



# Biocell' Tut rentrée 2014-2015

## Manipulation des cellules

# Plan

- I. Obtention des cellules
- II. Mise en culture des cellules
- III. Analyse du contenu cellulaire
- IV. Analyse de la composition moléculaire des différentes fractions

# I. Obtention des cellules

Dans l'organisme :

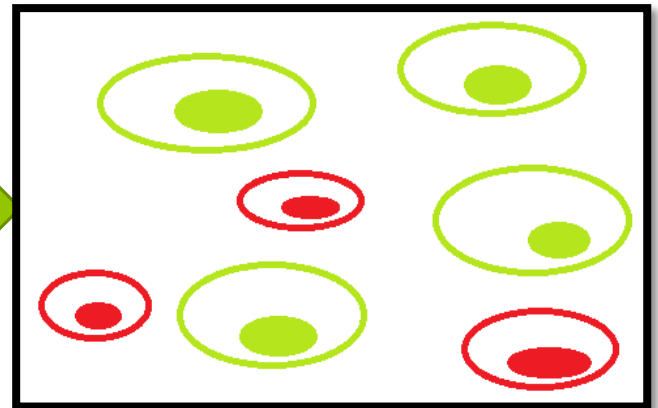
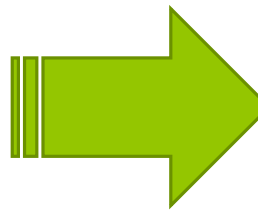
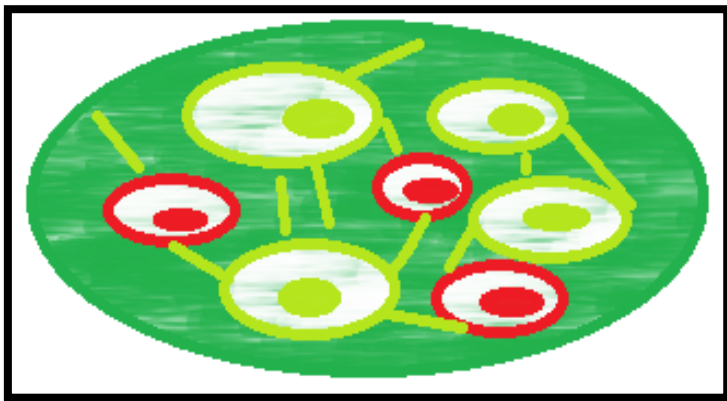
- Cellules organisées en **tissus**
- **Plusieurs types cellulaires**

On souhaite:

- **Dissocier** les cellules des tissus
- **Séparer** les différents types cellulaires

# A. Dissociation

- **Protéases** ou **action mécanique légère**
- **Dissociation** de la **matrice extracellulaire**
- **Rupture** des **liaisons intercellulaires**



