

METHODES D'ETUDES DE LA CELLULE :

Introduction :

Il existe 2 grands types de microscopie :

<u>La microscopie optique (MO) = microscopie photonique</u>	Moins bonne résolution que la ME. La limite de résolution (= capacité à distinguer la distance entre 2 objets) de la MO est de l'ordre de 200 nm . Permet de visualiser cellule et organelles .
<u>La microscopie électronique (ME)</u>	Permet de visualiser des molécules. On passe à un stade plus petit au niveau de la résolution. En effet, on gagne un facteur 1000 en termes de pouvoir séparateur par rapport à la MO puisqu'on peut ici séparer 2 points d'environ 0.2 nm .

La différence entre les deux est la particule qui va traverser la matière. Dans le premier cas ce sont des **photons** et dans le deuxième des **électrons**. Les résultats ne sont pas les mêmes, il existe donc des domaines d'utilisation déterminés pour ces types de microscopie.

MICROSCOPIE OPTIQUE :

I. Généralités :

1) La première étape est de disposer d'une source de photons. Cela peut-être une lumière « normale » mais il peut y avoir des dispositifs plus sophistiqués où la lumière a une **longueur d'onde** particulière. Les photons vont être dirigés vers l'échantillon par un **condensateur**.

2) La deuxième étape est de récupérer l'image à travers un **objectif**.

Comme dit précédemment, la limite de résolution est de **200 nm** et il manque notamment la dimension moléculaire. Mais il existe pour cela des astuces que nous allons voir.



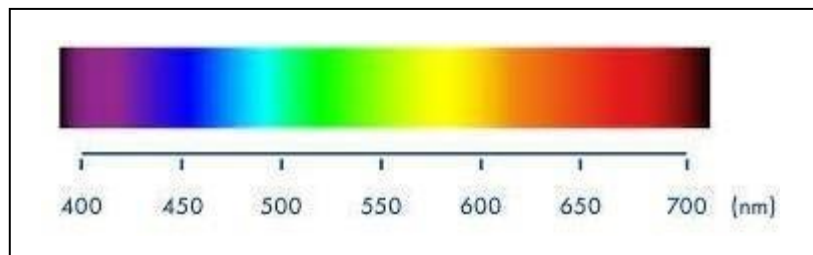
II. Fluorescence :

Pour rendre plus performante la MO et pouvoir visualiser des molécules, on va leur conférer une **propriété fluorescente**. On ne va donc pas visualiser directement la molécule mais la fluorescence qu'elle va émettre.

A) Principe de la fluorescence :

Certaines molécules (de manière naturelle ou artificielle) ont une propriété de fluorescence :

- Si une énergie lumineuse (ici un photon) arrive sur la molécule, celle-ci a la propriété d'absorber cette énergie. Ces photons sont caractérisés par une certaine longueur d'onde, c'est ce qu'on appelle la « **lumière d'excitation** ». La molécule fluorescente va donc être excitée.
- Le résultat de cette excitation moléculaire va être d'émettre d'autres photons très rapidement qui vont être les **photons d'émission**. Toutefois, cette agitation moléculaire a fait perdre de l'énergie. Les photons d'émission vont donc avoir une **énergie inférieure** aux photons d'excitation, et donc une **longueur d'onde supérieure**.



Chacune des molécules fluorescentes va être caractérisée par une **longueur d'onde d'excitation et d'émission**, et donc une certaine **couleur** d'excitation et d'émission.

B) Fonctionnement du microscope à fluorescence :

- 1) Il y a une source de lumière avec un premier filtre, le filtre d'excitation, qui va **filtrer les longueurs d'ondes** qui nous intéressent par rapport à la molécule fluorescente à observer.
- 2) Les photons vont rencontrer un **miroir dichroïque** c'est-à-dire qui laisse passer des photons d'une certaine longueur d'onde et reflète des photons d'une autre longueur d'onde.
- 3) Ce miroir va refléter des photons d'émission qui vont être dirigés vers la préparation.
- 4) S'il y a une molécule fluorescence, elle va émettre des **photons d'excitation** d'une longueur d'onde plus grande. Ces photons vont cette fois traverser le miroir dichroïque.

5) Ils traversent ensuite un deuxième filtre qui va réduire le « bruit de fond » de photons qui ne sont pas de la bonne longueur d'onde.

6) Pour finir, les photons sont soit directement visualisés par un oculaire ou soit couplés à un système de vidéo pour numériser les images.

