

II. METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES

1. Les matériels cellulaires

1.1. Cellules entières ou des coupes de cellules

Le microscope permet d'observer les cellules d'un tissu, mais dans des conditions très strictes : il faut que l'objet à examiner soit transparent à la lumière. Les objets biologiques ne le sont que rarement, à l'exception des objets naturellement très minces : suspensions (sang, ..) ou cultures cellulaires. Il faut donc les découper en tranches très minces (coupes) de l'ordre de 5 à 10 microns. Pour cela, il faut « durcir » l'objet par différentes techniques physiques ou chimiques. Mais la coupe causerait des dommages irréparables aux tissus et aux cellules et l'observation ne correspondrait pas à la réalité des cellules vivantes : séparation physique de structures proches plus ou moins entraînées par l'outil de coupe, libération d'enzymes lytiques (protéases essentiellement) contenues dans des compartiments spécifiques (lysosomes, peroxyosomes, ...) il faut donc au préalable "immobiliser" les structures dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et inactiver ces enzymes : c'est le but de toute une série de manipulations qui amèneront les objets biologiques à l'examen convenable au microscope.

Examen des échantillons en Microscopie Optique

Examen des cellules vivantes :

Il faut utiliser des techniques qui augmentent les contrastes sans toxicité pour la cellule.

- **Les méthodes chimiques, les colorants vitaux** : La quasi-totalité des colorants sont très toxiques pour les cellules, quelques rares colorants n'ont pas cet inconvénient. On peut citer :

***Le Vert Janus B** spécifique des mitochondries

***Le bleu de Trypan**, qui ne peut pénétrer dans des cellules vivantes, mais qui colore les cellules mortes (test d'exclusion du bleu trypan) : il est très utilisé pour évaluer la vitalité des cellules.

- **Les méthodes physiques, le microscope à contraste de phase** : ce microscope augmente le contraste des objets. C'est le seul moyen d'observer les mouvements cellulaires et de les filmer.

Examen des cellules mortes :

✚ **Prélèvement** : On distingue quatre catégories majeures de prélèvement :

- * Les frottis : grattage (du col de l'utérus...).
- * Les biopsies : fragments de tissu ou d'organe.
- * Les organes en intégralité.
- * Les liquides d'épanchement divers (pleural, ascitique, péricardique, etc).

✚ **Fixation** : C'est l'action de tuer les cellules. On peut fixer à l'aide de procédés chimiques : le liquide de **Bouin**, **formol**, acide acétique, etc....ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque (meilleur fixateur).



Figure 01. Fixation de prélèvement en utilisant des liquides fixateurs.

✚ **Déshydratation** : l'étape consiste à retirer l'eau de l'échantillon pour la remplacer par un solvant compatible avec le milieu utilisé pour l'inclusion (étape d'inclusion). à fin de ne pas créer un choc osmotique très important qui détruirait les cellules. Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans **des alcools de degrés croissants**, 70°, 80°, 90°, 100°, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations et l'eau va sortir par **osmose**. On procède donc à une double substitution.

*On remplace l'eau par de l'alcool (Déshydratation)

*On remplace l'alcool par le toluène (Substitution)

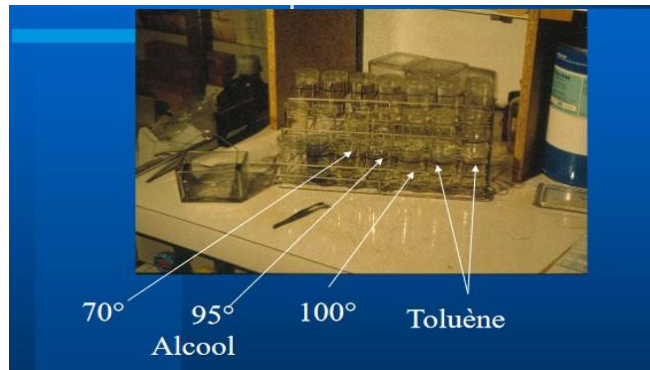


Figure 02. Bains successifs dans des alcools et de toluène.

✚ **Inclusion** : La coupe ne peut être pratiquée que dans une substance assez dure ; c'est pourquoi on **imprègne** les tissus d'une substance d'enrobage, en général **la paraffine**. On plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique le xylène, puis dans la paraffine. On refroidit alors et on obtient **un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner**.



Figure 03. Un bloc de paraffine contenant le tissu à examiner.

✚ **Microtomisation (COUPES)** : Le **bloc de paraffine est découpé en tranches minces** à l'aide des **microtomes** qui sont des appareils permettant de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Les forces de frictions entre couteau et bloc échauffent la paraffine et la mettent en surfusion, ce qui permet de coller les coupes les unes à la suite de l'autre : **ruban de coupes sériées**. On les recueille sur des lames de verre (porte objets) autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.



