
Structures cellulaires et endocytose visualisées en fluorescence : Marquage de structures cellulaires par sondes directes fluorescentes (DiOC6, Mitotracker, LysoTracker) et étude cinétique de l'endocytose de la transferrine par les cellules HELA.

Introduction.

C'est à l'aide de techniques basées sur la fluorescence que nous avons pu étudier des structures cellulaires (Mitochondries, Lysosomes et Réticulum endoplasmique), en comparant des micrographies espacées dans le temps, nous avons pu observer la cinétique de l'endocytose de la transferrine sur des cellules HELA.

Nous commencerons par une introduction au microscope en épifluorescence et au microscope confocal. Celle-ci permettra de rappeler les notions et les principes des appareils utilisés tout au long des expériences réalisées en laboratoire. Nous analyserons ensuite les résultats obtenus à l'aide de différentes micrographies. Après analyse des résultats, nous discuterons sur la qualité de ceux-ci et conclurons sur les perspectives qu'offrent les différentes techniques (choix des marqueurs par exemple) utilisées.

Microscope en épifluorescence et microscope confocal :

Principe de la fluorescence :

Une molécule **fluorescente** (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété **d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission)**(**figure 1**).

Figure 1 : Schéma d'absorption, d'excitation et d'émission de lumière d'un fluorochrome
<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Introduction/player.html>

Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve dans un état électroniquement excité, généralement un état singulet, que l'on note S^* .

Cet état excité est un état instable (de 10^{-15} à 10^{-9}) et le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières dont l'une d'elles est l'émission d'un photon, c'est le **phénomène de fluorescence**. (**figure 2**).

Figure 2 : Schéma général de la fluorescence d'une molécule
<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Introduction/player.html>

Le microscope en épifluorescence

Une large gamme de longueurs d'onde existe et sont capables d'exciter la fluorescence mais il y a aussi une large gamme de longueurs d'ondes réémises par le fluorochrome.

Les spectres d'absorption et de réémission définissent ces gammes et sont spécifiques du fluorochrome utilisé.

Pour obtenir une fluorescence contrastée, il est nécessaire d'avoir un **filtre d'arrêt** pour essayer d'arrêter les radiations incidentes (excitant la fluorescence) en le plaçant entre l'objet et l'observateur. Ce filtre laisse passer les longueurs d'ondes correspondant à la lumière réémise.

Il est tout aussi nécessaire de placer un **filtre d'excitation** qui sélectionne les longueurs d'ondes induisant une fluorescence entre la source et la matière fluorescente.

Les deux types de filtres sont disposés de manière sériée (**figure 3**).

Figure 3 : Schéma du dispositif du microscope en épifluorescence
Livre de tp de biologie cellulaire : tp n°4, page 5

Le microscope confocal

La microscopie confocale est basée sur la microscopie à fluorescence dont la lampe est un laser.

Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation sera suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence.

Les préparations sont « marquées » avec des fluorochromes qui permettent cette fluorescence.

Dans le microscope confocal (**figure 4**), un miroir semi-réfléchissant renvoie le faisceau réfléchi vers le détecteur. La source est constituée d'un laser, dont le faisceau est balayé en x et en y sur l'objet. Le détecteur recueille l'image en 2D point par point, puis le porte-objet est déplacé en z d'un pas constant, et à chaque avancée d'un pas une image xy est enregistrée dans la mémoire de l'ordinateur. On acquiert ainsi un fichier numérique à trois dimensions constitué de l'intensité de chaque point x, y, z.

Avantages de la microscopie confocale :

- La faible profondeur de champ permet d'obtenir une image d'un plan focal avec une définition supérieure par rapport à un microscope conventionnel et le bruit de fluorescence est pratiquement éliminé.

Figure 4 : Schéma d'un microscope confocal
<http://www.techno-science.net/?onglet=articles&article=2>

- Permet une reconstruction 3D de l'objet.
- La numérisation des images sur ordinateur donne la possibilité d'augmenter l'analyse des objets étudiés.

