

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)		Réplique à partir de coupes ± 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*):

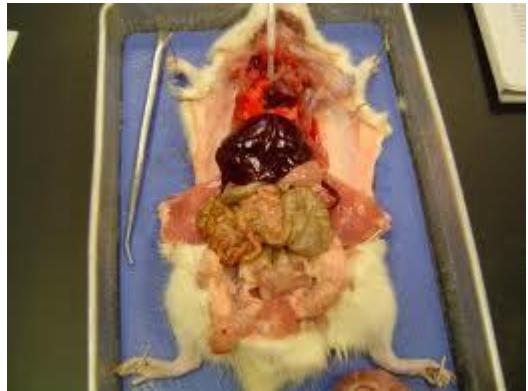
1. Prélèvement et fixation de l'échantillon
2. Déshydratation
3. Imprégnation
4. Inclusion
5. Coupe
6. Contraste
7. Montage et Observation

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



3. Flacons de déshydratation
(bains d'alcool)



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

2. Fixation chimique



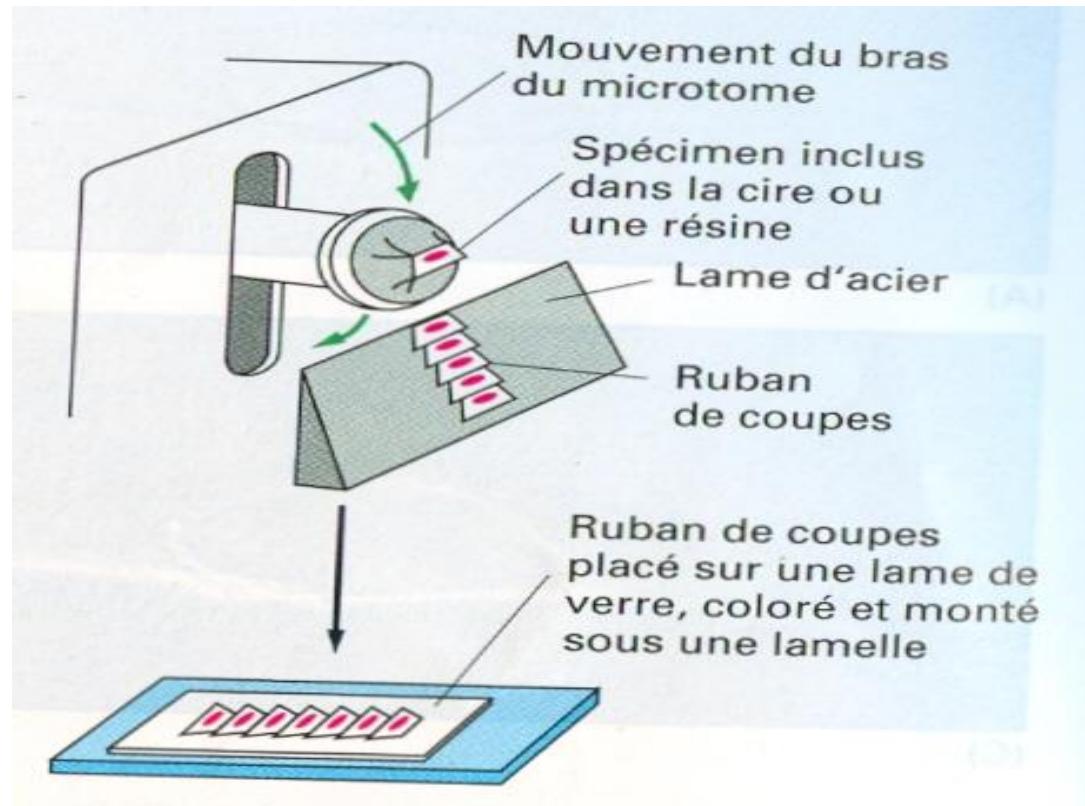
4. Inclusion à la paraffine
chaude



5. Préparation de
Blocs de paraffine
contenant
l'échantillon

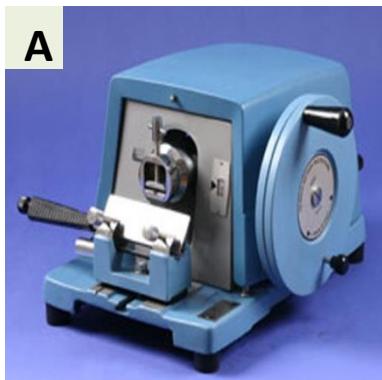
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique **coupe histologique**

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

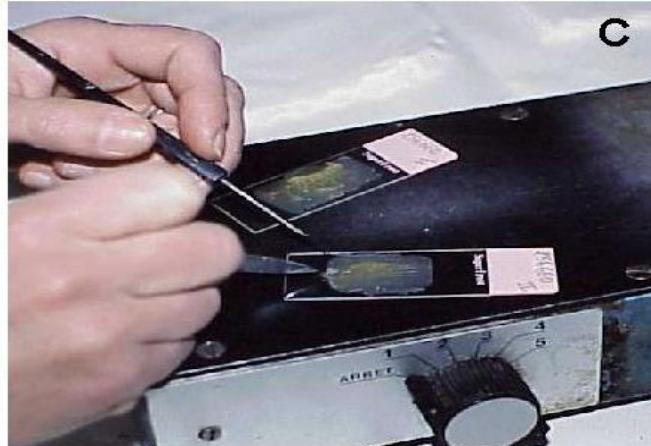
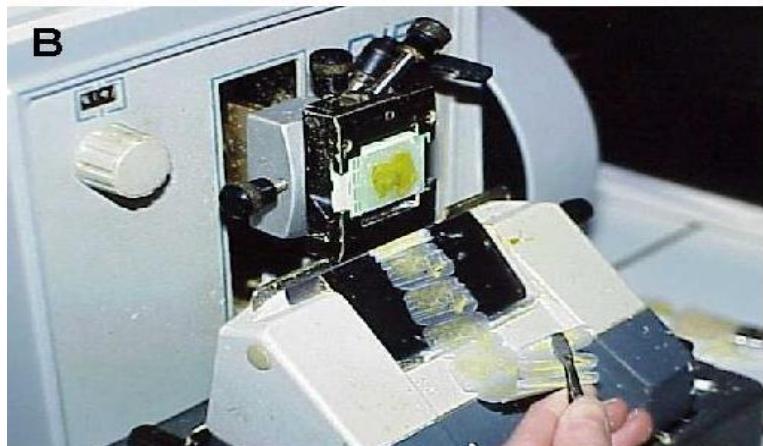


Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique coupe histologique

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



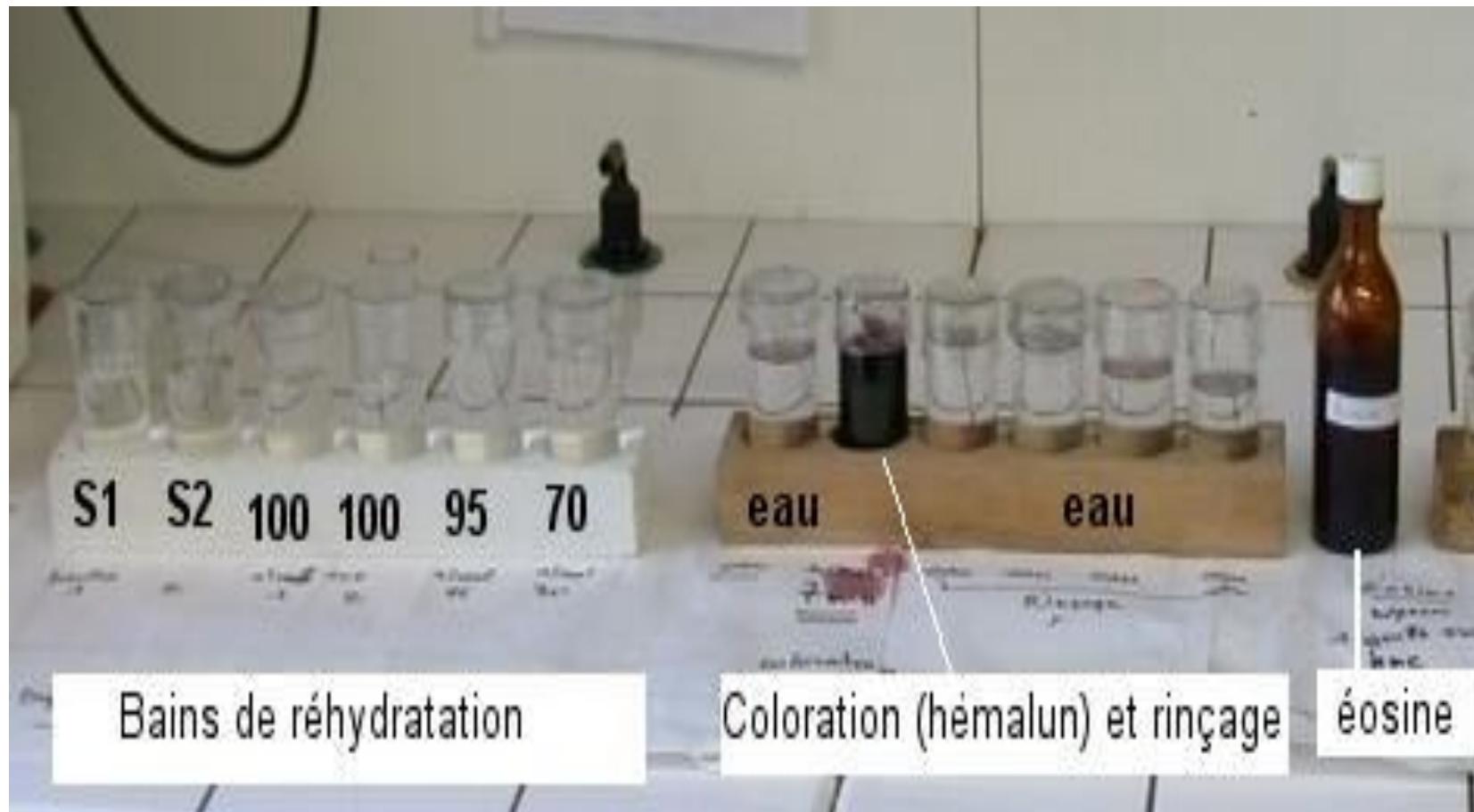
Ruban de coupes



A: Microtomie B et C : Récupération et étallement 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

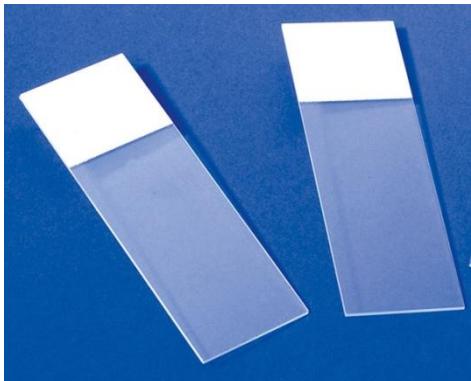


Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications : Technique **coupe histologique**



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**



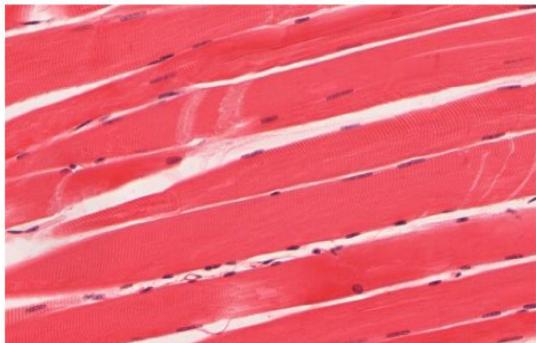
ETAPES DE LA TECHNIQUE DE COUPES HISTOLOGIQUE :
6.l'observation microscopique

