

Département de Médecine Dentaire, Faculté de Médecine, Université de Badji-Mokhtar
1 ère année Module de Cyto/histo/ Embryologie Volet Cytologie Pr DJEKOUN. S

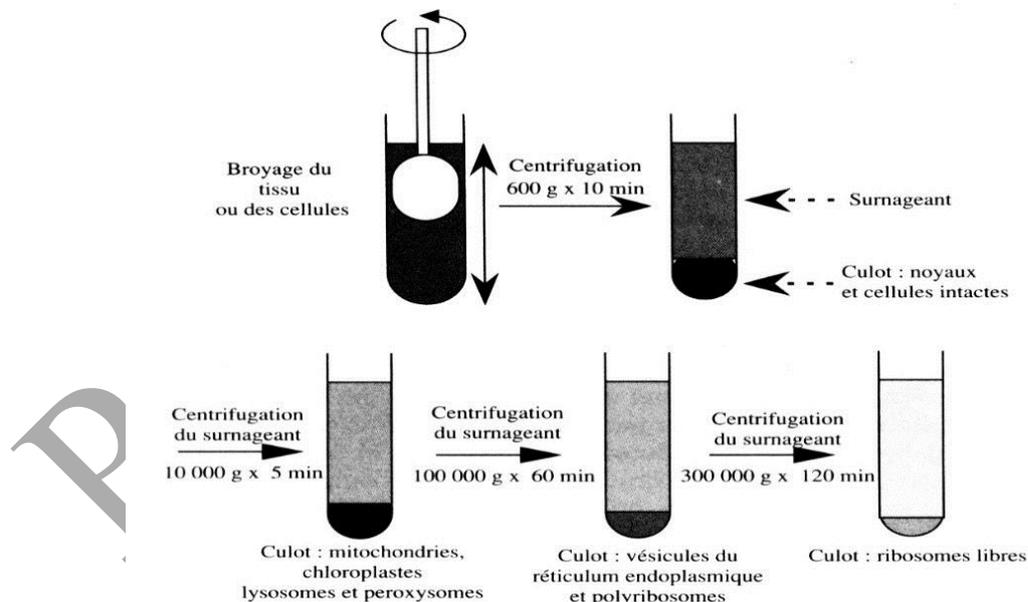
TECHNIQUES DE BASE EMPLOYEES DANS L'ETUDE DES CELLULES

La progression de la biologie cellulaire reste dépendante de l'utilisation combinée de plusieurs groupes de méthodes et techniques variées.

1- LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Technique consistant à ouvrir les cellules (broyat) et à séparer les différentes parties constitutives en fractions purifiées par des centrifugations successives. L'éclatement des cellules dans une solution est appelé *lyse* ou *homogénéisation*, est généralement obtenu après rupture mécanique de la membrane plasmique à l'aide d'un homogénéisateur. Certaines structures cellulaires, telles que les mitochondries, les chloroplastes, les lysosomes, les microcorpuscules, les noyaux et les ribosomes restent en grande partie intacts au cours de l'homogénéisation, alors que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique sont généralement fragmentés. Il est ensuite possible de séparer les constituants structuraux essentiels en différentes fractions pures par centrifugation sachant que la vitesse de sédimentation d'une structure dépend de sa taille, de sa densité et de sa forme.

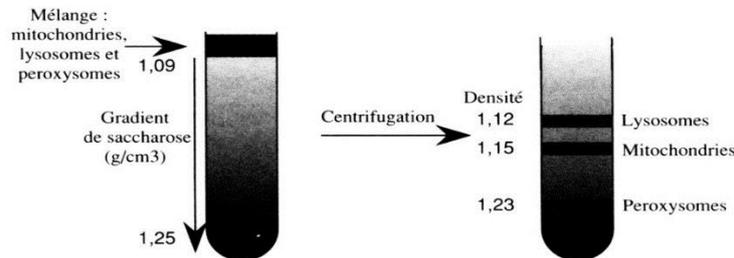
Après avoir obtenus les organites dans des fractions pures, on peut en analyser la composition biochimique ainsi que la fonction. Il est possible de soumettre certains organites à un fractionnement subcellulaire; ces séparations permettent d'affiner encore l'analyse fonctionnelle et structurale.



