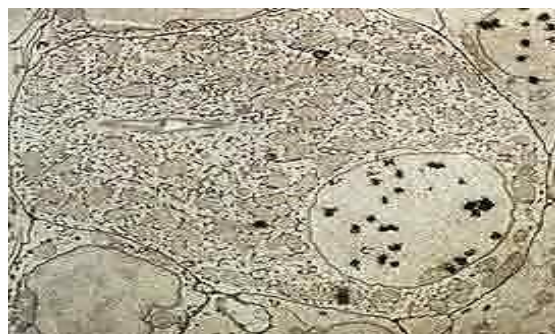


Département : Pré-clinique

Module : Cytophysiologie

Polycopié pédagogique

Méthodes d'étude de la cellule



Travaux dirigés destinés aux étudiants de Première Année Médecine Vétérinaire

Rédigé Par :

Nom et Prénom : DAHMANI Malika

Grade : Maitre de conférences B

Expertisé par :

Nom et Prénom : HADDADJ Fairouz

Grade et Etablissement : Maitre de conférences A (ENSV)

Nom et Prénom : SIHALI - BELOUI Ouahiba

Grade et Etablissement : Maitre de conférences A (FSB, USTHB)

Année universitaire 2022-2023



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة
École Nationale Supérieure Vétérinaire

Département : Préclinique

Module : Cytophysiologie

Polycopié pédagogique

Méthodes d'étude de la cellule

:

Dr : DAHMANI Malika

AVANT PROPOS

La biologie cellulaire est la science qui étudie les cellules, de leur structure à leur fonctionnement biochimique. C'est une branche de la biologie et, comme les cellules sont les unités de base de la vie, leur étude est essentielle pour comprendre le fonctionnement de tous les êtres vivants. Nous apportons dans ce document de travaux dirigés, les principales méthodes et techniques d'approche morphologique et fonctionnel des cellules.

Par son contenu, le document est destiné aux étudiants de première année en Médecine vétérinaire, en sciences médicales (Médecine, Médecine dentaire et Pharmacie) et en science Biologiques (Domaine des sciences de la nature et de la vie) en complément de l'enseignement de cours.

Le document a été rédigé conformément au nouveau programme du Comité Pédagogique Nationale. Il est divisé en cinq chapitres, en commençant par la microscopie, qui reste depuis sa découverte, l'outil de base de l'étude de la cellule. Les deux types de microscopies (photonique et électronique) ainsi que les différents types de microscope ont été traités sur les plans descriptif et fonctionnel. Un chapitre décrivant les techniques de préparation des coupes histologiques et cytologiques ainsi que les techniques de coloration liées à la microscopie photonique et électronique. Les méthodes de détection de composés cellulaires par autoradiographie et immunomarquage ainsi que le fractionnement cellulaire ont été également abordés. Le document se termine par des exercices d'application de différents types (questions Vrai/ Faux, QCM et exercices de synthèse) avec corrigé.

Des schémas, micrographies et figures accompagnent chaque chapitre pour rendre plus aisées la compréhension.

L'objectif de ce document de travaux dirigés en biologie cellulaire est d'assurer aux étudiants de première année une solide formation en ce qui concerne les méthodes d'étude de la cellule.

Liste des figures

❖ TD1. Microscopie photonique et électronique

Figure 1 : Représentation des échelles de grossissement en fonction du microscope.	1
Figure 2 : Microscope optique	2
Figure 3 : Trajet lumineux dans un microscope à fluorescence	3
Figure 4 : Trajets suivis par la lumière dans un microscope confocal à fluorescence	4
Figure 5 : Principales caractéristiques des microscopes électroniques (à transmission et à balayage)	6

❖ TD3. Etapes de préparation des coupes pour l'observation microscopique

Figure 1. Mise en place de la lamelle couvre objet [.....	9
Figure 2. Montage entre lame et lamelle	9
Figure 3. Remplacement d'un liquide de montage	10
Figure 4. Mise au point	11
Figure 5. Cellule de l'épithélium buccale montée dans le bleu de méthylène	11
Figure 6. Observation des cellules végétales de l'épiderme d'oignon rouge	12
Figure 7. Cellules d'épiderme d'oignon rouge montées dans de l'eau distillée	12
Figure 8. Techniques de préparation de coupes pour le microscope photonique	17
Figure 9. Fixation par le Glutaraldéhyde	18
Figure 10. Préparation des coupes en microscopie électronique	19

❖ TD4 .Méthodes d'étude de la cellule liées à la microscopie

Figure 1. Préparation de répliques de cryofracture pour l'observation au microscope électronique à balayage..	21
Figure 2. Noyau interphasique observé au microscope électronique à balayage, technique de cryodecapage	22
Figure 3. Observation d'une réplique de la membrane plasmique (surface interne) après cryodecapage.	22
Figure 4. Techniques de coloration	24
Figure 5. Mise en évidence des ATP synthétase par coloration négative	24
Figure 6. Mise en évidence de charpente cellulosique de la paroi d'une cellule végétale	24

❖ TD5 .Techniques de détection et de localisation des composés cellulaires

Figure 1. Technique de l'autoradiographie Cellules d'épiderme d'oignon rouge montées dans de l'eau distillée	26
Figure 2. Localisation de la synthèse protéique par autoradiographie	27
Figure 3. Principe de l'immunofluorescence.	29
Figure 4 . Principe de l'immunohistochimie	29

❖ TD6. Technique d'isolement des organites cellulaires

Figure 1. Différentes méthodes d'homogénéisation des cellules et tissus par la méthode mécanique	32
Figure 2. Solubilisation d'une membrane par un détergeant.....	32
Figure 3. La centrifugation	34
Figure 4. Purification par centrifugation différentielles	36

Liste des figures

❖ TD7. Techniques de mise en évidence du mouvement latéral des protéine

Figure 1. Représentation schématique d'une membrane plasmique	33
Figure 2. Utilisation de la fusion cellulaire pour mettre en évidence la mobilité des protéines membranaires	36
Figure 3. Technique de fusion cellulaire	37
Figure 4 Technique de FARP	38

Liste des abréviations

A°	angström
ADN	acide desoxyribinucléique
Ac	anticorps
Ag	antigène
ARN	acide ribonucléique
AP	phosphatase alcaline
BCIP/NBT	5-brom-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt /nitro blue tetrazolium chloride
Cl-	chlore
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
G×	grossissement
g	accélération centrifuge radiale
HRP	horseradish Peroxidase
MEB	microscope électronique à balayage
MO	microscope optique
MET	microscope électronique à transmission
min	minute(s)
mm	millimètre
Na+	sodium
nm	nanomètre

Avant-propos**Introduction**

TD1. Microscopie photonique et microscopie électronique.....	1
I. Microscopie photonique.....	2
1. Microscope photonique a fond claire	2
2. Microscope à contraste de phase	3
3. Microscope à fluorescence	3
4. Microscope confocal	4
II. Microscopie électronique.....	4
1. Microscope électronique à transmission	5
2. Microscope photonique à balayage	5
TD 2 . Comparaison entre la microscopie photonique et la microscopie électronique	7
TD3. Etapes de préparation des coupes pour l'observation microscopique.....	8
I. Réalisation des préparations et observation en microscopie optique	9
II. Préparation des coupes histologiques pour observation au microscope optique	13
III. Préparation des coupes pour observation au microscope électronique	18
TD4. Méthodes d'étude de la cellule liées à la microscopie	20
1-cryodécoupage	20
2- Techniques de coloration	22
TD5: Techniques de détection et de localisation des composés cellulaires.....	26
1. Autoradiographie.....	25
2. Immunomarquage (Immuno fluorescence et immunohistochimie)	27
TD6. Techniques d'isolement des organites cellulaires.....	30
1. Homogénéisation	30
2. Purification par centrifugation	33
D7. Techniques de mise en évidence du mouvement latéral des protéines	30
I. Modèle de la mosaïque en fluide des membranes	33
II. Techniques mettant en évidence la diffusion latérale des protéines membranaires	34
1. Technique de fusion cellulaire	34

2. Technique de FRAP.....	37
Exercices d'application	37
Corrigé des exercices	41
Conclusion.....	45
Bibliographie.....	46

Introduction

La biologie cellulaire a pour but d'étudier la structure et le fonctionnement des cellules. Nos connaissances actuelles sont la résultante d'une très longue histoire, qui a débuté au XVII^e, avec l'invention du microscope et l'apparition du terme cellule. Aujourd'hui, la biologie cellulaire est un grand sujet et elle a des liens avec presque toutes les branches de la science. Elle représente une bonne discipline scientifique et c'est la plus dynamique au vu de la multiplicité des méthodes d'investigation de la cellule basées, tant sur les observations en microscopie que sur les analyses biochimiques et moléculaires.

TD 1 : Microscopie photonique et électronique

Objectifs :

- Connaître le principe de fonctionnement des microscopes optiques et électronique.
- Pouvoir faire la différence entre la microscopie photonique et la microscopie électronique.

Les cellules sont très petites, trop petites pour être vues à l'œil nu. Ce n'est qu'au XVII^e siècle, avec l'invention du microscope qu'elles sont devenues visible. Par la suite, pendant plusieurs centaines d'années, toutes les connaissances sur les cellules ont été découvertes grâce à cet instrument. Les microscopes optiques (photoniques), qui utilisent la lumière visible pour illuminer les objets, sont encore des instruments essentiels dans un laboratoire de biologie cellulaire.

Bien que ces instruments aient subi des modifications sophistiquées, les propriétés de la lumière limitent leurs performances. Les microscopes électroniques, inventés dans les années 1930, vont au-delà de ces limites en utilisant, à la place d'un rayon lumineux, des faisceaux d'électrons comme source d'illumination, ce qui augmente grandement la capacité à voir les détails internes des cellules.

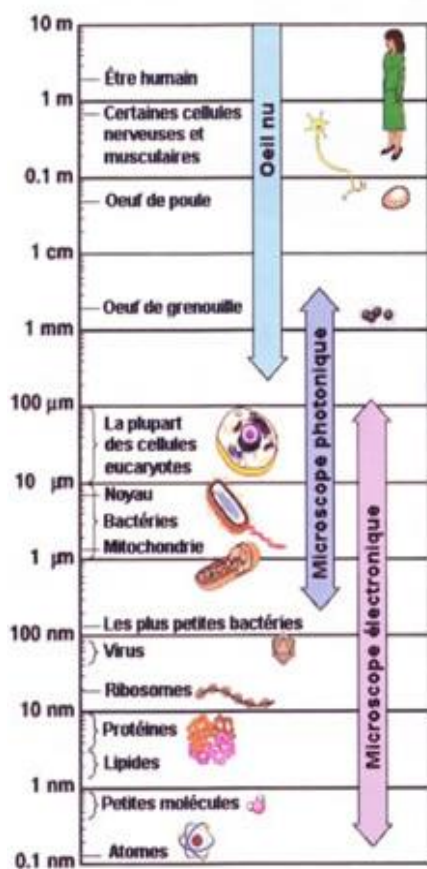


Figure 1. Représentation des échelles de grossissement en fonction du microscope. Le pouvoir séparateur (ou résolution) de l'œil est de 0,1mm, et celui d'un microscope photonique de 0,1µm. La plupart des cellules, hormis les plus grosses, comme certains protozoaires ou protophytes et des œufs de grenouille ou de poisson, devront être observées au microscope photonique, qui permettra également de localiser les plus gros des organites, noyau, mitochondries ou chloroplastes. Leur structure fine sera étudiée en microscopie électronique [2]. .

I. Microscopie optique

Les microscopes optiques (à lumière ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. Il existe différents type de microscopes photoniques :

1. Microscope photonique à fond clair

Le microscope optique permet de grossir les cellules jusqu'à mille fois. C'est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions (ce qui caractérise son grossissement) et de séparer les détails de cette image (d'où son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain .La figure 2 montre les parties importantes d'un microscope optique.

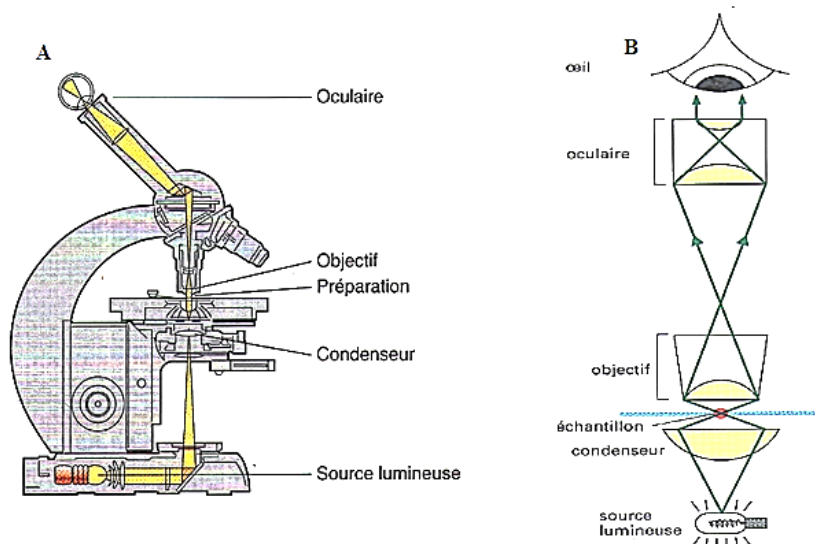


Figure 2. Microscope optique. (A) Différentes parties d'un microscope optique. (B) Trajet de la lumière dans un microscope optique [4].

Une source lumineuse, extérieure au microscope ou incorporée à sa base, éclaire l'objet. Le condenseur placé sous la platine concentre les rayons diffusés par la source lumineuse et éclaire l'objet. Les rayons lumineux focalisés par le condenseur au niveau de l'objet sont ensuite collectés par les lentilles de l'*objectif* du microscope. Les rayons lumineux de l'objet sont focalisés par l'objectif et donnent une image réelle agrandie dans la colonne du microscope. L'image formée par l'objectif est ensuite reprise par un second système de lentilles, l'*oculaire* pour donner une image agrandie et virtuelle. Un troisième système de lentilles, localisé à la partie antérieure de l'œil, transforme l'image virtuelle produite par l'oculaire et donne une image réelle sur la rétine. Quand on tourne la vis de réglage du microscope, on modifie la

distance entre l'objet et l'objectif pour mettre au point l'image finale dans le plan de la rétine [2].

2. Microscope à contraste de phase

Le microscope à contraste de phase augmente la visibilité des objets très transparents. Possède des systèmes optiques conçus pour exploiter les propriétés de diffraction des cellules vivantes. La lumière traversant les parties relativement denses ou épaisses de la cellule est retardée par rapport à celle qui traverse une région voisine plus mince. Il se crée ainsi des effets d'interférences produits par la recombinaison de ces deux séries d'ondes donnant des images fortement contrastées.

Ce type de microscope permet d'observer des cellules vivantes en action (déplacement, division, phagocytose, etc..).

3. Microscope optique à fluorescence

Les colorants fluorescents, utilisés pour colorer les cellules, sont détectés à l'aide d'un microscope à fluorescence. Ce microscope est semblable à un microscope optique ordinaire, en dehors du fait que la lumière incidente passe à travers deux jeux de filtres (Figure 3).

Le premier filtre (1) la lumière avant qu'elle n'atteigne l'échantillon, ne laissant passer que les longueurs d'ondes qui excitent le colorant fluorescent particulier utilisé ; le second (2) bloque cette lumière et ne laisse passer que les longueurs d'ondes émises lors de la fluorescence du colorant. Les objets colorés apparaissent en couleur vive sur fond sombre [4].

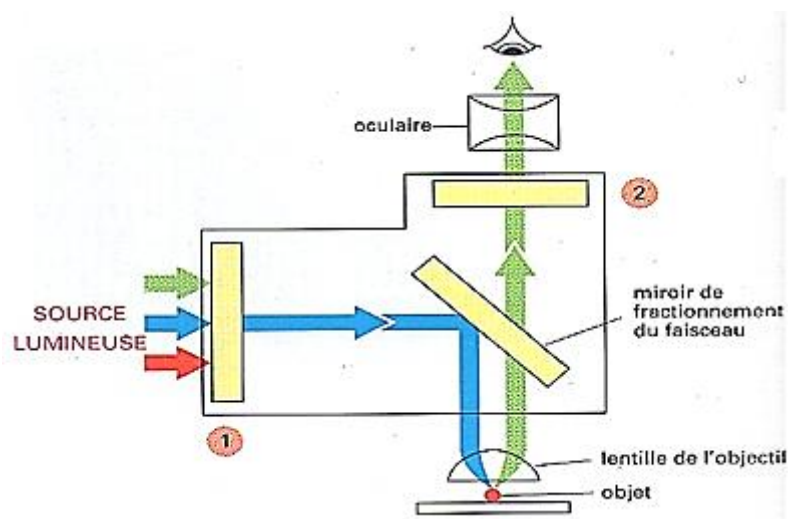


Figure 3. Trajet lumineux dans un microscope à fluorescence [4].

4. Microscope confocal

Un microscope confocal est un microscope à fluorescence dont la source lumineuse est un rayon laser. Ce dernier traverse un diaphragme étroit et est réfléchi par un miroir dichroïque (miroir réfléchissant certaines longueurs d'onde et transmettant les autres) vers un objectif qui la concentre en une plage dans le plan de l'objet. Les fluorochromes de l'objet absorbent la lumière incidente et émettent une lumière de plus grande longueur d'onde, capable de traverser le miroir et de concentrer dans un plan pourvu d'un diaphragme ponctuel. La lumière passe ensuite dans un tube photomultiplicateurs qui amplifie le signal et le transmet à un ordinateur [4].

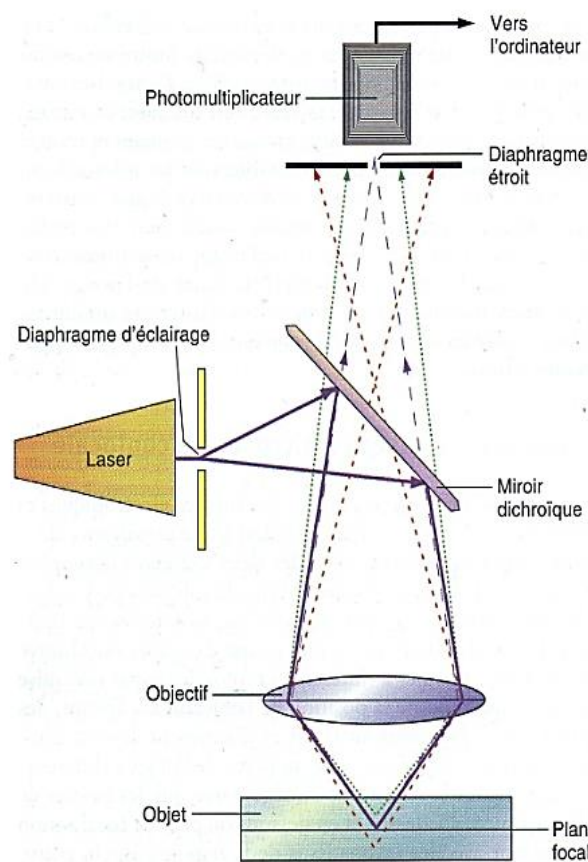


Figure 4. Trajets suivis par la lumière dans un microscope confocal à fluorescence [4].

II. Microscopie électronique

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons ce microscope fonctionne avec des électrons le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons.

L'ensemble du dispositif est placé sous vide. Les lentilles de verre sont remplacées par des bobines électromagnétiques ("lentilles" électromagnétiques) seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images. Avec ces microscopes le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques $\text{\AA}$. On aura donc accès à l'ultrastructure des organites.

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- la microscopie à transmission
- la microscopie à balayage

1. Microscope électronique à transmission (MET)

C'est la technique la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse, ils sont plus ou moins absorbés (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons), l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent. Le contraste est en général obtenu grâce à des colorations aux métaux lourds, denses aux électrons, qui absorbent ou dispersent localement les électrons [4].

