

L2

BCD

TP de biologie cellulaire

Boris Bardot, Sarra Bellanger, Benjamin Bonneau, Caroline Borday, Odile Bronchain, Emmanuel Culetto, Marianne Delarue, Yves Deveaux, Françoise Jamen, Boris Julien, David Latrasse, Alexia Le Barch, Morgane Locker, Sofia Mathieu, Léa Mayeur, Laurence Mery, Patrick Pla

Objectif des travaux pratiques

- Mettre en application la technique d'immunofluorescence et en connaître le principe.
- Visualiser et décrire l'organisation du cytosquelette dans des cellules animales en culture (microfilaments et microtubules).
- Analyser et interpréter les conséquences de traitements à la cytochalasine D et au nocodazole sur l'organisation du cytosquelette.
- Manipuler les fonctions de base d'un logiciel de traitement d'image (ImageJ) et réaliser un montage d'images.

Planning:

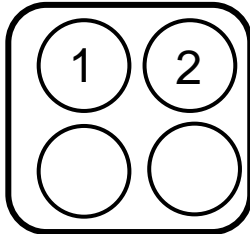
| Jour 1 | Jour 2 |
|--|---|
| Présentation du TP Traitement nocodazole ou cytochalasine D Marquage actine et tubuline Prise d'images Analyse de données complémentaires (Western Blot) | Présentation de l'analyse d'images Utilisation du logiciel Image J |

Activités :

| | |
|--|---|
| Jour 1 : Mise en évidence des microfilaments et des microtubules | 2 |
| Jour 1 : Prise d'images | 3 |
| Jour 1 : Analyse de données complémentaires (Western Blot) | 4 |
| Jour 2 : Analyse d'images..... | 6 |

Jour 1 : Mise en évidence des microfilaments et des microtubules

Les cellules utilisées sont des fibroblastes de souris immortalisés NIH3T3. Elles ont été préalablement ensemencées dans une boîte 4 puits, dont seuls les puits 1 et 2 ont été utilisés.



Puits 1 : Cellules contrôles (contrôle négatif, sans traitement)

Puits 2 : Cellules à traiter avec nocodazole **OU** cytochalasine D

Solutions à disposition ou à préparer :

Tampon phosphate = PBS

Tampon de fixation = PBS + PFA 4%

Tampon de perméabilisation (TP) **à préparer en séance** : tampon phosphate (=PBS) + 1% sérum albumine bovine + 0.2% Triton X-100

Solution NH_4Cl 50mM dans du PBS

Solution de marquage : anticorps anti-tubuline-Alexa fluor-488 dilué au 1/500^e + phalloïdine-Alexa fluor-555 diluée au 1/500^e dans du tampon de perméabilisation

Solution de Hoechst 33342 à 1mg/mL

Nocodazole: solution stock 1 mg/mL

Cytochalasine D: solution stock 0,1 mg/mL

Point important : vous fonctionnerez en paires de binômes. Un binôme traitera les cellules avec la cytochalasine D, l'autre avec le nocodazole. Vous mettrez ensuite en commun les images acquises sur les cellules traitées par ces deux drogues.

Procédure expérimentale :

1. Retirez le milieu des puits et placez le dans un tube Falcon. Remettez 500 μL de milieu dans les puits 1 et 2.
2. Dans le puits 2, ajoutez du nocodazole ou de la Cytochalasine D au 1/200^e. Ne pas toucher au puits 1 qui servira de contrôle. Incubez 30 min.
3. Retirez, à l'aide de la P1000, le liquide contenu dans les puits puis ajoutez 1 ml de PBS par puits
4. Enlevez le PBS sous la hotte et ajoutez 500 μL de tampon de fixation dans chaque puits. Incubez 15 min sous hotte

5. Retirez le tampon de fixation de chaque puits sous la hotte et ajoutez 500 μL de NH_4Cl par puits. Incubez 10 min
6. Pendant ce temps, préparez 10 mL de tampon de perméabilisation (TP)
7. Retirez le NH_4Cl de chaque puits et ajoutez par puits 500 μL de TP contenant du Hoechst dilué au 1/1000e
8. Incubez 15 min à température ambiante
9. Dans les deux puits, retirez le TP puis ajoutez 200 μL de la solution de marquage préparée par votre enseignant
10. Incubez 1h30 dans une étuve à 37°C.
11. Retirez la solution de marquage, puis lavez deux fois les deux puits en ajoutant 500 μL de TP. Laissez le dernier ajout de TP dans les puits.

