



**AUJOURD'HUI  
DANS VOTRE  
NOUVEL ÉPISODE  
DE KOH LANTUT'**

**PTN SVP  
PAS LA PHYSIQUE**

# LA MANIPULATION DES CELLULES



KOH-LANTA  
LA GUERRE DES CHIEFS

imgflip.com

## BY GOGO AND DAM'S



**C'EST QUI CES DEUX CONS ??**

TVI

  
**SOURIEZ ILS VONT NOUS INTERROGER SINON !**



# La Manipulation des Cellules

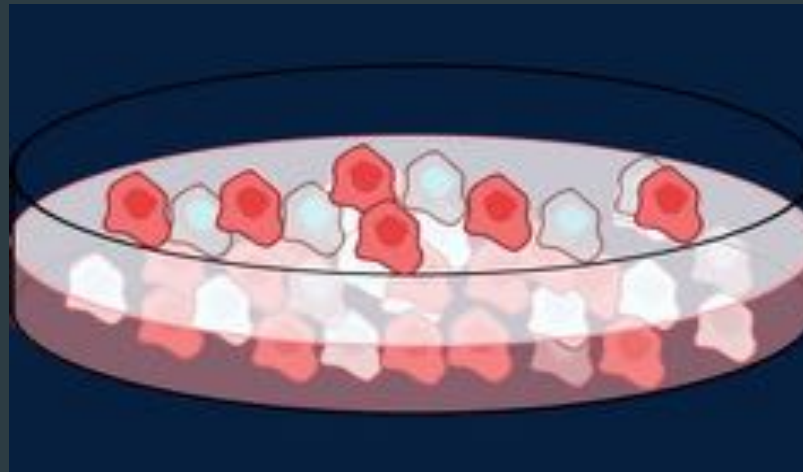


# I- Dissociation des cellules

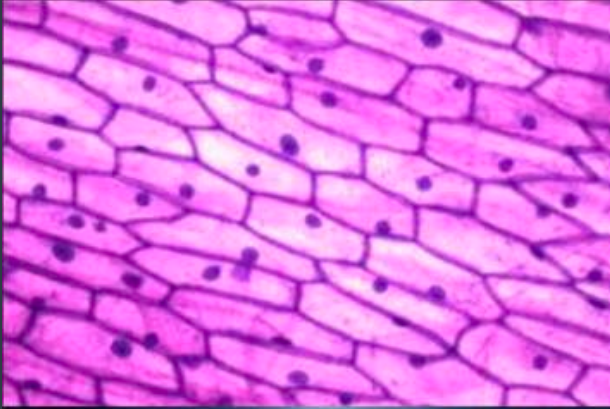
## 1- Obtention des cellules

### A- Dissociation

- Pour pouvoir étudier des cellules, Il faut tout d'abord dissocier un tissu pour faire une suspension de cellules.
- Dans le tissu sanguin les cellules sont **déjà en suspension**
- Dans les autres tissus il faut **éliminer la Matrice Extracellulaire (MEC)** grâce à des éléments chimiques (EDTA), biologiques (enzymes comme la trypsine) ou physiques (agitation)





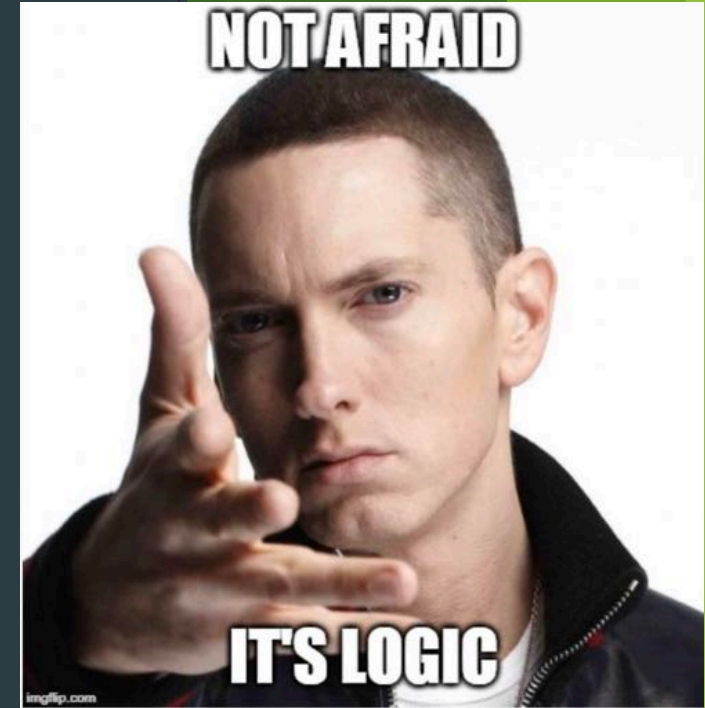


→ Cellules sous forme de tissu, présence d'une MEC



→ Suspension cellulaire, étudiable

- Dans un tissu, on trouve différents types cellulaires, après avoir dissocié nos cellules, **il faut donc les séparer.**



