

# INTRODUCTION

## 1) La cellule

Toutes les cellules sont faites de macromolécules (dont l'ADN et l'ARN et en grande majorité des protéines) constituées des mêmes éléments chimiques : C, H, O, N et Fe.

La cellule est l'unité d'organisation du vivant. Il y a 2 types de cellules: les procaryotes et les eucaryotes.

### **a) La cellule procaryote (ex: bactérie)**

- Se divise par défaut
- Toujours unicellulaire
- Pas de compartiment nucléaire (ADN diffus car pas de noyau)
- Pas d'organites
- Traduction co-transcriptionnelle (l'ARN est transcrit en même temps qu'il est traduit en prot) → transcription et traduction sont couplées
- Souvent entourée d'une paroi cellulaire (protège la cellule)

### **b) Les cellules eucaryotes (ex: mammifères)**

- Se divisent grâce à un signal
- Pluricellulaire ou UNICELLULAIRE (levure)
- ADN compartimenté dans le noyau et donc séparé du cytoplasme par l'enveloppe nucléaire (double membrane présentant des pores)
- Organites isolés (mito, peroxyosome) ou en complexe (système endomembranaire composé du RE, Golgi, lysosome, et endosome)
- Traduction post-transcriptionnelle (ARN transcrit dans le noyau PUIS traduit dans le cytoplasme en protéines) → transcription et traduction sont découplées

### **c) L'arbre phylogénétique**

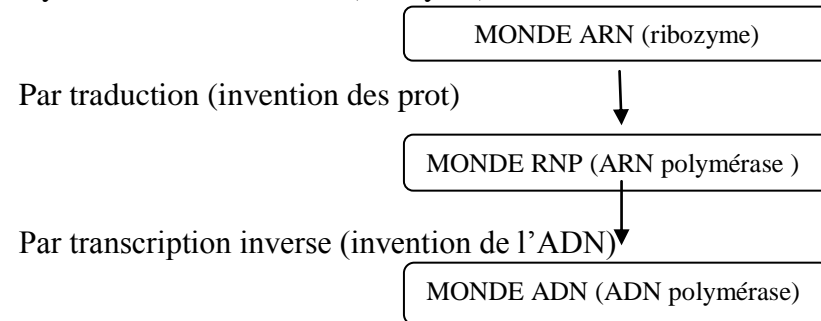
Grâce à une comparaison de l'ADN, on a pu identifier 2 groupes distincts cellules différents des bactéries et des eucaryotes: les eubactéries et les

archaebactéries(extrémophiles).

Les eucaryotes, les eubactéries et les archaebactéries ont un ancêtre commun hypothétique (existence pas certaine): LUCA.

### **d) L'origine des cellules**

*Théorie du monde à ARN*: l'ARN pourrait stocker une information ET catalyser certaines réactions (ribozyme).

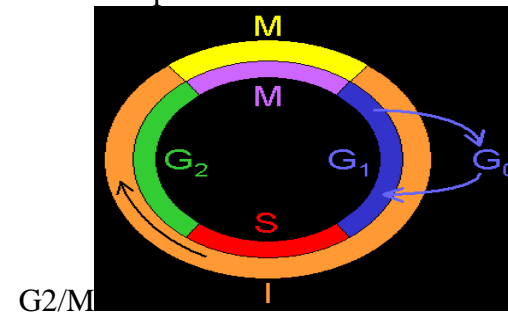


*Théorie endosymbiotique*: l'archaebactérie et l'eubactérie fusionnent et donnent un endosymbionte qui, par division coordonnée, invention du noyau, séparation, transcription et traduction donne une cellule eucaryote.

## 2)Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est la période durant laquelle une cellule-mère se divise pour donner 2 cellules filles. Elle comprend 2 phases principales: l'interphase (G1+S+G2) et la mitose M (caryocinèse+cytocinèse).

