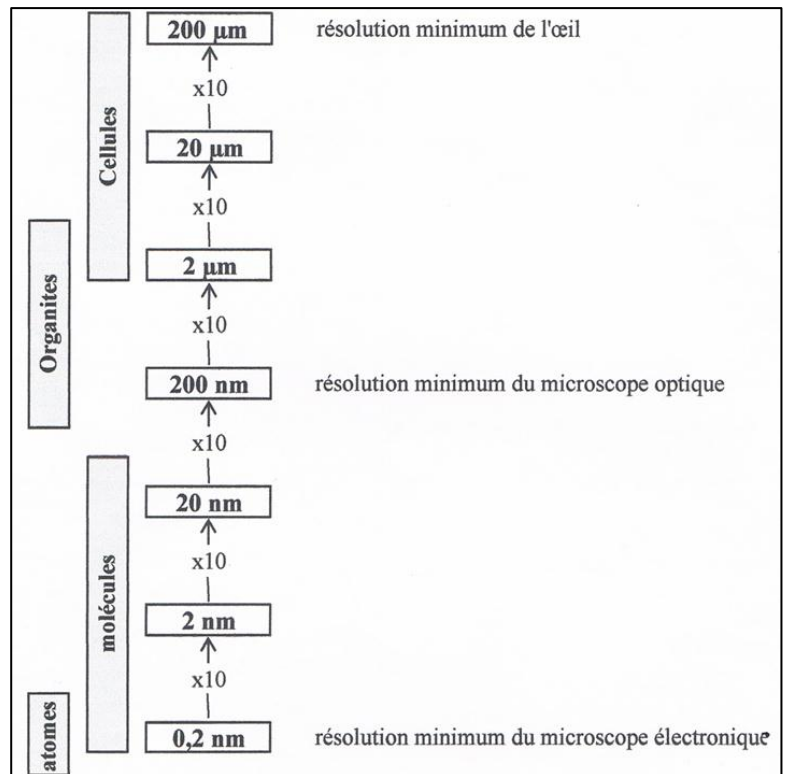


## TD n°2- Méthodes d'étude de la cellule

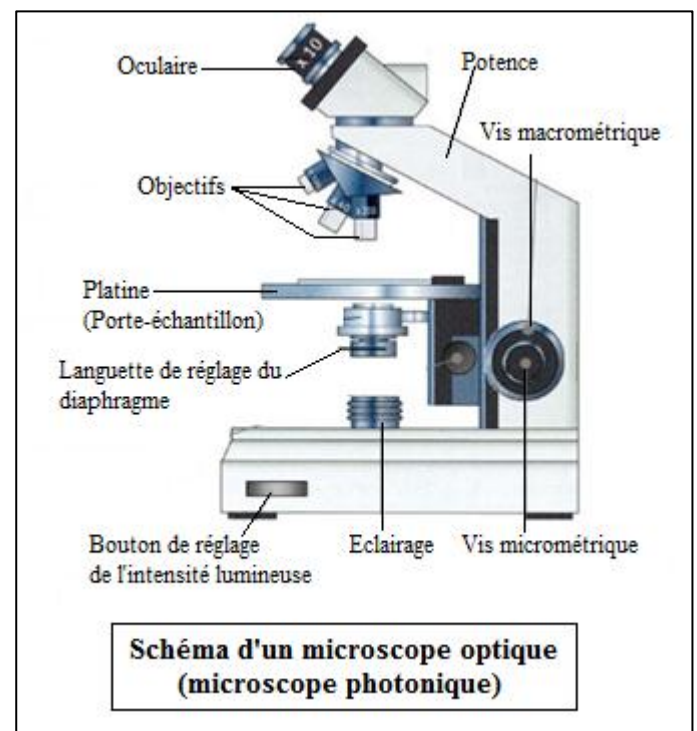
- La cellule est invisible à l'œil nu. Elle se mesure au micromètre. Il faut donc un microscope pour la visualiser.
- L'observation microscopique a évolué en passant par le microscope optique jusqu'aux différents types de microscopes électroniques.



