

Chapitre 2

METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

Objectifs principaux

- Méthodes d'observations (étude de différents types de microscopes)
- Méthodes cytologiques et histologiques
- Méthodes de séparation (centrifugations)
- Méthodes auto radiographiques
- Cultures cellulaires.

Introduction

Plusieurs méthodes et techniques sont mises en œuvre dans l'étude des cellules. Ces techniques n'ont pas cessé de se développer avec la progression de la science dans différentes disciplines, telles que la physique, la biophysique, la biochimie, la biologie moléculaire,...

Les observations et les mesures peuvent être effectuées à différents niveaux d'organisation structurale : celui de la cellule entière, celui des organites cellulaires entiers, celui des membranes biologiques et autre édifices multimoléculaires et enfin celui des molécules elles-mêmes.

Pour chacun de ces niveaux d'organisation, nous limiteront la description des techniques les plus fréquemment utilisées dans le monde biologique. Parmi les méthodes d'étude les plus utilisées, nous citerons :

- Méthodes microscopiques ;
- Techniques de centrifugation ;
- Techniques auto radiographiques ;
- Techniques histochimiques et cytochimiques ;
- Cultures cellulaires.

1.La microscopie : technique d'observation des constituants cellulaires

La cellule est une très petite entité, donc elle ne peut pas être vue à l'œil nu. Ici apparaît la nécessité de faire appel à des instruments tels les **microscopes** qui permettent sa visualisation.

1.1. Principe : les systèmes optiques dévient au travers d'une lentille transparente ou magnétique un flux ondulatoire de particules non chargées (photons) ou chargées électriquement (électrons)

pour former l'image agrandie A'B' d'un objet AB. La microscopie est fondée en général sur d'un côté la source d'énergie et d'un autre côté sur le système de lentilles.

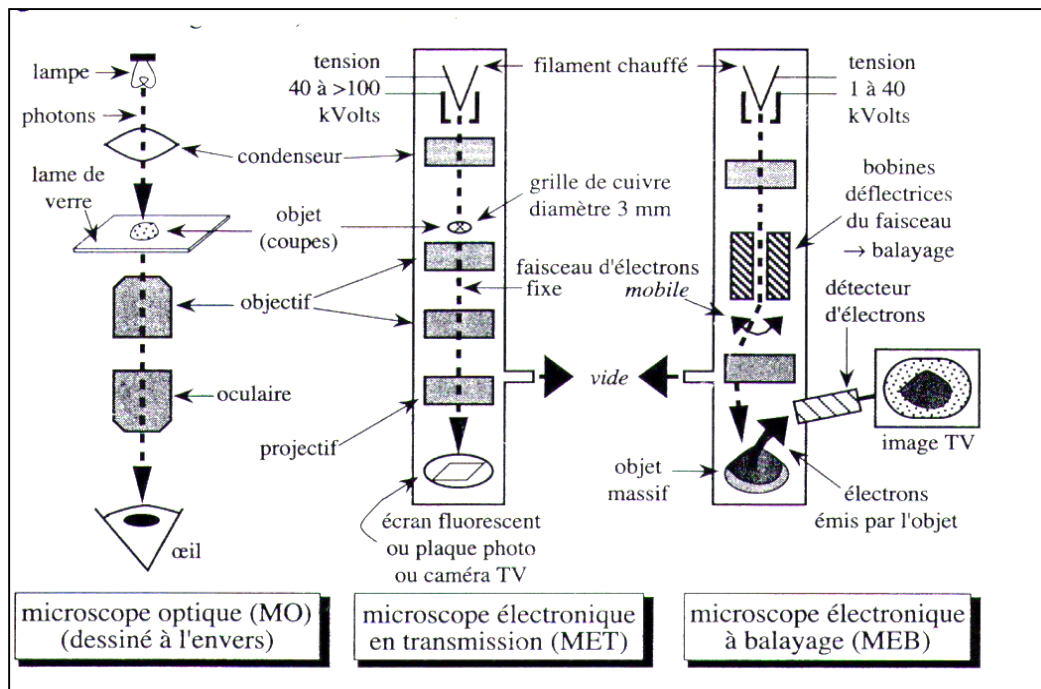


Figure 1. Caractéristiques du microscope optique (MO), du microscope électronique en Transmission (MET) et du microscope électronique à balayage (MEB)

