

BIOLOGIE CELLULAIRE

Tut'Rentrée 2015-2016

SOMMAIRE

I- Introduction

1. La cellule
2. Origine et évolution
3. Cellules souches

II- Méthodes d'étude de la cellule

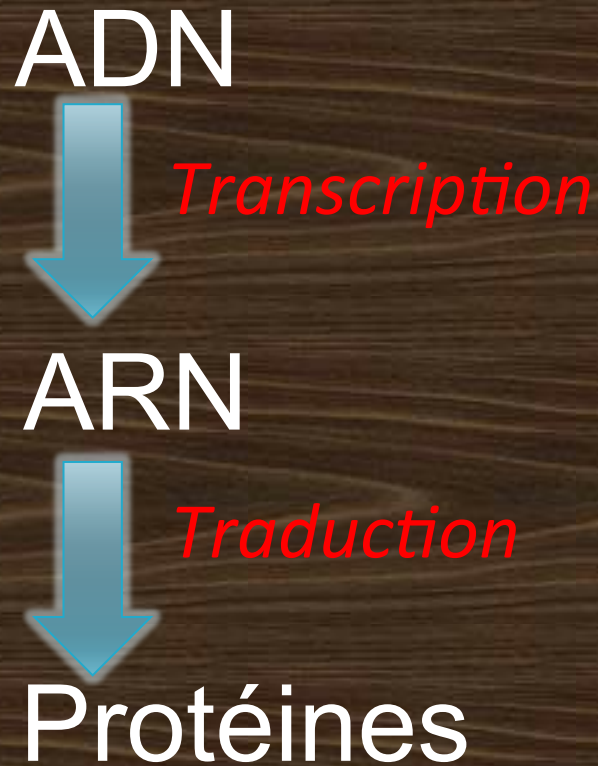
1. La Microscopie photonique
2. La Fluorescence
3. La Microscopie Electronique
4. La microscopie Atomique

INTRODUCTION

- Dans le corps humain: 10^{14} cellules + 10^{15} bactéries non pathologique
- Cellule = 70% eau + 30% macromolécules, ions et petites molécules

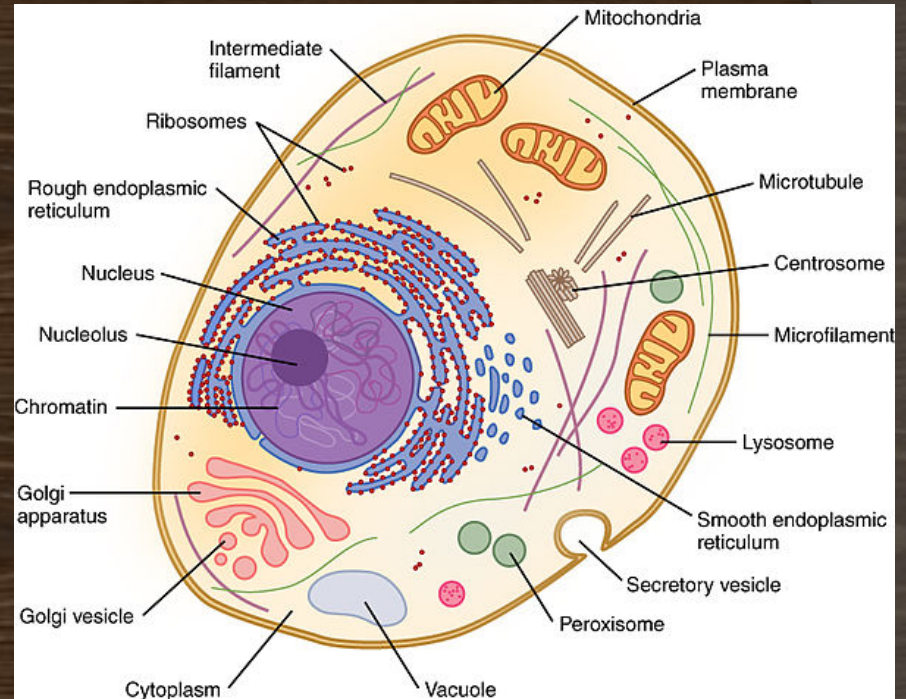
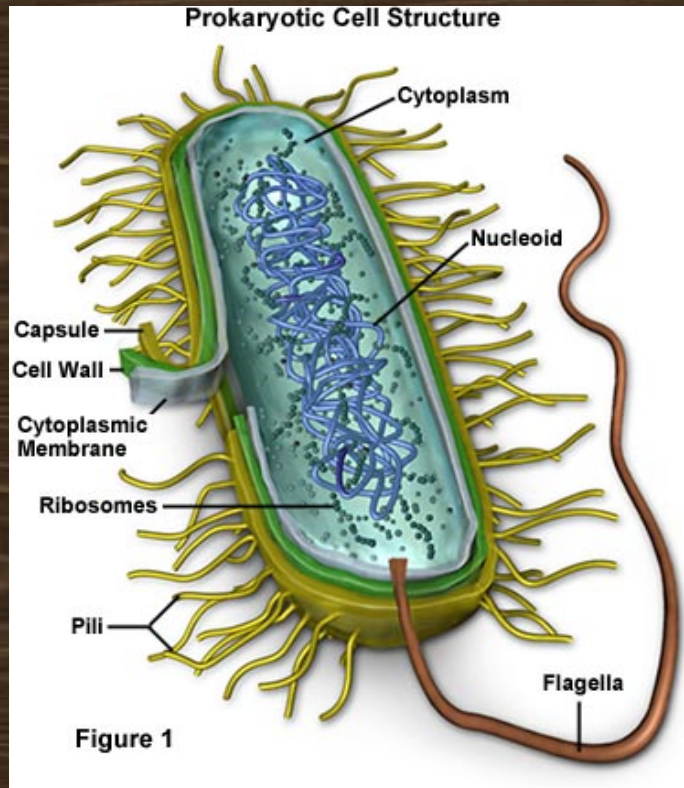
=> 3 Principes fondamentaux

Rappel:



LA CELLULE

Procaryote / Eucaryote



PROCARYOTE

Pas de Noyau ni d'organites

Traduction **co-transcriptionnelle**

Cellule de petite taille

EUCARYOTE

Présence d'un Noyau et d'organites

Traduction **post-transcriptionnelle**

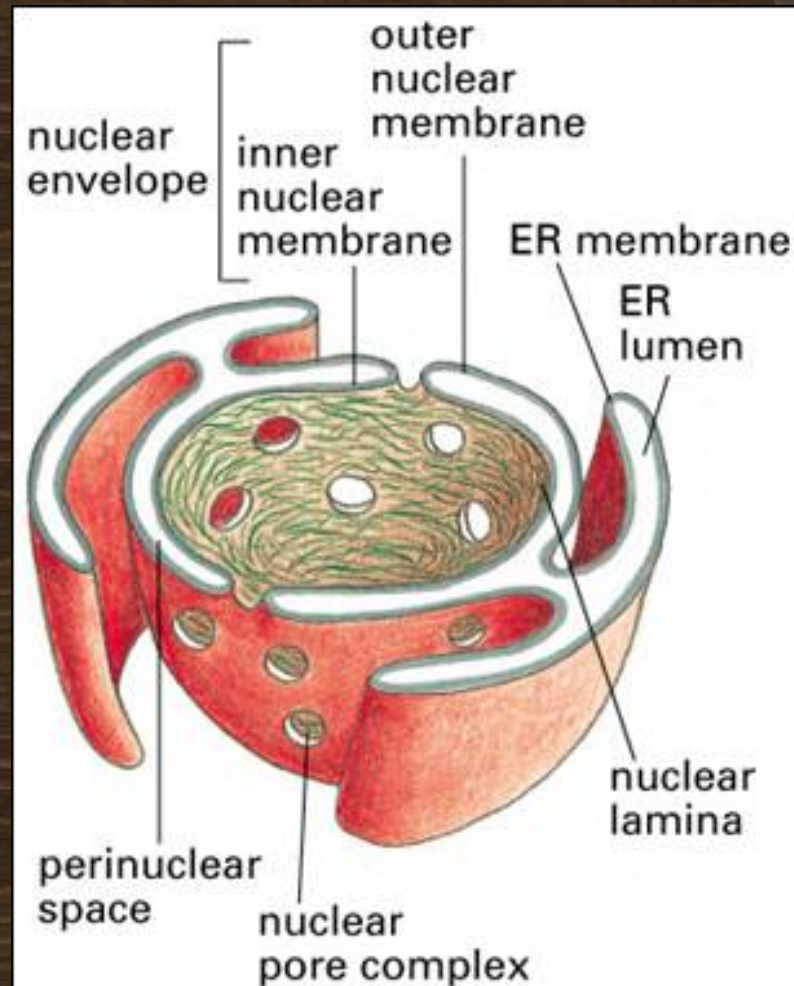
Cellule de grande taille

Système Endomembranaire

- Ensemble de cavités délimitées par des membranes
- Communication via des vésicules membranaires

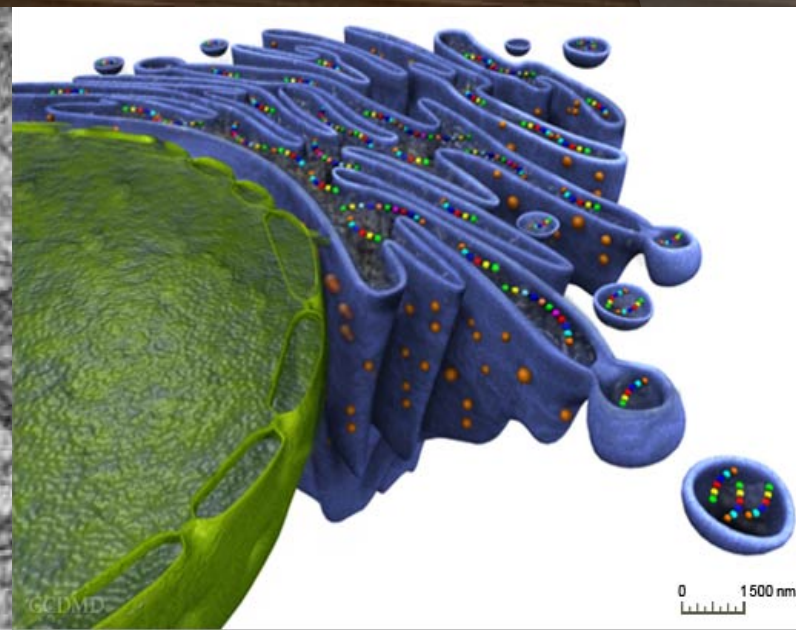
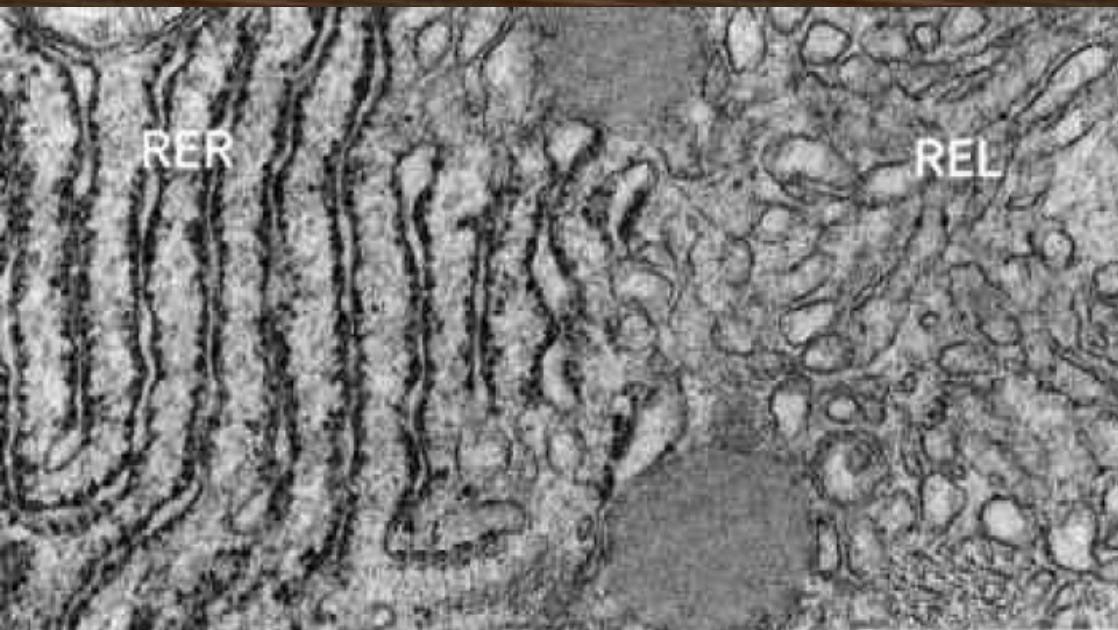
Système Endomembranaire

