

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers

POLYCOPIÉ DE Méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant

DESTINÉ AUX ÉTUDIANTS DE LA 2^{ÈME} ANNÉE SCIENCES BIOLOGIQUES

Réalisé par **Dr. ABED Hanane.**

Introduction

Les êtres vivants, animaux ou végétaux, sont ordinairement caractérisés par une forme extérieure (une morphologie externe) plus ou moins nettement définie. Cette morphologie et plus encore l'étude anatomique montrent que les êtres vivants sont constitués d'organes différents, racine, feuille, etc., chez une plante; cerveau, estomac, etc., chez un animal. Un être vivant se révèle donc essentiellement comme un être organisé, un organisme. Ce niveau d'organisation appréciable à l'œil nu fut longtemps le seul connu.

L'invention de moyens d'observation permettant de dépasser la limite de visibilité à l'œil nu a permis de découvrir d'autres niveaux d'organisation. Ces autres niveaux correspondent chacun à une étape historique du développement de la science, à certains types d'instruments et à un certain ordre de grandeur des éléments de structure de la matière vivante.

Outre l'étude de l'organisation morphologique de la matière vivante, celle de la nature chimique et du fonctionnement des structures observées a été entreprise. Nous distinguerons donc des méthodes d'études morphologiques, chimiques et physiologiques.

PARTIE I: METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

I. Méthodes Cytologiques

Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure des progrès scientifiques et technologiques réalisés dans divers domaines. Les progrès de la microscopie ont repoussé la frontière entre le visible et l'invisible. Au microscope électronique, on parvient même obtenir l'image d'atomes d'or cristallin.

Aujourd'hui, la médecine, la biologie ne peuvent plus se passer du microscope. Pour comprendre la biologie cellulaire contemporaine, il est indispensable de se familiariser avec les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude. Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- *- les techniques morphologiques.
- *- les techniques chimiques et biochimiques.
- *- les techniques physiologiques.

Ces techniques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques ; les manipulations sont justifiées par les deux exigences de l'examen au microscope :

- Les objets à examiner doivent être minces
- Leurs différents éléments doivent présenter un certain contraste.

En cytologie de nombreux procédés préparatoires des cellules sont utilisés pour une analyse morpho fonctionnelle. Nous traiterons dans ce chapitre que les principales techniques cytologiques.

1.LA MICROSCOPIE

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le microscope (photonique ou électronique) permet d'observer sur une coupe très fine les détails infiniment petits d'un objet (animal, plante). Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour traitement.

1.1 le principe de la microscopie :

Un microscope est un système optique constitué, dans l'essentiel, de deux parties (fig.1) :

- ***l'objectif***, qui va donner d'un objet réel (placé très près du plan focal objet une image réelle agrandie et renversée, placée en avant de F_2 .

- ***un oculaire***, qui va donner de cette image agrandie et renversée (donc servant d'objet réel, ou plus précisément d'image objective pour l'oculaire) une image virtuelle, observable par l'œil. La plupart des instruments d'optique sont constitués de ces deux éléments fondamentaux.

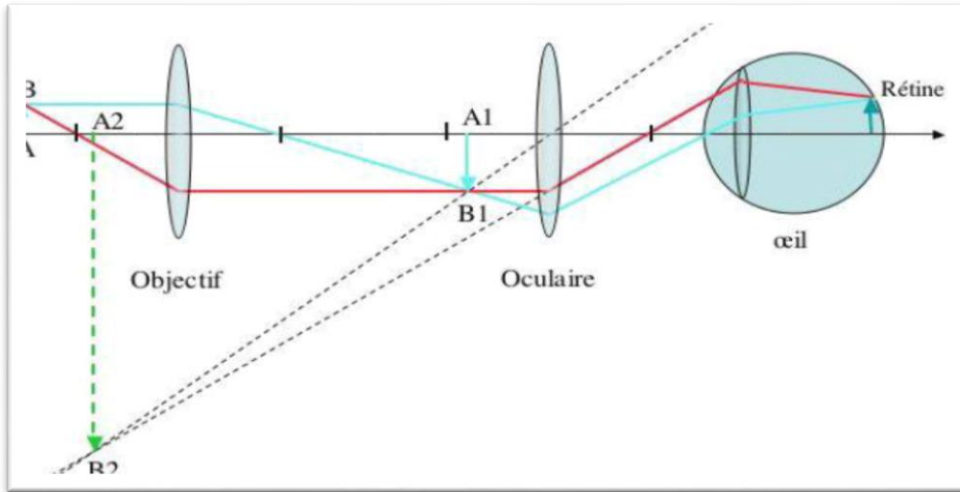


Fig1 :Principe de microscope

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le microscope optique et pour le microscope électronique à transmission et l'observation par réflexion pour le microscope électronique à balayage. Donc le microscope travaille en :

Transmission : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

Réflexion : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. (Fig2).

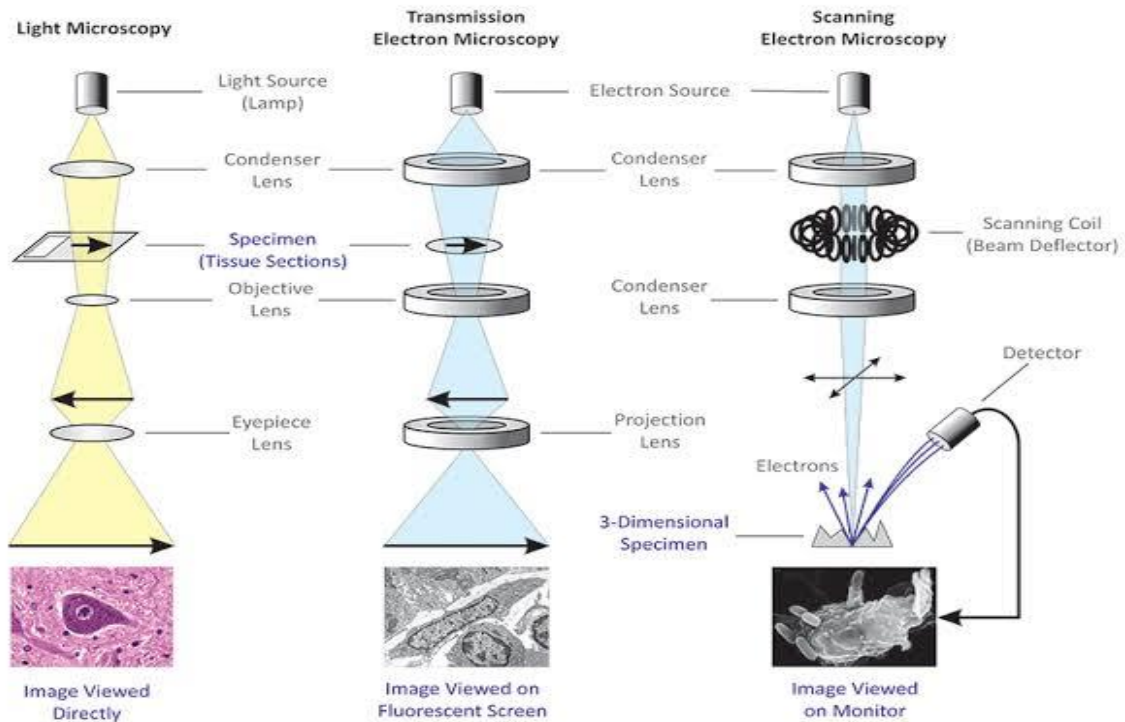


Fig2 : Principes de différents types de microscopes

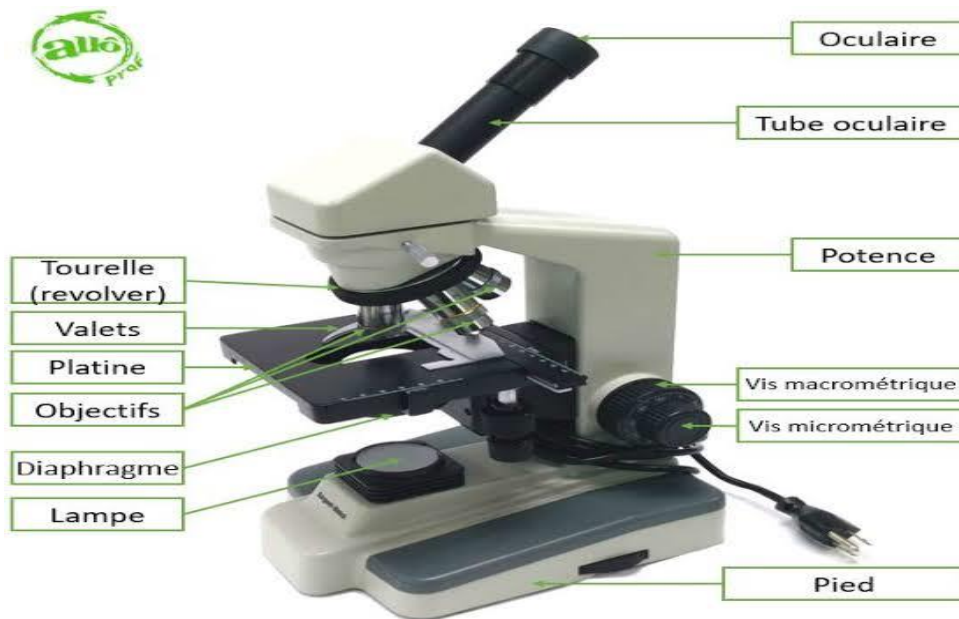
1.2. Les types de microscope

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée :