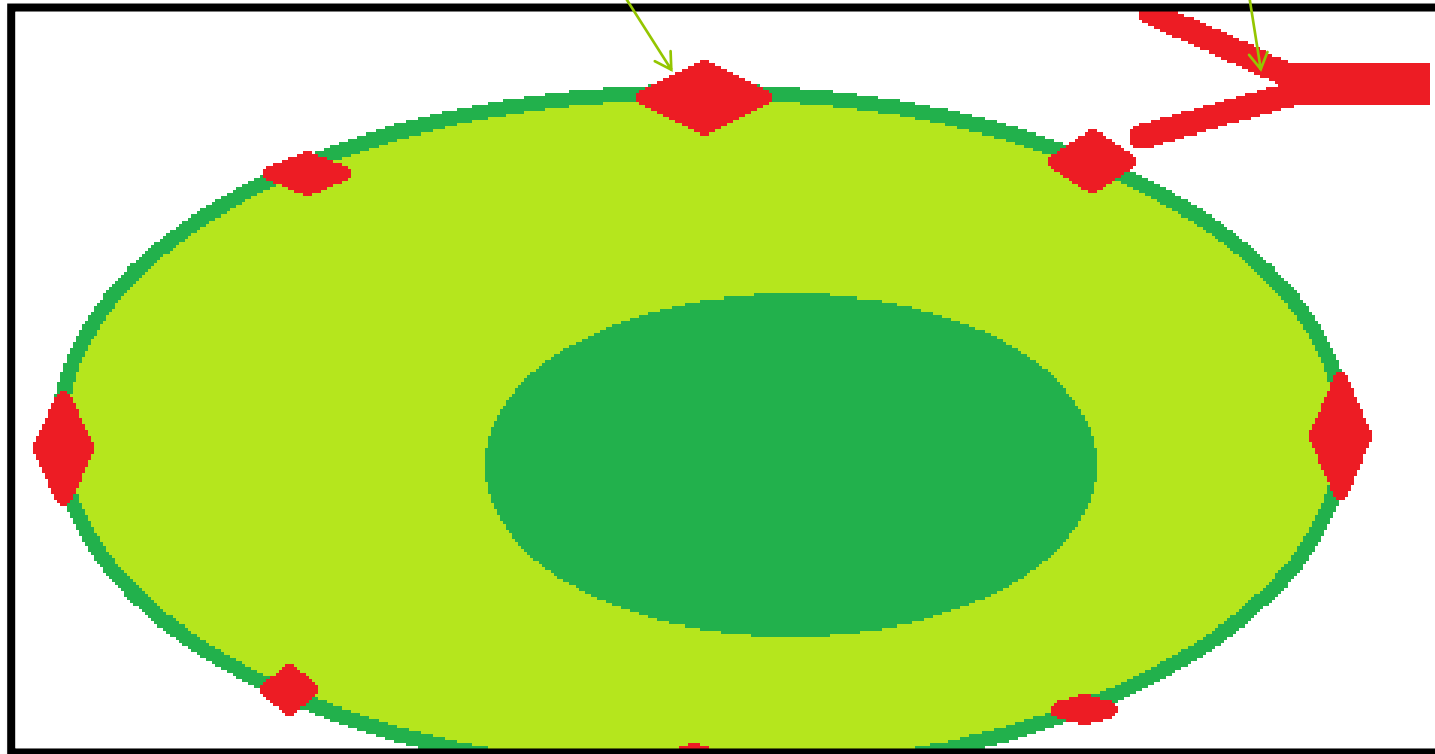
## B. Séparation

- Méthodes différentes selon le tissu et le type cellulaire
- Méthodes simples: centrifugation à basse vitesse, adhésion ou non à une surface
- Méthodes sophistiquées: purification sur support, cytométrie de flux

