

# I. Généralités sur la cellule

**Objectifs du cours:** être capable de:

- Définir une cellule eucaryote et procaryote
- De faire le schéma d'une cellule (animale ou végétale), d'un virus et d'une bactérie.
- De décrire au moins deux des techniques d'étude de la cellule
- De définir les structures microscopiques et leurs fonctions cellulaires

## 1. Caractères fondamentaux

Les cellules de tous les êtres vivants, qu'elles se présentent en structure organisée autonome ou en unité intégrée dans un ensemble communautaire, ont en commun certains caractères fondamentaux.

### 1.1. Nombre

Mis à part les unicellulaires et les formes qui ont un nombre de cellules constant et spécifique (ex: Rotifères : *Epiphaneosenta*: 959 noyaux cellulaires : Némathelminthes), le nombre de cellules est fonction de la taille du corps. Ce nombre croît jusqu'à la maturité de l'organisme.

Toutes les cellules ne se multiplient pas à la même vitesse. Chez l'homme, toutes les cellules nerveuses sont formées à la naissance, elles sont irremplaçables. Les cellules sanguines et celles des téguments ont une vie courte : Elles sont produites et remplacées de façon continue jusqu'à la mort de l'individu (chaque jour  $2 \times 10^{11}$  cellules sanguines sont formées chez l'homme).

On estime que le corps humain contient 100.000 à 1 million de milliards de cellules et que chaque seconde près de 50 millions de cellules meurent, cependant qu'un même nombre de cellules sont formées.

### 1.2 Forme

Très variable, cela tient à la diversité des fonctions:

- arrondies: (cellules sanguines) en milieu liquide par suite de la tension superficielle: exception: spermatozoïde,
- polyédriques dans un groupement de cellules parce qu'elles s'écrasent mutuellement.

Certaines cellules peuvent changer leur forme par des modifications de leur surface pseudopodes grâce auxquelles elles peuvent se déplacer ou se nourrir, ex: amibes, leucocytes. cellules à

forme étoilée, cas particuliers des cellules nerveuses et certaines cellules du tissu conjonctif

### **1.3 Taille**

Les cellules animales ont un diamètre qui varie en moyenne entre 7 et 20 $\mu$ , celui des virus et bactéries entre 100 à 1000 Å. Les ovules de batraciens et des oiseaux : 1mm à 7cm (autruche)

## **2. Structure microscopique et fonctions cellulaires**

La vie de la cellule se déroule suivant un cycle (cycle cellulaire) à deux phases : l'interphase et la mitose.

L'interphase correspond à la période fonctionnelle d'intenses activités biochimiques. La mitose représente la phase de division cellulaire.

Pendant l'interphase on distingue dans une cellule: une membrane, un cytoplasme contenant des organites et un noyau.

### **- Définition de la cellule**

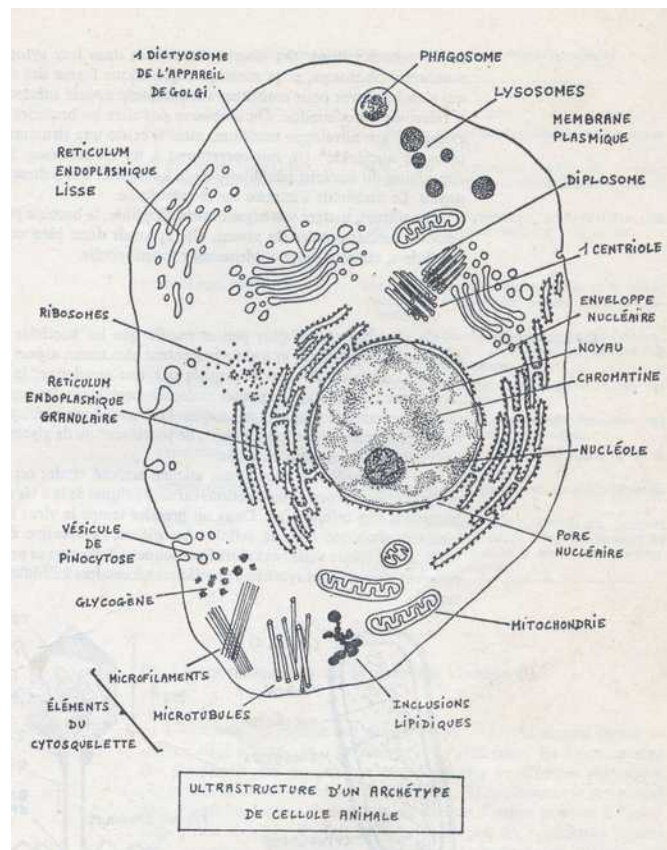
La cellule est un volume de cytoplasme entouré par une membrane cytoplasmique (doublée elle-même, chez les végétaux (d'une paroi) Elle renferme un noyau et différentes structures exception : bactéries cyanophycées sans noyau individualisé, algues et champignons à cellules polyénergides) et se présente isolée ou associée à d'autres cellules.