- le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons.
- le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

A : LA MICROSCOPIE OPTIQUE OU PHOTONIQUE

Le microscope optique 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 (et son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus, en pétrographie pour reconnaître les roches, en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage. Il ne faut pas le confondre avec la loupe binoculaire qui n'exige pas des échantillons plats de faible épaisseur. Ce microscope il a l'avantage de donner une vue générale des cellules ou des tissus et aussi de permettre l'examen de cellules vivantes.



Tous les microscopes sont caractérisés par leur pouvoir séparateur (pouvoir de résolution c'est à dire la distance limite appréciable entre 2 points et aussi limite de résolution). Un microscope photonique à transmission distingue des objets tout au plus distant de 0,2 μm . Le pouvoir séparateur d'un microscope est donné par la formule d'Abbe :

$$\epsilon = (0,61 \cdot \lambda) / (n \cdot \sin \alpha = \text{l'ouverture numérique de l'objectif})$$

ϵ : distance limite appréciable = limite de résolution

λ : longueur d'onde de la lumière utilisée (400 nm = violet ---> 800 nm = rouge)

n : indice de réfraction du milieu transparent

α : moitié de l'angle d'ouverture du cône lumineux entrant dans l'objectif

0,61 : constante

***Chez l'homme le pouvoir séparateur est de 0,1 mm à une distance de 25 cm. L'œil humain ne peut distinguer à 25cm que deux objets distants l'un de l'autre que de 0,1 mm. Au-delà l'image des 02 objets sera unique ou nulle.**

Grossissement du microscope

Le grossissement d'un objet est le produit du grossissement de l'objectif par celui de l'oculaire.
• On parle de grandissement pour un objectif et de grossissement pour un oculaire et de grossissement final d'un microscope (grandissement objectif x grossissement oculaire). Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer. Le grandissement de microscope optique étant au maximum de 1000X.

*Il existe divers types de microscopes photonique :

- les uns permettent **l'observation directe de structures** dont les dimensions sont de l'ordre de 0,2 μm ce sont les **microscopes par transmission**.
- les autres microscopes donnent des **informations indirectes** sur l'ultrastructure des cellules = **microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase**.
- le microscope confocal à balayage.

1. Microscopes par transmission

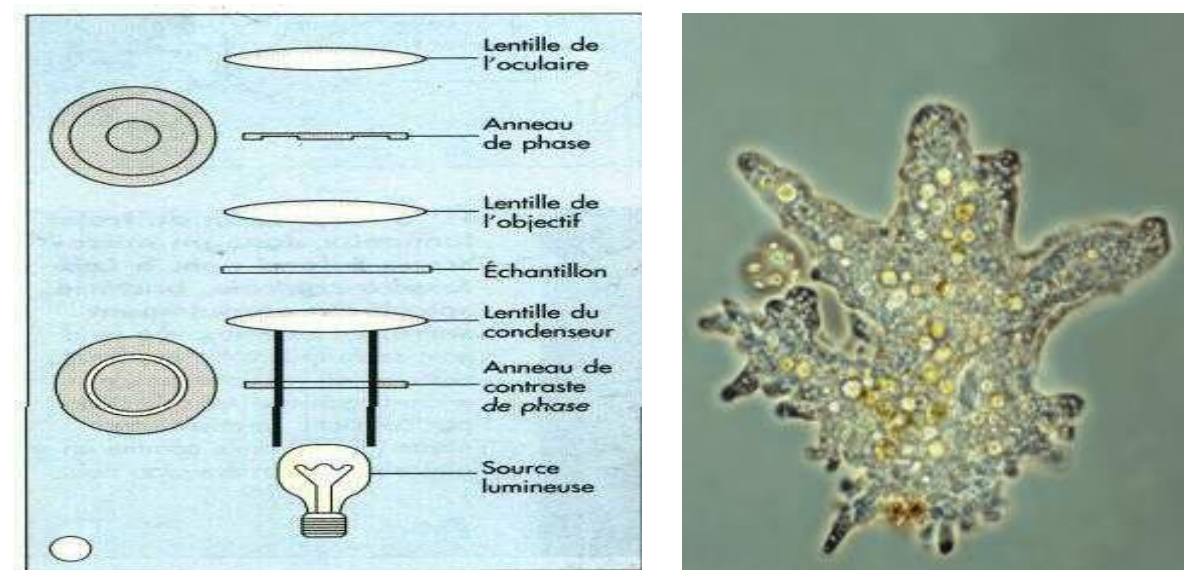
Le microscope le plus courant utilise la lumière visible (lumière blanche constituée de plusieurs longueurs d'onde) qui est transmise directement sur la préparation biologique. Ces microscopes sont équipés de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer. **Les échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.**

2. Les autres microscopes photoniques

a) Le microscope à contraste de phase :

Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation de cellules vivantes non fixées. Son principe repose sur l'amplification des contrastes naturels en mettant à profit les différences d'indices de réfraction entre les organites ; qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'œil. La base de cette transformation repose sur les interactions entre les ondes lumineuses : on parle d'interférences. Ce microscope est un bon outil pour l'observation des mouvements des cellules et de leurs organites tels que les mitochondries, les chromosomes, et de suivre les étapes de processus comme la mitose par exemple. Les images de l'observation peuvent être enregistrées par caméra vidéo, les films sont ensuite projetés sur un écran de télévision.

En microscopie à contraste de phase (Sa), le condenseur possède un anneau de contraste de phase qui produit aussi un cône de lumière creux, focalisé sur le plan de l'échantillon.



b) Le microscope à fond noir

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des cellules vivantes, en augmentant les contrastes naturels. Dans ce type de microscope, la source de lumière est oblique par rapport à la préparation cellulaire. Un condenseur spécial illumine la préparation sous une incidence rasante, seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif : le fond du champ d'observation est noir, et le moindre objet apparaît brillamment éclairé. Cela permet d'observer des objets dont la dimension est à la limite extrême du pouvoir séparateur, et qui passeraient inaperçus avec les techniques ordinaires. Mais ces objets devenant des sources lumineuses, leur forme et leur dimension ne peuvent pas être correctement appréciés.