◎ Enveloppe Nucléaire



Système Endomembranaire

◎ Réticulum Endoplasmique

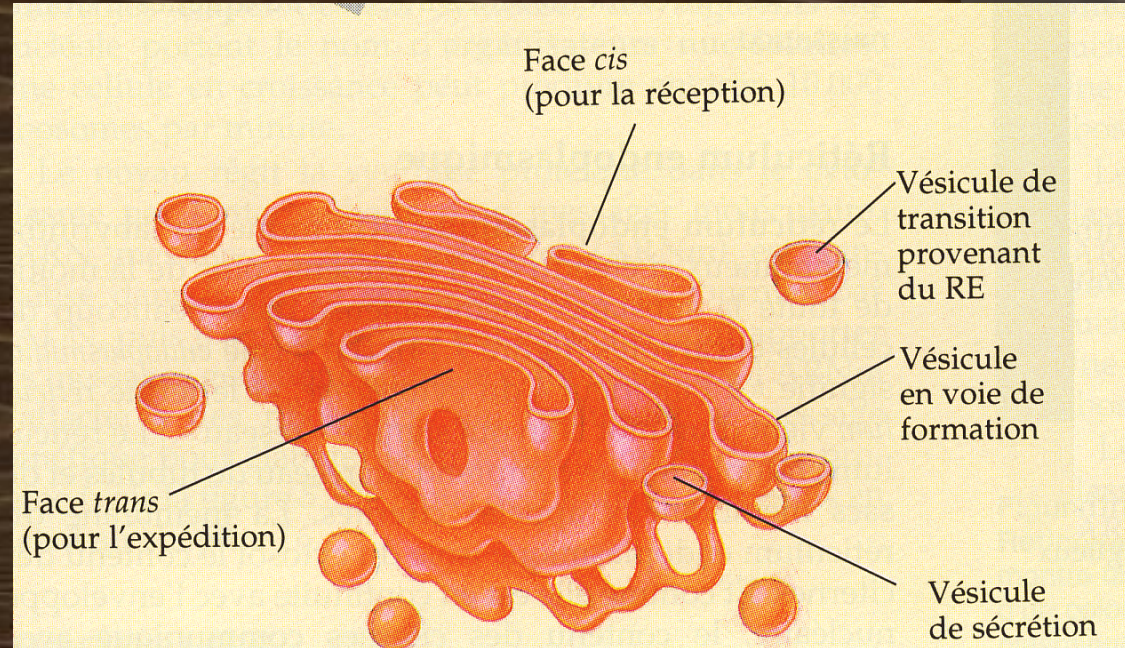


Système Endomembranaire

● Appareil de Golgi

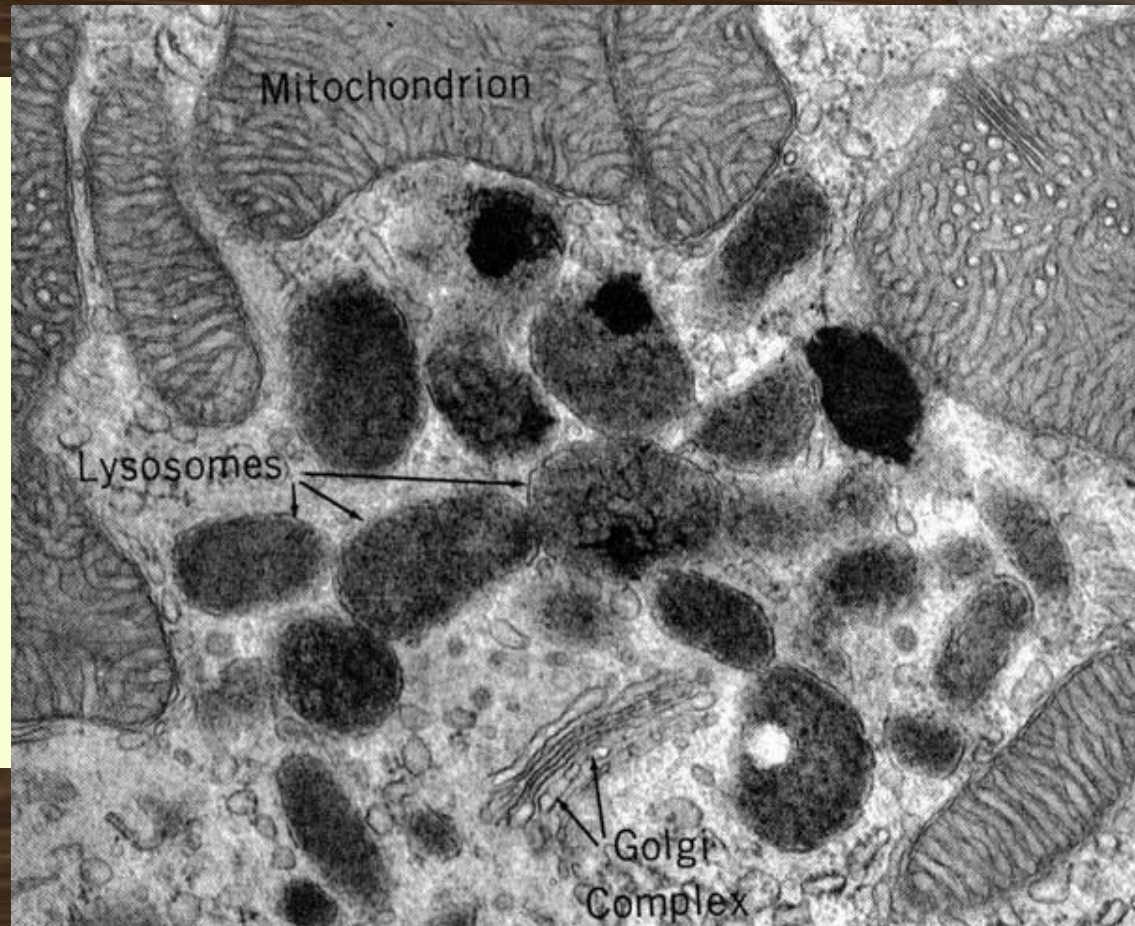
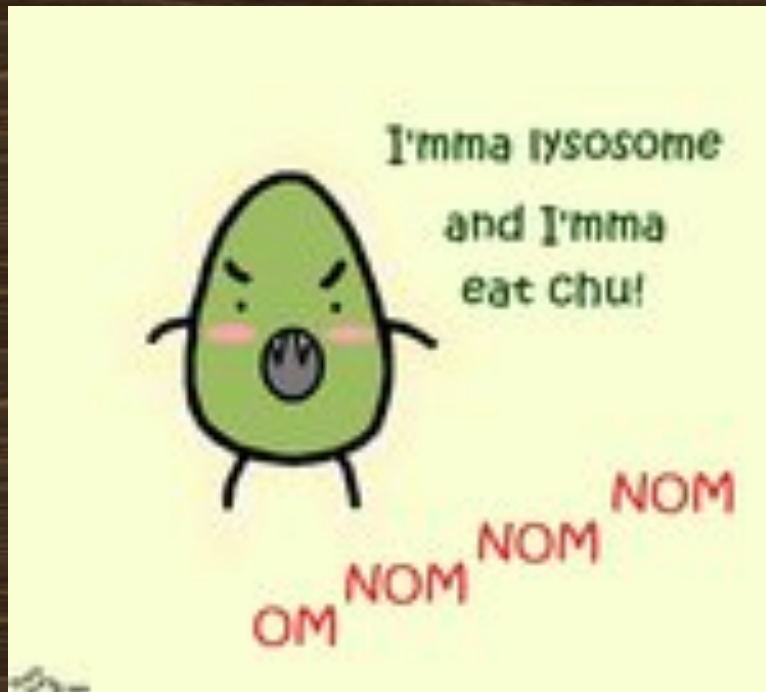


1 par cellules
Nombreux dictyosomes
Rôle majeur dans l'exocytose
Lien entre RE et membrane plasmique
Régule le transport vésiculaire
Rôle dans la maturation protéique



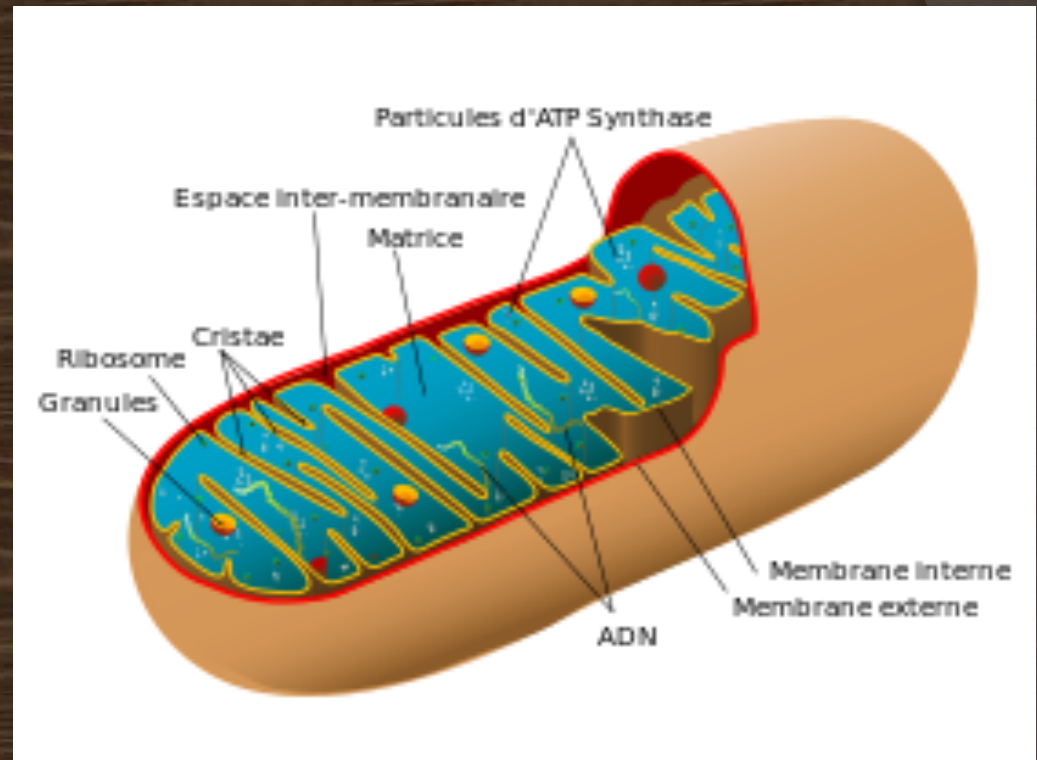
Système Endomembranaire

⦿ Lysosome



Organites isolés

● Mitochondrie



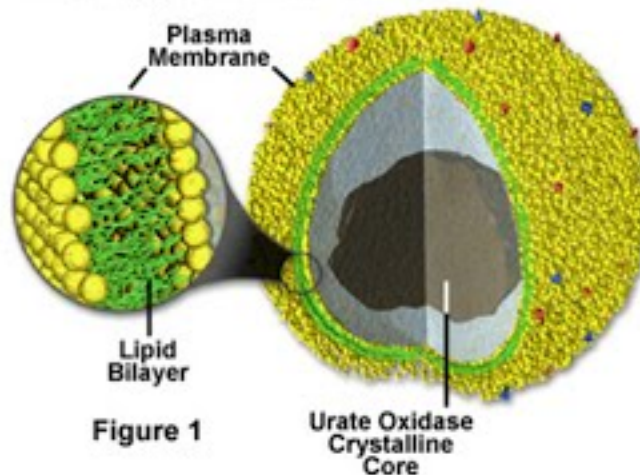
Source d'énergie principale de la cellule
Produit de l'ATP
Possède une partie de l'information génétique