- Il existe 2 points de contrôle: G1/S et





### Interphase:

G1: Phase de croissance cellulaire très variable selon les facteurs de croissance. Si absence de facteurs de croissance, la cellule passe en phase G0 (quiescence).

S: Phase de duplication des chromosomes

G2: Phase de contrôle de la duplication des chromosomes

### Mitose:

Phase très courte durant laquelle il y a ségrégation des chromosomes en 2 lots identiques.

## **3) La programmation cellulaire**

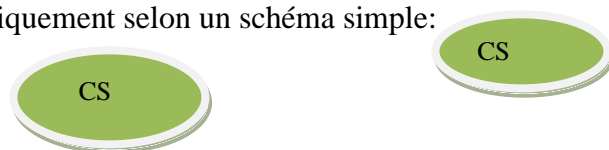
Sous l'effet de signaux exogènes (hormones) et endogènes (horloge interne), la cellule eucaryote peut

- se diviser
- se différencier
- passer en sénescence (G0 irréversible)
- passer en quiescence (G0 réversible)
- se déplacer (motilité)
- mourir soit par accident → nécrose
- soit par suicide programmé → apoptose

*Attention, seule la nécrose n'est pas physiologique (normal).*

## **4) Les cellules souches**

Cellule à un stade INDIFFERENCIE se divisant indéfiniment et asymétriquement selon un schéma simple:



Les CS sont localisées à 3 endroits dans le corps humains: le sang, l'épiderme et l'intestin.

Il y a 4 types de cellules souches:

CS totipotentes (ex: œuf fécondé et morula): donnent tous les types de cellules (organisme entier)

CS pluripotentes (ex: CSE et IPS): donnent une grande variété de tissus (PAS un organisme entier). Les CSE sont des cellules issues de la masse interne du blastocyste et les IPS sont des cellules adultes pro humaines (ex: cellule différenciée de la peau) reprogrammées pour les dédifférencier et revenir à un stade pluripotent.

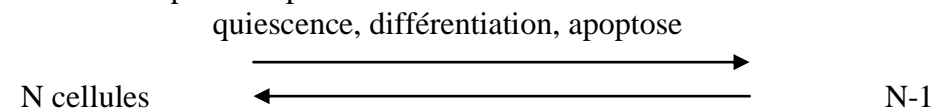
CS multipotentes (ex: CS hématopoïétiques): donnent un large spectre de cellules différenciées

CS unipotentes (ex: CS hépatocytes): donnent qu'un type de cellules

*Attention, l'être humain constitué ne contient plus que des cellules souches multipotentes et unipotentes*

## **5) Homéostasie**

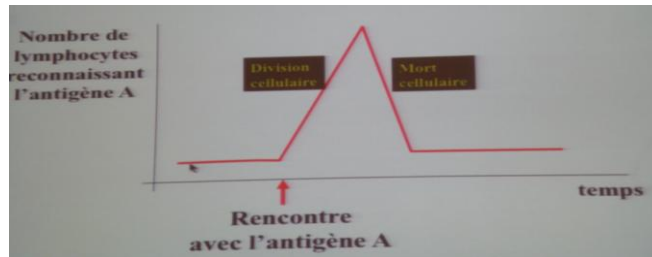
C'est un mécanisme qui assure le maintien d'un nombre constant de cellule dans un tissu après une perturbation.



