

COURS N°2



# Manipulation des Cellules

&

# Analyses génétiques

1

**Tutorat Niçois 2013 2014**

# PLAN

## Partie 1 : Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules**
- B) Culture des cellules**
- C) Analyse du contenu des cellules**
  - Lyse des cellules
  - Séparation
- D) Analyse moléculaires**
  - Génome
  - Transcriptome
  - Protéome

## Partie 2 : Analyses génétiques

- A) Généralités et mutations**
- B) Introduction à la transgénèse**
  - Expression Transitoire
  - Expression permanente
- C) Complémentation**
  - Test de Récessivité
  - Test de complémentation

# MANIPULATION DES CELLULES

## A) Obtention des cellules

En deux étapes → DISSOCIATION + SEPARATION

### 1) Dissociation

= détache la cellule de sa Matrice Extra  $\text{\$r}$  (MEC)  
par protéases ou agitation légère

*NB : Inutile pour le sang*

## A) Obtention des cellules

### 2) Séparation

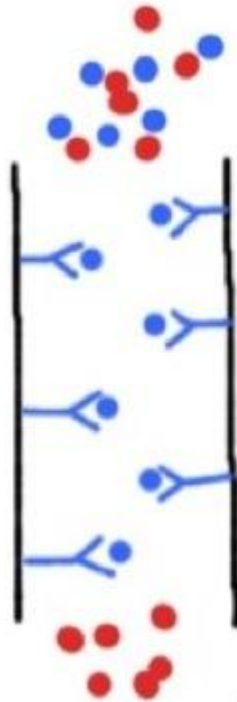
- Selon propriété physique → Centrifugation basse vitesse
- Selon propriétés d'adhésion à une surface  
Les fibroblastes adhèrent ++ au plastique
- Selon propriété moléculaires → 2 méthodes :
  - > Chromatographie d'affinité
  - > Cytométrie de flux

## A) Obtention des cellules

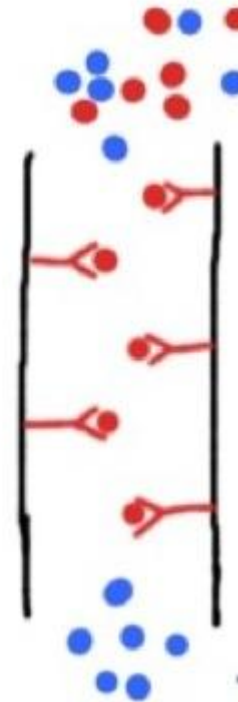
### 2) Séparation (suite)

1<sup>ère</sup> Méthode : Chromatographie d'affinité ou purification sur support

♥ Sélection Négative ♥



Sélection Positive



On veut récupérer les ROUGES

# A) Obtention des cellules

2) Séparation  
2<sup>ème</sup> Méthode  
Cytométrie de  
flux

## B) Culture des Cellules

Avantages	Inconvénients
<p><b>HOMOGENE</b></p> <p>Contrôle des conditions expérimentales</p> <p>Possible clonage</p>	<p><b>Hors du CONTEXTE</b> ⚡</p> <p>++ Mutations</p>

Culture Organotypique : Reproduit l'environnement ⚡

## B) Culture des Cellules

### 1) Micro Organismes

- Division par défaut
- Milieu semi solide
- Mutants facilement obtenus

### 2) Cellules animales

- Milieu solide
- Besoin d'un ORDRE pour se diviser → Sérum de veau foetal avec FACTEURS DE CROISSANCE

## B) Culture des Cellules

### 3) Types de cultures

2 types : Primaire ou Immortelle

- Primaire : Division un nombre de fois donné puis SENESCENCE ( = Tjrs actives mais plus de divisions )

- Immortelles :

Cellules cancéreuses prélevées directement

Immortalisation par un virus oncogène ( → mutation )

