

Cours 2

Manipulation des cellules et analyse génétique



Tutorat Niçois 2015-2016

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules →
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
- D) Exemples

A) Obtention des cellules

1) Dissociation

Détache les cellules de la matrice extracellulaire (MEC) : inutile pour **le sang**

→ Cellules en **suspension**

Différentes techniques :

- Avec des **enzymes**
- EDTA = chélateur d'ion calcium
- Agitation légère (plus doux)

!! Les cellules perdent leur environnement tissulaire !!

A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Plusieurs techniques, selon les propriétés cellulaires :

- Propriétés physique = la forme, la taille : **centrifugation à basse vitesse**
- Propriétés biologique : **adhérence à une surface** → interaction cellule/MEC
- Propriétés moléculaires : 2 méthodes :
 - **Chromatographie d'affinité**
 - **Cytométrie de flux**

A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Chromatographie d'affinité = Purification sur support

Principe = Suspension avec 2 types cellulaires (ou plus)

+ un support qui correspond à une surface neutre

(collagène, plastique, billes magnétiques ...)

sur laquelle on greffe des anticorps = **matrice d'affinité**

➔ seules les cellules qui possèdent l'antigène de surface correspondant peuvent adhérer

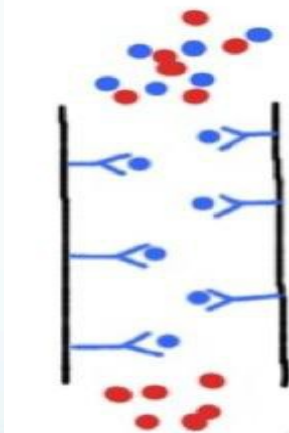
A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

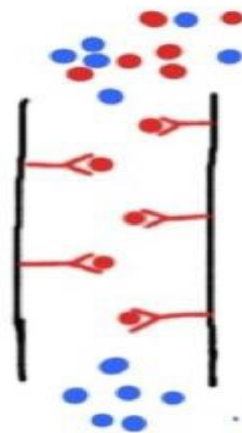
Chromatographie d'affinité = Purification sur support

On veut récupérer les rouges

Sélection
négative



Sélection
positive



On privilégie la **sélection négative** pour éviter les interactions et de casser la liaisons, altérant la biologie de la cellule

A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Cytométrie de flux = détection et analyse individuelles de chaque cellule

2 sortes de cytométrie : Analytique et de séparation

Cytométrie analytique = mesure des propriétés des cellules

→ Double détection :

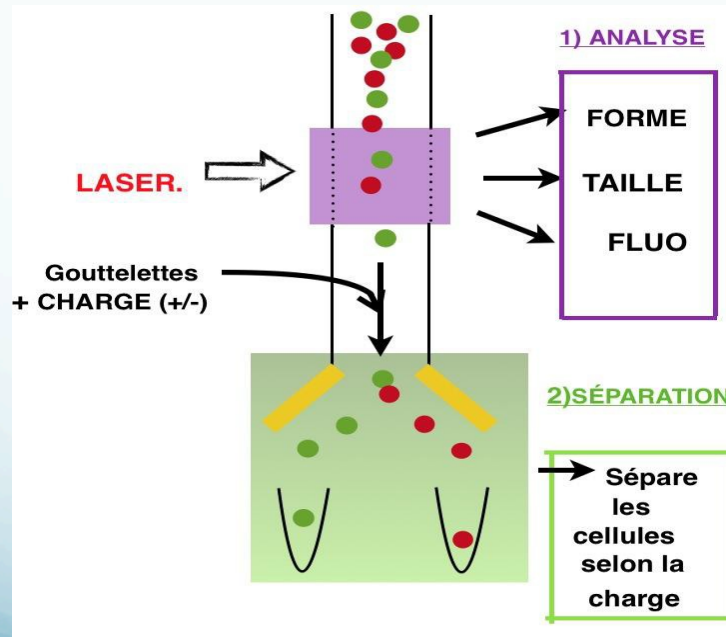
- **Fluorescence** après excitation d'un rayon laser
- Figure de diffraction = analyse forme et taille

A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Cytométrie de flux = détection et analyse individuelles de chaque cellule

Cytométrie de séparation (FACS) = tri et séparation des cellules



On quantifie la fluorescence via la charge de la gouttelette

A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Application du FACS :

- Numération des cellules en suspension (en fonction de leur forme, taille)
- % de cellules mortes ou vivantes
- Évaluer des paramètres cellulaires comme la taille, la forme, la fluorescence
- Quantité d'ADN
- Tri des cellules

