



UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III

« Site Maraîchers »

PACES UE2 « LA CELLULE, LES TISSUS »

- **Biologie Cellulaire (B. Ségui)**
- **Biologie cellulaire (AD. Terrisse)**

Année 2019 - 2020



ATTENTION :

Des modifications pourront être apportées sur les diapositives présentées dans ce polycopié, lors des cours magistraux.

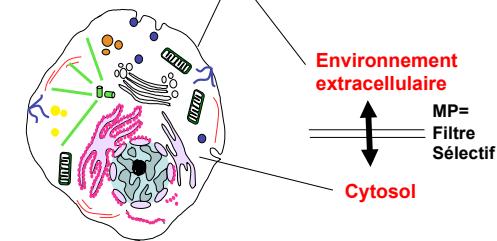
Les diaporamas projetés en cours durant l'année universitaire seront mis à disposition au fur et à mesure sur le site de Moodle.

LA MEMBRANE PLASMIQUE

Bruno Ségui

Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

La membrane plasmique



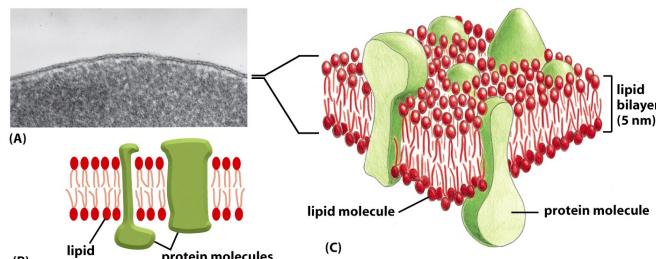
- I- Principales fonctions
- II- Architecture générale
- III- Les lipides
- IV- Les protéines
- V- Le glycocalyx

I- Principales fonctions de la MP

- 1- Barrière hydrophobe avec perméabilité sélective:
 - . Perméables aux gaz (O_2 et CO_2)
 - . Passage contrôlé de solutés (canaux - transporteurs - vésicules)
- 2- Communication Intercellulaire
- 3- Adhésion:
Interactions cellule/cellule
cellule/matrice
- 4- Fluidité:
« Mosaïque fluide »

Changement morphologique
Mobilité
Migration
Prolifération
Endo/Exocytose

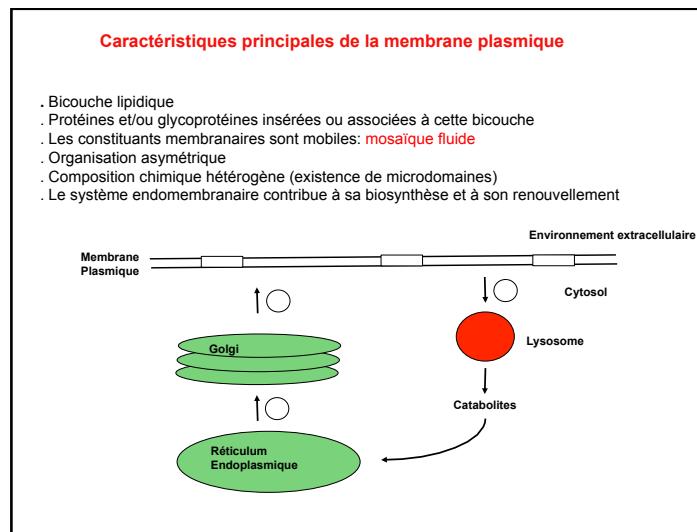
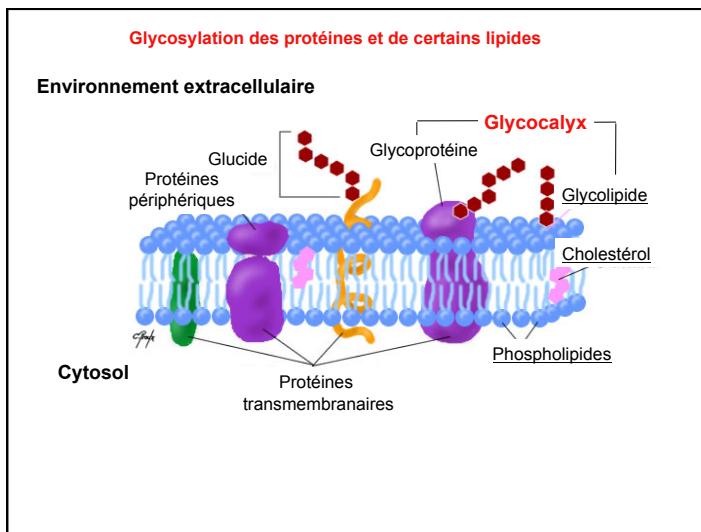
II- Architecture générale de la MP



Lipides: phospholipides (glycérophospholipides et sphingomyéline)
Cholestérol, glycolipides: Bicouche

Protéines transmembranaires / périphériques

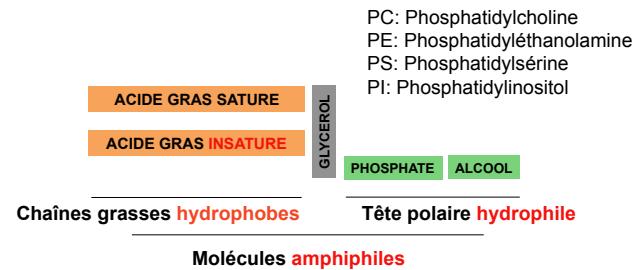
Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)



III- Les principaux lipides de la membrane plasmique

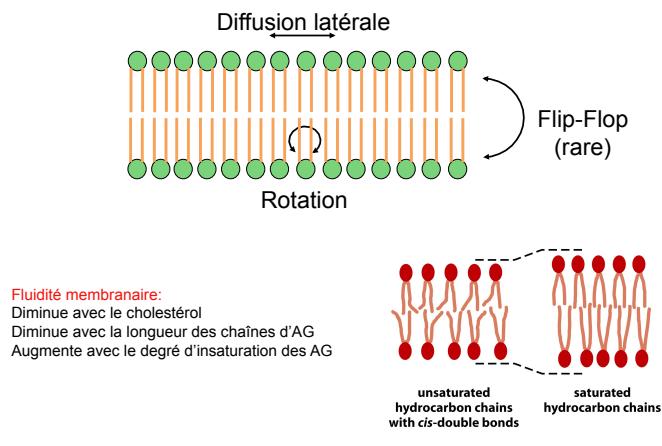
- III-1 Les glycérophospholipides
- III-2 Les sphingolipides
- III-3 Le cholestérol
- III-4 Organisation des lipides dans la MP
- III-5 Lipides et signalisation intracellulaire

III-1 Les glycérophospholipides

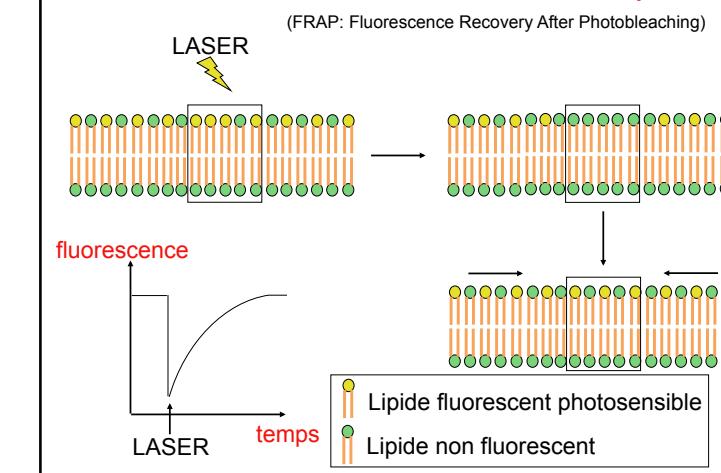


- . Synthèse: RE
- . Transport du RE à la MP: vésiculaire+++ ou monomériques+
- . Répartition asymétrique

III-4-2 notion de fluidité membranaire



Mise en évidence de la diffusion latérale des lipides



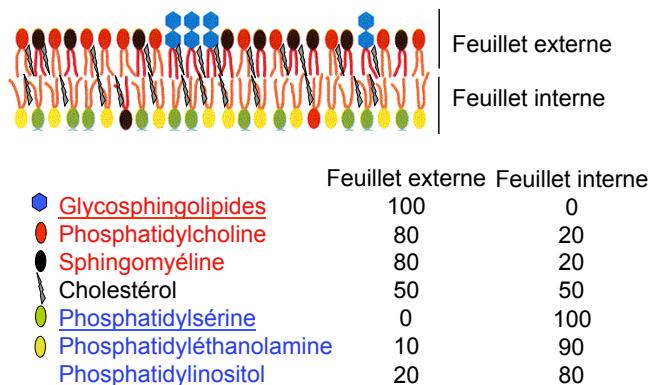
III-4-3 % des lipides dans la MP

	hépatocytes	GR	E. Coli
Phosphatidylcholine	24	17	0
Phosphatidyléthanolamine	7	18	70
Phosphatidylsérine	4	7	trace
Cholestérol	17	23	0
Sphingomyéline	19	18	0
Glycolipides	7	3	0
Autres*	22	14	30

*Diacylglycérol, Acide phosphatidique, céramide, phosphoinositides...

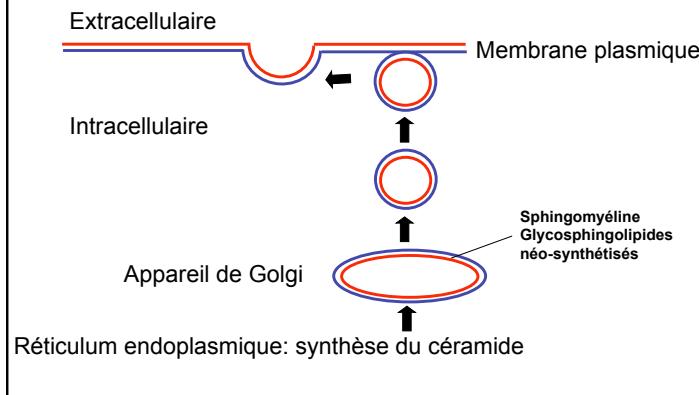
N.B. Prokaryotes:
 - Un PL majoritaire (PE)
 - Pas de cholestérol (paroi)

III-4-4 Distribution lipidique asymétrique



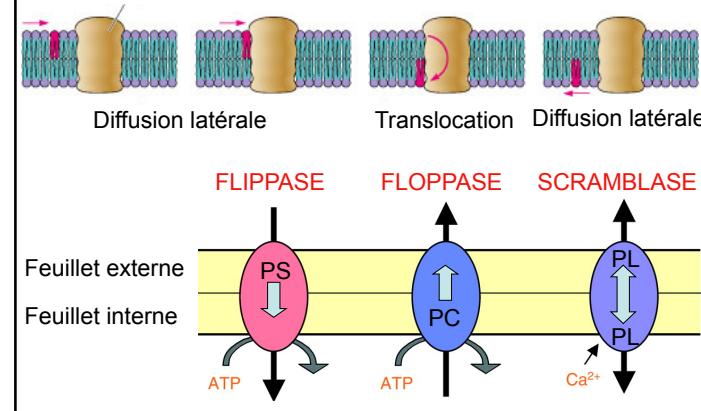
III-4-4-1 Pourquoi la MP est-elle asymétrique?

a- Exemple des sphingolipides

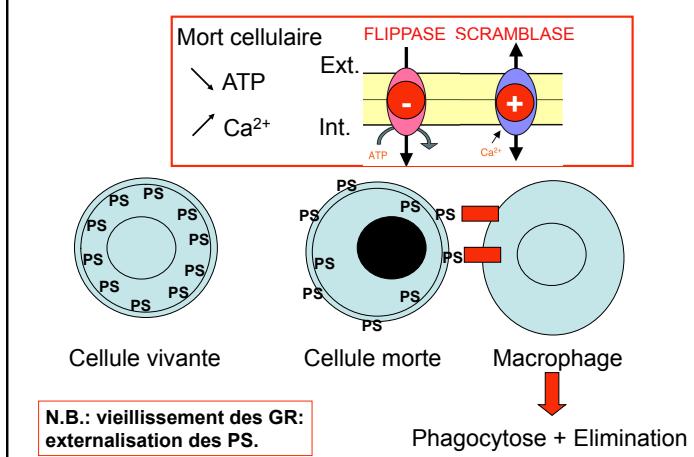


b- Les translocases

TRANSLOCASE: Translocation sélective des phospholipides



III-4-4-2 Mort cellulaire: un exemple d'altération de l'asymétrie lipidique



III-4-4-3 Externalisation des PS et coagulation sanguine.

Lésion vasculaire

Activation plaquettaire

Externalisation des PS

Fixation du Ca²⁺

Activation des facteurs de la coagulation

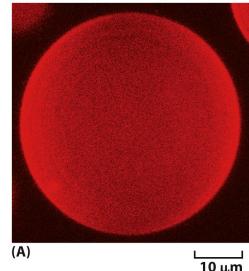
Syndrome de Scott:

Absence d'externalisation des PS
↓
Hémorragie

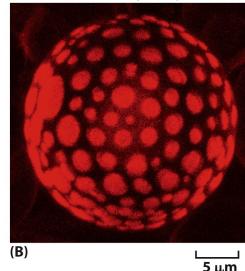
III-4-5 notion de microdomaines membranaires

Liposomes avec Sphingomyéline fluorescente

Phosphatidylcholine
Sphingomyéline (1:1)



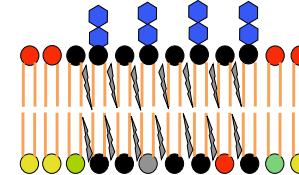
Phosphatidylcholine
Sphingomyéline
Cholestérol (1:1:1)



Distribution **punctiforme**

Microdomaines de la MP de cellules humaines

- Cholestérol
- SM
- GSL
- PE
- PC
- PS



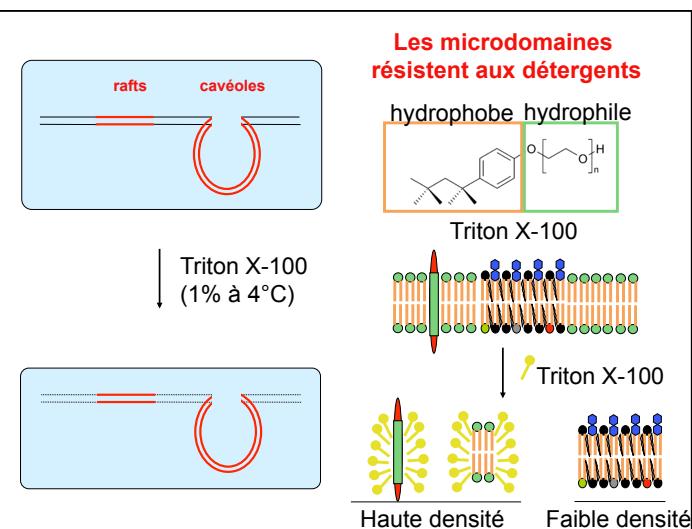
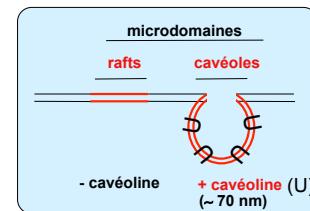
- Domaines enrichis en **cholestérol** et en **sphingolipides**
- Contiennent des protéines de la signalisation
- **Cyclodextrine** ou inhibition de la synthèse des SLs: altération de la signalisation

rafts cavéoles

M.E.

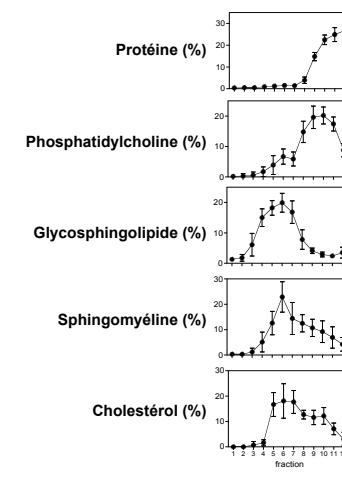
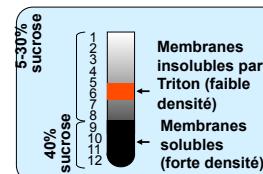


Cellules sans cavéoline Cellules avec cavéoline

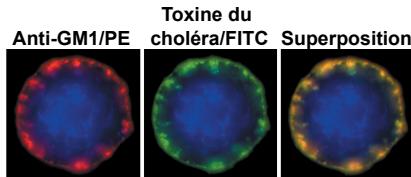
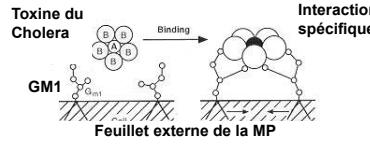


Séparation des microdomaines sur gradient de densité

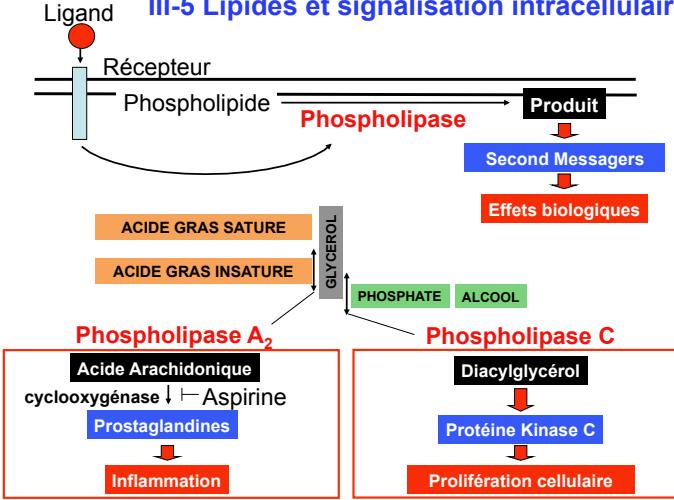
Faible densité des microdomaines: gradient de sucrose, ultracentrifugation



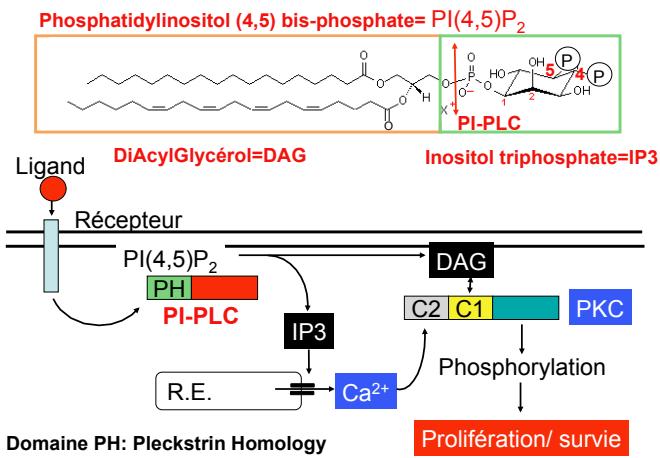
Analyse des microdomaines par microscopie confocale



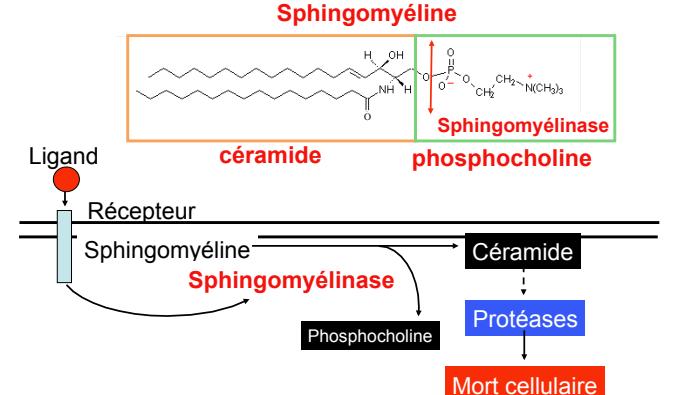
III-5 Lipides et signalisation intracellulaire



III-5-1 Exemple de la voie de signalisation des PI-PLC



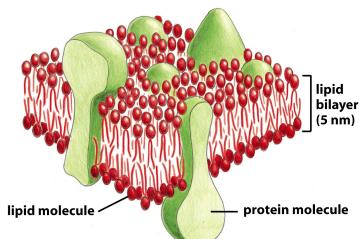
III-5-2 Exemple de la voie de signalisation « sphingomyéline-céramide »



IV- Protéines de la MP

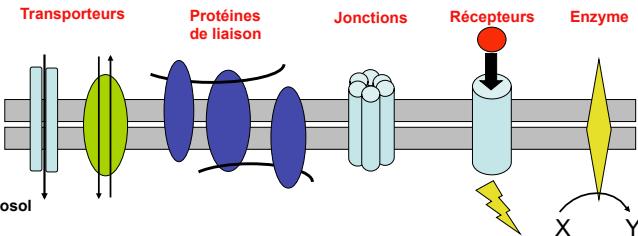
50 à 100 fois moins de protéines que de lipides.

Environ 50% de la masse des membranes.



