

Cours de Cytologie & Physiologie cellulaire

Dr A. DEKAR - MADOU

Promo: 2013-2014

Plan

Introduction

Le microscope photonique à fond clair M. Ph. ou M.O.

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Plan (suite)

Le microscope électronique à balayage MEB

- Fonctionnement
- Technique de cryofracture / cryodécapage + Ombrage

Le fractionnement & isolement subcellulaire

- Technique de coloration négative

Plan

Introduction

Le microscope photonique à fond clair M. Ph. / M.O.

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique
- Le microscope photonique à fluorescence

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Notion de pouvoir séparateur = pouvoir de résolution

✓ Capacité de l'œil à distinguer clairement deux points très rapprochés



0,2mm

✓ Organismes de taille plus petite



Invisibles



instrument d'optique permettant d'examiner des objets ou leurs détails, trop petits pour être vus à l'œil nu.

Artifices : lentille très réfringentes



1ers microscopes

Simple



0,2μm



complexes

Connaissance de la cellule

Etude morphologique

- Description structurale & ultrastructurale

- Taille

- Forme

- Contenu

Etude biochimique

- Détection
- Localisation
- Quantification

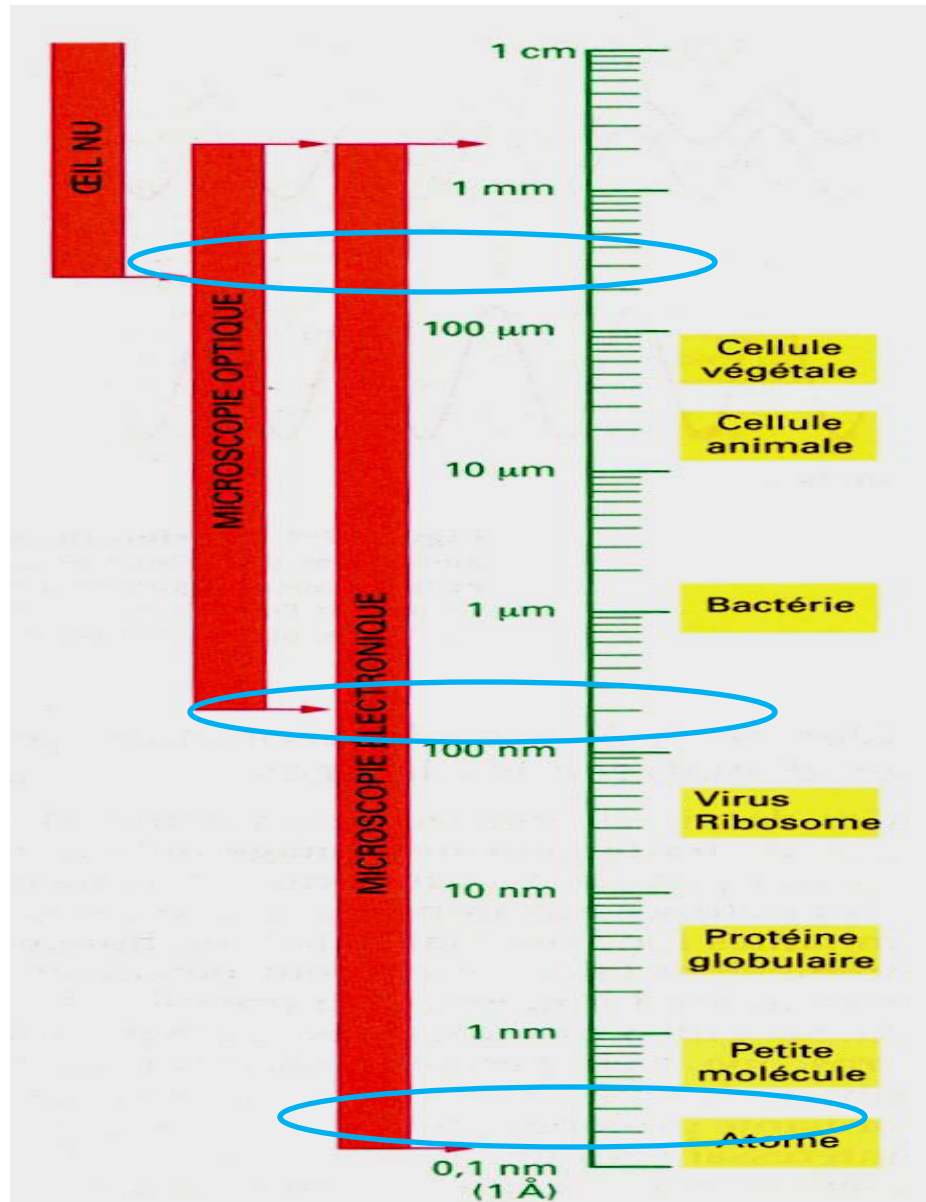
Composants

Etude moléculaire

- Nature des molécules
- Organisation

De la lentille au microscope

Echelle des dimensions dans le monde du vivant



Les premiers microscopes optiques



Microscope de Cuff (1760)



Microscope optique (1751)

Les premiers microscopes optiques

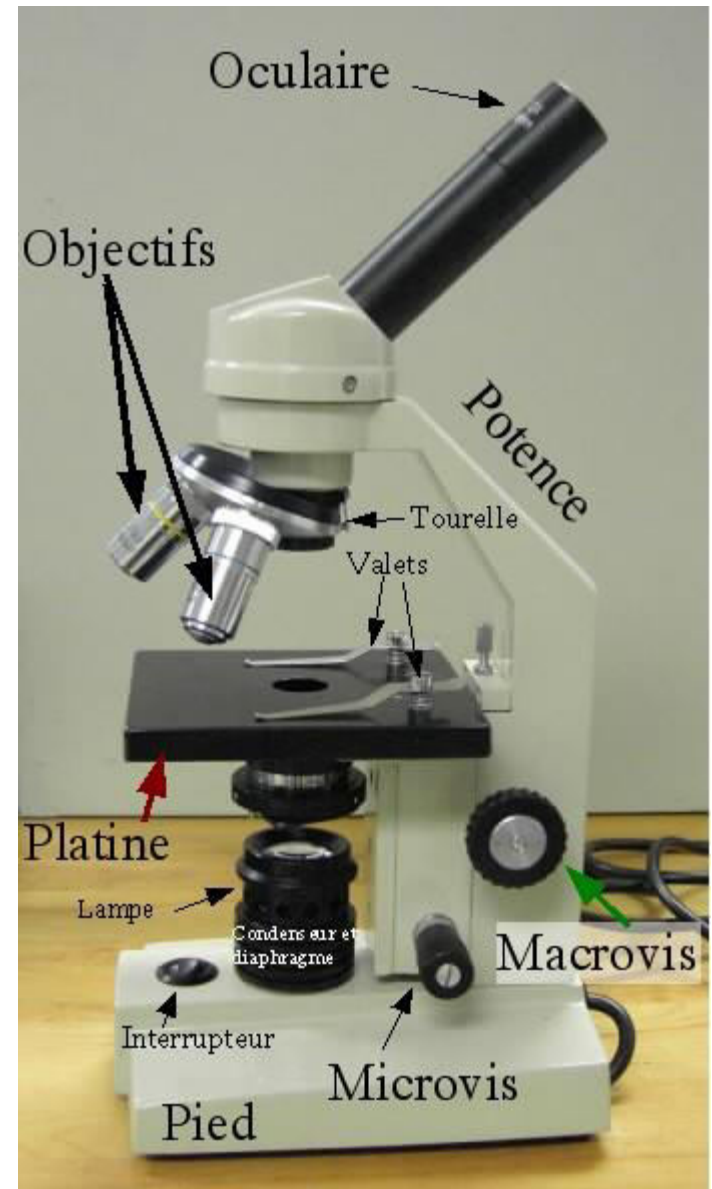
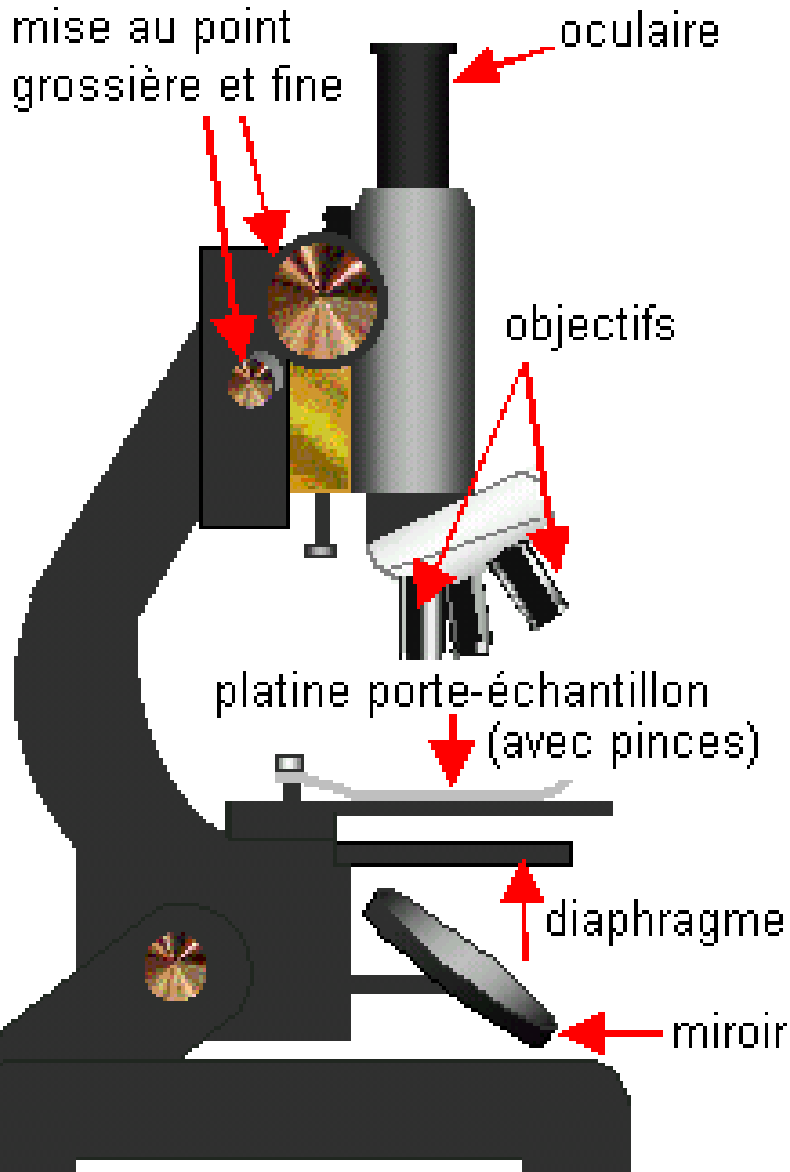


