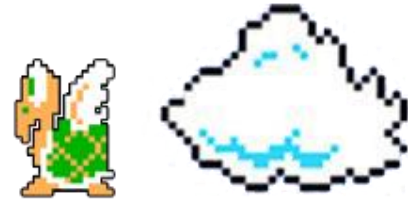


MÉTHODES D'ÉTUDE ET D'ANALYSE DES CELLULES



Sommaire



1. Manipulation des cellules

A) Obtention des cellules

B) Culture des cellules

C) Analyse du contenu cellulaire

2. Analyse génétique

A) Mutations

B) Complémentation



MANIPULATION DES CELLULES



A. ORIENTATION DES CELLULES



- Dissociation :

On cherche à détacher les cellules de la **Matrice Extra Cellulaire** pour faire des suspensions. On peut utiliser :

- ★ Des éléments chimiques (EDTA)
- ★ Des éléments biologiques (enzymes comme la trypsine)
- ★ Des éléments physiques (agitation)



A. ORIENTATION DES CELLULES



- Séparation des cellules :

Pour trier nos cellules on utilise :

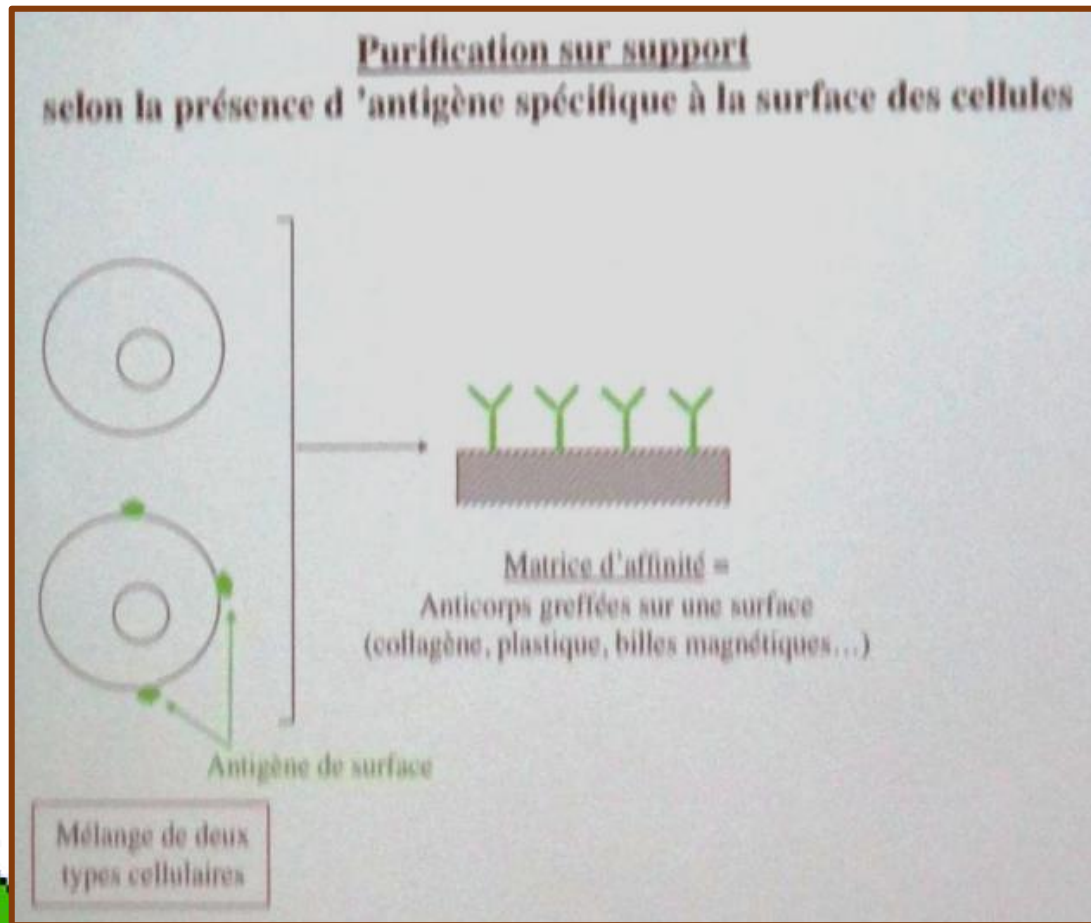
- ★ Les propriétés physiques des cellules

- ★ Les propriétés d'adhérence

- ★ Des méthodes moléculaires (**purification sur support** et **cytometrie de flux**)



PURIFICATION SUR SUPPORT OU CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

