



Méthodes et appareillages utilisés pour l'étude de la cellule

Dr BOUKRAA Djamilia

Les méthodes et les techniques développées dans ce module sont :

Introduction.....	3
I- Les techniques d'études des cellules	3
cellules vivantes	3
cellules mortes	3
I-1- Méthodes d'étude morphologiques de la cellule.....	4
II-1-1- Les étapes de préparation des coupes microscopiques	5
II-1-1-1- Prélèvement	5
Cytologique.....	6
Histologique.....	5
II-1-1-2- La Fixation	5
II-1-1-3- La Déshydratation	6
II-1-1-4- L'Inclusion	6
II-1-1-5- La formation des coupes fines ou ultrafines	7
II-1-1-6- La Réhydratation (déparaffinage)	7
II-1-1-7- La coloration des coupes.....	7
II-1-1-7-a- Les colorants métachromatiques	8
II-1-1-7-c- La coloration négative	8
II-1-1-7-d- Les ombrages métalliques	9
II-2- La microscopie.....	9
II-2- 1- Les microscopes optiques (photoniques)	10
Microscope Optique à fond clair	11
Microscope Optique à fond clair	11
Microscope Optique à fluorescence	11
Microscope Optique à contraste de phase	11
Microscope Optique confocal	11
II-2- 2- Les microscopes électroniques	12

- Microscope Electronique par transmission (MET).....	13
- Microscope Electronique à balayage (MEB)	13
II-2- 3- Comparaison entre microscope optique et microscope électronique	14
II-2- Méthodes d'étude cytochimiques et biochimiques	15
II-2-1- Méthodes non spécifiques	15
II-2-1-1- L'Autoradiographie ou auto-historadiographie	16
II-2-1-1-1- Marquage par les isotopes radioactifs (IR)	16
II-2-1-1-2- Exemples de marquage par les isotopes radioactifs	17
II-2-2- Méthodes spécifiques.....	18
II-2-2-1 - L'Immunocytochimie	18
II-2-2-1 -1- Marquage des anticorps	19
II-2-2-1 -2- Marquage des anticorps par l'utilisation des fluorochromes	19
II-2-2-2 – Hybridation in situ (HIS)	19
Radio-autographie	20
Immuno-cytochimie	20
II-2-2-3– La méthode histo-enzymatique	20
II-3- Méthodes physiologiques.....	21
II-3-1- Méthodes de fractionnement subcellulaire	21
II-3-2- La Dissociation cellulaire.....	21
II-3-3- L'Isolément / Tri cellulaire /Purification	21
II-3-4- L'éclatement cellulaire (Homogénéisation)	22
II-3-5- La Purification par centrifugation	22
II-3-5-1- Par la Centrifugation différentielle	22
II-3-5-2- Centrifugation par gradient préformé.....	23
II-4- La Culture cellulaire.....	24
II-4-1- Principe de la culture cellulaire	24
➤ Cultures histiotypiques	24
➤ Cultures organotypiques	24
II-4-2- Les techniques d'obtention des cellules	24
II-4-2-1- Les cellules libres et circulantes	25
II-4-2-2- Les cellules en cohésion qui constituent un tissu	25
II-4-2-2-1- La méthode par dissection.....	25
II-4-2-2-2- La méthode par digestion enzymatique_.....	25
II-4-3- Conditions de mise en culture cellulaire	25
II-4-4- Les milieux de culture.....	26
II-4-4-1- Les cultures en milieu liquide.....	26
II-4-4-2- Les cultures sur support solide.....	26
II-4-5- Contaminations	26
II-4-5- 1- Contaminants biologiques	26
II-4-5- 2- Contaminants chimiques	26
II-4-6- Différents types de culture	27
II-4-6-1- Culture primaire	27
II-4-6-2- Culture secondaire	28
II-4-6-3- Lignage cellulaire	29
Références bibliographiques.....	30
Evaluation.....	31

Introduction :

Les organismes animaux ou végétaux sont des ensembles complexes constitués de plusieurs cellules liées entre elles, pour assurer les fonctions vitales telles que la nutrition, la croissance, la reproduction ou encore la transmission de gènes. Les méthodes utilisées varient selon le matériel (échantillons) à étudier et les objectifs de l'examen. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur 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.

II- La cellule:

La cellule est une unité fondamentale, structurale et fonctionnelle des organismes vivants, de très petite taille et d'organisation très complexe. C'est une entité vivante qui fonctionne de manière autonome, tout en restant coordonnée avec les autres. On en distingue deux types:

I-1- Les cellules procaryotes :

Les cellules procaryotes (pro = primitif; caryon = noyau), d'une structure moins complexes et comprennent toutes les bactéries. Le matériel génétique n'est pas enfermé dans une enveloppe nucléaire. et sans organites à part des replis de la membrane plasmique dits mésosome.

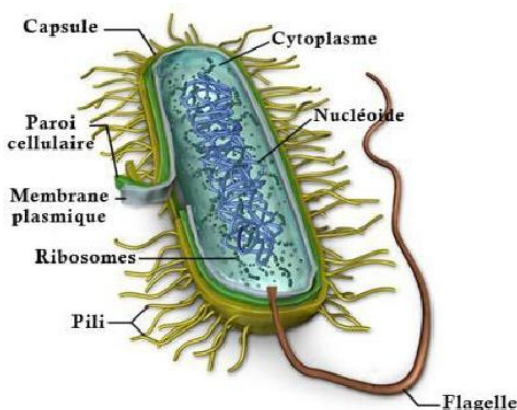
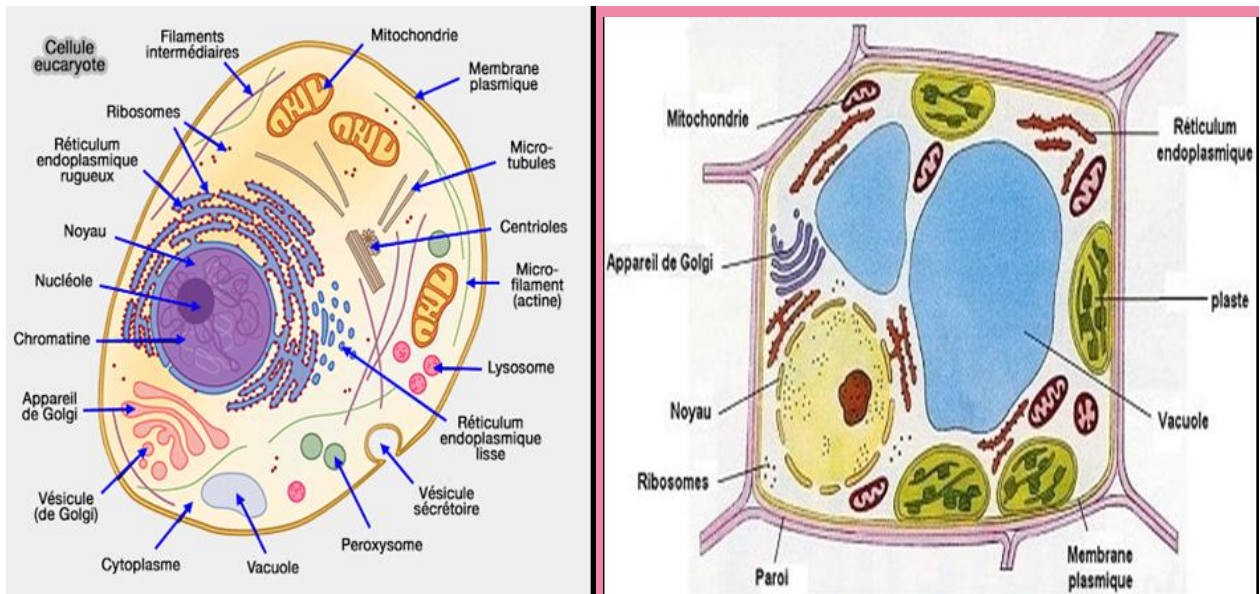


Figure 1 : Cellule procaryote (Triqui. 2016)

I-2- Les cellules eucaryotes :

Correspondent aux organismes multicellulaires, elles comprennent animaux, plantes, champignons, ainsi qu'à quelques eucaryotes unicellulaires. Ces cellules sont délimitées par une membrane (animaux) ou paroi (végétaux). L'ADN est localisé dans un noyau avec une membrane nucléaire possédant un noyau qui est l'organite contenant le génome de l'individu. Nombreux organites sont dispersés dans le cytoplasme, qui font soit parti du système endo-membranaire, soit parti des organites clos (peroxysomes, mitochondries et chloroplastes).



Cellule animale

cellule végétale

Figure 2 : Schémas comparatif représentant les constituants d'une cellule eucaryotes

III- Les techniques d'études des cellules:

La technique de préparation d'un échantillon dépend de l'objectif recherché et de la nature de l'échantillon. La plus part de ces techniques sont basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques.

Pour étudier la biologie et la physiologie cellulaire, il est indispensable de connaître les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude. Trois aspects sont a développés:

- 1- Les techniques morphologiques
- 2- Les techniques chimiques et biochimiques
- 3- Les techniques physiologiques

Ces manipulations sont justifiées par l'examen microscopique sur :

➤ **Des cellules vivantes :**

Sont généralement examinées sans préparation, les cellules isolées naturellement ou en culture cellulaire. On peut utiliser des colorants vitaux.

➤ **Des cellules mortes:**

Il est nécessaire de faire des manipulations ordonnées:

- 1- Les objets à examiner doivent être minces
- 2- Les différents éléments de la cellule doivent présenter un certain contraste.

Pour un examen microscopiques des cellules ou des échantillons biologiques des procédés de préparation des 'échantillons sont obligatoires.

II-1- Méthodes d'étude morphologiques de la cellule

Ces méthodes ont pour but de visualiser les formes, les dimensions des cellules et leurs organites cellulaires.

II-1-1- Les étapes de préparation des coupes microscopiques:

La préparation se fait en plusieurs étapes:

II-1-1-1- Prélèvement:

La première étape de la préparation d'un échantillon consiste, en général, à réaliser un prélèvement. Les prélèvements sont effectués en clinique, à l'hôpital ou dans des laboratoires par des spécialistes ou par des chirurgiens. On distingue plusieurs types de prélèvement :

- **Cytologique:** - Les frottis par grattage superficiel (du col de l'utérus, l'oriel...), L'aspiration, Les liquides d'épanchement divers (sanguin, pleural, ascitique, péricardique, etc.).
- **Histologique:** Les biopsies (fragments de tissu ou d'organe) et, pièce opératoire, par excision, ponction ou microdissection.

II-1-1-2- La Fixation:

La fixation dépend du type d'observation et/ou l'analyse, cette étape tue les cellules mais on conservant les structures dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant. La fixation se fait par des procédés chimiques (Alcool, formaldéhyde et le glutaldéhyde, acide acétique, etc....). Ou bien par des procédés physiques, comme la température et la congélation brusque (cryofixation meilleur fixateur), soit par l'azote liquide (-196°), ou par la neige carbonique (-60°)(Roland et Callen,2007).