IV-1 Protéines et fonctions associées

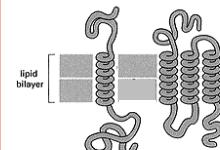
Environnement extracellulaire



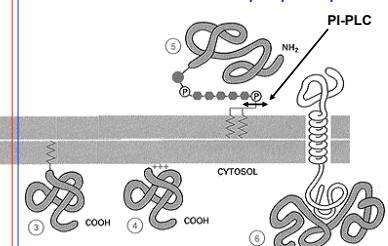
Type	Exemple	Fonction
Transporteur Liaison	Pompe à Na+ Intégrines	Sortie Na+; Entrée K+ Lien filaments actine et protéines matrice extracell.
Jonctions Récepteurs	Jonctions communicantes EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) Fas	Passage solutés (<1,5 kDa) Prolifération Mort cellulaire
Enzyme	Adénylate cyclase	Production d'AMPc

IV-2 Association protéines/membranes

Protéines membranaires intégrales



Protéines membranaires périphériques



1-2: AA hydrophobes en hélice α (le plus souvent) ou feuillet β

3: protéines acylées ou prénylées: chaîne grasse (palmitate (C16), myristate (C14, Nter), dérivés isopréniques ((C5)n, Cter)) (intracellulaire; microdomaine+++)

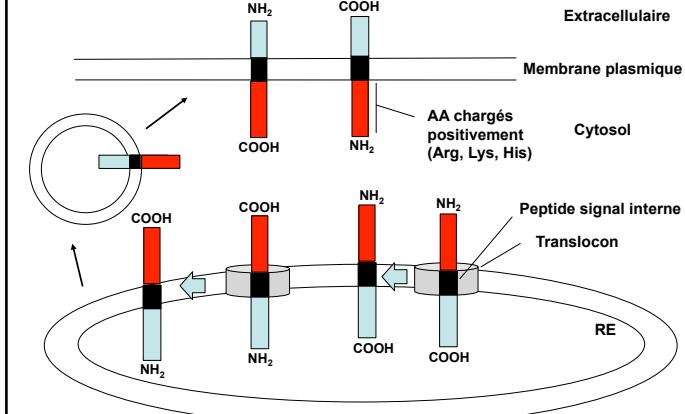
4: interaction protéine/lipide (domaine PH/ phosphoinositide)

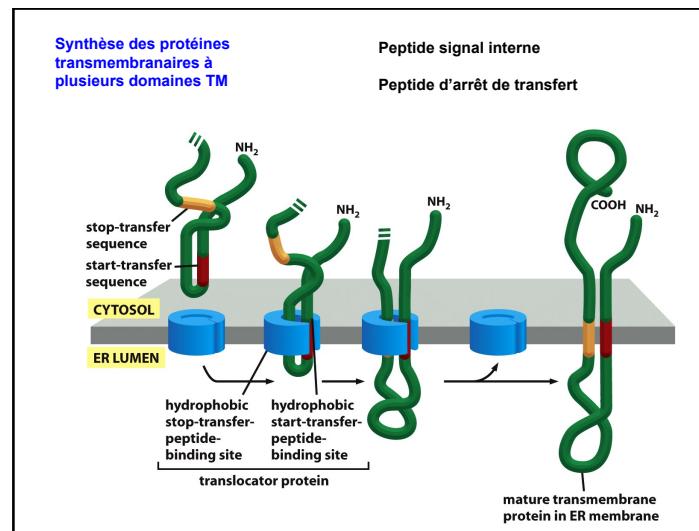
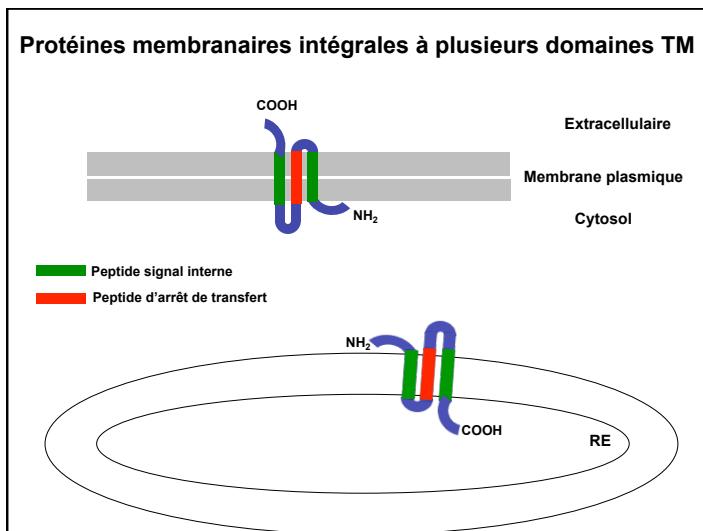
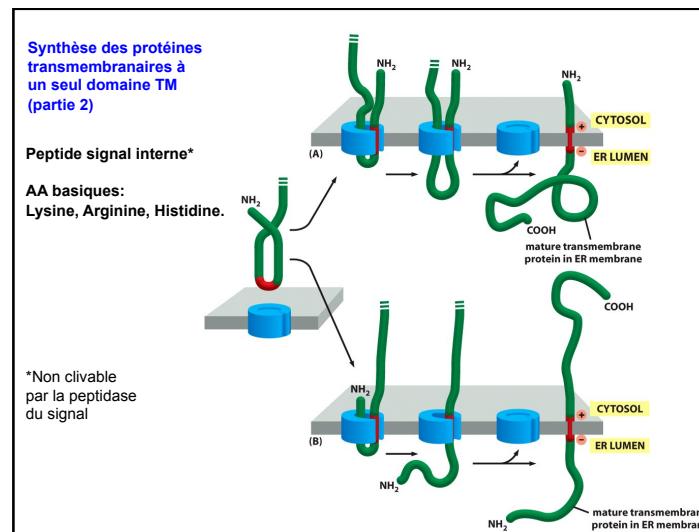
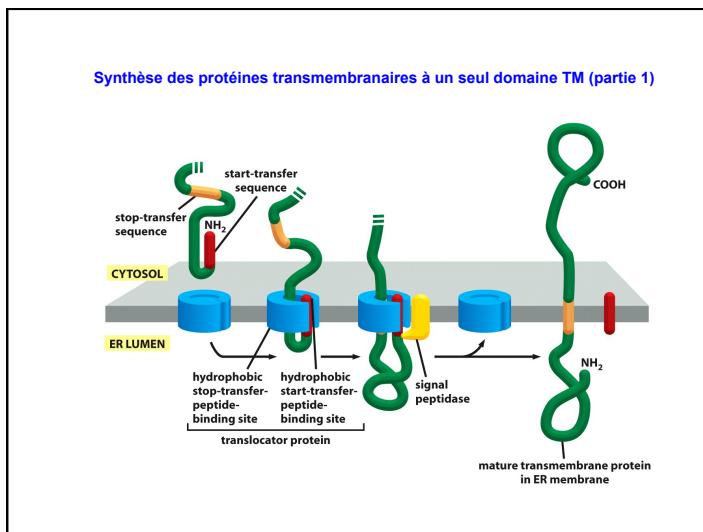
5: protéines porteuses d'une ancre GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol, Cter) (microdomaine+++)

6: interaction protéine/protéine

Protéines membranaires intégrales de type 1 et de type 2

type 1 type 2

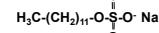
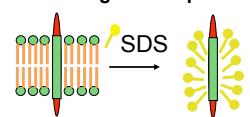




IV-3 Extraction et analyse des protéines membranaires

Dodécylsulfate de sodium (SDS):

Détergent ionique

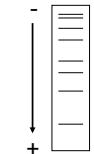


-

Electrophorèse
Gel de Polyacrylamide
SDS/PAGE

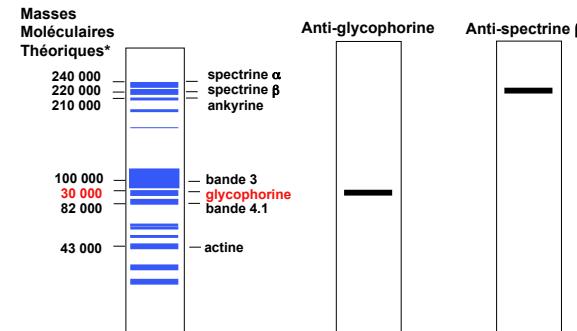
Révélation
Bleu de coomassie

Western blot
Transfert sur membrane (nitrocellulose)
Anticorps I
Anticorps II
Révélation
+ substrat: chimiluminescence



Exemples des protéines de la M.P. des Globules rouges

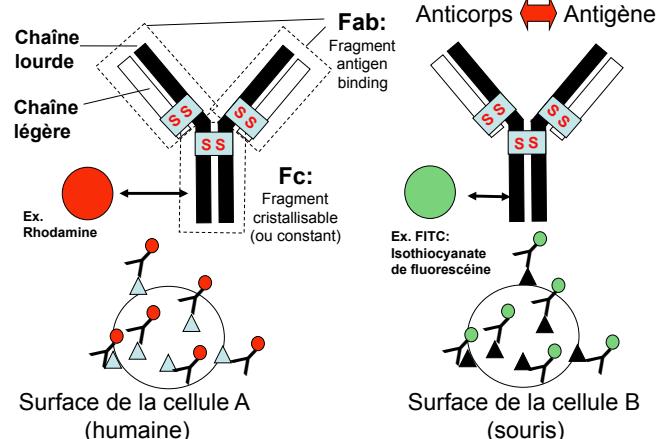
Western blot



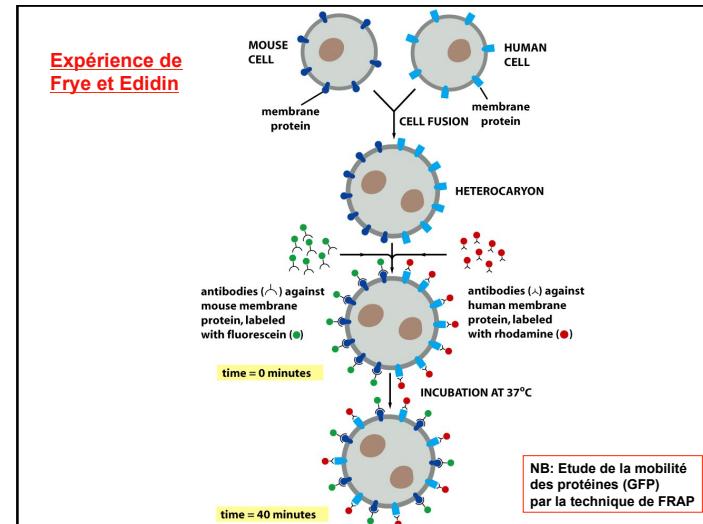
*Calculé à partir de la séquence en AA

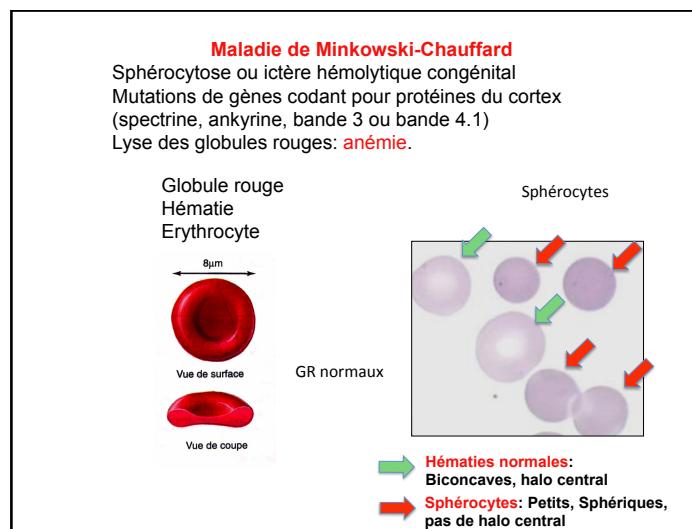
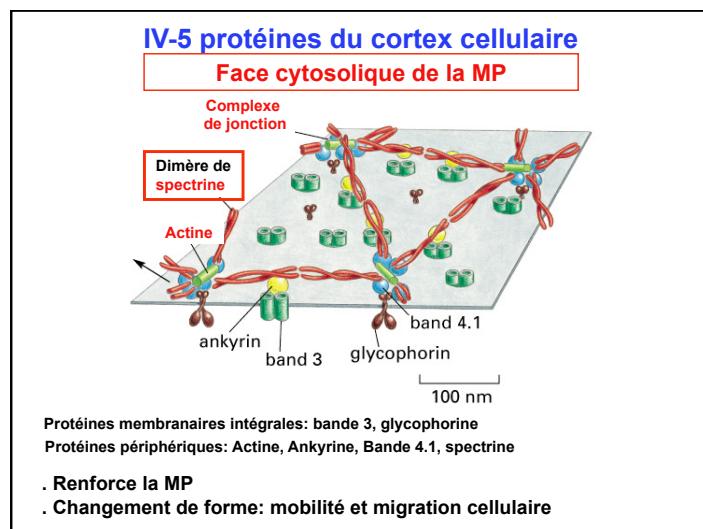
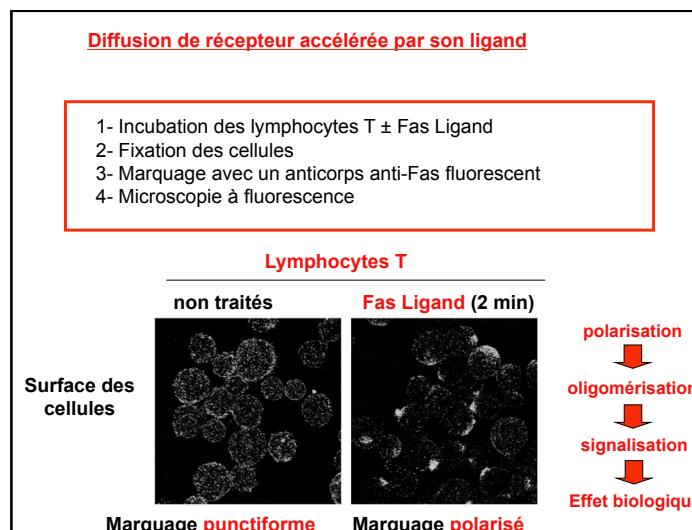
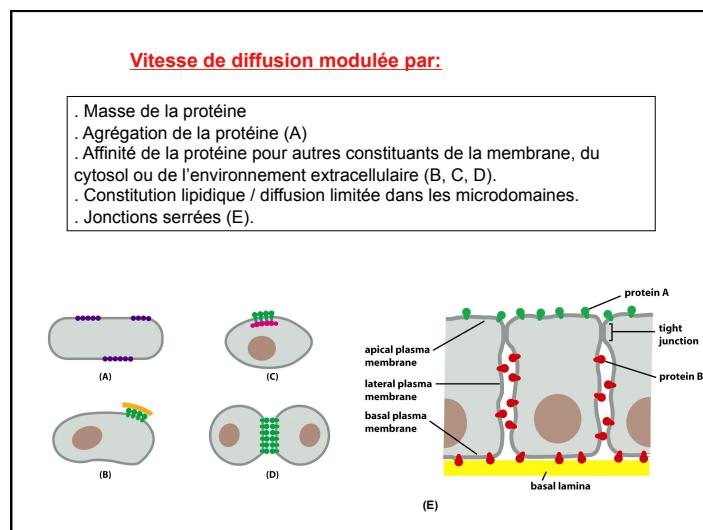
IV-4 Mobilité des protéines

Marquage des protéines membranaires par des anticorps



Expérience de Frye et Edidin

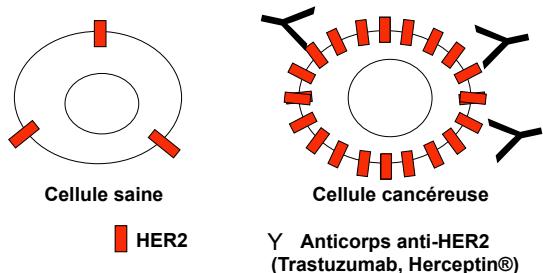




IV-6 protéines membranaires= cibles de médicaments.

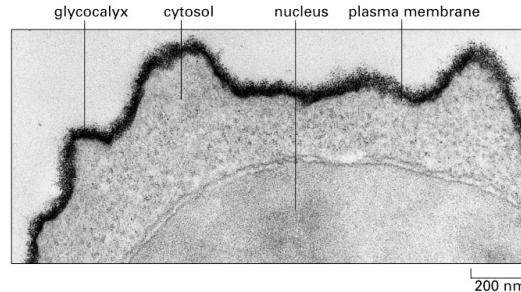
Exemple de HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor 2) en cancérologie:

Récepteur à activité Tyrosine kinase
Surexprimé dans environ 20% des cancers du sein
Favorise la prolifération non régulée des cellules cancéreuses



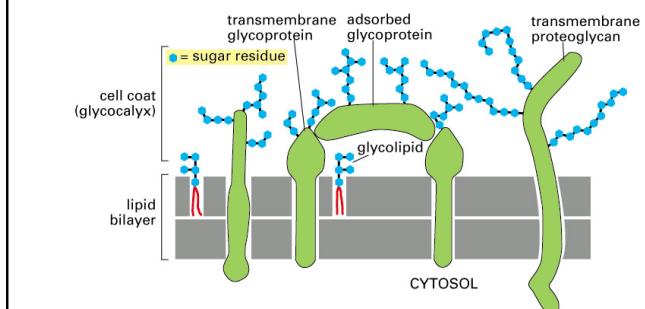
V- Glycocalyx ou cell coat

Zone périphérique riche en glucides



M.E. d'un lymphocyte coloré au rouge de ruthénium
Interaction avec des protéines végétales (lectines)
M.E.: Lectine/ferritine

V-1 Constituants du Glycocalyx



Glycoprotéines (chaînes glycosidiques courtes et ramifiées)

Protéoglycanes (chaînes glycosidiques longues et non ramifiées)

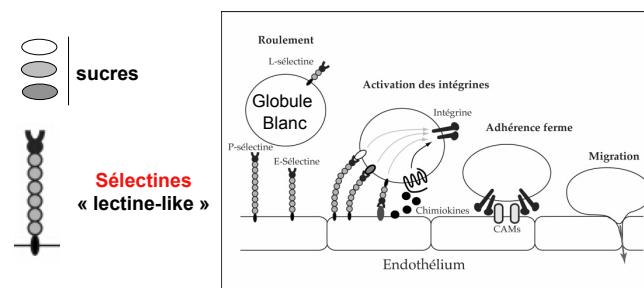
Glycolipides (glycosphingolipides: ch. glycosidiques courtes et ramifiées)

Liaisons O-glycosidiques (Lipides, Sérine, Thréonine)

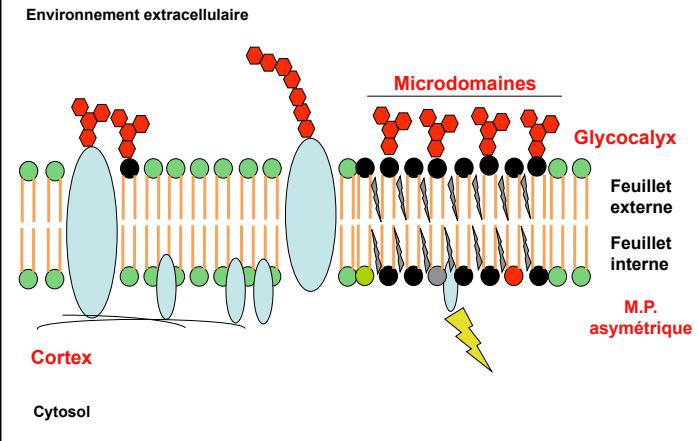
et N-glycosidiques (Asparagine)

V-2 Rôles du Glycocalyx

- . Protection
- . Maintien de l'asymétrie membranaire
- . Système ABO (glycosphingolipides; glycoprotéines)
- . Reconnaissance: GM1 / toxine cholérique
- . Adhésion cellulaire: exemple de la migration de globules blancs.



VI- Bilan de l'organisation de la M.P.



Le Transport Transmembranaire

Bruno Ségui

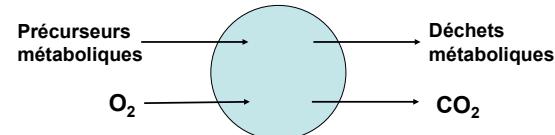
Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

Transport transmembranaire

Membrane plasmique: frontière hydrophobe

Perméabilité sélective, finement contrôlée

Echanges indispensables pour la vie cellulaire



I- Les différents types de transport

II- Transport facilité passif

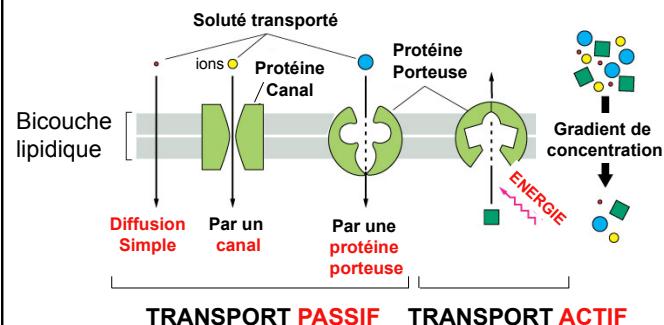
III- Transport actif

IV- Association de transporteurs actifs et passifs du glucose

V- Transporteurs actifs et régulation du pH

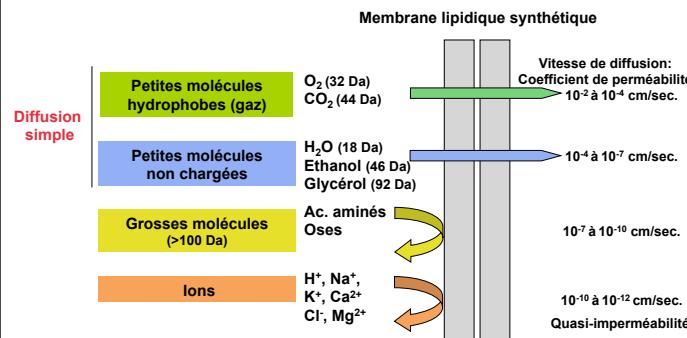
VI- Exemples de médicaments modulant le transport transmembranaire

I- Les différents types de transport



Constitution moléculaire différente dans le cytosol et dans l'environnement extracellulaire

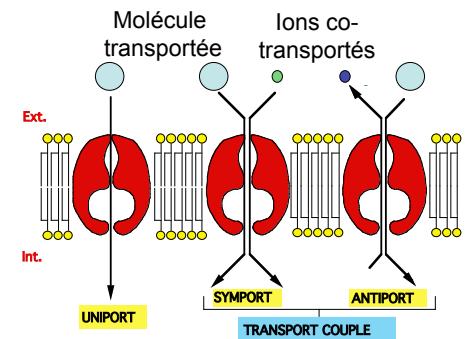
I-1 Diffusion simple



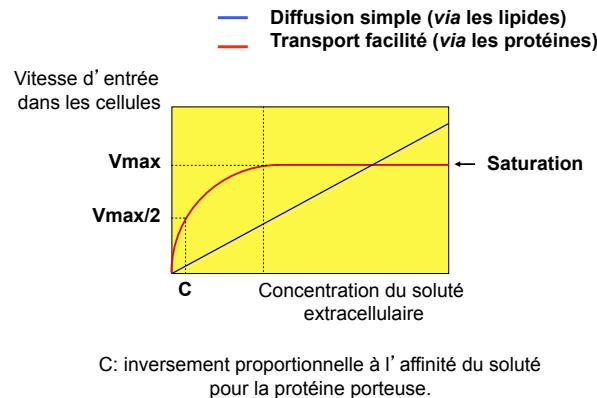
Diffusion simple: transport passif

Protéines membranaires :
Transport facilité passif ou transport actif des grosses molécules et des ions.

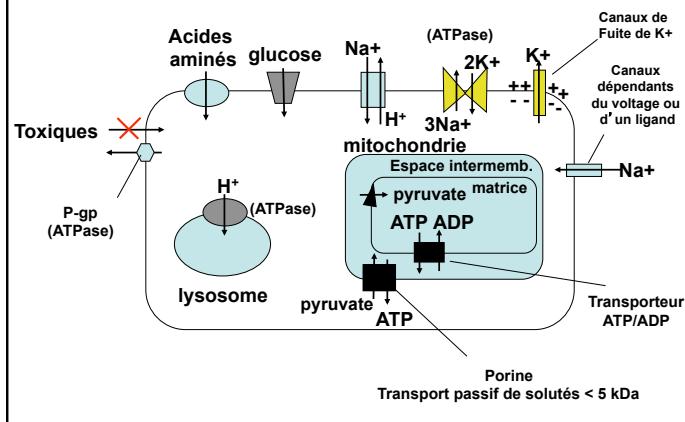
I-2 Transport facilité par des protéines porteuses



I-3 Aspects cinétiques de la diffusion simple et du transport facilité



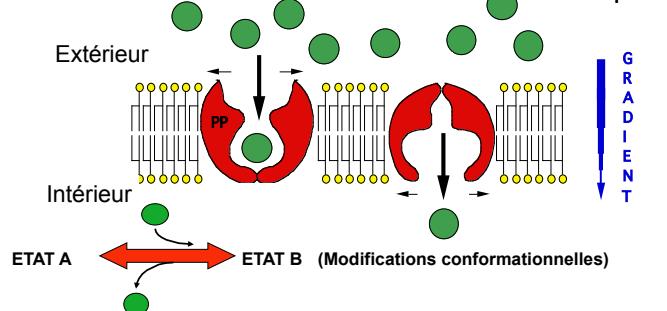
I-4 Exemples de transporteur protéique



II- Transport facilité passif.

