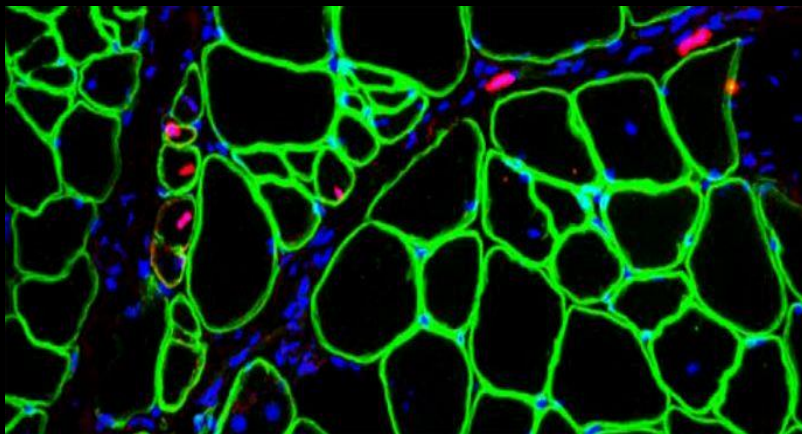
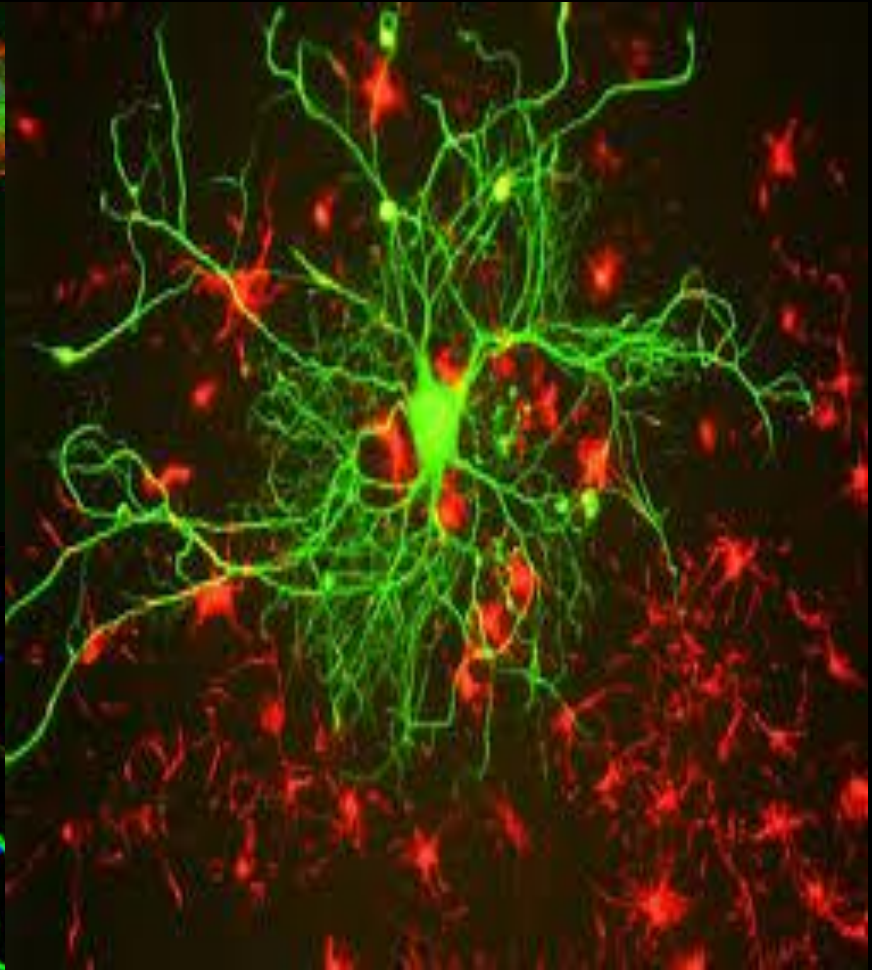
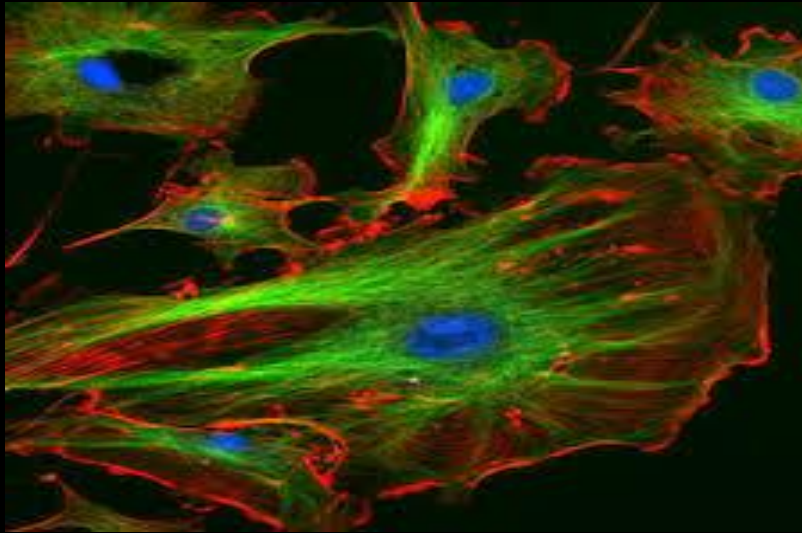


