

BIOLOGIE CELLULAIRE ET ANIMALE

LES TECHNIQUES D'ETUDES DE LA CELLULE

LES TECHNIQUES D'ETUDES DE LA CELLULE

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

A. LES CULTURES CELLULAIRES

Les cellules sont isolées à partir de certains *tissus* d'animaux ou de végétaux, puis mises en culture dans un milieu dont les caractéristiques physico-chimiques sont les plus proches possible du milieu « naturel » initial dont elles sont issues. (composition, température, oxygénation, lumière, pH...)

Selon leur origine, les cellules se développent *en suspension ou en adhérence* à un support. Ces cellules ainsi obtenues, ont l'avantage de constituer un modèle expérimental simplifié, homogène et stable dans le temps par rapport à un organisme entier.

1. Les cultures primaires.

Les cellules des tissus sont dispersées par *hydrolyse enzymatique* des protéines constituant la matrice extracellulaire.

La multiplication des cellules s'arrête quand un élément du milieu nutritif est épuisé. Quand elles sont cultivées sur support, leur croissance s'arrête par inhibition de contact. (c.a.d quand elles forment un tapis confluent de monocouche cellulaire.)

2. Les cultures secondaires

Ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour *ensemencer d'autres cultures* et ainsi de suite : ce sont donc les cultures secondaires. Ces cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine mais leur nombre de divisions est limité comme dans l'organisme.

3. Les lignées cellulaires

Il arrive que dans une population de cellules en culture, l'une d'elles acquière des caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Ces transformations peuvent être *spontanées ou induites*. (par des agents chimiques, des virus ...)

Ces cellules sont ainsi à l'origine de lignées cellulaires immortalisées, très utilisées car elles constituent un *matériel cellulaire homogène et indéfini*.

4. Les conditions de culture

- enceintes stériles
- cultures en suspension effectuées sous agitation lente
- cultures en tapis dans des flacons en plastique permettant l'adhésion cellulaire
- milieux de culture :
 - + solutions salines, tamponnées
 - + aa, glucose, vitamines
 - + sérum (facteurs de croissance)
 - + pH neutre
 - + T° physiologique (37°)
 - + composition de l'air définie

Culture asynchrone = les cellules de la culture se trouvent à des stades différents de leur cycle cellulaire (croissance exponentielle)..

Culture synchrone = les cellules se divisent toutes en même temps.

Temps de génération = temps nécessaire au doublment du nombre des cellules en croissance exponentielle.

B. MICROSCOPIE :

Ce sont des *systèmes optiques* qui dévient au travers d'une lentille transparente ou magnétique un flux ondulatoire de particules non chargées (photons), ou chargées électriquement (électrons) pour former l'image agrandie A'B' d'un objet AB.

Le **grandissement** est le rapport de la dimension de l'image sur la dimension de l'objet.

Le **pouvoir séparateur** est la distance minimum entre deux points A et b permettant de les distinguer.

❖ **Les microscopes photoniques :**

- **Optiques** : source lumineuse = photons (lumière visible), pouvoir séparateur de 0.2 μm , grossissement de 2000 fois, permet l'étude des *tissus*, *la localisation de leurs constituants*

biochimiques (grossière).

- **À fluorescence** : source lumineuse = lumière UV, pouvoir séparateur de 0.1 à 0.2 μm , il détecte les objets qui fluorescent (substances auto fluorescentes), on utilise des *sondes fluo* ou *fluochromes* qui seront fixés par la substance à étudier. (ex : l'acritine orange fluoresce dès sa fixation à l'ADN).
- **A contraste de phase** : source lumineuse = photons (lumière visible), série de systèmes optiques qui sont conçus pour exploiter les *propriétés de diffraction des cellules vivantes*. (plus la partie est dense plus le passage de la lumière est retardée et plus l'image de cette partie sera sombre) On obtient des images fortement contrastées. Ce système est très utilisé pour observer des cellules.

❖ **Les microscopes électroniques :**

➤ **À transmission :** source lumineuse = faisceau d'électrons, il traverse la préparation préalablement traitée par des sels de métaux lourds qui rendent les structures plus ou moins opaques aux électrons. Les électrons sont ainsi déviés par les lentilles électromagnétiques et forment une image très agrandie sur un écran fluorescent. Agrandissement de 150 000 fois environ et pouvoir séparateur de l'ordre du nanomètre.

➤ **À balayage :** un fin pinceau d'électrons balaie l'objet, l'intensité du faisceau réfléchi est mesurée à chacune de ses positions, l'image de la surface externe de l'objet est reconstituée point par point sur un écran.

❖ **Préparation des échantillons :**

Observation sur le vivant ou traitement des échantillons Δ préparations fixées.