2. Microscope électronique à balayage (MEB)

Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet au préalable recouvert d'une couche métallique. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image. Cet appareil permet de gagner en profondeur de champ, mais son pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission. Il fournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel des surfaces cellulaires [4].

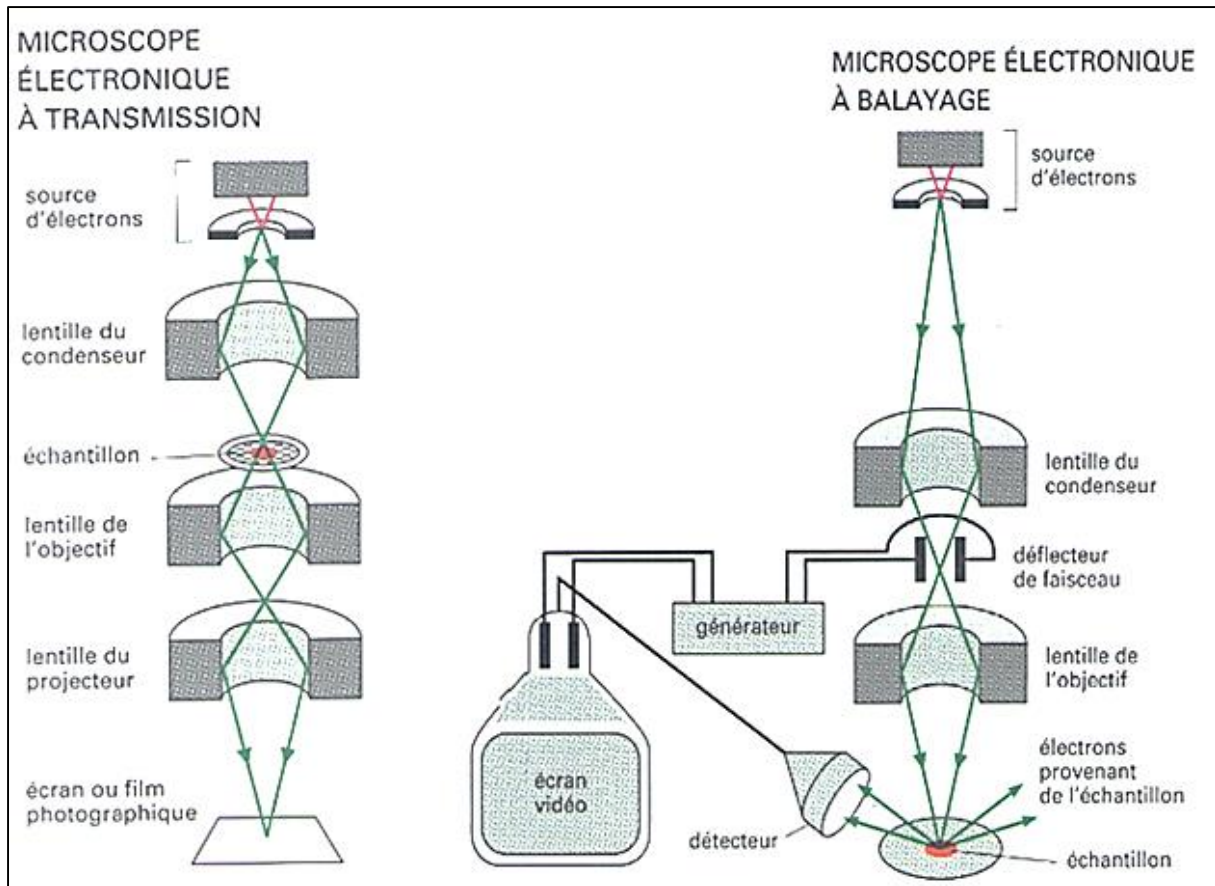


Figure 5. Principales caractéristiques des microscopes électroniques (à transmission et à balayage) [4].

TD2 : Comparaison entre les microscopes photonique et électronique

Bases de comparaison	Microscope photonique	Microscope électronique
Invention	On pense que les fabricants de lunettes hollandais Zacharius Jansen et son père Hans ont été les premiers à inventer le microscope composé au 16ème siècle.	Par le physicien Ernst Ruska et le l'ingénieur allemand Max Knoll en 1931.
Source d'énergie	Lampe électrique	Filament de tungstène porté à incandescence
Rayonnement	Photons	Faisceau d' électrons libres produit par un canon à électron. accéléré dans le vide pour traverser ensuite l'échantillon
Fuite de rayonnement	Aucun risque de radiation.	Il existe un risque de fuite de rayonnement.
Lentilles utilisées	Lentilles de verre	Lentilles électromagnétiques
Pouvoir de résolution	0,2µm	0,2nm (0,2Å)
Grossissement	×1000 On peut voir la cellule en entier	Grossissement plus élevé allant jusqu'à 2 millions de fois. On peut voir la structure fine de la cellule, on atteint souvent le niveau moléculaire.
Spécimen	Vivant ou mort	Mort
Epaisseur de l'échantillon	2 à 10µm	300-800Å
Tension	Pas besoin d'électricité haute tension	Un courant électrique haute tension est nécessaire (environ 50 000 volts et plus)
Système de refroidissement	Il n'y a aucune exigence de système de refroidissement	Il y a exigence de refroidissement élevé afin d'évacuer la chaleur générées par le courant électrique haute tension
Coupes	Coupes réalisées par un microtome (2à 20µm d'épaisseur)	Coupes réalisées par un ultramicrotome pour des coupes d'environ 0,1µm d'épaisseur.
Coloration	Colorations diverses	Coloration aux métaux lourds afin d'augmenter le faible contraste résultant du peu d'interaction entre les électrons et les surfaces biologiques.
Visibilité	L'image peut être vue directement	L'image n'est visible que sur un écran fluorescent
Disponibilité	Facilement disponible et moins cher	Pas facilement disponible et très coûteux.

TD3 : Etapes de préparation des coupes pour l'observation microscopique

Objectifs :

- *Savoir préparer une coupe pour l'étude aux microscopes photonique et électronique.*
- *Faire la différence entre les coupes histologiques et cytologiques.*

La structure et l'ultrastructure cellulaire sont révélées par la microscopie optique (M.O.) ou photonique d'une part et la microscopie électronique (M.E.) d'autre part. En microscopie optique, l'observation des objets biologiques est effectuée sur des lames du commerce ou bien à partir de préparations que l'observateur réalise lui-même.

I. Réalisation des préparations et observation en microscopie optique

La plupart des observations microscopiques se font sur des lames de verre généralement recouvertes d'une lamelle. L'échantillon doit être de faible épaisseur de manière à pouvoir être traversé par la lumière. Plus l'on souhaite observer à un fort grossissement, plus l'épaisseur doit être fine.

Les éléments montés sur une lame microscopique peuvent être frais ou séchés, hydratés ou déshydratés. Le milieu de montage peut être l'eau ou un milieu de montage plus pérenne (Baume du Canada, Eukit...). Lorsque la lame est destinée à être conservée ; il faut alors très fréquemment déshydrater et fixer l'échantillon à l'aide de solvants organiques.

La réalisation du montage ou l'utilisation de préparations microscopiques du commerce impose que lames et lamelles soient propres. Il est donc impératif d'éviter d'y poser les doigts en le tenant par la tranche. Par ailleurs, l'oculaire et objectifs du microscope doivent être régulièrement nettoyés avec de l'alcool [1].

A) Réalisation de la préparation

➤ Comment déposer une lamelle couvre-objet sur une lame ?

Poser la lamelle par l'une de ses arêtes sur la lame et inclinez-la progressivement pour chasser les bulles d'air. Vous pouvez la soutenir avec une aiguille montée pour ralentir sa chute (Figure1).

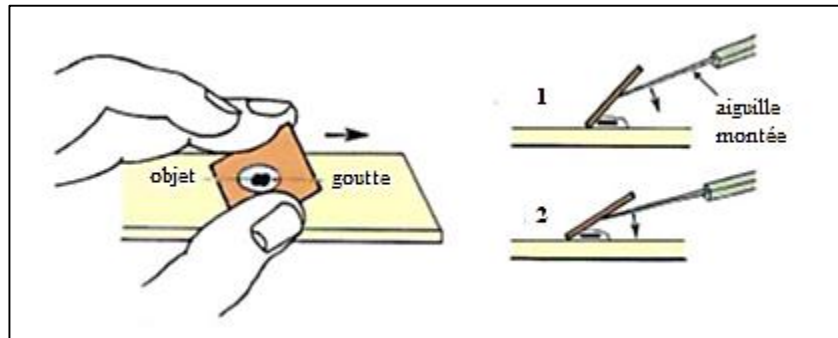


Figure 1 . Mise en place de la lamelle couvre objet [1].

➤ Comment réaliser le montage d'une préparation ?

Le montage entre lame et lamelle d'un objet biologique s'effectue dans un liquide de montage qui peut être de l'eau ou un colorant. Une bonne préparation exige que la lamelle repose de manière uniforme sur toute la surface de l'objet étudié (Figure 2).

La préparation est réussie s'il n'y a pas de liquide qui déborde de la lamelle et s'il n'y a pas de bulles d'air [1].

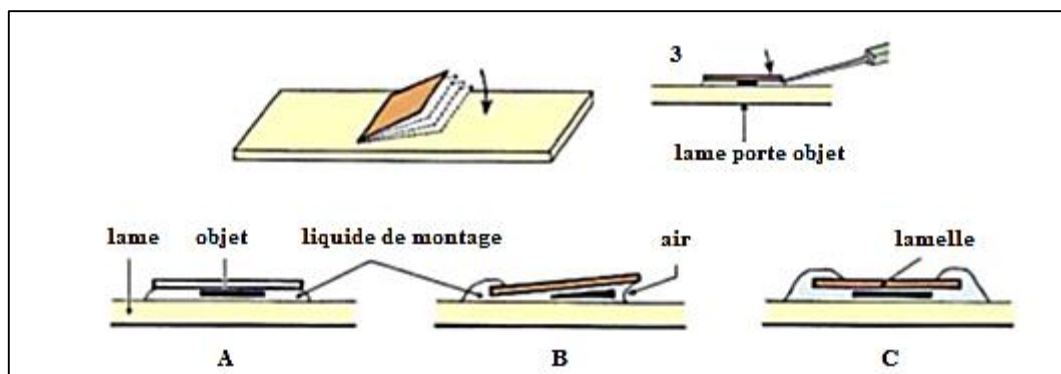


Figure 2 . Montage entre lame et lamelle [1].

A : Bonne préparation : objet mince, correctement étalé. Le liquide de montage occupe toute l'étendue de la lamelle bien horizontale. **B** : Mauvaise préparation : objet trop épais d'un côté de la lamelle qui est inclinée. Le liquide déborde du côté opposé. **C** : Trop de liquide de montage : l'objet »flotte« sous la lamelle et se déplace avec le liquide qui déborde. L'excès de liquide peut être éliminé par capillarité en apposant un papier filtre ou un buvard contre le bord de la lamelle.

➤ Comment substituer un liquide de montage à un autre ?

Cette pratique est utilisée lors de l'étude des échanges cellulaires quand on souhaite modifier le potentiel osmotique du liquide de montage. On dépose une goutte en A (Figure 3), au contact du premier liquide de montage, et on aspire ce dernier avec le papier filtre placé du côté opposé. Il s'établit un courant de A vers B qui remplace le premier liquide de montage par le second [1].

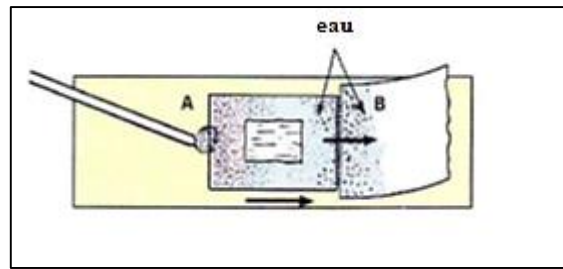


Figure 3. Remplacement d'un liquide de montage [1].

B) Observation microscopique

Pour observer correctement au microscope photonique, la lumière doit traverser l'ensemble de la préparation.

Placer la préparation sur la platine de manière à ce que la lamelle soit au-dessus de l'orifice par où passe la lumière.

✓ L'éclairage correct de la préparation

Le microscope est muni d'un condenseur (ou concentrateur) de lumière et d'un diaphragme à iris. Le condenseur concentre les rayons permettant de bien éclairer la préparation au fort grossissement. Il est mobile verticalement et son déplacement permet d'améliorer la netteté de l'observation. Le diaphragme à diamètre modifiable fait varier l'ouverture du faisceau éclairant. Il permet d'obtenir des contrastes et de modifier la profondeur de champ [1].

✓ Mise au point

La préparation est placée sur la platine de manière à ce que la lamelle soit au-dessus de l'orifice par où passe la lumière. L'observateur amène le plus petit objectif le plus près possible de la lamelle, sans la toucher, sous contrôle visuel. Lorsque l'image de l'objectif reflétée sur la lamelle apparaît, l'approche est maximale. L'œil placé sur l'oculaire, l'observateur remonte le tube optique à l'aide de la vis micrométrique jusqu'à l'apparition de l'image. La préparation est explorée en la faisant glisser sur la platine. Pour changer d'objectif, tournez le barillet ; la mise au point s'ajuste à l'aide de la vis micrométrique (Figure 4) [1].

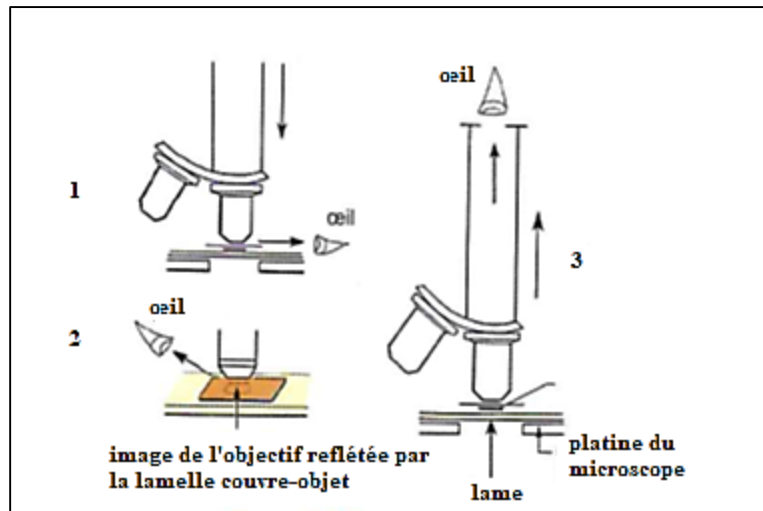


Figure 4. Mise au point [1].

C) Observation de quelques cellules eucaryotes

✓ Observation de cellules de la paroi buccale

L'intérieur de la bouche est tapissé de cellules épithéliales dont les couches les plus superficielles sont régulièrement éliminées puis remplacées par des cellules nouvelles. On peut donc aisément les prélever puis les observer. Le prélèvement s'opère en frottant l'intérieur de la joue avec un coton tige ou avec l'extrémité évasée de la sonde cannelée préalablement désinfectée à l'alcool. Déposer le prélèvement obtenu sur une lame. L'échantillon peut être coloré au bleu de méthylène de ou avec du vert de méthyl acétique. Ce dernier se fixe sur l'ADN de la chromatine et permet de bien repérer le noyau alors coloré en vert. Recouvrez d'une lamelle et analysez [1].

La figure 5 est une photographie d'une observation au microscope optique. Une structure arrondie est observée. C'est une cellule délimitée par sa membrane plasmique et comportant une structure centrale de forme ronde, le noyau. Il s'agit donc d'une cellule **eucaryote**. La forme arrondie de la cellule, l'absence de paroi entourant la membrane plasmique montre l'absence de vacuole et de plastides permettent de conclure que c'est une **cellule animale** [1].

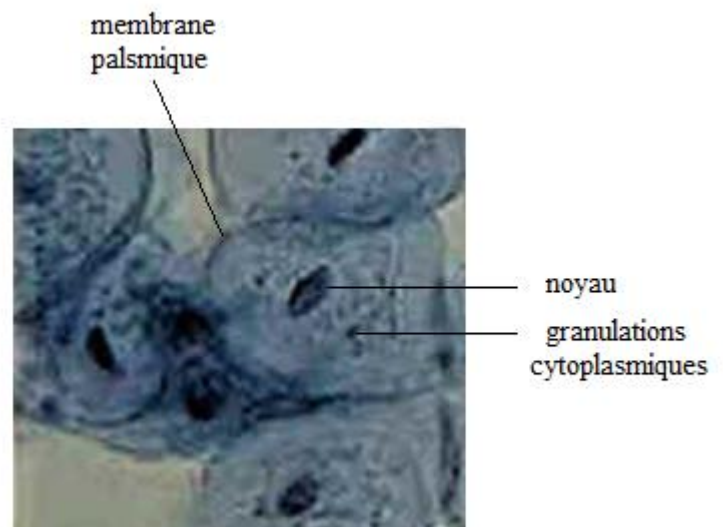


Figure 5 : Cellule de l'épithélium buccale montée dans le bleu de méthylène ($\times 600$) [1].

✓ Observation de vacuole de cellules d'épiderme d'oignon rouge

L'épiderme d'oignon rouge possède des vacuoles colorées par des anthocyanes en solution. On peut donc voir les vacuoles sans coloration.

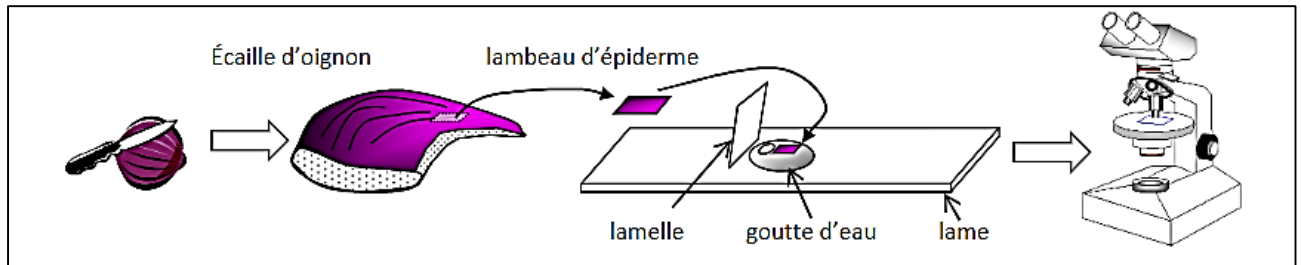


Figure 6. Observation des cellules végétales de l'épiderme d'oignon rouge (*Allium cepa*)
<https://studylibfr.com/doc/476087/protocole-d-observation-des-cellules-d-oignon-rouge>.

• Exercice

Prélevez un lambeau d'épiderme d'oignon rouge puis montez-le dans une goutte d'eau distillée (Figure 6). Observez.

Refaites la même préparation en utilisant une solution contenant du NaCl à 1% comme liquide de montage. Observez et comparez avec la préparation précédente.

-Reprenez l'observation de votre deuxième préparation après 15 minutes plus tard.

Proposez une explication pour chacune des trois situations.