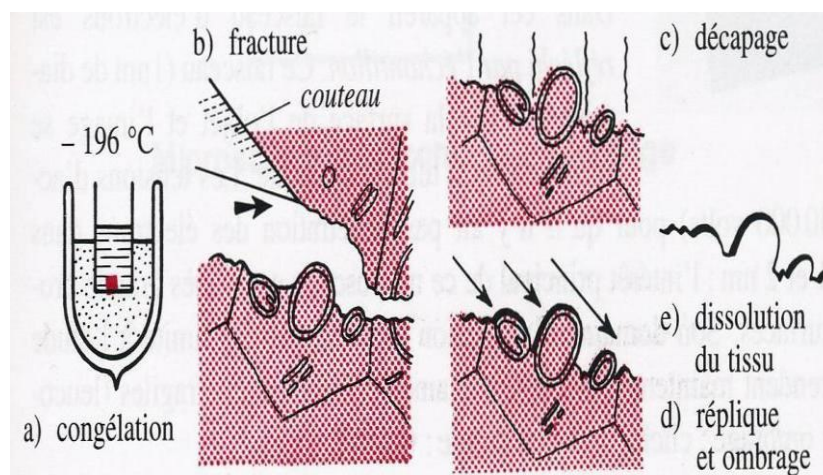


Figure3 : Schémas représentant la congélation (cryofixation) (Roland et Callen,2007)

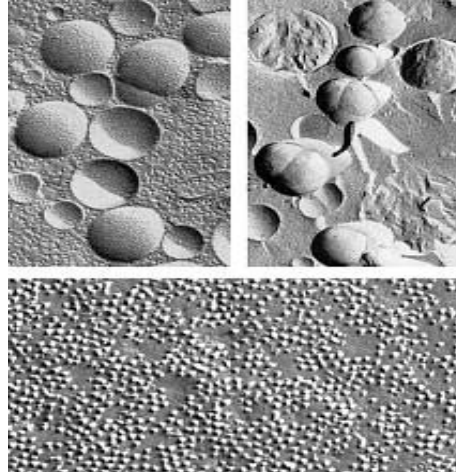


Photo 1 : cryofracture (Callen et Perasso, 2005):

(1a) Aspect de liposomes contenant des protéines intégrées à la bicouche (protéoliposomes) et ayant une surface rugueuse. (1b) Aspect de liposomes lisses constitués uniquement de lipides. (2) Aspect d'une membrane biologique (ici la membrane cytoplasmique d'un ovocyte de Xénope ; x 75 000) (Clichés P. Van Gansen, Bruxelles)

II-1-1-3- La Déshydratation:

Permet l'élimination de l'eau en le remplaçant par l'alcool. Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des bains d'alcools de degrés croissants, 70°, 80°, 90°, 100°C, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations. La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion.

II-1-1-4- L'Inclusion:

Les coupes ne peuvent être pratiquées que sur une substance assez dure ; c'est pourquoi on imprègne les tissus dans une substance d'enrobage, en général la paraffine (liquide à 56°C), la résine, la cire, pour permettre une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation. Parfois, on utilise un métal on parle de métallisation.

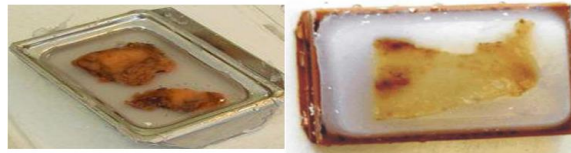


Photo 2 : L'inclusion des échantillons dans la paraffine (Tahiri, 2015)

II-1-1-5- La formation des coupes fines ou ultrafines:

Le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide des microtomes qui permet de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques dizaines de microns fines (3-4 μm , afin que la lumière (photons) du microscope puisse les traverser), à quelques nanomètres (ultrafines). On les recueille et on les colle sur des lames de verre en séchant (Aouati. 2016).

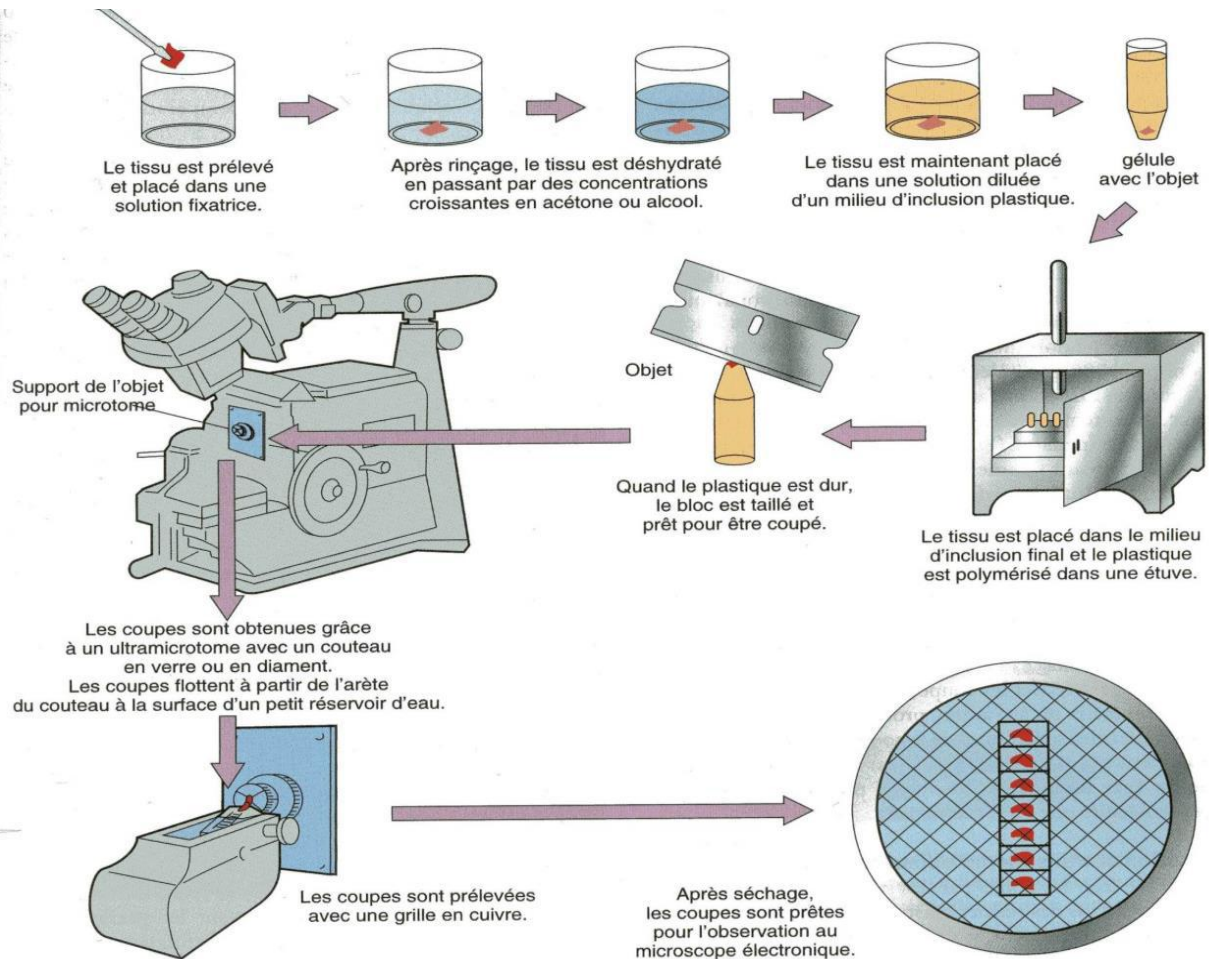


Figure 4 : Résumé de la méthode de préparation des coupes (Aouati. 2016).

II-1-1-6- La Réhydratation (déparaffinage):

Les coupes collées sur lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique, puis ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Cela permet de les colorer, car la majorité des colorants sont solubles dans l'eau ou dans l'alcool.

II-1-1-7- La coloration des coupes:

Il faut renforcer le contraste de couleur des différents organites ou mieux les colorer. On dispose de nombreux colorants naturels, qui se fixent sur telle ou telle structure de la cellule, par différents colorants ou méthodes de mise en évidence :

II-1-1-7-a- Les colorants métachromatiques qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le May-Grunwald-Giemsa (MGG), qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins. Les colorants histochimiques comme l'acide périodique de Schiff qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides, le vert de méthyle qui colore l'ADN.

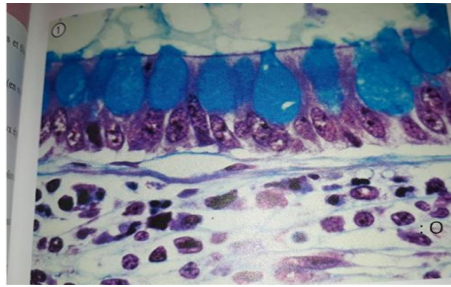


Photo 3 : Observation microscopique de chromosomes (Rolland et Callen., 2007)

Coupe d'épithélium intestinale humaine montrant des cellules à mucus; coloration histologique classique. Collection J.C.Callen, Labo BC 4,Orsay (x700)

II-1-1-7-c- La coloration négative permet de mettre en évidence le contour de petits objets, grâce à des projections de métaux lourds sur la préparation.

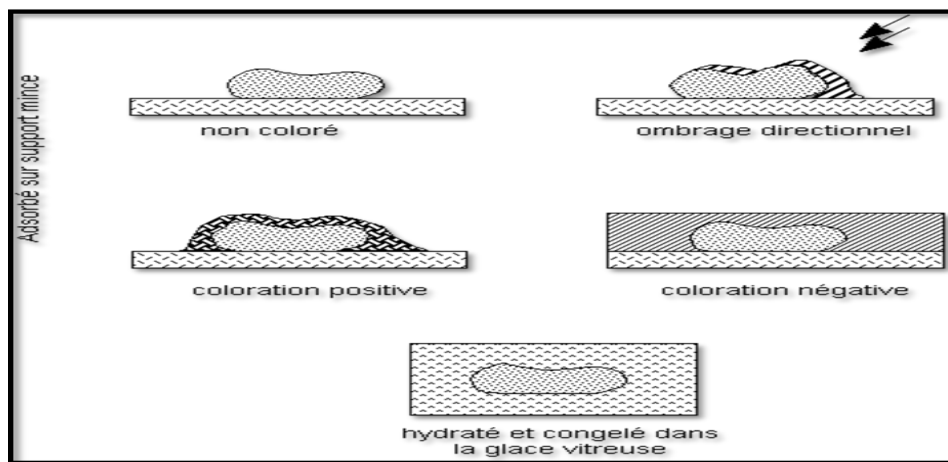


Figure 5 : Trois Différentes méthodes de préparation d'échantillons de macromolécules isolées pour l'observation en microscopie électronique à transmission (Colliex, 1996)

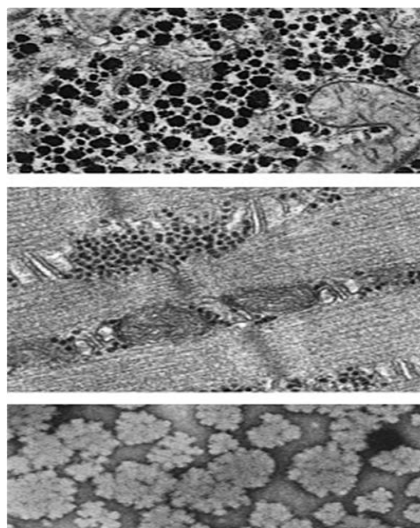


Photo 4 : Granules de glycogène dans les tissus animaux ((Callen et Perasso ., 2005)

Exemples de cellules observées en microscopie électronique: (1) cellule hépatique ; (2) cellule musculaire striée ; (3) aspect des rosettes de glycogène après purification et coloration négative. Taille des particules : 30-200 nm de diamètre. (Clichés J. André, Labo BC4, Orsay).

II-1-1-7-d- Les ombrages métalliques permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant sous vide une très fine couche métallique avec un certain angle d'incidence entraînant la formation d'ombre portée.

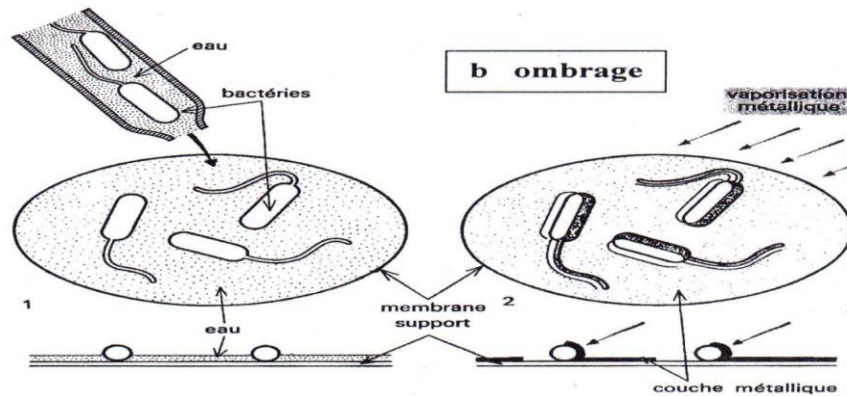


Figure 6 : Technique d'ombrage métallique (Chelli, 2013)

II-2- La microscopie

Le microscope est un instrument qui donne une image grandie d'un objet en général transparent. On attribue en général à Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) le fait d'avoir attiré l'attention des biologistes sur les utilisations du microscope. Utilise un flux d'ondes qui traverse un système de lentilles qui permet d'observer une image agrandie d'un petit objet, sépare les détails de celui-ci sur l'image (résolution), rend les détails visibles à l'œil ou avec une caméra.