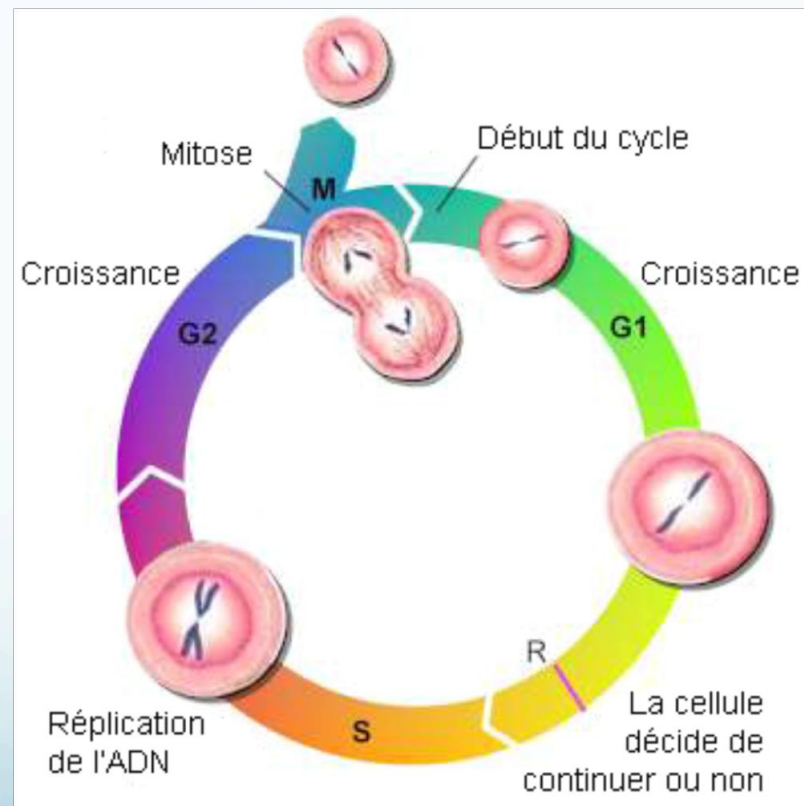
A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Cycle cellulaire

4 phases :

- **G1** : $2n\text{ADN}$
- **S** : Réplication
- **G2** : $4n\text{ADN}$
- **M** : Mitose

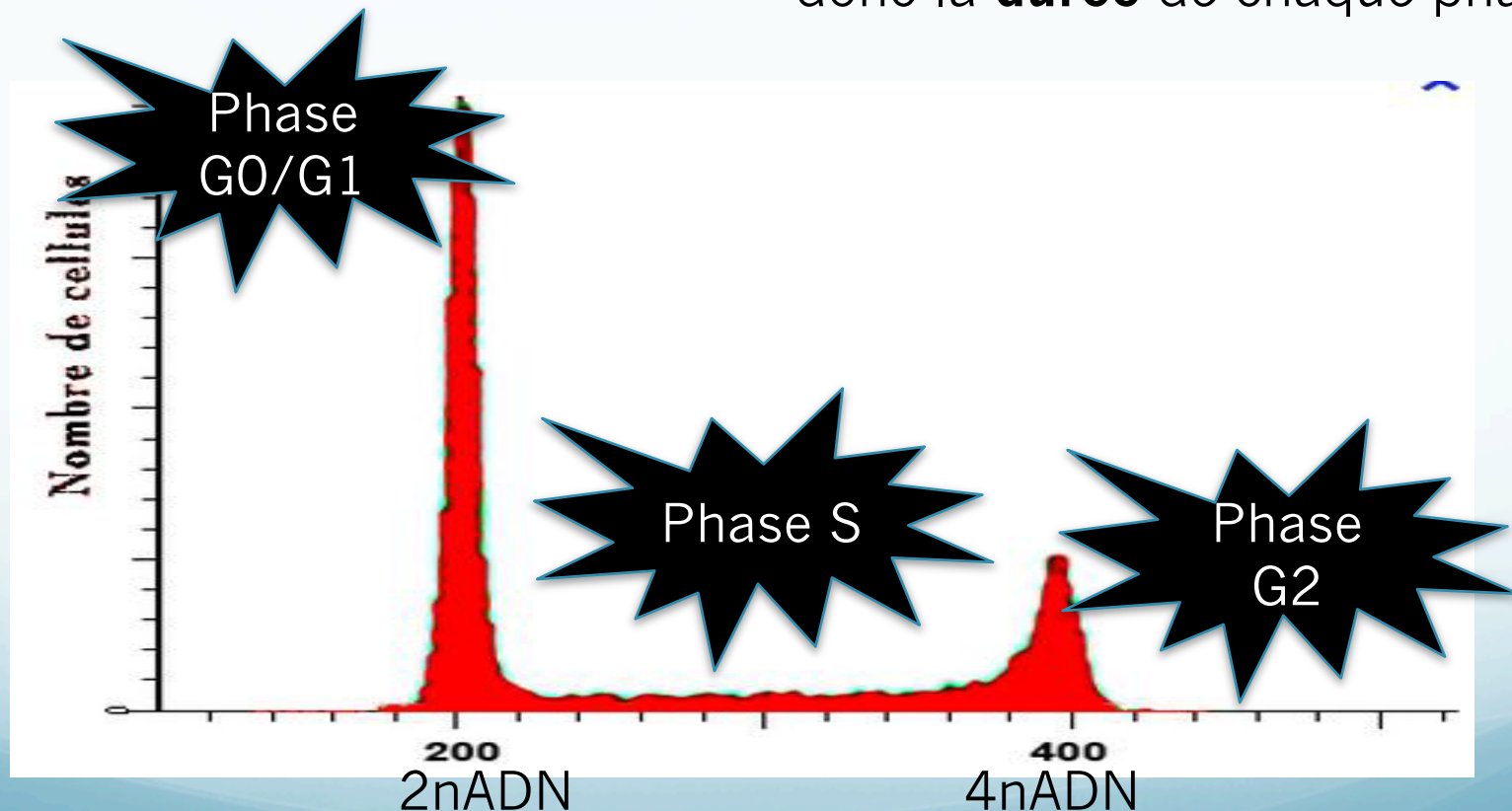


A) Obtention des cellules

2) Séparation des différents types cellulaires

Permet de savoir le % de cellules dans chaque phase :

donc la **durée** de chaque phase



QCM

- A) La cytométrie analytique permet de trier les cellules
- B) La cytométrie analytique permet de mesurer les propriétés des cellules
- C) Le FACS trie et sépare les cellules sur la base de la quantité de fluorescence
- D) L'une des applications de la cytométrie de flux est de déterminer la quantité d'ADN
- E) A, B, C et D sont fausses

