

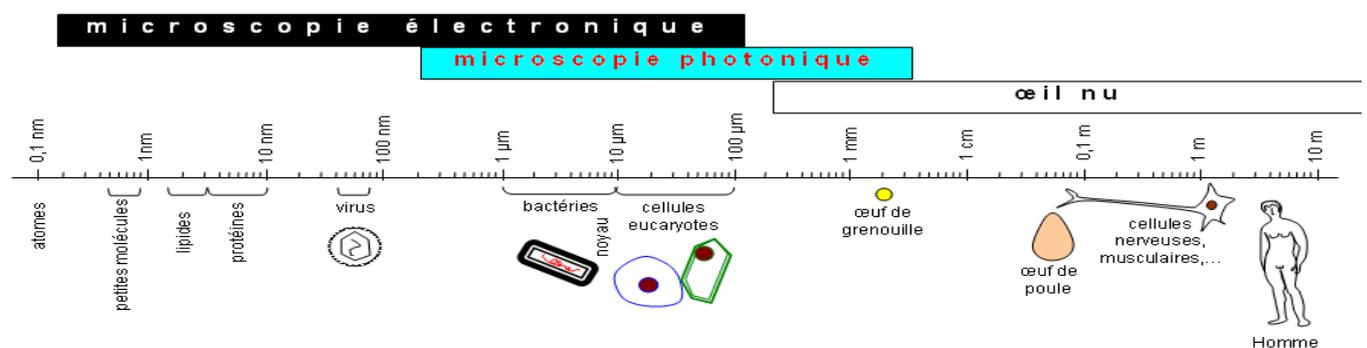
Chapitre 2 : Méthodes d'études de la cellule

Ces méthodes permettent d'observer et d'étudier l'organisation morphologique et la structure des cellules. Pour cela, on utilise la Microscopie afin d'étudier des cellules et des tissus qui peuvent être **vivants** (observation dynamique), ou **fixés** en coupes histologiques (observation précise). Des techniques cytologiques complémentaires sont nécessaires:

A- La Microscopie: La microscopie optique permet l'observation de la structure des cellules eucaryotes. La microscopie électronique (résolution en Angströms) révèle l'ultra structure des cellules procaryotes et eucaryotes.

1) **Le pouvoir séparateur** Le microscope est indispensable pour l'observation de la cellule. Il existe deux types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes dits « **optiques** » (à résolution 200 nm ou 0,2 μm soit 0,0002 mm), ou **photoniques** qui utilisent un faisceau lumineux, et les **microscopes électroniques** qui utilisent un faisceau d'électrons.

Figure 00: Echelle des dimensions dans le monde du vivant



2) **Constitution du microscope Optique:** De bas en haut :

- ◆ Une lampe électrique (ou miroir qui réfléchit la lumière blanche) pour éclairer l'échantillon;
- ◆ Le diaphragme: ouverture sous la platine à diamètre variable pour régler la luminosité qui éclaire l'échantillon.
- ◆ Le platine porte-échantillon mobile (gauche-droite et avant-arrière): où l'on pose **l'échantillon qui doit être mince et transparent** avec deux «valets» qui maintiennent l'échantillon.
 - Les **objectifs: lentille ou ensemble de loupes** pour le grossissement. Il y a 03 à 04 objectifs, pour plusieurs grossissements. Le plus fort grossissement (x100) à "immersion".
 - Deux vis macrométrique et micrométrique qui font monter et descendre l'ensemble **objectif-oculaire** pour la mise au point et la netteté de l'image.
 - **Un ou deux oculaires** placés sur une tête dite binoculaire rend plus confortable l'observation, L'oculaire porte des lentilles ou loupes formant l'image d'une manière reposante pour l'œil ;

Remarque 01: L'oculaire peut être remplacé par un appareil photographique, ou une caméra vidéo pour faciliter l'observation sur un écran de type télévision, (impression et traitement des images,...).

Remarque 02: Certains objectifs sont dits à immersion car utilise une goutte d'huile de cèdre pour éliminer l'air entre l'échantillon couvert par la lamelle et l'objectif afin d'augmenter le grossissement.