Inconvénients de la microscopie confocale :

Malgré une définition élevée, il subsiste cependant un bruit de fluorescence (même si celui-ci est réduit).

Matériel et Méthode

Partie 1 : marquage des structures cellulaires par sondes directes fluorescentes

Les cellules utilisées lors de ce rapport, pour les expériences concernant le marquage des structures cellulaires par sondes directes fluorescentes, sont des cellules EAHY926 soit des cellules endothéliales immortalisées issues de cordons ombilicaux. Les cellules ont été cultivées sur couvre-objet en boîte de 24 puits dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fS tal, le tout gardé à une température de 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Pour le marquage de structures cellulaires par sondes directes fluorescentes les sondes utilisées seront choisies en fonction de la structure cellulaire ciblée :

Pour le réticulum endoplasmique, on utilisera la sonde **DiOC6**. Il s'agit d'une carbocyanine à courte chaîne qui colore les membranes intracellulaires de cellules vivantes ou préalablement fixées par du glutaraldéhyde. Remarquons que cette sonde a tendance à colorer également les mitochondries. Pour éviter que nous observions à la fois le RE et les mitochondries, on veillera à laisser un peu de temps avant l'observation au microscope afin que la fluorescence moindre contenue dans les mitochondries ait disparu.

Le **MitoTracker** sera utilisé dans le marquage spécifique des mitochondries. Cette sonde diffuse passivement à travers la membrane plasmique et s'accumule dans les mitochondries actives et à des concentrations inférieures à 1 μM . Il a l'avantage d'être stable et de permettre une post-fixation avec des fixateurs aldéhydiques.

Afin de mettre en évidence les lysosomes, nous utiliserons la sonde **Lysotracker**. Cette sonde fluorescente couplée à une base faible est partiellement protonée à pH neutre et s'accumule dans les lysosomes et dans les autres organelles dont le pH est acide comme les vésicules transgolgiennes et les endosomes.

Avant de marquer les cellules au DiOC6 pour mettre en évidence le réticulum endoplasmique des cellules, on veillera à soigneusement aspirer les puits sans stresser ni gratter le milieu de culture avec une pipette pasteur. On fixera ensuite les cellules durant 5 minutes avec du Gutaraldéhyde 0,25% dans du tampon cacodylate de sodium. Après deux rinçages successifs au tampon cacodylate, 500 μL de sonde sont déposées dans les puits. Après une incubation des cellules durant 5 minutes à 37°C, les cultures sont à nouveau rincées trois fois successivement au tampon cacodylate de telle manière à ce que les sondes restantes ne soient que celles intégrées dans les cellules. La procédure de marquage se termine par le montage sur lamelle des cellules au Mowiol.

Le marquage au Mitotracker commence lui aussi par une aspiration attentive du milieu des puits. On diluera d'abord les sondes avant de les insérer dans les puits. Une solution de sonde 250 nM soit une dilution de 1/4000 est réalisée en 2 étapes. Premièrement, une dilution 1/500 soit en diluant 2 μL de solution stock dans 998 μL de milieu. Deuxièmement, 125 μL de la solution préparée est prélevée et ajoutée à

968 μL de milieu. 500 μL de solution de sonde diluée est ajoutée dans les puits. Après une incubation de 15 minutes à 37°C, les puits sont rincés trois fois avec 1 ml de milieu. La fixation s'effectue avec un ajout pendant 10 de Gutaraldéhyde. On rince ensuite 2 fois les puits avec du tampon cacodylate de sodium 1M, pH 7,4. On monte les cellules sur lamelle au Mowiol.

Pour le marquage au Lysotracker, le protocole expérimental est similaire à celui suivi pour le Mitotracker. La différence réside dans la dilution des sondes : On prépare une solution de sonde 75 nM en deux étapes. Tout d'abord, 2 μL de stock sont dilués dans 998 μL de milieu. 38 μL de cette dilution sont prélevés et ajoutés à 968 μL de milieu.

