



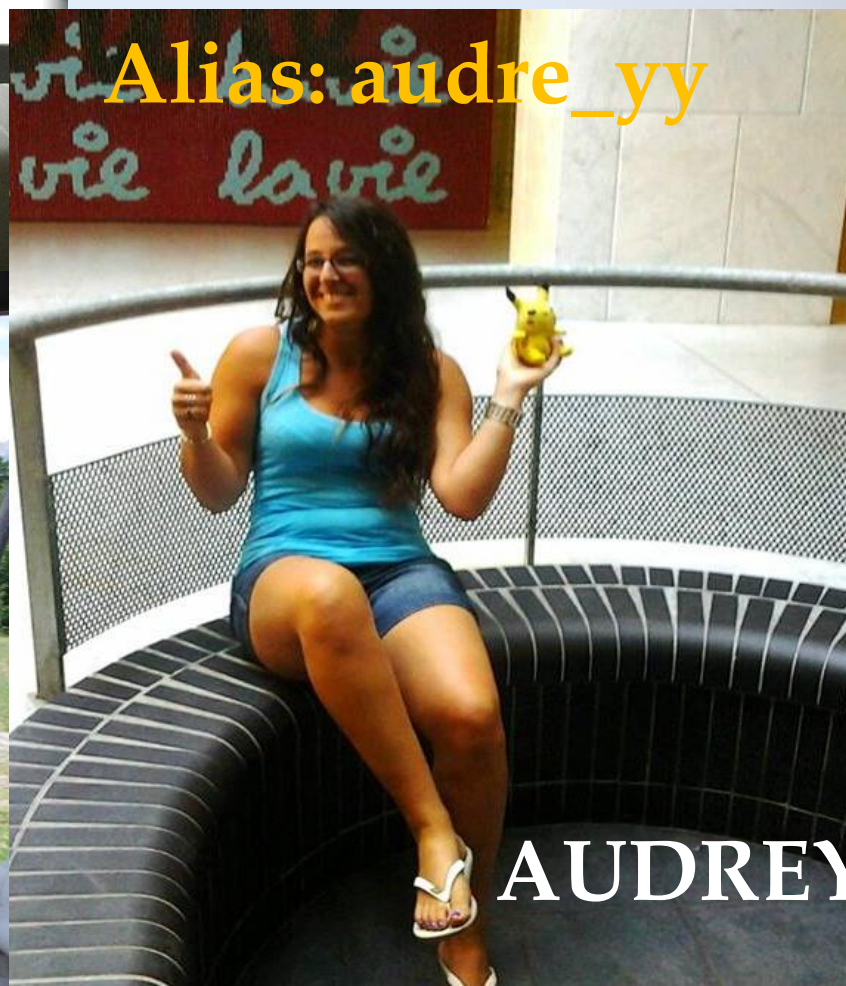
Biologie cellulaire

Tut' rentrée: 2013-2014

Les tutrices



CHLOE



Alias: audre_yy

AUDREY



LEONOR

Alias:
rockfort

Présentation de la matière

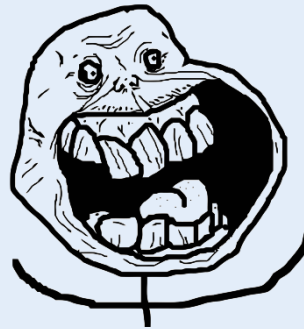
- Professeur : Eric Gilson
- Nombre d'heures: 30H
- **Chapitres:**
 - Introduction à la biologie cellulaire
 - Méthodes d'étude de la cellule
 - Compartiments membranaires de la cellule
 - Endocytose et exocytose
 - Cytosquelette & mitochondrie
 - Cycle cellulaire
 - Structure et fonctionnement du noyau
 - Notions de génétique et épigénétique
 - Mort cellulaire
 - Signalisation cellulaire



Présentation de la matière

- UE2 = 45 QCM = 1H
- 15 QCM

- Des expériences !!



- **Coeff 10 = pas d'impasse**
- **Compréhension et par <3**

SOMMAIRE

I- Introduction

La cellule

Origine et évolution

Cellules souches

Homéostasie

II- Méthode d'observation des cellules

Les différentes microscopie photonique

La fluorescence: principe

La fluorescence : exemple d'application

Microscopie électronique

INTRODUCTION

- ❖ Etude de la composition et du fonctionnement des cellules
- ❖ 10^{14} cellules
- ❖ 10^{15} bactéries non pathologiques

Rappel

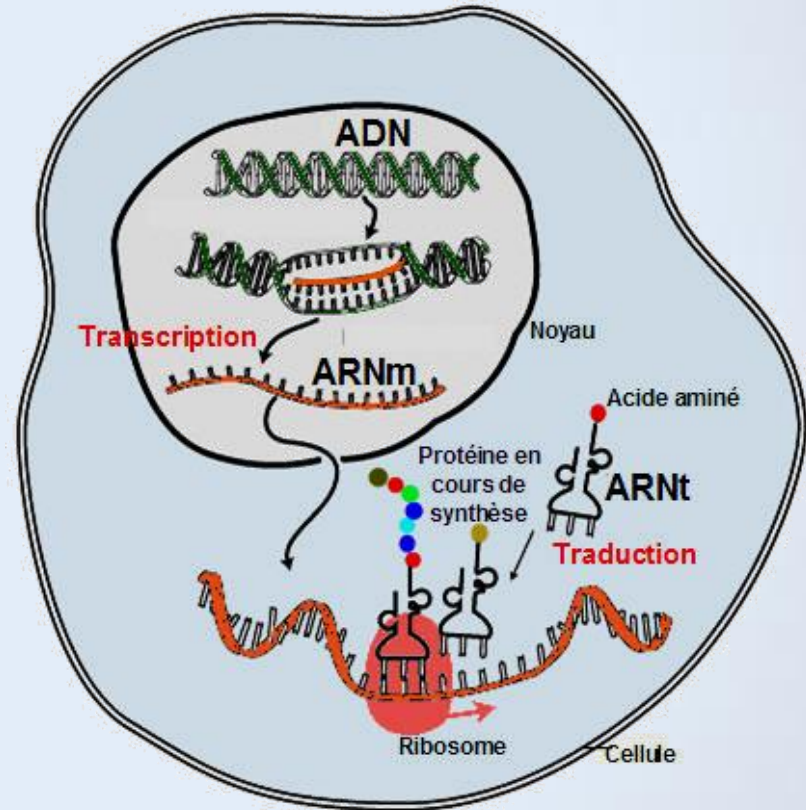
ADN

↓ *transcription*

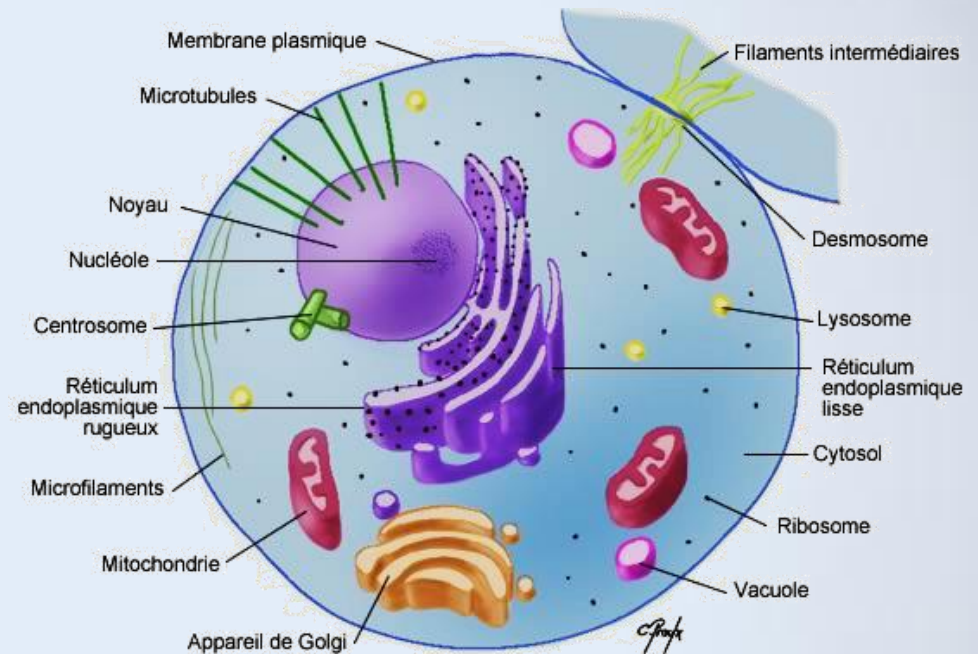
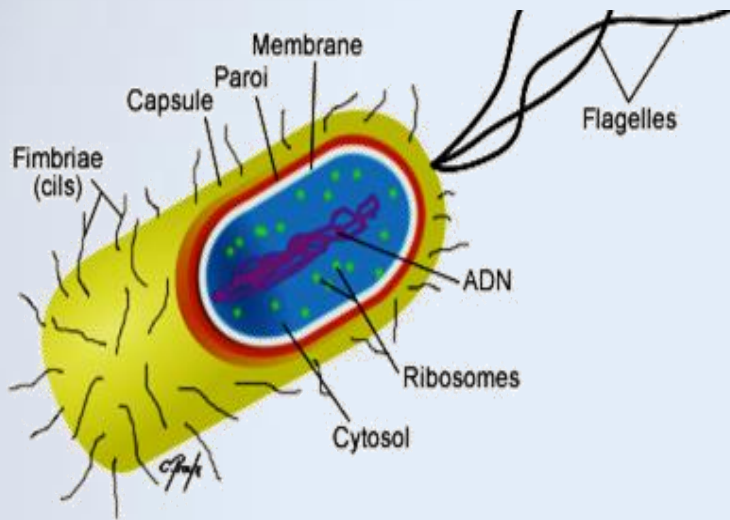
ARN

↓ *traduction*

PROTÉINES



DIFFERENCE PROCARYOTE-EUCARYOTE



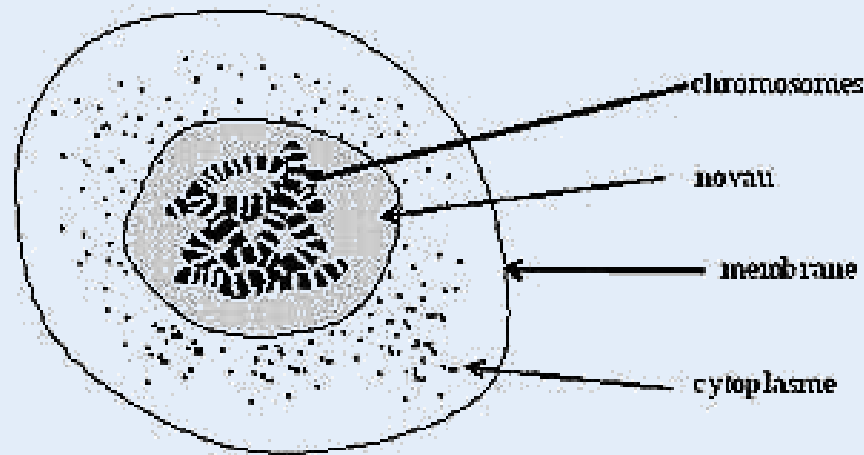
PROCARYOTE	EUCARYOTE
PAS DE NOYAU & PAS D'ORGANITES	ORGANITES dont NOYAU
Traduction co-transcriptionnelle	Traduction post-transcriptionnelle
Cellule de petite taille	Cellule de grande taille

Systeme Endomenbranaire

- **Ensemble de cavités**
- **Systeme délimité par des membranes**
- **Communication entre cavités par vésicules membranaires**

