

GÉNÉRALITÉS DE LA CELLULE

I. Définition de la cellule

Cellules → unités structurales et fonctionnelles communes à l'organisation de tous les êtres vivants (organismes uni ou pluricellulaires). Unité fondamentale de tout être vivant : + petite portion de matière vivante qui puisse vivre isolée et se reproduire.

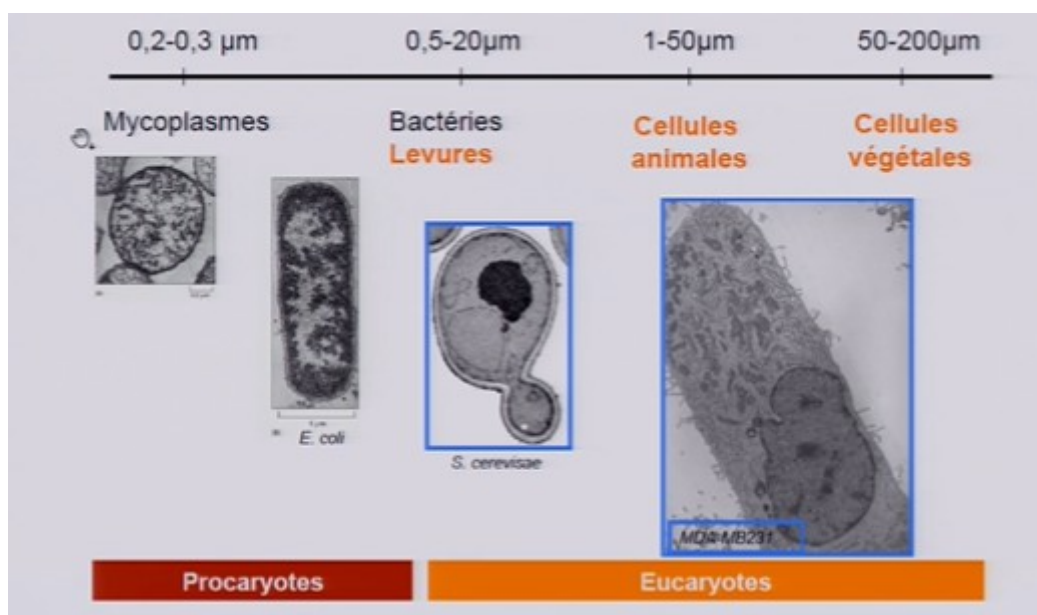
Elle synthétise l'ensemble de ses constituants en utilisant les éléments du milieu extracellulaire pour proliférer et éventuellement se différencier / se spécialiser.

II. Classification des cellules

- ◆ Cellules procaryotes : pas de noyau (nucléoïde)
- ◆ Cellules eucaryotes : noyau délimité par une membrane
 - soit dans les organismes unicellulaires (ex : amibes)
 - soit dans organismes pluricellulaires (ex : Homme 10^{14} cellules)

Nb : virus ne sont pas considérés comme des cellules ! Ils ne sont pas autonomes pour leur multiplication.