Les cellules sur les lamelles vont être observées en microscopie confocale. Les observations doivent être réalisées suivant des longueurs d'ondes spécifiques à chaque sonde. Les paramètres des sondes pour l'observation au microscope sont représentées dans le tableau suivant :

Sonde	λ Excitation	λ Emission
DiOC6	484nm	501nm
Mitotracker	579nm	599nm
Lysotracker	577nm	590nm

Partie 2 : Cinétique de l'endocytose de la transferrine par les cellules HELA

La deuxième partie de la séance de TP a pour but de nous faire comprendre l'endocytose liée aux récepteurs. Nous étudions à l'aide de cellules HELA la cinétique de l'endocytose par récepteur interposé de la transferrine. Les cellules HELA sont des cellules transformées du col de l'utérus de Henrietta Lacks, morte en 1951. Cette lignée immortalisée est couramment utilisée en laboratoire. Nous employons de la transferrine couplée à des molécules fluorescentes (une dans le vert et l'autre dans le rouge). La première tâche consiste à suivre, avec la transferrine verte, l'endocytose pendant 30 minutes. Enfin, l'emploi des deux transferrines à quelques

minutes d'intervalle met en évidence la dynamique du phénomène. L'observation se fait au microscope confocal.

La transferrine que nous utilisons lors de cette séance est de la transferrine issue de sérum humain couplée à des Alexa 488 (émission dans le vert) et 568 nm (émission dans le rouge-orange). Les maxima d'absorption/émission sont de ~495/519 nm et ~578/603 nm respectivement. Ces deux fluorochromes sont donc suffisamment éloignés spectralement pour garantir une bonne visualisation en microscopie confocale.

Le fer est transporté dans le plasma par la transferrine. Elle est synthétisée dans le foie et son renouvellement est de 15% par jour. Cette glycoprotéine est structurée en deux chaînes de polypeptides possédant chacune deux chaînes latérales sucrées terminées par de l'acide sialique.

La transferrine peut fixer deux Fe^{3+} avec un CO_3^{2-} à chaque fois. Il existe ainsi quatre formes de transferrine :

- sans fer, l'apotransferrine;
- avec un fer en -C term, transferrine monoferrrique (haute affinité) ;
- avec un fer en -N term, transferrine monoferrrique (affinité moindre) ;
- avec deux fer, transferrine diferrrique.

Toutes les cellules savent fixer la transferrine porteuse de un ou deux fer (Tf-Fe). Le complexe se lie à son récepteur avant d'être internalisé. Il y a formation d'un endosome primaire puis secondaire. L'acidification du contenu permet la réduction du fer qui se dissocie de la transferrine et passe dans le cytosol. L'endosome retourne en membrane plasmique. L'apotransferrine se détache du récepteur et est libérée dans le plasma. Ce phénomène d'endocytose par récepteur interposé dure de 10 à 30 minutes.

Les cellules Héla, repiquées sur couvre-objet (densité : 50 000 cellules/puits) et

incubées à 37°C avec 5% de CO_2 , ont été mises au repos à 13h dans un milieu DMEM sans sérum. La préparation de deux solutions avec transferrine a été effectuée en premier.

Le milieu de culture utilisé est le DMEM contenant un stabilisateur de pH, 1 HEPES. Il faut y ajouter : Un saturateur de sites non spécifiques, 1 albumine bovine (BSA: albumine bovine préparée à 50µg/ml PBS) et ensuite la transferrine fluorescente adéquate (concentration idéale testée : 50 µg/ml de milieu).

La solution A est celle de la transferrine verte (40µl soit 200µg de solution stock) avec 80 µl de BSA dans 4ml du milieu de culture. La solution B est celle de la transferrine rouge. Les mêmes proportions sont gardées mais pour un volume final moitié moindre.

