



BIOl 1372

2023-2024

Pharmacie _ Licence 1 _ S2



Méthodes d'étude de la cellule

Dr Dinkorma Ouologuem, MCA

Objectifs

1. Définir « les méthodes d'étude de la cellule »
2. Décrire le principe de fonctionnement du microscope photonique
3. Énoncer le principe d'une méthode de coloration de la cellule
4. Citer 1 caractéristique pour chacun des types de microscope électronique
5. Énoncer le principe du fractionnement cellulaire
6. Enoncer 2 applications

Plan

1. Généralités
2. Visualisation des cellules
3. Autres méthodes
4. Applications

Conclusion

1. Généralités

1.1. Définition

Les méthodes d'étude de la cellule sont un ensemble de techniques permettant d'analyser la **structure**, la **composition**, le **fonctionnement des cellules**.

1. Généralités

1.2. Intérêt

❖ Fundamental

- Investigation => Connaissance de la cellule

❖ Diagnostic

- Identification des microorganismes

❖ Thérapeutique

- Conception d'approches thérapeutiques

1. Généralités

1.3. Rappels

❖ Historique

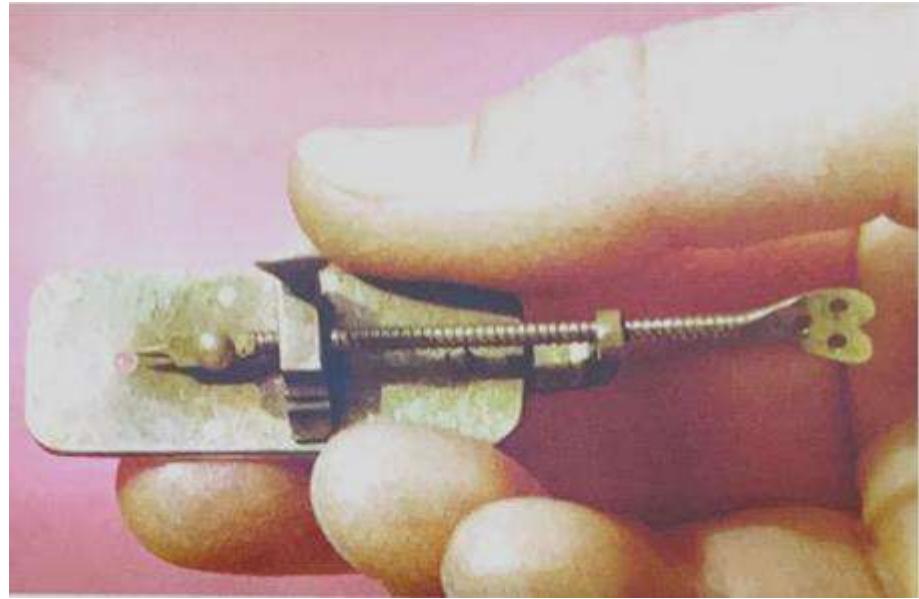
- 1662: Anton Van **LEEUWENHOEK**; invention 1^{er} microscope
- 1931: Ernest **RUSKA** & Max **KNOLL**; 1^{er} prototype microscope électronique; grossissement 400 fois
- 1930: Albert **CLAUDE**; fractionnement cellulaire (1974; prix Nobel)
- 1907: Roos **HARRISON**; culture tissus embryonnaires de grenouille

1. Généralités

1.3. Rappels

❖ Historique

Réplica du microscope de Leeuwenhoek



*microscope
électronique de
Ruska & Knoll*



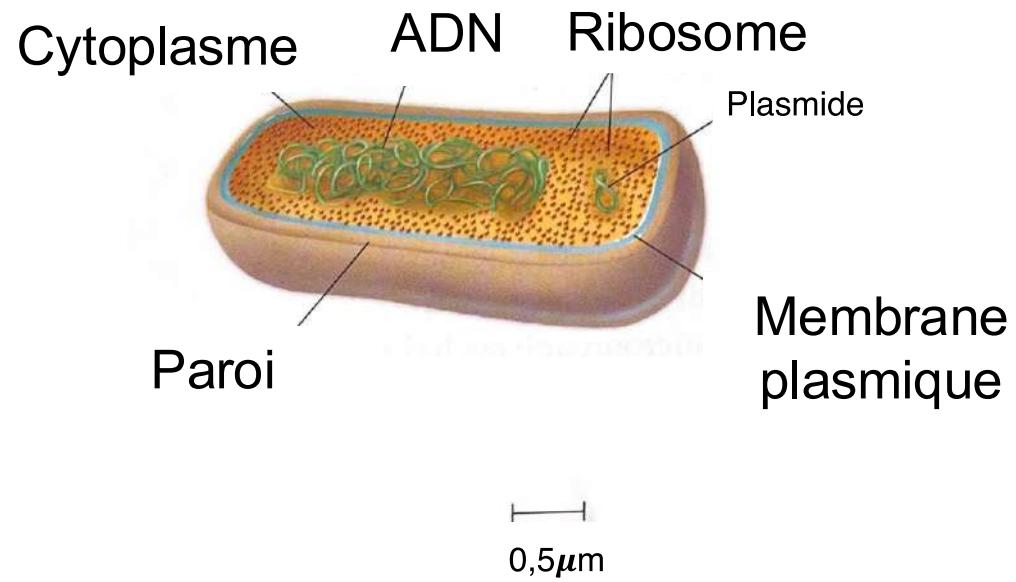
Figure 1. Illustrations de quelques avancés technologiques en microscopie
Biology of microorganisms, 11th edition

1. Généralités

1.3. Rappels

❖ les cellules

Cellule procaryote



Cellule eucaryote

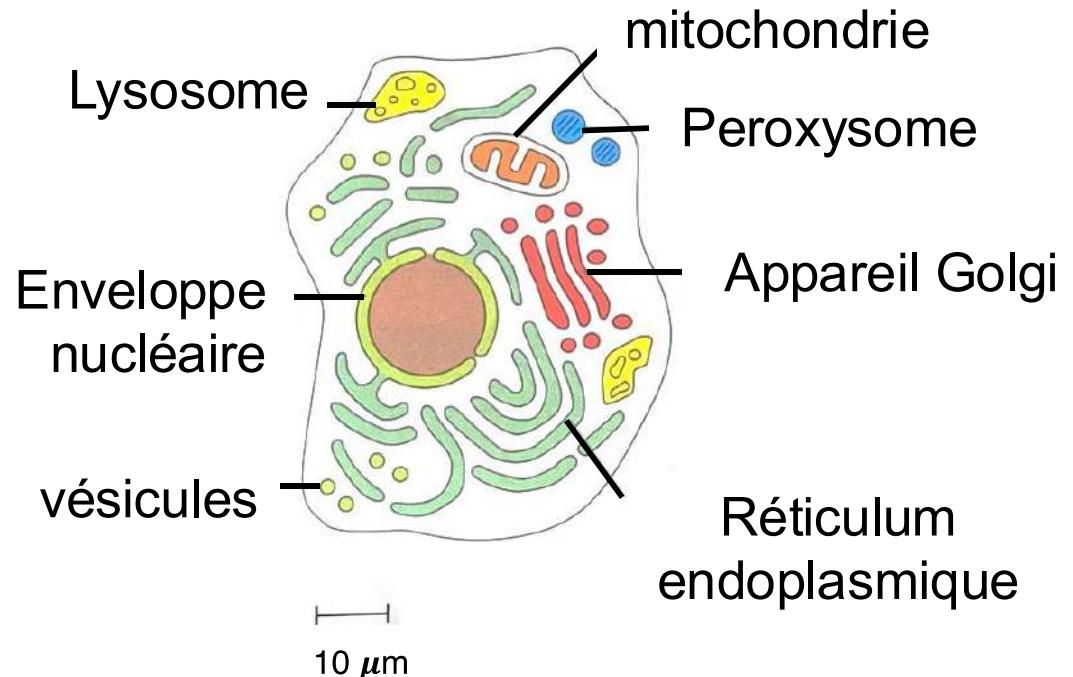


Figure 2. Schéma d'une cellule procaryote et cellule eucaryote

1. Généralités

1.3. Rappels

L'étude de la cellule consiste à :

