Méthodes d'étude de la cellule 3

by Glycoghélène✨

Coucouuuu les Poussins 🐣 !!!!!!
Bienvenus dans ce dernier cours de Biocell 🧣 ✨
Eh oui, malheureusement, on arrive à la fin de notre aventure dans le fantastique monde de la biocell 🥲 Je sais qu'on va beaucoup vous manquez et c'est réciproque. Ce fut un vrai plaisir d'être votre tutrice et littéralement l'accomplissement de mon rêve de P1. J'espère que j'ai été à la hauteur de mes vieux et que j'ai réussi à vous faire aimer la biocell. J'espère aussi que vous garderai de bons souvenirs de notre team biocell même si vous aimez pas nos cours et nos qcm. Après, ne vous inquitez pas, j'en ai pas encore fini avec vous, je vais essayer de vous sortir des DM pour continuer à vous préparer au mieux à l'examen, je ne vous lacherai pas tant que ce ne sera pas fini. Et puis, on se reverra au S2 parce que je serais toujours là quand même. Sur ce, ebmarquons dans ce dernier cours en compagnie de Kirby !!!
En plus, c'est le dernier cours qu'a fait notre cher Gilson en présentiel, le dernier cours de toute sa carrière donc il est très précieux, cherrissez-le bien.



Sommaire : Manipulation des cellules

I -Obtention des cellules
- A. Dissociation
- B. Séparation

II - Culture des cellules
- A. Généralités
- B. Les cultures primaires
- C. Les lignées immortelles

III - Analyses du contenu cellulaire
- A. Lyse des cellules
- B. Fractionnement et séparation de l'extrait cellulaire
- C. Composition moléculaire : notions de génome, transcriptome et protéome

IV - Analyses génétiques en biologie cellulaire
- A. Généralités
- B. Transgénèse

I - 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 n'est pas forcément composé que d'un seul type cellulaire, il peut y avoir plusieurs types de cellules 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. On a vraiment besoin de dissoudre, d'éliminer la matrice extracellulaire et les contacts entre les cellules. On perd alors cette information histologique.
Dans ce but, on peut utiliser des protéases comme la trypsine ou de l'EDTA qui est un chélateur du calcium. ou on peut aussi 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.



Tut'focus :
Le but ici, c'est de récupérer les cellules que l'on veut étudier. Or, vous voyez bien que les cellules ne sont pas indépendantes dans notre corps, elles font souvent partie d'un ensemble.
Donc, ce qu'on veut faire, c'est réussir à sortir les cellules de leur contexte pour les étudier. L'avantage c'est qu'on pourra vraiment bien les étudier tranquillement, être précis par contre le revers de la médaille c'est qu'en même temps, on perd l'information histologique, c'est-à-dire l'information sur l'ensemble du tissu.

B. Séparation

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

Il existe différentes techniques pour séparer les différents types cellulaire sen fonction du type de cellule et des observations ou expérimentations que l'on souhaite réaliser :

- 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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

- Des méthodes moléculaires basées sur la **reconnaissance de molécules à la surface des cellules** : purification sur support ou cytométrie de flux.

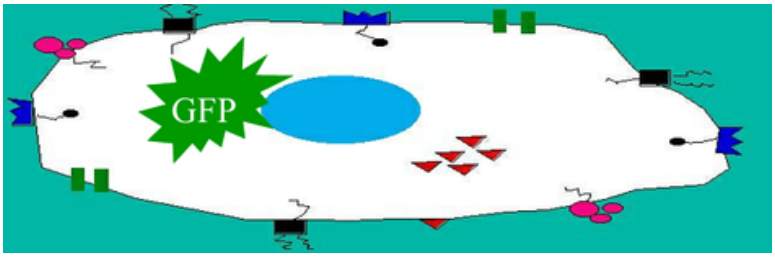
→ Ce sont des méthodes plus spécifiques et de choix pour séparer de manière précise les cellules. **Quand on va vers la spécificité en biologie on va vers le moléculaire**.



Tut'focus :

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 existe **deux types** de purification sur support 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 :

