PHARMACIE 1ère License

Cours de Biologie Cellulaire (2022-2023_L1S2)

Leçon 5

Méthodes d'étude des cellules: les techniques microscopiques

Dinkorma T. OUOLOGUEM, PhD

Bamako 9 janvier 2024

FAPH

OBJECTIFS

1. Décrire les cinq grandes étapes de préparation d'un échantillon destiné à la microscopie
2. Décrire le principe de deux techniques de coloration permettant la visualisation de structures cellulaires ou tissulaires
3. Définir une grande catégorie de microscopie
4. Citer deux types de microscope optique
5. Citer deux applications des techniques microscopiques

FAPH

PLAN

1. Généralités
2. Les techniques de préparations conventionnelles d'un échantillon
3. Les techniques microscopiques
4. Les applications

Conclusion

FAPH

1.1. DEFINITION

Les méthodes d'étude des cellules sont un ensemble de techniques **microscopiques**, **moléculaires**, ou **biochimiques** qui permettent de décrire les **constituants de la cellule**, leurs **fonctions** et leurs **relations**.

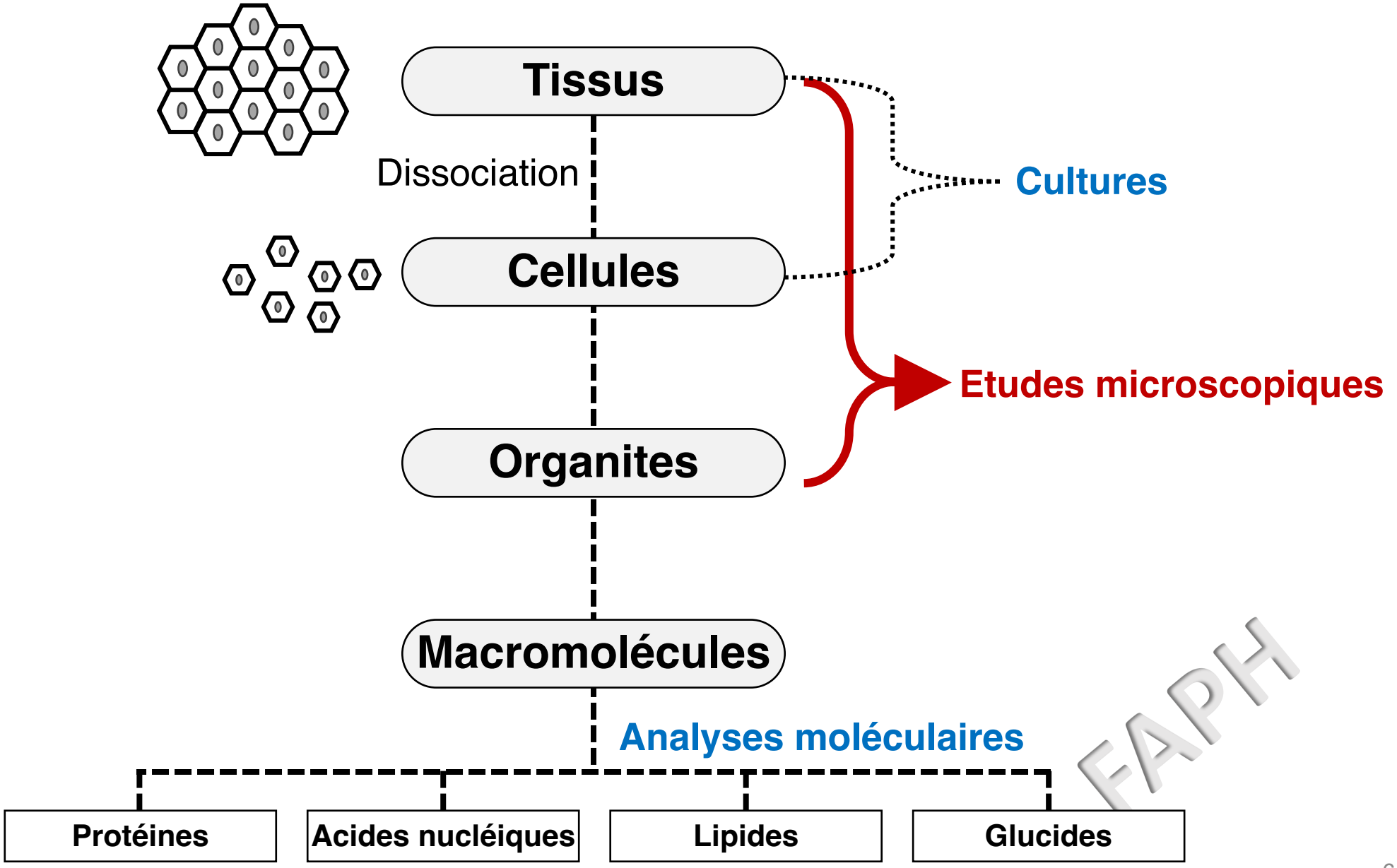
FAPH

1.2. INTERET

- **Diagnostic**
  - Visualisation et identification spécifique de cellules, tissues et microorganismes => diagnostic différentiel
  - Suivi et pronostic
- **Recherche fondamentale**:
  - Diversité biologique: Il existe une multitude de cellules qui ont des morphologies et des fonctions très diverses

FAPH

1.3. RAPPELS



FAPH

1.3. RAPPELS

- 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

FAPH

1.3. RAPPELS

- Les pathologies sont des dysfonctionnements à l'état atomique et moléculaire qui se manifestent au niveau des cellules et des tissus.

- L' étude des cellules et des tissus est l'approche la plus accessible et la moins couteuse pour diagnostiquer une pathologie et guider dans le traitement.

- Les cellules sont dans un environnement contenant des protéines fibreuses, des polysaccharides et le liquide extracellulaire.

- L' étude morphologique nécessite la préparation adéquate de l'échantillon et l'utilisation d'un microscope

FAPH

2. Les techniques de préparations conventionnelles

- La préparation d'un échantillon biologique consiste a pouvoir examiner le tissus ou des cellules isolées afin:
  - d' observer l' échantillon dans un état le plus proche possible de ce qu'il est à l' état vivant
  - de révéler un certain nombre de caractéristiques morphologiques
  - de dévoiler la présence des constituants par leur nature biochimique et / ou fonctions biologiques

FAPH

2.1. Prélèvement de l'échantillon biologique

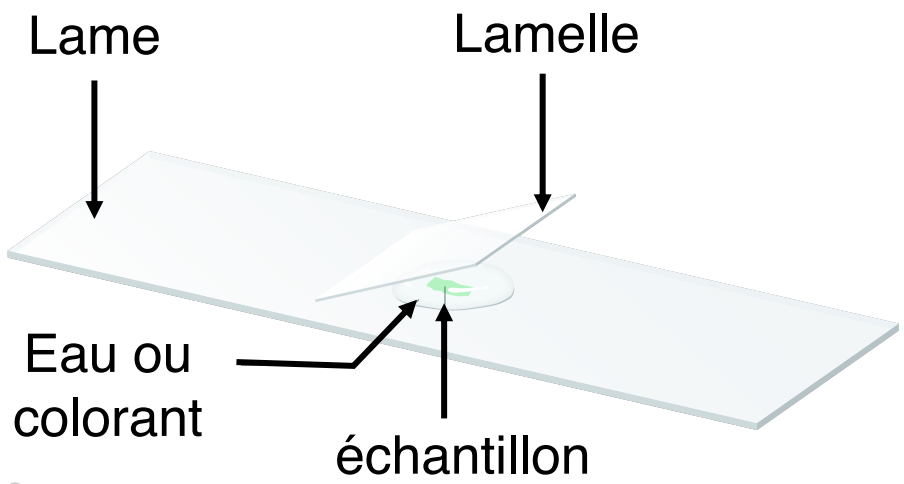
- **But**: Le but du prélèvement est d'obtenir un échantillon qui pourra être soumis a une analyse microscopique. Cette procédure nécessite le respect des bonnes pratiques de laboratoire
- **Méthode pour collecter un échantillon biologique**:
  - Prélèvement cytologique par **brossage** à l'aide d'un écouvillon suivi d'un **frottis**
  - Prélèvement sanguin suivi d'un frottis
  - Prélèvement des tissus (biopsie, résection chirurgical)
  - Culture cellulaire

FAPH

2.1. L' échantillon biologique

- **Utilisation du prélèvement:**
  - Observation à l' **état frais** (sans fixation) entre lame et lamelle (avec ou sans colorant)
  - Généralement tissus et cellules sont **fixés** pour une meilleure conservation
  - Les échantillons fixés sont ensuite colorées afin d'obtenir des images au microscope

Prélèvement entre lame et lamelle



FAPH

2.2. Préparation de l’échantillon

La préparation de l’ échantillon comprend classiquement 5 temps de préparation:

1. **La fixation**
2. **L’inclusion**
3. **La coupe**
4. **La coloration**
5. **Le montage**

FAPH

2.2.1. La fixation

- **But**: Préserver la qualité des échantillons et éviter la dégradation des cellules/ tissus
- **Technique**: Fixation par la chaleur ou des réactifs chimiques
- **Agents fixateurs**: paraformaldéhyde, méthanol, liquide de Bouin, etc..
- **Conséquence de la fixation**: Changement de la texture (durcissement /rigidité) et la couleur (marron, gris) de l' échantillon (tissus /cellules)
- **Paramètres importants**: L'épaisseur de l' échantillon => pénétration rapide du fixateur; choix du fixateur