Figure 04. Etape de La Microtomisation.

✚ **Réhydratation** : Les coupes collées sur lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique et ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations décroissantes.

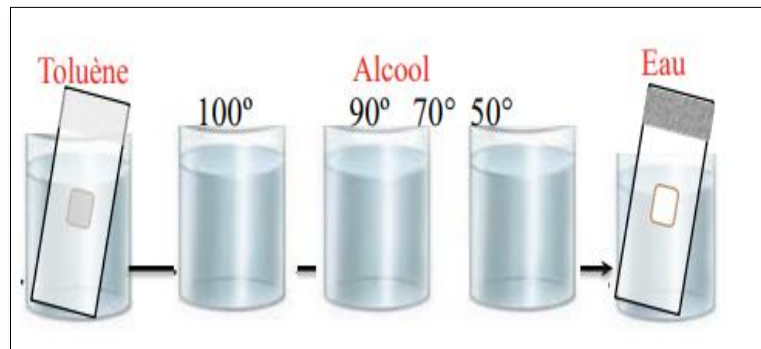


Figure 05. Etapes de la réhydratation.

✚ **Coloration** : Cette lame de verre est alors plongée dans un colorant. On dispose nombreux colorants naturels, qui se fixent sur telle ou telle structure de la cellule, les colorants plus courants sont :

***l'hématoxyline**, qui est un colorant basique qui se fixe aux acides nucléiques, et colore ainsi les noyaux cellulaires et le réticulum Endoplasmique Rigoureux (RER) en bleu violacé.

***L'éosine**, est un colorant acide qui se fixe aux protéines, et donc colore les cytoplasmes et les fibres en rose.

***Les bleus** (Bleu de méthylène, de toluidine) sont également employés en routine.



Figure 06. Coloration des lames (HES).

- ✚ **Montage** : les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « **préparation histologique** » prête à être observée au MO.

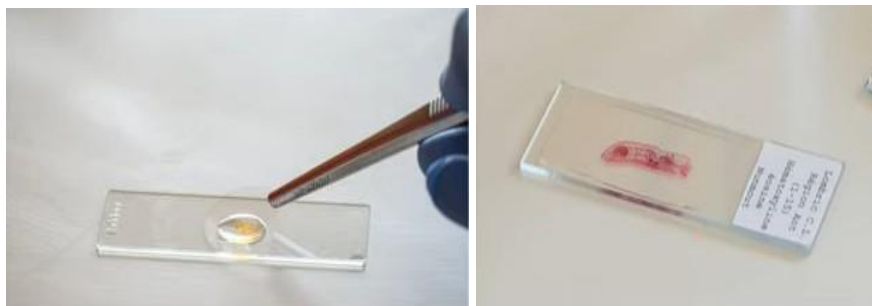


Figure 07. Montage des lames et Observation sous MO.

Examen des échantillons en Microscopie Electronique à Transmission

La séquence de manipulation est analogue à celle qui a été exposée pour la microscopie optique.

- ✚ **Fixation** : encore plus exigeante (les artefacts sont plus visibles), elle est réalisée avec des fixateurs spéciaux, comme : le tétraoxyde d'osmium OsO_4 et le glutar-aldehyde $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$. Ce sont les deux principaux fixateurs chimiques utilisés en microscopie électronique.
- ✚ **Déshydratation** : elle suit le même principe qu'en microscopie optique ; mais elle est délicate car les tissus doivent être conservés jusqu'au niveau moléculaire.
- ✚ **Inclusion** : elle se fait dans un milieu très dur, dans des matières plastiques telles que la résine. Une fois refroidi, durci par polymérisation, on obtient un échantillon solide.

- ✚ **Coupe** : effectuée sur un ultramicrotome, elle fournit des tranches encore ultra minces, de 50nm.
- ✚ **Coloration** (Contraste) : c'est plutôt une imprégnation (il n'y a que le noir et le blanc en microscopie électronique) par des sels de métaux lourds, comme les **sels de plomb** ou **d'uranyle**, qui augmente le contraste des structures cellulaires.
- ✚ **Observation** au MET.

