

Cours 2

***Fin de la microscopie +
Manipulation des cellules et
Analyse du contenu cellulaire.***

By Alexis & Michaël

Tutorat Niçois 2012-2013

Plan

Partie 1 : Suite et Fin de la microscopie

I. Microscopie électronique

1) Microscopie en transmission

a) Marquage à l'or

b) Coloration par ombrage

c) Cryomicroscopie

2) Microscopie à balayage

II. Microscopie à force atomique

Partie 2 : Manipulation des cellules

I. Obtention des cellules

II. Culture des cellules

1) Avantages

2) Désavantages

3) Culture des micro-organismes

4) Culture des cellules animales

III. Analyse des cellules

IV. Analyse du cycle cellulaire

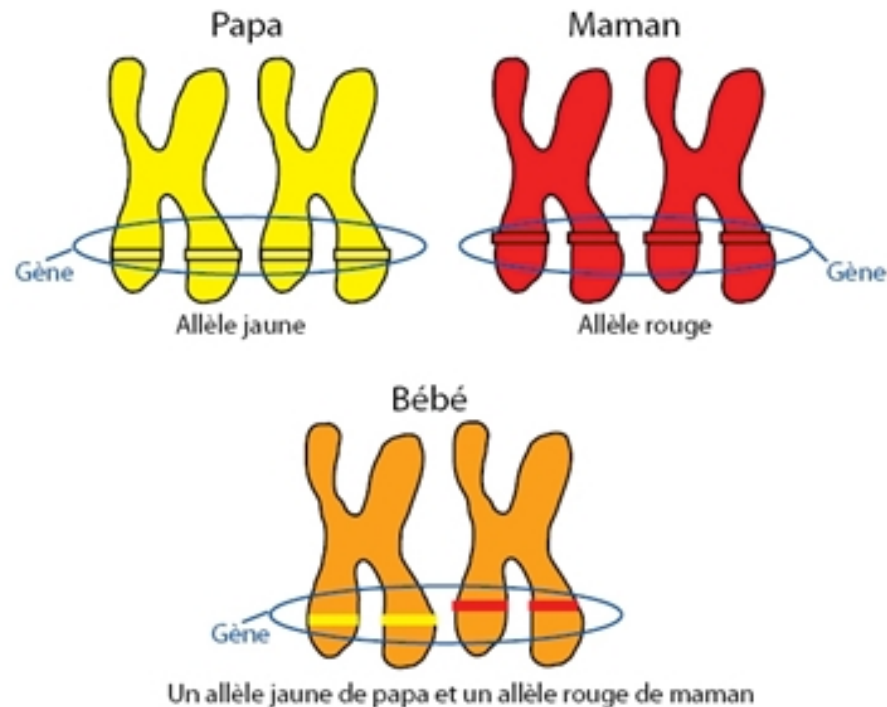
V. Notion de génétique appliquées à la Biocell'

Partie 3 : La complémentation

Définition

1^{ère} étape : Le Test de Récessivité

2^{ème} étape : Le Test de Complémentation



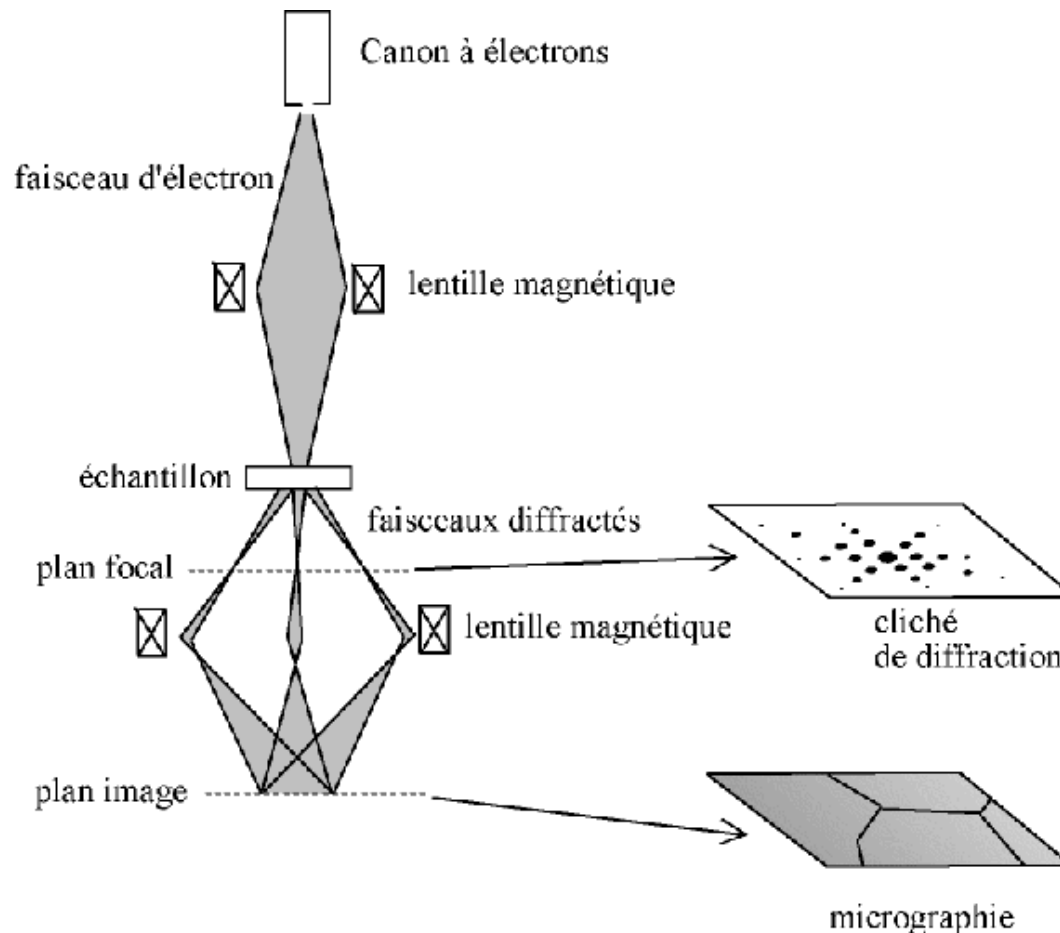
Partie 1 : La microscopie (Fin)

I) Microscopie électronique

- Résolution 2 nm (max 0,2 nm) → molécules
- Conditions spécifiques :
 - Vide poussé
 - Coupe ultrafine
 - Échantillons fixés chimiquement
 - Échantillons déshydratés (sauf cryomicroscopie)

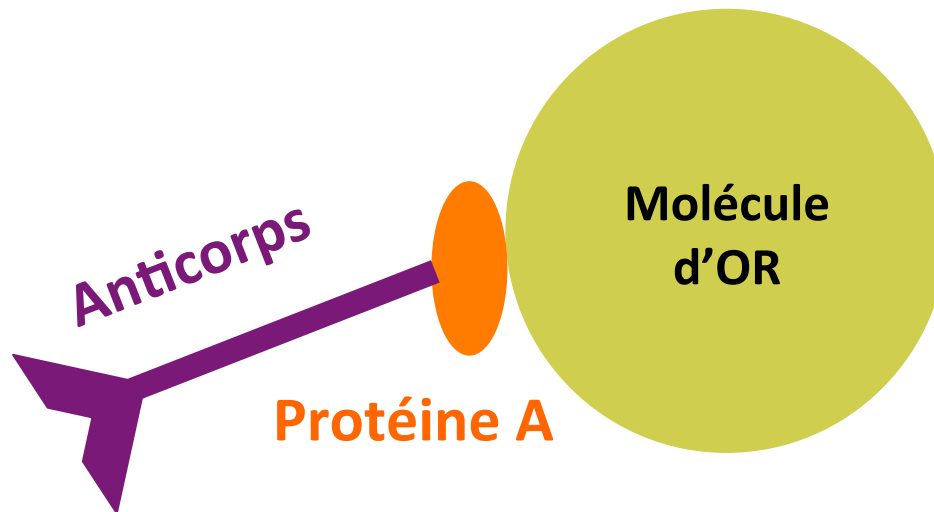
1. Microscopie en transmission

Le faisceau traverse la préparation !!