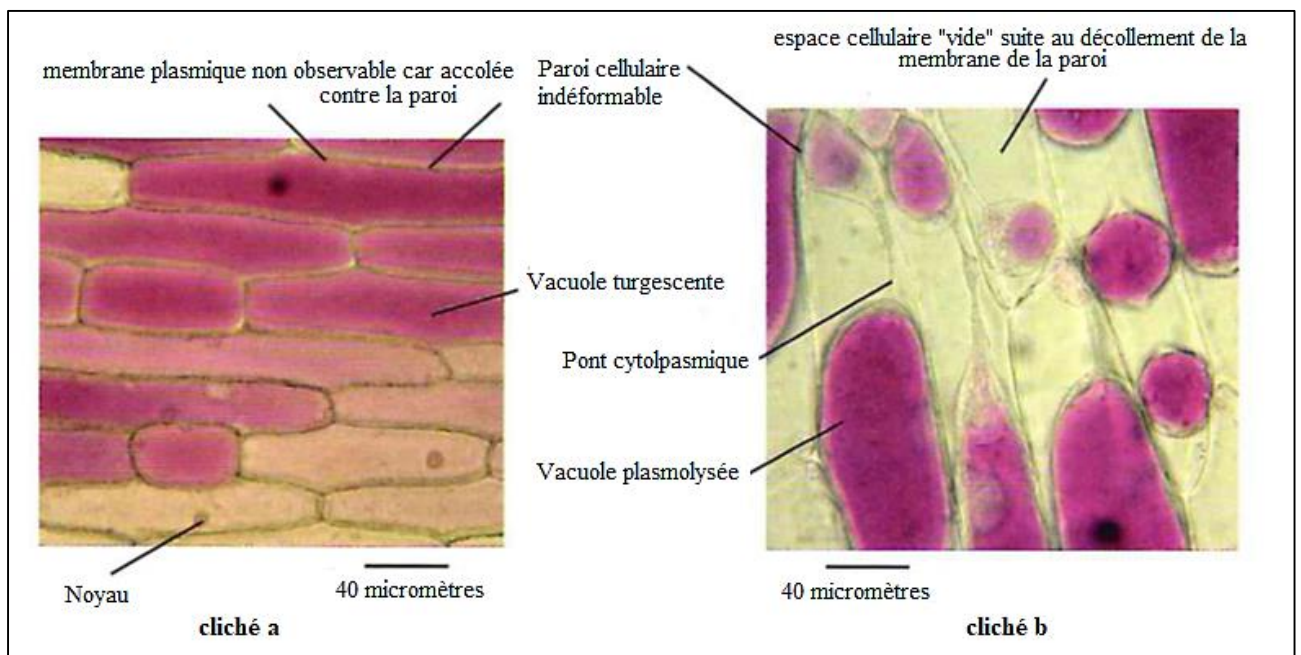


Figure 7. (A) Cellules d'épiderme d'oignon rouge montées dans de l'eau distillée (M.O. × 100) ; (B) Même cellules montées dans une solution de NaCl à 1% (M.O. × 400) [1].

Corrigé

Montage 1 : les cellules sont dans l'eau distillée donc à concentration en soluté bien plus faible que la concentration des liquides cellulaires. Le potentiel hydrique de ces derniers est inférieur à celui du milieu de montage. Il en résulte un influx d'eau dans la cellule, au niveau de la vacuole. Celle-ci occupe alors un volume important de la cellule et le tonoplaste exerce une pression hydrostatique sur la membrane plasmique qui s'applique contre la paroi. La cellule est turgescente.

Montage 2 : les cellules sont dans une solution saline de concentration plus importante que celle des liquides cellulaires et donc de potentiel hydrique nettement plus faible. Une partie de l'eau contenue dans la vacuole sort de la cellule. La vacuole apparaît très pigmentée et occupe un volume plus restreint dans la cellule. Le volume du cytosol ne varie guère si bien que la membrane plasmique n'appuie plus sur la paroi cellulaire. La membrane plasmique reste ponctuellement liée à la paroi au niveau des plasmodesmes en particulier. La cellule est en plasmolyse.

Montage 3 : après 15 minutes, un équilibre des concentrations s'est établi entre le milieu extracellulaire et la cellule ce qui suggère que des ions Na^+ et Cl^- ont pénétré dans la cellule.

De l'eau est à nouveau entrée dans la cellule qui n'est plus en plasmolyse. Cela démontre la perméabilité du plasmalemma [1].

II. Etapes de préparation des coupes histologiques pour l'observation au microscope optique

Les techniques histologiques passent par plusieurs opérations qui s'enchaînent et qui sont obligatoires. La méthode la plus usitée, avec inclusion à la paraffine, comporte 7 temps principaux :

- 1-Prélèvement de la pièce. Inclusion
- 2-Fixation.
- 3-Déshydratation
- 4-Inclusion dans la paraffine.
- 5-Réalisation des blocs.
- 6-Réalisation des coupes, étalement sur lame porte-objet.
- 7- Coloration et montage.

1- Prélèvement de la pièce

L'animal est sacrifié de la manière la plus douce possible, rapidement disséqué. Les pièces choisies sont prélevées puis placées dans une boîte de pétri remplie de fixateur.

Découper à l'aide d'une demi-lame de rasoir des fragments de ½ cm de côté dans les zones intéressantes.

Remarque : Penser à déchirer les capsules fibreuses s'il y a lieu (reins, testicules, larves de germes)

2- Fixation

C'est l'action de tuer les cellules, en évitant tout phénomène agonique, de manière à conserver les structures dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant. Une bonne fixation doit éviter tout artefact : apparition d'une structure nouvelle (par coagulation), disparition d'une structure normalement présente (par solubilisation), déformation ou déplacement des constituants cellulaires (par cristallisation).

On peut fixer à l'aide de procédés chimiques ou bien par des procédés physiques :

➤ Fixation par traitement chimique

Le traitement chimique consiste à placer les cellules dans liquides que l'on appelle fixateurs.

Il existe plusieurs agents fixateurs regroupés en 5 familles :

Le formol, les alcools, l'acide picrique, les acides organiques et minéraux et les sels de métaux lourds.

-Le formol est l'un des meilleurs fixateurs des protéines, il se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilisations.

-L'alcool : en général il s'agit de l'éthanol (parfois le méthanol). Il pénètre peu, fixe mal le noyau, médiocrement le cytoplasme, ne favorise pas les colorations.

-L'acide picrique ou trinitrophénol : on l'utilise en solution aqueuse saturée, l'acide picrique étant peu soluble. Il pénètre bien, facilite la coloration mais il durcit les tissus.

-Les acides organiques et minéraux : l'acide acétique est le plus employé, il conserve bien le noyau, pénètre bien, mais dégrade le cytoplasme et fait gonfler le collagène.

La durée de fixation et le volume du fixateur utilisé varient selon le volume des prélèvements. On recommande un volume de fixateur égal à 5 fois le volume du prélèvement. La durée de la fixation dépend de la taille de l'échantillon à fixer, de la vitesse de pénétration du fixateur dans les cellules, de la nature des cellules elles-mêmes. Pour des pièces cubiques de quelques

millimètres de côté, le temps de fixation varie, selon le fixateur, de 30 minutes à plusieurs jours. Pour des cellules isolées, ces temps sont plus courts (de quelques minutes à une demi-heure).

➤ **Fixation par traitement physique**

Le traitement physique le plus couramment utilisé pour la fixation est la congélation.

La pièce à fixer est refroidie rapidement, par immersion dans un liquide à basse température (azote liquide -196°C). La congélation doit être rapide pour que les cristaux de glace qui vont se former ne soient pas trop gros, sinon ils risqueraient de déchirer les structures cellulaires.

3-Déshydratation

La déshydratation a pour but d'éliminer l'eau de l'échantillon et de la remplacer par un solvant du milieu utilisé pour l'inclusion ; elle consiste en une série de bains dans des alcools de plus en plus concentrés. Un dernier bain est réalisé dans un mélange alcool/solvant organique du milieu d'inclusion (**ex.** xylène, toluène).

4. Inclusion

L'inclusion a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante, qui permettra une coupe fine et régulière. Cette substance, est souvent la paraffine qui est liquide à 60°C et dure à la température ambiante ; soluble dans les solvants cités plus haut, elle pénètre très aisément dans les tissus, on obtient à la fin un «bloc» qui pourra être correctement coupé et qui sert aussi de moyen de stockage des échantillons.

5. Obtention de coupes

Les blocs de paraffine, sont coupés en sections fines (de 2 à 10 µm d'épaisseur) et transparentes. On utilise un microtome, muni d'un rasoir métallique et d'un système d'avance mécanique du porte-objet, qui donne des coupes sériées qui sont ensuite collées sur des lames de verre.

Avant la coloration, les coupes doivent être débarrassées de la paraffine qui les couvre et réhydratées. Pour cela, la lame est mise à chauffer sur la platine chauffante.

Lorsque la paraffine est fondue, la lame est immergée dans un borel contenant du benzène (ou du toluène) elle passera successivement dans 6 borels constituant la batterie de déparaffinage.

- ✓ 2 borels contenant du benzène.
- ✓ borel contenant de l'alcool 100%.
- ✓ borel contenant de l'alcool à 90-95%.
- ✓ borel contenant de l'alcool 70-75%.
- ✓ borel contenant de l'eau distillée.

6. Coloration

La coloration permet de teinter de façon différentielle les divers territoires de l'échantillon biologique.

Les colorants permettant de repérer la forme précise des cellules et de leurs organites les plus volumineux. Les plus courants sont : l'hématoxyline, l'éosine. Les bleus (Bleu de méthylène, de toluidine) (Tableau1).

L'emploi d'un seul colorant est peu informatif, ils sont donc généralement utilisés en association à 2 (Hématoxyline, eosine), 3(Trichome de Masson : hématoxyline-éosine-vert de méthyle) ou plus 4 (Tetrachrome de Herlant) .

Remarque : L'hématoxyline et l'éosine sont très souvent associés sur la même lame, c'est la technique de coloration la plus courante (H.E).

Tableau I. Exemples de colorants utilisés en microscopie photonique

Mettre en évidence	Colorant	Coloration obtenue
Les cellules d'une façon non sélective	Bleu de méthylène	Cellule bleu
Cytoplasme	Eosine	Rose
	Rouge neutre	Cellule en rouge
Noyau (ADN,ARN) ou chromosomes	Carmin acétique	ADN en rose
	Vert de méthyle acétique en présence de pyronine	ADN en vert et ARN en rose
	Hématoxyline	Noyau en Bleu violacé
Paroi cellulosique	Carmin-vert d'iode	Cellulose en rose
	Rouge Congo	Cellulose en rouge
Vacuole	Rouge neutre	Vacuole en rouge
Amidon	Lugol ou eau iodé (pur ou dilué)	Amidon en bleu, violet ou marron
Glycogène	Lugol	Glycogène en brun acajou
Lipides	Rouge soudan III	Gouttelettes lipidiques en rouge

7. Montage

Le montage a pour but de rendre la préparation permanente, c'est-à-dire observable pendant des années. Après la déshydratation rapide de la préparation colorée, celle-ci est recouverte d'une goutte de baume de canada sur laquelle on laissera tomber une lamelle.

Les lames colorées, montées doivent être gardées horizontalement pendant au moins 48heures jusqu'au séchage complet. On les range ensuite, à l'abri de la lumière, dans une boîte spéciale, dite boîte à **préparation histologiques** [3,7].

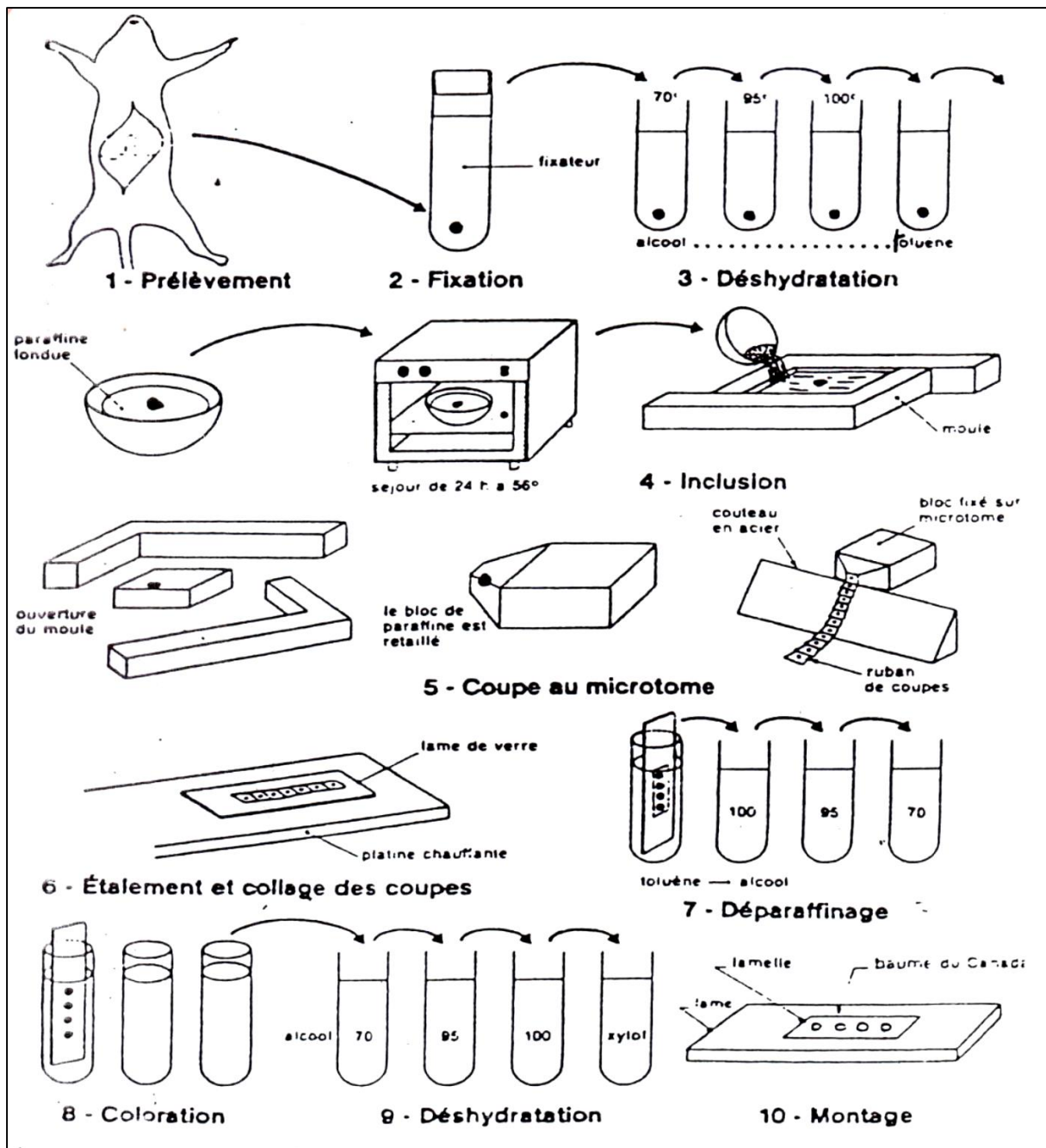


Figure 8. Techniques de préparation de coupes pour le microscope photonique [3].

III. Préparation des coupes pour observation au microscope électronique

En microscopie électronique, l'objet examiné est placé sous un vide très élevé, nécessaire au déplacement des électrons.

1. Fixation

Les fixateurs classiques ne suffisent pas car ils tendent à coaguler les protéines et à détruire les structures fines. Il faut utiliser ici des agents chimiques qui réalisent des pontages entre les molécules voisines (le permanganate de potassium assure une excellente conservation des membranes lipoprotéiques, mais les acides nucléiques sont très mal fixées ; le tétr oxyde d'osmium il pénètre mal dans les cellules ; le glutaraldéhyde pénètre bien dans les cellules, fixe efficacement de nombreuses structures, sauf les membranes).

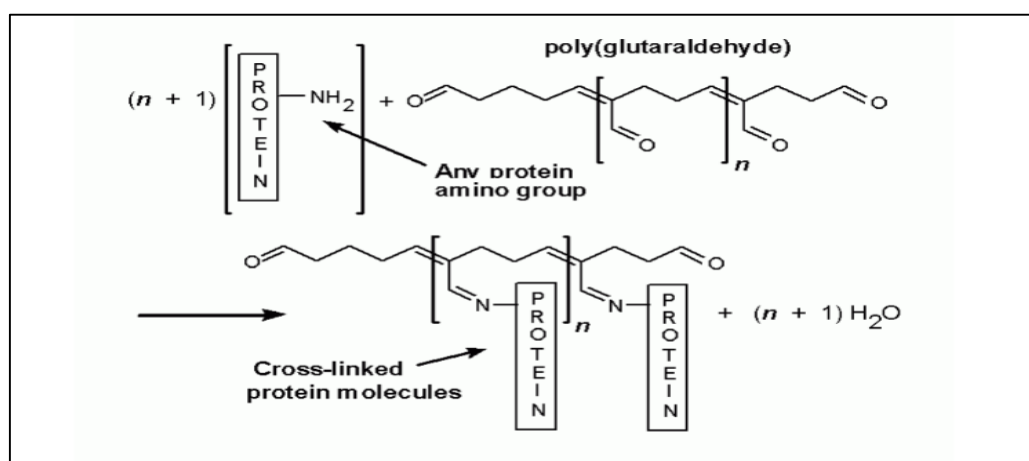


Figure 9. Fixation par le Glutaraldéhyde. Ce composé reconnaît la fonction amine de l'acide aminé en position N-terminale pour réaliser une liaison covalente. Les protéines se retrouvent alors fixées entre elles et la structure du cytoplasme est maintenue <https://www.studocu.com/fr/document/universite-de-lille/biologie-cellulaire-1/td2-partie-1-colorations-cytologiques-et-reactions-cytochimiques/8178911>.

2. Inclusion en résine

Après fixation, l'échantillon est déshydraté, puis inclus dans une résine synthétique transparente aux électrons (Epon, araldite), qui durcit fortement. On obtient des petits blocs solides et très durs, incluant et imprégnant l'échantillon à analyser.

3. Obtention de coupes

Des coupes très fines sont réalisées dans le bloc d'inclusion, en utilisant un ultramicrotome. Le couteau est en fait muni d'une petite cuvette contenant de l'eau à la surface de laquelle les coupes flottent (Figure 10). Celles-ci sont récupérées sur des grilles de cuivre de 3 à 4 mm de diamètre,

à mailles très fines, qui servent en fait de porte-objet et seront introduites dans la colonne du microscope.

4. Coloration

Les coupes sont ensuite éventuellement contrastées par exposition à des sels de métaux lourds (par exemple double imprégnation par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb). Le contraste dépend du nombre atomique des atomes qui se sont associés au matériel que l'on veut étudier ; plus le nombre atomique est élevé, plus les électrons sont dispersés et plus fort est le contraste.

On procède alors à l'observation des coupes au microscope électronique à transmission : les grilles supportant les coupes sont introduites dans le microscope. Il n'est pas nécessaire d'enlever la résine d'inclusion pour l'observation mais seules les régions des coupes situées entre les barreaux des grilles support pourront être observées.

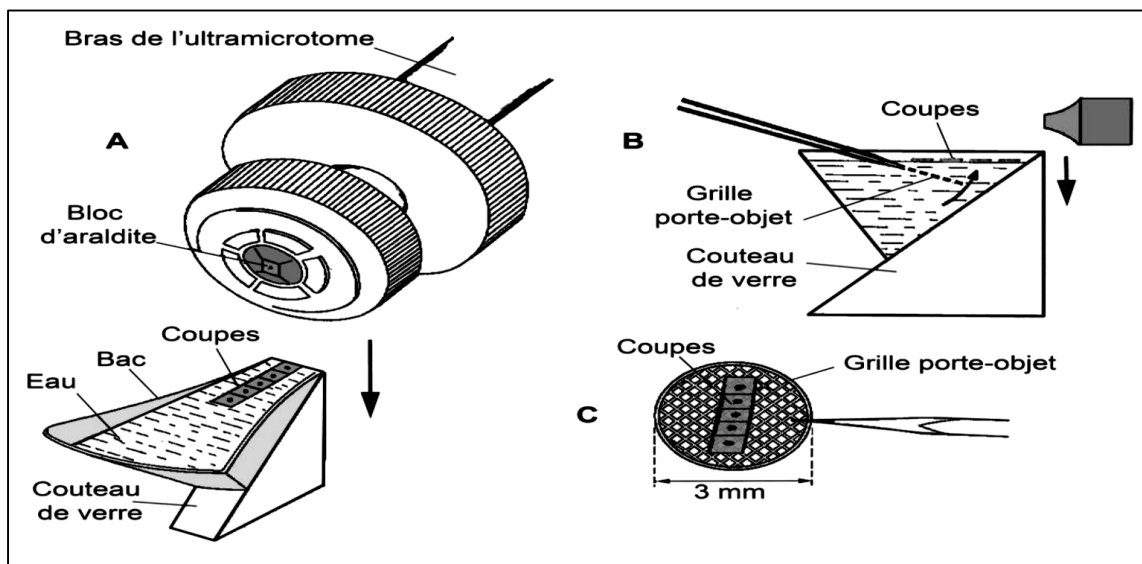


Figure 10. Préparation des coupes en microscopie électronique. (A) : Les coupes très fines réalisées dans le bloc d'inclusion, grâce à un ultra microtome utilisant un couteau de verre, sont récupérées à la surface de l'eau. (B) : Les coupes sont ensuite déposées sur une petite grille de cuivre porte-objet. (C) : Schéma d'une grille porte-objet associée à une série de coupes. https://www.editionsellipses.fr/index.php?controller=attachment&id_attachment=44983.

