

La Manipulation des Cellules

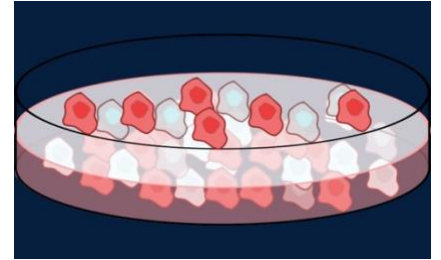
I- OBTENTION DES CELLULES

A- DISSOCIATION

Pour pouvoir étudier des cellules, 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 Extracellulaire (MEC)** grâce à des éléments chimiques (EDTA), biologiques (enzymes comme la trypsine) ou physiques (agitation)



B- SEPARATION

Dans un tissu, on trouve différents types de cellules. Après avoir dissocié nos cellules de la matrice, il faut donc les séparer entre elles. Pour cela, on peut utiliser les propriétés des différentes 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)
- Des **méthodes moléculaires** : **la purification sur support ou la cytométrie de flux** (développées juste après) : on utilise les antigènes de surface caractéristiques des cellules.

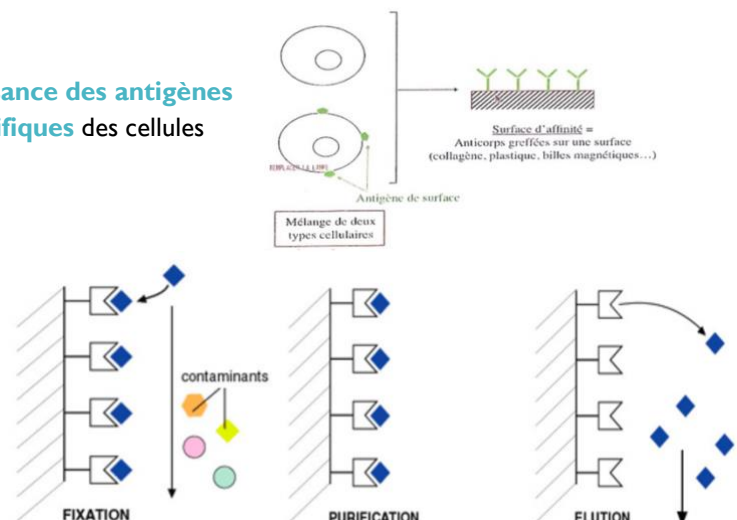
⇒ LA PURIFICATION SUR SUPPORT (= CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE)

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/surface d'affinité**).

Ensuite, on a **2 possibilités pour la récolte des cellules** :

→ **La sélection positive** : Les anticorps de la matrice sont dirigés contre les cellules à récupérer. **On récupère donc les cellules accrochées à la matrice.**

Lors de la sélection positive, on va devoir **éluer** (=détacher nos cellules de la surface d'affinité) par : Simple agitation, trypsination (utilisation de trypsine pour digérer les anticorps), modification des conditions physico-chimique...



→ **La sélection négative** : On récupère les **cellules qui n'ont pas eu d'affinité avec les anticorps de la surface.**

⇒ LA CYTOMETRIE DE FLUX

Fonctionnement de la cytométrie de flux :

On va faire passer notre suspension de cellules à travers une gaine fluide.

Grâce à des principes hydrodynamiques faisant circuler la gaine fluide et l'échantillon à des vitesses différentes, on arrive à obtenir une suspension où **les cellules sont les unes après les autres.**



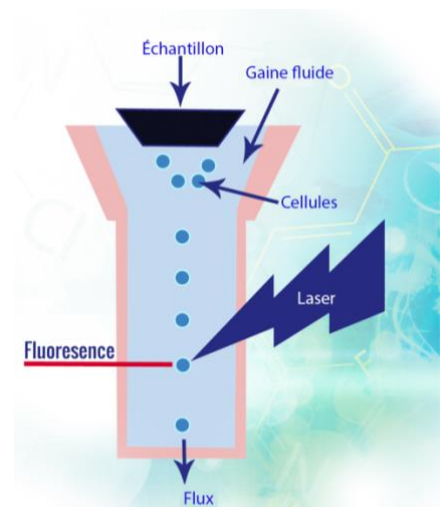
(comme toi quand tu fais l'attente pour rentrer en cours de biocell tu sais <3)

On va donc se servir de cette gaine fluide pour faire ce qu'on appelle une **hydro-focalisation** et faire en sorte que **toutes ces cellules passent à la suite dans la chambre de détection.**

Le flux va atteindre une chambre de détection (= cellule d'analyse) dans laquelle passe un rayon laser.