MANIPULATION ET CULTURE CELLULAIRE



INTRODUCTION

FIRE
AND BLOOD

THE WINTER OF DISCONTENT



Séparation de la matrice extra-cellulaire (MEC)

- méthode **chimique** : utilisation d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique)
- méthode **enzymatique** : emploi de protéases type trypsine
- méthode **mécanique** : agitation légère

NB : une cellule séparée de sa membrane extra-cellulaire n'est plus fonctionnelle, on a donc une perte d'informations concernant les potentialités cellulaires (micro-environnement)

Obtention des cellules d'intérêt :

- Centrifugation à basse vitesse
- Adhérence aux boites de Petri :



Les cellules reconnaissent plus ou moins facilement le plastique de la boîte de culture comme leur matrice extra-cellulaire.

- Chromatographie d'affinité
- Cytométrie de flux

Chromatographie d'affinité

Technique immunologique s'appuyant sur la reconnaissance des antigènes de surface.

On introduit un support neutre (la matrice d'affinité) comportant des anticorps spécifiques des antigènes des cellules d'intérêt, qui se fixeront ensuite sur celles-ci.

1- Sélection négative : on recueille les cellules non fixées par les anticorps.

2- Sélection positive : on recueille les cellules fixées par les anticorps.

NB : Contrairement aux premières intuitions, c'est la sélection négative qui est privilégiée.

Cytométrie de flux

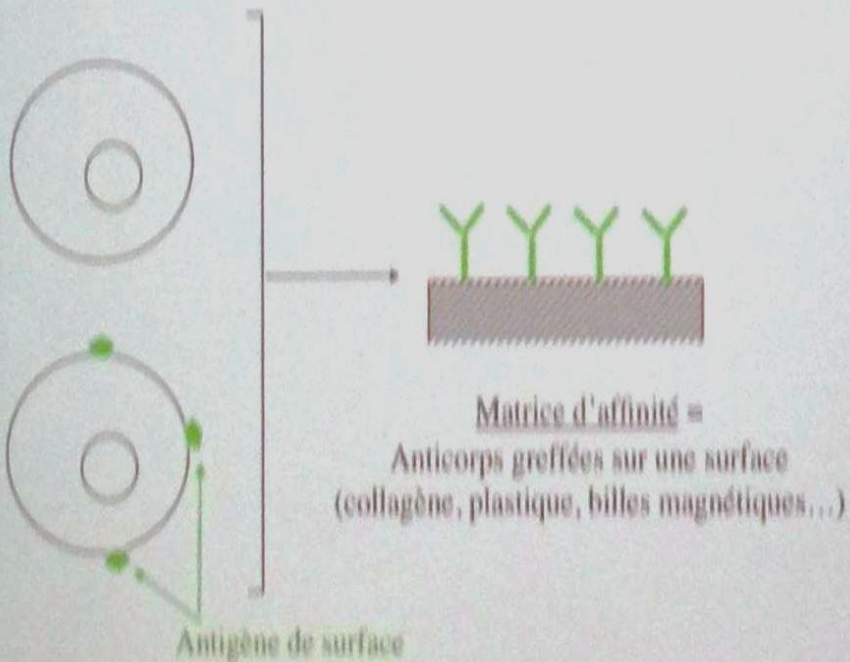
Principe : Des cellules en suspension (rendues fluorescentes ou pas) circulent à grande vitesse dans un appareil qui se chargera de les analyser individuellement.

