

INTRODUCTION À LA BIOCELLULAIRE

I. Historique et définitions

1. Rappels historiques

- L'invention du microscope permet d'établir l'unicité du monde vivant avec la découverte de la « **cellule** » : **Robert Hook** est le premier à utiliser ce terme.
- **Schwann et Schleiden élaborent la théorie Cellulaire** basée sur plusieurs principes : «*La cellule représente l'unité structurale et fonctionnelle de tous les êtres vivants*» et «*Toutes les cellules viennent d'une cellule préexistante* »
- En 1954, **Watson et Crick découvrent l'ADN**, c'est le début de la biologie moléculaire.

Les activités de la cellule sont toutes gouvernées par les principes de la chimie. Les cellules sont toutes formées des mêmes macro molécules.

2. La composition cellulaire

La cellule est composée de :

- **70% d'eau** (30 % du reste=ions, petites molécules, ADN/ARN, protéines, phospholipides...)

3. Les 3 Caractéristiques du monde vivant

- **La sélectivité** : La matière vivante contient sélectivement les éléments principaux C, H, N et O, qui sont beaucoup moins représentés dans la matière inerte.
- **La catalyse grâce aux enzymes**
- On a un **réseau d'interaction moléculaire** dynamique et complexe qui s'adapte à des changements intrinsèques ou extrinsèques.

Pour créer un organisme vivant, on part d'une cellule oeuf, et on arrive à l'être humain qui possède environ **10¹⁴ cellule**. L'organisme compte aussi **10¹⁵ bactéries** (non pathogènes) qui sont plus petites et qui accomplissent des tâches essentielles à notre survie (digestion).

II. Notions d'organisation, d'évolution, de programmation d'une cellule eucaryote

1. Procaryotes / Eucaryotes

Rappel : **Transcription** = de l'ADN vers ARN, **Traduction** = de l'ARN vers les protéines

PROCARYOTES (PRO=AVANT)	EUCARYOTES (EU = PROPRE)
PAS de noyau → Traduction co-transcriptionnelle	Présence d'un noyau → Traduction post-transcriptionnelle (L'ARNm est synthétisé dans le noyau, traduit en protéine dans le cytosol par les ribosomes)
Pas d'organites	Présence d'organites. Présence d'un noyau délimité par une double membrane
Cellules de petite taille	Cellules de grande taille

2. Organisation de la cellule eucaryote :

Système endomembranaire :	Organites isolés :
Réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi, lysosomes, endosomes, noyau (qui est un organite (selon Gilson) car il possède une double membrane).	Mitochondries, peroxysomes.

SYSTÈME ENDOMEMBRANAIRE	Il correspond à un ensemble de cavités , limitées par une membrane qui vont communiquer entre elles et avec la membrane cytoplasmique. Cette communication se fait de manière transitoire et utilisant des petites vésicules/canalicules membranaires.
RÉTICULUM	Le RE effectue la première modification des protéines
APPAREIL DE GOLGI	Il joue un rôle majeur dans le processus d' exocytose (faire sortir quelque chose de la cellule), puisqu'il fait l'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Il régule le transport vésiculaire et se charge de modifier les protéines par glycosylation, sulfatation...
LYSOSOMES	Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intra-cellulaire
MITOCHONDRIE	Elle est la source principale d' énergie pour la cellule eucaryote (Elle produit l' ATP). Elle contient une partie de l'information génétique
PEROXYOSOME	Ils sont chargés de la détoxification de la cellule
CYTOSQUELETTE (PAS UN ORGANITE)	L'ensemble organisé des polymères biologiques qui confèrent l'essentiel des propriétés mécaniques de la cellule
CYTOSOL (PAS UN ORGANITE)	A l'intérieur d'une cellule, la phase liquide dans laquelle baignent les organites cytoplasmiques.

3. Evolution cellulaire.

On pensait au départ qu'il existait 2 grands groupes de cellules : eucaryotes et procaryotes. On a montré dans les années 50 la présence dans le groupe des procaryotes, des **archae-bactéries**.

