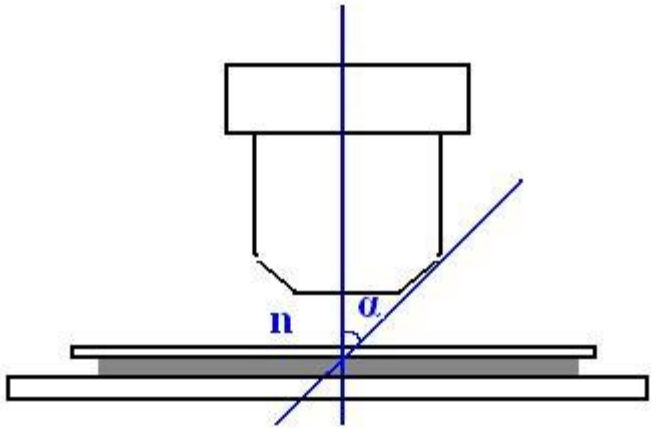
· La qualité des lentilles de verre

· La capacité de la lumière à traverser l'échantillon à observer.

3. Caractéristiques essentielles du microscope optique

a. Ouverture numérique :

$O_N = n \,.\, \text{Sin}\, \alpha$



a. Limite de séparation :

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

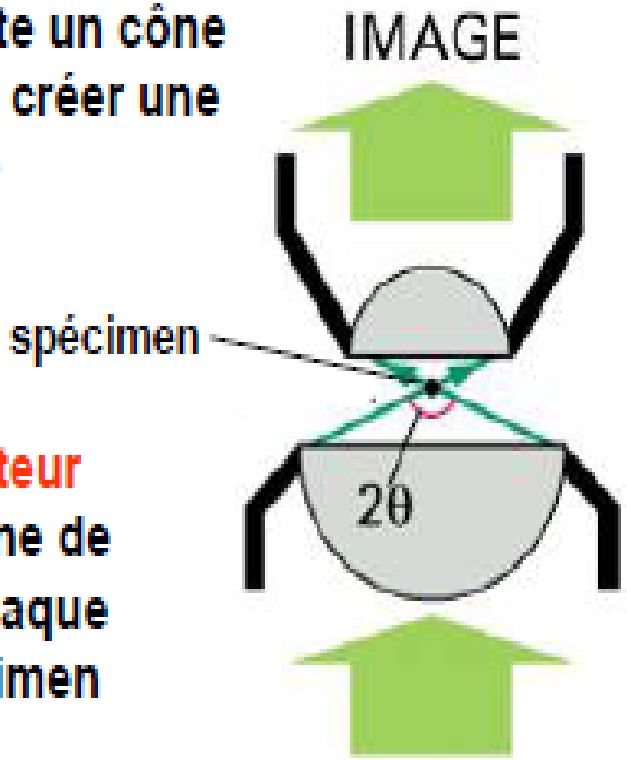
Pouvoir de résolution : 1/d

c. Grossissement: G = G_1 X G_2

Le pouvoir de résolution d'un microscope optique dépend de son ouverture numérique

OUVERTURE NUMÉRIQUE D'UNE LENTILLE = $n \sin \theta$

L'**objectif** collecte un cône de lumière pour créer une image

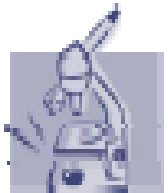


Le **condensateur** focalise un cône de lumière sur chaque point du spécimen

$$\text{RESOLUTION} = \frac{0.61\lambda}{n \sin \theta}$$

lumière blanche: $\lambda = 0.53\mu m$
n (indice de réfraction de l'air) = 1

LIMITE DE RÉSOLUTION: 0.2µm



Le pouvoir de résolution = le pouvoir séparateur

Le pouvoir de résolution d'un appareil grossissant est donné par la distance entre deux points les plus rapprochés qui peuvent encore être distingués l'un de l'autre.

Plus petite sera cette distance → meilleur sera le pouvoir de résolution.

Le pouvoir de résolution de :

- **l'œil : 0,2mm** (à 25 cm);
- **M.O ordinaire: ≅ 0,3µm;**

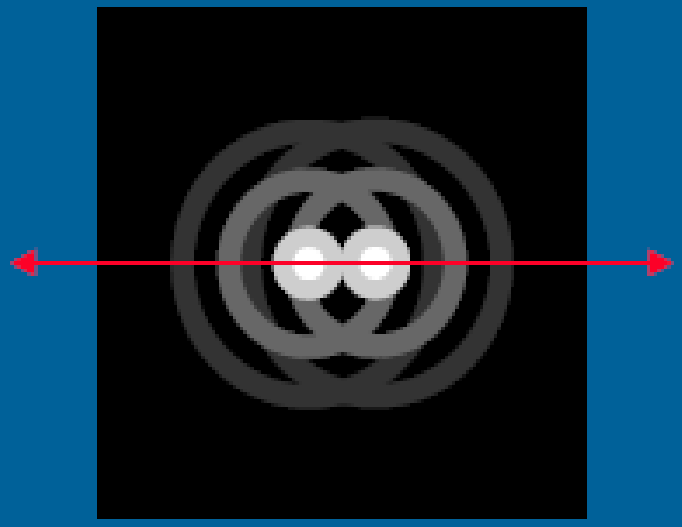
  2 traits différents séparés par une distance (d)

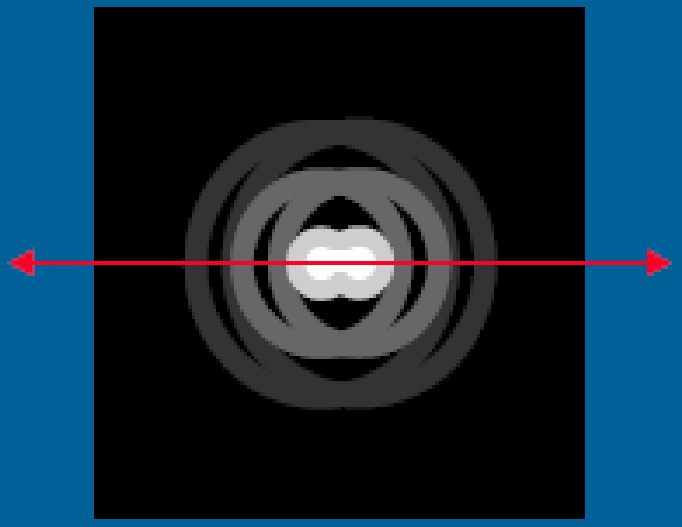
  d > 0,3µm, on pourra distinguer un trait de l'autre

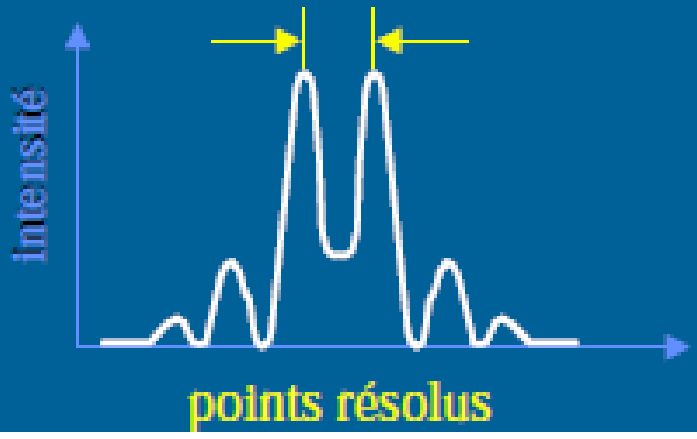
  d < 0;3 µm, on ne peut voir qu'un seul trait (confondus).
- **M.E.T: 0,1 nm**

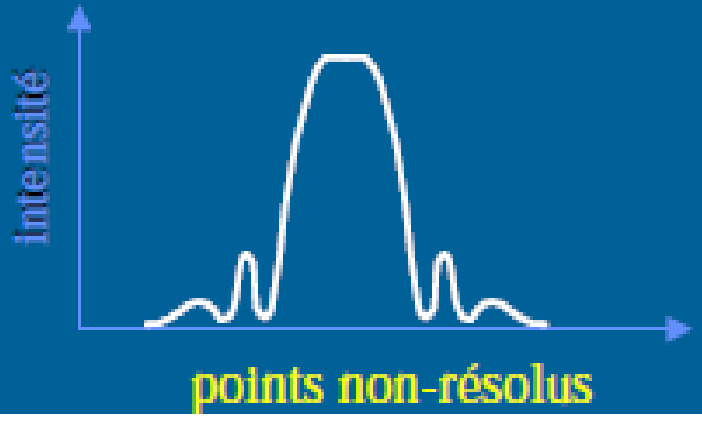
Microscopie photonique

Pouvoir séparateur







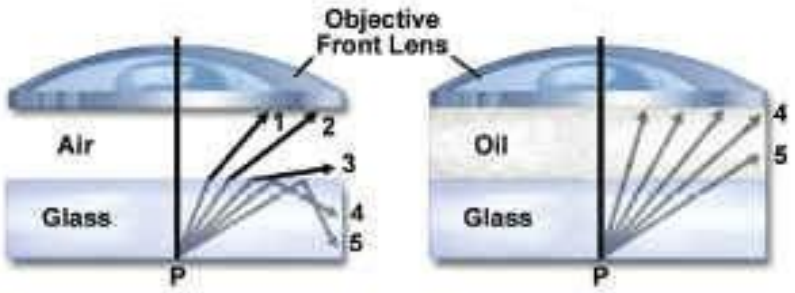


$$d = 0{,}61 * \lambda / n \sin \alpha$$

On peut donc améliorer la résolution de deux manières :

- En augmentant l'indice de réfraction. en utilisant un objectif à immersion dans un liquide dont l'indice de réfraction est proche du maximum de 1,5 - celui du verre.

Vide = 1 *Air = 1,00029*
Eau = 1,33 *Glycérol = 1,47*
Verre = 1,5 *Huile = 1,512*



- En diminuant la longueur d'onde. Toutefois, si on reste dans la lumière visible, il n'est pas possible de descendre en dessous de 400nm.

La limite de résolution d'un microscope photonique classique ≅ 0,2 µm.

Le microscope électronique en transmission atteindra, lui, une limite 100 fois plus petite

5. CONDITIONS D'OBSERVATION

- objets transparents à la lumière → Faible épaisseur: coupes semi-fines (5-10μ) ou fines (2- 5μ);

- Présentant des contrastes ou des colorations naturelles, sinon, recours à des moyens chimiques (colorations) ou physiques (M. à contraste de phase …).

6. PREPARATION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

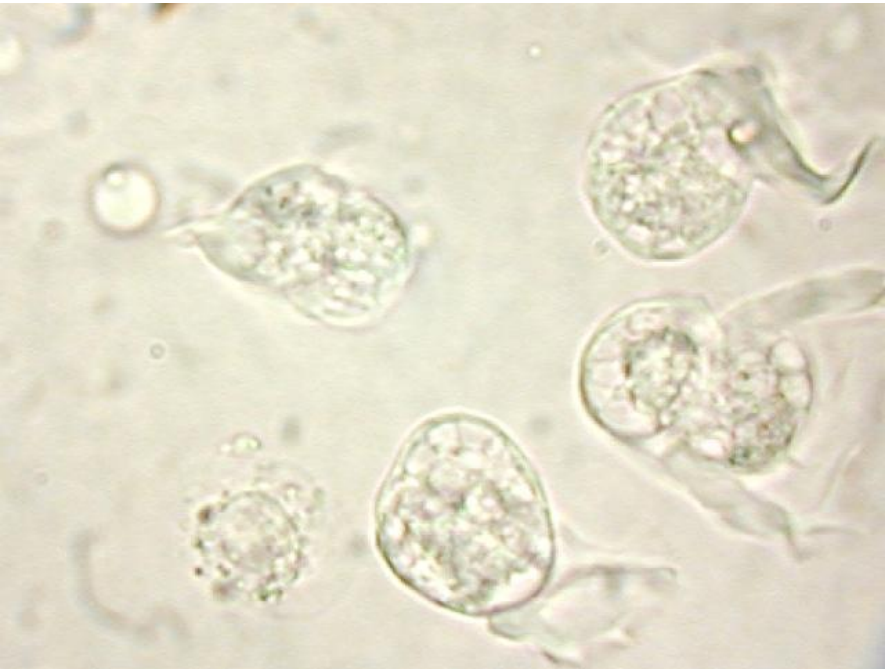
a) Etude de cellules ou de tissus vivants

b) Etude de cellules ou de tissus tués

Plusieurs étapes: *-Fixation;*
-Déshydratation;
- inclusion;
-coupes;
- coloration
- montage

a) Observation de cellules vivantes

- Risque de desséchement des cellules: utilisation de liquides physiologiques et/ou boite de cultures cellulaires.
- Si les structures ne sont pas naturellement colorées: utilisation de procédés chimiques (colorants vitaux) ou physiques (M. contraste de phase) pour les visualiser.



Cœlomocytes de ver de terre
(observation vitale, objectif à immersion x 1000)

Quantification de spermatozoïdes dans le sperme frais (test de Williams)
Colorants : éosine-nigrosine

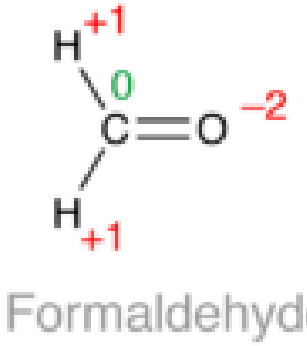
b) Etude de cellules ou de tissus tués

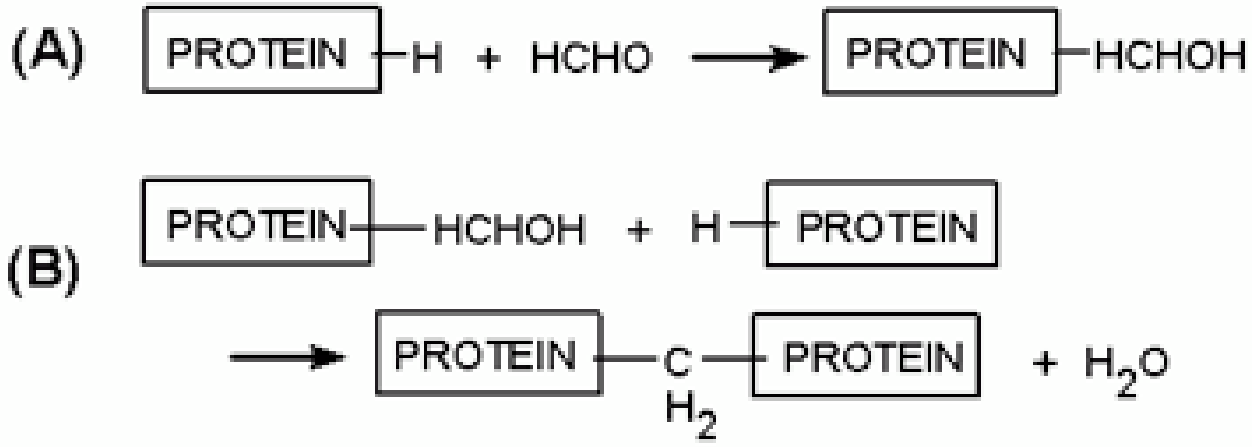
- **Fixation:**
  Préserve la structure de la cellule morte

  - **Fixation physique:** Congélation rapide

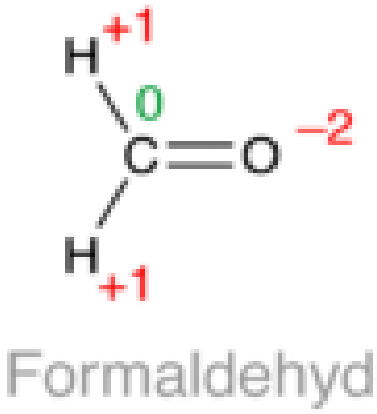
  - **Fixation chimique:** Fixateurs

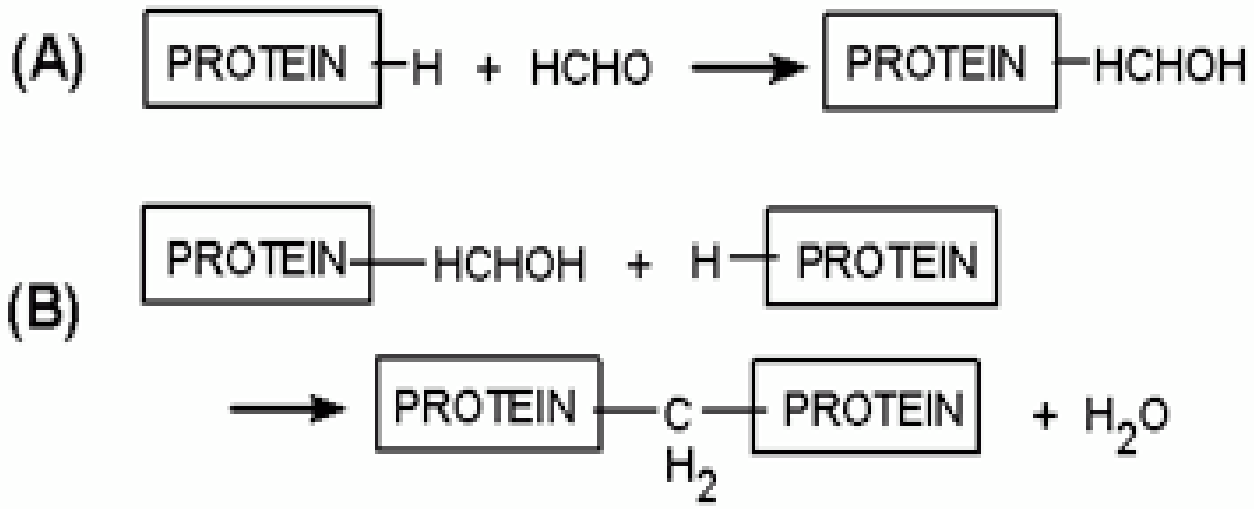
- **Les fixateurs** préservent la structure des cellules mortes en créant des liaisons chimiques très stables entre les molécules





- **Les fixateurs** préservent la structure des cellules mortes en créant des liaisons chimiques très stables entre les molécules.





La fixation se fait par le **formaldéhyde** et le **glutaraldéhyde**, qui sont des aldéhydes très réactifs.

Malheureusement la fixation tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation.

Elle se fait avec un mélange d'acide – éthanol (dénaturation et précipitation des protéines) et d'aldéhyde (fixation)

Microscopie optique : Acide acétique + Formaldéhyde

Etapes suivantes:

- **Déshydratation:** l'eau est retirée de la cellule au cours de passages successifs dans des bains d'alcool de plus en plus concentré.

- **Inclusion:** L'objectif est de solidifier le tissu fixé pour réaliser des coupes fines et régulières.

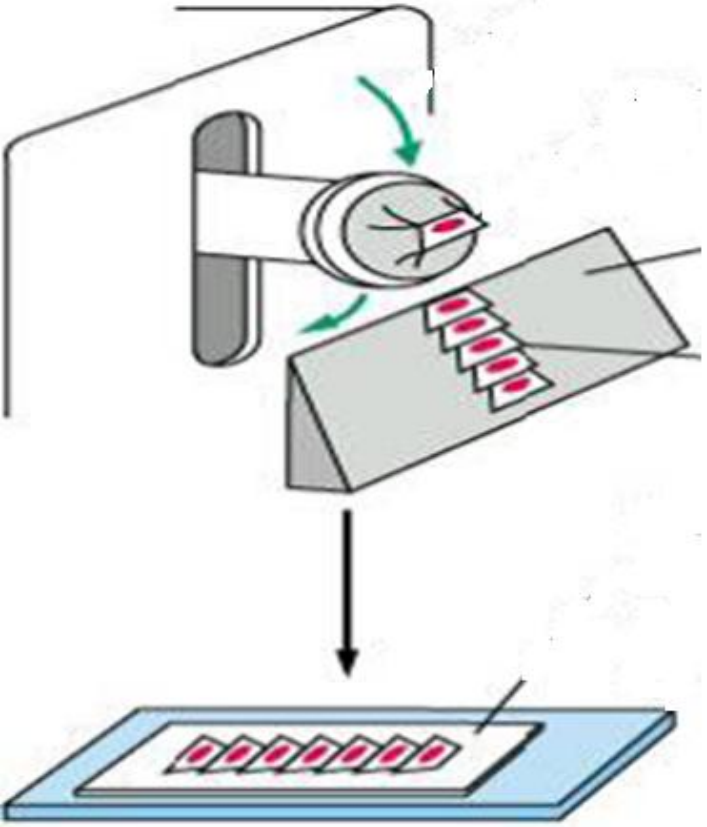
Pour la microscopie optique, l'inclusion se fait dans la **paraffine.**

Or, la paraffine est hydrophobe, non miscible à l'alcool
Nécessité de passage par un milieu intermédiaire:

Eau → Alcools (50°-70°-90°-100°)→ Toluène → Paraffine

Confection des coupes :

Pour la microscopie optique, on utilise un microtome (rasoir) pour obtenir des coupes sériées de 5 à 10 µm que l'on récupère à l'aide d'un pinceau.



Spécimen

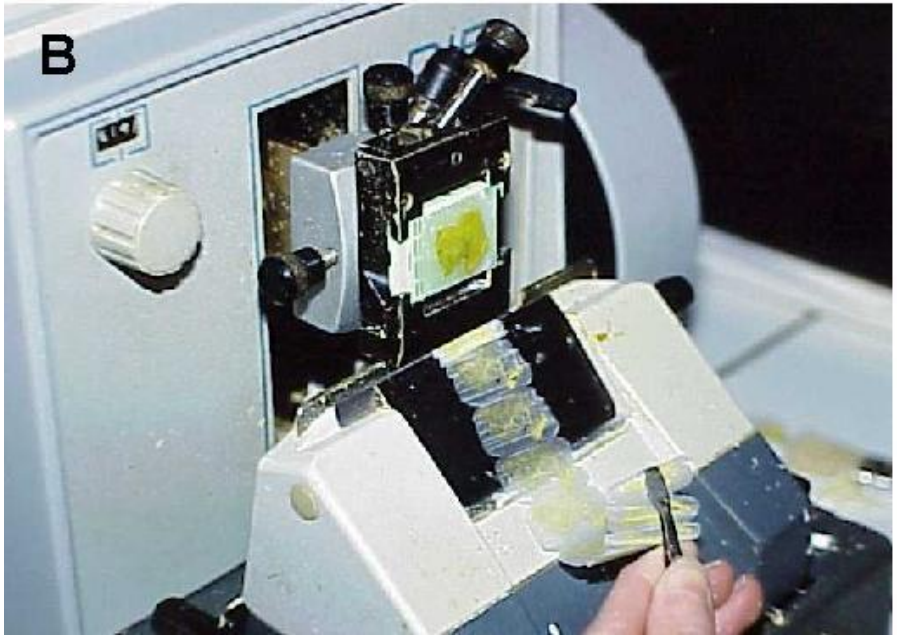
lame du microtome

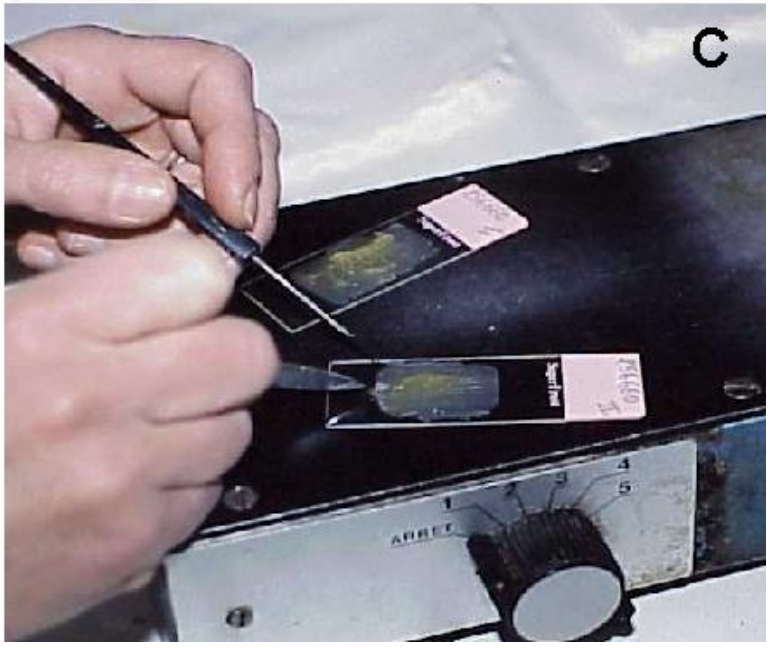
coupes de tissus

coupes de tissus déposées sur lame de verre

COLORATION

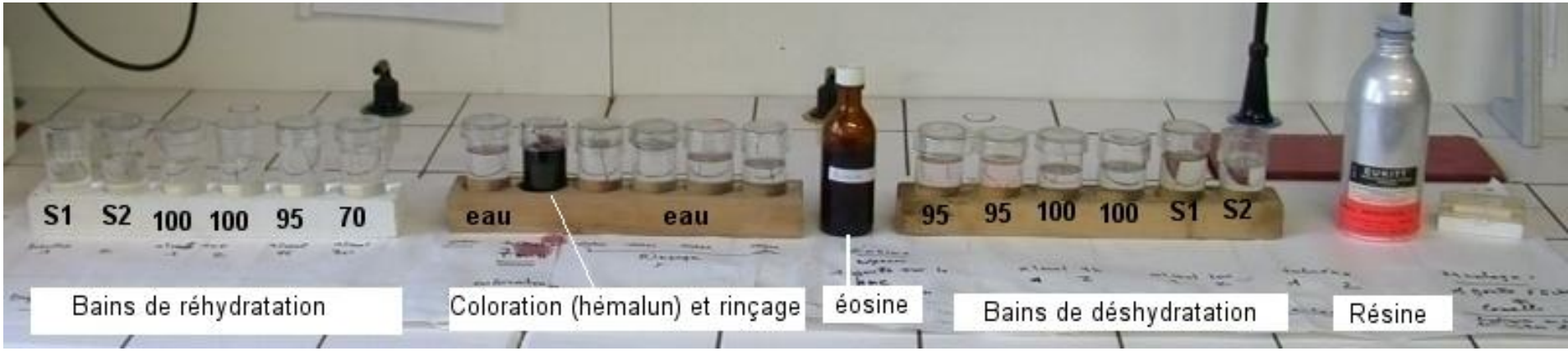
- Coupe du spécimen





A. Blocs de paraffine; **B**. Microtome (le bloc est débité en coupes fines);
C. Etalement des coupes sur les lames de verre sur une plaque chauffante.

- Coloration et montage



-Avant la coloration: il faut d'abord déparaffiner les cellules (bains de toluène), puis les réhydrater dans des bains d'alcools de moins en moins concentrés.

Toluène → Alcools 100°-95°-70°) → Eau → Coloration

-Après la coloration: les coupes seront de nouveau déshydratées (bains d'alcool de degré croissant).

