

-- La microscopie électronique --

La **résolution est d'environ 2nm (résolution max = 0,2 nm)**, on utilise le pouvoir séparateur des **électrons** qui ont des longueurs d'onde plus petites que le photon, permettant une meilleure résolution.

Qu'est-ce que « la résolution 2 nm » ? = on peut distinguer deux points distants de 2 nm.

Conditions requises pour observer un échantillon :

- **Vide poussé** (meilleur rendement en électron : les électrons ne seront pas déviés par les molécules d'air).
- **Coupe ultrafine** (< 0,1µm)
- **Echantillon fixé chimiquement.**
- **Echantillon déshydraté** (Problème : eau = principal constituant cellulaire) sauf en **cryomicroscopie**.

1. La microscopie en transmission

Le faisceau d'électron **TRAVERSE** la préparation (comme les photons en MO). On va marquer la préparation grâce à des **sels de métaux lourds** ce qui va permettre **d'augmenter le contraste** (les métaux lourds sont denses aux électrons).

a. Marquage à l'or

C'est un petit peu le même principe que l'immunofluorescence. On va prendre des anticorps spécifiques de la protéine qu'on veut étudier et on va les **marquer à l'or**. **L'or est l'équivalent du fluorochrome.**

b. Par ombrage

On va visualiser des **surfaces**. On fabrique une **réplique de l'échantillon** en vaporisant des métaux lourds sur la surface. On dissout ensuite l'échantillon à l'acide. On visualise enfin **la réplique** qui offre un meilleur contraste que l'échantillon lui-même.

c. La cryomicroscopie

On pratique la **cryofracture** : **On congèle la préparation dans de l'azote liquide à -150°C**. On fracture les blocs sous vide grâce à une lame selon un plan de fracture, c'est-à-dire une zone de moindre résistance qui passe **ENTRE LES DEUX FEUILLETS LIPIDIQUES D'UNE MEMBRANE**. On vaporise ensuite une fine couche de platine ou de carbone afin d'observer une réplique de la surface fracturée ou décapée.

2. La microscopie à balayage

Les électrons **NE TRAVERSENT PAS LA PREPARATION**, mais la surface va être balayée par un faisceau d'électrons qui vont exciter la surface de l'objet, il va y avoir émission **d'électrons secondaires** par la surface. La résolution est plus faible, de l'ordre de 10 nm mais on obtient des images en 3D, on peut étudier des échantillons épais. On peut recouvrir l'échantillon de métaux lourds pour augmenter le rendement.



-- La microscopie à force atomique --

On a une résolution identique à la résolution électronique c'est à dire **0,2 nm**. On va utiliser une **pointe la plus fine possible** qui va venir interagir avec les surfaces des molécules. Il y a une interaction lorsque 2 objets sont **très proches** mais **ne se touchent pas**, cette interaction va faire bouger la pointe. Il va y avoir changement de direction de la pointe, on appelle ça une **déflexion**. Cette pointe est reliée à un bras de levier qui va faire bouger la pointe selon les reliefs de l'échantillon. La pointe et l'échantillon seront **toujours à la même distance**. On envoie un faisceau laser sur le bras de levier. Le faisceau va être réfléchi et on va le récupérer et l'analyser grâce à une **photodiode** et un **ordinateur**. En fonction des mouvements du bras de levier, le faisceau va être réfléchi à des endroits différents. L'ordinateur reconstitue l'image.

Plus la pointe est fine meilleure sera la résolution. On relève la **TOPOGRAPHIE** de l'échantillon.

✓ Avantages :

- On peut travailler à **l'AIR LIBRE**, avec une **cellule vivante**.
- La résolution n'est limitée QUE par la taille de la pointe.
- On mesure des **volumes en 3D**, au niveau de la microscopie électronique, c'était des images 3D artificielles.
- C'est non destructif pour les cellules, on peut travailler en phase liquide, on n'a pas besoin de coloration.
- C'est **moins cher** que la ME.

