

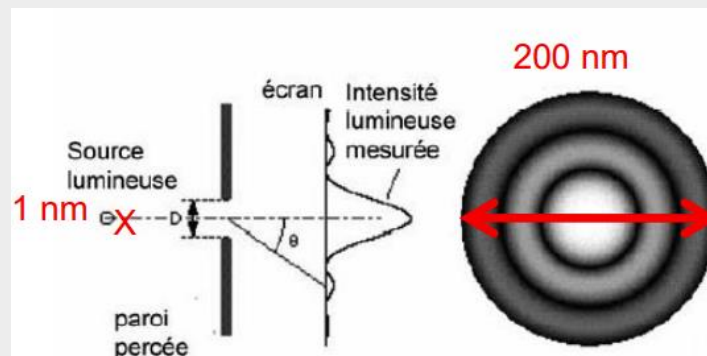
# Méthodes d'études de la cellule

Comme pour mes autres fiches cette écriture représente mes remarques qui ne sont pas à apprendre mais peuvent vous aider. 📖 : la notion est tombée une fois, 📖📖, la notion est tombée deux fois etc... Bon cours !

## I. La microscopie (suite)

### a) Limite de résolution de la microscopie optique

La limite de résolution de la microscopie optique (et donc de la microscopie à fluorescence) est de **200nm**. C'est le gros problème de cette méthode.

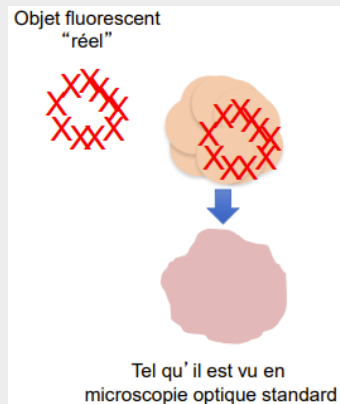


C'est l'allemand Ernst Abbe (fin XIXème siècle) qui a déterminé la formule pour trouver la limite de résolution de la microscopie optique. Cette équation est liée au caractère ondulatoire de la lumière. *C'est plus de la physique que de la biocell mais pour vous expliquer lorsqu'un objet a une taille suffisamment grande on peut négliger l'aspect ondulatoire de la lumière et on rentre dans le cadre de l'optique géométrique. Lorsque notre objet a une dimension qui est plus petite qu'une dimension seuil, l'aspect ondulatoire de la lumière est non négligeable et on va avoir des phénomènes d'interférences et on rentre dans le cadre de l'optique ondulatoire. Je vous rajoute ça pour votre compréhension.*



Les biologistes cellulaires ont voulu aller en deçà de cette limite mais en gardant la microscopie optique (pratique d'utilisation). Il existe ainsi une astuce pour détourner cette limite physique.

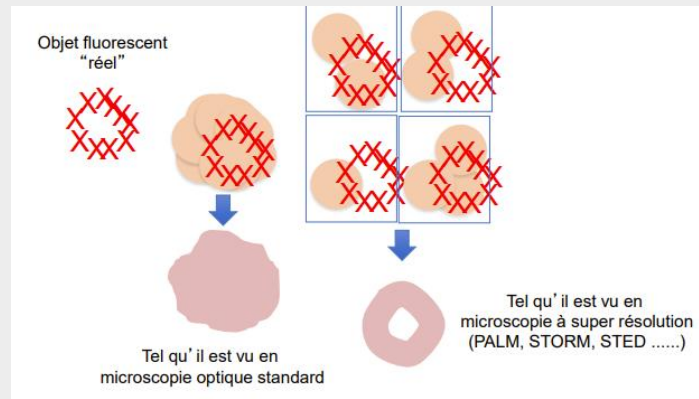
Imaginons un objet que l'on observe au microscope. Sur le schéma il est représenté tel qu'il est. Chaque croix est un fluorochrome (tel qu'il est vraiment dans la cellule). On peut voir une sorte de cercle (*on peut imaginer que c'est un complexe protéique dont chaque croix correspond à une sous-unité et dont l'ensemble forme un cercle*).



Maintenant on superpose à cette image réelle ce que l'on peut voir en microscopie optique traditionnelle avec la limite de résolution à 200 nm : on ne verra qu'une **tâche** (la résolution ne permet pas de savoir que c'est en forme de cercle et qu'il y'a un trou au milieu). On sait que la protéine est là mais on ne peut pas voir les sous-unités.

L'astuce c'est de mettre en place des techniques d'analyses où chaque molécule de fluorescence va **clignoter**. Les fluorochromes sont choisis de telle façon qu'il n'y aura qu'un nombre limité de fluorochromes qui va s'illuminer à la fois.

