



BIOL 1372
2023-2024
Pharmacie _ Licence 1 _ S2



Cours de Biologie cellulaire

Responsable: Dinkorma Ouologuem, MCA



BIOL 1372
2023-2024
Pharmacie _ Licence 1 _ S2



Méthodes d'étude de la cellule

Mercredi, 8 janvier 2025

Objectifs

- 1. Définir les méthodes d'étude de la cellule**
- 2. Décrire le principe de fonctionnement du microscope photonique**
- 3. Citer 2 caractéristiques d'un type de microscope électronique**
- 4. Enoncer le principe du fractionnement cellulaire en indiquant le 3 principales les étapes**
- 5. Citer 3 principales classes de macromolécules rentrant dans la composition d'un milieu de culture pour les cellules eucaryotes**
- 6. Enoncer 2 applications**

Plan

1. Généralités

2. Visualisation des cellules

3. Fractionnement cellulaire

4. Culture cellulaire

5. Applications

Conclusion

1. Généralités

1.1. Définition

Les méthodes d'étude de la cellule sont des **procédures** qui permettent de décrire la **morphologie** de la cellule, les **constituants** cellulaires, leurs **fonctions** et leurs **relations**.

FAPH BIO CELL

1. Généralités

1.2. Intérêt

❖ **Fondamental**

- Connaissance de la cellule

❖ **Diagnostic**

- Identification des microorganismes

❖ **Thérapeutique**

- Conception d'approches thérapeutiques

1. Généralités

1.3. Rappels

❖ Historique

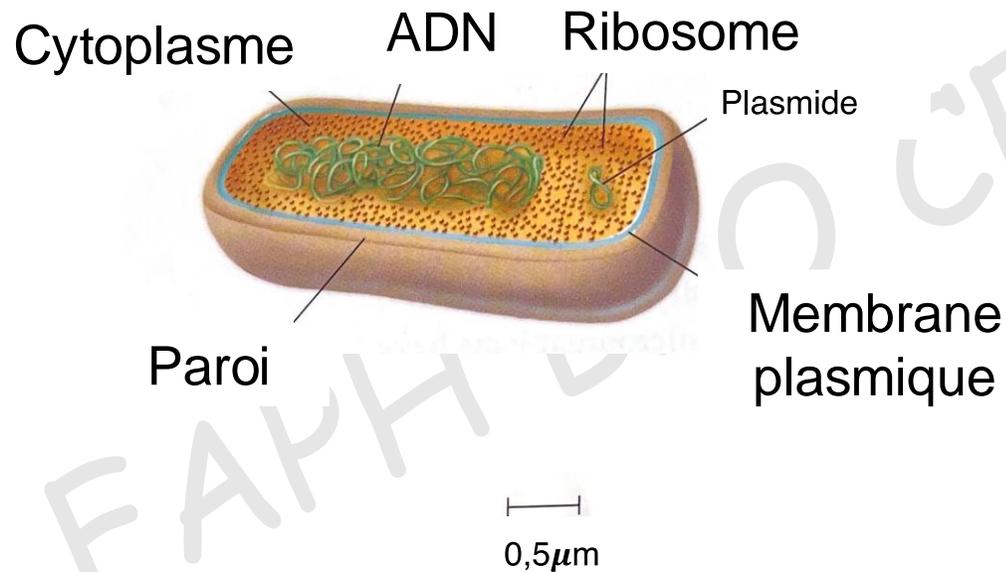
- **1662**: Anton Van **LEEUVENHOEK**; invention 1^{er} microscope
- **1931**: Ernest **RUSKA** & Max **KNOLL**; 1^{er} prototype microscope électronique; grossissement 400 fois
- **2008**: **SHIMOMURA, TSIEN & CHALFIE**; Prix Nobel pour le GFP (protéine fluorescente verte)

1. Généralités

1.3. Rappels

❖ les cellules

Cellule procaryote



Cellule eucaryote

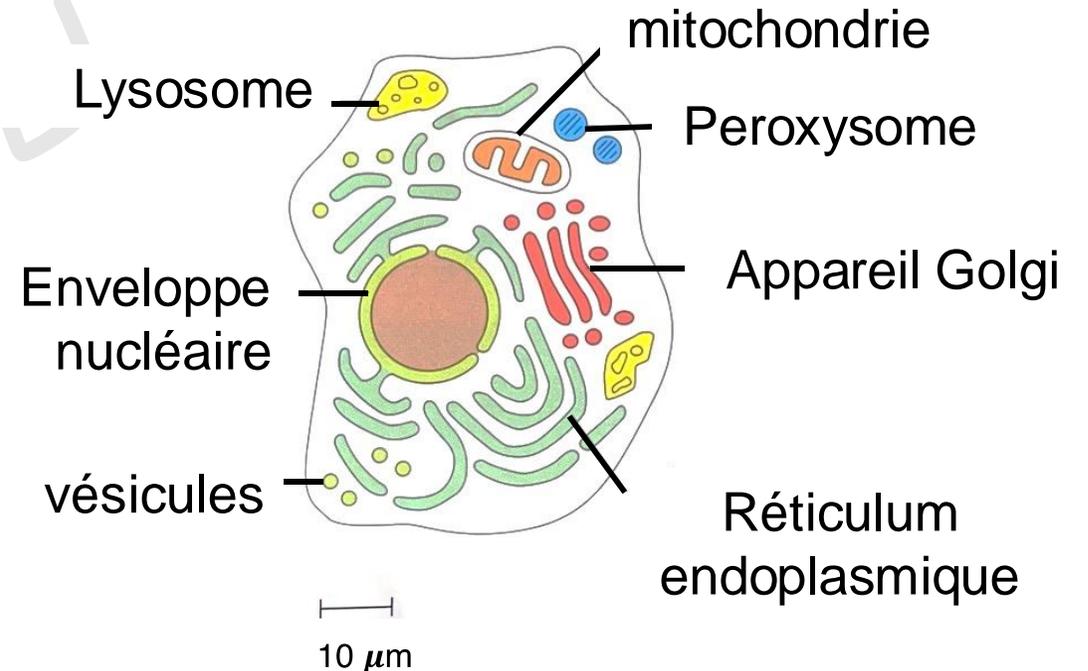


Figure 2. Schéma d'une cellule procaryote et cellule eucaryote

1. Généralités

1.3. Rappels

L'étude de la cellule consiste à :

- Visualiser la cellule et ses structures => **Microscopies**
- Composition moléculaire des structures cellulaires => **fractionnement cellulaire et approches moléculaires**
- Fonction des macromolécules et des structures cellulaires => **approches moléculaires, biochimiques et bio-informatiques**
- Cellule dans son environnement => **approches moléculaires, biochimiques, microscopiques**

2. Visualisation des cellules

- ❖ Microscope: visualisation cellules, organelles, macromolécules
- ❖ Plusieurs types de microscopes:
 - **Microscopes optiques = microscopes photoniques**
 - **Microscopes électroniques**

