

Département des Troncs Communs Sciences de la Nature  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

# Biologie cellulaire

Cours 2 : Techniques d'étude des cellules

Année universitaire 2015/2016

# PLAN DU COURS

## 1- Méthodes d'analyse microscopique

- Microscopie optique
- Microscopie électronique

## 2- Techniques d'isolement des organites

- Centrifugation différentielle
- Centrifugation sur gradient de densité

## 3- Méthodes histochimiques ou cytochimiques

- Mise en évidence des polysaccharides : réaction à l'acide périodique de Schiff (P.A.S)
- Mise en évidence de l'ADN : réaction de Feulgen

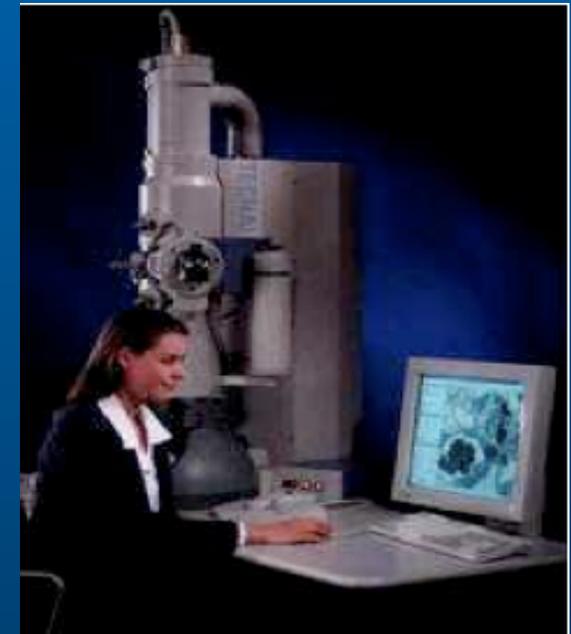
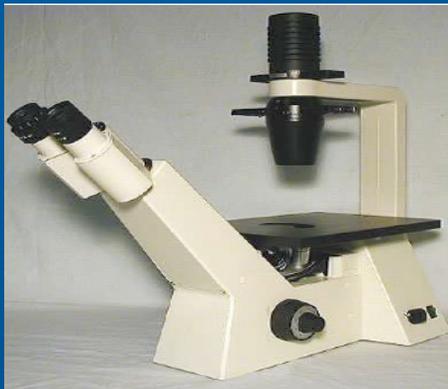
## 4- Méthodes immunocytochimiques

- Molécules fluorescentes
- Enzymes

# Méthodes d'analyse microscopique

- **Définition et principe :**

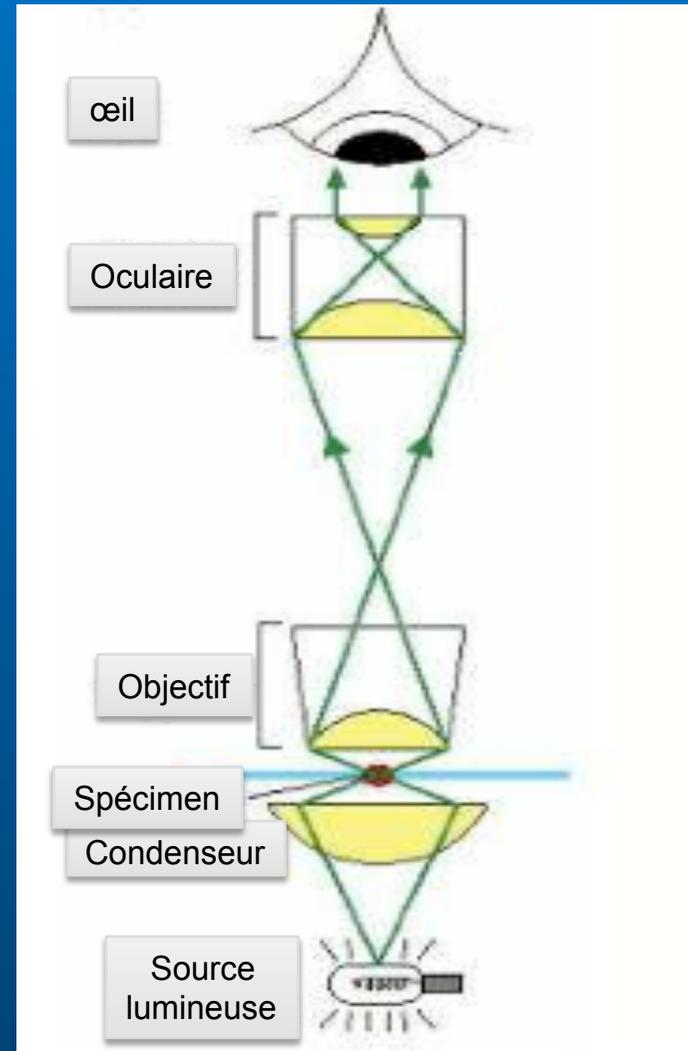
- Ensemble de **techniques** permettant d'obtenir une **image de structures biologiques**.
- Une **onde** (photons, électrons) est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un **objectif** qui la concentre et par un **oculaire** qui crée une image observable.



# Microscopie optique à lumière transmise

- **Principe et fonctionnement :**

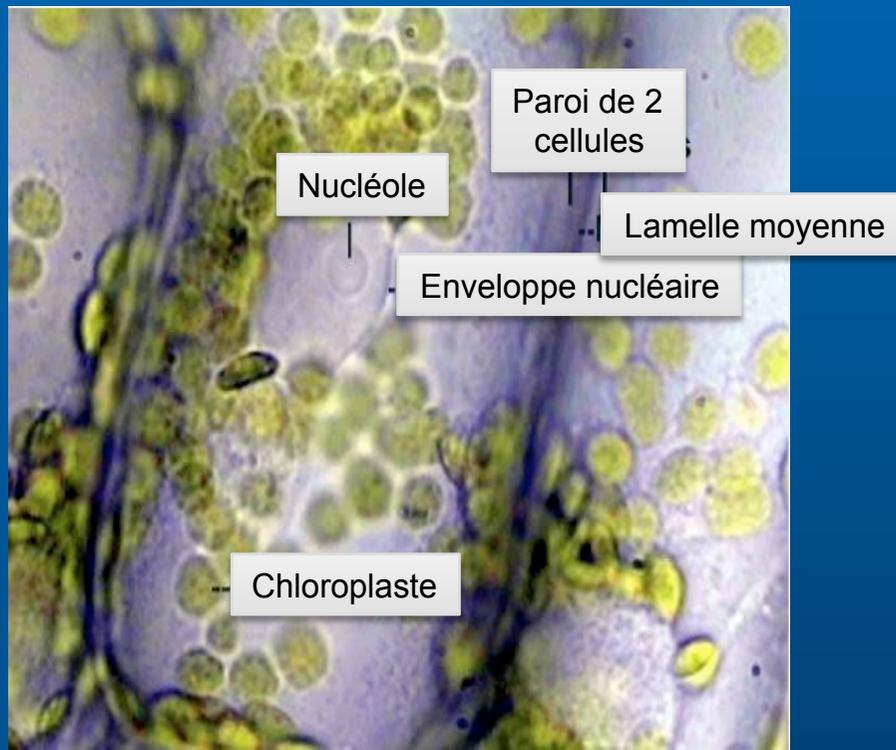
- Fondée sur l'utilisation de la **lumière** et de **lentilles optiques**.
- Permet l'**observation** d'éléments **non visibles à l'œil nu**.
- Source lumineuse fournie par une **lampe**.
- Concentrée par une lentille, le **condenseur**.
- La lumière traverse le spécimen, puis une autre lentille appelée **objectif** grossit le spécimen.
- Visualisée à travers une lentille : **oculaire**.



# Microscopie optique à lumière transmise

- Exemples d'observation

Cellules végétales (Élodée)