1.1. Agrandissement : $G = \text{dimension de l'image} / \text{dimension de l'objet}$

Microscope optique (MO) : $G_{\max} \sim 2000$

Microscope électronique (MET) : $G_{\max} \sim 100\,000 \text{ à } 150\,000$

Le MO permet de distinguer entre deux points séparés de $0,2\mu\text{m}$ ($0,2 \times 10^{-6}$ mètre)

Le ME peut distinguer entre deux points séparés de 2 nanomètres (2×10^{-9} mètre)

1.3. Préparation des coupes : en microscopie, la préparation des coupes (échantillons) s'avère très importante afin de réaliser une bonne observation, le tableau 1 donne en général les produits et les étapes aboutissant à la préparation d'une excellente coupe.

Tableau 1. Les différentes étapes pour une préparation destinée à être observée au MO ou au ME

Etape	Microscope optique (MO)	Microscope électronique (ME)
Fixation : évite la dégradation rapide des échantillons lors de la préparation, et assure une bonne conservation	-Froid, alcool, formol,....	-Glutaraldéhyde, acide osmique,....
Déshydratation : il s'agit d'enlever l'eau de l'échantillon sans lyser la cellule. Pour cela on trempe cette dernière dans de l'alcool.	-Alcool de titre croissant.	-Idem
Enrobage : augmente la rigidité de l'échantillon pour éviter sa déformation et donc faciliter sa coupe	-Paraffine.	-Résine synthétique
Coupe : couper l'échantillon en très fines tranches faciles à observer.	-Microtome à lame métallique.	-ultra microtome(lame de verre ou de diamant)
Étalement : sur des supports spéciaux.	-Lame de verre	-Grille métallique
Déparaffinage :étape propre au MO, consiste à enlever la paraffine	-Toluène	/
Réhydratation : vu que la plupart des colorants sont hydrophiles, cette étape est nécessaire pour ramener de l'eau à l'échantillon.	-Alcools de titre décroissants.	/
Coloration :	Observer des couleurs naturelles, Utiliser des colorants vitaux : rouge neutre (vacuole) Coloration après fixation : bleu de méthylène, vert Janus, ...	Sels de métaux lourds : plomb, Tungstène,... Couleurs observées : noir et blanc

1.2. Différents types de microscopes :

- A. **Microscope polarisant** : c'est un microscope photonique ordinaire dans lequel la lumière ne parvient pas à l'œil de l'observateur (c'est l'extinction) mais lorsque les particules ou les molécules sont anisotropes, elles apparaissent brillantes sur le fond sombre. Ce microscope est surtout utilisé en cristallographie. Dans l'étude des cellules, il donne des images de toutes structures fibreuses : fibres musculaires, fuseau mitotique, chloroplastes, grain d'amidon,...
- B. **Microscope à contraste de phase** : grâce à un système de canalisation de la lumière situé sur l'objectif, il est possible de donner des images en gris là où la lumière naturelle ne permet aucune distinction. Il équipe tous les microscopes de recherche moderne.
- C. **Microscope à fluorescence** : il permet de voir les molécules qui émettent des photons de longueur d'onde déterminée après excitation par une source lumineuse. Ces molécules portent le nom de fluorochromes. Un fluorochrome se fixe, par covalence, sur une protéine dont on souhaite connaître la localisation dans la cellule. La protéine marquée est injectée dans des cellules vivantes ; Son parcours intracellulaire peut être suivi par le microscope fluorescent et permet ainsi d'étudier les activités dynamiques auxquelles elle participe.
- D. **Microscope électronique à haut voltage** : quelques ME utilisent des différences de potentiel de l'ordre du méga volt. De tels microscopes permettent d'étudier des coupes épaisses, et par conséquent d'observer la forme tridimensionnelle (3D) des organites et surtout leur rapport les uns avec les autres. Par exemple, les mitochondries apparaissent comme des éléments allongés et non circulaires comme la microscopie électronique les montre.

2. La centrifugation : Technique de séparation des constituants cellulaires

Des particules en suspension ou certaines grosses molécules en solution peuvent être séparées en fonction de leur caractéristique de sédimentation dans un champ gravitationnel. Ce processus est accéléré par centrifugation.

2.1.Principe : lorsque des particules en suspension dans un liquide sont soumises à un champ gravitationnel, elles sédimentent avec une vitesse V ; cette technique consiste donc à séparer les constituants cellulaires en fonction de leur **taille** et de leur **densité** en s'appuyant sur la **force centrifuge**.