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

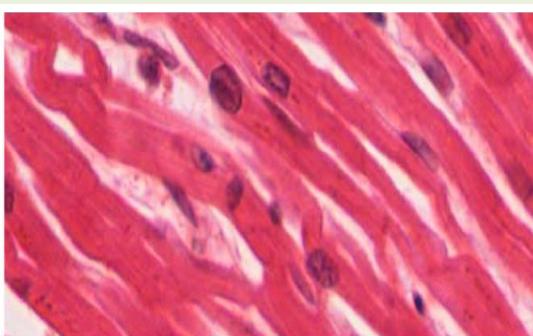


CONSERVATION DES PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES

Aspects microscopiques de quelques tissus



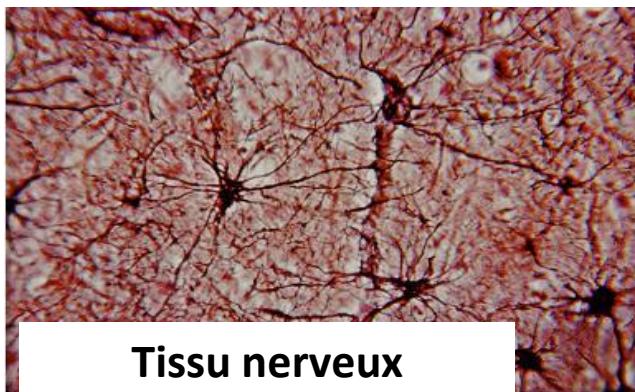
Tissu musculaire strié squelettique



Tissu musculaire strié cardiaque



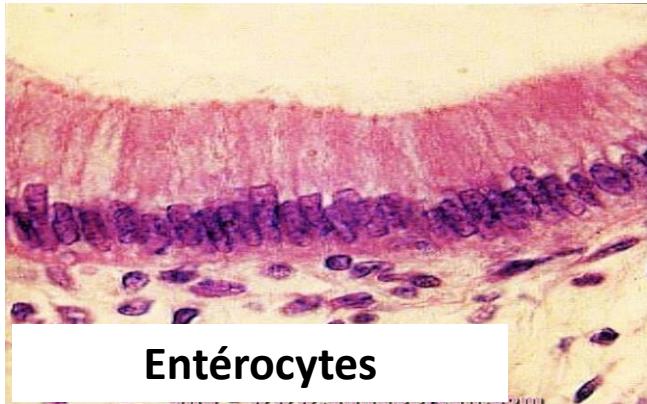
Tissu musculaire lisse



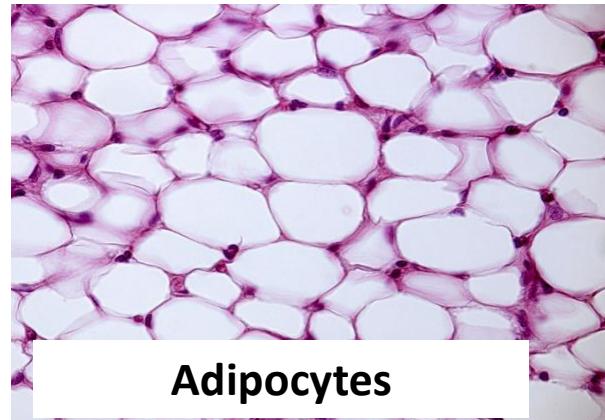
Tissu nerveux



Tissu hépatique



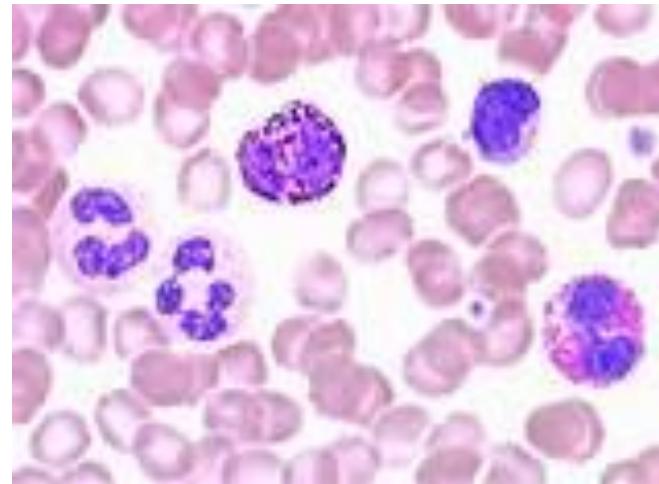
Entérocytes



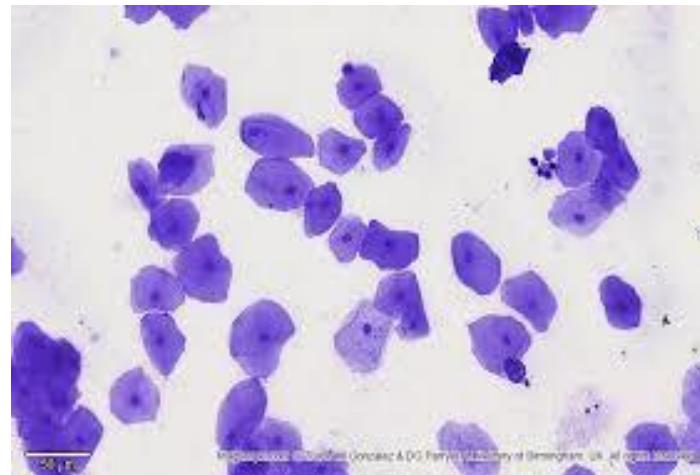
Adipocytes

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

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

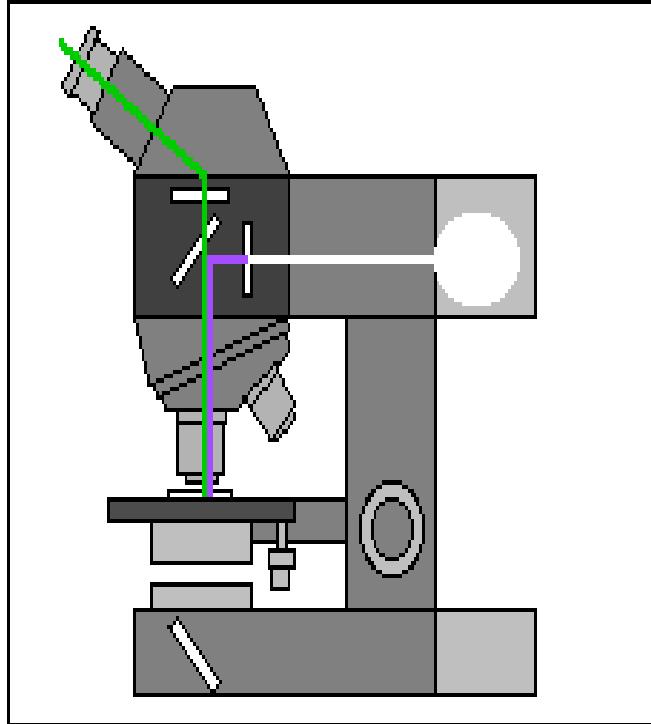


Tissu sanguin

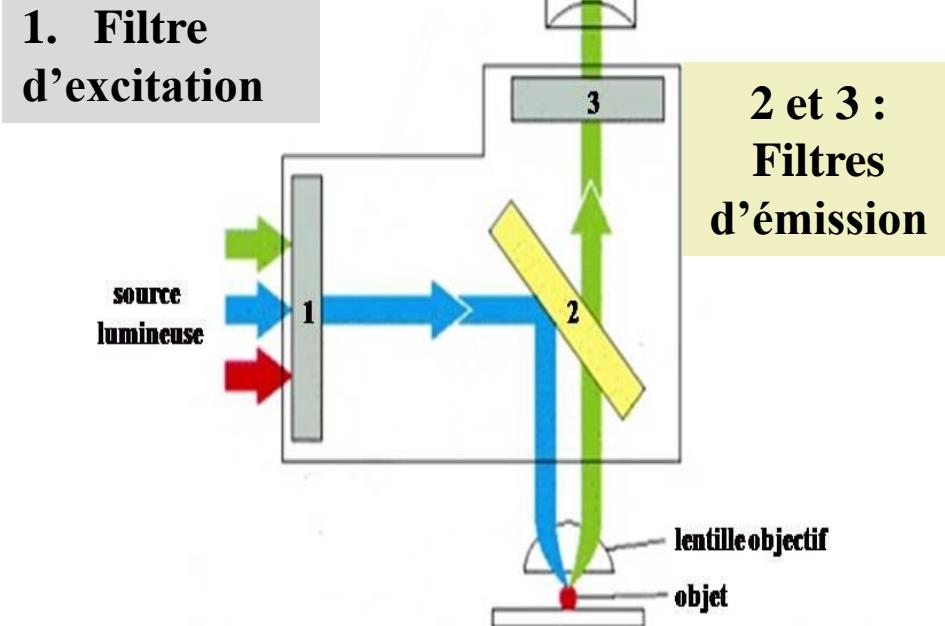


Epithélium buccal

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



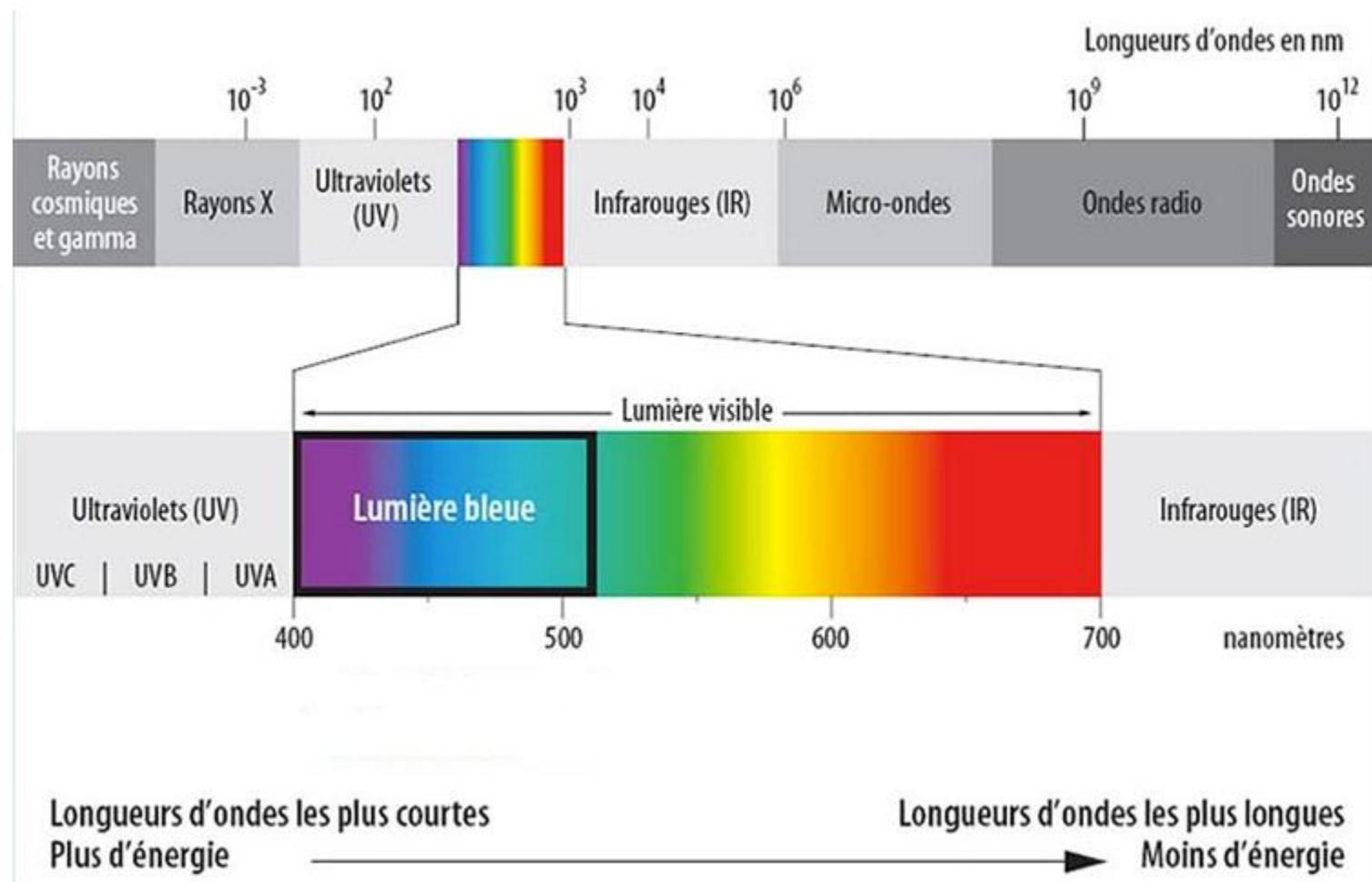
1. Filtre d'excitation



2 et 3 :
Filtres d'émission

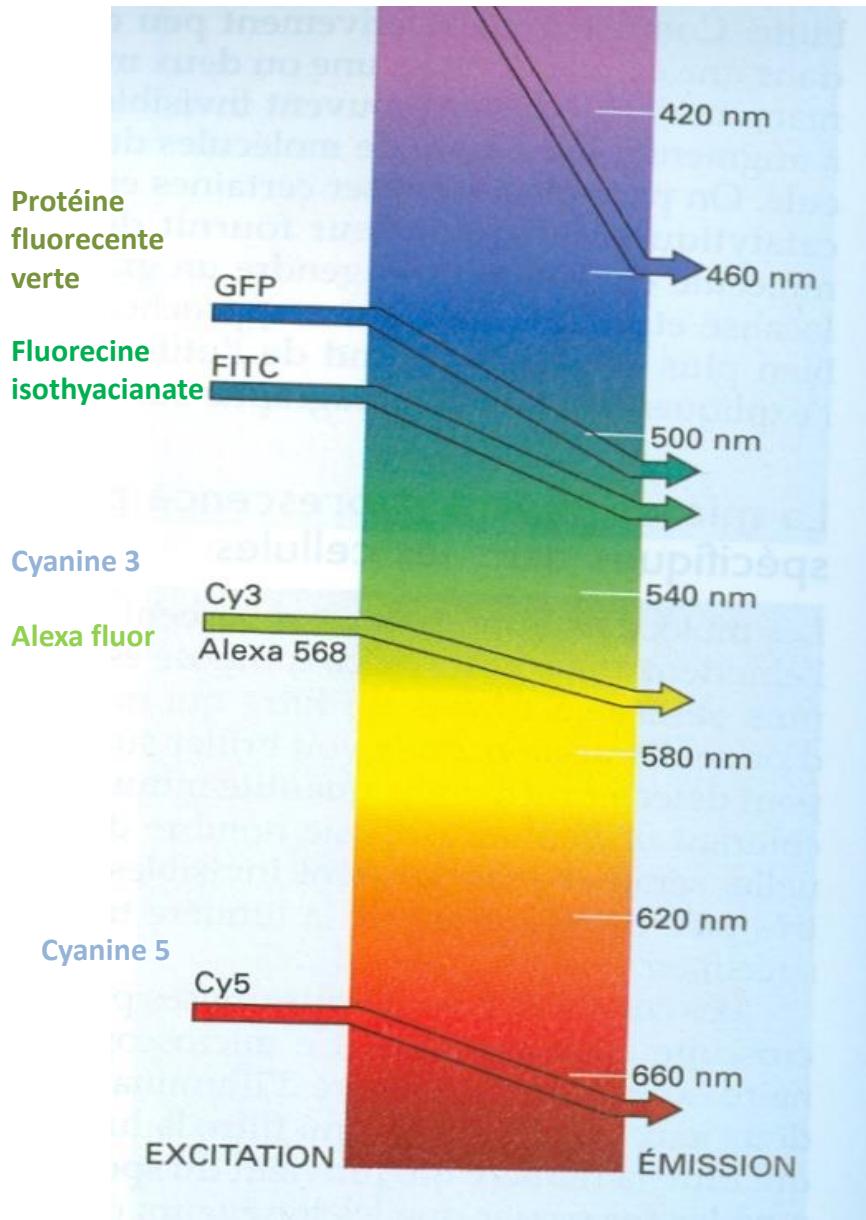
L'observation de la fluorescence n'est possible qu'avec l'utilisation d'un microscope à fluorescence

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



RAPPEL : spectre d'émission de la lumière blanche

CARACTÉRISTIQUES 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 réemet 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 .

