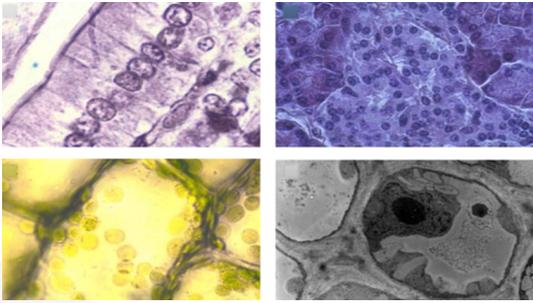


# TRAVAUX DIRIGES DE CYTOLOGIE



*Cellule-Elearning*

RADJAH Abir

Faculté des Sciences

Département des Sciences  
de la Nature et de la Vie

Email : [a.radjah@univ-skikda.](mailto:a.radjah@univ-skikda.dz)

dz

1.0

Mars 2025

# Table des matières

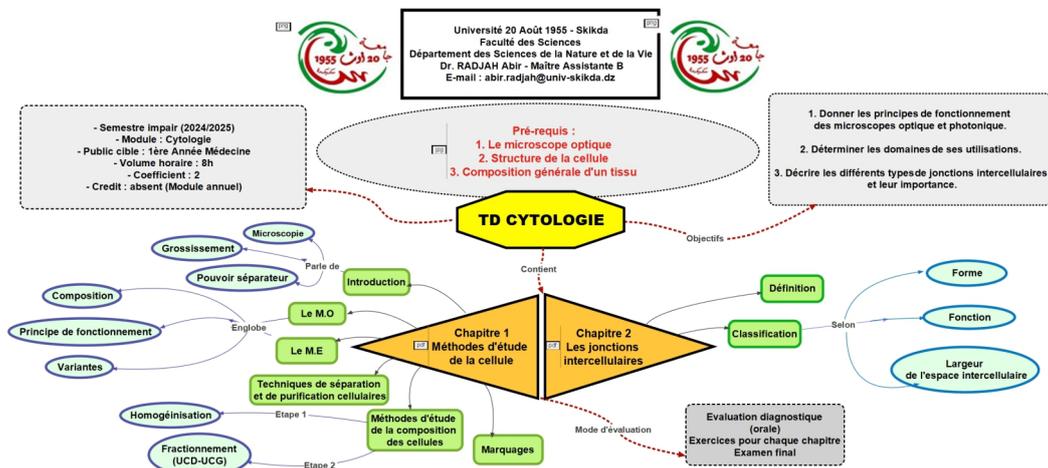
<b>Objectifs</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>I - Les pré-requis</b>	<b>5</b>
<b>II - TD 1 : Méthodes d'étude de la cellule</b>	<b>6</b>
1. Objectifs spécifiques .....	6
2. Le grossissement .....	6
3. Le pouvoir de séparation (résolution) .....	7
4. Le microscope optique (MO) .....	7
4.1. Composition du microscope optique .....	7
4.2. Principe de fonctionnement du microscope optique .....	8
4.3. Variantes du microscope optique .....	9
5. Le microscope électronique (ME) .....	12
5.1. Composition et principe de fonctionnement .....	12
5.2. Variantes du microscope électronique .....	12
6. Techniques de séparation et de purification cellulaire .....	13
6.1. Séparation des cellules d'un tissu .....	13
6.2. Purification .....	14
7. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules .....	14
7.1. Homogénéisation .....	15
7.2. Fractionnement cellulaire .....	16
8. Marquages .....	19
8.1. Histochimie/Cytochimie .....	19
8.2. Immunohistochimie .....	19
8.3. Immunofluorescence .....	20
<b>Conclusion</b>	<b>21</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>22</b>
<b>Webographie</b>	<b>23</b>

# Objectifs

- 1)** Donner les principes de fonctionnement des microscopes optique et photonique.
- 2)** Déterminer les domaines de ses utilisations.
- 3)** Identifier les méthodes de séparation et d'analyse des cellules dans un tissu.
- 4)** Décrire les différents types de jonctions intercellulaires et leur importance.

# Introduction

La cytologie est la science qui étudie les cellules, unités de base de tout organisme vivant. Grâce aux "microscopes", notamment optiques et électroniques. Les chercheurs peuvent observer en détail la structure cellulaire et ses composants. Parmi ces structures, les " jonctions cellulaires" qui jouent un rôle essentiel en assurant l'adhésion, la communication et l'organisation des cellules au sein des tissus.



Carte Conceptuelle

# I Les pré-requis

## *Rappel*

---

- 1) Reconnaître le microscope optique.
- 2) Savoir la structure de la cellule.
- 3) Identifier la composition générale d'un tissu.

# II TD 1 : Méthodes d'étude de la cellule

A l'œil nu l'observation des détails est limitée par 0.2 mm.

L'observation des cellules est délicate du fait de leurs très petites tailles (1 à 100  $\mu\text{m}$ ), leur observation nécessite l'utilisation des microscopes.

On en distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes optiques (photoniques) et les microscopes électroniques.

Le microscope est un instrument qui :

- a. donne une image grossie d'un petit objet ;
- b. sépare les détails de celui-ci sur l'image ;
- c. rend les détails visibles à l'œil ou à la caméra.....(5\*\*\*\*)

## 1. Objectifs spécifiques

### Attention

---

- 1) Distinguer les différences entre le microscope optique et le microscope électronique.
- 2) Définir le grossissement et le pouvoir de résolution.
- 3) Citer la différence entre la centrifugation et l'ultracentrifugation et leur principe de fonctionnement.
- 4) Expliquer que permet de mesurer un cytomètre en flux.
- 5) Décrire les méthodes de marquage en biologie, comme l'immunofluorescence.

