

I. Méthodes d'études de la cellule (partie 01)

I) Les méthodes d'observation

1) Méthodes et techniques d'observations des cellules

- a) Microscopes optiques (à fond clair, à fond noir, épi-fluorescences)
- b) Microscopes électroniques

2) Techniques de préparation des échantillons pour l'observation

I) Les méthodes -d'observation

1) Méthodes et techniques d'observations des cellules

L'observation des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles, et nécessite un certain nombre d'appareillages dont les microscopes. On distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes optiques et les microscopes électroniques.

a) Microscopes optiques

Les microscopes optiques (à lumière ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées des cellules en tissu (ou par des frottis en cas des cellules isolées comme le cas de cellules sanguines) .

Les microscopes optiques utilisent de la lumière visible et la qualité de l'image dépend du pouvoir séparateur qui donne la résolution du microscope limitée par la longueur d'onde de la radiation lumineuse. On obtient donc un grossissement x1000.

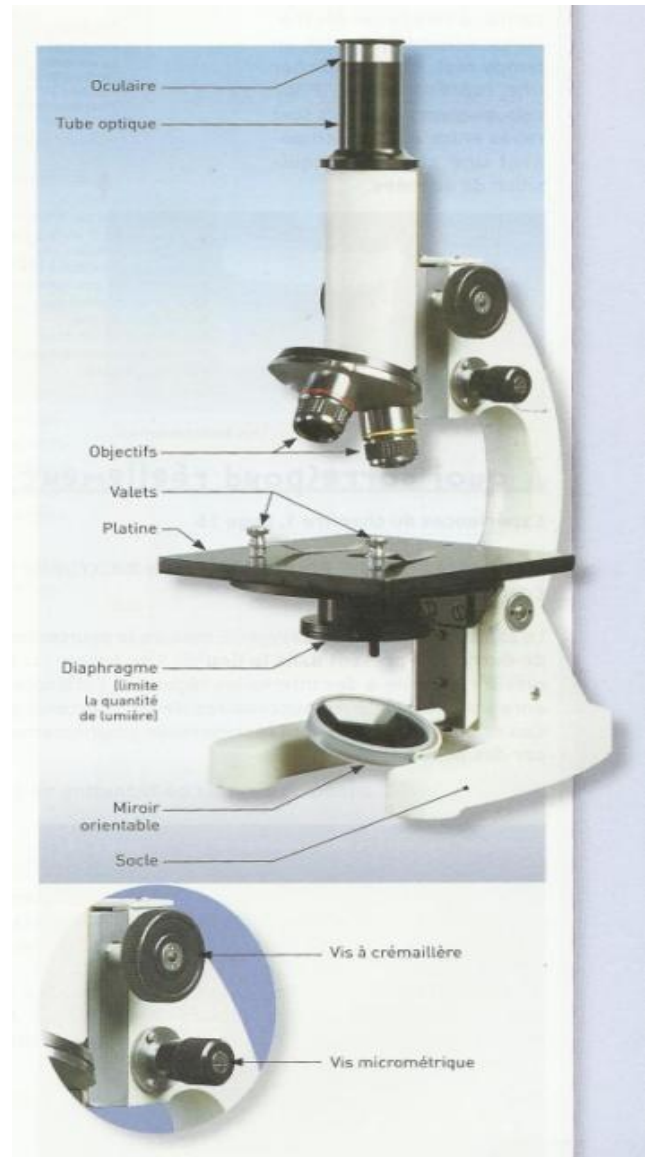
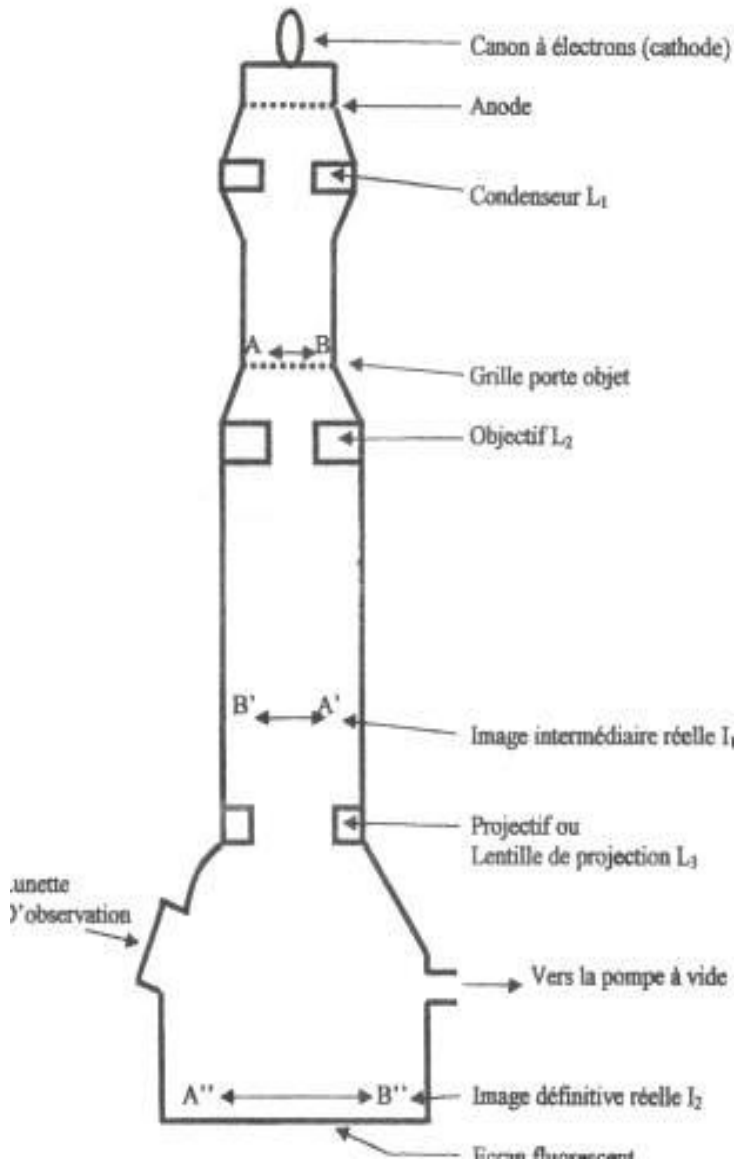
La figure ci-dessous montre un microscope optique et ses différentes composantes. Il permet de visualiser des objets très fins, montés dans une goutte d'eau ou de liquide coloré sur une lame porte objet et recouvert d'une lamelle couvre objet très fragile, ou des coupes fixées et colorées selon un protocole qui sera présenté ultérieurement. La lumière qui traverse l'objet remonte dans les lentilles de verre (objectif et oculaire) ce qui agrandit l'objet.