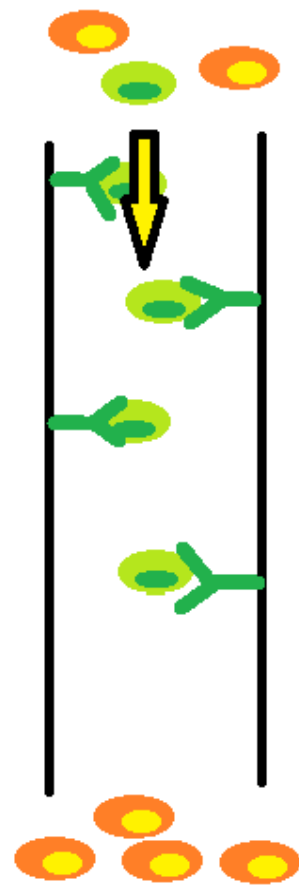
# Purification sur support

Antigène de surface

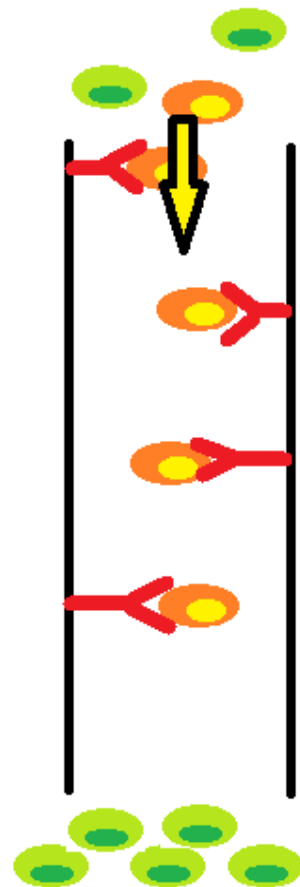
Anticorps



# Purification sur support



Sélection positive



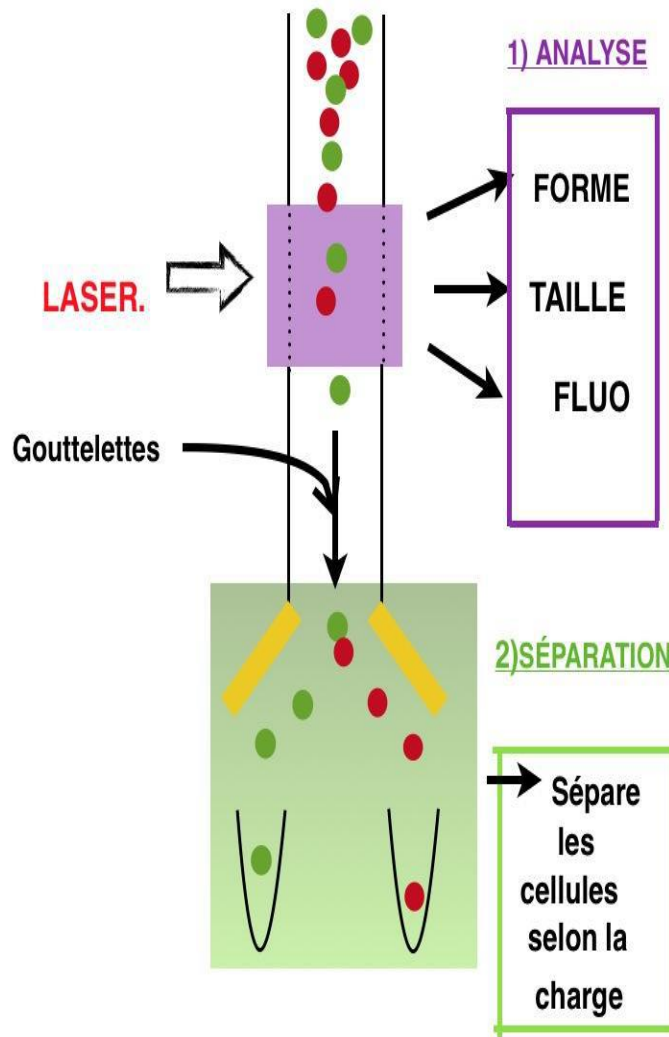
Sélection négative

Matrice  
D'affinité

# Cytométrie de flux

- **Analyse** et **triage** des cellules en **suspension**
- Cytométrie **analytique** : analyse
- Cytométrie **de de séparation (FACS)** : analyse et séparation