→ Ce rayon laser va **exciter les fluorochromes** et on va ainsi détecter une fluorescence.

Chaque cellule est **unique et va émettre un signal fluorescent qui lui est propre** permettant une analyse unique.



Info + : Comme on peut utiliser plusieurs fluorescences de couleurs différentes, on peut détecter plusieurs fluorochromes spontanément sur une même cellule.

Info + bis : En plus de ça, la façon dont le rayon laser va être dévié par la cellule (sans même avoir besoin d'un fluorochrome) va nous donner une information sur la taille et la forme de chaque cellule.

On distingue 2 types de cytomètres :

Le cytomètre de flux classique (ou cytométrie analytique)

Ne fait que mesurer les propriétés des cellules puis elles sont **jetées à la poubelle** une fois l'analyse effectuée.

Il permet une analyse **rapide** des cellules

→ Environ **5000 à 10 000 cellules/secondes.**

Le cytomètre de séparation (=FACS)

Permet après **l'analyse** des propriétés cellulaires, de **séparer** et de **recupérer** nos cellules en fonctions des critères préétablis.

Le **cytomètre de séparation** est un **véritable trieur physique.**

Néanmoins c'est une machine plus **lente** que l'analyse classique :

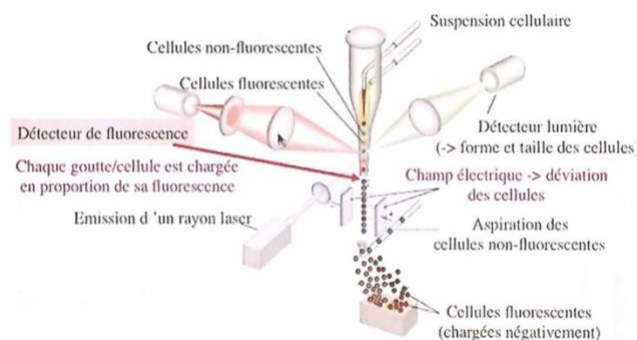
→ Environ **500 cellules/secondes.**

Focus sur le fonctionnement du FACS

Le principe de base est le même qu'au niveau du cytomètre analytique classique sauf qu'à la sortie de la cellule d'analyse, les différentes cellules vont se retrouver chacune « **emprisonnées** » dans de petites gouttelettes.

Ces micro-gouttelettes vont être **électrisées**, c'est-à-dire qu'elles vont chacune **porter une charge électrique** (cette charge est proportionnelle à la fluorescence de la cellule).

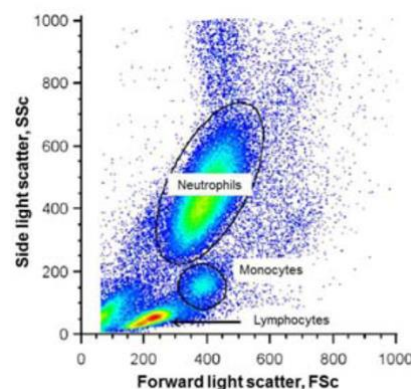
A la sortie de la cellule d'analyse, il va y avoir des plaques électriques qui vont **dévier les gouttelettes dans un sens ou dans l'autre en fonction de leur charge**, de manière à **les faire tomber dans différents compartiments** (tubes, poubelles.)



NB : Avec le FACS, on peut trier jusqu'à 4 conditions différentes, c'est-à-dire 4 couleurs fluorescentes différentes.

Grâce à la cytométrie 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 dissocié puis séparé les cellules, il est parfois nécessaire de les **cultiver** pour en obtenir une **plus grande quantité**.

