

# Méthode d'analyse des cellules - Manipulation des cellules



## I. Manipulation des cellules

### A. Obtention des cellules

#### 1. Dissociation du tissu: suspension de cellules

Il nous faut travailler sur des **cellules en suspension**.

- Dans le sang, les cellules sont déjà en suspension, il faudra juste les trier en fonction des types cellulaires différents.
- Dans les tissus solides (le reste), on n'a pas uniquement des cellules mais aussi une matrice extracellulaire (**MEC**). Il faudra dissocier les liaisons cellules/MEC et les liaisons cellules/cellules.

Pour cela on utilise différentes techniques:

- **biochimique**, enzymes dont les *protéases (trypsine...)*, vont dissocier les liaisons peptidiques responsables du contact cellule/cellule, cellule/MEC.
- **chimique** avec l'EDTA qui est un chélateur d'ion calcium (*il élimine le calcium en se fixant dessus, le calcium intervenant dans beaucoup d'interactions cellulaires*),
- **mécanique** avec agitation légère (plus douce).

**Les cellules perdent leur environnement tissulaire, elle n'est pas la même que lorsqu'elle est dans son tissu** (*on a une perte d'information sur leurs fonctions naturelles*).

#### 2. Séparation des différents types de cellules

On peut séparer les cellules en fonction de différentes propriétés. Selon les propriétés choisies, la technique sera différente:

- propriétés physiques (tailles, formes) = centrifugation basse vitesse
- propriétés d'adhésions sur plastique ou lame de verre
- propriétés moléculaires = purification sur support ou cytométrie de flux.

Les méthodes permettant de séparer les cellules en fonction des propriétés moléculaires concernent deux types de molécules:

- Les molécules directement exposées à la surface des cellules: Ag de surface (récepteurs, molécules d'adhésion) ce sont des molécules naturelles.
- Les molécules à l'intérieur: On va conférer artificiellement à une molécule des propriétés de fluorescence par manipulation de gènes, ainsi la cellule est toujours **vivante** (*avec des molécules fluorescentes type GFP*).

### ♦ Purification sur support

**Principe:** On a une suspension avec deux types cellulaires (ou plus) et un support qui correspond à une surface neutre (plastique, billes magnétiques...) sur laquelle on greffe des anticorps = **matrice d'affinité**.

**Dispositif:** on mélange des billes (couplées à des Ac) avec notre préparation de cellules. Ces Ac sont spécifiques de l'Ag situé à la surface des cellules que l'on veut séparer.

Pour résumer, les cellules possédant l'Ag reconnu par l'Ac situés sur les billes vont être séparées des autres cellules.

Il existe 2 types de sélection:

#### ● **Sélection négative** = c'est la procédure **de choix** !

On greffe sur le support des anticorps qui correspondent à des antigènes contenus dans les cellules que l'on ne veut pas. On récupère au fond les cellules qui nous intéressent, intactes, qui ne se sont pas accrochées aux parois.

○ **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.

⇒ La sélection positive a donc 2 défauts (l'interaction et la séparation Ag-Ac), alors que si on utilise la sélection négative, on obtient des cellules à leur état basal.

### ♦ Cytométrie de flux

**Principe** = des cellules en suspension vont passer en flux continu à grande vitesse dans un petit canal (légèrement plus large que les cellules qui nous intéressent) qui traverse différentes étapes de détection et nous permet de les analyser.

Les cellules triées sont souvent **fluorescentes**, naturellement ou artificiellement :

- soit via leurs antigènes de surface avec des anticorps greffés à un fluorochrome
- soit de manière endogène : la cellule exprime une molécule fluorescente comme la GFP ou ses variant

Il existe deux sortes de cytométrie :

**Cytométrie analytique:** mesure des propriétés de chacune des cellules.

On a une double détection :

- soit de la fluorescence après excitation avec un rayon laser,
- soit de la figure de diffraction qui permet d'analyser la forme et de la taille des cellules (*action de la lumière & angle de diffraction*).

