

METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE :

Introduction :

La biologie cellulaire est née avec l'invention de la microscopie. On distingue trois types de microscopies : optique, électronique et à champ proche. Ces trois types de microscopies reposent sur des principes physiques différents.

<u>La microscopie optique (MO) = microscopie photonique :</u>	Moins bonne résolution que la ME. La limite de résolution (= capacité à distinguer la distance entre 2 objets) de la MO est de l'ordre de 200 nm . Permet de visualiser cellule et organelles.
<u>La microscopie électronique (ME) :</u>	Permet de visualiser des molécules. On passe à un stade plus petit au niveau de la résolution. En effet, on gagne un facteur 1000 en termes de pouvoir séparateur par rapport à la MO puisqu'on peut ici séparer 2 points d'environ 0.2 nm .

La différence entre les deux est la particule qui va traverser la matière. Dans le premier cas ce sont des **photons** et dans le deuxième des **électrons**. Les résultats ne sont pas les mêmes, il existe donc des domaines d'utilisation déterminés pour ces types de microscopie.

La **résolution** est la capacité de distinguer deux points dans une image.

MICROSCOPIE OPTIQUE :

I. Généralités :

Dans le cas de la microscopie optique, la limite de résolution théorique est de **200 nm**. Cette technique de microscopie repose sur les photons et permet d'observer des cellules ainsi que des organelles mais pas les molécules.

1) La première étape est de disposer d'une source de **photons**. Cela peut-être une lumière « normale » mais il peut y avoir des dispositifs plus sophistiqués où la lumière a une longueur d'onde particulière. Les photons vont être dirigés vers l'échantillon par un **condensateur**.

2) La deuxième étape est de récupérer l'image à travers un **objectif**. Comme dit précédemment, la limite de résolution est de 200 nm et il manque notamment la dimension moléculaire. Mais il existe pour cela des astuces que nous allons voir.

II. La fluorescence :

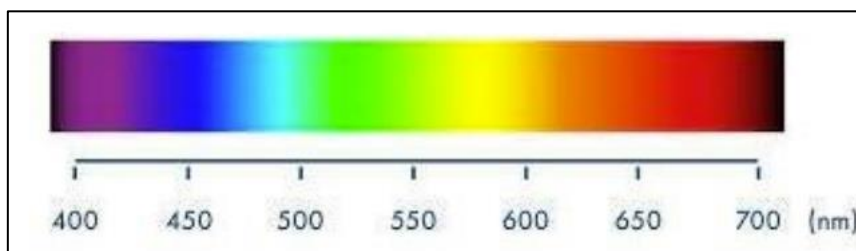
Pour rendre plus performante la MO et pouvoir visualiser des molécules, on va leur conférer une **propriété fluorescente**. On ne va donc pas visualiser directement la molécule mais la fluorescence qu'elle va émettre.

A) Principe de la fluorescence :

Certaines molécules (de manière naturelle ou artificielle) ont une propriété de fluorescence :

Si une énergie lumineuse (ici un photon) arrive sur la molécule, celle-ci a la propriété d'absorber cette énergie. Ces photons sont caractérisés par une certaine longueur d'onde, c'est ce qu'on appelle la « **lumière d'excitation** ». La molécule fluorescente va donc être excitée.

Le résultat de cette excitation moléculaire va être d'émettre d'autres photons très rapidement qui vont être les **photons d'émission**. Toutefois, cette agitation moléculaire a fait perdre de l'énergie. Les photons d'émission vont donc avoir une **énergie inférieure** aux photons d'excitation, et donc une **longueur d'onde supérieure**.



Chacune des molécules fluorescentes va être caractérisée par une longueur d'onde d'excitation et d'émission, et donc une certaine couleur d'excitation et d'émission

Il y a de nombreuses applications du microscope à fluorescence. On l'utilise pour comprendre le fonctionnement des cellules voire pour effectuer des tests dans des examens à visée médicale.

Il permet de localiser des molécules spécifiques dans la cellule, seules quelques molécules sont fluorescentes. Les marqueurs fluorescents peuvent être associés directement ou indirectement à la structure cellulaire étudiée. On les appelle des fluorochromes.

On peut combiner plusieurs fluorochromes, c'est-à-dire qu'on peut visualiser simultanément plusieurs molécules.

On peut coupler ces techniques de microscopie à des techniques de microcinéma qui permettent de filmer ces molécules ainsi que leur dynamique dans une cellule vivante.

Le problème va être de rendre les molécules fluorescentes puisqu'elles ne le sont pas toutes naturellement. Actuellement, la technique de choix est de les rendre fluorescentes en utilisant une molécule, une protéine qu'on retrouve dans les méduses, c'est la GFP.

III. La fluorescence naturelle :

A) Principe :

Il existe des petites molécules qui sont naturellement fluorescentes, mais c'est aussi le cas de protéines. C'est le cas d'une très célèbre qui est la **GFP**. On entre ainsi dans le domaine de la **bioluminescence**.

Les biologistes souhaitant marquer plusieurs molécules en même temps ont réalisé un travail de mutagenèse de la GFP naturelle pour obtenir d'autres molécules fluorescentes d'autres couleurs.

Une mutation est suffisante pour changer le spectre de la molécule. On a donc à notre disposition une batterie de dérivés de la GFP :

- YFP (jaune)
- BFP (bleu)
- CFP (cyan)

La GFP conserve ses propriétés de fluorescence quand elle est exprimée artificiellement dans des cellules procaryotes et eucaryotes. Il existe d'autres fluorochromes comme la **fluorescéine** qui émet dans le vert, ainsi que la **rhodamine** qui émet dans le rouge.