I. Obtention des cellules

Pour obtenir nos cellules, on procède en 2 étapes :

1. Dissociation :

On dissocie les cellules du tissu et de leur **matrice extra-cellulaire (MEC)**, (*sauf pour le sang car les cellules sont en suspension*). On va **rompre les contacts intercellulaire** grâce à des **protéases** ou une **agitation légère** (*pour ne pas stresser les cellules car elles sont toujours vivantes !*)

2. Séparation :

Plusieurs techniques :

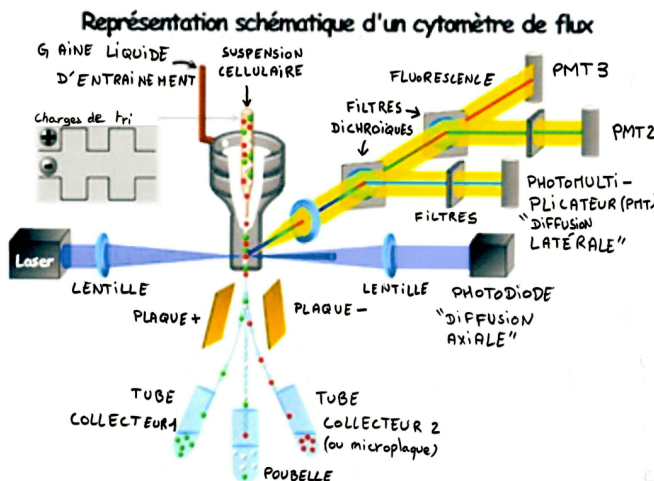
- En utilisant les propriétés **physiques** des ϕ → centrifugation à basse vitesse.
- On peut utiliser la **séparation** par les **propriétés générales d'adhésion à des surfaces** (Boîtes de pétri, lame de verre, milieux liquides). → **Un érythrocyte ne poussera pas sur une boîte de Pétri.**
- **Deux méthodes moléculaires** d'obtention d'une cellule :

a) Purification sur support ou chromatographie d'affinité

On va envoyer les cellules à proximité d'un support qui contient des **anticorps** spécifiques.

- **La sélection NEGATIVE** : On récupère la **cellule qui n'a pas été arrêtée par les anticorps**, celles qui ne possèdent pas l'antigène. Cette technique est préférentielle car elle n'altère pas la cellule (*la fixation de l'antigène sur l'anticorps peut modifier la cellule dans la sélection positive*) c'est **plus difficile** à faire et **plus cher** car il faut acheter tous les anticorps de toutes les cellules qu'on ne veut pas (*car un tissu n'est pas constitué que de 2 cellules !*)
- **La sélection POSITIVE** : On récupère les **cellules qui ont été fixées par les anticorps** c'est à dire celles qui **présentent l'antigène à leur surface**.

b) Cytométrie de flux



À la base, on introduit les **cellules préalablement dissociées et marquées à la fluorescence dans un tube très fin**. Ce sont des cellules **en suspension**. Un laser excite les cellules, il y a 2 détections dans **la partie analytique du cytomètre de flux**.

- ① Un détecteur de fluorescence qui reconnaît la fluorescence émise par les cellules après leur excitation.
- ② Un détecteur laser qui détecte la forme et la taille de la cellule.

Exemple d'application : la détermination de la durée des différentes phases de la méiose (l'aspect de l'ADN hétérochromatine, chromatine etc), la numérisation de cellules, la détermination des pourcentages de cellules mortes et vivantes ...

La deuxième partie permet le **trie** des cellules **c'est le FACS**, on va appliquer un champ électrique et les cellules vont être déviées en fonction de leur fluorescence, **plus elles sont fluorescentes, plus elles vont être déviées**.

→ C'est la cytométrie de SEPARATION :

Le canule va se mettre à vibrer et les cellules vont entrer dans des petites gouttelettes, la charge électrique de ces gouttelettes va être fonction de la fluorescence. On recueille à la sortie de l'appareil les cellules qui ont été déviées. Le FACS est efficace mais très coûteux.

II. Culture des cellules

1. Avantages

- **Contenu cellulaire homogène**, plus que dans un tissu.
- **Les conditions expérimentales sont contrôlées**.
- Possibilité **d'isoler une seule cellule** ce qui nous donne des clones génétiquement homogènes.

2. Inconvénients

- **En dehors** du contexte tissulaire, **on perd des informations**, mais il est possible de se rapprocher des vrais tissus en reconstruisant les conditions tissulaires (*les conditions organotypiques*).
- Facilement dérivable, on arrive à des mutations plus fréquemment.

