

**TP SV
C2**
LA CELLULE : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE - MICROBIOLOGIE (2)

COURS : SV-C-1, SV-C-2, SV-A-1, SV-A-2



L'**ultrastructure** d'une cellule correspond son organisation interne. Chez les eucaryotes, elle correspond à la présence d'organites et à leur organisation (abondances relatives, position intracellulaire et relative).

Un **organite** est une **structure cellulaire** remplissant une **fonction précise**. Dans la définition la plus stricte, on se limite aux structures limitées par une ou plusieurs membranes : ils délimitent donc un ou plusieurs compartiments. Les organites permettent une division du travail dans la cellule eucaryote, c'est-à-dire la réalisation de fonctions différentes mais complémentaires dans les différents compartiments.

Historiquement, les organites ont été observés et étudiés grâce à des techniques d'observation au microscope photonique. L'avènement de la microscopie électronique à partir des années 1930-1940 a rendu possible une étude plus fine des organites et la mise au point à partir des années 1940-1950 de techniques d'études spécifiques à leur analyse.

Par ailleurs, les organismes eucaryotes pluricellulaires peuvent vivre en permanence avec des microorganismes (bactéries, archées, protozoaires, champignons), qui forment alors un microbiote, symbiotique ou commensal.

L'objectif de ce TP est l'observation d'éléments intra et intercellulaires en microscopie électronique, afin de maîtriser les ultrastructures des cellules eucaryotes et bactériennes, ainsi que de compléter l'observation du microbiote d'eucaryotes pluricellulaires.

Programme officiel :

- Identifier les principaux types de jonctions intercellulaires sur des clichés de microscopie électronique
- Evaluer les dimensions d'une structure observée à partir de la connaissance de l'ordre de grandeur de quelques objets biologiques courants (membranes, organites)
- A l'aide de différentes techniques microscopiques, reconnaître les ultrastructures cellulaires eucaryotes et les caractéristiques ultrastructurales d'une bactérie
- Réaliser une coloration de Gram afin d'identifier la nature Gram+ ou Gram- d'une bactérie
- Identifier les partenaires d'une association interspécifique impliquant des microorganismes par observation microscopique (microbiote intestinal, nodosité)

Compétences :

- Mettre en œuvre un protocole de coloration adaptée à la problématique biologique
- Réaliser une observation en microscopie optique : objectifs et grossissement, intensité lumineuse, diaphragme, mise au point, utilisation de l'huile à immersion
- Déterminer un ordre de grandeur ou la taille d'un objet à partir d'une échelle ou d'un grossissement
- Identifier une technique de microscopie
- Exploiter des clichés de microscopie (optique, électronique, à fluorescence)
- Réaliser un dessin d'observation avec les conventions usuelles : fidélité, sélection des structures pertinentes, légendes, titre, échelle, orientations

Plan du TP :
1. Méthodes d'observation des cellules (2) : la microscopie électronique

- 1.1. La microscopie électronique à transmission (MET)
- 1.2. La microscopie électronique à balayage (MEB)
- 1.3. Marquages spécifiques utilisables en microscopie électronique

2. Mise en évidence de la structure en bicouche lipidique d'une membrane plasmique
3. Les organites des cellules eucaryotes

- 3.1. Le noyau de la cellule eucaryote
- 3.2. Système endomembranaire : le réticulum endoplasmique
- 3.3. Système endomembranaire : l'appareil de Golgi
- 3.4. Système endomembranaire : les vésicules de sécrétion
- 3.5. Les lysosomes
- 3.6. Organites semi-autonomes : les mitochondries
- 3.7. Organites semi-autonomes : les chloroplastes
- 3.8. Tableau bilan

4. L'adhérence entre les cellules eucaryotes

- 4.1. Les jonctions entre cellules animales
- 4.2. La paroi végétale assure la cohésion des cellules végétales

5. Observation de bactéries

5.1. Bactéries libres

5.2. Bactéries symbiotiques

Travail préparatoire :

1. Méthodes d'observation des cellules (2) : la microscopie électronique

L'utilisation d'un **faisceau d'électrons** au lieu d'un faisceau de photons permet d'augmenter grandement le pouvoir séparateur, la longueur d'onde des électrons étant très courte ($\lambda = 0,0005 \text{ nm}$!). Le **pouvoir de résolution** atteint est compris **entre 0,5 et 2 nm**. Les électrons sont émis par un filament de tungstène chauffé, puis accélérés par une différence de potentiel de plusieurs dizaines de milliers de Volts.

1.1. La microscopie électronique à transmission (MET)

Des bobines électromagnétiques accélèrent les électrons, puis les font converger vers l'échantillon, placé dans le vide. Des électroaimants jouent le rôle des lentilles.

Les électrons arrivant sur l'échantillon peuvent soit le traverser, soit être déviés. Un écran phosphorescent ou une plaque photographique permet ensuite de déceler les électrons qui ont pu traverser l'échantillon sans être dévié : ces zones apparaissent comme étant claires, alors qu'en même temps les zones ayant dévié les électrons sont obscures.

Pour être observés au MET, les échantillons biologiques doivent être de très faible épaisseur (50 à 100 nm), et subir un traitement de **fixation**. En effet, les structures biologiques sont toutes transparentes aux électrons, et ce n'est qu'après l'inclusion de particules métalliques lors de la fixation que certaines structures deviennent opaques. Cette obligation de fixation fait qu'il n'est pas possible d'observer un échantillon vivant au microscope électronique.

