



Méthodes d'études de la cellule 3

II. Manipulation des cellules

1) Obtention des cellules

a) Dissociation

Pour avoir des cellules, il faut partir d'un tissu et il faut donc le **dissocier** pour les obtenir.

Attention un tissu ce n'est pas forcément un seul type cellulaire, ça peut être plusieurs types mêlés.

Si ce sont des cellules à obtenir sur un **prélèvement sanguin**, c'est facile, les cellules sont **libres** dans le sang circulant et sont ainsi déjà dissociées.

En revanche dans les autres tissus (épithélia, muscles...), c'est plus compliqué. Il faut vraiment dissoudre et éliminer la **matrice extracellulaire** et les **contacts** entre les cellules (on perd donc cette information histologique). Dans ce but, on peut utiliser des **protéases** comme la trypsine ou de l'EDTA qui est un chélateur du calcium. On peut ainsi avoir des procédés **mécaniques** comme une légère agitation. Il est également possible de combiner des actions enzymatiques, chimiques et mécaniques. Cela dépend du tissu étudié.

b) Séparation

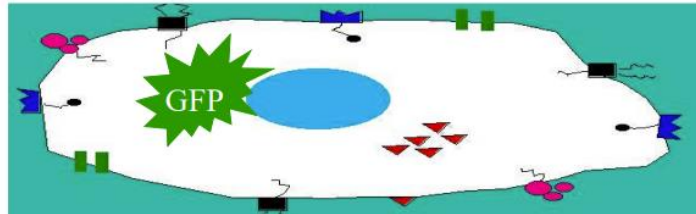
Les cellules étant maintenant dissociées, il est nécessaire d'**isoler** celles que l'on souhaite étudier.

Il y'a différentes techniques en fonction du type de cellule et des observations ou expérimentations que l'on souhaite réaliser pour séparer les différents types cellulaires :

- Selon leur propriétés **physiques** (taille et forme), c'est le cas de la centrifugation à basse vitesse
- Selon leurs **propriétés d'adhésion** sur plastique ou lame de verre (les fibroblastes adhèrent très facilement sur le plastique).
→ Ce sont des méthodes **peu spécifiques**
- Des **méthodes moléculaires** basées sur la reconnaissance de molécules à la surface des cellules : purification sur support ou cytométrie de flux.
→ Ce sont des méthodes plus **spécifiques** de choix pour séparer de manière précise les cellules. Quand on va vers la spécificité en biologie on va vers le moléculaire.

Les méthodes moléculaires sont basées sur des propriétés distinctives des cellules :

- antigènes de surface (**molécules d'adhésion** ou récepteurs **sensoriels** et métaboliques
- molécules fluorescentes (GFP)



- La purification sur support

Il en existe deux types en fonction de la façon dont on va procéder.

Il faut avoir un déterminant moléculaire (protéine, lipide...) spécifique du type cellulaire qui nous intéresse et pas sur les autres :

Soit il existe naturellement : il est créé par la cellule comme les protéines qui sont à la surface de cellules (ex : antigènes de surface, molécules d'adhésion, récepteurs...) ou encore des lipides.

Ou alors, vous pouvez introduire une molécule particulière qui va nous permettre de trier nos cellules (ex : la GFP, un marqueur de surface dont vous allez forcer l'expression)

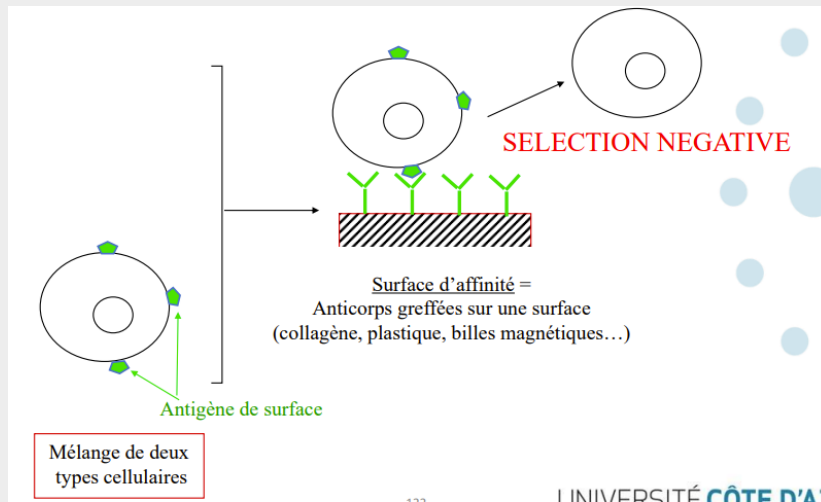
Dans tous les cas, que ce soit sur les antigènes de surface naturels ou des marqueurs « artificiels », le principe de séparation sur support est le même.

Imaginons un mélange de deux types de cellules que l'on souhaite séparer. Un de ces deux types a un certain type d'antigène à sa surface pour lequel on a des anticorps.

On a un support solide, peu importe sa composition (plastique, billes magnétiques, collagène...), sur lequel vont être greffés des anticorps qui vont reconnaître l'antigène de surface de l'un des types de cellule.

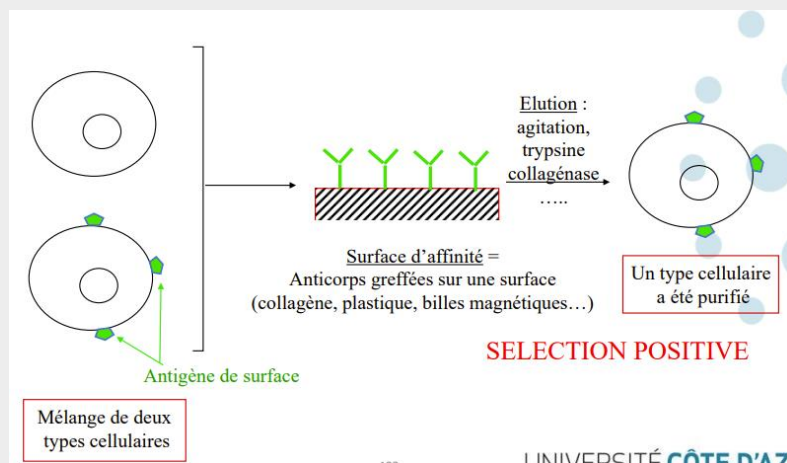
C'est à partir de là que l'on peut à partir du même dispositif expérimental employer deux façons de faire différentes : en positif ou en négatif.

