



PHARMACIE 1ère année
Cours de Biologie Cellulaire (2021-2022_S2)



Leçon 12

Méthodes d'étude des cellules: Les techniques microscopiques

Présentée par Dinkorma Ouologuem

Bamako 10 Janvier 2023

OBJECTIFS

1. Décrire le principe de fonctionnement d'un microscope optique et celui d'un microscope électronique
2. Décrire les techniques de préparation des échantillons pour la microscopie optique et la microscopie électronique
3. Citer quatre types de microscope optique
4. Citer deux types de microscope électronique

PLAN

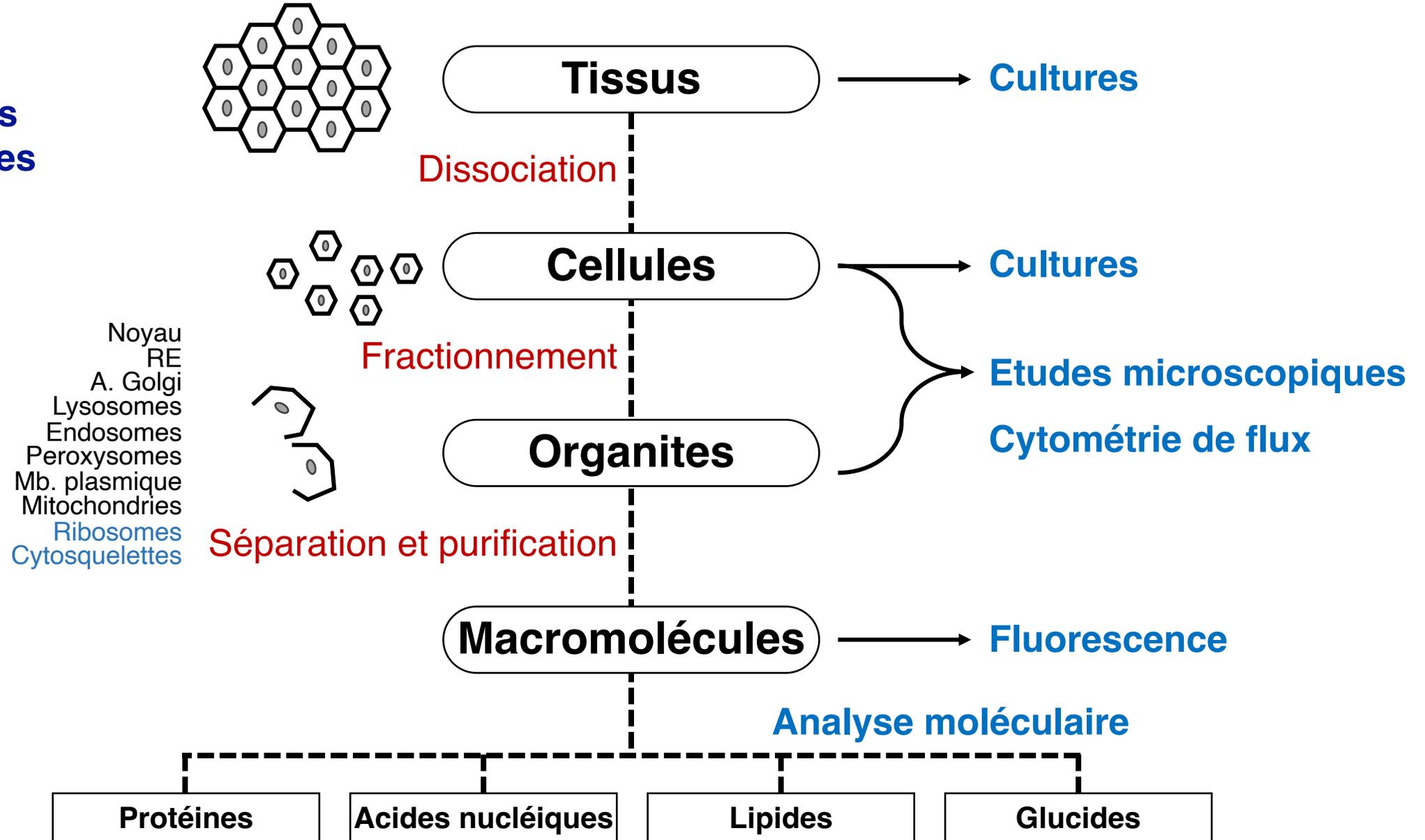
1. Généralités
2. La microscopie optique
3. La microscopie électronique
4. Conclusion

1. Généralités

- L'étude de la structure, de la composition chimique et du fonctionnement de la cellule 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
- Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule : **(1)** les techniques morphologiques, **(2)** les techniques chimiques et biochimiques, **(3)** les techniques physiologiques.

1. Généralités

Démarche
d'étude des
tissus et des
cellules



1. Généralités

- La biologie cellulaire est l'étude des constituants de la cellule, de leurs fonctions et de leurs relations
- **L'étude morphologique** nécessite l'utilisation d'un **microscope** (**méthodes d'observation**)
- D'autres **méthodes indirectes** utilisent la **biochimie** et la **biologie moléculaire** => Information sur le fonctionnement de la cellule

1. Généralités

- L'observation des cellules est délicate et nécessite un certain nombre d'appareillages dont les **microscopes**; Aujourd'hui, la médecine et la biologie ne peuvent plus se passer du microscope.
- La microscopie est **un ensemble de techniques** permettant d'obtenir une image des structures biologiques.