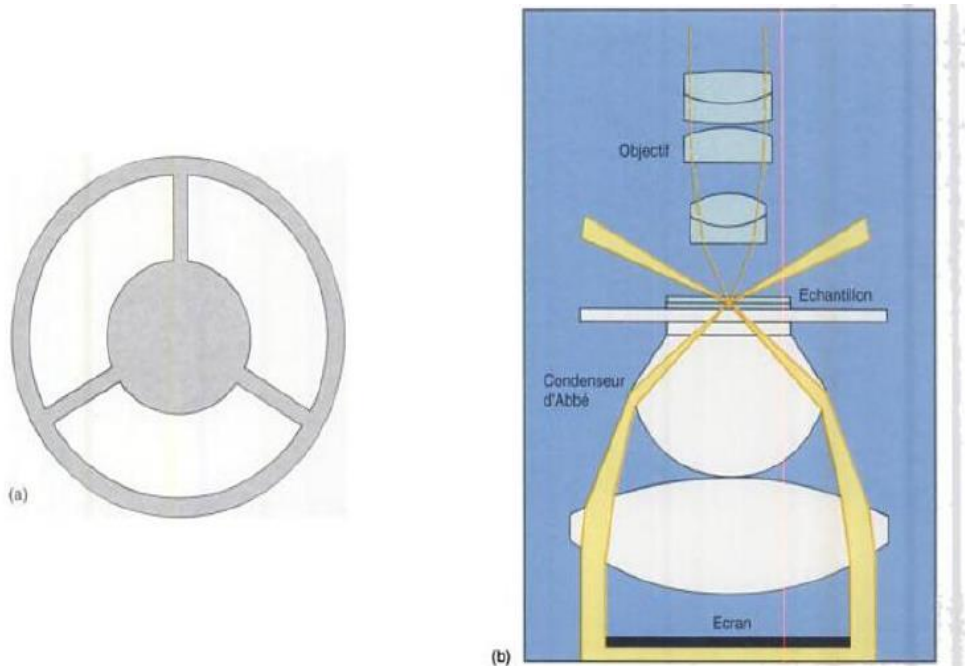


Figure 2.7 Le microscope à fond noir. La façon la plus simple de convertir un microscope en microscope à fond noir est de placer (a) un écran sous le microscope, (b) un système de lentilles convergentes. Ce condenseur produit un cône creux de lumière et la lumière qui entre dans l'objectif vient uniquement de l'échantillon.

c) Le microscope à lumière polarisée

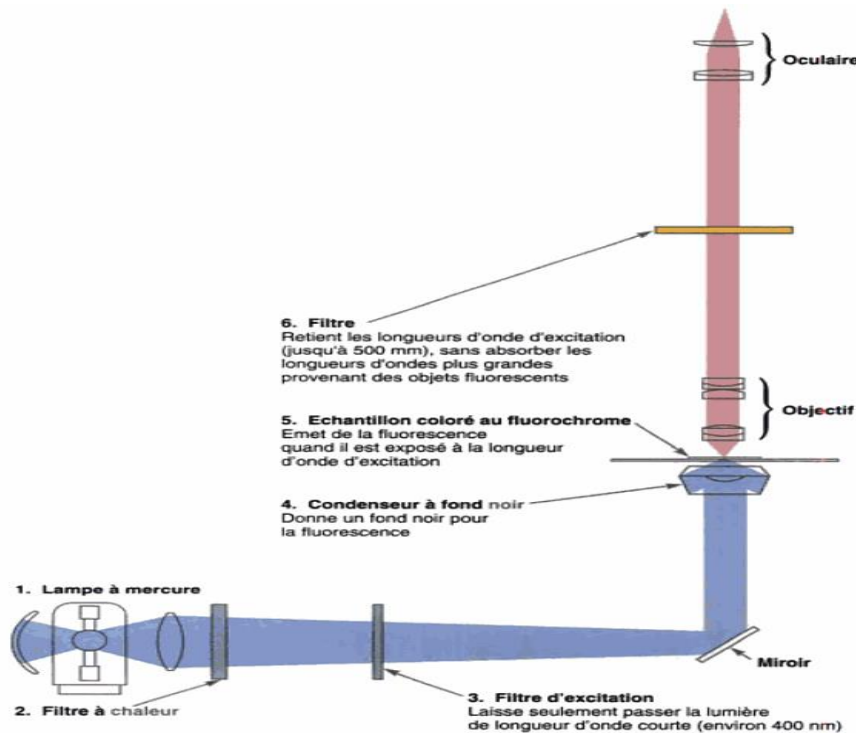
Il permet de détecter des structures biréfringentes qui ont une organisation moléculaire particulière, telles que les microtubules et les chloroplastes et parois des cellules végétales. Les photons lumineux passant à travers certains matériaux tels que les filtres Polaroid ou certains cristaux (Nicol) en ressortent "polarisés" : ils ne vibrent plus que dans un seul plan. Si un second filtre Polaroid ou un second Nicol est disposé sur leur trajet on peut par rotation de ce second filtre les arrêter complètement et obtenir l'extinction totale du faisceau. (Nicol "croisés") Si on place entre les deux filtres croisés un objet actif sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné, le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction. Un microscope à lumière polarisée est équipé d'un premier filtre au niveau du condenseur et un second filtre en position croisée dans le tube optique.

d) Microscope à balayage confocal :

Dans ce type de microscope, l'objet est éclairé par un faisceau laser finement focalisé qui balai rapidement à un seul niveau n'éclairant qu'un plan mince de l'objet, on parle de coupes optiques. Les préparations sont souvent traitées par des colorants fluorescents et la lumière émise par la coupe optique éclairée donne une image sur un écran vidéo. Les coupes photographiques d'un cerveau humain prises par un scanner sont un exemple de ce type.

e) Le microscope à rayons UV (= à fluorescence)

D'une manière générale, les molécules fluorescentes absorbent des radiations à une longueur d'onde donnée et émettent des radiations de longueur d'onde plus élevée. C'est le cas des substances appelées Fluorescéine qui fluoresce en vert et la Rhodamine en rouge sont des exemples de ce type de substances largement utilisées dans la biologie cellulaire. Ce microscope est semblable au microscope photonique ordinaire, sauf qu'il est muni d'une source de rayon UV (lampe à UV) et d'un système de filtre qui permet de choisir la longueur d'onde des UV appropriés pour chaque substance. Il est le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome ; à titre d'exemple, on peut aussi détecter la présence d'insuline dans une cellule avec anticorps Anti-insuline marqué par fluorescéine.



Le microscope à fluorescence. Les principes du microscope à fluorescence.

1.2 LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Le microscope électronique est beaucoup plus récent : le premier a été construit en 1931, par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. Puis il s'est répandu à partir des années 60. La résolution d'un microscope électronique peut atteindre 2 angströms, mais généralement les meilleurs microscopes atteignent 20 angströms seulement. 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 (cathode et anode percée). 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 on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques Å°. On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

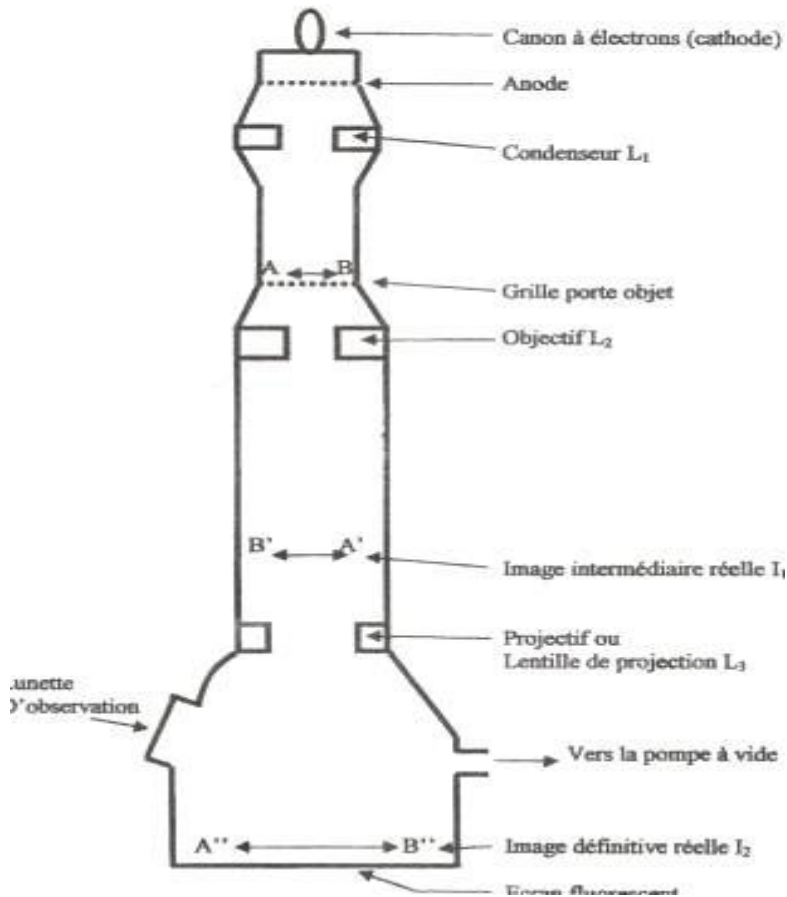
* Principe du fonctionnement:

Il est comparable à celui du microscope photonique. La source S est une cathode qui émet des électrons (au lieu des photons) qui sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel entre la cathode et l'anode (60 à 100 Kv). Le vide poussé à l'intérieur du ME est nécessaire au déplacement des électrons. Les électrons traversent 3 lentilles électromagnétiques L1, L2, L3 et l'objet AB.