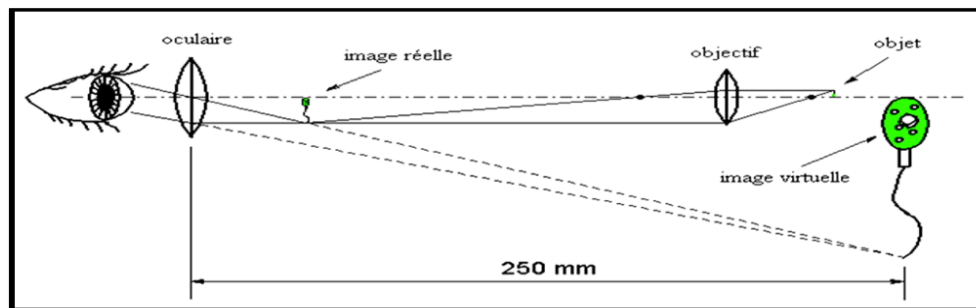


Figure 7: Schémas représentant le mécanisme de la microscopie (Site Web 1)

L'unité de longueur du système métrique est le mètre (m). Pour pénétrer dans le domaine des petites dimensions, nous allons procéder par bonds d'un facteur mille. La première étape est le millimètre (mm ou 10^{-3} m), grandeur que nous savons encore apprécier directement comme la dimension de la petite division d'une règle graduée. L'étape suivante est le micromètre (μm ou 10^{-6} m), mille fois plus petit que le millimètre et qu'il devient impossible d'appréhender sans l'aide d'un microscope ordinaire. Franchissons encore une étape, nous atteignons le domaine du nanomètre (nm ou 10^{-9} m soit un milliardième de mètre). Le microscope électronique va nous donner les clés pour

l'explorer. Les dimensions inférieures s'appellent pour mémoire le picomètre (pm ou 10^{-12} m) et le femtomètre (fm ou 10^{-15} m) (Colliex, 1996)..

On parle de grossissement pour un objectif et de grossissement pour un oculaire et le grossissement final d'un microscope est égal au grossissement objectif x grossissement oculaire. On appelle grossissement d'un oculaire (ou d'une loupe) le rapport du diamètre apparent de l'image au diamètre apparent de l'objet observé à l'œil nu, à la distance minimum de vision distincte (environ 25 cm) (Guillaud., 2010).

La résolution angulaire de l'œil est la distance angulaire minimale qui doit exister entre deux points pour que ceux-ci soient vus distinctement. Cette limite varie d'une personne à l'autre, elle dépend de la luminance et du contraste de la scène observée et également du diamètre de la pupille de l'œil (environ 2 à 3 mm). En microscopie photonique la résolution dépend de l'ouverture numérique (O.N.) de l'objectif et de la longueur d'onde de la lumière utilisée (ainsi que de l'ouverture numérique du condenseur quand on utilise le mode lumière transmise). L'ouverture numérique est généralement indiquée sur l'objectif et le condenseur.

La limite de résolution d'un microscope photonique est au mieux d'environ $0,2 \mu\text{m}$ (200 nm), elle se calcule grâce à la formule d'Abbei: (Colliex, 1996).

limite de résolution (distance) = $0,61 \cdot \lambda / O.N.$

- avec λ =longueur d'onde de la lumière utilisée
- et O.N. (indiquée sur l'objectif)
- O.N. peut être obtenu par la formule suivante :
- O.N. = $n \cdot \sin q$**
- avec n = indice de réfraction du milieu entre l'objet et l'objectif (*Tableau 1*)
- et q= demi angle du cône de lumière entrant dans l'objectif.

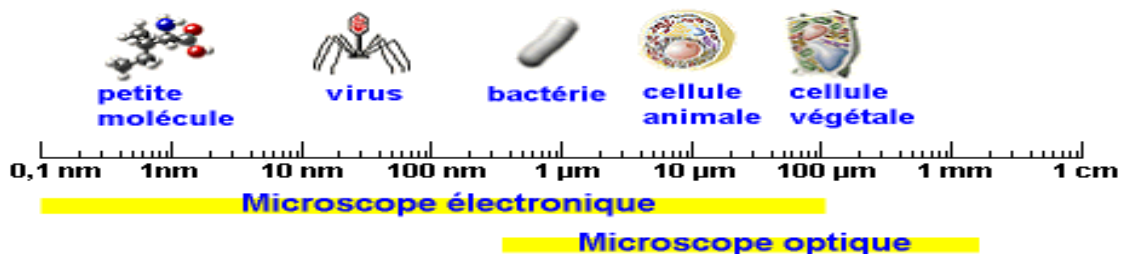


Figure 8: Echelle d'observation définie les dimensions typiques d'un certain nombre d'objets ou de structures identifiables (Colliex, 1996).

II-2- 1- Les microscopes optiques (photoniques) :

Permettent l'observation des cellules mortes ou vivantes. Le microscope utilise la lumière visible, il est équipé de trois systèmes de lentilles transparentes (verre). Il est constitué des éléments suivants :

- Une optique d'éclairage (source et un dispositif de focalisation de rayonnement lumineux sur l'objet);
- Une optique de formation de l'image (association de plusieurs lentilles assurant la fonction d'agrandissement);

- Un détecteur permettant l'observation ou l'enregistrement de l'image (œil, écran, caméra, appareil photographique, ...)
- Une partie mécanique de précision (permettant le déplacement et le positionnement précis de l'échantillon microscopique).

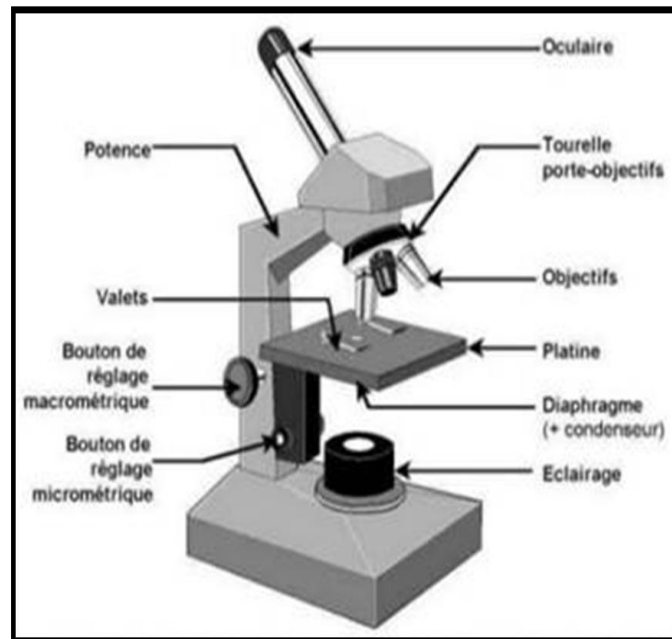


Figure 9: Organisation générale d'un microscope optique (Guillaud, 2010)

Changement de grossissement:

Il faut placer la zone à agrandir au centre de la platine, puis changer d'objectif en tournant le barillet, sans toucher au réglage précédent. Le changement d'objectif se fait toujours du plus faible au plus fort grossissement. La nouvelle mise au point se fait seulement par la petite vis.

Il existe plusieurs types de microscopes optiques:

- **Microscope Optique à fond clair** pour l'observation des structures cellulaires interne après coloration.
- **Microscope Optique à fond clair** pour l'observation des structures cellulaires interne après coloration.
- **Microscope Optique à fluorescence** pour l'observation du marquage fluorescent des structures et des macromolécules.
- **Microscope Optique à contraste de phase** pour la mise en évidence des différences d'indices de réfraction et de contraste.
- **Microscope Optique confocal** pour la reconstitution d'images tridimensionnelles de l'objet.

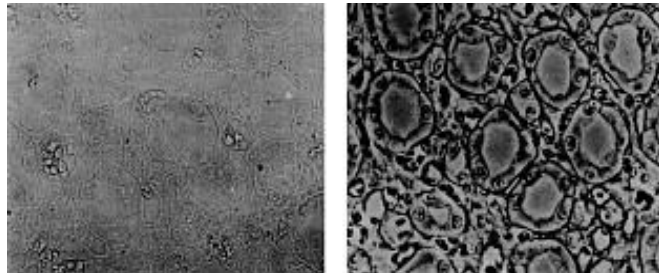


Photo 5: Comparaison des images obtenues avec un microscope photonique ordinaire (Callen et Perasso, 2005).

(à gauche) et avec un microscope à contraste de phase (à droite) Matériel non coloré artificiellement : coupes transversales de tubule rénal de Mammifère

II-2- 2- Les microscopes électroniques:

Comparable à celui du microscope photonique. La source S est une cathode qui émet des électrons émis sous vide (au lieu des photons), qui se déplacent selon une onde (comme la lumière), ils sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel entre la cathode et l'anode (60 à 100 Kv) et canalisés par une série de lentilles (lentilles électromagnétiques L1, L2, L3 et l'objet AB). La longueur d'onde diminue et la résolution augmente. Dans ces microscopes, le faisceau de photons est remplacé par un faisceau l'électron, accéléré par une forte différence de potentiel (Triqui., 2016).

- L1 : le condensateur permet de focaliser le flux d'électrons sur l'objet.
- L2 et L3 jouent le rôle d'objectif et permettent l'agrandissement de l'objet AB.

L'image est observée directement sur l'écran rendu fluorescent par le bombardement électronique ou sur une plaque photographique. Le MET permet des grossissements allant de 2000 à un million.



Photo 6: Microscope électronique (Rolland et Callen., 2007)

Il existe deux types de microscope électronique:

- **Microscope Electronique par transmission (MET)** pour la transmission de l'image par des faisceaux d'électrons. Permet d'analyser la lumière réémise par fluorescence par un échantillon éclairé. Pour analyser aussi bien des substances fluorescentes naturellement (comme la chlorophylle).

- **Microscope Electronique à balayage (MEB)** pour la formation de l'image de l'ultra-structure cellulaire en relief. La surface cellulaire est recouverte par une mince couche d'or, de platine ou de palladium pour empêcher la traversée des électrons. L'image ainsi reconstituée est tridimensionnelle.

II-2- 3- Comparaison entre microscope optique (MO) et microscope électronique (ME):

Les différences résident dans la nature de la source (lampe ou cathode), la nature des lentilles (en verre ou électromagnétiques) et en fin le mode d'observation: l'œil pour le microscope photonique et l'écran ou le cliché pour le microscope électronique.