La microscopie est divisée en deux grands groupes caractérisés par la nature de la particule élémentaire impliquée pour étudier l'objet :

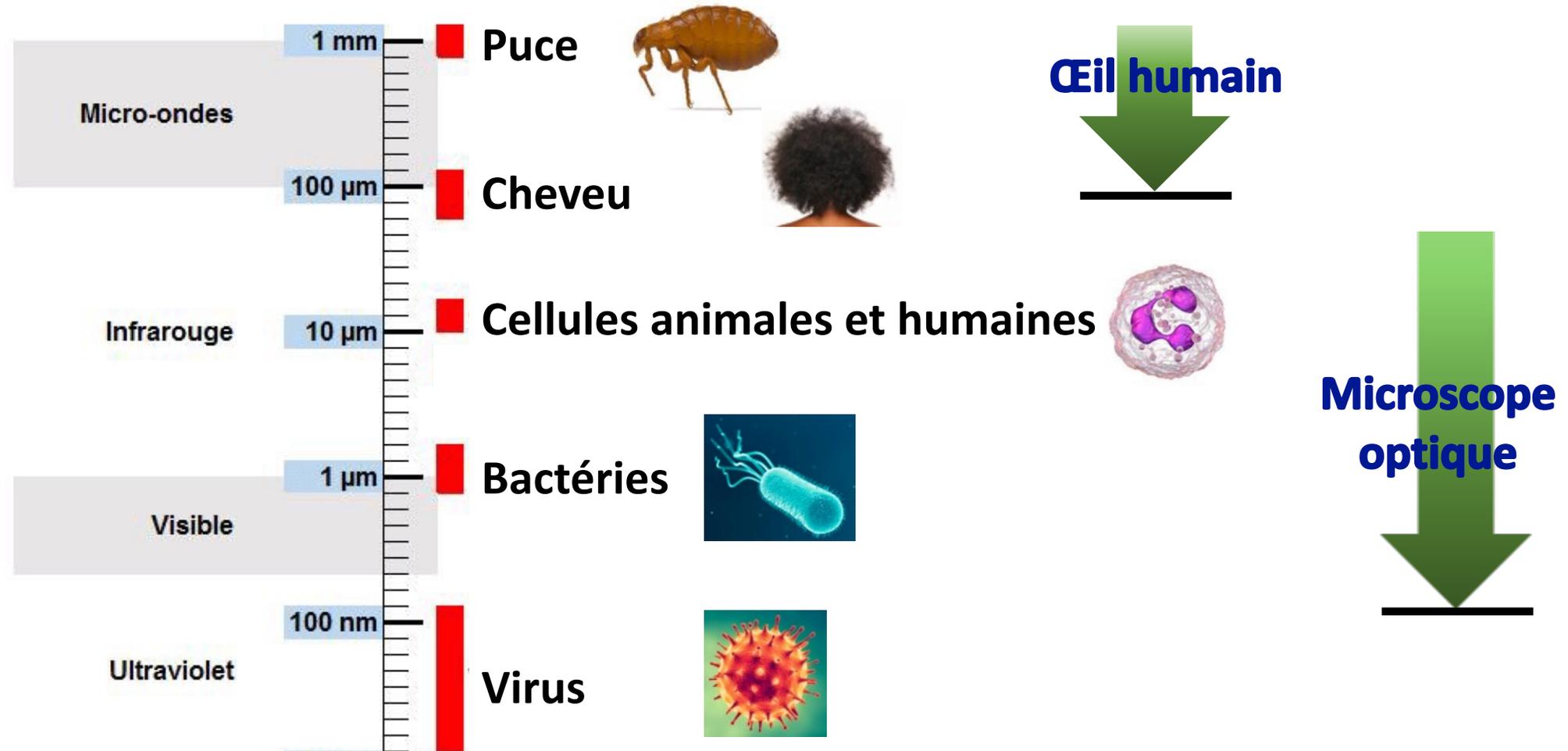
- **le microscope optique**, aussi appelé photonique
- **le microscope électronique**
-

2.1. Définition

Le **microscope optique**, aussi appelé **microscope photonique**, est un instrument d'optique utilisant des **photons** pour illuminer un échantillon, et qui est muni d'un **objectif** et d'un **oculaire** permettant de **grossir l'image** d'un objet et de **séparer les détails** de cette image afin qu'il soit **observable par l'œil humain**.