L'observation au microscope passe par les étapes suivantes :

- **Préparation de l'observation:** la préparation à observer est placée sur la platine et centrée pour que la lumière traverse le tube optique donnant un rond lumineux dans l'oculaire.
- **La mise au point:** le petit objectif (faible grossissement) est placé dans l'axe du tube optique. Il faut ensuite regarder dans l'oculaire et, à l'aide de la vis macrométrique de mise au point, remonter le tube jusqu'à l'obtention d'une image nette.
- **Exploration de la préparation :** la préparation est déplacée délicatement jusqu'à trouver l'objet recherché.
- **Changement de grossissement:** il faut placer la zone à agrandir au centre de la platine, puis changer d'objectif en tournant le barillet, sans toucher au réglage précédent. Le changement d'objectif se fait toujours du plus faible au plus fort grossissement. La nouvelle mise au point se fait seulement par la petite vis.
- Que faire pour ne pas endommager les préparations ?
- Toujours commencer l'observation avec l'objectif le plus faible.
- N'utiliser la vis macrométrique (la grosse) qu'à faible grossissement.
- Fixer la lame avec les valets : si l'un d'eux est manquant, ne pas incliner le microscope!
- Ne jamais descendre le tube sans surveiller la platine et la lame en regardant sur le côté.

- Aux grossissements supérieurs, n'utiliser que la vis micrométrique.
- Si la vis semble bloquée, il faut s'assurer que l'objectif n'appuie pas sur la lame.