Jour 1 : Prise d'images

Vous allez observer dans vos boîtes les cellules fixées à l'aide des microscopes à épifluorescence Evos, selon 4 modes :

1. transmission : illumination en lumière blanche, qui vous permet de voir les contours des cellules et par contraste le noyau.
2. filtre DAPI : le DAPI est une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN. Elle fluoresce en bleu ($\lambda = 450\text{-}490\text{ nm}$) lorsqu'elle est excitée avec de la lumière ultra-violette ($\lambda = 350\text{ nm}$).
3. filtre GFP : permet de détecter le fluorochrome lié à l'anticorps anti-tubuline. L'Alexa fluor-488 émet une lumière verte (520 nm) lorsqu'il est excité avec de la lumière bleue ($\lambda = 495\text{ nm}$).
4. filtre RFP : il permet de détecter le fluorochrome lié à la phalloïdine. L'Alexa fluor-555 émet une lumière orangé-rouge ($\lambda = 565\text{ nm}$), lorsqu'il est excité avec de la lumière verte ($\lambda = 555\text{ nm}$).

Vous prendrez une image dans chacun de ces 4 modes, en évitant de bouger la platine, ce qui empêcherait la superposition des 4 images produites.

Attention : Vérifier dans l'onglet « Settings » que les images sont enregistrées au format Tiff 12-bits.

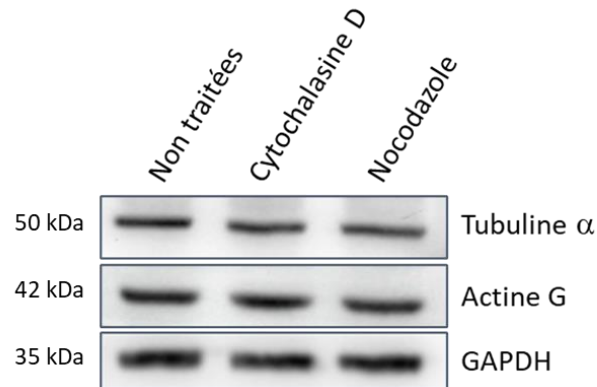
Ne pas cocher le bouton « Color » au niveau de l'onglet « Display » ni le bouton « Scalebar » dans l'onglet « View ».

Jour 1 : Analyse de données complémentaires (Western Blot)

Des cellules NIH3T3 ont été traitées ou non avec de la cytochalasine D ou du nocodazole de la même façon que pour les expériences précédentes.

Les cellules ont ensuite été lysées en condition dénaturante afin de pouvoir réaliser un western blot. Après un dosage de la concentration protéique de chaque échantillon, 30µg de protéines ont été mélangés avec un tampon de charge avant d'être déposés dans les puits d'un gel dénaturant.

La nature des protéines détectées à l'aide d'anticorps spécifiques est indiquée. La détection de la GAPDH sert de contrôle de charge.



a) Regardez les vidéos suivantes, puis lister les principales étapes des 2 techniques

Immunofluorescence indirecte ¹



Western Blot ²



| | <u>Immunofluorescence</u> | <u>Western Blot</u> |
|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| Principales étapes | | |

¹ <https://www.youtube.com/watch?v=U0vUoZCI6ds>

² https://www.youtube.com/watch?v=qT_AqI-MKJc

- b) Comparez dans le tableau ci-dessous la nature des informations obtenues grâce à une immunofluorescence et un western blot

| | <u>Immunofluorescence</u> | <u>Western Blot</u> |
|------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Informations obtenues | | |

NB : Les réponses aux questions suivantes ont pour but de vous aider à l'analyse et l'interprétation du western blot.

- c) Rappelez le principe d'un gel dénaturant. Que doit contenir le tampon de charge pour réaliser cette expérience ?
- d) Sur la base de vos connaissances concernant les différentes formes d'actine présentes dans les cellules et compte-tenu des conditions de lyse et de migration, expliquez la provenance de l'actine globulaire détectée ici.

