

Manipulation des cellules

I- Obtention des cellules

A- Dissociation

Il faut tout d'abord dissocier un tissu pour faire une **suspension** de cellules :


- ★ Dans le tissu sanguin les cellules sont déjà en suspension
- ★ Dans les autres tissus il faut éliminer la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) grâce à des éléments chimiques (EDTA), biologiques (enzymes comme la trypsine) ou physiques (agitation)

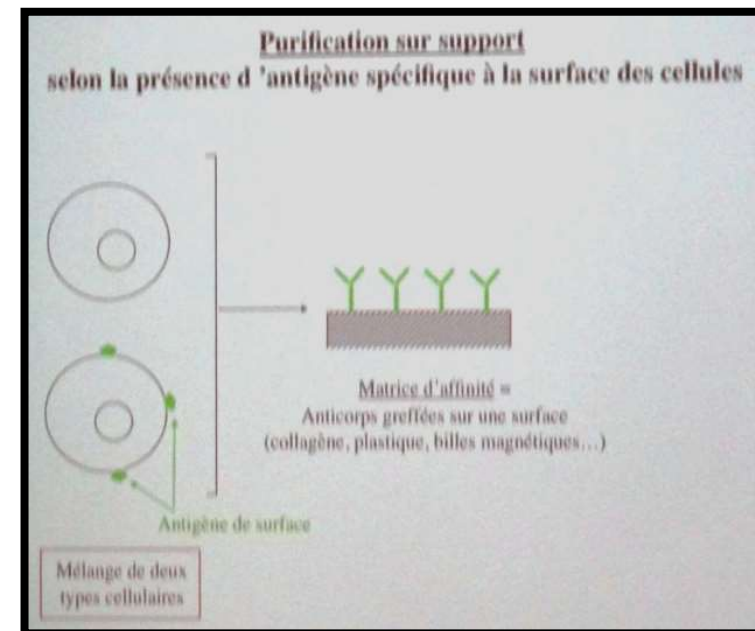
B- Séparation

Après avoir dissocié nos cellules, il faut les séparer. Pour cela, on peut utiliser les propriétés des cellules, telles que leurs propriétés **physiques** (taille...) avec une **centrifugation à basse vitesse** (une haute vitesse pourrait détruire nos cellules), leurs **propriétés d'adhérence** (certaines cellules par exemple adhèrent très bien aux boîtes de Petri, et d'autres non), ou avec des **méthodes moléculaires** avec la **purification sur support** ou la **cytométrie de flux** : on utilise les **antigènes de surface** caractéristiques des cellules.

- **Purification sur support** (= **Chromatographie d'Affinité**) :

C'est une technique **immunologique** qui se base sur la reconnaissance des **antigènes de surface**. On place sur un support neutre des anticorps spécifiques des cellules d'intérêt (créant ainsi une **matrice d'affinité**). On a 2 possibilités :

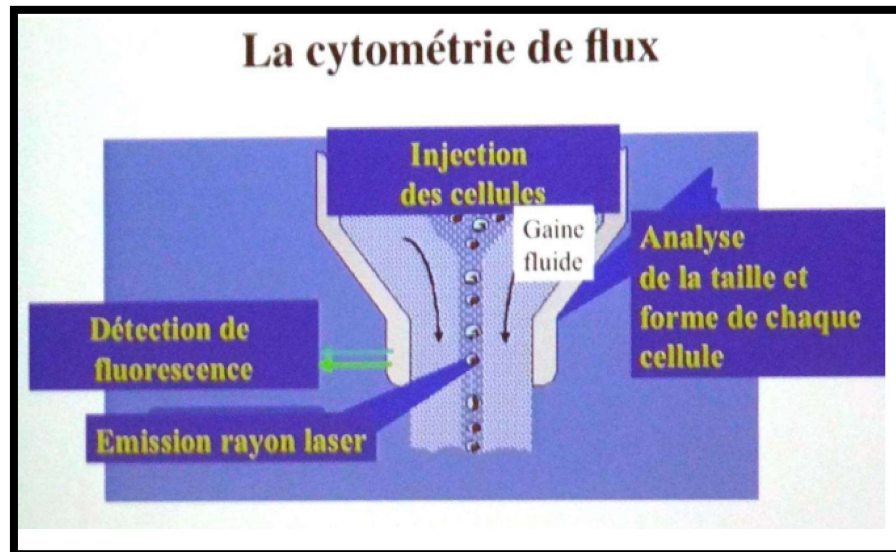
Sélection positive	Sélection négative
Les anticorps de la matrice sont dirigés contre les cellules à récupérer . On récupère donc les cellules accrochées à la matrice.	Les anticorps de la matrice sont dirigés contre toutes les cellules SAUF celles que l'on veut étudier . On récupère donc les cellules qui ne sont pas accrochées à la matrice.
 La sélection négative est celle qui est le plus utilisée, car dans la sélection positive on doit détacher les cellules de la matrice avec des enzymes, ce qui risque de les stresser.	