II-1 Exemple des protéines porteuses GLUT

GLUT: Glucose Transporter

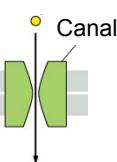


Régulation de la glycémie par hormones pancréatiques

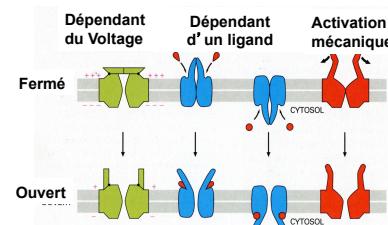
Insuline (hypoglycémiant)	Glucagon (hyperglycémiant)
↑GLUT: captation	Foie: Glycogène → Glucose
Foie: Glucose → Glycoène	Sortie de Glucose via GLUT

II-2 Les canaux ioniques

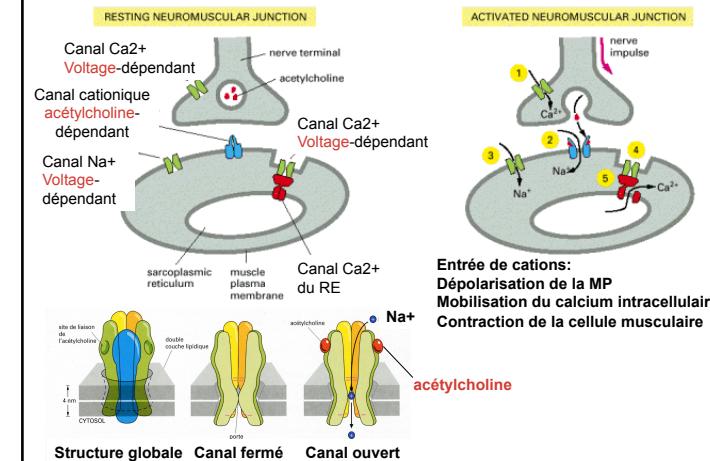
a- propriétés générales



- . Passage **sélectif des ions** (ex. Na^+ K^+ Ca^{2+} Mg^{2+} et Cl^-). contact étroit avec les parois du canal: taille et charge de l'ion appropriées.
- . Transport 1000 fois plus **rapide** que via les protéines porteuses
- . **Bidirectionnel** mais toujours dans le sens du gradient de concentration
- . Ouverture **brève** et **conditionnée** par divers stimuli (exception: canaux de fuite du K^+).

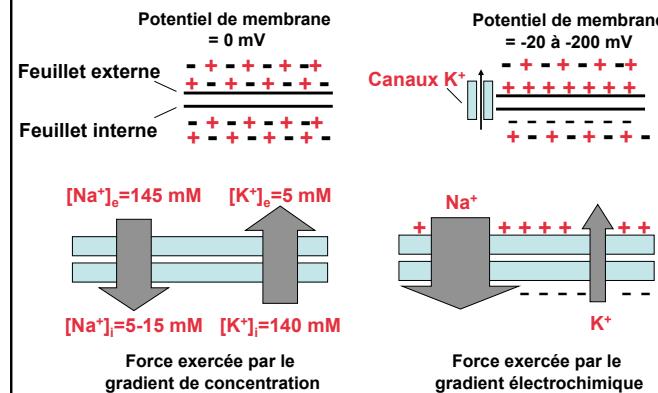


b- Exemple des canaux ioniques de la jonction neuromusculaire



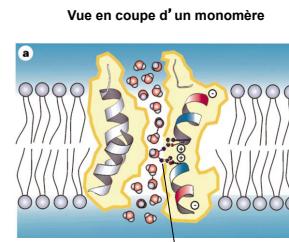
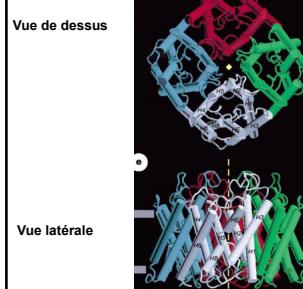
c- Notion de gradient électrochimique

Potentiel de membrane: différence de potentiel électrique de la MP: fine couche d'ions au contact de la MP



II-3 Les canaux hydriques: les Aquaporines

Organisation tétramérique:
4 pores hydriques distincts.

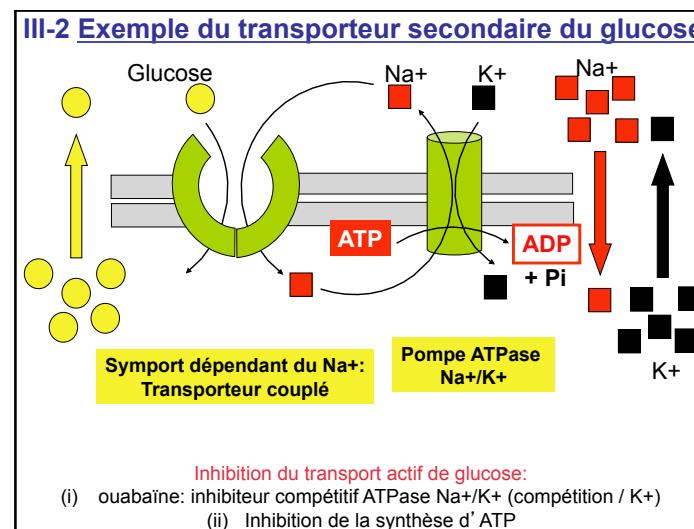
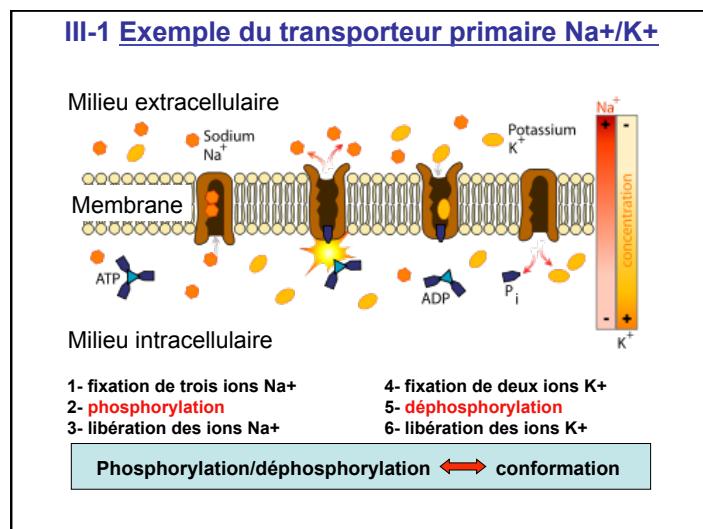
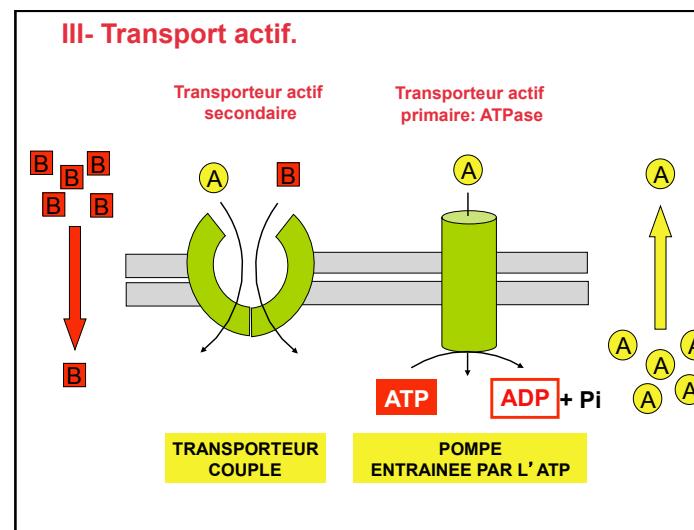
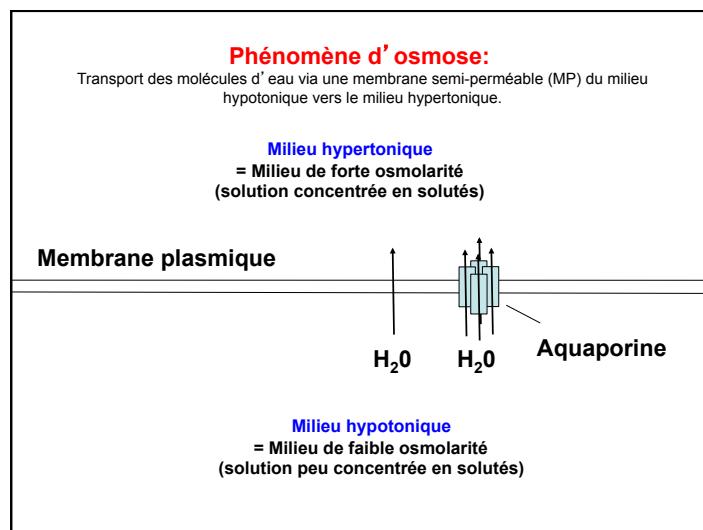


2 Résidus Asparagine:
Liaisons hydrogènes avec O de l' H_2O .
(Sélectivité du canal)

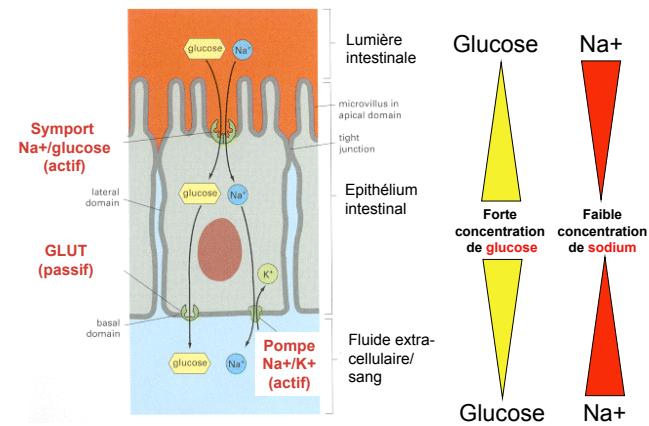
10⁹ molécules d'eau pas seconde

N.B.: imperméables aux ions.

Aquaporines: expression à la surface de nombreux types cellulaires
Expression très abondante à la surface des cellules épithéliales du rein



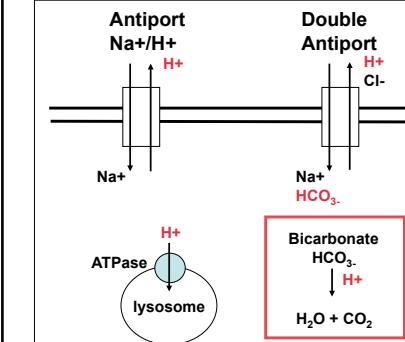
IV- Association de transporteurs actifs et passifs du glucose dans les entérocytes.



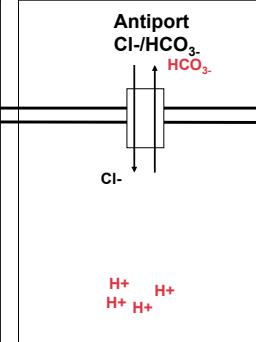
V- Transporteurs actifs et régulation du pH.

- pH cytosolique : 7.
- Métabolisme cellulaire: accumulation de H⁺.

Transporteurs permettant d'augmenter le pH cytosolique



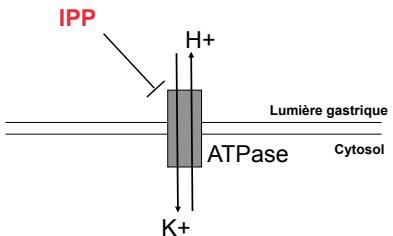
Transporteur permettant de diminuer le pH cytosolique



VI- Exemple de médicaments modulant le transport transmembranaire.

Exemple des inhibiteurs de la pompe à protons

Indication thérapeutique: Ulcère gastrique.



Communication cellulaire

A- Communications intercellulaires

- I- Communication dépendante du contact
- II- Production de médiateurs locaux
- III- Communication endocrine

B- Signalisation intracellulaire

- I- Généralités
- II- Les différents récepteurs
- III- Les différents modes de signalisation intracellulaire

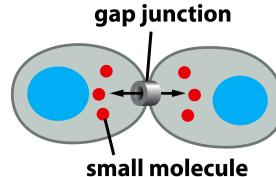
Bruno Ségui

Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

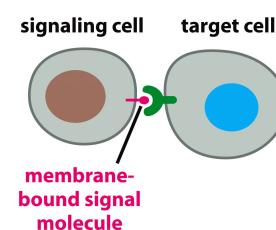
A- Communications intercellulaires

I- Communication dépendante du contact

Jonctions communicantes



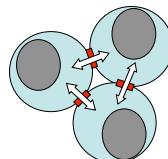
Ligand/Récepteur



I-1 Jonctions communicantes ou Gap junction

Présentes à la surface de **cellules épithéliales**, fibroblastes, cellules osseuses, cellules musculaires, neurones...

Canal: passage de solutés hydrosolubles <1,5 kDa:
. seconds messagers (Ca^{2+} , IP₃, AMPc)
. nucléotides; oses; AA
. ions (transmission influx nerveux)
. Inhibition de contact



Rôle Physiologique:

. Synchronisation fonctionnelle et métabolique des cellules d'un même tissu
. Le nombre varie en fonction des besoins:
ex. Cellules musculaires lisses de l'utérus: augmentation du nombre de jonctions communicantes: contraction synchronisée lors de l'accouchement.

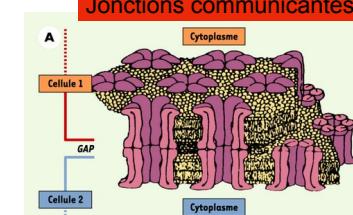
Pathologies: mutation de connexines: cancer, neuropathie, surdité

Jonctions communicantes

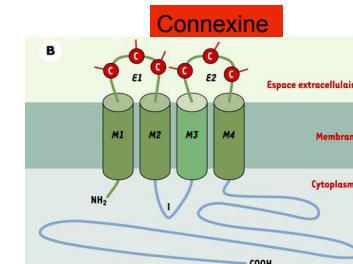
2 demi-canaux (**connexons**) associés par ponts disulfures entre cystéines.

1 connexon est formé de six **connexines**.

M1, 2, 3, 4: domaines transmembranaires
E1, 2: boucles extracellulaires
I: boucle intracellulaire
C: cystéine

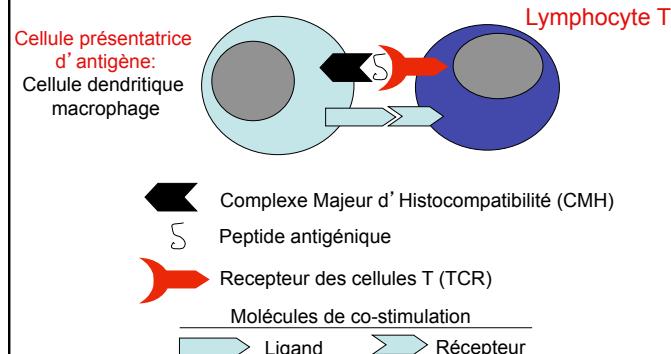


Connexine

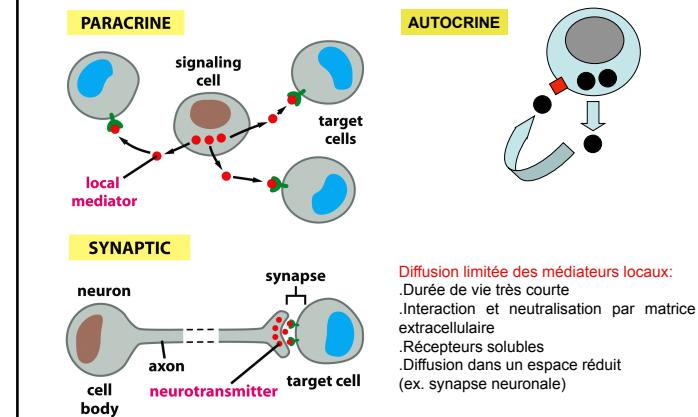


I-2 Ligand/récepteur membranaires

Exemple de l' activation des lymphocytes T



II- Communication dépendante de la production de médiateurs locaux



Exemples de médiateurs locaux

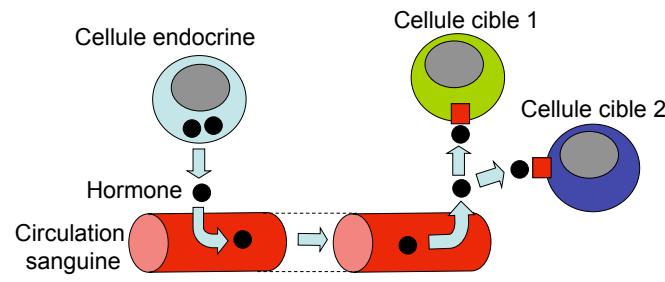
Médiateurs	Origine	Nature biochimique	Actions principales
Cytokines:	Diverses cellules	Protéine	prolifération (cancer)
EGF	cellules	Protéine	
TNF α	Monocytes Macrophages	Protéine	Inflammation (infection, autoimmunité) mort cellulaire
Histamine	Mastocyte	Dérivée de l' histidine (AA)	\uparrow perméabilité vasculaire Inflammation
NO	Cellules endothéliales	Gaz dissous	Relaxation des CML
Acétyl-choline	Neurones	Dérivé de la Choline (alcool)	Neurotransmetteur stimulant (SNP et SNC)
GABA		Dérivé de l' ac. glutamique (AA)	Neurotransmetteur Inhibiteur (SNC)

EGF: Epidermal Growth Factor NO: Monoxyde d'azote
TNF: Tumor Necrosis Factor GABA: Ac. γ -aminobutyrique
CML: Cellules Musculaires Lisses

III- Communication endocrine

Hormone:

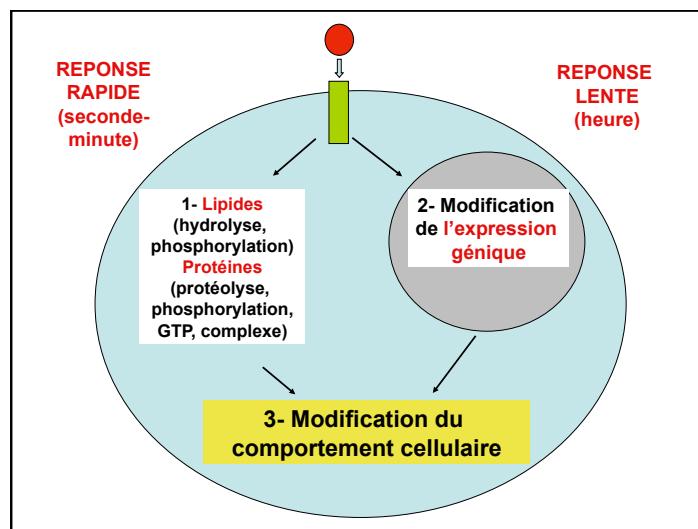
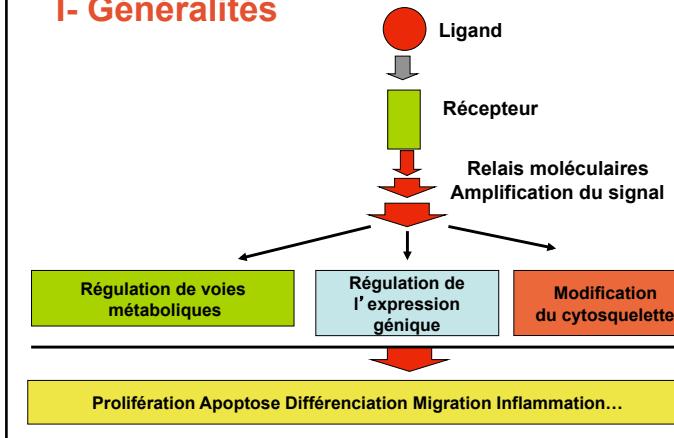
- Molécule (dérivée d' AA, peptides, protéines, lipides) sécrétée dans le sang par une **glande endocrine**.
- Action à distance après interaction avec récepteurs de haute affinité.



Exemples d' hormone			
Hormones	Origine	Nature biochimique	Actions principales
Adrénaline	Surrénale	Dérivée de la Tyrosine (AA)	↑ pression artérielle, ↑ rythme cardiaque,
Glucagon	Pancréas	Peptide	↑ glycogène → glucose
Insuline	Pancréas	Protéine	↑ captation glucose ↑ glucose → glycogène
Estradiol	Ovaire	Stéroïde (dérivé du cholestérol)	Caractères sexuels secondaires
Testostérone	Testicule		

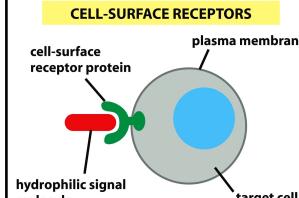
B- Signalisation intracellulaire

I- Généralités



II- Les différents récepteurs

Ligands hydrophiles

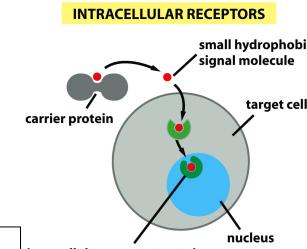


N.B. Monoxyde d'azote (N.O.)

- diffusion simple via MP
- pas de récepteur
- S-Nitrosylation des protéines intracellulaires



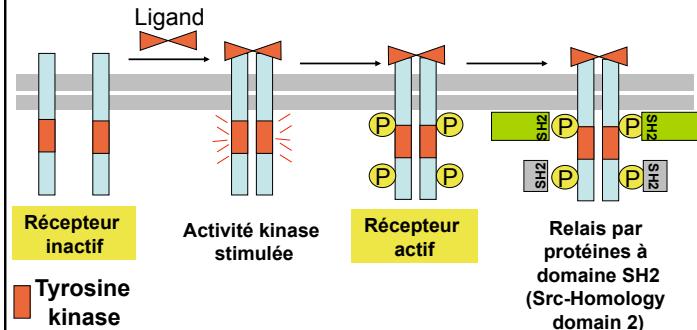
Ligands hydrophobes



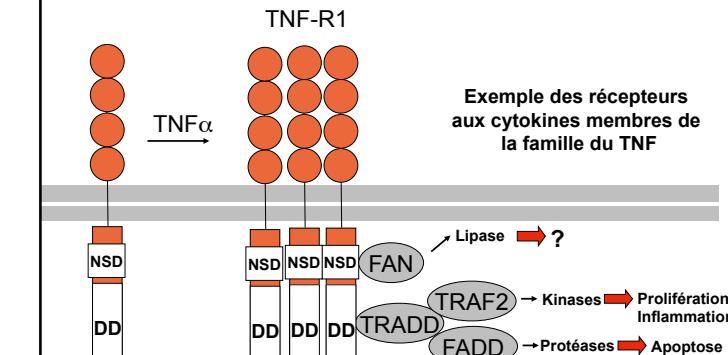
- Ex. Hormones stéroïdiennes:
- transport sanguin par Albumine
 - récepteur cytosolique (avant stimulation), nucléaire (après stimulation)

II-1 Les récepteurs à activité enzymatique intrinsèque

Exemple des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, VEGFR, PDGFR...) à activité Tyrosine kinase intrinsèque.