B) Introduction de la GFP :

Le principe va être d'introduire un gène GFP dans une cellule de l'organisme à étudier. Ce gène va être reconnu en tant que gène et, s'il a les bons signaux de régulation, il va être transcrit en **ARNm** dans le noyau.

Une fois cet ARNm GFP déporté dans le cytoplasme, il sera traduit par les ribosomes en une **molécule GFP**. C'est cette molécule protéique qui va émettre la **fluorescence**. On aura alors une cellule verte.

Si un gène nous intéresse mais que l'on ne connaît pas sa fonction, une manière de le savoir c'est de déterminer où il est localisé dans la cellule. On va donc fusionner ce gène X au gène GFP. Ces gènes fusionnés vont être transcrits en même temps puis traduits en une **protéine hybride GFP-X**. Si la fluorescence apparaît au niveau de la membrane plasmique, cela suggère que cette protéine X est membranaire.

Remarque : Démontrer ≠ Suggérer.

Démontrer : Il n'y a pas d'autre hypothèse par rapport à l'observation.

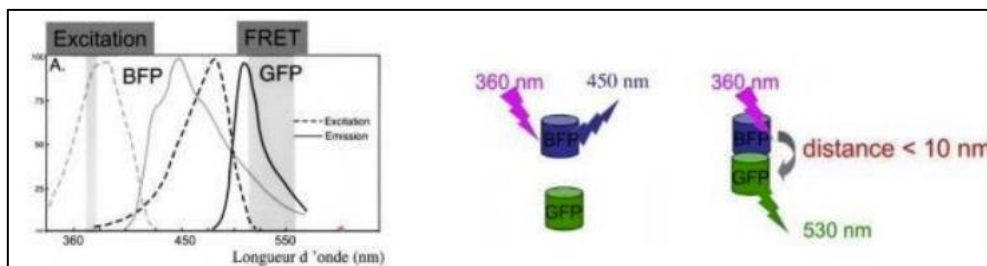
Suggérer : Il peut exister d'autres interprétations.

C) Application : FRET/FRAP/FLIP :

1. FRET :

Le FRET consiste en un transfert d'énergie **non radiatif** sans émission de lumière résultant de l'interaction entre **deux molécules fluorochromes** : une molécule **donneuse d'énergie** et une molécule cible **accepteuse d'énergie**.

Ce phénomène physique nécessite que le spectre d'émission du donneur recouvre (au moins partiellement) le spectre d'absorption du receveur.



Si un premier fluorochrome est irradié à 360nm, il va normalement émettre à 450nm. Mais si les deux fluorochromes différents (ici BFP et GFP) sont suffisamment proches (**moins de 10nm**), le photon d'émission à 450nm va servir à exciter le deuxième fluorochrome au lieu d'être directement repéré par le microscope.

Ce deuxième fluorochrome, à condition que leurs spectres se chevauchent, va alors émettre à une autre longueur d'onde : 530nm. Ainsi, en ayant initialement irradié avec un microscope à 360nm, si les deux fluorochromes sont à une distance inférieure à 10nm (même complexe moléculaire), il sera possible d'observer une émission à 530nm.

<u>FRET INTERMOLECULAIRE :</u>	<u>FRET INTRAMOLECULAIRE :</u>
<u>Étude de l'interaction entre deux molécules :</u>	<u>Étude de la conformation moléculaire :</u>
Utilisation de deux fluorochromes émettant dans des spectres différents afin de savoir si deux molécules sont en interaction (émission à 530nm).	Permet de savoir si une protéine est capable de se replier dans l'espace et de rapprocher deux fluorochromes (qui émettront à 530 nm).

Exemple d'application du FRET intermoléculaire :

Dans la cellule, on retrouve une protéine NIPP1 associée à la CFP (**CFP-NIPP1**) et une protéine PP1 associée à la **YFP** (**YFP-PP1**).

Si la cellule est irradiée à 430nm et que les deux protéines n'interagissent pas, on récupèrera une longueur d'onde de 476nm. Si on irradie à 510nm et que les protéines n'interagissent pas, on récupèrera une longueur d'onde de 530nm.

Mais, si les deux protéines sont exprimées en même temps dans la cellule et qu'elles interagissent ensemble, en les irradiant à 430nm on observera une fluorescence à 530nm. Cela va aussi donner une information spatiale : la fluorescence n'est pas uniforme dans le nucléoplasme (petits foyers très intenses), ce qui indique que ces molécules interagissent dans des **foyers particuliers**.

Au sens biologique, nous apprenons deux choses :

- NIPP1 et PP1 sont à une distance inférieure à 10nm.
- Ces deux protéines appartiennent au même complexe moléculaire.

Exemples d'application du FRET intramoléculaire : Sonde calcique caméléon :

Nous allons prendre l'exemple de la mesure du calcium avec une sonde que l'on appelle « caméléon ». En intramoléculaire, il existe des molécules qui disposent de propriétés de reconnaissance du calcium. Ces molécules vont répondre en fonction de la concentration de calcium.

Explications : Quand le **calcium est présent**, il va se fixer sur la **calmoduline**. Cela entraîne une modification de la conformation de la protéine, ce qui va se traduire par le rapprochement de **CFP et YFP**. Le signal de FRET va donc être proportionnel à la concentration de calcium.

Le graphique représente l'application de ce processus sur une cellule humaine : Pour être précis, on mesure le rapport entre le spectre d'émission à 530nm et le spectre d'excitation à 490 nm (mesures en ordonnées), ce qui va permettre d'indiquer la concentration en calcium. Si on rajoute du calcium dans la cellule, on s'aperçoit que le rapport augmente. À l'inverse, si l'on induit une **perte de calcium** en traitant la cellule par **ionomycine** (un canal à calcium), on s'aperçoit d'une diminution du rapport.