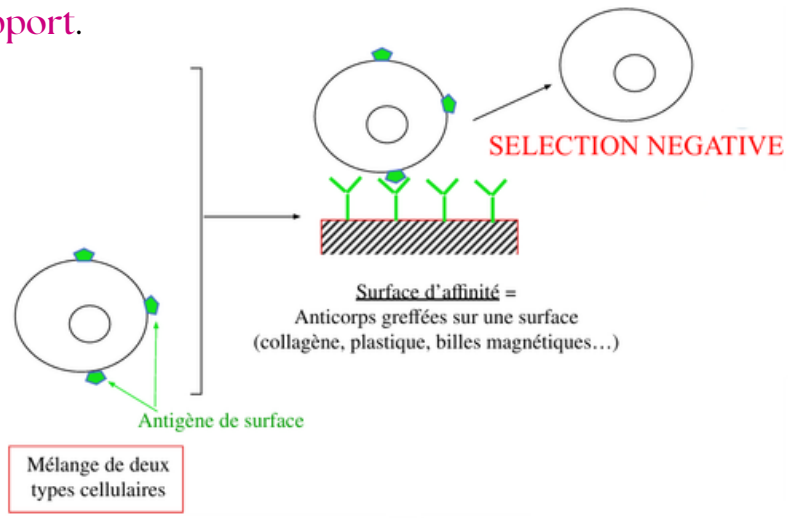
- Soit il existe **naturellement** : il est créé par la cellule comme les protéines qui sont à la surface de cellules (ex : antigènes de surface, molécules d'adhésion, récepteurs...) ou encore des lipides (on se souvient du cours sur la membrane).
- Soit vous pouvez **introduire une molécule particulière** 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.

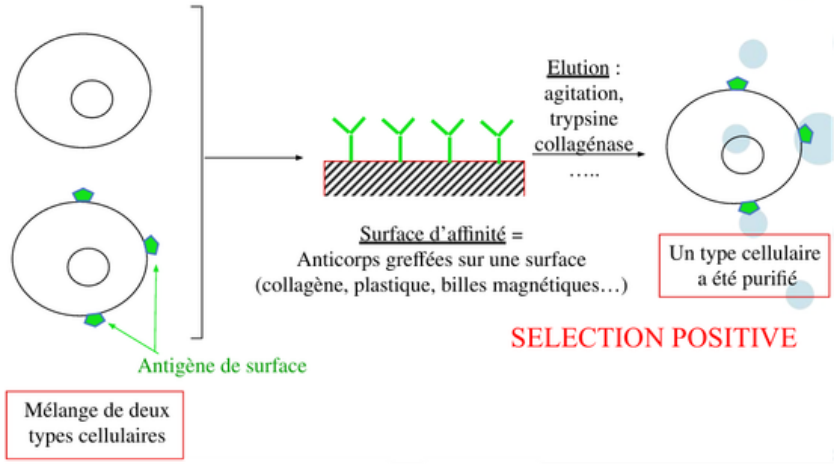
Imaginons un mélange de deux types de cellules que l'on souhaite séparer. Un de ces deux types a un certain type d'antigène à sa surface pour lequel on a des anticorps.
On a un **support solide**, peu importe sa composition (plastique, billes magnétiques, collagène...), sur lequel vont être **greffés 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**.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

En sélection négative, on met en contact le mélange de cellules avec le support. Alors, l'anticorps va s'associer aux cellules qui ont l'antigène par des liaisons non covalentes et pas aux autres (il ne s'accroche que aux antigènes qu'il peut reconnaître). Les cellules étant séparées, on va récupérer celles qui ne se sont pas attachées au support.



En sélection positive, on réalise les mêmes étapes mais on récupère les cellules présentes sur le support, c'est qui sont accrochées aux anticorps. On a donc un type cellulaire qui a été purifié.



Maintenant, quelle est la methode 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 (on se souvient de mon très cher cours sur le signalisation cellulaire, toute interaction avec l'environnement provoque des cascades).

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 est la sélection négative.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

Tut'récap :

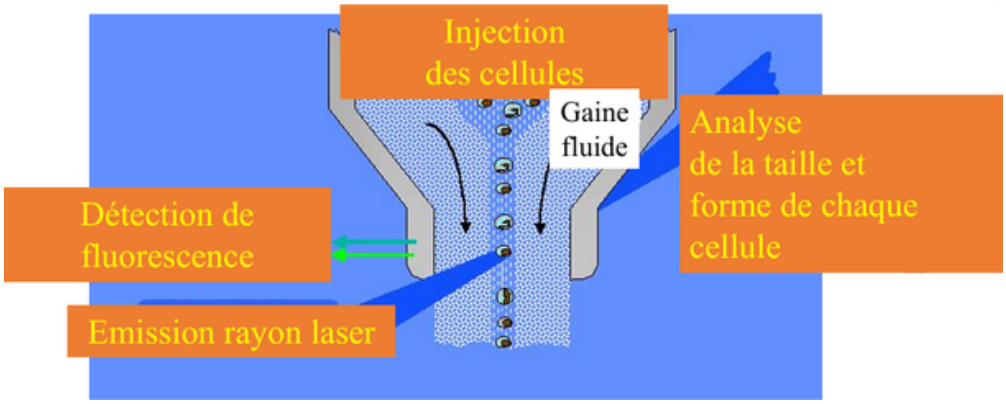
Sélection ***négative*** *= on trie ce qui n'adhère pas au support*

Sélection positive = on trice ce qui adhère au support

On préfère *quoi ? La sélection négative car elle reste neutre vis-à-vis des cellules qui nous intéresse.*

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).