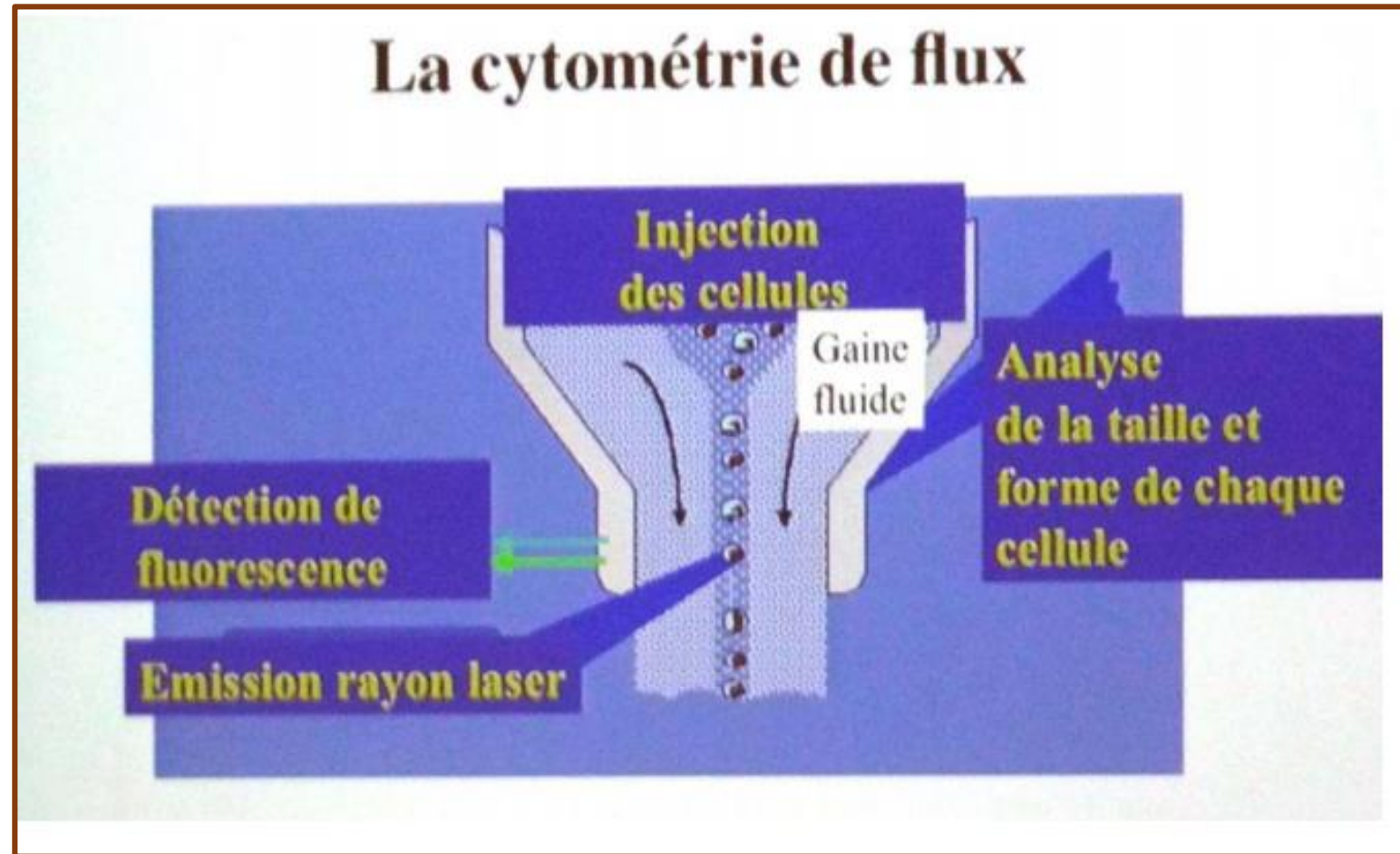


★ Sélection positive : on recueille les cellules qui ont adhéré à la matrice

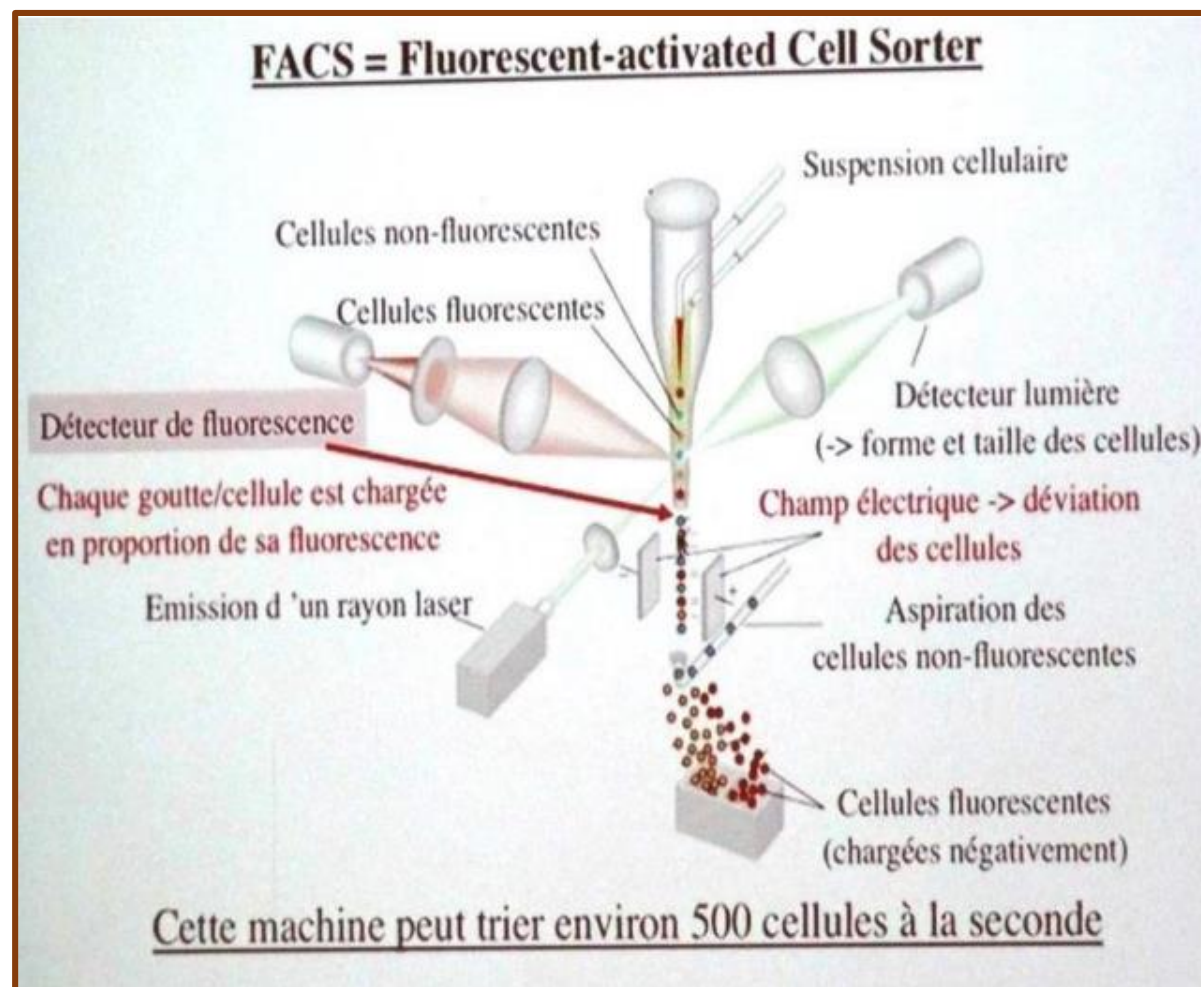
★ Sélection négative : on recueille les cellules qui n'ont pas adhéré à la matrice



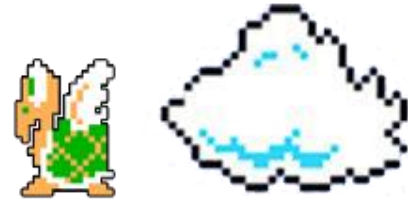
CYTOMETRIE DE FLUX



CYTOMÈTRE DE SÉPARATION OU FACS



CYTOMETRIE DE FLUX



Il y a plusieurs applications de la cytométrie :

★ **Compter** les cellules

★ Connaître le **pourcentage de cellules mortes**

★ **Déterminer la quantité d'ADN** dans la cellule (et donc analyser le **cycle cellulaire**)

★ **Trier** les cellules



B. CULTURE DES CELLULES



La culture cellulaire présente des avantages et des inconvénients :

Avantages

- **Homogénéité cellulaire**
- **Conditions expérimentales contrôlées**
- **Possibilité d'isoler une cellule et d'obtenir des clones identiques**

Inconvénients

- **Les cellules sont étudiées en dehors du contexte tissulaire**
- **Il y a un risque de sélectionner un mutant et de tirer des conclusions sur ce mutant qui n'est pas représentatif**



CULTURE DE MICRO-ORGANISMES



Organismes unicellulaires : **bactéries** (procaryotes) ou les **levures** ♥ (eucaryotes)

- ★ Division **très rapide**, formant des **colonies**.
- ★ Milieu semi-solide (agar).
- ★ **Mutants** facilement obtenus et isolés



CULTURE DE CELLULES ANIMALES



Cellules Eucaryotes

- ★ **Division beaucoup plus lente.**
- ★ **Milieu solide** (sauf cellules cancéreuses)
- ★ **Facteurs de croissance**
- ★ Chaque type cellulaire possède ses propres exigences de culture.