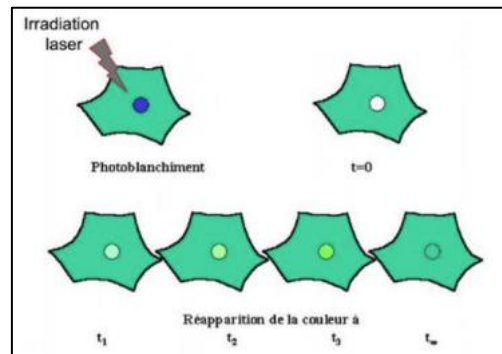
2. Le photoblanchiment : FRAP/FLIP :

La réaction normale suite à une fluorescence est l'émission d'une énergie inférieure, donc d'une longueur d'onde plus grande. En revanche, si on irradie avec une intensité très forte de lumière, une proportion des molécules **fluorescente va « s'éteindre »**.

En effet, les molécules qui auraient été fluorescentes au départ vont être profondément modifiées (perte d'électrons, production de radicaux libres etc.), ce qui va induire la perte de la propriété fluorescente de la molécule. On dit alors qu'elle est « **tuée** » ou « **blanchie** » puisqu'elle n'émet plus de lumière et ce, de manière irréversible : c'est le **photoblanchiment**.

Exemple du cours : On irradie au laser une petite portion de la cellule. On aperçoit alors un « trou » fluorescent dans la cellule. Si on réalise une expérience de cinétique/timelapse, on verra la fluorescence réapparaître progressivement. En effet, toutes les autres molécules de la même nature dans la cellule, vont migrer vers l'endroit irradié en fonction de leurs propriétés dynamiques.

On va ainsi pouvoir mesurer le temps de réapparition de la molécule, ce qui va nous permettre de connaître la **vitesse de diffusion** de la molécule dans la cellule. En effet, toutes les molécules de la cellule ne diffusent pas de la même façon selon leurs emplacements, leurs fonctions, l'état de la cellule etc. Cela nous donne donc une information précieuse sur le **mode de fonctionnement de la cellule**.



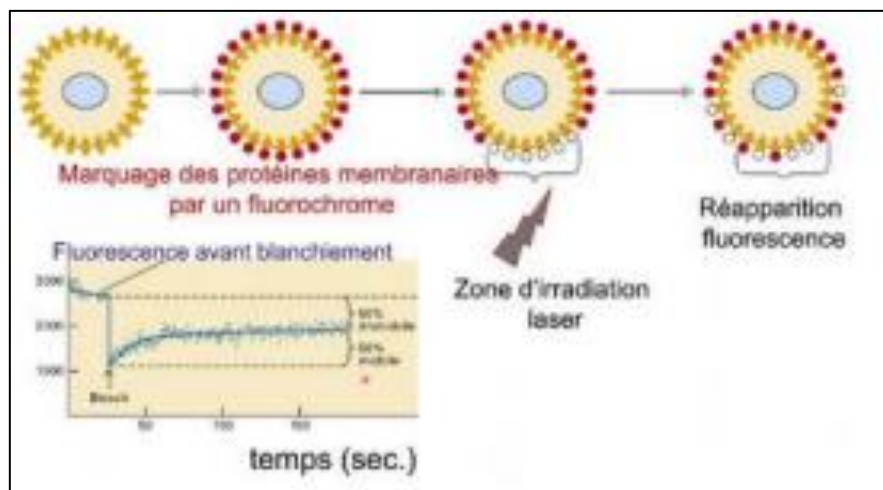
Il existe 2 principales méthodes d'utilisation de la technique de photoblanchiment :

<p style="text-align: center;"><u>FRAT</u> (Fluorescence Recovery After Photobleaching)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Étude de la réapparition de la fluorescence. ➤ On irradie qu'à un seul moment de l'expérience.
<p style="text-align: center;"><u>FLIP</u> (Fluorescence Loss In Photobleaching)</p>	<p><u>Deux sites d'étude de la cellule :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Un premier site où l'on maintient l'irradiation. Il est donc tout le temps blanc puisque chaque molécule qui a migré va immédiatement être tuée à son tour. Ce phénomène implique que l'on va progressivement tuer toutes les molécules de ce même type dans la cellule. ➤ Un deuxième site (non irradié) sur une autre portion de la cellule où l'on enregistre la fluorescence, et plus précisément sa disparition. C'est ce qui va permettre de mesurer la vitesse de déplacement/diffusion de la molécule.

Une application classique de ces techniques de photoblanchiment et notamment du FRAP est à l'origine de la démonstration du modèle de la mosaïque fluide de l'organisation des membranes.

Déroulement de l'expérience : Les membranes plasmiques ont été marquées par un fluorochrome particulier qui a été accroché à un antigène de surface. L'irradiation laser a été appliquée sur une zone de la surface membranaire et on a regardé la réapparition ou non de la fluorescence. Cela a permis de démontrer la capacité membranaire à diffuser et recoloniser cette zone photoblanchie.

Sur le graphique, on voit le niveau de fluorescence sur la zone observée avant puis après le photoblanchiment. On voit que la zone récupère la fluorescence mais pas jusqu'au plateau initial. En effet, on constate que seulement 50% des protéines ont migré. Cette expérience a donc mis en lumière que 50% des molécules sont immobiles et 50% sont mobiles.