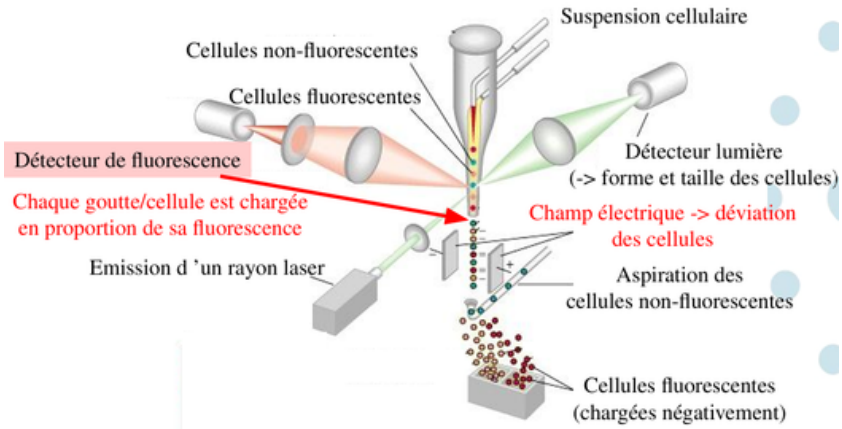


Les cellules vont donc passer une à une dans ce petit canal, et en passant elles vont rencontrer un certain nombre d'appareil de mesures pour mesurer la taille et la forme des cellules, voire même une lumière d'émission et un système de détection permettant de repérer la fluorescence émise par chacune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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite



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.

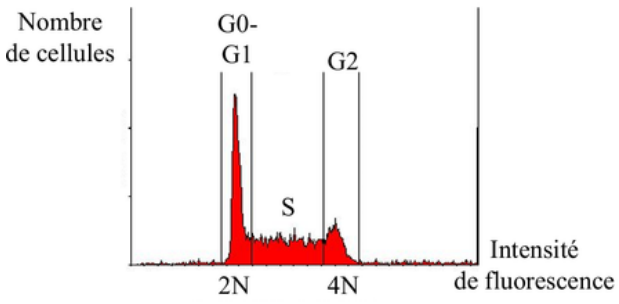
Un champ électrique dévie plus ou moins les cellules en fonction de leur charge et donc de leur fluorescence. Il suffira à l'appareil de récupérer les cellules plus ou moins déviées et donc de les trier en fonction de la fluorescence. On est ainsi capables de trier 500 cellules par seconde.

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

Les 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.



Un histogramme typique 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.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

Vous avez donc 2 fluorochromes qui sont principalement utilisés :

- l'hoechst
- l'iodure de propidium.

Il y a une grande différence entre les 2 (on y reviens plus tard no panic) 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'hoechst 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.



Tut'récap :

***Iodure de propidium** = perméabilisation grâce à un agent chimique*

***Hoescht** = PAS de perméabilisation préalable*

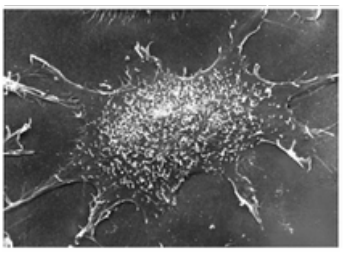
Petit mémo : dans iodure de propidium, il y a le P de Perméabilisation

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.

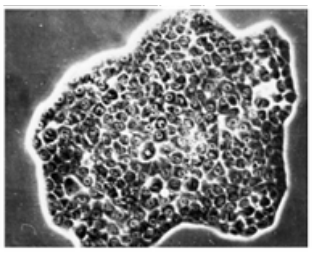
II - Culture des cellules

A. Généralités

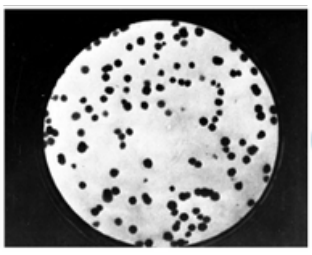
Ce n'est pas forcément facile de cultiver des cellules : ce n'est pas immédiat. Il y'a des cellules qui ne se cultivent pas, il faut prendre des précautions particulières. Le plus souvent, les bactéries sont plus simples à cultiver puisqu'il suffit de les nourrir sur une boîte de Pétri pour qu'elles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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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

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 (la signalisation cellulaire est encore de retour hihii) qui vont lui donner l'ordre de se diviser. Ce sont des molécules de signalisation.

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 fœtal 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 leur fait un sorte de tapis si vous voulez).

On peut alors distinguer différents types de cultures :

B. 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.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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. (on se du cours sur la sénescence de ma super co-tut ♡). 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.

C. 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 (expression d'un gène dans une région extérieure à son domaine d'expression) de la télomérase 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 (c'est l'une des étapes du cancer).