III. Taille des différentes cellules

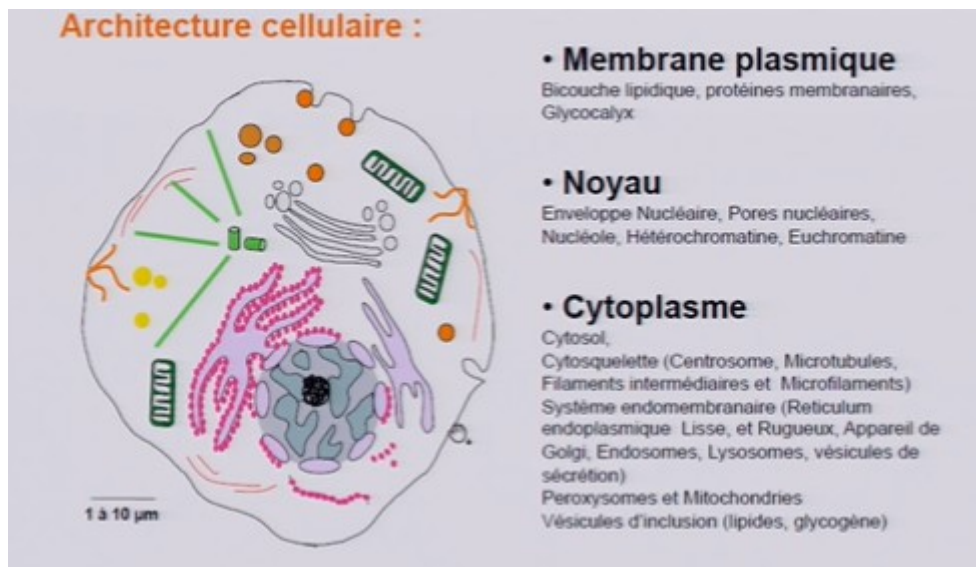


IV. La cellule animale

Constituants chimiques :

- H₂O +++ : >60%
Milieu de dispersion, associée à des sels minéraux ou à des macromolécules
- Sels minéraux sous forme ionique (Mg, Na, K) ou sous forme de carbonate ou phosphate
- Constituants organiques : Acides nucléiques et nucléotides, glucides complexes et oses, lipides et acides gras, protéines et aa

Structure de la cellule :



Notre organisme est composé de 10^{13} à 10^{14} cellules + bactéries

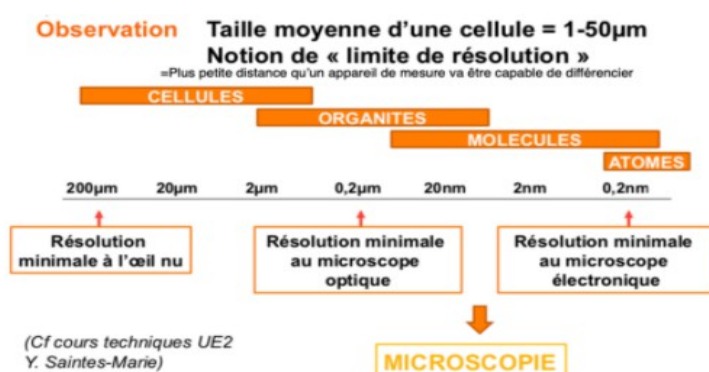
Cellules souches (cellules qui sont capables de s'auto renouveler) + cellules indifférenciées (cellules qui sont capables d'acquérir une certaine fonction) : 200 types de cellules différents

V. Techniques d'étude des cellules

Limite de résolution → + petite résolution qu'un appareil est en capacité de distinguer

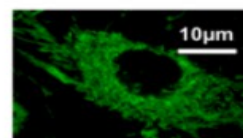
Modèle d'étude : Culture cellulaire

Mise en culture de cellules pour les amplifier et les étudier « in cellulo »

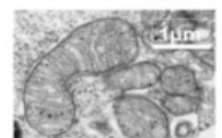


Exemple MICROSCOPIE

Observation Mitochondrie : organe intracellulaire (500nm)



Microscopie optique
mitochondriome
On voit qu'elle forme un réseau



Microscopie électronique
organisation mitochondrie
On voit les mitochondries avec un plus gros détail

Préparation spécifique des échantillons

(Teneur en eau, Densité, Epaisseur, Transparence)

COLORATION ou MARQUAGE des Cellules

Cellules vivantes/fixées, Perméabilisation (= obligés de traverser la membrane)
En fonction de ce qu'on veut observer il faut changer de microscope et préparer l'échantillon en fonction

Culture de cellules :

- animales
- bactéries/levures
- cellules d'insectes
- cellules végétales

Conditions de culture : dans un PSM (Poste Sécurité Microbiologique)

- Culture conditions stériles
- Milieu permettant la prolifération
- Environnement favorable (pH, Température)
- Travail réglementé (L2, L3, ...)

