



UNIVERSITE DE DOUALA
INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE



Plate forme des Technologies de l'Information et du Numérique : PFTIN

Filière : Génie Biomédical

COURS DE BIOLOGIE CELLULAIRE

Mars 2015

Par :

Pr. Leopold Gustave LEHMAN

Immuno-parasitologue

Mme Arlette Linda NGAPMEN ép. MBOA

Etudiante en Ph.D : Option Parasitologie

CHAPITRE 1 : LA CELLULE

I. INTRODUCTION

Les organismes animaux ou végétaux sont des ensembles complexes constitués de plusieurs parties agencées entre elles pour accomplir les fonctions vitales telles que la croissance, la nutrition ou la reproduction. Un organisme tel que le notre est constitué de plusieurs organes spécialisés chacun dans une fonction qui contribue à la vie de l'ensemble (Ex Appareil digestif: langue, estomac, foie pancréas etc...). L'**anatomie** permet d'étudier la disposition, la forme et la structure des organes. Chaque organe est à son tour constitué d'un assemblage de minuscules compartiments délimités chacun par une membrane entourant une suspension aqueuse de macromolécules. Ces compartiments sont des **cellules**.

La **biologie cellulaire** étudie les cellules et leurs organites, les processus vitaux qui s'y déroulent ainsi que les mécanismes permettant leur survie.

II. HISTORIQUE DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE



1677 : **Antoine van Leeuwenhoek**, connu pour ses améliorations du microscope, observe le poivre pour vérifier s'il porte des aiguilles minuscules. Cela l'amène à la découverte accidentelle d'**animalcules**, connus sous le nom de **protozoaires**.



1858 : **Louis Pasteur** réfute la génération spontanée, croyance selon laquelle des formes de vie peuvent apparaître spontanément.



1665 : **Robert Hooke** découvre des cellules dans du liège en utilisant les premiers microscopes.



1839 : **Theodor Schwann** découvre que les plantes et les animaux sont faits de cellules, concluant que la cellule est l'unité commune de structure et de développement: théorie cellulaire. Il donna son nom aux cellules de Schwann.



1858 : **Rudolph Virchow** affirme que les cellules naissent du résultat de la division cellulaire (« omnis cellula ex cellula »)

III. GENERALITES SUR LA CELLULE

La cellule (du latin *cellula* petite chambre) est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant toute partie d'un être vivant (à l'exception des virus). Chaque cellule est une entité vivante qui, dans le cas d'organismes multicellulaires, fonctionne de manière autonome, mais coordonnée avec les autres. Les cellules de même type sont réunies en tissus (assemblage de cellules remplissant une fonction particulière à l'intérieur), eux-mêmes réunis en organes (assemblage de plusieurs tissus qui remplissent une fonction spécifique. Ex : foie, cerveau, thyroïde). La cellule est l'unité de base des êtres vivants.

De façon générale, L'ensemble des systèmes biologiques peut se diviser en deux catégories:

1° - Les virus

Ils ne sont pas des cellules au vrai sens du terme car ils ne possèdent que le matériel génétique (acaryotes). De ce fait, ils n'ont pas un métabolisme propre et dépendent obligatoirement d'une cellule qu'ils infestent pour la fabrication de leur matériel génétique.

2° - Les organismes cellulaires

Ils peuvent être constitués d'une seule cellule. Ils sont alors dits **unicellulaires**. Ex: bactéries, amibes, plasmodies. Ils vivent alors isolés ou en colonies.

Les organismes **pluricellulaires** sont constitués de plusieurs cellules spécialisées fonctionnant de façon cohérente. Ils se divisent en 2 groupes:

- Les organismes cellulaires **procaryotes** (bactéries): ils sont des unicellulaires caractérisés essentiellement par l'absence d'une enveloppe nucléaire. Le matériel génétique est représenté par un seul chromosome qui baigne dans le cytoplasme

- Les organismes cellulaires **eucaryotes**: ce sont, contrairement aux procaryotes, des organismes chez lesquels le nucléoplasme est bien défini et séparé du cytoplasme par une membrane nucléaire double. Les eucaryotes regroupent deux grands ensembles:

- Les **protozoaires** constitués d'une seule cellule isolée (amibes, paramécies, plasmodies) ou associée dans un agrégat appelé colonie (Gonium, volvox).
- Les **métazoaires** dont les cellules sont groupées en tissus (conjonctifs, épithéliaux, musculaire, nerveux, de soutien, osseux, cartilagineux).

IV. CELLULES PROCARYOTES ET CELLULES EUCARYOTES

Les deux grands types d'organismes cellulaires, procaryotes et eucaryotes, ont un ancêtre commun unicellulaire appelé **proto-cellule** ou **progénote** qui est un organisme procaryote.

Les **procaryotes** sont identifiés aux bactéries : la plupart vivent comme des organismes monocellulaires mais certaines bactéries s'associent en chaîne. Les procaryotes ont leur ADN dans le cytoplasme de la cellule.

Les **eucaryotes** (ou « noyau-vrai ») possèdent un noyau, compartiment séparé du reste du contenu cellulaire, qui contient l'ADN.

Attention !!! Les virus, ou **acaryotes**, sont des éléments (et non des cellules) qui ne possèdent ni de noyaux ni de cytoplasme et ne peuvent se reproduire qu'en parasitant une cellule hôte en détournant la machinerie cellulaire.

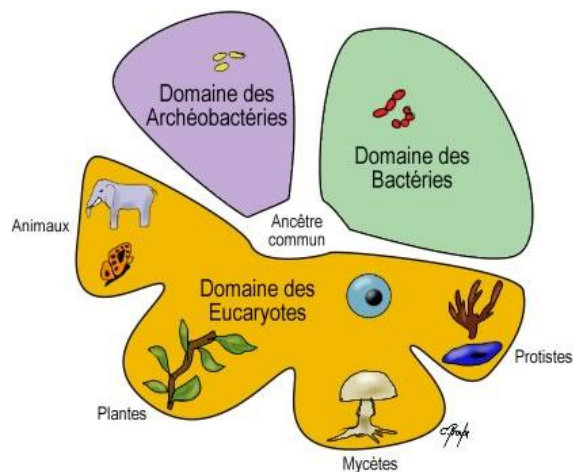


Schéma 1 : plan d'organisation des cellules

Tableau 1 : Composition moyenne des cellules vivantes

Composants	Pourcentage de la masse totale
Eau	70%
Protéines	18%
Lipides	5%
ADN	0,25%
ARN	1,1%
Polyosides	2%
Molécules simples (acides aminés, acides gras, glucose)	3%
Ions minéraux	1%

IV.1. CELLULES PROCARYOTES

Les cellules procaryotes sont divisées en deux types cellulaires :

- Les **archéobactéries** qui prennent en compte les cellules méthanogènes, les cellules halophiles et les cellules thermoacidophiles. Les archéobactéries sont les premières à coloniser les roches nues car elles survivent avec le minimum de ressources.

- Les **eubactéries** (ou « vraie-bactérie ») sont les plus proches des bactéries actuelles. Elles prennent en compte les bactéries contemporaines, les mycoplasmes et les cyanobactéries.

Le procaryote classique est *Escherichia coli* (ou E-coli), qui est une bactérie habitant dans la flore intestinale humaine grâce à une paroi cellulaire rigide.

Les bactéries se distinguent de part leurs parois cellulaires mise en évidence par la coloration de Gram. On trouve des bactéries « gram + » et des bactéries « gram – » :

- Les **bactéries gram +** retiennent le colorant, coloration violette. Leurs parois possèdent une couche unique de peptidoglycane qui repose sur la membrane plasmique, les deux constituent la paroi cellulaire. On pourra prendre comme exemple les **staphylocoques**.

- Les **bactéries gram –** sont beaucoup plus perméables au colorant, coloration rose. Leurs parois sont constituées d'une couche fine de peptidoglycane qui repose sur la membrane plasmique entourée par une membrane externe : il y a donc trois couches. L'exemple le plus pertinent sera *Escherichia coli*.

Les cellules procaryotes contiennent un compartiment unique, le cytoplasme, contenant un chromosome ou une molécule d'ADN unique qui est le plus souvent circulaire et que l'on appelle le **nucléotide**. Les bactéries se répliquent rapidement par division cellulaire ou **scissiparité**. Elles peuvent être pathogènes ou non pathogènes.

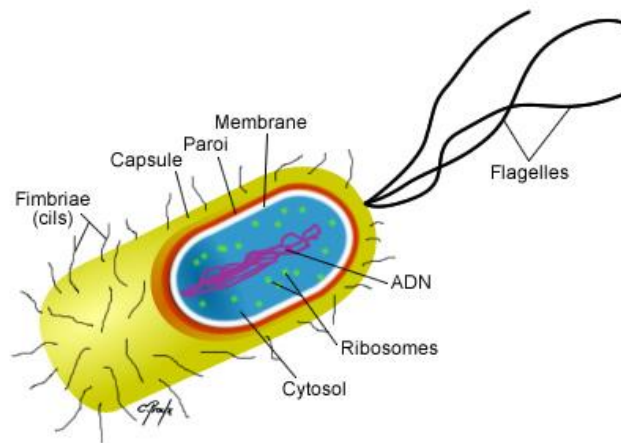


Schéma 2 : Organisation générale de la cellule procaryote (bactérie)



Escherichia coli



Algue bleue

IV.2. CELLULES EUCARYOTES

Les eucaryotes correspondent aux organismes multicellulaires (animaux, plantes, champignons) ainsi qu'à quelques eucaryotes unicellulaires. Les eucaryotes monocellulaires correspondent aux **protistes** qui sont de deux types : animal les **protozoaires** et végétal les **protophytes**. Les cellules eucaryotes sont délimitées par une membrane (animaux) ou paroi (végétaux) et possèdent un noyau qui est l'organite contenant le génome de l'individu. Les cellules végétales sont le sommet de l'évolution végétale : elles sont capables de synthétiser toutes substances organiques à partir de matière inorganique et de lumière. Elles contiennent des chloroplastes présentant des vacuoles volumineuses limitées par une double membrane qui correspondent à des saccules empilées les unes sur les autres appelées **thylakoïde**, où se réalisent la photosynthèse et donc qui contiennent de la chlorophylle. Les chloroplastes, comme les mitochondries, peuvent se reproduire et possèdent leurs propres ADN.

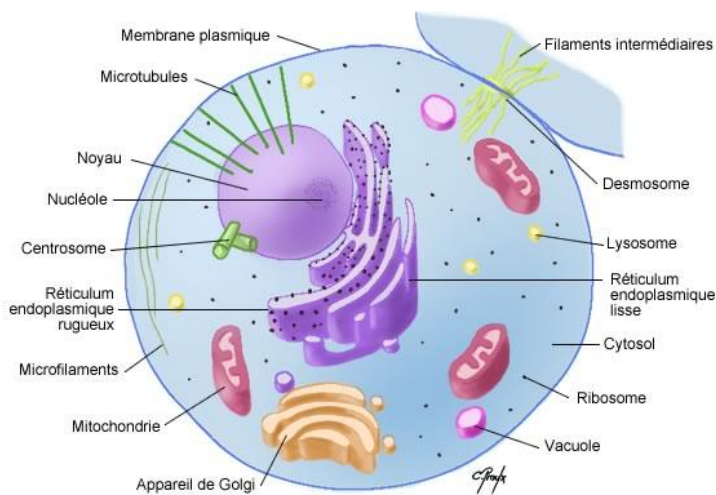


Schéma 3 : Organisation générale de la cellule animale

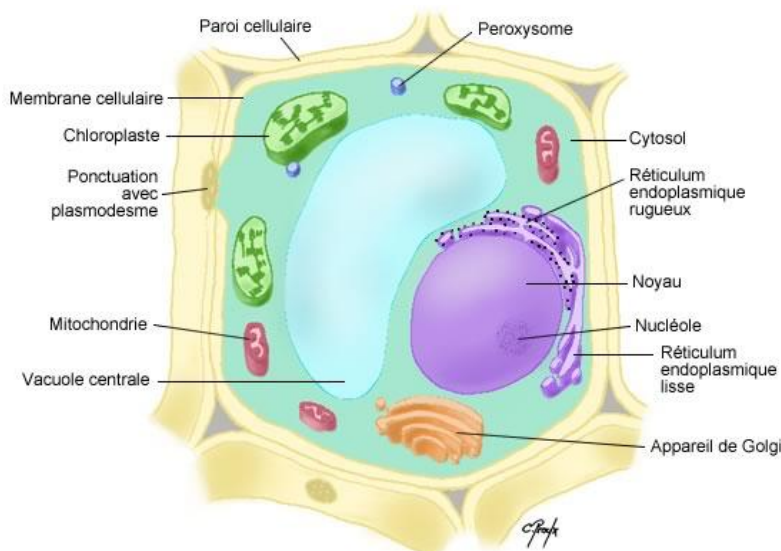


Schéma 4 : Organisation générale de la cellule végétale eucaryote

Tableau 2 : Tableau comparatif des cellules procaryotes et eucaryotes

Caractéristiques	Cellule procaryote	Cellule eucaryote
Taille	Généralement petite (1-10µm)	Généralement grande (10-100µm)
Cytosquelette	Absent	Présent
Organites	Absent	Présents
Système génétique	Absence de Noyau ADN avec quelques protéines non-histones; simple. Chromosome : une seule molécule circulaire dans les nucléotides non rattachés à la membrane	Noyau présent ADN complexé avec des protéines histones et protéines non-histones dans un noyau entouré d'une membrane nucléaire. Chromosome constitué de plusieurs molécules linéaires
Division cellulaire	Directe par fission binaire ou bourgeonnement. Pas de mitose	Certaines formes de mitose, Centrioles présents chez la +part fuseau mitotique présent
Système reproducteur	Généralement absent ou très modifié	Présent chez la plupart des partenaires mâle et femelle
Nutrition	Absorption pour la plupart, photosynthèse chez d'autres	Absorption, ingestion, photosynthèse chez certains
Métabolisme énergétique	Pas de mitochondries, enzymes oxydatives liées à la membrane cellulaire et non enveloppées séparément	Mitochondrie présente avec enzymes oxydatives empaquetées à l'intérieur. Modèle plus unifié de métabolisme oxydatif
Mouvements intracellulaires	Aucun	Phagocytose, pinocytose