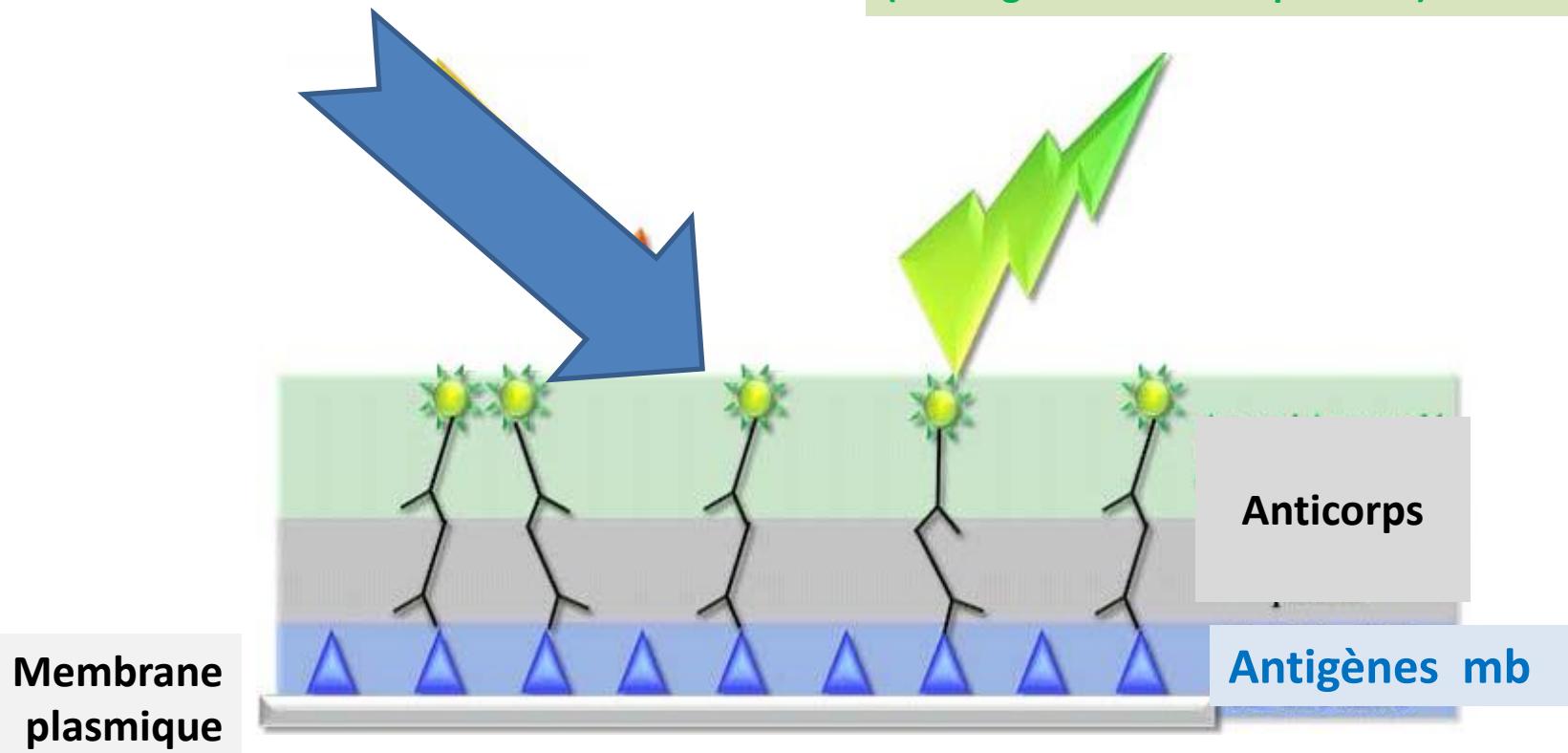
Les lumières émises sont dites de fluorescence ou d'émission .

Lire paragraphe 6/2

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

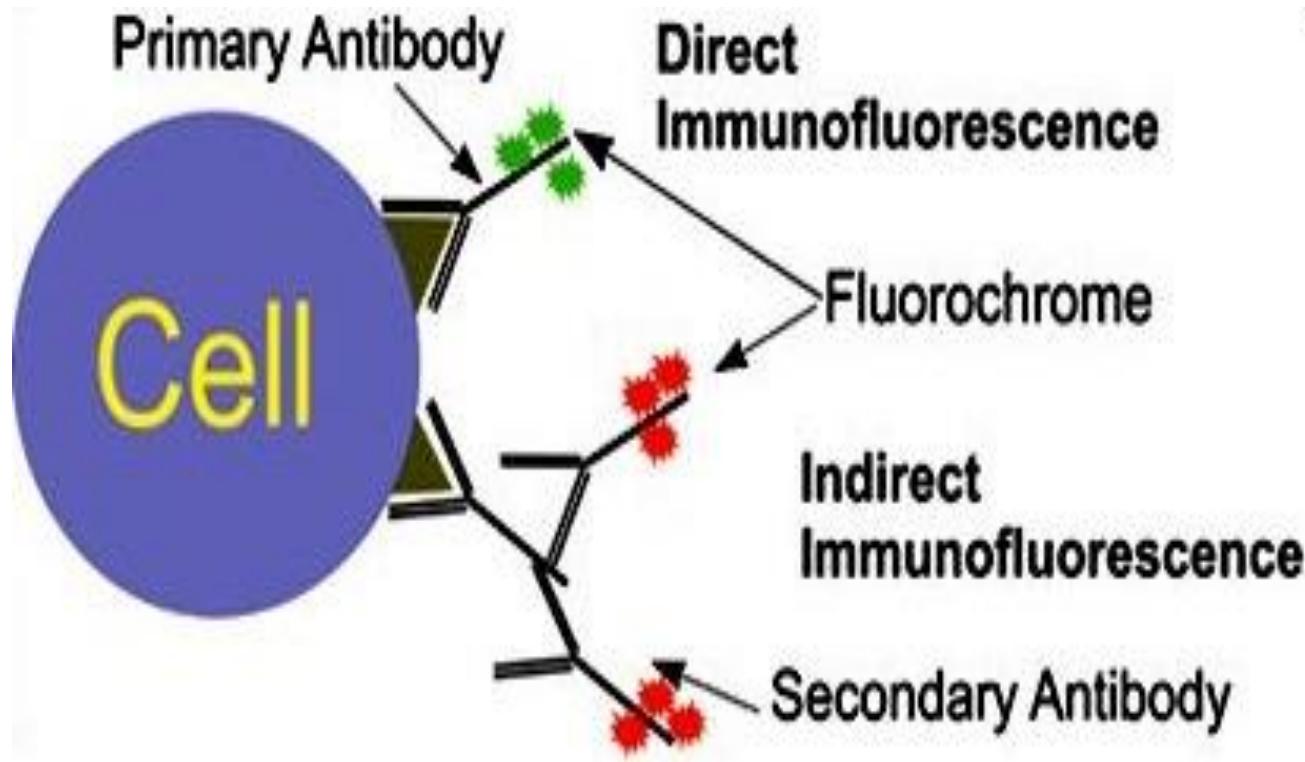
Radiation monochromatique absorbée /incidente de longueur d'onde inférieure

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



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

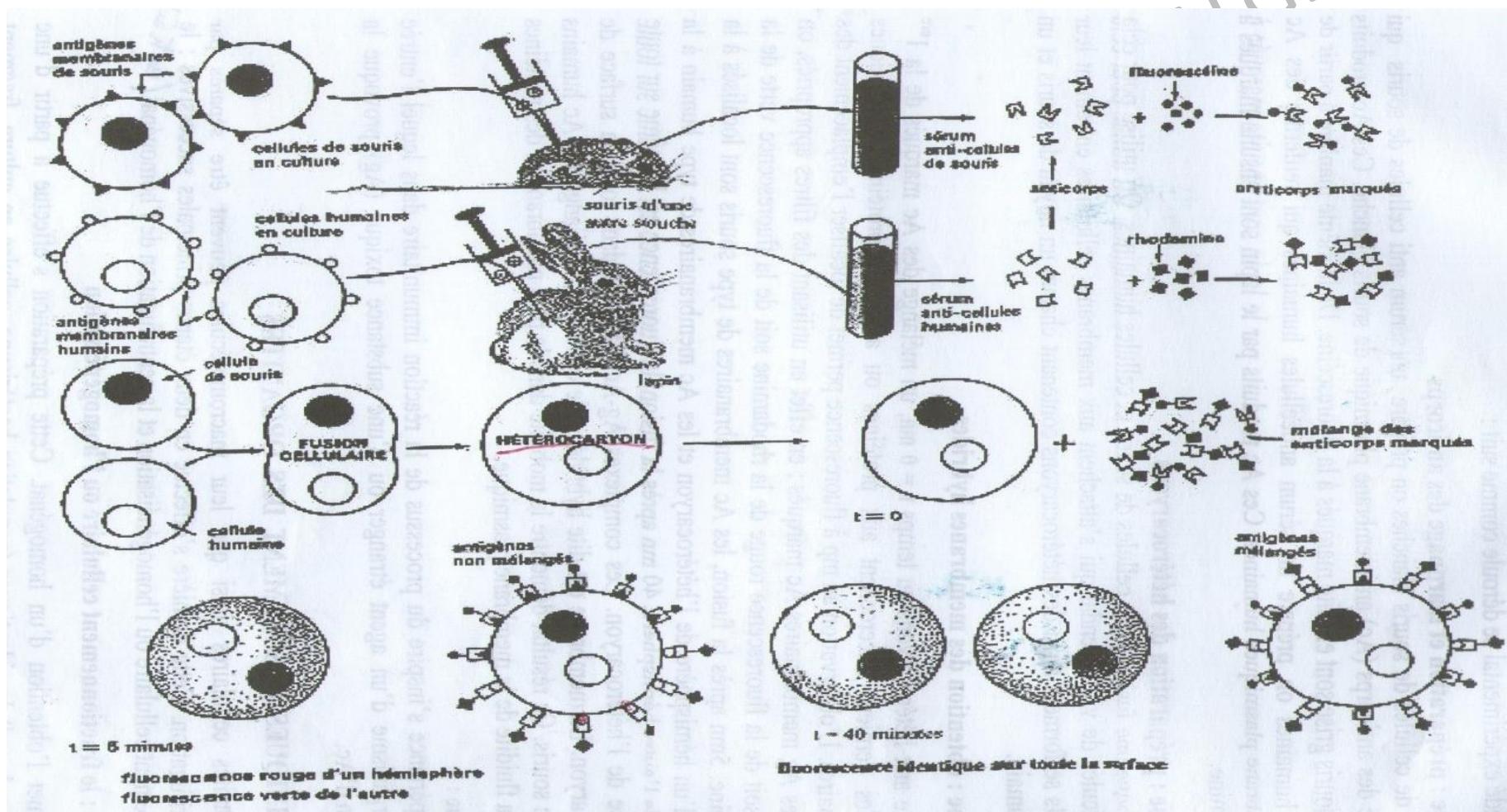
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique d'immunofluorescence



Les deux variétés d'Immunomarquage

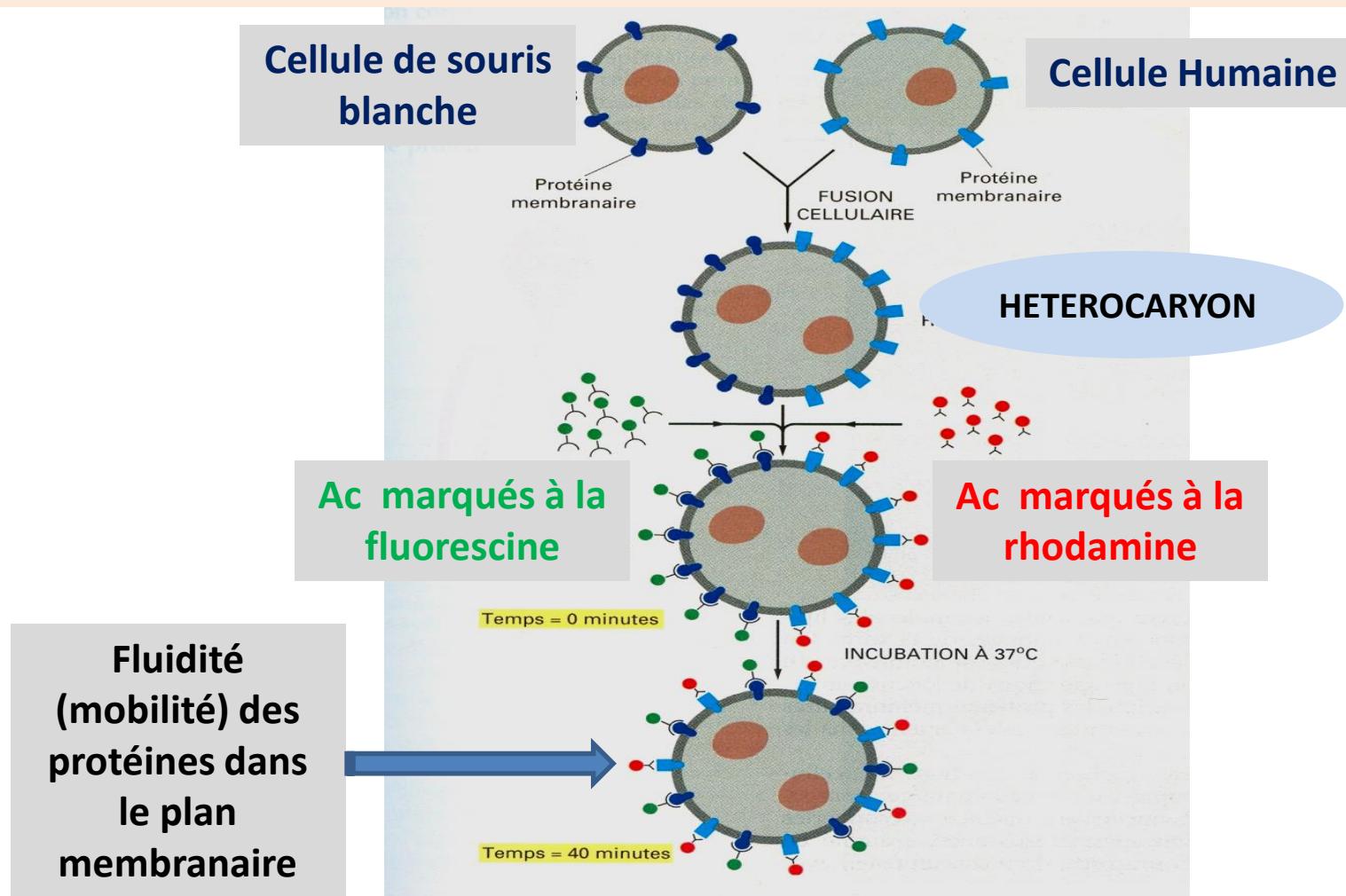
Il existe 2 variétés d'immunofluorescence: directe et indirecte. Dans les 2 cas les principes sont basés sur le marquage des Ac d'où l'appellation d'immunomarquage