TD4. Méthodes d'étude de la cellule liées à la microscopie

Objectif :

- Connaître le principe des techniques permettant d'étudier les détails d'une surface cellulaire et de caractériser la morphologie des particules isolées.

En plus des techniques histologiques et cytologiques, d'autres approches sont développées afin d'étudier les divers aspects de la cellule. La technique de cryodécapage ainsi que les techniques de coloration ont permis de faire de grands progrès dans la connaissance de la structure des membranes biologiques ainsi que la mise en évidence des contours de petites particules comme les virus ou les ribosomes.

1- Technique de cryodécapage

Le cryodécapage est une technique utilisée en particulier pour étudier l'organisation des surfaces des membranes biologiques. Le but c'est d'obtenir d'une réplique de l'échantillon étudié.

- **Etapes** (Figure 1) :

a-Congélation

L'échantillon de tissu à étudier est congelé brutalement dans du fréon liquide (-100°C), lui-même refroidi par l'azote liquide (-192°C), on obtient un bloc de glace.

b-Cryofracture

L'échantillon congelé est ensuite fracturé dans une enceinte sous vide grâce à une lame métallique portée à la surface de l'échantillon, ce dernier étant surgelé devient très cassant et la ligne de fracture tend à suivre les zones de moindre résistance qui sont en générales les espaces inter-membranaires (espace péri nucléaire par exemple) ou bien les régions intra membranaires qui correspondent aux moitiés hydrophobes des doubles couches lipidiques ; nous obtenons dans ce dernier cas une hémi-membrane.

c- Elimination de la couche de glace superficielle par sublimation

Le décapage par sublimation assure une évaporation de l'eau de la surface de fracture ce qui pour intérêt d'accentuer les irrégularités superficielles.

d- Confection de la réplique qui se fait en deux temps

- Ombrage de la surface de fracture, en projetant sur l'échantillon un métal lourd (platine) sous un angle de 45°.
 - Vaporisation verticale, sous une incidence perpendiculaire à la surface une fine pellicule de carbone qui servira à consolider la première couche de platine. On obtient ainsi un moulage rigide, ou réplique, de la surface de fracture, dont certaines zones correspondant aux reliefs mis en évidence par le dépôt hétérogène de platine, seront plus épaisses.
- e- Elimination de l'échantillon qui a servi de matrice par dissolution en utilisant un solvant organique (acide sulfurique ou chlorhydrique).
- f- Lavage puis dépôt de la réplique sur une grille porte-objet qui sera observée au microscope électronique à balayage (MEB) [2,7] (Figure 2 et 3).

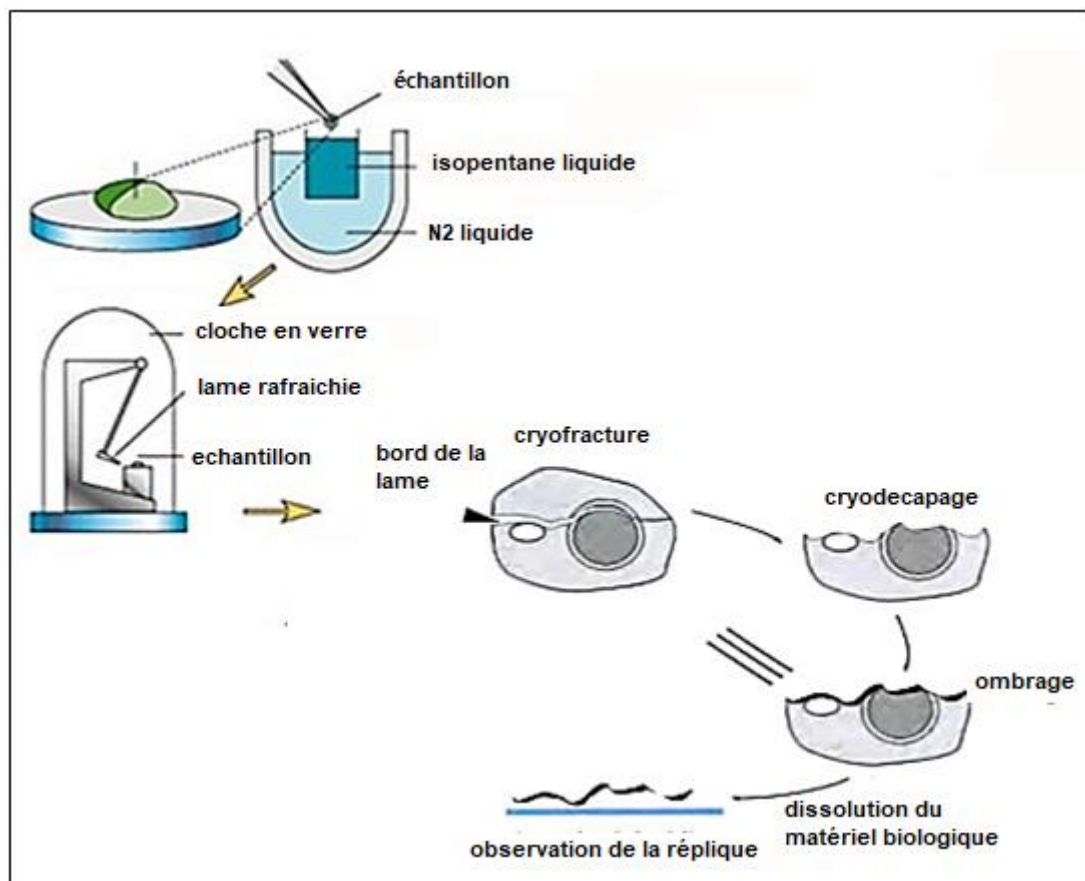


Figure 1. Préparation de répliques de cryofracture pour l'observation au microscope électronique à balayage. <https://fr.slideshare.net/liamaniouafia/technique-de-cryodcapage>.

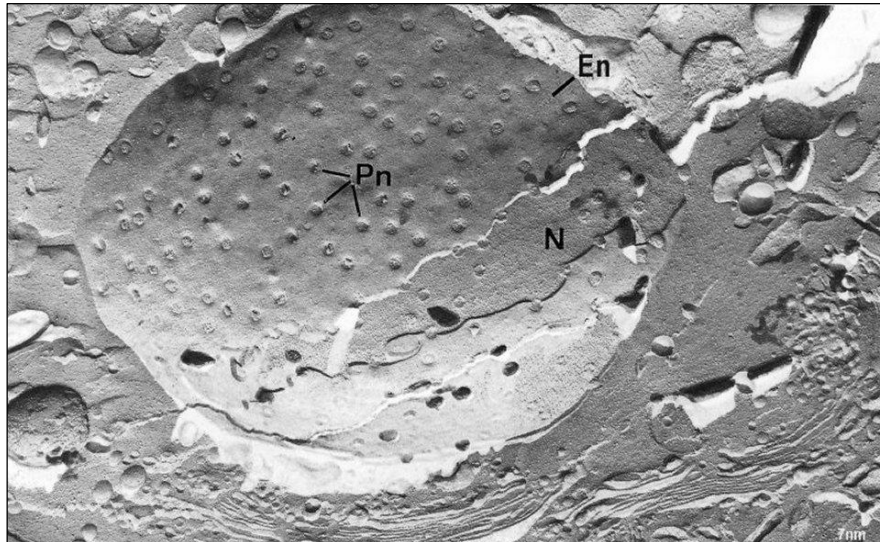


Figure 2. Noyau interphasique observé au microscope électronique à balayage, technique de cryodecapage. <http://raymond.rodriquez1.free.fr/Textes/1s13.htm>.

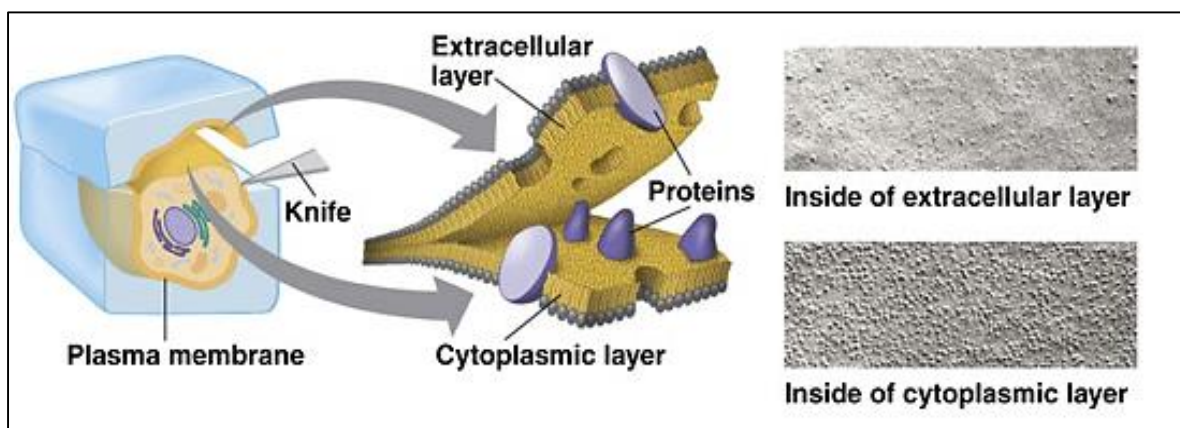


Figure 3 . Observation d'une réplique de la membrane plasmique (surface interne) après cryodecapage. Mise en évidence de particules membranaires correspondant aux protéines membranaires. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/freeze-fracture>.

2- Techniques de coloration

Le microscope électronique convient tout autant pour l'étude de très petites particules, comme les virus, les ribosomes, éléments de cytosquelette et complexes protéiques. On peut également mettre en évidence la forme des protéines et acides nucléiques individuels au microscope pour autant qu'on leur donne un contraste suffisant. Un des meilleurs moyens de rendre ces substances visibles est l'utilisation de techniques de coloration négative et l'ombrage.

1-Coloration négative

On place les objets dans une solution aqueuse d'acide phosphotungstique. On dépose une gouttelette de cette suspension sur une grille recouverte d'une membrane-support et on laisse s'évaporer la plus grande partie de la goutte. A cause de la tension superficielle, le colorant a tendance à envelopper la particule sur le film qui le supporte et pénétrer dans toutes les irrégularités qui s'ouvrent à la surface de la particule. Le reste de la particule recueille peu de colorant. De par sa forte masse atomique, le contrastant dévie les électrons dans le diaphragme objectif. 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 [2, 7]. (Figures 4 et 5).

2-Ombage métallique

Une autre technique largement utilisée pour rendre visible de très petites particules isolées est leur ombage. Les grilles sont placées dans un espace fermé, où l'on fait le vide. Dans la chambre se trouve un filament composé d'un métal lourd (généralement le platine) avec du carbone. Le filament est porté à haute température, ce qui provoque son évaporation et le dépôt d'un revêtement métallique sur toutes les surfaces accessibles dans la chambre.

Le métal se dépose donc sur les surfaces qui font face au filament, tandis que les surfaces opposées de l'objet et les parties du support qui sont dans l'ombre restent non revêtues et incapables de diffracter les électrons. Par conséquent, les zones qui sont dans l'ombre sont éclairées sur l'écran, alors que les régions couvertes de métal sont foncées. Cette relation est inversée sur la plaque photographique, qui est le négatif de l'image. Par conséquent, on représente les préparations ombrées en imprimant une image négative dans laquelle la particule paraît éclairée par une vive lumière blanche (correspondant à la surface revêtue), avec une ombre foncée produite par la particule. Cette technique donne un très bon contraste pour un matériel isolé et produit une impression d'image en trois dimensions (3D) [4, 7] (Figures 4, 6).

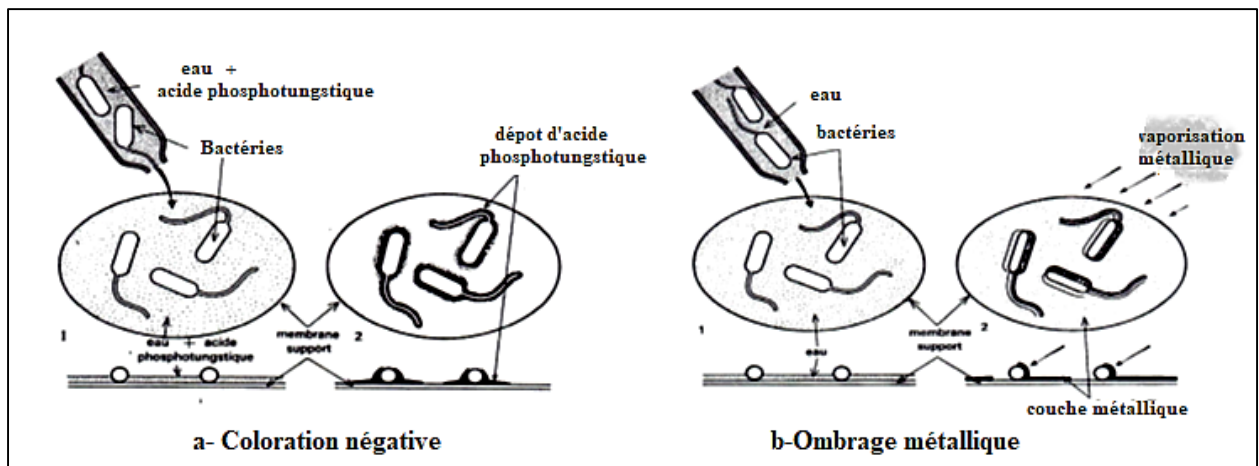


Figure 4. Techniques de coloration [7]. a. coloration négative. b. Ombrage métallique.

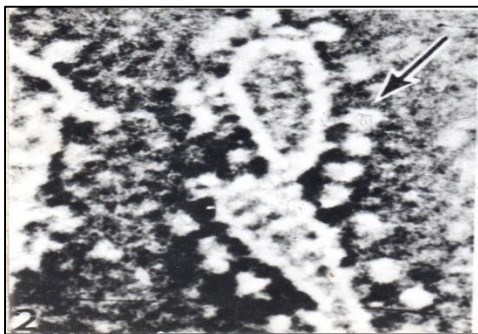


Figure 5. Mise en évidence des ATP synthétase par coloration négative au niveau des fragments de membranes mitochondriales internes [7].

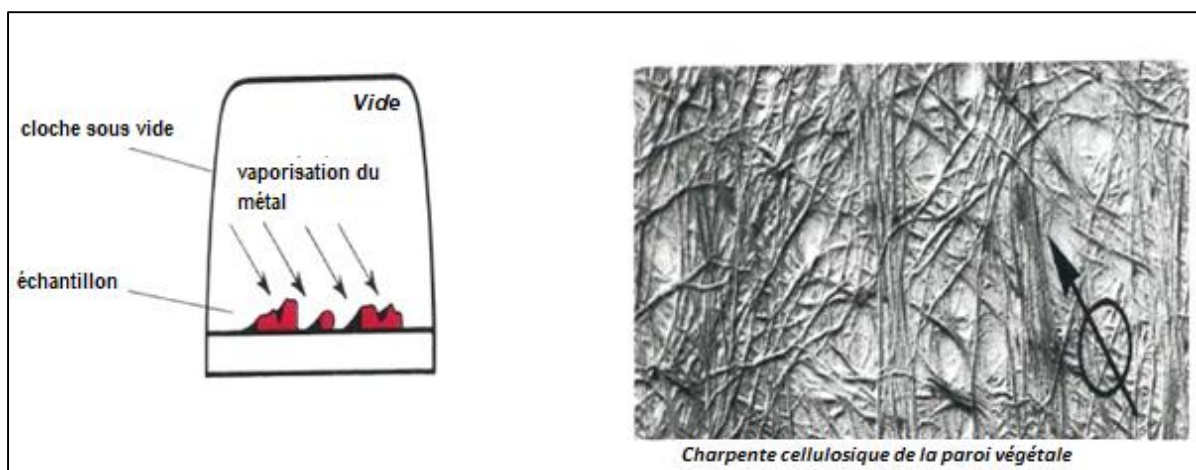


Figure 6. Mise en évidence de charpente cellulosique de la paroi d'une cellule végétale <https://slideplayer.fr/slide/509358/>

TD5. Techniques de détection et de localisation des composés cellulaires

Objectif :

- *Savoir localiser précisément certains composés au sein d'une cellule en se basant sur les précurseurs de ces composés et leurs structures.*

1- Autoradiographie

Plusieurs radio-isotopes sont employés en biologie ou physiologie cellulaire : ^3H - ^{14}C - ^{32}P - ^{35}S - ^{22}Na - ^{42}K - ^{125}I . On les utilise sous forme de molécules minérales ou organiques dans lesquelles un ou plusieurs atomes sont radioactifs ; celles-ci ne sont pas chimiquement distinguées des autres par les cellules et sont parfaitement assimilées (absorbées, métabolisées et incorporées dans leur propre matière).

La méthode d'autoradiographie permet de localiser un composé (sucre, protéine, acide nucléique) et de suivre son cheminement dans la cellule grâce à l'utilisation d'un traceur, métabolite enfermant un atome radioactif tels que le C^{14} , H^3 . En effet, les rayons émis par ces isotopes sont constitués d'électrons libérés à très grande vitesse, qui réduisent les grains de bromure d'argent contenus dans l'émulsion en grains d'argent métallique (Ag). Ceux-ci se localisent alors au-dessus des structures ayant incorporé des atomes radioactifs. Cette méthode s'adresse à des coupes tissulaires ou cellulaires destinées à la microscopie photonique ou électronique.

• Technique

- a- L'isotope radioactif spécifique de la molécule à étudier est injecté à un animal vivant. Cette étape d'introduction de la radioactivité dans les tissus constitue le pulse (Figure 1 A).
- b- Quelques jours après, l'animal est sacrifié et l'organe concerné par le métabolisme de la molécule à étudier est prélevé puis préparé selon la technique histologique ou cytologique.
- c- On recouvre les coupes par une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'Ag) et on maintient le tout plusieurs jours ou plusieurs semaines à l'obscurité. Pendant ce laps de temps, les rayonnements émis par ces éléments radioactifs contenus dans les coupes ; vont transformer l'AgBr en Ag métallique (Figure 1 B).
- d- On procède par la suite à la révélation de l'émulsion puis à sa fixation comme un film photographique.

- e- à l'observation, la molécule recherchée est révélée sous forme de taches noires (grains d'argent opaques) localisées dans les structures cellulaires ayant incorporé les atomes radioactifs. Le comptage de nombre de grains d'argent métallique renseigne sur l'intensité du phénomène étudié [7] (Figure 2).