2.2. Champs d'utilisation du microscope optique



2.3. Principe de la microscopie optique

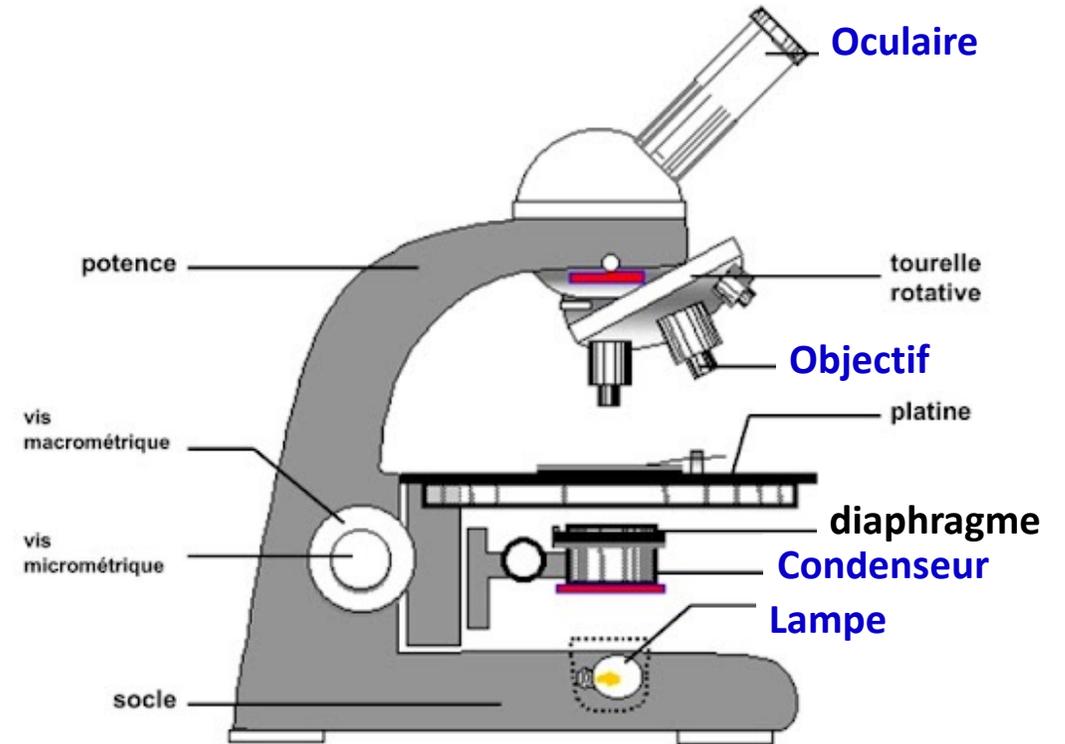
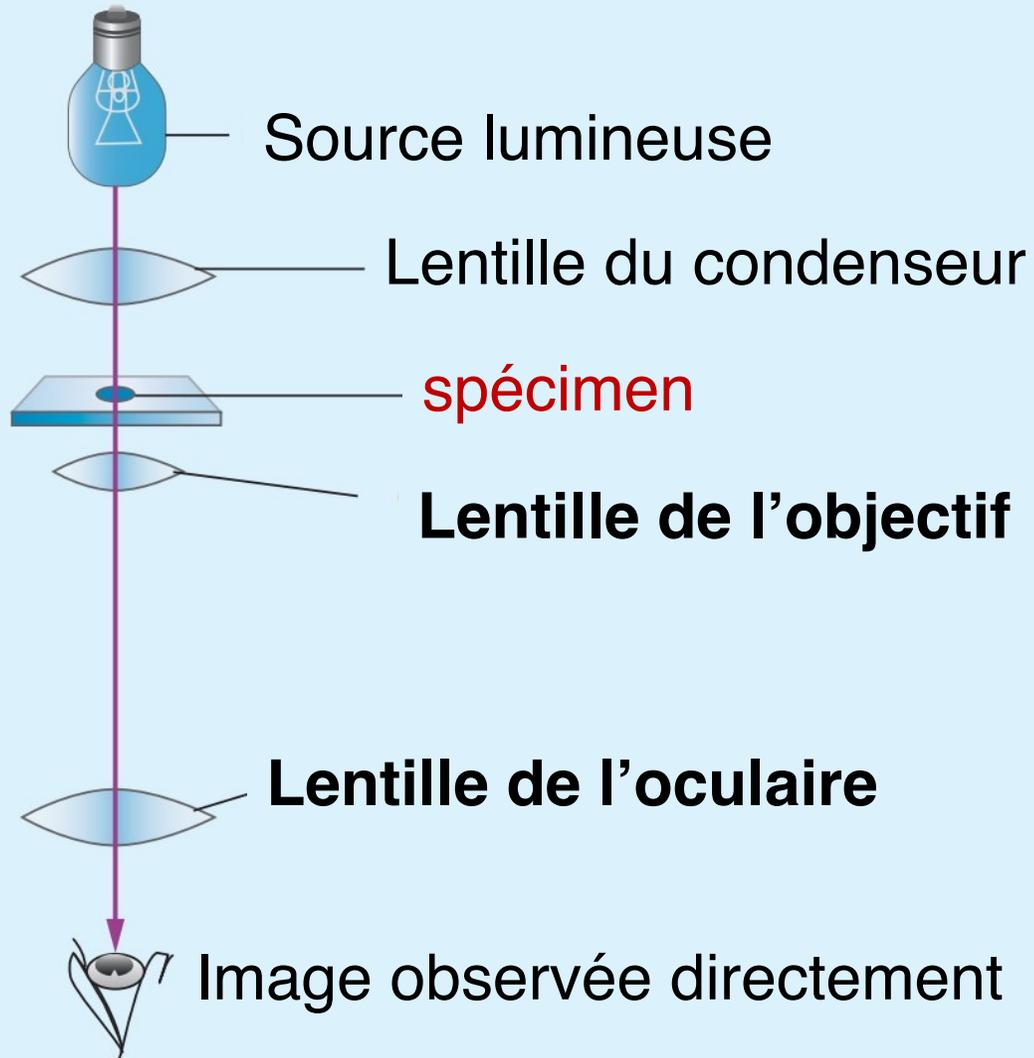
- L'examen au microscope nécessite que:
 - Les objets à examiner soient **minces**
 - Les différents éléments doivent présenter un certain **contraste** pour les différencier visuellement