C) Applications :

- Localiser des molécules spécifiques (qui peut donner une idée de la fonction de celle-ci au sein de la cellule).
- Visualiser simultanément plusieurs molécules.
- Technique de microcinéma qui permet de filmer ces molécules ainsi que leur dynamique dans une cellule

D) Bioluminescence :

Le problème va être de rendre les molécules fluorescentes puisqu'elles ne le sont pas toutes naturellement. Actuellement, la technique de choix est de les rendre fluorescentes en utilisant une molécule, une protéine qu'on retrouve dans les méduses (**Aequorea Victoria**) et qui est naturellement fluorescente. Cette molécule s'appelle la **GFP**.

Dans la structure tridimensionnelle de la GFP, il y a un **chromophore**, c'est-à-dire une structure fluorescente qui va permettre d'émettre dans le vert. Ce qui est très pratique en biologie c'est qu'on peut greffer la GFP sur n'importe quelle molécule.

Comment rendre une molécule fluorescente qui ne l'est pas naturellement ?

La GFP est ce qu'on appelle un **fluorochrome** (molécule fluorescente de manière intrinsèque). En dehors de la GFP il y a des petites molécules (qui ne sont pas des protéines) qu'on peut greffer chimiquement à d'autres protéines. On retrouve par exemple :

- La **fluorescéine** va émettre dans le vert quand elle est excitée dans le bleu.
- La **rhodamine** qui va émettre dans le rouge quand elle est excitée dans le vert.

Le principe va être d'introduire un **gène GFP** dans une cellule de l'organisme à étudier. Ce gène va être reconnu en tant que gène et, s'il a les bons signaux de régulation, il va être transcrit en ARNm dans le noyau.

Une fois cet **ARNm GFP** déporté dans le cytoplasme, il sera traduit par les ribosomes en une **molécule GFP**. C'est cette molécule protéique qui va émettre la fluorescence. On aura alors une cellule verte.

Si un gène nous intéresse mais que l'on ne connaît pas sa fonction, une manière de le savoir c'est de déterminer où il est localisé dans la cellule. On va donc fusionner ce gène X au gène GFP. Ces gènes fusionnés vont être transcrits en même temps puis traduits en une **protéine hybride GFP-X**. Si la fluorescence apparaît au niveau de la membrane plasmique, cela **suggère** que cette protéine X est membranaire.

Remarque : **Démontrer** ≠ **Suggérer**.

Démontrer : Il n'y a pas d'autre hypothèse par rapport à l'observation.

Suggérer : Il peut exister d'autres interprétations.

III. Fluorescence induite :

A) Définition :

La fluorescence induite est différente de ce qu'on a vu précédemment. Ce sont des molécules qui sont potentiellement fluorescentes mais qui n'expriment leur propriété de fluorescence que lorsqu'elles sont fixées à une **molécule particulière**.

Certains colorants permettent la visualisation des **acides nucléiques**, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas fluorescents en eux même mais qui le deviennent quand ils sont associés à l'ADN :

<u>Hoechst et DAPI</u>	Ils se fixent spécifiquement sur les bases A-T de l'ADN.
<u>Bromure d'éthidium</u> <u>/ Iodure de propidium</u>	Ce sont des agents intercalants , c'est-à-dire qu'ils s'intercalent dans la double hélice de l'ADN de manière non spécifique .

B) Répartition de l'ADN dans le noyau :

Il y a des zones très blanches où l'ADN est très condensé, c'est ce qu'on appelle l'**hétérochromatine** (que l'on retrouve en périphérie du noyau).

Il y a des zones où l'ADN est donc moins condensé, c'est ce qu'on appelle l'**euchromatine** (que l'on retrouve au milieu du noyau).

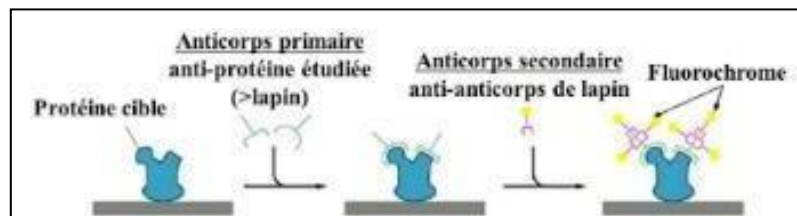
Il y a également une zone du noyau où il n'y a pas d'ADN, c'est le **nucléole**. Ce compartiment n'est pas délimité par une membrane mais il a plusieurs fonctions dont une essentielle qui est de synthétiser les ribosomes (qui seront ensuite exportés du noyau pour servir à la traduction).

