

Les méthodes d'étude de la cellule

La connaissance de la structure cellulaire dépend des techniques d'investigation utilisées.

Les progrès réalisés ont permis une connaissance de plus en plus approfondie. Il existe plusieurs techniques pour étudier la cellule :

- Etudes morphologiques (Techniques Microscopiques)
- Etudes physico-chimiques (Techniques de fractionnement des constituants cellulaires dont Centrifugation, etc...).

L'évolution de ces techniques d'étude a permis de mieux comprendre la biologie cellulaire.

La microscopie

La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie des objets de petites dimensions. Quelle que soit la technique employée, l'appareil utilisé pour rendre possible cette observation est appelé **un microscope**.

Définition

Du grec ancien mikros signifiant **petit** et skopein : **examiner**, la microscopie désigne l'observation d'objets invisibles à l'œil nu

C'est un instrument scientifique destiné à observer des objets trop petits. On distingue principalement 2 types de microscopies :

La microscopie optique,

La microscopie électronique

Historique

Le tout premier microscope a été créé en **1595**, à l'époque du roi Henri IV. C'est **Zacharias Janssen**, un fabricant de lunettes hollandais, qui a eu l'idée de superposer deux verres de lentille (les lunettes de l'époque) dans des tubes coulissants, afin de grossir de très petites choses.

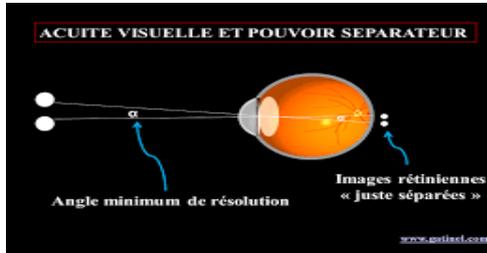
80 ans plus tard, Antoine van Leeuwenhoek et Robert Hooke y apportent quelques modifications pour observer des choses qui étaient invisibles à l'œil nu.



Le pouvoir séparateur ou résolution

Distance la plus petite possible qui doit séparer 2 objets pour qu'on puisse les observer en 2 éléments distincts.

- PS de l'œil: 0.2 mm.
- PS du MO: 0.2 μ m.
- PS du MET: 0.2nm.



Microscope photonique (optique)

Permettent l'observation de cellules **vivantes** ou **mortes**, le principe de microscope optique est **double** : **constitution**, grâce à un objectif, d'une image de l'objet observé puis **observation** de cette image grâce à un oculaire qui l'agrandit et la place à l'infini, permettant une observation confortable, l'ensemble permet d'agrandir l'image et d'**augmenter sa résolution**.

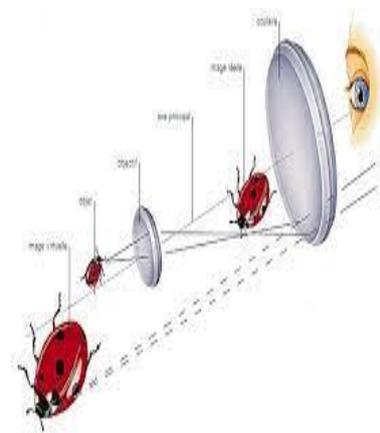
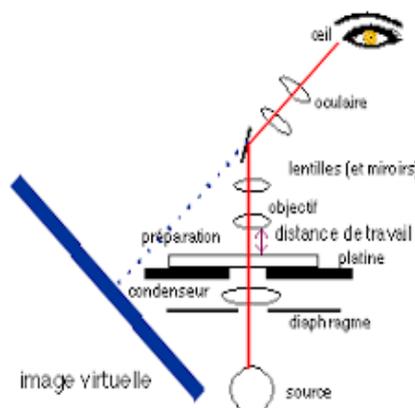
Il existe une limite au pouvoir de résolution du microscope, qui est de quelques dixièmes de micromètre et lié à la longueur d'onde de la lumière visible. PS; 0.2 μ m

L'objet observé est une coupe suffisamment **plane** pour être **nette** et suffisamment **fine** pour être **traversé par la lumière** qui permet d'observer l'objet.

Cela n'interdit cependant pas d'observer plusieurs épaisseurs de cellules, et surtout d'observer des tissus vivants.