## B- Séparation

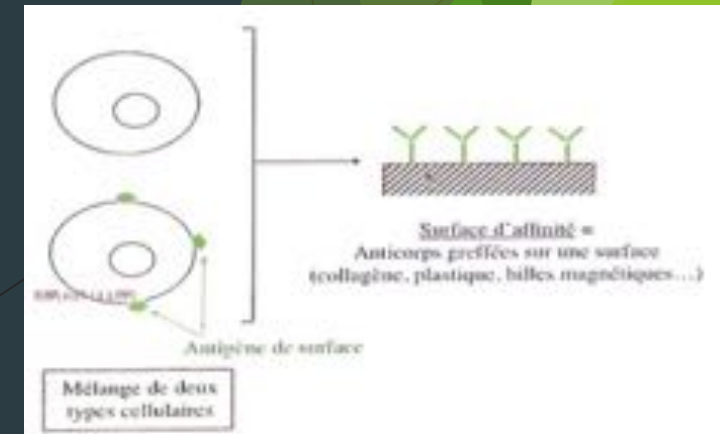
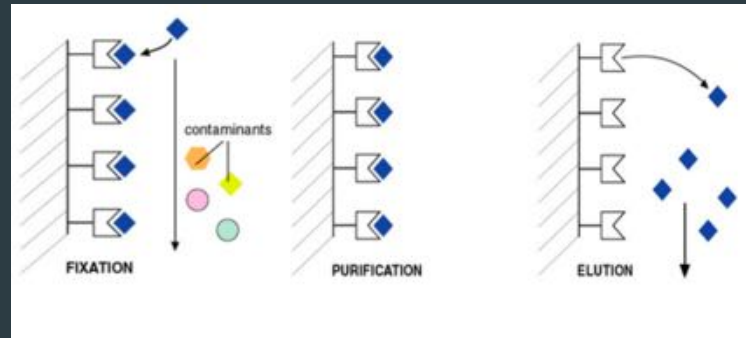


*(en parlant de séparation oupsi ...)*

- Pour séparer, on peut utiliser les propriétés des cellules, telles que :
  - Leurs **propriétés physiques (taille...)** avec une centrifugation à basse vitesse (une haute vitesse pourrait détruire nos cellules)
  - Leurs **propriétés d'adhérence** (certaines cellules par exemple adhèrent très bien aux boîtes de Pétri, et d'autres non)
  - Des méthodes moléculaires : la purification sur support (on utilise les antigènes de surface caractéristiques) ou la cytométrie de flux.

## i- La purification sur support (=Chromatographie d'Affinité)

- ▶ C'est une technique immunologique qui se base sur la reconnaissance des antigènes de surface.
- ▶ On place sur un support neutre des anticorps spécifiques des cellules d'intérêt (créant ainsi une matrice/surface d'affinité).
- ▶ On a ensuite 2 possibilités pour la récolte des cellules :
  - La sélection négative : on récupère les cellules qui n'ont pas eu d'affinité avec les anticorps de la surface.
  - La sélection positive : Les anticorps de la matrice sont dirigés contre les cellules à récupérer. On récupère donc les cellules accrochées à la matrice.
- ▶ On va devoir éluer (= détacher nos cellules de la surface d'affinité) par simple agitation, Trypsination ...





## ii- La cytométrie de flux

### ► Principe / Fonctionnement du cytomètre de flux :

On va faire passer notre suspension de cellules à travers une gaine fluide.

Grâce à des principes hydrodynamiques faisant circuler la gaine fluide et l'échantillon à des vitesses différentes, on arrive à obtenir une suspension où les cellules sont les unes après les autres. *(tu sais comme quand toi et tes potes vous vous pressez pour avoir les meilleurs places en amphi de biocell..)*



Le flux va atteindre une chambre de détection (= cellule d'analyse) dans laquelle passe un rayon laser.

→ Ce rayon laser va exciter les fluorochromes et on va ainsi détecter une fluorescence.

Chaque cellule est unique et va émettre un signal fluorescent qui lui est propre permettant une analyse unique.

On distingue **2 types de cytomètres**:

#### Le cytomètre de **flux classique** (ou **cytométrie analytique**)

Ne fait que mesurer les propriétés des cellules puis elles sont jetées à la poubelle une fois l'analyse effectuée.

Il permet une analyse rapide des cellules

→ Environ 5000 à 10 000 cellules/secondes.

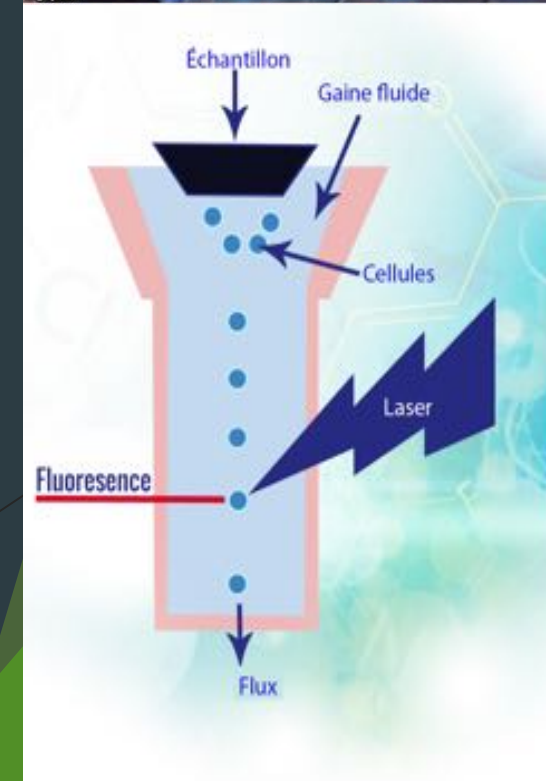
#### Le cytomètre de **séparation (=FACS)**

Permet après l'analyse des propriétés cellulaires, de séparer et de récupérer nos cellules en fonctions des critères préétablis.

Le cytomètre de séparation est un **véritable trieur physique**.

Néanmoins c'est une machine plus lente que l'analyse classique :

→ Environ 500 cellules/secondes.

