

Quelques méthodes d'étude de la cellule

Les données actuellement acquises sur la structure cellulaire résultent de la mise en œuvre d'un éventail de techniques. Nous nous limiterons dans cette étude à celles couramment utilisées en biologie cellulaire.

Microscopes photonique et électronique

I- Notion du pouvoir séparateur de l'œil humain

Le pouvoir séparateur de l'œil humain est de l'ordre de 0,2 mm c.à.d, que dans des conditions normales, à 25 cm, l'œil ne peut distinguer que deux points distants de 0.2 mm environ.

La taille des cellules étant en général de quelques dizaines de micromètres, il est impossible de les observer à l'œil nu d'où la nécessité d'avoir recours à des systèmes optiques qui permettent un grossissement.

II- Notion de système grossissant : le microscope

Les limites de l'observation à l'œil nu imposées par le pouvoir séparateur de l'œil ont été dépassées par l'invention d'un système grossissant à pouvoir séparateur plus petit, le microscope (micro = petit; scope = regarder).

Il existe 2 types de sources permettant l'observation dont la nature détermine 2 types de microscopie :

- ✦ les photons, particules constitutives de la lumière; c'est la source utilisée en microscopie photonique appelée aussi microscopie optique.
- ✦ les électrons, source utilisée en microscopie électronique (à transmission et à balayage).

II-1 Le microscope photonique

II 1-1 Principe de fonctionnement (Figure 1)

Le microscope photonique fonctionne de la façon suivante :

Une source lumineuse S envoie des rayons lumineux sur une première lentille L_1 appelée condensateur, qui concentre les rayons lumineux sur l'objet O . Une seconde lentille L_2 , l'objectif, donne de l'objet O une image agrandie I_1 . Une troisième lentille L_3 , l'oculaire, reprend une fraction de l'image I_1 et l'agrandit une nouvelle fois en une image I_2 qui est l'image perçue par l'observateur.

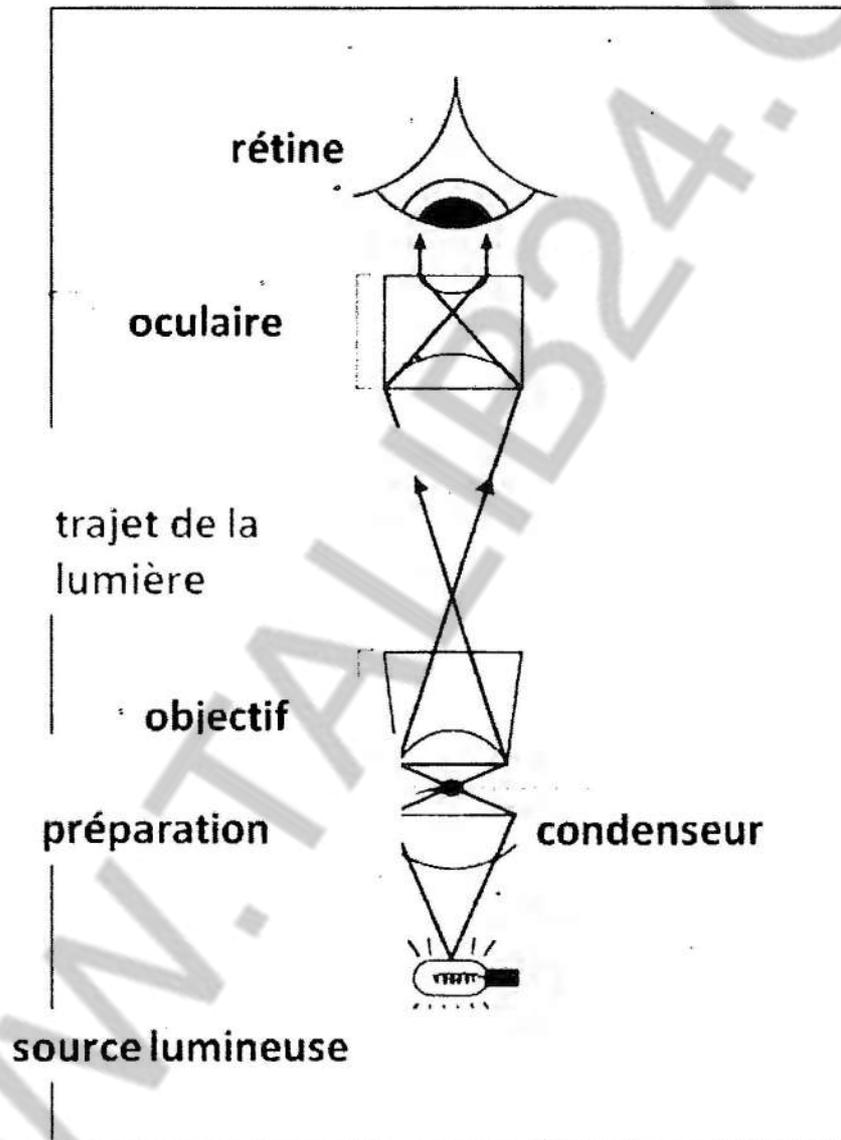


Figure 1 : Principe de fonctionnement d'un microscope optique à lumière transmise

II 1-2 Pouvoir séparateur (ou pouvoir de résolution) du microscope photonique

La qualité primordiale de toute lentille de microscope est sa capacité à distinguer deux points très voisins d'un objet (pouvoir de résolution). Le pouvoir de résolution est numériquement équivalent à la distance D minimale qui sépare deux points distincts, ceux-ci sont d'autant mieux résolus que D est petit.

$$D = 0.61\lambda / n \sin\alpha$$

Améliorer le pouvoir de résolution revient à diminuer D , c.à.d à essayer de changer λ , n et α .

- l'indice de réfraction mesure le degré de déviation qu'impose un milieu à un rayon lumineux qui le pénètre en sortant d'un autre milieu
- l'angle maximal d'ouverture des meilleurs lentilles d'objectifs est 70° ($\sin 70^\circ : 0.94$).
- en choisissant la plus courte longueur d'onde de lumière visible (bleue, $\lambda = 450 \text{ nm}$) et l'air ($n = 1$) entre l'objet et l'objectif, la résolution optimale est :

$$D = 0.61 \times 450 \text{ nm} / 1 \times 0.94 = 292 \text{ nm} \text{ soit près de } 0.3 \mu\text{m}$$

En utilisant l'huile à immersion, on a :

$$D = 0.61 \times 450 \text{ nm} / 1.5 \times 0.94 = 194 \text{ nm} \text{ soit environ } 0.2 \mu\text{m}$$

Le pouvoir séparateur limite du microscope photonique, en lumière visible, est donc d'environ $0.2 \mu\text{m}$

II-2 Microscope électronique à transmission (MET)

Le microscope électronique à transmission est la méthode de choix pour la cytologie. En pratique, le pouvoir séparateur obtenu est de l'ordre de 10 \AA , 200 fois supérieur à celui du microscope photonique, permettant ainsi de pousser l'exploration au niveau des ultrastructures cellulaires.