✓ **Observation sur le vivant :**

Cellules dissociées, entre *lame et lamelle*
(microscope optique, à fluorescence, contraste de phase)

✓ **Préparation de frottis :**

Expansion cellulaire *étalée* sur *lame et lamelle*
Fixation des cellules
Déshydratation
Coloration au fluorochrome
(microscope optique, à fluorescence)

✓ **Préparation de coupes :**

• **Histologiques**

Épaisseur de 5 à 10 μm
Fixation de l'échantillon : *congélation* dans l'azote liquide
Ou fixateur chimique (formol, liquide de Boin)
Déshydratation par un solvant organique (alcool éthylique, benzène)
Inclusion dans la paraffine
Microtonie de 5 à 10 μm
Coloration (colorants basiques ou acides)
(microscopie optique ou à fluorescence)

• **Ultra-fines**

Épaisseur 70-80 nm
Fixation de l'échantillon : *congélation* dans l'azote liquide
Ou fixateur chimique (glutaraldéhyde)
Déshydratation par un solvant organique (propylène)
Inclusion dans résine polymérisable
Microtonie 70-80 nm

Coloration (colorants basiques ou acides)
(microscopique électronique à transmission)

✓ **Préparation de répliques :**

Par **cryofracture ou cryodécapage**

À froid

Fracture sous vide à -100°C , l'échantillon est *congelé* dans l'azote liquide
(fracture au niveau des lignes de moindre résistance = bicouche lipidique des membranes)

projection d'une mince couche de platine (opaque aux e-) Δ ombrage, et de *fibre de carbone* (non opaque aux e-) Δ empreinte

dissolution Δ empreinte (=réplique platine-carbone)

(microscope électronique à transmission)

observation de membranes cellulaires

✓ **Préparation pour la microscopie électronique à balayage :**

Fixation par glutaraldéhyde

Déshydratation

Ajout d'une *mince couche de métal*

(le faisceau d'électrons balaie la surface métallique, on a une image en relief)

C. LA CENTRIFUGATION ET L'ULTRA CENTRIFUGATION

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

L'ultracentrifugation est une centrifugation à très grande vitesse, qui permet la séparation soit en **fonction de la taille**, ou de la **densité**, les fractions pures de différents organites cellulaires ou de macromolécules.

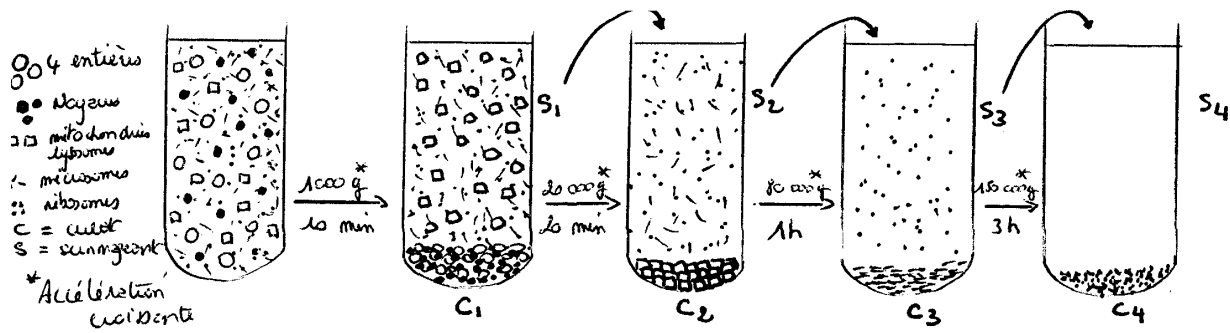
La vitesse de sédimentation (due à un champ de forces gravitationnelles) permet de définir pour chaque type de particule, un **coefficient de sédimentation** proportionnel entre autre à la taille de la particule.

1) Centrifugation utilisant les vitesses de sédimentation :

Elles séparent les particules en fonction de leur **taille**.

- **Centrifugations différentielles :**

Il s'agit d'une succession de Centrifugations pendant des temps déterminés et à des accélérations croissantes Δ séparation en fonction de la **taille**.



2) Centrifugations en gradient de sédimentation :

Il s'agit de la séparation des particules en **une seule étape** grâce à un **gradient de viscosité continu**, crée de manière artificielle dans un tube de Centrifugation Δ séparation en fonction de la vitesse de sédimentation.

Le gradient est crée par une solution de saccharose (gradient continu) le long du tube, en utilisant des concentrations qui confèrent des densités plus faible que celles des organites à séparer.

Au cours de la centrifugation, les différentes classes d'organites se déplacent suivant des vitesses définies surtout par leur taille. Au fur et à mesure qu'elles s'approchent du fond du tube elles sont soumises à des *forces de frictions croissantes*, et sont **d'autant plus ralenties que leur taille est petite**. Les particules se regroupent alors par **classe de taille** dans des

bandes distinctes qui finiraient par se superposer au fond du tube si la Centrifugation était poursuivie.