La culture des cellules présente des **avantages et des inconvénients** :

Avantages	Inconvénient
<p>Contenu cellulaire plus homogène qu'un tissu</p> <p>Conditions expérimentales contrôlées</p> <p>Possibilité d'isoler une cellule unique afin d'obtenir des clones identiques</p>	<p>Les cellules sont étudiées en dehors du contexte tissulaire (donc en dehors de l'influence de l'organisme en général)</p> <p>Il y a un risque de sélectionner un mutant et de tirer des conclusions sur ce mutant qui n'est pas représentatif</p>

A- LA CULTURE DES MICRO-ORGANISMES

En recherche, les micro-organismes ont souvent un grand intérêt, leur culture est plus **simple** que les cellules animales et apportent de nombreuses informations **essentielles**.

Les micro-organismes sont des **organismes unicellulaires** (ex : les bactéries (procaroyotes) et les levures (eucaryote)).

→ **Ces cultures apportent de nombreux avantages :**

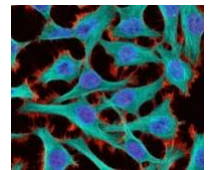
- > **Division** extrêmement **rapide**
- > Culture en milieu **semi-solide !! (Attention au piège) +++++**
- > Obtention et isolation des **mutants**



B- LA CULTURE DES CELLULES ANIMALES

La culture des cellules animales (eucaryote) est **plus complexe**, en effet :

- > Elles nécessitent beaucoup plus de nutriment, de **facteur de croissance ..**
- > Culture plus **lente**
- > Nécessitent un milieu **solide ! +++**
- > Chaque type de cellules ont leurs propres types de culture avec des **besoins différents**



On distingue **plusieurs types de cultures cellulaires :**

Les cultures primaires :	Les lignées immortelles :
<p>Établies à partir de tissus dissociés</p> <p>Certains types cellulaires sont plus facile à cultiver que d'autre</p> <p>Nombre de divisions limité (limite de Hayflick) à environ 50, après quoi elles entrent en sénescence (mais elles restent métaboliquement actives) : c'est un processus irréversible</p>	<p>Certains variants sont devenus immortels et peuvent former des lignées.</p> <p>Devenus immortelles à partir de tumeurs, spontanément ou après l'expression ectopique de la télomérase ou l'action d'agents mutagènes ou de virus.</p> <p>Le taux d'immortalisation spontanée varie en fonction des espèces</p>

Info + : 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.

Attention !! les cellules cancéreuses sont une exception, elles peuvent se diviser sur milieu solide ou semi-solide. (PIÈGE QCM ++)

III- ANALYSE DU CONTENU CELLULAIRE

Après avoir cultivé nos cellules, on va vouloir en **étudier le contenu** !

I- LYSE DES CELLULES

Lyse cellulaire = libération du contenu cellulaire dans un tube à essai

→ On détruit la membrane pour libérer le contenu de la cellule.

Ce procédé va nous permettre d'avoir accès au contenu de la cellule et donc de comprendre le rôle des différents composants cellulaires.

Il y a différentes techniques de lyse :



Sonication	Utilisation d'ultra-sons pour casser la membrane cellulaire
Choc osmotique	On met nos cellules dans une solution dite « hypotonique » (pauvre en sel), ce qui va faire rentrer l'eau dans la cellule jusqu'à la faire éclater (la pauvre)
Détergents	Qui détruisent les membranes lipidiques
Frottements	Destruction des membranes par une technique totalement mécanique

2- FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS DES CELLULES

Après avoir lysé la cellule, et donc obtenu ce qu'il y avait à l'intérieur de la cellule, on va chercher à fractionner (= séparer les différents constituants cellulaires) nos cellules.

On peut le faire par filtration (pour les gros débris principalement)

Par centrifugation (pour séparer les composés cellulaires : membrane, organites ...)

Pour séparer les macromolécules/protéines, on pourra utiliser l'électrophorèse ou la chromatographie



Il existe deux types de centrifugation :

A) CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

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. Cette différence de vitesse de centrifugation permettra de séparer les constituants.

Les gros éléments vont sédimenter plus vite que les petits.

