



## Manipulation des cellules

### A - Obtention des cellules

Elle se fait en 2 étapes : dissociation + séparation

#### 1) Dissociation

Elle va être différente **selon les tissus** et nécessite parfois de **détruire toute l'architecture** cellulaire. Deux méthodes :

- Protéases
  - **Agitation** légère ...
- !** Pour le sang les cellules sont déjà libres donc pas besoin de dissociation

#### 2) Séparation

- > Selon les propriétés physiques : Centrifugation basse vitesse
- > Selon les propriétés d'adhésion à une surface : Exemple du fibroblaste qui adhère au plastique
- > Selon les propriétés moléculaires (sophistiquées) : liées à la présence de molécules en surface de nos cellules → Chromatographie d'affinité ou Cytométrie de flux

##### a) Chromatographie d'affinité

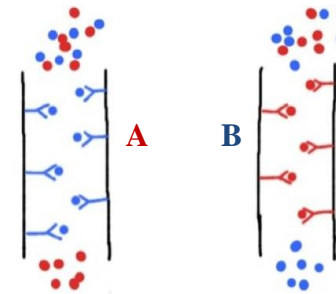
Imaginons un mélange de deux types cellulaires : les bleues et les rouges. On veut les séparer et récupérer les **rouges**.  
On va acheter des **anticorps bleus** qui "attraperont" les cellules bleues et des rouges pour les cellules rouges. Là deux possibilités :

> **Sélection POSITIVE** : On accroche les anticorps rouges sur les rebords d'un tube et on fait passer toutes nos cellules dedans → les rouges **restent accrochées** et on n'a plus qu'à les décrocher et les récupérer.  
Inconvénient : Après on est obligé de séparer les cellules de leur anticorps

et ça peut les **abîmer** (car on utilise pour ça des solutions très acides).

> **Sélection NEGATIVE** : On accroche les anticorps bleus → les rouges ne s'accrochent pas et on les **récupère en dessous**.  
Inconvénient : si on a dix types  $\mathcal{C}$ r différents il nous faudra neuf types d'anticorps pour pouvoir ne récupérer que celui qui nous intéresse et acheter neuf types d'anticorps, c'est **CHER !!!**

**!!! La meilleure = sélection négative !!!**



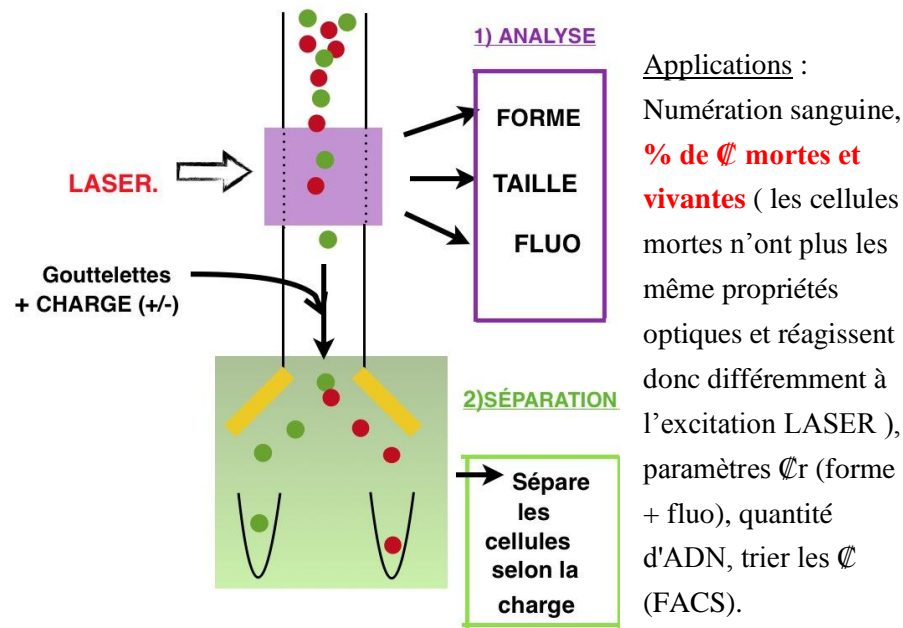
On veut récupérer les cellules **ROUGES**  
**A = Sélection négative** → on récupère les cellules qui n'ont pas accroché.  
**B = Sélection positive** → on les détache des anticorps pour les récupérer.

