

# Méthodes d'étude des cellules

## Plan

---

- I. Méthodes d'étude de la morphologie des cellules : techniques d'examens microscopiques
- II. Techniques de séparation et de purification cellulaire
- III. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules
- IV. Méthode d'étude du métabolisme cellulaire
- V. La culture cellulaire



# ***I. Méthodes d'étude de la morphologie des cellules : techniques d'examens microscopiques***

1. Préparations pour l'observation microscopique

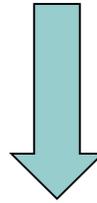
# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.1 en cas de microscopie à lumière

---

- L'observation par transmission exige que les rayons lumineux traversent l'objet.



- Ainsi l'objet doit être de faible épaisseur

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

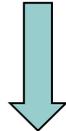
### 1.1. en cas de microscopie à lumière

---

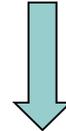
- L'objet doit être de faible épaisseur



Il faut donc réaliser une coupe : microtomie



Pour cela, il faut durcir l'échantillon : inclusion



Pour cela, il faut fixer les structures car le durcissement peut les altérer

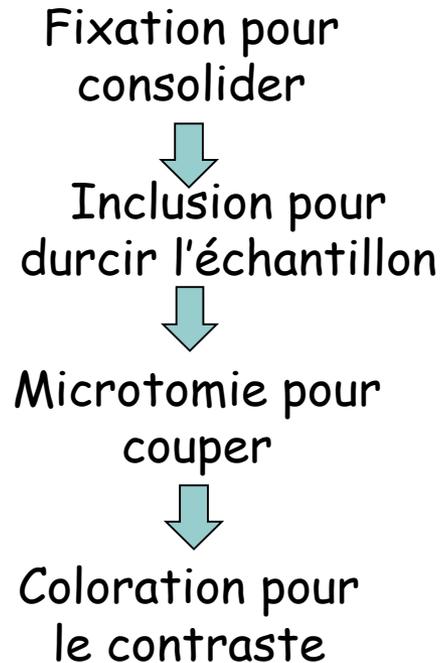
# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1. 1. en cas de microscopie à lumière

---

On récapitule :



# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1. 1. en cas de microscopie à lumière

---

#### Etape 1: la fixation

Elle peut être chimique:  
avec des fixateurs  
coagulants (pour les  
tissus) ou non coagulants  
(cytologie).

Elle peut être physique:  
la congélation (qui doit  
être rapide): c'est la  
meilleure technique.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1. 1. en cas de microscopie à lumière

---

## Etape 2: l'inclusion

l'eau des cellules est remplacée par de la paraffine chaude qui durcit en refroidissant.



NB: Le remplacement de l'eau par la paraffine n'est pas directement possible: ces deux liquides n'étant pas miscibles. On doit en premier lieu substituer à l'eau des cellules fixées de l'éthanol, puis du toluène qui peut se mélanger à la paraffine liquide chaude. On peut aussi durcir avec la congélation.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

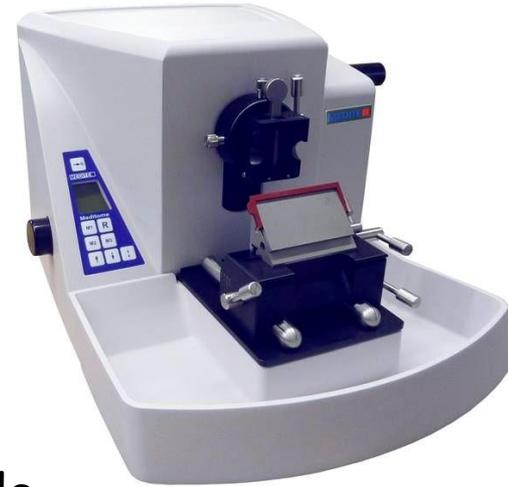
### 1.1. en cas de microscopie à lumière

#### Etape 3: la coupe

On utilise un microtome : rasoir d'acier

Après inclusion à la paraffine : coupes de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ,  
Après congélation : coupes de 5-10  $\mu\text{m}$ .

