

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. 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.

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 retraitement.

1.2. Les types de microscope 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 et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain.

*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 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).

*Il existe divers types de microscopes photoniques :

- les uns permettent **l'observation directe de structures** dont les dimensions sont de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$ 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.

Microscopes par transmission

Le microscope le plus courant utilise la lumière visible 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.**

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.

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 éclaire 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.

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.

On place entre **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.

Microscope à balayage confocal :

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**.

Le microscope à rayons UV (= à fluorescence)

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.

B. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La résolution d'un microscope électronique peut atteindre **2 angströms**. 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). 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.

Types de microscopes électroniques

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- la microscopie à transmission
- la microscopie à balayage

Microscope électronique à transmission :

C'est la technique la plus performante. 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.

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 a un pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission.

2. Les conditions d'observation aux microscopes

a)Examen des échantillons en microscopie optique

***Examen de 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. 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 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:**

a) Prélèvement : 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. 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. 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**. On plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique **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.

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) Ré hydratation :

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.

g) Coloration :

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, les colorants 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.

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 $C_5H_8O_2$. 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.

TECHNIQUE DE REPLIQUES

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

*Les tissus prélevés sont congelés rapidement sans fixation ou après fixation, 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 $-150^{\circ}C$ ou en plaçant l'échantillon au contact d'un bloc de métal refroidi dans l'hélium liquide.

*La **cryofracture**, 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. 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. On dépose ensuite une couche de carbone au dessus de la couche métallique directement à partir du haut. C'est la réplique de métal et de carbone qui est placée sur la grille et observée dans le faisceau d'électrons.

* La réplique de cryofracture est 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.

TECHNIQUES DE COLORATION

A) LA COLORATION NEGATIVE

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. 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. 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

Les grilles sont placées dans un espace fermé. Dans la chambre se trouve un filament composé d'un métal lourd 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 incapable 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 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

1. 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 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.

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.

* 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.

* 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** ; par des **fluorochromes**; par des **radioisotopes** ; par autoradiographie 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**. 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.

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.

III. TECHNIQUES DU GENIE GENETIQUE (Séquencage d'ADN)

Séquencage

Le séquençage est une technique d'analyse de l'ADN, il permet de déterminer l'ordre des nucléotides. Actuellement la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de Sanger.

-Méthode de Sanger :

La méthode des didésoxyribonucléotides employée pour séquencer l'ADN. Elle repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase, et d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne. Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogue par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi.

PARTIEII: METHODES ET TECHNIQUES D'APPROCHE DU VIVANT

L'HERBIER:

Un herbier est une collection d'échantillons **végétaux séchés** puis disposés sur des feuilles de papier, sous forme de « **planches** ». Il représente une « **banque** » de matériel végétal, mais aussi une « banque » d'informations précieuses.

Utilisations

-L'herbier permet l'étude des différents **stades phénologiques** sans devoir aller sur le terrain. La découverte de **nouvelles espèces** ne peut être confirmée que par comparaison avec d'autres spécimens d'herbiers disponibles.

-Les herbiers constituent en effet **une collection de référence** permanente qui fournit du matériel pour des études **morphologiques et anatomiques**.

-Utilisation des informations géographiques présentes sur les étiquettes des spécimens afin de synthétiser **la distribution des taxons**.

- Les herbiers, l'extraction de l'ADN des échantillons, par conséquent ils sont une source importante de matériel d'étude pour **les études moléculaires et (phylo) génétiques**.

-Les herbiers sont une source d'informations sur les plantes cultivées (variations morphologiques et génétiques, répartition géographique des cultures, distributions des espèces voisines, distributions des parasites etc.)

-Les herbiers peuvent être utilisés comme source de matériel pour des analyses des composants chimiques des plantes ou bien pour isoler et **caractériser des molécules actives**.

II. Techniques d'approche au vivant

1. Le système d'élevage est un ensemble d'éléments en interaction dynamique, organisé par l'homme en fonction de ses objectifs, pour faire produire (lait, viande, cuirs et peaux, travail, fumure...) et se reproduire un collectif d'animaux domestiques en valorisant et renouvelant différentes ressources.

2. Système de culture est un ensemble de procédés utilisés pour exploiter la terre dans le but de produire des **végétaux** utiles à l'homme. Il peut être défini comme "*l'ensemble des modalités techniques mises en œuvre sur des parcelles cultivées de manière identique*".

3. Collectes

La procédure **de collecte** (Collecter des échantillons dans leurs milieux d'origines), doit être détaillée dans le protocole de recherche et doit inclure le mode de prélèvement, les informations qui seront associées à chaque échantillon, la durée et la période de collecte.

4. Dissection : (du latin : *dissecare* : couper en deux) consiste en l'ouverture d'un corps animal ou végétal selon un protocole défini. La dissection est pratiquée dans les cours de biologie, botanique et anatomie. On parle de dissection humaine (ou anthropotomie) quand elle s'exerce sur un être humain.

III. Accès aux paramètres démographiques des populations animales et végétales.

Pour le biologiste, Une population animale ou végétale est un ensemble d'individus appartenant à la même espèce, susceptibles de se reproduire entre eux, et occupant une aire géographique commune. Celle-ci subit, au cours du temps, des changements incessants liés à la disparition (mortalité,

émigration) et à l'apparition de nouveaux sujets (reproduction, immigration). Des recensements successifs d'une population, s'ils renseignent sur les taux de croissance ou de décroissance.

Principaux paramètres écologiques propres aux populations Afin de pouvoir étudier les populations, il faut d'abord connaître leurs effectifs dans les écosystèmes.

-Méthode d'étude des effectifs

1-Comptage absolu des effectifs : Cette méthode se fait par comptage direct des individus à un instant **T**.

2-Estimation des effectifs: Elles impliquent dans un premier temps une stratégie d'**échantillonnage**. Méthodes des **plots** (régulier) ou des **quadrants** (aléatoire) pour des organismes peu mobiles.

3- Méthodes de piégeages : Ce modèle fonctionne si la population est sédentaire (petits mammifères, insectes).

4- Méthode des marquages, captures, recapturés : Cette méthode permet de fournir une estimation de l'effectif de la population. Elle permet aussi de connaître les taux de naissance ou de décès, les déplacements des individus et dans certains cas les dimensions de leur habitat.

5-Méthode par comptage direct : Elle se réalise en dénombrant les contacts visuels (grands mammifères) ou auditifs (oiseaux nicheurs).

-Paramètres descriptifs d'une population : La connaissance de la densité d'une population constitue un paramètre démoécologique primordial. La densité s'exprime en nombre d'individus rapporté à l'unité de surface.

*On exprime la densité des arbres en nombre d'individus par hectare.

*Les arthropodes de la litière en nombre de sujets par m².

Il est important de distinguer la densité brute et la densité écologique.

Densité brute : effectif total de la population / surface totale du biotope étudié.

Densité écologique : effectif total de la population / surface d'habitat réellement disponible pour la population étudiée.

1-Loi de croissance des populations et stratégies adaptative.

2- L'accroissement démographique exponentiel.

3-L'accroissement démographique logistique.

4-Stabilité et régulation des populations.