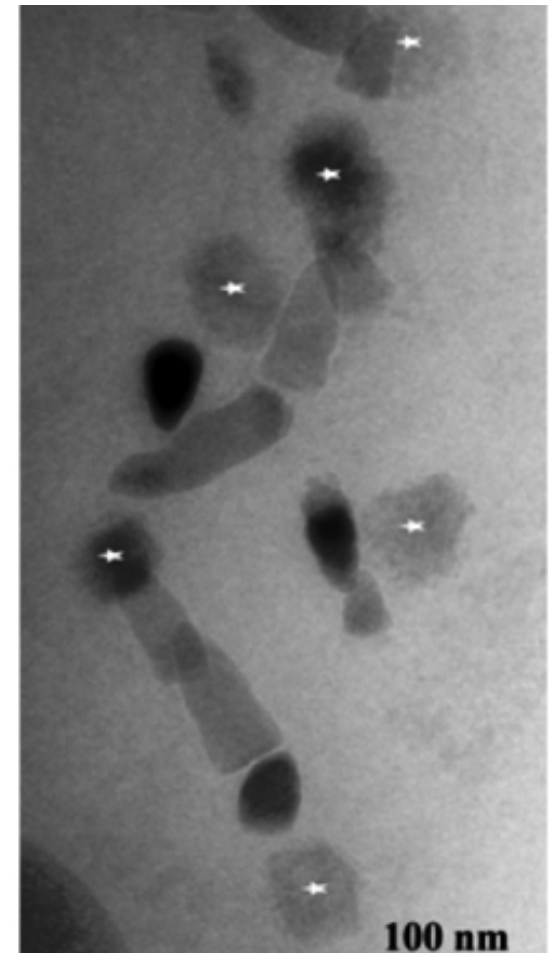
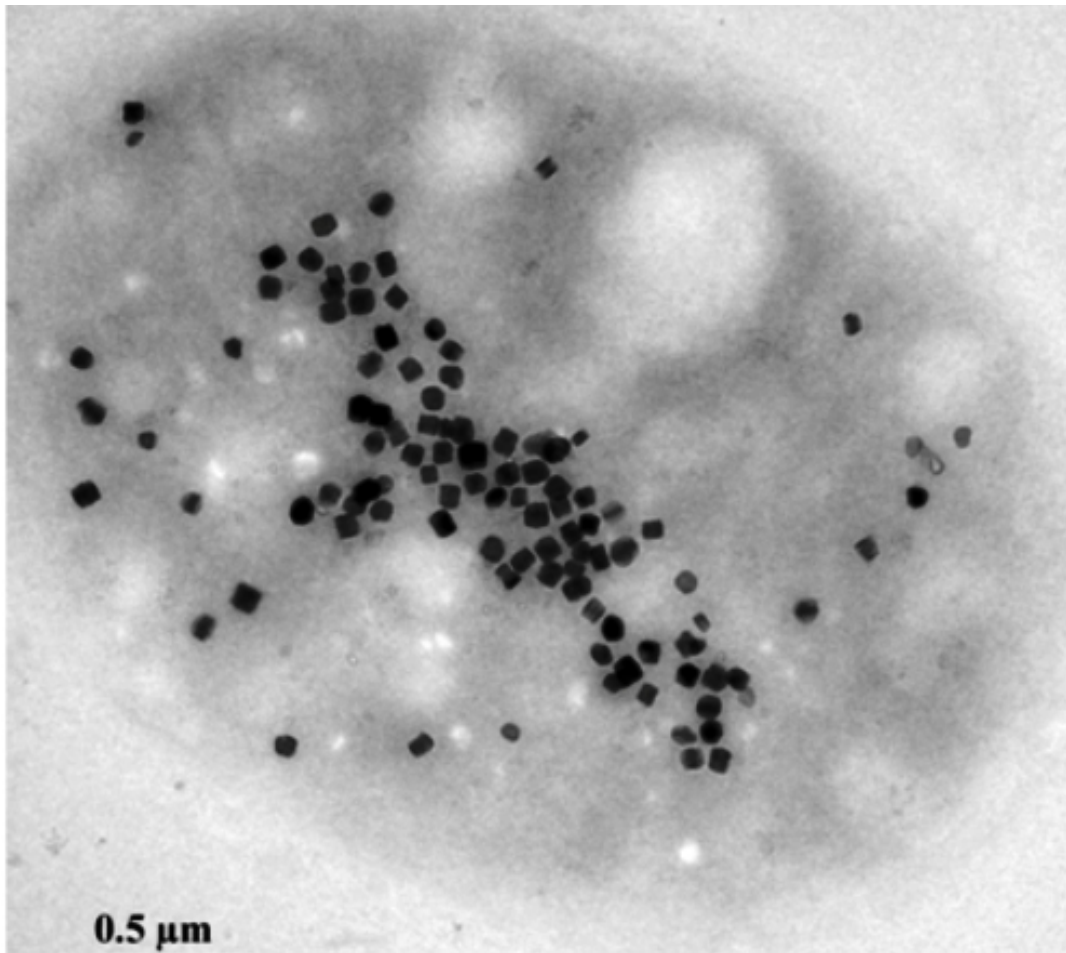


a. Marquage à l'or

Même principe que l'immunofluorescence
Anticorps spécifiques marqués à l'or et dirigés
contre la structure à visualiser.



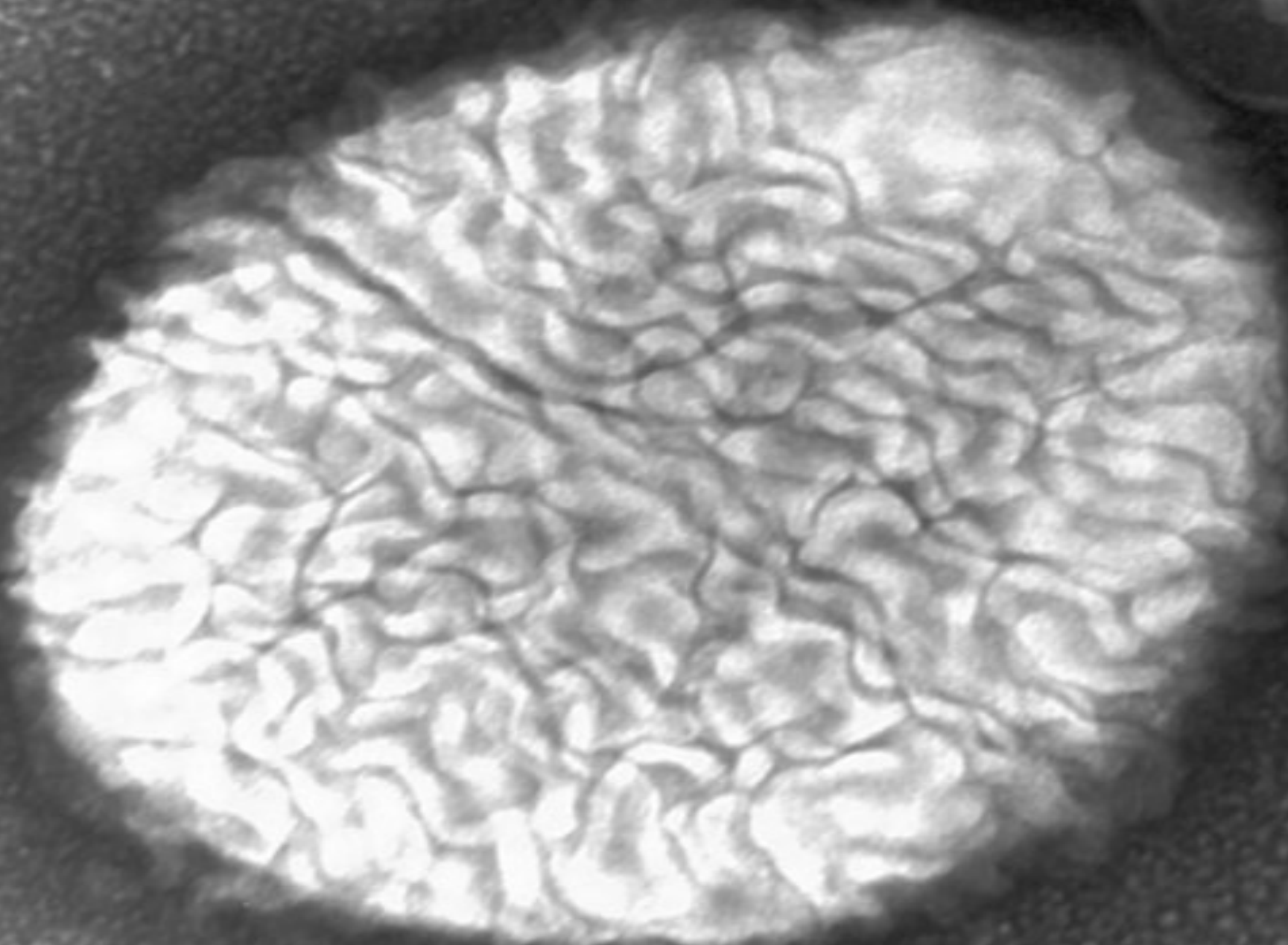
Chaque petit point noir correspond à des molécules d'or.



b. Coloration par ombrage

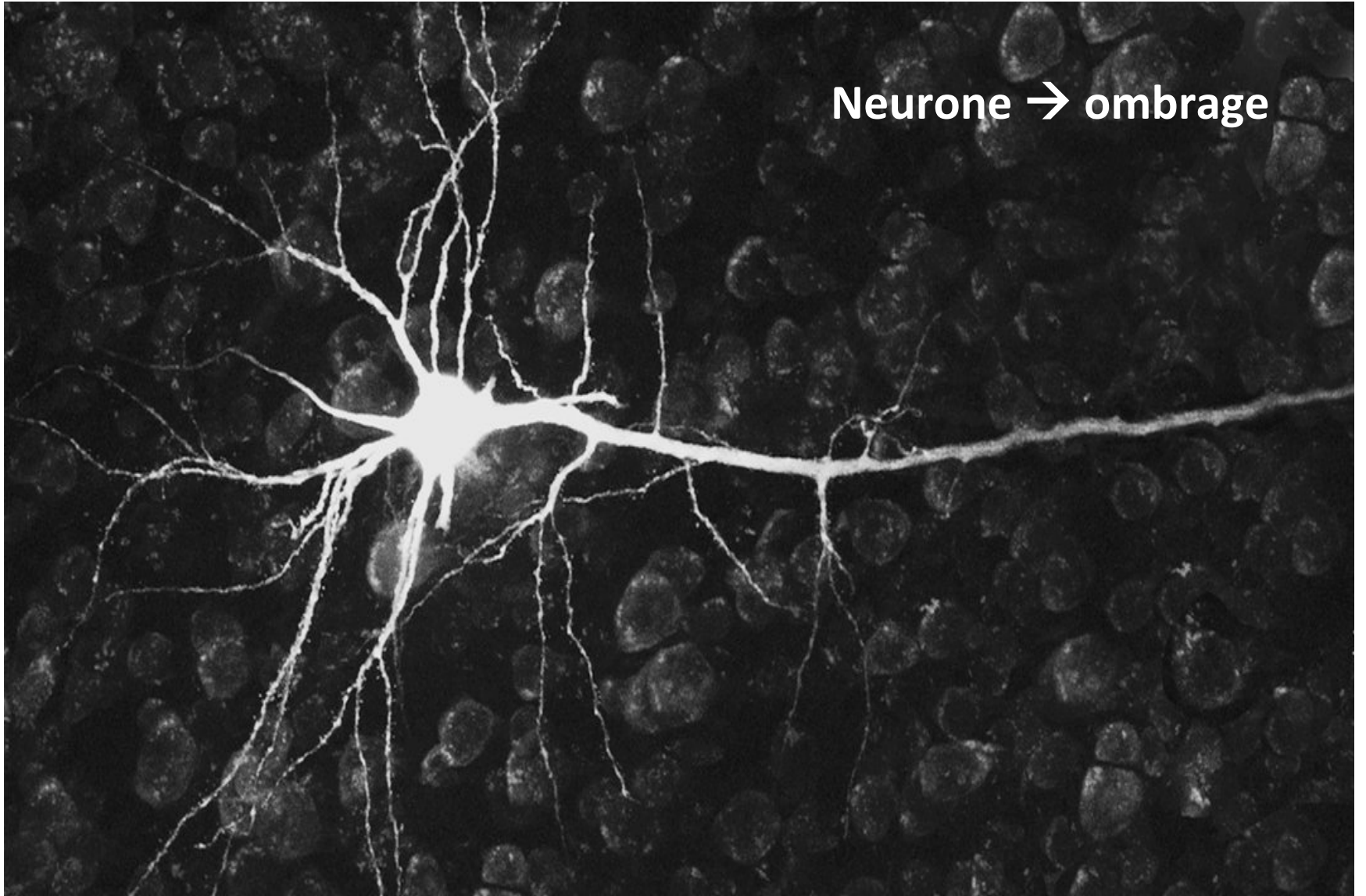
→ Pour visualiser des surfaces

On visualise la réplique (= moulage) de la membrane et non l'échantillon lui même.



