

**République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

**Université Djilali Bounaama de Khémis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des Sciences Biologiques**

Module

Méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant

Responsable du Module

Mme Douaouri N-H

Année universitaire

2021-2022

Programme

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

I. Méthodes Cytologiques

1. La microscopie

1.1. Les microscopes à lumière ou microscopes photoniques

1.1.1. Microscopes par transmission

1.1.2. Les autres microscopes photoniques

- * Le microscope à contraste de phase
- * Le microscope à fond noir
- * Le microscope à lumière polarisée
- * Le microscope à rayons UV (= microscope à fluorescence)
- * Le microscope à balayage

1.2. Les microscopes électroniques

1.2.2. Le microscope électronique par transmission

1.2.3. Le microscope électronique à balayage

II. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules

1. Les matériels cellulaires

1.1. Cellules entières ou des coupes de cellules

1.2. Broyats cellulaires = homogénats cellulaires (Différentes techniques sont utilisables)

1.3. Fractions cellulaires

- * Principe de la séparation des organites cellulaires
- * L'ultracentrifugation différentielle
- * L'ultracentrifugation sur gradient de densité

2. Les méthodes

2.1. Electrophorèse

2.2. Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

2.2. Les méthodes cytochimiques.

2.3. Immun cytologie / immunologie technique.

III. techniques du génie génétique (Séquençage d'ADN)

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET TECHNIQUES D'APPROCHE DU VIVANT.

I. L'herbier : Collection des plantes sèches, base indispensable de recherches.

II. Techniques d'approches du vivant.

1. Elevages.
2. Cultures.
3. Collectes.
4. Dissections.

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

Introduction

L'étude du monde du vivant relève de la biologie, la science qui a pour objectif d'explorer l'être vivant de sa cellule à son comportement individuel ou dans son environnement.

L'organisation d'un être repose sur une hiérarchie de niveaux structuraux, chacun s'édifie à partir du niveau inférieur. Les atomes s'agencent en molécules complexes qui à leur tour forment les structures fonctionnelles appelées organites. Qui sont les composants des cellules. Chez les organismes pluricellulaires, des cellules semblables se regroupent en tissus dont les arrangements particuliers forment les organes. Ces organes s'associent en système pour assurer une fonction précise afin de permettre la survie d'un organisme. Le monde vivant actuel est le résultat de processus évolutifs qui ont débutés il y a quelques milliards d'années, par la formation de molécules organiques à partir de quelques atomes de carbone et d'oxygène.

Un assemblage judicieux et la capacité de communiquer ont abouti à la première cellule. Cette cellule occupe une place privilégiée dans la hiérarchie de l'organisation car elle est capable d'assurer toutes les activités liées à la vie et qui permettent sa croissance et sa reproduction.

Mais une cellule n'existe pas seule : elle est indépendante de son environnement avec lequel elle interagit continuellement.

L'étude scientifique de cet être vivant, seul ou bien dans son environnement, nécessite une méthodologie adéquate et qui nécessite également un ensemble des outils, des instruments et des moyens propres à une recherche donnée appelé « techniques ».

L'objectif de ce cours est de vous permettre ;

- Acquérir des connaissances sur les méthodes appliquées à l'étude du vivant.
- connaître les différentes méthodes à savoir ; les méthodes cytologiques, les méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules et les techniques d'approche aux vivants.

I.1. Rappel sur les types de cellules

Tous les êtres vivants sont formés de cellules à l'exception des virus, les uns sont des unicellulaires et les autres sont des pluricellulaires. La cellule est la plus petite unité structurale et fonctionnelle des organismes vivants. En plus de son pouvoir de croissance et de multiplication elles synthétisent la majorité de ses constituants.

Les cellules sont classiquement réparties en deux formes distinctes :

Les cellules procaryotes (*pro* = primitif; *karyon* = noyau): renferment les bactéries, elles ne possèdent pas un vrai noyau mais un appareil nucléaire diffuse appelé : **Nucléoïde** et dont le génome est constitué d'un seul chromosome circulaire d'ordre haploïde (n ch). Le cytoplasme des cellules procaryotes est essentiellement dépourvu de structures membranaires (**Figure 01**).