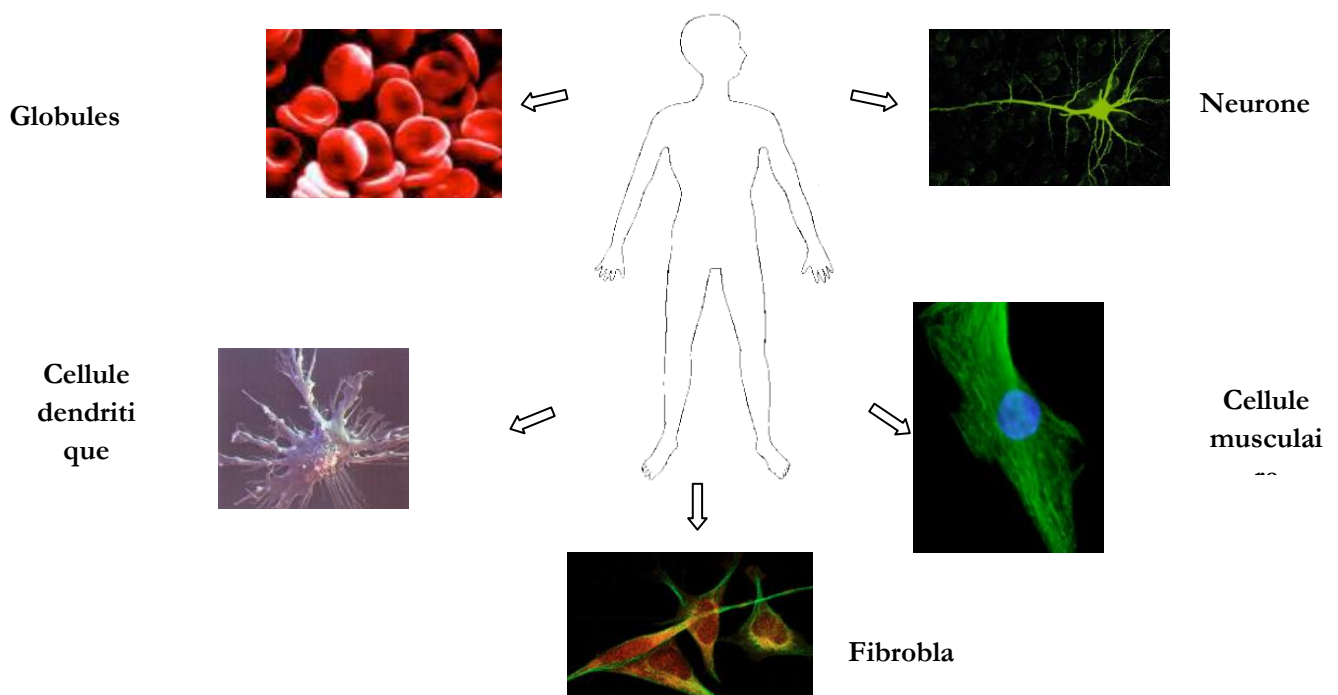


Schéma 5 : Diversité des cellules au sein d'un organisme

V. COMPOSITION DE LA CELLULE

Les organites constituant la cellule dont les mitochondries, réticulum endoplasmique, chloroplastes, noyau, membrane cellulaire, abritent des molécules et matériaux de base en biochimie, dont les protéines, lipides, glucides et acides nucléiques. Les chaînes du métabolisme prennent lieu dans différents organites.

V.1. La paroi cellulaire

La paroi des cellules est une caractéristique structurale de plusieurs êtres vivants dont les végétaux. Elle est constituée principalement de cellulose, hémicellulose, pectines, polymères phénoliques, protéines structurales et enzymatiques et différents ions. De nombreuses hydrolases (glucanases, pectine Methyl Estérase,...) sont présentes dans la paroi des cellules.

Les oses constituent les éléments de base des polysaccharides de la paroi cellulaire. Ce sont des composés carbonés possédant des fonctions alcool et des fonctions réductrices (aldéhydes et cétones). Il existe de nombreux isomères pour chacun des oses.

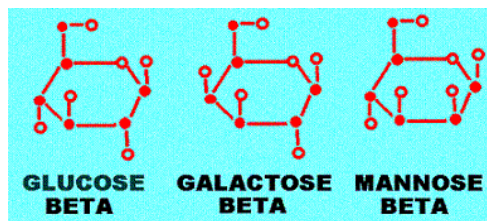


Schéma 6 : Quelques oses

V.2. La membrane plasmique

La membrane plasmique est constituée de lipides et de protéines. Les lipides membranaires sont des phospholipides présentant un pôle hydrophile (soluble dans l'eau) et un pôle hydrophobe. Au niveau des cellules, les phospholipides des membranes sont disposés en 2 couches, avec des parties hydrophobes en vis à vis. Les protéines hydrophiles sont fixées aux pôles hydrophiles des lipides. Les protéines hydrophobes sont fortement liées aux lipides (intégration).

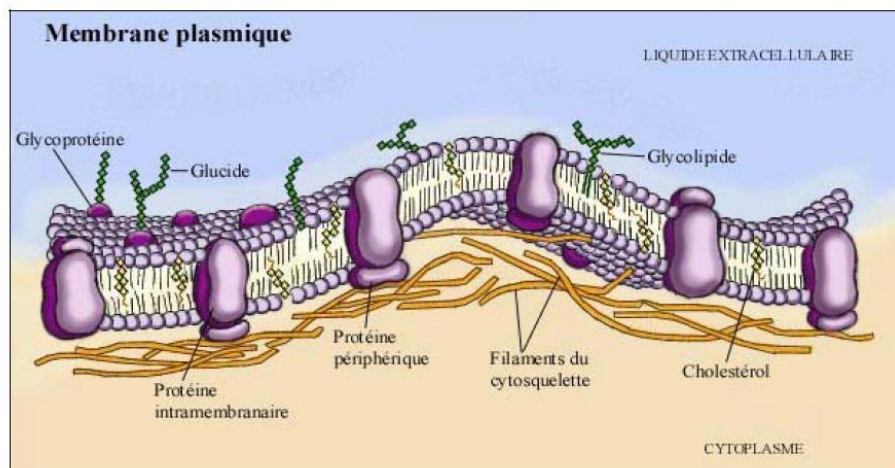
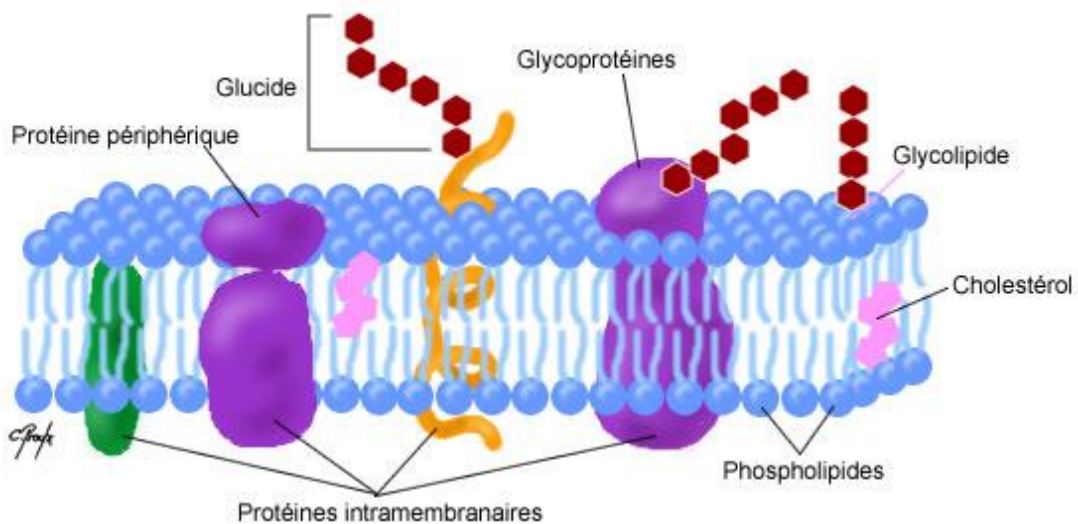


Schéma 7: La membrane plasmique

Les membranes cellulaires sont des doubles couches phospholipidiques dans lesquelles s'insèrent de manière **asymétrique** et **inhomogène** d'autres structures les caractérisant.

La membrane délimitant la cellule est appelée **membrane plasmique** et les membranes des organites sont appelées par le nom de l'organite concerné (membrane nucléaire, membrane mitochondriale, etc.).

En microscopie électronique on observe une tri-lamination de la membrane : un **feuillet clair** de 3 nm (environ 2 fois la longueur d'une chaîne d'acide gras) entouré par 2 **feuillets sombres** de 2,5 nm chacun ; l'épaisseur totale est donc d'environ **8 nm**. Ceci a permis de mettre en évidence la structure en bicouche phospholipidique de la membrane plasmique.



V.2.1. Composition des membranes

Les membranes sont constituées (en poids sec de membrane) de **40% de lipides**, **52% de protéines** et **8% de glucides**. En prenant en compte la différence de poids existant entre ces classes de molécules, on compte **50 molécules de lipides par molécule de protéine**.

V.2.1.1. Diversités des lipides membranaires

Au sein de la membrane les lipides sont présents sous différentes formes ; parmi elles on compte les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol.

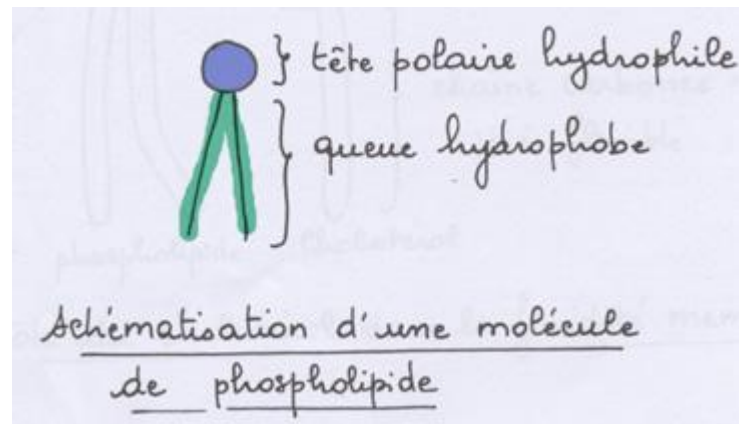
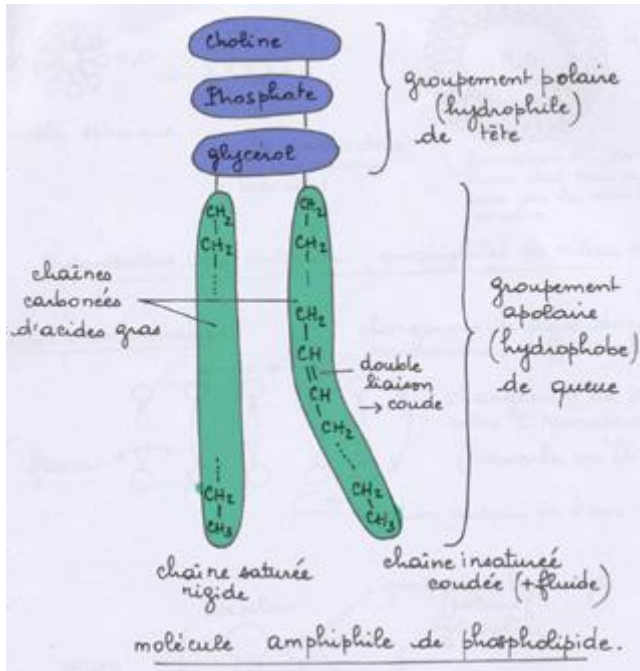
a) Phospholipides

Ils présentent tous une tête hydrophile (phosphate et groupement spécialisé) et une queue hydrophobe (glycérol et acides gras). On distingue deux types de phospholipides :

- Les **glycérophospholipides** correspondent à l'association de glycérol, de deux acides gras, d'un acide phosphorique et d'alcools ou d'acides aminés. Les alcools ou les acides aminés donnent l'identité et la caractéristique du glycérophospholipides. Parmi les acides

aminés on trouve la sérine et parmi les alcools on trouve l'inositol, l'éthanolamine et la choline ; on obtient ainsi la phosphatidyl-sérine, le phosphatidyl-inositol, la phosphatidyl-éthanolamine et la phosphatidyl-choline.

