

UNIVERSITE D'ALGER I Benyoucef Benkhedda
FACULTE DE MEDECINE ZIANIA

COURS DE PREMIERE ANNEE DE MEDECINE DENTAIRE

CHAPITRE 2:
METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

Conçu par
D^r Benzine-Challam H.

Année : 2022/2023

OBJECTIFS PRINCIPAUX

Objectif 4. Conditions d'observation en microscopie

Objectif 5: Citer les étapes des techniques applicables en microscopie photonique et électroniques et indiquer les domaines de leurs applications.

Objectif 4: Conditions d'observation en microscopie

- 1. EPAISSEUR DE L'ECHANTILLON:** l'échantillon doit présenter une **faible épaisseur** pour permettre le **passage** du faisceau incident **de photons** d'où la nécessité de **couper l'échantillon** . Epaisseur convenable en **mp** **2 à 10 μ** et **300 Å** au MET.
- 2. CONTRASTE :** pour une meilleure observation l'échantillon doit subir des **colorations** car les constituants cellulaires sont transparents naturellement en dehors de certaines cellules (GR, musculaires et les cellules végétales à plastes). On dit que les contrastes sont faibles et que les **colorants augmentent les contrastes**. On utilise des **colorants chimiques (en mp)** , ou des **contrastants électroniques –métalliques (MET,MEB)**. En m. à fluorescence on utilise les fluorochromes.

Tableau 2/1: Spécificités des 4 types de microscopes et les domaines de leurs applications

Eléments de comparaison		Microscope photonique	Microscope photonique à fluorescence	Microscope électronique à transmission	Microscope électronique à balayage
Pouvoir séparateur / résolution		0,2 μm		0,2 nm	22 nm
Grossissement		x 1500		x 500. 000	x 300. 000
Conditions d'observation	Epaisseur	Coupes (2-10 μm)		Coupes ultrafines (300Å)	Réplique à partir de coupes \pm épaisses Echantillon massif
	Contraste	Utilisation de colorants chimiques spécifiques	Utilisation de fluorochromes (immunomarquage) sur coupes histologiques	Utilisation de métaux lourds	
Techniques applicables		Techniques histologiques		Coupes cytologiques et contraste positif	<ul style="list-style-type: none"> Balayage/ombrage métallique Cryodécapage et ombrage métallique (répliques)
Objectif recherché (applications)		Etude morphologique et structurale des tissus	Détection, localisation et quantification d'une ou plusieurs protéines Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires	Etude ultrastructurale des cellules entières portions cellulaires , virus et bactéries	Etude tridimensionnelle des surfaces externes et internes des échantillons biologiques

Objectifs 5 : Décrire les **techniques** applicables en **microscopie** et les domaines de leurs **applications**

TECHNIQUES MICROSCOPIQUES PHOTONIQUES

Technique **de coupes histologiques**: étude histologique (structurale : description des cellules)

Technique d'**immunomarquage** /d'immunofluorescence: détection localisation, quantification de protéines, localisation de molécules.

TECHNIQUES MICROSCOPIQUES ELECTRONIQUES

Technique **cytologique**: étude ultrastructurale (description des organites cellulaires)

Technique des **répliques**: étude tridimensionnelle des cellules entières ou fractionnés, êtres vivants microscopiques, organites et complexes moléculaires isolés, membranes cellulaires.

Objectifs 5 : Décrire les techniques microscopiques et les domaines de leurs applications : Technique coupe histologique

TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE

Etapes (*lire paragraphes 4/1 et 5/1*):

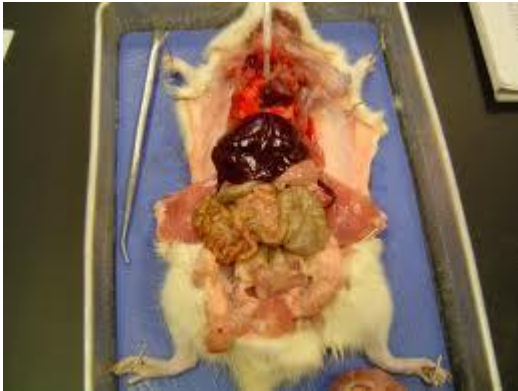
- 1. Prélèvement et fixation de l'échantillon**
- 2. Déshydratation**
- 3. Imprégnation**
- 4. Inclusion**
- 5. Coupe**
- 6. Contraste**
- 7. Montage et Observation**

OBJECTIFS

- . Etude morphologique des cellules du tissu (forme, dimension, nombre de types cellulaires, arrangement des cellules..)**
- . Etude structurale (identifier et décrire les composants..)**

Remarque: Ne pas retenir les étapes de la technique

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**



1. Dissection et prélèvement



2. Fixation chimique

**ETAPES DE LA TECHNIQUE
DE COUPES HISTOLOGIQUE
(voir Figure 2/4)**



**3. Flacons de déshydratation
(bains d'alcool)**



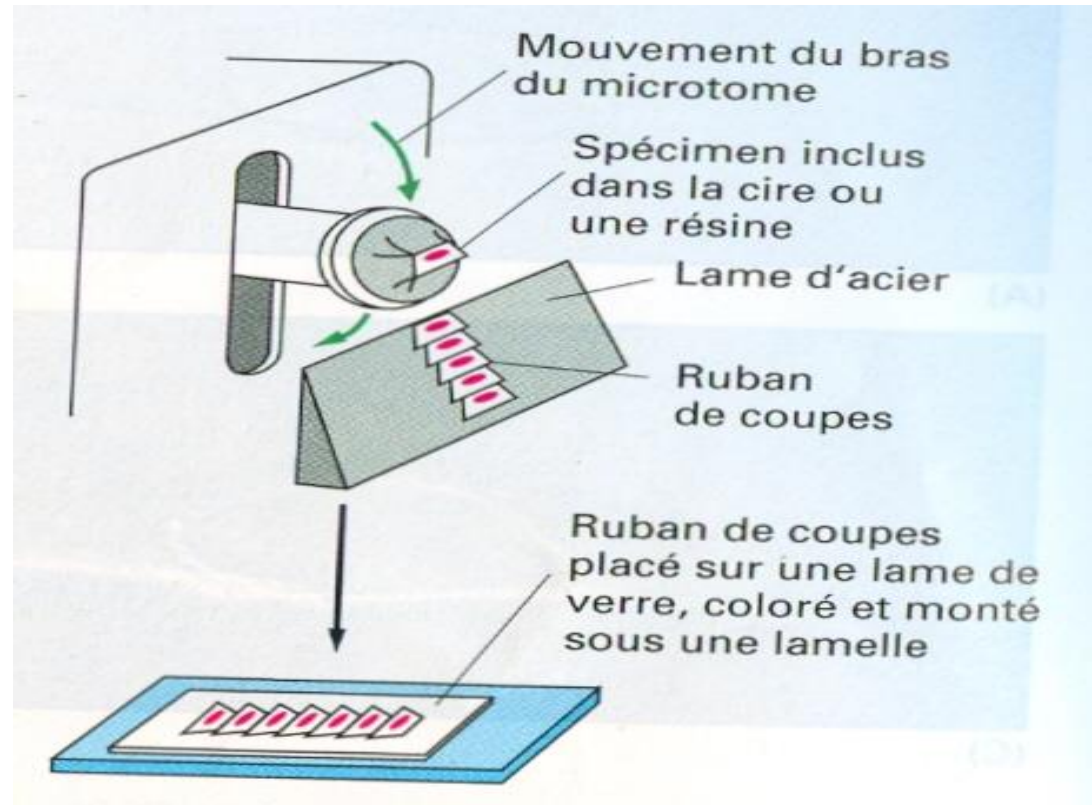
**4. Inclusion à la paraffine
chaude**



**5. Préparation de
Blocs de paraffine
contenant
l'échantillon**

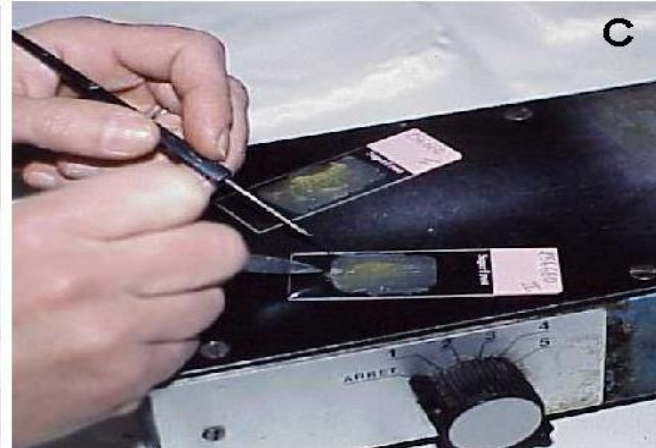
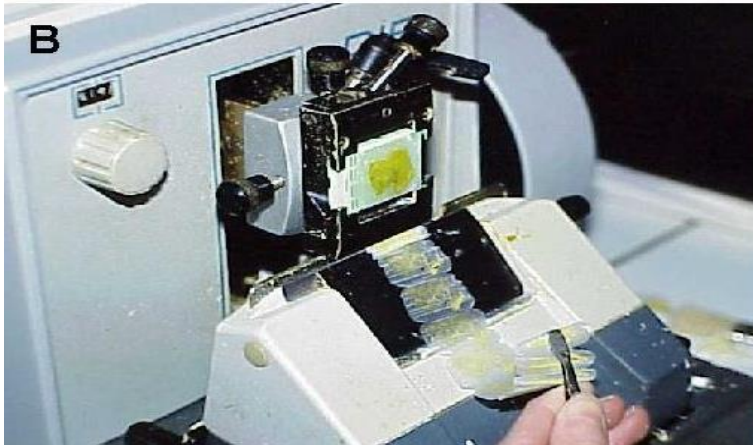
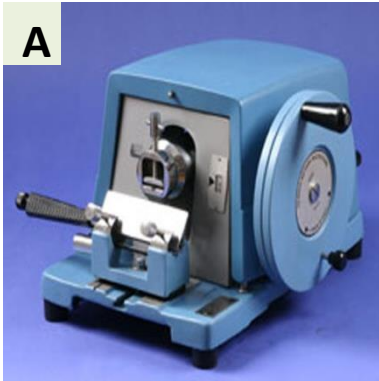
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**

ETAPES DE LA TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE : 5.réalisation des coupes



Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**

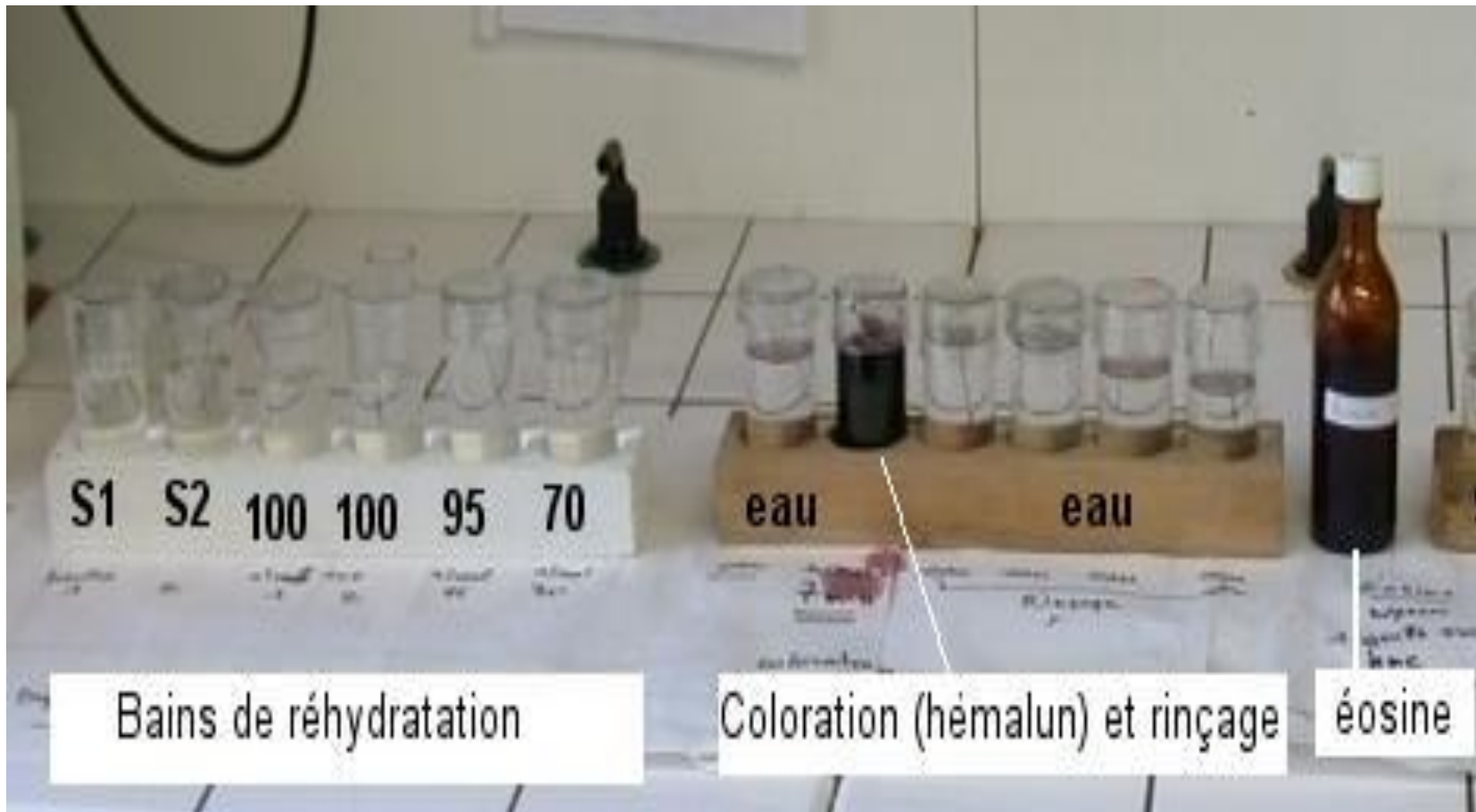
Coupes au Microtome (microtomie) = réalisation de coupes de 2–10 μm d'épaisseur



A: Microtomie B et C : Récupération et étalement des coupes sur lame.