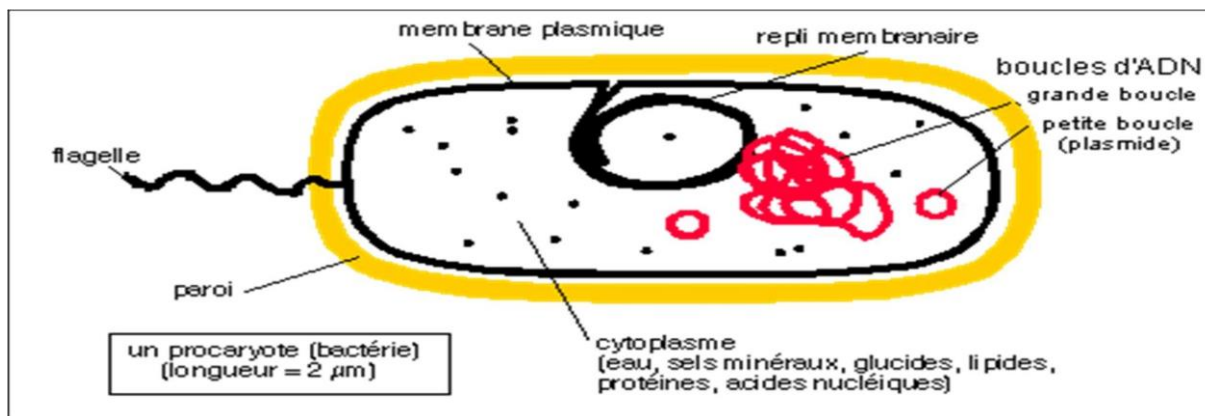


Figure 01 : Organisation d'une cellule procaryote

Les cellules eucaryotes (*eu* = vrai, *karyon* = noyau) : appartiennent aux royaumes des protistes (qui renferment les protozoaires, les algues unicellulaires et pluricellulaires), des Fungi (Champignons), des plantes (Plantes supérieures) et des animaux. Le noyau est délimité par une enveloppe nucléaire. Elles ont plusieurs chromosomes distincts contenant chacun une seule molécule linéaire d'ADN (d'ordre diploïde $2n$ ch). Les eucaryotes se divisent par mitose ou méiose. Des membranes internes délimitent des compartiments cytoplasmiques appelés organites. Parmi les cellules eucaryotes on distingue deux types de cellules : animale et végétale

Les cellules animales et végétales (figure 02) sont entourées par une membrane plasmique et présentent, en grande partie les mêmes organites. Mais, La cellule végétale est caractérisée par :

- La présence d'une paroi squelettique
- La présence des chloroplastes, organites spécialisés dans la photosynthèse.
- Une vacuole de grande taille pouvant occuper la plus grande partie du cytoplasme.

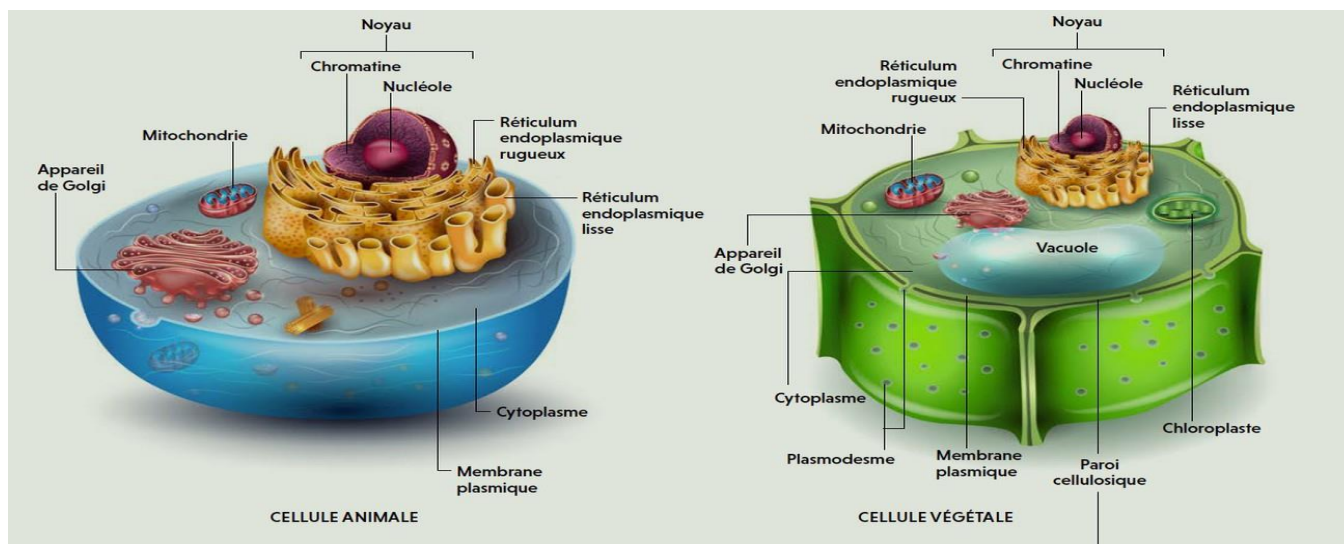


Figure 02 : Dessin représentatif des cellules eucaryotes

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

I. Méthodes cytologiques

Les cellules sont des unités structurales et fonctionnelles fondamentales des organismes vivants et en raison de leurs petites tailles, l'étude de leurs structures, de leurs compositions chimique et de leurs 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.

