

MANIPULATION DES CELLULES

I. OBTENTION DES CELLULES

Dans l'organisme, les cellules sont agencées en tissus. De plus, un type de tissu compte plusieurs types de cellules. On souhaite donc **dissocier** les cellules de la structure tissulaire puis **séparer** les différents types de cellules.

A. DISSOCIATION

On souhaite dissocier les cellules de la matrice extra cellulaire et rompre les contacts entre cellules.

2 solutions : utilisation de **protéases** (digèrent la MEC) ou **action mécanique légère**.

Remarque : Cette étape est inutile pour les cellules sanguines car elles sont déjà en suspension.

B. SEPARATION

Les méthodes sont différentes selon le tissu et les types cellulaires.

Il existe certaines méthodes simples :

- **Centrifugation à basse vitesse** (séparation selon les propriétés physiques)
- **Adhésion ou non à une surface** (plastique, lame de verre...)

Il existe d'autres méthodes, plus sophistiquées, basées sur la reconnaissance moléculaire :

1. PURIFICATION SUR SUPPORT

Il existe des **protéines de la membrane plasmique** qui **émergent à la surface** des cellules (**différentes** et **spécifiques** pour chaque type de cellule).

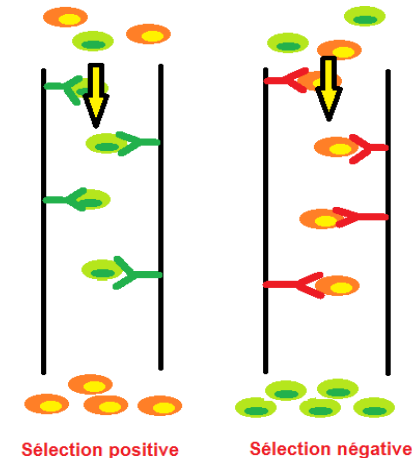
Principe : on prépare une **matrice d'affinité** (support fixe sur lequel sont greffés des anticorps qui vont reconnaître spécifiquement les protéines de surface d'une cellule). On va passer notre échantillon sur la matrice d'affinité et seules les cellules qui auront le bon antigène de surface seront reconnues et vont adhérer.

Par exemple : On a dissocié des cellules d'un tissu et on a obtenu un échantillon avec 2 types cellulaires différents (**cellules vertes** et **cellules oranges**). On souhaite les séparer pour n'étudier que les **cellules vertes**.

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

On distingue 2 types de sélection :

- **Sélection positive** : on recueille les cellules qui ont été retenues par l'anticorps. Il faut tout d'abord les **séparer** du support pour les étudier. Cependant, briser l'interaction antigène-anticorps va **altérer** la cellule.
- **Sélection négative** : on recueille les cellules qui ne sont pas reconnues par l'anticorps → C'est la **méthode de choix**.



2. CYTOMETRIE DE FLUX

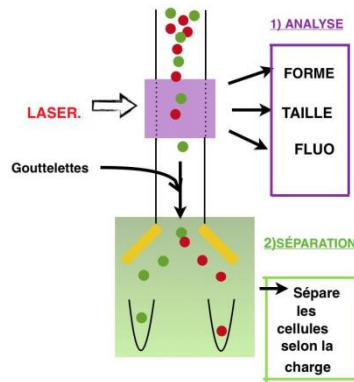
Cette technique à haut débit permet **d'analyser** et de **trier** (séparer) les cellules en **suspension**. Il existe 2 types d'utilisation :

- La **cytométrie analytique** : les cellules passent dans le tube et sont **analysées**.
- La **cytométrie de séparation** : Les cellules sont **analysées** et sont **séparées** selon leur quantité de fluorescence. Cette technique est appelée **FACS** (Fluorescent-Activated Cell Sorter)

Principe : Les cellules en **suspension** passent dans un petit canal. Un **rayon laser** détecte la **fluorescence** des cellules et un **détecteur de lumière** nous informe sur leur **taille** et leur **forme**.

Ensuite, l'appareil va mettre la cellule dans une petite goutte et chaque goutte sera chargée électriquement proportionnellement à sa fluorescence (plus la cellule est fluorescente, plus la goutte sera chargée négativement).