FAPH BIO CELL

2. Visualisation des cellules

2.1. Champs d'utilisation du microscope

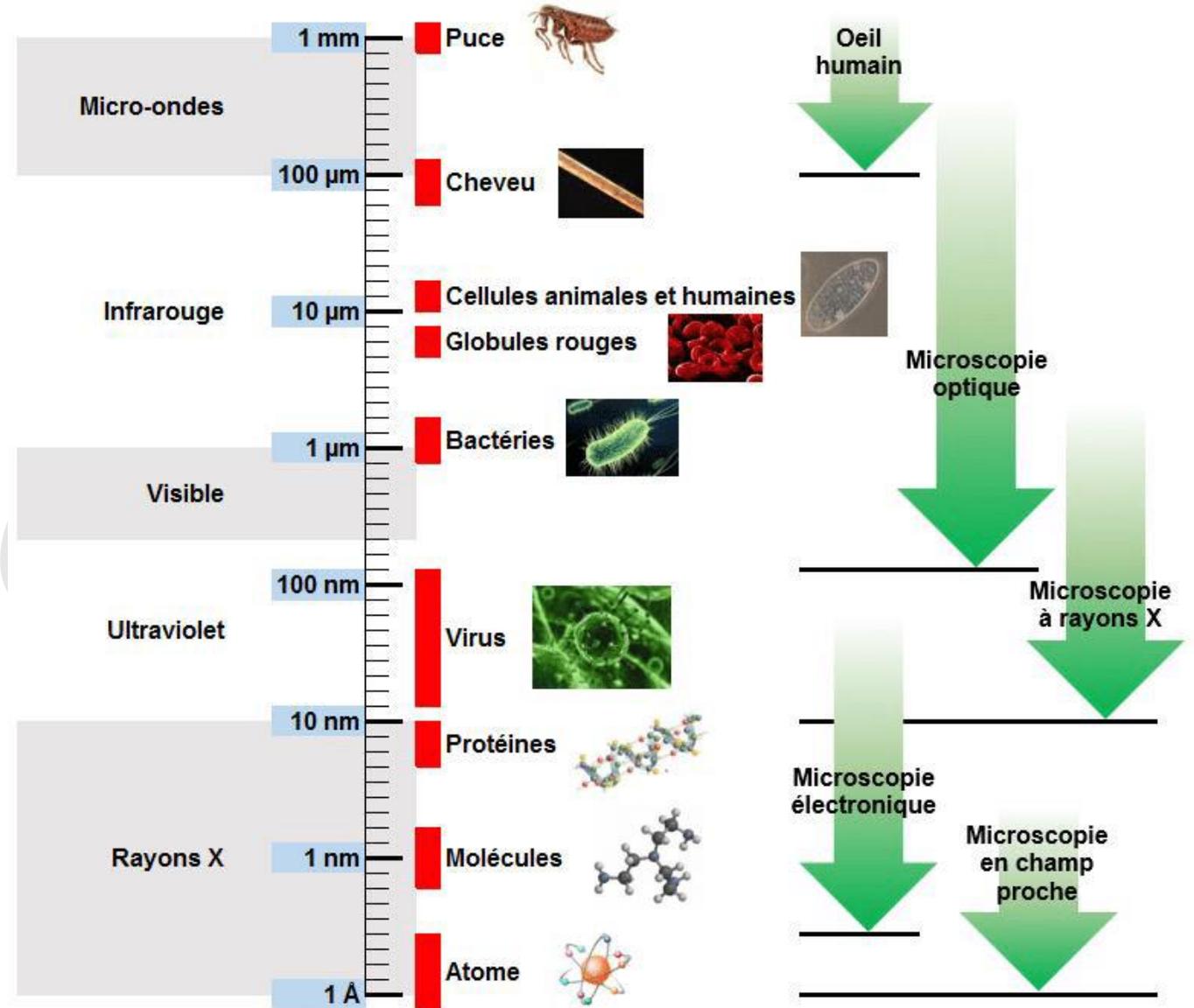


Figure 3. Champs d'utilisation de différents microscopes

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

Le microscope optique (**microscope photonique**), est un instrument d'optique utilisant des **photons** pour illuminer un échantillon, et qui est muni d'un **objectif** et d'un **oculaire** permettant de grossir l'image d'un objet et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain.

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Principe

- Une **onde (photons)** envoyée sur la **préparation** ou émise par la préparation, est captée par un **objectif** qui la concentre et la passe par un **oculaire** afin de créer une **image observable**.
- Cette image est soit observée à **l'œil nu**, soit **photographiée**, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour traitement.

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

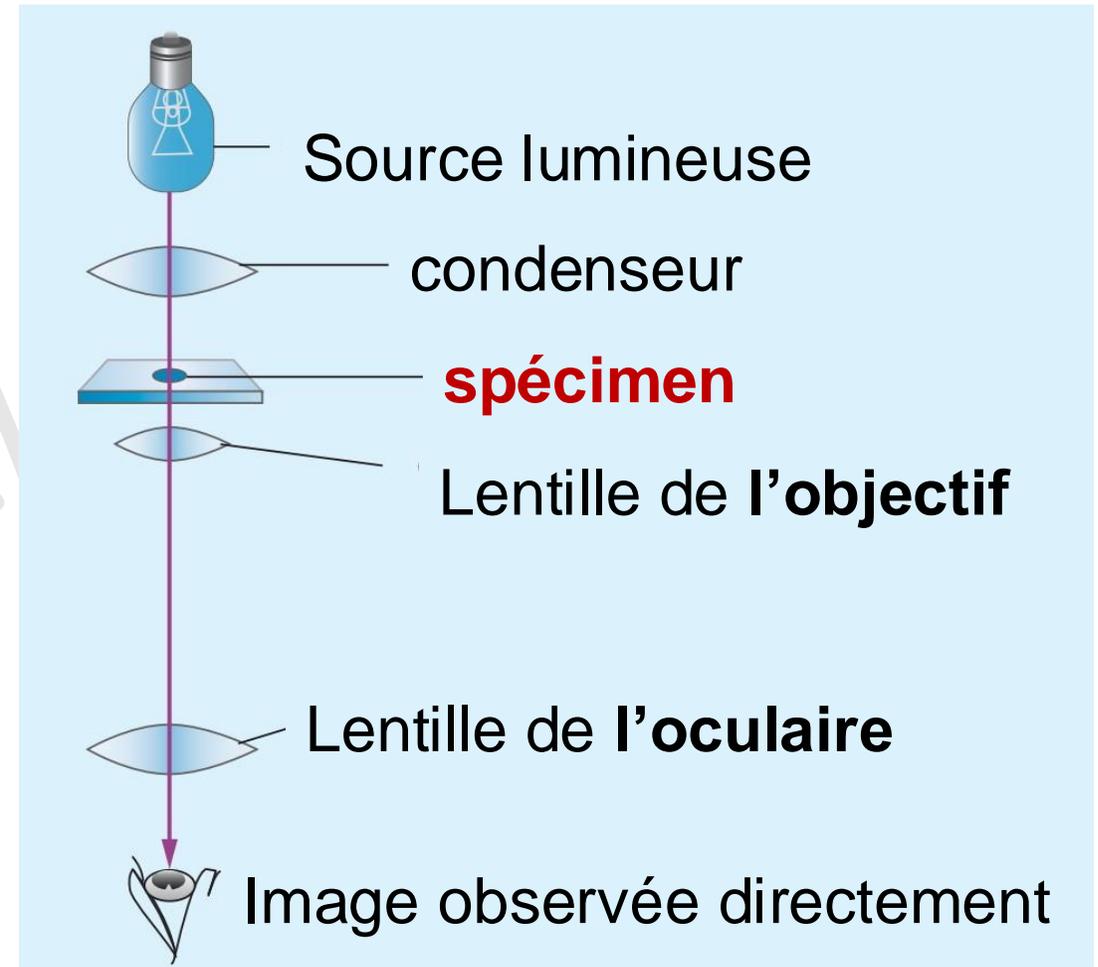
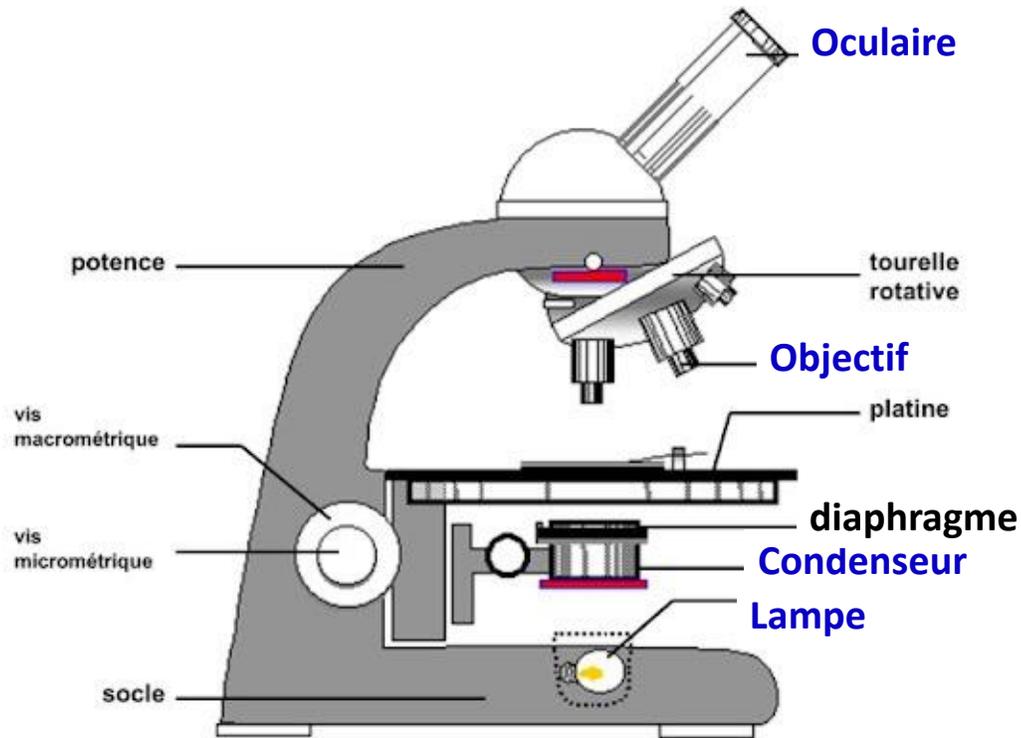