## C) Analyse des Cellules

### 1) Lyse des cellules

= Destruction pour récupérer ce qu'il y a dedans

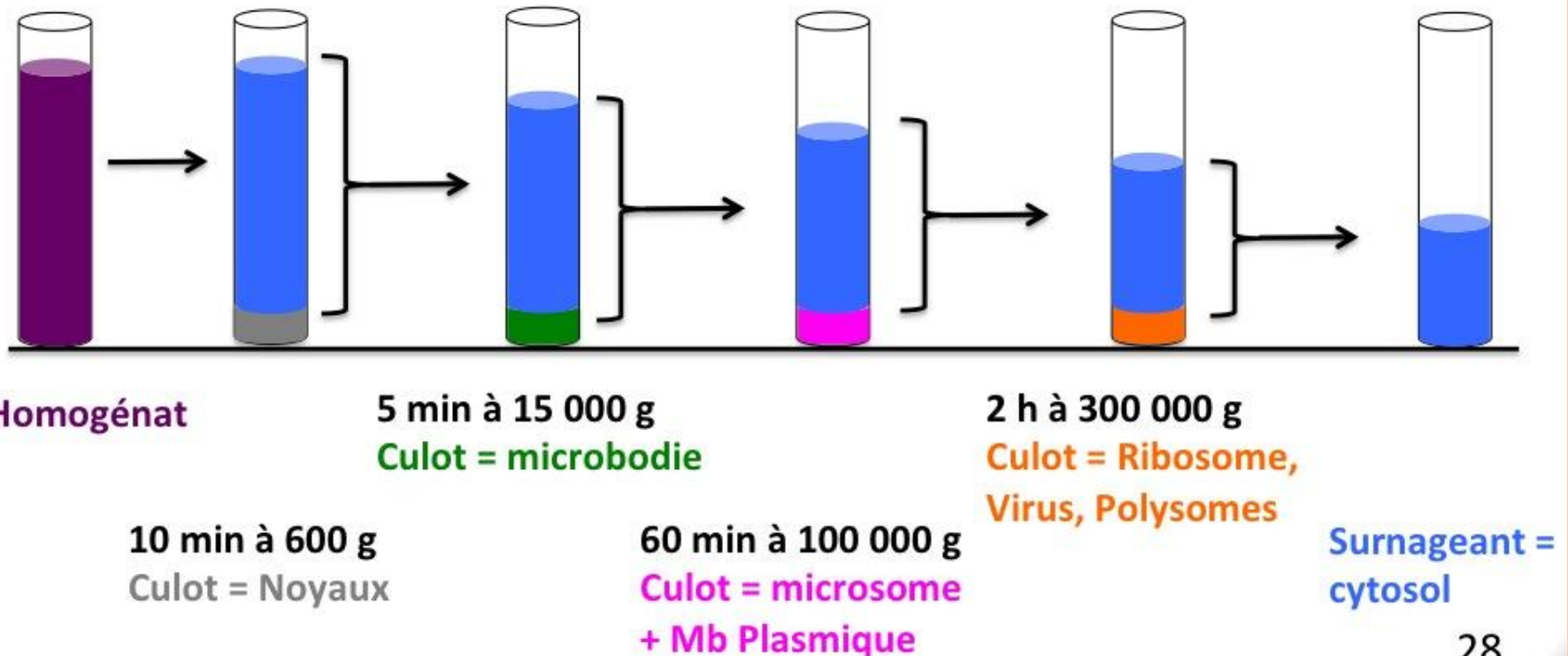
- ⊙ Sonication *Ultra sons*
- ⊙ Choc Osmotique *Déplacements d'eau*
- ⊙ Détergent *Trous dans la membrane*
- ⊙ Frottements *Membrane arrachée*

## C) Analyse des Cellules

### 2) Séparation des ≠ fractions cellulaires

Filtration (gros débris) + 2 types de centrifugation

### Ⓚ Centrifugation différentielle

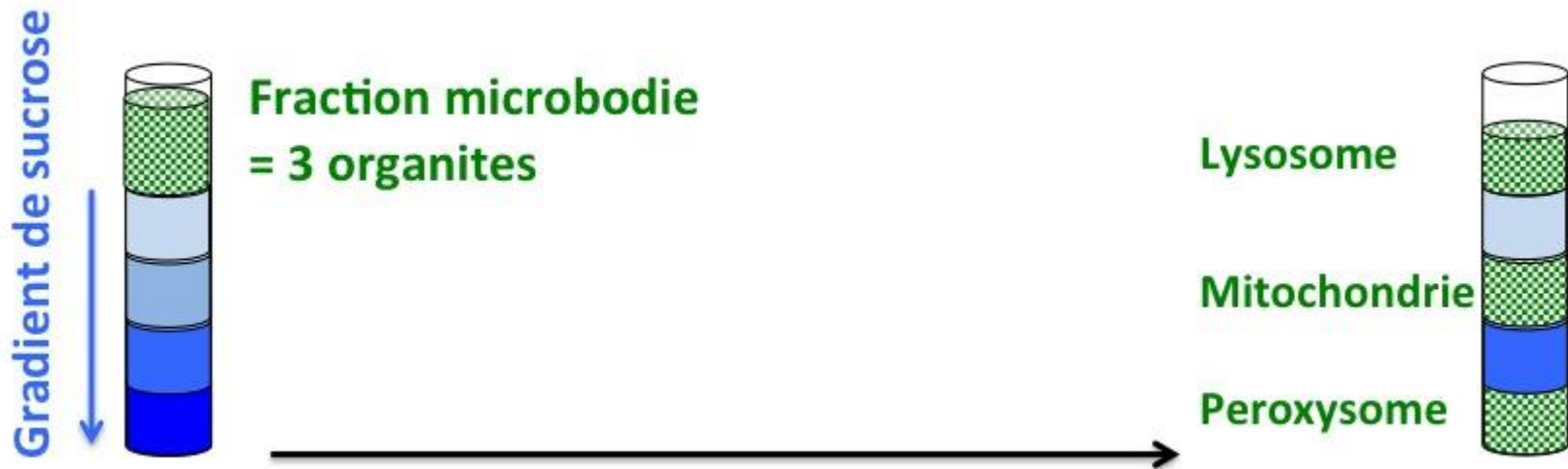


## C) Analyse des Cellules

### 2) Séparation des ≠ fractions cellulaires

Filtration (gros débris) + 2 types de centrifugation

#### Ⓚ Centrifugation isopycniqne ( à l'équilibre )



## D) Analyse de la composition moléculaire

3 type de molécules :