<u>AVANTAGES :</u>	<u>INCONVENIENTS :</u>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Travail sur des cellules vivantes. ➤ Étude dynamique (vidéo, time laps). ➤ Possibilité de visualiser tous les compartiments de la cellule. ➤ Possibilité d'étudier des phénomènes complexes (forme et distribution des organelles). ➤ FRET, FRAP, FLIP. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Technique lourde nécessitant des étapes de recombinaison génétique (introduction des fluorochromes). ➤ Technique coûteuse et non-réalisable en routine (laboratoires spécialisés). ➤ La protéine chimère GFP-X doit conserver la fonction de X. <p><u>Explication</u> : Il y a possibilité de perdre une partie de la fonction ou d'en gagner une nouvelle sur la protéine X après sa fusion avec la GFP. Il faut donc faire très attention sinon l'interprétation de l'expérience sera faussée.</p>

IV. Fluorescence induite :

A) Définitions :

La **fluorescence induite** est différente de ce qu'on a vu précédemment. Ce sont des molécules qui sont potentiellement fluorescentes mais qui n'expriment leur propriété de fluorescence que lorsqu'elles sont fixées à une molécule particulière. Certains colorants permettent la visualisation des acides nucléiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas fluorescents en eux même mais qui le deviennent quand ils sont associés à l'ADN :

<u>Hoechst et DAPI</u>	Ils se fixent spécifiquement sur les bases A-T de l'ADN.
<u>Bromure d'éthidium et Iodure de propidium</u>	Ce sont des agents intercalants , c'est-à-dire qu'ils s'intercalent dans la double hélice de l'ADN de manière non spécifique.

B) Répartition de l'ADN dans le noyau :

Il y a des **zones très blanches** où l'ADN est très condensé, c'est ce qu'on appelle l'**hétérochromatine** (que l'on retrouve en périphérie du noyau).

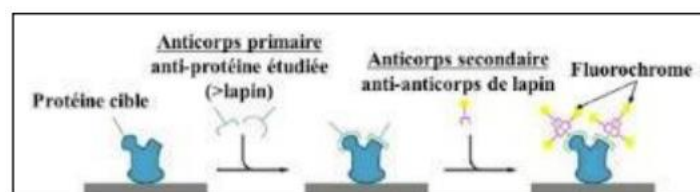
Il y a des zones où l'ADN est donc **moins condensé**, c'est ce qu'on appelle l'**euchromatine** (que l'on retrouve au milieu du noyau).

Il y a également une zone du noyau où il n'y a pas d'ADN, c'est le **nucléole**. Ce compartiment n'est pas délimité par une membrane mais il a plusieurs fonctions dont une essentielle qui est de **synthétiser les ribosomes** (qui seront ensuite exportés du noyau pour servir à la traduction).

V. Immunofluorescence indirecte :

On utilise l'immunofluorescence indirecte dans le cas où l'on souhaite étudier une molécule mais que l'on ne peut pas utiliser la technique de la fluorescence. Cela peut s'expliquer par le fait que c'est un **processus expérimental assez lourd** ou bien parce qu'on ne peut pas effectuer de **manipulation génétique** sur nos patients.

Ainsi, une autre manière de rendre cette molécule fluorescente de manière indirecte est, sur votre préparation cellulaire ou tissulaire, d'appliquer un **anticorps** (Ac). Un anticorps est une molécule produite naturellement pour reconnaître spécifiquement une protéine, plus précisément un **épitope étranger** et donc que l'on va pouvoir diriger vers une protéine spécifique.



Si on souhaite étudier une protéine humaine, il va être possible d'utiliser par exemple des Ac de lapin. Il suffit de mettre l'Ac en contact avec la cellule pour qu'il se fixe spécifiquement à la protéine souhaitée. C'est l'**anticorps primaire**.

Or, cet anticorps primaire n'est pas fluorescent. On va alors devoir utiliser un **anticorps secondaire** qui va venir reconnaître l'anticorps primaire. Ces anticorps secondaires ont été produits dans des boîtes de biotechnologies pour les rendre **fluorescents**.

Au laboratoire, les anticorps peuvent être obtenus en injectant l'antigène dans un animal (souris, lapin, chèvre, mouton, cheval...). Des injections répétées du même antigène stimulent les cellules B pour produire des anticorps reconnaissant l'antigène injecté : **anticorps polyclonaux**.

Il existe une technique de laboratoire permettant d'obtenir des anticorps monoclonaux, ne reconnaissant qu'un seul épitope d'antigène. On réalise un **criblage d'hybridomes**. On met en culture des cellules de cancer immortelles que l'on fusionne avec des lymphocytes B, ce qui va les rendre immortelles à leur tour.

On va pouvoir tester un par un les clones obtenus (cribler) avec l'antigène afin d'obtenir des anticorps monoclonaux.

Ces anticorps monoclonaux ont plusieurs utilisations :

- Marquage d'une protéine pour visualisation en microscopie à fluorescence (immunofluorescence indirecte).
- Purification par chromatographie d'affinité (couplage des anticorps monoclonaux à une colonne).
- Outils diagnostiques : test de grossesse, dépistage séropositivité au VIH...
- Médicaments : infection, anti-rejet de greffe, allergie, psoriasis, anti-cancer...

VI. FISH (Fluorescent in situ hybridization) :

L'hybridation in situ est l'équivalent de la technique d'**immunofluorescence indirecte** pour les **acides nucléiques**. On va utiliser des petites molécules d'**ADN** ou d'**ARN** qui sont appelées des **sondes** et qu'on va rendre fluorescentes en laboratoire.