Un tissu est broyé mécaniquement dans une solution de saccharose de façon à donner un **homogénat** puis centrifugé. Deux fractions sont obtenues :

- Fraction solide ou **culot** : contient les molécules les plus lourdes, cette fraction se trouve au fond du tube ;
- Fraction liquide ou **surageant** : contient les molécules les plus légères, elle se trouve à la surface du tube.

Remarque : la vitesse de sédimentation des particules dans un champ gravitationnel donné permet de définir, pour chaque type de particule, un **coefficient de sédimentation S** (unité **Svedberg**) qui est proportionnel à sa taille.

2.2. Les différents types de centrifugation et leurs utilisations

2.2.1. Centrifugation différentielle ou zonale : Elle permet de séparer les particules (organe, macromolécule, ...) en fonction de leur **taille** par une succession de centrifugations à des **temps** et des **accélérations croissants**. Les éléments les plus gros et les plus denses sédimentent plus rapidement que les autres structures.

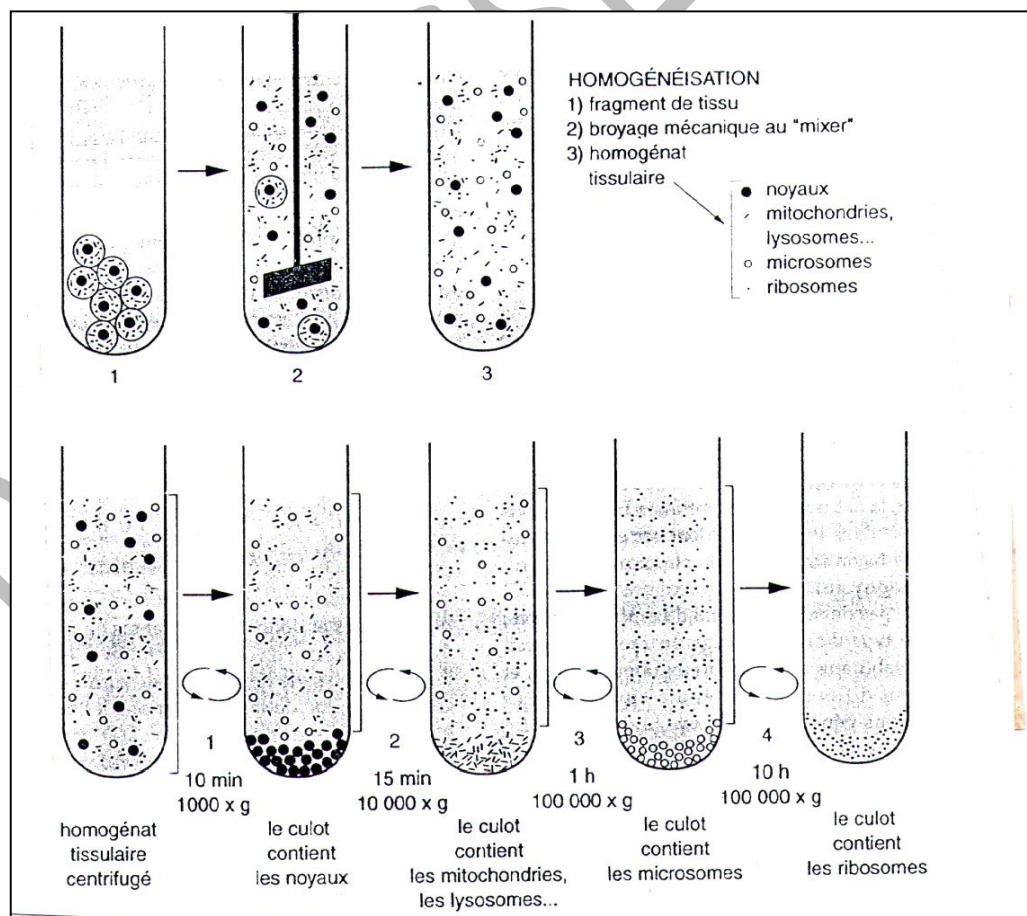


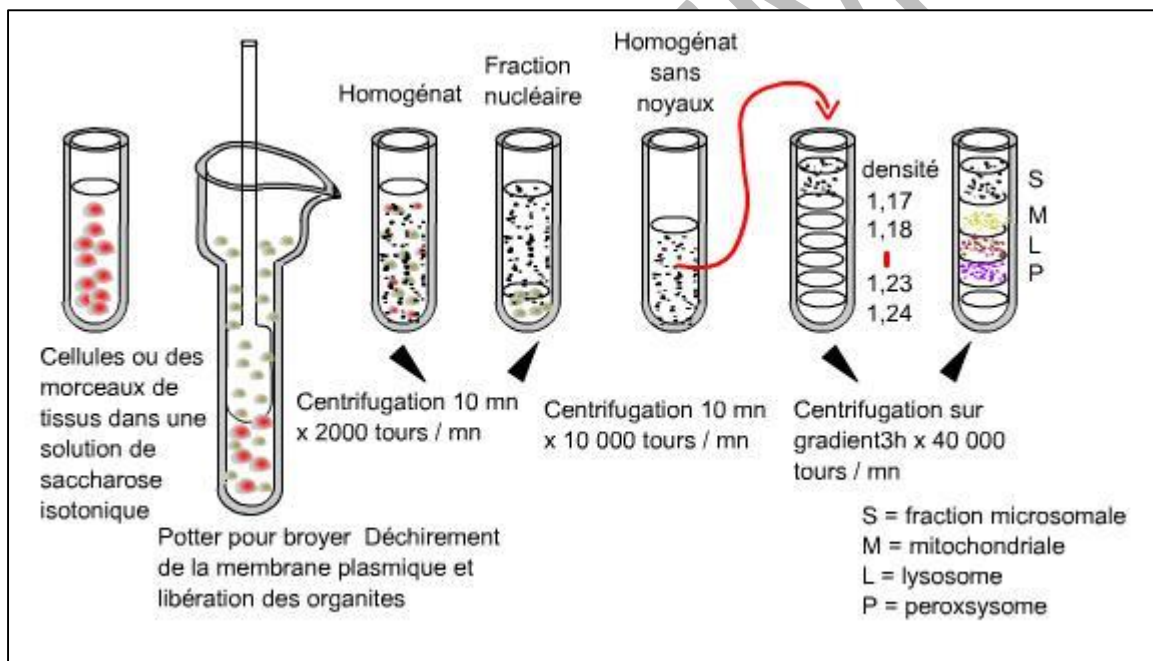
Figure 2. Protocole de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Responsable du module de Cytologie : Dr ABDESSEMED. S

1: basse vitesse; 2: vitesse moyenne; 3: vitesse élevée; 4: vitesse élevée à durée longue.

Utilisation : ces centrifugations permettent la séparation grossière d'une catégorie d'organites.

