

Approfondissement

- Méthodologie -


I – Obtention des cellules

II – Culture des cellules

III – Analyse du contenu cellulaire

**IV – Analyse des
compositions moléculaires**

V – Analyse génétique



theBiO
CELL
THEORY

III – Analyse du contenu cellulaire

A – Lyse des cellules

Lyse cellulaire : libération du contenu cellulaire dans un tube à essai.

Il existe différentes techniques de lyse :

- Sonication
- Choc osmotique
- Détergents
- Frottements

III – Analyse du contenu cellulaire

B – La fragmentation

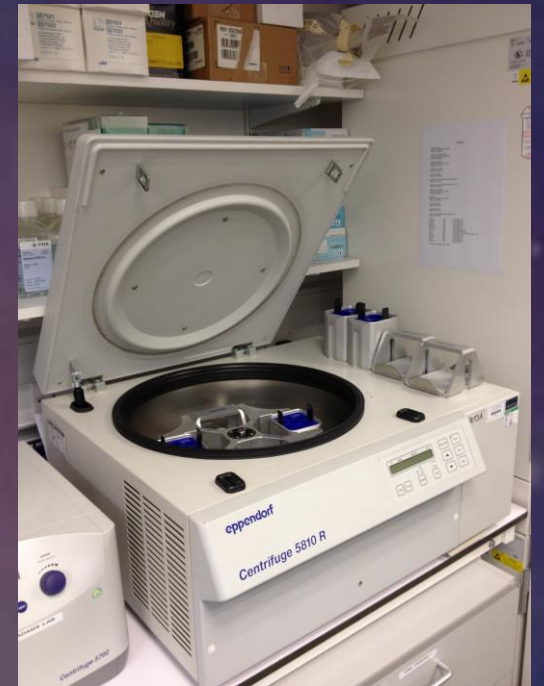
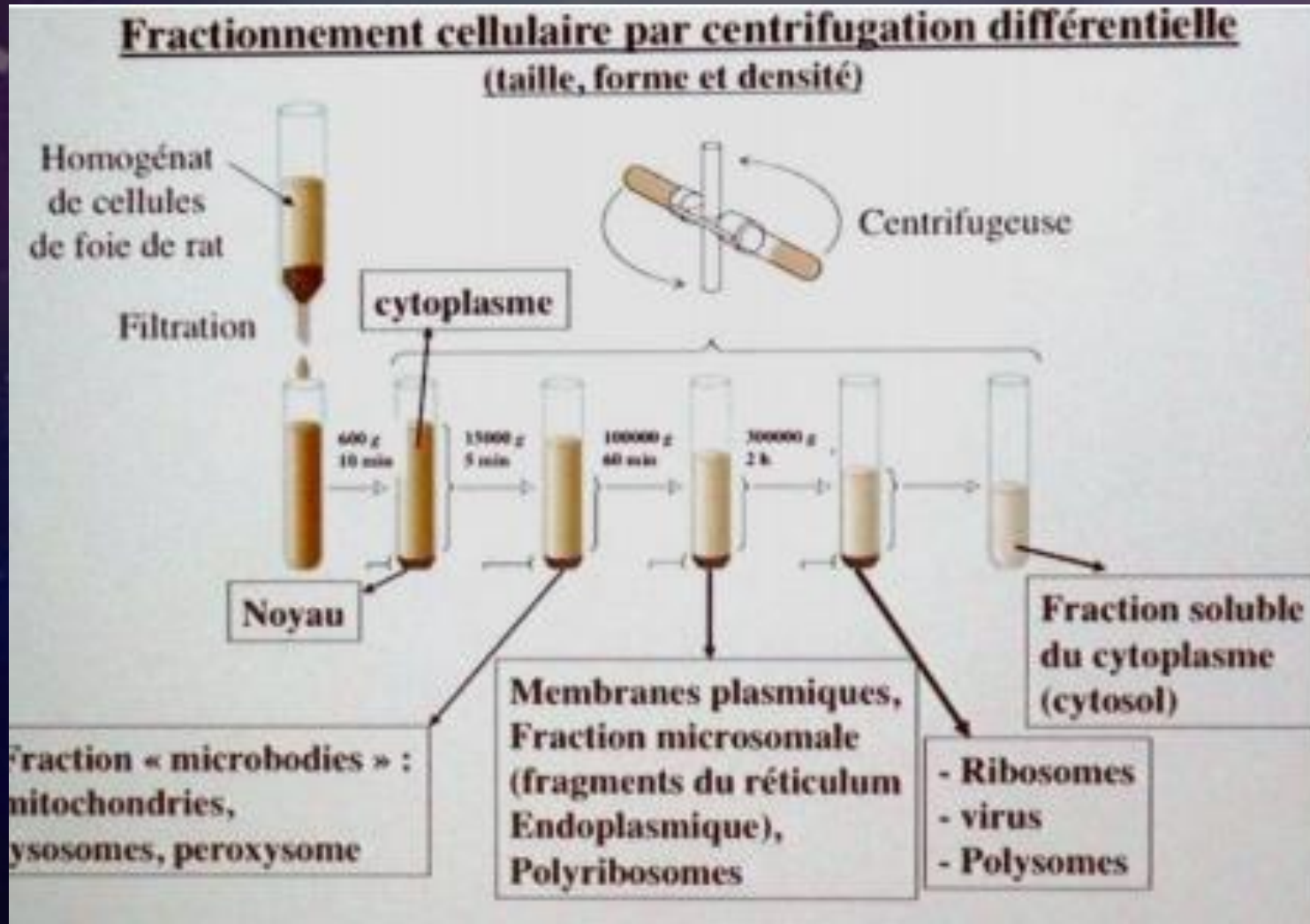
Fragmentation : Séparation des différents constituants de la cellule.