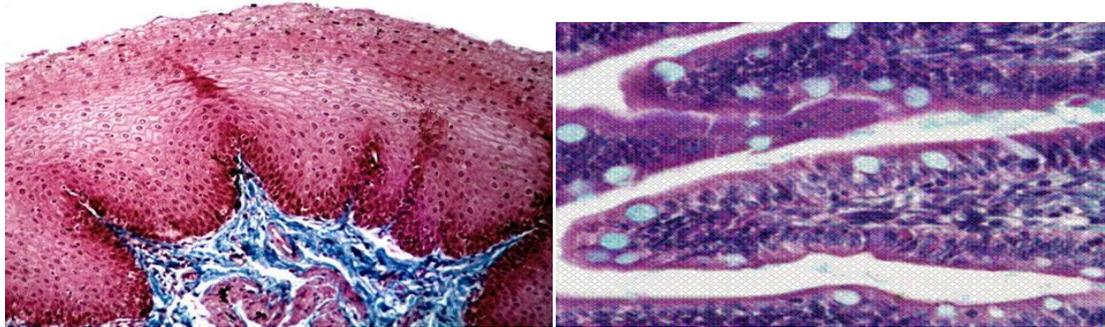
Présentation du microscope optique

Composé d'un statif (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, d'un tube optique le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités un oculaire permettant de recueillir l'image et des objectif servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, d'une platine (porte objet) percée d'un trou et munie de pinces pour immobiliser la lame et d'une source lumineuse éclairant la préparation.



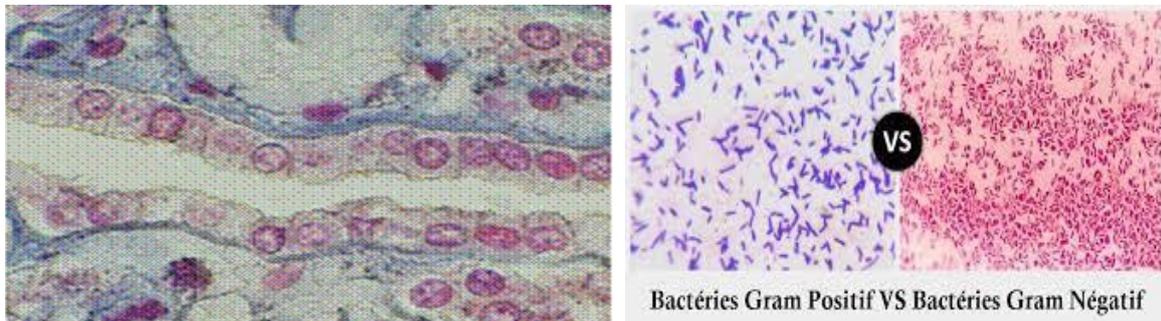
Domaines d'application du Microscope Optique

Histologie, Hématologie, Parasitologie et Bactériologie. Description structurales des tissus et des cellules (taille et forme cellulaire ou tissulaire, forme et position des noyaux,..) et dans l'observation des différentes formes bactérienne après coloration de Gram.



Épithélium pavimenteux stratifié (œsophage)

épithélium Prismatique simple plateaérié
Jéjunum



Epithélium cubique simple (ovaire)

Bactéries Gram Positif VS Bactéries Gram Négatif

Étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair (technique histologique)

- 1- La fixation
- 2- La déshydratation
- 3- L'inclusion
- 4- La coupe
- 5- La coloration ou l'immunomarquage
- 6- Le montage

1. La fixation

La fixation est réalisée immédiatement après le prélèvement de l'échantillon à observer. Elle permet d'immobiliser et de conserver l'échantillon dans le temps, dans un état proche du vivant. Elle peut être réalisée par un liquide fixateur ou par congélation. La fixation en liquide fixateur est réalisée en plongeant le matériel biologique dans une solution de formol. La fixation par congélation consiste à plonger l'échantillon dans un milieu de congélation des tissus (liquide à température ambiante et solide à -20°C). Le tout est ensuite refroidi dans de l'azote liquide. L'échantillon congelé est conservé jusqu'à la réalisation des coupes.

2. La déshydratation

La déshydratation permet l'élimination de l'eau : L'eau est retirée au cours de passage dans des bains d'alcools successifs.

3. L'inclusion

L'étape suivante d'inclusion est réalisée à l'aide d'une table d'inclusion. Elle consiste à orienter l'échantillon dans un moule contenant de la paraffine en fusion, en veillant à respecter le plan de coupe. Le bloc qui en résulte est enfin refroidi. L'échantillon est ensuite coupé au microtome.