3. Culture des micro-organismes

Attention à bien se rappeler que les **levures sont EUCARYOTES**, et que les **bactéries sont PROCARYOTES**, mais que les deux sont **des organismes unicellulaires**. Cependant on va les cultiver **dans les mêmes conditions**.

Les conditions de croissance sont simples. On utilise des **milieux semi solides** comme les boîtes de Pétri qui permettent la formation de colonies, les mutants sont facilement isolés et obtenus. **<3 LE REVE D'UNE BACTERIE EST DE DEVENIR 2 BACTERIES <3**

4. Culture de cellules animales

Nécessite des milieux **complexes** qui comportent les **a.a essentiels**, les **vitamines** et surtout les **facteurs de croissance, messagers hormonaux**. Les cellules **eucaryotes NE SE DIVISENT PAS PAR DEFAUT**. Il faut leur donner l'ordre de se diviser par des signaux exogènes et ajouter du sérum de veau fœtal (SVF). Il n'y a pas de division anarchique contrairement aux cultures cancéreuses.

★ Cultures primaires ★

On étudie directement les tissus dissociés (le plus souvent les fibroblastes : facilement cultivables et bien connus), cependant la cellule en culture **ne se divise qu'un nombre de fois limité**. Après, elle se met en **sénescence**. Attention, ce n'est pas la mort de la cellule qui reste métaboliquement active. Au bout d'une **50^{aine}** de divisions, on a la sénescence. Celle-ci est **IRREVERSIBLE**.

5. Lignées immortelles (≠ culture primaire !)

C'est à dire que les variants cellulaires vont se diviser **à l'infini** (*sérum etc ...*). ATTENTION, les lignées des tumeurs et des cancers sont **EN PARTIE IMMORTELLE**, il y a une capacité de prolifération au delà des limites, on dit que les cellules sont **SUR LE CHEMIN DE L'IMMORTALITE**.

→ On peut les amener à « l'immortalité » en sélectionnant des variants dans des milieux de culture en laboratoire.

Chez l'homme les **lignées immortelles spontanées sont très rares**, chez les souris, il y a plus de cancer, donc souvent des lignées immortelles spontanées.

On peut utiliser l'introduction d'**UN GENE d'immortalisation spontanée** : le gène de la **TELOMERASE** (enzyme qui finit la réplication des chromosomes).

III - Analyse des cellules

Elle requiert la destruction de la cellule : on va la fractionner et l'analyser par les procédés suivant :

1. Lyse des cellules

On « casse » la membrane plasmique pour libérer le contenu de la cellule dans un tube à essai. On va ainsi obtenir des bouts de membranes et des organites qu'on appelle **extrait** ou **homogénat**.

Pour ce faire, on emploie différentes techniques :

- La **sonification** : lyse grâce aux ultra-sons
- Les **chocs osmotiques** : créer des différences de concentration intra et extra cellulaire pour la forcer à s'étirer au delà de sa limite.
- Les **détergents** : s'intercalent dans la membrane et l'ouvrent.
- Les **procédés physiques de frottement** sur des pistons de téflon.

Une fois l'homogénat obtenu, on va d'abord le séparer grossièrement, là aussi par plusieurs techniques : *filtration, centrifugation* (principe revu juste après), *études biochimiques, chromatographie, électrophorèse*.

2. Le fractionnement des cellules

a) On utilise la **centrifugation différentielle**. Les différents éléments sont séparés en fonction de leur taille et de leur densité. Plus les éléments sont petits et peu dense, plus la centrifugeuse doit tourner rapidement. On parle en *g* (gravité), comme dans les avions de chasse où les pilotes subissent plusieurs *g* c'est-à-dire plusieurs fois leur poids.

→ Au dessus de 100 000 g on parle d'**ultra centrifugeuse**.