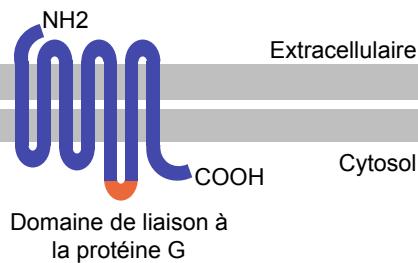


II-2 Les récepteurs couplés aux protéines adaptatrices

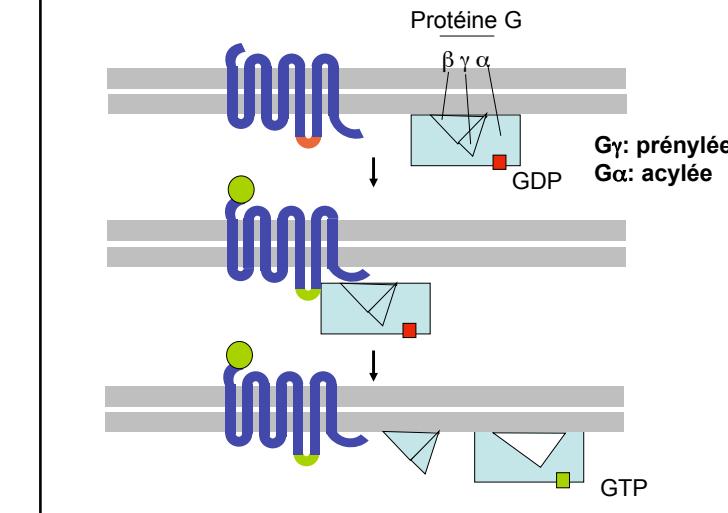


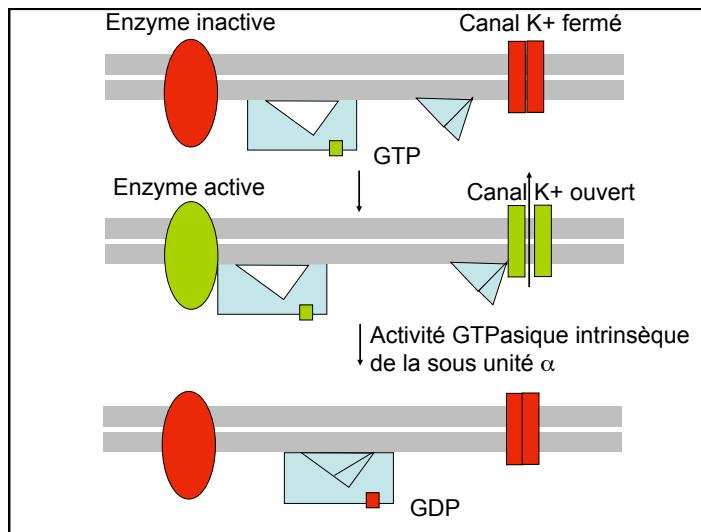
II-3 Les récepteurs couplés à une protéine G

- . Protéine G: protéine liant le GTP (guanosine triphosphate)
- . Plus grande famille de récepteurs (plus de 1000 gènes)
- . Ligands: dérivés d' AA, peptides, protéines, lipides, nucléotides, ions, photons, molécules odoriférantes.
- . 7 domaines transmembranaires



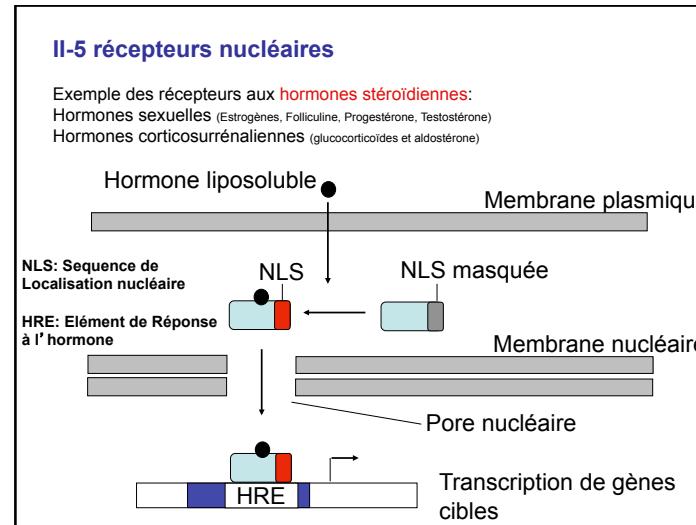
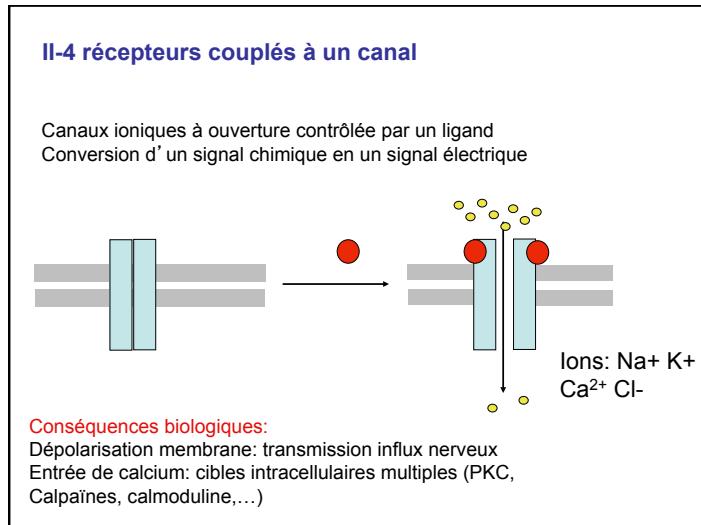
Protéine G

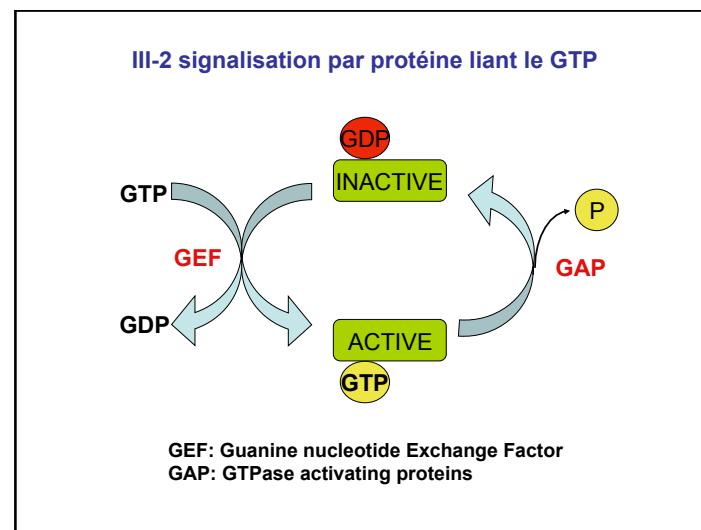
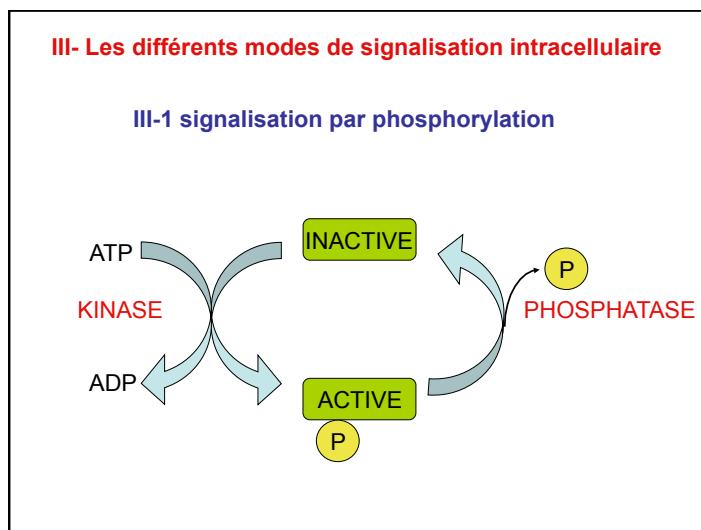
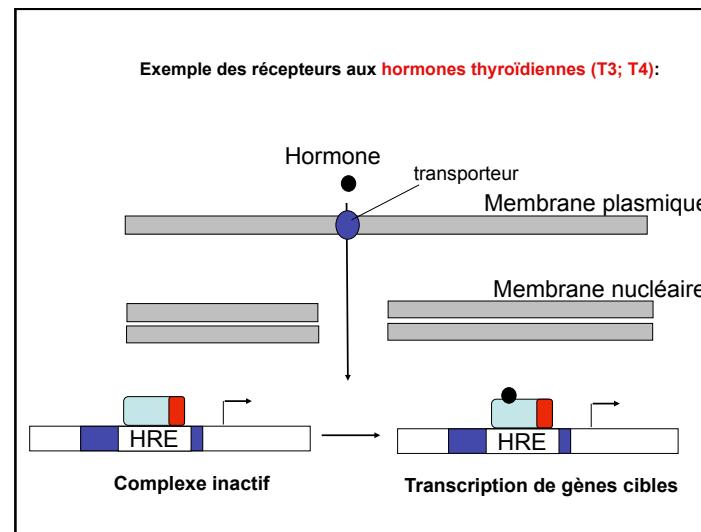
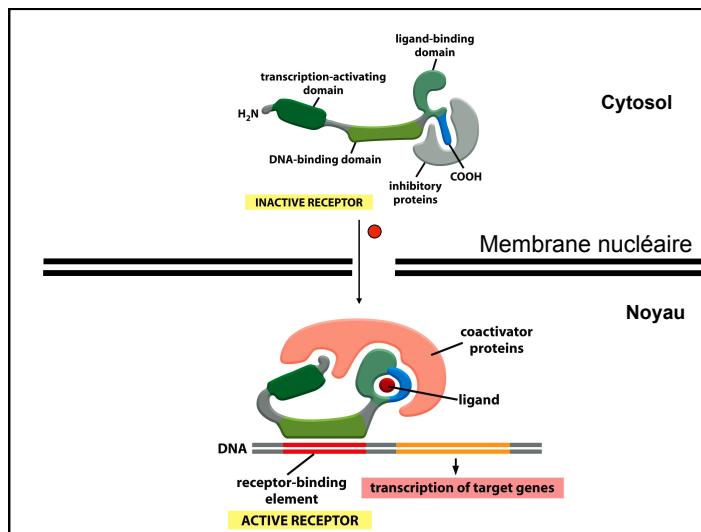


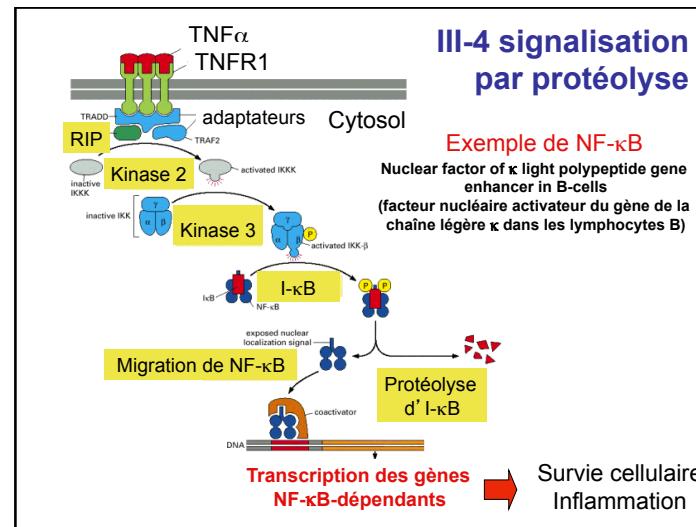
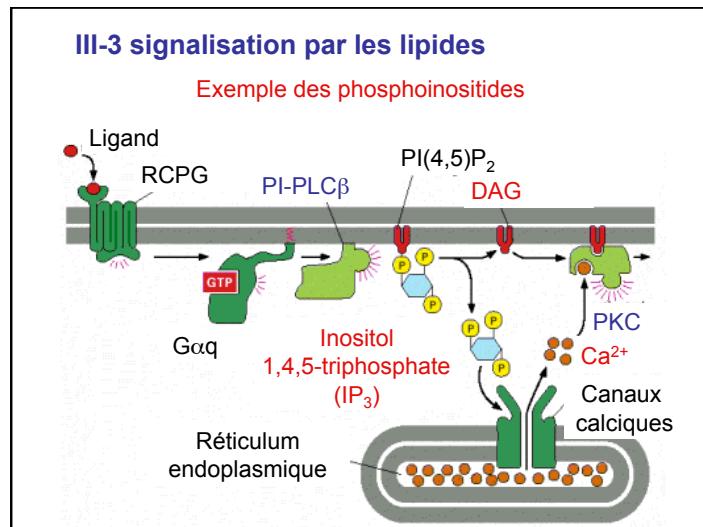
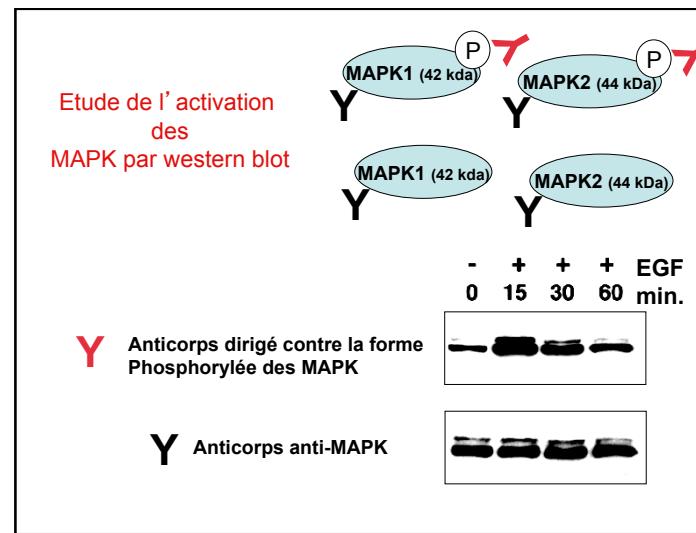
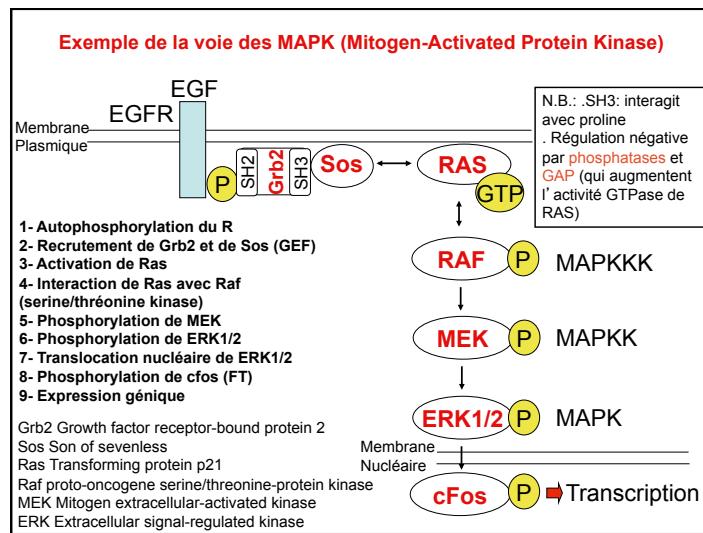


Exemples de cibles des sous-unités G α			
Sous-unités	Cibles	Second messagers	Conséquences
G α s	+ Adénylate cyclase	↑AMPc	+PKA
G α i	- Adénylate cyclase	↓AMPc	-PKA
G α q	+ PI(4,5)P ₂ -PLC β	↑IP ₃ ↑DAG	↑calcium +PKC

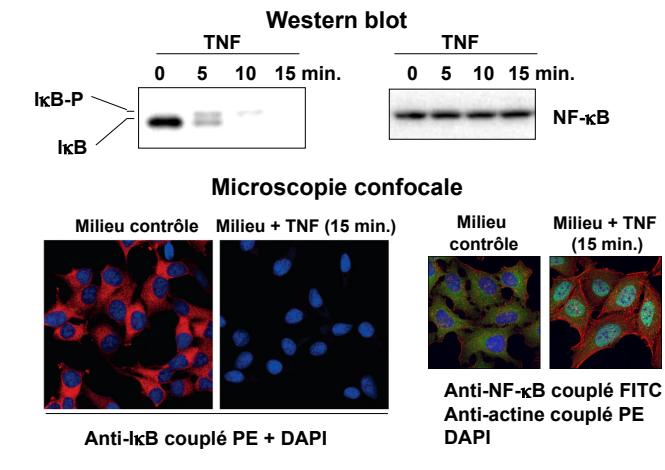
AMPc: Adenosine monophosphate cyclique
PI(4,5)P₂: Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PLC β : Phospholipase C β
IP₃: Inositol tri phosphate
DAG: diacylglycérol
PKA/C: Protéine kinase A/C



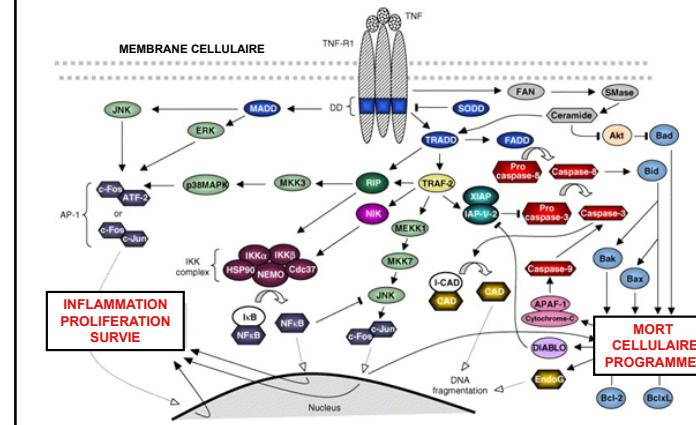




Etude de l'activation de NF-κB



III-5 Interconnexions des voies de signalisation et conséquences biologiques

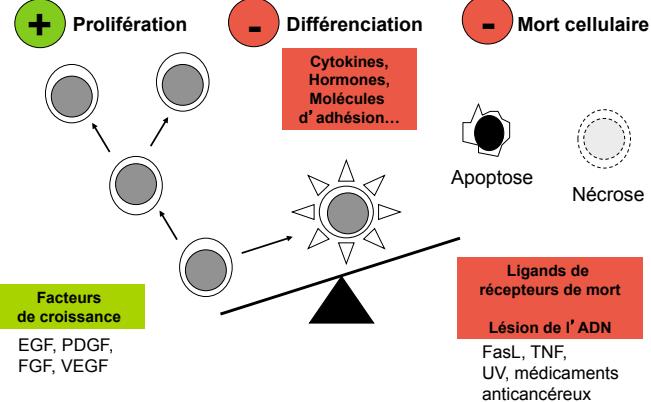


LA PROLIFERATION CELLULAIRE

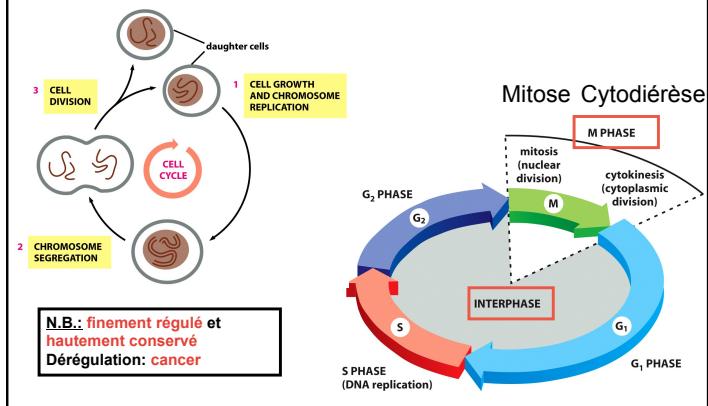
- I- Le cycle cellulaire: définition
- II- L'interphase
- III- La phase M
- IV- Répartition des organites
- V- Régulation du cycle cellulaire
- VI- Cycle cellulaire et vieillissement
- VII- Cycle cellulaire et cancer
- VIII- Techniques d'étude de la prolifération cellulaire

Bruno Séguier
 Professeur de Biologie Cellulaire
 Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
 Faculté des Sciences Pharmaceutiques
 Université Paul Sabatier, Toulouse III

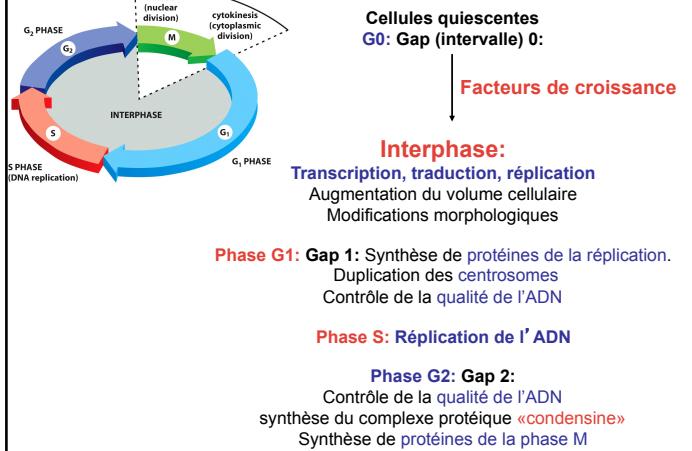
Homéostasie d'un tissu

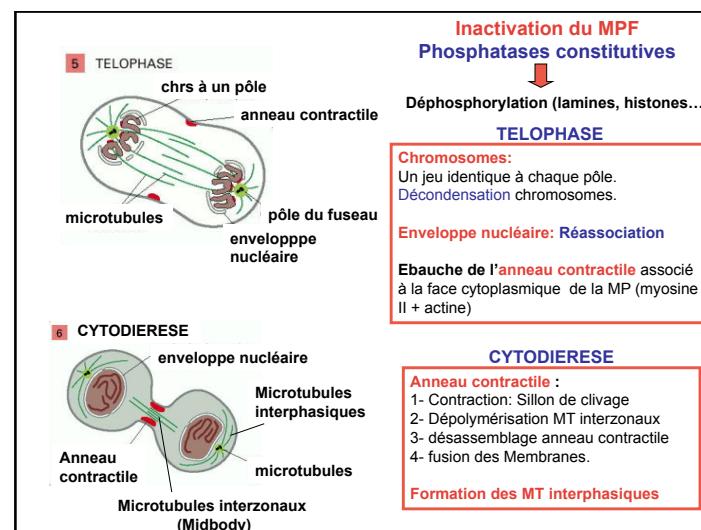
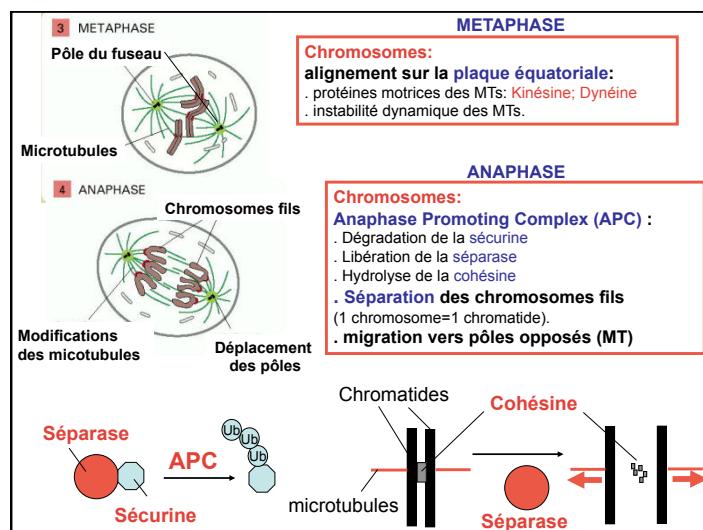
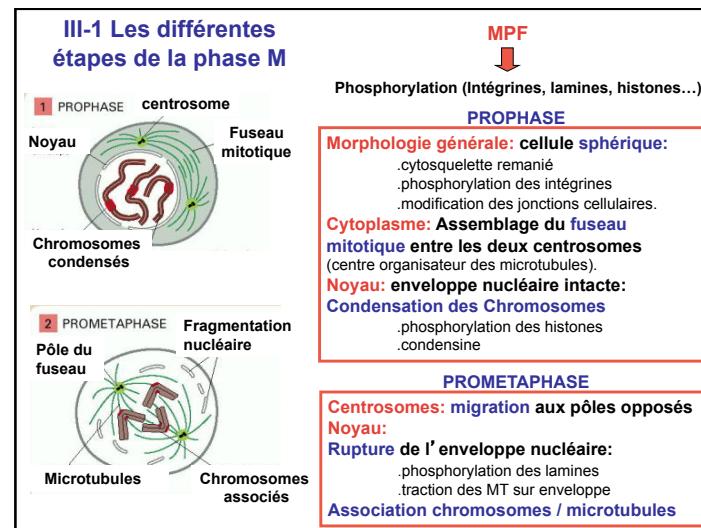
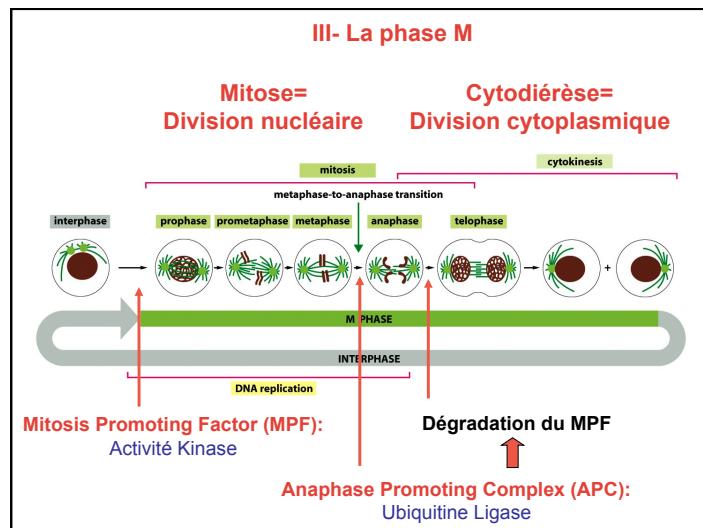


