A fluorescence microscopy image showing a dense network of green filaments (likely actin or microtubules) forming a cytoskeleton. Scattered throughout are several bright blue, roughly circular structures representing cell nuclei. Small, bright red puncta are visible, likely representing organelles such as mitochondria or lysosomes. The overall appearance is that of a highly organized, interconnected cellular structure.

# Biologie cellulaire

*Année 2016/2017*

# Présentation de la matière :

- Pr Gilson
- 15aine de cours à la fac
- 15 QCM au partiel en UE2 soit beaucoup de points



# Sommaire

- I) Introduction à la biologie cellulaire
- II) Méthode d'étude de la cellule

A) Théorie cellulaire

B) Organisation de la cellule

C) Cycle cellulaire

D) Cellules souches et  
homéostasie

A) Intro

B) Microscopie optique

C) Fluorescence

D) Microscopie électronique

E) AFM



FIRE AND BLOOD

# I) Introduction à la biologie cellulaire



**FIRE AND BLOOD**



# A) Intro

□ Essor de l'observation

2 postulats fondamentaux :

1° La cellule est l'unité fonctionnelle et structurale de base des êtres vivants

2° Toute cellule provient d'une cellule préexistante

## B) Théorie cellulaire

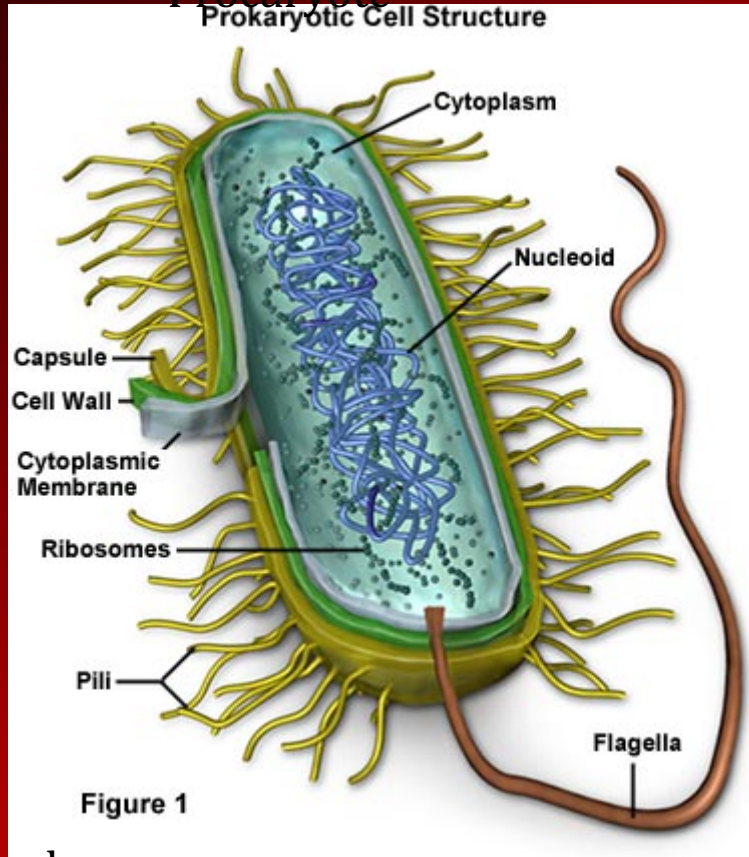
- Composition cellule vivante :
- 70 % H<sub>2</sub>O le reste= ions, ADN, ARN, sucres
- 10<sup>14</sup> cellules 10<sup>15</sup>bactéries dans le corps

- Cette composition amène a une distinction :
- Vivant/Inerte
  
- Sélectivité
- Catalyse
- Interactions moléculaire

# C) Organisation cellulaire

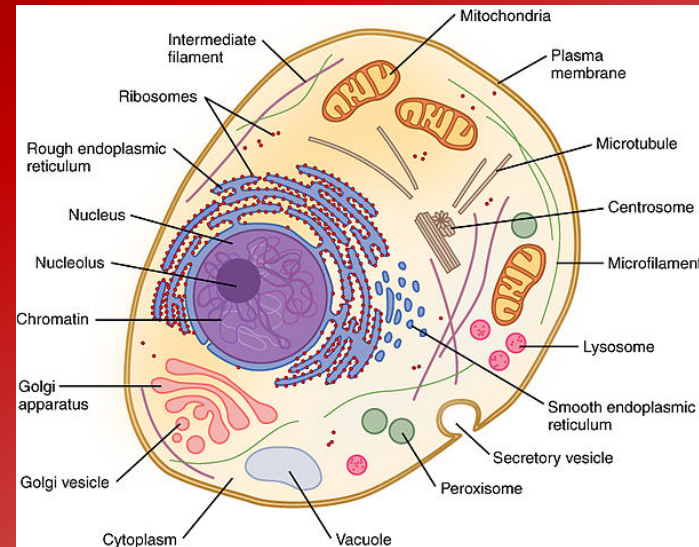
Procarvote

Prokaryotic Cell Structure



Pas de noyau  
ADN circulaire  
Traduction co-transcriptionnelle

Eucaryote

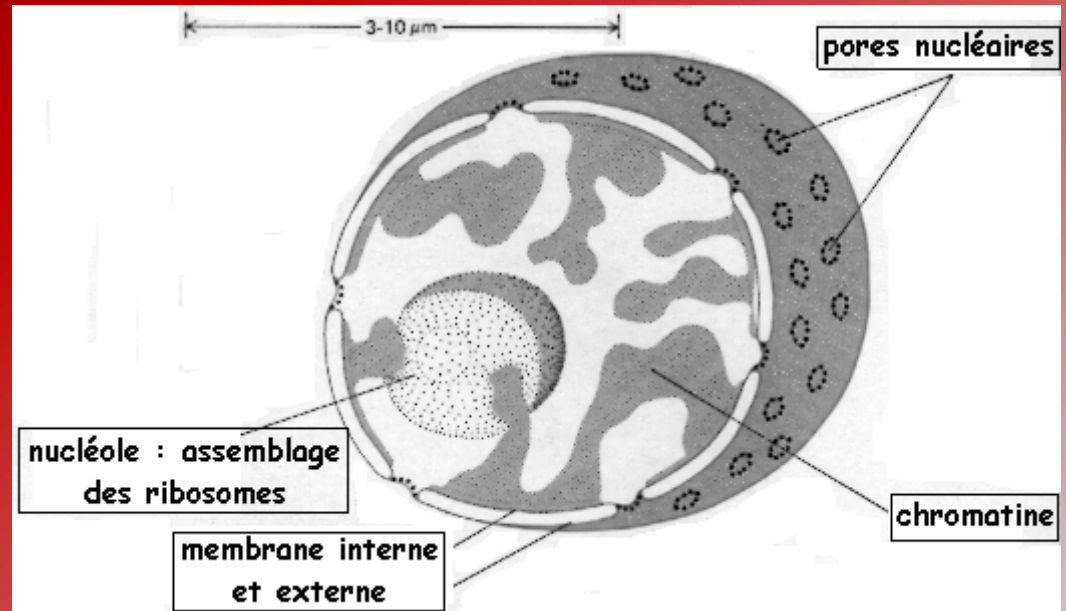
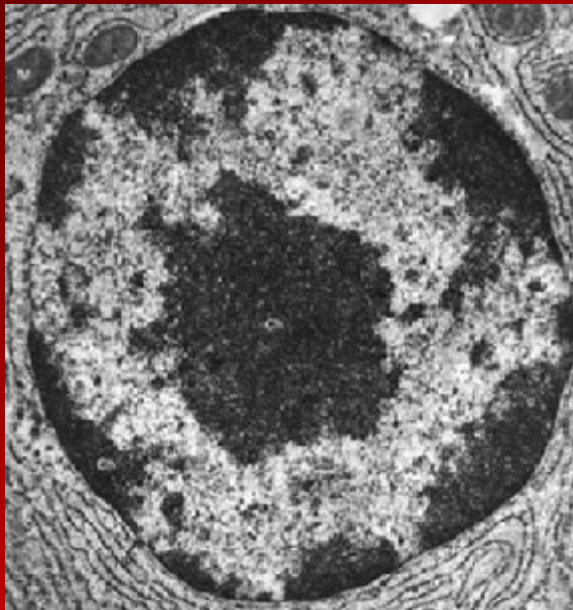


Noyau délimité par une double membrane  
Traduction et transcription découplées

# Organisation d'une cellule eucaryote :

## Noyau :

- lieu de conservation de l'ADN
- entouré d'une double membrane

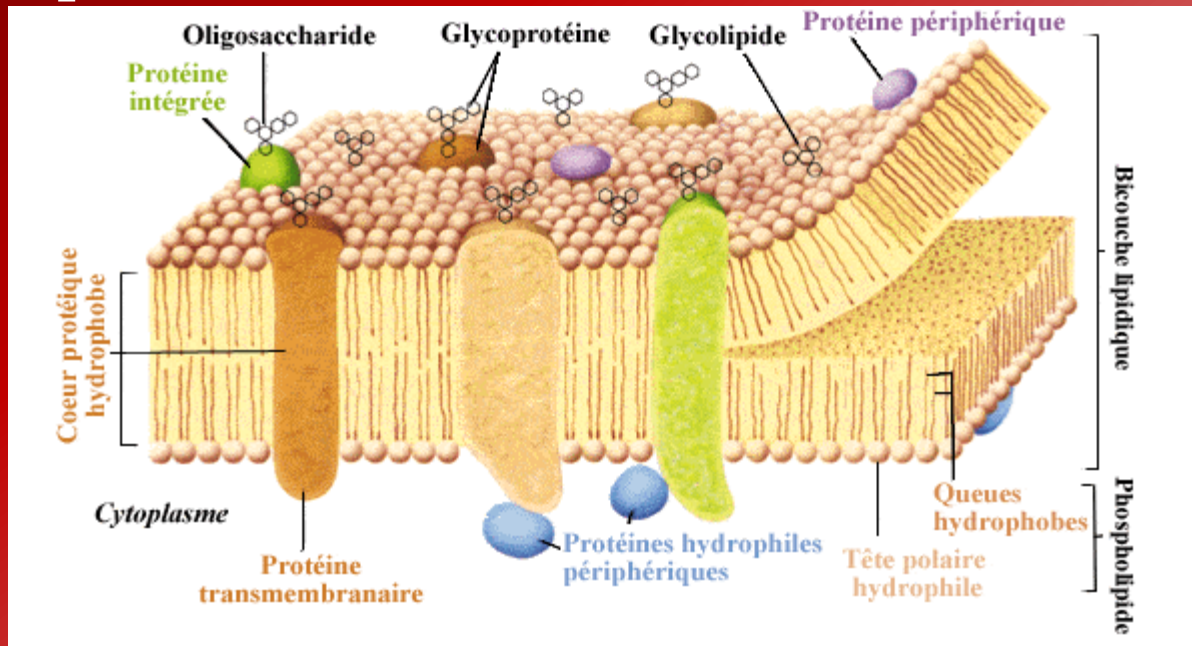


# Le cytosol :

- liquide dans lequel baignent les organites
- siège de la plupart des réactions
- Pas un organite