C. ANALYSE DU CONTENU CELLULAIRE



Pour étudier l'intérieur de nos cellules, il faut tout d'abord les **lyser**, et pour cela on a différentes techniques :



★ **Sonication** (utilisation d'ultrasons pour briser la membrane cellulaire)

★ **Choc osmotique** (on met notre cellule dans une solution hypotonique (pauvre en sel) ce qui la fait éclater)

★ **Détergents** (qui détruisent la membrane)

★ **Frottements** (méthode mécanique)



C. ANALYSE DU CONTENU CELLULAIRE



Après avoir lysé nos cellules, on cherche à les **fractionner**, c'est-à-dire à **séparer les constituants cellulaires**.

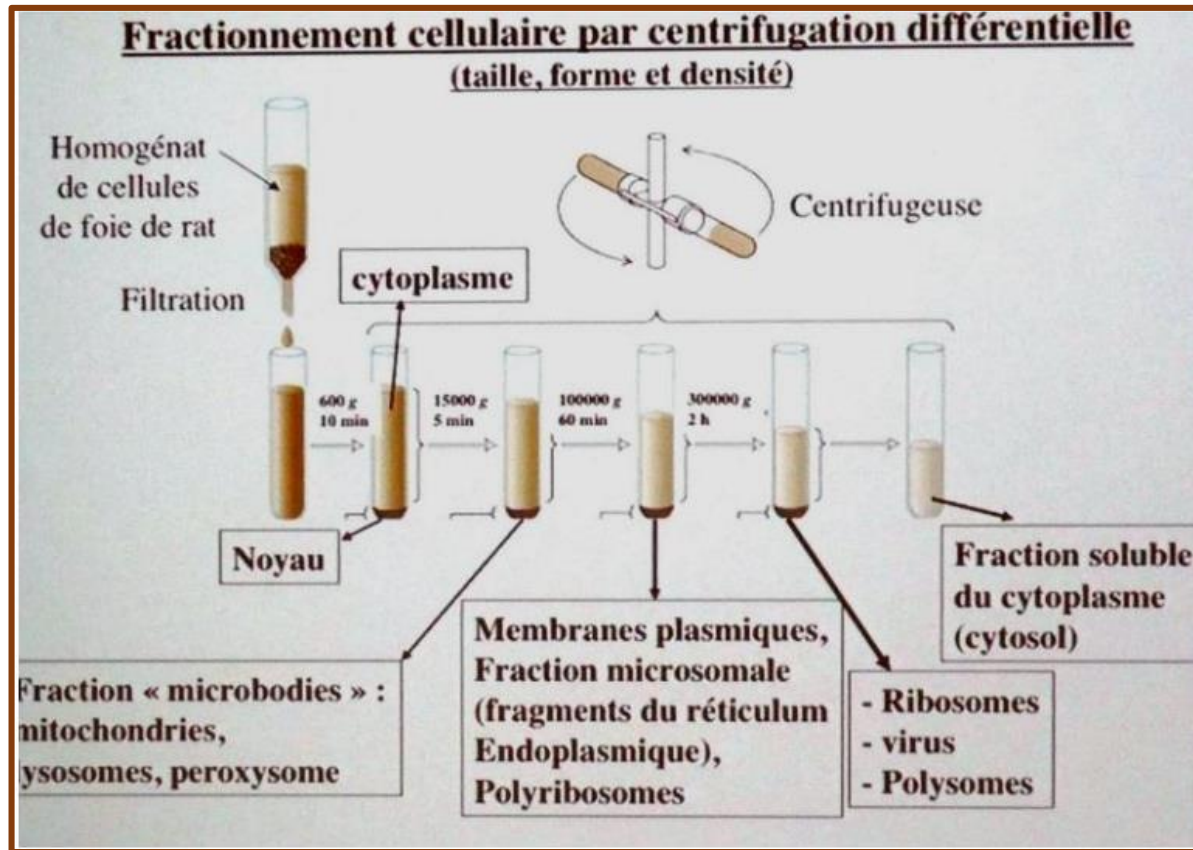
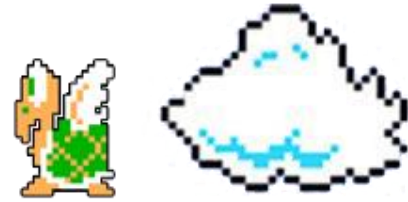
On peut le faire par **filtration** (pour les plus gros constituants) ou par **centrifugation** :

