

Manipulation des cellules – Méthode d'analyse des cellules

I) Manipulation des cellules

A) Obtention des cellules

1) Dissociation du tissu → cellules en suspension

Dans le **sang**, les cellules sont déjà en suspension.

Dans les tissus **solides** (le reste), on doit dissocier les liaisons cellules/cellules et cellules/MEC.

Pour rompre ces liaisons, il existe 3 techniques :

- **Biochimique**, avec des enzymes dont les protéases, qui dissocient les liaisons peptidiques des cellules entre elles et des cellules avec la MEC ;
- **Chimique**, avec L'EDTA, qui est un chélateur d'ion calcium ;
- **Mécanique**, avec une agitation légère.

Les cellules perdent leur environnement tissulaire, elles sont donc modifiées, ce qui entraîne une perte d'information sur leur fonctions.

2) Séparation des différents types cellulaires.

Les cellules sont séparées selon leurs différentes propriétés :

- propriétés **physique** des cellules = la forme, la taille → **centrifugation à basse vitesse**, séparant les cellules des grosses particules du tissu.
- propriétés **biologiques**, avec leur **adhérence** à un support artificiel → en culture, sur boîtes de pétri en plastique ou sur lame de verre.
- propriétés **moléculaires** (spécifique) → **purification sur support ou cytométrie de flux**.

Il y a 2 grands types de molécules qui peuvent être reconnues :

- molécule exposée à la surface de la cellule : types **antigènes de surface** (plus simple). Ce sont des **molécules naturelles**. On peut y avoir accès sans casser la cellule, elle est donc vivante ;
- molécule à l'intérieur de la cellule : on lui confère artificiellement une propriété de **fluorescence** (manipulation de gène), ainsi la cellule est toujours vivante.

On distingue 2 grands types de séparations moléculaires basées sur la reconnaissance de composantes spécifiques des cellules : **Purification sur support ou la cytométrie de flux.**

❖ **Purification sur support = chromatographie d'affinité appliquée au cellules**

Principe : On a une suspension avec 2 types cellulaires (ou plus), et un support qui correspond à une surface neutre (collagène, plastique, billes magnétiques...) sur laquelle on greffe des anticorps = **matrice d'affinité.**



Les Ac reconnaissent les Ag de surface des cellules qui défilent, et là on a 2 possibilités, 2 types de sélection :

➤ **La sélection négative** ➔ **La procédure de choix !!!!!**

On greffe sur la matrice des Ac qui ne reconnaissent pas les Ag des cellules qui défilent, du coup elles ne s'accrochent pas aux parois et on peut les récupérer intactes.

➤ **La sélection positive**

Les Ac greffés sont spécifiques aux Ag de la cellule, il se fait alors une interaction Ag/Ac. Pour récupérer les cellules, il faut casser cette liaison, ce qui altère la biologie des cellules.

❖ **Cytométrie de flux**

Principe : Des cellules en suspension passent dans un **flux continu** à grande vitesse dans un petit canal qui traverse différentes étapes de **détection** afin **d'analyser** chaque cellule **individuellement**.

Les cellules triées sont souvent **fluorescentes**, naturellement ou artificiellement :

- Soit via leur antigène de surface, reconnu par des anticorps greffés à un fluorochrome.
- Soit de manière endogène : la cellule exprime une molécule fluorescente comme la GFP ou ses variantes.

Application :

- permet la **quantification** des molécules **d'ADN** de chaque cellule avec des molécules dont la fluorescence est induite par le contact avec des cellules nucléiques.
- Permet la mesure simultanée de la **taille** et de la **forme** des cellules, ce qui permet entre autres d'analyser si nos cellules sont **mortes ou vivantes**.