Tut'récap :

Pour faire nos petites expériences, on a besoin de cultiver les cellules afin d'en avoir un plus grand nombre. On a alors le choix entre 2 types de cultures :

***cultures primaires** : directement à partir des cellules des tissus qu'on a dissocié mais le problème c'est qu'elles ont un nombre limité de divisions donc comme une "date de péremption" pour leur observation.*

***lignées immortelles** : peuvent être obtenues naturellement mais à partir de situation pathologiques (donc pas la norme) comme les cancer. Le problème ici est leur différence avec le comportement de cellules "normales/saines".*

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 - Analyse du contenu cellulaire

A. 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.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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 :

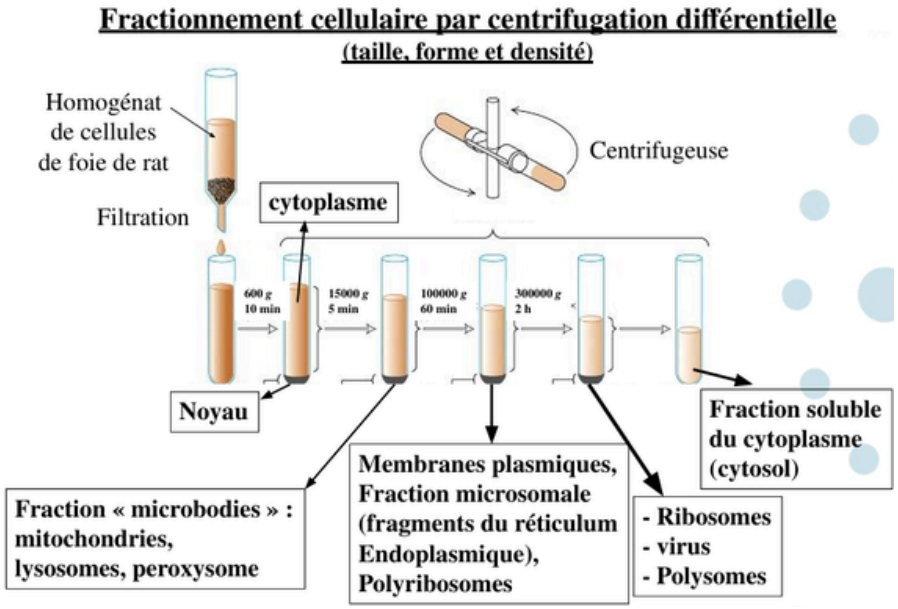
- Ultrasons (sonification)
- Choc osmotique
- Détergents : plus ou moins forts, ils agissent sur les lipides et interagissent ainsi avec certains types de membranes (rappel pour aller revoir mon cours)
- Frottement (homogénéiseur avec piston de téflon)

B. 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.



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



Tut'warning :

N'allez pas me confondre le g pour des grammes on est d'accord ? Ce g là c'est la constante de pesanteur, c'est le même qui nous a casser la tête en physique en terminale.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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, peroxysomes. 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 protéines). 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.



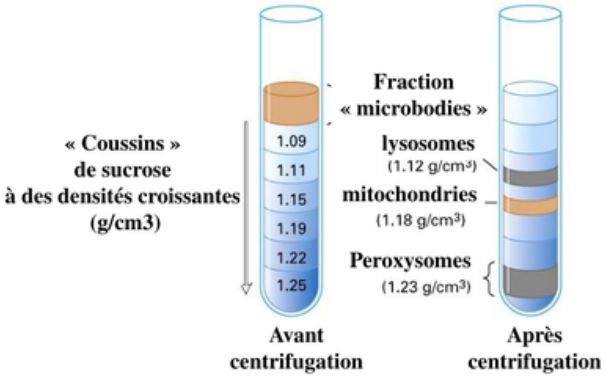
Tut'info :
J'espère que vous vous souvenez de mon cours sur l'organisation du noyau, si c'est pas le cas je sais ce que vous attendez pour aller le relire. En tous cas, je vous le redis mais le cytosol mais c'est la cytoplasme sans tous les organites qui y flottés donc vraiment juste la partie liquide sans rien dedans.

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. (un peu comme quand on mélange du jus de fruits et de la grenadine, la grenadine c'est lourd donc au fond et le jus au-dessus).