A : Centrifugation différentielle

Une bonne purification des divers organites peut se réaliser en une seule étape par la centrifugation en gradient de sédimentation. On dépose la suspension à centrifuger au sommet d'un gradient de densité, composé de couches de solutions de saccharose de plus en plus dense (de 1,09 à 1,25 g/cm³). Après centrifugation, les différents constituants cellulaires se répartissent en bandes de densité distincte, chaque bande contenant les organites de taille et de

forme identiques (figure 2.1B). Ainsi, au cours de l'ultracentrifugation les organites ou macromolécules migreront dans le tube pour se stabiliser au niveau de densité du liquide identique à celle du constituant cellulaire. A la fin de la centrifugation les bandes seront collectées individuellement. Cette méthode de séparation extrêmement fine permet de séparer l'ADN moléculaire ($d = 1,703$) de l'ADN mitochondrial ($d = 1,701$) d'hépatocytes.



B : Centrifugation en gradient de densité.

Figure 2.1 : Fractionnement d'un extrait cellulaire par centrifugation.

2- LES METHODES MICROSCOPIQUES

La microscopie optique (ou photonique) révéla aux biologistes que des cellules, assemblées en agrégats, constituent les tissus végétaux et animaux. Cette découverte due à Van Leeuwenhoek en 1674, fut à l'origine de la théorie cellulaire de Schwann (1835) et de l'essor de la microscopie en biologie. Ces dernières années les progrès en électronique et en informatique ont favorisées la conception de microscopes photoniques et électroniques très performants.

2.1- Le microscope photonique

Le microscope optique car la source d'éclairage est en général la lumière visible qui se qualifie en photons. La lumière traverse la préparation (l'échantillon), puis des lentilles de verre qui réfractent (dévient) la lumière de façon à grossir l'image projetée dans l'œil.

Le grossissement et le pouvoir de résolution sont deux facteurs importants en microscopie. **Le grossissement** représente le rapport entre les dimensions apparentes de l'image et les dimensions réelles de l'objet. **Le pouvoir de résolution** est une mesure de clarté de l'image ; plus précisément, il correspond à la distance en deçà de laquelle deux points n'apparaissent plus comme distincts. Par exemple, là où l'œil nu voit une seule étoile dans le ciel, le télescope permet d'apercevoir des étoiles jumelles.

Le pouvoir de résolution d'un microscope a ses limites qui ne dépassent pas $0,2 \mu\text{m}$, soit la taille d'une petite bactérie ou d'une mitochondrie car elle est fixée par la longueur d'onde de la lumière de la lumière visible utilisée pour éclairer la préparation. Les microscopes photoniques grossissent jusqu'à 1 500 fois la taille de l'objet ; au-delà, les images deviennent brouillées. En effet, la plus part des structures cellulaires ou *organites* sont visibles au microscope photonique. La biologie cellulaire a fait un grand pas dans les années 1950 grâce à l'invention du *microscope électronique*.

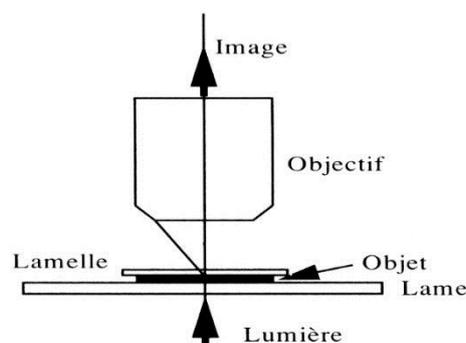


Figure 2.2 : Schéma d'un microscope optique.

2.2- Le microscope électronique

Les microscopes électroniques modernes atteignent une limite de résolution d'environ 0,2 nm, soit 1000 fois plus grande que celle du microscope photonique, ils renseignent sur

L'ultrastructure cellulaire

On trouve deux sortes de microscopes électroniques : *le microscope électronique à transmission (MET)* et *le microscope électronique à balayage (MEB)*. Le premier envoie un faisceau d'électron à travers une coupe mince de l'échantillon, un peu comme le microscope photonique fait passer la lumière à travers la lame. Au lieu de comporter des lentilles de verre, opaques aux électrons, le microscope électronique à transmission fonctionne au moyen d'électroaimants qui mettent au point et grossissent l'image en déviant la trajectoire des électrons chargés. L'image est finalement projetée sur un écran ou sur une pellicule photographique. Pour accentuer le contraste, on « colore » des coupes très minces des cellules fixées ; cette coloration se fait au moyen d'atomes de métaux lourds qui s'attachent à certains endroits des cellules.