# Cytométrie de flux

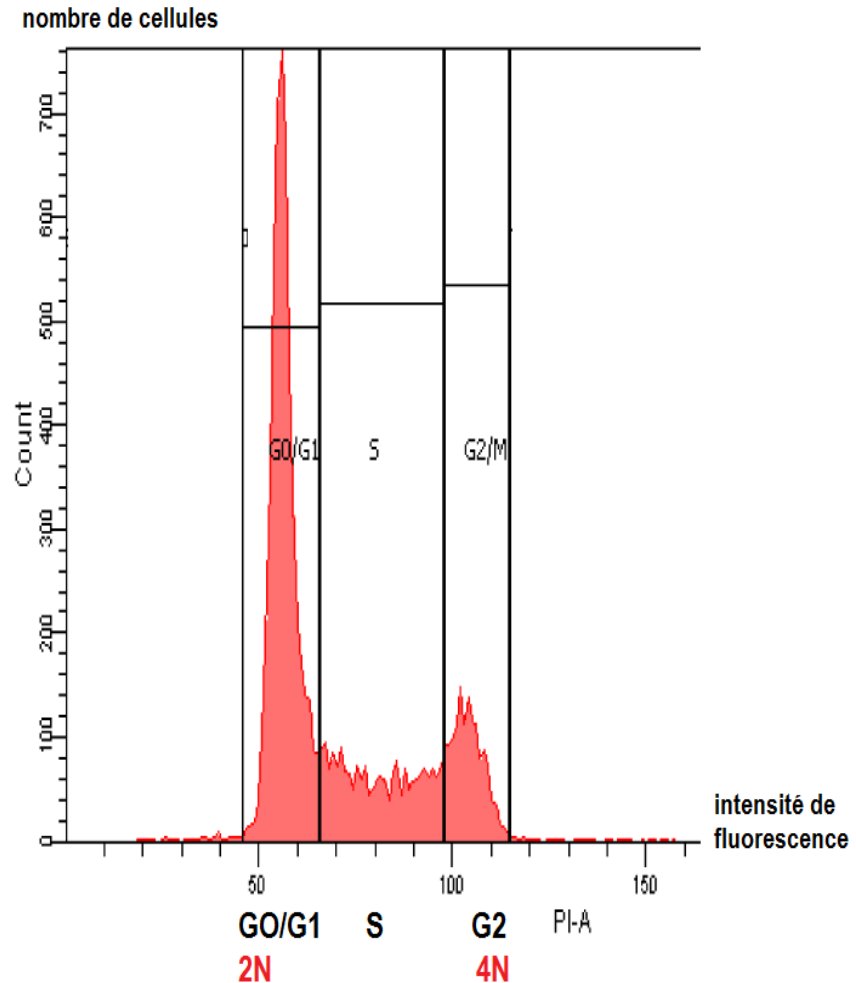


- Un **rayon laser** détecte la **fluorescence**
- Un **détecteur de lumière** informe sur la **taille** et la **forme**
- La cellule est insérée dans une petite **goutte**
- Chaque goutte est **chargée proportionnellement à la fluorescence** de la cellule
- Chaque goutte passe dans un **champ électrique** et est **déviée selon sa charge**.

Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

# Analyse du cycle cellulaire

- Application de la **cytométrie de separation**
- Basée sur la **quantification de l'ADN**
- **Fluorescence induite**



## II. Mise en culture

<b><u>AVANTAGES</u></b>	<b><u>INCOVENIENTS</u></b>
Homogène Conditions expérimentales contrôlées Possibilité d'obtenir un clone génétiquement homogène	Cellule étudiée hors de son contexte tissulaire Mutations pas toujours contrôlable

# Culture de microorganismes

- ◉ **Division par défaut**
- ◉ **Milieu semi solide**
- ◉ **Vitesse de division élevée**

# Culture de cellules animales

- Besoin d'un **ordre** pour se diviser
- Sérum de veau foetal (**facteurs de croissance**)
- Besoin d'un **milieu solide** pour se diviser
  
- Cultures primaires
- Lignées immortelles

### III. Analyse du contenu cellulaire

- Il faut tuer les cellules (**lyse cellulaire**)
- **Fractionnement l'extrait cellulaire**  
(filtration, centrifugation à basse vitesse, centrifugation différentielle, centrifugation isopycnique)