- En **sélection négative**, on met en contact le mélange de cellules avec le support. Evidemment, l'anticorps va s'associer aux cellules qui ont l'antigène par des liaisons non covalentes et pas aux autres. Les cellules étant séparées, on va récupérer celles qui ne se sont **pas attachées au support**.



→ On trie ce qui **n'adhère pas** : sélection NEGATIVE

- En sélection **positive**, on réalise les mêmes étapes mais on récupère les cellules présentes **sur le support**. On a donc un type cellulaire qui a été purifié.



→ On trie ce qui **adhère** = sélection POSITIVE

Quelle est la méthode la plus adéquate pour étudier la fonction des cellules ? C'est la sélection **négative**. En effet une cellule n'est **pas indifférente** à un antigène reconnu par un anticorps (#signalisation cellulaire).

Quand une protéine de surface est reconnue par un anticorps, cela peut entraîner une information à l'intérieur de la cellule. Le fait d'adhérer sur ce support, qui reste artificiel, va modifier l'état de la cellule qui nous intéresse. La technique de choix pour purifier une cellule la plus native possible, c'est la **sélection négative**.

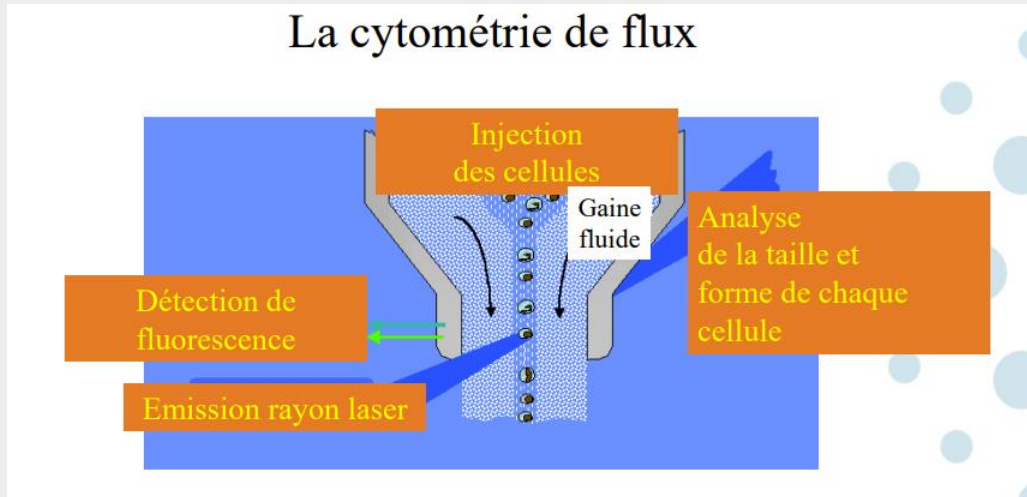
- La cytométrie de flux

Cette autre technique est centrale en biologie et en médecine.

Une fois les cellules dissociées et en suspension, on les dépose dans un appareil qui va les injecter dans un petit canal qui a le diamètre d'une cellule et n'en laisse passer qu'une à la fois dans un flux (cyto = cellule, métrie = mesure et en flux).

Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

La cytométrie de flux

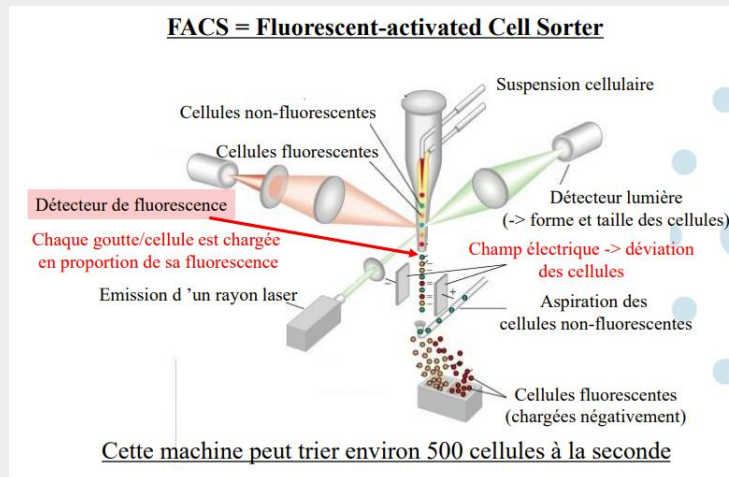


Les cellules vont donc passer une à une dans ce petit canal, et en passant elles vont rencontrer un certain nombre d'appareil de mesures de la taille et la forme des cellules, voire même une lumière d'émission et un système de détection permettant de repérer la fluorescence émise par chacune des cellules.

Principes :

- Les cellules triées sont souvent **fluorescentes** (association avec des anticorps greffés à un fluorochrome, cellule exprimant la GFP...)
- Les cellules doivent être en **suspension** (cellules du sang circulant, cellules de tissus après destruction protéolytique de la matrice extracellulaire et des contacts « cellule-cellule » ...)
- Permet la mesure de la **quantité d'ADN** après traitement des cellules à un colorant fluorescent de l'ADN
- Permet la mesure simultanée de la **taille et de la forme** des cellules par diffraction de rayons lumineux
- Cytométrie **analytique** = mesure des **propriétés** des cellules en flux, mais on ne les trie pas vraiment
- Cytométrie de **séparation** = technique de séparation/tri des cellules en flux (**FACS** = Fluorescent-Activated Cell Sorter)

Zoom sur la cytométrie de séparation (FACS) :



- C'est toujours un cytomètre de flux mais plus sophistiqué. On retrouve le principe précédent avec un **détecteur de fluorescence**.

