

Chapitre 2 : les méthodes d'étude de la cellule

Dr. AIT ATMANE Sihem

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département du Tronc Commun

Email : sihem.aitatmane@univ-bejaia.dz

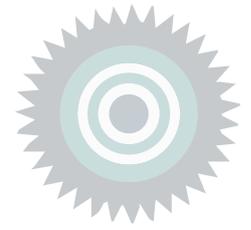
3.7 Avril 2022

Chapitre I

Table des matières

| | |
|---|----------|
| Objectifs | 3 |
| I - Carte conceptuelle | 4 |
| II - Thème 2 : Méthodes d'étude de la cellule | 5 |
| 1. Pré-test | 5 |
| 1.1. Exercice | 5 |
| 1.2. Exercice : Je complète ce passage | 5 |
| 2. Méthodes et techniques d'observations des cellules | 5 |
| 2.1. Les microscopes optiques | 6 |
| 2.2. Les microscopes électroniques | 7 |
| 3. Techniques de préparation des échantillons | 7 |
| 3.1. Études des structures..... | 7 |
| 3.2. Mise en culture | 8 |
| 4. Méthodes de fractionnement subcellulaire..... | 8 |
| 4.1. Homogénéisation..... | 8 |
| 4.2. Purification | 9 |
| 5. Exercice : QCM 1 | 10 |
| 6. Exercice : QCM 2 | 10 |
| 7. Références..... | 10 |

Objectifs

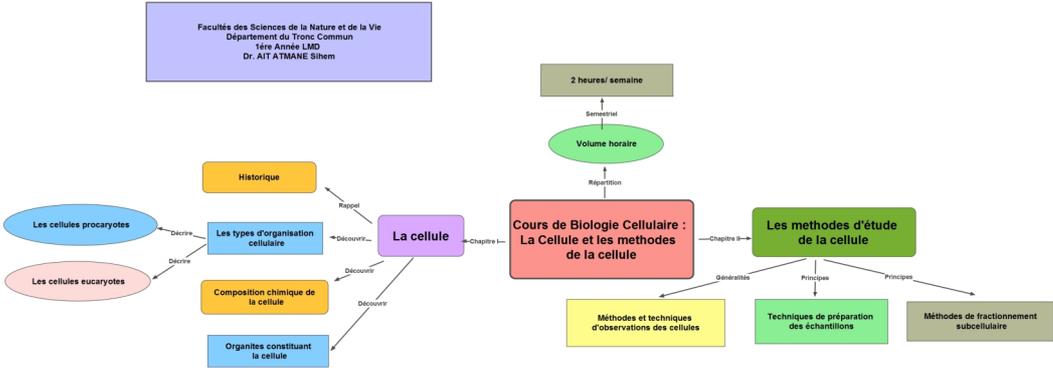


A la fin de ce chapitre, l'étudiant sera capable de :

- Découvrir les principales techniques d'étude des cellules
- Savoir comment identifier chaque type cellulaire via une technique d'analyse microscopique
- Schématiser chaque type cellulaire



Carte conceptuelle



Carte conceptuelle

Thème 2 : Méthodes d'étude de la cellule



Les **cellules** sont de très petite taille et d'organisation très **complexe**. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure des progrès scientifiques et technologiques réalisés dans divers domaines. Les progrès de la **microscopie** ont repoussé la frontière entre le visible et l'invisible. Au microscope électronique, on parvient même obtenir l'image d'atomes d'or cristallin. Aujourd'hui, la médecine, la biologie ne peuvent plus se passer du microscope. Pour comprendre la **biologie cellulaire** contemporaine, il est indispensable de se familiariser avec les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude. Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- Les techniques morphologiques.
- Les techniques chimiques et biochimiques.
- Les techniques physiologiques.

1. Pré-test

1.1. Exercice

On distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution :

- Les microscopes optiques
- Les microscopes optiques à lumière
- Les microscopes électroniques.

1.2. Exercice : Je complète ce passage

L'observation des [] est délicate du fait de leurs très [] tailles, et nécessite un certain nombre de [] pour mettre en évidence leurs [] dont les [] .

2. Méthodes et techniques d'observations des cellules

L'**observation** des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles, et nécessite un certain nombre d'appareillages dont les microscopes. Le microscope est caractérisé par :

- Son **grossissement** : Égal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire
Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.
- Son pouvoir de **résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

On distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes optiques et les microscopes électroniques.