FAPH

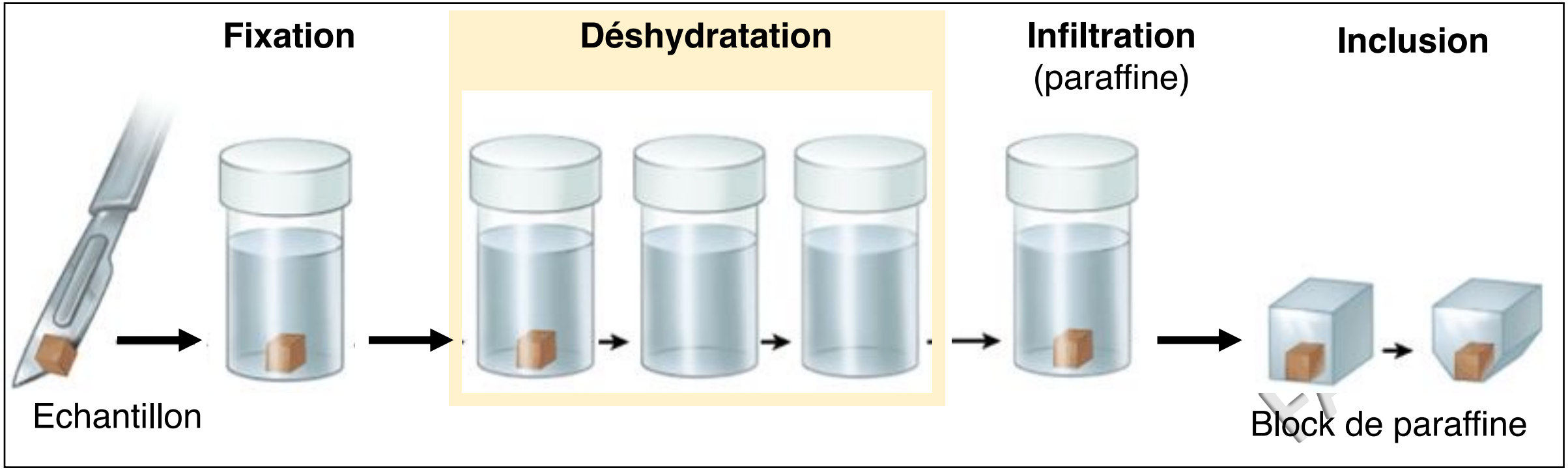
2.2.2. L’inclusion

- **But**: Remplacer les molécules d’eau présentes dans l’échantillon par un constituant solide à température ambiante
- **Technique**: l’échantillon est **déshydraté** progressivement, **infiltré** avec un réactif durcisseur, puis **englobé** dans de la paraffine pour former un **bloc** contenant l'échantillon
- **Réactifs**:
  - Déshydratation: bains d’alcool de concentration croissante (70°, 95° et 100°)
  - Solution intermédiaire: Toluène ou Xylène
  - Inclusion: la paraffine (liquide à 56°C)

FAPH

2.2.2. L'inclusion

- **Conséquence de l'inclusion**: Rigidifier les structures cellulaires/tissulaires qui permettra de réaliser des coupes fines indispensable au passage de la lumière et l'observation microscopique



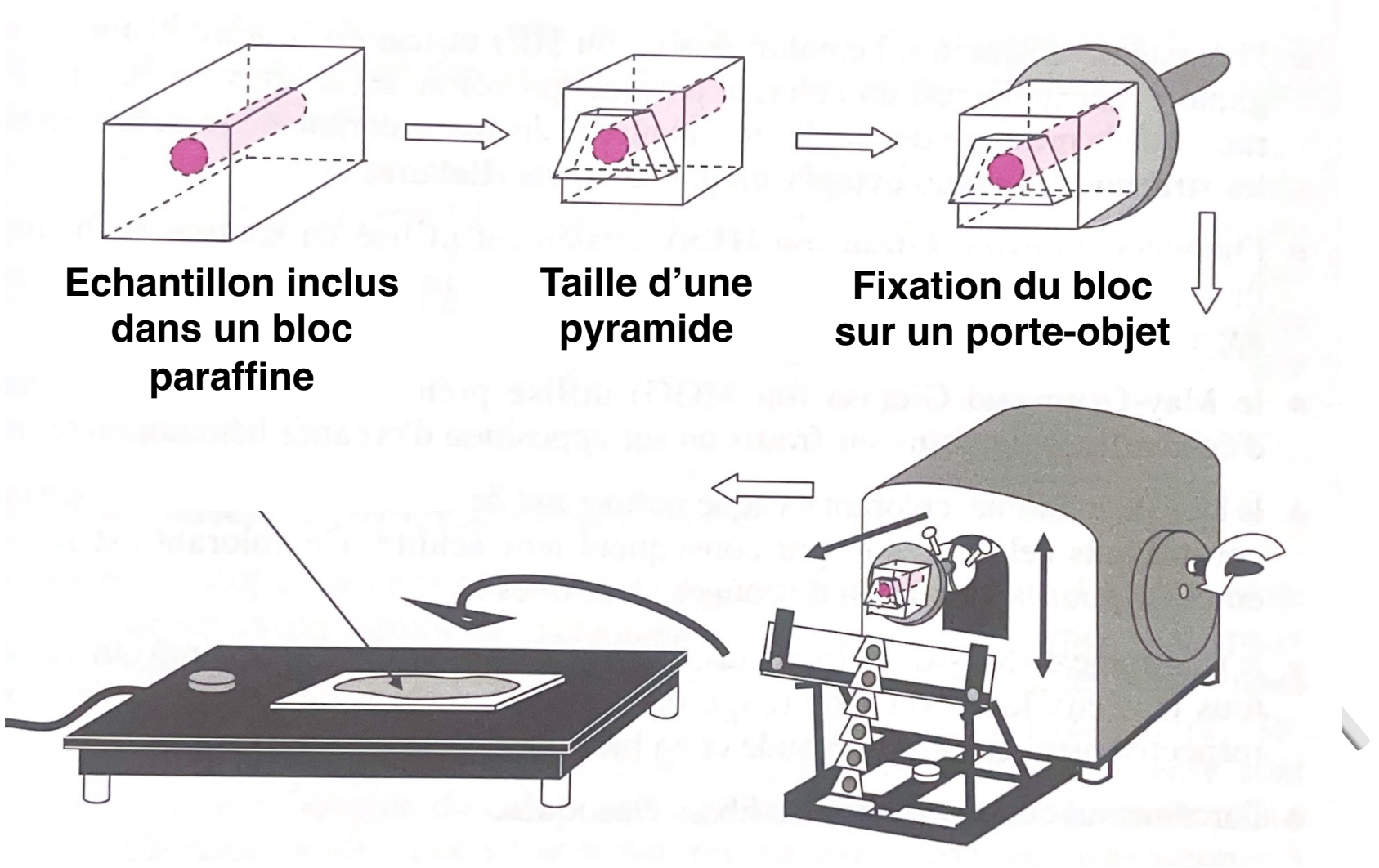
2.2.3. La coupe

- **But**: Obtenir des tranches fines de l' échantillon (4- 10μm) pour la microscopie
- **Technique**: **Sectionné** en tranches très fines le bloc de paraffine à l'aide d'un **microtome**

FAPH

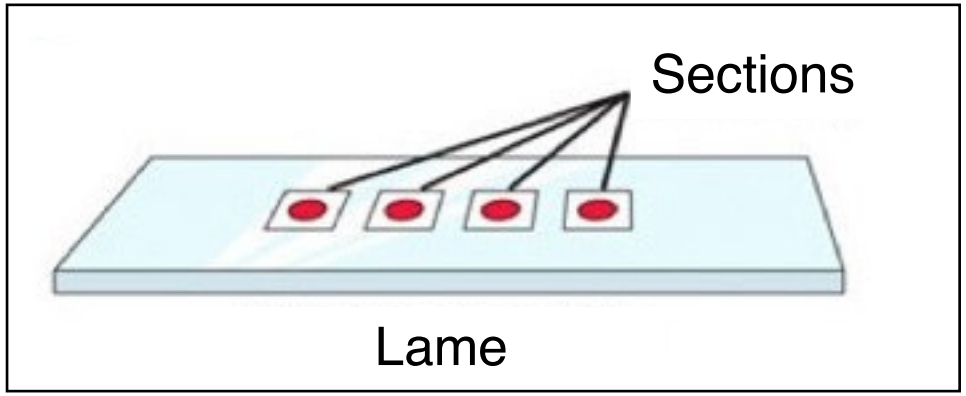
2.2.3. La coupe

Préparation des coupes d'un prélèvement englobé dans de la paraffine



2.2.3. La coupe

- L' échantillon ainsi obtenue **ne peut pas être observé** directement au microscope:
  - Transparence
  - Section trop fine
  - Manque de **contraste**
- Procéder à la coloration



FAPH

2.2.4. Coloration

- **But**: Donner du contraste à l' échantillon et distinguer les structures cellulaires
- **Technique**: Procéder a un déparaffinage et à une réhydratation des préparations puis soumettre mettre l' échantillon en contact de substances aqueuses colorantes
- **Réactifs**:
  - Déparaffinage: Toluène ou Xylène
  - Réhydratation: bains d'alcool de concentration décroissante (100°, 95° et 70°, eau distillée)
  - Colorants: fonction du but visé

FAPH

2.2.4. Coloration

- **On distingue trois grandes approches de coloration:**
  - Coloration **histologique:**
  - Coloration **histochimique:**
  - Coloration **immunohistochimique:**