Microscope Carl Zeiss 1891



**Modèle Voigt & Hochgesang"
(1890)**

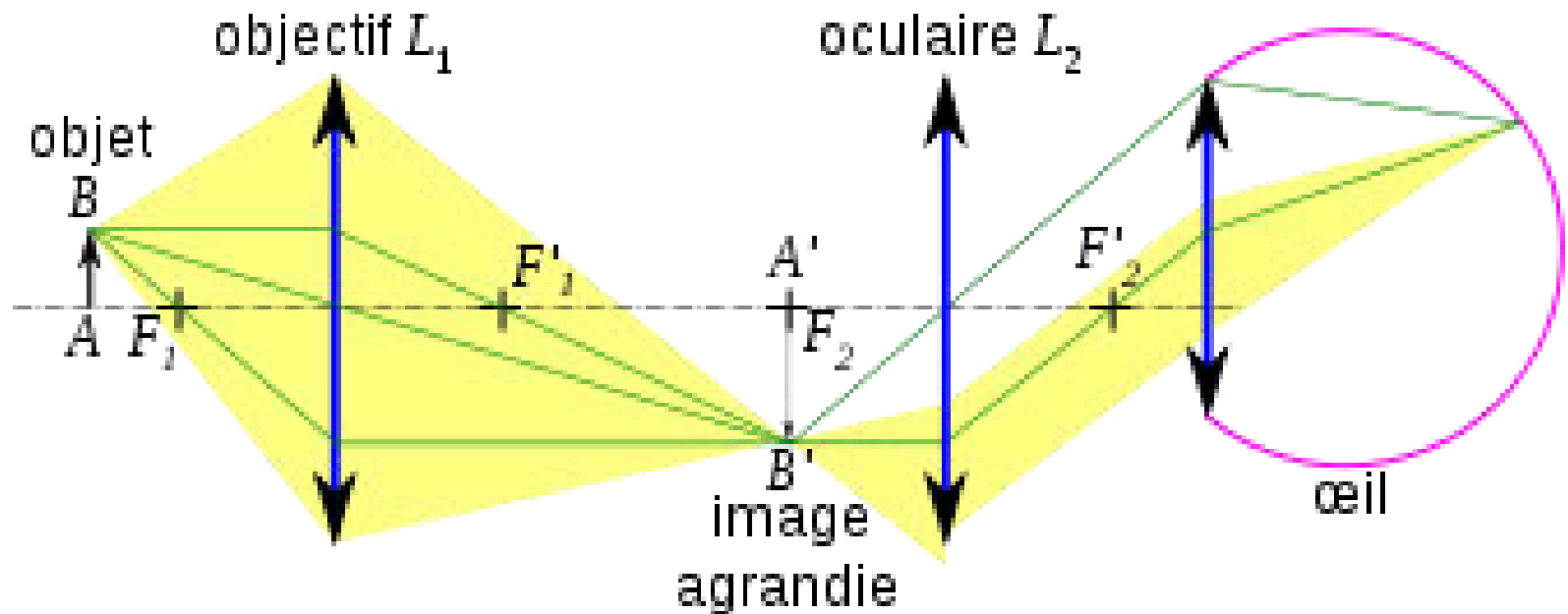
Composants du microscope photonique



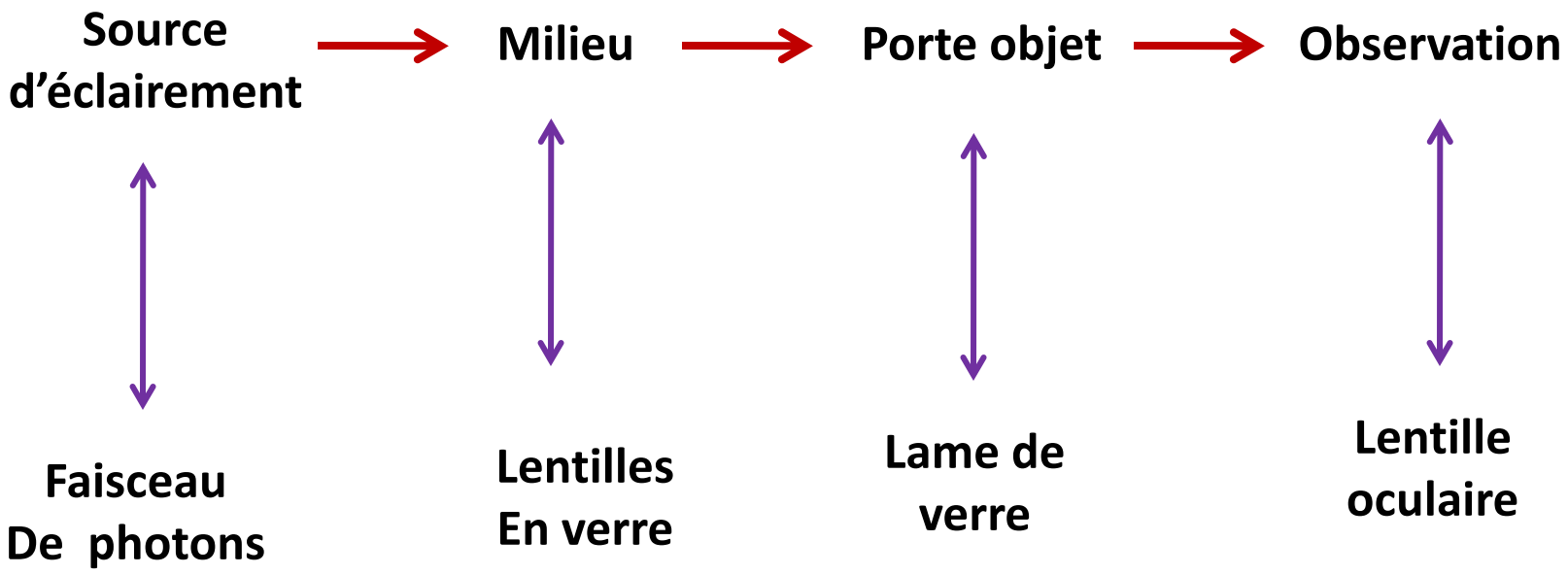
**Principe de fonctionnement:
observation par transmission**

Principe de la transmission du faisceau de photons

Les microscopes sont conçus selon le principe de l'optique. la formation de l'image dans la rétine de l'œil se fait par la transmission du faisceau de photons à travers les milieux liquidiens de l'œil