# Lyse cellulaire

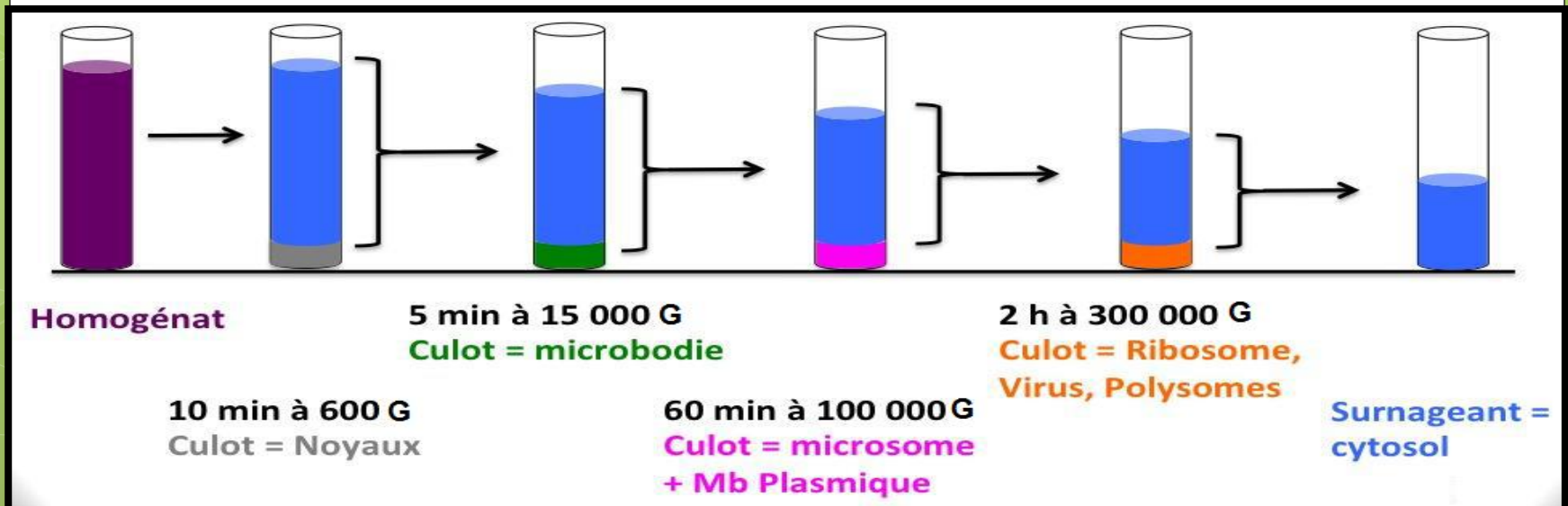
- Libération du contenu cellulaire dans un tube à essai
- Sonication
- Choc osmotique
- Frottements
- Détergents

# Fractionnement de l'extrait cellulaire

- On se débarrasse des **gros débris** par **filtration** ou **centrifugation à basse vitesse**
- Techniques de fractionnement **plus fines**: **centrifugation différentielle** et **centrifugation isopycnique**

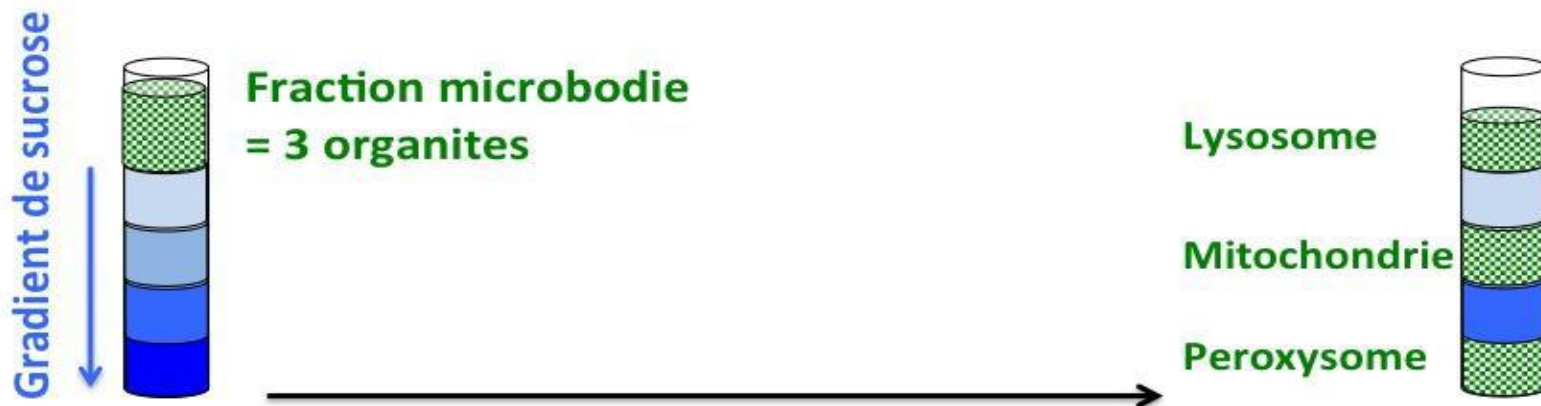
# Centrifugation différentielle

- Succession de centrifugations de plus en plus rapides
- Composants séparés selon leur **taille** et leur **densité**