## Méthodes d'études de la cellule 2



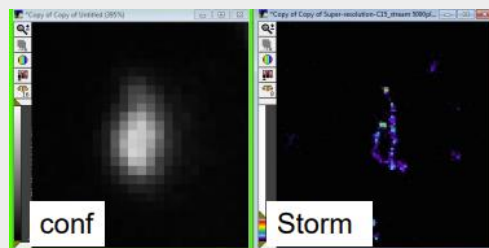
A chaque clignotement le microscope va prendre une image. Ainsi, des milliers d'images vont être prises pour le même objet et puisque les fluorochromes ne s'allument pas tous en même temps on n'aura pas l'aspect de tâche qu'on avait au départ.

On va ainsi pouvoir reconstituer l'image avec une meilleure résolution qu'en microscopie optique standard. On va arriver à une résolution de l'ordre de **10-15 nm**.

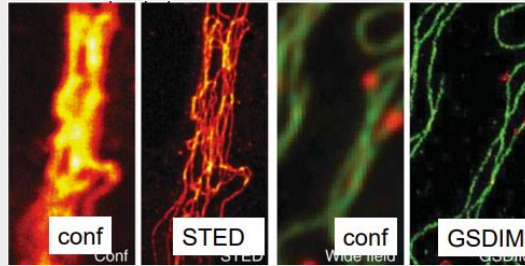
On appelle ce type de microscopie la **microscopie à super-résolution**. Différentes techniques existent (PALM, STORM, STED...) mais on ne les abordera pas.

Voici quelques exemples où l'on voit la différence entre la microscopie optique standard et celle à super résolution :

-On observe l'extrémité des chromosomes qui se terminent en boucles d'ADN. En MO standard on ne voit qu'une « tâche ». En MO à super résolution on peut suivre toute la boucle d'ADN.

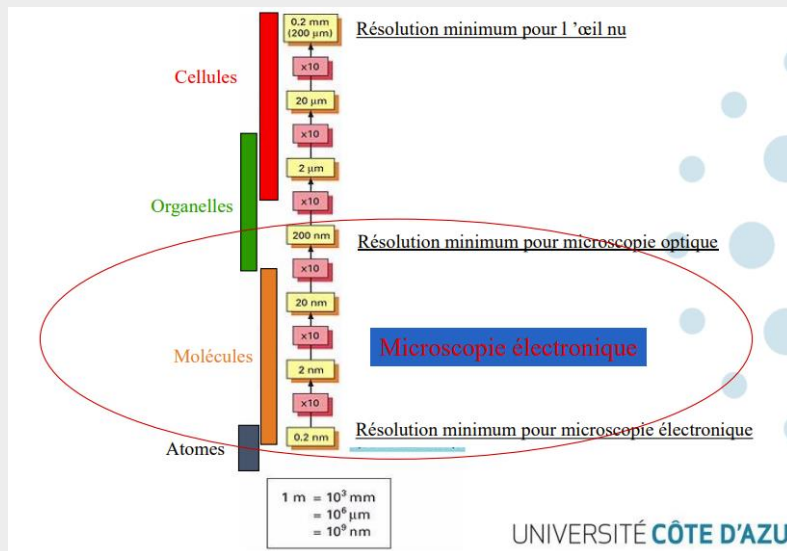


-Cette fois on observe des fibres de microtubules (à droite) et des images de vimentine (à gauche) dans des cellules humaines. Encore une fois on voit que la super résolution permet de gagner énormément pour vraiment comprendre l'architecture de ces réseaux et leur fonction.



## 1. Microscopie électronique

Cette technique de microscopie est différente, on descend donc dans la limite de résolution au niveau **moléculaire**. A noter que les cellules observées ne peuvent pas être vivantes.



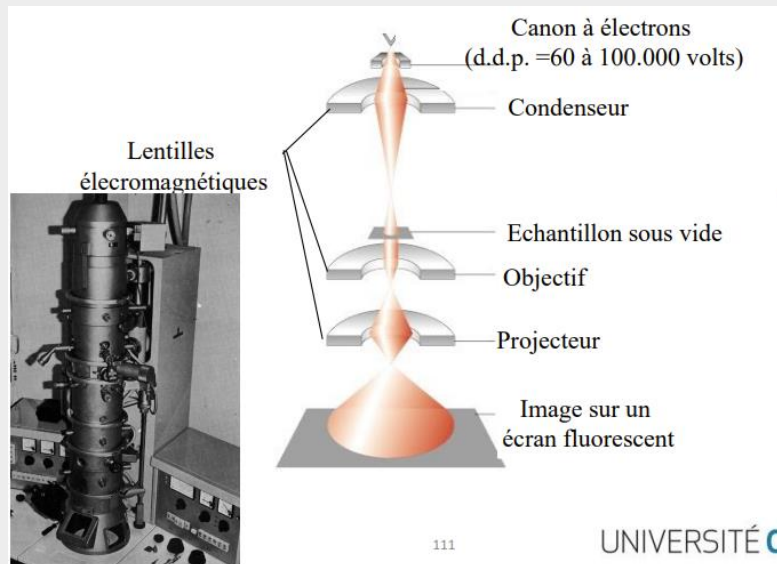
Le principe est assez simple : on remplace les photons de la microscopie optique par des **électrons**. C'est cela qui augmente la résolution. Il existe différents types de microscopie électronique (ME) : soit par transmission (MET), soit à balayage (MEB).