Les organites qui sédimentent les premiers sont donc les plus lourds. Nous allons réaliser plusieurs sédimentations, toujours plus fort et en gardant le **surageant** et en enlevant la partie qui a sédimentée entre chaque centrifugation dans l'ordre :

- 1) 10 min à 600 g → culot = **Noyaux**
- 2) 5 min à 15 000 g → culot = **fraction microbodies (péroxyosomes, lysosomes et mitochondries)**. On ne peut différencier un organe d'un autre.
- 3) 60 min à 100 000 g → culot = membrane plasmique, **fraction microsomale** (fragment de RE et grosse structures comme ARNm accrochés aux ribosomes = **polyribosomes**)
- 4) 2 heures à 300 000 g → **ribosomes libres, virus, polysomes**.

→ Le **surageant de cette dernière centrifugation est le cytosol**.

On aura beau centrifuger à très haute vitesse, on restera avec le **cytosol** qui est la **fraction soluble** du cytoplasme.

Pour obtenir encore plus de précision avec le fractionnement on va utiliser la **centrifugation à l'équilibre en gradient de densité (= centrifugation isopycnique)**.

b) Cette technique consiste à mettre, par exemple, la **fraction microbodies** dans un tube à essai rempli de différentes strates de solutions de sucrose avec des densités différentes connues des expérimentateurs.

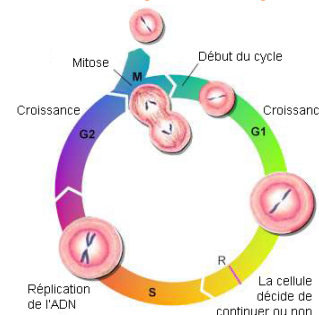
Les constituants de la fraction microbodies se seront répartis selon leur densité, entre deux strates.

Cette technique a permis de détecter les enzymes que produisent les différents organites pour leur fonctionnement :

- **Lysosome** le moins dense : **phosphatase acide**
- **Mitochondrie** : **cytochrome oxydase**
- **Péroxyosome** le plus dense : **catalase**

Cette découverte est l'illustration parfaite d'une règle universelle des enzymes : elles sont compartimentées. L'endroit où elles sont dans la cellule déterminent si elles marchent ou pas. Les dysfonctionnements sont à l'origine de maladies plus ou moins graves (ex : syndrome de Zellweger).

IV. Analyse du cycle cellulaire grâce à la quantification de l'ADN :



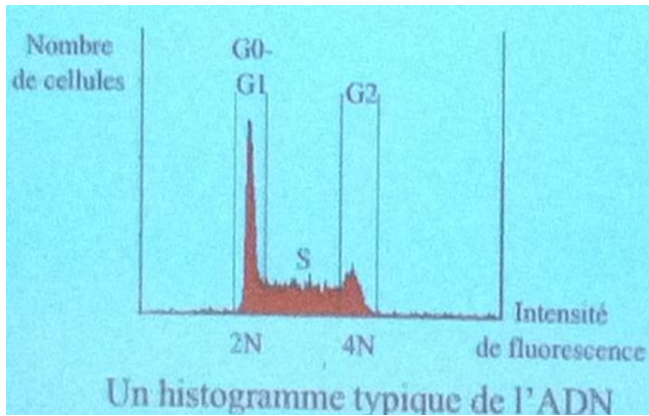
Selon l'avancement du cycle cellulaire, nous aurons une quantité d'ADN différente.

Ainsi en **phase G1**, la cellule (diploïde) va contenir **2n chromosomes**.

En **phase S**, la **quantité d'ADN augmente** et en **phase G2**, elle en **contiendra 4n**.

Puis lors de la **mitose** on revient à **2n chromosomes** lors de la caryocinèse.

Pour observer nos cellules, il suffit de colorer l'ADN grâce à l'**Hoescht** (*traverse tout seul la membrane*) et/ou à l'**iodure de propidium** (*qui nécessite une perméabilisation de la membrane*).



Lorsqu'on utilise l'Hoescht, on obtient ce type de résultat (à noter que l'on prend une « photo » à un instant T d'une colonie de plusieurs cellules). On obtient **2 pics**, le 1^{er} nous donne une indication sur la **quantité de cellules en phase G1/G0**, et le 2^{ème} pic, qui correspond à la quantité maximale d'ADN nous renseigne sur la **quantité de cellules en G2** au moment de notre « photo ».

Ainsi il sera possible d'évaluer **en proportion** le nombre de cellules en phases G1/G0, S, et G2, et donc de **déduire le temps que dure chacune de ces phases**.