QCM

- A) La cytométrie analytique permet de trier les cellules
- B) La cytométrie analytique permet de mesurer les propriétés des cellules
- C) Le FACS trie et sépare les cellules sur la base de la quantité de fluorescence
- D) L'une des applications de la cytométrie de flux est de déterminer la quantité d'ADN
- E) A, B, C et D sont fausses

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules →
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
- D) Exemples

B) Culture des cellules

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Contenu cellulaire + homogène que dans un tissu• Conditions expérimentales contrôlées (T°, O2 ...)• isoler une cellule unique pour obtenir un clone homogène génétiquement	<ul style="list-style-type: none">• Perte d'info (→ solution = culture organotypique)• Sélectionner des mutants, variants, sans facilement les contrôler

Culture organotypiques : on récrée l'environnement tissulaire dans une boîte de Pétri

B) Culture des cellules

1) Culture de micro-organismes

- Boîte de pétri contenant un **milieu semi-solide** (gélose)
- Temps de division d'environ 2h
- Mutant facilement obtenus et isolable

2) Culture de cellules animales

- Nécessite des milieux complexes
- Boîte de pétri mais contenant un **milieu solide** (sans gélose)
→ propriétés d'adhésion à la MEC
- Temps de division d'environ 24h

Exception : Les cellules cancéreuses perdent leur capacité d'adhérence au milieu solide

B) Culture des cellules

On distingue 2 types de culture :

Culture primaire : cellules normales

- Nombre de division limité (+/- 50) → **Sénescence** = phénomène physiologique irréversible
- Protège de l'apparition de cancers

Cultures immortelles : cellules cancéreuses qui échappent à la sénescence → on parle de lignée de cellules immortelles

- Division à l'infini
- Immortalisation spontanée ou artificielle (virus oncogènes et agents mutagènes)

QCM

- A) Les cellules saines en culture poussent sur un milieu semi-solide
- B) Les cellules cancéreuses perdent leur capacité d'adhérence au milieu solide
- C) Un des avantages de la culture des cellules est l'homogénéisation du contenu cellulaire
- D) Aucune culture ne peut recréer un environnement tissulaire
- E) A, B, C et D sont fausses

QCM

- A) Les cellules saines en culture poussent sur un milieu semi-solide
- B) Les cellules cancéreuses perdent leur capacité d'adhérence au milieu solide
- C) Un des avantages de la culture des cellules est l'homogénéisation du contenu cellulaire
- D) Aucune culture ne peut recréer un environnement tissulaire
- E) A, B, C et D sont fausses

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire →
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
- D) Exemples

C) Analyse du contenu cellulaire

A) Lyse de la cellule

= casser la cellule pour récupérer le contenu cellulaire

On obtient un homogénat = extrait

Différentes techniques :

- **Sonication** : avec ultra-sons qui cassent les compartiments membranaires, préserve les interactions (doux et efficace)
- **Choc osmotique** : solution hypotonique, la cellule explose
- **Détergents** (sélectif) : solubilisation des membranes
- **Frottements** : éclatement des cellules par frottements avec des pistons de téflons

C) Analyse du contenu cellulaire

B) Fractionnement

= séparation des différents constituants cellulaires

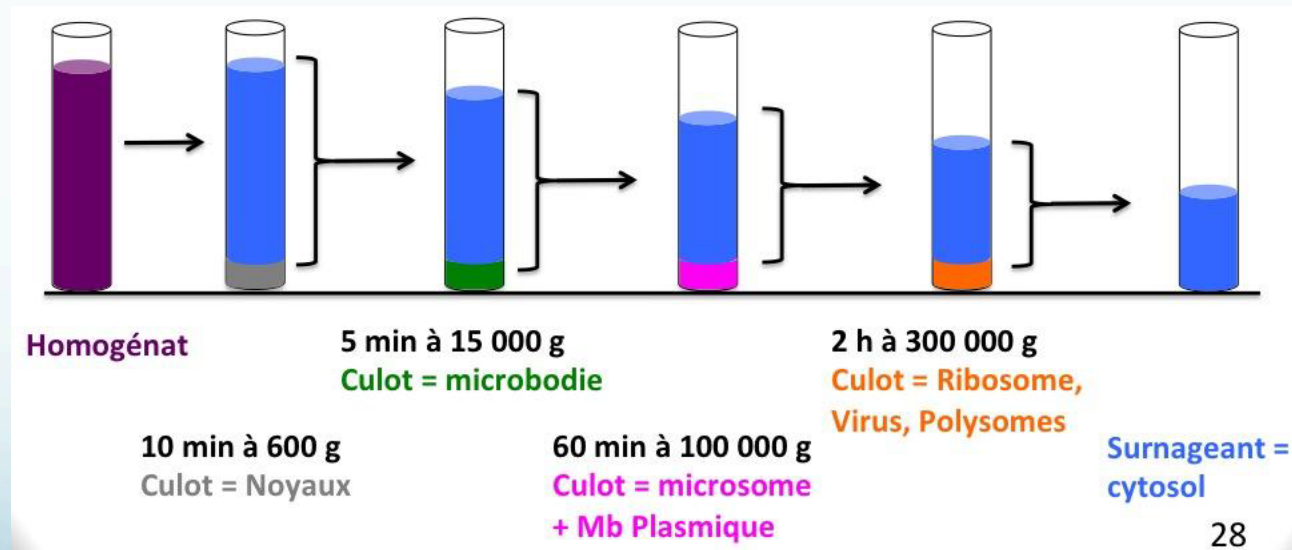
- **Filtration** : gros débris
- **Centrifugation** : membranes, organites, complexes moléculaires
- **Chromatographie et électrophorèse** : protéines, acides nucléiques