4. La coupe

Les coupes sont réalisées par microtomie ou cryotomie. La coupe est une étape importante de la préparation des lames car elle conditionne la bonne observation de l'échantillon en microscopie.

Les échantillons inclus en paraffine sont coupés de façon transversale avec un microtome, en fines tranches de 5 micromètres. Les lames de verre sont recouvertes d'une solution contenant un additif permettant d'optimiser l'accroche de la coupe déposée sur la lame. Les lames sont ensuite placées sur des plaques chauffantes afin d'aider au bon étalement de l'échantillon. Le liquide résiduel est retiré à la main après réchauffement de la lame. Les lames sont ensuite séchées à température ambiante. Les échantillons congelés sont coupés à l'aide d'un cryotome. Les coupes à congélation sont ensuite déposées sur une lame de verre pour stockage à -80°C.

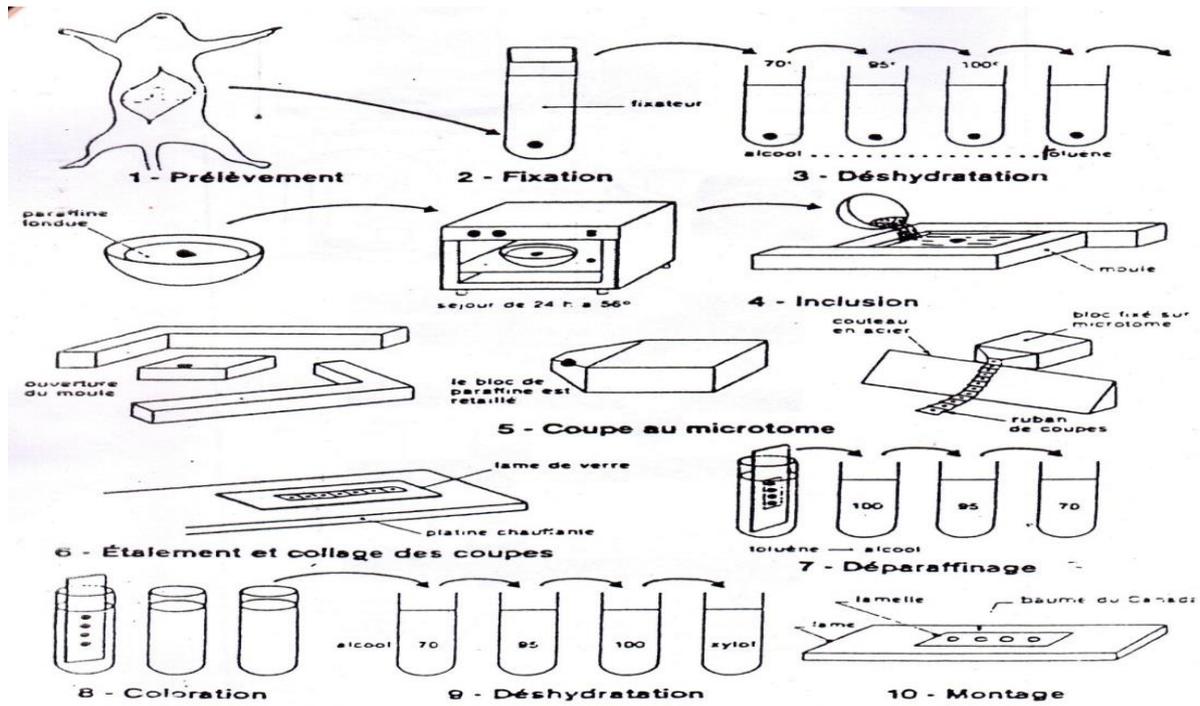


5. La coloration ou l'immunomarquage

La coloration permet d'accentuer les contrastes afin de reconnaître et de différencier des éléments constitutifs du matériel biologique. L'échantillon est déparaffiné et réhydraté au préalable afin de permettre aux colorants polaires d'imprégner les tissus. Ainsi, les différents colorants peuvent entrer en contact avec les éléments à colorer en fonction de leur affinité. Une fois la coloration effectuée, la lame est rincée et déshydratée pour le montage.

6. Le montage

Les coupes sont montées entre lames et lamelles avec un produit permettant leur adhérence. Les lames sont prêtes à être stockées ou observées. Pour les observations en microscopie à fluorescence, un milieu de montage est utilisé afin de diminuer temporairement la perte de fluorescence.



Étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair (technique histologique)

Microscope optique à fluorescence

Est la propriété physique de certaines molécules d'émettre une lumière de longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde de la lumière d'excitation.

Le microscope à fluorescence : est un microscope optique qui porte deux filtres interposés entre l'échantillon 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

Fluorochrome

Ou fluo-marqueur est une substance chimique excitable par la lumière, capable d'absorber une énergie lumineuse haute (de faible longueur d'onde) dite lumière d'excitation et de la réémettre sous forme d'une lumière d'énergie basse (et de longueur d'onde forte) dite lumière de fluorescence, détectée par l'oculaire. Ces molécules photo excitables peuvent être :

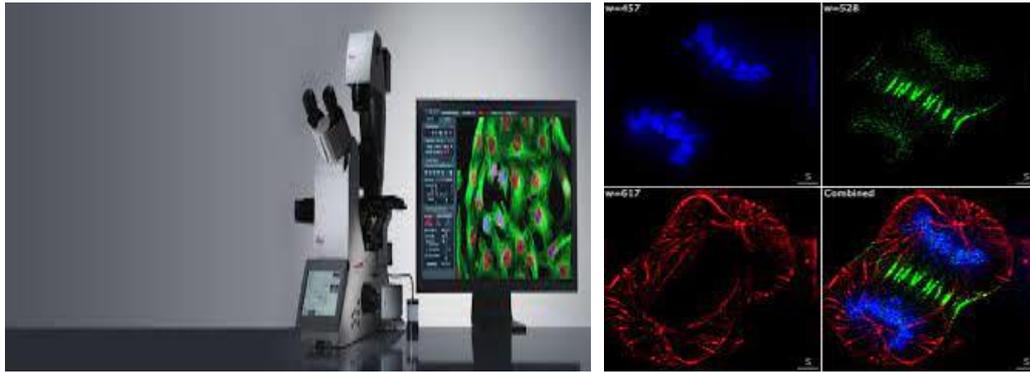
Endogènes (naturelle): chlorophylle.

Exogènes (artificielles): Fluorescéine et la Rhodamine

Domaines d'application

Il est le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome ; à titre d'exemple, on peut aussi détecter la présence d'insuline dans une cellule avec anticorps Anti-insuline marqué par fluorescéine.

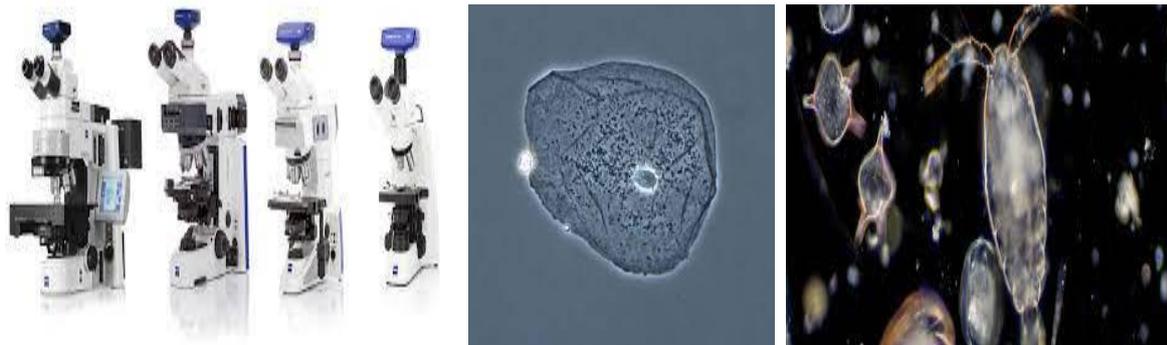
Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires. - Détection , localisation, quantification de protéines cellulaires comme les hormones , les protéines du cytosquelette.



Microscope optique à fluorescence

Le microscope à contraste de phase

Le microscope à contraste de phase est un type de microscope qui vous permet d'observer des échantillons vivants sans utiliser de techniques de coloration. Ce microscope est basé sur l'existence d'une différence de phase entre les différentes ondes lumineuses qui traversent l'échantillon pour générer l'image de l'observation.



Le microscope électronique

Un principe semblable à la microscopie optique, si l'on considère un faisceau d'électrons de la même manière qu'un faisceau de lumière, ce type de microscope n'est pas très différent d'un microscope optique, Les lentilles de verre y sont remplacées par des lentilles magnétiques qui dévient les électrons selon le même principe, les coupes doivent être très fines ; ce qui interdit l'observation de tissus vivants.