Organites isolés

● Peroxysome

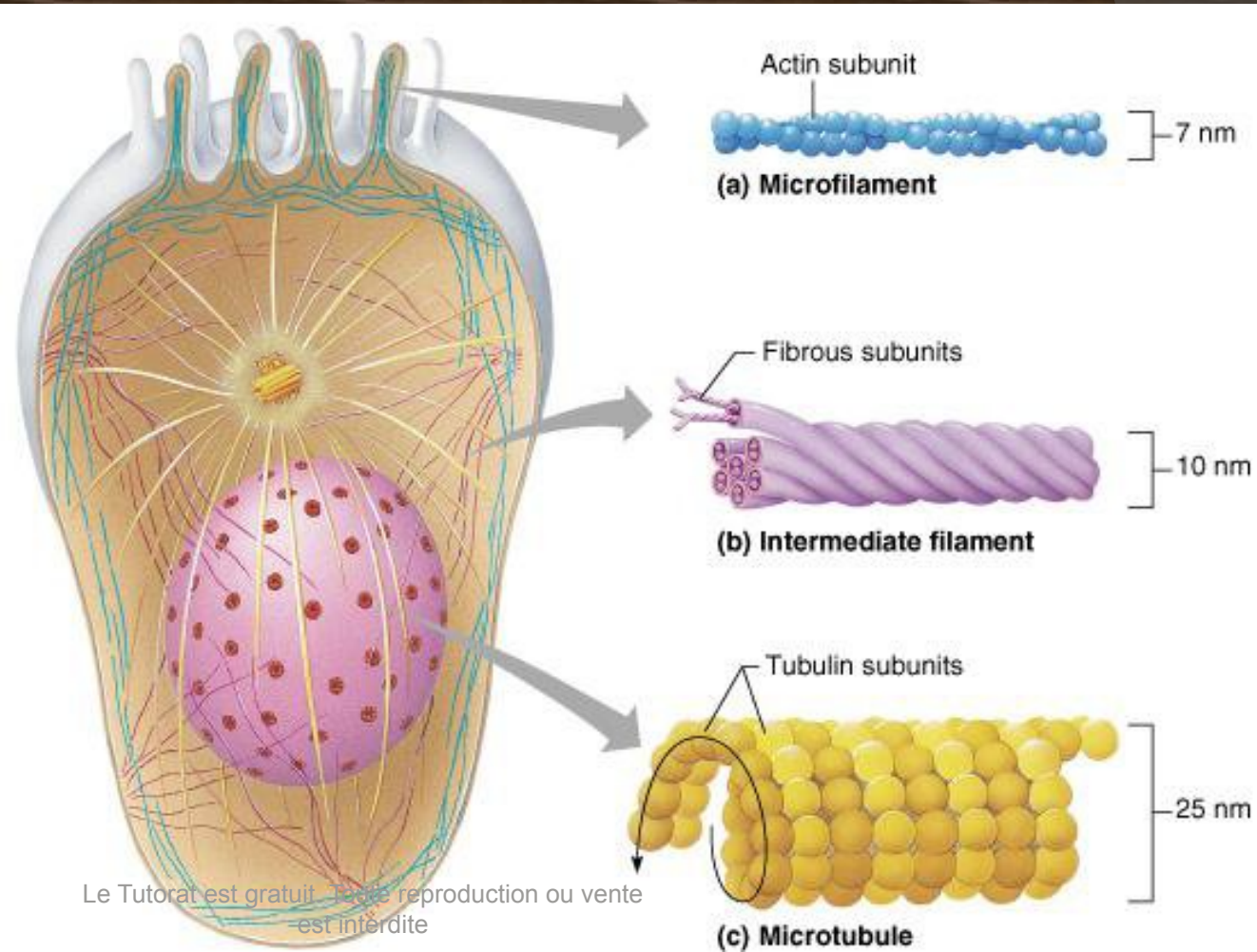
PEROXISOME

Anatomy of the Peroxisome



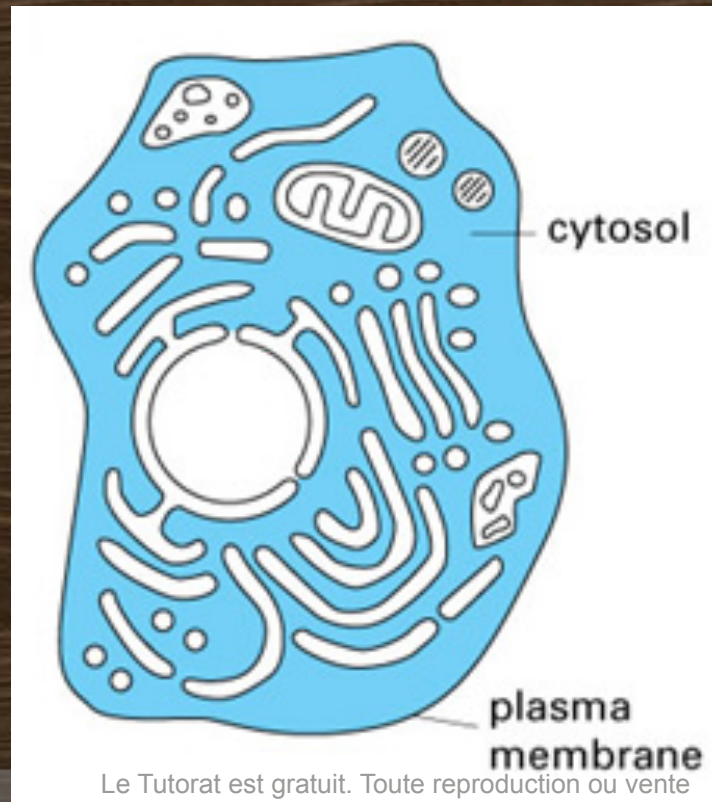
Organites isolés

● Cytosquelette



Cytosol

- Pas un organite
- Phase liquide où baigne les organites



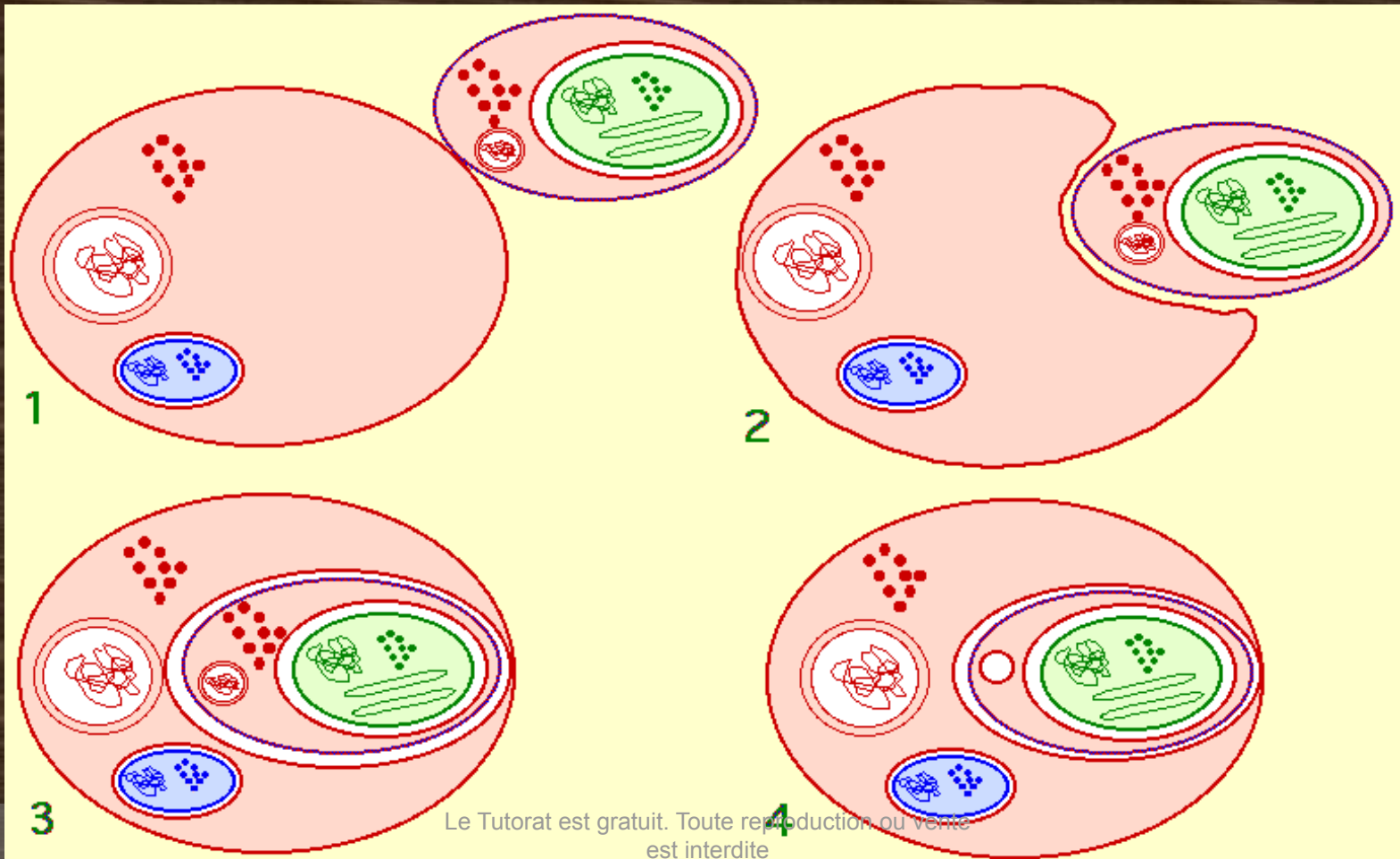
Origine et évolution

Evolution Cellulaire

- 3 groupes, 1 ancêtre commun = LUCA
- Eu-bactérie (=bactérie) (=procaryote)
- Archae-bactérie => Se rapproche des Eucaryotes
- Eucaryotes