1) ADN = Génome

*!! Le même partout !!*

**TRANSCRIPTION**

2) ARN = Transcriptome

*!! ≠ selon le type cellulaire !!*

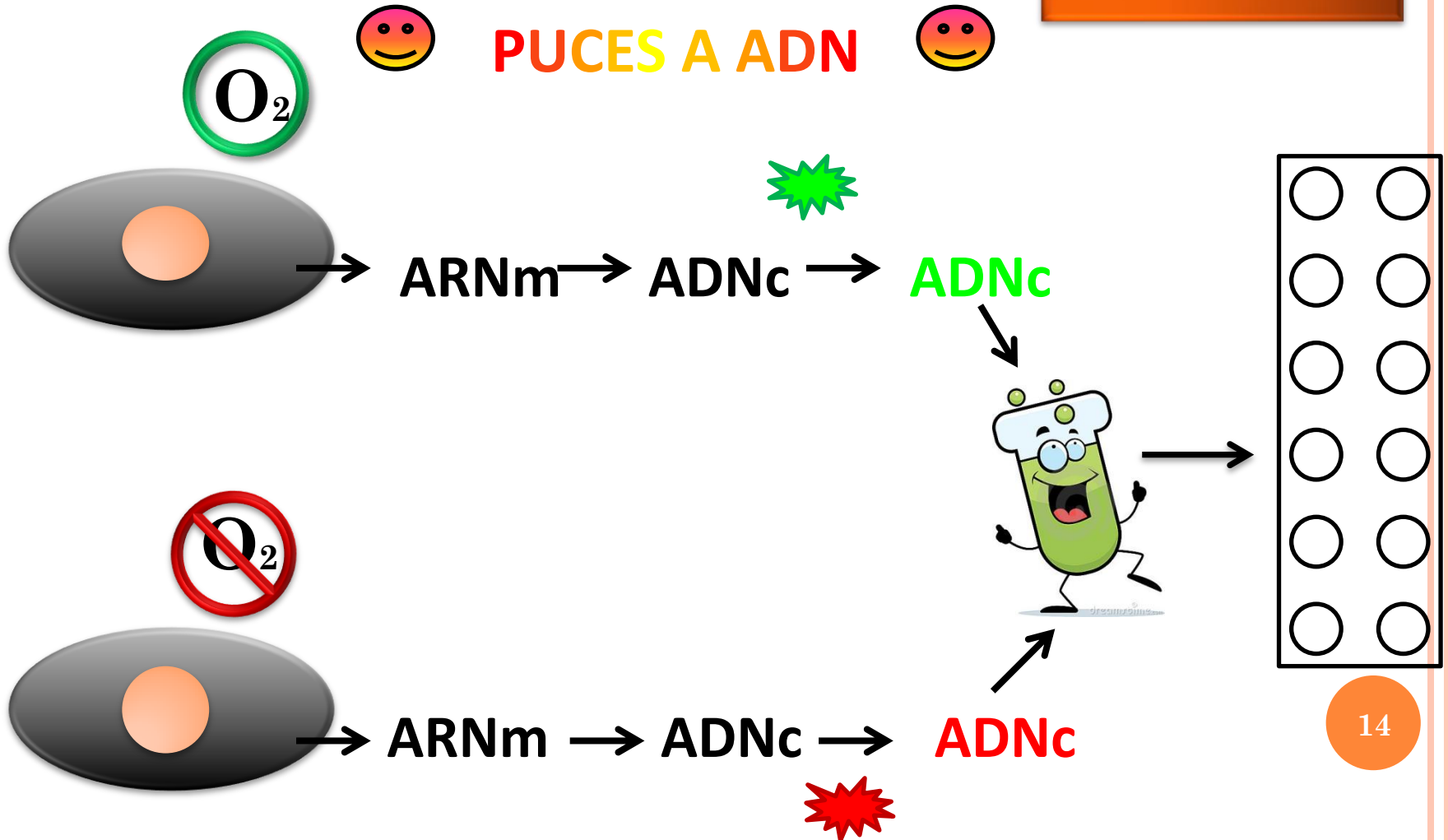
**TRADUCTION**

3) Protéines = Protéome

# D) Analyse de la composition moléculaire

## 1) Génome

**VIDEOO**



## D) Analyse de la composition moléculaire

### 1) Génome



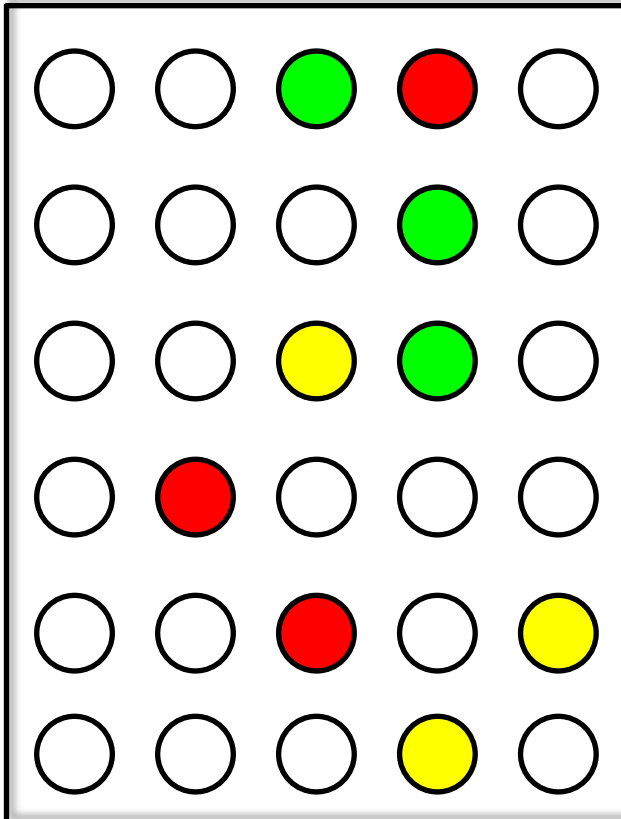
## PUCES A ADN



**Vert** → Exprimé uniquement en aérobie 

**Rouge** → Exprimé QUE en anaérobie 

**Jaune** = Vert + Rouge → Exprimé en aérobie  ET anaérobie 



Pas de couleur = Pas d'ADNc correspondant = pas d'ARNm correspondant → gène pas exprimé

