

**COURS N 03 DE CYTOLOGIE****LES METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE****Introduction**

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle fondamentales des organismes vivants et en raison de sa petite taille, la biologie cellulaire à, tout d'abord, besoin d'en obtenir une image agrandie de bonne qualité ; ceci a nécessité la mise au point d'outils comme les microscopes et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure du temps.

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 et le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

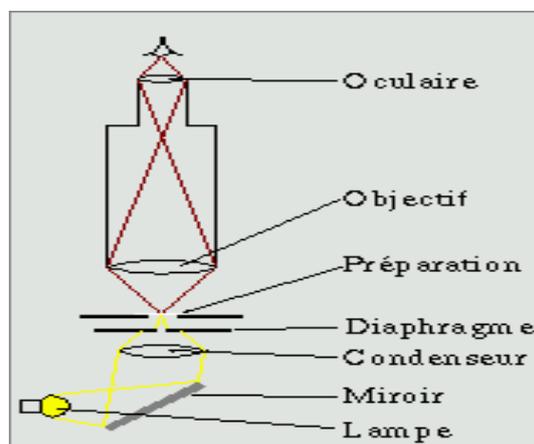
Afin d'observer des détails encore plus fins, il faut augmenter **la résolution**, qui est généralement proportionnelle à la longueur d'onde de la radiation utilisés pour interférer avec les structures étudiées.

On distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes optiques et les microscopes électroniques.

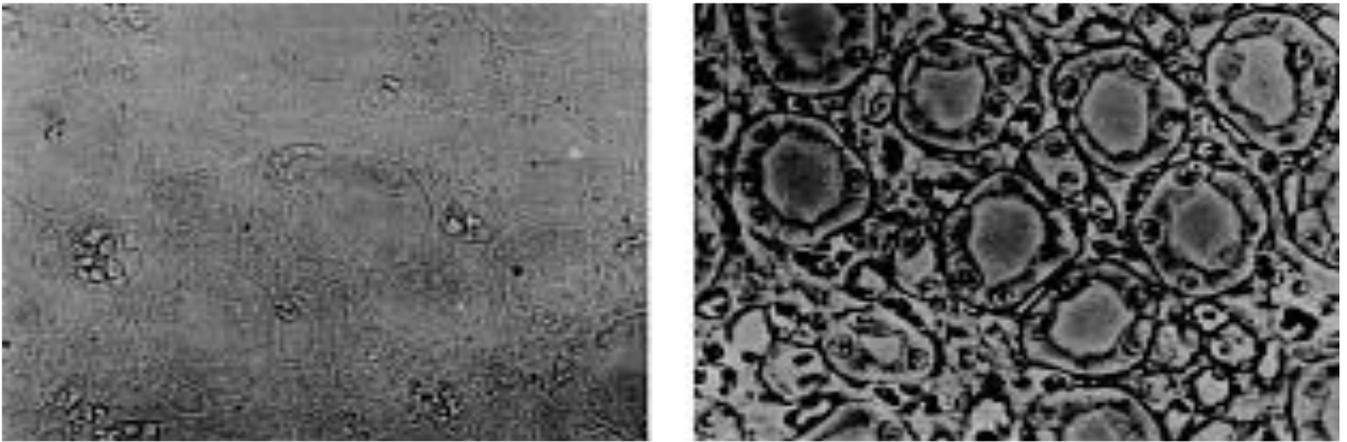
**1. La microscopies optiques**

Les microscopes optiques (à lumière ou photoniques) permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparations fixées, il donne ainsi une vue générale des cellules ou des tissus et permet aussi l'examen de cellules vivantes.

Les microscopes optiques utilisent de la lumière visible et le pouvoir séparateur du microscope photonique atteint sa limite théorique à  $0,2 \mu\text{m}$ , le grossissement étant au maximum  $\times 1000$ .



