

Généralités et méthodes d'étude des cellules

Introduction

Organisation des échelles : Homme -> Organes/ Systèmes -> Tissus = ensemble de cellules spécifiques ou non et MEC (matrice extra cellulaire) 4 groupes : tissu épithélial, nerveux, musculaire et conjonctif -> Cellules -> Organites -> Protéines -> Molécules -> Atomes.

Les dimensions essentielles : Espace (mètre), Temps (secondes), Masse (kg), Energie (Joules ou kcal/mole).

La spécificité du vivant

On possède des molécules « inanimées ».

-> Les molécules du vivant (biomolécules) possèdent un haut degré de complexité et d'organisation.

-> Capacité d'extraire, d'extraire et d'utiliser l'énergie de l'environnement.

-> Auto réplication et auto assemblage (acides nucléiques, protéines, lipides, glucides.)

I. Les origines de la vie

Apparition de la vie sur terre : le hasard (collision des molécules de manière aléatoire) et la nécessité (sélection et avantage sélectif) : Jacques Monod.

Big Bang il y a 13,7 milliards d'années.

Première biomolécules il y a 5 milliards d'année.

Les 1ères cellules (primitives ; procaryotes) : 3,5 milliards d'années.

1 ère c. eucaryotes : 1,5 milliards d'années.

ACTE I : formation des biomolécules et l'auto-assemblage

Expérience : En prenant 4 éléments de l'atmosphère primitive (eau, métal, de l'ammoniac et de l'hydrogène), en les mélangeant et en faisant passer de la chaleur, des décharges électrique : on aboutit à la naissance d'un certain nombre de molécules : formaldéhyde, acide formique etc (pas de fonction biologique) et autres molécules glycine, alanine, acide lactique etc impliqués dans les biomolécules.

Synthèse abiotique : Assemblage aléatoire des biomolécules (auto assemblage, formation de matrices d'ARN, réplication de matrices par complémentarité).

ACTE II : Evolution des consommations et apparition de fonctions catalytiques

Les molécules acquièrent une forme qui déterminera la fonction (important chez les protéines, forme hémoglobine pour capter oxygène par exemple).

1ère forme dont on a la trace : forme d'un ARN (le ribozymes) capable d'accélérer des réactions biologiques (catalyse : accélération des activités biologiques).

Types catalyse :

Catalyse auto-réplicative : accélère repro d'elle même.

Catalyse hétéro-réplicative : peut accélérer reproduction autre molécule

Catalyse diversifiée : une molécules accélère repro d'elle même + autre bio molécules et ces bio molécules vont permettre assemblage de plusieurs biomolécules développant une nouvelle fonction.

ACTE III : compartimentation et formation de la première cellule

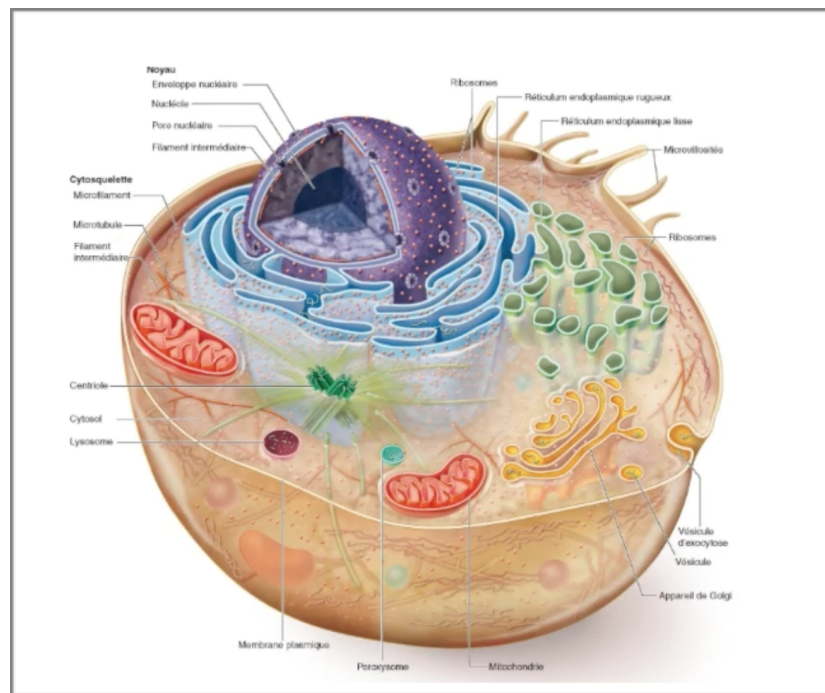
compartimentation = création d'un petit compartiment limité par membrane dans lequel on retrouve solution concentrée de biomolécules.