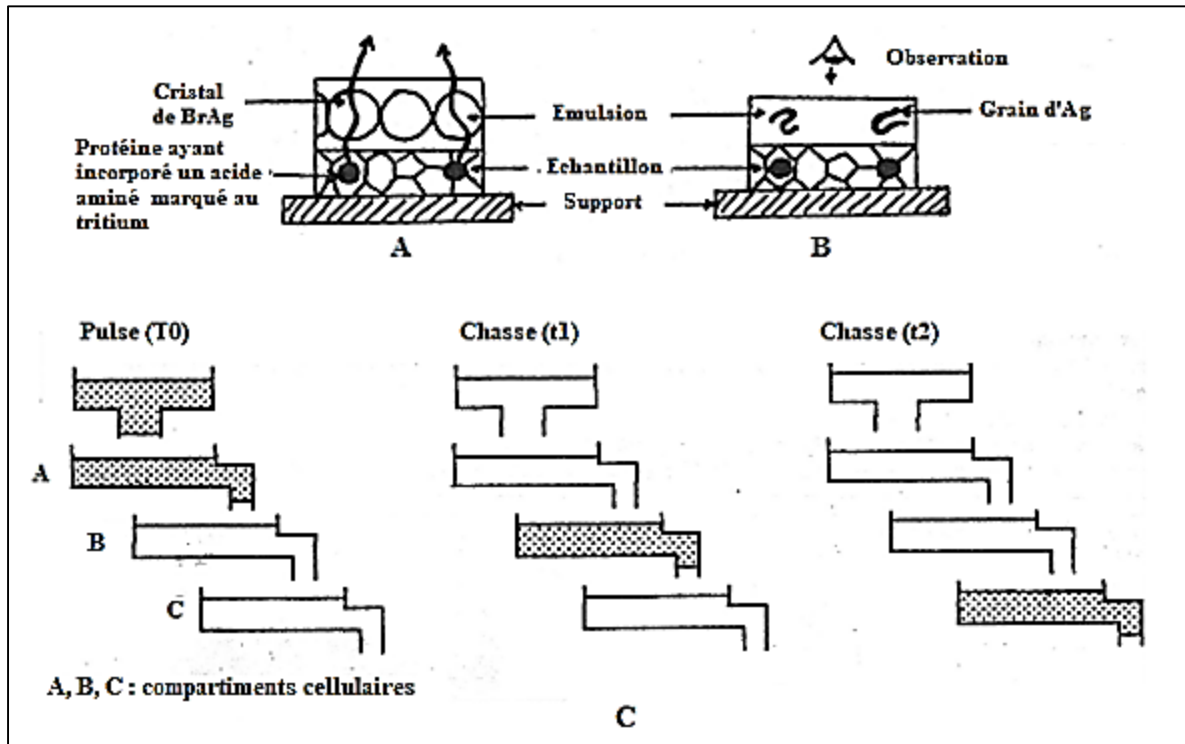


Figure 1. Technique de l'autoradiographie. (A) Période d'exposition : les atomes radioactifs impressionnent l'émulsion. **(B)** Après développement de l'émulsion **localisation des grains d'argent au-dessus des molécules ayant incorporé l'élément radioactif.** **(C)** Technique de pulse-chasse. http://www.lyc-claudel-vaureal.ac-versailles.fr/IMG/pdf/Les_techniques_de_laboratoire_-_l_autoradiographie.pdf.

Afin de suivre le devenir de certaines molécules dans l'organisme, on réalise, après le pulse une chasse : c'est à dire que l'on fournit à nouveau l'élément non radioactif à l'organisme et en excès. Ainsi, la quantité de molécules marquées est relativement plus faible que la quantité de molécules non marquées. L'évolution du lot de molécules marquées parmi toutes les autres présentes dans le milieu peut alors être distinguée. Les niveaux d'expression ou de dégradation des molécules ayant été marquées ainsi que leur localisation peuvent ainsi être suivis à différents intervalles de temps. (Figure1 C).

Historiquement, l'expérience de Jamieson et Palade en 1967 sur le pancréas exocrine est un exemple d'expérience en pulse-chasse, qui permet de reconstituer le trajet des protéines au sein d'une cellule [11].

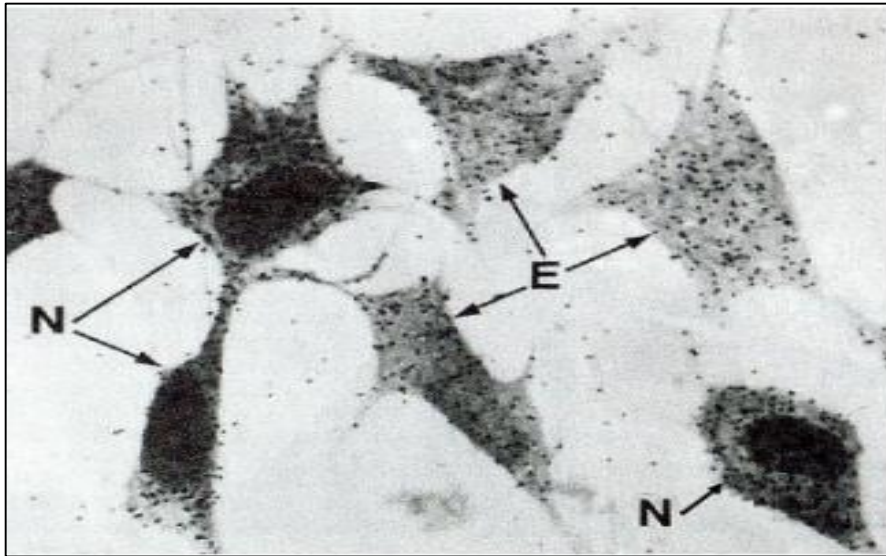


Figure 2. Localisation de la synthèse protéique par autoradiographie. Des cellules animales sont cultivées in vitro dans un milieu contenant un acide aminé radioactif, la leucine (sa molécule contient du tritium ^3H radioactif). Le noyau de certaines de ces cellules (notées «E» pour cellules «énucléées») a été enlevé par micromanipulation quelques minutes avant la mise en présence de la leucine radioactive. D'autres cellules (notées «N» pour cellules «nucléées») ont conservé leur noyau. Un lavage de la préparation élimine toute trace d'acide aminé qui ne serait pas incorporé au sein d'une protéine. L'incorporation de leucine radioactive dans des molécules protéiques est révélée par des grains noirs sur une autoradiographie.

L'incorporation de la leucine radioactive au sein des protéines synthétisées se fait dans le cytoplasme, alors que l'information génétique dont l'ADN est le support se trouve dans le noyau.

<http://docplayer.fr/115886626-Acide-amine-radioactif-autoradiographie-conclusion-partielle.html>.

2. Immunomarquage

• Immunohistochimie et immunofluorescence

L'immunohistochimie trouve son origine en 1942 avec la publication de Coons et *al*, décrivant pour la première fois une coloration des antigènes du streptocoque bactérien sur du tissu infecté à l'aide d'anticorps conjugué FITC. C'est en 1966 que Nakane a introduit l'utilisation d'enzymes comme systèmes de révélation pour l'immunohistochimie (IHC) en microscopie optique. Le terme immunohistochimie a été défini à partir des mots « immunologie » en référence à l'utilisation d'un anticorps et « histologie » qui évoque l'utilisation de tissus.

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisant des corps fluorescents dits fluorochromes ou fluorophores.

Par définition, le fluorochrome désigne toute substance chimique naturelle (chlorophylle, pigment cellulaire...) ou artificielle (Fluorescéine, Rhodamine, DAPI ..) capable d'émettre une lumière

de fluorescence. En effet chaque fluorochrome est excitable par une radiation lumineuse spécifique généralement de haute énergie et de faible longueur d'onde dite lumière d'excitation. Celle-ci est réémise sous forme d'une lumière d'énergie plus faible dite lumière de fluorescence [7].

Ex : la fluorescéine émet une lumière verte et la rhodamine émet une lumière rouge.

• Principe

Le but de l'immunomarquage est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques (filaments d'actine, microtubules..), nucléaires (récepteurs hormonaux) ou membranaires (cerbB2), spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine aux propriétés antigènes. Le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré (enzyme) ou d'un colorant fluorescent (Immunofluorescence).

Les anticorps spécifiques utilisés sont obtenus de deux façons différentes :

- 1- Immuniser un animal (souris, lapin, cobaye) en lui injectant l'antigène donné et recueillir ensuite son sérum pour le purifier et isoler ensuite un anticorps polyclonal,
- 2- Immuniser un animal (souris), recueillir ses lymphocytes, mettre ceux-ci en culture, et après purification du surnageant de la culture, obtenir un anticorps monoclonal.

L'anticorps spécifique ainsi produit est ensuite soit isolé et marqué par un «révélateur» optique (Figure 1), généralement la fluorescéine ou la rhodamine pour l'immunofluorescence (directement couplé à un fluorochrome ou révélé par un anticorps secondaire fluorescent), soit détecté par un second anticorps dirigé contre la partie constante du premier (antisouris ou anti-lapin) marqué par une enzyme . Cette enzyme peut être la peroxydase de raifort aussi appelée HRP (Horse Radish Peroxidase) ou la phosphatase alcaline appelée AP (Alkaline Phosphatase). Le complexe antigène-anticorps-enzyme est révélé grâce à un substrat spécifique de l'enzyme HRP ou AP. Il existe plusieurs chromogènes de l'HRP (DAB, Emerald, AEC, Permanent HRP green ...) et de l'AP (BCIP/NBT, Permanent Red, Fast Red ...). L'activité se manifeste par la formation d'un produit coloré [8] .

Une contre-coloration peut être réalisée en fin de marquage pour permettre une meilleure visualisation des tissus/cellules.

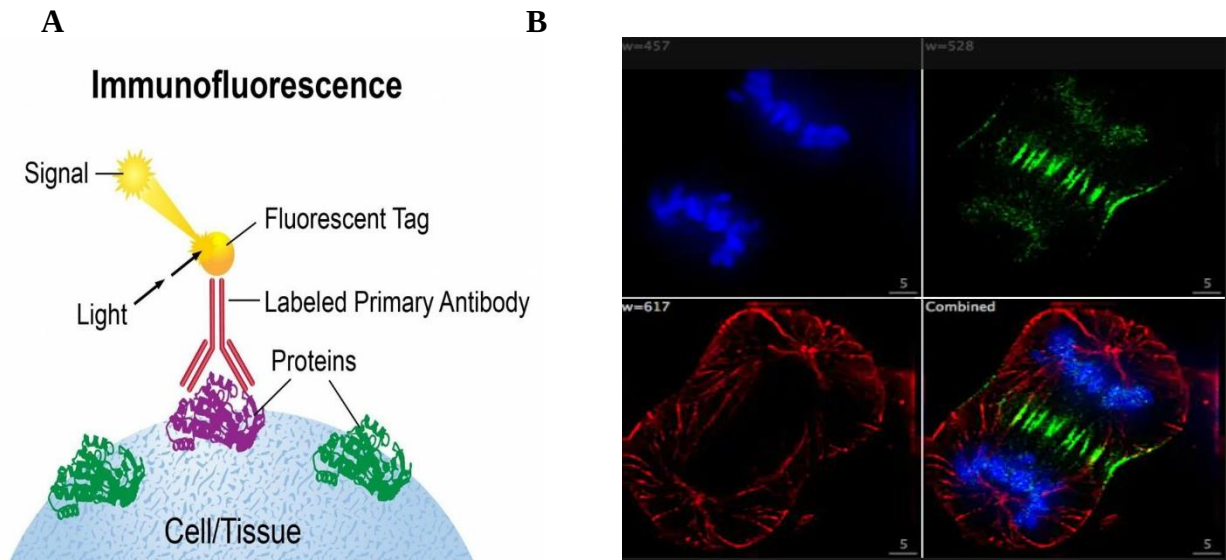


Figure 1. Principe de l'immunofluorescence. (A) L'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt peut être directement couplé à un fluorochrome ou révélé par un anticorps secondaire fluorescent. <https://www.leinco.com/immunohistochemistry/>. (B) Une mitose est observée au microscope à épifluorescence grâce à différents fluorochromes (l'ADN en bleu, la tubuline en rouge et une protéine centromérique en vert) [Définition | Microscope en fluorescence | Futura Santé \(futura-sciences.com\)](#).

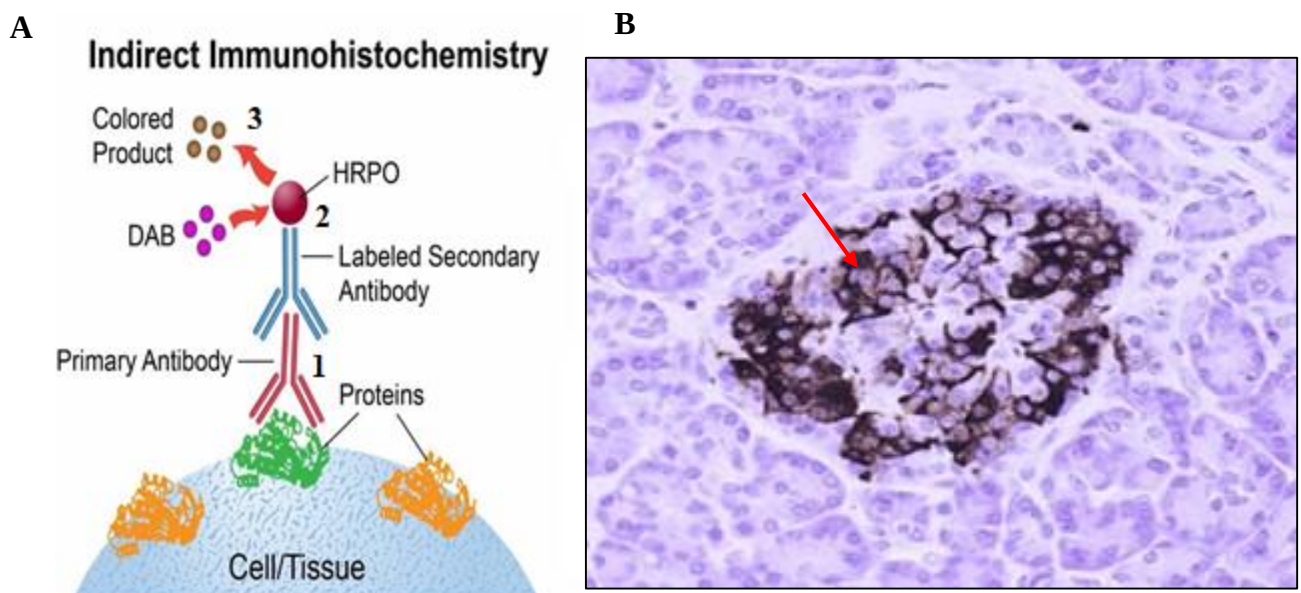


Figure 2. Principe de l'immunohistochimie classique de trois couches faisant appel à : (1) L'anticorps primaire spécifique anti souris reconnaît l'antigène tissulaire recherché. (2) l'anticorps secondaire marqué par l'enzyme (HRP) reconnaît l'anticorps primaire de souris. (3) La réaction entre la HRP et son substrat (DAB) est révélée sous forme d'un précipité brun bien visible <https://www.leinco.com/immunohistochemistry/>. (B) Mise en évidence de l'insuline au niveau des cellules de Langerhans du pancréas de souris. <http://s.martinez.free.fr/V2/biologie/notions/1020-cellule-foie-pancreas.html>.*

TD6. Technique d'isolement des organites cellulaires :

Fractionnement cellulaire

Objectifs

- Décrire les techniques utilisées pour séparer les différents types de cellules et organites.
- Connaître le principe et les types de la centrifugation.

La cellule (animale, végétale ou microbienne) est riche en molécules (macromolécules et micromolécules) et organites. Le fractionnement cellulaire est une méthode utilisée en biologie cellulaire afin d'isoler les organites cellulaires les uns des autres et à les obtenir aussi pure que possible dans des tubes à essais distincts.

Cette technique est considérablement utile tant au plan biochimique : détermination des molécules propre aux organites cellulaires, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Cette technique implique deux étapes :

1. Homogénéisation (Broyage des cellules)

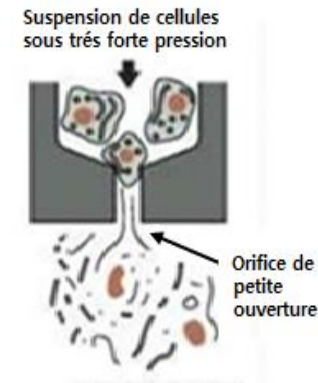
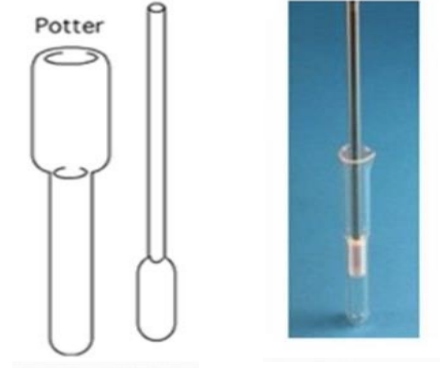
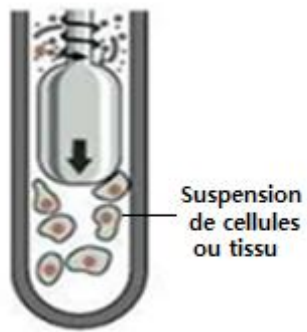
Les cellules isolées ou dissociées des tissus sont placées en suspension dans une solution de pH et de pression osmotique appropriés, puis la membrane cellulaire est rompue. Pour les bactéries, levures et cellules végétales entourées d'une paroi ; des enzymes adéquates sont ajoutées. Les principales techniques d'homogénéisations utilisent (Figure 1) :

- des broyeurs mécaniques comme les homogénéisateurs à piston qui fonctionnent comme des mixeurs, écrasent les cellules entre le piston et la paroi interne du tube. En fonction de leur diamètre, ils dissocient les tissus ou cassent les cellules.
- **presse de French** : faire obliger la suspension cellulaire à passer à travers des ouvertures de dimension inférieure au diamètre des cellules, ce qui entraîne leur destruction par rupture de leurs membranes.
- des ultrasons qui induisent des compressions / décompressions et déstructurent très efficacement les cellules. Ce procédé de cavitation ultrasonore est souvent appelé « sonication »
- **Broyage à bille** : consiste à détruire les cellules par l'action abrasive des billes de verre. Ce type de broyage dégage de la chaleur. Il est nécessaire de travailler à froid.

L'homogénéisation peut se faire également par des méthodes chimique ou biochimique :

- **lyse osmotique** : cette méthode consiste à mettre les cellules dans un milieu hypotonique, ce qui conduit au passage de l'eau vers le milieu intracellulaire par osmose et l'éclatement des cellules, cette technique est efficace avec les cellules animales et sans effet avec les cellules qui ont une paroi cellulaire (bactérie, cellule végétale)
- **lyse enzymatique** : utilisé pour les cellules qui possèdent une paroi cellulaire, dans le cas des cellules végétales on utilise des cellulases qui dégradent la cellulose, dans le cas de la cellule bactérienne on utilise le lysozyme qui dégrade le peptidoglycane et on utilise la trypsine et la collagénase pour se débarrasser de la matrice extracellulaire de cellules animales.
- **Détergeant** : consiste à déstabiliser les membranes, solubilisent les protéines membranaires et forment des amas de lipides dans un solvant aqueux (Figure 2).

Pratiquement, chaque type cellulaire présente des conditions de broyage particulières, toutefois elles doivent tous se faire en baisse température (0-4°C) et le plus vite possible afin de minimiser la dégradation chimique suivant la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés [2].

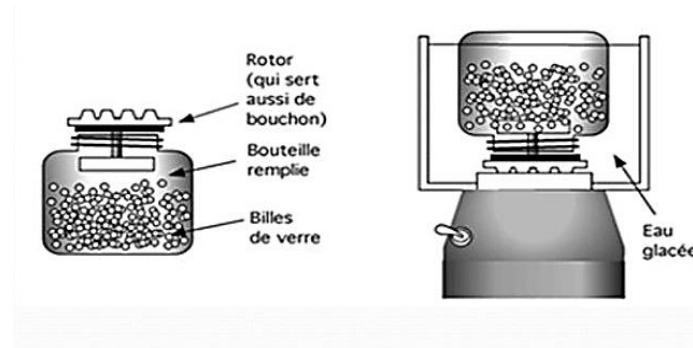


A. Cisaillez les cellules entre un broyeur tournant étroitement adapté et les parois épaisses d'un récipient en verre.

B. Forcer les cellules à passer à travers un petit trou en utilisant une forte pression (presse de French)



C. Fractionner les cellules par des ultrasons à haute fréquence (Sonication).



D. Broyeurs à billes



Figure 1. Différentes méthodes d'homogénéisation des cellules et tissus par la méthode mécanique. (A) (B) La presse de French C. La sonication. . D. broyeur à bille <https://slideplayer.fr/slide/12876379/>.