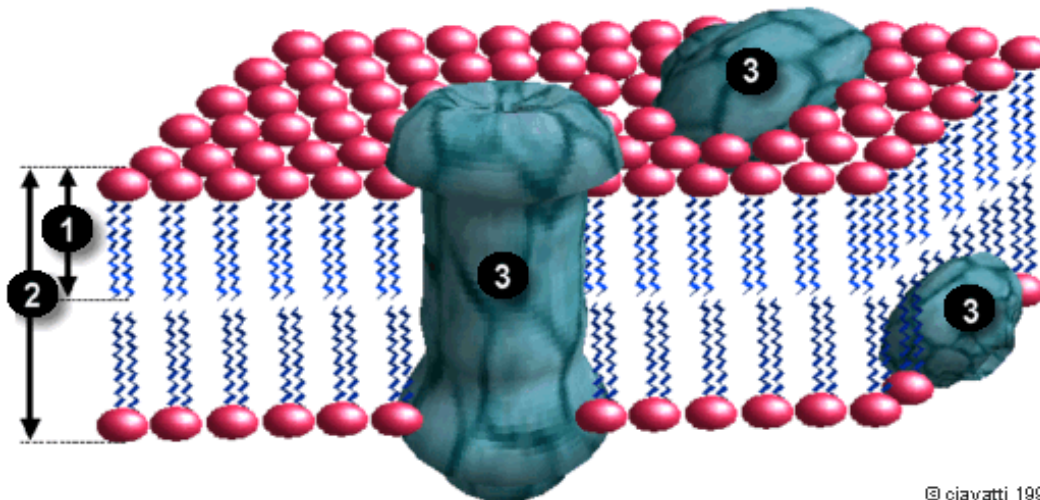
Bactérie vue au microscope électronique → coloration par ombrage

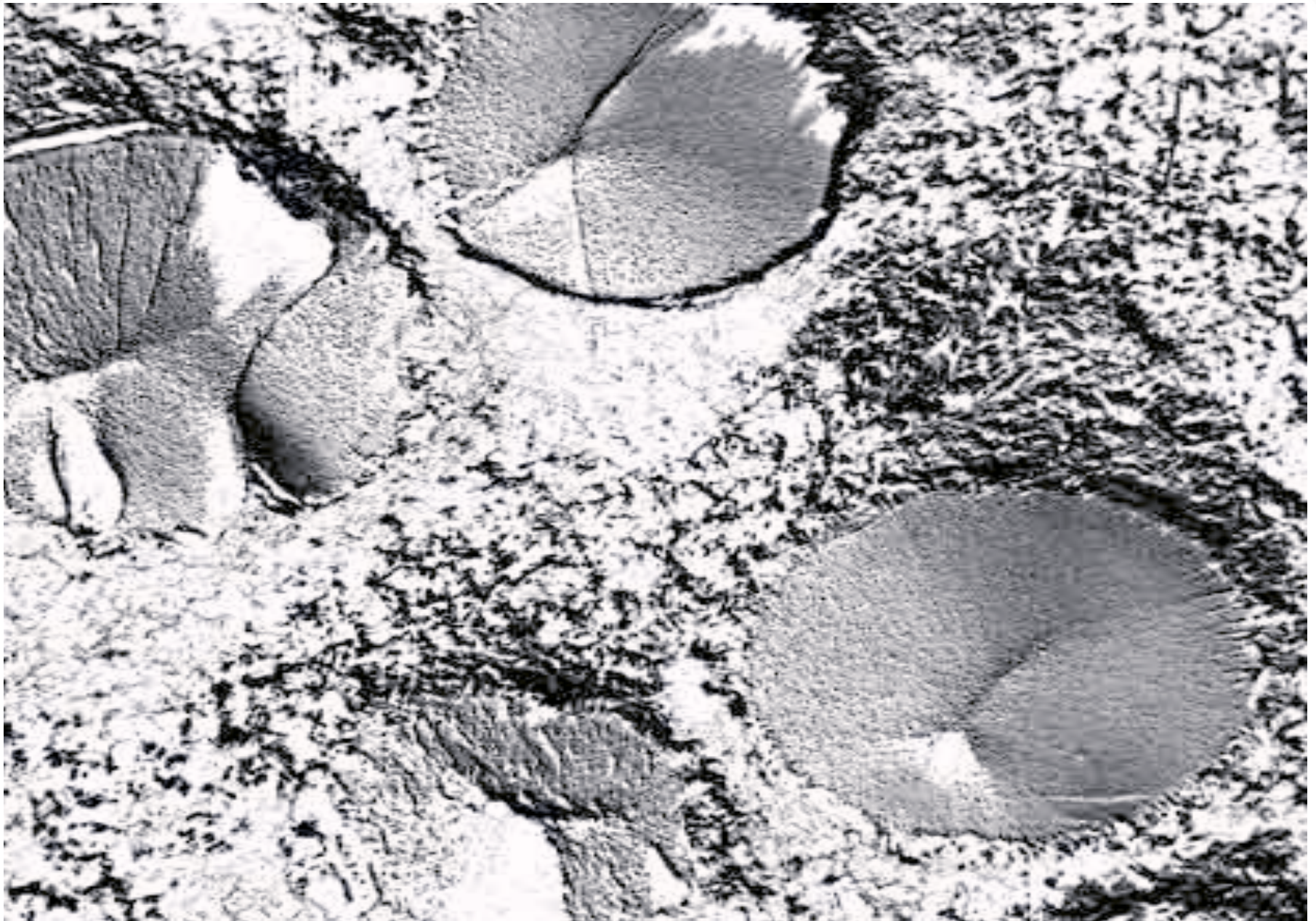
Neurone → ombrage



c. Cryo-microscopie

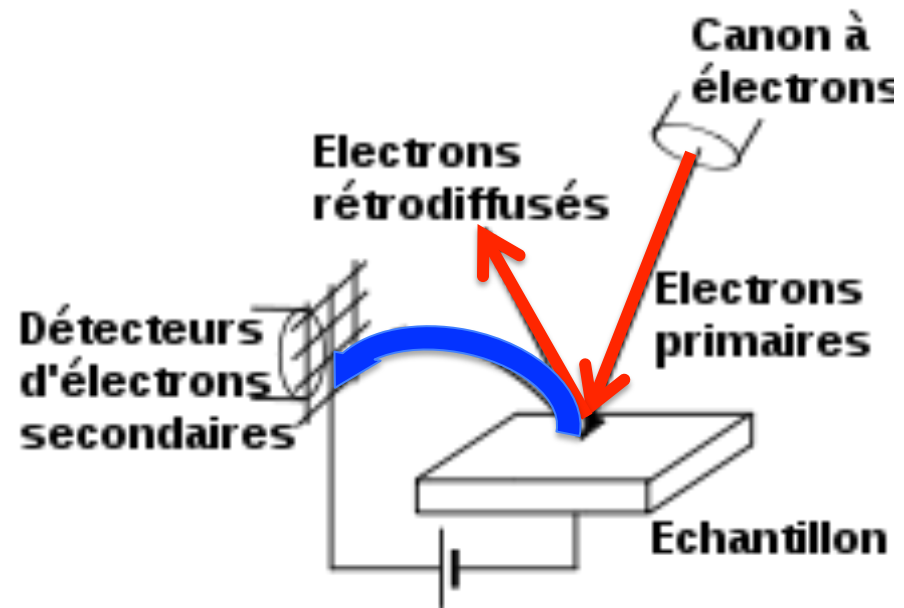
- 1) Congélation à l'azote liquide (-150°C)
- 2) Cryofracture (entre les 2 feuilletts lipidiques d'une membrane)
- 3) Vaporisation métaux lourds
- 4) Observation de la réplique





2. Microscopie à balayage

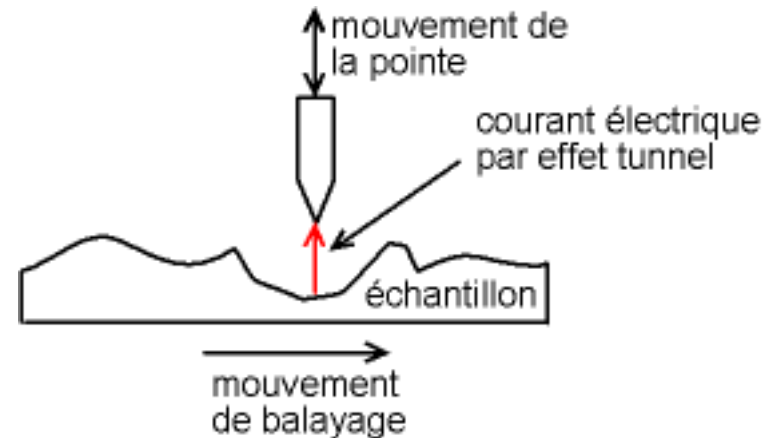
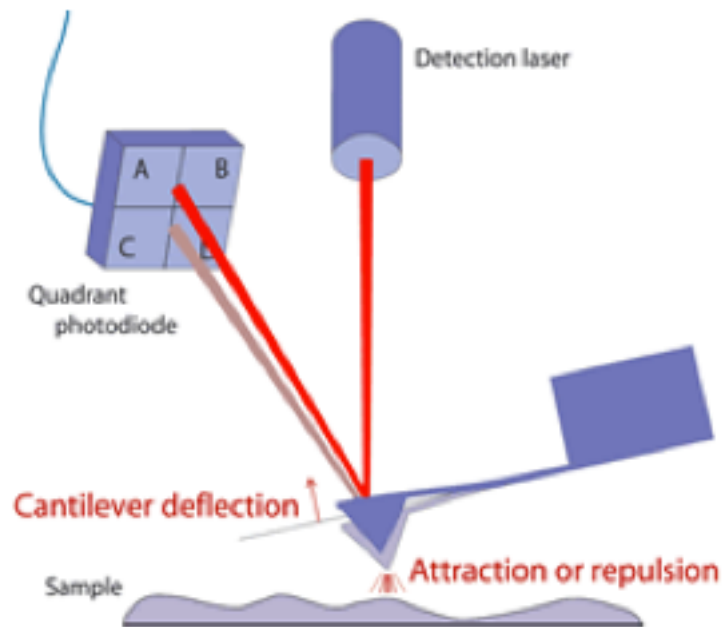
- Électrons ne traversent pas la préparation !!
- Image visuelle créée grâce aux électrons secondaires.
- Image en 3D
- Résolution 10 nm