FAPH

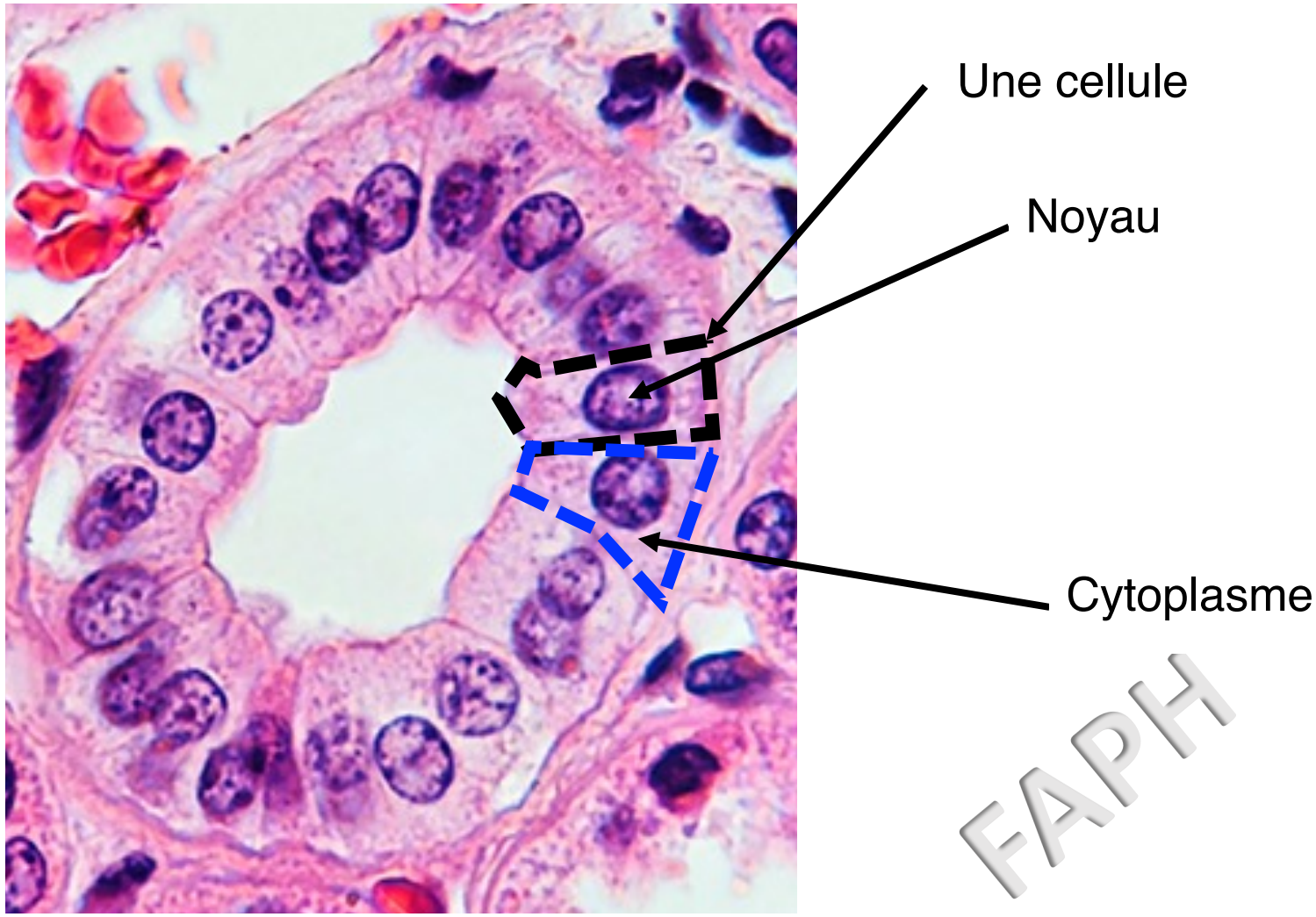
2.2.4. Coloration

- **Coloration histologiques:**
  - Interaction directe entre un colorant et le structure => coloration spécifique des structures
  - **Colorants naturels ou synthétiques** comportant une partie colorante acide ou basique:
    - **Colorants basiques** fixent les structures chargées négativement (structures basophiles)
    - **Colorants acides** fixent les structures chargées positivement (= structures acidophiles)

FAPH

2.2.4. Coloration

Coloration d'un tissu avec de l'hématoxyline et l'éosine



FAPH

Source: https://www.newcomersupply.com/

2.2.4. Coloration

- **Coloration histochimique:** coloration basée sur les processus métaboliques et les groupements chimiques => caractérisation des constituants de la cellule (métaux, enzymes, acides nucléiques, glucides, lipides, protéines)

- **Coloration immunohistochimique:** Combinaison de techniques immunologiques et histochimiques

FAPH

3. Les techniques de microscopie

- Les microscopes sont classés selon la nature de la source qui sert à observer la préparation biologique.
- On distingue deux grands groupes:
  - le **microscope optique**, aussi appelé photonique
  - le **microscope électronique**
- Le choix du microscope est fonction du but recherché et du mode de préparation de l'échantillon

FAPH

3.1. La microscopie optique

3.1.1. 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.**

3.1. La microscopie optique

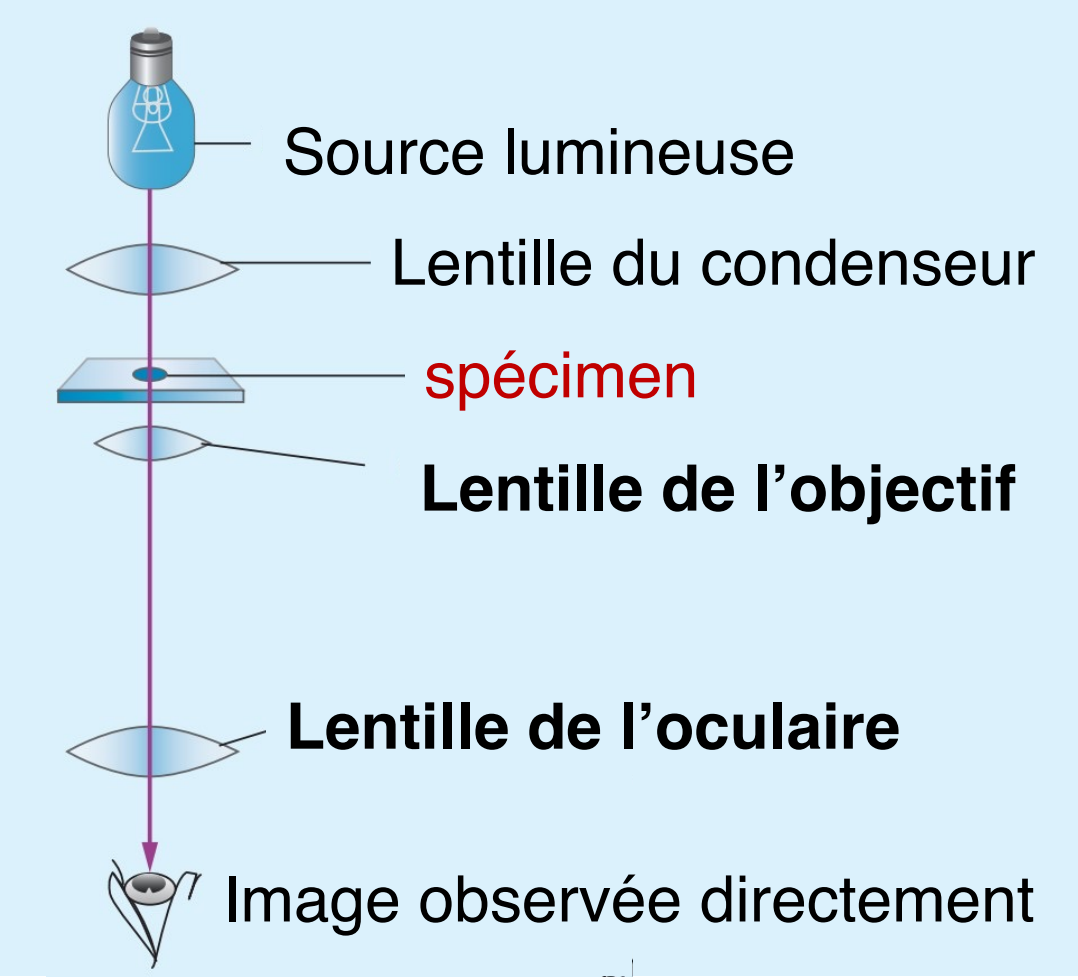
3.1.2. Principe de la microscopie optique

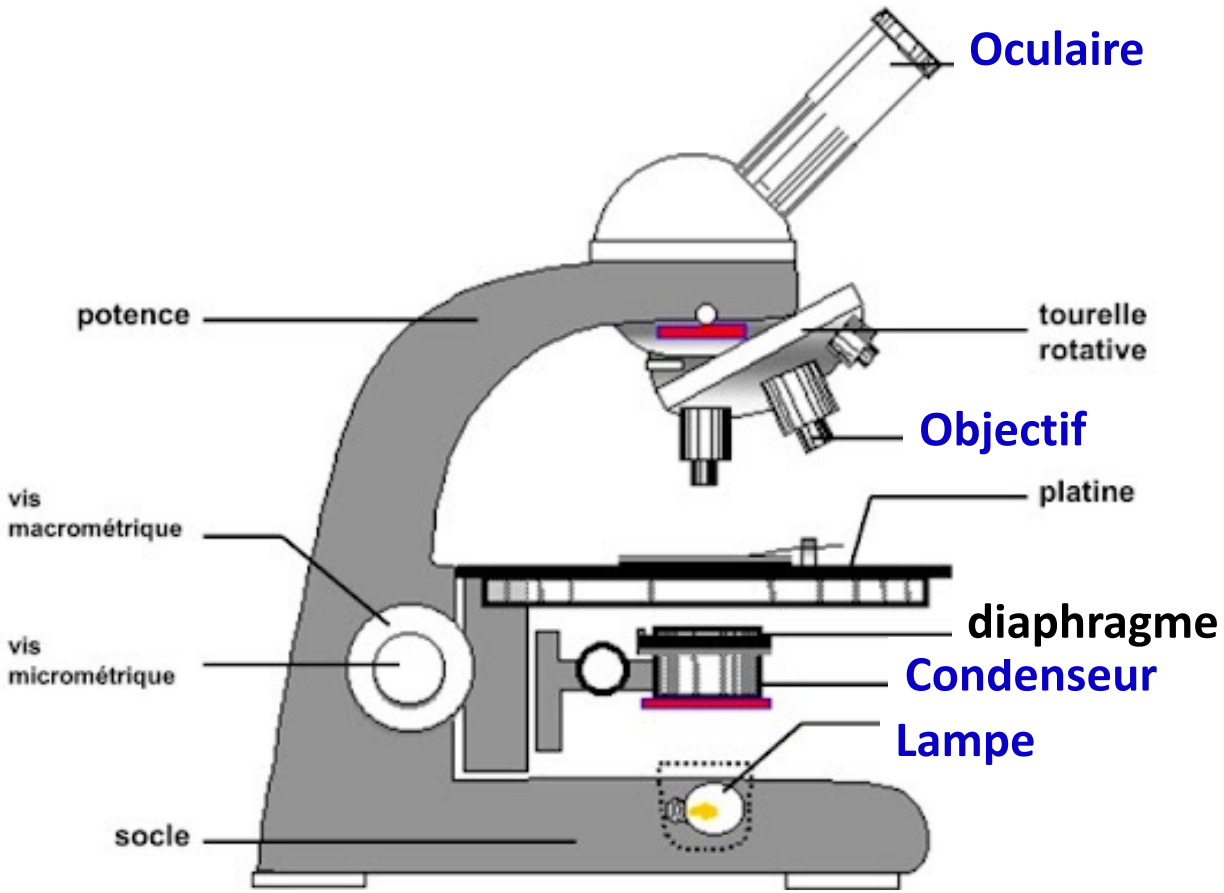
- **une onde** (**photon**) est envoyée sur l'échantillon ou émise par l'échantillon.
- la lumière est focalisée sur l'échantillon par la lentille du **condenseur**.
- Cette onde est captée par un **objectif** qui la concentre et passe par un **oculaire** qui crée une **image observable**.
- Cette image est soit observée à **l'œil nu**, soit enregistrée par **caméra CCD** et stocké sur ordinateur pour retraitement.