A) Fonctionnement :

- 1) Il va falloir **dénaturer** l'ADN afin d'exposer ses deux brins, puis les mettre en contact avec une sonde fluorescente.
- 2) Celle-ci va venir **s'hybrider** (par complémentarité) spécifiquement à la molécule d'ADN ou d'ARN d'intérêt et vous permettre de la visualiser

B) Application :

- Possibilité de visualiser des réarrangements chromosomiques sur des caryotypes (application cytogénétique).
- Possibilité d'observer les territoires qu'occupent les chromosomes dans le noyau en interphase. Ce qui nous permet d'étudier la localisation et la dynamique des chromosomes dans le noyau, et donc de comprendre comment ils fonctionnent.
- Possibilité d'obtenir des informations sur la localisation et l'intensité d'expression des ARN au sein d'un tissu.

VII. La microscopie confocale :

La microscopie confocale est un outil d'exploration **tridimensionnelle** des cellules et des tissus, ce qui permet de gagner beaucoup d'informations spatiales.

A) Fonctionnement :

Le microscope est semblable à un microscope à fluorescence classique à ceci près qu'il possède un dispositif qui permet de concentrer la lumière d'excitation vers un plan de notre échantillon qu'on appelle le **plan confocal**. C'est ce plan de la cellule que l'on pourra observer. Évidemment, ce dispositif est fait de telle façon qu'il est possible de déplacer ce plan confocal et ainsi scanner tous les plans de la cellule. Grâce à la microscopie confocale on va donc pouvoir avoir une information précise au niveau d'un seul plan mais aussi reconstruire la cellule en **3D** (grâce à l'assemblage de tous les plans).

Ainsi, la microscopie confocale permet de :

- Générer des images tridimensionnelles des cellules.
- Obtenir des images de section optique en éliminant les signaux hors champ focal (grâce à un diaphragme ou pin-hole).
- Augmenter la résolution des images.
- Examiner des échantillons épais (œuf, embryon, tissu).

B) Principe détaillé :

- 1) Un laser émet tout d'abord une **lumière monochromatique**. Le faisceau est ensuite réfléchi par le **miroir dichroïque** et va illuminer l'échantillon biologique analysé.
- 2) Un **dispositif de balayage** permet de déplacer le faisceau sur la totalité de l'échantillon (déplacement horizontal pour pouvoir observer toute la surface sur un même plan).
- 3) Un **moteur** de haute précision permet de déplacer la platine par rapport à l'objectif pour obtenir une **succession de coupes** (de plans focaux) dans la profondeur de l'échantillon.

4) Les fluorochromes présents dans l'objet biologique éclairé par les faisceaux lumineux vont donc réémettre des photons de longueur d'onde supérieure et traverser le miroir dichroïque.

5) Un dispositif de **diaphragme**, que l'on appelle le **pin-hole**, ne laisse passer que les photons provenant spécifiquement du plan focal analysé. Il va ensuite les envoyer sur un **photomultiplicateur** qui va permettre de visualiser l'image sur un ordinateur.

Les images obtenues sont donc des images numériques. On peut ainsi faire défiler sur l'ordinateur tous les plans confocaux que l'on a analysés.

La reconstruction des **images en 3D** est très simple. Il faut imaginer qu'un objet peut toujours être décomposé en différentes sections avec une certaine épaisseur. Chaque section va correspondre à une image. L'ordinateur peut superposer ces images et donc reconstruire à l'aide de logiciels spécialisés la structure tridimensionnelle de l'objet à partir d'une série d'images de plans confocaux.

Un exemple concret d'utilisation de la microscopie à fluorescence : l'enzymologie de la réparation de l'ADN :

Notre ADN est endommagé tous les jours, quoi que l'on fasse, même par le simple fait de respirer ou bien d'aller à la plage. Heureusement, nos cellules possèdent la capacité de **réparer** notre ADN quand il est endommagé, ce qui est un phénomène essentiel et une question biologique centrale très souvent étudiée. Pour étudier ces voies de réparation, nous allons effectuer ce qu'on appelle de **l'enzymologie in vivo** grâce aux techniques de microscopie que nous avons étudiées.

Notre ADN subit différents types de dommages au quotidien. On retrouve par exemple des coupures sur un brin ou des modifications chimiques comme :

<u>Des pontages :</u>	Ce sont des liaisons covalentes qui se font de manière anormale. <u>Exemple</u> : les liaisons G-G qu'on appelle un pontage inter-brin contre lequel l'ADN ne peut pas faire grand-chose.
<u>Des dimères de pyrimidine :</u>	C'est lorsque deux pyrimidines adjacentes d'un brin se lient de façon covalente. Ils sont provoqués par les UV et entraînent une distorsion de la double hélice d'ADN. Le dimère T-T est le plus fréquent. On dit que cette lésion est photo-induite car induite par les UV.

Les bases peuvent également être modifiées sous l'action de certains agents physio-actifs comme des **radicaux libres**.

L'ADN est au centre du fonctionnement de la cellule donc il faut absolument pouvoir le réparer. Pour cela, il va y avoir un **arrêt dans le cycle cellulaire** grâce aux **checkpoints** durant le temps de réparation. C'est la voie de réponse à l'ADN endommagé.

Mais parfois, ce processus ne fonctionne pas :

- Cela peut être parce que l'altération du métabolisme de l'ADN a occasionné trop de dommages ou que des mutations sont apparues (les modifications de la structure de l'ADN se sont transformées en mutations).
- Cela peut aussi être parce que l'ADN endommagé ne sait plus transcrire ou répliquer, ce qui va entraîner des problèmes dans le cycle cellulaire (sénescence, mort de la cellule etc.).

Ces altérations du métabolisme de l'ADN apparaissent dans un génome normal mais parfois de manière accrue suite à des mutations germinales héritées des parents.