## 2. Le grossissement

### Définition

---

C'est combien de fois l'image finale a été agrandie.

### 3. Le pouvoir de séparation (résolution)

#### Définition

C'est la capacité à distinguer nettement deux points très rapprochés. Il est inversement proportionnel à la limite de séparation, qui représente la plus petite distance entre deux points de l'objet vus de façon distincte. Le pouvoir séparateur est le paramètre déterminant de la netteté d'une image.....(5<sup>\*\*\*</sup>)

### 4. Le microscope optique (MO)

Il s'agit d'un système optique fait de lentilles en verre permettant d'avoir une image finale virtuelle agrandie et claire. Il existe plusieurs variantes du microscope optique.

#### 4.1. Composition du microscope optique

##### Fondamental : a. Une partie mécanique

qui aide à la manipulation du microscope et à la mise au point.

##### Fondamental : b. Une partie optique

responsable de la formation de l'image, constituée de :

- **Source de lumière (lampe).**
- **Condenseur et son diaphragme :** Le condenseur est le système optique qui focalise la lumière sur l'objet et permet d'obtenir un éclairage homogène et régulier du champ observé.
- **Objectifs :** c'est un ensemble de lentilles de différents grossissements montés sur une tourelle rotative.
- **Oculaires :** lentilles en regard de l'œil. Elles peuvent être remplacées par un appareil photographique, ou par une caméra vidéo pour faire une acquisition numérique. (**Fig. 1**).....(5<sup>\*\*</sup>)

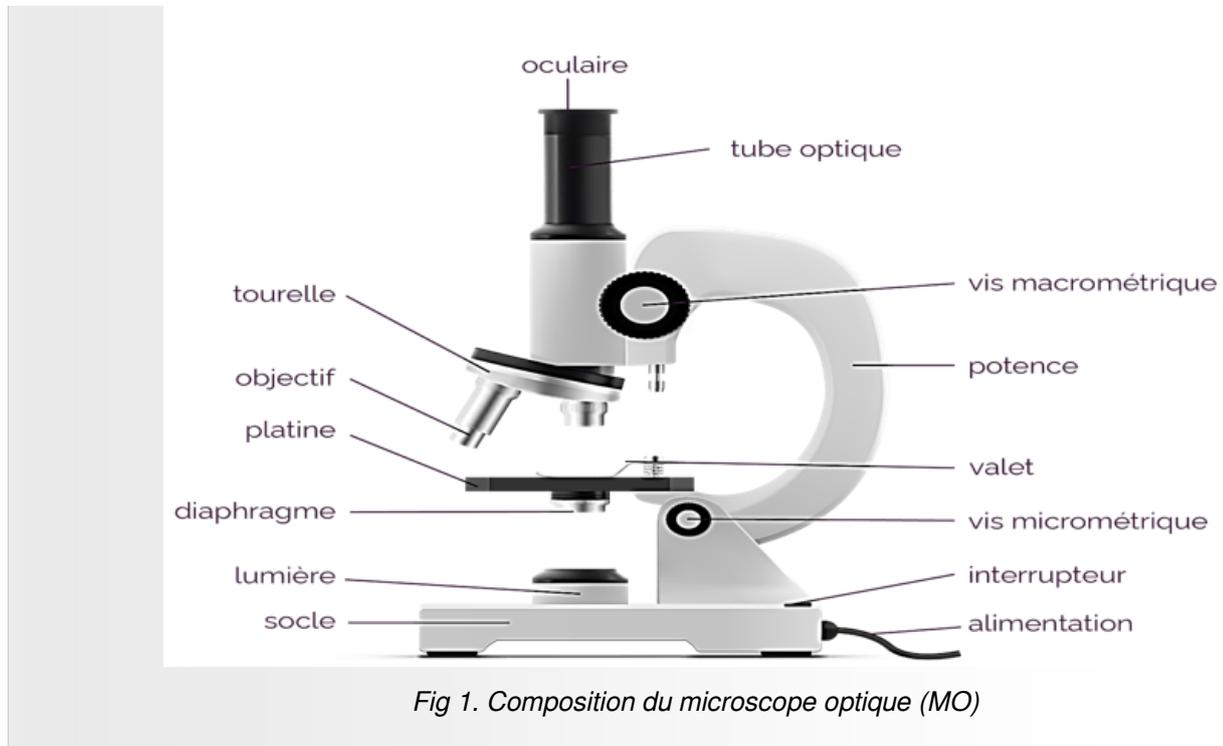


Fig 1. Composition du microscope optique (MO)

## 4.2. Principe de fonctionnement du microscope optique

### ⚙️ Méthode : Trajet de la lumière et construction de l'image

La microscopie optique se base sur la transmission de lumière (photons) à travers un système optique de lentilles superposées. La lumière traversant l'objet est déviée par deux systèmes : «objectifs» et «oculaires», avant de former une image agrandie sur notre rétine (ou tout système de capture d'une image).

**En résumé :** l'objectif donne une première image agrandie de l'objet : il s'agit d'une image réelle. L'oculaire donne une image agrandie de l'image formée par l'objectif. Au final nous apercevons une image virtuelle agrandie par l'objectif (dont le grossissement est  $G_1$ ) et l'oculaire (dont le grossissement est  $G_2$ ).....( $1^{***}$  \*\*)

### 🔍 Exemple : Le grossissement du microscope optique

Il est donc la valeur du produit  $G_1 \times G_2$  et peut atteindre au mieux 1000 fois la taille de l'objet (x1000). (Fig. 2)

# Le grossissement



- Le microscope est équipé de trois objectifs :

- Faible puissance (4X)
- Moyenne puissance (10X)
- Forte puissance (40X)

Le grossissement total est le produit du grossissement de l'objectif par celui de la lentille de l'oculaire (10X).