A. Conditions générales de culture des cellules animales

- INCUBATEURS :
 - 37°C : T° de l'organisme
 - 5% CO₂ : maintien du pH
 - Atm humide : pour éviter l'évaporation du milieu
- MILIEU SYNTHETIQUE contenant :
 - sels minéraux
 - aa
 - Vitamines
 - Glc ou pyruvate
 - Rouge de Phénol : indicateur coloré pour suivre le pH
 - Solution tampon (solution carbonate ou épaisse pour maintenir le pH)
- + sérum (SVF) : source de facteurs de croissance qui vont permettre la prolifération des cellules +/- ATB et antifongiques

2 types de cellules :

- cellules adhérentes
- cellules non-adhérentes

B. Différents types de culture cellulaire (cellules animales)

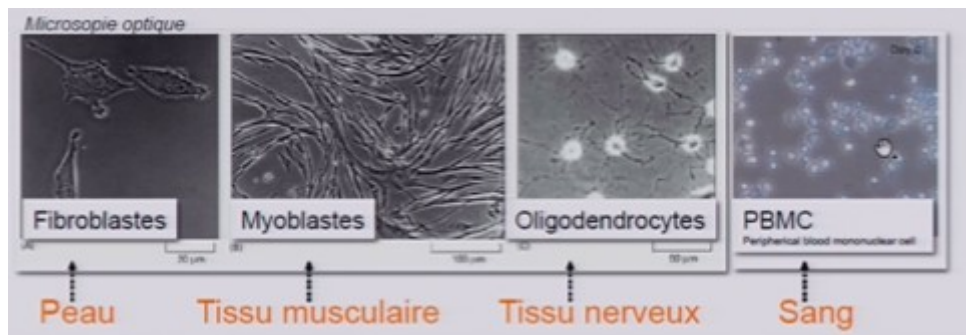
1) Cultures primaires

Culture primaire → proviennent directement d'un tissu sain, culture ex-vivo

Il faut trier les cellules (Ac, trieur en cytométrie de flux)

Prolifération limitée :

- nb de division limité
- durée de vie limitée (Senescence)
- notion de confluence (inhibition de contact) : si pas assez d'espace elles arrêt de la croissance



2) Lignées cellulaires

- cellules immortalisées/transformées :
 - provenant de tumeurs cancéreuses
 - modifiées par un virus (SV40 ou Herpes Virus)
 - modifiées par génie génétique (AgT de SV40, S-U de la télomérase)
- Prolifération illimitée :
 - capacité illimitée de division
 - perte d'inhibition de contact : elles ne s'arrêtent de grandir uniquement lorsqu'elles n'ont plus de quoi se nourrir
 - lignées conservées
 - Banques de cellules (azote liquide)
 - pb de dérivation

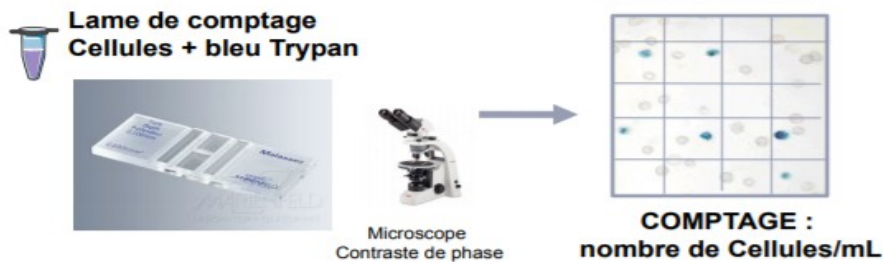
1951 : Cellules Hela : cancer du col de l'utérus dû au Papillomavirus

C. Numérisation cellulaire et détermination de la viabilité cellulaire

Numérisation cellulaire → comptage des cellules

On réalise un test d'exclusion au Bleu Trypan qui s'accumule dans les cellules mortes (anomalie au nv de la mb plasmique), les cellules vivantes restent incolores.