II) Microscopie à force atomique

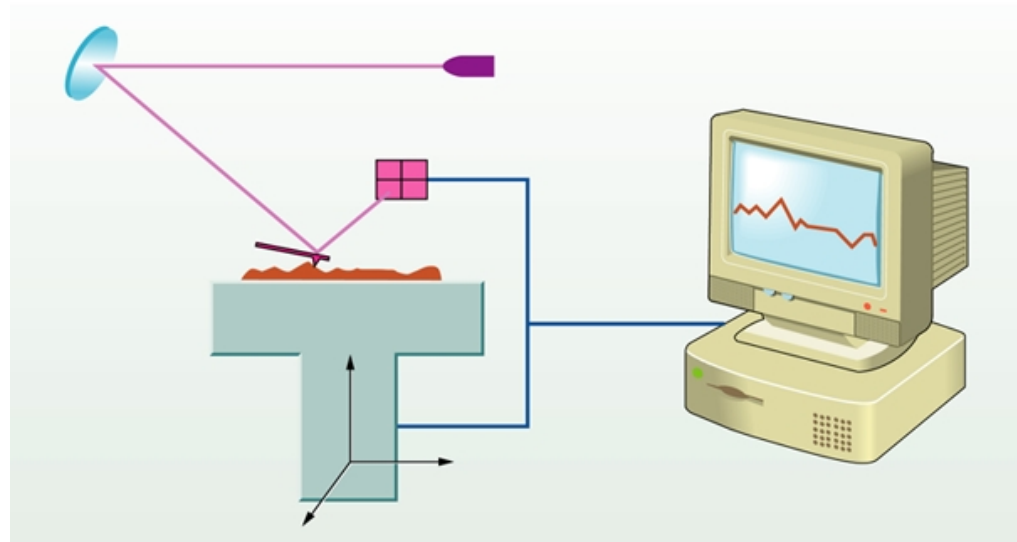
- Résolution max 0,2 nm

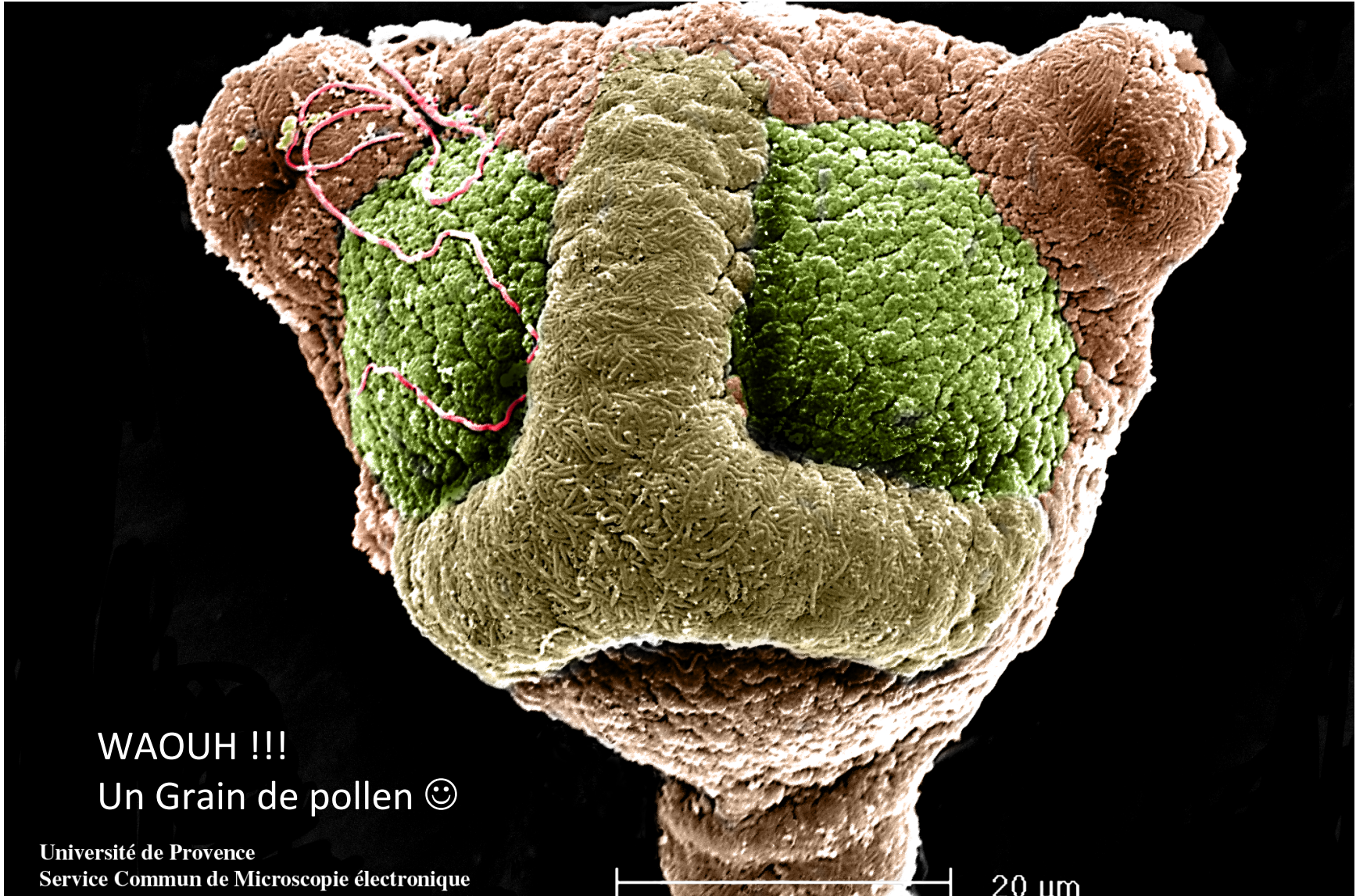
Attention on peut travailler sur des cellules vivantes !!



Avantages

- Cellules vivantes.
- Travail à l'air libre.
- Mesure de volumes en 3D.
- Moins cher que la ME.