Exemple : pour l'objectif de faible puissance,  
grossissement total =  $4 \times 10 = 40$

Activer \

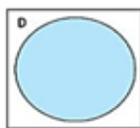
Fig 2. Le grossissement du MO.

## 🔍 Exemple : Le pouvoir de séparation

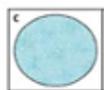
Pour le microscope optique, il est au mieux de  $0,2 \mu\text{m}$  ce qui permet de distinguer à peine la plupart des bactéries.

(Fig. 3)

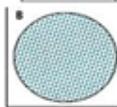
## Le pouvoir séparateur



- La capacité de distinguer deux points très rapprochés l'un de l'autre est appelée le pouvoir séparateur.

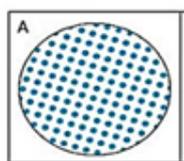


- L'oeil humain ne peut pas distinguer des objets s'ils sont trop rapprochés à moins de  $0,1 \text{ mm}$  l'un de l'autre.



- Le microscope permet de voir des objets très rapprochés :  $0,2$  micromètres l'un de l'autre.

$$0,2\mu\text{m} = 0,0002\text{mm}$$



Actiu

Fig 3. Le pouvoir séparateur du MO.

### 4.3. Variantes du microscope optique

#### 💡 Fondamental : a. Microscope à fluorescence

- La fluorescence est la propriété que possèdent certains matériaux d'absorber une longueur d'onde précise de la lumière et de la réémettre sous forme de rayonnement de longueur d'onde plus grande.

- Une substance possédant cette propriété est un **fluorochrome**. Un fluorochrome est donc caractérisé par deux spectres : son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.
- En pratique, on peut être amené à réaliser des marquages fluorescents de l'échantillon que nous voulons observer. Ceci nous permettra de **détecter, localiser et quantifier différentes protéines cellulaires**.
- Le microscope à fluorescence utilise une source de lumière blanche pour observer en transmission comme pour le microscope à fond clair et une lampe qui donne le spectre de la lumière blanche afin de sélectionner la longueur d'onde qui nous intéresse. (Fig. 4)
- Il est doté d'un filtre d'excitation qui permet de sélectionner la longueur d'onde incidente qui excite le fluorochrome et d'un filtre d'émission qui ne laisse passer que la longueur d'onde émise par le fluorochrome après son excitation.....(5\*)

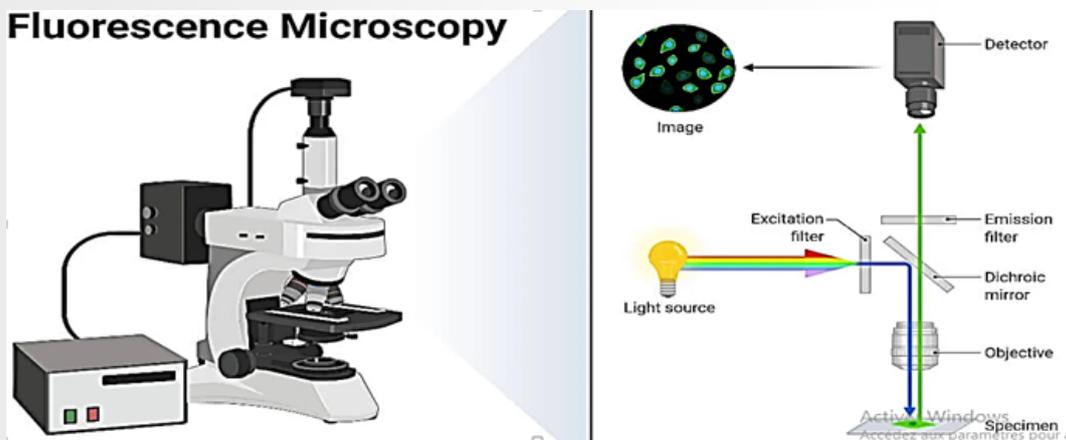


Fig 4. Le microscope à fluorescence.

🔦 **Fondamental : b. Microscope confocal à fluorescence**

C'est une version améliorée du microscope à fluorescence. La source lumineuse est un **LASER** qui balaye point par point l'objet. On procède ensuite grâce à un traitement informatique à une superposition des acquisitions et à une reconstruction de l'image ce qui permet d'obtenir une image nette et même en 3D. (Fig. 5).....(5\*)

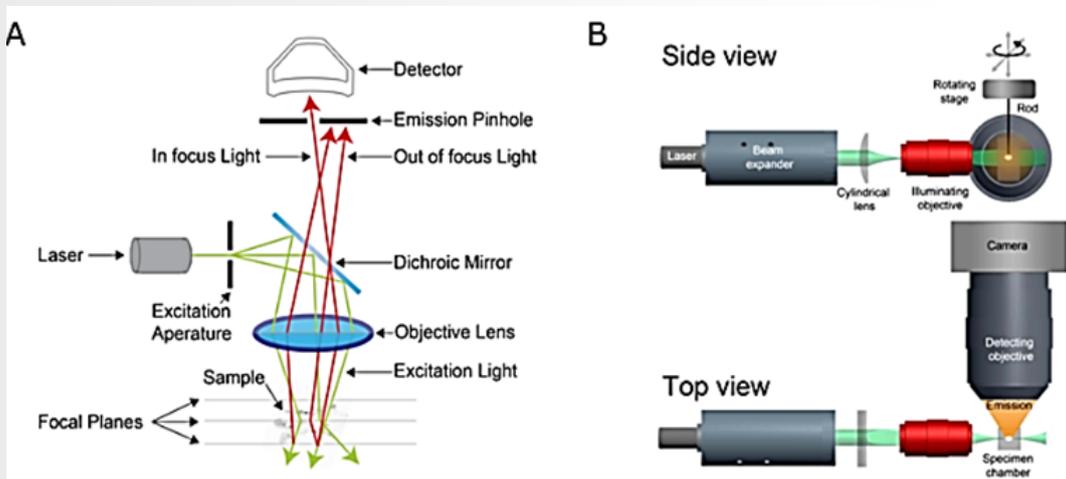


Fig 5. Le microscope confocal à fluorescence.