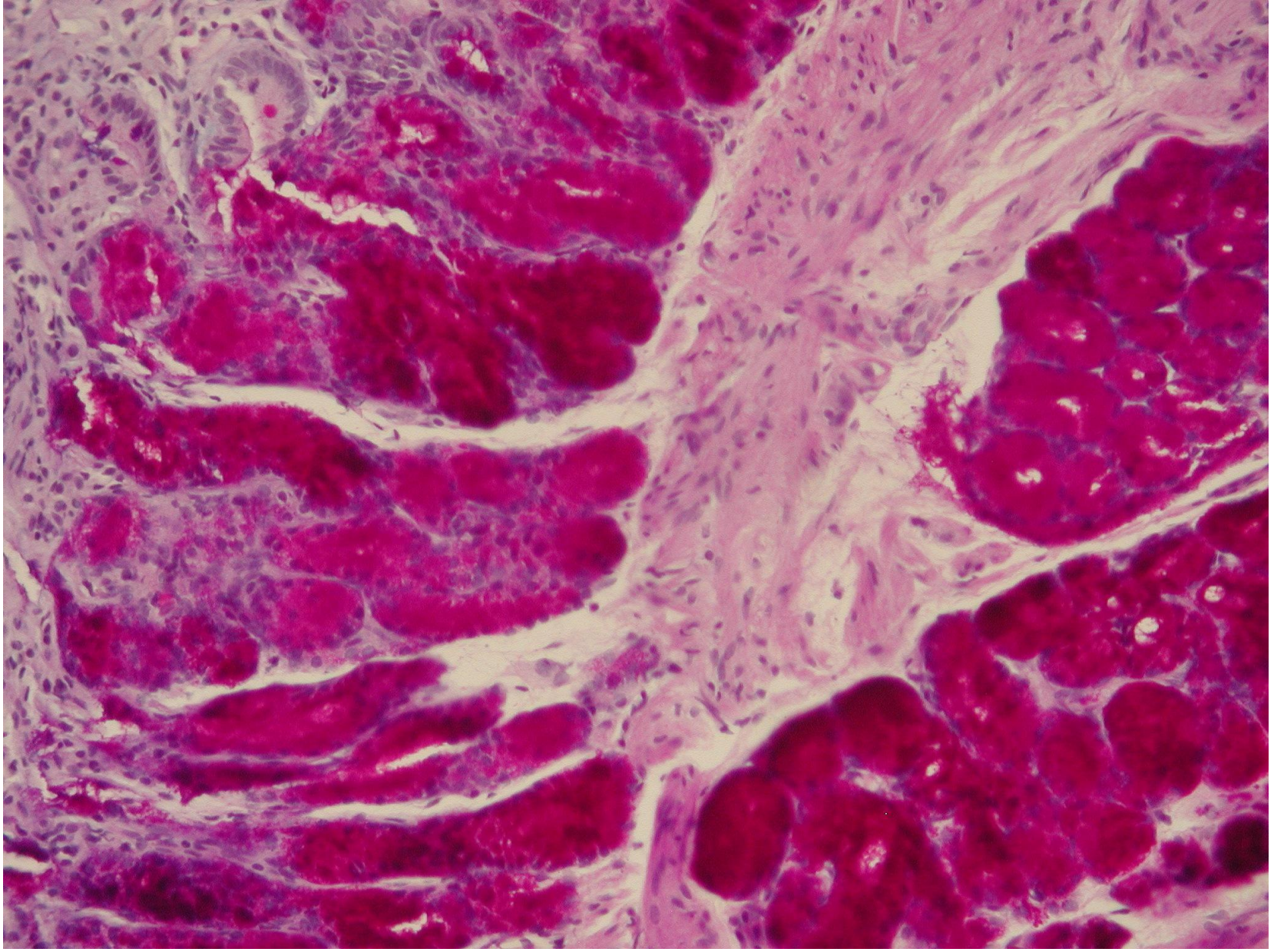
Coloration → Alcools (70°-95°-100°) → Toluène → Montage

Montage dans une résine ayant même indice de réfraction que le verre (Baume de Canada ou Eukitt)

Colorations signalétiques

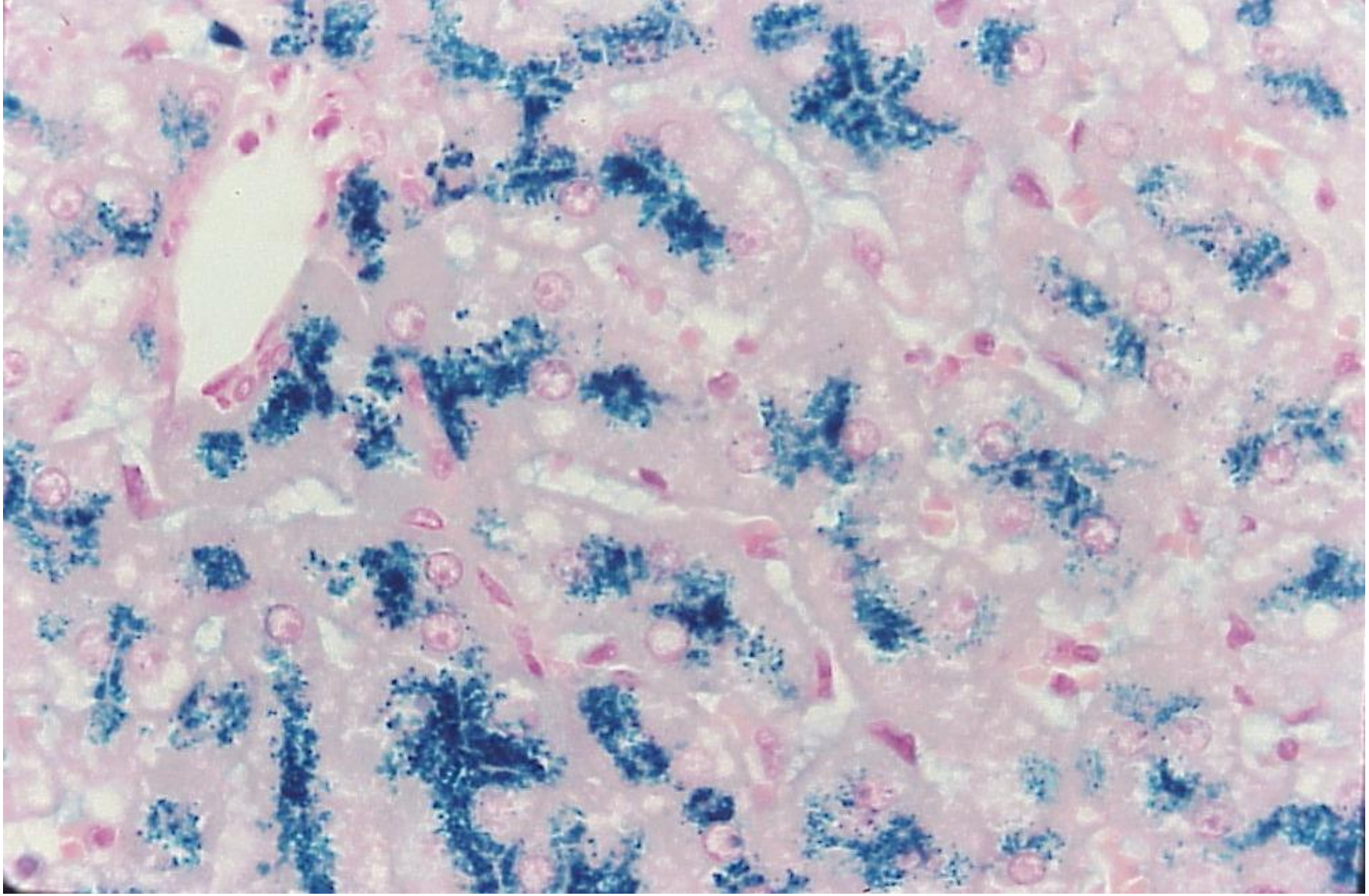
Hématoxyline- Eosine

(foie)



Coloration au PAS

(glandes duodénales, sécrétion du mucus)



Coloration de Perls

Hémisidérose intrahépatocytaire
(mise en évidence du fer ferrique)

7. Applications de la m. optique à fond clair

a.Histologie

b.Hématologie

c.Parasitologie

d.Bactériologie

II. Le Microscope Electronique

- Principe de fonctionnement:

Utilise un faisceau d'électrons;

Grossissements: x 1000 à 500 000 fois;

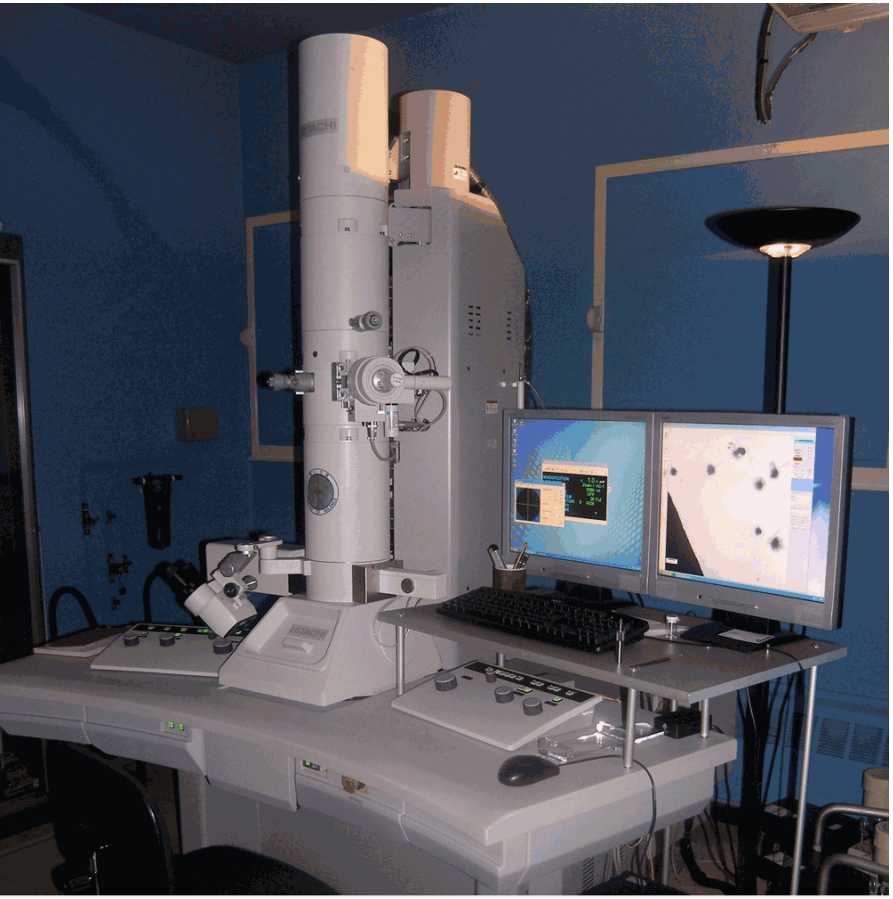
Pouvoir de résolution = 0,1nm (2nm usuellement en biologie).

D'où la révélation des plus fines structures internes de la cellule.

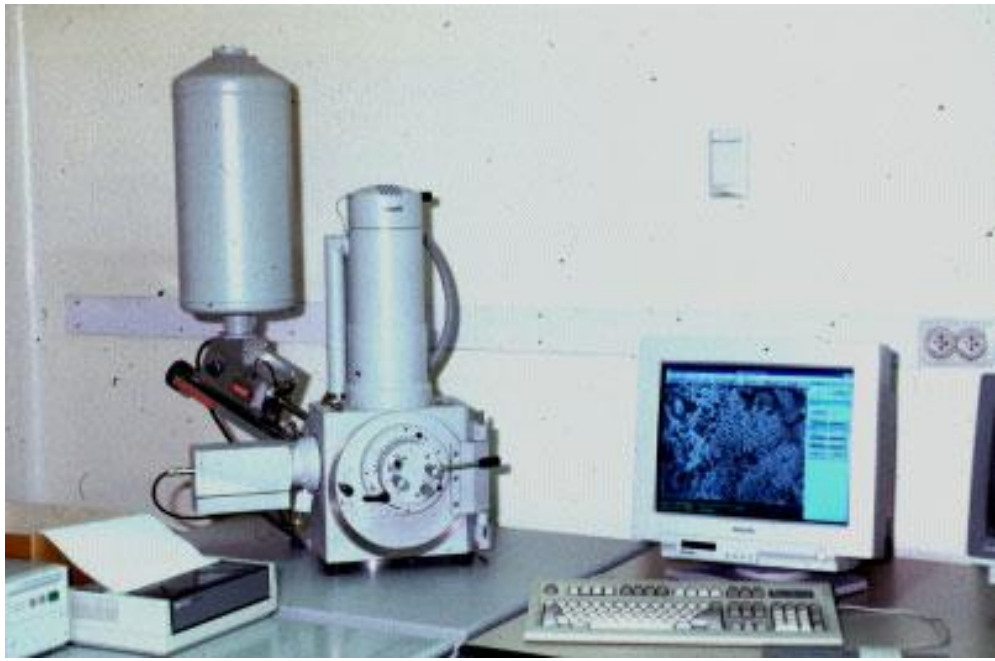
Il existe deux techniques d'observation en microscopie électronique :

- La microscopie électronique à transmission.
- La microscopie électronique à balayage.

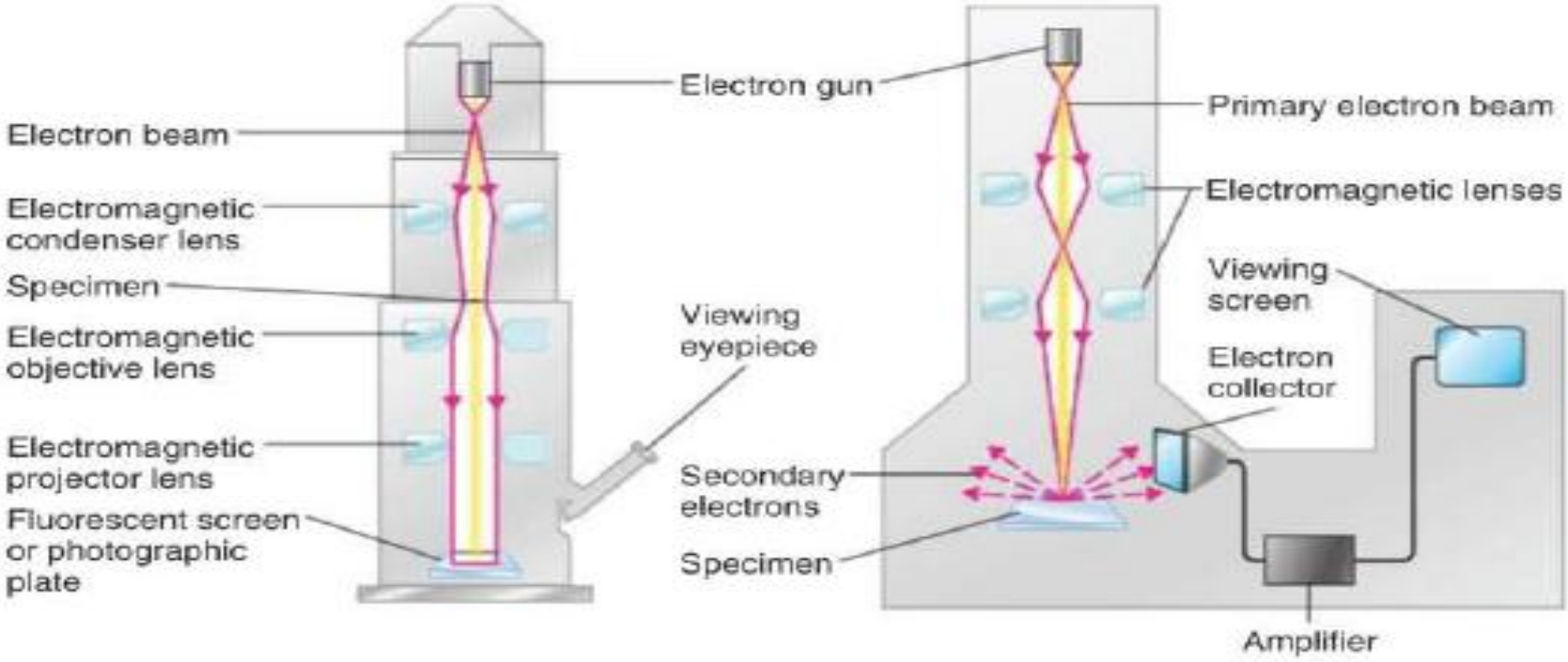
II. Le Microscope Electronique



M.E. à Transmission

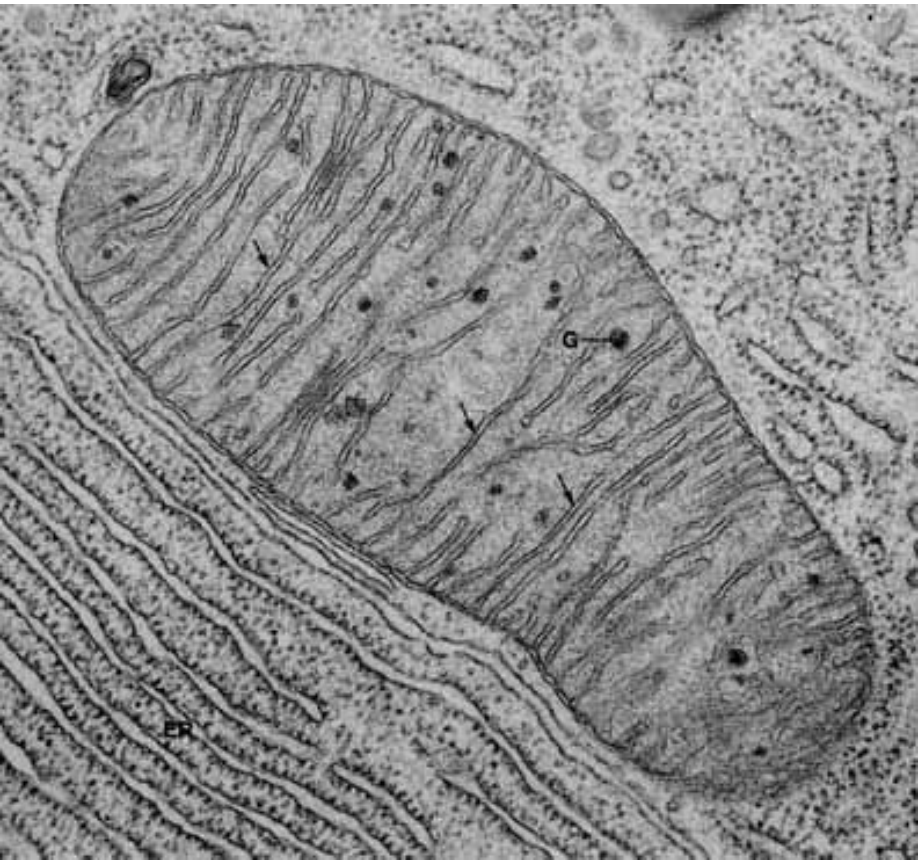


M.E. à Balayage

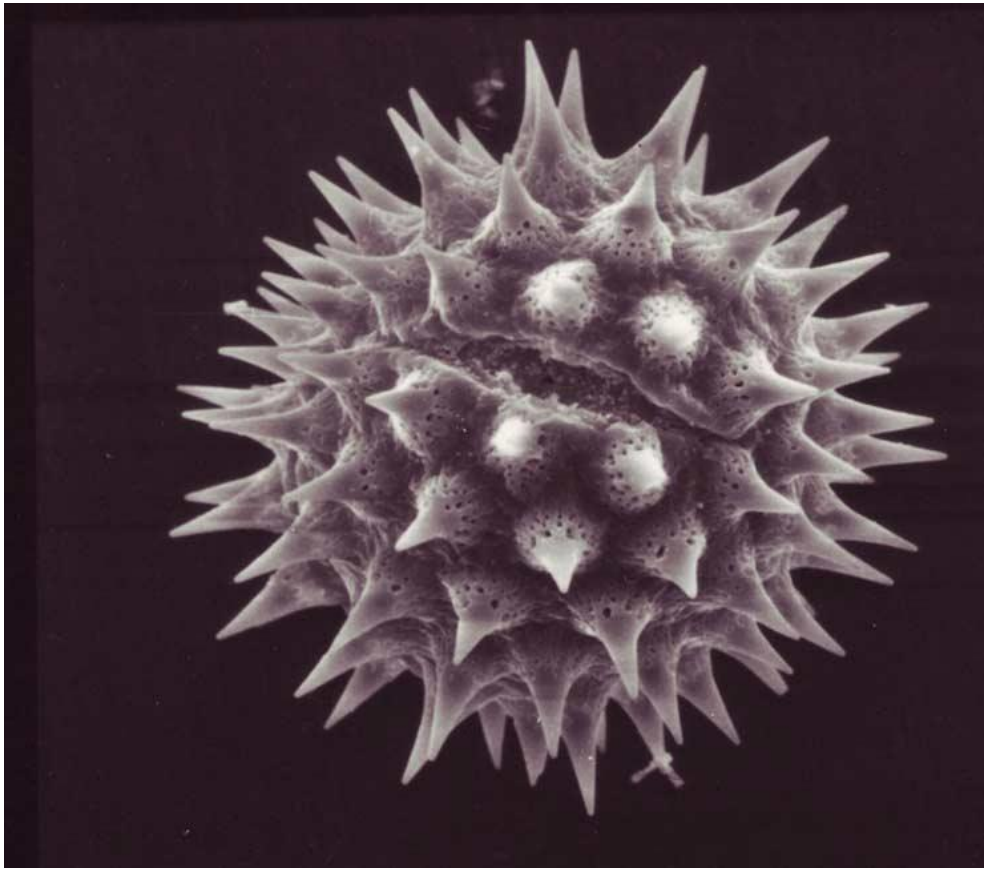

Electron gun
Electron beam
Electromagnetic condenser lens
Specimen
Electromagnetic objective lens
Electromagnetic projector lens
Fluorescent screen or photographic plate
Viewing eyepiece
Primary electron beam
Electromagnetic lenses
Viewing screen
Electron collector
Secondary electrons
Specimen
Amplifier

TEM

SEM

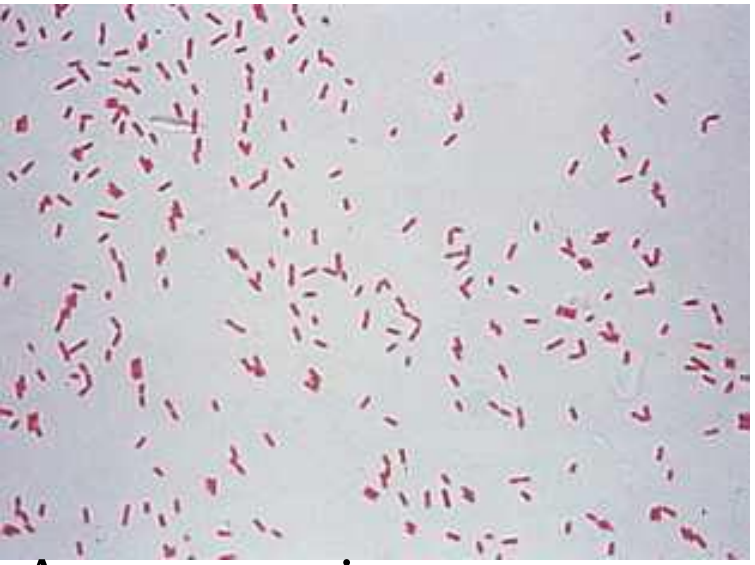


Mitochondrie observée au MET

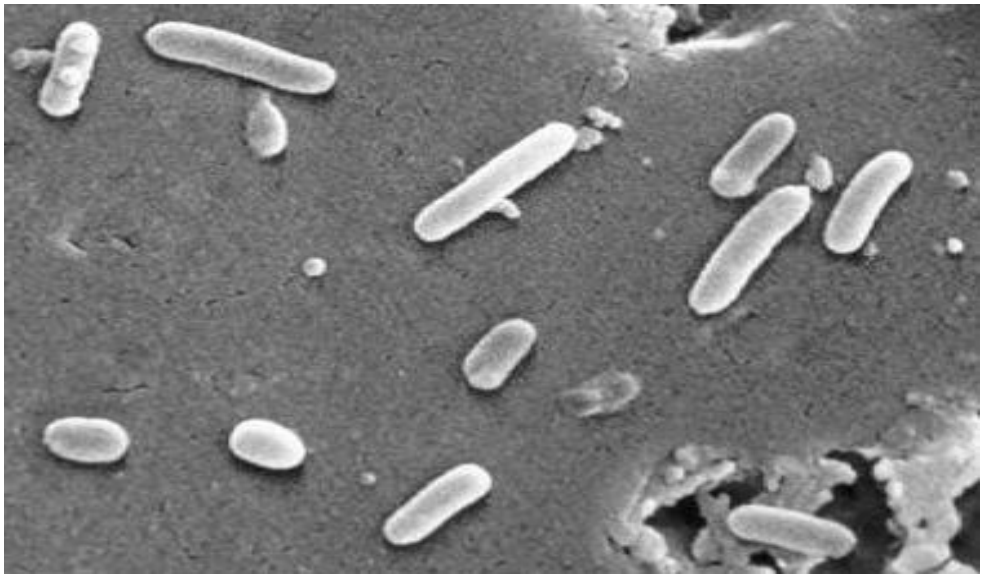


Grain de pollen de saule vu au **microscope électronique** à **balayage** (MEB).

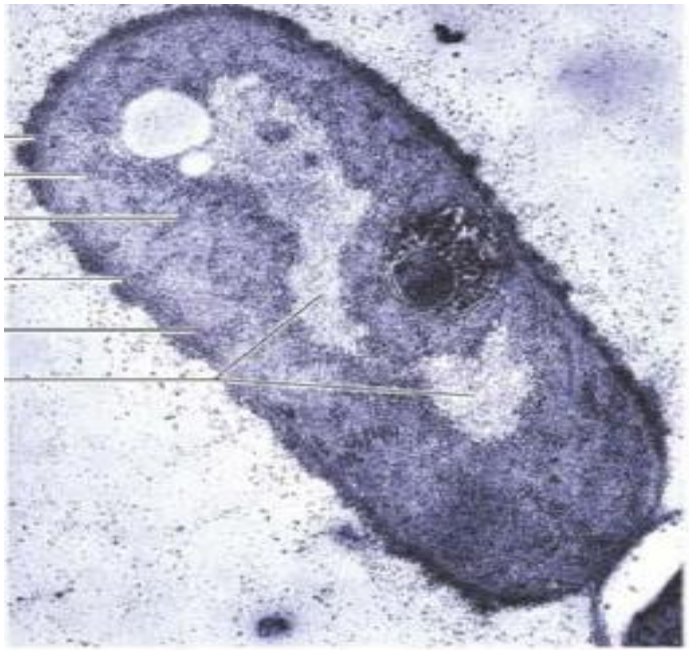
Exemple de *Pseudomonas aeruginosa*



Aspect au microscope optique à transmission



Aspect au microscope électronique à balayage



Aspect au microscope électronique à transmission

A- L a microscopie Electronique (ME)

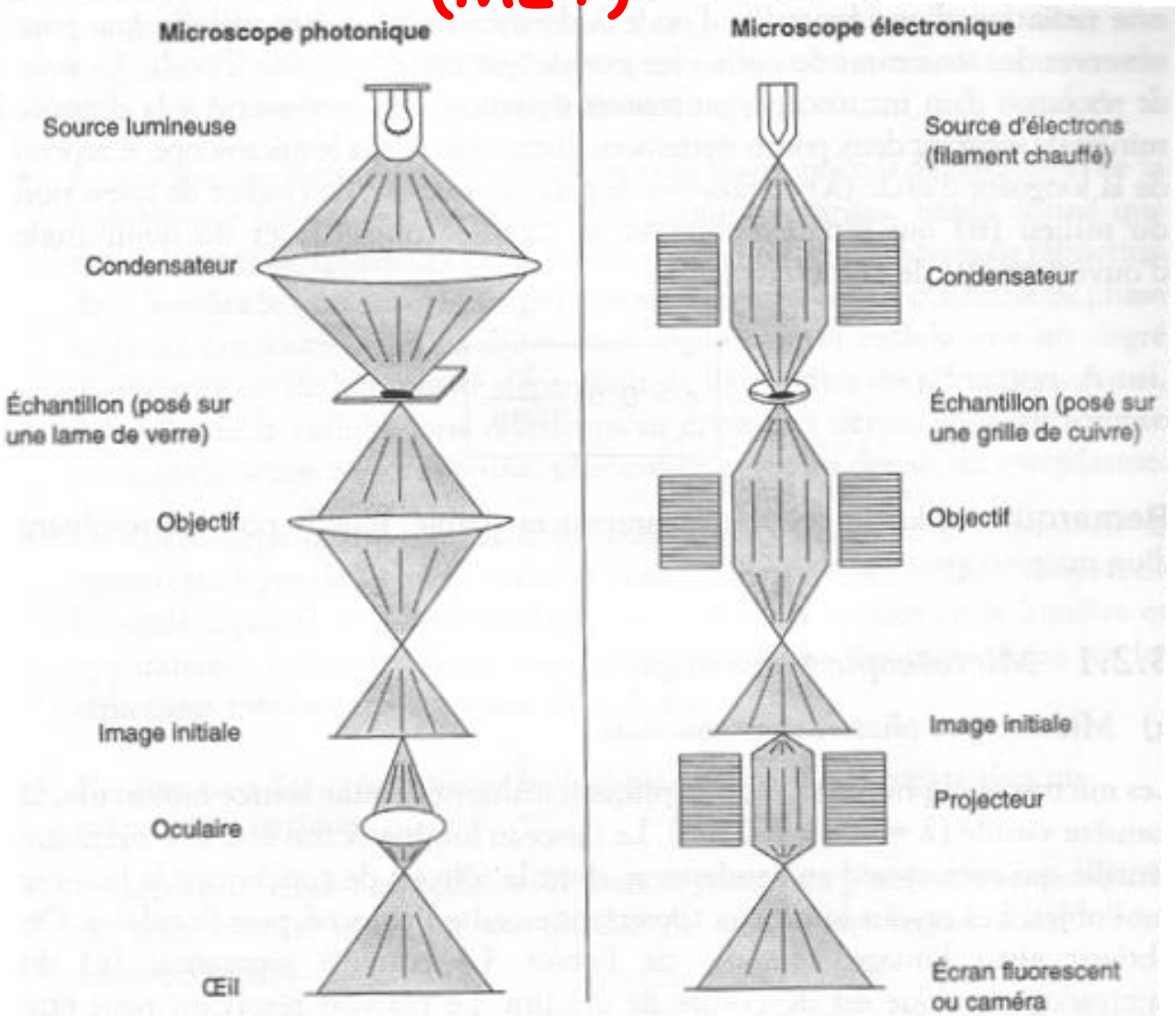
Elle est similaire au microscope optique, sauf qu'elle utilise des Electrons et les lentilles sont électromagnétiques. La colonne surmontant l'installation est occupée par une cathode qui enverra les électrons, un système de refroidissement, et un système permettant de faire le vide (car les électrons ne voyagent pas dans l'air).

Le grossissement est réglé par les tensions appliquées sur les lentilles.

Il y aura:

- Une lentille de **condensation**
- L'**échantillon**
- Une lentille d'**objectif**
- Le **projectif qui projette l'image sur un écran fluorescent**
- En dessous il y aura une plaque qui permet la **capture d'image.**

1. Le Microscope Electronique à Transmission (MET)



Principales composantes du microscope photonique et du microscope électronique à transmission.

En microscopie photonique, l'image agrandie peut être observée directement ou projetée sur un écran.

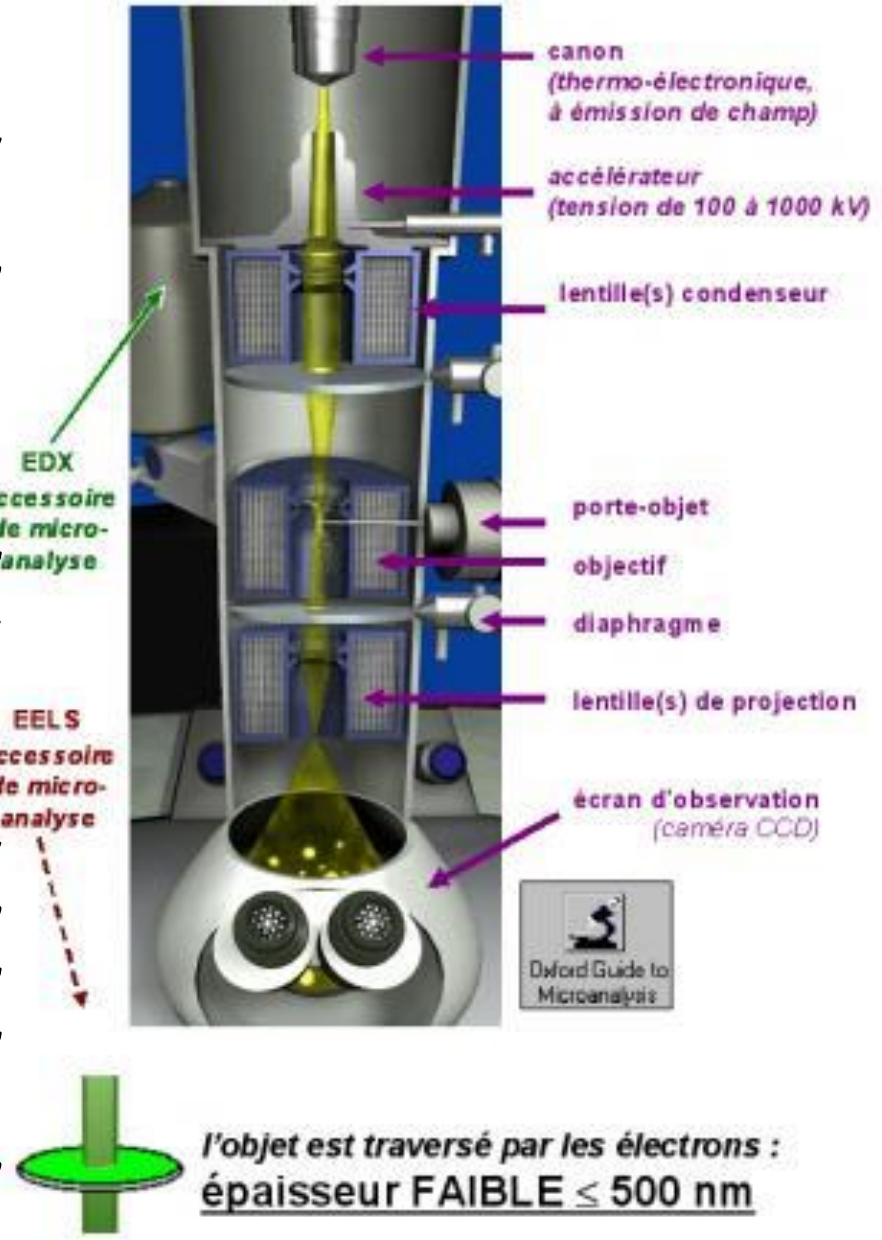
En microscopie électronique, l'image ne peu être observée que sur un écran fluorescent.

Dans sa conception, un MET ressemble à un microscope classique, mais en plus d'être plus grand et inversé:

*- **Le flux des électrons** provient du chauffage d'un filament et de l 'accélération des électrons libérés par le filament au moyen d 'une différence de potentiel de 60 à 100 kilovolts.*

- Le flux des électrons peut être focalisé au moyen de lentilles magnétique situées dans les parois de la colonne du microscope.

