Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de Médecine, Département de Médecine
Laboratoire dôHistologie-Embryologie, Cytologie et Génétique Cliniques
Pr Ghalamoun-Slaimi R, Dr Hamadouche H, Pr Belarbi-Amar N
Cours de Cytologie de la première année de Médecine

LES METHODES DôETUDE DE LA CELLULE

I. GENERALITES :

Lôobservation des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles, et nécessite un certain nombre de techniques pour les mettre en évidence.

Ces méthodes :

- Permettent lôobservation de lôorganisation morphologique des cellules.
- Etudient la structure de cellules mortes ou vivantes.

II. LA MICROSCOPIE :

-Lôexamen des cellules a toujours répondu à lôutilisation des microscopes.

-Il existe deux types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes dits **« optiques »** qui vont utiliser un faisceau lumineux, et **les microscopes électroniques** qui vont utiliser un faisceau d'électrons. Que ce soit pour la microscopie optique ou électronique, les structures à étudier nécessite une préparation.

La **préparation des coupes fines** se fait en plusieurs étapes :

1. La fixation : consiste à plonger le tissu à étudier dans un fixateur, qui tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation. Exemples de fixateurs :

   le formaldéhyde et le **glutaraldéhyde,** le **tétroxyde dôosmium**

2. La déshydratation permet lôélimination de lôeau : Lôeau est retirée au cours de passage dans des bains dôalcools successifs.
3. Lôinclusion : lôéchantillon est inclus dans un matériau tendre et résistant comme de la résine, ou de la paraffine, qui permet une solidification de lôéchantillon.
4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.
5. La coloration permet de renforcer le contraste des cellules et de leurs constituants. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence, les colorants utilisés peuvent être naturels ou synthétiques.
6. Le montage : les coupes sont étalées et collées sur lame de verre.

a) Le <u>microscope optique</u>

Les **microscopes optiques** (à lumière transmise ou photoniques) permettent lôobservation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. Lôéchantillon est éclairé en lumière transmise, et est examiné à travers un système optique qui comprend :

- ✓ Un objectif : qui donne une image grossie de la structure étudiée.
- ✓ Un oculaire : qui permet lôexamen de lôimage.

Les cellules éclairées deviennent très claires et il est souvent nécessaire de procéder à des colorations afin de les observer

Le pouvoir séparateur ou de résolution : Est la capacité d'une lentille ou d'un microscope à permettre la vision de **2 points** extrêmement **rapprochés** comme **2 points distincts.**

Lôimage de lôéchantillon est agrandie jusquôà 1000 fois, avec un pouvoir séparateur de 1/10 de micromètres.

<u>Le **microscope à fluorescence :**</u> est un microscope optique qui porte deux filtres interposés entre lôéchantillon coloré par des molécules fluorescentes, app : **fluorochromes :**

- ➢ Le premier filtre ne laisse passer que la lumière qui excite le fluorochrome.
- ➢ Le deuxième filtre ne laisse passer que la lumière émise par le fluorochrome.

Les **fluorochromes** absorbent une lumière spécifique, et émettent une lumière différente.
Ex : la Fluorescéine et la Rhodamine.
Dans ce type de microscope les structures à étudier apparaissent très colorées sur un fond noir.
Permet de détecter :

- ✓ **Les substances spontanément fluorescentes** : vitamine A.
- ✓ **Des structures qui fixent des colorants.**

Il permet de voir des macromolécules que lôon nôaurait pas vues au microscope optique simple.
Intérêts :
-Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires.
- Détection, localisation, quantification de protéines cellulaires comme les hormones, les protéines du cytosquelette.

<u>Le microscope à contraste de phase</u> : il est basé sur le fait que lôonde lumineuse qui traverse les structures est retardée et change de phase par rapport à lôonde qui arrive directement à lôobservateur. Ce type de microscopie utilise les propriétés de réfraction de lôéchantillon.

Ce type de microscope permet lôobservation de structures vivantes, non fixées et non colorées, en absence de coloration ces structures sont peu ou pas visibles.