Il existe deux catégories de cytométrie de flux :

- La cytométrie analytique : qui décrit simplement les cellules en utilisant des procédés optiques (comme la diffraction ou la fluorescence) pour caractériser la morphologie et les différents types cellulaires avec une capacité de traitement de 10 000 à 1 000 000 de cellules/minute
- La cytométrie de séparation (ou FACS) : qui analyse **ET** sépare les cellules en fonction d'une quantité de fluorescence

Purification sur support

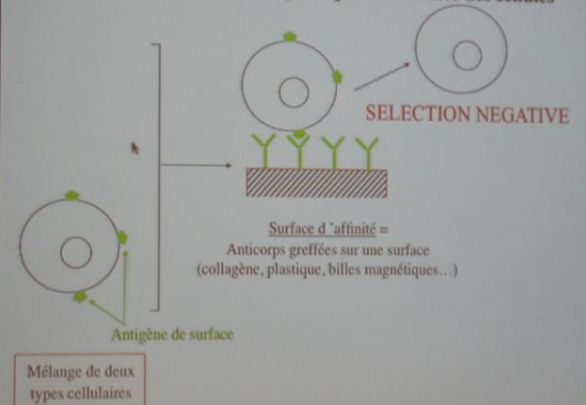
selon la présence d 'antigène spécifique à la surface des cellules



Matrice d'affinité =
Anticorps greffés sur une surface
(collagène, plastique, billes magnétiques...)

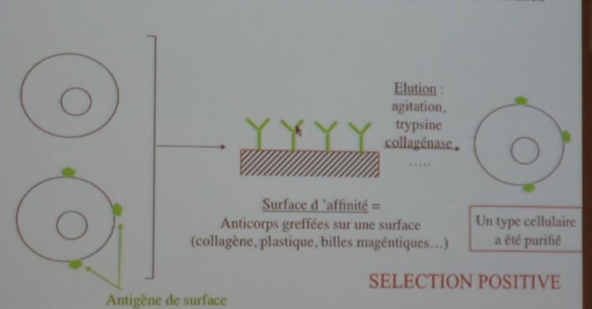
Mélange de deux
types cellulaires

Purification sur support selon la présence d 'antigène spécifique à la surface des cellules



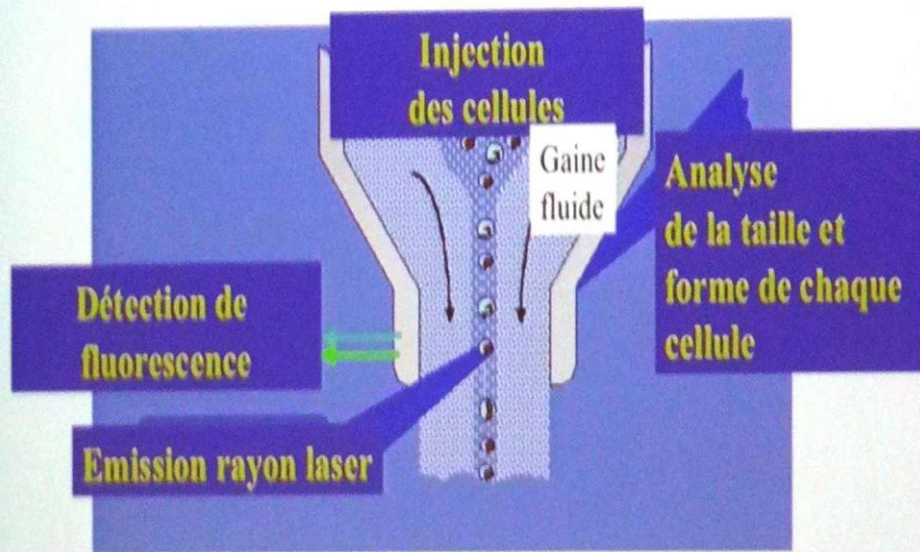
Mélange de deux
types cellulaires

Purification sur support selon la présence d 'antigène spécifique à la surface des cellules