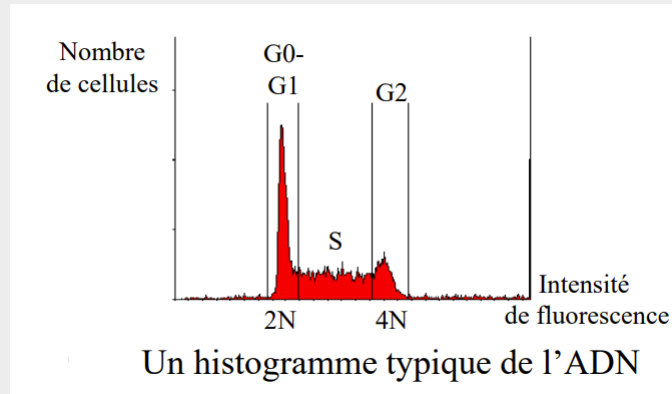
Chaque goutte contenant une cellule est chargée en **fonction de sa fluorescence** par des ions **chargés négativement**.

Un champ électrique dévie plus ou moins les cellules en fonction de leur charge et donc de leur fluorescence. Il suffira pour l'appareil de récupérer les cellules plus ou moins déviées et donc de les trier en fonction de la fluorescence. On est ainsi capables de trier **500 cellules par seconde**.

Il peut y'avoir **simultanément** plusieurs détecteurs de fluorescence et donc plusieurs marquages pour trier les cellules (jusqu'à 10-15 couleurs différentes).

Principales applications de la cytométrie de flux :

- **Numération** de cellules en suspension (suivant leur morphologie ou leur fluorescence)
- Déterminer le pourcentage de cellules **mortes et vivantes**
- Evaluer des **paramètres cellulaires** (forme, fluorescence...) en traitant de 10 000 à 1 000 000 cellules par minutes.
- **Trier** des cellules (FACS)
- Déterminer la **quantité d'ADN** → analyse du cycle cellulaire : il s'agit de l'une des applications les plus anciennes et toujours très utilisée de la cytométrie basée sur la quantification de l'ADN. On ajoute un agent fluorescent induit par l'ADN (bromure d'éthidium, Hoechst, DAPI...). Le cytomètre va mesurer la quantité d'ADN. En phase G1, il va y'avoir une quantité 2n d'ADN (chez la cellule diploïde) et au passage à la phase S et G2 la quantité d'ADN va doubler à 4n. La fluorescence augmente donc selon l'axe des abscisses.



Vous avez donc 2 fluorochromes qui sont principalement utilisés : l'hoescht et l'iodure de propidium.

Il y a une grande différence entre les 2 (revu plus tard) et ils sont utilisés pour des variantes de cette technique :

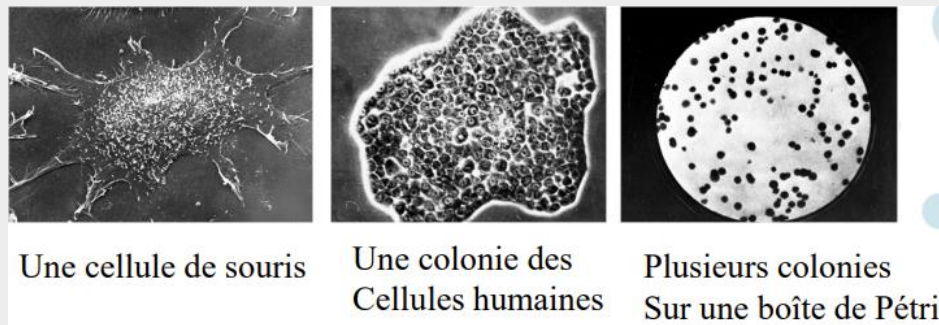
- L'iodure de propidium nécessite la perméabilisation de la membrane de la cellule : il va falloir utiliser un autre agent chimique pour faire des trous pour que l'iodure de propidium pénètre à l'intérieur.
- L'hoescht permet de rentrer directement, spontanément dans la cellule : il ne nécessite pas de perméabilisation. C'est une technique différentielle qui permet de voir l'état des cellules.

Iodure = perméabilisation / Hoescht = PAS de perméabilisation préalable +++++

Nous avons isolé les cellules, nous les avons triées, nous avons commencé à les analyser en fonction de leur composition moléculaire, mais ce n'est pas assez pour faire des expériences visant à mieux comprendre leur fonctionnement. Il faut maintenant les faire vivre en laboratoire, les cultiver.

2) Culture des cellules

Ce n'est pas forcément facile de cultiver des cellules : ce n'est pas immédiat. Il y'a des cellules qui ne se cultivent pas, il faut prendre des précautions particulières. Le plus souvent, les bactéries sont plus simples à cultiver puisqu'il suffit de les nourrir sur une boîte de Pétri pour qu'elles poussent sur la gélose. Cela reste néanmoins important de les cultiver pour les étudier.



Une cellule de souris

Une colonie des
Cellules humaines

Plusieurs colonies
Sur une boîte de Pétri

Avantages	Inconvénients
<p>Les cellules sont en plus grande quantité donc il y'aura plus de matériel pour les analyser</p> <p>Plus homogène que le contenu cellulaire d'un tissu</p> <p>Les conditions expérimentales sont contrôlées (traitement, température...)</p> <p>On peut isoler une cellule unique et la laisser se diviser pour former un clone génétiquement homogène</p>	<p>Le fonctionnement cellulaire est étudié en dehors de son contexte cellulaire</p> <p>On peut sélectionner des mutants/variants sans facilement le contrôler</p>

Une grosse différence entre une bactérie et une cellule animale, c'est que la bactérie va se diviser **par défaut** si elle a de quoi se nourrir.

Une cellule ne se **divisera pas** par défaut. Il lui faut de quoi manger mais il lui faut aussi des **signaux** qui vont lui donner l'ordre de se diviser.

Ce sont des molécules de signalisation (que l'on reverra dans les cours sur la transduction du signal et du cycle cellulaire).