## 5. Le microscope électronique (ME)

### 5.1. Composition et principe de fonctionnement

#### 💡 Fondamental

Dans le microscope électronique, le faisceau de photons est remplacé par un **faisceau d'électrons** émis sous vide, accélérés par une forte différence de potentiel et canalisés par une série de lentilles (**électromagnétiques**). L'image se forme sur un écran fluorescent. Grâce au microscope électronique on a pu atteindre **un grossissement  $\times 100000$**  et un **PS de 0,2 nm ( $2 \text{ \AA}$ )** ce qui a permis d'obtenir **l'ultrastructure** de la cellule et de découvrir un bon nombre d'organites cellulaires. Mais à la différence du microscope photonique, il est impossible d'observer des échantillons vivants. (Fig. 6).....(2\*)

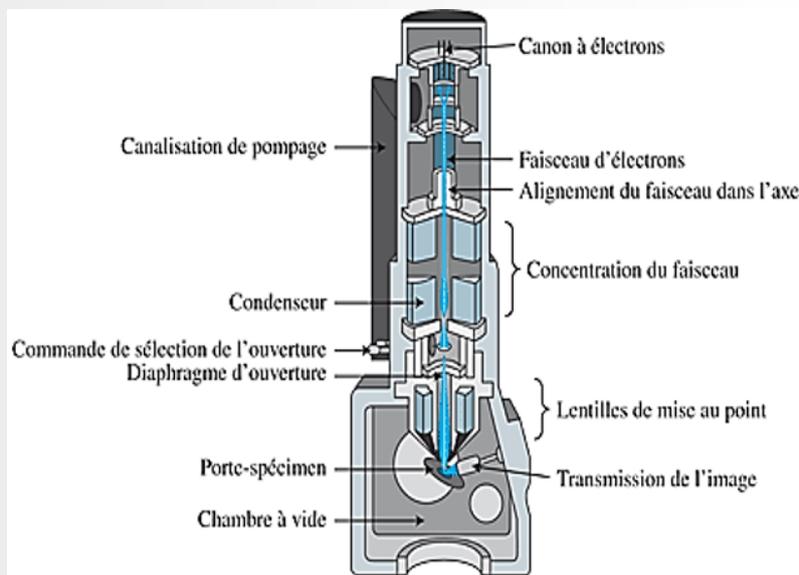


Fig 6. Composition du microscope électronique (ME).

### 5.2. Variantes du microscope électronique

Il existe deux types de microscopes électroniques :

- **Microscope Electronique à Transmission (MET)** : qui donne l'ultrastructure.
- **Microscope Electronique à Balayage (MEB)** : qui permet une étude morphologique en 3D et permet de révéler les surfaces externes et internes.

#### 💡 Fondamental : MET

Dans le MET, le flux d'électrons traverse l'échantillon. Il renseigne sur l'ultrastructure de la cellule et des organites qui la composent.

## 💡 Fondamental : MEB

- À la différence du MET, où le faisceau d'électrons traverse l'échantillon pour en donner une image complète, le MEB balaie la surface de l'échantillon sans le pénétrer.
- Les électrons sont réfléchis à la surface, il en résulte des images de surface donnant une idée sur la forme de l'objet.
- Pour stopper les électrons à la surface, les échantillons sont couverts d'une fine couche d'or ou de carbone. Un détecteur capte les électrons réfléchis et les transmet à un écran fluorescent.....(1\*)

## 6. Techniques de séparation et de purification cellulaire

- L'exploration de la cellule peut se faire à différents niveaux.
- Il est important de noter que la microscopie reste une méthode commune à tous les niveaux de l'expérimentation vers laquelle converge la majorité des techniques de laboratoire.

### 6.1. Séparation des cellules d'un tissu

#### ⚙️ Méthode

Il est possible d'obtenir des cellules vivantes à partir d'un organe ou un tissu frais. On procède tout d'abord à **une dissociation mécanique** puis **enzymatique** du tissu afin d'éliminer la matrice extracellulaire et de casser les jonctions intercellulaires. Ensuite, on élimine les débris et on passe les cellules au **cytomètre de flux** (Fig. 7) afin de les trier et de garder celles qui nous intéressent.....(1\*)