★ Centrifugation différentielle

★ Centrifugation isopycnique/à l'équilibre en gradient de densité



CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

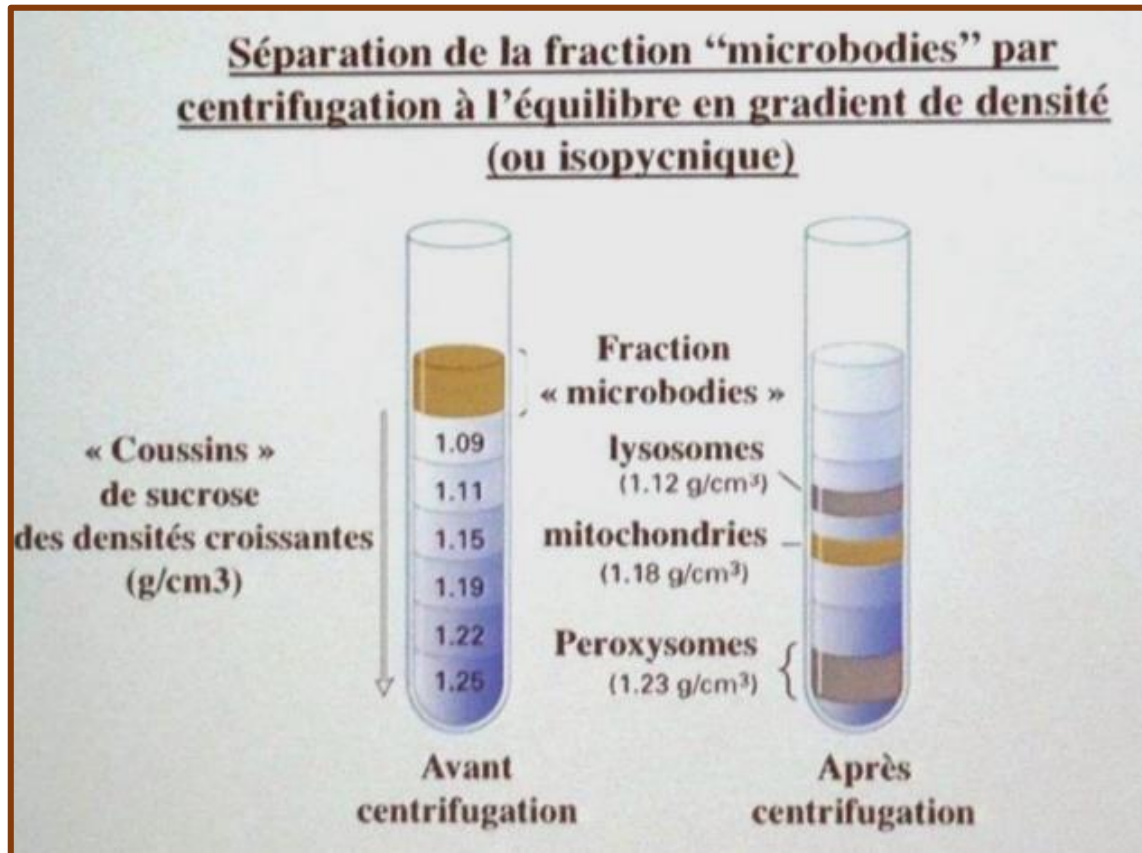


On sépare en fonction de la **taille/masse** les constituants cellulaires en leur appliquant une **force de centrifugation croissante**.

NB : A partir de 100000G, on parle d'ultracentrifugation.



CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE / À L'ÉQUILIBRE EN GRADIENT DE DENSITÉ



Cette séparation est faite sur des **coussins de sucrose à densité de concentration croissante** entre le haut et le bas du tube.

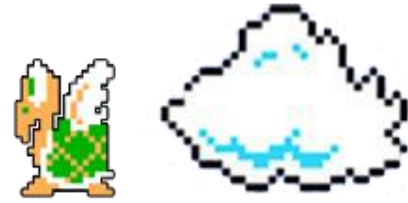
On dépose notre **échantillon** sur le dessus et une après **centrifugation**, les différents constituants vont **s'équilibrer** entre les **coussins** en fonction de leur densité.



