

MÉTHODE D'ÉTUDE DES CELLULES ET ANALYSE GÉNÉTIQUE

I - Obtention des cellules

Étape 1 : Dissocier les cellules

On prélève des cellules à partir :

- De tissus
- De cultures cellulaires

Les cultures cellulaires sont plus faciles à manipuler contrairement aux cellules d'origine tissulaire, on choisira leur origine en fonction de ce qu'on veut étudier par la suite.

En général, on obtient des cellules à partir d'un tissu. Il va falloir les prélever afin d'obtenir une suspension de cellules :

- A partir de sang circulant, il n'y a pas de problème. Les cellules sont déjà en suspension en phase liquide et déjà dissociées ++
- A partir d'autres tissus, les cellules sont dans un environnement en interaction avec d'autres constituants spécifiques de chaque tissu. Notamment la Matrice Extra Cellulaire (MEC) qui est l'échafaudage de protéines situé à l'extérieur de la cellule permettant aux cellules de s'associer en tissu, il faudra donc l'éliminer pour avoir une suspension de cellules.

Comment éliminer la MEC ainsi que les contacts entre les cellules ?

-> Méthode chimique ou biochimique, à l'aide :

- De protéases comme la trypsine, qui vont digérer les protéines de la MEC qui maintiennent le contact « cellule-cellule » et « MEC-cellule ».
- D'EDTA qui est un chélateur de cations divalents (ions calcium Ca^{2+}) qui va affaiblir les interactions qui dépendent de ces ions.

-> Méthode physique, à l'aide :

- D'agitation légère (action mécanique) : « Je vous le dit c'est de la cuisine ».

Étape 2 : Séparer les cellules

Dans un tissu on a différents types cellulaires, on va donc vouloir isoler chaque type cellulaire afin de les étudier séparément.

Pour ce faire, on utilise les différentes propriétés des cellules à l'aide de différentes techniques (individuellement ou séquentiellement si on a beaucoup de cellules différentes). Cette séparation peut se faire selon :

- Leurs propriétés physiques (taille et forme) par centrifugation à basse vitesse.
- Leurs propriétés d'adhésion (sur plastique ou lame de verre) où certaines cellules confondront le plastique/verre avec leur MEC et y adhéreront alors que les autres non. (Exemple : Les érythrocytes restent en suspension alors que les fibroblastes adhèrent.)
- Les méthodes moléculaires telles que la purification de support ou la cytométrie de flux.

On va se pencher sur ces méthodes moléculaires, en quoi elles consistent au juste ?

Leur but est de séparer les cellules en fonction de leurs spécificités moléculaires en les gardant en vie et le plus proche de leur état naturel ++

On va utiliser :

- Les antigènes de surface (ex : molécules d'adhésion ou récepteurs sensoriels et métaboliques)
 - = La purification sur support.
- Les molécules fluorescentes (ex : la GFP)
 - = La cytométrie de flux.

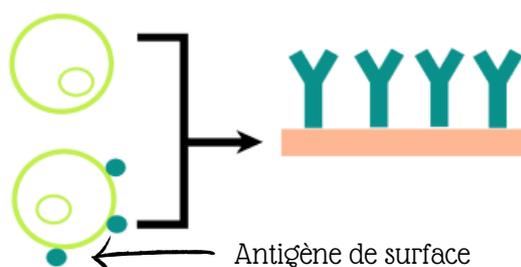
A - La purification sur support

On va se servir des antigènes spécifiques présents à la surface des cellules.

Mais comment va-t-on pouvoir séparer les différentes cellules ?

-> Grâce à une surface d'affinité

- Définition « surface d'affinité » : Surface solide (collagène, plastique ou billes magnétiques) sur laquelle on a mis en place des anticorps spécifiques qui vont détecter et se lier aux antigènes de surface des cellules d'intérêt.



→ Lors de la sélection positive : on récupère les cellules dont l'antigène et l'anticorps se sont fixés entre eux.

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

NB : Lors de la sélection positive on va devoir éluer (= détacher nos cellules de la surface d'affinité) grâce à différentes techniques (agitation, trypsination, changement de conditions physico-chimiques).

!!! Important !!! La sélection négative est privilégiée car, on le rappelle, le but est de garder nos cellules le plus proches de l'état naturel de base, et une interaction avec des anticorps va induire des modifications biologiques via des transductions de signal.

B - La cytométrie de flux

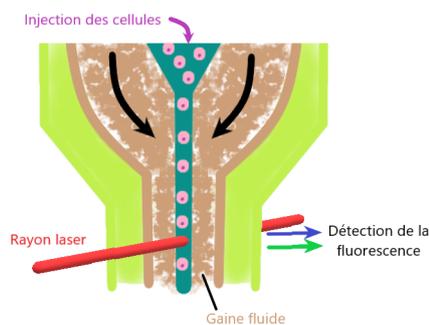
La cytométrie de flux permet d'analyser des cellules en flux c'est-à-dire que les cellules doivent être en SUSPENSION +++

→ 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.

→ 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. Ainsi on aboutira à une analyse par diffraction du laser qui donnera des informations sur les caractéristiques de la cellule (taille, forme...) et une analyse moléculaire qui mesurera la quantité de fluorescence spécifique de chaque cellule, c'est une analyse unique.

NB : On peut détecter plusieurs fluorochromes spontanément dans une même cellule.

On distingue 2 types de cytomètres :

- La cytométrie de flux classique (ou analytique) où on mesure uniquement les propriétés des cellules puis elles sont jetées à la poubelle après l'analyse qui sera rapide.
- La cytométrie de séparation (= FACS) qui permet, après l'analyse des propriétés cellulaires, de séparer et de récupérer mes cellules en fonction de critères pré-établis. Après l'analyse un détecteur de fluorescence va charger négativement chaque gouttelette d'une charge électrique proportionnelle à sa quantité de fluorescence. Puis les gouttelettes seront soumises à un champ électrique qui les fera dévier, plus une cellule est déviée, plus sa quantité de fluorescence est élevée.