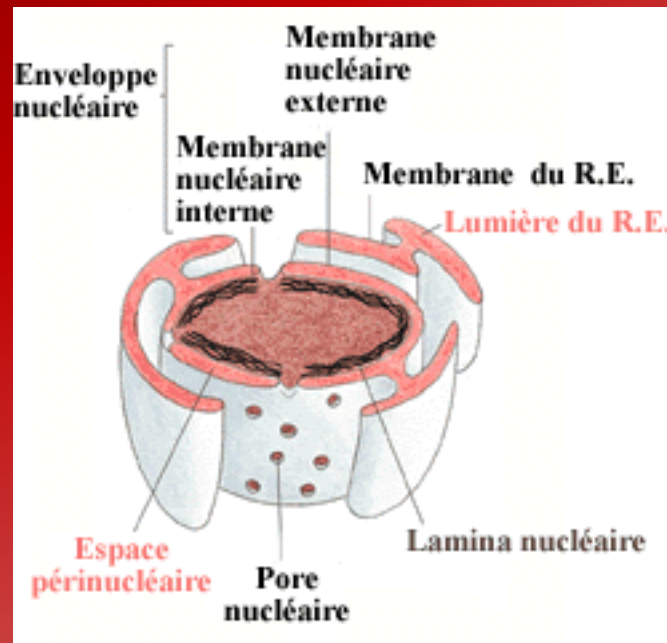
# Membrane plasmique

- Bicouche de phospholipide
- Deux feuilletts : hydrophile à l'ext et hydrophobe à l'intérieur de ceux-ci



# Enveloppe nucléaire

- Double bicouche lipidique (différent de la MB plasmique)
- En continuité avec le RE



# Systeme endo-membranaire

- Ensemble de cavités délimités par une membrane
- Communique entres elle par des vésicules

# Le réticulum endoplasmique

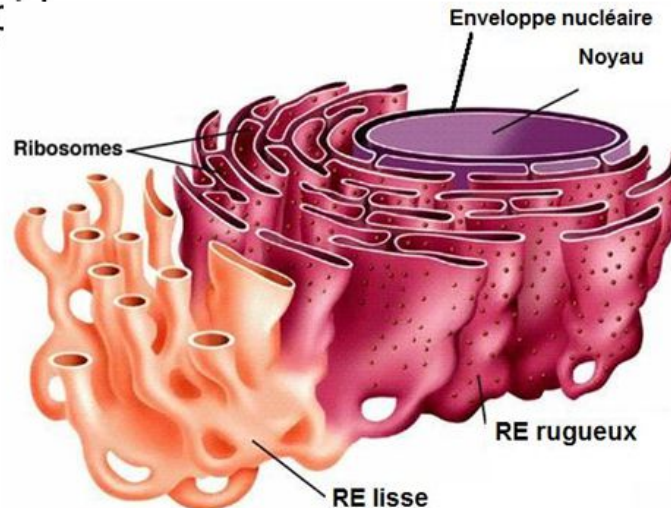
## RE rugueux c RE lisse

### RE lisse

- Pas couverte des ribosomes
- Site de la synthèse des phospholipides

### RE rugueux

- Couverte des ribosomes, alors il aide avec la synthèse des protéines



# L'appareil de golgi

- Un seul par cellule
- Responsable de la formation de vésicules et les envoi au différents endroit de la cellule



# Endosome

- Capture les molécules de l'extérieur de la cellule
- Rôle nourricier

# Lysosome

- Lieu de dégradation de molécules complexes

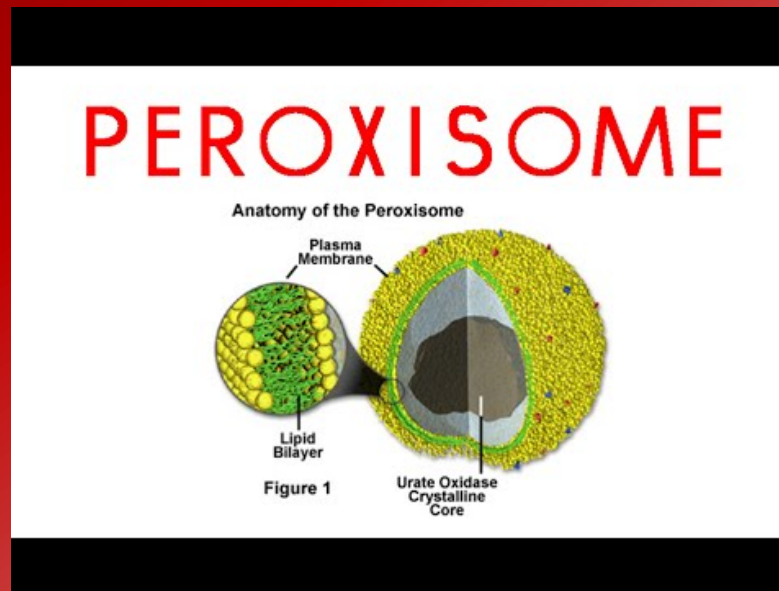


# Organites isolés

- Peroxysome :

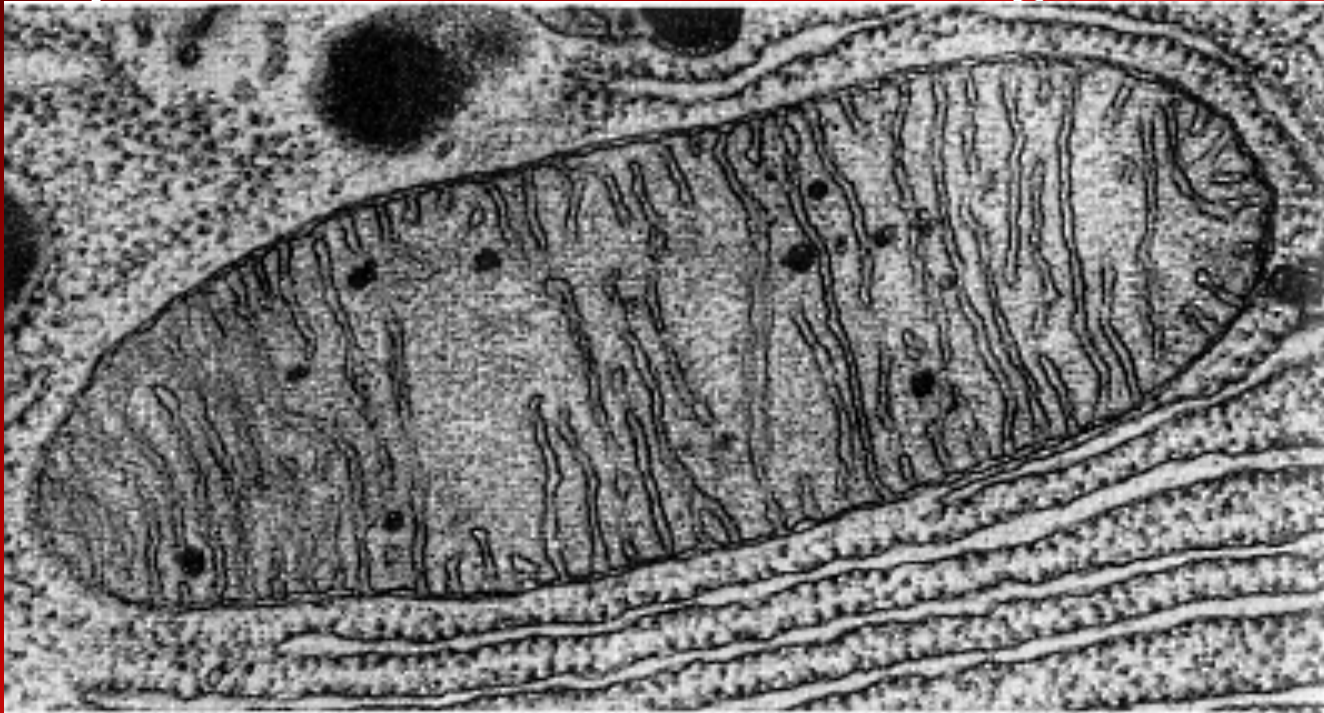
Lieu de détoxification de la cellule

Présence de nombreuses enzymes hydrolytiques (peroxydase)



# Mitochondrie

- Plusieurs par cellule
- 3 groupes cellulaire, un ancêtre commun LUCA
- Principale lieu de création d'énergie