- L1 : le condensateur permet de focaliser le flux d'électrons sur l'objet.

- L2 et L3 jouent le rôle d'objectif et permettent l'agrandissement de l'objet AB. L'image est observée directement sur l'écran rendu fluorescent par le bombardement électronique ou sur une plaque photographique. Le MET permet des grossissements allant de 2000 à un million.

Schéma du microscope électronique



Types de microscopes électroniques

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- la microscopie à transmission
- la microscopie à balayage

a) Microscope électronique à transmission :

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 similaire à ceux qui équipent les téléviseurs noirs et blancs. Hormis le fait que les absorbeurs d'électrons sont des métaux lourds les mêmes techniques de révélation que pour la microscopie en lumière directe peuvent être utilisées.

b) Microscope électronique à balayage (scanning) :

Bien que de résolution plus faible que la précédente, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en pseudo 3D. 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, par exemple.

***Comparaison entre le microscope optique et électronique**

Le tableau montre que les deux fonctionnent selon les mêmes principes. Les différences résident dans la nature de la source (lampe ou cathode), la nature des lentilles (en verre ou électromagnétiques) et en fin le mode d'observation : l'oeil pour le microscope photonique et l'écran ou le cliché pour le microscope électronique.

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

2. Les conditions d'observation aux microscopes

Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécoupage etc....

2.1 TECHNIQUES DE COUPES ET DE REPLIQUES

Le microscope permet d'observer les cellules d'un tissu, mais dans des conditions très strictes : il faut que l'objet à examiner soit transparent à la lumière. Les objets biologiques ne le sont que rarement, à l'exception des objets naturellement très minces : suspensions (sang, ..) ou cultures cellulaires. Il faut donc les découper en tranches très minces (coupes) de l'ordre de 5 à 10 microns. Pour cela, il faut « durcir » l'objet par différentes techniques physiques ou chimiques. Mais la coupe causerait des dommages irréparables aux tissus et aux cellules et l'observation ne correspondrait pas à la réalité des cellules vivantes : séparation physique de structures proches plus ou moins entraînées par l'outil de coupe, libération d'enzymes lytiques (protéases essentiellement) contenues dans des compartiments spécifiques (lysosomes, peroxysomes, ...) il faut donc au préalable "immobiliser" les structures dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et inactiver ces enzymes : c'est le but de toute une série de manipulations qui amèneront les objets biologiques à l'examen convenable au microscope.

2.1.1 TECHNIQUES DE COUPE

Pour un examen morphologique des cellules ou des échantillons biologiques en microscopie, des procédés préparatoires de l'échantillon sont nécessaires.

a) Examen des échantillons en microscopie optique

*Examen de cellules vivantes :

Elles peuvent être examinées sans préparation, mais dans un nombre très limité de cas. Il ne peut s'agir que des cellules isolées, naturellement ou en culture. Une cellule animale dépourvue d'exosquelette se déshydrate très rapidement dans l'air. Son observation ne peut s'effectuer qu'en milieu liquide. L'observation en milieu de culture permet de maintenir la physiologie cellulaire. Mais les boîtes de culture interdisent des objectifs de grossissement utile (maximum X5). L'astuce consiste à inverser le montage du système optique : on illumine la boîte par le haut (les condenseurs actuels permettent de focaliser la lumière sur le fond de la boîte de culture) et l'on observe à travers le fond : microscope inversé.

Comment observer correctement les cellules vivantes ?

Il faut utiliser des techniques qui augmentent les contrastes sans toxicité pour la cellule.

- **les méthodes chimiques, les colorants vitaux :**

La quasi totalité des colorants sont très toxiques pour les cellules, quelques rares colorants n'ont pas cet inconvénient. Ils augmentent le contraste d'absorption de certaines longueurs d'onde, conférant une couleur aux structures qui les retiennent. On peut citer :

- ***Le Vert Janus B** spécifique des mitochondries

- ***Le bleu de Trypan**, qui ne peut pénétrer dans des cellules vivantes, mais qui colore les cellules mortes (test d'exclusion du bleu trypan) : il est très utilisé pour évaluer la vitalité des cellules. Les colorants d'exclusion dérivent d'une technique utilisée par les microbiologistes qui visualisaient des levures par contraste en les dispersant dans l'encre de Chine.

- **les méthodes physiques, le microscope à contraste de phase :** ce microscope augmente le contraste des objets. C'est le seul moyen d'observer les mouvements cellulaires et de les filmer.

*Examen des cellules mortes:

Il est nécessaire la mise en œuvre de manipulations indispensables à l'obtention d'objets minces et contrastés. On ne peut en effet, examiner que des cellules colorées ; il est aussi nécessaire d'obtenir des coupes minces de ces cellules et donc de les inclure au préalable dans des substances relativement dure, il faut auparavant les fixer, pour éviter toute altération susceptible de se produire au cours des manipulations. La séquence de ces manipulations est donc la suivante : Prélèvement, fixation, inclusion, coupe et coloration.

a) Prélèvement :

Dans le milieu médical, les prélèvements sont effectués en clinique, à l'hôpital ou dans des cabinets privés ou médecin spécialiste. Ils sont réalisés par des chirurgiens. On distingue quatre catégories majeures de prélèvement :

- * Les frottis : grattage (du col de l'utérus...).

- *Les biopsies : fragments de tissu ou d'organe.

- *Les organes en intégralité.

- *Les liquides d'épanchement divers (pleural, ascitique, péricardique, etc.).

Il existe également des techniques de prélèvement plus sophistiquées : par excision, ponction ou microdissection.

b) 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 : Alcool, formol, acide acétique, etc...ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque (meilleur fixateur).

c) Déshydratation :

Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools de degrés croissants, 70°, 80°, 90°, 100°, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations. La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine. La paraffine

n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation. On procède donc à une double substitution.

*On remplace l'eau par de l'alcool (Déshydratation)

*On remplace l'alcool par le toluène (Substitution)

d) Inclusion :

La coupe ne peut être pratiquée que dans une substance assez dure ; c'est pourquoi on imprègne les tissus d'une substance d'enrobage, en général la paraffine ; l'alcool n'étant pas parfaitement miscible avec la paraffine, on plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique intermédiaire miscible à l'alcool et la paraffine, le xylène, puis dans la paraffine maintenue liquide à l'étuve entre 50 et 60°C. On refroidit alors et on obtient un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner. Cette imprégnation suppose une déshydratation et une substitution de l'eau par l'alcool, solvant de la paraffine. En effet l'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).

e) Coupe (microtomisation) :

Le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide des microtomes qui sont des appareils permettant de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Les forces de frictions entre couteau et bloc échauffent la paraffine et la mettent en surfusion, ce qui permet de coller les coupes les unes à la suite de l'autre : ruban de coupes sériées. On les recueille sur des lames de verre (porte objets) autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.

f) Réhydratation :

Les coupes collées sur lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique et ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Cela permet de les colorer, car la majorité des colorants sont solubles dans l'eau ou dans l'alcool.

g) Coloration :

Les objets biologiques coupés et examinés par transparence ne sont pas ou peu colorés: ils offrent très peu de contraste, donc de visibilité, et aucun détail ne peut être perçu. Il faut renforcer le contraste de couleur des différents organites ou mieux les colorer. Cette lame de verre est alors plongée dans un colorant. On dispose nombreux colorants naturels, qui se fixent sur telle ou telle structure de la cellule, par exemple, le vert de méthyle colore en vert la chromatine. On utilise deux catégories de colorants : Les plus courants sont :

*l'hématoxyline, qui colore les noyaux cellulaires en bleu violacé

*L'éosine, qui colore les cytoplasmes en rose

*Les bleus (Bleu de méthylène, de toluidine) sont également employés en routine.