## D) Analyse de la composition moléculaire

### 1) Génome

#### SEQUENCAGE HAUT DEBIT

- Lire des séquences d'ADN ou d'ARN, base après base

Plusieurs giga bases par jour



## D) Analyse de la composition moléculaire

### 2) Transcriptome

= Etude des ARNm



On séquence les ADNc → Composition du transcriptome

!!! Tous les ARNm ne sont pas traduits en protéine !!!

*Epissage alternatif*

## D) Analyse de la composition moléculaire

### 3) Protéome

= Etude des protéines et de leur composition

2 techniques : ELECTROPHORÈSE + SPECTROMÉTRIE

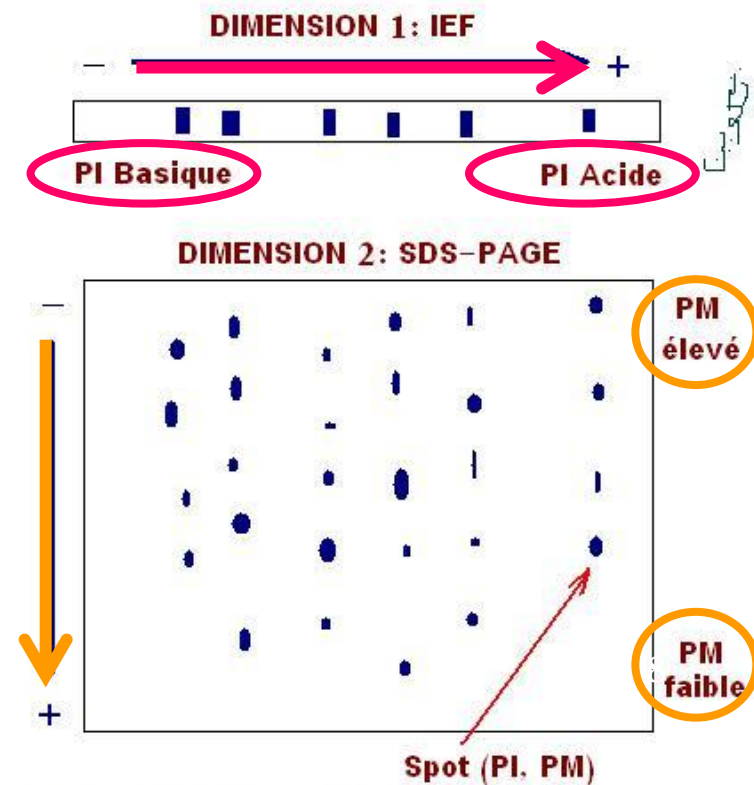
#### ■ Electrophorèse

Bi-dimensionnelle

Sépare les protéines selon :

- > leur **pHi = dimension 1**
- > leur **MASSE = dimension 2**

Chaque petit rond = 1 protéine



ELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION

## D) Analyse de la composition moléculaire

### 3) Protéome

- Spectrométrie de masse

- ▣ Découpe la protéine en petits morceaux

- ▣ Ionise les petits morceaux ( = donne une charge )

- ▣ Détermine le rapport Masse Charge M/Z de chaque morceau

- ▣ Compare ce M/Z à une base de donnée

- ▣ **IDENTIFICATION**

M/Z est hyper **spécifique** de chaque molécule → PRECIS !!