I.1 Microscopie

La microscopie est un ensemble de techniques qui a permis d'obtenir une image des structures biologiques, qui ont repoussé la frontière entre le visible et l'invisible grâce au microscope (photonique ou électronique).

Il permet d'observer sur coupe très fine les détails infiniment petits d'un échantillon animal ou végétal. 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'oeil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour retraitement (**Figure 03**).

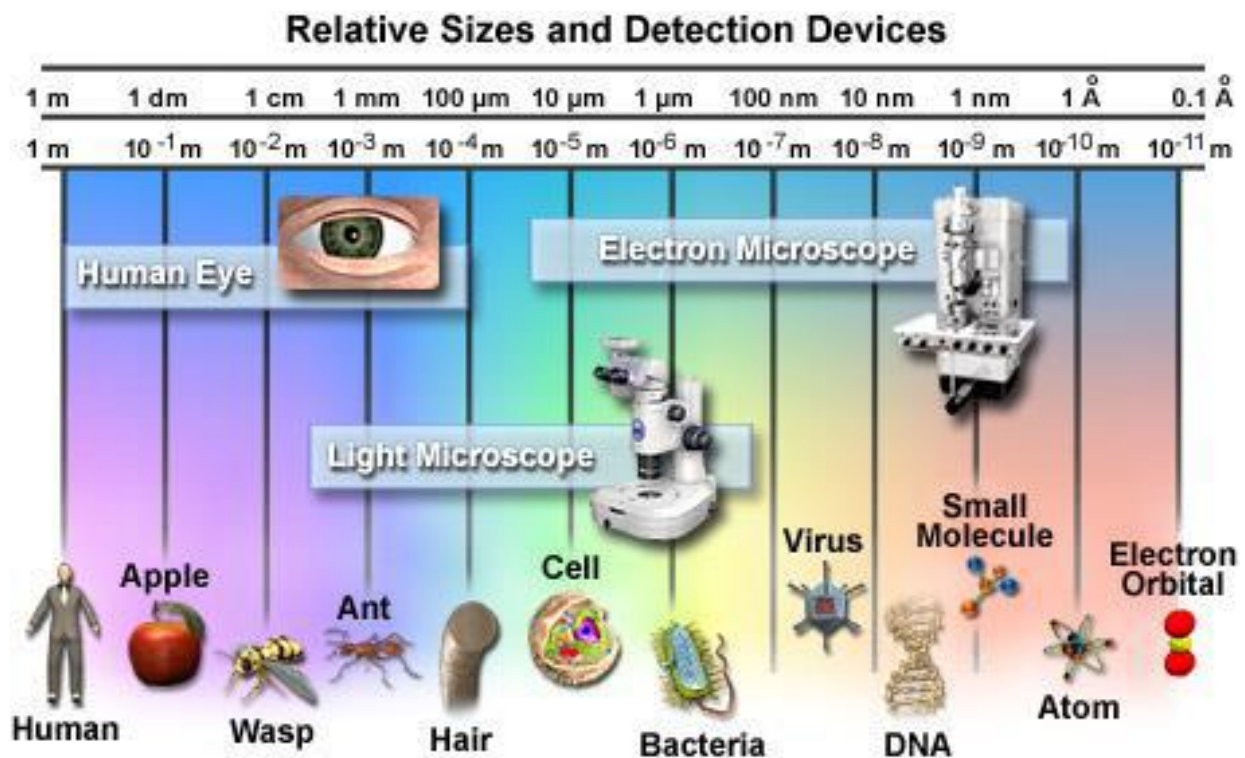


Figure 03 : Représentation des échelles de grossissement en fonction du microscope

Plusieurs techniques de **microscopie optique** existent afin d'observer les cellules. Ces dernières qui ont été fixées et colorées sont étudiées avec un microscope optique conventionnel, alors que le **microscopie à fluorescence** permet de localiser dans les cellules des molécules particulières qui ont été marquées par des anticorps couplés à des colorants fluorescents. L'observation des cellules vivantes peut s'effectuer avec des **microscopie à contraste de phase**.