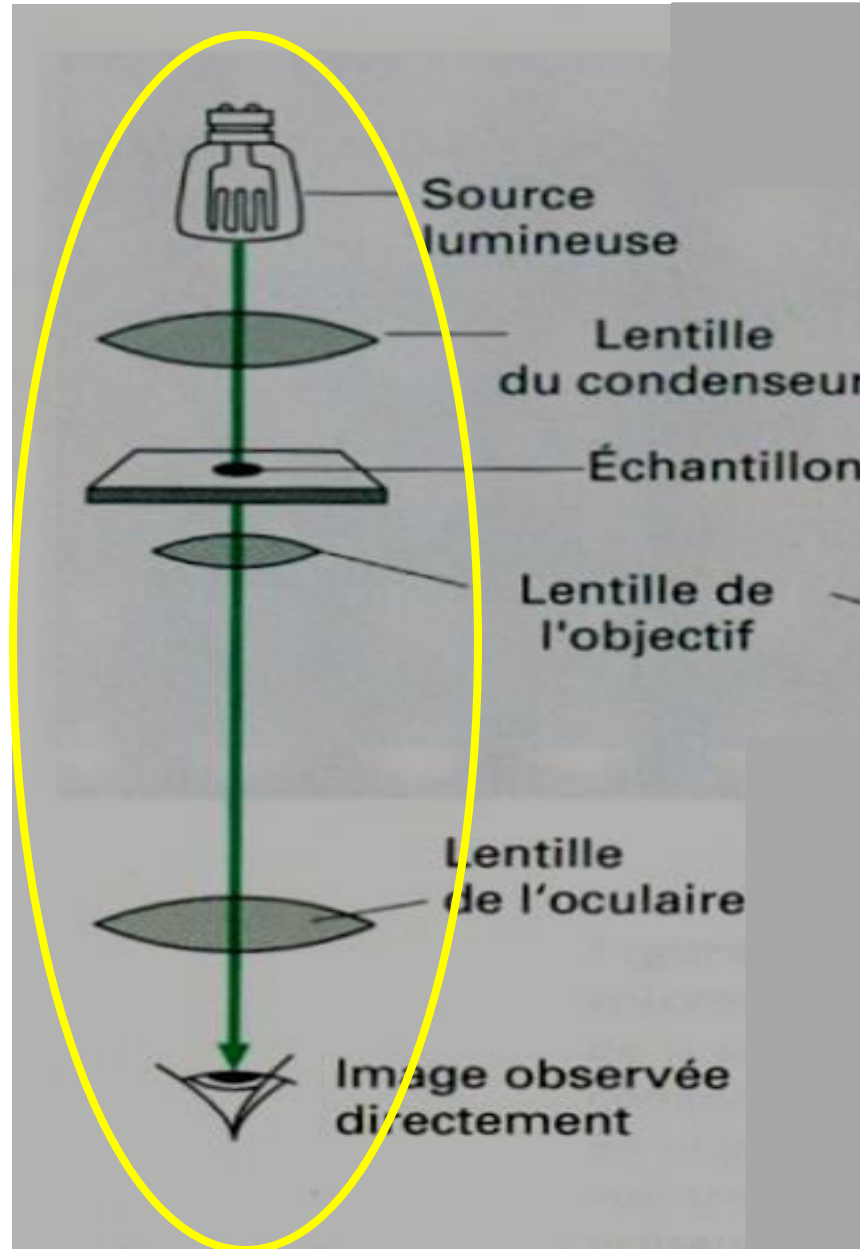


Principe de fonctionnement du M. Ph



Résultat : image en couleur

Principe de la transmission pour le M Ph. Et le ME



Méthodes de préparation de l'échantillon Pour l'observation au M Ph.

Technique histologique

Prélèvement



Dissection et
prélèvement



Fixation



4 jrs



Déshydratation



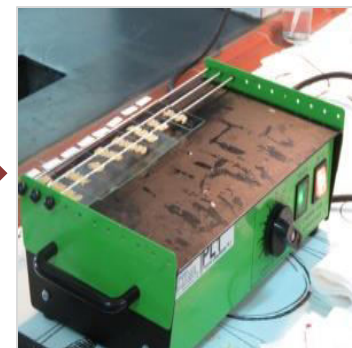
Inclusion



Réalisation des coupes

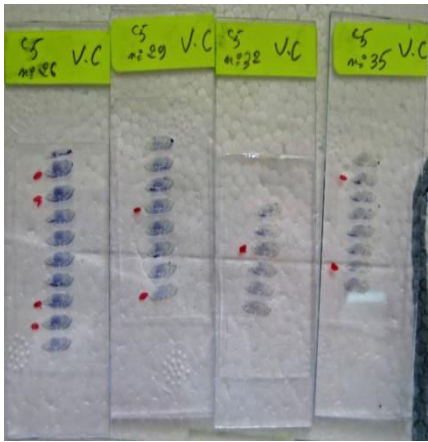
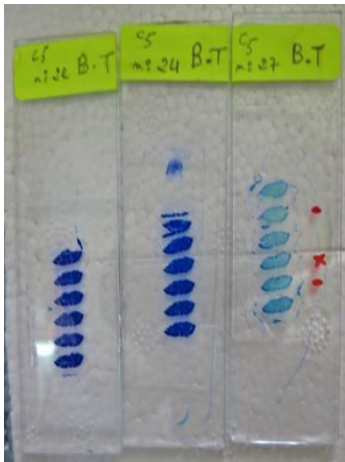
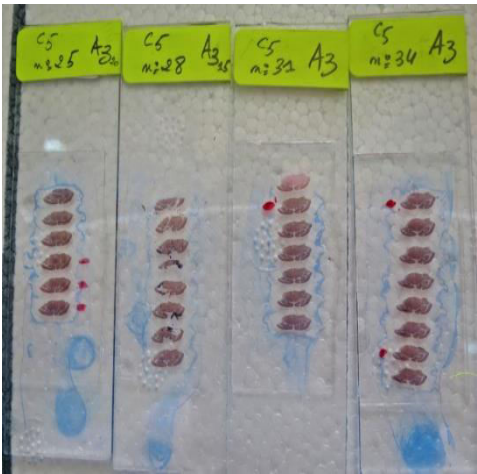


Obtention
des rubans
De coupes



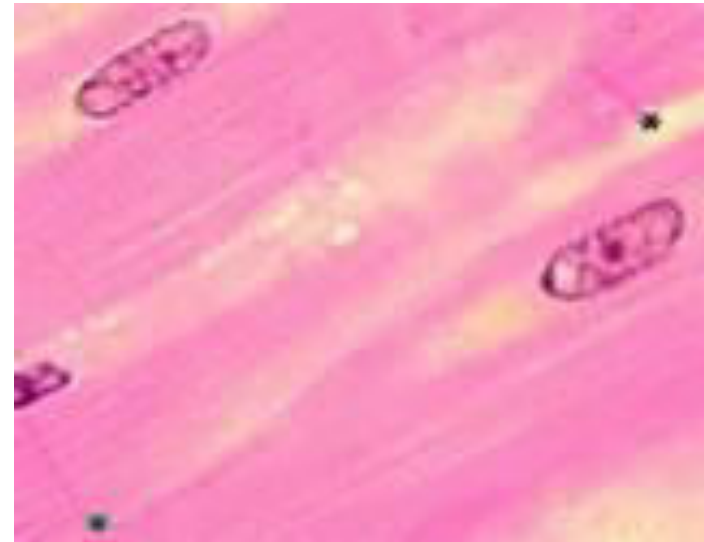
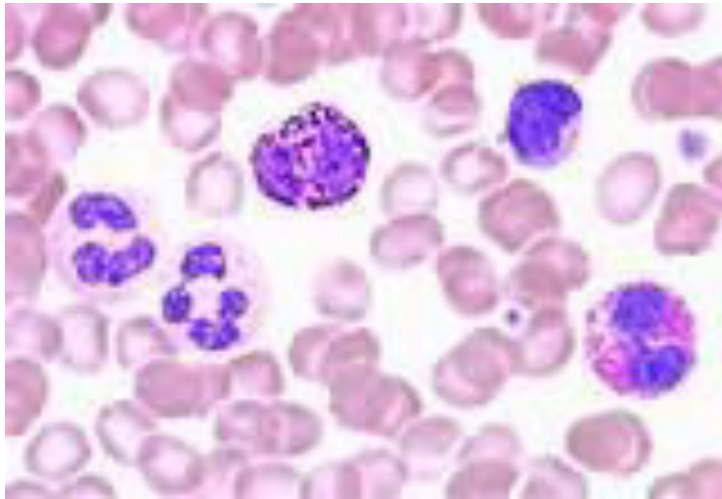
Etalement

Coloration



Analyse des coupes au M.Ph.





Etude structurale des tissus et des cellules

Plan

Le microscope photonique à fond clair M. Ph. / M.O.

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Le microscope à fluorescence: un microscope photonique qui détecte une lumière fluorescente



Principe de fonctionnement du microscope à fluorescence

Il faut savoir que

Longueur d'onde (en m)								
Rayons cosmiques	Rayons gamma	Rayons X	Ultra violet	Lumière visible	Infra rouge	Micro ondes	Ondes radio	Grandes ondes
Picomètre		Nanomètre			Micromètre	Millimètre	Mètre	Kilomètre