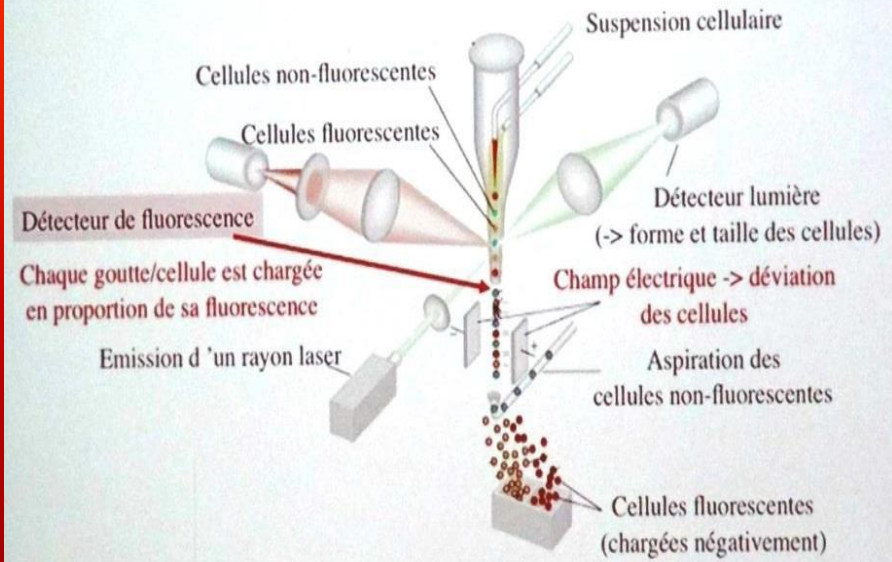


Mélange de deux
types cellulaires

La cytométrie de flux



FACS = Fluorescent-activated Cell Sorter



Cette machine peut trier environ 500 cellules à la seconde

Applications de la cytométrie de flux :

- Numération des cellules en suspension (formule sanguine)
- Détermination de la proportion de cellules mortes et vivantes d'un échantillon
- Trier les cellules d'une biopsie tissulaire
- Analyse du cycle cellulaire (via la quantité d'ADN)



CULTURE CELLULAIRE

- Culture de micro-organismes :

Pour se développer, les micro-organismes nécessitent un milieu semi-solide (généralement de la gélose) et des nutriments essentiels à leur survie. Leur temps de division cellulaire est court (2 heures pour une levure) ce qui leur confère l'avantage d'être un modèle de comportement cellulaire simple et rapide à obtenir. Ces cellules poussant sous forme de « colonies » les variants rapidement obtenus sont aisément isolables.

- Culture de cellules animales :

Les cellules animales se multiplient sur un milieu solide, mimant la matrice extra-cellulaire (**SAUF** les cellules cancéreuses) à l'aide d'éléments essentiels, comme les protéines, les lipides et les glucides. A l'inverse des micro-organismes, ces cellules nécessitent un signal pour se diviser, ce signal sera délivré via des facteurs de croissance (contenus par exemple, dans le sérum de veau fœtal) ajoutés à la préparation, ou des oncogènes (voir plus loin)

Les différents types de culture cellulaire

Les cultures primaires : Cellules normales en culture. Chaque cellule a un « potentiel de division » donné (une cinquantaine pour le fibroblaste). Une fois ce potentiel atteint, la cellule entre en sénescence, elle ne peut plus se diviser mais reste métaboliquement active (Cf cours sur la sénescence), ce processus étant irréversible, il met définitivement fin à l'expérimentation.