- ✓ Filtrer les différents débris
- ✓ Centrifuger le contenu cellulaire
- ✓ La chromatographie / électrophorèse pour séparer les protéines de l'ADN

1) La centrifugation différentielle

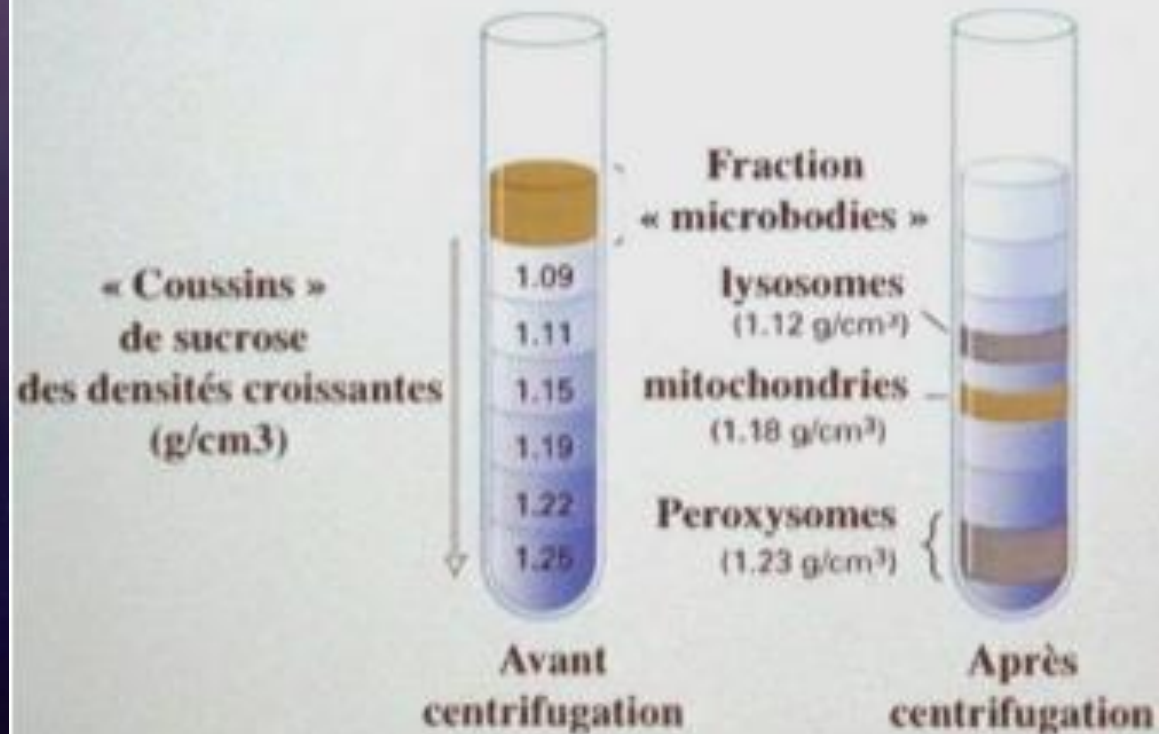
2) La centrifugation isopycnique

1) La centrifugation différentielle



2) La centrifugation isopycniq

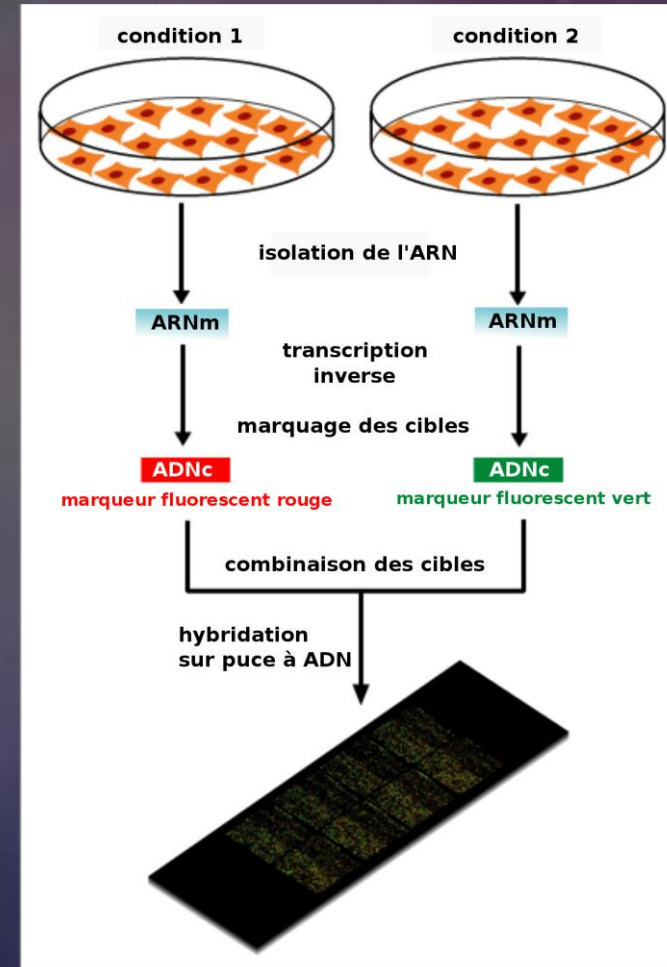