- il est couplé à un système de pompage qui réalise le vide dans la colonne du microscope. Ce vide est nécessaire pour permettre le déplacement des électrons (qui sinon entrent en collision avec les molécules de l 'air) et leur permettre de traverser l'échantillon pour en établir une image.



l'objet est traversé par les électrons :
épaisseur FAIBLE ≤ 500 nm

Mode de préparation pour MET

Pour obtenir des coupes ultrafines de 60-100 nm d'épaisseur

Les échantillons doivent être fixés très rapidement, sinon ils seront détruit.

- ➢ Fixation au **Glutaraldéhyde, qui fixe les protéines très rapidement**
- ➢ Post fixation à l'**Acide Osmique qui fixe les lipides.**
- ➢ **Déshydratation en passant par un solvant**
- ➢ Le bloc doit être très rigide pour pouvoir être coupé finement, il y a donc une inclusion en résine: **Epon ou Araldite semi-liquide à froid.**
- ➢ La résine est **chauffé à 60°C environ où elle polymérise**
- ➢ L'échantillon enrobé sera de l'ordre du millimètre cube
- ➢ On découpe l'échantillon avec un **Ultra-microtome plus sensible (avec un pas de 50nm).**

Le couteau est fait de diamant et dont le fil fait 3mm.

- ➢ **La coupe est maintenant ultra-fine avec une épaisseur de 100nm.**
- ➢ Les coupes sont regroupées sur des grilles à maillage adapté.

1. FIXATION

2. DÉSHYDRATATION

2'. REFROIDISSEMENT très rapide, à très basse température

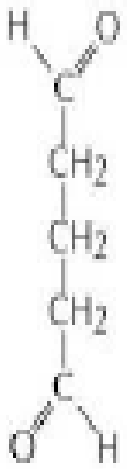
2 " REMPLACEMENT DE L'EAU par un solvant organique

3. ENROBAGE DANS UNE RÉSINE

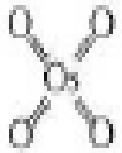
4. COUPES ULTRAFINES

50-100nm

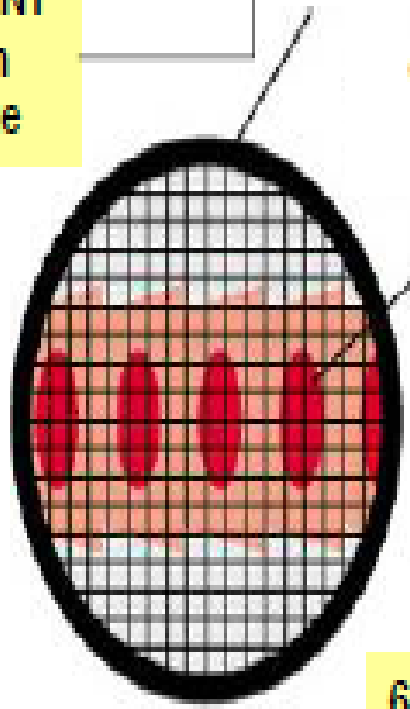
5. MONTAGE SUR GRILLE



glutaraldéhyde (protéines)



acide osmique (lipides)



grille de cuivre

coupes ultrafines déposées sur la grille

3 mm

6. COLORATION (avec des métaux lourds)

Pour augmenter la visibilité

❖ On peut augmenter le contraste en utilisant les sels de métaux:

- **Citrate de Plomb**
- **Acétate d'Uranyle**

Les électrons sont arrêtés par les métaux et l'image en tiendra compte:
C'est la ***coloration positive***.

❖ Coloration négative

Coloration de petits objets isolés et déposés sur une grille recouverte d'un filtre.
Le produit de contraste vient se mouler autour des objets, le MET affichera alors une image en négatif (en marquant les contours).

Pour augmenter la visibilité

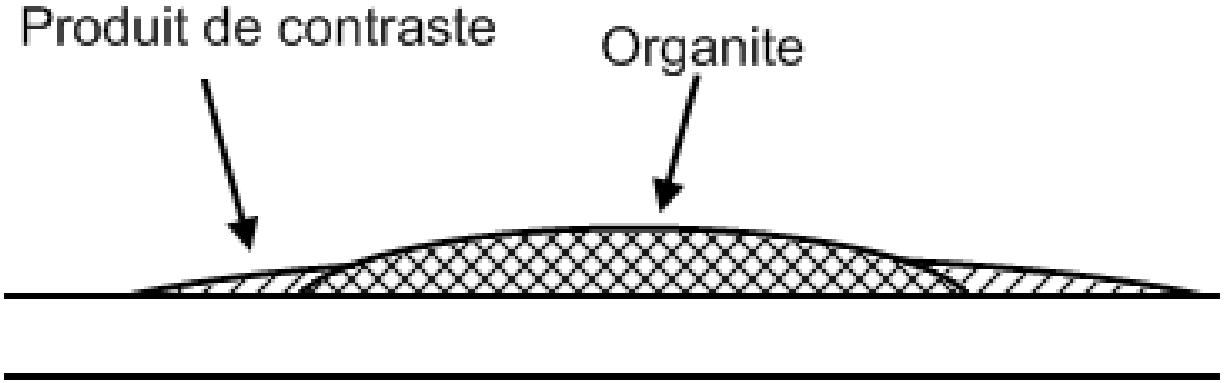
❖ On peut augmenter le contraste en utilisant les sels de métaux:

- **Citrate de Plomb**
- **Acétate d'Uranyle**

Les électrons sont arrêtés par les métaux et l'image en tiendra compte:
C'est la ***coloration positive***.

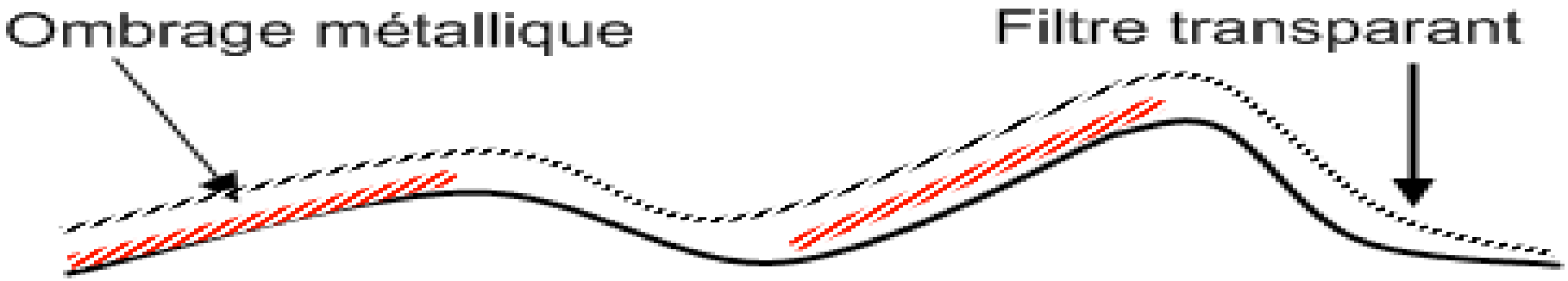
❖ Coloration négative

Coloration de petits objets isolés et déposés sur une grille recouverte d'un filtre.
Le produit de contraste vient se mouler autour des objets, le MET affichera alors une image en négatif (en marquant les contours).



Ombrage métallique

Il met en évidence de petits éléments dans une cellule (ex: molécules protéique de la membrane cellulaire). Le métal chauffé se dépose sur un coté de la structure.
Une fois déposé, il faudra solidariser la structure en appliquant un **filtre transparent**. **L'échantillon** pourra ensuite être détruit, et on ne gardera que la réplique qu'on passera au MET. On aura alors une image en contraste avec impression de relief.



L'ombrage métallique est souvent associé aux techniques suivantes:

1. **La cryofracture**
2. **Le cryodécapage**

1. La cryofracture

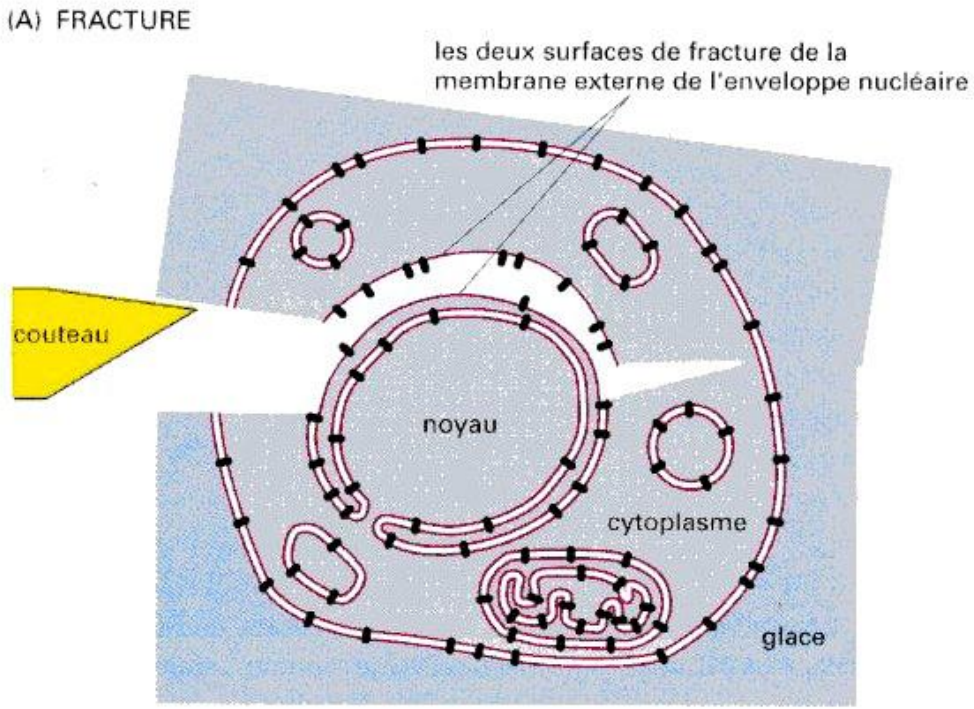
Un échantillon est trempé dans de l'Azote liquide (pour le refroidir), puis cassé à l'aide d'un couteau. La cassure se fera préférentiellement entre les deux feuillets d'une membrane.

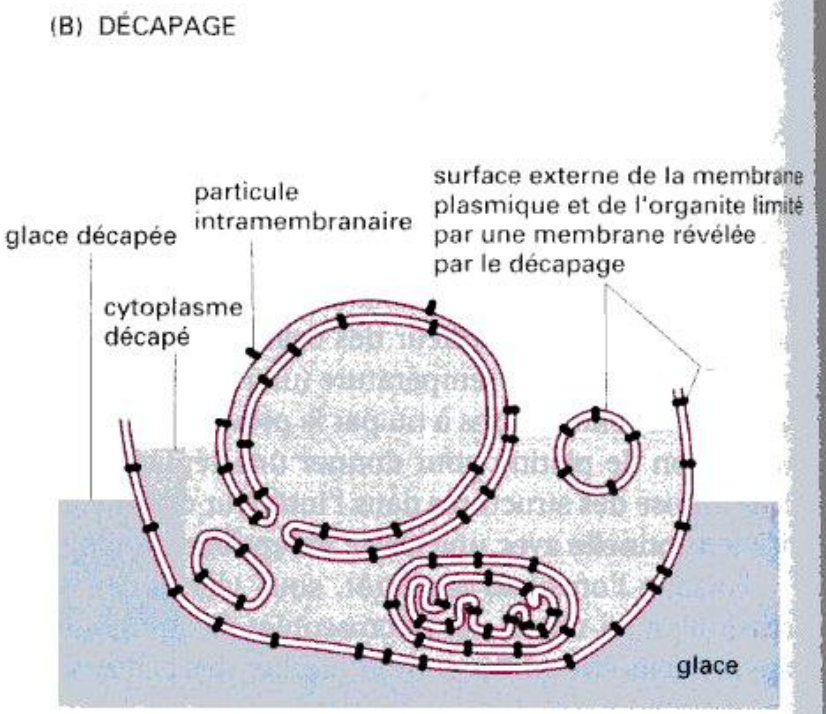
Ainsi les faces internes des deux feuillets de la membrane pourront être examiné. Grâce à l'ombrage métallique on pourra déterminer la concentration en protéines !

2. Le cryodécapage

On sublime l'eau du cytoplasme et on fait ainsi apparaître une partie du feuillet externe de la membrane.

Cette technique est utilisé pour faire apparaître le **Cytosquelette.**





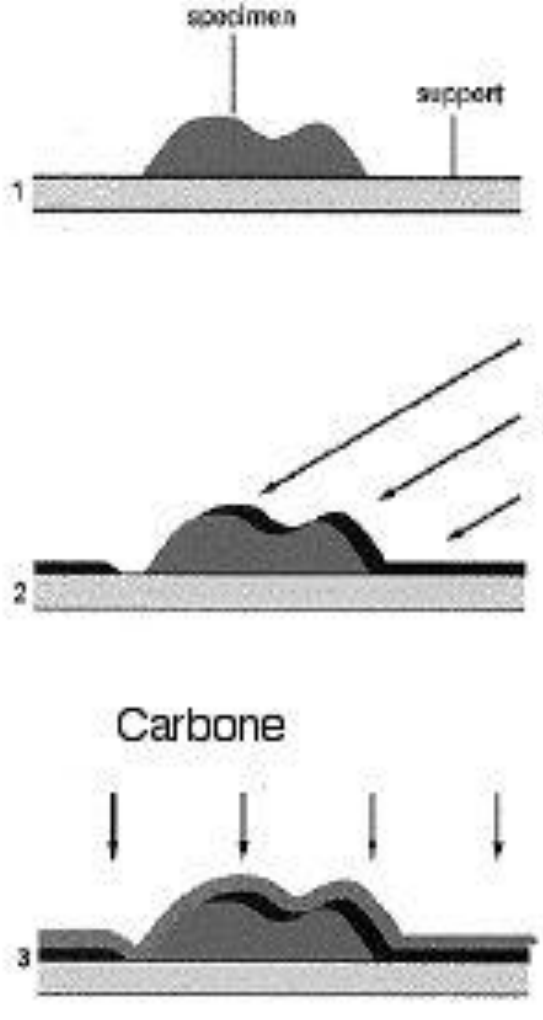
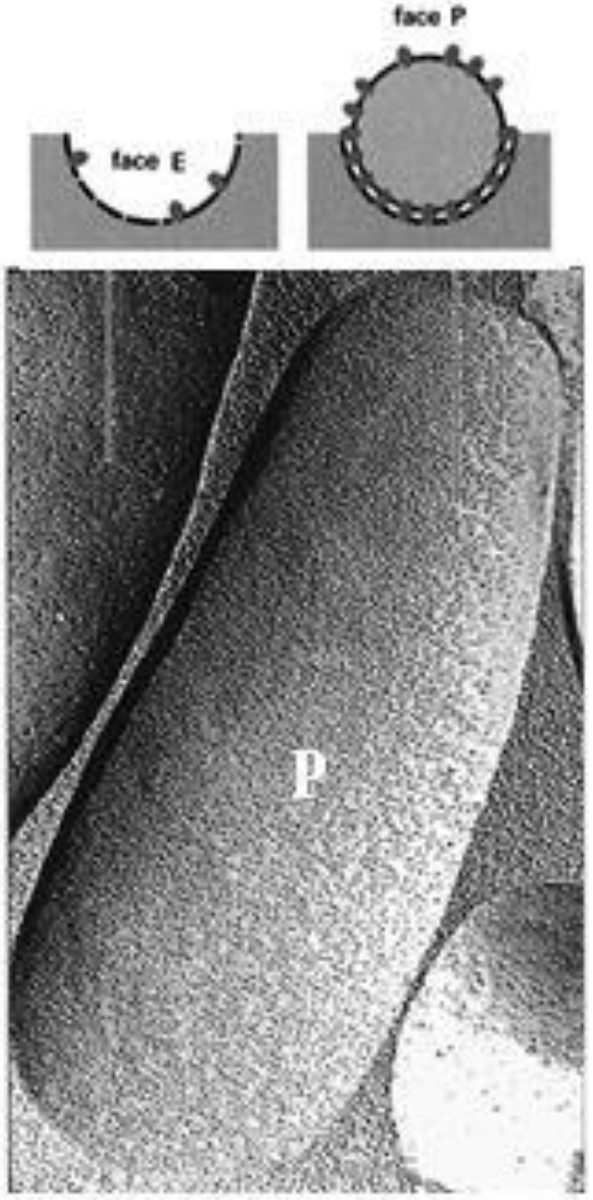
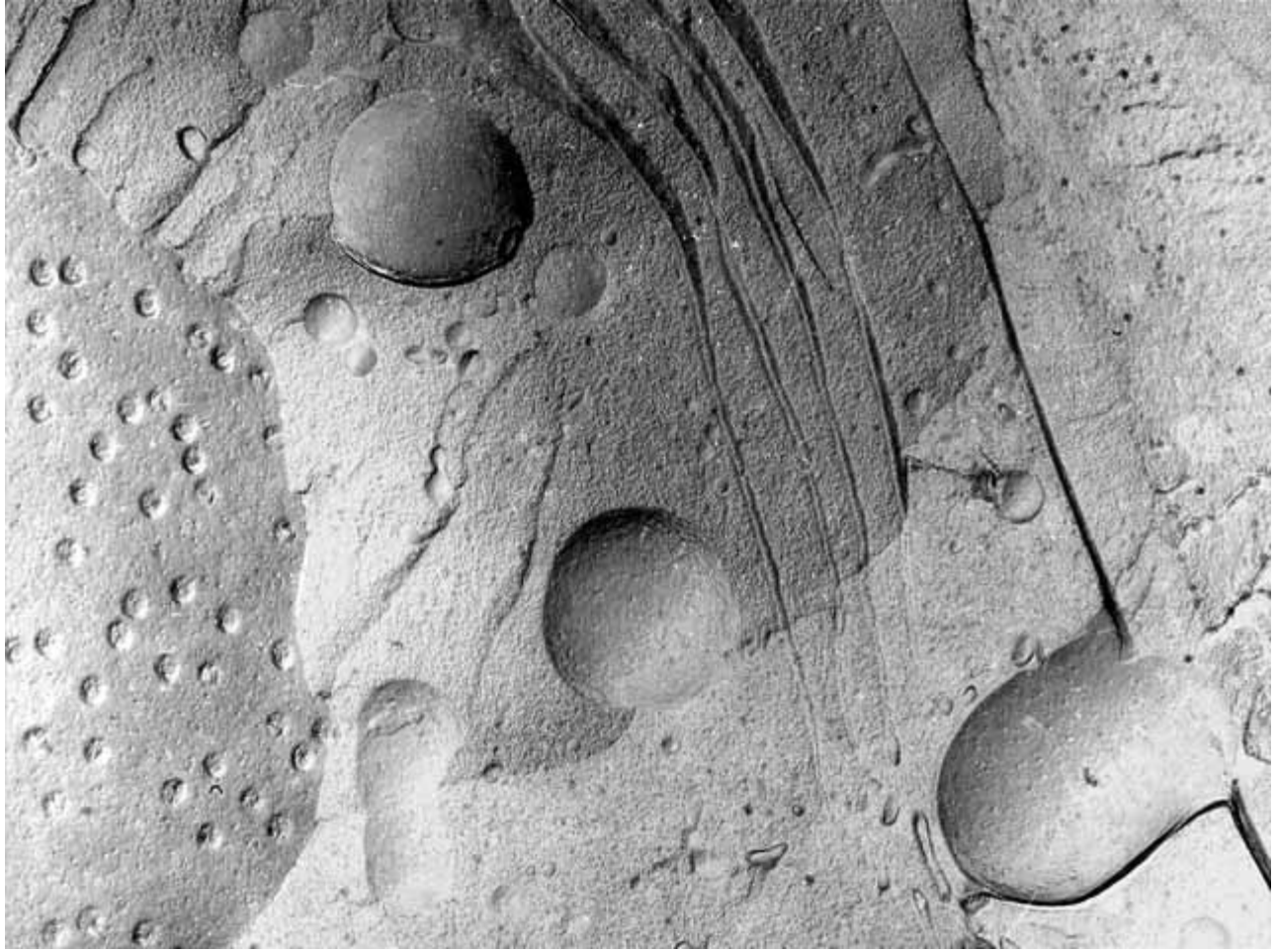


Image observée sur l'écran du microscope électronique.

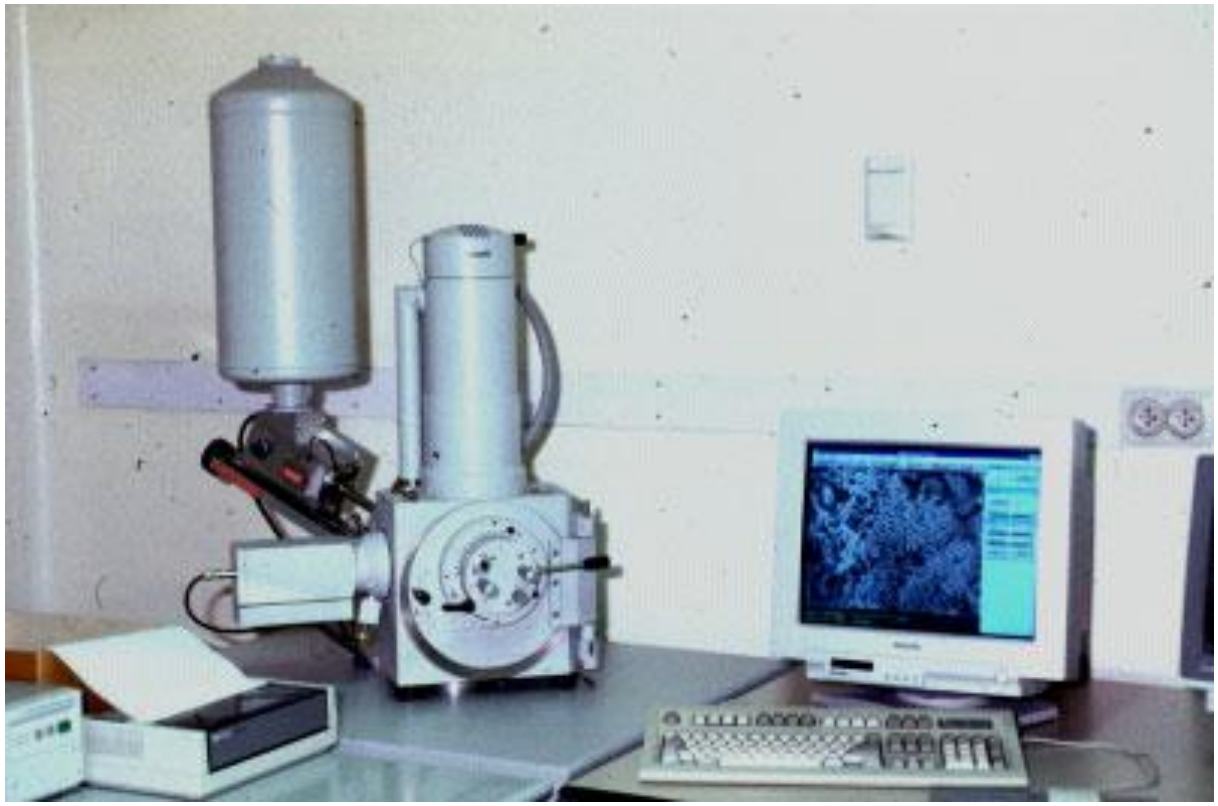


Globules rouges après cryo-fracture
E : face exoplasmique.
P: face protoplasmique.

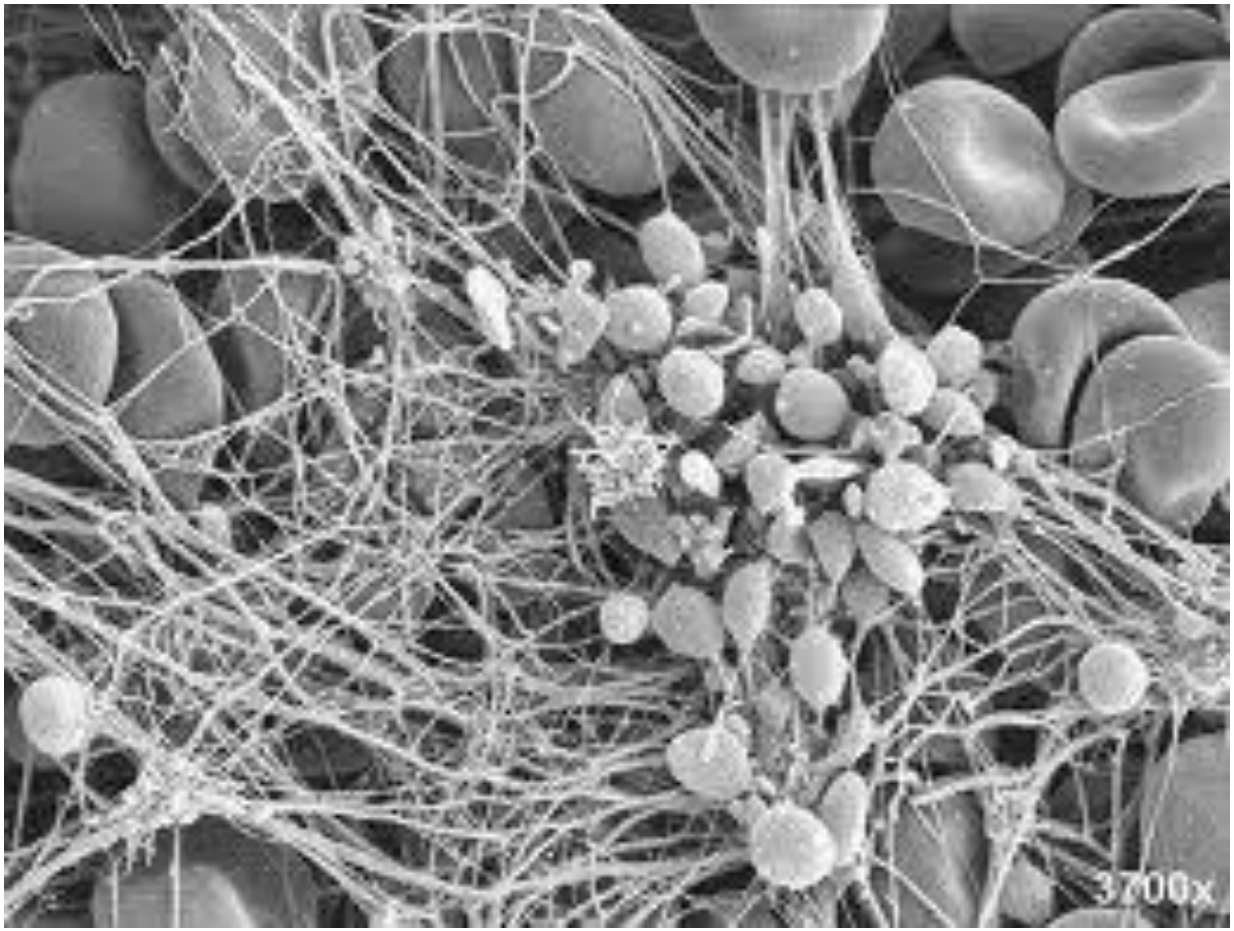


Cette cellule de racine a été fracturée à froid. La surface de fracture a été ombrée par des vapeurs métalliques opaques aux électrons et l'ensemble recouvert d'une couche résistante de carbone transparente aux électrons. Les structures vivantes sont ensuite détruites et seule la réplique (moulage) est observée en microscopie électronique à transmission. On observe à gauche le noyau et les pores nucléaires, au centre du réticulum endoplasmique et à droite la membrane plasmique avec des vésicules de sécrétion.

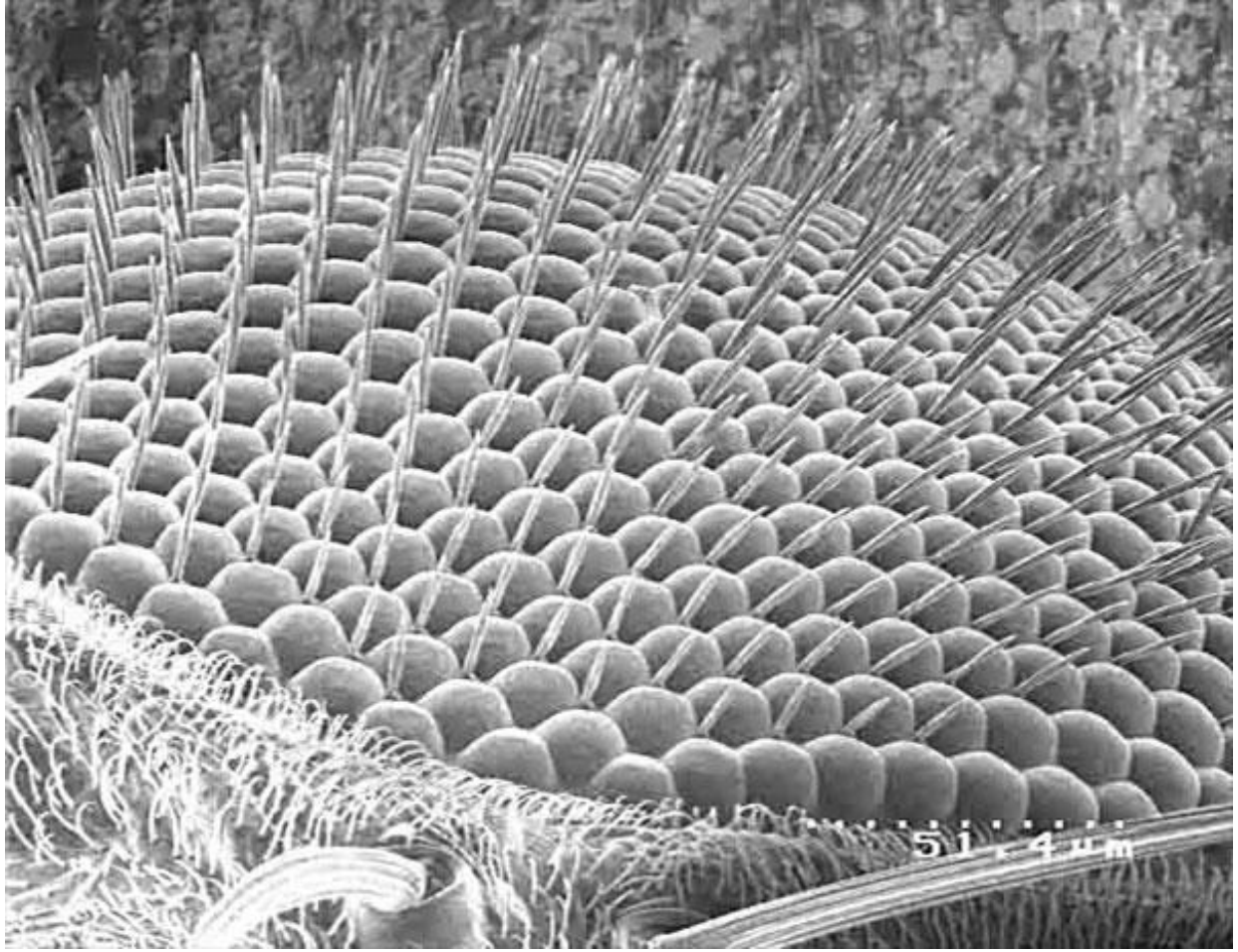
2. Le microscope électronique à balayage.