IV. Immunofluorescence indirecte :

On utilise l'immunofluorescence indirecte dans le cas où l'on souhaite étudier une molécule mais que l'on ne peut pas utiliser la technique de la fluorescence. Cela peut s'expliquer par le fait que c'est un **processus expérimental assez lourd** ou bien parce qu'on ne peut pas effectuer de **manipulation génétique** sur nos patients.

Ainsi, une autre manière de rendre cette molécule fluorescente de manière indirecte est, sur votre préparation cellulaire ou tissulaire, d'appliquer un **anticorps (Ac)**.

Un anticorps est une molécule produite naturellement pour reconnaître spécifiquement une protéine, plus précisément un **épitope étranger** et donc que l'on va pouvoir diriger vers une protéine spécifique.



Si on souhaite étudier une protéine humaine, il va être possible d'utiliser par exemple des Ac de lapin. Il suffit de mettre l'Ac en contact avec la cellule pour qu'il se fixe spécifiquement à la protéine souhaitée. C'est l'**anticorps primaire**.

Or, cet anticorps primaire n'est pas fluorescent. On va alors devoir utiliser un anticorps secondaire qui va venir reconnaître l'anticorps primaire. Ces **anticorps secondaires** ont été produits dans des boîtes de biotechnologies pour les rendre **fluorescents**.

V. Le FISH (Fluorescent in situ hybridization) :

L'hybridation in situ est l'équivalent de la technique d'immunofluorescence indirecte pour les **acides nucléiques**. On va utiliser des petites molécules d'ADN ou d'ARN qui sont appelées des **sondes** et qu'on va rendre **fluorescentes** en laboratoire.

A) Fonctionnement :

- 1) Il va falloir **dénaturer** l'ADN afin d'exposer ses deux brins, puis les mettre en contact avec une **sonde fluorescente**.
- 2) Celle-ci va venir s'hybrider (par **complémentarité**) spécifiquement à la molécule d'ADN ou d'ARN d'intérêt et vous permettre de la visualiser.

B) Applications :

- Possibilité de visualiser des réarrangements chromosomiques sur descaryotypes (application cytogénétique).
- Possibilité d'observer les territoires qu'occupent les chromosomes dans le noyau en interphase. Ce qui nous permet d'étudier la localisation et la dynamique des chromosomes dans le noyau, et donc de comprendre comment ils fonctionnent.
- Possibilité d'obtenir des informations sur la localisation et l'intensité d'expression des ARN au sein d'un tissu.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE :**Introduction :**

Il y a deux grands types de ME :

<u>ME en transmission</u>	Un faisceau d'électrons traverse la préparation. Il faut quelque chose qui va arrêter les électrons donc on va colorer la préparation aux sels de métaux lourds, ce qui va permettre de révéler les différentes structures.
<u>ME à balayage</u>	L'objet est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètre pas mais qui excite la surface de l'objet et émet des électrons secondaires recueillis par un détecteur. Cela permet une vision en 3D .

I. ME à transmission :

Le microscope électronique ressemble à un microscope optique sauf que la source de lumière est remplacée par un canon à électrons.

- 1) Un **condensateur** va concentrer les faisceaux d'électrons vers l'échantillon.
- 2) Le faisceau va passer à travers l'échantillon **sous vide**.
- 3) Un **objectif** va permettre de projeter la transmission des électrons (qui va se faire ou pas en fonction de la présence des métaux lourds) sur une **image micro fluorescente** en bas du microscope.

II. ME à balayage :

L'intérêt c'est de regarder les objets en 3D. On a toutefois une moins bonne résolution puisqu'elle est de l'ordre de 10 nm.

L'objet à étudier est encore une fois recouvert de **métaux lourds**. Les électrons qui vont arriver vont être **réfléchis** par cette surface et deviennent des **électrons secondaires** qui seront détectés par un capteur.

L'image est ensuite reconstituée **informatiquement** pour donner des images en relief.

MANIPULATION DES CELLULES :

I. Obtention des cellules :

1) La première étape pour obtenir des cellules est de **dissocier** les cellules du tissu. Il y a un cas assez facile c'est lorsque qu'on étudie des cellules du sang, où les cellules sont séparées les unes des autres. En revanche pour les tissus solides, il faudra dissocier les cellules afin qu'elles soient isolées et sans contact. Pour cela, il existe plusieurs techniques :

- Les enzymes comme la **trypsine** qui détruit les ponts protéiques entre les cellules.
- Les techniques physiques comme l'**agitation**.