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)

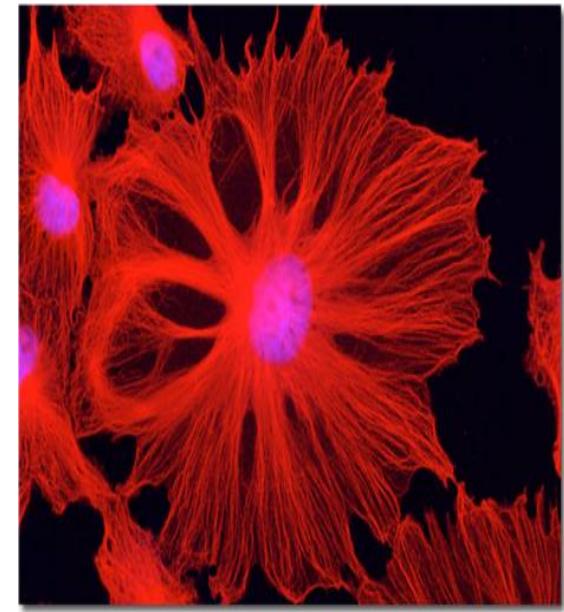
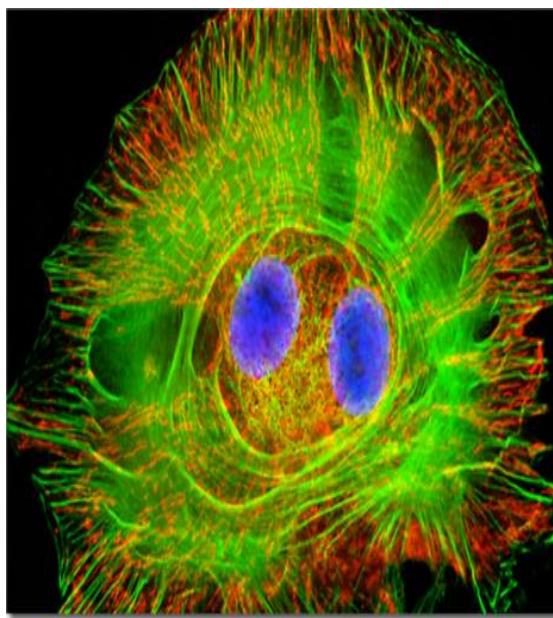
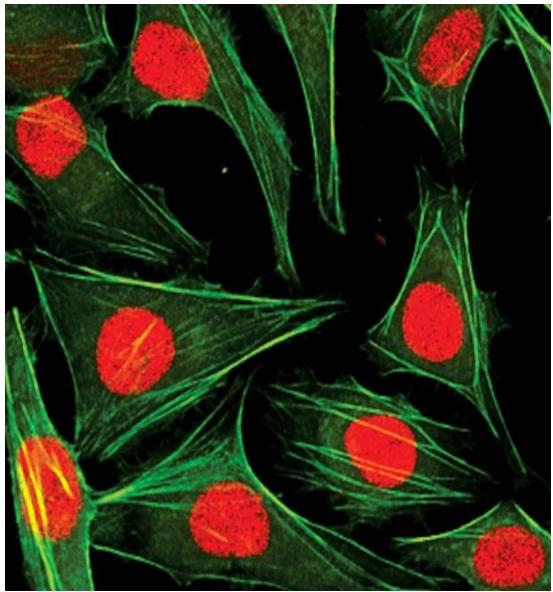
Objectif 5: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique d'immunofluorescence



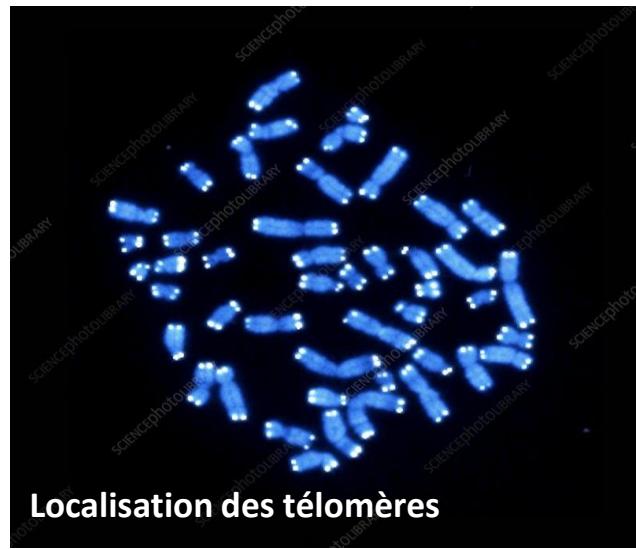
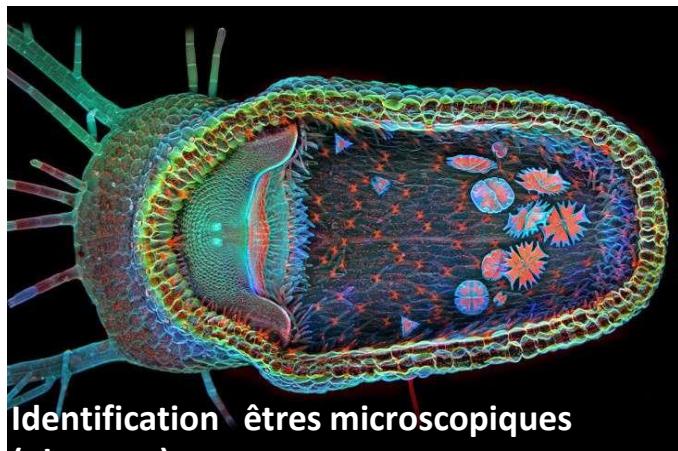
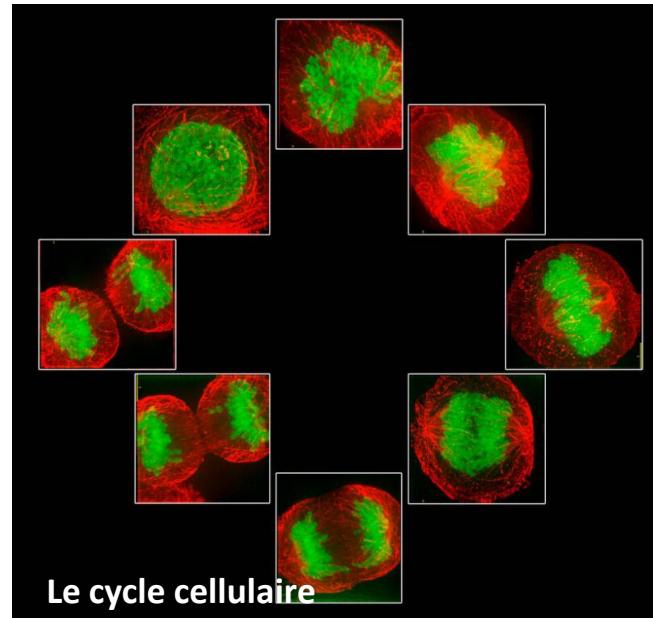
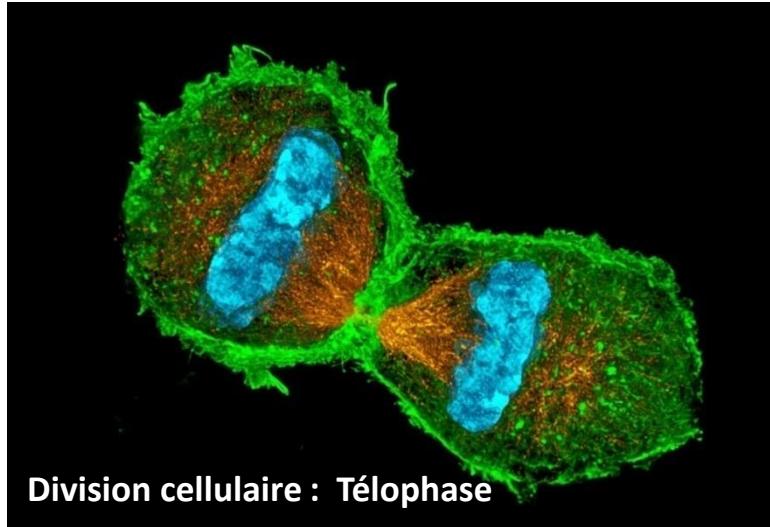
Mise en évidence de la fluidité membranaire (des protéines) par immunofluorescence (*Figure 2/3*).

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

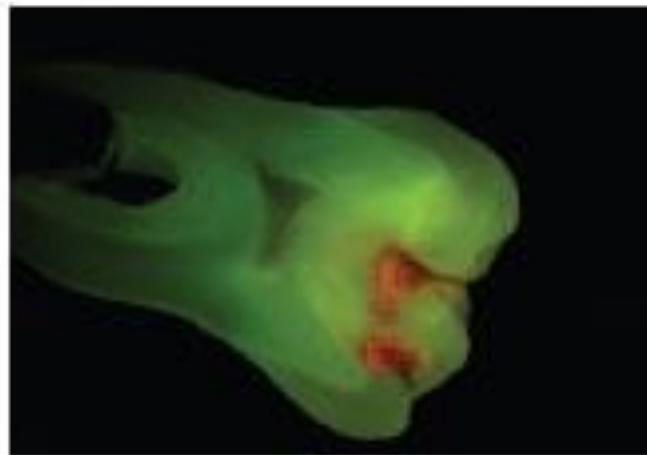
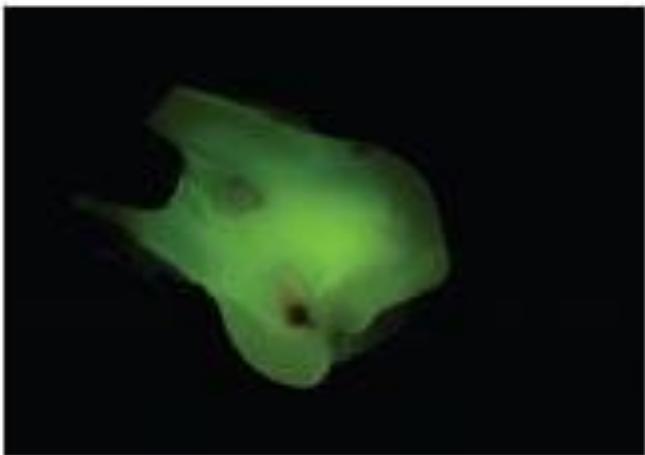
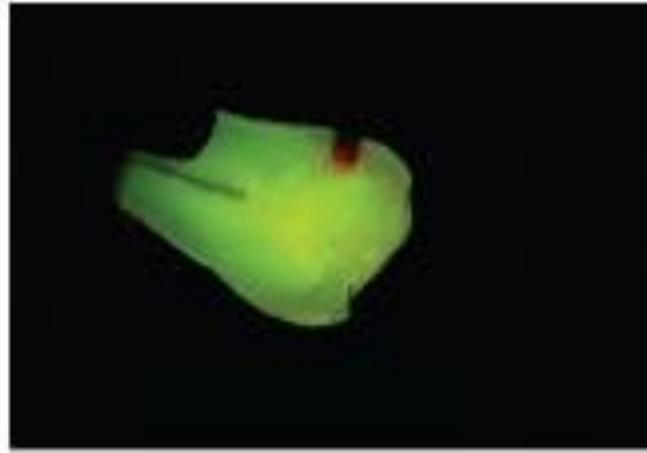
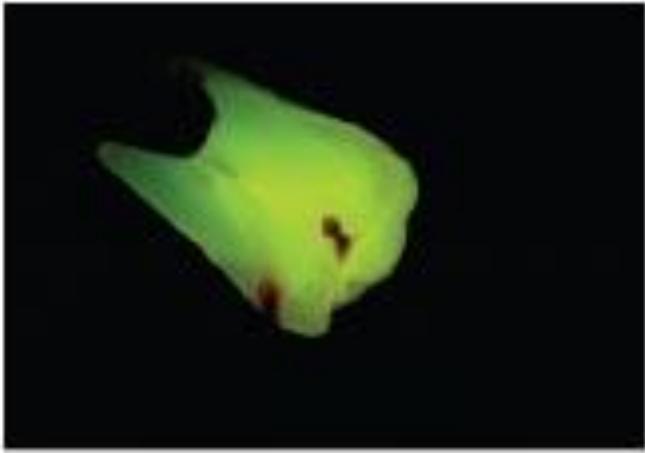
Aspects des protéines du cytosquelette en microscopie à fluorescence