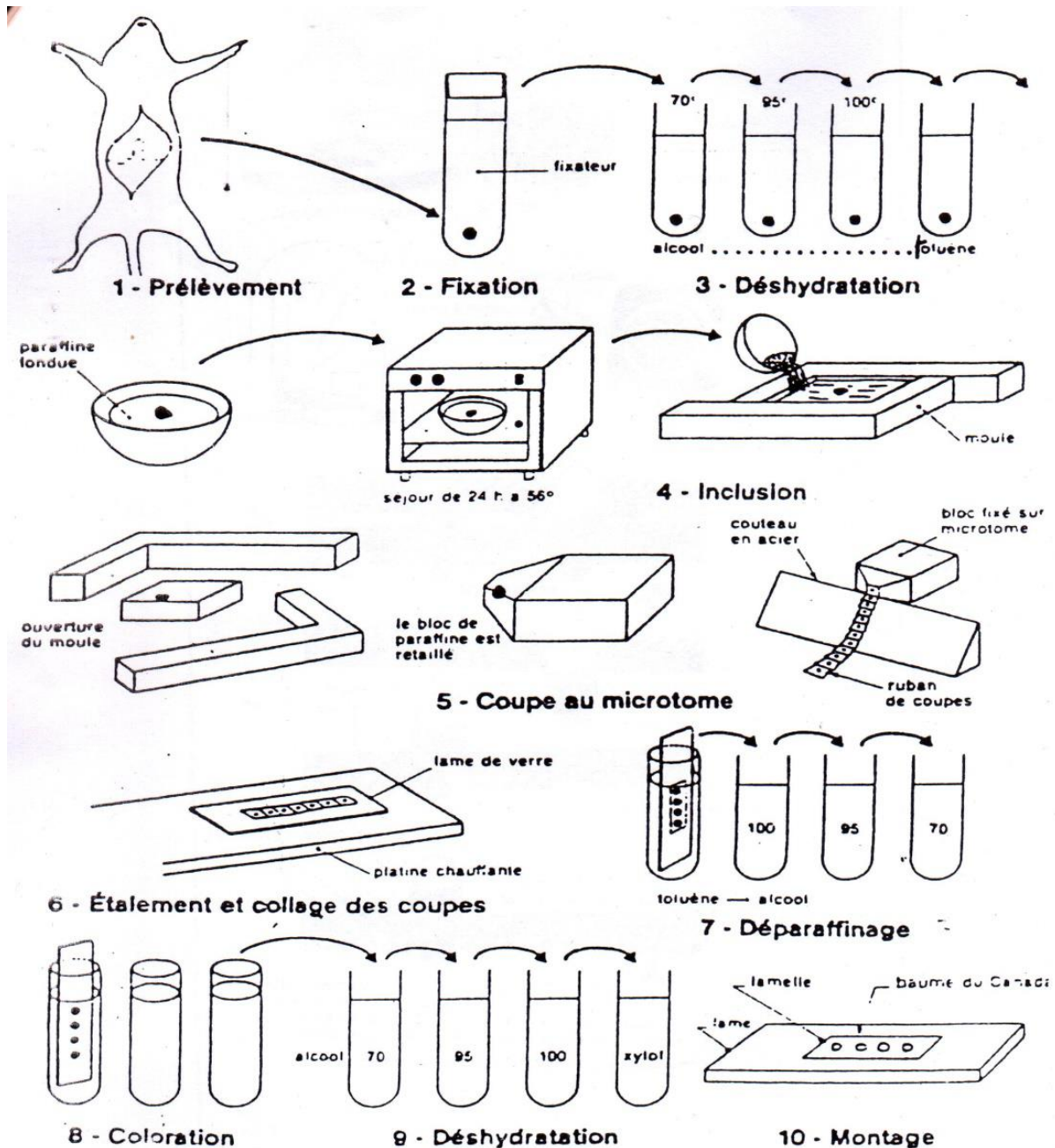


Fig : Techniques de préparation de coupes pour le microscope photonique

B)Examen des échantillons en microscopie électronique

La séquence de manipulation est analogue à celle qui a été exposée pour la microscopie optique.

a) Fixation : encore plus exigeante (les artefacts sont plus visibles), elle est réalisée avec des fixateurs spéciaux, comme : le tétraoxyde d'osmium OsO_4 et le glutaraldehyde $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$. Ce sont les deux principaux fixateurs chimiques utilisés en microscopie électronique.

b) Déshydratation : elle suit le même principe qu'en microscopie optique; mais elle est délicate car les tissus doivent être conservés jusqu'au niveau moléculaire.

c) Inclusion : elle se fait dans un milieu très dur, dans des matières plastiques telle que la résine. Une fois refroidi, durci par polymérisation, on obtient un échantillon solide.

d) Coupe : effectuée sur un ultramicrotome, elle fournit des tranches encore plus minces, de 50 nm.

e) **Coloration** : c'est plutôt une imprégnation (il n'y a que le noir et le blanc en microscopie électronique) par des sels de métaux lourds, comme les sels de plomb ou d'uranyle, qui augmente le contraste des structures cellulaires.

2.1.2 TECHNIQUE DE REPLIQUES

Elle est généralement applicable au MEB et s'effectue en 03 étapes : la congélation de l'échantillon, la cryofracture et l'obtention des répliques.

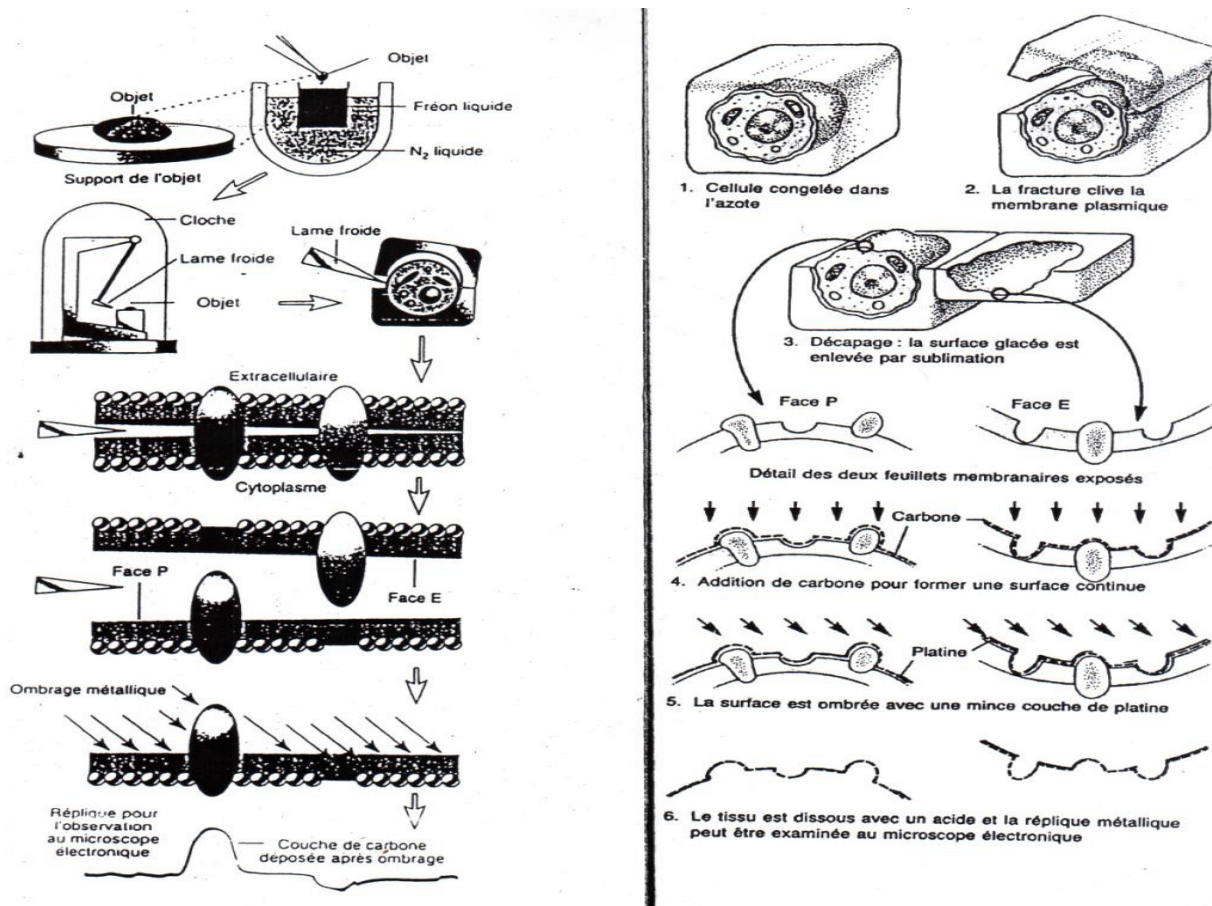
***Examen de répliques après cryofracture et cryodécapage :**

Cette technique permet de réaliser une empreinte topographique (réplique) après fracture d'un échantillon congelé. Elle permet l'obtention d'une simple ou d'une double réplique (moulage des deux faces de la fracture). Le tissu est fracturé après fixation à basses températures, le trait de fracture présente des reliefs dus à l'hétérogénéité des constituants cellulaires. Ceux ci sont accentués par la projection selon une incidence rasante (ombrage) d'une fine couche métallique. Celle ci est ensuite détachée et constitue une réplique qui peut être examinée au microscope. On a alors une idée des reliefs de la surface d'un organite ou même d'une membrane si la fracture l'a délaminiée (coupe tangentielle). Elle est généralement applicable au MEB et s'effectue comme suit :

La congélation de l'échantillon, la cryofracture, le décapage, ombrage et obtention de la réplique.