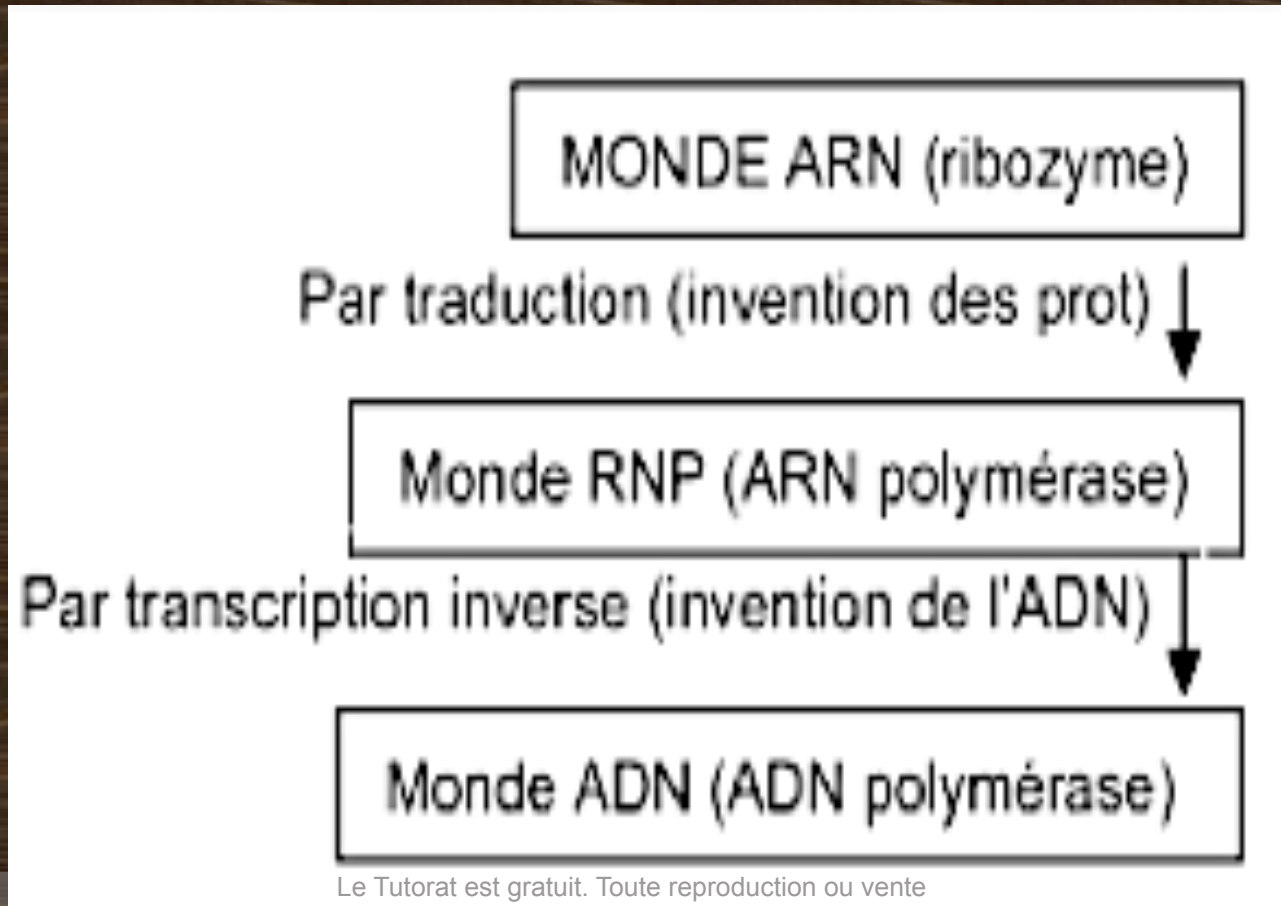
Origine des cellules

● Théorie de l'Endosymbionte



Origine des cellules

◎ Théorie du monde ARN



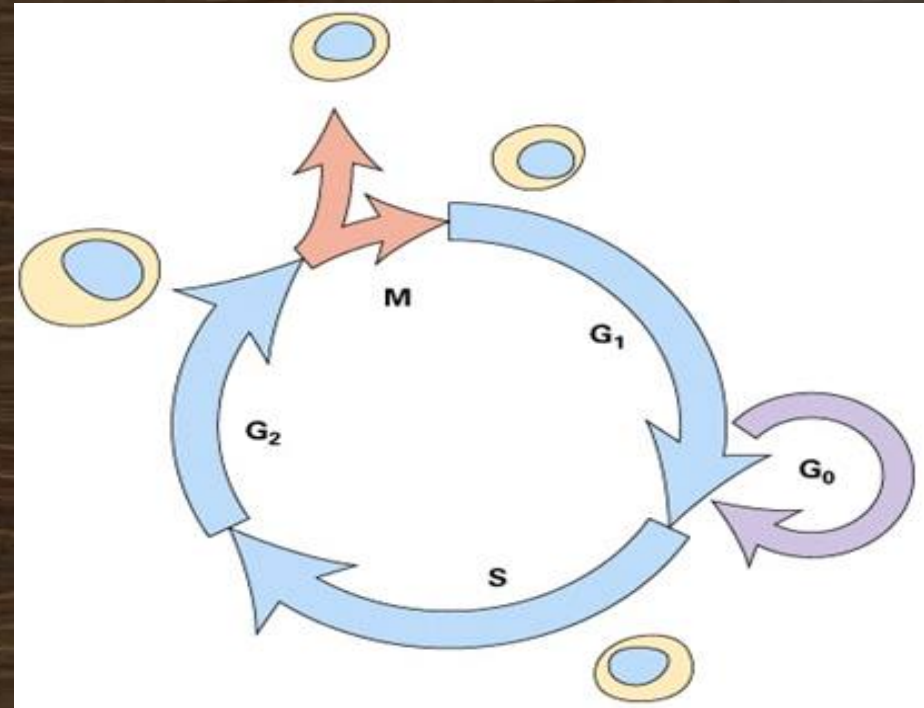
Multiplication cellulaire

⊙ **Interphase:**

- Phase G₁
- Phase S
- Phase G₂

⊙ **Mitose (phase M):**

- Caryocinèse
- Cytocinèse

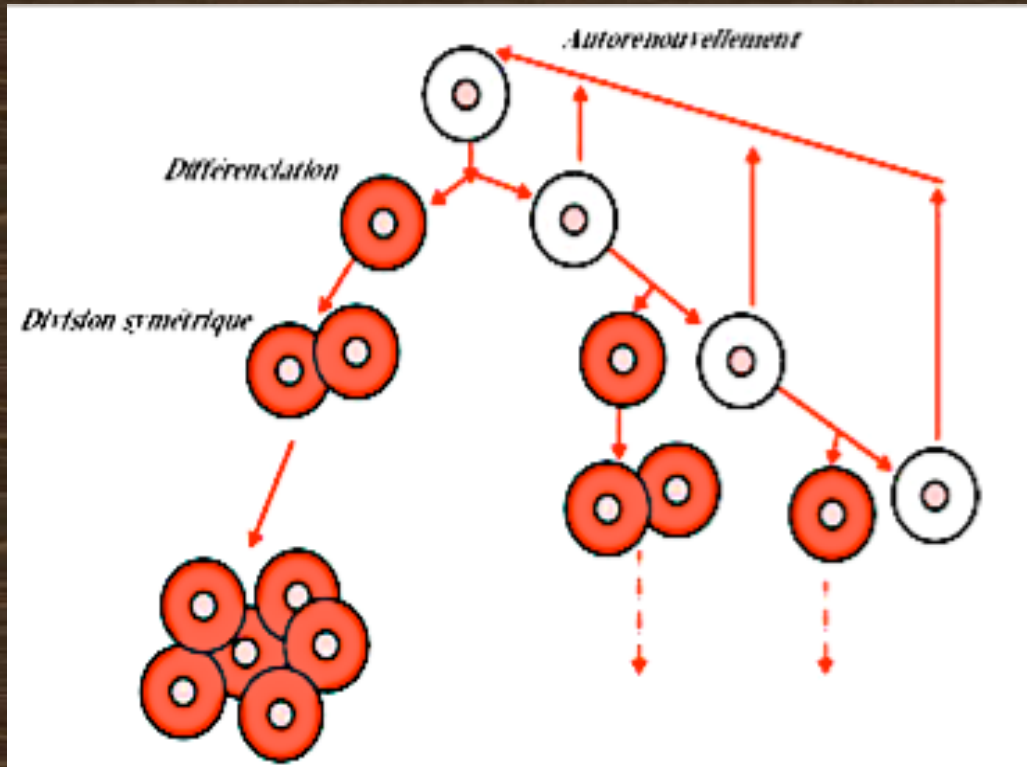


Multiplication cellulaire

- Arrivé en G0 plusieurs possibilités
- Entrée en phase S
- Quiescence
- Sénescence
- Différenciation
- Mort (Apoptose + Nécrose)

Cellules souches

Cellules souches



- Non différencié
- Division asymétrique
- Auto-renouvellement
- Différenciation à la demande

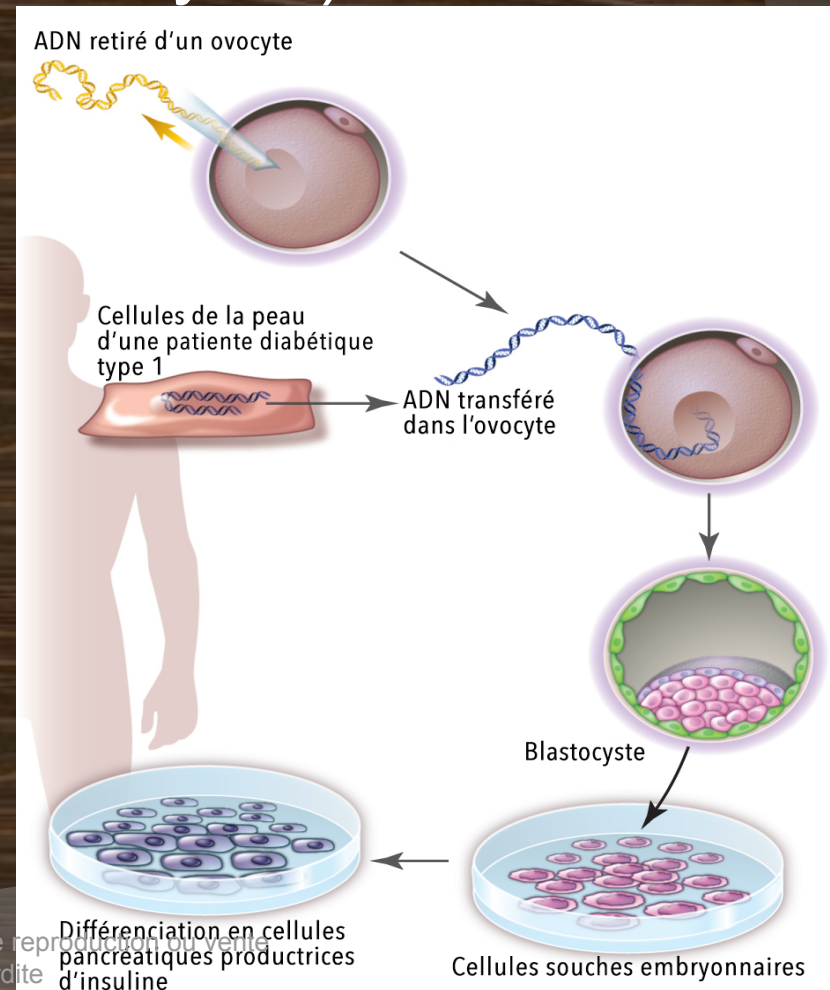
Cellules souches

⦿ 4 catégories:

- Totipotente
- Pluripotente
- Multipotente
- Unipotente

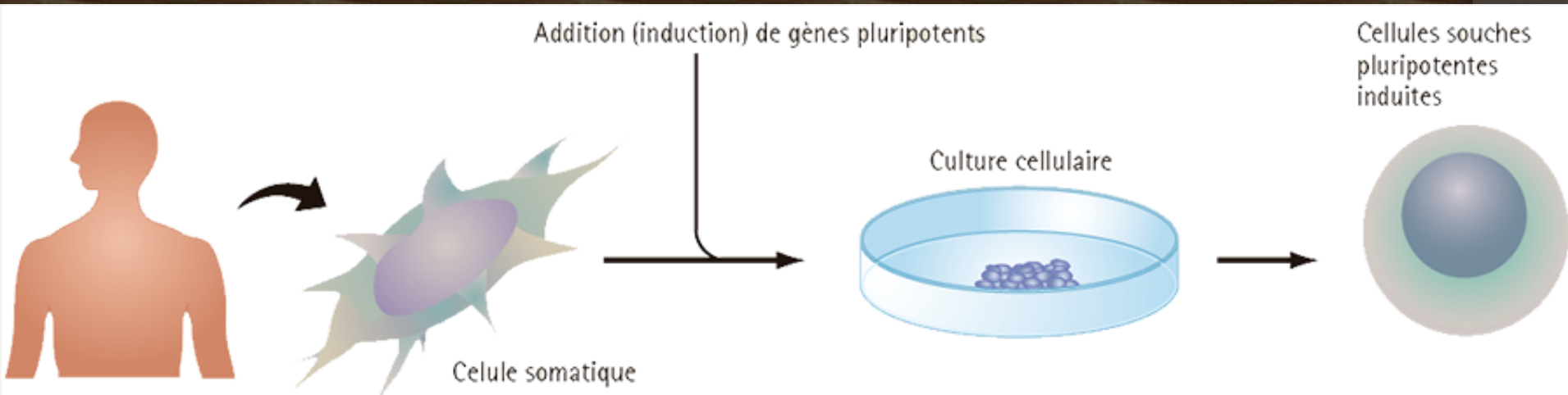
Cellules souches embryonnaires

- Pluripotente (stade Blastocyste)
- Pas de rejet
- Problème éthique
- Problème de tumeur



Cellules souches pluripotentes induites

- Pr Yamanaka
- Cocktail magique
- Aucun problème éthique
- En cours de développement





Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente
est interdite

QCM 1

A propos des cellules

- A) Dans le corps humain on peut retrouver 10 fois plus de bactéries pathologiques que de cellules
- B) La levure (être unicellulaire procaryote) ne possède pas de noyau, ni d'organites
- C) Afin de produire des protéines, les cellules traduisent l'ARNm en protéines
- D) La cellule est l'unité structurelle et fonctionnelle du vivant
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 1

A propos des cellules

- A) Faux : Il y a 10 fois plus de bactéries non pathologiques que de cellules
- B) Faux : La levure est un être unicellulaire eucaryote
- C) Afin de produire des protéines, les cellules traduisent l'ARNm en protéines
- D) La cellule est l'unité structurelle et fonctionnelle du vivant
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 2

A propos du système endomembranaire

- A) Le réticulum endoplasmique granuleux (REG) permet la synthèse de protéines et de lipides
- B) Dans une cellule, les nombreux appareils de Golgi ont un rôle majeur dans l'exocytose
- C) Les différents éléments du système endomembranaire sont connectés via un système de vésicules
- D) La mitochondrie sert à produire de l'ATP
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 2

A propos du système endomembranaire

- A) Le REG ne sert qu'à la synthèse de protéines, le REL permet la synthèse de lipides
- B) Il n'y a qu'un seul et unique appareil de Golgi par cellule mais de nombreux dictyosomes
- C) Les différents éléments du système endomembranaire sont connectés via un système de vésicules
- D) La mitochondrie ne fait pas partie du système endomembranaire
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

La Microscopie

METHODES D'ETUDES DE LA CELLULE

MICROSCOPIE OPTIQUE	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
<ul style="list-style-type: none">- Résolution: entre 0,2mm-200 nm- Cellules vivantes- Adaptée à l'observation des <u>cellules</u>	<ul style="list-style-type: none">- Résolution: entre 200nm-0,2nm- Cellules mortes- Adaptée à l'observation des <u>molécules</u>

Microscopie optique

Microscopie Optique (= photonique)