(utilisation surtout pour purifier des fractions obtenues par Centrifugations différentielles.)

- **Centrifugations en gradient de densité à l'équilibre :**

Les différents constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur **densité** en une **seule étape**. Un *gradient de densité encadrant la densité des particules* est crée le long du tube (gradient **discontinu**). Les particules vont donc *s'immobiliser* dans la région de gradient correspondant à leur *propre densité*. Il se forme alors dans le tube autant de bandes que de classe de densité de particules. Si on poursuivait la centrifugation, cet équilibre ne serait pas modifié et les bandes ne descendraient pas au fond du tube.

- gradients de saccharose
utilisés pour séparer des particules de densité < 1.3.
- gradients de chlorure de césium

peuvent atteindre des densités de **1.8**. il sont essentiellement utilisés pour séparer des acides nucléiques.

- **récupération des particules séparées par centrifugation :**

On perce le plus souvent le fond du tube et on recueille le contenu goutte à goutte dans une série de petits tubes suivant le nombre de fractions à recueillir.

A. ELECTROPHORESE :

C'est une technique de séparation des molécules **chargées électriquement**, en fonction de leur **charge** ou de leur **taille**, selon une vitesse de migration dans un **champ électrique**. C'est la méthode la plus fréquemment utilisée pour séparer des molécules ionisées. Les molécules chargées en solution sont déposées sur, ou dans, un support imprégné d'une solution saline conductrice. Le champ électrique est créé par un générateur de courant continu dont les pôles sont reliés aux extrémités du support. Les molécules chargées négativement se déplacent vers le pôle positif du support et inversement.

- Unidimensionnelle :

1. Séparation en fonction de la charge

Les différentes molécules se déplacent vers l'un ou l'autre des pôles à des vitesses définies par leur *densité de charge*, tout en conservant leur activité biologique puisqu'elles ne sont pas dénaturées.

En fin de séparation, les protéines sont localisées sur le support par différents procédés : coloration, autoradiographie, ...

1.1. sur papier en acétate de cellulose

les protéines à séparer en solution dans un tampon de **pH déterminé**, sont déposées sur un support imbibé de tampon, n'opposant qu'un minimum de résistance à leur déplacement. utilisée pour séparer les molécules dont la masse est négligeable et en fonction de leur charge.

1.2. par isoélectrofocalisation

On utilise un support en **gradient de pH**. Les protéines migrent sous l'effet du champ électrique jusqu'au **point isoélectrique** correspondant à un pH donné. (pH auquel la charge de la protéine est nulle donc elle ne migre plus.)

1. Séparation en fonction de la taille

1.1. sur gel

elle utilise 2 caractéristiques :
la **mobilité** dans un champ électrique
la **taille** de la molécule

Les protéines sont préalablement traitées avec du *Dodécyl Sulfate de Sodium* = SDS qui est une petite molécule de détergent chargée **négativement**. Ce produit va **dénaturer** les

molécules (détruit les structures tertiaires et quaternaires) et **masquer ainsi. leur charge**. On peut aussi ajouter du *-mercaptoéthanol*, agent **réducteur** qui coupe les liaisons disulfures. Les charges sont donc toutes **équivalentes** et elles migrent toutes vers un **même pôle**. La migration se fait **+/- rapidement suivant la taille** de la molécule.

Le support est constitué de *gel de polyacrilamide* qui forme des **mailles** d'autant plus fines que sa concentration est élevée. On a un effet **filtration** de gel puisque la taille des pores du support va limiter la vitesse de migration des molécules et plus la molécule sera grosse, moins elle migrera rapidement.

La distance de migration étant proportionnelle au log de l'inverse de la masse moléculaire (MM), on pourra déterminer à tout instant les MM des protéines en fonction de leur distance de migration.

- **Bidimensionnelle :**

Séparation des molécules à la fois par **isoélectrofocalisation** et par gel de **polyacrilamide**.

D séparation par rapport à la taille et à la charge.

B. LA CHROMATOGRAPHIE

Cette technique permet de séparer des molécules en fonction de leurs **caractéristiques hydrophiles ou hydrophobes**, lors d'un entraînement différentiel par des solvants.

On sépare les constituants d'un mélange mis en solution = **phase mobile** (PM), à travers un support = **phase stationnaire** (PS), selon divers critères : solubilité, charge, antigénicité,

- **De partage :**

Migration de la PM par **capillarité** sur un **support poreux** (mince couche de cellulose étalée sur un film plastique) lui-même imbibé complètement dans **l'eau** (=PS aqueuse = hydrophile).