PARTIE 4 : NOTIONS DE GENETIQUE APPLIQUEES A LA BIOCELL'

1) Définition

<3 Quelques définitions à savoir par cœur :

- **Génotype** : ensembles des gènes normaux (= sauvages) et mutés.
- **Polymorphisme génétique** : phénomène permettant la diversité intra-espèce : **plusieurs allèles pour un même gène**. Les **gènes mutés** sont des allèles inadaptés qui provoquent un **trouble physiologique**.
- **Phénotype** : **Apparence extérieure** codée par le génotype et dépendant de l'environnement.
- **Épigénétique** : Phénomènes environnementaux régissant l'expression des gènes.
- **Haploïdie/Diploïdie** : Si un organisme n'a qu'une copie de chacun de ses gènes alors il est *haploïde*, s'il a 2 fois le même gène il sera *diploïde*.
- **Homozygotie/Hétérozygotie** : Un gène est homozygote lorsqu'il a ses deux allèles identiques.
- **Allèle dominant/Allèle récessif** : Il y a toujours interaction entre les deux allèles d'un même gène, seulement, lorsque l'un des deux est dominant, l'autre n'influera pas sur le phénotype. Il est important de savoir quel allèle est dominant et lequel est récessif dans les phénomènes de mutation.

Les mutations sont le plus souvent récessives. Elles correspondent à une « **perte de fonction** » c'est-à-dire que la protéine codée par le gène ne marche plus.

Pour les mutations dominantes, il existe le « **gain de fonction** » mais c'est plus rare.

2) Analyse de la composition moléculaire des fractions

3 ensembles moléculaires dans la ϵ : **génome (ADN)**, **transcriptome (ARN)** et **protéome (protéines)**.

- **Tous les gènes ne sont pas transcrits** (*Exemple : seulement 10% des gènes sont exprimés chez un lymphocyte*). **Donc si on connaît le génome, ça ne veut pas dire qu'on connaît le transcriptome.**

- De même, **tous les ARNm ne donnent pas des protéines** et certaines protéines sont modifiées après leur traduction. **Donc si on connaît le transcriptome ça ne veut pas dire qu'on connaît le protéome.**

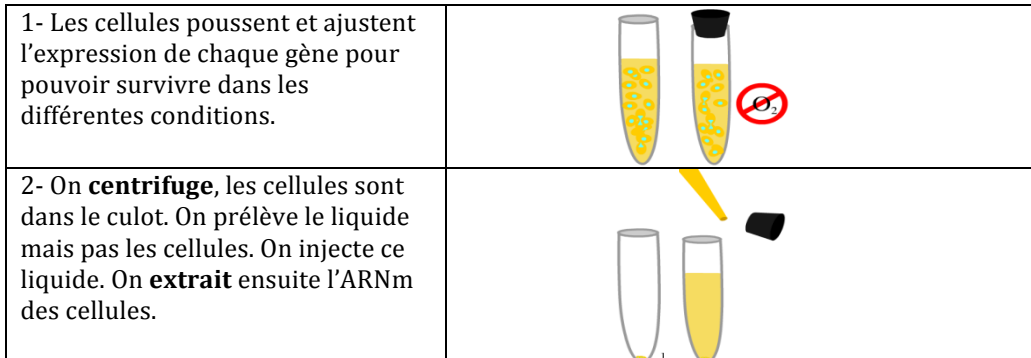
PARTIE 5 : ANALYSE DU GENOME/PROTEOME/TRANSCRIPTOME

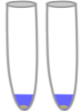
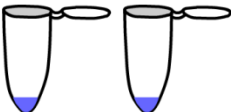

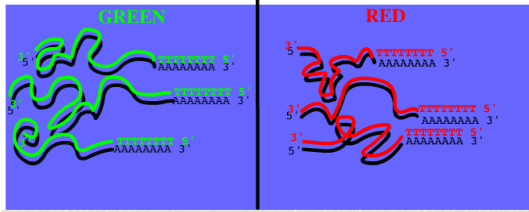
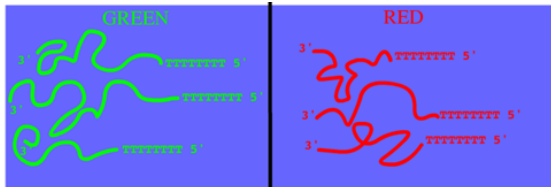
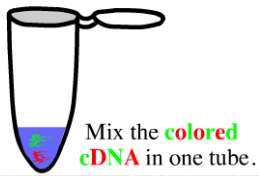