Enfin, chaque goutte passe dans un champ électrique et est déviée selon sa charge (plus elles sont chargées, plus elles sont déviées).



• **Applications de la cytométrie de flux : analyse du cycle cellulaire.**

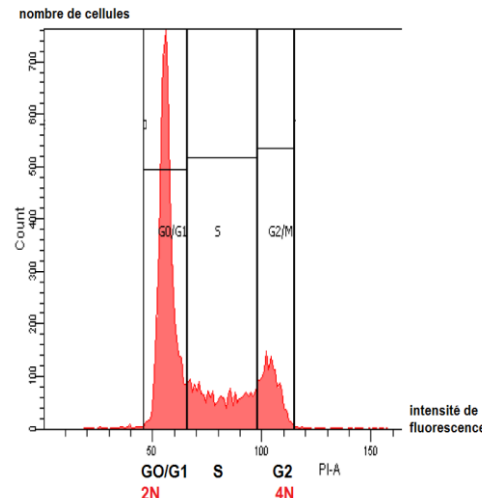
Cette technique est basée sur la **quantification de l'ADN**.

Rappel : cycle cellulaire = **G1 – S – G2 – M**

Réplication de l'ADN pendant la phase S → **2 fois plus d'ADN en G2 qu'en G1**.

Si on connaît la quantité d'ADN dans une cellule, on peut savoir à quel stade du cycle cellulaire elle se trouve.

On va utiliser la **fluorescence induite**, on marque l'ADN de nos cellule avec du **Hoechst** et on sépare les cellules en fonction de la **quantité de fluorescence (quantité d'ADN)** grâce à la **cytométrie de séparation**.



On obtient ce graphique :

2N ADN → Phase G1 ou G0

4N ADN → Phase G2

Entre les deux → Phase S

Cette analyse permet également de trouver le temps de résidence des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire.

II. MISE EN CULTURE DES CELLULES

Maintenant qu'on a obtenu et trié des cellules on veut les **cultiver** pour en avoir plus.

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> -Plus homogène que le contenu cellulaire d'un tissu -Conditions expérimentales contrôlées -Possibilité d'isoler une cellule et de la laisser se diviser pour obtenir un clone génétiquement homogène 	<ul style="list-style-type: none"> -Le fonctionnement cellulaire est étudié en dehors de son contexte tissulaire -On peut sélectionner des mutants sans facilement le contrôler (→ erreurs expérimentales)

(**Clone** : ensemble de cellules identiques issues d'une même cellule originelle)

On utilise les microorganismes eucaryotes (ex : levure ♥) en temps que modèle pour étudier le fonctionnement de nos cellules.

Les microorganismes se **divisent par défaut**, peuvent pousser en milieu semi-solide et ont une vitesse de division élevée.

Les cellules animales ont besoin d'un **ordre pour se diviser**, c'est pourquoi dans les cultures de cellules animales on utilise du sérum de veau fœtal (contient beaucoup de facteurs de croissance). Physiologiquement, les cellules animales **ne poussent pas en milieu semi solide**.

On distingue 2 types de culture cellulaire animale :

- **Les cultures primaires** : culture de cellules provenant directement des tissus. Ces cellules vont se diviser un certains nombre de fois (environ 50 fois) puis vont entrer en sénescence (toujours métaboliquement actives mais plus de division).
- **Les lignées immortelles** : culture de cellules obtenues à partir de tumeurs ou ayant subi l'action d'agents mutagènes ou de virus oncogènes.

Remarque : l'immortalisation cellulaire est une étape vers la cancérisation. Le taux d'**immortalisation spontanée** est faible chez l'homme mais élevé chez la souris.

III. ANALYSE DU CONTENU CELLULAIRE

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

Pour pouvoir analyser le contenu cellulaire, il va falloir les **tuer** (les lyser).