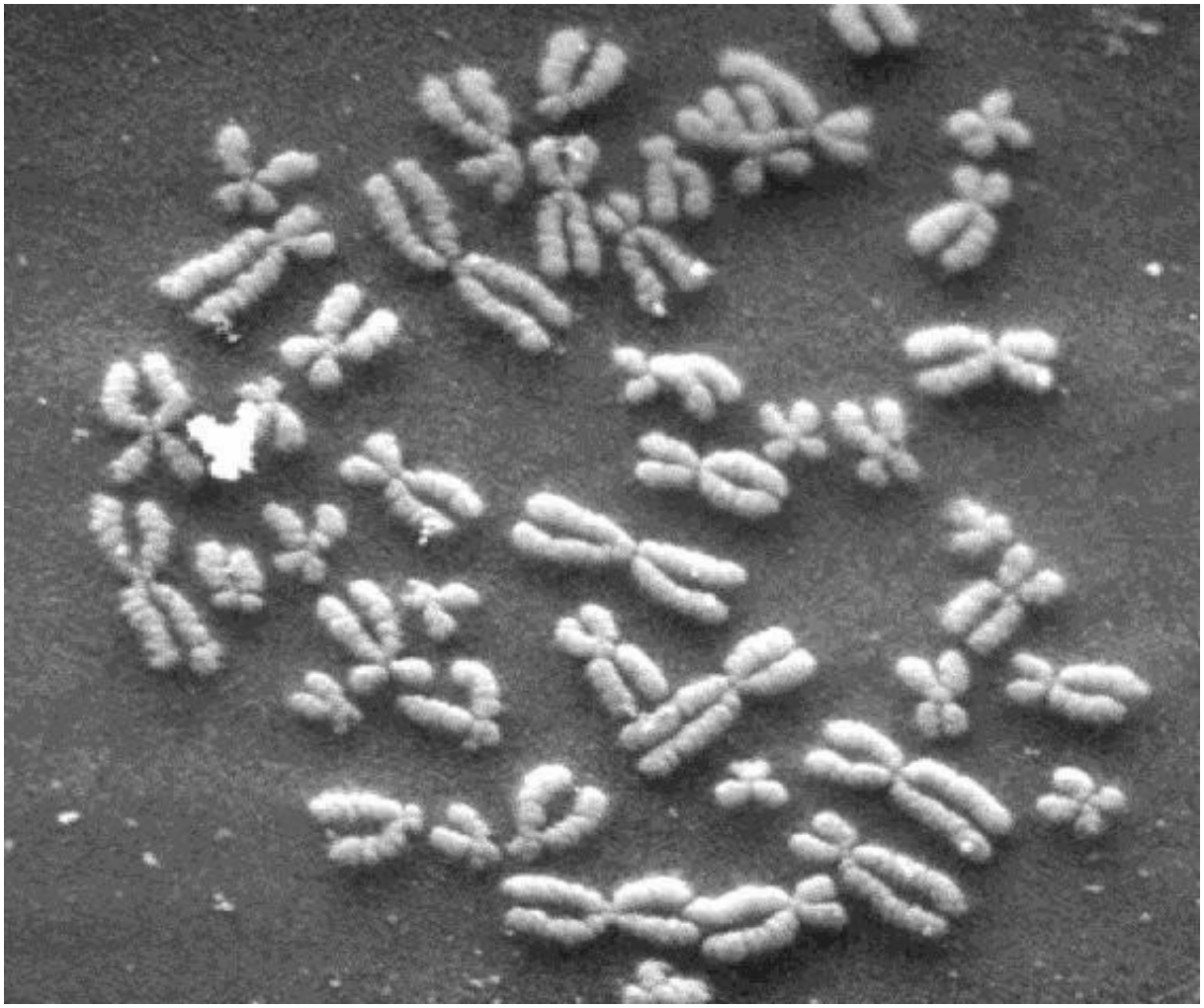
«Le microscope électronique à balayage fournit des images en trois dimensions des surfaces observées. Ce type de microscope est plus petit et moins onéreux qu'un microscope électronique à transmission.



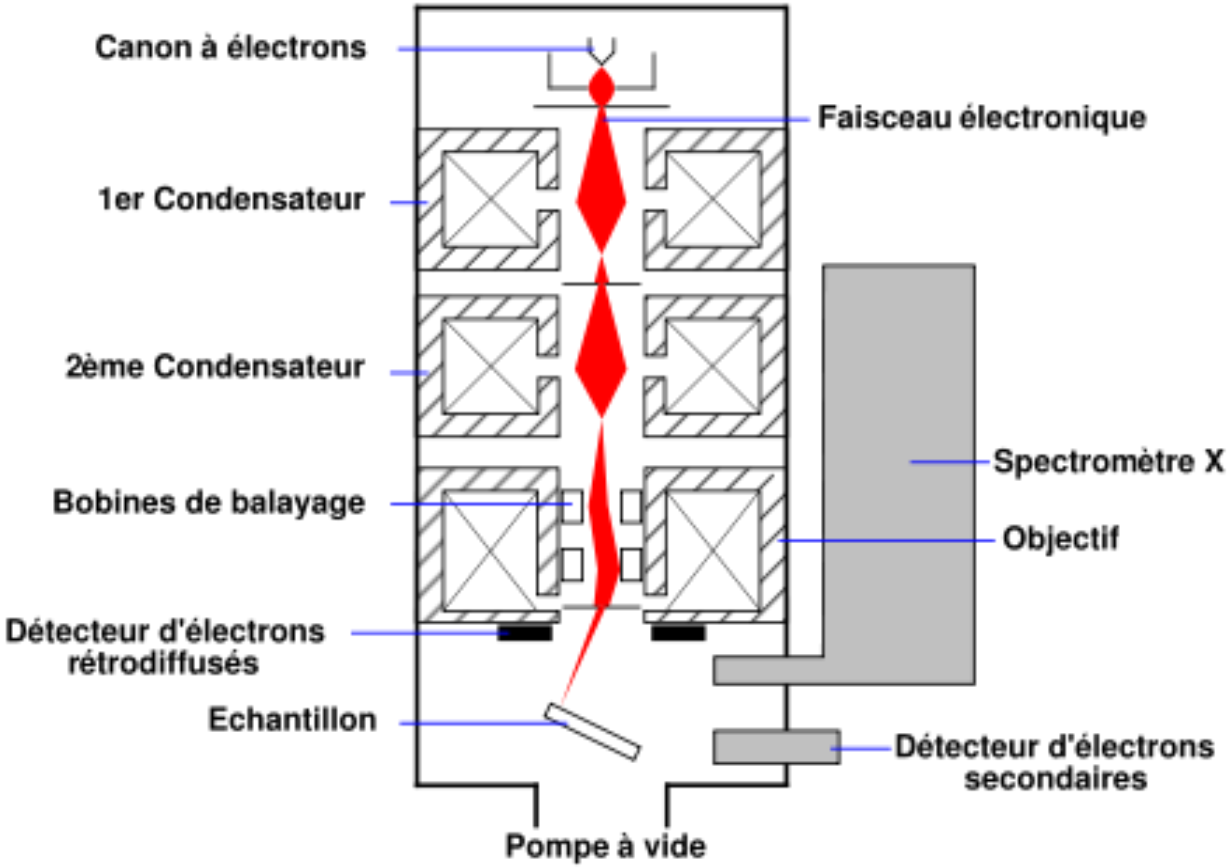
Caillot sanguin observé en MEB



Sur cet œil de mouche observé enMEB, il est possible de voir la topographie de la surface de l'œil et l'agencement géométrique des cellules accompagnées de poils sensoriels. Chaque petite sphère correspond à une cellule qui se comporte comme un œil élémentaire et donne l'image d'une partie du champ visuel de l'insecte

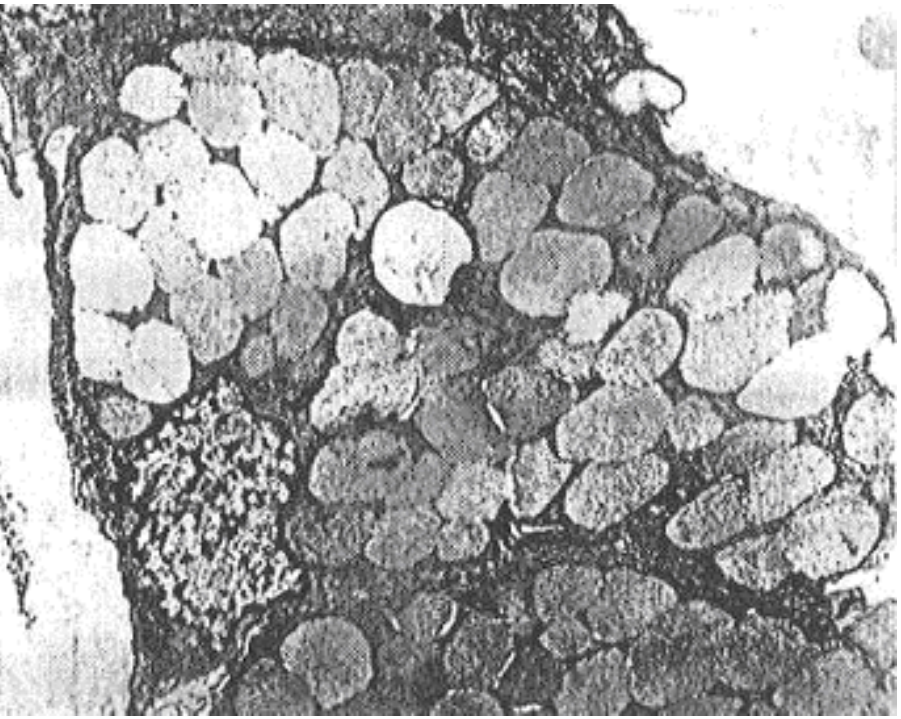


Chromosomes humains observés en MEB

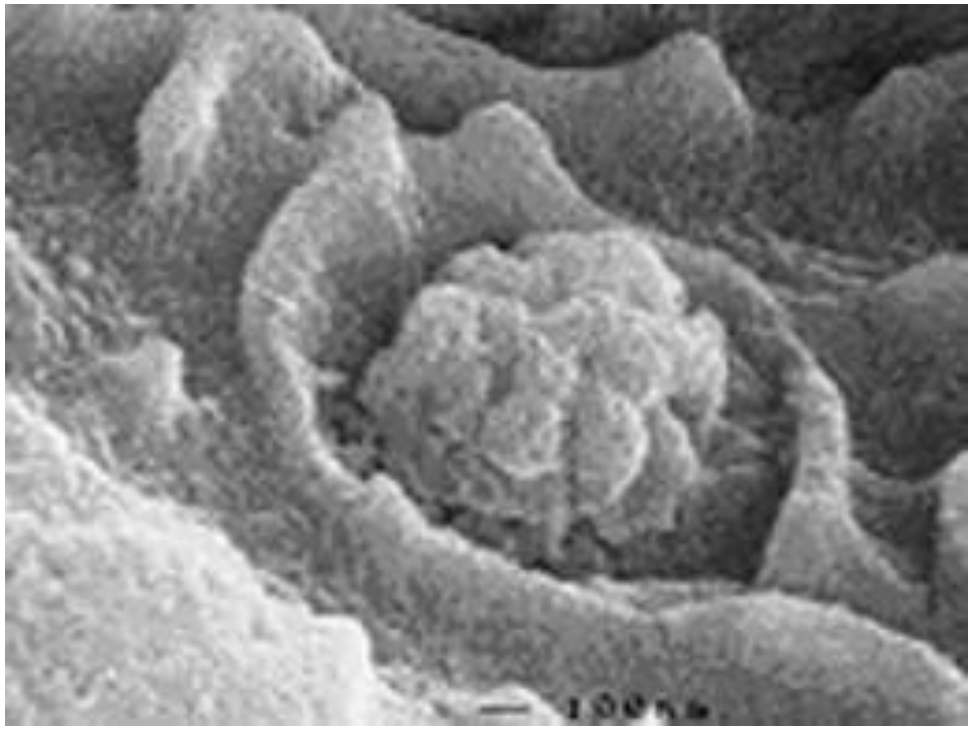


-utilise pour former une image, les électrons secondaires qui sont émis de la surface d 'un échantillon lorsque celui-ci est balayé par un fin faisceau d 'électrons primaires.

- l'échantillon est rendu conducteur pour le flux d 'électrons qui le balaye en le recouvrant d'une fine couche de métal lourd après fixation et déshydratation,.



MET

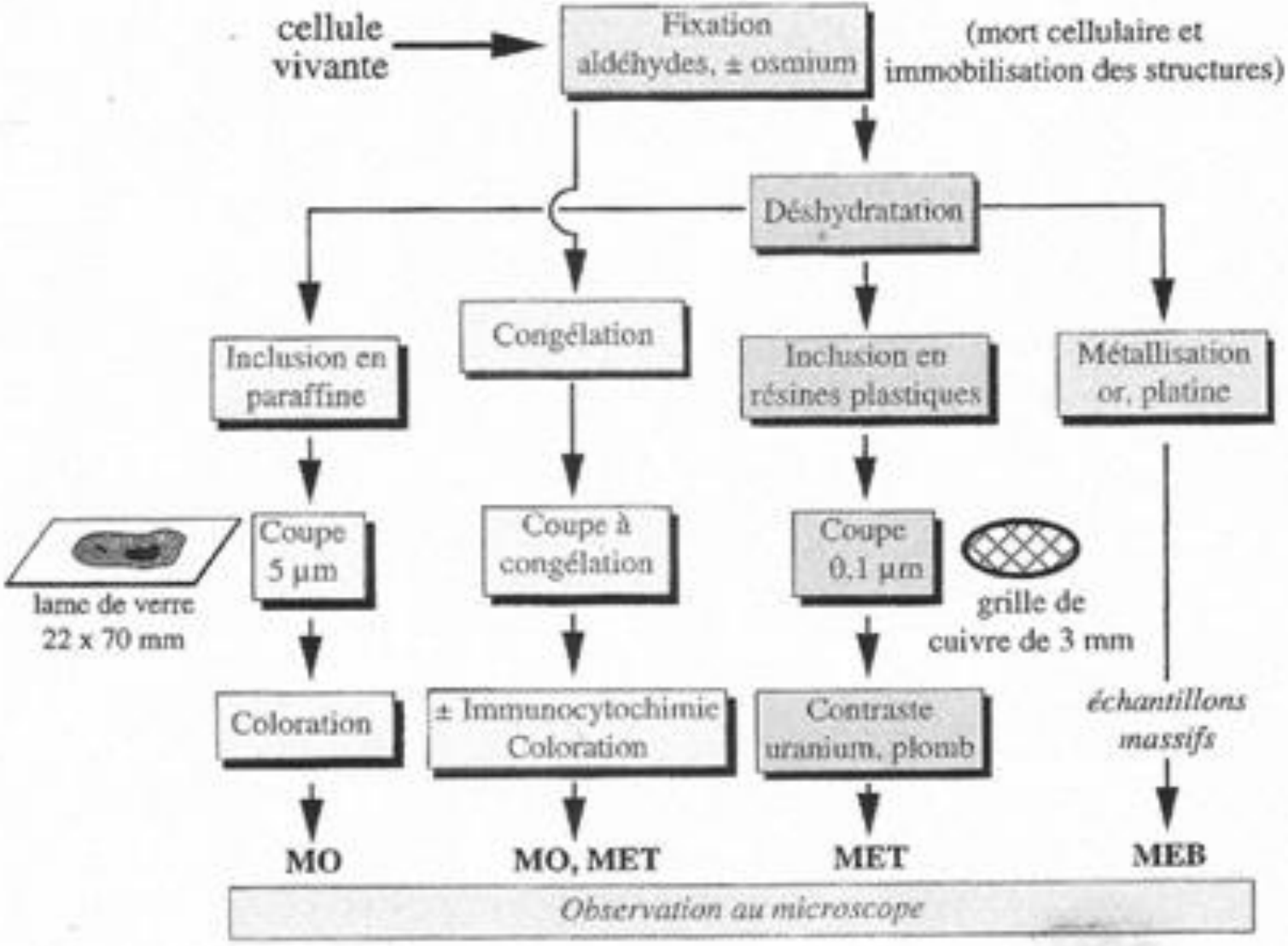


MEB

Les cellules à mucus montrant
des grains de sécrétion prêts
à être libérés

Observation par microscopie de cellules non-vivantes

Préparation de l'échantillon



II. Méthodes Physico-chimiques et Biochimiques

Etude des constituants cellulaires

=

Méthodes interdisciplinaires faisant appel à des principes et des techniques empruntés à la physique, chimie, …

Mise en évidence *in situ* de certains constituants

Fractionnement *et* séparation

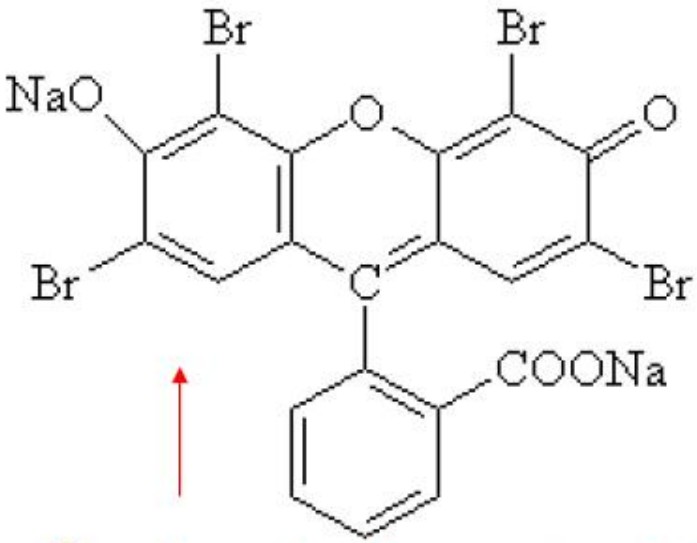
1. Méthodes de localisation in situ

Rappel:

- **Une observation générale**
  - Coloration signalétique par Hematoxyline-eosine.
  - Etudes de cellules vivantes avec le M. à contraste de phase.
  - Les organites intracellulaires, le MET est requis.
  - Observer les différenciations des surfaces: le MEB.

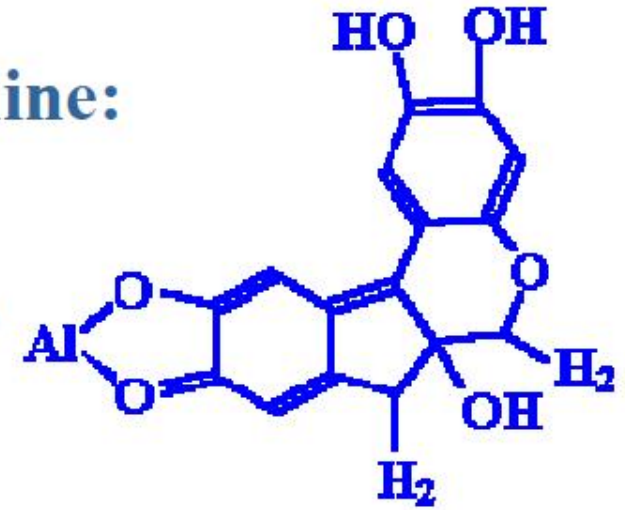
➢ Localisation moléculaire à l'intérieur de la cellule:

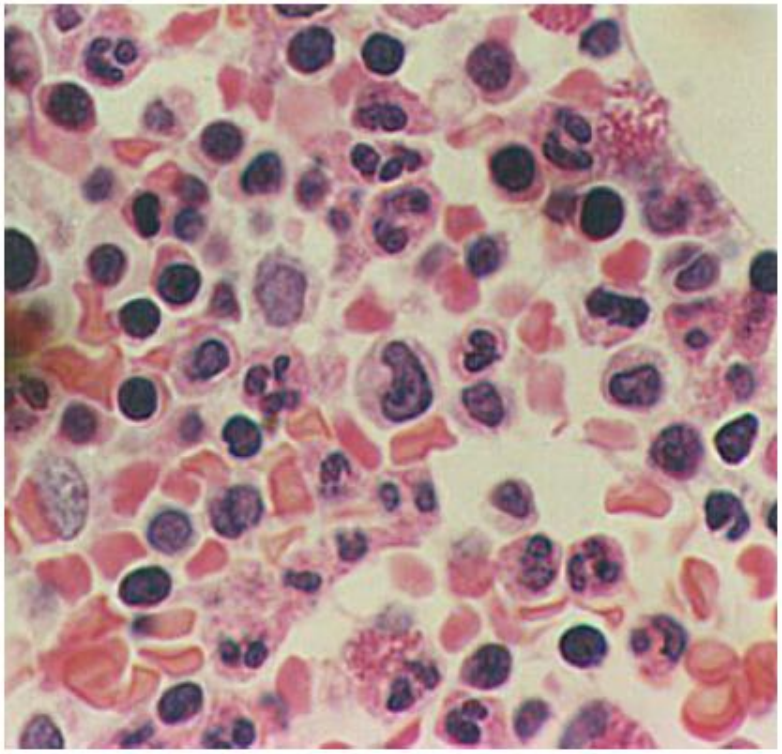
1. **Cytochimie et Histochimie**
2. **Histoenzymologie**
3. **Immunocytochimie / Immunohistochimie:**
4. **Hybridation in situ**
5. **Autoradiographie**



Éosine (colorant acide)

Hématoxylline: (colorant basique)





Tissu coloré à l'hématoxylline/éosine

(procédure standard en histologie/pathologie)

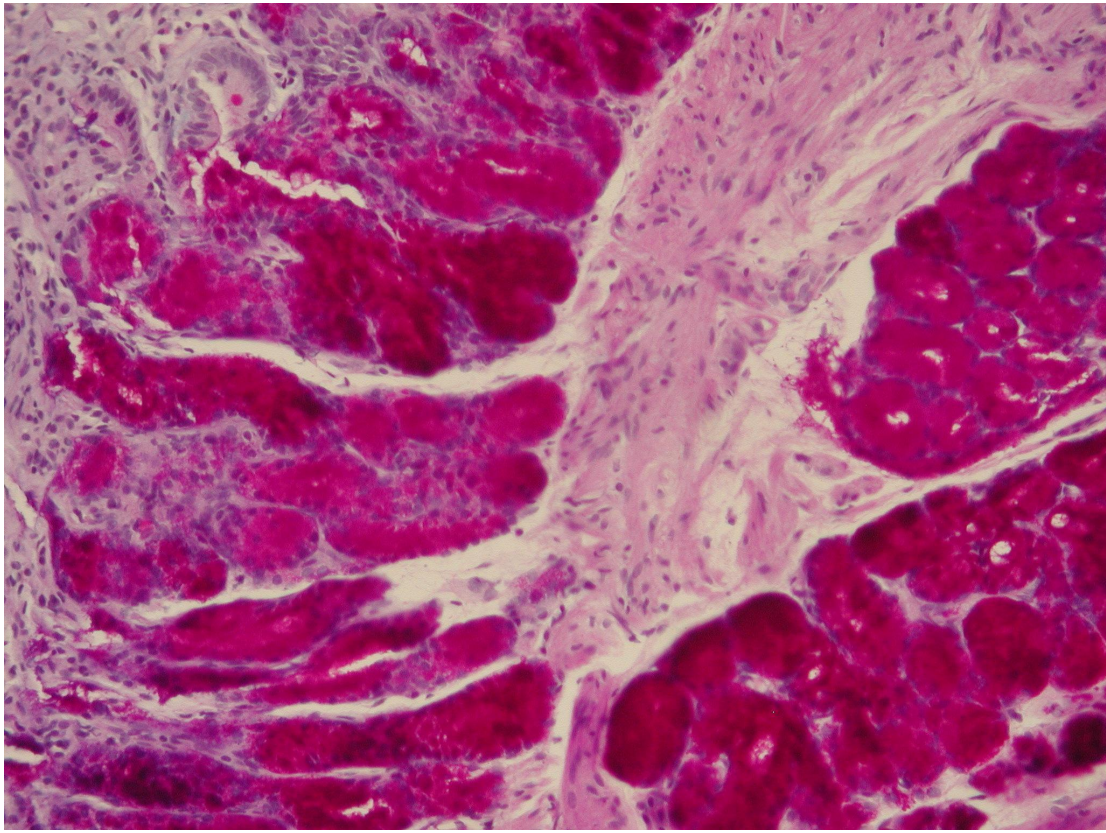
1. Cytochimie -Histochimie

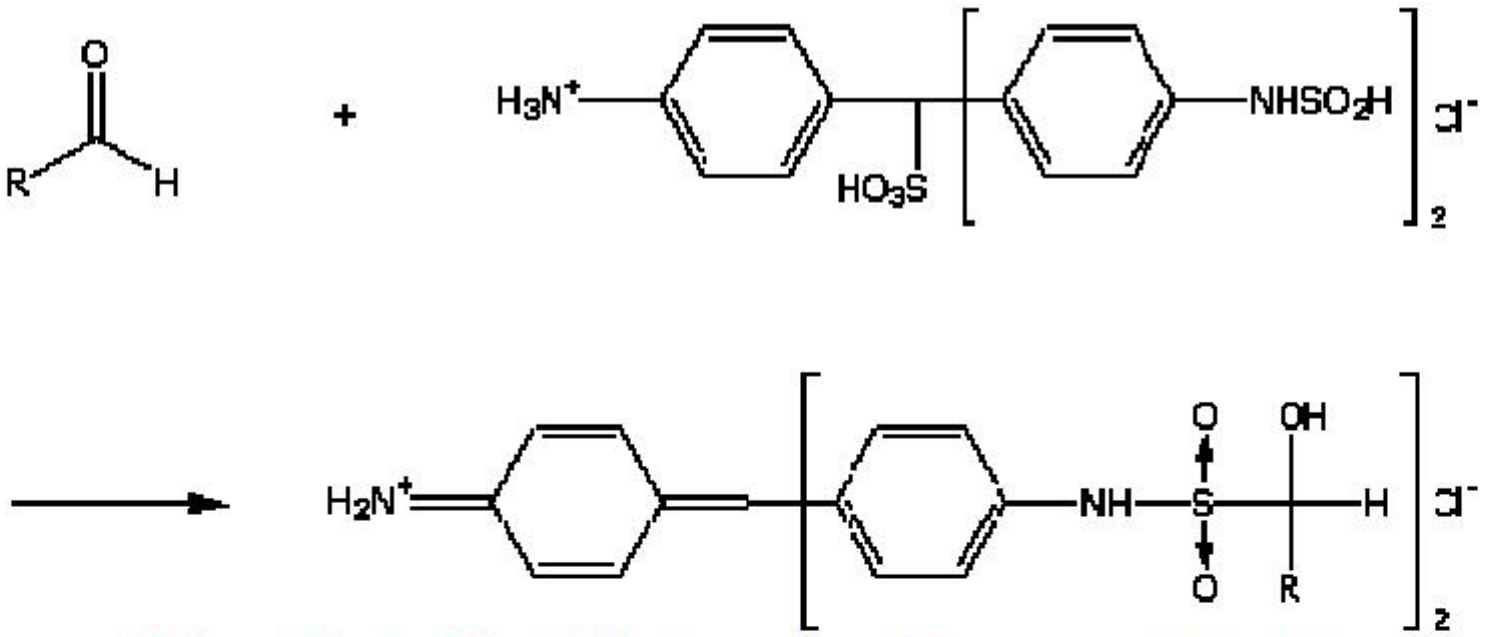
permet de mettre en évidence <u>dans les cellules</u> des constituants chimiques spécifiques (Glucides, acides nucléiques, lipides....)

Exemple: la réaction histochimique la plus connue est la PAS (Acide Périodique de Schiff).

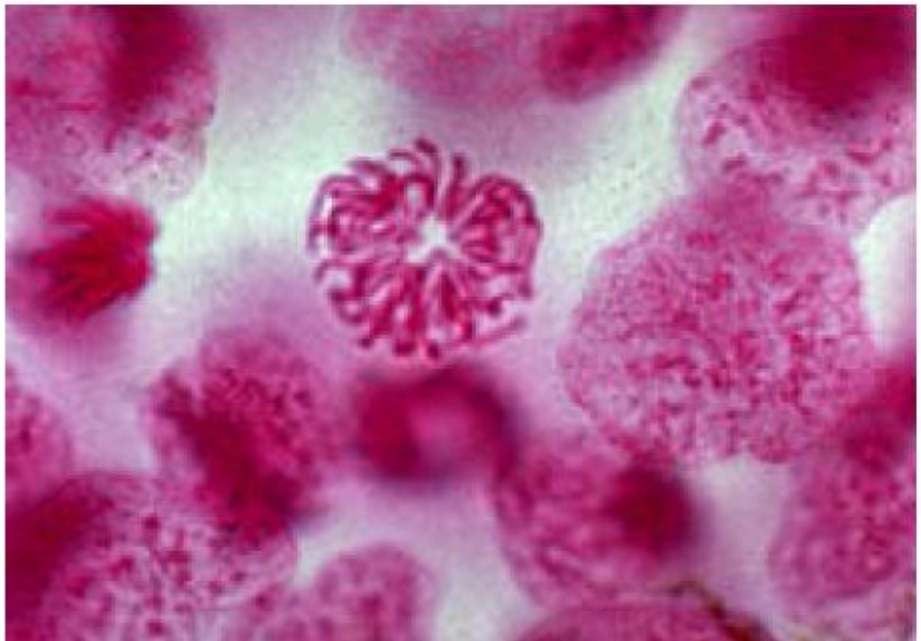
Dans cette réaction, on oxyde les glycols par l'acide Périodique transformé alors en Aldéhyde, puis on met en évidence les aldéhydes par le réactif de Schiff.

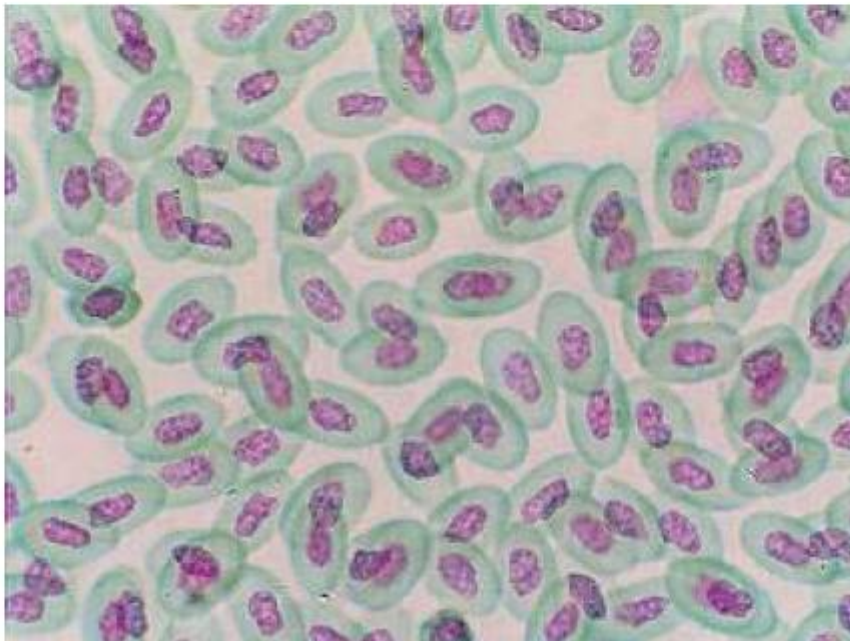
La coloration est Rouge Pourpre.