De même, l'utilisation d'un faisceau d'électrons fait qu'aucune nuance de coloration n'est visible : une image en microscopie électronique est toujours une image en **noir et blanc** (tout photographie au MET présentant de la couleur résulte d'une colorisation, et donc d'une interprétation).



⇒ Préparation des échantillons :

➤ **Fixation** : l'échantillon étant placé dans le vide, il n'est pas possible de l'observer à l'état vivant et hydraté. On peut le fixer par : Le glutaraldéhyde, qui établit des pontages covalents entre les molécules protéiques voisines.

Le tétraoxyde d'osmium OsO_4 , qui se fixe sur les doubles couches lipidiques (têtes hydrophiles des phospholipides) aussi bien que sur les protéines et les stabilise.

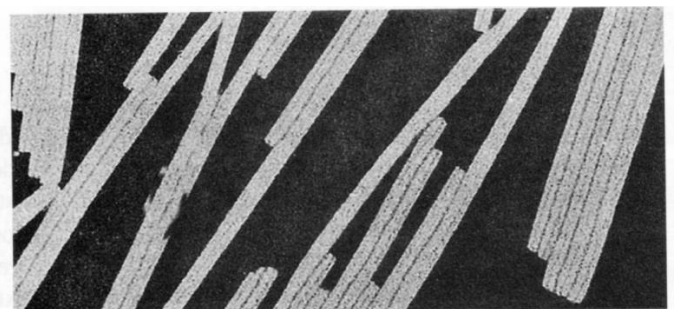
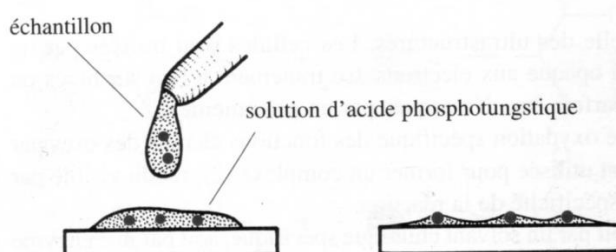
Le permanganate de potassium, qui conserve très bien les membranes mais assez mal les structures avec des acides nucléiques.

➤ **Inclusion** : le principe est le même que pour la microscopie optique, mais avec des résines particulièrement dures.

➤ « **Coloration** » : il s'agit en fait d'un renforcement des contrastes. En effet, les atomes de petit numéro atomique (cas majoritaire des molécules organiques) ne dispersent que peu les électrons. On sature donc les échantillons (avant ou après les coupes) par des métaux lourds, comme l'osmium, l'uranium ou le plomb.

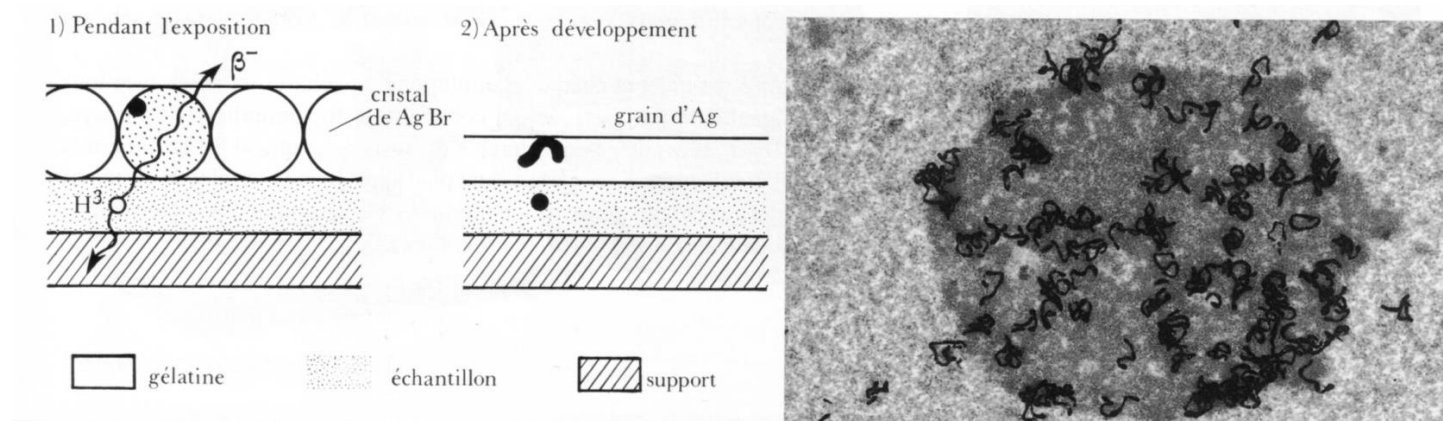
⇒ Coloration négative au MET :

Les échantillons sont mis en suspension dans une solution opaque aux électrons. Une goutte est déposée sur le support d'observation ; après séchage, les objets apparaissent en clair et les espaces entre eux sombres. Ceci permet de visualiser des objets de très petite taille et peu opaques aux électrons.



⇒ Autoradiographie au MET :

Dans certaines expériences, on utilise des molécules radioactives. Une **émulsion photographique** est appliquée sur la préparation réalisée : les rayonnements radioactifs réagissent avec l'émulsion, conduisant à la **précipitation d'argent métallique, opaque aux électrons**.

