

# MANIPULATION ET METHODE D'ANALYSE DES CELLULES

## OBTENTION DES CELLULES

**Le premier objectif est de séparer les différentes cellules de la membrane extra-cellulaire du tissu cible**

Deux cas de figure :

- 1- La cellule est une cellule sanguine, dans ce cas elle est déjà en suspension (en milieu liquide),
- 2- La cellule appartient à un tissu (cas le plus fréquent) : il va falloir l'extraire et la dissocier de sa matrice extra-cellulaire (ou MEC) afin de l'exploiter.

Il existe 3 techniques pour séparer les cellules de leur MEC :

- Technique « **biochimique** » utilisant des enzymes, comme la trypsine
- Technique **mécanique** consistant en une agitation légère de la préparation cellulaire
- Technique **chimique** nécessitant l'EDTA (acide Ethylène Diamine Tétracétique) qui élimine le calcium intra-cellulaire qui permet l'adhésion à la matrice extra-cellulaire

NB : une cellule dissociée de sa MEC n'est plus fonctionnelle car elle n'est plus dans son environnement tissulaire, plus en communication avec celui-ci, on a donc une perte d'informations concernant sa fonction et certains mécanismes en rapport avec le bio-environnement de la cellule d'intérêt.

## SEPARATION DES CELLULES

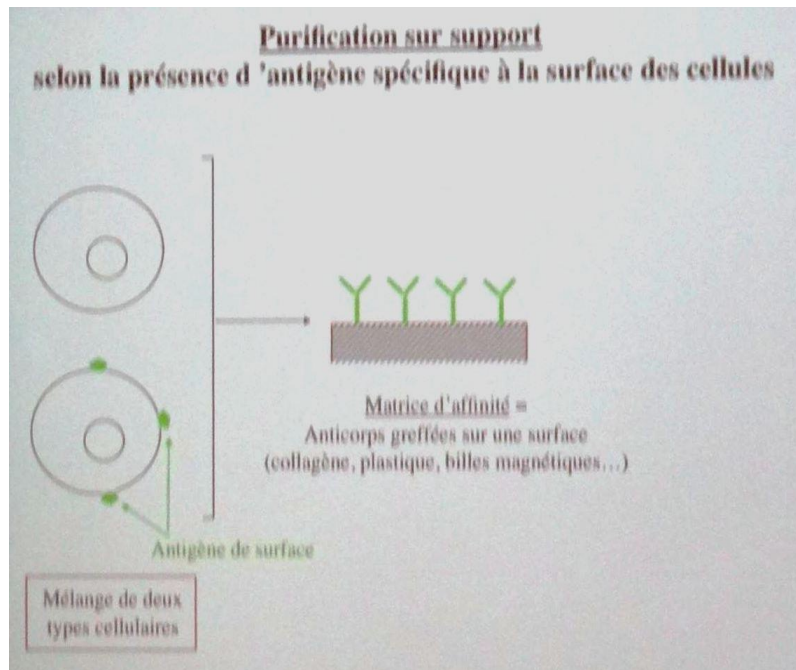
**On souhaite maintenant séparer les différents types cellulaires obtenus pour conserver uniquement les cellules cibles**

On maîtrise plusieurs techniques de séparation, des plus simples aux plus complexes nous avons :

- **Centrifugation à basse vitesse** : basée sur la morphologie des cellules (taille du noyau, forme du cytosquelette),
- **Adhérence aux boîtes de Pétri** : certaines cellules adhèrent plus ou moins aux boîtes de culture, cela est fonction de leur capacité à considérer le plastique de la boîte de Pétri comme leur matrice extra-cellulaire. Les cellules sanguines reposant sur une MEC liquide (*Cf cours d'histologie sur le tissu sanguin*) cette stratégie est peu efficace sur ces cellules
- **Chromatographie d'affinité ou Purification sur support** : 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.

