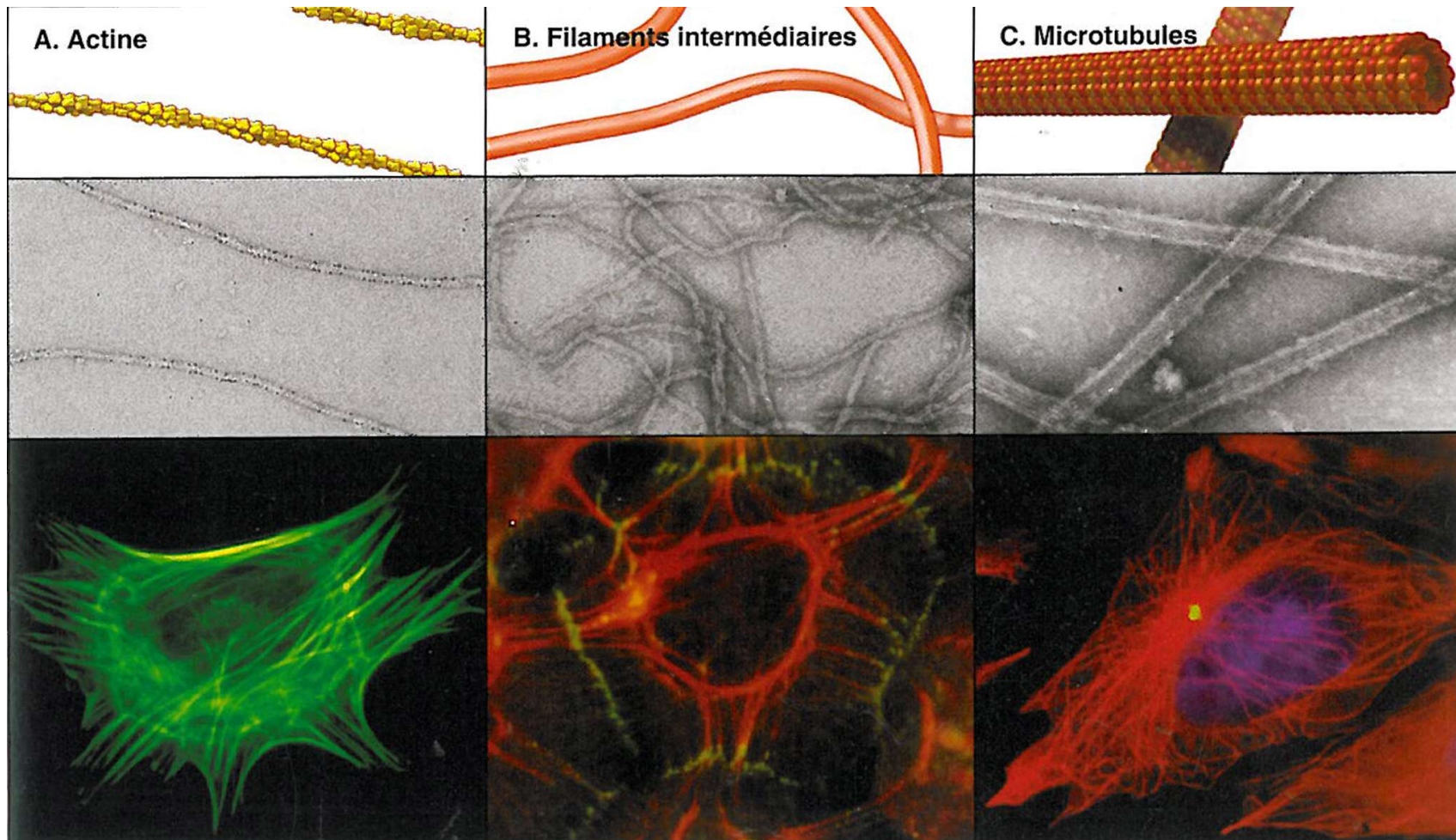


TP de Biologie Cellulaire

UE BCD

Observation du cytosquelette dans
des cellules animales en culture

TP: rappels sur les 3 types de réseaux



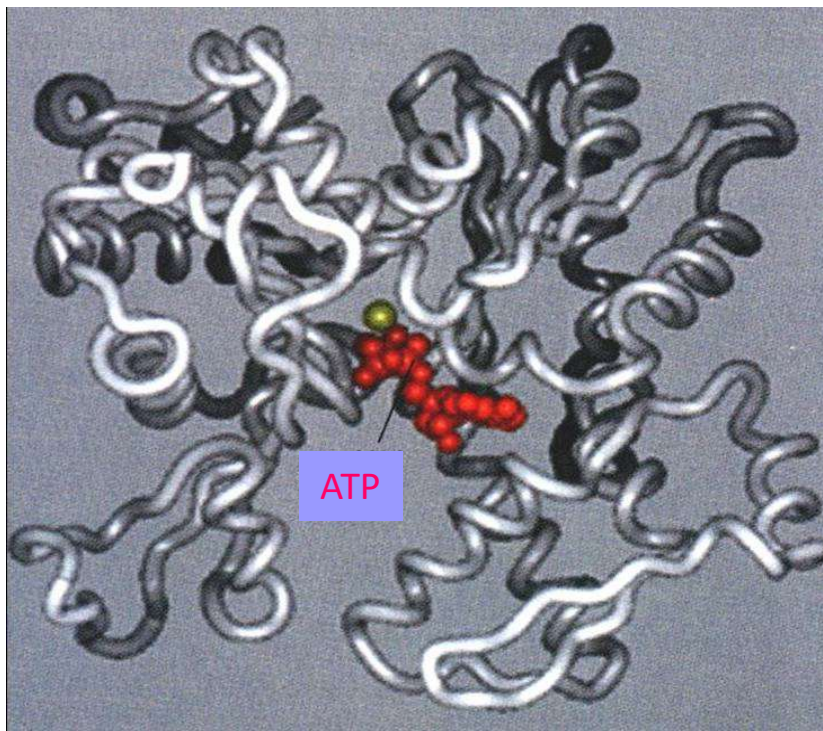
~ 8 nm
de diamètre

~ 10 nm
de diamètre
(6 types différents)