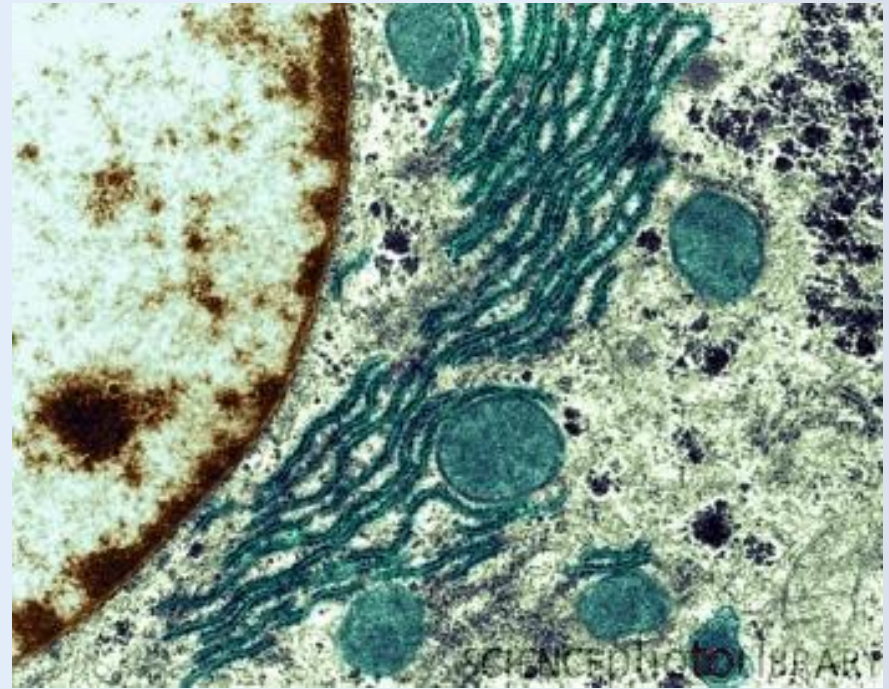
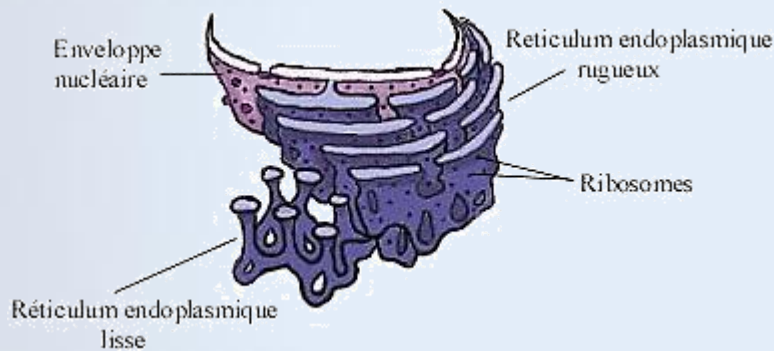
Systeme Endomenbranaire

L'enveloppe nucléaire



Systeme Endomenbranaire

Le réticulum endoplasmique (RE)



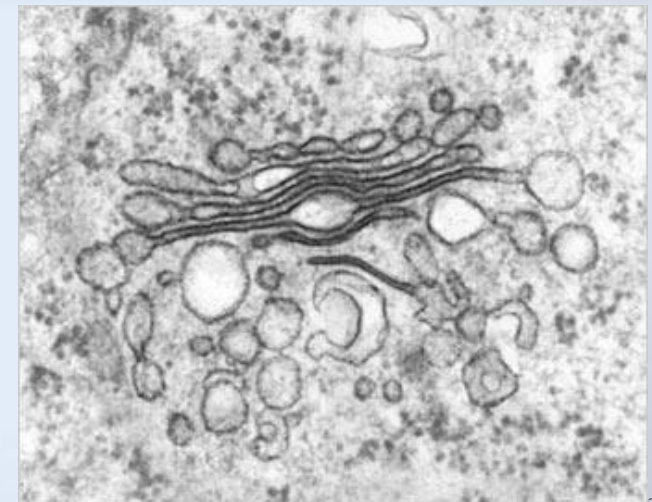
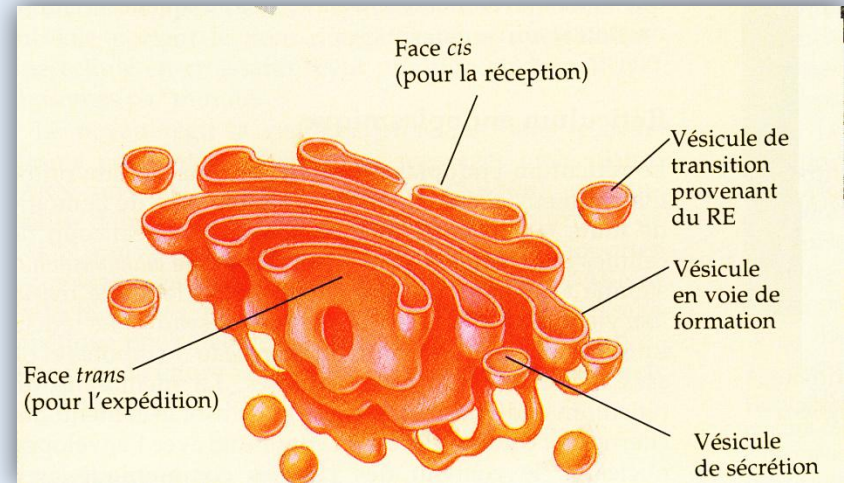
➤ **Effectue la 1^{ère} modification des protéines et lipides**

● Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite

Systeme Endomenbranaire

L'appareil de golgi

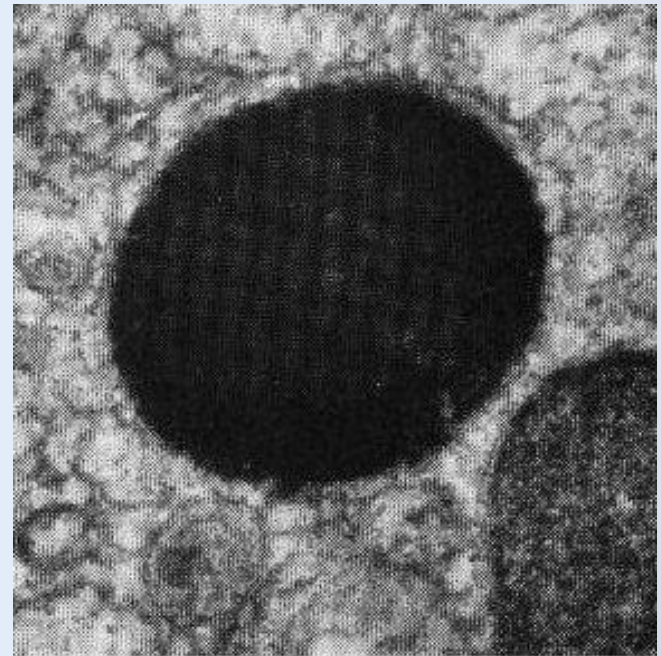
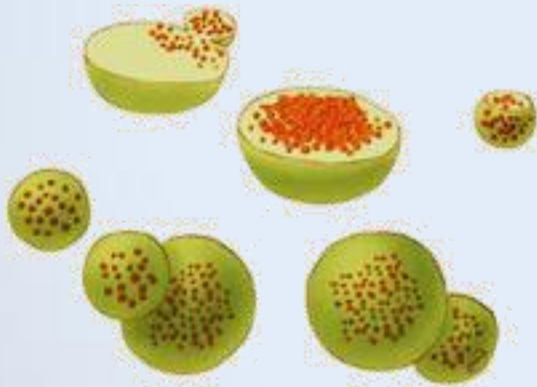
- 1 seul par cellule
- Composé de dictyosomes
- Rôle majeur dans l'exocytose
- Lien entre RE et membrane plasmique
- Régule le transport vésiculaire
- Modifie les protéines (glycosylation, Sulfatation...)



Systeme Endomenbranaire

Le lysosome

➤ Dégrade des composés intracellulaire

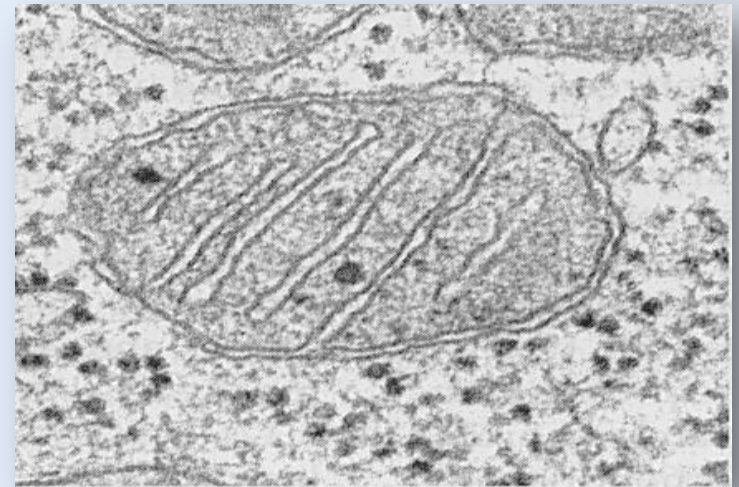


Organites isolés

(pas dans le système endomembranaire)

La mitochondrie

- **Source d'énergie principale de la cellule**
- **Produit l'ATP (adénosine triphosphate)**
- **Possède une partie de l'info génétique (ADN mitochondrial)**

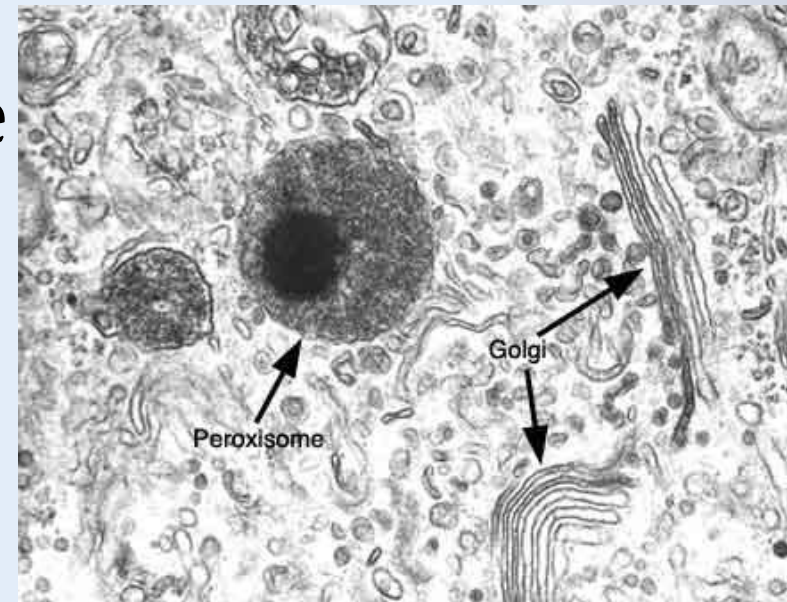
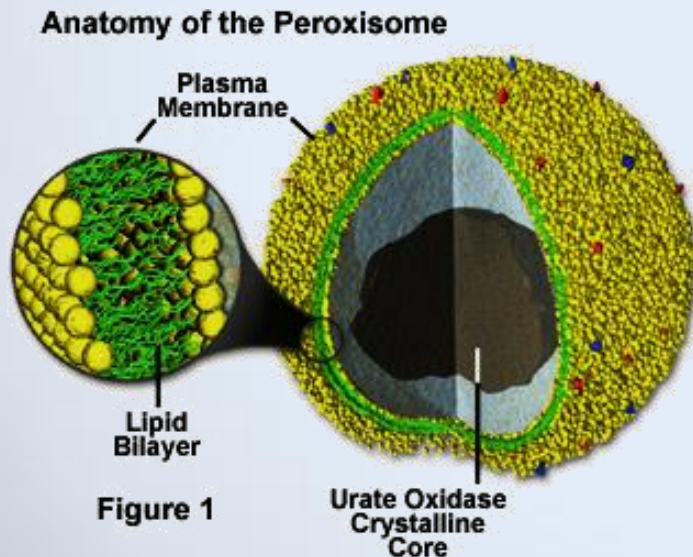


Organites isolés

(pas dans le système endomembranaire)

Peroxisome

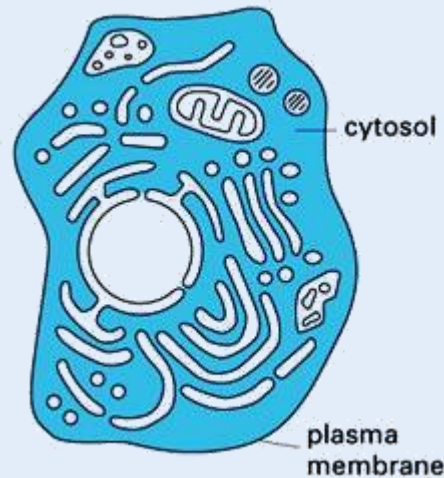
➤ Détoxification de la cellule



CYTOSOL

(pas un organelle)