Utilisation du Bleu Trypan



Bleu Trypan :

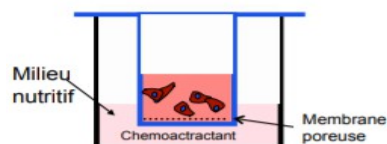
- Exclu des cellules vivantes
 - Accumulé dans les cellules mortes
- > **Test d'exclusion**

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Cellules non colorées par le bleu}}{\text{cellules totales}} \times 100$$

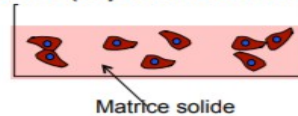
Flacon de culture:



EX 2 : Chambre de Boyden (migration, invasion)



EX 1 : Culture dans matrice solide (dépendance / ancrage)



EX 3 : Organoïdes



Med Sci, (2016) 983-990

VI. Définitions compartiments et organites

Compartiments → Ensembles délimités par un mb biologique

Organites → Structures spécialisées ayant une fonction spécifique au sein de la cellule

VII. Compartiments et organites (cellule animale)

Compartiments cellulaires : Noyau, Cytosol, Organites

Organites à simple mb : RE, App de Golgi, Lysosomes, Vésicules type endosomes, Peroxysomes

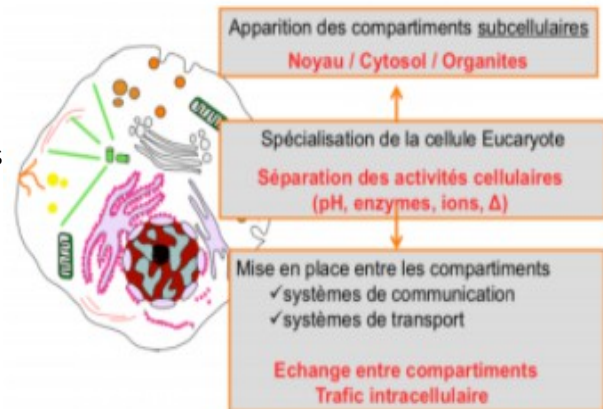
Organites à double mb : Noyau, Mitochondries

Système endomembranaire → Ensemble des cavités délimitées par les mb internes correspondant au diff compartiments qui communiquent par l'émission de vésicules

RE, Ag, Lysosomes, Endosomes, Vésicules cellulaires, Mb nucléaire

Pq a-t-on des compartiments dans les cellules eucaryotes ?

Cela permet de séparer des activités cellulaires (ex : activités enzymatiques).



VIII. Techniques étude des compartiments et organites

Chaque compartiment :

- compo spé
- Organisation et fonction propre
- Communication entre les diff compartiments

Comment peut-on étudier les diff compartiments ?

- Fractionnement cellulaire : séparation organites ou compartiments
- Marquages spécifiques
- Étude fonctionnelle de la cellule eucaryote

A. Fractionnement cellulaire

1° étape : Obtention d'un HOMOGÉNAT

Organe
Tissus
Cellules en culture

LYSE

HOMOGÉNAT : cellules éclatées,
organites, débris



- broyeur
- ultrasons
- pression
- congélation/décongélation
- détergent doux
- choc hypotonique