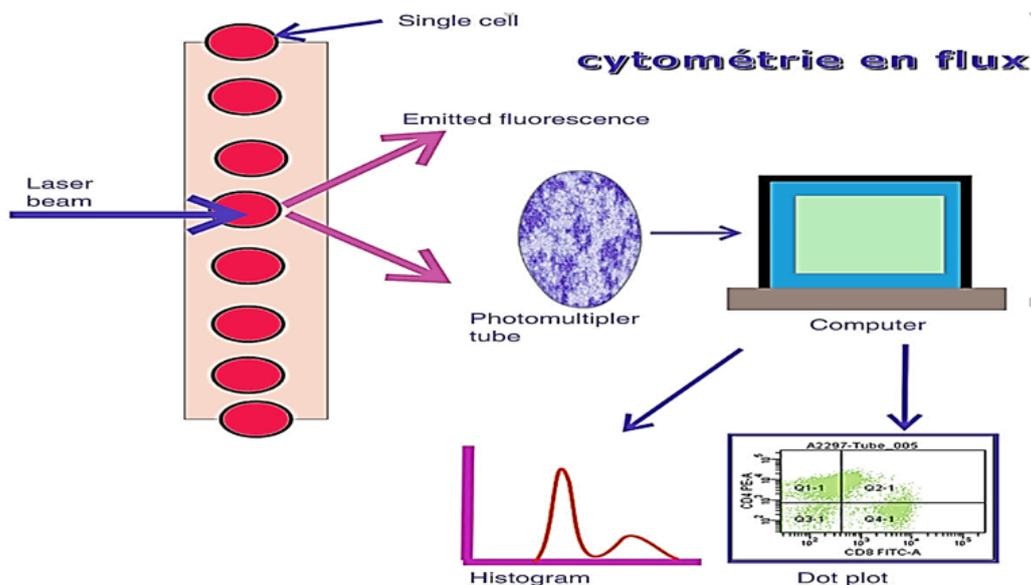


Fig 7. Cytométrie en flux.

## 6.2. Purification

### Définition

---

C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule à savoir :

- sa taille relative
- sa granularité
- son intensité relative de fluorescence si les cellules sont marquées par un fluorochrome.

### Méthode

---

- Les cellules passent l'une après l'autre dans le cytomètre où elles sont exposées à un rayon LASER qui sonde les paramètres suscités.
- Grâce au cytomètre en flux, il est possible de trier les cellules et de ne garder que la population qui nous intéresse. A titre informatif, le cytomètre analyse 1000 cellules/seconde.
- Les cellules obtenues sont vivantes, pour les maintenir dans cet état il est important de les cultiver dans les conditions propices : c'est tout l'intérêt de la culture cellulaire.....(5<sup>\*</sup>)

### Complément

---

Sur ces cellules, on peut réaliser :

- Des études morphologiques ;
- Des études biochimiques ;
- Des études fonctionnelles (respiration, la mitose, la migration, l'apoptose, signalisation....) ;
- Autre: dépistage de maladies génétiques, thérapie génique. Les cellules sont également utilisées en industrie pharmaceutique pour la production de vaccins ;
- Dans le domaine de la recherche, les médicaments et les réactifs sont d'abord testés sur les cellules avant d'être testés sur les animaux puis sur l'Homme.....(5<sup>\*</sup>)

## 7. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules

Afin d'analyser leur structure ou leur composition, il peut être intéressant de séparer les différentes structures présentes dans la cellule afin de les explorer d'une manière individuelle. On obtient les organites cellulaires par **homogénéisation** suivie de **fractionnement**.

## 7.1. Homogénéisation

### 🔍 Définition

Elle consiste en **la rupture des membranes plasmiques** ce qui entraîne la libération du contenu cellulaire. On obtient un homogénat dans lequel baignent les différents constituants de la cellule (Fig. 8).

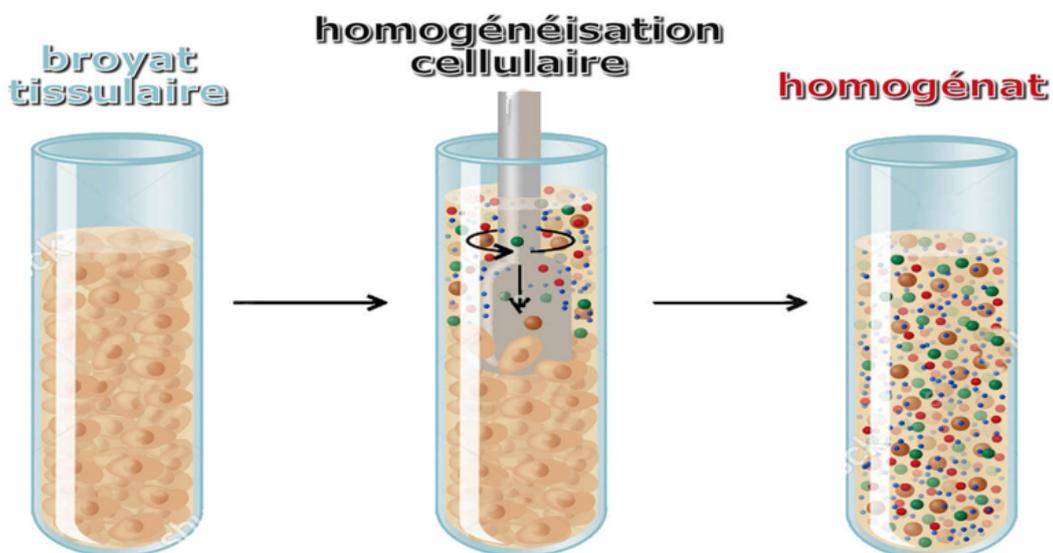


Fig 8. L'homogénéisation.

### ⚙️ Méthode

L'homogénéisation doit se faire dans des conditions assez rigoureuses afin de bloquer l'activité des enzymes lytiques (Dans un liquide isotonique, à basse température, en présence d'agents réducteurs et à PH neutre). Elle peut être réalisée par **action mécanique (broyage des cellules)**, ou **physique (pression ou sonication ((Fig. 9))** ) ou **chimique (choc osmotique ((Fig. 10))** ou **détergents**) ou **biochimique (enzymes).....(5\*)**