Les cellules ayant un noyau différencié, limité pas une enveloppe nucléaire sont dites eucaryotes, celles n'ayant pas de noyau bien différencié sont dites procaryotes.

### **2.1 Cellule eucaryote. (Voir Planche 1)**

La cellule animale diffère de la cellule végétale par:

- La présence du centrosome (lequel existe seulement chez les végétaux inférieurs: thallophytes (algues et champignons) et bryophytes (mousses) et ptéridophytes (fougères)
- l'absence de plastes(présent chez chlamydomonas et euglènes)
- l'absence d'une membrane cellulosique
- la présence de vacuoles moins volumineuses
- présence d'enclaves de glycogène



## 2.2 Cellules procaryotes

### a) Les bactéries (voir Planche 2)

Ce sont des organismes unicellulaires caractérisés par une structure simple ( $1\mu$ ) observable au Microscope ordinaire, appareil de Golgi, lysosomes et mitochondries sont absents.

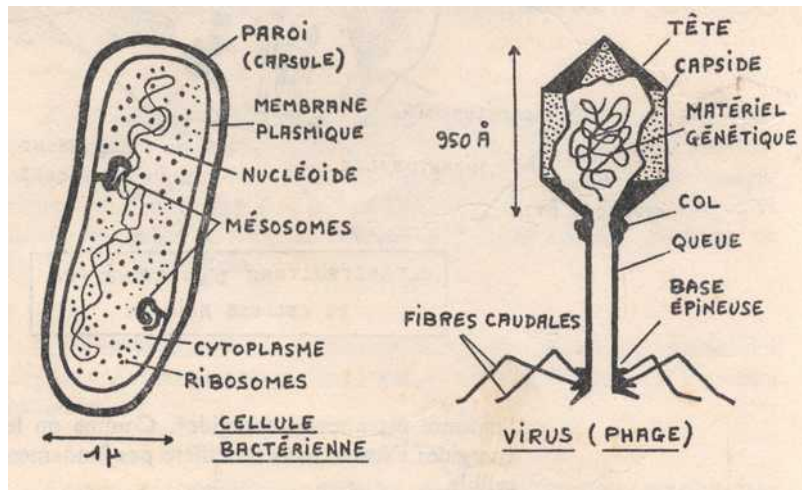
Présence de nombreux ribosomes et d'un mésosome (digitations de la membrane plasmique à fonction mitochondriale) sur lequel se fixe le nucléoïde (chromosome bactérien)

Malgré cette organisation simplifiée, la bactérie présente les activités fondamentales du vivant. (Dualité, noyau-cytoplasme)

### b) Les virus (voir Planche 2).

Ils ne présentent pas d'aspect cellulaire: matériel génétique enveloppé dans une capsid observable seulement au microscope électronique. Un virus isolé ne présente aucune manifestation de vie.

Les virus peuvent néanmoins présenter certaines fonctions vitales lorsqu'ils parasitent une cellule hôte. Il existe des virus à ADN et des virus à ARN.