Les cultures immortelles : On octroie la capacité de se diviser infiniment aux cellules via un virus oncogène (type papillomavirus) ou on prélève directement des cellules tumorales sur un patient ou un animal. Ces cellules échappant au phénomène de sénescence, on peut mener un grand nombre de manipulations à partir des mêmes cellules (mais attention aux mutations inopinées)



Analyse moléculaire

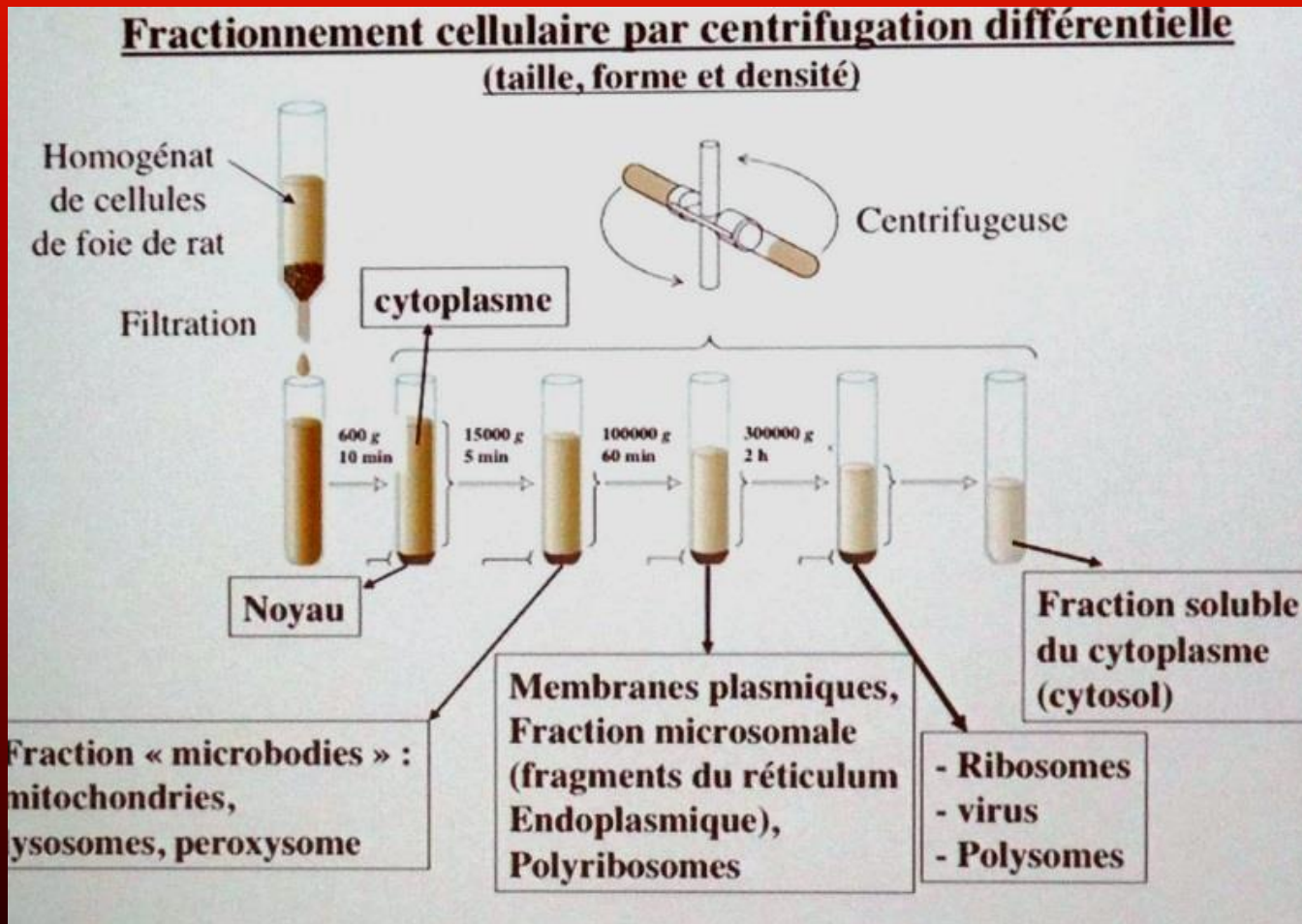
- Différentes techniques de lyse cellulaire :
 - Sonication
 - Frottement avec un piston
 - Choc osmotique
 - Utilisation de détergents