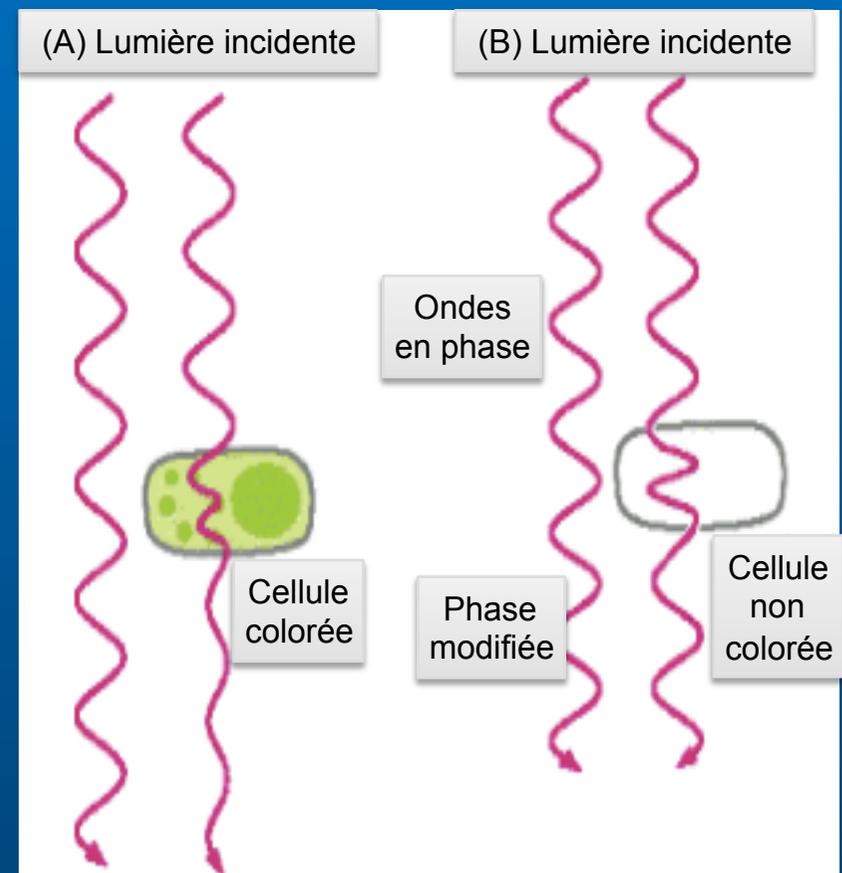


Cellule de la muqueuse buccale



# Microscopie optique à contraste de phase

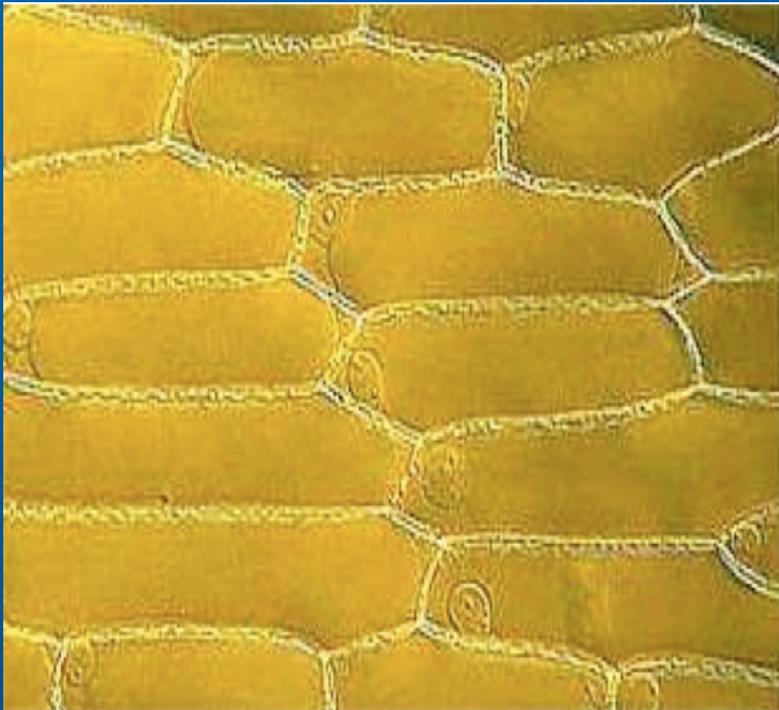
- Ces microscopes permettent d'observer des objets non préalablement colorés, par exemple des cellules vivantes.
- (A) : quand des ondes lumineuses traversent des **objets colorés**, leur **amplitude est diminuée**, c'est ce qui crée l'image.
- (B) : quand les ondes lumineuses traversent un **objet non coloré**, leur **amplitude est peu changée**, mais leur **phase est modifiée**, ce qui crée des **interférences**. Les effets de ces interférences sont exploités pour créer une **image** dans les microscopes à contraste de phase.



# Microscopie optique à contraste de phase

- Exemples d'observation

Cellules de l'épiderme d'oignon



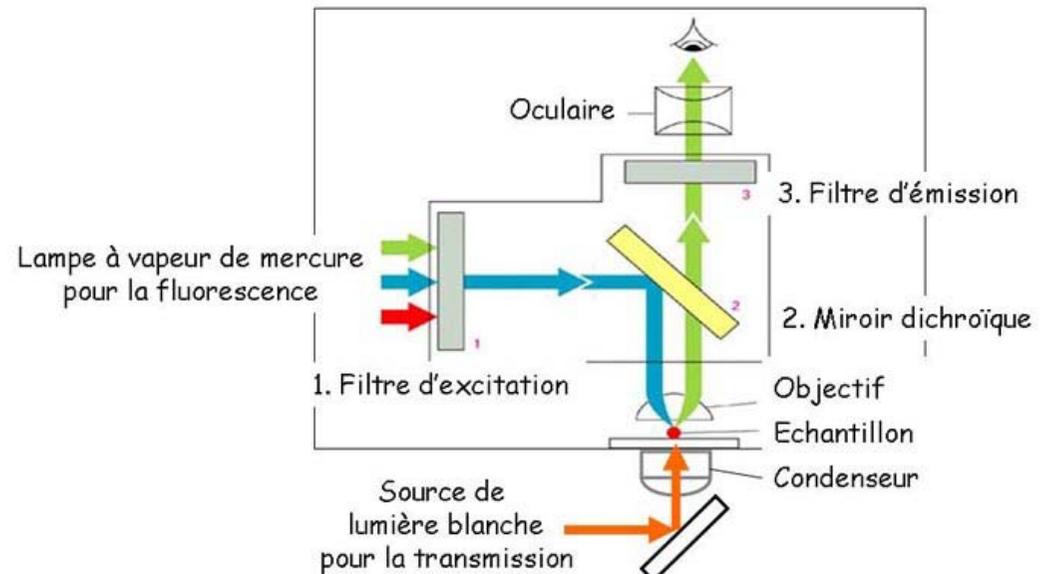
Cellule de la muqueuse buccale



# Microscopie optique à fluorescence

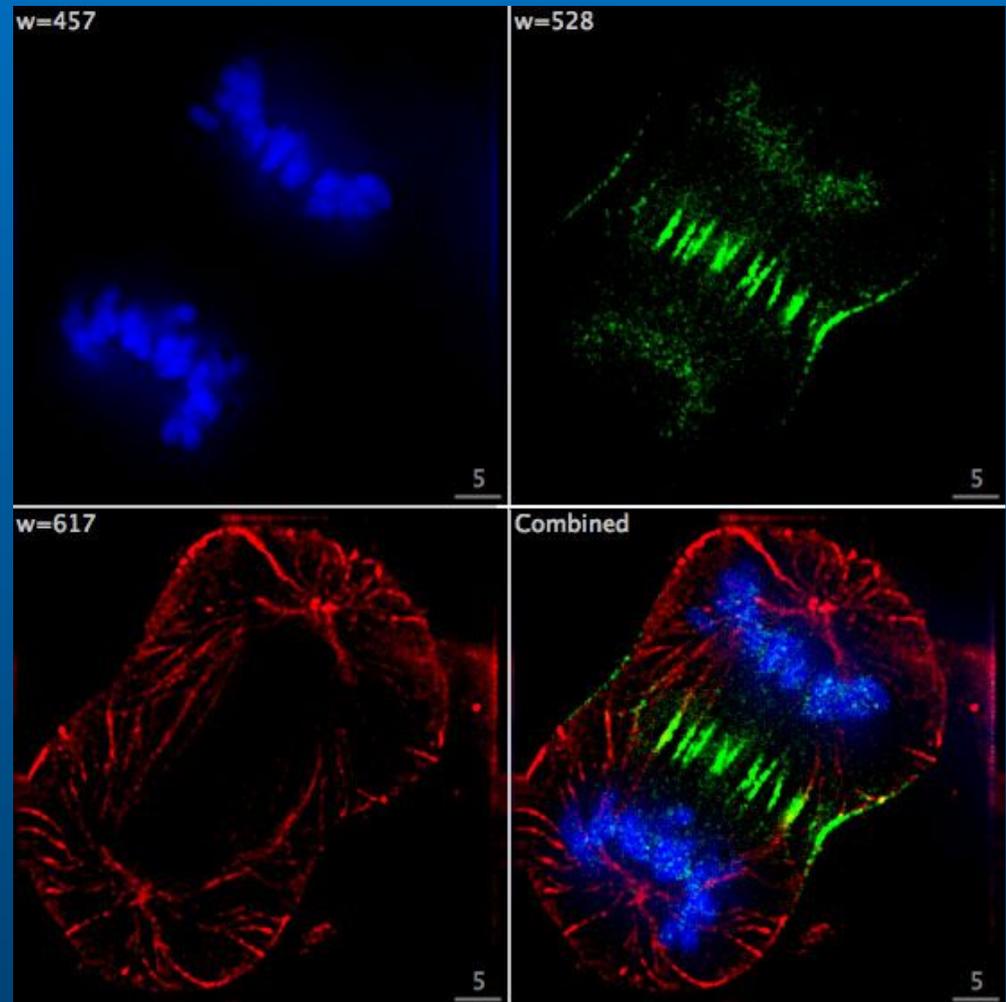
- Ce microscope permet d'observer des éléments fluorescents (naturels comme la chlorophylle ou bien marqués par une sonde spécifique couplée à un fluorochrome) dans une cellule.
- L'objet est excité par une lumière de longueur d'onde ( $\lambda$ ) définie par un filtre.
- Après excitation de l'échantillon, celui-ci émet à son tour une lumière de longueur d'onde différente.