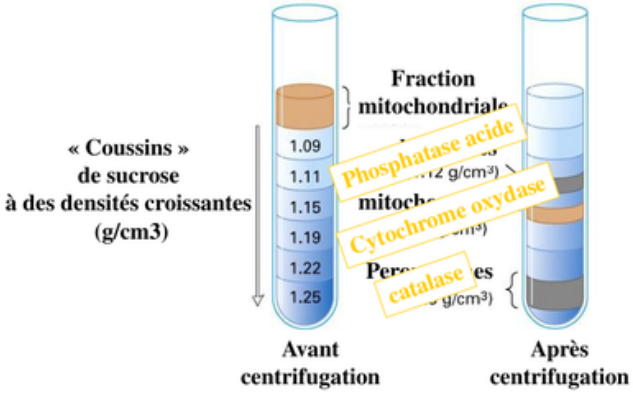
Sur ce gradient, on dépose la fraction à étudier (par exemple la fraction microbodies) et on soumet le tube à une centrifugation. Ainsi, à l'équilibre, les différents constituants de la fraction vont s'arrêter dans le milieu correspondant à leur propre densité : les lysosomes, les mitochondries et les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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite



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 péroxysomes, cytochrome oxydase aux mitochondries, phosphatase acide aux lysosomes) : on a une compartimentation enzymatique. (Prix Nobel de Médecine 1974)



C. 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 s'appelle le génome, l'ensemble des protéines s'appelle le protéome, l'ensemble des lipides s'appelle le lipidome, l'ensemble des métabolites s'appelle le métabolome... (encore une fois ce sont des rappels de mon cours sur l'organisation du noyau youpiiiii).

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 :

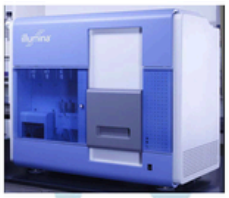
On l'a déjà dit mais l'ensemble de la séquence d'acides nucléiques, c'est le génome.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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

Séquençage haut débit ou
NGS = Next Generation Sequencing

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 de l'échantillon étudié.



Plateforme	Longueur de lecture	Débit (par run)
Illumina NovaSeq X	2 × 150 pb (jusqu'à 2 × 300 pb)	Jusqu'à 16 Tb/run (~8 Tb/jour)
PacBio Revio (HiFi)	~15–20 kb	~120 Gb / cellule
Oxford Nanopore PromethION	10–30 kb (>100 kb en ultra-long)	~200 Gb / cellule

☐ Lecture courte, plus précis, debit maximum

☐ Lecture longue, moins precis, permet rassemblage complet sequences répétées

1 Gb = un gigabase = 10^9 bases
1 Tb = 1000 Gb = 10^{12} bases

Genome humain : 3,1/3,2 Gb ->
Séquençage complet avec 30 x de couverture en moins de 24 heures

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

n 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 (GI)GIabase (109 bases).

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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite



Tut' focus :

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.

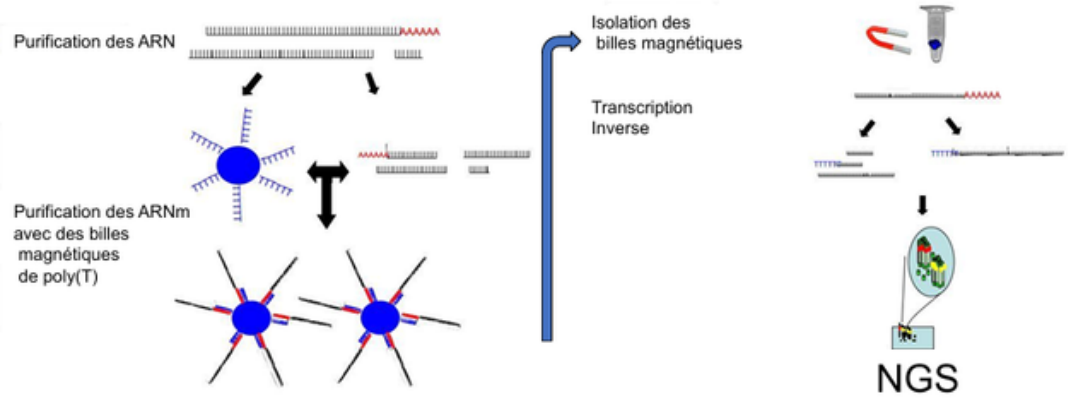


Tut' mémo :

Si c'est pas clair, voyez ça comme ça : quand on vous parle d'un film et qu'on essaie de vous faire visualiser un extrait, c'est plus facile pour vous de vous repérez si on vous donne un dialogue entier et le décor que si on vous donne juste une réplique. Là c'est la même chose, pour le read est long plus ce sera facile de retrouver sa position. Et ça vaut surtout pour les read qui se répète comme les répliques préférés des persos qui sortent tout le temps la même phrase.

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.

Maintenat, passons aux ARNm dont l'ensemble forme le transcriptome.
On utilise une transcriptase inverse pour obtenir de l'ADN à partir d'ARN. Elle a le rôle inverse de l'ARN polymérase si vous voulez.



Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

Mais pourquoi on voudrait séquencer l'ARN alors qu'on peut déjà séquencé l'ADN ? (on va encore faire des rappels de mon cours sur le noyau hihiii)

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... (la différenciation on s'en souvient)

Conclusion très importante : le transcriptome n'est pas équivalent au génome

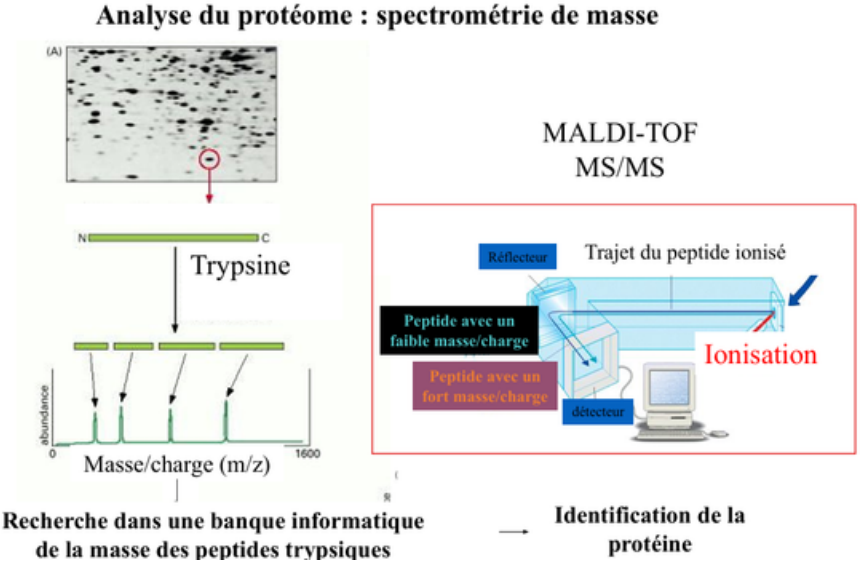
Le transcriptome va donner beaucoup plus d'informations sur la fonctionnalité de telle ou telle cellule car vous allez savoir quels gènes sont activés et quels gènes ne le sont pas.

Enfin, concernant le poids moléculaire (chromatographie, électrophorèse, spectrométrie de masse...), il nous renseigne sur le protéome.

Autant l'ADN et ARN ont des structures chimiques proches, autant les protéines (même si 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



Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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 réflectés 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

A. 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.

Mais pourquoi étudier les cellules mutantes ? Pour plusieurs choses :

- 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

B. 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.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

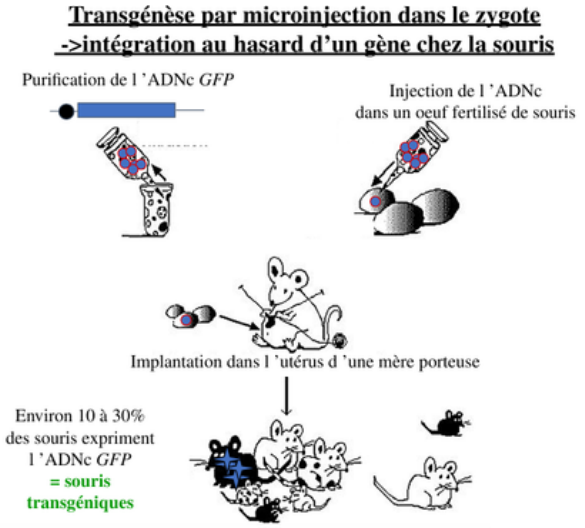
Pour cela, il faut être capable de **manipuler le contenu génétique** d'une cellule ou d'un organisme. C'est ce qu'on appelle la **transgénèse**. D'un point de vue formel, c'est l'introduction d'un nouveau gène (transgène) dans une cellule ou dans un organisme, alors appelé transgénique.
La transgénèse a déjà été abordée lors de la fusion d'une protéine X avec la protéine GFP que vous avez vu avec mes incroyables co-tut ♡

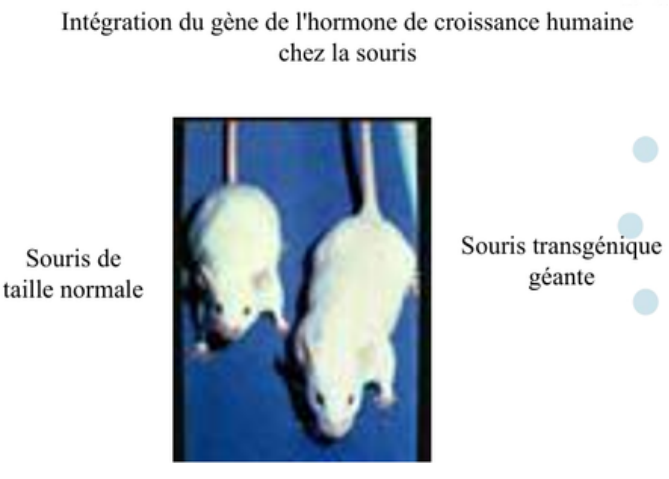
On peut exprimer des protéines étrangères généralement étiquetées par un épitope ou par un fluorochrome (GFP), c'est une intégration qui peut être au **hasard ou ciblée** à un endroit précis dans le génome. Cela permet :

- 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)**
Si on **réduit 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.