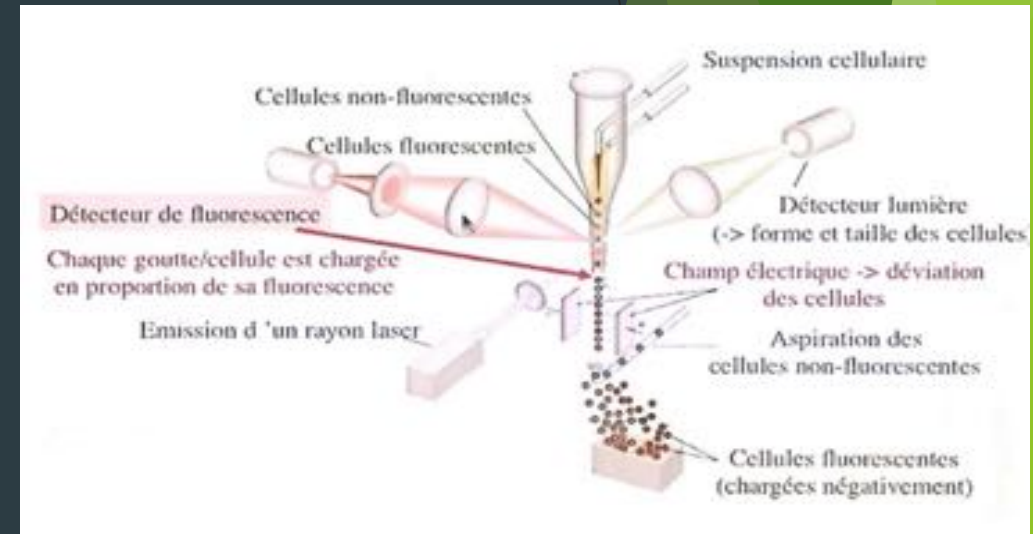


## Principe du FACS

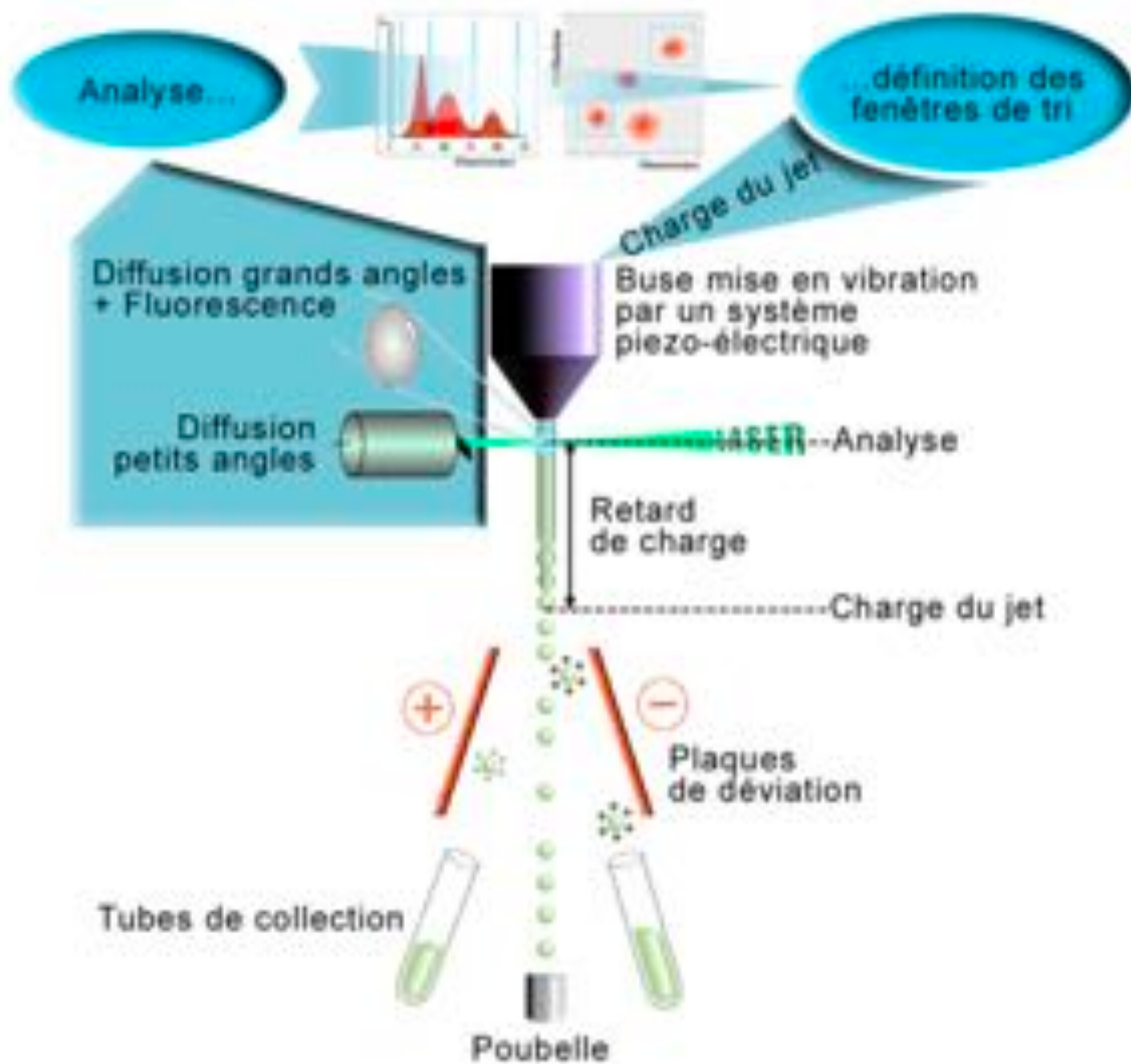
- Le principe de base est le même qu'au niveau du cytomètre analytique classique.
- La cellule d'analyse composée d'un laser qui permet l'excitation lumineuse et la récupération du signal au niveau des détecteurs.
- A la sortie de la cellule d'analyse, les différentes cellules vont se retrouver chacune « **emprisonnées** » **dans de petites gouttelettes, qui sont électrisées.**
- ▶ Des plaques électriques vont **dévier les gouttelettes dans un sens ou dans l'autre** en fonction de leur charge, de manière à les faire tomber dans différents compartiments (tubes, poubelles.)