## *Microscope à fluorescence*



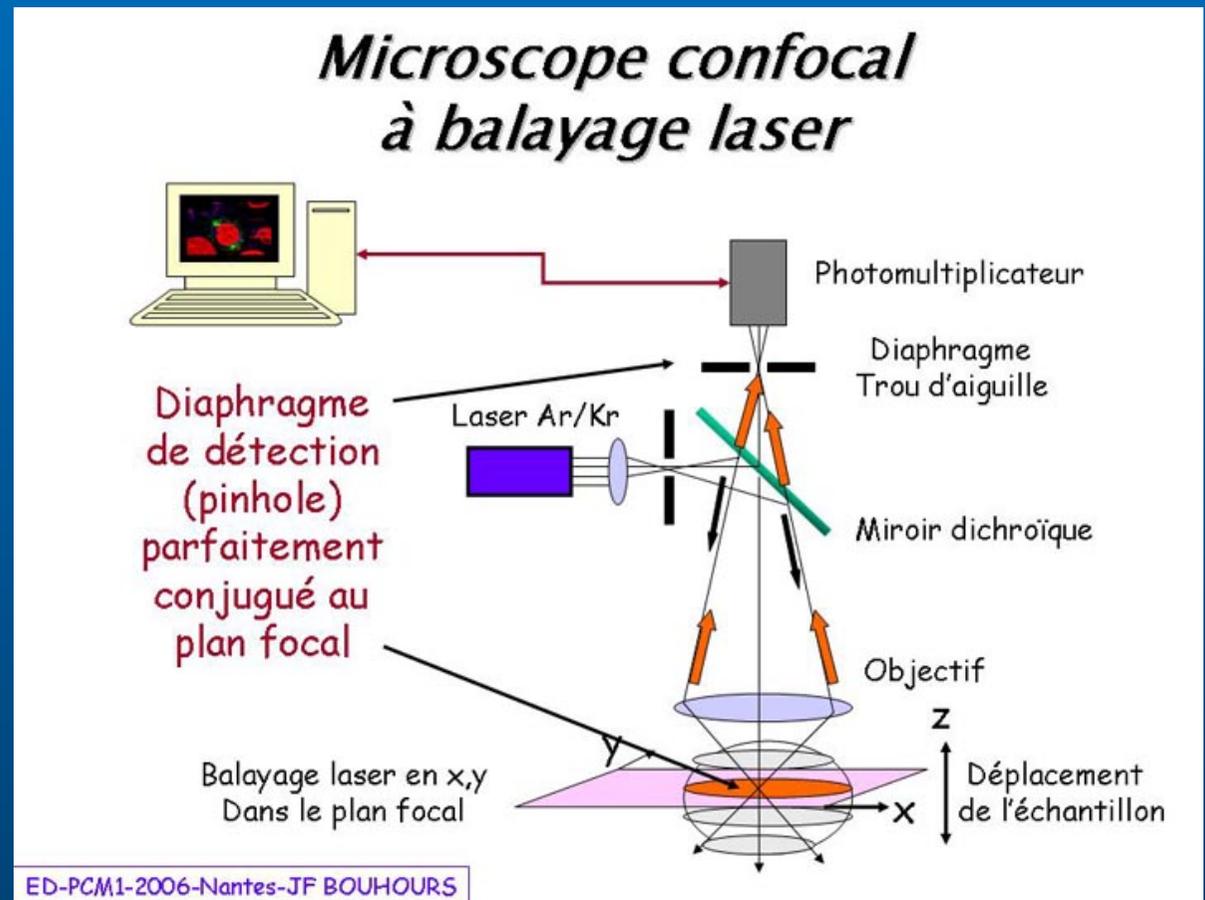
# Microscopie optique à fluorescence

- Exemple d'une mitose observée en utilisant différents fluorochromes :
  - ADN en bleu
  - Tubuline en rouge
  - Protéine centromérique en vert.



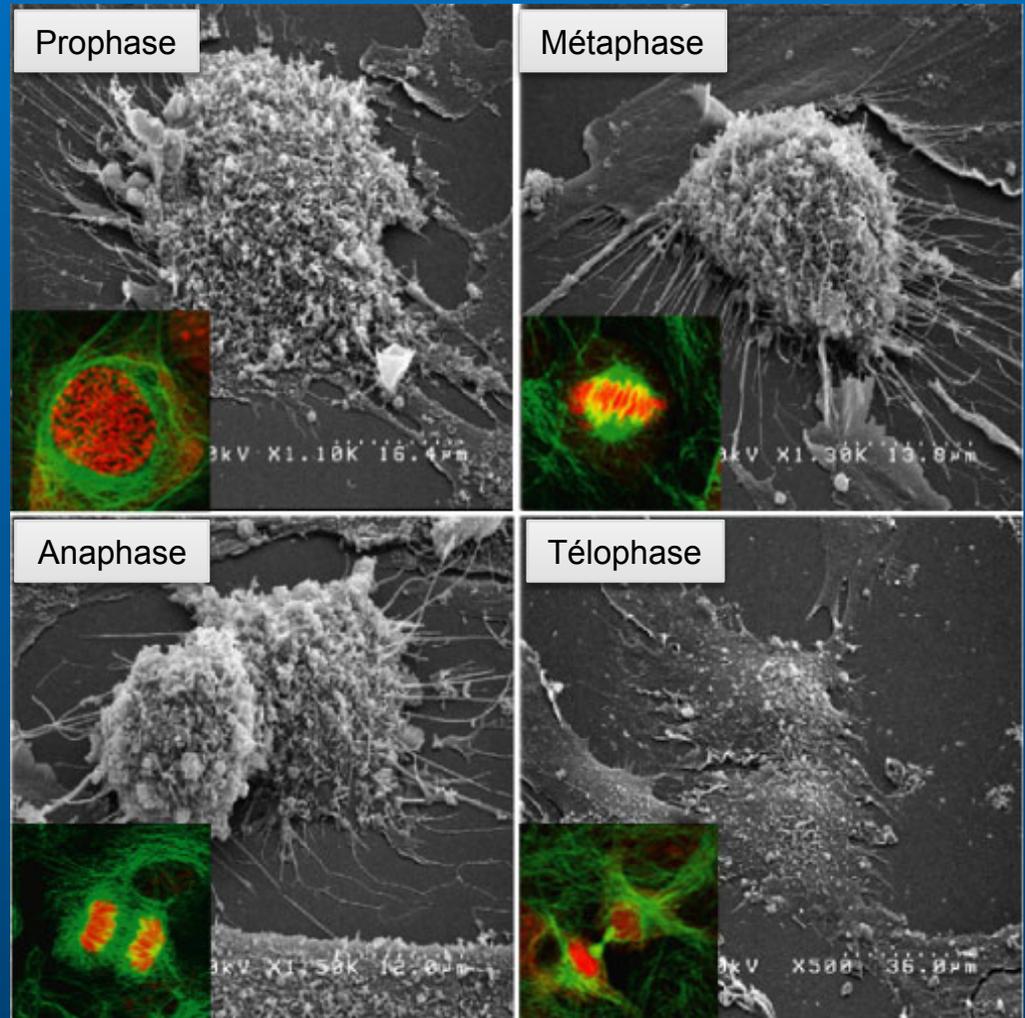
# Microscopie confocale

- Ce microscope augmente la qualité de l'image en éliminant le flou.
- Le principe est de capter l'image non pas de toute l'épaisseur de l'objet, mais uniquement d'un plan donné.
- Il est généralement utilisé pour faire de la microscopie en fluorescence



# Microscopie confocale

- **Etapes de la mitose observées en microscopie électronique à balayage (images en relief) et en microscopie confocale (double marquage rouge-vert en immunofluorescence) :**
  - Les chromosomes en rouge
  - Le fuseau mitotique en vert
  - La plaque métaphasique en jaune.