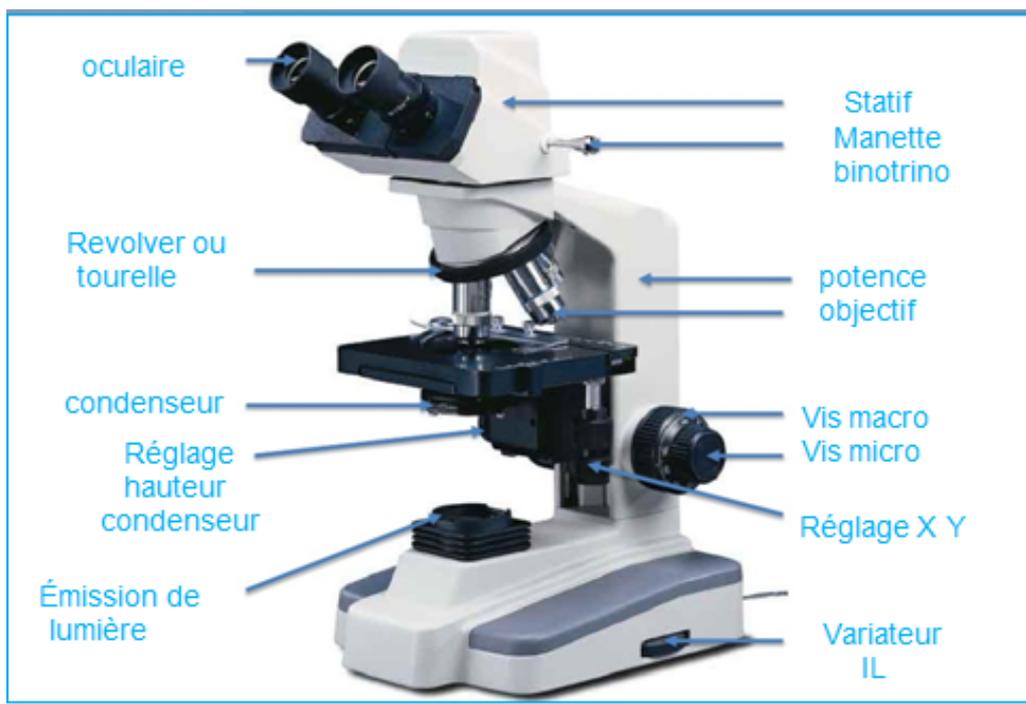
| M. OPTIQUE | Caractéristiques | M. ELECTRONIQUE |
|---|--|-----------------|
| * grossissement : de 25 à 1500 fois * pouvoir séparateur : environ 0.2µm * préparation est traversée par des photons * longueur d'onde : 0.4 à 0,8 µm * lentilles sont en verre * image : est reçue directement * les coupes au microtome : 2 à 10 µm | * grossissement : 1500 à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10Å° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0.05 Å° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0.05µm | |
| Avantages | | |
| * on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles | * on peut voir la structure fine de la cellule * on atteint très souvent le niveau moléculaire * a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux) | |
| Inconvénients | | |
| * on ne peut pas pousser l'analyse assez loin | * la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent | |
| Unités | | |
| * l'unité est le micromètre ou micron (µm) 1µm = 10 ⁻³ mm | * l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10 ⁻⁶ mm ou 10 ⁻⁹ m | |

Les différences entre le microscope optique et électronique

2.1. Les microscopes optiques



Les **microscopes optiques** (à lumière ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. Les microscopes optiques utilisent de la lumière visible et la qualité de l'image dépend du pouvoir séparateur qui donne la résolution du microscope limitée par la longueur d'onde de la radiation lumineuse. On obtient donc un grossissement x1000. Un microscope optique en général est 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. Les étapes de l'observation sont comme suite: préparation de l'échantillon, mise au point, changement de grossissement, l'observation.



Le microscope optique

2.2. Les microscopes électroniques



Les **microscopes électroniques** utilisent des faisceaux d'électrons qui sont chargés, possèdent une masse et se comportent comme une onde. Plus les électrons sont accélérés plus les longueurs d'onde diminuent et plus la résolution augmente. Ces électrons possèdent des compartiments possédant un vide parfait afin de maintenir rectiligne les faisceaux d'électrons, et des lentilles électromagnétiques qui forment un condensateur. On obtient ici un grossissement $\times 100\ 000$. 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 et donc soumis à des inclusions.

- Le **microscope électronique par transmission**: où tout s'effectue sous vide via un filament de Tungstène chauffé émet des électrons qui sont plus ou moins diffractés par les diverses structures cellulaires.
- Le **microscope électronique à balayage** : consiste à balayer une préparation par un faisceau d'électrons, permettant la mise en évidence des reliefs de l'échantillon.

3. Techniques de préparation des échantillons

3.1. Études des structures



Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécapage.

La préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

1. La fixation se fait par le **formaldéhyde** et le **glutaraldéhyde**, qui sont des aldéhydes très réactifs. Malheureusement la fixation tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation.
2. La déshydratation permet l'élimination de l'eau en la remplaçant par des solvants de types **xylène** et **toluène**.
3. L'inclusion dans de la résine, cire ou paraffine, permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.
4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.
5. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence
 - Les **colorants métachromatiques** qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le **May-Grunwald-Giemsa (MGG)**, qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins.
 - Les **colorants histochimiques** comme l'**acide périodique de Schiff** qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides.
 - La **méthode histo-enzymatique** qui permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore.
6. Le montage rend la préparation observable.