Figure 4. Eléments et principe de fonctionnement d'un microscope optique

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Description de l'instrument

- **Lentilles de grossissement**

- **Objectif:** Lentilles pour 1^{er} grossissement; 4X, 10X, 20X, 40X, 100X
- **Oculaire:** Lentilles pour 2^e grossissement; fonction du microscope; 10X ou 25X

=> Grossissement élément microscopique (si oculaire 10X): 40 à 1000 fois

- **Pouvoir de résolution / pouvoir séparateur:** ~ 0,1 μm

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Quelques types de microscopes optiques

	Mic. en champ sombre	Mic. Contraste de phase	Mic. Fluorescent
Echantillon	Cellules transparentes	Cellules fixées ou vivantes	Cellules fixées ou vivantes
Traitement de l'échantillon	sans préparation	Avec ou sans préparation	Marquage immunofluorescent
Avantages	Usage courant	Observation sans coloration	Détection spécifique de structures cellulaires
Inconvénients	Résolution très faible	Résolution faible	Résolution faible
Application	Comportement organisme entier	Mouvements cellulaires	Visualisation structures cellulaires

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

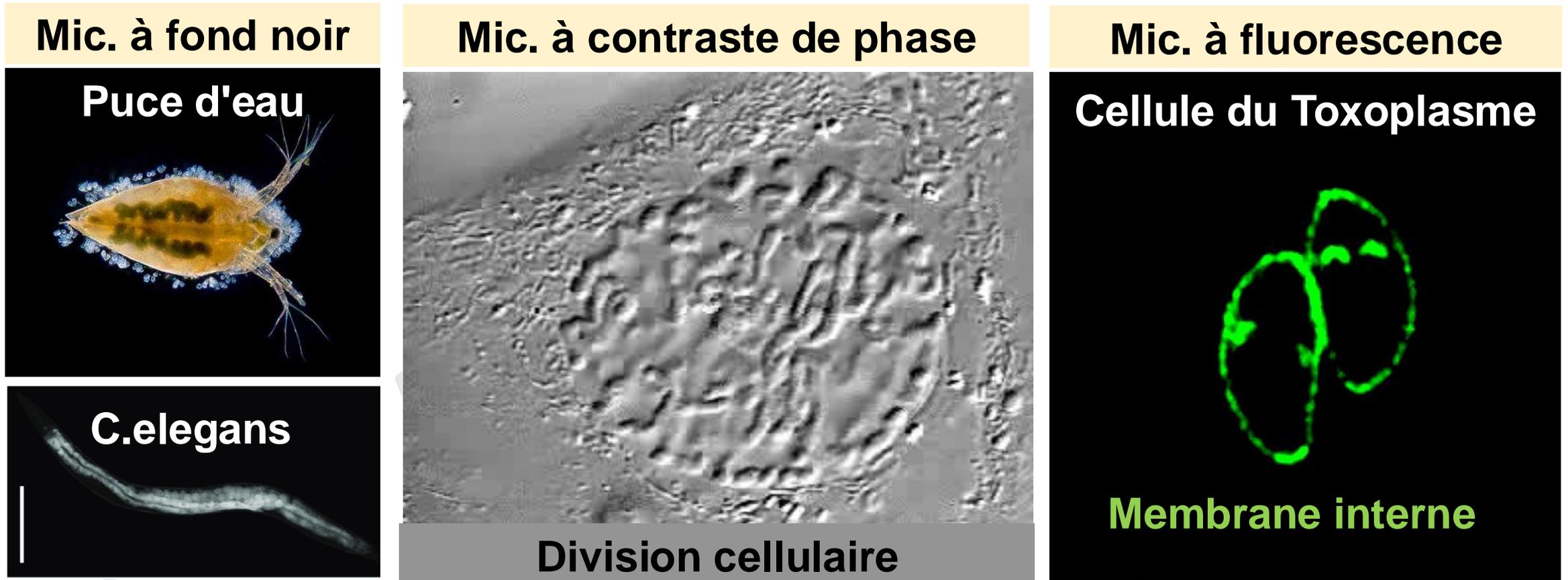


Figure 5. Micrographies provenant de quelques microscopes optiques

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- Caractéristiques du spécimen :
 - Epaisseur (4-8 μm)
 - Contraste
- => permet la différenciation des éléments**

FAPH BIO CELL

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- **Fixation**

- **But:** tuer les cellules et préserver les structures cellulaires dans un état proche de l'état vivant
- **Agents fixateurs:**
 - **Chimiques:** méthanol, formol, formaldéhyde, glutaraldéhyde
 - **Physiques:** chaleur

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- **Coloration**

- **But:** permettre une différenciation optique (contraste) des constituants cellulaires
- **Colorants:**
 - **Chimiques:**
 - ✓ colorants basiques (ex. hématoxyline) => interaction avec molécules chargées négativement (ex. acides nucléiques)
 - ✓ colorants acides (ex. éosine) => interaction molécules chargées négativement

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

❖ Techniques de préparation des échantillons

- **Coloration**

- **Autres types de coloration:** méthodes enzymatiques, méthodes Immuno-enzymatiques

FAPH BIO CELL

2. Visualisation des cellules

2.2. Microscope optique

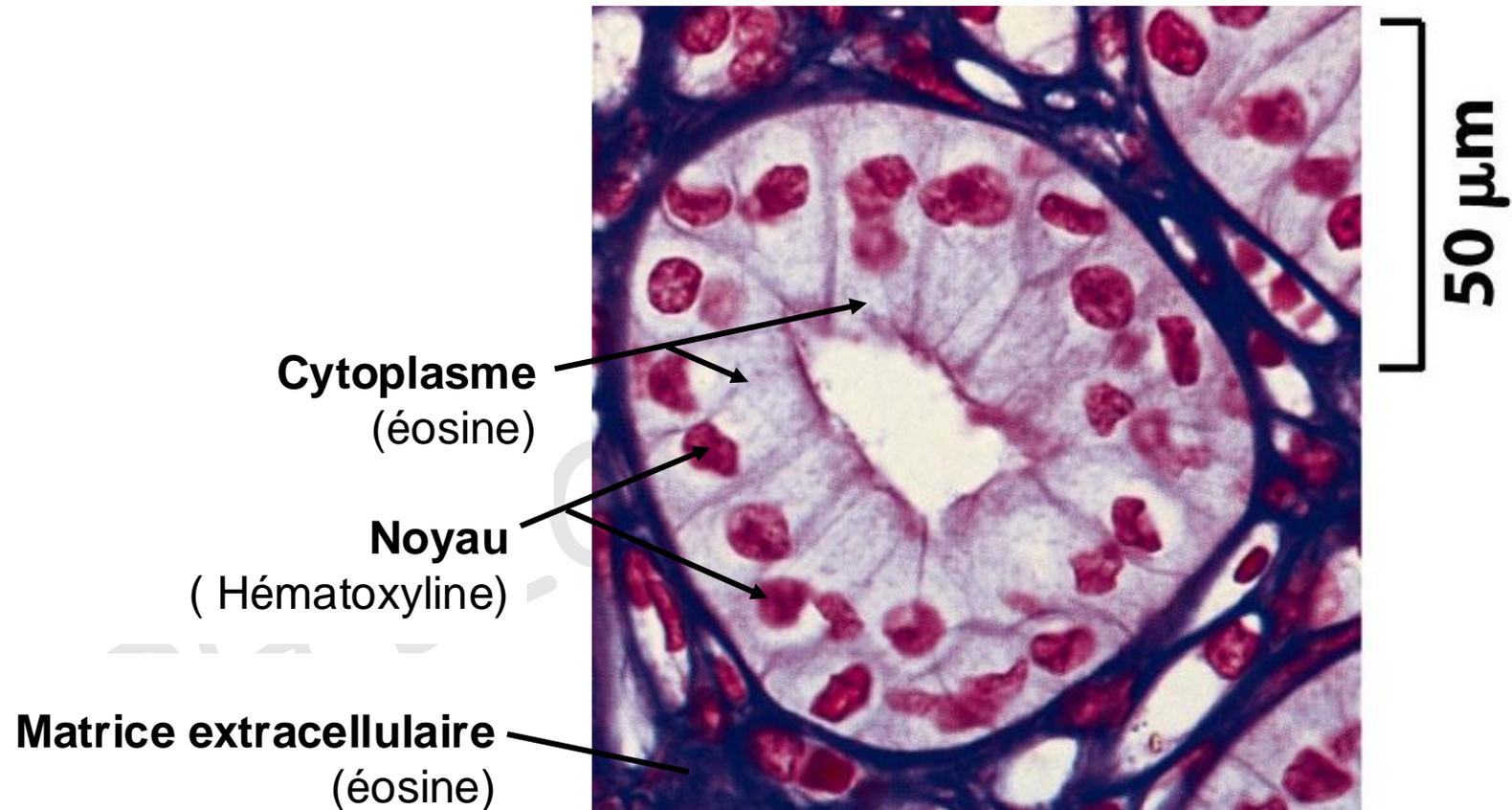


Figure 7. Micrographe d'un tissus coloré avec l'éosine et l'hématoxyline

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

Le microscope électronique est un type de microscope qui utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et créer une image très agrandie avec un grossissement pouvant aller jusqu'à 2 millions de fois