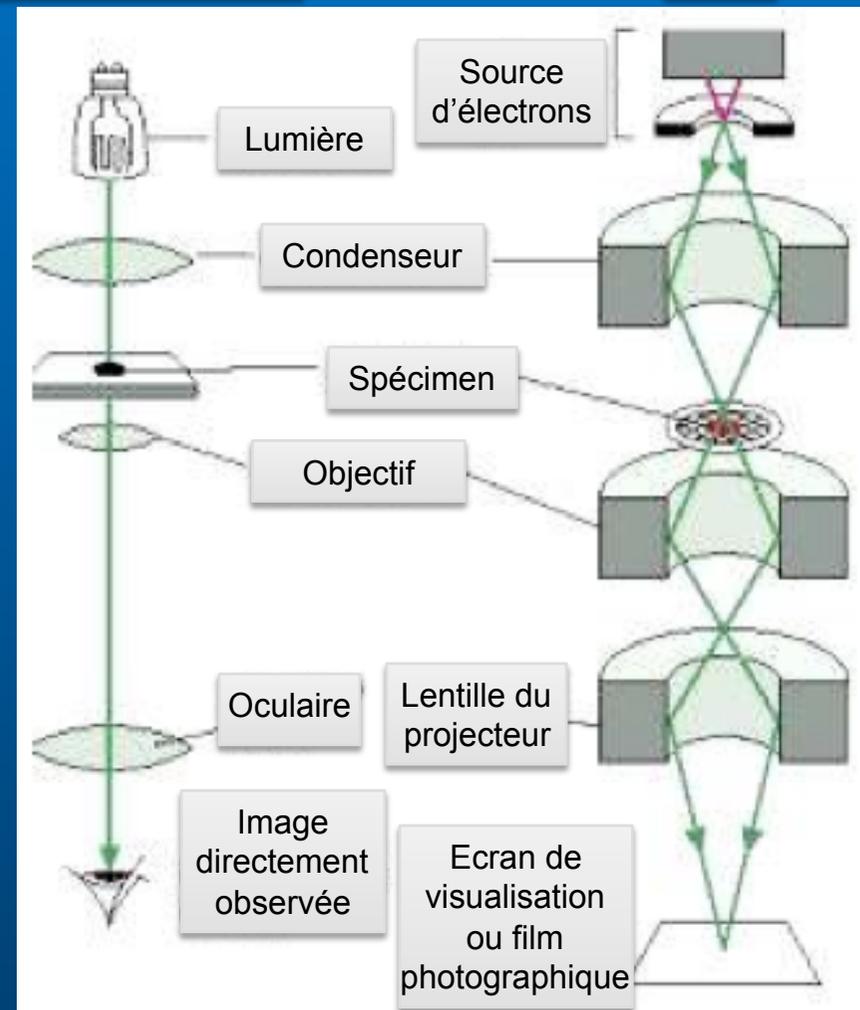


# Microscopie électronique à transmission (MET)

- Au lieu d'être éclairé, l'objet est bombardé par un faisceau d'électrons.
- L'image mettra en évidence les structures plus ou moins opaques aux électrons.
- L'objet doit être préalablement coupé en tranches ultrafines, puis imprégné de sels de métaux lourds qui vont se fixer différentiellement sur les différentes structures intracellulaires et les rendre plus ou moins opaques aux électrons.

Microscopie optique

MET



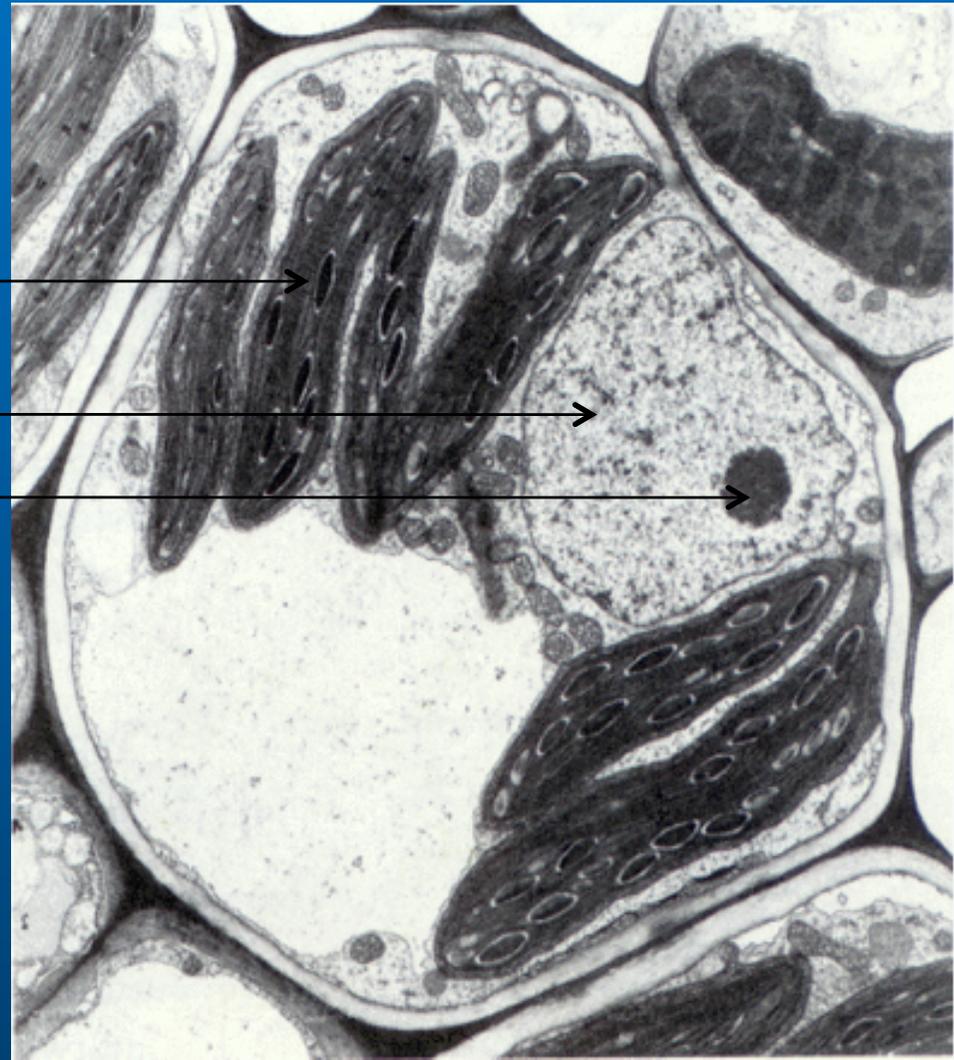
# Microscopie électronique à transmission (MET)