2.2.2. Centrifugation à l'équilibre en gradient de densité ou iso pycnique : les fractions obtenues par la centrifugation zonale ne sont pas parfaitement pures. Pour améliorer les résultats, il convient de soumettre ces fractions à une centrifugation iso pycnique, c'est-à-dire une centrifugation à l'équilibre en gradient de densité. Une solution de saccharose ou de glycérol est préparée de telle sorte que la concentration la plus élevée se trouve au fond et la moins élevée en haut du tube à centrifuger. La fraction à étudier est placée dans ce tube qui est soumis à une centrifugation plus élevée (40 000 tours/ min) pendant plusieurs heures. Chaque élément contenu dans le tube flotte alors à sa position d'équilibre. Cette position d'équilibre correspond à une zone du tube où la densité du liquide est égale à celle de l'élément concerné ; Il se forme dans le tube autant de bandes que de classes de densités de particules.



2.3. Récupération des particules séparées par centrifugation : dans le cas des centrifugations en vitesse de sédimentation ou en gradient de densité où le matériel se regroupe en bandes, celles-ci sont souvent recueillies en perçant le fond du tube avec une aiguille. Le tube se vide goutte à goutte par le fond et son contenu est recueilli dans une série de petits tubes. Les différentes fractions ainsi obtenues contiennent chacune le matériel correspondant à une hauteur déterminée du tube de centrifugation