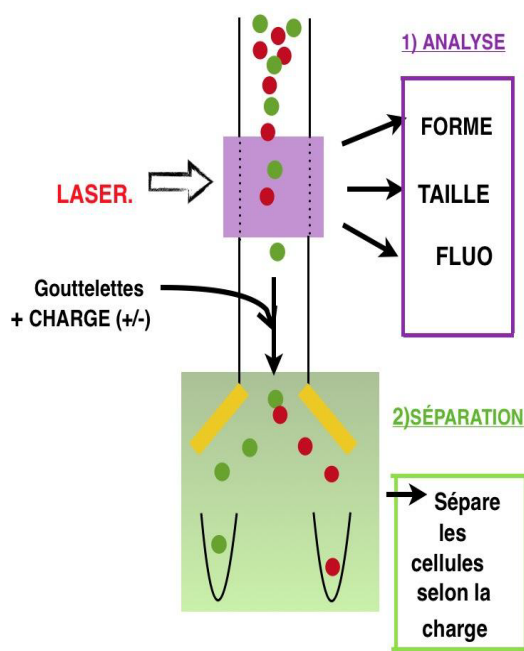
Il existe 2 sortes de cytométrie = **analytique** ou de **séparation**

❖ **Cytométrie analytique** = mesure des propriétés de chacune des cellules.

On a une double détection :

- soit de la fluorescence après excitation avec un rayon laser
- soit de la figure de diffraction qui permet d'analyser la forme et la taille des cellules (action de la lumière et angle de diffraction)

❖ **Cytométrie de séparation (FACS)** = technique **d'analyse** et de **séparation** des cellules.

Principe :

Il y a un tri et une séparation des cellules sur la base de la **quantité de fluorescence**.

Dispositif du FACS :

Les cellules arrivent par le tube, le canal vibre, et en vibrant il sépare les cellules et les met dans une petite **gouttelette = une cellule**.

Au moment de sa formation, la gouttelette reçoit une petite charge électrique injectée par la machine, dont **la quantité est proportionnelle à la fluorescence**.

→ On va donc quantifier la fluorescence via la charge de la gouttelette.

Il suffit ensuite de faire passer la gouttelette dans un **champ électrique**, celle-ci est alors **déviée** en fonction de sa charge et on récupère les cellules en fonction de leur angle de déviation.

Application :

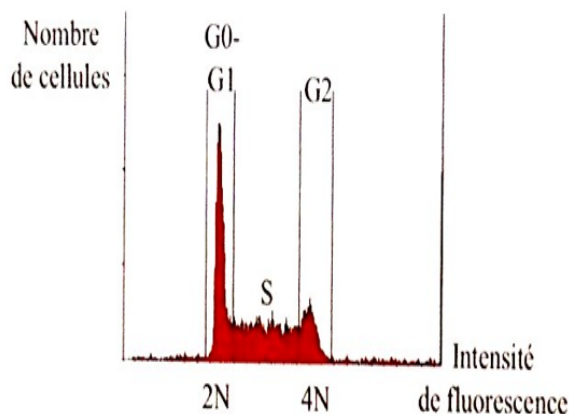
- **Numération** des cellules en suspension (formulation sanguine) en fonction de leurs paramètres cellulaires comme la forme et leur taille ;
- Déterminer le % de cellules mortes et de cellules vivantes ;
- Déterminer la quantité **d'ADN** (utile pour étudier le cycle cellulaire) ;
- Trier les cellules.

Exemples:

On peut se baser sur la quantification de l'ADN (cytométrie) pour déterminer l'état du cycle dans lequel est la cellule. En effet, la quantité d'ADN contenu dans le noyau de la cellule change en fonction du moment du cycle.

On a en G1 (2nADN), en phase S (4nADN), pareil en G2 puis pendant la mitose on revient à 2nADN et ainsi de suite.

On a une suspension de cellules non synchronisées = **culture asynchrone**, chacune à un moment du cycle, elles sont indépendantes et en décalé.



On observe un pic à 2nADN : beaucoup de cellules sont en phase G1 voire G0.

Au milieu, elles sont en phase S.

Une cellule normale a un cycle d'environ 24h.