- Cellule végétale observée au MET

Chloroplaste

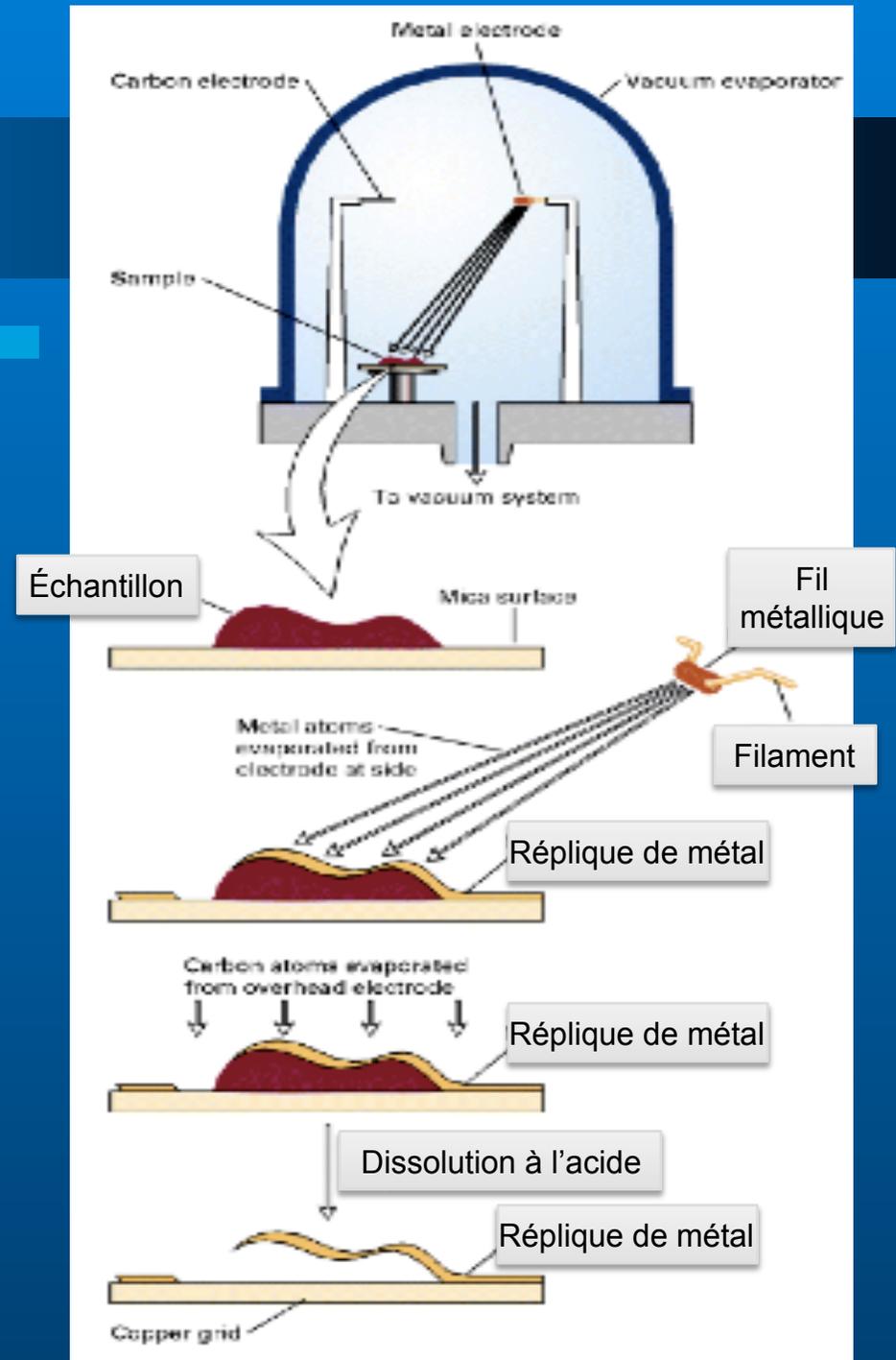
Noyau

Nucléole



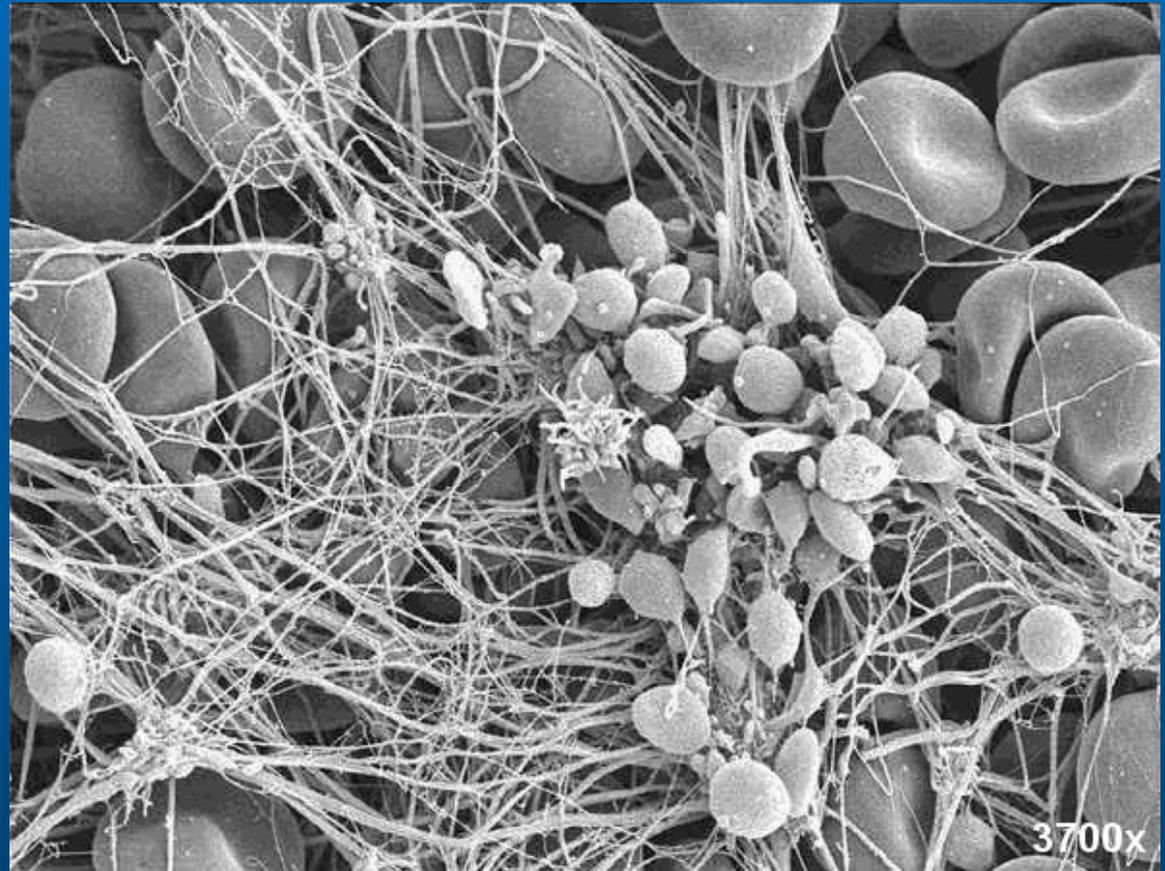
# Microscopie électronique à balayage (MEB)

- Observation du relief des structures.
- L'objet à observer n'est pas coupé, mais sa surface est recouverte d'un fil métallique d'épaisseur différentielle en fonction du relief.
- Le matériel biologique est ensuite dissout à l'acide.
- Le fil métallique est récupéré et analysé au microscope électronique.



# Microscopie électronique à balayage (MEB)

- **Caillot sanguin observé au MEB**



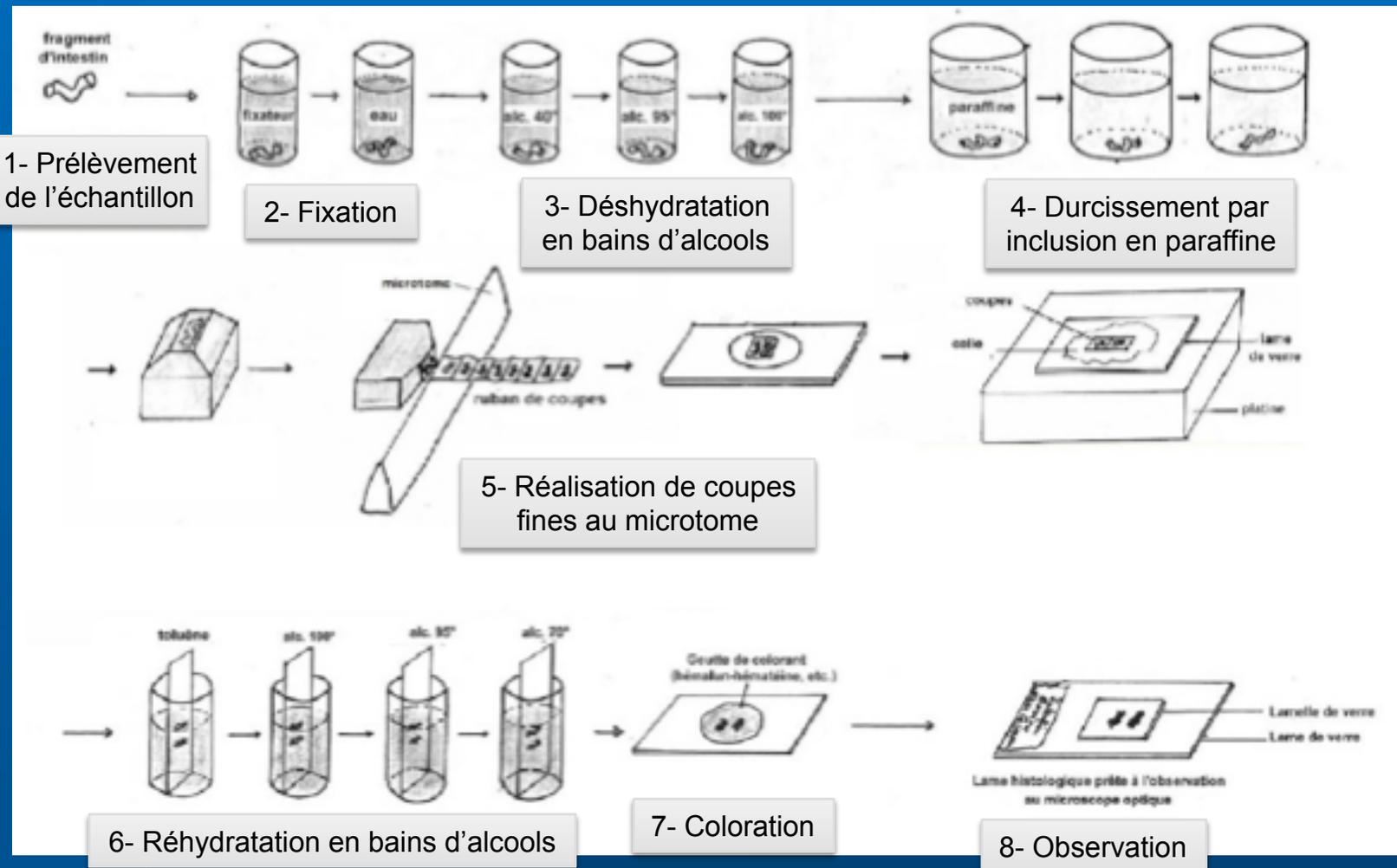
# Microscopie optique vs microscopie électronique

M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
<ul style="list-style-type: none"> <li>*grossissement : de 25 à 1500 fois</li> <li>*pouvoir séparateur : environ 0.2<math>\mu</math>m</li> <li>* préparation est traversée par des photons</li> <li>*longueur d'onde : 0,4 à 0,8 <math>\mu</math>m</li> <li>*lentilles sont en verre</li> <li>*image : est reçue directement</li> <li>*les coupes au microtome : 2 à 10 <math>\mu</math>m</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* grossissement : 1500à 200000 fois</li> <li>* pouvoir séparateur : 10A°</li> <li>* Préparation traversée par les électrons</li> <li>* longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 A°</li> <li>* les lentilles sont des champs magnétiques</li> <li>* image : est reçue sur écran fluorescent</li> <li>* les coupes à l'ultramicrotome : 0,05<math>\mu</math>m</li> </ul>
<b>Avantages</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* on peut voir la cellule en entier</li> <li>* on peut observer une cellule vivante</li> <li>* on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* on peut voir la structure fine de la cellule</li> <li>* on atteint très souvent le niveau moléculaire</li> <li>*a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux)</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* on ne peut pas pousser l'analyse assez loin</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* la cellule est morte</li> <li>* on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent</li> </ul>
<b>Unités</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>*l'unité est le micromètre ou micron (<math>\mu</math>m)</li> <li>1<math>\mu</math>m = 10<sup>-3</sup> mm</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* l'unité est le nanomètre (nm)</li> <li>1nm = 1 millimicron = 10<sup>-6</sup> mm ou 10<sup>-9</sup> m</li> </ul>

# Technique de préparation des objets à observer applicable à la microscopie optique

- **L'objet à observer au microscope optique doit laisser passer les photons :**
  - **Coupe fine** de l'objet (5 à 10  $\mu\text{m}$ ) pour être **translucide**.
  - **Fixation et durcissement** de l'objet pour ne pas s'autodétruire.
- **Traitements appliqués à l'objet :**
  - **Fixation** : dans une solution d'aldéhydes ou de sels oxygénés de métaux lourds.
  - **Durcissement** : par **congélation**, **polymérisation** ou **inclusion en paraffine**, nécessitant au préalable une **déshydratation dans des bains d'alcool**.
  - **Coupe** : au microtome.
  - **Coloration** : dépend des besoins de contraste de l'observateur, nécessite une réhydratation.
  - **Observation** : à sec ou en immersion.