## I. Différents types de microscope

### I.1. Microscope optique (microscope photonique)

- fondé sur l'utilisation de la lumière et de lentilles optiques.
- la lumière traverse le spécimen, puis l'objectif (lentilles) et nous donne un grossissement du spécimen de 20 à 100 fois plus que la taille réelle.



## I.2. Microscopes électroniques

### I.2.1. Microscope électronique à transmission (MET):

- L'échantillon est traversé par un faisceau d'électrons ce qui permet la formation d'une image sur écran fluorescent.
- La résolution est élevée **2 nm**. L'image obtenue est en **2D**.

### I.2.2. Microscope électronique à balayage (MEB):

- Le faisceau est réfléchi par l'échantillon. Ce faisceau balaie la surface de l'échantillon.

Les avantages du MEB :

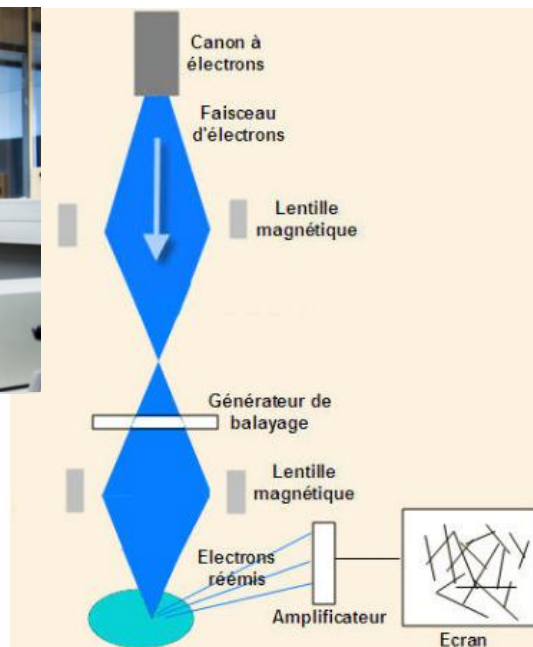
- La résolution est de **1 – 2 nm**. L'image obtenue est en **3D**.
- une exploration d'une grande surface de l'échantillon.

### I.2.3. Microscope électronique à haut voltage :

- Les électrons sont accélérés sous une très forte tension (**1 à 3 millions volt**).
- Cet appareil présente l'avantage de l'observation de cellules vivantes.