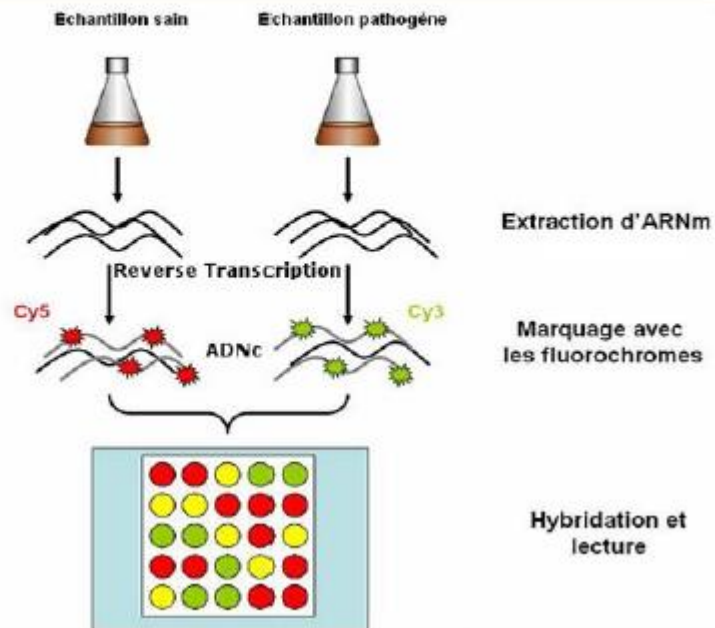
Séparation de la fraction "microbodies" par centrifugation à l'équilibre en gradient de densité (ou isopycniq)



IV – Analyse des compositions moléculaires

A – La puce à ADN

Les Puces à ADN



IV – Analyse des compositions moléculaires

B – Le séquençage (génomique et transcriptome)

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.