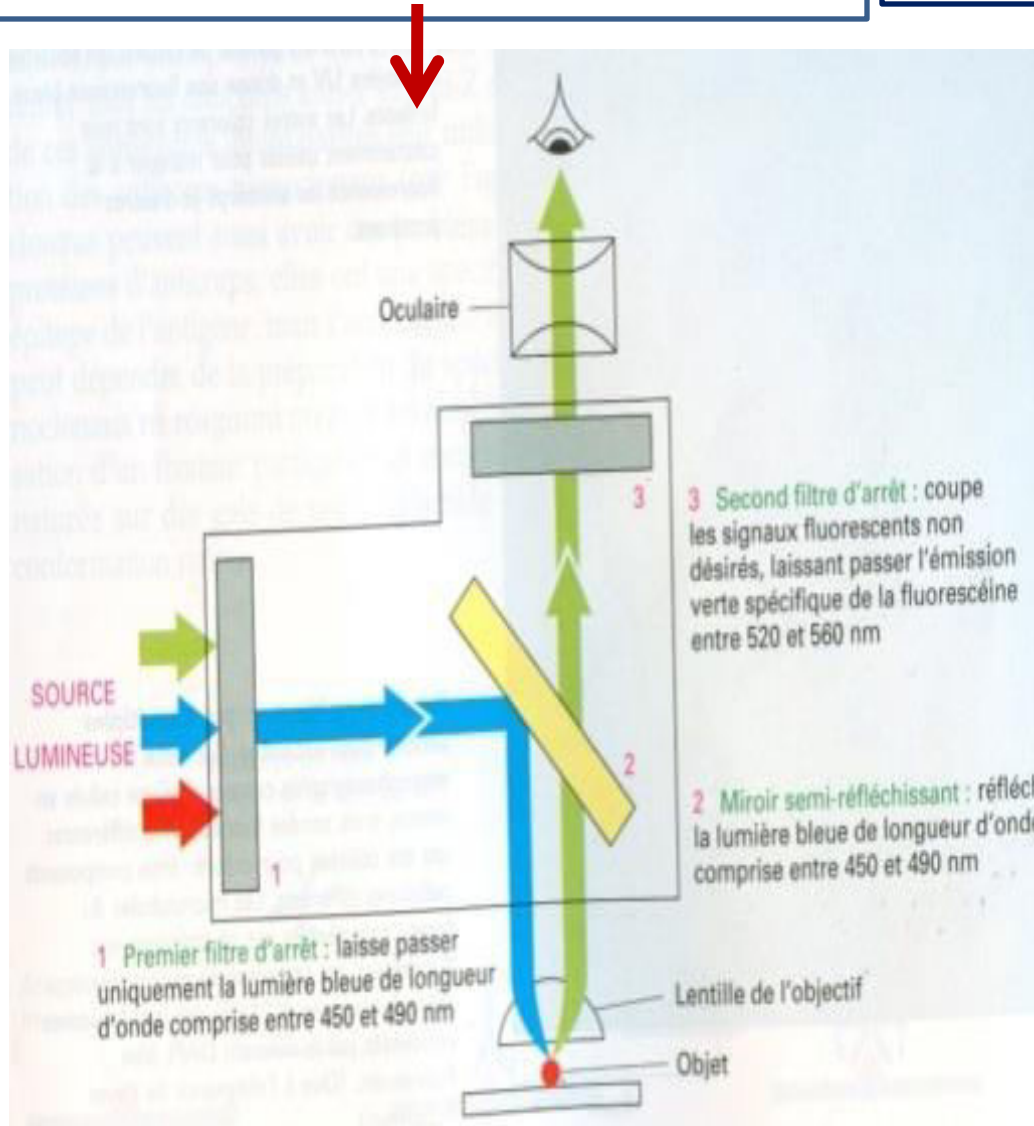


380nm

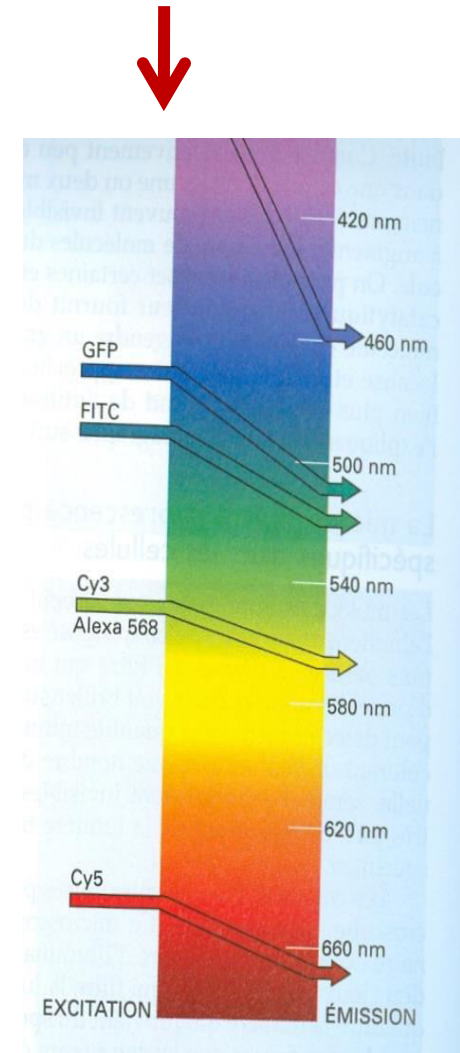
780nm

Décomposition du spectre de la lumière visible

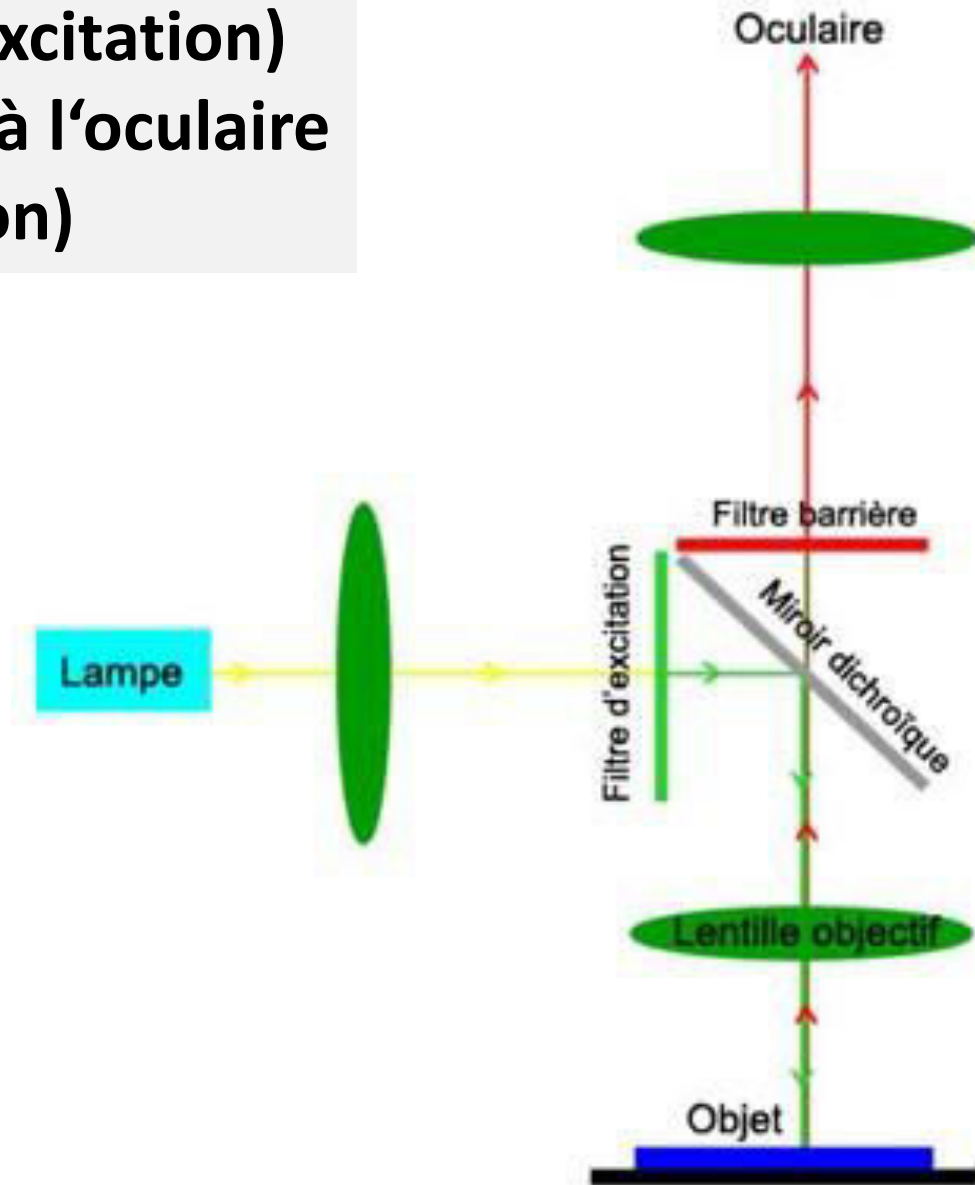
Formation de l'image fluorescente



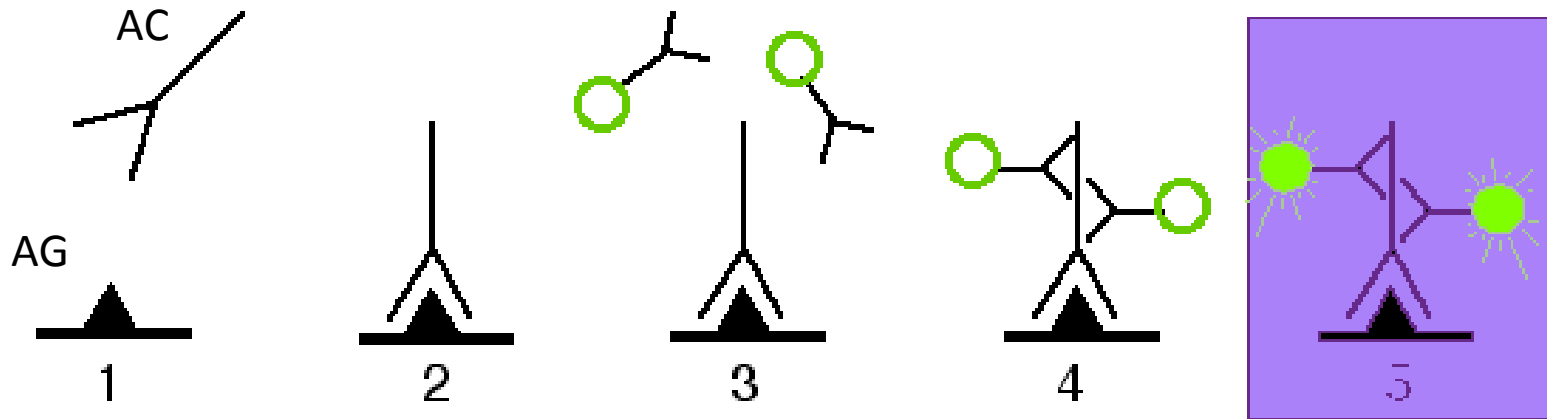
Interactions: lumière -fluorochromes



Trajet de la lumière qui éclaire l'échantillon (lumière d'excitation) et de la lumière transmise à l'oculaire (lumière d'émission)