ACTE IV : Des procaryotes aux eucaryotes

Cellule élémentaire : proto-cellule capable de s'auto reproduire (DACU : dernier ancêtre commun universel). Elle s'est diversifié en fonction de l'environnement au règne des bactéries, archae (procaryotes) et procaryotes.

II. Généralité sur la cellule

A. Généralités sur les cellules



Tous les organismes sont composés d'au moins une cellule. Nous -> plusieurs millions qui vont être spécialisées pour remplir des fonctions précises.

La cellule est l'unité structurale de la vie.

= c'est la plus petite unité capable de manifester de manière autonome les propriétés du vivant (auto repli et auto assemblage). Elle croit, se multiplie et meurt (apoptose).

On classe les cellules en deux catégories :

Eucaryotes (Humains, plantes, champignons) 10 à 30 μm	Procaryotes (Bactéries et les archées) 1 μm
- Présence d'un noyau (structure entouré d'une enveloppe qui contient l'info génétique de la c. - Seul le globule rouge est une cellule eucaryote. qui ne présente pas de noyau.	- Absence de noyau -> l'ADN se trouve dans une région appelée nucléoïde
- Présence d'organites membraneux	- Aucun organite membraneux
- Présence d'un cytoplasme composé de cytosol.	- Taille plus réduite

Eucaryotes (Humains, plantes, champignons) 10 à 30 μm	Procaryotes (Bactéries et les archées) 1 μm
- Cellule généralement grande (comparé aux procaryotes)	-Version primitive des cellules
- Il y en a 10^{14}	- Il y en a $>10^{15}$ (10x plus que de cellules eucaryotes).

Caractéristiques communes :

- > présence membrane délimitant la frontière entre la c. et le milieu extérieur.
- > information génétique sous forme d'ADN.

⚠ Le virus n'est pas une cellule, il a besoin d'un hôte dans lequel entrer pour détourner les mécanismes d'actions (pas autonome).

La cellule vit rarement seule mais plutôt en troupeaux (dans les tissus).
Les globules rouges, blancs etc eux ne s'organise pas en tissus, ils vivent seuls.

Diversité fonctionnelle et cellulaire : > 300 types cellulaires différents (tous les types de lymphocytes ne sont pas pris en compte).

Exemple d'une cellule épithéliale :

Elles tapissent les surfaces internes et externes des organes.

- > Cellules absorbantes : microvillosités (intestins) augmente surface échange. Elles sont liées entre elles par des jonctions intercellulaire (empêche passage).
- > Cellules ciliées (poumons) : évacuent la pollution et les saletés que l'on reçoit. On trouve des cellules sécrétrices protectrices (mucus).
- > Elles peuvent s'organiser en glandes sécrétoires qui vont créer un réservoir (cellules pancréatiques sécrétant de l'insuline, du glucagon)