Tableau 01 de comparaison entre le microscope optique et électronique

M Optique	M Electronique
Faisceau de lumière	Faisceau d'électrons
Résolution 0,2 μm	Résolution 0,2 nm
Lentilles optiques	Lentilles électroniques
Grossissement de 25 à 1500 fois	Grossissement de 1500 à 200000 fois
Longueur d'onde 0,4 à 0,8 μm	Longueur d'onde variable de l'ordre de 0,05 \AA
L'image est reçue directement	L'image est reçue sur écran fluorescent
Utilisation des colorants pour certaines observations	Pas de coloration
Les coupes au microtome de 2 à 10 μm	Les coupes ultrafines aux microtomes (nm)

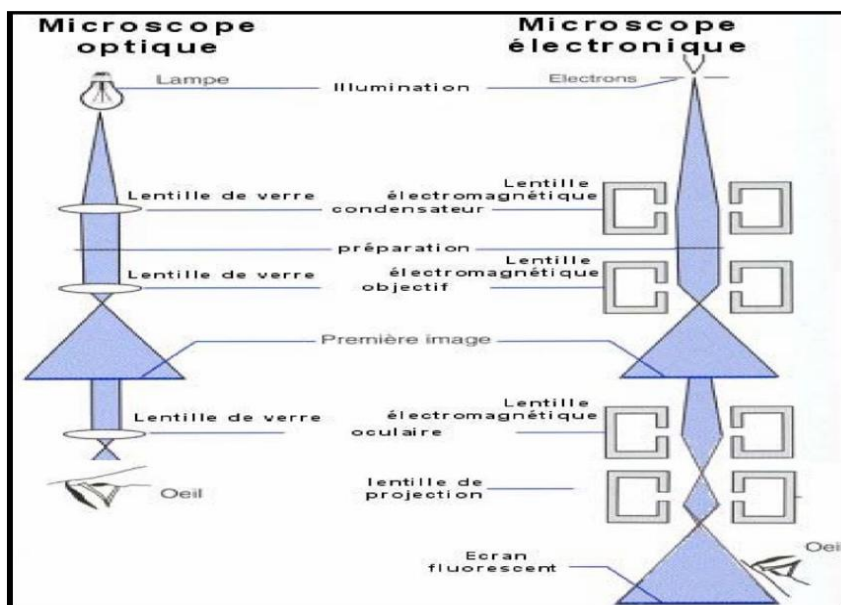


Figure 10: Schémas de comparaison des trajets des rayons lumineux et des électrons dans un microscope photonique et dans un microscope électronique (Callen et Perasso., 2005)

Le premier est équipé de lentilles de verre, tandis que le second est équipé de lentilles électromagnétiques.

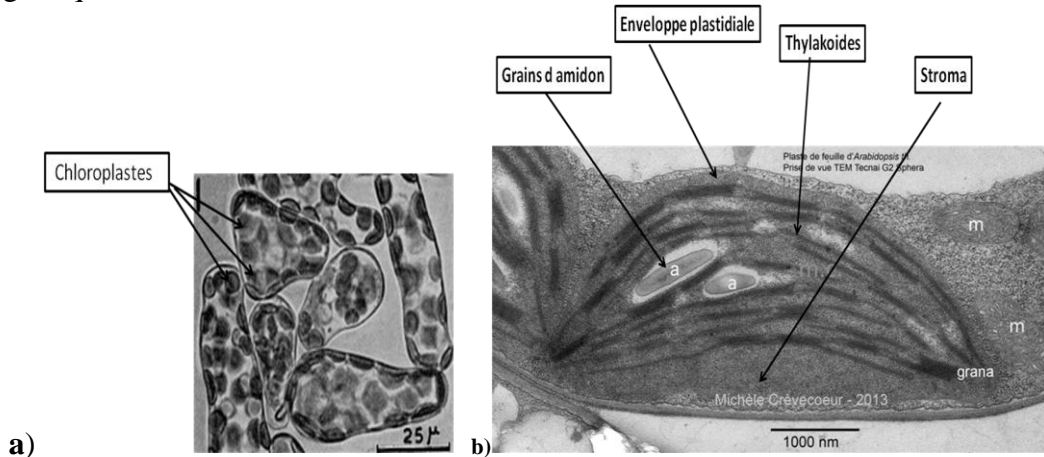


Photo 7: Observation de l'aspect des chloroplastes des Végétaux supérieurs (Robert et Rolland., 1998) : a) en microscopie photonique Chloroplastes observés dans des cellules isolées d'euphorbe. Cliché J. Orcival (Orsay). (x). b) en électronique à transmission (x16 000). Vue générale d'un thylacoïde dans une cellule de parenchyme chlorophyllien de feuille d'épinard. Cliche Maenpaa et Aro).

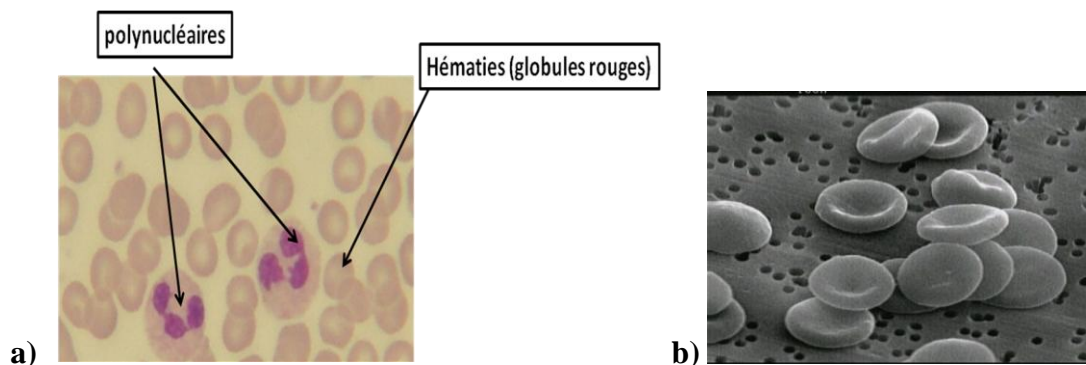


Photo 8: Observation des globules rouges en microscope optique et électronique (Alberts et al.,2011)

a) Observation du sang humain au microscope optique (G=1200), on peut distinguer deux polynucléaires entourés d'hématies. b) Globules rouges observés au microscope électronique à balayage (de forme concave).

II-2- Méthodes d'étude cytochimiques et biochimiques

Utilisation de réactions chimiques qui vont permettre la détection d'une molécule cellulaire précise par les techniques de marquage cellulaire.



Photo 9: Exemple de coloration cytochimique (Rolland et Callen., 2007)

Chromosomes géants de larve de Chironome; coloration cytochimique de l'ADN par méthodes classique de Feullgen. Cliche J. Orcival, Orsay (x600).

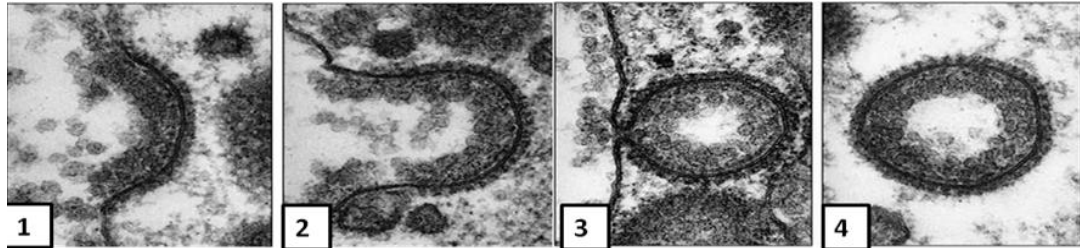
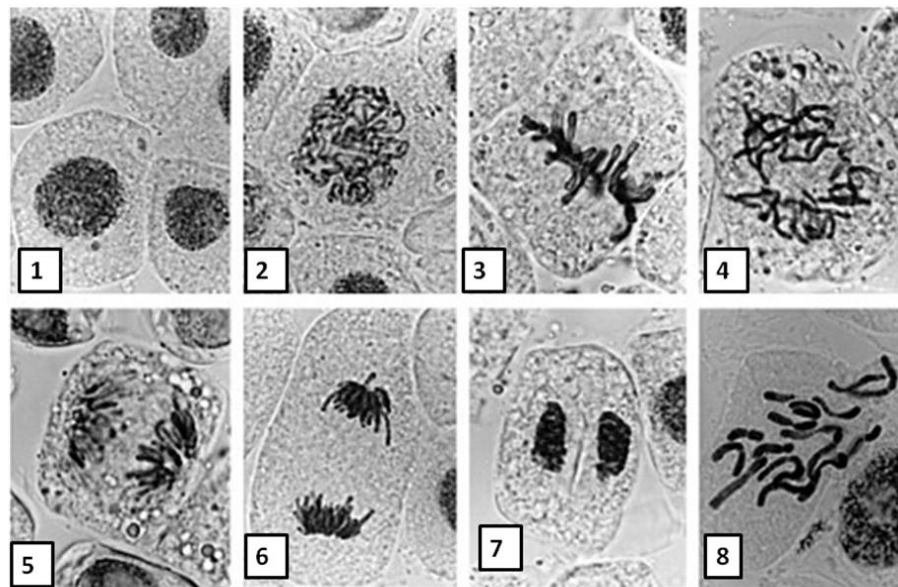


Photo 10: Formation d'une vésicule recouverte de clathrine à partir de la membrane plasmique, par microscope électronique (Alberts et al, 2011)

(1) et (2) Vésicules d'endocytose en cours de pincement, recouvertes d'une enveloppe de clathrine. (3) Vésicule recouverte refermée, sous la surface de la membrane plasmique, avant qu'elle ait perdu son feutrage protéique. (4) Vésicule non recouverte de clathrine, à titre de comparaison. Grossissement \square 100 000. (Labo BG, Orsay).



1. Interphase - 2. Prophase - 3 et 4. Métaphases en vue latérale et polaire - 5 6. Anaphases - 7. Télaphase - 8. Stock chromosomique de *Allium cepa* ($2n = 16$).

Photo 11: Différents stades de la mitose dans des cellules de méristème de racine d'oignon (Callen et Perasso, 2005)

Coloration de l'ADN par la méthode de Feulgen. Clichés J. Orcival, Orsay.

II-2-1- Méthodes non spécifiques :

Méthodes permettant de détecter un ensemble de molécules ayant certaines propriétés chimiques communes : Autoradiographie

II-2-1-1- L'Autoradiographie ou auto-historadiographie :

Est une technique de laboratoire permettant de **localiser des molécules** sur une préparation microscopique. Les cellules sont mises en culture dans un milieu contenant un substrat radioactif.

II-2-1-1-1- Marquage par les isotopes radioactifs (IR):

Les IR sont des traceurs du métabolisme cellulaire, ils permettent de suivre la synthèse d'une molécule donnée dans la cellule. On injectant l'IR à un animal, par addition l'IR aux cellules en culture ou dans le sol ou l'eau pour les plantes par les étapes suivantes:

- Prélèvement à des intervalles variés (t_0 , t_1 , t_2 , ...) de cellules ayant intégrées les IR
- Fixation et préparation des cellules pour le MO ou pour le ME
- Application d'une émulsion photographique sur les coupes
- Maintien des coupes à l'obscurité pendant une durée (des jours ou des semaines) nécessaire à la désintégration des IR.

Détection des IR par Autoradiographie ou auto-historadiographie et de localiser les radiations des IR sur des coupes histologiques par MO ou ME. Il y a émission de petits éclairs lumineux (Callen et Perasso., 2005).

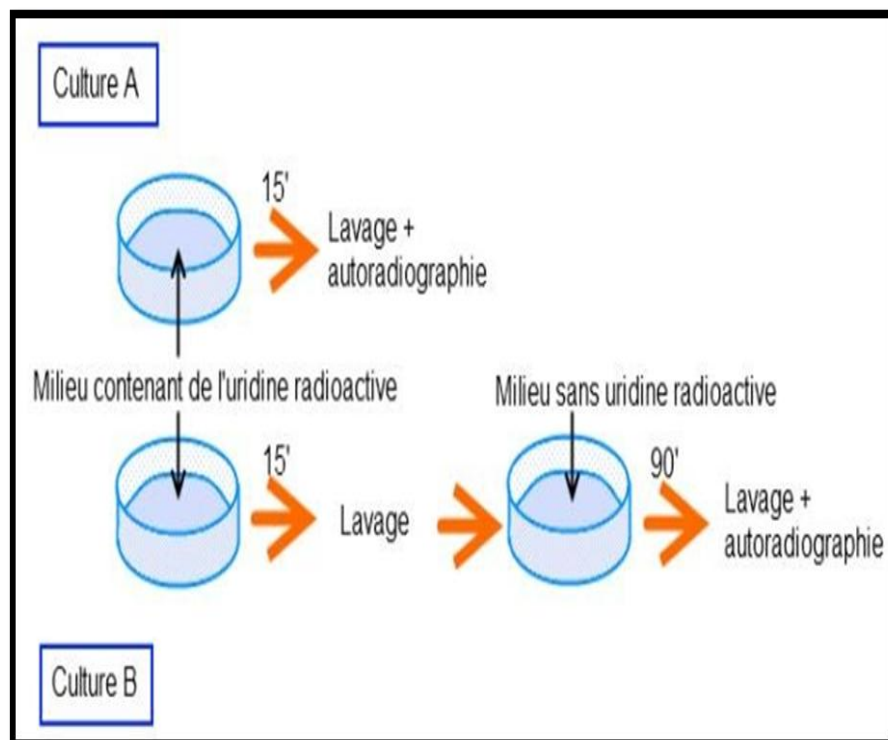


Figure 11: Les étapes de préparation de molécules par autoradiographie (Site Web 2)

C'est la détection d'un rayonnement émis par une source radioactive grâce à des grains d'argent superposés à cette source radioactive et formés à partir d'une émulsion photographique.

