

Méthodes d'étude de la cellule

2015/2016

- Introduction:
- **Notion de pouvoir de résolution ou de pouvoir séparateur :**

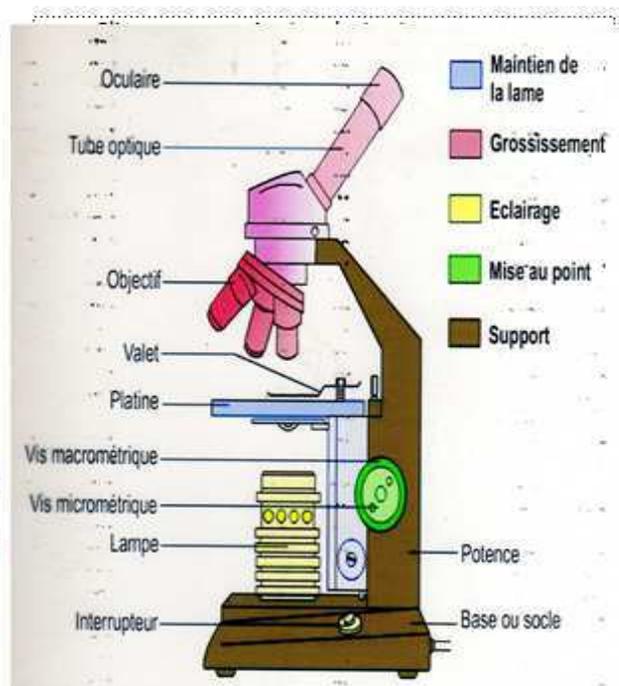
La résolution est définie comme la distance minimale séparant deux points individualisables. Chez l'homme le **PS** est de **0,1mm** à une distance de **25cm**.

Le P.S du microscope photonique (MP) est de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$

1. Description des microscopes :

A. le microscope photonique :

- Dans le cadre de **la microscopie optique** classique, l'échantillon à étudier est posé sur une plaquette en verre appelée : **porte objet** ou **lamelle**, et il est recouvert par un **couvre objet** ou **lamelle**. Cette préparation à observer est déposée sur **la platine** du microscope, et elle est maintenue en place par **deux pinces valets**.
- La lumière fournie par une **lampe** ou un **miroir**, est concentrée par une lentille appelée **condensateur**, avant de traverser l'objet.
- La lumière transmise est captée par l'un des **objectifs** du microscope (qui en compte généralement plusieurs et de puissance différentes). Ces objectifs sont montés sur une pièce tournante appelée **revolver**.
- Finalement, l'image agrandie par l'objectif, parcourt le tube **porte oculaire** et est encore magnifiée par l'**oculaire** sur lequel l'observateur pose son œil.
- Le grossissement de l'oculaire multiplié par celui de l'objectif, fournissent le grossissement total de l'image par le microscope.
- La mise au point s'effectue par les vis de réglage : **vis macrométrique** pour le réglage grossiers ; **vis micrométrique** pour le réglage fin.
- L'ensemble des pièces qui constituent le microscope, est fixé sur la **potence** par laquelle il est aisé de le saisir.



b. Le microscope électronique à transmission : il comprend :

- Un canon à électrons (filament de tungstène porté à une haute tension 200 000 V) ; un tube ou une pompe à vide ; une série de lentilles électromagnétiques ; une grille porte objet ; un écran fluorescent relié à un écran de télévision.

c. Le microscope électronique à balayage : il comprend :

- Un canon à électrons, un tube à vide, une grille porte objet ; un circuit de balayage et un écran de tv.