II-2-1 Principe de fonctionnement (Figure 2)

Le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission est tout à fait comparable à celui du microscope photonique. La source S est une cathode qui émet un flux d'électrons. Ceux-ci sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel entre la cathode S et l'anode A . L'anode A est percée en son centre et les électrons la traversent. Leur flux est concentré sur l'objet O par une première lentille magnétique $L1$ qui sert de condensateur. Les électrons traversent l'objet O . Une deuxième lentille magnétique $L2$ joue le rôle d'objectif et donne de l'objet O une image agrandie $I1$. Une fraction de cette image est reprise par une troisième lentille magnétique $L3$ et l'agrandie une nouvelle fois. L'image finale $I2$ est projetée sur un écran rendu fluorescent par le bombardement électronique. Cette image $I2$ peut être étudiée directement sur l'écran et être photographiée.

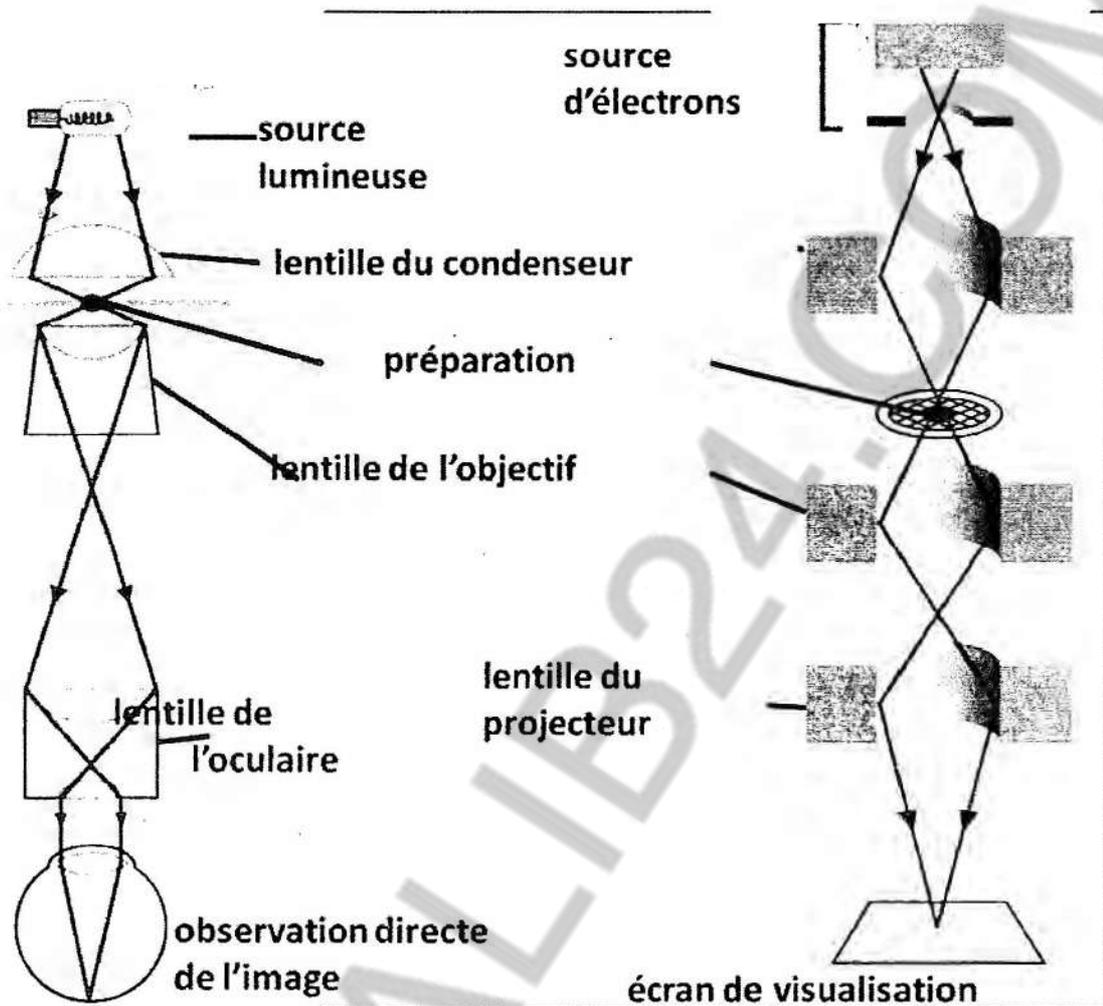


Figure 2 : Principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (schéma à droite)

II-2-2 Microscopie électronique par cryofracture (Figure 3)

La cryofracture est une technique adaptée à l'étude des structures intramembranaires de la cellule sur réplique. C'est la seule technique qui visualise, en détail, les différentes jonctions cellulaires ainsi que les divers arrangements particuliers du double feuillet des membranes plasmiques.

Les cellules sont congelées dans de l'azote liquide (-196°).

- Le bloc de glace obtenu est fracturé à l'aide d'un couteau: le plan de fracture traverse le centre hydrophobe des bicouches lipidiques membranaires séparation en 2 monocouches.
- Les faces fracturées sont ombrées par des vapeurs métalliques opaques aux électrons.
- Les structures vivantes sont ensuite détruites et seule la réplique (moulage) est observée en microscopie électronique.