En sachant la durée du cycle et le % de cellule dans le cycle, on en déduit le temps de chaque phase du cycle pour ce type cellulaire en particulier.

B) Culture des cellules

Pourquoi ? → Quand on prélève les cellules d'un tissu, on en a peu, on veut donc les multiplier pour obtenir une **colonie**.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - contenu cellulaire plus homogène que dans un tissu - conditions expérimentales contrôlées - possibilités d'isoler une cellule unique pour obtenir un clone homogène génétiquement 	<ul style="list-style-type: none"> - perte d'info car étude de la cellule hors du contexte cellulaire (→ solution = culture organotypique) - on peut sélectionner des mutants, variants, sans facilement les contrôler

Il existe des types de culture plus sophistiqués = **cultures organotypiques** → on mélange **plusieurs types cellulaires** pour essayer de recréer les conditions retrouvées dans le tissu dans une **boîtes de pétri**.

A savoir : Les **levures** ne sont pas des bactéries, ce sont des organismes eucaryotes !!!!

1) Culture de micro-organismes (levure)

Les conditions de croissance sont simples et la vitesse de division est rapide (2h environ).

Elles peuvent être cultivées en **milieu semi-solide** (gélose), elles vont poussées en **colonie**. Les mutants sont facilement reconnus et isolés. A partir d'une cellule unique on peut obtenir des variants !!

2) Culture de cellules animales

Elle nécessite un **milieu complexe**.

La culture se fait aussi sur une boîte de pétri, mais sans gélose, on a besoin d'un **milieu solide**.

En effet, les cellules animales **saines** ont la propriété de reconnaître la MEC. Leur contact avec celle-ci leur permet de recevoir des signaux afin qu'elles se divisent.

Sinon, elles comprennent que c'est anormal et ne se divisent pas.

→ **Propriété d'adhésion des cellules sur le plastique !!**

Exception : **Les cellules cancéreuses !!**

En effet, elles sont dans l'incapacité de reconnaître le milieu extracellulaire pour se diviser.

→ **Elles perdent leur capacité d'adhérence au milieu solide.** (Donc en gélose, elles pourront se diviser).

On distingue 2 types de culture = **primaires** ou **immortelles**.

❖ **Cultures primaires** = cellules normales en culture.

Les cellules se divisent un nombre de fois **limité** (+/- 50).

Cet arrêt de division s'appelle **la sénescence**, elle est **irréversible** !!

La sénescence est un phénomène **physiologique** (programmé), qui nous protège de l'apparition de cancers.

❖ **Cultures immortelles**

Certains **variants** sont rendus immortelles, et peuvent donner des lignées. Ils se divisent à **l'infini**.

Le taux d'immortalité spontanée varie en fonction des espèces (rare chez l'homme, fréquent chez la souris).

L'apparition de lignée immortelle est surtout due à une intervention artificielle (traitement avec virus oncogènes ou agents mutagènes) à but de recherche.

II) Analyse du contenu cellulaire

Il faut **détruire les cellules** pour "récupérer ce qu'il y a dedans" et ensuite analyser ce contenu.

A) Lyse et fractionnement

Le but est obtenir un **homogénat = extrait** qui va être le point de départ de l'analyse moléculaire du contenu des cellules.

1) Lyse = méthode qui consiste à **casser** la cellule → **libération du contenu cellulaire** dans un tube à essai.

Il existe différentes techniques de lyse :

- **Sonication** = ultrasons qui cassent les compartiments membranaires ;
- **Choc osmotique** = on utilise une solution hypotonique qui fait exploser la cellule ;
- **Détergents** = méthode chimique qui solubilise (de manière élective) les membranes cellulaires) ;
- **Frottements** = éclatement des cellules par frottements avec des pistons de téflons.

2) Fractionnement = permet de **séparer** les différents constituants des cellules.