##### b) Cytométrie de flux

On utilise une machine géniale qui va permettre l'**ANALYSE** et la **PURIFICATION** (= séparation) des  $\mathcal{C}$  = F.A.C.S. (Fluo Activator Cells Sorter).

Le principe : On insère les  $\mathcal{C}$  en suspension dans la machine :

- Un **laser** excite la  $\mathcal{C}$  et on a une **double détection** selon la **taille/forme** et la **fluorescence**. C'est la partie **ANALYTIQUE**.
- Puis, la suspension circule dans un tube qui va vibrer, enrobant chaque cellule dans une gouttelette qui va recevoir une charge en **fonction de sa fluorescence**. Les **gouttelettes** passent dans un champ électrique où elles vont être **+ ou - déviées** selon leur charge (et donc leur fluo) permettant de les récupérer séparément les unes des autres. C'est la

partie **SEPARATION.****B- Culture des  $\mathcal{C}$** 

**Pourquoi ?** → Parce que quand on prélève des cellules d'un tissu on en a très peu et la culture permet de les **multiplier** ;)

Avantages	Inconvénients
<b>Homogène</b> <b>Conditions expérimentales contrôlées</b> Possible d'obtenir des clones ( $\Sigma$ de cellules identiques issues d'une même cellule originelle )	<b>Hors du contexte de la <math>\mathcal{C}</math></b> Possibles mutations ++

**Cultures Organotypiques** = qui reproduisent au max l'**environnement**

et l'**architecture cellulaire** (contre le problème du contexte).

Culture de Micro Organismes	Cultures de cellules Animales
Division <b>par défaut</b> Milieux <b>semi solides</b> (apagar) <b>Vitesse</b> de division élevée Mutant facilement obtenus et isolés	Besoin d'un <b>ORDRE</b> pour se diviser → <b>Sérum de veau fœtal</b> contient des <b>facteurs de croissance</b> <b>Milieu solide</b> (plastique ++)=MEC

**!/\ Les micro organismes ne sont pas tous des procaryotes (levures) !/\**

Il existe deux types de cultures :

> **Cultures primaires** : les  $\mathcal{C}$  ne se divisent qu'un **nombre de fois** donné (+/- 50). Ensuite elles entrent en **SENESCENCE**, elles sont toujours actives mais ne se divisent plus. (= **cultures de base**)

> **Cultures immortelles** : on va utiliser des  $\mathcal{C}$  **cancéreuses** ou **induire** l'immortalisation de  $\mathcal{C}$  saines avec un **virus** oncogène (on les fait **muter** → immortelles). Les lignées cancéreuses sont assez rares chez l'homme.

**C- Analyse des  $\mathcal{C}$** 

→ Il faut **détruire les cellules** pour "récupérer ce qu'il y a dedans" et ensuite analyser ce contenu :

> **Lyse cellulaire** (= libération du contenu cellulaire dans un tube à essai) :