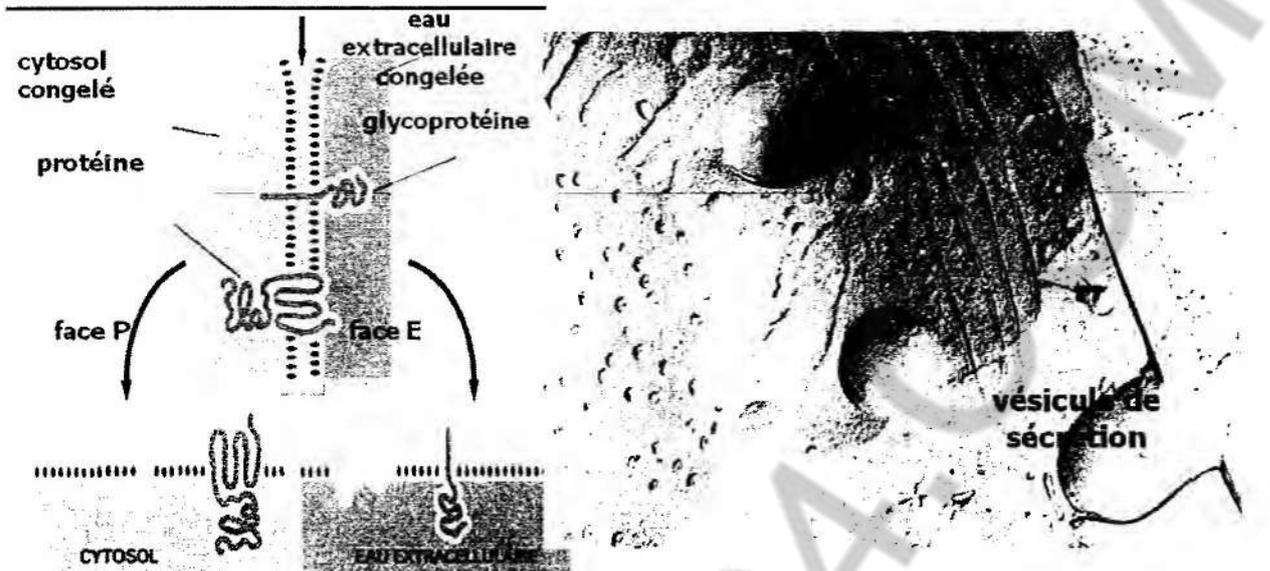


Figure 3 : Microscopie électronique par cryofracture

II-3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le MEB permet de réaliser des images de la surface d'objets en 3 dimensions avec une haute résolution de l'ordre du nanomètre (milliardième de mètre).

Principe de fonctionnement (Figure 4)

Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet.

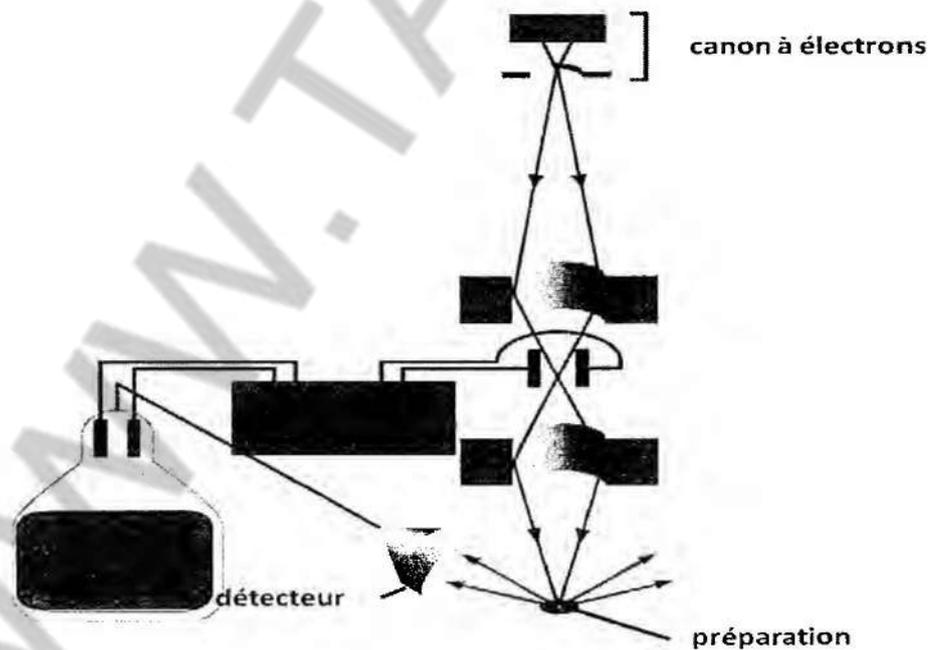


Figure 4 : Principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage

III- comparaison entre microscope photonique et électronique

WWW.TALIB24.COM

Méthode autoradiographique avec pulse-chasse

Intérêt

Cette technique permet de suivre la synthèse d'une molécule donnée dans la cellule.

Principe

La technique repose sur l'utilisation de produits radioactifs qui possèdent 2 propriétés essentielles :

- ✦ Ils sont utilisés par les êtres vivants exactement comme leurs isotopes (éléments chimiques identiques ne différant que par leurs masses atomiques) non radioactifs.
- ✦ Ils émettent un rayonnement qui peut être repéré par l'utilisation d'une émulsion photographique.

Exemples d'isotopes radioactifs (IR):

- Tritium (H_3) : isotope H_2
- Iode 132 (I_{132}) : isotope de I_{131}
- Calcium 45 (Ca_{45}) : isotope de Ca_{44}

Notion de pulse et chasse

On injecte pendant un temps bref (=pulse) l'élément radioactif et on réalise une chasse en fournissant immédiatement après le pulse une quantité importante du même précurseur non radioactif. Les éléments synthétisés après la chasse utilisent les précurseurs non radioactifs et ne seront pas marqués. Cela permet de suivre le déplacement dans la cellule de la seule substance marquée

La mesure de la radioactivité peut être :

- qualitative : elle est détectée sur les cellules, on parle d'histo-autoradiographie [*le nombre de radioactivité*]
- quantitative : elle est mesurée par un compteur à scintillation

Technique (Figure 5)

- Injection de l'isotope radioactif à l'animal ou addition au milieu de culture.
- Prélèvement à des intervalles de temps variés (t_0, t_1, t_2, \dots) de cellules ayant intégrées les IR. *éléments radioactive*
- Fixation et préparation des cellules pour le microscope optique ou pour le microscope électronique.
- Application d'une émulsion photographique sur les coupes.
- Maintien des coupes à l'obscurité pendant une durée (des jours ou des semaines) nécessaire à la désintégration des IR.

Observation des coupes au microscope photonique ou au microscope électronique (dépôts sombres sur les zones de la coupe permettant des IR).