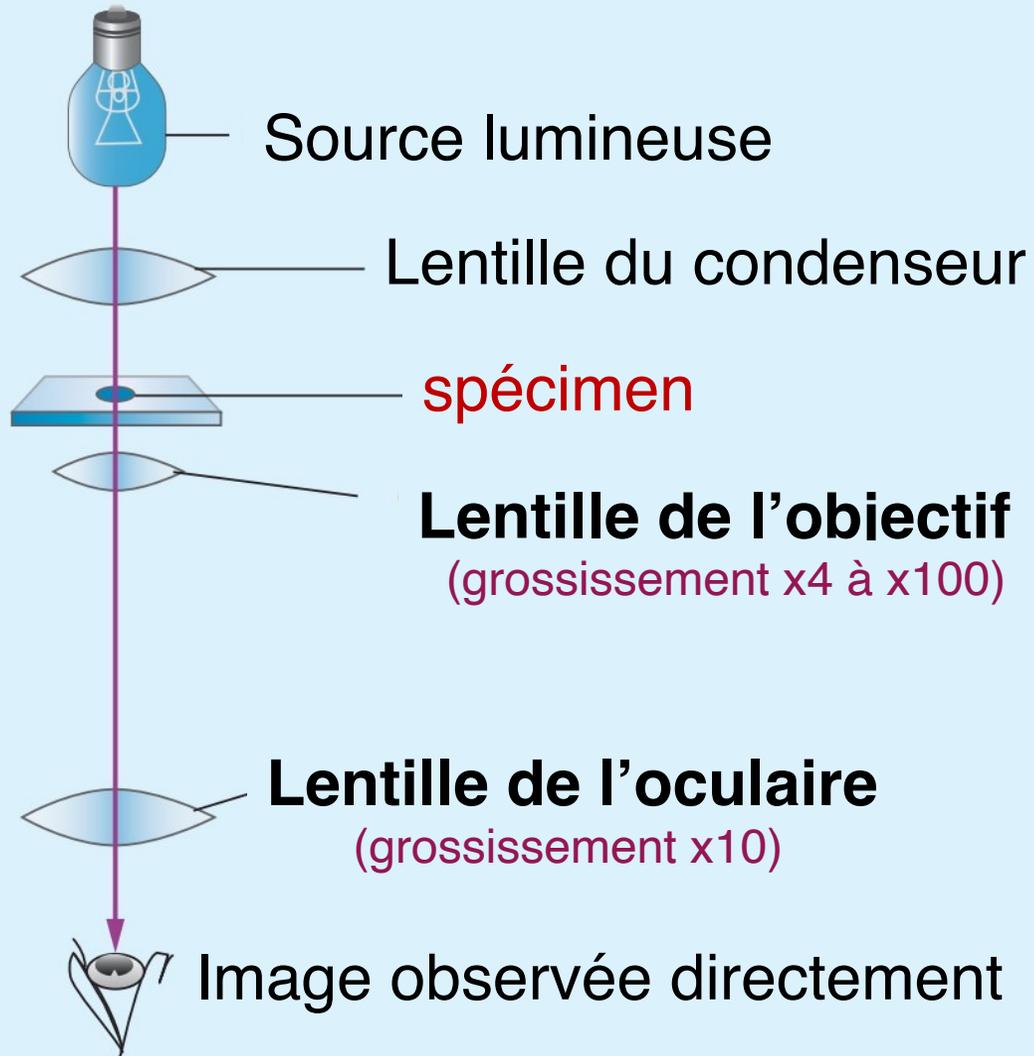
2.3. Principe de la microscopie optique

- **une onde (photon)** est envoyée sur le spécimen (échantillon) ou émise par le spécimen.
- la lumière est focalisée sur l'échantillon par la lentille du **condenseur**.
- 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 enregistrée par **caméra CCD** et stocké sur ordinateur pour retraitement.

2.3. Principe de la microscopie optique



2.3. Principe de la microscopie optique



- **La lentille de l'objectif** permet un premier grossissement entre x4 et x100
- **La lentille de l'oculaire** apporte un deuxième grossissement (x10)
- L'image de l'échantillon est ainsi agrandie jusqu'à 1000 fois par l'objectif et les lentilles oculaires.

2.3. Principe de la microscopie optique

Objectif	Oculaire	Grossissement
x 4	x 10	x 40
x 10	x 10	x 100
x 20	x 10	x 200
x 40	x 10	x 400
x 100	x 10	x 1000

2.3. Principe de la microscopie optique

- La limite de séparation des meilleurs microscopes optiques étant limitée physiquement, deux points situés à une distance inférieure à **$0,1\mu\text{m}$** ne pourront pas être distingués. Il faudra alors recourir à un microscope électronique

2.4. Techniques de préparation des échantillons

- Les cellules sont naturellement incolores;
- Les colorations vitales sont possibles mais elles ne donnent que peu de renseignement sur les diverses structures et elles ne peuvent pas être conservées.
- Il faut **fixer les cellules puis les colorer** afin d'obtenir des **préparations permanentes**.
- Fixation: Consiste à **tuer les cellules** tout en préservant une structure aussi proche que possible de celle qu'elles ont à l'état vivant.