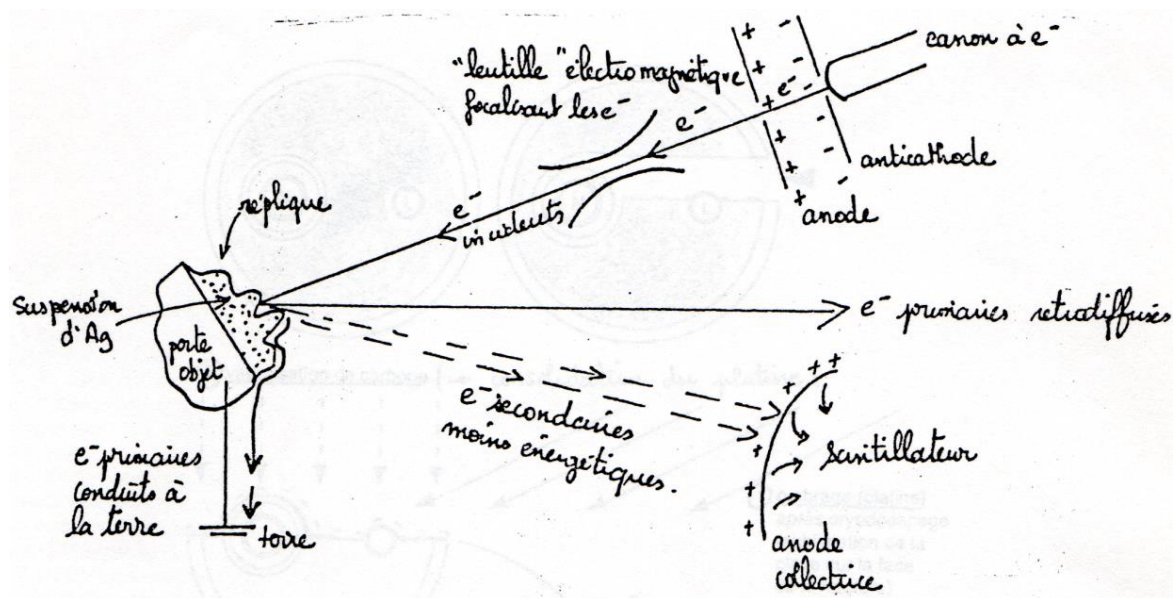


1.2. La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage permet l'observation de **surfaces**.

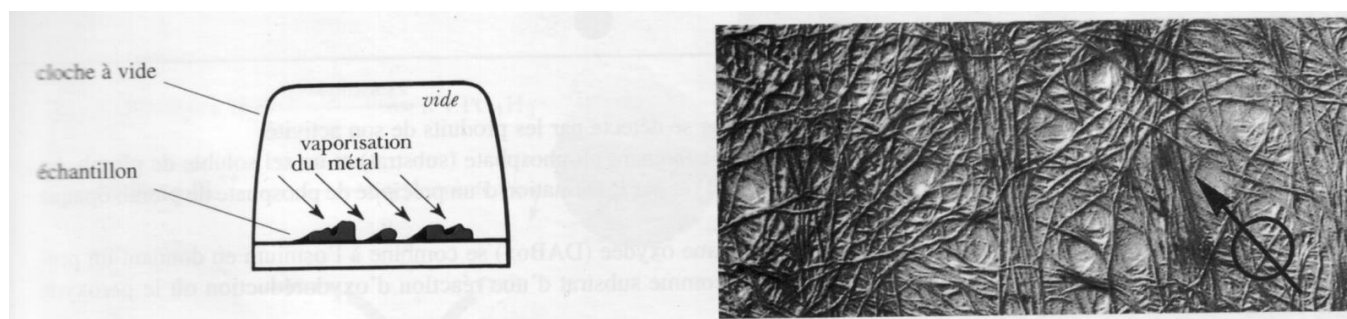
L'échantillon est fixé puis **recouvert d'une fine couche de métal lourd** et balayé par un faisceau d'électrons très étroit. Ce faisceau est réfléchi par l'échantillon et un détecteur permet de reconstituer une image. Suivant l'angle entre le faisceau et la surface, la quantité d'électrons diffusée est plus ou moins importante, ce qui donne un effet de relief.

La résolution est moins importante qu'en MET (grossissements d'environ 20000, contre 220000 en MET).



⇒ Ombrage métallique et MEB :

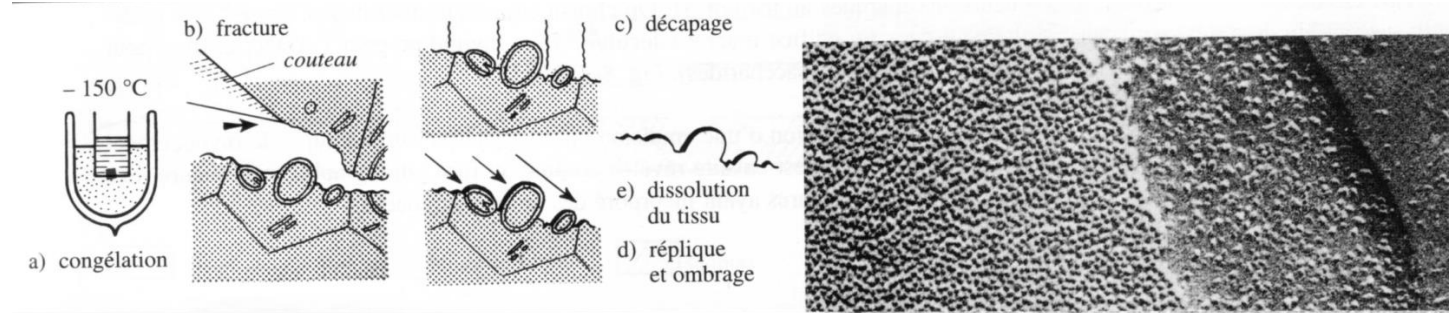
Du métal est vaporisé (sous vide) avec un angle d'environ 30° sur l'échantillon. Ceci permet d'accentuer les reliefs.