## E) Cycle Cellulaire

○ (R)appels

**4 phases :**

> G1 → 2n ADN

> S → REPLICATION

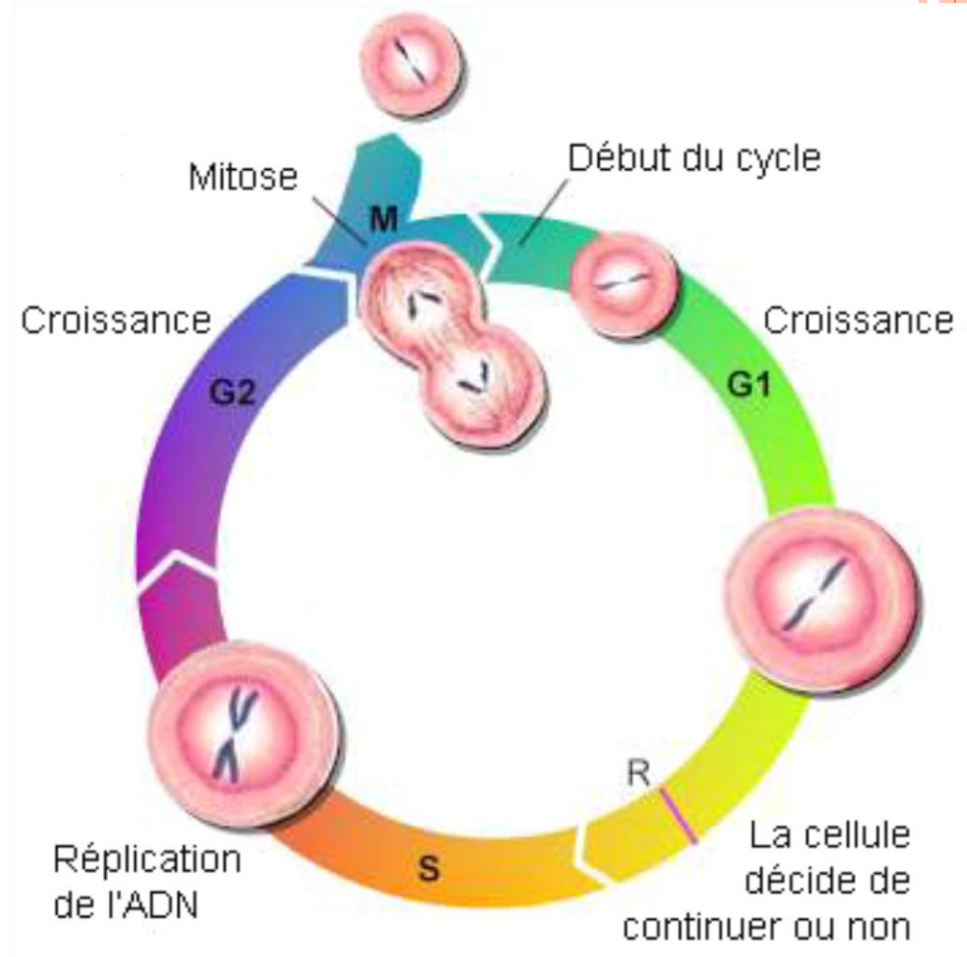
Debut = 2n ADN

Fin = 4n ADN

> G2 → 4n ADN

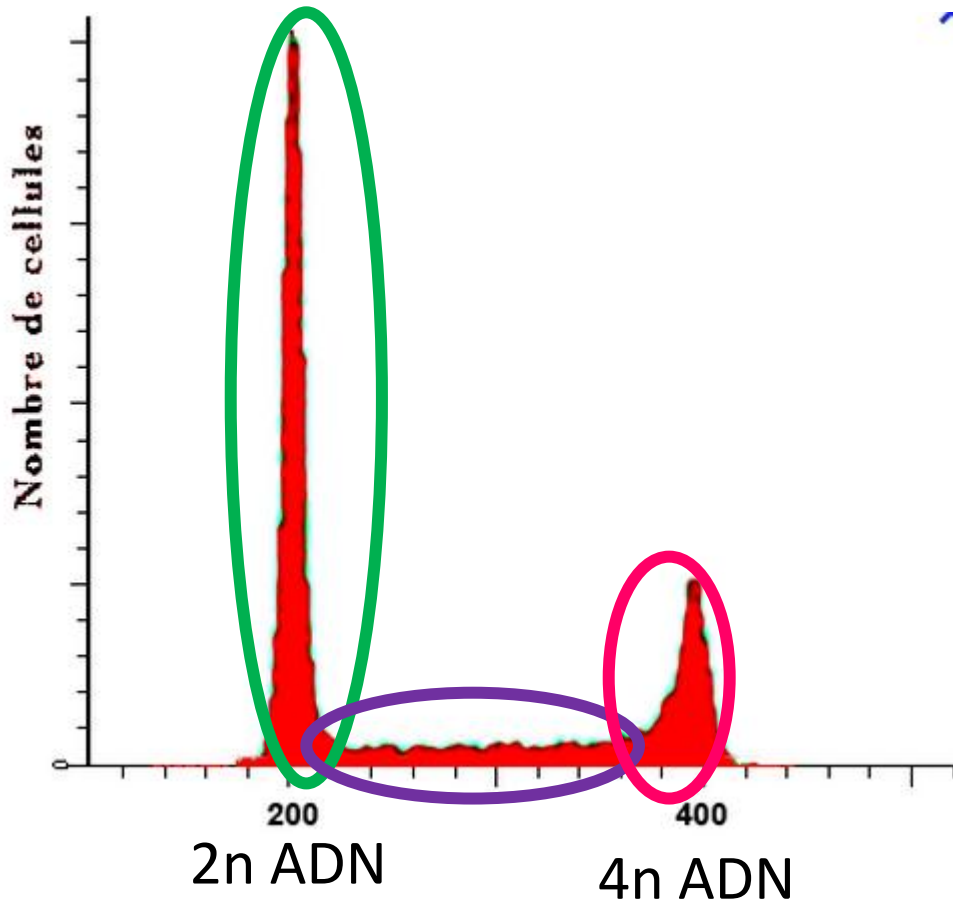
> M → Mitose =

Quantité d'ADN rediminue



## E) Cycle Cellulaire

### ○ Analyse du cycle



**Pic à 2n = Cellules en phase G1/G0**

**2N → 4N = CELLULES EN PHASE S**

**Pic en 4n = Cellules en phase G2**

⊞ Permet de savoir quelle % de  $\Phi$  dans chaque phase et donc **DUREE DE CHAQUE PHASE**

# Analyses Génétiques



## A) Généralités et mutations

- 📌 **Génotype** : Ensemble des gènes
- 📌 **Phénotype** : Ensemble des caractères observable d'1 individu ( *Génotype + Environnement* )
- 📌 **Polymorphisme génétique** : plusieurs allèles pour un même gène → Diversité intra espèce
- 📌 **Epigénétique** : Phénomènes environnementaux → action sur les gènes

## A) Généralités et mutations

- ✘ **Haploïde** : UNE seule copie de chaque gène
- ✘ **Diploïde** : DEUX copies de chaque gène
  
- ✘ **Homozygote** : les deux allèles sont IDENTIQUES
- ✘ **Hétérozygote** : les deux allèles sont DIFFERENTS
  
- ✘ **Allèle Dominant** : exprimé même si présent une seule fois
- ✘ **Allèle Récessif** : Exprimé QUE si présent deux fois

## B) Introduction à la transgénèse

C'est quoi ?