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

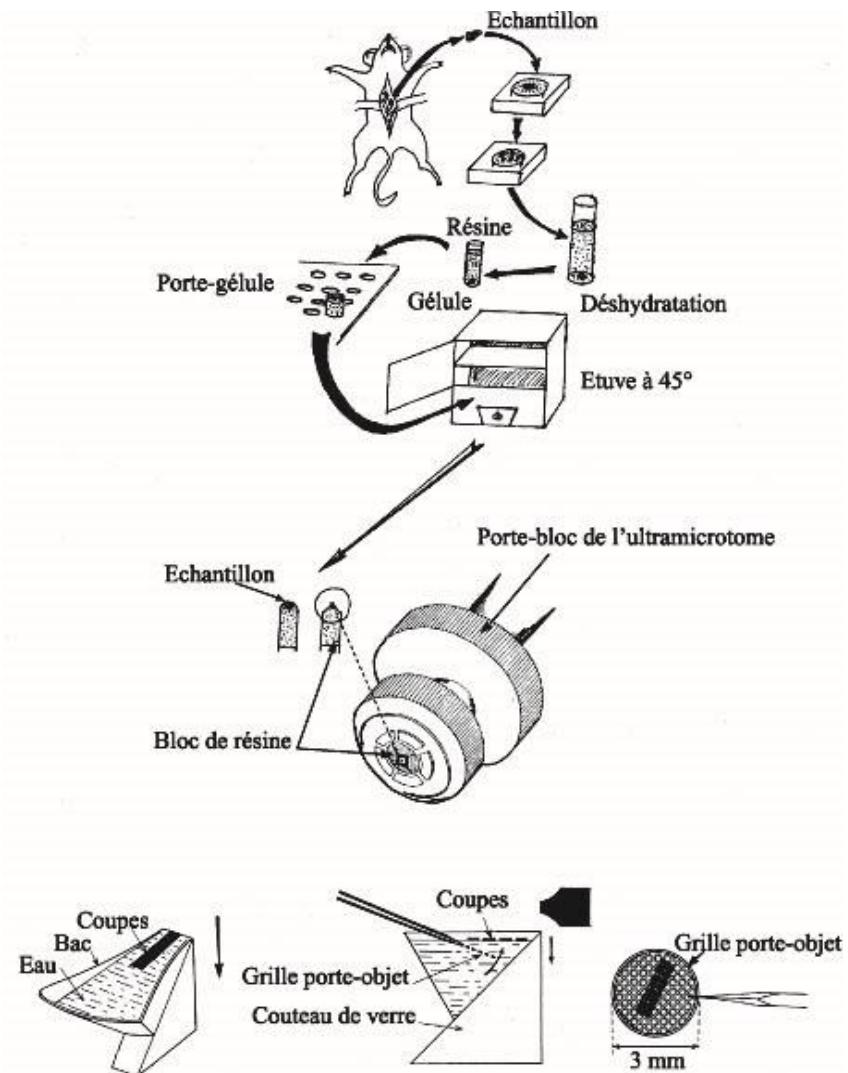
- 1. Fixation de l'échantillon**
- 2. Déshydratation**
- 3. Imprégnation**
- 4. Inclusion**
- 5. Coupe**
- 6. Contraste**
- 7. Observation**

Remarque: Ne pas retenir les étapes

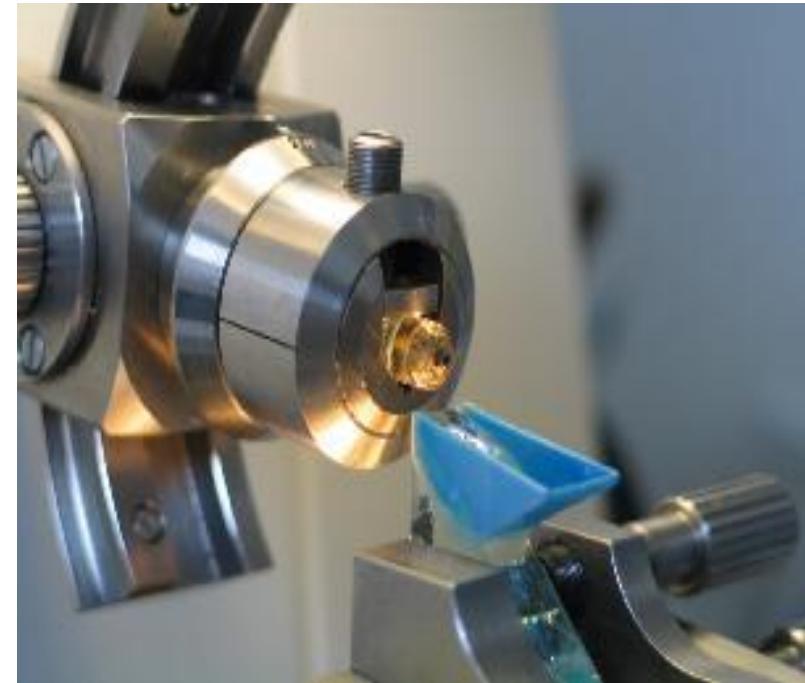
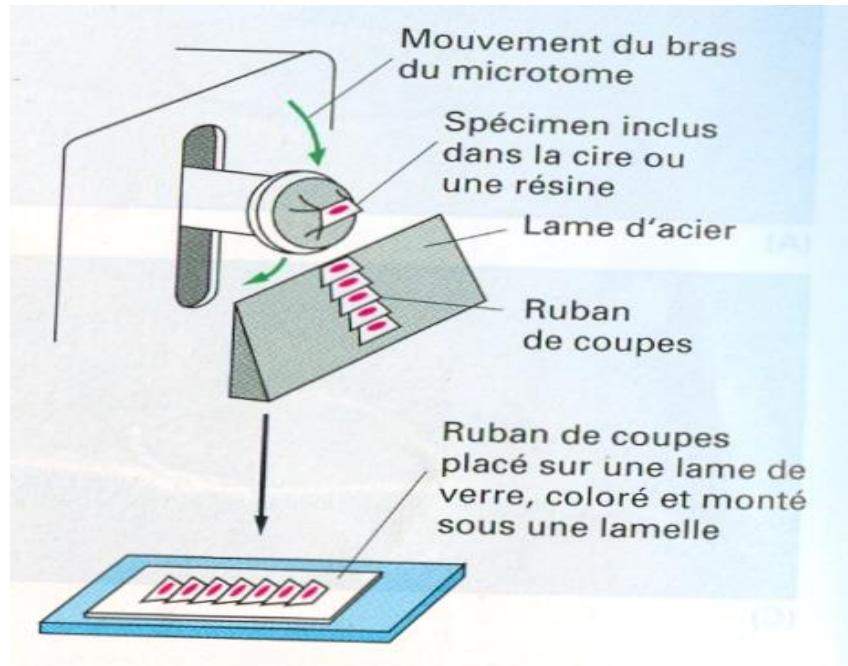
Objectif 5 : Décrire les techniques microscopiques et les domaines de leurs applications

TECHNIQUES MICROSCOPIQUES ELECTRONIQUES:

Technique **coupes minces**
(Figure 2/6)



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

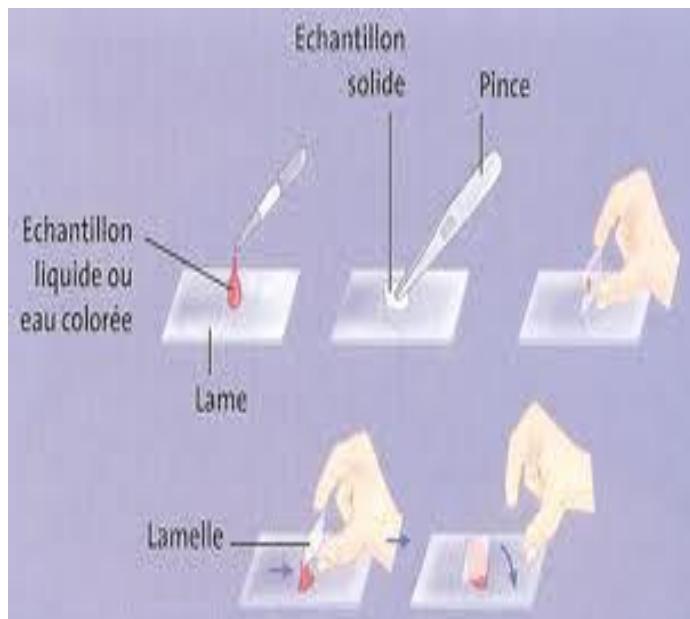


Comparaison technique histologique (à gauche) et cytologique (à droite)

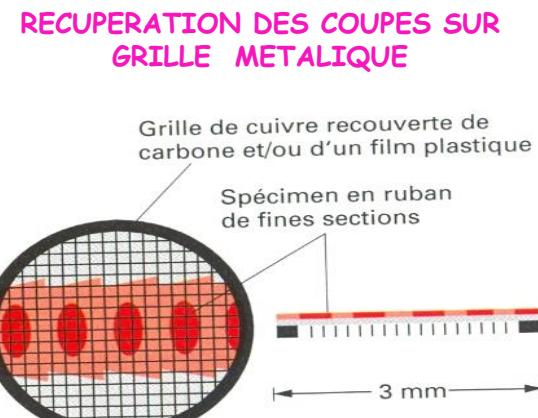
Les coupes sont réalisées à l'aide d'appareils adaptés (ultramicrotome en remplacement du microtome).

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

Mp: récupération des coupes sur lames en verre



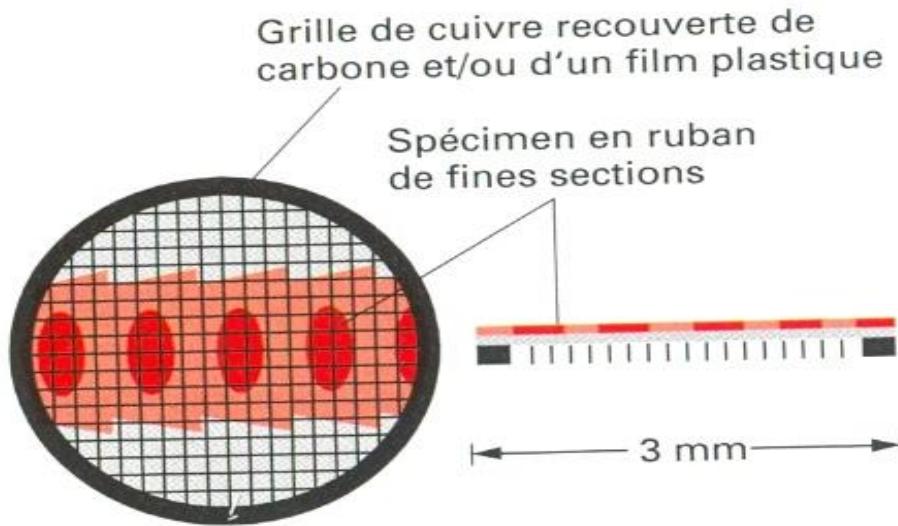
MET : récupération des coupes sur grilles métalliques (3mm Ø)



Comparaison technique histologique et cytologique

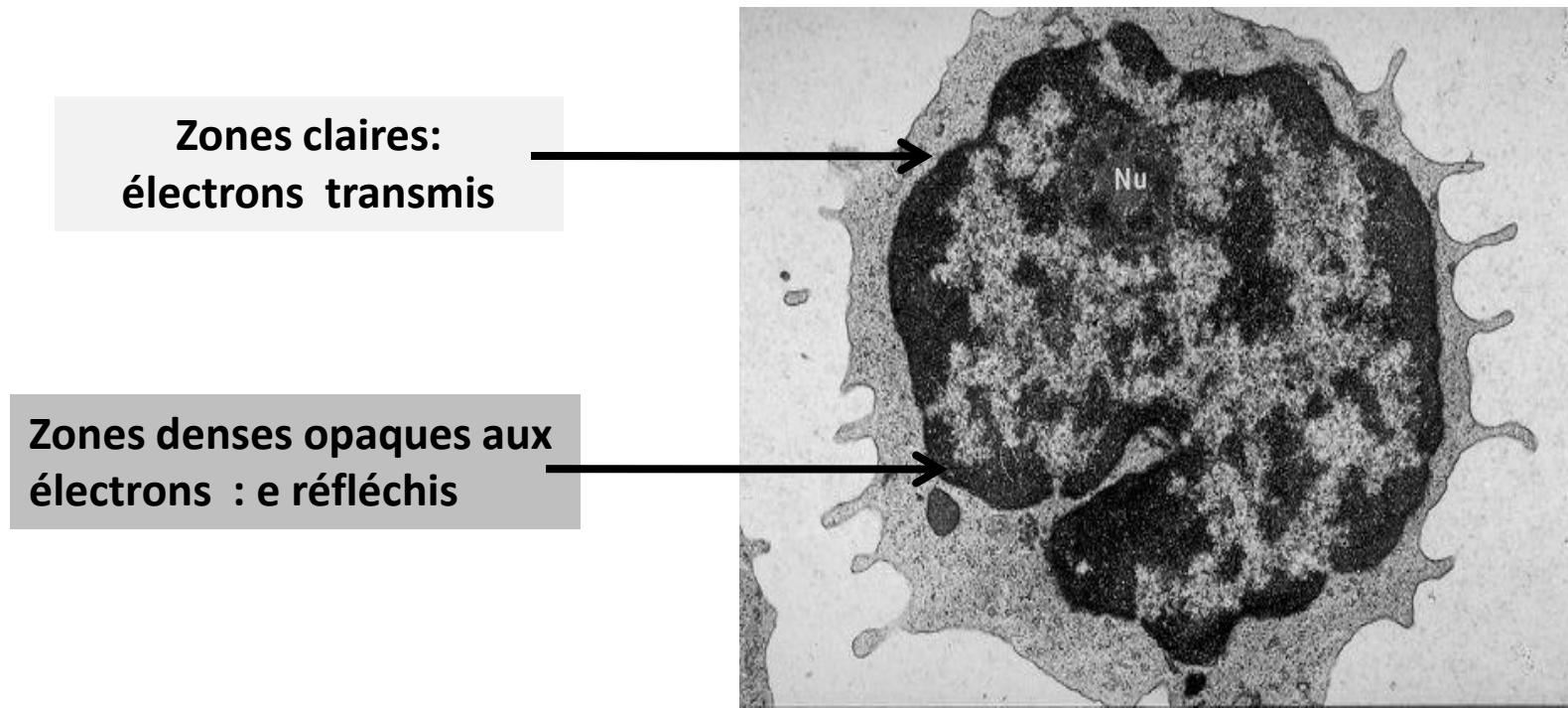
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique cytologique