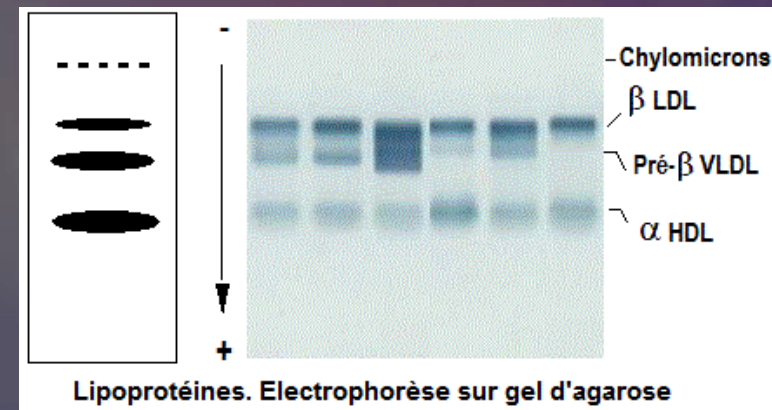
Avec des logiciels spéciaux on pourra en plus déterminer tous les variants d'épissages et donc « avoir une vision beaucoup plus complète de la réponse transcriptionnelle ».

IV – Analyse des compositions moléculaires

C – Chromatographie / Électrophorèse et Spectrométrie de masse (protéome)

Électrophorèse :

- ✓ Migration selon la taille uniquement
- ✓ Électrophorèse bidimensionnelle (taille + pHi)

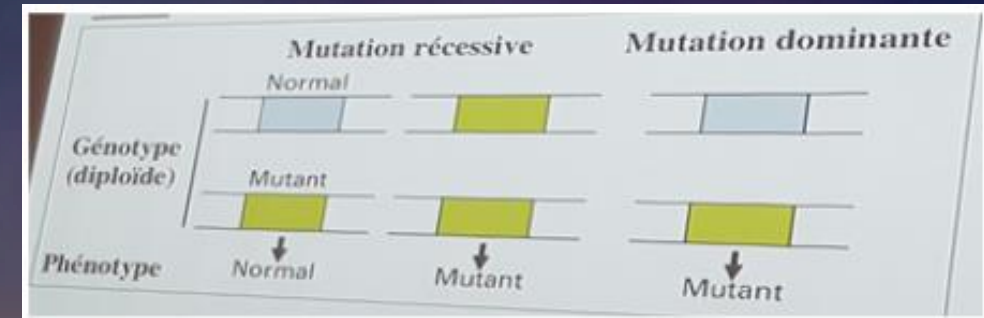


Spectrométrie de masse :

- ✓ Analyse du rapport masse/charge
- ✓ Comparaison avec une banque de données des ratios

V – Analyse génétique

A – Notion de mutation



- 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 même 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 => le gène est considéré comme homozygote.
 - Et un allèle qui pris seul induirait un problème => le gène est considéré comme hétérozygote.

V – Analyse génétique

B – La complémentation

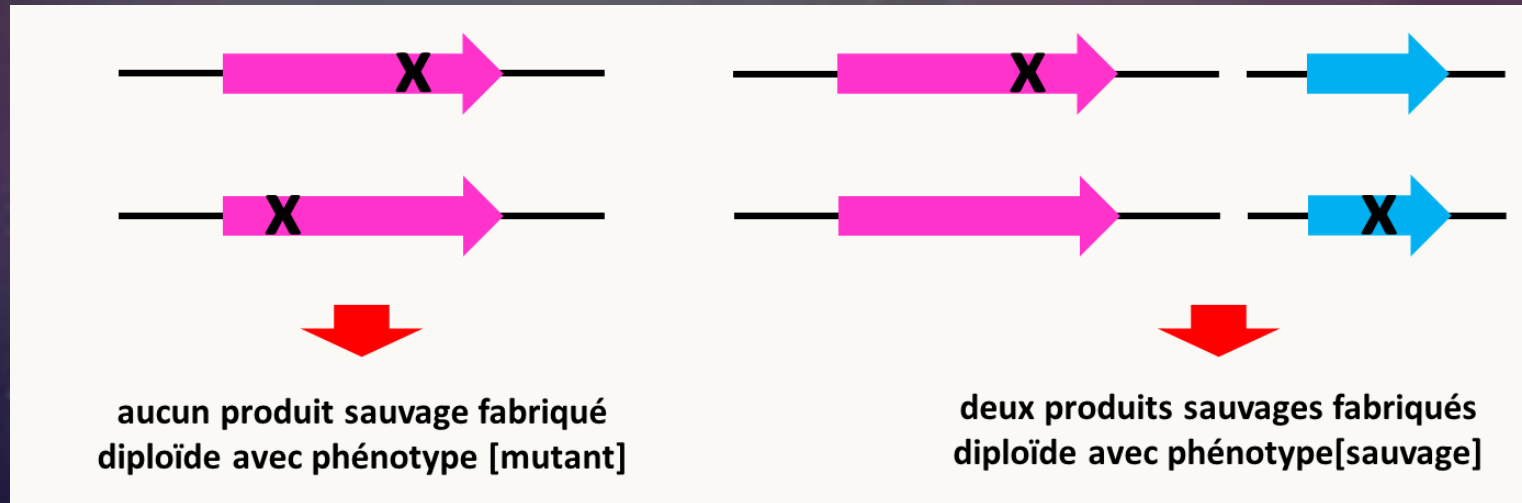
- Complémentation : habileté à une fonction combinant la même cellule deux gènes dont au moins un est muté.
- Test de récessivité : restauration du phénotype sauvage par introduction dans une cellule du gène sauvage.
- Test de complémentation : vise à établir l'allélisme deux mutations récessives.