La détermination des structures détaillées des organites dans les cellules nécessite une forte résolution que l'on peut atteindre avec un **microscopie électronique à transmission**, des images tridimensionnelles de la surface des cellules et des tissus sont obtenues par la **microscopie électronique à balayage**.

I.1.1 Microscopes à lumières ou photoniques

I.1.1.1 Microscopes par transmission

Le microscope optique en lumière transmise 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 grâce à des lentilles optiques (cellules mortes sans modification essentielle de leur structure) et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain.

Dans la microscopie optique conventionnelle, une source lumineuse est concentrée par une lentille spéciale appelé condenseur. La lumière traverse le spécimen biologique par en dessous (celui-ci se trouve sur une lame de verre qui est elle-même disposé sur une platine du microscope) puis une autre lentille appelée objectif. Ensuite, elle est mise au point sur le plan focal et l'image est visualisée à travers une lentille oculaire.

Les deux propriétés importantes d'un microscope optique sont le grossissement et la résolution ;

- **Le grossissement** dépend des caractéristiques physiques de la lentille objectif et de la lentille oculaire et peut atteindre jusqu'à un facteur de 1000.
- **Le pouvoir de résolution d'un microscope** désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. La limite de résolution de cet appareil (la plus petite distance entre deux points de l'objet vus de façon distincte) est au mieux de $0,25 \mu\text{m}$, ce qui permet de distinguer à peine la plupart des bactéries ; on rappelle que cette limite, pour l'œil nu, est de $100 \mu\text{m}$ environ.

Il est utilisé en :

- Biologie, pour observer les cellules (Cytologie) et les tissus (Histologie),
- Pétrographie pour reconnaître les roches,
- Métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage.

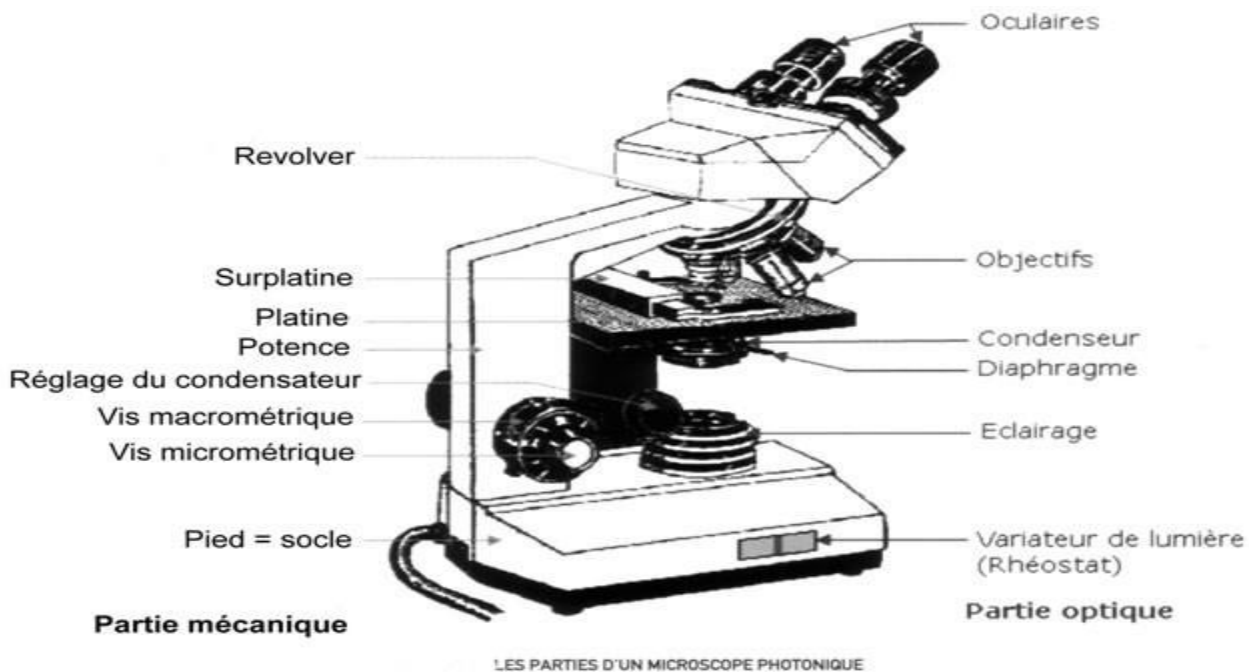


Figure 04 : Dessin représentatif d'un microscope optique

I.1.1.2 Microscope à contraste de phase

Cette microscopie est utilisée pour l'observation nette des cellules vivantes en culture car elle est sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine.