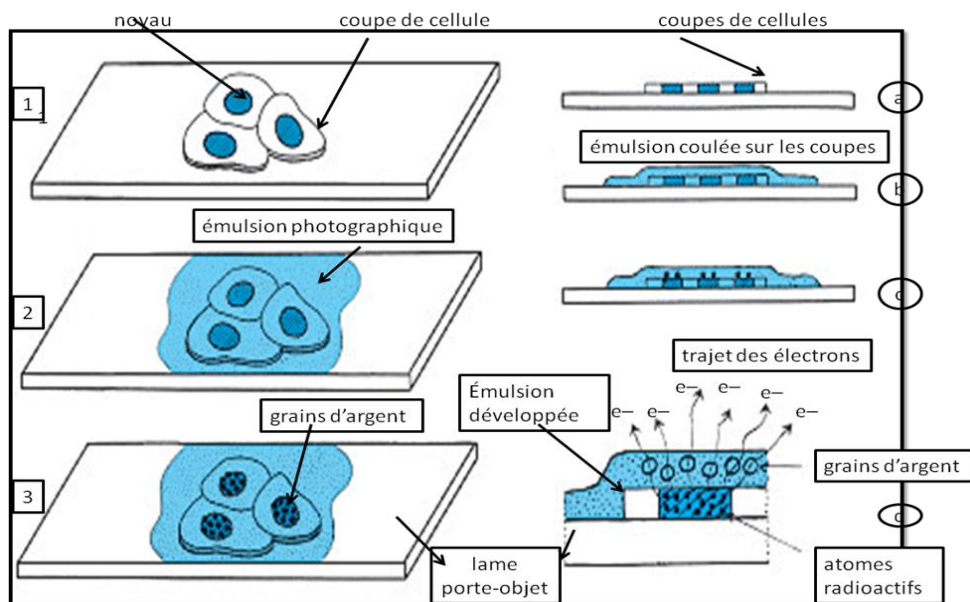


Figure 12: Principe de l'autoradiographie (Callen et Perasso., 2005)

La technique est ici appliquée à des coupes traitées pour la microscopie photonique. Les cellules analysées ont incorporé, avant le traitement, un précurseur radioactif spécifique de l'ADN (thymidine tritiée), de sorte que seuls les noyaux apparaîtront marqués après développement de l'émulsion. (1) Coupes de cellules marquées collées sur une lame de verre. (2) Coulage d'une émulsion photographique à l'obscurité. (3) Aspect des coupes de cellules après développement de l'émulsion. (a), (b) et (c) : aspect en coupe des préparations 1, 2 et 3 ; (d) : secteur agrandi de (c).

II-2-1-1-2- Exemples de marquage par les isotopes radioactifs:

- *Leucine radioactive: détection et localisation des protéines en synthèse.*
- *Thymidine radioactive: détection et localisation d'ADN répliqué.*
- *Uridine radioactive: détection et localisation d'ARN en synthèse.*
- *Mannose ou fructose radioactifs: détection et localisation des molécules glycosylées.*
- *Aide gras radioactifs: détection et localisation des lipides.*



Photo 12 : Synthèse d'ADN dans le noyau (Rolland et Callon., 2007)

Mise en évidence par autoradiographie, Cellule folliculaire de l'ovaire de papillon (cliché M. Guelin) (x15000). Injection de la thymidine radioactif H^3 à l'animal, sur une autoradiographie des tissus, les grains d'argent sont localisés électivement sur la chromatine, ils indiquent les sites où l'ADN vient d'être synthétisé.

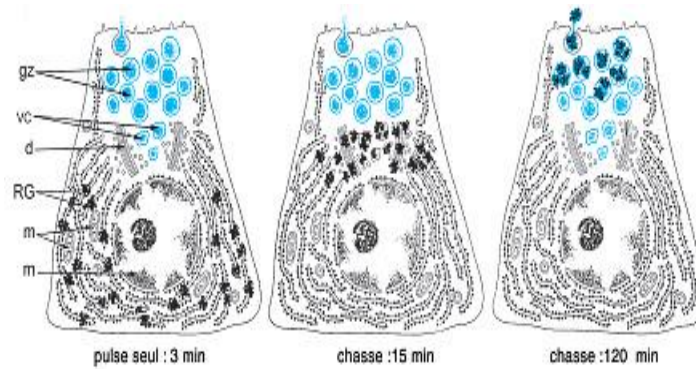


Figure 13: Expériences historiques sur la sécrétion des protéines par les cellules pancréatiques (Callen et Perasso., 2005).

Le phénomène sécrétoire est étudié au moyen d'expériences d'incorporation de leucine tritiée (de type *pulse-chase*), suivies d'autoradiographie. La radioactivité se déplace, au cours du temps, successivement dans les compartiments mis en jeu dans ce processus : réticulum endoplasmique rugueux (rg) ; appareil de Golgi (d) ; vésicules de concentration (vc) et grains de zymogène (gz) ; m : mitochondries ; n : noyau. (D'après J. Jamieson).

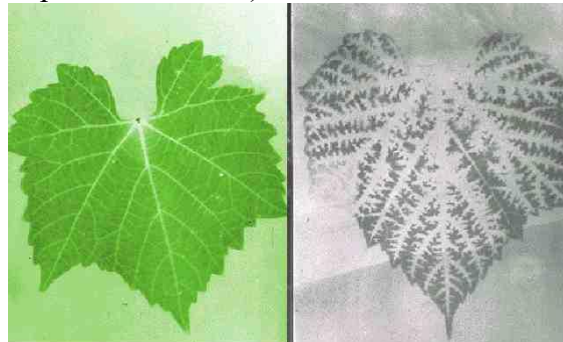


Photo 13 : Autoradiographie utilisant du dioxyde de carbone radioactif (Chapon., 2006)

On cherche à mettre en évidence l'utilisation de dioxyde de carbone dans la photosynthèse. On prend une feuille d'érable que l'on place dans une atmosphère dans laquelle on a mis du dioxyde de carbone radioactif. On obtient les résultats suivants : Les zones foncées sur l'image de droite correspondent à la présence de dioxyde de carbone radioactif.

II-2-2- Méthodes spécifiques

Méthodes permettant de détecter une molécule particulière par:

- Immunohistochimie (IHC) - Hybridation in situ (HIS) - Histoenzymologie

II-2-2-1 - L'Immunocytochimie

L'immunochimie consiste à révéler une molécule biologique (protéines ou autres molécules) présente sur une cellule ou un tissu avec des anticorps spécifiques. La réaction antigène-anticorps (Ac-Ag) sur coupe histologique est révélée par l'émission de la fluorescence (Callen et Perasso., 2005).

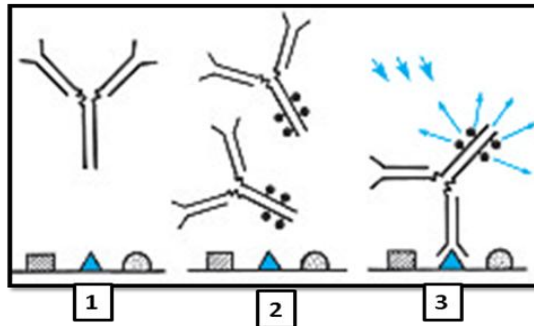


Figure 14 : Principe de l'immunocytochimie directe (Callen et Perasso ., 2005)

L'antigène cible (triangle coloré), au sein d'une coupe ou d'une cellule entière (1), est spécifiquement reconnu par l'anticorps correspondant, auquel a été greffé, selon les cas, une enzyme, de la ferritine, de l'or colloïdal ou un fluorochrome (2). L'exemple de l'immunofluorescence (3) est illustré ici.

II-2-1-2 -1- Marquage des anticorps :

Marqueurs fixés sur des anticorps (Isotopes radioactifs, Enzymes (peroxydase ou phosphatase alcaline)

II-2-1-2 -2- Marquage des anticorps par l'utilisation des fluorochromes:

Les fluorochromes sont des marqueurs fonctionnant comme des colorants en se liant à certains éléments constitutifs de la cellule. Les anticorps peuvent être rendus fluorescents par la **fluorescéine, rhodamine**, on parle d'immunofluorescence. La lecture de la lame se fait au microscope à fluorescence

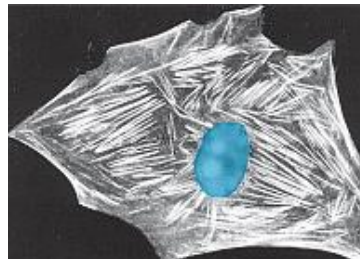


Photo 14 : Réseau de microfilaments d'une cellule animale en culture observé en immunofluorescence (Callen et Perasso.,2005).

De nombreux câbles épais s'entrecroisent au sein du cytoplasme ; la périphérie de la cellule contient en revanche de l'actine non polymérisée en câbles (fluorescence diffuse). Le noyau central est coloré par un fluorochrome spécifique de l'ADN (DAPI) ; d'après un cliché de E. Lazarides.

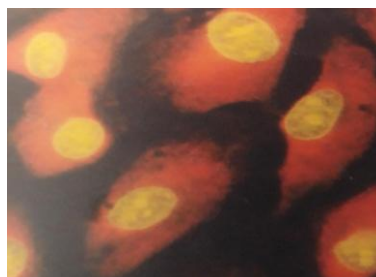


Photo 15: Cellule animales en culture (Rolland et Callon., 2007)

Les noyaux (en jaune) sont mis en évidence par un colorant fluorescent; l'acridine orange. Collection J.C.Callen, Orsay) (x800)

II-2-2-2 – Hybridation in situ (HIS):

C'est l'association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité-sonde : séquence d'ADN complémentaire de la séquence cible.

Les techniques de ciblage moléculaire par:

- **Radio-autographie** grâce aux nucléotides radioactifs présents dans la sonde.
- **Immuno-cytochimie** grâce à la présence de nucléotides couplés à la dioxigénine, alors détectée par un anticorps spécifique couplé à une enzyme ou à une molécule fluorescente.