A savoir: Pour colorer l'ADN: Hoescht rentre directement dans la cellule et dans le noyau, elle traverse toutes les membranes biologiques. Pour l'iodure de propidium (c'est un intercalant), il faudra perméabiliser (détruire avec des détergents) les membranes biologiques.

**Cytométrie de séparation (FACS):**

Dispositif du FACS:

Les cellules arrivent par le tube (**une seule cellule à la fois**), le canal va vibrer et en vibrant il sépare les cellules et les met dans une **petite gouttelette** (*une gouttelette = une cellule*).

Au moment de sa formation, la gouttelette va recevoir une petite **charge électrique** injectée par la machine dont la quantité est **proportionnelle** à la fluorescence.

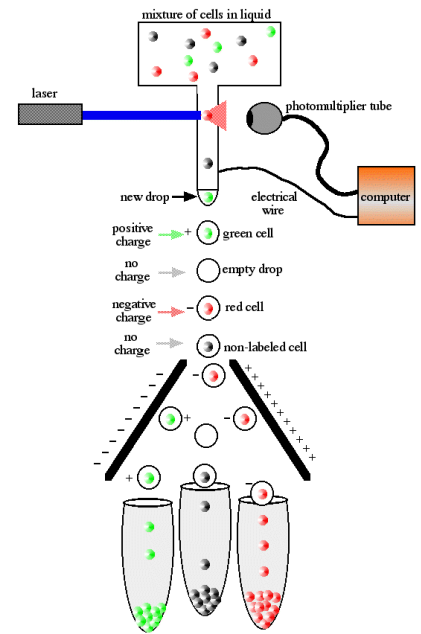
⇒ On va donc quantifier la fluorescence via la charge de la gouttelette.

Il suffit ensuite de faire passer la gouttelette dans un **champ électrique**, celle-ci est alors **déviée** en fonction de sa charge et on récupère les cellules en fonction de leur *angle de déviation*.

⇒ On peut distinguer les cellules très fluo des cellules peu fluo.

Applications:

- numération (classement par type) des cellules en suspension
- détermination du pourcentage de cellules mortes et vivantes
- tri des cellules
- quantité d'ADN: analyse du cycle
- évaluation des paramètres cellulaires (propriétés)

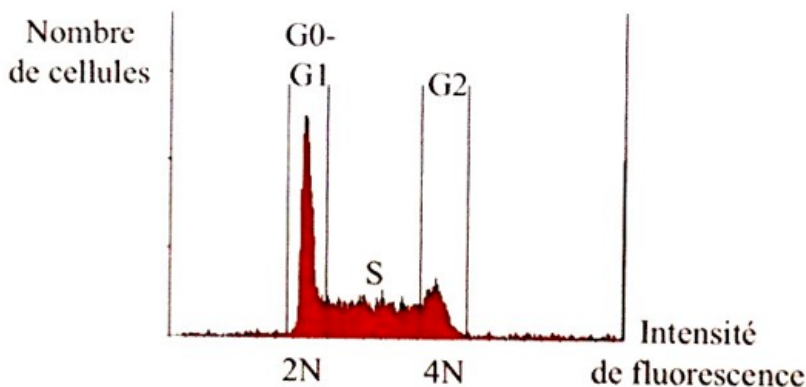


Exemples:

On peut se baser sur la quantification de l'ADN (cytométrie) pour déterminer l'état du cycle dans lequel est la cellule. En effet la quantité d'ADN contenu dans le noyau de la cellule change en fonction du moment du cycle.

On a en G1 (2nADN), en phase S (4nADN), pareil en G2 puis pendant la mitose on revient à 2nADN et ainsi de suite.

On a une suspension de cellules non synchronisées = **culture asynchrone**, chacune à un moment du cycle, elles sont indépendantes et en décalé.



On observe un pic à **2nADN** : un très grand nombre de cellules ont 2nADN → phase G1 voire G0  
Lorsqu'on a **4nADN** elles sont en G2.

Une cellule normale a un cycle d'environ **24h**.

En sachant la durée du cycle et le pourcentage de cellules dans le cycle, on peut en déduire **le temps de chaque phase du cycle** pour ce type de cellule en particulier.