**Sonication** : des **ultra sons** détruisent la cellulaire.

**Choc Osmotique** : on fait **exploser** la cellule par transfert d'eau.

**Détergents** : on utilise des substances qui font des **trous** dans la cellule.

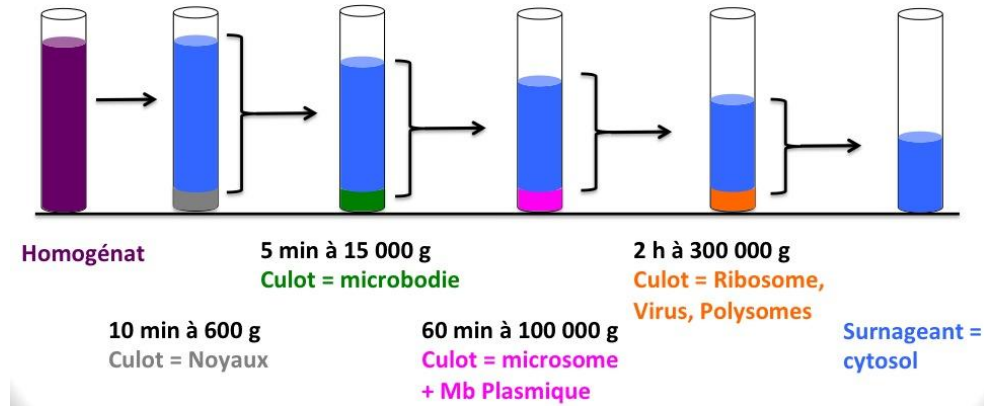
**Frottement** : on fait passer la cellule entre des pistons → **membrane arrachée**.

### > Séparation de l'extrait Cr :

- ⊛ Filtration : élimine les gros débris.
- ⊛ Centrifugation différentielle : centrifugation à des vitesses croissantes pour **séparer les différents constituants Cr**.

**!! A partir de 100 000g on parle d'hyper centrifugation !!**

- 10min à **600g** → Culot = **Noyau**
- 5min à **15 000 g** → Culot = **Fraction microbodies** (mitochondries + lysosomes + peroxyosomes)
- 60min à **100 000g** → Culot = **Fraction Microsomale** (RE + ARNm accroché aux ribosomes) + **Mb plasmique**
- 2h à **300 000g** → Culot = **Ribosomes + Virus + Polysomes**  
Surnageant = **Cytosol** (fraction soluble)



**Centrifugation à l'équilibre (isopicyque)** : ++ pour **séparer les composants d'une fraction obtenue** (Ex : **microbodies**).

On la dépose sur un **tube en gradient de densité** c'est-à-dire qu'on a des sortes de coussins ou d'étage représentant chacun une densité différente, plus on descend, plus les densité sont élevées !!

Ensuite on attend pendant 12 à 48h le temps que les constituants migrent. Chacun va **s'arrêter à la hauteur de sa densité** à lui :) )



### D- Analyse de la composition moléculaire des fractions

Trois types de molécules : **ADN (génome)**, **ARN (transcriptome)** et **protéines (protéome)**

**!!! ADN → le même dans toutes les Cr, ARN → ≠ selon le type Cr !!!**

En effet, l'ADN ne **va pas être intégralement transcrit** en ARN dans chaque cellule. C'est **selon le type cellulaire** que va se faire cette transcription afin que notre petite cellule ait uniquement l'ARN nécessaire pour former les protéines qui lui **seront utiles**




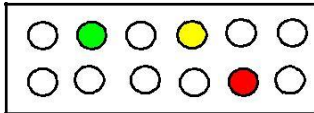
#### 1) Génome

> **Biopuces à ADN** (vieux technique)

C'est quoi : plaque avec pleins de **spot**, chaque spot est **gravé avec un gène** spécifique. **Si le gène est exprimé → ARNm formé → ça s'hybride ;)**

**Objectif : COMPARER** deux situations et déterminer **quels gènes** s'expriment dans **quelle situation**

**!/\ Il faut connaître les séquences des gènes !/\**

On met nos cellules dans deux situations <b>aérobie/anaérobie</b>	
On récupère les <b>ARN</b>	<p style="text-align: center;">ARNm                      ARNm</p>
On utilise une transcriptase inverse pour fabriquer les <b>ADNc</b>	<p style="text-align: center;">ADNc                      ADNc</p>
On va hybrider ces ADNc avec une <b>sonde fluo</b> : <b>rouge</b> pour <b>anaérobie</b> , <b>vert</b> pour <b>aérobie</b>	
On mélange nos ADNc et on les dépose sur la biopuce Ils <b>s'hybrident</b> aux spots qui leur correspondent.	<p style="text-align: center;">Biopuce</p> 
On observe l'image obtenue :	
<b>Vert</b> = uniquement aérobie <b>Rouge</b> = uniquement anaérobie <b>Jaune</b> = Rouge + Vert = présent pour les deux	