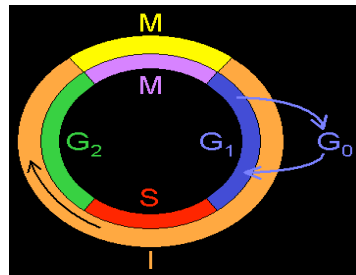
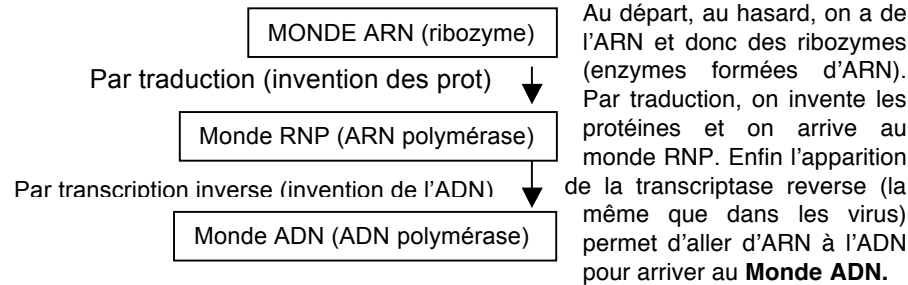
Les archaées sont plus proches des eucaryotes que des (eu-)bactéries (procaryote de base) et sont **extremophiles** (se plaisent dans des conditions de température ou de salinité extrêmes). Leur intérêt est la production d'**enzymes thermostables utilisables en médecine**.

On parle donc de 3 grands groupes de cellules, les eu-bactéries, les archae(-bactéries) et les eucaryotes, ayant tous un ancêtre commun hypothétique appelé LUCA (Last Universal Common Ancestor).

4. Les hypothèses sur l'origine des cellules

Théorie de l'endosymbionte : la cellule eucaryote serait apparue par la fusion de l'archae et de la bactérie, (La bactérie serait à l'origine des mitochondries).

Théorie du monde à ARN :



5. La division des cellules.

Le cycle cellulaire est une alternance de **mitose (phase M) et d'interphase (G1 + G2 + S)**.

- **G1 (Gap1) et G2 sont des phases de croissance.**
- **S est une phase de synthèse ou réplication de l'ADN.**
- **M est la phase de caryocynèse (division du noyau) et cytokynèse (division du cytoplasme.)**

La **transcription et la traduction se font pendant G1 S et G2**, car en phase M, toute l'énergie de la cellule se concentre sur la division.

La **transition G1-S** correspond au **point Start** (départ du cycle irréversible).

Lorsque le cycle cellulaire s'arrête (Quiescence (réversible) et Senescence (Irréversible)) la cellule passe en **G0**, c'est un stop dans le cycle cellulaire qui se fait à la fin de la phase G1.

6. La programmation cellulaire

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

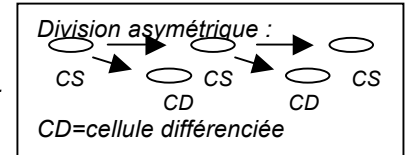
- se diviser (mitose)
- se différencier pour effectuer des fonctions spécialisées
- Passer en sénescence (G0 irréversible) (perte de la capacité de se diviser Signe du vieillissement de l'organisme).
- Passer en quiescence (G0 réversible) Ex : *Activation des lymphocytes*
- Se déplacer (motilité)
- Mourir
 - à nécrose (par accident)
 - à apoptose (par suicide programmé) c'est physiologique (normal)

L'**homéostasie** est le processus qui permet de **restaurer l'état originel d'une cellule, d'un tissu, d'un organe suite à une perturbation**, c'est un **équilibre** entre la division et la mort (ou sénescence ou quiescence) qui permet de maintenir un nombre constant de cellules. Dans le cas des **cancers**, on a une **rupture de l'homéostasie** qui peut être due à 2 phénomènes, soit l'**augmentation de la capacité de division des cellules**, soit la **diminution des processus d'apoptose, de sénescence et de différenciation**.

III. Notions de cellules souches et d'homéostasie

Une cellule souche CS :

- **Est non différenciée**
- **Est capable de se diviser**
- **Est capable d'auto renouvellement** (*Division asymétrique*).
- **Se différencie à la demande** (après réception de signaux)



On distingue :

CS	Localisation	Particularité
totipotentes	œuf jusqu'à morula	Donne un organisme entier.
pluripotentes	Blastocyste	Pas organisme entier mais tt types de tissus.
multipotentes	3 feuilletts embryonnaires	Large spectre de c différenciées.
unipotentes		Ne donne qu'un seul type cellulaire.

Chez l'adulte on ne retrouve que des CS uni et multipotentes.

Les **cellules souches embryonnaires (CSE)** sont les cellules pluripotentes du stade blastocyste. Elles peuvent donner des cellules des 3 feuilletts. Leur utilisation en recherche pose des problèmes éthiques en France car on est obligé de passer par la création d'un embryon.

Pour contrer ce problème éthique, on peut aussi passer par les **IPS**, on utilise des cellules adultes différenciées auxquelles on ajoute 3 ou 4 gènes spécifiques qui font revenir la cellule au stade pluripotent. (Pas de création d'embryon = pas de pb éthique).