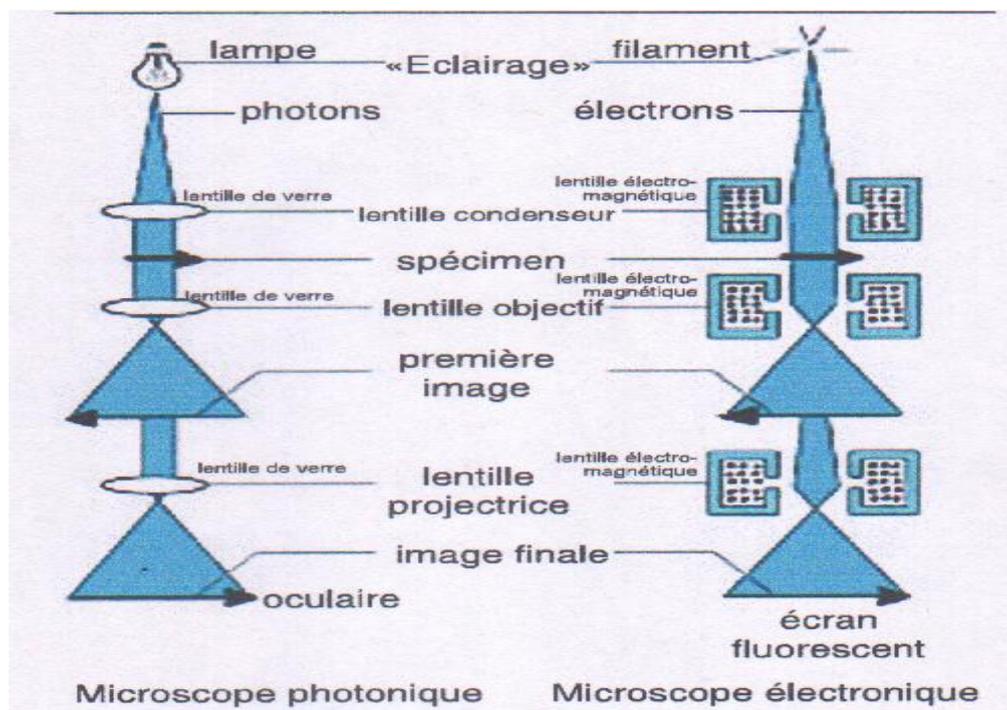
**Figure 1.** Schéma descriptif d'un microscope optique



**Figure 2.** Comparaison des images obtenues avec un microscope photonique ordinaire (à gauche) et avec un microscope à contraste de phase (à droite) Matériel non coloré artificiellement : coupes transversales de tubule rénal de Mammifère.

## 2. La microscopies 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 microscopes sont munis de lentilles électromagnétiques. Le pouvoir séparateur du microscope électronique est de 0,2 nm et est 1 000 fois plus élevé que pour le microscope optique, le grossissement étant au maximum x 100 000.



**Figure 3.** Schémas comparés des trajets des rayons lumineux et des électrons dans un microscope photonique et dans un microscope électronique.

## Observation microscopique de la cellule

L'observation de la cellule se fait à deux niveaux ; à l'extérieur et à l'intérieur.

### OBSERVATION INTERNE DE LA CELLULE

#### A- Techniques de préparation des coupes :

En raison du faible pouvoir pénétrant des électrons, les objets observés doivent être extrêmement fins (coupes de 50 à 80 nm), ce qui nécessite des techniques spécifiques de coupe des échantillons.

Lorsque le matériel biologique est massif (tissus animaux ou végétaux : foie, cerveau, muscle..., ou tige, feuille, racine...), il faut préalablement le débiter en tranches fines et régulières, qui seront ensuite colorées. Dans une cellule de 20 µm de diamètre, on peut débiter 200 à 400 coupes ultrafines.

Les étapes de ce protocole diffèrent dans la mesure où l'observation se fait sous microscopie photonique ou électronique.