1 μm

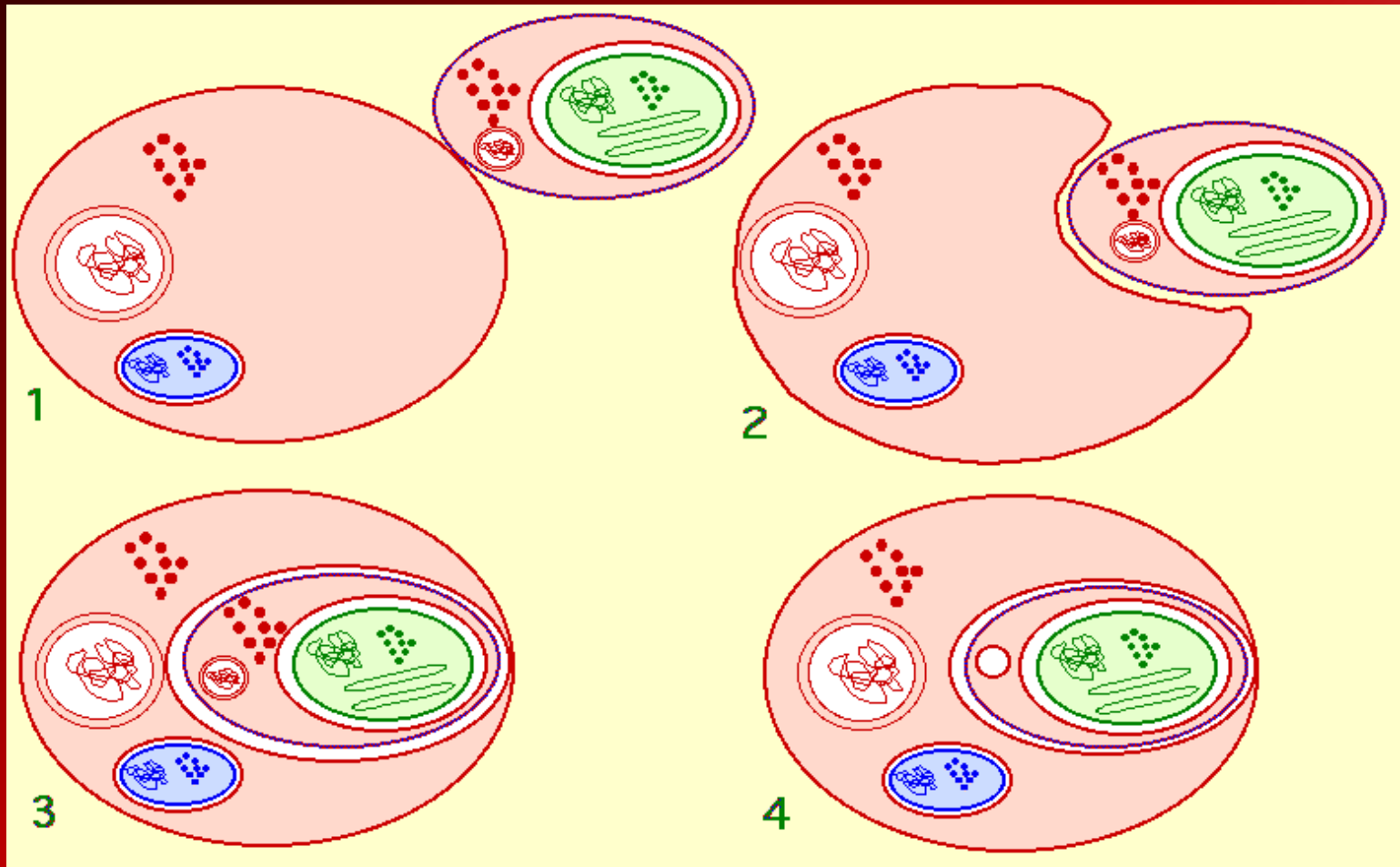
# Évolution cellulaire

Eubactéries (= bactéries=procaryote)

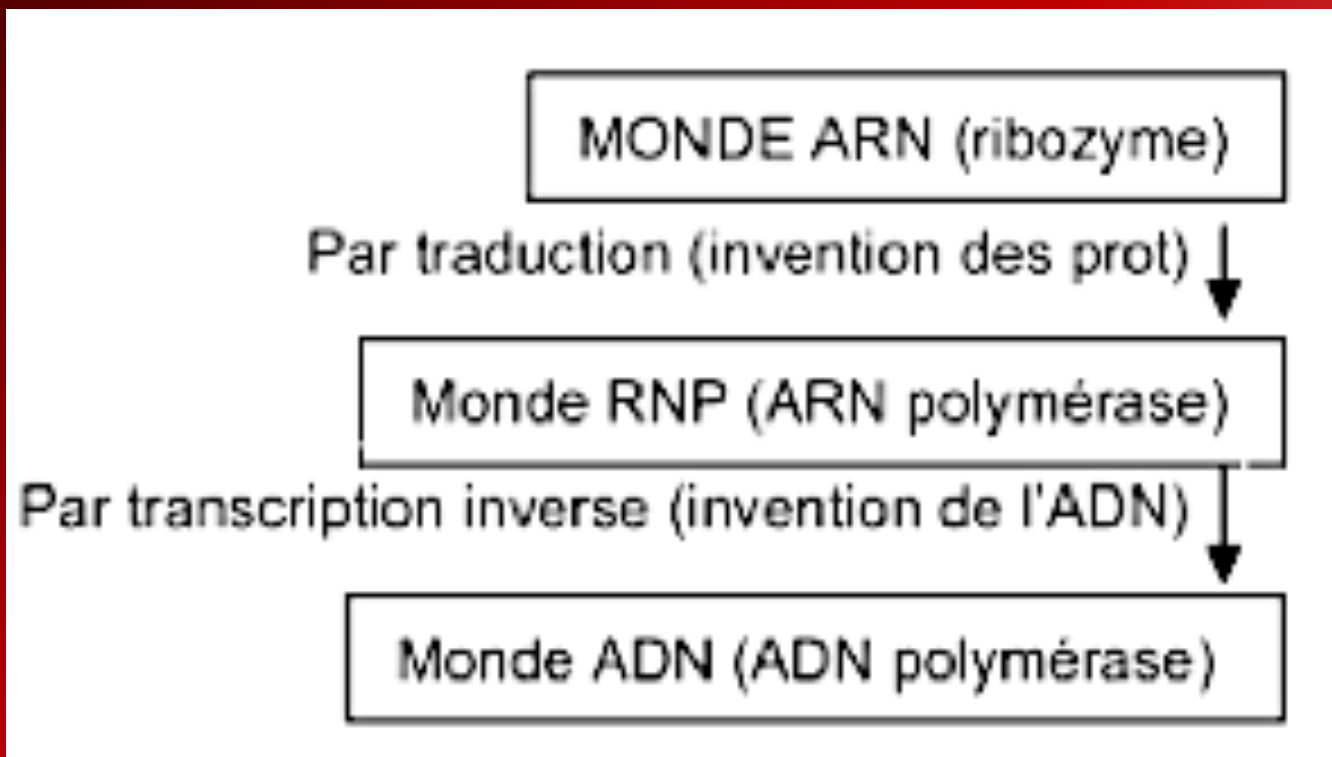
Archaeobactéries (se rapproche des eucaryote)  
sont des bactéries extrémophiles

Eucaryotes

# Théorie de l'endosymbionte

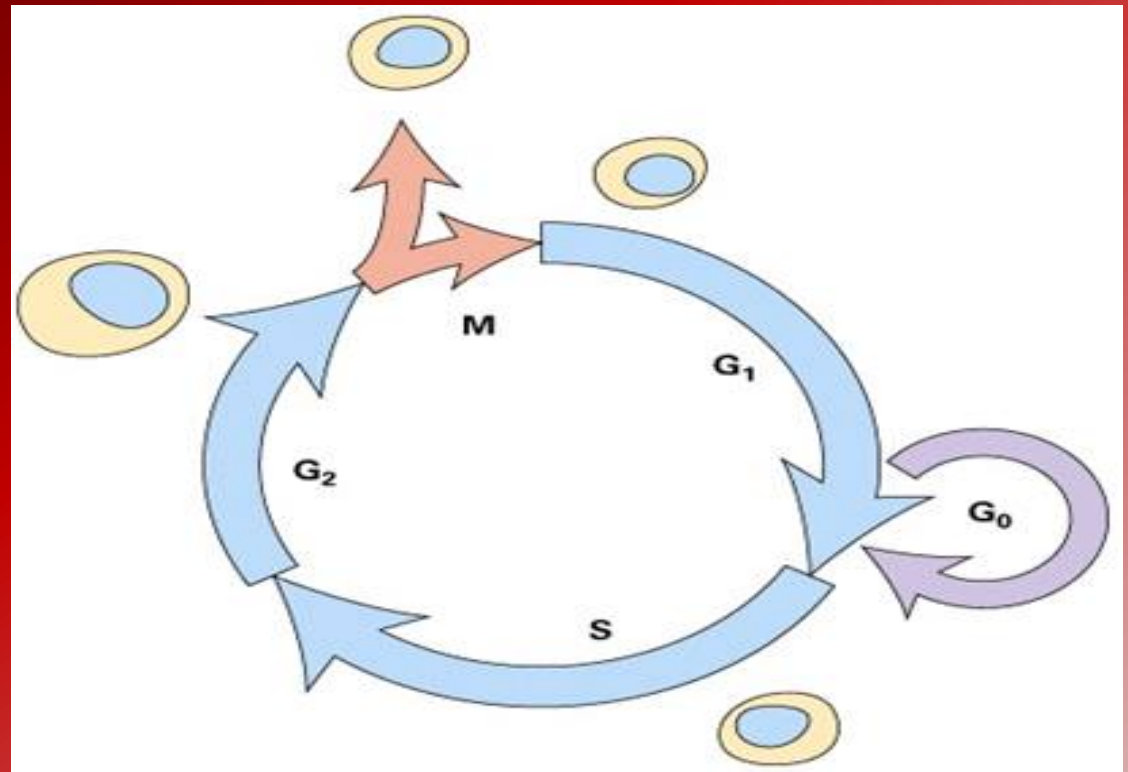


# Evolution moléculaire



## c) Cycle cellulaire

- Phase G1
- Phase S
- Phase G2
- Phase M

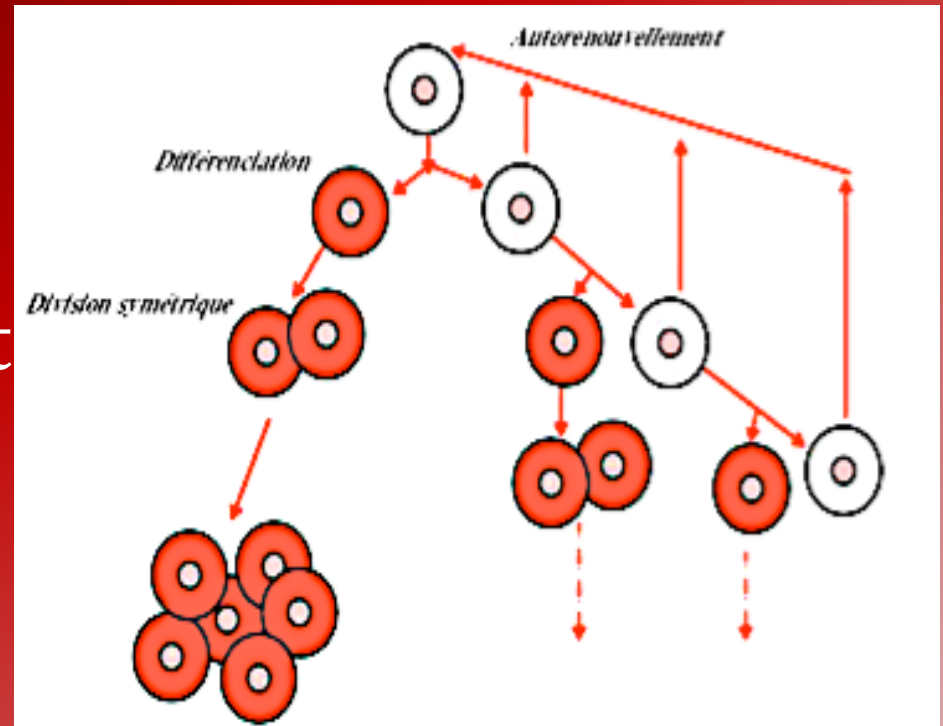


# Programmation cellulaire

- Division
- Différenciation
- Motilité
- Quiescence
- Sénescence
- Mort : apoptose ou nécrose