Réactif de Schiff et colorations au **Feulgen**



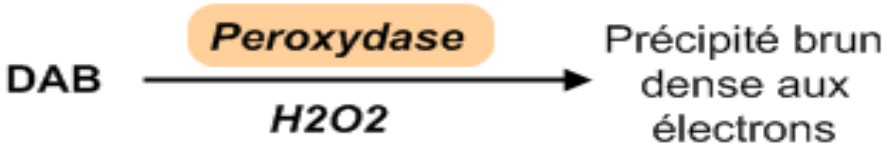


2. Histoenzymologie

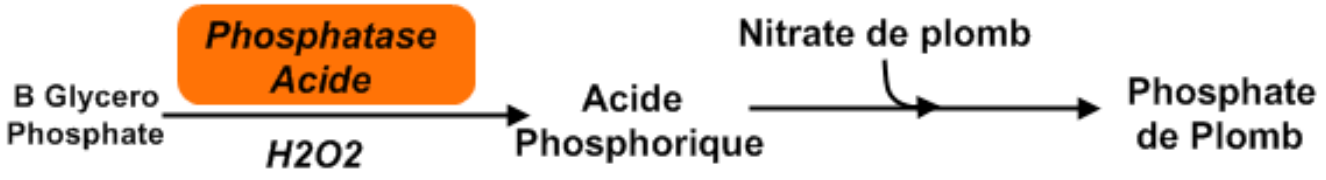
- **permet de travailler en MO et ME.**
- **Détecte dans une cellule une enzyme spécifique** par la formation d'un produit à partir d'un substrat que l'on ajoute à la préparation.
  - Au MO, le produit devra être coloré;
  - Au ME, le produit doit être dense aux électrons.

exemples:

1. *mise en évidence de la Peroxydase par le DAB (diamino benzidine)*



2. localisation de phosphatase acide dans les lysosomes, actif à un pH=5.



Précipité de phosphate de plomb visible au ME

Dans la plupart des cas il faut des fixations légères, donc tissu frais et qui a maintenu l'activité enzymatique.

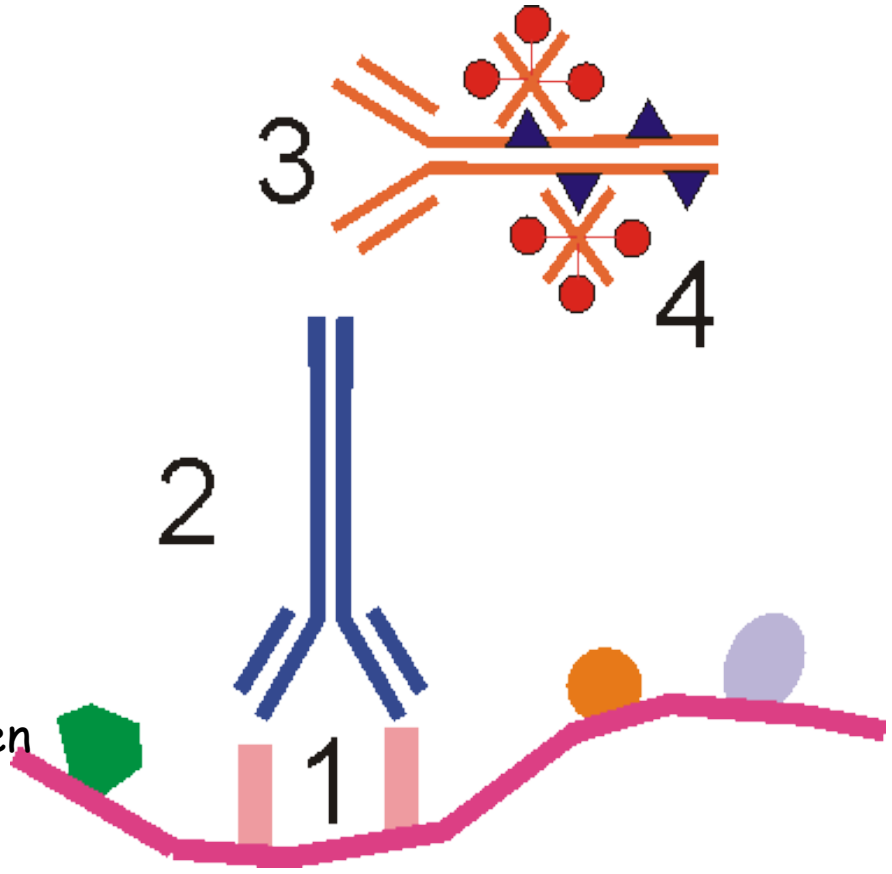
3. Immunocytochimie / Immunohistochimie

- **Permet de détecter des** molécules (protéines/glycoprotéines) *in situ en utilisant la reconnaissance spécifique* entre un **anticorps** et un **antigène**.

- L'examen immuno-histochimique (IHC) consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques.

Immunohistochimie: Schéma de la technique

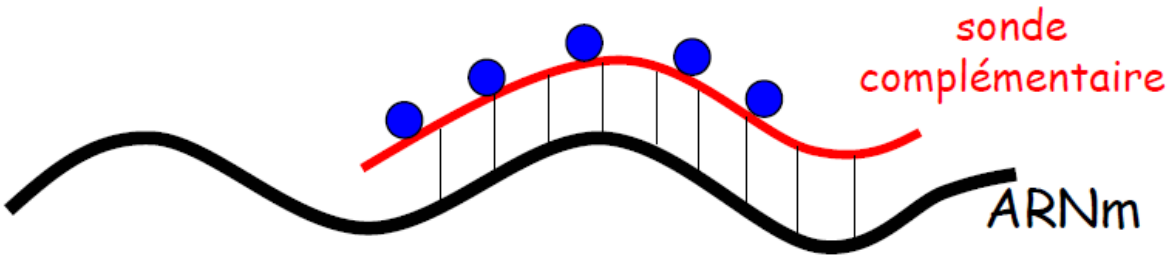
- Après étalement, déparaffinage et séchage des coupes, l'**anticorps primaire** est déposé directement sur le tissu et reconnaît, s'il existe, le récepteur antigénique recherché.
- Un **deuxième anticorps** susceptible de se fixer à l'anticorps primaire est complexé à un système **avidine-biotine-peroxydase** permettant la révélation est appliqué.
- La Diaminobenzidine révèle la réaction en brun et rouge respectivement.
- Une contre-coloration douce avec l'hématoxyline recolore le tissu et rend possible une détermination topographique du marquage.



1 – Antigène; 2 - Anticorps 1;
3 - Anticorps 2
4 - Complexe Avidine-biotine-péroxydase

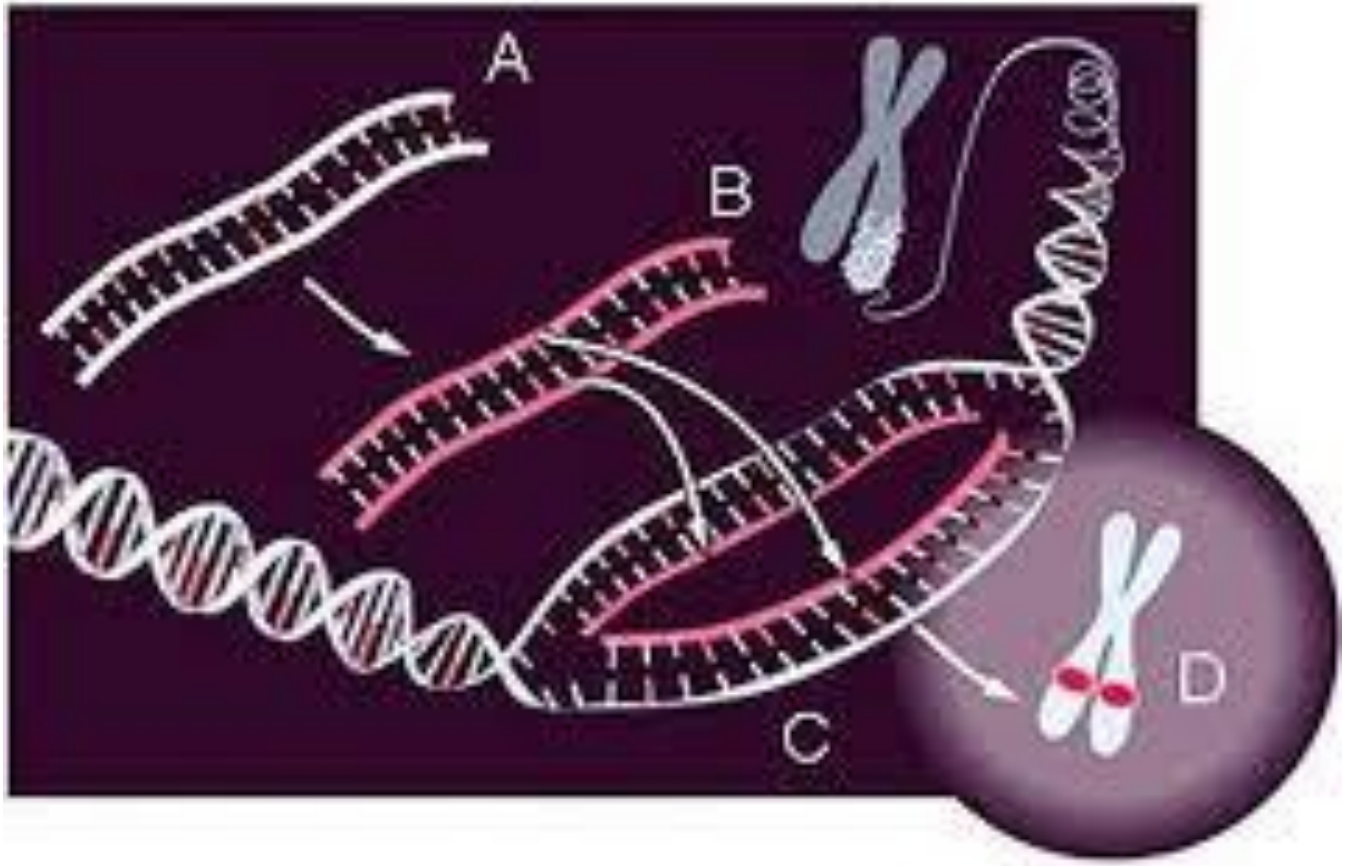
4. Hybridation in situ

Permet de ***détecter des*** séquences d'ADN ou d'ARN messager grâce à l'hybridation d'une sonde spécifique complémentaire dans un tissu donné.



Les sondes chaudes = sondes radioactives révélées par émulsions photographiques (précipitation des grains d'argent): marquage autoradiographique. Utilisation de nucléotides radiomarqués: phosphore 32, tritium, soufre 35, ...

Les sondes froides sont marquées par un haptène (digoxigénine, biotine) et révélées par un AC couplé à une enzyme (peroxydase...): détection immunoenzymatique (immunocytochimie)


A
B
C
D

5. Autoradiographie

- **Utilisant des radio-isotopes (*Tritium par ex). Ces particules vont*** impressionner un film photographique placé au dessus de l'échantillon qu'on va observer.

- L'échantillon devra être traité dans le noir.

- Cette technique est utilisée pour étudier la liaison entre une molécule et son récepteur:

- on injecte la protéine/molécule marquée avec du radio-isotope, puis on attend que la liaison se fasse entre la protéines et son récepteur, puis on prélève, on coupe et on observe où s'est fixé la protéine, qui révèlera la position des récepteurs.

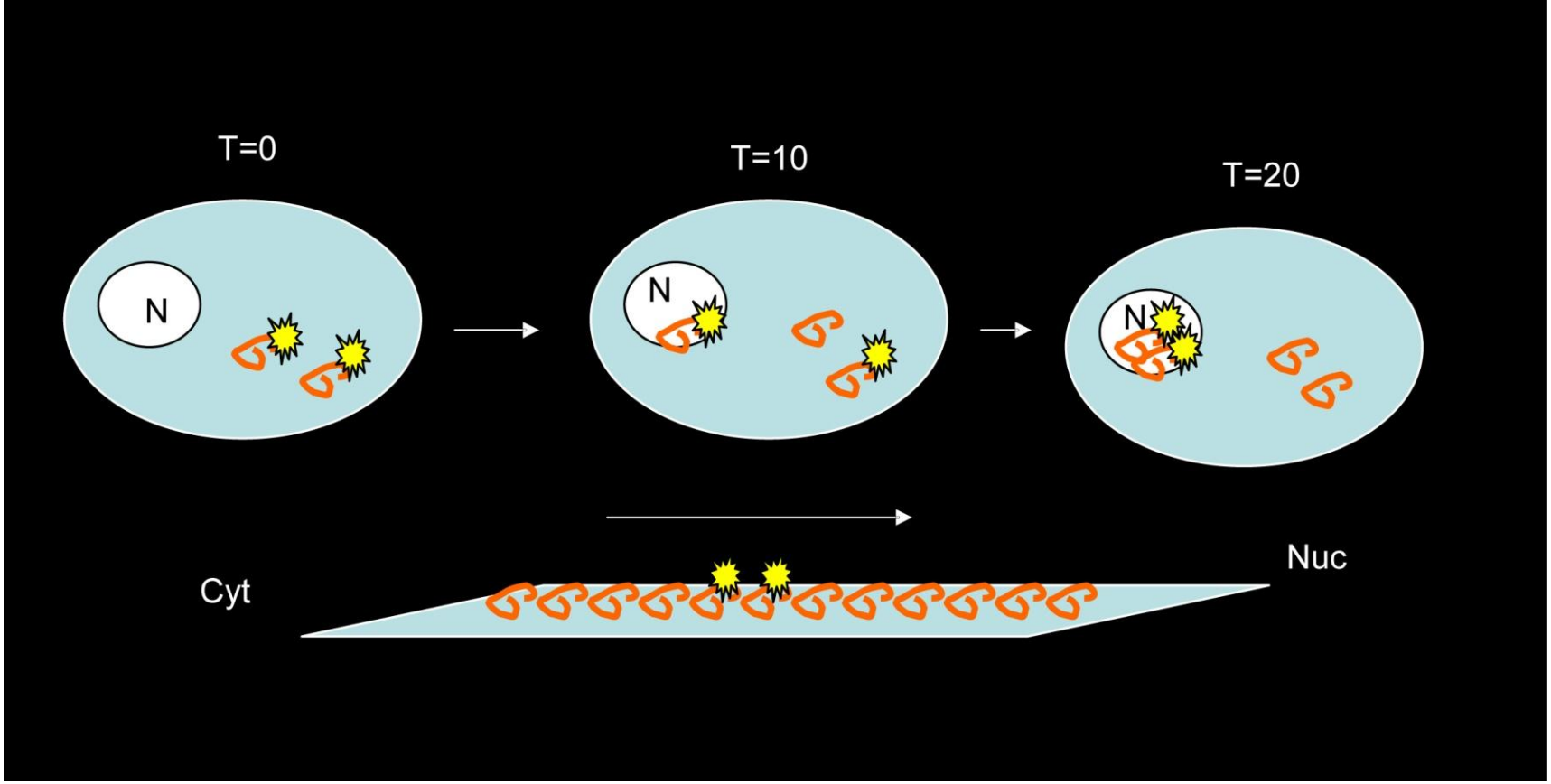
- Très utilisé dans:

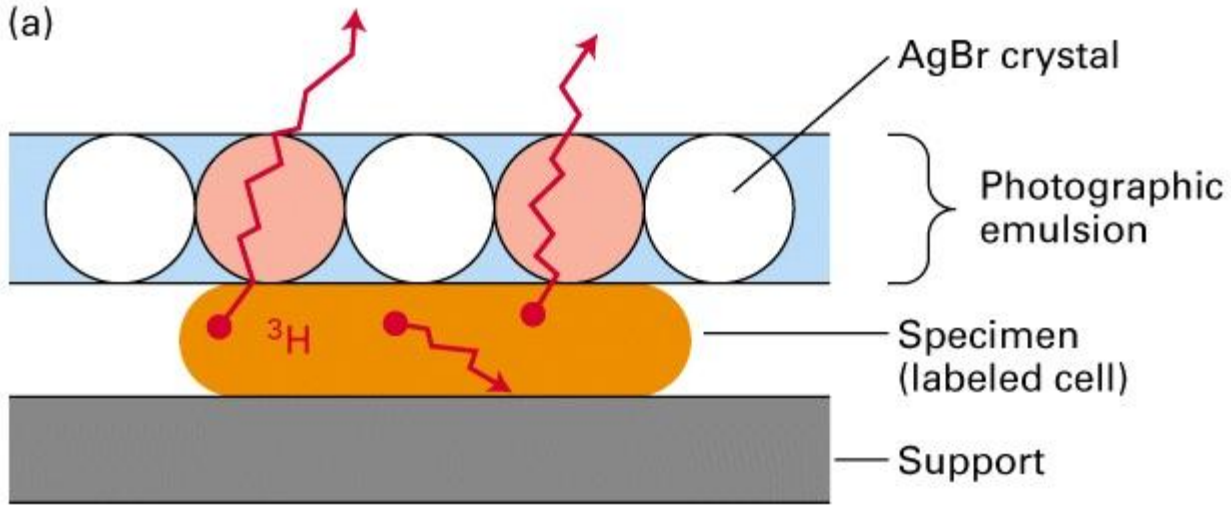
  - l'***hybridation in situ;***

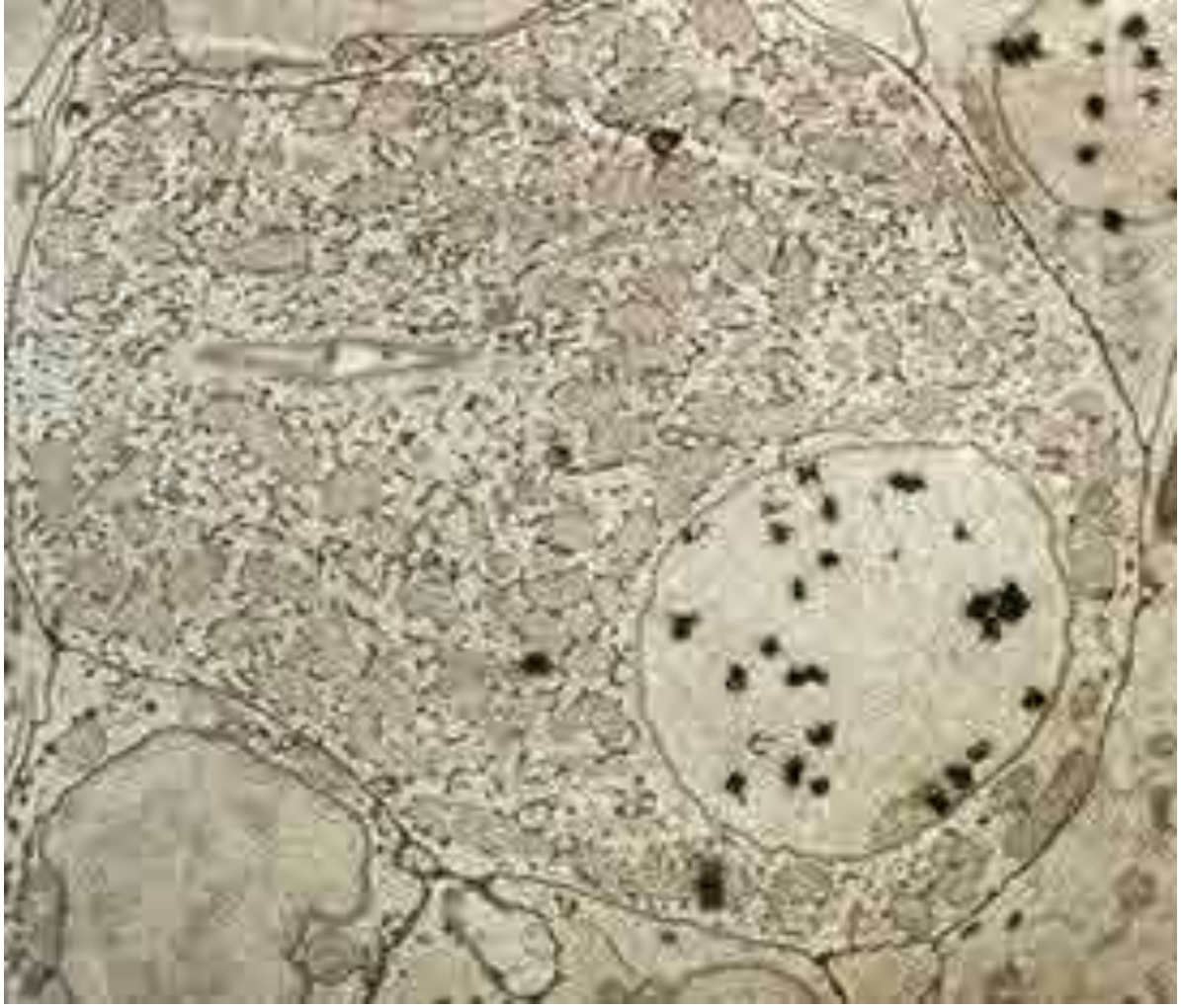
  - **Etude de la prolifération cellulaire**: on injecte à un animal de la **Thymidine Triciée** qui va s'incorporer dans l'ADN (dans les phases de synthèse de l'ADN et donc toute les cellules en phase de synthèse vont l'incorporer). On relèvera alors le nombre de noyau marqué par la Thymidine Triciée.

Détection de protéines et d'acides nucléiques par incorporation de molécules radioactives lors de leur synthèse

- acides aminés radioactifs : détection des protéines en synthèse
- thymidine radioactive : détection de l'ADN répliqué (croissance)
- uridine tritiée : détection de l'ARN en synthèse
- mannose et le fucose tritiés : glycosylation


T=0
T=10
T=20
N
N
N
Cyt
Nuc


(a)
AgBr crystal
Photographic emulsion
^3H
Specimen (labeled cell)
Support



Autoradiographie en microscopie électronique d'une cellule épithéliale provenant d'un animal auquel de la thymidine tritiée a été administrée quatre jours auparavant.
L'incorporation de thymidine tritiée dans le noyau, résulte d'une synthèse d'ADN utilisant cette base nucléotidique. Elle signe l'apparition d'une cellule nouvellement formée.

Méthodes de détection spécifiques et non-spécifiques

Méthodes enzymatiques	Méthodes radioautographiques	Méthodes fluorescentes
Formation d'un dépôt opaque à la lumière ou dense aux électrons (MO ou ME + densimétrie)	Formation de grains d'argent opaques à la lumière ou denses aux électrons (MO ou ME)	Composé fluorescent (spectrophotométrie, M. à épifluorescence, M. confocale à balayage)

2. Méthodes de Fractionnement et de séparation

Techniques de séparation et de purification concernant:

- les cellules entières → TRI CELLULAIRE → Cytophotométrie en flux
- les organites cellulaires → Fractionnement - Centrifugation
- les macromolécules biologiques → Electrophorèse - Chromatographie

2.1. Le tri cellulaire

But: obtention d'une variété de cellules aussi pure que possible.

- Permet de séparer différentes catégories de cellules selon qu'elles contiennent ou non une molécule particulière

- Les cellules sont :
  - incubées avec une **sonde fluorescente** qui reconnaît la molécule ciblée ou une propriété physico-chimique
  - bombardée par un ou plusieurs **faisceaux lasers** afin de donner une charge négative aux cellules fluorescentes séparées des cellules non-fluorescentes dans un champ électrique.

• Préparation d'une suspension cellulaire: traitement par:
  - ➢ enzymes qui éliminent la MEC;
  - ➢ Chélateurs du Calcium pour dissocier les cellules jointives
• Utilisation d'Anticorps pour la reconnaissance des cellules qui nous intéressent.

• **Cytomètrie de flux: les Ac sont liés à un fluorochrome**, et seront couplés à leur Ag.
  - ➢ La suspension sera passée dans une colonne qui débouche sur un interstice d'un diamètre d'une cellule.
  - ➢ Les cellules passeront l'une après l'autre devant un détecteur de fluorescence et l'appareil va pouvoir placer les cellules dans une gouttelette chargée positivement ou négativement en fonction de la détection du fluorochrome. Les cellules passeront devant un *déflecteur* qui déviera les gouttelettes chargées dans un sens ou dans l'autre.

Système extrêmement rapide.

FACS

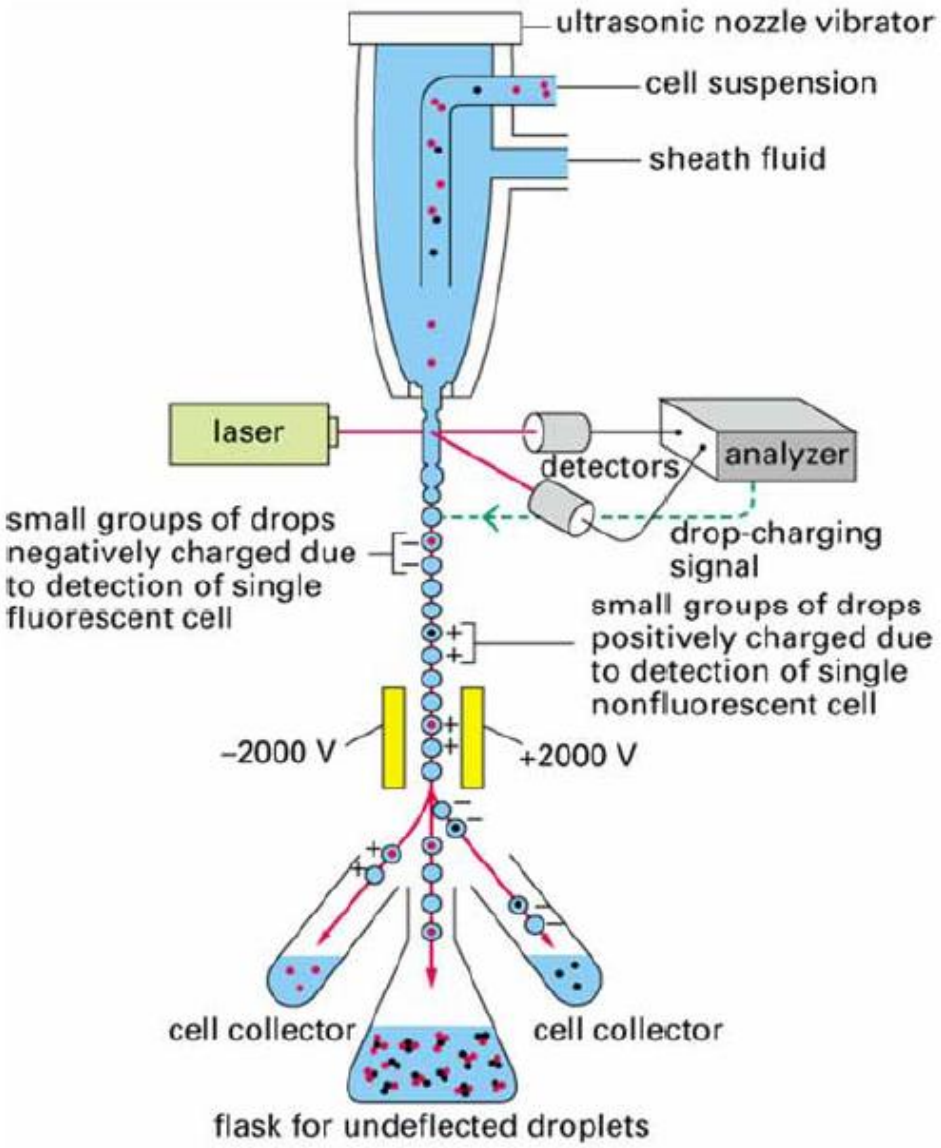
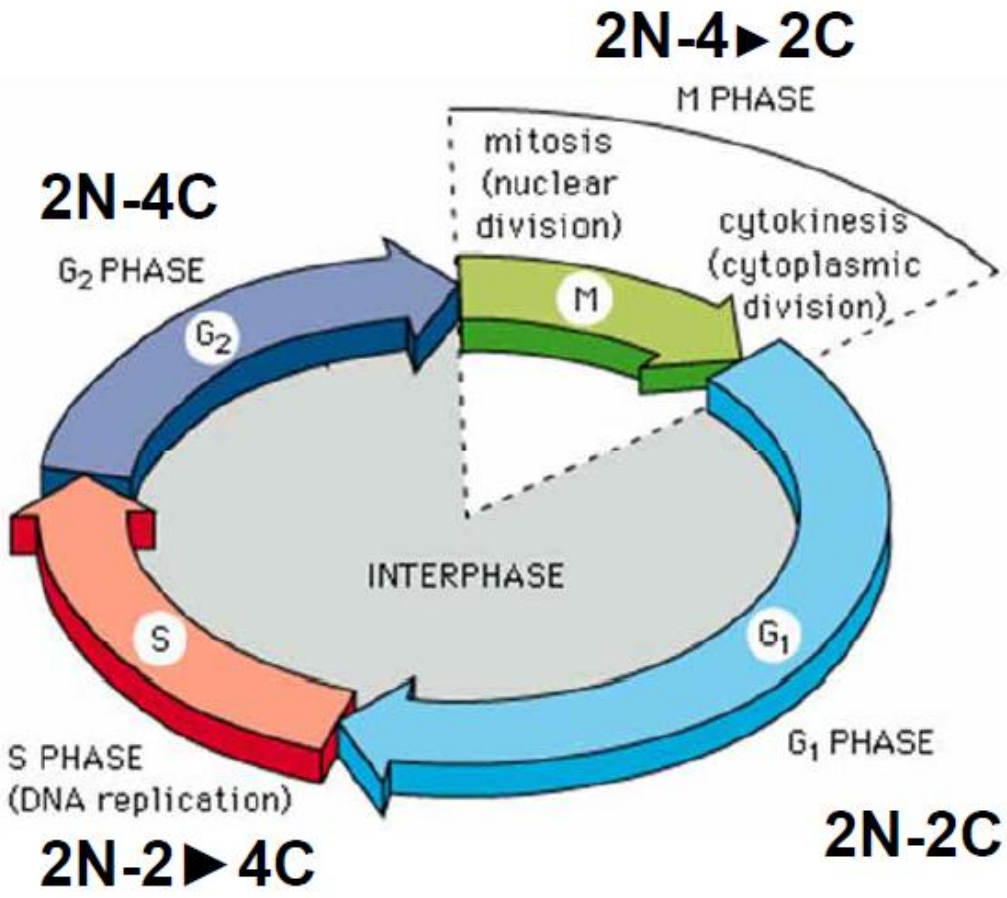