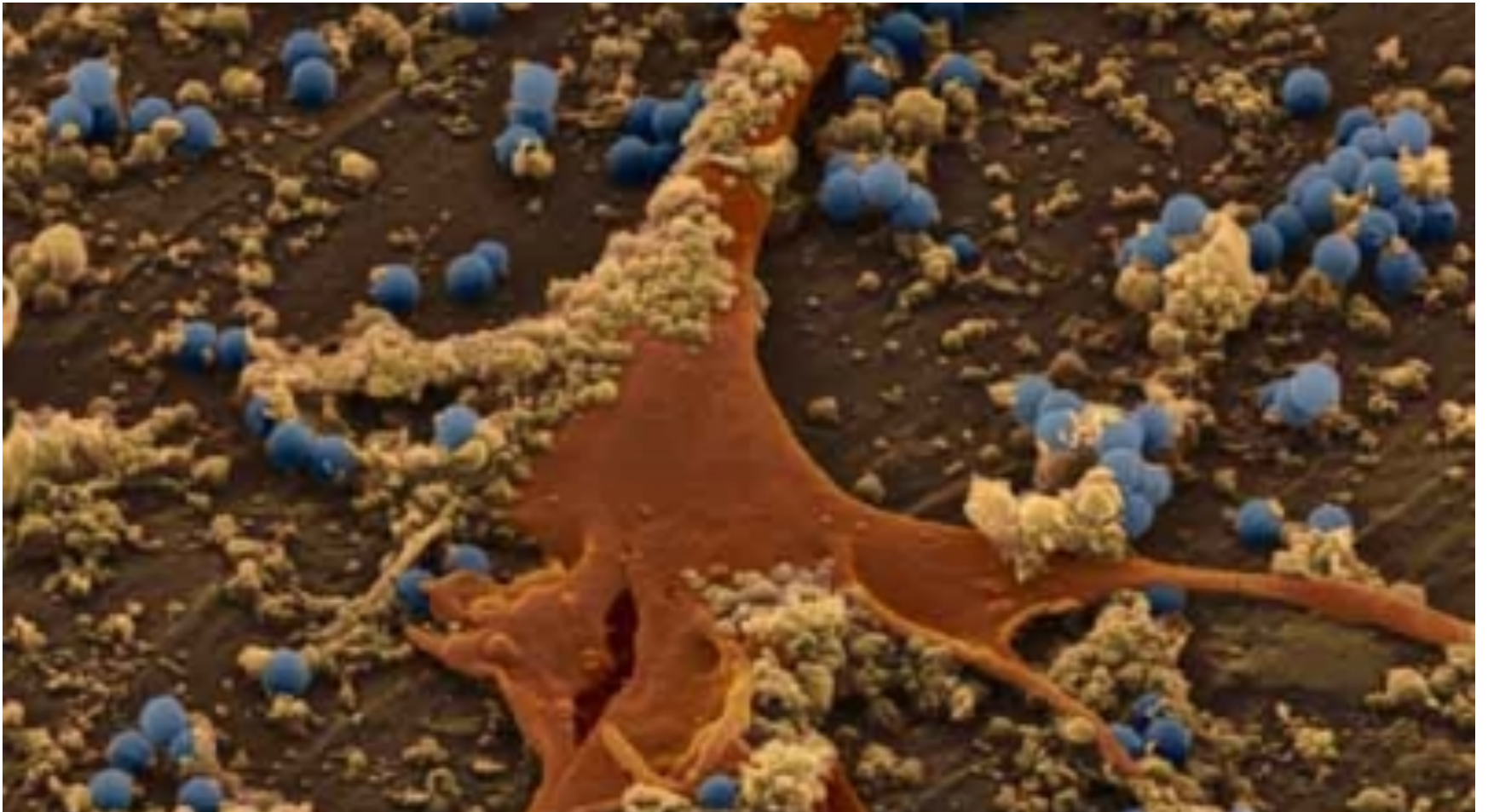
WAOUH !!!
Un Grain de pollen 😊

Université de Provence
Service Commun de Microscopie électronique

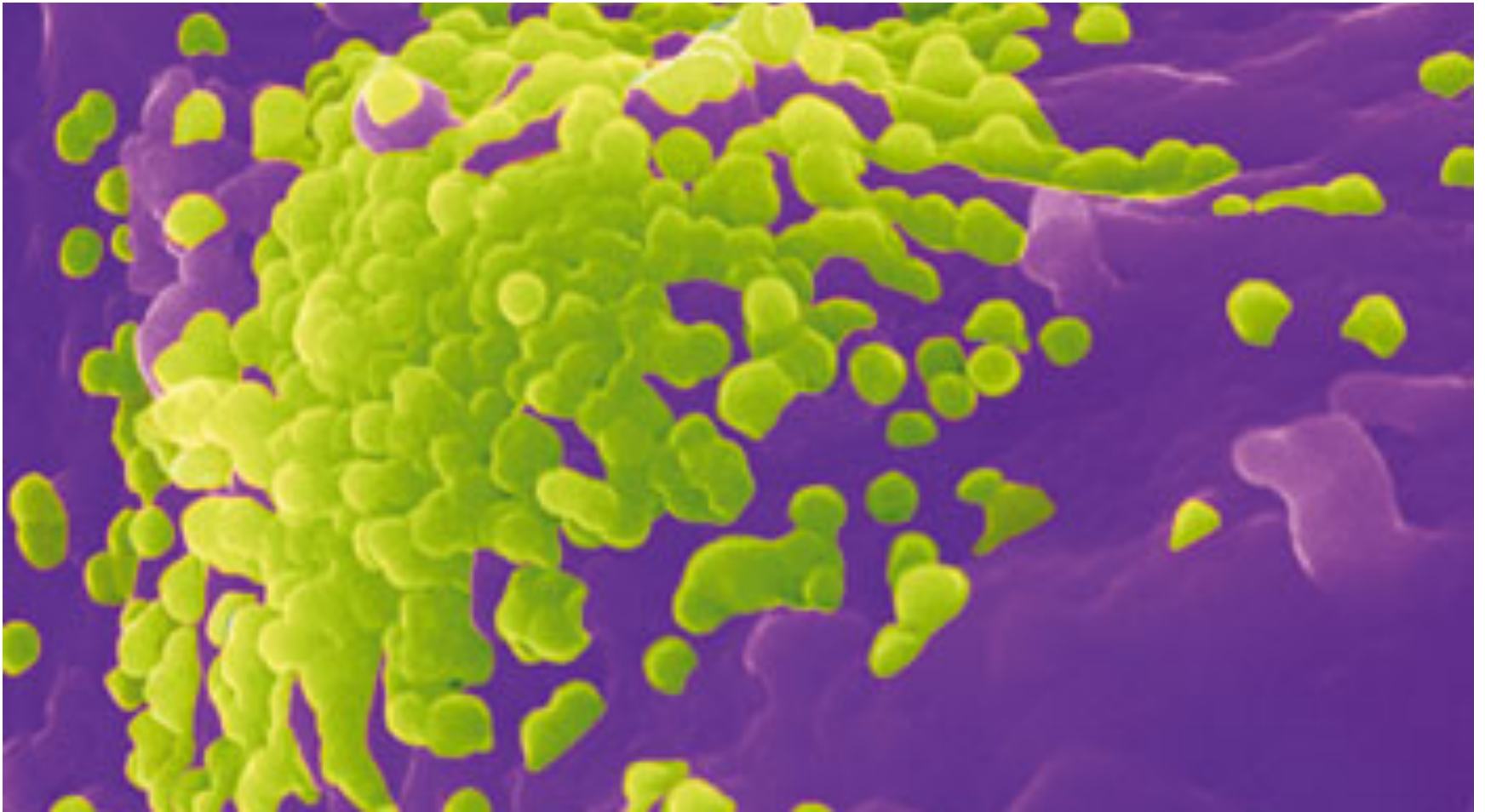


Une famille de grain de pollen, mais c'est génial !!

Axone de souris démyélinisés



Virus du VIH bourgeonnant sur des lymphocytes



Partie 2 : Manipulation des cellules

I. Obtention des cellules

2 étapes : dissociation + séparation

1) Dissociation de la MEC et des cellules entre elles (sauf sang) → protéase et/ou agitation légère.

2) Séparation :

Utilisation des propriétés physiques des cellules
→ centrifugation à basse vitesse

Utilisation des propriétés générales d'adhésion des cellules à des surfaces.

2) Séparation (suite)

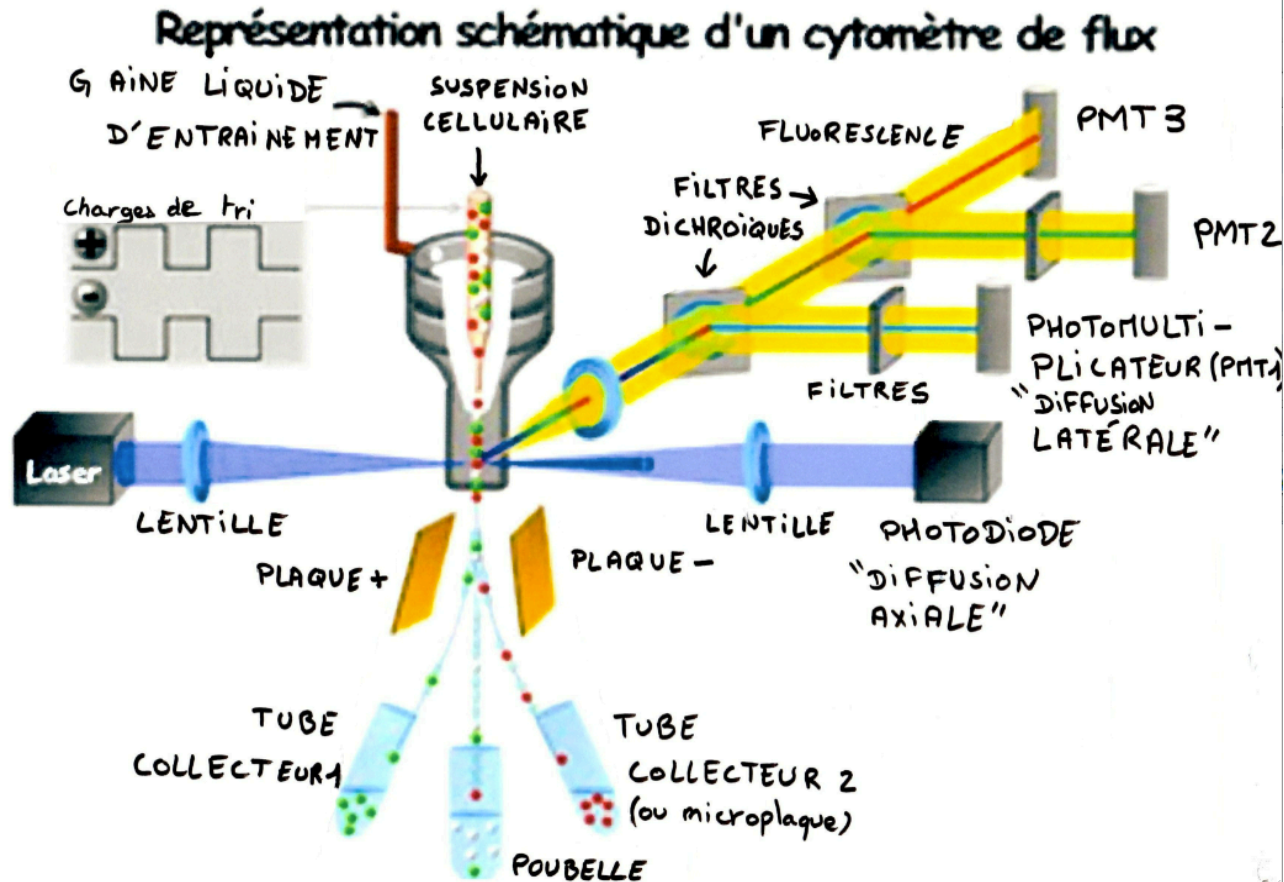
Deux méthodes moléculaires

1^{ère} méthode : Purification sur support ou chromatographie d'affinité.

2) Séparation (suite)

Deux méthodes moléculaires

2^{ème} méthode : Cytométrie de Flux



II. Culture des cellules

1. Avantages

- Contenu cellulaire homogène
- Conditions expérimentales contrôlées
- Possibilité d'isoler une cellule unique

2. Désavantages

- Exclusion du contexte tissulaire → perte d'informations.
- Mais, possibilité de reconstruire le contexte tissulaire (= conditions organotypiques).
- Mutations plus fréquentes.

3. Culture des micro-organismes

- Rappels :

Levures = Eucaryotes Unicellulaires

Bactéries = Procaryotes (donc unicellulaires)

<3 Le rêve d'une bactérie est de devenir 2 bactéries <3

Conditions de culture identiques :

- Milieu : boîte de pétri (semi solide)
- Mutants facilement isolés

4. Culture des cellules animales

✧ Les cellules

Milieux complexes (aa essentiels, vitamines ...
+ signaux de division : SVF = sérum de veau
foetal)

ATTENTION : culture primaire ≠ culture immortalisée.

Cultures lignées immortelles

→ Ne sont pas des cultures primaires !!

Culture primaire	Culture lignées immortelles
On prend nos cellules et on les cultive CASH !!	On prend nos cellules, on les immortalise puis on les cultive.
Sénescence après \approx 50 divisions (<u>irréversible</u>)	Téломérase donc pas de sénescence.