Le principe est basé sur le fait que les structures biologiques sont transparentes, mais qu'elles ont un indice de réfraction différent. Les rayons lumineux (La lumière) vont donc subir des déviations en passant d'un milieu à un autre, cela se traduit par un déphasage entre les rayons. En supprimant les rayons lumineux en fonction de leur déphasage, on obtient une image en niveau de gris qui visualise tous les changements de milieu à l'intérieur de l'objet observé.

En pratique, on supprime ces rayons déphasés en plaçant des diaphragmes qui bloquent la lumière dans l'axe de l'objectif, mais laissent passer ceux de la périphérie.

Les régions de la cellule ayant un indice de réfraction élevé ralentissent la lumière laquelle sera déphasée par rapport à la lumière traversant une région de la cellule dont l'indice de réfraction est peu élevé.

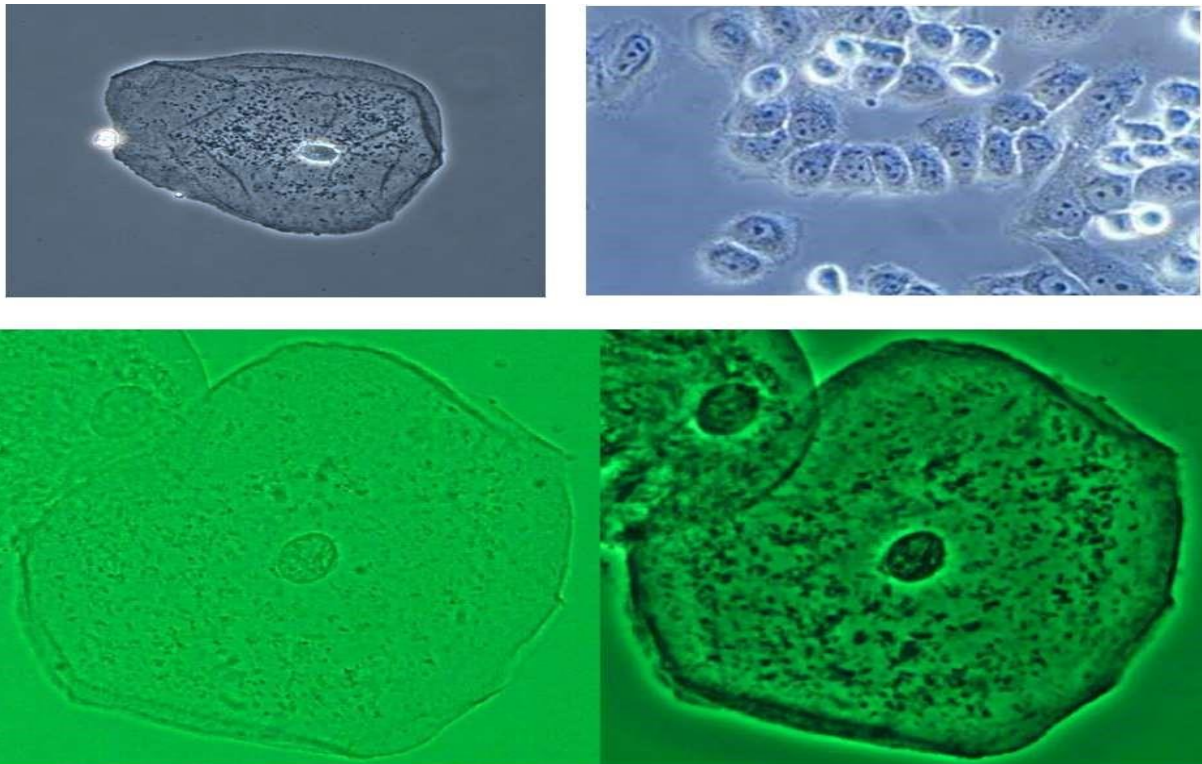


Figure 05 : Photos représentatives d'une observation microscopique à contraste de phase

I.1.3 Microscope à fluorescence

Cette variante exploite la capacité qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière une fois éclairées avec une lumière de longueur d'onde supérieure. 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.

Il est très utile pour analyser aussi bien des substances fluorescentes naturellement (comme la chlorophylle) que des substances fluorescentes fixées artificiellement sur des molécules comme marqueurs appelées **fluorochrome ou fluorophore** (qui est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation avec une longueur d'onde précise). 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.