Schéma du microscope électronique



- le **microscope à fond noir** est généralement utilisé pour les échantillons non colorés. L'image obtenue a un fond (**l'arrière-plan de l'observation**) sombre, presque noir avec des objets lumineux qui en ressortent, produisant des images spectaculaires très reconnaissables. Dû à l'absence de colorant, ces préparations, sont difficiles à voir en utilisant la technique du fond clair. Les applications sont pour la plupart des échantillons biologiques, des frottis sanguins, des cultures de tissus ou d'organismes unicellulaires à base d'eau non traitée. Dans le passé, la microscopie de fond noir était limitée à cause des faibles niveaux lumineux observés sur l'image. Euromex a surmonté ce problème en développant des méthodes d'éclairages LED très puissants, sans endommager les échantillons

- **le microscope en champ clair**, à l'opposé du microscope à fond noir, permet de recueillir la lumière de la source directement dans les objectifs, après avoir été transmise par l'échantillon. Celui-ci est éclairé par-dessous et observé par-dessus. Bien que la préparation des échantillons soit peu contraignante, cette technique est limitée par un faible contraste et une faible résolution. On peut améliorer l'observation en colorant les échantillons.

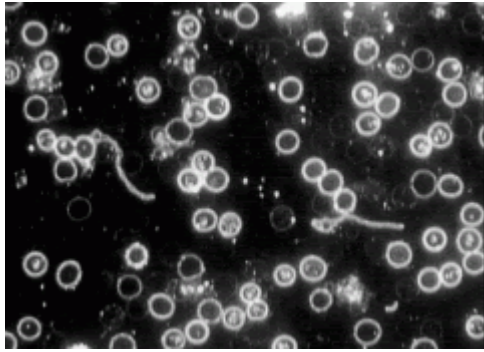


Fig. Infection génito urinaire carabinée et microscopie de sang à fond noir.

le lien : <http://silicium.blogspirit.com/archive/2014/12/10/un-cas-d-infection-genito-urinaire-carabine-mysterieux-exame-3030597.html>

- Le microscope à fluorescence:

La fluorescence est la propriété que certains corps ou molécules ont à émettre une lumière après avoir été excités avec une lumière d'énergie supérieure. Ainsi, un objet excité par une longueur d'onde émettra une fluorescence à une longueur d'onde supérieure. La technique du microscope en fluorescence est donc la même qu'un microscope optique, sauf que la lumière utilisée n'est pas blanche, mais possède une gamme définie de longueur d'onde. Toutefois, en général, la lumière arrive sur l'échantillon par le haut (épi-fluorescence) et non par-dessous.

À l'émission, on peut alors utiliser des lasers possédant une longueur d'onde unique ou des filtres d'excitation ne laissant passer que la lumière de longueur d'onde désirée sur l'échantillon.

Après excitation de l'échantillon, celui-ci émet à son tour une lumière d'une longueur d'onde différente. On peut utiliser des filtres permettant de n'observer que la longueur d'onde désirée, c'est-à-dire les photons d'émission, et bloquer les photons d'excitation. Le microscope en fluorescence permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents (chlorophylle...), ou des molécules rendues fluorescentes pour mieux les observer (protéines couplées à la GFP, DAPI pour l'ADN, fluorochromes...).

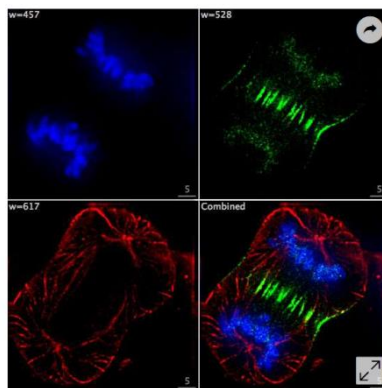
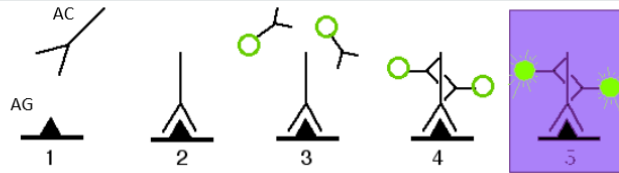


Fig: Une mitose est observée au microscope à épifluorescence grâce à différents fluorochromes (l'ADN en bleu, la tubuline en rouge et une protéine centromérique en vert).

le lien : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-microscope-fluorescence-7775>.