ANALYSE GÉNÉTIQUE



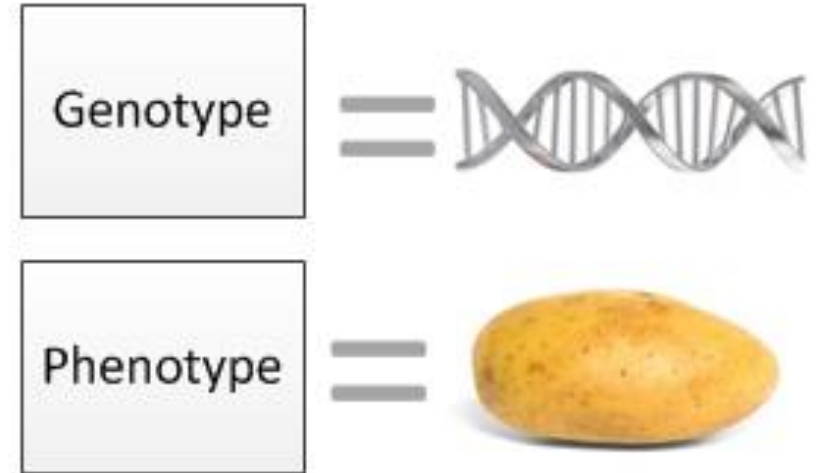
A. MUTATIONS



Définitions :

★ **Génotype** : Ensemble des gènes normaux (= sauvages) ou mutés, d'un organisme.

★ **Phénotype** : Apparence d'un organisme, dépend du génotype mais aussi de l'environnement (épigénèse = interaction de l'environnement avec les gènes).



A. MUTATIONS



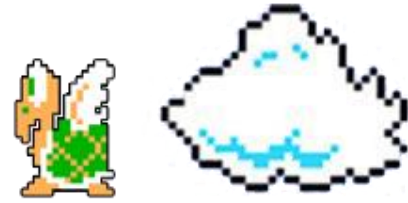
★ **Organisme haploïde** :
Cellule ou individu ayant **une seule copie de chaque chromosome.**



★ **Organisme diploïde** : Cellule ou individu ayant **deux copies de chaque chromosome.**



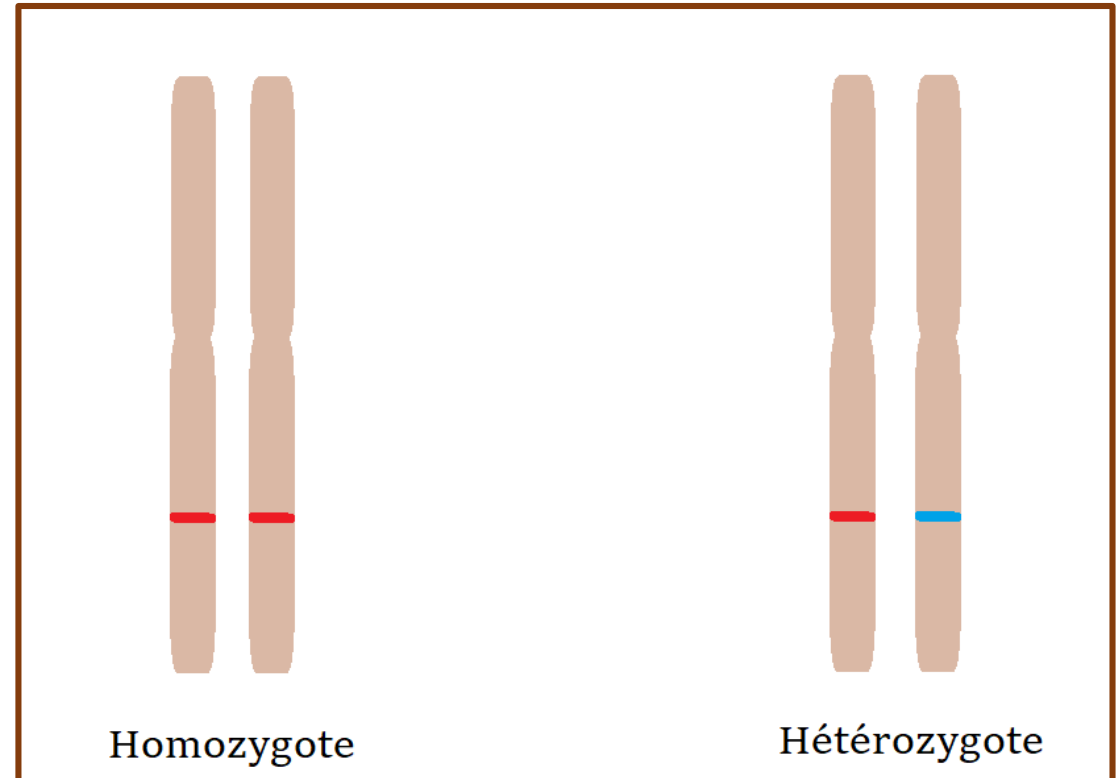
A. MUTATIONS



Dans le cas d'un **organisme diploïde** :