Principales applications de la cytométrie :

- Énumération des cellules en suspension.
- Pourcentage de cellules mortes ou vivantes.
- Trier les cellules (avec les FACS).
- Évaluer les paramètres cellulaires.
- Analyser le cycle cellulaire.

Mais comment est-ce possible d'analyser le cycle cellulaire grâce à la cytométrie de flux ?

Rappelons, que lors du cycle cellulaire, la quantité d'ADN varie. Ainsi en phase G₀/G₁ on a 2n ADN, en S on a la duplication qui fait qu'en G₂ on a 4n ADN (cf. Cycle Cellulaire). Donc si on colore l'ADN (grâce au Hoechst ou à l'iodure de propidium) on pourra observer la quantité de fluorescence et donc la quantité d'ADN évoluer en fonction du cycle cellulaire.

II - La culture cellulaire

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.

Il existe 2 types cellulaires que l'on peut cultiver :

- Les micro-organismes
- Les cellules animales

A - La culture des micro-organismes

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

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 que l'on retrouve chez les organismes plus complexes.

- Vitesse de division extrêmement rapide et des conditions simples de croissance
- Peuvent être cultivées en milieu semi-solide ++
- Les mutants peuvent être facilement obtenus et isolés avec le système de réplique

Le système de réplique : Application d'un velours stérile qui va retenir quelques cellules de chaque colonie et ainsi « photocopier » telle une copie conforme la culture dans une autre boîte de Pétri.

→ L'intérêt est de pouvoir changer le milieu de culture des cellules.

B - La culture des cellules animales

Les cellules animales nécessitent des milieux de culture plus complexes et vont avoir des besoins différents en culture (acides aminés, de vitamines, de sels, de facteurs de croissance, etc...).

Elles ont aussi besoin d'une surface solide ++ comme le plastique des boîtes de Pétri.

! Attention exception ! Les cellules cancéreuses peuvent se diviser sur milieu solide ET semi-solide, donc dans n'importe quel type de milieu et deviennent autocrine (= pas besoin de signal pour se développer comme le sérum de veau foetal).

On distingue plusieurs types de lignées :

Les cultures primaires	Les lignées immortelles
<ul style="list-style-type: none"> • Établies à partir de tissus dissociés. • Certains types cellulaires sont plus facile à cultiver que d'autres. • 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 ++ 	<ul style="list-style-type: none"> • Certains variants sont devenus immortels et peuvent former des lignées. • Devenues immortelles à partir de tumeurs, spontanément ou après l'expression ectopique de la télomérase ou l'action d'agents mutagènes ou de virus. • Le taux d'immortalisation spontanée varie en fonction des espèces.

Nb : Une cellule sénescence ne meurt pas, elle arrête juste de se diviser et résiste à la mort ++

Info en + : 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.

III - Analyse du contenu cellulaire

A - 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 en préservant les protéines et complexes protéiques.
Choc osmotique	On met nos cellules dans une solution dite « hypotonique » (riche en eau et pauvre en sel), ce qui va faire rentrer l'eau dans la cellule jusqu'à la faire éclater.
Détergents	Qui détruisent les membranes lipidiques.
Frottements	Destruction des membranes par une technique totalement mécanique. On peut utiliser un piston de Téflon lorsque on a que quelques cellules à lyser.

B - La fragmentation

Définition « fragmentation » : Séparation des différents constituants de la cellule.

On peut pour cela :

- Filtrer les différents débris.
- Centrifuger le contenu pour séparer les différents composés cellulaires (membranes, organites, etc...).
- La chromatographie / électrophorèse pour séparer les protéines de l'ADN.

On a 2 types de centrifugation :

1) La centrifugation différentielle

La centrifugation est dite « différentielle » car on va centrifuger nos extraits à différentes vitesses. 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.

Conditions expérimentales	Éléments obtenus
10 minutes 600 G	Noyau
5 minutes 15 000 G	Fraction « microbodies » (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes)
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	

A titre d'illustration, ne m'apprenez pas ça s'il vous plaît

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

2) La centrifugation isopycniqne (ou à l'équilibre en gradient de densité)

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/ peroxyosomes.

En effet, en centrifugation différentielle, ces 3 organites forment une seule et même couche (microbodies) ; la centrifugation isopycniqne 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.

Via ce principe on a pu montrer que les différentes enzymes sont spécifiques d'un endroit donné.

Exemple : Pour les microbodies, la phosphatase acide est spécifique des lysosomes, la cytochrome oxydase des mitochondries et la catalase des peroxysomes.

Le syndrome de Zellweger :

C'est une maladie qui touche le peroxysome. En temps normal ce peroxysome a une seule membrane et a une activité extrêmement importante dans le métabolisme oxydatif, puisque grâce à la catalase, il détoxifie la cellule en empêchant l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. Dans le cas de ce syndrome, les gènes de la formation du peroxysome sont mutés, et la catalase se retrouve dans le cytoplasme. L'espérance des patients atteints est inférieure à 1 an, avec des problèmes neurologiques, hépatiques etc... Ça témoigne donc de l'importance de la compartimentalisation de certaines enzymes.