FAPH BIO CELL

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

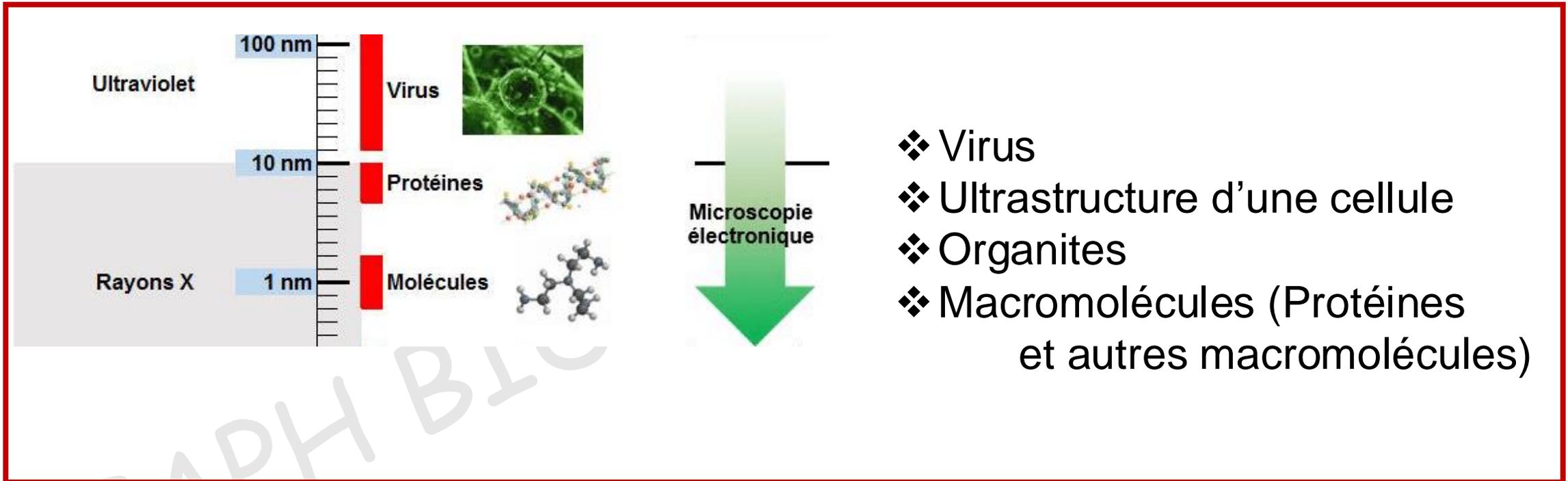


Figure 8. Champ d'utilisation du microscope électronique

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Principe

Des **électrons** sont captés par un **1^{er} jeu de lentilles électromagnétiques (aimants)** qui les focalisent sur la **préparation**. Les électrons traversant l'échantillon sont captés par un **2^e jeux de lentilles électromagnétiques** qui projette les faisceaux d'électrons sur un film photographique permettant la visualisation de l'image agrandi.

❖ Pouvoir de résolution : 2Å

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

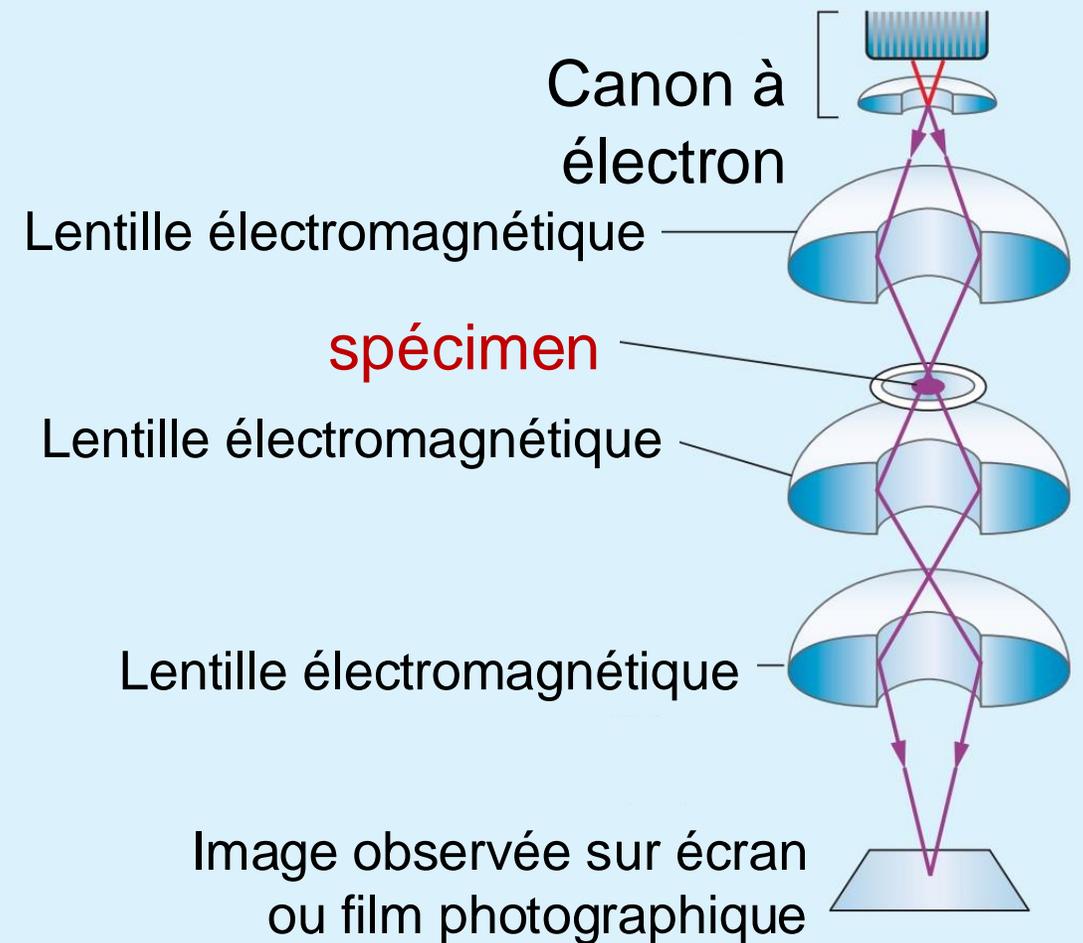


Figure 9. Image et principe de fonctionnement d'un microscope électronique

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

	Microscope électronique à transmission (MET)	Microscope électronique à balayage (MEB)
Echantillon	Spécimens fixées	Spécimens fixées
Traitement de l'échantillon	Traitements spécifiques et coloration avec des métaux	Traitements spécifiques et coloration avec des métaux
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none">• Technique la plus performante• Visualisation des structures intracellulaires et ultrastructures	<ul style="list-style-type: none">• Visualisation images en pseudo 3D• fournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel de l'objet / spécimen