*Info + : Avec les FACS, on peut trier jusqu'à 4 conditions différentes, c'est-à-dire 4 couleurs fluorescentes différentes.*







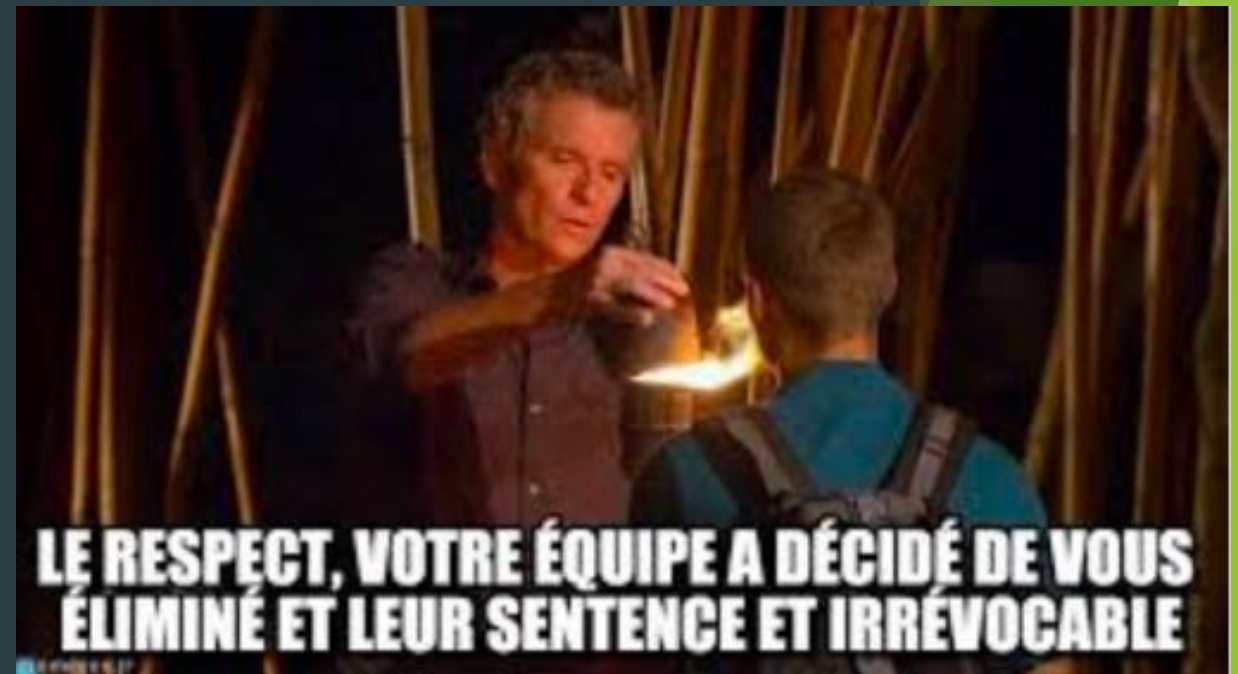
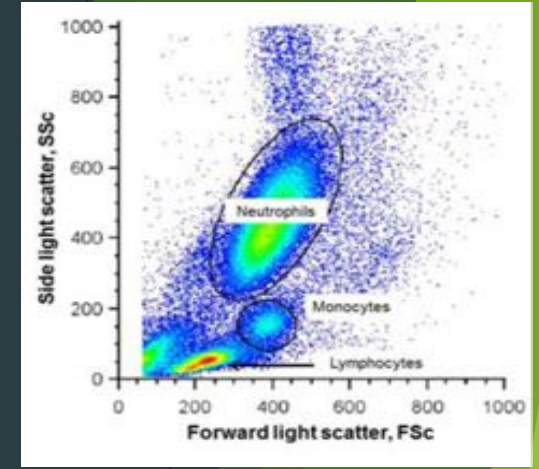
► Grâce à la cytométrie on peut :

→ Compter les cellules ❤️

→ Connaître le pourcentage de cellules mortes ❤️

→ Déterminer la quantité d'ADN dans la cellule (et donc analyser le cycle cellulaire +++)

→ Trier les cellules ❤️





## II- Culture des Cellules

- ▶ Après avoir dissocié puis séparé les cellules, il est parfois nécessaire de les cultiver pour en obtenir une plus grande quantité.
- ▶ La culture des cellules présente des avantages et des inconvénients :

### Avantages

Contenu cellulaire plus **homogène** qu'un tissu

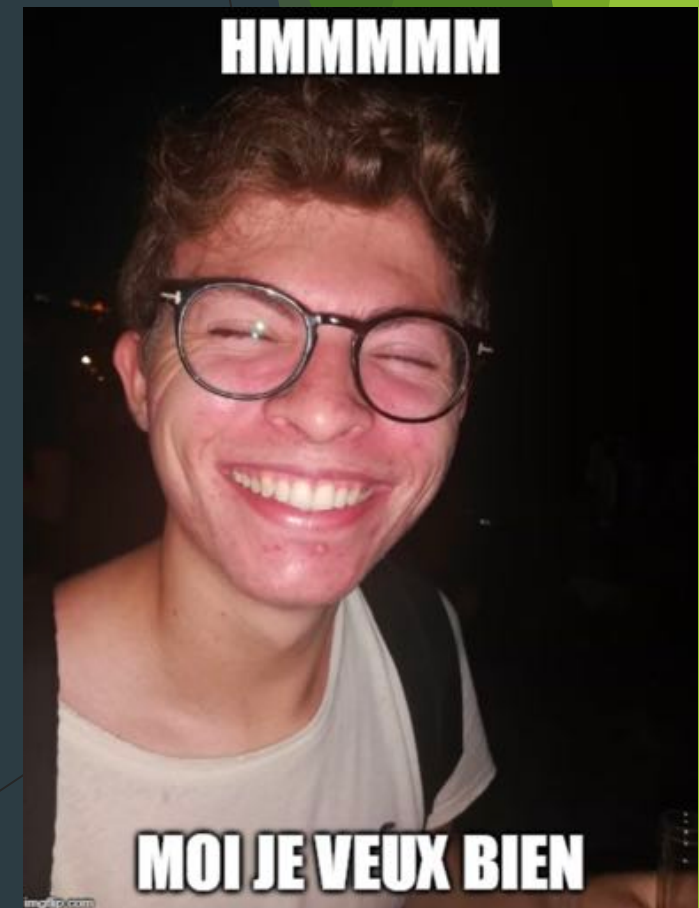
Conditions expérimentales **contrôlées**