I- Le cycle cellulaire: définition

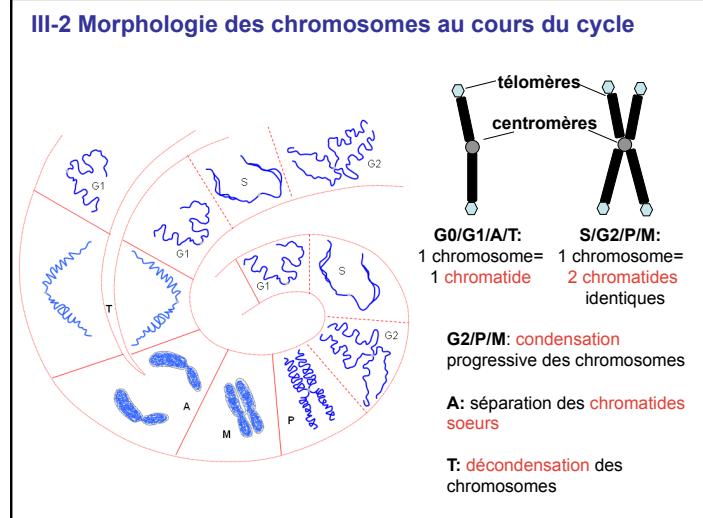


II- L'interphase

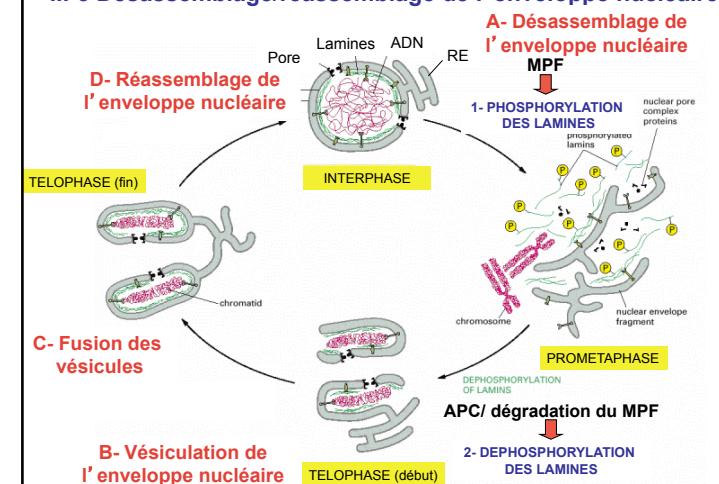




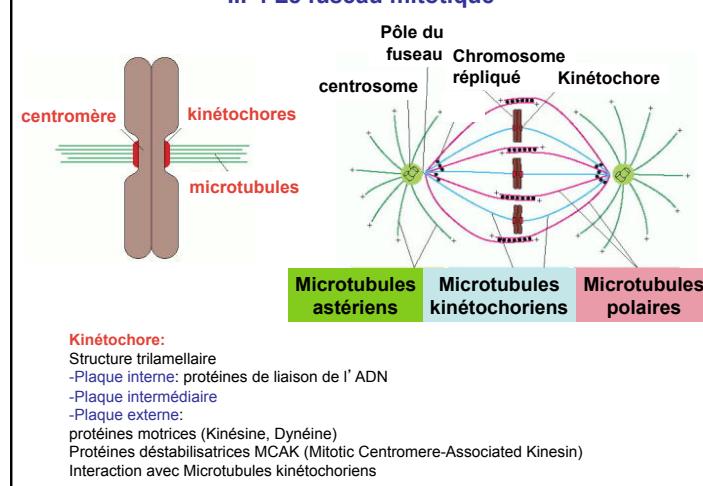
III-2 Morphologie des chromosomes au cours du cycle



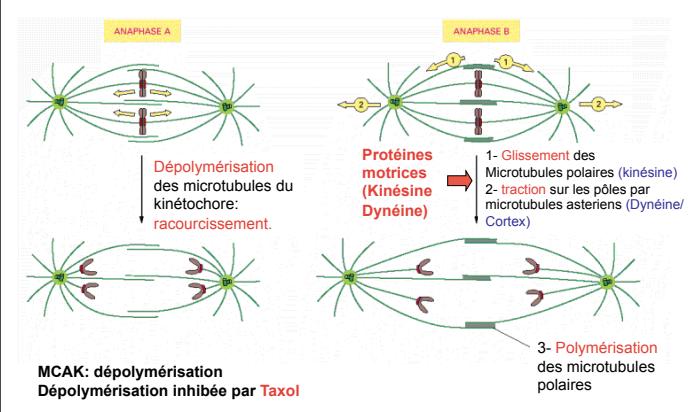
III-3 Désassemblage/réassemblage de l'enveloppe nucléaire



III-4 Le fuseau mitotique



Instabilité dynamique des microtubules + protéines motrices: ségrégation des chromosomes: Anaphase.



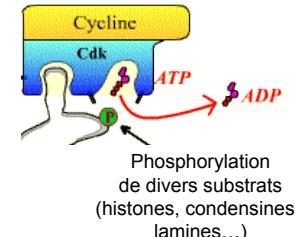
IV- Répartition des organites

- . Les organites proviennent de la croissance et de la division d'organites existants.
- . Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi se morcellent en de petits fragments au cours de la mitose.
- . Les organites, les fragments du RE et de l'AG se répartissent aléatoirement dans la cellule en cours de division
- . Les organites se répartissent plus ou moins également entre les deux cellules filles.

V- Régulation du cycle cellulaire

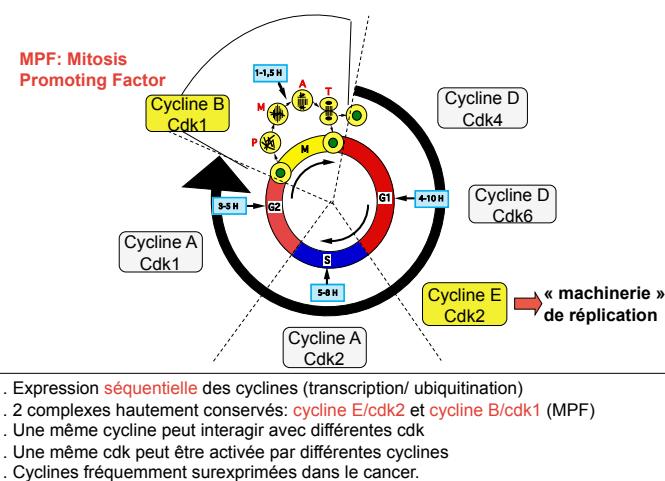
V-1 Les complexes cdk/cyclines

Cdk: Cyclin-dependent kinase
sérine-thréonine kinases dépendantes des cyclines



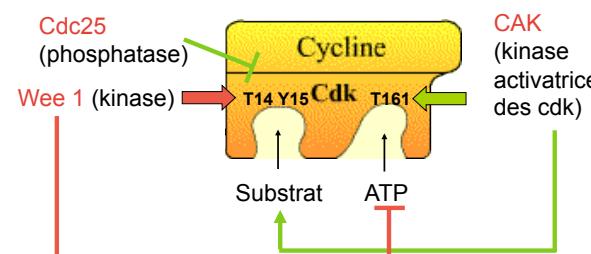
- . Réplication de l' ADN
- . Compaction des chrs
- . Dissociation de l'enveloppe nucléaire
- ...

V-2 Formation séquentielle de complexes cdk/cyclines



V-3 Régulation de l'activité des cdk par phosphorylation

- . phosphorylation activatrice: cdk1 T161
- . phosphorylation inhibitrice/ déphosphorylation activatrice: cdk1 T14 et Y15

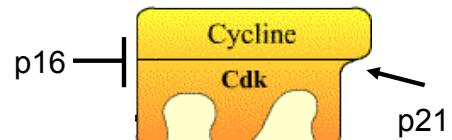


V-4 Inhibition des complexes cdk/cyclines par les CKI

CKI: cyclin-dependent kinase inhibitor:

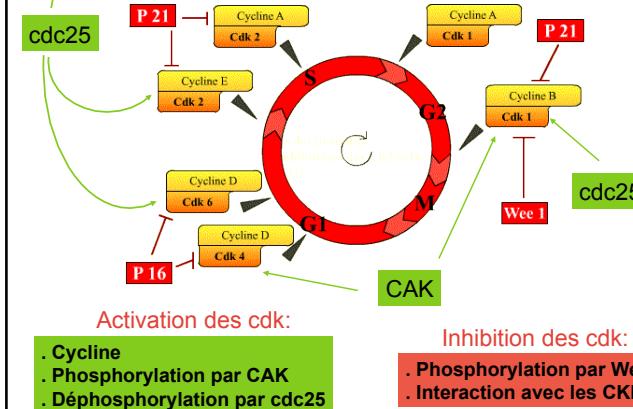
Famille p16 (p16, p15, p18, p19): compétition versus cycline D.

Famille p21 (p21, p27, p57): inhibiteur universel de l'activité cdk.

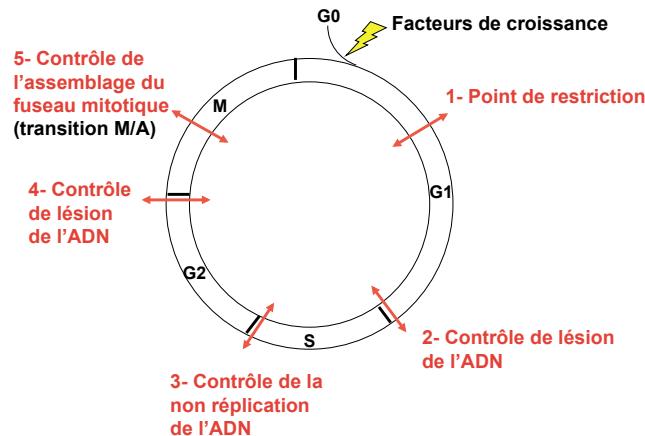


- . Mutation inactivatrice des CKI: cancer
- . Ex. mutation de p16: mélanomes malins

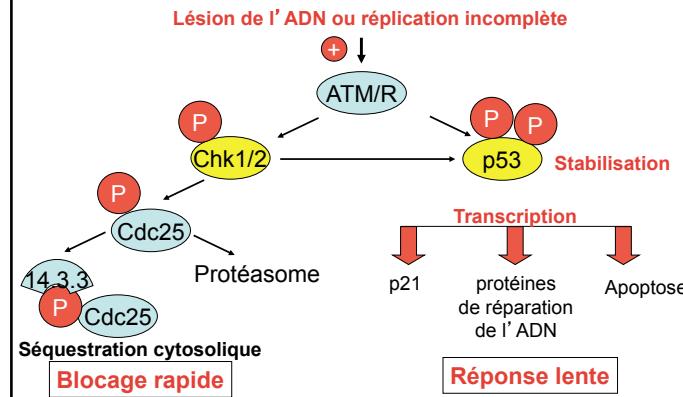
V-5 Les différents systèmes de régulation des complexes cdk-cyclines



V-6 Les principaux points de contrôle du cycle cellulaire



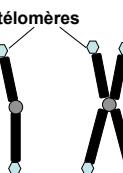
Exemple du contrôle des lésions et de la réplication de l'ADN



VI- Cycle cellulaire et vieillissement (sénescence)

Le nombre de division des cellules humaines est limité (~100)

- Activation de p53
- ↑ expression des CKI (p16, p21) et β -galactosidase (marqueur)
- ↓ expression des télomérases:
 - Reverse transcriptase: sous-unité protéique (transcriptase inverse) + ARN complémentaire de la séquence TTAGGG
 - synthèse des télomères (séquences TTAGGG répétées)
- ↓ télomères : perte d'environ 100 pb par cycle
- Forte activité télomérase:**
 - dans les cellules souches: autorenouvellement.
 - dans les cellules cancéreuses: immortalité.



VII- Cycle cellulaire et cancer

Surexpression d' oncogènes (protéines pro-prolifératives):

- Protéines de la voie des MAPK
- Cycline
- ...

Inactivation de suppresseurs de tumeur (protéines anti-prolifératives):

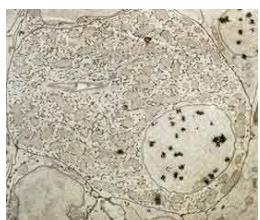
- p53
- CKI
- ...

Prolifération non contrôlée des cellules cancéreuses

VIII- Techniques d' étude de la prolifération cellulaire

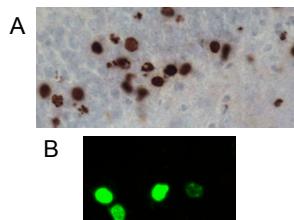
VIII-1 analogue de la thymidine (nucléoside)

. Incorporation dans l' ADN en cours de réplication.



. Pulse de thymidine tritiée puis analyse par autoradiographie en microscopie électronique.

. Mesure de la radioactivité incorporée sur ADN précipité

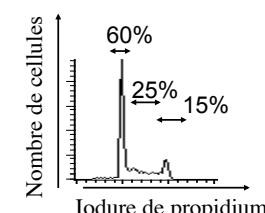
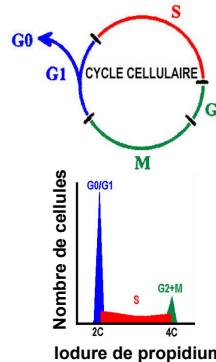


. Pulse de Bromo-deoxyuridine (BrdU)

. Révélation avec un anti-BrdU couplé à la peroxydase (A) ou à un fluorochrome (B).

VIII-2 cytométrie en flux

- Incubation de cellules perméabilisées avec de l' iodure de propidium (agent fluorescent et intercalant de l' ADN)
- Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux.



LA MORT CELLULAIRE

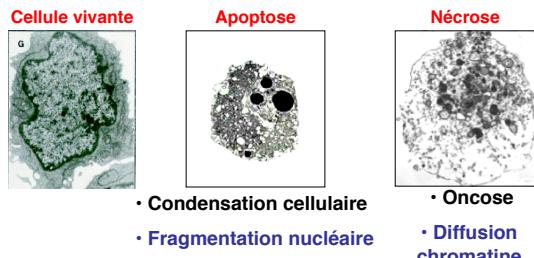
- I- Mort cellulaire et physiopathologie
- II- Nécrose/apoptose
- III- Les différentes caspases de l' apoptosis
- IV- Mode d' activation des caspases
- V- Exemples de substrats des caspases
- VI- Principales techniques d' étude de la mort cellulaire

Bruno Ségui
Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

II- Nécrose/apoptose

Nécrose: mort accidentelle caractérisée par l' altération de la perméabilité des membranes.
Apoptose (mort cellulaire programmée): caractérisée par l' activation de mécanismes intracellulaires hautement conservés

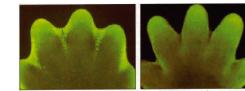
II-1 Nécrose/apoptose, principales caractéristiques morphologiques



I- Mort cellulaire et physiopathologie

- Permet la régulation de l' homéostasie d' un tissu et l' élimination:

- . des cellules indésirables-inutiles ⇒ sculpture de l' organisme au cours du développement
- . des cellules endommagées
- . des cellules infectées



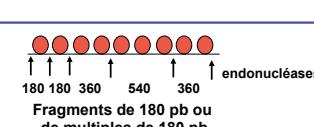
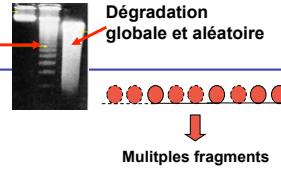
- Mort cellulaire excessive

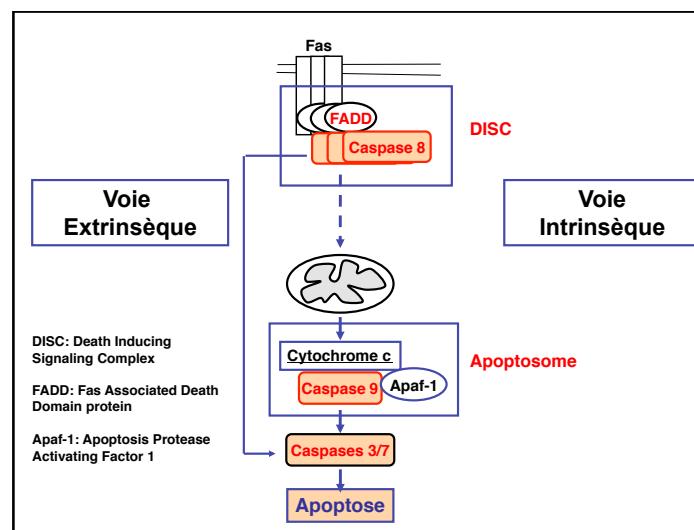
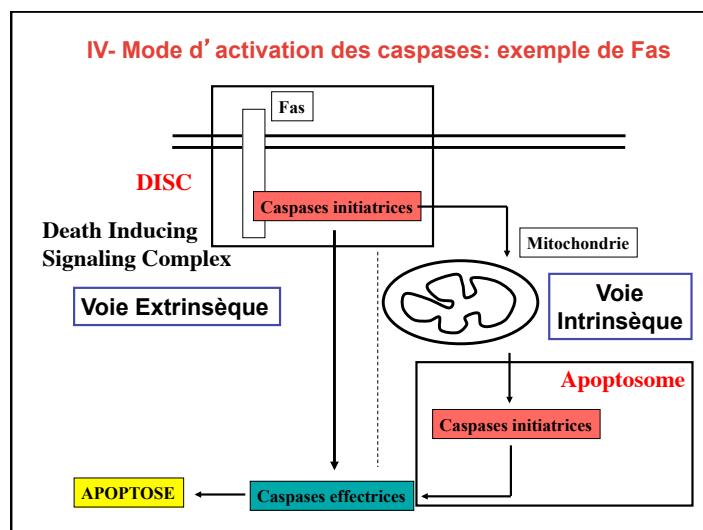
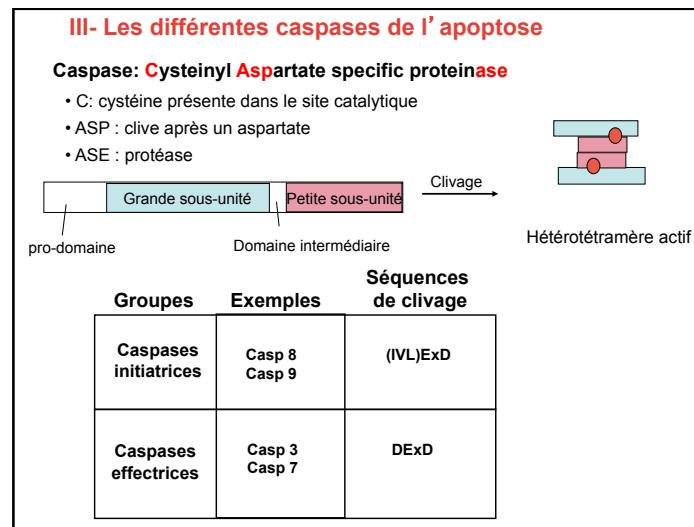
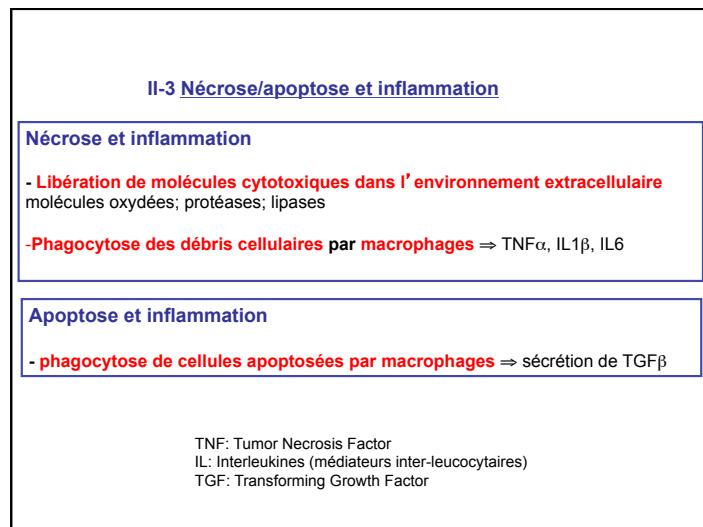
- . Maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, ...)
- . Accidents cardiovasculaires
- . SIDA