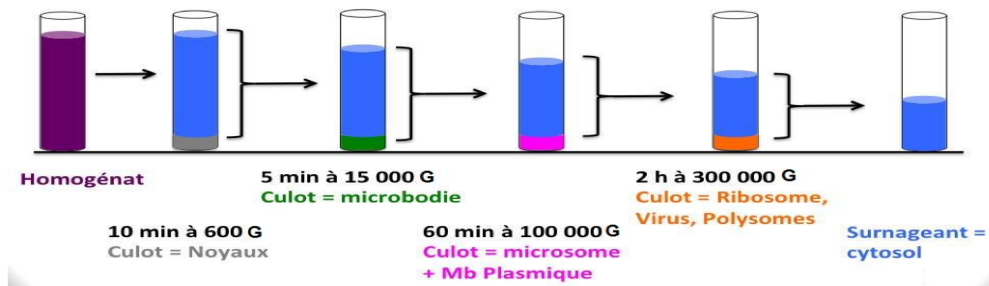
On doit faire une séparation avant de passer à la suite :

- **Filtration** pour les gros débris ;
- **Centrifugation** : membranes, organites, complexes moléculaires
- **Chromatographie et électrophorèse** (plus sophistiquées) : protéines, acides nucléiques ...

2 types de centrifugation : **Différentielle** et **isopycnique**.

❖ **Centrifugation différentielle**

Principe : Séparation des organites cellulaires en fonction de leur **taille** et de leur **densité** (les plus gros et les plus denses sédimentent plus vite).



A chaque fois on récupère le surnageant, et on applique des centrifugations de plus en plus rapides et de plus en plus longtemps.

A partir de **100 000g**, on parle **d'hyper-centrifugation**, on doit changer de machine.

La **fraction microbodies** (= mitochondries, lysosomes et peroxysome) n'est pas pure, leur densité et leur forme sont trop proches. On effectue alors une centrifugation isopycnique.

❖ Centrifugation isopycnique = à l'équilibre en gradient de densité

Principe : on prépare des tubes composés de coussins de sucrose de densités croissantes **connues** (gradient).

Au dessus des coussins, on dispose notre solution à séparer (la fraction microbodies).



Plus on descend, plus la densité est élevée.

Les enzymes sont compartimentées dans les cellules, c'est-à-dire qu'elles sont localisées spécifiquement dans certains organites.

La centrifugation isopycnique met en évidence cette **compartimentation enzymatique** :

- **Péroxyosome** : la **catalase** qui protège contre le stress oxydant ;
- **Mitochondrie** : **cytochrome**, spécifique de la chaîne respiratoire mitochondriale ;
- **Lysosome** : enzymes hydrolytiques qui dégradent par hydrolyse des macromolécules comme la **phosphatase acide**.

Cette compartimentation enzymatique est essentielle à la vie de la cellule !!

Exemple de compartimentation enzymatique : le **Syndrome de Zelleweger**

C'est une mauvaise compartimentation de la **catalase** qui est normalement dans le peroxysome. Ici, elle est diffuse dans toute la cellule.

Ce syndrome aboutit au décès du nouveau né dans la première année de vie suite à des problèmes hépatiques, neurologiques, et d'anomalies du développement de la face.

Cette maladie génétique est causée par la mutation d'un gène qui ne code pas pour la catalase mais qui est impliqué dans la **structure** et la **fonction** des peroxysomes.

3) Composition moléculaire

- **Génome** = ensemble des gènes, séquences d'acides nucléiques.
- **Transcriptome** = ensemble des transcrits (tous les gènes ne sont pas transcrits).
- **Protéome** = ensemble des protéines traduites.

!!! ADN → le même dans toutes les cellules, ARN → ≠ selon le type cellulaire !!!

1) **Puces à ADN** = Etude du transcriptome.

On a une lame de verre composée de nombreux spots = cases. Dans ces spots est gravée une séquence caractéristique d'un gène. On sait que telle case correspond à tel gène, grâce à des machines spécialisées.