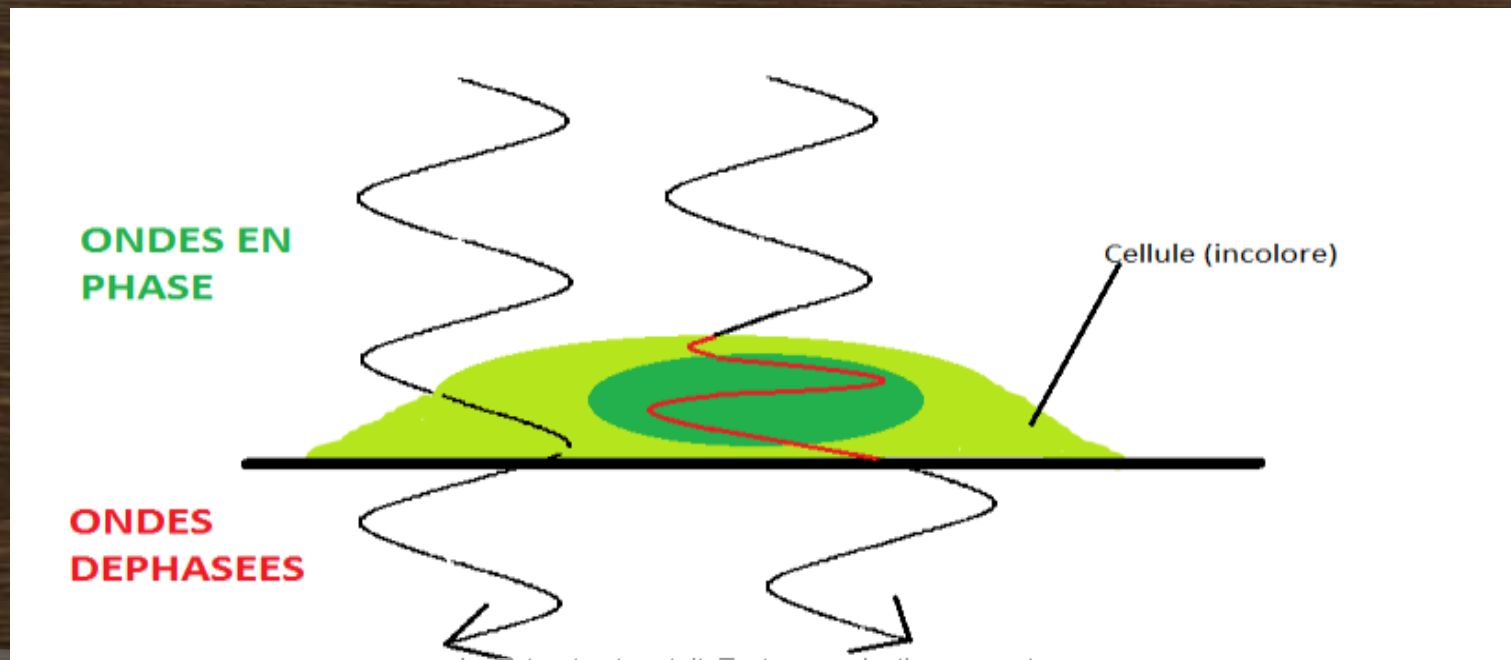
- Microscopie optique conventionnelle
- Microscopie à contraste de phase
- Microscopie à fluorescence
- Microscopie confocale
- Microscopie à super résolution

Microscopie optique conventionnelle

- Observation en lumière directe
- Observation de tissus fixés, rigidifiés, coupés et colorés => Mort de la cellule

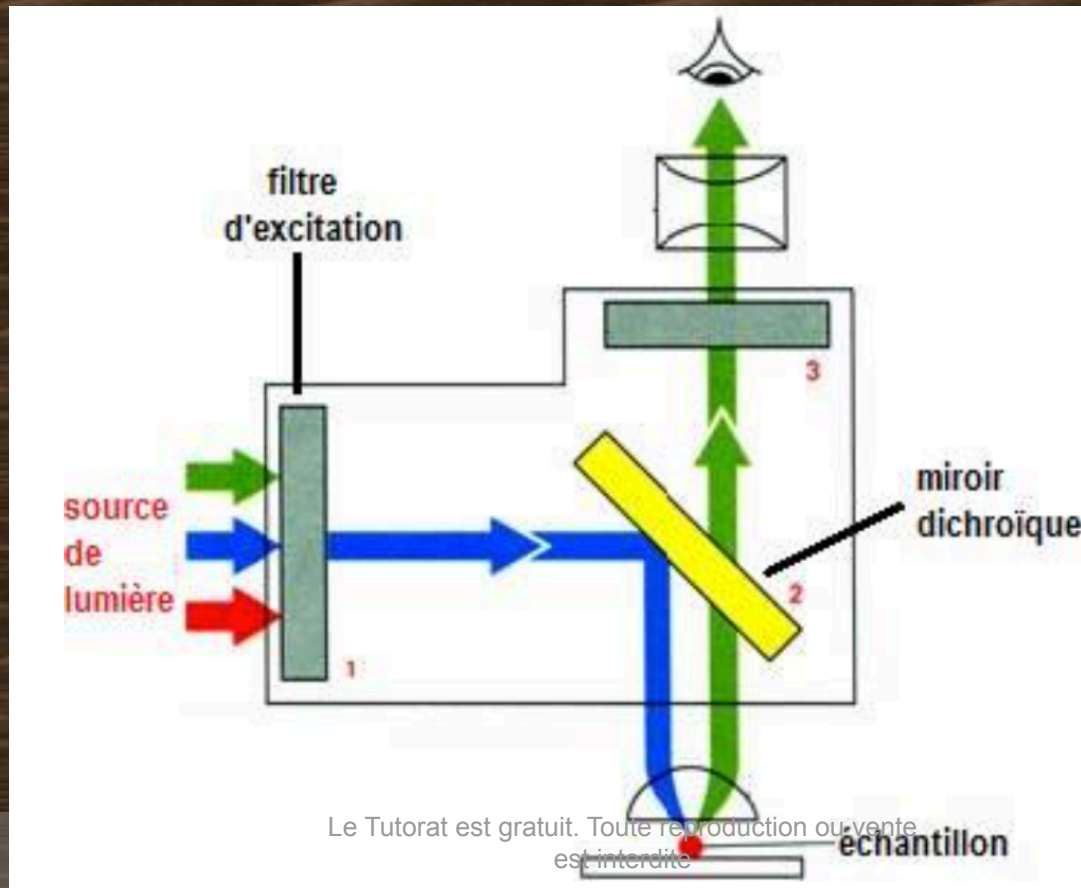
Microscopie à contraste de phase

- Etudie cellules vivantes
 - Amplification du déphasage
- => Microscopie time-lapse

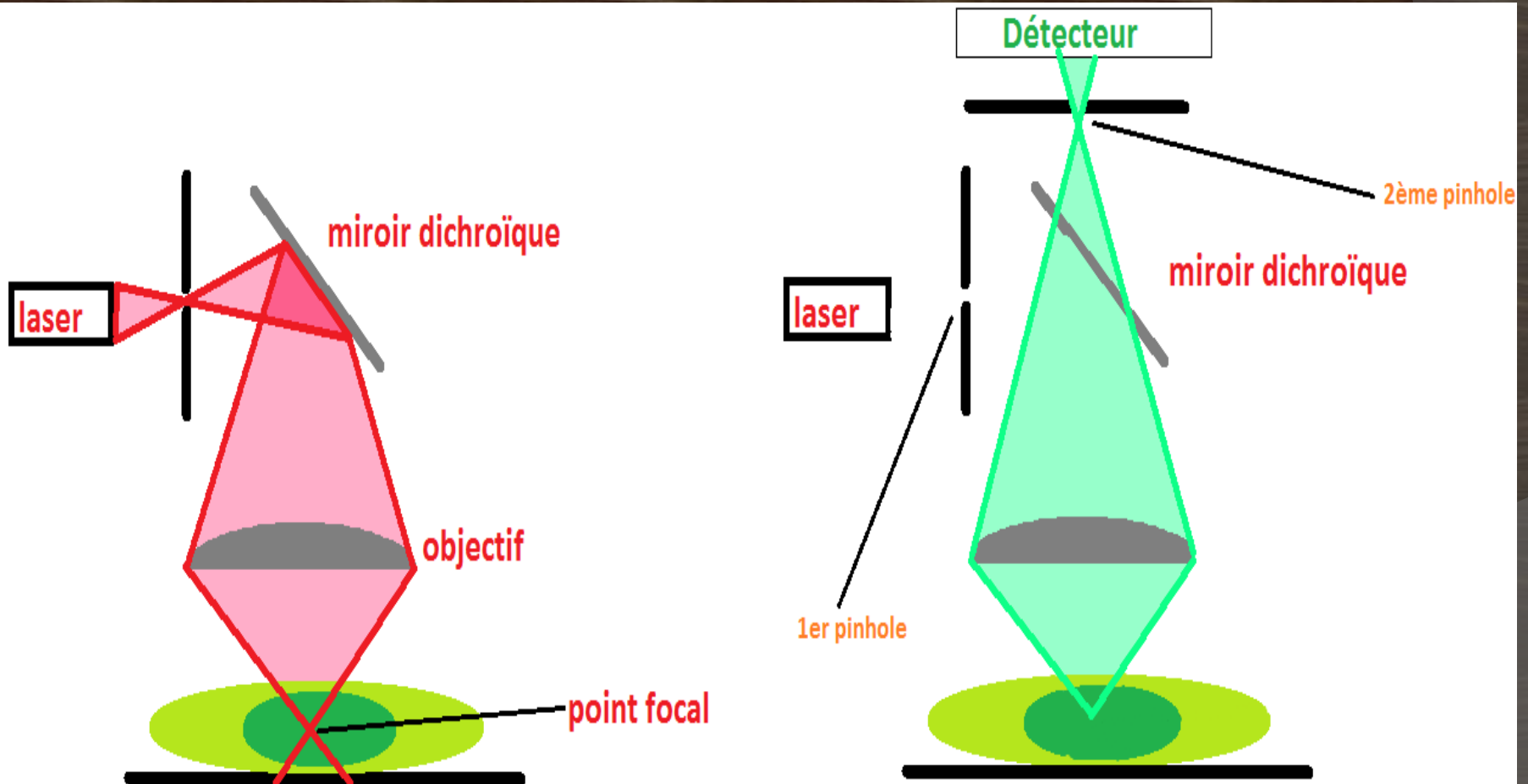


Microscopie à Fluorescence

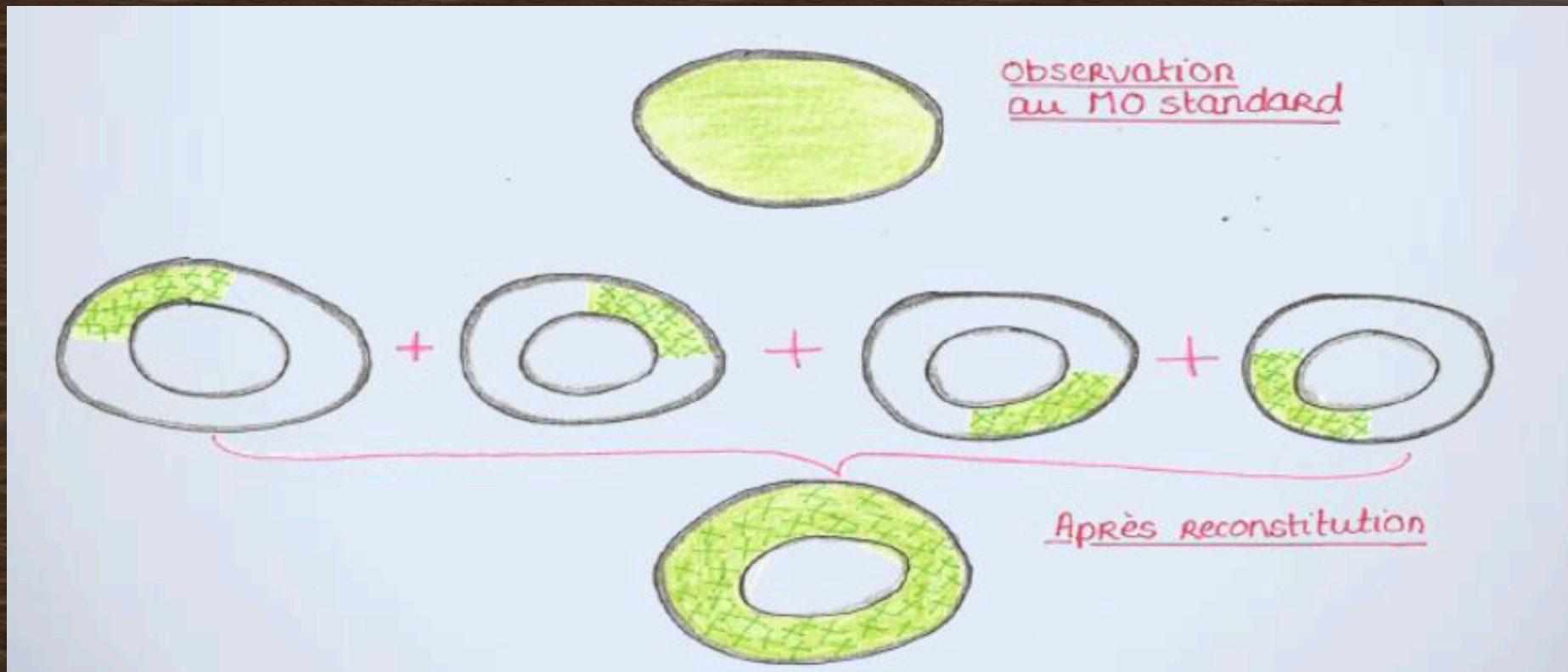
- Observation indirecte par émission de photons en greffant des fluorochromes



Microscopie confocale



Microscopie à super résolution



Fluorescence

LA FLUORESCENCE

- ⦿ Permet la visualisation indirecte de molécules en MO
- ⦿ Molécule fluorescente = fluorochromes
- ⦿ $E = h.c / \lambda$

Fluorochromes

GFP

- ⦿ Naturellement fluorescente = propriété intrinsèque
- ⦿ Fluorophore de 3 AA
- ⦿ Absorbe dans le BLEU émet dans le VERT