La maladie la plus connue est **Xeroderma Pigmentosum (XP)** dont les personnes atteintes sont appelées les enfants de la lune. Ce sont des enfants qui, du fait de mutations dans leur génome, sont incapables de réparer les **lésions induites par les UV**. Ils sont obligés de vivre dans des habits de « cosmonautes » sinon ils développent des cancers cutanés dans les zones exposées au soleil. C'est une maladie génétique rare qui est liée à un défaut de la **voie globale du NER**.

VIII. La microscopie en super-résolution :

On va maintenant parler d'un nouveau type de microscopie à fluorescence qui permet d'aller en deçà de la limite des **200 nm de résolution**. Cette limite reste toujours théoriquement valable mais on va voir qu'il existe une astuce pour la contourner : c'est ce qu'on appelle les techniques de **super-résolution**.

C'est une petite révolution dans la microscopie et ce sont des techniques de plus en plus utilisées en biologie cellulaire et en biologie en général. On imagine que chaque point de cet objet (par exemple un ensemble de protéines qui forme un cercle) est une molécule fluorescente : ce n'est donc pas la molécule que l'on voit mais c'est la **fluorescence qu'elle émet**.

Évidemment, à cause de la limite de résolution de 200 nm, on ne peut observer toutes les informations de cet objet (dans notre exemple, que les molécules sont organisées de manière à former un cercle).

L'astuce de la super-résolution est la suivante : on utilise un **fluorochrome** particulier qui ne va pas émettre un signal fluorescent continu mais **par « à coups »**. Ainsi à un instant t, seules quelques molécules vont fluorescer et juste l'instant d'après, cela va être d'autres molécules, et ainsi de suite. De cette manière, on va accumuler des **milliers d'images** pour le même objet et l'ordinateur va reconstituer une image en les compilant. On va ainsi visualiser la formation que l'on n'avait pas en microscopie standard en augmentant la résolution.

Peu importe le nom des techniques (PALM, STORM, STED...), elles sont toutes basées sur le même principe.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE :

Cette technique de microscopie est différente, on descend donc dans la limite de résolution au **niveau moléculaire**.

Le principe est assez simple : on remplace les photons de la microscopie optique par des **électrons**, c'est cela qui augmente la résolution. Il existe différents types de microscopie électronique (ME) : soit par **transmission** (MET), soit à **balayage** (MEB). À noter, les structures visibles en ME en biologie cellulaire sont appelées les **ultrastructures**.

Il y a deux grands types de ME :

<u>ME en transmission :</u>	Un faisceau d'électrons traverse la préparation. Il faut quelque chose qui va arrêter les électrons donc on va colorer la préparation aux sels de métaux lourds, ce qui va permettre de révéler les différentes structures
<u>ME à balayage :</u>	L'objet est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètre pas mais qui excite la surface de l'objet et émet des électrons seconds recueillis par un détecteur. Cela permet une vision en 3D.

I. Microscopie électronique en transmission (MET) :

Le microscope électronique ressemble à un microscope optique sauf que la source de lumière est remplacée par un canon à électrons.

- 1) Un condensateur va concentrer les faisceaux d'électrons vers l'échantillon.
- 2) Le faisceau va passer à travers l'échantillon **sous vide**.
- 3) Un objectif va permettre de projeter la transmission des électrons (qui va se faire ou pas en fonction de la présence des métaux lourds) sur une image micro fluorescente en bas du microscope.

Il faut donc préparer les échantillons de telle façon qu'on les fixe avec des atomes de métaux lourds pour qu'ils soient opaques aux électrons. Différentes techniques sont possibles :

- Coupe ultrafine (moins de 0,1 μm d'épaisseur)
- Coloration à l'or pouvant être couplé à des anticorps
- Ombrage
- Cryodécapage, cryofracture où l'on casse la cellule pour voir les reliefs

II. Microscopie électronique à balayage (MEB) :

L'intérêt c'est de regarder les objets en **3D**. On a toutefois une moins bonne résolution puisqu'elle est de l'ordre de **10 nm**. L'objet à étudier est encore une fois recouvert de **métaux lourds**.

Les électrons qui vont arriver vont être réfléchis par cette surface et deviennent des **électrons secondaires** qui seront détectés par un capteur. L'image est ensuite reconstituée informatiquement pour donner des images en relief.

MANIPULATION DES CELLULES :

I. Obtention des cellules :

1) La première étape pour obtenir des cellules est de **dissocier** les cellules du tissu. Il y a un cas assez facile c'est lorsque qu'on étudie des cellules du sang, où les cellules sont séparées les unes des autres. En revanche pour les tissus solides, il faudra dissocier les cellules afin qu'elles soient **isolées et sans contact**.

Pour cela, il existe plusieurs techniques :

- Les enzymes comme la trypsine qui détruit les ponts protéiques entre les cellules.
- Les techniques physiques comme l'agitation.

2) Une fois les cellules dissociées du tissu, il faut les **séparer**.

Il est possible de les séparer suivant différents critères :

- Propriétés physiques (taille et forme) par des techniques de centrifugation.
- Propriétés d'adhésion sur plastique ou sur lame de verre
- Méthodes moléculaires : purification sur support / cytométrie de flux)

A) La purification sur support :

Il en existe deux types en fonction de la façon dont on va procéder. Imaginons un mélange de deux types de cellules que l'on souhaite séparer. Un de ces deux types a un certain type **d'antigène de surface** pour lequel on a des anticorps.

On a un support solide, peu importe sa composition (plastique, billes magnétiques, collagène...), sur lequel vont être greffés des **anticorps** qui vont reconnaître **l'antigène de surface** de l'un des types de cellule. C'est à partir de là que l'on peut à partir du même dispositif expérimental employer deux façons de faire différentes : **en positif ou en négatif**.