Les tissus prélevés sont congelés rapidement sans fixation ou après fixation. A fin d'éviter les dégâts provoqués par la formation de cristaux de glaces, les tissus sont imprégnés de substances telles que le glycérol, puis congelés rapidement dans des liquides à température très basses comme le fréon liquide, dont le point de fusion se situe à -150°C ou en plaçant l'échantillon au contact d'un bloc de métal refroidi dans l'hélium liquide. Quand le tissu est congelé, on l'observe souvent par la technique de la réplique de **cryofracture**, illustrée dans la figure ci-dessous. De petits fragments de tissus sont mis sur un petit disque métallique et congelé rapidement, le disque est ensuite placé dans un support spécial et le bloc de tissu congelé est frappé par une lame, provoquant à partir du point de contact une fente qui clive le tissu en deux parties. Quand le plan de fracture traverse une cellule composée d'organites très divers, de composition différente. Ces structures ont tendance à dévier le plan de fracture, vers le haut ou vers le bas, provoquant dans les surfaces des protubérances, des dépressions et des crêtes qui reflètent les contours du protoplasme traversé. En d'autres termes, les surfaces exposées par la fracture donnent des informations sur le contenu de la cellule. Le but est de rendre visibles ces informations. Pour ce faire, la technique de la réplique utilise la surface de fracture comme un moule sur lequel on dépose une couche de métal lourd. Le métal est déposé à la surface du tissu congelé qui vient d'être exposée dans l'enceinte même qui a servi à produire la fracture. Le métal est déposé sous un angle qui accentue la topographie locale par ombrage. On dépose ensuite une couche de carbone au dessus de la couche métallique directement à partir du haut, plutôt que latéralement, de manière à obtenir une couche uniforme de carbone qui cimente les plages métalliques dans un film continu. Quand on a ainsi obtenu un moulage de la surface, on peut faire fondre le tissu qui a servi de modèle, l'enlever et l'éliminer ; c'est la réplique de métal et de carbone qui est placée sur la grille et observée dans le faisceau d'électrons.

Par conséquent, cette technique convient particulièrement pour étudier l'intérieur des membranes. La réplique de cryofracture est, par elle-même, une technique extrêmement utile, mais elle peut encore servir pour donner plus d'informations quand on y ajoute une étape de **cryodécapage**. Au cours de cette étape, l'objet congelé et fracturé, toujours dans la chambre froide, est placé sous vide à une température élevée pendant une ou quelques minutes : une couche de glace superficielle s'évapore (sublimation). Après l'élimination de l'eau, la surface de la structure peut être recouverte par un métal lourd.



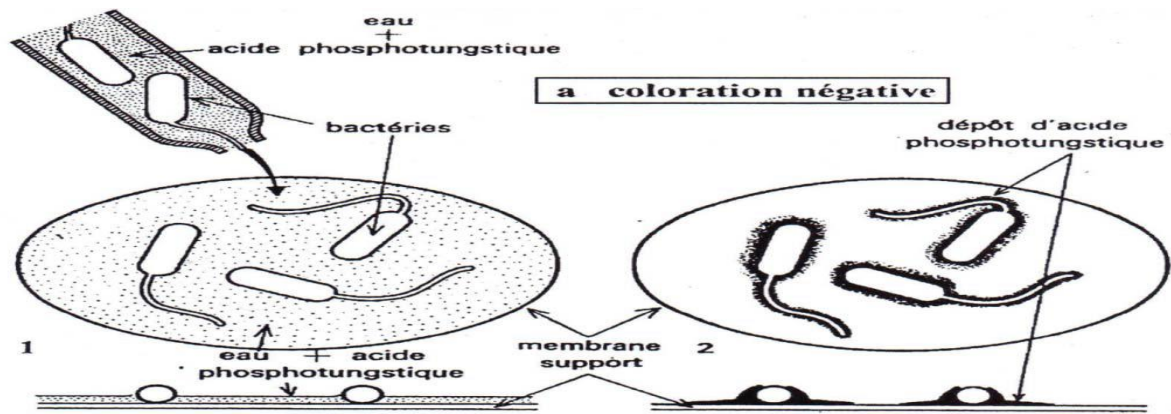
Préparation de répliques de cryofracture pour l'observation au microscope électronique

2.2 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. Il y a également une autre technique largement utilisée pour rendre visible de très petites particules isolées est leur ombrage.

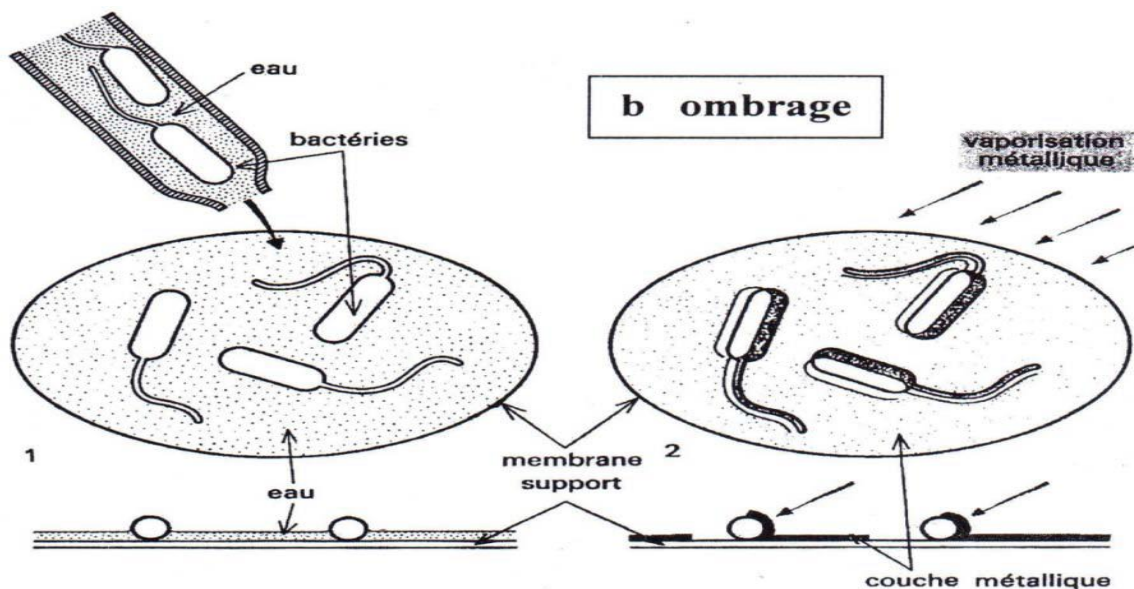
A) LA COLORATION NÉGATIVE

Les échantillons minces (de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur) sont adsorbés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin (quelques nanomètres). Ce sont typiquement des complexes protéiques ou des virus. On forme un dépôt de métal lourd sur toute la surface de la grille sauf aux endroits où se trouvent les particules. Par conséquent, la structure de l'objet se distingue par sa clarté relative sur l'écran fluorescent. Dans cette technique, on place une goutte de colorant (acétate d'uranyle ou phosphotungstate de potassium) sur une grille qui porte les particules à étudier 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 pénètre 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.



B) L'OMBRAGE

Une autre technique largement utilisée pour rendre visible de très petites particules isolées est leur ombrage. 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).



II.METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES

Méthodes permettant l'identification de la nature des constituants chimiques de la cellule et leur repositionnement. Parmi ces méthodes utilisées on a le fractionnement cellulaire et l'autoradiographie.