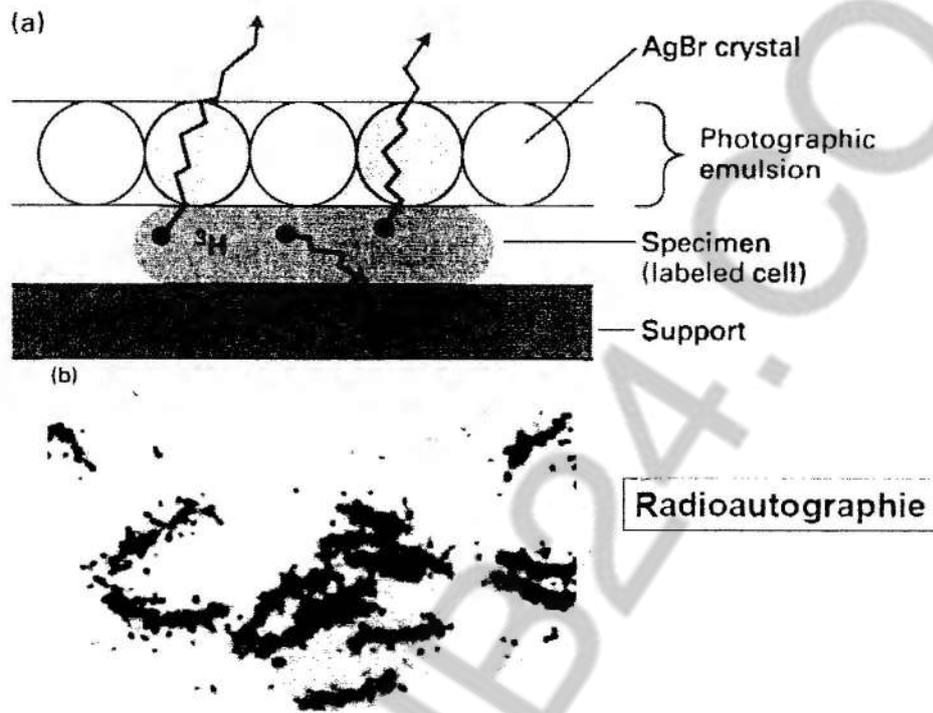


Figure 5 : Technique autoradiographique

Fractionnement cellulaire par centrifugation

Centrifugation différentielle ou zonale (Figure 6)

Cette technique consiste à séparer les divers constituants de la cellule afin de les étudier séparément *in vitro*. Les cellules sont broyées et leur contenu est mis en suspension dans un milieu tamponné, isotonique par rapport au milieu cellulaire afin d'éviter les lésions; on obtient un homogénat.

Toutes les opérations s'effectuent à 0°C pour empêcher que d'éventuelles réactions biochimiques ne se produisent au sein du mélange.

L'homogénat est soumis à une première centrifugation à basse vitesse (600 fois la gravité pendant 10 minutes). Le culot qui correspond aux particules les plus lourdes (noyaux, cytosquelette) est séparé du surnageant qui contient des particules légères. Celui-ci est centrifugé de nouveau pendant 5 minutes à 15.000 g. On sépare encore un culot (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes) du surnageant. Celui-ci est soumis à une ultracentrifugation (100.000 g pendant 60 minutes), ce qui permet d'obtenir un culot formé de particules cellulaires les plus légères (membranes plasmiques,

microsomes). Une dernière ultracentrifugation du surnageant à vitesse élevée et à 300.000 g permet d'obtenir les ribosomes et des macromolécules.

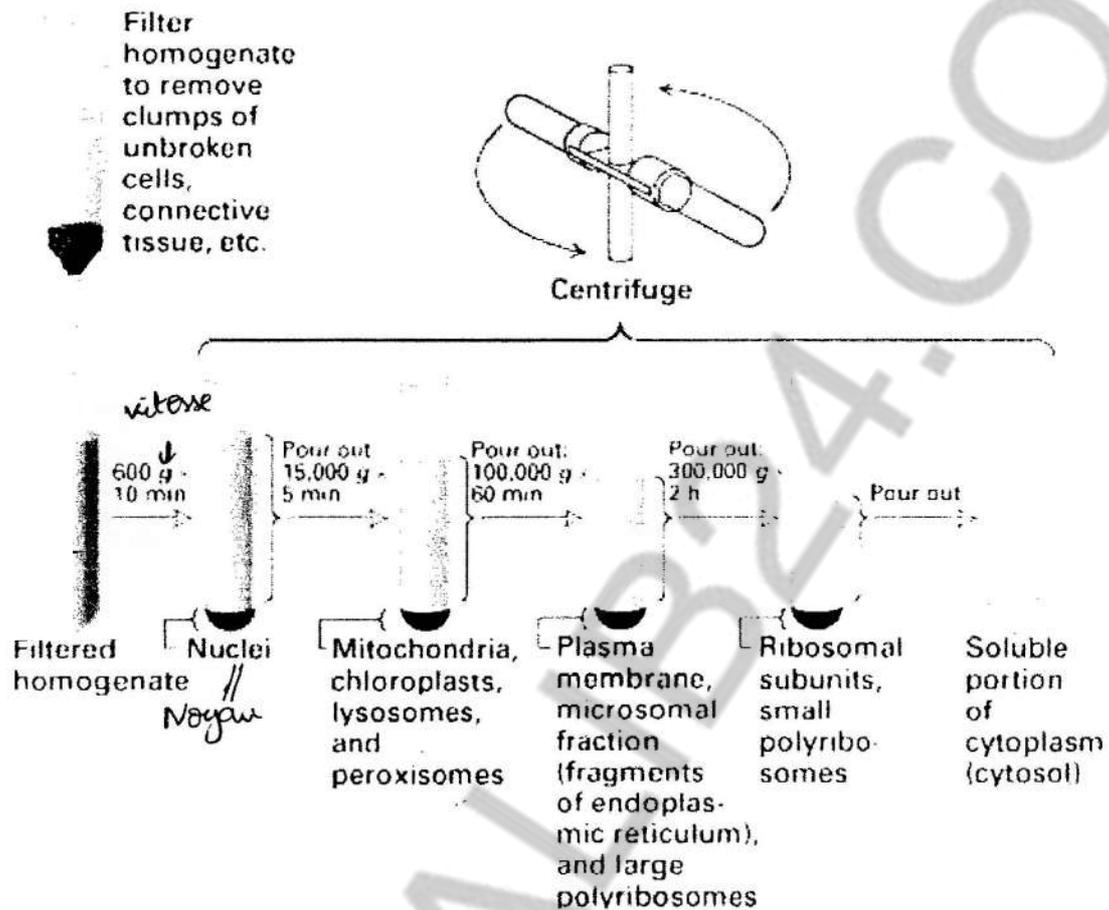


Figure 6 : Centrifugation zonale

Centrifugation isopycrique (Figure 7)

Les fractions obtenues par centrifugation zonale ne sont pas suffisamment pures. Elles peuvent être soumises à une centrifugation à l'équilibre en gradient de densité. Elles seront ainsi séparées en une série de bandes, indépendamment de leur forme et de leur taille mais selon leur densité de flottaison, dans un gradient de densité contenant une forte concentration de saccharose ou de chlorure de césium. Au cours de l'ultracentrifugation, le composant cellulaire commence à sédimenter dans le gradient jusqu'à ce qu'il atteigne la bande où la densité est égale à la sienne.

