



Méthodes d'études de la cellule

Comme pour mes autres fiches cette écriture représente mes remarques qui ne sont pas à apprendre mais peuvent vous aider. 📖 : la notion est tombée une fois, 📖📖, la notion est tombée deux fois etc... Bon cours !

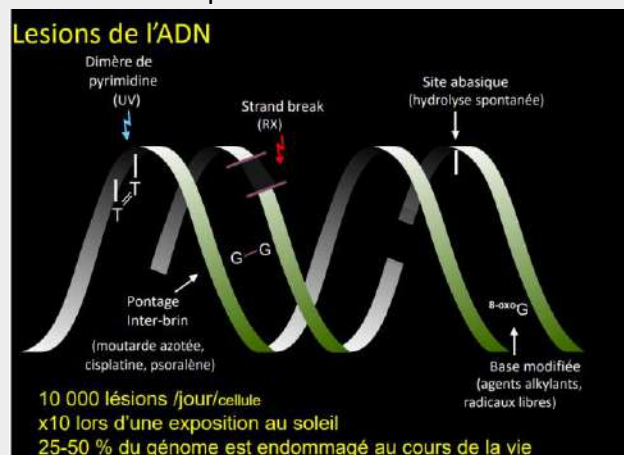
I. La microscopie (suite)

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

1) Lésions de l'ADN

L'ADN est une molécule précieuse qui peut subir des dommages. On retrouve par exemple :

- Des coupures sur un brin
- Des modifications chimiques appelées **pontages**, c'est-à-dire des liaisons covalentes qui se font de manière anormale (par exemple la liaison G-G, que l'on appelle un pontage inter-brin, modification dramatique car l'ADN ne sait plus faire grand-chose dans ce cas).
- Les bases peuvent également être modifiées **chimiquement** sous l'action de certains agents physico-réactifs (par exemple une guanine qui a été oxydée par des radicaux libres en 8 oxo-guanine).
- Des dimères de pyrimidine provoqués par les **rayons UV**. Deux pyrimidines adjacentes d'un brin se lient de façon covalente, provoquant une distorsion de la double hélice de l'ADN. Le dimère le plus fréquent est le dimère T-T. On appelle cette lésion un photo-induit car induite par les UV.



L'ADN est vraiment au centre du fonctionnement de la cellule donc il faut absolument pouvoir le **réparer**.

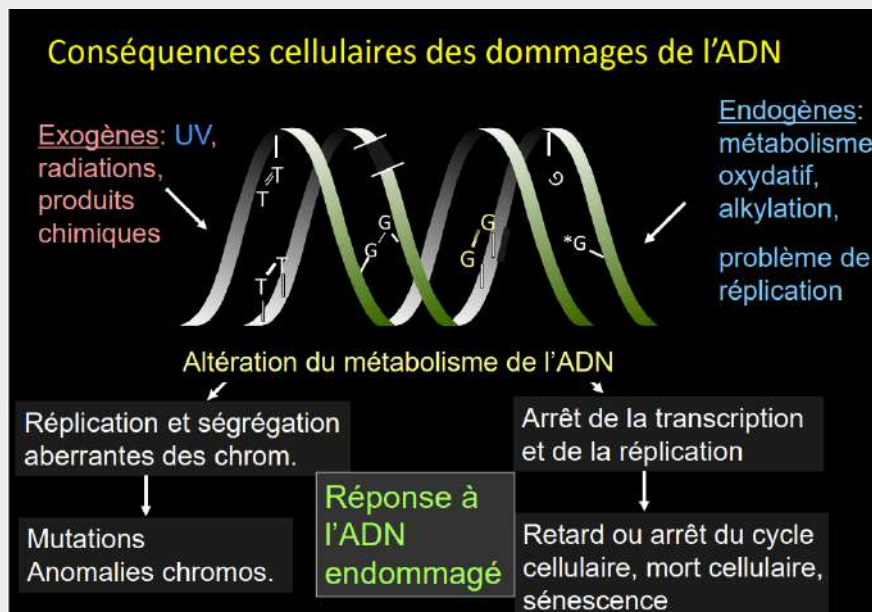
Pour cela, il va y'avoir un **arrêt** dans le cycle cellulaire grâce aux checkpoints le temps de la réparation. C'est ce que l'on appelle la voie de réponse à l'ADN endommagé **NER** (Nucleotid Excission Repair).

Si ces processus ne fonctionnent pas bien, parce qu'on a des mutations ou qu'il y'a trop de dommages, la cellule ne sait plus gérer la quantité de dommages.

Ces modifications ne sont pas mutations en tant que tel mais peuvent le devenir.

Pour vous expliquer la nuance, on a ici des dommages de l'ADN qui peuvent encore être réparés. En revanche si lors de la prochaine réplication ils induisent des changements dans la séquence nucléotidique de l'ADN alors ces changements sont permanents et sont donc nommés mutations.

Evidemment, les mutations vont changer la **programmation** de la cellule et donc entraîner des maladies comme des **cancers**...



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 le **Xeroderma pigmentosum** (XP) dite des « enfants de la lune ». C'est une maladie génétique humaine rare, provenant d'un défaut du système de réparation de l'ADN endommagé par les rayons UV (**voie globale du NER**). 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 scaphandres pour se protéger des rayons du soleil, sinon ils développeraient très rapidement des cancers cutanés.



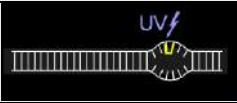
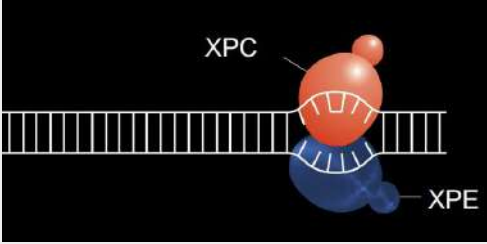
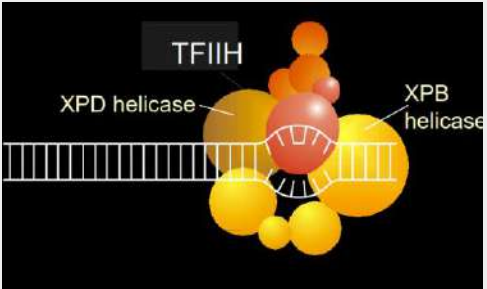
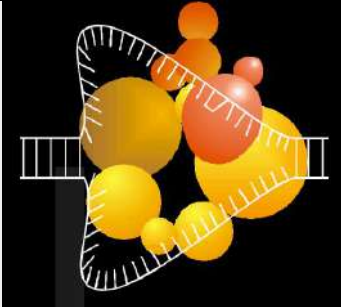
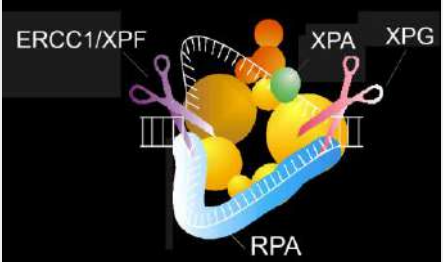

2) Réparation des lésions de l'ADN après irradiation par les UV

Il existe toute une batterie de mécanismes pour réparer en fonction du type de dommage. Quand c'est un dimère de pyrimidine induit par les UV, on va utiliser une voie de réparation particulière : le voie NER (Nucleotid Excission Repair).