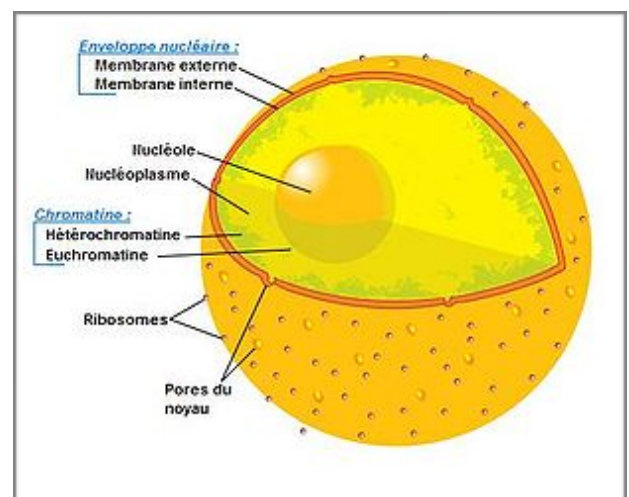
Autre exemple : la cellule photoréceptrice

Possède des disques membranaires avec assemblage de rhodopsines (protéine sensible au photon qui vont se déformer en leur présence).

B. Décomposition de la cellule eucaryote

Le noyau

- > L'organite le plus important (en terme de volume mais aussi car il contient l'info génétique).
- > Il n'est pas présent de façon permanente dans la cellule : absent durant la mitose.
- > Il est délimité par une enveloppe (=association de deux membranes).
- > Le noyau contient l'info génétique : l'ADN qui se trouve sous forme de chromatine (associé à des protéines).

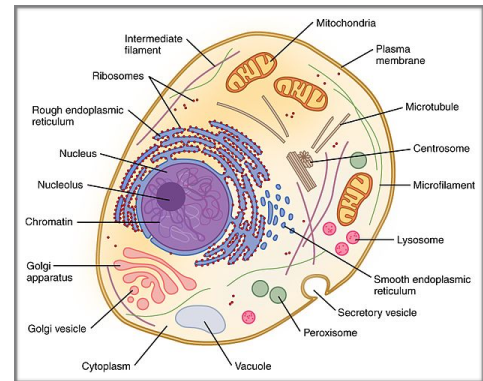


Le cytoplasme

- * **Cytoplasme** : milieu qui compose l'intérieur des cellules (partie liquide : **cytosol** (= liquide concentré de biomolécules) et partie solide : organites et cytosquelette).
- * **Cytosquelette** : réseau de filaments et tubules qui structure la cellule.
- * **Organites** : compartiments différenciés et délimités de la c. qui remplissent des fonctions précises.

Les organites sont nombreux :

- le **réticulum endoplasmique** (sac de membrane qui synthétise et modifie lipides, protéines)
- **appareil de Golgi** (trie et expédie les protéines dans la cellule ou vers d'autres cellules)
- les **lysosomes** (détruisent certains éléments)
- les **mitochondries** (fournissent l'énergie (ATP) à la cellule par la respiration).
- les **peroxysomes** (impliqués dans les réactions de la cellule).

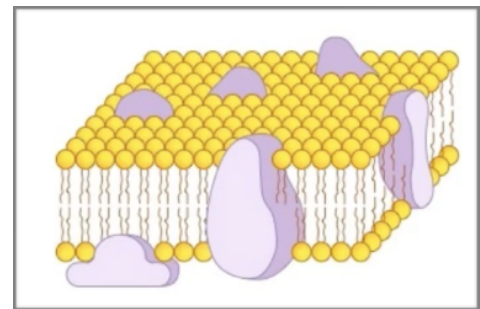


La membrane plasmique

= délimite la cellule et permet de maintenir un milieu cellulaire différent de celui cellulaire et assure une perméabilité sélective.

->Elle est composée de protéines et de lipides.

->Les lipides sont disposés en deux couches : c'est une bicouche lipidique.



III. Méthodes d'étude des cellules

Première observation au microscope : **Robert Hooke 1665** : cellules végétales.

Matthias Jakob Schleiden et Theodor Schwann ont une théorie cellulaire : « Tout objet vivant est composé de cellules. Les cellules sont l'unité de base structurales et fonctionnelles des objets vivants. Toute cellule provient d'une autre cellule; elle croît, se multiplie et meurt. »

A. Outils de description

Les outils de description : l'oeil et le microscope.

L'oeil permet la sélection des zones d'intérêt, la description des pièces et leur identification. Mais son pouvoir discriminant est faible d'où l'utilisation d'un microscope.