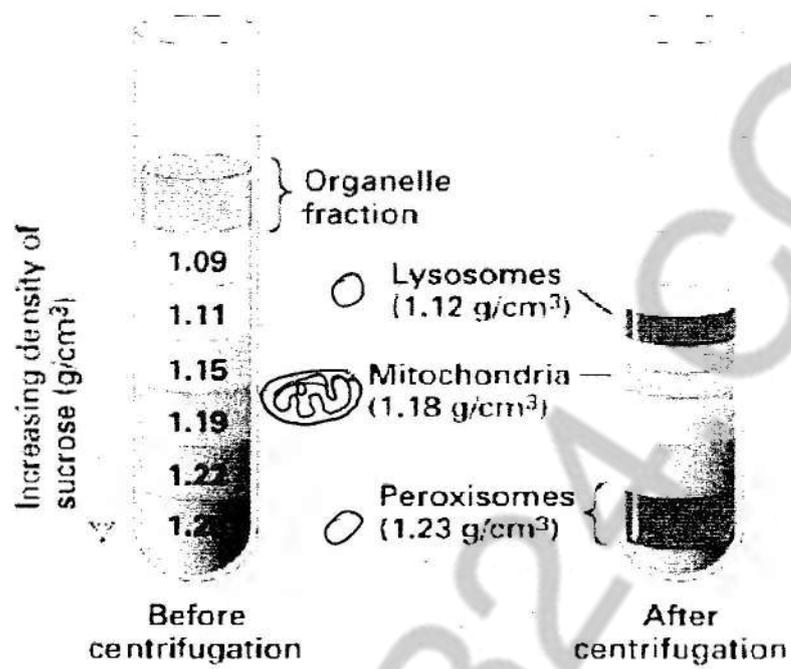


Figure 7 : Centrifugation isopycnic

Les différenciations morphologiques de la membrane plasmique

Les différenciations morphologiques et fonctionnelles de certaines régions de la membrane plasmique permettent :

- ✦ soit l'augmentation de la surface d'échange avec le milieu extracellulaire
- ✦ soit la liaison des cellules entre elles : Jonctions

Certains de ces domaines sont souvent le siège d'interactions entre des protéines membranaires et le cytosquelette sous-jacent.

I-Les différenciations d'augmentation de la surface d'échange

I-A Différenciations morphologiques du pôle apical

I-1 Les microvillosités

Les microvillosités sont :

- ✦ des expansions cytoplasmiques
- ✦ en doigt de gant
- ✦ de longueur variable (moins de $1 \mu\text{m}$)
- ✦ de diamètre régulier ($0.1 \mu\text{m}$)
- ✦ observées sur la plupart des types cellulaires (cellules épithéliales, globules blancs,.....)

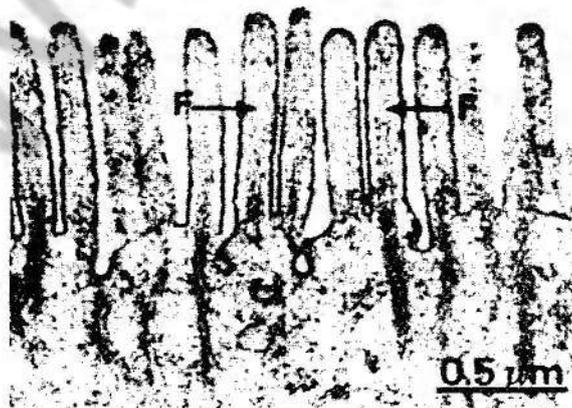


Figure 1 : Les microvillosités en coupe longitudinale observées en ME

Les microvillosités renferment un axe formé de (Figure 2):

- Microfilaments d'actine
- + nombreuses protéines d'association (fimbrine, fascine,.....)

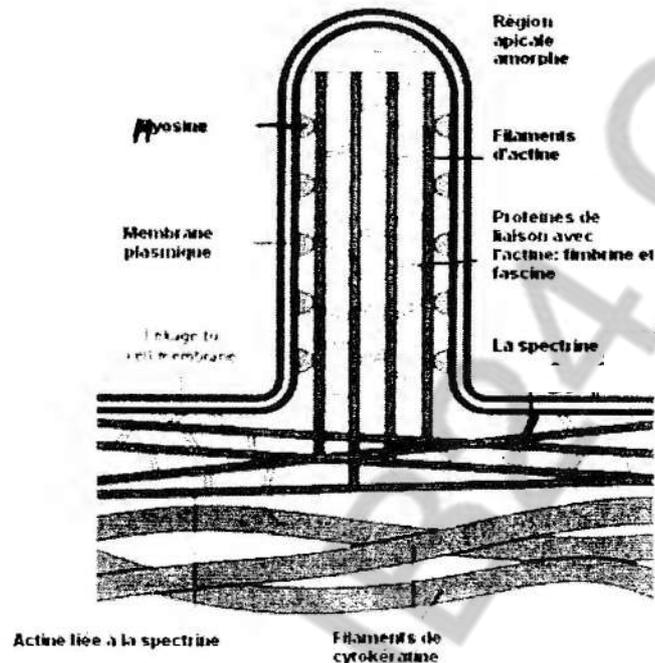


Figure 2 : Schéma de l'architecture moléculaire des microvillosités

Les microvillosités sont d'aspect variable selon les types cellulaires. Elles 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.
Immigration des globules blancs au dehors / filtration
- ❖ longues et très nombreuses, c'est le cas du pôle apical de certaines cellules épithéliales spécialisées dans les échanges avec le milieu extracellulaire.

Exemple 1 : Bordure en brosse des cellules des tubules rénaux (Figure 3)

microvillosité irrégulière ; ne sont pas de la même hauteur

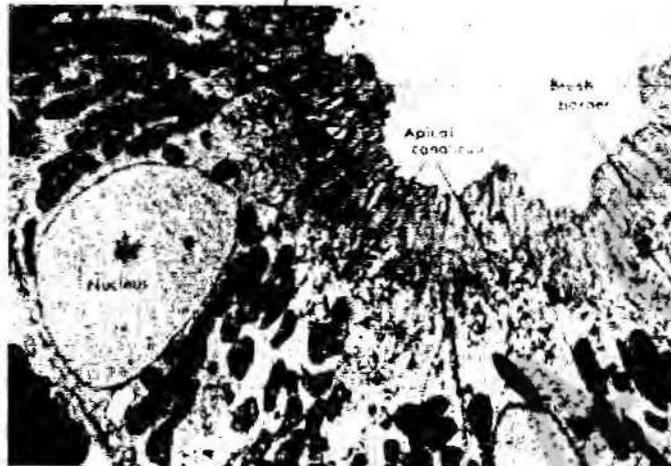


Figure 3 : Cellules des tubules rénaux observées au MET

Exemple 2 : Plateau strié des cellules intestinales ou entérocytes (Figure 4)

rectiligne et de même hauteur



Figure 4 : Microvillosités des entérocytes observées au MET

I-2 Les stéréocils

très longues ; disposition parallèle à la base est pas à l'extrémité

Les Stéréocils ressemblent à de très longues microvillosités, ils possèdent également un squelette filamentueux d'actine. Chaque stéréocil est parallèle à ses voisins au niveau de leurs bases. Mais plus on progresse vers l'extrémité et plus ils deviennent sinueux et ainsi s'entremêlent avec les autres. C'est cette caractéristique qui permet de les différencier des microvillosités (Figure 5).