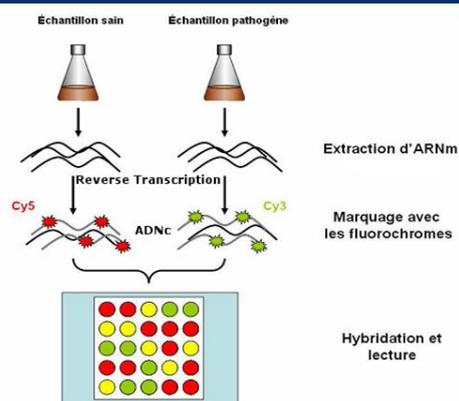
IV - Analyse des compositions moléculaires

A - La puce à ADN

- On a déposé sur des petites puces des puits avec dans chacun de ces puits des oligonucléotides correspondant à nos gènes. Il y a 20 000 puits et dans chaque puit un gène.
- Si on prend une cellule et qu'on veut vérifier quel gène est exprimé, on va, grâce par exemple à des reverse transcriptase, transformer les ARNm de cette cellule en ADN complémentaire. (C'est de l'ADN simple brin qui cherchera donc à se coupler si jamais il rencontre de nucléotides).
- Ensuite cet ADN_c sera couplé à des fluorochromes et on verse notre ADN_c sur la puce.
 - > Les ADN_c (représentant les gènes présents dans notre cellule de base) vont se coupler aux oligonucléotides complémentaires de leur séquence et libérer le fluorochrome.
- Et ainsi on verra la fluorescence au niveau de chaque puit représentant un des gènes présent dans la cellule.

-> On peut donc en déduire quel gène est exprimé dans notre cellule, voire même comparer deux cellules différentes, ou deux mêmes cellules mais développées dans des milieux différents et voir si tel ou tel gène favorise tel ou tel milieu.

Les Puces à ADN



Limite de cette technique : Un gène n'est pas simplement défini par sa séquence génétique. C'est plus complexe, car un gène peut donner plusieurs protéines via la maturation de son ARN suite à l'épissage différentiel. Et le problème c'est que cette technique ne permet pas d'avoir accès à ce type d'information.

B - Le séquençage (génomique et transcriptomique)

Le séquençage haut débit (=NGS) de l'ADN :

- La technique consiste à fragmenter l'ADN en petits bouts, qui seront mis dans des petites gouttes.
- L'appareil va alors lire chaque séquence de chaque goutte, et il reconstituera à la fin de toutes ces lectures l'ensemble de l'ADN grâce à la bio-informatique.
- Avec des logiciels spéciaux on pourra en plus déterminer tous les variants d'épissages et donc « avoir une vision beaucoup plus complète de la réponse transcriptionnelle ».

C- Chromatographie / Électrophorèse et Spectrométrie de masse (protéomique)

L'électrophorèse :

La technique de base c'est l'électrophorèse simple, le but c'est de mettre nos protéines une à une dans un gel puis les faire migrer en fonction de leur taille et uniquement de leur taille. Le problème c'est que si deux protéines ont la même taille on les confondra. On a donc amélioré cette méthode en électrophorèse bidimensionnelle. On évalue cette fois-ci les protéines en fonction de leurs tailles ET de leur pHi. C'est un peu plus discriminant.

La spectrométrie de masse :

C'est une technique plus récente et automatisée, où on peut mettre beaucoup de protéines à la fois, mais qui garde le même principe c'est-à-dire que chaque protéine sera fragmentée à des endroits précis générant des peptides, et ces peptides seront chargés et seront analysés par rapport à leur masse, et surtout à leur rapport masse/charge. Ensuite ce ratio obtenu il sera comparé à une banque de données recensant tous les ratios qui existent. Et donc on pourra identifier les protéines présentes dans notre mélange de base et donc notre protéome recherché.

VI- Analyse génétique

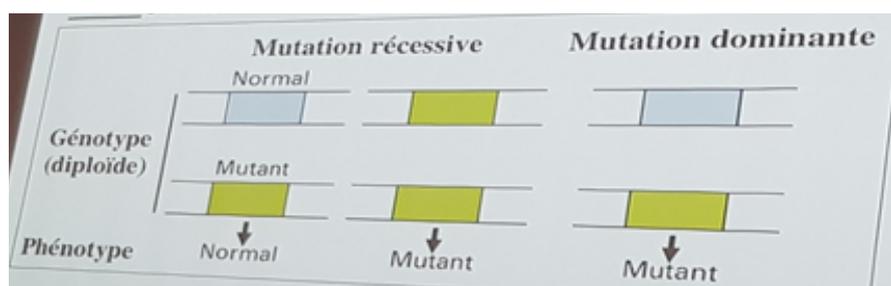
Il faut distinguer la génétique fondamentale de la génétique inverse qui est plus moderne. La notion centrale c'est l'étude de gène. En génétique fondamentale, on partait du phénotype et on en déduisait le génotype. Aujourd'hui c'est le contraire, on découvre des gènes donc le génotype, et on essaye de savoir à quelle caractéristique phénotypique il correspond.

A - Notion de mutation

Définitions

- Génotype : ensemble de gènes sauvages ou mutés.
- Phénotype : apparence d'un organisme ou d'une cellule dépendent du génotype ET de l'acquis.
- Le polymorphisme : Les gènes au niveau de nos cellules sont présents en double exemplaire la plupart du temps (sauf dans les gamètes). Donc les deux gènes vont être les mêmes mais il y aura des petites différences en termes de séquence.
 - En effet, un allèle qui n'est différent qu'en terme de séquence mais qui n'induit pas de changement de la protéine \Rightarrow le gène est considéré comme homozygote.
 - Et un allèle qui pris seul induirait un problème \Rightarrow le gène est considéré comme hétérozygote.

Avec toutes ces études on découvre donc de plus en plus de polymorphisme génétique. Le problème c'est que ces polymorphismes ne sont pas forcément des maladies mais quelquefois peuvent signaler des prédispositions à certaines maladies. Ex : Le cancer du sein.



Rappels :

- Un organisme haploïde a une copie de chaque chromosome.
 - Un organisme diploïde a deux copies de chaque chromosome.
 - \rightarrow Chaque gène est présent sous la forme de 2 allèles :
 - Un gène est dit homozygote si les deux allèles sont identiques.
 - Un gène est dit hétérozygote si les deux allèles sont différents.
 - \rightarrow Les allèles peuvent être normaux (= sauvages), mutés, dominants ou récessif
- ++ Un allèle dominant complémente une mutation récessive ++**

B - La complémentation

Résultat de tout cela c'est les interactions des gènes entre eux, si un des gènes est défectueux ET récessif l'autre peut prendre sa place.