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**

ETAPES DE LA TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE : 6.le contraste

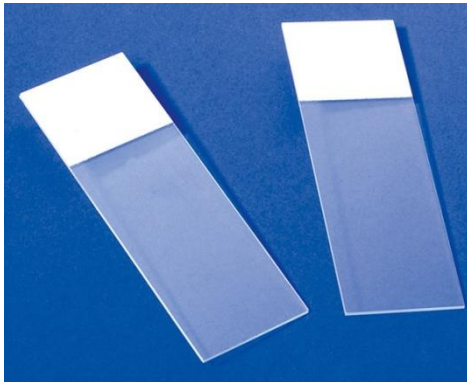


Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications : Technique **coupe histologique**



Les colorants

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications : Technique **coupe histologique**



ETAPES DE LA TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE :
6.le montage

Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**



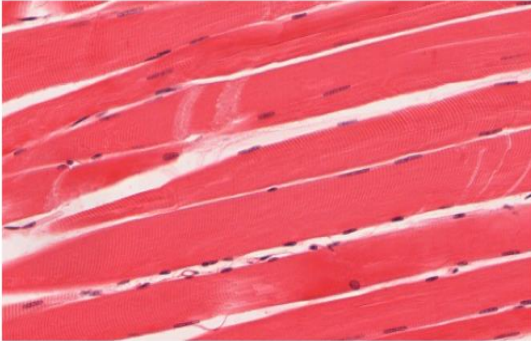
ETAPES DE LA TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE :
6.l'observation microscopique

Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**

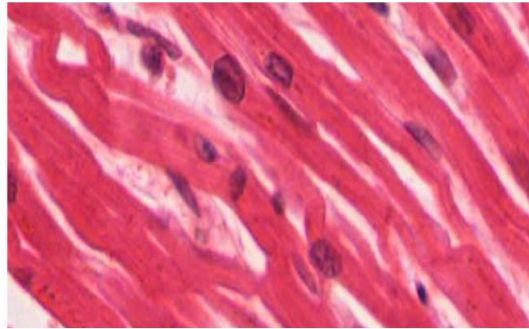


CONSERVATION DES PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES

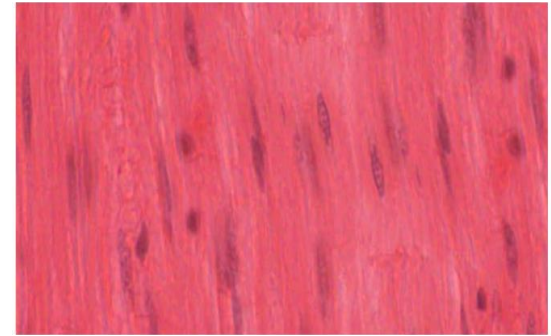
Aspects microscopiques de quelques tissus



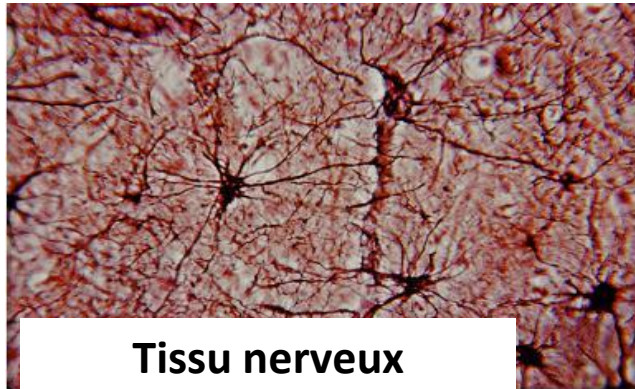
Tissu musculaire strié squelettique



Tissu musculaire strié cardiaque



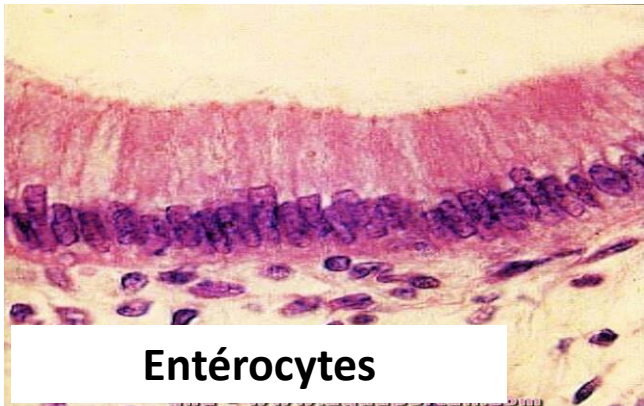
Tissu musculaire lisse



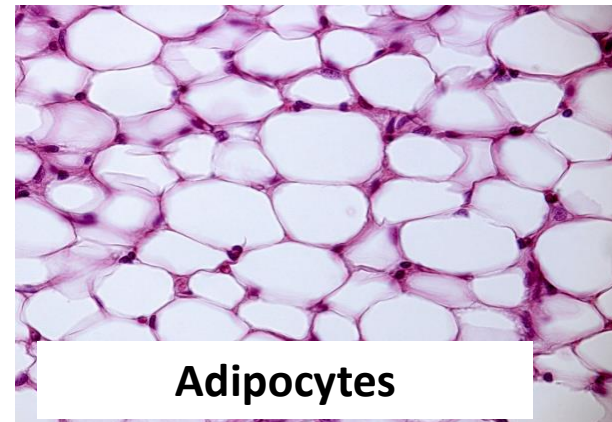
Tissu nerveux



Tissu hépatique



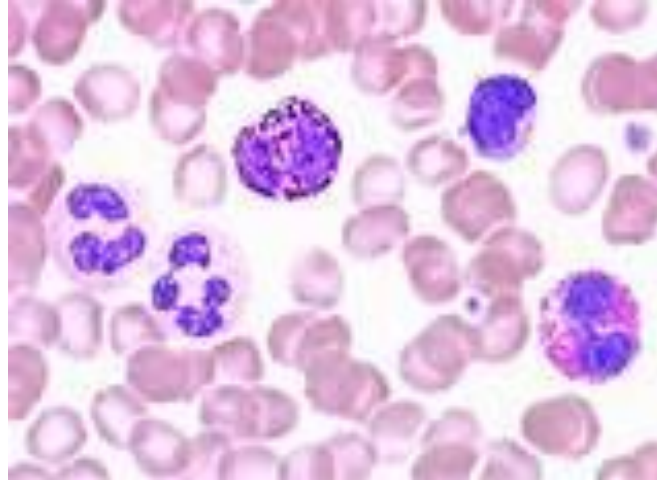
Entérocytes



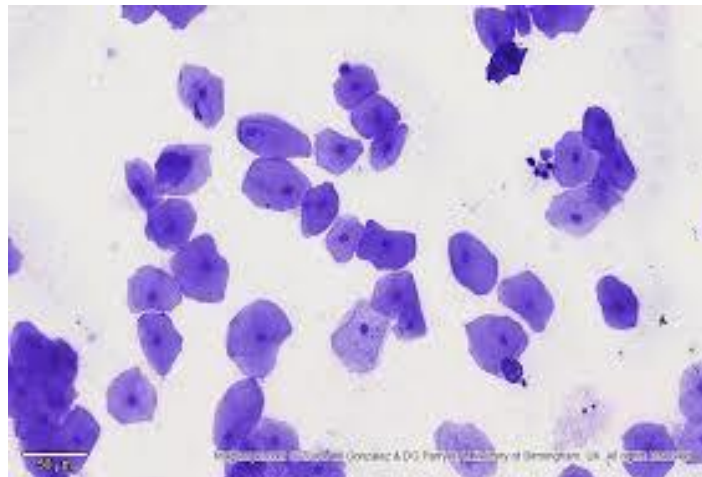
Adipocytes

Objectifs 5 + 6: Décrire les **techniques** microscopiques et les domaines de leurs **applications** : Technique **coupe histologique**

Il est possible dans certains cas de réaliser une étude histologique **sans coupe** de l'échantillon biologique.