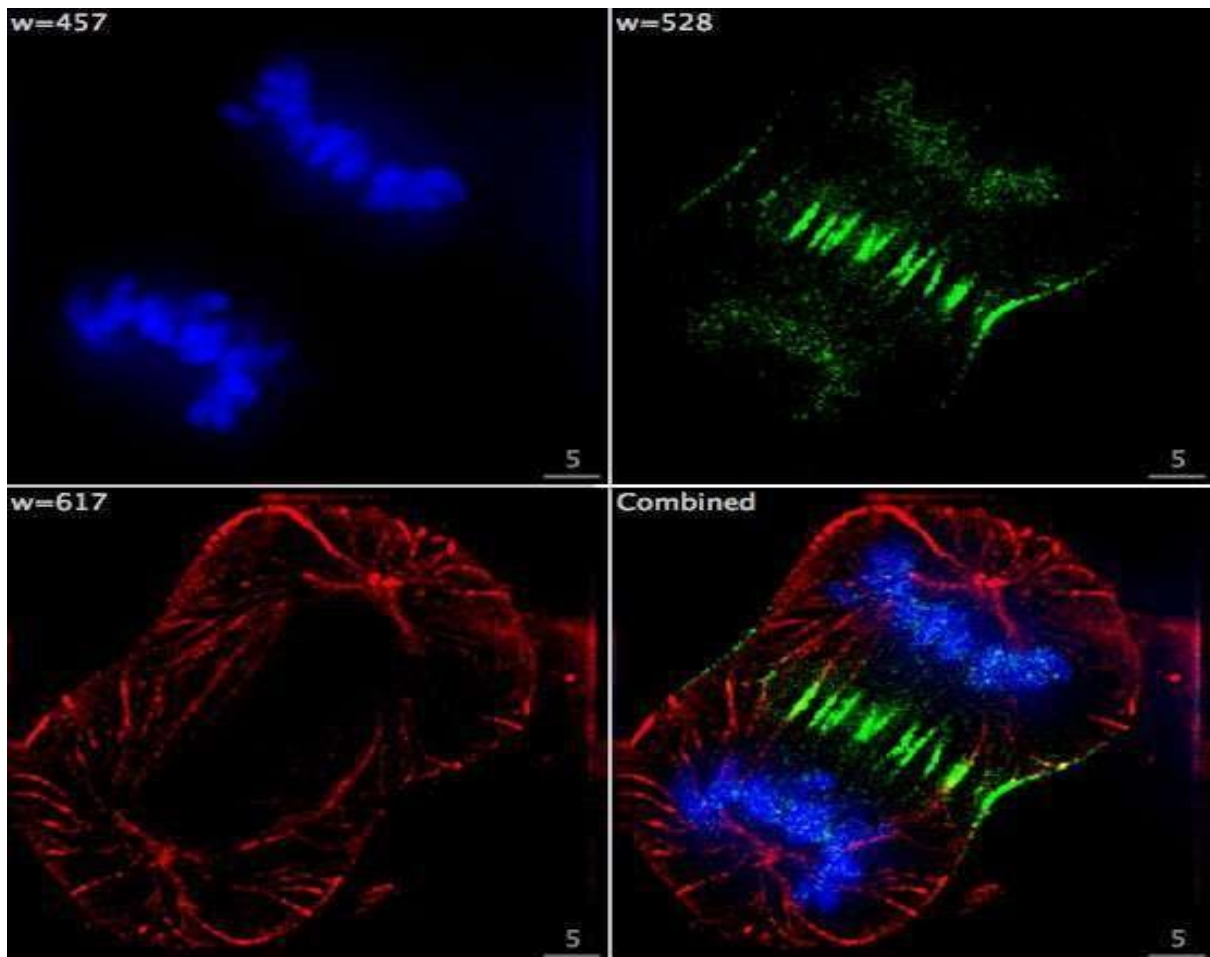


Figure 06 : Photos représentatives d'une observation microscopique à fluorescence.

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).

I.1.1.4 Microscope à fond noir :

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des cellules vivantes, en augmentant les contrastes naturels (répartition de la lumière entre les parties claires et sombres).

Le microscope à fond noir (ou en champ sombre) permet d'améliorer le contraste d'échantillons qui sont transparents et difficilement observables au microscope optique classique.

L'échantillon est éclairé de derrière de telle façon que l'éclairage ou La lumière source (transmise) ne tombe pas (n'atteint pas) directement dans l'objectif ; Seule la lumière déviée par l'échantillon atteint l'objectif (seule la lumière diffusée et donc déviée par l'échantillon peut être observée). Le fond de l'image apparaît donc

sombre, tandis que les objets de l'échantillon paraissent clairs et le contraste est ainsi fortement amélioré, sans nécessiter la coloration d'un échantillon pourtant transparent (Figure 07).