Amener une cellule à exprimer un gène qu'elle n'a pas naturellement

Comment ?

Même type de méthodes que pour fluorochrome

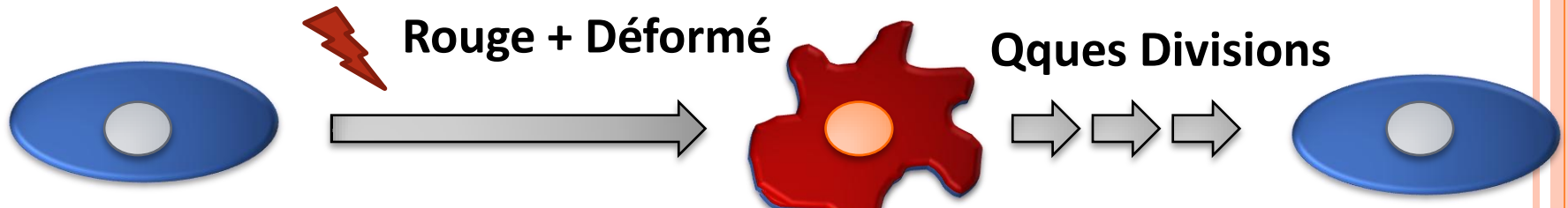


## B) Introduction à la transgénèse

2 possibilités :

### ❖ Expression transitoire

Ne s'intègre PAS totalement ( Se perd au bout de quelques division )



## B) Introduction à la transgénèse

### ❖ Expression Permanente

2 types d'intégration : Illégitime ou Ciblée

#### ➤ Illégitime :

Le transgène s'intègre au HASARD dans le génome

#### ➤ Ciblée

Le transgène s'intègre de façon précise exactement là où on l'a décidé (au niveau de séquences identiques entre transgène et ADN cible) +++++ RARE

## C) Complémentation

### Définition

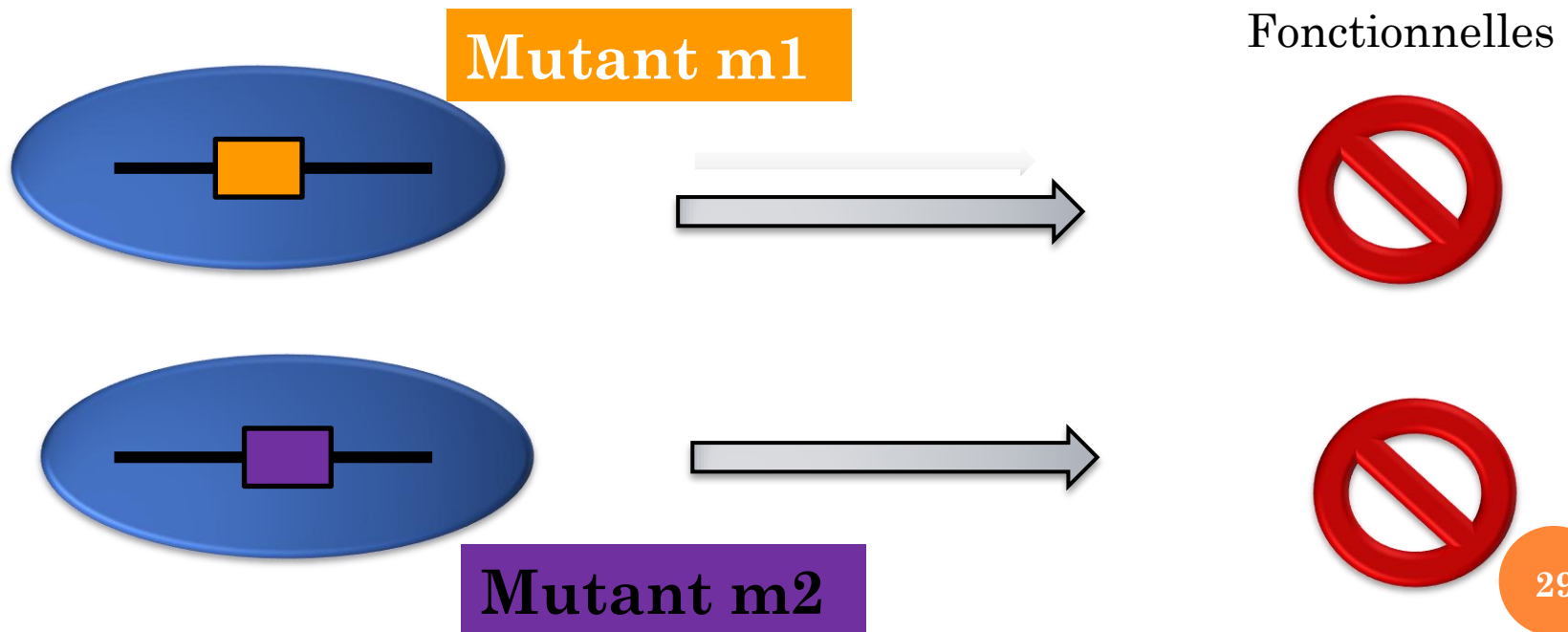


**La complémentation en génétique est le fait qu'un gène introduit dans un organisme puisse compenser le défaut provoqué par la mutation d'un des gènes de cet organisme**