RECUPERATION DES COUPES SUR GRILLE METALLIQUE



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

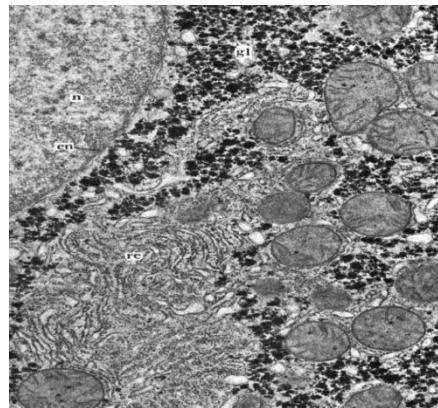
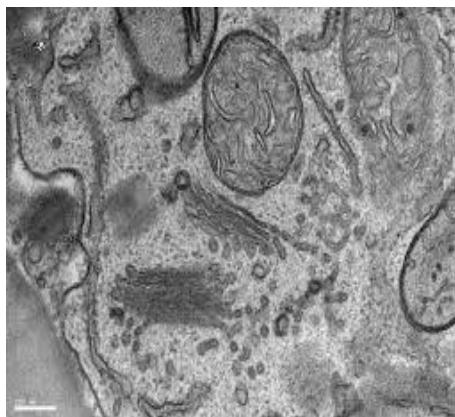
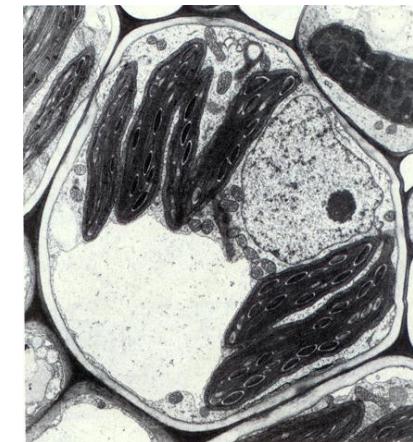
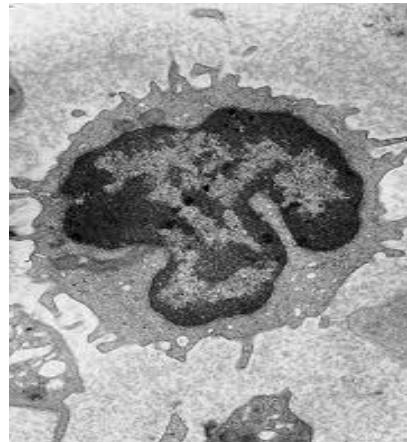
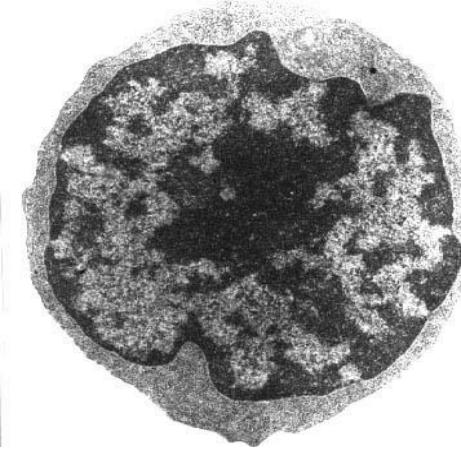
Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique cytologique et coloration positive



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

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

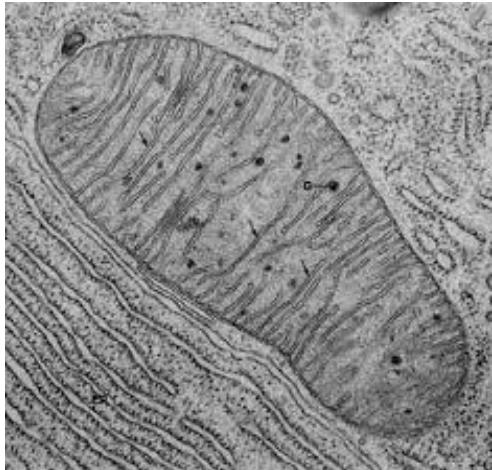
Objectifs 5 et 6: Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique cytologique et coloration positive



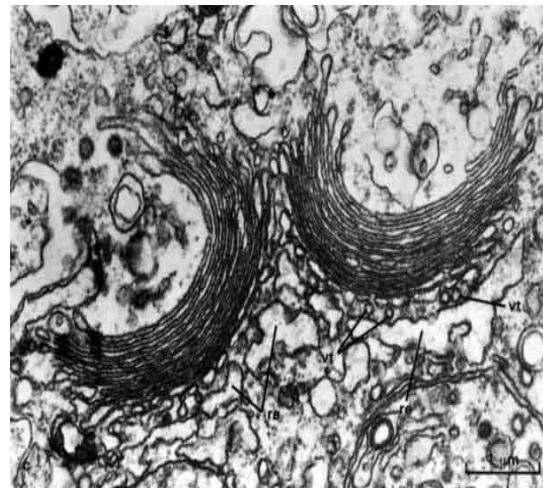
Application : étude ultrastructurale de cellules entières ou de portions cellulaires (voir Figure 2/7)

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

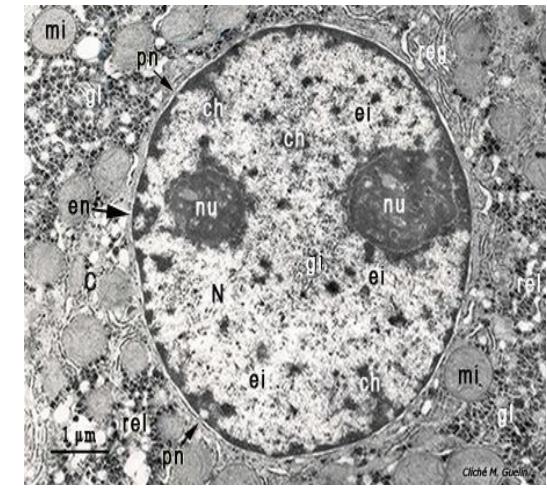
Application : étude ultrastructurale des organites



Ultrastructure d'une mitochondrie



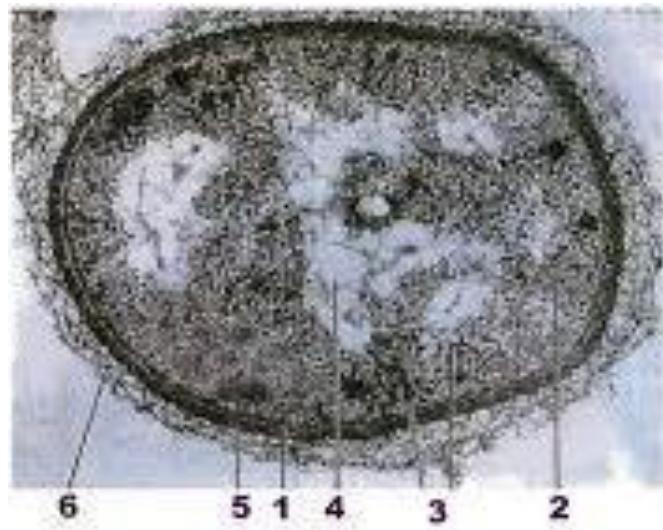
Ultrastructure de l' appareil de Golgi



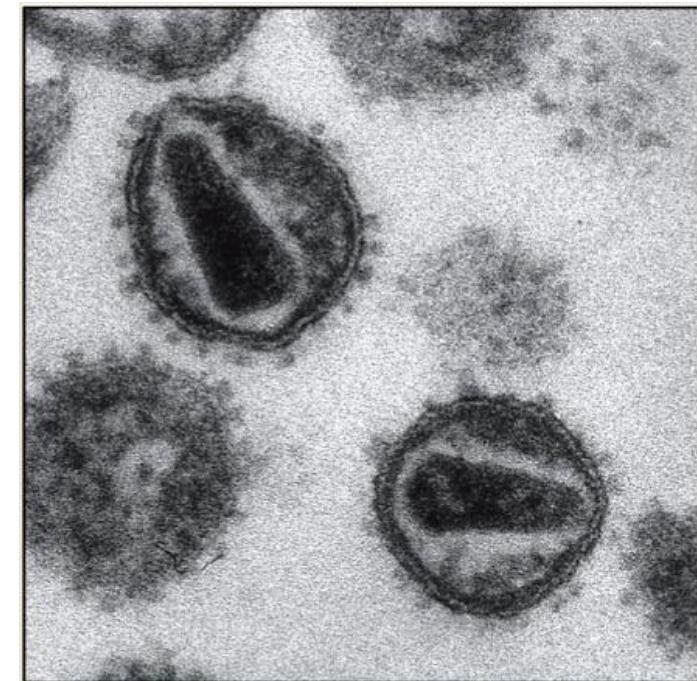
Ultrastructure d'un noyau

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

Application : étude ultrastructurale des microorganismes



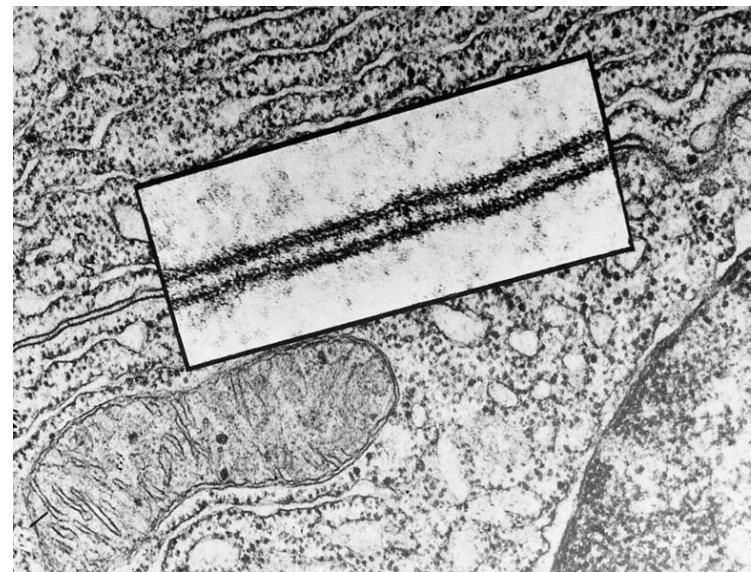
Bactérie 70 000 x



Virus du sida dans la cellule hôte

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

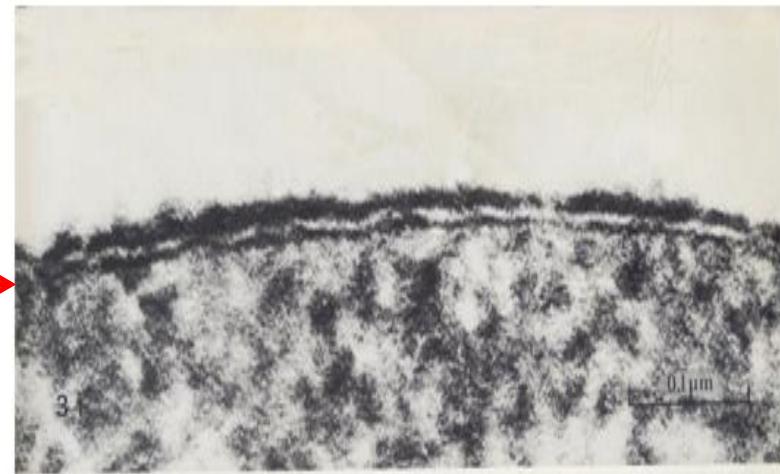
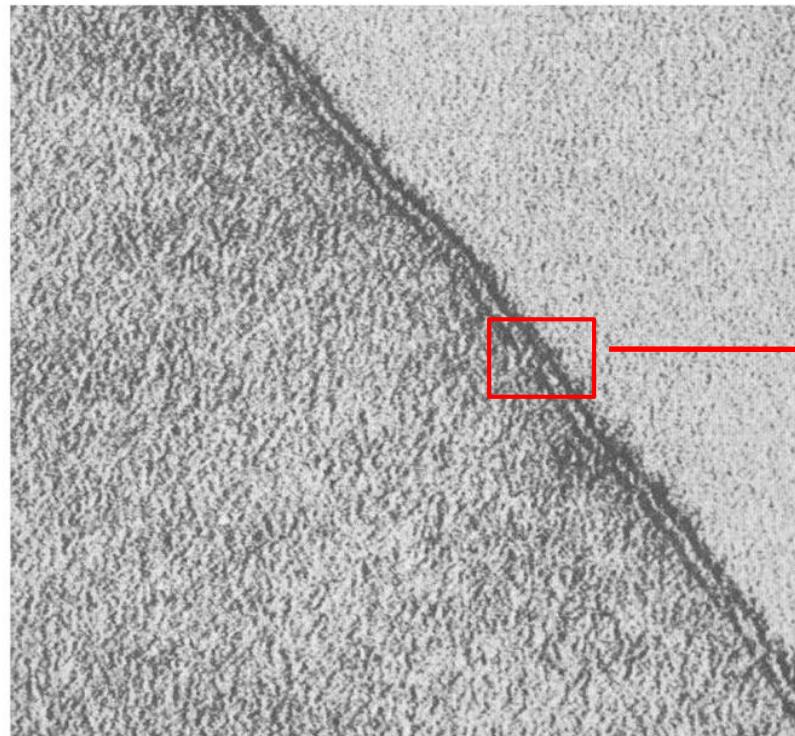
Application : étude **ultrastructurale des membranes cellulaires**



