

PARTIE 1 : Introduction à la BioCell'

I. À savoir :

La cellule représente l'unité structurale et fonctionnelle de tous les êtres vivants.

- **10¹⁴ cellules** dans l'organisme
- **10¹⁵ bactéries** (non pathogènes)

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

1. Procaryotes / Eucaryotes

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

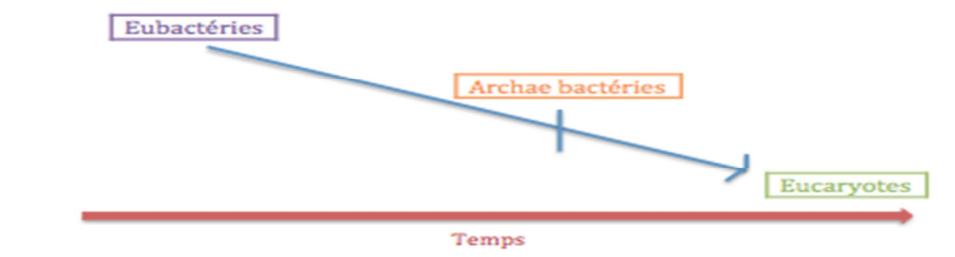
Procaryotes (pro=avant)	Eucaryotes (eu = propre) (Mnémo : Oeuf = noyau)
PAS DE NOYAU → Traduction co-transcriptionnelle	Présence d'un noyau → Traduction post-transcriptionnelle (L'ARNm est synthétisées dans le noyau, traduit en protéine dans le cytosol par les ribosomes).
PAS D'ORGANITES	Présence d'organites. 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 (<i>qui est un organite (selon Gilson) car il possède une double membrane</i>).	Mitochondries, peroxyosomes.

Système Endomembranaire	Il correspond à un ensemble de cavités , limitées par une membrane qui vont communiquer entre elles et avec la membrane plasmique. Cette communication se faisant de manière transitoire et utilisant des petites vésicules/canalicules membranaires.
RE : Réticulum Endoplasmique	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... Il n'y en a qu'un seul par cellule.
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 (ADN mitochondrial).
Peroxyosome	Ils sont chargés de la détoxification de la cellule
Cytosquelette (pas un organite)	L'ensemble est organisé par 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.



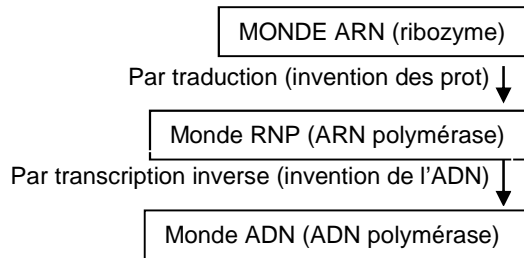
On parle de 3 grands groupes de cellules : les eu-bactéries, les archaebactéries et les eucaryotes, ayant tous un ancêtre commun hypothétique appelé LUCA (Last Universal Common Ancestor).

L'archae

- Elle est **extrêmophile** (conditions extrêmes)
- Elle est utilisée en **recherche médicale** (génétique).
- Elle est procaryote mais se **rapproche plus de la cellule eucaryote**

4. Les hypothèses sur l'origine des cellules

- **Théorie de l'endosymbionte** : la cellule eucaryote serait apparue par l'**endocytose** de la **bactérie** par l'**archae**, (La bactérie serait à l'origine des mitochondries).
- **Théorie du monde à l'ARN** :

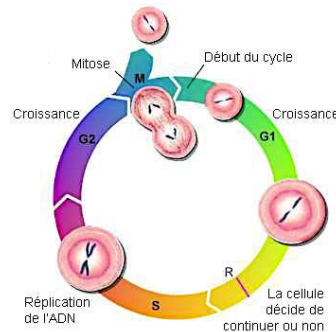


Au départ, au hasard, on a de l'**ARN** et donc des ribozymes (enzymes formées d'ARN). Par **traduction**, on invente les **protéines** et on arrive au **monde RNP**. Enfin l'apparition de la **transcriptase reverse** (la même que dans les virus) permet d'aller d'ARN à l'ADN pour arriver au **Monde ADN**.

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 **cytocynèse (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.