~ 25 nm
de diamètre

Structure du monomère d'actine G et du filament d'actine

G-actine-ATP



Extrémité plus

Extrémité moins

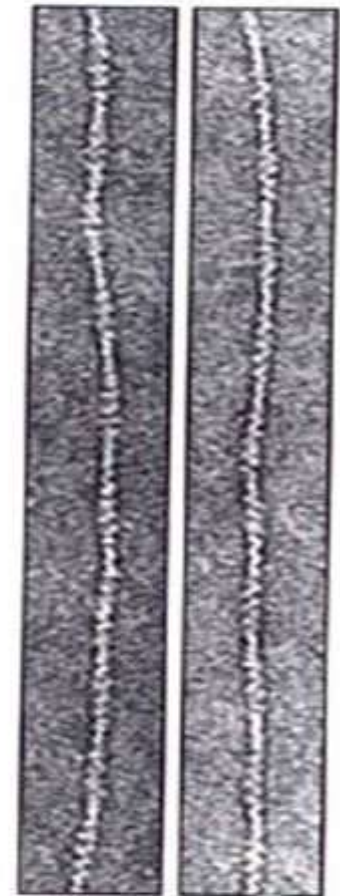
Extrémité plus

37 nm

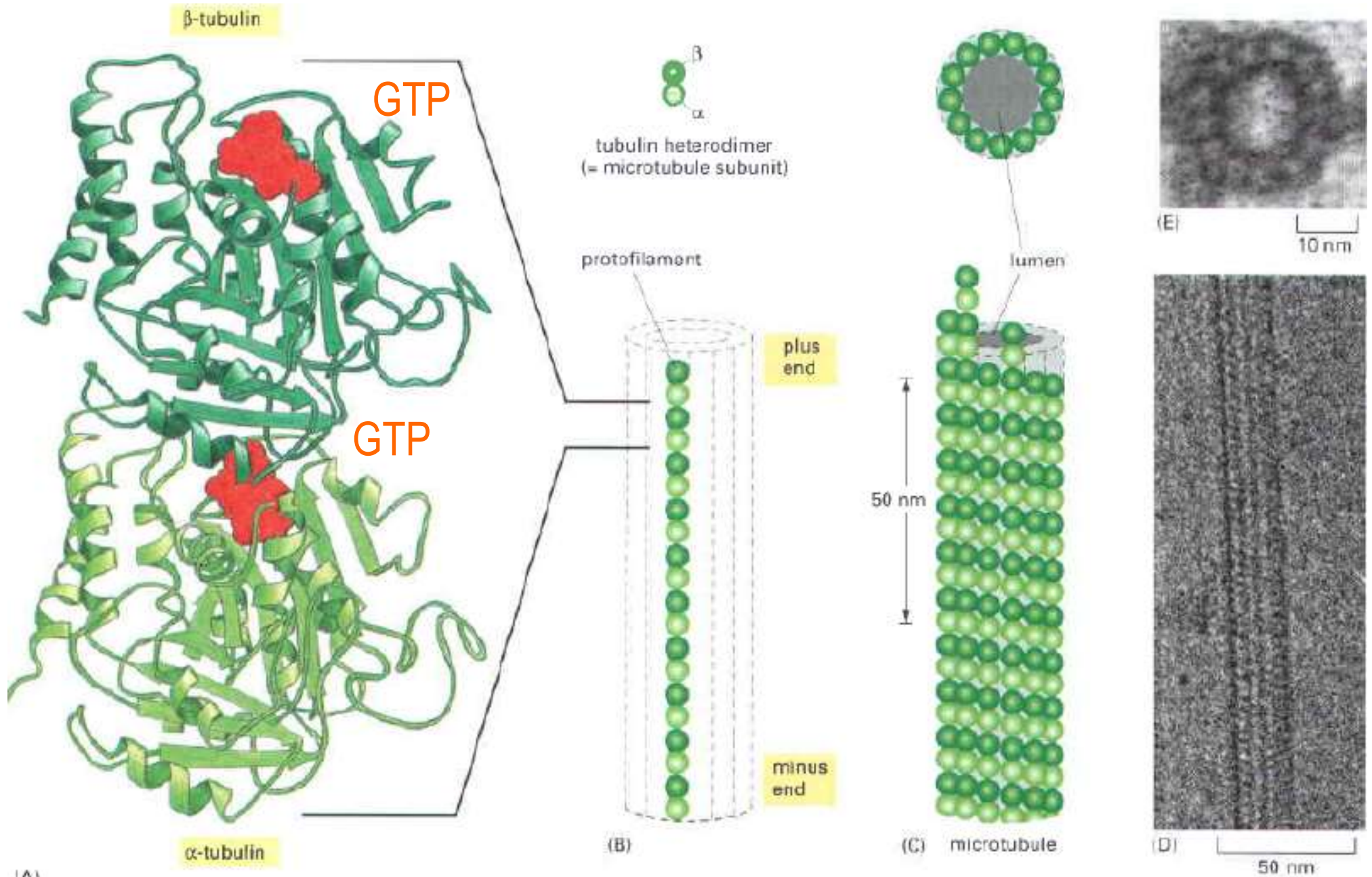
Extrémité moins

7 nm

F-actine

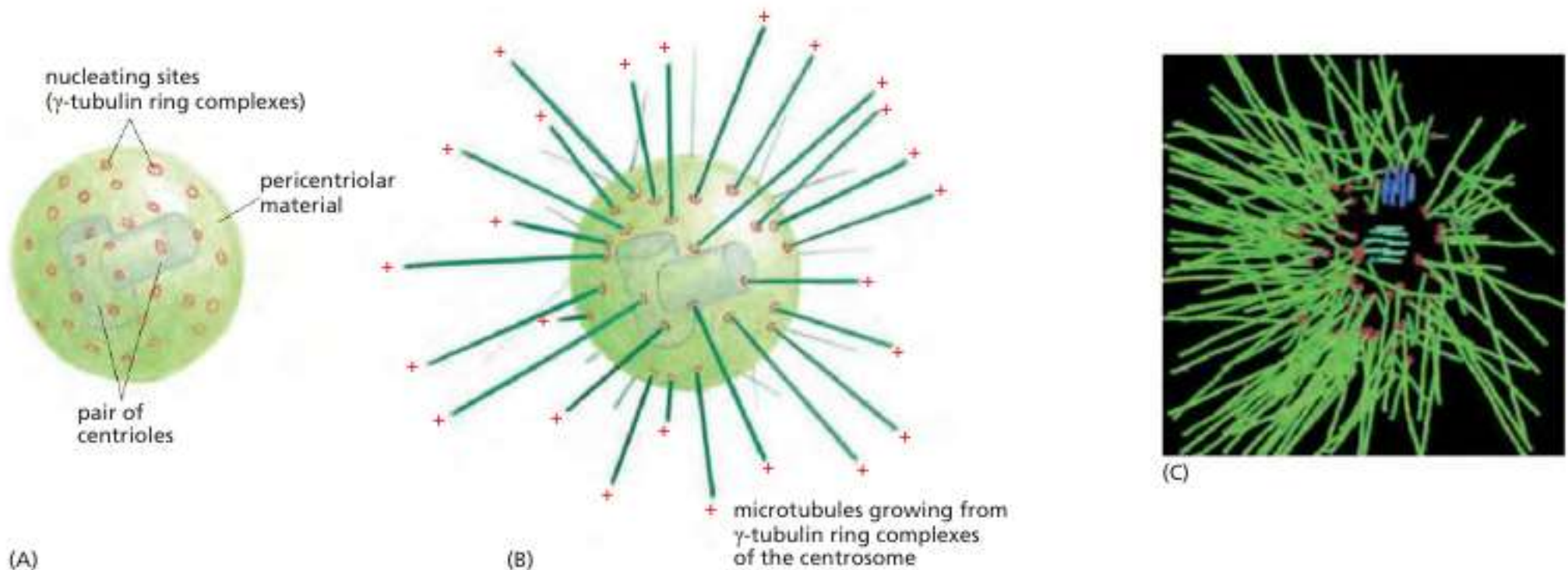


Rappel: Structure microtubules



Ancrage des microtubules au MTOC

- Les microtubules sont liés, via leur extrémité moins, à un centre organisateur, le centrosome (= 2 centrioles perpendiculaires + matériel péricentriolaire) -> contient des gamma-TuRC stables

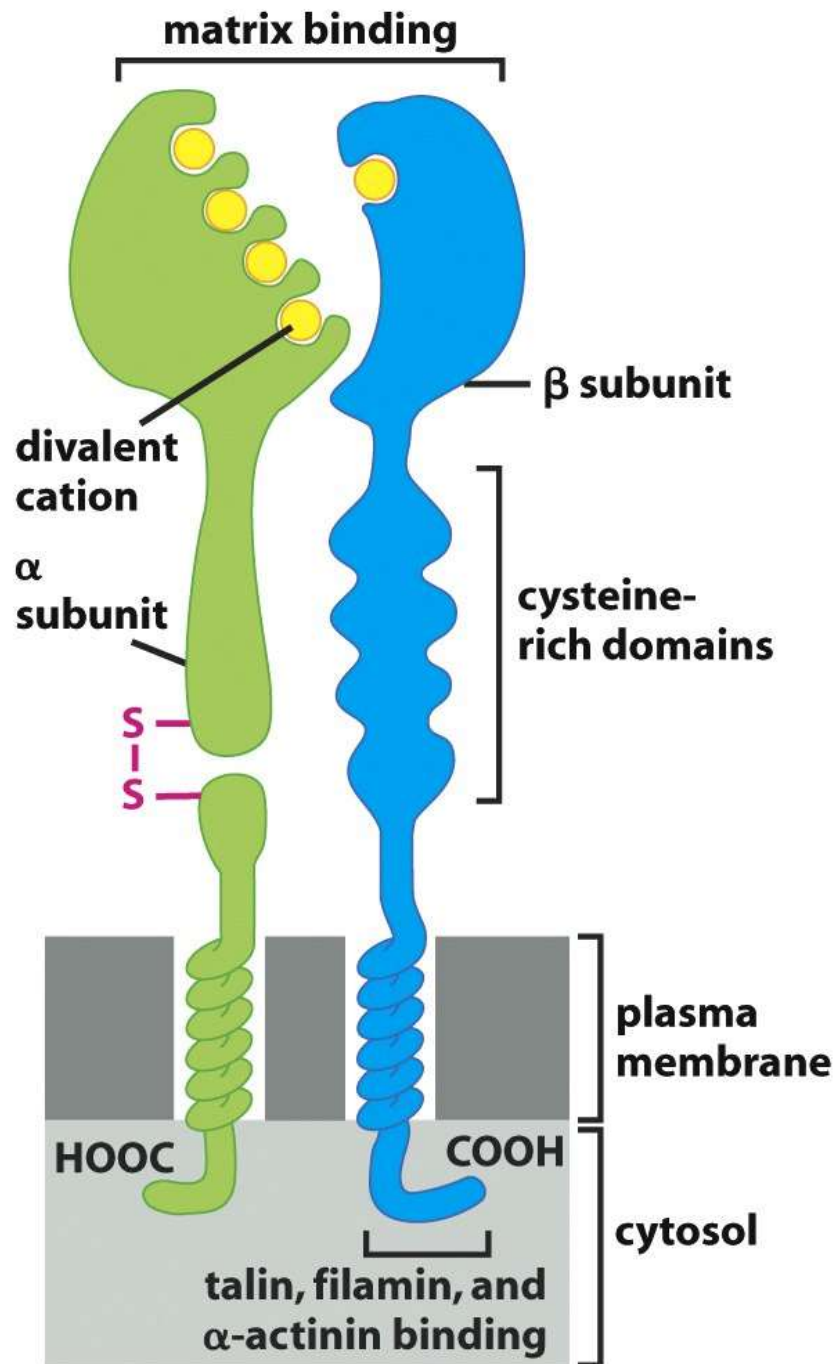


Cellules animales utilisées

(= Cellules 3T3 = Fibroblastes de souris)

- Cellules motiles et capables de se diviser
- résident dans les tissus conjonctifs non spécialisés.
- Produisent la plupart des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) dont elles assurent le renouvellement.
- Peuvent former des contacts avec les cellules voisines, mais ces derniers sont peu stables.
- Interagissent avec certains constituants de la MEC via les intégrines.

Adhésion à la MEC



Interaction avec des protéines de la MEC via les domaines N-terminaux des chaînes α et β

Intégrines = Glycoprotéines
transmembranaires
formées de 2 chaînes α et β
18 sous-unités α
8 sous-unités β
24 hétérodimères

Interaction avec le cytosquelette d'actine via
Le domaine C-terminal de la sous-unité β

Association avec des molécules de signalisation
via les parties C-terminales des 2 chaînes α et β

Forces de traction exercées par la cellule sur la matrice extracellulaire

Li B and Wang JHC Sensors (2010) 10: 9948-9962.