Microscope électronique à balayage

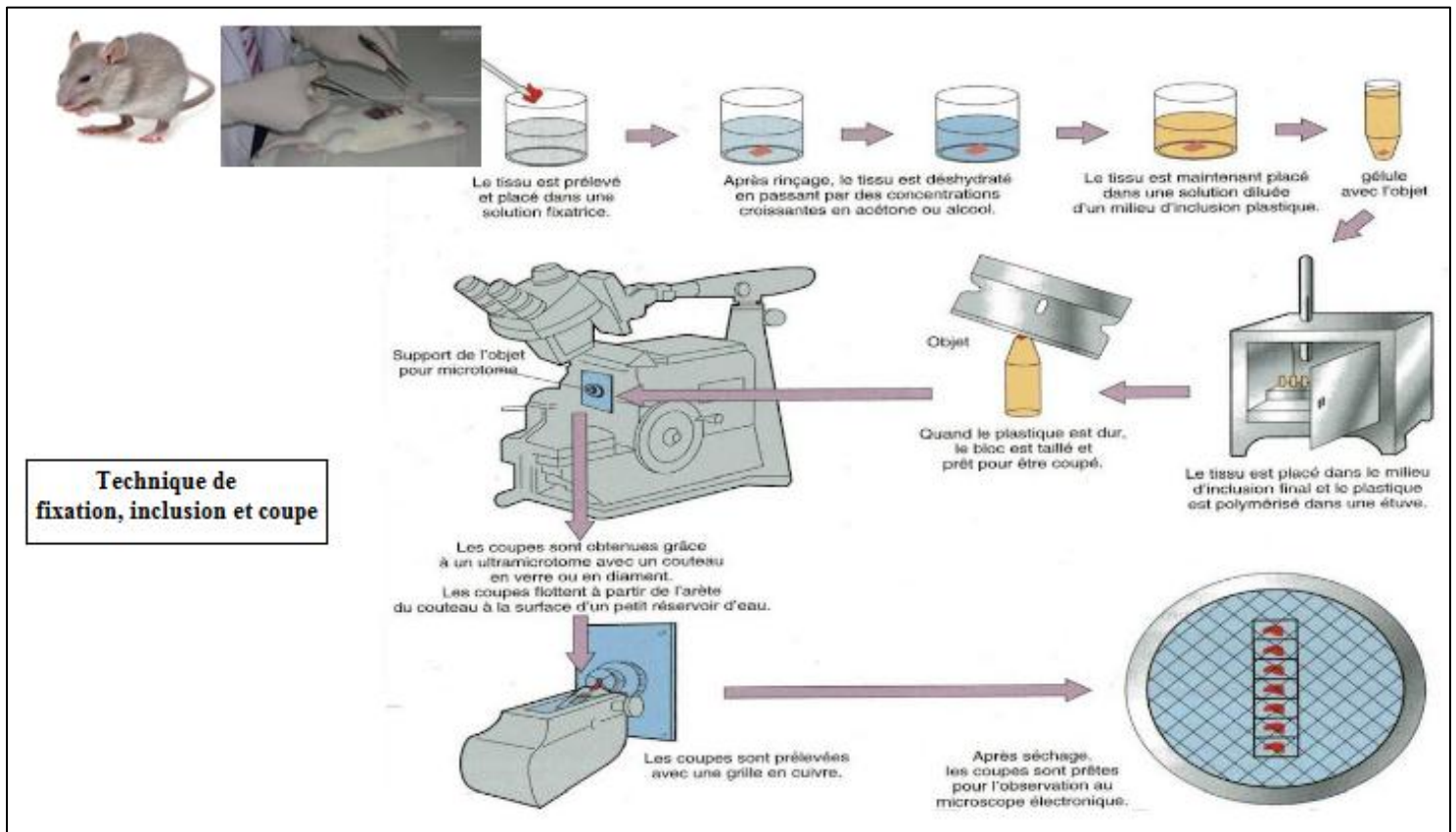


## II. Techniques d'étude de la cellule

### II.1. Exploration morphologique

#### II.1.1. Fixation, inclusion et coupe

- A- Fixation :** consiste à mettre l'échantillon le plus rapidement possible dans une solution tamponnée contenant soit de l'acide osmique  $\text{OsO}_4$ , du permanganate de potassium  $\text{KMnO}_4$ , du formol...  
But de la fixation : consolider les édifices cellulaires en créant de nouvelles liaisons intermoléculaires de la cellule, ce qui permet la conservation et donc d'éviter la dégradation trop rapide des cellules.
- B- Inclusion :** Après la fixation, l'échantillon est déshydraté par l'augmentation progressive de la concentration en alcool.  
L'échantillon est ensuite placé dans une solution de résine qui se rigidifie à  $60^\circ\text{C}$ .  
La rigidification de l'échantillon facilite la coupe du tissu sans la déformation des cellules.
- C- Coupe :** Les blocs obtenus sont coupés par un microtome de précision. Les coupes sont recueillies sur un porte-objet (grille métallique).

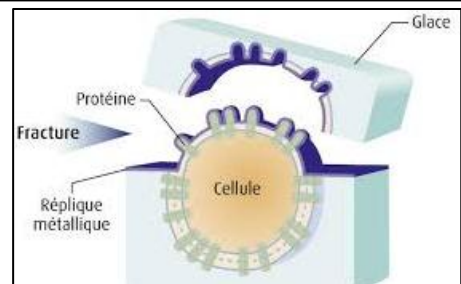
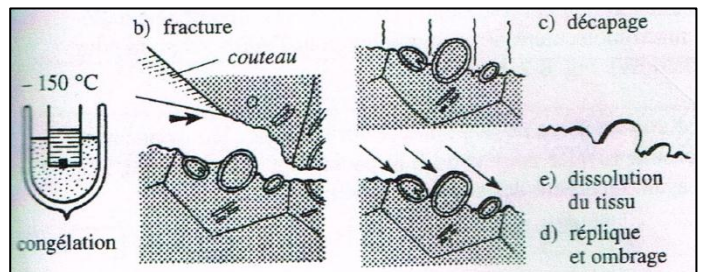