2. Principe de fonctionnement des microscopes :

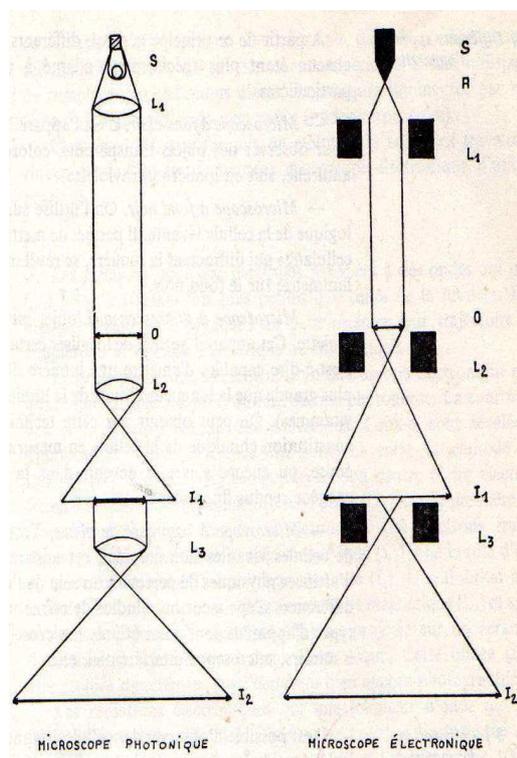
- Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le MP et le MET et l'observation par réflexion pour le MEB.

a. Observation par transmission :

L'échantillon est traversé par des photons (MP) ou des électrons (MET). Les lentilles de verre (MP) ou les lentilles magnétiques (MET) permettent d'obtenir une image qui est reprise par l'oculaire (MP) ou l'écran fluorescent (MET).

b. Observation par réflexion :

Seuls les électrons émis par la surface de l'objet seront utilisés pour la formation de l'image sur l'écran.



3. Conditions d'observation en microscopie :

Pour effectuer une observation en microscopie deux conditions sont requises :

- **L'épaisseur de l'échantillon** : pour permettre le passage des électrons ou des photons l'épaisseur de l'échantillon doit être faible d'où la nécessité de couper l'échantillon. L'épaisseur convenable, pour le **MP** est de **2 à 10 µm** et de **300 à 500Å**, pour le **ME**.
- **Le contraste** : l'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres : c'est l'effet contraste.

Conditions d'observation en microscopie :

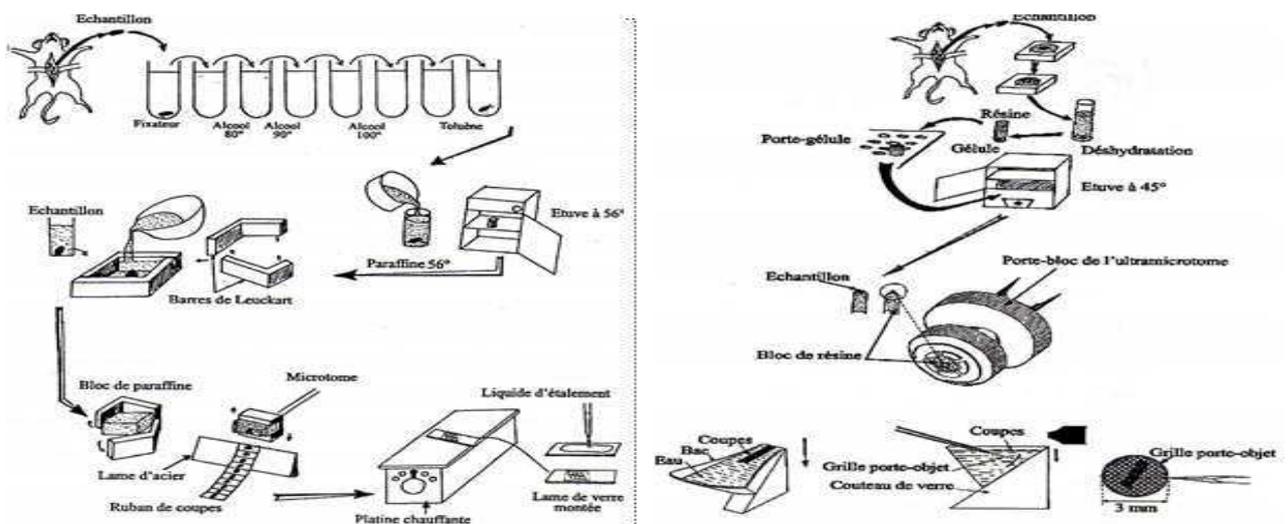
Eléments de comparaison		MP	MET	MEB
Fonctionnement	type d'observation	Observation par transmission	Observation par transmission	Observation par réflexion
Condition d'observation	Echantillon (épaisseur)	Epaisseur de coupes de 2 à 10µ	Epaisseur de coupes <0,1µ	Répliques
	Contraste	Colorants sélectifs	Artifice de Coloration : métaux lourds	Artifice de Coloration : métaux lourds
Application	Observation (cellules vivantes/ mortes)	Vitales et post-mortem	post-mortem	post-mortem
	Observation (couleurs de l'image)	Différentes colorations	Image en noir et blanc	Image en noir et blanc