microscopie photonique	Microscopie électronique
<b>Fixation</b> : a pour but de tuer les cellules tout en modifiant le moins possible leurs structures internes. On utilise à cet effet des mélanges variés, contenant des substances connues pour dénaturer et coaguler essentiellement les protéines : acides, alcools, aldéhydes, certains sels... Ces fixateurs, dits coagulants, doivent être adaptés à la nature du matériel biologique analysé et au type de coloration employé ultérieurement.	
Chaleur, alcool, formol....	Glutaraldéhyde, acide osmotique.....
<b>Déshydratation</b> : a pour but d'éliminer l'eau de l'échantillon et de la remplacer par un solvant du milieu utilisé pour l'inclusion ; elle consiste en une série de bains dans des alcools de plus en plus concentrés. Cette opération doit être progressive pour que la substitution n'entraîne pas de déformation des tissus. Un dernier bain est réalisé dans un mélange alcool/solvant organique du milieu d'inclusion, pour arriver enfin à avoir l'échantillon dans ce solvant pur : xylène, toluène...	
<b>Inclusion ou Enrobage</b> : a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante, qui permettra une coupe fine et régulière. Cette substance, dont les molécules remplacent en fait les molécules d'eau initiales, est souvent la paraffine ou la résine Epoxy qui est liquide à 60 °C et dure à la température ambiante ; soluble dans les solvants cités plus haut, elle pénètre très aisément dans les tissus. Après plusieurs bains à 60 °C et durcissement de la résine, on obtient un «bloc» qui pourra être correctement coupé et qui sert aussi de moyen de stockage des échantillons.	
Paraffine	Résine synthétique Epoxy
<b>Coupe</b> : a pour but de réaliser des sections fines et transparentes de l'objet inclus. On utilise un <b>microtome</b> pour la microscopie optique, muni d'un rasoir métallique,	

qui donne des coupes sériées ; celles-ci sont collées avec une solution de gélatine sur des lames de verre, séchées et déparaffinées avec du xylène ou du toluène. Seule la matière organique de la coupe subsiste sur la lame.

-Microtome à lame métallique de type Rasoir -de l'ordre de 5 à 7 $\mu$ m

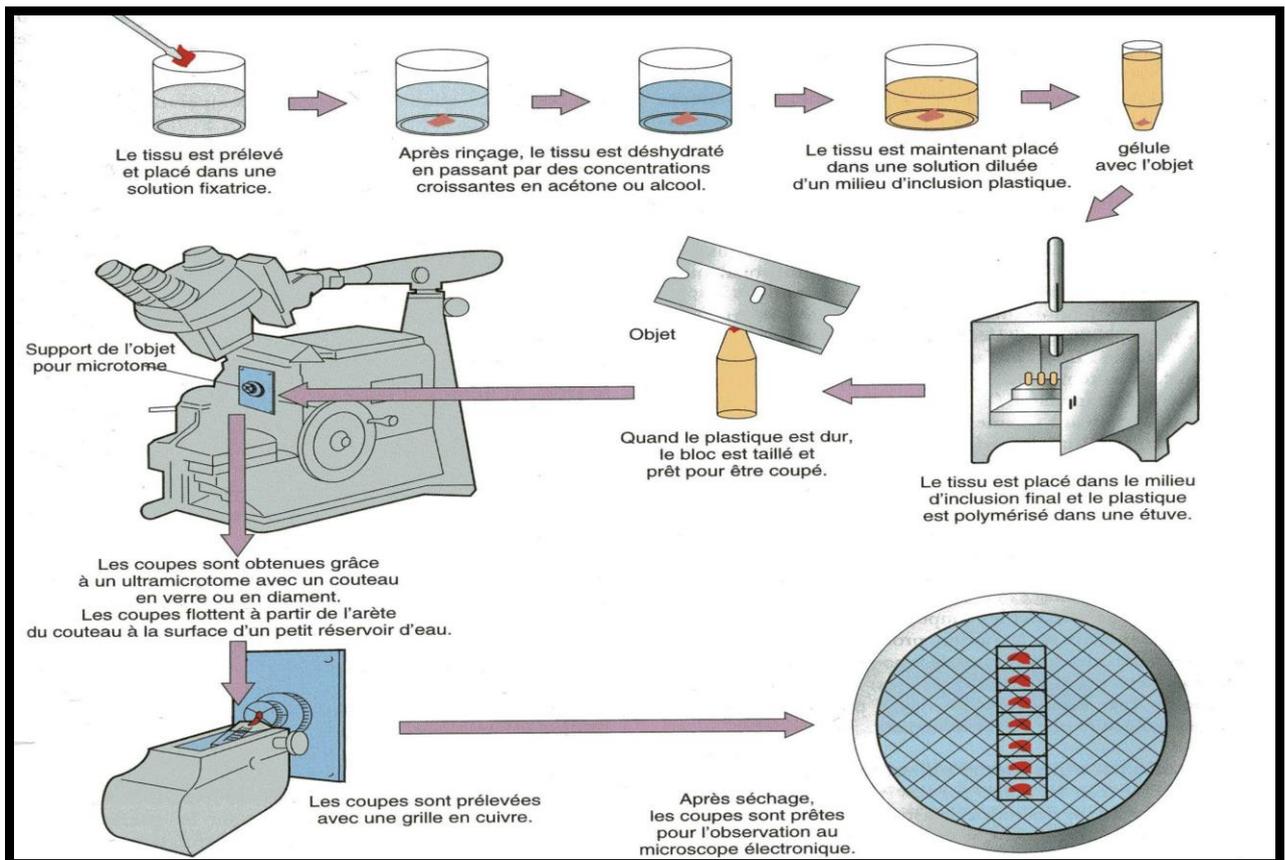
-Ultramicrotome à lame de verre ou de diamant - de l'ordre de 0.1 $\mu$ m et moins