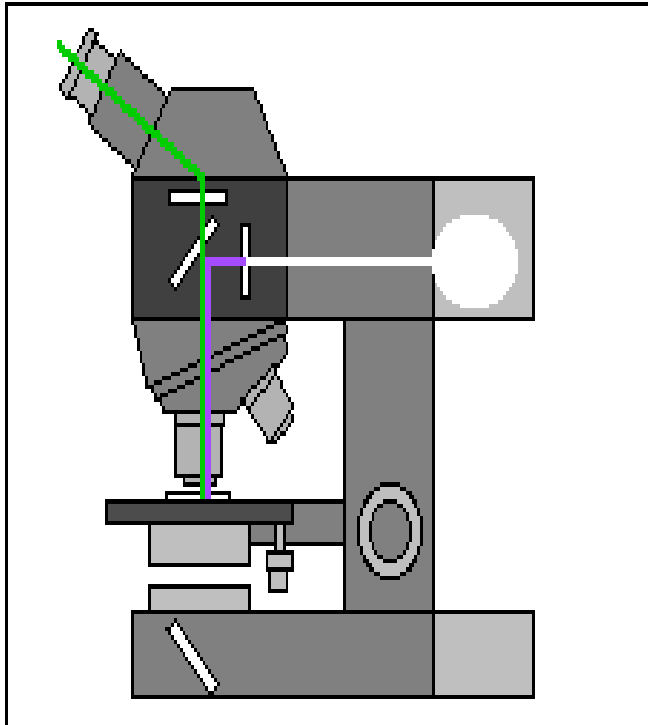


Tissu sanguin

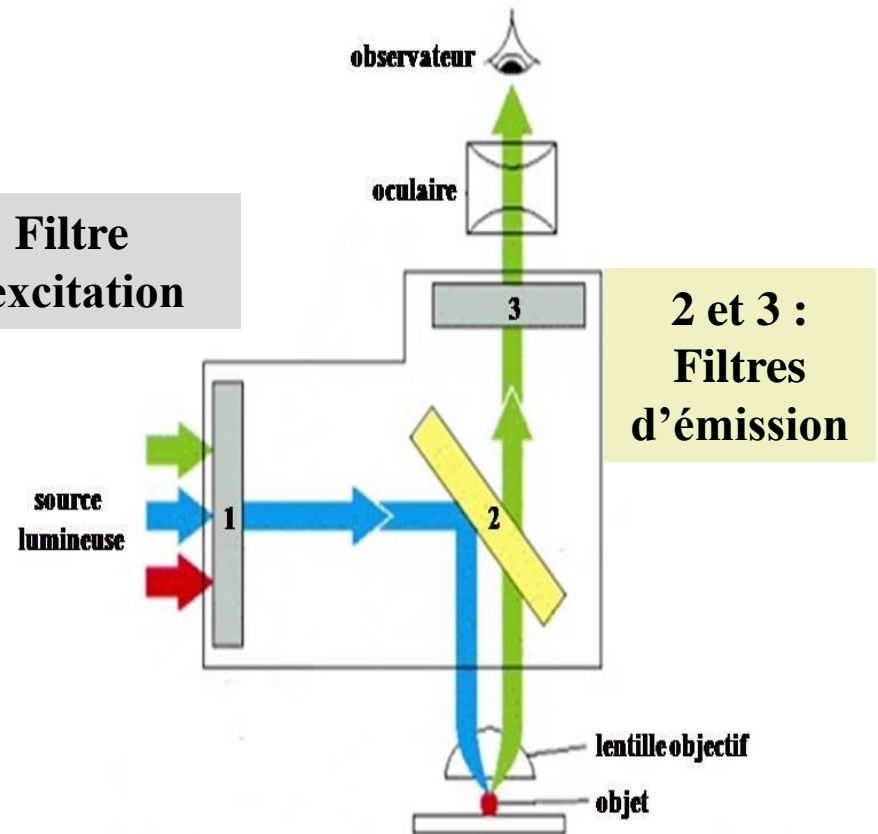


Epithélium
buccal

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**

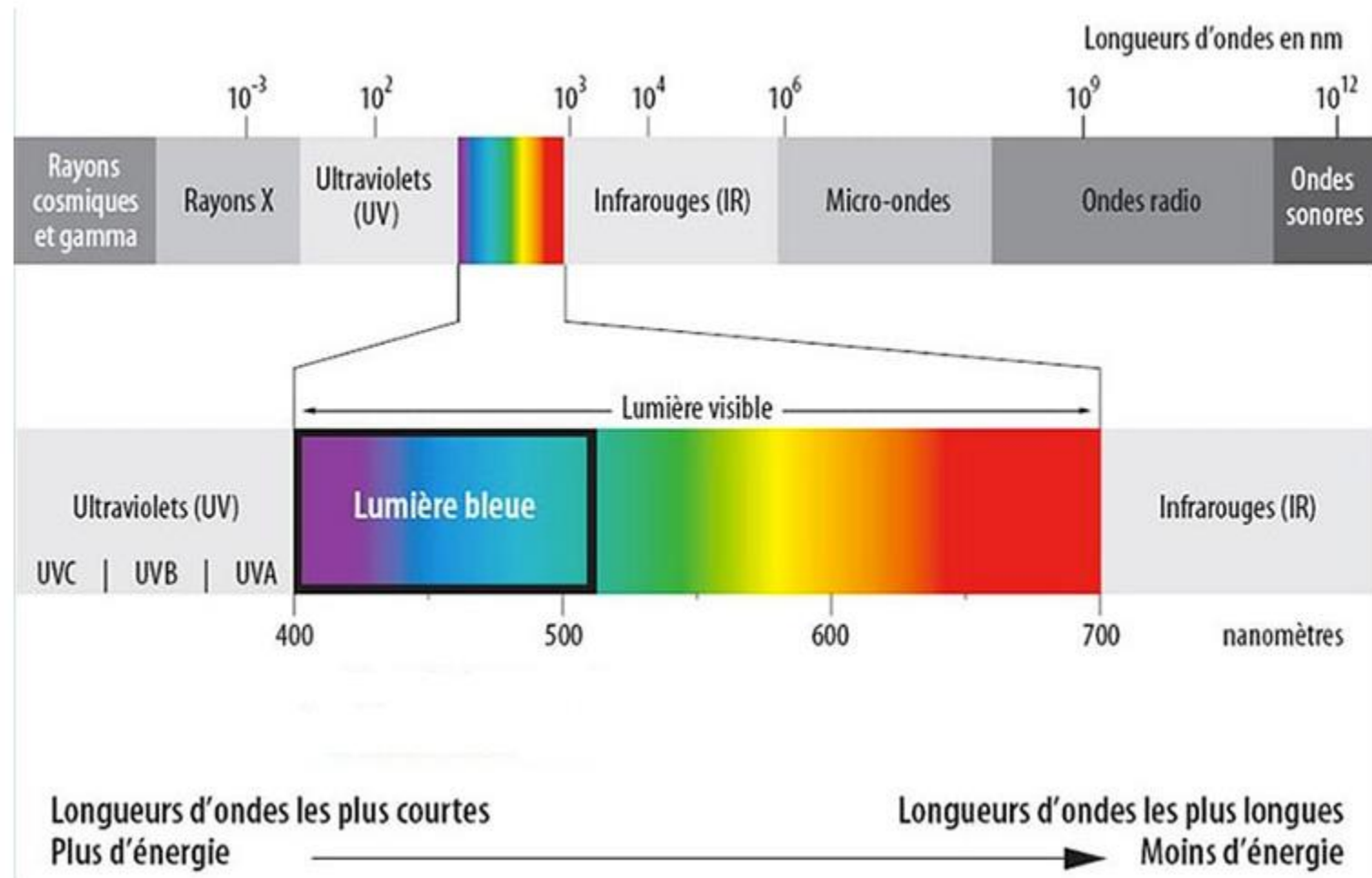


1. Filtre d'excitation



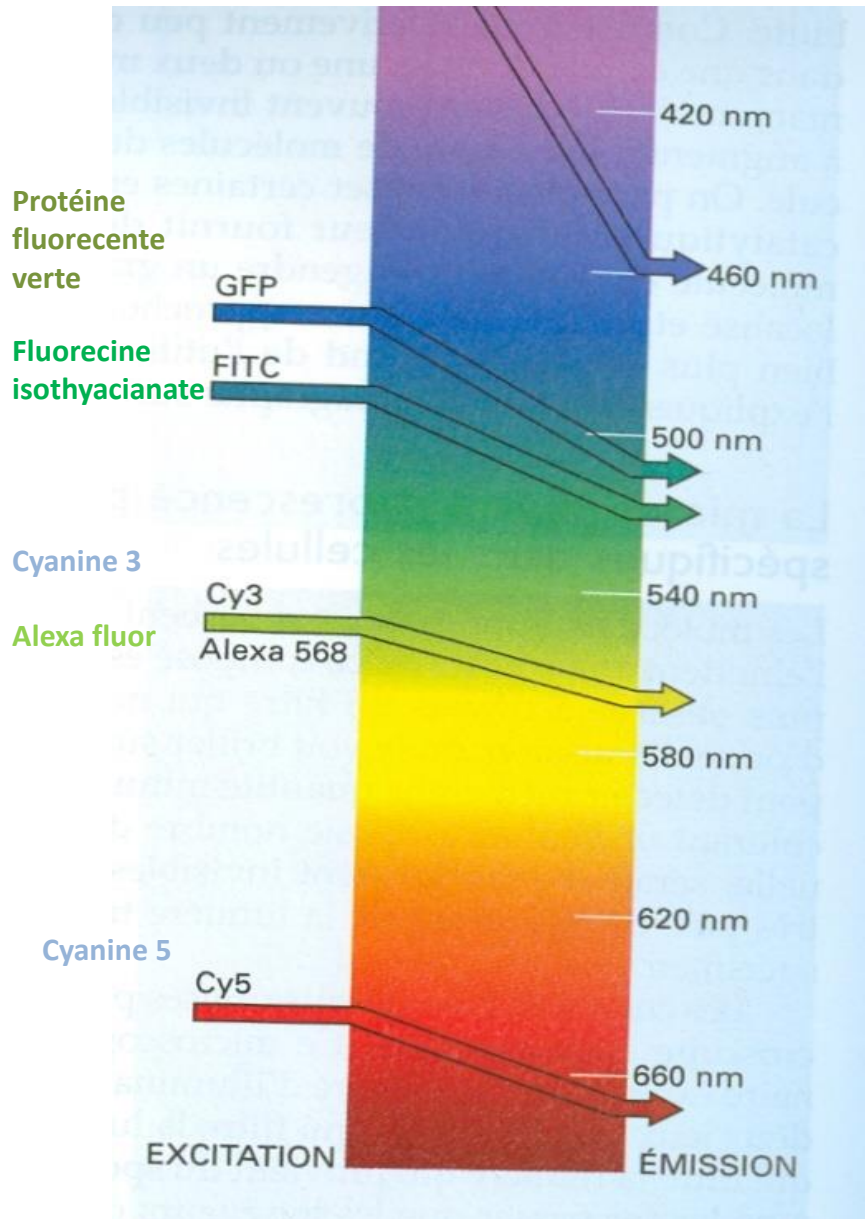
L'observation de la fluorescence n'est possible qu'avec l'utilisation d'un microscope à fluorescence

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**



RAPPEL : spectre d'émission de la lumière blanche

CARACTERISTIQUES D'UN FLUOROCHROME



Un FLUOROCHROME est une **substance chimique** pouvant **absorber** l'énergie lumineuse **d'une radiation monochromatique** et la **réémettre à une longueur d'onde plus grande**.

De nombreux fluorochromes existent.

Nous retiendrons 2 types:

- **La Rhodamine** absorbe dans la radiation orange à **640nm** et réémet une radiation de fluorescence **rouge** détectable à **670nm**.

- **La Fluorescéine** qui absorbe dans la radiation **bleu 470nm** et émet dans la radiation **verte 530nm**.

Les lumières absorbées sont dites d'excitation .

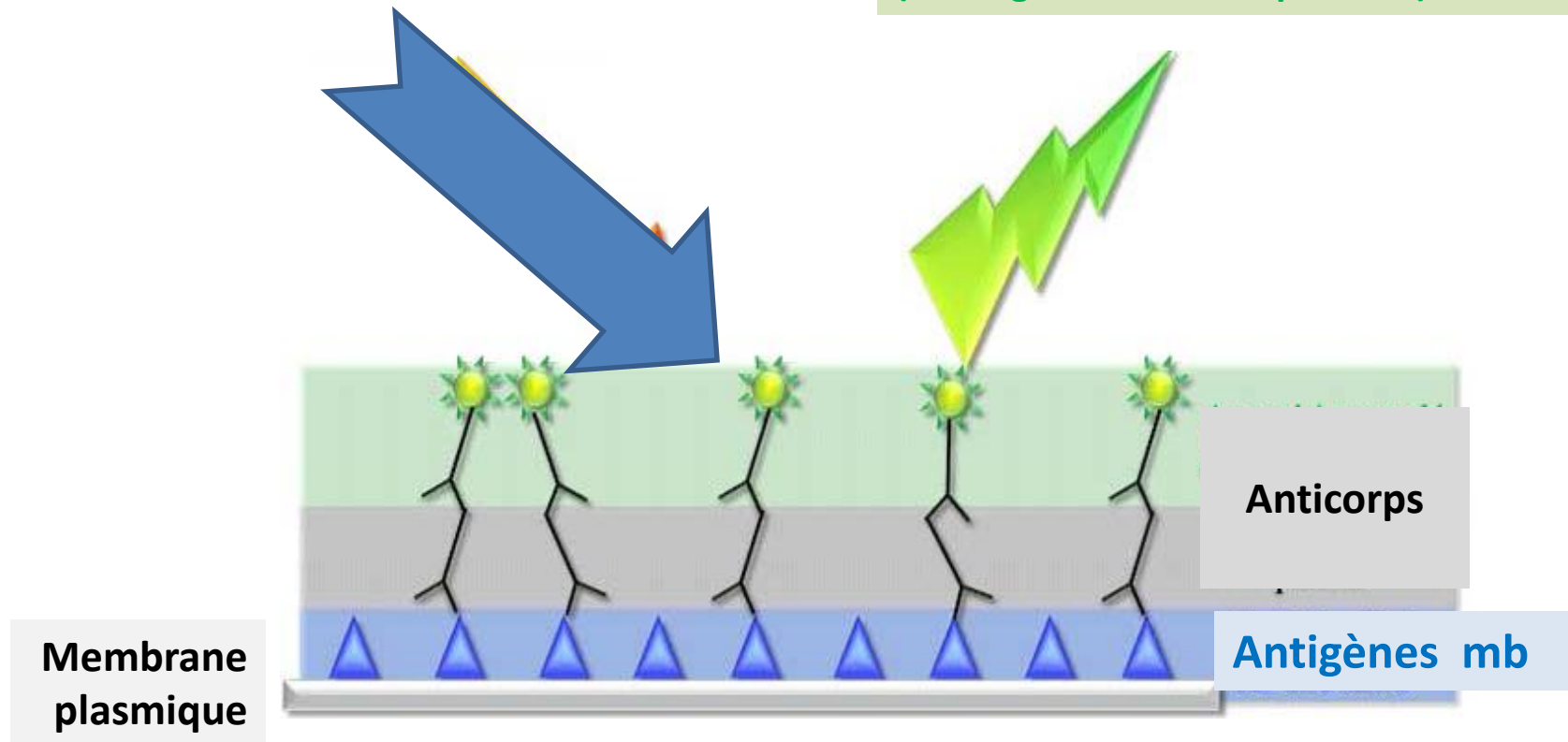
Les lumières émises sont dites de fluorescence ou d'émission .

Lire paragraphe 6/2

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**

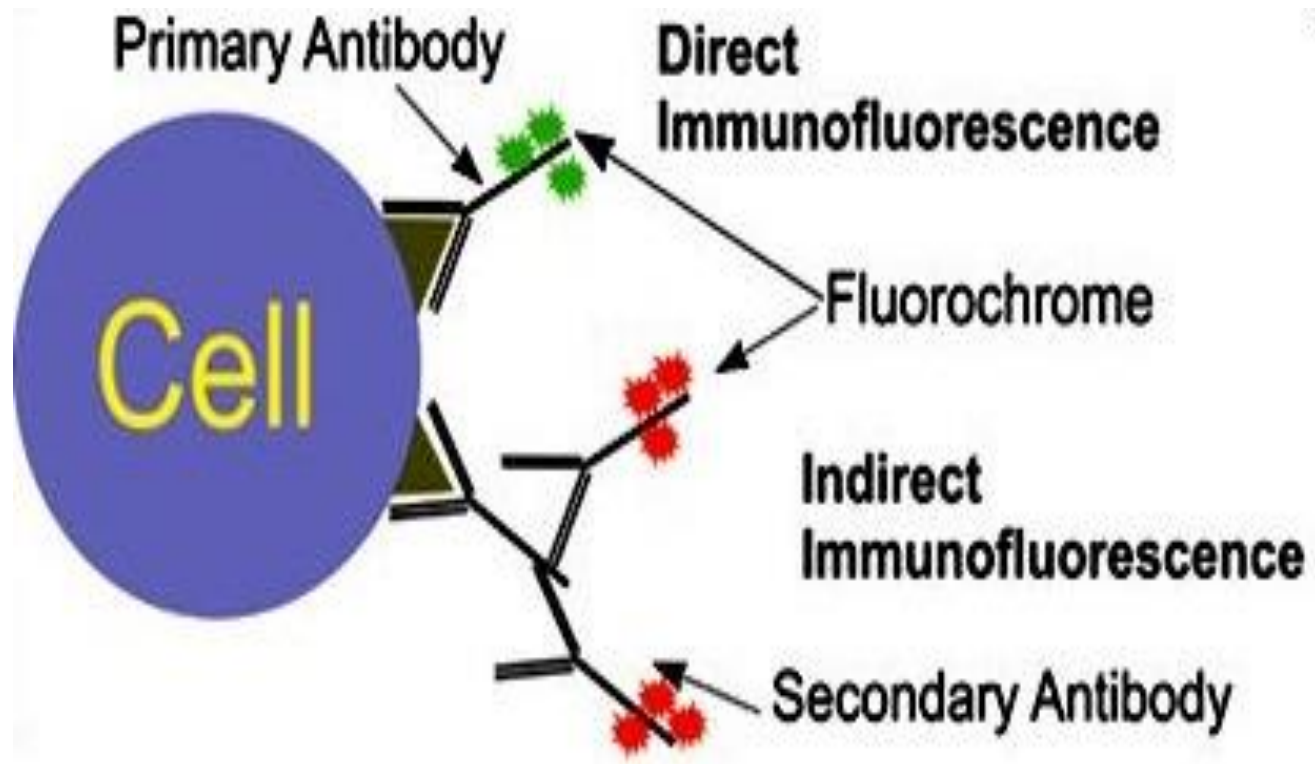
Radiation monochromatique absorbée / incidente de longueur d'onde inférieure

Radiation monochromatique / réfléchie (de longueur d'onde supérieure)



CARACTERISTIQUES D'UN FLUOROCHROME:
Cas de la Fluoresceine : (Fluorochrome/ fluorophore)