FAPH

3.1. La microscopie optique

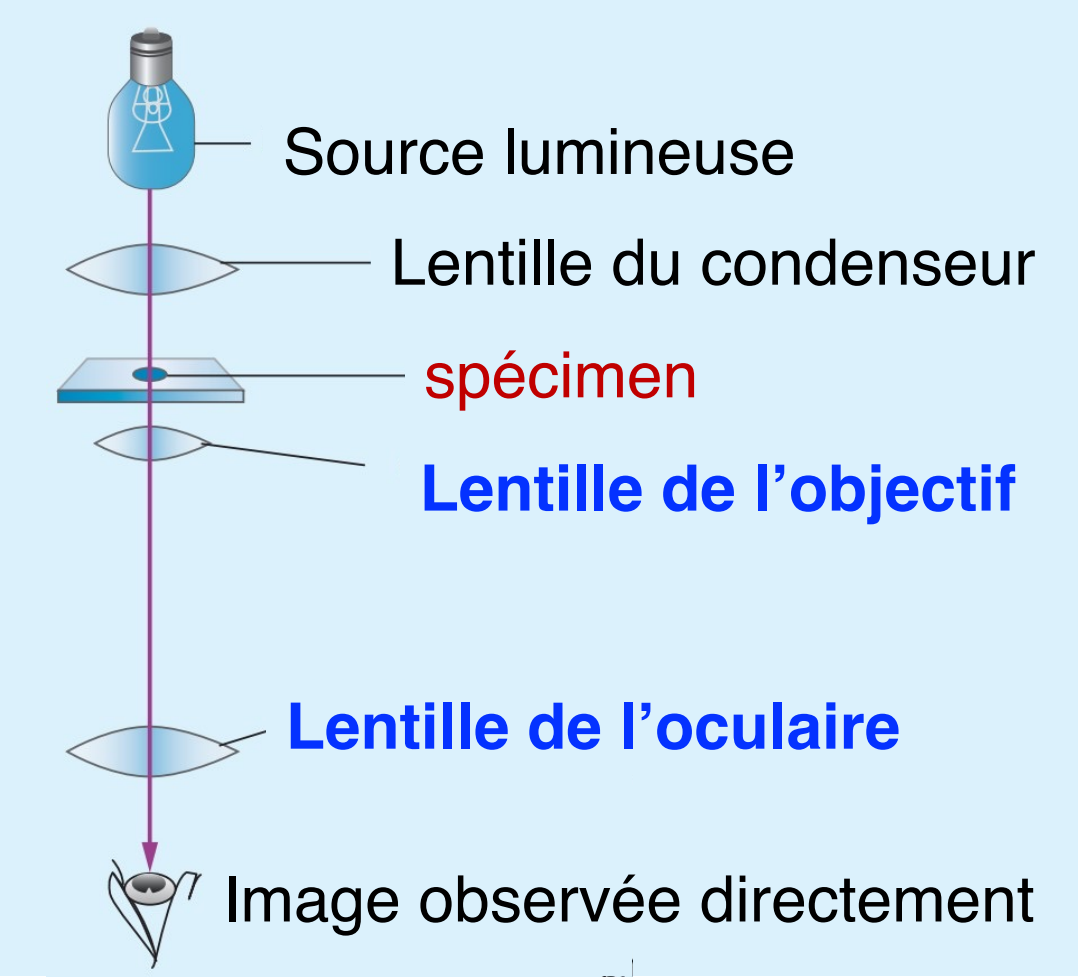
3.1.2. Principe de la microscopie optique





3.1. La microscopie optique

3.1.2. 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,** x20, x25)
- L'image de l'échantillon est ainsi agrandie jusqu'à 2500 fois

FAPH

3.1. La microscopie optique

3.1.2. Principe de la microscopie optique

Grossissement de l'objectif	Grossissement de Oculaire	Grossissement Final
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

FAPH

QUESTION

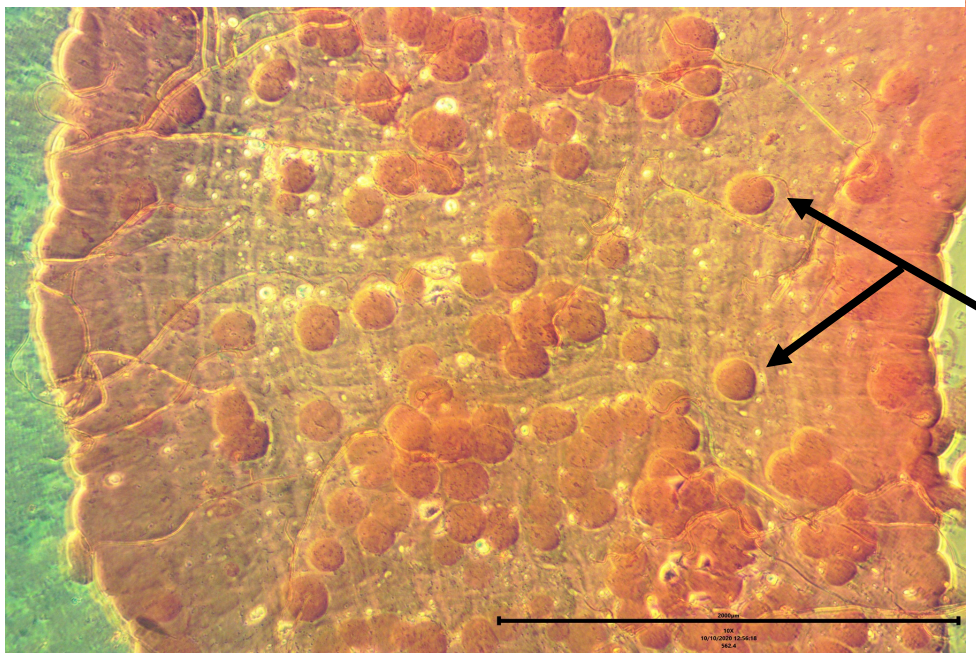
Grossissement de l'objectif	Grossissement de Oculaire	Grossissement Final
x 5	x 25	?
x 10	x 25	?
x 20	x 25	?
x 40	x 25	?
x 100	x 25	?

FAPH

3.1. La microscopie optique

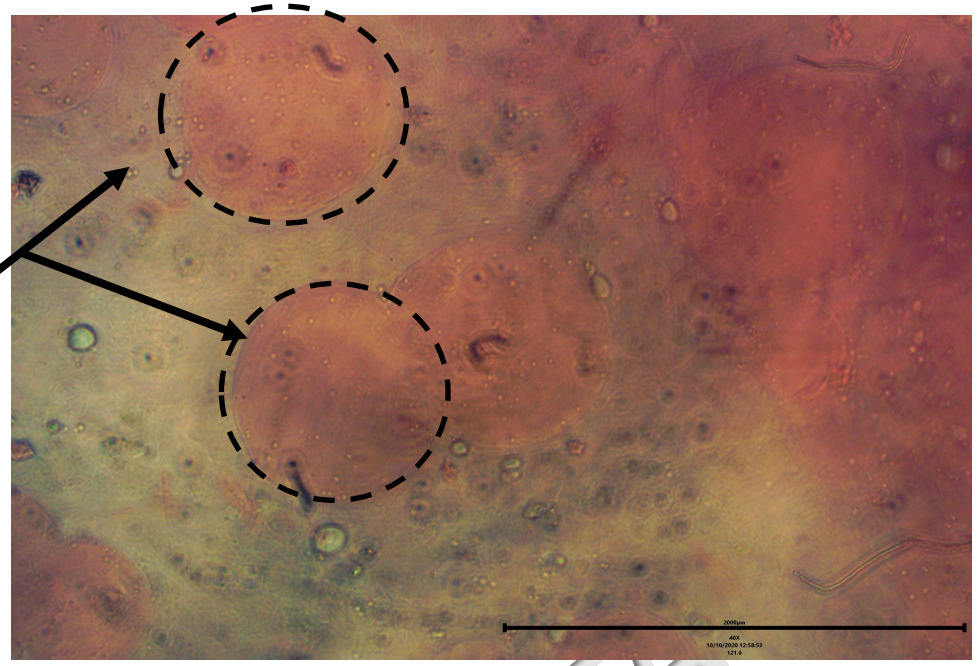
3.1.2. Principe de la microscopie optique

Objectif 10x => grossissement 100X



Oocystes

Objectif 40x => grossissement 400X



Micrographe d'un estomac de moustique contenant des oocystes de *Plasmodium falciparum*