- Cytométrie de flux

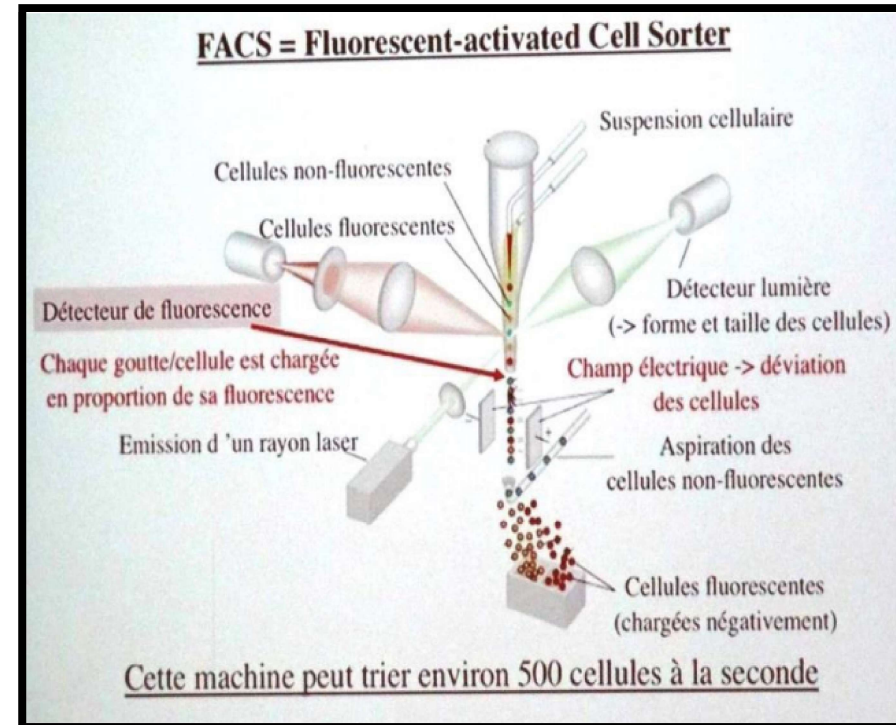
On fait passer des cellules en suspension dans une machine qui les analyse individuellement. On en retrouve deux types :

Cytométrie analytique	Cytométrie de séparation
La machine (dans ce cas un cytomètre de flux) analyse les cellules une à une pour déterminer leur forme, taille, aspect, etc. Cela permet une analyse très rapide (~5000 cellules/seconde)	La machine (dans ce cas un cytomètre de séparation , ou FACS) va analyser ET séparer chaque type de cellule. C'est une machine plus lente (~500 cellules/seconde)



Le principe de ces machines est de faire passer **une à une** les cellules en suspension dans une **gaine fluide**, et ensuite un **faisceau laser** vient sur la cellule et on détecte leur **fluorescence** (en les ayant préalablement marquées

avec des anticorps fluorescents), on peut aussi analyser les propriétés de réfractives de la lumière des cellules (pour déduire leur taille, forme, etc). Dans le cas du **FACS**, après l'analyse, les cellules sont **emprisonnées dans des gouttelettes plus ou moins chargées** (en fonction de la quantité de fluorescence) et sont **déviées** en fonction de leur charge pour être triées.