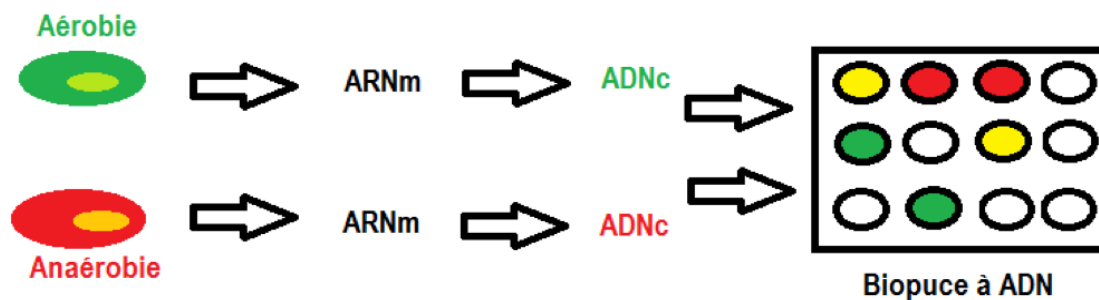
Souvent, cette méthode est utilisée pour comparer 2 situations biologiques (Ex : gènes transcrits en présence d'oxygène).

Principe :

- On place des cellules en présence d'oxygène et d'autres sans oxygène ;
- On lyse les cellules, puis on récupère les **ARNm** ;
- On fait une **transcriptase inverse** pour obtenir **l'ADN complémentaire** à partir de l'ARNm ;
- On fait des sondes (hybridation in situ) fluorescentes avec 2 fluorochromes différents (émission dans le **vert** pour les cellules en situation **aérobie** et émission dans le **rouge** pour les cellules en **anaérobie**) ;
- On place ces ADNc sur la biopuce, si les ADNc s'hybrident avec les gènes gravés sur la lame de verre, on verra apparaître une fluorescence.

Plusieurs cas sont alors possibles :

- **Florescence verte** = gène exprimé seulement en aérobie ;
- **Fluorescence rouge** = gène exprimé seulement en anaérobie ;
- **Fluorescence jaune** = rouge + vert = jaune = gène exprimé dans les 2 situations ;
- **Pas de fluorescence** = gène exprimé dans aucune des 2 situations.



2) NGS ou Séquençage Haut Débit

Les méthodes dites **NGS** ne sont **qu'en partie enzymatique**, l'**ADN** est gravé sur une puce, ce qui permet d'avoir toute une panoplie de séquences, le tout traité par des machines très rapides.

On découpe l'ADN en morceaux. On met l'ADN dans la machine qui donne un listing avec toutes les séquences des petits fragments. Chaque morceau d'ADN va être séquencé et on obtient des résultats (de petite taille). Des ordinateurs analysent toutes les séquences de ces résultats et regardent si elles sont présentes dans un **génom**e dit **de référence**.

On peut ainsi en *quelques heures* déterminer la **séquence du génome** par rapport au génome de référence.

Application :

- séquencer le génome ;
- chercher des mutations : germinales ou somatiques ;
- mieux caractériser les cancéreuses pour faire de la médecine personnalisée
- étudier au niveau germinale des gènes de susceptibilité de prédispositions ;
- étudier le transcriptome : les séquences d'ADN.

3) Spectrométrie de masse → analyse du protéome

Principe : Technique physique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse (*et de leur charge*) avec une précision très importante.

Pour avoir une carte des protéines il faut les **séparer**, pour cela on utilise généralement **l'électrophorèse bidimensionnelle** qui sépare les protéines en fonction de leur **masse** et de leur **charge** (pHi).

On sépare ensuite les protéines de l'électrophorèse en petits morceaux grâce à des coupeurs de protéines, les peptides).

A l'aide d'un **spectromètre de masse** on va analyser le rapport masse/charge de chacun des fragments, puis on va comparer ce rapport à une base de données afin d'identifier la protéine (2 protéines ne peuvent pas avoir le même rapport M/Z), cette technique est donc très **discriminante**.