Pour la cinétique d'endocytose, deux tests ont été réalisés :

- (1) un simple marquage à la transferrine verte s'étalant sur 30 minutes;
- (2) un double marquage à la transferrine verte puis rouge sur 45 minutes.

Notre groupe a suivi un timing similaire dans les deux cas. Tous les puits ont été vidés de leur milieu sans sérum, puis remplis avec la solution A de transferrine verte et placés à incuber. Le temps d'incubation est de 15 min pour le double marquage. Ensuite tous les puits sont rincés deux fois avec du milieu PBS. La transferrine rouge (300µl) est ajoutée dans les puits et la cinétique commence.

Lorsque le temps est venu, les puits concernés sont rincés au PBS glacé pour bloquer les réactions cellulaires. Les cellules peuvent alors être fixées pendant 10 min avec la solution de paraformaldéhyde. Elles suivent de nouveaux rincages avec du PBS.

Il fallait arrêter les réactions à 1, 5, 15 et 30 minutes pour le simple marquage à la transferrine verte. Cependant, ces temps d'incubations ont été perturbés suite à un léger accident survenu au début de cette manipulation. Les durées pour le double marquage étaient de 5, 15, 30, et 45 min.

Résultats

Partie 1 : Structures cellulaires et endocytose visualisées en fluorescence

Visualisation du réticulum endoplasmique

Le DiOC6 colore le réticulum endoplasmique de chaque cellule en vert. Celui-ci se trouve principalement autour du noyau de la cellule qui apparaît très bien sur chaque micrographie. Celui-ci apparaît comme une tache ovoïdale plus sombre. Le réticulum endoplasmique n'est pas limité à la région du noyau. On peut y observer de longues digitations comme sur les photos 1 et 2.

Photo 1. Microscopie à fluorescence. Mise en évidence du RE via DiOC6.

Photo 2. Microscopie à fluorescence. Mise en évidence du RE via DiOC6.

Visualisation des mitochondries

Les mitochondries mises en évidence par le Mitotracker apparaissent en rouge au microscope. Elles se retrouvent autour du noyau qui n'étant pas marqué par la sonde apparaît comme une tache ovoïdale foncée. Dans la photo n°3, on perçoit bien l'aspect granuleux, chaque granule correspondant à une mitochondrie. Dans la photo n°4, on peut remarquer que la localisation des mitochondries n'est pas restreinte à la zone proche du noyau.

Photo 3. Microscopie à fluorescence. Mise en évidence des mitochondries avec Mitotracker. Aspect granuleux.

Photo 4. Microscopie à fluorescence. Mise en évidence des mitochondries avec Mitotracker. Localisation mitochondries.

Visualisation des lysosomes

Les lysosomes apparaissent très clairement en rouge orange au microscope grâce au marquage au Lysotracker. Chaque lysosome apparaît sous la forme d'un petit bâtonnet. En comparant la forme et le nombre de lysosomes aux mitochondries, on voit que les lysosomes sont de taille supérieure aux mitochondries mais ils sont en moins grand nombre. On voit toujours clairement la localisation du noyau.

Photo 5. Microscopie à fluorescence. Mise en évidence des lysosomes avec du Lysotracker. Lysosomes sous forme de nombreux bâtonnets.

Partie 2 : Cinétique de l'endocytose de la transferrine par les cellules HELA

Résultats du marquage à la transferrine couplée à Alexa 488 nm :

Le signal croît avec le temps. La couleur verte est beaucoup plus présente dans les micrographies correspondant aux temps les plus longs (15 et 30 minutes).

À 5 min, il est possible de distinguer les formes des cellules.

Le signal augmente considérablement de 15 à 30 min :

- 15 min : nous pouvons constater des zones noires correspondant aux emplacements des noyaux.
- 30 min : la quantité de transferrine est importante. Non seulement nous observons les zones des noyaux mais aussi les contours plus nets du cytoplasme des cellules.