On distingue deux sélections :

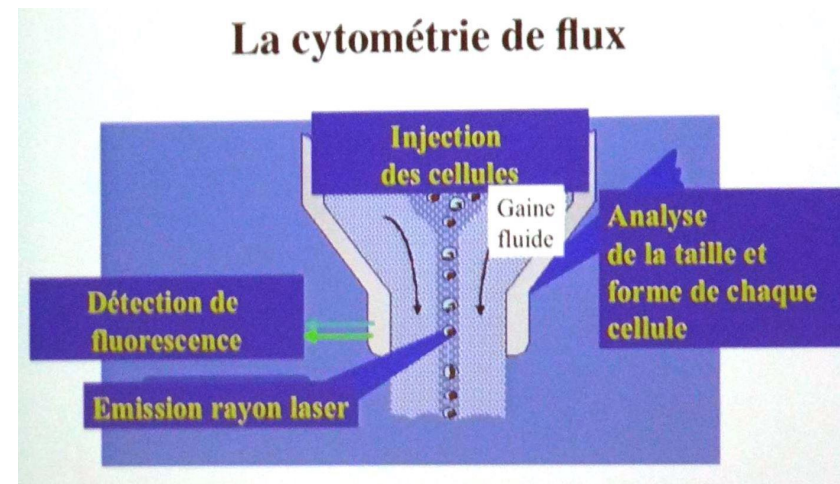
- **Sélection positive** : les anticorps de la matrice correspondent aux antigènes des cellules d'intérêt. On récupère les cellules accrochées à la matrice d'affinité,
- **Sélection négative** : les anticorps de la matrice correspondent aux antigènes de l'ensemble des cellules présentes **SAUF** celles qui nous intéressent. On récupère donc les cellules qui ne se sont pas accrochées à la matrice d'affinité.



☀ Contrairement à ce qu'on pourrait penser, c'est la **sélection négative** qui est privilégiée, car on ne souhaite pas stresser les cellules avec les enzymes nécessaires à la séparation des anticorps, lors de la récupération des cellules sur la matrice d'affinité lors de la sélection positive. De cette manière nous pourrions mieux observer l'ensemble des potentialités cellulaires ☀

**La Cytométrie de flux** (*Cytos* : la cellule, et *métros* : la mesure)

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

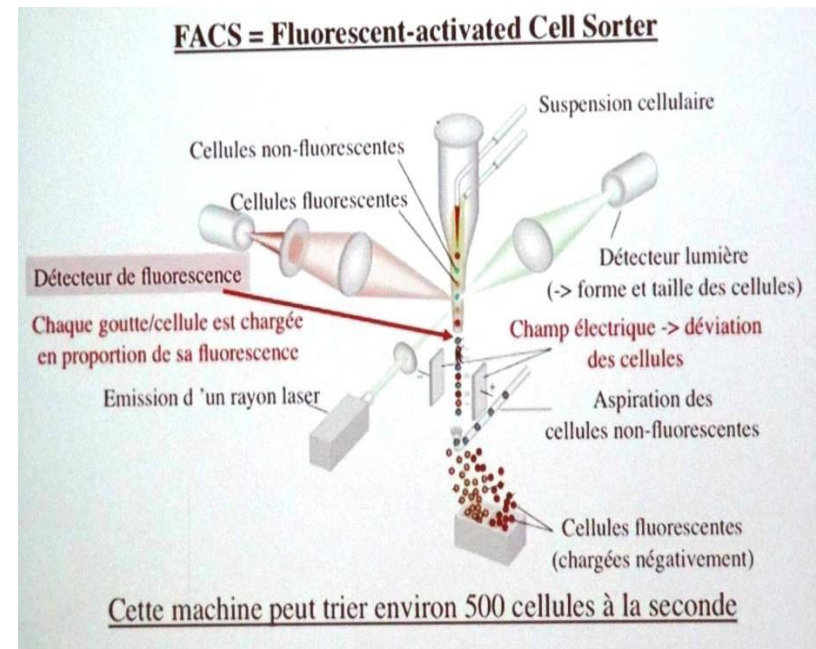


Il existe deux catégories de cytométrie de flux :

- **Cytométrie analytique** : qui analyse (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**.
- **Cytométrie de séparation (ou FACS)** : qui analyse ET sépare les cellules en fonction d'une quantité de fluorescence.