Pour induire la fluorescence on procède à un marquage (par des fluorochromes) des molécules recherchées (AG) selon le principe de l'immuno-réaction (AG-AC)



Fluorochromes	rhodamine	fluorescéine	FITC	orange d'acridine	DAPI
Couleur d'excitation	vert	bleu	bleu	bleu	UV

Les marqueurs fluorescents les plus courants et leurs lumières d'excitation

b) Microscopes électroniques

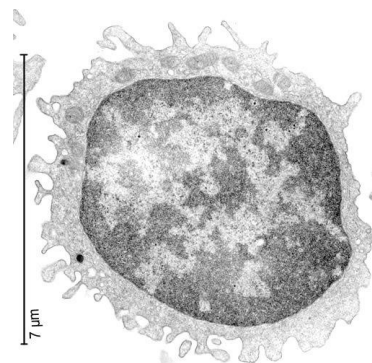
Les microscopes électroniques utilisent des faisceaux d'électrons qui sont chargés, possèdent une masse et se comportent comme une onde. Plus les électrons sont accélérés plus les longueurs d'onde diminuent et plus la résolution augmente. Ces électrons possèdent des compartiments possédant un vide parfait afin de maintenir rectiligne les faisceaux d'électrons, et des lentilles électromagnétiques qui forment un condensateur. On obtient ici un grossissement x 100 000. Les microscopes électroniques nécessitent la déshydratation de l'échantillon et donc la mort des cellules et du fait du faible pouvoir pénétrant des électrons les échantillons doivent être sous forme de coupes ultra fines et donc soumis à des inclusions .

- **le microscope électronique en transmission (MET)** utilise un faisceau d'électron à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée.

- **Le microscope électronique à balayage (MEB)** C'est le microscope d'observation des surfaces et permet d'obtenir une image en relief de la surface de l'échantillon. La surface cellulaire est recouverte par une mince couche d'or, de platine ou de palladium pour empêcher la traversée des électrons. Un faisceau d'électrons balaye la surface ce qui provoque une émission d'électrons qui sont captés par l'écran. L'angle d'impact du faisceau d'électrons avec la surface cellulaire varie. L'image ainsi reconstituée est tridimensionnelle.



a

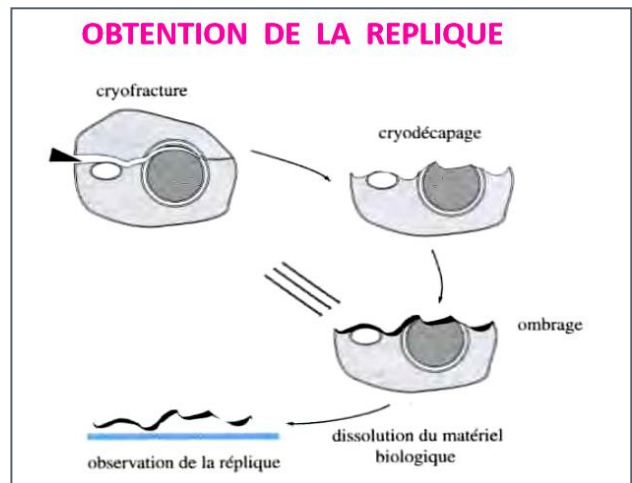
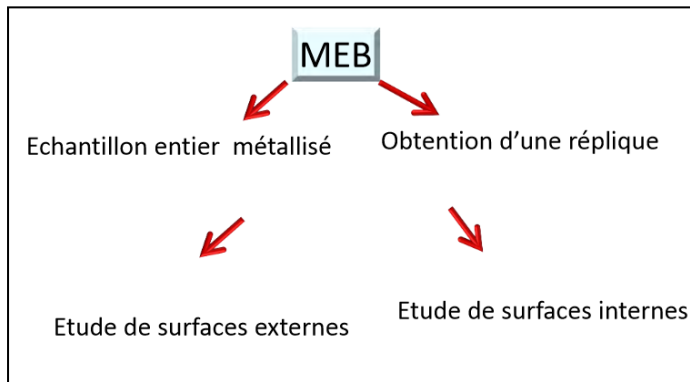


b

a) Fig : Le microscope électronique à balayage fournit des images en relief des objets observés (ici, une tête de fourmi).
 b) Fig : lymphocyte (microscope électronique de transmission)

a) le lien : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-microscope-electronique-balayage-7783/>

b) le lien : <http://accs.ens-lyon.fr/accs/thematiques/immunité-et-vaccination/ressources-logicielles/nouveau-programme-immunologie-2012/la-reaction-inflammatoire-aigüe-mécanisme-essentiel-de-l'immunité-innée/ressources/imagés-1/lymphocyte ME>