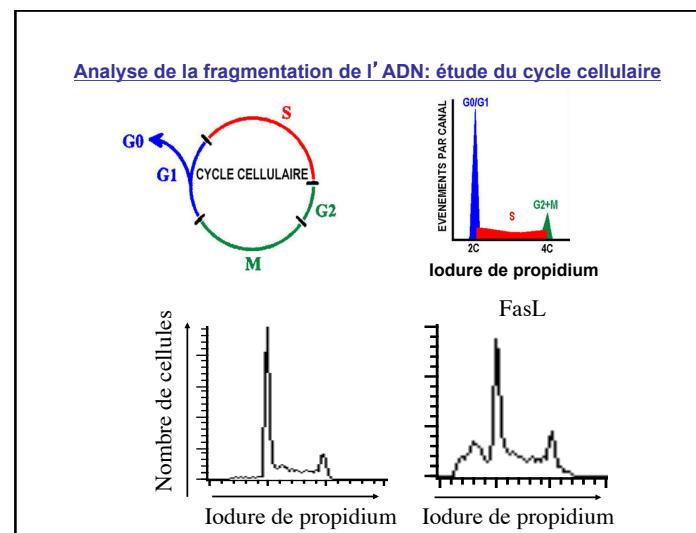
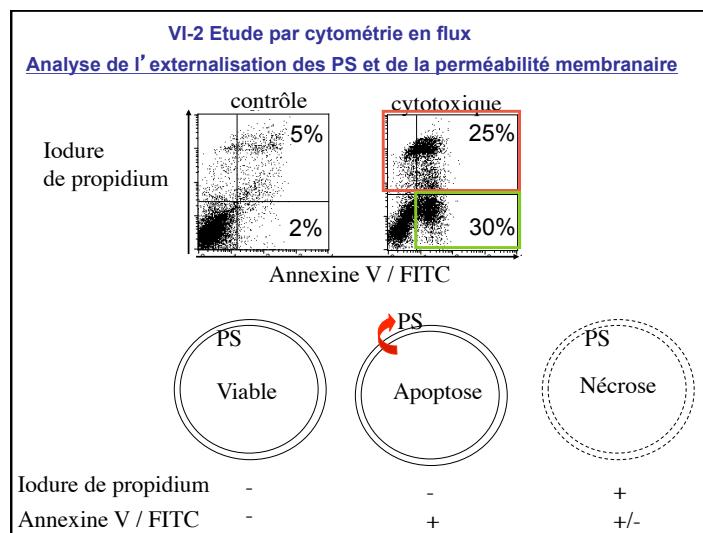
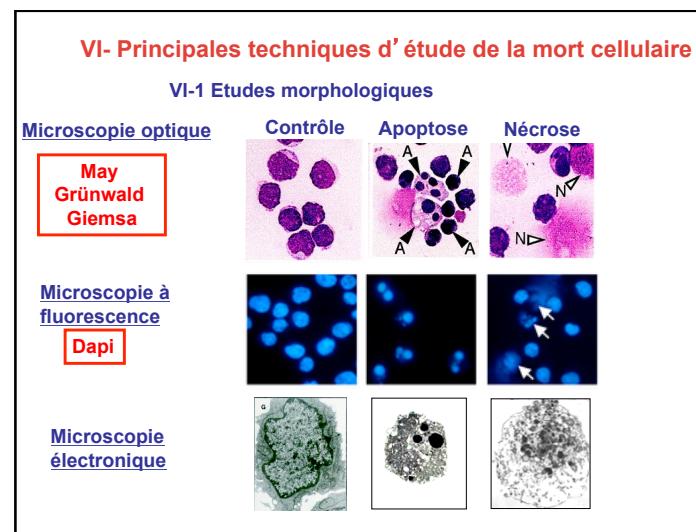
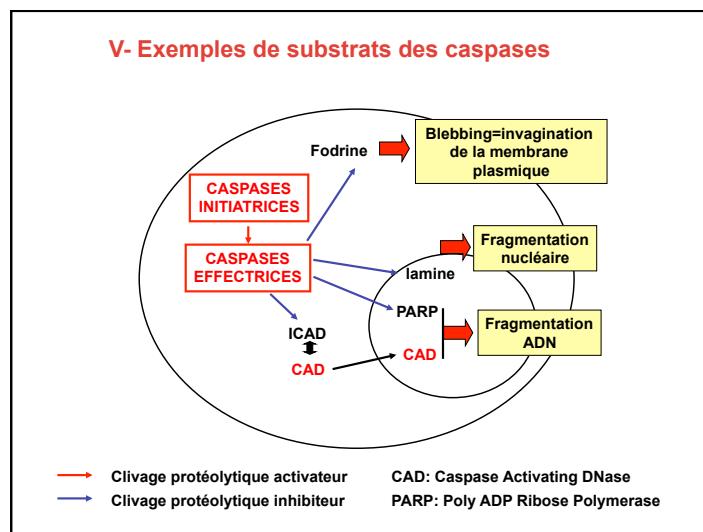
- Mort cellulaire défective

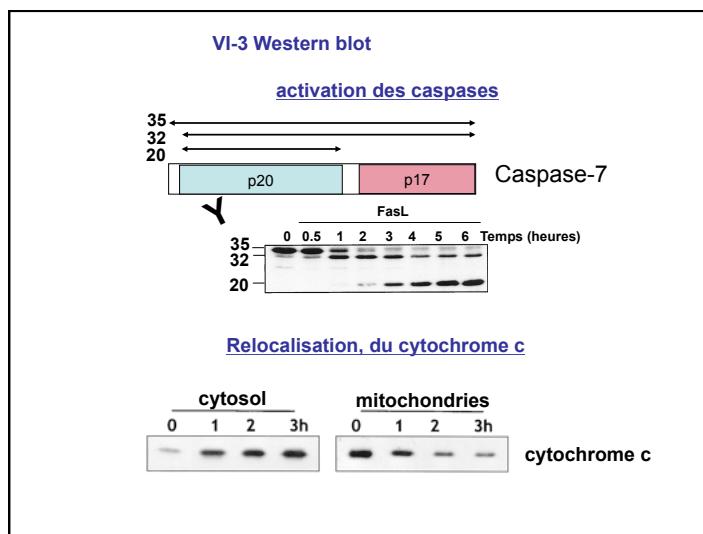
- . cancers
- . maladies auto-immunes
- . infections virales

II-2 Nécrose/apoptose, principales caractéristiques biochimiques

	Apoptose	Nécrose
Membrane	Externalisation de PS	oxydation lipidique et protéique; rupture
Organites	perméabilité modérée mitochondrie ($\downarrow \Delta\psi$)	oxydation lipidique et protéique Vacuolisation
Signalisation	caspases	Espèces réactives de l' oxygène (ROS) Reactive Oxygen Species
ADN	Fragmentation internucléosomale	Dégénération globale et aléatoire
	 Fragments de 180 pb ou de multiples de 180 pb endonucléases	 Multiples fragments







L1 PACES site Maraîchers  UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

UE2 : la cellule et les tissus
Partie Biologie cellulaire

MOLECULES d'ADHERENCE

Cours A.D Terrisse
2018 - 2019

Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie

Plan du cours

- I - Présentation générale des molécules d'adhérence
- II - Cadhérines a) définition
 b) rôle biologique
- III - Sélectines a) définition
 b) rôle biologique
- IV - Immunoglobulines a) définition
 b) rôle biologique
- V - Intégrines a) définition
 b) rôle biologique
- VI - Coopération séquentielle des molécules d'adhérence
- VI - Migration cellulaire
- VII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence
- VIII - Méthodes d'études

I- Présentation générale des molécules d'adhérence

Introduction :

- communication avec l'environnement cellulaire

Reconnaissance spécifique

Récepteurs Transmembranaire

I- Présentation générale des molécules d'adhérence

Fonctions :

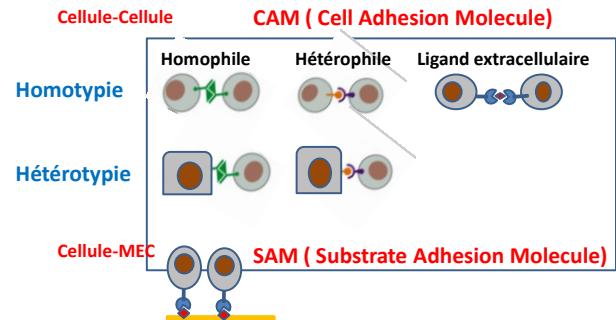
- Cohésion cellulaire
- Mobilité cellulaire
- Communication

Rôles des molécules d'adhérence :

- Formation des Tissus, cohésion des organes
- Entretien des tissus
- Signalisation intracellulaire

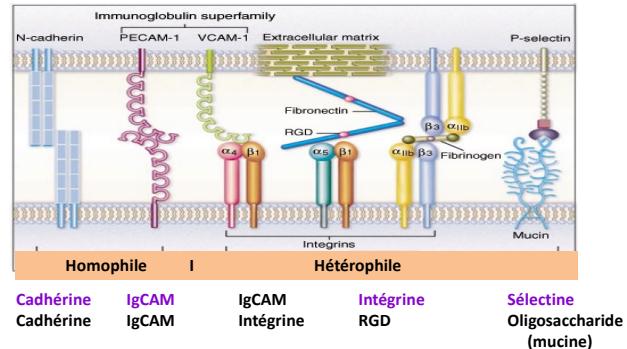
I- Présentation générale des molécules d'adhérence

Types d'interactions

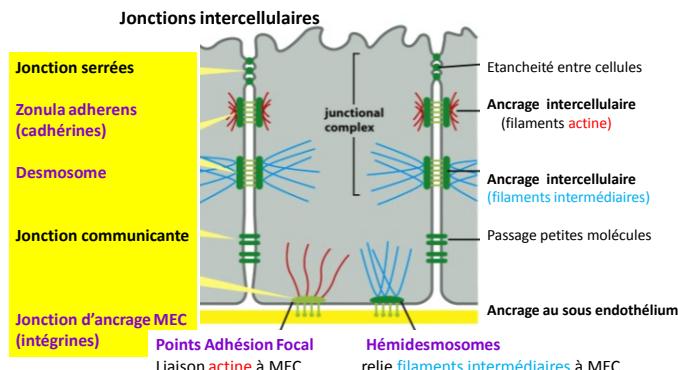


I- Présentation générale des molécules d'adhérence

4 super familles

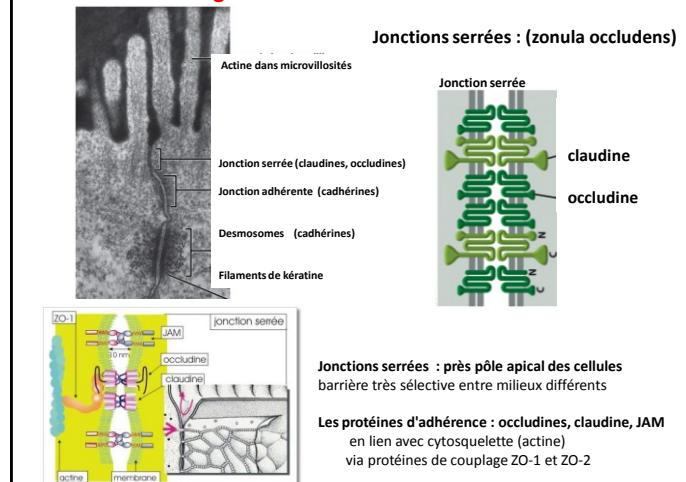


I- Présentation générale des molécules d'adhérence



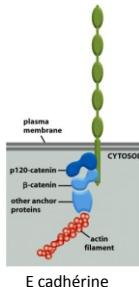
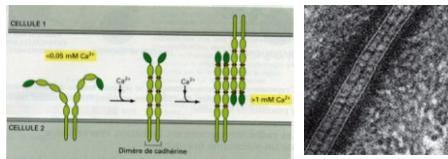
I- Présentation générale des molécules d'adhérence

Jonctions serrées : (zonula occludens)



II- Cadhérines

a- définition : (calcium-dependent-Adherin)



Liaison :

- avec cadhérine cellule voisine
- calcium dépendante

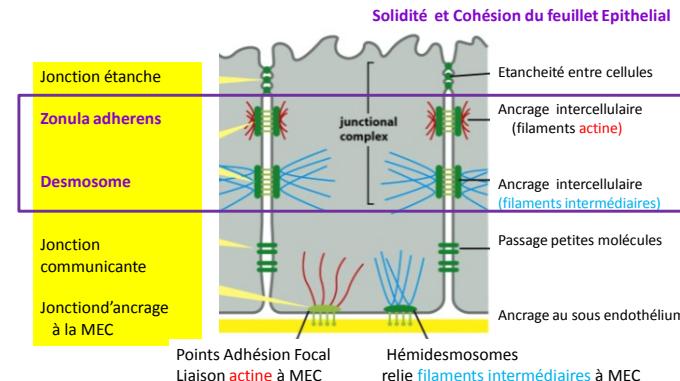
Structure :

Domaine Extracellulaire: motifs répétitifs
Absence de Ca++ : dissociation domaine EC

Domaine cytoplasmique : liaison cytosquelette (actine) via protéines de couplage : α et β caténines.

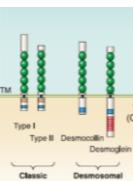
II- Cadhérines

b- Rôle : Cohésion Tissulaire



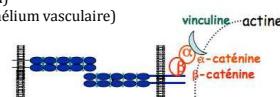
II- Cadhérines

b- Rôle : Solidité et Cohésion du feuillet Epithelial



Cadhérines classiques (zonula adherens)

E-cadhérine (épithéliale)
N-cadhérine (mésoderme, ectoderme)
P-cadhérine (placenta)
VE-cadhérine (endothélium vasculaire)



Cadhérines desmosomales

desmosomes



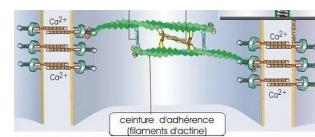
- Domaine EC : Desmogleine –Desmocolline
- Domaine cytoplasmique : plaque fibreuse (plakoglobin , plakophilin) liée à desmoplakine qui insère filaments intermédiaires

II- Cadhérines

b- Rôle : Solidité et Cohésion du feuillet Epithelial

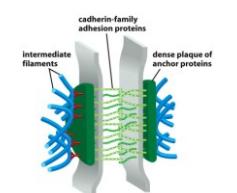
Zonula adherens :

E-cadhérine - E-cadhérine
cohésion intercellulaire via filaments actine



Desmosome

Desmocolline - Desmogleine
cohésion intercellulaire via filaments intermédiaires



points focaux entre cellules
filaments intermédiaires
(kératine dans épithéliums)

Résistance verticale

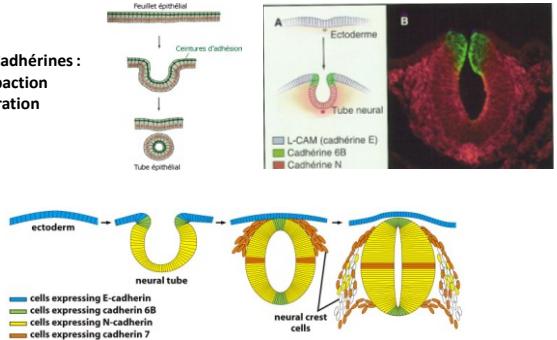
Résistance horizontale

II- Cadhérines

b- Rôle : Formation des tissus

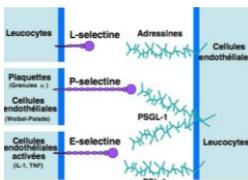
Embryogénèse: Formation Tube neural

Role des Cadhérines :
Compaction
Migration



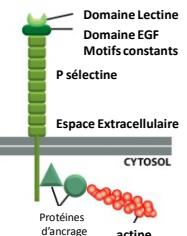
III- Sélectines

a- définition Compartiment vasculaire



Glycoprotéines membranaires
A la surface d'une cellule vasculaire (glycoprotéine ou glycolipide)

Liaison : Calcium dépendante



Structure :

Domaine Extracellulaire:

L : lectine : liaison sucres

E : EGF

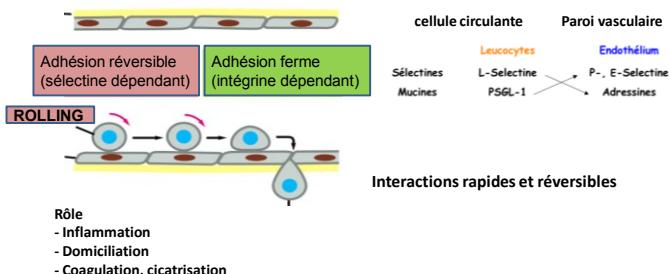
C : motifs constants et répétitifs: selon nombre L, P ou E sélectines

Domaine cytoplasmique : liaison actine

III- Sélectines

b- Rôle : Interactions entre paroi et cellules sanguines

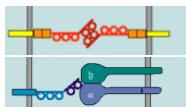
-> ralentissement cellules circulantes par « rolling »



Rôle
- Inflammation
- Domiciliation
- Coagulation, cicatrisation

IV- Immunoglobulines (CAM)

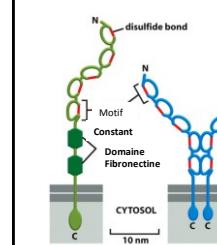
a- définition Interactions homophiles ou hétérophiles calcium indépendantes



Protéines transmembranaires

Liaison : Homophile (NCAM, VCAM, PECAM)

Hétérophile : Intégrines, Protéoglycans à héparanne sulfate



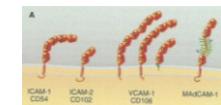
Structure :

Domaine Extra Cellulaire N terminal:

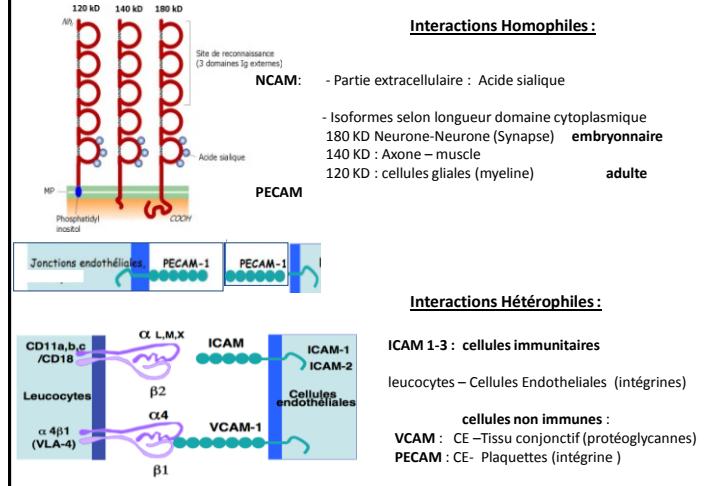
- motifs constants et répétitifs : Boucle de 110 aa

Domaine cytoplasmique : court :

Isoformes selon longueur

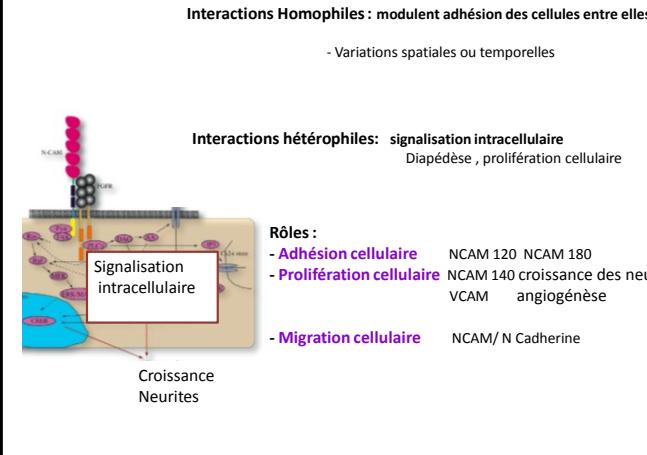


IV- Immunoglobulines (CAM)



IV- Immunoglobulines (CAM)

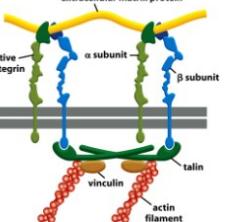
b- rôle



V- Intégrines

a- définition

Interactions hétérophiles

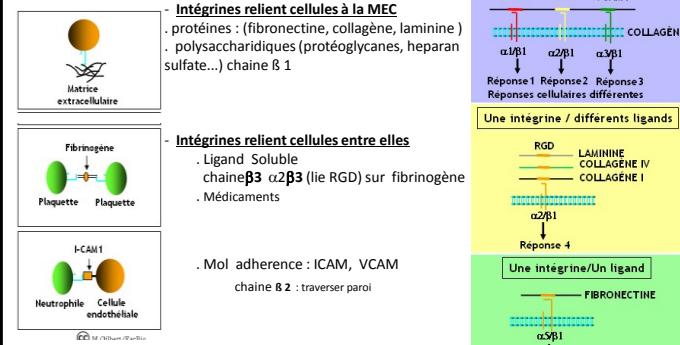


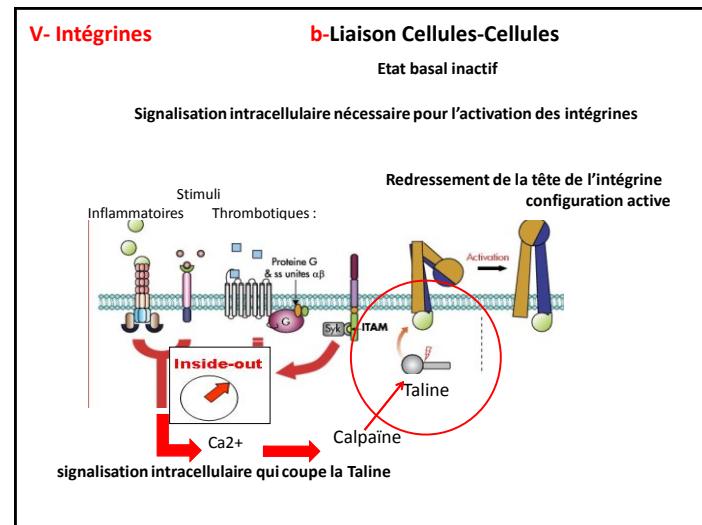
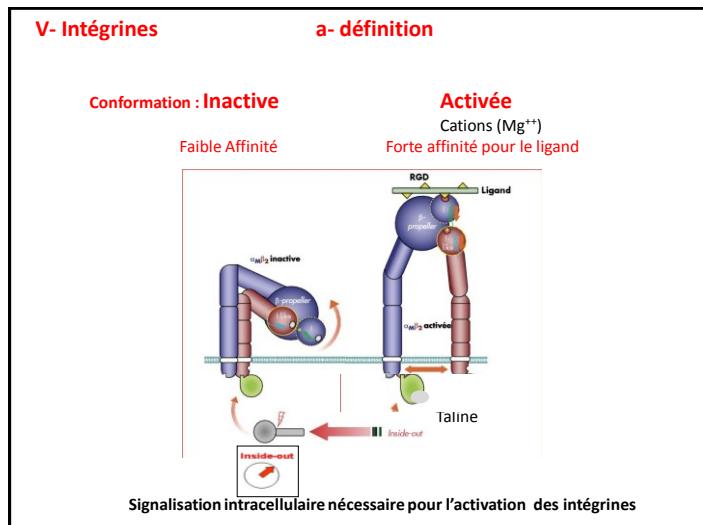
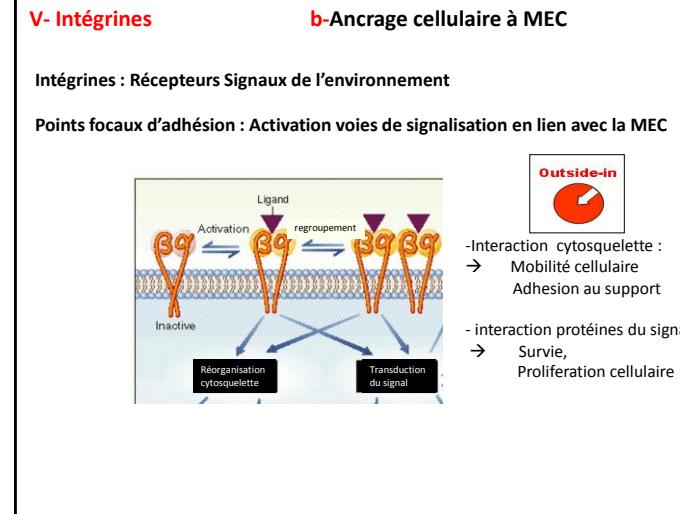
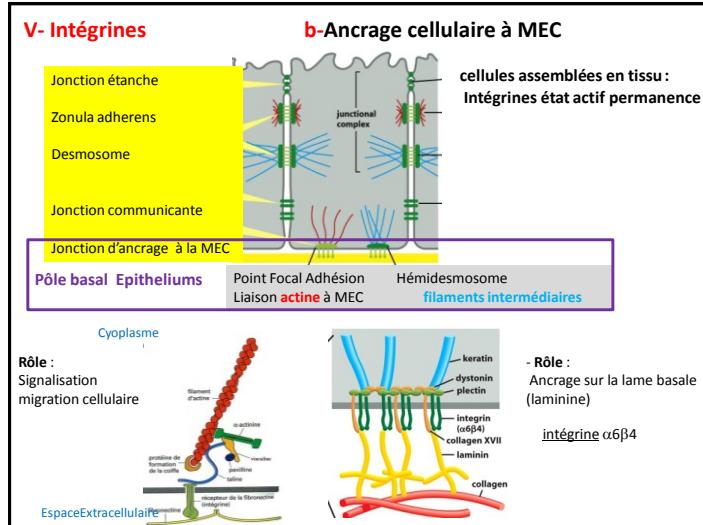
V- Intégrines