La **coloration négative** permet de mettre en évidence le contour de petits objets, grâce à des projections de métaux lourds sur la préparation.

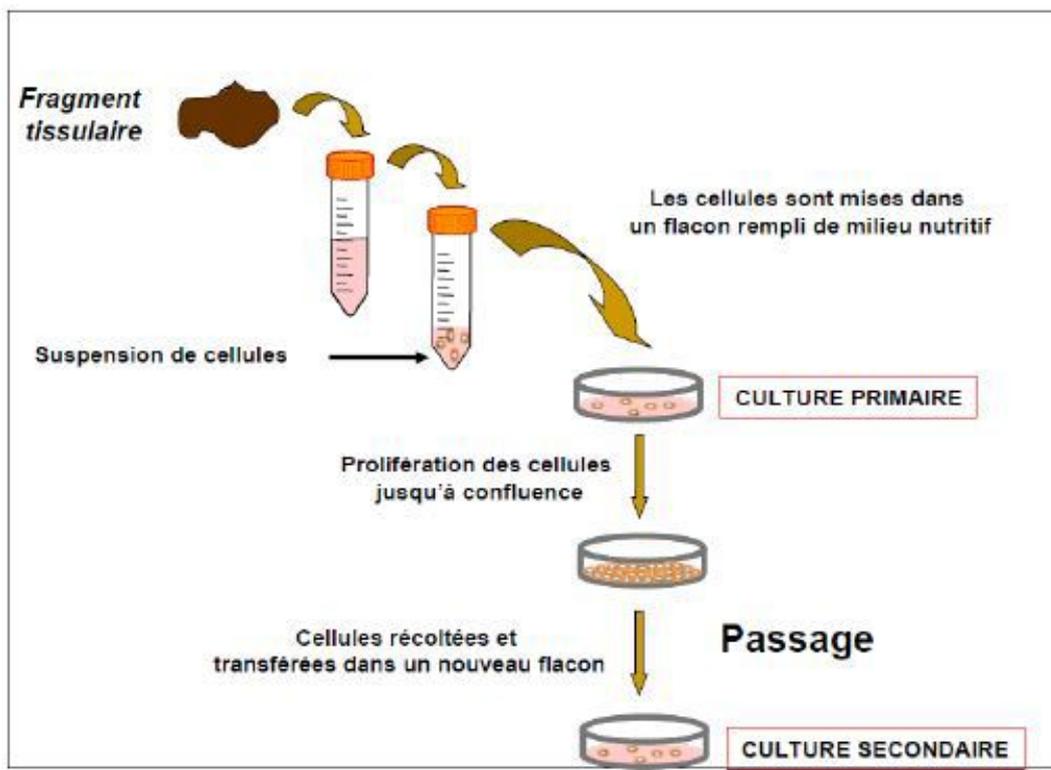
Les **ombrages métalliques** permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant sous vide une très fine couche métallique avec un certain angle d'incidence entraînant la formation d'ombre portée.

3.2. Mise en culture



La culture cellulaire est obtenue après le maintien en vie de cellules plus de 24 heures dans un milieu de culture artificielle. On met en évidence deux types de cultures :

- Les **cultures organotypiques** sont soumises à un maintien de la différenciation morphologique et fonctionnelle. Ces fragments d'organes ou tissus sont appelés des explants.
- Les **cultures histotypiques** correspondent à une multiplication active mais sans maintien de l'organisation.



Culture cellulaire

4. Méthodes de fractionnement subcellulaire

4.1. Homogénéisation



Le but de l'**homogénéisation** est de rompre la membrane plasmique (ou la paroi pour les cellules végétales et fongique). Pour se faire on met les cellules en suspension dans un tampon de pH et de force ionique connus. L'homogénéisateur est un tube de verre dans lequel on place la préparation puis un piston en verre. La cellule passera entre le tube de verre et le piston, sera ainsi comprimée et éclatera, libérant son contenu dans le tampon. On obtient un **homogénat** avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées **microsomes**.