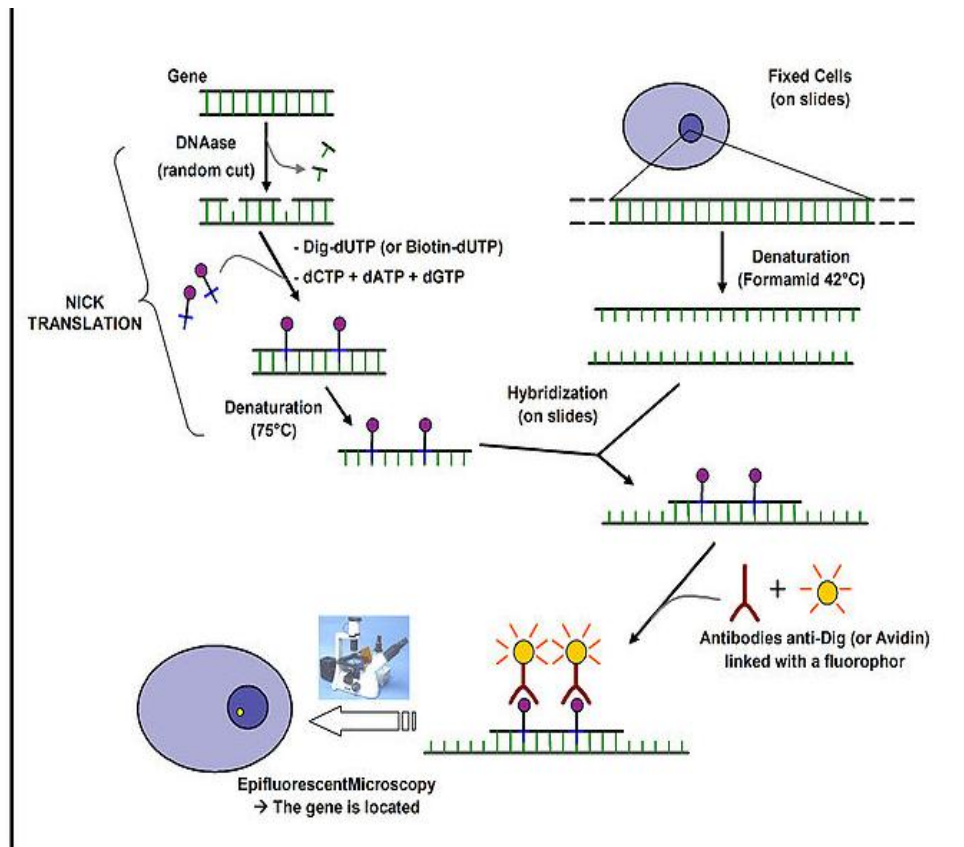


Figure 15: Les étapes d'une Hybridation in situ (Fluorescence) (Lunard., 2011)

II-2-2-3 – La méthode histo-enzymatique:

Permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore. Le montage rend la préparation observable pour :

- Détection et localisation dans un tissu ou dans une cellule d'une activité enzymatique.
- La présence de l'enzyme est mise en évidence grâce à l'utilisation d'un substrat spécifique et d'un chromogène
- A l'issue de la réaction enzymatique, le produit obtenu forme un précipité coloré visible au microscope photonique et/ou électronique à transmission.

II-3- Méthodes physiologiques

Les ultracentrifugeuses sont des machines très sophistiquées par rapport aux centrifugeuses classiques ; leurs rotors peuvent tourner jusqu'à près de 80 000 tours par minute, et ils fournissent des champs de gravité atteignant 500 000 fois la gravité terrestre. Les différentes classes d'organites se distinguent par leur taille, leur forme et leur densité; les variations des deux premiers paramètres peuvent être très grandes (les noyaux atteignent 10 μm de diamètre tandis que les ribosomes mesurent 15- 20 nm) alors que celles relatives à la densité restent faibles (de 1,1 environ pour les mitochondries, les lysosomes ou les peroxysomes, à 1,6 pour les ribosomes).

II-3-1- Méthodes de fractionnement subcellulaire:

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique et la désorganisation de la structure des cellules. Dans une solution à pH constant pour éviter les échanges de protons, à 0°C pour annuler l'activité enzymatique. On obtient une suspension ou homogénat où sont dispersés les organites cellulaires vivants.

II-3-2- La Dissociation cellulaire:

Consiste à dissocier les cellules d'un même tissu réalisé, par la destruction de la matrice extracellulaire et des jonctions intercellulaires, par méthode enzymatiques (trypsine, collagénase), ou mécaniques (tube de Potter, homogénéisateur de Dounce) (**Chelli, 2013**)

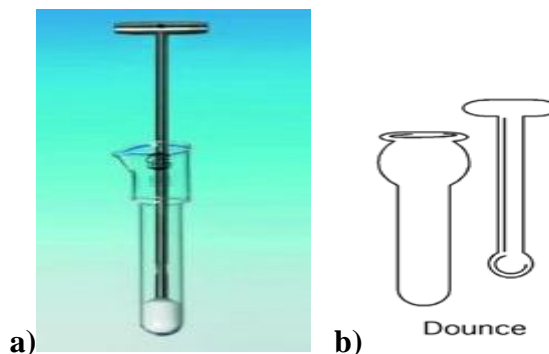


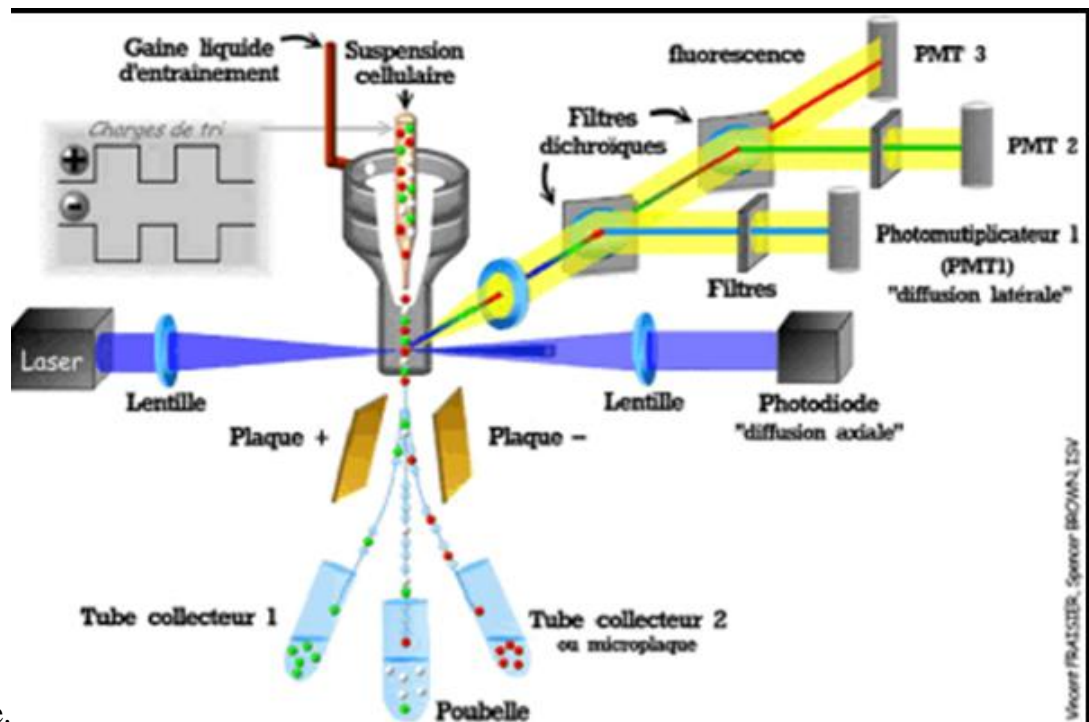
Figure 17: a) Tube de Potter, b) homogénéisateur de Dounce (Chelli, 2013)

II-3-3- L'Isolement / Tri cellulaire /Purification :

Pour séparer les différentes catégories cellulaires.

II-3-3-1- Par le cytofluorimètre ou cytomètre en flux

Permet un tri physique des populations étudiées ainsi qu'un dénombrement des cellules viables. La CMF permet de passer au crible les cellules une par une dans un flux, la rapidité d'analyse peut aller jusqu'à plusieurs milliers de cellules par



seconde.

Figure 18: Représentation schématique d'un cytomètre de flux (Rahman., 2008)

II-3-4- L'éclatement cellulaire (Homogénéisation)

Le but est de rompre la membrane plasmique (ou la paroi pour les cellules végétales et fongique). Pour se faire on met les cellules en suspension dans un tampon de pH et de force ionique connus. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule, la plupart des organites restent intactes.

II-3-5- La Purification par centrifugation :

Les ultracentrifugeuses sont des machines très sophistiquées par rapport aux centrifugeuses classiques ; leurs rotors peuvent tourner jusqu'à près de 80 000 tours par minute, et ils fournissent des champs de gravité atteignant 500 000 fois la gravité terrestre. Le principal paramètre déterminant la vitesse de sédimentation, dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg (S)**. De sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forment le premier sédiment (ou **culot**) rassemblé au fond du tube à centrifuger, le liquide surnageant contenant les plus petites et les plus légères. Le **surnageant** et le **culot** sont séparés par décantation (Aouati. 2016).

II-3-5-1- Par la Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

- A 600g, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 15 000g, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxyosomes.

- A 100 000g (ultracentrifugation), on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.
- A 200 000g, on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

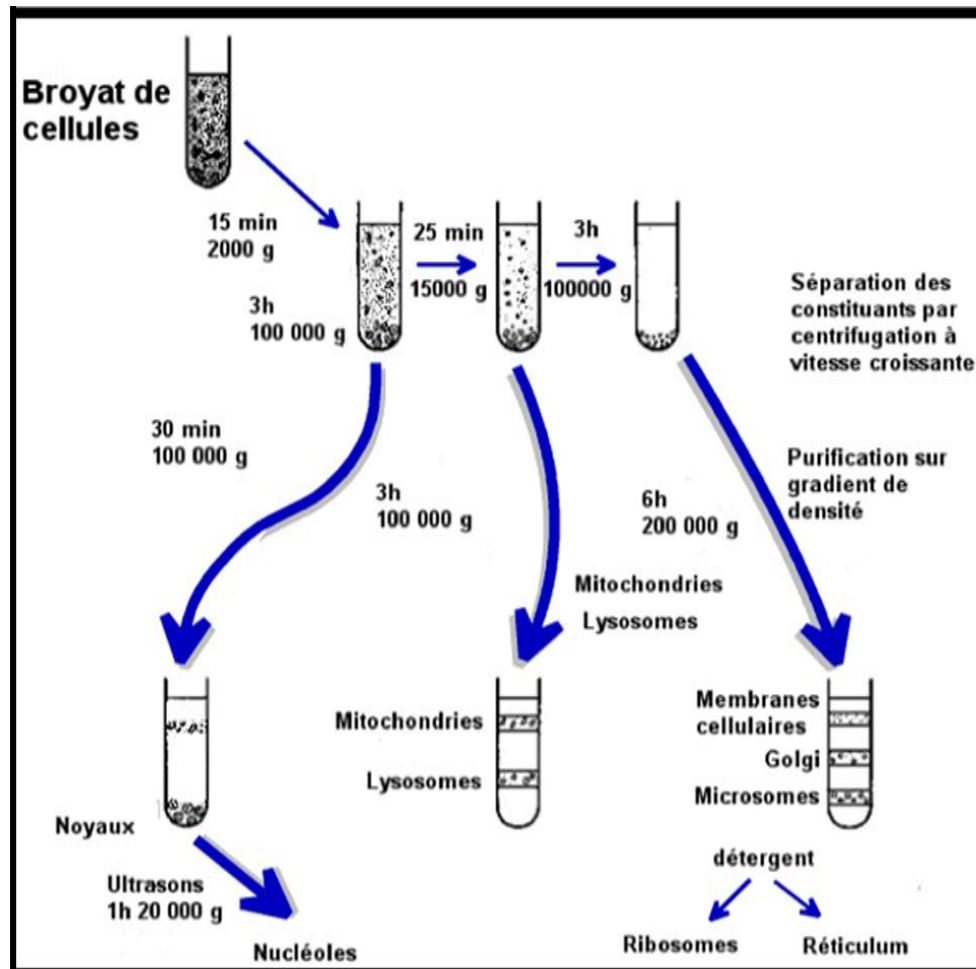


Figure 19: Schémas d'une centrifugation différentielle à partir de foie de rat (Rolland et Callen., 2007)

L'homogénéisation du tissu et les centrifugations sont faites à 0°C dans des solutions tamponnées de saccharose. Des solutions de molarité différente permettent de construire des gradients discontinus ou continus de concentration dans lesquels les organites se répartissent en fonction de leurs densités (les chiffres indiquent les molarités des solutions de saccharose).

II-3-5-2- Centrifugation par gradient préformé :

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera. Par cette technique, on peut séparer des protéines ou des ADN, dont les différences de densité sont dues à la présence d'isotopes lourds (ADN contenant par exemple du 15N au lieu du 14N normal).