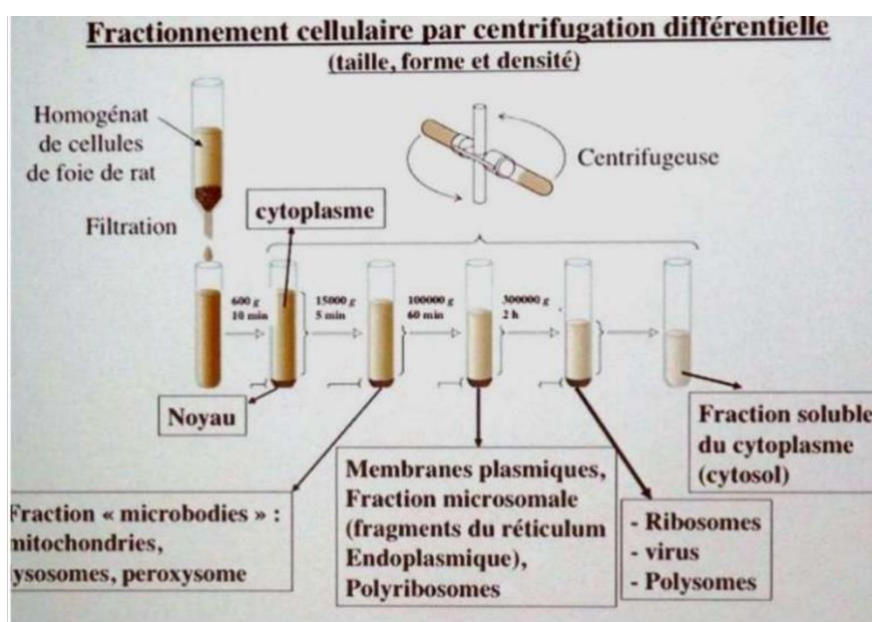
Ce tableau est là plus à titre indicatif qu'autre chose. Le prof en parle tous les ans mais ça n'est jamais tombé au concours. Pour le concours blanc vous n'aurez pas de question sur ce tableau.

Conditions expérimentales	Eléments 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

Joli tableau tiré de la fiche de l'année dernière par vos super-vieux-tuteurs

NB bis : un « g » correspond à une unité d'accélération, $1g =$ une accélération gravitationnelle de pesanteur.



Diapo intéressante pour comprendre le fonctionnement de la centrifugation différentielle et qui récapitule le tableau

Entre chaque étape de centrifugation on **recupère le surnageant** et on le transfère dans un autre tube pour refaire une centrifugation et ainsi de suite ...

B) CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE/A L'EQUILIBRE

Cette séparation permet d'augmenter la **pureté** de la centrifugation différentielle.

→ Elle est utilisée, par exemple, pour séparer les organites de la **fraction microbodies** : *mitochondries/lysosomes/ peroxysomes*.

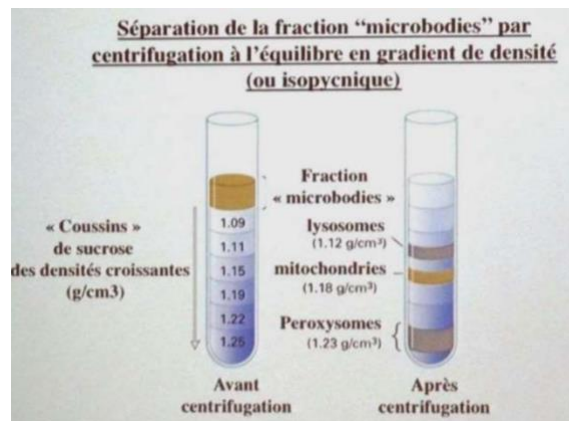
En effet, en centrifugation différentielle, ces 3 organites forment une seule et même couche (microbodies) ; la centrifugation isopycnique va donc nous permettre de **les séparer**.

Comment ?

→ On dépose la fraction microbodies sur des **coussins de sucrose à densité de concentration croissante entre le haut et le bas du tube.**

Après centrifugation (à 40 000 tours/minute pendant quelques heures), les différents constituants vont **s'équilibrer entre les coussins en fonction de leur densité.**

Idem, diapo du Pr.Gilson pour que vous visualisiez bien le mécanisme.