1) Matériel cellulaire

A) Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire vise, après avoir détruit la membrane plasmique, à séparer les organites cellulaires les uns des autres et à les obtenir aussi pure que possible dans des tubes à essais distincts. Cette technique offre des possibilités expérimentales considérables tant au plan de la biochimie : identification des molécules propres aux organites, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Cette technique implique deux étapes :

- Broyage des cellules ou homogénéisation qui dissocie les organites et les suspend dans un milieu approprié.

- Séparation des organites en fractions pures, au moyen de centrifugation.

*broyage des cellules (homogénéisation)

Cette première étape qui conduit à un homogénat, doit conserver autant que possible l'intégrité structurale, biochimique et physiologique des organites des cellules étudiées. Pour obtenir un homogénat, on place les cellules dans un tube à essai contenant une solution isotonique, cette suspension sera fractionnée par l'un des traitements suivants :

- **Mécanique** : écrasement par un piston.

- **Physique** : avec des ultrasons ou haute pression.

- **Chimique** : avec des détergents (acides ou basiques) ou par des enzymes

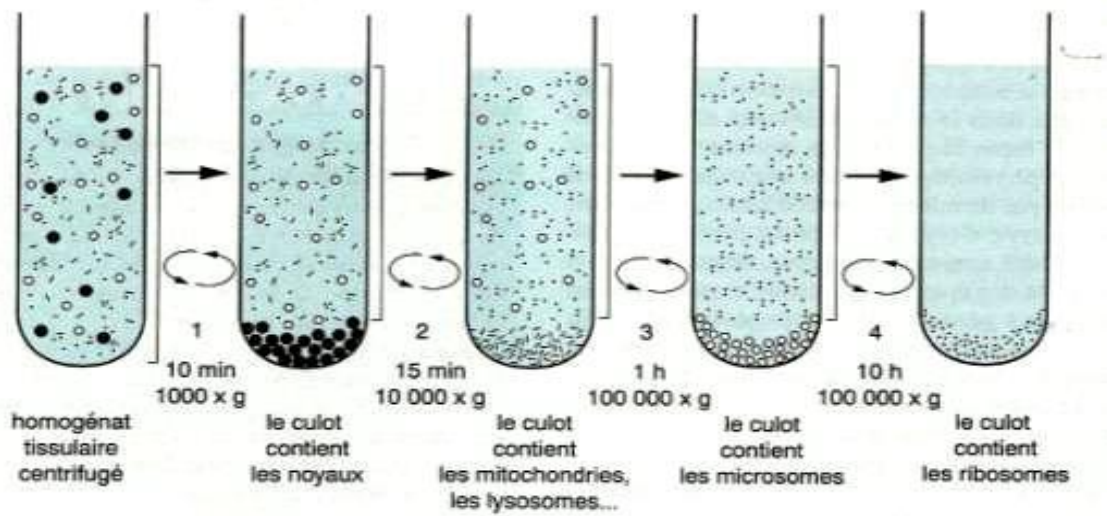
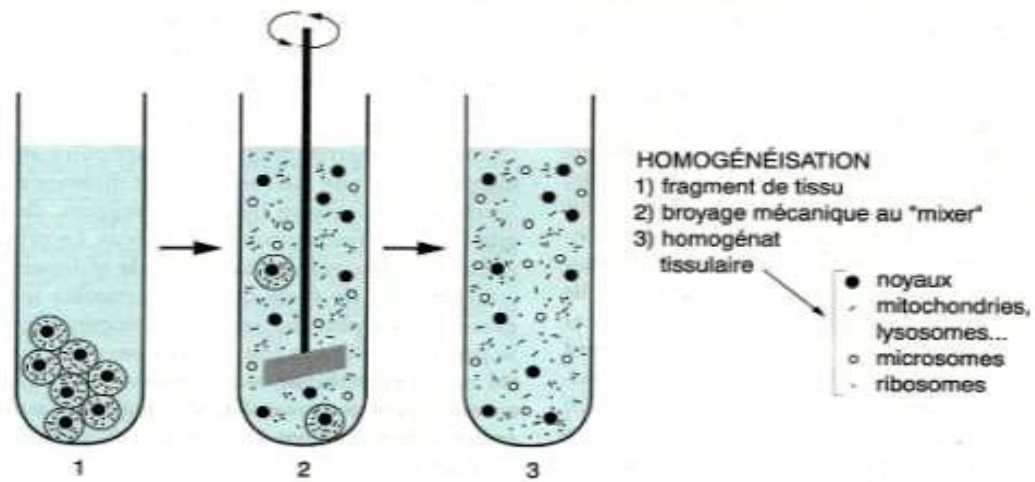
Les milieux de broyage doivent répondre à des exigences chimiques et osmotiques : leur pH est neutre et leur composition ionique aussi voisine que possible de celle du cytoplasme. On considère qu'une solution de saccharose 0.25 M est isotonique vis-à-vis de la plupart des organites vésiculaires.

*Séparation par centrifugation

Les organites cellulaires sont séparés par une technique de centrifugation (ou ultracentrifugation) jouant sur les différences de vitesse de sédimentation des différentes organites en suspension. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, de sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forment le premier sédiment (ou culot).

- **La centrifugation différentielle**

Elle permet de séparer les particules (organites, macromolécules,...) en fonction de leur taille par une succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissantes. On fractionne l'extrait initial en une série de culots et de surnageants.

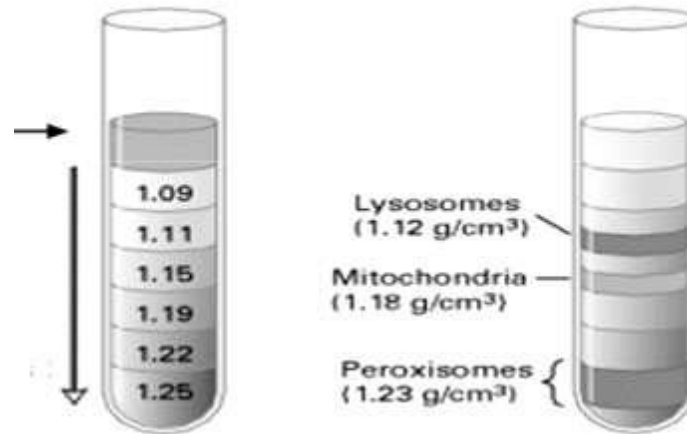


Centrifugations successives

1) basse vitesse 2) vitesse moyenne 3) vitesse élevée 4) vitesse élevée, longue durée

- **La centrifugation sur gradient de densité**

Certains organites et macromolécules sédimentent à des vitesses tellement voisines qu'ils sont très difficiles à séparer par une ultracentrifugation différentielle. C'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes. La technique d'ultracentrifugation sur gradient de densité (UGD) permet de séparer des organites cellulaires et même des petites particules biologiques présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques, et ce en fonction de leur densité.



B) Autoradiographie

La technique d'autoradiographie a pour objectif de marquer une molécule spécifique avec de la radioactivité. Elle permet de suivre et de localiser des substances au niveau des organites cellulaires (figure 3).

Cette technique repose sur l'utilisation de produits radioactifs qui possèdent deux propriétés essentielles:

- Ils sont utilisés par les êtres vivants exactement comme leurs isotopes (éléments chimiques identiques ne différant que par leurs masses atomiques) non radioactifs.
- Ils émettent un rayonnement qui peut être repéré par l'utilisation d'une émulsion photographique

***Les étapes**

1. On fournit à l'organisme un composé radioactif (contenant le plus souvent du ^{14}C ou du ^3H = tritium). Il peut s'agir d'une incubation des cellules en contact avec ce composé ou d'une injection directe dans un organisme, Cette étape d'introduction de la radioactivité dans les tissus constitue le pulse.
2. On sacrifie l'organisme et l'on réalise des coupes dans les tissus à étudier, ou on prélève les cellules en culture. On fixe le matériel et les composants radioactifs non incorporés sont éliminés par lavage.
3. On recouvre le matériel d'une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'Ag). On maintient le tout plusieurs jours ou plusieurs semaines à l'obscurité. Pendant ce laps de temps, les rayonnements émis par les éléments radioactifs vont transformer l'AgBr en Ag métallique.
4. On développe le film pour faire apparaître en noir les zones impressionnées (présence des grains d'argent opaques).
5. L'observation simultanée du matériel permet de localiser les molécules ayant incorporé l'élément radioactif (molécules marquées)