Chaque cellule a ses propres ordres, mais pour la culture de tous les jours, on va utiliser un cocktail de facteurs de croissance présent dans du **sérum** (de veau foetal le plus souvent), ainsi que des acides aminés essentiels, des vitamines, du sel et du glucose.

On part ainsi d'une seule cellule qui va se diviser, et on va obtenir des **colonies** qui poussent sur une surface solide (plastique des boîtes de Pétri).

En effet, pour réaliser une culture, on a besoin du support physique. On utilise la plupart du temps du plastique comme surface solide mais le milieu dans lequel on va faire la culture dépend de la cellule : le plastique ne convient donc pas à tous les types de cellules (elles n'aiment pas ça...). Pour ce type de cellules, on a retrouvé une astuce qui est d'ajouter un feeder c'est-à-dire qu'on va mettre une couche de cellules mortes entre nos cellules et le plastique.

On distingue différents types de cultures :

- Les cultures **primaires**

Elles sont établies à partir des tissus **dissociés** (biopsie). Certains types cellulaires sont plus faciles à cultiver que d'autres (le fibroblaste est le plus utilisé).

Même si elles ont tout ce qu'il faut pour se nourrir, les cellules en culture ne se divisent que **pour un nombre limité de fois** (environ **50** divisions). Ce phénomène sera étudié plus en détail dans le cours sénescence cellulaire.

Cela pose problème car si on ne fait que 50 divisions, ça limite l'étude à long terme d'un certain type cellulaire. Ainsi souvent en laboratoire, on étudie des lignées immortelles.

- Les lignées **immortelles**

Historiquement, ce sont les premières lignées qui ont été largement étudiées. Cependant on les étudie de moins en moins maintenant car elles sont régulièrement un peu plus déviantes de la réalité.

On les nomme immortelles car elles sont capables de se diviser « à l'infini » : certains variants sont devenus immortels et peuvent former des lignées.

On peut les obtenir à partir de situations pathologiques comme des **tumeurs**, spontanément ou après l'expression ectopique de la **téломérase** ou l'action d'agents mutagènes ou de virus.

Le taux d'immortalisation spontanée varie en fonction des espèces : il est **fréquent** chez la souris, très **rare** chez l'homme (heureusement : c'est l'une des étapes du cancer).

On a obtenu des cellules, on les a cultivées en grande quantité, on a imaginé des expériences...

Mais encore faut-il analyser le contenu cellulaire.

III. Analyses du contenu cellulaire

1) Lyse des cellules

La **lyse** des cellules signifie que l'on va casser les cellules et ainsi libérer le **contenu cellulaire** dans un tube à essai. La technique de lyse va varier selon le type de molécule que l'on veut étudier. On cherche à comprendre le rôle de chaque composant de la cellule qui dépend de la façon dont elle a été détruite.

La lyse va donc casser les membranes en vésicules et libérer les organites, donnant ainsi un extrait appelé homogénat. Il existe donc plusieurs techniques de lyse :

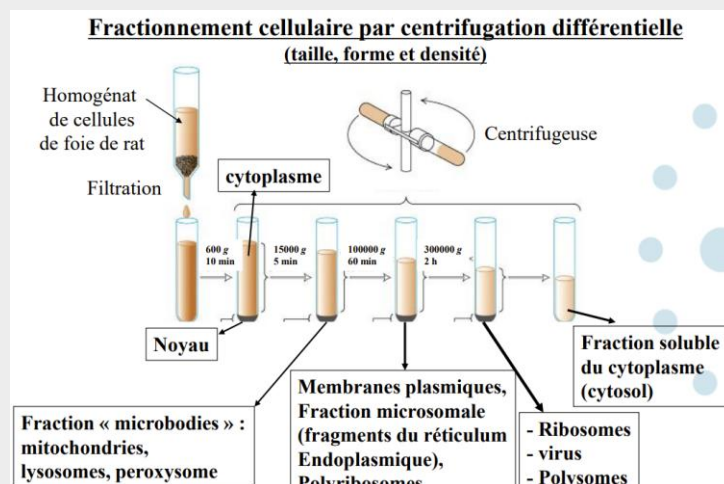
- Ultrasons (sonification)
- Choc osmotique (solution hypotonique #physio) *Vous voyez ça en physio mais en mettant des cellules dans une solution hypotonique il va y'avoir un flux d'eau vers le milieu intracellulaire qui va les faire « exploser ». Coucou Mammoniac*
- Détergents : plus ou moins forts, ils agissent sur les lipides et interagissent ainsi avec certains types de membranes
- Frottement (homogénéiseur avec piston de téflon)

2) Fractionnement et séparation de l'extrait cellulaire

On a obtenu un extrait de cellules, encore faut-il le **purifier**. Généralement, on le fait par :

- Filtration pour éliminer les gros débris
- Chromatographie et électrophorèse (protéines, acides nucléiques)
- Centrifugation (membranes, organites, complexes moléculaires)

La centrifugation est une technique de choix en biologie cellulaire. Le principe est simple, les éléments les plus gros sédimentent en premier.



Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

A partir de **100 000 g**, (g étant la constante d'accélération de la pesanteur $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$), on parle d'**ultracentrifugation**.

Etapes de la centrifugation différentielle :

Etape 1 : L'homogénat de la cellule est filtré afin d'obtenir une préparation **homogène** sans gros débris.

Etape 2 : On réalise une centrifugation basse vitesse (**600g**) pendant 10 minutes. On obtient dans le culot les **noyaux**. On récupère le surnageant correspondant au **cytoplasme**.

Etape 3 : On accélère la vitesse de centrifugation (**15 000g**) pendant 5 minutes. On obtient la fraction des **microbodies** qui contient les plus petits éléments membranaires de la cellule : mitochondries, lysosomes, peroxyosomes. On récupère de nouveau le surnageant.

Etape 4 : On accélère encore la vitesse (**100 000g**) pendant une heure. On obtient les débris de la **membrane plasmique**, la fraction **microsomale** (fragments du réticulum endoplasmique) et les **polyribosomes (chaînes de ribosomes sur une même protéine)**. On récupère encore le surnageant.