C) Analyse du contenu cellulaire

B) Fractionnement

2 types de **centrifugation** : Différentielle et Isopycnique

- **Centrifugation différentielle** = séparation des organites cellulaires en fonction de leur taille et leur densité



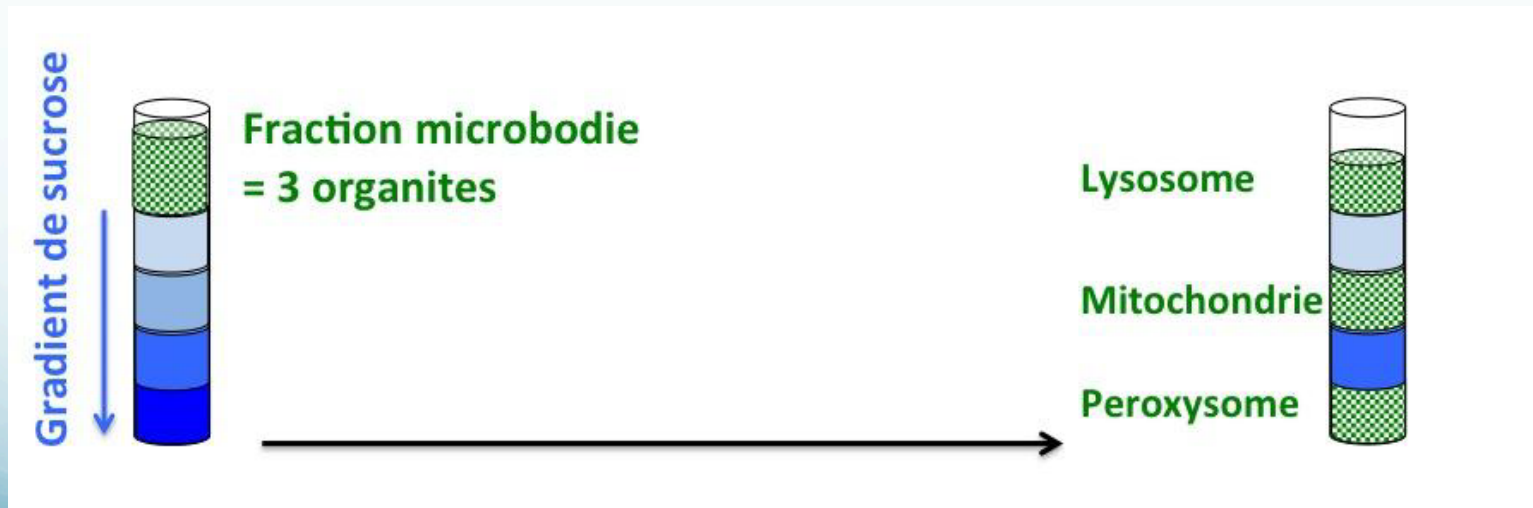
A partir de 100 000g : **Hyper-centrifugation**

C) Analyse du contenu cellulaire

B) Fractionnement

- **Centrifugation Isopycnique** = à l'équilibre en gradient de densité

La fraction microbodie n'est pas pure :
densité trop proches



C) Analyse du contenu cellulaire

B) Fractionnement

Centrifugation isopycnique → Permet de déterminer la **compartimentation enzymatique** :

- Peroxisome : catalase (protège contre le stress oxydant)
- Mitochondries : Cytochrome (chaîne respiratoire mitochondriale)
- Lysosome : enzymes hydrolytiques (phosphatase acide ...) qui dégradent des macromolécules

C) Analyse du contenu cellulaire

B) Fractionnement

La **compartimentation enzymatique** est essentielle à la vie d'une cellule

Exemple : Syndrome de Zellweger

Maladie génétique grave est rare, caractérisée par :

- Désordres neurologiques et hépatiques
- Anomalie du développement de la face
- Mort au cours de la 1ere année

Mutation d'un gène impliqué dans la structure et la fonction des peroxysomes

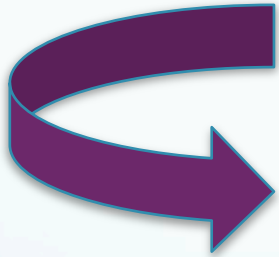
La catalase est diffuse dans le cellule au lieu d'être localisée seulement dans le peroxysome

C) Analyse du contenu cellulaire

C) Composition Moléculaire

3 types de molécules :