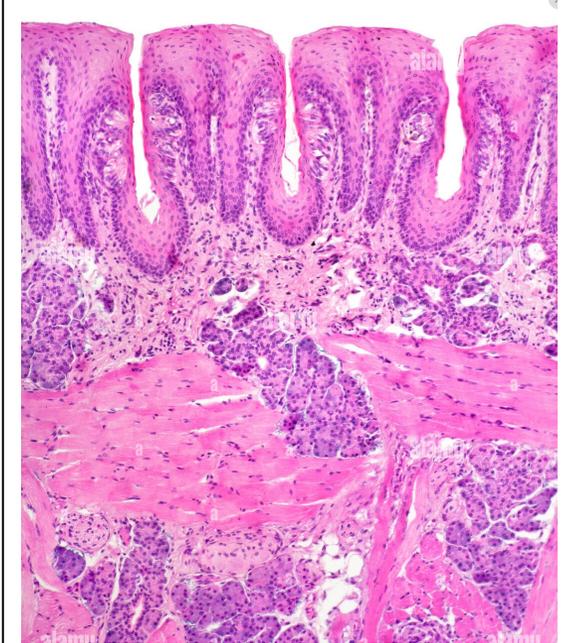
2.4. Techniques de préparation des échantillons

- La fixation utilise des mélanges d'agents chimiques comme le **méthanol, formol, formaldéhyde, glutaraldéhyde, l'acide osmique, acide acétique, acide picrique** ou à des sels (bichromate de potassium)
- **Les techniques de coloration:** Les colorants utilisés sont des **colorants naturels** ou des **colorants synthétiques**; La coloration histologique permet une différenciation optique (contraste) des divers constituants de la préparation observée;

2.5. Quelques microscopes optiques

Microscope	Fond clair
Matériel analysé	<ul style="list-style-type: none">• Cellules / tissus vivants• Cellules / tissus fixés (morts)
Préparation	Fixation et/ou Coloration
Avantages	Usage courant
Inconvénients	Résolution faible
Application	<ul style="list-style-type: none">• Test de viabilité• Structure cellulaire

Microscope à fond clair



Papilles linguales



2.5. Quelques microscopes optiques

Microscope	Contraste de phase
Matériel analysé	<ul style="list-style-type: none">• Cellules / tissus vivants• Cellules / tissus fixés (morts)
Préparation	Sans préparation
Avantages	Observation sans coloration
Inconvénients	Résolution faible
Application	<ul style="list-style-type: none">• Mouvement cellulaire• Contrôle des cultures cellulaires

Microscope à contraste de phase

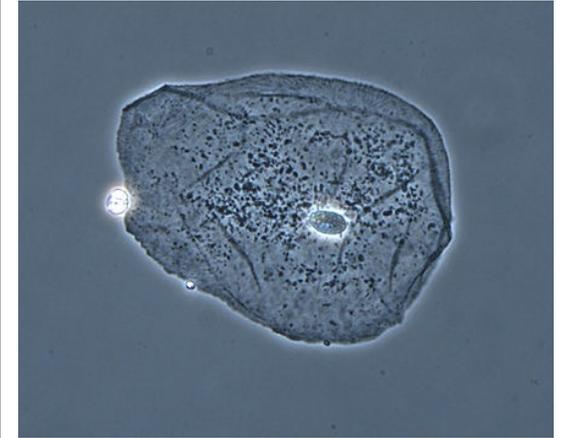


Image d'une cellule épithéliale



Division d'une cellule animale

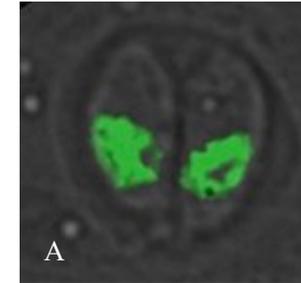
2.5. Quelques microscopes optiques

Microscope	Fluorescent
Matériel analysé	<ul style="list-style-type: none">• Cellules/ tissus vivants• Cellules/ tissus fixés (morts)
Préparation	Immunofluorescences ou molécules fluorescentes
Avantages	Détection spécifique
Inconvénients	Résolution faible
Application	<ul style="list-style-type: none">• Marquage d'organites• Détection de sondes fluorescentes