Etape 5 : On accélère encore la vitesse (**300 000g**). On récupère des **ribosomes**, des **virus** et d'autres **polysomes**.

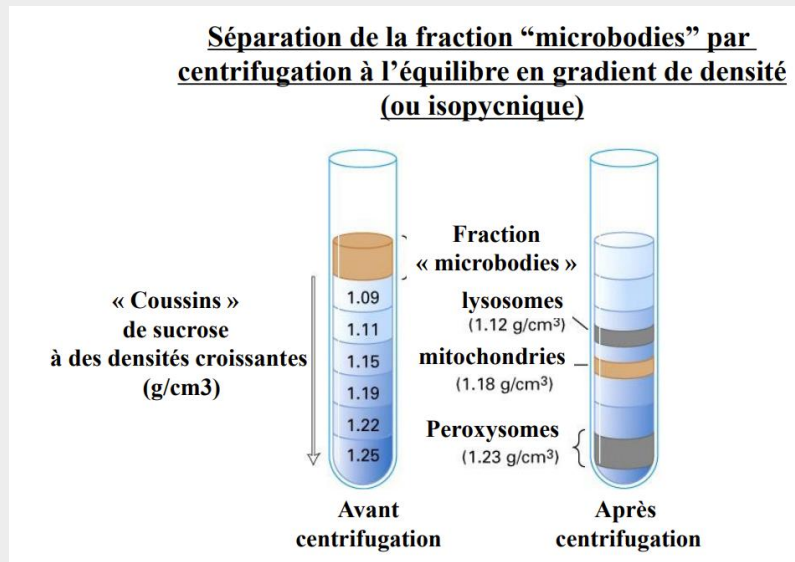
La fraction soluble restante s'appelle opérationnellement le **cytosol**.

On peut faire ensuite appel à une autre technique complémentaire appelée **centrifugation à l'équilibre en gradient de densité** ou centrifugation isopycnique.

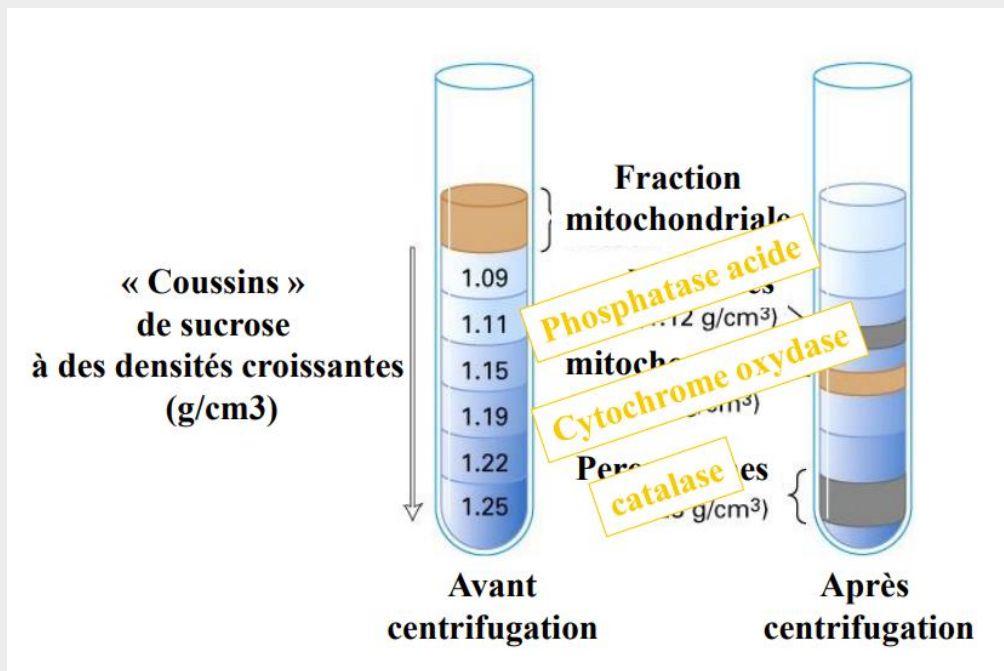
En effet les fractions obtenues par centrifugation différentielle ne sont pas encore complètement pures, on veut aller encore plus loin dans la séparation.

Avant même de centrifuger, on crée dans le tube de centrifugation un **gradient de densité** (ici grâce à des coussins de sucrose de densités croissantes). La densité augmente en allant vers le fond du tube.

Sur ce gradient, on dépose la fraction à étudier (par exemple la fraction microbodies) et on soumet le tube à une centrifugation. Ainsi, à l'équilibre les différents constituants de la fraction vont s'arrêter dans le milieu correspondant à leur propre densité les lysosomes, les mitochondries et les peroxyosomes.



Maintenant que l'on a séparé les constituants de la fraction selon leur densité, on peut étudier leurs **propriétés**, par exemple l'activité enzymatique.



De cette manière, on découvre que des enzymes sont associés à certains organites (catalase aux peroxyosomes, cytochrome oxydase aux mitochondries, phosphatase acide aux lysosomes) : on a une compartimentation enzymatique. (Prix Nobel de Médecine 1974).

3) Composition moléculaire : notions de génome, transcriptome et protéome

Une fois tous ces composants obtenus, on veut aller encore plus loin et analyser au niveau moléculaire.

Lorsqu'on obtient l'ensemble de certaines molécules d'une cellule, on appelle cela une omique et on ajoute le suffixe -ome à la molécule pour le décrire : l'ensemble des gènes

Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

s'appelle le **génom**e, l'ensemble des protéines s'appelle le **protéome**, l'ensemble des lipides s'appelle le **lipidome**, l'ensemble des métabolites s'appelle le **métabolome**...

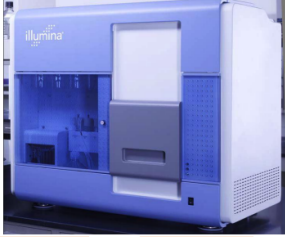
C'est une source d'informations incroyable permettant à la fois de revisiter les mécanismes, mais aussi de **personnaliser** les traitements des patients et avoir la bonne décision thérapeutique vis-à-vis d'une maladie.