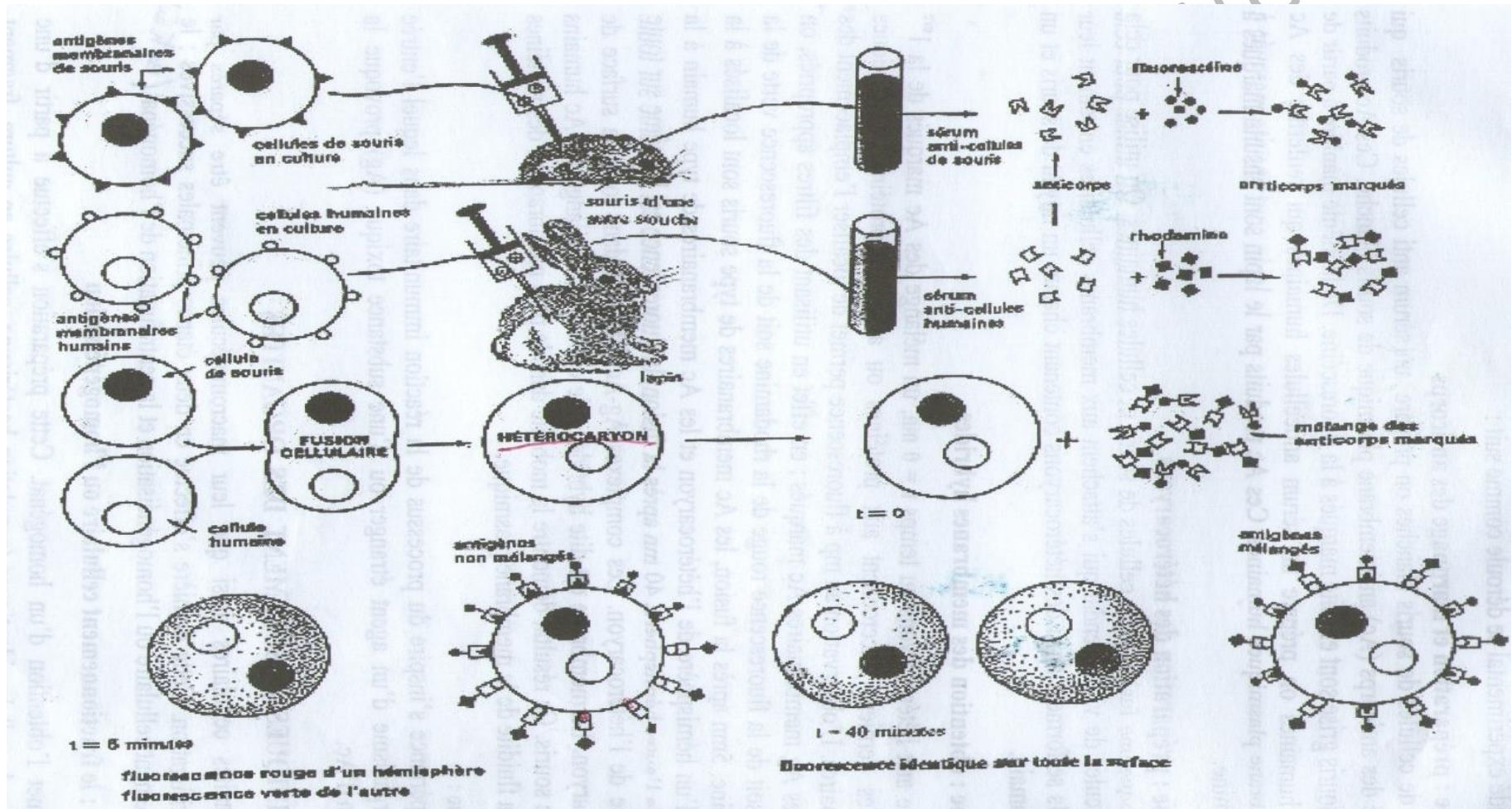
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**



Les deux variétés d'Immunomarquage

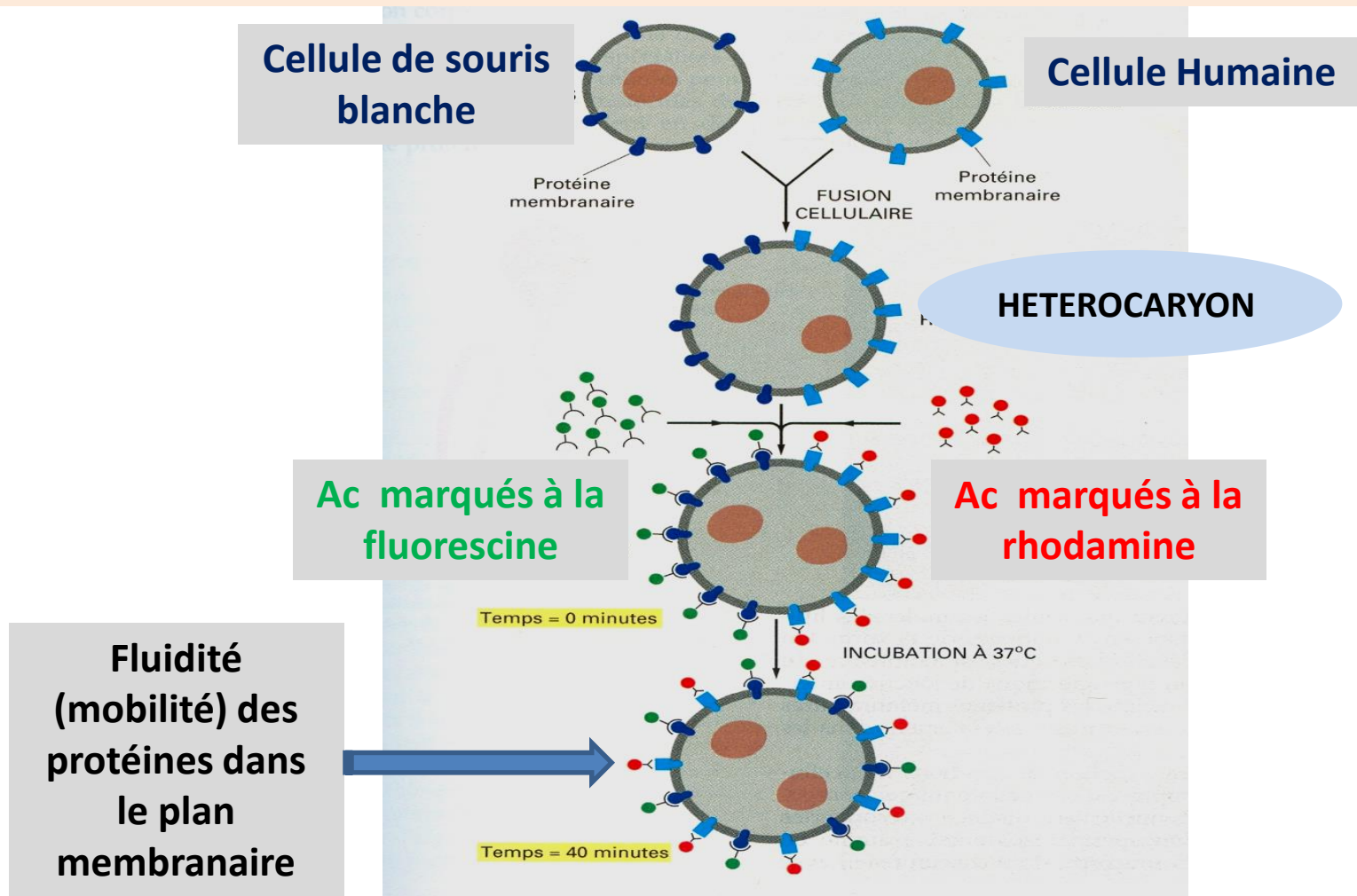
Il existe **2 variétés d'immunofluorescence: directe et indirecte**. Dans les 2 cas les principes sont basés sur le **marquage des Ac** d'où l'appellation **d'immunomarquage**

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**



Cas de **mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires** :
Expérience d'immuno marquage de Frye et Edidin (1970)

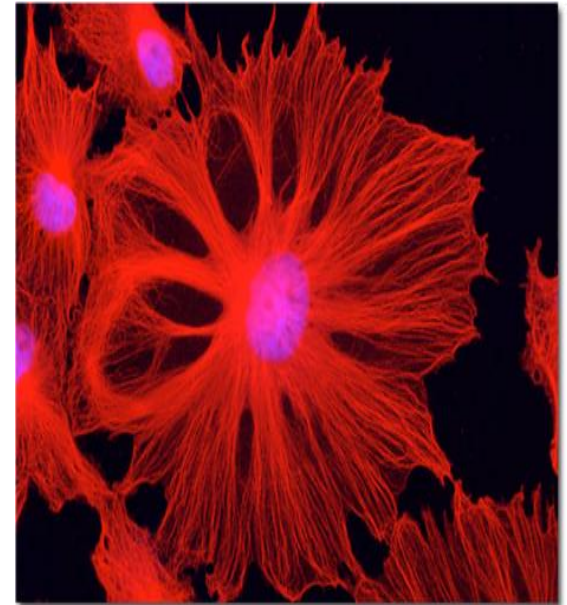
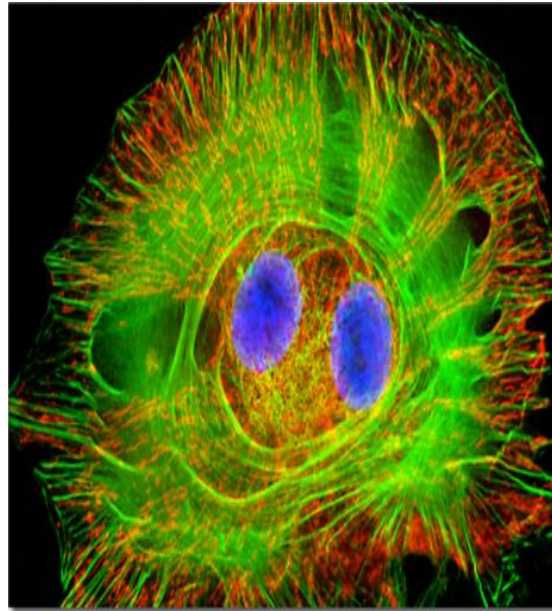
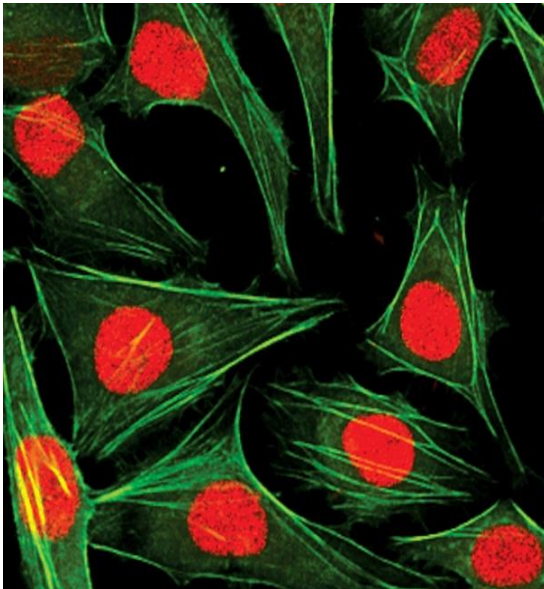
Objectif 5: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**



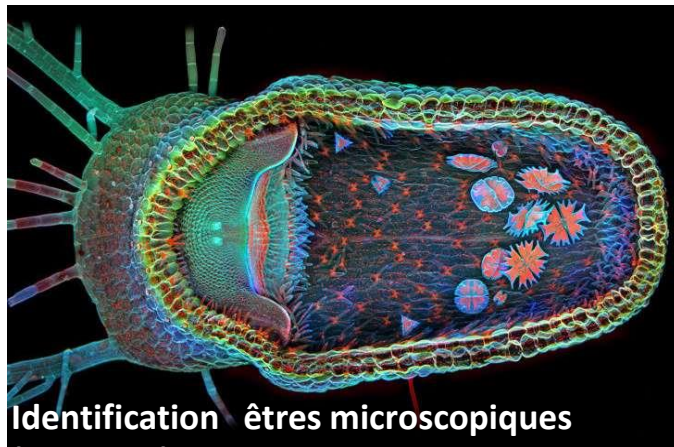
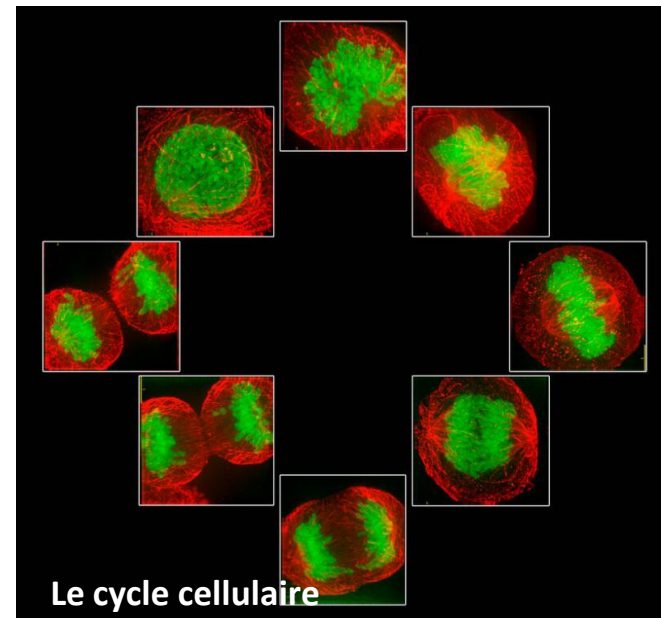
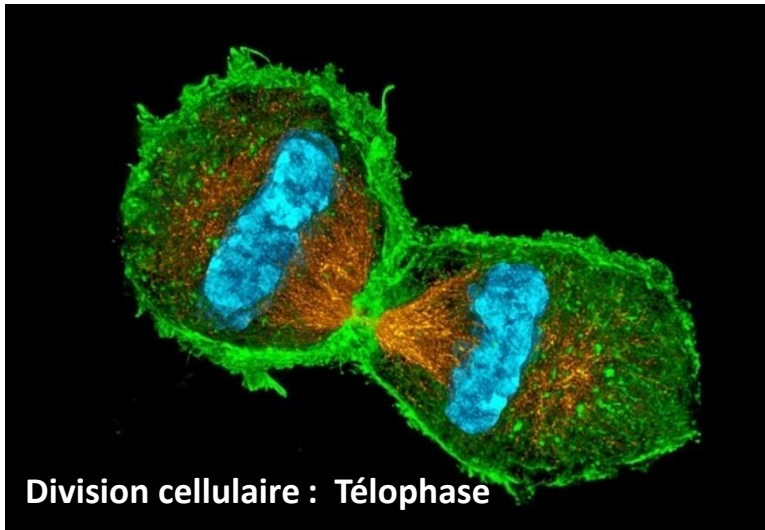
Mise en évidence de la fluidité membranaire (des protéines)
par immunofluorescence (*Figure 2/3*).