## B. Culture des cellules

### Avantages:

- elles sont plus homogènes que dans les tissus
- les conditions expérimentales sont contrôlées
- on peut isoler une cellule unique et la laisser se diviser pour obtenir des clones homogènes.

### Inconvénients:

- le fonctionnement n'est pas réellement le même que dans les tissus, les cellules subissent un stress du fait qu'elles soient dans les conditions de la culture.
- on peut sélectionner des mutants/variants sans facilement les contrôler, ils nuisent à l'homogénéité de la culture.

*Lorsque l'on part d'une cellule unique et qu'on veut obtenir des clones à partir du patrimoine génétique de la cellule initiale, il peut y avoir certaines modifications dues aux conditions de culture.*

Il existe des types de culture plus sophistiqué : **cultures organotypiques**.

On va **mélanger** plusieurs types cellulaires pour essayer de **récréer** les conditions retrouvées dans le **tissu** dans une boîte de pétri.

### 1. Culture des micro-organismes

Les conditions de croissance sont **simples** et la vitesse de division est rapide. Ils peuvent être cultivés en milieu **semi-solide** pour former des **colonies**. Les mutants sont facilement obtenus et isolés. On obtient des colonies à partir d'une cellule qui s'est divisée environ **20 fois**.

On peut voir apparaître un mutant qui confère une couleur différente aux cellules: on appelle cela un **secteur**. Un secteur est d'autant plus grand que la mutation est survenue tôt dans les divisions

### 2. Culture de cellules animales

La culture se fait également dans un boîte de pétri pour les cellules animales, mais sans gélose, il faut un **milieu solide**.

On se base une fois encore sur les propriétés **d'adhésion** des cellules sur le plastique (+++) → **propriété des cellules qui reconnaissent leur MEC**.

La cellule animale a besoin de ses contacts avec le **milieu extracellulaire** pour lui envoyer les **signaux** qui vont lui dire de se **diviser**

On distingue:

- Les cultures primaires: elles sont établies directement à partir des tissus dissociés et certains types cellulaires sont plus facilement utilisables pour ce genre de culture. Les cellules en culture ne se divisent qu'un nombre **limité** de fois (environ 50), c'est la **sénescence cellulaire** (touche les cellules **somatiques** mais pas les **germinales**).  
Attention on parle de sénescence pour les cellules et de vieillissement pour l'organisme.
- Les lignées immortelles: certains **variants** sont rendus **immortels** et peuvent donner des lignées. Le taux d'immortalité spontanée varie en fonction des espèces (rare chez l'homme, fréquent chez la souris). L'apparition de lignées immortelles est surtout due à une intervention **artificielle** (exogène) à but de recherche.

## C. Analyse du contenu cellulaire

### 1. Lyse et fractionnement

#### ◆ Lyse de la cellule

**Lyse** = Casser la cellule pour libérer le contenu cellulaire dans un tube à essai.

**Fractionnement** = permet de séparer les différents constituants des cellules.

Le but est d'obtenir un **homogénat** (ou **extrait**) qui va être le point de départ de l'analyse moléculaire du contenu des cellules.

Il existe différentes techniques de lyse :

- **Sonication** = On utilise des ultrasons, méthode douce et efficace
- **Choc osmotique** = fait appel à une **solution hypotonique**, la cellule va exploser.
- **Détergents** = destruction sélectives des membranes cellulaires
- **Frottements** = éclatement des cellules par frottement avec des piston de téflons.