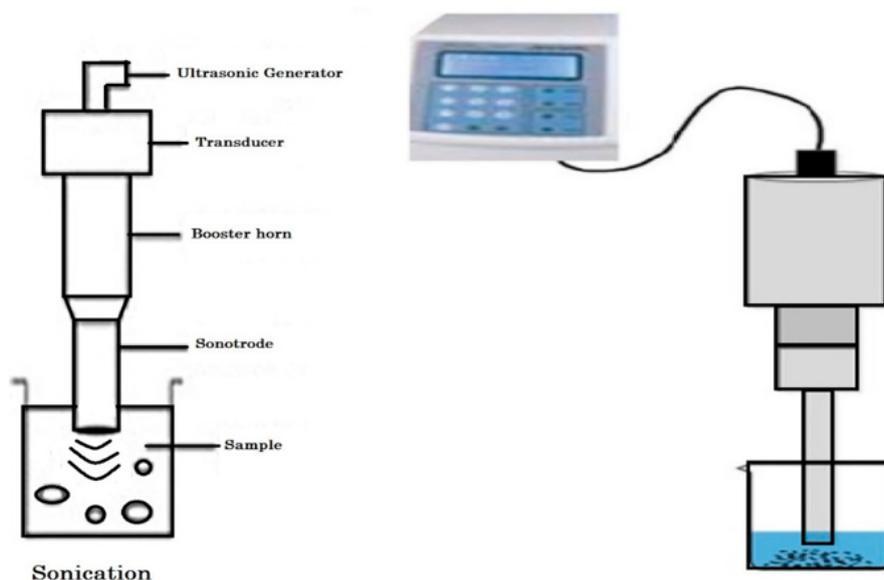


Fig 9. La sonication.

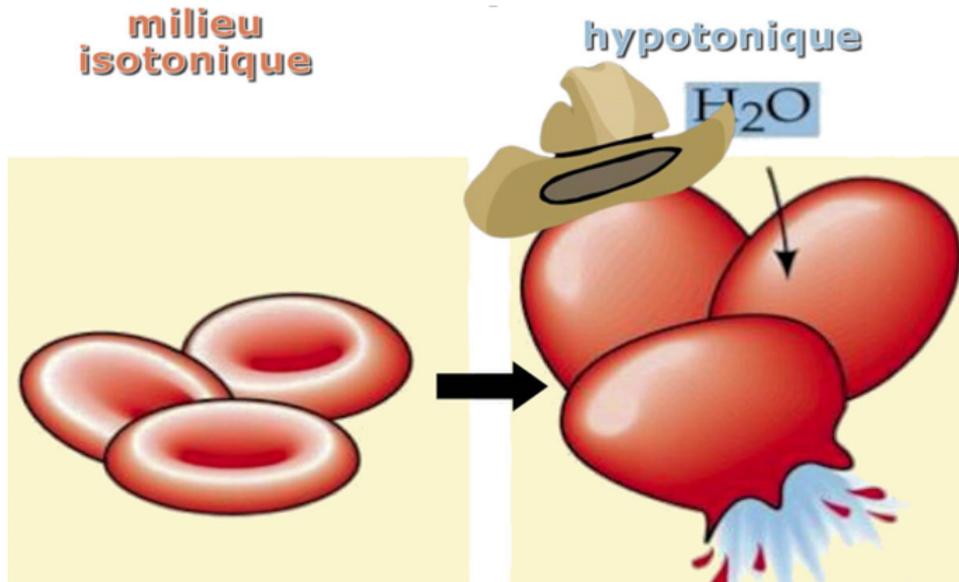


Fig 10. Cytolyse des globules rouges par choc osmotique.

**Remarque**

- Il est à noter que dans l'homogénat : les organites restent intacts sauf le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui se trouvent rompus en fragments tout comme la membrane plasmique. Ces fragments se referment aussitôt pour former des petites vésicules connues sous le nom de microsomes.....(5\*)

**7.2. Fractionnement cellulaire**

Le fractionnement cellulaire se fait par **centrifugation** (Fig. 11) qui permet la séparation des éléments constitutifs d'un corps par la force centrifuge.

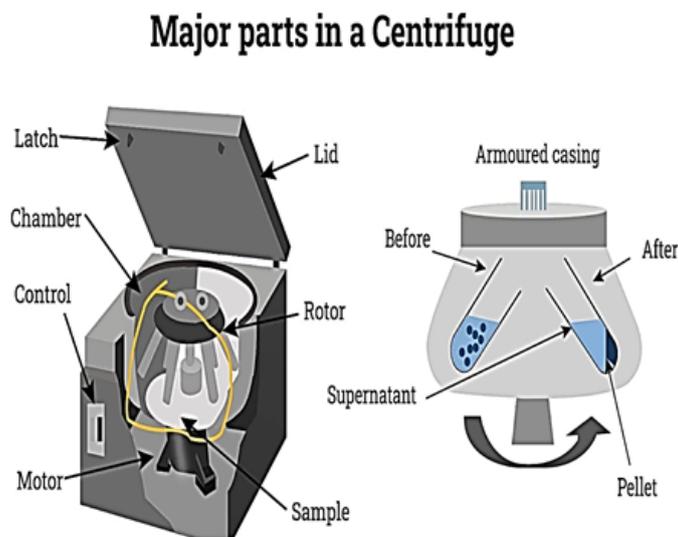


Fig 11. Les composants d'une centrifugeuse.

## ⚙️ Méthode

- L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse nommée centrifugeuse. Quand les vitesses de rotation sont très élevées on parlera d'ultracentrifugeuse (>15000 rpm (rotation par minute)).
- Le fractionnement cellulaire peut se faire grâce à deux techniques différentes.

