

Les méthodes d'étude de la cellule

Les progrès de la biologie cellulaire sont directement liés à l'évolution des techniques d'observation du monde microscopique. Le terme « cellule » résulte directement des premières observations de R. Hooke. La connaissance de l'échelle subcellulaire date du ^{xx}e siècle, avec l'invention de la microscopie électronique.

I. L'OBSERVATION DES CELLULES

1. Le microscope optique : observation de tissus

Le principe du microscope optique est double : constitution, grâce à un objectif, d'une image de l'objet observé, puis observation de cette image grâce à un oculaire qui l'agrandit et la place à l'infini, permettant une observation confortable. L'ensemble permet d'agrandir l'image et d'augmenter sa résolution. Il existe une limite au pouvoir de résolution du microscope, qui est de quelques dixièmes de micromètre et lié à la longueur d'onde de la lumière visible. L'objet observé est une coupe suffisamment plane pour être nette et suffisamment fine pour être traversée par la lumière qui permet d'observer l'objet. Cela n'interdit cependant pas d'observer plusieurs épaisseurs de cellules, et surtout d'observer des tissus vivants. Les techniques complémentaires L'observation de cellules peut être améliorée de multiples manières par des techniques de coloration, de révélation (autoradiographie, fluorescence...). Quelques techniques microscopiques permettent d'améliorer dans certains cas le contraste ou la profondeur de champ, comme le contraste de phase ou la microscopie confocale.

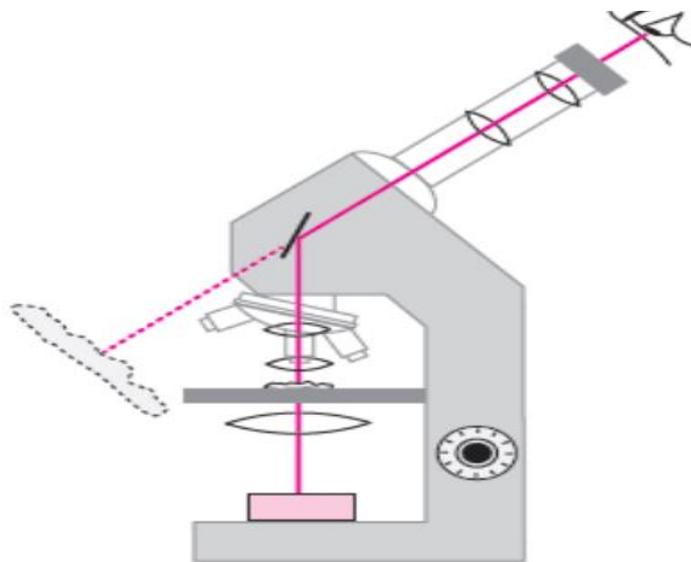


Figure 1 : Technique de microscope optique

2. Le microscope électronique à transmission :

Les ultrastructures Un principe semblable à la microscopie optique Si l'on considère un faisceau d'électrons de la même manière qu'un faisceau de lumière, le microscope à transmission n'est

CHAPITRE II : Les méthodes d'étude de la cellule

appropriés, puis la membrane cellulaire est rompue. Pour les bactéries, levures et cellules végétales entourées d'une paroi, des enzymes adéquates sont ajoutées. Les principales techniques d'homogénéisation utilisent :

- des broyeurs mécaniques (type Ultraturax®) qui fonctionnent comme des mixeurs et servent surtout à dissocier les tissus ;
- des homogénéisateurs à piston (type Dounce®) qui écrasent les cellules entre le piston et la paroi interne du tube. En fonction de leur diamètre, ils dissocient les tissus ou cassent les cellules ;
- des ultrasons qui induisent des compressions/décompressions et déstructurent très efficacement les cellules. Ce procédé de cavitation ultrasonore est souvent appelé « sonication » ;
- des homogénéisateurs sous pression (type bombe à azote ou presse de French), des cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide ou des détergents doux qui solubilisent la membrane.

2. La séparation par centrifugation

Le développement de centrifugeuses à haute vitesse, ou ultracentrifugeuses, imposant des accélérations supérieures à 20 000 fois la pesanteur terrestre (20 000 g) a permis le fractionnement subcellulaire. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, elle est quantifiée par le coefficient de sédimentation donné en unités Svedberg (S).

➤ La centrifugation différentielle

Les particules sédimentent à une vitesse donnée, en fonction de leur taille et de leur densité, dans le tampon d'homogénéisation. Le procédé de purification des composants cellulaires peut être réalisé en plusieurs étapes, le surnageant étant chaque fois centrifugé plus vite et plus longtemps. (Figure 3)