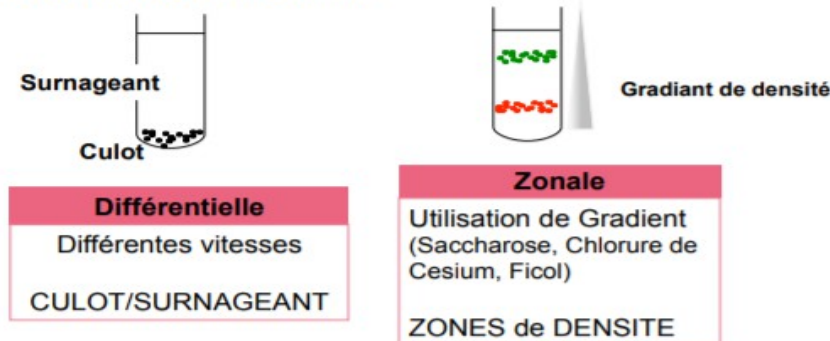


2° étape : séparation par CENTRIFUGATION

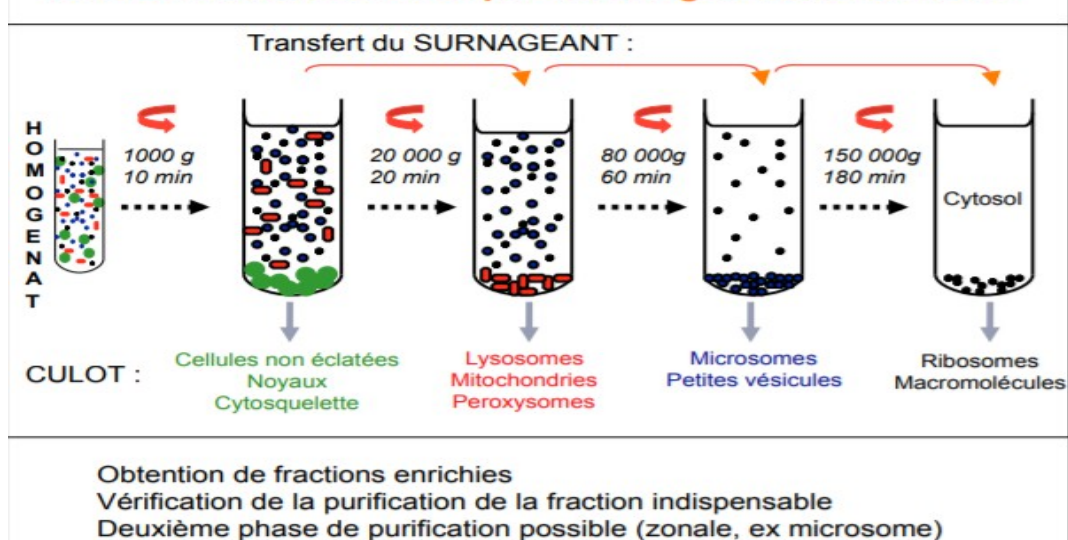


Utilisation de la **force centrifuge** (mesurée en g ou rpm)

Vitesse de sédimentation = fonction particules (diamètre + densité) et de la densité de la solution dans laquelle elles se trouvent
Exprimée en **SVEDBERG (S)** coefficient de sédimentation
ex : sous-unité 40S des ribosomes



Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

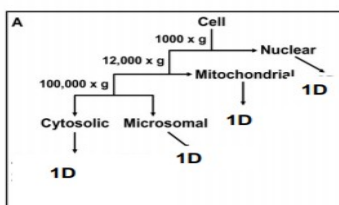


(Retenir l'ordre)

NB : Microsomes → fractionnement REG et REL

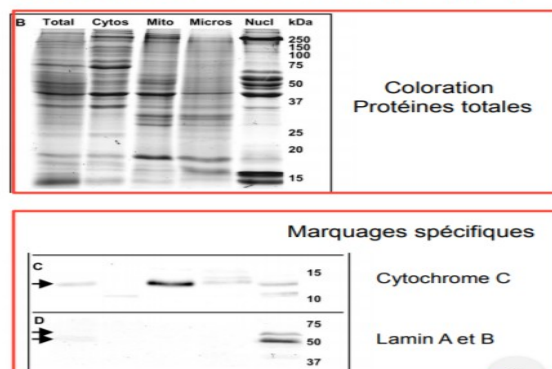
Ex : Analyse d'un fractionnement cellulaire

• Protocole d'Ultracentrifugation (A)



D'après Domanski and Helbing BMC Developmental Biology 2007 7:94

- Analyse par électrophorèse **SDS-PAGE** et coloration protéines (B)
- **Western Blot** avec AC spécifiques (C, D)

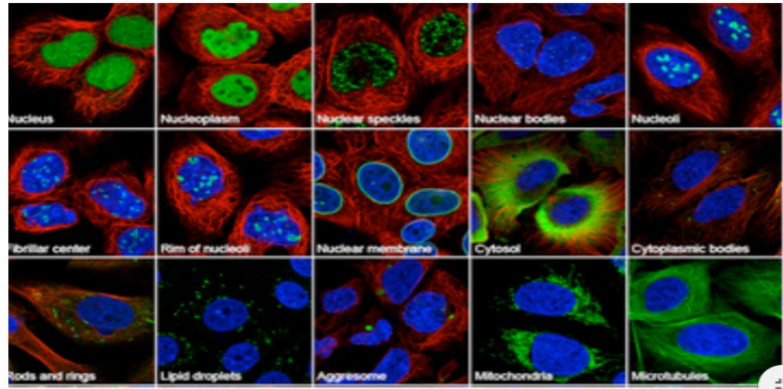


Cytochrome : Protéines spécifiques des mitochondries.