Principe du FACS : les cellules en suspension, qu'on aura préalablement rendues fluorescentes et excitées avec un laser prévu à cet effet (*Cf cours sur la microscopie*) arrivent dans l'appareil à grande vitesse et sont emprisonnées dans une gouttelette chargée électriquement dont la charge est proportionnelle à la quantité de fluorescence émise. Les gouttelettes ainsi créées seront déviées dans un champ électrique puis séparées en fonction de leur angle de déviation pour être triées. La capacité de traitement de l'appareil est de **500 cellules par seconde**.

NB : ce sont les gouttes qui sont électriquement chargées, pas les cellules.



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

**Une fois que les cellules sont triées, nous cherchons à obtenir un grand nombre de cellules d'intérêt, afin de mener d'éventuelles expériences et de limiter les prélèvements.**

*Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients de la culture cellulaire*

<u>AVANTAGES</u>	<u>INCONVÉNIENTS</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contenu cellulaire homogène, contrairement au tissu d'origine,</li> <li>- Contrôle des conditions expérimentales,</li> <li>- Possibilité d'isoler une cellule unique pour obtenir des clones identiques...</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perte d'information sur le comportement et les potentialités de la cellule (ex : éventuelle métaplasie cellulaire) car pas dans son milieu naturel,</li> <li>- Il existe un risque de sélectionner un variant cellulaire (mutation ponctuelle plus ou moins significative) et de l'amplifier par inadvertance.</li> </ul>

Il existe des méthodes pour diminuer les inconvénients des cultures cellulaires, comme les **cultures organotypiques**, qui, comme leur nom l'indique, reproduisent l'environnement tissulaire de l'organe d'où sont extraites les cellules.

*Par exemple, pour des cellules du tissu conjonctif de l'épiderme, on va ajouter des fibroblastes et des cellules épithéliales pour mimer la peau.*

✚ **Culture de micro-organismes** : Cette section concerne les êtres unicellulaires, comme les levures (qui sont des organismes eucaryotes) ou les bactéries (qui sont des organismes procaryotes)

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 et 30 min pour une bactérie) 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 étant issues d'individus pluricellulaires eucaryotes, leurs conditions de culture sont plus complexes et exigeantes.

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 différentes cultures cellulaires :

▶ **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).



Petite colonie de cellules

Tableau récapitulatif des différents modes de culture cellulaire

<u>Micro-organismes</u>	<u>Cellules animales</u>
-Milieu <b>semi-solide</b> -Nutriments essentiels -Temps pour division cellulaire <b>court</b> (environ 2h) -Variants facilement isolables	-Milieu <b>solide</b> -Nutriments essentiels + <b>facteurs de croissance</b> -Temps pour division cellulaire <b>plus élevé</b> (environ 24h) -Lignées normales : 50 divisions puis sénescence -Lignées immortelles : spontanées (cancer) ou artificielles (virus oncogène) nombre infini de division

ANALYSE DU CONTENU CELLULAIRE

À présent, on souhaite connaître les composants précis des cellules de cultures (qui sont, en théorie, toutes identiques). Pour cela, nous voulons obtenir une suspension cellulaire qui servira de base pour les analyses.

✚ Différentes méthodes de lyse cellulaire :

▶ **Sonication** : application d'ultra-sons pour briser les compartiments membranaires (noyau, membrane plasmique etc...).

▶ **Choc osmotique** : on ajoute une solution dite hypotonique qui a la qualité de pénétrer à travers les cellules et de les faire gonfler puis éclater.

▶ **Détergents chimiques** : qui détruisent les lipides membranaires, l'avantage de cette technique est la capacité à détruire électivement certaines membranes (uniquement la membrane nucléaire par exemple) en fonction des détergents.