cellules

division

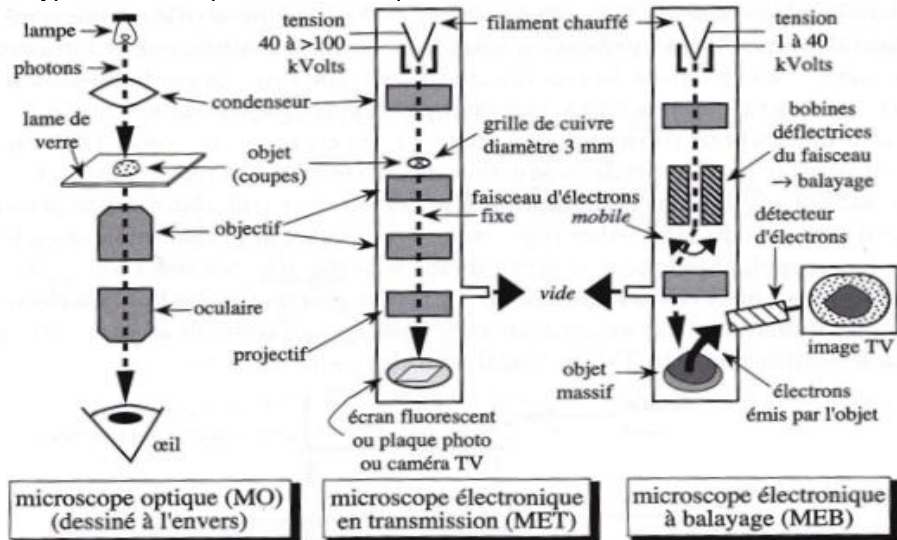
Les cancers (augmentation non contrôlée des cellules) peuvent résulter d'une accélération de la division ou d'une inhibition de l'apoptose, de la différenciation ou de la sénescence.



Exemple: les lymphocytes se divisent pour réaliser leur travail et une fois accompli, il y a mort cellulaire pour revenir à un nombre constant.

## LA MICROSCOPIE:

- 2 types: Photonique et Electronique.



## I) PHOTONIQUE:

### A) Généralités:

- Résolution plus faible que l'Electronique (200µm-200nm) => permet observation Cellule/ Organites mais pas des molécules. => Obligation d' utiliser des marqueurs pour étudier les molécules.

### B) Problème lié à la transparence des cellules:

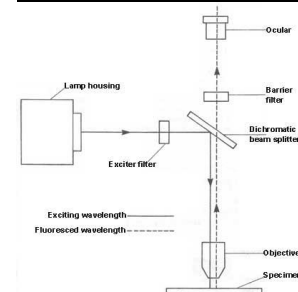
Un problème se pose en microscopie optique, les cellules sont transparente, ainsi il est difficile de les observer telles qu'elles sont dans notre corps, pour remédier à ce problème on peut utiliser des COLORANTS (solution1) (≠fluorochromes), mais ils tuent la cellule (utilisation en Histologie plutôt qu'en microscopie). On peut aussi utiliser la MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE (solution2). (On augmente le déphasage des photons traversant l'échantillon par rapport aux autres pour créer un contraste plus important, ce n'est pas à savoir par cœur et ce n'est pas très grave si vous ne comprenez pas exactement le mécanisme.) Avec le microscope à contraste de phase les cellules apparaissent avec un meilleur contraste mais moins de luminosité. On peut avec ces microscope faire du «microcinéma» ou **microscopie «time lapse**, et donc étudier des cellules vivante en film.

## C) LA FLUORESCENCE: très utiles en microscopie photonique.

### 1) Généralités:

- Certaines protéines sont fluorescentes c.à.d. qu'elles sont capable d'absorber une énergie lumineuse spécifique (donc de longueur d'onde spécifique) (lumière d'absorption) pour ensuite émettre une nouvelle radiation lumineuse d'énergie spécifique inférieure. (Lumière d'émission).

### - Le microscope à fluorescence:



## 2) Un exemple de fluorochrome très utilisé, la GFP (Green Fluorescent Proteine):

- Protéine naturellement présente chez la méduse, elle émet une lumière verte caractéristique.
- Elle présente 3 AA responsables de ses propriétés fluorescentes : le CHROMOPHORE (= triade d'AA)
- On peut modifier cette triade pour obtenir différentes protéines fluorescentes et donc différents spectres d'absorption et d'émission.
- C'est un marqueur Universel (garde sa fluorescence quel que soient les conditions)
- Autres exemples de fluorochromes :  
**Fluorescéine** : (ou FITC) excité dans le bleu, émet dans le vert (comme la GFP)  
**Rhodamine** : excité dans le vert pour émettre dans le rouge.