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 → il y a eu **complémentation** → les deux mutations appartiennent à deux groupes de complémentation séparés (ils ne sont pas allèles).
- Phénotype muté : signifie que les deux gènes ont la même mutation → ils ne se complémentent pas → les deux mutations appartiennent au même groupe de complémentation (ils sont allèles).

V – Analyse génétique

B – La complémentation



Il y a complémentation entre deux mutations si les deux mutations appartiennent à deux groupes distincts de complémentation

→ Chaque groupe de complémentation correspond à un gène distinct

Phénotype Sauvage → Suggère → mutations ont lieu sur des gènes Séparés (différents) → Groupes de complémentation Séparés +++

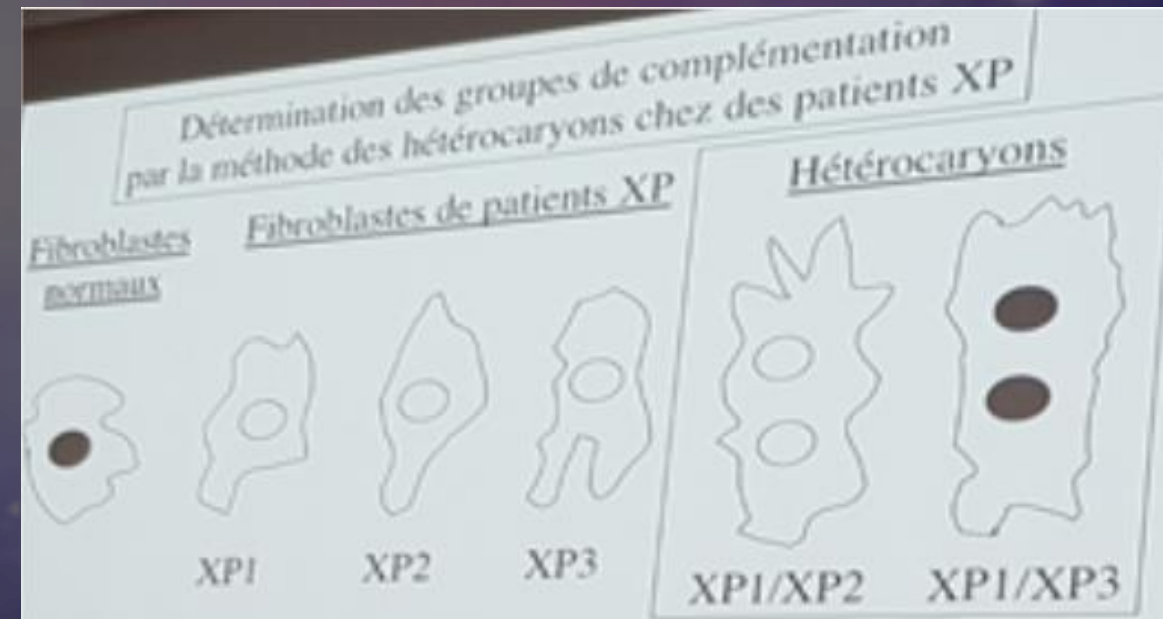
Phénotype Muté → déMontre → mutations ont lieu sur le Même gène → Même groupe de complémentation +++

V – Analyse génétique

B – La complémentation en pratique

Utilisé lorsque l'on a plusieurs patients atteints d'une maladie génétique (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. 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 -> probablement pas allèles.