Marquage imp sur la bande des mitochondries + contamination au nv des microsomes

Lamines A et B : Protéines spécifiques du noyau, on a bien enrichie en noyau

B. Marquage des organites ou composés cellulaires (marquages spécifiques)



Techniques de marquages spécifiques

Marqueurs chimiques	Anticorps	Sondes nucléiques	Précurseurs radioactifs
Molécules Organites Compartiments Ca ²⁺ , pH	Motifs Protéiques, AA modifiés, Motifs Osidiques Motifs Lipidiques	Séquences ARN ou ADN	Fonction des précurseurs H ³ , C ¹⁴ , P ³² , S ³⁵
Interactions spécifiques	Reconnaissance Ag/AC	Hybridation moléculaire <i>Cf bio mol</i>	Incorporation spécifique

Système de Visualisation du lieu de fixation
(fluorescence, enzyme/substrat, autoradiographie, billes d'or)

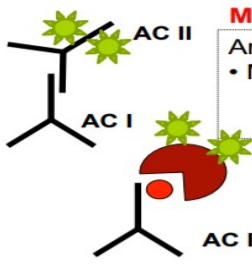
Système de visualisation du lieu de fixation des AC ou des sondes nucléotidiques

MARQUAGE DIRECT



- Marqueur fluorescent (ex FITC, Rhodamine, GFP)
- Enzyme révélée par Ajout de substrat (peroxydase)
- Marqueur radioactif
- Billes d'or

MARQUAGE INDIRECT



Amplification du signal : « marquage à étage »

- Marquage indirect :
AC II marqué
Système d'amplification (biotine + StreptAvidine marquée)

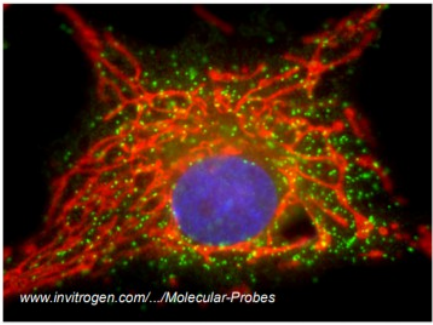


(Cf cours techniques UE2
Y. Saintes-Marie)

Exemple 1 : cellule animale marquée pour le noyau, les mitochondries et les peroxysomes

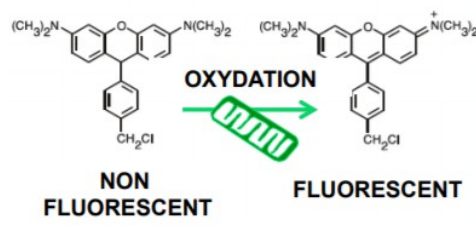
Exemple 1 : Marqueurs Chimiques et Anticorps

Cellule animale



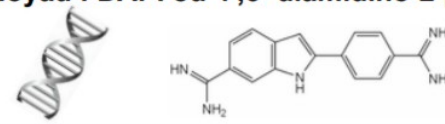
www.invitrogen.com/.../Molecular-Probes

Mitochondries : Mitotracker



NON FLUORESCENT → OXYDATION → FLUORESCENT

Noyau : DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole



Peroxisomes : AC anti-PMP70 + AC II couplé au FITC (marquage indirect)

Le Mitotracker rentre dans les mitochondries où il est oxydé et deviendra fluorescent. Seules les mitochondries sont capables de l'oxyder donc seules les mitochondries seront marquées.