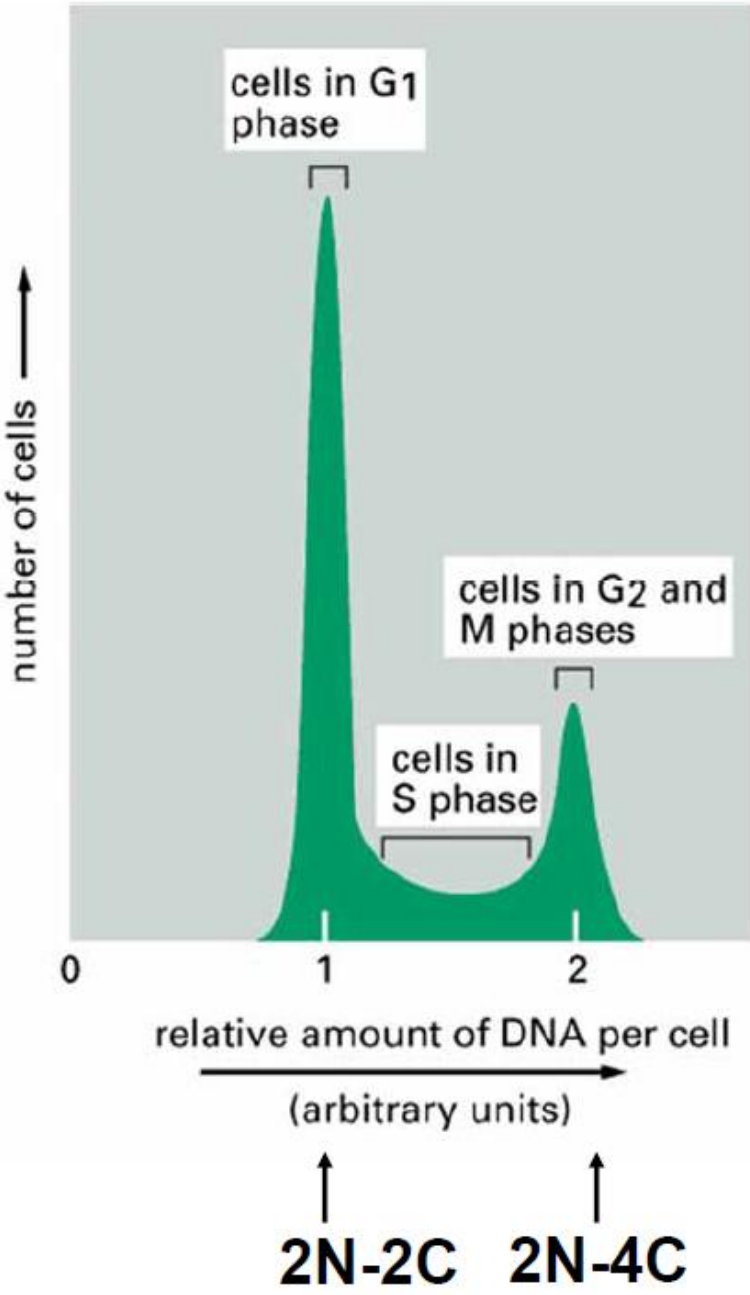
Figure 8–2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Cytométrie en flux

(*FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter*)

FACS


2N-4►2C
M PHASE
mitosis (nuclear division)
cytokinesis (cytoplasmic division)
2N-4C
G2 PHASE
G2
M
INTERPHASE
S
G1
S PHASE (DNA replication)
G1 PHASE
2N-2C
2N-2►4C


cells in G1 phase
cells in G2 and M phases
cells in S phase
number of cells
0
1
2
relative amount of DNA per cell
(arbitrary units)
2N-2C
2N-4C

2.2. Technique de Fractionnement cellulaire

Première étape: **Broyage cellulaire**

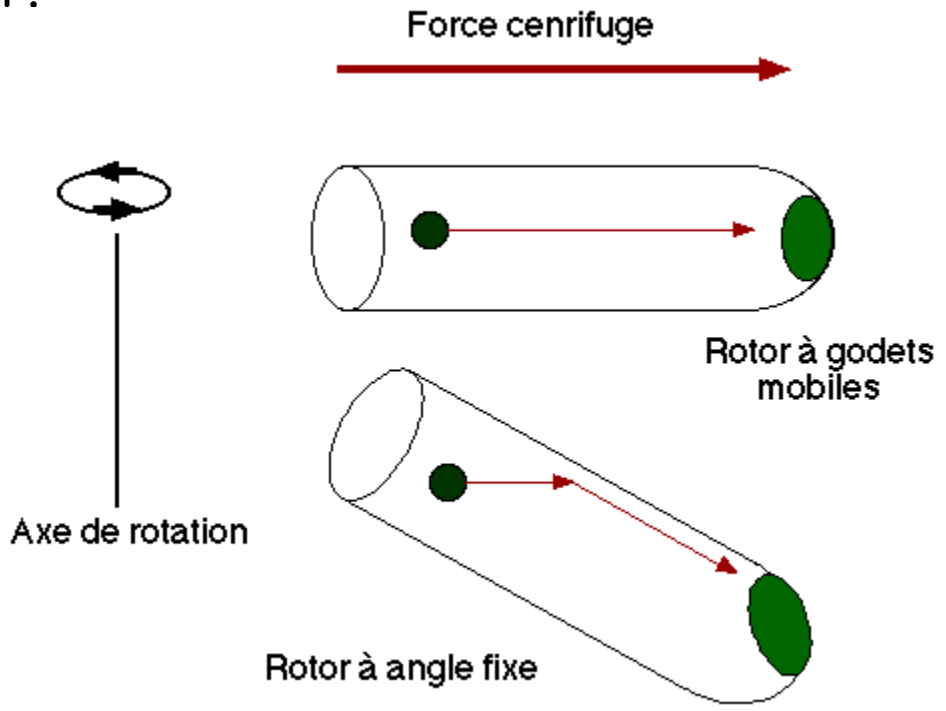
Destruction des membranes cytoplasmique par **broyage**

- Procédés mécaniques
  - Mortier;
  - Mixer;
  - Potter: Broyage grâce à un piston qui laminera le long de la paroi, on travaille généralement dans la glace pour préserver les petites structures
- Choc osmotique: Eclatement des cellules dans un milieu **hypotonique**
- Utilisation **d'Ultrason**

Après broyage, on obtient un homogénat qui devra être fractionné par **centrifugation**

2.3. Centrifugation

En mettant une préparation biochimique dans le rotor d'une centrifugeuse et en faisant tourner celui-ci, les particules qui la composent vont se déplacer le fond du tube à centrifuger.



- Chaque particule donnée a une vitesse spécifique de sédimentation lors d'une centrifugation (en fonction de sa masse, sa densité et de sa morphologie) =

Coefficient de sédimentation (en unités Svedberg (S)).

- Plus une particule est massive ou dense, plus son S sera élevé.

- Cette unité de "taille" est particulièrement employée pour caractériser les particules ribosomiques.

Centrifugation différentielle:

Elle permet de séparer les particules
(organite, macromolécule, ...)
en fonction de leur taille par une succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissants.

RUPTURE DES CELLULES

homogénat cellulaire

CENTRIFUGATION A BASSE VITESSE
1000g X 10 min

cellules entières
noyau
cytosquelette

CENTRIFUGATION A VITESSE INTERMEDIAIRE
20 000g X 20 min

mitochondries
peroxysomes
lysosomes

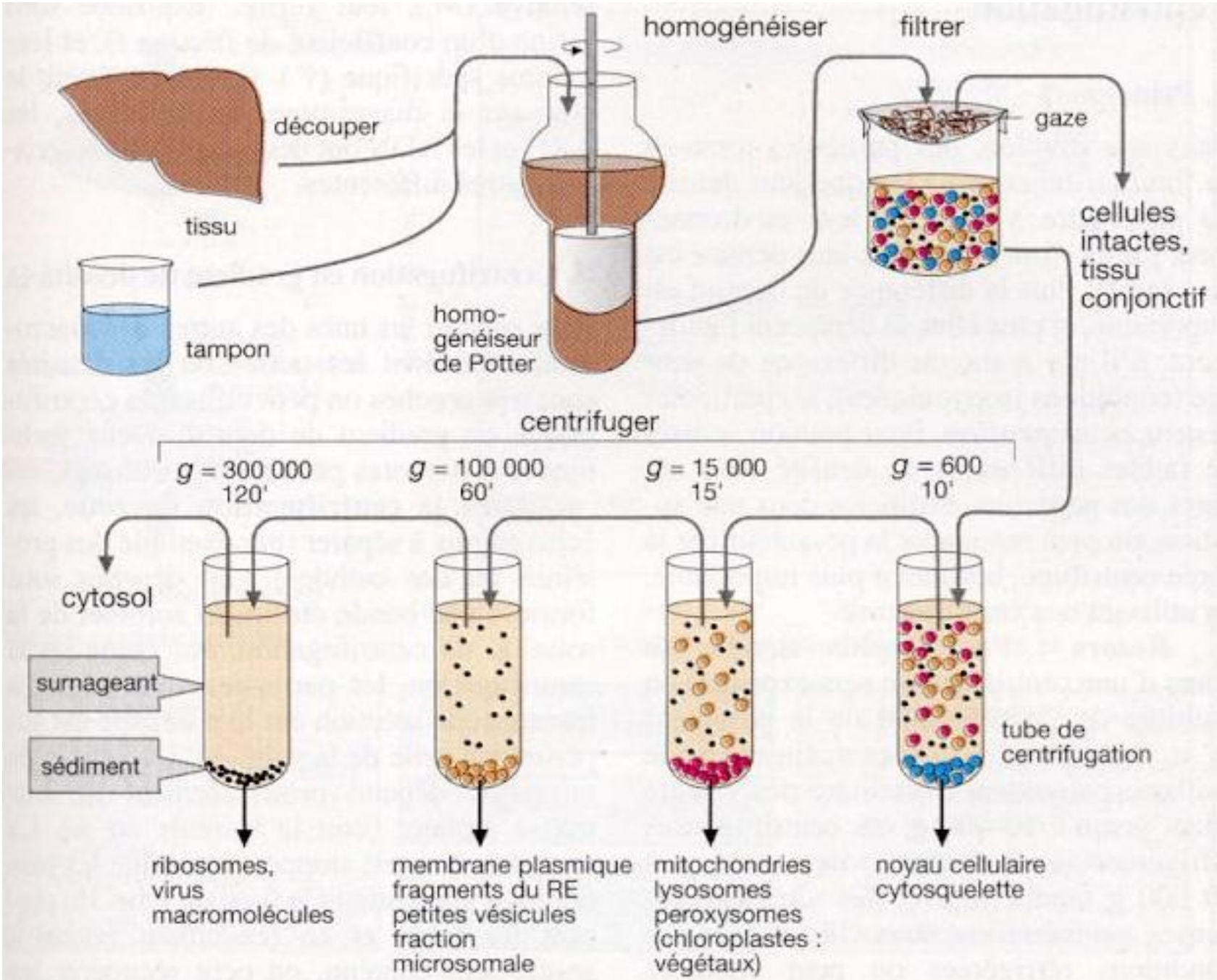
CENTRIFUGATION A HAUTE VITESSE
80 000g X 1 h

microsomes
petites vésicules

CENTRIFUGATION A TRES HAUTE VITESSE
150 000g X 3 h

ribosomes
virus
grandes
macromolécules

= séparation en fonction de la taille et de la densité

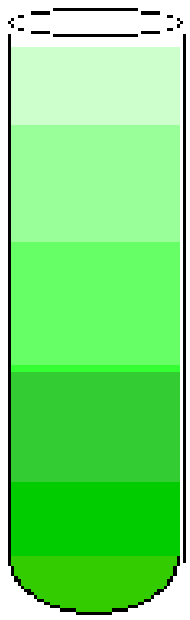


A. Isolement des organites cellulaires

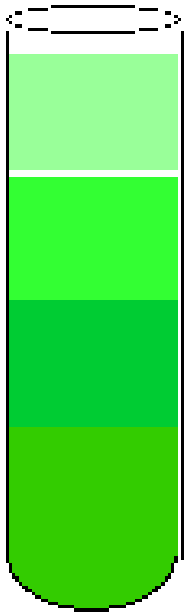
Centrifugation en gradient de densité

La vitesse de sédimentation d'une particule (organite, macromolécule, ...) est fonction de la différence entre sa densité et celle du milieu ambiant.
Les variations de densités sont obtenues en faisant varier la concentration d'un produit chimique qui doit être très solubles dans l'eau. Divers produits peuvent être utilisés pour faire ces gradients.

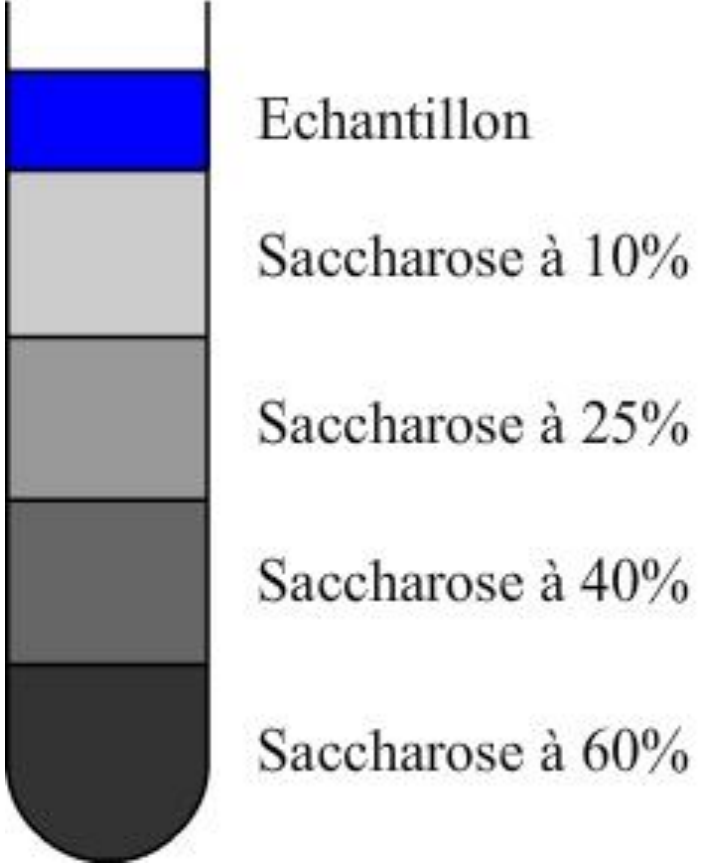
Exemples: Saccharose (gradient préformé), Césium (gradient formé au cours de la centrifugation).



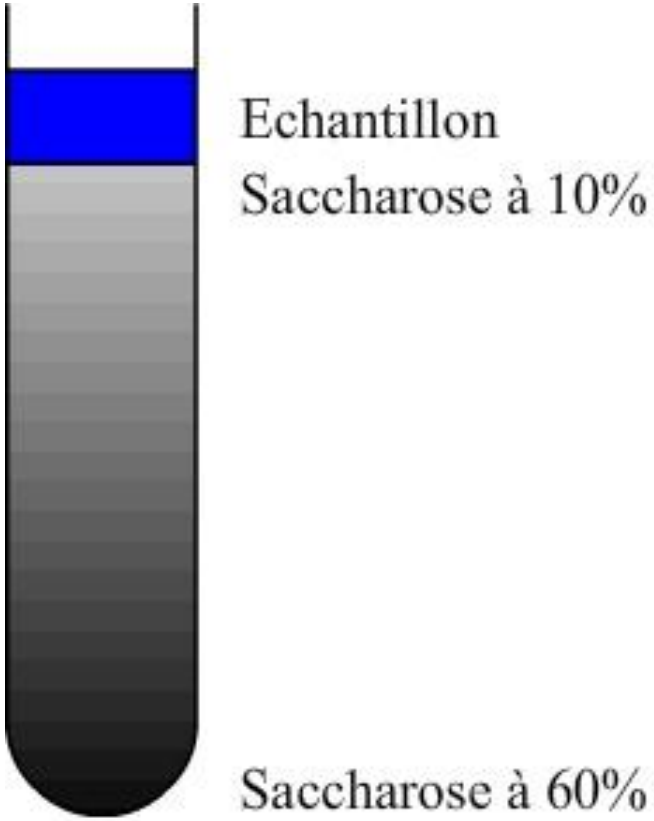
gradient continu



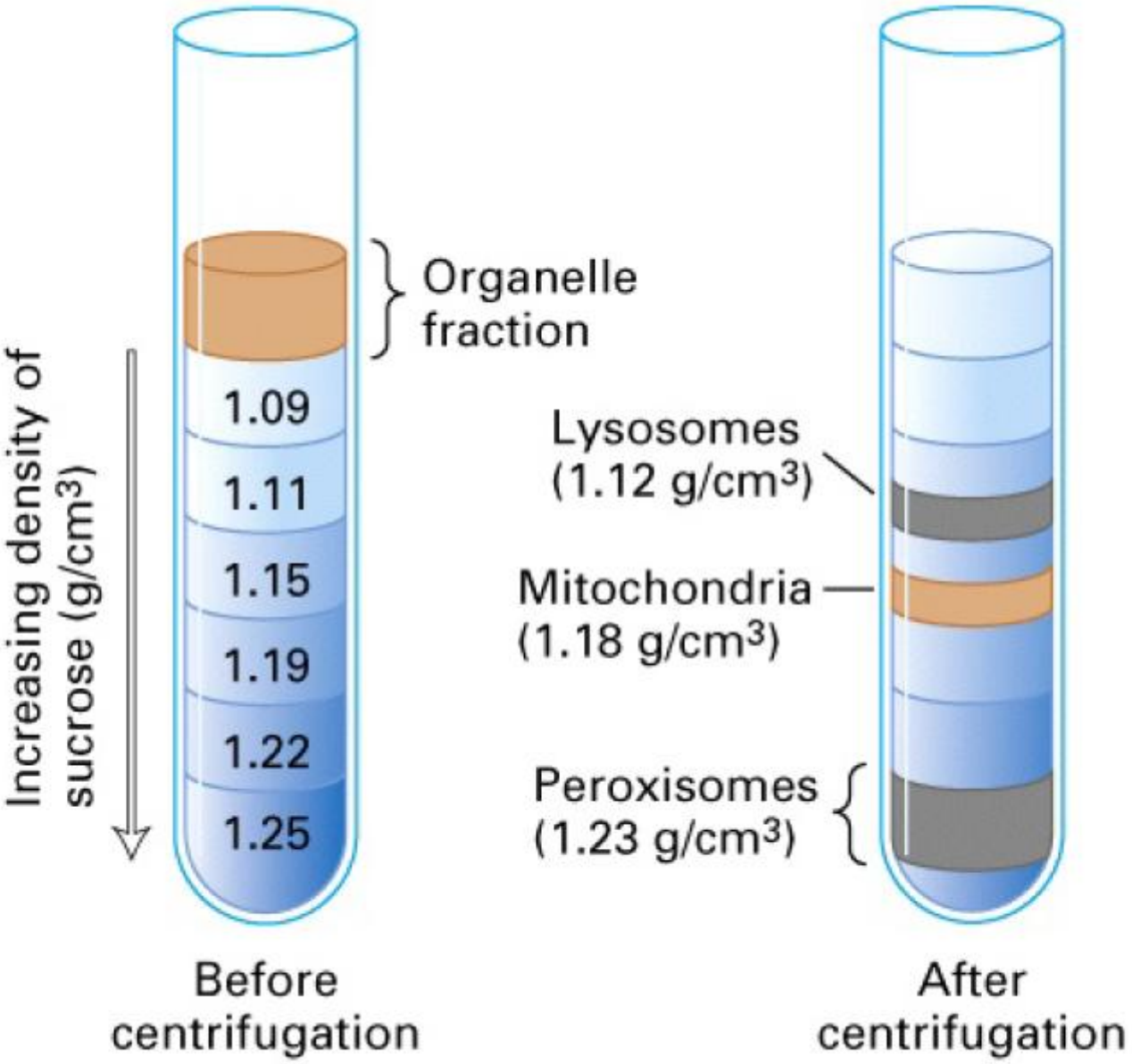
gradient discontinu

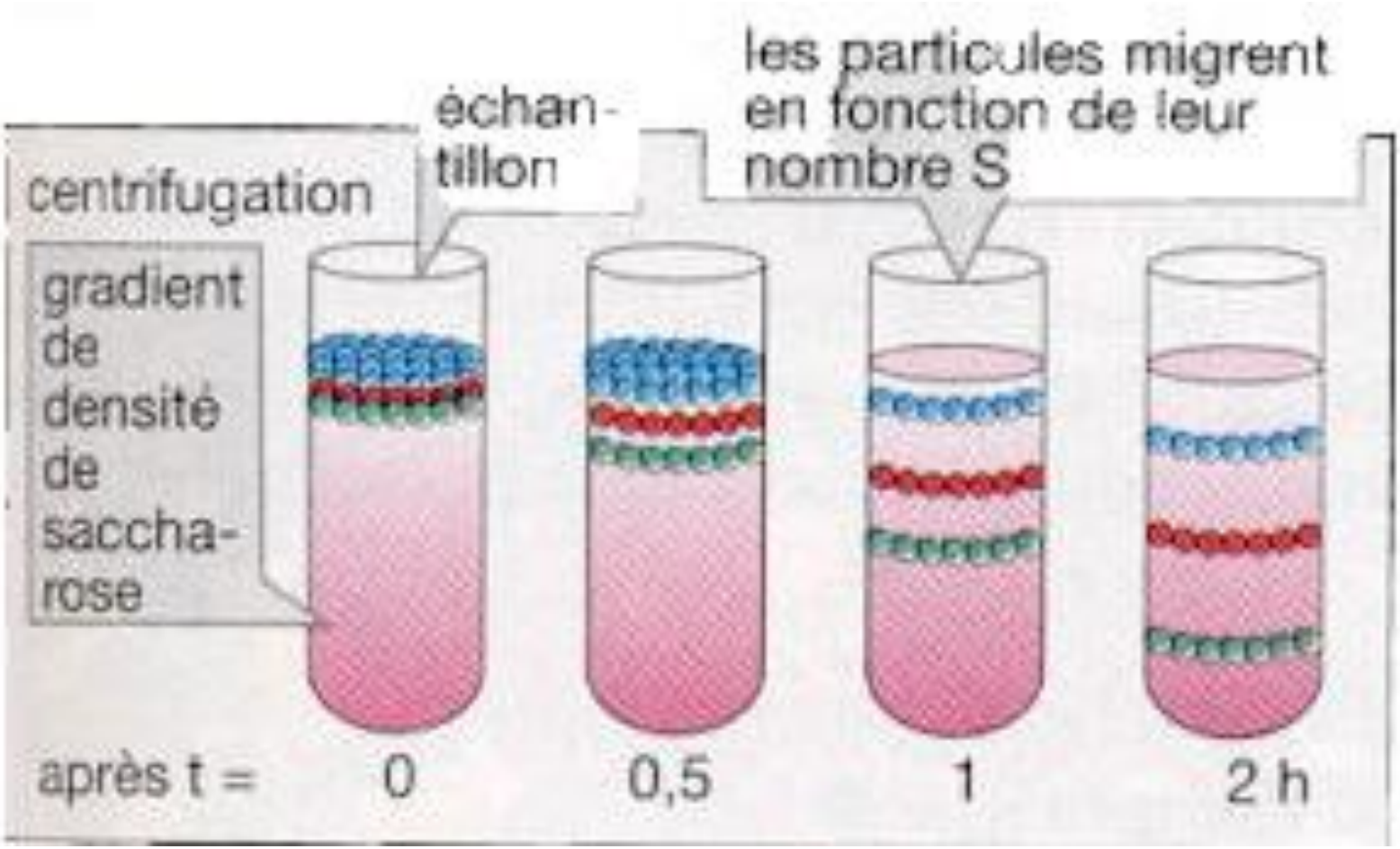


Exemple de gradient discontinu. L'échantillon a été représenté au sommet ce qui suppose qu'il soit moins dense que la première couche de solution de saccharose. Il arrive qu'on place l'échantillon au fond, au besoin en ayant au préalable augmenté sa densité en ajoutant du saccharose (par exemple).



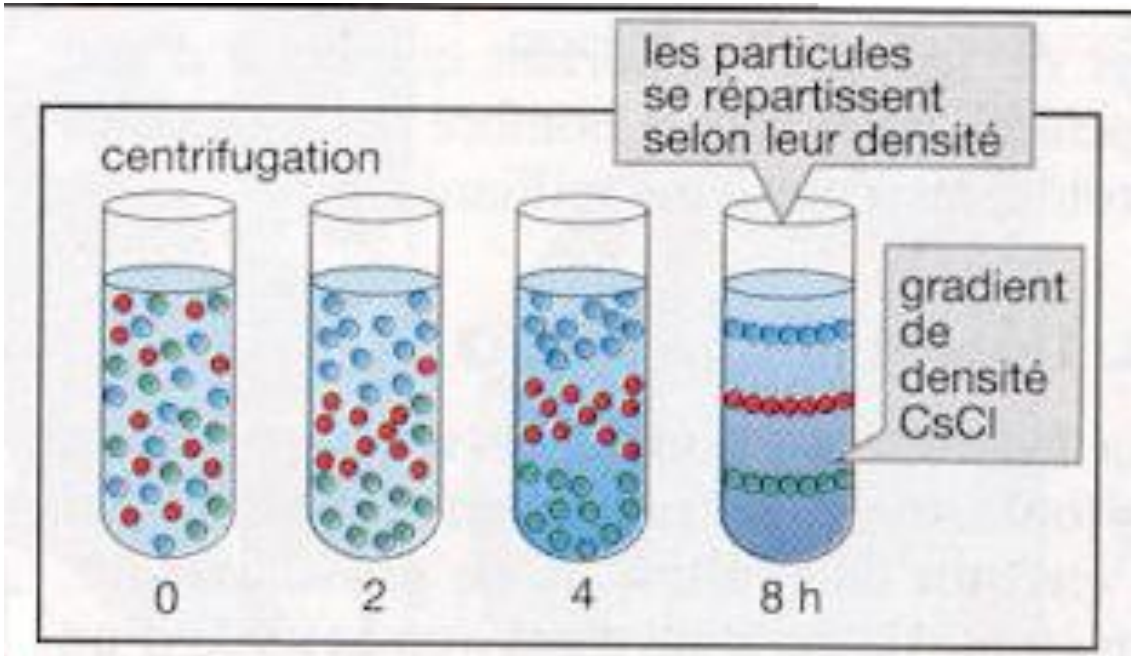
Exemple de gradient continu. Le gradient peut être linéaire (cas présenté) mais aussi exponentiel ou logarithmique selon les besoins. On le coule en faisant varier en continu le débit de deux pompes qui mélangent deux solutions, l'une à 10% et l'autre à 60% de saccharose dans le cas présent.


Increasing density of sucrose (g/cm³)
Organelle fraction
1.09
1.11
1.15
1.19
1.22
1.25
Lysosomes (1.12 g/cm³)
Mitochondria (1.18 g/cm³)
Peroxisomes (1.23 g/cm³)
Before centrifugation
After centrifugation

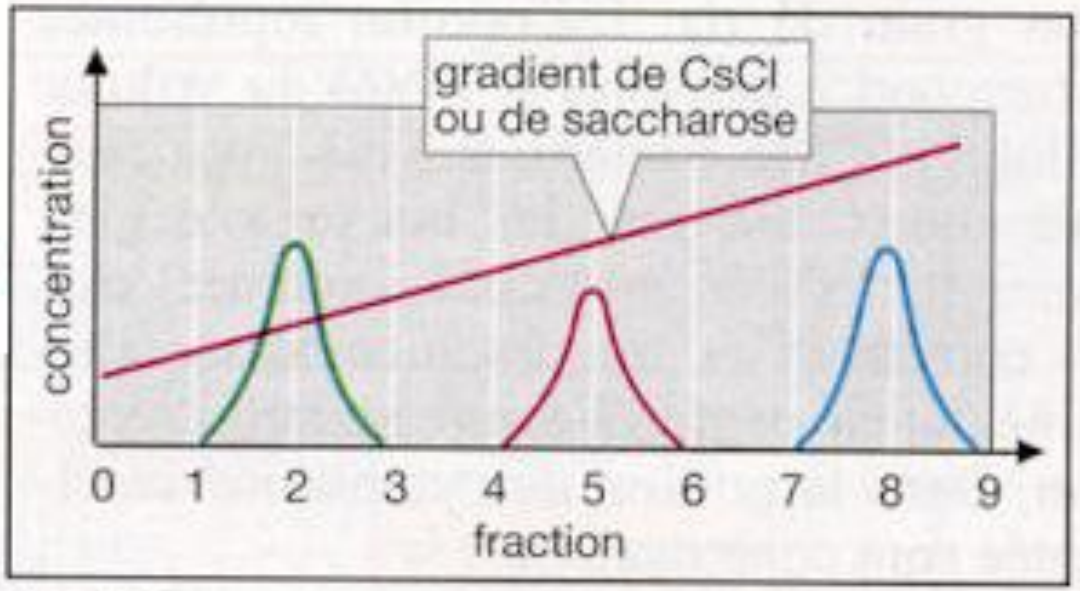


La sédimentation en
gradient de saccharose
sépare les macromolécules
en fonction de leur masse moléculaire

Une centrifugation en gradient de Chlorure de Césium sépare les macromolécules en fonction de leur densité



centrifugation isopycnique

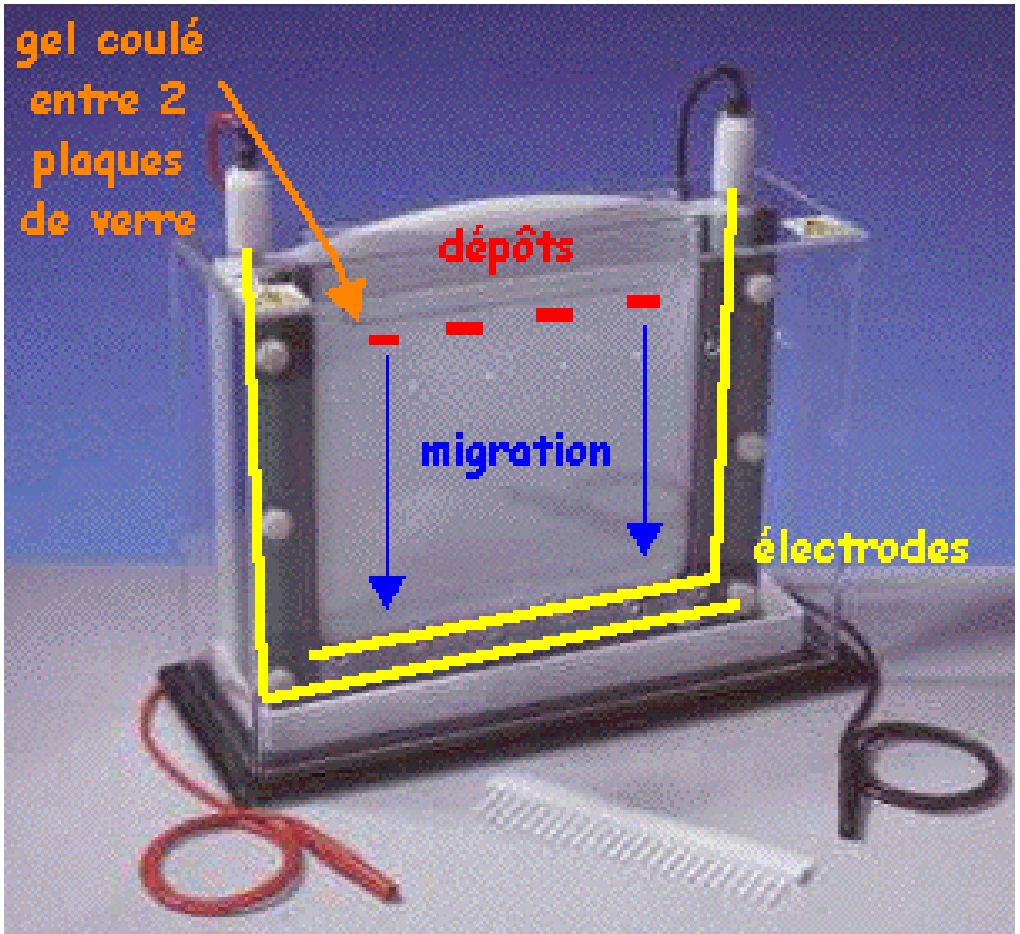


mesure

2.4. L'électrophorèse

La migration différentielle de molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique est à la base de cette technique de fractionnement.