V – Analyse génétique

B – La complémentation en pratique

On récupère des cellules cancéreuses chez 6 patients (cellules C1, C2, C3, C4, C5, C6) et des cellules saines chez un individu qui n'a pas de cancer (cellules S1). On souhaite savoir si les cellules cancéreuses sont mutées au niveau de CDC25C. Pour le savoir, on croise ces cellules entre elles. On est capable grâce à des marqueurs de reconnaître les cellules mutées au niveau du gène CDC25C (phénotype muté).

+ : phénotype **sauvage**

- : phénotype **muté**

	S1	C1	C2	C3	C4	C5	C6
S1	+	+	+	+	+	+	+
C1		-	+	+	-	+	+
C2			-	+	+	+	+
C3				-	+	-	-
C4					-	+	+
C5						-	-
C6							-

V – Analyse génétique

B – La complémentation en pratique

On récupère des cellules cancéreuses chez 6 patients (cellules C1, C2, C3, C4, C5, C6) et des cellules saines chez un individu qui n'a pas de cancer (cellules S1). On souhaite savoir si les cellules cancéreuses sont mutées au niveau de CDC25C. Pour le savoir, on croise ces cellules entre elles. On est capable grâce à des marqueurs de reconnaître les cellules mutées au niveau du gène CDC25C (phénotype muté).

+ : phénotype **sauvage**
- : phénotype **muté**

	S1	C1	C2	C3	C4	C5	C6
S1	+	+	+	+	+	+	+
C1		-	+	+	-	+	+
C2			-	+	+	+	+
C3				-	+	-	-
C4					-	+	+
C5						-	-
C6							-

A propos du tableau de complémentation ci-contre, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :

- A) C3 et C4 complémentent
- B) On démontre que C2 n'est pas muté au niveau du même gène que C1
- C) C3, C5 et C6 sont dans le même groupe de complémentation
- D) On retrouve 2 groupes de complémentation
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

V – Analyse génétique

B – La complémentation en pratique

On récupère des cellules cancéreuses chez 6 patients (cellules C1, C2, C3, C4, C5, C6) et des cellules saines chez un individu qui n'a pas de cancer (cellules S1). On souhaite savoir si les cellules cancéreuses sont mutées au niveau de CDC25C. Pour le savoir, on croise ces cellules entre elles. On est capable grâce à des marqueurs de reconnaître les cellules mutées au niveau du gène CDC25C (phénotype muté).

+ : phénotype **sauvage**
- : phénotype **muté**

	S1	C1	C2	C3	C4	C5	C6
S1	+	+	+	+	+	+	+
C1		-	+	+	-	+	+
C2			-	+	+	+	+
C3				-	+	-	-
C4					-	+	+
C5						-	-
C6							-

A propos du tableau de complémentation ci-contre, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :

- A) C3 et C4 complémentent
- B) On démontre que C2 n'est pas muté au niveau du même gène que C1
- C) C3, C5 et C6 sont dans le même groupe de complémentation
- D) On retrouve 2 groupes de complémentation
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

Phénotype **Sauvage** → **S**uggère → mutations ont lieu sur des gènes **S**éparés (différents) → Groupes de complémentation **S**éparés +++

Phénotype **Muté** → **déM**ontre → mutations ont lieu sur le **M**ême gène → **M**ême groupe de complémentation +++

V – Analyse génétique

C – Exemples de mutations CDC

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.

Identifier les 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.

V – Analyse génétique

D – Notion de transgénèse

1) Notion d'intégration

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

- ✓ 1ère possibilité : L'expression transitoire
 - ADN dans le noyau mais n'est pas intégrée dans les chromosomes (grande majorité des cas)
 - Expression possible (transcription et traduction) pendant une courte période
 - Perdu progressivement après quelques divisions -> étude de l'expression du gène seulement pendant quelques jours (entre 24 et 96 heures)

- ✓ 2ème possibilité : L'expression permanente
 - Le transgène s'intègre dans le génome par recombinaison + maintenu même après plusieurs divisions, on parle de lignée stable (cas rares)
 - 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.
 - 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.