L'utilisation de CSE et IPS en thérapeutique permet de ne pas avoir de rejets.

LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CELLULE

PARTIE 1: LA MICROSCOPIE

On distingue la microscopie optique de la microscopie électronique.

-> La microscopie **optique** a une résolution minimale de **200 nm** elle est donc adaptée à l'observation des **cellules**.

-> La microscopie **électronique** a une résolution minimale de **0,2 nm** elle est adaptée à l'observation des **molécules (à la limite de l'observation d'un atome)**.

I. La microscopie optique ou photonique

Pour observer une cellule, les colorants ne sont pas une bonne solution car ils dénaturent (=tuent=fixent) la cellule.

A. La microscopie en contraste de phase

La microscopie en **contraste de phase**, permet de visualiser les cellules en augmentant le déphasage entre la lumière incidente et la lumière émise, on utilise les fonctions de réfraction de la cellule. (*Cf schéma fait en cours*)

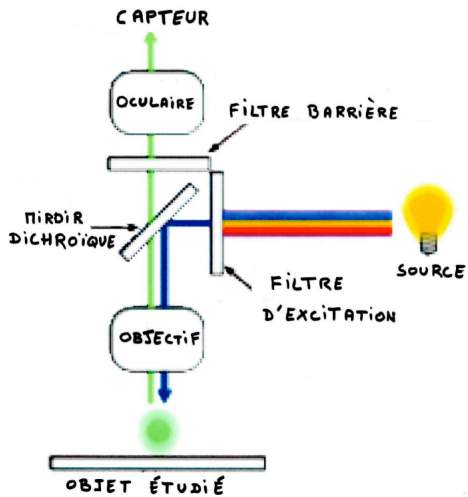
Inconvénient : perte de brillance et de luminosité

Avantage : image contrastée, observation de cellules vivantes. On peut par exemple observer une cellule en division, un déplacement cellulaire : Microscopie time lapse (micro-cinéma). La cellule n'est pas dénaturée.

B. La fluorescence

On va utiliser la fluorescence, c'est à dire la capacité intrinsèque qu'ont certaines molécules à absorber de la lumière et à la ré-émettre spontanément et très rapidement. Ces molécules fluorescentes sont appelées **fluorochromes**.

Il va y avoir absorption d'une lumière à une énergie donnée et une longueur d'onde donnée, et émission d'une lumière avec une **ENERGIE INFÉRIEURE**, une **LONGUEUR D'ONDE SUPÉRIEURE** (*Rappel : Longueur d'onde et énergie sont inversement proportionnels*). La lumière la plus énergétique est la lumière d'**absorption ou d'excitation**, la lumière la moins énergétique est la lumière d'**émission**.



1. Les fluorochromes

* La **GFP** est une molécule **NATURELLE et PROTEIQUE** qui a été identifiée à partir des méduses, formée en forme de tonneau avec au centre une triade d'acides aminés qui constitue le **chromophore**. Elle est excitée par le **BLEU** et émet dans le **VERT**. On peut changer les acides aminés à l'intérieur et créer des fluorochromes artificiels et permettre une gamme d'émission et d'absorption dans tout le spectre. L'énorme avantage de la GFP c'est qu'elle est **UNEVIERSELLE : ELLE GARDE SES PROPRIÉTÉS DE FLUORESCENCE DANS TOUTES LES CELLULES OU ELLE EST INCORPORÉE**

* On a aussi la **Rhodamine** qui absorbe dans le **Vert** et émet dans le **rouge**

* **La FITC = fluorescéine** a des propriétés comparables à la GFP car elle absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**.

2. Introduire la GFP seule dans la cellule

On va pouvoir exprimer artificiellement la GFP dans toutes les cellules, il va pour cela falloir injecter la GFP dans la cellule, on a plusieurs options.

a. la micro-injection

C'est une méthode **longue et fastidieuse** qui consiste à injecter directement le fluorochrome dans la cellule à l'aide d'une micro-pipette. chaque cellule est traitée individuellement.

b. L'électroporation

On va mettre la cellule en présence d'un champ électrique et on va donc percer la membrane d'une multitude de petits trous qui vont permettre de laisser entrer le fluorochrome. Les trous

1. La lumière polychromatique passe par un filtre qui sélectionne la **lumière d'excitation**.
2. La lumière d'excitation est réfléchiée par le miroir dichroïque Ce miroir va **réfléchir certaines** longueur d'onde et en **transmettre d'autres**.
3. Le bleu (lumière d'excitation) excite le fluorochrome qui va émettre dans le vert (lumière d'émission).
4. La lumière verte passe le miroir dichroïque. Le deuxième filtre va ne laisser passer que la lumière verte, ou lumière d'émission, il élimine les impuretés. **On va pouvoir localiser les endroits de la cellule où il y a eu fluorescence.**