Pour cela, on a plusieurs méthodes :

- Sonication : on utilise des **ultrasons** pour percer la membrane
- Choc osmotique : on met des cellules dans une **solution hypotonique**, tellement d'eau va rentrer dans les cellules qu'elles vont exploser
- Frottements : éclatement des cellules par frottements avec des **pistons** de téflon
- Détergents : destruction de la membrane plasmique.

Fractionnement de l'extrait cellulaire :

Suite à la lyse, on obtient un **extrait cellulaire**, on se débarrasse d'abord des **gros débris** par **filtration** ou **centrifugation à basse vitesse**.

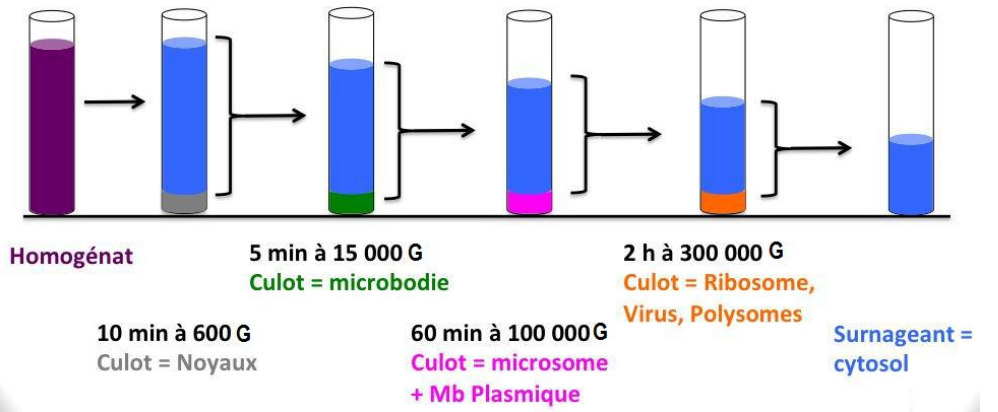
Ensuite on va utiliser d'autres techniques pour réaliser des séparations de plus en plus fines :

- Centrifugation différentielle :

On réalise une succession de centrifugations de plus en plus rapides pour séparer spécifiquement certains composants en fonction de leur **taille** et de leur **densité**.

Les éléments plus gros et plus denses vont sédimenter plus vite.

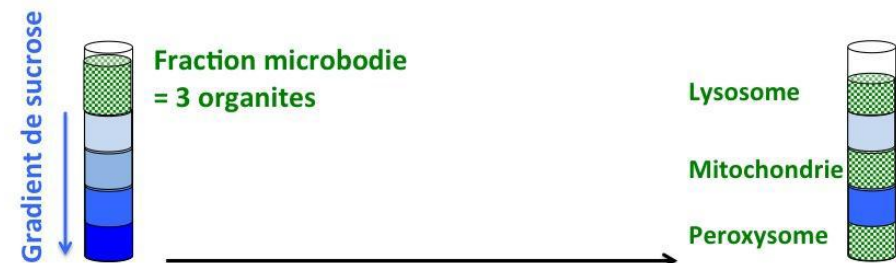
10 minutes à 600 G	Culot : noyau Surnageant : cytoplasme
5 minutes à 15 000 G	Culot : fraction microbodies (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes)
1 heure à 100 000 G	Culot : membrane plasmique et fraction microsomale (fragments de réticulum endoplasmique), polyribosomes.
2 heures à 300 000 G	Culot : ribosomes, virus, certains polyribosomes. Surnageant : cytosol



- Centrifugation à l'équilibre (= centrifugation en gradient de densité = centrifugation isopycnique).

Parfois, la centrifugation différentielle n'est pas suffisante (par exemple pour purifier la fraction microbodie → séparer mitochondries, lysosomes et peroxyosomes).

Principe : On utilise un tube à essai composé de **coussins de sucre** qui ont des **densités croissantes** (ces densités sont connues et plus on descend, plus la densité est élevée). On place notre préparation dans le tube, on centrifuge et chaque élément va s'arrêter quand il aura rencontré la couche de sucre qui correspond à sa densité.