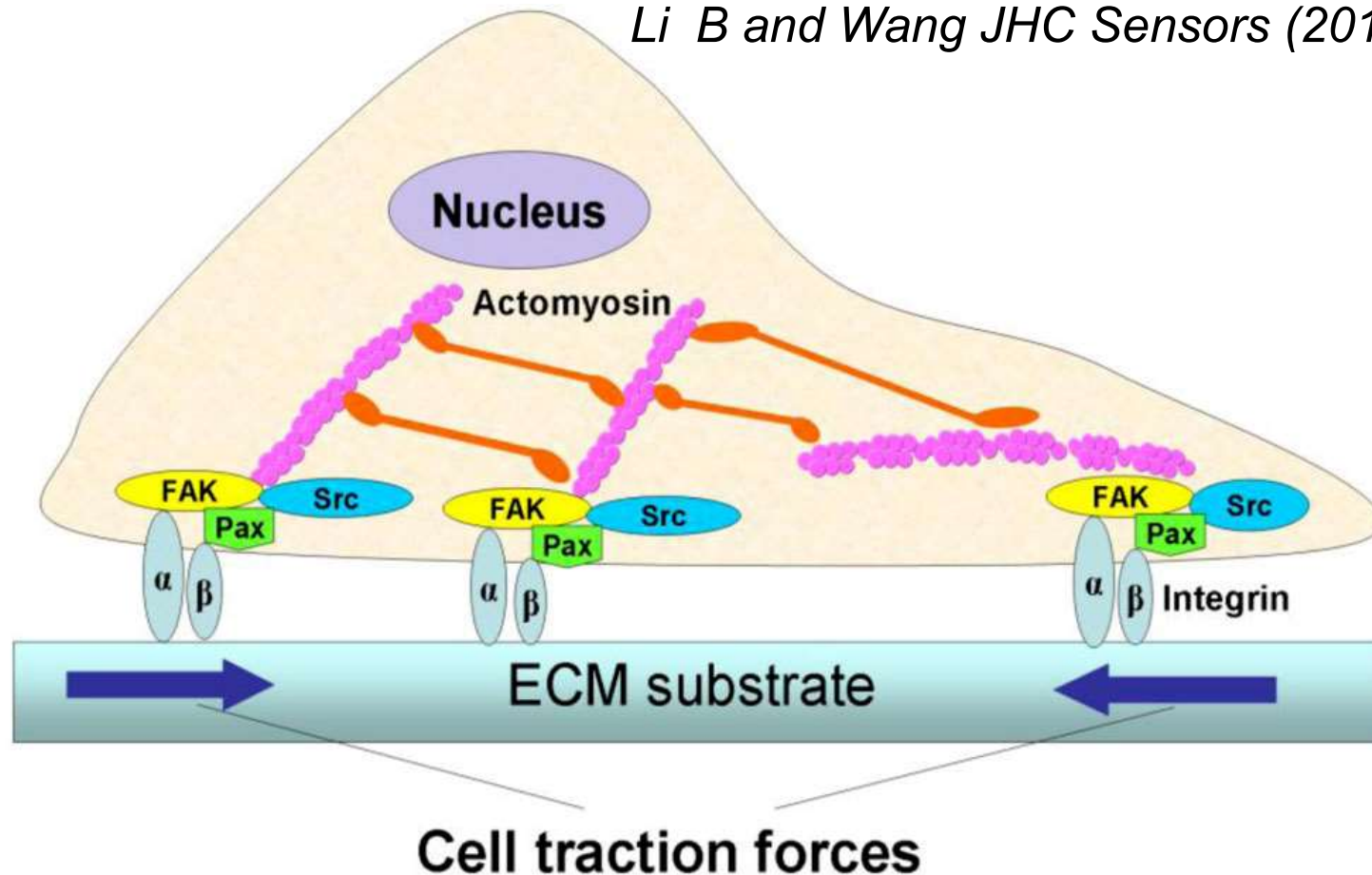


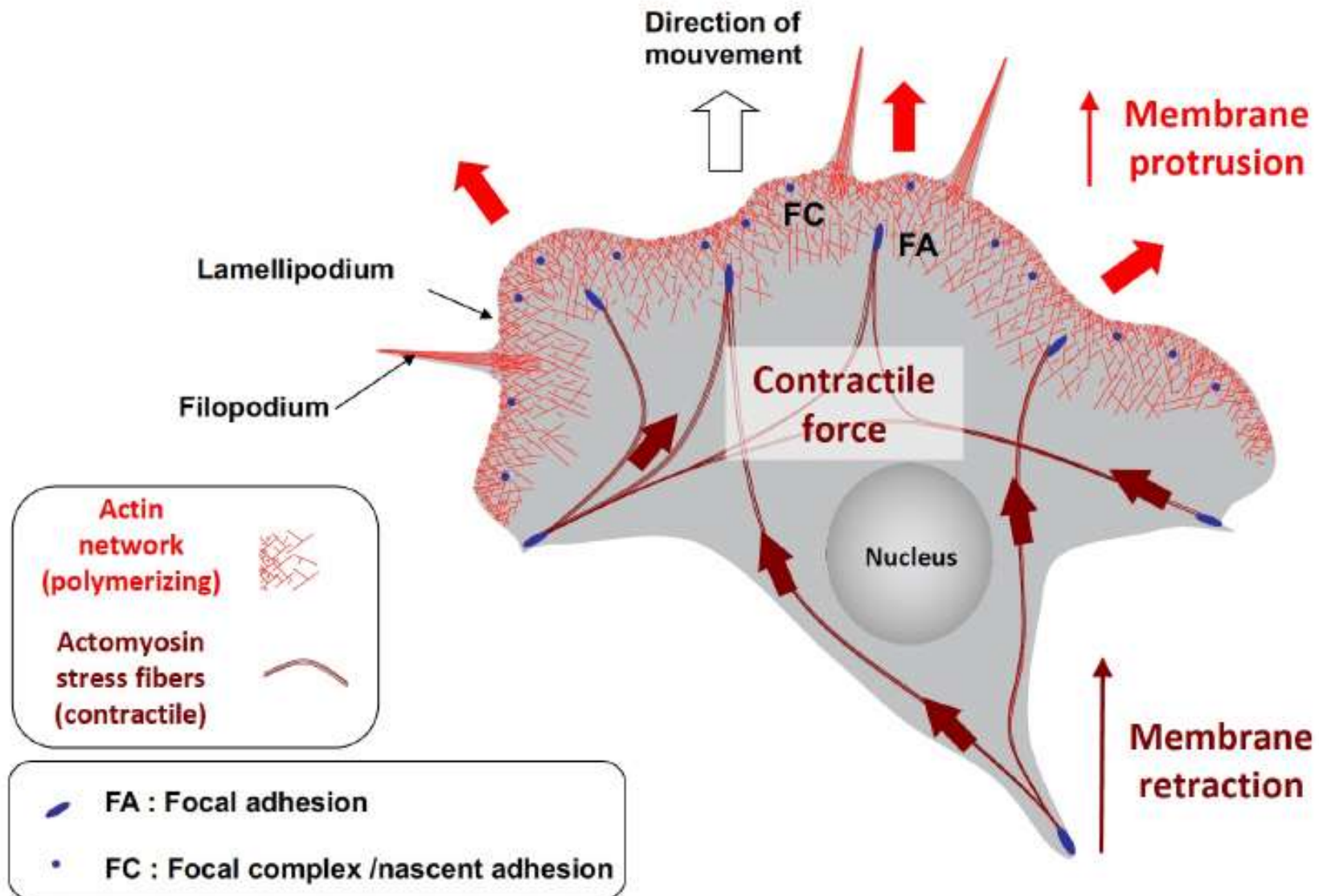
Figure 1. Pour pouvoir se déplacer au sein du tissu conjonctif, les fibroblastes exercent sur la MEC des forces de traction. La génération de ces forces est rendue possible par le fait que les intégrines, peuvent se lier de manière simultanée à certains composants de la MEC et aux filaments d'actine. Les tensions mécaniques produites dans la cellule par le cytosquelette d'actine sont transmises à la MEC via les intégrines.

Migration des cellules mésenchymateuses

La migration cellulaire nécessite la formation de structures spécifiques à base de filaments d'actine :

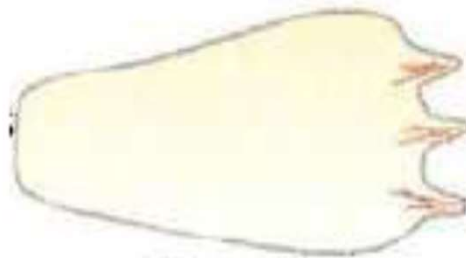
- Filopode : protrusion membranaire très fine qui contient des filaments d'actine disposés en faisceaux parallèles et qui permet à la cellule de sonder son environnement (rigidité, signal, ...).
- Lamellipode : protrusion membranaire large et plate qui contient des filaments d'actine formant un réseau branché et qui propulse la cellule vers l'avant.
- Fibres de stress : faisceaux d'actine anti-parallèles et contractiles permettant d'exercer une traction sur la MEC et la contraction du corps cellulaire.

Migration des cellules mésenchymateuses

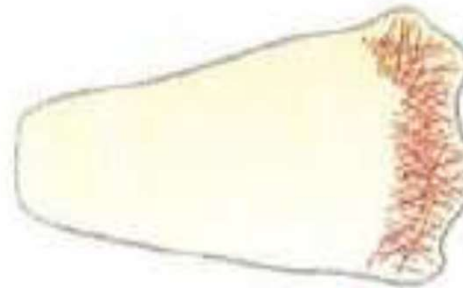


Organisation des filaments d'actine dans les fibroblastes en migration ou en division.