Fluorochromes

Rhodamine

- ⦿ Absorbe dans le VERT émet dans le ROUGE

Fluorescéine

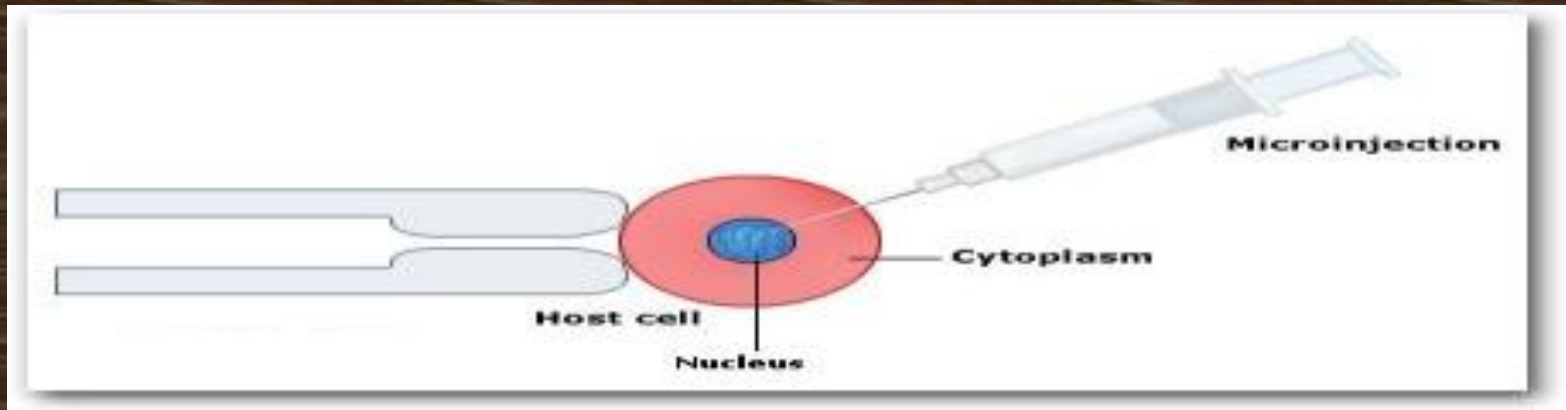
- ⦿ Absorbe dans le BLEU émet dans le VERT

Introduire un fluorochrome

Plusieurs méthodes:

- ⦿ Micro-injection
- ⦿ Electroporation
- ⦿ Vectorisation par vésicule
- ⦿ Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

Micro-injection



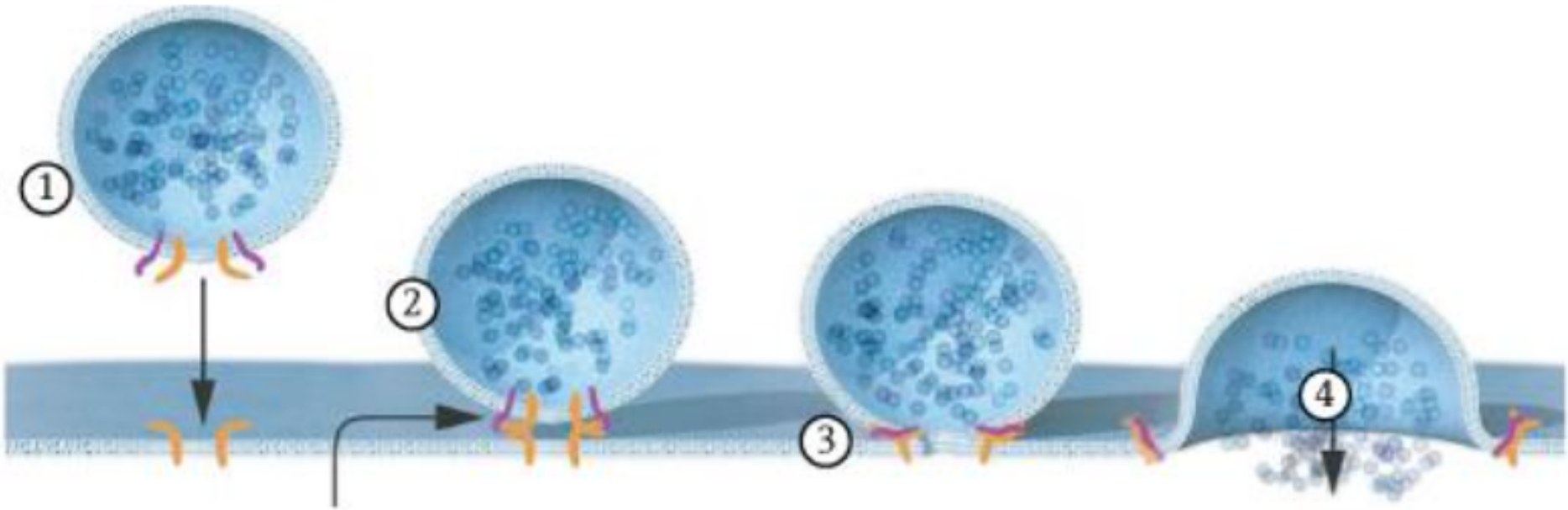
Traitement cellule / cellule par
micropipette en verre
Travaille long et fastidieux

Electroporation



Choc électrique = trous transitoires dans la MP =
entrée des fluorochromes
Méthode traumatisante

Vectorisation par vésicule



- Méthode la plus naturelle et douce
- Fusion des vésicules contenant les fluorochromes avec la MP

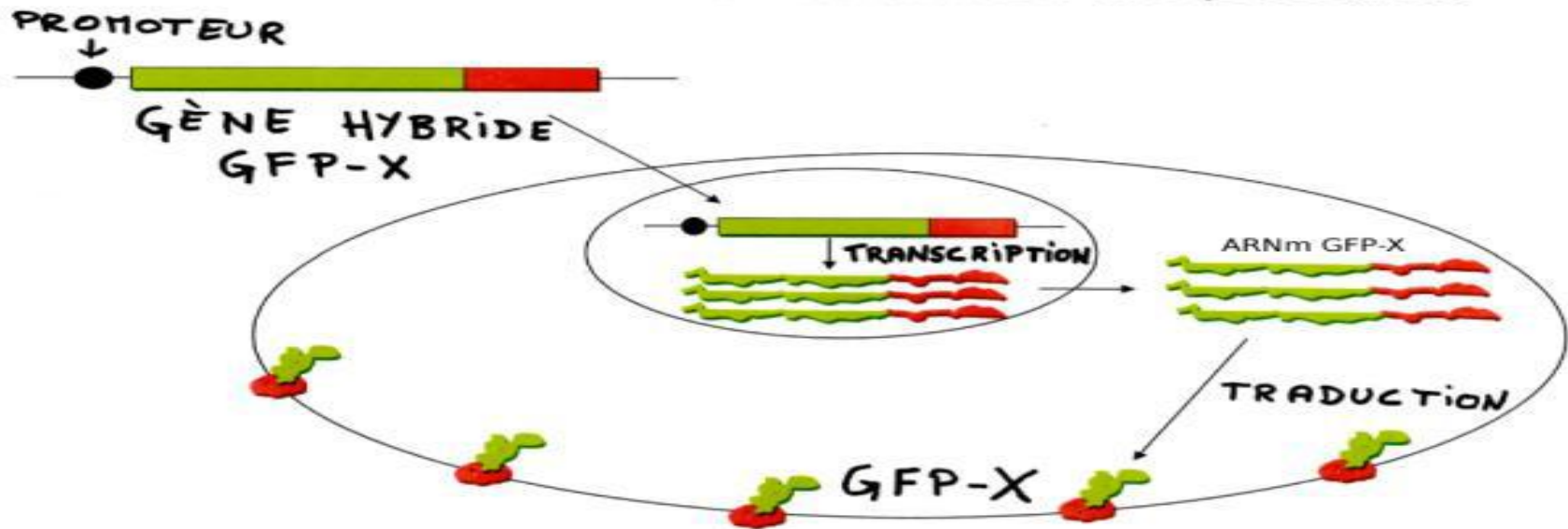
Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

- ⦿ Greffe de la séquence GFP au gène d'intérêt
- ⦿ Introduction du gène hybride dans la cellule d'intérêt = **transfection**
- ⦿ Le gène sera transcrit en protéine fluorescente

DEMONTRER / SUGGERER

- ⦿ **Démontrer** = aucune autre interprétation possible
- ⦿ **Suggérer** = interprétation la plus plausible mais pas la seule

Etude de la localisation cellulaire d'une protéine X



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

- On **démontre** que GFP-X est membranaire
- On **suggère** que X est membranaire

Applications de la fluorescence

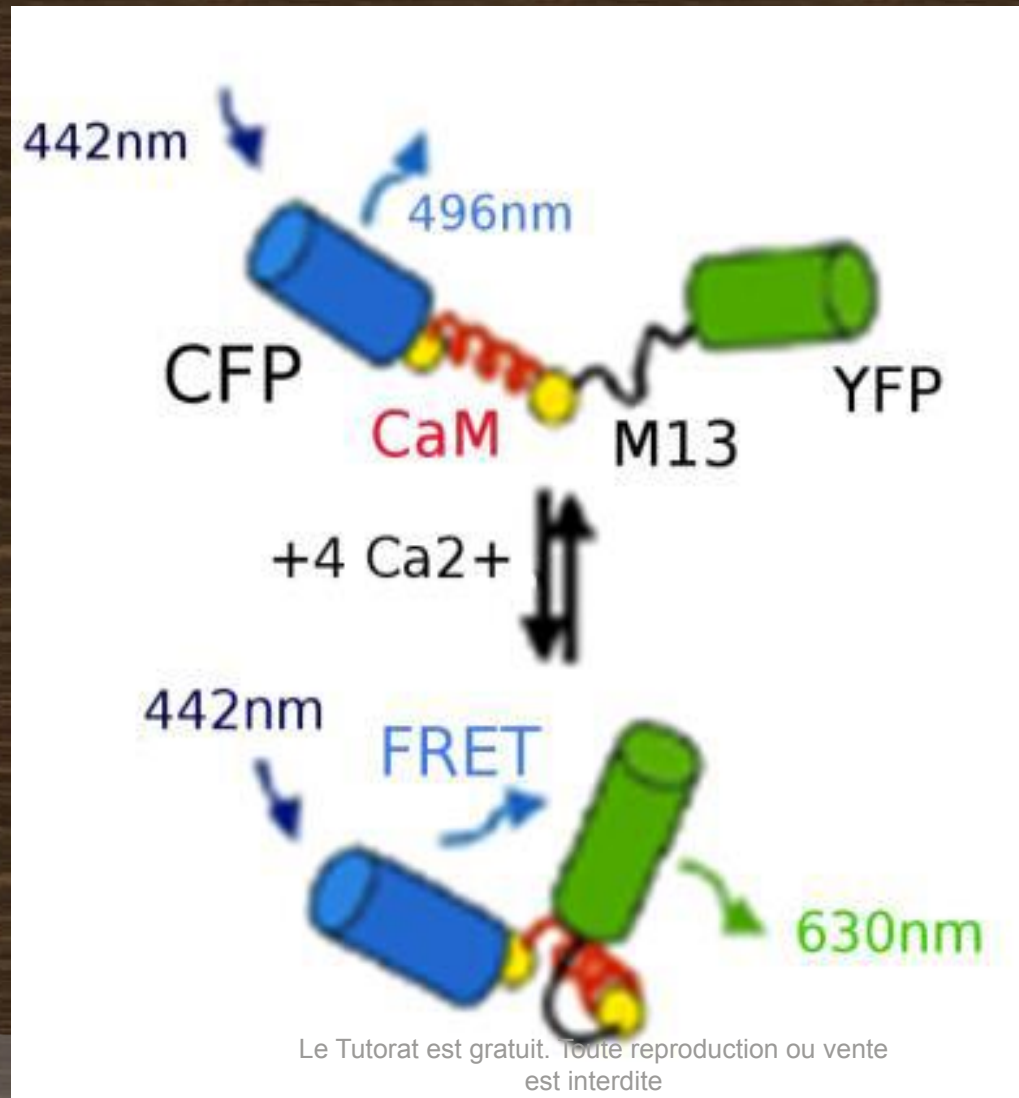
FRET

- Etude des interactions intra/intermoléculaires
- Transfert d'énergie non radiatif
- Greffe de fluorochromes à des molécules à étudier
- Excitation du 1^{er} fluorochrome qui excite le 2nd
- 2 conditions: distance < 10 nm + chevauchement des spectres