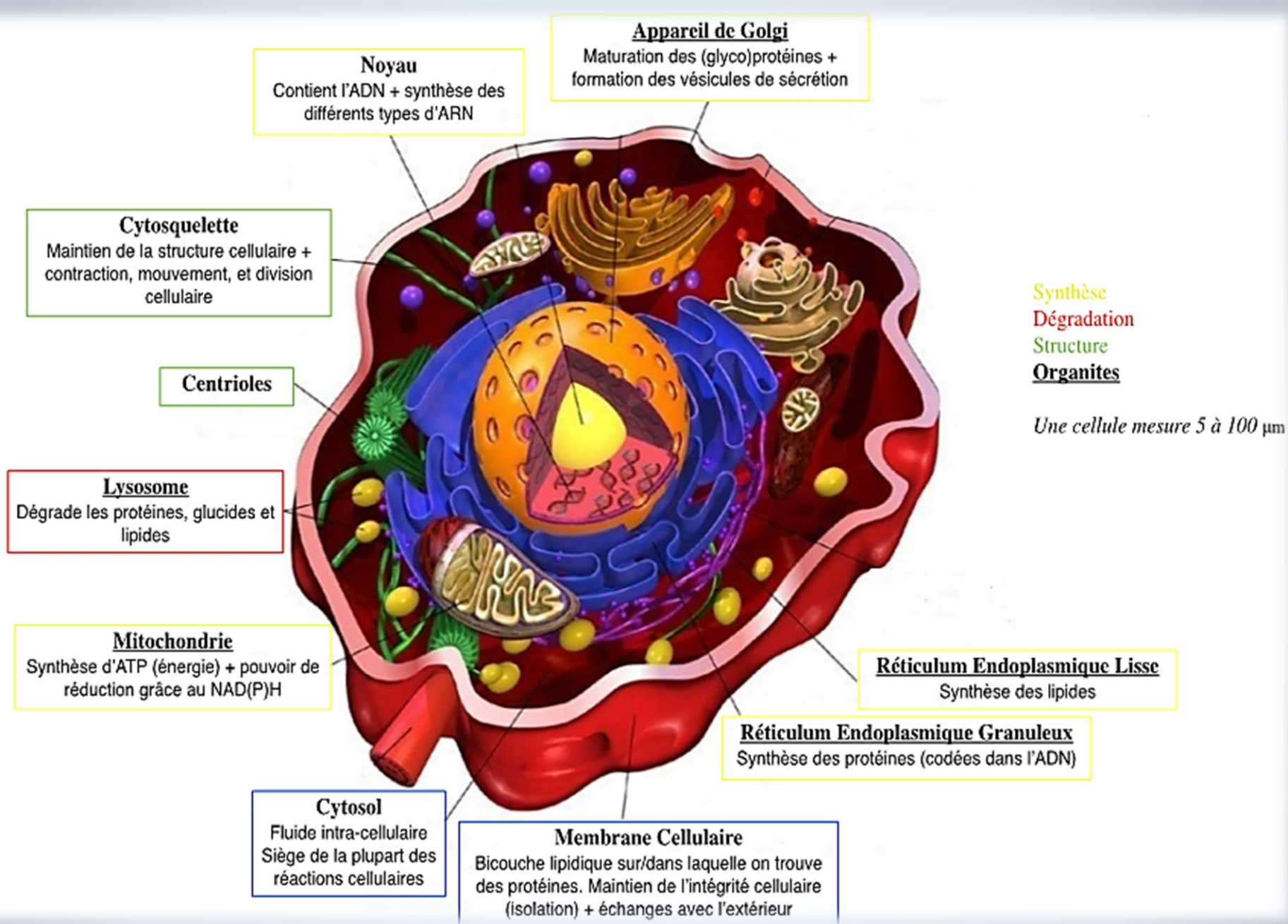
➤ **Partie liquide de la cellule où baignent les organites**



Cytosquelette

Revue dans le cours 3

➤ **Confère des propriétés mécaniques à la cellule**

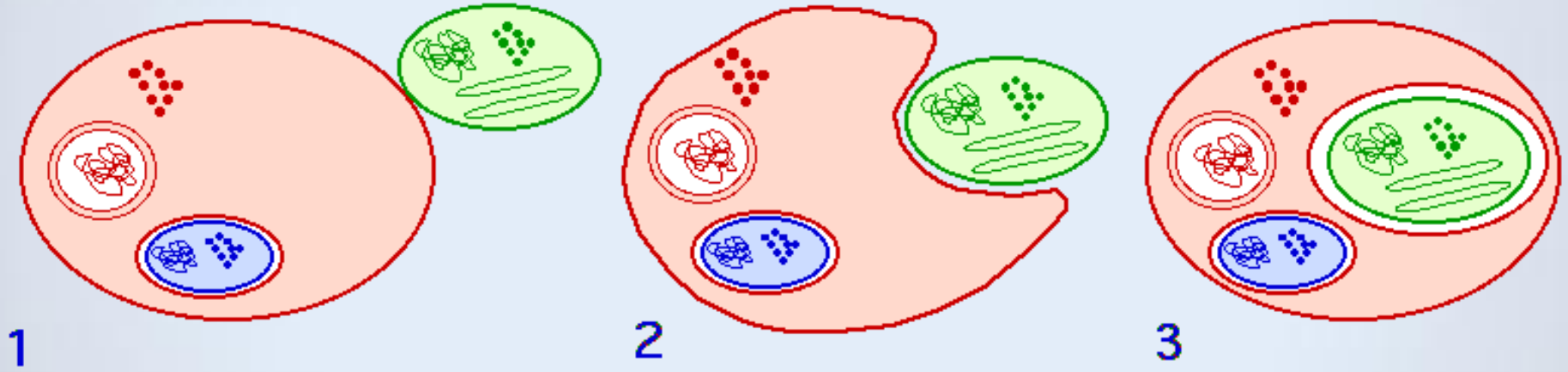


Evolution cellulaire

- ❑ 3 groupes ayant un **ancêtre commun hypothétique**: LUCAS
 - **Eu-bactéries (=bactéries)** (procaryotes)
 - **Archae-bactéries** (procaryotes) → se rapprochent le plus des eucaryotes
 - **Eucaryotes**

Les hypothèses sur l'origine des cellules

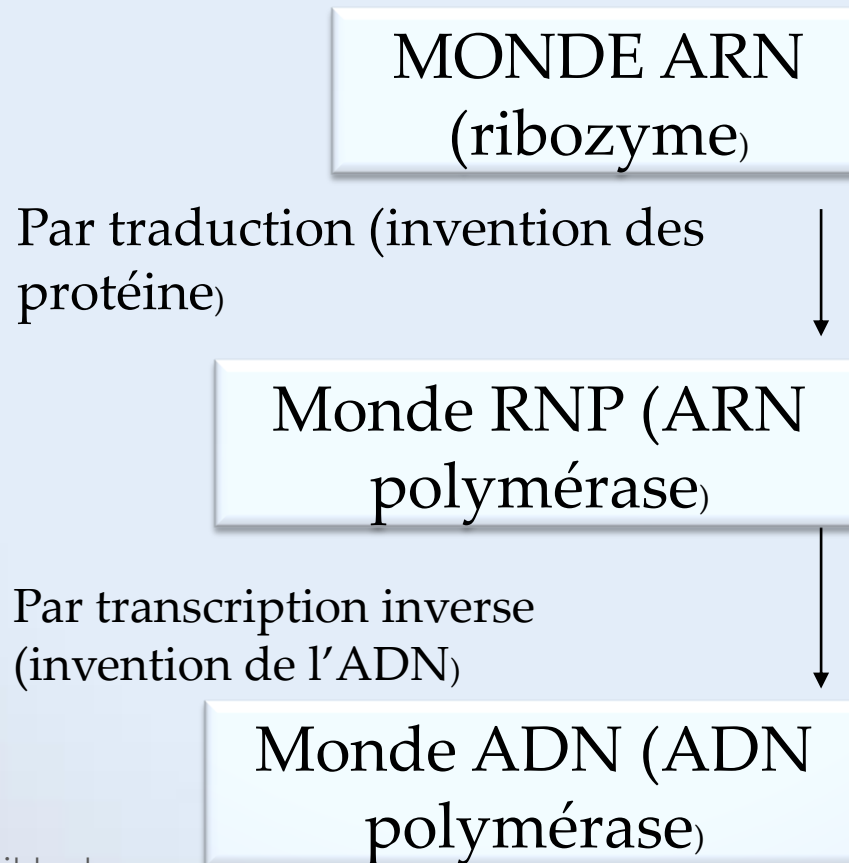
Théorie de l'endosymbionte



➤ Les eucaryotes seraient apparus par l'endocytose de la bactérie par l'archaé

Les hypothèses sur l'origine des cellules

Théorie du monde ARN



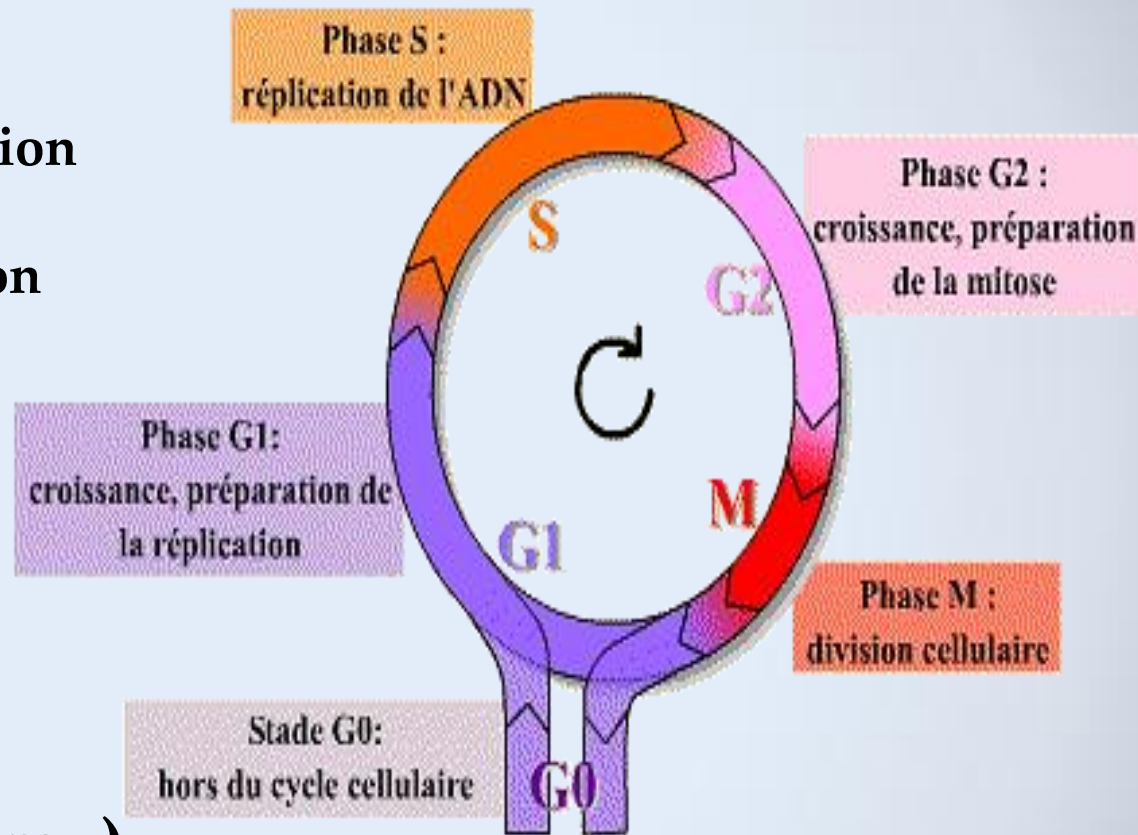
Cycle cellulaire

INTERPHASE:

- Phase G1
 - Phase S
 - Phase G2
- } Transcription
+
Traduction

MITOSE (PHASE M)

- Caryocinèse
(division du noyau)
- Cytocinèse
(division du cytoplasme)



Cycle cellulaire

Arrivé en phase G0 la cellule a plusieurs possibilités pour son devenir:

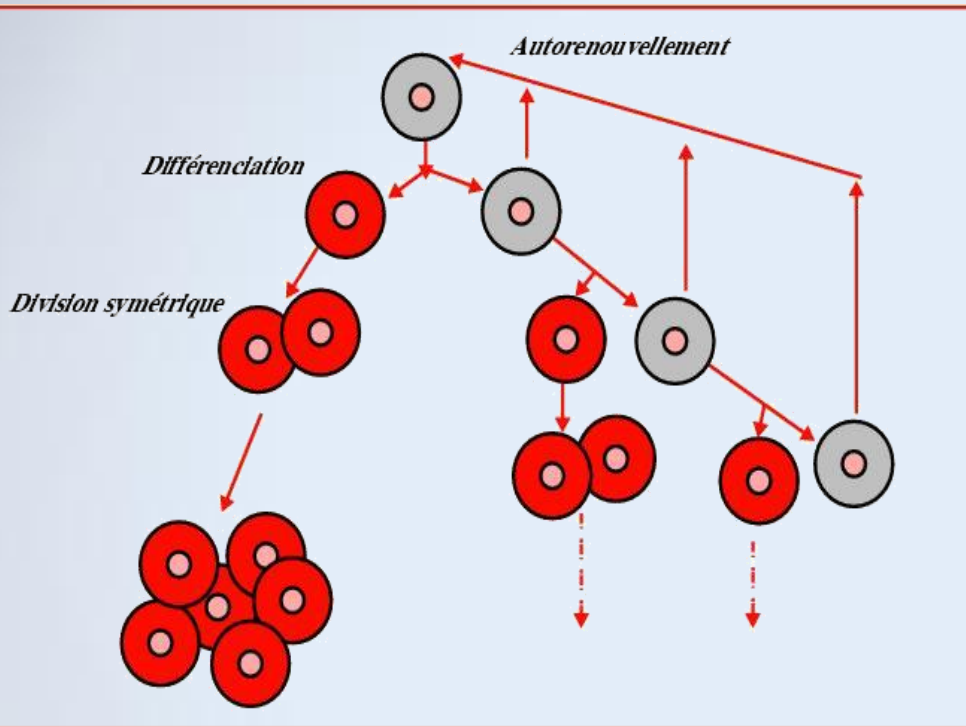
Entrée en phase S

Quiescence

Sénescence → cellule métaboliquement active

Différenciation

Cellules souches



- **Non différencié**
- **Se divise de façon asymétrique**
- **Se différencie à la demande (signaux)**