▶ **Frottements et rupture des membranes avec un piston** : technique purement mécanique.

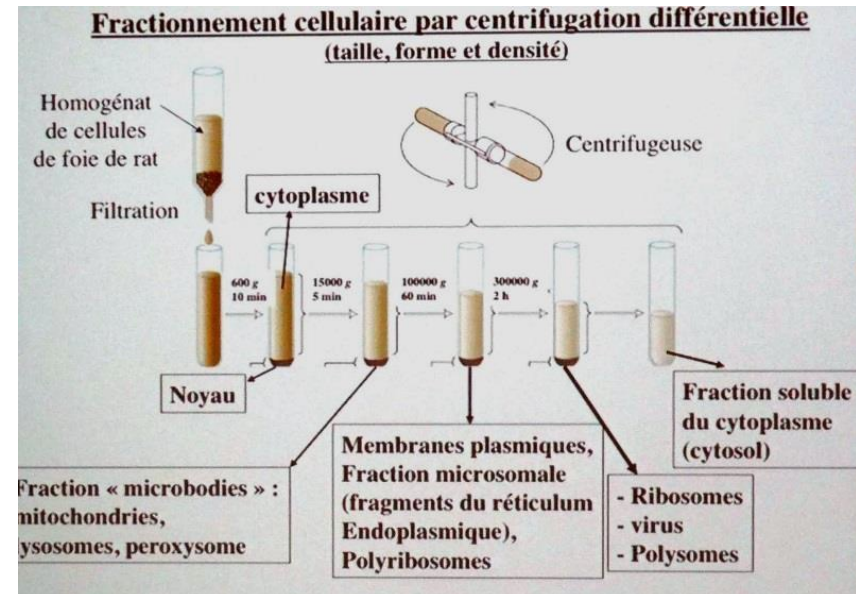
**Maintenant que l'on a obtenu une suspension cellulaire, composée d'un mélange de molécules et d'organites des cellules, nous allons trier ces différents composants afin de les étudier, grâce à :**

- ➔ Des méthodes de filtration : pour les plus gros éléments
- ➔ La centrifugation : pour les différents organites

✚ Deux types de centrifugation :

- **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.

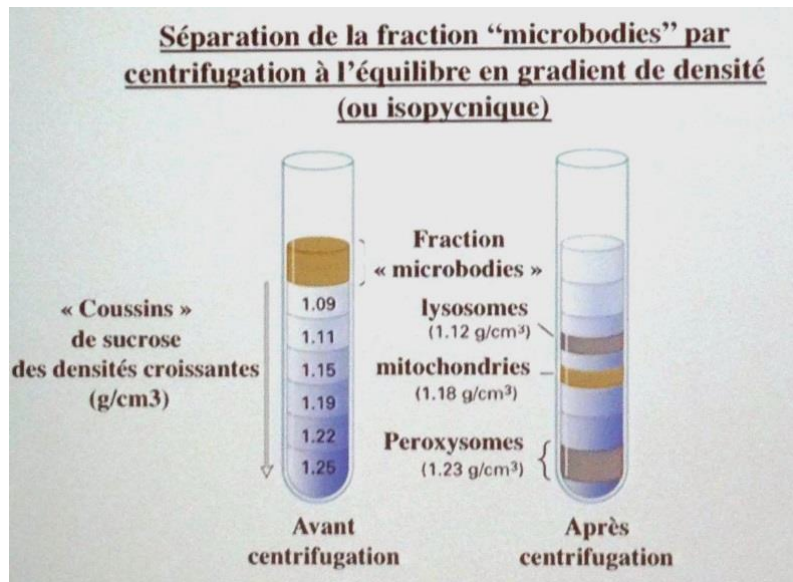
<u>CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	<u>ELEMENTS OBTENUS</u>
Suspension cellulaire sans aucune intervention	Cytosol (surnageant)
10 minutes/600G	Noyau
5 minutes/15 000G	Fraction <u>microbodies</u> (mitochondries, peroxysomes, lysosomes)
60 minutes/100 000G	Fraction <u>microsomale</u> (réticulum endoplasmique, ribosomes reliés par des ARNm ou polyribosomes, membrane plasmique)
120 minutes/300 000G	Virus, polyribosomes, ribosomes



**NB : on parle d'ultra-centrifugation quand le seuil des 100 000G est atteint.**

➤ **Centrifugation isopycnique ou 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'organe d'intérêt.