### 💡 Fondamental : a. Ultra Centrifugation Différentielle (UCD)

- Elle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants (macromolécules, organites etc...). Elle consiste à centrifuger l'homogénat à différentes vitesses. A chaque centrifugation, un organite sédimente pour former un culot. On récupère le surnageant et on le centrifuge à une vitesse plus grande ce qui va permettre la sédimentation d'un autre organite et ainsi de suite. (Fig. 12)
- Dans l'ordre, les **noyaux** sédimentent en premier puis les **mitochondries** et les **lysosomes** et les **peroxyosomes** puis les **microsomes** puis les **ribosomes**.
- L'UCD offre, à côté de la simplicité de préparation, l'avantage de manipuler de grandes quantités d'homogénat. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir des fractions pures.....(5\*)

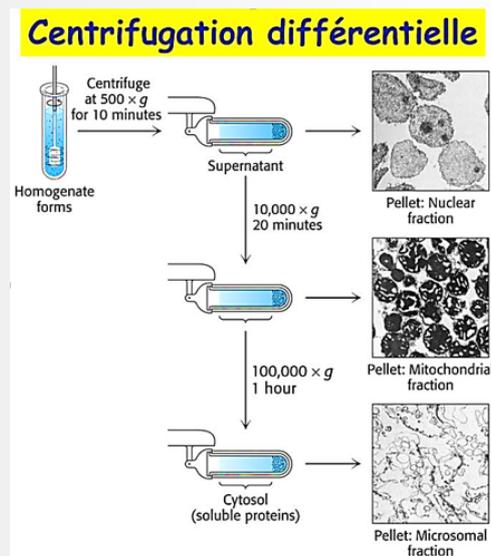


Fig 12. La centrifugation différentielle.

### 💡 Fondamental : b. Ultra Centrifugation sur Gradient (UCG)

- L'ultracentrifugation est également utilisée pour séparer les composants cellulaires sur la base de leur densité de flottaison qui fait appel à la poussée d'Archimède. Pour cela on prépare un gradient de densité en utilisant le plus souvent le sucrose. Les variations de densité sont obtenues en faisant varier la concentration de sucrose dans l'eau. L'homogénat est déposé sur le gradient puis centrifugé à l'ultracentrifugeuse. On obtient une séparation simultanée des différents constituants cellulaires en fonction de leur densité. Chaque molécule reste dans la phase qui correspond à sa densité, elle ne peut migrer dans une phase à densité supérieure. (Fig. 13)

- L'UCG permet d'obtenir des fractions pures en une seule centrifugation mais seulement sur un volume d'homogénat très réduit (ce qui constitue un inconvénient majeur de cette technique).....(5\*)

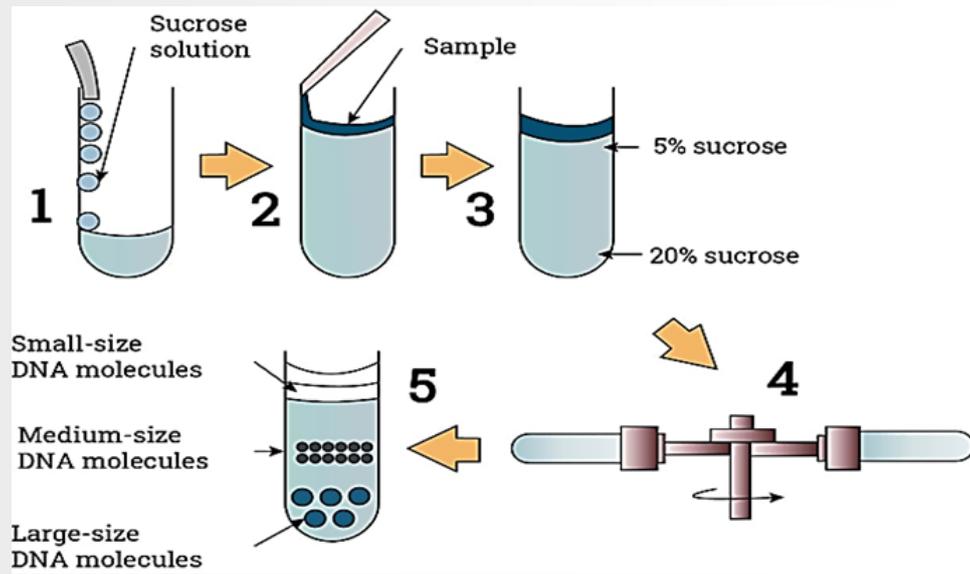


Fig13. La centrifugation sur gradient.

## 8. Marquages

### 8.1. Histochimie/Cytochimie

#### 💡 *Fondamental*

Elle se base sur l'utilisation de **colorants en phase aqueuse** pour localiser des molécules à la surface ou à l'intérieur des cellules sur des coupes (**Fig. 14**)

(Exemple: localisation de polysaccharides).....(5<sup>\*</sup>)

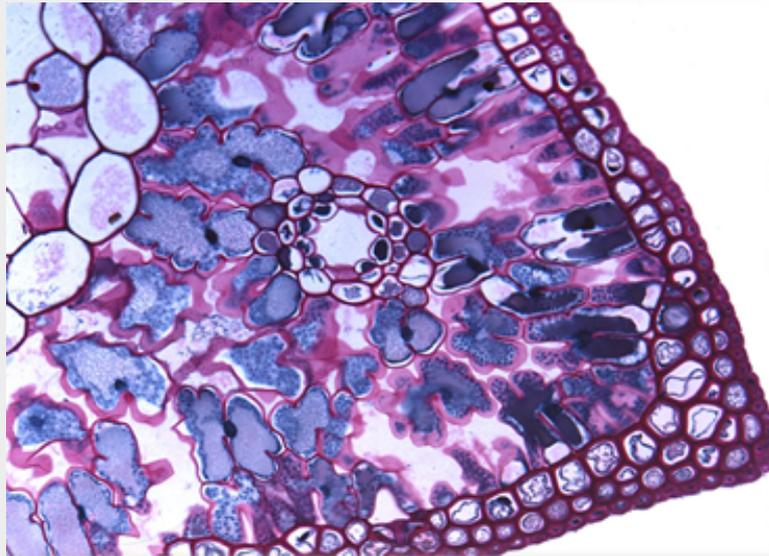


Fig 14. Marquage par histochimie.