→ C'est la notion de complémentation dans un organisme diploïde.

Imaginons une mutation perte de fonction sur le gène de la mère, le gène du père prendra le relais. Sauf dans le cas très spécial où les deux gènes doivent s'exprimer et s'il en manque un on parlera d'haplo-insuffisance. Mais en règle générale un des deux gènes suffit.

On a deux mutations, donnant deux phénotypes. On cherche à savoir si les deux mutations sont les mêmes.

On fera donc un test de complémentation ++

Pour cela on commence TOUJOURS par un test de récessivité (on introduit le gène sauvage et on vérifie qu'il s'exprime à l'état sauvage).

Définitions :

- Complémentation : habileté à une fonction combinant la même cellule deux gènes dont au moins un est muté.
- Test de récessivité : restauration du phénotype sauvage par introduction dans une cellule du gène sauvage.
- Test de complémentation : vise à établir l'allélisme deux mutations récessives.

Si la récessivité pour nos deux mutants est vérifiée, alors on passe au test de complémentation :

On va introduire nos deux gènes dans une cellule et vérifier comment est le phénotype.

Deux possibilités :

→ Phénotype sauvage : signifie que les deux gènes n'ont pas la même mutation donc qu'il y a eu complémentation. Donc que les deux mutations appartiennent à deux groupes de complémentation séparés (ils ne sont pas allèles).

→ Phénotype muté : ça veut dire que les deux gènes ont la même mutation, d'où le fait qu'il ne se complémente pas. Ils appartiennent au même groupe de complémentation (ils sont allèles).

- Il y a complémentation entre deux mutations les deux mutations appartiennent à deux groupes distincts complémentation.

Dans la plupart des cas, c'est la co-expression des gènes non-mutés qui rétablit le phénotype sauvage

→ chaque groupe de complémentation correspond à un gène distinct.

- Le cas de la suppression intra-génique est en fait un cas très rare où les deux mutations vont venir se compléter en termes de forme et donner une protéine homo-dimérique fonctionnelle et donc un phénotype sauvage. Dans ce cas deux groupes de complémentation correspondent au même gène.

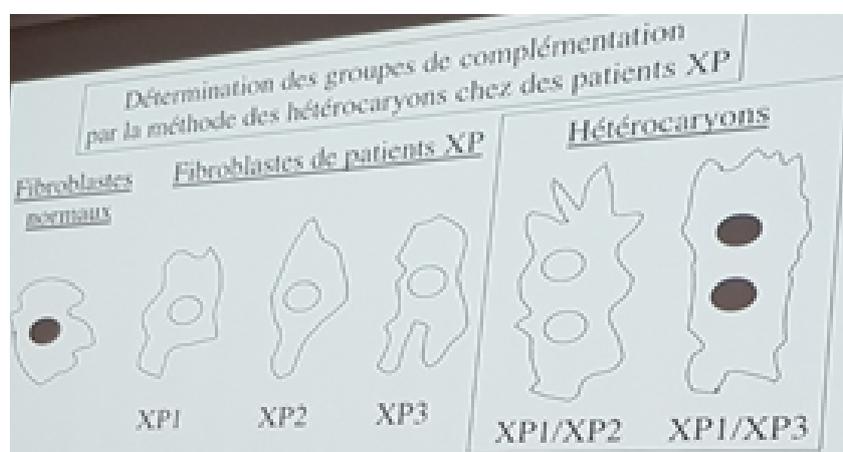
Donc :

- Si complémentation → les deux mutations appartiennent à deux groupes de complémentation distincts → pas allèles.
- Si absence de complémentation → les deux mutations appartiennent au même groupe de complémentation → allèles.

En pratique, ce test de complémentation est utilisé lorsque l'on a plusieurs patients atteints d'une maladie génétique (le prof prend l'exemple de la Xeroderma Pigmentosum) et que l'on veut déterminer entre ces patients les différents groupes de complémentations.

Pour cela on va prendre les cellules de ces patients deux par deux, et on va former des hétérocaryons.

Ensuite on observera si le phénotype est sauvage ou muté et on conclura. (dans notre exemple ci-dessous, si la thymidine tritiée est incorporée alors le phénotype est sauvage, sinon il est muté) :



Après irradiation des cellules, la réparation est mesurée par la capacité des cellules incorporer de la thymidine tritiée (noyaux noirs).

- XP1/XP2 → Pas de complémentation XP1 et XP2 sont du même groupe → ils sont allèles.
- XP1/XP3 → Complémentation → XP1 et XP3 correspondent à deux groupes de complémentation ils → probablement pas allèles.

C - Exemples de mutations CDC

1) Identifier des mutants de progression du cycle cellulaire

Comment produire un mutant quand le phénotype recherché ne permet pas de former des colonies ?

Il y a une mutation du cycle cellulaire donc les cellules ne se divisent pas/plus.

Pour pallier à ce problème, on va chercher et utiliser des mutations conditionnelles ++

- Mutation conditionnelle : mutation qui s'exprime en fonction du contexte, selon les conditions du milieu (température, acidité...) ils vont donner un phénotype mutant ou sauvage.

Exemples :

- Mutation thermosensible : exprime son caractère mutant à une température élevée.
- Mutation cryosensible : exprime son caractère mutant à une température basse.

Condition du milieu	Phénotype	But
Température <u>permissive</u> Mutation <u>NON-exprimée</u>	Phénotype <u>sauvage</u>	Fabriquer le plus de matériel biologique/cellules donc de divisions possible.
Température <u>non-permissive</u> (restrictive) Mutation <u>exprimée</u>	Phénotype <u>muté</u>	Faire le test : voir les effets de la mutation sur le cycle et la cellule.

On va ensuite faire des répliques :

Dans la boîte dans laquelle ont poussé les colonies, on fait une réplique à partir d'un velours stérile que l'on met sur un tampon ayant la forme de la boîte.