# Centrifugation isopycnique

- (= centrifugation à l'équilibre = centrifugation en gradient de densité)
- Tube à essai composé de **coussins de sucrose de densité croissantes**



## IV. Analyse de la composition moléculaire des différentes fractions

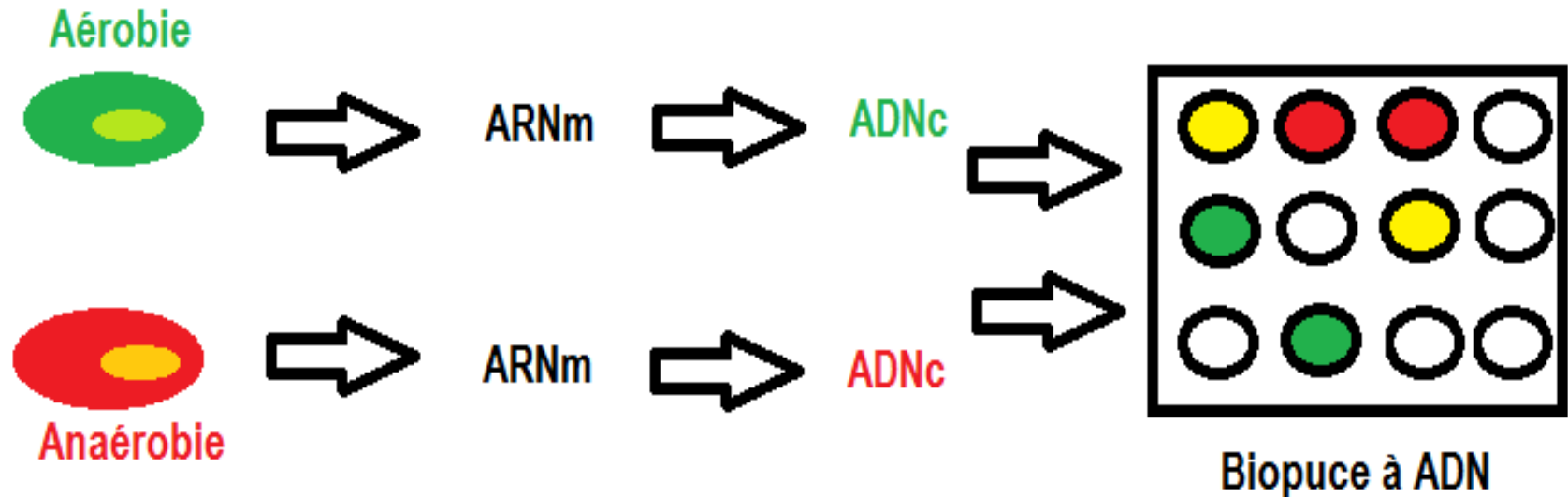
- **Génome**: ensemble de la séquence des gènes potentiellement transcrits
- **Transcriptome**: Ensemble des ARNm
- **Protéome**: Ensemble des protéines

# Biopuce à ADN

- Permet l'étude du **transcriptome**
- Lame de verre composée de nombreux **spots** sur lesquels on a gravé les séquences de chaque gène
- **Comparaison** de 2 situations biologiques
- **Lyse** des cellules
- **Purification des ARNm**
- **Reverse transcriptase → ADNc**

(On place des précurseurs nucléotidiques couplés à des fluorochromes différents dans chaque situation)

- **Fluorescence verte** → gène exprimé uniquement en aérobie
- **Fluorescence rouge** → gène exprimé uniquement en anaérobie
- **Fluorescence jaune** (rouge + vert = jaune) → gène exprimé dans les 2 situations.
- → gène exprimé dans aucune des 2 situations.