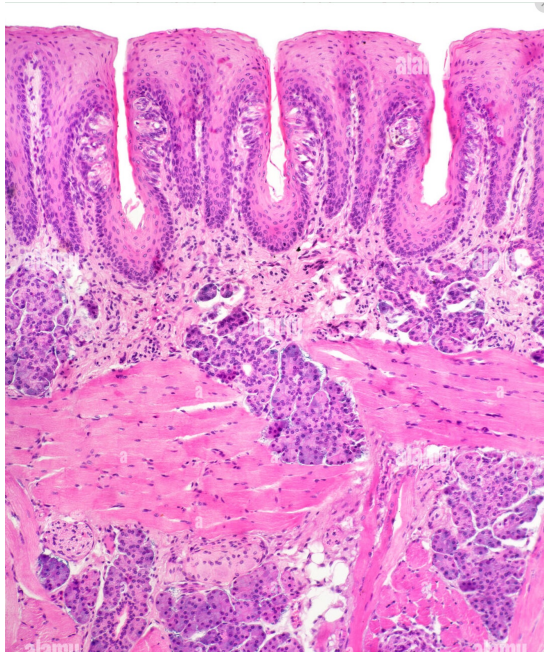
3.1. La microscopie optique

3.1.3. Quelques microscopes optiques

Le microscope à fond clair

Microscope	Fond clair
Matériel analysé	• Cellules / tissus vivants • Cellules / tissus fixés (morts)
Préparation	Fixation et/ou Coloration
Avantages	Usage courant
Inconvénients	Résolution faible
Application	• Test de viabilité cellulaire • Structure cellulaire

Microscope à fond clair



Papilles linguales

3.1. La microscopie optique

3.1.3. Quelques microscopes optiques

Le microscope à contraste de phase

Microscope	Contraste de phase
Matériel analysé	• **Cellules / tissus vivants** • Cellules / tissus fixés
Préparation	Sans préparation
Avantages	Observation sans coloration
Inconvénients	Résolution faible
Application	• Mouvement cellulaire • Contrôle des cultures cellulaires

Microscope à contracte de phase

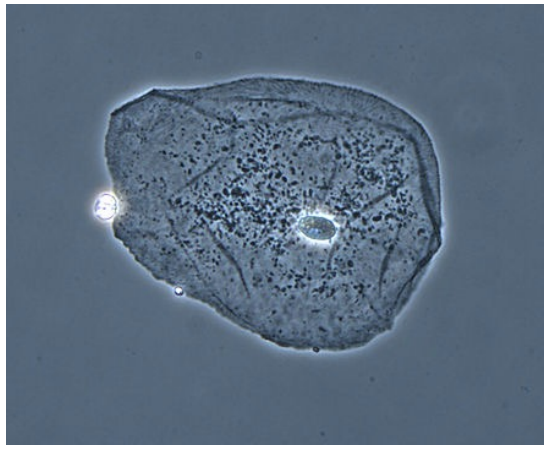
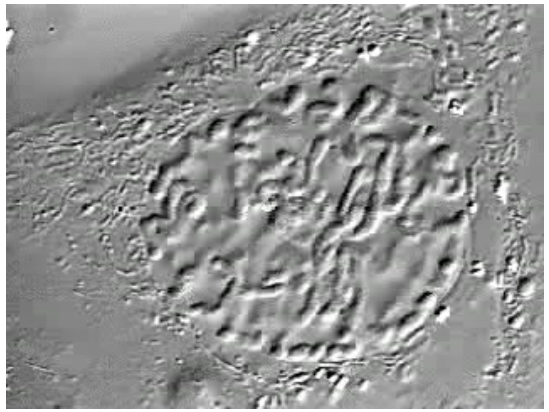


Image d'une
d'un cellule épithéliale



Division d'une cellule animale

3.1. La microscopie optique

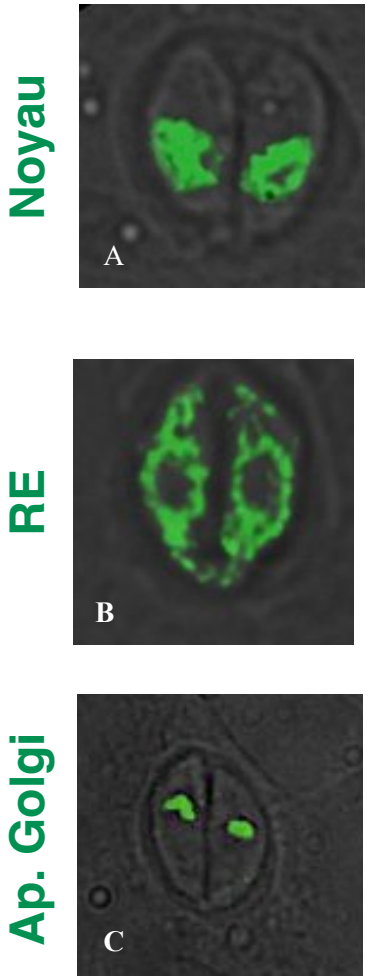
3.1.3. Quelques microscopes optiques

Le microscope à fluorescence

Microscope	Fluorescent
Matériel analysé	• Cellules/ tissus vivants • Cellules/ tissus fixés (morts)
Préparation	Immunofluorescences ou molécules fluorescentes
Avantages	Détection spécifique
Inconvénients	Résolution faible
Application	• Visualisation spécifique des organites

Microscope fluorescent

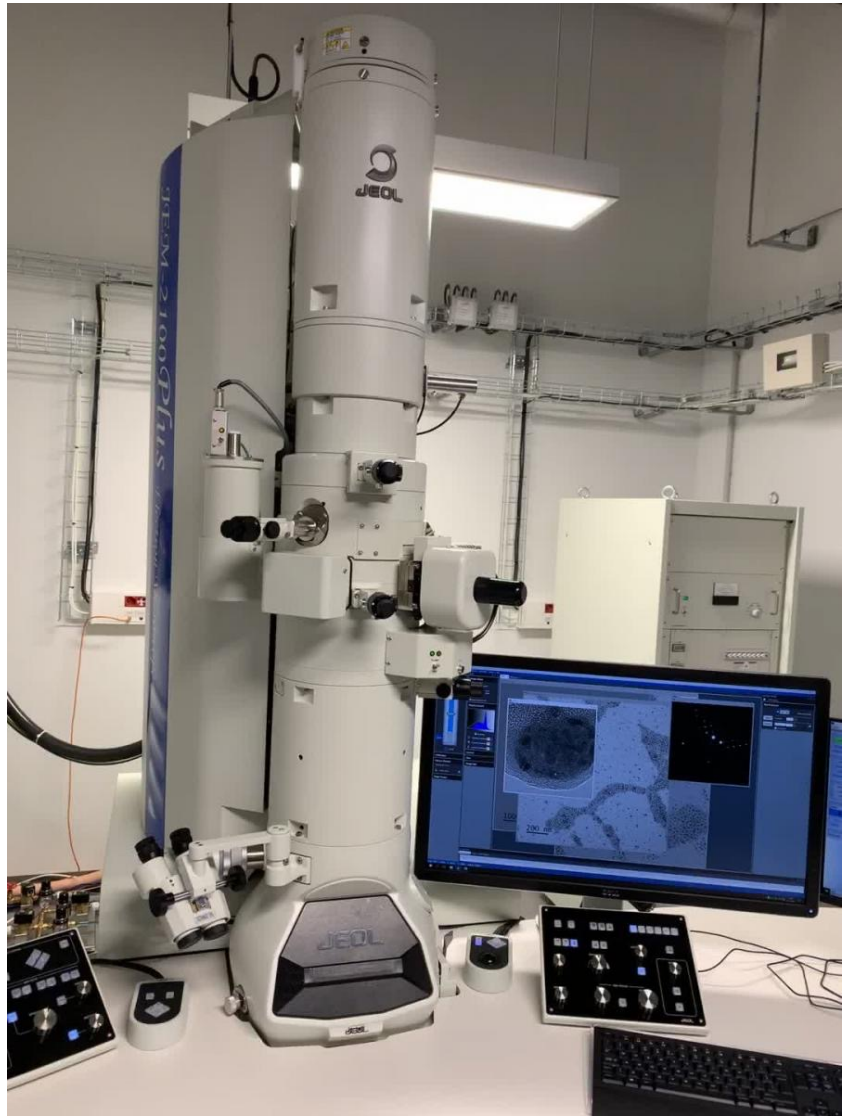
Visualisation des organites du parasite *Toxoplasma gondii*



3.2. La microscopie électronique

3.2.1. Définition

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



3.2. La microscopie électronique

3.2.2. Microscope électronique à transmission (MET)

- 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*

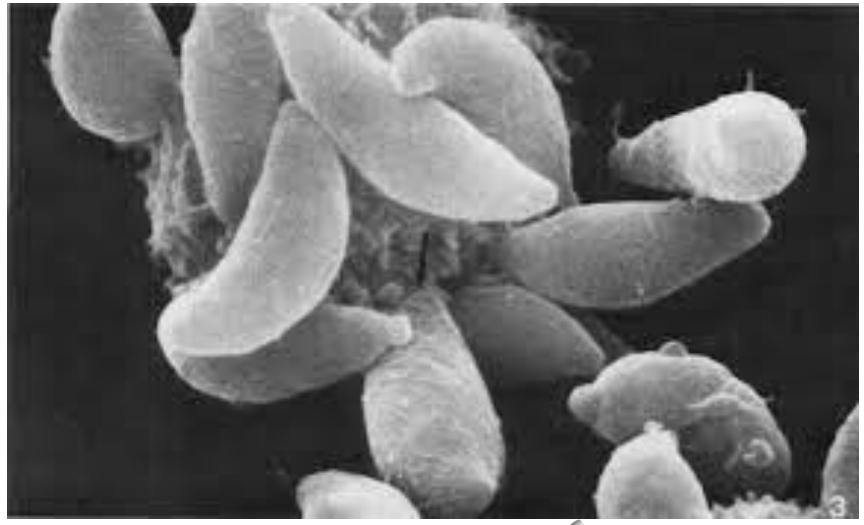
EAP

3.2. La microscopie électronique

3.2.3. Microscope électronique à balayage

- Technique moins performante que la MET.
- Cette technique donne des images en pseudo 3D
- Fournit des renseignements sur l'aspect