Résolution : 200µm, 0,2 mm. On ne peut pas voir de cellules.

Les microscopes permettent d'agrandir une image, de réaliser un contraste faisant ressortir les détails d'une image.

Ils sont caractérisés par un pouvoir de résolution = distance minimale entre deux points contigus qui peuvent être discernés.

Plusieurs types de microscope :

Microscopie photonique

1. Le microscope photonique, classique (à fond clair)

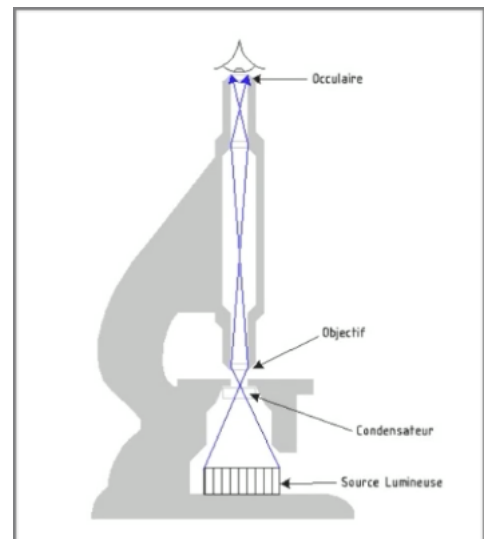
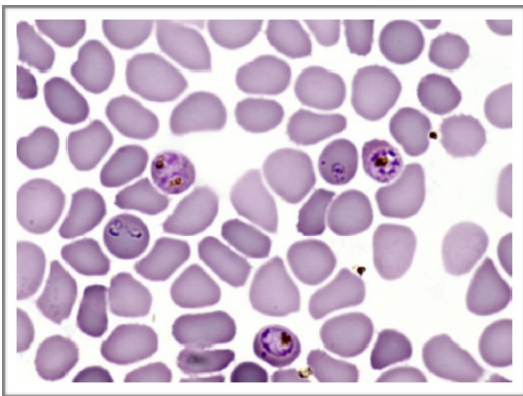
Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek.

Pouvoir résolution : 200nm, 0,2 μm . Observation de c. végétale, animal et bactérie mais il est impossible de voir les virus, les protéines et petites molécules avec ce microscope.

Il est composé d'une source lumineuse, d'un condensateur qui concentre les rayons sur la platine, d'un objectif qui collecte la lumière et donc forme l'image agrandie et enfin l'oculaire, qui permet de voir l'image.

Il est décliné de plusieurs manières (à épifluorescence, à contraste de phase, confocal).

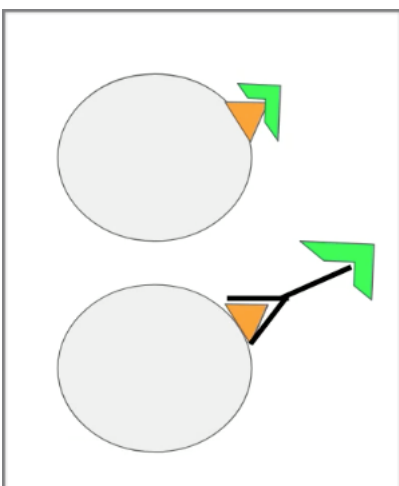
La résolution dépend de la longueur d'onde de la lumière utilisée, de l'indice de réfraction et de l'angle d'observation.



2. Le microscope à fluorescence.

Utilise également des photons mais de plus haute énergie.