NB : Lorsqu'on travaille avec des échantillons congelés, le microtome est équipé d'une enceinte maintenue à  $-20^{\circ}\text{C}$ .



# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

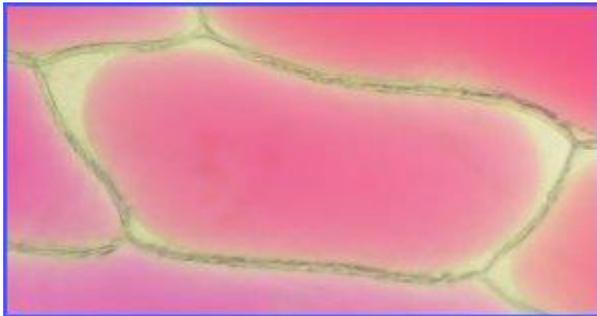
### 1. 1. en cas de microscopie à lumière

---

## La coloration

### Colorants vitaux

Ils ne tuent pas les cellules mais  
sont peu nombreux  
Ex: rouge neutre



Observation de cellules d'oignons au microscope  
photonique

### Colorants non vitaux

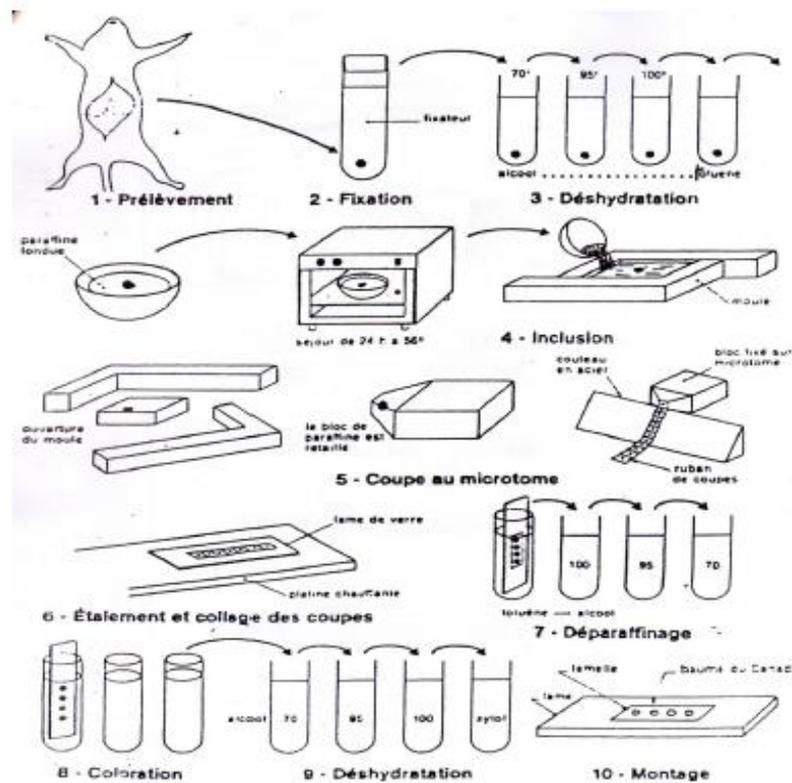
Ils tuent la cellule et  
nécessitent une fixation de la  
cellule au préalable.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1. 1. en cas de microscopie à lumière

#### Schéma récapitulatif des étapes de la préparation des coupes pour le microscope photonique



# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique ( Technique des coupes minces)

---

1. But : obtenir à partir d'un échantillon parfaitement conservé de coupes suffisamment minces (500 à 700Å) pour être transparentes aux électrons, et suffisamment contrastées, pour donner une image nette à l'écran (ou la micrographie).

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

On récapitule :

Fixation pour  
consolider



Déshydratation



Inclusion pour  
durcir l'échantillon



Ultra microtomie pour  
couper



Obtention  
de contraste

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

##### Etape1: Fixation

la fixation a pour but la conservation (après la mort) des ultrastructures cellulaires sans altération (c'est à dire aussi proche du vivant).