tridimensionnel de l'objet / spécimen



Micrographe montrant des parasites Toxoplasma gondii

FAPEL

3.3. Limites de résolution et taille des objets biologiques

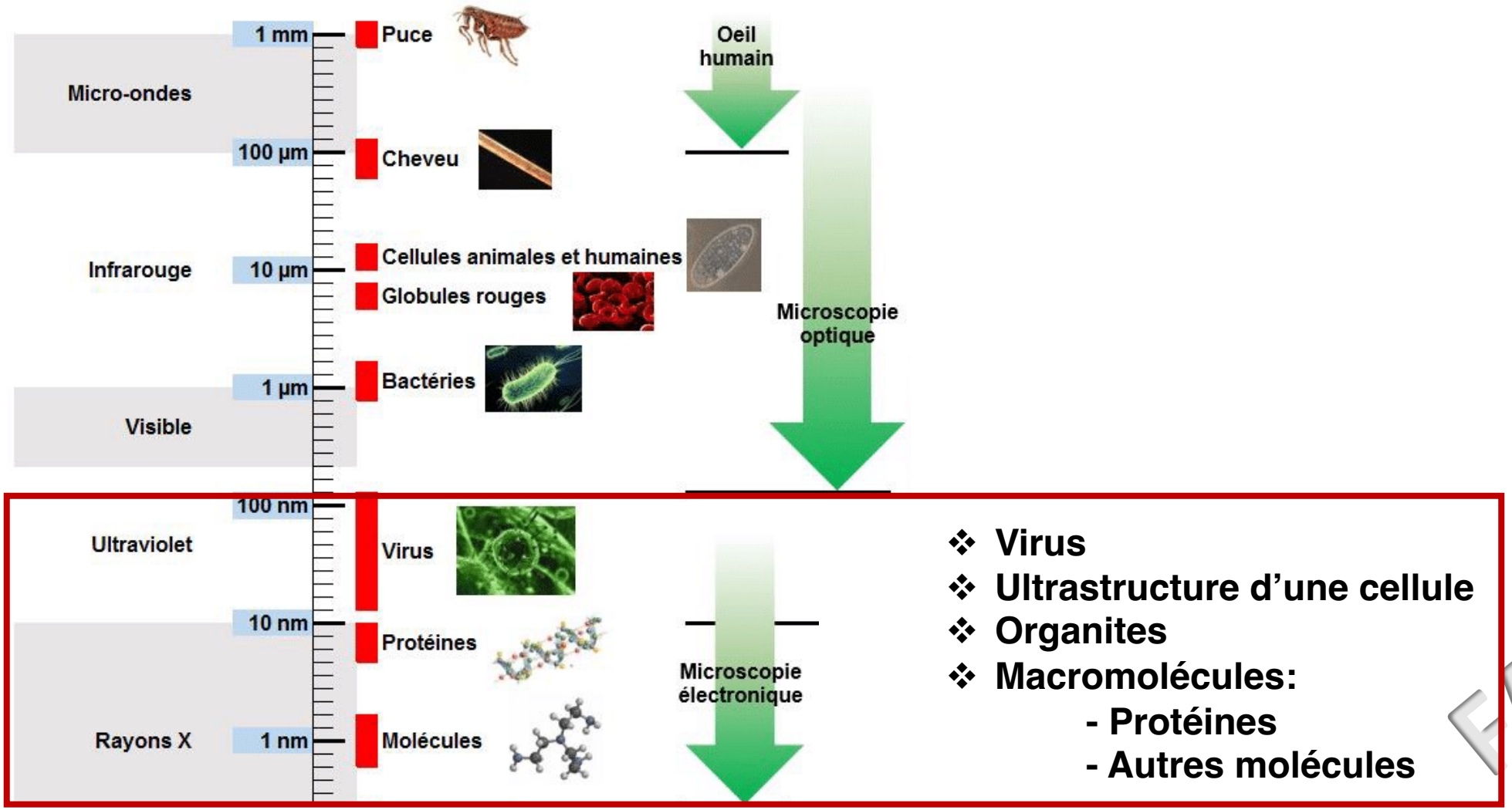
- La limite de résolution est la plus petite distance entre 2 points observés avec un système optique au-delà de laquelle les deux points paraissent confondus.

- La limite de séparation des meilleurs microscopes optiques étant limitée physiquement, deux points situés à une distance inferieure à **0,1-0,2 *µ*m** ne pourront pas être distingués. Il faudra alors recourir à un microscope électronique

- La limite de résolution du MET est de **2Å** avec un pouvoir de séparation 1000 fois plus grand que celui du microscope optique

FAPH

3.3. Limites de résolution et taille des objets biologiques



- Virus
- Ultrastructure d'une cellule
- Organites
- Macromolécules:
  - Protéines
  - Autres molécules

FAPH

4. Les applications des techniques microscopiques

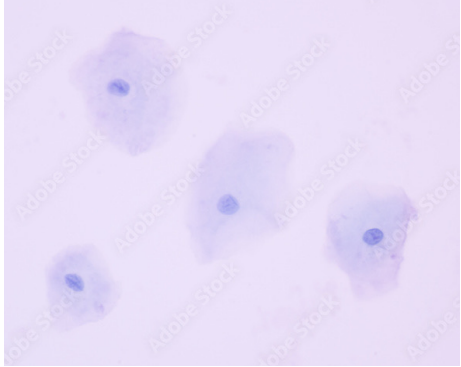
- **Diagnostic:**
  - Visualisation et identification spécifique de cellules, tissues et microorganismes spécifique => diagnostic différentiel

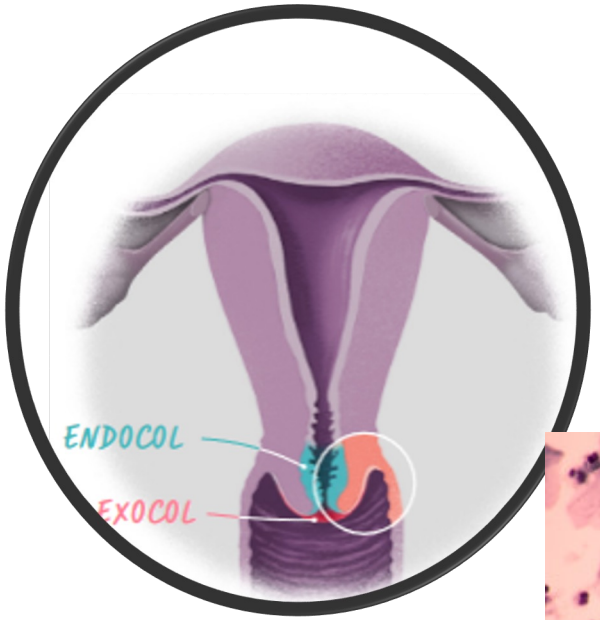
- **Recherche fondamentale**
  - Etudier l'aspect morphologique de tissus ou cellules
  - Diversité biologiques

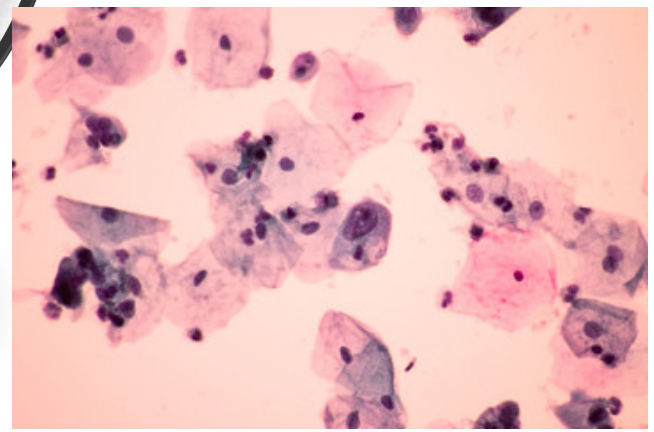
FAPH

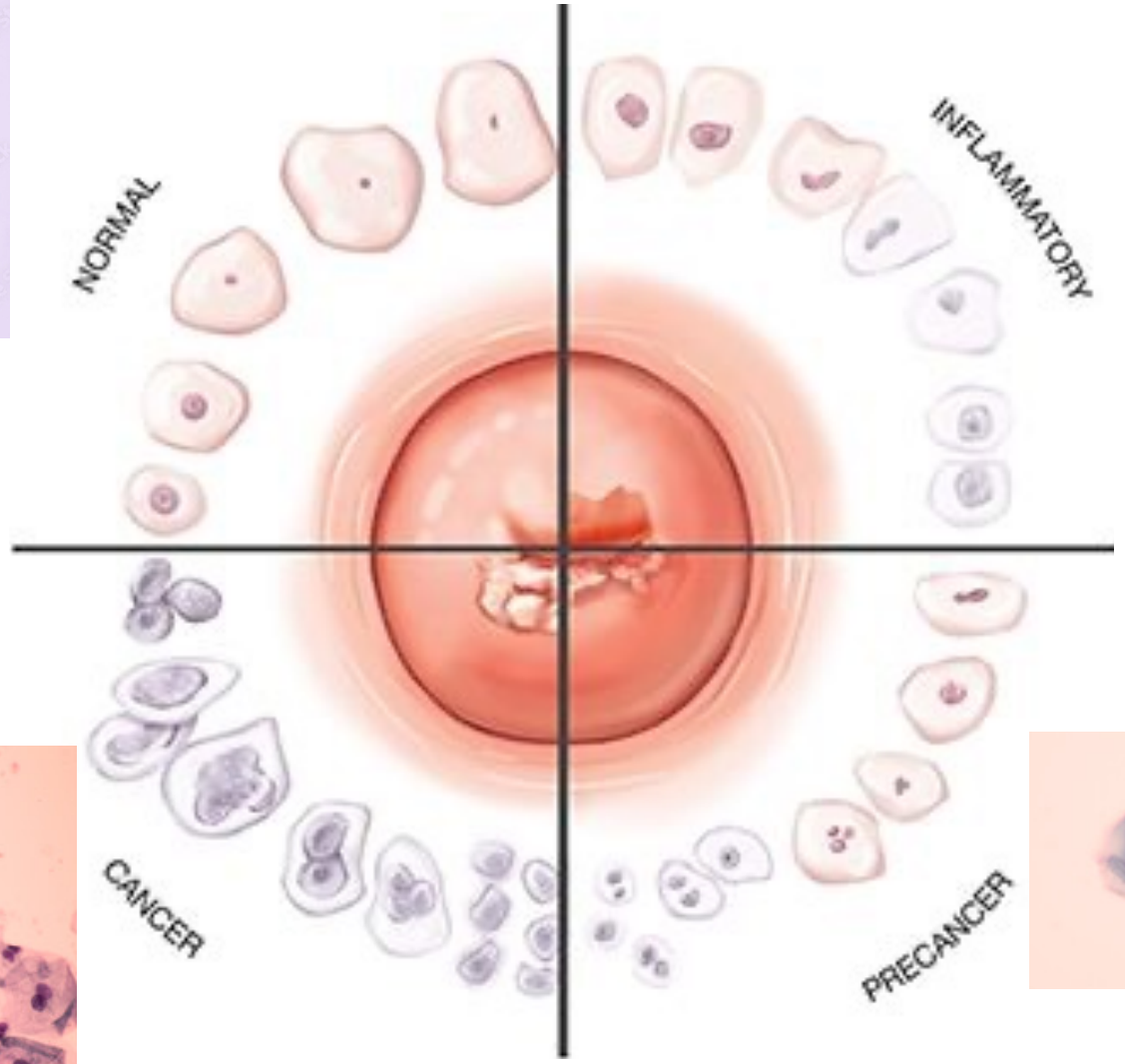
4. Les applications des techniques microscopiques