FRET intramoléculaire sonde calcique

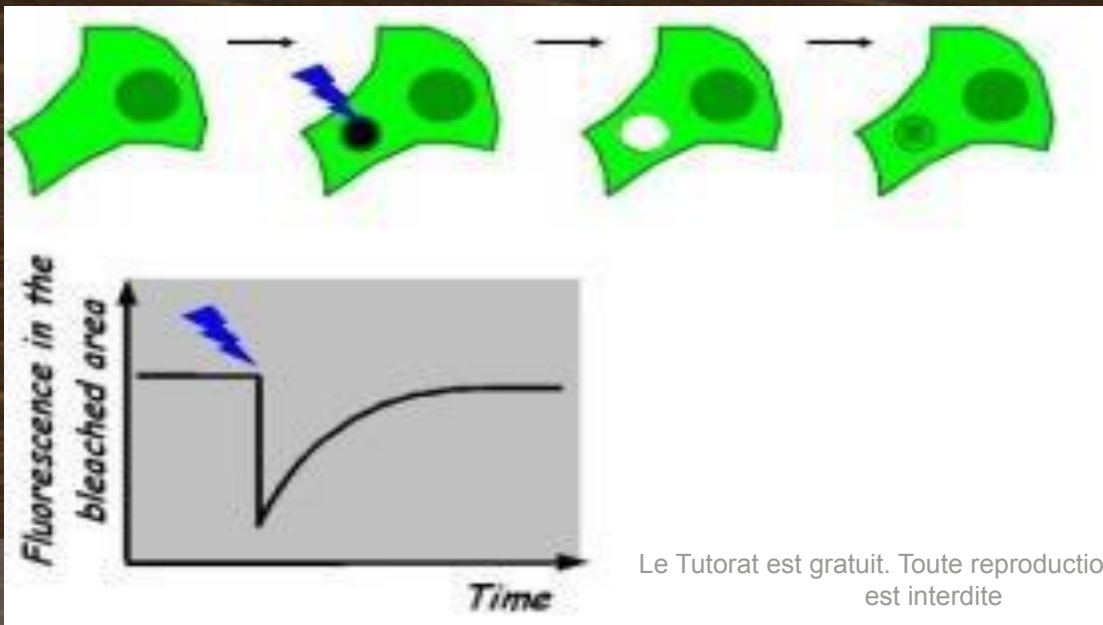
« caméléon »



Applications de la fluorescence

FRAP

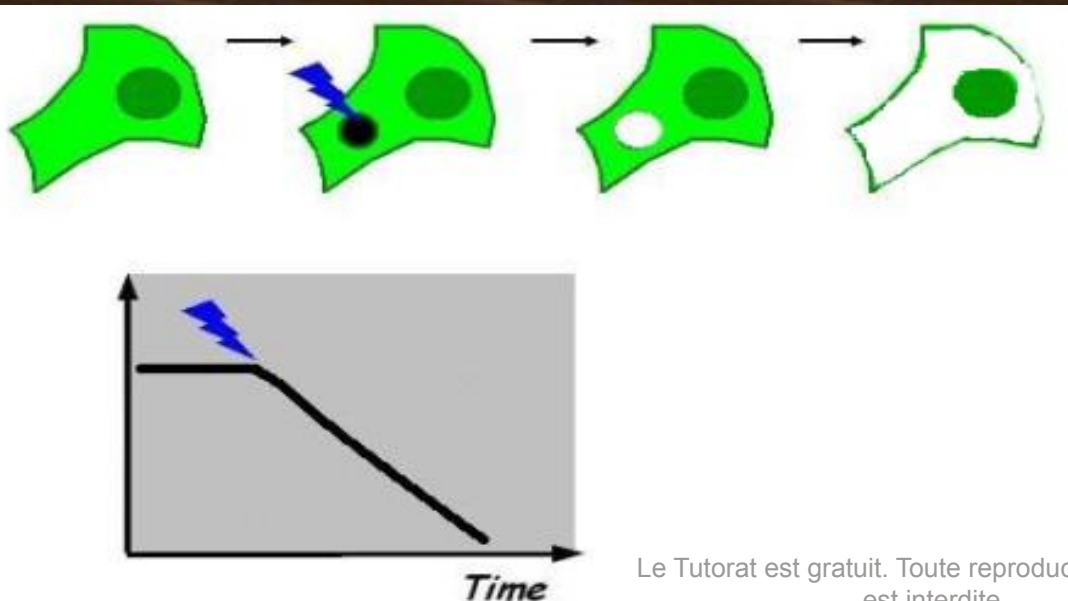
- Technique de photoblanchiment
- Irradiation d'une zone précise dans la cellule = perte de la fluorescence
- On observe le retour de la fluorescence



Applications de la fluorescence

FLIP

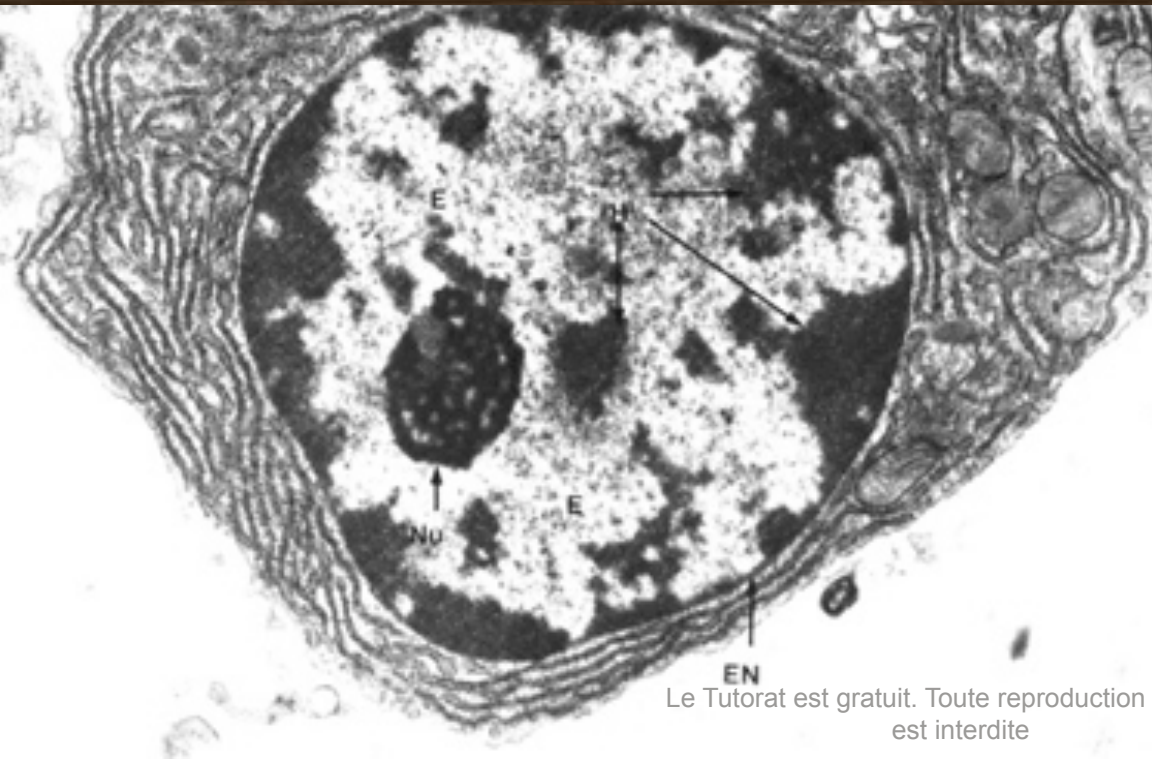
- Irradiation d'une zone en continue
- On observe la disparition de la fluorescence dans une autre zone que celle irradiée



Applications de la fluorescence

Fluorescence Induite

- Utilisation de colorants
- Visualisation des acides nucléiques



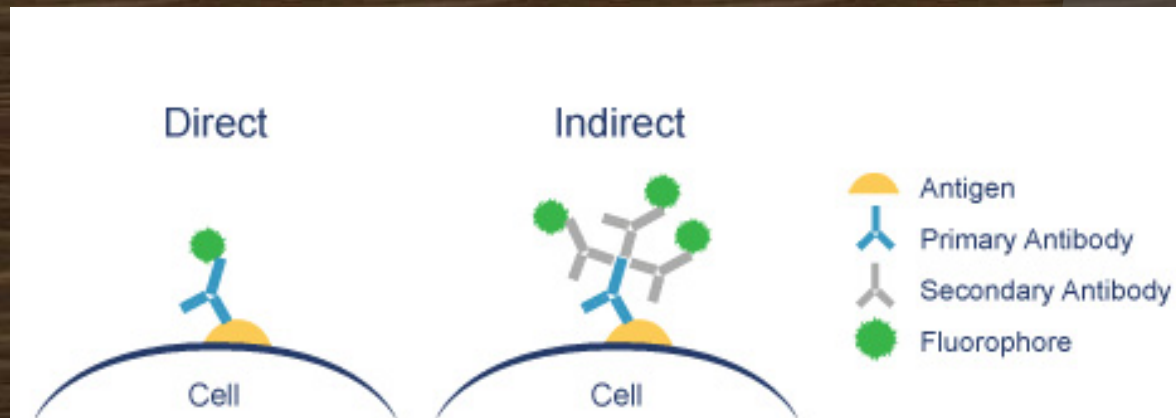
Hoescht & DAPI
=> bases A-T

Intercalants =>
entre double brin
d'ADN

Application de la fluorescence

Immunofluorescence indirecte

- Protéine joue le rôle d'AG
- Utilisation d'AC monoclonaux
- Anticorps primaire : reconnaît la protéine
- Anticorps secondaire : couplé à des fluorochromes, reconnaît les AC primaires



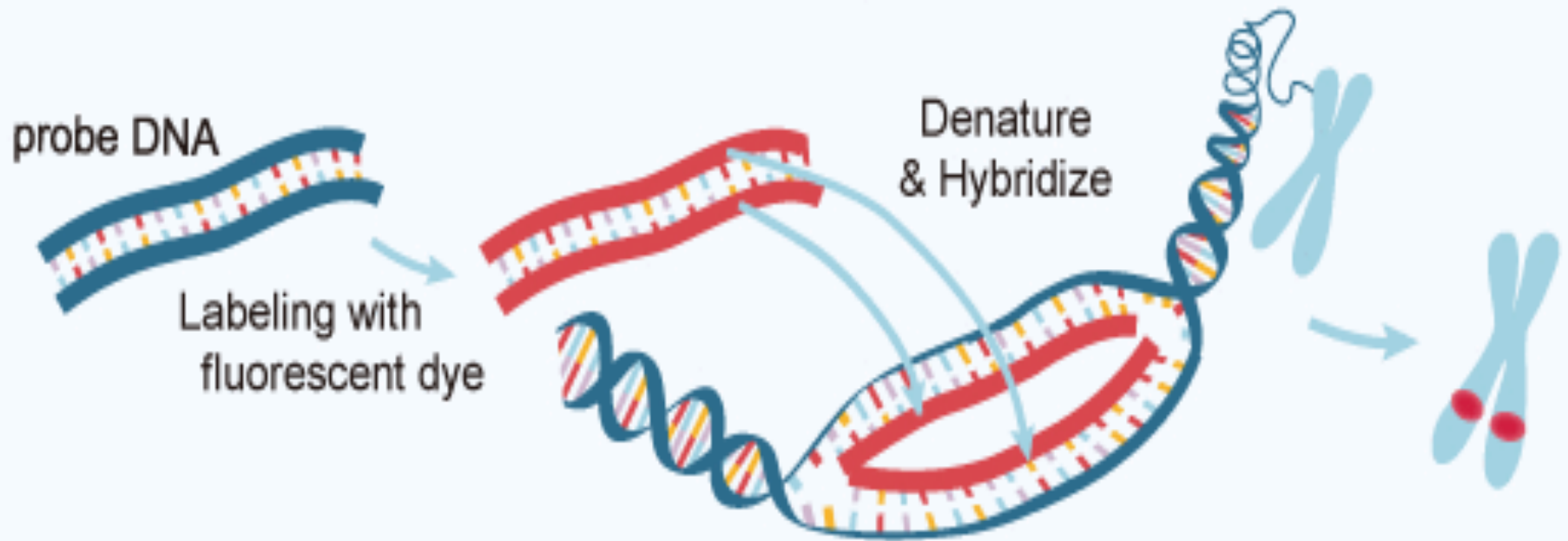
ATTENTION

- ◎ Pour différencier 2 protéines différentes:
 - 2 AC primaires d'espèces différentes
 - 2 AC secondaires d'espèces différentes
 - AC primaires et secondaires pas de la même espèce
 - Fluorochromes des 2 AC secondaires de couleurs différentes