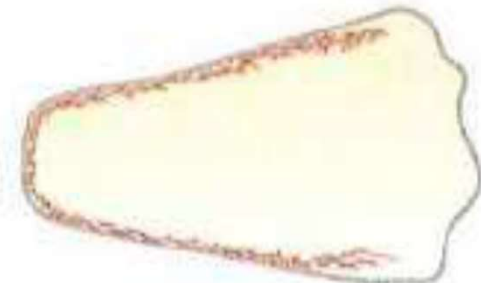
Cellules en migration



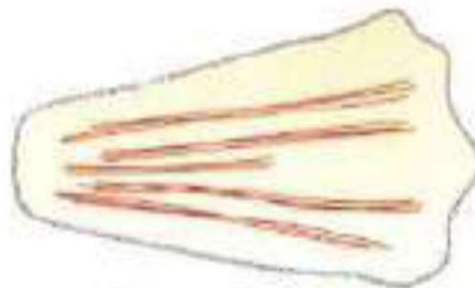
Filopodia



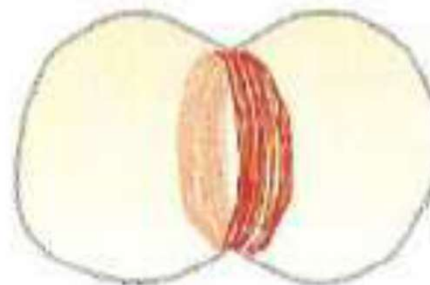
Lamellipodium/
leading edge



Cell cortex

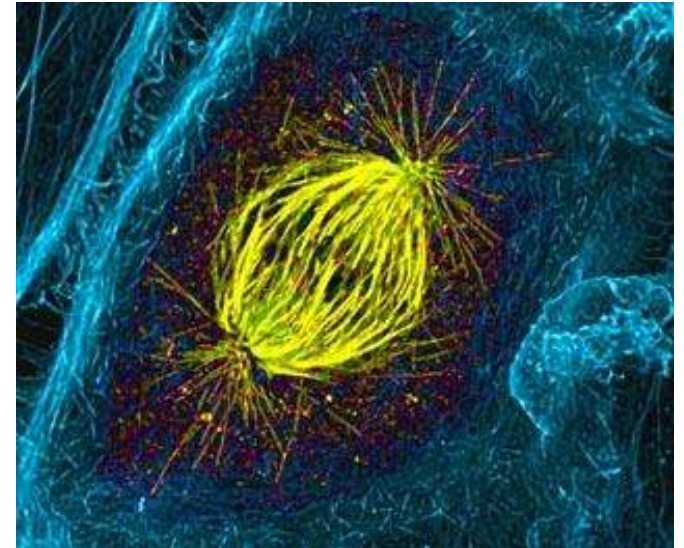
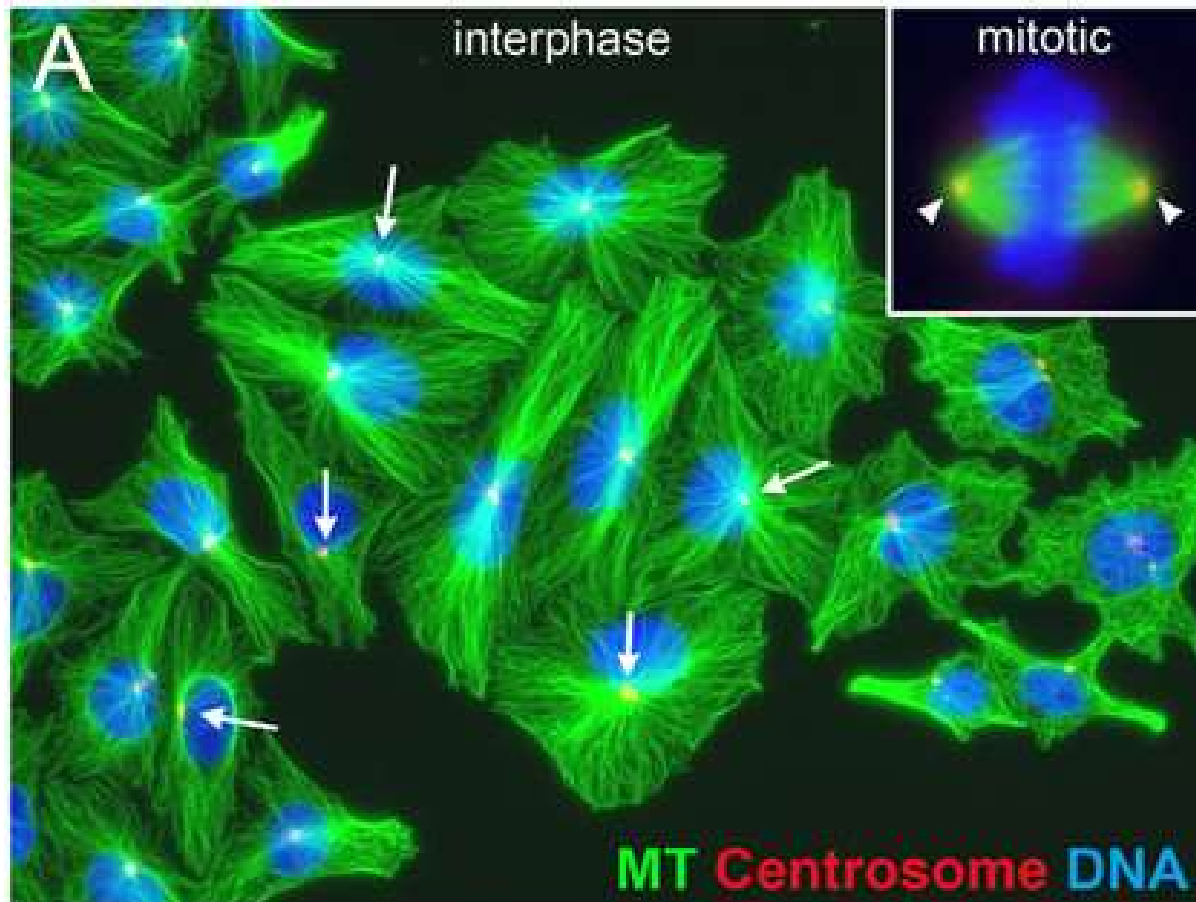


Stress fibers

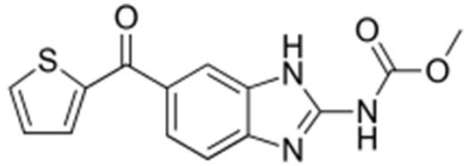


Contractile ring
Cellules en division

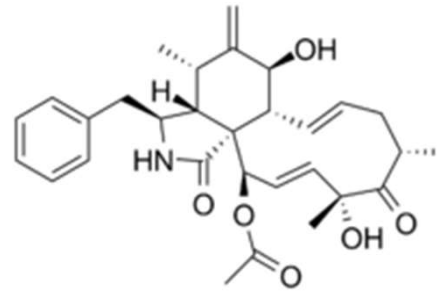
Organisation des Microtubules
dans des fibroblastes en
Interphase ou en division



2 drogues:

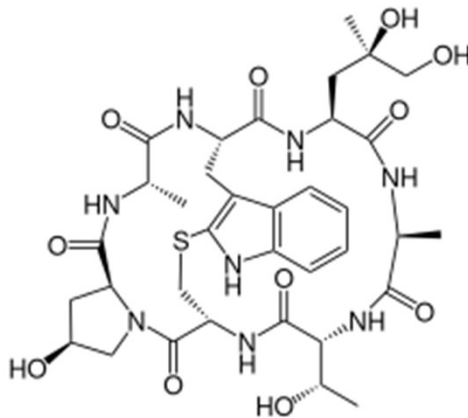


Nocodazole

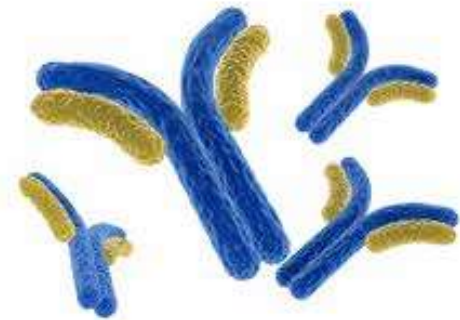


Cytochalasine D

2 marqueurs/révélateurs



Phalloïdine



Ac anti-tubuline

Déroulement du TP, principe des manipulations

Séance 1: Traitement nocodazole ou cytochalasine D

Fixation

Réduction des fonctions aldéhydes

Perméabilisation

Marquage

Observations

« Rédaction du compte-rendu »

Séance 2: Traitement des images et montage

objectifs des différentes étapes qui précèdent le marquage

Fixation (avec la solution de PFA à 4% dans du PBS)

Cette étape consiste à figer les cellules dans un état particulier, en préservant leur forme, leur organisation et l'intégrité de leurs constituants.

Le paraformaldéhyde (PFA) est un agent de réticulation qui réagit principalement avec les fonctions amines des protéines. En réticulant les protéines, le PFA les rend insolubles et il stabilise les édifices tridimensionnels qu'elles forment.

Quenching (avec une solution de NH_4Cl)

Cette étape a pour but de réduire les fonctions aldéhydes du PFA encore libres.

Elle permet 1) d'éviter que les résidus de fixateur endommagent les « marqueurs » utilisés pour la visualisation des éléments du cytosquelette et 2) de limiter l'auto-fluorescence du fixateur.

Perméabilisation (avec une solution contenant un détergent, le Triton X100)

La membrane plasmique forme une barrière sélective très efficace, même lorsque les cellules sont mortes. Pour que les marqueurs utilisés puissent entrer dans les cellules, il faut donc la rendre perméable en utilisant un détergent.