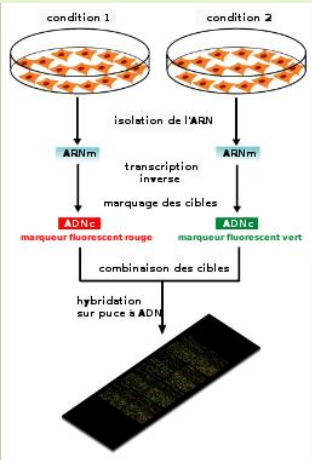
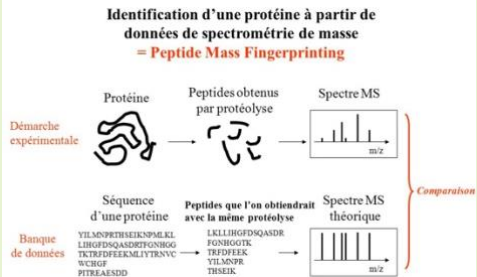


IV- ANALYSE DE LA COMPOSITION MOLECULAIRE DES CELLULES

On va vouloir éventuellement analyser la **composition moléculaire** des différentes fractions.

En purifiant les différentes fractions (via électrophorèse/chromatographie) on va identifier :

- 1- Le **génom**e (la séquence d'ADN)
- 2- Le **transcriptome** (les gènes qui sont transcrits par la cellule)
- 3- Le **protéome** (les différentes protéines de la cellule)

Analyse du génome : le NGS	Analyse du transcriptome (la puce à ADN)	Analyse du protéome (spectrométrie de masse)
<p>Appareil lisant la séquence de l'ADN : elle détermine l'enchaînement des nucléotides dans un morceau d'ADN</p> 	<p>Permet de savoir si un gène est transcrit par la cellule dans différentes conditions expérimentales.</p> <p>C'est une lame de verre avec des trous à l'intérieur desquels se trouvent certains gènes du génome (Fonctionnement non détaillé sur cette fiche, revu en UE1 I au S2, peu intéressant pour la biocell ...)</p> 	<p>Techniques d'électrophorèse bidimensionnelle séparant les protéines en fonction de leur charge et leur poids/taille.</p> <p>On les passe ensuite dans un spectromètre de masse ce qui permettra de déterminer la séquence peptidique de la protéine en comparant les masses obtenues à une banque de données</p> 

V- ANALYSE GENETIQUE

I- NOTION DE MUTATION (+ NOTIONS DE GENETIQUE)

L'intérêt d'étudier les mutations est de comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire.

C'est-à-dire ?

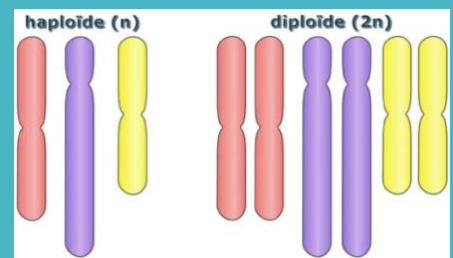
Le **niveau moléculaire** ce sont **les gènes** (donc la molécule d'ADN).

Ainsi, si on étudie certaines maladies génétiques et leurs conséquences au niveau cellulaire, on pourra modéliser ces maladies au niveau moléculaire.

Exemple fictif : on imagine une cellule mutante qui n'arrive pas à se diviser. On analyse le génome de cette cellule et on voit que le gène X est muté. → On en déduit que ce gène X doit être impliqué dans le processus de division cellulaire.

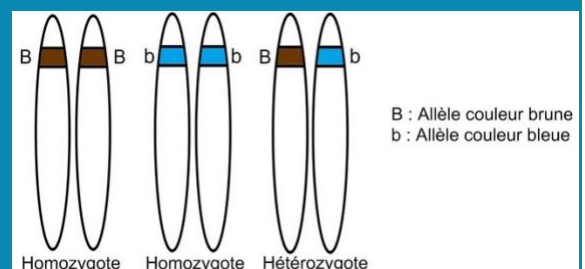
→ Petite compilation de définitions **IMPORTANTES** qu'il faut savoir maîtriser (et pas que pour la biocell !) :

- **Génotype** : ensemble des gènes, normaux (=sauvages) ou mutés d'un organisme.
- **Phénotype** : apparence d'un organisme, d'une cellule ou d'un individu. Il dépend du génotype et de l'environnement.
- **Organisme haploïde** : cellule/individu ayant **une** copie de chaque chromosome.
- **Organisme diploïde** : cellule/individu ayant **deux** copies de chaque chromosome. C'est-à-dire que chaque gène va être présent dans l'organisme sous la forme de deux allèles.