Possibilité d'**isoler** une cellule unique afin d'obtenir des clones **identiques**

### Inconvénient

Les cellules sont étudiées en **dehors** du contexte **tissulaire** (donc en dehors de l'influence de l'organisme en général)

Il y a un risque de sélectionner un **mutant** et de tirer des conclusions sur ce mutant qui n'est pas représentatif







## 1- La culture des micro-organismes

- ▶ Les micro-organisme sont des **organismes unicellulaires** (ex : les bactéries (procaryotes) et les levures(eucaryote)).
- ▶ En recherche, les micro-organismes ont souvent un grand intérêt, leur culture est plus **simple** que les cellules animales et apportent de nombreuses informations essentielles.

- ▶ Ces cultures apportent de nombreux avantages :

**Division** extrêmement **rapide**

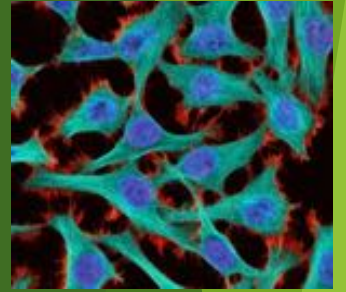
Culture en milieu **semi-solide !! (Attention au piège) +++++**

Obtention et isolation des **mutants**



## 2- Culture des cellules animales

- La culture des cellules animales (eucaryote) est plus complexe, en effet :
  - Elles nécessitent beaucoup plus de nutriment, de **facteur de croissance** ..
  - Culture plus **lente**
  - Nécessitent un milieu **solide** ! +++
  - Chaque type de cellules ont leurs propres types de culture avec des **besoins différents**



- On distingue plusieurs types de cultures cellulaires :

Les cultures primaires :	Les lignées immortelles :
Établies à partir de tissus dissociés	Certains <u>variants sont devenus immortels</u> et peuvent former des lignées.
Certains types cellulaires sont <u>plus facile à cultiver que d'autre</u>	Devenus immortelles à partir de tumeurs, spontanément ou après l'expression ectopique de la télomérase ou l'action d'agents mutagènes ou de virus.
Nombre de divisions limité (limite de Hayflick) à environ 50, après quoi elles entrent en sénescence (mais elles restent métaboliquement actives) : <u>c'est un processus irréversible</u>	Le taux d'immortalisation spontanée varie en <u>fonction des espèces</u>



**Attention !! les cellules cancéreuses sont une exception, elles peuvent se diviser sur milieu solide OU semi-solide. (PIÈGE QCM ++)**







FINNNN

Courage pour la  
suite



**QUAND TU CROYAIS C'ÉTAIT LA FIN DU COURS**

**MAIS Y'A GOGO QUI DÉBARQUE  
POUR FAIRE LA PARTIE D'APRÈS**

# III- Analyse du contenu cellulaire

## 1- Lyse des cellules

- Lyse cellulaire = libération du contenu cellulaire dans un tube à essai

Sonication	Utilisation d'ultra-sons pour casser la membrane cellulaire
Choc osmotique	On met nos cellules dans une solution dite « hypotonique » (pauvre en sel), ce qui va faire rentrer l'eau dans la cellule jusqu'à la faire éclater (la pauvre)
Détergents	Qui détruisent les membranes lipidiques
Frottements	Destruction des membranes par une technique totalement mécanique





## 2- Fractionnement des constituants des cellules

- Fractionnement du contenu cellulaire par filtration ou **centrifugation**

→ 2 types de centrifugations:

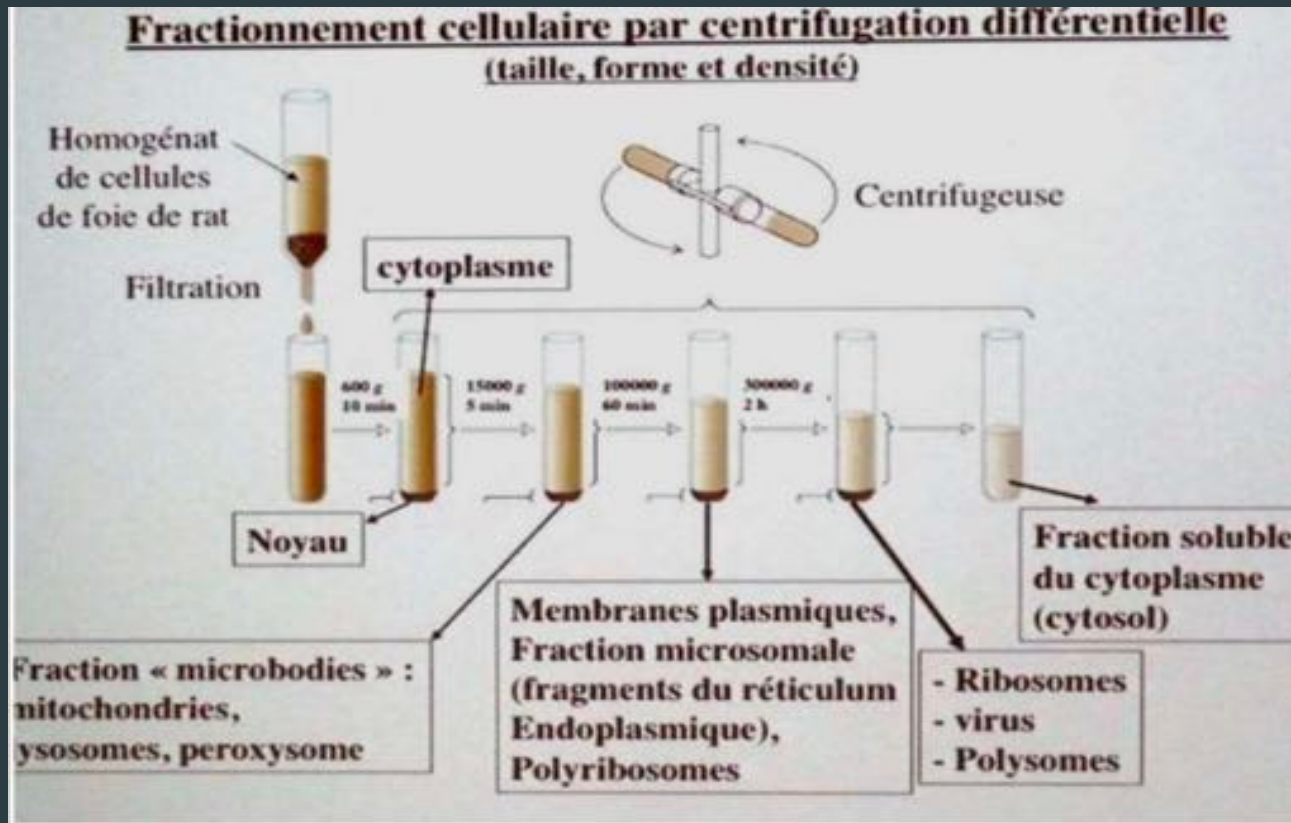
A- Centrifugation différentielle

B- Centrifugation isopycnique/à l'équilibre



## A- Centrifugation différentielle

- Consiste à séparer nos constituants en **fonction de leur taille/masse** en leur appliquant une force de centrifugation de plus en plus forte.

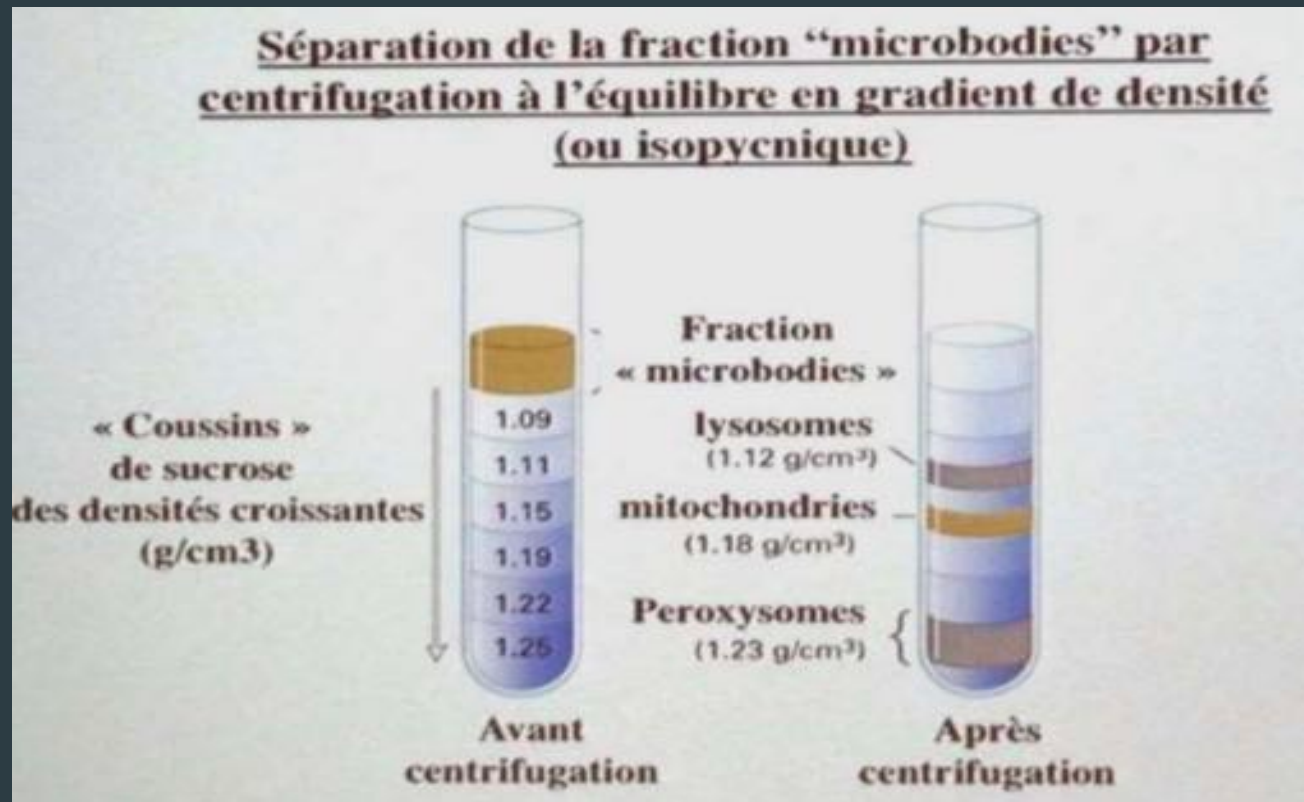


Les différents mood en PACES

À partir de 100 000g de force de centrifugation, on parle **d'ultracentrifugation**

## B- Centrifugation isopycnique/à l'équilibre

- On dépose la fraction étudiée sur des coussins de sucrose à densité de concentration croissante entre le haut et le bas du tube.
- On a un équilibrage en fonction de la densité





# IV- Analyse de la composition moléculaire des cellules

## Analyse du génome : le NGS

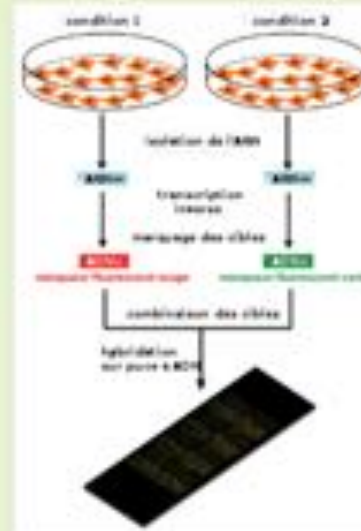
**Appareil lisant la séquence de l'ADN** : elle détermine l'enchaînement des nucléotides dans un morceau d'ADN



## Analyse du transcriptome (la puce à ADN)

Permet de **savoir si un gène est transcrit par la cellule** dans différentes conditions expérimentales.