Ici on obtient en terme de densité : lysosome < mitochondrie < peroxyosome

Remarque : les **enzymes** sont **compartmentées** dans les cellules, c'est-à-dire qu'elles sont localisées spécifiquement dans certains **organites** (par exemple la catalase dans les peroxyosomes). La centrifugation isopycnique permet de séparer les différents organites et donc de **mesurer l'activité enzymatique** des différentes enzymes.

IV. ANALYSE DE LA COMPOSITION MOLECULAIRE DES FRACTIONS.

GENOME : Ensemble de la séquence des **gènes** potentiellement transcrits d'une cellule ou d'un organisme (→ ADN).

TRANSCRIPTOME : Ensemble des ARNm d'une cellule ou d'un organisme.

PROTEOME : Ensemble des protéines d'une cellule ou d'un organisme.

⚠ On ne peut pas déduire le transcriptome du génome car tous les gènes ne sont pas forcément transcrits en ARN. On a le même ADN dans chaque cellule mais pas les mêmes ARNm.

A. Puces à ADN (=biopuces à ADN)

Cette technique permet d'étudier les **ARNm** dans une cellule → le **transcriptome**.

Biopuce à ADN = lame de verre composée de nombreux **spots** sur lesquels on a gravé les séquences de chaque gène du génome (1 gène par spot).

Généralement, on utilise cette méthode pour **comparer 2 situations** biologiques (par exemple cellule avec oxygène (**aérobie**) et cellule sans oxygène (**anaérobie**)).

Principe : On place des cellules en aérobie et d'autres en anaérobie. On **lyse** les cellules puis on purifie tous les **ARNm**. On utilise des **reverse transcriptases** qui vont créer des **ADNc** (ADN complémentaire) à partir des ARNm.

Dans la situation aérobie, on aura placé des précurseurs nucléotidiques couplés à des fluorochromes verts et dans la situation anaérobie, pareil avec des fluorochromes rouges.

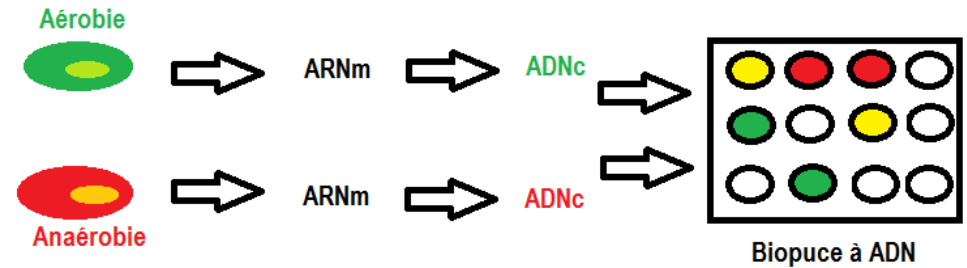
On place ces ADNc sur la biopuce, si les ADNc s'hybrident avec les gènes gravés sur la lame de verre, alors on verra apparaître de la fluorescence.

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

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

Plusieurs cas sont possibles :

- **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.
- **Pas de fluorescence** → gène exprimé dans aucune des 2 situations.



B. Séquençage haut débit (NGS : next generation sequencing)

Cette technique permet d'étudier l'ADN et l'ARN → le **génome et le transcriptome**

On obtient directement la **séquence nucléotidique** de l'ADN ou de l'ARN grâce à la **méthode de Sanger** qui est basée sur des réactions de polymérisation de l'ADN.

C. Spectrométrie de masse

Cette technique permet d'étudier les protéines d'une cellule → le **protéome**

Principe : Chaque peptide passe dans la **chambre d'ionisation** et devient donc chargé. Les peptides ionisés sont ensuite **accélérés** puis **déviés selon leur masse**. La machine analyse le signal et donne un **spectre de masse** qui dépend du rapport entre la **masse** et la **charge**. Ce spectre de masse permettra d'identifier les peptides.

Souvent on n'analyse la séquence que d'une protéine : on doit donc séparer les différentes protéines. Pour ça il existe une technique : **l'électrophorèse bidimensionnelle**.

Les protéines sont séparées selon leur **masse** et leur **pHi** (point isoélectrique)