Il existe plusieurs voies du NER :

- La **voie globale NER** : GG-NER
- La **voie du NER couplée à la transcription** : TCR-NER

a) La voie globale NER ou GG-NER

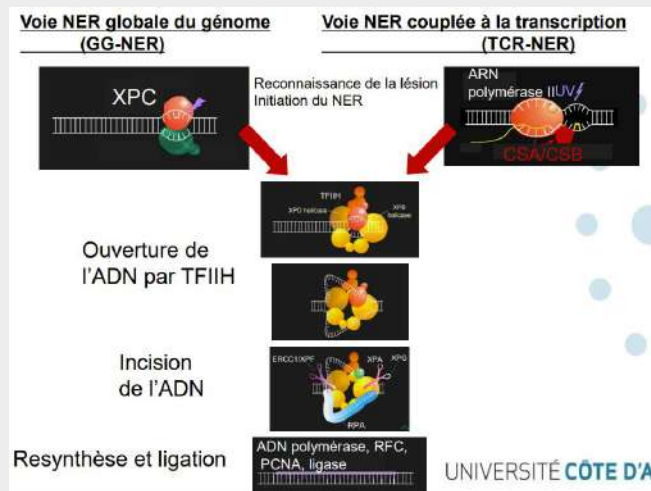
	Après une exposition aux UV, un dimère de pyrimidine se forme.
	La cellule va reconnaître ce dimère avec des protéines spécialisées : XPC et XPE (les protéines s'appellent XP car elles ont été retrouvées mutées chez les patients atteints de Xeroderma pigmentosum). Il va y'avoir une dissymétrie entre les deux brins d'ADN puisque XPC va se fixer sur le dimère et donc reconnaître le brin altéré.
	Cette première étape permet de faire venir un complexe multiprotéique : TFIIH . C'est une protéine complexe qui n'intervient pas que dans la réparation (comme souvent en biologie cellulaire, une protéine est utilisée pour plusieurs fonctions). Elle intervient aussi par exemple dans la transcription . TFIIH arrive pour apporter dans ses sous-unités deux protéines : XPD et XPB . Ce sont des hélicases , c'est-à-dire des enzymes qui vont dérouler la double hélice d'ADN. Ainsi TFIIH permet d'ouvrir autour de l'endroit où se trouve le dimère.
	XPC s'en va et XPA arrive au niveau du dimère. C'est important d'avoir la dissymétrie pour savoir quel brin est à réparer. La protéine RPA va venir se fixer sur l'autre brin pour le marquer. On a donc un complexe intermédiaire avec XPA et RPA qui permet de savoir quel est le brin à réparer et quel est celui à conserver. Il ne reste plus qu'à enlever ce qui est anormal.
	Deux nouvelles protéines arrivent, ce sont des nucléases , qui vont couper l'ADN comme des paires de ciseaux : du côté 5' ERCC1/XPF et du côté 3' XPG .
	Une fois l'ADN excisé, il va être réparé par une ADN polymérase et ses facteurs associés (dont PCNA). Tout cela se termine par une ADN ligase . On aura ainsi reconstitué la molécule d'ADN sans dimères de pyrimidine.

b) La voie du NER couplée à la transcription ou TCR-NER

Il existe aussi une autre voie qui agit en même temps que la GG-NER (son action dépend du type de lésion, de la localisation...) Cette voie ressemble à la GG-NER mais avec un démarrage différent.

	<p>Durant la transcription, l'ARN polymérase II transcrit les gènes qui codent pour des protéines.</p> <p>En cas d'exposition aux UV, un dimère de pyrimidine se forme à un endroit où la polymérase va arriver. Il va y'avoir collision car la polymérase ne peut pas continuer.</p>
	<p>Un facteur, CSB (du nom du syndrome de Cockayne), va venir se fixer et recruter TFIIF</p>
	<p>On reprend ensuite les mêmes étapes que pour la voie globale (hélicases, XPA, RPA, nucléases, excision, repolymérisation...)</p>
	<p>Une fois le brin réparé, la polymérase pourra reprendre son chemin et continuer sa transcription.</p>

Récap :



Toutes ces étapes peuvent être reconstituée in vitro en biologie moléculaire mais on ne sait pas comment tout cela se passe dans la cellule et il **reste de nombreuses questions** pour la biologie cellulaire.

- Localisation des protéines NER dans des compartiments nucléaires ?
- Les protéines NER sont-elles immobiles ou diffusent-elles librement ?
- Existe-t-il un "holocomplexe" ou un assemblage séquentiel au niveau du site de dommage UV ?
- Liens avec d'autres processus nucléaires :

. Transcription

. Réplication

. Recombinaison

. Cycle cellulaire

La biochimie et la biologie moléculaire ne peuvent pas répondre à ces questions, il faut les adresser à des outils de la biologie cellulaire, dont un en particulier : la microscopie à fluorescence.

3) Localisation et dynamique des protéines NER : stratégie expérimentale

Afin d'étudier tout cela, on va rendre chacun des acteurs fluorescents puis les introduire par technique de génie génétique dans la cellule.



Avant les expériences, certaines précautions doivent être prises. La principale est de savoir si les protéines mutantes étudiées sont bien **fonctionnelles**.

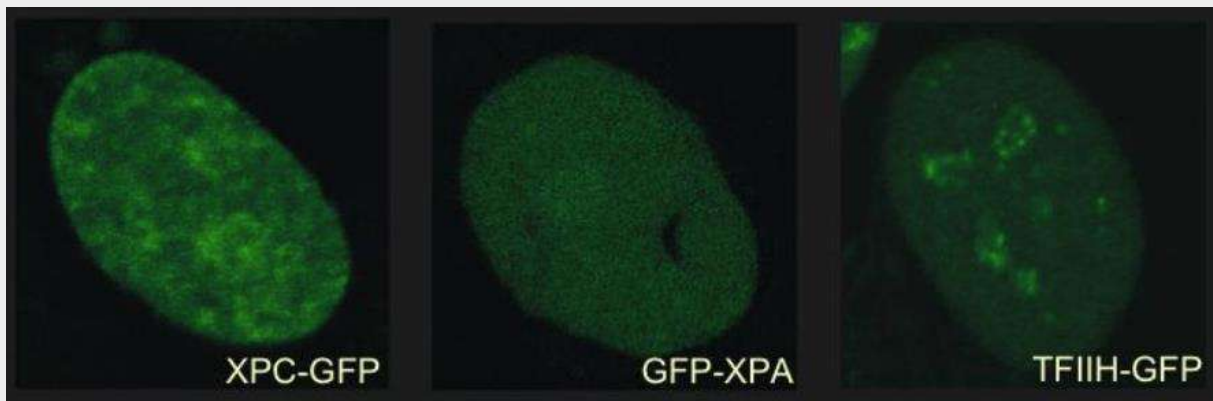
Pour cela, on va faire une **complémentation**, c'est-à-dire que l'on va mettre les protéines hybrides dans des cellules mutantes, des cellules de patients comportant des mutations qui les rendent défectifs aux réparations des dommages UV, et voir si ces protéines restaurent la fonction.