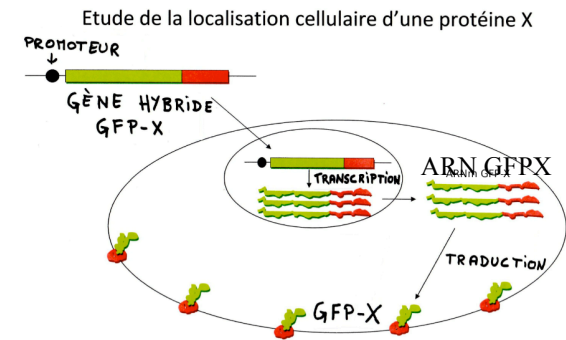
vont se **refermer très vite**. On va pouvoir traiter un grand nombre de cellules à la fois. Cette technique est **traumatisante** pour la cellule sans remettre en cause sa nature vivante.

c. La vectorisation par vésicules

C'est la méthode la plus douce et la plus naturelle. Elle va consister à encapsuler les fluorochromes dans des vésicules lipidiques, qui vont venir fusionner avec la cellule et déverser leur contenu dans le cytoplasme.

Le problème c'est qu'on introduit de nouvelles molécules dans la cellule, et on ne saura pas si le comportement de la cellule n'est pas biaisée par cette introduction artificielle. Il est donc plus avantageux de faire exprimer par la cellule elle-même les molécules fluorescentes.

3. Exprimer un gène codant pour une protéine fluorescente, méthode



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

- On va juste **permettre la transcription de la GFP** (possible car c'est un **fluorochrome protéique**) en mettant un promoteur à côté d'un gène artificiel codant pour la GFP, et enclencher la machinerie transcriptionnelle pour permettre sa synthèse. Cependant cela n'a pas beaucoup d'intérêt car il ne sert à rien de créer une GFP seule dans la cellule.
- Ce qui est beaucoup plus intéressant c'est d'associer la

synthèse de la GFP directement à une protéine, **celle qu'on veut observer**

→ On va introduire la séquence (d'acide nucléique) qui code pour la GFP à côté de la séquence du gène qui code pour la protéine qui nous intéresse : **protéine X**, on crée un **gène hybride**.

→ L'appareil transcriptionnel ici lit la séquence codant pour la GFP en même temps que la séquence de la protéine. On crée **une protéine hybride X-GFP**.

Grâce à la microscopie à fluorescence on peut **suivre le trajet de la protéine hybride**.

Cependant les résultats de l'observation (localisation, fonction...) sont des **suggestions**.

En effet l'hybridation peut altérer la fonction/localisation de la protéine X (modification des mécanismes de régulation, de transport ...).

*Ex : On **suggère** que la protéine X est membranaire car la protéine hybride GFP-X est localisée sur la membrane à l'observation.*

Il est possible de faire des tests fonctionnels (la protéine a bien la même fonction hybridée et non hybridée) pour confirmer partiellement l'hypothèse.

4. Les applications de la fluorescence

a. Le FRET (Fluorescence Résonance Energy Transfer)

Le FRET sert à étudier la **configuration spatiale de complexes protéiques** (intermoléculaire) ou de molécule (intramoléculaire). Pour cela :

- On envoie une **lumière d'excitation** qui excite un **premier fluorochrome**. Celui-ci renvoie une lumière d'émission.

- Cette lumière d'émission va **exciter un deuxième fluorochrome** qui lui même va émettre une radiation d'énergie inférieure.

On a eu un **transfert d'énergie non radiatif** (entre les 2 fluorochromes, la lumière émise et de suite absorbée, on ne peut pas l'observer). Ce transfert est possible à 2 conditions :

- La **distance entre les deux fluorochromes ne DOIT PAS ETRE SUPERIEURE A 10 NM.**

- Les spectre des 2 fluorochromes doivent se chevaucher au moins partiellement. (Le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'absorption du receveur)

Ex : Par exemple on peut avoir la GFP qui va absorber le **Bleu**, émettre du **vert**, ce vert va exciter la rhodamine, qui va émettre dans le **rouge**. On ne verra que le **rouge**.