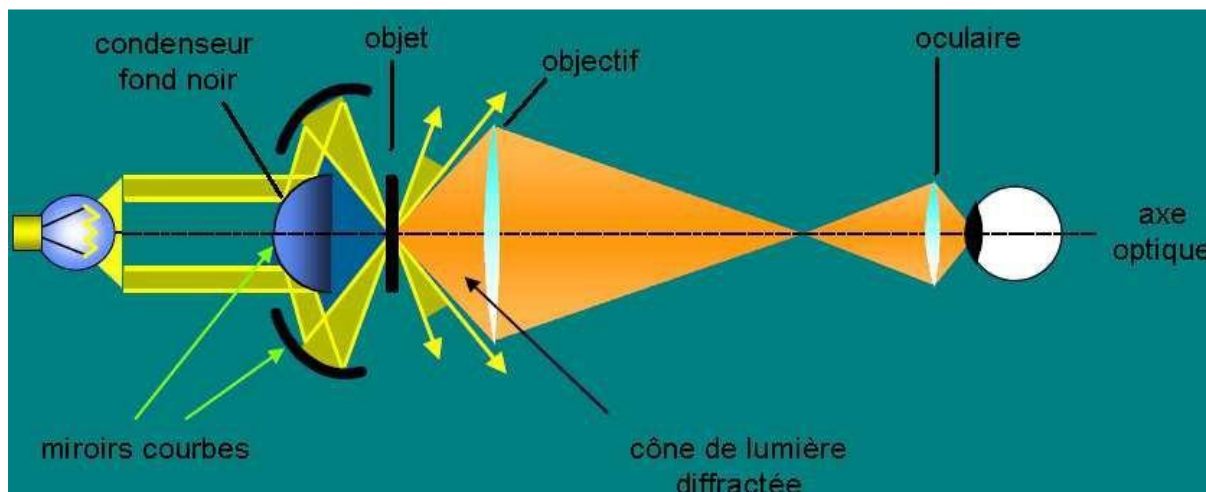


Figure 07. Principe du microscope à fond noir.

La microscopie à fond noir est adaptée aux échantillons non colorés. Elle permet d'observer des structures vivantes et en déplacement comme des bactéries ou des organismes unicellulaires.

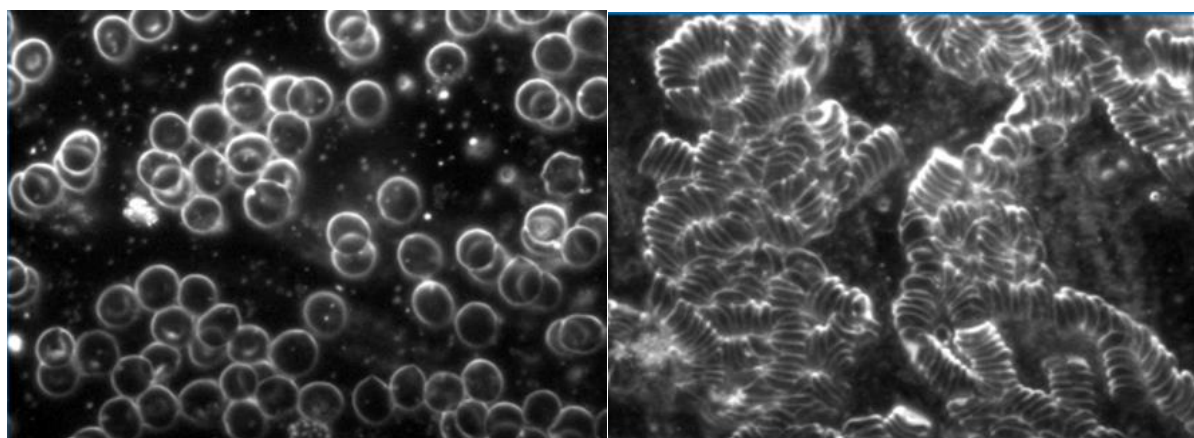


Figure 08 : Photos représentatives d'une observation microscopique à fond noir
Observation d'une goutte de sang (normale) et d'une goutte de sang (anormale).

I.1.1.5 Le microscope à lumière polarisée

Ce microscope utilise une lumière particulière : la lumière polarisée. La lumière ordinaire (naturelle ou artificielle) est une onde électromagnétique qui vibre dans toutes les directions dans un plan perpendiculaire au trajet de propagation. Lorsque cette lumière traverse un filtre particulier (filtre polarisant) elle ne vibre que dans une seule direction. Cette lumière est appelée lumière polarisée (LP).