- Les **sphingophospholipides** correspondent à l'association de sphingosine, d'acide gras, d'acide phosphorique et d'alcool ou d'acides aminés ; on obtient ainsi la sphingomyéline (par association de la choline).

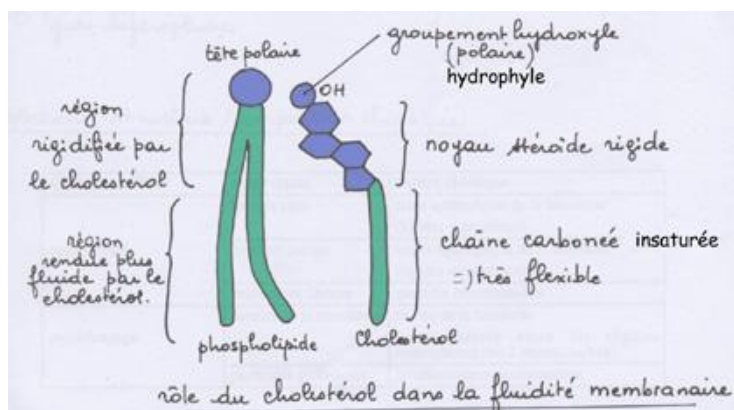


b) Glycolipides

Ils sont de deux types : les **glycéroglycolipides** et les **sphingoglycolipides**. Il est intéressant de préciser que les glycolipides des membranes des érythrocytes (globules-rouges), définissent le groupe sanguin de l'individu.

c) Cholestérol

Le cholestérol est uniquement présent dans les membranes des cellules animales, en effet, il est absent des cellules végétales et des bactéries. Le cholestérol est composé d'un noyau stéroïde hydrophobe, d'une queue hydrophobe et d'une fonction alcool hydrophile. La molécule est donc amphiphile, représente environ un quart des lipides membranaires et influence la fluidité membranaire.



V.2.1.2. Diversités des protéines membranaires

Les protéines membranaires ont des rôles bien spécifiques au sein de la double couche phospholipidique : récepteurs, transporteurs, adhérence cellulaire, catalyse enzymatique, messagers intracellulaires, etc. Chaque protéine possède une extrémité N-terminale et une extrémité C-terminale). Les protéines sont ancrées de différentes manières dans la membrane.

a) Les protéines extrinsèques

Les protéines extrinsèques sont localisées en dehors de la bicouche phospholipidique et sont ainsi soit entièrement intracellulaire, soit entièrement extracellulaire. Elles interagissent avec la membrane, par des liaisons électrostatiques de types liaisons hydrogènes et liaisons de Van der Waals, au niveau de domaines caractéristiques de protéines transmembranaires ou de lipides. Ces interactions étant faibles, elles sont rompues facilement par des variations de forces ioniques et de pH.

b) Les protéines ancrées dans des acides gras

Les protéines périphériques ancrées dans les lipides sont de deux types :

- Ancrées sur les **glyco-phosphatidyl-inositol (GPI)** qui correspondent à l'association d'une phospho-éthanol-amine sur des sucres, eux-mêmes ancrés sur un phosphatidyl-inositol. Ces protéines sont présentes sur la face extracellulaire de la membrane.
- Ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'acide gras (acide palmitique et acide myristique). Ces protéines sont présentes sur la face intracellulaire de la membrane.

c) Les protéines transmembranaires

Les protéines transmembranaires traversent les deux feuillets de la membrane. Ces protéines sont liées de manière stable à la membrane avec l'environnement hydrophobe de la face interne de la membrane, par les acides aminés apolaires de leurs hélices α . Elles ne peuvent ainsi être séparées de la double couche phospholipidique (et donc étudiées) que par l'action de détergents.

V.2.1.3. Diversités des glucides membranaires

La grande majorité des glucides membranaires sont sous forme de glycoprotéines et une petite partie sous forme de glycolipides. Au niveau de la membrane les glucides n'existent pas à l'état libre, ils sont liés à des protéines, par des **liaisons N-glycosidiques** (le plus souvent) et des **liaisons O-glycosidiques**, sous forme de petites glycoprotéines ou de protéoglycanes.

- Les **glycoprotéines** contiennent des polysaccharides courts, souvent ramifiés et n'excédant pas 50% du poids moléculaire de la glycoprotéine. Le sucre terminal est souvent de l'acide sialique chargé négativement.

- Les **protéoglycanes** sont également des glycoprotéines, mais qui contiennent des polysaccharides à chaîne longue composée d'unités disaccharidiques répétées à l'infini, représentant jusqu'à 90% du poids moléculaire globale. Souvent un des deux sucres de l'unité est aminé, on parle alors de **glyco-amino-glycane** (ou **GAG**) dont le plus simple est l'**acide hyaluronique**.

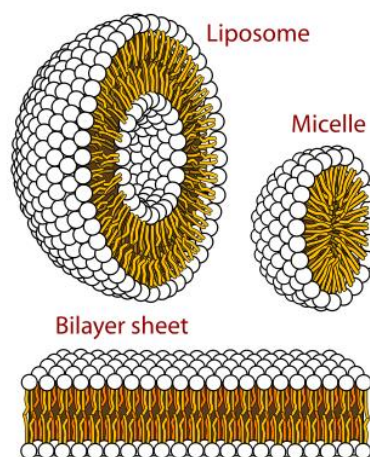
Pour information, les protéoglycanes sécrétoires composent la matrice extracellulaire (tissu conjonctif, cartilage, etc.) et sont différents des protéoglycanes cellulaire.

V.2.2. Propriétés des membranes

V.2.2.1. Auto-assemblage des lipides

Les phospholipides, dus à leurs propriétés physico-chimiques, s'assemblent de manière automatique en différentes sortes de structures suivant l'environnement :

- Les **monocouches** sont des couches mono-moléculaires dont les têtes hydrophiles sont dirigées vers le milieu aqueux et les queues hydrophobes vers le milieu lipidiques.
- Les **micelles** sont des formations sous la forme de gouttelettes rondes, où dans un milieu aqueux les têtes hydrophiles sont dirigées vers l'extérieur de la sphère et les queues hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur (dans un milieu lipidique la conformation est inverse).
- Les **bicouches phospholipidiques** permettent la formation de vésicules sphériques appelées **liposomes**. Les bicouches phospholipides rentrent dans la formation des bicouches membranaires. Pour information, les liposomes sont actuellement utilisés en thérapeutique pour encapsuler des substances médicamenteuses.



V.2.2.2. Asymétrie membranaire

Toutes les membranes biologiques sont constituées de feuillettes dont les compositions lipidiques sont différentes, sauf le cholestérol qui se trouve en quantité équivalente dans l'un ou l'autre des feuillettes, pouvant basculer facilement de l'un à l'autre.

- Le **feuillet interne** est caractérisé par les **phosphatidyl-sérine** (amphotère) et **phosphatidyl-éthanol-amine** (charge négative).

- Le **feuillet externe** est caractérisé par la **sphingomyéline** (charge négative) et la **phosphatidyl-choline** (charge négative).

L'asymétrie des lipides entraîne ainsi une asymétrie de la charge globale de chaque feuillet. On visualise également une asymétrie des protéines présente dans la double couche phospholipidique ; ces protéines participent à caractériser les propriétés de la membrane, que cela soit du côté intracellulaire ou extracellulaire.

La plus grande asymétrie est celle présente au niveau des glucides, en effet tous les motifs glucidiques sont localisés sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Pour les organites intracellulaires les sucres sont dirigés vers la lumière de l'organite. « L'arbre glucidique » présent au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique forme ce que l'on appelle le **glycocalix**.

3) Fluidité membranaire

La mobilité des lipides est nécessaire pour l'activité cellulaire. Ils peuvent se mouvoir de différentes manières au sein de la membrane : rotation, diffusion latéral et flip flop (passage d'un feuillet à l'autre). Certaines protéines vont être bloquées par des structures intracellulaires ou extracellulaires par des interactions protéines-protéines ou interactions avec le cytosquelette. La fluidité membranaire intervient dans différentes fonctions cellulaires : absorption, sécrétion, protection, adhérence, communication, interaction avec la matrice, etc. La fluidité est influencée par différents facteurs, des facteurs externes comme la température (une augmentation de la température entraîne la fluidification de la membrane) et des facteurs internes :

- La composition en acides-gras : Plus les chaînes carbonées des acides-gras sont courtes et insaturées plus la membrane est fluide.
- La proportion de cholestérol : Le cholestérol renforce la solidité et rigidité membranaire et correspond jusqu'à 50% des lipides totaux de la membrane.
- Le nombre de protéines : Les protéines diminuent la fluidité membranaire.

V.2.3. Différenciation de la membrane plasmique

On distingue 3 principaux types de différenciation de la membrane plasmique, qui touche des pôles différents de la cellule concernée.

V.2.3.1. La bordure en brosse

La bordure en brosse est un rassemblement de **microvillosités** qui touche la membrane plasmique du **pôle apical** des cellules, permettant une augmentation de la surface d'échanges des cellules épithéliales (entérocytes, tubules rénaux, etc.).

Les microvillosités sont constituées de **faisceaux** de microfilaments d'actines, parallèlement par rapport à l'axe de la microvillosité. A la base de la microvillosité on trouve des filaments

intermédiaires qui s'orientent de manière perpendiculaire par rapport aux microvillosités. La structure des faisceaux est permise grâce aux **villines** et **fimbrines** qui unissent les microfilaments d'actines entre eux (*cf. chapitres microfilaments d'actines*). Les faisceaux sont fixés à la membrane à l'aide de protéines contractiles : les **myosines 1** latéralement et les **myosines 5** à la pointe de la microvillosité.

V.2.3.2. Les microvillosités isolées

Les microvillosités peuvent être distantes les unes des autres, on parle de microvillosités isolées. Ces dernières sont notamment visibles au niveau des polynucléaires (ou globules-blanc ou leucocytes) lors de la diapédèse (*cf. cours d'immunologie – « Immunité innée »*).

V.2.3.3. Les intra-digitations

Les intra-digitations correspondent à des replis de la membrane plasmique au niveau du pôle basal des cellules épithéliales, le plus souvent au niveau de cellules qui sont sujettes à des échanges d'eau et de minéraux de manière bidirectionnelle avec la matrice extracellulaire.

II) Molécules d'adhérences et jonctions intercellulaires

1) Les molécules d'adhérence

Parmi les molécules d'adhérence on trouve les **CAM** (pour *Cell Adhesion Molecules*) qui permettent l'interaction cellule-cellule et les **SAM** (pour *Substrate Adhesion Molecules*) qui permettent l'interaction cellule-matrice extracellulaire.

Ces interactions peuvent être **homophile**, c'est-à-dire qu'il y a interaction entre deux mêmes protéines, et **hétérophile**, c'est-à-dire qu'il y a interaction entre deux protéines différentes.

a) Immunoglobuline

Les immunoglobulines sont des monomères de la même superfamille que les anticorps, possédant également une chaîne lourde et une chaîne légère, avec des boucles fermées par des liaisons disulfure. Ce sont des glycoprotéines riches en acide sialique et possèdent une trentaine de membres, dont les N-CAM présentent au niveau du système nerveux.