⇒ Cryofracture, cryodécapage et MEB :

L'échantillon est durci par un refroidissement rapide à -120°C (immersion dans l'azote liquide). Les blocs obtenus sont **fracturés (CRYOFRACTURE)** sous vide, et éventuellement **décapés (CRYODECAPAGE)** par sublimation de la couche superficielle de glace. Du métal est vaporisé sur la surface, ce qui permet d'obtenir une **réplique**, qui est observée au MEB.

Les plans de fracture correspondent aux **zones de moindre résistance**, soit aux membranes cellulaires (soit en surface, soit au cœur de la bicouche par séparation des deux feuilletts).

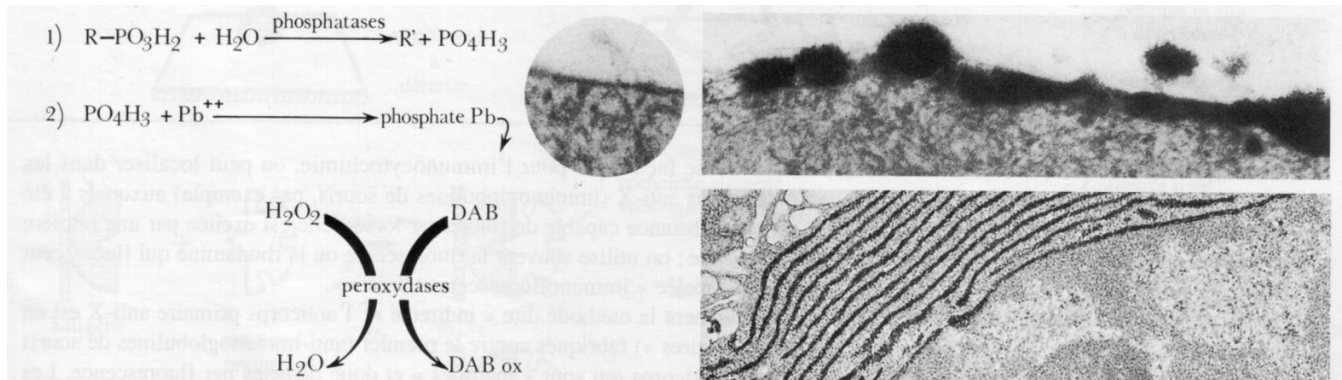


1.3. Marquages spécifiques utilisables en microscopie électronique

Les mêmes techniques de marquage spécifique, basées sur des réactions spécifiques ou l'utilisation d'anticorps, sont utilisables en microscopie électronique à transmission et en microscopie photonique. Mais là où la microscopie photonique utilise des réactions colorées ou des marquages fluorescents, la microscopie électronique utilise la radioactivité ou des composés opaques aux électrons.

⇒ Cytoenzymologie :

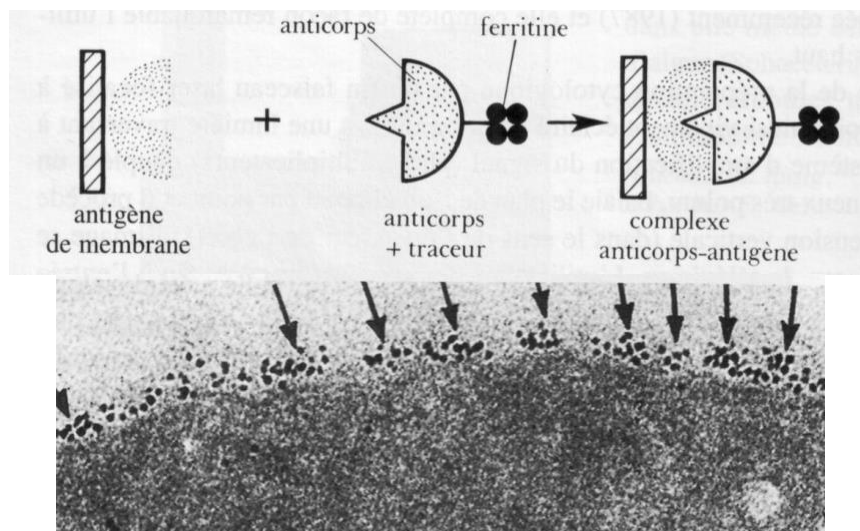
Recherche de **l'activité d'une enzyme** en incubant les cellules dans un substrat de cette enzyme qui produit une molécule colorée (en microscopie photonique) ou une molécule opaque aux électrons (en microscopie électronique) comme le phosphate de plomb.



⇒ Immunocytochimie :

L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de localiser dans une cellule une molécule particulière, que l'anticorps va reconnaître et à laquelle il va se fixer (il s'agit d'un **immunomarquage** : la même technique est utilisable à l'échelle d'un tissu ou d'un organe, on parle alors d'immunohistochimie).

En **microscopie électronique**, l'anticorps utilisé est couplé à des molécules opaques aux électrons (billes d'or, ferritine...).



Auto-évaluation

Après avoir lu attentivement le texte et les figures, répondre aux questions suivantes.