Pour induire la fluorescence on procède à un marquage (par des fluorochromes) des molécules recherchées (AG) selon le principe de l'immuno-réaction (AG-AC)

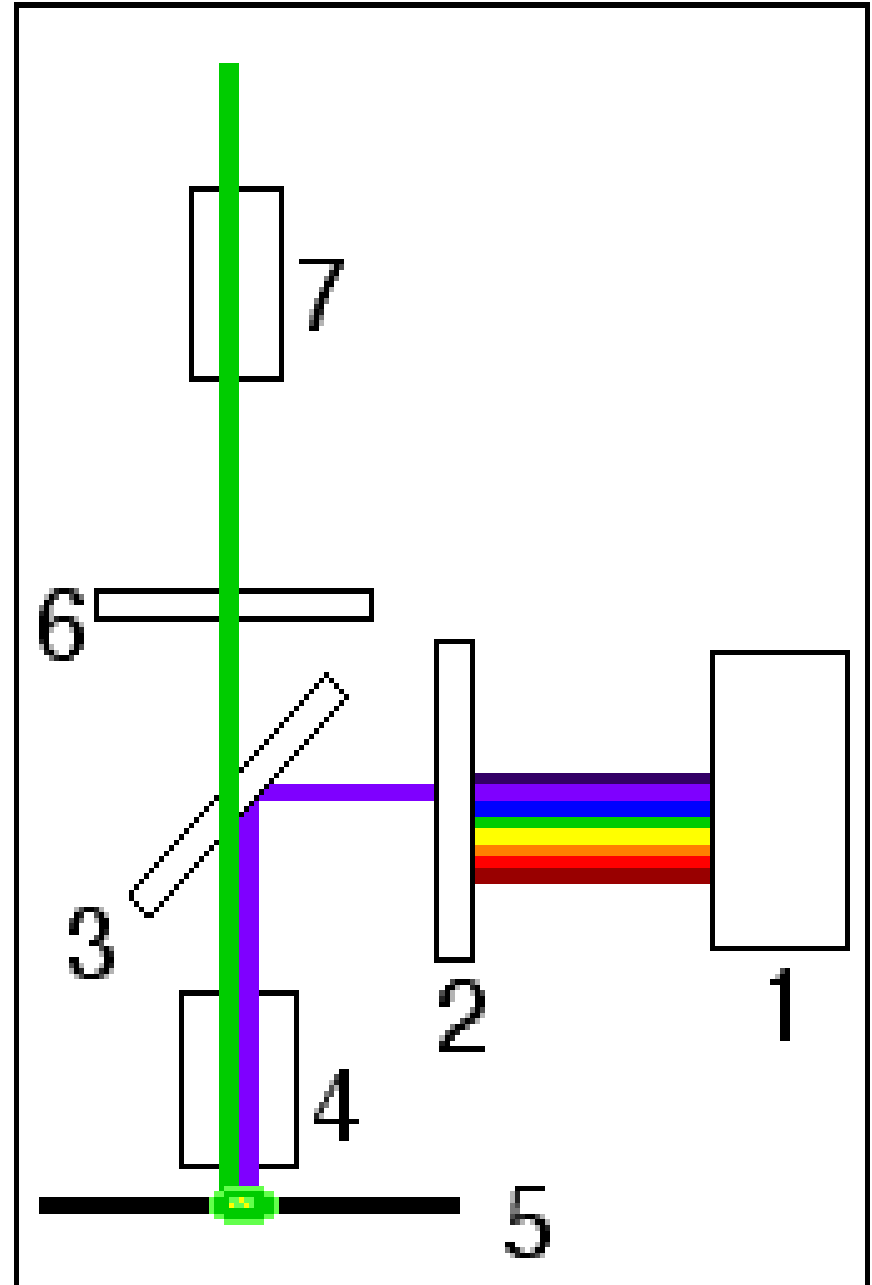


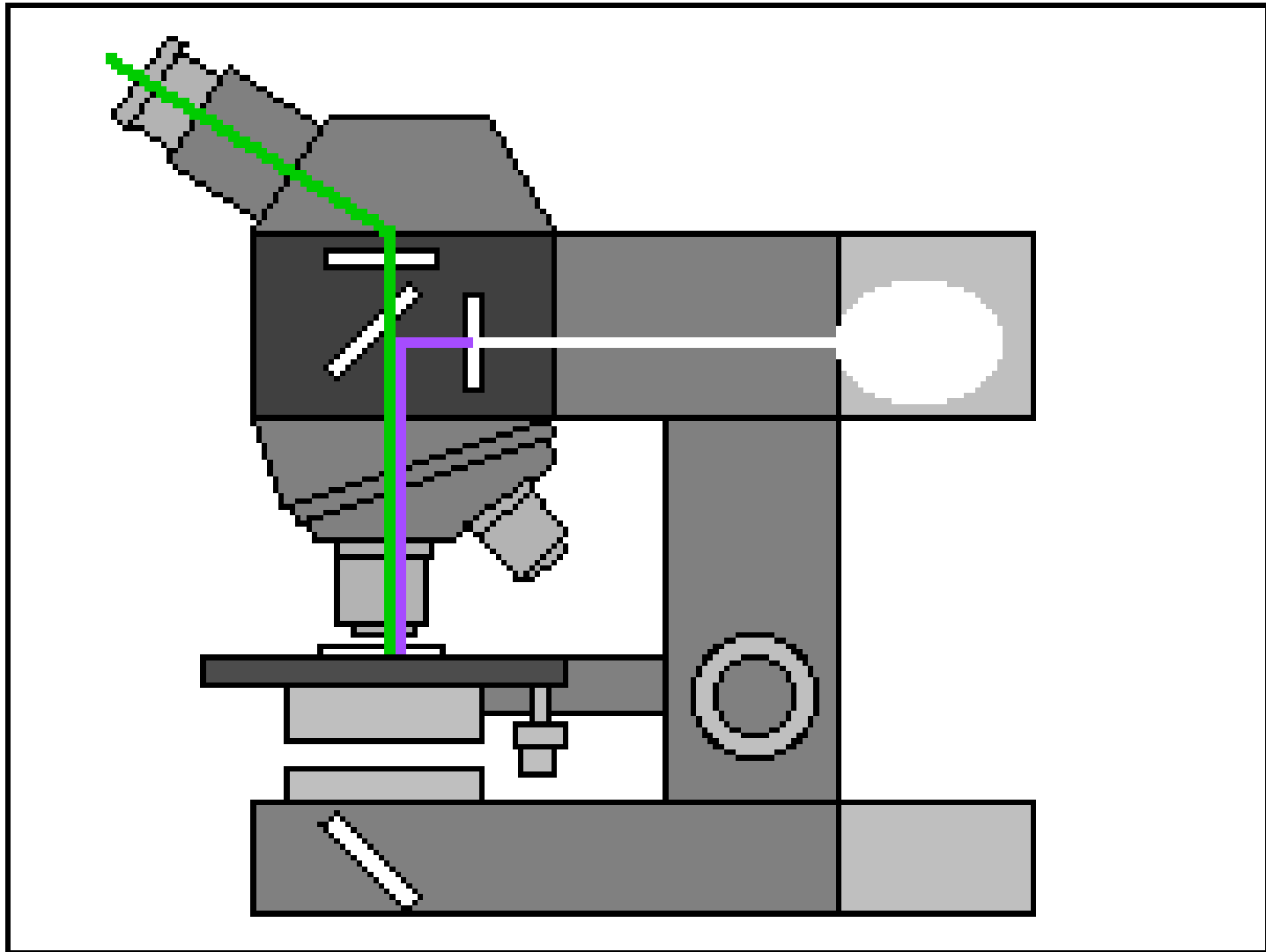
Fluorochromes	rhodamine	fluorescéine	FTTC	orange d'acridine	DAPI
Couleur d'excitation	vert	bleu	bleu	bleu	UV