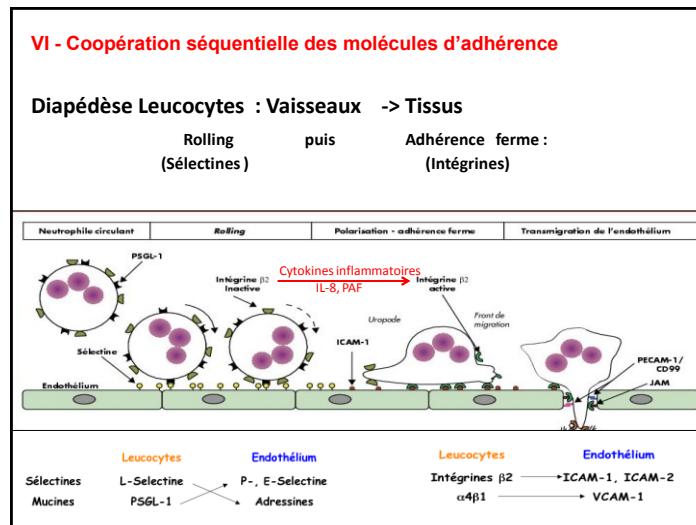
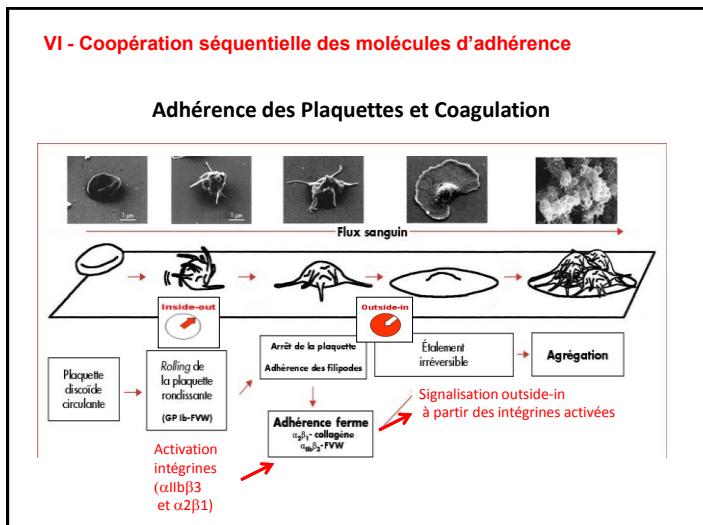
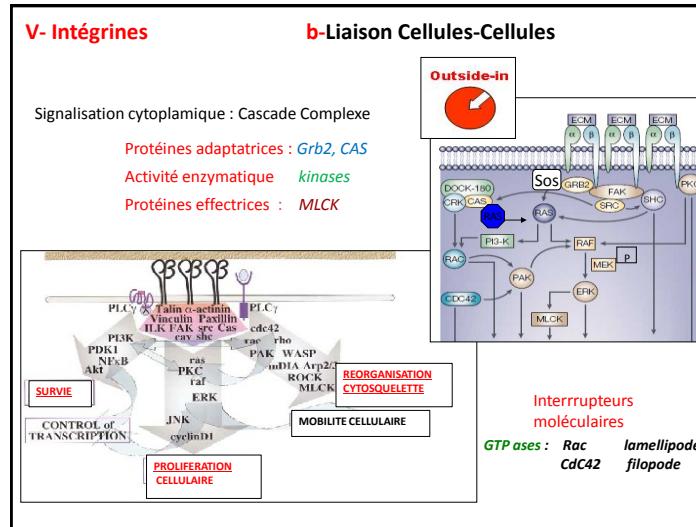
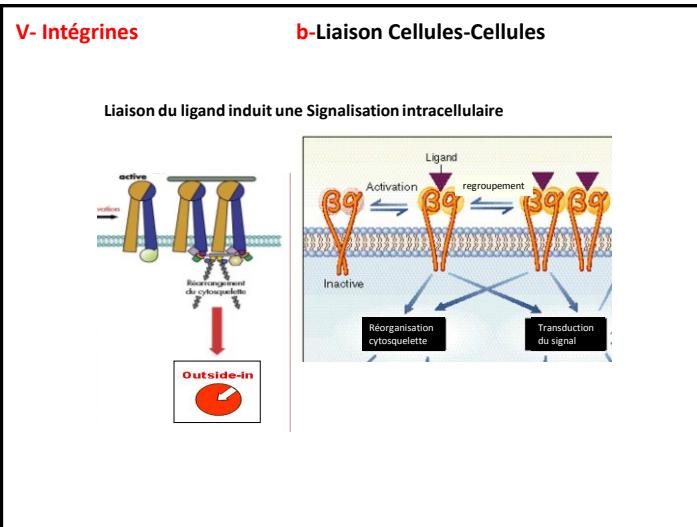
a- définition

Reconnaissance : ligand
Calcium ou magnésium dépendante

LIGANDS DES INTÉGRINES







VII- Migration cellulaire

MIGRATION CELLULAIRE

Pourquoi?

Organisation des tissus en réponse aux besoins :
Assemblage et Développement
Entretien des tissus

Comment ?

Processus coordonnés dans l'espace et le temps

Des molécules qui collent

Adhésines
Intégrines
Cadherines
Sélectines
Super famille Ig

des molécules qui attirent

Chimiokines
- solubles :
- à la surface de la MEC (Glycoaminoglycannes)
oligomérisation des chimiokines -> gradient
- des cellules mortes

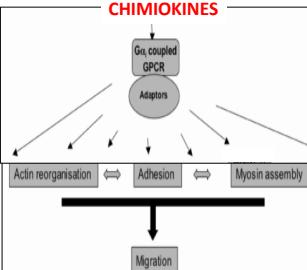
VII- Migration cellulaire

Interaction
chimiokine CXC
+
récepteur CXCR
(RCPG)

CHIMIOKINES

Gα_i couplé
GPCR
Adaptors

Signalisation



Chimiokine

Protéines basiques de 6-17 kD
- pont disulfure entre 2 (ou 4) Cystéines

C

C

• chimioquine CC
• CXC
• CX₃C

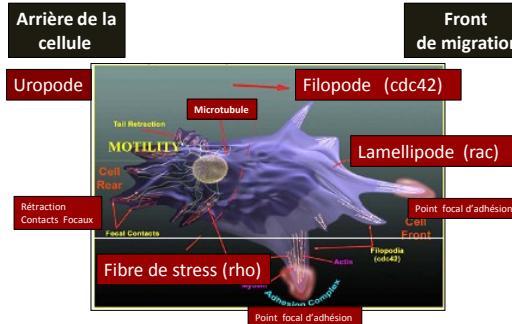
Rôle : Active et contrôle la migration des cellules :

-> GPCR, PLC, Ca⁺⁺, Rho GTPases: mobilisation cytosquelette, polarisation cellulaire
Temps de latence : -> Internalisation du récepteur

VII- Migration cellulaire

adhésines Sens de migration chemokine

Polarisation cellulaire :

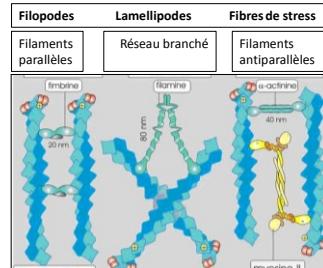
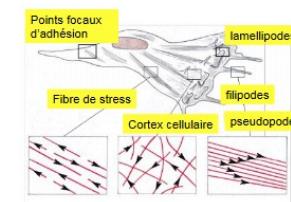
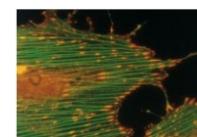


Structure des filaments d'actine

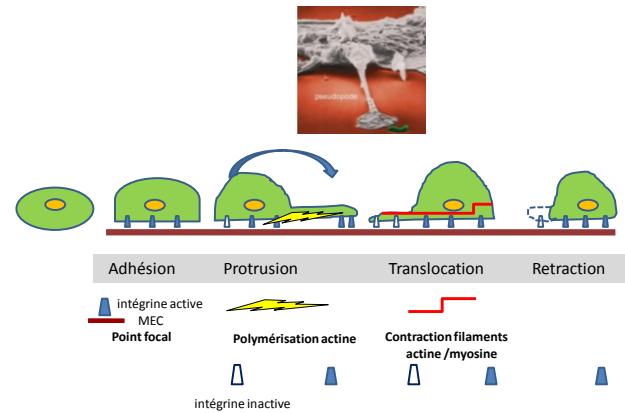


Extension de la membrane plasmique :

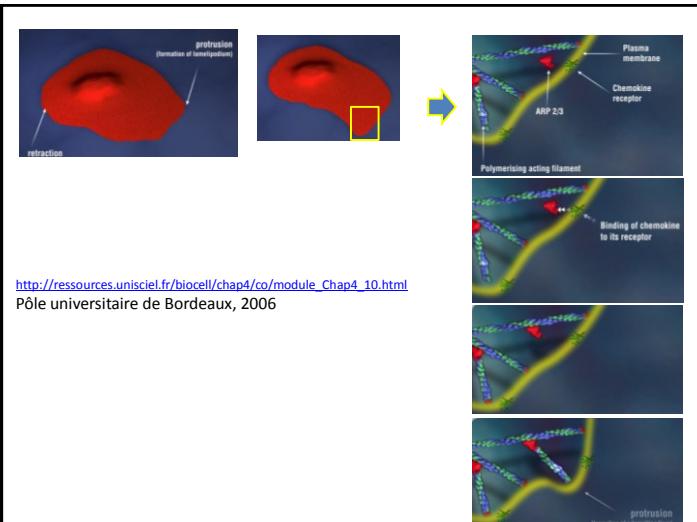
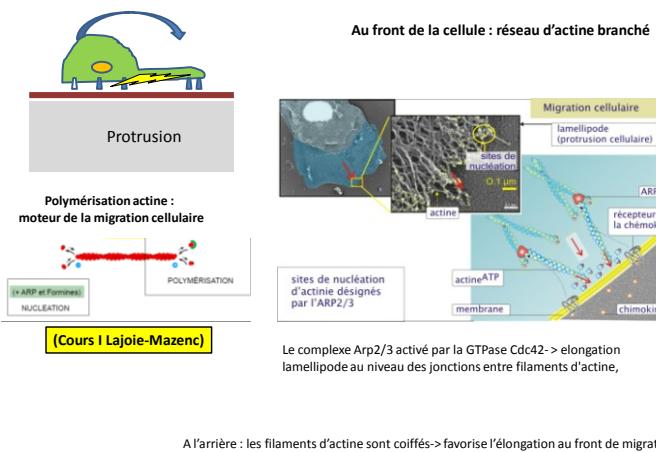
➤ induite par polymérisation filaments d'actine au front de migration



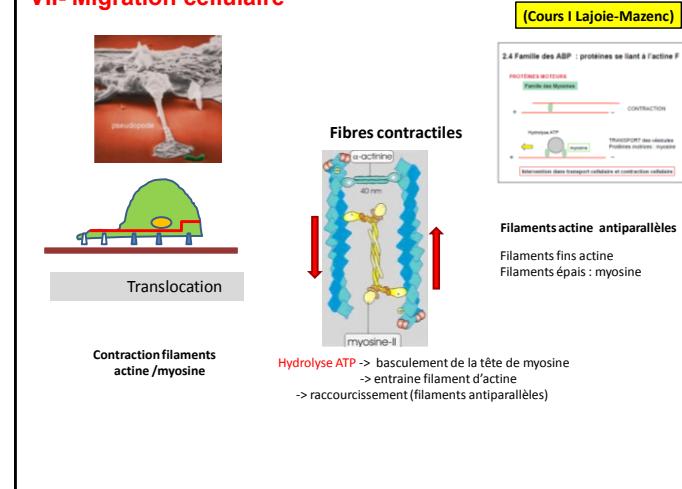
VII- Migration cellulaire



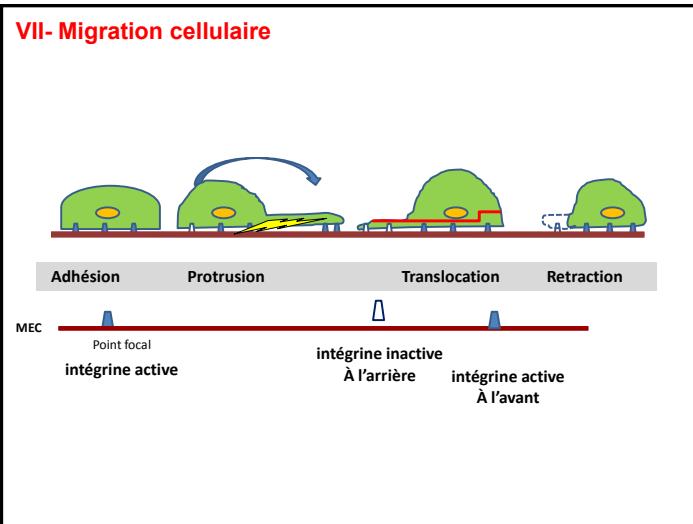
VII- Migration cellulaire



VII- Migration cellulaire

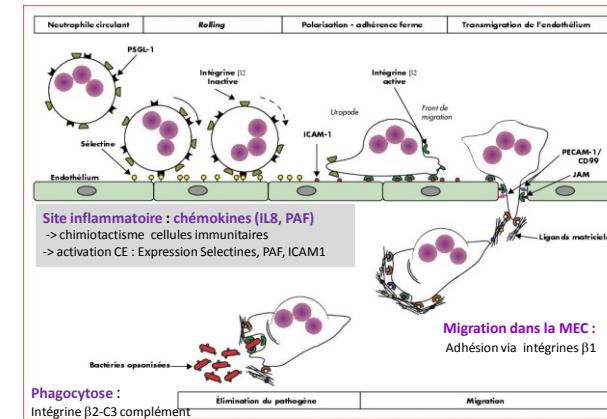


VII- Migration cellulaire



VII- Migration cellulaire

Réponse Immunitaire
Entretien des Tissus



Cicatrisation d'une plaie cutanée



1ère phase vasculaire

2ème phase inflammatoire

3ème phase de bourgeonnement

4ème phase d'épidermisation

Arrêt du saignement, formation de caillots.

Détersion de la plaie.

Comblement de la plaie

Fermeture de la plaie

Ces 4 phases ont une durée de 21 jours chez une personne saine,

Puis la phase de remodelage débute et peut durer jusqu'à deux ans.

VII- Migration cellulaire

Blessure :
Saignement
débris nécrotiques
bactéries

Phase vasculaire

Plaquettes

Dégranulation

Fact. Croissance
(PDGF, TGF, FGF)

Molécules Adhérance
Intégrines

Cicatrisation d'une plaie cutanée

5 j

Phase inflammatoire

Chimiotactisme
Phagocytes

Caillot de fibrine

Fact. Croissance
(PDGF, TGF, VEGF)

Intégrines
Sélectines
Ig CAM

P. Neutrophile

Macrophages

Enzymes protéolytiques

Intégrines
Ig CAM

2 mois - 2 ans

Remodelage
Hémidesmosomes
Lame basale

15j

jours

Phase de Réparation tissulaire

CE
Fibroblastes

Fibroblastes : reconstitution
Tissus conjonctifs = bourgeon charnu

Myofibroblastes :
Rapprochement berges de la plaie

Intégrines
Cadhérine

Epithérialisation

Kéatinocytes

Migration
Différenciation

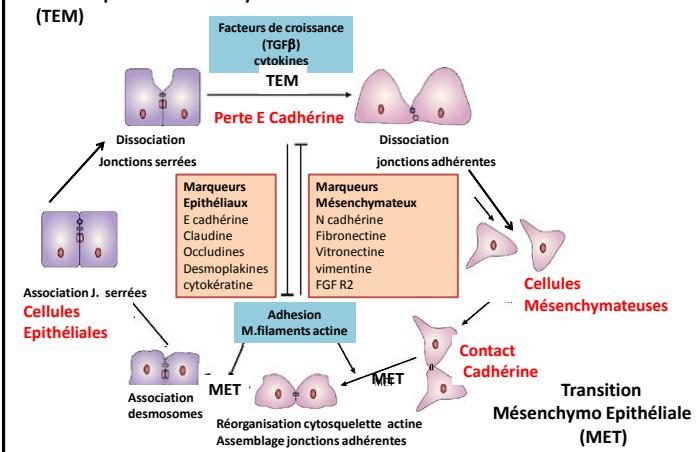
Fact. Croissance
(TGF, EGF, KGF)

Intégrines

VII - Migration cellulaire

Rôle de la différenciation cellulaire dans la migration

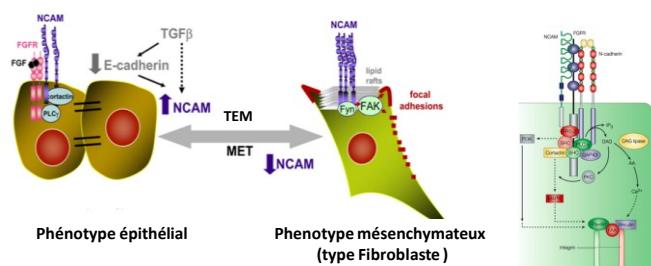
Transition Epithelio Mésenchymateuse (TEM)



VII - Migration cellulaire

Rôle de la différenciation cellulaire dans la migration

Transition Epithélio Mésenchymateuse



VIII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence

Intégrines :

- Hémorragies (α IIb β 3 : Thrombasthénie de Glanzman)
défaut agrégation plaquettaire)

--LAD (leukocyte adhesion deficiency):

Déficit génétique dans la chaîne β
commune aux intégrines leucocytaires (β 2, CD18)

Fonctions cellulaires déficientes chez les enfants LAD

- Adhérence et chimiotactisme des cellules phagocytaires
- Phagocytose de particules opsonisées par le complément C3

VIII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence

Cadhérines :

Anticorps anti desmoglein -3 : Pemphigus Vulgaris

Désolidarise feuillet épithéial du tissu conjonctif :
Formation de bulles.



VIII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence **Cancer**

Perte du comportement social des cellules au sein d'un tissu

Cadhéries : Perte E cadhérine = Perte Inhibition de contact

Les cellules saines cessent de se diviser à confluence
Les cellules cancéreuses continuent de se diviser (perte inhibition contact)

(b)

A → B → C

Tissu Normal cancer in situ cancer invasif

Expression E cadhérines : inversement proportionnelle au pouvoir métastatique des cellules tumorales

VIII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence **Cancer**

Cadhéries Mutation stabilisante β caténine : prolifération cellulaire

VIII - Pathologies liées à un défaut de molécules d'adhérence

Cancer

Intégrines (aussi):

- Redistribution des Intégrines à la surface de la cellule tumorale :
-> Diminue ancrage
- Changement Intégrine : - rupture adhésion lame basale
- changement signalisation survie, migration

c normale c cancéreuse

Chimiokines : métastases

Les cellules tumorales acquièrent récepteurs pour des facteurs de croissance (ex CXCR4) :

SDF-1 (ligand de CXCR4) : est exprimé dans de nombreux tissus
pouvoir chimoattractant puissant
favorise la survie et croissance des cellules tumorales

IX - Méthodes d'études : Adhésion, activation cellulaire (en temps réel)

Adhésion à une matrice (protéine MEC ou cellules)

Formation de thrombus
Perfusion de sang sur matrice de collagène

chambre de Perfusion in vitro

Capillaires : recouverts d'une matrice

Vidéo-microscope (géré par Métamorph)

Flux aspiré par Seringue électrique - Arteriel (1500 sec-1)

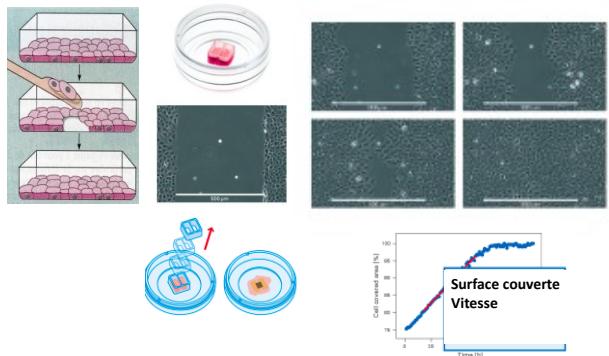
Sang total + DIOC⁴ ou reconstitué

Adhésion de Plaquettes sur monocouche de cellules endothéliales

Contrôle Mpm : Activation CE Mpm SOD : bloque l'activation

IX - Méthodes d'études : Prolifération cellulaire, régénération

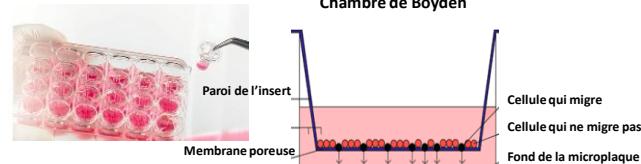
prolifération cellulaire / invasion 2D/ régénération



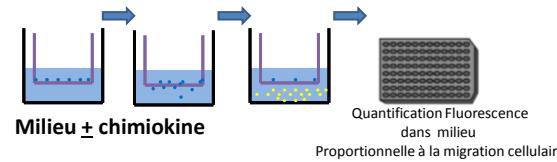
IX - Méthodes d'études :

Migration cellulaire

Chambre de Boyden



Protocole d'invasion cellulaire en réponse à un facteur de croissance ou une chémokine



L1 PACES site Maraîchers 

UE2 : la cellule et les tissus
Partie Biologie cellulaire

DIFFERENTIATION CELLULAIRE
après la naissance

Cours A.D Terrisse
2018 - 2019

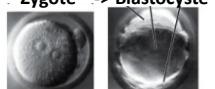
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie

Plan du cours

- I - Généralités sur la Différenciation cellulaire
- II - Les cellules souches
- III - Les cellules souches adultes
- IV - Différenciation Terminale des cellules souches tissulaires
 - a) unipotentes : kératinocytes
 - b) multipotentes : intestinales, sanguines
- V - Pathologie
 - a) Métaplasie
 - b) rupture homéostasie cellulaire
- VI – Thérapie cellulaire régénératrice
 - a) Généralités
 - b) Greffe de peau
 - c) Greffe de Moelle osseuse
 - d) Différenciation de CSA

I - Généralités sur la Différenciation cellulaire

Zygote -> Blastocyste



Prolifération



Spécialisation

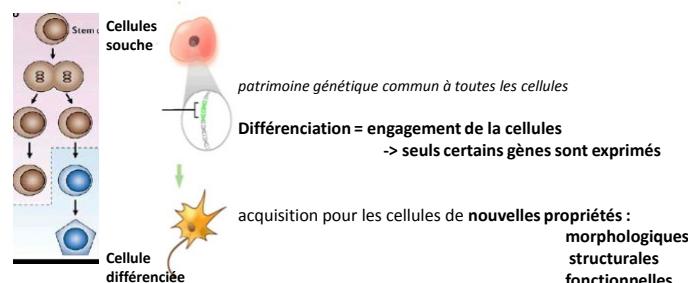


Différenciation cellulaire = ensemble des étapes
-> cellule spécialisée (structure, fonction, localisation)

ORGANISATION :

- SYSTEMES
- ORGANES
- TISSUS
- CELLULES

I - Généralités sur la Différenciation cellulaire



Cellules souches

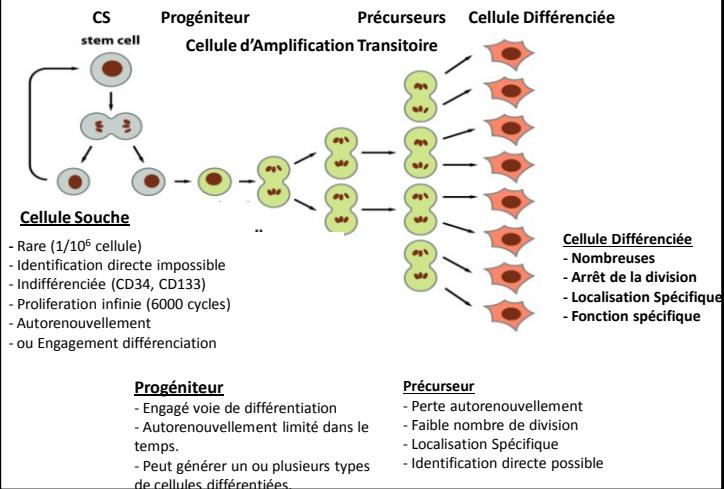
Cellule différenciée

patrimoine génétique commun à toutes les cellules

Différenciation = engagement de la cellules
-> seuls certains gènes sont exprimés

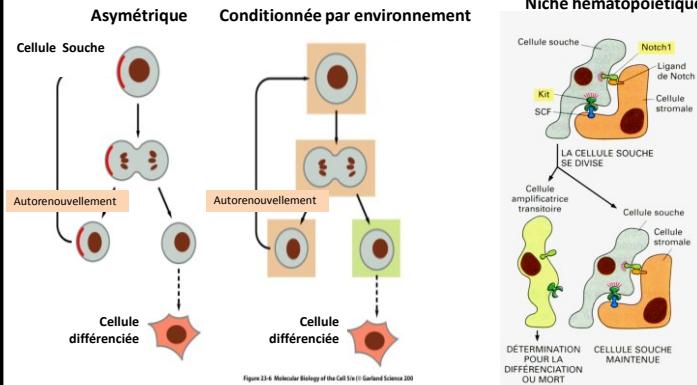
acquisition pour les cellules de nouvelles propriétés :
morphologiques
structurales
fonctionnelles

I - Généralités sur la Différenciation cellulaire



Autorenouvellement ou Engagement vers la différenciation

II- Division des cellules souches



II- Hiérarchie des Cellules Souches

Potentialité

CS Totipotentes (1- 4 è j)
Individu entier

Pluripotentes (CSE) (< 5 sem)
Toutes lignées (200)
sauf annexes (cavité amniotique, sac vitellin allantoïde)

Multipotentes: (CSA)
issues d'1 lignée
Plusieurs types cellulaires

Unipotentes : (CSA)
1 type cellulaire

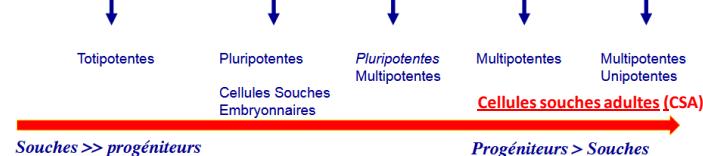
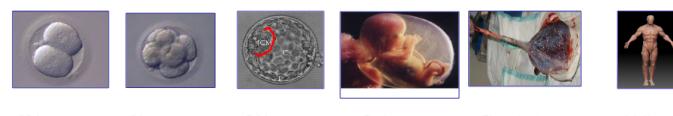
CS : autorenouvellement à l'identique
cellules progénitrices: capacité de division limitée.