Objectif 5: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique d'immunofluorescence**

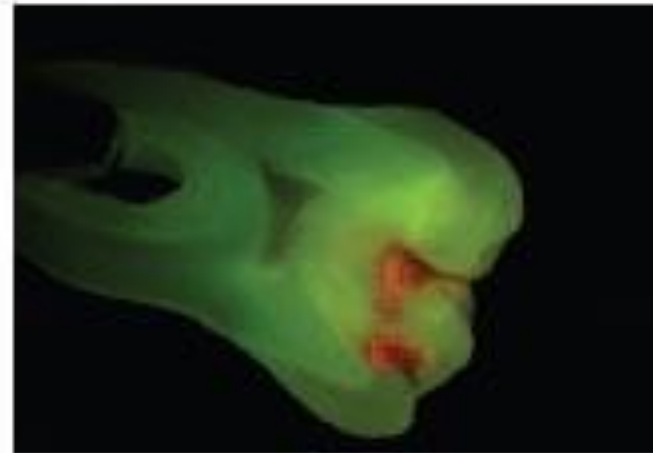
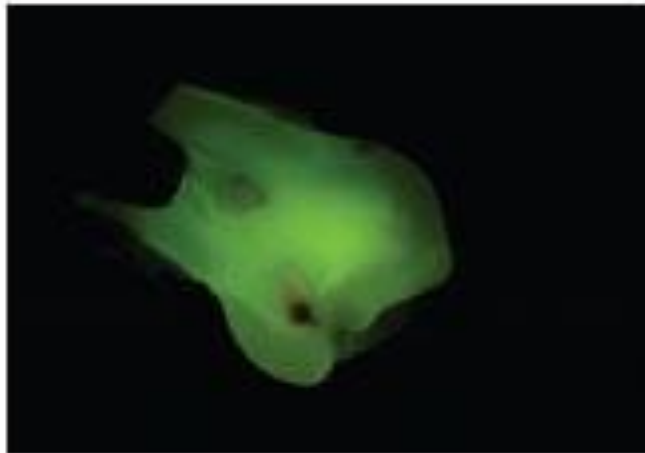
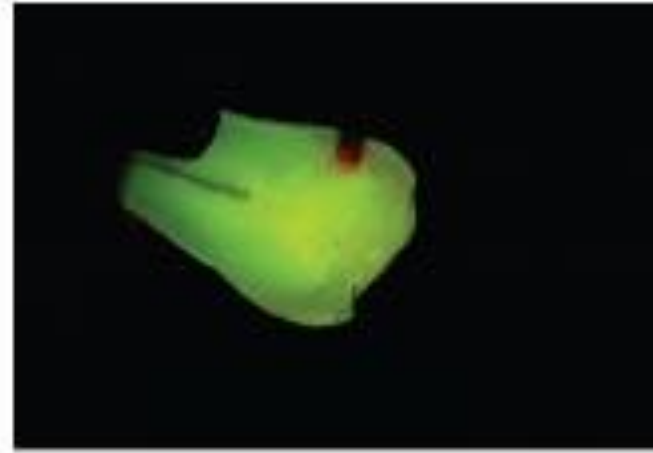
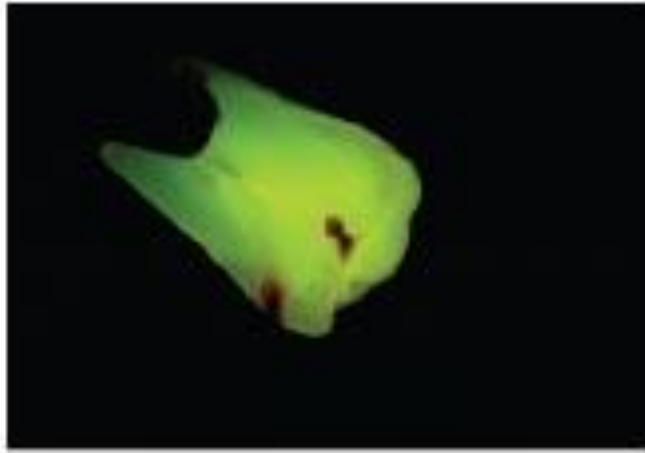
Aspects des protéines du cytosquelette en microscopie à fluorescence



APPLICATIONS possibles sur coupes histologiques pour la :
.**Détection** . **Localisation**. **Quantification** des **PROTÉINES**
intracellulaires et **périphériques**.



Autres domaines d'application de la technique d'immunofluorescence



Domaine d'application du principe de la fluorescence : l'imagerie
fluorescente en chirurgie dentaire pratiquée dans la détection
macroscopique des caries.

Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique ou de coupes minces**

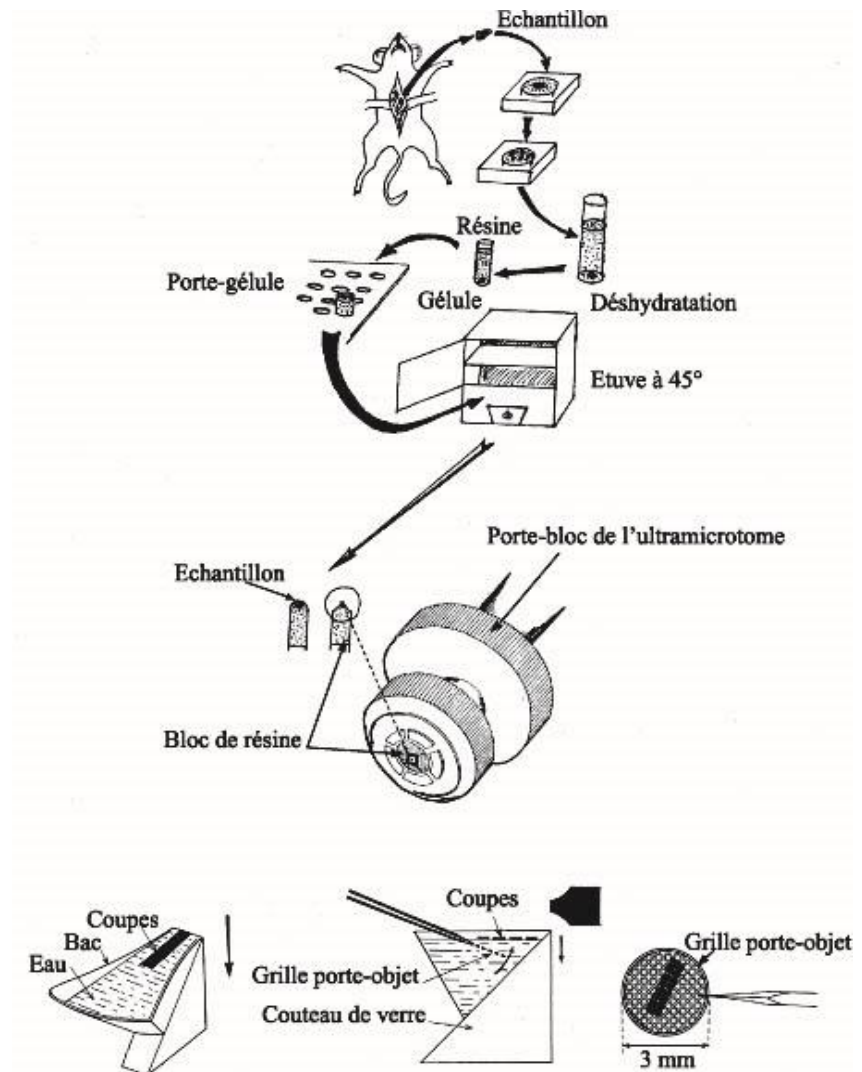
ETAPES DE LA TECHNIQUE CYTOLOGIQUE

- 1. Fixation de l'échantillon**
- 2. Déshydratation**
- 3. Imprégnation**
- 4. Inclusion**
- 5. Coupe**
- 6. Contraste**
- 7. Observation**

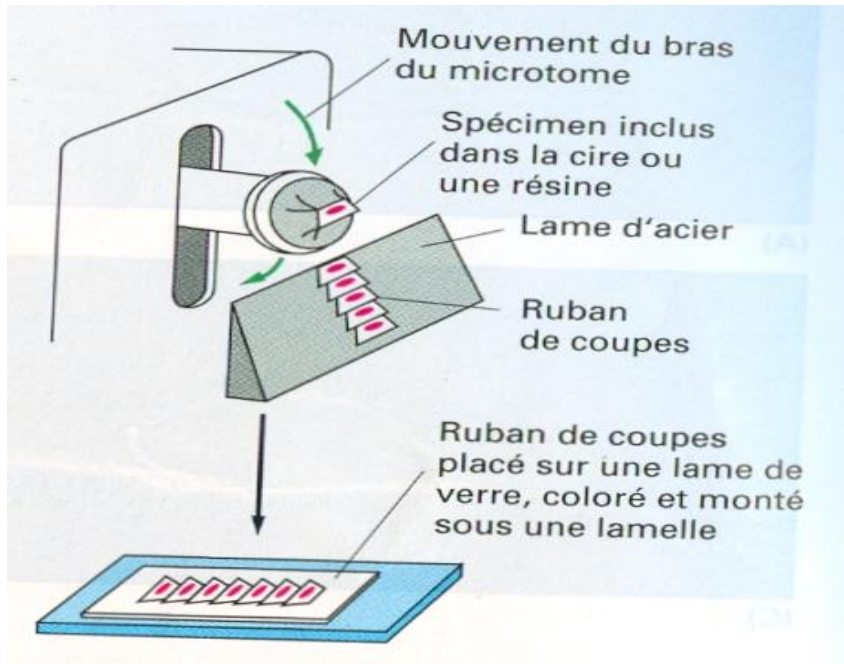
Remarque: Ne pas retenir les étapes

Objectif 5 : Décrire les techniques microscopiques et les domaines de leurs applications

TECHNIQUES MICROSCOPIQUES ELECTRONIQUES: Technique **coupes minces** (Figure 2/6)



Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique**

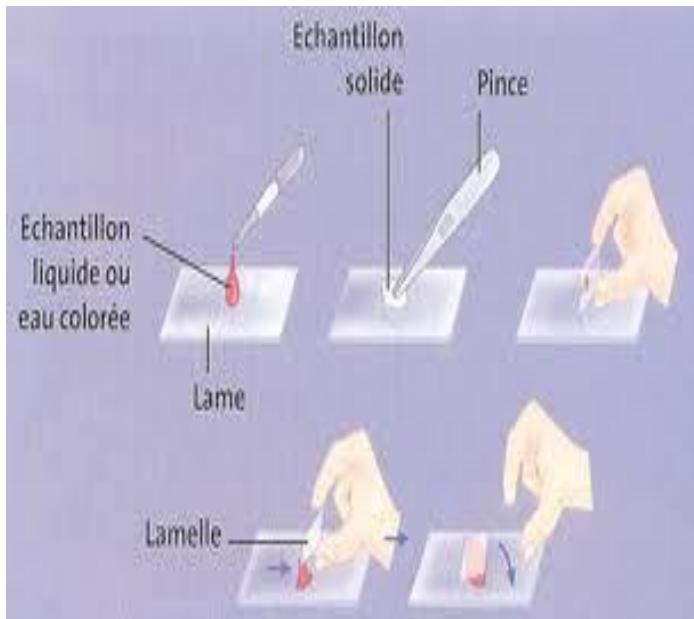


Comparaison technique histologique (à gauche) et cytologique (à droite)

Les **coupes** sont réalisées à l'aide d'appareils adaptés (**ultramicrotome** en remplacement du microtome).

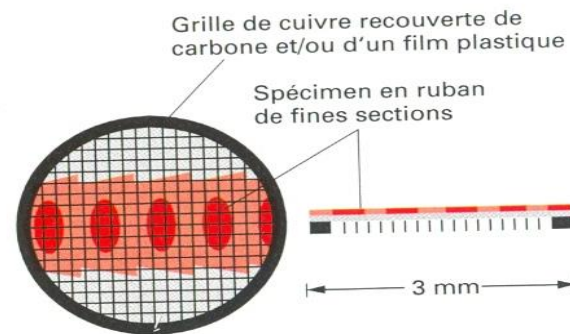
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique**

Mp: récupération des coupes sur lames en verre



MET : récupération des coupes sur grilles métalliques (3mm Ø)

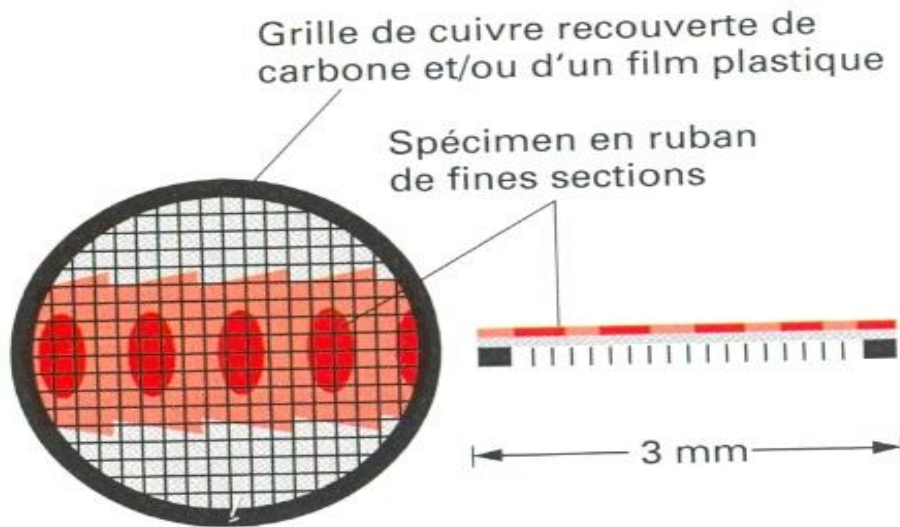
RECUPERATION DES COUPES SUR GRILLE METALLIQUE



Comparaison technique histologique et cytologique

Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique**

RECUPERATION DES COUPES SUR GRILLE METALLIQUE

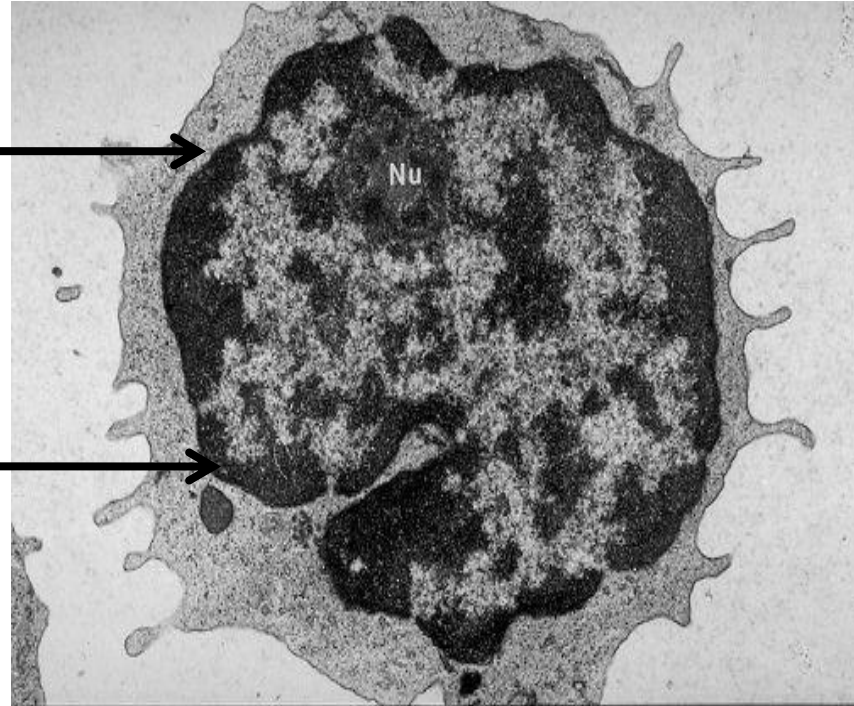


Technique cytologique récupération des coupes sur grilles métalliques (3mm Ø)

Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique et coloration positive**

Zones claires:
électrons transmis

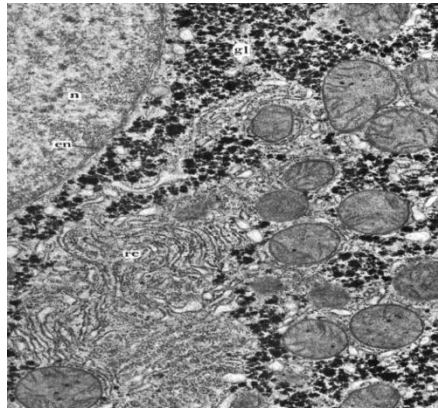
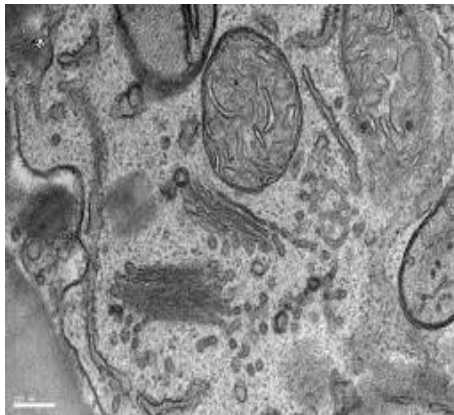
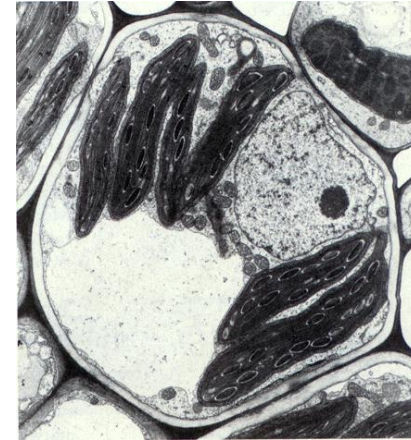
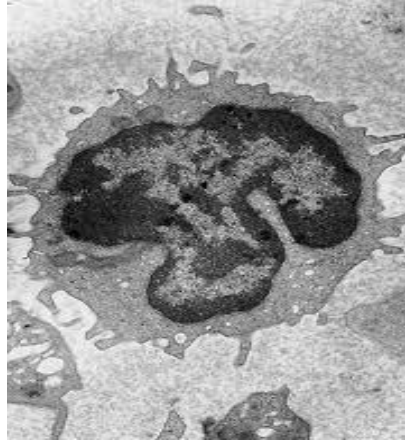
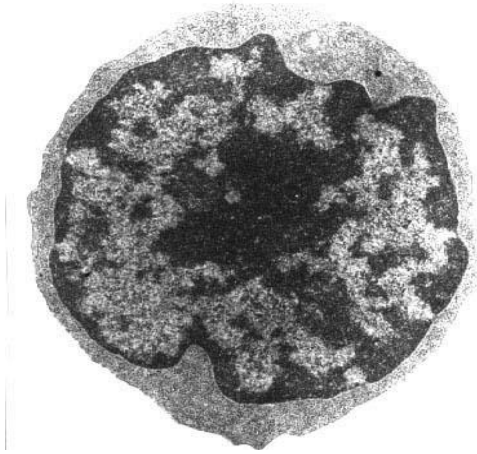
Zones denses opaques aux
électrons : e réfléchis



Ultrastructure d'un monocyte sanguin après contraste positif
X 20 000

Dans la technique cytologique on parle de **coloration ou contraste métallique / positive**

Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique et coloration positive**



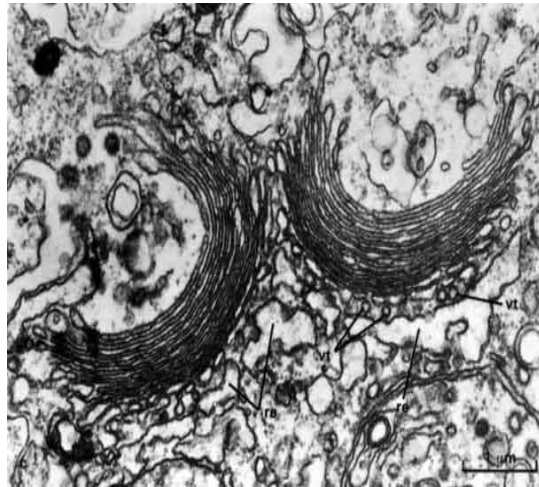
Application : étude ultrastructurale de cellules entières ou de portions cellulaires (voir Figure 2/7)

Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications; **technique cytologique**

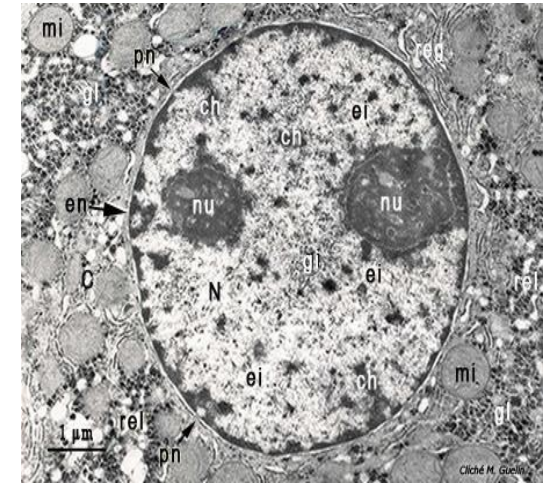
Application : **étude ultrastructurale des organites**



Ultrastructure d'une
mitochondrie



Ultrastructure de
l'appareil de Golgi



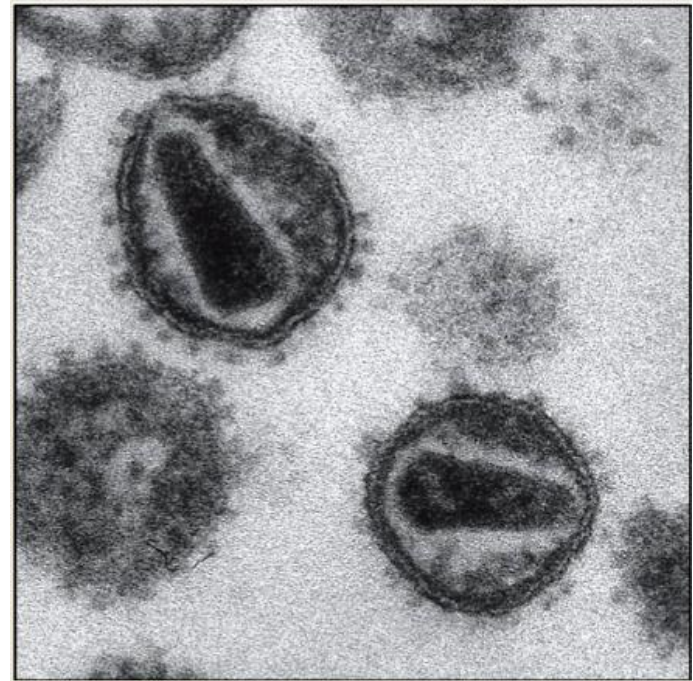
Ultrastructure d'un
noyau

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique cytologique et coloration positive

Application : étude ultrastructurale des microorganismes



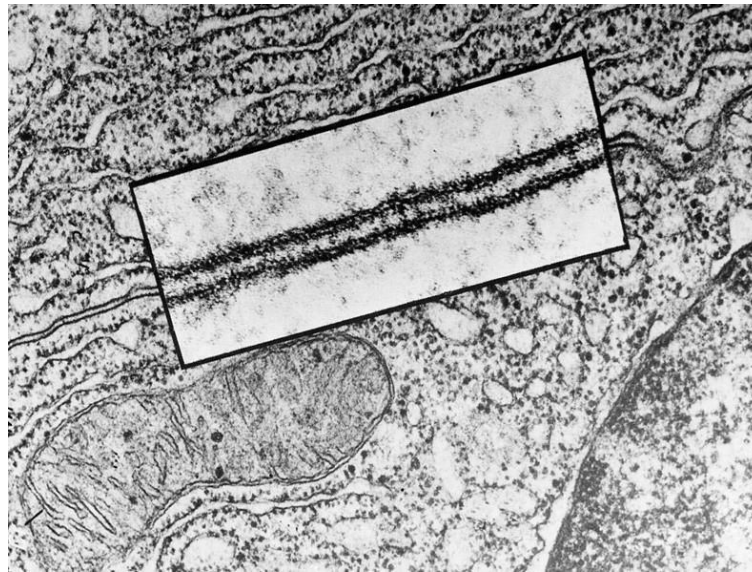
Bactérie 70 000 x



Virus du sida dans la cellule hôte

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications; **technique cytologique et coloration positive**

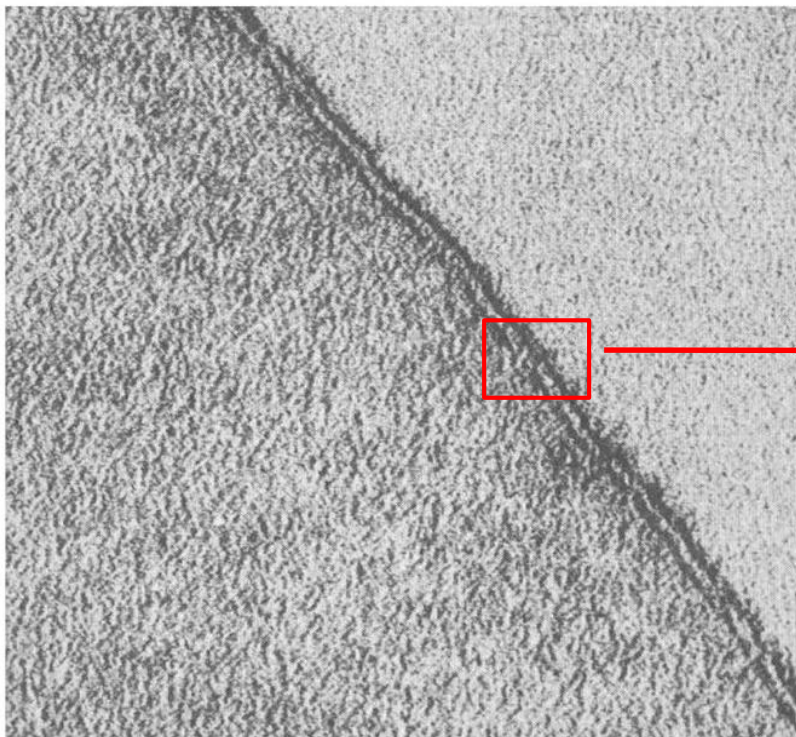
Application : étude ultrastructurale des membranes cellulaires



Ultrastructure de la membrane du REG

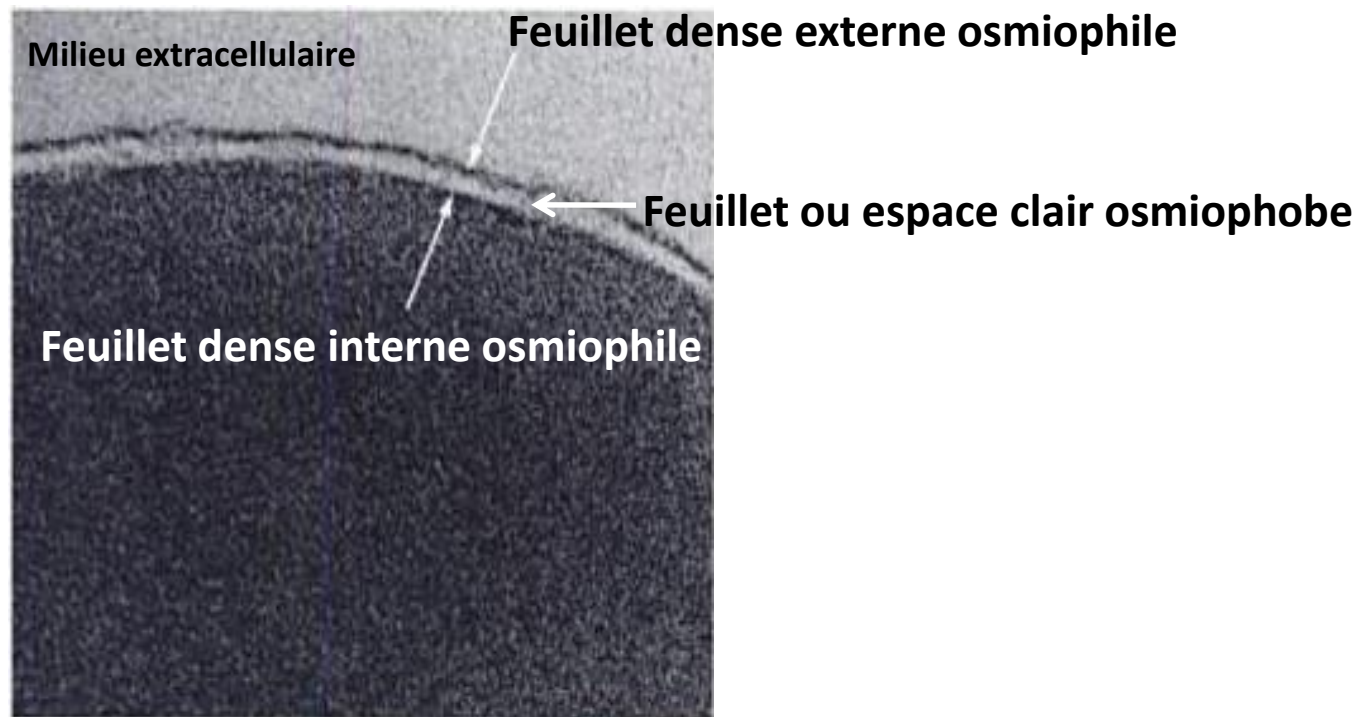
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique et coloration positive**