Remarques :

- la paraffine est utilisée pour le microscope optique et la résine pour le microscope électronique.
- Le microtome coupe des tranches de 1 à 8  $\mu\text{m}$ .
- L'ultramicrotome coupe des tranches de 0.02 à 0.1  $\mu\text{m}$ .

### II.1.2. Cryofracture

- L'échantillon cellulaire est durci par refroidissement rapide ( $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dans de l'azote liquide.
- L'échantillon est ensuite fracturé à l'aide d'un couteau.
- Après sublimation et donc l'évaporation du carbone, le métal restant permet d'obtenir un moule de la surface fracturée.
- Les tissus sont ensuite dissous et c'est la réplique qui va être observée, celle-ci doit comporter des reliefs d'où l'intérêt de cette technique.



Remarque : la sublimation empêche la déformation de la surface cellulaire, ce qui sera impossible si on attendait une simple fonte de la glace puis évaporation de l'eau.

**La coloration :** Les colorants sont utilisés pour mettre en évidence des structures morphologiques intracellulaires. On utilise des colorants vitaux pour garder les cellules vivantes telles que les bactéries et les cellules du sang. Chaque organe intracellulaire possède sa propre coloration.

Exemple :

Bleu de méthylène, bleu de bromothymol  $\rightarrow$  noyau

Rouge neutre  $\rightarrow$  vacuole

Vert janus  $\beta$   $\rightarrow$  mitochondrie

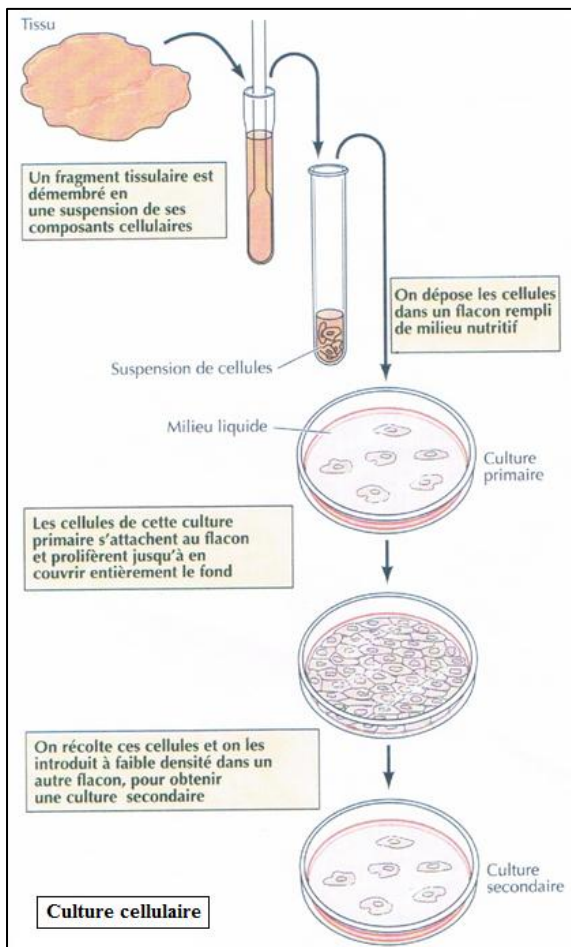
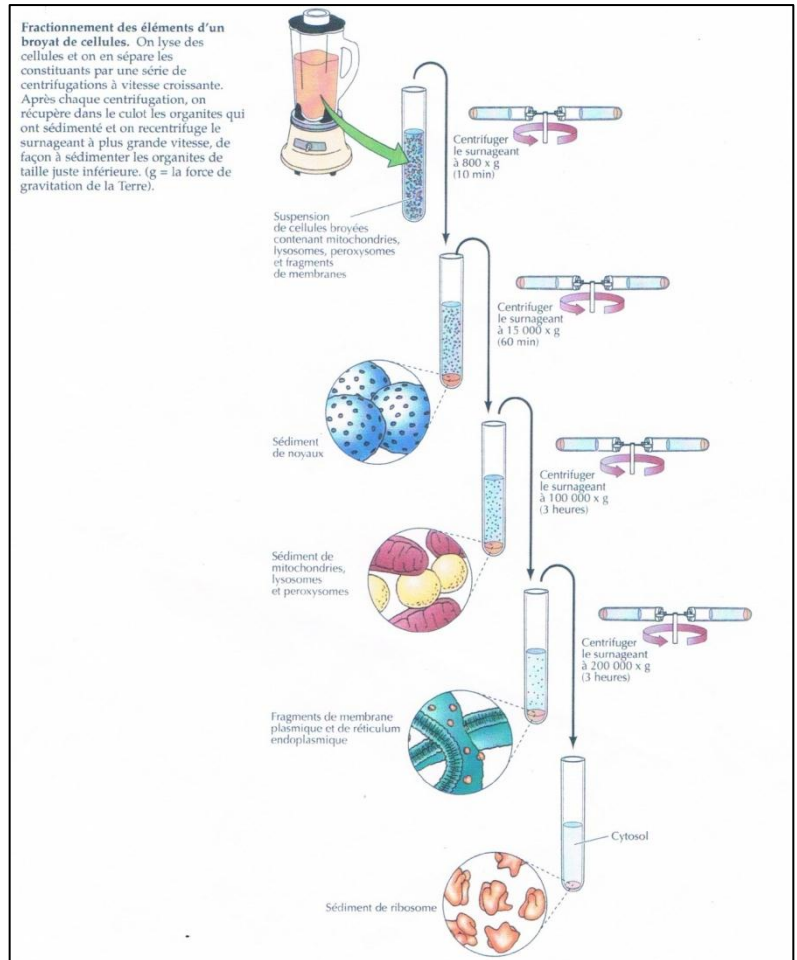


Remarque : Pour les cellules isolées de tissus par fixation, inclusion et coupe ; la coloration doit d'abord être précédée par une étape de **réhydratation**, car la plus part des colorants sont hydrophiles.