Cellules souches

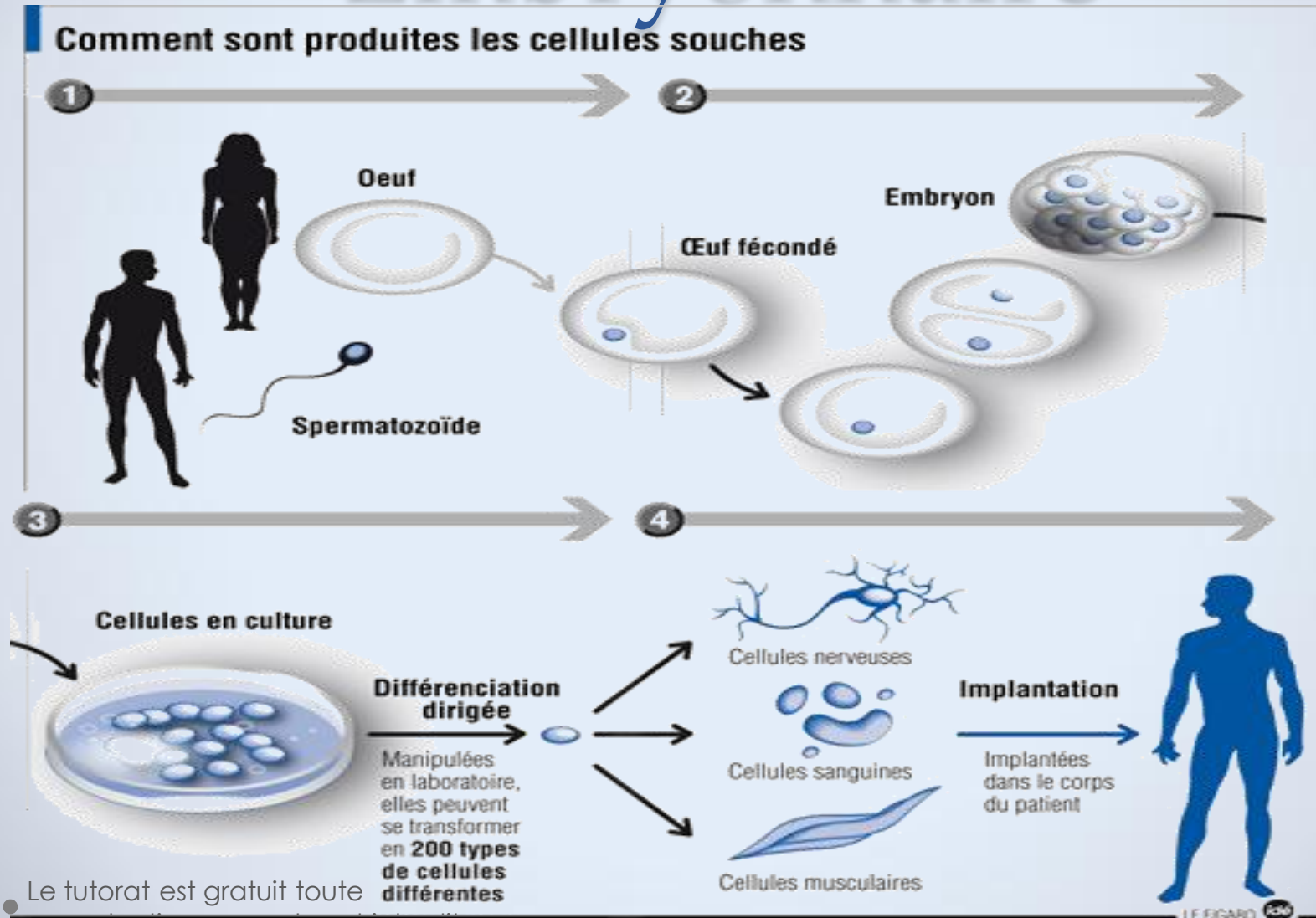
4 catégories:

- Totipotente
- Pluripotente
- Multipotente
- Unipotente

Cellules souches Embryonnaire

- **Pluripotente (stade blastocyste)**
- **Pas de rejet**
- **Problème éthique car on doit créer des embryons pour les obtenir**
- **Problème de tumeur**

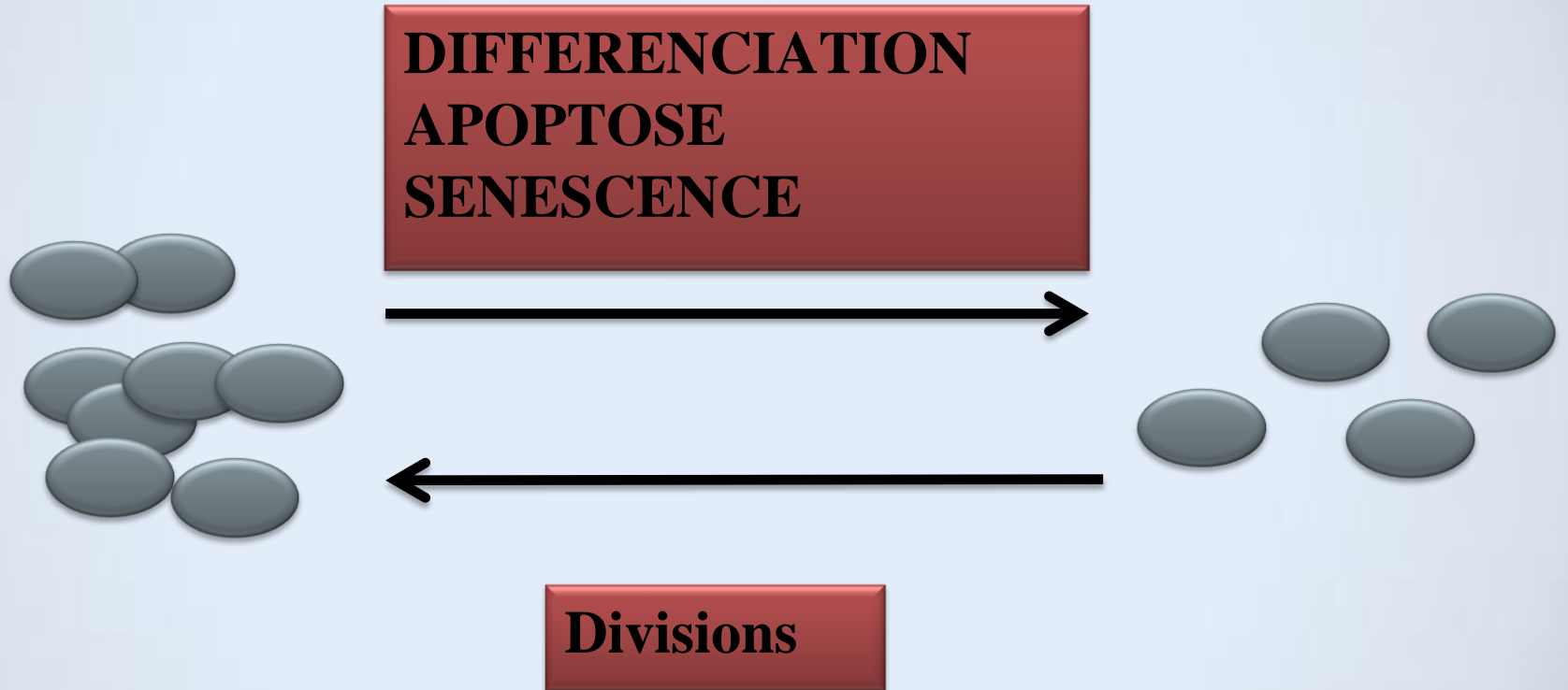
Cellules souches Embryonnaires



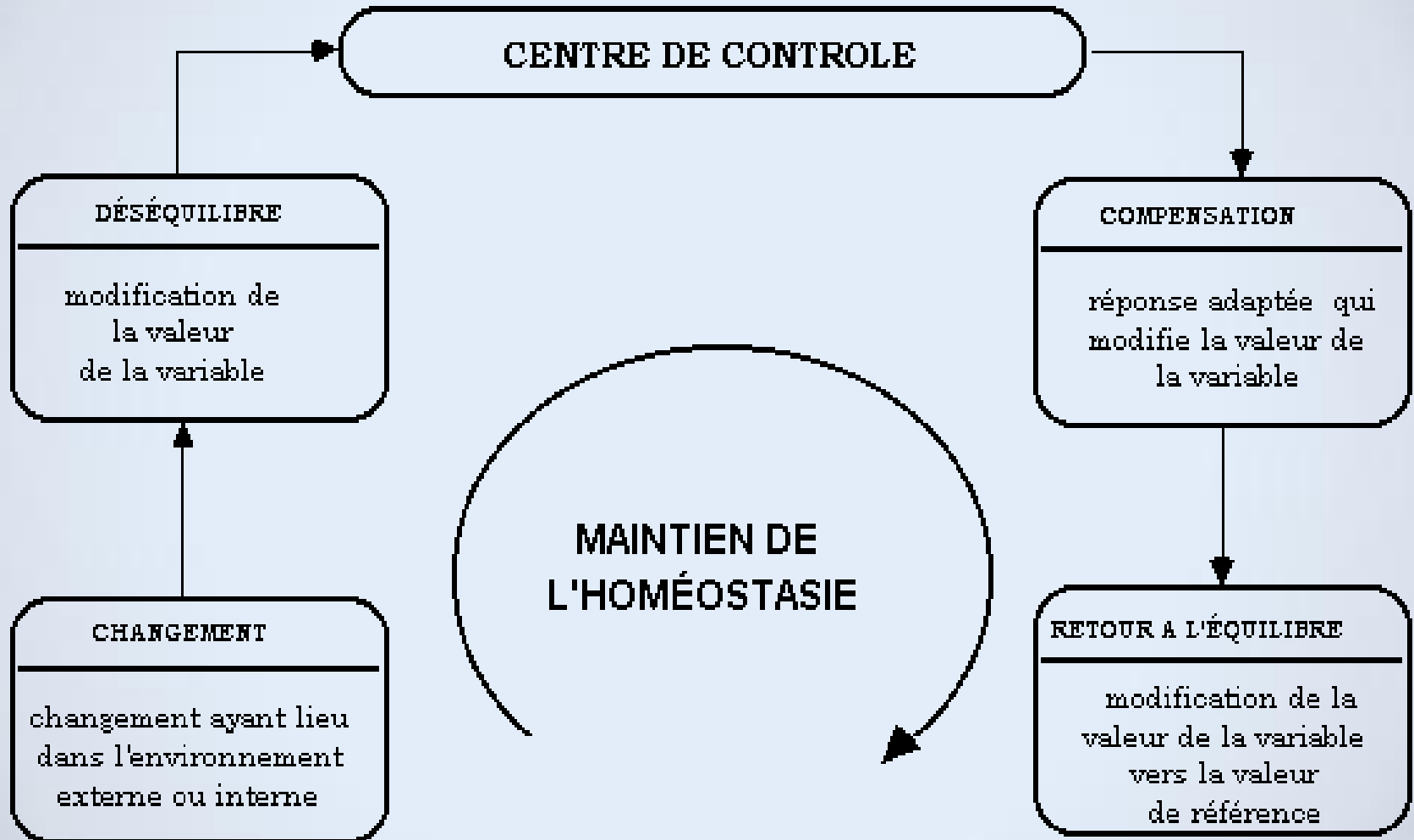


Homéostasie

Maintient un nombre constant de cellules



Homéostasie



Homéostasie

Dérèglement du système:

- **Augmentation de la capacité de division des cellules**
- **Diminution des processus d'apoptose, sénescence, différenciation**

Méthode d'observation des cellules

MICROSCOPIE OPTIQUE

- Résolution maximale : **200 nm**
- Cellules vivantes
- Adaptée à l'observation des **cellules**

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

- Résolution maximale : **0,2 nm**
- Cellules mortes
- Adaptée à l'observation des **molécules**