ADN = **génom**e = ensemble de gènes



Transcription

ARN = **Transcriptome**



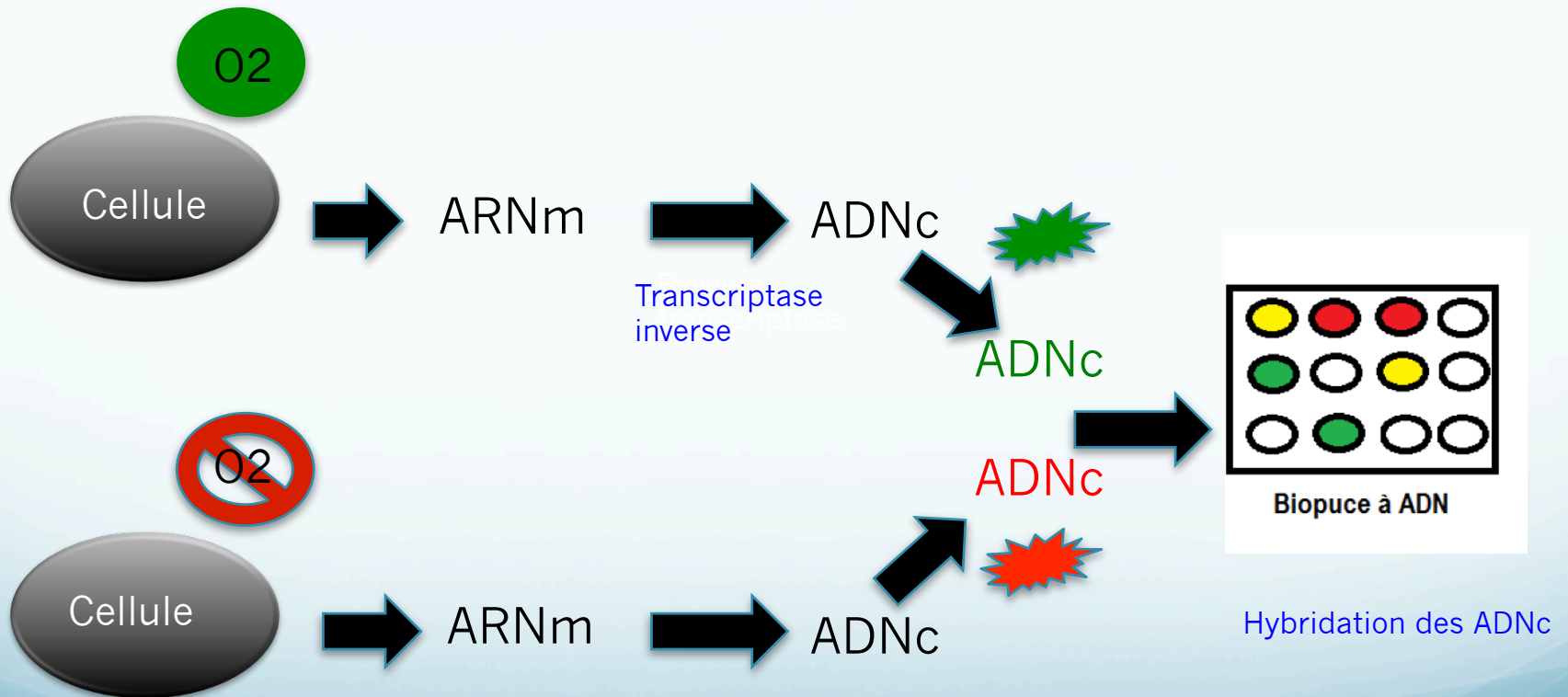
Traduction

Protéines = **Protéome**

C) Analyse du contenu cellulaire

C) Composition moléculaire

Etude du transcriptome : **Puces à ADN**



C) Analyse du contenu cellulaire

C) Composition moléculaire

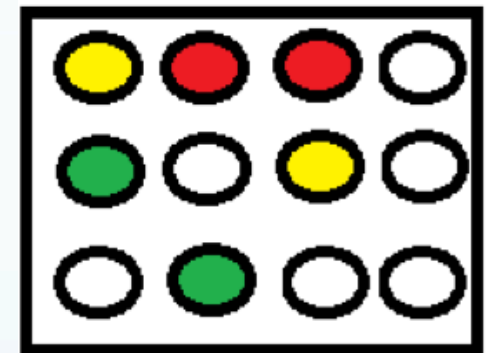
- Etude du transcriptome : **Puces à ADN**

Vert → gène exprimé seulement en condition aérobie

Rouge → gène exprimé seulement en condition anaérobie

Jaune = rouge + vert → gène exprimé dans les 2 conditions

Pas de couleur → pas d'ADNc → pas d'ARNm
→ gène exprimé dans aucune des 2 conditions



Biopuce à ADN

C) Analyse du contenu cellulaire

C) Composition moléculaire

Etude du génome et du transcriptome : **NGS = Séquençage Haut Débit**

Séquençage de l'ADN = déterminer l'ordre des nucléotides

Lire des séquences d'ADN ou d'ARN, base après base.

Plusieurs giga bases par jour

En partie enzymatique

Compare les séquences lu avec un génome de référence

Permet d'étudier des mutations responsables de maladies

Gènes de susceptibilités au cancer

Caractériser les cellules cancéreuses

C) Analyse du contenu cellulaire

C) Composition moléculaire

Etude du protéome : Spectrométrie de masse

- Découpe la protéine en petits morceaux
- Ionise les petits morceaux = donne une charge
- Détermine le rapport masse/charge (M/Z) de chaque morceau
- Compare ce M/Z à une base de donnée
- **Identification**
- M/Z est hyper **spécifique** de chaque molécule → Précis !!