C'est une lame de verre avec des trous à l'intérieur desquels se trouvent certains gènes du génome (Fonctionnement non détaillé sur cette fiche, revu en UE11 au S2, peu intéressant pour la biocell ...)



## Analyse du protéome (spectrométrie de masse)

Techniques **d'électrophorèse bidimensionnelle** séparant les protéines en fonction de leur charge et leur poids/taille.

On les passe ensuite dans un **spectromètre de masse** ce qui permettra de **déterminer la séquence peptidique de la protéine** en comparant les masses obtenues à une banque de données



# V- Analyse Génétique







# 1- Notion de mutation

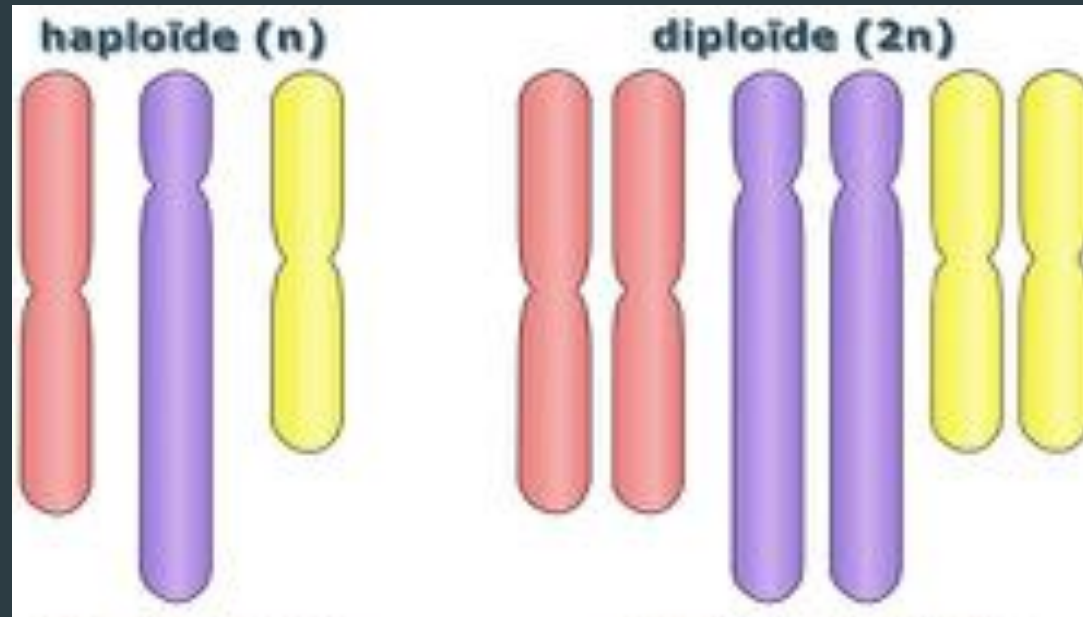
L'intérêt d'étudier les mutations est de comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire.

→ Définitions importantes:

- ▶ **Génotype** : ensemble des gènes, normaux (=sauvages) ou mutés d'un organisme.
- ▶ **Phénotype** : apparence d'un organisme, d'une cellule ou d'un individu. Il dépend du génotype et de l'environnement.

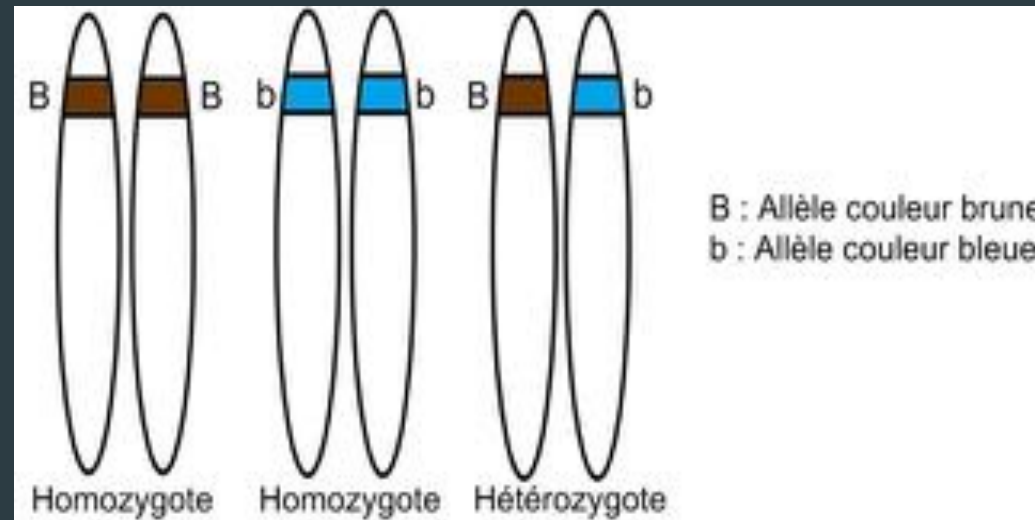


- Organisme haploïde : cellule/individu ayant une copie de chaque chromosome.
- Organisme diploïde : cellule/individu ayant deux copies de chaque chromosome. C'est-à-dire que chaque gène va être présent dans l'organisme sous la forme de deux allèles.