# D) Cellules souches et homéostasie

- Cellules souches :
  - non différenciée
  - capable de se diviser
  - auto-renouvellement
  - se différencie à la demande

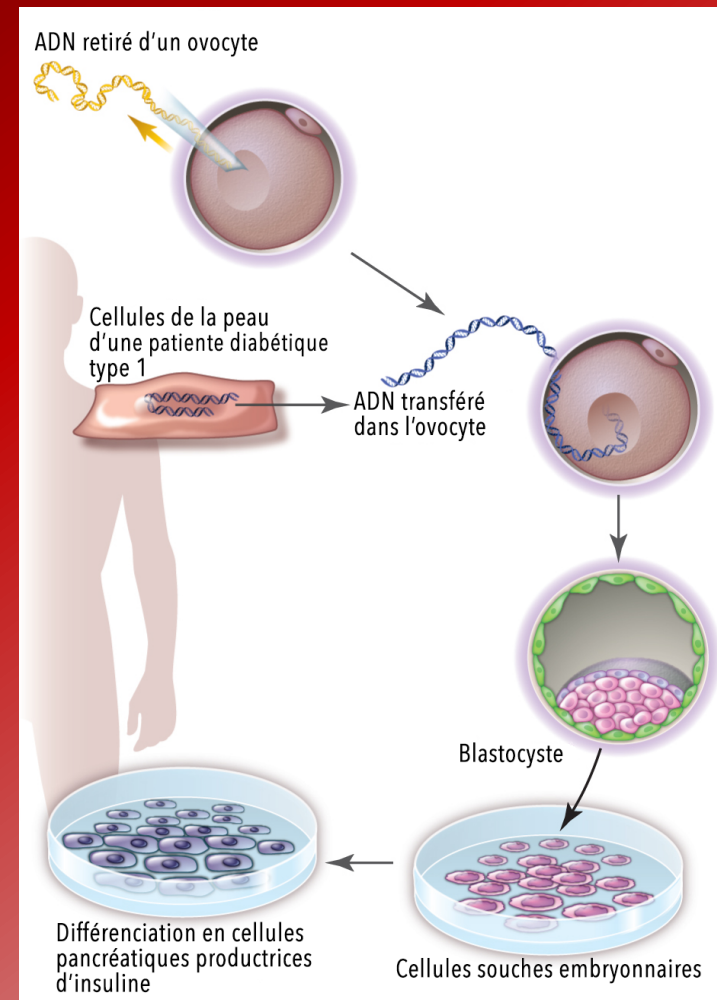


# Types de cellules souches :

- Cellule totipotente
- Cellule pluripotente
- Cellule multipotente
- Cellule unipotente

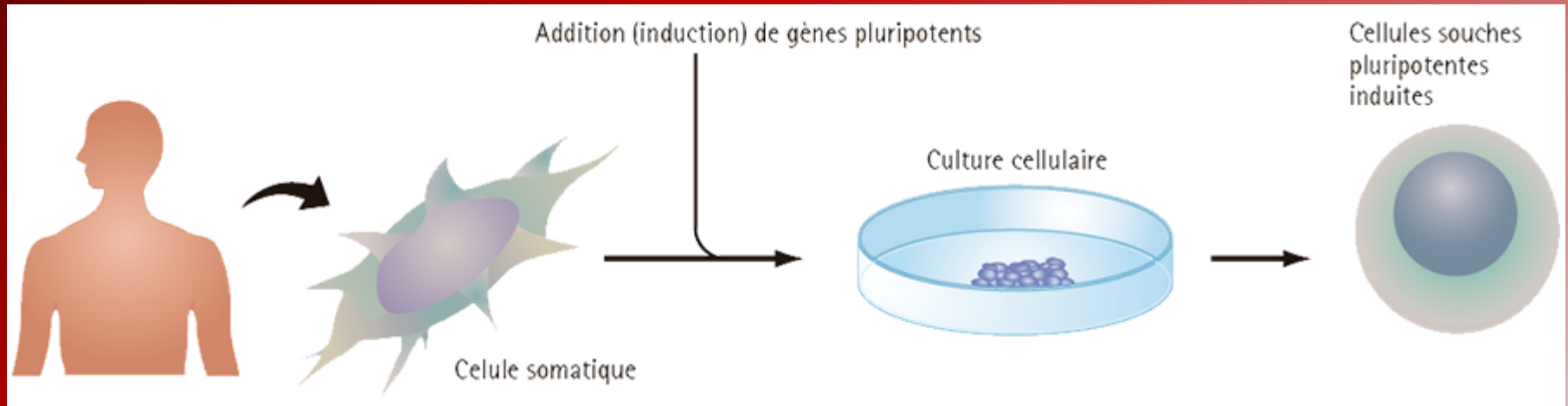
# Cellules souches embryonnaires

- Pluripotente
- Présente au stade de blastocyste
- Pas de rejet
- Problème éthique et physique (tumeur)



# Cellules souche pluripotente induite

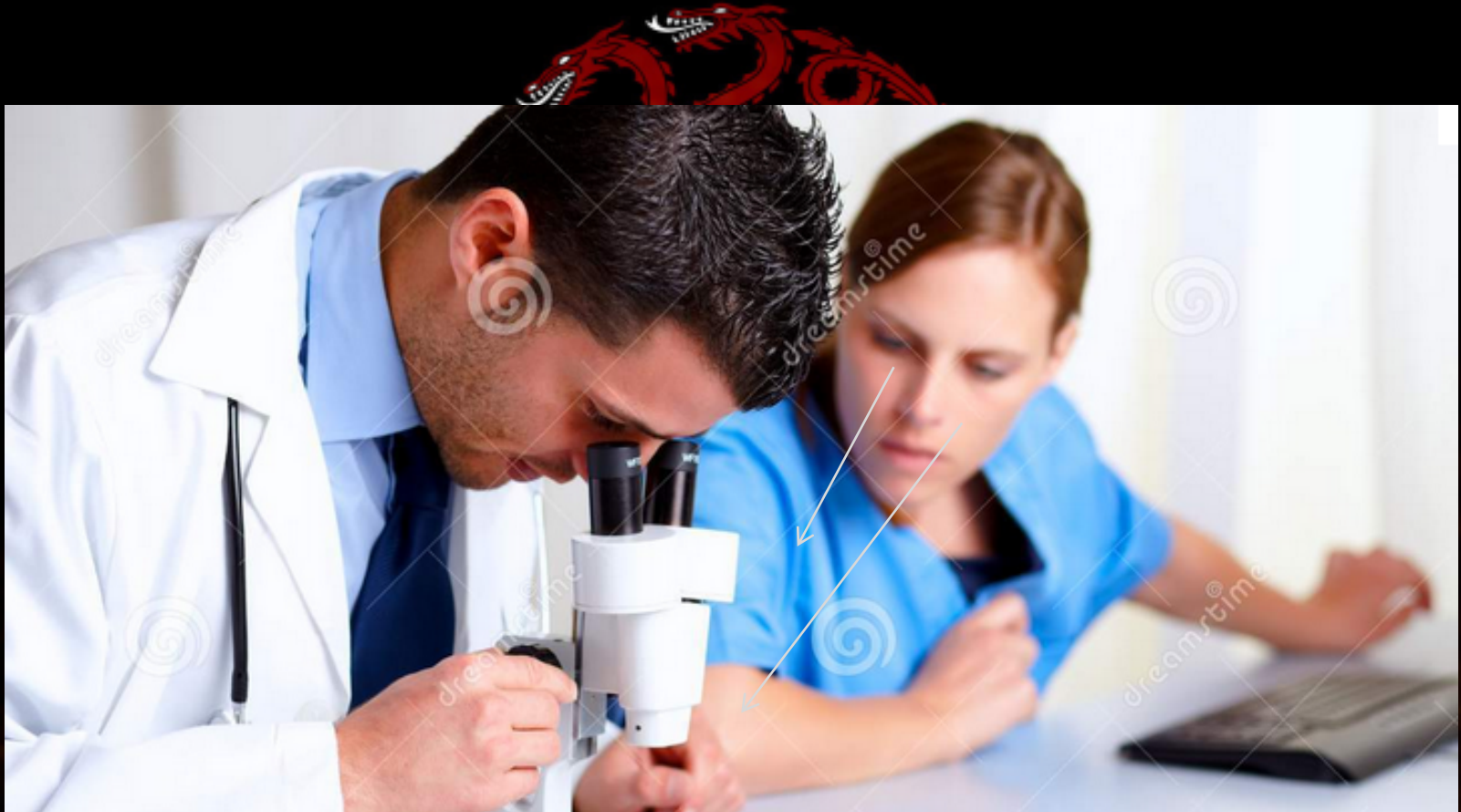
- Pr Yamanaka
- Pas de rejet
- Pas besoin d'embryon !!



# Homéostasie

- Capacité d'un organisme vivant à revenir à un état originel après une perturbation
- Ex : glycémie ou nombre de cellules
- Catastrophique en cas de défaillance

## II) Méthode d'étude de la cellule



# A) Introduction

- 3 types de micro :
  - Optique, électronique et atomique
  - 3 résolutions différentes
- 
- Résolution : capacité de distinguer deux objets côte à côte.