Les marqueurs fluorescents les plus courants et leurs lumières d'excitation

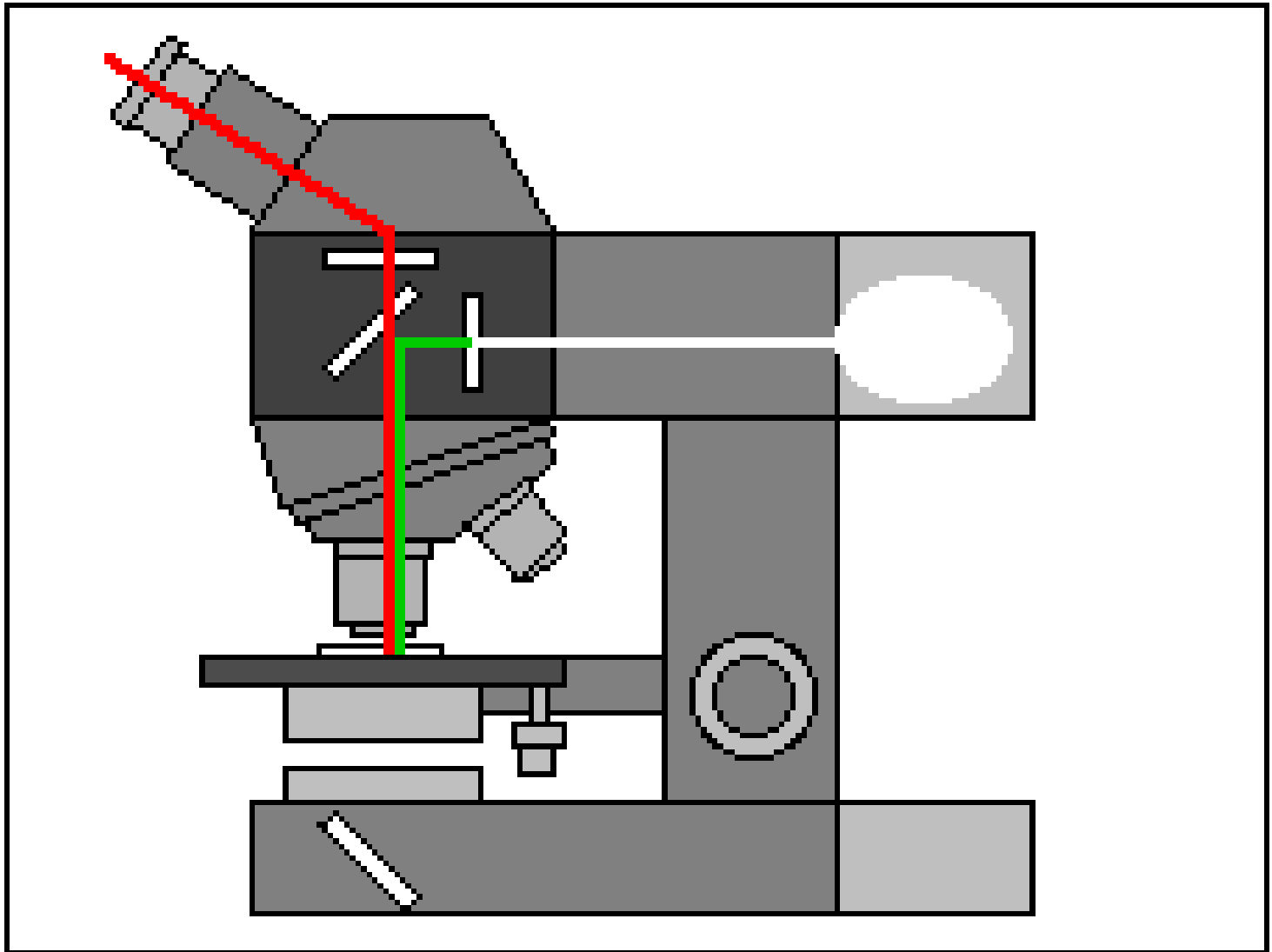
Optique simplifiée du microscope à fluorescence

- 1-lampe à arc
- 2-filtre
d'excitation
- 3-miroir
dichroïque
- 4-objectif
- 5-préparation
- 6-filtre
d'émission
- 7-oculaire