Exemple : Nous voulons tester notre protéine hybride EGFP-XPA. Nous prenons un patient portant une mutation XPA. Si cette protéine permet de restaurer la fonction normale, on saura que l'hybride EGFP-XPA est fonctionnel.

Expériences (à bien comprendre)

Distribution subnucléaire distincte pour différentes protéines NER

Ces expériences de microscopie permettent de voir où sont localisées les protéines (XPX, XPA, TFIIH) dans le noyau. On constate qu'elles ne sont **pas au même endroit**, ce qui veut dire qu'elles ne sont pas sous forme d'un holo-complexe toutes associées et prêtes à l'emploi mais plutôt dans des compartiments différents.



On va essayer de comprendre quelle logique il y'a dans ces compartiments.

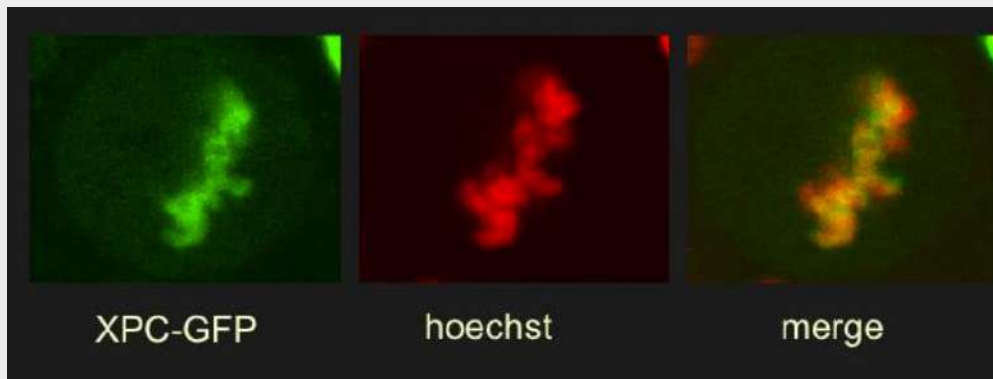
Localisation d'XPC en absence de rayons UV

Si l'on marque l'ADN du noyau (que ce soit avec du DAPI ou du Hoechst), on peut voir la masse d'ADN dans le noyau. On observe des gros foyers qui correspondent à des concentrations élevées d'ADN.



Quand on regarde la localisation d'XPC et que l'on fait un merge, c'est-à-dire que l'on superpose les deux images, on peut constater qu'elles sont localisées au même endroit. On en déduit qu'en l'absence d'UV, XPC est déjà sur l'ADN.

On peut aussi regarder des cellules en division. Ici on peut voir les chromosomes métaphasiques qui s'alignent sur la plaque équatoriale. Encore une fois, on constate qu'XPC est associé à l'ADN.



Donc : XPC est associé à l'ADN même en absence d'irradiation d'UV.

Localisation de TFIIH (XPB) en l'absence de rayons UV

Pour rappel, XPB est une sous-unité de TFIIH donc il va permettre de la marquer. Sur l'image du centre on peut voir en contraste de phase le nucléole.



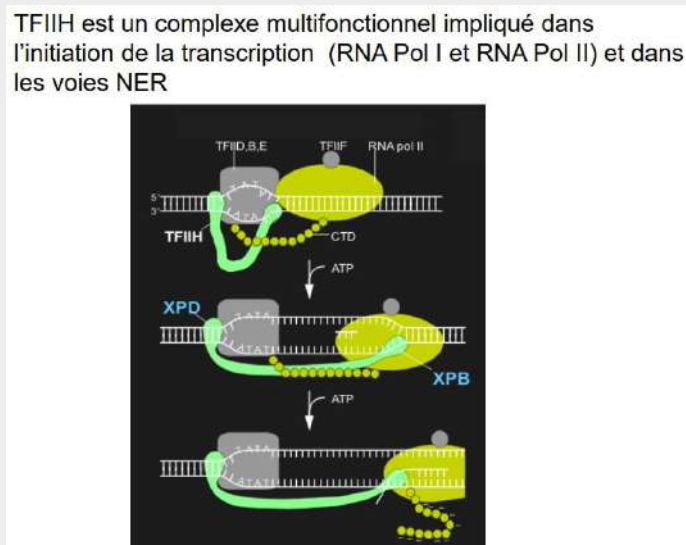
En faisant un merge, on voit que XPB est à l'intérieur du nucléole. On voit donc bien que les protéines ont chacune un compartiment différent.

Ceci n'est pas complètement étonnant. En effet, comme on l'a dit précédemment, TFIIH participe aussi à d'autres processus cellulaires comme la transcription.

Donc : XPB s'accumule au niveau du nucléole

TFIIH et la transcription

On est à un moment crucial de la transcription, qui est le moment où on décide de démarrer la transcription. Ça se passe au niveau du **promoteur**.



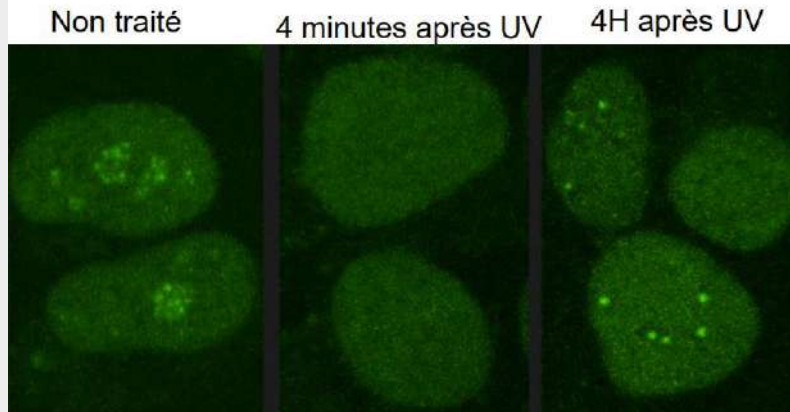
Le gros ovale correspond à l'ARN polymérase II. L'espèce de collier de billes correspond au domaine C-terminal, qu'on appelle CTD. Il vient bloquer le démarrage de la polymérase.

Grâce à ses hélicases, TFIIH va ouvrir toute cette région d'initiation de la transcription et ainsi permettre au CTD de se libérer. La polymérase va ainsi pouvoir commencer la transcription.

Effet des UV sur la distribution d'XPB

TFIIH est localisé au niveau des foyers actifs de la transcription. Mais que se passe-t-il lorsque la cellule subit des irradiations aux UV ?