## B) Microscopie optique

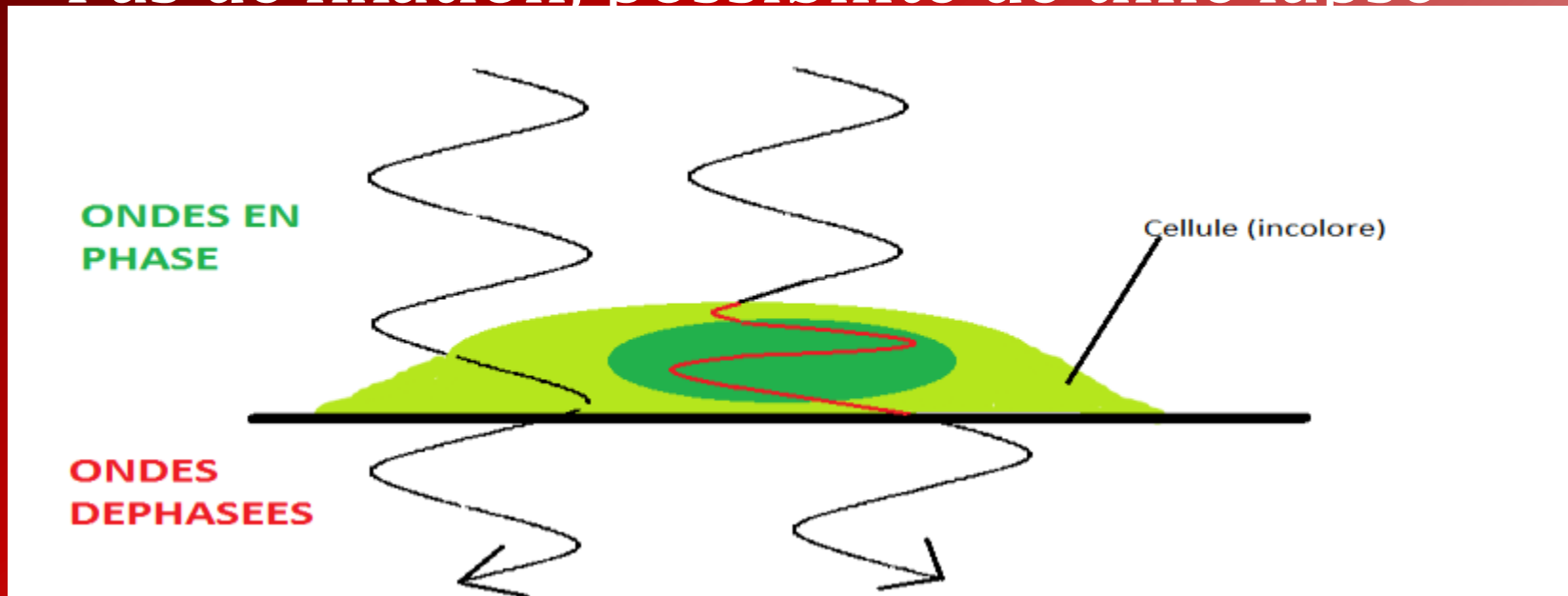
- Microscopie optique conventionnelle
- Microscopie à contraste de phase
- Microscopie à fluorescence
- Microscopie confocale
- Résolution : 0.2mm à 200nm

# Microscopie optique conventionnelle

- Observation lumière directe
- Œil observe l'image agrandie
- Nécessité de fixer l'échantillon (souvent car échantillon mou)

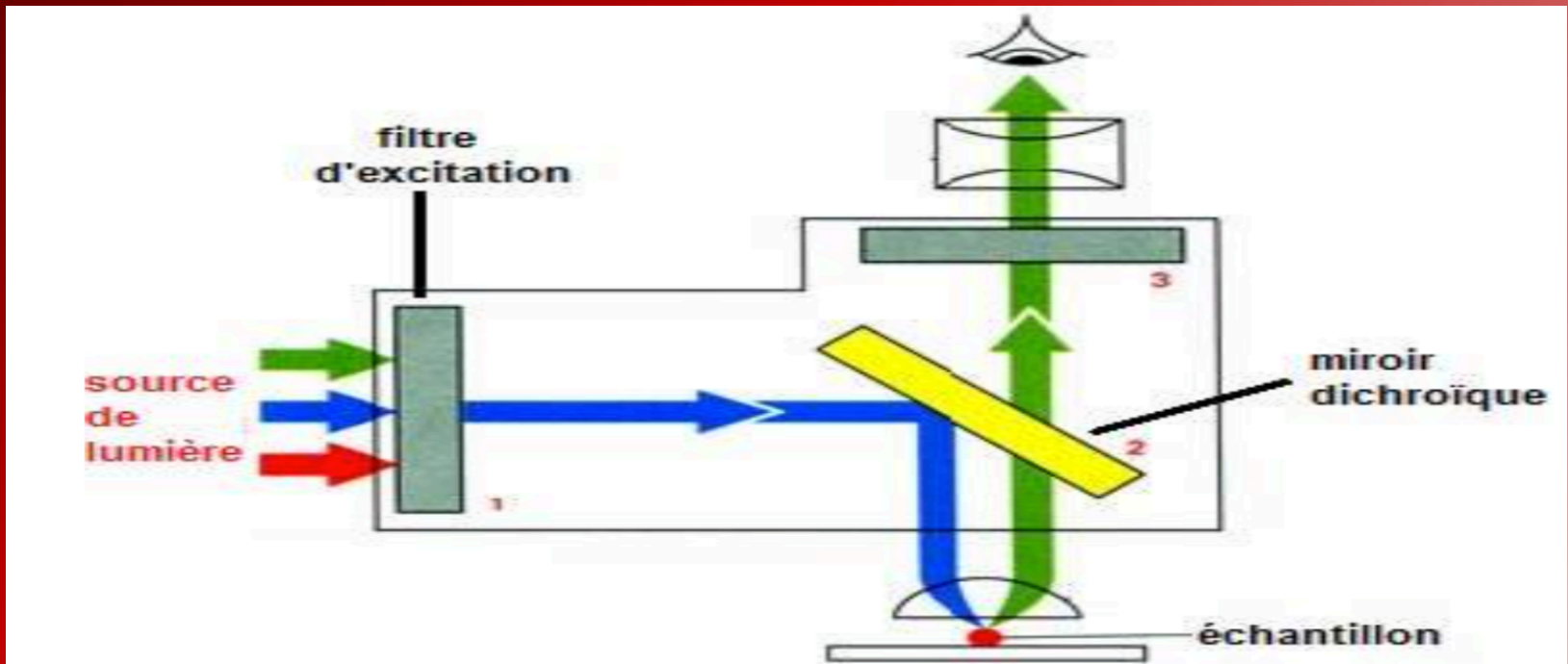
# Microscopie à contraste de phase

- Utilisation des propriétés de réfraction de l'échantillon
- Amplification du déphasage
- Pas de fixation, possibilité de time lapse