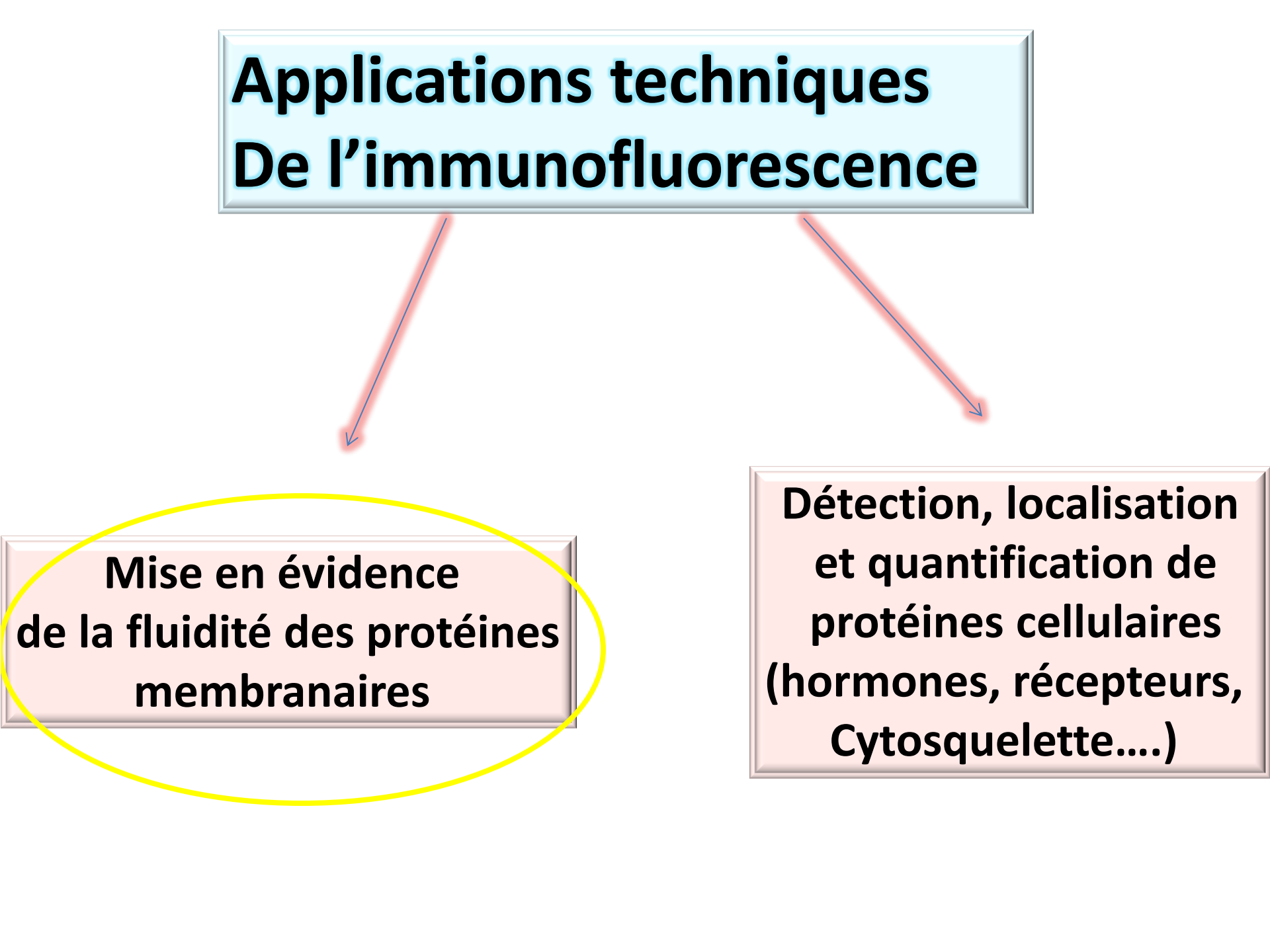


**Observation en utilisant le jeu de
filtres spécifique de la fluorescéine.**



**Observation en utilisant le jeu
de filtres spécifique de la rhodamine.**

Applications techniques De l'immunofluorescence

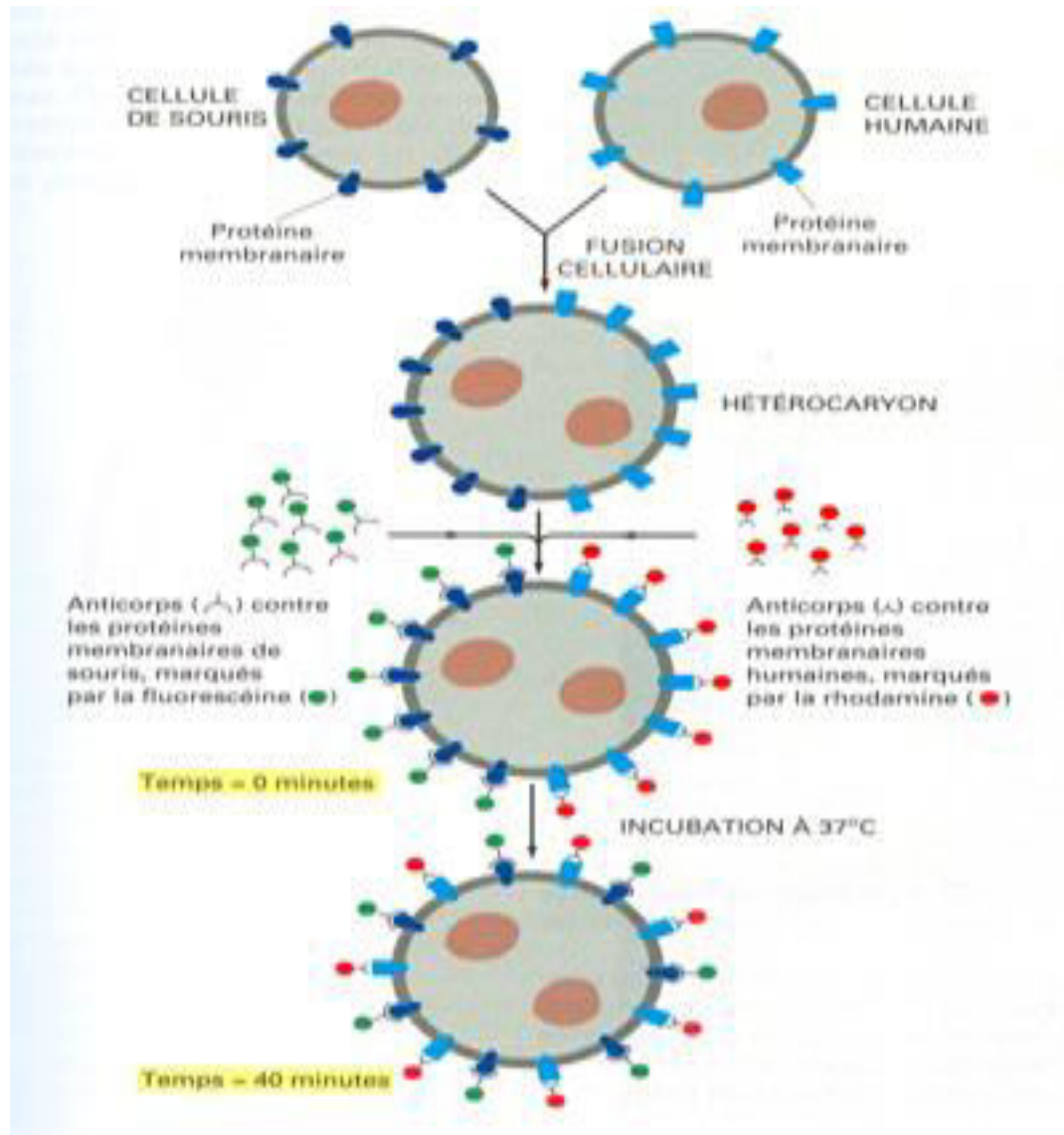


```
graph TD; A[Applications techniques De l'immunofluorescence] --> B[Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires]; A --> C[Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, Cytosquelette....)]
```

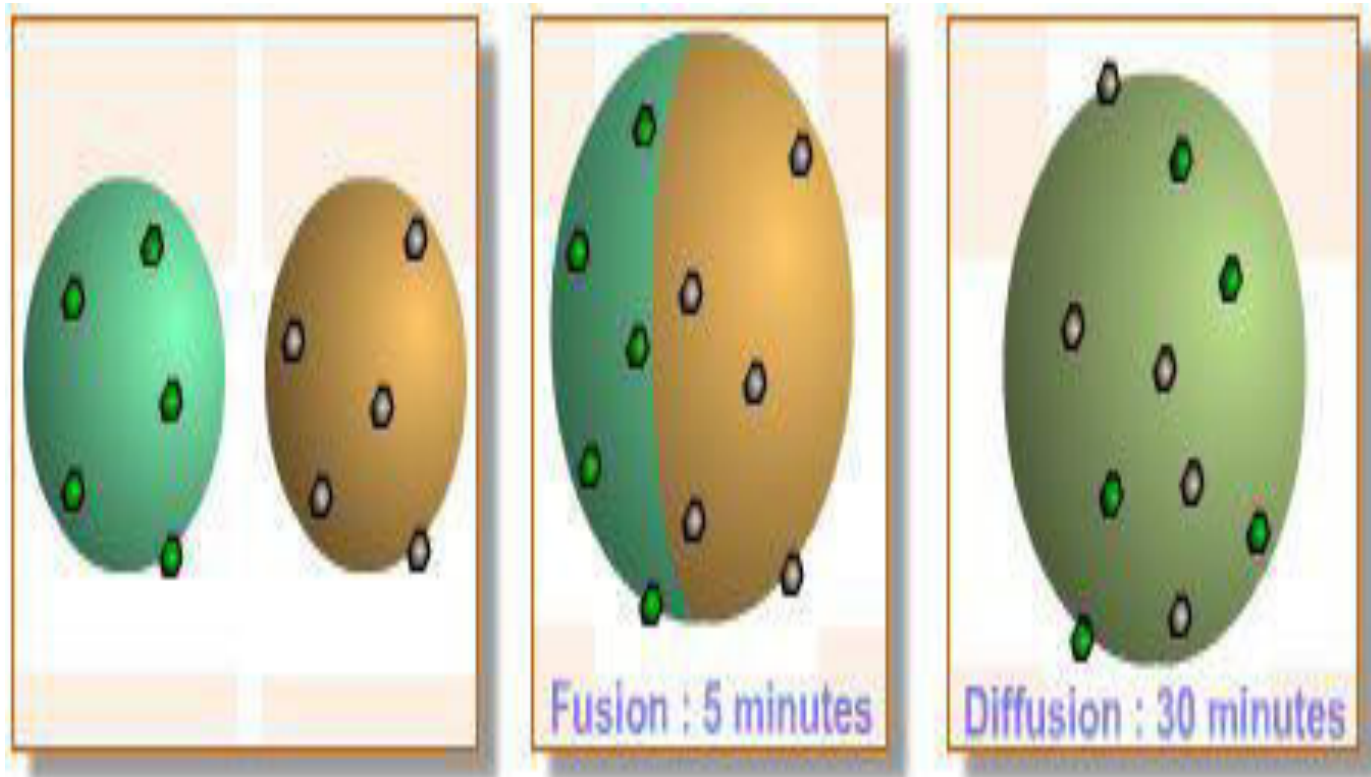
**Mise en évidence
de la fluidité des protéines
membranaires**

**Détection, localisation
et quantification de
protéines cellulaires
(hormones, récepteurs,
Cytosquelette....)**

APPLICATION DE L'IMMUNOFLUORESCENCE



La technique d'immunofluorescence sur hétérocaryon (expérience de Frye & Edidin 1970) p: 35