→ Dans le cas d'un organisme diploïde :

- Un gène est **homozygote** si les **2 allèles sont identiques** (même version du gène sur les 2 chromosomes de la même paire).
- Un gène est **hétérozygote** si les **2 allèles sont différents**.



- Un allèle peut être **normal** (sauvage) ou **mutant** (#X-Men)
- Un allèle peut être **dominant** ou **récessif**

→ Il y a 2 types de mutations :

Mutation dominante	Mutation récessive
Il suffit qu'un seul allèle soit muté pour que le phénotype soit mutant	Il faut que les 2 allèles soient mutés pour que le phénotype soit mutant

2- LA COMPLEMENTATION ++

Définissons d'abord la complémentation et groupe de complémentation

Qu'est-ce que la complémentation ?

C'est le fait qu'un allèle **normal** va pouvoir **complémenter/ramener au phénotype normal une mutation récessive** = habilité à **restaurer une fonction** (phénotype sauvage) en complémentant, dans une même cellule, deux allèles dont au moins un est **muté**.

En d'autres termes, vous avez 2 allèles : un **allèle muté récessif** et un **allèle normal (dominant)** → Votre phénotype sera **normal** car l'allèle **normal** a **complémenté**, c'est-à-dire qu'il « maintient » le **phénotype normal**.

Qu'est-ce qu'un groupe de complémentation ?

C'est un ensemble de **mutants** qui ne complémentent **PAS** entre eux → ce sont des gènes **mutants** (qui peuvent être les mêmes ou non) qui, placés dans la cellule, ne **rétablissent pas** un phénotype normal

Ces notions vont nous permettre de réaliser un **test de complémentation**.

Ok, mais dans quel but ?

→ Ce test sert à montrer **si 2 organismes mutants sont mutés sur le même gène ou non !**

Avant un test de complémentation il faut faire un **test de récessivité** = un test qui détermine que les mutations testées sont bien récessives et non pas dominantes, sinon il ne peut pas y avoir de complémentation vue que la mutation est dominante.

On va fusionner le noyau d'une cellule sauvage et d'une cellule mutée. → si le **phénotype est sauvage la mutation est bien récessive**, sinon la mutation est dominante (elle a pris le dessus sur l'allèle sauvage :o)

Le principe d'un test de complémentation est de fusionner les noyaux de 2 cellules mutantes ayant le même phénotype et observer le phénotype après la fusion, notamment si on a un retour au phénotype sauvage (donc s'il y a bien complémentation).

Si le phénotype observé est **SAUVAGE**, cela veut dire que qu'il y a eu **COMPLÉMENTATION**

Les mutations sont dans des **groupes de complémentation DIFFÉRENTS**

→ On **suggère** que les mutations sont sur des gènes **DIFFÉRENTS**

Parenthèse suggérer/démontrer (eh oui encore) : ici on utilise le terme « **suggérer** » car il est possible que les 2 mutations soient sur le **même gène** et qu'il y ait quand même eu complémentation (à cause d'un phénomène qu'on appelle **suppression intra-génique**).

Si le phénotype observé est **MUTANT**, cela veut dire que qu'il n'y a **PAS** eu **complémentation**.

Les mutations sont dans le **MÊME** groupe de complémentation.

→ On **démontre** que les mutations sont sur le **MÊME** gène.

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

Je me permets de reprendre le moyen mnémotechnique de vos super tuteurs de l'an dernier, parce que je l'utilisais moi-même ^^

FIN

Instant dédié Kanye : Tout d'abord dédié à Mimi et Roro les 2 meilleures personnes du monde <3..

Dédi à mes 2 co-tuts love qui sont vraiment géniaux autant l'un que l'autre et avec qui on forme la meilleure équipe du monde (vive la biocell <3)

Grosse dédicace à la Team Rando Originelle (#KL)

Mini-dédi à SLAASH qui m'a fait 50 dédicaces sur ses fiches et tout donc jsuis un peu obligé de faire pareil sinon elle va me tuer ...

Dédi à rambo qui va m'aider à trouver un super déguisement tout mignon pour le WEIT

Dédi à tous les gens de Mc et de Albert 1er (même FANB tkt)

À dédi à vous tous qui lisez cette petite fiche j'espère qu'elle vous a plu <333



La Biocel Squadl inter-générationnelle



la charmante SLAASH



la team Rando <3