Les biologistes privilégient le microscope électronique à balayage pour l'examen détaillé de la surface d'un échantillon. Le faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon, qu'on aura habituellement recouvert d'une pellicule d'or moulante. Le faisceau excite les électrons de la pellicule d'or, qui émet alors des électrons secondaires. Ces derniers forment à l'écran une image tridimensionnelle de l'échantillon. Le microscope électronique à balayage se distingue par sa grande profondeur de champ.

2.2.1- Préparation des échantillons pour la microscopie électronique ME

Les échantillons sont mis sous vide, donc ceci élimine l'observation des cellules vivantes. Les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde puis avec le tétraoxyde d'osmium pour stabiliser les membranes. Le faible pouvoir de pénétration des électrons oblige à réaliser avec un ultramicrotome des coupes fines de 50 à 100 nm. L'échantillon est au préalable déshydraté et inclus dans une résine qui en se polymérisant, forme un bloc entourant la préparation.

Le contraste en ME dépend du nombre atomique des éléments. Plus il est élevé plus les électrons sont dispersés ce qui augmente le contraste. Les molécules biologiques étant constituées d'éléments à faible nombre atomique (carbone, azote, hydrogène, oxygène) il est nécessaire de traiter les coupes avec des sels de métaux lourds (uranium, osmium, plomb) afin de révéler les constituants cellulaires grâce à leur degré d'imprégnation par les sels.

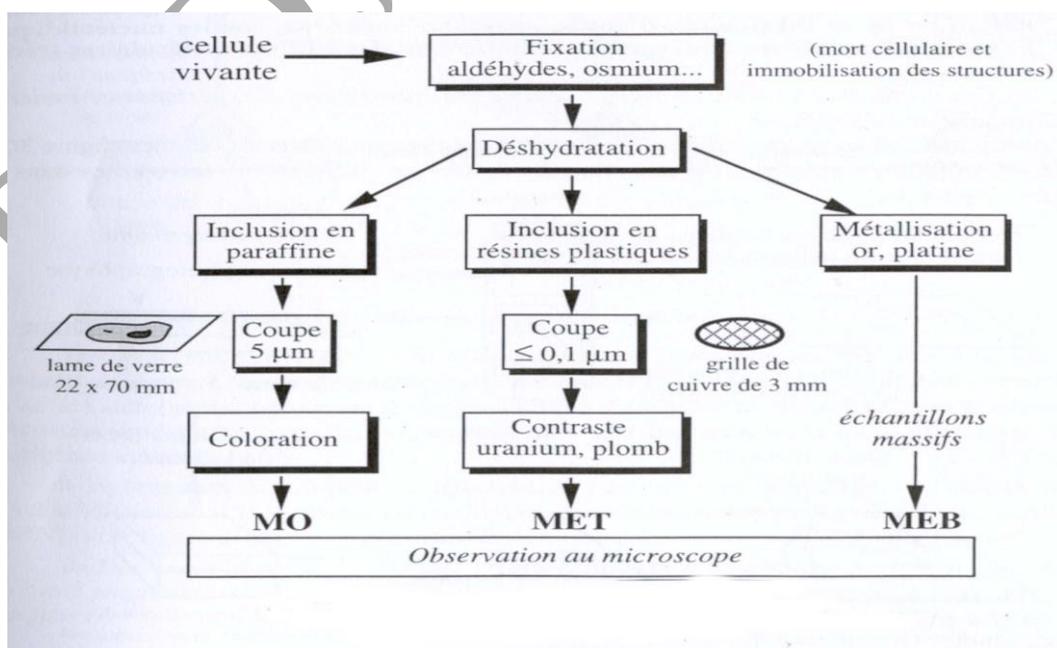


Figure 2.4 : Préparation des échantillons pour l'examen microscopique

2.3- Comparaison entre microscope optique et électronique

Les microscopes électroniques révèlent un grand nombre d'organites qui échappent au microscope photonique. Toutefois, non seulement les méthodes chimiques et physiques de préparation de l'échantillon utilisées en microscopie électronique tuent-elles les cellules, mais elles peuvent aussi y introduire des artéfacts, c'est à dire des caractères structuraux inexistant dans les cellules intactes. C'est pourquoi le microscope photonique convient mieux à l'étude de la cellule.