A l'issue de cette séance du TP, vous devrez compléter et rendre la trame fournie par votre enseignant qui comprend notamment une description et une interprétation de ce western blot

Jour 2 : Analyse d'images

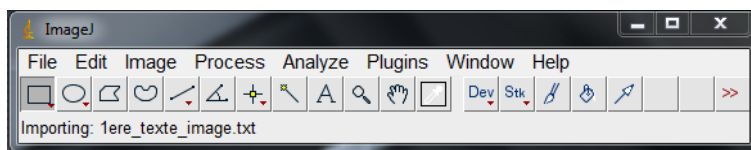
I. Notion d'image numérique :

- Une image numérique est un outil de quantification. Pour l'ordinateur, c'est une matrice (tableau) de valeurs numériques.
- L'image numérique est composée de pixels, ce qui signifie en anglais : « picture element ». Le pixel est la plus petite unité que l'on peut trouver dans 1 image, il correspond à chaque coordonnée de l'image, c'est aussi une partie (physique) de l'écran.
- Chaque pixel est caractérisé par ses coordonnées (x, y) et par son intensité (niveau de gris).
- L'intensité de chaque pixel est codée en bits. Le bit étant l'unité binaire de mesure de l'information (ne prenant que deux valeurs possibles : le 0 ou le 1).
- Dans une image codée en 8bits, l'intensité de chaque pixel peut prendre $2^8=256$ valeurs différentes, sur une échelle allant de 0 à 255.
- Dans une image codée en 16 bits, c'est $2^{16}=65536$ valeurs possibles pour chaque pixel, conférant ainsi un échantillonnage de valeurs beaucoup plus important, une image plus détaillée grâce à une plus grande précision dans le codage de l'information et donc dans la quantification des signaux mesurés.

II) Le logiciel ImageJ, les fonctions de bases :

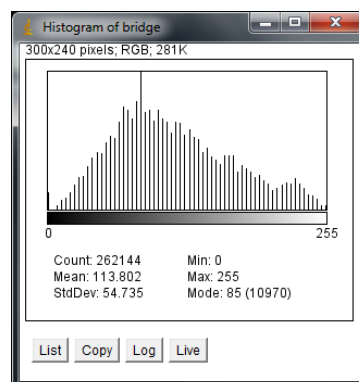
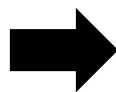
- Fenêtre principale : plusieurs menus déroulants donnent accès à des fonctions et des programmes. Les icônes permettent entre autres de délimiter des formes, tracer des lignes.

→ Ouvrez une de vos images en glissant-déposant le fichier sur la fenêtre principale.



- L'histogramme :

Faire : Analyse → Histogramme



L'histogramme est un véritable outil de quantification. Il montre la distribution des valeurs d'intensité des pixels de l'image considérée. Il permet aussi de juger de la qualité de l'acquisition

En abscisse est indiquée la valeur d'intensité des pixels et en ordonnée pour chaque valeur d'intensité la hauteur de la barre correspond au nombre de pixels dans l'image ayant cette intensité.

- Une image sombre aura un histogramme déplacé vers la gauche (beaucoup de pixels avec un intensité faible)
- Une image très claire aura un histogramme déplacé vers la droite (beaucoup de pixels avec un intensité élevée)

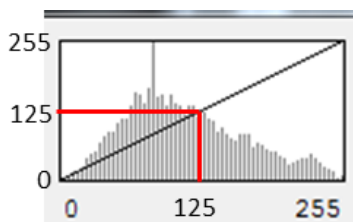
Des modifications peuvent être appliquées sur l'histogramme afin d'améliorer le contraste d'images sur ou sous-exposées. Ces modifications peuvent être de différents types expliqués ci-dessous.

A) Modifications linéaires de l'image :

Faire : Image → Adjust → Brightness/Contrast

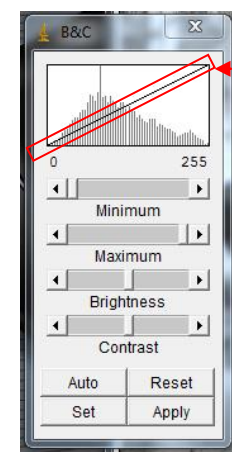
Ici une courbe de réponse linéaire se superpose à l'histogramme.

