



### I. Généralités – Rappels

- Il existe une **compartmentation** des activités de la cellule: chaque élément cellulaire remplit une fonction précise.
  - le noyau, qui contient l'ADN et où a lieu la transcription en ARN chez les eucaryotes.
  - les mitochondries, productrices d'énergie.
  - l'appareil de Golgi (AG) et le réticulum endoplasmique (RE), lieux de maturation des protéines.
  - les lysosomes ayant une fonction de dégradation.
  - le cytosquelette, armature de la cellule qui permet également le transport des protéines.
  - le cytosol, liquide baignant tous ces éléments
- Le Cycle cellulaire:

La division ou l'arrêt des divisions cellulaires sont contrôlés par de nombreux signaux.

  - Une cellule se divise en suivant l'alternance des phases G1-Synthèse-G2-Mitose.
  - Une cellule peut arrêter de se diviser et se bloquer en phase G1, alors appelée G0.

Cet arrêt peut être *temporaire* en cas de **quiescence** ou *définitif* en cas de **sénescence**.

### II. Microscopie

Il existe deux grandes familles de microscopies :

- La **microscopie Optique** ou **Photonique** qui capte les photons (la lumière). Elle a une résolution médiocre (minimum de l'ordre du  $\mu\text{m}$  = échelle de la cellule).

**[VOIR AU DOS]**

#### COMPLEMENT FLUORESCENCE

##### 1)Comment rendre fluo une molécule qui ne l'est pas ?

On greffe sur la molécule à visualiser un fluorochrome (ex.: FITC et GFP=vertes, rhodamine=rouge).

##### 2)Comment introduire la protéine hybride dans la cellule ?

-**micro-injection**. Inconvénient: fastidieux de traiter chaque cellule.

-**électroporation**: un choc électrique crée des trous dans les membranes.

Avantage: plusieurs cellules en même temps; inconvénient: le choc peut modifier la réaction cellulaire.

-**vectorisation par vésicules** lipidiques fusionnant avec la membrane. Avantage: technique douce.

-introduction dans la cellule d'un **gène** codant pour une protéine hybride GFP-protéine à visualiser.

Avantage: protéine hybride produite directement dans la cellule;

Inconvénient: technique lourde et possible modification de la fonction de la protéine: *suggestion mais pas démonstration* de la localisation.

- La **microscopie Electronique** qui utilise des électrons. Sa résolution en est meilleure (de l'ordre du **nm**, on voit les organites).

### MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

TECHNIQUE	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>ME en transmission</b>	Un faisceau d'électron <b>traverse</b> la préparation qui a été préalablement fixée, colorée aux métaux lourds, puis coupée en tranche très fines.	Technique la plus performante.	
Techniques spécifiques Du MET	<b>Tétroxyde d'osmium</b>	Coloration au tétr oxyde d'osmium des lipides qui paraissent plus foncés.	
	<b>Marquage à l'or</b>	Anticorps associés à la molécule d'or sont injectés dans l'échantillon et sont dirigés contre la protéine à étudier	
	<b>Ombrage</b>	On vaporise du métal sur la surface à visualiser pour en obtenir un « moule ».	Visualise les surfaces.
	<b>Cryofracture</b>	L'échantillon est durci puis on le fracture. On vaporise le plan de fracture de platine, cela forme un moule que l'on peut observer.	Evite la fixation chimique, c'est une simple congélation.
<b>ME à BALAYAGE</b>	Les électrons <b>effleurent</b> la surface, cela excite les molécules de la surface qui émettent des électrons secondaires que l'on capte.	Visualise les surfaces.	La résolution est moins bonne que pour le MET

*Le tutorat est gratuit. Toutes reproduction ou vente sont interdites.*

## MICROSCOPIE OPTIQUE (ou PHOTONIQUE)

TECHNIQUE		PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
En lumière directe	Avec colorant	Observation directe par un microscope optique standard. Problème : les cellules sont transparentes, on utilise donc des colorants.		Modification de structures C <sup>R</sup>
	Contraste de phase	On amplifie le déphasage en retardant la lumière.	Image + contrastée	
	Vidéo Time lapse	On place une caméra sur l'oculaire.	Cellules en mvt	
M I C R O S C O P I E de F L U O R E S C E N C E	Fluorochrome naturel Ex : la <b>GFP</b> ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )	Issue de la méduse, cette protéine est intrinsèquement fluorescente, c.à.d. qu'elle peut <i>absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde (couleur) donnée et la restituer immédiatement à une autre longueur d'onde caractéristique.</i> Ce sont <b>3AA</b> particuliers organisés en triade (appelée <b>chromophore</b> ) qui lui confèrent sa fluorescence. En modifiant ces AA, on peut obtenir des variants de couleur de la GFP. Cette protéine a la particularité de conserver ses propriétés fluorescentes même si on l'introduit dans un organisme autre que la méduse. On peut donc créer des protéines fluo en les greffant à la GFP (cf complément) pour pouvoir les voir avec un microscope spécialisé.		Cette méthode permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel : la cellule vivante.
	Applications de la GFP	FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfert</i> C'est un transfert d'énergie sans émission de lumière entre deux protéines fluorescentes différentes qui sont espacées de <b>moins de 10nm</b> . - intermoléculaire : on veut savoir si deux protéines distinctes sont collées. - intramoléculaire : on veut savoir si deux parties d'une même protéine sont collées (cas des protéines qui subissent un changement de conformation = qui se replient).	Le choix des 2 prot doit permettre le transfert d'énergie (recouvrement des spectres d'émission de la 1° et de réception de la 2°)
		FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> On utilise la méthode du <b>photoblanchiment</b> : une lumière très forte (laser) vient détruire la fluorescence à l'endroit précis où elle est appliquée.	Permet d'étudier la dynamique des protéines. (+ leur vitesse de déplacement dans le cas du FLIP)
		FLIP	<i>Fluorescence Loss In Photobleaching</i> On photoblanchit un endroit de manière <b>continue</b> , et on regarde en même temps la disparition de la fluorescence à <b>un autre endroit</b> .	
	Immunofluorescence indirecte	On utilise des anticorps secondaires fluorescents (couplés à des fluorochromes chimiques tels que la <i>rhodamine</i> ) dirigés contre des anticorps primaires anti-Protéine qui nous intéresse.		Amplification du signal par les AC secondaires.
	Fluorescence induite	On utilise des molécules qui deviennent fluo une fois fixées à leur cible. Ex: DAPI = colorant nucléaire qui se fixe sur des paires de bases de l'ADN.		Coloration nucléaire Info sur le cycle C <sup>R</sup>
	FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridation</i> On fabrique une sonde fluorescente complémentaire au gène que l'on veut visualiser et localiser.		Sur ARN, pas besoin de dénaturation Sur ADN, il faut dénaturer l'hélice.
	MICROSCOPIE CONFOCALE		Un diaphragme (pinhole) élimine les signaux qui se trouvent hors du plan focal, et élimine ainsi le bruit de fond dans un échantillon épais.	Image 3D, Résolution excellente Cher !

*Le tutorat est gratuit. Toutes reproduction ou vente sont interdites.*