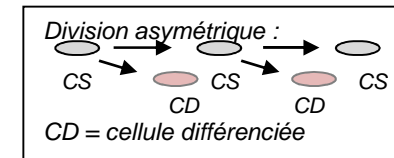
III. Notions d'homéostasie et de cellule souche

1. L'homéostasie

C'est un **équilibre** qui permet de maintenir constant le nombre de cellules de l'organisme. Ainsi, une rupture de l'homéostasie peut être due à **2 phénomènes** : soit **une augmentation de la capacité de division des cellules (cancers ...)**, soit **une diminution des processus d'apoptose, de sénescence, et de différenciation ...**

2. Définition d'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)



3. Les cellules souches embryonnaires (CSE) :

Les **cellules souches embryonnaires (CSE)** sont les cellules **pluripotentes** du stade blastocyste. Elles ont une phase **G1** courte.

Avantages	Inconvénients
- 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 (cellules souches pluripotentes induites)**, 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 problème éthique**.
→ **L'utilisation de CSE et IPS en thérapeutique permet de ne pas avoir de rejets.**

PARTIE 2 : LA MICROSCOPIE

On distingue la microscopie optique de la microscopie électronique.

→ La **microscopie optique** a une résolution maximale de **200 nm** (0,2µm) elle est donc adaptée à l'observation des **cellules**.

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

-- La microscopie optique ou photonique --

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

I. La microscopie en contraste de phase

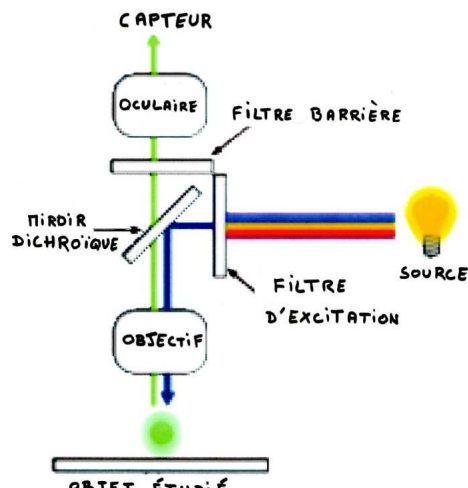
La microscopie en **contraste de phase**, permet de visualiser les cellules en augmentant le déphasage entre la lumière incidente et la lumière émise, on utilise les fonctions de réfraction de la cellule. (Cf schéma fait en cours)

- × **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).

II. La fluorescence

Fluorescence : 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**.



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** longueurs 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 ne va 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.**

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**
 - **Chromophore** = triade d'acides aminés
 - **UNIVERSELLE** : elle garde ses propriétés de fluorescence dans **toutes les cellules où elle est incorporée**.
 - Elle est excitée par le **BLEU** et émet dans le **VERT**. On peut changer les acides aminés du **chromophore** et créer des fluorochromes artificiels et permettre une gamme d'émission et d'absorption dans tout le spectre.

- **Rhodamine** : 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

Comment introduire la GFP dans nos cellules ?

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** qui va « percer » la membrane d'une multitude de petits trous qui vont permettre de laisser entrer le fluorochrome. Les trous 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.

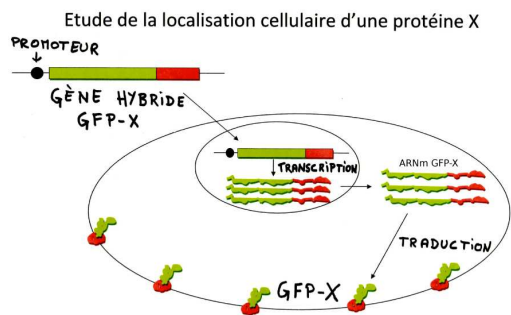
c. La vectorisation par vésicules

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 de ces trois techniques**, c'est qu'on introduit des nouvelles molécules dans la cellule, et on ne saura pas si le **comportement** de la cellule n'est pas **biaisé** 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 moléculaire

- 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**.

Transgénèse :

But : On veut **suivre le déplacement** des protéines au sein de la cellule.

Méthode : On **couple** la protéine d'intérêt **avec la GFP** pour qu'elle soit visible.

Conclusion : Le résultat est soumis à des réserves. On ne peut **pas être certain** qu'il s'agit du **fonctionnement normal** de la protéine que l'on observe car on voit notre **protéine d'intérêt MODIFIÉE**.