#### ◆ Séparation de l'extrait cellulaire

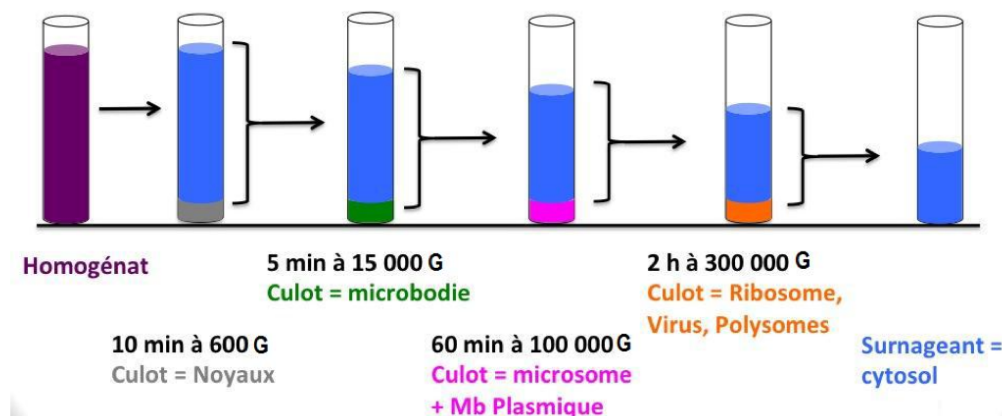
On doit faire une **séparation** avant de passer à la suite :

- Filtration : pour les gros débris,
- Centrifugation : membranes, organistes, complexes moléculaires
- Par méthode d'analyses moléculaires plus sophistiquées et plus biochimiques = **chromatographie et électrophorèse** : protéines et acides nucléiques...

Centrifugation différentielle:

**Principe** = séparation des organites cellulaires en fonction de leur taille et de leur densité (les plus gros et les plus denses sédimentent plus vite chaque fois on récupère le surnageant, et on applique des **centrifugations** de plus en plus rapides et de plus en plus longtemps.

A partir de **100 000g** on parle d'**hyper-centrifugation**, on doit changer de machine (une plus sophistiquée).

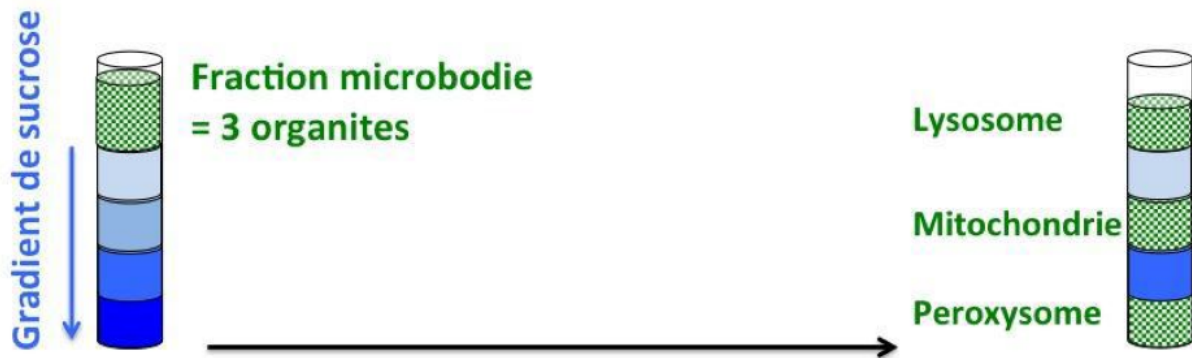


La fraction **microbodie** n'est pas pure, on a pas séparer les mitochondries, des peroxyosomes, des lysosomes, pour cela on utilise:

Centrifugation isopycnique, à l'équilibre en gradient de densité

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.



Les enzymes sont compartimentées dans les cellules, c'est-à-dire qu'elles sont localisées spécifiquement dans certains organites.

**Peroxyosome:** La catalase (protection contre le stress oxydant = décompose l'eau oxygénée en eau et oxygène).

**Lysosome:** enzymes hydrolytiques qui dégradent par hydrolyse des macromolécules: phosphatase acide

**Mitochondrie:** enzyme spécifique de la chaîne respiratoire mitochondriale qui est la **cytochrome oxydase**.

→ Cette **notion** de compartiment est **centrale** en biologie cellulaire.

Exemple de compartimentation enzymatique: Le syndrome de Zellweger

C'est une mauvaise compartimentation de la catalase qui normalement est dans les peroxyosomes.

Cette dernière va se retrouver **dans toute la cellule**. Ce syndrome aboutit à la mort très rapide du nouveau né suite à des problèmes neurologiques, hépatiques et du développement de la face.