Grâce à cette technique on peut :

- ★ 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

II- Culture des cellules

Après avoir trié les cellules, il faut les **cultiver** afin d'en obtenir une grande quantité.

A- Avantages et Inconvénients

La culture des cellules présente des avantages et des inconvénients :

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> 🌱 Contenu cellulaire plus homogène qu'un tissu 🌱 Conditions expérimentales contrôlées 🌱 Possibilité d'isoler une cellule unique afin d'obtenir des clones identiques 	<ul style="list-style-type: none"> 🌹 Les cellules sont étudiées en dehors du contexte tissulaire (donc en dehors de l'influence de l'organisme en général) 🌹 Il y a un risque de sélectionner un mutant et de tirer des conclusions sur ce mutant qui n'est pas représentatif

B- Culture de Micro-organismes

Concerne les cultures d'organismes **unicellulaires** par exemple de **bactéries** (organismes **procaryotes**) ou de **levures** (organismes **eucaryotes**, qui donnent une *bonne odeur de croissant au labo* ♥). Les particularités de ces cultures sont :


- ★ La vitesse de division extrêmement **rapide**, et donne des **colonies**
- ★ Nécessite d'être cultivé en **milieu semi-solide** (gélose) avec les nutriments essentiels à leur survie
- ★ Facilité d'obtention et d'isolement des **mutants**

C- Culture de Cellules Animales

Les **cellules animales (eucaryotes)** sont plus **complexes** à cultiver :

- ★ La culture est plus **lente** que pour les micro-organismes
- ★ Nécessité de les cultiver sur **milieu solide** (sauf les cellules cancéreuses) et nécessite l'apport en Acides Aminés, Sel, Glucose, etc
- ★ Contrairement aux micro-organismes, la division de ces cellules ne se fait qu'en présence de **facteurs de croissance** (elles ne se multiplient pas spontanément)
- ★ Chaque type de cellule possède ses propres exigences de culture

On peut séparer les cultures de cellules animales en deux types :

Culture primaire	Lignées immortelles
<p>Elles sont obtenues directement à partir des tissus dissociés (une des plus faciles à cultiver est le fibroblaste #DediAL'Histo).</p> <p>Elles ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois (~50 fois) avant d'atteindre une sénescence (la cellule ne peut plus se diviser mais reste métaboliquement active, c'est un processus IRREVERSIBLE.)</p>	<p>Pour pallier à la sénescence, on peut utiliser des lignées immortelles.</p> <p>Ces lignées peuvent se faire spontanément (cancer) ou être créées artificiellement (grâce à des agents oncogènes).</p> <p>Le taux d'immortalisation spontanée varie en fonction des espèces : il est très fort chez la souris mais très faible chez l'homme.</p>
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>La sénescence ne concerne que les cellules animales, les micro-organismes peuvent se diviser un nombre indéfini de fois sans avoir besoin de créer de lignée immortelle.</p> </div> </div>	

III- Analyse du contenu cellulaire

Après avoir cultivé nos cellules, on cherche à étudier nos cellules, afin, par exemple d'en connaître le contenu.

A- Lyse des cellules

Lyse cellulaire = libération du contenu cellulaire dans un tube à essai (le but est donc de détruire la membrane pour libérer l'intérieur de la cellule). Il y a différentes techniques de lyse :

- ★ **Sonication** : Utilisation d'**ultra-sons** intenses pour briser la membrane cellulaire
- ★ **Choc osmotique** : On met nos cellules dans une solution dite « **hypotonique** » (pauvre en sel) qui va pénétrer dans la cellule jusqu'à la faire éclater
- ★ **Détergents** : Qui détruisent les membranes lipidiques
- ★ **Frottements** : destruction des membranes par une technique totalement mécanique

B- Fractionnement de la cellule

Une fois le contenu de nos cellules libéré, on cherche à **fractionner** (= séparer les différents constituants cellulaires) nos cellules. On peut le faire par **filtration** (pour les gros débris principalement) ou par **centrifugation**. Il existe deux types de centrifugation :