★ Un gène est dit **homozygote** si les **2 allèles sont identiques** (un allèle correspond à la version d'un gène)

★ Un gène est dit **hétérozygote** si les **2 allèles sont différents**



A. MUTATIONS



Dans le cas d'un **organisme diploïde** :

★ Les **allèles** peuvent être **normaux (= sauvages)** ou **mutés**

★ Ils peuvent aussi être **dominants** (une seule copie de l'allèle est nécessaire pour qu'il s'exprime) ou **récessifs** (deux copies de l'allèle sont nécessaires pour qu'il s'exprime)



B. LA COMPLÉMENTATION



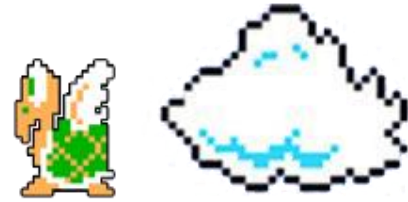
★ **Complémentation** : Habilité à restaurer une fonction (phénotype sauvage) en complémentant, dans une même cellule, deux gènes dont au moins un est muté.

★ **Groupe de complémentation** : Ensemble de mutants qui ne complémentent pas entre eux.

On utilise des **tests de complémentation**, c'est-à-dire qu'on **combine 2 mutations dans une même cellule**, afin de déterminer si ces **2 mutations** sont localisées sur **le même gène** ou pas.

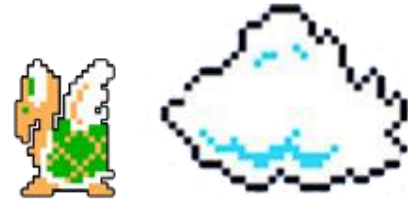


B. LA COMPLÉMENTATION



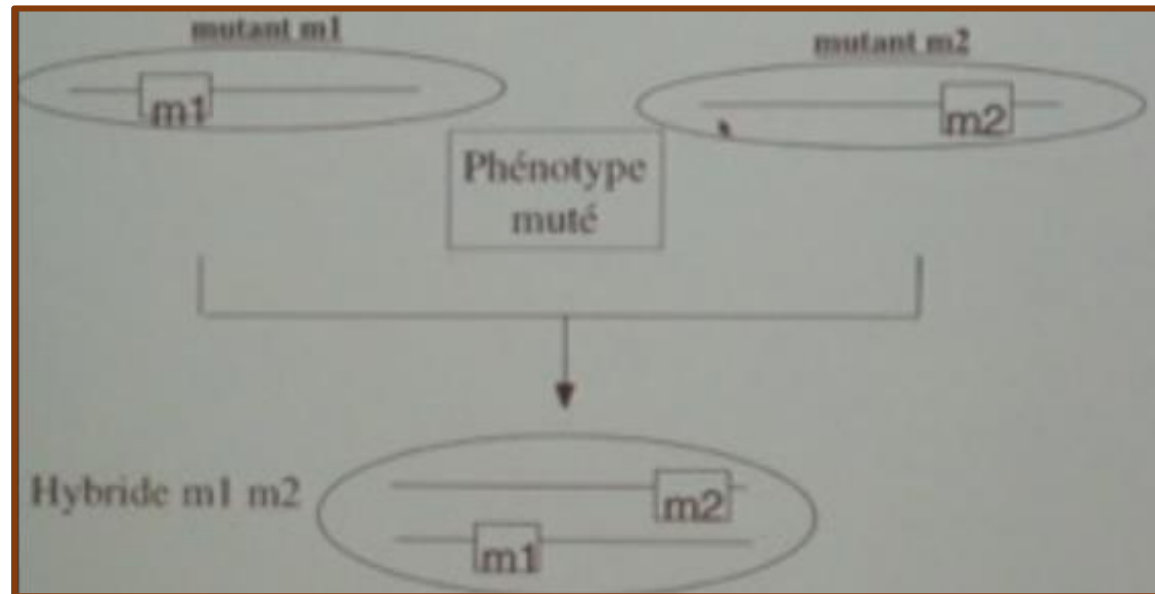
Avant de faire un test de complémentation, on doit faire un test de récessivité.





B. LA COMPLÉMENTATION

Test de complémentation : On fusionne dans une même cellule les noyaux des deux cellules mutées et on observe le phénotype obtenu :



B. LA COMPLÉMENTATION



★ Si le phénotype obtenu est sauvage, il y a complémentation, donc les mutations sont dans des groupes de complémentation différents, donc on SUGGERE que nos mutations sont sur des gènes différents.