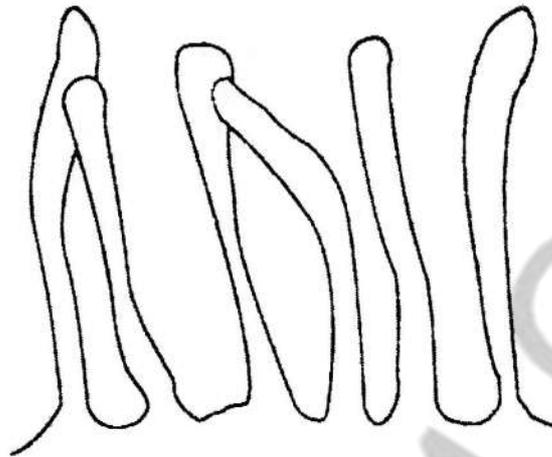


Figure 5 : Schéma des stéréocils

Les stéréocils se rencontrent dans:

- les voies génitales chez l'homme (épididyme) (Figure 6)
- certains épithéliums sensoriels



Figure 6 : Aspect en MO (à gauche) et à balayage (à droite) des stéréocils de l'épididyme

1-3 Les cils

Les cils sont des expansions du cytoplasme avec un squelette de microtubules et de protéines associées (Figure 7) (Cf. cours Cytosquelette)

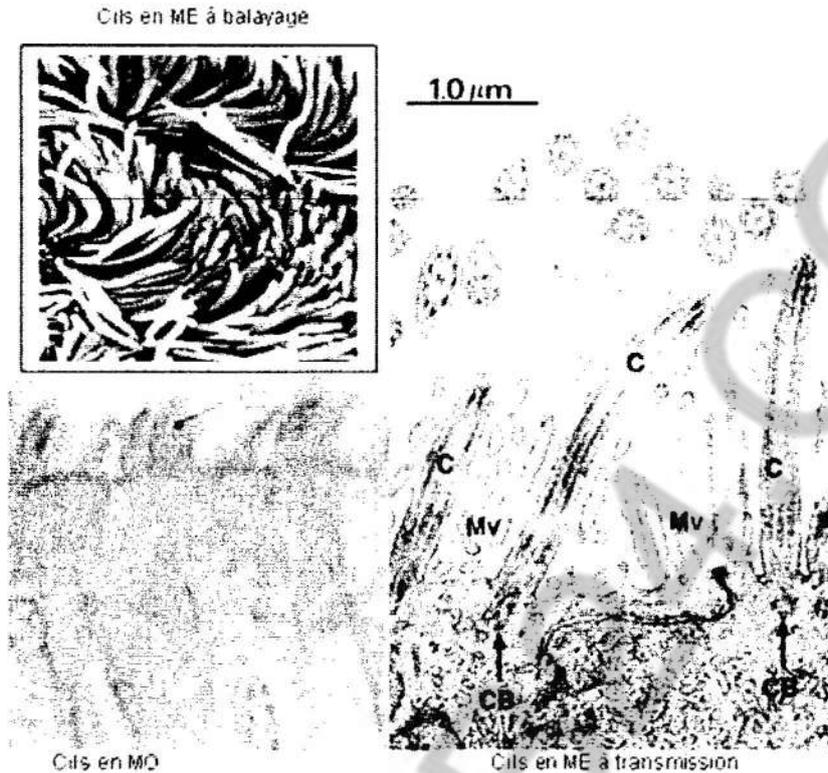


Figure 7 : Aspect des cils en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission et à balayage

I-B Différenciations morphologiques du pôle basal

Les replis de la membrane du pôle basal des cellules épithéliales se trouvent dans les cellules jouant un rôle dans les échanges hydrominéraux; c'est le cas des cellules du tube contourné proximal du néphron (rein) (Figure 8).



Figure 8 : Les replis basaux au niveau du tube proximal du rein en ME

Entre les replis de la membrane sont logés des mitochondries allongées qui fournissent l'énergie nécessaire aux échanges (Figure 9).

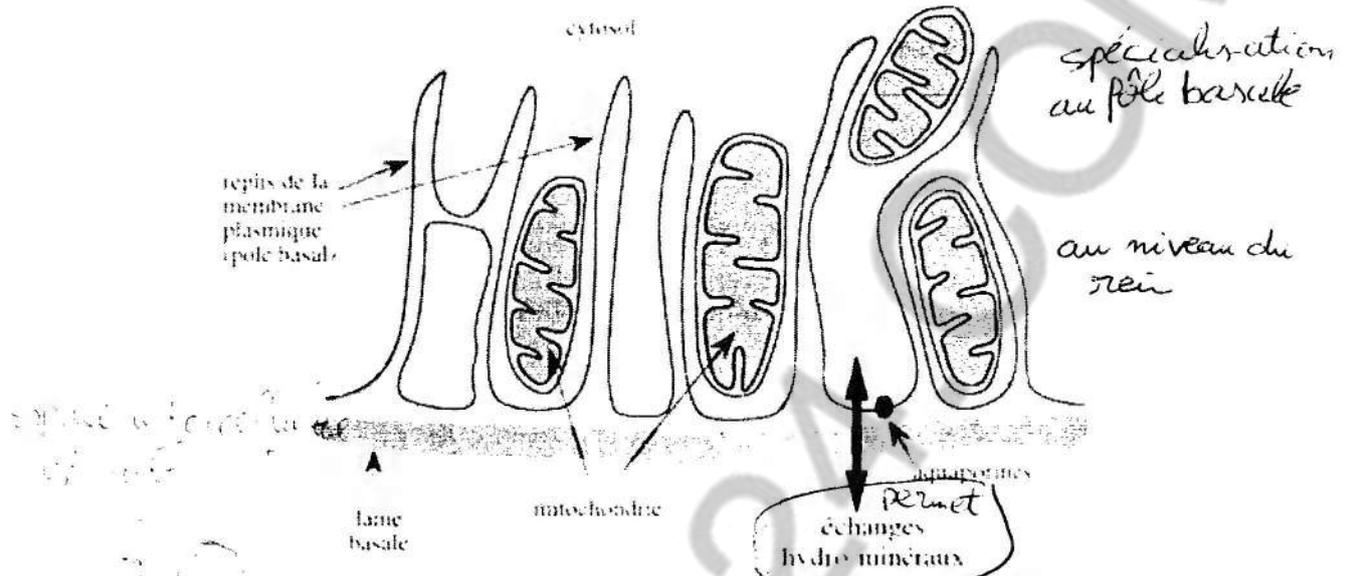


Figure 9 : Représentation schématique des replis basaux

II-Jonctions intercellulaires : Ce sont des zones de différenciation de la membrane des cellules. Elles permettent l'adhésion des cellules entre elles (Figure 10).