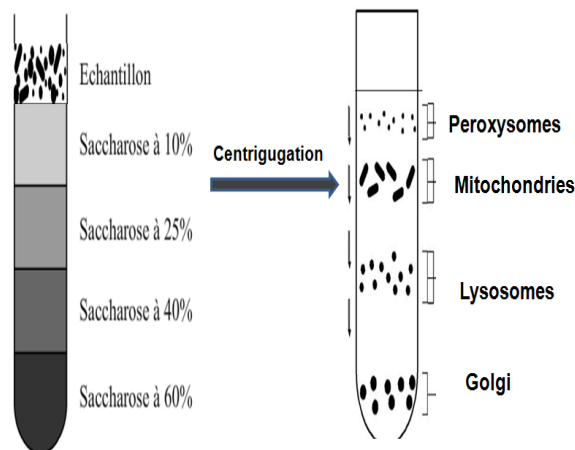


Figure 20: Centrifugation par gradient de densité (Chelli, 2013)

Centrifugation en gradient de densité à l'équilibre (gradient autoformé de CsCl). L'échantillon (en général, des acides nucléiques) est au départ dissous dans la solution de CsCl au sein de laquelle s'établit, au cours de la centrifugation, un gradient continu de concentration et de densité. Les molécules se séparent en bandes selon leur seule densité et restent ainsi à l'équilibre.

II-4- La Culture cellulaire

C'est le maintien en vie de cellules plus de 24 heures dans un milieu de culture artificielle, en dehors de l'organisme. Ces cellules sont non organisées en tissu mais capable de se diviser in-vitro et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques. L'application première des cultures cellulaires est la production d'anticorps monoclonaux.

II-4-1- Principe de la culture cellulaire:

Le prélèvement des cellules, des tissus ou des fragments d'organes sur un être vivant (animal ou végétal), ou des cellules naturellement isolées dans la nature telles que les bactéries et on les place dans un milieu favorable à leur survie. On met en évidence deux types de cultures :

- **Cultures histiotypiques** : Correspondent à une multiplication active mais sans maintien de l'organisation.
- **Cultures organotypiques** : Sont soumises à un maintien de la différenciation morphologique et fonctionnelle. Ces fragments d'organes ou tissus sont appelés des explants (Callen et Perasso., 2005).

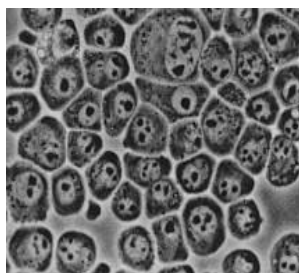


Photo 16 : Cellules animales en culture au microscope électronique (Callen et Perasso., 2005)
Cellules tumorales de souris (Cliché Labo BG, Orsay)

II-4-2- Les techniques d'obtention des cellules:

On distingue 2 types de cellules:

II-4-2-1- Les cellules libres et circulantes:

Les cellules circulantes sont obtenues par prélèvement et centrifugation, comme les cellules du sang ou de la moelle.

II-4-2-2- Les cellules en cohésion qui constituent un tissu:

Les cellules organisées en tissus nécessitent la mise en œuvre de deux techniques:

II-4-2-2-1- La méthode par dissection:

Consiste à couper en fragment d'environ 1 à 4 mm³ le tissu que l'on réduit encore à l'aide de pince. Ces fragments sont ensuite placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Cette méthode s'appelle également la méthode des explants.

➤ **Les avantages et les inconvénients de ces méthodes :**

La méthode par dissection est souvent utilisée quand le tissu à mettre en culture est très petit. L'obtention nécessaire pour avoir des couches cellulaires confluentes est relativement long (environ 30 jours).

II-4-2-2-2- La méthode par digestion enzymatique:

Les enzymes utilisées sont des enzymes protéolytiques qui digèrent la trame protéique qui entoure les cellules. on utilise souvent la trypsin à une concentration de 0,5 à 2,5 g/l dans une solution saline.

➤ **Les avantages et les inconvénients de ces méthodes :**

La méthode enzymatique est beaucoup plus rapide avec un bon rendement mais certaines cellules à membrane fragile peuvent être lésées par cette méthode.

II-4-3- Conditions de mise en culture cellulaire:

Reproduction et maintien d'un environnement physiologique :

- Température identique à la température de la source de prélèvement.
- Taux du pO₂ et pCO₂
- pH 7.2 - 7.5
- Système tampon: HCO₃⁻ avec CO₂ atmosphérique (5-10%)
- Hygrométrie 85% (évaporation)
- Lumière visible à éviter
- Indicateur coloré pour contrôler le milieu de culture (rouge de phénol).

II-4-4- Les milieux de culture:

Les milieux usuels de culture de cellules animales, dont l'origine remonte au début du siècle (ROUX, 1885 ; HARRISON, 1909 et CARREL, 1913), c'est un milieu synthétique sont à base de solutions salines riche en acides aminés, sels minéraux-NRJ (glucose/glutamine) et Vitamines (fragiles, ne pas autoclaver).

- Ils doivent aussi contenir des extraits suppléments indéfini de sérum sanguin (de veau, p ar exemple), qui apportent en très faible concentration des facteurs de croissance indispensables à la multiplication cellulaire albumine/transferrine/hormones
- Les antibiotiques à large spectre d'action, afin d'éliminer complètement le contaminant microbien, à condition qu'ils n'affectent pas la viabilité ou le métabolisme des cellules.

II-4-4-1- Les cultures en milieu liquide

Les cellules sont ensemencées dans un milieu liquide en suspension dans ce milieu, elles peuvent croître librement jusqu'à épuisement des éléments nutritifs. Le contenant de la culture est un flacon.

II-4-4-2- Les cultures sur support solide

Les cellules sont déposées à la surface du support, puis elles seront recouvertes d'un milieu nutritif, naturellement liquide. Le support peut être très varié. Il peut s'agir simplement de gélatine pour les milieux simples, ou des milieux très complexes contenant des protéines et des facteurs de croissance. Le fond d'une boîte de pétri ou des puits est recouvert d'un support qui permettra aux cellules de s'accrocher.

II-4-5- Contaminations :

II-4-5- 1- Contaminants biologiques :

- Bactéries
- Levures/moisissures
- Virus

II-4-5- 2- Contaminants chimiques :

- Endotoxines
- Qualité du plastique
- Reste de détergent
- Trace d'aluminium
- Résidus désinfectants

II-4-6- Différents types de culture :

II-4-6-1- Culture primaire

Résultent simplement de la multiplication de cellules (souvent de nature embryonnaire).

Le prélèvement des cellules, différenciée à attachement obligatoire (ADC) et ayant été dissociés par des enzymes appropriées (protéases).

II-4-6-2- Culture secondaire :

Résultent du repiquage de cellules issues de cultures primaires, après dilution et ensemencement dans du milieu nutritif neuf. Ces cultures sont à terme condamnées à mourir, comme celles de l'organisme de départ, après environ 50 à 100 divisions ; on parle de souches cellulaires ; qui sont soit des cellules cancéreuses, soit des cellules en voie de Cancérisation, soit des cellules saines rendues "immortelles" artificiellement).

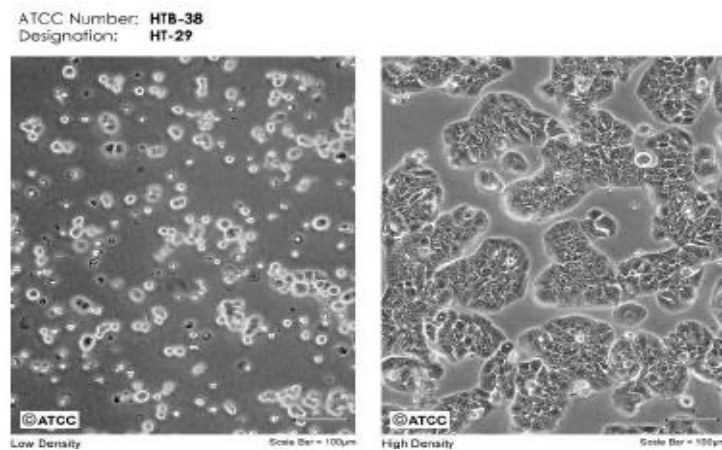


Photo 17: Cellules épithéliales du colon humain indifférenciées au microscope électronique (Callen et Perasso ., 2005)

Provenant d'un prélèvement effectué sur une patiente de 44 ans atteinte d'un cancer colique et détectée en 1964 (J Frogh).

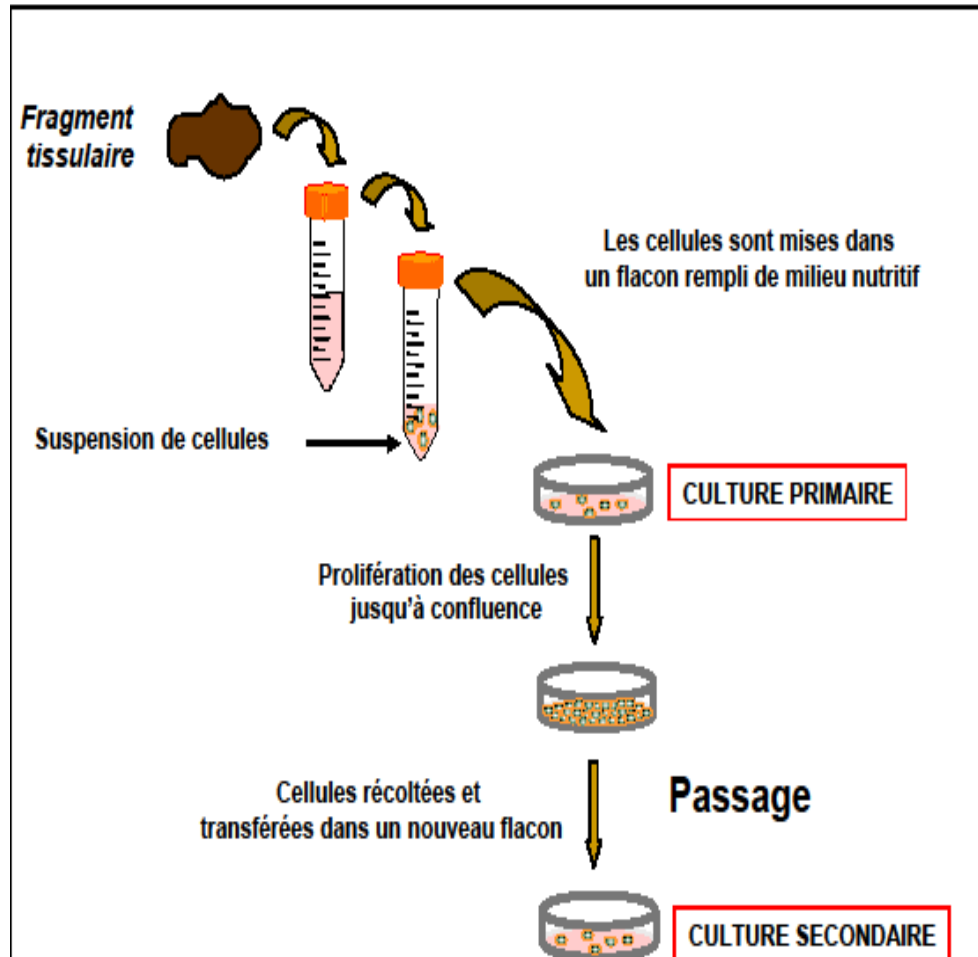


Figure 21: Les différentes étapes de culture cellulaire humaine (Site Web 3)

II-4-6-3- Lignage cellulaire:

Dérivent des cultures primaires ou secondaires, après que certaines cellules particulières de la population aient acquis la propriété de se multiplier indéfiniment et aient été sélectionnées par l'expérimentateur. Ces cellules immortelles sont donc, par définition, anormales et elles résultent de mutations spontanées (ponctuelles ou réarrangements chromosomiques). Les lignées de ce type sont relativement faciles à obtenir chez les rongeurs (lignées dites 3T3) ; ce n'est pas le cas pour les lignées d'origine humaine. Elles peuvent être aussi artificiellement obtenues grâce à des agents chimiques ou physiques mutagènes, par des Virus ou bien par des manipulations génétiques (transfection d'ADN purifié). Parmi les lignées cellulaires immortalisées, on distingue enfin des **lignées** dites **transformées**, qui induisent des tumeurs si on injecte leurs cellules à des animaux sains. La plus connue des lignées entretenues en culture est la lignée HeLa, d'origine humaine (carcinome du col de l'utérus), cultivée depuis 1952 et universellement utilisée.