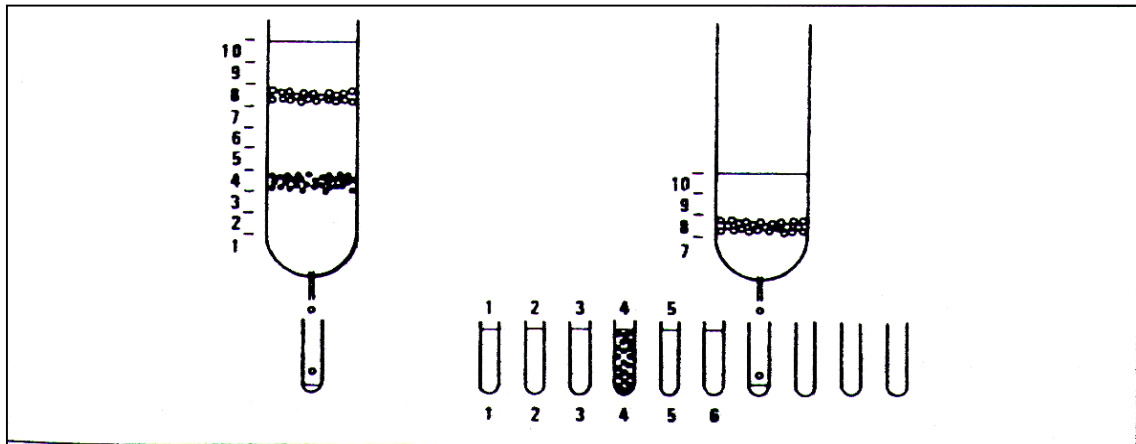


Figure 3. Technique de séparation des phases de la centrifugation

3. Les techniques autos radiographiques

L'introduction d'un précurseur biologique marqué par un isotope radioactif dans un milieu vivant (mélangé au milieu de culture bactérien ou cellulaire, injection à un animal,...) permet l'intégration de cet isotope radioactif dans les structures biologiques. Il s'y comporte alors comme source de rayonnement. Cette source peut être photographiée ce qui permet de déterminer le site de synthèse d'une molécule et de suivre la cinétique de cette molécule au cours de la vie de la cellule. Ces précurseurs devront être choisis afin de marquer le plus spécifiquement possible la molécule désirée.

Exemple : la thymidine tritiée (contenant le tritium H^3) pour localiser dans les cellules le lieu de synthèse de l'ADN, l'uridine tritiée pour localiser l'ARN, le S^{32} pour marquer les acides aminés et localiser la synthèse des protéines,...

On peut effectuer une étude quantitative et mesurer la radioactivité en fonction du temps. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de courbes.

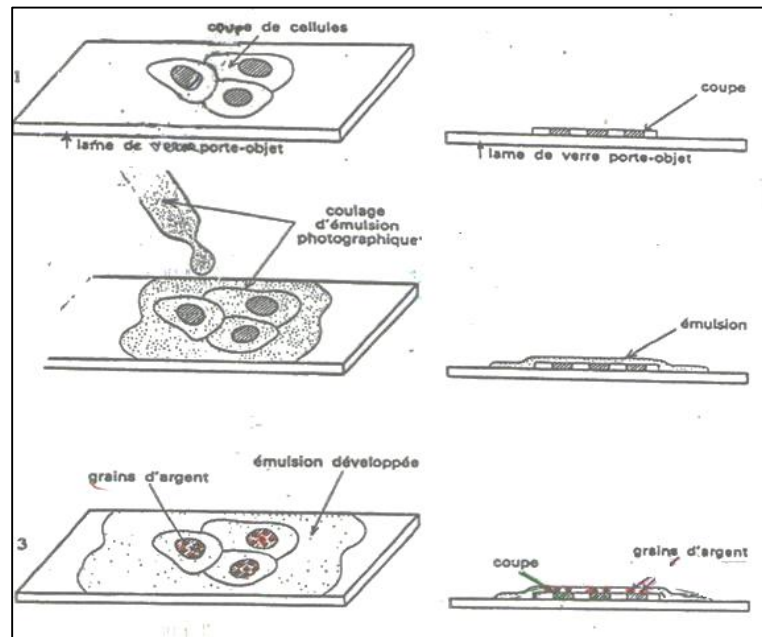


Figure 4. Technique du marquage par autoradiographie

4. Les techniques histochimiques et cytochimiques

Ce sont des techniques consistant à obtenir des colorations spécifiques de certains groupes de substances. Ainsi, les colorants basiques se fixent sur les structures acides et vice versa. De nombreuses techniques d'identification sont mises au point, fondées sur l'obtention de colorations spécifiques.