### 2.3. Principales structures et fonctions cellulaires.

Structure	Fonction
<b>Noyau</b> : chromatine (interphase)	
Chromosome div.cellulaire.	centre de contrôle de la croissance et de la reproduction cellulaire support de l'information héréditaire pendant l'interphase règle le fonctionnement C <sup>re</sup>
	Marque une discontinuité mais autorise des échanges entre le cytoplasme et le noyau.
<b>Cytoplasme</b>	
Membrane cytoplasmique	Règle les échanges entre la cellule et le milieu extérieur. Perméabilité passiv eou active ou selective
	Sépare deux phases cellulaires, surface membranaire active intracytoplasmique, réseau de transport et de stockage.
Ribosomes	Granulations du reticulum rugueux. Siège dessynthèses protéiques.
Appareil de golgi, dictyosome	Stockage, maturation et conditionnement dessubstances élaborées par la cellule.
Lysosomes, Peroxysomes	Vésicules contenant les enzymes digestivesdigestives de la cellule.
Mitochondries	Organites membranaires, centrales énergétiquesde la cellule.
Hyaloplasme	Substance fondamentale du cytoplasme. Supportdes organes cellulaires. Tous les éléments du métabolisme cellulaire y transitent Microtubules, microfilaments.

## 3 Méthodes d'étude de la cellule

### 3.1 Méthodes morphologiques:

#### 3.1.1. Microscopie photonique

- Source lumineuse visible: lumière naturelle ou électrique (radiations électromagnétiques lumineuses)
- Longueur d'onde entre 0,4μ (violet) et 0,8μ (rouge)
- Pouvoir séparateur 0,4μ ou mieux 0,2μ
- - Grossissement courant 1000 fois, 2500 pour les appareils les plus

perfectionnés fonctionnant au uv.

La microscopie photonique permet d'étudier la cellule vivante traitée ou non par un colorant vital (rouge, neutre, vert jaune iode..).

L'observation se fait directement entre lame et lamelle. On peut pratiquer au cours de l'observation une microdissection à l'aide de micromanipulateurs ou encore filmer les phénomènes qui se déroulent sous le microscope (microcinématographie de la mitose des mouvements de cyclose ou encore des contractions de vacuoles)  
La Microdissection renseigne sur la consistance cellulaire et permet l'ablation de territoire cellulaire et des griffes de noyaux.

La microscopie photonique permet également l'étude de la cellule tuée et colorée. La préparation du matériel se fait en deux phases :

- Fixation :

C'est le procédé par lequel on tue la cellule tout en gardant sa structure intacte. Elle consiste à l'immersion pendant un certain temps d'un petit fragment d'organe dans le fixateur.

On distingue des fixateurs physiques (chaleur froid) et des fixateurs chimiques (Alcool, Bichromate de K; Sels D'argent, Ac. osmique.)

- INCLUSION

Après la fixation le fragment d'organe déshydraté est inclus dans de la paraffine liquide. Après solidification de la paraffine par abaissement de la température, on obtient un bloc d'inclusion que l'on découpe en coupes minces à l'aide d'un microtome (épaisseur 1 à 7 $\mu$ ). Ces coupes sont collées sur une lame de verre, déparaffinées, réhydratées, colorées puis recouvertes de baume du Canada. On les recouvre ensuite d'une lamelle et on les observe au microscope.

### **3.1.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**

(De Broglie, 1931).

- Source : électrons: Particules à charges négatives de longueur plus petite que celle des radiations lumineuses. Flux d'électrons émis par la cathode: radiations électroniques.

- - Pouvoir séparateur 0,4A.
- - DDP entre cathode anode. 100.000V.
- - Vitesse des électrons. 164.000 Km/s
- - Grossissement. De 100.000 à 600.000.
- - Hauteur. 2m. Poids. 500kg.
- - Consommation 2500W

La microscopie électronique ne permet pas l'étude de cellule vivante car les objets examinés doivent être placés sous vide très élevé

( $10^{-5}$  d'Hg) nécessaire au déplacement des électrons.