Ultrastructure de la membrane du REG

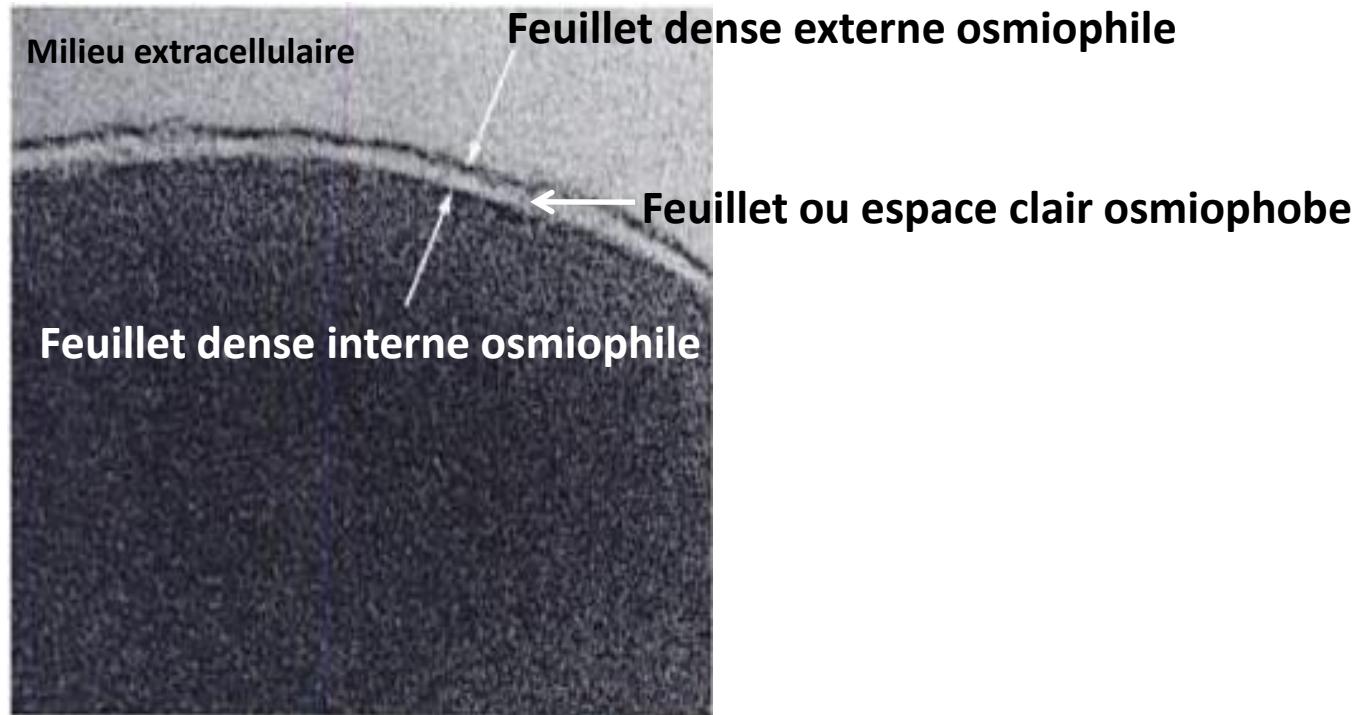
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: **Technique cytologique et coloration positive**

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



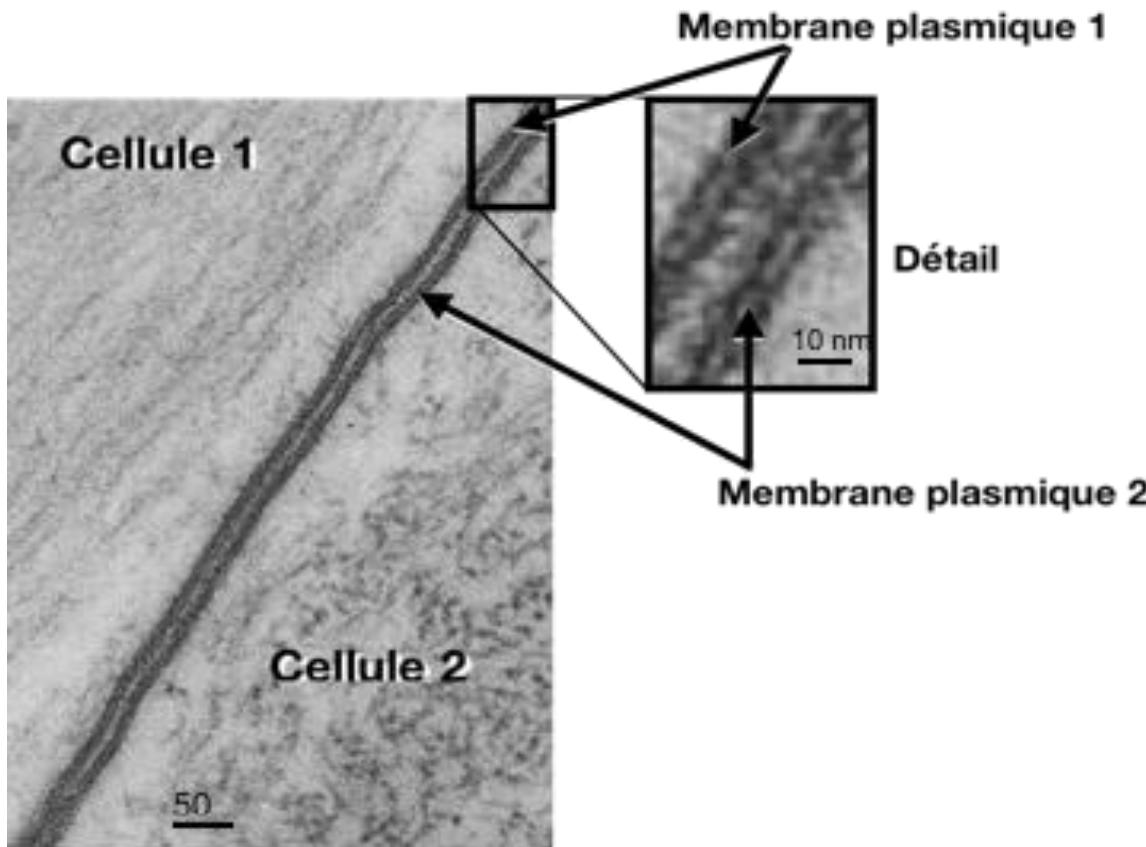
Ultrastructure de la membrane: aspect tristratifié

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)**

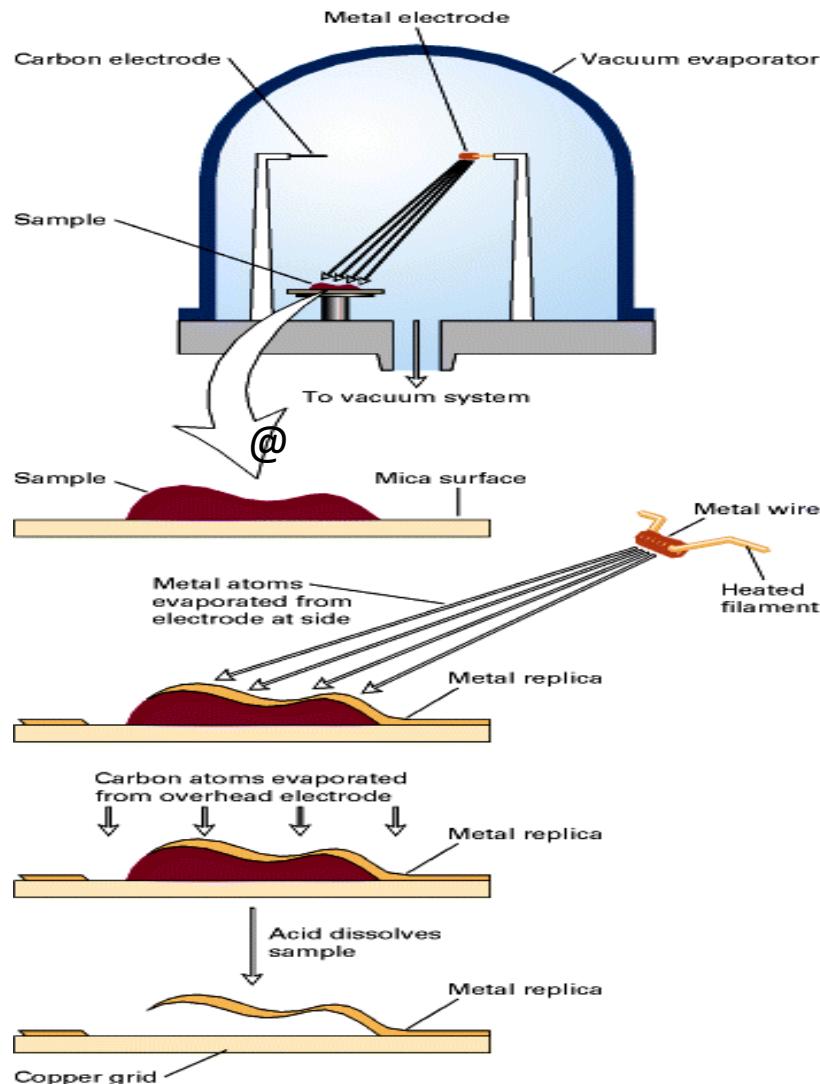
LA TECHNIQUE REPLIQUE/ CRYODECAPAGE

Etapes (*lire paragraphes 4/2*):

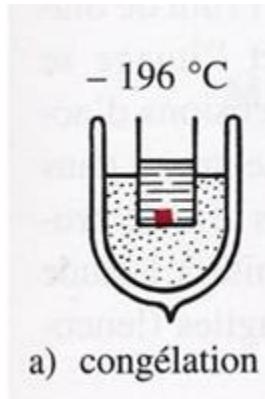
1. Fixation physique de l'échantillon
2. Cryofracture (si besoin)
3. Décapage
4. Ombrage métallique
5. Obtention de la réplique
6. Observation

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

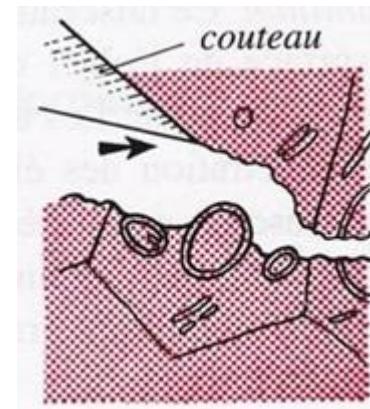
Technique des répliques (Figure 2/8)



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

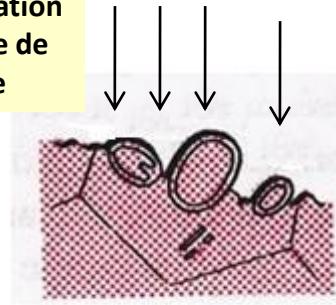


a) congélation

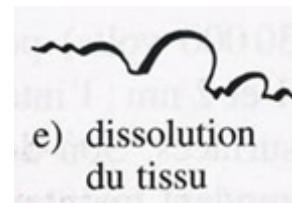


b) fracture

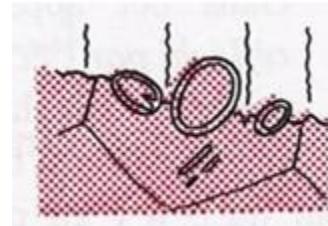
Vaporisation
verticale de
Carbone



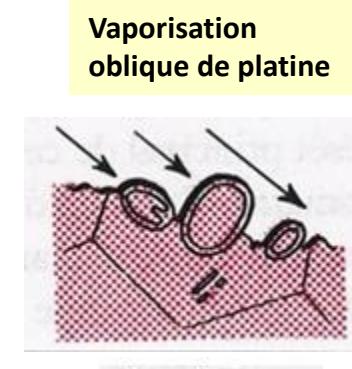
d) ombrage



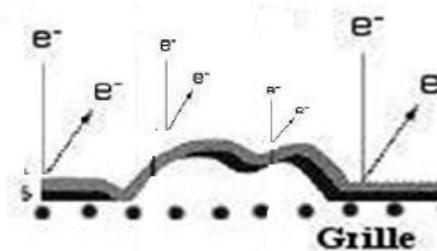
Etapes de la technique de cryodécapage



c) décapage



d) ombrage



f) Observation de
la réplique au MEB



Image observée sur l'écran
du microscope électronique.

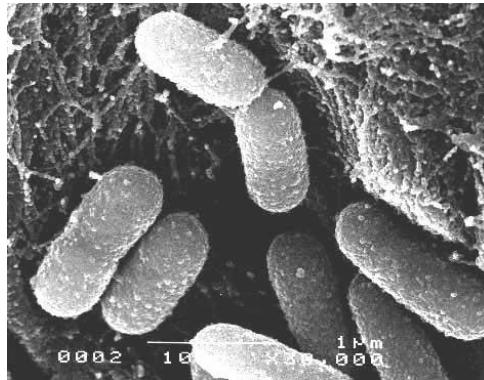
Remarque: Les étapes préparatoires à la réplique se déroulent dans une enceinte fermée.