Relier les matériels d'observation avec les types d'observation ou techniques (*plusieurs correspondances peuvent être possibles*) :

- | | | |
|--------------------|-----------------------|--|
| MET | ☐ | ☐ Observation en couleur |
| MEB | ☐ | ☐ Observation en noir et blanc |
| Microscope optique | ☐ | ☐ Repérage spécifique d'une molécule/structure |
| | | ☐ Vue fluorescente |
| | | ☐ Observation de cellules/tissus fixés (morts) |
| | | ☐ Observation de cellules/tissus vivants |
| | | ☐ Vue en 3D |
| | | ☐ Vue d'une coupe |
| | | ☐ Autoradiographie |

Quel microscope(s) et/ou technique(s) utiliser pour réaliser les observations suivantes :

- Ultrastructure cellulaire (*l'ultrastructure est la structure interne de la cellule, dont les organites*)
- Mouvements de structures intracellulaires
- Embryon entier (taille : environ 3 cm par exemple)
- Chromatine (= ADN + protéines, lors de l'interphase)
- Une structure d'une taille de 25 nm

2. Mise en évidence de la structure en bicouche lipidique d'une membrane plasmique

Voir séance de TP

3. Les organites des cellules eucaryotes

Travail préparatoire à réaliser :

- **Lire** attentivement les descriptifs des organites
- **Observer** les différents documents photographiques proposés (indiqués par la flèche : ☞) afin de les **légender** à partir des explications et schémas explicatifs.

❶ Les organites (structures et fonctions) seront à connaître impérativement ❶

3.1. Le noyau de la cellule eucaryote

Le **noyau** est limité par une **double membrane (= enveloppe nucléaire)** en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique (*figure page suivante*). La membrane externe est recouverte de ribosomes, comme le REG.

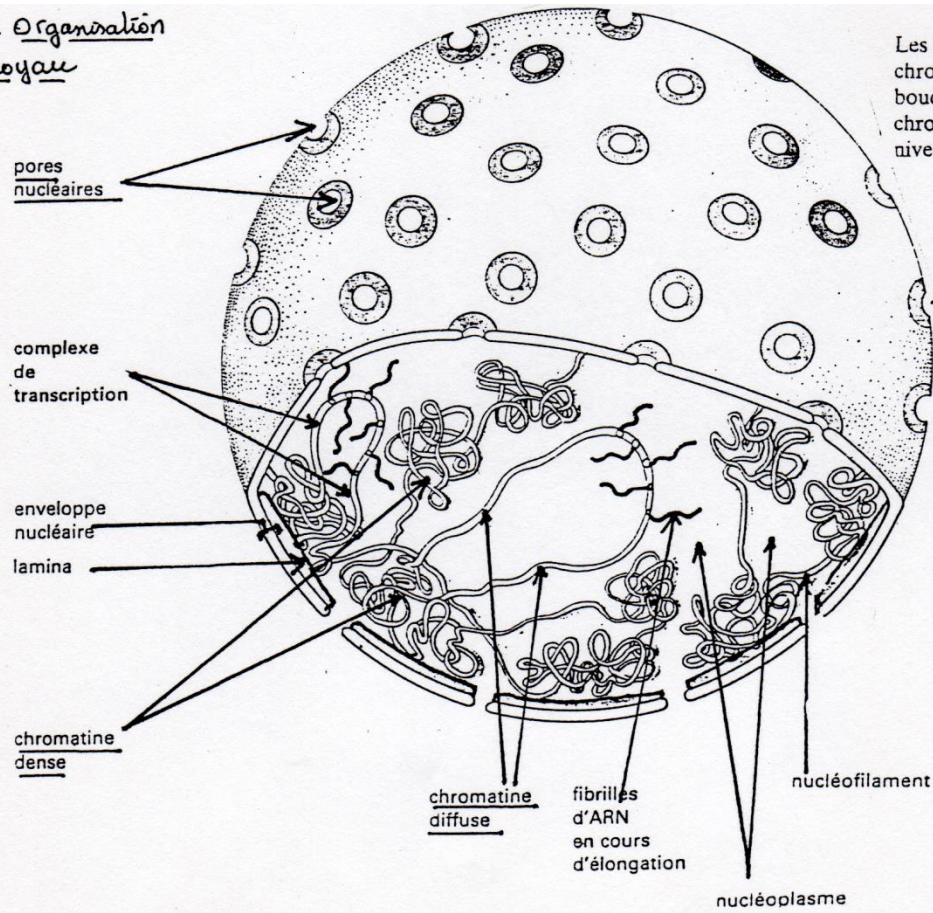
Les échanges entre le noyau et le cytoplasme sont contrôlés par les **pores nucléaires**.