Cette droite indique la valeur d'intensité de sortie y (valeur affichée) en fonction de son intensité x dans l'image de départ avec la fonction : $y = ax + b$



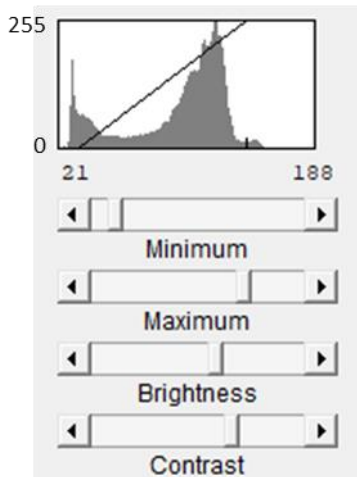
Au départ cette droite a une pente égale à 1 et une ordonnée à l'origine de 0. Ainsi $y = x$

En modifiant les paramètres Contrast et Brightness on peut modifier la pente et l'ordonnée à l'origine de cette droite respectivement. Les fonctions Minimum, Maximum permettent de modifier les deux.



Courbe de réponse

→ Exercez-vous sur vos propres images et observez les changements sur la droite et sur vos images.



Exemple : Ici pour une valeur d'entrée de 21, la sortie sera 0 alors que pour une valeur d'entrée de 188, la sortie sera de 255

Les pixels ne peuvent pas avoir une valeur <0 ou une valeur >255 (pour les images 8 bits, 4095 pour 12 bits). Ainsi tous les pixels avec une valeur d'entrée <21 apparaîtront à 0 alors que ceux avec une valeur >188 apparaîtront à l'intensité maximum de 255

NB : Ces modifications ne sont pas appliquées sur les données brutes et n'altèrent donc pas les informations contenues dans l'image. Elles changent seulement l'affichage de l'image pour permettre de mieux visualiser ces informations SAUF si vous appuyez sur le bouton « Apply » ce qui modifie définitivement la valeur des pixels dans l'image.

→ Si vous souhaitez enregistrer ensuite l'image modifiée, il faut appliquer les modifications sinon elles ne seront pas apparentes sur l'image sauvegardée.

B) Modifications non linéaires : exemple de la fonction Gamma

Nous sommes parfois confrontés à la coexistence de signaux forts et de signaux faibles dans un même champ d'observation.

Deux comportements sont souvent constatés, un bon et un mauvais !

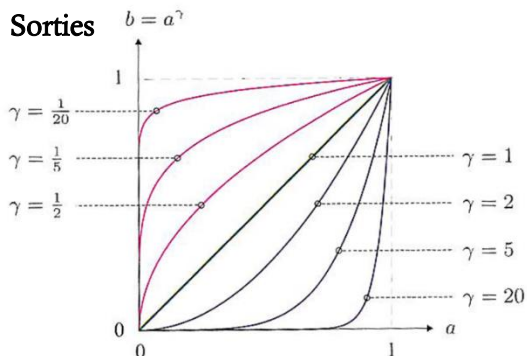
→ Le « mauvais » microscopiste augmente le temps d'exposition de la caméra ou la puissance de la source lumineuse, au risque de saturer le capteur CCD. Les données deviennent alors impropres à la quantification.

→ Le « bon » microscopiste fait en sorte d'utiliser la dynamique de la caméra (le plus souvent en microscopie photonique : 12 bits = 4096 niveaux de gris) sans la dépasser pour ne pas saturer le capteur (l'histogramme peut vous aider pendant l'acquisition des images, et même *a posteriori* pour vérifier la qualité des acquisitions). Les signaux faibles seront alors difficilement distinguables à l'écran, mais ils seront bien présents et enregistrés dans votre ordinateur (l'écran n'affiche qu'une partie des données acquises : affichage en 8 bits d'un fichier qui est codé en 12 bits). Un post-traitement bien choisi vous permettra de faire apparaître le signal faible sans modifier de façon significative les signaux plus forts : la fonction Gamma est un outil de choix pour réaliser ce traitement.

La fonction Gamma

La formule ci-après vous permet de connaître la nouvelle intensité de chaque pixel, en fonction de l'intensité originale et de la valeur du γ (Gamma).

$$I_{nouvelle} = \left(\frac{I_{originale}}{max_{gamme}} \right)^\gamma \times max_{gamme}$$



Entrées

En préambule, commencer par dupliquer votre image, puis travailler sur la copie :

Faire : Image → Duplicate

Puis, pour appliquer une fonction Gamma :

Faire : Process → Math → Gamma (utiliser l'option « preview », bien pratique !)

Ainsi, vous pouvez augmenter les intensités des pixels « faibles » sans trop impacter les pixels « forts ».