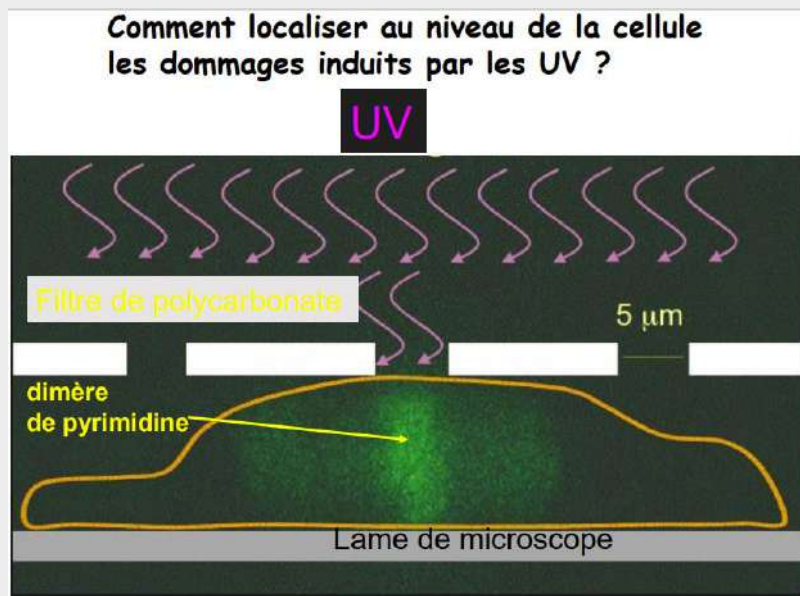
Effet des UV sur la distribution d'XPB (TFIIH)



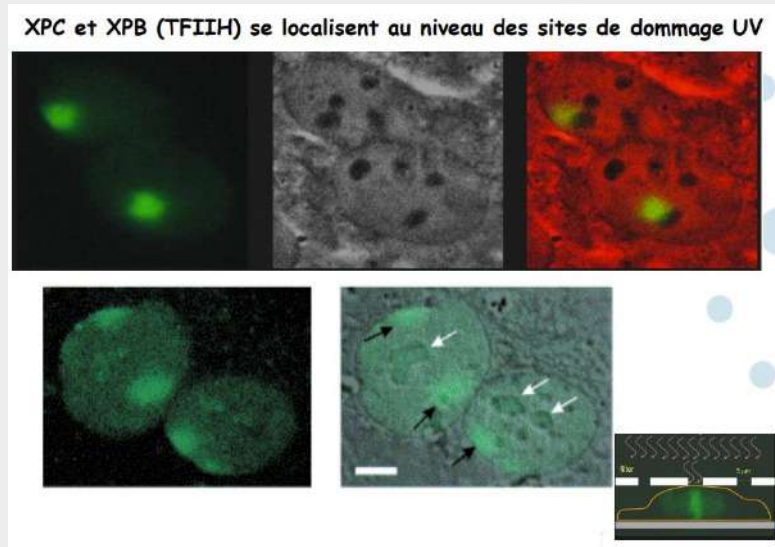
On va traiter la cellule aux UV. 4 minutes après les UV, TFIIH disparaît. 4 heures, après il réapparaît sous formes de foyers très différents de ce qu'on voyait dans la cellule non irradiée. Ce sont les sites de réparation.

Comme on veut être très précis et que l'on a besoin d'informations très sophistiquées, on va irradier une partie uniquement de la cellule. Il y'a pour cela une astuce très simple.

On a le dispositif avec la lame de microscope et la cellule couchée dessus. On applique un **filtre de polycarbonate** qui ne laisse passer les UV qu'au niveau des pores. Il n'y aura donc des dimères de pyrimidines qu'à ces endroits précis.



Localisation d'XPC et d'XPB en présence de rayons UV

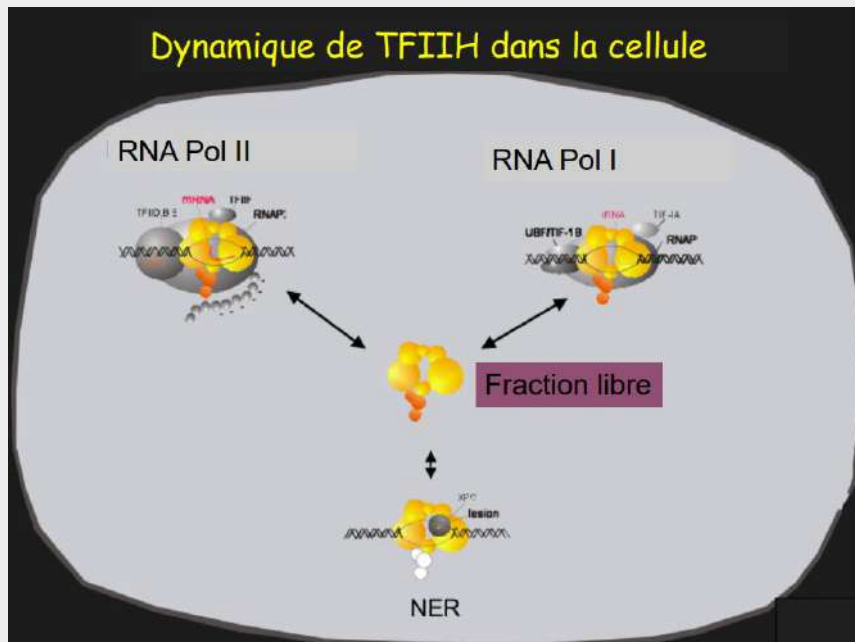


On voit que XPC et XPB (TFIIH) se localisent au niveau des **sites de dommage**. Ces protéines se relocalisent dans le noyau en fonction des zones à réparer.

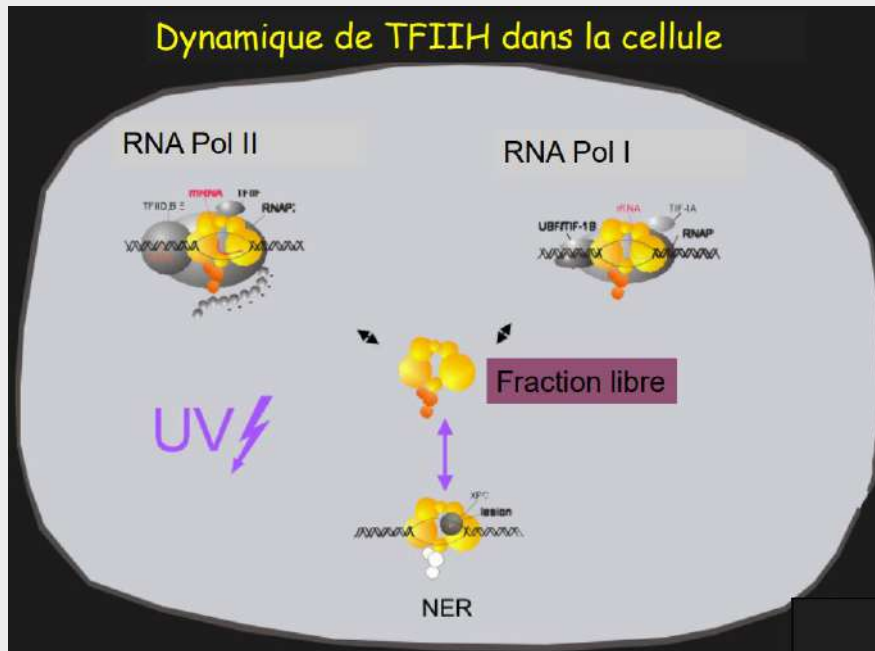
Donc : XPC et XPB se localisent au niveau des sites de dommage d'UV

Dynamique de TFIIH dans la cellule

TFIIH est **partagé** pour la transcription et la réplication. Cela veut dire qu'il y'a une fraction de TFIIH qui est libre et qui « hésite » entre les deux.