2. Visualisation des cellules

2.3. Microscope électronique

❖ Quelques types de microscopes électroniques

Image d'une vacuole contenant 2 parasites *Toxoplasma gondii*

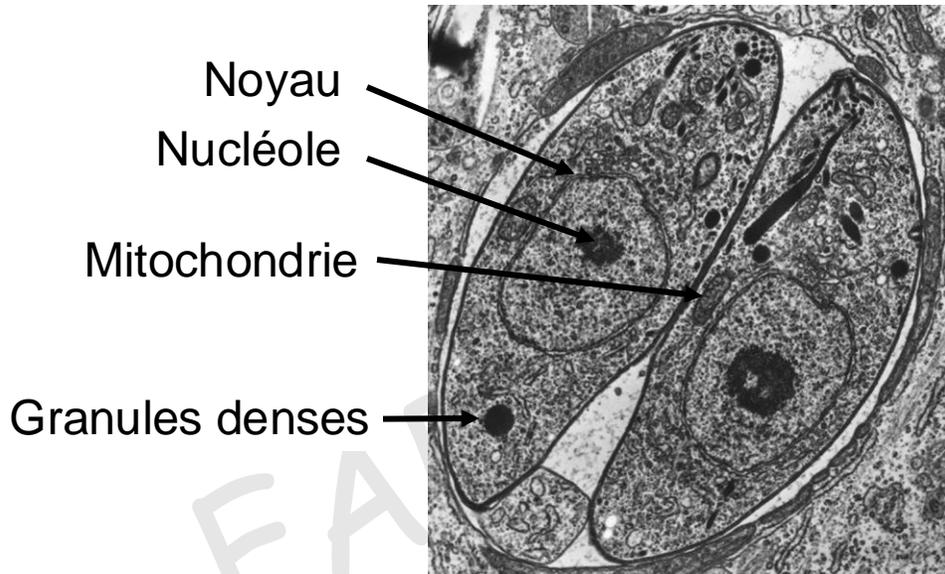


Image pseudo 3D des parasites *Toxoplasma gondii*

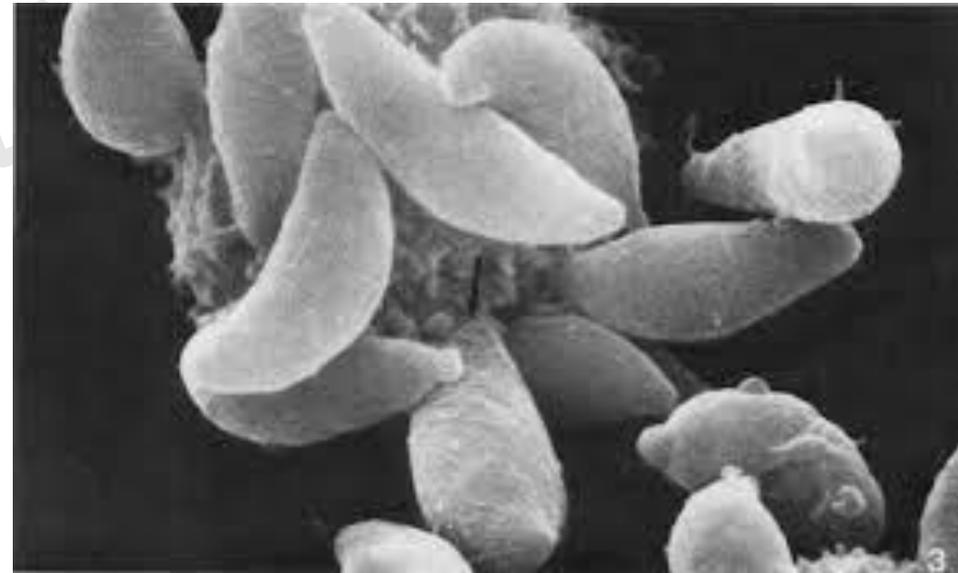


Figure 10. Micrographies des cellules du toxoplasme provenant du MET et du MEB

3. Fractionnement cellulaire

- ❖ Le fractionnement cellulaire est une **technique d'isolement d'organites et de structures cellulaires** tout en préservant leurs fonctions individuelles
- ❖ Le fractionnement nécessite **la rupture de la membrane plasmique** suivi de la **purification des organites** et des structures cellulaires
- ❖ Les organites purifiés sont étudiés par la suite (structure, composition moléculaire, fonctions)

3. Fractionnement cellulaire

3.1. Etapes

❖ Principe

Consiste à lyser la cellule et à purifier les organites cellulaires afin d'obtenir des fractions pures d'organites cellulaires

❖ Le fractionnement comprend 3 grandes étapes

- Homogénéisation = lyse cellulaire (rupture de la membrane plasmique)
- Filtration
- Purification des organites par centrifugation

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

❖ Echantillons

- Fraction homogène de cellules
- Origine des cellules
 - Culture cellulaire (ex. culture de cellule Hela)
 - Population cellulaire isolée d'un échantillon (ex: leucocytes isolé d'un prélèvement sanguin)
 - Dissociation des cellules d'un tissu (ex. cellules dissociées du foie)

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

❖ Échantillons

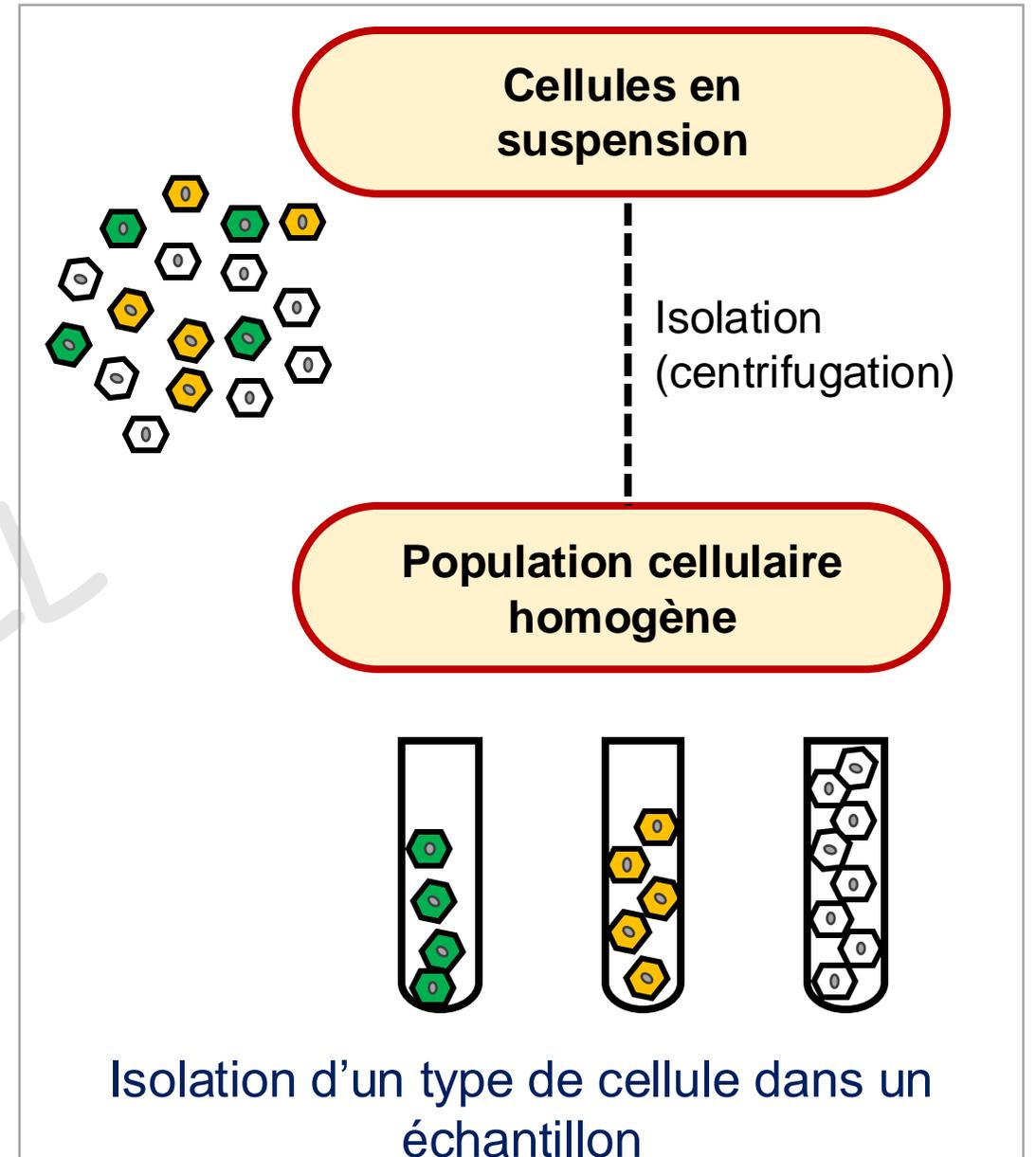
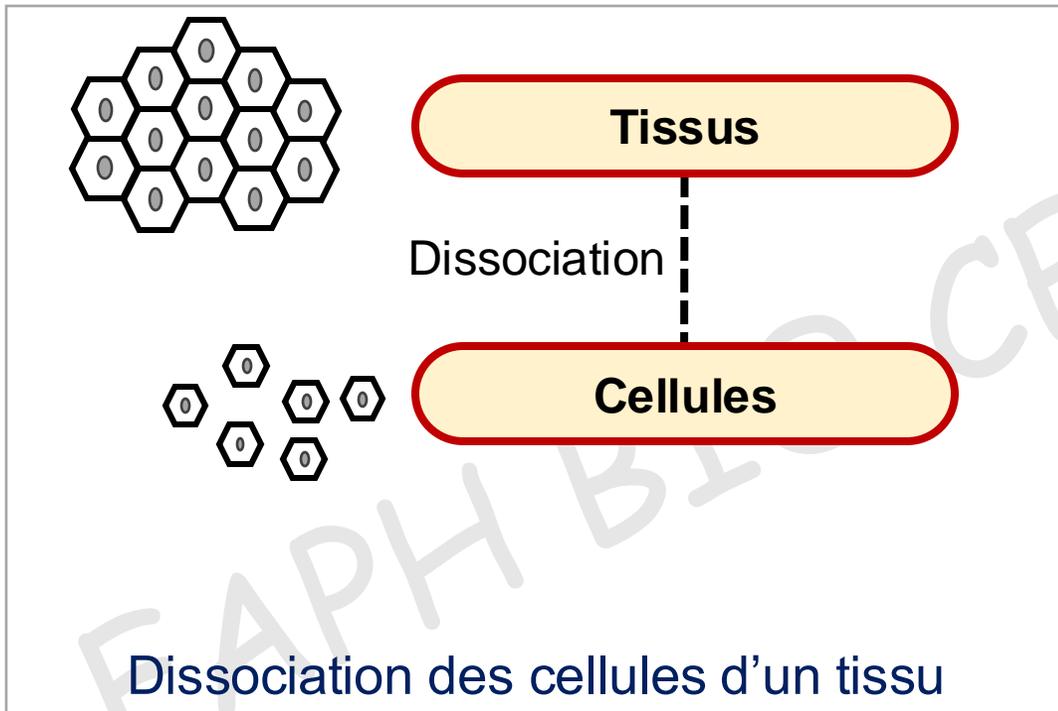