- **Etude des organites :**

- Centrifugation différentielle : qui consiste en une séparation en fonction de la taille et de la masse des organites à l'aide de l'augmentation croissante de la force centrifuge et du temps de centrifugation
- Centrifugation isopycniqne (à l'équilibre en gradient de densité) : On prépare un tube à essai avec des « coussins de sucrose » de densités connues et croissantes, puis on centrifuge l'extrait cellulaire. Les organites seront séparés en fonction de leur densité car ils sédimenteront au niveau du coussin de sucrose correspondant à leur propre densité. On prélèvera finalement la galette de sucrose comportant l'organite d'intérêt.

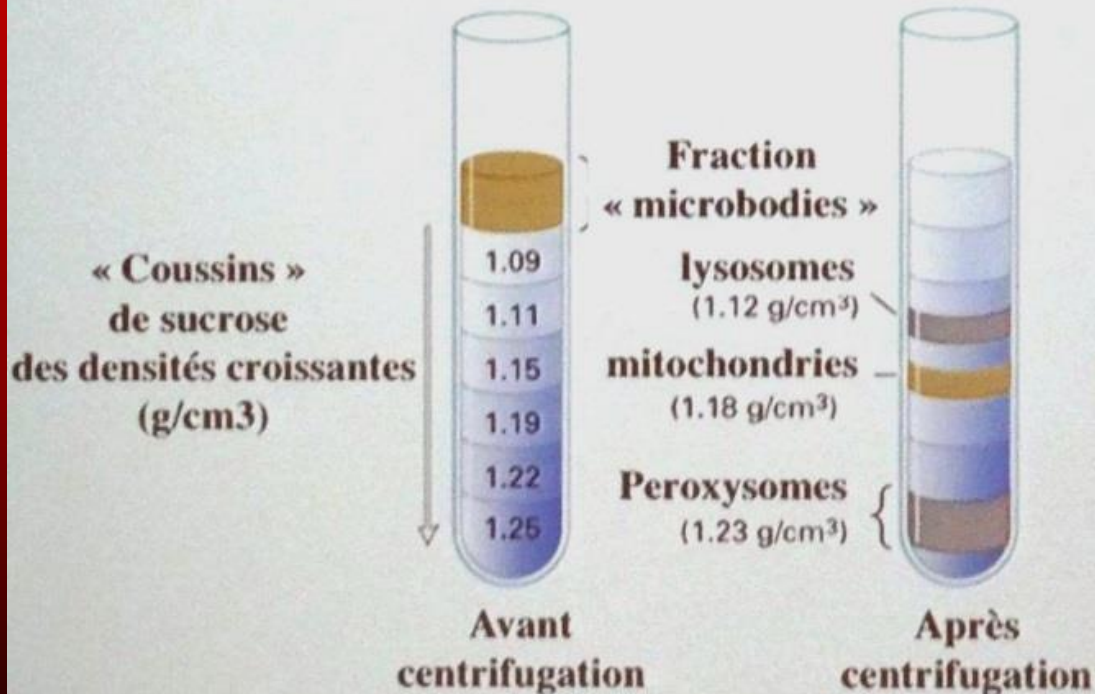


Centrifugation différentielle



Centrifugation isopycniq

Séparation de la fraction «microbodies» par centrifugation à l'équilibre en gradient de densité (ou isopycniq)



