



PREMIERE ANNEE MEDECINE (2022/2023) - MODULE CYTOLOGIE

METHODES DIETUDES DE LA CELLULE

Dr Naouel AILANE

I.	METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE : TECHNIQUES D'EXAMEN MICROSCOPIQUE	2
I.1	LE MICROSCOPE OPTIQUE (MO).....	2
I.1.1	Composition du microscope optique.....	3
I.1.2	Principe de fonctionnement du microscope optique	3
I.1.3	Comment préparer un échantillon destiné à être observé par un microscope optique ?	3
I.1.4	Les Variantes du microscope optique :	3
I.2	LE MICROSCOPE ELECTRONIQUE (ME).....	4
I.2.1	MET :	4
I.2.2	MEB	4
I.3	COMPARAISON ENTRE LE (MO) ET (ME).....	5
II.	TECHNIQUES DE SEPARATION ET DE PURIFICATION CELLULAIRE	5
II.1	Séparation des cellules d'un tissu	5
II.2	Purification	5
III.	METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES .	6
III.1	Technique de fractionnement cellulaire :.....	6
III.2	Marquages.....	7
IV.	METHODES D'ETUDE DU METABOLISME CELLULAIRE	7

La cellule peut être assimilée à un royaume infiniment petit d'organisation très complexe. En raison de cette petitesse, il n'a été possible d'identifier la cellule et de l'étudier sur le plan biochimique et fonctionnel qu'après le perfectionnement d'instruments permettant d'en obtenir une image agrandie et claire : « les microscopes » qui ont rendu visible ce que ne l'était pas et qui ont donné naissance (après leur perfectionnement) à tout une science qu'on appelle la biologie cellulaire.

En médecine, la biologie cellulaire a permis de lever le mystère sur la physiopathologie d'un grand nombre de maladies. En effet, la cellule étant l'unité fonctionnelle fondamentale des organismes vivants, les premiers mécanismes aboutissant à un état pathologique se développent à son niveau. La connaissance de la structure et de la physiologie normales de la cellule est donc un impératif qui permettra de tracer la frontière entre le physiologique et le pathologique. Un des meilleurs exemples qui vient appuyer cette théorie est le cancer qui n'est autre qu'une maladie de la cellule.

L'étude biochimique et fonctionnelle de la cellule repose sur un ensemble de techniques et de méthodes de plus en plus pointues et fait appel à une panoplie d'instruments de plus en plus performants.

I. METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE : TECHNIQUES D'EXAMEN MICROSCOPIQUE

Le terme « microscope » est composé de deux mots d'origine grecs : «mikros» : qui signifie petit ; et «skopein» : qui signifie observer, le tout désignant cet instrument qui permet d'observer ce qui est petit.

Les microscopes peuvent être classés en deux grands groupes :

- ✓ Microscopes optiques ou photoniques ou à lumière
- ✓ Microscopes électroniques

Le microscope est un instrument qui:

1. donne une image grossie d'un petit objet
2. Sépare les détails de celui-ci sur l'image
3. Rend les détails visibles à l'œil ou à la caméra

Il existe deux paramètres clé qui caractérisent tout microscope quelque soit sa nature :

- Le Grossissement : combien de fois l'image finale a été agrandie.
- Le Pouvoir Séparateur (PS qu'on appelle également limite de résolution ou résolution tout simplement) : il est défini par la capacité à distinguer nettement deux points très rapprochés. Il est inversement proportionnel à la limite de séparation qui représente la plus petite distance entre deux points de l'objet vus de façon distincte. Pour l'œil nu, le PS est de 200µm environ.

Le pouvoir séparateur est le paramètre déterminant de la netteté d'une image.

I.1 LE MICROSCOPE OPTIQUE (MO)

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

Il existe plusieurs variantes du microscope optique, nous verrons les détails concernant le microscope photonique à fond clair avant de parler de ses principales variantes.

I.1.1 Composition du microscope optique

Sur le plan fonctionnel, un microscope optique est composé de deux parties distinctes:

- ✓ Une partie mécanique: qui aide à la manipulation du microscope et à la mise au point.
- ✓ Une partie optique : responsable de la formation de l'image.
 - Source de lumière (lampe)
 - Condenseur et son diaphragme : Le condenseur est le système optique qui focalise la lumière sur l'objet et permet d'obtenir un éclairage homogène et régulier du champ observé.
 - Objectifs : c'est un ensemble de lentilles de différents grossissements montés sur une tourelle rotative

 - Oculaires : lentilles en regard de l'œil. Elle peut être remplacée par un appareil photographique, ou par une caméra vidéo pour faire une acquisition numérique.