Plus les molécules sont hydrophobes, plus elles vont migrer rapidement avec la PM car elles ne sont pas retenues par la PS hydrophobe ;

Les molécules *hydrophiles*, elles, sont *retenues* dans la PS.

Les constituants de l'échantillon sont donc séparés car différemment entraînés par le flux de solvant.

Δ séparation par rapport à l'hydrophilie ou l'affinité avec le solvant.

Après migration, la position des molécules est révélées par coloration.

Utilisation pour la séparation de protéines, peptides, acides aminés,..

- **Sur colonne :**

La PS est une **poudre ou du gel**, imbibée par un **solvant**. L'échantillon qui est dans la PM est déposé au sommet de la PS (du tube). Puis on dépose au dessus de l'échantillon un **éluant** qui va pousser ce dernier au travers de la PS.

Selon certains critères, certaines molécules vont rester accrochées à PS et d'autres non
Δ purification de celles qui restent accrocher, car un deuxième éluant les décroche.

- **d'affinité**

La substance que l'on cherche à isoler est *sélectivement retenue* lors de son passage à travers la colonne, par une *interaction spécifique* avec des molécules fixées sur le support inerte constituant la colonne. Elles peuvent être du type antigène - anticorps, récepteur – ligand, etc.....

Les molécules adsorbées (retenues) sont ensuite *éluées* (évacuées) par modification du pH ou de la force ionique du tampon d'éluion.

- **échangeuse d'ions**

On introduit au niveau de la PS des caractéristiques qui feront qu'on aura des résines *anioniques à fonction acide, ou cationiques à fonction basique*. La séparation des molécules se fera donc en fonction de leur *charge*.

C. UTILISATION DES ISOTOPES RADIOACTIFS EN BIOLOGIE

Le marquage radioactif de molécules biologiques par incorporation d'isotopes radioactifs utilisés comme **traceurs** permet de suivre leur devenir dans l'espace et dans le temps.

Les cellules construisent leur propre matière à partir de molécules appelées **précurseurs**. Ces précurseurs peuvent être marqués radioactivement par remplacement d'un de leurs atomes constitutifs par un isotope = traceur, et ainsi la cellule qui va l'incorporer dans sa structure sera à son tour radioactive et pourra être détectée.

Ces précurseurs devront être choisis afin de marquer spécifiquement la molécule désirée.

Par exemple : la thymidine ³H ou ¹⁴C pour l'ADN (un H ou unC de la thymidine ont été remplacés par leur isotope radioactif et ils sont incorprrés spécifiquement dans la structure de l'ADN comme base.)

L'uridine ³H ou ¹⁴ C pour l'ARN.

Mode d'utilisation de ces précurseurs :

➤ **marquage des molécules au cours de leur synthèse :**

- **marquage bref par pulse :**

Les cellules ont un *temps de contact bref* avec le précurseur radioactif (15 à 30 min). il est alors possible d'identifier les molécules *immédiatement synthétisées* à partir d'un précurseur donné, de localiser dans la cellule le lieu de synthèse de ces molécules.

- **pulse suivi de chasse :**

Immédiatement après le pulse, le marquage de nouvelles molécules est *arrêté* en éliminant le précurseur radioactif ou en le diluant avec un excès du même précurseur non radioactif ; Cela permet de suivre *l'évolution dans le temps ou dans l'espace* des molécules radioactives synthétisées lors du pulse.

- marquages longs :

On incorpore le précurseur radioactif en *continu* et on obtient un *mélange* des molécules fraîchement et anciennement synthétisées. (l'ensemble des molécules formées sont marquées.)

Puis on utilise des techniques de chromatographie ou de centrifugations pour repérer la molécule où le marqueur a été incorporé.

On compte la radioactivité par des **compteurs** , **ou – ou par autoradiographie**.

D. UTILISATION DES ANTICORPS

Anticorps = Ac = immunoglobuline synthétisées par les vertébrés (par l'intermédiaire des lymphocytes B) en réponse à l'introduction dans l'organisme d'une substance étrangère ou antigène (Ag).

Un antigène possède en général plusieurs déterminants antigéniques appelés épitopes et un Ac est spécifique d'un ou de plusieurs épitopes.

Ac monoclonaux = chaque épitope d'un Ag stimule un lymphocyte B producteur d'Ac et sa multiplication en un clone programmé pour synthétiser le type d'Ac correspondant à cet épitope.

Ac polyclonaux = mélange des différents clones de lymphocytes B stimulés chacun par un épitope différent du même Ag = mélange des Ac monoclonaux.

Cet extrait de cours de 1^o Année de Pharmacie
est offert par :
AVENIR SANTE
64 GRANDE RUE 25000 BESANCON
Tél/Fax : 03.81.81.26.21