COMPOSITION MOLECULAIRE

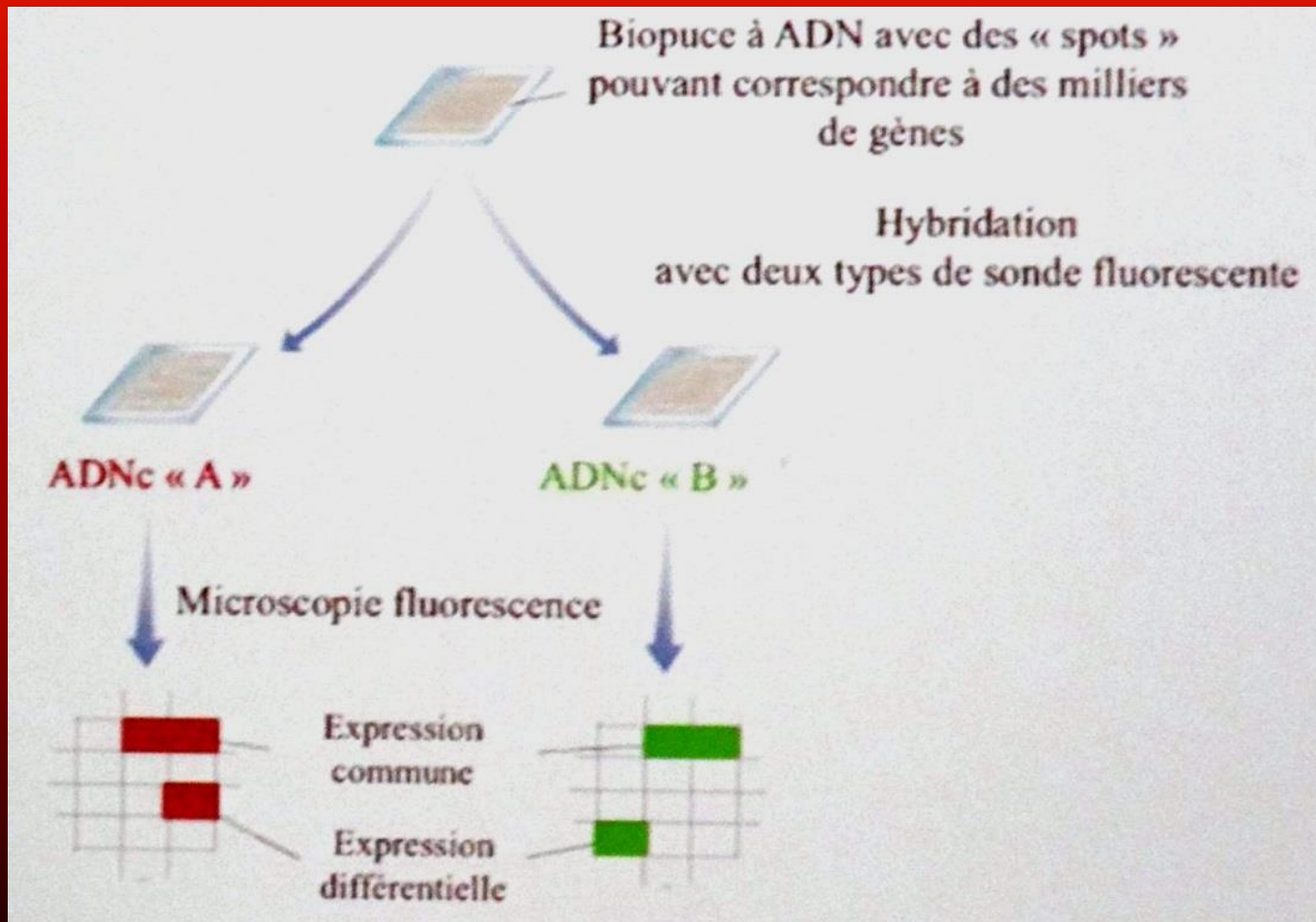


Etude du noyau et du cytosol:

-Puce à ADN: Etude de la transcription d'un gène dans différentes conditions expérimentales

-NGS: technique d'avenir permettant un séquençage complet du génome

Puce à ADN



NGS

Séquençage haut débit ou
NGS = Next Generation Sequencing



	Lectures (nt)	Run (jour)	Gb/run)
Roche 454	330	0.35	0.45
Illumina Solexa GA II	36 à 100	4	18
Applied Biosystems Solid 3	50	7	30

Un "run" est la réalisation d'un processus complet par la machine.