Les micrographies associées au marquage à la transferrine couplée à Alexa 488 nm sont reprises à la fin du rapport annexe 1.

Résultats du double marquage à la transferrine couplée à Alexa ($\lambda = 488$ et 568 nm) :

Nous ne disposons pas des images de notre groupe car le marquage a été malheureusement effectué les deux fois avec la même transferrine couplée à l'Alexa 568 nm.

Il n'y avait donc aucun résultat lors de la détection à 488 nm. La seule couleur émise était le rouge. Les images obtenues ne fournissaient aucune information supplémentaire par rapport au simple marquage à la transferrine verte. La description des micrographies ainsi que la partie discussion se feront donc sur base des résultats d'un autre groupe.

Les micrographies associées au double marquage à la transferrine couplée à Alexa ($\lambda = 488$ et 568 nm) sont reprises à la fin du rapport annexe 2.

▪ Description des micrographies :

Détection Alexa à 488 nm :

Le signal décroît de manière générale avec le temps d'exposition à la transferrine rouge. La couleur verte est plus présente dans les micrographies correspondant à des expositions courtes (5 et 15 min). À 15 min, il est possible de bien distinguer la zone noire due à la présence du noyau ou le liseré noir dû à l'espace intercellulaire. Le contour des cellules n'est plus visible à 30 min. Un marquage très faible subsiste à 45 min.

Détection Alexa à 568 nm :

Le signal augmente de 5 à 45 min. La différence entre 5 et 15 min est la plus marquée. Les résultats obtenus en 30 et 45 min sont très proches. Nous observons des contours cellulaires nets ainsi que les zones occupées par les noyaux.

Superposition :

La superposition des signaux vert et rouge donne une couleur jaune sur les micrographies. La superposition des deux types de transferrine est la plus marquée à

15 min. Elle diminue fortement à 30 min. Les micrographies 5 et 45 min ne comportent que peu de jaune.

Discussion, conclusions, perspectives

A propos du marquage du réticulum endoplasmique par le DiOC6

Nous avons réussi à colorer et à mettre en évidence le réticulum endoplasmique en utilisant la sonde DiOC6. La répartition du réticulum endoplasmique observée est bien celle attendue théoriquement. Celui-ci se trouve tout autour du noyau et de nombreuses digitations vont occuper différentes parties de la cellule. Le noyau présente une couleur verdâtre foncée qui n'est pas due à un marquage du noyau par le DiOC6, mais à la répartition tout autour du noyau et en trois dimensions du réticulum endoplasmique. On peut parfois voir certaines taches, granules plus colorées que l'ensemble du réticulum endoplasmique. Il est possible qu'il s'agisse de mitochondrie. Afin d'atténuer leur expression, nous aurions pu attendre encore un peu avant de prendre les photos.

A propos du marquage des mitochondries par le Mitotracker

Les cellules ont bien été marquées par le Mitotracker et nous pouvons facilement localiser les mitochondries dans la cellule. Une seule photographie sur six permet de bien séparer chaque mitochondrie l'une de l'autre. Dans les autres photographies, la coloration semble assez diffuse. Peut-être aurait-il fallu attendre un peu plus de temps avant de prendre les photos, ou bien s'agit-il d'un problème de mise au point du microscope.

A propos du marquage des lysosomes à l'aide du LysoTracker

Le marquage au LysoTracker a très bien marché et nous pouvons observer très distinctement la répartition des nombreux lysosomes au sein de chaque cellule. N'oublions cependant pas que ce marquage n'est pas totalement spécifique des

lysosomes. La sonde marque les vésicules à pH faible. Nous pourrions donc avoir sur nos micrographies diverses vésicules transgolgiennes ou endosomes.