Les poils du velours attrapent quelques cellules dans chaque colonie.

On s'en sert comme un tampon : on prend le velours et on l'applique sur de nouvelles boîtes vierges : les poils du velours relâchent alors quelques cellules dans la même disposition que la boîte d'origine.

On remet les nouvelles boîtes à pousser, et éventuellement dans des contextes/conditions différentes (de température, présence ou non de nutriments...).

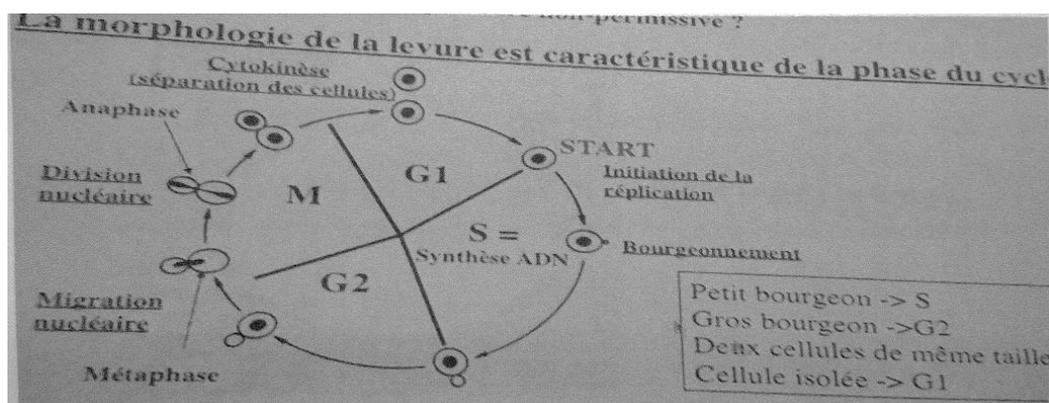
Dans ce cas là, on fait varier la température sur les différentes répliques :

- A 23°C (température permissive) : pas de problème, on retrouve toutes les colonies qui étaient précédemment là exactement dans la même disposition.
- A 36°C (température non-permissive) : certaines colonies sont absentes alors qu'elles sont présentes en température permissive, ce sont donc des mutants thermosensibles.

Intérêt des mutants thermosensibles : On va pouvoir utiliser une température à laquelle on a une division cellulaire, et une température où on n'en a pas. Si notre mutant est complet, c'est-à-dire non-conditionnel, la mutation s'exprimera à toutes températures.

Point historique : Le travail de Hartwell sur des mutants thermosensibles de levure a permis d'identifier ces mutants du cycle cellulaire. Notamment 32 gènes essentiels pour la progression de la division cellulaire, ce sont les gènes CDC (Cell Division Cycle).

A quelle phase du cycle cellulaire les mutants CDC sont bloqués à température non-permissive ?



On va pouvoir l'étudier grâce à la morphologie de la levure qui est caractéristique en fonction de la phase du cycle : les cellules ont une apparence différente en fonction de la phase du cycle dans laquelle elle se trouve.

- Phase G1 : cellule isolée.
- Phase S : petit bourgeonnement sur le côté de la cellule (= initiation de la réplication et de la synthèse d'ADN).
- Phase G2 : gros bourgeonnement.
- Phase M : les 2 parties se séparent pour donner 2 cellule-filles de même taille.

2) Exemple du mutant CDC13

On observe les cellules au microscope à température permissive : il y a un cycle cellulaire normal.

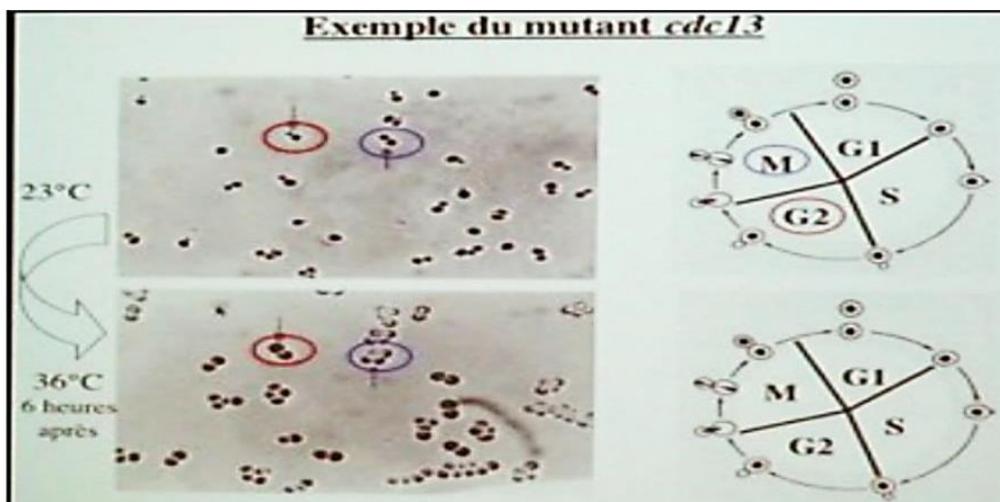
- Cercle 1 : on a un gros bourgeon → phase G2
- Cercle 2 : on a 2 cellules de taille équivalente → phase M

Cette même culture a été mise à température non-permissive pendant 6h, on observe que :

- Cercle 1 : la cellule en G2 est passée en phase M, en 6h c'est assez long : on en déduit qu'elle est restée bloquée en M, le cycle ne s'est pas fini.
- Cercle 2 : la cellule a fini sa phase M mais les 2 cellule-filles se sont bloquées en phase M suivante.

On remarque également que toutes nos cellules en général se sont bloquées en phase M.

Conclusion : A l'état non-permissif, la mutation CDC13 empêche les cellules de progresser pendant la mitose et plus particulièrement bloque la transition G2/M. C'est un des points de contrôle important du cycle cellulaire.