Les structures observées apparaissent en relief. Il permet de voir les mitochondries, le noyau et dôautres structures cellulaires.

b) Le <u>microscope électronique :</u> va nous permettre à l'intérieur de la cellule d'étudier des objets extrêmement petits, jusqu'à l'échelle d'une macromolécule. Le microscope électronique va nécessiter une préparation spéciale des cellules qui est différente de celle de la microscopie optique. Le microscope électronique utilise des lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et le faire converger sur un plan.

Il donne des photos en noir et blanc.

*Le **microscope électronique à transmission (MET) :***

- utilise un rayonnement électronique
- possède un pouvoir séparateur 40 000 fois supérieur à celui du microscope optique et deux millions de fois plus que lôîil humain, et qui est théoriquement de 2nm.

Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de lôéchantillon et donc la mort des cellules et du fait du faible pouvoir pénétrant des électrons les échantillons doivent être sous forme de coupes ultra fines (< 0,1um) après inclusion dans une résine.

Lôobjet fixé est bombardé dôélectrons, ces derniers permettent dôobtenir une image agrandie, qui se formera sur un écran fluorescent.

<u>Technique de coloration négative</u> :

Certaines structures échappent à la microscopie électronique, la coloration négative permet de les mettre en évidence. Lôéchantillon biologique est placé sur un film et on attend que les sels de métaux lourds se déposent autour de lôéchantillon, qui est coincé dans une pellicule de colorant imperméable aux électrons. Il apparait en clair sur un fond sombre.

*<u>Le **microscope électronique à balayage (MEB) :**</u>* consiste à balayer un échantillon par un faisceau dôélectrons, la surface est préalablement recouverte dôune mince couche de métal.
Il a un pouvoir de résolution de 7nm.
Le microscope électronique à balayage donne des images tridimensionnelles de lôéchantillon (en relief), et permet dôétudier les surfaces cellulaires (les contours), les organites et même à lôintérieur des membranes.

Lô**ombrage métallique** de lôéchantillon à étudier consiste à vaporiser sous vide une très fine couche de métal lourd, qui recouvre lôéchantillon dôune fine pellicule. Lôombrage métallique permet dôaccentuer les reliefs.

III. LES METHODES DE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE :

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

Lôhomogénéisation : consiste à provoquer lôéclatement de la cellule, et la rupture de la membrane plasmique, en mettant la cellule dans un homogénéisateur. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intactes, mais sans précaution particulière lôappareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées **microsomes**.

La centrifugation :
La centrifugation permet de séparer les organites en fonction de leur coefficient de sédimentation, qui est quantifié en unités de Svedberg (S).
La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme

Lôultracentrifugation différentielle

Lôultracentrifugation différentielle permet la purification de lôhomogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. Elle consiste en une série d'ultracentrifugations à des vitesses croissantes qui séparent les composants en fonction de leur vitesse de sédimentation.

Lôhomogénat est placé dans une centrifugeuse ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

- A 600g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 15 000g, pendant 5 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- A 100 000g (ultracentrifugation), pendant 60 minutes on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.
- A 300 000g, pendant 2heures on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin côest la fraction hydrosoluble du cytosol.