Saturation (avec une solution contenant de l'albumine)

Cette étape permet de saturer les sites auxquels les marqueurs utilisés pour la visualisation des MF et des MT pourraient se lier de manière non spécifique.

Mise en évidence des microtubules: Immunofluorescence directe

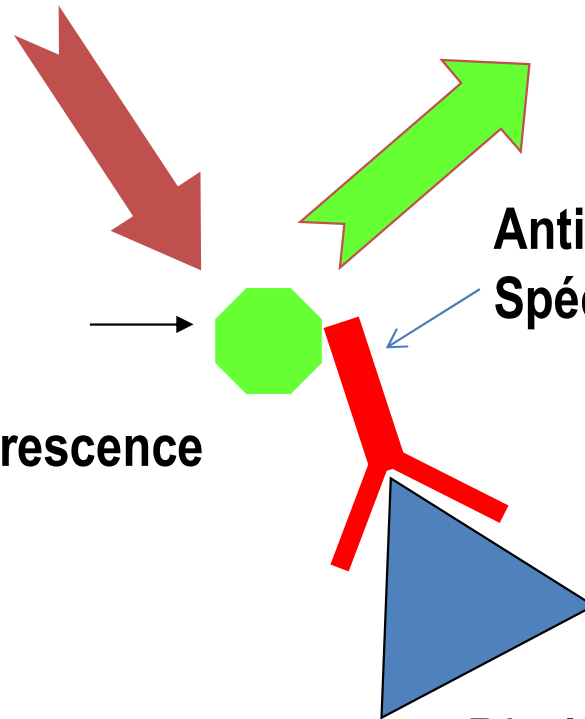
**Excitation à longueur
d'onde donnée**

**Emission à longueur
d'onde donnée**

**Fluorophore
= Alexa 488
Émet une fluorescence
Verte.**

**Anticorps reconnaissant de façon
Spécifique la tubuline**

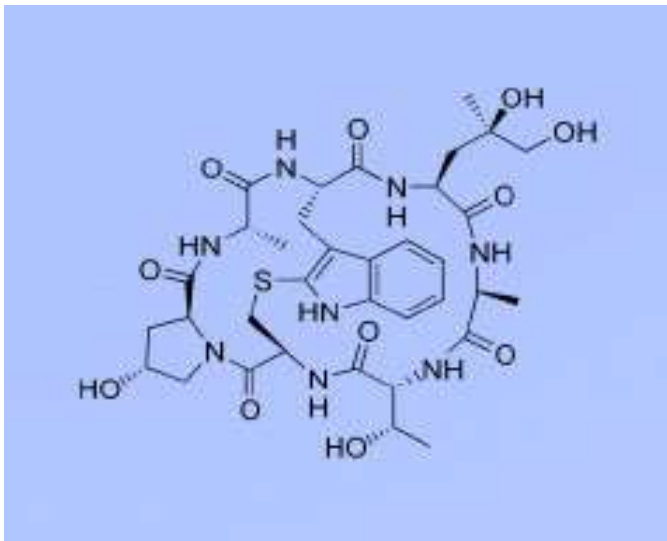
**Dimère de tubuline au sein d'un MT
ou libre dans le cytosol.**





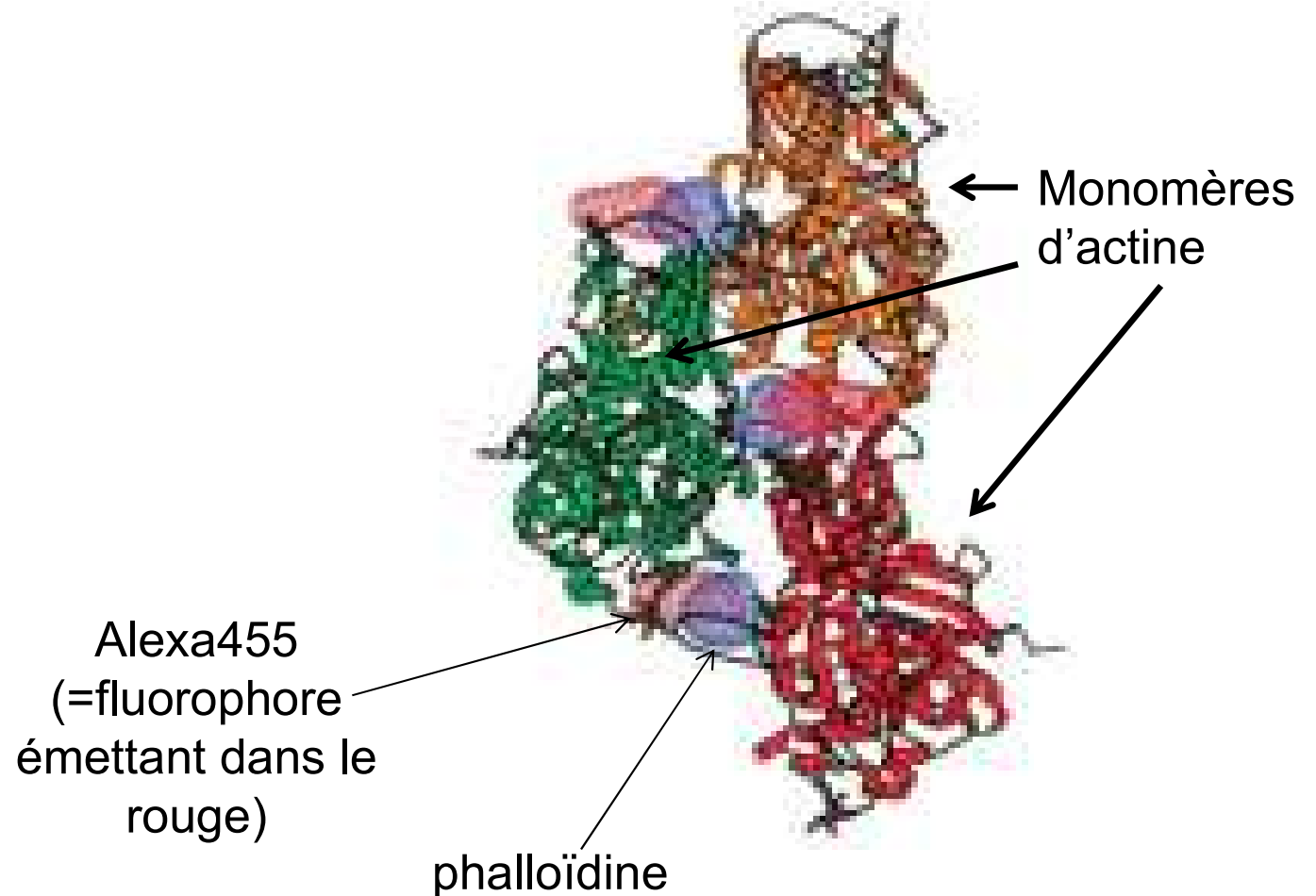
Amanite phalloïde

Mise en évidence des microfilaments:
à l'aide de la phalloïdine marquée avec de la rhodamine
(Fluorescence directe)



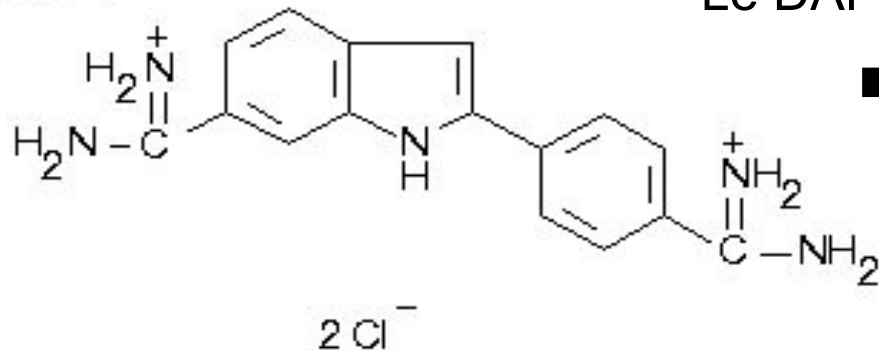
Phalloïdine

La phalloïdine ne se lie pas à l'actine G

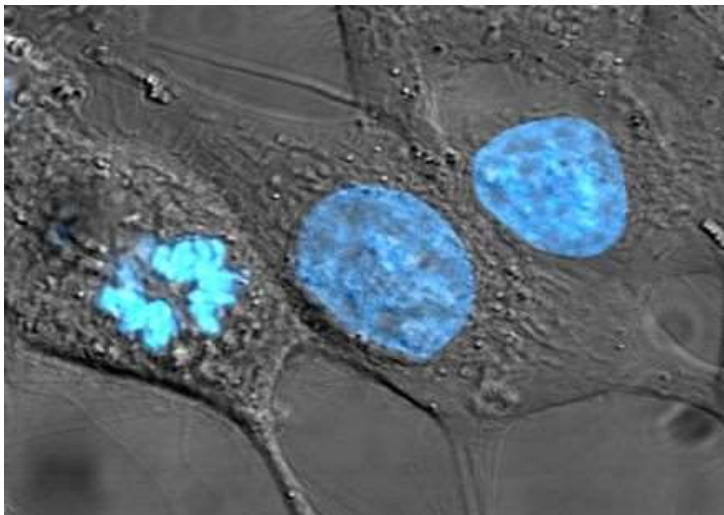
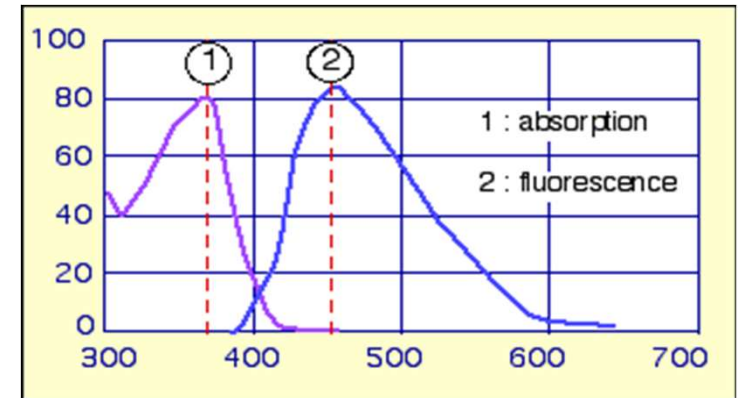


Mise en évidence des noyaux des cellules à l'aide du DAPI (Fluorescence directe)

DAPI



Le DAPI se lie à l'ADN



Il émet une lumière bleue lorsqu'il est lié à l'ADN et qu'il est excité avec une lumière violette

Observations des cellules à l'aide d'un microscope à épifluorescence

La microscopie photonique (ou optique) utilise la lumière et des lentilles de verre pour obtenir une image agrandie d'un objet.