Quand il y'a des **rayons UV**, on va **déplacer l'équilibre** de la fraction libre vers les zones lésées (ce qu'on a vu juste avant).



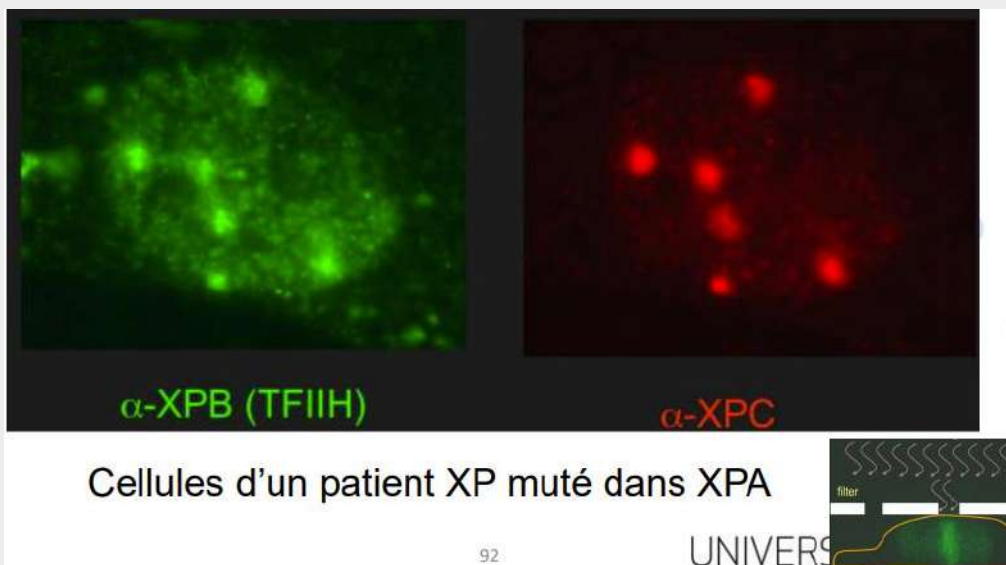
Assemblage du complexe de protéines sur l'ADN après rayons UV

Là on a pris des cellules d'un patient muté dans XPA. Toujours avec le dispositif du filtre, on va regarder si les protéines vont se fixer au niveau des dommages. La question que l'on se pose est :

« En présence de rayons UV dans cette cellule de patient qui n'a pas de XPA, est-ce que les autres protéines vont se fixer ? »

Autrement dit :

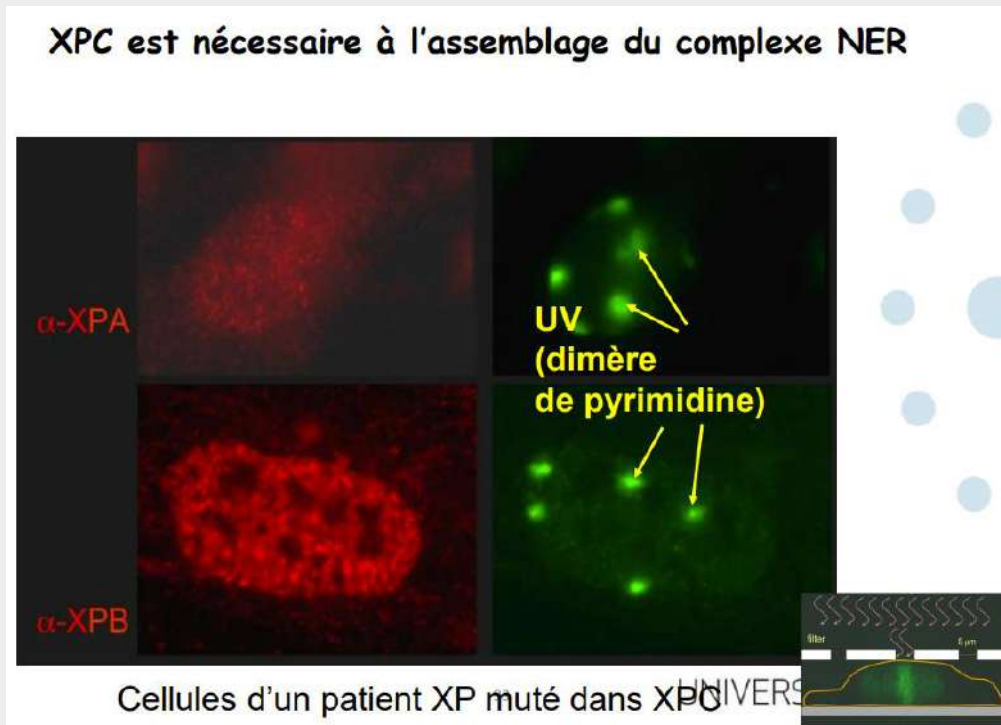
« XPA est-il **nécessaire** à la fixation des autres protéines ? ».



Dans cette cellule on va rendre fluorescent XPB (TFIIH) et XPC. On voit qu'ils se fixent au niveau des dommages, ce qui veut dire qu'XPA **n'est pas nécessaire** à leur recrutement.

Donc : XPA n'est pas nécessaire au recrutement de XPC et TFIIH aux sites de dommage UV

On prend cette fois un patient muté dans **XPC**. Pour rappel, on avait dit qu'XPC était un facteur arrivant au début de la voie globale.



En présence des rayons UV, on voit que les autres protéines (XPA, XPB) ne s'assemblent pas alors qu'on a bien repéré des dimères de pyrimidines.

Donc : XPC est nécessaire à l'assemblage du complexe NER

Diffusion des protéines

Par des techniques de **FRAP**, on peut mesurer les **coefficients de diffusion** pour chacune des protéines et les mettre en relation avec leur poids moléculaire.