**Réhydratation** : ceci nécessite l'emploi d'une série d'alcools de titres décroissants, pour arriver à l'eau.

**Coloration** : permet de teinter de façon différentielle les divers territoires de l'échantillon biologique.

- pour la microscopie optique tous les colorants utilisés étant hydrosolubles ils colorient l'échantillon et permettent le passage de la lumière.
- pour la microscopie électronique c'est des métaux lourds qui sont utilisés afin d'augmenter le faible contraste résultant du peu d'interaction entre les électrons et les surfaces biologiques.

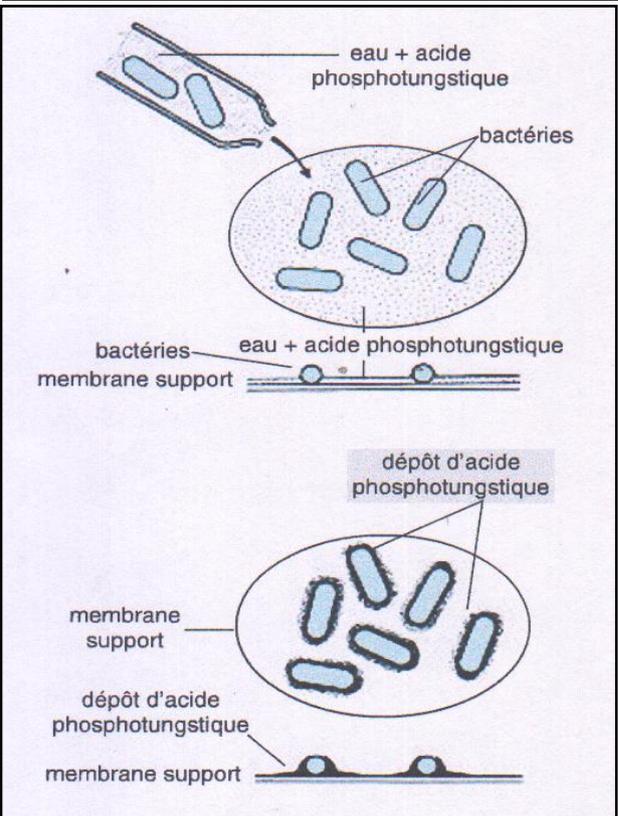
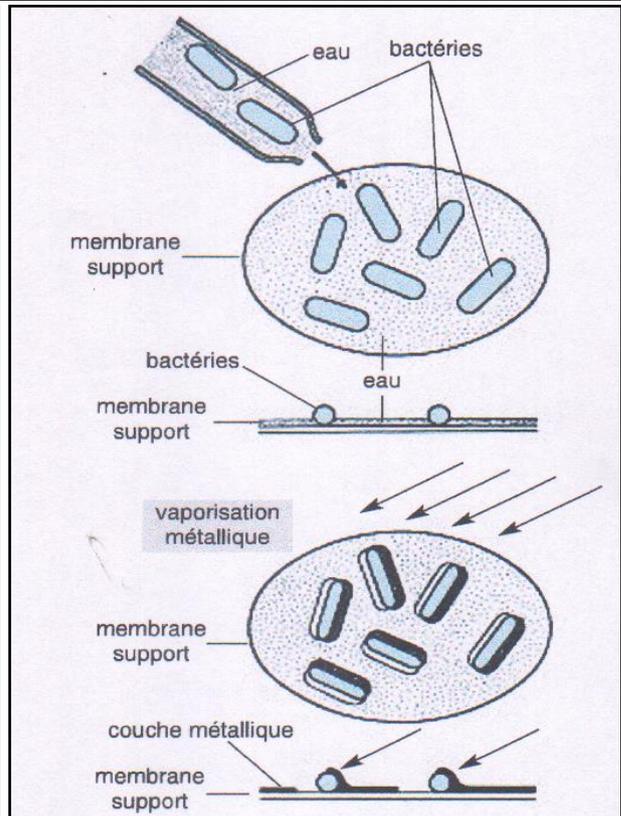
Bleu de méthylène, rouge neutre... Sels de métaux lourds : Citrate de plomb.....