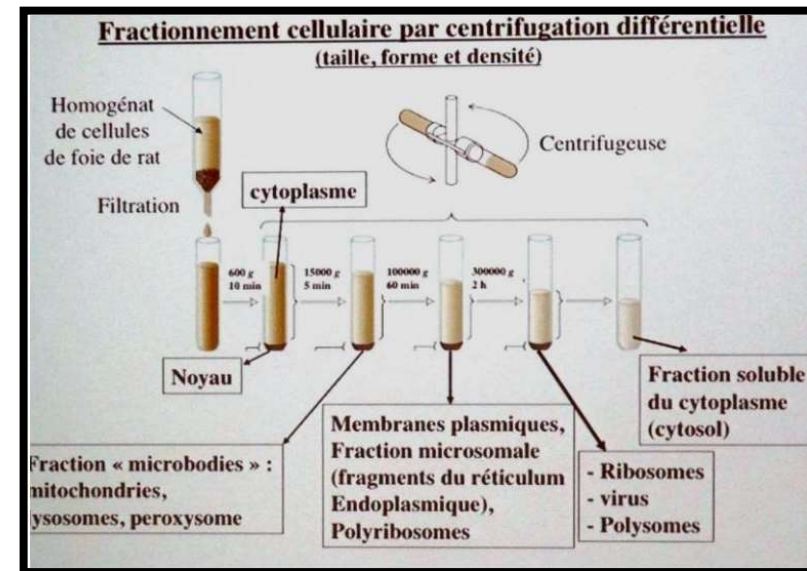
- **Centrifugation différentielle** :

Cette technique consiste à **séparer** en fonction de la **taille/masse** nos **constituants**, en leur appliquant une **force de centrifugation de plus en plus forte**. On va donc faire plusieurs centrifugations de forces croissantes les unes à la suite des autres.

Ce tableau est là plus à titre indicatif qu'autre chose. Le prof en parle tous les ans mais ça n'est jamais tombé au concours. Pour le concours blanc vous n'aurez pas de question sur ce tableau.

Conditions expérimentales	Éléments obtenus
10 minutes 600 G	Noyau
5 minutes 15 000 G	Fraction « microbodies » (mitochondries, lysosomes, peroxysomes)
60 minutes 100 000 G	Membranes plasmiques, fraction microsomale (fragments du Réticulum Endoplasmique), Polyribosomes
2 heures 300 000 G	Ribosomes, Virus, Polysomes
	Après avoir extrait tous ces composants, il reste dans le tube le cytosol

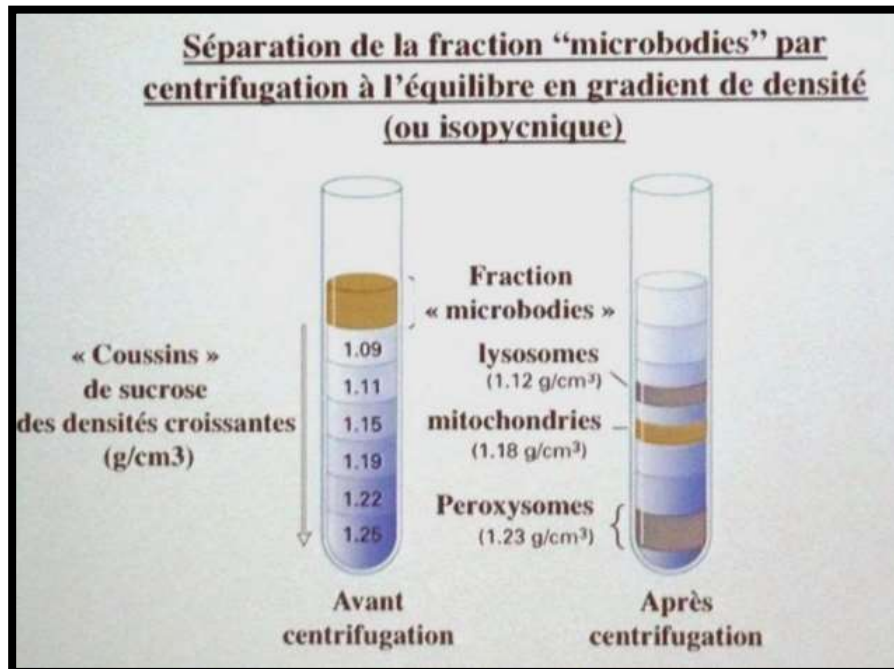
NB : A partir de 100 000 G on parle d'ultracentrifugation