A-Etude du génome


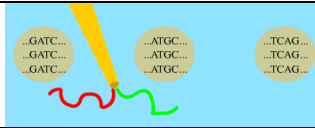

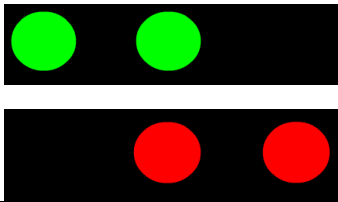
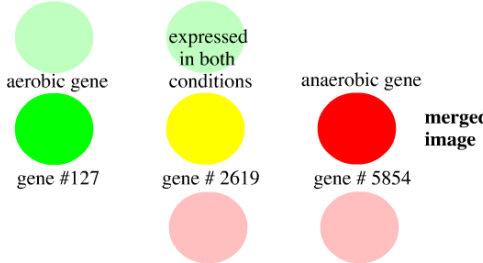
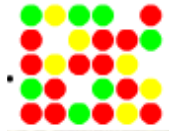
1. Les puces à ADN

- ↳ **But** : on veut voir **quels gènes sont exprimés**.
- ↳ **Prérequis** : **Connaître** à l'avance **les séquences** des gènes qui nous intéressent.
- ↳ **Avantages** : **fiable, faible coût**.
- ↳ **Inconvénients** : ne permet pas de séquencer. On ne peut pas mesurer l'ADN dans l'absolue, **il faudra toujours comparer deux populations cellulaires différentes pour voir les différences d'expression génique (ex : ϵ cancéreuse VS ϵ saine)**.

Application : on compare ici l'expression génique d'une lignée de cellules cultivée en présence d'oxygène avec une autre lignée privée d'oxygène.



3- L'ARNm flotte maintenant dans une solution tampon.	
4- On récupère l'ARNm et on le met dans un autre tube.	
5- Exemple avec trois des nombreuses molécules d'ARNm provenant de chacun des tubes.	
6- On va fabriquer de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARNm. On introduit dans un des tubes des bases azotées (ATCG) marquées avec un fluorochrome émettant dans le vert. L'ADNc formé sera vert. Pareil avec du rouge pour le deuxième tube.	
7- L'ADNc est formé. On dégrade l'ARNm .	
8- On prélève les ADNc dans les 2 tubes et on les mélange dans un 3 ^{ème} tube.	
9- Voilà la biopuce ; chaque spot représente des séquences de gènes différents. On choisit d'étudier 3 spots au hasard.	

10- Chaque spot est fait d'ADN qui va pouvoir s'apparier avec l'ADNc. Une portion de chaque séquence est montrée ci-contre.	
11- On incube l'ADNc avec la biopuce	
12- Certains ADNc marqués vont se lier aux spots. On enlève tout l'ADNc qui ne s'est pas lié et on observe la biopuce.	
13- En regardant directement la biopuce on ne voit toujours rien, il va falloir détecter l'ADNc lié pour pouvoir le visualiser. On met la biopuce dans un microscope et on envoie le laser .	
14- On superpose les deux images par ordinateur : c'est le merge . On en déduit les gènes exprimés en conditions aérobie (O ₂), les gènes exprimés en condition anaérobie (pas d'O ₂) et les gènes exprimés dans les deux conditions.	
15- Biopuce complète	

PARTIE 6 : LE TEST DE COMPLEMENTATION

Définition :

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

★ 1^{ère} étape OBLIGATOIRE ET ESSENTIELLE AVANT LE TEST DE COMPLEMENTATION ★ Le Test de Récessivité

Ce test va nous renseigner sur « la nature » de la **mutation**. En effet celle ci doit impérativement être **récessive** et non dominante. Pour cela le phénotype sauvage doit être rétabli à la fin de notre expérience.

Comment procède-t-on ?