**Figure 4.** Résumé de la méthode de préparation des coupes.

## B-Techniques d'observation des formes et des surfaces cellulaires

Il existe des échantillons et objets de très petites dimensions, de forme relativement simple (molécules, Virus ou éléments cellulaires isolés : organites ou fragments d'organites) possédant de très fins détails qui ne nécessite pas de coupe en particulier dans le cas de structures fibreuses (protofilaments protéiques, flagelles, queue de certains Virus...). L'observation de ces derniers au microscope électronique à transmission pose un problème de manque de contraste, au quel nous pouvons pallier en utilisant l'une de ces deux techniques :

1- COLORATION NÉGATIVE	2- OMBRAGE MÉTALLIQUE
<p><b>Principe :</b> consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à plonger l'ensemble dans une solution de sel de métal lourd, qui est drainée. et les traces de solution qui restent se concentrent sur les angles ou sur les bords des objets.</p>	<p><b>Principe :</b> consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à exposer l'ensemble à des vapeurs métalliques (obtenues en vaporisant sous vide une électrode métallique) et ceci sous incidence pour avoir une ombre formée.</p>
	

**Figure 5.**

### Principe de la coloration négative

Après évaporation du solvant contenant le «colorant» et accumulation de ce dernier autour des particules ou des cellules déposées sur une membrane-support, on obtient un effet de halo permettant de voir ces particules en négatif, en microscopie électronique.

**Figure 6.**

### Principe de l'ombrage métallique

Après évaporation du solvant contenant les particules ou les cellules en suspension, celles-ci sont déposées sur une membrane-support. On procède ensuite à une opération de vaporisation métallique latérale sous vide ; celle-ci conduit à une accumulation localisée de métal qui créera un effet «d'ombre portée» lors de l'examen en microscopie électronique.

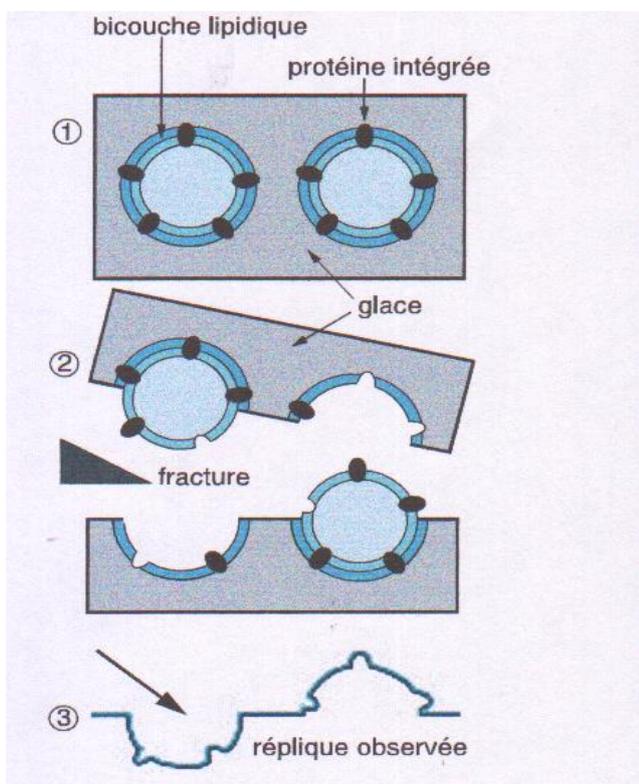
Lors de l'observation de tissus massifs, et de leurs composants interne qui ne sont pas le résultat d'une coupe, mais celui d'une fracture, on parle de cryofracture et cryodécapage.