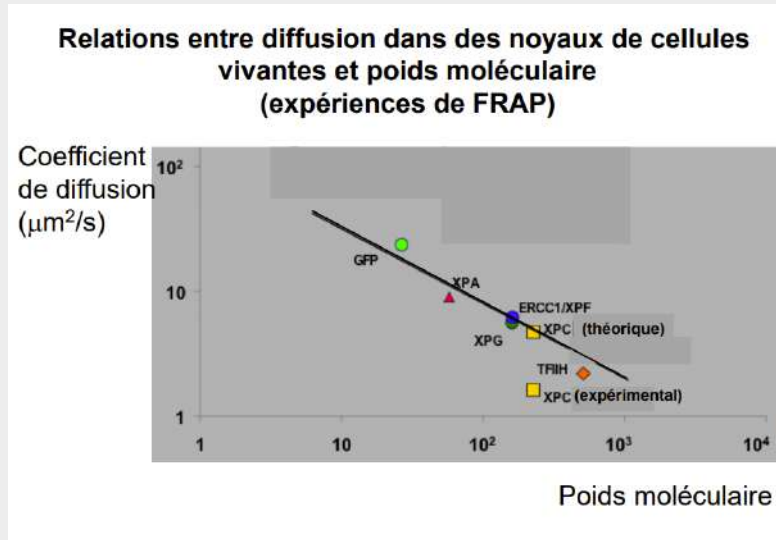
On constate que plus les protéines sont grosses, plus petite est leur vitesse de diffusion.

Logique : $E_c = \frac{1}{2}mv^2$

Pour une même énergie, si la masse augmente la vitesse diminue.

Plus rigoureusement mais avec le même raisonnement avec la quantité de mouvement p :

$p = mv$



La ligne du graphique correspond à la ligne théorique. On voit que beaucoup de protéines diffusent en fonction de la taille.

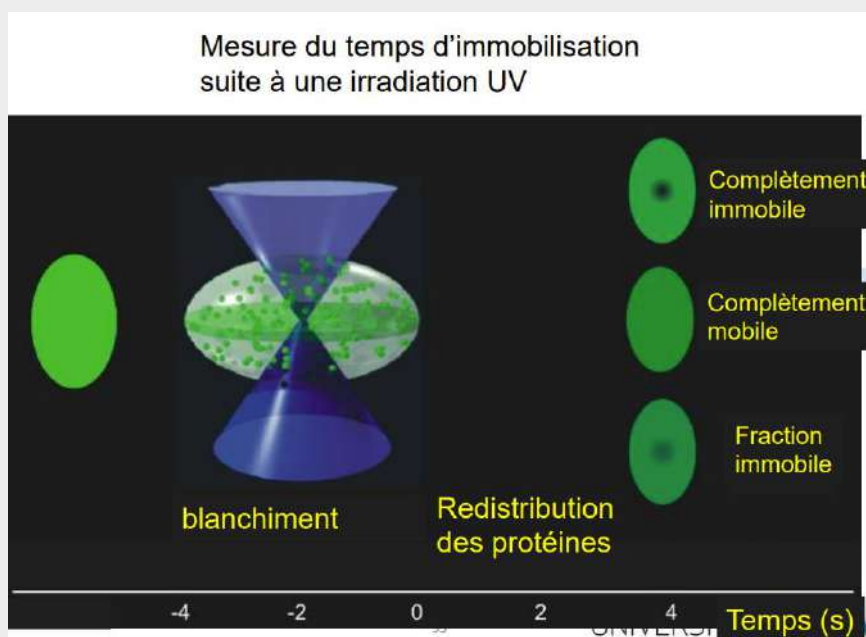
Il y'a cependant des exceptions, notamment une intéressante :

XPC va diffuser beaucoup plus lentement que ce que laisserait présupposer sa taille.

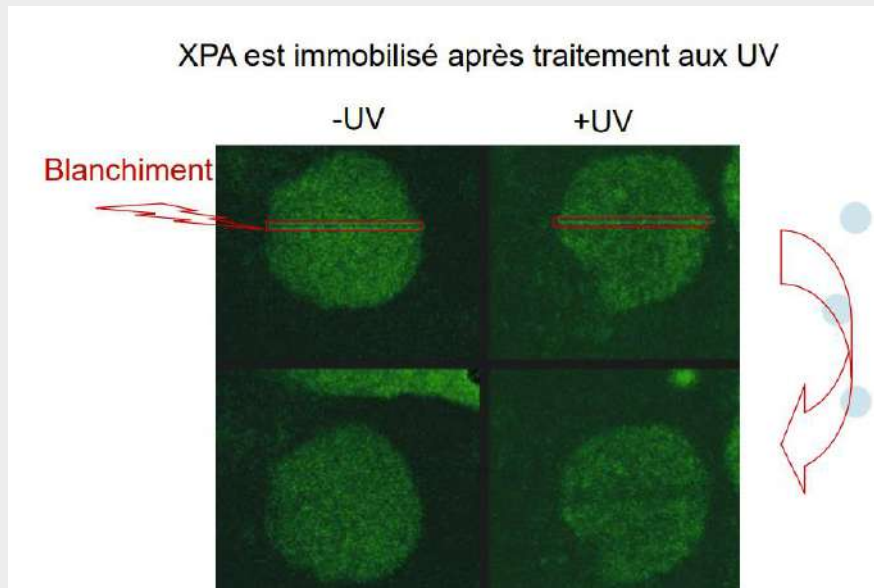
On se demande maintenant combien de temps ces protéines vont rester au niveau des dimères de pyrimidines, ce qui va permettre de savoir la vitesse à laquelle on répare l'ADN.

On va pour cela utiliser la technique de **FRAP** :

- Si les protéines sont complètement **immobiles**, on ne récupère **jamais** la fluorescence
- Si les protéines sont complètement **mobiles**, on la récupère **totalemment**
- S'il y'a **une fraction immobile**, on la récupère **partiellement**.



Une zone a été photoblanchie sur une cellule en absence d'UV et en présence d'UV. On va regarder XPA.



Donc :

En absence d'UV : la zone photoblanchie regagne sa fluorescence. XPA est donc **mobile**.

En présence d'UV, XPA **s'immobilise un peu partout** dans le noyau et ne peut donc pas recoloniser.

Temps d'immobilisation des protéines NER au site de dommage UV (FRAP)

-XPC est très rapide (1,5 minutes). C'est l'initiateur de la voie globale. Il est relâché très rapidement.

-CSB on le rappelle, est un peu l'équivalent d'XPC mais dans la voie de transcription. Il est également rapide (2,5 minutes d'immobilisation) et est relâché rapidement.

-TFIIH (XPB) reste beaucoup plus longtemps (4 minutes).

-PSNA, un des facteurs associés à la polymérase, reste très longtemps (20-25 minutes). La resynthèse de l'ADN est un moment très long (ce fut une surprise au moment de cette découverte).