En revanche, le pouvoir de résolution est très fortement amélioré, on peut observer des détails de l'ordre de quelques nanomètres.



Le microscope électronique

Le microscope électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique permettant d'observer des organites intracellulaires sur les échantillons coupés, de localiser des molécules avec des marqueurs.

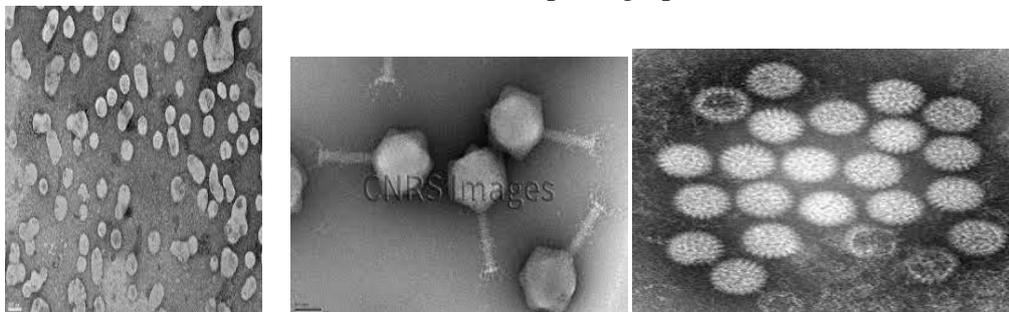
Elle est utilisée également pour visualiser des structures moléculaires (protéines ou acides nucléiques) et des microorganismes entiers par les techniques de colorations négatives.

Un microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électron pour illuminer l'échantillon, et les électrons traversant l'échantillon, donc transmis, sont détectés sur un écran. Les échantillons doivent être suffisamment minces pour être traversés par le faisceau d'électron. Le type de préparation va dépendre de la nature des échantillons, mais dans tous les cas la taille de l'échantillon sera limitée en épaisseur (20-100nm) et en surface (max 500 µm X 500 µm)

Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de l'échantillon 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 (< 0,1µm) après inclusion dans une résine.

LA COLORATION NEGATIVE

Dans cette technique, on place une goutte de colorant (acétate d'uranyle ou phosphotungstate de potassium) sur une grille qui porte les particules à étudier et on laisse s'évaporer la plus grande partie de la goutte. Le colorant a tendance à envelopper la particule sur le filme qui le supporte et pénètre dans toutes les irrégularités qui s'ouvrent à la surface de la particule. Le reste de la particule recueille peu de colorant. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre sur les photographies.



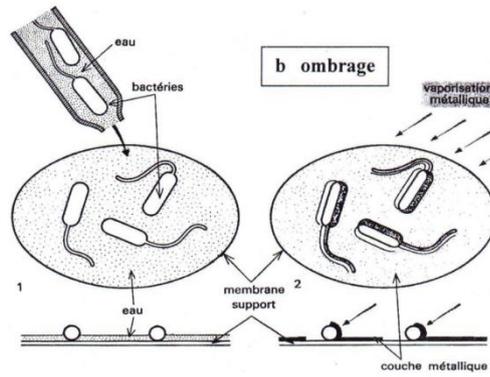
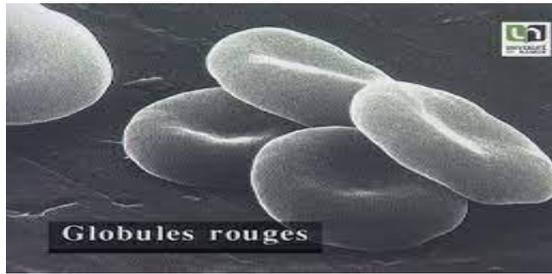
Le microscope électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique permettant de visualiser la surface de structures massives, l'échantillon apparaissant en volume.

Un microscope électronique à balayage utilise un faisceau d'électrons très fin qui balaie, point par point, la surface de l'échantillon à observer.

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



Les méthodes de fractionnement cellulaire

Ces techniques consistent à séparer les constituants d'une cellule ou d'un organe et comportent deux étapes principales :

1. **L'homogénéisation** (ou broyage), qui implique la destruction de la membrane plasmique et donne un homogénat (extrait acellulaire) ;
2. **La purification** : qui consiste à la séparation des constituants cellulaires par des techniques de centrifugation.