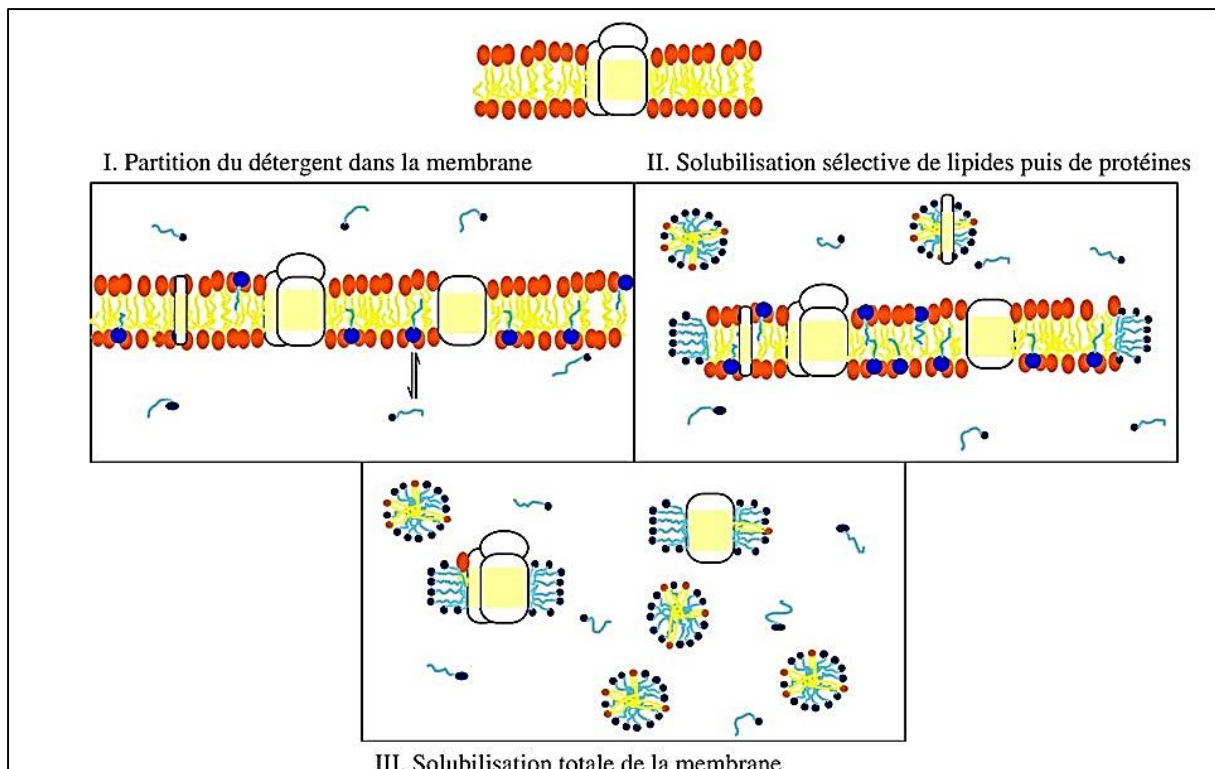


Figure 2 . Solubilisation d'une membrane par un détergent.
<https://docplayer.fr/6014170-Biochimie-des-proteines-membranaires-ou-l-importance-de-la-bonne-concentration-de-detergent.html>

2. Purification par centrifugation

La centrifugation permet de séparer l'homogénat en différentes parties ; elle permet d'isoler les organites selon leur coefficient de sédimentation.

La centrifugeuse est un dispositif qui sépare les particules des suspensions ou même des macromolécules des solutions selon leur taille, leur forme et leur densité. Elle est constituée d'une chambre de centrifugation dans laquelle sort l'axe de rotation, qui est relié au moteur. Sur l'axe on fixe le rotor et dans les emplacements du rotor on met les éprouvettes contenant l'échantillon à centrifuger (Figure 3). La force de la pesanteur est remplacée, dans une centrifugeuse, par une force centrifuge développée le rotor tournant à grande vitesse (6 à 10000 rotation par minute).

Le principal paramètre déterminant la vitesse de sédimentation est la masse, de sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forment le premier sédiment (ou culot) rassemblé au fond du tube à centrifuger, le liquide surnageant contenant les plus petites et les plus légères. Le surnageant et le culot sont séparés par décantation (Figure 3 C).

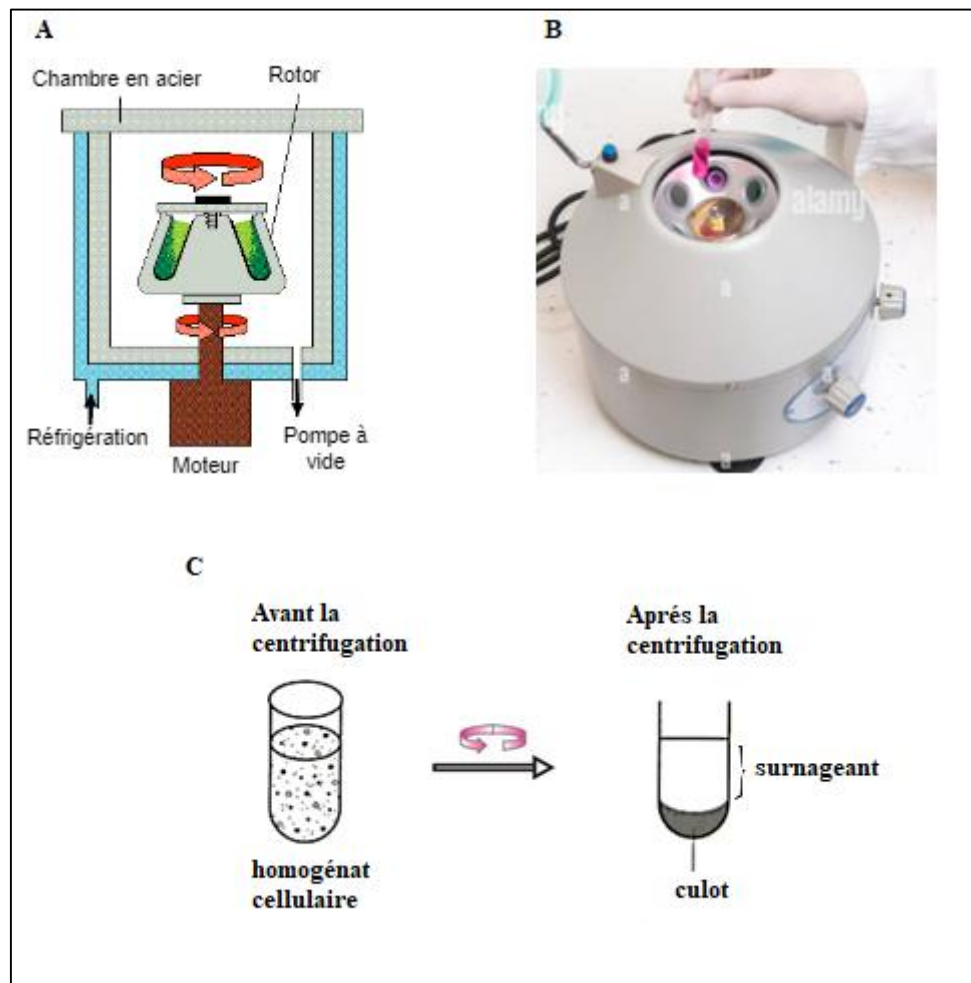


Figure 3. La centrifugation. (A et B) centrifugeuses (C) Séparation des constituants de l'homogénat cellulaire après centrifugation : le culot comporte les composants les plus gros et les plus denses, le surnageant comporte les composants les plus petits et les moins denses [10].

2.1. Centrifugation différentielle (à vitesse croissante)

Les particules sédimentent à une vitesse donnée, en fonction de leur taille et leur densité, dans le tampon d'homogénéisation. Le procédé de purification des composants cellulaires peut être réalisé en plusieurs étapes, le surnageant étant à chaque fois centrifugé plus vite et plus longtemps (Figure 4).

- A 600g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette
- A 15 00g, pendant 20 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes
- A 100 000g, pendant 60 minutes on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.

- A 300 000g, pendant 2heures on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

2.2.Centrifugation sur gradient de densité

Afin de séparer les organites contenus dans un même culot (car même coefficients de sédimentation), on pratique la centrifugation sur gradient de densité. Cette technique de séparation consiste à déposer l'échantillon (un culot) 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 différents constituants atteignent une position dont ils ne vont plus bouger, car étant en équilibre, or l'équilibre est atteint lorsque la densité d'une particule est égale à la densité du solvant, dans ce cas la vitesse de sédimentation ne doit pas intervenir. Il est donc nécessaire de laisser le temps aux particules d'atteindre leur position d'équilibre, ce qui implique des temps de centrifugation assez longs. Bien entendu, les particules les moins denses peuvent se retrouver au sommet du tube et les particules les plus denses peuvent former un culot. Le contenu du tube peut être récupéré (en perçant le tube) par fractions successives, souvent du bas vers le haut, pour utilisation et/ou analyse ultérieure (Figure 10).

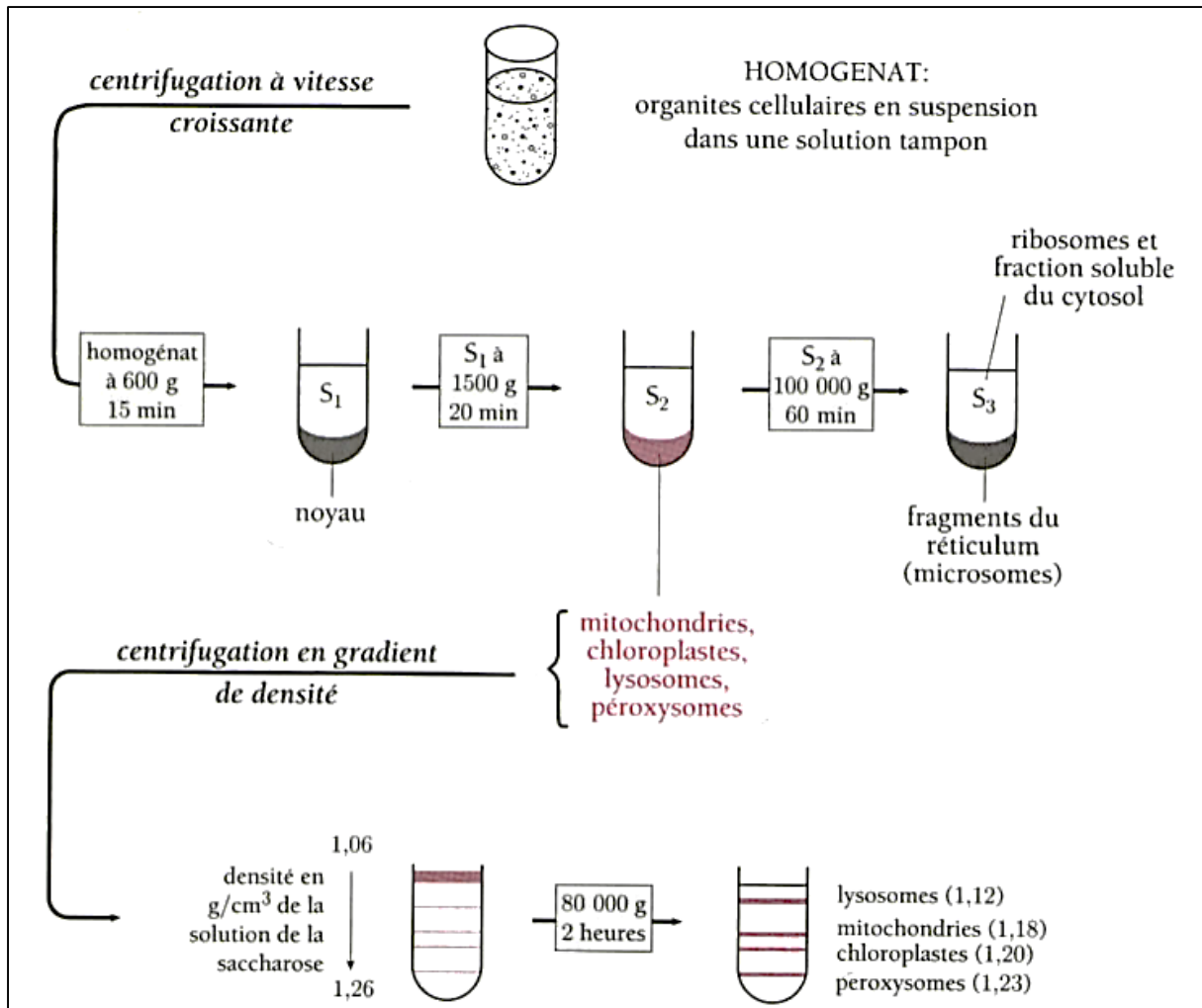


Figure 4 : Purification par centrifugation différentielles (à vitesse croissante) et centrifugation sur gradient de densité [10].

TD7. Techniques de mise en évidence du mouvement latéral des protéines

Objectif

- Montrer à travers des expériences, la dynamique de la membrane cellulaire.

Comme les lipides, les protéines membranaires sont capables de se déplacer latéralement (diffusion latérale). La première preuve directe de la mobilité de certaines protéines dans le plan de la membrane fut apportée par des expériences utilisant des cellules hybrides qui étaient produites artificiellement en fusionnant des cellules de souris et des cellules humaines.

I. Modèle de la mosaïque en fluide des membranes

Les membranes biologiques représentent un élément fondamental de l'organisation cellulaire. Elles assurent l'individualité cellulaire et sont responsables de la compartimentation de l'espace cytoplasmique en organites fonctionnellement spécialisés ainsi que des échanges contrôlés entre l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire.

Ces membranes sont loin d'être des enveloppes inertes. Le modèle de « mosaïque fluide » a été introduit en 1972 par Singer et Nicolson. Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant constituées d'une double couche de phospholipides, dans laquelle les chaînes hydrophobes se font face, traversées par des protéines membranaires (Figure 1) [12].

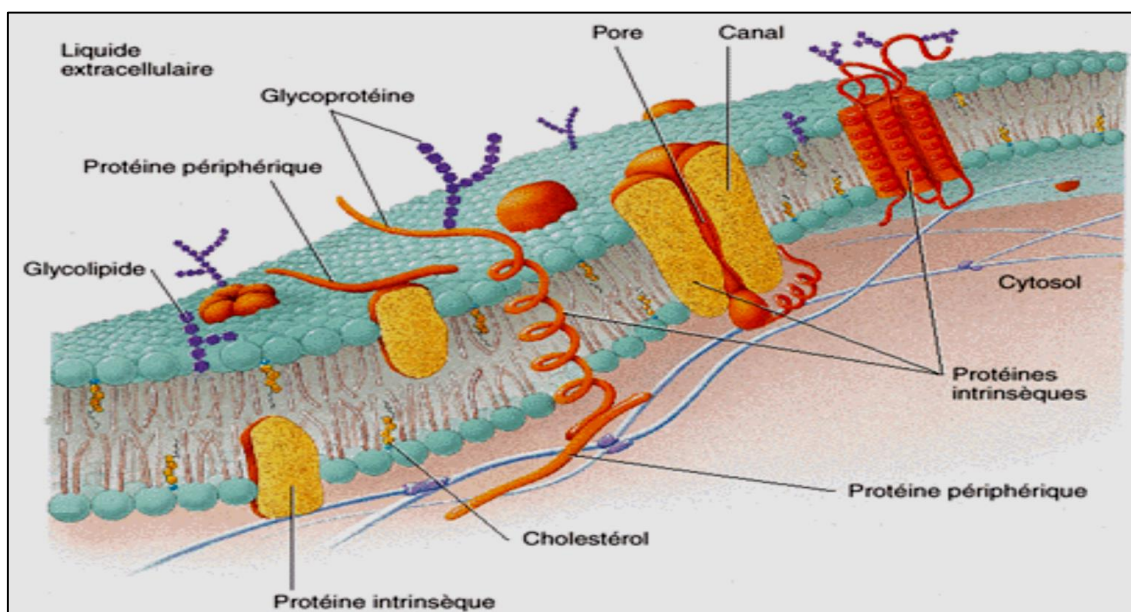


Figure 1. Représentation schématique d'une membrane plasmique (Modèle mosaïque fluide de l'architecture moléculaire de la membrane plasmique) [12].

- **Historique sur les premiers modèles d'organisation membranaire**

Dès la découverte de l'existence d'une membrane entourant les cellules, vers la fin du XIX^e siècle, plusieurs modèles d'organisation membranaire ont été proposés prenant en compte la composition connue (ou supposée) en lipides et en protéines. Citons notamment Charles Overton qui détermina les lipides comme étant la composante majoritaire des membranes en 1895. En 1925, Gorter et Grendel ont imaginé une structure en bicouche des lipides, mais qui ne considérait pas l'existence de protéines. Dix ans plus tard Danielli et Davson rajoutaient de chaque côté de cette bicouche une épaisseur de protéines, établie alors comme le second constituant des membranes. Dans les années 1950, la microscopie électronique a permis de visualiser la membrane plasmique. L'épaisseur (environ 6 nm) ainsi que l'aspect des membranes observées (deux couches foncées entourant un centre plus clair) semblaient cohérents avec la proposition de Danielli et Davson et ont assuré la pérennité de ce modèle jusqu'à la fin des années 1960.

En 1970, la technique de cryofracture appliquée à différents types de membranes (Bayer, 1970 ; Wrigglesworth, 1970) met en évidence la présence de protéines enchâssées, et commence à mettre à mal ce modèle. La même année, Frye et Edidin démontrent la diffusion des constituants membranaires et ajoutent ainsi la notion de dynamique des composants de la membrane (Frye, 1970). En se basant sur ces travaux, Singer et Nicolson présentent un nouveau modèle de membrane dite *en mosaïque fluide* (Singer, 1972). Dans ce modèle, les protéines sont supposées se déplacer sans contrainte dans le plan de la bicouche lipidique [13].

II. Techniques mettant en évidence la diffusion latérale des protéines membranaires.

1. Technique de fusion cellulaire (Expérience de Frye et Edidin, 1970)

Les premières expériences destinées à prouver que les protéines membranaires peuvent se déplacer dans le plan vertical de la membrane ont utilisé la fusion cellulaire et les résultats ont été publiés en 1970 par Frye et Edidin . Ils ont pu créer des hybrides cellulaires ou hétérocaryons en fusionnant une cellule humaine avec une cellule de souris pour former une seule cellule avec une membrane plasmique continue et contenant des protéines membranaires humaines et de souris. Pour suivre de la répartition des protéines membranaires, soit de souris, soit humaines à différents moments après la fusion, ils ont préparé des anticorps marqués par des fluorochromes distincts contre l'un ou l'autre type de protéine [7]..

Le procédé expérimental s'est déroulé comme suit (Figures 2 et 3) :

a. Préparation et marquage des anticorps

A partir de cellules de souris blanches, on prépare un sérum anticellules de souris blanches enfermant des anticorps (Ac) anti-membrane plasmique de souris blanches. Ces Ac produits par une souris grise sont ensuite marqués à la fluorcéine. De la même manière à partir de cellule humaines on prépare un sérum anticellules humaines qui renferme des Ac anti-membrane plasmiques humaines. Ces Ac produits par le lapin sont ensuite marqués à la rhodamine.

b. Préparation des hétérocaryons

On provoque la fusion entre cellules de souris et cellules humaines. On utilise pour cela des particules de virus Sendai qui s'attache aux membranes cellulaires entraînant leur fusion. Ils se forment ainsi des hétérocaryons contenant chacun un noyau de souris et un noyau humain.

c. Marquage des membranes hybrides

On ajoute aux hétérocaryons au temps $t=0mn$, un mélange des Ac marqués de la première étape. Ces derniers s'accrochent aux protéines antigéniques membranaires. L'observation au microscope à fluorescence permet de localiser l'emplacement des complexes (Ag membranaires –Ac) marqués, en effet en utilisant des filtres appropriés, on observe soit de la fluorescence verte de la fluorcéine soit de la fluorescence rouge de la rhodamine. **5 minutes** après la fusion, les Ac membranaires de type souris sont localisés à la surface d'un hémisphère de l'hétérocaryon et les Ac membranaires de type humain à la surface de l'autre hémisphère. **40 minutes** après la fusion, la membrane est dite hybride ; elle contient un mélange Ag-Ac humain et Ag-Ac souris. Ce résultat ne peut s'expliquer que par l'existence d'une diffusion latérale des protéines [7].