- Visualiser la cellule et ses structures => **Microscopies**
- Composition moléculaire des structures cellulaires => **fractionnement cellulaire et approches moléculaires**
- Fonction des macromolécules et des structures cellulaires => **approches moléculaires, biochimiques et bioinformatiques**
- Cellule dans son environnement => **approches moléculaires, biochimiques, microscopiques**

2. Visualisation des cellules

- ❖ **Instrument:** Microscope
 - visualisation cellules, organites, macromolécules
- ❖ Plusieurs types de microscopes:
 - **Microscopes optiques** = microscopes photoniques
 - **Microscopes électroniques**

2. Visualisation des cellules

2.1. Champs d'utilisation du microscope

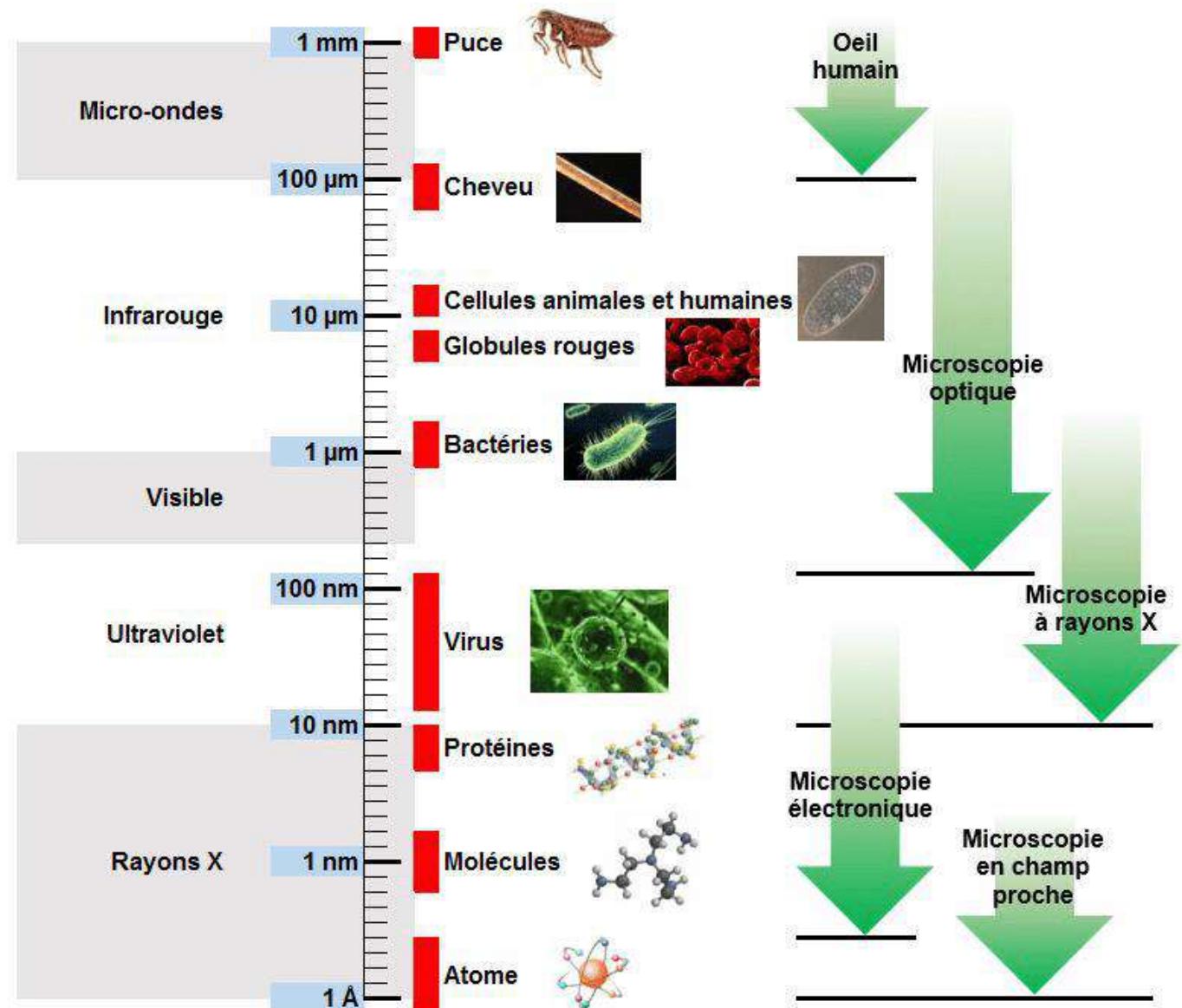


Figure 3. Champs d'utilisation de différents microscopes

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Définition

Le microscope optique (**microscope photonique**), est un instrument d'observation qui utilise les **photons** pour éclairer un échantillon. Grâce à un système de **lentilles**, il **agrandit** l'image d'un objet afin qu'elle soit **visible par l'œil humain**.

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Principe

- Une lumière (**photons**) envoyée sur la **préparation** (spécimen) ou émise par la préparation, est captée par un **objectif** qui la concentre et la passe par un **oculaire** afin de créer une **image observable**.
- Cette image est soit observée à **l'œil nu**, soit **photographiée**, soit enregistrée par caméra, puis stockée sur un ordinateur pour traitement.