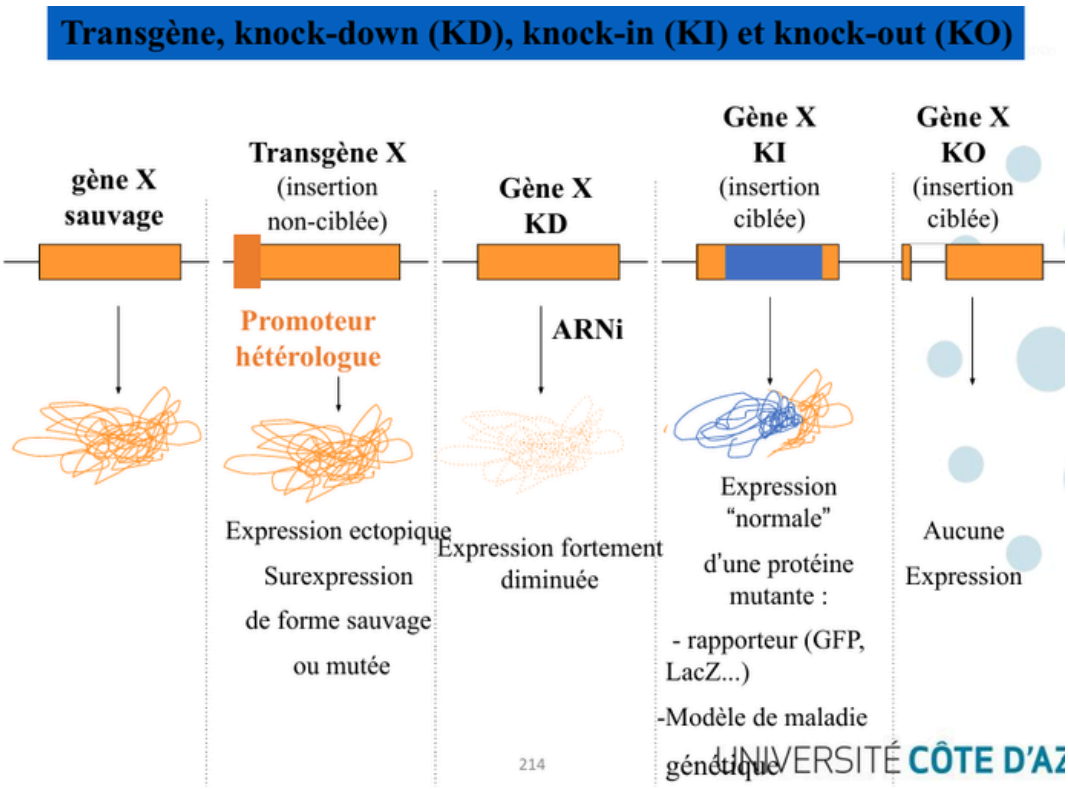


Parmi les descendants des souris, environ 10 à 30% vont exprimer la GFP comme le gène de l'hormone de croissance humaine.

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

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 transgénèse, 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)

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.

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

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

Tut' mémo :

Knock-Down : Down en anglais c'est "vers le bas" donc diminué → réduction de l'expression

Knock-In : In en anglais c'est "à l'intérieur" donc on ajoute quelque chose, une propriété

Knock-Out : Out en anglais c'est "en -dehors" donc on enlève quelque chose, un gène, on le met à l'extérieur



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

FINITOOOOO, c'est trop triiiiiste

Toutes mes félicitations à vous, vous venez de terminer votre dernier cours de biocell !! Je sais c'est vraiment triste et vous n'allez jamais vous en remettre, moi non plus d'ailleurs. Eh oui la fin de mon mandat approche, mais ne vous inquiétez pas, vous me verrez toujours au S2, je ne vais pas disparaître. Mais bon, ça ne sera plus la même chose. En attendant, on va ranger les mouchoirs parce que j'ai pas encore dis mon dernier mot, il me reste encore des dédis à faire et pleins de DM à vous sortir pour vous régaler comme il se doit ! Tout de même, ça a vraiment était un immense plaisir d'être votre tutrice, j'espère que j'ai réussi un tant soit peu à vous faire aimer la biocell ou vous aider à vous réconcillier avec elle. J'espère aussi que mes fiches vous ont plu, que vous avez bien compris mes cours et que vous me détestez pas pour avoir tous les cours les plus long (j'ai vraiment essayé de les faciliter pour vous). Ne l'oubliez jamais : la biocell vous aime ♡.