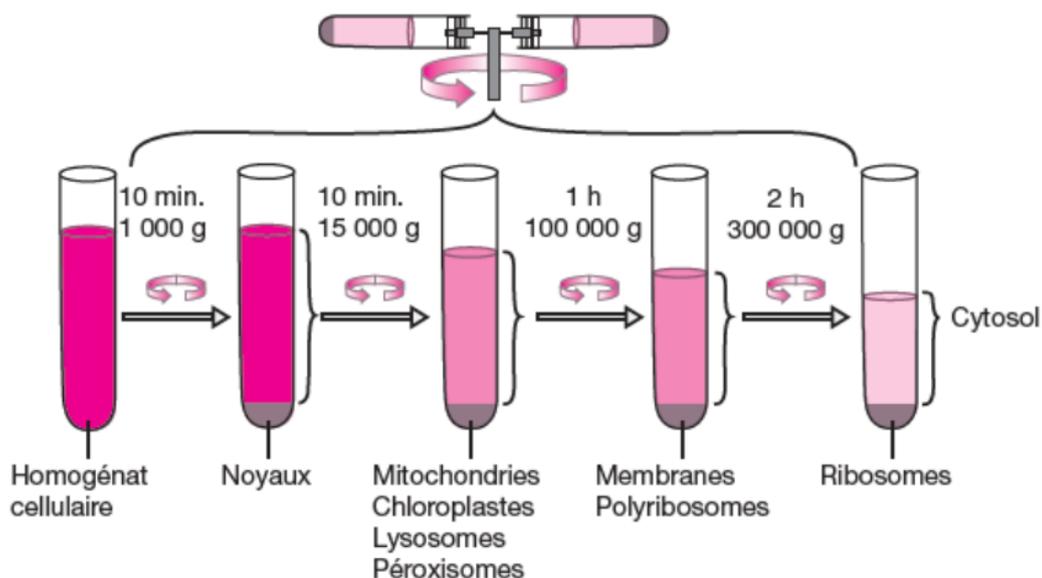


Figure 3 : Les principales étapes de centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire

➤ **La centrifugation sur gradient de densité (figure4)**

L'échantillon est déposé sur un gradient de densité puis centrifugé à une vitesse adaptée à la séparation des particules d'intérêt. Les molécules utilisées pour former les gradients peuvent être des sucres (saccharose), des sels métalliques (chlorure de césium CsCl), des colloïdes (Percoll). Il faut distinguer la centrifugation zonale de la centrifugation à l'équilibre.

- Lors d'une centrifugation zonale, la densité maximale du gradient est inférieure à la densité maximale des particules. Il y a donc une séparation basée sur la vitesse de sédimentation. La durée est contrôlée pour que les particules ne sédimentent pas jusqu'au fond du tube.
- Lors d'une centrifugation à l'équilibre (iso pycnique), la densité maximale à la base du gradient est supérieure à la densité maximale des particules. La séparation est basée sur la densité. La durée de centrifugation peut être très longue jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Dans ces procédures, le gradient peut être continu ou discontinu, on parle alors de centrifugation « sur coussin ». Avec le chlorure de césium utilisé pour séparer différentes formes d'acides nucléiques (ADN génomique, plasmidique, ARN), le gradient n'est pas préformé. L'échantillon est mélangé à une solution concentrée de CsCl puis, au cours de la centrifugation, un gradient de CsCl se forme ce qui entraîne la séparation des acides nucléiques.

3 La séparation par immunoadsorption

La purification par centrifugation des composants subcellulaires a permis une très bonne caractérisation de nombreuses vésicules dans la cellule. S'il existe des marqueurs de surface caractéristiques (protéines transmembranaires), des anticorps monoclonaux peuvent être produits et utilisés pour une séparation par immunoadsorption sur support solide. Les anticorps sont greffés sur des billes de résine ou sur des billes magnétiques qui permettent la séparation physique des vésicules d'intérêt.

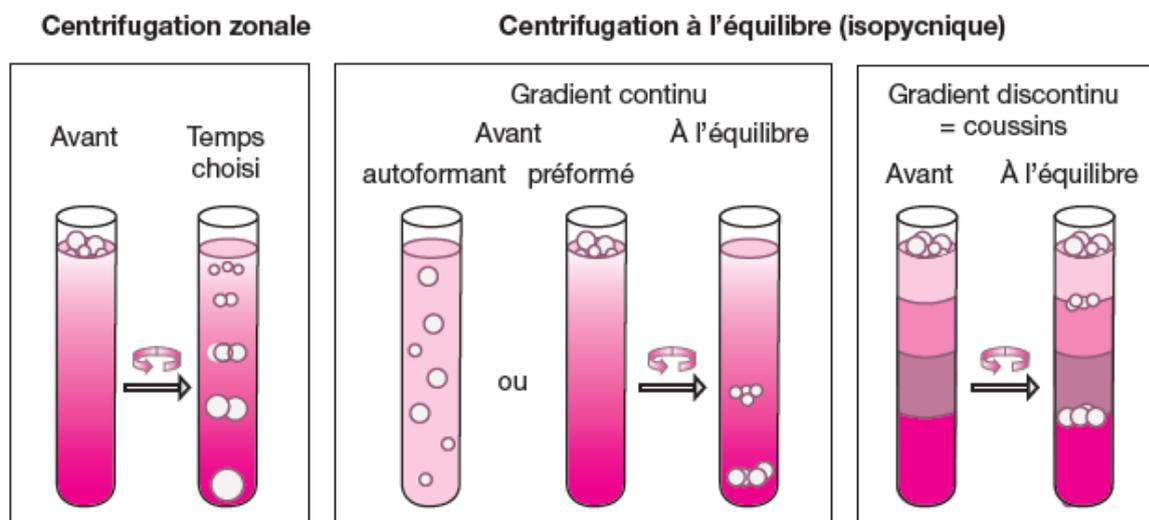


Figure 4 : Les différents types de centrifugation sur gradient