Pour analyser la composition moléculaire des fractions, il faut les **purifier** (chromatographie, électrophorèse) et ensuite les **identifier** :

- Séquence (acides nucléiques) → génome

On est capable de déterminer la séquence d'ADN à très grande vitesse grâce au séquençage haut débit ou **NGS**. Ces techniques sont encore améliorées aujourd'hui.

Séquençage haut débit ou
NGS = Next Generation Sequencing



	Lectures (nt)	Run (jour)	Gb/run)
Roche 454	330	0.35	0.45
Illumina Solexa GA II	36 à 100	4	18
Applied Biosystems Solid 3	50	7	30

Un "run" est la réalisation d'un processus complet par la machine.
Il produit un grand nombre de lectures correspondant à des séquences d'ADN ou d'ARN de l'échantillon étudié.
La nouvelle génération de séquenceurs à très haut débit permet de séquencer, en quelques jours, plusieurs gigabases d'ADN.

1 Gb = un gigabase = 10^9 bases

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

Ce tableau n'est ici qu'à titre indicatif

Le NGS permet le séquençage complet du génome (recherche de mutations, cellules cancéreuses, gènes de susceptibilité/prédisposition) ainsi que du transcriptome (RNA-seq).

Les méthodes utilisées fonctionnent de la manière suivante :

- 1) Elles vont déterminer la séquence de petits fragments de la molécule d'ADN (=reads/lectures).
- 2) Les machines sortent donc toute une série de reads (de quelques dizaines (50) à quelques centaines (330) de nucléotides) de différentes façons et de manière très rapide.
- 3) Avec l'aide de logiciels bio-informatiques, vous pouvez hybrider selon la complémentarité tous ces nucléotides du génome = étape d'alignement des reads sur le génome. Vous allez pouvoir couvrir le génome de référence avec tous vos reads et regarder (par rapport au génome de référence) s'il y a des petites différences ou pas, des séquences sur-représentées d'un individu à l'autre.

→ On comprend donc que c'est également un outil permettant de faire de la médecine personnalisée (différences entre individus, entre des tissus...). On fait plusieurs runs (fait de séquencer 1 fois l'ADN) ce qui peut faire plusieurs ADN par jour et par machine et on s'exprime en gigabase (109 bases).

Au final, on peut couvrir très rapidement l'entièreté de l'ADN.

Remarque : ces techniques évoluent très rapidement mais il y a une technique qui a révolutionné le domaine : c'est la technique long read (ou lecture longue).

Ces nouvelles machines sont capables de lire plusieurs millions de paires de base en une seule lecture. C'est très important car le génome humain contient beaucoup de séquences répétées (certaines vraiment beaucoup de fois) qui jouent un rôle dans notre physiologie.

Lorsque vous avez une petite lecture/petit read qui est complémentaire d'une séquence répétée, vous ne savez pas où la mettre dans votre génome de référence. Elle peut être mise n'importe où puisqu'elle est répétée.

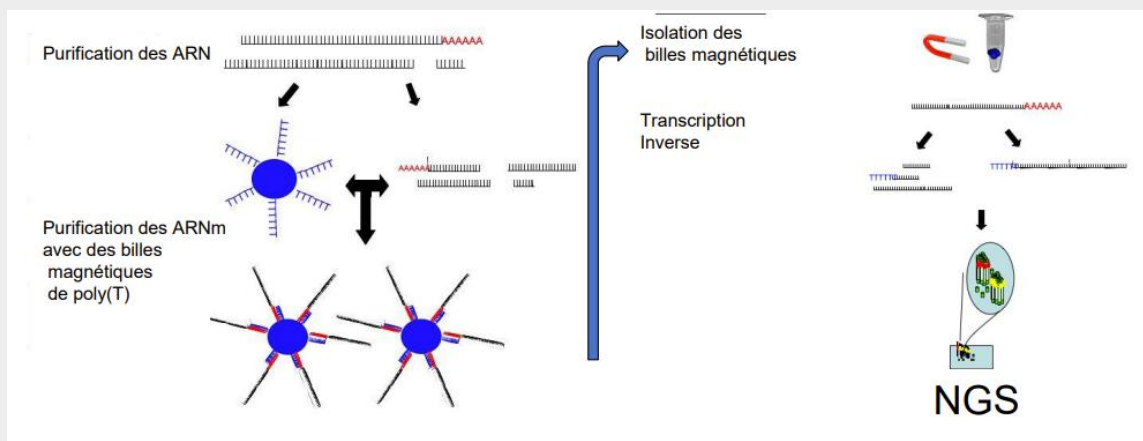
Par contre, si vous êtes capables de séquencer au-delà de cette séquence répétée dans le même read, vous savez exactement où elle est positionnée.

Conclusion : Cela permet d'avoir une vision complète du génome, et ce n'est que l'année dernière qu'on a pu avoir toutes les séquences de tous les chromosomes, du télomère au télomère (d'une extrémité à l'autre) pour un individu.

C'est un progrès incroyable parce que, maintenant, on peut vraiment connaître la composition exacte en acides aminés totale de tous les chromosomes humains.

- ARNm → transcriptome

On utilise une **transcriptase inverse** pour obtenir de l'ADN à partir d'ARN.



Pourquoi séquencer l'ARN si on peut déjà séquencer l'ADN ?

- 1) Pour une raison importante : tous les gènes, toutes les séquences d'ADN de notre génome ne sont pas transcrites en ARN.
- 2) Tous les gènes ne sont pas transcrits en même temps, cela dépend du type de la cellule, sa fonction...

Conclusion : Le transcriptome n'est pas équivalent au génome.