### 3- Cryofracture et cryodécapage

Cette technique constitue un développement de la technique dite d'**ombrage métallique** mise au point dix ans plus tôt, elle est d'abord basée sur la congélation très rapide d'un tout petit échantillon biologique (moins de 1 mm<sup>3</sup>), dans de l'azote liquide (- 196 °C). L'étape cruciale du protocole est la fracture, et non la coupure, de l'échantillon congelé, et ceci à très basse température. Cette **cryofracture** dégage une surface irrégulière à travers l'échantillon, et c'est cette surface qui sera observée.

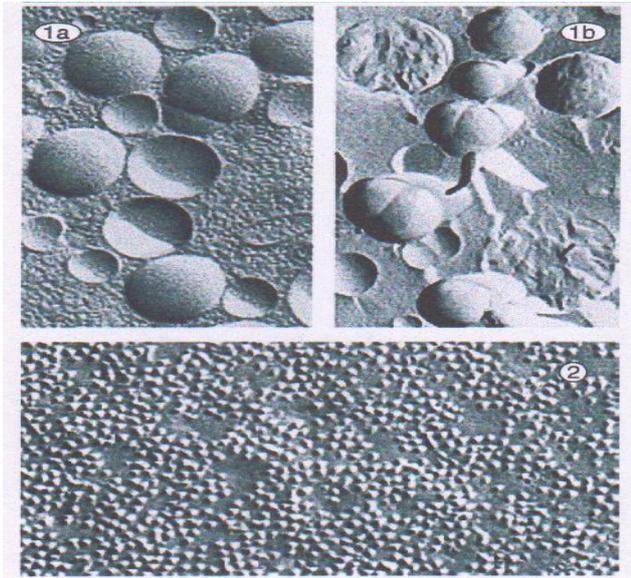
On réalise ensuite le décapage de la surface de l'échantillon en sublimant, sous vide et à basse température, une fine pellicule de glace superficielle ; ce qui a pour effet d'augmenter très légèrement les reliefs des structures (**cryodécapage**).

On enchaîne avec un ombrage métallique, sous vide et à froid, pour renforcer les reliefs). Un film de carbone uniforme et très fin est ensuite vaporisé par dessus la surface métallisée pour la renforcer et couvrir les zones non atteintes par le métal. On a ainsi réalisé un vrai moulage extrêmement précis de la surface fracturée de l'échantillon : la **réplique** ; c'est elle qui est observée au microscope électronique à transmission. Avant l'observation, il faudra la décoller de l'échantillon par décongélation, la rincer et enfin la déposer sur une grille de microscopie électronique.



**Figure 7 :** Principe de la formation des images lors du protocole de cryofracture/cryodécapage (1) Exemple de deux protéoliposomes inclus dans la glace.

(2) Fracture de la glace dégageant soit la partie concave (à gauche), soit la partie convexe (à droite) des vésicules. (3) Aspect de la réplique métallique obtenue après ombrage unidirectionnel (flèche) et vaporisation de carbone. La fracture fait apparaître la face supérieure ou l'empreinte de la face inférieure des protéines intrinsèques, en fonction de leur degré d'enfouissement dans la bicouche. La réplique métallique de cette surface présente ainsi des « creux » ou des « bosses », selon les cas.



**Figure 8.**

Clichés obtenus par cryofracture

(1a) Aspect de liposomes contenant des protéines intégrées à la bicouche (protéoliposomes) et ayant une surface rugueuse. (1b) Aspect de liposomes lisses constitués uniquement de lipides. (2) Aspect d'une membrane biologique (ici la membrane cytoplasmique d'un ovocyte de Xénope ; x 75 000) .