

## Les méthodes d'étude de la cellule

### I. Généralités :

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

Ces méthodes :

- Permettent l'observation de l'organisation morphologique des cellules.
- Etudient la structure de cellules mortes ou vivantes.

### II. La microscopie :

-L'examen des cellules a toujours répondu à l'utilisation des microscopes.

-Il existe deux types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes dits « **optiques** » qui vont utiliser un faisceau lumineux, et les **microscopes électroniques** qui vont utiliser un faisceau d'électrons. Que ce soit pour la microscopie optique ou électronique, les structures à étudier nécessitent une préparation.

La **préparation des coupes fines** se fait en plusieurs étapes :

1. La fixation : consiste à plonger le tissu à étudier dans un fixateur, qui tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation. Exemples de fixateurs :

**le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, le tétr oxyde d'osmium**

2. La déshydratation permet l'élimination de l'eau : L'eau est retirée au cours de passage dans des bains d'alcools successifs.
3. L'inclusion : l'échantillon est inclus dans un matériau tendre et résistant comme de la résine, ou de la paraffine, qui permet une solidification de l'échantillon.
4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.
5. La coloration permet de renforcer le contraste des cellules et de leurs constituants. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence, les colorants utilisés peuvent être naturels ou synthétiques.
6. Le montage : les coupes sont étalées et collées sur lame de verre.

### a) Le microscope optique

Les **microscopes optiques** (à lumière transmise ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées. L'échantillon est éclairé en lumière transmise, et est examiné à travers un système optique qui comprend :

- ✓ Un objectif : qui donne une image grossie de la structure étudiée.
- ✓ Un oculaire : qui permet l'examen de l'image.

Le pouvoir séparateur ou de résolution : Est la capacité d'une lentille ou d'un microscope à permettre la vision de **2 points** extrêmement **rapprochés** comme **2 points distincts**.

L'image de l'échantillon est agrandie jusqu'à 1000 fois, avec un pouvoir séparateur de 1/10 de micromètres.

**Le microscope à fluorescence** : est un microscope optique qui porte deux filtres interposés entre l'échantillon coloré par des molécules fluorescentes, app: **fluorochromes** :

- Le premier filtre ne laisse passer que la lumière qui excite le fluorochrome.
- Le deuxième filtre ne laisse passer que la lumière émise par le fluorochrome.

Les **fluorochromes** absorbent une lumière spécifique, et émettent une lumière différente.

**Ex** : la Fluorescéine et la Rhodamine.

Dans ce type de microscope les structures à étudier apparaissent très colorées sur un fond noir.

Permet de détecter:

- ✓ **Les substances spontanément fluorescentes**: vitamine A.
- ✓ **Des structures qui fixent des colorants**.

Il permet de voir des macromolécules que l'on n'aurait pas vues au microscope optique simple.

**Intérêts :**

- Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires.
- Détection , localisation, quantification de protéines cellulaires comme les hormones , les protéines du cytosquelette.

**Le microscope à contraste de phase** : il est basé sur le fait que l'onde lumineuse qui traverse les structures est retardée et change de phase par rapport à l'onde qui arrive directement à l'observateur.

Ce type de microscope permet l'observation de structures vivantes, non fixées et non colorées, en absence de coloration ces structures sont peu ou pas visibles. Les structures observées apparaissent en relief.

**b) Le microscope électronique** : va nous permettre à l'intérieur de la cellule d'étudier des objets extrêmement petits, jusqu'à l'échelle d'une macromolécule. Le microscope électronique

va nécessiter une préparation spéciale des cellules qui est différente de celle de la microscopie optique

**Il donne des photos en noir et blanc.**

**Le microscope électronique à transmission (MET) :**

- utilise un rayonnement électronique
- possède un pouvoir séparateur 40 000 fois supérieur à celui du microscope optique et deux millions de fois plus que l'œil humain, et qui est théoriquement de 2nm.

Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de l'échantillon et donc la mort des cellules et du fait du faible pouvoir pénétrant des électrons les échantillons doivent être sous forme de coupes ultra fines ( $< 0,1\mu\text{m}$ ) après inclusion dans une résine.

L'objet fixé est bombardé d'électrons, ces derniers permettent d'obtenir une image agrandie, qui se formera sur un écran fluorescent.