I.1.2 Principe de fonctionnement du microscope optique

Trajet de la lumière et construction de l'image :

La microscopie optique se base sur la transmission de lumière (photons) à travers un système optique de lentilles superposées.

La lumière traversant l'objet est déviée par deux systèmes : «objectifs» et «oculaires», avant de former une image agrandie sur notre rétine (ou tout système de capture d'une image).

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

Le grossissement du microscope optique est la valeur du produit $G_1 \times G_2$ et peut atteindre au mieux 1000 fois la taille de l'objet ($\times 1000$).

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

I.1.3 Comment préparer un échantillon destiné à être observé par un microscope optique ?

Voir TP1 (Cytologie/Histologie)

I.1.4 Les Variantes du microscope optique :

Microscope à fluorescence :

Qu'est-ce que la fluorescence ? C'est la propriété que possèdent certains matériaux d'absorber une longueur d'onde précise de la lumière et de la réémettre sous forme de rayonnement de longueur d'onde plus grande. Une substance possédant cette propriété est un fluorochrome. Un fluorochrome est donc caractérisé par deux spectres: son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.

En pratique, on peut être amené à réaliser des marquages fluorescents de l'échantillon que nous voulons observer. Ceci nous permettra de détecter, localiser et quantifier différentes protéines cellulaires

Le microscope à fluorescence utilise une source de lumière blanche pour observer en transmission comme pour le microscope à fond clair et une lampe qui donne le spectre de la lumière blanche afin de sélectionner la longueur d'onde qui nous intéresse.

Il est doté d'un filtre d'excitation qui permet de sélectionner la longueur d'onde incidente qui excite le fluorochrome et d'un filtre d'émission qui ne laisse passer que la longueur d'onde émise par le fluorochrome après son excitation.

Microscope confocal à fluorescence

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

I.2 LE MICROSCOPE ELECTRONIQUE (ME)

Dans le microscope électronique, le faisceau de photons est remplacé par un faisceau d'électrons émis sous vide, accélérés par une forte différence de potentiel et canalisés par une série de lentilles (électromagnétiques). L'image se forme sur un écran fluorescent.

Grâce au microscope électronique on a pu atteindre un grossissement $\times 100000$ et un PS de 0,2nm ($2A^\circ$) ce qui a permis d'obtenir l'ULTRASTRUCTURE de la cellule et de découvrir un bon nombre d'organites cellulaires. Mais à la différence du microscope photonique, il est impossible d'observer des échantillons vivants.

Il existe deux types de microscopes électroniques:

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

I.2.1 MET :

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

I.2.2 MEB

À la différence du MET, où le faisceau d'électrons traverse l'échantillon pour en donner une image complète, le MEB balaie la surface de l'échantillon sans le pénétrer. Les électrons sont réfléchis à la surface, il en résulte des images de surface donnant une idée sur la forme de l'objet.

Pour stopper les électrons à la surface, les échantillons sont couverts d'une fine couche d'or ou de carbone. Un détecteur capte les électrons réfléchis et les transmet à un écran fluorescent.

I.3 COMPARAISON ENTRE LE (MO) ET (ME)

Critère de comparaison	Microscope optique	Microscope électronique
Nature du faisceau traversant l'échantillon	Photons	Electrons
Lentilles	En verre	Electromagnétiques
Grossissement	X1000	X100 000
Pouvoir séparateur	0.2µm	0.2nm (2A°)
Réception de l'image	Sur l'œil ou sur un système de caméra	Sur un écran fluorescent
Cellules observées	Vivantes ou mortes après fixation	Cellules mortes
Couleurs de l'image obtenue	Visualisation neutre ou en couleur après coloration ou marquage	Image en noir et blanc
Particularités techniques lors de la préparation des coupes	Coupes fines (2 à 5µm) obtenues par utilisation du microtome	Coupes ultrafines (300 à 600A°) obtenues par l'utilisation de l'ultramicrotome

II. TECHNIQUES DE SEPARATION ET DE PURIFICATION CELLULAIRE

L'exploration de la cellule peut se faire à différents niveaux. Le synopsis en Figure (1) résume le matériel auquel on peut avoir recours pour étudier la fonction ou la composition de la cellule, comment l'obtenir et les différentes expérimentations qu'on pourra faire sur ce matériel.