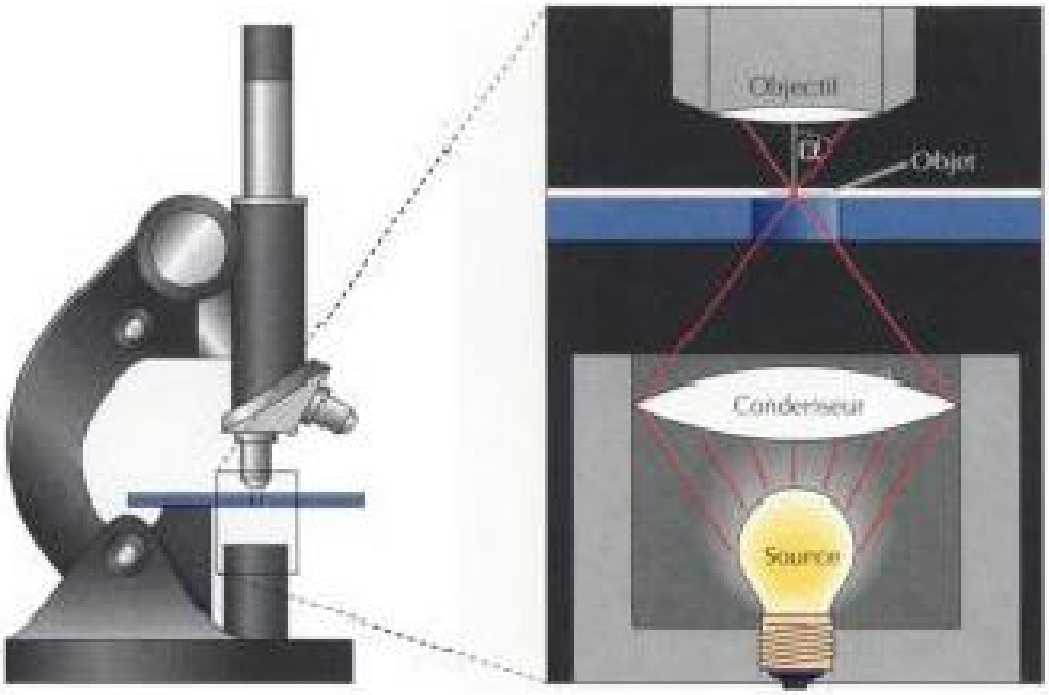
La Centrifugation par gradient préformé

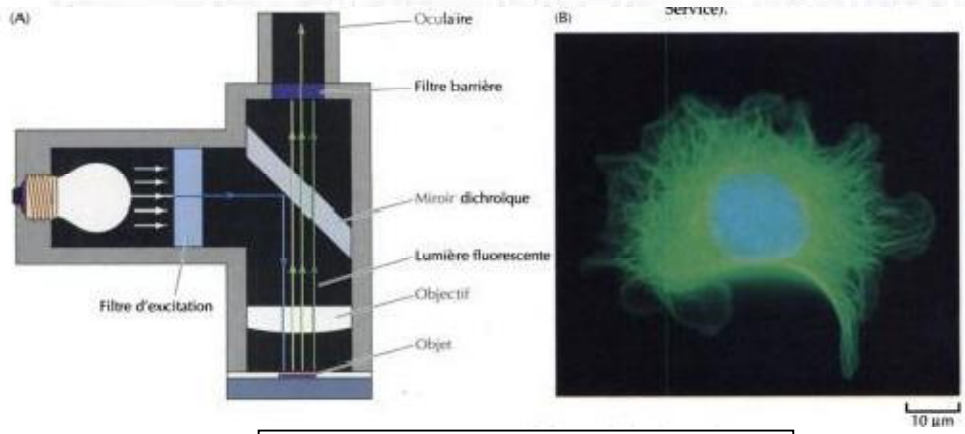
La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche dôhomogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante

du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

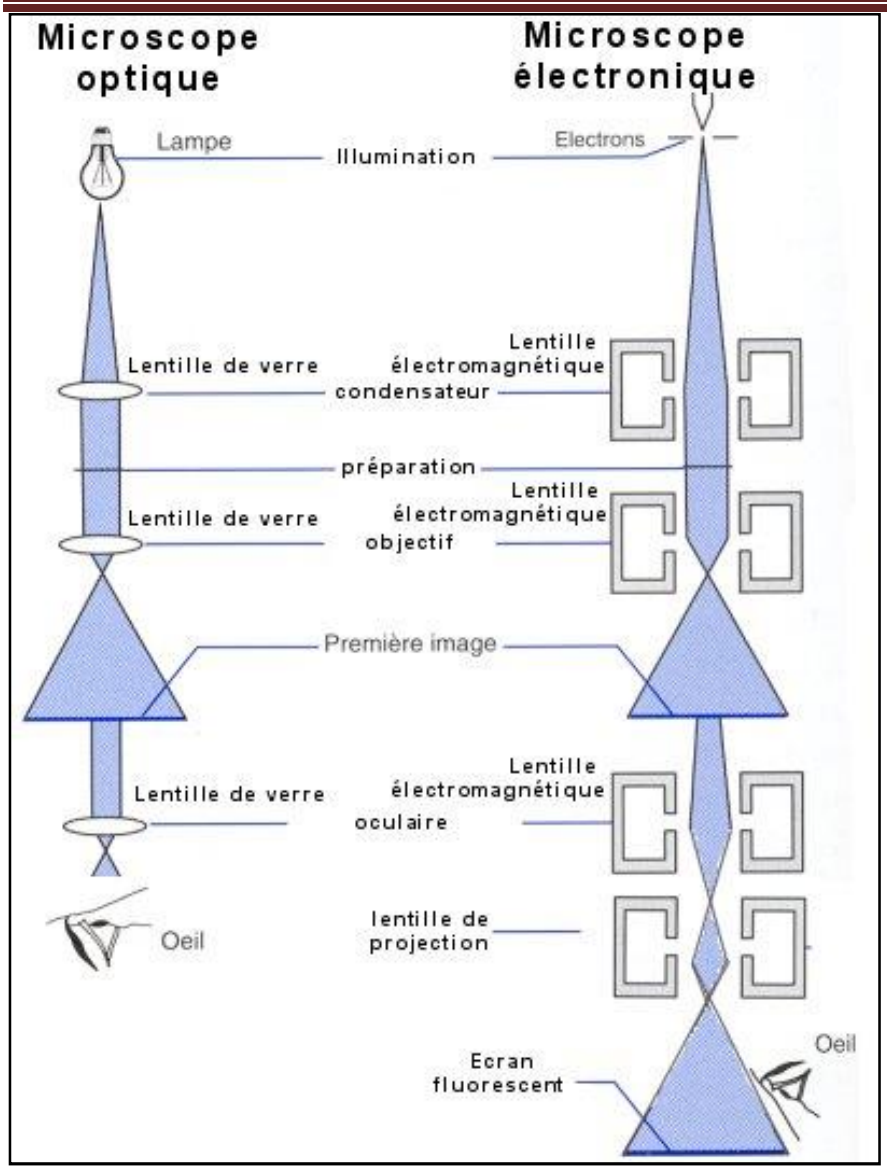
La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg** (**S).**