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

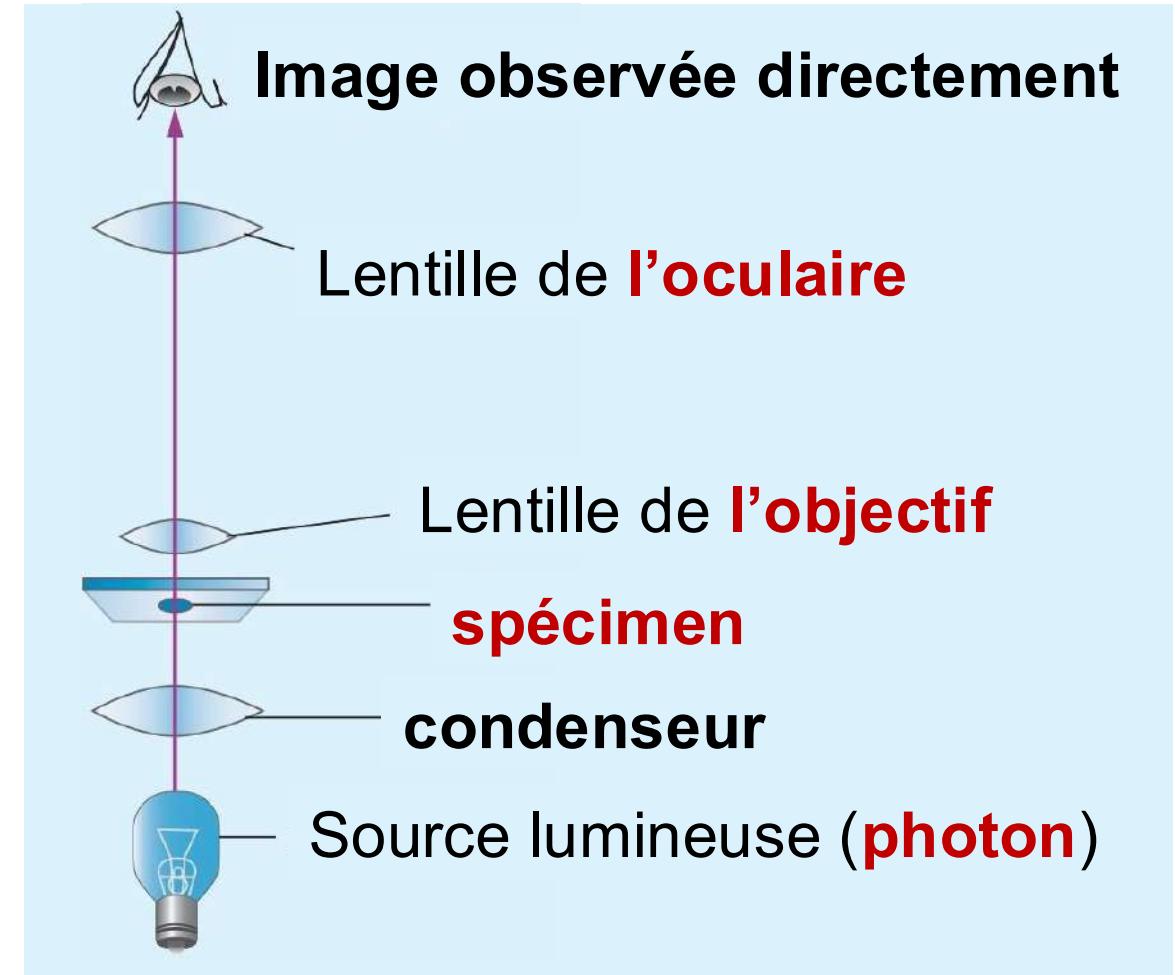
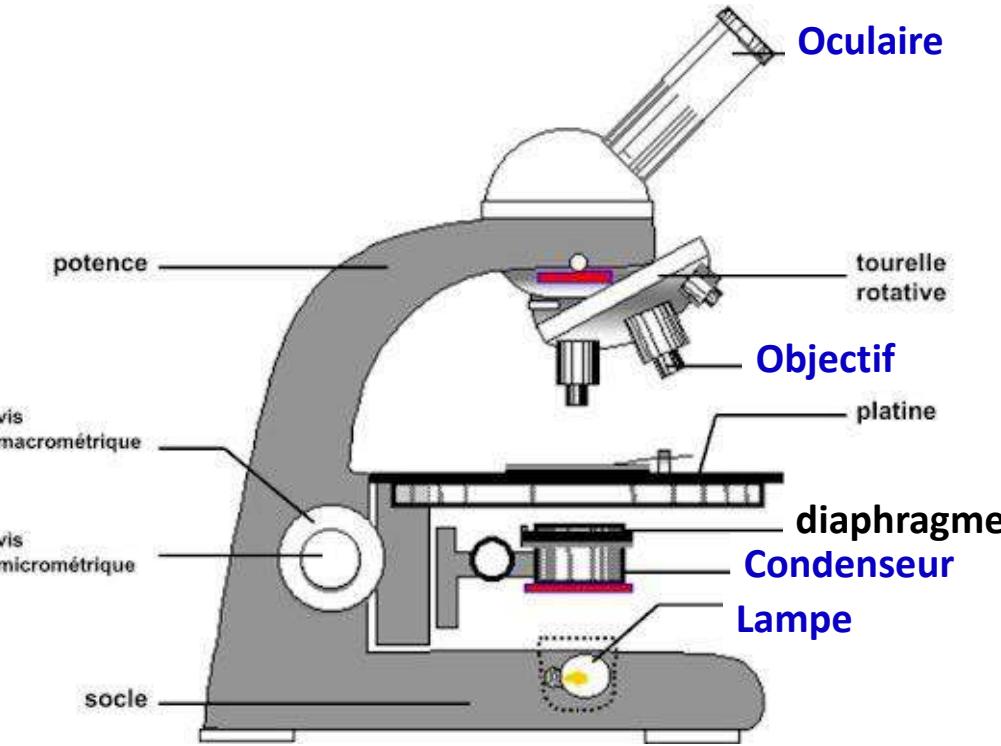


Figure 4. Eléments et principe de fonctionnement d'un microscope optique

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Description de l'instrument

- **Lentilles de grossissement**
 - **Objectif:** Lentilles pour 1^{er} grossissement; 4X, 10X, 20X, 40X, 100X
 - **Oulaire:** Lentilles pour 2^e grossissement; fonction du microscope; 10X ou 25X
 - => Grossissement élément microscopique (si oculaire 10X): 40 à 1000 fois
- **Pouvoir de résolution** / pouvoir séparateur: ~ 0,1 µm

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

Mic. de champ sombre (à fond noir)	
Echantillon	Cellules transparentes
Traitement de l'échantillon	sans préparation
Avantages	Usage courant
Inconvénients	Résolution très faible
Application	<ul style="list-style-type: none">• Comportement organisme entier;• bords et contours du spécimen• micro-organismes;

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

Puce d'eau



C elegans



Figure 5. Microographies provenant de microscopes optiques à champ sombre

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

Mic. Contraste de phase	
Echantillon	Cellules fixées ou vivantes
Traitement de l'échantillon	Avec ou sans préparation
Avantages	Observation sans coloration; grand contraste
Inconvénients	Résolution faible
Application	Mouvements cellulaires

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

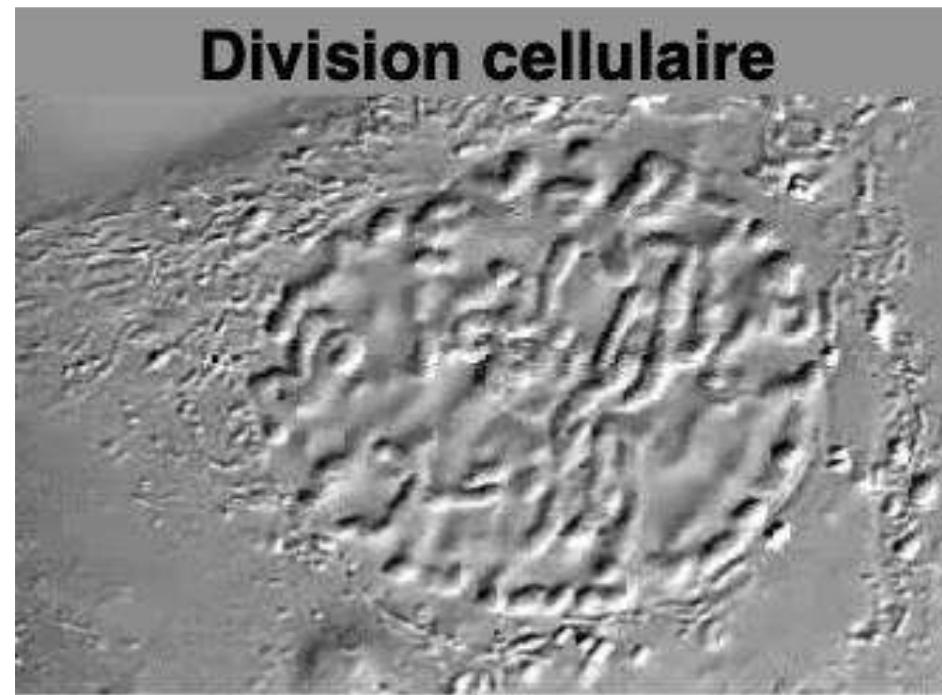
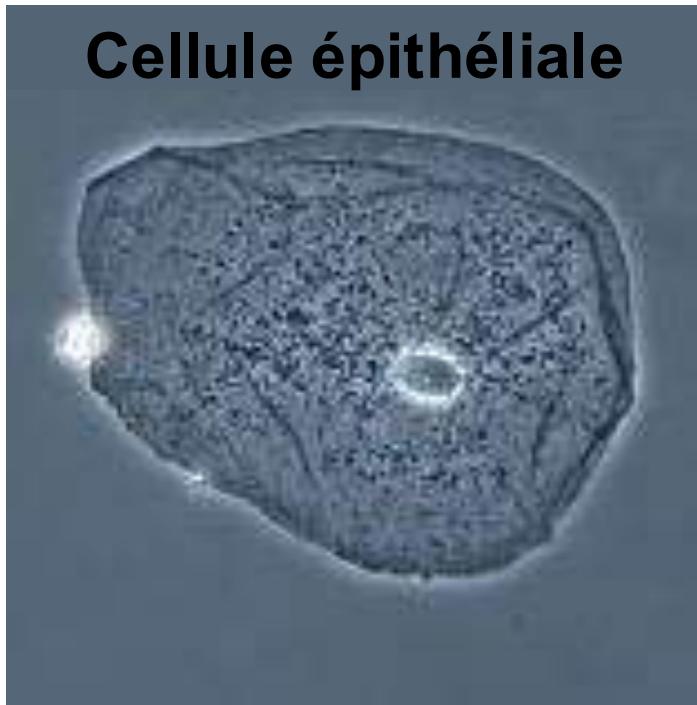