Photo du M.O. de Cuff 1760

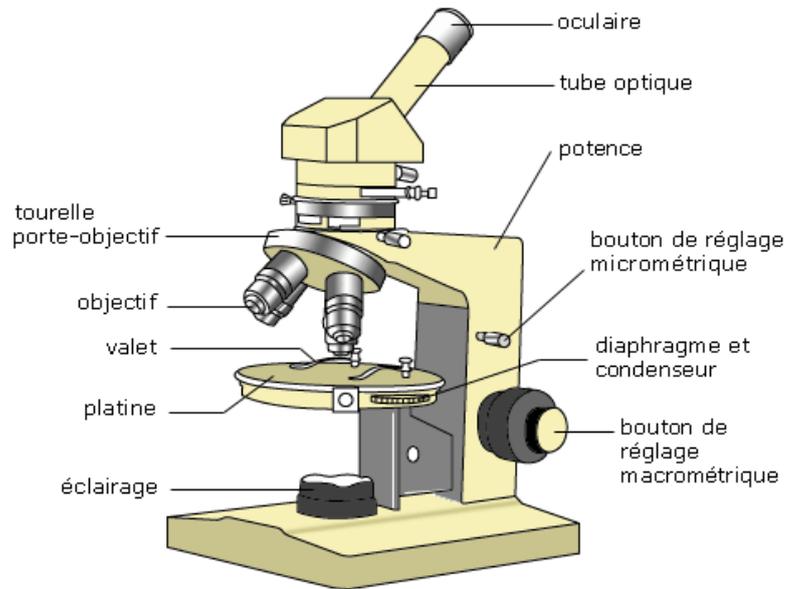


Image de la structure du M.O. Moderne

3) Les étapes préparatoires d'un échantillon pour l'observation au M.O.:

Que ce soit en microscopie optique ou électronique, les structures à étudier nécessitent une préparation. Pour la microscopie optique, la **préparation des échantillons** se fait en plusieurs étapes :

- a) **La fixation:** 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**)
- b) **La déshydratation:** Elimination et retrait de l'eau par des bains d'alcools successifs.
- c) **L'inclusion :** l'échantillon est inclus dans la paraffine, pour solidifier l'échantillon.
- d) **La formation des coupes** ultrafines (7 à 10 μ) est réalisée par des **microtomes**.
- e) **La coloration** permet de renforcer le contraste des cellules et de leurs constituants. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants spécifiques (vitaux ou toxiques).
- f) **Le montage :** les coupes sont étalées et collées entre lame et lamelle de verre

Remarque: Utilisation des colorants ayant des affinités différentes avec les composés chimiques selon leur pH (par ex: ADN en vert, ARN en rose). Différentes colorations, vitales ou non, permettent l'observation des structures au microscope optique : rouge neutre pour vacuoles, vert janus pour la mitochondrie, vert de méthyl pour le noyau...

4) Principe de fonctionnement et utilisation du M.O. à fluorescence:

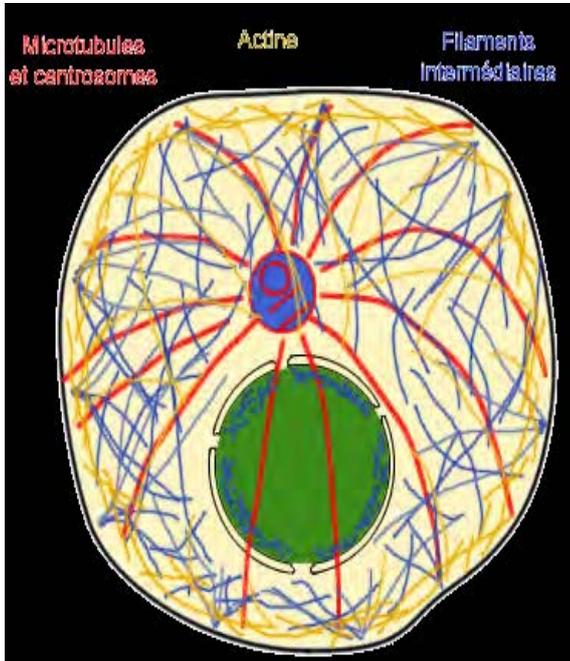
La technique du microscope à fluorescence est la même que pour un microscope optique, sauf que la lumière utilisée n'est pas blanche, mais possède une gamme définie de longueur d'onde. Toutefois, **la lumière arrive sur l'échantillon par le haut** (épi-fluorescence) et non pas par le bas.

Le **microscope à fluorescence** est un microscope optique qui porte deux filtres interposés entre l'échantillon coloré par des molécules fluorescentes, dites **fluorochromes** : Le premier filtre ne laisse passer que la lumière **qui excite le fluorochrome** et le deuxième filtre ne laisse passer que la lumière **émise par le fluorochrome**.