QCM

- A) Le fractionnement consiste à casser la cellule pour obtenir un homogénat (= extrait)
- B) La centrifugation différentielle met en évidence la compartimentation enzymatique
- C) La centrifugation isopycnique utilise des coussins de sucrose de densités différentes connues
- D) La catalase est contenu dans la mitochondrie et détoxifie la cellules suite à un stress oxydant
- E) A, B, C et D sont fausses

QCM

- A) Le fractionnement consiste à casser la cellule pour obtenir un homogénat (= extrait)
- B) La centrifugation différentielle met en évidence la compartimentation enzymatique
- C) La centrifugation isopycnique utilise des coussins de sucrose de densités différentes connues
- D) La catalase est contenu dans la mitochondrie et détoxifie la cellules suite à un stress oxydant
- E) A, B, C et D sont fausses

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse →
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
- D) Exemples

A) Transgénèse

La transgénèse c'est l'introduction d'un nouveau gène (transgène) dans une cellule ou un organisme, alors appelé transgénique

Objectif : Amener une cellule à exprimer un gène précis qu'elle ne possède pas naturellement

Comment : Avec les mêmes types de méthodes que pour le fluorochrome

A) Transgénése

Lorsqu'on **transfecte** une molécule d'ADN étrangère, elle aura 2 possibilités :

- **Expression transitoire du transgène** (le plus souvent) = le gène se trouve dans le nucléoplasme, pas intégré par les chromosomes → rapide, gène transcrit dans les 24/48h

Phase transitoire, effet à court terme

Pas de recombinaison

A) Transgénèse

- **Expression permanente du transgène** (plus rare)

L'ADN recombine avec le génome

Cette molécule d'ADN va se dupliquer → **lignée stable** (effet à long terme)

2 grands types de recombinaison :

- Illégitime = par hasard = non homologue → problèmes : le transgène peut se transférer à l'intérieur d'un gène important ce qui le rendrait inactif
- Recombinaison homologue = séquence spécifique = par intégration ciblée (plus précis mais rare) → transgène s'intègre seulement s'il reconnaît des séquences spécifiques avec la séquence d'ADN

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations →
- C) Test de complémentation
- D) Exemples

B) Notions de mutations

1) Définitions

- **Génotype** = ensemble de gènes
- **Phénotype** = Apparence d'un organisme, dépendant de l'environnement
- **Polymorphisme génétique** = plusieurs allèles pour un même gène → diversité intra-espèces
- **Organisme haploïde** = une copie de chaque chromosome
- **Organisme diploïde** = deux copie de chaque chromosome

B) Notions de mutations

1) Définitions

- 2 **allèles** du même gène dans un organisme diploïde :
 - Gène **homozygote** si les 2 allèles sont identiques
 - Gène **hétérozygote** si les 2 allèles sont différents

- Les allèles peuvent être **sauvages** = normaux ou **mutés**

- Les allèles peuvent être :
 - **Dominant** = exprimé même si présent une seule fois
 - **Récessif** = exprimé seulement si présent en double

B) Notions de mutations

2) La notion de complémentation

Un allèle sauvage complémente une mutation récessive !!

Plusieurs cas :

- Allèle normal + allèle muté récessif = **phénotype normal**
- 2 allèles mutés récessifs = **phénotype muté**
- Allèle normal + allèle muté dominant = **phénotype muté**

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
➔
- D) Exemples

C) Test de complémentation

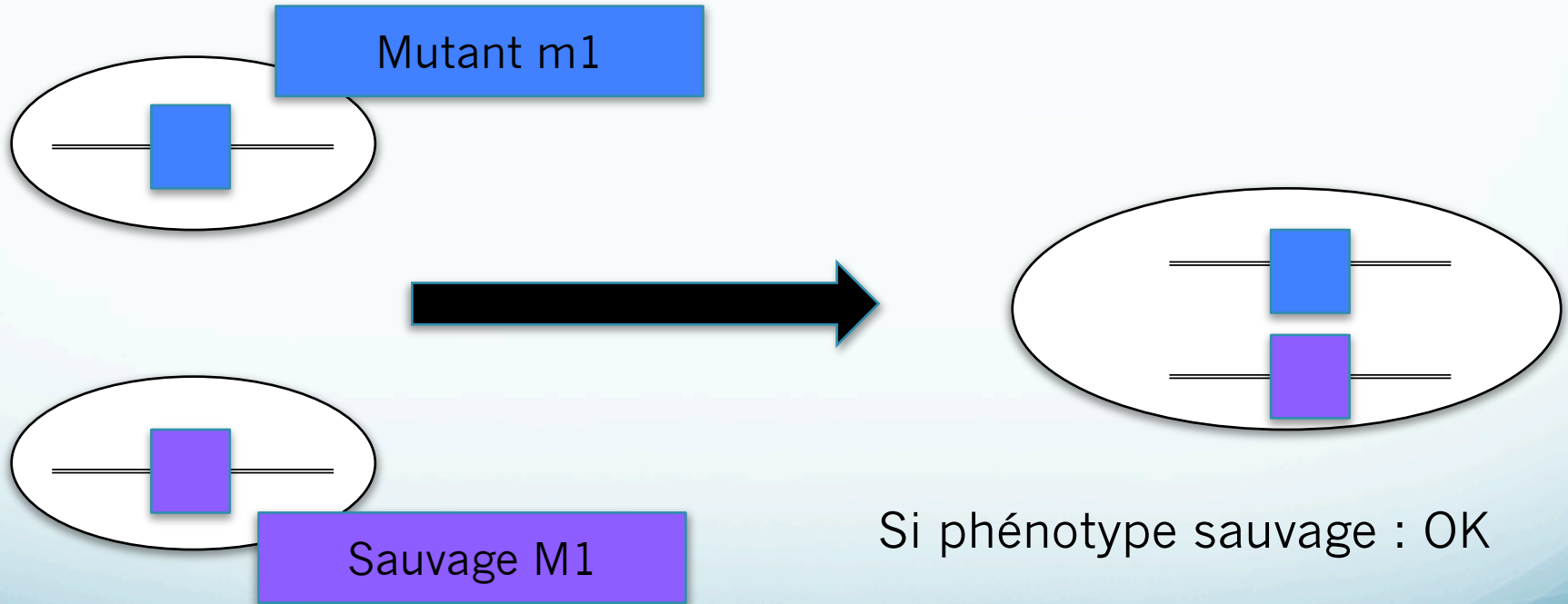
Ce test permet d'étudier les **interactions** entre **2 gènes**