## 3) Introduction de fluorochromes dans la Cellule :

Pour marquer une molécule on peut lui greffer un fluorochrome, cependant il faut planter cette molécule marquée dans la Cellule pour pouvoir l'étudier. Différentes solutions existent :

### Micro-Injection :

On injecte avec une micro seringue la molécule à travers la membrane, ceci peut se faire sur n'importe quelle cellule mais il faut traiter chaque cellule une à une, cela prend donc très longtemps...

### Electroporation :

On fait apparaître transitoirement des trous dans la membrane, grâce à un choc électrique, ainsi la molécule peut traverser la membrane. Cette technique permet de traiter plusieurs cellules en même temps.

### Vectorisation par vésicule :

Cette méthode est moins « traumatisante » pour la cellule, elle utilise le phénomène naturel de fusion membranaire pour introduire les molécules dans la cellule. On fabrique des vésicules contenant les molécules que l'on veut étudier puis on force la fusion avec la membrane cellulaire.

### Expression du gène :

On modifie le gène de la protéine (il faut que ce soit une protéine sinon ce n'est pas codé) à étudier de telle sorte que la cellule produise elle-même une protéine fluorescente (attention on ne pourra pas utiliser cette méthode avec des fluorochromes non protéiques, et donc non codés).

## 4) Techniques en microscopie à fluorescence :

### Les 3 plus Importantes :

| <u>Technique</u>                                     | <u>Principe</u>  | <u>Objectif</u>  | <u>notes</u>   |
|--|--|--|--|
| FRET<br>(fluorescence resonance energy transfer)     | 2 fluorochromes, la lumière d'émission du premier doit correspondre à la lumière d'absorption de second.<br>- Si les 2 fluorochromes sont à moins de 10nm il y a un transfert d'énergie entre les 2 sans émission de lumière. Ceci se traduit par l'apparition de la lumière d'émission du second suite à une irradiation à la lumière du premier. | - 2 types de FRET :<br>- <b>Intermoléculaire</b> : entre 2 molécules différentes, il met en évidence une proximité des 2 molécules (une interaction)<br>- <b>Intramoléculaire</b> : entre 2 parties d'une même molécule, FRET quand elles sont collées (mise en évidence d'un changement de conformation.) | - il faut qu'il y est recouvrement entre spectre d'émission et d'absorption des deux fluorochromes.  |
| FRAP<br>(fluorescence recovery after photobleaching) | photoblanchiment d'une zone de la cellule puis on arrête l'irradiation, si la zone irradiée redevient fluorescente on aura mis en évidence le déplacement des fluorochromes dans la cellule, venu remplir la zone blanche.   | Etude du mouvement des fluorochromes (et donc aussi des molécules auxquels ils sont rattachés) dans la cellule.  | Attention ! : La perte de fluorescence des molécules est irréversible cependant la perte de fluorescence de la zone transitoirement irradiée ne l'est pas. |

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| FLIP<br>(fluorescence loss in photobleaching) | photoblanchiment continu d'une zone de la cellule, pendant l'irradiation on observe | idem + étude de la vitesse de déplacement.<br>En effet il est plus |  |
|---|---|--|--|

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
|  | une autre zone de la cellule, si cette zone perd sa fluorescence cela voudra dire qu'il y a eu mouvement des fluorochromes de la zone irradiée vers la zone observée. | facile d'observer la vitesse de disparition de la fluorescence plutôt que sa vitesse de réapparition. |  |
|--|---|---|--|

**Le Photoblanchiment** : Le FRAP et le FLIP utilise le photoblanchiment (= photobleaching) cela consiste à utiliser un laser pour irradier des molécules fluorescentes et leur faire perdre leur fluorescence. On ne tue pas la cellule, on ne détruit pas les molécules on ne fait que disparaître les propriétés fluorescentes.