Le noyau contient l'**ADN** de la cellule, organisé sous forme de **chromatine**, association de l'ADN avec diverses protéines (les chromosomes ne sont pas discernables individuellement en dehors de la mitose). La chromatine peut présenter deux états différents :

- **Hétérochromatine** : dense et très opaque aux électrons ; elle correspond à une forme compactée qui ne permet pas l'expression génétique
- **Euchromatine** : peu dense ; les gènes présents dans l'euchromatine peuvent s'exprimer

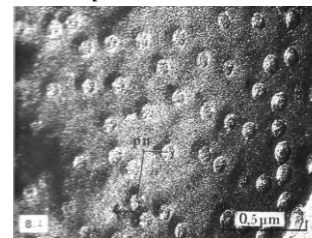
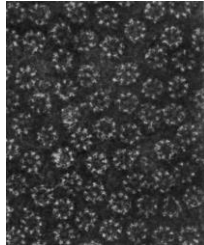
Par ailleurs, on observe un **nucléole** (parfois plusieurs) : il s'agit d'un compartiment nucléaire dans lequel se réalise la transcription d'ARNr et la formation des ribosomes.

modèle 3D - Organisation du noyau

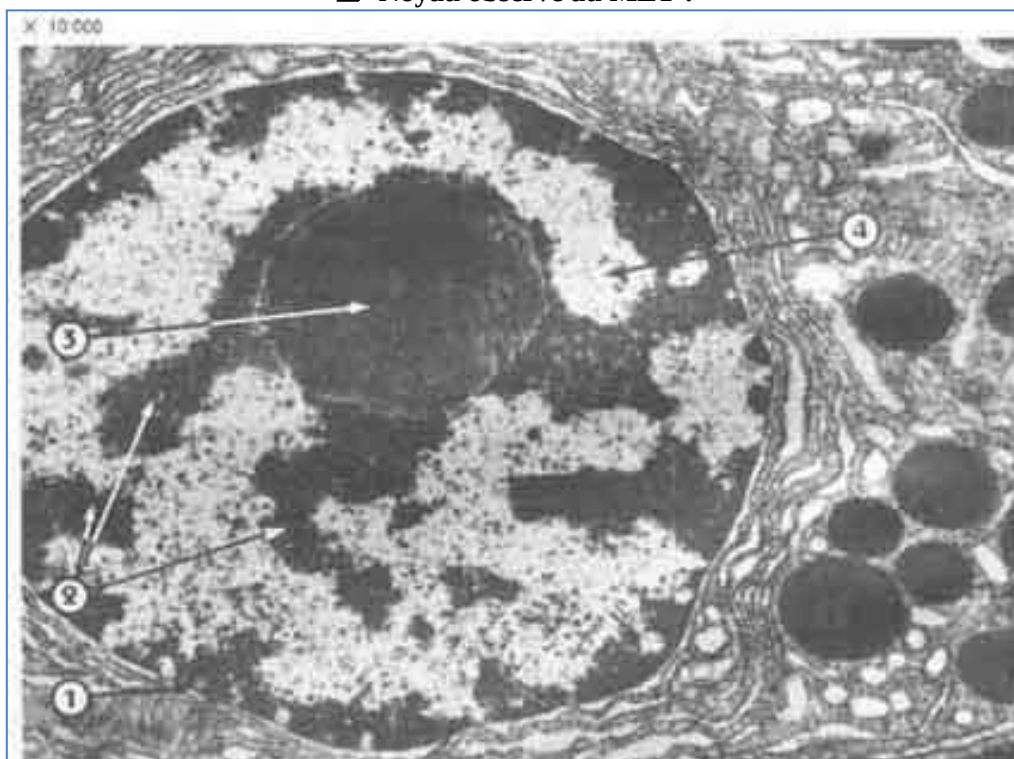


Les nucléofilaments formant les chromosomes sont déployés en boucles au niveau de la chromatine diffuse, repliés au niveau de la chromatine dense.

Enveloppe nucléaire vue en microscopie électronique :



☒ Noyau observé au MET :

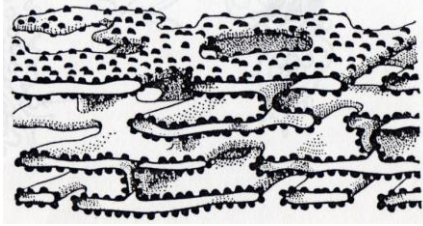


3.2. Système endomembranaire : le réticulum endoplasmique

Le **système endomembranaire** est un ensemble de structures, en relations par des flux de vésicules. Il comporte les **réticulums** (**granuleux** –REG- et **lisse** –REL-, en continuité) et l'**appareil de Golgi**.

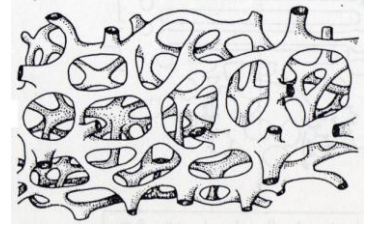
Le réticulum endoplasmique granuleux est le lieu de certaines synthèses protéiques (d'où la présence de ribosomes).

Le réticulum endoplasmique lisse est le lieu de synthèses lipidiques, et peut stocker certains ions comme le calcium Ca^{2+} .