**Complémentation = Habilité à restaurer une
fonction en combinant dans une même cellule
deux
gènes dont au moins un est muté !!**

C) Test de complémentation

1) Test de récessivité

Les 2 allèles mutés doivent être récessifs pour faire un test de complémentation



Si phénotype sauvage : OK

Si phénotype muté : pas bon

C) Test de complémentation

2) Complémentation

Il consiste à rétablir l'allélisme de 2 mutations récessives

On dit qu'il y a complémentation entre les 2 mutations lorsqu'elles appartiennent à un **groupe distinct de complémentation**

Objectif : Déterminer si une mutation appartient au même gène

On a 2 cellules :

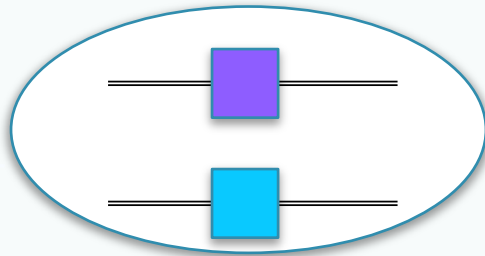
- Cellule A qui a une mutation **m1**
- Cellule B qui a une mutation **m2**

→ Fusion des 2 noyaux = **hétérocaryon**

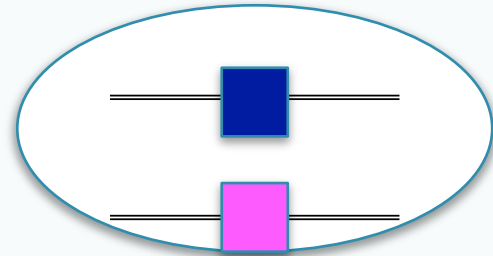
C) Test de complémentation

2) Test de complémentation

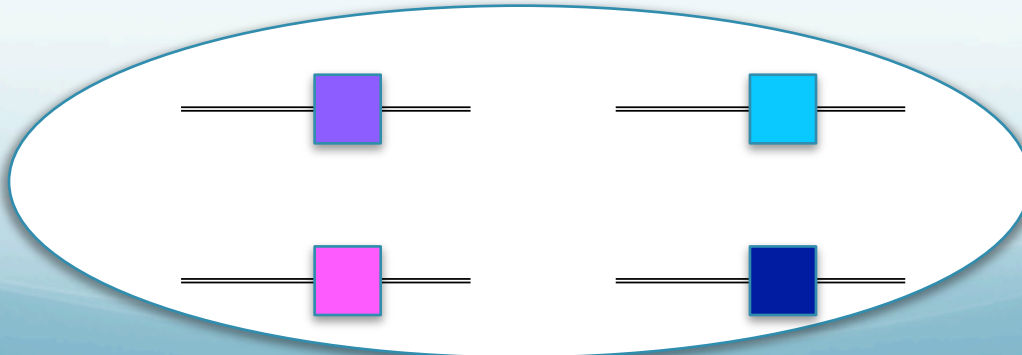
Cas 1: Il y a complémentation = phénotype sauvage



