

## Correction TD 3 : Application sur les méthodes d'étude cellulaire

### I-Répondez brièvement aux questions suivantes :

1) **A propos de la préparation de coupes au microscope** optique, remettre dans l'ordre les différentes étapes.

a) Inclusion b) Fixation c) Déshydratation d) Coloration e) Coupe f) Réhydratation.

➤ 1. fixation, 2. déshydratation, 3. inclusion, 4. coupe, 5. réhydratation, 6. coloration

2) **Pourquoi la déshydratation de l'échantillon se fait avant l'inclusion dans la paraffine ?**

➤ Les échantillons sont déshydratés avant d'être inclus en paraffine. Il s'agit alors de remplacer l'eau contenu dans l'échantillon par le milieu d'inclusion. La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les pièces fixées devront être déshydratées dans **des bains d'alcools à degrés croissants** puis dans du xylène et pour finir dans de la paraffine chauffée à son point de fusion. L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur. L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine : il s'agit soit de xylène, soit de toluène.

3) **Après la réalisation des coupes, comment déparaffiner les échantillons ?**

➤ L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

4) **Quel est le rôle de chacune des étapes suivantes**

a- Inclusion      b- Fixation      c- Déshydratation

➤ Inclusion : durcir l'échantillon pour réaliser les coupes. fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Dans certains cas, on utilise d'autres milieux d'inclusion (celloïdine, résines plastiques, etc.).

➤ Fixation : éviter l'autodégradation des tissus et la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique).

➤ Déshydratation : L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur. La paraffine n'étant pas miscible à l'eau (facilite l'inclusion).

## II- Complétez les propositions suivantes :

5) Pour la déshydratation des cellules

on utilise : des bains d'alcools de degrés croissants, 70°, 80°, 90°, 100°, ... et enfin dans deux bains de solvant (toluène ou xylène).

6) La limite de résolution d'un microscope optique classique est d'environ : 0,2 µm.

7) Le microscope électronique à transmission permet d'observer : organisation et de la structure interne de l'échantillon (les organites intracellulaires, des virus, des cristaux).

8) Le microscope électronique à balayage permet d'observer : la surface et la forme d'un échantillon (image en trois dimensions).

9) Pour le MEB, La coloration se fait par : ombrage métallique.

## III- Répondez par vrai ou faux aux propositions suivantes

10) Le microscope électronique oblige à ce que l'échantillon soit placé sous vide pendant l'observation. vrai

11) La technique d'autoradiographie nécessite l'utilisation de substances fluorescentes. faux.

12) Pour le MEB, la préparation des échantillons n'a pas besoins ni à l'inclusion ni à la réalisation des coupes. vrai.

13) La coloration négative permet de contraster le contour de petits objets. vrai.

## IV- Cochez la(les) réponse(s) juste(s)

14) Concernant le MEB :

- a. L'échantillon est traversé par un faisceau d'électrons.
- b. L'ombrage métallique consiste à vaporiser des métaux lourds sur l'échantillon.
- c. La surface de l'échantillon est recouverte d'une couche de métal.
- d. Le grandissement de l'image est d'environ X1500.

15) Quelles propositions sont vraies à la fois pour le MET et le MP à fond clair :

- a. Les échantillons sont généralement fixés, coupés puis contrastés.
- b. L'observation se fait par transmission.
- c. Après la fixation, l'échantillon subit une déshydratation.
- d. La coupe est faite par un ultramicrotome.

16) Concernant la coloration négative :

- a. Les structures apparaissent en clair sur un fond sombre.
- b. Elle permet la description morphologique des surfaces externes des organites
- c. Elle est souvent utilisée pour une observation au MET.
- d. Elle est utilisée pour décrire l'architecture moléculaire des macromolécules.

17) A propos de la technique des répliques :

- a. La sublimation est réalisée après la cryofracture.
- b. La sublimation est réalisée après l'ombrage métallique.
- c. Elle permet l'étude des surfaces internes.
- d. Les coupes des échantillons sont plus ou moins épaisses.

18) A propos de l'ultracentrifugation différentielle

- a. L'unité du coefficient de sédimentation est le m<sup>2</sup>/s
- b. Le culot se forme en haut du surnageant.
- c. La vitesse de sédimentation dépend d'un seul paramètre: la taille.

d. Les particules s'arrêtent en bandes à leurs densités respectives.

### V- Exercice :

Des chercheurs ont réalisé un fractionnement cellulaire à partir d'un foie entier. Le foie d'un animal est récupéré et broyé dans un milieu isotonique. L'extrait de broyage est filtré et le filtrat obtenu est soumis à une première centrifugation de 1000 g. Le culot contenant essentiellement des noyaux est récupéré et le surnageant est centrifugé à 10000g. L'opération est répétée quatre fois afin d'isoler les différents composants cellulaires.

a- Pourquoi le broyage était-il effectué dans un milieu isotonique ?

- Un milieu isotonique est un milieu de même pression osmotique que le milieu intracellulaire et donc éviter la destruction des cellules.

b- Comment s'appelle ce type de centrifugation ?

- **La centrifugation différentielle**

c- Pourquoi les composants cellulaires ne sont pas tous retrouvés dans le premier culot ?

- Car les composants cellulaires ont des différences de tailles, du temps de sédimentation et aussi des accélérations croissantes.

d- Connaissez-vous une autre méthode pour séparer les organites cellulaires par centrifugation ? Expliquez son principe.

- **La centrifugation sur gradient de densité**

Cette technique permet de séparer en une seule fois des organites qui ont des vitesses de sédimentation très voisines (très faibles différences de densité C'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes). On travaille dans un milieu présentant un gradient de densité, d'où le nom donné à la technique.

On utilise un gradient de saccharose. Après centrifugation, chaque constituant rejoindra la zone de densité équivalente à la sienne. Le contenu du tube peut être récupéré par fractions successives, souvent du bas vers le haut, pour utilisation ou analyse ultérieure.