## COMPOSITION MOLECULAIRE

**Finalement, une fois les organites séparés, on analyse précisément leur contenu.**

✚ Etude du noyau et du cytosol :

➤ **Puces à ADN** (étude du génome et du transcriptome)

On fixe des suites de nucléotides correspondant à des séquences précises de gènes sur les cases (ou spot) d'une lame de verre, qui contiendra l'ensemble du génome de la cellule étudiée.

Intérêt : étudier la transcription d'un gène dans différentes conditions expérimentales (*par exemple : en conditions aérobies ou anaérobies*)

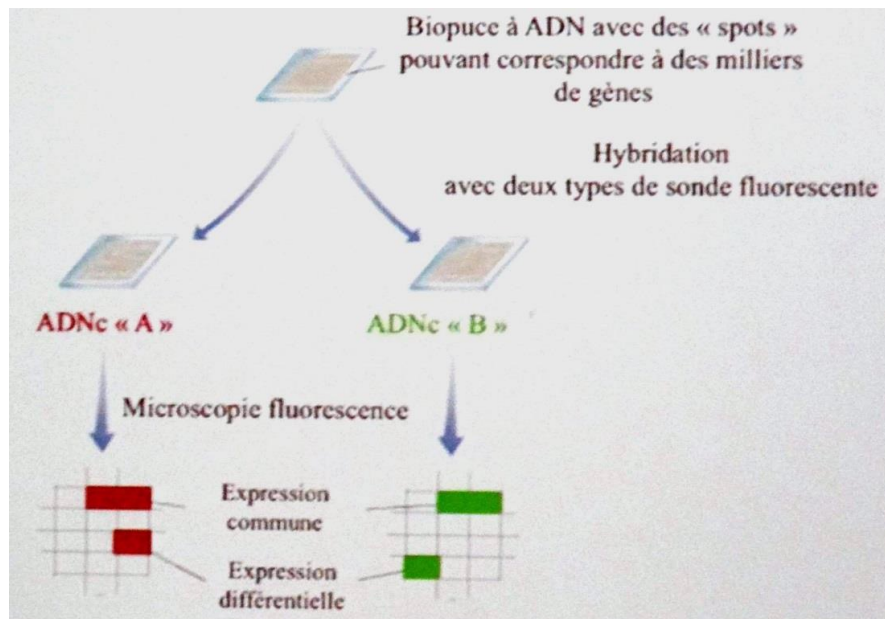
Principe et marche à suivre :

- On place nos cellules (ou extraits cellulaires) dans deux ou plusieurs situations expérimentales (donc dans des éprouvettes différentes),
- Récupération séparée des ARNs messagers (indicateurs de l'expression génique),
- Utilisation d'une transcriptase inverse, une enzyme qui transforme l'ARN en ADN (*Cf cours de biologie moléculaire*),
- On équipe les ADNc obtenus de fluorochromes de couleurs différentes (comme une sonde d'hybridation),
- Ajout des ADNc issus des différentes conditions expérimentales sur la puce à ADN : s'ils s'hybrident, on observe une fluorescence, il y a donc expression du gène.

SI une seule couleur de fluorescence est observée, le gène n'est actif que dans l'une des situations

SI on remarque une double fluorescence (ex : Rouge+Vert = Jaune) le gène est actif dans les deux situations.

Cette technique est ancienne mais toujours utilisée en laboratoire, elle tend à être remplacée par les méthodes nouvelles générations, qui se démocratisent.