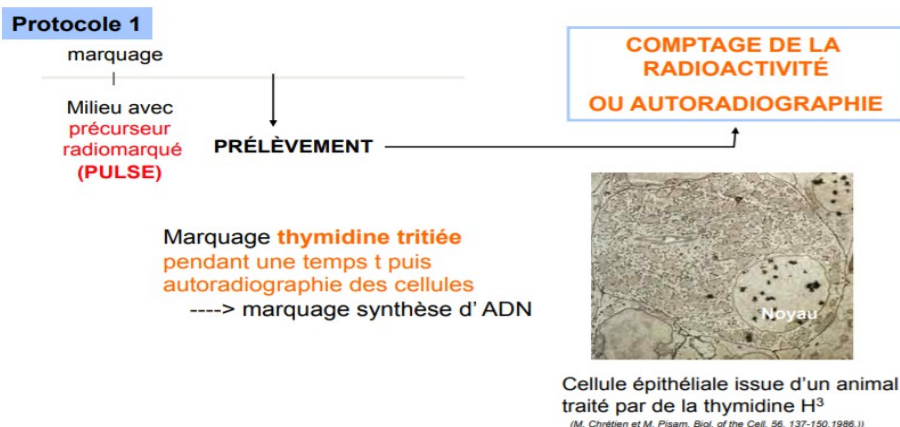
Le DAPI est capable de s'intercaler entre les bases de l'ADN et devient fluorescent.

Pour les peroxysomes : alternative : Protéines couplées à la GFP (PMP0 – GFP)

Exemple 2 :

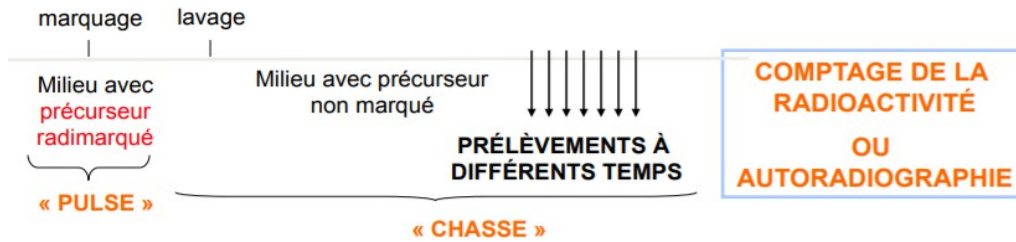
Exemple 2 : Marquages radioactifs

Utilisation de la radioactivité pour suivre molécule dans la cellule
(précurseurs radiomarqués ^{14}C , ^{35}S , ^3H , ^{32}P)

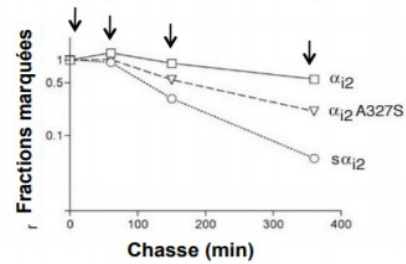


On voit ici que la synthèse d'ADN est faite dans le noyau.

Protocole 2



Marquage **méthionine** S^{35}
pendant un temps t puis chasse
----> Synthèse de protéines
----> Analyse du devenir de ces protéines

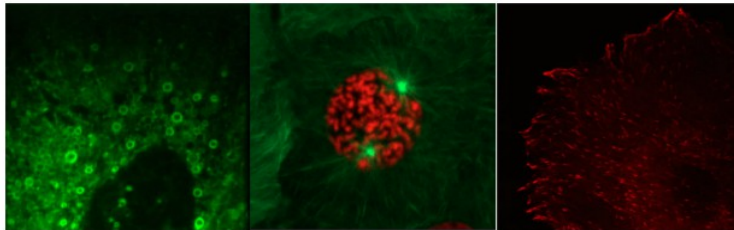


On marque spécifiquement les protéines. On chasse la radioactivité incorporée. La protéines $S\alpha_{i2}$ va se dégrader + rapidement que les autres.

Exemple 3 :

Exemple 3 : Protéines fluorescentes

- Cellules modifiées pour exprimer des protéines fluorescentes (type GFP)
- Microscopie en temps réel



Voir films sur <http://www.microscopyu.com/>