Cette maladie génétique est causée par la mutation d'un gène qui **ne code pas pour la catalase** (cette dernière est bien présente ici) mais qui va jouer un rôle dans la structure et la fonction du peroxyosome: c'est le gène **PXR 1**.

Sans la catalase, le peroxyosome n'accomplit plus sa fonction qui est de détoxifier.

## 2. Composition moléculaire

- **Génome** = ensemble des gènes, séquences d'acides nucléiques
- **Transcriptome** = ensemble des transcrits (*tous les gènes ne sont pas transcrits*)
- **Protéome** = ensemble des protéines traduites

### ◆ Biopuce 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)).

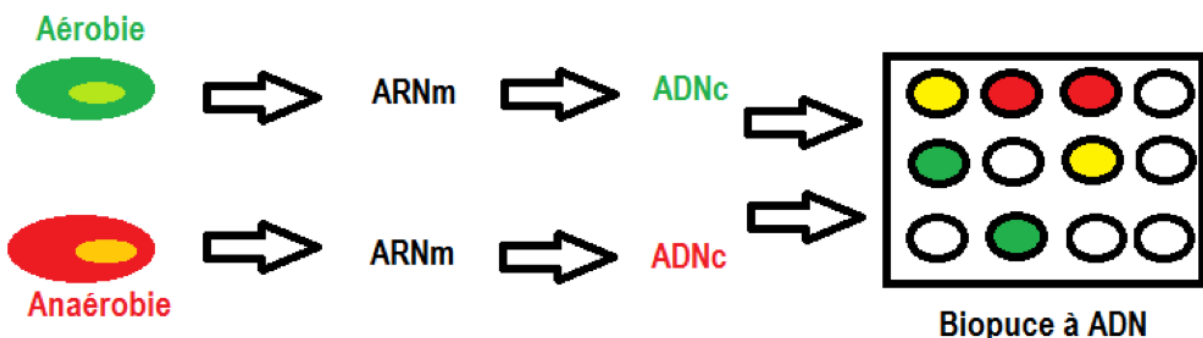
Principe : On place des cellules en aérobie et d'autres en anaérobie. On lyse les cellules puis on purifie tous les ARNm. On utilise des reverse transcriptases qui vont créer des ADNc (ADN complémentaire) à partir des ARNm.

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.

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.



### ◆ NGS ou séquence haut débit

Les méthodes dites **NGS** ne sont **qu'en partie enzymatique**, l'**ADN** est gravé que une puce, ce qui permet d'avoir toute une panoplie de séquences, le tout traité par des machines très rapides.

On découpe l'ADN en morceaux. On met l'ADN dans la machine qui donne un listing avec toutes les séquences des petits fragments. Chaque morceau d'ADN va être séquencé et on obtient des résultats (de petite taille). Des ordinateurs analysent toutes les séquences de ces résultats et regardent si elles sont présentes dans un **génomme dit de référence**.

On peut ainsi en *quelques heures* déterminer la **séquence du génome** par rapport au génome de référence.

#### Applications

- séquencer le génome,
- chercher des mutations : germinales ou somatiques,
- mieux caractériser les cellules cancéreuses pour faire de la médecine personnalisée,
- étudier au niveau germinale des gènes de susceptibilité de prédisposition (cancers...) étudier le transcriptome : les séquences d'ARN.

### ◆ Analyse du protéome (spectrométrie de masse)

**Principe** = technique physique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse (*et de leur charge*) avec une précision très importante.

Pour avoir une carte des protéines il faut les **séparer**, pour cela on utilise généralement l'**électrophorèse bidimensionnelle** qui sépare les protéines en fonction de leur **masse** et de leur **charge** (pHi).

On sépare ensuite les protéines de l'électrophorèse en petits morceaux (grâce à des **coupeurs de protéines**, les peptides).

A l'aide d'un **spectromètre de masse** on va analyser le rapport masse/charge de chacun des fragments, puis on va comparer ce rapport à une base de données afin d'identifier la protéine (deux protéines ne peuvent pas avoir le même rapport M/Z), cette technique est donc très **discriminante**.