Grossissement maximal : x1000.

Résolution maximale : 200 nm.

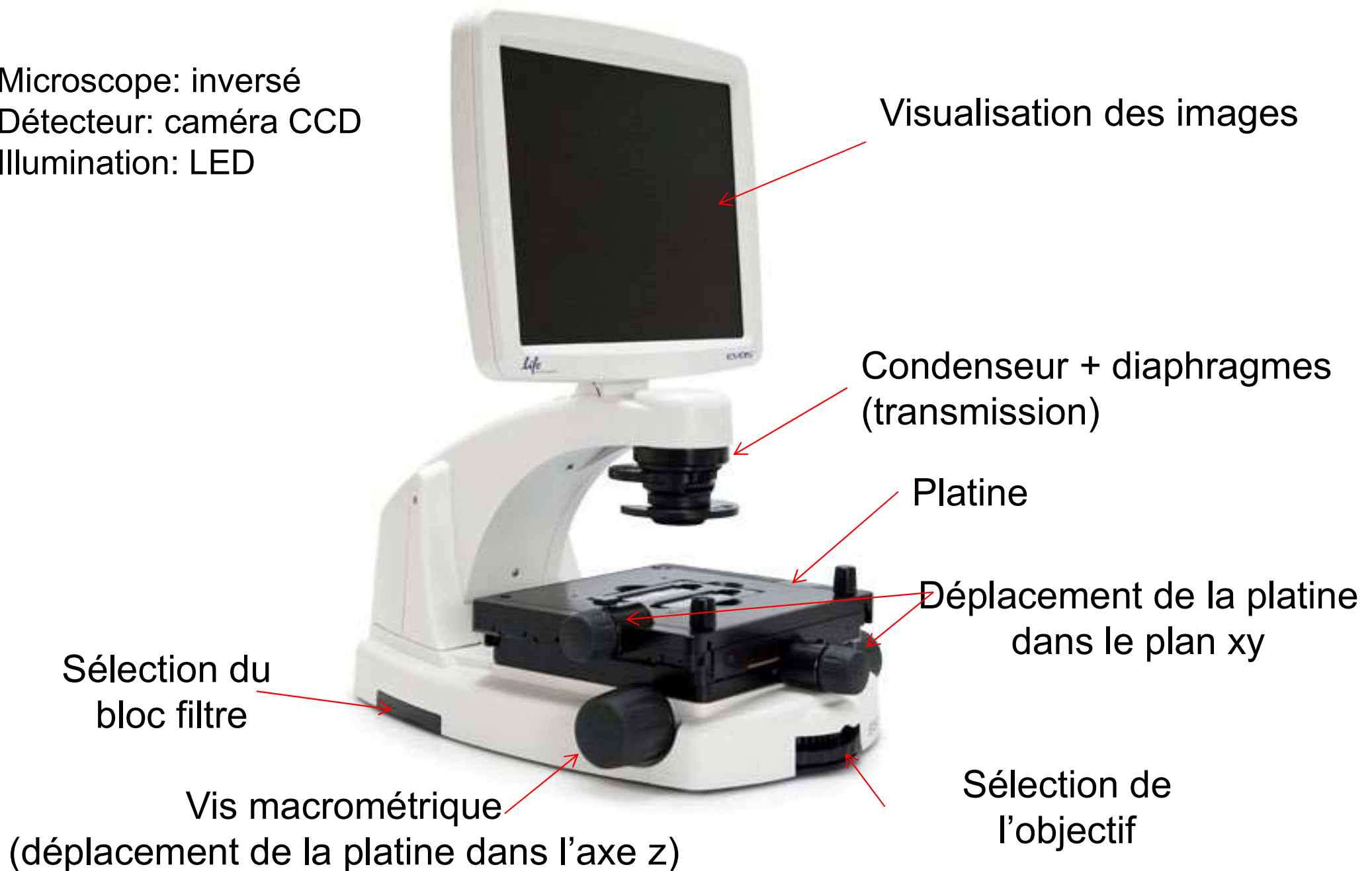
Détection :

- Lumière blanche transmise.
- Fluorescence émise par l'échantillon.

Résolution = distance minimale séparant deux points contigus perçus comme distincts.

Système d'acquisition d'image EVOS

Microscope: inversé
Détecteur: caméra CCD
Illumination: LED



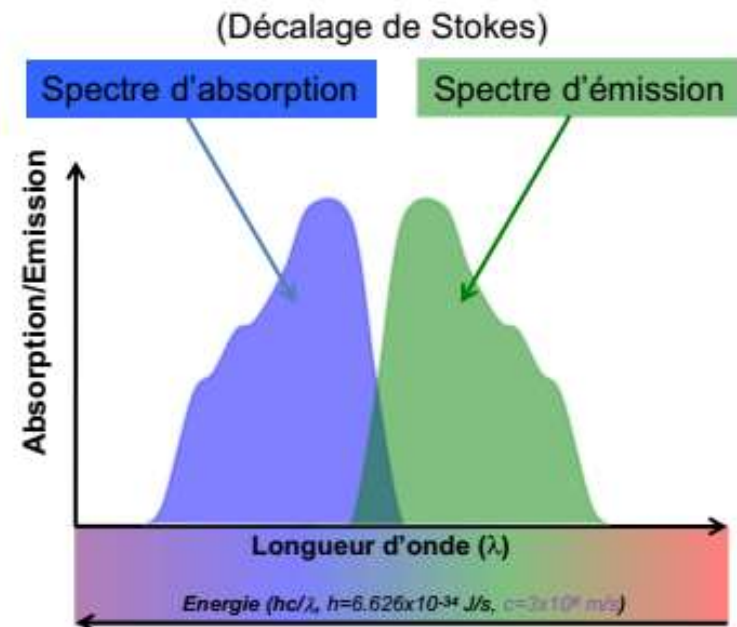
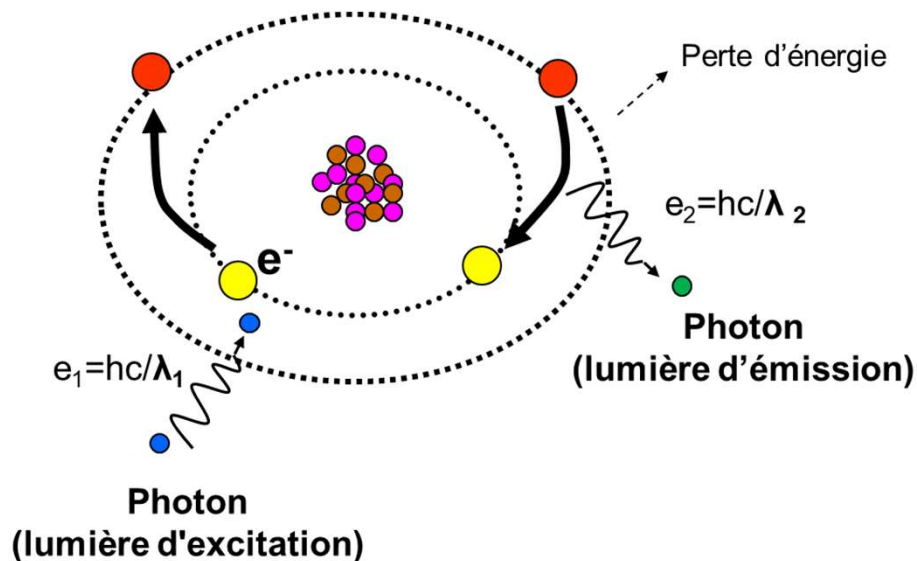
Molécule fluorescente : Rappel

Molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière excitation) -> passage à un état excité instable

Retour à l'état fondamental s'accompagne d'une perte d'énergie et d'émission d'énergie lumineuse (lumière émission)