# Récapitulatif sur la technique de préparation des objets à observer applicable à la microscopie optique



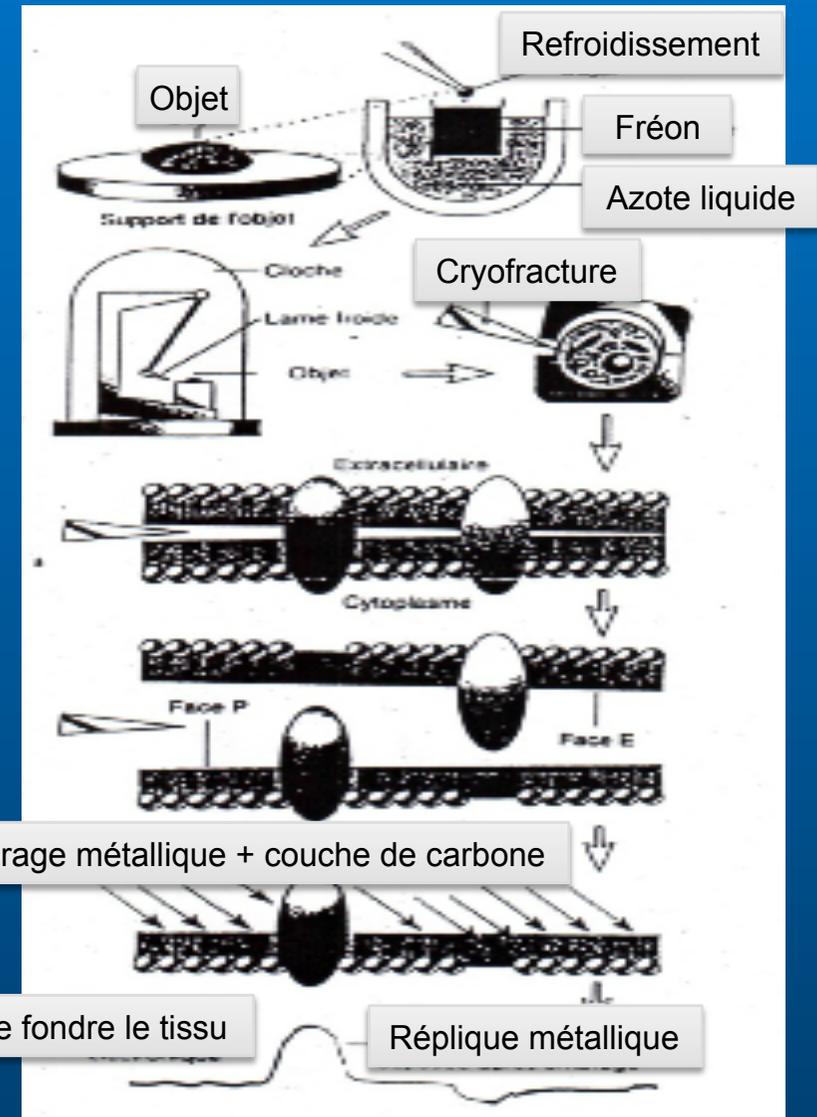
# Technique de préparation des objets à observer applicable à la microscopie électronique à transmission

- Les traitements appliqués à l'objet sont les mêmes qu'en microscopie optique, avec quelques spécificités :
  - **Fixation** : dans de glutaraldéhyde + acide osmique.
  - **Durcissement** : par inclusion en résine époxy.
  - **Coupe** : est effectuée par un ultramicrotome.
  - **Colorants signalétiques** : sels de métaux lourds permettant l'optimisation du contraste par absorption des électrons sur la coupe.
  - **Colorants spécifiques** : fixation de métaux sur des sondes spécifiques d'une molécule.

# Technique de préparation des objets à observer applicable à la microscopie électronique à balayage

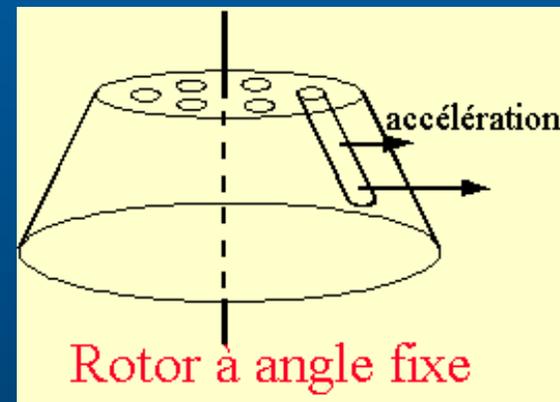
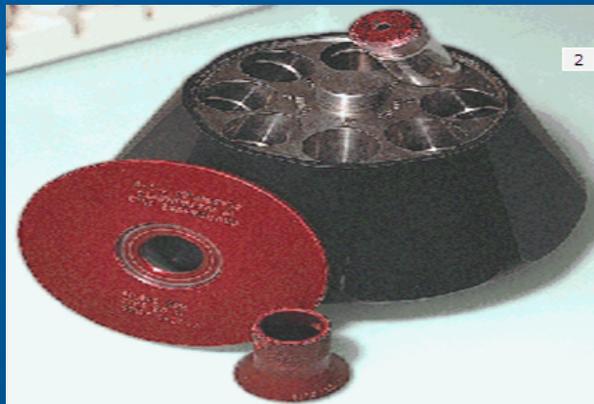
- **Cryofracture :**

- **Refroidissement** rapide de l'échantillon dans du fréon ou de l'azote liquide.
- **Cryofracture** par une lame qui clive le fragment en 2 parties.
- **Ombre métallique** : la surface de fracture constitue un moule sur lequel on dépose une couche de métal lourd.
- **Couche de carbone** : additionnée à la couche métallique.
- Faire **fondre** le tissu qui a servi de modèle.
- **Observation** de la réplique de métal et de carbone au MEB.