Figure 6. Microographies provenant de microscopes optiques à contraste de phase

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

Mic. à fluorescence	
Echantillon	Cellules fixées ou vivantes
Traitement de l'échantillon	Marquage avec des molécules fluorescentes
Avantages	Détection spécifique de structures cellulaires
Inconvénients	Résolution faible
Application	Visualisation spécifique structures cellulaires

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

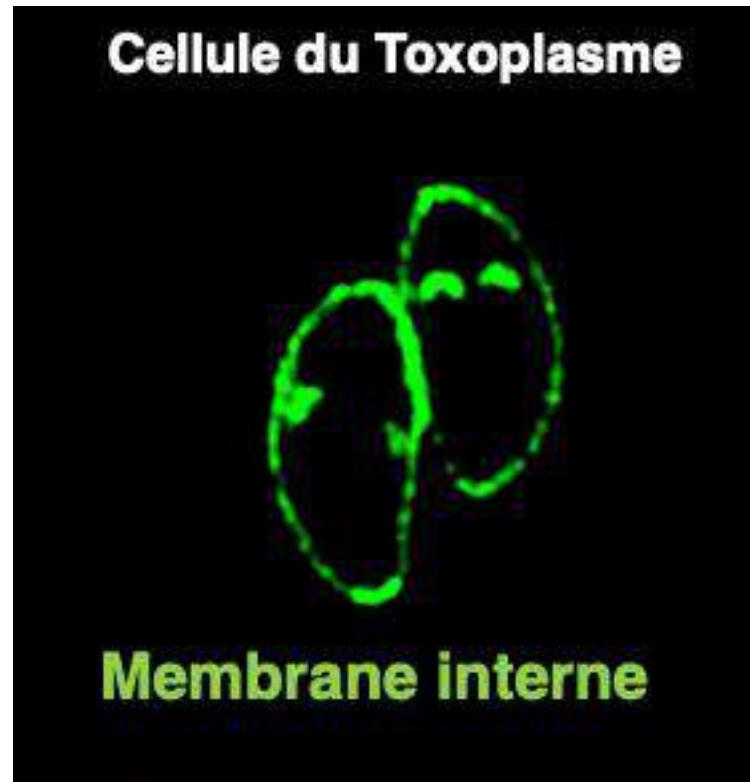


Figure 7. Microographies provenant de microscopes optiques à fluorescence

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- Caractéristiques du spécimen :
 - Epaisseur **(4-8 µm)**
 - **Contraste**
- ⇒ Permet la différenciation des éléments

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique



Figure 8. Illustration du traitement d'image pour un meilleur contraste

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- **État frais** => cellules vivantes
- **Fixation** => Mort des cellules
- **Coloration** (cellules mortes et cellules vivantes)

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- Fixation

- But:

- Empêcher la décomposition de la cellule et permettre aux colorants de se fixer correctement sur les structures;
 - Préserver les structures cellulaires dans un état proche de l'état vivant.

- Agents fixateurs:

- **Chimiques:** méthanol, formol, formaldéhyde, glutaraldéhyde
 - **Physiques:** chaleur

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- **Coloration**

- **But:** permettre une **différenciation optique** (contraste) des constituants cellulaires pour les **échantillons morts/fixés**
Colorants absorbent certaines longueurs d'onde de la lumière
- **Méthodes**
 - Coloration chimique (plus courante), méthodes enzymatiques, méthodes immuno-enzymatiques, méthodes fluorométriques

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

Tableau 1: Coloration avec des colorants chimiques

APPROCHE COLORIMETRIQUE	PRINCIPE	OBJECTIFS	EXEMPLE
COLORATION CHIMIQUE	<ul style="list-style-type: none">Baigne l'échantillon dans une solution coloréeColorants basiques et acides	Créer un contraste global pour distinguer les structures générales ex. Noyau vs cytoplasme	<ul style="list-style-type: none">Colorants basiques hématoxyline bleu de méthylèneColorants acides éosine fuchsine acide

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

Tableau 2: Caractéristiques des colorants acides et basiques

Type de colorant	Charge du colorant	Cible (Charge de la molécule)	Exemple de structure colorée
Basique	Positive (+)	Négative (-)	Noyau (ADN/ARN)
Acide	Négative (-)	Positive (+)	Cytoplasme / Matrice extracellulaire

2. Visualisation des cellules

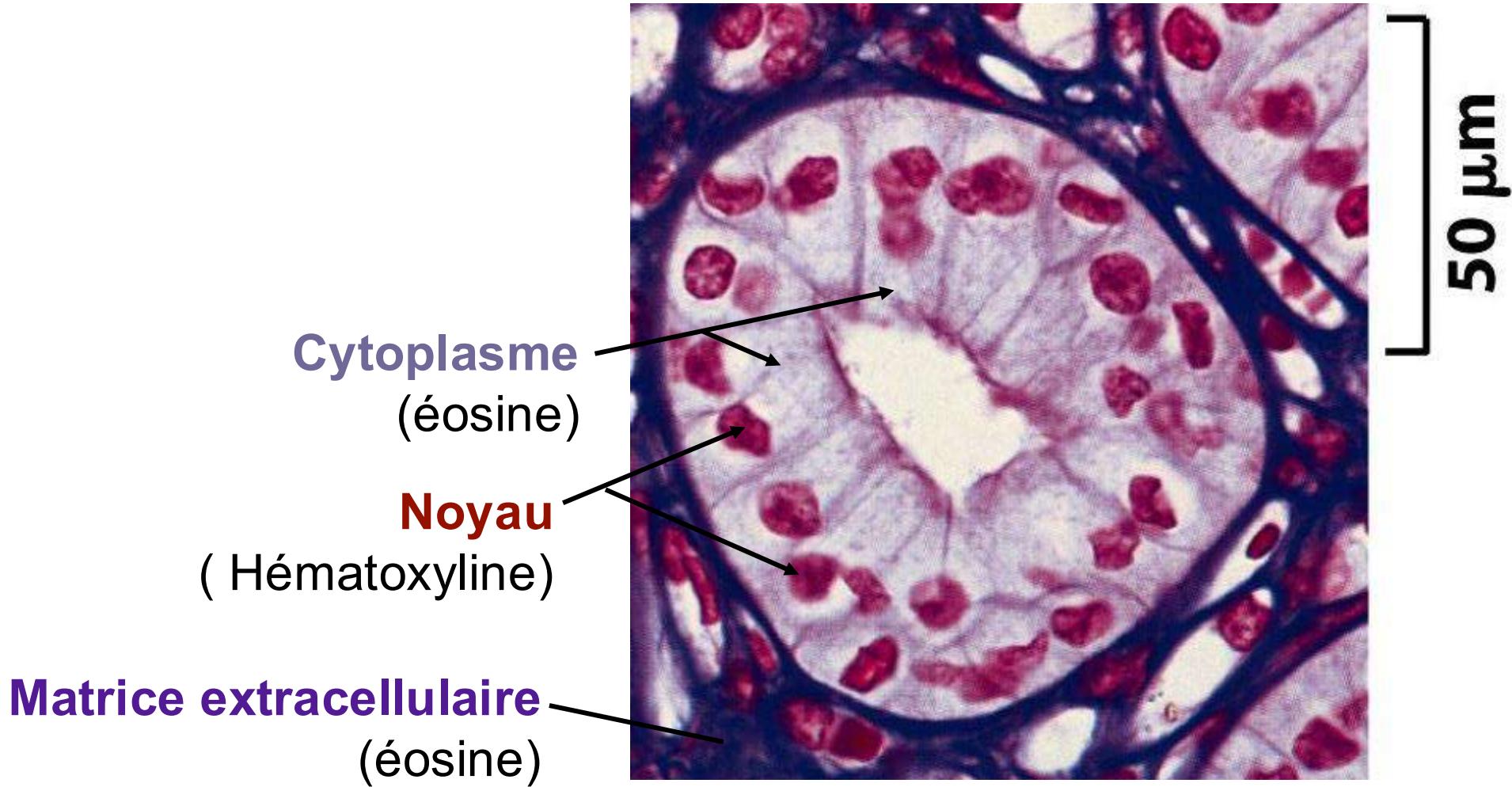


Figure 9. Micrographe d'un tissu coloré avec l'éosine et l'hématoxyline

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

Tableau 3: Colorations enzymatiques

APPROCHE COLORIMETRIQUE	PRINCIPE	OBJECTIFS
COLORATION ENZYMATIQUE (histoenzymologie)	Fournir un substrat incolore à la cellule. Si enzyme spécifique présente et active => transformation du substrat en produit coloré et insoluble qui précipite sur place.	Localiser précisément où une réaction chimique se produit dans la cellule