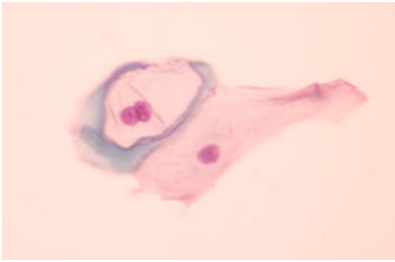
Ex: Diagnostic du cancer du col de l' utérus







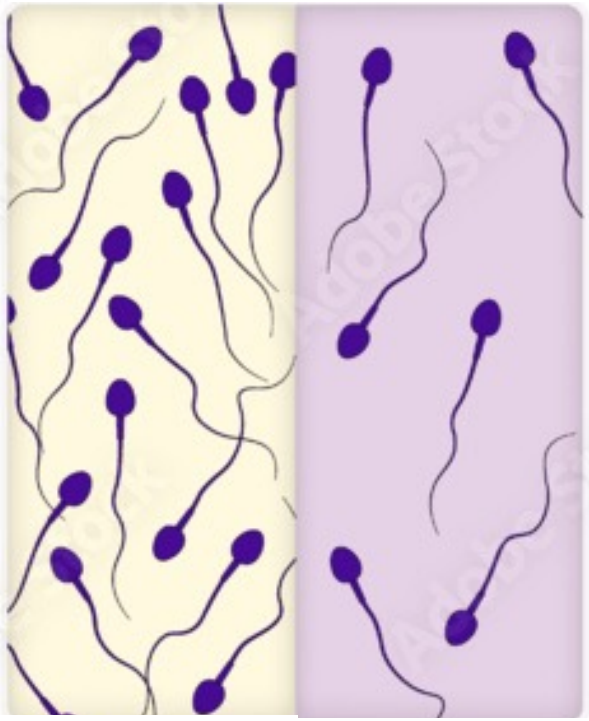




4. Les applications des techniques microscopiques

Ex:
Diagnostic de l'infertilité relative masculine

Nombre de spermatozoïdes

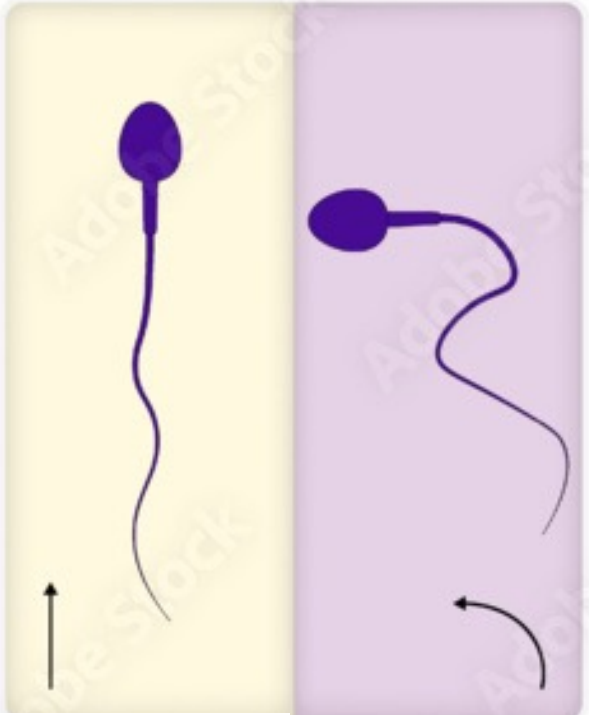


Normale **Anormale**

Morphologie des spermatozoïdes

Normale **Anormale**

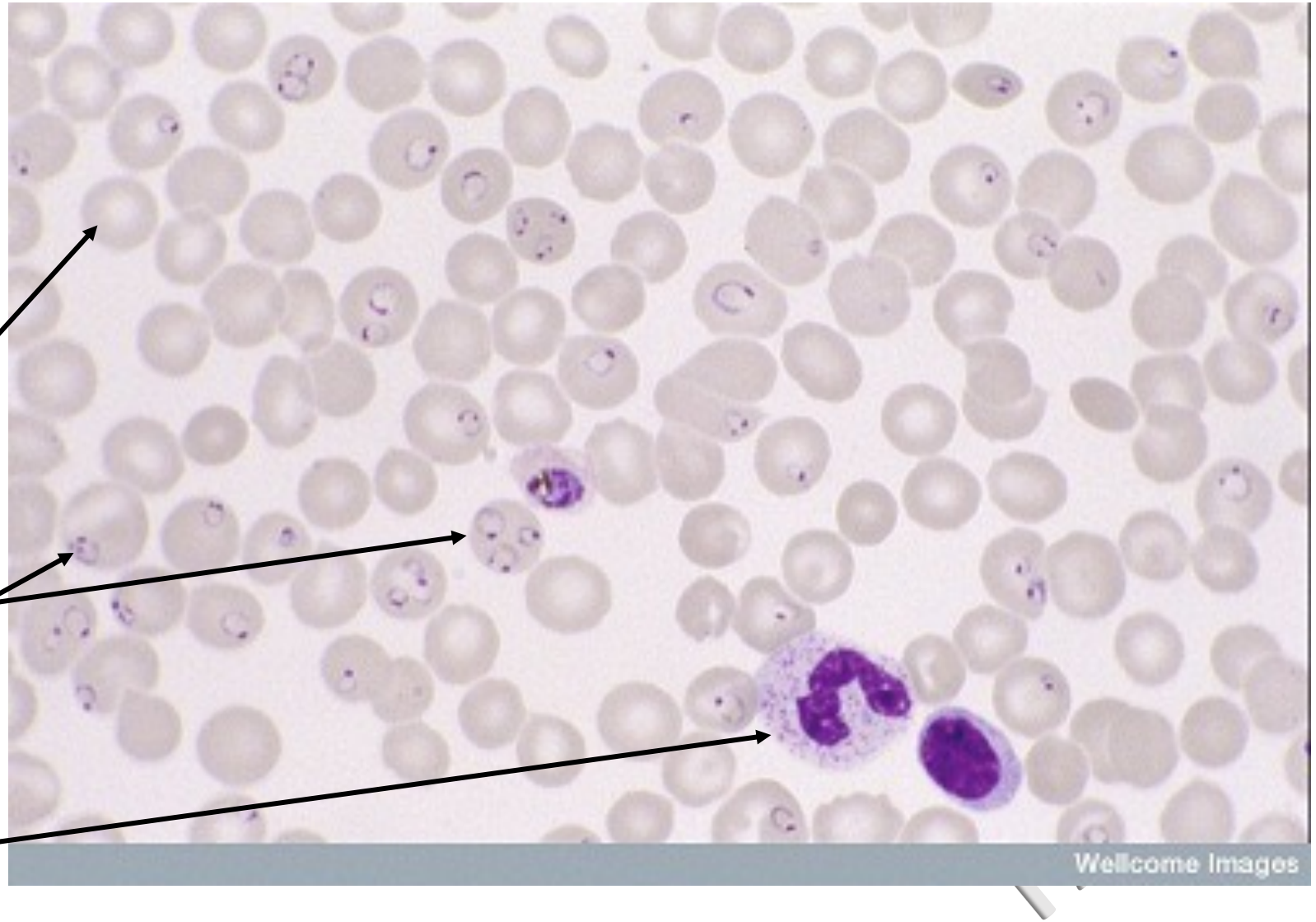
Mouvement des spermatozoïdes



Normale **Anormale**

4. Les applications des techniques microscopiques

Ex:
Diagnostic du paludisme



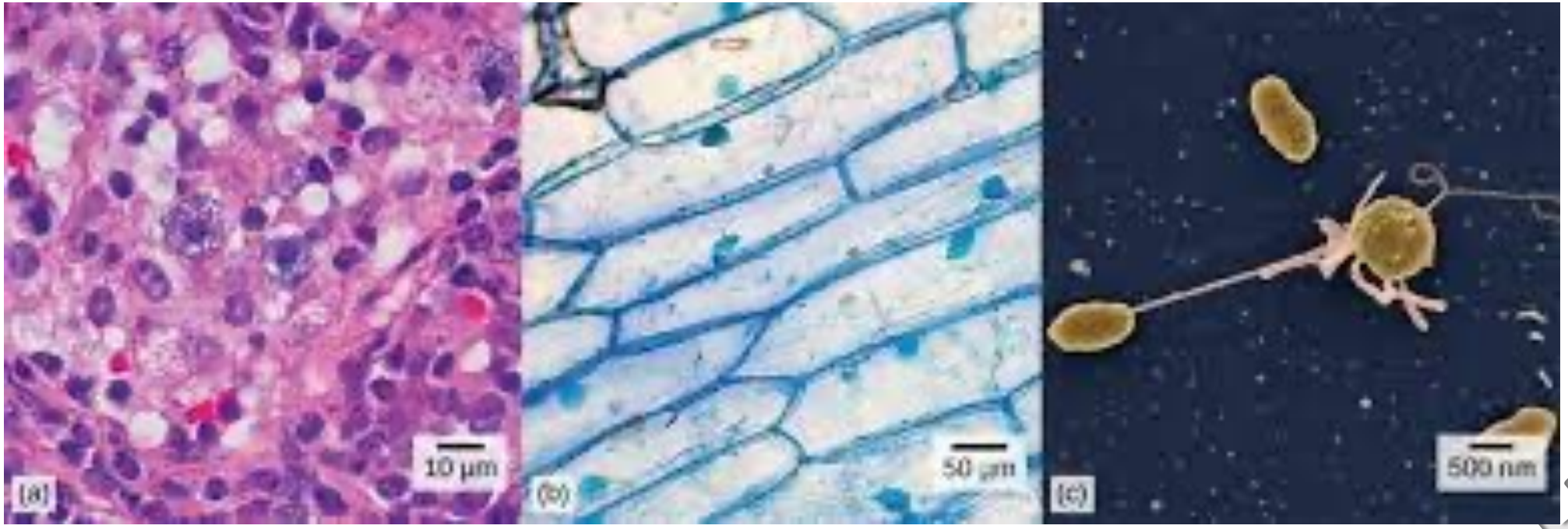
Globule rouge non infecté

Globule rouge infecté

Globule blanc

4. Les applications des techniques microscopiques

Ex: Diversité biologique



Les cellules des sinus nasaux
(microscope optique)