On fixe les cellules *in vivo* à l'aide de produits chimiques (tetroxyde d'osmium :  $OsO_4$  ou du glutaraldéhyde :  $C_5H_8O_2$ ) ou d'agents physiques (propane liquide à  $-196^\circ$ , l'hélium liquide à  $-272^\circ$ ).

Il s'agit d'une étape critique qui conditionne le succès de l'étude cytologique.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

#### Etape 2 : Rinçage

le rinçage à l'eau permet d'éliminer le fixateur en lui substituant une solution de même pH.

Il faut effectuer plusieurs rinçages successifs.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

#### Etape 3 : Déshydratation

Déshydratation : elle permet de débarrasser les pièces de leur eau en les plongeant dans des bains d'alcool à concentration croissante ou dans de l'acétone. Le dernier bain se fait à l'oxyde de propylène.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

#### Etape 4 : Inclusion

favorise le durcissement des échantillons, en remplaçant le milieu intracellulaire aqueux par un milieu solide tel que la résine.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

**Etape 5 :** Confection des coupes ultraminces ou ultrafines

Confection de coupes ultraminces ou ultrafines : découper le fragment en coupes de 500 à 700Å d'épaisseur.

Les blocs obtenus sont taillés, les coupes sont effectuées à l'aide d'un ultra-microtome, et recueillies sur une grille métallique couverte d'un film de collodion.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etapes

#### Etape 6 : Contraste :

Il s'agit d'une imprégnation par des sels de métaux lourds (comme les sels de plomb, d'uranyle ou de nitrate d'argent) qui augmente le contraste des structures cellulaires.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

#### Etape 7 : Observation

- Observation directe
- Observation des micrographies prises au MET

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

Technique appliquée au microscope électronique à balayage (MEB) ( Technique de Cryodécapage)

#### 1. But:

**Le cryodécapage permet l'observation des surfaces intra et inter-membranaires, le plus souvent**

- appliquée en microscopie électronique à balayage (MEB). L'observation peut se faire dans certains cas au MET (cas des répliques obtenues à partir de virus ou molécules isolées).

#### 2.Principe:

**Pour l'obtention d'une réplique de l'échantillon étudié**

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

Technique appliquée au microscope électronique à balayage (MEB) ( Technique de Cryodécapage)

#### Etapes

##### Etape 1: Congélation

Les échantillons sont congelés à température dans l'azote liquide (à  $-196^{\circ}\text{C}$ ), on obtient un bloc de glace.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

Technique appliquée au microscope électronique à balayage (MEB) ( Technique de Cryodécapage)

#### **Etape 2:** Fracture du bloc

Fracture du bloc : à l'aide d'une lame refroidie, le plan de fracture passe toujours par les zones de moindre résistance qui sont en générales les espaces inter-membranaire (espace péri nucléaire de l'enveloppe nucléaire) ou bien les régions intra-membranaires qui correspondent aux parties hydrophobes (feuillet clair) de la bicouche lipidique, on obtient dans ce dernier cas une hémimembrane.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

Technique appliquée au microscope électronique à balayage (MEB) ( Technique de Cryodécapage)

**Etape 3:** Elimination de la couche de glace

On élimine la glace superficielle par sublimation.

**Etape 4:** Confection de la réplique

Elle se fait en deux temps, on dépose par vaporisation en biais une couche de platine qui assure l'ombrage de la réplique.

On rajoute à l'aide d'une vaporisation verticale, une couche de carbone qui servira à consolider la couche de platine.

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

---

Technique appliquée au microscope électronique à balayage (MEB) ( Technique de Cryodécapage)

**Etape 5** : Elimination de l'échantillon biologique

Elimination de l'échantillon biologique qui a servi de matrice, par dissolution en utilisant un solvant approprié.

**Etape 6**: Lavage de la réplique et observation au MEB (dans le ca général)

# I - Techniques d'examen microscopique

## 1. Préparation pour l'observation microscopique

### 1.2. En cas de microscopie électronique

Schéma récapitulatif des étapes de la technique de Cryodécapage