*Ex: Les acides aminés sont séparables et identifiables par cette technique par leur **dissociation acido-basique**.*



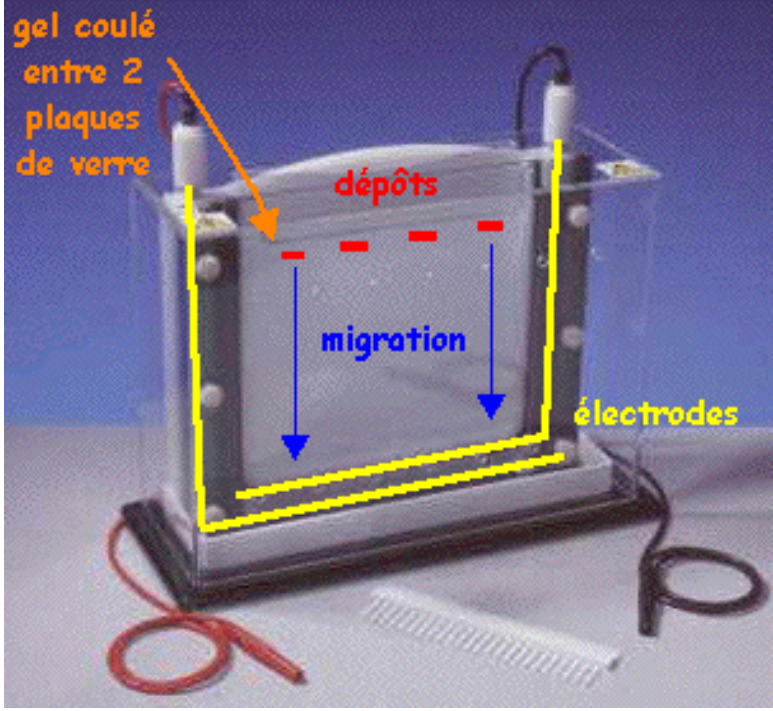
Le système est composé de:

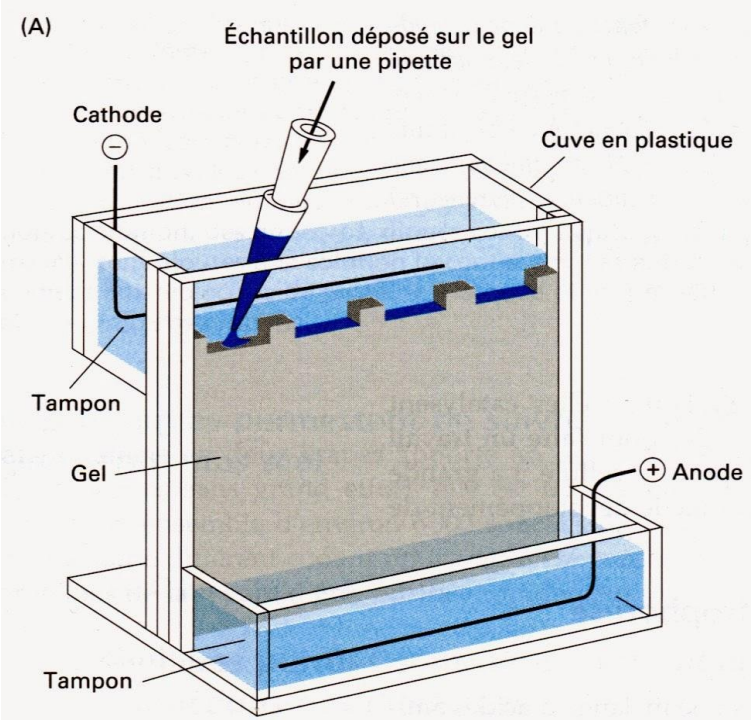
- 2 plaques de verre entre lesquelles est coulé un **gel d'agarose** ou **d'acrylamide;**

- le gel est creusé de puits recevant les échantillons à étudier;

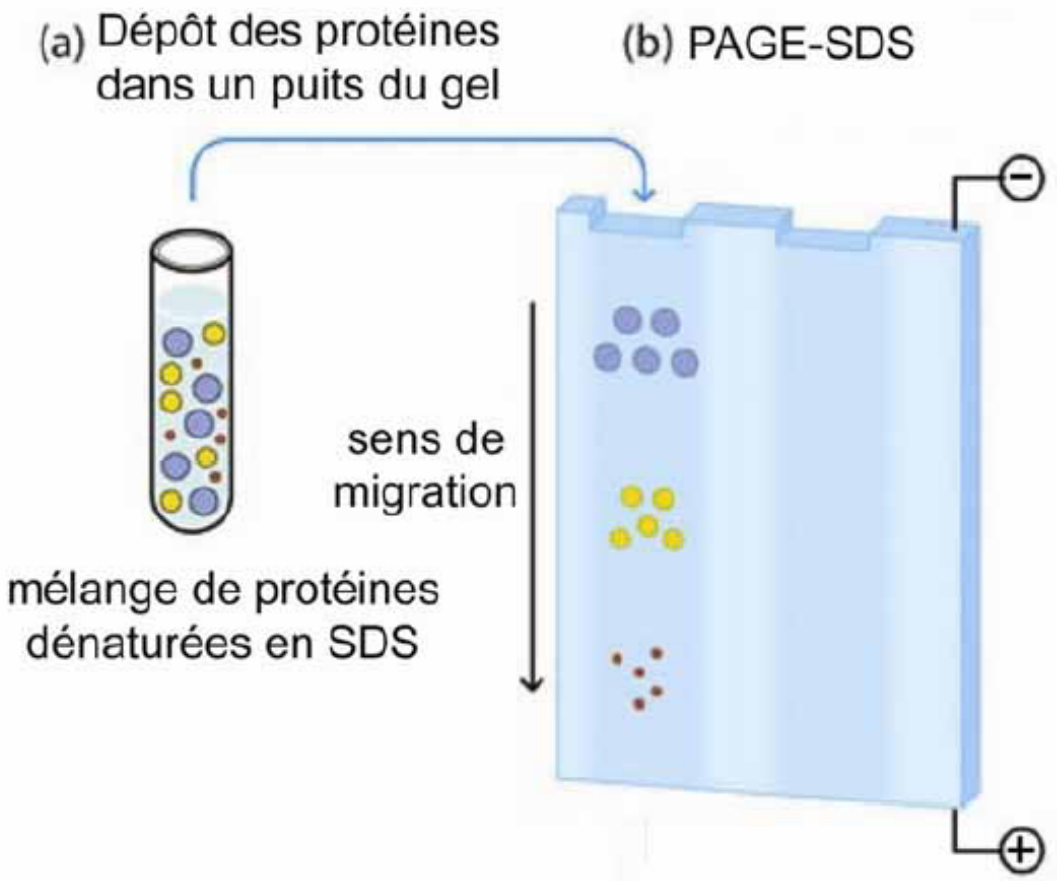
- de part et d'autre de la plaque, se disposent cathode et anode au contact du tampon de migration (solution riche en ions pour la conduction de l'électricité) ;

- Une différence de potentiel entre les électrodes est réalisée par un courant continu haut voltage.





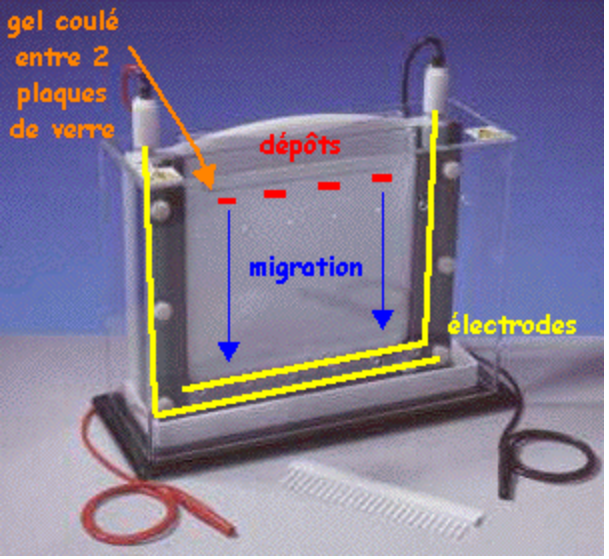
Préparation et séparation des protéines



P

Dans l'électrophorèse, c'est un courant électrique qui entraîne les molécules. Seules celles qui sont chargées se déplaceront.

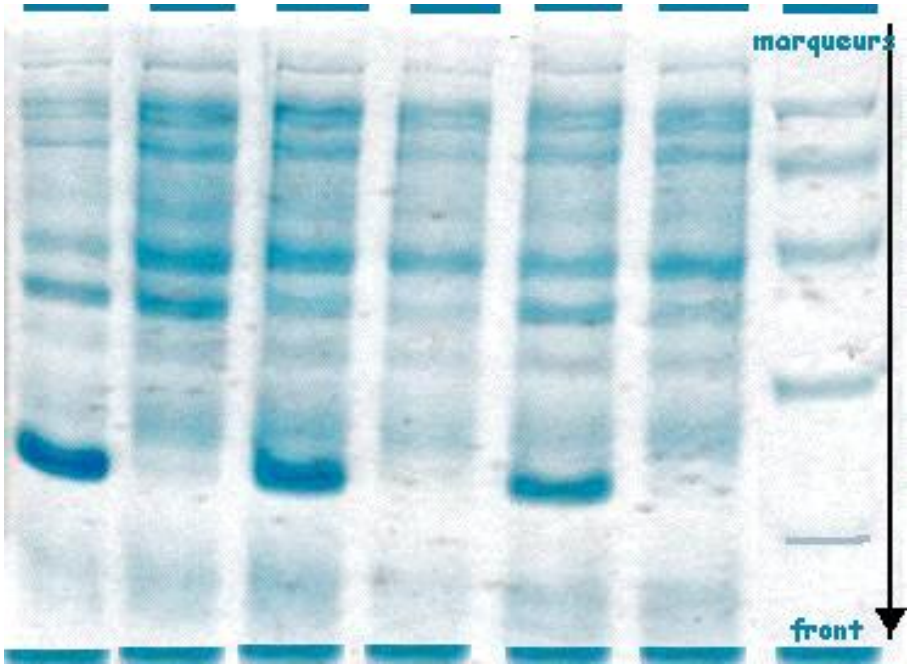
Plus les composés auront des charges importantes et plus vite ils migreront



Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel.

Les protéines sont révélées par une coloration : par exemple avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible).

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration). La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).



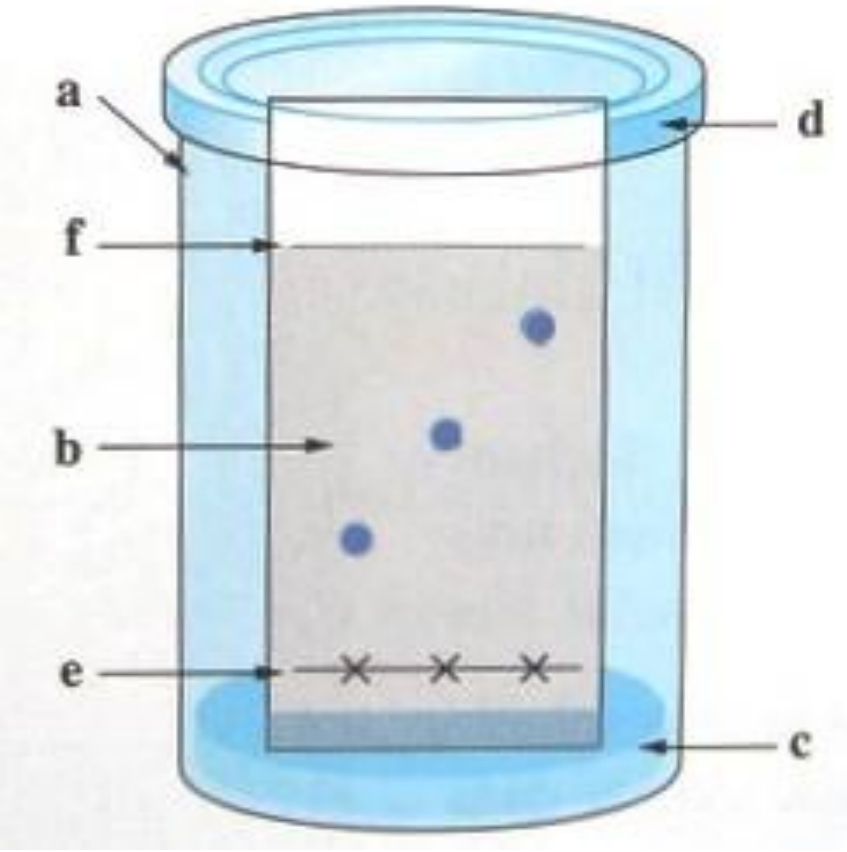
2.5. La Chromatographie

- La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la ***phase stationnaire*** et la ***phase mobile*** qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange.

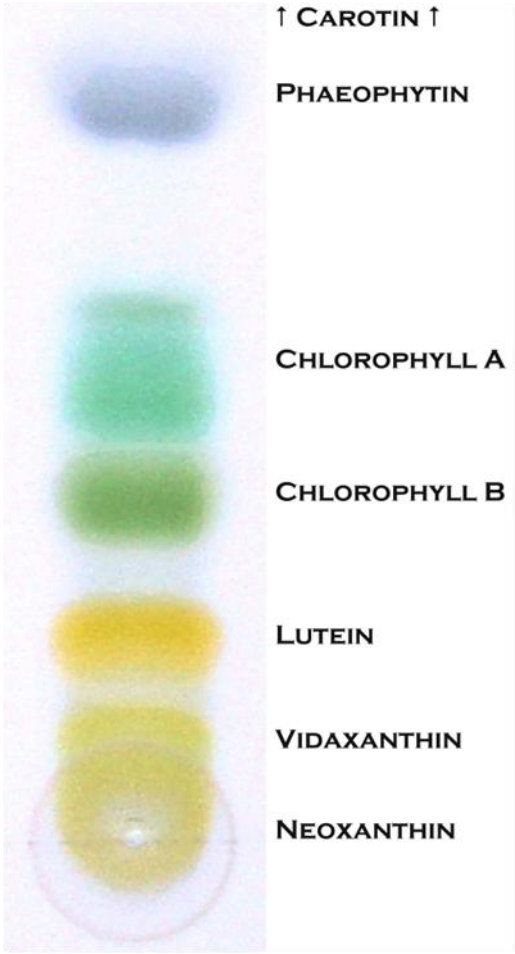
- La phase stationnaire est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane.
- La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.
- L'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

2.5. La Chromatographie

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de **deux phases**, l'une **stationnaire ou fixe**, l'autre **mobile**.

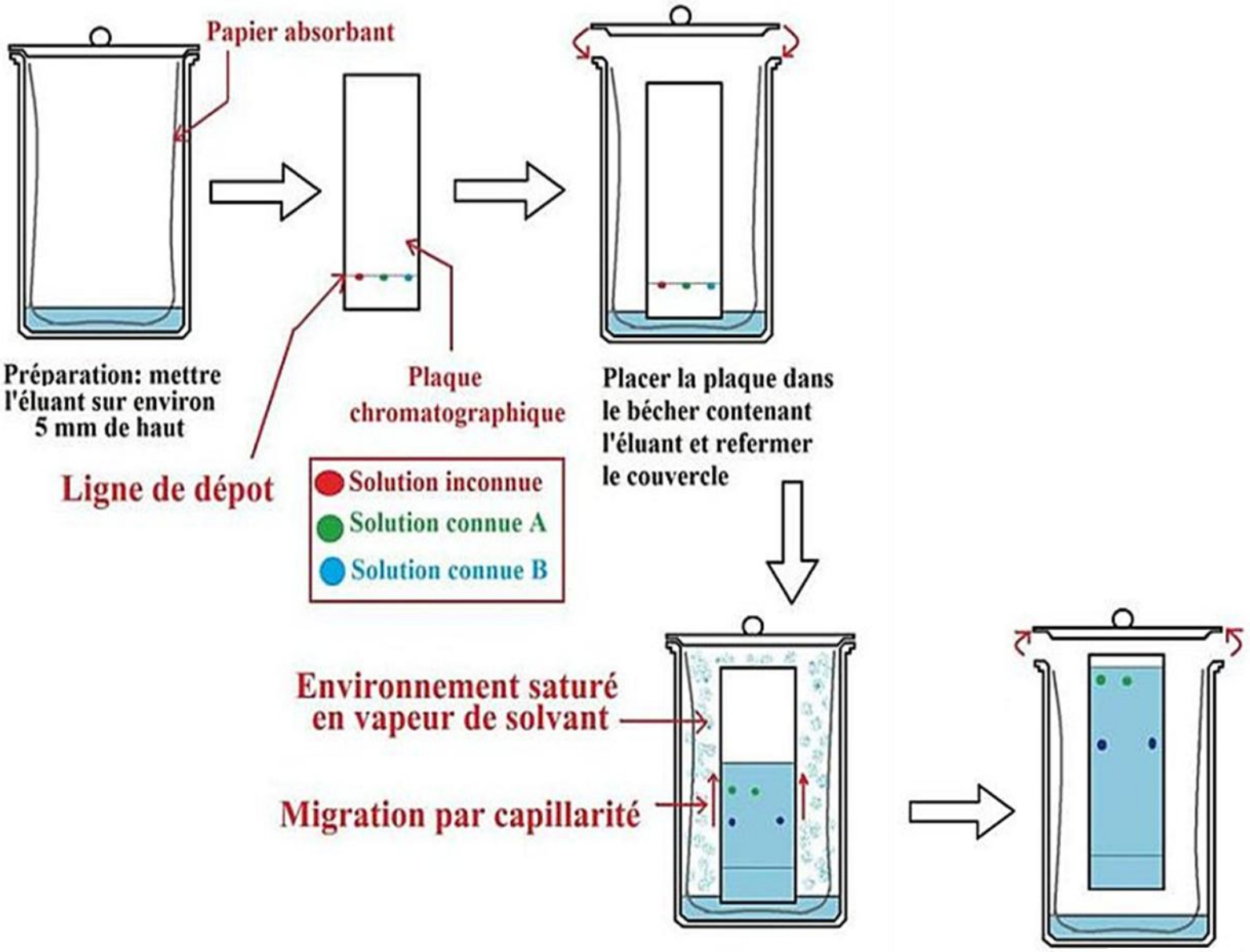


a: colonne; b: papier Whatman *(phase stationnaire)*; c: Eluant *(phase mobile)*; d: couvercle de la colonne; e: ligne de départ où sont déposés les échantillons; f: front de migrations

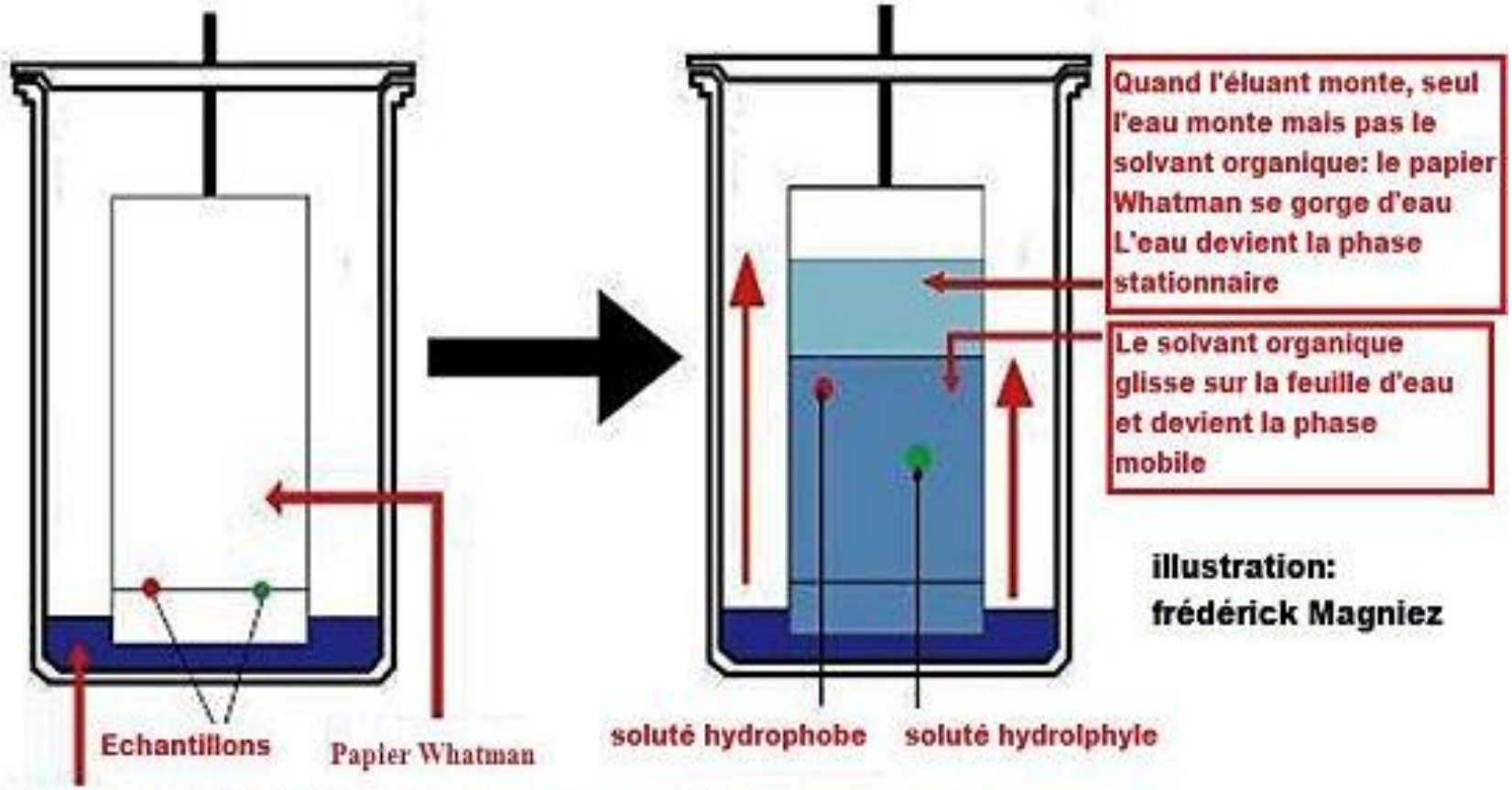


Exemple:

séparation par chromatographie de pigments photosynthétiques



CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE



Chromatographie sur papier unidimensionnelle en phase normale

➢Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur **adsorption** et de leur **désorption** successives sur la phase stationnaire, soit de leur **solubilité différente** dans chaque phase: On définit un **«Coefficient de partition K »**.

➢La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la **colonne**. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à:

- leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...);
- ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

A leur arrivée en bout de colonne, le **détecteur** mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

LES DIFFERENTS TYPES DE TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES :

Classification des chromatographies en fonction des mécanismes de séparation :

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont :

- la solubilité dans un solvant liquide,
- la taille (la forme),
- la polarité,
- la charge électrique,
- la présence de groupernents d'atomes formant des sites particuliers.

Les différents types de chromatographie résultent

Les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un des facteurs suivants, afin de séparer des composés constituant un mélange :

- la solubilité dans un solvant liquide : dans la chromatographie de partage

- la taille, la forme : dans la chromatographie d'exclusion

- la polarité : dans la chromatographie d'adsorption, et d'adsorption en phase inversées

- la charge électrique : dans la chromatographie par échange d'ions

- la présence de groupernents d'atomes formant des sites particuliers : dans la chromatographie d'affinité

Classification

Selon la technologie mise en œuvre

- –Chromatographie **sur colonne**
- –Chromatographie **de surface** :sur papier ou sur couche mince (CCM)

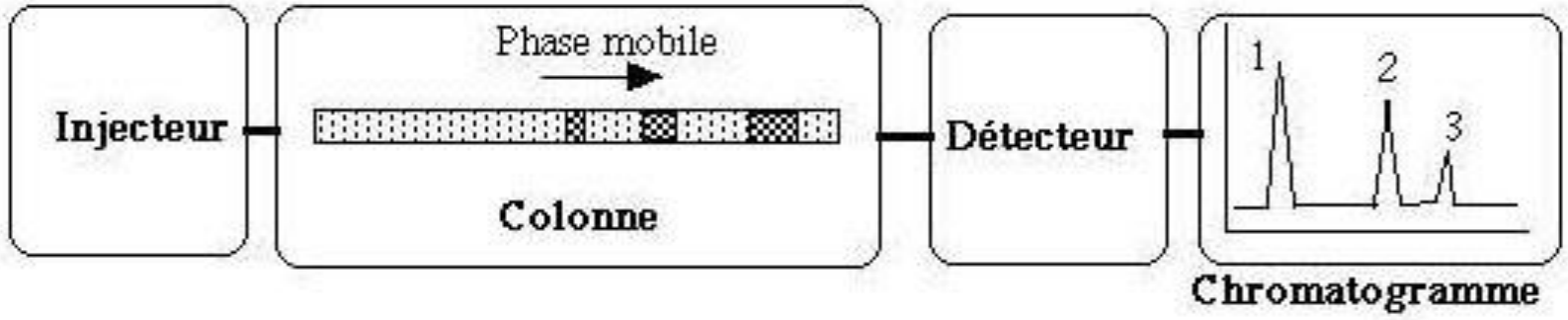
Selon la nature des phases

- **–Selon la nature de la phase mobile on distingue:**
  - •la chromatographie en phase liquide **CPL**
  - •la chromatographie en phase gazeuse **CPG**
  - •la chromatographie en phase supercritique **CPS**
- **–Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:**
  - •la chromatographie gaz / solide **CGS**
  - •la chromatographie gaz / liquide **CGL**
  - •la chromatographie liquide / solide **CLS**
  - •la chromatographie liquide / liquide **CLL**

Selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation

- **•La chromatographie d'adsorption** basée sur les processus répétés d'adsorption/désorption par la phase stationnaire (solide)
- **•La chromatographie de partage** basée sur les différences de solubilité des molécules entre la phase stationnaire (liquide) et la phase mobile
- **•La chromatographie d'échange d'ions** Échange entre une phase stationnaire ionisée et un soluté ionisé ou ionisable
- **•La chromatographie d'exclusion** basée sur la séparation des molécules en fonction de leur taille
- **•La chromatographie d'affinité** Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple

Schéma simplifié de la chromatographie



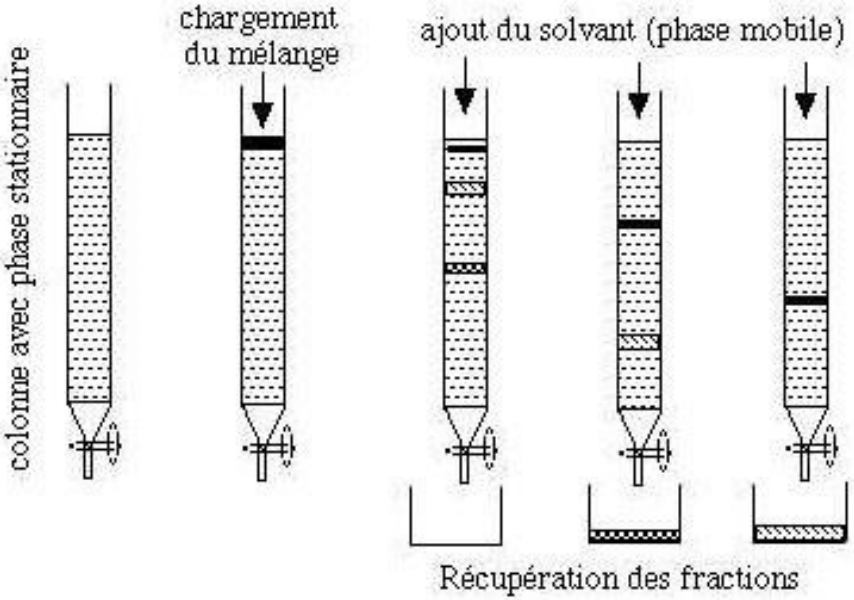


Schéma simplifié d'une chromatographie liquide

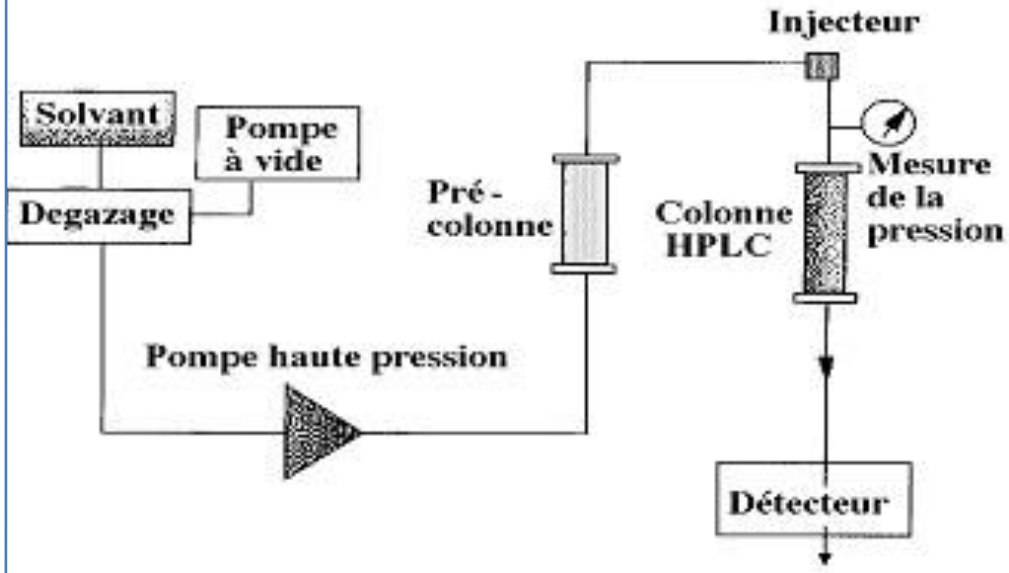


Schéma simplifié d'un chromatographe HPLC

III. Méthodes Physiologiques

Culturelles cellulaires

Ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex-vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation in vitro

Les cellules mises en culture peuvent être:
-Des cellules animales
-Des cellules végétales;
-Des micro-organismes (bactéries, levures)

Techniques de culture cellulaire

- Les cellules
- Les milieux de culture
- Les contenants
- L'environnement
- L'entretien

1. Culture des cellules animales

Les cellules mises en culture peuvent être:

- des cellules « saines » prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie,...), on parle alors de « culture primaire ». Ces cellules ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment;

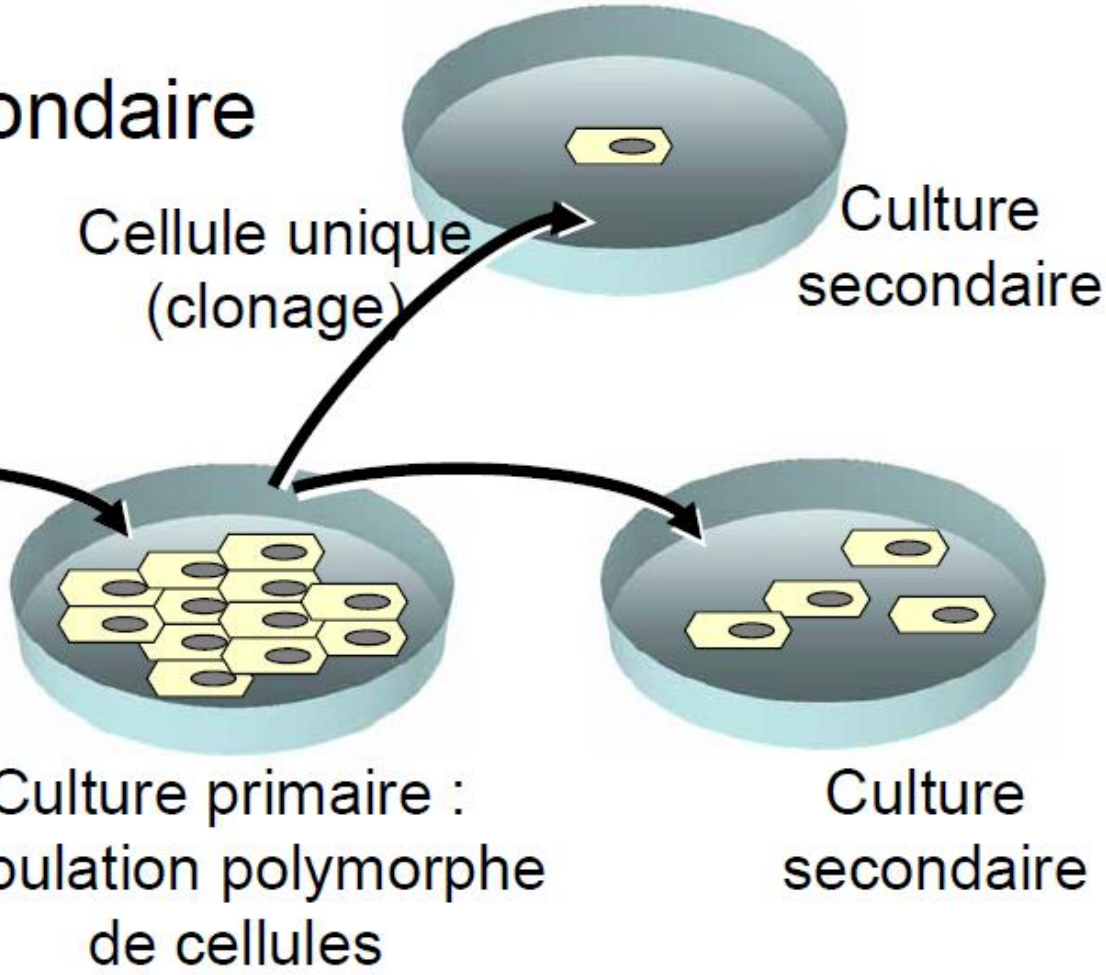
- des cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'« immortalité en culture »). Ce sont des lignées cellulaires (cellules cancéreuses, cellules en voie de cancérisation, cellules saines rendues « immortelles » artificiellement ou des cellules souches);

- Des tranches d'organes.