### 8.2. Immunohistochimie

#### 💡 *Fondamental*

Utilise pour le marquage des molécules, des anticorps qui se fixent spécifiquement sur ces molécules selon une réaction **Antigène-Anticorps**. Il s'agit d'une réaction hautement spécifique qui donne un meilleur marquage que la précédente (**Fig. 15**).....(5<sup>\*</sup>)

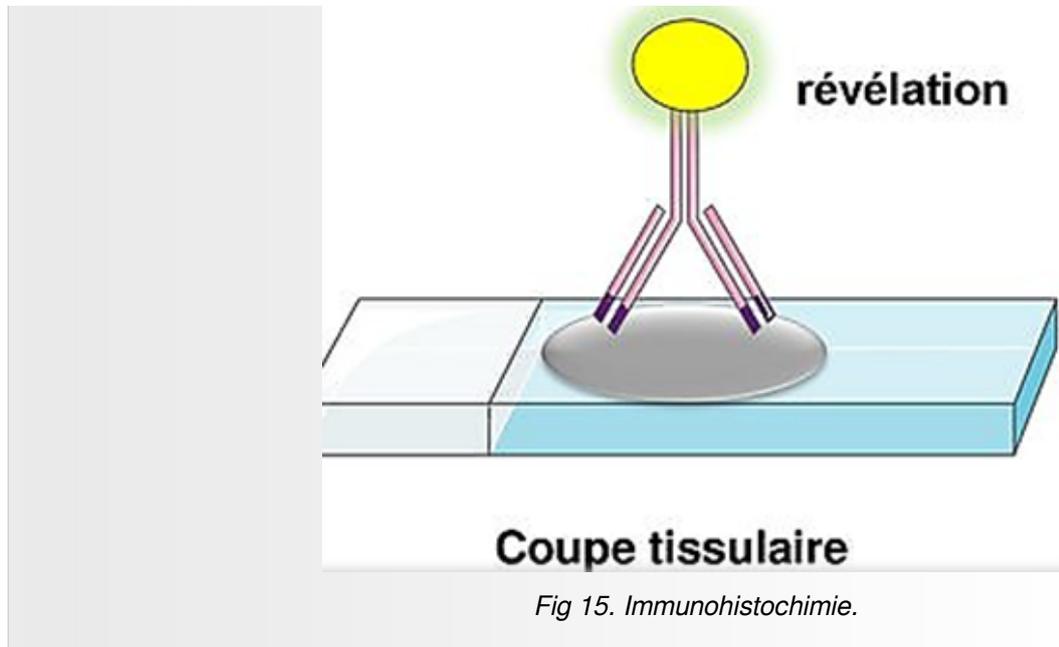


Fig 15. Immunohistochimie.

### 8.3. Immunofluorescence

#### 💡 Fondamental

Les anticorps peuvent être couplés à des **fluorochromes**, on parle alors d'immunofluorescence directe ou indirecte. Ce marquage peut se faire sur des cellules isolées en suspension (révélation au cytomètre en flux) ou sur des cellules adhérentes sur lame (révélation au microscope). (**Fig. 16**).....(5<sup>+</sup>)

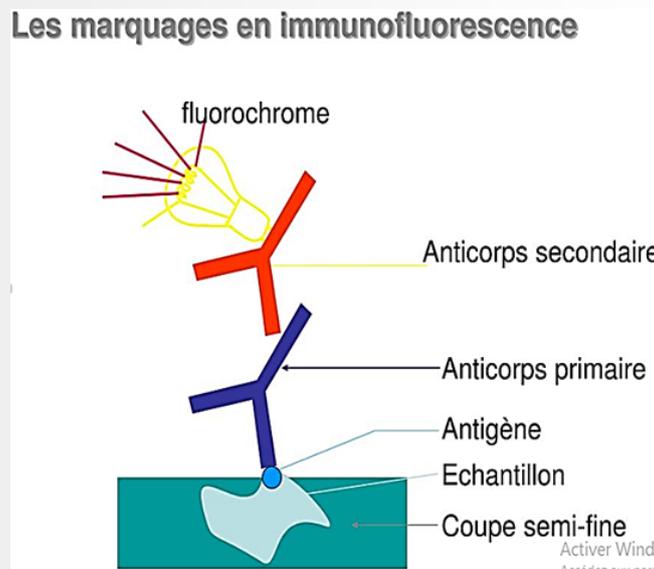


Fig 16. Les marquages en immunofluorescence.

# Conclusion

En conclusion, les méthodes d'étude des cellules, telles que la microscopie optique, électronique, la culture cellulaire et les techniques de marquage, ont profondément enrichi notre compréhension de la structure et des fonctions cellulaires. Elles permettent d'observer en détail les composants intracellulaires ainsi que les interactions entre cellules. Les jonctions intercellulaires, quant à elles, jouent un rôle fondamental dans la cohésion, la communication et l'organisation des tissus. Leur étude met en lumière la complexité de l'architecture cellulaire et les mécanismes essentiels au fonctionnement des organismes multicellulaires. L'association de ces approches expérimentales continue de faire progresser la recherche en biologie cellulaire, en physiologie et en médecine.

# Bibliographie

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). \*Molecular Biology of the Cell\* (6th ed.). Garland Science.

Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (2015). \*Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology\* (4th ed.). Elsevier.

# Webographie

<https://www.studocu.com/row/document/universite-badji-mokhtar-de-annaba/medecine/2022-2023-p1-methodes-d-etude-de-la-cellule-dr-ailane/74095075>

<https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/tc/2020/TDN%C2%B04-%20Les%20jonctions%20intercellulaires%202020-2021%20Dr%20ZOUAGHI%20Youcef.pdf>