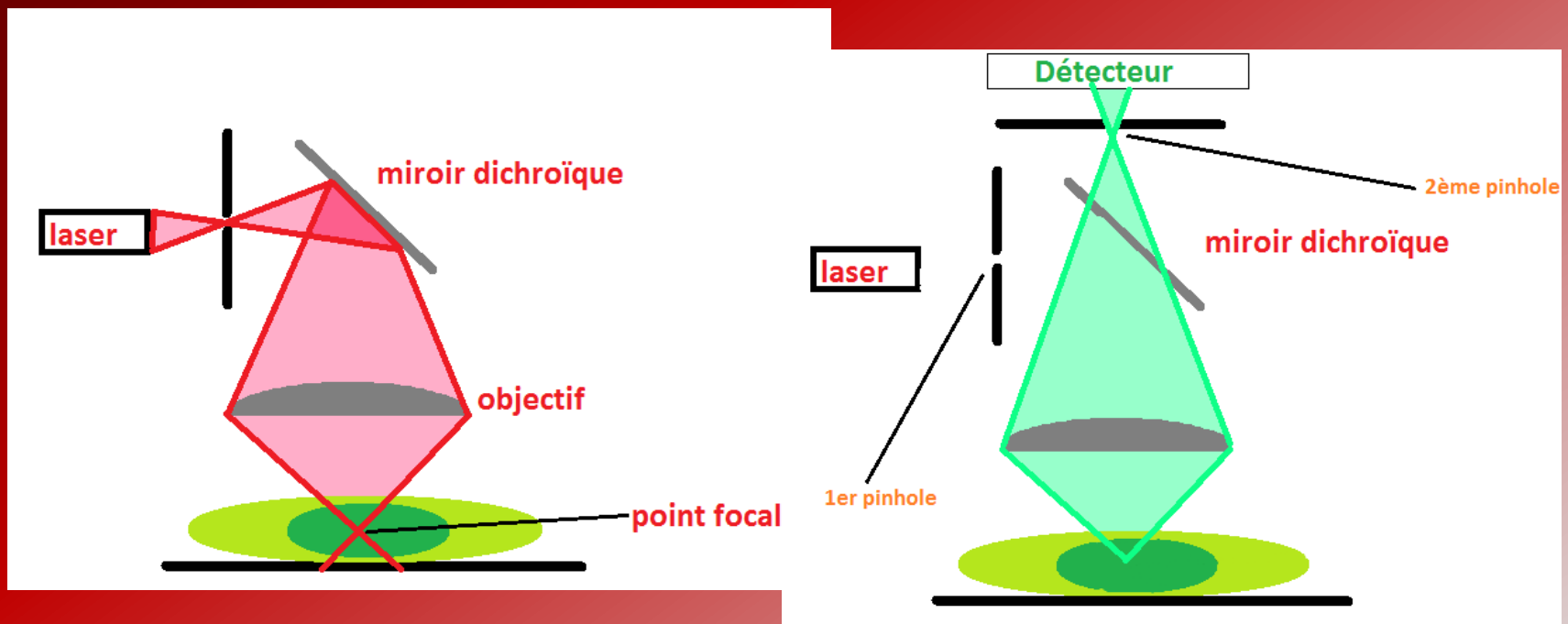
# Microscopie à fluorescence

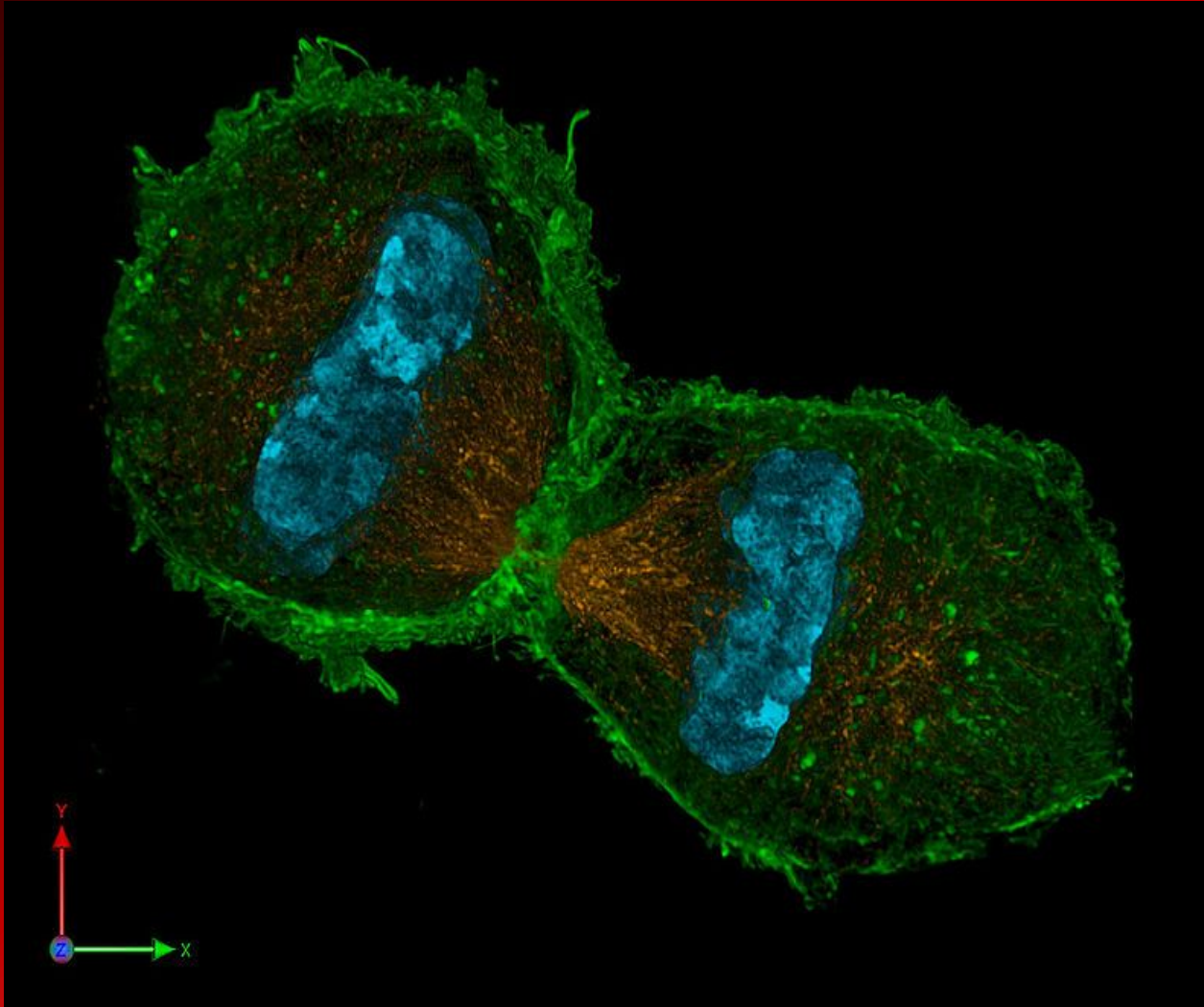
- Observation indirecte via des fluorochromes
- Excitation des molécules grâce à des longueurs d'ondes spécifiques



# Microscopie confocale

- Technique de microscopie à fluorescence
- Permet une étude tridimensionnelle
- Sélection du plan de focalisation, diminution du bruit, permet image 3D





# C) Fluorescence

- Principe :
- Molécule fluorescente capable d'absorber de l'énergie (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement (lumière d'émission)
- Permet d'observer des molécules spécifiques



# Différents fluorochromes

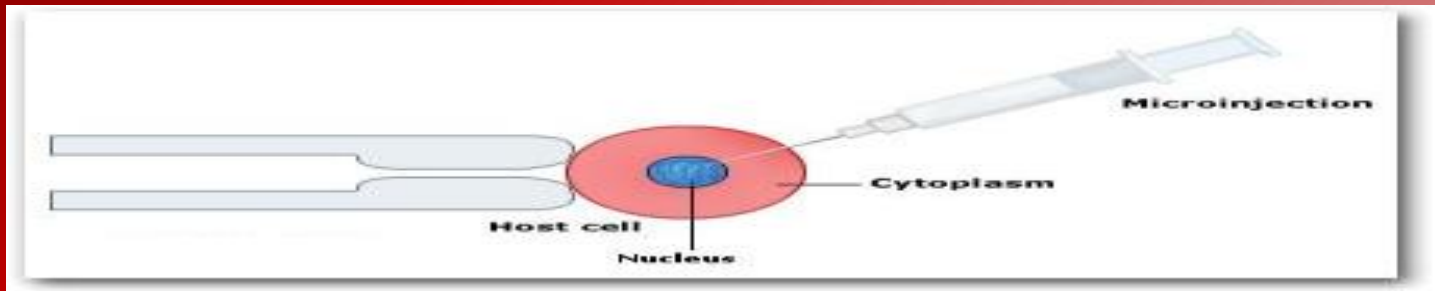
- GFP : absorbe dans le bleu, émet dans le vert
- Propriété fluorescente intrinsèque
- S'exprime dans n'importe quelle cellule



- Fluorescéine : absorbe dans le **bleu**, émet dans le **vert**
- Rhodamine : absorbe dans le **vert**, émet dans le **rouge**

# Comment introduire des molécules fluorescentes dans la cellule ?

- 1) la microinjection :
  - Injection avec une micropipette du fluorochrome
  - Injection cellule par cellule, peu utilisé



- 2) électroporation :
  - Choc électrique qui crée de micro pores transitoires
  - -traitement de plusieurs cellules
  - Peu physiologique, peu utilisé

- 3) vectorisation par vésicule
  - On met les cellules en présence de fluorochromes
  - par fusion les vésicules franchissent la MB plasmique
  - Méthode la plus douce et physiologique qui soit !

# RAPPEL

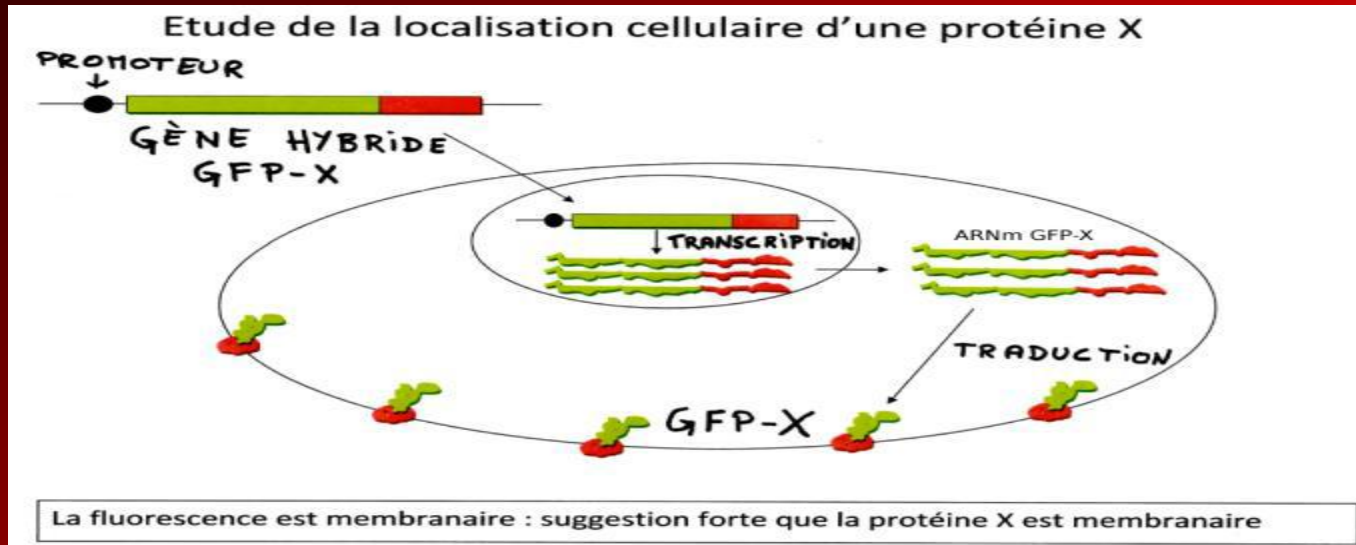
- ADN (double brin)
- Transcription de l'ADN en ARN grâce à l'ARN polymérase
- Traduction de l'ARN en plusieurs Acides Aminés qui forment la protéine correspondante
- Protéine rejoint sa position cellulaire et joue son rôle

- 4) Expression d'un gène codant pour la protéine d'intérêt
  - connaissance du gène codant pour la protéine d'intérêt
  - greffe de la séquence de la GFP (par exemple); obtention d'un gène hybride GFP-prot
  - transfection de ce gène dans la cellule
  - transcription, traduction et expression de notre prot hybride

# Démontrer vs Suggérer

- Démontrer = aucune autre possibilités possibles (rare en milieu expérimental #biocell)
- Suggérer= tout laisse supposer que ce que l'on affirme est vrai mais pas à 100%

# Exemple :



Ici, je démontre que la protéine de fusion GFP-prot est membranaire  
Je suggère que la véritable protéine est membranaire (peut être que la fusion traductionnelle a modifié ses caractéristiques ...)

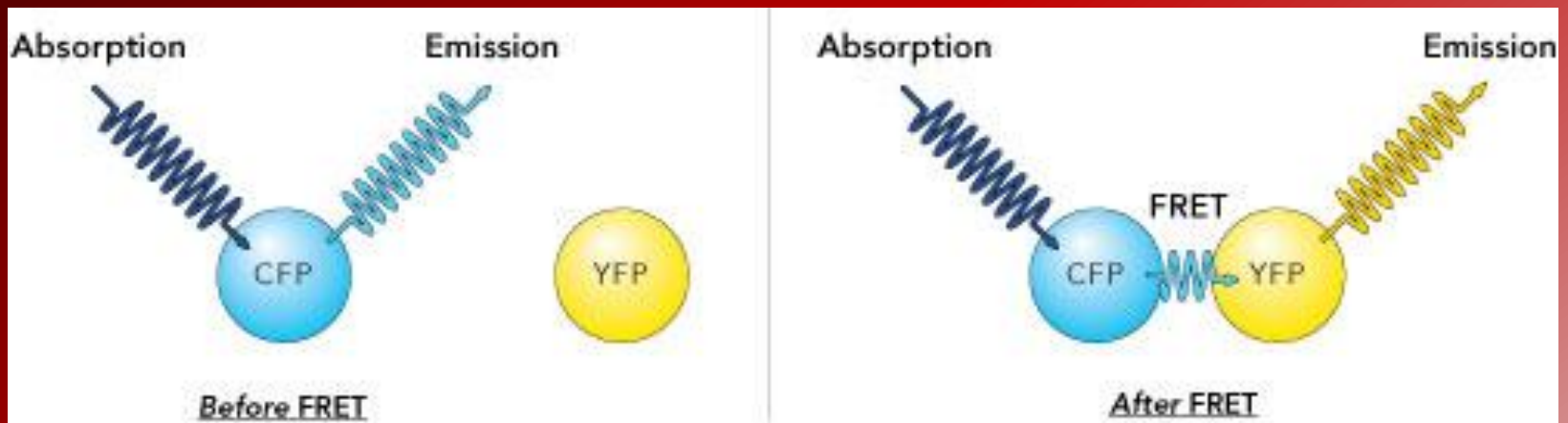
# Application à la fluorescence

- FRET
- FRAT
- FLIP
- FISH
- Immunofluorescence indirecte
- Fluorescence induite

# FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

- Permet l'étude des interactions moléculaires via un transfert d'énergie non radiatif
- Principe : on greffe des fluorochromes aux molécules que l'on veut étudier. Il faut que :
  - le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur
  - les molécules soient espacés de moins de 10 nm