On met notre allèle mutant en présence de notre allèle sauvage.

- Si le **phénotype** est de type **muté**, cela signifie que l'allèle muté a « pris le dessus » sur notre allèle sauvage. On dit que la **mutation est dominante**.

- Si le **phénotype** est de type **sauvage**, cela signifiera que l'allèle sauvage a « pris le dessus » sur notre allèle muté. La **mutation** est dite **récessive**.

Pourquoi ce test est obligatoire ?

C'est dû à la nature du test de complémentation. Le but de ce test était de **rétablir l'allélisme** de deux mutations génétiques (= **mutation du même gène**). Donc si les supposées mutations sont dominantes, mises en face de l'allèle sauvage (du même gène), la **mutation s'exprimera** quand même.

Mais ce qu'on veut, c'est justement savoir si cet **allèle sauvage** peut **complémenter le mutant** donc il faut que la mutation soit récessive.

★ 2^{ème} étape ★ : Le Test de Complémentation (uniquement si mutations dominantes)

On a 2 cellules :

- Une cellule A qui a une mutation (RECESSIVE) qui exprime la protéine **m1**.

- Une cellule B qui a une mutation (RECESSIVE) qui exprime la protéine **m2**.

(minuscule = muté, majuscule = sauvage)

On ne sait pas si les deux mutations **m1** et **m2** sont allèles (*mutation du même gène*) ou sur 2 gènes différents.

On va fusionner les noyaux des cellules (on crée un **hétérocaryon** avec un noyau hybride) donc l'ADN des 2 cellules s'exprime.

1^{ère} solution :

Après fusion des cellules, on observe l'expression de la protéine **M1** sauvage et de la protéine **M2** sauvage. **Comment est-ce possible ?** La cellule A avait **m1** muté, mais **M2** sauvage. La cellule B avait **m2** muté mais **M1** sauvage. On a donc 2 mutations récessives à l'état hétérozygote : **Le phénotype sauvage est donc rétabli**.

On dit donc que **M1** de la cellule B a **complémenté m1** de la cellule A, et que **M2** de la cellule A a **complémenté m2** de la cellule B.

Que peut-on en conclure sur l'allélisme des gènes ?

On suggère que les 2 mutations **m1** et **m2** **NE SONT PAS ALLELES, ils appartiennent donc à 2 groupes de complémentation différents**. Chaque groupe de complémentation correspond à un gène distinct.

Pourquoi suggère-t-on seulement ? → Car il existe une exception :

Dans un cas bien précis, les mutations amènent à une **protéine sauvage**.

Considérons qu'une protéine est dimérique, la mutation **m1** de la cellule A produit 1 seul monomère, celle de la cellule B (**m2**) l'autre monomère, les 2 mutations donnent bien lieu à un **phénotype mutant** (A noter que la protéine avec un seul monomère n'est pas fonctionnelle) et les **allèles** sont bien **récessifs**. Donc quand on va réunir les 2 mutants on va avoir **rétablissement du phénotype sauvage** dans le cas d'un même gène (chaque allèle code pour son dimère de protéine et la protéine devient fonctionnelle). C'est un **cas exceptionnel** dans lequel il y a complémentation alors que les 2 gènes sont allèles.

DONC ICI DEUX GROUPES DE COMPLEMENTATION CORRESPONDENT AU MEME GENE :

→ Il y a complémentation = c'est la **SUPPRESSION INTRAGENIQUE**

2^{ème} solution :

→ **m1** et **m2** sont allèles.

Lorsqu'on crée l'hétérocaryon avec noyau hybride, on se retrouve avec nos 2 allèles récessifs, mais cette fois ci, on obtient un **phénotype muté**. On en conclut directement qu'il n'y a pas d'allèle sauvage pour complémenter les mutations récessives.

DANS CE CAS : Il n'y a PAS COMPLEMENTATION → On démontre que nos 2 mutations sont allèles d'un même gène.

On dit qu'elles appartiennent à un même groupe de complémentation.

Résumé :

On observe 1 **phénotype muté** → Pas de complémentation → **Démontre mutations allèles**

On observe 1 **phénotype sauvage** → COMPLEMENTATION → **Suggère mutations pas allèles.**

(Suggère car rares cas)