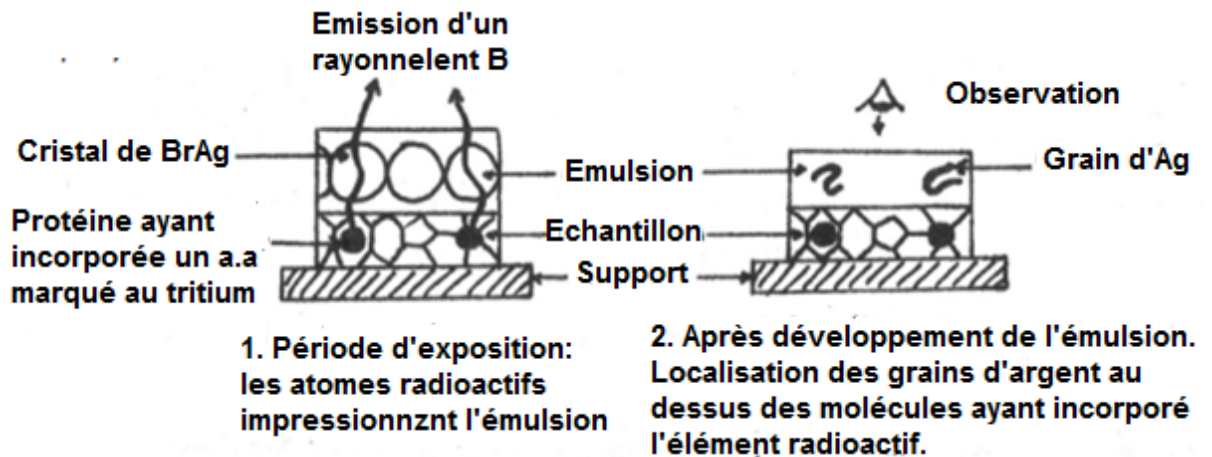


Figure 3 : Principe de la radioactivité incorporée dans un constituant cellulaire par autoradiographie

2. Les méthodes

2.1. Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

Elles sont appliquées soit à des homogénats, soit à des fractions cellulaires à partir desquels on obtiendra des **extraits bruts = constituants biochimiques en solution**. Elles consistent à rechercher la **nature et la concentration des constituants biochimiques** : glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. Elles sont **très nombreuses** et concernent les techniques d'extraction, de purification, de caractérisation et de dosage.

2.2. Les méthodes cytochimiques

Ces méthodes permettent de **localiser les constituants biochimiques** à l'intérieur des cellules. Ces méthodes **s'adressent à des coupes**. Différents exemples vont être donnés en illustration. * ex : localisation de polysaccharides : réaction à l'APS (Acide Périodique - réactif de Schiff) C'est la méthode la plus employée pour localiser les polysaccharides dans la cellule. Elle se réalise sur des **coupes tissulaires en deux temps** :

1) **oxydation des polysaccharides** par l'acide périodique IO₄H. Il y a alors **formation de fonctions aldéhydes** à partir de certaines fonctions alcool (= groupement hydroxyle) des oses qui constituent les polyholosides. La coupe est trempée dans un bain d'AP.

2) **mise en évidence des fonctions aldéhydes apparues par le réactif de Schiff**. La coupe est immergée dans un bain de réactif de Schiff. On obtient une **coloration rouge** dans les régions cellulaires riches en polysaccharides. La coupe est ensuite **observée au microscope photonique par transmission**.

3) Pour **connaître la nature des polysaccharides** détectés dans les différentes régions de la préparation, on effectue au préalable une **digestion enzymatique**. La coupe est trempée dans une solution tamponnée d'une enzyme donnée (ex. la glycogénase). Puis on réalise la réaction APS. On compare la première lame et de la seconde, et on recherche les zones dans lesquelles la coloration rouge a disparu. On en déduit alors la localisation du polysaccharide recherché (ex glycogène).

* ex : localisation d'acides nucléiques : test de Brachet et réaction de Feulgen. Cette technique est employée pour localiser les acides nucléiques dans la cellule. Elle est toujours réalisée à partir de coupes. Ce test combine :

- une méthode de coloration au mélange [vert de méthyle + pyronine] :
- vert de méthyle ----> ADN vert
- pyronine ----> ARN rouge

*l'emploi d'enzymes capables d'hydrolyser de façon spécifique soit l'ADN soit l'ARN, c'est-à-dire DNase et RNase. Le traitement par les nucléases est nécessaire pour vérifier la spécificité de la coloration, car la coloration au vert de méthyle-pyronine n'est pas très spécifique.

coupe A sert de témoin et n'est pas traitée par les nucléases ;

coupe B est traitée par la DNase ;

coupe C est traitée par la RNase.

Puis ces trois coupes sont colorées par le mélange vert de méthyle-pyronine et sont observées au microscope photonique par transmission.

- noyau contient ADN (chromatine) et ARN (nucléole bien visible, mais transcription partout aussi)
- cytoplasme contient ARN pas d'ADN (l'ADN mitochondrial et chloroplastique n'est pas visible à l'intérieur de ces organites car sont rarement observables en microscopie photonique).

* Localisation d'antigènes (Ag) et d'anticorps (Ac) :

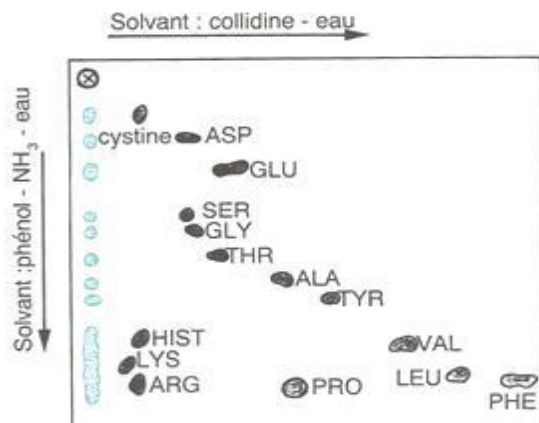
Utilisation des "outils anticorps" Ce sont des **méthodes très générales** car à partir du moment où on a l'Ac on peut localiser n'importe quel Ag c'est à dire n'importe quelle molécule. Ces méthodes reposent donc sur la propriété de reconnaissance spécifique des anticorps. On travaille toujours **à partir de coupes tissulaires**. La méthode se déroule en **deux temps** :

- 1) **formation du complexe Ag-Ac** = complexe immun : la coupe est trempée dans un bain contenant l'anticorps en solution ;
- 2) **révélation de la présence des complexes immuns** : utilisation d'outils immunologiques marqués, par exemple anti-anticorps = anti-immunoglobuline = anti-Ig = antiglobuline marquée. Il existe **différentes façons de marquer les "anticorps révélateurs"** :
 - par des **enzymes** capables d'utiliser un substrat chromogène c.à.d. capable de donner un produit coloré détectable ----> observation en microscopie photonique par transmission ;
 - par des **fluorochromes** ----> observation au microscope à fluorescence ;
 - par des **radioisotopes** ----> autoradiographie (voir § plus tard) puis observation de la coupe et de la plaque photographique en parallèle au microscope photonique ou électronique.

2.3.Chromatographie et électrophorèse

La **chromatographie** est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les propriétés de solubilité différentielle des composés dans des solvants ou des mélanges de solvants **variés**. Chaque espèce chimique se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases mobile et/ou stationnaire. La chromatographie permet donc de séparer les constituants d'un mélange homogène. Il existe différents types de chromatographies suivant la méthode de séparation utilisée: d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion. La chromatographie sur couche mince (CCM), par exemple, est une technique physique de séparation d'espèces chimiques. Pour cela on utilise un éluant: solvant qui monte par capillarité le long du support entraînant ainsi les différentes espèces chimiques.

Dans certains cas, le partage se fait plus facilement par chromatographie de partage bidimensionnelle : une première chromatographie dans un premier système de solvants est suivie par une deuxième migration dans un système de solvants différent effectuée sur la plaque préalablement séchée et tournée de 90°. les constituants du mélange sont répartis sur toute la surface de la plaque et donc mieux séparés qu'après une migration monodimensionnelle.



Chromatographie de partage bidimensionnelle

L'électrophorèse est basée sur les différences de charge électrique. Elles permettent aisément de séparer les sucres simples, les acides aminés, les acides organiques et les acides gras, les nucléotides... C'est aussi une méthode intéressante pour séparer, en présence d'un champ électrique, les centaines ou les milliers d'espèces moléculaires de protéines et d'acides nucléiques constituant les mélanges naturellement rencontrés dans les cellules.