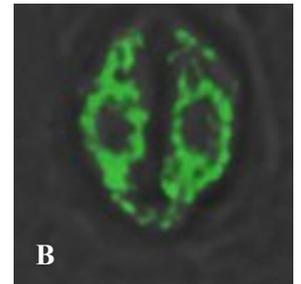
Microscope fluorescent

Visualisation des organites du parasite *Toxoplasma gondii*

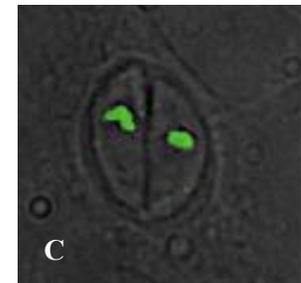
Noyau



RE



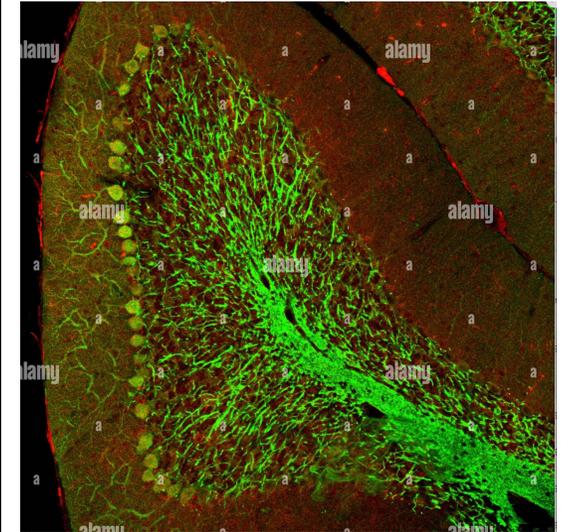
Ap. Golgi



2.5. Quelques microscopes optiques

Microscope	Balayage laser
Matériel analysé	<ul style="list-style-type: none">• Cellules / tissus vivants• Cellules / tissus fixés (morts)
Préparation	Immunofluorescences ou molécules fluorescentes
Avantages	<ul style="list-style-type: none">• Détection spécifique• Qualité de l'image
Inconvénients	Coût du microscope
Application	<ul style="list-style-type: none">• Colocalisation• Structure tridimensionnelle