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

Tableau 4: Colorations immuno-enzymatiques

APPROCHE COLORIMETRIQUE	PRINCIPE	OBJECTIFS
COLORATION IMMUNO-ENZYMATIQUES	<ol style="list-style-type: none">1. Utilise un anticorps pour cibler une protéine précise.2. L'anticorps est couplé à une enzyme.3. On ajoute ensuite un substrat qui change de couleur au contact de l'enzyme.	<p>Repérer une protéine spécifique avec une très grande précision</p> <p>Ex. : Déetecter des marqueurs cancéreux</p>

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

Tableau 5: Colorations fluorométriques

APPROCHE COLORIMETRIQUE	PRINCIPE	OBJECTIFS
COLORATION FLUOROMETRIQUES	Utilisation des fluorochromes pour marquer spécifiquement une macromolécule (lipides, glucides, acides nucléiques, protéine)	<ul style="list-style-type: none">• Obtenir une image très lumineuse sur fond noir• Visualisation spécifique des structures extrêmement fines• Suivie des molécules dans des cellules vivantes

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Définition

Le microscope électronique est un instrument optique qui utilise un **faisceau d'électrons** pour illuminer un échantillon et créer une **image très agrandie**, avec un **grossissement** pouvant atteindre **2 millions de fois**.

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

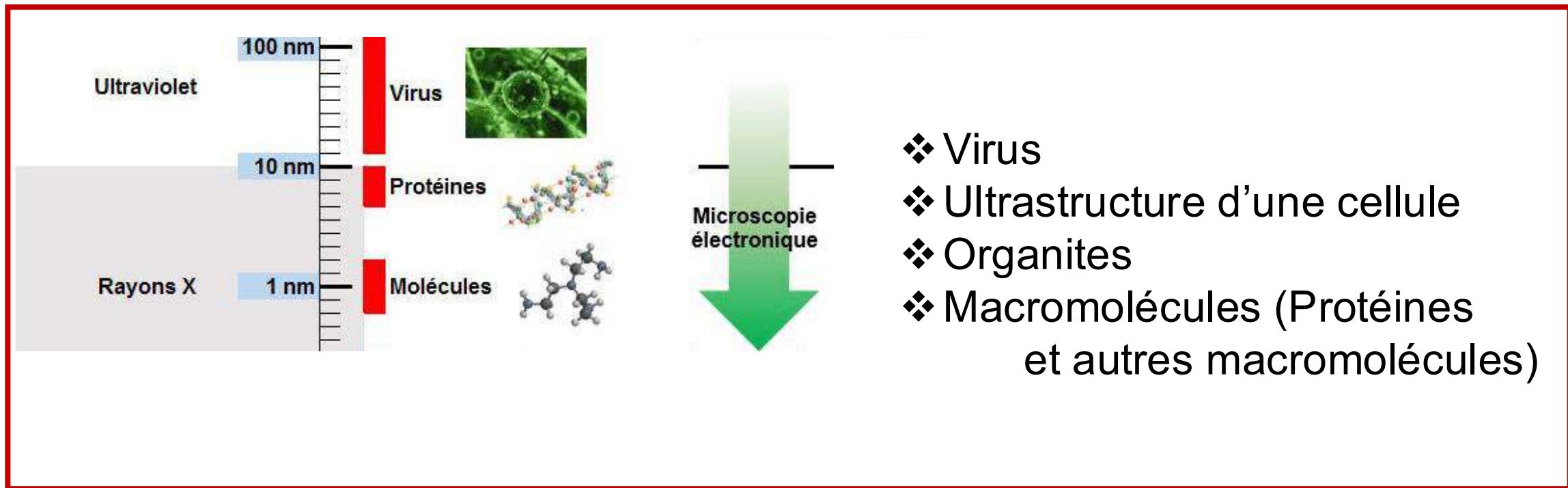


Figure 10. Champ d'utilisation du microscope électronique

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Principe

Des **électrons** sont captés par un **1^{er} jeu de lentilles électromagnétiques (aimants)** qui les focalisent sur la **préparation**. Les électrons traversant l'échantillon sont captés par un **2^e jeu de lentilles électromagnétiques**, qui projette les faisceaux d'électrons sur un **film photographique**, ce qui permet de visualiser l'image agrandie.

- **Pouvoir de résolution : 2Å**

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

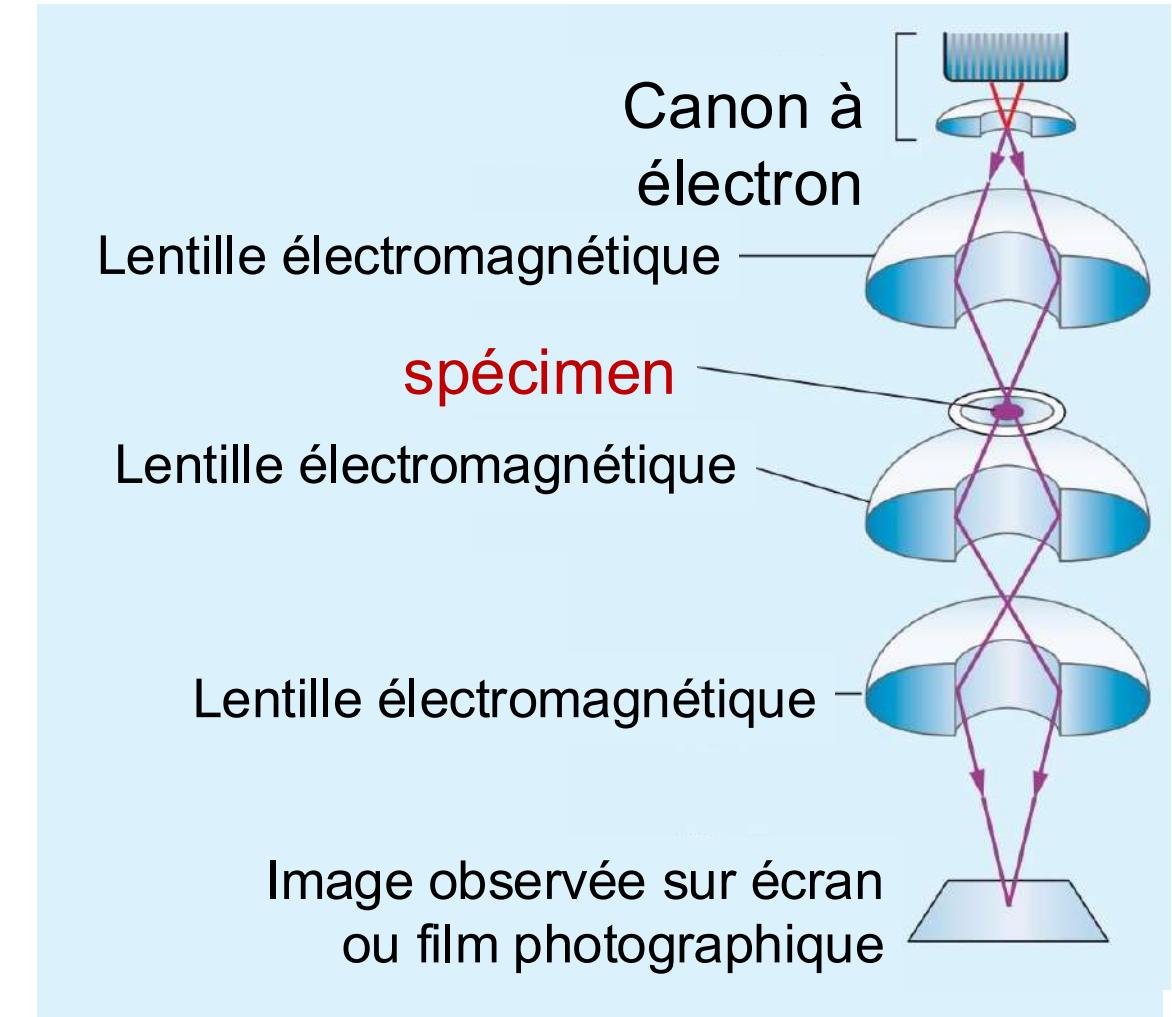
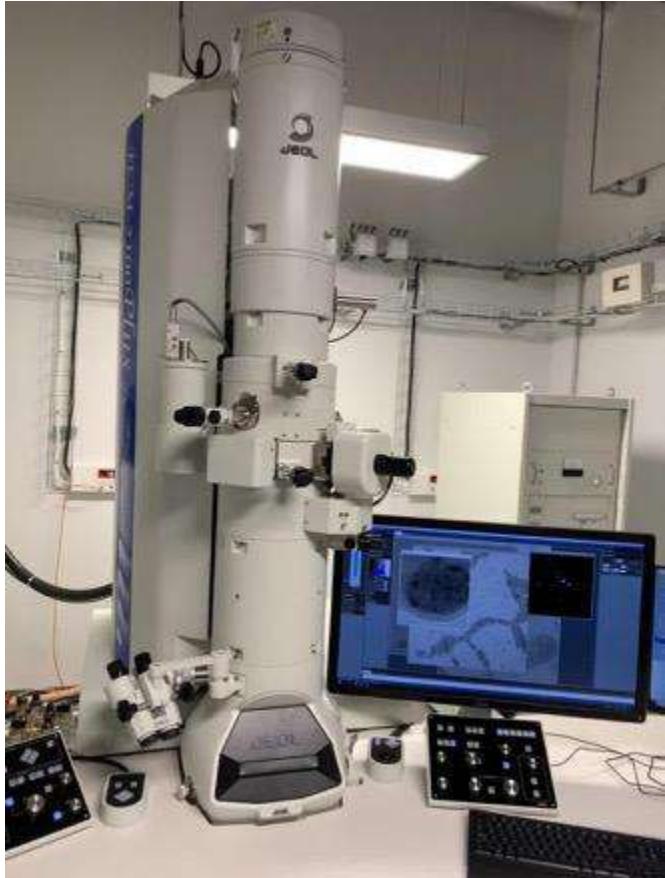