Il y a deux applications au FRET :

* **L'intermoléculaire** : on va pouvoir vérifier si deux protéines se trouvent proches dans la cellule (**moins de 10 nm**), et interagissent (ex. elles appartiennent au même complexe protéique)

Exemple : Avec GFP et Rhodamine. On envoie du bleu, si on observe du vert, il n'y a pas eu FRET, les molécules de GFP et de Rhodamine (et les protéines auxquelles elles sont rattachées) sont à plus de 10 nm. Si on observe du rouge il y a eu transfert d'énergie non radiatif, on peut donc affirmer que la GFP et la Rhodamine sont à moins de 10 nm.

* **L'intramoléculaire** : Permet d'étudier la conformation spatiale d'une molécule. On peut

chercher à savoir si une molécule est en conformation **étendue** ou rapprochée (après interaction avec un substrat par exemple).

Exemple d'application : Un exemple d'application du FRET intra moléculaire est la **sonde calcique Caméléon**. On sait qu'en présence de calcium, la calmoduline est modifiée, change de conformation, rapprochant les deux acides aminés marqués par la CFP et la YFP. Ce **rapprochement qui ne se fait qu'en présence de calcium** va permettre le transfert d'énergie. En faisant le rapport de la quantité de lumière émise à 530 nm (lumière d'émission du deuxième chromophore) sur la quantité de lumière émise à 490 nm (lumière d'émission du premier chromophore), on détermine

précisément l'évolution de la concentration de calcium dans la cellule. *plus il y a de calcium, plus la calmoduline change de conformation, plus le FRET a lieu, plus on observe les radiations à 530nm*).

b.Le FRAP (Fluorescence Reappareance After Photobleaching)

Pour le FRAP et le FLIP on utilise le **photoblanchiment** d'une cellule fluorescente grâce à un laser qui va irradier la fluorescence à l'endroit où est localisé le faisceau. Le fluorochrome est ainsi trop excité et perd donc sa fluorescence.

Attention, la perte de fluorescence des molécules est irréversible, cependant, la perte de fluorescence de la zone transitoirement irradiée de l'est pas.

Dans le FRAP on va juste irradier pendant une courte période, et on voit réapparaître petit à petit la fluorescence au niveau de la zone irradiée. Cela permet d'observer la **dynamique**

des fluorochromes dans la cellule grâce à la réapparition (ou non) de la fluorescence.

On a eu ici un photoblanchiment **Ponctuel**.

Une application du FRAP est l'étude des protéines membranaires. Cf. *Schéma cours*

c. Le FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)

Dans le cas du FLIP on a une irradiation **en continu** par le laser. Mais cette fois, au lieu d'étudier la zone photoblanchie, on étudie une autre zone située à un autre endroit de la cellule, et on va voir petit à petit **disparaître** la fluorescence. On étudie la **PERTE** de la fluorescence. Là encore on va pouvoir déterminer la **VITESSE** de déplacement d'un point A à un point B (lieu d'irradiation, lieu étudié) des molécules fluorescentes.

5. La fluorescence induite

Dans ce cas, le fluorochrome ne va devenir fluorescent qu'une fois qu'il se sera fixé sur la molécule qu'on étudie.

-> Par exemple, les colorants **DAPI et Hoetsch** vont devenir fluorescents qu'une fois qu'ils se seront fixés sur les **bases de l'ADN T et A.**

-> On a aussi des intercalants entre la double hélice d'ADN : **l'iode de propidium et le bromure d'ethidium.**

Cela permet de distinguer l'hétérochromatine qui est de l'ADN très condensé (peu de transcription) car la fluorescence y sera plus forte, de l'euchromatine ou cette fois, l'ADN est décondensé et ou la fluorescence sera moins forte.

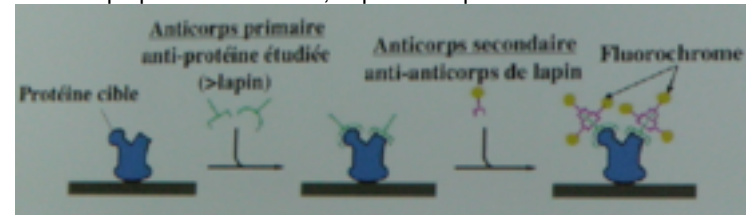
6. L'immuno - fluorescence indirecte

Dans ce cas, on va procéder en plusieurs étapes.

- On va injecter un **antigène à un animal** (ex un lapin) pour provoquer la création de très nombreux anticorps (qui serviront d'anticorps **primaires**) contre cette molécule. Cette étape sert uniquement à la création d'anticorps primaires.

- On va ensuite récupérer ces anticorps primaires et les injecter dans la cellule d'intérêt.