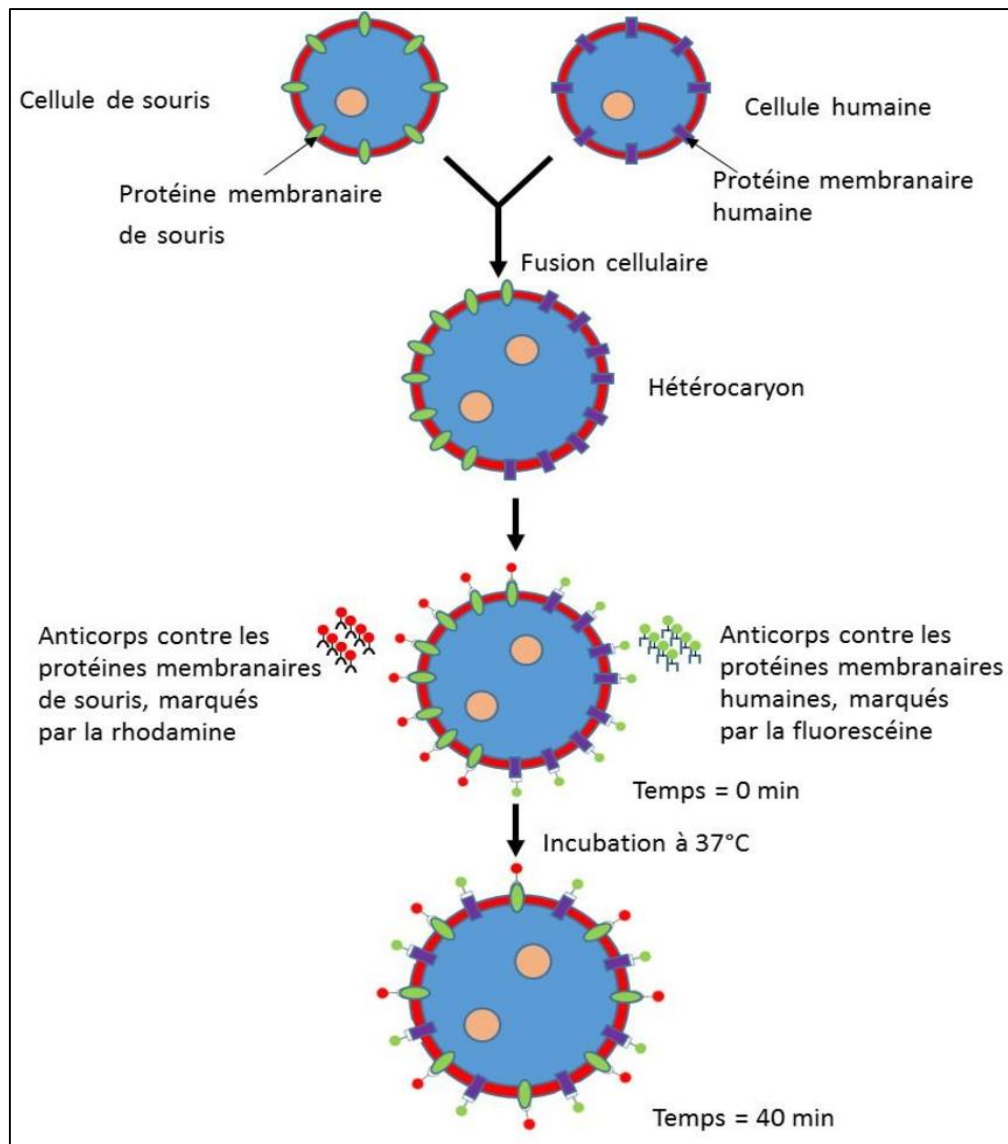


Figure 2. Utilisation de la fusion cellulaire pour mettre en évidence la mobilité des protéines membranaires <https://www.semanticscholar.org/paper/Etude-de-la-perm%C3%A9abilisation-de-la-membrane-et-des-M%C3%A9norval/237cfbf033eaca221963286354e680845c7dcde6>

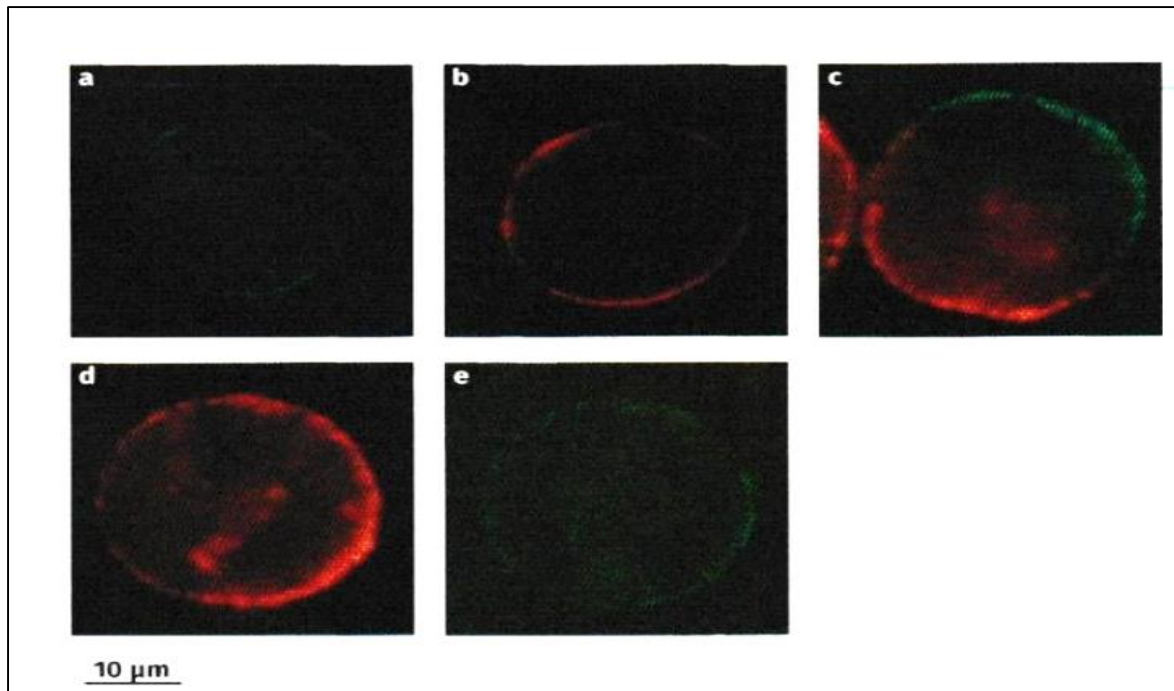


Figure 3. Technique de fusion cellulaire (expérience de Frye et Edidin, 1970). de (a) cellule de souris marquée . (b) cellule humaine marquée. (c) cellule hybride. (d et e) même cellule hybride 40 minutes après . Des filtres différents sont utilisés pour laisser passer uniquement la fluorescence rouge (d) ou verte (e). (https://rodriguezgeologie.files.wordpress.com/2019/09/les-membranes-cellulaires_seance2.pdf)

2. Technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching)

La technique de FRAP est utilisée depuis 1976 pour la mesure de la mobilité de molécule fluorescente à l'échelle microscopique. Sa version basique utilise un simple faisceau laser. Elle consiste à illuminer fortement une région de l'échantillon de façon à photoblanchir les molécules fluorescentes situées dans cette région puis à observer avec une puissance d'excitation beaucoup plus faible, l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Si les molécules sont mobiles, celles qui restées hors de la zone d'exposition vont diffuser dans la zone blanchie et *vice-versa* , ce qui va conduire à un recouvrement de la fluorescence dans la région observée [12].

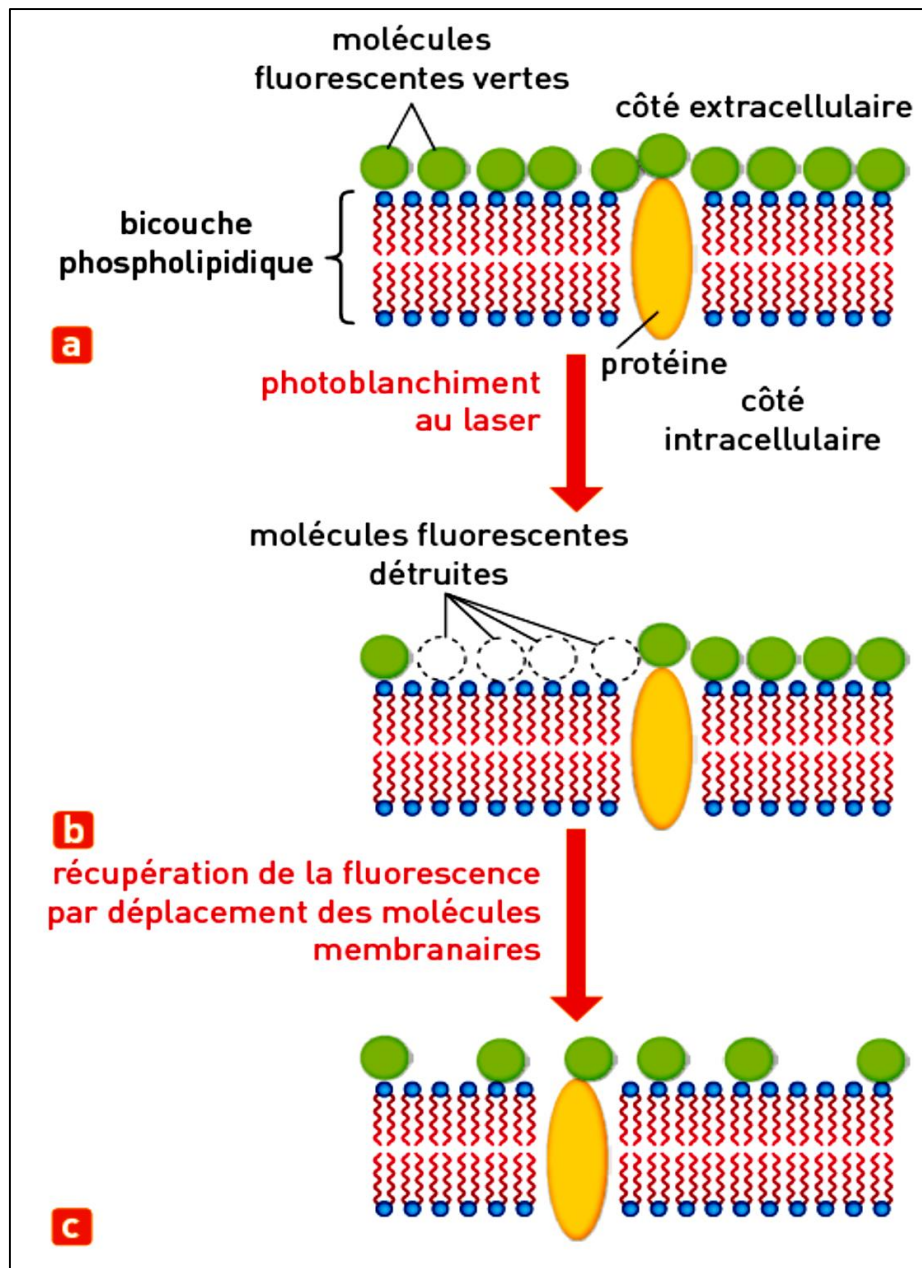


Figure 4 : Technique de FRAP appliquée sur une membrane biologique. (a) Avant l'expérience, la fluorescence est partout. **b.** À $t = 0$ min, la fluorescence est détruite à l'aide d'un laser dans la zone arrondie qui devient sombre. **c.** À $t = 2$ min, la fluorescence est revenue dans la zone traitée au laser. Des molécules (phospholipides et protéines) fluorescentes sont venues dans la zone traitée qui redevient fluorescente. Plus le temps passe, plus la zone redevient fluorescente.

Les molécules ne sont pas statiques dans la membrane. Elles bougent les unes par rapport aux autres, ce qui explique un rééquilibrage de la fluorescence dans la zone traitée. On parle de « mosaïque fluide » <https://bordas.fr/9782047336908/assets/partie-1--corrigé-détail-exercice-7/preview>.

Exercices d'application

Question 1

Répondez par vrai (V) ou par faux (F) aux affirmations suivantes :

	Dans le microscope photonique, le condenseur permet de concentrer la lumière sur l'objet.
	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de l'angstrom $\text{\AA}$.
	L'échantillon n'est jamais traversé par les électrons dans le microscope électronique à transmission (MET).
	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser .
	Le microscope confocal nécessite l'utilisation des rayonnements X.
	En microscopie photonique, la lentille la plus proche de l'objet est l'objectif.
	Dans le microscope électronique à transmission (MET), les lentilles de verre focalisent les électrons sur l'échantillon.
	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope , il correspond à la moitié de la distance entre 2 points distincts de l'objet observé.
	Le microscope optique permet généralement de discerner clairement la forme des atomes et molécules.
	La colonne du microscope électronique à transmission doit être sous vide.
	La technique de cryodécapage permet d'apprécier la distribution des protéines membranaires.
	En microscopie électronique à balayage, les électrons balaient la surface de l'échantillon mais ne le traversent pas
	Dans la microscopie optique, l'échantillon observé est traversé par des électrons.
	La limite de résolution du microscope optique est $20\text{ }\mu\text{m}$.
	Le microscope électronique à balayage (MEB) nécessite des coupes plus fines qu'en microscope à transmission.
	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des cellules vivantes, non colorées peuvent être observées.
	La source lumineuse est fournie par un laser dans un microscope confocal.
	Le microscope optique permet généralement de discerner clairement la forme des cellules animales et végétales.
	Le microscope électronique à transmission (MET) permet d'observer l'ultrastructure de la cellule et de ses organites.
	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope. . Il correspond au produit de grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif.
	Dans la technique de cryodécapage, l'échantillon est congelé à très basse température .
	Le microscope à fluorescence est basé sur la détection des électrons émis par l'échantillon observé.
	Le microscope électronique à balayage permet d'explorer la surface d'un échantillon.
	L'objectif permet un grossissement supplémentaire de l'image projetée par l'oculaire.
	Les lentilles électromagnétiques font partie intégrante du microscope à fluorescence.
	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de $0,2\text{nm}$.
	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser.
	Le microscope à contraste de phase est un microscope électronique.
	En microscopie photonique, la lentille la plus proche de l'objet est l'oculaire.
	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope. , il correspond à la distance à partir de laquelle 2 points séparés apparaissent distincts.
	Le microscope électronique permet généralement de discerner clairement la forme des atomes et molécules.

	Le microscope électronique à balayage produit une image de la structure tridimensionnelle de la surface de l'échantillon.
	Contrairement au microscope photonique classique, le microscope à fluorescence possède un système qui filtre la lumière avant qu'elle n'atteigne l'échantillon.
	La limite de résolution du microscope optique est 200 μm .
	La technique de cryodécapage est utilisée pour une observation au microscope électronique à balayage.
	Un ultramicrotome est utilisé lors de la préparation des échantillons pour la microscopie photonique.
	Un système de refroidissement est une exigence dans un microscope électronique.
	Le microscope électronique à transmission (MET) permet une reconstitution en 3D de l'image
	La source lumineuse est fournie par des photons dans un microscope confocal.
	Pour le microscope électronique à balayage (MEB), la surface de l'échantillon est recouverte d'une couche de métal
	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de l'angstrom $\text{\AA}$.
	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser .
	Le microscope confocal nécessite l'utilisation des rayonnements X.
	Les métaux lourds sont utilisés pour le contraste en microscopie électronique à transmission.
	Le microscope électronique à balayage utilise un rayon laser fin qui balaye la surface de l'échantillon.

Question 2

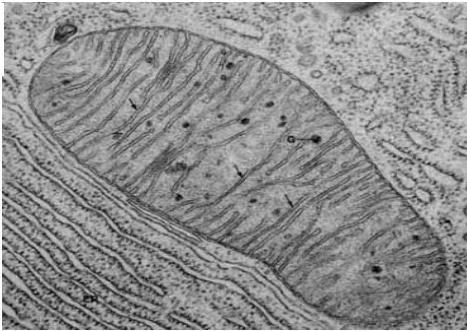
Répondez aux questions suivantes :

- Donnez l'ordre exact du chemin optique dans le microscope photonique ?
- Comment peut-on connaître le grossissement avec lequel on observe un objet en microscopie photonique ?
- Quelle différence y a-t-il entre microtome et ultramicrotome ?
- Quel est l'intérêt de la coloration aux métaux lourds dans la microscopie électronique à transmission ?

Question 3.

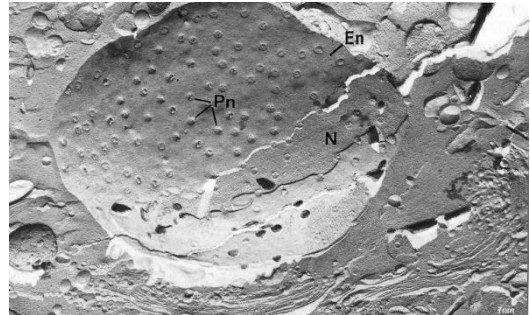
1- Avec quel type de microscope ces images ont-elles été produites et avec quelle technique ?