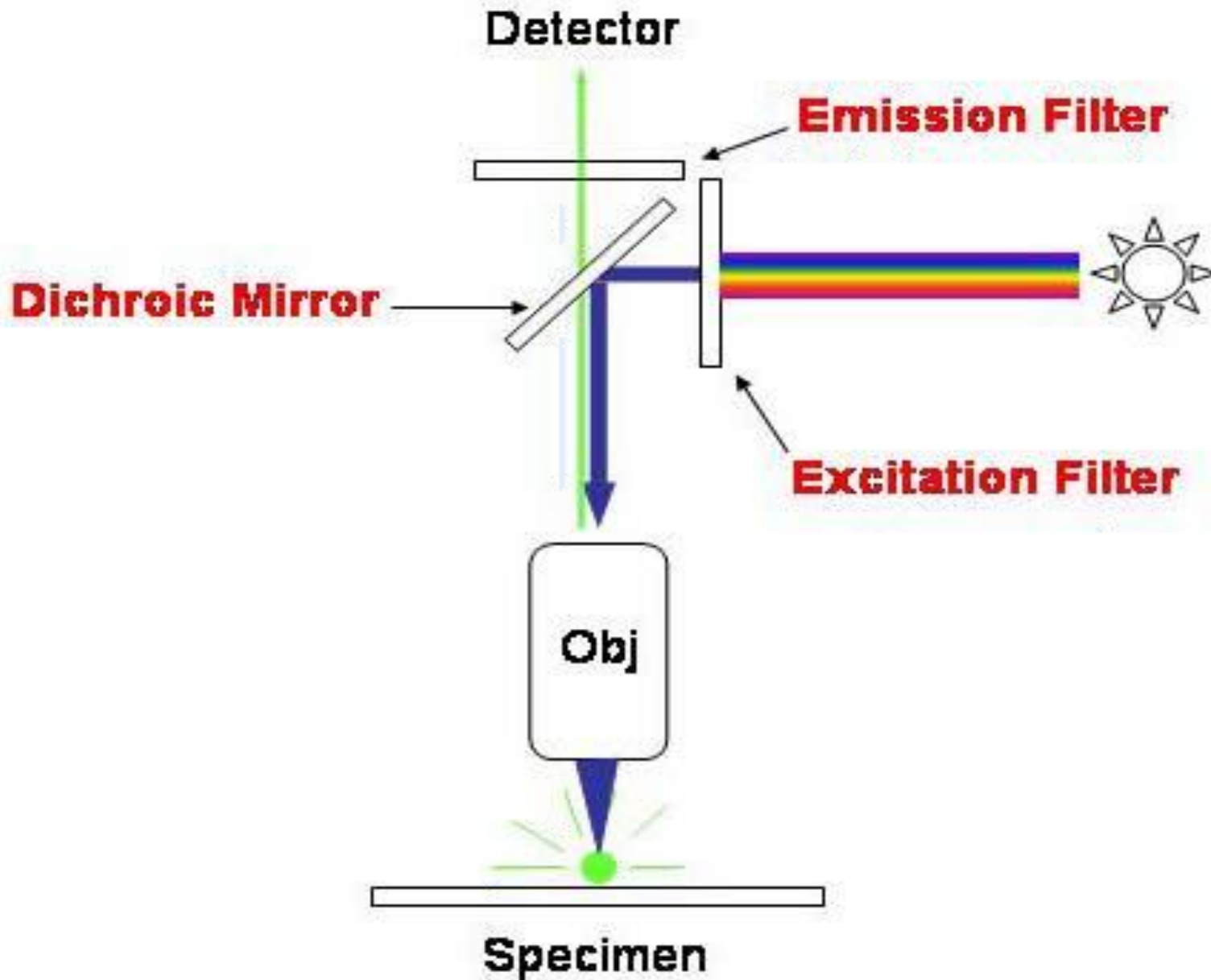
Microscopie optique (= photonique)

- Microscopie photonique à transmission
- **Microscopie à contraste de phase**
- **Microscopie à fluorescence**
- Microscopie à super résolution
- **Microscopie confocale**

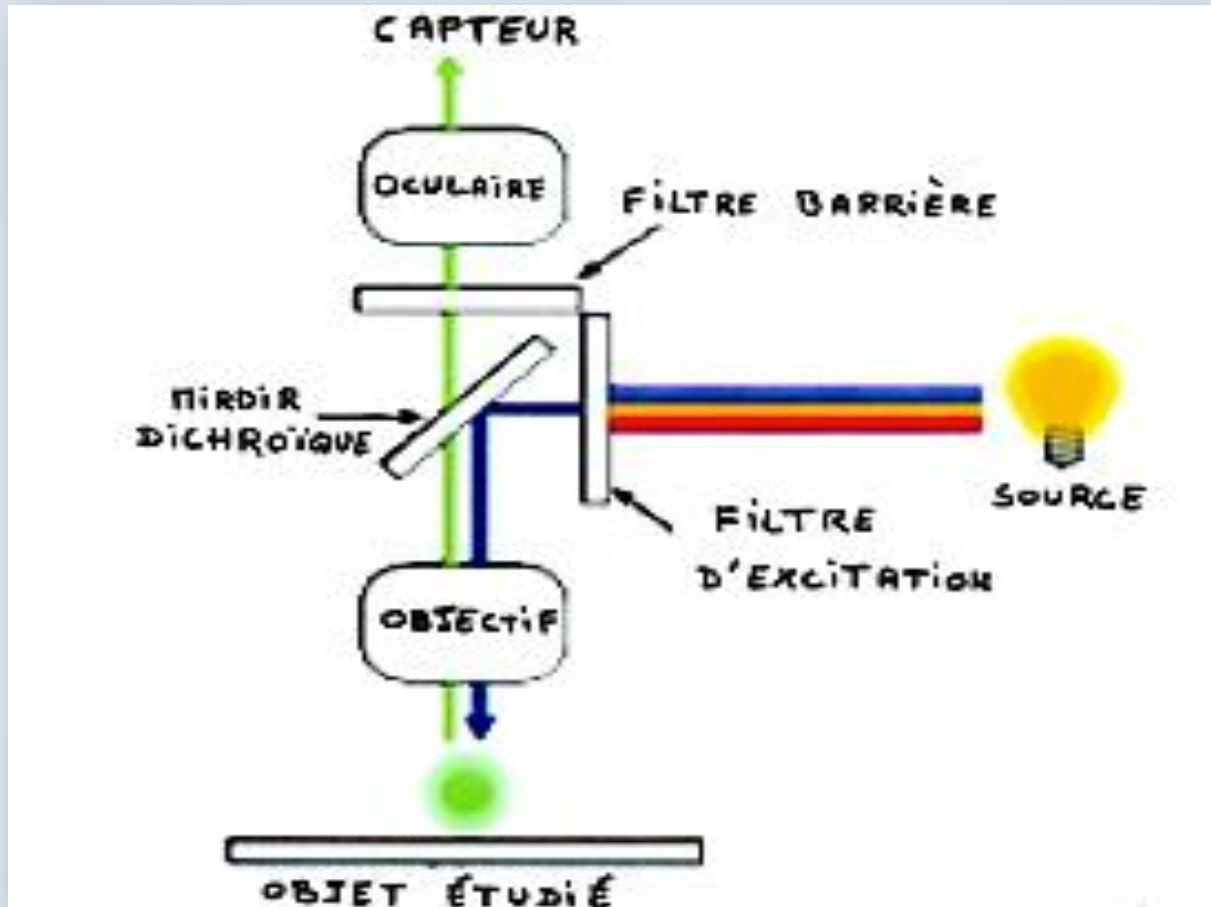
Fluorescence

- ❑ **Excitation** d'une molécule par **absorption** de lumière suivie d'une **émission spontanée** de lumière
- ❑ **Molécule fluorescente = fluorochromes**
- ❑ **Energie d'excitation (absorption) > Energie d'émission**
- ❑ **Longueur d'onde absorption < longueur d'onde émission**
- **Energie inversement proportionnelle à longueur d'onde**

Comment observer ?



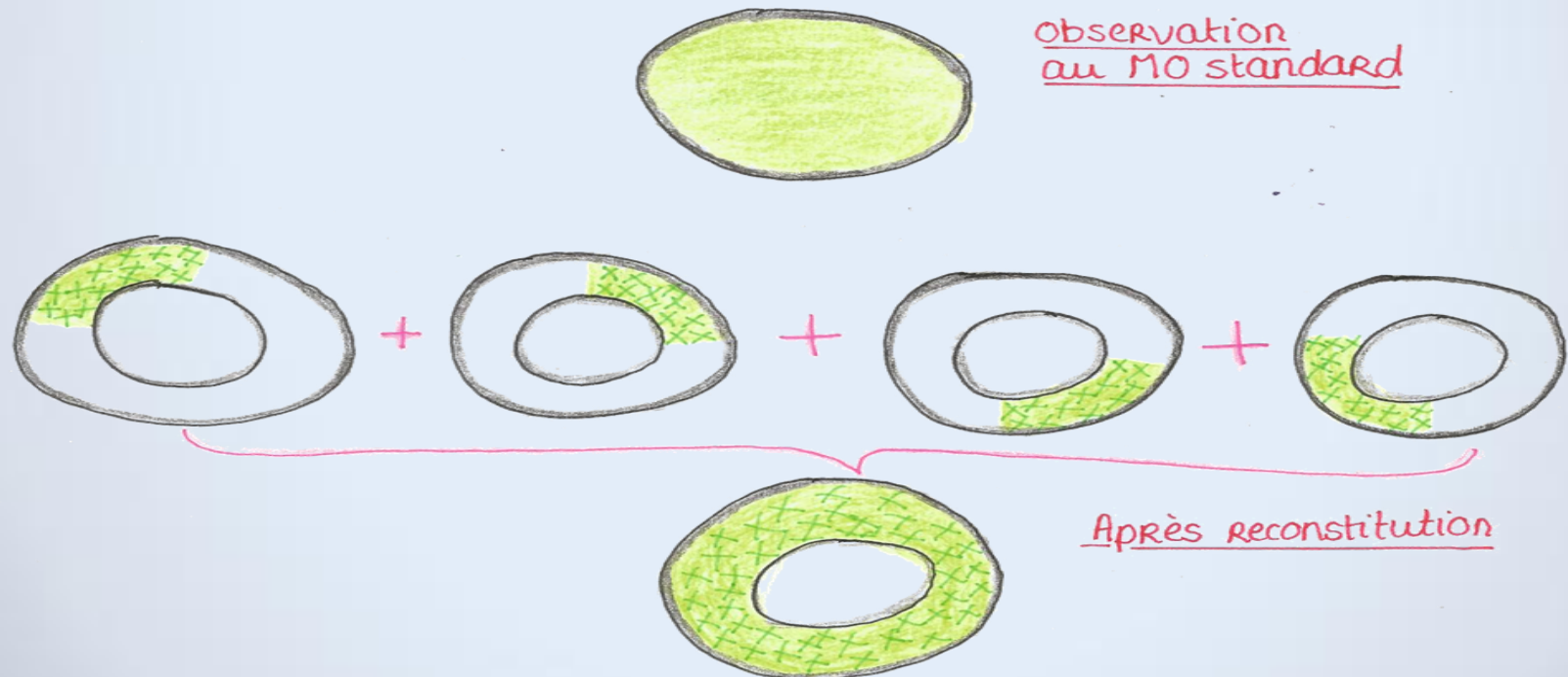
Microscopie confocale



- Point par point, Plan par plan
- 3D

Microscopie à super résolution

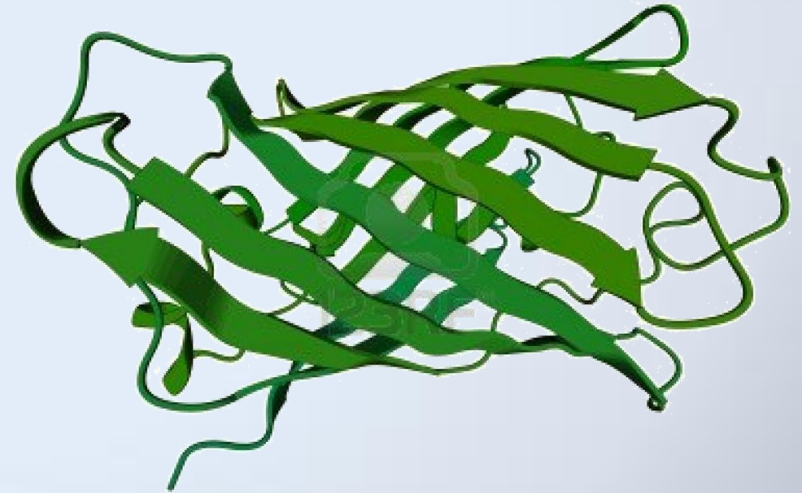
- **Principe** : allumer les fluorochromes dans la cellule successivement selon leur localisation