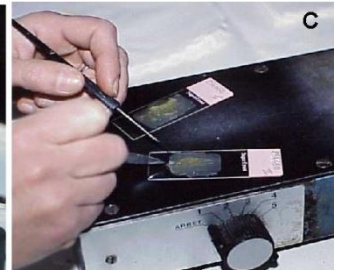
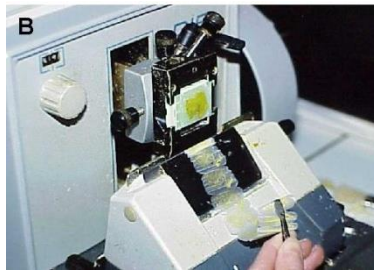
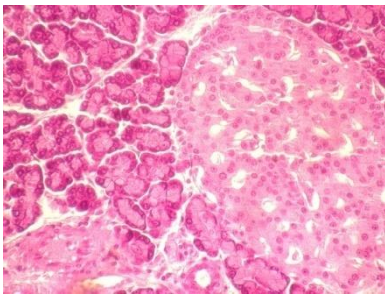
2) Techniques de préparation des échantillons (cellules)

Afin d'observer et étudier les cellules on utilise un certain nombre de techniques :

- préparation des coupes fines, et ultrafine
- coloration négative,
- le cryo-fracture et cryo-décapage, et l'ombrage métallique,
- la technique de la immunofluorescences.

- **La préparation des coupes fines** se fait en plusieurs étapes (pour l'études histologique classique) :

1. La fixation se fait par le **formaldéhyde** et le **glutaraldéhyde**, qui sont des aldéhydes très réactifs. Malheureusement la fixation tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation.
2. La déshydratation permet l'élimination de l'eau en la remplaçant par des solvants de types **xylène** et **toluène**.
3. L'inclusion dans de la résine, cire ou paraffine, permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.
4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.
5. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence :
 - o Les **colorants métachromatiques** qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le **May-Grunwald-Giemsa (MGG)**, qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins.
 - o la coloration hématoxyline -eosine qui colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie, cette coloration est utilisé souvent dans l'étude histologique .
 - o Les **colorants histochimiques** comme l'**acide périodique de Schiff** qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides.
 - o La **méthode histo-enzymatique** qui permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore.
6. Le montage rend la préparation observable (une goutte de résine de montage (par exemple, Eukit) est disposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe) . ci-dessous exemple d'une coupe histologique observée par microscope photonique.



a) Fig: Pancréas de cobaye : aspect général (x 250). b) Fig : réalisation des coupes par le microtome.
 a) le lien : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/histo.htm>
 b) le lien : http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_1/site/html/2_2.html.

- La **préparation des coupes ultrafine** : les cellules doivent être coupées en tranches très fines (50 à 100 nm) pour permettre aux électrons de les traverser, pour cela :

- Les cellules sont tuées par des fixateurs (glutaraldéhyde, tétroxyde d'osmium) qui préservent les structures cellulaires.
- Les échantillons fixés sont lavés dans l'eau, puis déshydratés par des solvants organiques (acétone).
- Les échantillons sont inclus dans une résine (araldite).
- Les blocs de résine renfermant l'échantillon sont coupés à l'aide d'un ultra microtome muni d'un couteau de verre ou de diamant.
- Les coupes cellulaires sont recueillies sur une grille en cuivre. La grille est trempée dans une solution de métaux lourds (uranium, plomb) pour noircir les structures cellulaires et augmenter le contraste. La grille est ensuite introduite dans le MET pour l'observation. (voir la vidéo dans le lien 01)

- La **coloration négative** c'est pour l'observation de petits échantillons tels que les virus, bactéries et aussi macromolécules comme l'ADN, la myosine.., il est basé sur l'augmentation du contraste par utilisation de produits imperméables aux électrons comme l'acide phosphotungstique. la préparation de la solution constituée par l'échantillon et l'acide phosphotungstique (2%). Dépôt d'une goutte de ce mélange sur la grille porte objet recouverte d'une membrane ayant de l'affinité avec l'acide phosphotungstique (des liaisons s'établissent entre la membrane et l'acide phosphotungstique imperméable aux électrons). Laisser sécher de manière à ce que l'acide/phosphotungstique ne se retrouve que sur la surface de la membrane, autour de l'échantillon mais pas au dessus de ce dernier.