Application de la fluorescence

FISH

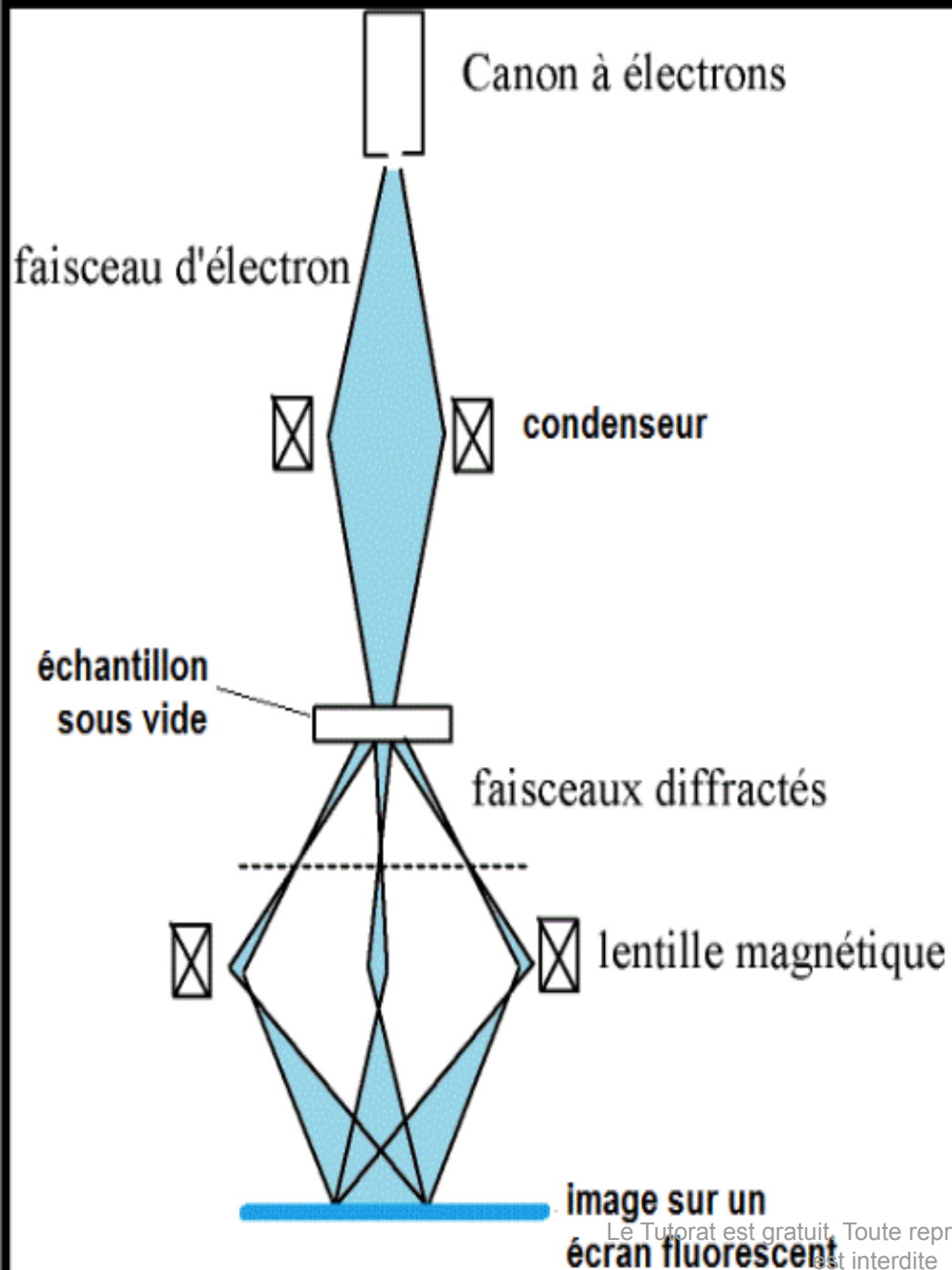
Fluorescence In Situ Hybridization



Microscopie électronique

Microscopie Electronique

- ⦿ Microscopie électronique à Transmission
- ⦿ Microscopie électronique à Balayage



Echantillon fixé,
déshydraté, inclus en
résine d'Epoxy

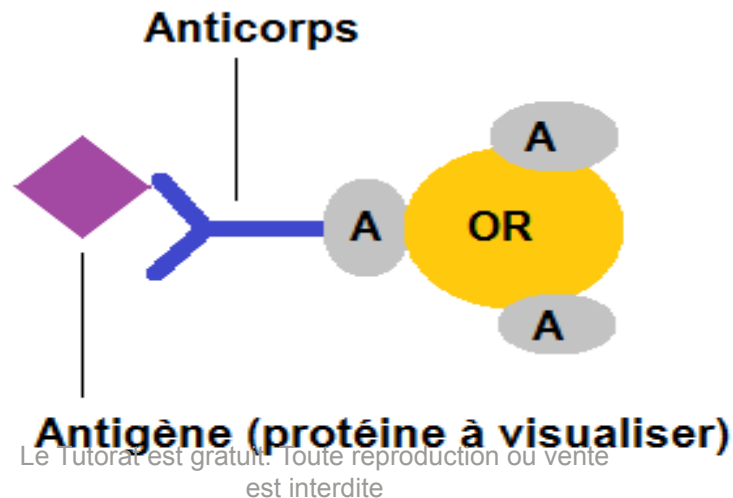
Utilisation d'agents de
contraste

Microscopie électronique à transmission

- ⦿ Electrons traversent l'échantillon
- ⦿ Contraste entre zones perméables et non perméables
- ⦿ Techniques spécialisées:
 - Marquage à l'or
 - Ombrage
 - Cryomicroscopie

Marquage à l'or

- L'or ne laisse pas passer les électrons
- Marque spécifiquement les molécules
- AC dirigé contre la protéine à visualiser
- Protéine A couplé à l'or



Ombrage

- Echantillon bombardé de métaux lourds
- Réplique en métal de l'échantillon
- Dissolution de l'échantillon
- Visualisation indirecte
- Electrons ne traversent pas



Cryomicroscopie

- Echantillon congelé puis fracturé sous vide = cryofracture
- Couteau passé entre les 2 feuillets de la MP
- Sublimation de la couche superficielle => augmente les reliefs
- Vaporisation d'une fine couche de platine et carbone => réplique (augmente les contrastes)
- Dissolution de l'objet

Microscopie électronique à balayage

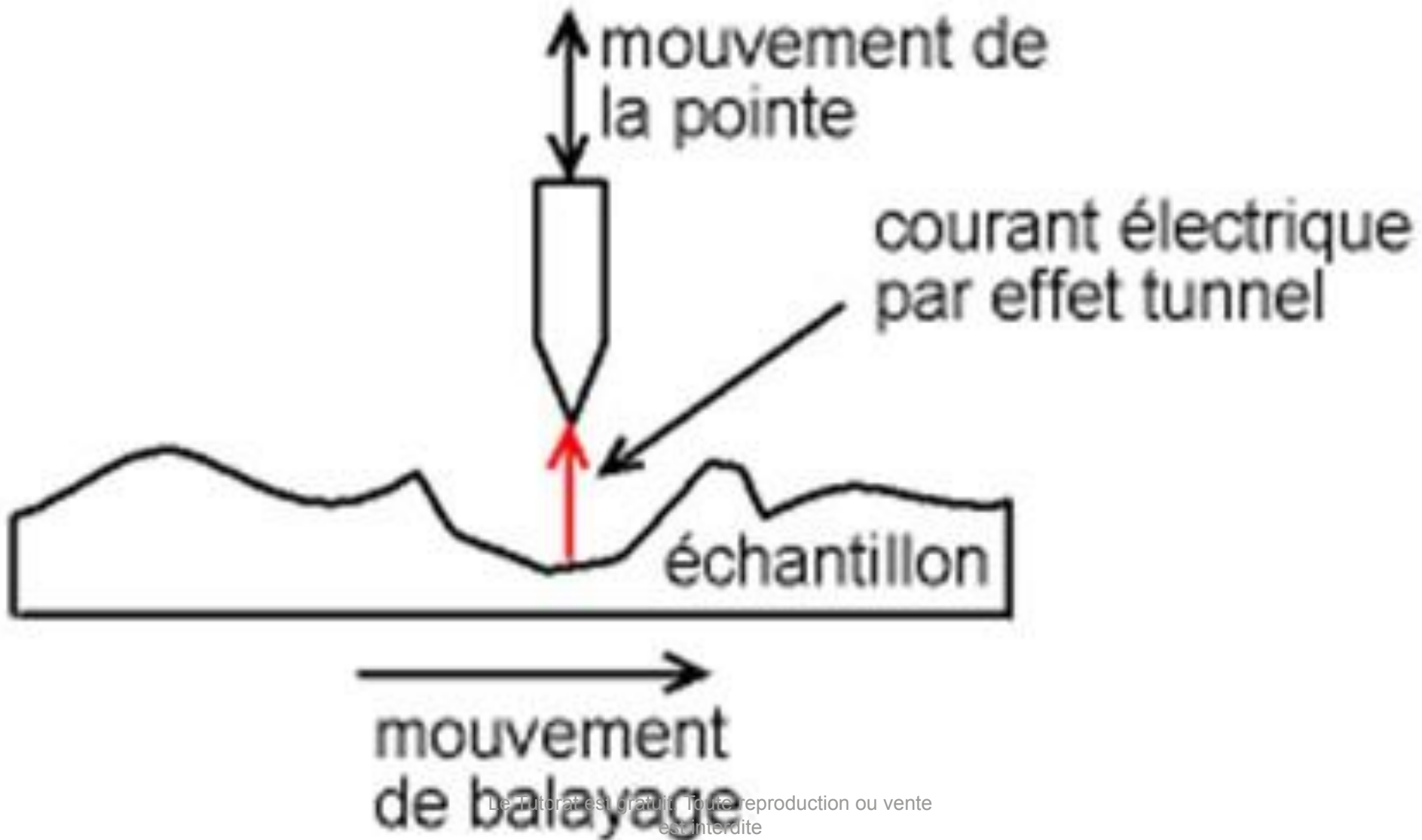
- Résolution plus faible : 10 nm
- Visualisation de la surface des cellules et tissus
- Electrons sont réfléchis à la surface
- Recueil des électrons secondaires
- Etude sur des échantillons vivants

Microscopie à force atomique

Microscopie à force atomique

- Image directe de l'échantillon à l'échelle atomique
- Mesure des volumes
- Utilisable en phase liquide
- Pas de coloration
- Non destructive
- Balayage de l'échantillon avec une pointe très fine
- Résolution égale ou supérieur à la ME

Plus la pointe est fine meilleure est la résolution





Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente
est interdite

QCM 3

A propos de la fluorescence

- A) Il faut modifier le fluorophore de la GFP pour lui permettre d'être fluorescente en dehors de la méduse
- B) La technique du FRET repose sur un transfert d'énergie radiatif entre deux fluorochromes greffés aux molécules à étudier
- C) La GFP absorbe dans le vert et émet dans le bleu
- D) Dans l'utilisation de l'immunofluorescence indirecte les AC primaires couplés à des fluorochromes se fixent aux AC secondaires
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 3

A propos de la fluorescence

- A) La fluorescence est une propriété intrinsèque (= naturelle) de la GFP
- B) Le FRET se base sur un transfert d'énergie non radiatif
- C) La GFP absorbe dans le bleu et émet dans le vert
- D) Les AC secondaires couplés à des fluorochromes se fixent aux AC primaires
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 4

On souhaite étudier la localisation de la protéine Carapaze (enzyme conférant à Tortank la capacité d'utiliser Hydrocanon) ainsi que celle de la Mignonaze (enzyme conférant à Pikachu son côté trop mignon).

On utilise la microscopie à fluorescence en couplant des anticorps primaires de Nosférapti contre la Carapaze et des anticorps primaires de Bulbizarre contre la Mignonaze.

Avec l'utilisation d'anticorps secondaires, comment fait-on pour visualiser séparément la Carapaze et la Mignonaze?

A) Anticorps de Magnéti anti-immunoglobuline de Psykokwak couplés à la GFP et anticorps de Psykokwak anti- immunoglobuline de Magnéti couplés à la rhodamine.

B) Anticorps de Galopa anti-immunoglobuline de Magnéti couplés à la GFP et anticorps de Kangourex anti- immunoglobuline de Psykokwak couplé à la fluorescéine.

C) Anticorps de Bulbizarre anti-immunoglobuline de Bulbizarre couplés à la fluorescéine et anticorps de Rondoudou anti- immunoglobuline de Nosférapti couplés à la rhodamine.

D) Anticorps de Métamorph anti-immunoglobuline de Nosférapti couplés à la fluorescéine et anticorps de Miaouss anti- immunoglobuline de Bulbizarre couplés à la rhodamine.

E) Les réponses A,B,C et D sont fausses

QCM 4

On souhaite étudier la localisation de la protéine Carapaze (enzyme conférant à Tortank la capacité d'utiliser Hydrocanon) ainsi que celle de la Mignonaze (enzyme conférant à Pikachu son côté trop mignon).

On utilise la microscopie à fluorescence en couplant des anticorps primaires de Nosférapti contre la Carapaze et des anticorps primaires de Bulbizarre contre la Mignonaze.

Avec l'utilisation d'anticorps secondaires, comment fait-on pour visualiser séparément la Carapaze et la Mignonaze?

A) Anticorps de Magnéti anti-immunoglobuline de Psykokwak couplés à la GFP et anticorps de Psykokwak anti- immunoglobuline de Magnéti couplés à la rhodamine.

B) Anticorps de Galopa anti-immunoglobuline de Magnéti couplés à la GFP et anticorps de Kangourex anti- immunoglobuline de Psykokwak couplé à la fluorescéine.

C) Anticorps de Bulbizarre anti-immunoglobuline de Bulbizarre couplés à la fluorescéine et anticorps de Rondoudou anti- immunoglobuline de Nosférapti couplés à la rhodamine.

D) Anticorps de Métamorph anti-immunoglobuline de Nosférapti couplés à la fluorescéine et anticorps de Miaouss anti- immunoglobuline de Bulbizarre couplés à la rhodamine.

E) Les réponses A,B,C et D sont fausses