- On achète ensuite des anticorps génériques (**ANTICORPS SECONDAIRES**) qui vont être des «**anti-anticorps**» pour le lapin par exemple. Ils vont se fixer sur les anticorps **primaires** (de lapins, ceux qui reconnaissent spécifiquement l'antigène), mais aussi sur tous les autres anticorps de lapins qui pourraient se trouver dans notre cellule d'étude. **Cet anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome** et donc permettra de localiser les anticorps primaires et donc, la protéine qu'on étudie.



Attention. Si on veut localiser **2 molécules à la fois**, il faut que **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.

7. Le FISH (Fluorescence In Situ Hybridation)

Il est difficile de localiser de l'ADN car il n'y a pas d'anticorps anti ADN **spécifiques**, (un anticorps ne pourra pas reconnaître spécifiquement la séquence d'un gène donné).

Le FISH peut s'appliquer à **l'ADN ou à l'ARN**. L'ADN formé d'un **double brin** doit d'abord être **dénaturé**, c'est à dire qu'on va **défaire les 2 brins** qui seront chacun seuls.

On introduit alors une **sonde** qui est **fluorescente** et qui possède la séquence en nucléotide spécifique du gène que l'on cherche à localiser. La sonde va donc se **fixer à sa moitié complémentaire** (si on connaît la séquence d'un gène, on peut le localiser). Ceci fonctionne aussi avec l'ARN (sans dénaturation car l'ARN n'a qu'un seul brin).

On parle d'hybridation de la sonde fluorescente à l'ARN ou l'ADN.

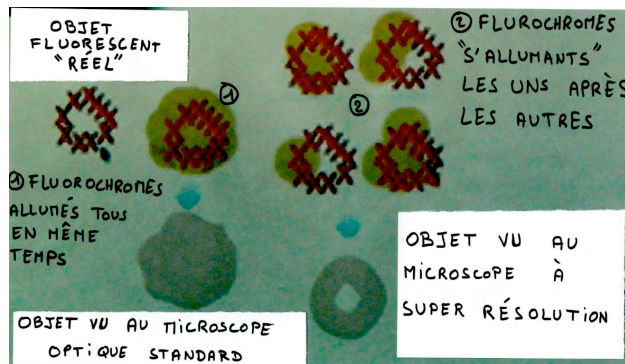
Comment rendre la sonde fluorescente? On peut greffer des fluorochromes aux nucléotides. On peut greffer un antigène reconnu ensuite par un anticorps marqué à la fluorescence.

8. La microscopie confocale

Elle permet d'étudier la **structure tri dimensionnelle d'une cellule** (en microscopie normale on observe une cellule écrasée).

Le **diaphragme appelé pin-hole** va littéralement exclure toutes les images hors du champ pour se focaliser que sur l'endroit où le laser a son application. Cela permet d'observer des échantillons épais. La résolution est de l'ordre du micron.

9. La microscopie à super résolution ou microscopie nanométrique



Des scientifiques ont montré récemment qu'on ne pouvait pas distinguer deux éléments à partir d'une certaine distance à **cause des propriétés de diffraction d'une onde**. C'est la distance de résolution.

Avec la microscopie standard on visualise juste une tache mais pas le fait qu'il forme un cercle. On a une superposition de spots flous (ronds oranges). On va donc faire toute une série

d'images, tous les fluorochromes ne vont **pas être excités et réfléchis au même moment** ce qui permettra une meilleure résolution.

II. La microscopie électronique

La **résolution est d'environ 2nm (résolution max = 0,2nm)**, on utilise le pouvoir séparateur des **électrons** qui ont des longueurs d'onde **plus petites que le photon**, permettant une meilleure résolution. Qu'est-ce que la résolution? 2 nm = on peut distinguer deux points distants de 2 nm.

Conditions requises pour observer un échantillon :

- Vide poussé (meilleur rendement en électron : les électrons ne seront pas déviés par les molécules d'air).
- Coupe ultrafine (<0,1µm)
- Echantillon fixé chimiquement.
- Echantillon déshydraté (pb : eau = principal constituant cellulaire) sauf en **cryomicroscopie**.