Application : étude ultrastructurale de la membrane plasmique après coupe mince et coloration positive



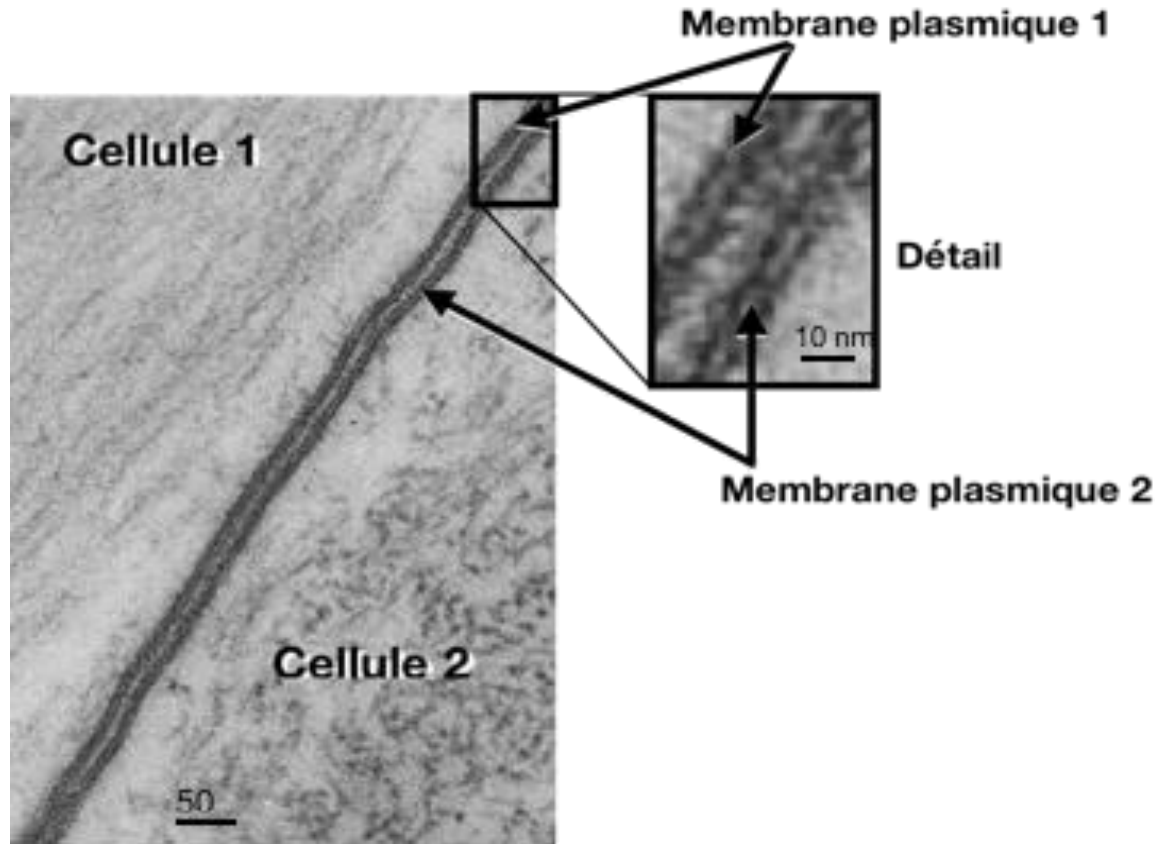
Ultrastructure de la membrane: **aspect tristratifié**

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique**



Ultrastructure de la membrane plasmique : **aspect tristratifié**

Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique**



Après coupe mince et coloration positive **l'observation au MET des membranes plasmiques des Eucaryotes (ainsi que celle des Bactéries, indiquent un aspect tristratifié** (voir chapitre membrane plasmique).

Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques/ Cryodécapage (MEB)**

Le microscope électronique à balayage



Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques/ Cryodécapage (MEB)**

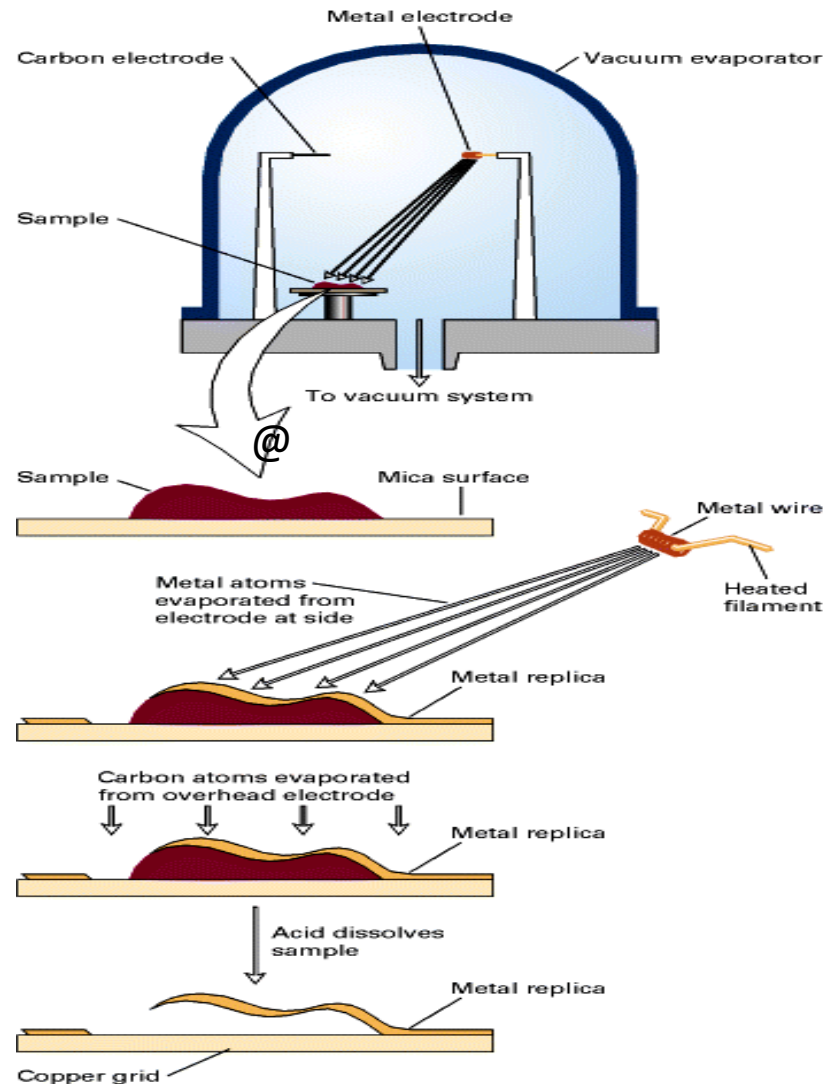
LA TECHNIQUE **REPLIQUE/ CRYODECAPAGE**

Etapes (*lire paragraphes 4/2*):

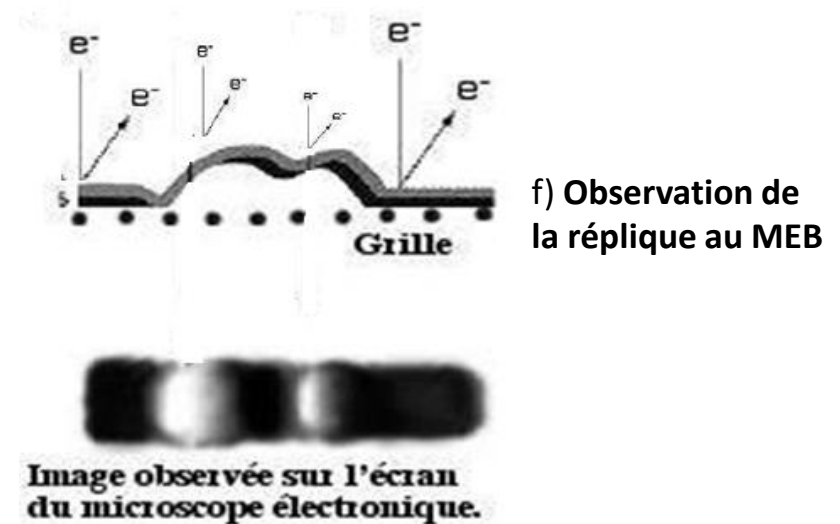
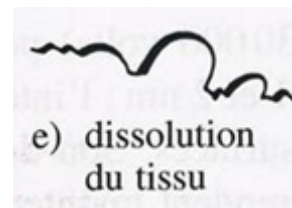
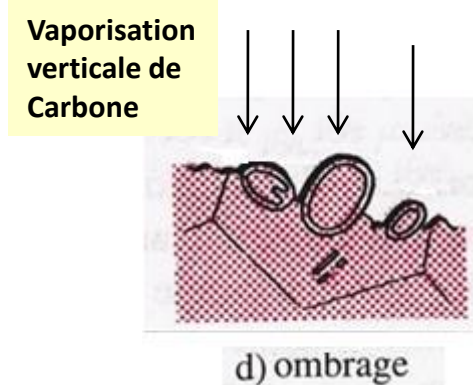
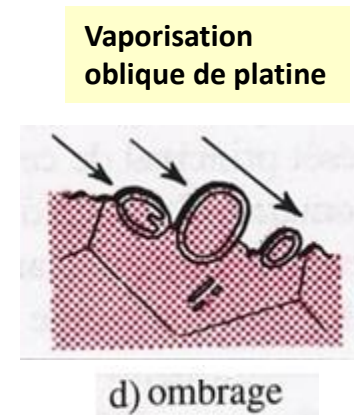
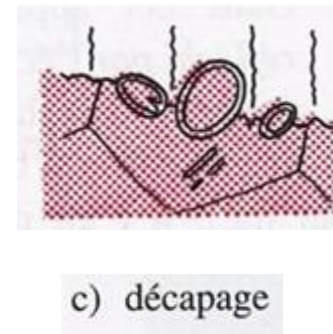
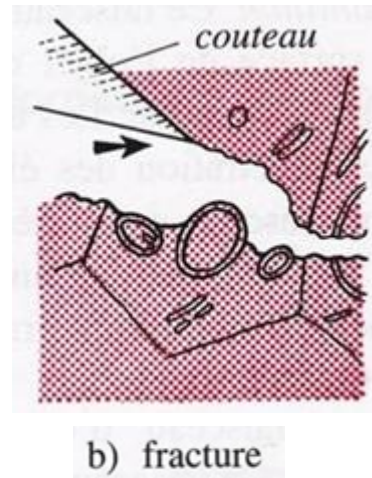
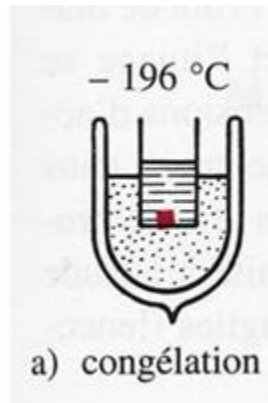
1. Fixation physique de l'échantillon
2. Cryofracture (si besoin)
3. Décapage
4. Ombrage métallique
5. Obtention de la réplique
6. Observation

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques/ Cryodécapage (MEB)**

Technique des répliques (Figure 2/8)



Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**



Etapes de la technique de cryodécapage

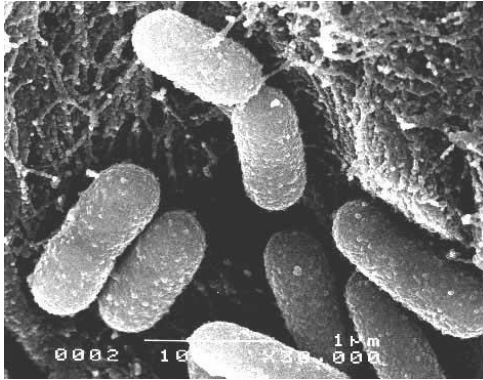
Remarque: Les étapes préparatoires à la réplique se déroulent dans une enceinte fermée.

Objectif 5 :Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**

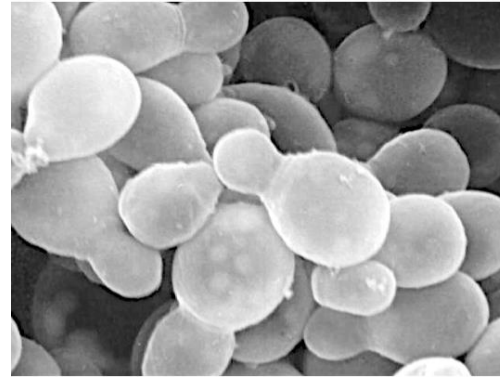


**Aspect en 3 D des êtres vivants microscopiques allergisants:
les Acariens**

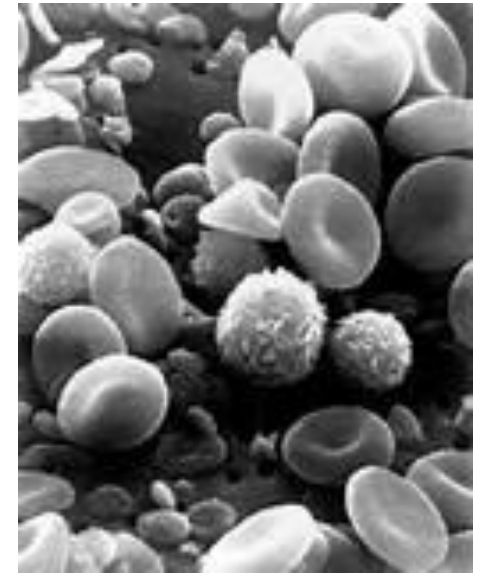
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**



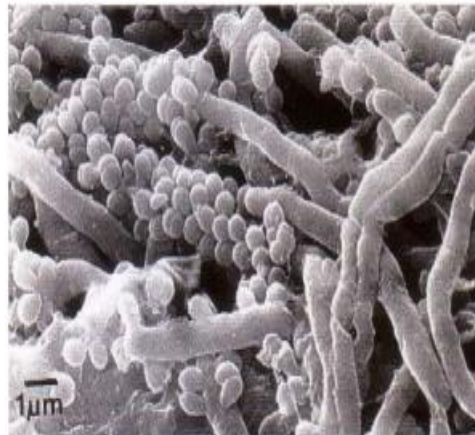
BACTERIES



LEVURES
(Champignons
microscopiques)