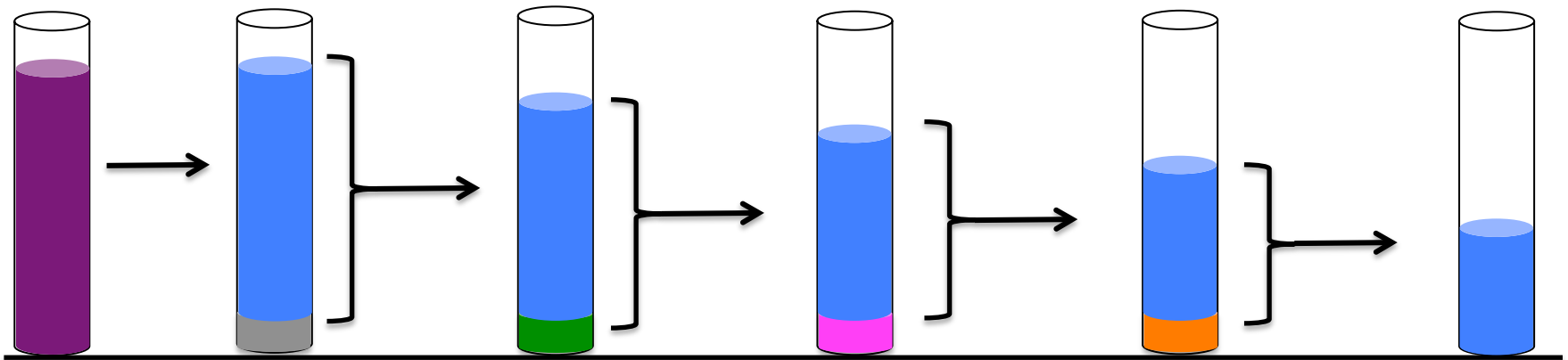
Lignées immortelles spontanées : rares chez l'Homme et fréquentes chez la souris.

III. Analyse des cellules

1) Lyse des cellules (on s'en ouff)

2) Fractionnement des cellules (très important)

Centrifugation différentielle :



Homogénat

5 min à 15 000 g

Culot = microbodie

10 min à 600 g

Culot = Noyaux

60 min à 100 000 g

Culot = microsomes
+ Mb Plasmique

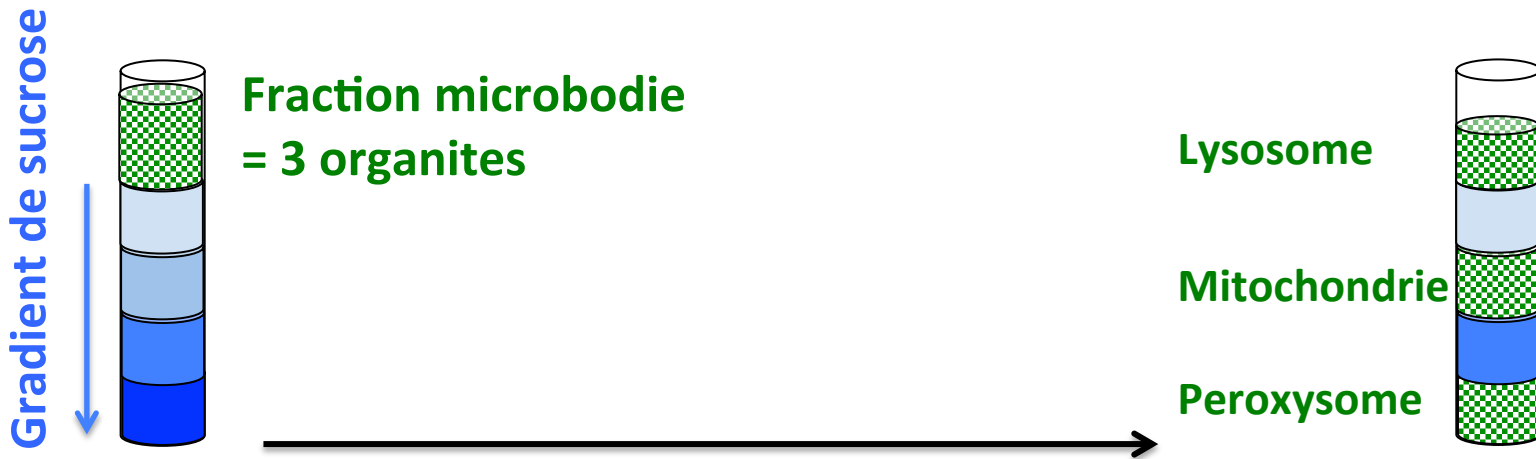
2 h à 300 000 g

Culot = Ribosome,
Virus, Polysomes

Surnageant =
cytosol

Centrifugation iso-pycnic :

Séparation en fonction de la densité pour dissocier les différents éléments du culot :



Centrifugation très Longue à haute vitesse

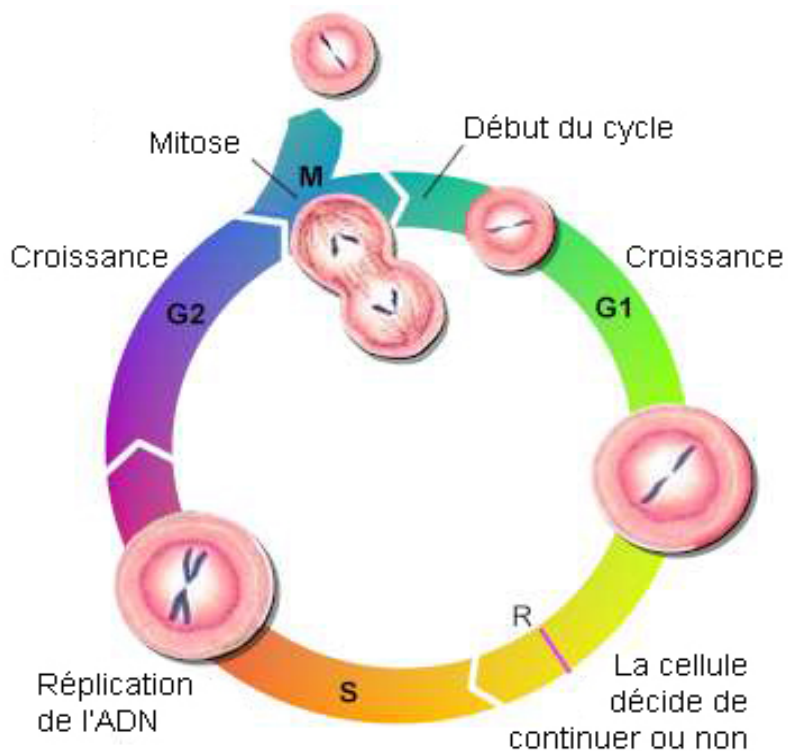
Exemple du syndrome de Zellweger

Maladie génétique → mutation d'un gène impliqué dans la **structure** et la **fonction** des **transporteurs de la catalase** dans les peroxysomes (gène PXR1).

Conséquence : On retrouve la catalase partout dans la cellule !!

→ Mort des nouveau-nés

IV. Analyse du cycle cellulaire



Phase G1 : $2n$ ADN

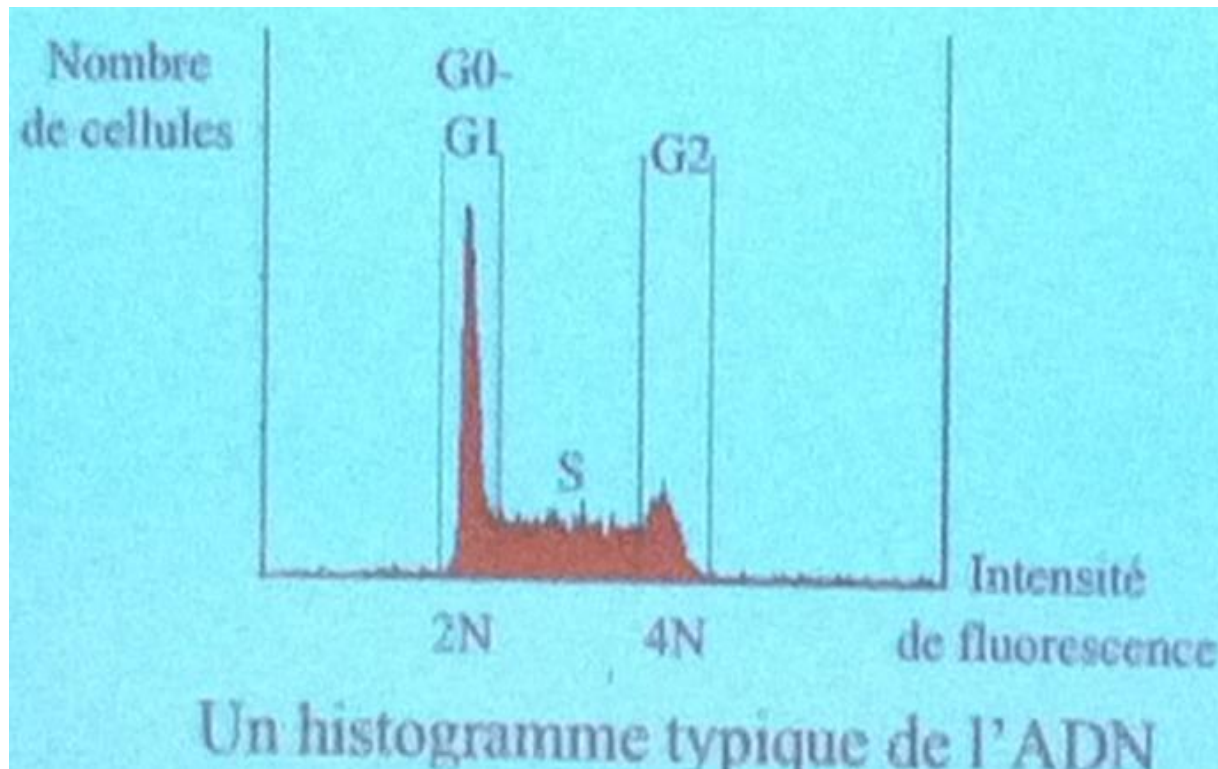
Phase S : **Début** : $2n$ ADN
Fin : $4n$ ADN

Quantité d'ADN augmente

Phase G2 : $4n$ ADN

Phase M : Quantité d'ADN re-diminue après la caryocinèse.

IV. Analyse du cycle cellulaire (suite)



On colore nos cellules à l'**Hoechst** ou à l'**iodure de propidium** pour pouvoir en observer la quantité d'ADN.