4.1. Réaction de Feulgen

Protocole de la réaction :

- le tissu subit un traitement par l'acide chlorhydrique à chaud (60°C) ce qui provoque une hydrolyse partielle des molécules d'ADN ;
- les liaisons entre les bases puriques et les pentoses sont rompues ;
- les coupes sont plongées dans le réactif de Schiff ;
- les fonctions aldéhydes et désoxyriboses, démasquées lors de l'hydrolyse, forment un complexe rose violacé avec le réactif de Schiff.
- Les organites colorés en rose renferment de l'ADN.

Remarque : la réaction de Feulgen est une réaction spécifique à l'ADN. Un traitement préalable à la désoxyribonucléase (ADN ase) rend la réaction négative.

4.2. Réaction de Brachet : cette réaction permet de détecter l'ARN dans les tissus.

Les cellules sont traitées par la pyronine et se colorent en vert aux endroits où se localise une quantité suffisante d'ARN (cytoplasme, noyau). Cependant, d'autres substances retiennent la pyronine. Pour que la réaction soit spécifique, on fait incuber une préparation témoin dans une solution de ribonucléase (ARNase). L'enzyme hydrolyse l'ARN et le fait disparaître en quelques heures à 56° C. Après la digestion enzymatique, la coupe est traitée par la pyronine. Si la coloration ne s'effectue pas, c'est bien de l'ARN qui a été caractérisé dans la 1^{ère} préparation.

5. Les cultures cellulaires

Des cellules isolées à partir de certains tissus animaux ou végétaux peuvent survivre et se multiplier dans un milieu artificiel. Ces cultures cellulaires *in vitro* exigent l'utilisation de milieux de culture dont les caractéristiques physico-chimiques (composition, température, oxygénation, lumière,...) sont les plus proches possible de celles des milieux intérieurs de l'organisme d'où les cellules sont issues. Selon leur origine, les cellules se développent alors en suspension ou en adhérence à un support, dans des conditions expérimentales contrôlées. Le matériel biologique obtenu présente l'avantage d'être homogène, stable dans le temps et de constituer un modèle expérimental simplifié par rapport à un organisme entier.

La croissance d'une culture cellulaire est donnée par l'équation :

$$N(t) = N(0)e^{kt}$$

$N(0)$: nombre de cellules à l'instant $t = 0$

$N(t)$: nombre de cellules à l'instant t

K : constante de croissance spécifique de la population cellulaire étudiée

Le temps de génération T est le temps nécessaire au doublement du nombre des cellules en croissance exponentielle. Il est fonction du type de cellules et des conditions de cultures.

L'équation précédente montre que si $N(t) = 2N(0)$

Alors $T = 0,693 / K$

Les cultures cellulaires permettent :

- D'étudier les cellules vivantes soumises à des conditions variées, de les cinématographier et d'observer leur réaction à des agents chimiques ;

- De suivre le déroulement de la mitose, dans des conditions normales ou après application de substances antimitotiques ;
- De réaliser des études génétiques
- D'observer des cellules cancéreuses et leur comportement ;
- De maintenir des virus et de fabriquer des vaccins, etc.