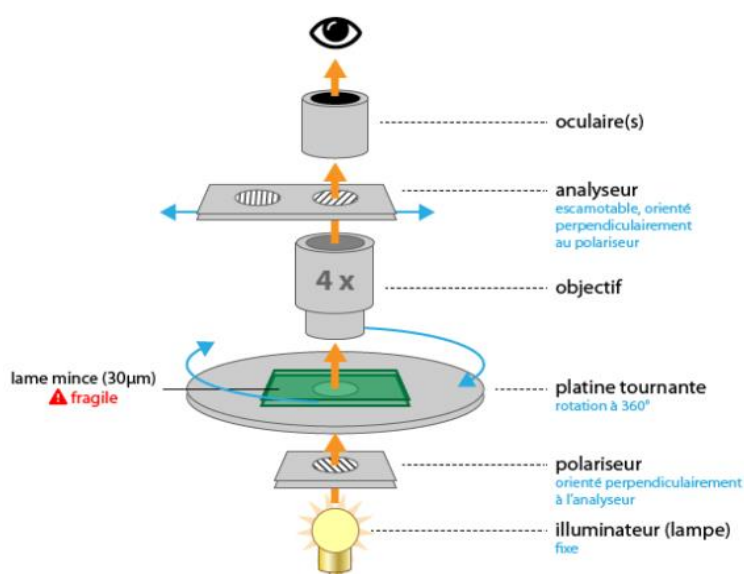
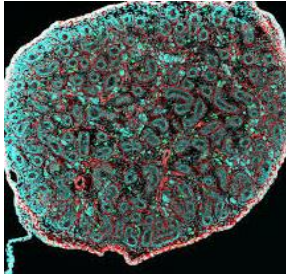


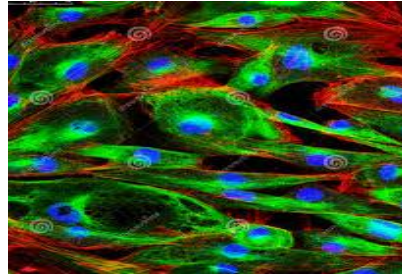
Figure 09 : Principe du microscope à lumière polarisante

I.1.1.6. Le microscope à balayage

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. La coloration est par sondes fluorescentes et la lumière émise par la coupe optique éclairée donne une image sur un écran vidéo. Ce type de microscopie est employé pour l'observation des échantillons massifs. Les coupes photographiques d'un cerveau humain prises par un scanner sont un exemple de ce type.



Testicule



Fibroblaste

I.1.2. Microscopie électronique

Le microscope électronique est beaucoup plus récent : le premier a été construit en 1931, par Max Knoll et Ernst Ruska. Puis il s'est répandu à partir des années 60. Sa résolution peut atteindre 2 angströms.

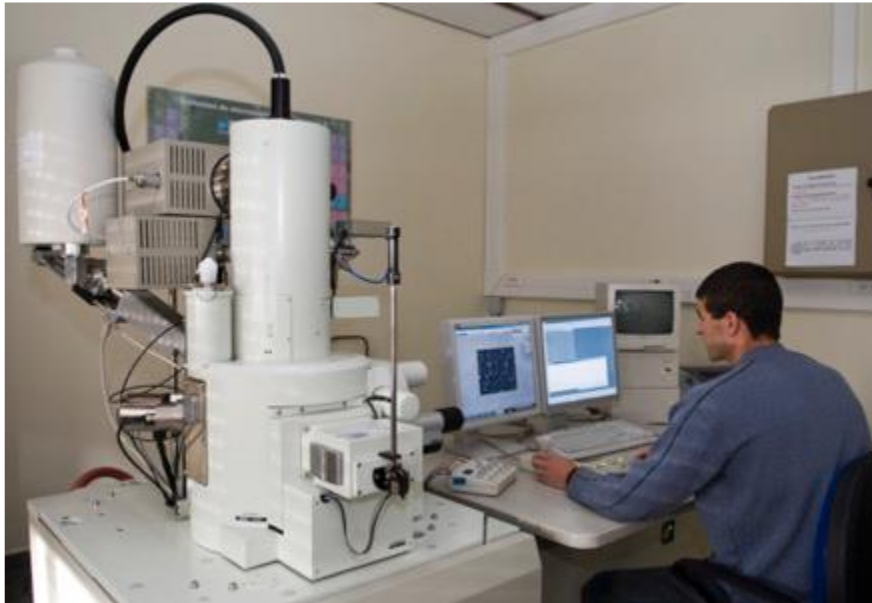
I.1.2.1 Le microscope électronique par transmission :

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, l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent.



I.1.2.2. Le microscope électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. 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.



Principes comparés du microscope optique (MO), du microscope électronique à transmission (MET) et du microscope électronique à balayage (MEB)