Figure 11. Image et principe de fonctionnement d'un microscope électronique

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

	Microscope électronique à transmission (MET)	Microscope électronique à balayage (MEB)
Echantillon	Spécimens fixés	Spécimens fixés

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

	Microscope électronique à transmission (MET)	Microscope électronique à balayage (MEB)
Echantillon	Spécimens fixés	Spécimens fixés
Traitement de l'échantillon	Traitements spécifiques et coloration avec métaux lourds	Traitements spécifiques et coloration avec métaux lourds

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

	Microscope électronique à transmission (MET)	Microscope électronique à balayage (MEB)
Echantillon	Spécimens fixés	Spécimens fixés
Traitement de l'échantillon	Traitements spécifiques et coloration avec métaux lourds	Traitements spécifiques et coloration avec métaux lourds
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none">Technique la plus performanteVisualisation des structures intracellulaires => ultrastructures	<ul style="list-style-type: none">Visualisation images en pseudo 3Dfournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel de l'objet / spécimen

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

Image d'une vacuole contenant 2 parasites *Toxoplasma gondii*

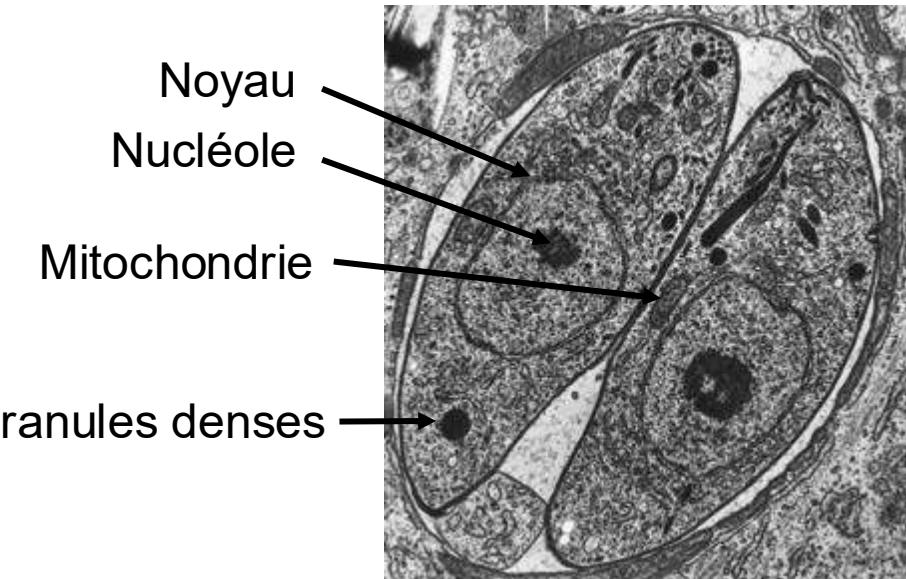


Image pseudo 3D des parasites *Toxoplasma gondii*

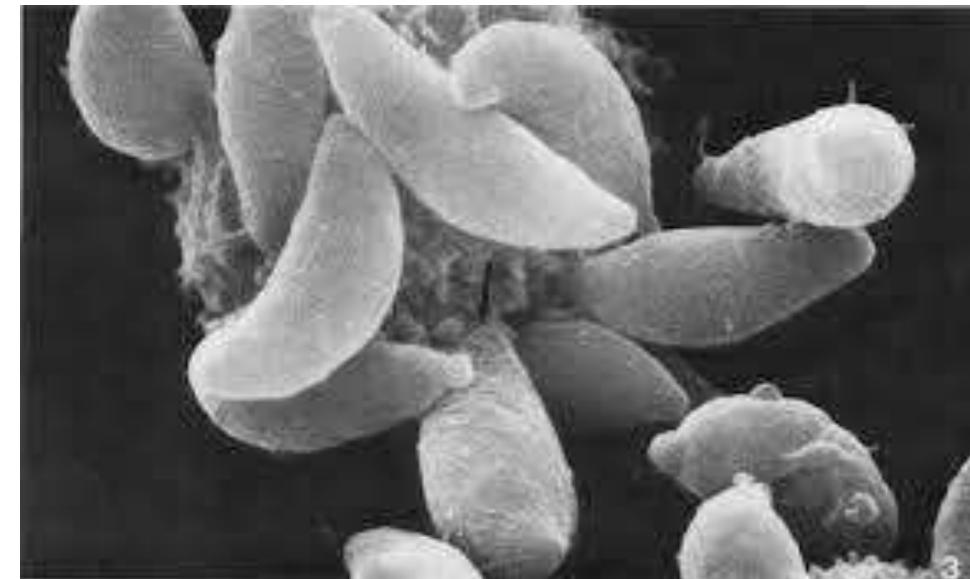


Figure 12. Microographies des cellules du toxoplasme provenant du MET et du MEB

3. Autres méthodes

3.1. Fractionnement cellulaire

❖ Définition

Le fractionnement cellulaire est une technique d'**isolement d'organites et de structures cellulaires** tout en préservant leurs fonctions individuelles

❖ Principe

Consiste à **lyser la cellule** et à **purifier les organites** cellulaires afin d'obtenir des fractions d'organites cellulaires purifiées.