**Temps d'immobilisation des protéines NER
au site de dommage UV déterminé par FRAP**

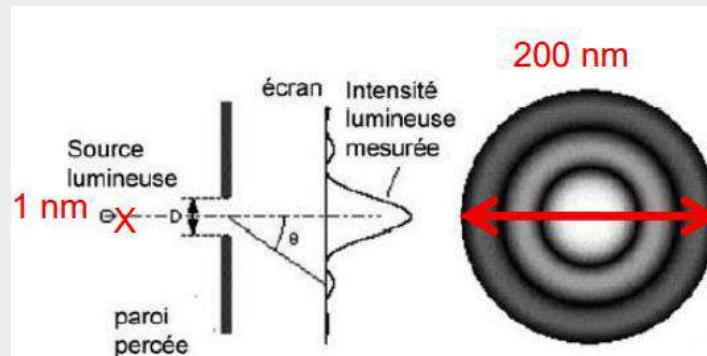
XPC	1.5 min.	initiateur du GG-NER -> relaché rapidement
CSB	2.5 min.	initiateur du TCR-NER -> relaché rapidement
TFIIH (XPB)	4 min.	ouverture de l'ADN -> plus long
PCNA	20-25 min.	resynthèse -> très long

Conclusions :

- Chaque protéine NER représente une **distribution subnucléaire spécifique**, il n'y a pas d'holocomplexe NER.
- La mobilité intranucléaire des facteurs s'effectue par **diffusion passive** en fonction du poids moléculaire (sauf XPC).
- Assemblage rapide et séquentiel des facteurs au site de dommage (avec des temps d'immobilisations différents).
- Localisation nucléaire de TFIIH avec un couplage transcription/réparation
- Avantages pour la cellule :
 - Flexibilité
 - Efficacité
 - Multifonctionnalité
 - Coordination
 - Régulation multiple

b) Limite de résolution de la microscopie optique

La limite de résolution de la microscopie optique (et donc de la microscopie à fluorescence) est de **200nm**. C'est le gros problème de cette méthode.

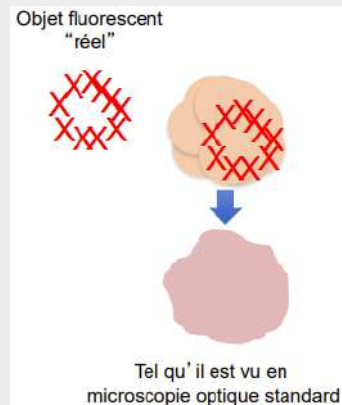


C'est l'allemand Ernst Abbe (fin XIXème siècle) qui a déterminé la formule pour trouver la limite de résolution de la microscopie optique. Cette équation est liée au caractère ondulatoire de la lumière. *C'est plus de la physique que de la biocell mais pour vous expliquer lorsqu'un objet a une taille suffisamment grande on peut négliger l'aspect ondulatoire de la lumière et on rentre dans le cadre de l'optique géométrique. Lorsque notre objet a une dimension qui est plus petite qu'une dimension seuil, l'aspect ondulatoire de la lumière est non négligeable et on va avoir des phénomènes d'interférences et on rentre dans le cadre de l'optique ondulatoire. Je vous rajoute ça pour votre compréhension.*



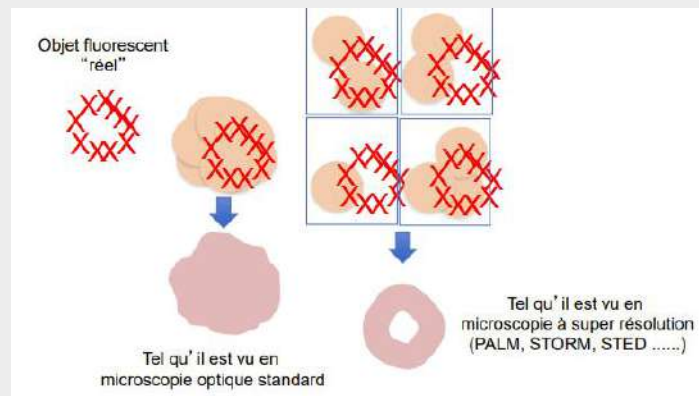
Les biologistes cellulaires ont voulu aller en deçà de cette limite mais en gardant la microscopie optique (pratique d'utilisation). Il existe ainsi une astuce pour détourner cette limite physique.

Imaginons un objet que l'on observe au microscope. Sur le schéma il est représenté tel qu'il est. Chaque croix est un fluorochrome (tel qu'il est vraiment dans la cellule). On peut voir une sorte de cercle (*on peut imaginer que c'est un complexe protéique dont chaque croix correspond à une sous-unité et dont l'ensemble forme un cercle*).



Maintenant on superpose à cette image réelle ce que l'on peut voir en microscopie optique traditionnelle avec la limite de résolution à 200 nm : on ne verra qu'une **tâche** (la résolution ne permet pas de savoir que c'est en forme de cercle et qu'il y'a un trou au milieu). On sait que la protéine est là mais on ne peut pas voir les sous-unités.

L'astuce c'est de mettre en place des techniques d'analyses où chaque molécule de fluorescence va **clignoter**. Les fluorochromes sont choisis de telle façon qu'il n'y aura qu'un nombre limité de fluorochromes qui va s'illuminer à la fois.



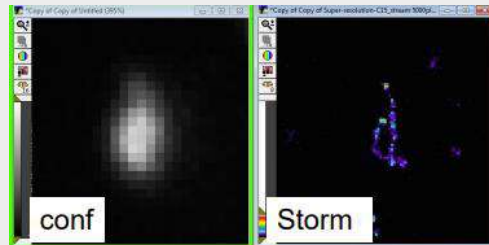
A chaque clignotement le microscope va prendre une image. Ainsi, des milliers d'images vont être prises pour le même objet et puisque les fluorochromes ne s'allument pas tous en même temps on n'aura pas l'aspect de tâche qu'on avait au départ.

On va ainsi pouvoir reconstituer l'image avec une meilleure résolution qu'en microscopie optique standard. On va arriver à une résolution de l'ordre de **10-15 nm**.

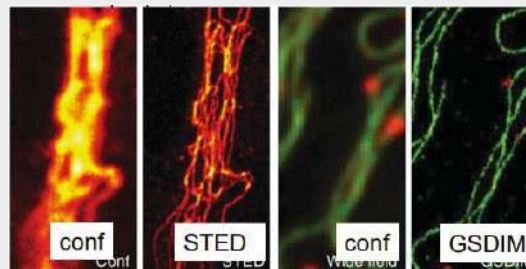
On appelle ce type de microscopie la **microscopie à super-résolution**. Différentes techniques existent (PALM, STORM, STED...) mais on ne les abordera pas.

Voici quelques exemples où l'on voit la différence entre la microscopie optique standard et celle à super résolution :

-On observe l'extrémité des chromosomes qui se terminent en boucles d'ADN. En MO standard on ne voit qu'une « tâche ». En MO à super résolution on peut suivre toute la boucle d'ADN.