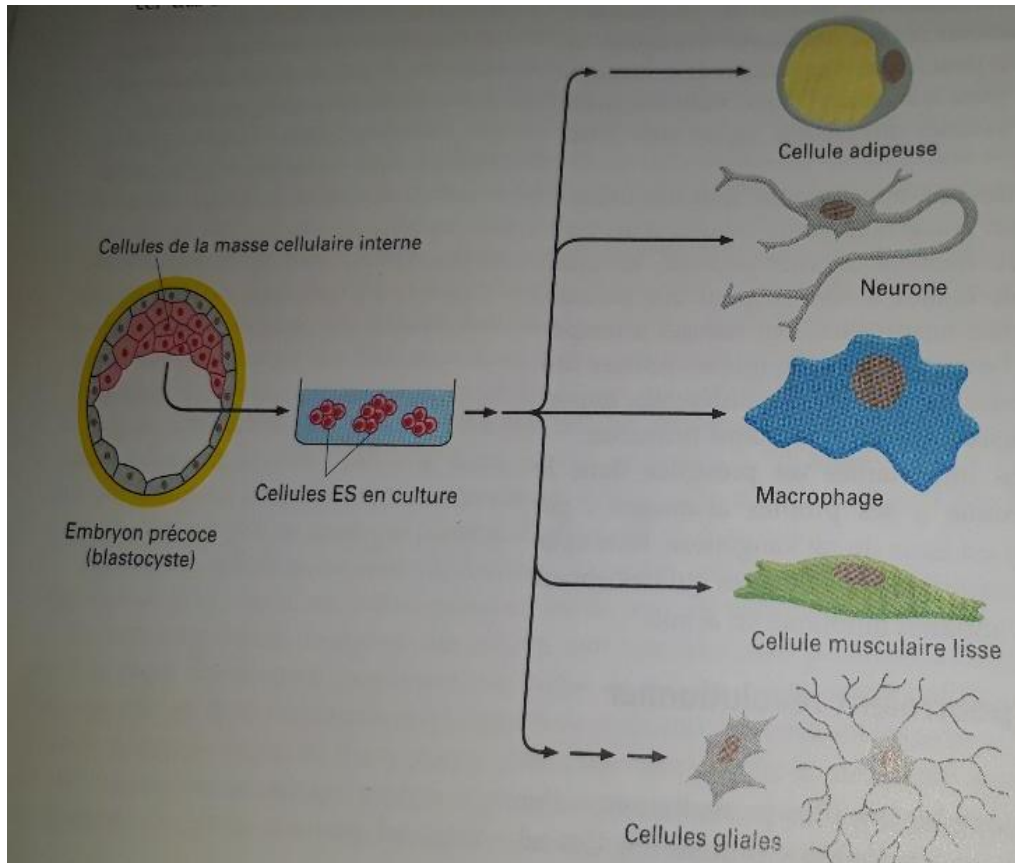


Figure 22: Les différentes étapes de culture cellulaire humaine (Alberts et al, 2011)

Cellules souches (ES) ayant pour origine un embryon. Ces cellules en culture peuvent donner tous les autres types cellulaires de l'organisme. Les cellules sont récoltés à partir de la masse cellulaire d'un embryon précoce et maintenues en culture indéfiniment et peuvent être conservées comme cellules de lignées immortelles.

Références bibliographiques:

Ouvrages

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M., 2011. Biologie moléculaire de la cellule. Lavoisier. 5^{ème} édition. p 511,789.
- Aouati A. 2016., Les méthodes d'étude de la cellule. Cours, Faculté de Médecine de Constantine.
- Barlovatz-Meimou G Ronot X ., 2014. Culture de cellules animales. 3e édition. Lavoisier, Paris. France.
- Callen J. C et Perasso R., 2005. Biologie cellulaire, des molécules aux organismes. Organisation cellulaire. 2e édition. Dunod, Paris, 2005 ISBN 2 10 049236 5. p : 27, 55, 62, 66, 292,381.
- Chapon L., 2006. La Technique d'autoradiographie. Université Hohenheim de Stuttgart, en Allemagne. Image d'après, M. Chrétien et M. Pisam, Biol. of the Cell, 56, 137-150,1986.
- Chelli A., 2013. Cours de Biologie Cellulaire. Chapitre IV. Cour méthodes d'étude de la cellule. 1ère Année LMD. FSNV. Univ. Bejaia.
- Colliex C., 1996. La Microscopie Electronique. CNRS, Université de France.
- Guillaud .P., 2010. Microscopie Photonique. Principes et Applications. Université Pierre et Marie Curie. Paris.
- Lunard J., 2011. Méthodes d'étude. Année universitaire 2011. Université Joseph Fourier de Grenoble.
- Rahman M. Introduction à la Cytométrie en Flux. Cf. Institut d'optique. Graduate school. Wikiversité.
- Robert D et Rolland J C., 1998. Biologie végétale. Organisation cellulaire. Doin, 2^{ème} édition. p 166.
- Rolland J C et Callon J C., 2007. Atlas de biologie cellulaire. Dunod, Paris. 6^{ème} édition. p 17,18,20,21,73,75.
- Tahiri J N., 2015. Biologie cellulaire Université Hassan II Casablanca. Faculté de Médecine et de Pharmacie.
- Thiry M., 2014. Exercices et méthodes. Biologie cellulaire. Université de Liège. Belgique. Dunod.
- Triqui. ZA., 2016. Cours de biologie cellulaire. Université Mohammed V. Faculté des Sciences.

Sitographie

Site web 1 : [http://www. Bio faculté](http://www.Bio faculté). Les différents types de microscope

Site web 2 : brinks 3 free.fr. Autoradiographie de cellules. Marquage cellulaire

Site web 3 : [Bio faculté](#) 544 × 140. Dissociation mécanique et enzymatique. Culture cellulaire

III-Evaluation:

I- OCM : Parmi les propositions suivantes, cochez (X) la ou les réponse (s) exacte(s)

- 1. La culture cellulaire utilise:**
 - a) des cellules libres ou en cohésion
 - b) des cellules libres et en cohésion
 - c) des cellules libres seulement
- 2. Les protéines sont synthétisées dans :**
 - a) le noyau et le cytoplasme
 - b) le noyau ou le cytoplasme
 - c) commence toujours dans le RER
- 3. Le microscope optique est un outil pour :**
 - a) l'étude de la taille des cellules seulement
 - b) l'étude de la forme et la taille des cellules
 - c) seulement pour étudier le cheminement des macromolécules
- 4. La culture cellulaire est :**
 - a) une technique in-vivo qui remplace les techniques in-vitro
 - b) une technique in-vitro qui remplace les techniques in-vivo
 - c) une technique de culture des bacteries ayant un noyau
- 5. Les protéines joue le rôle dans:**
 - a) la structure seulement
 - b) la régulation et le transport
 - c) source des acides aminé
- 6. Le microscope électronique permet d'observer une image agrandie d'un échantillon qui est traversé par:**
 - a) faisceau d'électron et de photons
 - b) faisceau d'électron
 - c) faisceau de rayons X
- 7. Les protéines peuvent êtres marquées par:**
 - a) autoradiographie
 - b) hybridation-in vitro
 - c) coloration au Lugol
- 8. L'immunocytochimie utilise :**
 - a) toujours des colorants vitaux
 - d) éléments radioactifs
 - c) colorants et métaux lourds

9. La cytochimie permet:

- a) la multiplication des cellules
- b) toujours, la production de substances de nature non protéique
- c) la production de divers sucres comme l'insuline, le glucagon et les anticorps

10. L'autoradiographie est :

- a) une technique de marquage
- b) utilise des anticorps
- c) Détecte le cheminement des protéines

II- Citez si la réponse est Vraie ou fausse, et justifiez la réponse fausse (10 réponses au choix) :

1- Le microscope optique contient des lentilles en verre et des lentilles électromagnétiques.

...F... Le microscope optique contient des lentilles en verre

2- La cryofracture permet de révéler la localisation des protéines membranaires. L'échantillon à étudier est congelé dans de l'azote liquide (+170°C)

F : La cryofracture permet de révéler la localisation des protéines membranaires. L'échantillon à étudier est congelé dans de l'azote liquide (-170°C)

3- L'Hybridation in situ c'est la détection de séquences polypeptidiques spécifiques

F :L'Hybridation in situ c'est la détection de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques

4- Le but de l'immunochimie est de révéler une molécule biologique présente sur une cellule ou un tissu avec des métaux lourds.

F :Le but de l'immunochimie est de révéler une molécule biologique présente sur une cellule ou un tissu avec des anticorps.

5- Le microscope électronique contient une lentille électromagnétique Vrai

6- Les GFP sont des protéines prélevées des plantes ayant la propriété d'émettre une fluorescence dans les cellules sous microscope.

F : Les GFP sont des protéines prélevées des méduse et de certains animaux aquatiques ayant la propriété d'émettre une fluorescence dans les cellules sous microscope.

7- La culture cellulaire est le maintien en vie des cellules non organisées en tissus dans l'organisme, mais capable de se diviser in-vitro.

F : La culture cellulaire est le maintien en vie des cellules non organisées en tissus en dehors de l'organisme, mais capable de se diviser in-vitro.

8- Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer et désorganiser les différents composants cellulaires par broyage. Vrai

9- La préparation d'échantillon pour microscope optique est indirecte. L'objet est mis entre lame et lamelle en présence d'une goutte de paraffine.

F : La préparation d'échantillon pour microscope optique est directe. L'objet est mis entre lame et lamelle en présence d'une goutte d'eau.

10- Au lieu de la coloration pour microscopie électronique, on utilise les intensificateurs pour le microscope optique.

F : Au lieu de la coloration pour microscopie optique, on utilise les intensificateurs pour le microscope électronique.

ou

F : Au lieu des intensificateurs pour microscopie électronique, on utilise les colorants pour le microscope optique.

11- En microscopie optique ou électronique, la préparation comporte généralement 4 étapes : *Fixation – Inclusion – Déshydratation - Coupe*

F : En microscopie optique ou électronique, la préparation comporte généralement 4 étapes : *Fixation – Déshydratation - Inclusion - Coupe*

12- Les méthodes cytochimiques sont des méthodes de marquage cellulaires par fixation des colorants vitaux.

F : Les méthodes cytochimiques sont des méthodes de marquage cellulaires par fixation des composés chimiques.

13- La chaîne polypeptidique est allongée par attachement des aminoacides fixés sur les différents ARNm.

F : La chaîne polypeptidique est allongée par attachement des aminoacides fixés sur les différents ARNt.

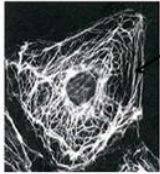
14- Les techniques cytochimiques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes électroniques

F : Les techniques cytochimiques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes Electroniques ou optiques

15- Les cellules du sang sont obtenues par prélèvement et centrifugation, puis mises en culture des cellules libres séparément sur milieu solide.

F : Les cellules du sang sont obtenues par prélèvement et centrifugation, puis mises en culture des globules blancs seulement sur milieu solide.

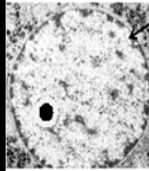
VI) *Donnez la technique utilisée et le type de microscope auquel correspondent ces deux photos :*

 Anticorps fluorescent

Microscope :.....ME.....

Technique:...Immunocytochimique

Organites observés ...Cellule animale ,noyau, cytosquelette...

 Carbone 14

Microscope :.....ME.....

Technique :...Autoradiographique

Organites observés : Membrane nucléaire,nucléole, chromatine.....