Les immunoglobulines sont **calcium** (Ca^{2+}) **indépendante**, contrairement aux autres molécules d'adhérence, et sont exprimées de manière constitutive au niveau de la membrane plasmique, autrement dit en permanence. Elles réalisent des **liaisons homophiles** mais qui peuvent se faire avec des membres différents, ainsi que des **liaisons hétérophiles** avec des protéoglycanes de la matrice extracellulaire et des intégrines.

b) Cadhérine

Les cadhérines sont des glycoprotéines sous la forme de monomère, possédant une extrémité N-terminale extracellulaire et étant **calcium** (Ca^{2+}) **dépendante**. Les différents types de cadhérines sont spécifiques au tissu.

Ces molécules jouent un rôle principal dans les jonctions intercellulaires de type **desmosomes**. De cette manière leurs extrémités intracellulaires C-terminale interagiront avec les plaques denses ou directement avec les protéines du cytosquelette, et leurs extrémités extracellulaires N-terminale réaliseront des interactions homophiles et hétérophiles avec des autres cadhérines, des intégrines et des protéines de la matrice extracellulaire.

Dans les tissus, les cellules inhibent leurs propres croissances en interagissant les unes avec les autres et ceci grâce à la présence des cadhérines qui sont responsables de ce phénomène appelé **inhibition de contact**.

c) Sélectine

Les sélectines sont des glycoprotéines sous forme de monomère possédant une extrémité N-terminale extracellulaire. Les sélectines sont des lectines **calcium** (Ca^{2+}) **dépendante** qui ont la spécificité de reconnaître les groupements glucidiques d'autres glycoprotéines.

Les sélectines permettent la formation de liaison brève et de très haute spécificité. Elles ne sont pas exprimées en permanence, mais nécessite une activation entraînant son endocytose. Elles interviennent dans des interactions hétérophiles lors de la **diapédèse**.

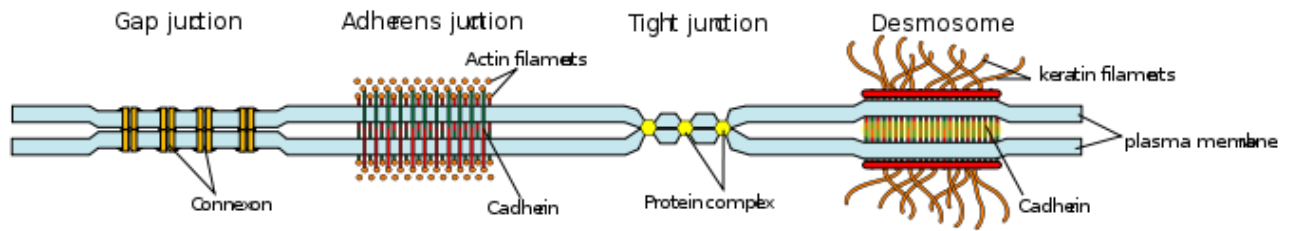
d) Intégrine

Les intégrines sont des glycoprotéines sous forme de **dimère** ($\alpha\beta$) présentant une extrémité extracellulaire N-terminale et étant elles aussi **calcium** (Ca^{2+}) **dépendante**.

Les intégrines interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire et de la lame basale tels que les fibronectines, les laminines et le collagène. Elles interagissent également par des interactions hétérogènes avec des immunoglobulines et des cadhérines, et dans le milieu intracellulaire avec le cytosquelette.

2) Jonctions intercellulaires et jonctions cellules-matrice extracellulaire

Les **jonctions intercellulaires** sont des régions différenciées de la membrane plasmique responsable de l'adhérence intercellulaire et au niveau desquelles on distingue une concentration importante de molécules d'adhérence. Parmi elles on distingue les **jonctions serrées** (ou *Zonula Occludens*), les **jonctions intermédiaires** (ou *Zonula Adherens*), les **desmosomes**, les **jonctions communicantes** (de type nexus ou jonctions gap).



Les **jonctions cellules matrice-extracellulaire** sont des régions différenciées de la membrane plasmique responsable de l'adhérence entre les cellules et les éléments de la matrice extracellulaire. Elles sont également riches en molécules d'adhérence. Parmi elles on distingue les **hémidesmosomes**.

Ces jonctions sont présentes chez les animaux, mais pas chez les végétaux et les bactéries qui sont uniquement liés par leurs parois. Elles permettent une solidité mécanique d'une part et une communication cellulaire d'autre part.

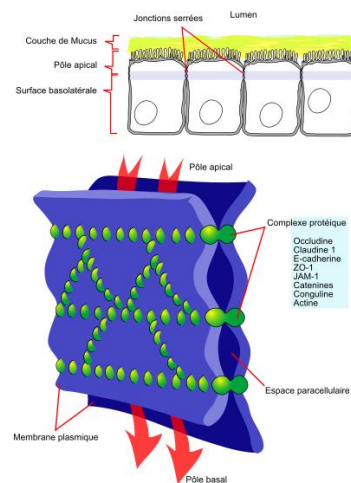
a) Les jonctions serrées (ou *zonula-occludens*)

Les zonula-occludens sont des jonctions étanches qui ceinturent la cellule, d'où le terme de « zonula », au niveau du pôle apical et ceci notamment au niveau des épithéliums monocouches (endothélium et cellules polarisées par exemple au niveau des entérocytes et hépatocytes). Elles créent des occlusions qui interdisent entièrement la diffusion latérale des protéines ; l'espace intercellulaire est totalement obturé.

Elles sont composées d'**occludines** et de **claudines** qui sont des molécules calcium indépendantes et d'immunoglobulines dont les **JAM** (*Junctional Adhesion Molecule*).

Du côté cytoplasmique on trouve des protéines spécifiques appelées **protéines ZO** qui interagissent avec les molécules de la jonction d'une part, et permet l'ancrage des microfilaments d'actine (*cf. cytosquelette*) d'autre part, et ceci grâce à la **cinguline** qui joue le rôle d'adaptateur entre les protéines ZO et les microfilaments d'actine.

b) Les jonctions intermédiaires (ou *zonula-adherens*)

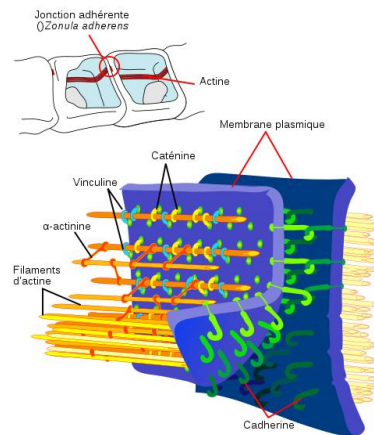


Production Mariana RUIZ
(LadyofHats) – Traduction Berru

Les zonula-adherens sont également des jonctions qui ceinturent la cellule au niveau du pôle apical, situées juste en dessous des zonula-occludens. Elles sont situées au niveau des cellules polarisées et laissent un espace intercellulaire plus important que les jonctions serrées.

Elles sont composées de **cadhérines** et de **nectines** qui sont des immunoglobulines spécifiques. Du côté cytoplasmique on trouve une plaque dense cytoplasmique où sont ancrées les cadhérines et les nectines :

- Les **caténines** permettent la jonction entre les microfilaments d'actines et les cadhérines.
- L'**afadine** et la **ponsine** permettent la jonction entre les microfilaments d'actines et les nectines.



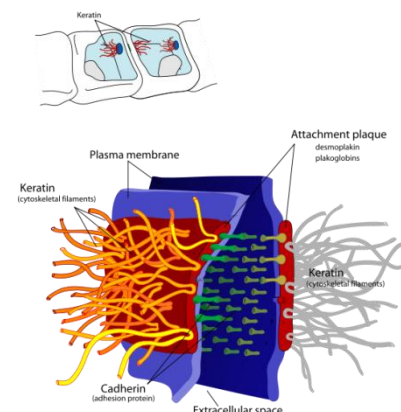
Production Mariana RUIZ
(LadyofHats) – Traduction Berru

c) Les desmosomes

Les desmosomes ne sont cette fois-ci plus des zonulas, mais des **macula-adherens** qui sont des zones d'ancrage des **filaments intermédiaires** sous la forme de tâche, d'où le terme de « macula ». Ils permettent la formation de jonctions intercellulaires, contrairement aux hémidesmosomes qui créent des jonctions entre cellules et lame basale. On trouve les desmosomes principalement au niveau des épithéliums, mais pas exclusivement.

Ils sont composés de **desmocolline** et **desmogléine** qui sont des cadhérines (calcium dépendantes) spécifiques formant des interactions homophiles et hétérophiles entre elles, ainsi que des molécules de la superfamille des immunoglobulines.

La plaque dense a cette fois-ci une forme arrondie et est co fixent les filaments intermédiaires de cytokératine. Il es molécules font office d'intermédiaire entre les molécules t et desmogléine), et les molécules de la plaque dense (desmo



Production Mariana RUIZ
(LadyofHats)

plakophiline.

Les desmosomes permettent l'adhérence intercellulaire, le maintien de la forme des cellules et une résistance cytoplasmique.

d) Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont présents au niveau du pôle basal et forment, comme dit précédemment, des jonctions avec la lame basale par interaction entre les intégrines des hémidesmosomes et les laminines de la lame basale.

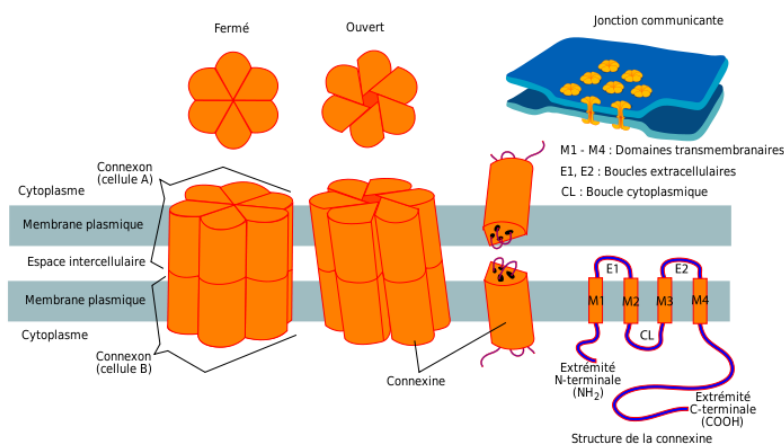
Comme les desmosomes, les hémidesmosomes présentent une plaque dense qui permet d'ancrer les filaments intermédiaires de cytot kératine. Ces derniers forment un réseau entre les plaques des desmosomes et hémidesmosomes permettant le maintien de la cohésion cellulaire.

e) Les jonctions communicantes de type nexus (ou jonction gap)

Au niveau des nexus on observe un espace intercellulaire de 2 à 3 nm. On les trouve au niveau des faces latérales des cellules épithéliales et également des cellules non épithéliales (fibroblastes, cellules musculaires, cellules osseuses, neurones, etc.).

Ils sont composés de plusieurs centaines de canaux bidirectionnels par association de l'un à l'autre provenant d'une cellule et de l'autre. Chaque canal est un **connexon** formé de 6 sous-unités, dont chaque sous-unité est une **connexine** qui possède 4 segments transmembranaires. Les nexus permettent une coopérativité métabolique intercellulaire en fonction du gradient de concentration (ions et petites molécules) et permet ainsi le transfert d'informations (second messagers tels que l'AMP cyclique, le calcium Ca^{2+} et certains enzymes).

Ces jonctions ne sont pas exprimées de manière constitutionnelle mais possèdent des demi-vies de l'ordre de 24 heures. La régulation de la perméabilité dépend donc de la concentration des nexus qui varie selon l'activité cellulaire.



V.3. Le cytoplasme

Dans le cytoplasme, baignent des éléments appelés organites ou organelles. (le 1^{er} organite décrit fut l'appareil de Golgi, par Golgi en 1898 grâce à une coloration des cellules au nitrate d'argent). C'est le lieu de la glycolyse où les sucres simples sont convertis en pyruvate. C'est à ce niveau aussi que les cellules réalisent le repliement des protéines.

V.4. Le noyau

Il existe suivant les cellules un ou plusieurs noyaux, certaines cellules même n'en contiennent pas (les hématies). Sa forme est en général sphérique ou ovoïde. Sa taille est proportionnelle à la cellule (environ 1/3 de la cellule). Les constituants du noyau sont variés: une enveloppe nucléaire, le nucléoplasme, la chromatine et un ou plusieurs nucléoles.