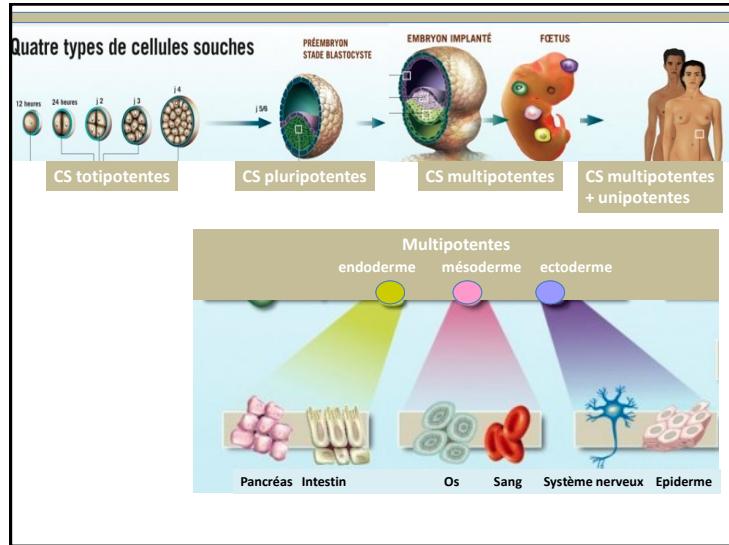
Cellules souches embryonnaires (CSE)

Cellules souches adultes (CSA)
-> déterminées
Potentiel de différenciation limité aux cellules de leur tissu d'origine (ectoderme, mésoderme
- Division limitée (50 à 150 cycles)

Les cellules souches au cours du développement

Développement

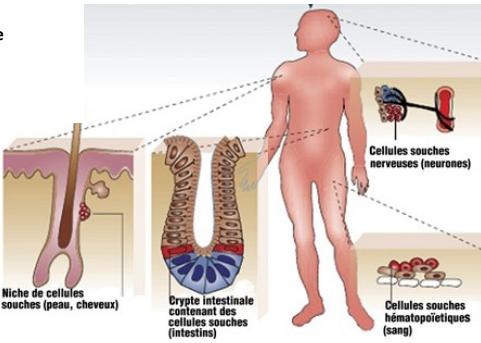




III- Cellules Souches Adultes

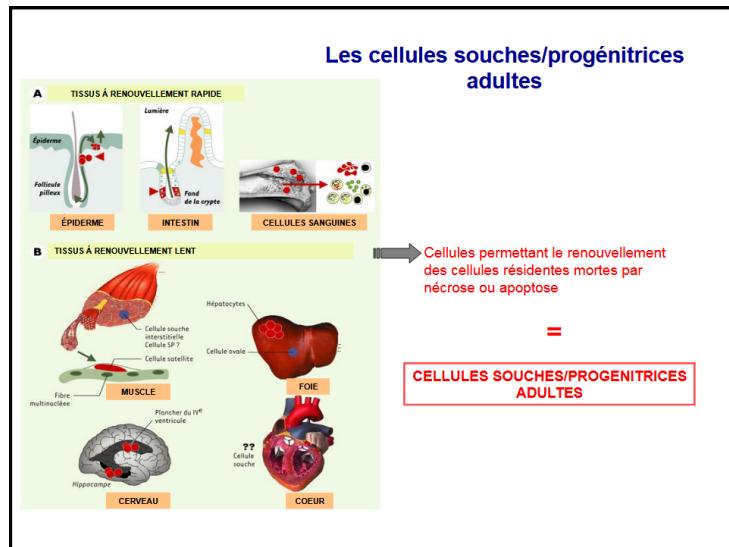
Rôle : Entretien des Tissus

Epiderme
Muqueuse Intestin grêle
Cellules sanguines

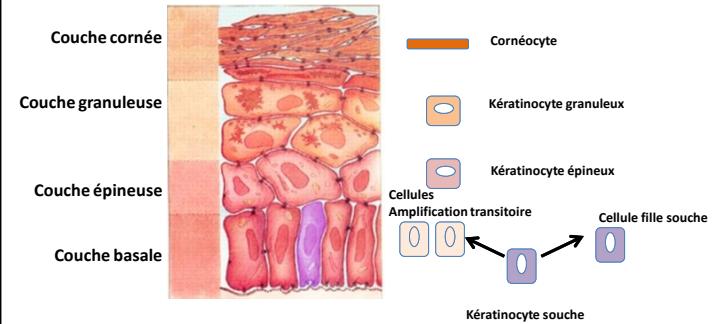


Assurent en même temps:

- un renouvellement constant des cellules-> permet l'homéostasie et la réparation des tissus
- le maintien d'un réservoir de cellules souches.

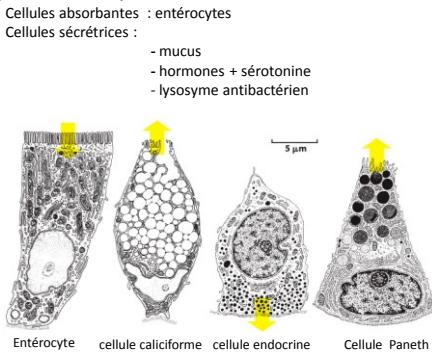


IVa- Differenciation Terminale des kératinocytes épidermiques

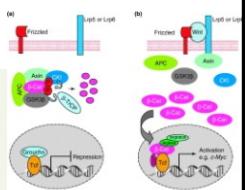
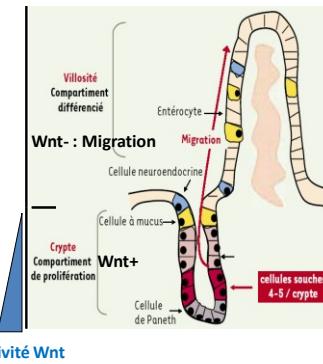


IVb- Differentiation Terminale de la paroi intestinale

4 types de cellules épithéliales



IVb- Differentiation Terminale de la paroi intestinale

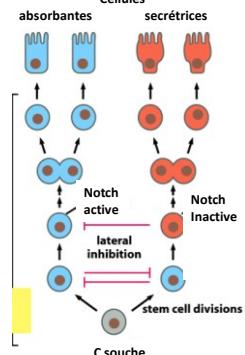
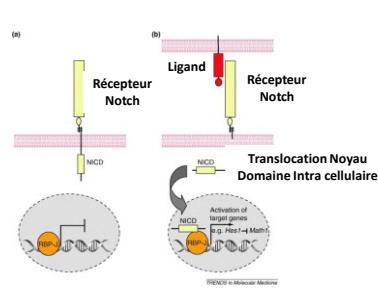


La voie Wnt : Rôle crucial dans régulation prolifération / migration
gradient inverse de l'activité Wnt le long de l'axe crypte-villosité

IVb- Differentiation Terminale de la paroi intestinale

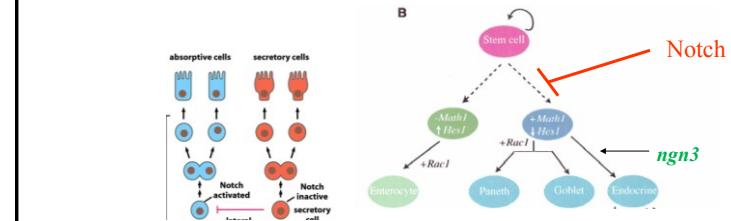
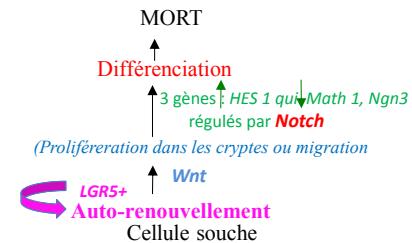
Differentiation des CS Intestinales

Differentiation selon voie Notch active /inactive

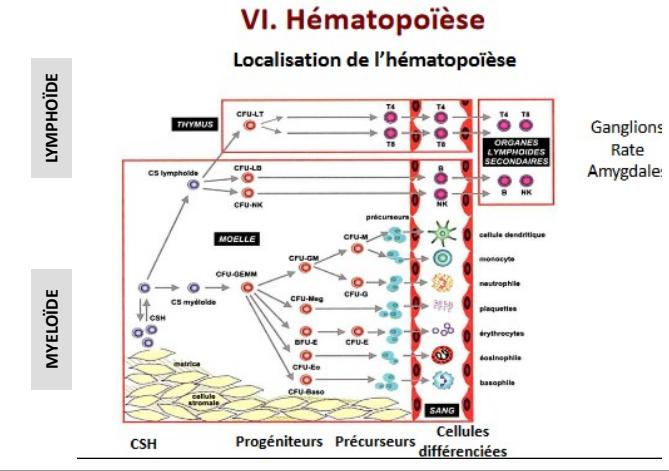


IVb- Differentiation terminale de la paroi intestinale

Regulation de la Differentiation des enterocytes

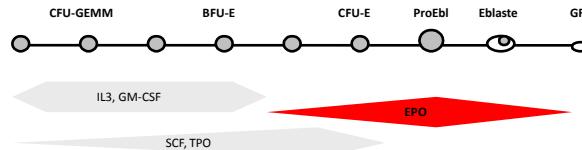


IVb- Differentiation Terminale des cellules sanguines

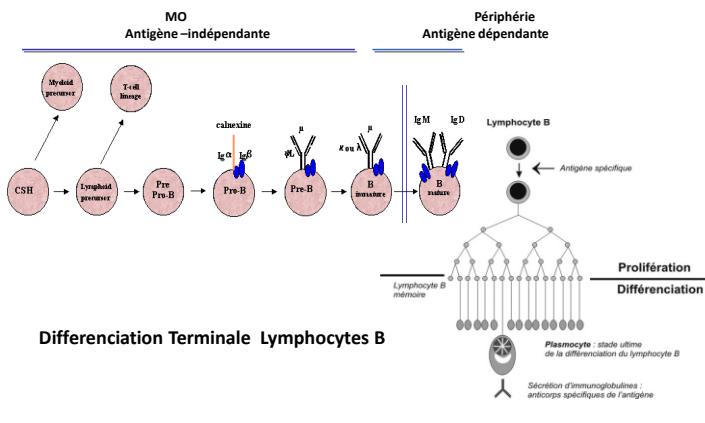


IVb- Differentiation Terminale des cellules sanguines

Facteurs de différenciation des Erythrocytes



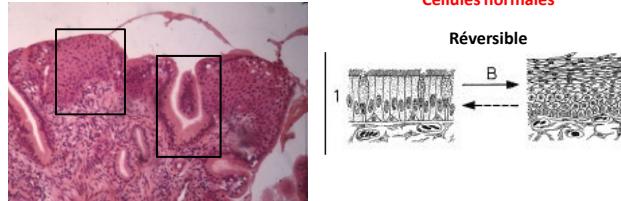
IVb- Differentiation Terminale des cellules sanguines



Va-PATHOLOGIE :

METAPLASIE

Transdifferenciation
Tissu différencié en un autre tissu différencié
sous l'effet d'un stimulus chronique
même tissu
Cellules normales



Epithelium cylindrique simple → Epithelium malpighien (pavimenteux, stratifié non kératinisé)

- Epithelium bronchique (bronchite chronique, tabac)
- Epithelium endocol de l'utérus

Epithelium malpighien non kératinisé → kératinisé

Vb- PATHOLOGIE :**RUPTURE HOMEOSTASIE TISSULAIRE****Prolifération anormale****Rupture équilibre Prolifération/Différenciation****Cellules normales**

- Hypo prolifération
- Hyperprolifération

Tumeurs bénigne :

Proliferation indéfinie d'un clone cellulaire
Expression du *Programme de différenciation normal*
Envahissement tissu local

Cellules anormales**Tumeur maligne :**

Proliferation indéfinie d'un clone cellulaire
Expression du *Programme de différenciation hétérogène*
Envahissement tissus voisins puis à distance

VI- THÉRAPIE CELLULAIRE RÉGÉNÉRATRICE

= Greffé de cellules
visant à restaurer les fonctions d'un tissu

Tissu définitivement détruit : - CS détruites

- absence de CS capables de régénérer le tissu

Greffé à partir de**- CSA humaines : Autogreffe**

- même tissu : prolifération *ex greffe de peau*
- autre tissu : Transdifferenciation (Recherche encouragée)

: **Allogreffe** (*greffe de moelle osseuse*)

- CSE humaines : Allogreffe (avortement , FIV : Recherche étroitement réglementé)

embryon obtenu par Clonage : interdit

VI- THÉRAPIE CELLULAIRE RÉGÉNÉRATRICE**OBTENTION DES CELLULES SOUCHES**

CSA : Moelle Osseuse ,
Cordon ombilical
Tissu adulte (peau...)

CSE :

- Embryons surnuméraires de FIV (5 jours)
- IPS (CS pluripotentes induites)

Lois Bioéthiques :

Réglementent les pratiques Médicales (reproduction, clonage, don d'organe).

- 1994 : Premières lois en France - Révision tous les 5 ans (7 ans depuis 2011)
Le clonage d'embryon humain est interdit en France
- . Les scientifiques peuvent travailler sur les cellules souches embryonnaires animales
- .
- 2013: Recherche sur l'embryon humain et les CSE autorisée sous 4 conditions:
 - projet scientifiquement pertinent
 - à finalité médicale,
 - ne pouvant être conduit qu'avec des embryons humains
 - respectant les garanties éthiques

VI- THÉRAPIE CELLULAIRE RÉGÉNÉRATRICE**VIb- Autogreffe de peau chez les grands brûlés**

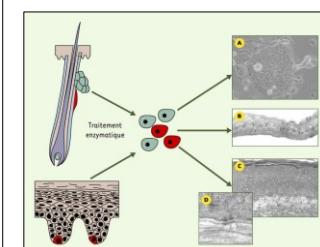
Primoculture : Biopsie + Dissociation épiderme
-> Kératinocytes

Supports de culture :
Plastique revêtu de composants de la MEC
(Dermé artificiel ou irradié)

Prolifération/ Différenciation :

- Calcium
 - <0,1 mM : **prolifération**,
(pas de stratification)
 - de 1 à 1,8 mM : **stratification, différenciation**
-> feuillet épidermique greffé

Vitamine A et rétinoïdes
Facteurs de croissance
Cytokines



VI- THÉRAPIE CELLULAIRE RÉGÉNÉRATRICE

Vlc- Greffe de cellules souches Hématopoïétiques

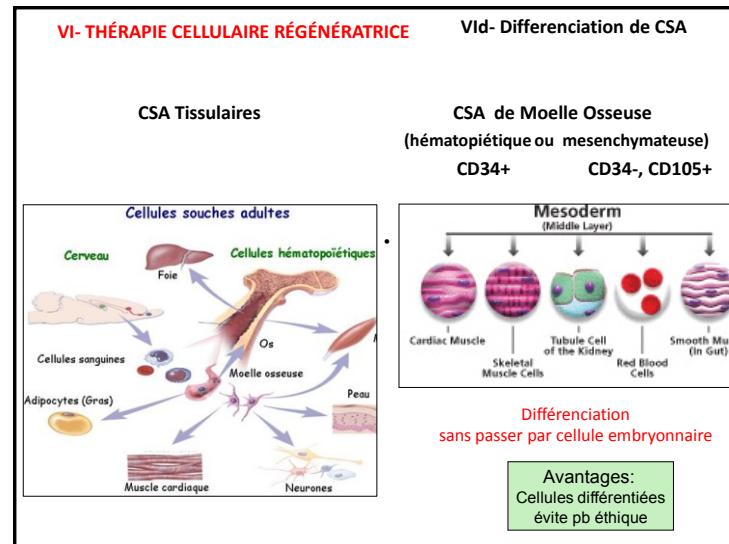
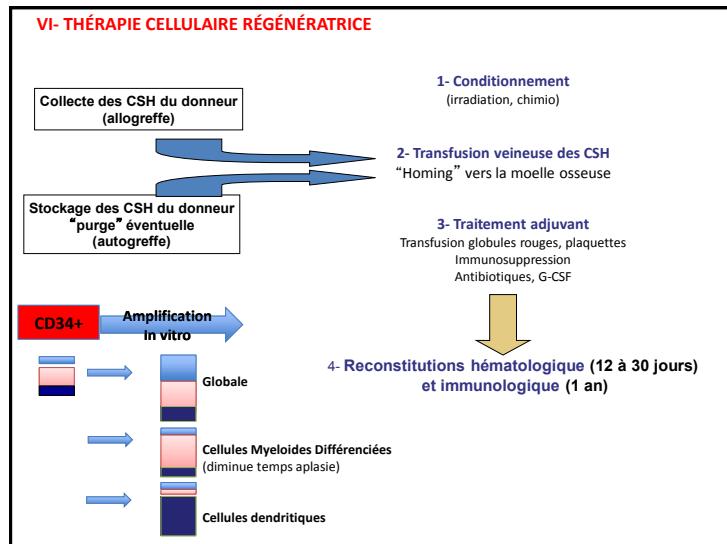
Cellules souches : CD34+ Moelle Osseuse ou sang périphérique	Cellules souches Cordon ombilical	
Quantité importante (500-1200 ml) MO : ponction sous Anesthésie générale (10 ml/kg du receveur) = $2.8 \times 10^6 / \text{kg}$ CSP : injection G-CSF, cytaphérèse : $7 \times 10^6 / \text{kg}$	Faible quantité (80 ml) $0.2 \times 10^6 / \text{kg}$	
Nécessité compatibilité HLA élevée Recherche de donneur : 3-4 mois	Immatures Compatibilité HLA moins élevée déjà cryoconservées	
Allogreffe,	Autogreffe	Allogreffe

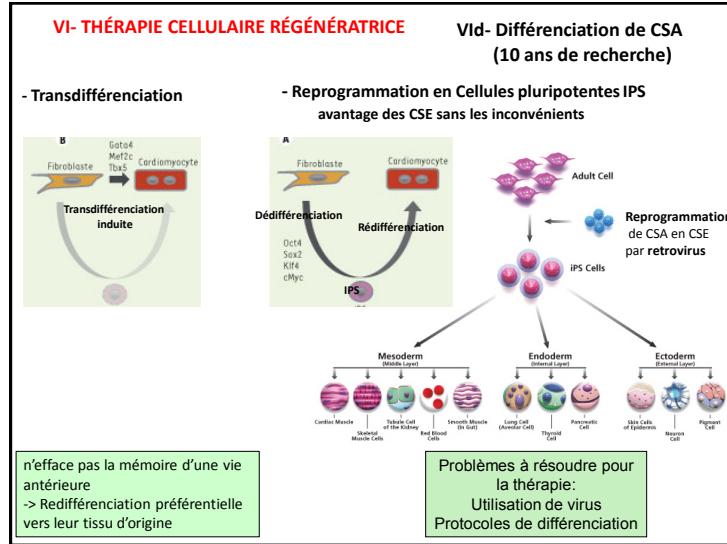
VI- THÉRAPIE CELLULAIRE RÉGÉNÉRATRICE

Restorer une fonction chez des patients avec mutations génétiques:
⇒ Allogreffe
Cancers du système hématopoïétique

Conserver et re-injecter les CSH saines
⇒ Autogreffe
après traitement: Tumeurs solides, Lymphomes ou certaines leucémies

La capacité de "homing" (domiciliation):
Permet aux CSH de retourner dans la moelle osseuse après injection I.V.





Essai clinique en 2017 : traitement de la DMLA (dégénérescence maculaire)

Fibroblastes de peau du malade-> reprogrammés en IPS-> cellules épithéliales rétiniennes injectées chez patient

Premiers traitements : Etude faisabilité chez l'homme- peu de recul.
1 an après chirurgie : Cellules épithéliales mais oedème

Publication : N Engl J Med. 2017
Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration.

Mandal M¹, Watanabe A², Kurimoto Y¹, Hirami Y¹, Morinaga C¹, Daimon T¹, Fujihara M², Akimura H², Sakai N¹, Shibusawa Y¹, Taneda M¹, Nomiyama Y¹, Tanahashi S¹, Nakamura M¹, Kamio H¹, Sugita S¹, Onishi A¹, Ito T¹, Fujita K¹, Kawamoto S¹, Go M¹, Shinohara C¹, Hata K¹, Sawada M¹, Yamamoto M¹, Ohta S¹, Ohara Y¹, Yoshida K¹, Kubohara I¹, Kitano Y¹, Amano N¹, Umekage M¹, Kitaura F¹, Tanaka A¹, Okuda C¹, Takesu N¹, Ogawa S¹, Yamane S¹, Takahashi M¹.

Abstract

We assessed the feasibility of transplanting a sheet of retinal pigment epithelial (RPE) cells differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in a patient with neovascular age-related macular degeneration. The iPSCs were generated from skin fibroblasts obtained from two patients with advanced neovascular age-related macular degeneration and were differentiated into RPE cells. The RPE cells and the iPSCs from which they were derived were subject to extensive testing. A surgery that included the removal of the neovascular membrane and transplantation of the autologous iPSC-derived RPE cell sheet under the retina was performed in one of the patients. At 1 year after surgery, the transplanted sheet remained intact, best corrected visual acuity had not improved or worsened, and cystoid macular edema was present.