A propos du marquage à la transferrine couplée à Alexa 488 nm

— Nous pouvons constater que le résultat obtenu sur la micrographie à 5 min présente un décalage par rapport à ce qui aurait du apparaître. Ceci est dû à l'incident qui a perturbé le bon déroulement de la cinétique. Le résultat est plus proche d'un temps d'incubation de 15 minutes que de 5 minutes.

Même si la quantité de transferrine croît avec le temps, normalement nous ne devrions pas encore constater la forme des cellules mais plutôt un nuage vert non encore définissable. C'est-à-dire que nous devrions observer un commencement d'endocytose dans les cellules à peine plus avancé que celui vu sur la micrographie à 1 min.

Il faut une attention beaucoup plus stricte pour ne pas obtenir ce type d'erreur. Cela pouvant fausser fortement les résultats : en ne percevant pas de cohérence avec la théorie ou les données de la littérature ou en émettant de mauvaises hypothèses concernant le processus d'endocytose lié aux récepteurs.

A propos du double marquage à la transferrine couplée à Alexa ($\lambda = 488$ et 568 nm) :

Nous avons dû modifier l'intitulé des micrographies car celui-ci ne correspondait pas à la manipulation effectuée. En effet, il était noté « Endocytose de la transferrine couplée à Alexa 568nm pendant 15 min, suivie par une cinétique d'endocytose de la transferrine couplée à Alexa 488nm. » Selon le protocole suivi, nous avons plutôt commencé par la transferrine verte (Alexa 488nm) avant de laisser différents temps de marquage à la transferrine rouge (Alexa

568 nm). De plus, les résultats obtenus sur les micrographies en microscopie confocale correspondent aux attentes relatives à ce protocole.

La légende correcte est donc « Endocytose de la transferrine couplée à Alexa 488 nm pendant 15 min, suivie par une cinétique d'endocytose de la transferrine couplée à Alexa 568nm ». Enfin, il s'agit de modifier en conséquence l'axe temporel : « x min de Tf 488 nm » devient « x min de Tf 568 nm ».

- Détection Alexa 488 nm :

Contrairement à l'allure générale du simple marquage à la transferrine verte, la quantité de transferrine internalisée est importante en début de cinétique et décroît avec le temps. Ceci s'explique par le fait qu'ici la transferrine verte a été mise en début de manipulation. Elle est donc déjà restée 15 min en plus du temps renseigné pour l'incubation en présence de transferrine rouge. Le nombre de minutes pour la transferrine verte sont donc au minimum : 20, 30, 45 et 60. Vu la durée de l'endocytose qui est de 10 à 30 min, les micrographies représentent la partie terminale du phénomène.

- Détection Alexa 488 nm :

Nous observons une augmentation de détection très importante entre 5 et 15 min. C'est au cours de cet intervalle de temps que débute l'internalisation de la transferrine rouge. L'endocytose de cette transferrine se poursuit à un rythme soutenu au cours des minutes suivantes.

- Superposition :

L'évolution de la coloration des micrographies correspond à nos attentes. La transferrine verte cède la place à la rouge. La transition s'effectue un peu avant 15 min et 30 min principalement. Sur la micrographie prise à 15 min, le vert domine les zones avec un seul type de transferrine. Le rouge lui succède dans la micrographie de 30 min.

Bibliographie

<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Introduction/player.html>

<http://www.techno-science.net/?onglet=articles&article=27&page=5>

<http://probes.invitrogen.com/>

http://www.picin.u-bordeaux2.fr/Cours/formation_2006/FluorescenceDIAPOS

http://www.picin.u-bordeaux2.fr/Cours/formation_2006/FluorescenceDIAPOS

<http://www.spiral.univlyon1.fr/polycops/Hematologie/CellulesSanguines/CellulesSangDESDis-35.html>

http://ist.inserm.fr/basismedsci/2002/ms_11_2002/sommaire/1126_Benmerah_S.pdf

Livre de tp de biologie cellulaire, tp n°4