4. Technique de coupe et de réplique :

4-1. Technique de coupe :

La technique de coupe se réalise en six étapes :

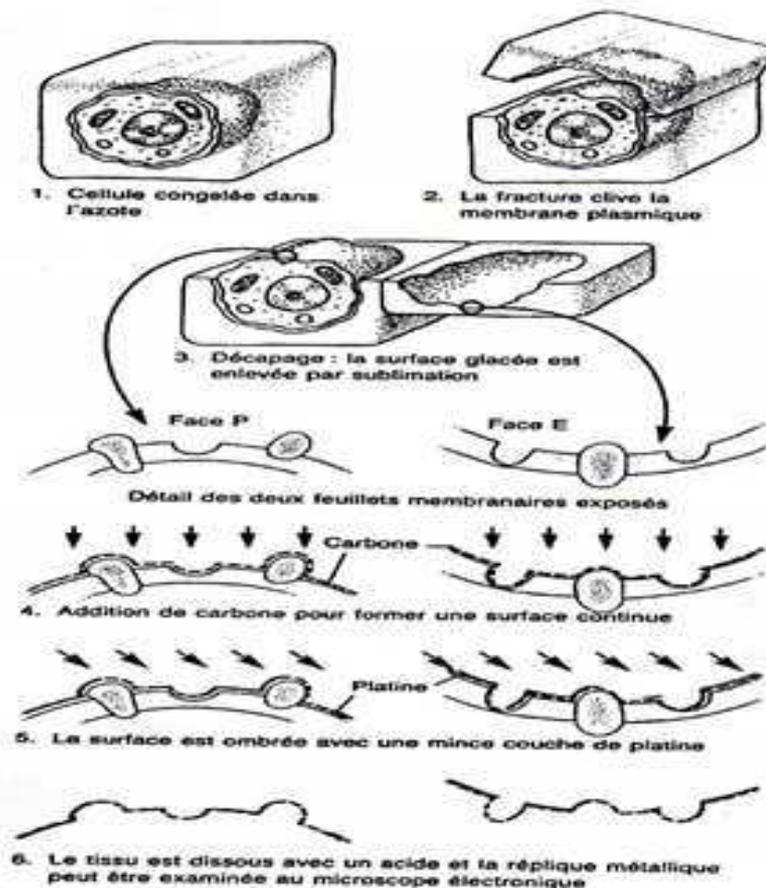
- **la fixation** : elle se fait dans des fixateurs, ex : le formol (MP) et le tétr oxyde d'osmium (ME)
- **La déshydratation** : se réalise par des passages successifs dans de bains d'alcool à degrés croissant où le milieu intracellulaire est progressivement remplacé par un solvant.
- **L'imprégnation** : remplace progressivement le solvant par le milieu d'inclusion : la paraffine (MP) ou la résine (ME). L'imprégnation nécessite un séjour à l'étuve de quelques jours.
- **L'inclusion** : permet d'enrober l'échantillon dans le milieu d'inclusion de façon à pouvoir confectionner un bloc (MP) ou une gélule (ME) et le couper.
- **La coupe** : s'effectue sur un microtome (MP) ou un ultramicrotome (ME). Les coupes sont récupérées sur des lames en verre permettant le passage des photons (MP) ou sur des grilles métalliques résistant au passage d'électrons (ME).
- **Le contraste** cellulaire étant naturellement faible, il est augmenté par l'utilisation de colorants spécifiques (MP) ou des contrastants tels que les sels de métaux lourds **opaques** aux électrons ex : le nitrate d'argent (ME).