# Animation biopuce à ADN

**<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/CHIP/CHIP.HTML>**

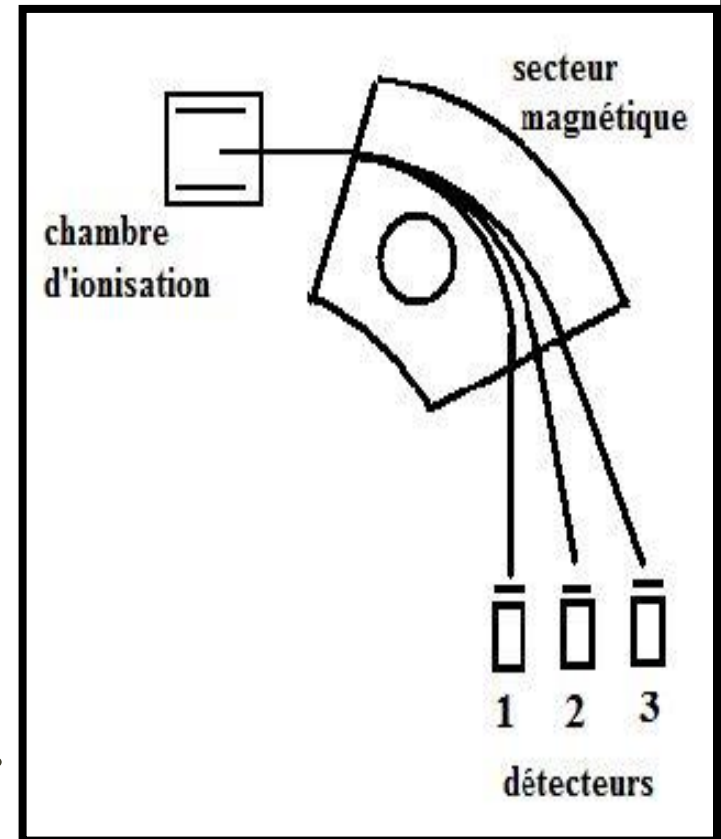
Le tutorat est gratuit. Toute reproduction ou  
vente est interdite.

# Séquencage haut débit (NGS)

- Permet l'étude du **génom**e et du **transcriptome**
- Donne directement la **séquence nucléotidique** de l'ADN ou de l'ARN