En **sélection négative**, on met en contact le mélange de cellules avec le support. Évidemment, l'anticorps va s'associer aux cellules qui ont l'antigène par des liaisons non covalentes et pas aux autres. Les cellules étant séparées, on va récupérer celles qui ne se sont pas attachées au support. **On trie ce qui n'adhère pas = SÉLECTION NÉGATIVE.**

En **sélection positive**, on réalise les mêmes étapes mais on récupère les cellules présentes sur le support. On a donc un type cellulaire qui a été purifié. **On trie ce qui adhère = SÉLECTION POSITIVE.**

Quelle est la méthode la plus adéquate pour étudier la fonction des cellules ?

C'est la sélection négative. En effet, ce n'est pas indifférent pour une cellule d'avoir un antigène reconnu par un anticorps. Quand une protéine de surface est reconnue par un anticorps, cela peut entraîner une **information à l'intérieur de la cellule**. Le fait d'adhérer sur ce support, qui reste artificiel, va modifier l'état de la cellule qui nous intéresse. La technique de choix pour purifier une cellule la plus native possible, c'est la **sélection négative**.

B) La cytométrie de flux :

Cette autre technique est centrale en biologie et en médecine. Une fois les cellules dissociées et en suspension, on les dépose dans un appareil qui va les injecter dans un petit canal qui a le diamètre d'une cellule et n'en laisse passer qu'une à la fois dans un flux. Les cellules vont donc passer une à une dans ce petit canal, et en passant elles vont rencontrer un certain nombre d'appareils de mesures de la **taille et la forme des cellules**, voire même une lumière d'émission et un système de détection permettant de repérer la **fluorescence** émise par chacune des cellules.

C'est la **technique de référence** pour séparer les cellules une fois qu'elles sont en suspension car c'est une technique à haut débit.

II. Culture des cellules :

Une fois que les cellules sont dissociées du tissu et séparées les unes des autres, il est possible de les **étudier** directement ou de les cultiver dans des **boîtes de Pétri**.

<u>Avantage de la culture en boîte de Pétri :</u>	<u>Inconvénients de la culture en boîte de Pétri :</u>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Contenu plus homogène de cellules. ➤ Contrôle sur les conditions expérimentales. ➤ Possibilité de créer des clones génétiquement homogènes. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le fonctionnement cellulaire est étudié en dehors de son contexte tissulaire. ➤ Risque de sélectionner des mutants/variants.

En culture, les cellules ont besoin de beaucoup de choses et cela varie en fonction des types cellulaires. Globalement, elles ont besoin de **milieux complexes** qui comportent tout ce qu'il faut pour qu'elles puissent « manger » et fabriquer leurs constituants. Il faut donc leur apporter des acides aminés essentiels, vitamines, sel, glucose et **sérum**.

Le sérum joue un rôle très important puisqu'il contient les molécules de signalisation nécessaires à la division des cellules.

On distingue deux types de culture de cellules :

<u>Les cultures primaires :</u>	<p>Les cellules en culture ne se divisent que pour un nombre limité de fois (environ 50 divisions). Après cela elles rentrent en sénescence cellulaire. Ce phénomène de sénescence cellulaire qu'on observe naturellement à partir d'une culture primaire reflète en partie les mécanismes de vieillesse de l'organisme.</p>
<u>Les lignées immortelles :</u>	<p>Ces cellules n'ont pas de limite de division, elles ne rentrent pas en sénescence. Elles peuvent ainsi se diviser en théorie de manière infinie.</p> <p><u>Ces lignées n'existent pas naturellement :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Soit on les obtient à partir de situations pathologiques où il y a la formation de ces cellules immortelles comme le cancer. ➤ Soit on les rend immortelles (agents mutagènes, virus, télomérase). <p>Il existe des immortalisations spontanées (très fréquentes chez la souris mais extrêmement rares chez l'Homme).</p>

III. Analyse du contenu cellulaire :

Une fois que les cellules ont été cultivées, il est possible de les **étudier**. Ainsi, après les avoir séparées et cultivées, il faut les **détruire**. En effet, pour pouvoir étudier les constituants cellulaires, il va falloir les fractionner : c'est ce qu'on appelle la **lyse cellulaire**

Pour cela, il existe plusieurs techniques (possibles à combiner) pour lyser les cellules :

- Ultrasons
- Chocs osmotiques
- Détergents
- Techniques mécaniques comme des frottements avec des appareils particuliers : des pistons de téflon qui vont frotter et lyser des cellules.

L'étape suivante est de séparer l'extrait cellulaire pour isoler les différents constituants. Du plus grossier au plus précis :

FILTRATION	Gros débris.
CENTRIFUGATION	Membranes, organites, complexes moléculaires.
ELECTROPHORESE CHROMATOGRAPHIE	/ Protéines et acides nucléiques.

La **centrifugation** est une technique de choix en biologie cellulaire. Le principe est simple, les éléments les plus gros sédimentent en premier. À partir de 100 000 g (g c'est la constante d'accélération de la pesanteur = $9,81 \text{ m.s}^{-2}$), on parle d'**ultracentrifugation**.

Étapes de la centrifugation différentielle :

- 1) L'homogénat de cellules est filtré afin d'obtenir une **préparation homogène sans gros débris**
- 2) On réalise une **centrifugation basse vitesse** (600 g). On obtient dans le **culot** les noyaux. On récupère le **surageant** correspondant au cytoplasme.
- 3) On accélère la vitesse de centrifugation (15 000 g). On obtient la fraction des microbodies qui contient les plus petits éléments membranaires de la cellule : **mitochondries, lysosomes, peroxysomes**. On récupère de nouveau le surageant.
- 4) On accélère encore la vitesse (100 000 g). On obtient les **membranes plasmiques**, la **fraction microsomale** (fragments du réticulum endoplasmique) et les **polyribosomes**. On récupère encore le surageant.
- 5) On accélère encore la vitesse (300 000 g). On récupère des ribosomes, des **virus** et des **polysomes**.
- 6) La fraction soluble restante s'appelle opérationnellement le **cytosol**.