### **Autres Techniques :**

#### **- Fluorescence Induite :**

On utilise des molécules qui deviennent fluorescente une fois en contact avec la molécule à marquer. Ceci concerne surtout des fluorochromes se fixant aux acides nucléiques (ADN, ARN)

- Certains se fixent sur les paires de base A-T : DAPI et Hoechst
- D'autres s'intercalent entre les brins d'ADN ou d'ARN double brin (ça existe): ce sont les intercalants ex : l'iodure de propidium, le bromure d'ethidium.

Ceci nous permet de colorer l'ADN dans le noyau, l'observation de sa densité nous permet de différencier des zones où l'ADN est plus compact (hétérochromatine) que d'autres (euchromatine), il existe aussi une zone non colorée (donc sans ADN) c'est le Nucléole.

#### **- Immunofluorescence indirecte :**

On utilise deux types d'anticorps, des AC dirigés contre la molécule à étudier (AC primaires) et des AC fluorescents (AC secondaires) dirigés contre les AC primaires. On utilise 2 types d'AC pour amplifier la fluorescence, plusieurs AC secondaires se fixeront sur chaque AC primaire.

ATTENTION : il faut que les 2 types d'AC proviennent d'espèces différentes.

#### **- FISH : Fluorescence In Situ Hybridation :**

On fabrique des sondes ADN fluorescentes à partir du gène à étudier puis on introduit cette sonde pour localiser le gène dans la cellule, on peut aussi grâce à cette technique, localiser des brins d'ARN messager.

#### **- La biopuce :**

Cette technique utilise aussi le principe d'hybridation, on utilise une plaque sur laquelle on place différents brins d'ADN hybridés complémentaires de différents ARN, on met cette plaque en contact avec le contenu de la cellule. Si un ARN se fixe sur un ADN il y a apparition de fluorescence sur la plaque. Ainsi on peut comparer le

transcriptome de différentes cellules etc.

### **5) La microscopie confocale (!!!:appartient à la MO):**

Elle permet d'obtenir des images en 3D en examinant chaque section optique une après l'autre, on élimine les signaux hors champ grâce à un diaphragme (pin hole). Ce microscope permet d'observer des échantillons épais et possède une meilleure résolution que le MO simple.

## **II) ELECTRONIQUE :**

2 types : En transmission et à Balayage.

### **A) En transmission :**

#### **1) Généralités :**

Les électrons traversent l'échantillon, comme les photons en MO. Les échantillons sont placés sous vide pour augmenter le rendement en électrons (les électrons ne sont pas déviés par les molécules de l'air), les échantillons ne peuvent donc pas être hydratés (il existe néanmoins une alternative : la cryomicroscopie)

Ces microscopes offrent une très bonne résolution, cependant la préparation des échantillons et l'utilisation du microscope sont des choses très techniques.

#### **2) Techniques :**

**Marquage à l'or** : On utilise des AC dirigés contre la molécule à étudier, et on y greffe des molécules d'or. Pas besoin d'AC secondaire car les molécules d'or sont très volumineuses. C'est l'équivalent de l'immunofluorescence en MO.

**Coloration par ombrage** : On vaporise une surface de l'échantillon avec des métaux lourds, ensuite on élimine l'échantillon par un traitement acide, on observe ensuite une réplique en métal de l'échantillon. Les métaux lourds étant denses aux électrons, la réplique apporte un meilleur contraste que l'échantillon lui-même.

**Cryomicroscopie** : On pratique la cryofracture (on durcit l'échantillon à -150°C dans l'azote liquide puis on fracture les blocs sous vide à l'aide d'un couteau, les plans de fracture correspondent aux plans de moindre résistance ex : entre deux feuillettes de la membranes). On utilise ensuite une technique de coloration par ombrage pour observer les surfaces fracturées.