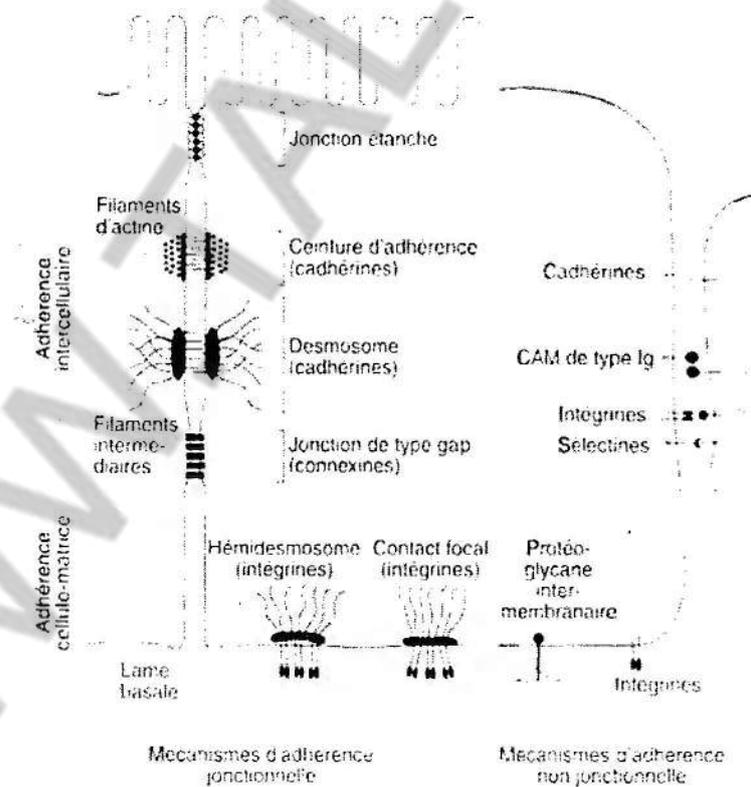


Figure 10 : Schéma du système jonctionnel des cellules

Ces complexes jonctionnels sont de 3 types :

II-1 Les jonctions imperméables ou jonctions étanches appelées aussi « zonula occludens ou tight junction »

Ces jonctions réunissent les cellules entre elles et empêchent le transit moléculaire dans les espaces intercellulaires.

II-2 Les jonctions de communications ou « gap junction »

Présentes dans les cellules épithéliales et non épithéliales au niveau desquelles l'espace intercellulaire est très réduit (20Å).

Le passage des ions et des petites molécules (glucides, nucléosides, vitamines) se fait par l'intermédiaire de petits tunnels reliant les cellules adjacentes. La perméabilité de ces jonctions est régulée par le calcium et le pH du milieu intracellulaire.

II-3 Les desmosomes

Sont des jonctions mécaniquement résistantes assurant une très forte adhésion entre les cellules adjacentes. L'espace intercellulaire est élargi (240 Å). Au point de contact, le feuillet interne de la membrane s'épaissit, il est associé à des tonofilaments intra-hyaloplasmiques qui rayonnent vers l'intérieur de la cellule.

Exercice d'application

La thymidine kinase transforme la thymidine en thymidine triphosphate (T.T. P), forme polaire qui s'incorpore à l'ADN.

Des cellules musculaires lisses déficientes en thymidine kinase et des cellules musculaires normales sont mises en culture en présence de la thymidine tritiée.

Des contacts s'établissent entre les deux types cellulaires et on constate après autoradiographie, que l'ADN radioactif est présent dans toutes les cellules.

Ces observations peuvent s'expliquer par une diffusion des molécules de T.T. P. radioactives vers les cellules musculaires déficientes :

- A- par transport passif à travers la bicouche lipidique
- B- au niveau des jonctions étanches
- C- à travers les desmosomes
- D- par l'intermédiaire des jonctions de type gap.

Dites si chacune des affirmations est exacte ou fautive en justifiant chaque réponse.

Exercices d'application sur la membrane plasmique et les échanges membranaires

Exercice 1: Compléter les propositions suivantes:

A- Dans les membranes biologiques, les molécules lipidiques sont arrangées en une double couche continue, appelée ... *phospholipides*

B- Les trois types majeurs de lipides rencontrés dans la membrane cellulaire sont les *phospholipides / Cholestérol / glycolipides*

C- Tous les lipides rencontrés dans les membranes cellulaires sont dits *amphiphiles* parce qu'ils possèdent une extrémité hydrophobe et une extrémité *hydrophile*

D- Les *glyco* lipides contenant des oligosaccharides ne se rencontrent que sur la face externe de la double couche avec leurs groupes glycosylés exposés à la surface de la cellule.

E- Les protéines qui s'étendent à travers la double couche et sont exposées à des environnements aqueux de part et d'autre de la membrane sont appelées protéines

F- La zone riche en glucides présente à la surface de la plupart des cellules eucaryotes est appelée

Exercice 2: Indiquer si les assertions suivantes sont vraies ou fausses, si une proposition est fausse, expliquer pourquoi.

A- La structure de base des membranes biologiques est déterminée par la double couche lipidique, mais leurs fonctions biologiques sont liées à la présence de protéines.

B- Dans toutes les membranes cellulaires, les deux couches de lipides d'une même bicouche ont la même composition chimique, celle-ci étant spécifique de l'organisme.

C- Les protéines membranaires dites «intrinsèques» sont des protéines profondément et solidement enfouies dans la bicouche lipidique.

D- La pinocytose permet l'absorption de microgouttelettes de fluide par l'intermédiaire de petites vésicules alors que la phagocytose permet l'ingestion de particules de plus grande taille.

E- Pinocytose et phagocytose sont deux mécanismes voisins d'endocytose utilisés indifféremment par tous les types cellulaires pour prélever des molécules dans le milieu extérieur.

Exercice 3:

On dispose d'un récipient formé de deux compartiments A et B séparés par une membrane perméable à l'eau, mais imperméable à tous les solutés. On place dans le compartiment A une solution contenant 10 mM de NaCl et 10 mM de glucose, et dans le compartiment B 10 mM de NaCl et 10 mM de saccharose. On observe :

A : un mouvement net d'eau de A vers B

B : un mouvement net d'eau de B vers A

C : un mouvement transitoire d'eau de A vers B, avant retour à l'équilibre initial.