Attention, les conséquences sont importantes ! Ayant modifié les valeurs des pixels de façon non linéaire, vous ne pouvez plus réaliser de quantification après avoir cliqué sur « OK ». → Travailler donc sur des duplicatas : une première image pour l'aspect qualitatif et pour faciliter le repérage « à l'œil » des structures d'intérêt et une seconde, non modifiée, pour la quantification (utiliser la fonction « Duplicate » du menu « Image »).

→ Exercez-vous sur vos propres images.

C) Ajout de couleur

Les images que vous avez obtenues sont encodées en niveaux de gris car les détecteurs des microscopes ne détectent pas la longueur d'ondes des photons.

Il est toutefois possible d'ajouter de la couleur à une image en niveaux de gris.

Faire : Image → Lookup Tables → Choisir la couleur de votre choix

→ Colorez si vous le souhaitez la série d'images que vous avez sélectionnées pour réaliser votre montage.

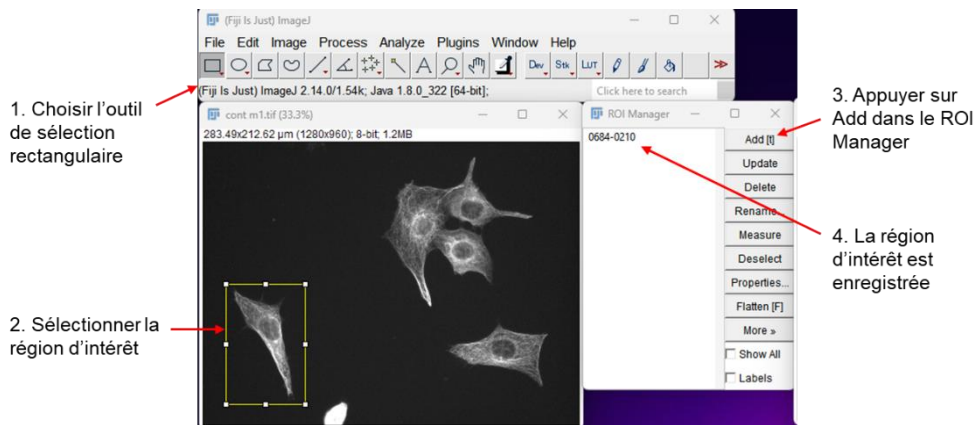
D) Rogner une image

Afin de mettre en évidence certaines régions remarquables de votre image il est possible de rogner celle-ci pour ne conserver que la région d'intérêt.

Dans le but de garder la même région sur les images prises avec les différents fluorochromes nous allons enregistrer la taille et la localisation de région d'intérêt à l'aide du ROI manager :

Faire : Analyze → Tools → ROI Manager...

Choisir ensuite la région d'intérêt et ajoutez-la au ROI Manager en suivant la procédure ci-dessous



Sélectionnez maintenant une autre image et cliquez sur le nom de la région d'intérêt dans le ROI Manager. La sélection apparaît alors sur l'image au même endroit et à la même dimension que sur la 1^{ère} image.

Une fois les régions d'intérêt positionnées, vous pouvez rogner les images :

Faire : Image → Crop

→ Utiliser cette fonction si vous souhaitez n'utiliser qu'une région d'intérêt des images destinées à votre montage.

E) Superposition d'images

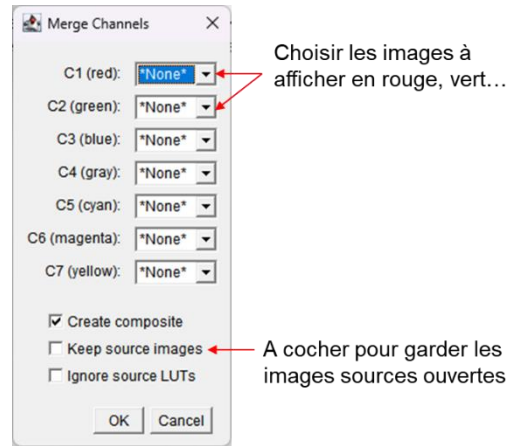
Afin d'observer différents marquages fluorescents sur une même image il est nécessaire de superposer plusieurs images prises séparément.

Il faut d'abord ouvrir les images à superposer puis :

Faire : Image → Color → Merge Channels...

Vous pouvez superposer des images en niveaux de gris et choisir ici la couleur qu'aura chaque image dans la superposition.

Vous pouvez aussi superposer des images auquel vous avez déjà appliqué une couleur (si vous cochez « Ignore source LUTs » cette couleur ne sera pas prise en compte)



En cochant « Create Composite », vous créez une image superposée pour laquelle chaque couleur peut être modifiée à l'aide de transformations linéaires (cf. II.A). Pour cela déplacer le curseur en bas de l'image composite pour choisir la couleur.