★ Si le phénotype obtenu est muté, il n'y a pas complémentation, donc les mutations sont dans le même groupe de complémentation, donc on DEMONTRE que nos mutations sont sur le même gène.



B. LA COMPLÉMENTATION



Moyen mnémotechnique :

- 🍄 Phénotype **M**uté = pas de complémentation = **M**ême groupe de complémentation = on affir**M**e que les mutations sont sur le **M**ême gène
- 🍄 Phénotype **S**auvage = complémentation = groupes de complémentation **S**éparés = on **S**uggère que les mutations sont sur des gènes **S**éparés



TABLEAU DE COMPLÉMENTATION



Mutation	A	B	C	D
A	-	-	+	+
B		-	-	-
C			-	+
D				-



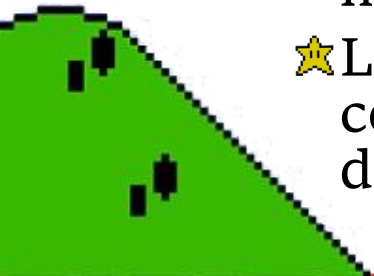
TABLEAU DE COMPLÉMENTATION



Mutation	A	B	C	D
A	-	-	+	+
B		-	-	-
C			-	+
D				-

Ici par exemple :

- ★ Les mutations A et B ne complémentent pas, donc elles sont dans le même groupe de complémentation, donc on démontre qu'elles sont sur le même gène
- ★ Les mutations A et C complémentent, donc elles sont dans des groupes de complémentations différents, donc on suggère qu'elles sont sur des gènes différents



QCMs !!!



Concernant l'étude et l'analyse des cellules, donnez la/les réponses juste(s) :

- A. Les micro-organismes se développent sur un milieu solide.
- B. Les cellules animales sont soumises au phénomène de sénescence : on peut y pallier en créant des lignées immortelles.
- C. La centrifugation différentielle sépare les constituants cellulaires en utilisant des coussins de sucrose de densité croissante.
- D. Le FACS est une machine permettant de trier les cellules à une vitesse d'environ 500 cellules/seconde.
- E. Les réponses A, B, C et D sont fausses.



QCMs !!!



Concernant l'étude et l'analyse des cellules, donnez la/les réponses justes :

- A. Les micro-organismes se développent sur un milieu solide. → *semi-solide ! (gel d'agar)*
- B. Les cellules animales sont soumises au phénomène de sénescence : on peut y pallier en créant des lignées immortelles.
- C. La centrifugation différentielle sépare les constituants cellulaires en utilisant des coussins de sucrose de densité croissante. → *centrifugation isopycnique !*
- D. Le FACS est une machine permettant de trier les cellules à une vitesse d'environ 500 cellules/seconde.
- E. Les réponses A, B, C et D sont fausses.



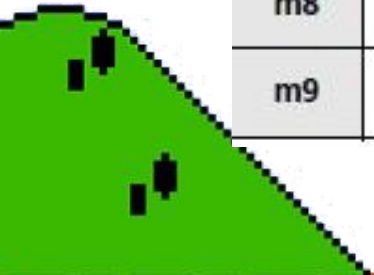
QCMs !!!



	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9
m1	-	+	+	+	-	+	+	-	+
m2		-	+	-	+	+	+	+	+
m3			-	+	+	+	+	+	+
m4				-	+	+	+	+	+
m5					-	+	+	-	+
m6						-	+	+	-
m7							-	+	-
m8								-	+
m9									-

Concernant le tableau de complémentation ci-contre, donnez la/les réponses juste(s) :

- A. Avant de faire ce test de complémentation, on a obligatoirement fait un test de récessivité.
- B. Les mutations m5 et m8 sont localisées sur le même gène
- C. Les mutations m4 et m6 complètent : elles sont dans le même groupe de complémentation.
- D. On démontre que les mutations m3 et m9 sont sur des gènes séparés.
- E. Les réponses A, B, C et D sont fausses.



QCMs !!!



	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9
m1	-	+	+	+	-	+	+	-	+
m2		-	+	-	+	+	+	+	+
m3			-	+	+	+	+	+	+
m4				-	+	+	+	+	+
m5					-	+	+	-	+
m6						-	+	+	-
m7							-	+	-
m8								-	+
m9									-

Concernant le tableau de complémentation ci-contre, donnez la/les réponses juste(s) :

- A. Avant de faire ce test de complémentation, on a obligatoirement fait un test de récessivité.
- B. Les mutations m5 et m8 sont localisées sur le même gène
- C. Les mutations m4 et m6 complètent : elles sont dans le même groupe de complémentation.
- D. On démontre que les mutations m3 et m9 sont sur des gènes séparés.
- E. Les réponses A, B, C et D sont fausses.