D : pas de mouvement net d'eau entre A et B

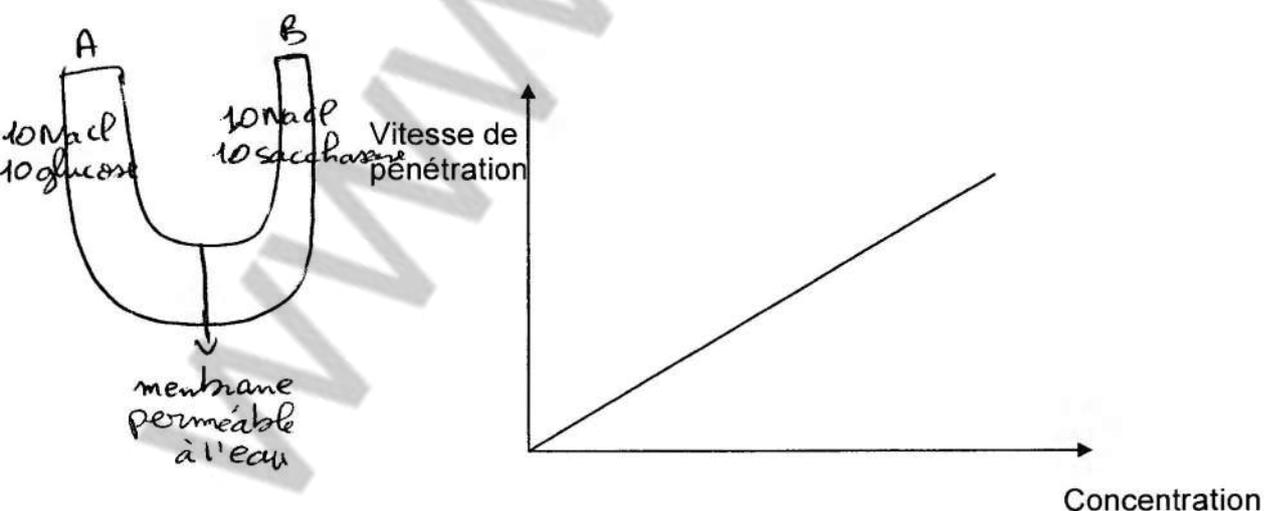
Exercice 4:

L'addition de Na^+ radioactif dans le plasma sanguin se traduit par l'apparition rapide de la radioactivité dans les globules rouges. Par ailleurs, dans les conditions normales, la concentration en Na^+ est toujours plus élevée dans le plasma que dans le milieu intracellulaire, mais si on fait agir sur les globules rouges des poisons métaboliques bloquant la fonction ATPasique membranaire (dinitrophénol), on observe qu'un équilibre s'établit entre les globules rouges et le plasma.

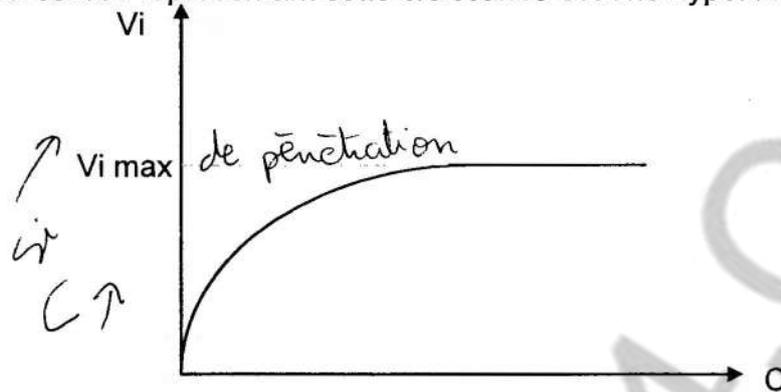
Que peut-on conclure de ces observations ?

Exercice 5:

Dans un phénomène de diffusion, la courbe représentant la vitesse de pénétration croît linéairement en fonction de la concentration du soluté dans le milieu.



Lorsqu'on étudie la vitesse de pénétration du glucose dans les hématies humaines, on constate que la vitesse de pénétration croît effectivement en fonction de la concentration du glucose dans le milieu, mais que cette vitesse atteint un palier maximum : la courbe représentant cette croissance est une hyperbole.



Que peut-on conclure de l'examen de cette courbe ?

Exercice d'application sur le cytosquelette

I- Compléter les propositions suivantes :

A- Le ~~cytosquelette~~ est un réseau complexe de filaments protéiques permettant aux cellules eucaryotes d'adopter des formes variées et d'exécuter des mouvements coordonnés et dirigés.

B- La plus abondante des protéines du cytosquelette est ~~l'actine~~ que l'on trouve sous forme de sous-unités globulaires et de filaments larges de 7 nm.

C- Les filaments d'actine ont des extrémités structurellement distinctes appelées l'..... (ou extrémité pointue) et l'.....(ou extrémité barbelée).

D- Dans de nombreuses cellules, la protéine de pontage de l'actine la plus abondante est la

E- La mieux caractérisée des protéines présentant la propriété de fluidifier des gels d'actine est qui casse les chaînes d'actine et coiffe leur extrémité plus.

F- Les sont des appendices cellulaires ressemblant à des poils, construits de microtubules et bougeant à la manière de petits fouets.

G- Les microtubules se forment à partir de molécules de

H- Le complexe protéique responsable du glissement des doublets externes de microtubules les uns sur les autres à l'origine de la courbure des cils est appelé

I- Les corpuscules basaux contiennent des; petits organites cylindriques formés de neuf groupes de trois microtubules fusionnés.

J- Le, appelé aussi centre cellulaire organise l'arrangement des microtubules pendant l'interphase.

K- L'extrémité moins des microtubules est enchâssée dans

L- Les servent à stabiliser les microtubules pour éviter qu'ils ne se désassemblent et sont également responsables de leurs interactions avec les autres constituants cellulaires.

M- Un grand complexe protéique appelé déplace uni-directionnellement des vésicules le long des microtubules.

N- Les forment des feuilletts bidimensionnels hautement organisés de filaments qui se désassemblent et se réassemblent rapidement à des stades particuliers de la mitose.

II- Quel type de tissu de vertébrés serait une excellente source :
- de tubuline ?

- d'actine ?
- de kératine ?

Quel type de protéines vous attendriez-vous à trouver comme contaminants dans :

- une préparation de tubuline ?
- une préparation d'actine ?

III- La figure ci-dessous présente la micrographie électronique d'une coupe transversale de flagelle.

A- Attribuer les composés suivants aux positions indiquées sur la figure :

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| tubule A | gaine centrale |
| tubule B | nexine |
| bras externe de dynéine | fibre rayonnante |
| bras interne de dynéine | microtubules centraux |

B- Parmi les structures ci-dessus, lesquelles sont composées de tubuline ?

C- Quelles sont –s'il y en a- les structures en continuité avec les constituants du corpuscule basal?