Figure 11. Obtention des cellules pour le fractionnement cellulaire

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

❖ Homogénéisation

- **Lyse de la cellule** = rupture de la membrane cellulaire => libération des organites
- Obtention de l' **homogénat**
 - Homogénéiseur de Dounce
 - Sonication
 - Congélation et décongélation successives
 - Choc osmotique
 - Enzymes: perforation de la membrane (ex. lysozyme)

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

❖ Filtration

- Dépend de l'origine des cellules
- Permet d'éliminer les cellules non homogénéisées et les gros débris de l'homogénat
- Réalisation de la filtration:
 - Filtres
 - Centrifugation

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

❖ Purification

- Séparation des principaux composants de l'homogénat par centrifugation
- 2 types de centrifugation
 - **Centrifugation différentielle:** basée sur une série d'ultracentrifugations à des vitesses croissantes => séparation en fonction de la vitesse de sédimentation des organites
 - **Centrifugation en gradient de densité:** basée sur la sédimentation des composants cellulaires dans un gradient de saccharose (solutions de densités différentes)

3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

Centrifugation en gradient de densité

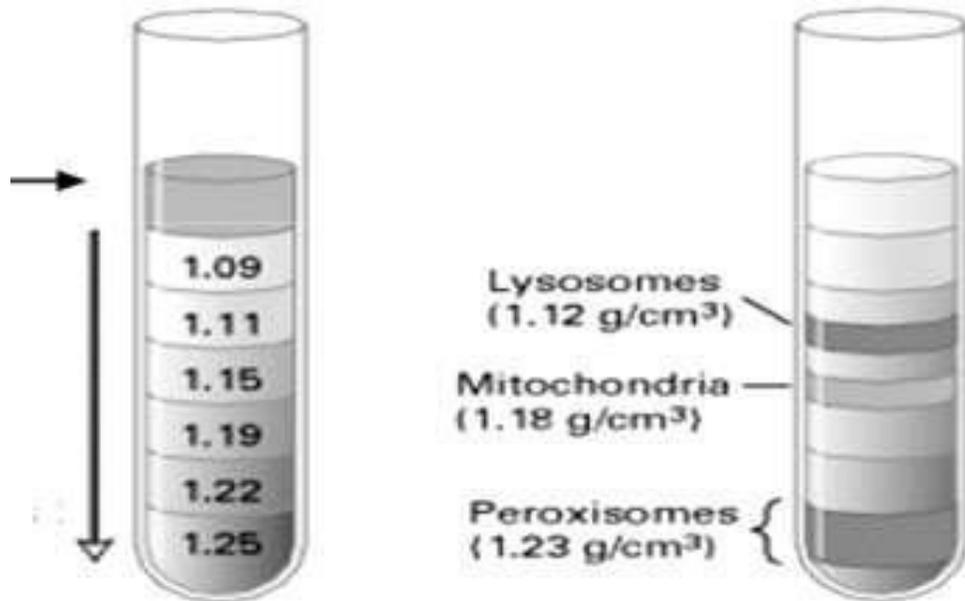
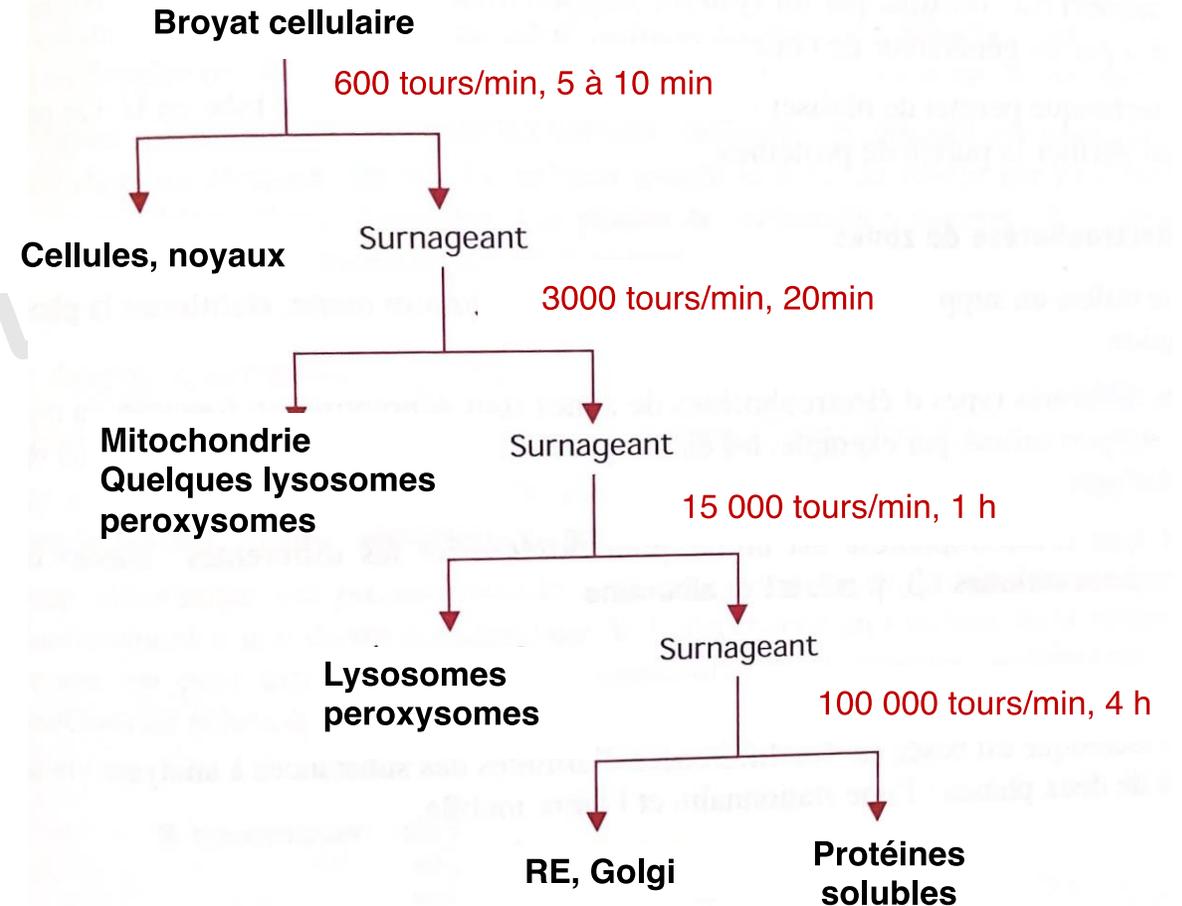


Figure 11. La centrifugation différentielle

Centrifugation différentielle



3. Fractionnement cellulaire

3.2. Éléments nécessaires

	Centrifugation différentielle	Centrifugation sur gradient
Milieu pour la séparation	<ul style="list-style-type: none">• Milieu homogène	<ul style="list-style-type: none">• Milieu hétérogène = gradient de gel ou de solution (ex saccharose)
Principe de séparation	<ul style="list-style-type: none">• Plusieurs centrifugation à différente vitesse• Séparation par poids et taille• Obtention de 2 fractions (surnageant et le culot)	<ul style="list-style-type: none">• Centrifugation a une seule vitesse• Séparation par taille, forme et densité des organites• Obtention de plusieurs fractions (pour chacun de concentration du gel utilisé)

4. Culture cellulaire

- ❖ La culture cellulaire est un ensemble de techniques permettant de faire croître des cellules hors de leur milieu d'origine ou hors de l'organisme (*ex-vivo*)

FAPH BIO CELL

4. Culture cellulaire

4.1. Principe

❖ Principe

Consiste à maintenir des cellules dans un milieu de culture précis et des conditions environnementales propices à leur croissance et multiplication