A gauche : technique histologique (MP), à droite : Technique cytoologique (MET)

4-2. Technique des répliques :

- **La congélation** : c'est un processus de **fixation très rapide** pratiqué dans **l'azote liquide (à -200 °c)** qui assure une bonne conservation de la moindre petite structure cellulaire.
- **La cryofracture** : **l'objet est fracturé sous vide** par l'action d'une **lame** elle-même refroidie. La structure de fracture suit les reliefs membranaires intracellulaires
- **Le décapage** par **sublimation** qui assure **l'évaporation de l'eau** de la surface de la fracture ce qui a pour but **d'accentuer les irrégularités superficielles**.
- **L'ombrage** : une **1^{ère} vaporisation verticale** d'une mince **couche de carbone** : c'est la **réplique carbonée**. Cette dernière est ombrée par une **2^{ème} vaporisation oblique** de **platine**, ce qui fait **ressortir les détails superficiels** en produisant un **effet d'ombre** ; on obtient ainsi **une empreinte (un moulage) de la surface de fracture**.
- **La réplique obtenue est retirée de l'enceinte sous vide après dissolution des débris cellulaires** (support organique) à l'aide d'un acide (ac. Sulfurique ou chlorhydrique).
- **A l'observation au MEB, l'image observée présente des reliefs et des dépressions.**



Technique des répliques

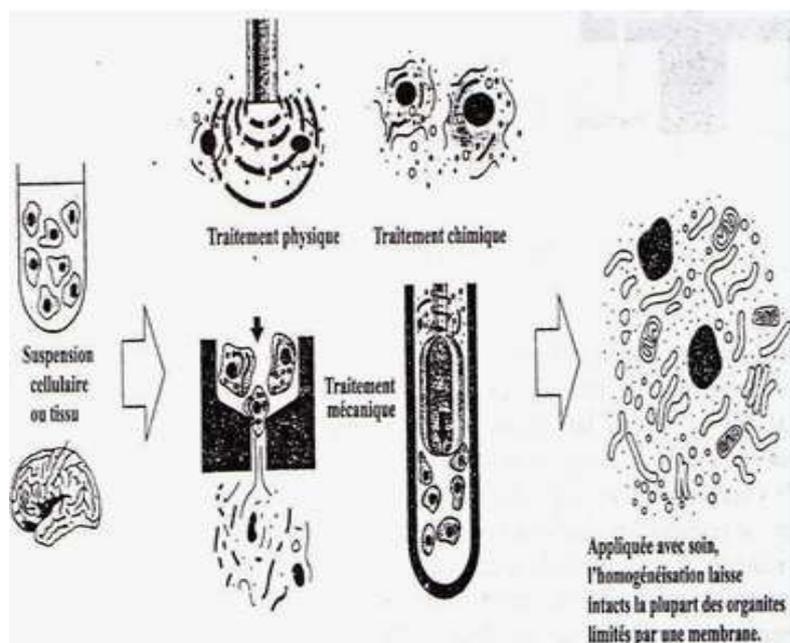
5- Technique de détection et localisation des composés cellulaires :

Ex : La technique d'autoradiographie (voir TD1)

6- Technique d'isolement des organites :

a. l'homogénéisation : ou fractionnement cellulaire

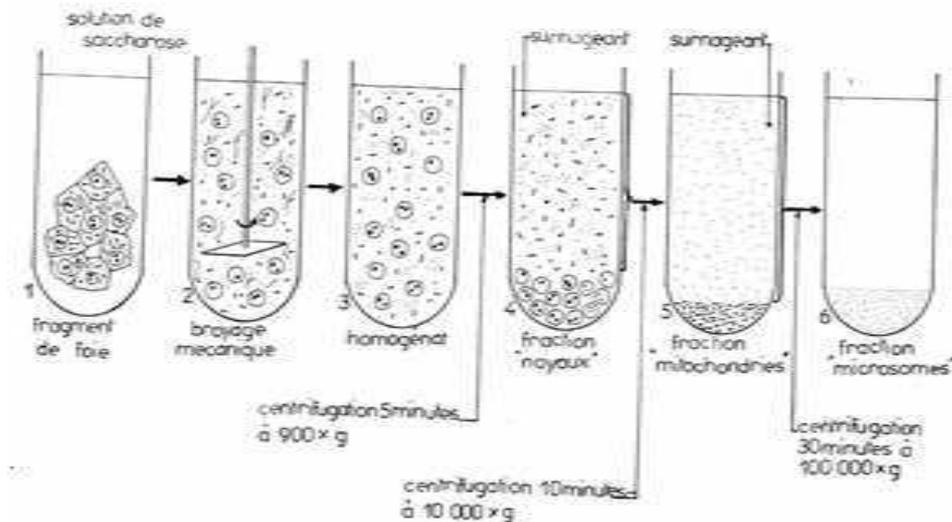
- Elle permet l'obtention d'un homogénat. Cette préparation s'effectue à partir d'une population de cellules identiques (population bactérienne, cellules en culture, fragment d'organe...).
- Ces cellules sont placées dans des tubes à essais contenant une solution isotonique : c'est la suspension.
- La suspension est fractionnée suite à un traitement physique (ultrasons), chimique (addition d'un détergent acide ou basique), ou mécanique (écrasement par un piston vertical ou tournant).
- Il en résulte des déchirements membranaires : les organites cellulaires et les métabolites sont alors libérés dans la solution isotonique : c'est l'**homogénat**.