Tableau 2.1 : Caractéristiques des microscopes optiques et électronique

M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
* 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		* grossissement : 1500 à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10Å° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 Å° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0,05µm
Avantages		
* on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voir des couleurs réelles		* 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		
* on ne peut pas pousser l'analyse assez loin		* la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
* l'unité est le micromètre ou micron (µm) 1µm = 10 ⁻³ mm		* l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10 ⁻⁶ mm ou 10 ⁻⁹ m

3- UTILISATION DES ISOTOPES RADIOACTIFS

L'analyse biochimique des structures et des fonctions cellulaires est grandement facilitée par les isotopes radioactifs qui sont utilisés comme « traceurs » des réactions chimiques s'accomplissant dans la cellule. Ces isotopes permettent de réaliser des mesures extrêmement précises qui n'étaient pas possibles avant leur utilisation. Un isotope est un élément chimique dont le noyau atomique comporte un neutron de plus ou de moins que l'atome normal. En raison du nombre anormal des neutrons qu'ils renferment, les noyaux atomiques des isotopes radioactifs se désintègrent en émettant un rayonnement caractéristique. Le noyau de l'atome d'hydrogène est formé par un proton mais ne contient pas de neutron. Le deutérium est un isotope de l'hydrogène dont le noyau contient un proton et un neutron. Le tritium est un autre isotope de l'hydrogène ayant un proton et deux neutrons.

Pour chaque sorte d'isotope, la radioactivité décroît avec une vitesse caractéristique ; on appelle *demi-vie* ou *période* le temps mis par la moitié des atomes radioactifs présents pour se désintégrer. La période du ³²P est égale à 14,3 jours, ce qui signifie que, pour une quantité initiale donnée d'isotopes, 50% des atomes seront désintégrés en 14,3 jours. L'autre moitié des atomes verra sa radioactivité disparaître au bout des 14,3 jours suivants, etc.

Les isotopes radioactifs tels que le ^3H , le ^{14}C , le ^{32}P et le ^{35}S sont utiles dans les expériences réalisées avec des cellules, car il est possible de les substituer aux atomes normaux qui constituent les molécules organiques. Il est possible par exemple, de fabriquer des molécules de glucose dans lesquelles un ou plusieurs atomes de carbone sont remplacés par le ^{14}C .

4- LA CULTURE CELLULAIRE

4.1- Les milieux de culture

La base du milieu de culture se constitue d'un mélange de petites molécules, l'apport de protéines, de facteurs de croissance et d'attachement s'effectue en général par addition de sérum de veau fœtal (SVF). Outre le mélange de nutriments, d'autres molécules apparaissent plus spécifiques. C'est le cas : - De l'insuline qui stimule la prolifération de la plupart des cellules somatiques *in vivo*. Elle agit en synergie avec de nombreuses hormones, - Des facteurs de croissance : facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance fibroblastiques (5FGF), facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), facteur de croissance nerveux (5NGF), - Des protéines comme la transferrine pour le transfert du fer et l'albumine pour la fixation et le transport des acides gras, - Des facteurs d'attachement, fibronectine, collagène, etc., qui sont prépondérants pour l'adhésion des cellules au flacon de culture.

4.2- Les divers types de culture

Après dissociation d'un tissu par dilacération ou par hydrolyse enzymatique ménagée (trypsine, etc.), les cellules mises en suspension peuvent vivre en culture. On appelle *culture primaire* ces cellules cultivées directement à partir d'un tissu. Généralement, les cellules sont prélevées de la culture primaire et repiquées dans d'autres boîtes pour former des *cultures secondaires*. Au cours des repiquages successifs (durant plusieurs semaines), les cellules continuent à exprimer les propriétés propres à leur tissu d'origine. Par exemple : des cellules provenant du muscle squelettique embryonnaire forment des fibres musculaires géantes et se contractent ; les cellules nerveuses établissent des synapses entre elles. De tels phénomènes ne peuvent s'observer et s'étudier qu'en culture.

Cependant la durée de vie de ces cellules reste limitée. Des cellules de peau, essentiellement des fibroblastes ne peuvent se diviser plus de 50 fois avant de mourir. En revanche les cellules provenant de tumeurs cancéreuses sont immortelles et se propagent indéfiniment constituant des *lignées cellulaires*. Des cellules normales après transformation par des virus ou des agents tumorigènes deviennent immortelles. Les lignées cellulaires aujourd'hui très nombreuses constituent un matériel de prédilection pour la compréhension des mécanismes de la synthèse des constituants cellulaires et de leur régulation en biologie cellulaire.