## II.2. Exploration fonctionnelle

### II.2.1. Fractionnement cellulaire

- Un broyage mécanique se fait à l'aide d'un mixeur, en présence d'un tampon approprié qui respecte l'intégrité des structures et des molécules des cellules, ceci permet d'obtenir un **homogénat cellulaire** dans lequel les organites sont dispersés.
- Une série de centrifugation rassemble les constituants de densités voisines, puis les fractions sont purifiées.



### II.2.2. Culture cellulaire

- La culture *in vitro* a permis aux biologistes d'étudier la prolifération cellulaire, ainsi que d'effectuer les manipulations génétiques nécessaires à la compréhension de la structure et de la fonction des gènes.
- Pour cultiver une cellule animale, on commence par dissocier un fragment tissulaire en une suspension.
- On transfère cette suspension dans une boîte de culture remplie de milieu nutritif.
- La plupart des cellules animales s'attachent et se divisent à la surface des boîtes de culture.
- Les cultures de cellules issues du prélèvement direct sur un tissu sont des **cultures cellulaires primaires** qu'on peut récolter et obtenir des **cultures cellulaires secondaires**.
- Le processus est reproductible de nombreuses fois, mais la plupart des cellules normales vont finir par ne plus se diviser pour mourir. Par contre, les cellules dérivées d'une tumeur prolifèrent en général indéfiniment en culture, on les appelle **les lignées cellulaires immortelles**.

Autres méthodes d'exploration fonctionnelle :

Cytoenzymologie - Immunocytochimie - Autoradiographie - Hybridation *in situ*.