A noter, les structures visibles en ME en biologie cellulaire sont appelées les ultrastructures.

### a) Microscopie électronique à transmission MET

Comme son nom l'indique, un faisceau d'électrons traverse la préparation traitée aux sels de métaux lourds, des structures de contraste. Il faut donc préparer les échantillons de telle façon qu'on les fixe avec des atomes de **métaux lourds** pour qu'ils soient opaques aux électrons.

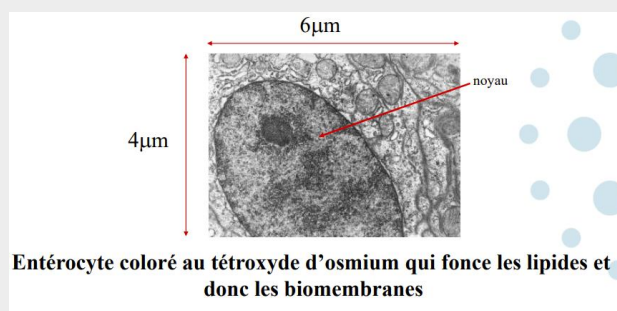
## Méthodes d'études de la cellule 2



Différentes techniques sont possibles :

- Coupe ultrafine (moins de  $0,1 \mu\text{m}$  d'épaisseur)
- Coloration à l'or pouvant être couplé à des anticorps
- Ombrage
- Cryodécapage, cryofracture où l'on casse la cellule pour voir les reliefs

C'est un énorme microscope qui n'a rien à voir avec le microscope à fluorescence. L'échantillon est **mis sous vide** la plupart du temps (*ce serait dommage que les électrons interagissent avec les atomes de l'air*), avec un système optique qui va servir à focaliser et à détecter ces électrons produits par un canon à électrons, canon qui va avoir un certain potentiel plus ou moins énergétique. Le faisceau d'électrons est condensé sur l'échantillon et l'image est ensuite recueillie.



Voici une coupe assez standard de cellule en MET. Plus c'est foncé, plus c'est dense aux électrons. On observe donc dans le noyau le nucléole (\*) plus foncé. Dans le cytoplasme, on observe le réticulum, des mitochondries... On observe très bien tout ce qui est membranes.

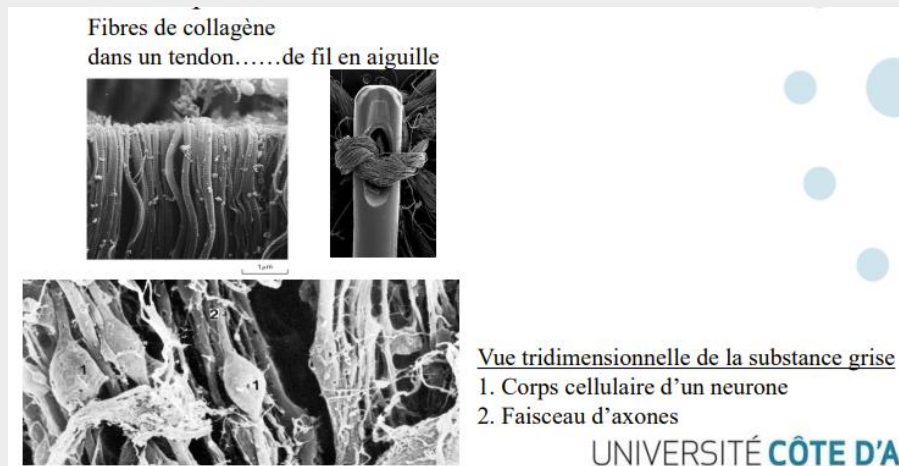
### b) Microscopie électronique à balayage MEB

Comme son nom l'indique, l'objet est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètre pas mais qui **excite** sa surface et émet des **électrons secondaires** recueillis et analysés par un détecteur.

Cette technique permet de visualiser la **surface** des cellules et des tissus. L'échantillon est fixé et recouvert de métaux lourds et le faisceau d'électrons y est réfléchi. La résolution est plus faible (*donc la limite de résolution est plus grande*) que la MET de l'ordre de **10 nm**.

*La limite de résolution du MET est de 0,1 nm*

Ici on a des fibres de collagènes, un fil passant dans une aiguille et de la substance grise.



On peut donc véritablement étudier l'**ultrastructure** d'un tissu grâce à cette méthode.

Dédi à kamsoo, cette coéquipière de SV fabuleusement incroyable qui a embellit ma P1 (c'est elle qu'a écrit ça)



Dédi au plus mignon chat de Nice Seth



Dédi à la biocell