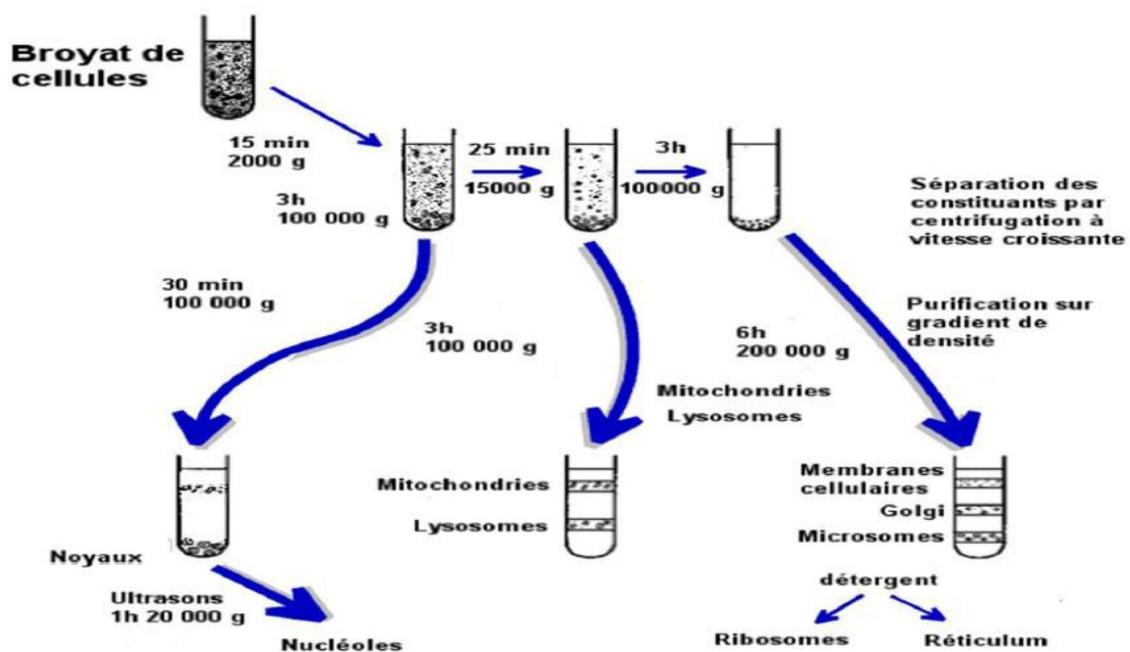
4.2. Purification

a) Centrifugation différentielle



Elle permet la **purification** de l'homogénat en fonction de la taille et de la **densité** de ses constituants. Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé

- A 1000g, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 10000g, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- A 105000g (ultracentrifugation), on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.
- A 200000g, on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

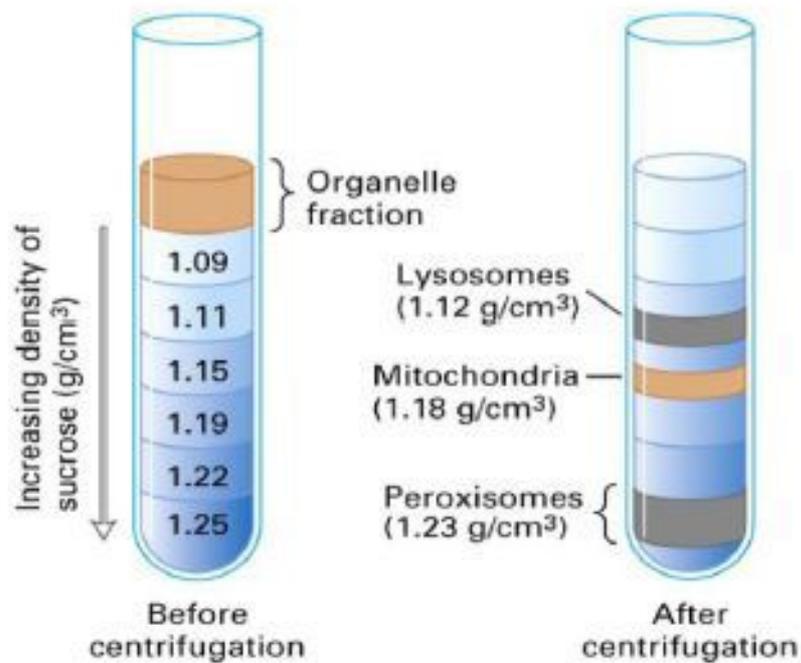


Centrifugation différentielle

b) Centrifugation par gradient préformé ou de densité



La **centrifugation par gradient préformé** consiste à déposer une mince couche d'homogénat 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)**.



Centrifugation par gradient de densité

5. Exercice : QCM 1

Les microscopes optiques sont caractérisés par un :

- Pouvoir séparateur de 10\AA
- grossissement de 25 à 1500 fois.
- Un grossissement de 1500 à 200000 fois.
- Pouvoir séparateur d'environ $0.2\mu\text{m}$.

6. Exercice : QCM 2

La préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

- La fixation
- La coloration
- La déshydratation
- L'inclusion
- L'extraction

7. Références

<https://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/methodes-detudes-cellulaires.html>

http://www.ured-douala.com/download/biologie_cellulaire.pdf