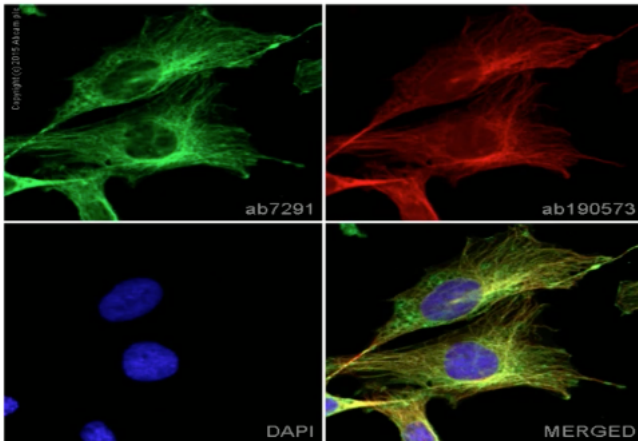
Dans ce type de microscopie, la lumière est filtrée pour obtenir une lumière monochromatique (une longueur d'onde). Un faisceau est envoyé sur l'échantillon grâce à un miroir dichroïque qui contient des molécules fluorescentes capables d'absorber la lumière et d'émettre dans une autre.



La préparation n'est pas la même : on rajoute des fluorochromes (substances chimiques capables d'émettre de la lumière fluorescente après excitation (par des rayons UV ou photons de haute énergie)).

Fluorochrome associé à la protéine recherchée (ou lipide).

Fluorochrome associé à un ac qui lui même s'associe avec la protéine recherchée -> immunomarquage.



Chaque fluorochrome se fixe sur un endroit bien particulier.

Surbstance	Longueur onde excitation	Longueur onde émission
DAPI (pour le noyau et l'ADN)	UV	Bleu
Fluorescéine (cytosquelette par ex)	Bleu	Vert
Rhodamine (membrane par ex)	Vert	Rouge

3. La microscopie confocale à balayage laser

Elle permet de réaliser des coupes à différents niveaux de la cellule et de visualiser l'échantillon en 3D et en couleur après un traitement numérique.

Microscopie électronique (ME)

Il utilise cette fois ci non pas des photons, mais des électrons.

Il permet d'obtenir une image agrandie jusqu'à 200 000 fois, et donc de pouvoir observer des organites, des systèmes de jonction. Cette microscopie donne des images en noir et blanc et la cellule observée est toujours fixée (morte).

Le pouvoir de résolution : 2nm.

Il est cependant nécessaire de préparer de façon spécifique la préparation.

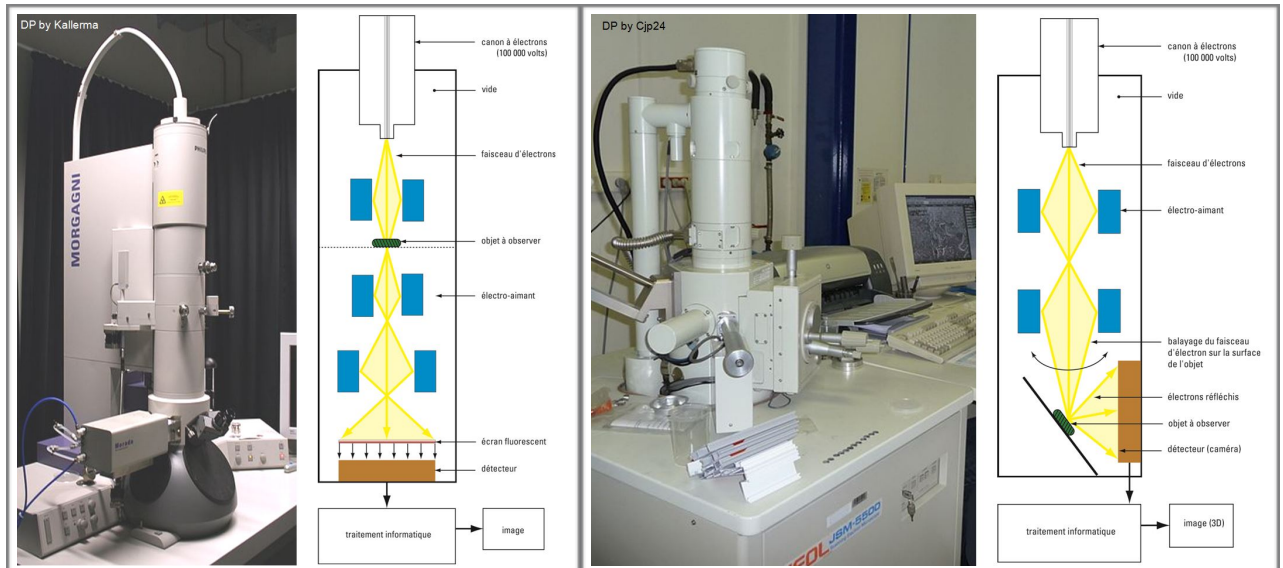
On distingue deux types de ME :

-> le ME à transmission (MET) qui permet d'observer la structure interne des cellules.