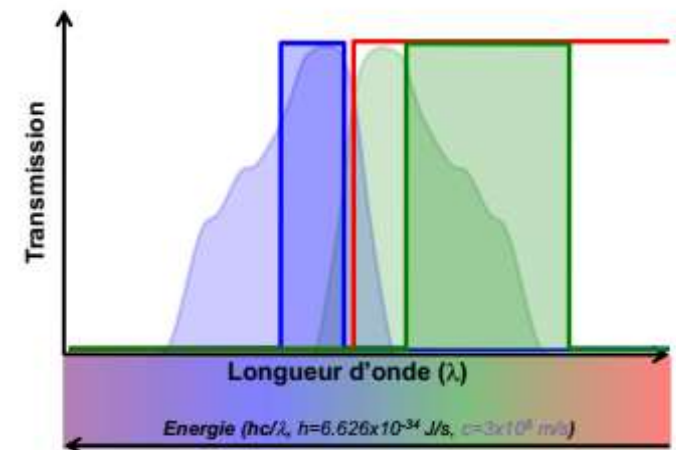
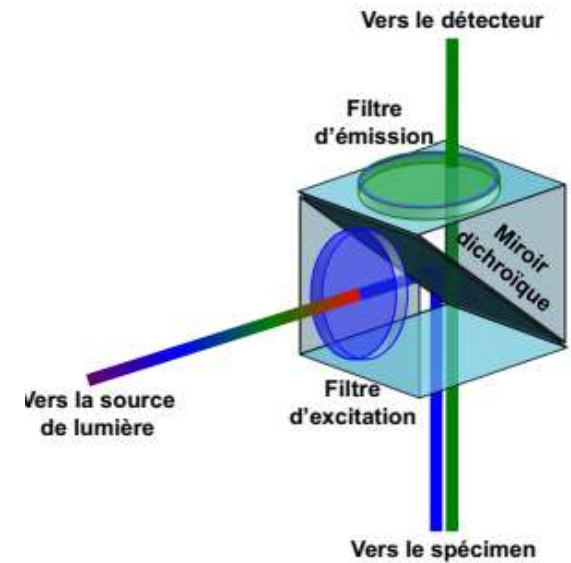
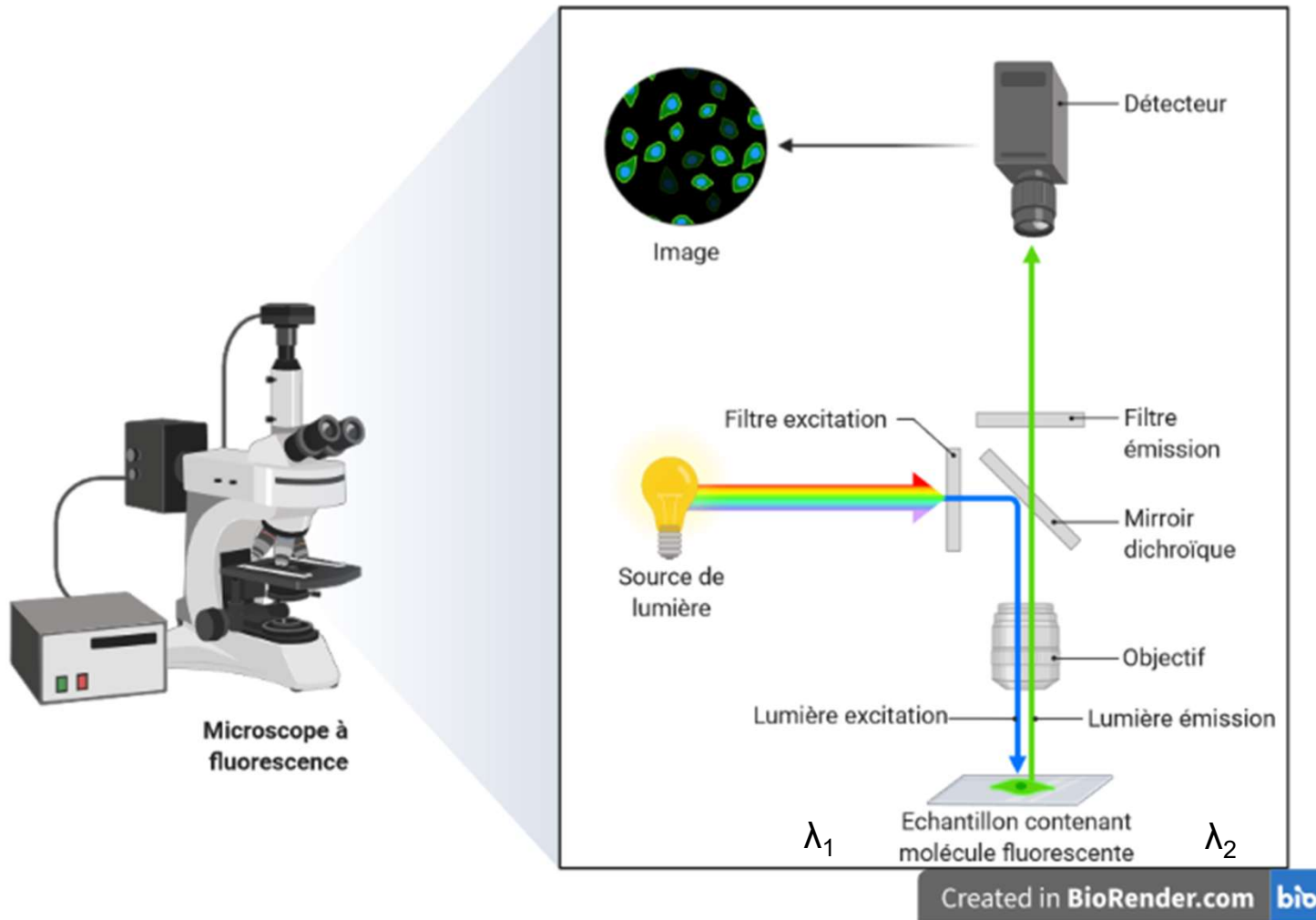
→ énergie émission (e_2) < énergie excitation (e_1) donc $\lambda_1 < \lambda_2$