FAPH BIO CELL

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

- ❖ Cellules à cultiver
- ❖ Milieu de culture
- ❖ Environnement / atmosphère

FAPH BIO CELL

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

❖ Cellules à cultiver

- **Microorganismes**
- **Cellules saines fraîchement prélevées** d'un organisme (par biopsie);
 - caractérisée par un nombre limitée de division cellulaire
 - ne peuvent pas être maintenues en culture indéfiniment
- **Cellules immortalisées**
 - caractérisées par une capacité de division non limitée
 - ex. cellules souches, lignées cellulaires, cellules cancéreuses

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

❖ Milieu de culture

- **Milieu liquide ou solide** selon le type de cellule
 - Cellules animales: milieu liquide
 - Bactéries: milieu liquide ou solide
- Milieu de culture des procaryotes est plus simple que celui des eucaryotes
- **Composition du milieu de culture:** contient généralement acides aminés, vitamines, sels, autres macromolécules (protéines, sucres)

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

❖ Milieu de culture

AMINO ACIDS	VITAMINS	SALTS	MISCELLANEOUS	PROTEINS (REQUIRED IN SERUM-FREE, CHEMICALLY DEFINED MEDIA)
Arginine Cystine Glutamine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Threonine Tryptophan Tyrosine Valine	biotin choline folate nicotinamide pantothenate pyridoxal thiamine riboflavin	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ MgCl ₂	glucose penicillin streptomycin phenol red whole serum	insulin transferrin specific growth factors

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

❖ Environnement et atmosphère

- **Bactéries**

- Température: variable; généralement 37°C,
- Composition atmosphérique et humidité sont fonction du type de bactérie (ex. aérobie vs anaérobie)

- **Cellules animales**

- atmosphère humide, 5% CO₂
- Température: généralement 37°C

4. Culture cellulaire

4.2. Éléments nécessaires

❖ Environnement et atmosphère

- **Bactéries**

- Température: variable; généralement 37°C,
- Composition atmosphérique et humidité sont fonction du type de bactérie (ex. aérobie vs anaérobie)

- **Cellules animales**

- atmosphère humide, 5% CO₂
- Température: généralement 37°C

4. Culture cellulaire

4.2. Types de culture

❖ Culture primaire

- Cellules animales :
 - atmosphère humide, 5% CO₂
 - Température: généralement 37°C
- Bactéries:
 - Température: variable; généralement 37°C,
 - composition atmosphérique et humidité sont fonction du type de bactérie (ex. aérobie vs anaérobie)

5. Applications

5.1. Diagnostic

❖ Concept: Approche microscopique

❖ Visée de l'analyse:

- Appréciation des formes cellulaires (organisme fixé) , quantité (organisme fixé) et mouvement (organisme vivant)
- Identification de cellules étrangères ou atypiques (organisme fixé)

FAPH BIO CELL

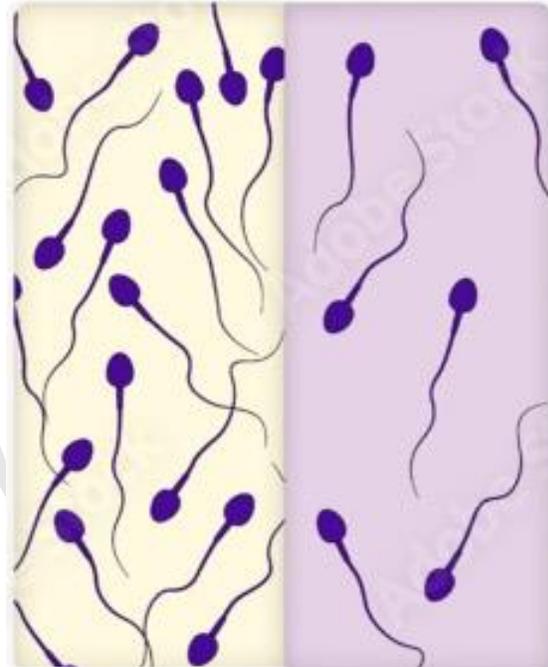
5. Applications

5.1. Diagnostic

Ex:

Diagnostic de
l'infertilité
relative
masculine

**Nombre de
spermatozoïdes**



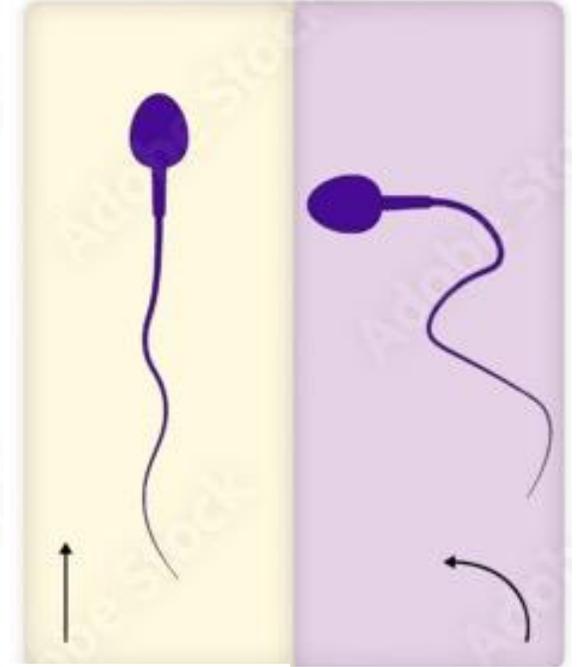
Normale Anormale

**Morphologie des
spermatozoïdes**



Normale Anormale

**Mouvement des
spermatozoïdes**



Normale Anormale

5. Applications

5.1. Diagnostic

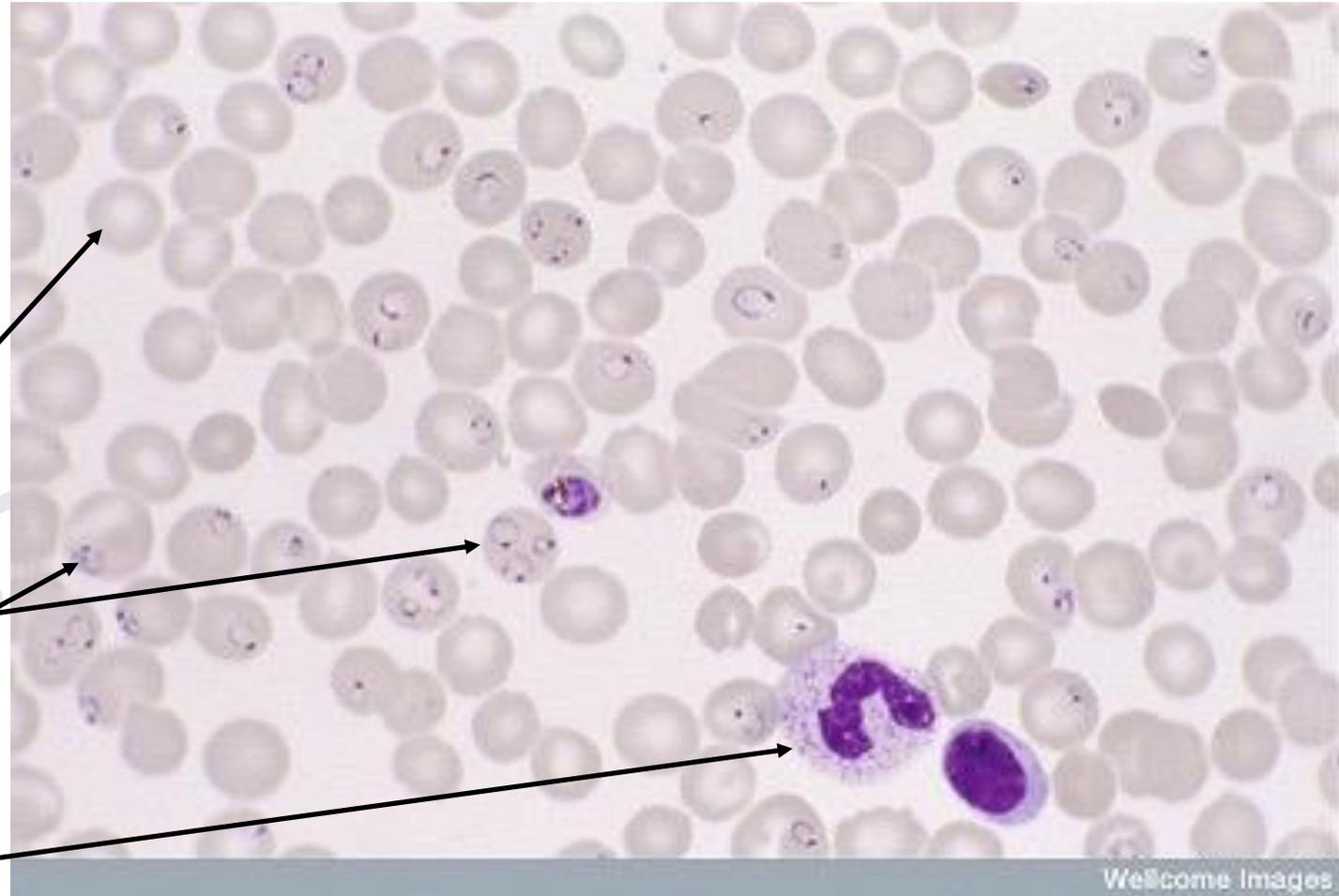
Ex:

Diagnostic du
paludisme

Globule rouge
non infecté

Globule
rouge infecté

Globule blanc



5. Applications

5.2. Recherche

- ❖ Concept: Fractionnement cellulaire, approche moléculaires et biochimiques
- ❖ Visée de l'analyse:
 - Enrichissement d'organite
 - Analyse moléculaire du contenu (quantité, interaction entre macromolécules)

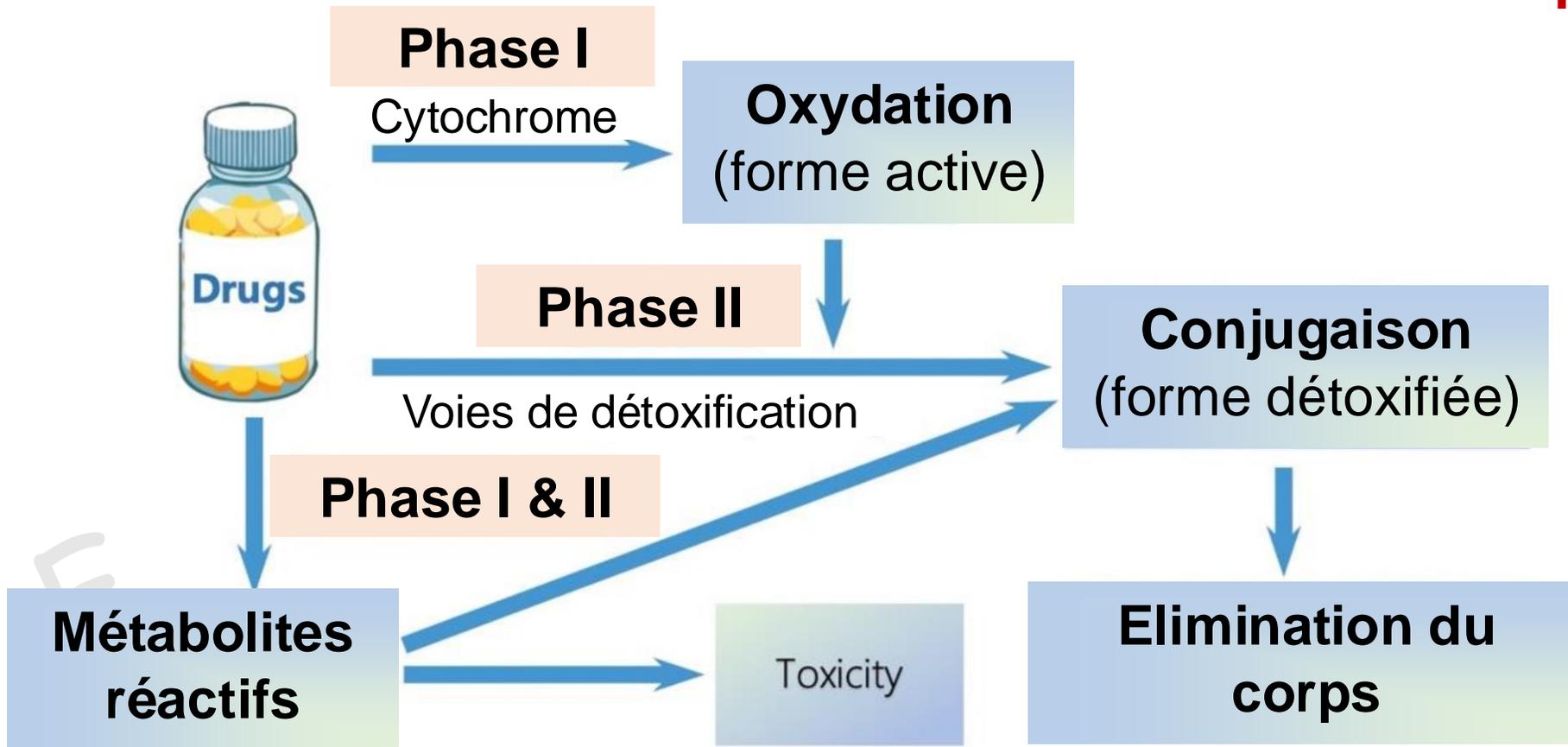
FAPH BIO CELL

5. Applications

5.2. Recherche

Ex. Découverte et de développement de médicaments

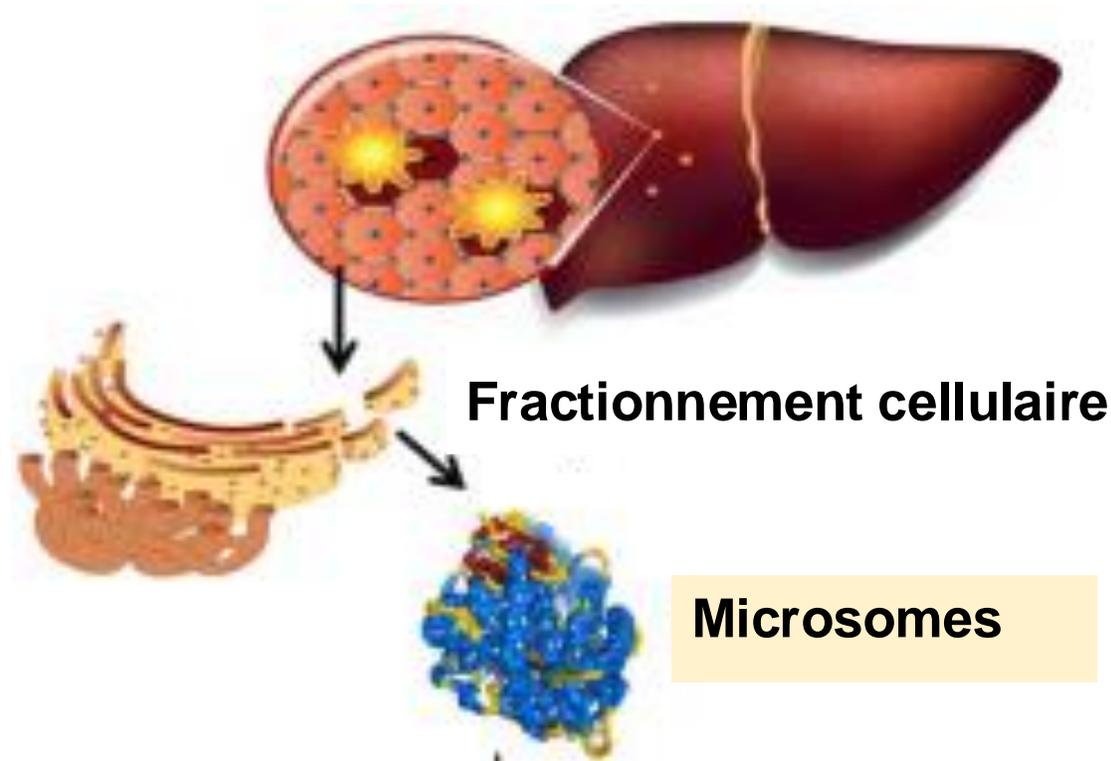
Toxicité



5. Applications

5.2. Recherche

Réticulum
endoplasmique
des hépatocytes



Phase-I

Phase-II

Etudes pharmacodynamiques

5. Applications

5.2. Recherche

Utilisation des microsomes (= vésicules du RE riche en enzymes de métabolisation)

- ❖ Evaluation du métabolisme des médicaments
- ❖ Identification de métabolites toxiques => Prédiction des effets secondaires du médicament
- ❖ Etudier la manière dont un médicament interagit avec des enzymes (dans le foie et autres tissus)

5. Applications

5.2. Recherche

Ex. Etude des fonctions cellulaires

- ❖ Fractionnement cellulaire => Obtention d'une quantité importante d'un organe donnée.
- ❖ Comparaison des organites provenant de 2 types de cellule

FAPH BIO CELL

Conclusion

Les méthodes d'étude des cellules ont permis de mieux comprendre la vie.

Ces méthodes sont utilisés pour diagnostiquer, déchiffrer les bases moléculaires des maladies et de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques.

FAPH BIO CELL