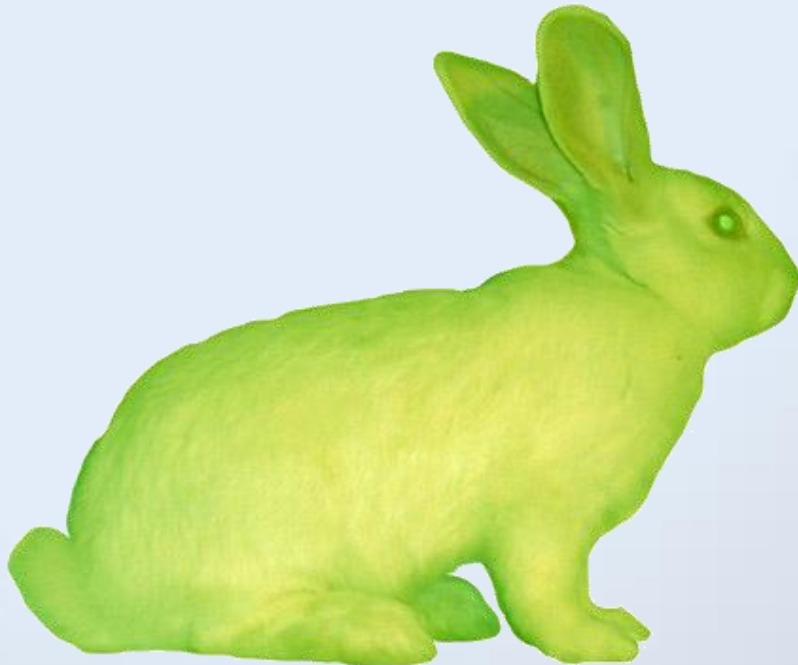
Les différents Fluorochromes

La GFP

- **Protéine naturellement fluorescente**
- **Découverte chez la méduse**
- **Structure en tonneau**



- Triades d'acides aminés = **CHROMOPHORES** → confèrent la fluorescence
- Excitée par le **BLEU** et émet dans le **VERT**
- UNIVERSELLE = garde ses propriétés intrinsèques de fluorescences dans toutes les cellules où on l'incorpore



La Rhodamine

- Absorbe dans le **VERT** et émet dans le **ROUGE**

La fluorescéine (FITC)

- Absorbe dans le **BLEU** et émet dans le **VERT**

Comment introduire la GFP dans la cellule



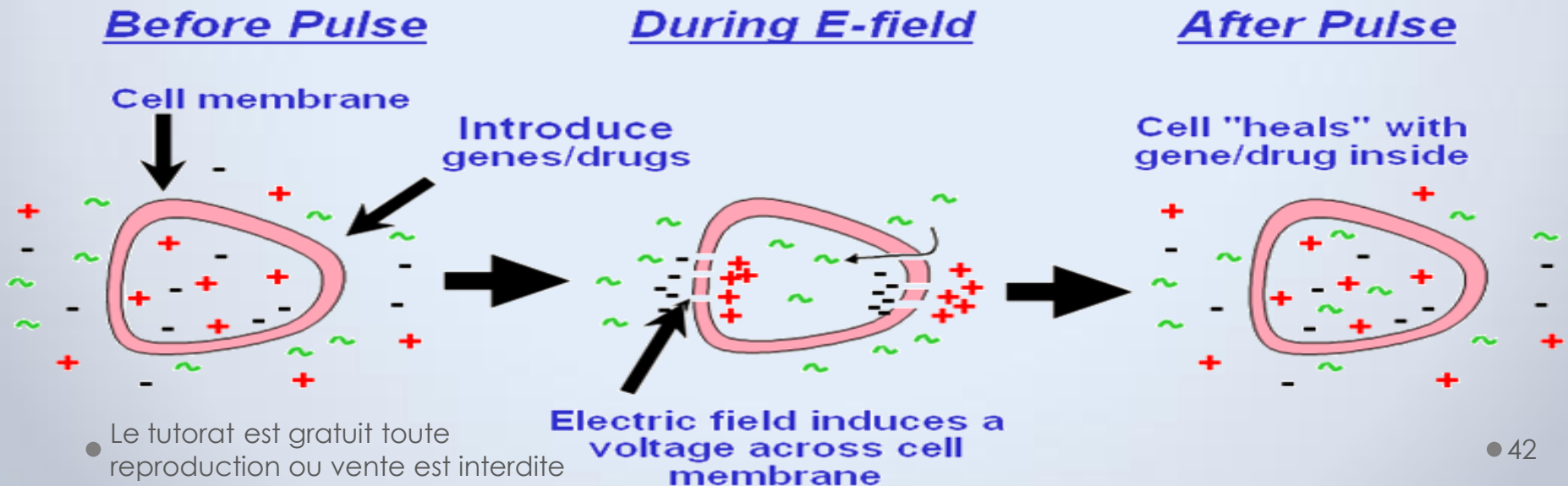
La micro-injection

- Longue et fastidieuse
- Injection de fluorochrome dans la cellule grâce à une micropipette
- Cellule traité individuellement



Electroporation

- Champ électrique → permet de faire des trous dans la cellule
- Membrane se referme vite
- Grand nombre de cellules à la fois
- Technique traumatisante



La vectorisation par vésicule

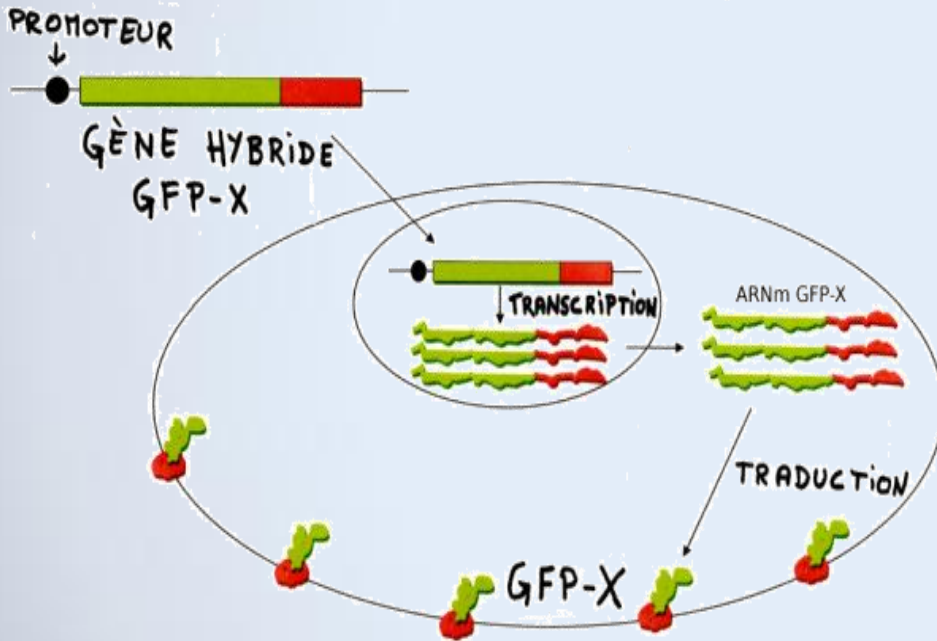
- Plus douce et plus naturelle
- Utilisation de vésicules lipidiques contenant des fluorochromes
- Fusion des vésicules avec cellules → contenu déversé dans cytoplasme



Inconvénient: nouvelle molécule → comportement de la cellule peut-être biaisé

Expression d'un gène codant pour une molécule fluo

Etude de la localisation cellulaire d'une protéine X



- Expression de la GFP par transgénèse
- GFP greffé à un gène
- Puis introduit dans la cellule

La fluorescence est membranaire : suggestion forte que la protéine X est membranaire

Différence

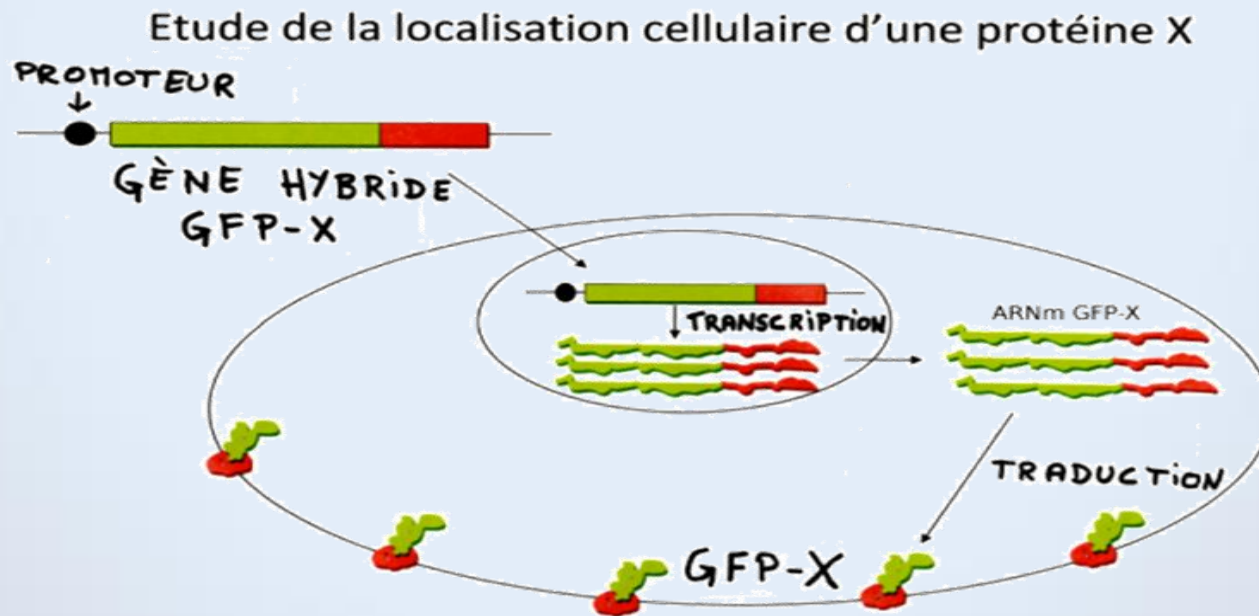
suggérer/démontrer

www.dailymail.co.uk



Protéine X : on **SUGGERE** qu'elle est membranaire

Protéine GFP-X : on **DEMONTRE** qu'elle est membranaire



Les applications de la fluorescence

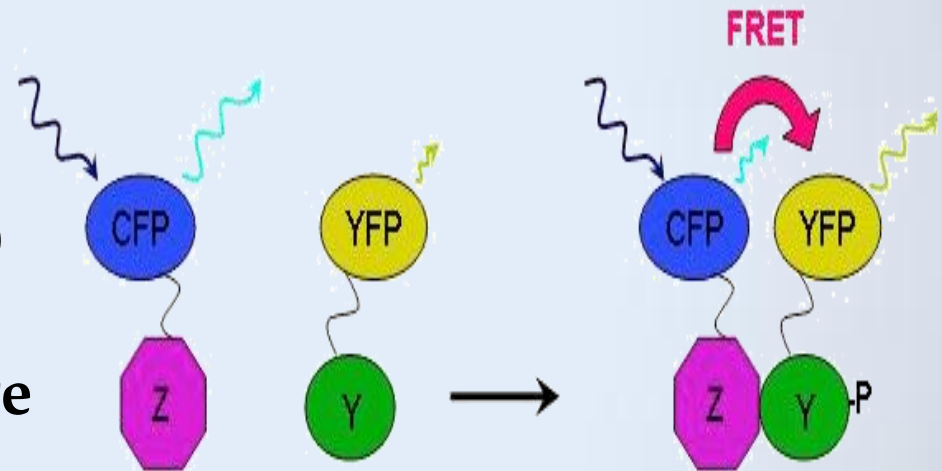


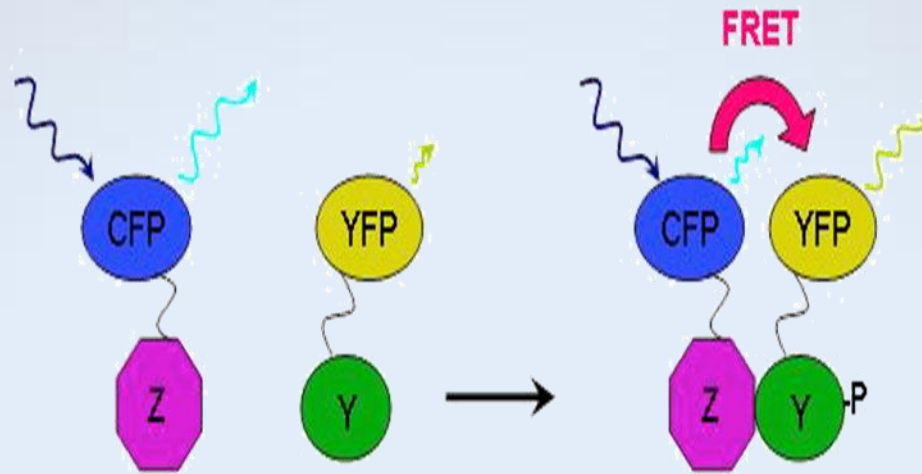
Le FRET

- Transfert d'énergie non radiatif **intramoléculaire** ou **intermoléculaire** : Etudie la configuration spatiale

❖ Principe du FRET :

- Lumière d'excitation excite un **1^{er} fluorochrome**
- **1^{er} fluorochrome** Renvoie une radiation (E inférieur)
- **Transfert non radiatif** entre **1^{er}** et **2nd fluo**
- **2nd fluo** excité envoie alors la fluorescence qu'on aperçoit au microscope





Conditions:

- Distance entre 2 fluo < à 10 nm
- Les spectres des 2 fluo doivent se chevaucher au moins partiellement