# FRET intermoléculaire

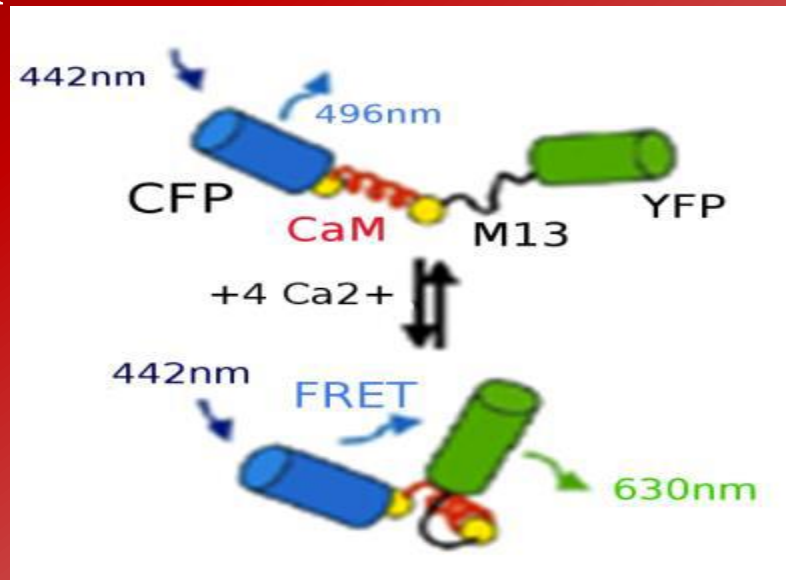


# FRET intramoléculaire

- Exemple de la sonde caméléon :
  - Permet de mesurer le taux de calcium
  - Modification du taux de calcium = chgmt de conformation moléculaire
  - Deux extrémités de la sonde calcique se rapprochent quand le taux de calcium augmente

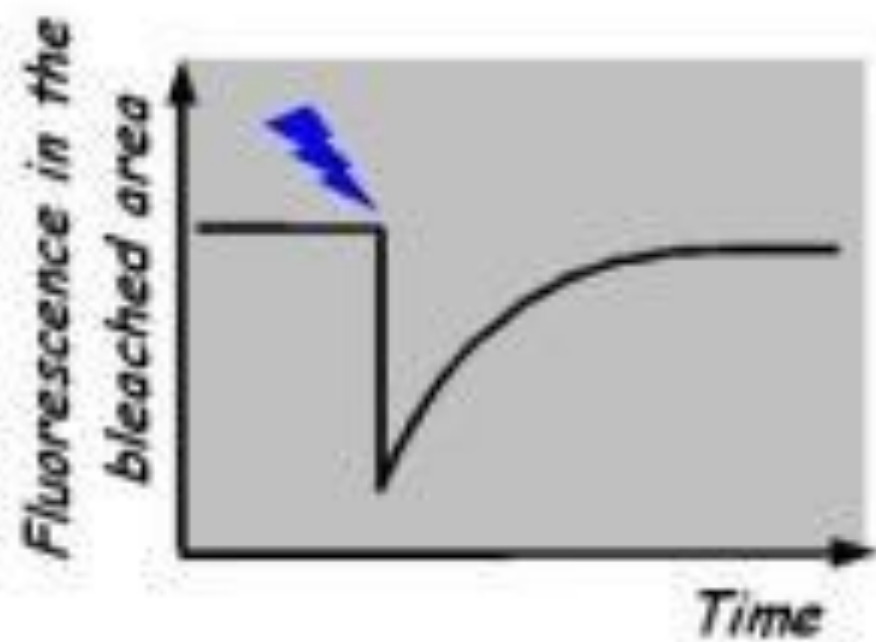
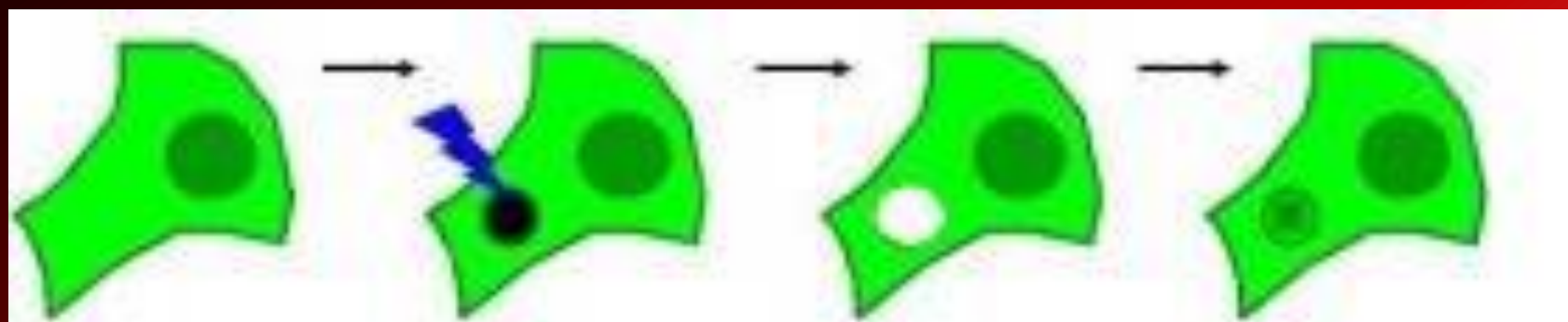
# Principe :

- On greffe deux fluorochromes à chaque extrémités
- Si calcium augmente, transfert de lumière sinon pas de transfert
- Fluorescence sera proportionnelle au taux de calcium



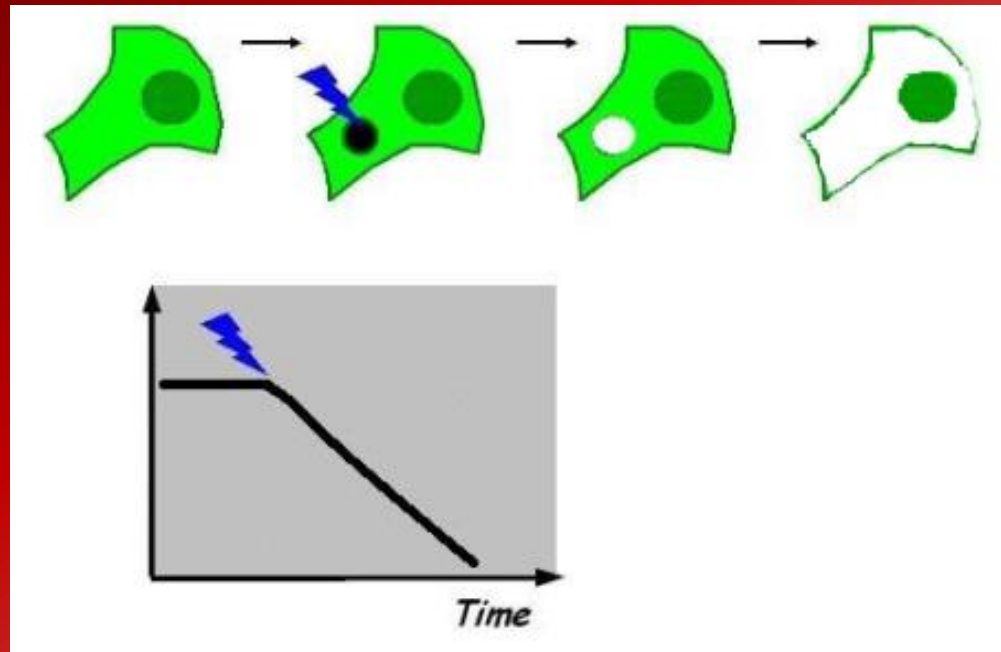
# FRAP

- Technique basée sur le photoblanchiment de la cellule
- On irradie un point précis de la cellule (l'irradiation de la fluorescence est irréversible)
- Puis on observe le retour de la fluorescence
- Permet l'observation du mouvement des molécules fluorescente



# FLIP

- On irradie un point de la cellule en continu
- On observe la disparition de la fluorescence



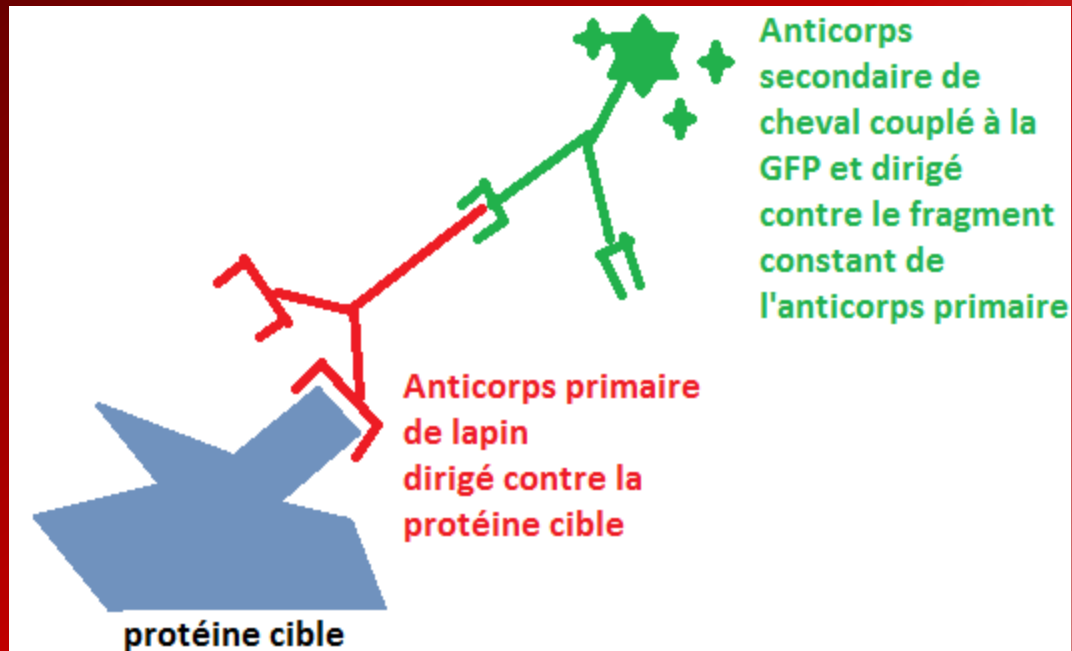
# Fluorescence induite

- Rappel : un colorant devient fluorescent lorsqu'il se fixe à sa molécule d'intérêt.
- Deux colorants :
  - Hoechst et dapi : se fixe spécifiquement sur les bases A et T
  - Les intercalants : se fixe non spécifiquement