1- L'enveloppe nucléaire

Elle est constituée de 2 membranes (6nm d'épaisseur),

- une membrane externe au contact du cytoplasme
- une membrane interne au contact du nucléoplasme

Elles sont séparées par un espace périnucléaire de 40nm. La membrane interne est tapissée par une structure fibreuse: la lamina. La lamina correspond à un réseau protéique qui relie la membrane interne à l'ADN chromatidien. Elle est constituée de 3 types de protéines:

- la lamine A
- la lamine B
- la lamine C.

2- La chromatine

L'ADN contenu dans le noyau est lié à des protéines de liaisons formant ainsi la chromatine. Il existe deux types de protéines:

- Les protéines histones qui assurent une forte liaison avec l'ADN
- Les protéines non histones

L'association de l'ADN aux protéines histones se fait selon un modèle défini: la fibre nucléosomique, considéré comme l'unité chromatidienne. Différents types de chromatines sont mis en évidence:

- la chromatine dispersée (ou euchromatine) constituée principalement de fibres A (ensemble de nucléosomes enroulés en spirale et liés chacun par un histone H1)
- la chromatine condensée (ou hétérochromatine) constituée principalement de fibres B (spiralisation des fibres A en fibres B)

3- Le nucléole

Le nucléole est le site de production des ribosomes. C'est l'activité de segment d'ADN, les organisateurs nucléolaires, qui expriment les gènes sous forme d'ARNr. Le nucléole contient trois composants:

- un composant fibrillaire clair: correspond aux organisateurs nucléolaires.
- un composant fibrillaire dense: correspond aux transcrits primaires donc à la partie active du nucléole.
- un composant granulaire périphérique: correspond à la zone de stockage des pré-ribosomes.

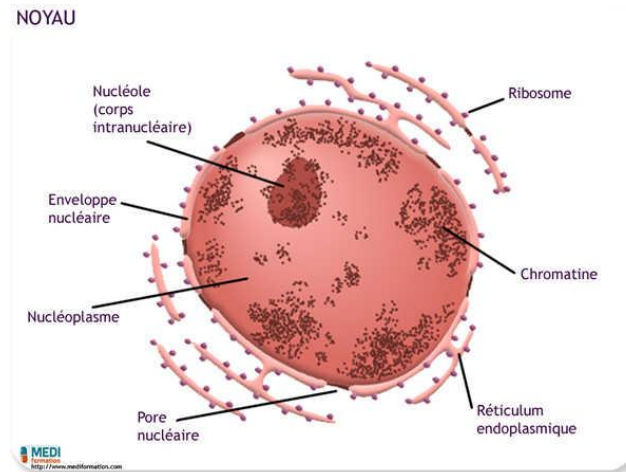


Schéma 8 : Le Noyau

V. 5. Le réticulum endoplasmique

Au niveau des cellules, le réticulum endoplasmique est un ensemble de cavités de formes variées. Si la face hyaloplasmique des cavités peut être couverte de petits grains (ribosomes) : le réticulum est dit granuleux. Sinon, il est dit lisse. Les ribosomes sont impliqués dans la synthèse des chaînes polypeptidiques. Ils décodent le message porté par le RNA messenger. Les chaînes polypeptidiques traversent les membranes et sont libérées dans les cavités. Les protéines sont constituées d'acides aminés de différentes catégories.

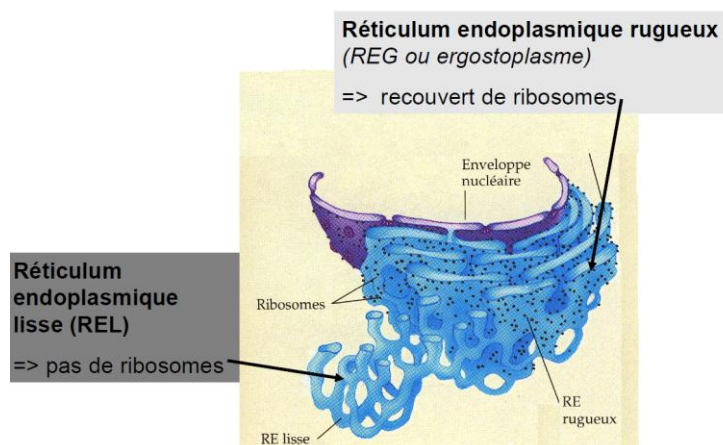


Schéma 9: Le réticulum endoplasmique

V.6. Les ribosomes (20-25nm)

V.6. 1. Structure

- Ils sont constitués d'ARN associé à des protéines.
- Les ribosomes synthétisés dans le nucléole se retrouvent libres dans le cytoplasme ou rattachés au REG.
- Les ribosomes sont dépourvus de membrane. Ils sont constitués de 2 sous unités ayant respectivement une constante de sédimentation de 40S et de 60S.
- Les sous unités s'assemblent dans le cytoplasme sur des structures appelées polyribosomes.

Les mitochondries, les chloroplastes et les bactériens ont leurs propres ribosomes.

V.6.2. Fonction

Ils sont les principaux acteurs de la biosynthèse des protéines (celle-ci étant accentuée dans la phase G du cycle cellulaire).

La biosynthèse des protéines est la translation du code de l'ARN messenger (mRNA) à partir de la séquence d'acides aminés de la chaîne polypeptidique.

V.7. L'appareil de Golgi

C'est un organe cytoplasmique constitué suivant le type cellulaire par un ou plusieurs dictyosomes (sacculles + vésicules) généralement situés à proximité du noyau.

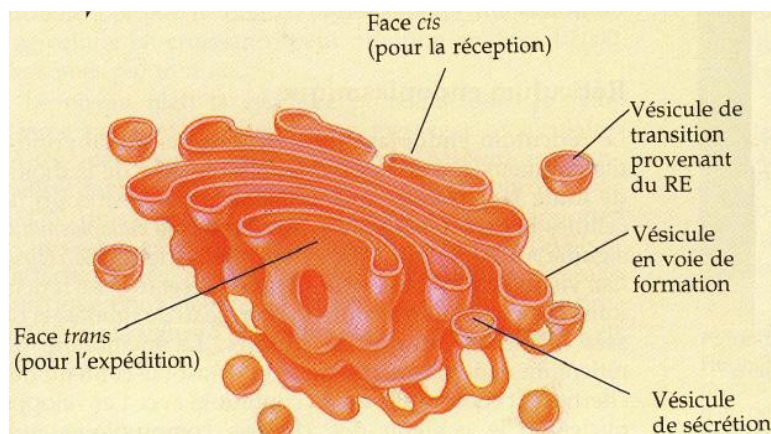


Schéma 10 a : L'appareil de Golgi

V.7. 1 Structure et ultrastructure

Chaque dictyosome se présente comme un empilement **polarisé** de sacculles membranaires aplatis, séparées par le hyaloplasme.

On distingue deux pôles (ou faces):

- Une face tournée vers le REG voisin ; c'est la face cis ou face de formation (=face convexe, externe, proximale). La face cis se caractérise par la formation de nouveaux sacculles golgiens provenant de la fusion de vésicules émis par le REG.

➤ Une face généralement orientée vers la surface cellulaire, ou face trans (= face de maturation ou concave ou distale) ; c'est la face produisant des vésicules.

Rappel: les saccules de la face cis ont une structure proche du RE 6µm d'épaisseur alors que celles de la face trans sont proches de la membrane cytoplasmique 7,5µm.

Entre les compartiments cis et trans se trouve le compartiment **médian**.

Le nombre de saccules est variable (4-8) chez certains protozoaires, plus de 40 chez les métazoaires. Il y en a en moyenne une vingtaine par cellule.

Les vésicules faisant suite aux saccules du compartiment de maturation constituent le **réseau trans golgien (Trans Golgi Network, TGN)**. Les différents types de transport par l'intermédiaire des signaux cellulaires sont effectués par des vésicules tapissées de clathrine bourgeonnant du réseau trans golgien.

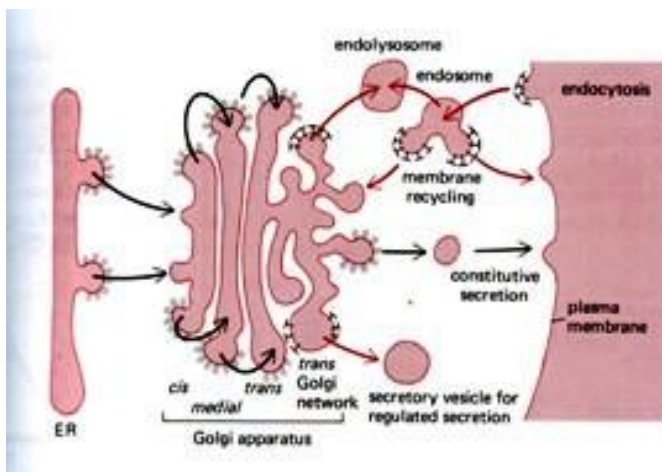


Figure 10 b : Modèle hypothétique de transport de protéines dans une cellule non polarisée

V.7.2. Composition chimique

Les saccules golgiens sont délimités par une membrane cellulaire classique à 35% de lipides et 65% de protéines (protéines structurales et enzymes)

* Les enzymes golgiennes :

Ce sont principalement des glycosyl transférases qui modifient les protéines et les lipides à travers:

- l'addition de glycoprotéines provenant du glycocalyx.
- l'addition de glycoprotéines contenant surtout des ions sulfates et sulfures [(sulfatées et sulfonées) = mucopolysaccharides] des cellules cartilagineuses.
- l'addition d'acides gras.

Les principales enzymes sont la mannosidase et la galactosyltransférase.

V.7.3. Fonctions

L'acide gras est un atelier d'emballage et de finition pour les protéines et lipides nouvellement synthétisées provenant du RE telles que les hormones et les enzymes.

Les précurseurs d'enzymes (protéines n'ayant pas encore atteint leur stade actif final) dont la synthèse débute dans les ribosomes et se poursuit dans le RE y subissent une O ou N-**glycosylation** (O=Serine HO-CH₂-, Thréonine; HO-CHCH₃-R), enveloppés et stockés dans les saccules de Golgi d'où ils migrent progressivement. La migration des différentes protéines vers la face de maturation (cis) s'accompagne d'incorporations progressives de sucres spécifiques à chaque étape. Le contenu des saccules golgiens subit une ségrégation au niveau du TGN. Les vésicules de transport provenant du TGN portent les produits synthétisés vers leur destination finale (structure, sécrétion, etc...).

V.8. Les mitochondries

Elles sont présentes en grand nombre chez tous les eucaryotes (1000 à 2000 dans les hépatocytes).

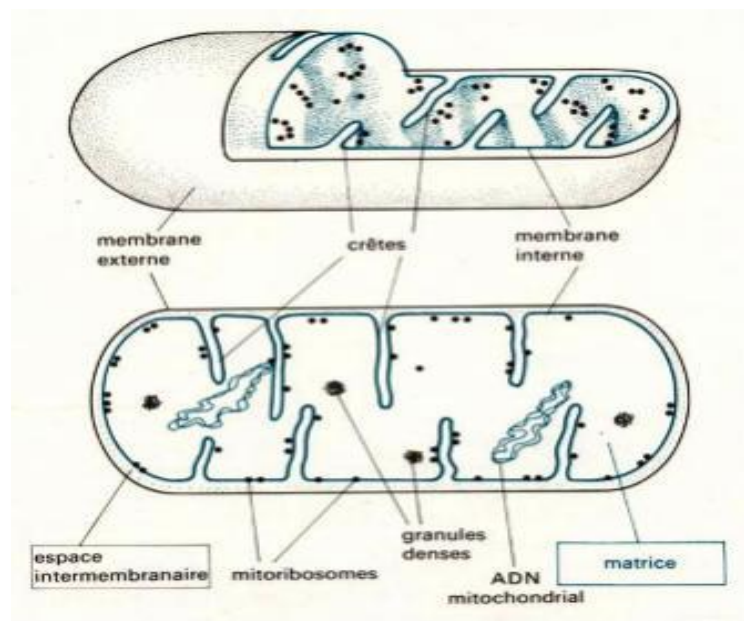


Schéma 11 : La mitochondrie

V.8.1. Structure

Ce sont des organites cellulaires à enveloppe dont la taille varie (longueur 2-4µm, épaisseur 0,5-1µm). Elles apparaissent arrondies ou allongées mais sont en fait très déformables.

Elles sont en forme:

- d'anneau autour de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes
- de bâtonnet allongé chez les trypanosomes
- ramifiée dans les cellules des glandes muqueuses d'escargot.

On y distingue 04 principales parties :

- **La matrice mitochondriale:** elle contient un mélange fortement concentré de plusieurs centaines d'enzymes dont celles nécessaires pour l'oxydation du pyruvate, et des acides gras et celle du cycle de Krebs.