b. La centrifugation de l'homogénat :

- Elle consiste à séparer l'homogénat en différentes parties ; elle permet d'isoler les organites selon leur **coefficient de sédimentation** en fonction du milieu.
- En pratiquant des centrifugations de plus en plus poussées des surnageants on arrive à récupérer des fractions de plus en plus légères : c'est l'**ultracentrifugation différentielle** ou l'**UCD**. Afin de séparer les organites contenus dans un même culot (**ayant le même coefficient de sédimentation**), on pratique l'**ultracentrifugation sur gradient de densité** ou l'**UGD**. Cette dernière consiste à déposer l'échantillon (un des culots) dans un **gradient de**

chlorure de césium (afin d'isoler les acides nucléiques) ou dans un gradient de saccharose (pour isoler les organites). Après centrifugation les organites se répartissent dans les zones de gradient de même densité qu'eux. Les zones de gradients ou bandes finales sont collectées en perçant le tube de centrifugation.



Ultra centrifugation différentielle ou UCD

7. La culture cellulaire :

La **culture cellulaire** est un ensemble de [techniques](#) de [biologie](#) utilisées pour faire [croître](#) des [cellules](#) hors de leur organisme (*ex-vivo*).

Les cellules mises en culture peuvent être:

- des [micro-organismes](#) libres ([bactéries](#) ou [levures](#))
- des cellules « saines » prélevées fraîchement d'un [organisme](#) ([biopsie](#))
- des cellules ayant une capacité de division non limitée. Ce sont des [lignées cellulaires](#). Les lignées sont : soit des **cellules cancéreuses**, soit des **cellules en voie de cancérisation**, soit des **cellules saines rendues « immortelles » artificiellement**, soit des [cellules souches](#).
- Des tranches d'[organes](#) (d'épaisseur [optimisée](#) selon le tissu)

Les cellules animales sont généralement cultivées en [incubateurs](#), à une température de 37 °C et dans une atmosphère très humide à teneur en [CO₂](#) contrôlée, souvent 5 %.

8-1 Culture primaire :

Il existe deux méthodes de base pour faire la culture primaire:

- **les Cultures des plants:** de **petits morceaux de tissus** sont **fixés** sur un **réceptif de culture** en **verre** ou en **plastique** traité et baignés dans du milieu de culture. **Après quelques jours**, des cellules individuelles **se déplacent des plants de tissus vers la surface du réceptif de culture** ou du substrat où **elles** commencent à **se diviser** et se proliférer.
- **Dissociation enzymatique:** la méthode la plus généralement utilisée. ce processus est **accélééré** en ajoutant **des enzymes de digestion**, à des fragments de tissus pour **dissoudre le ciment** maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de **cellules individuelles** qui sont placées dans des **réceptifs de culture** contenant un **milieu de culture** pour les laisser pousser et se diviser.

8-2 culture secondaire :

- **Repiquage ou culture secondaire :** Lorsque les cellules dans le réceptif de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur **donner de la place** afin d'avoir une croissance continue (**culture secondaire**). Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes. Ces enzymes (protéolytiques) sont similaires à celles utilisées pour obtenir la culture primaire et sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques **liant les cellules au substrat**.