Molécule fluorescente



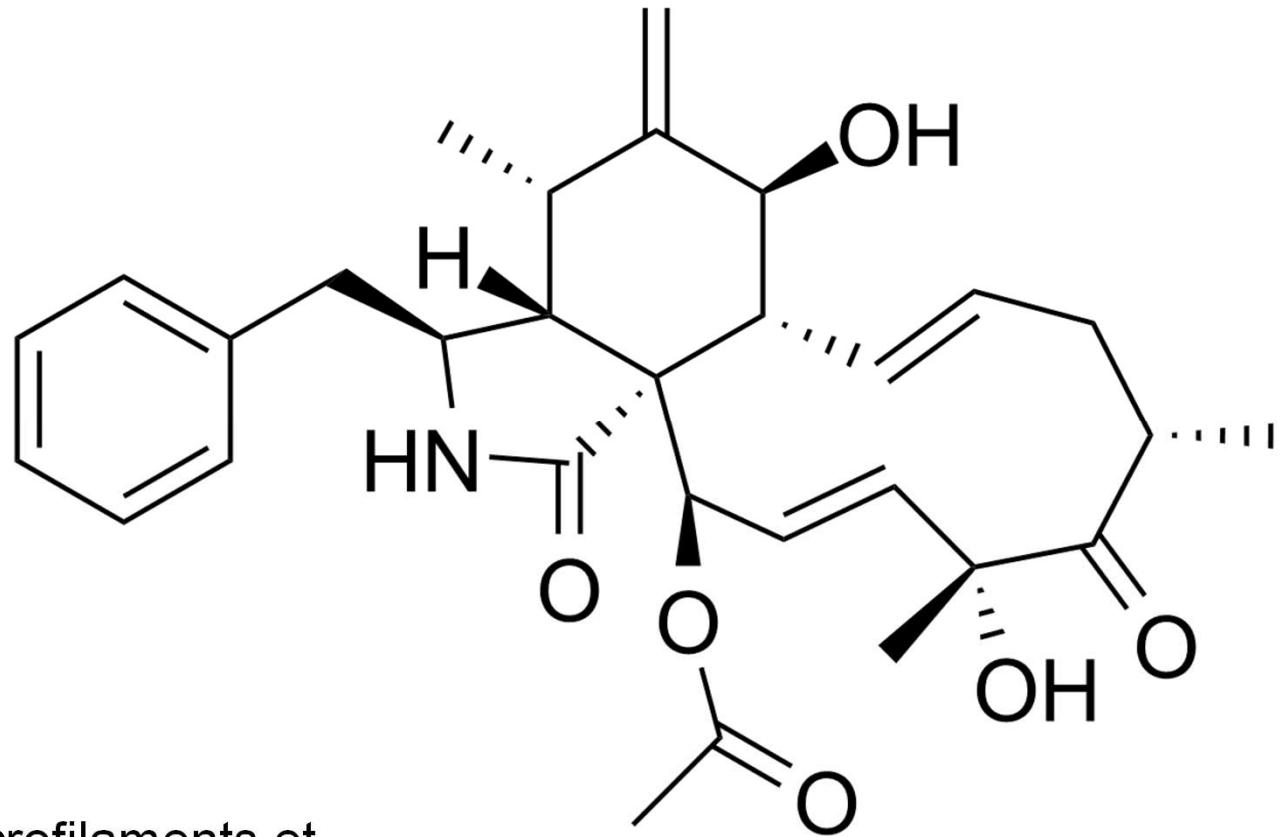
Adapté de F. Cordellieres

Observation fluorescence



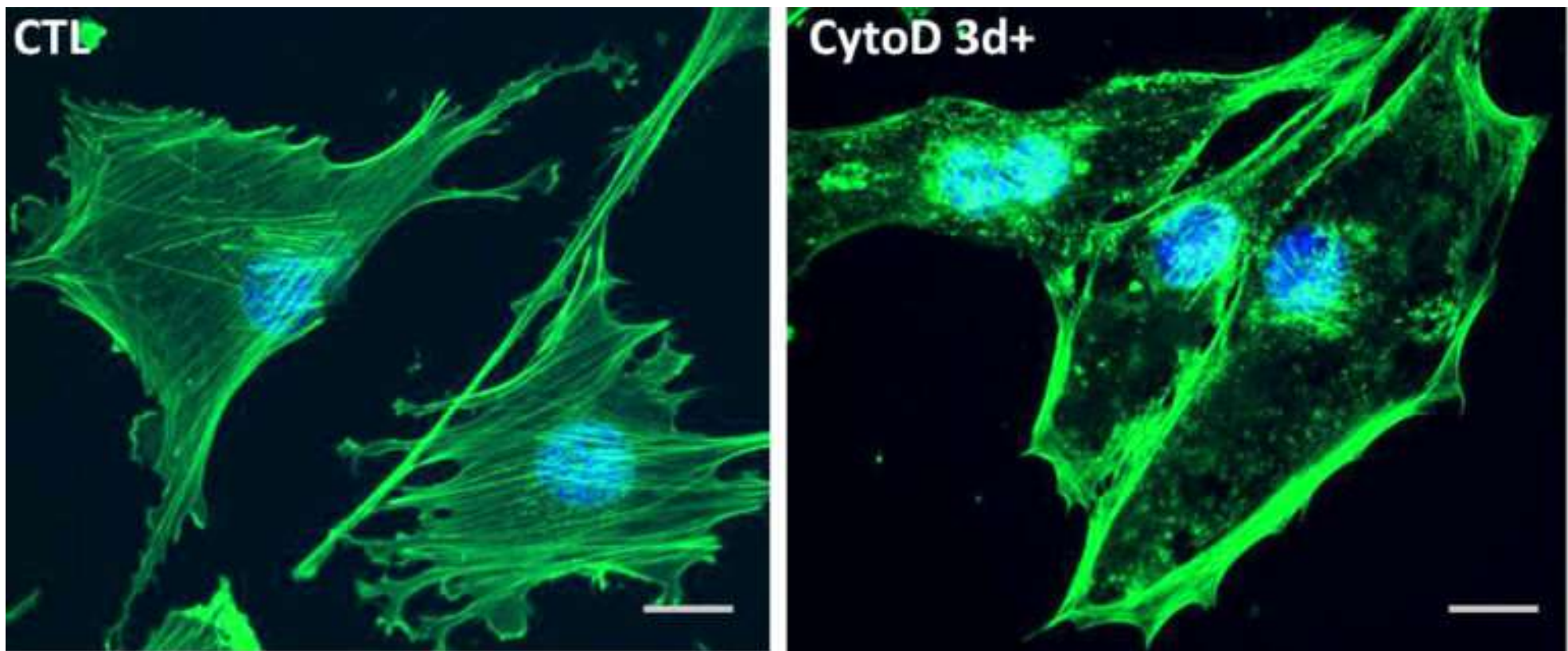
Fluorochrome	Excitation	Emission
Hoechst	350nm (UV)	450nm (bleu)
Alexa Fluor 488	495nm (bleu)	520nm (vert)
Alexa Fluor 555	555nm (vert)	570nm (orange-rouge)

Cytochalasine D



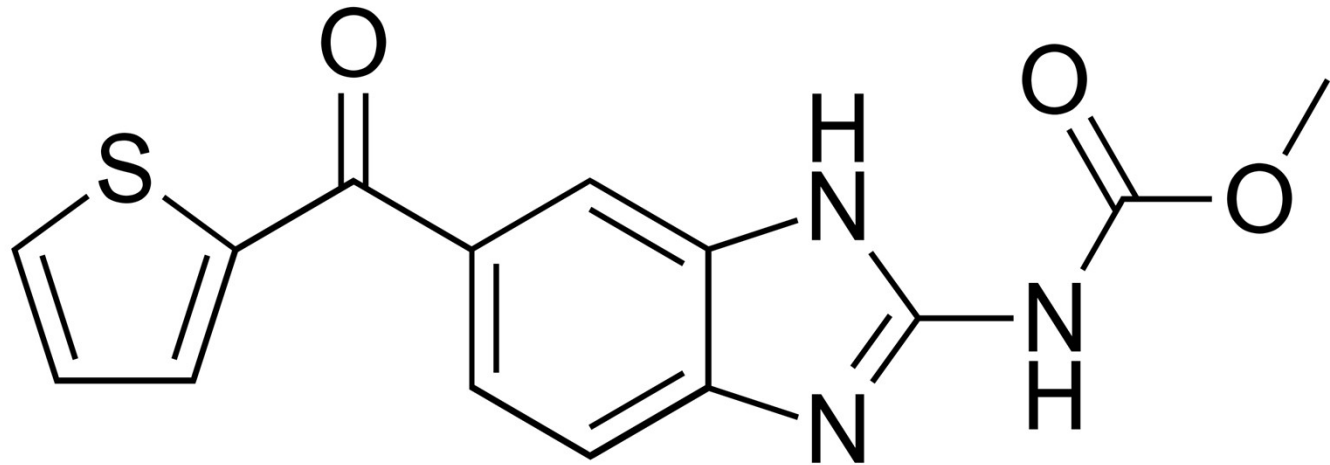
- Origine : fongique
- Se lie à l'extrémité (+) des microfilaments et empêche les processus de polymérisation et de dépolymérisation au niveau de cette extrémité.
- Favorise la fragmentation des microfilaments.
- Favorise la formation de dimères d'actine G et stimule l'activité ATPasique des sous-unités constituant les dimères .

Organisation des filaments d'actine



Nocodazole

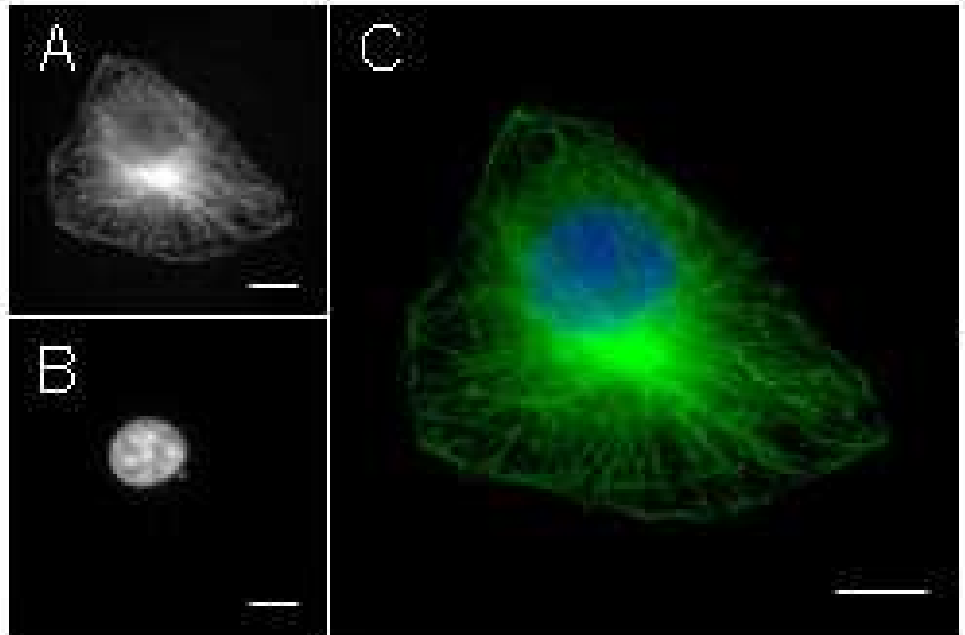
- Origine : synthèse
- Liaison à une arginine de la tubuline β
- Séquestre les hétérodimères de tubulines solubles.



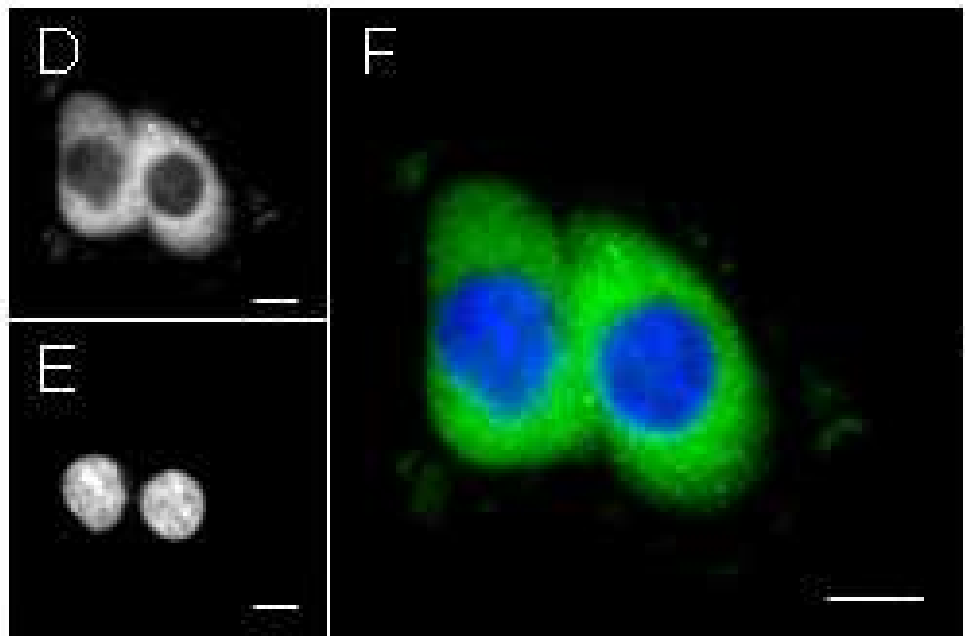
5-[2-thiénylcarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yle de méthyle

Microtubules + DAPI

Nocodazole Untreated



Nocodazole Treated



Organisation des MT dans
une cellule en interphase

<https://www.youtube.com/watch?v=TB6H8RoyPh0>

<https://www.youtube.com/watch?v=N97cgUqV0Cg>