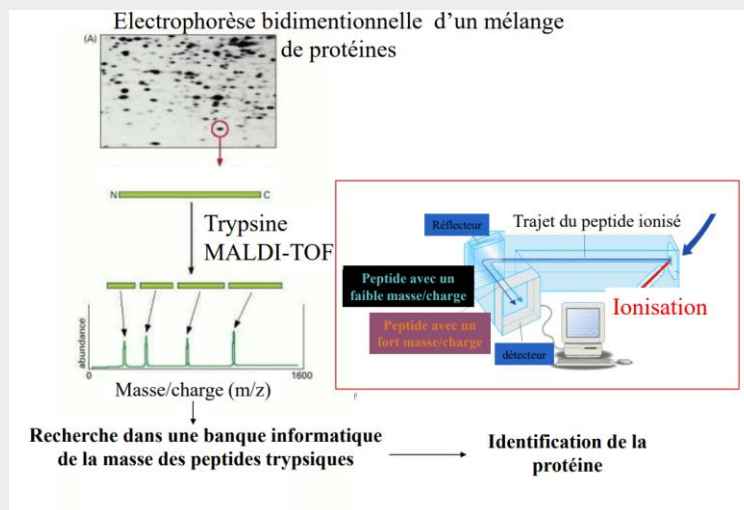
Le transcriptome va donner beaucoup plus d'informations sur la fonctionnalité de telle ou telle cellule car vous allez savoir quels gènes sont activés et quels gènes ne le sont pas.

- Poids moléculaire (chromatographie, électrophorèse, spectrométrie de masse...) → protéome

Autant l'ADN et l'ARN ont des structures chimiques proches, autant les protéines (même elles sont issues de l'information qui était codée de l'ADN à l'ARN) sont extrêmement différentes.

Vous avez un mélange de protéines ou une protéine dont vous voulez déterminer la séquence. Vous prenez vos protéines :

- Soit elles sont isolées à partir d'un gène : l'image du haut montre des tâches correspondant à des protéines après une électrophorèse (1 tâche=1protéine)
- Soit on prend l'ensemble des protéines qu'on va découper en petits morceaux pour faire des petits peptides



Comme ils sont suffisamment petits et qu'il y a 20 acides aminés chez l'homme, chaque peptide va avoir une masse, un poids moléculaire différent en fonction de sa séquence.

Le rôle du spectromètre de masse va être de déterminer la masse de chacun des peptides après digestion par une protéase.

- 1) Les peptides vont être ionisés
- 2) ils vont être accélérés dans un vide
- 3) ils vont être réfléchés à un endroit
- 4) Ils sont projetés avec une certaine déviation dans le récepteur.

C'est cette déviation qui va être caractéristique du poids moléculaire du peptide

Une fois que vous avez le poids moléculaire, vous avez la séquence. Et lorsque vous avez la séquence de chaque peptide, l'ordinateur va reconstituer la séquence entière de la protéine. Vous identifiez ainsi la ou les protéines de votre homogénat cellulaire.

IV. Analyses génétiques en biologie cellulaire

1) Généralités

Ces analyses génétiques sont centrales en biologie cellulaire, ce sont des outils précieux pour analyser les cellules.

Qui dit génétique, dit mutation, dit modification de la fonction d'un constituant (ADN, ARN, protéine). La génétique va donner un **mutant**, qui va gagner ou perdre une fonction. En observant la déviation d'un processus normal, on va déduire le fonctionnement normal : c'est en étudiant l'anormal que l'on va comprendre le normal.

Pourquoi étudier des cellules mutantes ?

- Comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire
- Modèles des maladies génétiques : des maladies que l'on peut hériter, des modifications génétiques somatiques comme le cancer.
- Identifier et caractériser des nouveaux médicaments liés à ces mutations

2) Transgénèse

Le plus important en biologie cellulaire est d'avoir des mutations qui vont donc modifier une fonction cellulaire, et c'est cette modification que l'on va étudier qui va permettre de mieux comprendre le fonctionnement normal.

Pour cela, il faut être capable de manipuler le contenu génétique d'une cellule ou d'un organisme. C'est ce qu'on appelle la **transgénèse**. D'un point de vue formel, c'est l'introduction d'un nouveau gène (transgène) dans une cellule ou dans un organisme, alors appelé transgénique.

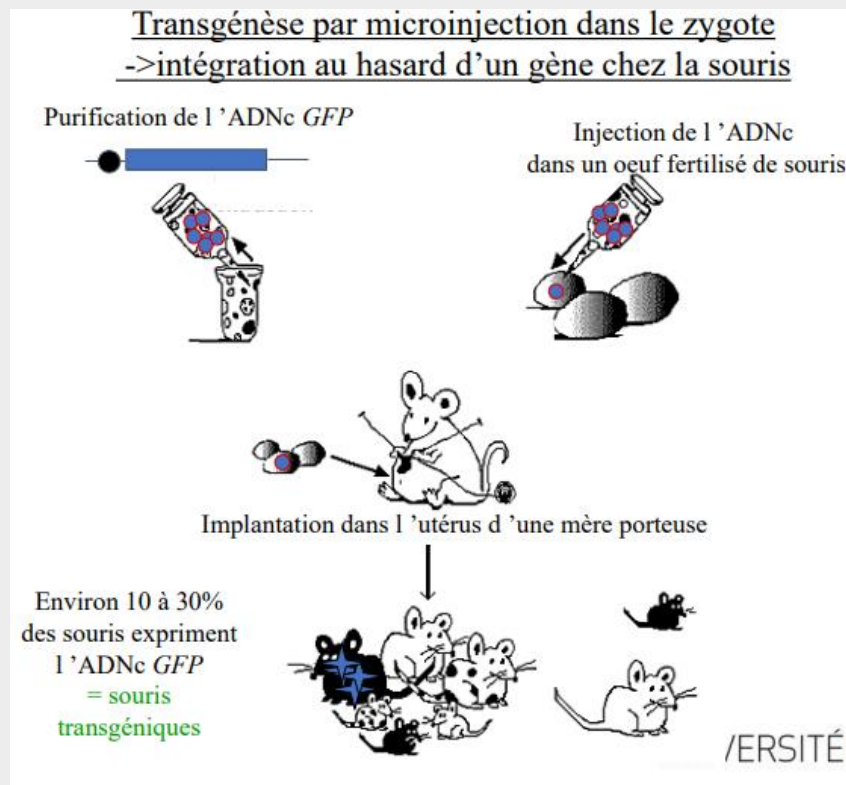
Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

La transgénèse a déjà été abordée lors de la fusion d'une protéine X avec la protéine GFP.