- **La membrane interne** : c'est une bicouche lipidique. Elle s'invagine pour donner plusieurs crêtes qui augmentent sa surface totale. Elle contient des protéines possédant 3 principales fonctions:

- Celles qui effectuent les réactions d'oxydation avec la chaîne respiratoire.
- Un complexe enzymatique appelé ATP synthétase ($=F_0F_1ATPase$) qui produit l'ATP dans la matrice (15% des protéines de la membrane interne).
- Des protéines de transport spécifiques qui règlent le passage des métabolites vers la matrice et en provenance de celle-ci.

- **La membrane externe** est également une bicouche lipidique. Elle contient une grande protéine-canal appelée **porine**, elle est perméable à toutes les molécules de moins de 10 000 daltons. Elle contient également des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides mitochondriaux

- **L'espace inter membranaire** : Il contient plusieurs enzymes qui utilisent l'ATP traversant la matrice pour phosphoryler d'autres nucléotides.

V.8.2. Fonctions

La mitochondrie est le site des réactions d'oxydation de la respiration. Il en résulte une production d'énergie stockée sous forme d'ATP dans les cellules.

Elles constituent les centrales énergétiques de la cellule par leur production d'ATP, directement au niveau des sites où cette molécule est fortement consommée. Les mitochondries sont donc plus fréquentes dans les cellules consommatrices d'énergie (Exemple : muscle cardiaque, tubules rénaux, spermatozoïdes).

V.9. Les chloroplastes

Grace à ses pigments, le chloroplaste (CH) transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique permettant la synthèse des glucides.

V. 10. Inclusions, lysosome et peroxyosome

Ce sont des structures vacuolaires dont le rôle est de dégrader les déchets cellulaires. Le peroxyosome est un organite ou une vésicule découverte en 1954 par Rhodin et abrite plusieurs oxydases qui produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), molécule toxique pour la cellule et prise en charge par une enzyme spécifique, la catalase. Il semble qu'il soit présent dans presque toutes les cellules eucaryotes. Dans les cellules végétales, on peut trouver aussi un organite proche: le glyoxysome. Toutes les protéines peroxysomales sont codées par des gènes nucléaires et synthétisées sur des ribosomes libres dans le cytosol. Les lysosomes sont des compartiments acides contenant des enzymes pour la digestion des protéines et des acides nucléiques.

V.11. Le cytosol / le cytosquelette

V.11.1. le cytosol

Le cytosol, ou hyaloplasme se présente comme un plasma transparent contenant de 70 % à 90 % d'eau et de pH proche de la neutralité. Constitué de protéines, il est apte à changer de morphologie: il passe de l'état de gel (colloïde) à l'état sol (liquide) et réciproquement selon l'activité cellulaire. Le cytosol contient:

- des enzymes de stockage intracellulaire de produits de réserve (graisses, glucides)
- des ribosomes assurant la synthèse des protéines
- des précurseurs des constituants du cytosquelette

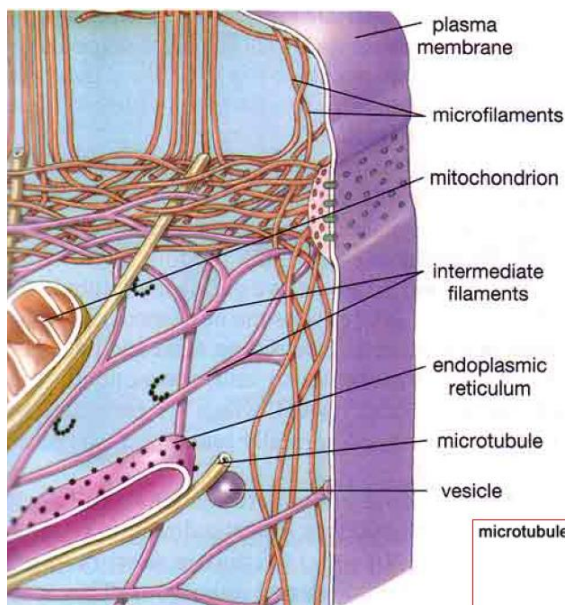
V.12. 2. Le cytosquelette

V.12. 2. 1. Définition

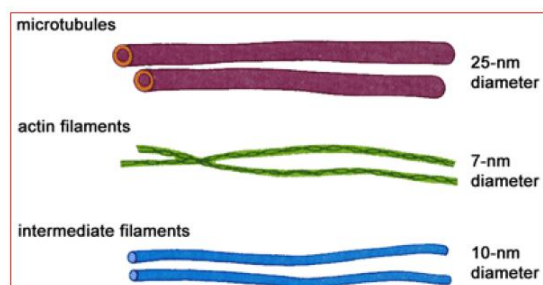
C'est un réseau complexe de filaments protéiques ou tubulaires qui s'étend à travers le cytoplasme. Il confère aux cellules eucaryotes leur aptitude à prendre des formes différentes et à se déplacer. Il est également appelé cytomusculature car responsable des mouvements amiboïdes, ciliés et flagellés de la cellule. Il permet aussi les échanges cellulaires.

V.12. 2. 2. Eléments du cytosquelette

Les différentes activités du cytosquelette ne dépendent que de 3 types de filaments protéiques: les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires.



Éléments du cytosquelette



CHAPITRE 2 : METHODES D'ETUDES CELLULAIRES

En 1939 Theodor Schwann décrit les cellules animales comme semblables aux cellules végétales. C'est ainsi que naquit la cytologie avec la "cell doctrine" de Schleiden & Schwann qui stipule que toutes les plantes et les tissus animaux sont des agrégats de cellules individuelles. L'organisme humain compte environ 10^{18} cellules (= un trillion). La cellule animale typique mesure 10 à 20µm de diamètre (environ 5 fois plus petite que la plus petite particule visible) En général, la taille d'une cellule varie de 0,2µm à 100µm.

La **cytologie** est la partie de la biologie qui étudie la structure et les fonctions de la cellule. (= biologie cellulaire).

Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure des progrès scientifiques et technologiques réalisés dans divers domaines. Pour comprendre la biologie cellulaire, il est indispensable de se familiariser avec les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude.

Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- les techniques morphologiques.
- les techniques chimiques et biochimiques.
- les techniques physiologiques.

Ces techniques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques.

I. LA MICROSCOPIE

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Principe : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour retraitement.

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons et le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

I.1. Caractéristiques du microscope

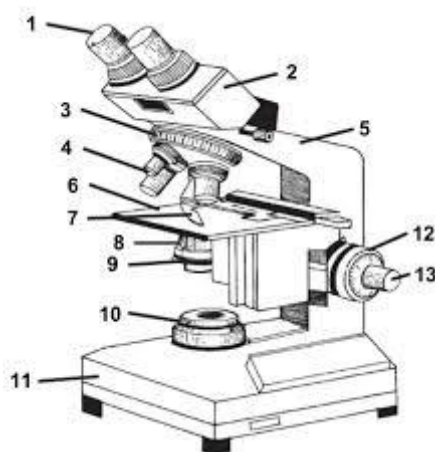
Le microscope est caractérisé par :

- son **grossissement ou puissance** : Egal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.

- son **pouvoir de résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

I.2. Présentation du microscope optique :

Un microscope optique en général est composé d'un statif (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, d'un tube optique le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités un oculaire permettant de recueillir l'image et des objectif servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, d'une platine (porte objet) percée d'un trou et munie de pinces pour immobiliser la lame et d'une source lumineuse éclairant la préparation.



Légende

- 1 : oculaire
- 2 : tube optique
- 3 : tourelle ou revolver
- 4 : objectif
- 5 : potence
- 6 : platine
- 7 : préparation
- 8 : diaphragme
- 9 : condenseur
- 10 : éclairage, source lumineuse
- 11 : socle
- 12 : vis macrométrique
- 13 : vis micrométrique

Schéma 12 : Microscope optique

I.3. Principe du fonctionnement du microscope :

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le microscope optique et pour le microscope électronique à transmission et l'observation par réflexion pour le microscope électronique à balayage.

Donc le microscope travaille en :

Transmission : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

Réflexion : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne.

L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet. Ce mode de microscopie est peu utilisé, il correspond aux loupes binoculaires ou stéréomicroscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

I.4. Conditions d'observation en microscopie :

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : l'épaisseur de l'échantillon et le contraste.

L'épaisseur de l'échantillon : pour une observation par transmission l'échantillon doit présenter une faible épaisseur afin de permettre le passage du faisceau incident des photons ou d'électrons d'où la nécessité de faire des coupes très très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm

Le contraste : L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui amplifient les contrastes naturels comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

I.5. Types de microscopes optiques :

Un certain nombre de microscopes ayant chacun des montages optiques spéciaux ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules dans certaines conditions et améliorer la qualité de celle ci. Le développement de ces microscopes répond principalement à 2 objectifs :

- augmenter les contrastes pour mieux visualiser les structures subcellulaires
- améliorer le pouvoir de résolution (voir des détails de plus en plus petits !)

Parmi ces microscopes, nous avons :

I.5.1. Les microscopes optiques, à lumière ou photoniques

Il existe divers types de microscopes à lumière :

- les microscopes par transmission ; ils permettent l'observation directe de structures dont les dimensions sont de l'ordre de 0,2 μm : ce sont les autres microscopes donnant des

informations indirectes sur l'ultrastructure des cellules : microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase

- le microscope confocal à balayage.

I.5.1.1. Le microscope par transmission

Le microscope le plus courant utilise la lumière visible (lumière blanche constituée de plusieurs longueurs d'onde) qui est transmise directement sur la prépa biologique. Ces microscopes sont équipés de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer. Les échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.

I.5.1.2. Le microscope à contraste de phase

Il permet d'observer des objets non préalablement colorés, par exemple des cellules vivantes. Lorsque des ondes lumineuses traversent des objets colorés, leurs amplitudes sont diminuées, c'est ce qui crée l'image. Quand les ondes lumineuses traversent un objet non coloré leur amplitude est très peu changée, mais leur phase est modifiée, ce qui crée des interférences. Ce sont les effets de ces interférences qui sont exploités pour créer une image dans les microscopes à contraste de phase.

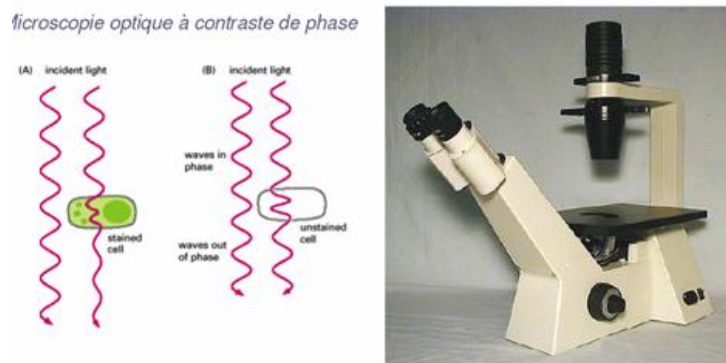


Figure 1 : Exemple d'un microscope à contraste de phase

I.5.1.3. Le microscope à fond noir

I.5.1.4. Le microscope à lumière polarisée

I.5.1.5. Le microscope à rayons UV (= microscope à fluorescence)

C'est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie. La **fluorescence** est une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autres que la chaleur (on parle parfois de « lumière froide »). Elle se distingue de la phosphorescence (phénomène observé lorsqu'une matière continue à

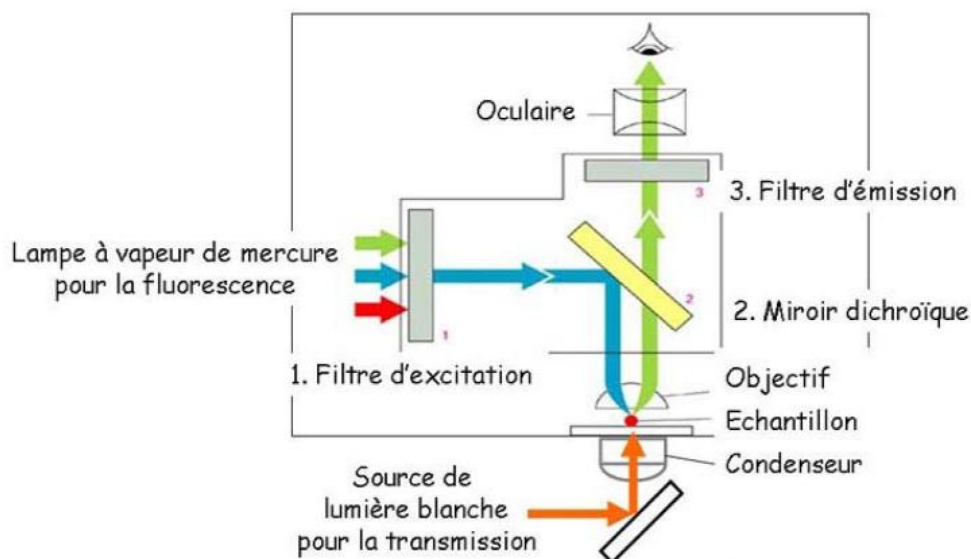
émettre de la lumière après avoir été éclairée) en ce que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation. En microscopie à fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes. Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes (tableau I), comme par exemple le DAPI (Di Amidino Phényle Indole) qui marque l'ADN et fluoresce en bleu.