**Pas de couleur = pas d'hybridation = gène pas exprimé**

Petite animation vidéo très bien faite :

[www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/CHIP/CHIP.HTML](http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/CHIP/CHIP.HTML)

### > Séquençage haut débit

A quoi ça sert ? Ça permet de **décrypter**, de lire des séquences d'ADN, base après base → **très très rapide** avec plusieurs giga base / jour.

On peut séquencer l'**ADN (génomique)** et l'**ARNm (transcriptomique)**.

Applications : séquence tout l'ADN, cellules cancéreuses, séquencée à la naissance ...

### II- Transcriptome

On récupère nos **ARNm – transcriptase inverse** → **ADNc**.

On séquence ces ADNc et on obtient la composition exacte de notre transcriptome.

!!! Ce n'est pas parce qu'on a le transcriptome qu'on a le protéome !!!

Tous les ARNm ne sont pas traduits en protéines.

### III- Protéome

Consiste en l'étude des protéines. Deux techniques ++

#### > Electrophorèse bi-dimensionnelle

Sépare les différents composants des protéines selon leur **masse** et leur **pHi (point isoélectrique)** → Chaque "petit rond" correspond à un composant d'une protéine :





## > Spectrométrie de masse

- > Découpe la protéine en petit morceaux.
  - > Ionise (= donne une charge) à chaque petit morceau.
  - > L'appareil va déterminer pour **chaque** petit **morceau** de protéine (peptide) son rapport **Masse/Charge M/Z** (qui est **spécifique** de chaque peptide).
  - > Elle le compare à une grande **base de donnée** → **IDENTIFICATION**
- C'est une technique **très discriminante** (= ça sépare très bien et c'est précis).

## E) Analyse du cycle Cellulaire

On va utiliser les analyses de la quantité d'ADN. **Pourquoi ?**

Phase **G1** → **2n** chromosomes (chz)

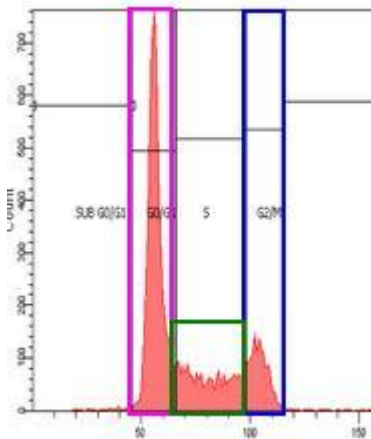
Phase **S** → **augmentation** progressive

Phase **G2** → **4n** chz

La quantité d'ADN nous donne la phase dans laquelle on se trouve

Pour ces études on colore l'ADN des cellules on utilise 2 colorants principaux :

- > **Hoesch** qui traverse les membranes
- > **Iodure de propidium** qui ne les traverse pas → **on a besoin d'une perméabilisation**



A un instant t on obtient ce type de résultats

**2n** → Phase **G0/G1** (1er pic)

**Entre 2n et 4n** (en hausse) → Phase **S**

**4n** → Phase **G2** (2eme pic)

Grâce à ce type d'analyse à un instant t on va pouvoir déterminer la **proportion de  $\Phi$**  dans chaque phase et donc déduire la **durée de chaque phase**.

## Analyses génétiques en Biologie cellulaire

### A) Généralités et mutations

*En génétique on va ++ étudier les MUTATIONS ... Parce qu'étudier ce qui ne fonctionne pas nous permet de comprendre comment c'est censé fonctionner ☺*

#### <3 Quelques définitions à savoir par cœur :

→ **Génotype** : ensembles des gènes sauvages (= "normaux") et mutés.