1. La microscopie en transmission

On a le faisceau d'électron qui **TRAVERSE** la préparation (comme les photons en MO). On va marquer la préparation grâce à des sels de métaux lourds ce qui va permettre d'augmenter le contraste (les métaux lourds sont denses aux électrons).

a. Marquage à l'or

C'est un petit peu le même principe que l'immunofluorescence. On va prendre des anticorps spécifiques de la protéine qu'on veut étudier et on va les **marquer à l'or**. L'or est l'équivalent du fluorochrome.

b. Par ombrage

On va visualiser des **surfaces**. On fabrique une réplique de l'échantillon en vaporisant des métaux lourds sur la surface. On dissout ensuite l'échantillon à l'acide. On visualise enfin la réplique qui offre un meilleur contraste que l'échantillon lui-même.

c. La cryomicroscopie

On va pratiquer la **cryofracture**. On congèle la préparation dans de l'azote liquide à -150 °. On fracture les blocs sous vide grâce à une lame selon un plan de fracture, c'est-à-dire une zone de moindre résistance qui passe **ENTRE LES DEUX FEUILLETS LIPIDIQUES D'UNE MEMBRANE**. On vaporise ensuite une fine couche de platine ou de carbone afin d'observer une réplique ou moule de la surface fracturée ou décapée.

2. La microscopie à balayage

Cette fois les électrons ne **TRAVERSENT PAS LA PREPARATION**, mais la surface va être balayée par un faisceau d'électrons qui vont exciter la surface de l'objet, il va y avoir émission **d'électrons secondaires** par la surface. La résolution est plus faible, de l'ordre de 10 nm mais on obtient des images en 3D, on peut étudier des échantillons épais. On peut recouvrir l'échantillon de métaux lourds pour augmenter le rendement.

III. La microscopie à force atomique

On a une résolution identique à la résolution électronique c'est à dire **0,2 nm**. On va utiliser une **pointe la plus fine possible** qui va venir interagir avec les surfaces des molécules. Il y a une interaction lorsque 2 objets sont **très proches** mais ne se touchent pas, cette interaction va faire bouger la pointe. Il va y avoir changement de direction de la pointe, on appelle ça une **déflexion**. Cette pointe est reliée à un bras de levier qui va faire bouger la pointe selon les reliefs de l'échantillon. La pointe et l'échantillon seront toujours à la même distance. On envoie un faisceau laser sur le bras de levier. Le faisceau va être réfléchi et on va le récupérer et l'analyser grâce à une photodiode et un ordinateur. En fonction des mouvements du bras de levier, le faisceau va être réfléchi à des endroits différents.

Plus la pointe est fine meilleure sera la résolution. On relève la **TOPOGRAPHIE** de l'échantillon.

Avantages :

- On peut travailler à l'**AIR LIBRE**, avec une **cellule vivante**.
- La résolution n'est limitée QUE par la taille de la pointe.
- On mesure des **volumes en 3D**, au niveau de la microscopie électronique, c'était des images 3D artificielles.
- C'est non destructif pour les cellules, on peut travailler en phase liquide, on n'a pas besoin de coloration.
- C'est **moins cher** que la ME.

PARTIE 2: LA MANIPULATION DES CELLULES

I. Obtention des cellules

Pour obtenir les cellules, on procède en 2 étapes :

1. Dissociation :

On dissocie les cellules du tissu et de leur matrice extra-cellulaire (MEC), sauf pour le sang (car les cellules sont en suspension). On va rompre les contacts intercellulaire grâce à des protéases et/ou une agitation légère (pour ne pas stresser les cellules car elles sont toujours vivantes !)

2. Séparation :

Plusieurs techniques :

- En utilisant les propriétés physiques des ϕ (taille, forme...) => centrifugation à basse vitesse
- On peut utiliser la **séparation** par les propriétés générales d'adhésion à des surfaces (Boîtes de pétri, lame de verre, milieux liquides)
- Deux méthodes moléculaires d'obtention d'une cellule :

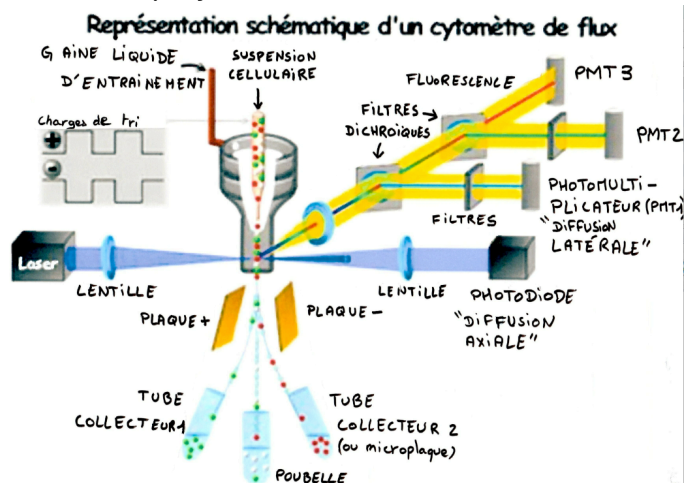
a) Purification sur support ou chromatographie d'affinité

On va envoyer les cellules à proximité d'un support qui contient des anticorps spécifiques.