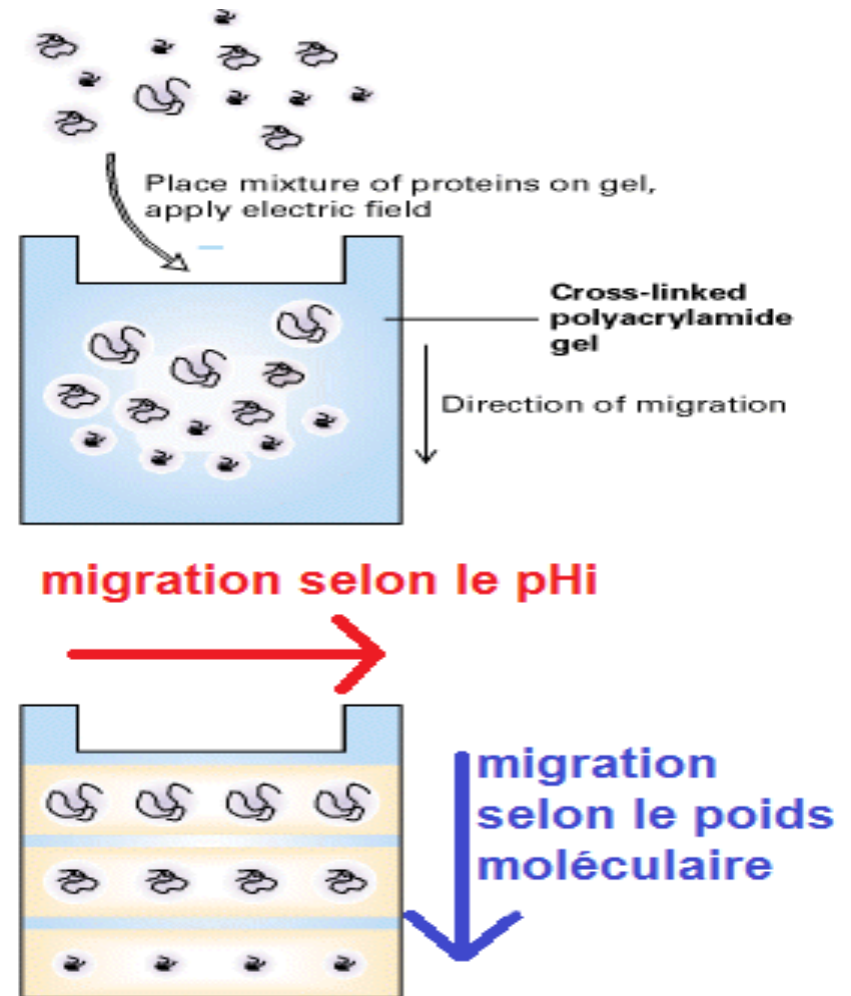
# Spectrométrie de masse

- Permet d'étudier le **protéome**
- Peptides chargés dans une **chambre d'ionisation**
- Peptides accélérés puis déviés selon leur masse
- **Spectre de masse** (dépend du rapport entre masse et charge) **permet d'identifier les peptides.**



# Electrophorèse bidimensionnelle

- **Séparation** des différentes protéines selon leur **masse** et leur **pHi**



# QCM

## A propos de l'obtention des cellules:

- A) On peut dissocier les cellules d'un tissu en utilisant des protéases
- B) La purification sur support repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre une protéine de surface
- C) La cytométrie de flux permet l'analyse du cycle cellulaire
- D) La cytométrie de flux analyse la taille, la forme et la fluorescence des cellules
- E) Toutes les propositions sont fausses

# QCM

**A propos de l'obtention des cellules:**

- A) On peut dissocier les cellules d'un tissu en utilisant des protéases**
- B) La purification sur support repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre une protéine de surface**
- C) La cytométrie de flux permet l'analyse du cycle cellulaire**
- D) La cytométrie de flux analyse la taille, la forme et la fluorescence des cellules**
- E) Toutes les propositions sont fausses

# QCM

## **A propos de la mise en culture des cellules:**

- A) On ne peut pas contrôler les conditions expérimentales
- B) On peut toujours contrôler les mutations
- C) Les microorganismes ont besoin d'un ordre pour se diviser
- D) Les cellules animales se divisent par défaut
- E) Toutes les propositions sont fausses

# QCM

## A propos de la mise en culture des cellules:

- A) On ne peut pas contrôler les conditions expérimentales
- B) On peut toujours contrôler les mutations
- C) Les microorganismes ont besoin d'un ordre pour se diviser
- D) Les cellules animales se divisent par défaut
- E) **Toutes les propositions sont fausses**

# QCM

## A propos de l'analyse des cellules:

- A) La centrifugation différentielle correspond à une succession de centrifugations de plus en plus rapides
- B) Le protéome représente l'ensemble des ARNm dans une cellule
- C) La biopuce à ADN permet la comparaison de l'expression des gènes dans 2 situations biologiques
- D) La spectrométrie de masse permet l'étude du protéome
- E) Toutes les propositions sont fausses

# QCM

**A propos de l'analyse des cellules:**

- A) La centrifugation différentielle correspond à une succession de centrifugations de plus en plus rapides**
- B) Le protéome représente l'ensemble des ARNm dans une cellule
- C) La biopuce à ADN permet la comparaison de l'expression des gènes dans 2 situations biologiques**
- D) La spectrométrie de masse permet l'étude du protéome**
- E) Toutes les propositions sont fausses