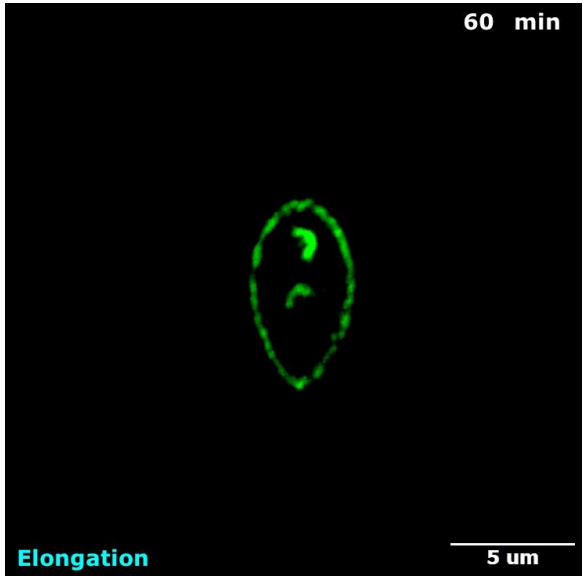
les cellules d'oignon
(microscope optique)

les cellules bactériennes Vibrio tasmaniensis
(microscope électronique à balayage)

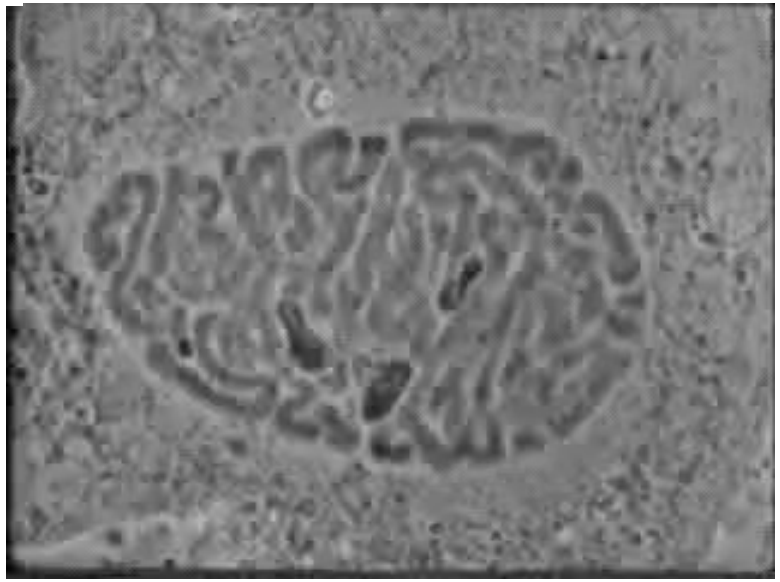
4. Les applications des techniques microscopiques

Ex: Mécanisme de la multiplication cellulaire

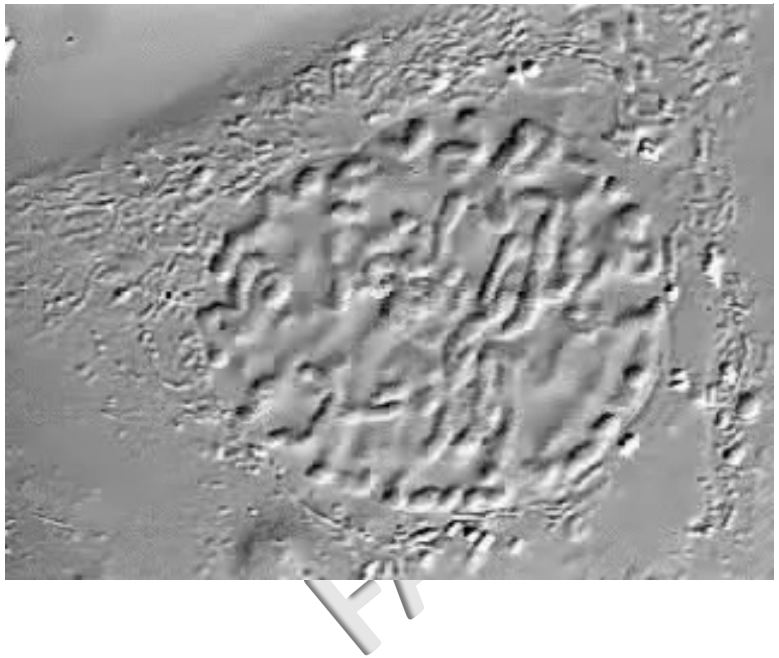
Division du parasite Toxoplasma gondii



Division d'une cellule végétale



Division d'une cellule animale



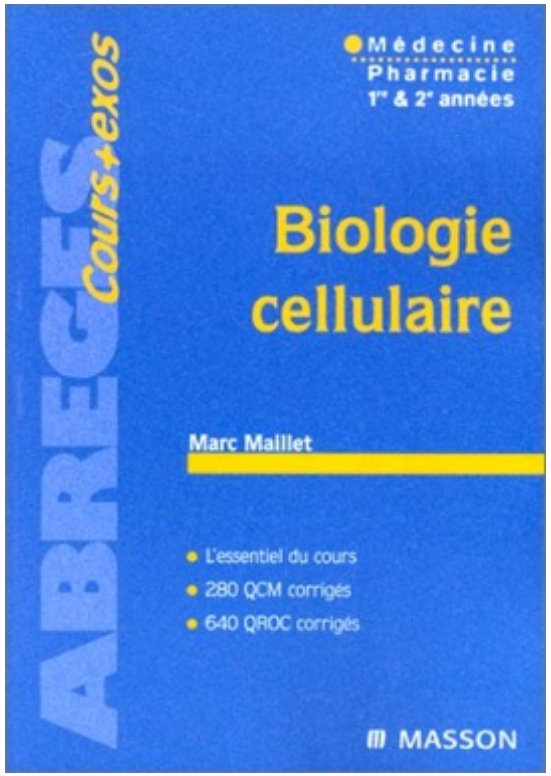
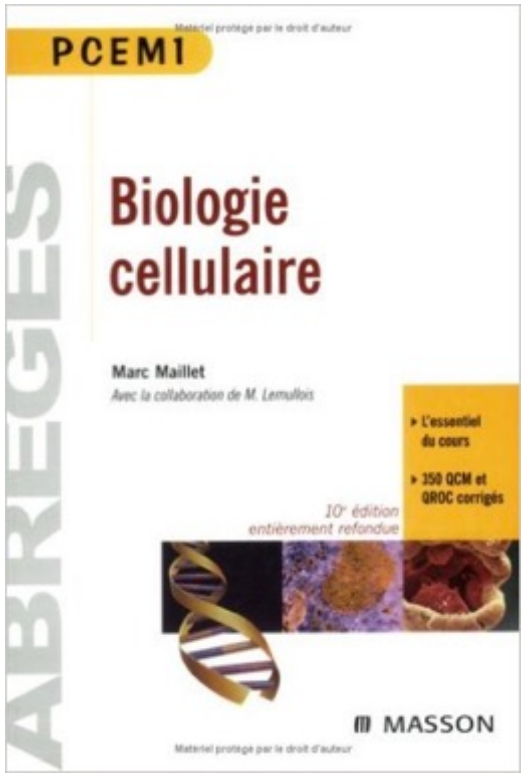
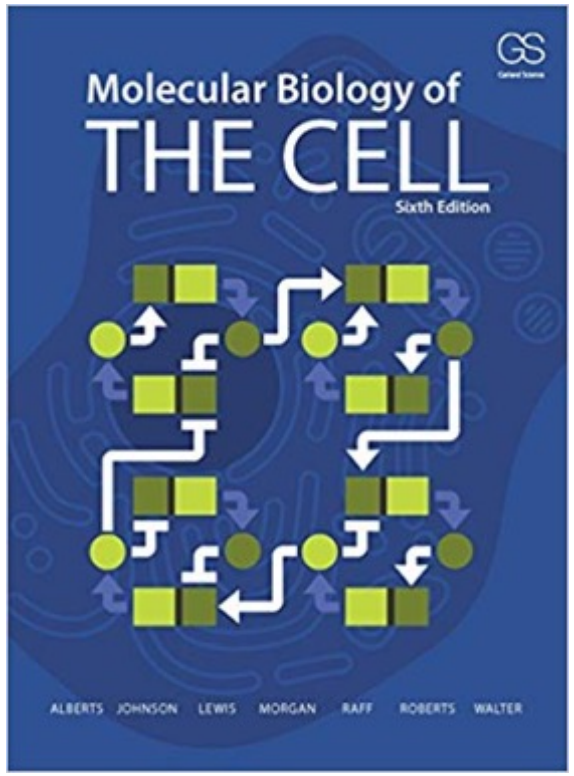
5. Conclusion

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. Aujourd'hui, la médecine et la biologie ne peuvent plus se passer des techniques microscopiques.

FAPH

Références

1 : Abrégés de Biologie Cellulaire de Marc Maillet, 9ème ou 10ème Edition; chez MASSON

2: Molecular Biology of the Cell, 6th Edition de Bruce Alberts

3. Pass Biologie cellulaire **E**DI**S**CIENCE