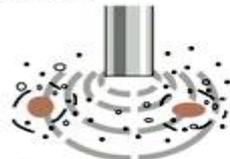
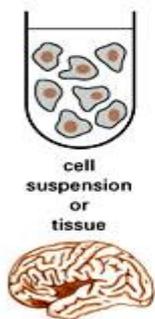
L'homogénéisation cellulaire

BREAKING CELLS AND TISSUES

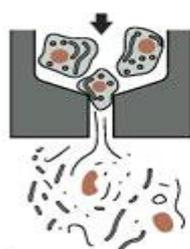
The first step in the purification of most proteins is to disrupt tissues and cells in a controlled fashion.

Using gentle mechanical procedures, called homogenization, the plasma membranes of cells can be ruptured so that the cell contents are released. Four commonly used procedures are shown here.

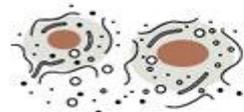
The resulting thick soup (called a homogenate or an extract) contains large and small molecules from the cytosol, such as enzymes, ribosomes, and metabolites, as well as all the membrane-bounded organelles.



- 1 break cells with high frequency sound



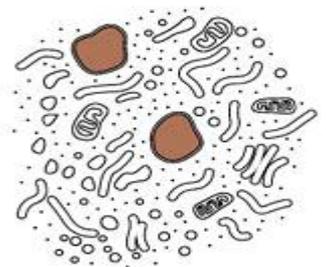
- 3 force cells through a small hole using high pressure



- 2 use a mild detergent to make holes in the plasma membrane

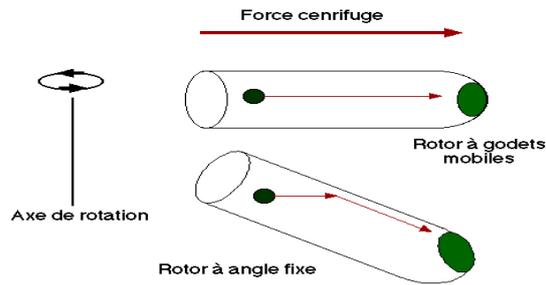


- 4 shear cells between a close-fitting rotating plunger and the thick walls of a glass vessel

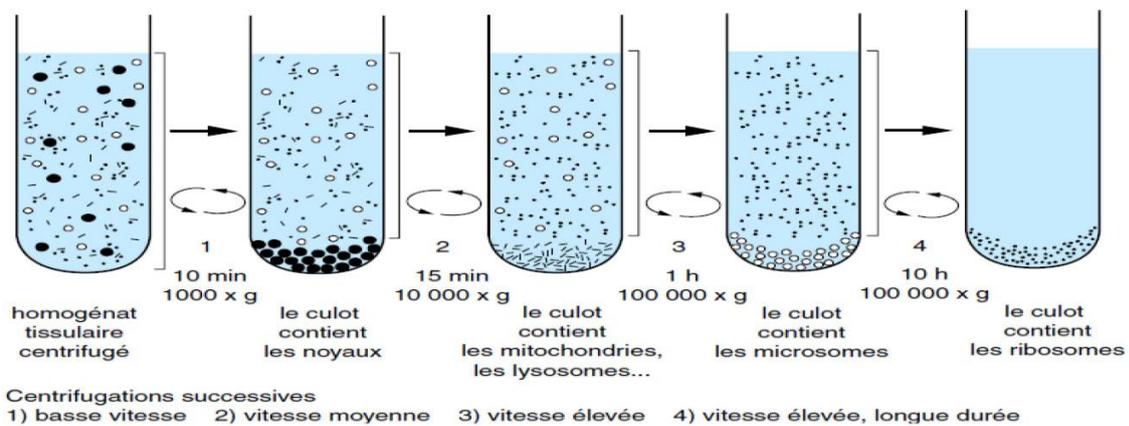


When carefully applied, homogenization leaves most of the membrane-bounded organelles intact.

Techniques de Centrifugation



Centrifugation différentielle



Étapes de la centrifugation en gradient de densité

1. Un gradient de densité d'un milieu est créé en déposant doucement la concentration inférieure sur les concentrations supérieures dans un tube à centrifuger.
2. L'échantillon est ensuite placé sur le gradient, et les tubes sont placés dans une ultracentrifugeuse.
3. Les particules traversent le gradient jusqu'à ce qu'elles atteignent un point où leur densité correspond à la densité du milieu environnant.
4. Les fractions sont retirées et séparées, obtenant les particules sous forme d'unités isolées.