Les préparations (fixation et inclusion) sont faites suivant les mêmes étapes qu'en microscopie photonique. Les fixateurs utilisés sont: tetroxyde d'osmium, ( $O_5O_4$ ), le formaldéhyde, H-CHO glutaraldehyde  $CHO(CH_2)_3-CHO$ , le permanganate de potassium ( $KMnO_4$ ).

Après la fixation, l'inclusion se fait dans une résine (épon, araldite, vestopal) ou un plastique (métacrylate de butyle ou de méthyle) Puis les blocs sont coupés à l'ultramicrotome ( $0,03\mu$ ) et recueillies à la surface d'une solution acétonique.

Les meilleures coupes de couleur jaune claire ( $0,03\mu$ ) sont placées sur un tamis de bronze ou de cuivre que l'on dépose sur un porte-objet. Ce dernier est inséré dans la colonne du M.E. Comme contrastant, on utilise des sels de plomb, d'uranium ou de tungstène, la structure apparaît en noir sur un fond clair (électron-dense)

les observations en microscopie électronique peuvent être améliorées par des techniques particulières comme:

#### -Ombrage métallique

On fait vaporiser sous vide sur les éléments à étudier (Cellule entière, constituants cellulaires, bactérie ou virus), un métal lourd (or), de la silice ou du carbone. Un effet d'ombrage se crée en raison du relief des objets (étude du relief et des dimensions des objets)

#### -Coloration négative (Hall 1955)

L'objet étudié (en réalité non coloré) est entouré d'un dépôt électron-dense de sel de l'acide phosphotungstique. Cette suspension est déposée sur une grille recouverte d'un film de collodion (solution de nitrocellulose dans un mélange d'alcool et d'éther pour la photographie)

En séchant, le phosphotungstate de Na crée un écran entre les structures qui seules laissent passer les électrons. On obtient des images en négatif. Cette propriété est utilisée pour visualiser les structures qui ne sont pas suffisamment denses.

#### - Cryodécoupage (Steere 1957)

L'objet étudié est congelé rapidement, puis fracturé sous vide par une lame refroidie. La surface de fracture suit les reliefs membranaires. L'opération se poursuit par la technique de l'ombrage métallique pour l'étude des reliefs.

## **3.2. Méthodes cytochimiques, biochimiques et cytophysiques**

### **3.2.1. Coloration et méthodes cytochimiques**

Divers colorants sont utilisés pour obtenir des indications sur les substances entrant dans la composition des structures colorants acides se fixent sur les structures basiques. Colorants basiques ont une affinité pour les structures à caractère acide.

Les colorants d'oxydo-réduction mettent en évidence les régions oxydantes ou réductrices de la cellule, leur couleur varie selon qu'ils sont réduits ou oxydés.

### **3.2.2. Autoradiographie**

On met à la disposition de la cellule, des précurseurs radio-Actifs ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131-125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) qui seront métabolisés. Elle permet de localiser les structures sur lesquelles sont incorporés les précurseurs radioactifs (sites de synthèse) et de suivre par exemple le déroulement d'un processus métabolique ou les déplacements dans la cellule d'un composé marqué. Isotopes lourds ou stables  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ .

### **3.2.3. Fractionnement**

Séparation des divers constituants cellulaires.

#### a) centrifugation simple

Broyage ménagé des cellules qui ensuite maintenues dans une solution isotonique: on obtient ainsi un homogénat. Toutes les opérations se font à basse température ( $0^\circ\text{C}$ ) pour empêcher d'éventuelles réactions biochimiques au sein du mélange. L'homogénat est centrifugé une première fois à faible vitesse (700g) pendant un temps très court (10mn) Le culot contenant les particules lourdes (noyaux) est séparé du surnageant contenant les particules légères. Le surnageant subit une nouvelle centrifugation (séparation culot-surnageant) et ainsi de suite.

#### b) centrifugation de zone et centrifugation à équilibre de densité (isopycnique).

C'est un procédé de fractionnement suivant un gradient de densité (gradient de saccharose, de  $\text{C}_5\text{Cl}$ , eau lourde  $\text{O}_2\text{O}$ ). Après centrifugation les particules se répartissent dans les zones du gradient dont la densité correspond à leur densité propre.