A



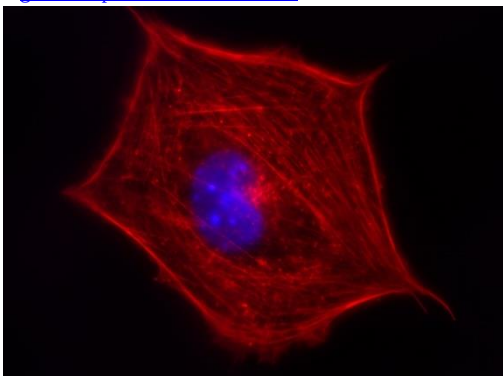
<https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/vie-aconitase-garde-corps-mitochondrie-5475/>

B



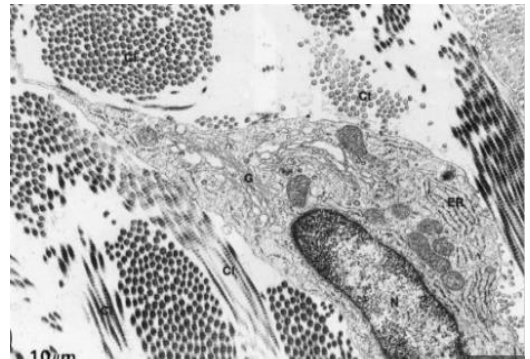
<http://raymond.rodriquez1.free.fr/Textes/1s13.htm>

C



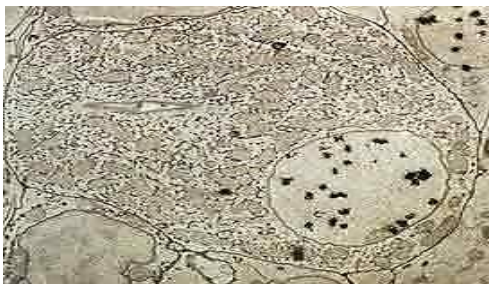
<http://www.lenaturaliste.net/portail/articles-des-membres/5-techniques-diverses/69-marquages-fluorescents-dans-des-fibroblastes-de-souris>

D



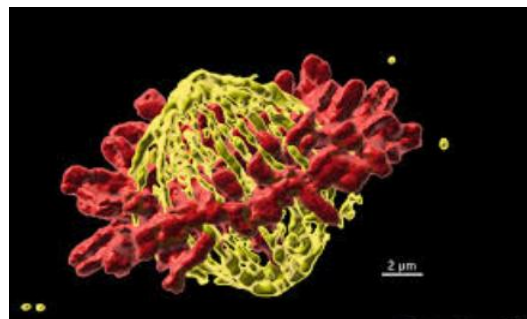
<https://docplayer.fr/21184019-Histologie-generale-les-tissus-conjonctifs-de-soutien.html>

E



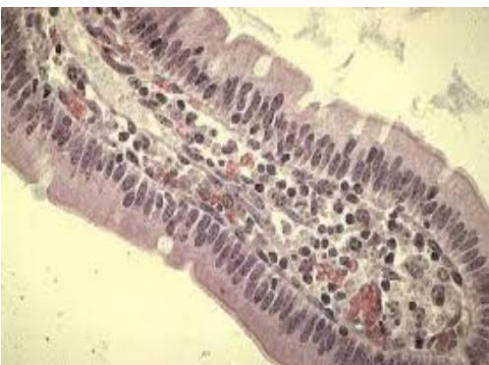
<http://site.svttenligne.fr/spip.php?article24>

F



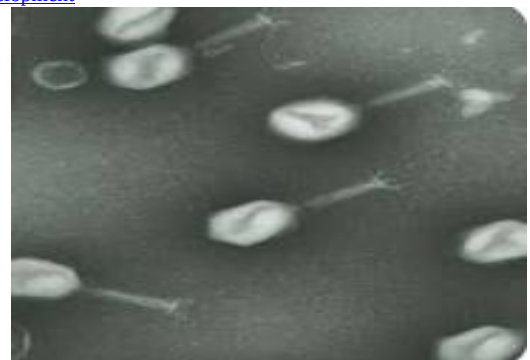
<https://andor.oxinst.com/learning/view/article/using-confocal-microscopy-to-understand-cell-division-and-cancer-development>

G



<http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20CATHO%20LOUVAIN/istospec/safe/dig56.htm>

H



<https://docplayer.fr/amp/9432299-Microscopie-electronique-en->

Question 4

-Cochez la (les) réponse(s) juste(s)

• **L'observation d'un échantillon au microscope optique à fond clair nécessite:**

- a. Dans l'ordre: prélèvement, déshydratation, fixation puis inclusion.
- b. Une inclusion dans la résine.
- c. La vaporisation d'une couche de platine sur la surface de la préparation.
- d. Une inclusion dans la paraffine après la déshydratation

• **A propos de la technique des répliques :**

- a. La sublimation est réalisée après la cryofracture.
- b. La sublimation est réalisée après l'ombrage métallique.
- c. Elle permet l'étude des surfaces internes.
- d. Les coupes des échantillons doivent être très fines.

• **Parmi les produits suivants, lesquels sont utilisés comme fixateur des tissus ?**

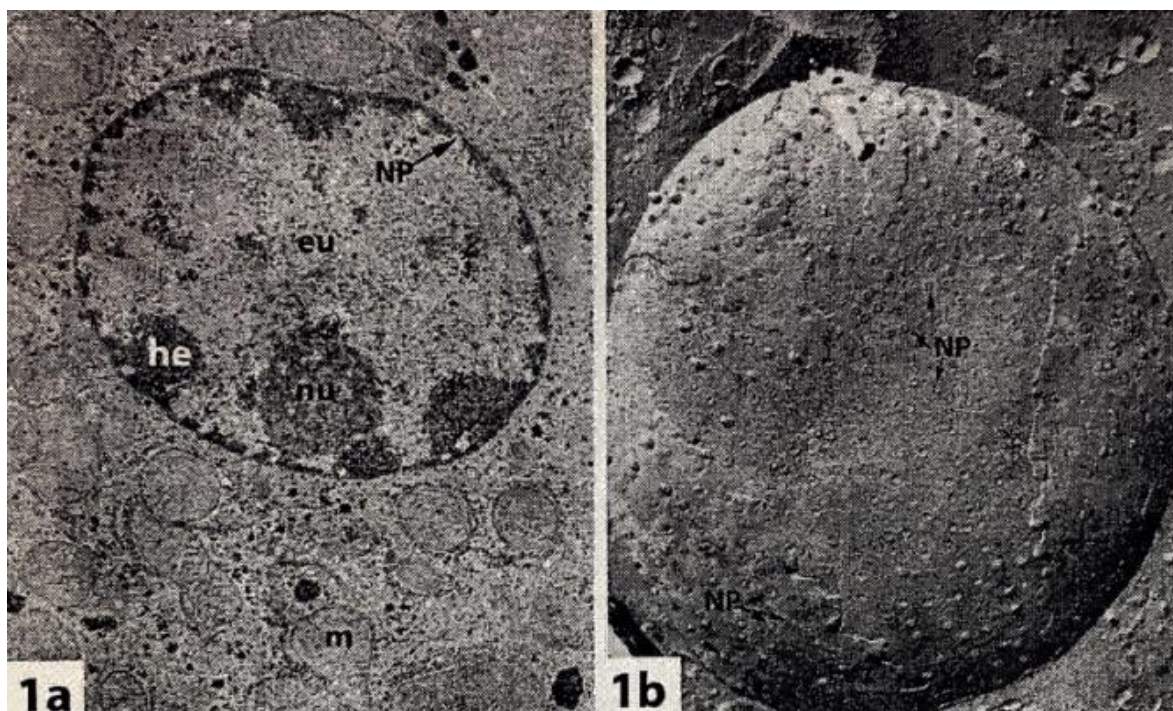
- a. L'acétate d'uranyle.
- b. L'araldite.
- c. Le formol.
- d. Le glutaraldéhyde.
- e. Le xylène.

• **Dans la technique dite d'immunofluorescence, le second anticorps employé doit être :**

- a. produit par la même espèce qui a fourni le premier anticorps.
- b. marqué par un fluorochrome afin de pouvoir être décelé.
- c. dirigé contre le constituant cellulaire à étudier.
- d. spécifiquement dirigé contre le premier anticorps.

Question 5

Un fragment de rein de rat est prélevé pour réaliser une observation du noyau d'une cellule épithéliale en microscopie électronique (micrographie 1a). Un autre fragment est congelé, puis une cryofracture est réalisée (micrographie 1b). Les cellules en 1a et 1b sont de la même population cellulaire. **NP** : pores nucléaires ; **eu** : euchromatine ; **he** : hétérochromatine ; **m** : mitochondrie ; **nu** : nucléole.



-Donnez un titre complet à chaque micrographie en précisant le type de microscope utilisé ainsi que la technique de microscopie.

Corrigé

1)

V	Dans le microscope photonique, le condenseur permet de concentrer la lumière sur l'objet.
V	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de l'angstrom $\text{\AA}$.
F	L'échantillon n'est jamais traversé par les électrons dans le microscope électronique à transmission (MET).
F	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser .
F	Le microscope confocal nécessite l'utilisation des rayonnements X.
V	En microscopie photonique, la lentille la plus proche de l'objet est l'objectif.
F	Dans le microscope électronique à transmission (MET), les lentilles de verre focalisent les électrons sur l'échantillon.
F	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope , il correspond à la moitié de la distance entre 2 points distincts de l'objet observé.
F	Le microscope optique permet généralement de discerner clairement la forme des atomes et molécules.
V	La colonne du microscope électronique à transmission doit être sous vide.
V	La technique de cryodécapage permet d'apprécier la distribution des protéines membranaires.
V	En microscopie électronique à balayage, les électrons balaient la surface de l'échantillon mais ne le traversent pas
F	Dans la microscopie optique, l'échantillon observé est traversé par des électrons.
F	La limite de résolution du microscope optique est $20\text{ }\mu\text{m}$.
F	Le microscope électronique à balayage (MEB) nécessite des coupes plus fines qu'en microscope à transmission.
V	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des cellules vivantes, non colorées peuvent être observées.
V	La source lumineuse est fournie par un laser dans un microscope confocal.

V	Le microscope optique permet généralement de discerner clairement la forme des cellules animales et végétales.
V	Le microscope électronique à transmission (MET) permet d'observer l'ultrastructure de la cellule et de ses organites.
F	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope. Il correspond au produit de grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif.
V	Dans la technique de cryodécapage, l'échantillon est congelé à très basse température.
F	Le microscope à fluorescence est basé sur la détection des électrons émis par l'échantillon observé.
V	Le microscope électronique à balayage permet d'explorer la surface d'un échantillon.
F	L'objectif permet un grossissement supplémentaire de l'image projetée par l'oculaire.
F	Les lentilles électromagnétiques font partie intégrante du microscope à fluorescence.
V	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de 0,2nm.
F	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser.
F	Le microscope à contraste de phase est un microscope électronique.
F	En microscopie photonique, la lentille la plus proche de l'objet est l'oculaire.
V	Le pouvoir de résolution est l'une des caractéristiques physiques importantes d'un microscope, il correspond à la distance à partir de laquelle 2 points séparés apparaissent distincts.
V	Le microscope électronique permet généralement de discerner clairement la forme des atomes et molécules.
V	Le microscope électronique à balayage produit une image de la structure tridimensionnelle de la surface de l'échantillon.
V	Contrairement au microscope photonique classique, le microscope à fluorescence possède un système qui filtre la lumière avant qu'elle n'atteigne l'échantillon.
F	La limite de résolution du microscope optique est 200 μm .
V	La technique de cryodécapage est utilisée pour une observation au microscope électronique à balayage.
F	Un ultramicrotome est utilisé lors de la préparation des échantillons pour la microscopie photonique.
V	Un système de refroidissement est une exigence dans un microscope électronique.
F	Le microscope électronique à transmission(MET) permet une reconstitution en 3D de l'image
F	La source lumineuse est fournie par des photons dans un microscope confocal.
V	Pour le microscope électronique à balayage (MEB), la surface de l'échantillon est recouverte d'une couche de métal
V	Le pouvoir de résolution d'un microscope électronique est de l'ordre de l'angstrom $\text{\AA}$.
F	Dans la technique de microscopie à contraste de phase, des coupes optiques sont réalisées à l'aide d'un laser.
F	Le microscope confocal nécessite l'utilisation des rayonnements X.
V	Les métaux lourds sont utilisés pour le contraste en microscopie électronique à transmission.
F	Le microscope électronique à balayage utilise un rayon laser fin qui balaye la surface de l'échantillon.

2)

-L'ordre exact du chemin optique dans le microscope photonique

- Source lumineuse
- Lentille du condenseur.
- Echantillon.
- Lentille objectif.

e. Lentille oculaire.

-Comment peut-on connaître le grossissement avec lequel on observe un objet en microscopie photonique ?

En multipliant le grossissement indiqué sur l'oculaire (exemple : $\times 10$) avec celui de l'objectif utilisé (exemple : $\times 40$) : dans ce cas le grossissement final de l'objet est de 400 fois.

-Différence entre microtome et ultramicrotome :

Les microtomes (couteaux métalliques) sont utilisés pour la microscopie photonique : ils réalisent des coupes (échantillons inclus en paraffine ou congelés) d'environ 2 à 20 μm . Les ultramicrotomes (couteaux de verre ou diamant) sont utilisés pour la microscopie électronique à transmission (échantillons inclus en résine) : ils réalisent des coupes semi-fines (0,5 à 1 μm) ou ultra-fines (environ 50nm).

4-Quel est l'intérêt de la coloration aux métaux lourds dans la microscopie électronique à transmission ?

Dans la microscopie électronique à transmission, le contraste dépend du nombre atomique des atomes qui se sont associés au matériel que l'on veut étudier ; plus le nombre atomique est élevé, plus les électrons sont dispersés et plus fort est le contraste. Les coupes sont contrastées par exposition à des sels de métaux lourds (par exemple double imprégnation par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb).

3)

Type de microscope	Technique
A et D : Microscope électronique à transmission	Coupes minces
B : Microscope électronique à balayage	Cryodécapage
C : Microscope à fluorescence	Immunofluorescence
E : Microscope électronique à transmission	Autoradiographie
F : Microscope confocal	Immunofluorescence
G : Microscope photonique	Coupe histologique
H : Microscope électronique à transmission	Coloration négative

4)

L'observation d'un échantillon au microscope optique à fond clair nécessite :

Faux. a. Dans l'ordre: prélèvement, déshydratation, fixation puis inclusion.

Faux. b. Une inclusion dans la résine.

Faux. c. La vaporisation d'une couche de platine sur la surface de la préparation.

Vrai. d. Une inclusion dans la paraffine après la déshydratation

A propos de la technique des répliques :

Vrai. a. La sublimation est réalisée après la cryofracture.

Faux. b. La sublimation est réalisée après l'ombrage métallique.

Vrai. c. Elle permet l'étude des surfaces internes.

Faux. d. Les coupes des échantillons doivent être très fines.

Parmi les produits suivants, lesquels sont utilisés comme fixateur des tissus ?

Vrai. a. L'acétate d'uranyle.

Faux. b. L'araldite.

Vrai. c. Le formol.

Vrai. d. Le glutaraldéhyde.

Faux. e. Le xylène.

Dans la technique dite d'immunofluorescence, le second anticorps employé doit être :

Faux. a. produit par la même espèce qui a fourni le premier anticorps.

Vrai. b. marqué par un fluorochrome afin de pouvoir être décelé.

Faux. c. dirigé contre le constituant cellulaire à étudier.

Vrai. d. spécifiquement dirigé contre le premier anticorps.

5)

Micrographie1a : micrographie montrant le noyau d'une cellule épithéliale rénale de rat observé au microscope électronique à transmission technique de coupes minces.

Micrographie1b micrographie montrant le noyau d'une cellule épithéliale rénale de rat observé au microscope électronique à balayage technique de cyodécapage.

Conclusion

L'étude de la biologie cellulaire représente une bonne entrée à la connaissance du monde du vivant. En savoir plus sur les cellules est absolument indispensable afin de savoir comment fonctionnent les organismes et de comprendre le fonctionnement de la vie.

Les méthodes et les techniques de biologie cellulaire, décrites dans ce document représentent la base de la cyto_histologie fonctionnelle et pathologique.

Il est indispensable qu'un étudiant en biologie cellulaire soit capable de faire le lien entre la morphologie et fonctionnement de la cellule, entre l'ultrastructure de la cellule et son aspect en microscopie optique, acquise un comportement actif dans la description des micrographies, dans l'analyse au microscope, une curiosité intellectuelle et une ouverture d'esprit qui lui permettront d'intégrer les notions de la cytologie dans les autres disciplines. Il est indispensable de connaître d'autres techniques de plus en plus sophistiquées.

BIBLIOGRAPHIE

1. AUGERE B., DARRIBERE T., DUPIN J M., ESCUYER C. Biologie tout en un. Edition Dunod 1^{ère} Ed. 738p.
2. BASSAGLIA Y., 2001- Biologie Cellulaire. Edition Maloine. 2^{ème} Ed. 198p.
3. BENDJELLOUL M., 2019- La cellule et sa physiologie. Office des Publications Universitaires. 290p.
BONELLO K., FIGONI H., 2014. Biologie cellulaire. Edition VG. 339p.
4. BRAY A., JOHNSON H., RAFF L., WALTER R. 2012. L'essentiel de la biologie cellulaire. Edition Lavoisier. 3^{ème} Ed. 731p.
5. CAILLIEZ J.C.. 2011. La biologie cellulaire en 1001 QCM et QROC. Edition ellips. 2^{ème} Ed. 236p.
6. CORNEC J. P ., 2014- La cellule eucaryote .Edition de boeck. 308 p.
7. DEKAR A., BENZIN-CHALLAM H., 2017- L'essentiel en biologie cellulaire. Office des Publications Universitaires 3^{ème} Edition. 213p.
8. GENTON C.Y. L'immunohistochimie Son principe, ses applications et ses limites. (2006). *Clin. Mother. Child .Health*. 3 (1): 477-481.
9. Jamieson J., Palade G. (1967). Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. *The journal of cell biology*. (34)/ 597-615.
10. Petit J.M., Arico S., Julien R. 2013. Manuel de biologie cellulaire. Edition Dunod. 3^{ème} Ed. 229p.
11. TOURTE M., 2011- BIOLOGIE CELLULAIRE. Edition DUNOD. 3^{ème} Ed. 247p.
12. Frédéric HARB , **"Etude d'un système biomimétique simple : diffusion brownienne et mobilité électrophorétique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée"**, Thèse de doctorat en Biophysique, sous la direction de Bernard TINLAND, Marseille, Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille.
13. Aude Karine Sauliere, **"Etapas membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G : organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humain à la surface de neuroblastomes"**, Thèse de doctorat en Biophysique, sous la direction Laurence SALOME, Ecole Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies, université de Toulouse III, 2007, 201p.

Sites consultés

- <http://docplayer.fr/115886626-Acide-amine-radioactif-autoradiographie-conclusion-partielle.html>.
- http://ekladata.com/xzhXwp5czxyv_qVe1DZLuU2s_b8.pdf.
- <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-centrifugation>
- <https://biologie-maroc.com/le-fractionnement-cellulaire/>.
- Définition | Microscope en fluorescence | Futura Santé (futura-sciences.com).
- <http://s.martinez.free.fr/V2/biologie/notions/1020-cellule-foie-pancreas.html>.
- <https://studylibfr.com/doc/10035855/techniques-d-e%CC%81tude-en-biologie-mole%CC%81culaire>
- <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/using-confocal-microscopy-to-understand-cell-division-and-cancer-development>
- <https://docplayer.fr/amp/9432299-Microscopie-electronique-en->
- <http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20CATHO%20LOUVAIN/istospec/safe/dig56.htm>
- <http://site.svtenligne.fr/spip.php?article24>
- <https://docplayer.fr/21184019-Histologie-generale-les-tissus-conjonctifs-de-soutien.html>
- <http://www.lenaturaliste.net/portail/articles-des-membres/5-techniques-diverses/69-marquages-fluorescents-dans-des-fibroblastes-de-souris>
- <http://raymond.rodriquez1.free.fr/Textes/1s13.htm>
- <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/vie-aconitase-garde-corps-mitochondrie-5475/>
- <https://www.leinco.com/immunohistochemistry>
- <http://s.martinez.free.fr/V2/biologie/notions/1020-cellule-foie-pancreas.html..>
- <http://docplayer.fr/115886626-Acide-amine-radioactif-autoradiographie-conclusion-partielle.html>
- http://www.lyc-claudel-vaurel.ac-versailles.fr/IMG/pdf/Les_techniques_de_laboratoire_-_l_autoradiographie.pdf.
- https://lewebpedagogique.com/bouchaud/files/23_1ES_ULHM3_expose.pdf.
- <http://raymond.rodriquez1.free.fr/Textes/1s13.htm>.
- <https://fr.slideshare.net/liamaniouafia/technique-de-cryodcapage>
- https://www.editionsellipses.fr/index.php?controller=attachment&id_attachment=44983
- <http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20CATHO%20LOUVAIN/istospec/safe/dig56.htm>
- <https://www.studocu.com/fr/document/universite-de-lille/biologie-cellulaire-1/td2-partie-1-colorations-cytologiques-et-reactions-cytochimiques/8178911>.
- <https://studylibfr.com/doc/476087/protocole-d-observation-des-cellules-d-oignon-rouge>
- <https://www.diagomics.com/immunohistochemie>
- <http://lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20CATHO%20LOUVAIN/istospec/safe/dig56.htm>
- <https://slideplayer.fr/slide/12876379/>.

- <https://docplayer.fr/6014170-Biochimie-des-proteines-membranaires-ou-l-importance-de-la-bonne-concentration-de-detergent.html>.
- <https://slideplayer.fr/slide/509358/>.
- <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/freeze-fracture>.
- <https://www.semanticscholar.org/paper/Etude-de-la-perm%C3%A9abilisation-de-la-membrane-et-des-M%C3%A9norval/237cfbf033eaca221963286354e680845c7dcde6>
- (https://rodriguezgeologie.files.wordpress.com/2019/09/les-membranes-cellulaires_seance2.pdf)£