Tableau 3: Les marqueurs fluorescents les plus courants et leur lumière d'excitation.

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

- **Principe de la microscopie à fluorescence**

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie à fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.



Principe d'un microscope optique à fluorescence. Ce type de microscope permet d'observer des éléments fluorescents dans une cellule. Ces éléments fluorescents peuvent être naturels, mais le plus souvent ce sera une molécule spécifique, un ARNm ou une protéine par exemple, que l'on aura marqué à l'aide d'une sonde spécifique couplée à un fluorochrome. Ce type de microscope permet donc de localiser précisément dans la cellule tel ou tel type de molécule. L'objet est excité par une lumière de longueur d'onde définie par un filtre. La fluorescence émise est observée.

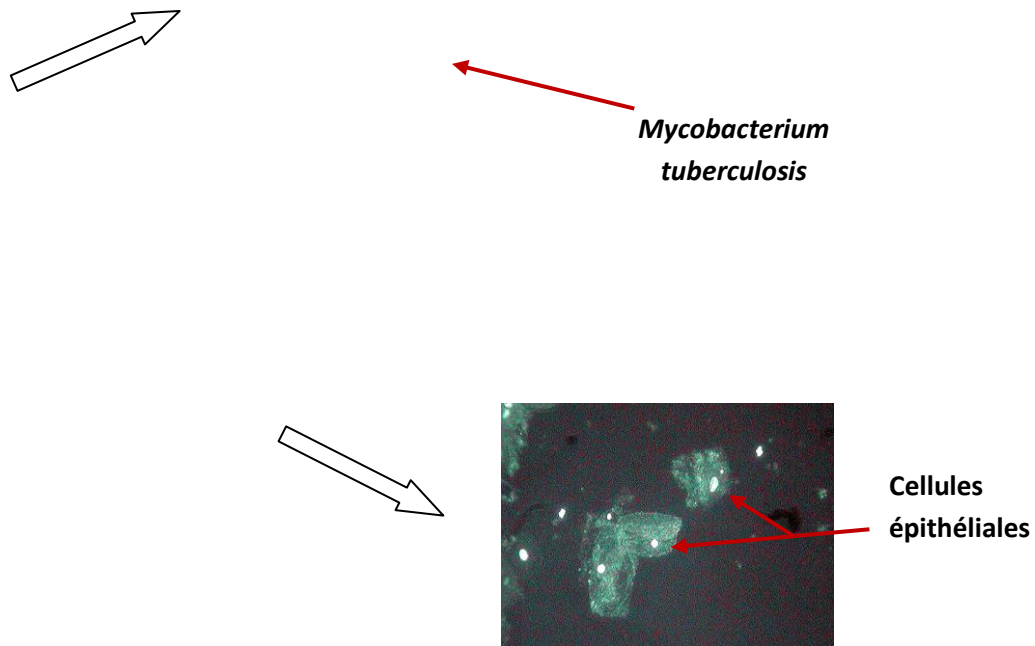
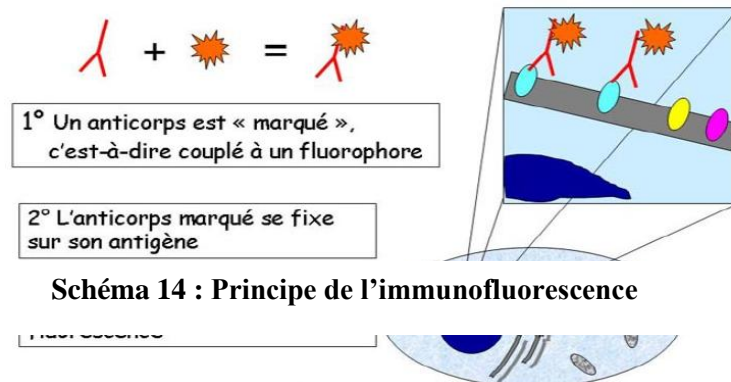


Figure 2 : Exemple d'un microscope à fluorescence

Immunofluorescence



I.5.1.6. Le microscope confocal à balayage

Sa technique consiste à balayer une préparation par un faisceau d'électrons, permettant la mise en évidence des reliefs de l'échantillon.

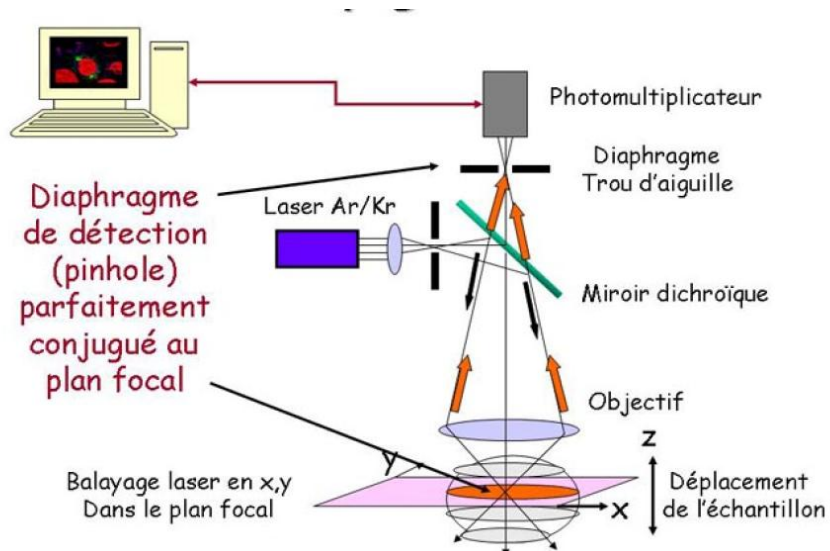


Schéma 15 : Microscope confocal à balayage

II.2. Les microscopes électroniques

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons ce microscope fonctionne avec des électrons le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons (cathode et anode percée).

L'ensemble du dispositif est placé sous vide. Les lentilles de verre sont remplacées par des bobines électromagnétiques seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images. Avec ces microscopes on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques \AA . On aura donc accès à l'ultra structure des organites. Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

a. Le microscope électronique par transmission:

- tout s'effectue sous vide;
- un filament de Tungstène chauffé émet des électrons;
- les électrons sont plus ou moins diffractés par les diverses structures cellulaires.

b. Le microscope électronique à balayage :

- le spécimen est vaporisé par un métal lourd;
- le spécimen est vaporisé par un faisceau d'électron;
- Il y a émission de faisceau secondaires par le spécimen;
- Il y a production d'une vue 3D du spécimen.

Tableau 4 : Comparaison entre le microscope optique et électronique

M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
<ul style="list-style-type: none"> *grossissement : de 25 à 1500 fois *pouvoir séparateur : environ 0.2µm *préparation est traversée par des photons *longueur d'onde : 0,4 à 0,8 µm *lentilles sont en verre *image : est reçue directement *les coupes au microtome : 2 à 10 µm 		<ul style="list-style-type: none"> * grossissement : 1500à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10A° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 A° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0,05µm
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles 		<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la structure fine de la cellule * on atteint très souvent le niveau moléculaire *a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux)
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> * on ne peut pas pousser l'analyse assez loin 		<ul style="list-style-type: none"> * la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
<ul style="list-style-type: none"> * l'unité est le micromètre ou micron (µm) 1µm = 10⁻³ mm 		<ul style="list-style-type: none"> * l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10⁻⁶ mm ou 10⁻⁹ m

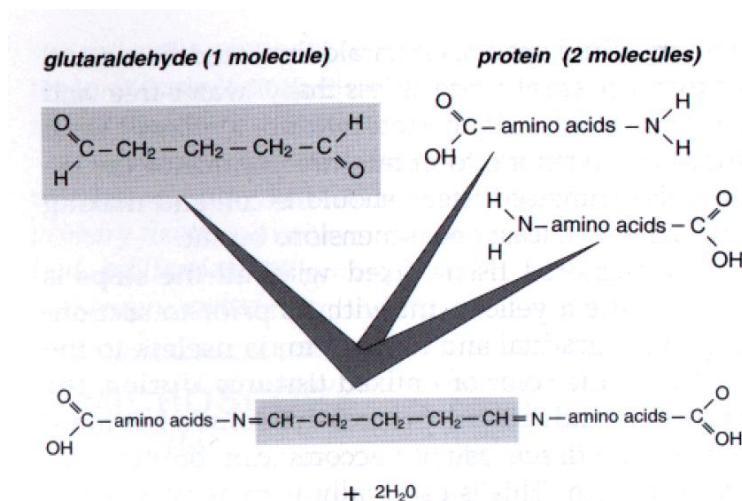
II. TECHNIQUES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

II.1. Etudes des structures

Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécapage.

II.1.2. La préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

1. La fixation se fait par le **formaldéhyde** et le **glutaraldéhyde**, qui sont des aldéhydes très réactifs ou le tétr oxyde d'osmium. Malheureusement la fixation tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation.



**Exemple de fixation
au glutaraldéhyde**

2. La déshydratation permet l'élimination de l'eau en la remplaçant par des solvants de types **xylène** et **toluène**.
3. L'inclusion dans de la résine, cire ou paraffine, permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.
4. La formation des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.

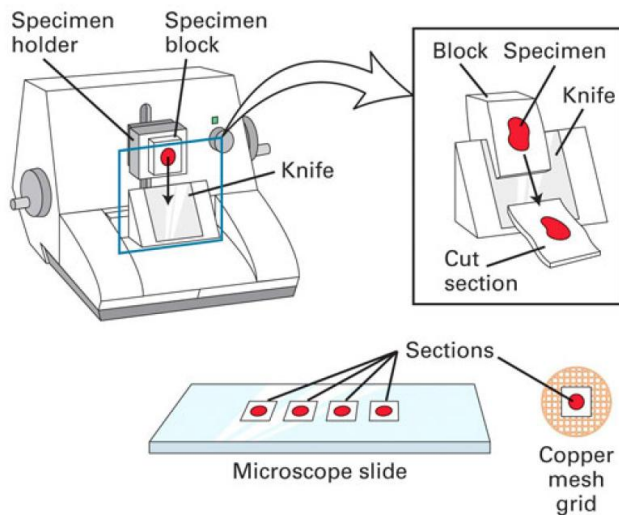
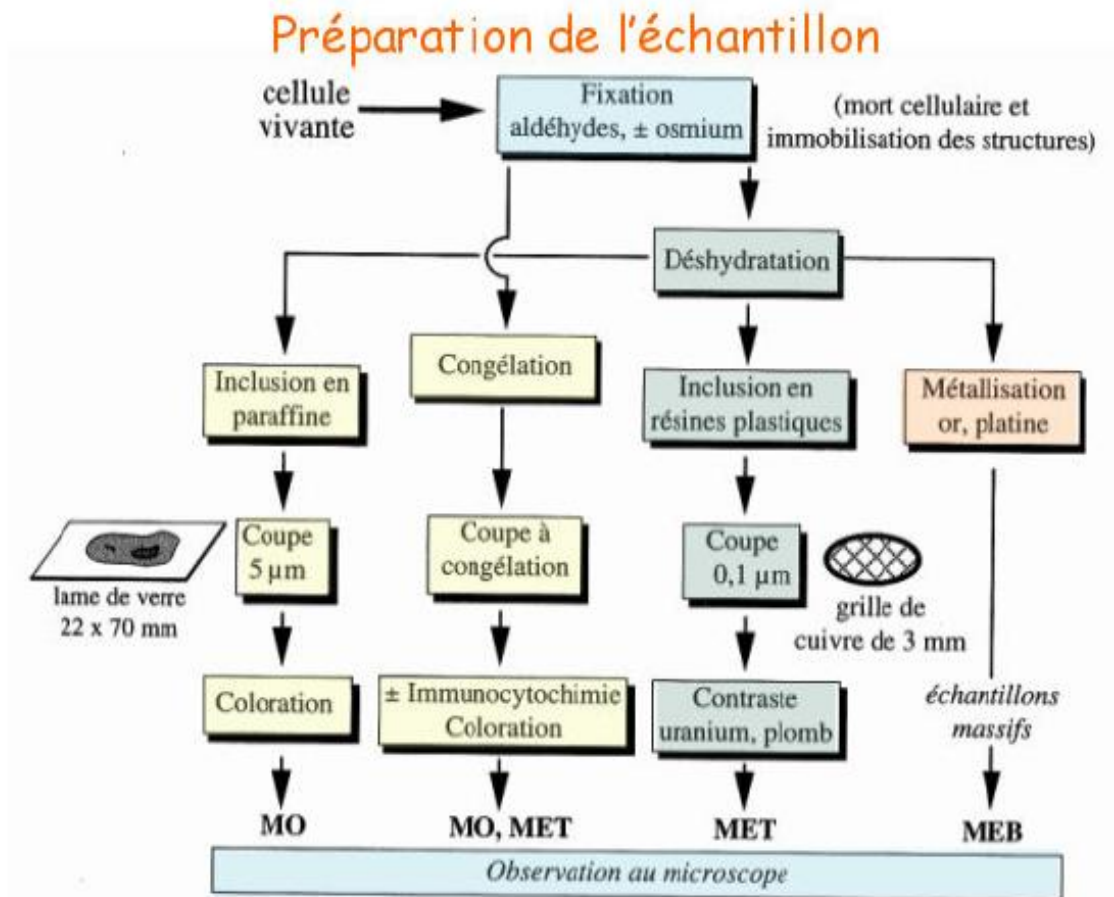


Schéma 16: Coupe au microtome

5. La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence :
 - Les **colorants métachromatiques** qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le **May-Grunwald-Giemsa (MGG)**, qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins.
 - Les **colorants histochimiques** comme l'**acide périodique de Schiff** qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides.
 - La **méthode histo-enzymatique** qui permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore.
6. Le montage rend la préparation observable.