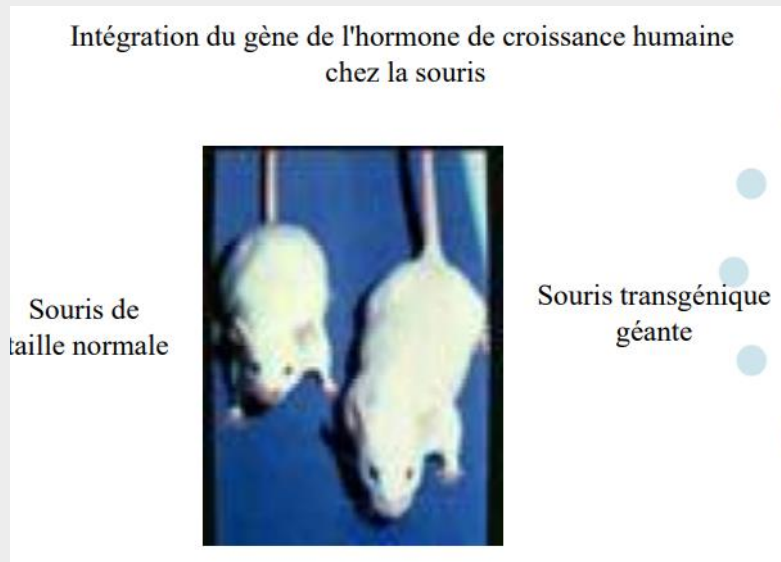
On peut exprimer des protéines étrangères généralement étiquetées par un épitope ou par un fluorochrome (GFP), c'est une intégration qui peut être **au hasard** ou **ciblée** à un endroit précis dans le génome. Cela permet :

- D'étudier la localisation et la dynamique de la protéine dans la cellule
- La purification de complexes (immunoprécipitation)
- D'étudier des domaines d'une protéine
- D'inactiver un gène :
En remplaçant le gène endogène par un gène inactif : on dit que le gène est invalidé par **Knock-out (KO)**
En réduisant l'expression du gène **Knock-Down (KD)**

La transgénèse peut aussi se faire à l'échelle d'organismes. On purifie l'ADN du gène que l'on souhaite introduire (par exemple GFP) que l'on injecte dans un œuf fertilisé de souris que l'on va implanter dans une mère porteuse.

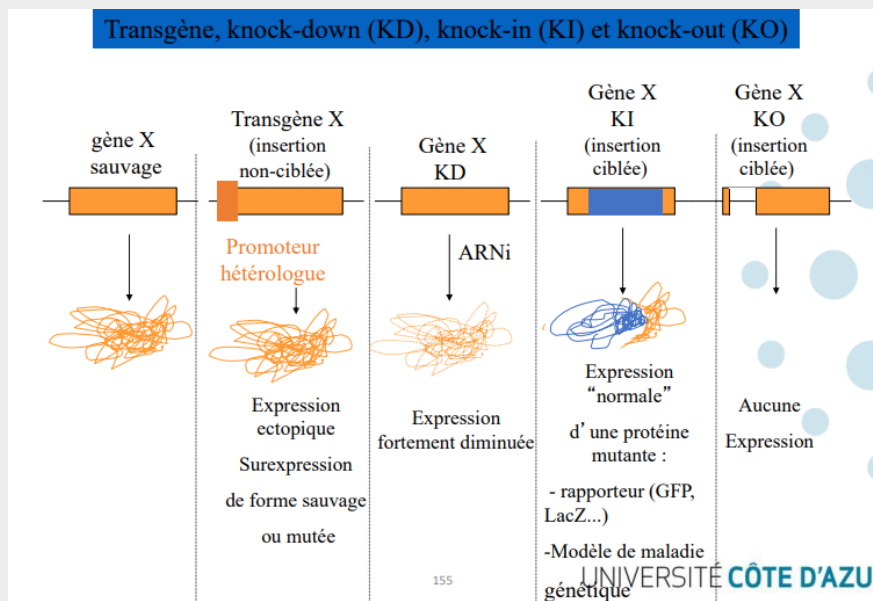


Parmi les descendants des souris, environ 10 à 30% vont exprimer la GFP comme le gène de l'hormone de croissance humaine.



On a un exemple de **gain de fonction** où on a une souris transgénique géante du fait de la surexpression du facteur de l'hormone de croissance humaine. Cela veut dire que l'on peut étudier l'hormone de croissance humaine quand elle s'exprime chez la souris.

Pour moduler l'expression ou la fonction d'un gène par transgénése, il y'a différentes façons :



- Il peut y'avoir une insertion non ciblée d'un promoteur hétérologue. On peut avoir une expression ectopique d'un gène, une surexpression de forme sauvage ou mutée (comme l'hormone de croissance humaine chez la souris)
- Le **Knock-Down** : on ne va pas empêcher complètement l'expression d'un gène mais **réduire** son expression par des techniques d'interférences ARN. Le produit du gène sera de séquence normale mais en moins grande quantité. On étudie donc l'influence de la **quantité** du produit de ce gène sur le processus biologique étudié.

Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

- **Knock-In** : On va modifier un gène en lui conférant une **propriété**. Il y'a donc expression « normale » d'une protéine mutante permettant de la tracer (GFP) ou de modéliser une maladie génétique par exemple.
- **Knock-out** : on va complètement inactiver le gène. On étudie l'effet de l'**absence** de produit du gène.

Toutes les techniques que l'on a vu dans ce cours sont désormais **miniaturisées**, on peut réaliser l'étude complète d'une unique cellule.

C'est le moment des dédiiiiis

Dédi à mes trois rayons de soleils qui ont illuminé mes TD d'SV

Dédi à mon Mimi

Dédi à mon Guérinou

Dédi à Baptistou

Dédi à Pierrot

Dédi à JA et Noé

Dédi à Seth