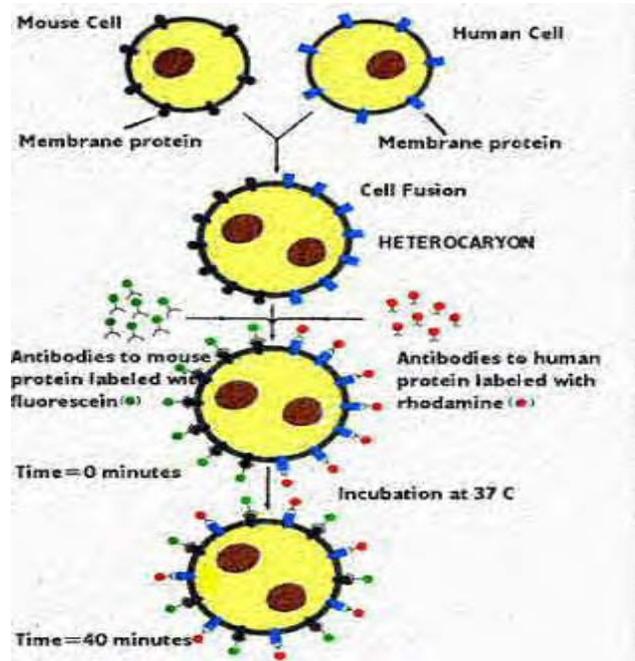
a) Définir un fluorochrome - exemples de fluo marqueurs utilisés (fluorescéine- lumière verte, rhodamine-lumière rouge) - c'est une substance chimique excitable par la lumière. Elle est capable d'absorber une énergie lumineuse haute dite **lumière d'excitation** et de la **réfléchir fortement** sous forme d'une lumière d'énergie plus faible dite **lumière de fluorescence**.

b) Domaines d'application du microscope à fluorescence:

Il visualise des objets naturellement fluorescents (chlorophylle, vitamine A...), ou des organites rendus fluorescents pour mieux les observer et suivre leur parcours. Etudier au niveau cellulaire et moléculaire les structures biologiques, leur fonctionnement et leurs interactions (division cellulaire et fluidité ou déplacement des protéines membranaires, quantification de protéines cellulaires comme les hormones, les protéines du cytosquelette, les protéines de sécrétion, communication neuronale, etc.), dans le diagnostic clinique (pathologie, microbiologie...).

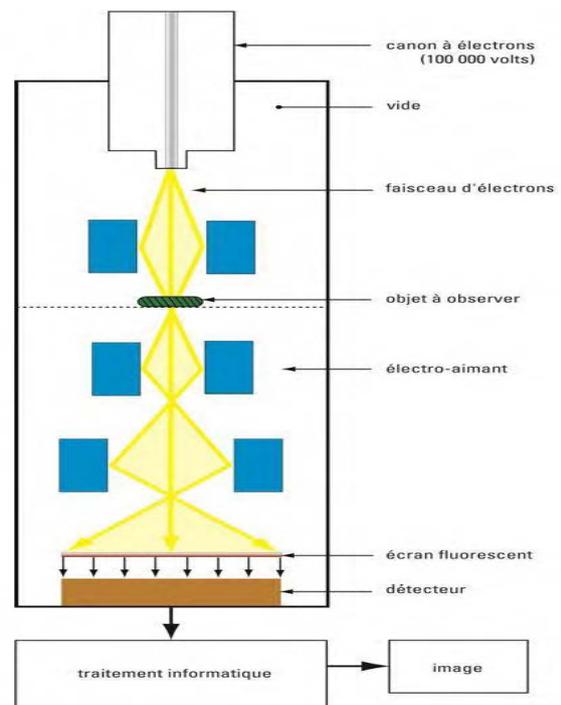


Cytosquelette (microfilaments d'actine en vert et microtubules en rouge)



Détecter et Suivre la fluidité des **protéines membranaires** (expérience de Fry)

B- La Microscopie électronique



Le microscope électronique à transmission (MET) permet une très haute résolution (grossissement $\times 1000000$). Il possède un pouvoir séparateur 40 000 fois supérieur à celui du microscope optique et deux millions de fois plus que l'œil humain, et qui est théoriquement de 0,2nm (2 \AA)

. Un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon mince et l'image se forme sur un écran phosphorescent couplé à une caméra numérique.