➤ **NGS (next-generation sequencing) ou séquençage haut débit :**


Cette machine permet elle aussi l'étude du génome et du transcriptome, mais à une vitesse bien plus élevée, sur de plus gros échantillons et de manière automatisée.

Principe : On dépose un échantillon ADN (ou le noyau cellulaire entier) dans la machine qui va « l'éclater » en milliers de fragments, dont elle déterminera la séquence nucléotidique (on parle de séquençage) afin de déterminer si le gène est muté, présente des délétions ou des insertions, en le comparant à une base de données.

(Vous apprendrez en UE11S le fonctionnement exact de l'outil informatique, cet exposé est présent pour illustrer la révolution médicale et biologique qu'est le NGS, pas pour poser des questions sur le fonctionnement précis de la machine)

NB : l'intégralité du génome (10<sup>9</sup> paires de bases) peut être séquencée en quelques heures avec cette machine.

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<sup>9</sup> bases

Applications :

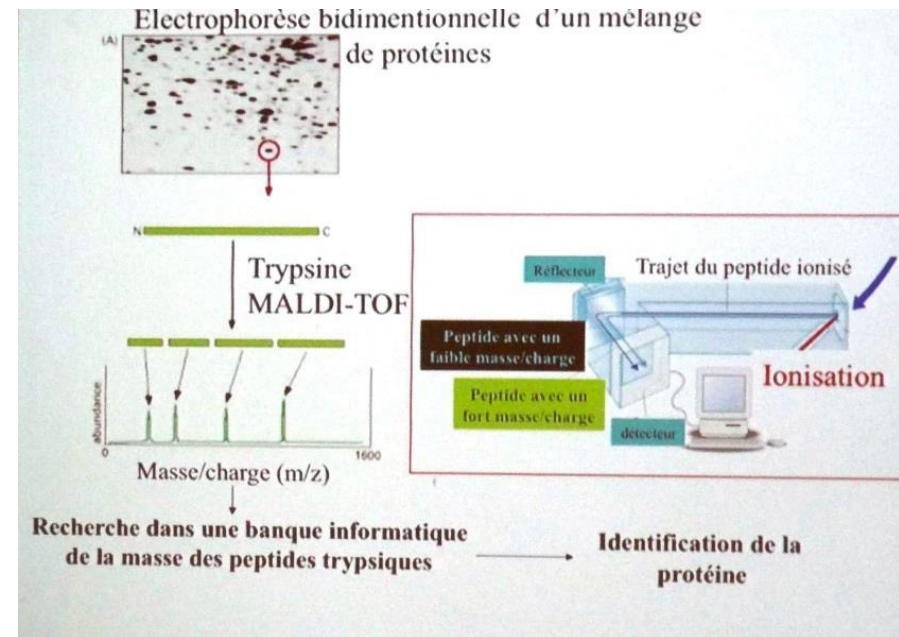
- Séquençage du génome
- Diagnostic pré-natal non invasif (détection d'une trisomie 13 ou 18 via l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel)
- Caractérisation des cellules cancéreuses pour une thérapie personnalisée
- Étude et découverte des mutations, pour les maladies rares notamment

✚ Étude de protéines cytosoliques ou mitochondriales :

- **Spectrométrie de masse** : déterminer la composition et la masse d'une protéine inconnue

Principe :

- On procède au découpage d'une protéine inconnue à l'aide de diverses protéases,
- On place les peptides obtenus à l'entrée de la chambre d'ionisation, on leur applique une charge électrique arbitraire et on mesure leur déviation qui sera fonction de leur masse, comme lorsqu'on envoie des particules chargées dans un condensateur (Cf UE3a),
- La masse des peptides étant corrélée à leur composition en acides aminés, l'ordinateur détermine la composition précise de la protéine inconnue à l'aide des fragments de peptides et de sa base de données.



*Félicitations pour avoir terminé (une énième fois sans doute) cette fiche ! Elle est plutôt longue mais accessible, et très utile pour comprendre les expériences, car elle illustre les principales techniques de base en laboratoire. Bon courage !*