→ Créer une superposition des images destinées à votre montage. Ce dernier devra contenir la superposition et les images individuelles prises avec les différents filtres.

F) Calibration des images et barre d'échelle :

Pour effectuer ce travail, il vous faut connaître la taille de vos pixels dans vos images. Cette information peut être fournie par le logiciel d'acquisition (métadonnées) ; elle peut aussi être calculée à partir de la taille des pixels de votre détecteur (caméra) et du grossissement utilisé en appliquant la formule suivante (remarque : **taille pixel EVOS : 6,45 µm**) :

$$Taille\ Pixel_{image} = \frac{Taille\ Pixel_{détecteur}}{Grossissement}$$

- Pour calibrer une image :

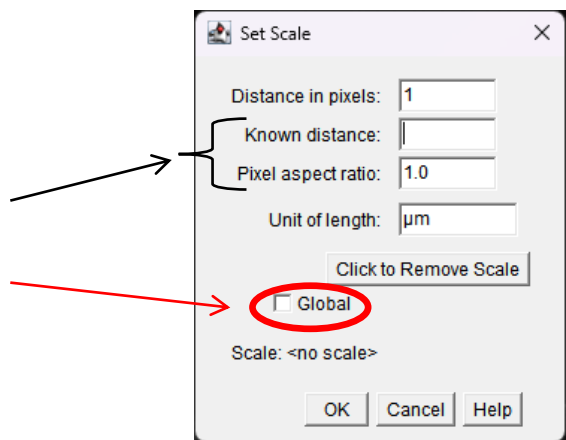
Faire : Analyse → Set Scale

Indiquer la taille du pixel ainsi que l'unité et presser « OK ».

Cliquez sur « Global » si vous souhaitez appliquer la même taille de pixels à toutes les images ouvertes

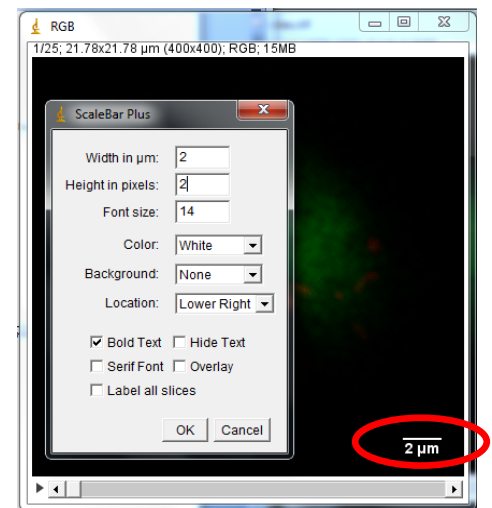
- Pour ajouter une barre d'échelle :

Faire : Analyse → Tools → Scale Bar



Choisir les options de mise en forme parmi celles proposées dans la fenêtre ci-contre, ainsi que la localisation de votre barre d'échelle. Ne pas cocher « Overlay ».

→ Ajoutez une barre d'échelle à l'une des images qui sera intégrées dans votre montage.



G) Enregistrement des images

Pour que vos images soient visibles et utilisables dans d'autres logiciels, il faut d'abord s'assurer qu'elles sont au format 8-bits ou RGB. Si ce n'est pas le cas, il faut les convertir avant de les enregistrer.

Pour des images en niveaux de gris ou pour lesquelles une couleur a été ajoutée :

Faire : Image → Type → 8-bit

Pour des images composites en couleur :

Faire : Image → Type → RGB color

Enfin sauvegardez vos images :