La **coloration négative** permet de mettre en évidence le contour de petits objets, grâce à des projections de métaux lourds sur la préparation.

Les **ombrages métalliques** permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant sous vide une très fine couche métallique avec un certain angle d'incidence entraînant la formation d'ombre portée.



II.1.2. Mise en culture

La culture cellulaire est obtenue après le maintien en vie de cellules plus de 24 heures dans un milieu de culture artificielle. On met en évidence deux types de cultures :

- Les **cultures organotypiques** sont soumises à un maintien de la différenciation morphologique et fonctionnelle. Ces fragments d'organes ou tissus sont appelés des explants.
- Les **cultures histiotypiques** correspondent à une multiplication active mais sans maintien de l'organisation.

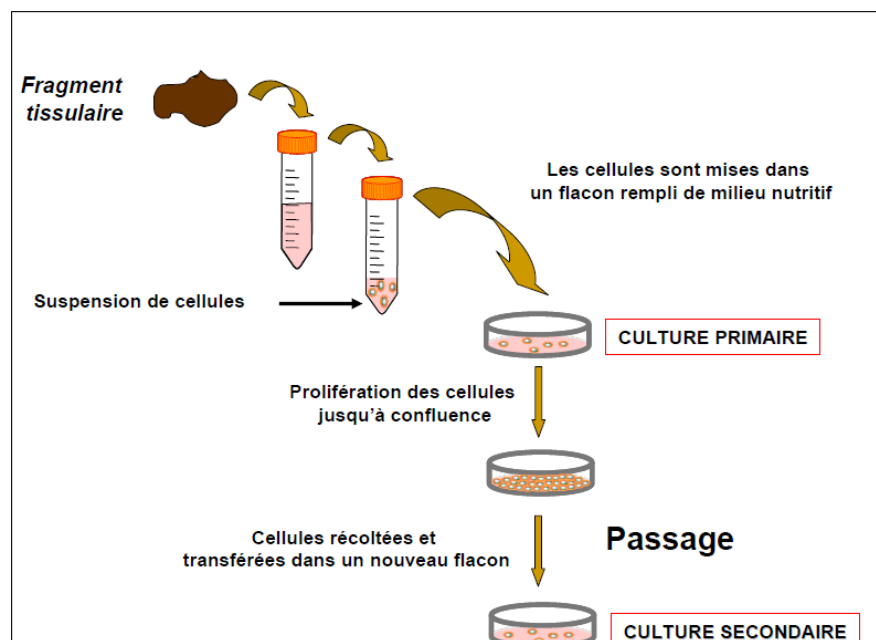


Schéma 17 : Cultures

III. LES METHODES DE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

III.1. Homogénéisation

Le but de l'homogénéisation est de rompre la membrane plasmique (ou la paroi pour les cellules végétales et fongique). Pour se faire on met les cellules en suspension dans un tampon de pH et de force ionique connus. L'**homogénéiseur** est un tube de verre dans lequel on place la préparation puis un piston en verre. La cellule passera entre le tube de verre et le piston, sera ainsi comprimée et éclatera, libérant son contenu dans le tampon. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées **microsomes**.

III.2. Purification

III.2.1. Centrifugation différentielle

Elle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé

- A 1000g, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 10000g, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- A 105000g (ultracentrifugation), on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.

- A 200000g, on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

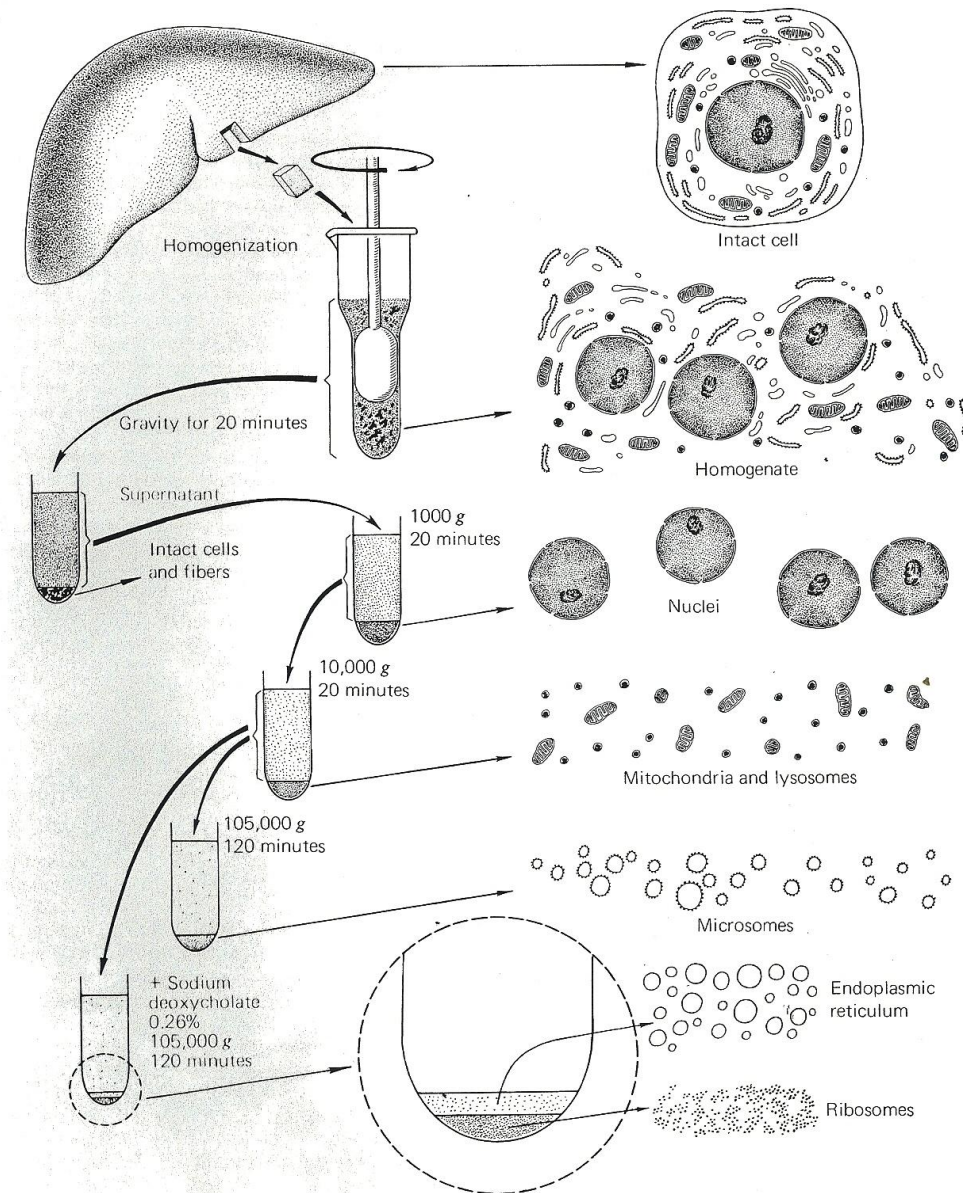


Figure 1-10. Isolation of cell constituents by differential centrifugation. The supernatant of each tube is centrifuged again at higher speeds. The drawings at right show the cellular organelles at the bottom of each tube after centrifugation. Centrifugal force is expressed by g , which is equivalent to the force of gravity. (Redrawn and reproduced, with permission, from Bloom W, Fawcett DW: *A Textbook of Histology*, 9th ed. Saunders, 1968.)

Schéma 18 : Centrifugation différentielle

III.2.2.

Centrifugation par gradient préformé ou de densité

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera. La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg (S)**.

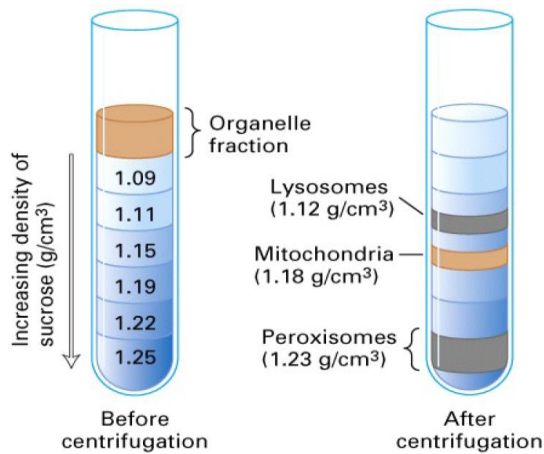


Schéma 19 : Centrifugation par densité

III.3. Diffraction des rayons X

La diffraction permet de déterminer la structure tridimensionnelle d'une molécule. Elle est fonction de la propriété des rayons X d'être diffractés lorsqu'ils rencontrent des obstacles. Selon l'espacement et la disposition des atomes, les rayons seront déviés de manière différente. Ex structure en double hélice de la molécule d'ADN par la cristallographie de diffraction de rayons X.

III.4. Cytométrie de flux

La cytométrie en flux décrit une technique d'analyse de routine des cellules ou particules biologiques en suspension qui traversent une cellule de mesure les unes après les autres. Un ou plusieurs lasers excitent chaque particule ainsi injectées. Si les particules ont été marquées avec un ou plusieurs fluorochromes, la source lumineuse excite ceux-ci et nous informe sur certains aspects biologiques supplémentaires

Le cytomètre mesure la lumière de fluorescence et la lumière diffusée. Grâce à des phénomènes de diffusion lumineuse, il caractérise les cellules selon : la taille, la granularité et la fluorescence.

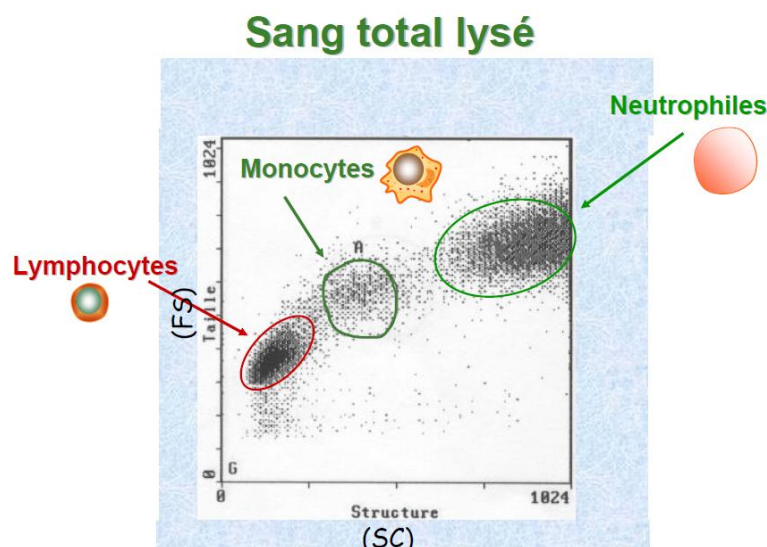


Schéma 19 : séparation des populations par cytométrie