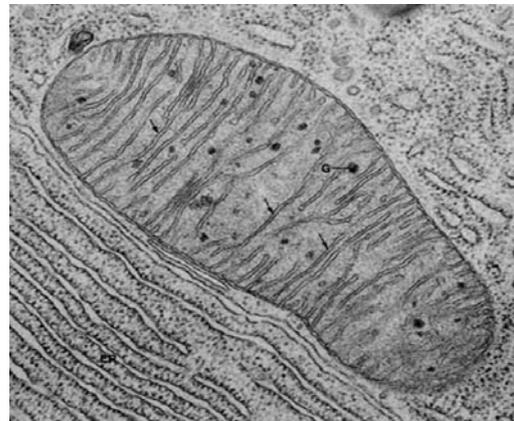
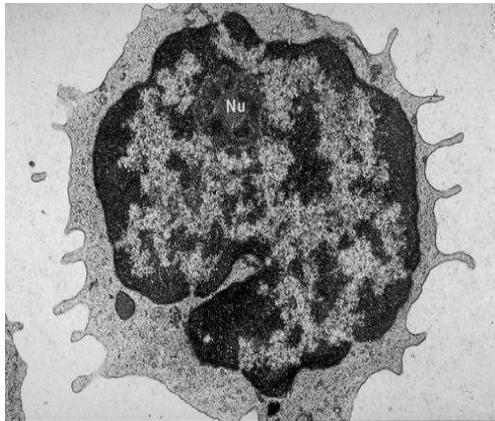
a) Principe du M.E.T.:

En microscopie électronique l'irradiation de l'échantillon se fait avec un faisceau d'électrons. Les M.E. utilisent des lentilles électrostatiques et des lentilles magnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et le faire converger sur un plan particulier par rapport à l'échantillon. Le grossissement plus grand du M E est du à la longueur d'onde d'un électron plus petite que celle d'un photon de lumière visible.

L'objet fixé est bombardé d'électrons, ces derniers permettent d'obtenir une image agrandie, qui se formera sur un écran fluorescent.

b) Technique de coloration négative :

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



Contraste positif

Le microscope électronique à balayage (MEB): consiste à balayer un échantillon par un faisceau d'électrons, la surface est préalablement recouverte d'un film de platine obtenu par ombrage métallique. L'**ombrage métallique** de l'échantillon à étudier consiste à vaporiser sous vide une très fine couche de métal lourd, qui recouvre l'échantillon d'une fine pellicule. L'ombrage métallique permet d'accentuer les reliefs.

Le microscope électronique à balayage donne des images tridimensionnelles de l'échantillon, et permet d'étudier les surfaces cellulaires, les organites et même à l'intérieur des membranes.

c) Les étapes de la technique de coupes minces

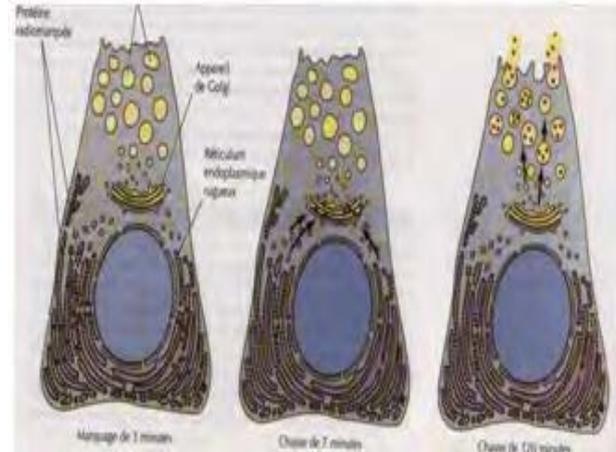
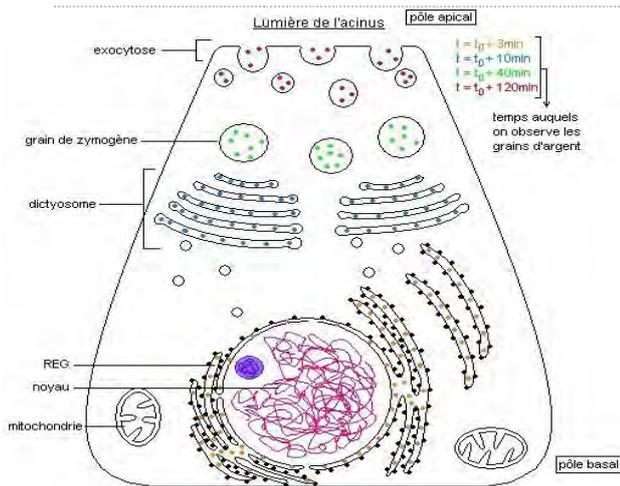
Le principe et le procédé sont les mêmes que pour la technique histologique , la différence est dans les produits et les outils utilisés .