Faire : File → Save as

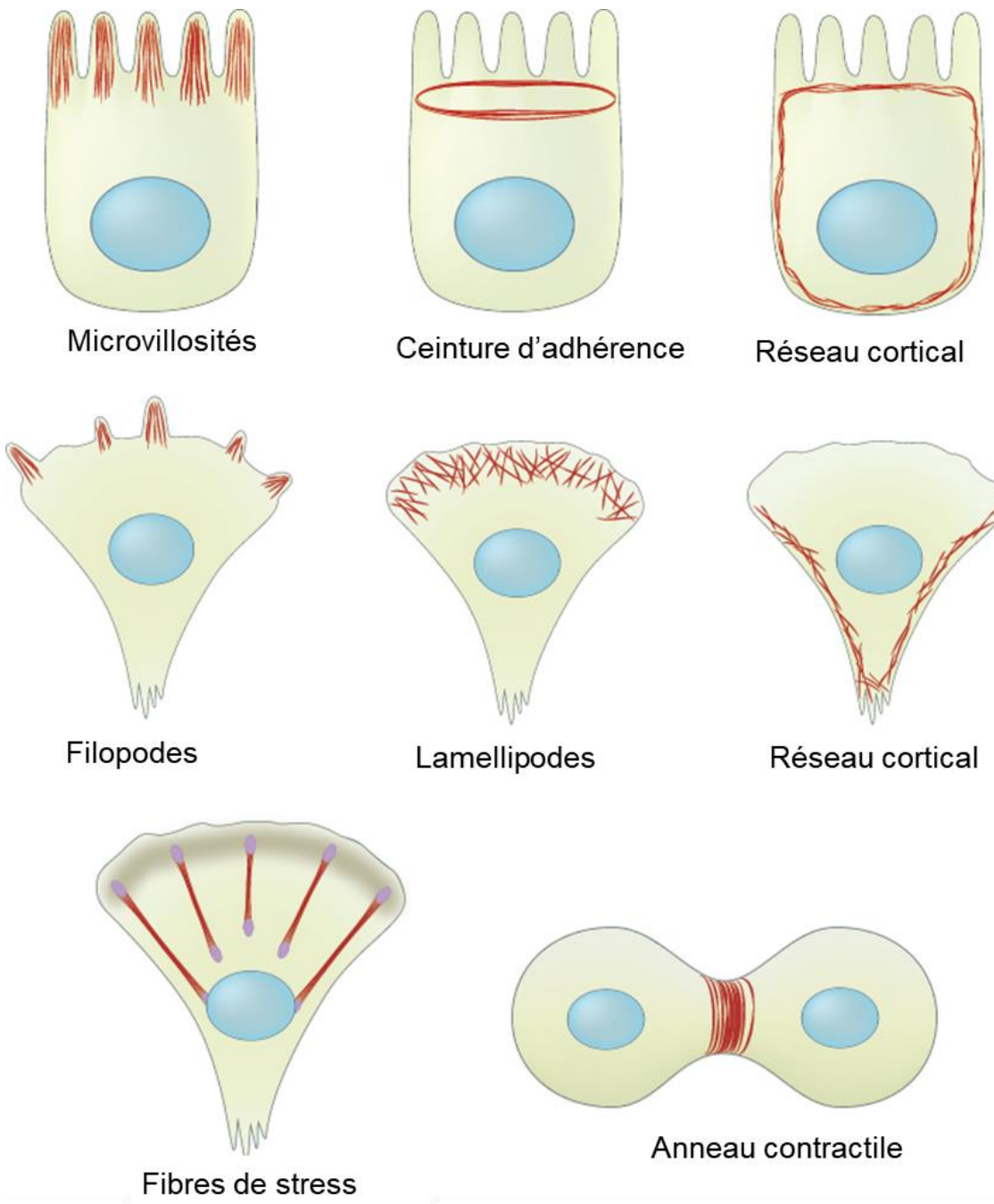
A l'issue de la séance « Analyse d'images » vous devrez :

- 1. Réaliser une figure contenant un montage des photos prises sur les microscopes avec un titre et une légende rédigée.** Pour cela vous utiliserez un logiciel comme PowerPoint ou LibreOffice Impress.
A l'aide de flèches et pointes de flèches vous pointerez des structures du cytosquelette remarquables dans la condition contrôle. (cf annexe du photocopié de TP).
Cette figure devra illustrer vos observations sur l'organisation du cytosquelette dans la condition contrôle et en fonction des drogues utilisées.
- 2. Décrire en quelques lignes l'effet des drogues sur les structures remarquables du cytosquelette ainsi que sur la morphologie des cellules.**
- 3. À partir des résultats de ces expériences et en vous appuyant sur les changements observables de forme, de taille ou d'organisation des cellules, conclure sur le(s) rôle(s) des réseaux de cytosquelettes d'actine et de tubuline à différentes échelles.**
- 4. Expliquer/discuter ce qu'apportent les résultats du WB à l'interprétation des résultats des immunofluorescences.**

Vous rendrez ce document à votre enseignant avant la fin de la journée de la séance « Analyse d'images ».