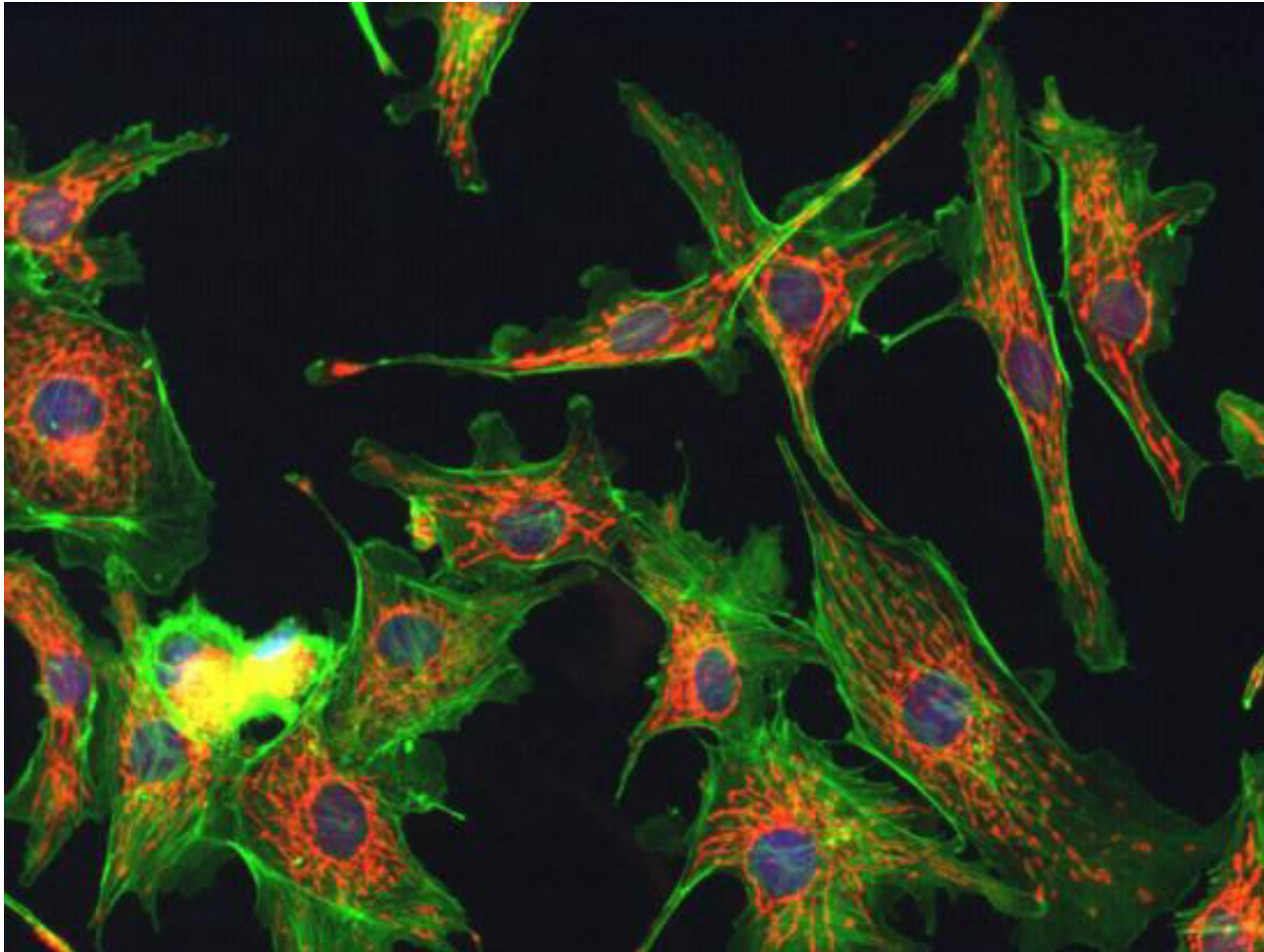


Applications techniques

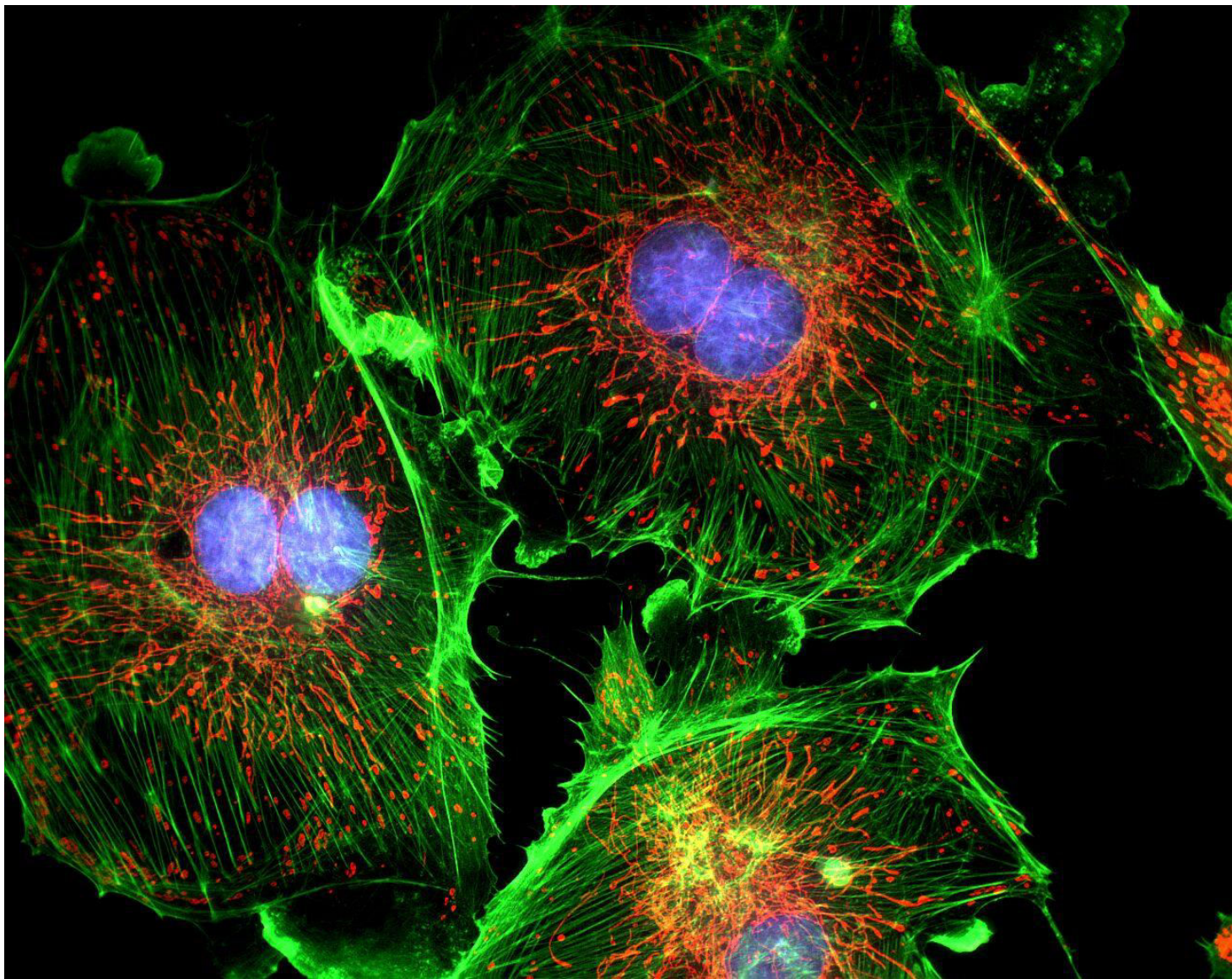
```
graph TD; A[Applications techniques] --> B[Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires]; A --> C[Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires]; style C stroke:#ffff00,stroke-width:4px
```

**Mise en évidence
de la fluidité des protéines
membranaires**

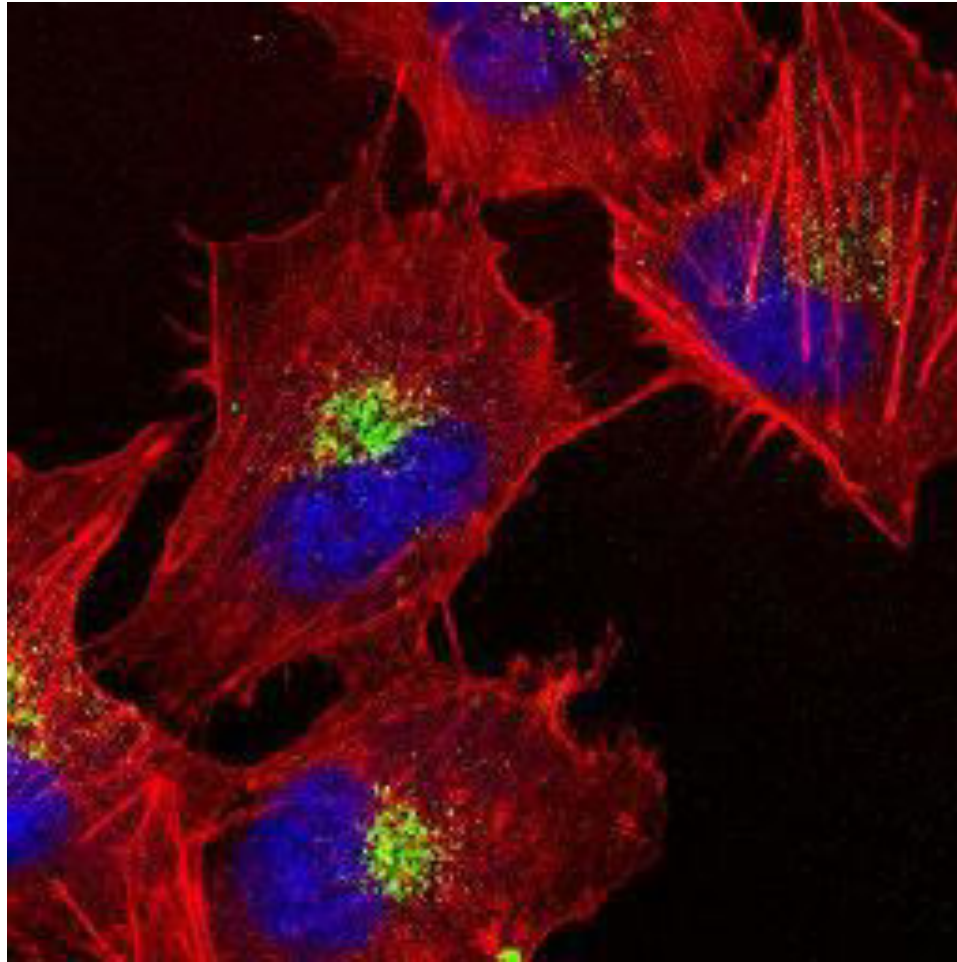
**Détection, localisation
et quantification de
protéines cellulaires**



**Répartition des éléments du cytosquelette
dans les neurones**



Répartition des éléments du cytosquelette dans les cellules en division



*Marquage de structures intracellulaires (**noyau en bleu** et **filaments d'actine en rouge**) et suivi de l'internalisation d'une protéine (**la transferrine en vert**)*

Plan

Le microscope photonique à fond clair M. Ph. / M.O.

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Echelle d'observation du vivant