Il est important de noter que la microscopie reste une méthode commune à tous les niveaux de l'expérimentation vers laquelle converge la majorité des techniques de laboratoire.

II.1 Séparation des cellules d'un tissu

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

II.2 Purification

Cytométrie de flux :

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

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

Les cellules passent l'une après l'autre dans le cytomètre où elles sont exposées à un rayon LASER qui sonde les paramètres suscités.

Grâce au cytomètre en flux, il est possible de trier les cellules et de ne garder que la population qui nous intéresse. A titre informatif, le cytomètre analyse 1000 cellules/seconde.

Les cellules obtenues sont vivantes, pour les maintenir dans cet état il est important de les cultiver dans les conditions propices : c'est tout l'intérêt de la culture cellulaire.

Sur ces cellules, on peut réaliser :

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

III.METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES

III.1 Technique de fractionnement cellulaire :

Afin d'analyser leur structure ou leur composition, il peut être intéressant de séparer les différentes structures présentes dans la cellule afin de les explorer d'une manière individuelle.

On obtient les organites cellulaires par homogénéisation suivie de fractionnement.

Homogénéisation : elle consiste en la rupture des membranes plasmiques ce qui entraîne la libération du contenu cellulaire. On obtient un homogénat dans lequel baignent les différents constituants de la cellule.

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

Il est à noter que dans l'homogénat: les organites restent intacts sauf le RE et l'AG qui se trouvent rompus en fragments tout comme la membrane plasmique. Ces fragments se referment aussitôt pour former des petites vésicules connues sous le nom de MICROSOMES.

Fractionnement cellulaire :

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

L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse nommée centrifugeuse. Quand les vitesses de rotation sont très élevées on parlera d'ultracentrifugeuse (>15000 rpm (rotation par minute)).

Le fractionnement cellulaire peut se faire grâce à deux techniques différentes :

- UCD (UltraCentrifugation Différentielle) : qui permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants (macromolécules, organites etc...). Elle consiste à centrifuger l'homogénat à différentes vitesses. A chaque centrifugation, un organite sédimente pour former un culot. On récupère le surnageant et on le centrifuge à une vitesse plus grande ce qui va permettre la sédimentation d'un autre organite et ainsi de suite. Dans

l'ordre, les **noyaux** sédimentent en premier puis les **mitochondries et les lysosomes et les peroxyosomes** puis les **microsomes** puis les **ribosomes**.

L'UCD offre, à côté de la simplicité de préparation, l'avantage de manipuler de grandes quantités d'homogénat. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir des fractions pures.

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

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

III.2 Marquages

III.2.1 Histochimie/Cytochimie:

Elle se base sur l'utilisation de colorants en phase aqueuse pour localiser des molécules à la surface ou à l'intérieur des cellules sur des coupes (Exemple: localisation de polysaccharides : réaction à l'APS vu en TP sur le microscope).

III.2.2 Immunohistochimie:

Utilise pour le marquage des molécules des anticorps qui se fixent spécifiquement sur ces molécules selon une réaction Antigène-Anticorps. Il s'agit d'une réaction hautement spécifique qui donne un meilleur marquage que la précédente.

III.2.3 Immunofluorescence :

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

IV. METHODES D'ETUDE DU METABOLISME CELLULAIRE

On citera dans ce cours la principale méthode reposant sur l'utilisation d'isotopes radioactifs : le Pulse-Chase.

Un isotope est un élément chimique qui diffère de l'élément naturel par sa masse nucléaire. Il peut être instable et subir des désintégrations libérant des électrons ou des radiations: isotope radioactif. Les principaux radio-isotopes utilisés en biologie sont ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{22}Na , ^{42}K , ^{125}I .

La technique du Pulse-Chase s'opère comme suit :

Pulse: les cellules vivantes sont mises en présence d'un précurseur métabolique radioactif dit chaud pendant une courte durée. Ce précurseur entre dans la cellule et sera intégré dans certaines réactions métaboliques.

Chase: les cellules sont maintenues dans un milieu contenant un large excès de précurseur froid. Ceci permettra à la cellule de l'incorporer et donc d'accélérer l'utilisation du précurseur chaud dans les différentes voies métaboliques. Pour connaître ces voies, on réalise des prélèvements espacés régulièrement ce qui permet de suivre les transformations du précurseur chaud en diverses molécules portant le marquage radioactif. On peut également réaliser des autoradiographies faisant appel aux microscopes optique ou électronique afin de localiser le compartiment où se situent les molécules radioactives.

Figure 1