- 1) Coupes ultrafines de 300–600Å sur Ultramicrotome
- 2) Coupes étalées sur grille métallique (en cuivre)
- 3) Contraste aux sels de métaux lourds, tel l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb ...
- 4) Observation en noir et blanc
- 5) Fixation double aux aldéhydes + tetroxyde d'osmium .
- 6) Déshydratation à l'alcool + solvant de la résine
- 7) Inclusion / imprégnation à la résine

d) Autoradiographie : But: Etude de la Cinétique d'un métabolisme cellulaire

Utilisation des molécules radioactives portant du C¹⁴, O¹⁸ ou N¹⁵... Pour reconnaître l'emplacement des organites cellulaires ou suivre la synthèse de composés cellulaires grâce à l'analyse de photos

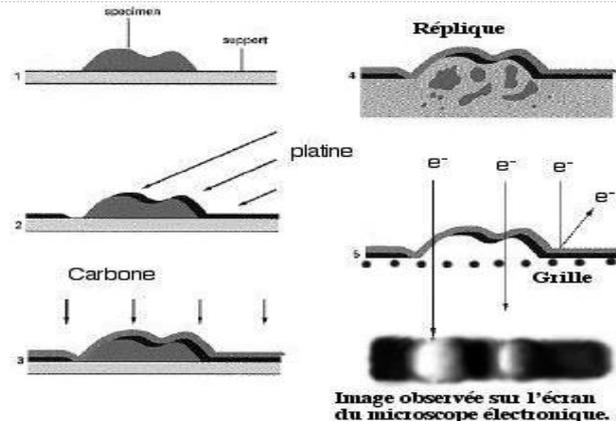
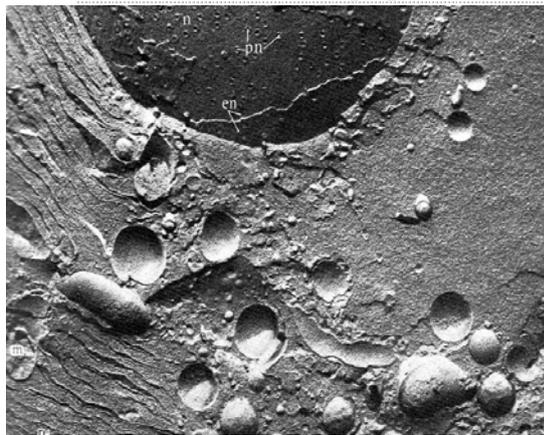
chronologiques (Exemple la synthèse de l'insuline dans la cellule pancréatique). Marquage à la leucine radioactive et suivi des protéines néo synthétisées dans la cellule pancréatique:



Cinétique de la synthèse et de l'emballage des produits de sécrétion (Insuline)

e) La technique de cryodécoupage est généralement applicable au MEB et s'effectue comme suit :

- La congélation de l'échantillon: dans l'Azote à -160°C
- la cryofracture : l'échantillon dur est cassé
- Le décapage: Sublimation ($T^{\circ}\text{C}$ élevée) de l'échantillon cryofracturé
- l'ombrage métallique** : Vaporisation sur la section de **Platine** puis du **Carbone**
- l'obtention de la réplique: Détacher **le moule** ou **la réplique** en métal



Réplique d'une portion de cellule hépatique

Principe d'Obtention d'une réplique (moule)

- **Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation**: choc osmotique puis centrifugation pour isoler les différents organites par sédimentation selon leur densité puis leur étude fonctionnelle.
- **La chromatographie et l'électrophorèse** : pour l'analyse biochimique des structures isolées par centrifugation . séparation différentielle des composés organites tels que les pigments chlorophylliens, les immunoglobulines ou anti corps ou encore un mélange de protéines, d'acides aminés ou de sucres ... par électrophorèse, dialyse, etc.
- **Numération des cellules** réalisée grâce au test MTT. (Tétrazole) - **Culture in-vitro** : permet d'étudier des cellules dans des conditions variées, - **Micro-chirurgie**: ablation ou greffes d'organites.

Références bibliographiques :

1. Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes, 2ème édition. J c Callen.DUNOD.2005.
2. La cellule et sa physiologie : M Bendjelloul. Office des Publications Universitaires 2011.
3. La cellule. (cours) Université Oran1 Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Dpt de Médecine, Service d'Histologie-Embryologie Pr Ag Belarbi-Amar