## C) Complémentation

### 1<sup>ère</sup> Etape : Test de RECESSIVITE

Nos deux mutants doivent être RECESSIFS pour effectuer un test de complémentation



## C) Complémentation

On fusionne un noyau sauvage avec chacune de nos cellules mutées :

Mutant m1

Sauvage M1



Cellule non OK =

Phénotype **MUTE**

→ Le mutant m1 est **DOMINANT**

## C) Complémentation

### 2<sup>ème</sup> étape : Test de COMPLEMENTATION

**Mais c'est quoi ça ??** 😊

C'est la restauration (ou pas) du phénotype sauvage en combinant plusieurs gènes dans la même cellule

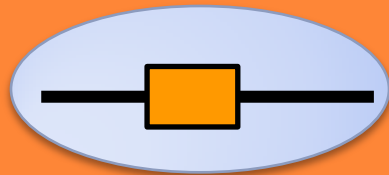
La complémentation d'une mutation récessive c'est l'habilité à restaurer une fonction en combinant dans une cellule deux gènes dont au moins un est muté

## C) Complémentation

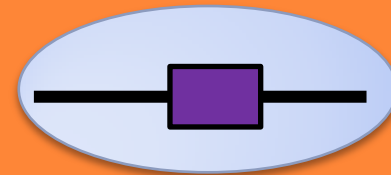
### 2<sup>ème</sup> étape : Test de COMPLEMENTATION

- Objectif : Déterminer si deux mutations appartiennent au même gène

Cellule A  
Mutant m1



Cellule B  
Mutant m2



On fusionne leur noyau pour former un **HETERO**CARYON qui contient les deux mutants

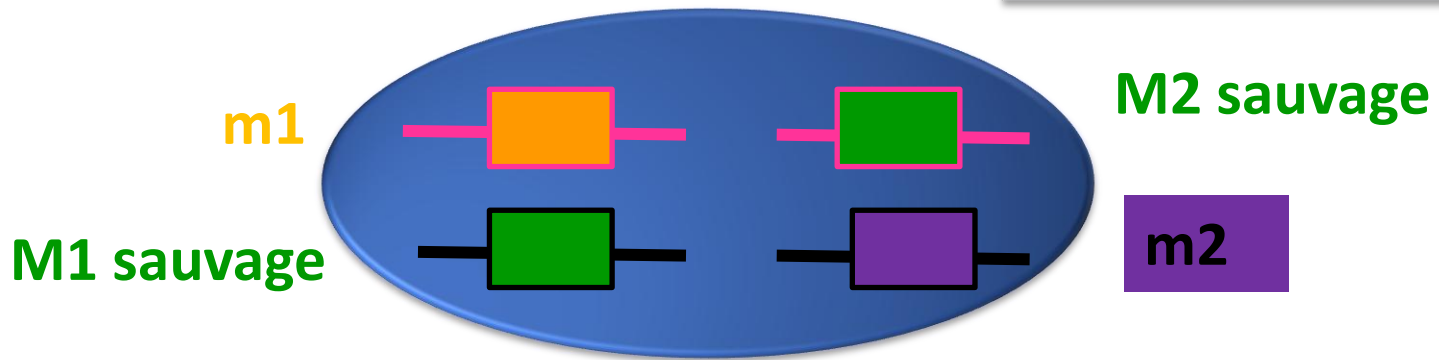
On observe le phénotype obtenu :  
**COMPLEMENTATION** ou **PAS**  
**COMPLEMENTATION** et on conclut ;)

## C) Complémentation

Cas n°1 : Il y a COMPLEMENTATION

→ Le phénotype est sauvage

**m1** → Rien du tout  
**M1** → Protéine 1 OK  
**m2** → Rien du tout  
**M2** → Protéine 2 OK



## C) Complémentation

Cas n°1 : Il y a COMPLEMENTATION

→ LE cas particulier : la suppression INTRA GENIQUE

C'est quoi ?

On a un **phénotype sauvage** = **COMPLEMENTATION**  
alors que les mutations sont **ALLELES** du même gène

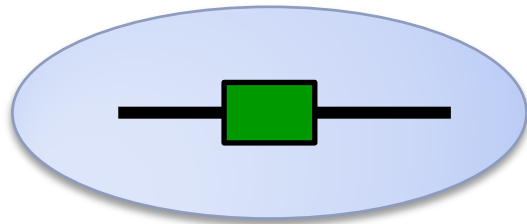
Comment ?

Les 2 protéines non fonctionnelles des mutations  
s'associent → protéine **fonctionnelle au final** !!