Analyse Génétique

- Centrifugation isopycnique ou 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 va donc **déposer** notre **échantillon** (ex : fraction microbodies) sur le dessus et, après **centrifugation**, les différents constituants vont **s'équilibrer entre les coussins en fonction de leur densité**.



I- Mutations

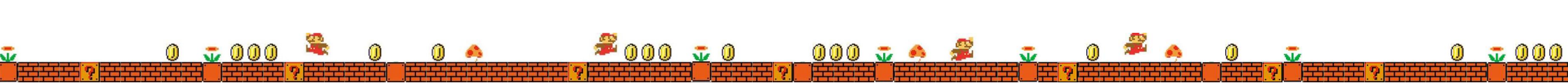
Pourquoi étudier les cellules mutantes ? Pour comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire : en étudiant les gènes responsables des maladies génétiques, on peut en déduire le rôle physiologique de ces gènes.

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).
- ★ **Organisme haploïde** : Cellule ou individu ayant une seule copie de chaque chromosome.
- ★ **Organisme diploïde** : Cellule ou individu ayant deux copies de chaque chromosome.

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**
- ★ 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)



II- La Complémentation

- ★ **Complémentation :** Habilité à restaurer une fonction (phénotype sauvage) en complétant, dans une même cellule, deux gènes dont au moins un est muté.
- ★ **Groupe de complémentation :** Ensemble de mutants qui ne complètent pas entre eux.

On peut réaliser un **test de complémentation**, afin de savoir si deux mutations correspondent au **même gène ou non**. Le principe d'un test de complémentation est de **combinaison** dans une **même cellule** les **deux mutations** et d'observer si on a un **retour du phénotype sauvage** (on veut donc savoir si les deux mutations complètent ou pas).

Avant de faire un **test de complémentation**, il faut obligatoirement faire un **test de récessivité** (on veut savoir si nos mutations sont récessives ou non) car on ne peut faire un test de complémentation **que si les mutations sont récessives**.

- **Test de récessivité :** On fusionne les noyaux d'une cellule sauvage et d'une cellule mutée (lorsqu'on fusionne les noyaux de deux cellules, on forme ce que l'on appelle un **hétérocaryon**, *c'est en fait une cellule avec deux noyaux différents dedans ☺*), et on observe le phénotype obtenu : si ce **phénotype est sauvage**, c'est que la **mutation est récessive** (l'allèle sauvage ayant dominé le gène muté).

Après avoir fait ce test de récessivité on fait le test de complémentation.

- **Test de complémentation :** Le principe est de **fusionner les noyaux** des deux cellules mutées et on observe le phénotype obtenu :
 - ★ Si le **phénotype est sauvage**, il y a **complémentation**, les mutations sont dans des **groupes de complémentation différents**, et on **suggère** que les mutations sont sur des **gènes différents**.

NB : On ne peut que **suggérer** que les mutations sont sur des gènes différents, car il est possible que les deux mutations soient sur le **même gène**, mais que le **phénotype sauvage soit rétabli** quand même (on appelle ça la **suppression intragénique**). Il faut faire attention à distinguer les notions démontrer/suggérer au concours !

- ★ Si le **phénotype est muté**, il **n'y a pas complémentation**, les mutations sont dans le **même groupe de complémentation**, et on **démontre** que les mutations sont sur les **mêmes gènes**.

Moyen mnémotechnique :

- Phénotype Muté → pas de complémentation → Même groupe de complémentation → on affirMe que les mutations sont sur le Même gène
- Phénotype Sauvage → complémentation → groupes de complémentation Séparés → on Suggère que les mutations sont sur des gènes Séparés