À l'observation, les e^- qui arrivent sur la surface de l'échantillon vont le traverser et poursuivre leur trajet vers l'écran luminescent. Les e^- qui arrivent sur la surface de la membrane recouverte d'acide phosphotungstique seront retenus ; par conséquent, l'échantillon aura un aspect clair sur un fond très dense.

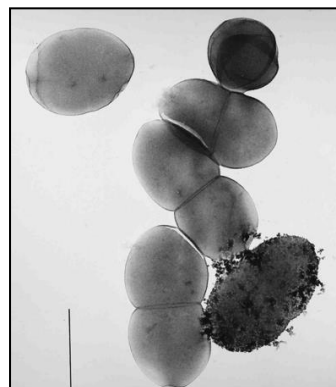


Fig : l'image de coloration négative de streptococcus pneumoniae qui permet de visualiser la division bactérienne en fonction de la virulence de la bactérie (D Fenel, AM Di Guilmi - 2007)

- Les **ombrages métalliques** c'est pour rendre visible de très petites particules isolées et également visualiser l'ADN et l'ARN et dans l'étude des surfaces (cryofracture). les ombrages métalliques permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant sous vide une très fine couche métallique avec un certain angle d'incidence entraînant la formation d'ombre portée. se déroulent dans une cloche où sous vide. Les molécules ou les particules, dissoutes ou suspendues dans l'eau, sont directement étalées à la surface d'une grille carbonée pour la microscopie électronique. Vaporisation d'une très fine couche métallique (or ou platine), à la surface de la préparation. La projection de métal est réalisée sous un angle assez incliné par rapport au plan de la grille celle-ci conduit à une accumulation localisée de métal qui donne un effet «d'ombre portée» lors de l'examen en microscopie électronique à balayage.

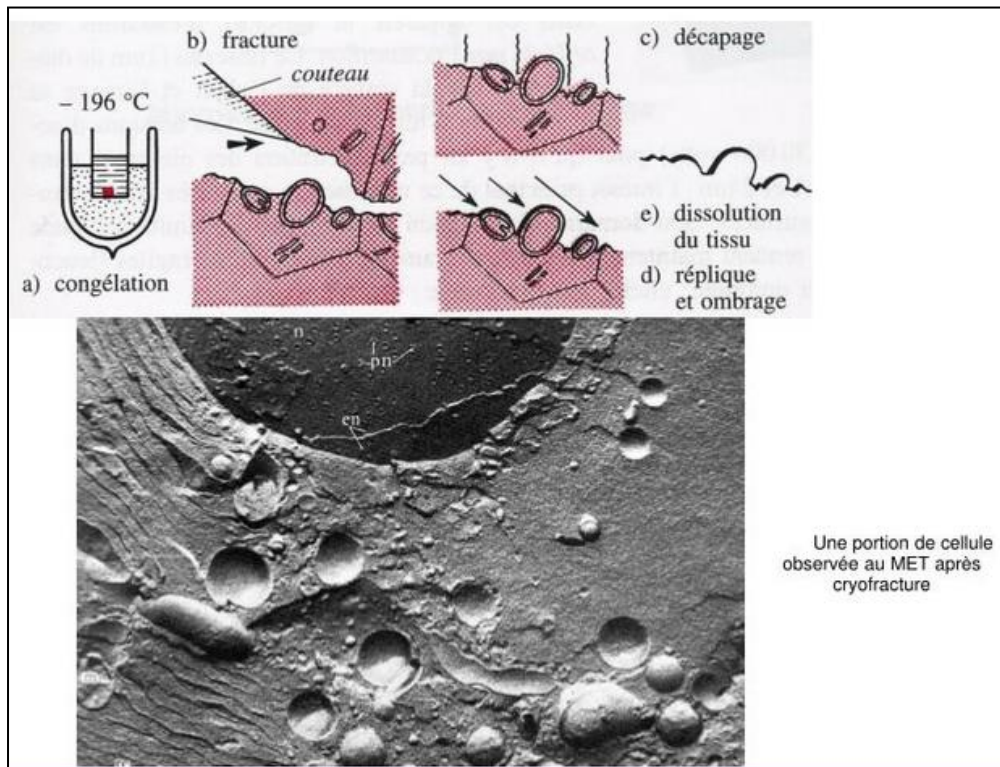


Fig: technique de cryo-fracture et cryo-décapage et ombrage métallique 03

Remarque : vous trouvez les références utilisées dans la suite de ce chapitre (partie 02)