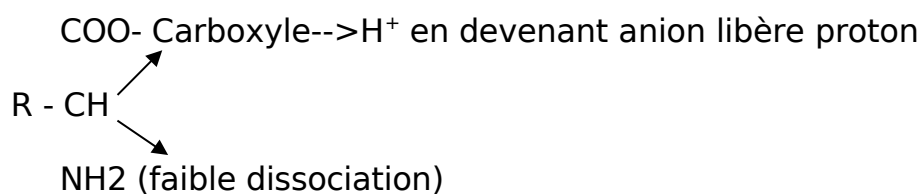
### **3.2.4. Chromatographie**

- sur colonne
- sur papier.
- sur colonne...etc.

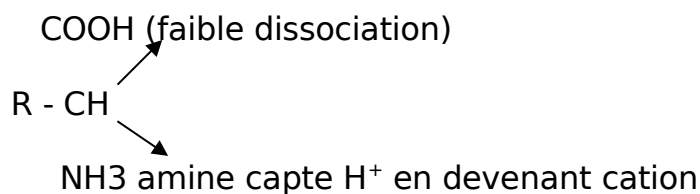
### 3.2.5. Electrophorèse

C'est la séparation des protéines suivant leurs charges électriques et/ou leur poids moléculaire. Les protéines sont des poly-électrolytes amphotères. Les radicaux  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  proximaux n'entrent pas en ligne de compte car, à l'exception de ceux des acides aminés terminaux, ils sont engagés dans des liaisons peptidiques ( $\text{SO-NH}$ ). N'interviennent que les groupements distaux des AA polaires acides (GLU, ASP) et basiques (LYS, ARG, HIS).

- Dans un milieu basique les protéines se comportent comme un anion (charge négative), elles migrent vers l'anode chargée positivement.



- En milieu acide, elles se comportent comme un cation (Charge positive), elles migrent vers la cathode chargée négativement.



- Point isoélectrique : les deux dissociations sont égales, on obtient un ion mixte qui ne migre pas.

Il existe plusieurs types d'électrophorèse:

- Electrophorèse sur papier
- Electrophorèse sur gel.

### 3.3. Méthodes physiologiques et expérimentales.

#### 3.3.1. Dosages immunologiques.

a) Dosage radio-immunologique RIA

\* Dosage d'anticorps

- L'antigène en solution saline incubé dans une plaque de microtitration est absorbé en partie sur la surface plastique l'antigène libre est éliminé par lavage.



- La plaque est ensuite bloquée par un excès de protéine étrangère pour prévenir toute fixation non spécifique.
- L'anticorps à doser est ajouté et se fixe à l'antigène
- Les protéines libres sont éliminées par lavage
- L'anticorps est détecté par un ligand radiomarqué. Le ligand libre est éliminé par lavage et la radioactivité de la plaque est comptée dans un compteur gamma ou un compteur à scintillation liquide ( $\beta$ )  
Fixation spécifique 20 à 100 fois supérieure au bruit de fond. Par une réaction inverse, on peut détecter la présence ou l'absence de l'antigène en utilisant un anticorps spécifique.

Ex : détection des sporozoïtes dans les moustiques à partir d'anticorps anti *P. falciparum*.

#### b) Dosage immuno-enzymatique: ELISA

La plaque d'ELISA est préparée comme le RIA jusqu'à l'étape 4. le ligand est une molécule couplée à une enzyme telle que la peroxy-dase  
Il se fixe à l'anticorps à doser et après lavage est révélé par l'addition d'un substrat incolore activé par la portion enzymatique du ligand pour donner un produit coloré. La quantité d'anticorps est déterminée à partir de la Densité optique induite/ apparition du produit coloré.

Il faut toujours prendre soin de disposer de témoins positifs et négatifs.