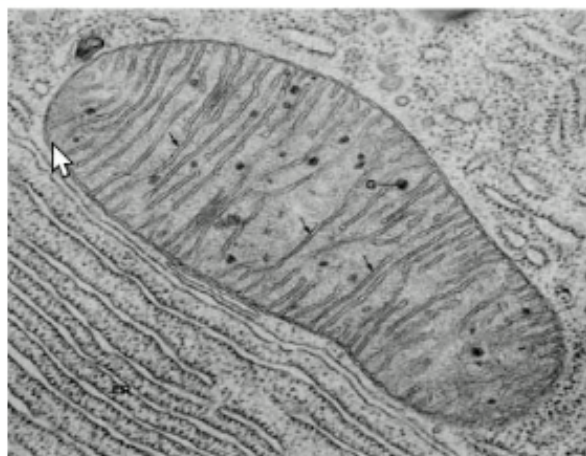
-> le ME à balayage (MEB) qui permet d'observer la surface des cellules (les électrons ne traversent pas la préparation dans ce cas là, uniquement balayage de la surface). Cela donne une image tridimensionnelle de la surface cellulaire.

Attention, pour les ME, aucune coloration n'est faite sur les coupes observées. Le contraste peut éventuellement être obtenue par ajout de certains métaux qui se fixeront sur les structures particulières.

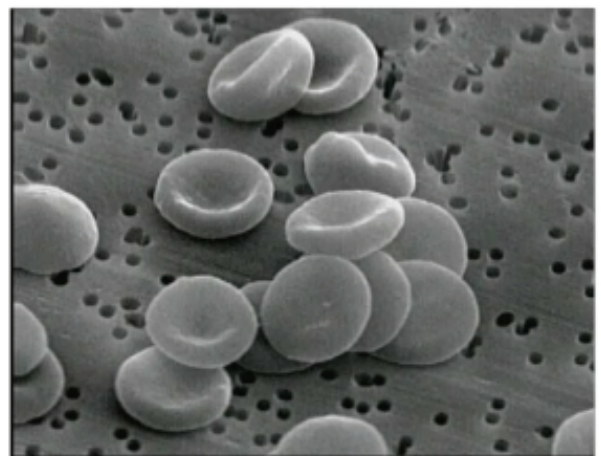
En MO, les coupes sont très souvent colorées.



MET



MEB



B. Base de la cytochimie et de l'Immunohistochimie (IHC)

La **cytochimie** = utilisation de marqueurs vitaux (molécules colorées permettant de visualiser certaines parties de la cellule).

1. L'IHC

L'IHC est très utilisée -> elle a pour but de repérer des protéines sur des cellules ou dans la MEC que l'on appelle antigène (Ag).

Les c. sont caractérisées par des Ag (de surface).

Une fois les ac produits, on peut faire une **IHC** :

Les cellules doivent être fixées.

DIRECTE :

1. Incubation des cellules avec les ac (marqués par un fluorochrome par ex).
2. Lavage (enlève les ac non fixés, pour qu'il n'y ait pas de faux signal).
3. Lecture avec MO à fluorescence

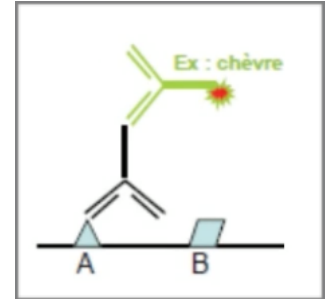
INDIRECTE

Ici, deux types d'ac sont nécessaires :

- les ac primaires, qui se fixent sur l'ag
- les ac secondaires qui reconnaissent la partie constante des ac primaires.