On peut faire ensuite appel à une autre technique complémentaire appelée **centrifugation à l'équilibre en gradient de densité** ou **centrifugation isopycnique**.

Centrifugation à l'équilibre en gradient :

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle ne sont pas encore complètement pures, on veut aller encore plus loin dans la séparation. Avant même de centrifuger, on crée dans le tube de centrifugation un **gradient de densité** (ici grâce à des coussins de sucrose de densités croissantes).

La densité augmente en allant vers le fond du tube. Sur ce gradient, on dépose la fraction à étudier (par exemple la fraction microbodies) et on soumet le tube à une centrifugation. Ainsi, à l'équilibre les différents constituants de la fraction vont s'arrêter dans le milieu correspondant à leur **propre densité**. Dans le cas de la fraction microbodies, on peut séparer en fonction de leur densité les lysosomes, les mitochondries et les péroxysomes.

Maintenant que l'on a séparé les constituants de la fraction **selon leur densité**, on peut étudier leurs propriétés, par exemple l'activité enzymatique.

Il est maintenant possible de pouvoir effectuer l'analyse moléculaire du contenu de ces cellules et des différentes fractions. On dispose de nos jours de technologies de pointe qui permettent d'analyser tout un ensemble de molécules des cellules et d'avoir une vision complète du contenu cellulaire.

Si on séquence tout l'ADN d'une cellule, on obtient le GENOME (séquençage haut débit / NGS).

Si on répertorie les différentes sortes d'ARN d'une cellule, on obtient le TRANSCRIPTOME (reverse transcriptase).

Si on détermine l'ensemble des protéines d'une cellule (par des techniques de spectrométrie de masse), on obtient le PROTEOME (chromatographie, électrophorèse, spectrométrie de masse).

La technique de choix la plus précise est la spectrométrie de masse :

Dans un premier temps, on va digérer grâce à des protéases, comme la trypsine, un mélange de protéines pour obtenir des peptides, chacun étant spécifique de la protéase utilisée et ayant une masse moléculaire spécifique.

En étant extrêmement précis sur la masse d'un peptide, on peut déterminer sa séquence.

Les peptides sont ionisés et accélérés dans l'appareil et en fonction de leur ionisation et de leur masse, ils sont réfléchis sur un écran qui va les analyser.

Une banque de données permet d'identifier les peptides en fonction de leur masse grâce à leur niveau de réflexion. On identifie ainsi la protéine étudiée.

IV. ANALYSES GÉNÉTIQUES EN BIOLOGIE CELLULAIRE :**A) Généralités :**

Ces analyses génétiques sont **centrales en biologie cellulaire**, ce sont des outils précieux pour analyser les cellules. Qui dit génétique, dit mutation, dit modification de la fonction d'un constituant (ADN, ARN, protéine). La génétique va donner un mutant, qui va gagner ou perdre une fonction. En observant la déviation d'un processus normal, on va en déduire le fonctionnement normal : **c'est en étudiant l'anormal que l'on va comprendre le normal.**

Pourquoi étudier des cellules mutantes ?

- Comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire (biologie cellulaire).
- Modèles de maladies génétiques (Voir cours de génétique) : des maladies que l'on peut hériter, des modifications génétiques somatiques comme le cancer.
- Identifier et caractériser des nouveaux médicaments liés à ces mutations.

B) Transgénèse :

Le plus important en biologie cellulaire est d'avoir des mutations qui vont donc modifier une fonction cellulaire, et c'est cette modification que l'on va étudier qui va permettre de mieux comprendre le fonctionnement normal.

Pour cela, il faut être capable de manipuler le contenu génétique d'une cellule ou d'un organisme. C'est ce qu'on appelle la **transgénèse**. D'un point de vue formel, c'est l'introduction d'un nouveau gène (transgène) dans une cellule ou un organisme, alors appelé transgénique.

On peut exprimer des protéines étrangères généralement étiquetées par un épitope ou par un fluorochrome (GFP), c'est une intégration qui peut être au hasard dans le génome ou ciblée à un endroit précis du génome. Cela permet :

- D'étudier la localisation et la dynamique de la protéine dans la cellule
- La purification de complexes (immunoprécipitation)
- D'étudier des domaines d'une protéine
- D'inactiver un gène : En remplaçant le gène endogène par un gène inactif : on dit que le gène est invalidé par Knock-Out (KO) o Par Knock-Down (KD)

La transgénèse peut aussi se faire à l'échelle d'organismes (souris transgéniques).

Il y a différentes façons de moduler l'expression ou la fonction d'un gène par transgénèse :

- Il peut y avoir une insertion non ciblée sur un promoteur hétérologue. On peut avoir une expression ectopique d'un gène, une surexpression de forme sauvage ou mutée (comme l'hormone de croissance humaine chez la souris).
- Le Knock-Down (KD) : on ne va pas empêcher complètement l'expression d'un gène mais réduire son expression par des techniques d'interférences ARN. Le produit du gène sera de séquence normale mais en moins grande quantité. On étudie donc l'influence de la quantité du produit de ce gène sur le processus biologique étudié.
- Le Knock-In (KI) : on va modifier un gène en lui conférant une propriété. Il y a donc expression "normale" d'une protéine mutante permettant de la tracer (GFP) ou de modéliser une maladie génétique.
- Le Knock-Out (KO) : on va complètement inactiver le gène. On étudie l'effet de l'absence de produit du gène.