Certaines cellules sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes), d'autres sur des plastiques traités leur offrant des capacités d'adhérence. Ces supports peuvent prendre la forme de boîtes de différents formats ou de *flasks*.

Culture cellulaire

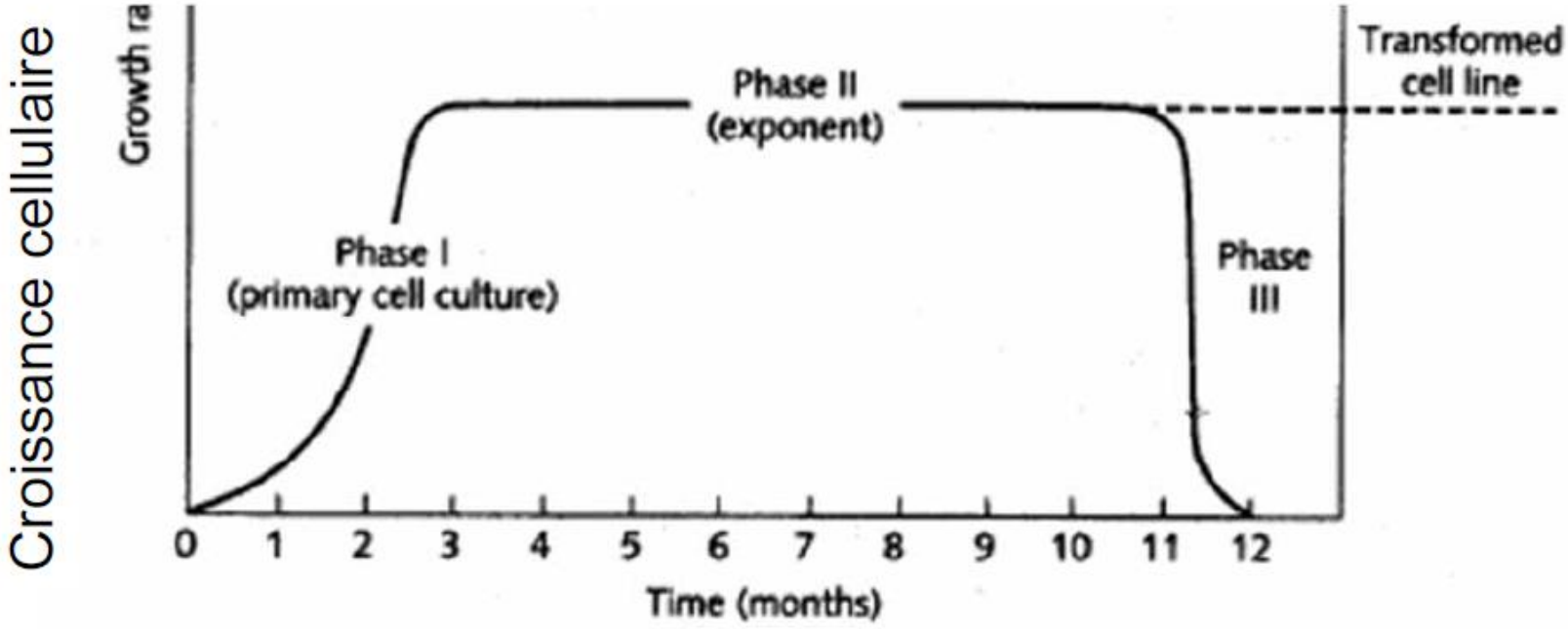
- Culture primaire
- Culture secondaire



Culture cellulaire

Immortalisation

– Les cellules normales ont un nombre de divisions limité



Culture cellulaire

Immortalisation

- Introduction d'un oncogène (SV 40, Myc) qui immortalise la cellule sans la rendre tumorale

- Cellules tumorales
  - exple : He(nrietta) La(cks)

Culture cellulaire

Cellule normale

Cellule immortalisée

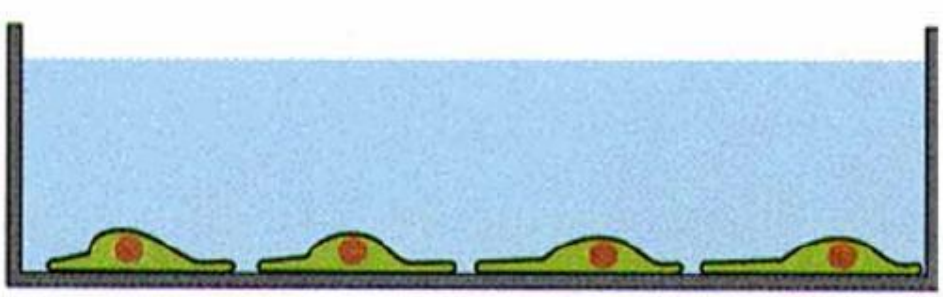
Cellule transformée

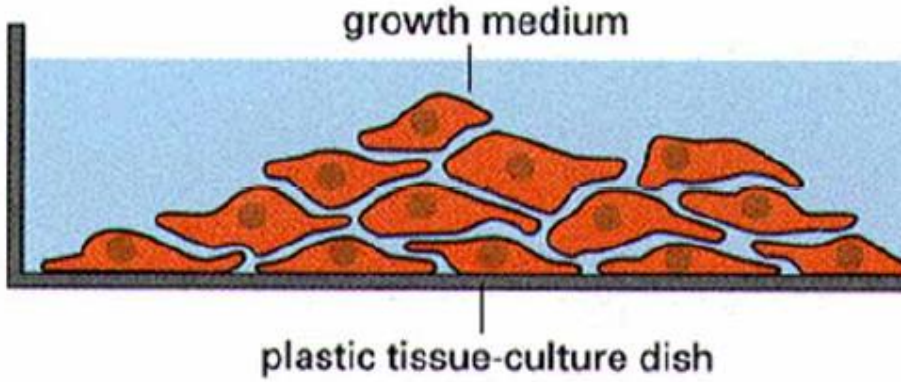
Divisions

Ancrage,
Fact. Croiss.,
Inhib. Contact.

Cellules normales

cellules cancéreuses

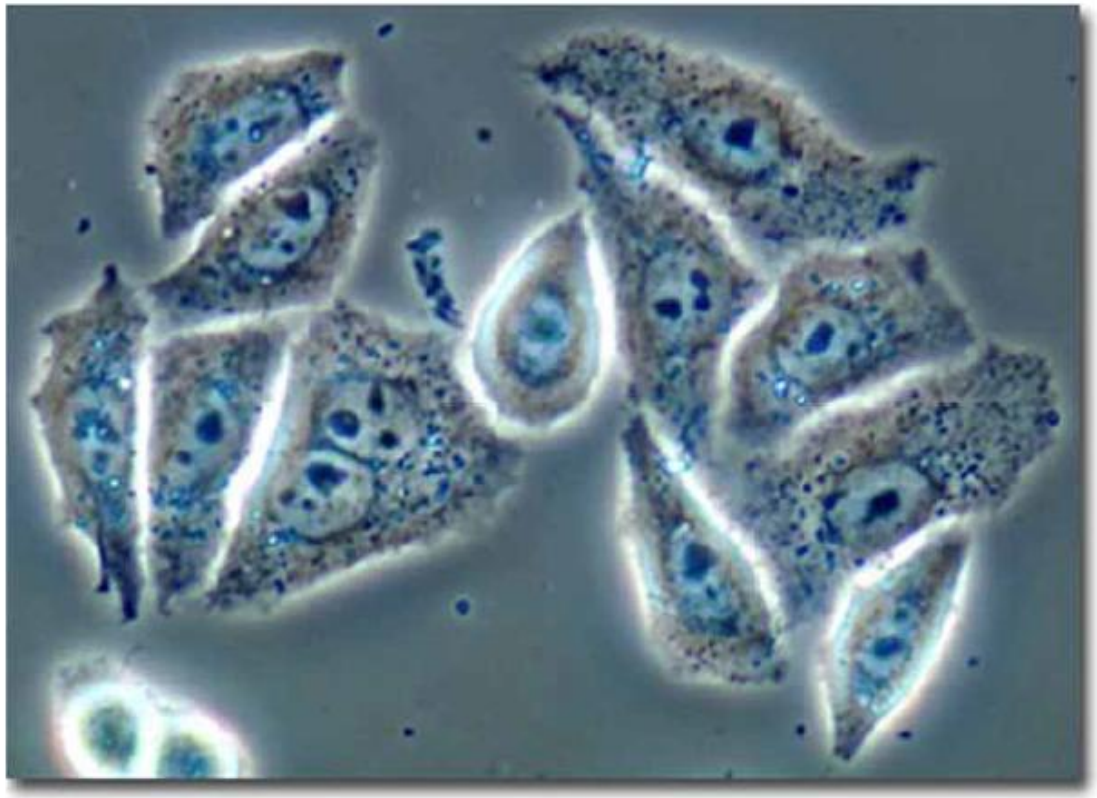




Culture cellulaire

Observation

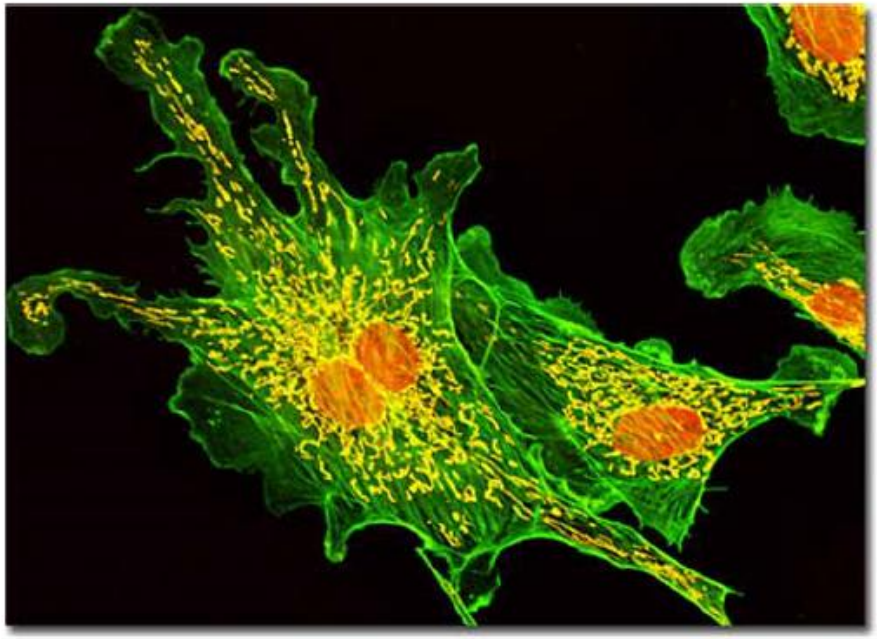
- Microscopie à contraste de phase
- Vidéo-microscopie



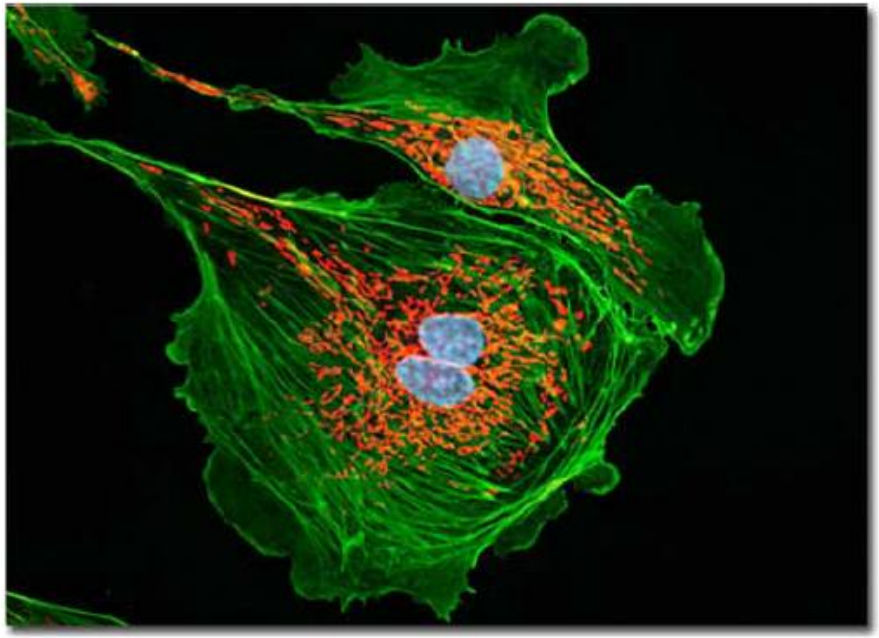
Culture cellulaire

Observation

- Immunofluorescence



Mitochondries : jaune
Filaments d'actine : vert
ADN : rouge



Mitochondries : rouge
Filaments d'actine : vert
ADN : bleu

Culture cellulaire

Conditions de culture

- 37°C, pH, sels, CO_2
- Milieu de culture
  - Milieu de base
  - +/- Sérum
  - Facteurs de croissance
- Support

Les milieux de culture

- **Exigences cellulaires minimales**
  - **eau**
  - **ions minéraux** donnant une osmolarité identique à celle du sérum physiologique
  - **source de carbone et d'énergie** (glucose par exemple)
  - **source d'azote** : acides aminés
  - **source d'acides gras**
  - **pH** constant 7,4 (indicateur de pH : rouge de phénol) grâce un système tampon CO_2/HCO_3^- ou phosphates.
- Base commune (milieux Hanks, Earl, PBS, Gey) :
  - Sels minéraux : NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, NaH_2PO_4…
  - Sucre : glucose
- Compléments variables selon les milieux (RPMI, MEM, DMEM…)
  - Acides aminés
  - Vitamines et cofacteurs
  - Bases azotées, ribose et désoxyribose

Les milieux de culture

- **Compléments à ajouter** extemporanément :
  - **Mélanges d'antibiotiques** au taux final de **1 %**
    - Pénicilline G,
    - Streptomycine,
    - Amphotéricine B (antifongique)…
  - **Glutamine** à **1%** (acide aminé instable)
  - **Sérum de veau fœtal** (S.V.F. ou F.C.S. Fœtal Calf Serum) entre 1,5 et **10 %**
    - prélevé stérilement et décomplémenté
    - apportant
      - **facteurs de croissance cellulaire**
        - » EGF (facteur de croissance épidermique),
        - » FGF (facteur de croissance fibroblastique)
        - » PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
      - **Facteurs de différenciation comme** fibronectine (ancrage des cellules).
      - **Inhibiteurs** comme l'alpha1 antitrypsine (neutralisation de l'action enzymatique de la trypsine)

Les contenants

- **Flacons**
  - En polystyrène optiquement clair stérile
  - Traités ou non pour adhérence
  - De contenance et surface variable par ex :
    - 25 cm^2 contenance totale 60 mL / vol 5 mL
    - 75 cm^2 contenance totale 250 mL / vol 10 mL
    - 150 cm^2 contenance totale 60 mL / vol 20 mL

- **Plaques multipuits**
  - En polystyrène optiquement clair stérile
  - Traités ou non pour adhérence
  - À fond plat et couvercle
  - Nombre de puits et contenance variable
    - 6, 12, 24, 48, 96

- **Boites**
  - En polystyrène optiquement clair stérile
  - Traités ou non pour adhérence
  - Diamètre allant de 35 à 150 mm

L'environnement durant l'incubation

Respectant certains paramètres physico-chimiques nécessaires à la culture cellulaire

- la température : 37 °C
- l'hygrométrie : 84 à 85 % d'humidité
- le pH 7,4 maintenu grâce aux systèmes tampon
  - du milieu
  - renforcés par à l'atmosphère enrichie à 5% de CO_2 (système tampon avec HCO_3^-)

L'incubateur à CO_2

5 % 37°C

Voyants de Pression en CO_2 et température

Incubateur fermé avec

Ses manomètres de pression

Son système d'injection

Bonbonne d'anhydride carbonique

Double porte avec verrouillage

Clayettes perforées pour circulation d'air

Bac d'eau stérilisée pour maintien d'un taux d'humidité suffisant

L'environnement durant le repiquage

Respectant la stérilité

Sensibilité des cellules aux infections

- Bactériennes (en particulier les mycoplasmes),
- Fongiques,
- Virales.

Utilisation de façon adéquate d'une enceinte à atmosphère stérile :

- PSM Poste de Sécurité Microbiologique

Indicateur de pH : Rouge de phénol

- rose à pH 7,4
- rouge si alcalinisation (infection fongique)
- jaune si acidification (contamination bactérienne ou mort cellulaire)

L'entretien

Suivi de la culture cellulaire

- Aspect macroscopique
  - Observation du milieu de culture limpide et rose pouvant devenir trouble et/ou rouge ou jaune
- Au microscope inversé
  - sous la platine : les objectifs
  - au dessus de la platine : l'éclairage
  - avec contraste de phase : meilleure visualisation des prolongements cytoplasmiques, organites et vacuoles
  - Vacuolisation et présence de cellules arrondies en suspension = souffrance et perte d'adhésion
- Nécessité de changer le milieu tous les 2 ou 3 jours

L’entretien

- Microscope inversé

avec contraste de phase

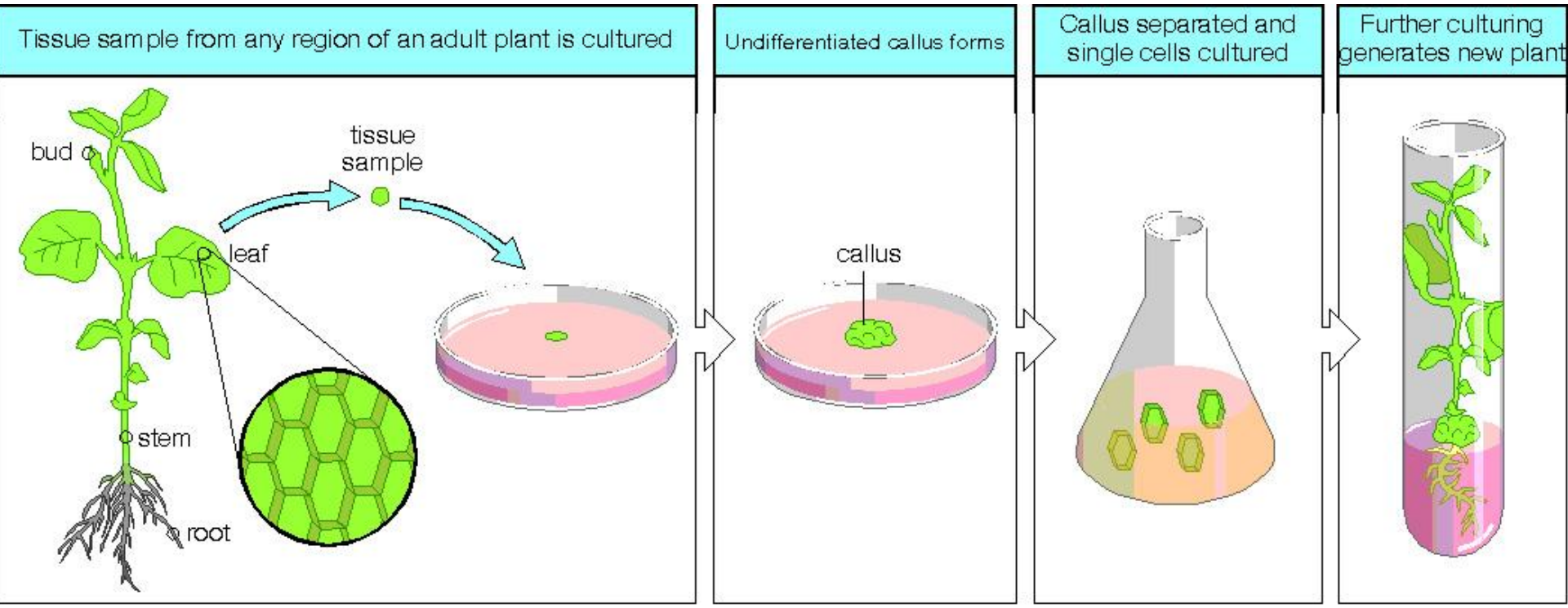
au dessus de la platine : l’éclairage

sous la platine : les objectifs

Culture cellulaires chez les végétaux

- Prélèvement d'un fragment de végétal (aseptiquement);
- culture sur une gélose nutritive;
- prolifération en une masse de cellules mésenchymateuses qui vont évoluer en un cal (callogenèse) pour donner une tige feuillée ou en racines (Rhizogenèse).

-Nécessité de faire des repiquages à des intervalles de temps réguliers



Comment fabrique-t-on une plante transgénique ?

Le gène qui code pour le caractère dont on veut doter une plante peut provenir d'une cellule animale ou végétale, d'un virus ou d'une bactérie.

Cellule

Pour isoler ce "gène d'intérêt", on extrait l'ADN de la cellule, puis on le découpe à l'aide de "ciseaux enzymatiques".

ADN

Gène d'intérêt

On insère ensuite le gène d'intérêt dans le plasmide, avec un marqueur" pour repérer les cellules modifiées, et un "promoteur" qui permet au gène de s'exprimer.

Gène d'intérêt

Marqueur

Promoteur

Plasmide

Ouverture du plasmide

Extraction du plasmide

La bactérie *Escherichia coli* contient un plasmide, fragment d'ADN circulaire, qui est utilisé comme vecteur pour transporter le gène d'intérêt dans les cellules de la plante à modifier.

Plasmide

Bactérie *Escherichia coli*

Le plasmide modifié est introduit dans une autre bactérie (généralement *E. coli.*)

Bactérie *Escherichia coli*

Des colonies de ces *E. coli* modifiées sont mises en culture. Ensuite, les chercheurs ont le choix entre deux techniques.

Culture de *E. coli*

Extraction du plasmide modifié

E. coli

On extrait de la bactérie le plasmide modifié, avec lequel on enrobe des microbilles de tungstène (1 µm de diamètre).

Microbilles de tungstène

Canon à particules

A l'aide d'un canon à particules, on bombarde de microbilles les cellules végétales à modifier. Le gène d'intérêt s'insère de manière aléatoire dans le patrimoine génétique de certaines d'entre elles.

Tissu végétal

Le tissu végétal modifié est mis en culture.

E. coli

Transfert

Agrobacterium tumefaciens

Le plasmide modifié est transféré de *E. coli* à une bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, naturellement capable d'introduire des fragments d'ADN dans le génome des plantes.

Passage du gène d'intérêt

Cellule végétale

A. tumefaciens

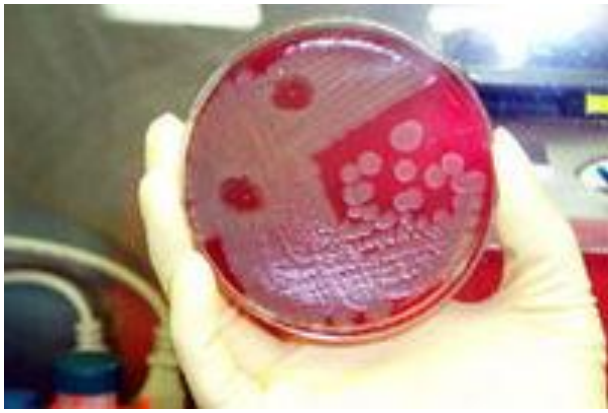
Culture de *A. tumefaciens* avec des cellules végétales

Cellule végétale modifiée

Culture microbienne

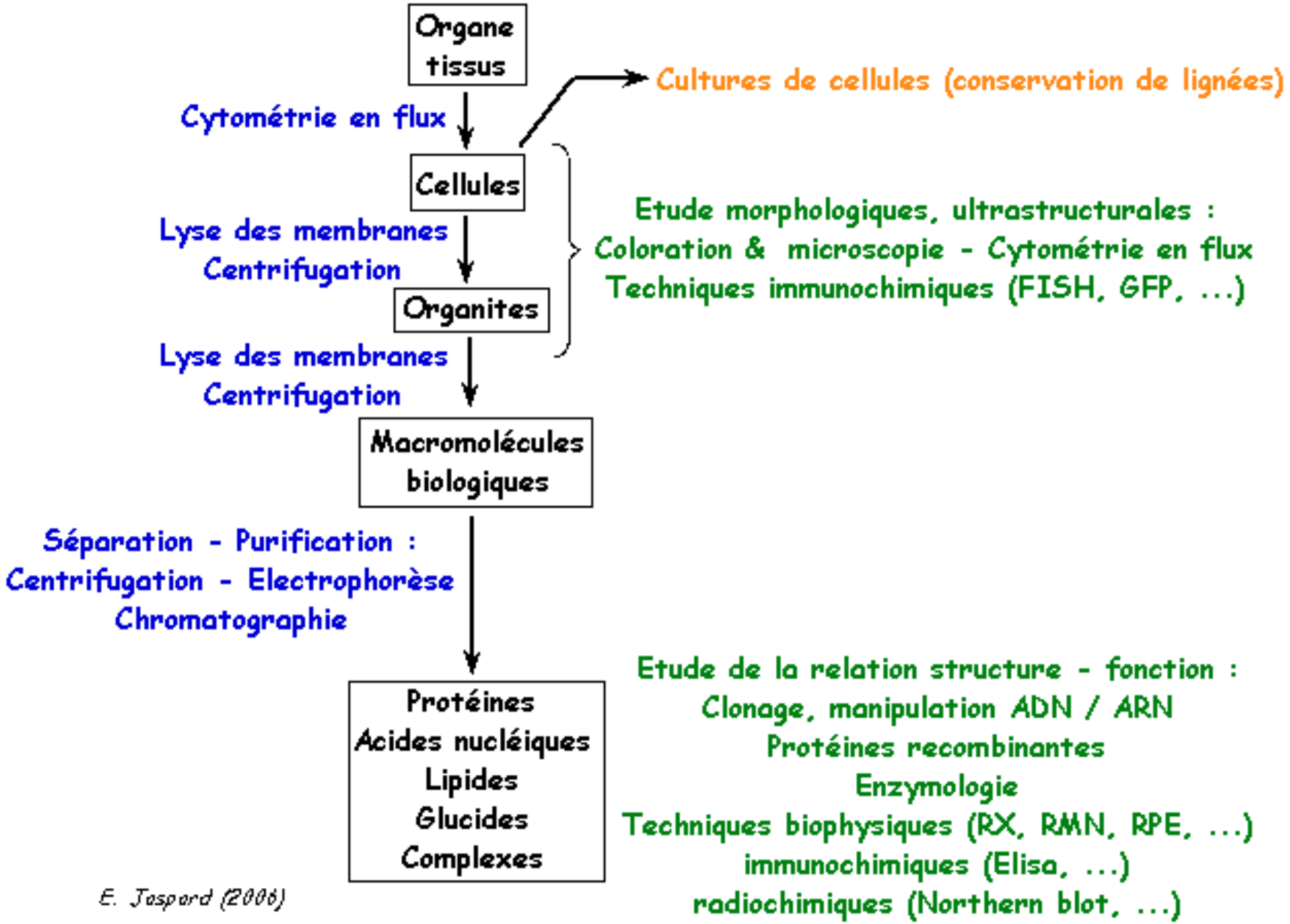
Les techniques fréquemment employées, on trouve l'ensemencement d'une souche en boîte de Pétri, tube à essai, ou galerie

Il s'agit de placer des bactéries à la surface ou à l'intérieur d'une gélose.
Les géloses contiennent des éléments nécessaires à la croissance bactérienne, mais aussi, parfois, des produits inhibiteurs.
On place les cultures microbiennes à une température favorable (en général 37°C) pendant environ une journée (24 heures).



But:

- le dénombrement des micro-organismes (dans le cas d'un contrôle sanitaire par exemple ;
- l'identification de la bactérie (par exemple pour trouver l'agent responsable d'une infection) ;
- la réalisation d'un antibiogramme (Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.), afin de déterminer la sensibilité des bactéries, et de trouver un traitement adapté à une infection.



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