Application du FRET

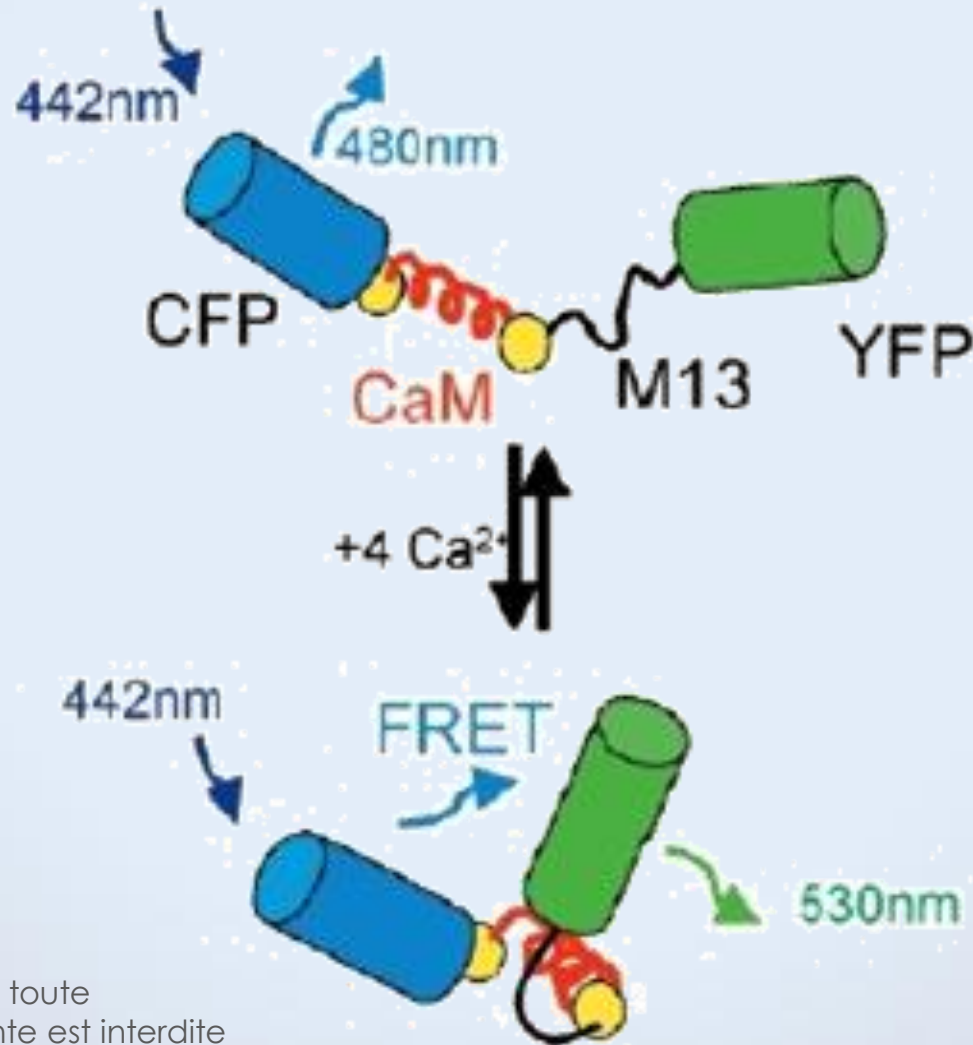
➤ Intermoléculaire

- Voir si 2 protéines de la cellule sont proches et interagissent

➤ Intramoléculaire

- Étudier la **conformation spatiale** d'une molécule
- Conformation étendue ou rapprochée

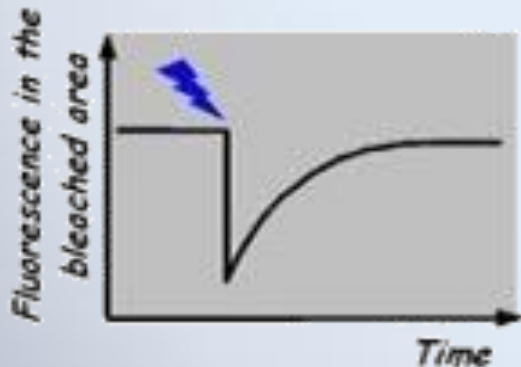
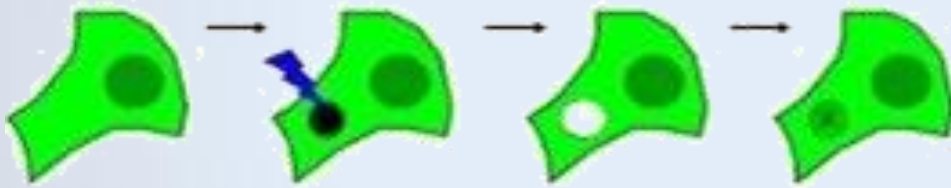
Exemple calmoduline (fret intramoléculaire)



Le FRAP

(fluorescence RECOVERY in photobleaching)

- Étudie la mobilité (dynamique) d'une protéine dans la cellule
- Utilisation du photoblanchiment → observation de la zone photoblanchie



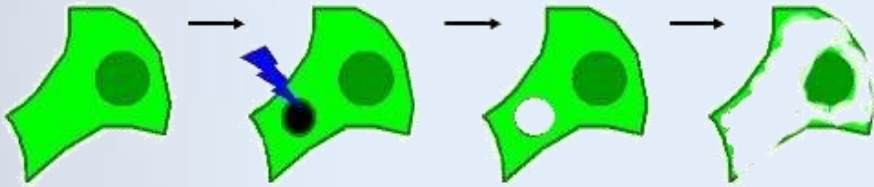
➤ Irradiation d'un point pendant un court laps de temps

➤ REAPPARITION de la fluorescence

Le FLIP

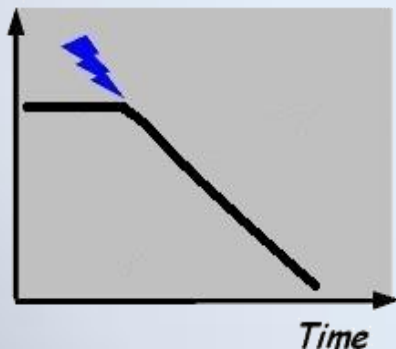
(fluorescence LOST in photobleaching)

- Etudie la vitesse de déplacement des protéines
- Zone étudié autre que celle photoblanchie



➤ Irradiation d'un point en continu

➤ DISPARITION de la fluorescence



FLUORESCENCE INDUITE

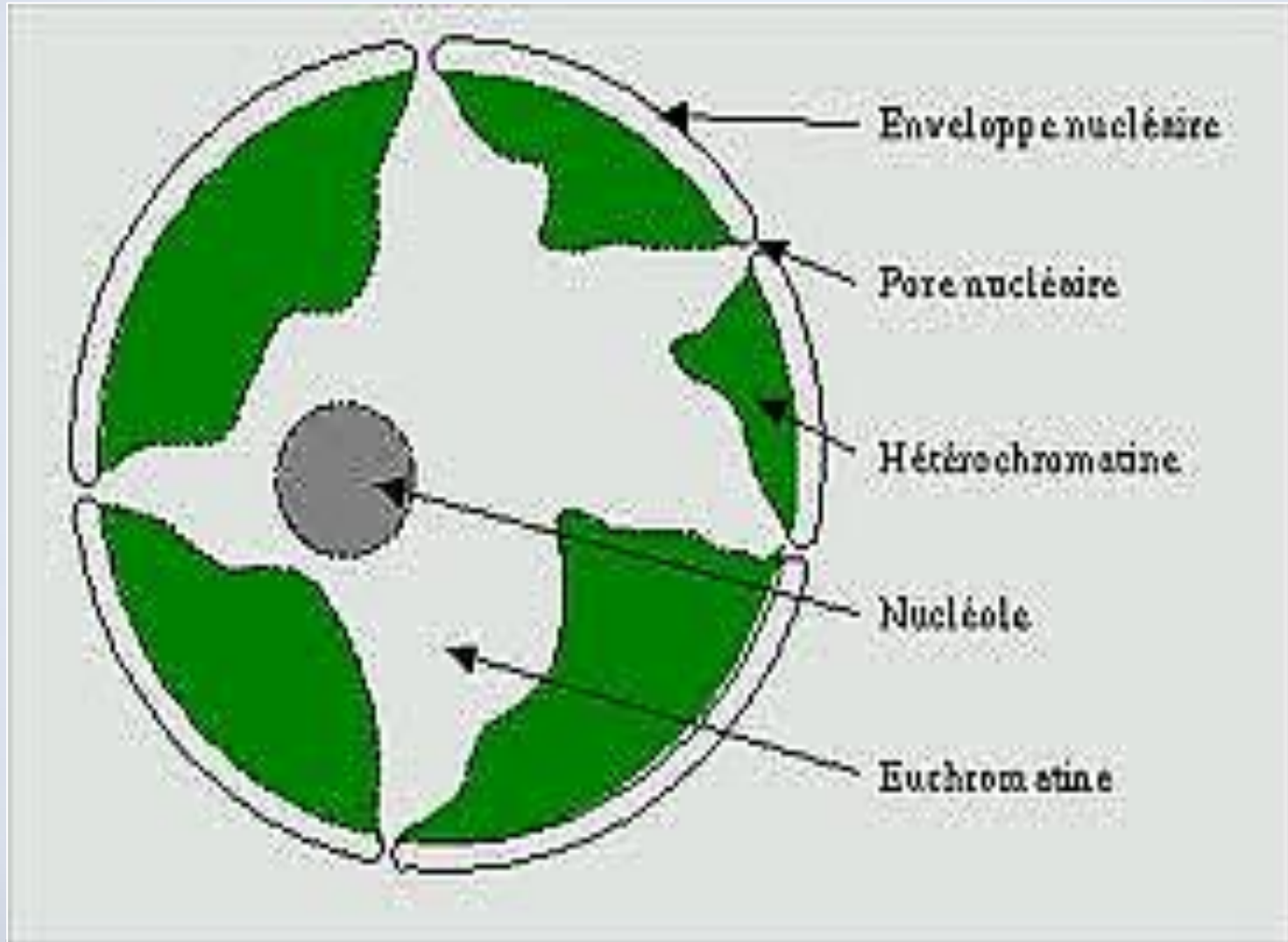
□ Hoescht and dapi:

- Base A-T
- Pas de perméabilisation de la membrane

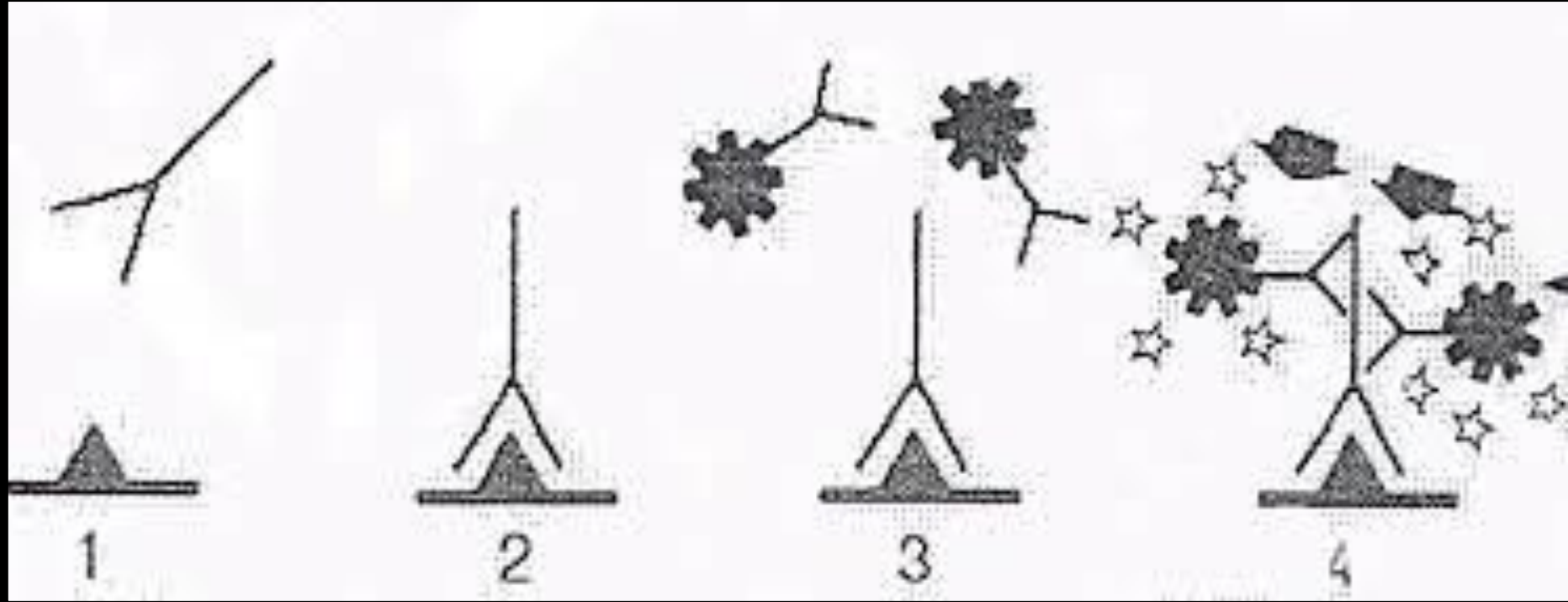
□ Les intercalants:

- Perméabilisation de la membrane
- **Iodure de propyidium et bromure d'éthidium** s'intercalent entre les double brins d'ADN

Fluorescence dans le noyau



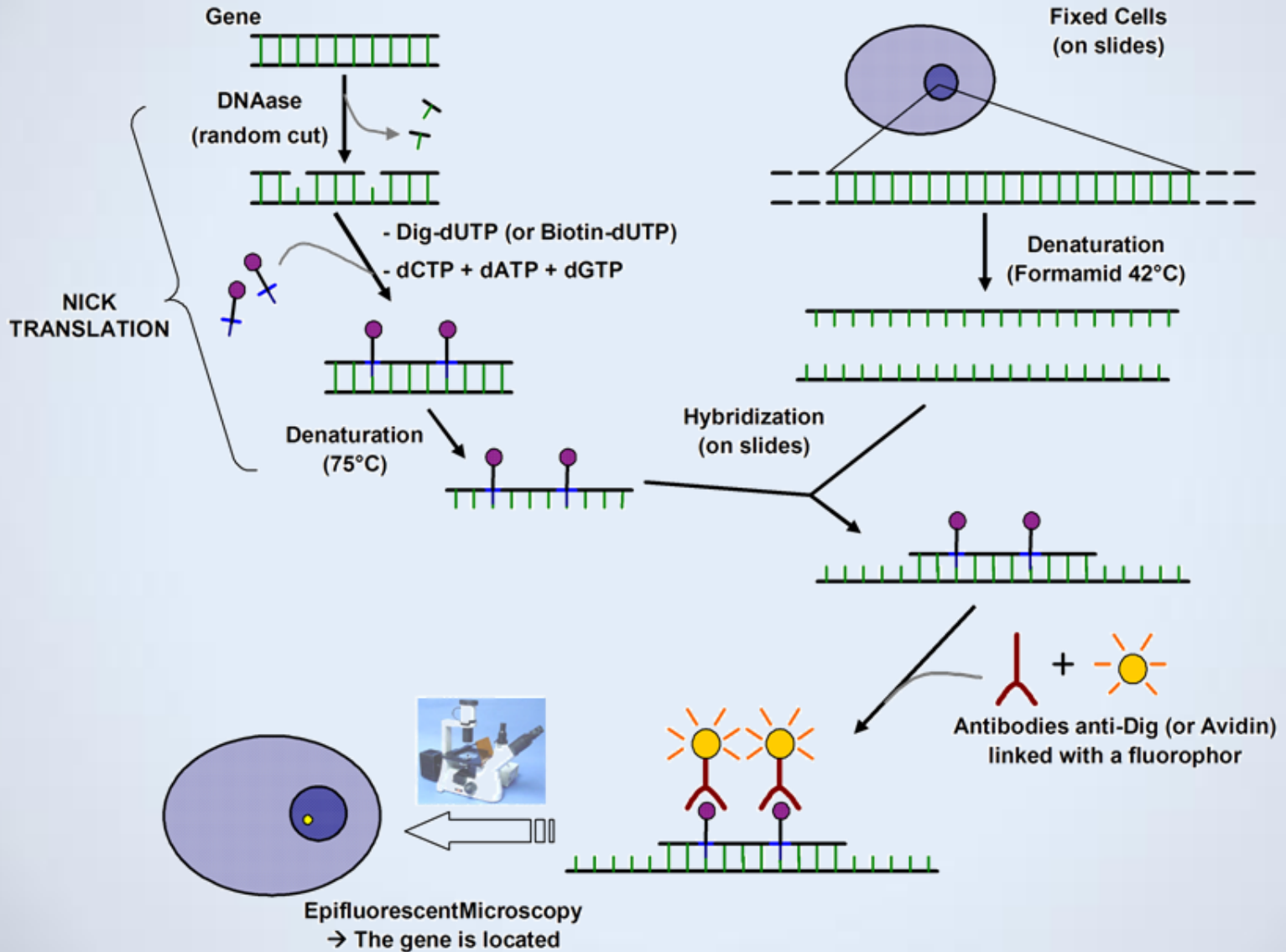
Immunofluorescence indirecte



Pour localiser 2 molécules à la fois:

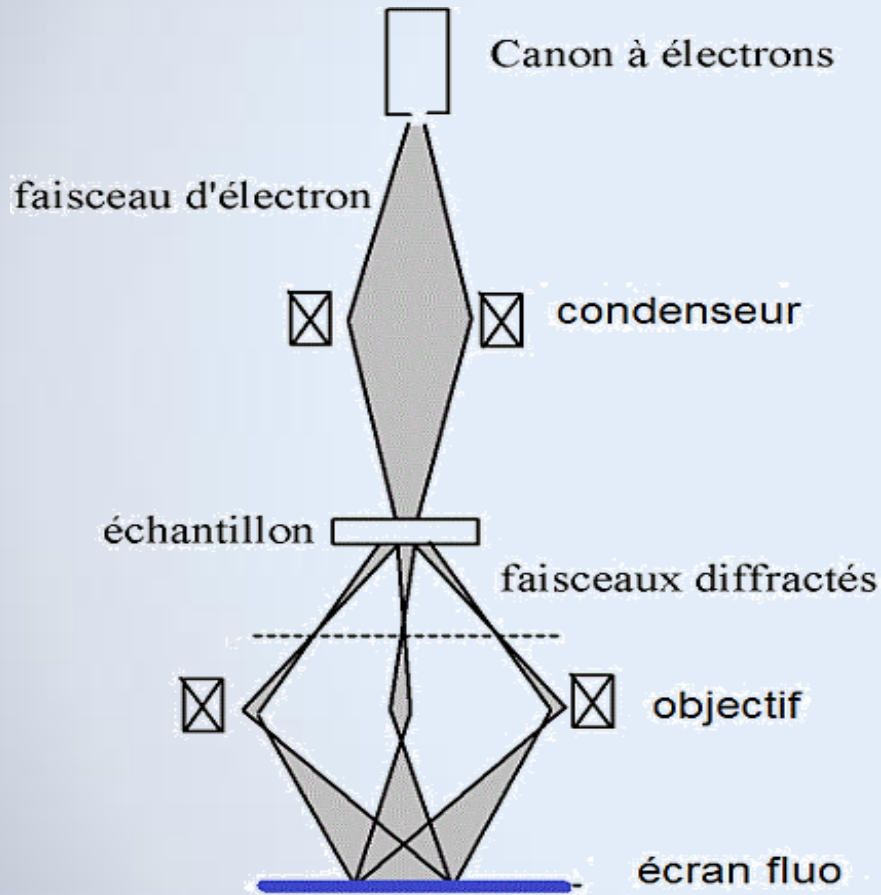
Les deux anticorps primaires et les deux anticorps secondaires proviennent de deux animaux différents ET que les fluorochromes aient des longueurs d'onde d'émission différentes.

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



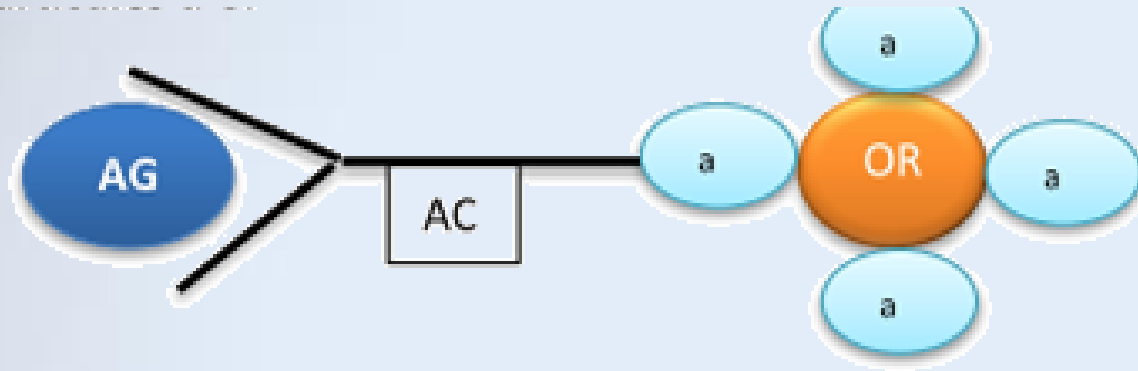
La microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission



- **Sous vide**
- **Électrons traversent la préparation**
- **Coupes ultra-fine**

➤ Marquage à l'or



➤ Cryomicroscopie:

Échantillon congelé dans de l'azote liquide, fracturé en bloc sous vide, puis coloration par ombrage → visualisation des surfaces

Microscopie électronique à balayage

- Etudie la surface d'une cellule
- Electrons y sont réfléchis
- Dans certaines condition on peut observer des cellules vivantes
- Résolution moins bonne que transmission mais en 3D et plus épais

Microscopie à force atomique

- Visualisation surface s'un échantillon
- Pointe fine balaye l'échantillon → déflexion
- Plus la pointe est fine plus la résolution est bonne

Avantages:

- Image en 3D
- Échantillon pas mis sous vide
- Pas besoin de coloration
- Cellule vivante ou morte
- Non destructif

Quelques QCM

annatut 2012-2013

QCM 1 :

a) Après modification de la séquence ADN d'une cellule eucaryote, on a créé un gène hybride cadhérine-GFP ce qui permettra de former une protéine cadhérine-GFP. On observe les cellules en microscopie optique. On observe une coloration verte sur les complexes membranaires de jonction.

- A) La microscopie photonique a une meilleure résolution que la microscopie électronique
- B) On a démontré que la protéine cadhérine-GFP est localisée au niveau des complexes membranaires de jonction

b) On réalise la même expérience avec une enzyme permettant la synthèse de la DiHydroTestostérone (DHT) à partir de la testostérone : la 5-alpha-reductase.

On effectue un dosage de la Testostérone et de la DHT sur une culture A de cellules témoins et sur la culture B de cellules avec le gène hybride 5-alpha-réductase-GFP (Les conditions de culture sont rigoureusement les mêmes).

Les résultats sont en moyenne identiques dans les deux cultures.

- C) On suggère fortement que la fonction de la 5-alpha-réductase n'est pas altérée par le marquage à la GFP
- D) On peut donc extrapoler avec certitude sur la localisation de la 5-alpha-réductase dans la cellule.
- E) Aucune de ces propositions n'est juste.

QCM 1 : Réponses B,C

- A) Faux : la microscopie électronique a une résolution allant jusqu'à 0,2nm, c'est seulement 200 nm pour la microscopie optique.
- B) Vrai : si on parle de la protéine cadhérine-GFP on peut démontrer le résultat (l'observation microscopique ne ment pas, si c'est membranaire, c'est pour de vrai). En revanche ATTENTION si on parle de la protéine cadhérine (TOUT COURT) on ne peut que SUGGERER notre résultat!
- C) Vrai, attention, fonction différent de localisation
- D) FAUX ! on ne peut que suggérer !

QCM 3 : A propos de la fluorescence :

- A) Il faut modifier la GFP pour qu'elle garde ses propriétés de fluorescence en dehors de la méduse.
- B) Lorsqu'on irradie par photobleaching, les protéines GFP disparaissent.
- C) Dans l'immuno fluorescence indirecte, les anticorps secondaires sont des anticorps anti «anticorps de l'espèce».
- D) Lors d'un FRAP, on observe les molécules qui redeviennent fluorescentes, cela permet de mettre en évidence leur mobilité.
- E) Aucune de ces propositions n'est juste.

QCM 3 : Réponse C

- A) Faux : c'est justement l'avantage de la GFP
- B) Faux : elles ne disparaissent pas, elles perdent seulement leur propriété fluorescente.
- C) Vrai
- D) Faux : les molécules ne redeviennent pas fluorescentes, mais d'autres molécules fluorescentes vont venir à l'endroit qui a été photoblanchi. C'est la zone observée qui redevient fluorescente.

QCM 20: Donner la ou les proposition(s) vraie(s)

- A) La GFP émet dans le bleu
- B) C'est en modifiant l'extrémité Nt de la GFP que l'on obtient des variants comme la BFP
- C) Il y a intérêt à utiliser simultanément la GFP et la Fluorescéine pour localiser simultanément deux molécules
- D) La micro-injection est une technique peu utilisée car elle est très lente
- E) L'électroporation crée des trous définitifs dans la membrane de la cellule

- Réponse D

**ENFIN FINI, travaillez
bien!!**

ça commence maintenant

**Je vous souhaite bonne
chance pour le CCB**

CHALLENGE ACCEPTED

POUTOUPOUTOU