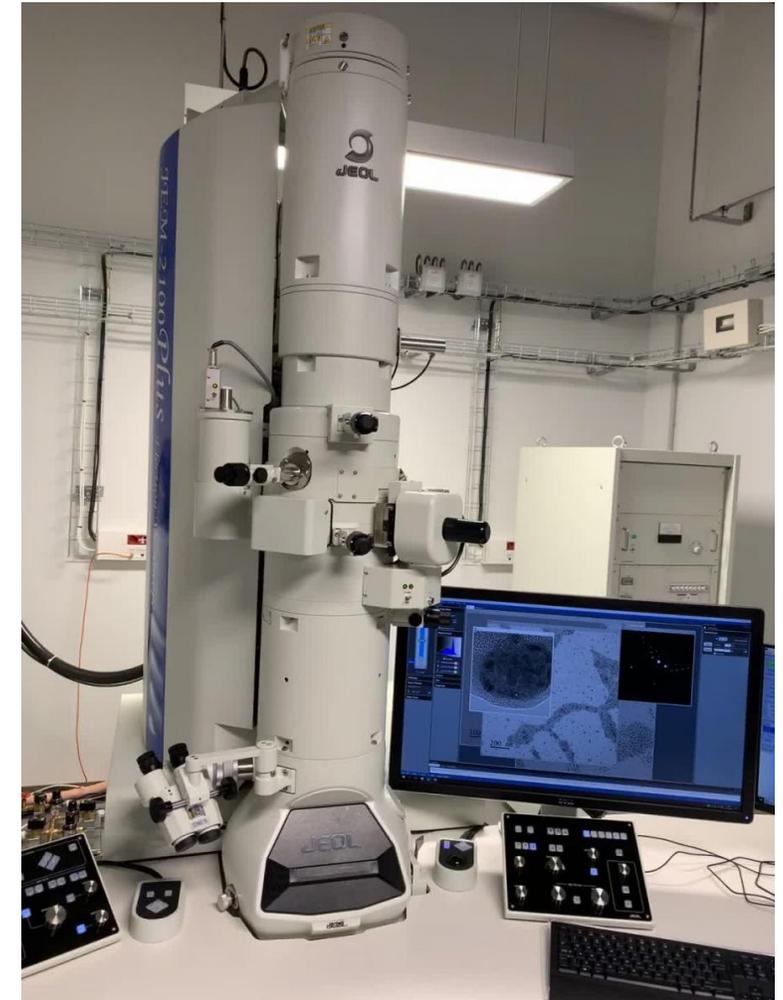
Microscope à balayage laser



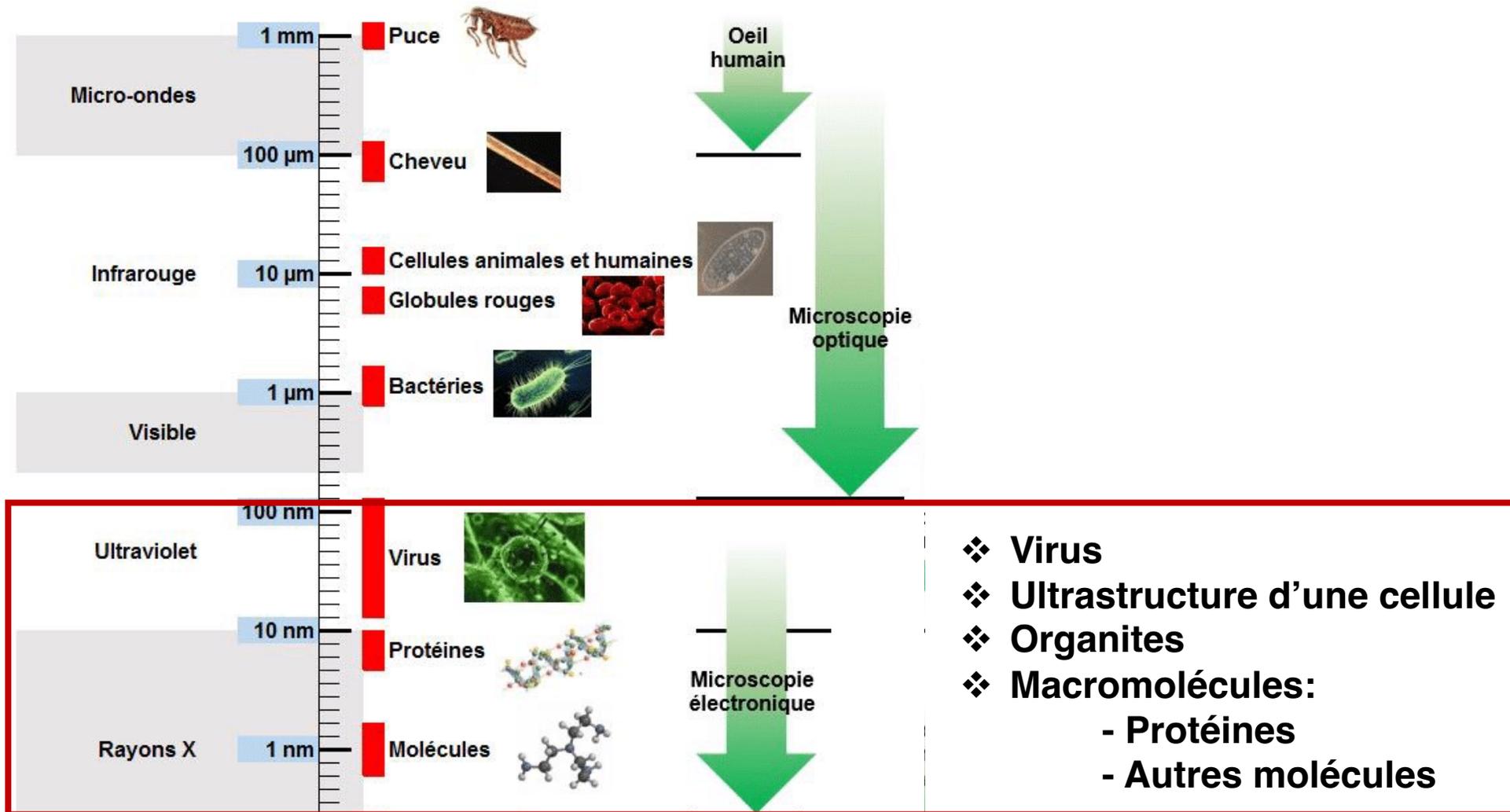
Folium cérébelleux provenant d'une section du cerveau de la souris, marqué par immunofluorescence

3.1. Définition

Le **microscope optique** est un type de microscope qui utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et créer une image très agrandie avec un grossissement pouvant aller jusqu'à 250 000 fois.



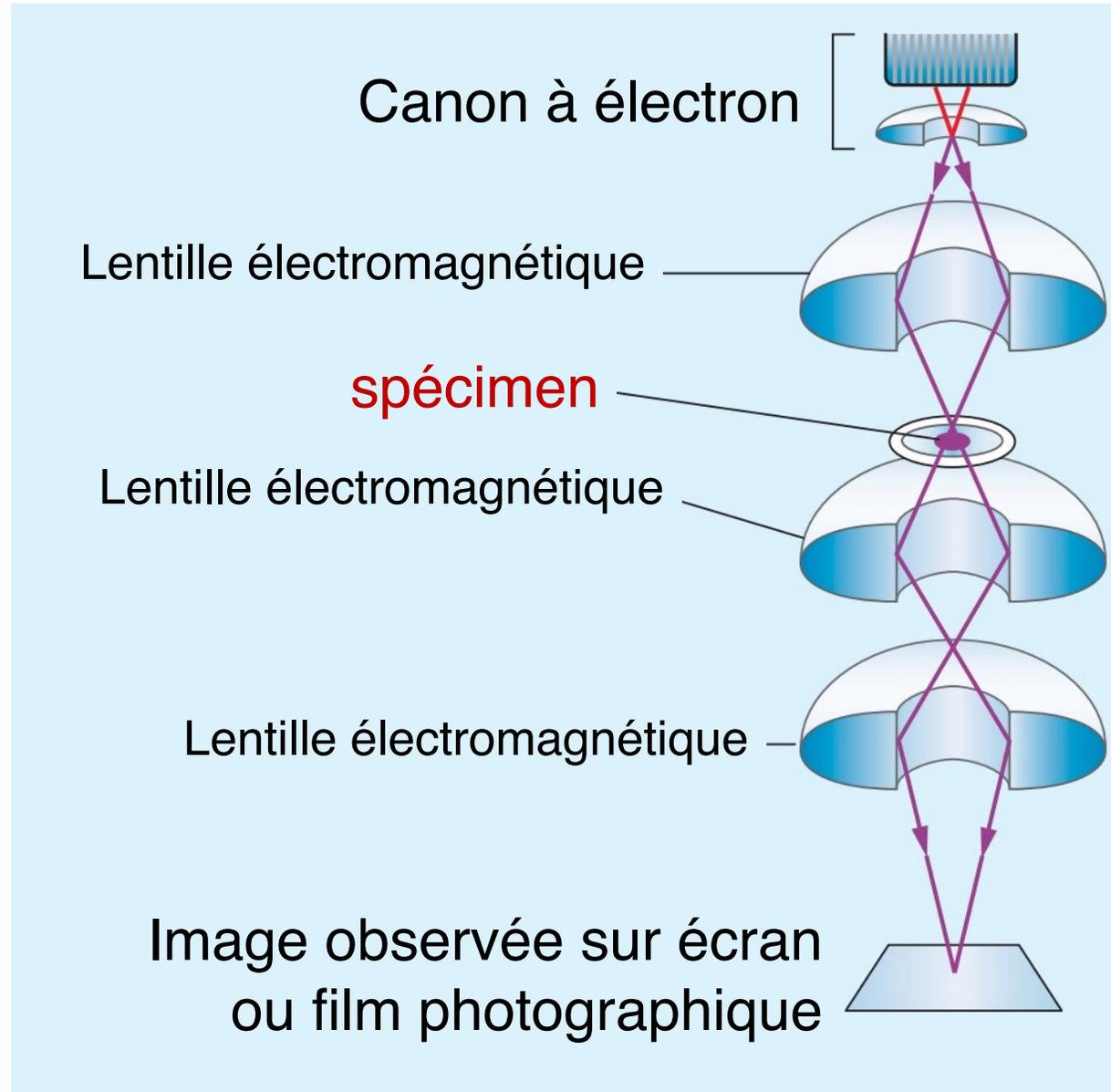
3.2. Champs d'utilisation du microscope électronique