Annexe :

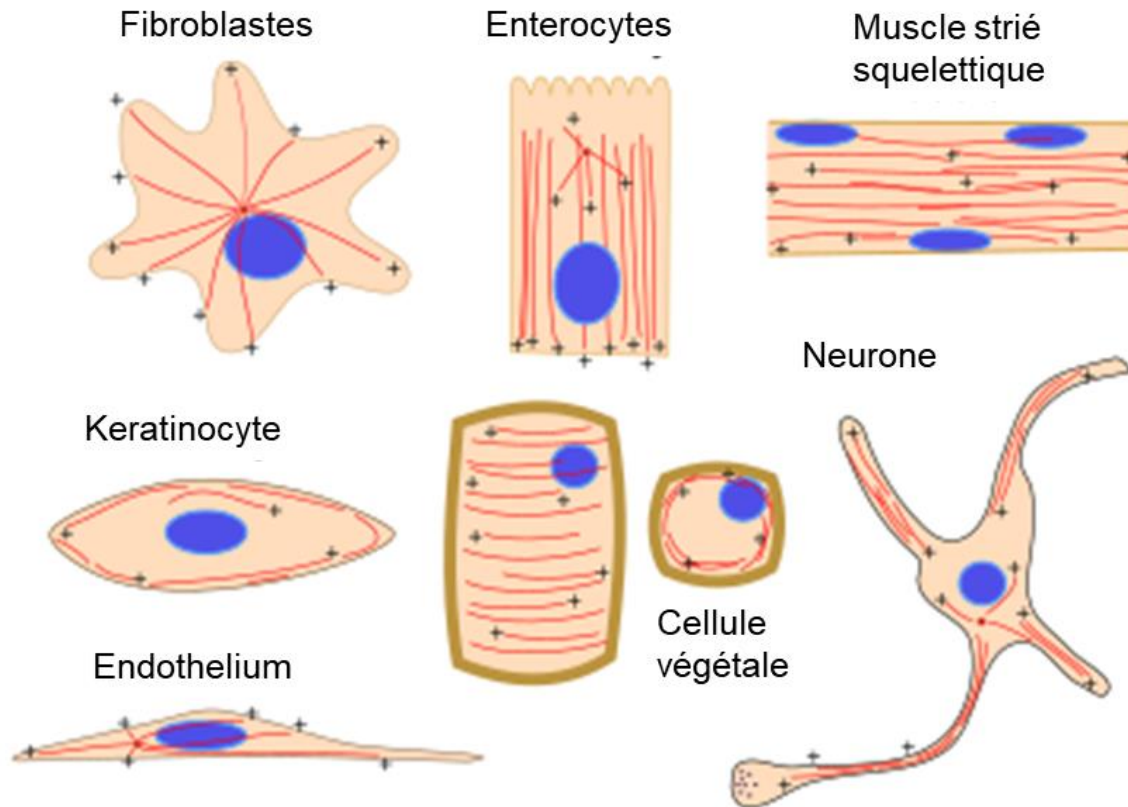
Exemple d'organisation des microfilaments d'actine



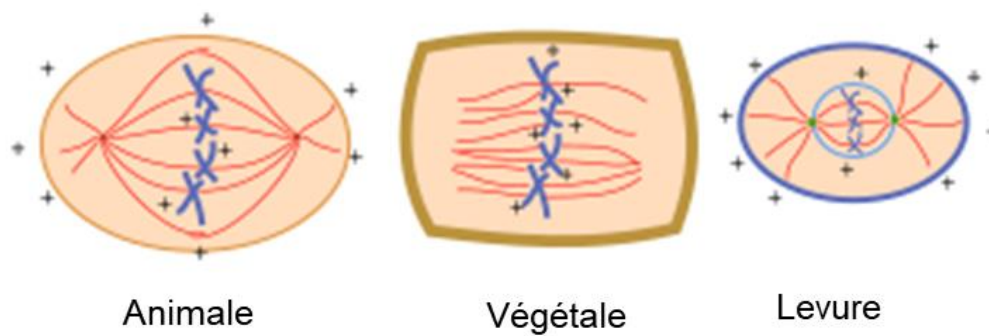
Adapté de <https://www.mbi.nus.edu.sg/mbinfo/how-are-actin-filaments-distributed-in-cells-and-tissues/>

Exemple d'organisation des microtubules

Interphase



Mitose



Adapté de <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/7-microtubulos.php>