V. Notions de génétique appliquées à la Biocell'

1) Définitions :

- Génotype : ensemble des gènes sauvages **et** mutés.
- Polymorphisme génétique : phénomène permettant la diversité intra-espèce : plusieurs allèles possibles pour un même gène.
- Mutation : allèles mutés inadaptés → troubles physiologiques.
- Phénotype : apparence extérieure codée par le génotype et dépendant de l'environnement.
- Epigénétique : phénomènes environnementaux régissant l'expression des gènes.

V. Notions de génétique appliquées à la Biocell' (suite)

- Haploïdie : Organisme dont les noyaux des cellules somatiques ne possèdent qu'un seul jeu de chromosomes.
- Diploïdie : Organisme dont les noyaux des cellules somatiques possèdent 2 jeux de chromosomes.
- Homozygotie/Hétérozygotie : Un organisme est homozygote pour un gène lorsque les 2 allèles de ce gène sont identiques.
- Dominance/Récessivité : En cas d'hétérozygotie, c'est l'allèle dominant qui s'exprimera.

2) Analyse de la composition moléculaire des fractions

3 ensembles moléculaires :

- Génome = ensemble de l'**ADN**
- Transcriptome = ensemble des **ARN**
- Protéome = ensemble des **Protéines**

Attention : Tous les gènes ne sont pas transcrits et tous les ARN ne sont pas traduits !!!

LA BIOPUCE

😊 Petit Film 😊

Partie 3 : Complémentation

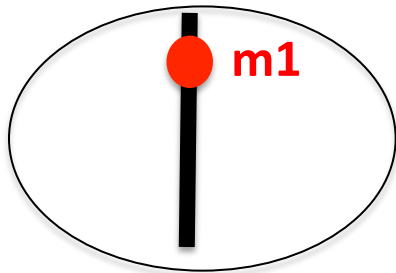
Définition

On dit qu'il y a complémentation entre 2 mutations lorsqu'elles appartiennent à des groupes de complémentation distincts.

1^{ère} Partie : Le Test de Récessivité

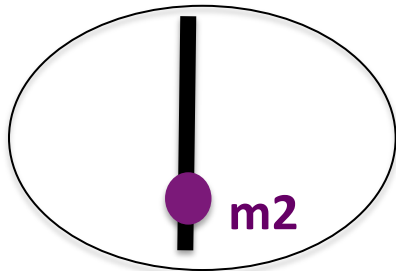
Nos 2 mutants doivent être récessifs pour pouvoir effectuer le test de complémentation.

Gène mutant m1



On remarque que la cellule ne marche pas « normalement »

Gène mutant m2

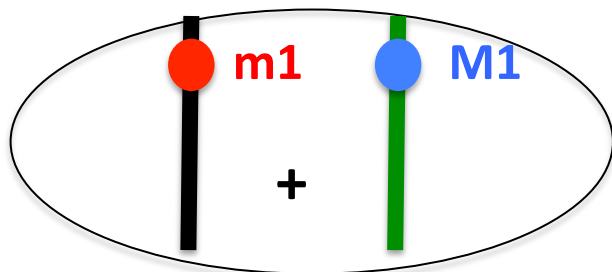


On remarque que la cellule ne marche pas « normalement »

Comment
savoir si nos
mutations sont
dominantes ou
récessives ? 😊

On fusionne un **noyau sauvage** avec le noyau de notre cellule mutée, et on observe ...

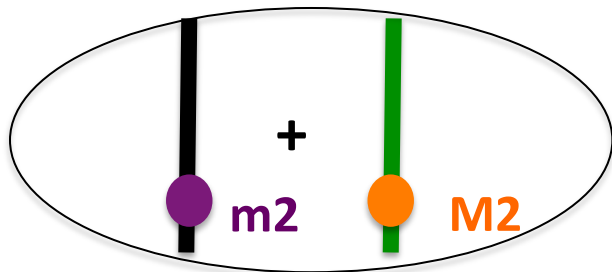
Gène mutant m1 (protéine non fonctionnelle)



Phénotype sauvage : notre mutant est récessif.
Phénotype mutant : notre mutant est dominant.

Gène sauvage M1 (protéine fonctionnelle)

Gène mutant m2 (protéine non fonctionnelle)



Phénotype sauvage : notre mutant est récessif.
Phénotype mutant : notre mutant est dominant.

Gène sauvage M2 (protéine fonctionnelle)

Qu'est ce que la complémentation ?

C'est la restauration (ou pas) du phénotype sauvage en combinant dans la même cellule plusieurs gènes.

La complémentation d'une mutation récessive c'est l'habilité à restaurer une fonction en combinant dans une cellule 2 gènes dont au moins 1 est muté.

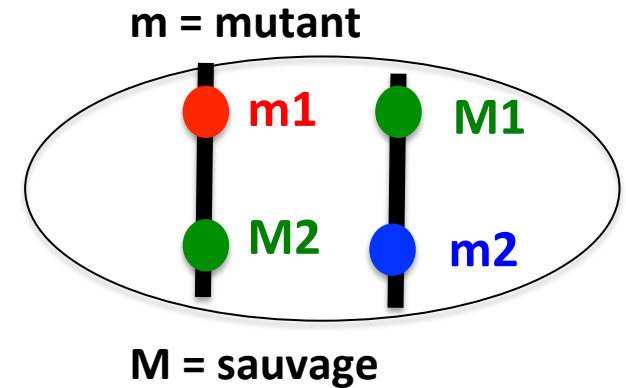
2^{ème} Partie : Le Test de Complémentation

But : On veut savoir si nos mutations sont allèles d'un même gène, ou bien si elles appartiennent à 2 gènes différents.

- 1) On prend 2 cellules « mutantes »
- 2) On fusionne leurs noyaux.
- 3) On observe le phénotype.
- 4) On conclut.

Il y a Complémentation

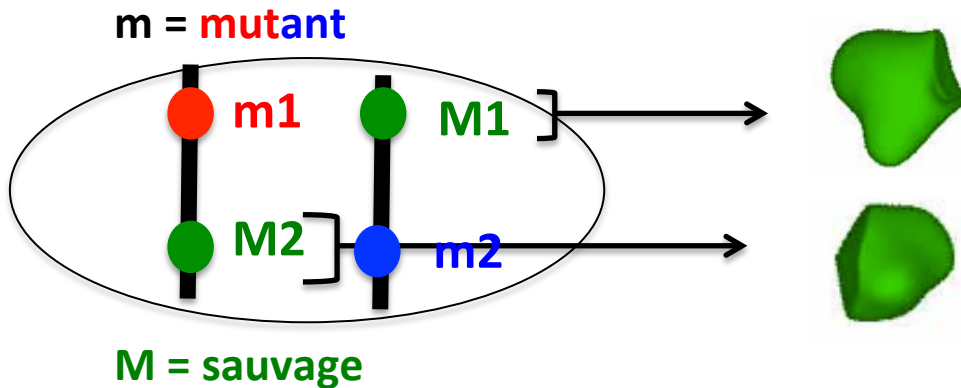
1^{er} Cas : → Phénotype sauvage



Il y a complémentation, les mutations appartiennent à 2 groupes de complémentation distincts.

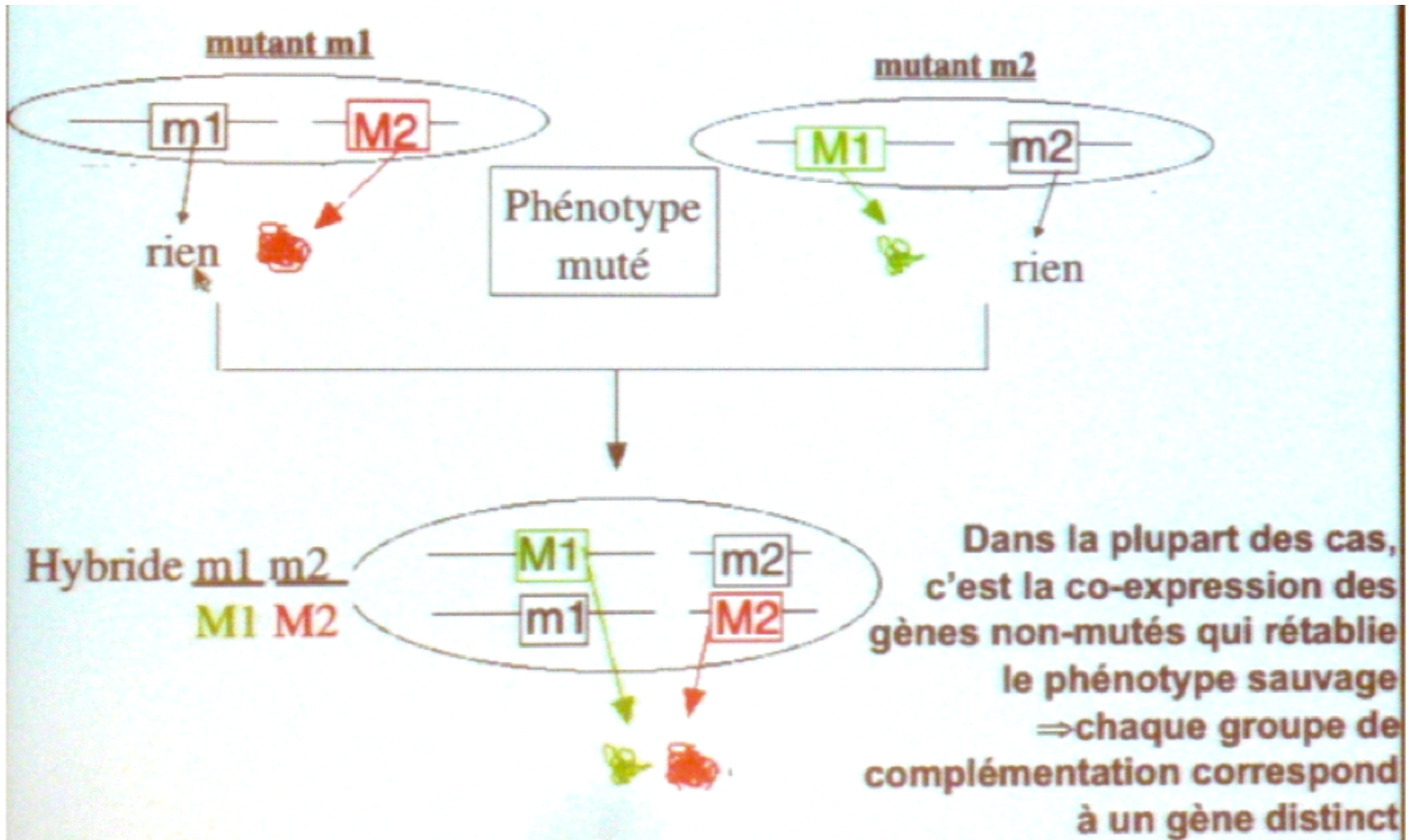
→ On SUGGÈRE que nos mutations NE SONT PAS ALLÈLES d'un même gène (*car il existe un cas particulier*)