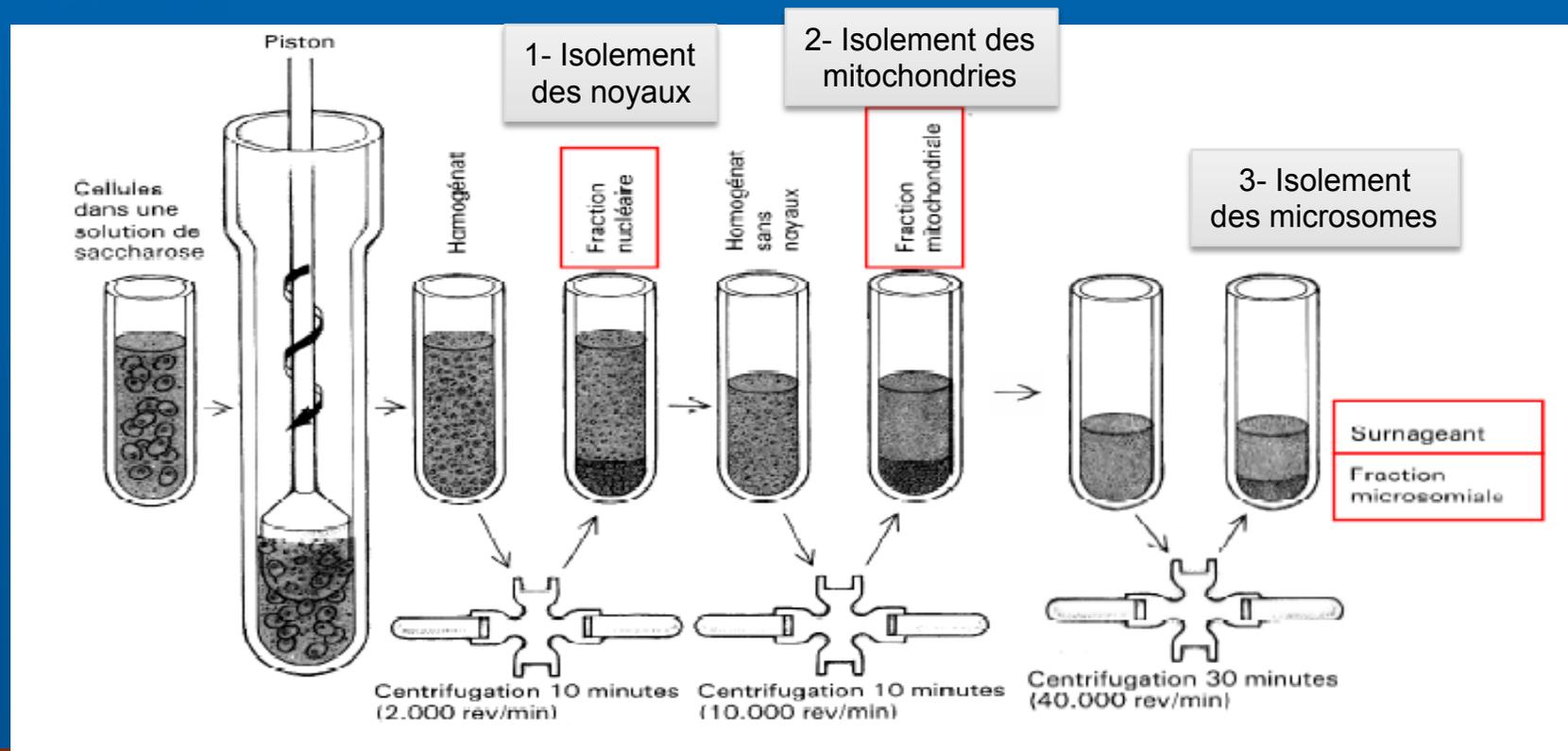
# Techniques d'isolement des organites

- **Fractionnement et séparation des constituants cellulaires :**
  - Méthode qui permet de **séparer** les différents **composants cellulaires** après destruction de la **membrane plasmique**.
  - La **séparation** s'effectue par **centrifugation**. C'est une opération de **séparation mécanique** basée sur l'**accélération** due à la **pesanteur** tout en augmentant la **vitesse de rotation**.
  - Les **structures les plus massives** se rassemblent au **fond d'un tube (culot)**.



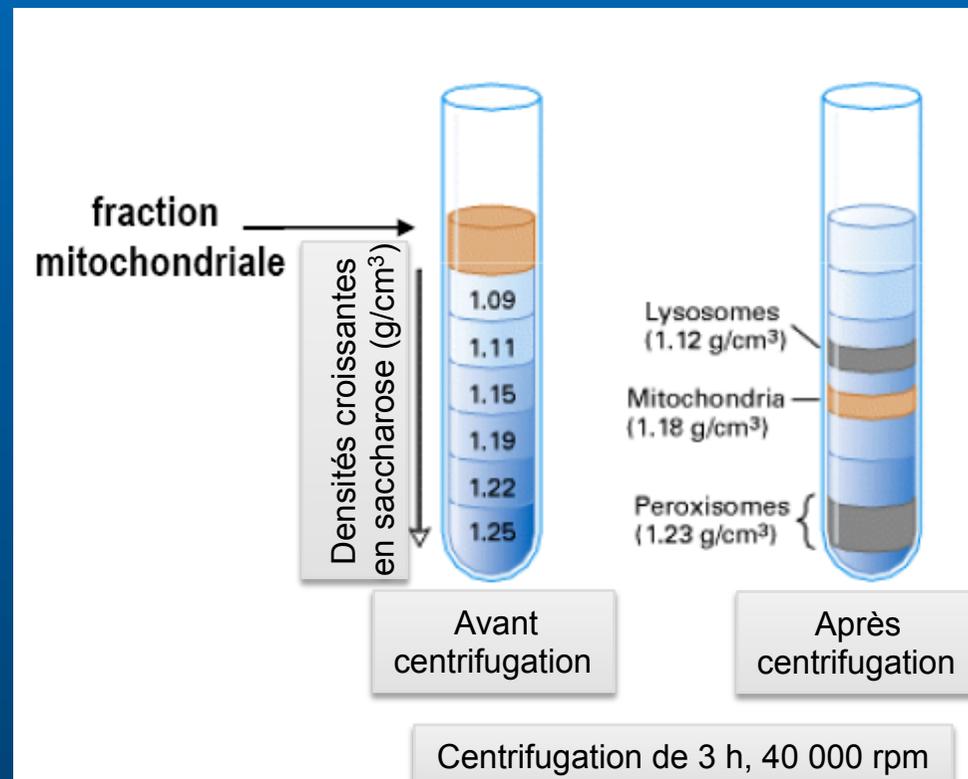
# Centrifugation différentielle

- C'est la séparation des organites en fonction de leur **taille** et de leur **densité** par une **succession de centrifugations** à des **temps** et des **accélérations croissantes**.



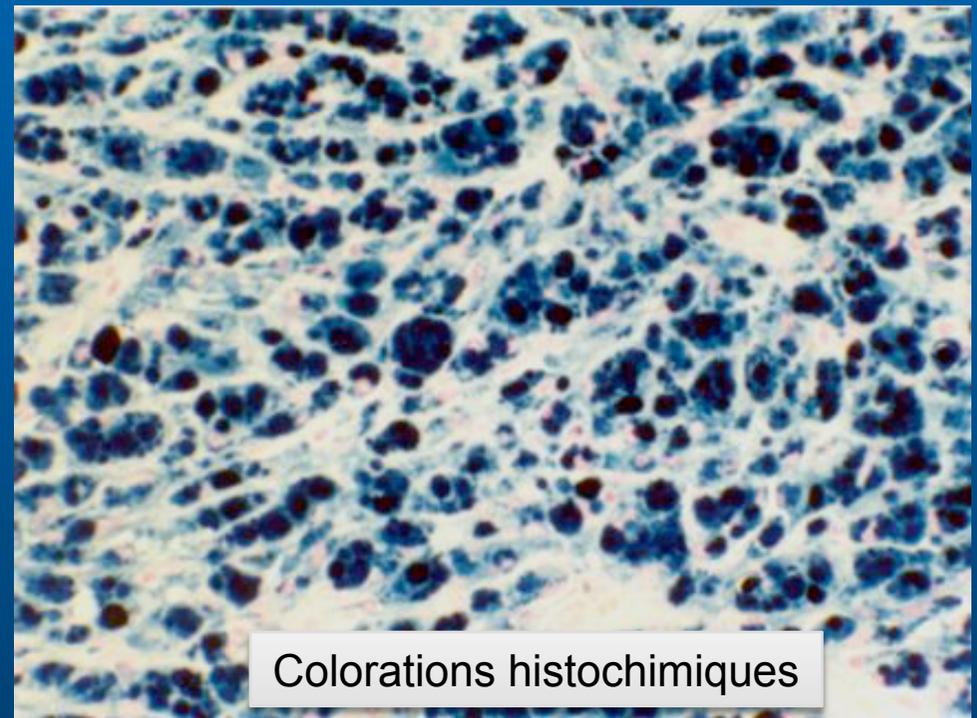
# Centrifugation sur gradient de densité

- On peut **amplifier la séparation** des particules en **centrifugeant** dans des **gradients de densité** comme le saccharose ou le chlorure de caesium.



# Méthodes histochimiques ou cytochimiques

- Les **techniques histochimiques** sont basées sur des **réactions biochimiques** qui permettent de **mettre en évidence *in situ***, dans les **cellules ou dans les tissus**, différents **constituants** (lipides, glucides, protéines, acides nucléiques, etc.).
- L'**histochimiste** cherche donc à **localiser une substance donnée** dans une **structure histologique**
- **Stratégie** : réaction spécifique produisant une **coloration** avec la **substance recherchée**
- Exemple de **colorations** :
  - Réaction à l'acide périodique de Schiff (P.A.S.)
  - Réaction de Feulgen

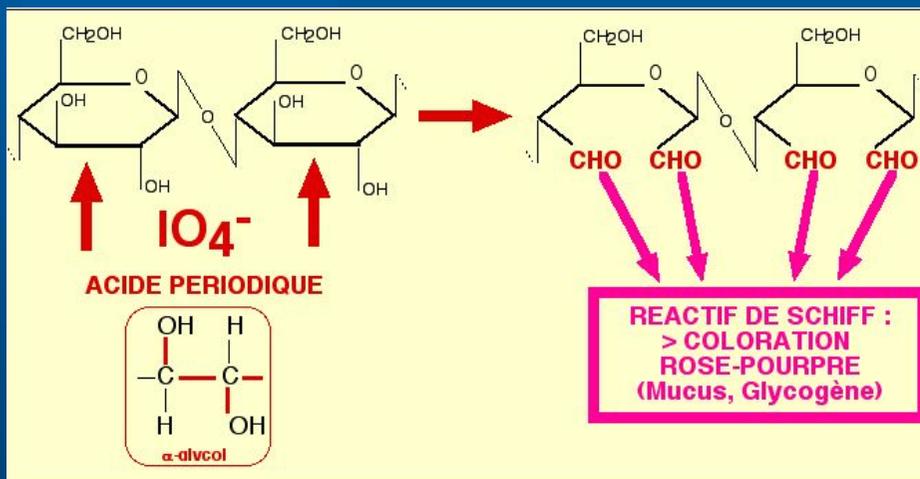


Colorations histochimiques

# Mise en évidence des polysaccharides

## Réaction à l'acide périodique de Schiff (P.A.S.)

- **Mode opératoire pour mettre en évidence des polysaccharides grâce à la réaction à l'acide périodique de Schiff :**
  - **Etape 1 :** une oxydation à l'**acide périodique** fait ouvrir les cycles des oses (unités monomériques des polysaccharides), générant des **fonctions aldéhydes libres (-CHO)**
  - **Etape 2 :** en appliquant le **réactif de Schiff**, on **colore en rose-pourpre** ou en **rouge**, les **fonctions aldéhydes libres des oses**