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

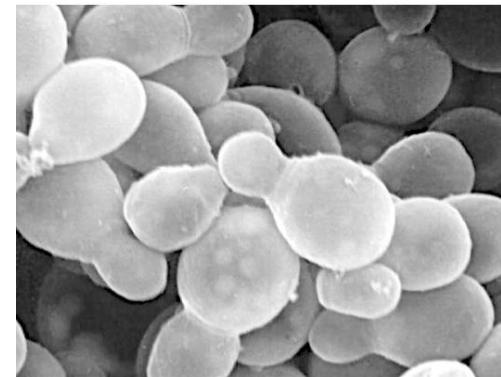


**Aspect en 3 D des êtres vivants microscopiques allergisants:
les Acariens**

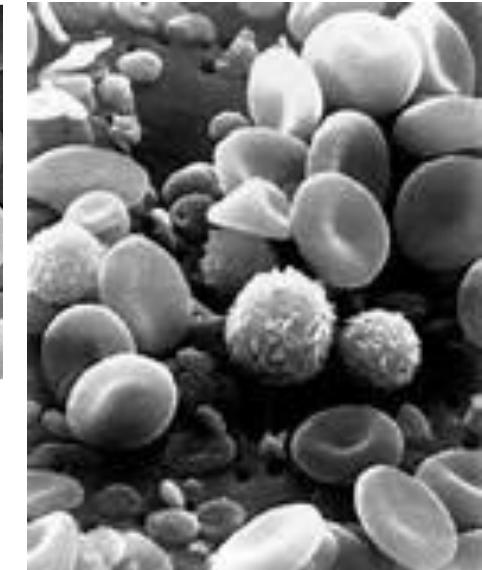
Objectif 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique des répliques



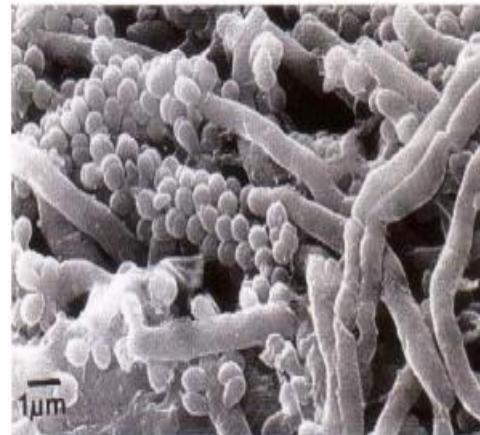
BACTERIES



LEVURES
(Champignons
microscopiques)



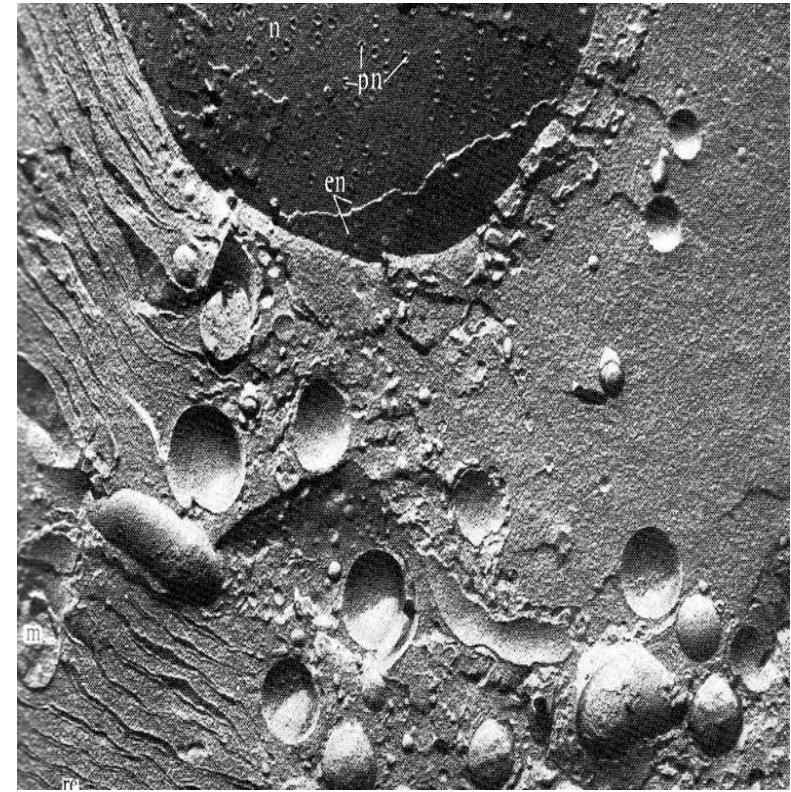
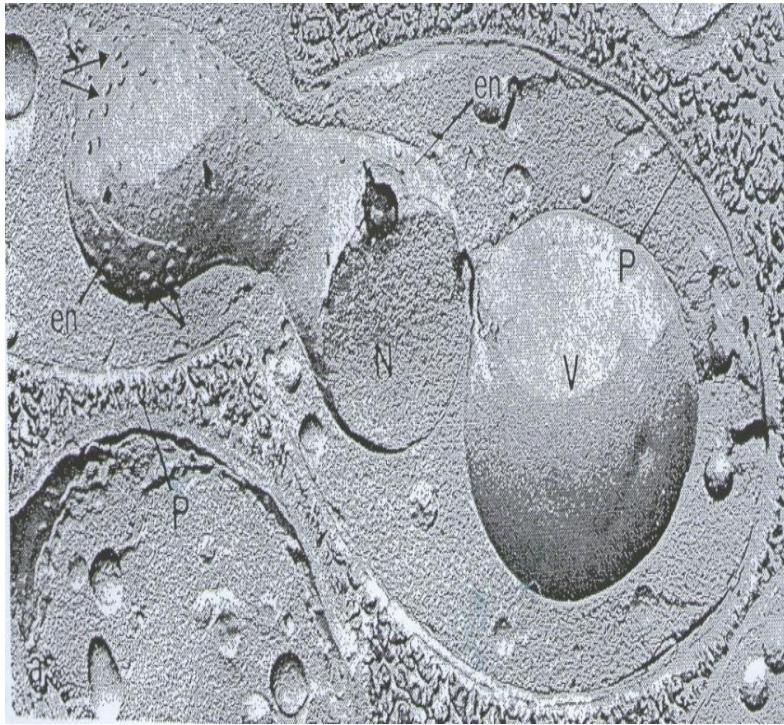
Tissu sanguin humain



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

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

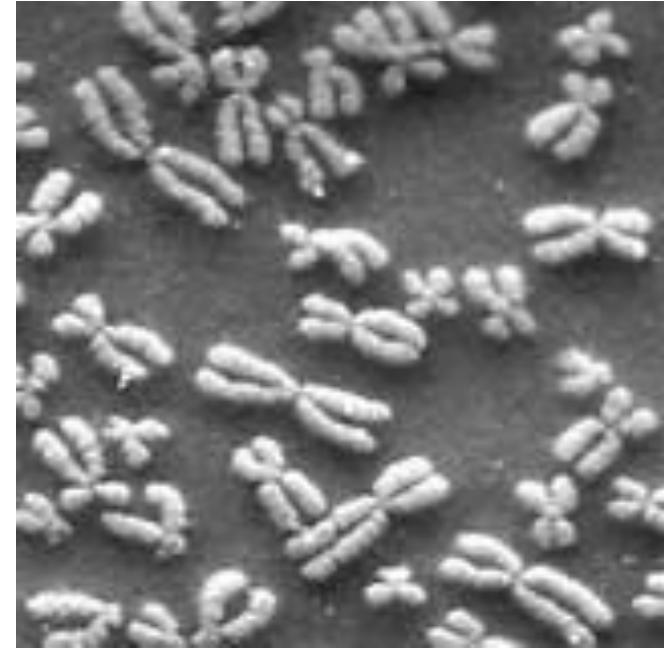
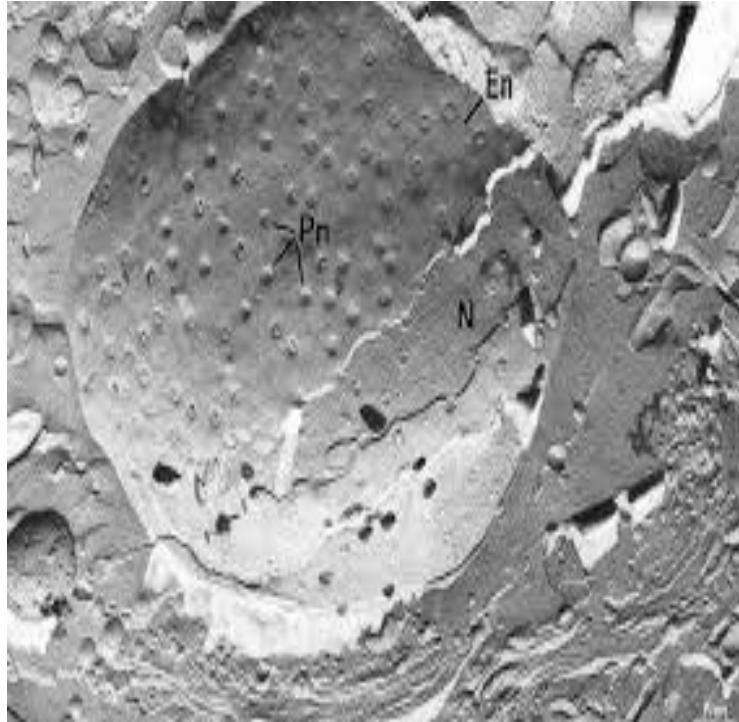
Objectifs 5 : Techniques microscopiques et les domaines d'applications: Technique des répliques



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



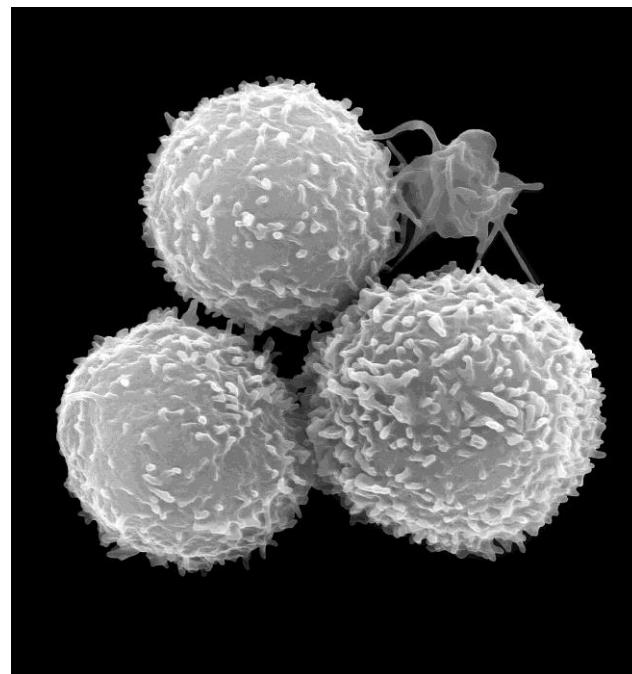
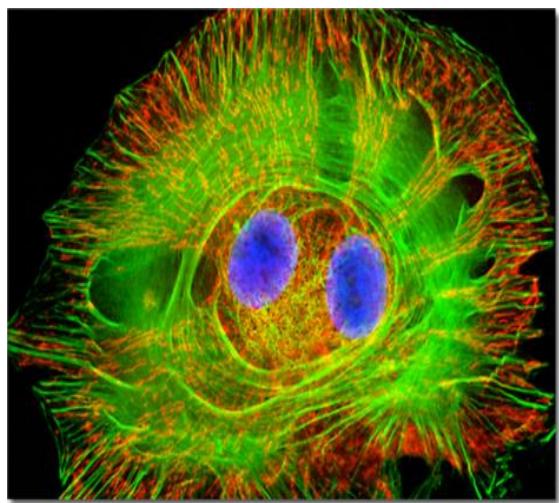
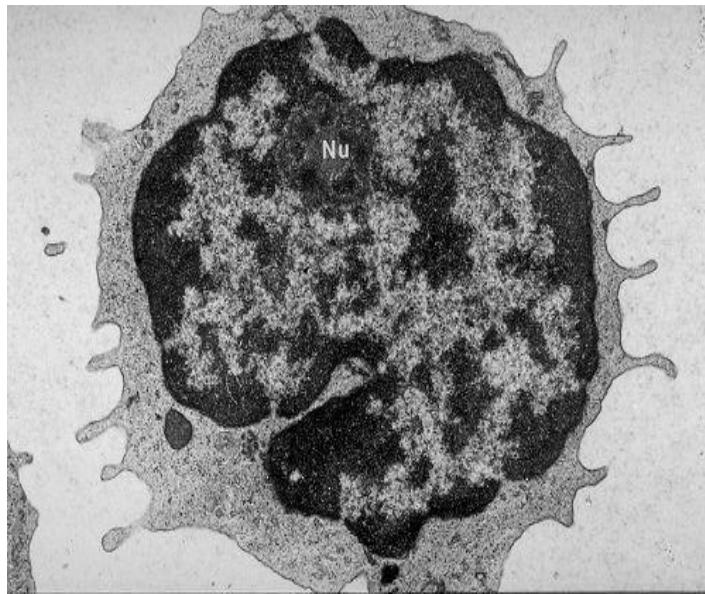
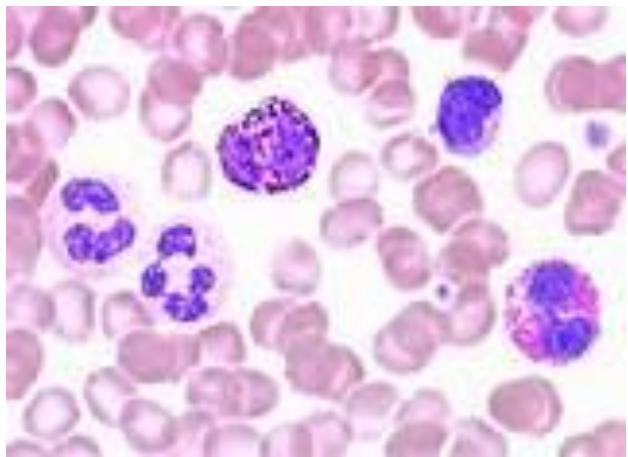
Comparaison aspects de la membrane plasmique du globule rouge au MET et MEB.

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