Et sur ce, place à mes dernières dédiiiii (sauf si je décide d'en mettre dans mes DM hihiii on sait jamais) :



☆ Dédi à vous de faire ces études. Je sais que c'est dur mais je vous promets que ça en vaut vraiment la peine. Si vous doutez c'est normal mais continuez, accrochez-vous et je vous promets que ça ira mieux après. Si vous avez besoin, n'hésitez pas à m'envoyer un message, si vous voulez parler 🤗

☆ Dédi à ma mère, mon père, mon frère et toute ma famille pour tout le soutient qu'ils m'ont apporté, jaurais vraiment pas réussi sans eux donc infiniment merci. Dédi particullière à ma grand-mère, tu es une warrior, tu es super courageuse et extrêmement forte, je te fais des gros bisous et je reviens te rendre visite très bientôt 😘

☆ Dédi à Ophrane, merciiiiii beaucouuuuup d'avoir été la meilleure des marraines dont je pouvais rêver. Vraiment, la P1 sans toi, je sais pas dans quel état je l'aurais fini mais pas aussi bien. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, merci de m'avoir aidé à prendre confiance en moi et merci d'être maintenant mon amie. Je t'aime trop et je te harcelerais jusqu'à l'EHPAD, c'est cadeau 🥰

☆Dédi à Anaïs votre incroyable tut de biostat que vous allez ENFIN bientôt rencontrer. Vous allez voir, elle est trop forte, c'est une crack. Avec elle, vous avez aucun soucis à vous faire pour cette matière autant redoutée que la biocell. (Elle m'a pas du tout demandé de lui refaire une dédi, elle a intérêt à m'en faire plein en retour aussi). Je l'aime trop et je sais que vous allez l'adorer aussi 🥰🌟

Et maintenant, j'aimerais faire des dédi spéciales tut et notamment pour la magnifique et éblouissante dynastie biocelloise ! 🧣🧸🔥

Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite

☆Dédi en premier à mes incryables co-tut d'amour 🫶. Merci d'être aussi fantastiques, on a vraiment une des meilleures team ever. Je suis vraiment super contente d'avoir passé l'année avec vous et l'aventure continue. Vraiment merci beaucoup encore, j'aurais pas pu espérer mieux.

☆ Dédi à mes vieux : Sandrine, Maxence et Gevorg. Vous avez vraiment été géniaux, c'est vous qui m'avez donné envie d'être tut de biocell et je ne regrette pas une seconde. Vous êtes les meilleurs vieux qui soit et je suis très heureuse d'avoir pris votre relève même si vous aviez mis la barre haute. J'espère qu'on a su vous rendre fiers 🔥

☆ Dédi à mes vieux vieux et à toute la dynastie 🧣 Vous êtes vraiment trop sympas et je suis super contente de vous avoir rencontré (pour ceux que j'ai réussi à voir). Je suis honoré de faire partie de cette fabuleuse dynastie, merci à tous pour votre soutient et votre binevaillance 🫶

☆ Dédi à ce cours, le dernier de Gigi ever, on était trop ému en cours et merci les vieux d'être venu lui dire au revoir avec nous. Et lui aussi, croyez moi, ça lui brise le cœur de prendre sa retraite mais il a était très heureux d'enseigner toutes ces années : "Avec toute mon émotion et ma joie d'enseigner avec vous" Pr. Eric Gilson.

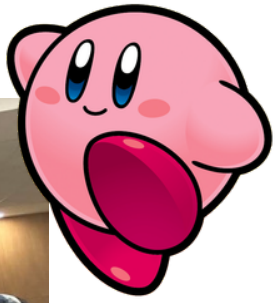
☆Dédi à notre Gigi, notre professeur adoré. Merci pour toutes ces années d'enseignement et pour votre passion de la biocell que vous avez à coeur de nous transmettre 🧣

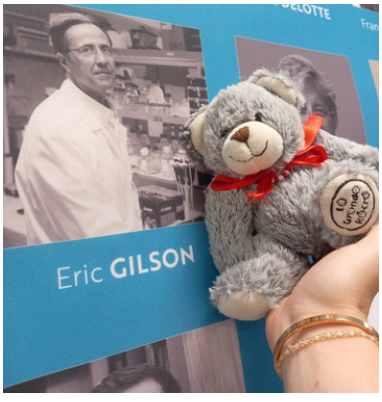
☆Dédi à mes futures pioux, je compte sur vous pour la relève, la biocell le mérite bien et je veillerai à ce que vous lui fassiez honneur (sans pression hein). Sachez que vous intégrerai la plus grande des dynastie avec les meilleurs vieux. 🔥🧸

☆Dédi aux P1 qui ont fait le collier de Giginours : Julia, Nada, Mila et Cloé. Encore merciii, vous avez géré, c'est super gentil. Je vous promets que jamais ce collier ne quittera son cou.











Le tutorat est gratuit (c'est incroyable) ! Toute vente ou reproduction est interdite