Le microscope optique

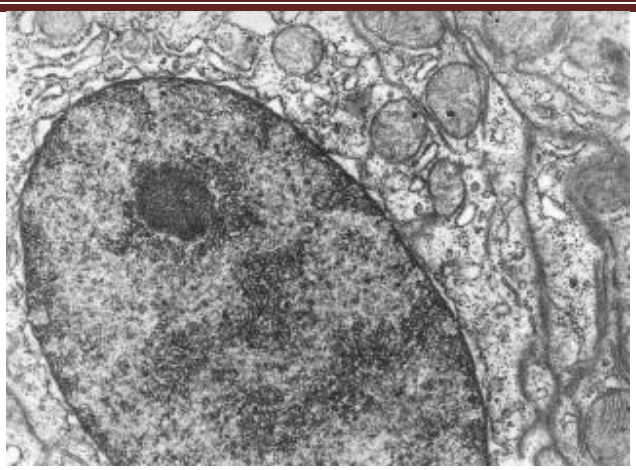




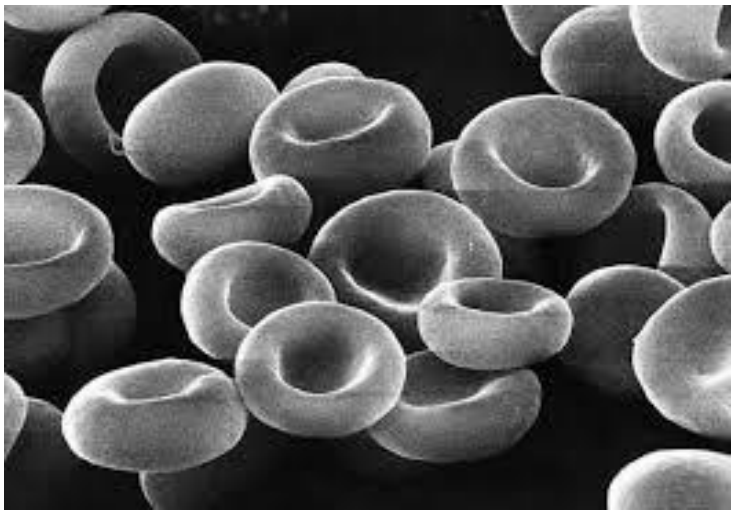
Le microscope à fluorescence



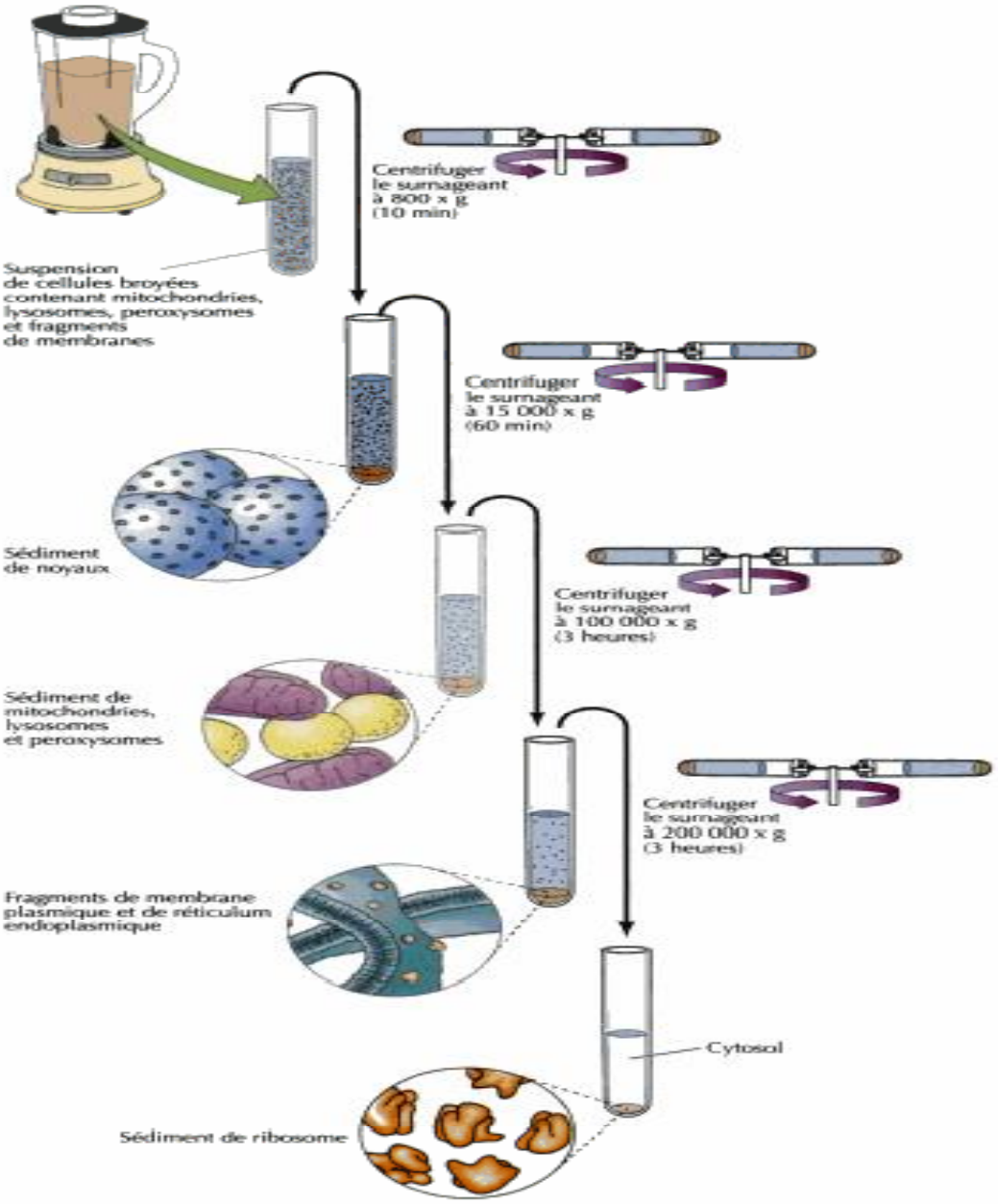
La microscopie optique et électronique

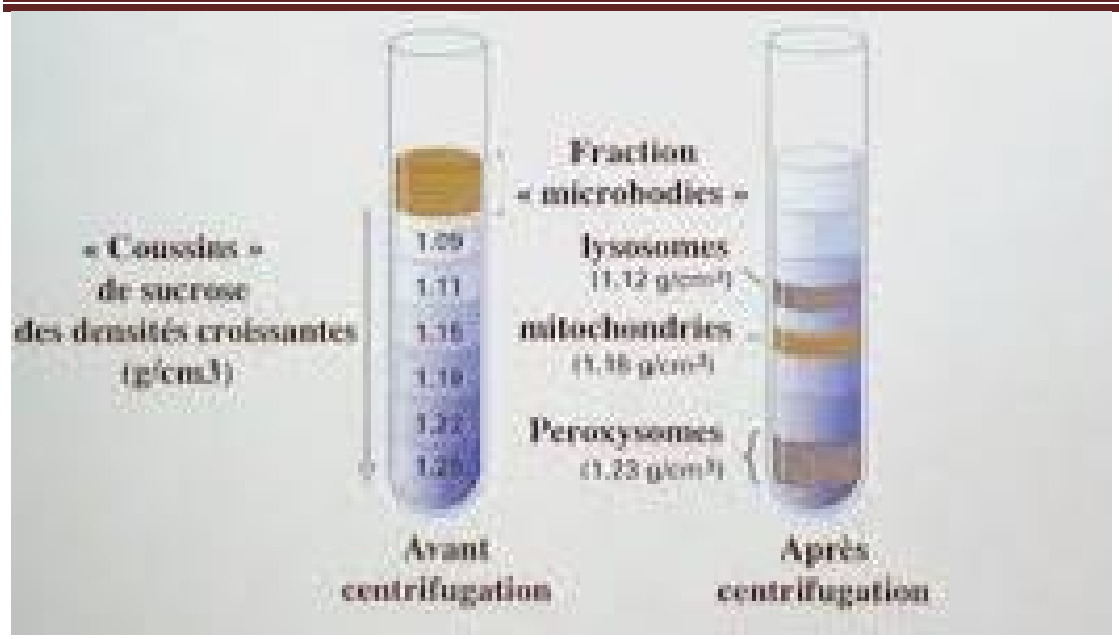


Photographie en microscopie électronique à Transmission



Photographie en microscopie électronique à Balayage


Centrifuger le surnageant à 800 x g (10 min)
Suspension de cellules broyées contenant mitochondries, lysosomes, peroxysomes et fragments de membranes
Centrifuger le surnageant à 15 000 x g (60 min)
Sédiment de noyaux
Centrifuger le surnageant à 100 000 x g (3 heures)
Sédiment de mitochondries, lysosomes et peroxysomes
Centrifuger le surnageant à 200 000 x g (3 heures)
Fragments de membrane plasmique et de réticulum endoplasmique
Cytosol
Sédiment de ribosome



Centrifugation sur gradient de densité

Références bibliographiques :

1. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet.9ème édition, Masson2002.
2. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet.10ème édition, Masson2006.
3. Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes, 2ème édition. J c Callen. DUNOD.2005.
4. Biologie cellulaire et moléculaire. Tout en fiches .3ème édition. Dunod.2019.
5. Biologie et Physiologie Cellulaire II. Berkaloff A, Bourguet J, Favard P. Hermann Collection Méthodes Paris.1978.
6. Cours de Biologie Cellulaire : Pierre Cau, Raymond Seite. Edition ellipses.1999.
7. Cytologie & Physiologie cellulaire. M. Abdelali, H. Benzine-Challam, A.Madoui-Dekar. Office des Publications Universitaires 2008.