### **B) A Balayage :**

Les électrons sont ici réfléchis par la surface de l'échantillon, on capte les électrons renvoyés par l'échantillon pour obtenir l'image. On peut ainsi obtenir des images en 3D. On peut observer des échantillons plus épais qu'en ME en transmission et dans certaines conditions des échantillons vivants. Les échantillons ne doivent pas forcément être placés sous vide.

## MANIPULATION DES CELLULES

### 1) *Obtention des cellules*

- 1 ère étape : dissocier les cellules du tissu, sauf pour le sang car les cellules sont lâches. (=suspension). Pour cela, il faut les séparer de leur *matrice* et détruire les *contacts intercellulaires* en utilisant des *protéases* et/ou une agitation légère.

- 2 ème étape : dissocier les cellules entre elles (car un tissu regroupe différents types de cellules) - en fonction des propriétés physiques

- cytométrie de flux

| Purification sur support  | Cytométrie de flux  |
|---|---|
| <p>La séparation des cellules se fait grâce aux Ag naturellement présents à la surface des cellules</p> <p>- <u>sélection négative</u> : correspond à la solution contenant les cellules non reconnues par l'Ac. C'est la plus utilisée car pas de modification du fonctionnement de la cellule</p> <p>- <u>sélection positive</u> : cellules fixées aux Ac, 2 défauts qui modifient la cellule : fixation Ag-Ac (activation de la cellule)<br/>il faut séparer les cellules des Ac (par élution)</p> | <p>Technique qui permet à la fois d'analyser les cellules en suspension (cytométrie analytique) et de les séparer (cytométrie de séparation = FACS)</p> <p>Au cours du trajet unidirectionnel des cellules, on applique un laser qui permet :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- d'étudier la fluorescence : après fluorescence induite, on mesure la quantité d'ADN coloré de chaque cellule → étude du cycle cellulaire.</li> <li>On peut même déduire le temps de chaque phase du cycle</li> <li>- de mesurer la taille et la forme des cellules</li> <li>- <u>Le FACS</u>: on agite la suspension pour que chaque goutte contienne 1 cellule. La cellule est chargée proportionnellement à sa fluorescence. Ensuite un champ électrique les dévie. On sépare donc les cellules fluo des cellules non fluo.</li> </ul> |

### 1) *Culture des cellules*

| avantages   | avantages   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- plus homogène que dans des tissus (=in vivo)</li> <li>- les conditions expérimentales sont contrôlées</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- hors contexte (= in vitro)</li> <li>- on peut facilement obtenir des mutants, sans les contrôler. Ils nuisent à l'homogénéité</li> </ul> |

|  |  |
|--|--|
| - on peut isoler une cellule et la laisser se diviser pour obtenir des cellules identiques |  |
|--|--|

#### a) culture des organismes unicellulaires

- Sur un milieu semi-solide
- Croissance rapide et conditions de culture simples
- Les mutants sont facilement isolés
- Exemple : la levure est un organisme unicellulaire eucaryote qui se divise environ 50 fois en culture

#### b) culture des cellules animales

- milieu solide
- conditions de culture complexes (il faut des acides aminés, des vitamines, un sérum) : même si les cellules ont tous les nutriments essentiels, il faut des facteurs de croissance pour qu'elles se divisent

Les cultures primaires : obtenues directement après dissociation du tissu. Les cellules se divisent 50 fois environ à cause de la sénescence.

Attention : la sénescence touche les cellules somatiques mais pas les cellules germinales.

Les lignées immortelles : ce sont des variants (mutants) immortels obtenus spontanément ou par des agents mutagènes. On les retrouve dans les tumeurs. Ces cellules ne deviennent pas sénéscentes

Le taux d'immortalité varie selon les espèces : rare chez l'homme, plus fréquent chez les souris