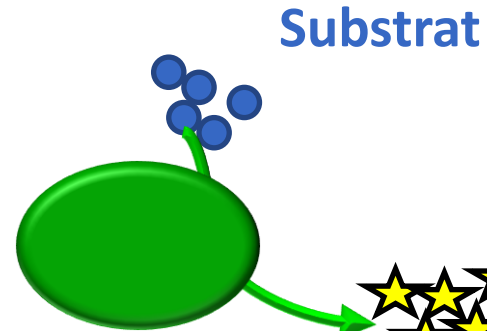
**J'AI PAS COMPRIS ... ?!?**

# C) Complémentation

## La preuve par schéma

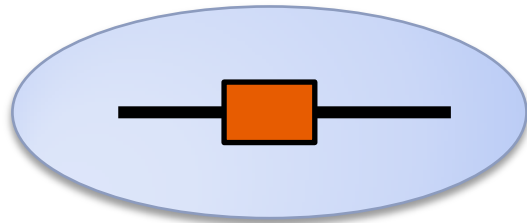


**Sauvage Z1**



**Protéine OK**

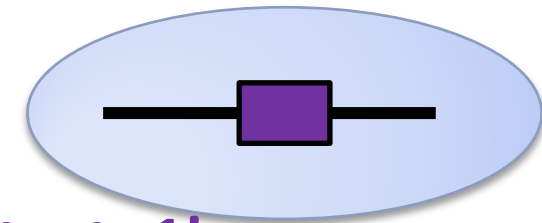
**Produit**



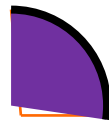
**Mutant z1**



**Protéine Pas OK**



**Mutant z1'**



**Protéine Pas OK**



Le tutorat est gratuit, tout reproduction ou vente est interdite

## C) Complémentation

### Cas n°1 : Il y a COMPLEMENTATION

→ LE cas particulier : la suppression INTRA GENIQUE

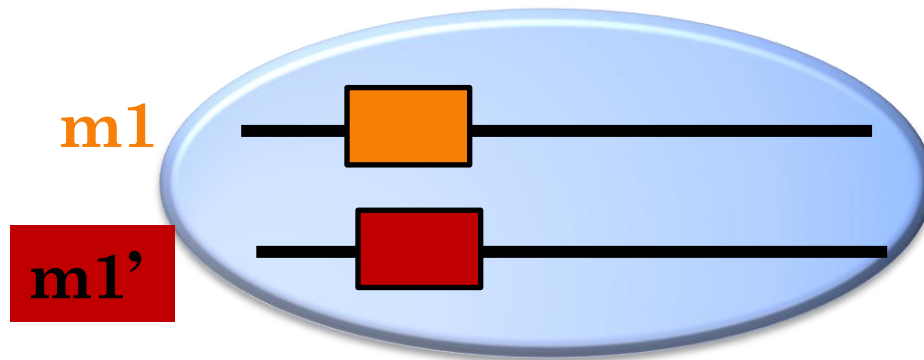
**C'est pour ça qu'on ne peut que SUGGERER que deux mutations qui complémentent ne sont pas allèles, parce qu'il est possible qu'on soit dans ce cas là !!**

**C'est plus clair maintenant ?!?!?**

## C) Complémentation

### Cas n°2 : Il n'y a PAS COMPLÉMENTATION

→ Le phénotype est muté



$m1$  → Rien du tout  
 $m1'$  → Rien du tout  
Personne pour compenser → Pas OK :  
Phénotype MUTE

## C) Complémentation

### 2<sup>ème</sup> étape : Test de COMPLEMENTATION

#### En Résumé



Phénotype **sauvage** → Complémentation

- **DEMONTRE** 2 groupes de complémentation différents
- **SUGGERE** mutations de deux gènes différents



Phénotype **muté** → PAS Complémentation

- **DEMONTRE** même groupe de complémentation
- **DEMONTRE** mutations allèles du même gène

## A propos des cultures cellulaires

- A. Les fibroblastes issus d'une biopsie de peau sont incapables de se multiplier dans des boîtes de Pétri en présence d'un milieu de culture adéquate.**
- B. Les cellules sénéscentes sont métaboliquement inactives.**
- C. Les cellules humaines peuvent se multiplier indéfiniment en laboratoire à condition de renouveler régulièrement leur milieu de culture.**
- D. On peut immortaliser des cellules humaines normales en les infectant avec un virus oncogène.**
- E. Aucune de ces propositions n'est juste.**

## A propos des cultures cellulaires

- A. Faux : dans un milieu de culture adéquat on aura des facteurs de croissance ... et tout ce qui est nécessaire à nos petits fibroblastes**
- B. Faux : elles ne peuvent plus se diviser mais restent métaboliquement actives**
- C. Faux : au bout d'une cinquantaine de divisions elles entrent en sénescence et ne se divisent plus**
- D. Vraiiiiii**
- E. Aucune de ces propositions n'est juste.**
- Réponse D**

## A propos de l'analyse du contenu cellulaire

- A. La sélection négative de la purification sur support est préférable mais souvent plus couteuse.**
- B. Dans la cytométrie de flux on a d'abord le tri des cellules, et ensuite l'analyse.**
- C. La cytométrie de flux est une méthode d'analyse et de tri des cellules selon leurs propriétés physiques**
- D. Dans la partie analytique de la cytométrie de flux, il est possible de déterminer le pourcentage de cellules mortes et vivantes.**
- E. Aucune de ces propositions n'est juste.**

## A propos de l'analyse du contenu cellulaire

**A. Vrai**

**B. Faux : c'est l'inverse, le tri se fait en dernier**

**C. Faux : selon leurs propriétés moléculaires**

**D. Vrai**

**E. Aucune de ces propositions n'est juste.**

**Réponses A et D**

# Merci pour votre attention



## Et bon courage à tous

**Poutou Poutou**