Les mutants CDC ont permis également de découvrir que les suites d'évènements ayant lieu au cours du cycle cellulaire n'étaient pas forcément dépendant les uns des autres : certaines suites d'évènements sont indépendantes. Même si dans un cycle normal, le bourgeonnement suit la réplication et le passage des phases en terme de synthèse d'ADN : dans certains mutants on peut avoir une synthèse d'ADN sans avoir de bourgeonnement ou inversement avoir un bourgeonnement sans synthèse d'ADN. Même si ces deux évènements indépendants se rejoignent à la fin pour former les cellule-filles.

On a retrouvé les homologues des mutants CDC (de levure) dans les cellules mammifères et humaines, certaines d'entre elles font partie des protéines les plus importantes du cycle cellulaire, pouvant être mutés dans certains cancers.

D - Notion de transgénèse

1) Introduction et notion d'intégration

Transgénèse : introduction d'un nouveau gène (= le transgène) dans une cellule ou un organisme, alors appelé organisme transgénique.

Pour effectuer une transgénèse : on utilise le transgène d'intérêt que l'on veut introduire dans le génome de notre cellule. On s'arrange pour transférer ce nouveau gène, c'est-à-dire introduire directement l'ADN dans le noyau.

Dans la majorité des cellules, si l'intégration se fait de manière simple et mécanique, on perd le transgène : il n'arrive pas à s'intégrer correctement dans la molécule d'ADN génomique, il restera à l'extérieur et finira par être éliminé par la cellule.

Parfois il peut être intégré et on peut l'étudier. Il y a 2 cas :

- 1ère possibilité : la molécule d'ADN se retrouve dans le noyau, mais n'est pas intégrée dans les chromosomes, c'est ce qu'il se passe dans la grande majorité des cas. Malgré tout, ce transgène va pouvoir s'exprimer (transcription et traduction) pendant une courte période, c'est l'expression transitoire. En effet, au bout de quelques heures, son expression n'est plus observable dans la masse des cellules car il n'est pas répliqué et transmis de générations en générations : le gène va être perdu progressivement dans la vaste majorité des cellules après quelques divisions. On ne peut alors étudier l'expression du gène seulement pendant quelques jours (entre 24 et 96 heures).
- 2ème possibilité : Dans de rares cas, le transgène s'intègre dans le génome par recombinaison et sera maintenu même après plusieurs divisions, on parle de lignée stable : c'est une expression permanente. Il existe une technique pour savoir si la cellule a vraiment intégré le gène sans son génome. Il existe 2 types de recombinaison :
 - Recombinaison illégitime = non homologue = au hasard : il n'y a pas d'homologie de séquence entre le transgène et l'ADN receveur, il est ainsi intégré totalement au hasard. C'est le cas le plus fréquent.

Remarque : cette recombinaison est problématique parce que l'on ne sait pas où va aller s'intégrer le transgène, il peut très bien aller s'insérer dans un gène important. Ainsi ce que l'on étudie n'est pas seulement l'expression du gène introduit, mais également celle de la mutation créée au hasard.

- Recombinaison homologue = ciblée = séquence-spécifique : les extrémités du transgène vont reconnaître les séquences identiques à l'ADN receveur. Complexe à réaliser, c'est en revanche beaucoup plus précis.

Désavantage de l'intégration ciblée :

On étudie le transgène seulement dans le contexte du site d'intégration, toujours au même endroit, l'effet peut être lié au site d'intégration et non au transgène.

Alors que pour l'intégration aléatoire (à différents endroits) on peut voir si l'effet a lieu uniquement parce que on a intégré quelque chose à un endroit particulier ou si c'est lié à ce que vous avez intégré (le transgène lui-même).

Explication : si on intègre dans différents endroits, et que dans tous ces clones on constate le même effet, l'effet vient bien du transgène et non du site d'intégration (puisque celui-ci est différent à chaque fois).

Exemple d'intégration :

Ici le transgène d'intérêt est l'ADNc ACT-GFP (Actine-GFP), c'est la fusion entre l'actine et la GFP, ce qui permet de voir l'actine en fluorescence dans la cellule pour pouvoir l'étudier dans la suite de l'expérience. On rajoute en plus du transgène, un gène de résistance (= gène de sélection, permettant de sélectionner nos événements rares d'intégration) qui va conférer une résistance aux antibiotiques c'est le gène de résistance à la puromycine. Ainsi après l'ajout de puromycine, les seules cellules qui vont rester vivantes sont celles possédant le gène de résistance Puro et donc notre transgène. Il y a d'autres gènes de résistance : résistance à la néomycine (non utilisés pour les cellules humaines car elles y sont déjà résistantes), résistance à l'hygromycine...

Récap

1. On transfecte et on laisse les cultures se développer 2-3 j.
2. On a quelques événements rares d'intégration par recombinaison non-homologue.
3. On va mettre l'antibiotique dans le milieu de culture.
4. Pratiquement toutes les cellules vont mourir car elles seront tuées par l'antibiotique, sauf les rares cellules où le transgène aura été intégré. Il n'y a plus qu'à étudier les cellules qui expriment ACT-GFP.

2) L'ARN interférent

On va intégrer dans notre génome une séquence d'ADN qui va permettre la synthèse de petit ARN double brin qui est homologue à une partie de la séquence du gène X dont on veut inhiber l'expression.

La cellule détecte des petits ARN double brins dont la séquence correspond à l'ARN messager qui est normalement exprimé par la cellule va entraîner la dégradation de cet ARNm par la suite.

Les différentes étapes sont :

- 1) Passage par la formation d'ARN bi caténaire (double brin).
- 2) Maturés, coupés en petits bouts par une RNase qui s'appelle DICER : on obtient des petits ARN interférents de 21 à 23 pnb.
- 3) Prise en charge des ARNi par le complexe RISC qui va dégrader l'un des brins, en ne gardant qu'une partie de la séquence et va ainsi être capable d'aller repérer s'il existe des ARNm correspondant à cette séquence-là : s'il en trouve, il les dégrade.