#### **3.3.2 Production d'anticorps monoclonaux:** (biotechnologie, 1975)

- Animaux (souris ou rats) immunisés avec l'antigène.
- Les lymphocytes spléniques sont préparés et fusionnés avec les cellules d'une lignée de myélome (tumeur de lymphocytes B) par addition de polyéthylène glycol (PEG) qui induit la fusion membranaire. Seulement une petite portion des cellules fusionne avec succès (5%).
- Le mélange est ensuite mis en culture dans un milieu contenant HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine)  
C'est un milieu de sélection pour empêcher la croissance des cellules de myélome après la fusion avec les lymphocytes. Les cellules spléniques peuvent pousser en milieu HAT mais les cellules de myélome ont un défaut métabolique (manque d'Hypoxanthine Phosphoriboxyl Transférase HPRT et ne peuvent utiliser le shunt de sorte qu'elles meurent en milieu HAT.
- La culture développée en milieu HAT, contient les cellules spléniques, les cellules du myélome et les hybrides (hybridome)

Les premières meurent naturellement après une à deux semaines (milieu de culture pauvre), les secondes sont tuées par le HAT, mais les hybrides survivent car ils ont l'immortalité des cellules du myélome et le shunt métabolique des cellules spléniques. Certaines auront également la capacité de produire des anticorps comme les cellules spléniques.

Tous les puits contenant des cellules se multipliant sont testés pour la production d'anticorps souhaité (par RIA ou par ELISA) et s'ils sont positifs, la culture est clonée c'est à dire réparti dans des plaques de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits (centrifugation dilution ou support semisolide, transfert pipette PASTEUR)

Cela donne un clone cellulaire provenant d'une seule souche qui est à la fois immortelle et productrice d'anti-corps (monoclonal)

### 3.3.3 Génie Génétique

C'est la formation de nouvelles combinaisons dans le matériel génétique, par insertion de molécules d'acides nucléiques (isolées du reste de l'organisme) par un **système vectoriel** quelconque permettant l'incorporation dans un hôte capable d'assurer sa propagation continue.

Il comprend 5 étapes principales:

- L'isolement d'une **séquence d'acide nucléique**, idéalement un **gène**, (enzyme de restriction)
- L'insertion de ce gène dans un **vecteur** (plasmide ou phage),
- L'incorporation de ce vecteur dans un **hôte** (généralement *E. coli*), mais plus récemment les cellules eucaryotes et même de mammifères)  
**Transfection.**
- L'hôte ainsi transformé peut assurer la propagation du vecteur à chaque cycle de réplication, et par conséquent, de la séquence génétique qui y est insérée.

Dans la mesure où une telle séquence est conservée après chaque cycle de réplication, on aboutit à la formation d'un **clone** (puisque par ce type de transmission se propage dans une lignée tout un ensemble de cellules qui sont génétiquement identiques d'une génération à la suivante). Initialement présente sous la forme d'un seul gène (ou plus exactement d'un petit nombre de copie), la séquence insérée va ainsi être propagée à un grand nombre d'exemplaires: on dit qu'elle est **amplifiée**.

Dans certains cas il sera possible de faire traduire (**s'exprimer**) la séquence génétique insérée et amplifiée qui sera donc fonctionnelle en dehors de l'organisme dont elle est initialement issue.

Les ensembles géniques insérés dans les clones constituent des **banques génomiques** ou banques d'ADNC (bibliothèques)

**Application:** productions d'antigènes d'agents pathogènes pouvant être utilisées dans la production de **vaccins**.

### **Emploi de sonde d'ADN pour le diagnostic du paludisme**

- Prélèvement de sang sur sujet parasité
- Lyse des cellules sur plaque de microtitrage
- Transférer l'échantillon sur filtre de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de microtransfert (Technique de buvardage ou blotting)
- Incuber pendant 10 minutes dans NaOH, puis 10 minutes dans du tampon à température ambiante
- Chauffer à l'étuve à 50°C pendant une heure
- Ajouter la sonde d'ADN marquée (<sup>32</sup>P) pendant au moins quatre heures à 42°C, afin de l'hybrider avec l'ADN cible. Couvrir avec une plaque d'autoradiographie
- Développer pendant 6 heures en chambre noire.