L'ac secondaire est marqué par un fluorochrome ou par une enzyme. Pour détecter l'enzyme, on place un substrat, qui, en présence de l'enzyme se transforme en produit coloré.

Néanmoins, pour que la réaction marche, il faut que les deux types d'ac soient d'espèces différentes (exemple pour un homme, introduire un ac de chèvre accélérera la réaction).



Une autre technique de marquage : sondes couplées à une protéine fluorescente

Il est possible de faire exprimer par la cellule elle-même une protéine fluorescente. On prépare par génie génétique un fragment d'ADN circulaire où le gène de la protéine à étudier a été combiné à un gène qui code pour une protéine fluorescente.

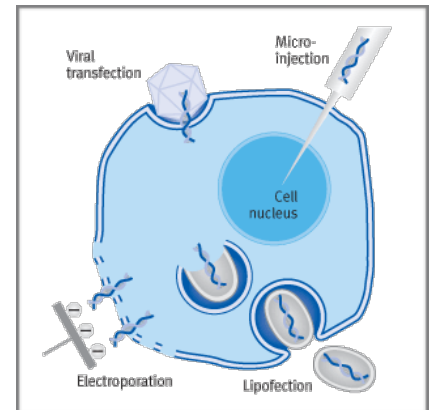
Exemple : green fluorescent protein.

On injecte ensuite l'ADN de 3 méthodes différentes :

Micro-injection : on injecte l'ADN recombinant à l'aide d'une micro-pipette.

Electroporation : on perméabilise transitoirement la membrane de la cellule par un choc électrique pour que l'ADN puisse y pénétrer.

Transfection : on encapsule l'ADN recombinant dans un liposome qui fusionne avec la membrane plasmique de la cellule et y relargue l'ADN.

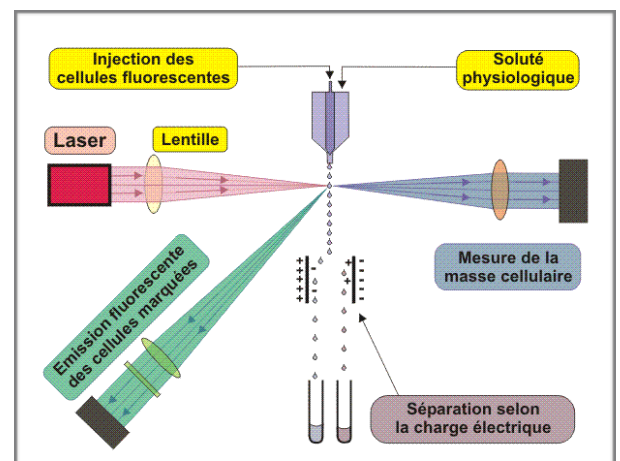


Les cellules ainsi transformées peuvent être analysées en vidéo-microscopie.

La cytométrie en flux et trieur de cellules

C'est une technique permettant de reconnaître et trier les c fluorescentes et de compter le nombre total de c exprimant la protéine.

L'analyseur affecte une charge positive aux c non fluorescentes et une charge négative aux c fluorescentes grâce à un électro aimant.



Les cultures cellulaires

Le principe de la culture cellulaire est d'isoler des cellules à partir d'un organe et de les mettre dans un milieu de culture leur permettant de continuer à vivre. Il existe deux types de culture :

- les cultures primaires qui ont une courte durée de vie et qui perdent rapidement leurs caractéristiques de différenciation.

- les cultures en lignée qui utilisent des cellules transformées, notamment cancéreuses, qui gardent la capacité à se multiplier.

- les cultures de "cellules souches", qui sont prélevées sur un blastocyste (très jeune embryon) et qui sont totipotentes (capable de donner n'importe quel type cellulaire). Ces cellules peuvent ensuite être induites en différents types cellulaires (cellules nerveuses, musculaire, sanguine...).