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).

Procédé :

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

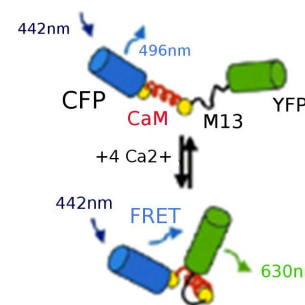
- Cette lumière d'émission va **exciter un deuxième fluorochrome** qui lui-même va émettre une radiation d'énergie inférieure.

On a eu un **transfert d'énergie non radiatif** (entre les 2 fluorochromes, la lumière émise par le premier est tout de suite absorbée par le second, on ne peut pas

l'observer). Ce transfert est possible à 2 conditions :

→ La **distance entre les deux fluorochromes NE DOIT PAS ÊTRE SUPÉRIEURE À 10 nm**.

→ Les spectres 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).

Par exemple on peut avoir la GFP qui va absorber le **Bleu**, émettre du **vert**, ce vert va exciter la rhodamine, qui va absorber dans le vert et réémettre 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 **FRET**, 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**. Plus il y a de calcium, plus la calmoduline change de conformation, plus le FRET a lieu, plus on observe les radiations à une longueur d'onde spécifique.

b. Le FRAP (Fluorescence Reappareance After Photobleaching)

Pour le FRAP et le FLIP on utilise le **photo-blanchiment** d'une cellule fluorescente grâce à un laser qui va irradier la cellule. Le fluorochrome est photo blanchi et perd sa fluorescence.

Attention, la perte de fluorescence des molécules est irréversible, cependant, la perte de fluorescence de la zone transitoirement irradiée ne 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**.

La réapparition de la fluorescence est due au déplacement des protéines sur la membrane.

Une application du FRAP est l'étude des protéines membranaires.

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 zone située à un autre endroit de la cellule. On va voir petit à petit **disparaître** la fluorescence. On étudie la **PERTE de la fluorescence**. Ici, on va pouvoir déterminer la **VITESSE** de déplacement des molécules fluorescentes.

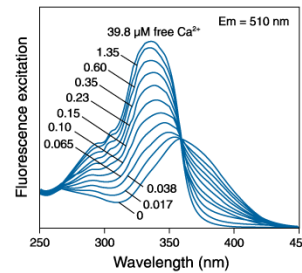
5. La fluorescence induite

Dans ce cas, le fluorochrome ne va devenir fluorescent **qu'une fois fixé sur la molécule étudiée**.

→ 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**. (Ne reconnaît que celles de l'ADN et pas de l'ARN).

→ On a aussi des **intercalants** entre la double hélice d'ADN : **l'iodure 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.



Visualisation de la quantité de calcium dans la cellule :

La molécule Fura-2 possède des propriétés fluorescentes en fonction de sa fixation au calcium.

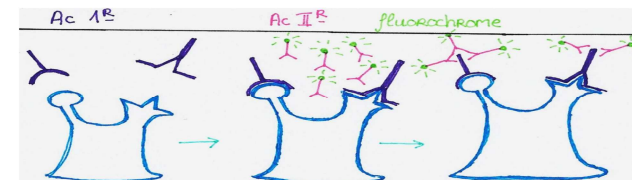
L'augmentation de l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration en calcium. Ainsi les endroits de la cellule riches en calcium seront d'avantage fluorescent (*Exemple : le RE*).

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 (\neq cellule du lapin).
- 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 fluorescente** et qui possède la séquence en nucléotide complémentaire du gène que l'on cherche à localiser. La sonde va donc se **fixer à sa moitié complémentaire**. Ceci fonctionne aussi avec l'ARN (sans dénaturation car l'ARN n'a qu'un seul brin). **On utilise le brin anti-sens de l'ARN**.

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 par un fluorochrome**.

8. La microscopie confocale (en 3D)

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 sur une zone précise. Cela permet d'observer des **échantillons épais**. **La résolution est de l'ordre du micron (μm)**.

9. La microscopie à super résolution ou microscopie nanométrique

On ne peut pas distinguer deux éléments à partir d'une certaine distance **à cause des propriétés de diffraction d'une onde**.

Avec la microscopie standard on visualise juste une « **crêpe** ». On a une superposition de spots flows (ronds verts). 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** → on observe finalement un « **donut** ».