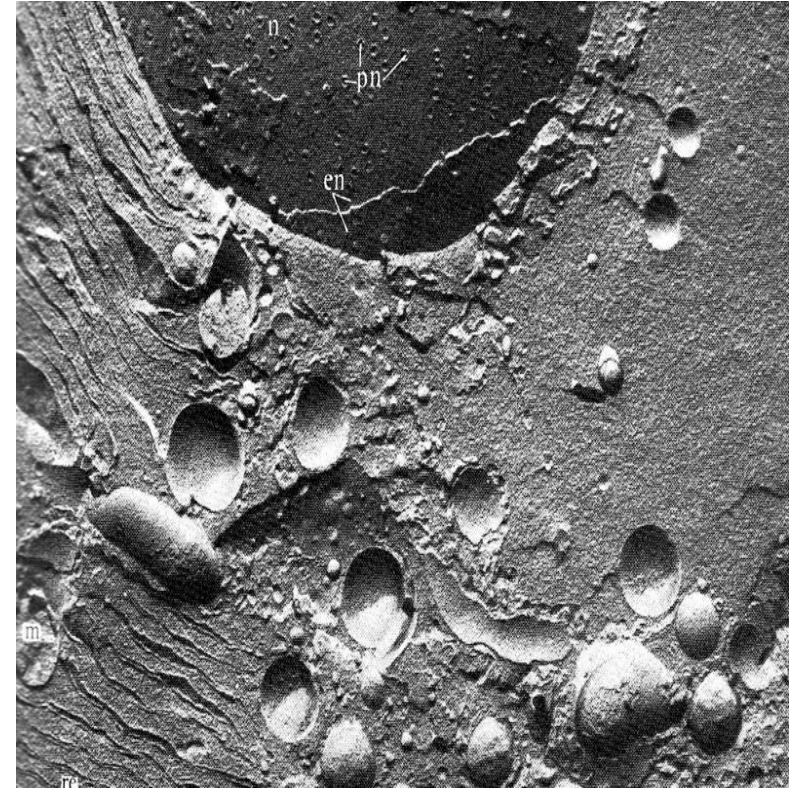
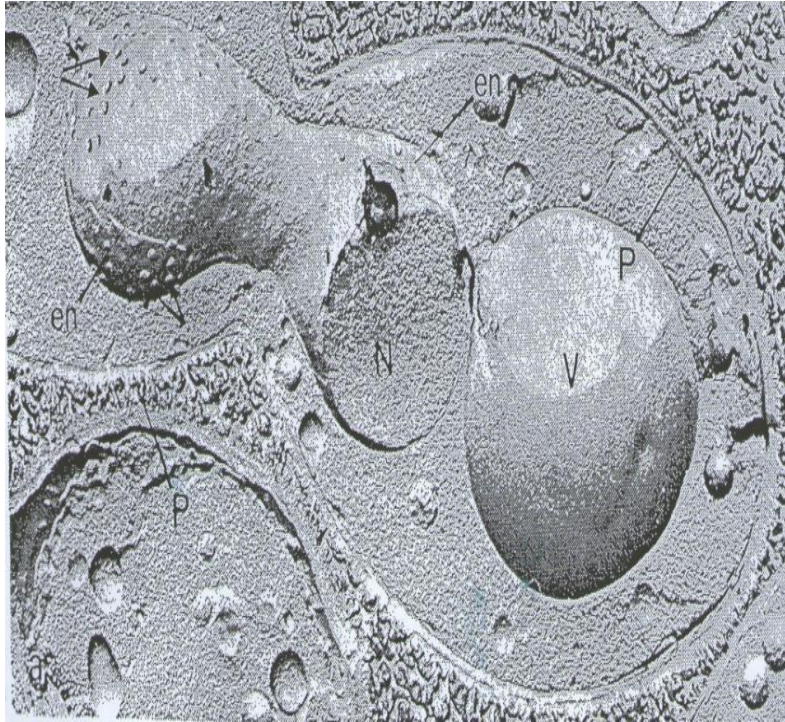
Tissu sanguin humain



**Plaque dentaire (Colonies
bactériennes) recouvrant la
surface de l'émail**

Micrographies tridimensionnelles : bactéries, levures, cellules du tissu sanguin, plaque dentaire observées au MEB.

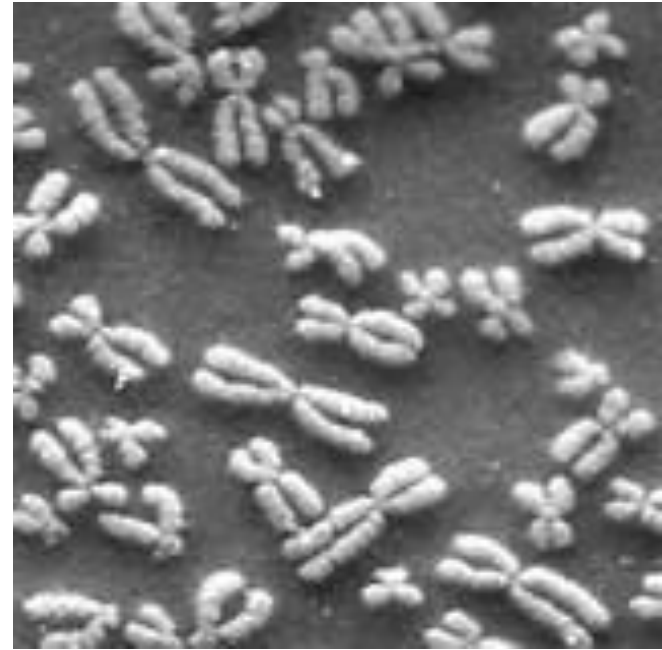
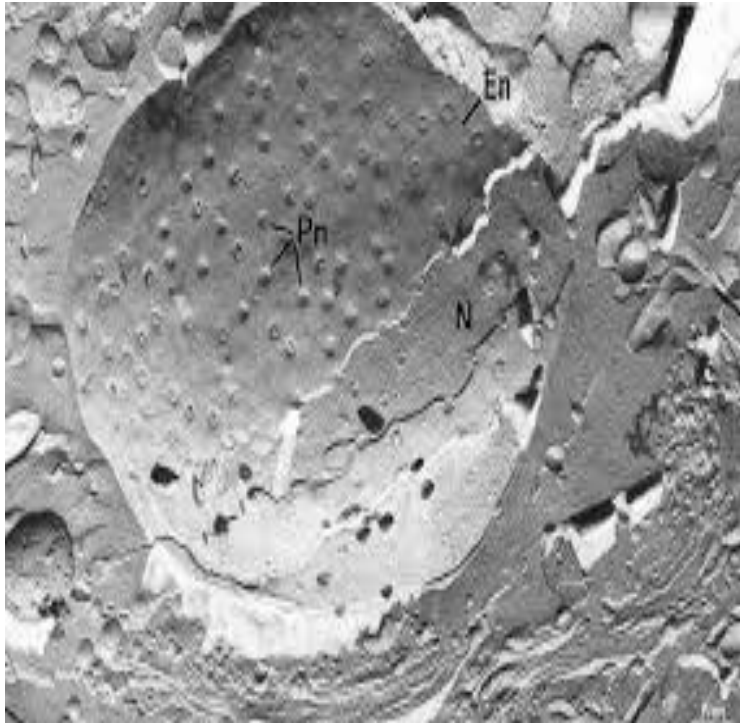
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**



Répliques de **surfaces cellulaires internes** observées au MEB: cellule de levure en division observées (à gauche), portion de cellule hépatique (à droite).

P= paroi , V= vésicule, En= Enveloppe nucléaire, Pn= pore nucléaire, N= Noyau

Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**

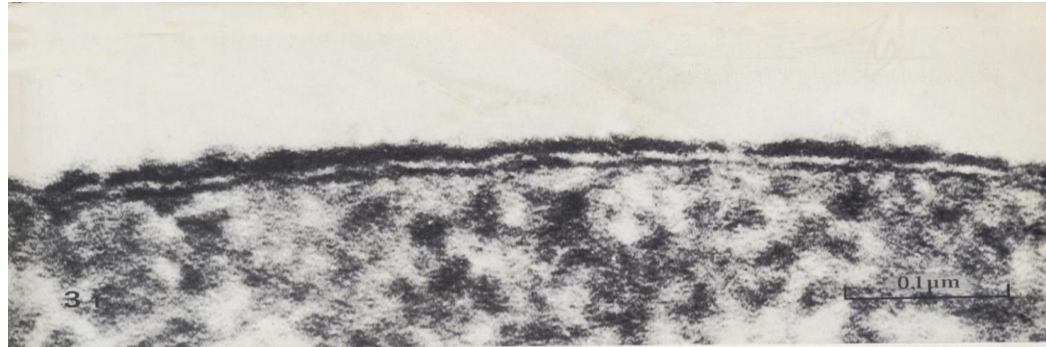


Vue d'une réplique d'un noyau et d'une plaque chromosomique après cryodécapage (voir Figure 2/9).

En= Enveloppe nucléaire Pn= pore nucléaire/ N= Noyau

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**

COUPES MINCES
Coloration Positive



CRYODECAPAGE
Ombrage



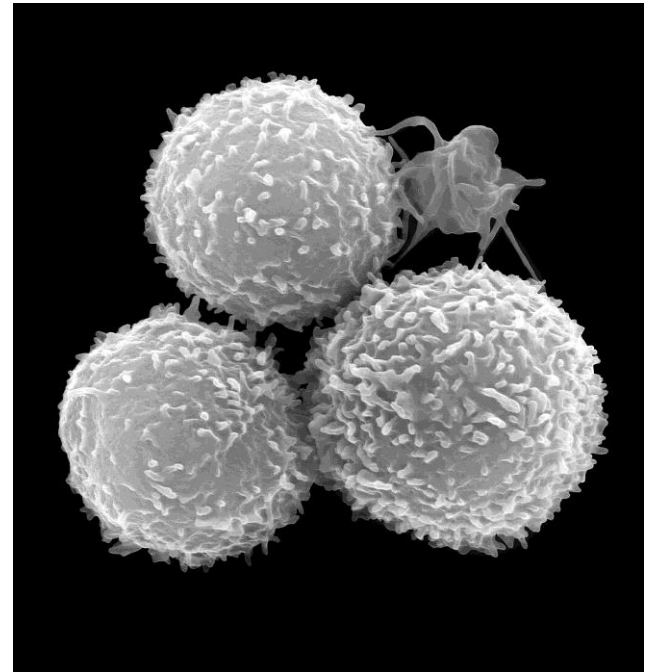
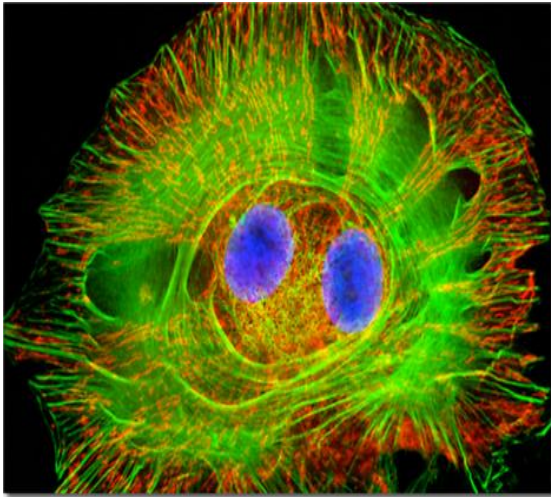
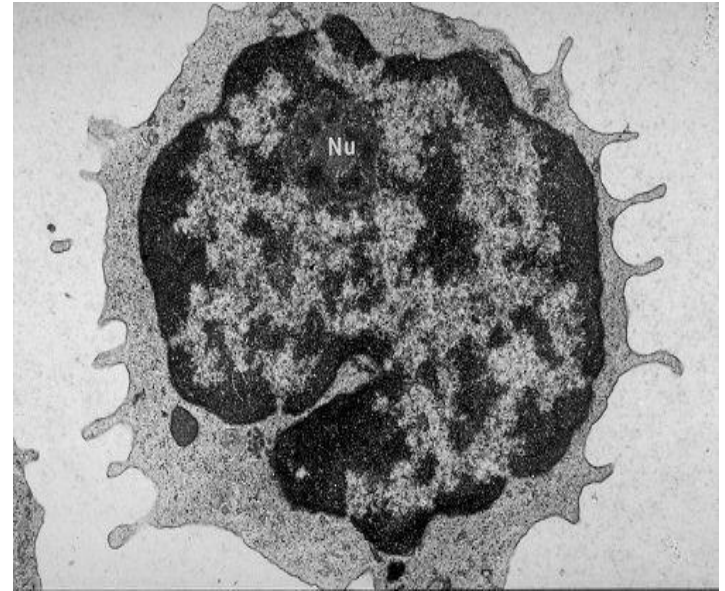
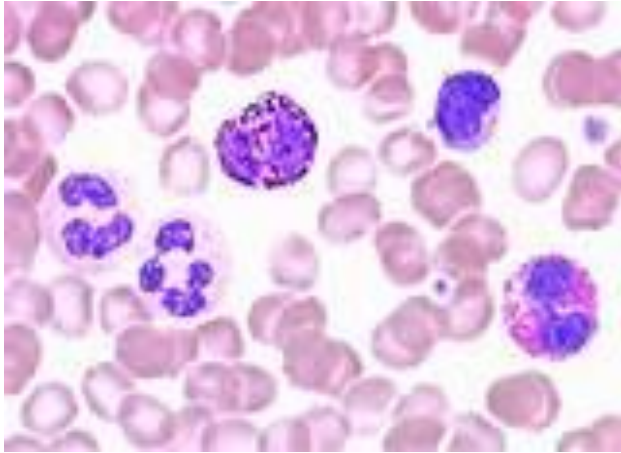
Comparaison aspects de la membrane plasmique du globule rouge au MET et MEB.

Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique des répliques**



Chaque particule globulaire correspond à l'emplacement d'une protéine membranaire

Figure 3 /4 : Aspect globulaire d'une réplique de membrane plasmique (MEB).



Micrographies de Globules blancs humains observés au mp, au mp à fluorescence, au MET, et MEB