**Technique de coloration négative :**

Certaines structures échappent à la microscopie électronique, la coloration négative permet de les mettre en évidence. L'échantillon biologique est placé sur un film et on attend que les sels de métaux lourds se déposent autour de l'échantillon, qui est coincé dans une pellicule de colorant imperméable aux électrons. Il apparaît en clair sur un fond sombre.

**Le microscope électronique à balayage (MEB) :** consiste à balayer un échantillon par un faisceau d'électrons, la surface est préalablement recouverte d'un film de platine obtenu par ombrage métallique.

L'**ombrage métallique** de l'échantillon à étudier consiste à vaporiser sous vide une très fine couche de métal lourd, qui recouvre l'échantillon d'une fine pellicule. L'ombrage métallique permet d'accentuer les reliefs.

Le microscope électronique à balayage donne des images tridimensionnelles de l'échantillon, et permet d'étudier les surfaces cellulaires, les organites et même à l'intérieur des membranes.

**III. Les méthodes de fractionnement subcellulaire**

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

**L'homogénéisation :** consiste à provoquer l'éclatement de la cellule, et la rupture de la membrane plasmique, en mettant la cellule dans un homogénéisateur. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées **microsomes**.

### **L'ultracentrifugation différentielle**

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. L'homogénat est placé dans une centrifugeuse ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

- A 600g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 15 000g, pendant 5 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- A 100 000g (ultracentrifugation), 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.

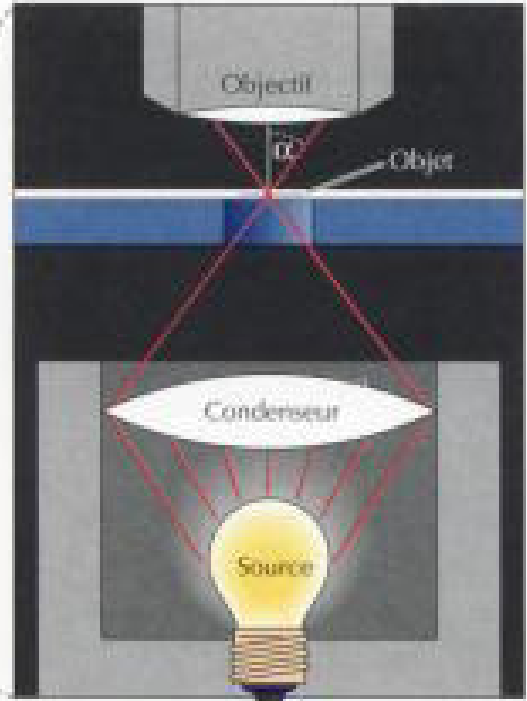
### **La Centrifugation par gradient préformé**

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

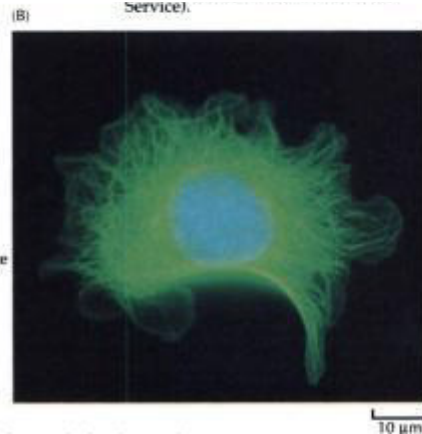
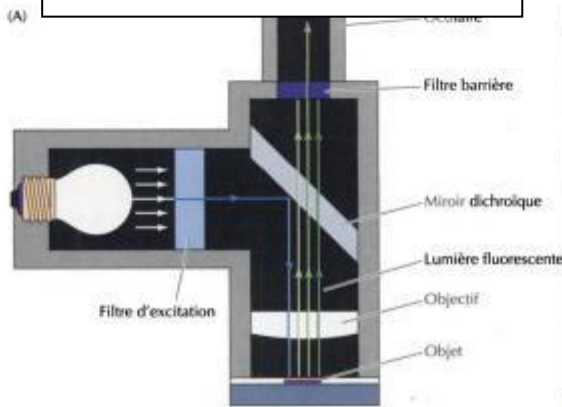
La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg (S)**.