3. Autres méthodes

3.1. Fractionnement cellulaire

❖ Etapes

Le fractionnement comprend 3 grandes étapes

- **Homogénéisation** = lyse cellulaire (rupture de la membrane plasmique)
- **Filtration**
- **Purification** des organites/structures **par centrifugation**

3. Autres méthodes

3.1. Fractionnement cellulaire

❖ Etapes

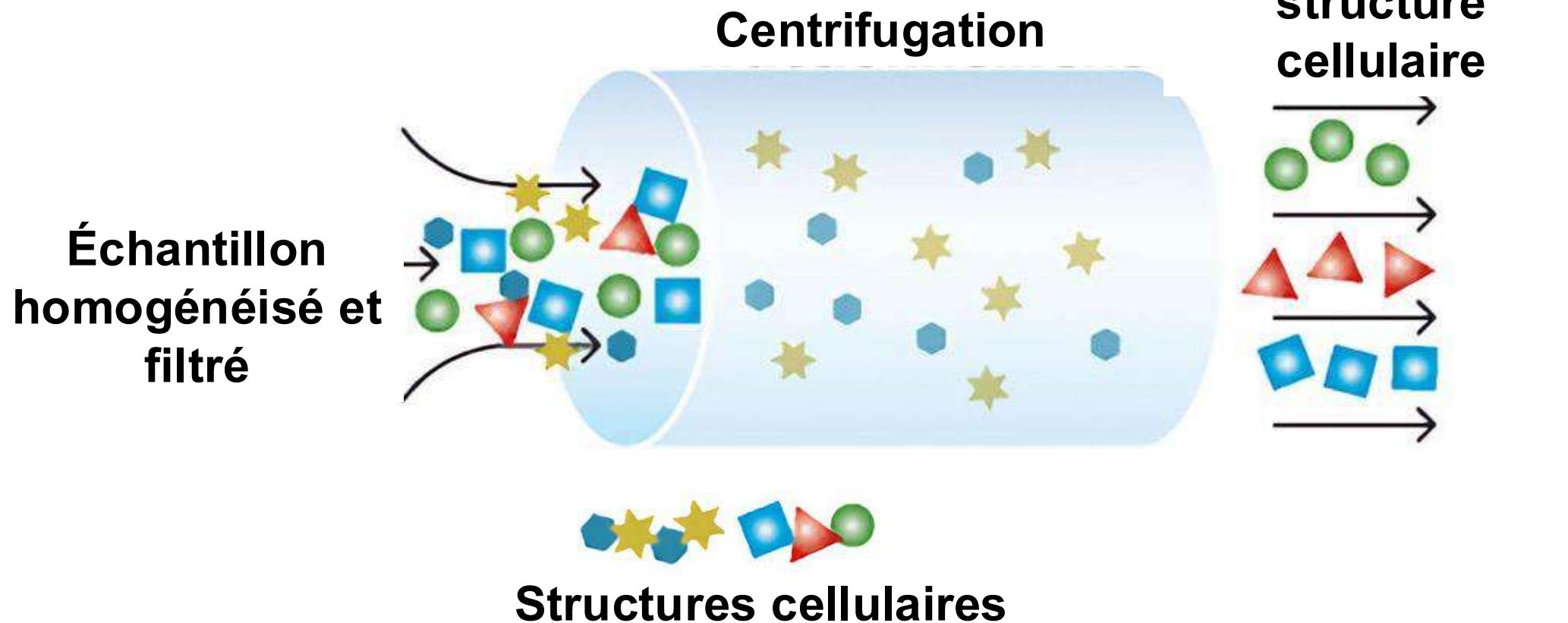


Figure 13. Fractionnement cellulaire

3. Autres méthodes

3.1. Fractionnement cellulaire



Figure 13. Ultracentrifugeuse

3. Autres méthodes

3.2. Culture cellulaire

❖ Définition

Ensemble de techniques permettant de faire croître des cellules hors de leur milieu d'origine ou de l'organisme

❖ Principe

Consiste à maintenir des **cellules** dans un **milieu de culture précis** et des **conditions environnementales** propices à leur croissance et multiplication

3. Autres méthodes

3.2. Culture cellulaire

Supports de culture



Incubateur pour la culture cellulaire



Figure 14. Support de culture et incubateurs pour la culture cellulaire

4. Applications

4.1. Diagnostic

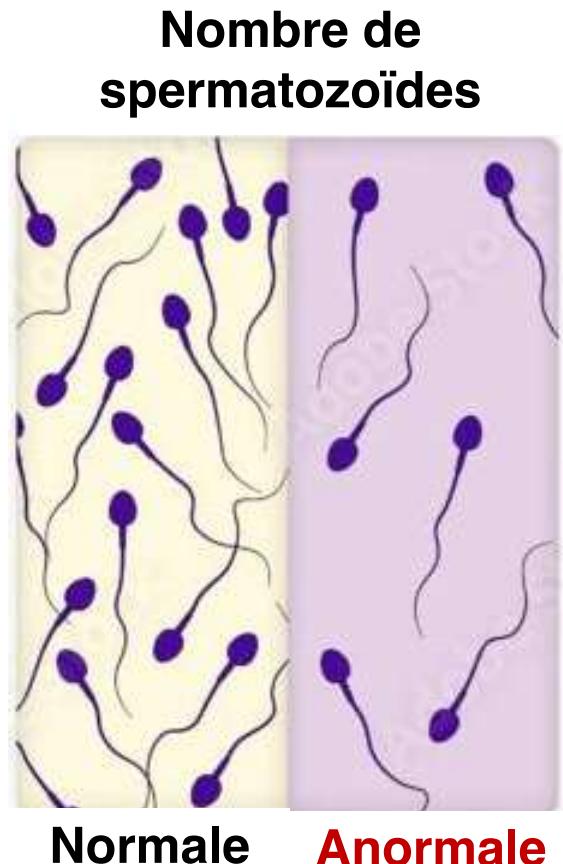
- ❖ Concept: Approche microscopique
- ❖ Analyse:
 - Appréciation des formes cellulaires (organisme fixé) , quantité (organisme fixé) et mouvement (organisme vivant)
 - Identification de cellules étrangères ou atypiques (organisme fixé)

4. Applications

4.1. Diagnostic

Ex:

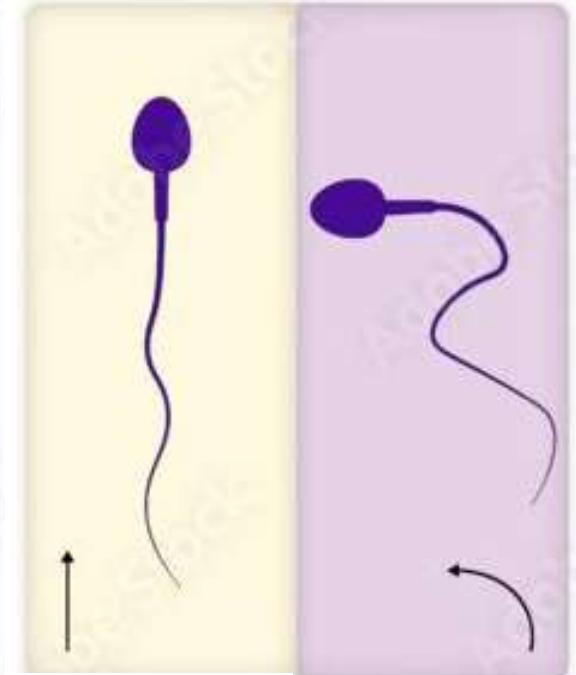
Diagnostic de
l'infertilité
relative
masculine