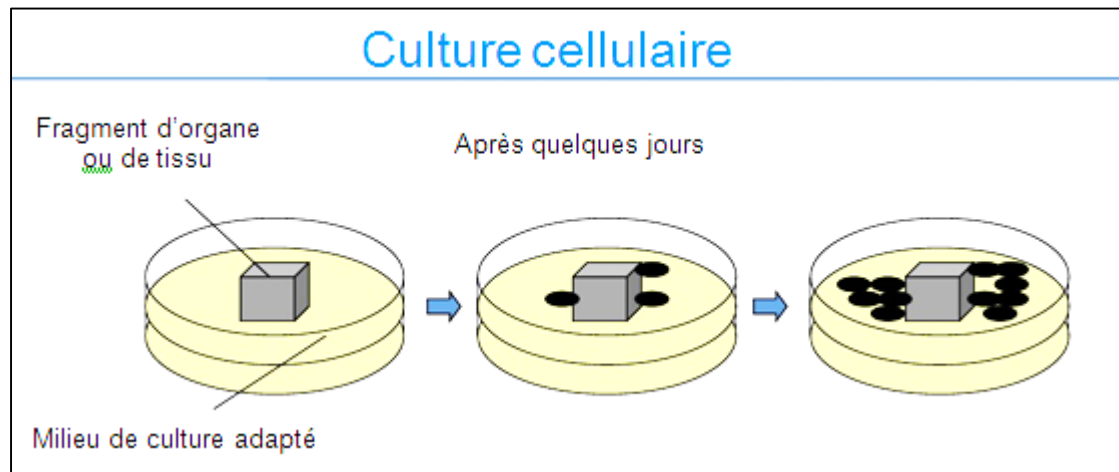


Figure 5. Technique des cultures cellulaires animales

6. La biologie moléculaire

Depuis les années 1970, de très nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse des acides nucléiques présents dans les cellules : extraction, purification, détermination d'une séquence nucléotidique, synthèse de séquences nucléotidiques,...

Les outils utilisés sont des enzymes, préparées à partir de bactéries ou de virus et dont le nombre croît de jour en jour. On distingue :

- Les enzymes de restriction : permettent de couper des séquences désoxyribonucléotidiques double brin (ADN) de manière sélective ;
- Les enzymes transcriptases : copier un ARN en ADN par une transcriptase inverse, transcrire un ADN en ARN, amplifier une séquence d'ADN par la technique de PCR (voir cours génétique)
- Les ligases capables de coller des séquences nucléotidiques bout à bout.

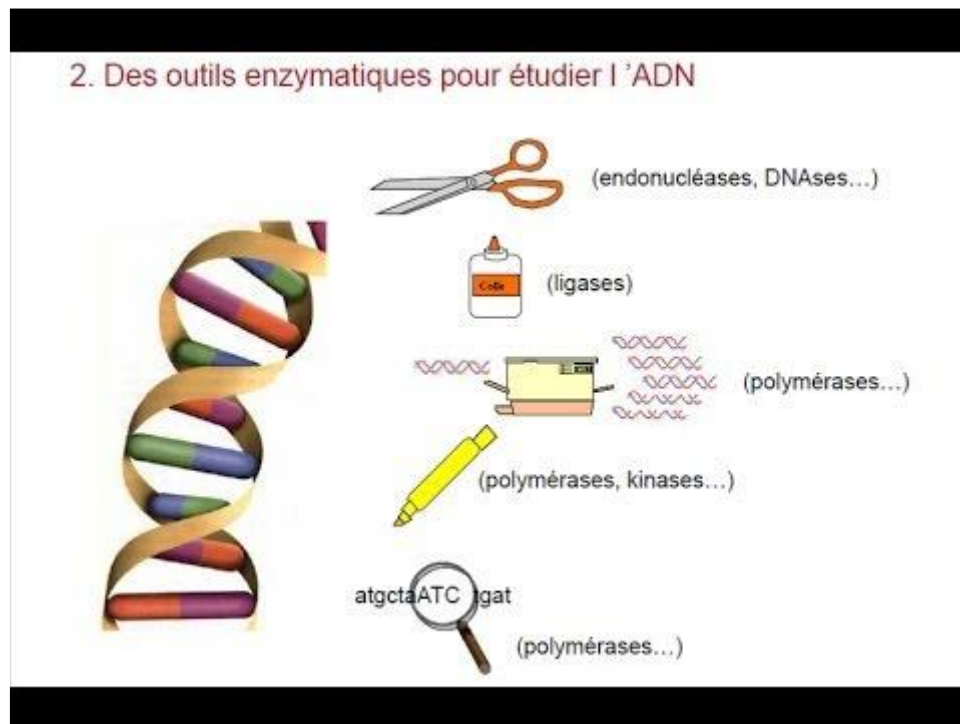


Figure 6. Quelques enzymes utilisées en biologie moléculaire

7. L'informatique et internet

Ils sont devenus des outils de travail indispensables en biologie. Les informations obtenues sont stockées *in silico* et traitées par des logiciels appropriés.

Les séquences nucléotidiques et peptidiques sont stockées dans des banques de données accessibles à distance via un micro-ordinateur (Gen Bank aux USA, la banque EMBL

(European Molecular Biology Laboratory en Allemagne)

Des programmes informatiques permettent de comparer des séquences nucléotidiques ou protéiques entre elles. Ces méthodes ont permis de classer les protéines, d'étudier leur évolution, de calculer le poids moléculaire théorique d'une protéine,



Figure 7. Conception d'une banque de données sur ordinateur