Grâce à l'utilisation de ce processus cellulaire de l'ARNi on provoque le blocage de l'expression du gène cible.

Avantages de la technique de l'ARN interférence

- Robuste : cette technique marche bien dans beaucoup de cas.
- Polyvalente : puisqu'il est possible de diminuer l'expression d'un gène ou de plusieurs gènes, soit simultanément, soit séquentiellement.
- Spécifique : l'existence d'un seul mésappariement entre l'antisens du ARNi et l'ARNm homologue se traduit par une chute importante de l'inhibition. On peut cibler un gène bien précis sans avoir d'effet sur d'autres gènes.
- Thérapeutique : les approches n'ont pas encore été validées, mais l'utilisation de cette stratégie pourrait éventuellement permettre d'aller bloquer l'expression d'une protéine mutée délétère pour le fonctionnement cellulaire et de l'organisme (à l'origine de certaines maladies).

Pourquoi la cellule a mis en place le système d'ARN interférent ?

- Lutte contre les virus, parasites du génome (1ère raison de la mise en place de ce système) : un ARN double brin n'est pas quelque chose de très naturel, si on en a beaucoup. En général c'est un signe d'infection virale avec un virus ARN, le mécanisme ARN interférent est donc mis en place pour limiter aussi bien la propagation des virus en bloquant certaines étapes de leur cycle de vie en détruisant leur ARN messager (même principe que pour l'ARN du gène X).
- Répression des transposons (2ème "parasite" du génome) : la présence d'ARN double brin de façon importante peut également être le signe qu'un transposon ou un rétro-transposon qui est en train de se dupliquer dans le génome. Les gènes exprimés ne représentent que 4 % des séquences alors que les résidus de transposons et retro transposons qui ne sont plus actifs représentent 50 % (= séquences sauteuses du génome).
- La formation de l'hétérochromatine : outre le fait de dégrader l'ARNm, il y a une autre voie avec un « retour » jusqu'à la séquence génique d'origine. On peut provoquer la formation d'hétérochromatine pour bloquer l'expression de la séquence dans le génome (dont on a trouvé l'ARN double brin). La cellule va jusqu'à modifier la chromatine au niveau d'un gène à partir du moment où il a trouvé un ARN interférent.
- Régulation de ces propres séquences : on pense que, en plus de la lutte contre ces parasites génomiques, la cellule a également utilisé le mécanisme d'ARN interférents pour la régulation de ses propres séquences.

Applications de la transgénése

- Exprimer des protéines étrangères, généralement étiquetées par un épitope ou par un fluorochrome (GFP) par intégration au hasard ou ciblée pour :
 - Étudier la localisation et la dynamique de la protéine dans la cellule.
 - Purification de complexes (immunoprécipitation), pour récupérer notre protéine d'intérêt et toutes celles qui sont en interaction avec elle dans la cellule (grâce à notre épitope contre lequel on dirige notre anticorps) et qu'on ne connaît pas forcément.
 - Étudier des domaines d'une protéine : Pour voir quelles sont les parties intéressantes, et à quoi sert chaque petit bout de la protéine : si j'enlève un bout vais-je perdre ma fonction protéique ? Si on remet cette partie vais-je restaurer la fonction protéique totalement ou non ? partiellement ?
- Inactiver un gène :
 - Par Knock-down (KD) = l'utilisation de l'ARN interférents (siRNA) pour diminuer l'expression d'un gène (on ne bloque jamais totalement l'expression par cette technique-là).
 - Par Knock-Out (KO) = En remplaçant le gène endogène par un gène inactif (intégration ciblée) : le gène est invalidé complètement ou KO. On veut tuer l'expression du gène X, j'y intègre une cassette composée de : 2 séquences homologues aux séquences entourant le gène cible avec au milieu non pas la réelle séquence du gène mais un codon stop et un gène de résistance à la puromycine. La protéine sera alors non fonctionnelle et on aura l'expression du gène de résistance pour pouvoir sélectionner spécifiquement les cellules qui ont intégré la cassette et donc le KO.

→ Créer des animaux transgéniques.

Exemple de transgénèse par micro injection dans un zygote de souris :

1. On purifie notre ADNc éventuellement tagué à la GFP.
2. On micro-injecte directement dans un oeuf fertilisé de souris.
3. On remet les oeufs dans l'utérus d'une mère porteuse.
4. La descendance : on s'aperçoit qu'environ 10 à 30% des souris générées vont exprimer le transgène, ce sont les souris transgéniques, cette expression peut-être sur tout l'animal ou partiel.

N.B : On effectue souvent les transgénèses chez la souris car il s'agit de l'espèce la plus rentable, il y a seulement 5% de rentabilité mais c'est déjà beaucoup mieux que les autres espèces (cochon, mouton, vache, chèvre) pour lesquelles on a moins d'1% de rentabilité.

→ Après l'intégration, tout n'est pas encore gagné : on peut encore avoir des problèmes d'expression du transgène, qui sont souvent imprévisibles. Dans la lignée d'animaux transgéniques obtenus, le niveau d'expression du transgène n'est pas forcément le même. Donc lorsqu'on génère des animaux transgéniques il faut vérifier que tous ces paramètres-là sont corrects par rapport à ce qu'on voulait, cela ne doit pas fausser l'étude.

On peut avoir :

- Une variabilité d'expression : c'est-à-dire, un niveau d'expression variable d'un animal à l'autre.
- Une spécificité tissulaire de l'expression qui est parfois non contrôlable. Même si on fait en sorte qu'un gène soit exprimé par un promoteur particulier dans un tissu bien spécifique il peut arriver que l'expression ait également lieu au niveau d'un autre tissu qui n'était pas forcément ciblé.
- Une bigarrure d'expression : c'est-à-dire qu'au sein d'un tissu ciblé on peut avoir des cellules qui expriment et d'autres pas du tout.