Mutation m2 + sauvage M1



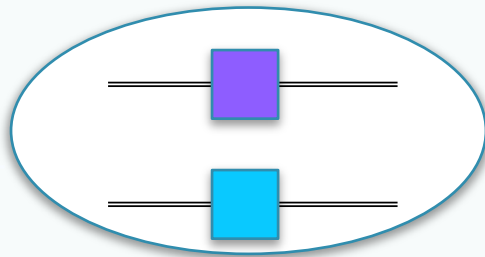
mutation m1 + sauvage M2



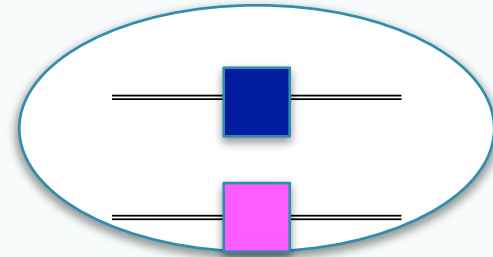
C) Test de complémentation

2) Test de complémentation

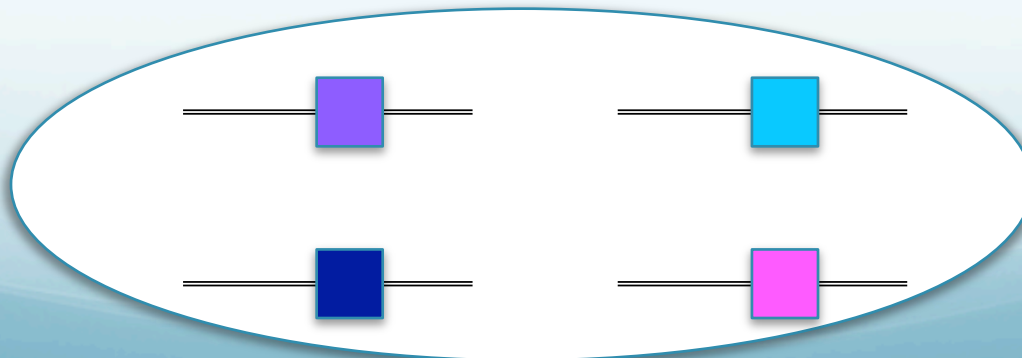
Cas 2: Exception : **Suppression intra-génique.** Il y a complémentation = phénotype sauvage



Mutation m2 + sauvage M1



mutation m1 + sauvage M2



C) Test de complémentation

2) Test de complémentation

Cas 2 : Exception :

Suppression intra-génique. Il y a complémentation = phénotype sauvage

Il y a complémentation alors que les 2 mutations sont allèles : ces 2 mutations appartiennent au même gène

C'est le cas des **protéines** qui agissent sous forme homodimère

2 moitiés de protéines mutées se complètent = homodimérisation et restaurent le phénotype sauvage

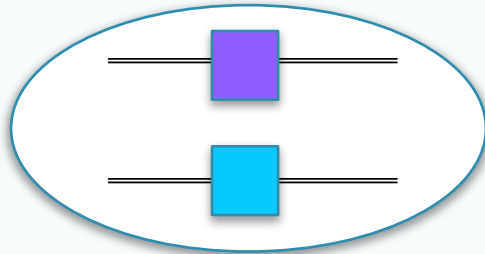
2 groupes de complémentation distincts correspondent au même gène

C) Test de complémentation

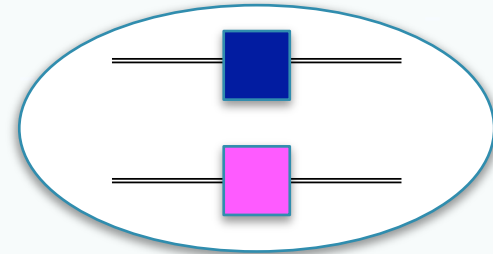
2) Test de complémentation

Cas 3: Il n'y a pas complémentation = phénotype muté

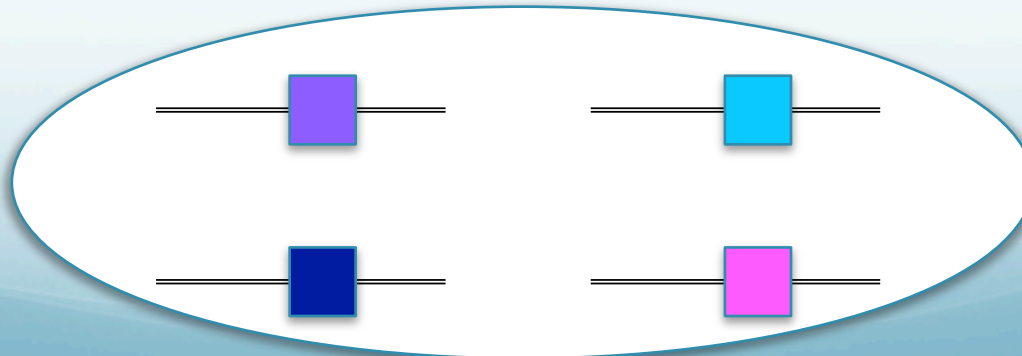
Les 2 mutations sont allèles = elles appartiennent au même gène



Mutation m2 + sauvage M1



mutation m1 + sauvage M2



C) Test de complémentation

2) Test de complémentation

Récap :

- Si **complémentation** entre 2 mutations → on restaure un **phénotype sauvage**

Les 2 mutations appartiennent à 2 groupes de complémentations distincts

On **suggère** seulement que les 2 mutations ne sont pas allèles, car on a le cas où les allèles appartiennent au même gène mais se complémentent : **homodimérisation des protéines**

- S'il n'y a **pas complémentation** entre les 2 mutations → on restaure **un phénotype muté**
- On **démontre** que les 2 mutations appartiennent au même groupe de complémentation

Plan

Manipulation des cellules

- A) Obtention des cellules
- B) Culture des cellules
- C) Analyse du contenu cellulaire
- D) Analyse moléculaire

Analyse génétique

- A) Transgénèse
- B) Notions de mutations
- C) Test de complémentation
- D) Exemples ➔

C) Exemple

Comment interpréter un tableau de complémentation

	m1	m2	m3	m4	m5	m6
m1	—	+	+	+	—	—
m2		—	—	+	+	+
m3			—	+	+	+
m4				—	+	+
m5					—	—
m6						—

- on lit ligne par ligne et on note les mutations qui ne complémentent pas

m1/m5 avec m1/m6

m2/m3

m5/m6

m4

+ complémentation
— pas de complémentation

C) Exemple

Comment interpréter un tableau de complémentation possédant des valeurs

	m1	m2	m3	m4	m5	m6
m1	1	10	9	10,5	2	1,4
m2		1	2	8	9	10,4
m3			1	12	11,5	9,9
m4				1	8,9	9,2
m5					1	3,8
m6						1