Il y a Complémentation



Protéines « normales »
par complémentation.
→ Phénotype sauvage

Il y a Complémentation



Il y a Complémentation

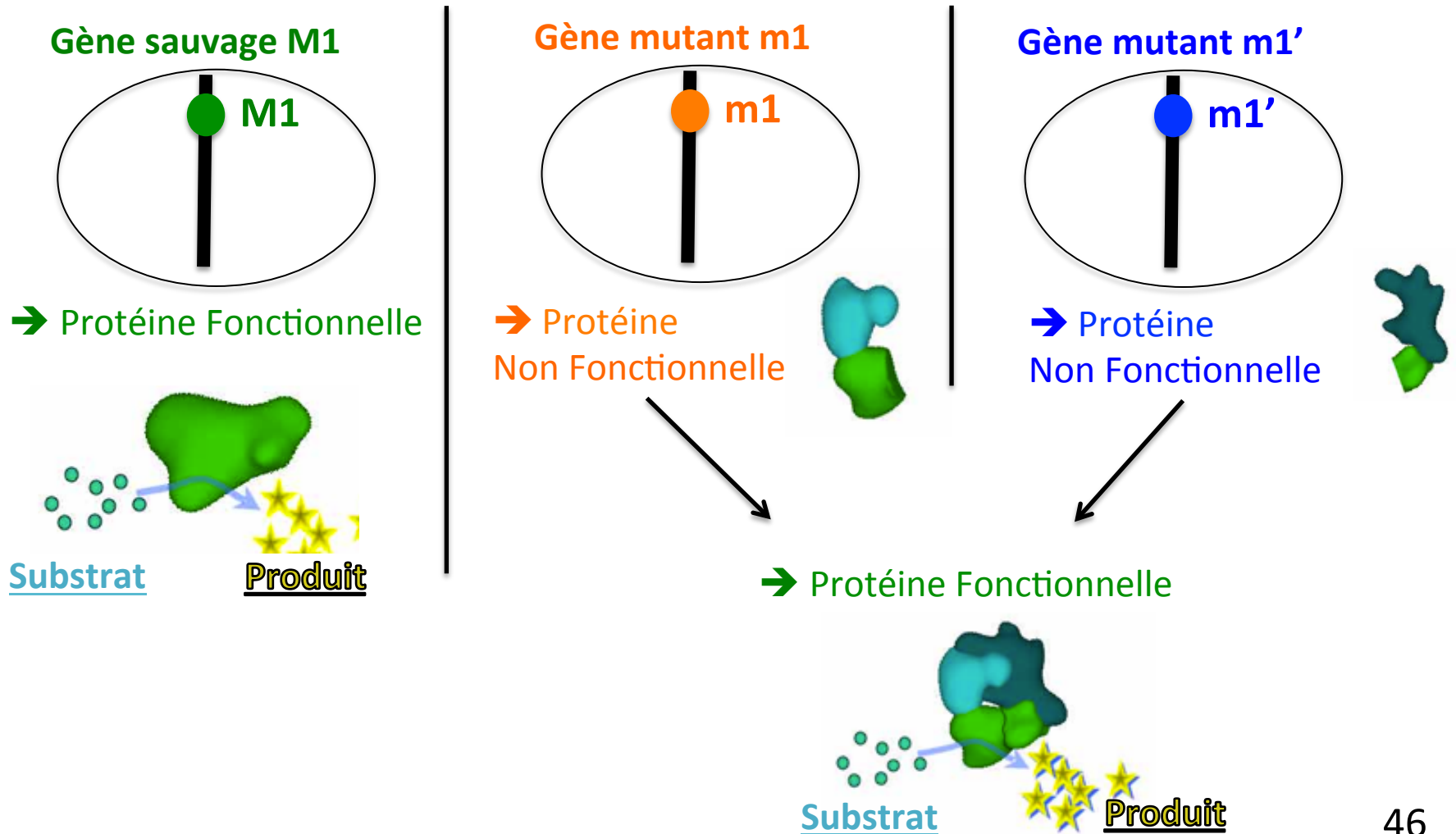
Cas exceptionnel (suppression intragénique) :

→ Phénotype sauvage

→ On SUGGÈRE que nos mutations NE SONT PAS ALLÈLES d'un même gène, mais en fait elles le sont car :

→ 2 protéines non fonctionnelles peuvent en s'associant redonner une protéine fonctionnelle !?!

Cas de la suppression intragénique : 2 Protéines non fonctionnelles peuvent donner une protéine fonctionnelle.

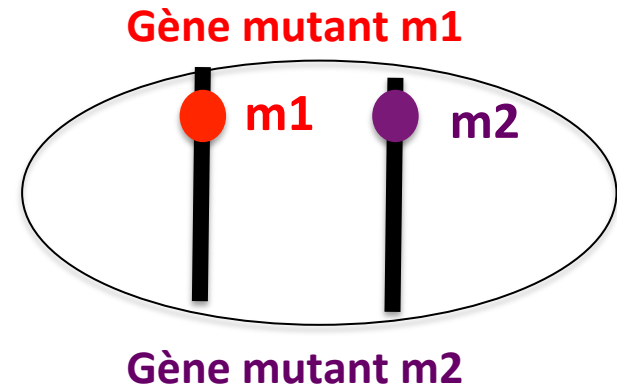


Pas de Complémentation

Après Observation :

2^{ème} Cas :

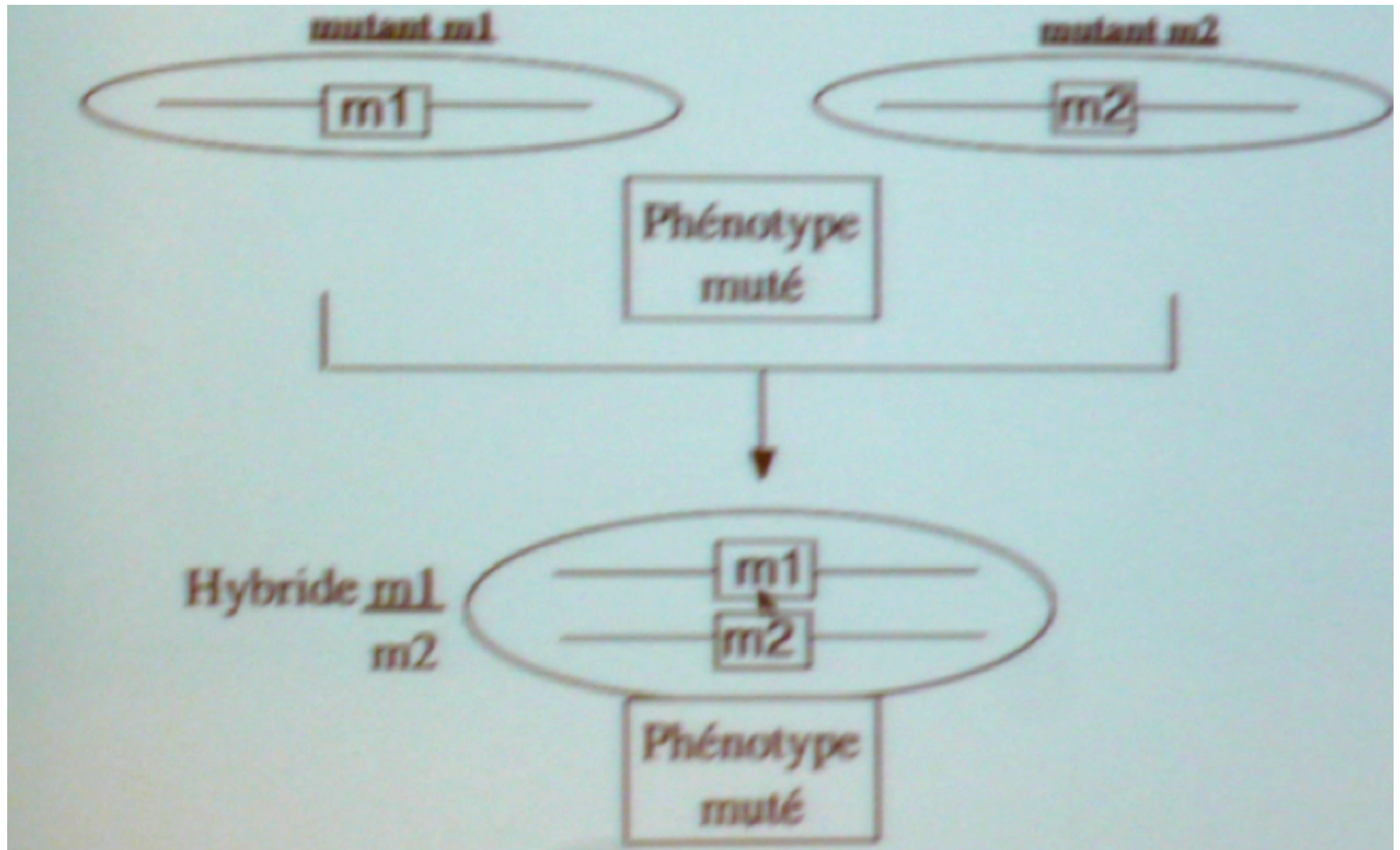
→ Phénotype muté



Il n'y a pas complémentation, les mutations appartiennent au même groupe de complémentation.

→ On **DÉMONTRE** que nos mutations sont **allèles** d'un même gène.

Pas Complémentation



Pour résumer

Phénotype muté → Les mutations appartiennent au même groupe de complémentation. On démontre que c'est allèle.

Phénotype sauvage → On **suggère** que c'est pas allèle car suppression intragénique possible.

NON LA BIOCELL' CA REND PAS FOU



😊 **MERCI A TOUS POUR VOTRE** 😊

😊 **ATTENTION** 😊

ET

**BON COURAGE POUR SAMEDI, ET
POUR CETTE ANNEE DE DINGUE ;-)**



Alexis et Mika