3.3. Principe de la microscopie électronique

- **Des électrons** sont envoyés sur la préparation
 - Les électrons sont captés par **un premier aimant (lentilles électromagnétiques)** qui focalise les faisceaux d'électrons sur l'échantillon;
 - Les électrons traversent le spécimen et sont captés par **un deuxième jeu de** lentilles électromagnétiques qui projette les faisceaux d'électrons sur un film photographique.
- => agrandissant l'image de l'échantillon jusqu'à 250 000 fois**

3.3. Principe de la microscopie électronique



3.4. Techniques de préparation des échantillons

- La microscopie électronique nécessite la **déshydratation de l'échantillon** et donc la **mort des cellules**
- Les échantillons doivent être sous forme de **coupes ultra fines** (50-100 nm)
- Pour le contraste: les tissus ou spécimens sont « **colorés** » **partiellement (MET)** ou **sur toute la surface (MEB)** avec des atomes de métaux lourds: tétr oxyde d'osmium, les sels d'uranium. Ces métaux se lient de manière différentielle à diverses macromolécules intracellulaires, colorant ainsi également la cellule pour EM.

3.4. Techniques de préparation des échantillons

- Des anticorps spécifiques contre la protéine peuvent être mis en jeu pour visualiser l'emplacement d'une protéine.

3.5. Quelques microscopes électroniques

Microscope électronique à transmission

C'est la **technique la plus performante**. Elle permet de visualiser **l'ultrastructure des cellules**. l'image se présente en noirs et blanc.

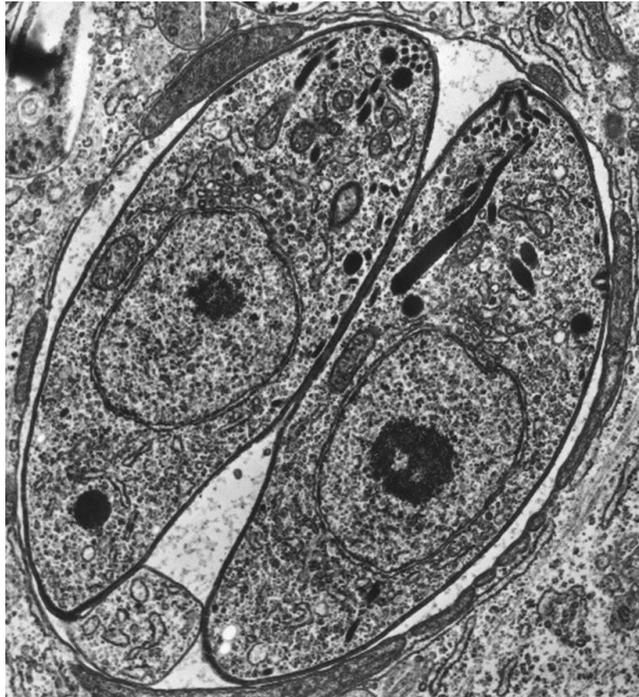


Image d'une
vacuole contenant
2 parasites
Toxoplasma gondii

Microscope électronique à balayage

C'est la **technique la moins performante**. Cette technique donne des images en pseudo 3D et fournit des renseignements sur **l'aspect tridimensionnel de l'objet / spécimen**



*Micrographe montrant des parasites
Toxoplasma gondii*

4. Conclusion

- Les études morphologiques de la cellule sont essentiellement basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques
- La microscopie optique classique utilise les photons: Elle donne des images de structures vivante ou fixées, colorées ou non avec un pouvoir séparateur de $0,1\mu\text{m}$ et un grossissement de 1000 diamètres.

4. Conclusion

- La microscopie électronique utilise des électrons: Elle donne des images de structures fixées (= morte) et permet de visualiser l'ultrastructure des cellules et l'aspect tridimensionnel d'un objet / specimen.

RÉFÉRENCES

1. Abrégés de Biologie Cellulaire de Marc Maillet, 9^{ème} ou 10^{ème} Edition; chez MASSON
2. Molecular Biology of the Cell, 6th Edition de Bruce Alberts
3. Pass Biologie cellulaire **EDISCIENCE**