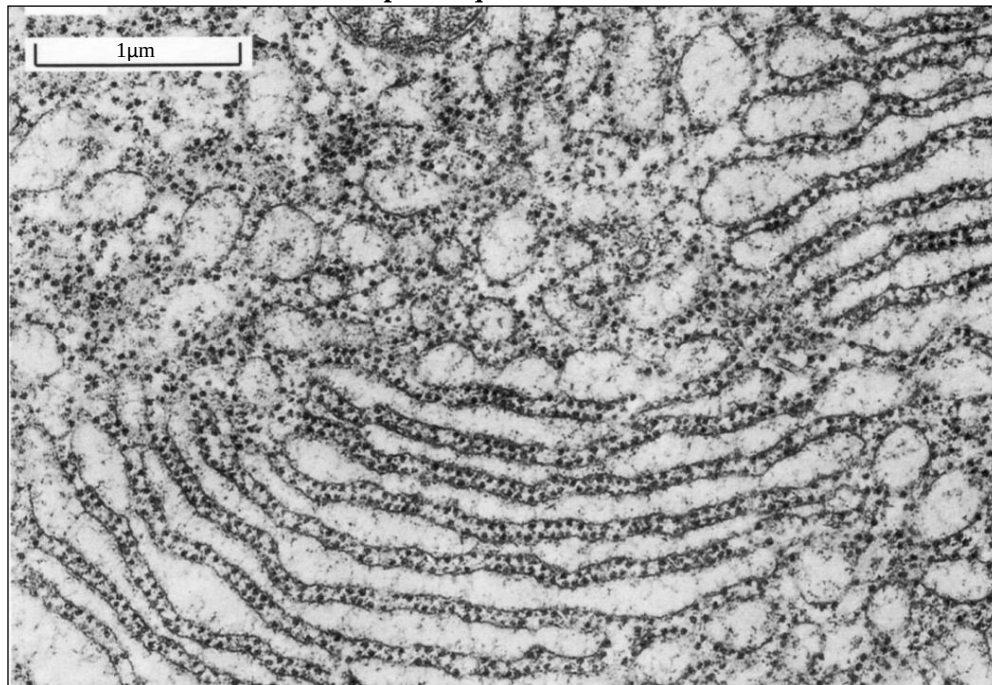


Modélisation 3D du
REG

Modélisation 3D du
REL



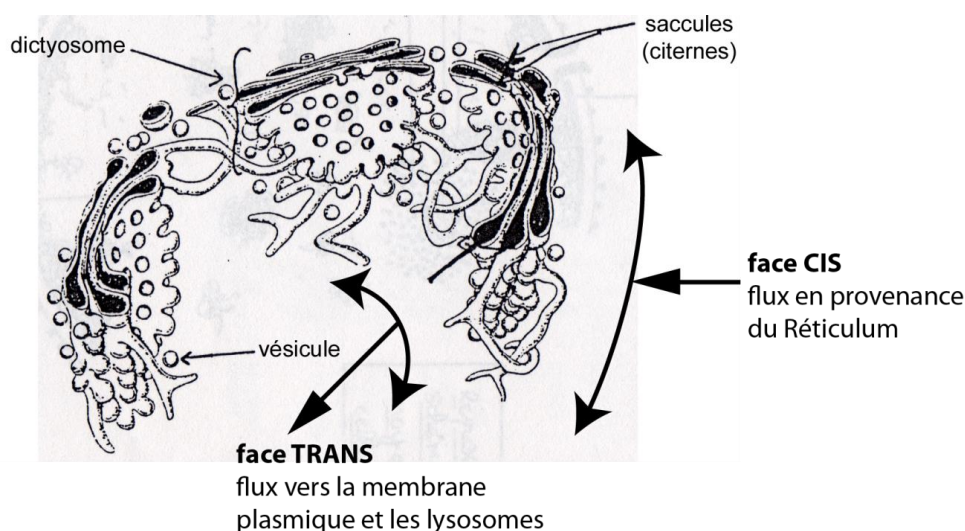
☒ Réticulum Endoplasmique Granuleux observé au MET



3.3. Système endomembranaire : l'appareil de Golgi

L'**appareil de Golgi** est un lieu de **transit** et d'**adressage** des protéines synthétisées destinées à être exocytées ou dirigées vers les lysosomes. Le Golgi possède une très nette polarité, et est en continuité avec le REG par des vésicules de transition, et avec la membrane plasmique par les vésicules de sécrétion.

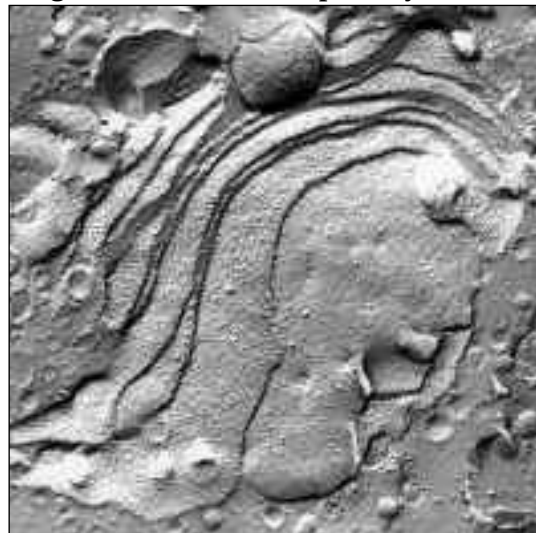
On distingue le saccule **cis** du côté du réticulum, puis le saccule **médian** et enfin le saccule **trans** et le **réseau trans-golgien**. Les protéines arrivent dans le Golgi par la face cis, puis en repartent (après maturation et tri) par la face trans.