→ **Polymorphisme génétique** : phénomène permettant la diversité intra-espèce : **plusieurs allèles pour un même gène**.

→ **Phénotype** : **Apparence extérieure** codée par le génotype et dépendant de l'environnement.

→ **Épigénétique** : Phénomènes environnementaux régissant l'expression des gènes.

→ **Haploïdie/Diploïdie** : Si un organisme n'a qu'une copie de chacun de ses gènes alors il est *haploïde*, s'il a 2 fois le même gène il sera diploïde.

→ **Homozygotie/Hétérozygotie** : Un gène est homozygote lorsqu'il a ses deux allèles identiques.

→ **Allèle dominant/Allèle récessif** : Il y a toujours interaction entre les deux allèles d'un même gène, seulement, lorsque **l'un des deux est dominant, l'autre n'influera pas** sur le phénotype. Il est important de savoir quel allèle est dominant et lequel est récessif dans les phénomènes de mutation.

Les mutations sont le plus souvent **récessives**. Elles correspondent à une « **perte de fonction** » c'est-à-dire que la protéine codée par le gène ne marche plus.

Pour les mutations **dominantes**, il existe le « **gain de fonction** » mais c'est plus rare.

## B) Introduction à la transgénèse

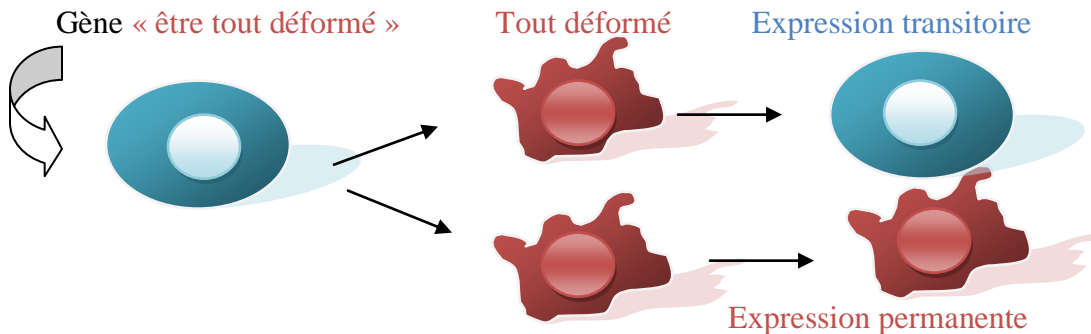
Objectif : Amener une cellule à **exprimer un gène précis** qu'elle ne possède pas naturellement

Comment : On utilise les mêmes méthodes que pour introduire un fluorochrome

**!! Deux possibilités : Expression TRANSITOIRE ou PERMANENTE !!**

Transitoire : le gène va jusqu'au noyau où il est reconnu, transcrit, traduit → fonction prévue mais il ne s'intègre **pas totalement** à la cellule. Il est perdu au bout de quelques divisions

Permanente : non seulement le gène rentre jusqu'au noyau et est exprimé, mais surtout il **s'INTEGRE totalement** à l'ADN de la cellule. PLUS RARE



Sélection des expressions permanentes :

On ajoute au gène que l'on veut intégrer un gène de **résistance à un antibiotique**. On place toutes les cellules qui ont intégré le gène en présence d'antibiotique, celles qui survivent à long terme sont celles qui ont intégré le transgène de façon permanente.

**!!! Deux types d'expression permanente : ILLEGITIME ou CIBLÉE !!!**

Illégitime : (=au hasard) **pas d'homologie** de séquence et l'ADN passager est intégré n'importe où dans le génome

Ciblée : (= homologue) la recombinaison se fait au niveau de séquences identiques entre le receveur et l'ADN intégré → ++ intéressant mais **TRES rare**

## C) Complémentation

Définition : La complémentation en génétique est le fait qu'un gène introduit dans un organisme puisse **compenser le défaut** provoqué par la mutation d'un des gènes de cet organisme

### 1) 1<sup>ère</sup> étape : Test de RÉCESSIVITÉ

**Test de complémentation possible QUE si la mutation est récessive**

Pourquoi : On utilise le principe d'**allélisme** → deux allèles pour un même gène, si notre mutation est **dominante**, elle va **s'exprimer** même en face de l'allèle sauvage. Impossible donc de savoir si elle a été **oui ou non complétement**

Le test : On insère dans une cellule (pour un même gène) un **allèle sauvage** et un **allèle muté**. Si le phénotype est **sauvage** → mutation **RECESSIVE**, si le phénotype est **muté** → mutation **DOMINANTE**.