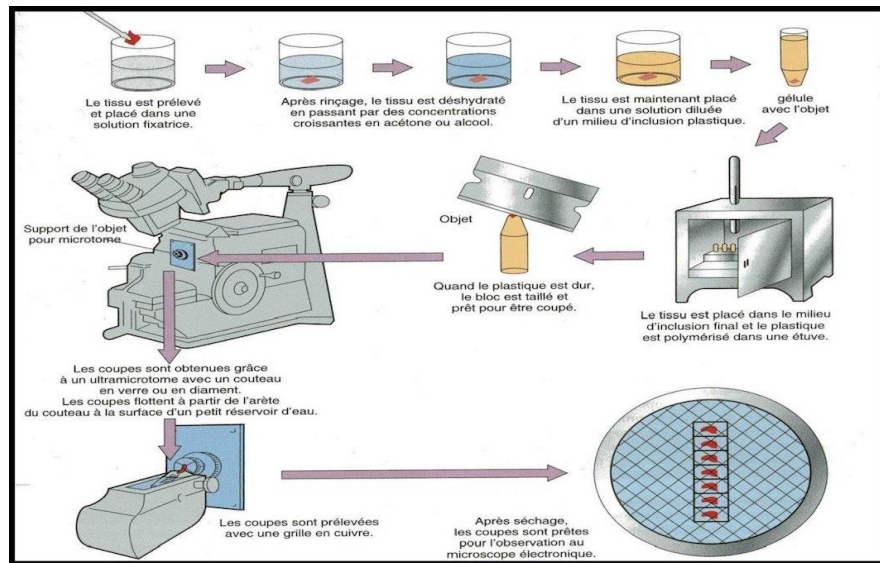


Figure 08. Etapes de la technique Cytologique.

Technique de Répliques

*Examen de répliques après Cryofracture et Cryodécapage :

*Les tissus prélevés sont congelés rapidement sans fixation ou après fixation, les tissus sont imprégnés de substances telles que **le glycérol**, puis congelés rapidement dans des liquides à température très basses comme **le fréon** liquide, dont le point de fusion se situe à -150°C ou en plaçant l'échantillon au contact d'un bloc de métal refroidi dans **l'hélium liquide**.

*La cryofracture, de petits fragments de tissus sont mis sur un petit disque métallique et congelé rapidement, le disque est ensuite placé dans un support spécial et le bloc de tissu congelé est frappé par une lame, provoquant à partir du point de contact une fente qui clive le tissu en deux parties. Les surfaces exposées par la fracture donnent des informations sur le contenu de la cellule.

* Le but est de rendre visibles ces informations. Pour ce faire, la technique de la réplique utilise la surface de fracture comme un moule sur lequel on dépose une couche de métal lourd. Le métal est déposé à la surface du tissu congelé qui vient d'être exposée dans l'enceinte même qui a servi à produire la fracture. On dépose ensuite une couche de carbone au-dessus de la couche métallique directement à partir du haut. C'est la réplique de métal et de carbone qui est placée sur la grille et observée dans le faisceau d'électrons.

* La réplique de cryofracture est une technique extrêmement utile, mais elle peut encore servir pour donner plus d'informations quand on y ajoute une étape de **cryodécapage**. Au cours de cette étape, l'objet congelé et fracturé, toujours dans la chambre froide, est placé sous vide à une température élevée pendant une ou quelques minutes : une couche de glace superficielle s'évapore (sublimation). Après l'élimination de l'eau, la surface de la structure peut être recouverte par un métal lourd.

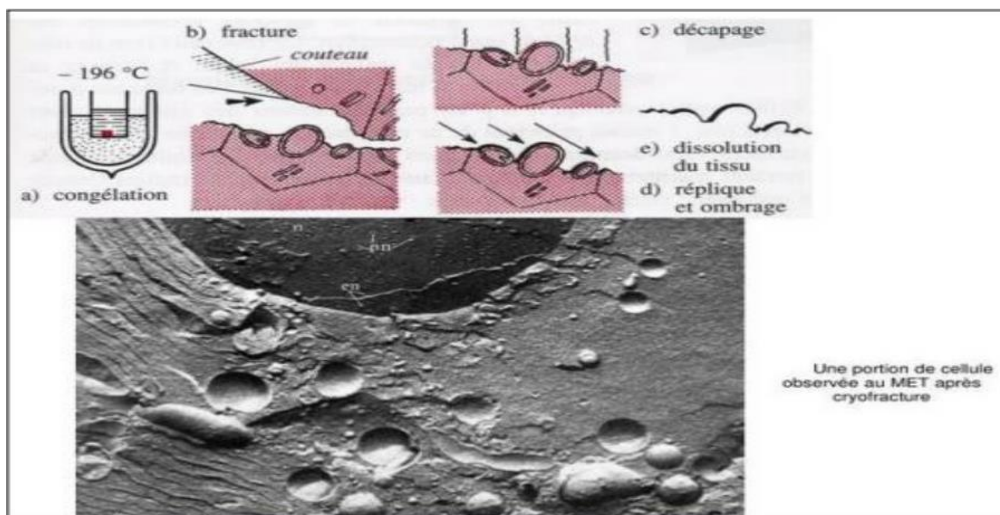


Figure 09. Technique de Cryofracture, Cryodécapage et ombrage métallique.