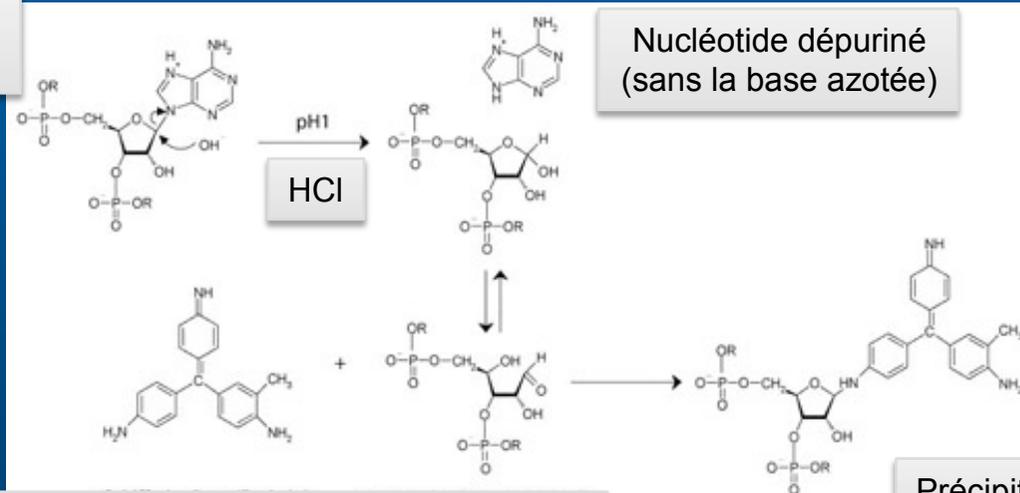
Exemple d'une coloration PAS appliquée à un muscle squelettique

# Mise en évidence de l'ADN

## Réaction de Feulgen

- **Mode opératoire pour mettre en évidence l'ADN grâce à la réaction de Feulgen :**
  - **Etape 1 :** une **hydrolyse modérée** par l'**acide chlorhydrique (HCl)** à **60°C** permet de **dépuriner l'ADN** (élimination des bases azotées A et G) et de **libérer les fonctions aldéhydes des désoxyribose (ose)**
  - **Etape 2 :** le réactif de **Schiff** réagit alors avec les **fonctions réductrices** formant un **précipité rouge**. Donc l'ADN est coloré en rose-rouge.

Nucléotide =  $H_3PO_4$  +  
désoxyribose + 1 base azotée



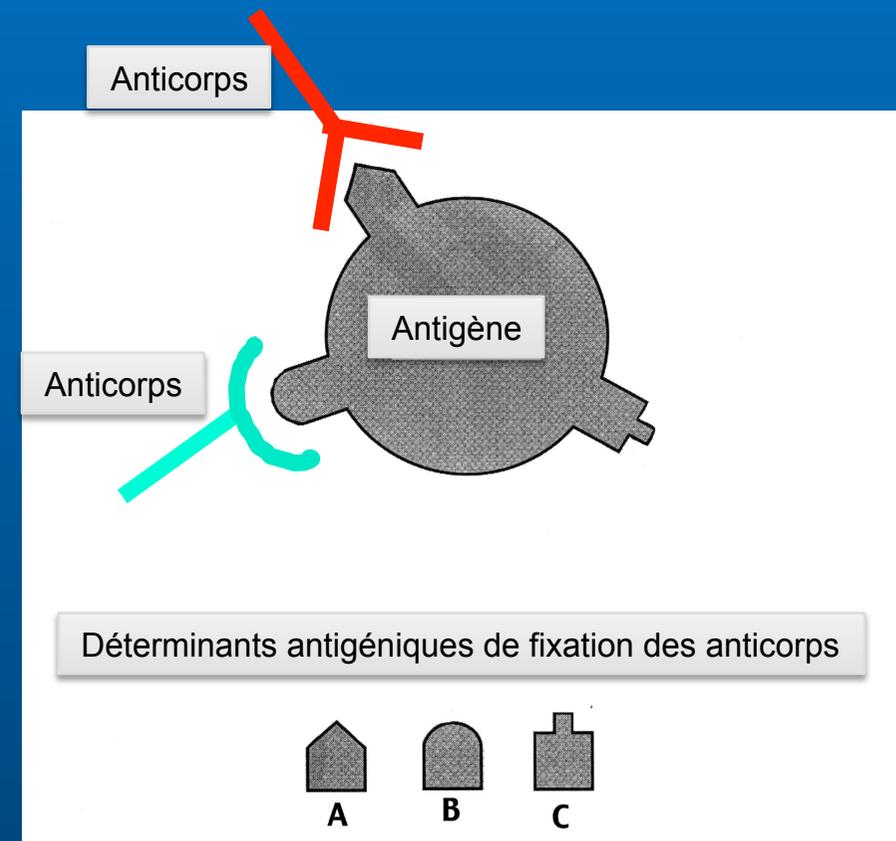
Réactif de Schiff + CHO libre du désoxyribose

Précipité rouge

# Méthodes immunocytochimiques

- **Principe :**

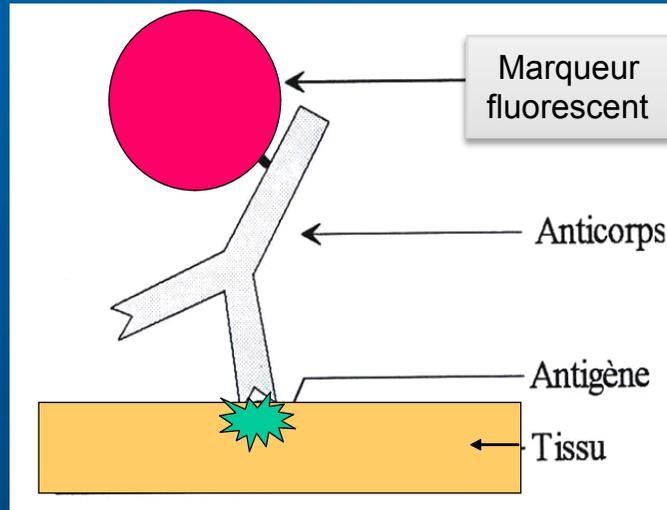
- La technique d'**immunocytochimie** permet de **localiser des antigènes** dans des tissus, cellules ou organites cellulaires grâce à l'**utilisation d'anticorps spécifiques** dirigé contre l'antigène d'intérêt à détecter
- Cette **réaction est visualisée par des marqueurs** qui sont :
  - a)- Soit des **molécules fluorescentes**
  - b)- Soit des **enzymes**



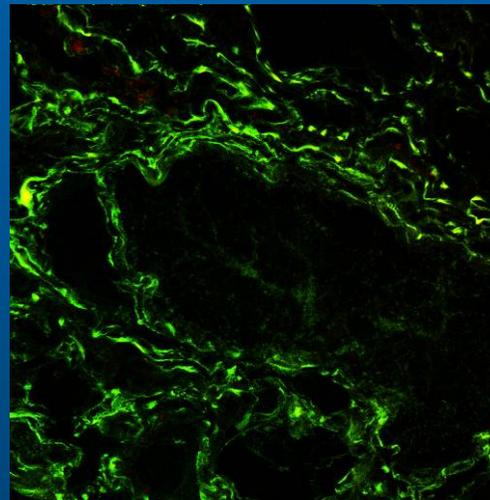
# Méthodes immunocytochimiques

## Molécules fluorescentes

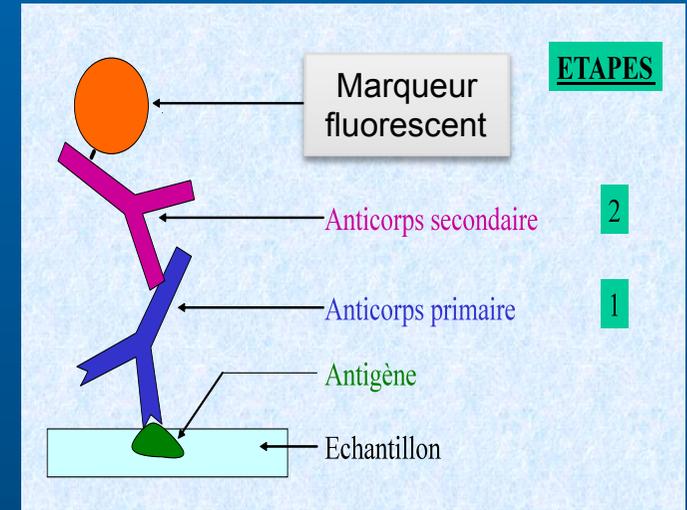
- Révélation du complexe anticorps – antigène par une réaction :
  - Directe : le marqueur est directement couplé à l'anticorps primaire
  - Indirecte : on utilise un anticorps secondaire couplé au marqueur dirigé contre l'anticorps primaire



Immunofluorescence directe



Fluorescence révélée au microscope à fluorescence



Immunofluorescence indirecte

# Méthodes immunocytochimiques

## Enzymes

- Révélation du complexe anticorps – antigène par une réaction couplée à une enzyme :
- On obtient des produits colorés insolubles, précipitant là où se trouve l'anticorps et donc la substance (antigène) à localiser