V – Analyse génétique

D – Notion de transgenèse

2) ARN interférent

Principe : 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 messenger qui est normalement exprimé par la cellule va entraîner la dégradation de cet ARNm par la suite.

Avantages :

- 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 gène.
- 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).

V – Analyse génétique

D – Notion de transgenèse

2) ARN interférent

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

- Lutte contre les virus, parasites du génome
- Répression des transposons
- La formation de l'hétérochromatine
- Régulation de ces propres séquences

Applications de la transgenèse

- Exprimer des protéines étrangères, généralement étiquetées par un épitope ou par un fluorochrome (GFP) par intégration au hasard ou ciblé
- Inactiver un gène (KD et KO)
- Créer des animaux transgéniques

- 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.

V – Analyse génétique

D – Notion de transgénèse

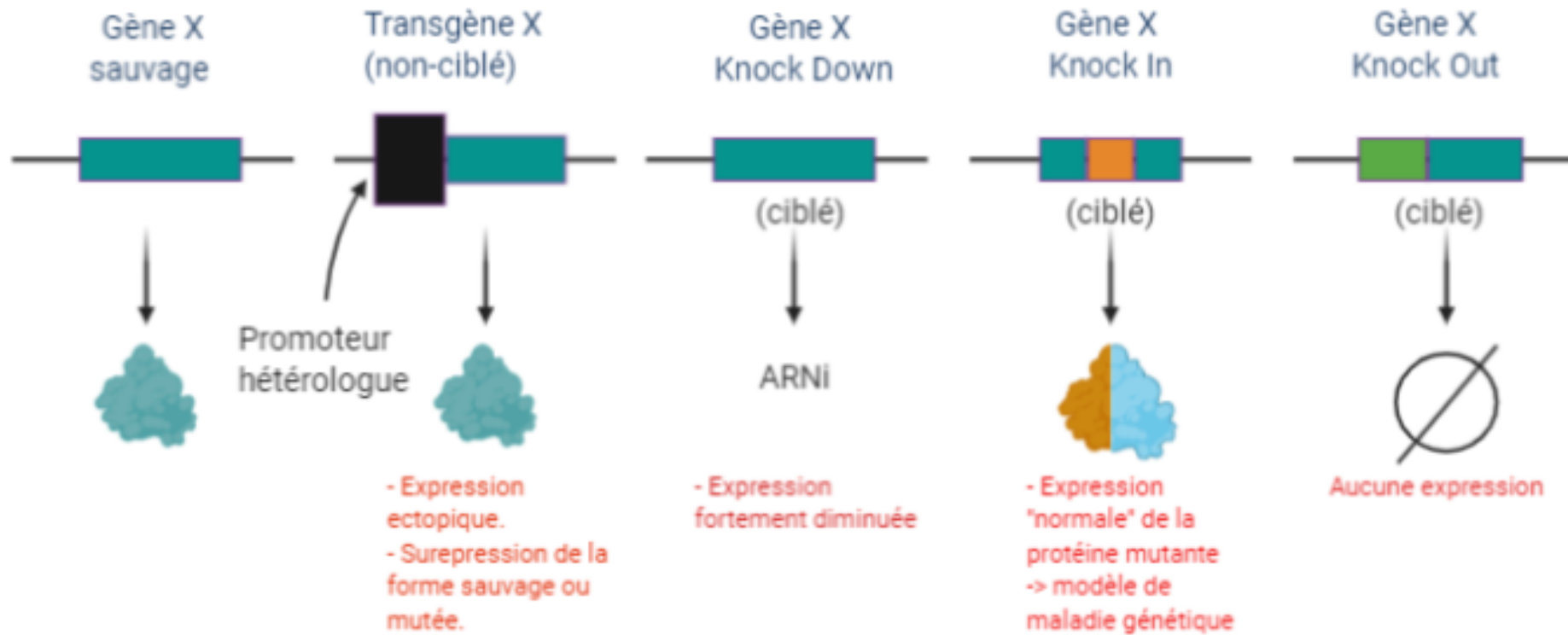
Les différents types de transgénèse (KD, KI, KO) :

- ✓ 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...
- ✓ Knock-down (KD) : 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.
- ✓ 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.
- ✓ Knock-out (KO) qui permet, par une insertion ciblée, d'inhiber complètement l'expression d'un gène.

V – Analyse génétique

D – Notion de transgénèse

Récap' des types de transgénèse





the BIG

CELL

THEORY

THE END