# Immunofluorescence indirecte

- Définition :
  - Protéine joue le rôle d'AG
  - Utilisation d'AC monoclonaux
  - Anticorps primaires : reconnaissent la prot
  - Anticorps secondaires : reconnaissent l'anticorps primaire, reconnaît l'anticorps primaire

# Explication



# Attention

- L'anticorps primaire et secondaire doivent appartenir à deux espèces animales différentes
- Pour étudier conjointement deux prot différentes on utilise deux fluorochromes différents

# QCM

- Vous voulez étudier une prot X et une prot Y. On utilise des Ac de chevaux contre X et des Ac de gazelle contre Y. Quels Ac secondaires permettent l'étude conjointe de X et Y ?
  - A) Des Ac de chimpanzé anti immunoglobuline de chevaux couplés à la GFP et des Ac de Panda anti immunoglobuline de gazelle couplés à la fluorescéine.
  - B) Des Ac de chimpanzé anti immunoglobuline de chimpanzé couplés à la GFP et des Ac de Panda anti immunoglobuline de gazelle couplés à la fluorescéine
  - C) Des Ac de chimpanzé anti immunoglobuline de chevaux couplés à la GFP et des Ac de Panda anti immunoglobuline de gazelle couplés à la rhodamine
  - D) Des Ac de thug (drôle de zèbre d'ailleurs) anti immunoglobuline de chevaux couplés à la GFP et des Ac de beurette anti immunoglobuline de gazelle couplés à la fluorescéine

Bonne réponse : C)

# Immunofluorescence directe

- Utilisation d'Ac primaires directement couplés à un fluorochrome contre la prot d'intérêt
- Défaut : moins de précision par augmentation du bruit de fond

# FISH (Filet-O)

- Technique d'hybridation in situ d'acides nucléique (DNA)
- Permet d'étudier la localisation d'un gène
- Permet une étude chromosomique
- Permet de faire de jolies caryotypes coloré (avantage principal évidemment)

# Principe :

- Dénaturation de l'ADN
- Ajout de la sonde fluorescente
- Hybridation spécifique
- Révélation

# FISH bis

- Plus la sonde est longue plus elle sera spécifique du gène
- Possibilité d'étudier des ARN mais pas de dénaturation vu que les ARN sont simple brin
- Fish ne permet pas d'études vivantes car dénaturation de l'ADN

## D) Microscopie électronique

- Résolution : 200 à 0.2 nm (meilleur que l'optique)
- Permet l'observation des organelles et des molécules
- Utilisation d'e- et plus de photons

# Préparation d'un échantillon en ME

- Fixation
- Déshydratation (perte d'information de la physiologie de la cellule)
- Mise en résine de l'échantillon
- Agent de contraste

# 2 types de ME

- Microscopie électronique à transmission
- Microscopie électronique à balayage

# ME à transmission

- Utilisation d'un faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon
- On regarde ce qui passe
- Plus une structure est dense aux électrons plus elle apparaîtra foncée
- Permet de bien voir les contours de la cellule et des organites

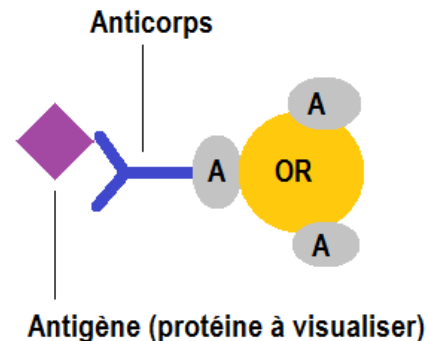
# Plusieurs technique de MET

- 1) marquage à l'or

Greffe d'une bille d'or à un AC qui est dirigé contre la prot

contre la prot

Amplification du signal (or est dense aux électrons)



- 2) Ombrage

- étude de la surface de l'échantillon

- système sous vide

- réplique en métal de la surface de l'échantillon

- Dissolution de l'échantillon est observation de la réplique

- Visualisation indirecte



- 3) Cryomicroscopie

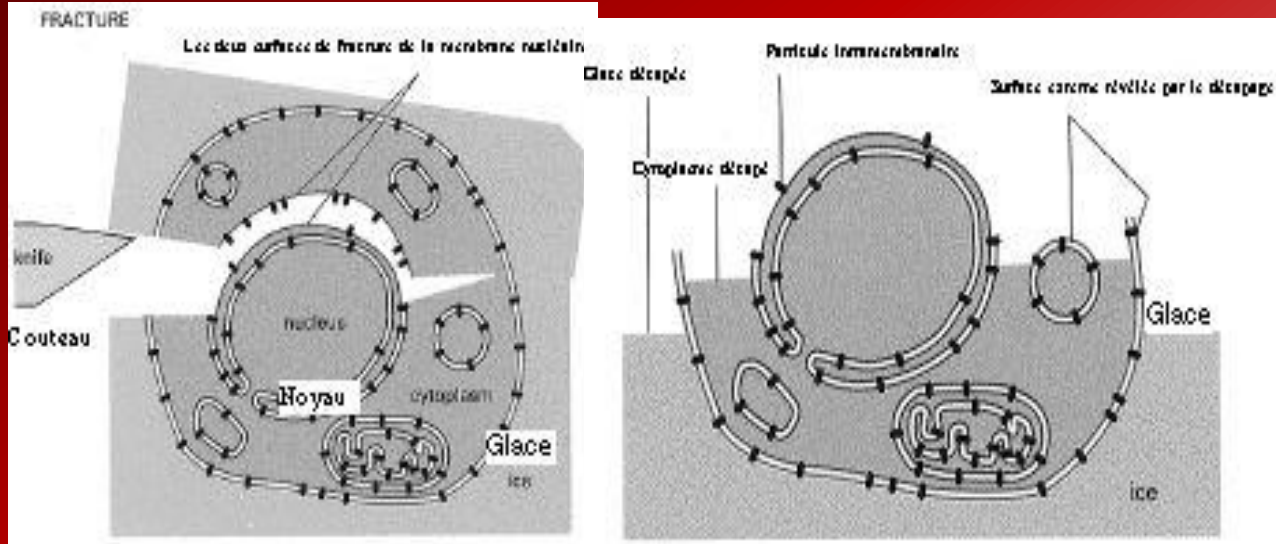
→ Limite la dénaturation

Principe :

- congélation

- fracturation de l'échantillon dans les zones de moindre résistance (MB)

- décapage et vaporisation de platine puis observation de la réplique

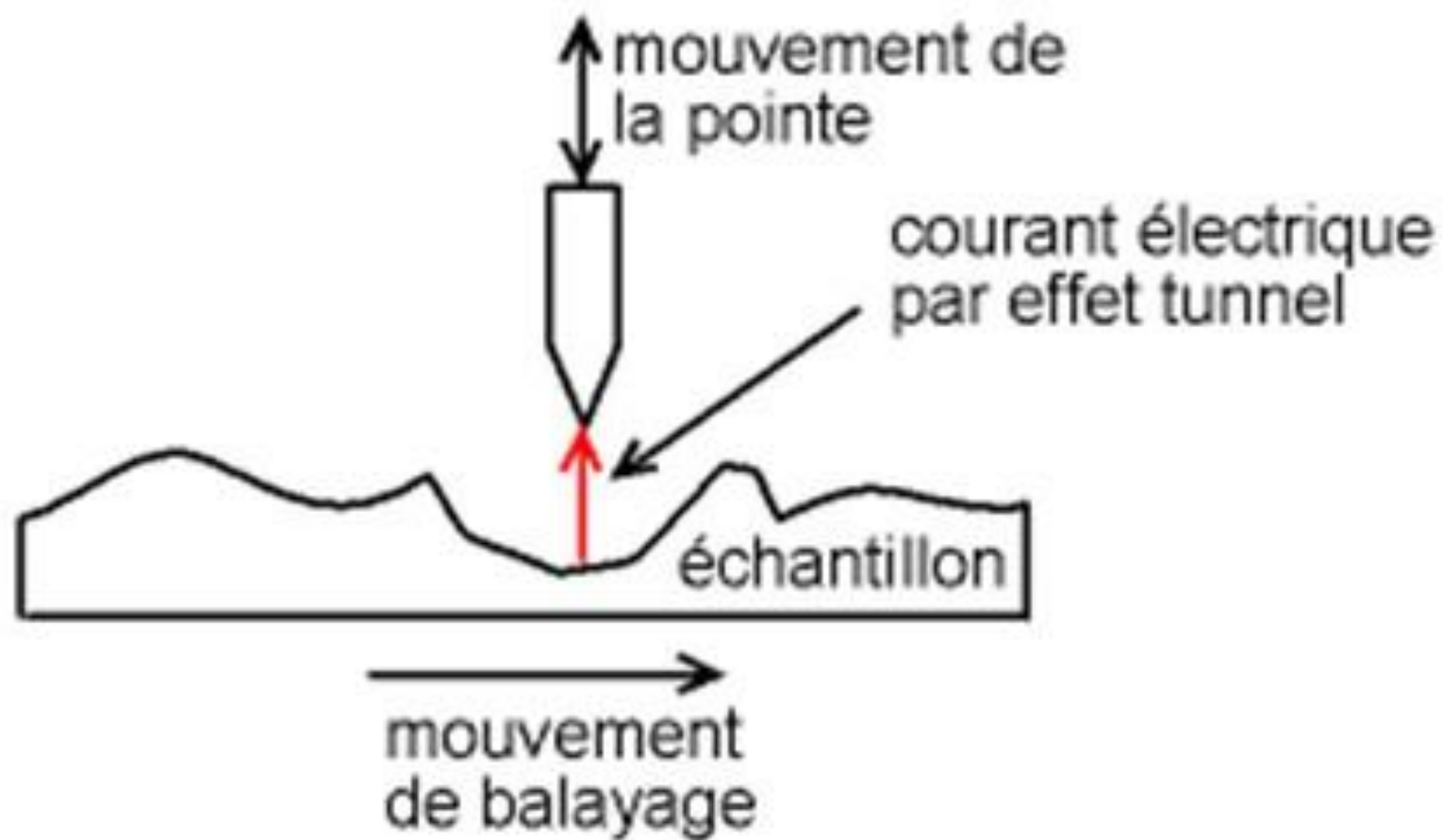


# Microscopie à balayage

- On regarde ce qui est réfléchi
- Electrons sont réfléchit par l'échantillon
- Recueil d'électrons secondaires
- Moins bonne résolution qu'en MET (10nm)

# E) Microscopie à force atomique

- Image directe de l'échantillon
- Mesure des volume
- Echantillons non fixés
- Balayage de l'échantillon avec une pointe très fine
- Utilisable en phase liquide
- Résolution supérieure ou égale a la ME



Question ?