Morphologie des spermatozoïdes



Mouvement des spermatozoïdes



4. Applications

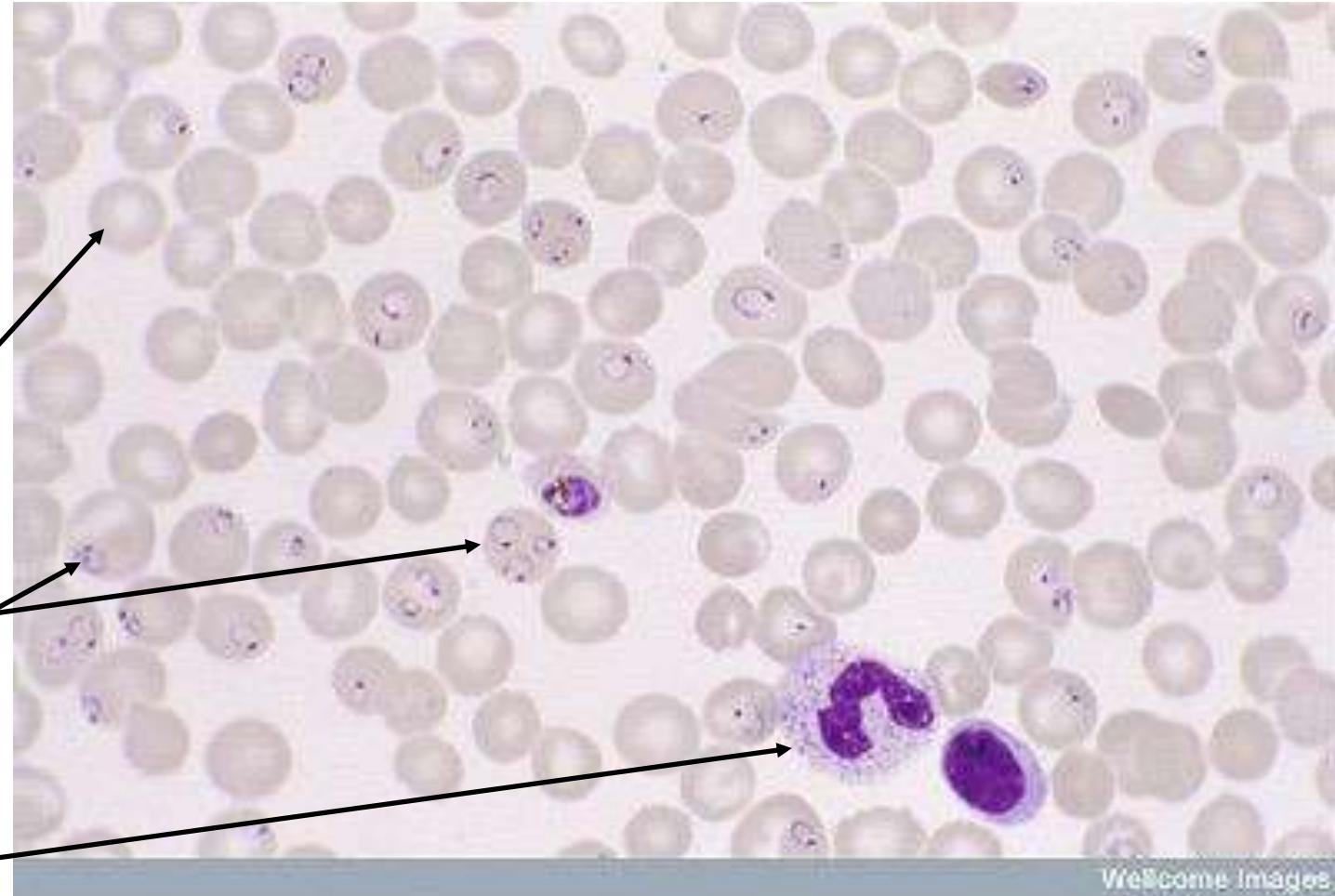
4.1. Diagnostic

Ex:
Diagnostic du
paludisme

Globule rouge
non infecté

Globule
rouge infecté

Globule blanc



Welcome Images

4. Applications

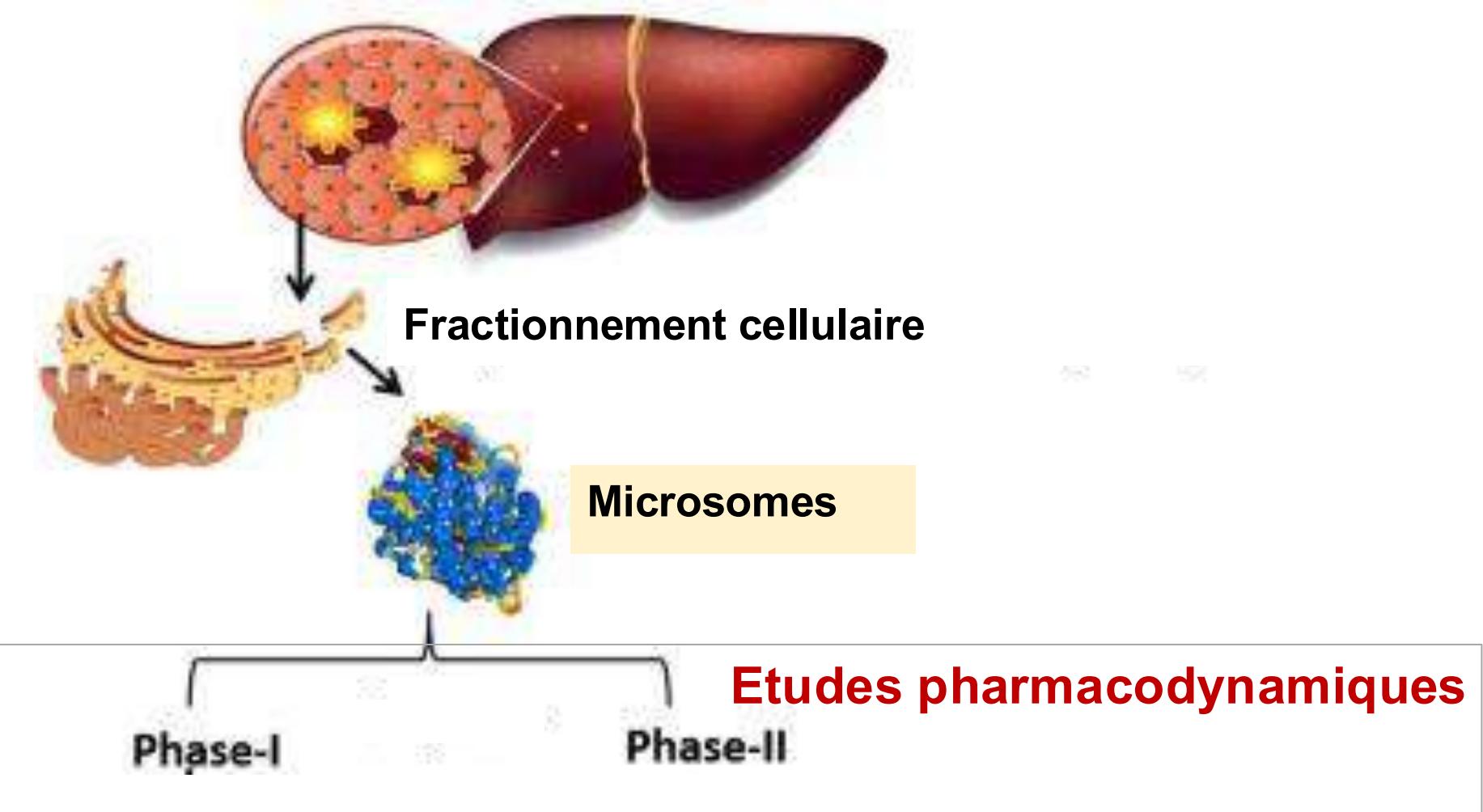
4.2. Thérapeutique

- ❖ Concept: **Fractionnement cellulaire**
- ❖ Visée de l'analyse:
 - Enrichissement d'organite
 - Utilisation de structures cellulaires (membranes, récepteurs, enzymes) purifiées pour des études pharmacologiques (interactions, pharmacodynamie, toxicité, etc.)

4. Applications

4.2. Thérapeutique

Réticulum
endoplasmique
des hépatocytes



4. Applications

4.2. Thérapeutique

Utilisation des **microsomes** (= vésicules du RE riche en enzymes de métabolisation)

- ❖ Évaluation du métabolisme des médicaments
- ❖ Identification de métabolites toxiques => Prédiction des effets secondaires du médicament
- ❖ Étudier la manière dont un médicament interagit avec des enzymes (dans le foie et autres tissus)

4. Applications

4.3. Recherche

Étude des fonctions cellulaires

- Fractionnement cellulaire => Obtention d'une quantité importante d'un organite donné.
- Caractérisation des constituants moléculaires
- Comparaison des organites provenant de 2 types de cellule

Conclusion

Les méthodes d'étude de la cellule ont révolutionné notre compréhension du vivant. Au-delà de l'observation, elles sont devenues des outils indispensables pour établir des diagnostics précis, décrypter les mécanismes moléculaires des pathologies et développer des stratégies thérapeutiques innovantes.