*La **sélection NEGATIVE** : On récupère la molécule qui n'a pas été arrêtée par les anticorps, celle qui ne contient pas l'antigène. Elle est préférentielle car on n'altère pas la cellule (la fixation de l'antigène sur l'anticorps peut modifier la cellule dans la sélection positive) c'est plus difficile à faire et plus cher car il faut acheter tous les anticorps de toutes les cellules qu'on ne veut pas (car un tissu n'est pas constitué que de 2 cellules!)

* La **sélection POSITIVE** On récupère les cellules qui ont été fixées par les anticorps c'est à dire celles qui présentent l'antigène à leur surface.

b) Cytométrie de flux



A la base, on introduit les cellules préalablement dissociées et marquées à la fluorescence dans un tube très fin, ce sont des cellules en suspension. Un laser excite les cellules, il y a 2 détections dans la partie analytique du cytomètre de flux.

- Un détecteur de fluorescence qui détecte la fluorescence émise par les cellules après leur excitation

- Un détecteur laser qui détecte la forme et taille de la cellule.

Ex d'application : la détermination de la durée des différentes phases de la méiose (l'aspect de l'ADN hétérochromatine, chromatine etc), la numérisation de cellules, la détermination des pourcentages de cellules mortes et vivantes...

La deuxième partie permet le **trie des cellules** c'est le **FACS**, on va appliquer un champ électrique et les cellules vont être déviées en fonction de leur fluorescence, **plus elles sont fluorescentes, plus elles vont être déviées**. C'est la cytométrie de **SEPARATION**. Le

Tutorat BioCell 2011/2012

canule va se mettre à vibrer et les cellules vont entrer dans des petites gouttelettes, la charge électrique de ces gouttelettes va être fonction de la fluorescence. On recueille à la sortie de l'appareil les cellules qui ont été déviées. Il est efficace mais très coûteux.

II. Culture des cellules

1. Avantages

- Contenu cellulaire homogène, plus que dans un tissu
- Les conditions expérimentales sont contrôlées
- On peut isoler une cellule unique, on a des clones génétiquement homogènes

2. Désavantages

- En dehors du contexte tissulaire, on perd des informations, mais il est possible de se rapprocher des vrais tissus en reconstruisant les conditions tissulaires (les conditions organotypiques).
- Facilement dérivable, on arrive à des mutations

3. Culture des micro organismes

Attention à bien se rappeler que les **levures sont EUCARYOTES**, et que les **bactéries sont PROCARYOTES**, mais que les deux sont **des organismes unicellulaires**. Cependant on va les étudier dans les mêmes conditions.

C'est pratique car elles ont une vitesse de division élevée, les conditions de croissance sont simples. On utilise des milieux semi solides comme les boîtes de Petri qui permettent la formation de colonies, les mutants sont facilement isolés et obtenus.

4. Culture de cellules animales

Nécessite des milieux complexes qui comportent les aa essentiels, les vitamines et surtout les facteurs de croissance, messagers hormonaux. Les cellules **eucaryotes** ne **SE DIVISENT PAS PAR DEFAUT**, alors que **LE REVE D'UNE BACTERIE EST DE DEVENIR 2 BACTERIES**. Il faut leur donner l'ordre de se diviser par des signaux exogènes et ajouter du sérum de veau foetal (ça s'achète). Il n'y a pas de division anarchique contrairement aux cultures cancéreuses.

Cultures primaires:

On étudie directement les tissus dissociés (le plus souvent les fibroblastes : facilement cultivables et bien connus), cependant la cellule en culture **ne se divise qu'un nombre de fois limité**. Après, elle se met en **sénescence**, attention, ce n'est pas la mort de la cellule qui reste métaboliquement active, c'est juste le repos. Au bout de **50** divisions, on a la sénescence. C'est **IRREVERSIBLE**.

5. Lignées immortelles (pas une culture primaire!)

C'est à dire que les variants cellulaires vont se diviser à **l'infini** (sérum etc). ATTENTION, les lignées des tumeurs et des cancers sont **EN PARTIE IMMORTELE**, il y a une capacité de prolifération au delà des limites, on dit que les cellules sont sur **LE CHEMIN DE L'IMMORTALITE**.

On peut les amener à l'immortalité en sélectionnant des variants dans des milieux de culture en laboratoire.

Chez l'homme les **lignées immortelles spontanées sont très rares**, chez les souris, il y a plus de cancer, donc souvent des lignées immortelles spontanées.

On peut utiliser l'introduction d'UN GENE d'immortalisation spontanée : le gène de la TELOMERASE (enzyme qui finit la réplication des chromosomes).