Ces problèmes peuvent avoir pour cause :

→ Nombres de copies intégrées du gène : l'intégration est rare mais lorsqu'elle a lieu, on va souvent intégrer de nombreux transgènes et du coup les niveaux d'expression sont extrêmement hauts. Souvent les copies s'intègrent en tandem dans le génome, c'est-à-dire qu'elles arrivent avec de nombreuses répétitions à la suite. La cellule aura ainsi l'impression qu'elle se fait envahir par un parasite génomique (virus, transposon...) et va donc bloquer l'expression par la formation d'hétérochromatine.

→ Sites d'insertion dans les chromosomes : comme souvent les insertions se font au hasard, le problème c'est que vous ne tombez jamais au même endroit et donc le contexte de la chromatine n'est jamais exactement le même. Les gènes peuvent tomber dans un endroit où ils ne vont pas du tout être exprimés, être réprimés immédiatement ; et parfois ils peuvent tomber dans un endroit où ils vont pouvoir s'exprimer.

3) Transgénèse à partir de cellules souches embryonnaires (ES) : intégration ciblée d'un gène chez la souris (KO)

Dans ce cas on veut avoir un KO, il est plus simple de passer par des cellules souches embryonnaires.

- On leur introduit le transgène, puis on sélectionne la cellule qui aura véritablement intégré l'inactivation (c'est plus efficace pour avoir un animal transgénique, c'est nous qui sélectionnons la cellule telle qu'on la veut).
- L'intérêt de ces cellules ES c'est qu'on peut les micro injecter dans un blastocyste. On obtient une souris mosaïque puisque ces cellules ES vont être programmées comme les autres cellules et dispersés dans la souris : on aura ainsi un mélange de cellules portant le transgène et de cellules qui ne le portent pas (mosaïque).
- Mais du coup l'animal n'est pas complètement transgénique, il faudra passer par 3 étapes supplémentaires pour y parvenir :
 1. On veut trouver parmi les souris mosaïques, une souris qui aura l'expression d'un transgène au niveau de ses cellules germinales : les gamètes seront eux complètement transgéniques.
 2. On croise la souris mosaïque qui exprime des gamètes totalement transgéniques avec une souris sauvage première génération : on obtient 50 % de souris homozygote sauvage et 50 % hétérozygotes.
 3. On croise les hétérozygotes entre eux ; on obtient une deuxième génération :
 - 25 % homozygotes sauvages,
 - 25% homozygotes mutés (totalement transgéniques),
 - 50% de souris hétérozygotes.

Les remplacements ciblés :

- KO (Knock-Out) : Invalider un gène, plus aucune expression fonctionnelle en insérant un gène de sélection à la place du gène d'origine (vu juste avant).
- KI (Knock-In) : Tracer l'expression d'un gène ou introduire une mutation ponctuelle. L'avantage, la façon dont ça s'exprime sera strictement la même que pour le gène endogène.

(Rappel : le KD se fait également de façon ciblée par le système ARN interférant)

Pour le KI, la finalité est un peu différente que pour le KO, vous voulez quand même que le gène s'exprime pour pouvoir tracer son expression ou tracer son produit. On insère une cassette avec un gène rapporteur ou une version mutée du gène et un gène de sélection. Pour éviter de faire une transgénèse qui va s'insérer n'importe où, on rajoute un promoteur pour insérer les choses directement dans le contexte de la cellule. On aura ainsi une expression qui aura le même niveau que le niveau naturel, qui va avoir aussi la même répartition dans les tissus que la répartition naturelle.

- Exemple de KI du gène HoxB8 avec LacZ :

On a rentré le gène LacZ de la B-galactosidase dans le site spécifique de HoxB8. On va marquer au X-gal spécifiquement les zones où s'exprime LacZ et donc où s'exprime HoxB8, puisque ce composé devient bleu sous l'action des B-galactosidase. On peut ainsi étudier l'expression d'HoxB8 au cours du développement. Grâce à ça on a pu déterminer que HoxB8 s'exprime dans le tube neural et les somites du rat et de la souris, avec une frontière antérieure au niveau de la 7ème pré-vertèbre de l'embryon.

→ Donc le KI permet de déterminer le profil d'expression naturel d'un gène au cours du développement.

Le KO se fait obligatoirement en homozygote. Chez l'homozygote KO de HoxB8 on voit que les deux premières côtes T1 et T2 sont fusionnées. Manifestement, un des défauts de développement lié à l'invalidation de HoxB8 intervient dans tout ça. Donc le KO permet aussi de déterminer le rôle d'un gène au niveau d'un organisme.

Résumé sur les différents types de transgénèse (KD, KI, KO) :

- Vous pouvez étudier votre gène sauvage dans son contexte sans modification.
- Vous pouvez insérer votre transgène X avec une insertion non ciblée et un promoteur hétérologue (pas le promoteur naturel). Quand vous faites une transgénèse d'un gène X, vous aurez toujours une expression d'un niveau différent du niveau naturel : expression ectopique, surexpression...
- Si au contraire vous ne voulez pas qu'un gène s'exprime, vous avez la technique du knock-down (KD) donc l'utilisation de l'ARN interférent qui diminue fortement l'expression mais pas complètement. Si vous voulez aller vers une invalidation complète du gène, il faut tuer le gène endogène (KO) pour être sûr qu'il ne s'exprime plus.
- Vous pouvez également faire un knock-in (KI) avec une insertion ciblée, vous avez toujours l'expression « normale » et physiologique de votre transgène avec votre gène d'intérêt et vous pouvez étudier le niveau d'expression de votre gène d'intérêt avec le gène rapporteur (GFP, LacZ), faire des modèles de maladie génétique, ou tout simplement ajouter un tag pour suivre la protéine dans son expression naturelle.
- Il y a aussi le knock-out (KO) qui permet, par une insertion ciblée, d'inhiber complètement l'expression d'un gène.

Récap' des types de transgénèse