### 2) Test de complémentation

Objectif : déterminer si **deux mutations** appartiennent au **même gène**

On a deux cellules :

> Cellule A qui a une mutation **m1** } Fusion des noyaux → **hétérocaryon**  
> Cellule B qui a une mutation **m2** } avec l'ADN des deux cellules exprimé

Deux solutions pour la cellule issue de la fusion :

<p><b>Phénotype sauvage</b></p>  <p> <u>M2</u>  <u>m2</u> </p> <p> <u>M1</u>  <u>m1</u> </p> <p><b>Phénotype sauvage :</b>            Chacune des mutations a été <b>COMPLEMENTE</b> par un allèle sauvage (en majuscule)</p> <p>La cellule B : <b>m2</b> muté <b>M1</b> sauvage            La cellule A : <b>m1</b> muté <b>M2</b> sauvage            Le <b>M2</b> de la cellule A va aller complémenté le <b>m2 muté</b> de la cellule B            Le <b>M1</b> de la cellule B complémentera le <b>m1 muté</b> de la cellule A            Comme elles sont <b>récessives</b>, elles ne s'expriment pas → On obtient un <b>phénotype SAUVAGE !!</b>  <b>On a DEMONTRÉ</b> que les mutations appartiennent à <b>deux groupes de complémentation différents</b>  <b>On a SUGGERÉ</b> que les mutations ne sont <b>pas allèles</b> (2 gènes différents )</p>	<p><b>Phénotype muté</b></p>  <p> <u>m1</u>  <u>m2</u> </p> <p> <u>X</u>  <u>X</u> </p> <p><b>Phénotype muté :</b>            Les mutations n'ont pas été complémentées, dans notre hétérocaryon, il n'y a pas d'allèle sauvage pour complémenté nos mutations</p> <p>Le phénotype sauvage n'est pas rétabli → On obtient un <b>phénotype muté</b></p> <p><b>On a DEMONTRÉ</b> que les mutations appartiennent au <b>même groupe de complémentation</b></p> <p><b>On a DEMONTRÉ</b> que les deux mutations sont <b>allèles</b></p>
---	---

Pourquoi on ne fait que SUGGERER ? ... → il y a une exception

**Exemple :** considérons une protéine dimérique  
**m1** de la cellule A → 1 seul monomère au lieu de deux  
**m2** de la cellule B → l'autre monomère au lieu de deux

Les 2 mutations donnent bien lieu à un **phénotype mutant** et les **allèles** sont bien **récessifs**, mais quand on réunit les 2 mutants on va avoir **rétablissement du phénotype sauvage** (les 2 demi-dimères se complètent)

C'est un **cas exceptionnel** dans lequel **il y a complémentation alors que les 2 gènes sont allèles**, c'est la **SUPPRESSION INTRAGENIQUE**.

**Résumé :**

**Phénotype sauvage → Complémentation**

- > Démontre 2 groupes de Complémentation
- > Suggère pas allèles

**Phénotype muté → PAS Complémentation**

- > Démontre même groupe de Complémentation
- > Démontre allèles du même gène

**Voili Voilou !!**

**Si vous avez des questions sur ce cours ou des remarques sur la fiche ( genre si vous trouvez des erreurs ou quoi ) SURTOUT n'hésitez pas à aller poster sur le forum ;)**

**Bonne chance pour le concours blanc ( et puis pour toute l'année aussi !!! )**

**Poutou Poutou ♥♥**