2) Une fois les cellules dissociées du tissu, il faut les **séparer**. Il est possible de les séparer suivant différents critères :

- **Propriétés physiques** (taille et forme) par des techniques de centrifugation.
- **Propriétés d'adhésion** sur plastique ou sur lame de verre
- **Méthodes moléculaires** : purification sur support / cytométrie de flux

A) Cytométrie de flux :

C'est la technique de référence pour séparer les cellules une fois qu'elles sont en suspension car c'est une technique à haut débit.

Fonctionnement : Les cellules vont passer dans un canal sous forme de flux. Au fur et à mesure qu'elles traversent le canal, les cellules vont être analysées de différentes façons :

- Elles vont être étudiées en fonction de leur taille et de leur forme, simplement en analysant leurs propriétés de réflexion de la lumière.
- Il va en même temps y avoir l'émission d'une lumière laser qui va détecter une éventuelle fluorescence de ces cellules qui va être enregistrée simultanément.

II. Culture des cellules :

Une fois que les cellules sont dissociées du tissu et séparées les unes des autres, il est possible de les étudier directement ou de les cultiver dans des boîtes de Pétri.

<u>Avantage de la culture en boîte de Pétri :</u>	<u>Inconvénients de la culture en boîte de Pétri :</u>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Contenu plus homogène de cellules. ➤ Contrôle sur les conditions expérimentales. ➤ Possibilité de créer des clones génétiquement homogènes. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le fonctionnement cellulaire est étudié en dehors de son contexte tissulaire. ➤ Risque de sélectionner des mutants/variants.

En culture, les cellules ont besoin de beaucoup de choses et cela varie en fonction des types cellulaires. Globalement, elles ont besoin de milieux complexes qui comportent tout ce qu'il faut pour qu'elles puissent « manger » et fabriquer leurs constituants.

Il faut donc leur apporter des acides aminés essentiels, vitamines, sel, glucose et sérum. Le **sérum** joue un rôle très important puisqu'il contient les molécules de signalisation nécessaires à la division des cellules.

On distingue deux types de culture de cellules :

<p><u>Les cultures primaires :</u></p>	<p>Les cellules en culture ne se divisent que pour un nombre limité de fois (environ 50 divisions). Après cela elles rentrent en sénescence cellulaire.</p> <p>Ce phénomène de sénescence cellulaire qu'on observe naturellement à partir d'une culture primaire reflète en partie les mécanismes de vieillissement de l'organisme.</p>
<p><u>Les lignées immortelles :</u></p>	<p>Ces cellules n'ont pas de limite de division, elles ne rentrent pas en sénescence. Elles peuvent ainsi se diviser en théorie de manière infinie.</p> <p><u>Ces lignées n'existent pas naturellement :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Soit on les obtient à partir de situations pathologiques où il y a la formation de cellules immortelles comme le cancer. ➤ Soit on les rend immortelles (agents mutagènes, virus, télomérase). Il existe des immortalisations spontanées (très fréquentes chez la souris mais extrêmement rares chez l'Homme).

III. Analyse du contenu cellulaire :

Une fois que les cellules ont été cultivées, il est possible de les étudier. Ainsi, après les avoir séparées et cultivées, il faut les détruire. En effet, pour pouvoir étudier les constituants cellulaires, il va falloir les fractionner : c'est ce qu'on appelle la **lyse cellulaire**.

Pour cela, il existe plusieurs techniques (possibles à combiner) pour lyser les cellules :

- Ultrasons
- Chocs osmotiques
- Détergents
- Techniques mécaniques comme des frottements avec des appareils particuliers : des pistons de téflon qui vont frotter et lyser des cellules.

L'étape suivante est de **séparer** l'extrait cellulaire pour isoler les différents **constituants**. Du plus grossier au plus précis :

FILTRATION	Gros debris.
CENTRIFUGATION	Membranes, organites, complexes moléculaires.
ELECTROPHORESE / CHROMATOGRAPHIE	Protéines et acides nucléiques.

Il est maintenant possible de pouvoir effectuer l'analyse moléculaire du contenu de ces cellules et des différentes fractions. On dispose de nos jours de technologies de pointe qui permettent d'analyser tout un ensemble de molécules des cellules et d'avoir une vision complète du contenu cellulaire.

Si on séquence tout l'ADN d'une cellule, on obtient le GENOME.

Si on répertorie les différentes sortes d'ARN d'une cellule, on obtient le TRANSCRIPTOME.

Si on détermine l'ensemble des protéines d'une cellule (par des techniques de spectrométrie de masse), on obtient le PROTEOME.