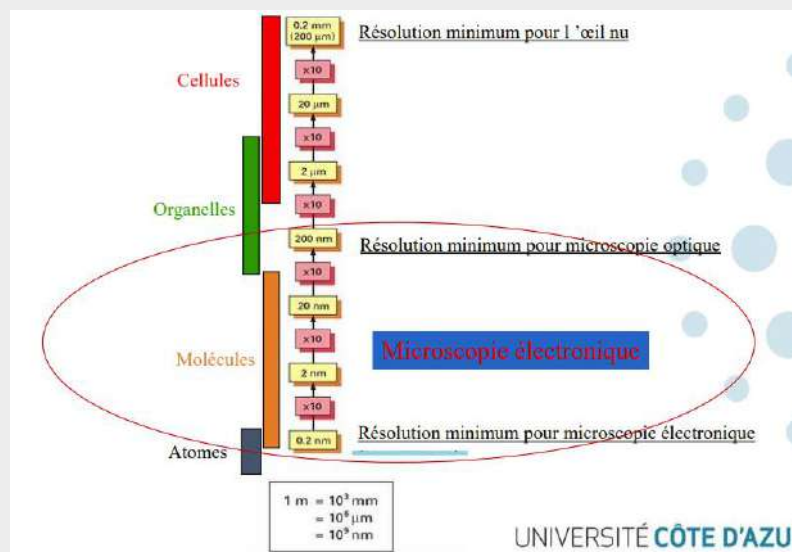


-Cette fois on observe des fibres de microtubules (à droite) et des images de vimentine (à gauche) dans des cellules humaines. Encore une fois on voit que la super résolution permet de gagner énormément pour vraiment comprendre l'architecture de ces réseaux et leur fonction.



1. Microscopie électronique

Cette technique de microscopie est différente, on descend donc dans la limite de résolution au niveau **moléculaire**. A noter que les cellules observées ne peuvent pas être vivantes.

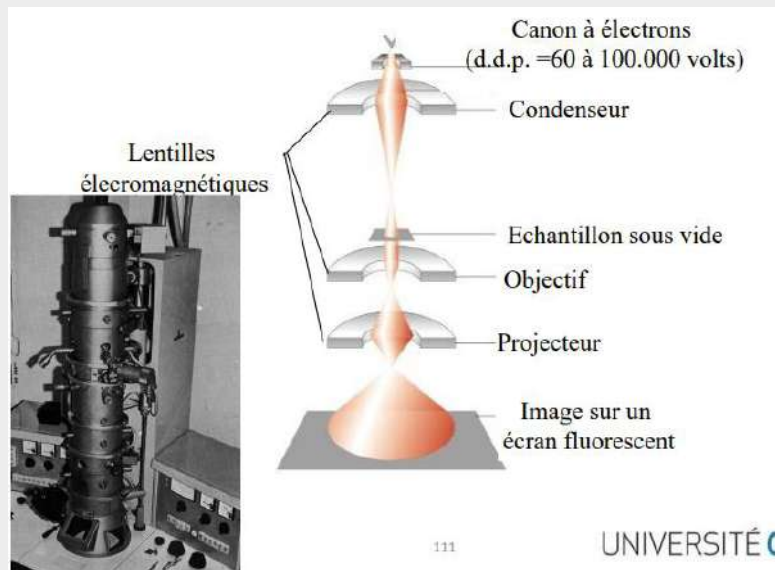


Le principe est assez simple : on remplace les photons de la microscopie optique par des **électrons**. C'est cela qui augmente la résolution. Il existe différents types de microscopie électronique (ME) : soit par transmission (MET), soit à balayage (MEB).

A noter, les structures visibles en ME en biologie cellulaire sont appelées les ultrastructures.

a) Microscopie électronique à transmission MET

Comme son nom l'indique, un faisceau d'électrons traverse la préparation traitée aux sels de métaux lourds, des structures de contraste. 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.

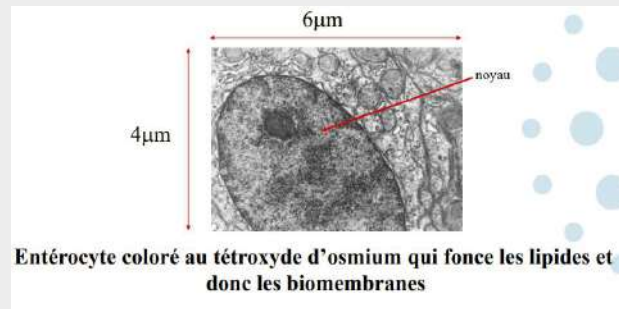


Différentes techniques sont possibles :

- Coupe ultrafine (moins de $0,1 \mu\text{m}$ 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

C'est un énorme microscope qui n'a rien à voir avec le microscope à fluorescence. L'échantillon est **mis sous vide** la plupart du temps (*ce serait dommage que les électrons interagissent avec les atomes de l'air*), avec un système optique qui va servir à focaliser et à détecter ces électrons produits par un canon à électrons, canon qui va avoir un certain potentiel plus ou moins énergétique. Le faisceau d'électrons est condensé sur l'échantillon et l'image est ensuite recueillie.

Méthodes d'études de la cellule 2



Voici une coupe assez standard de cellule en MET. Plus c'est foncé, plus c'est dense aux électrons. On observe donc dans le noyau le nucléole (*) plus foncé. Dans le cytoplasme, on observe le réticulum, des mitochondries... On observe très bien tout ce qui est membranes.

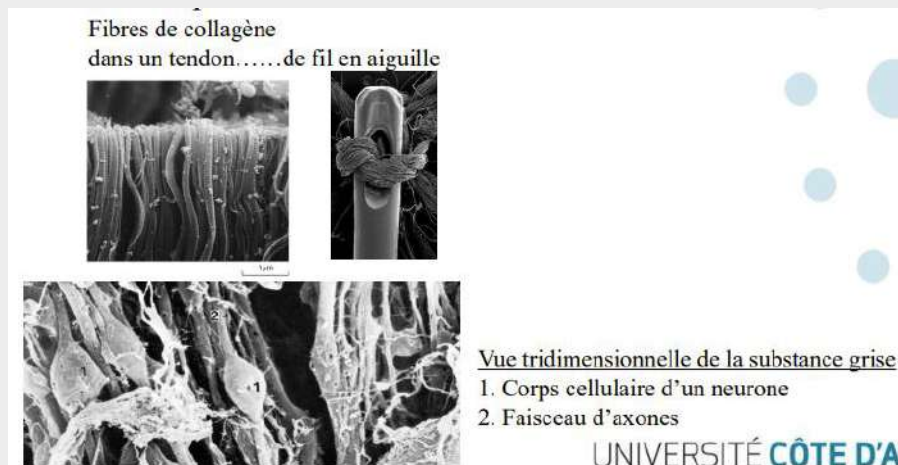
b) Microscopie électronique à balayage MEB

Comme son nom l'indique, l'objet est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètre pas mais qui **excite** sa surface et émet des **électrons secondaires** recueillis et analysés par un détecteur.

Cette technique permet de visualiser la **surface** des cellules et des tissus. L'échantillon est fixé et recouvert de métaux lourds et le faisceau d'électrons y est réfléchi. La résolution est plus faible (*donc la limite de résolution est plus grande*) que la MET de l'ordre de **10 nm**.

La limite de résolution du MET est de 0,1 nm

Ici on a des fibres de collagènes, un fil passant dans une aiguille et de la substance grise.



On peut donc véritablement étudier l'**ultrastructure** d'un tissu grâce à cette méthode.

Méthodes d'études de la cellule 2

Dédi à kamsou, cette coéquipière de SV fabuleusement incroyable qui a embellit ma P1 (c'est elle qu'a écrit ça)



Dédi au plus mignon chat de Nice Seth



Dédi à la biocell