⊗ Appareil de Golgi observé au MET



⊗ Appareil de Golgi observé au MEB, après cryofracture et cryodécapage

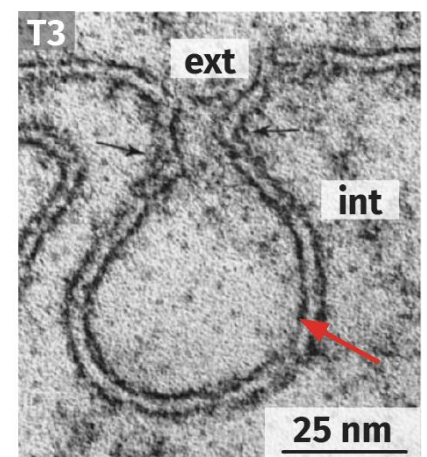
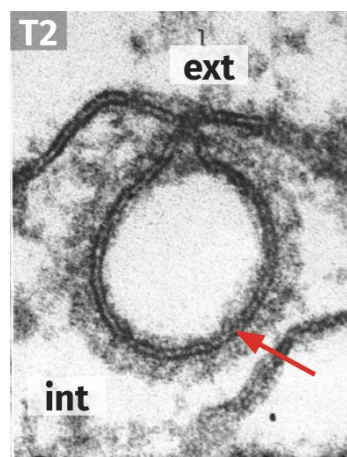
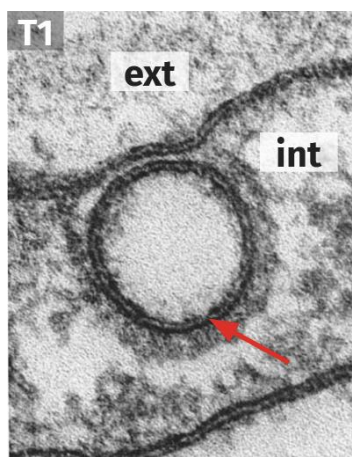


3.4. Système endomembranaire : les vésicules de sécrétion

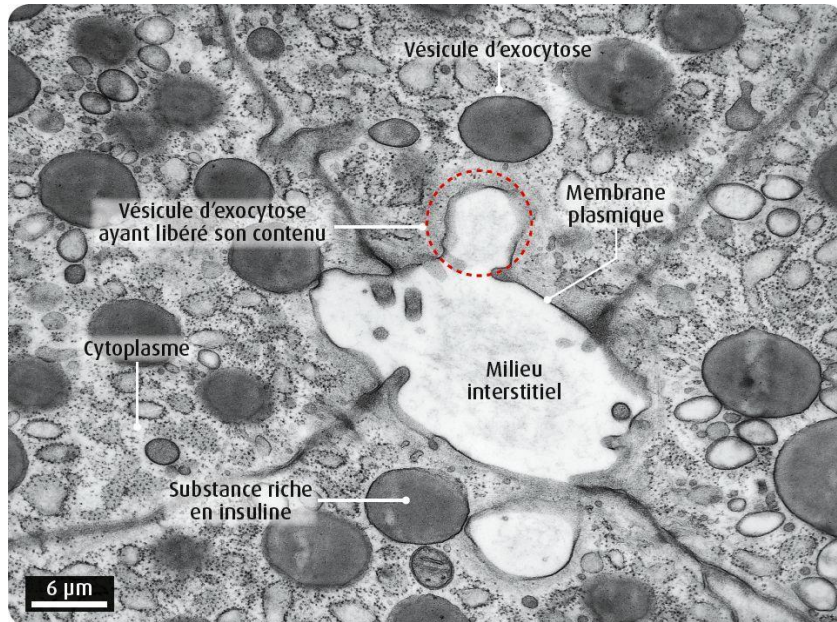
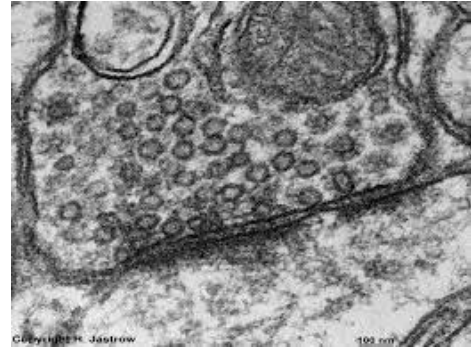
Les vésicules émises par l'appareil de Golgi ont deux destinations possibles : les lysosomes, ou la membrane plasmique. Dans ce deuxième cas de figure, il s'agit alors de vésicules de sécrétion, qui permettent :

- Le renouvellement des protéines de la membrane plasmique.
- L'exocytose constitutive dans le milieu extracellulaire (des constituants de la matrice extracellulaire par exemple).
- L'exocytose régulée dans le milieu extracellulaire, déclenchée par la détection d'un stimulus (ex : exocytose des vésicules de neurotransmetteurs au niveau des boutons synaptiques des neurones).

Trois étapes d'une
exocytose
observées au MET



Bouton synaptique avec vésicules de neurotransmetteurs observé au MET



Vésicules de sécrétion contenant de l'insuline (= hormone) dans les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, observées au MET

3.5. Les lysosomes,

Les **lysosomes** sont des organites qui participent aux phénomènes de « digestion » cellulaire : destruction d'organites âgés, phagocytose d'éléments extérieurs, etc.

Il s'agit de d'organites présentant :

- Un **pH acide**, grâce à des pompes à protons maintenant de manière active cette différence de pH par rapport au cytosol.
- De **nombreuses enzymes hydrolytiques**, permettant la digestion des molécules.

Les lysosomes interviennent en particulier :

- Dans les processus d'hydrolyses d'éléments extracellulaires, après leur internalisation (par endocytose ou phagocytose) ; les vésicules d'endocytose ou de phagocytose fusionnent avec des **endosomes** (dont le pH n'est que faiblement acide), puis l'action des pompes à protons permet d'acidifier l'endosome pour le « transformer » en lysosome.
- Dans les processus d'hydrolyses d'éléments intracellulaires (mitochondries défectueuses ou surnuméraires par exemple) ; les lysosomes viennent alors englober les structures à hydrolyser.

☒ Lysosomes de tailles variables observés au MET