Il produit un grand nombre de lectures correspondant à des séquences d'ADN ou d'ARN de l'échantillon étudié.

La nouvelle génération de séquenceurs à très haut débit permet de séquencer, en quelques jours, plusieurs gigabases d'ADN.

1 Gb = un gigabase = 10^9 bases

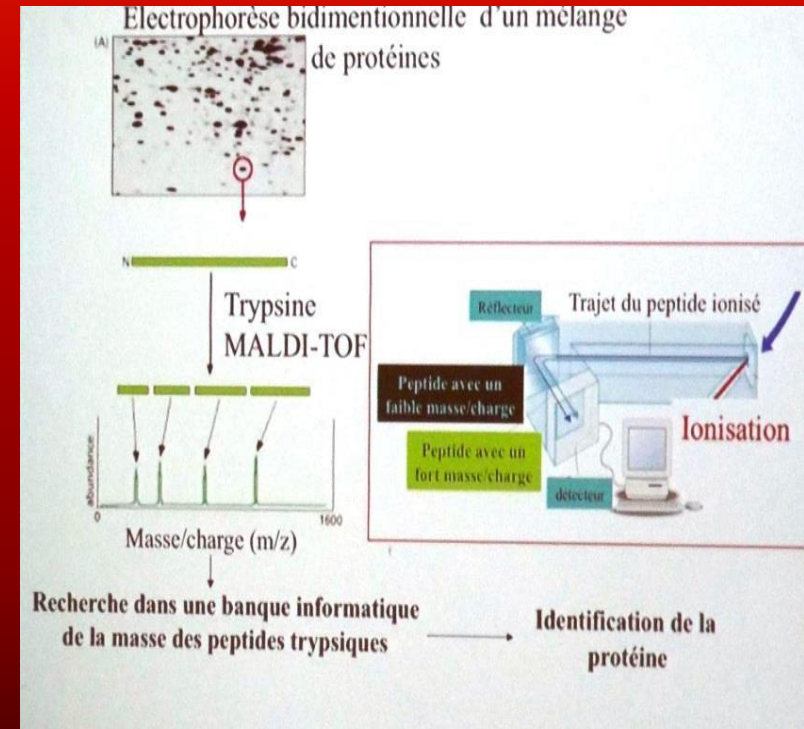


Etude du protéome (cytosol, REG, Mitochondrie...):

-Spectromètre de masse

-Electrophorèse (détaillée en biochimie)

Spectromètre de masse



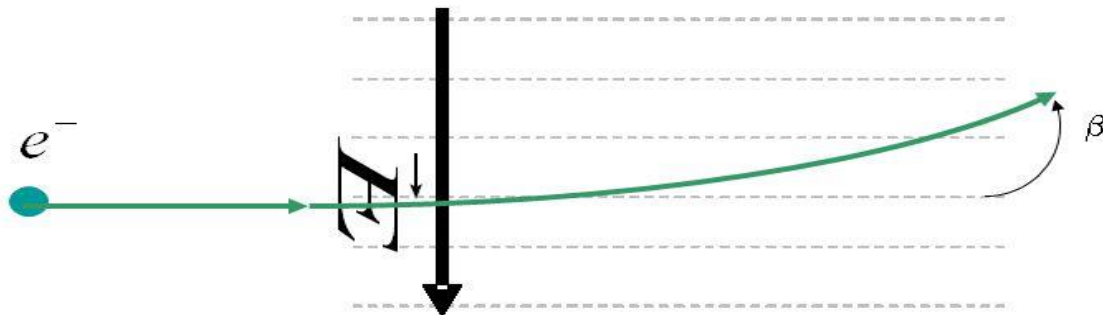
Spectromètre de masse de l'université de Brest

Analogie avec le condensateur

Electrocinétique

I Etude du mouvement des particules dans un champ électrique

Déviaton de particules chargée



Une particule chargée arrivant parallèlement dans un condensateur plan sera soumise à un champ \vec{E} perpendiculaire qui produira une déviation du trajet de la particule

TRIAL BY QCMs



Fire and Blood

ARE YOU A TARGARYEN ?