### **Références bibliographiques :**

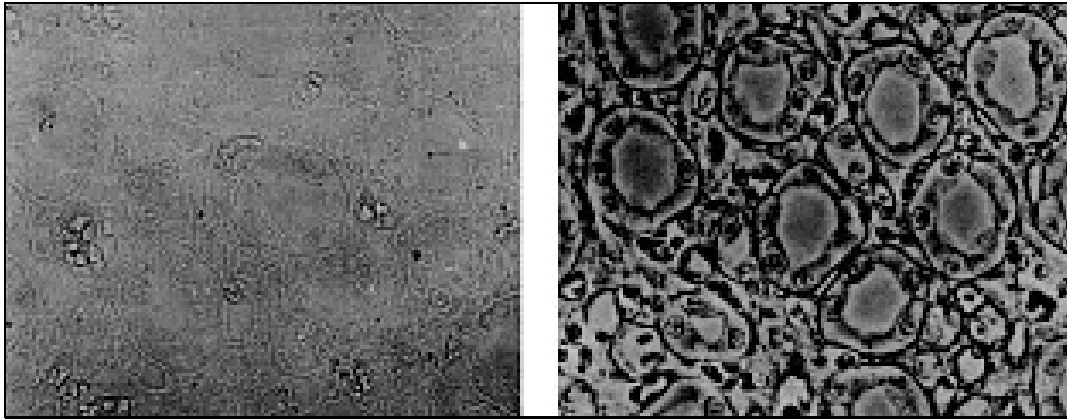
1. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet. 9<sup>ème</sup> édition, Masson 2002.
2. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillet. 10<sup>ème</sup> édition, Masson 2006.
3. Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes, 2<sup>ème</sup> édition. J c Callen. DUNOD. 2005.
4. Cours de Biologie Cellulaire : Pierre Cau, Raymond Seite. Edition ellipses. 1999.
5. Cytologie & Physiologie cellulaire. M. Abdelali, H. Benzine-Challam, A. Madoui-Dekar. Office des Publications Universitaires 2008.
6. La cellule et sa physiologie : M Bendjelloul. Office des Publications Universitaires 2011.
7. La cellule. Geoffrey M Cooper. Edition De Boeck. 1999.



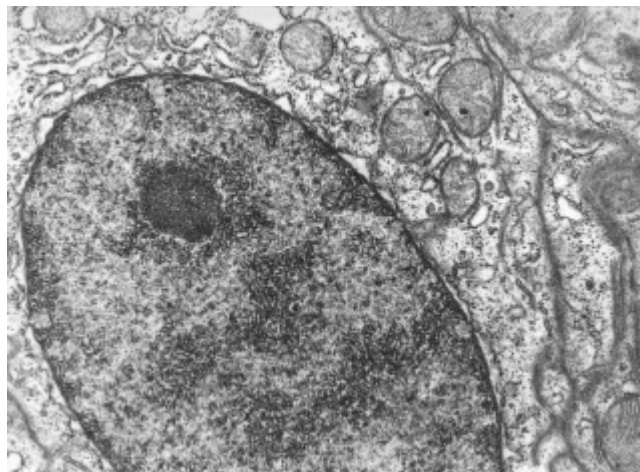
**Le microscope optique**



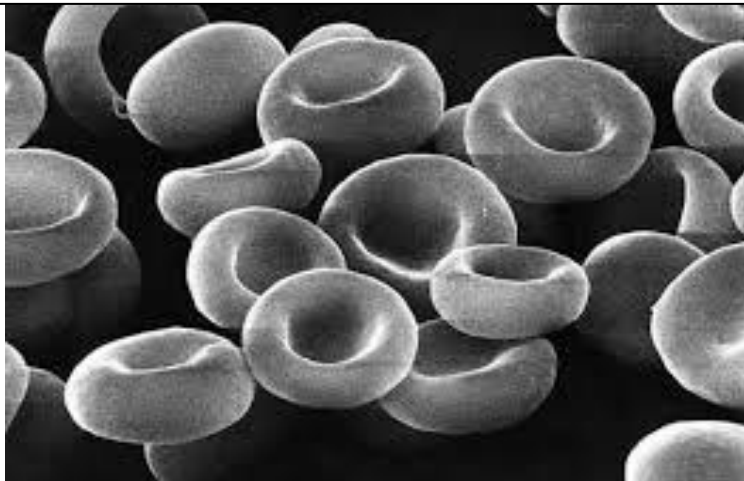
**Le microscope à fluorescence**



Les tubules rénaux : Comparaison des images obtenues avec un microscope photonique ordinaire (à gauche) et avec un microscope à contraste de phase (à droite)



Photographie en microscopie électronique à Transmission



Photographie en microscopie électronique à Balayage