→ Dans le cas d'un organisme diploïde :

- ▶ Un gène est **homozygote** si les 2 allèles sont **identiques** (même version du gène sur les 2 chromosomes de la même paire).
- ▶ Un gène est **hétérozygote** si les 2 allèles sont **différents**.



- ▶ Un allèle peut être **normal** (sauvage, retrouvé le plus communément) ou **mutant** (#X-Men)
- ▶ Un allèle peut être **dominant** (il s'exprimera toujours) ou **récessif** ++

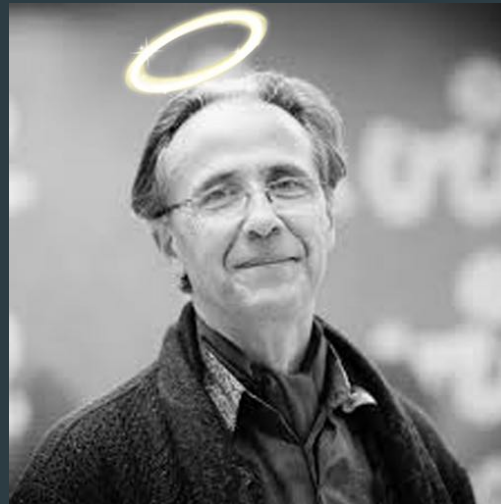
→ Il y a 2 types de mutations :

Mutation dominante	Mutation récessive
Il suffit qu'un seul allèle soit muté pour que le phénotype soit mutant	Il faut que les 2 allèles soient mutés pour que le phénotype soit mutant

## 2- La Complémentation ++

- **Complémentation**: C'est le fait qu'un allèle **normal** va pouvoir compléter/ramener au phénotype **normal** une **mutation récessive**
- **Groupe de complémentation**: ensemble de mutants qui ne complémentent **PAS** entre eux une fois présent dans la même cellule

On va vouloir réaliser des tests de complémentation pour montrer si **2 organismes mutants** sont mutés sur le même gène ou non !

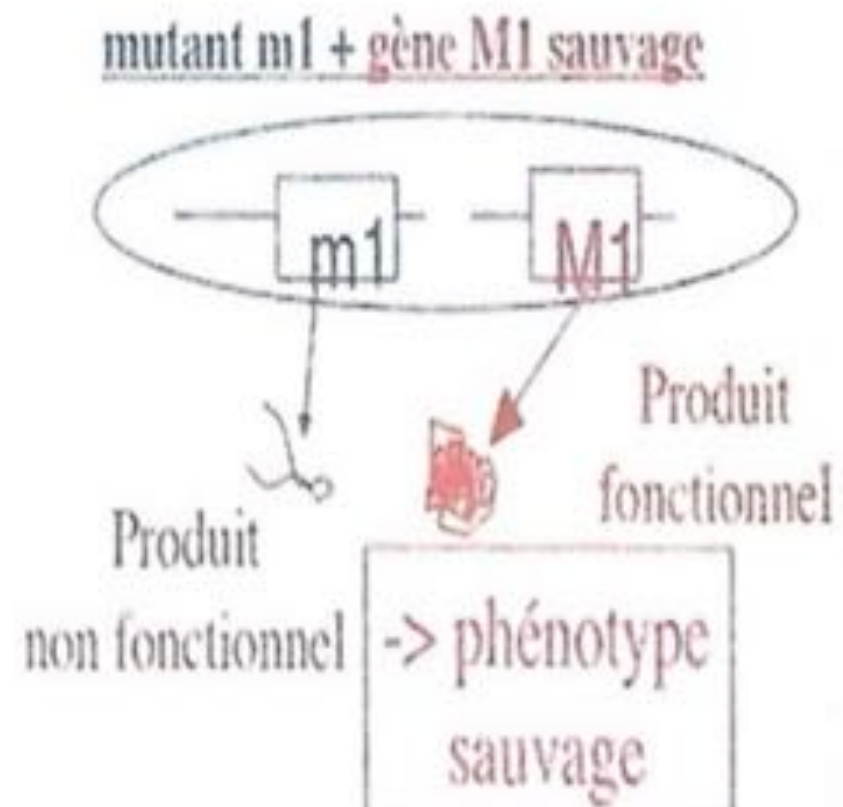
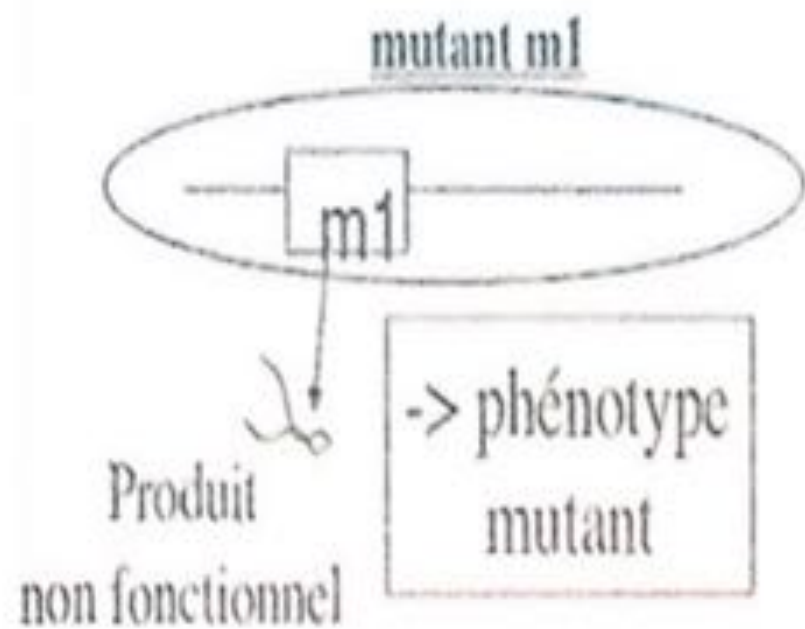


Dieu Gigi



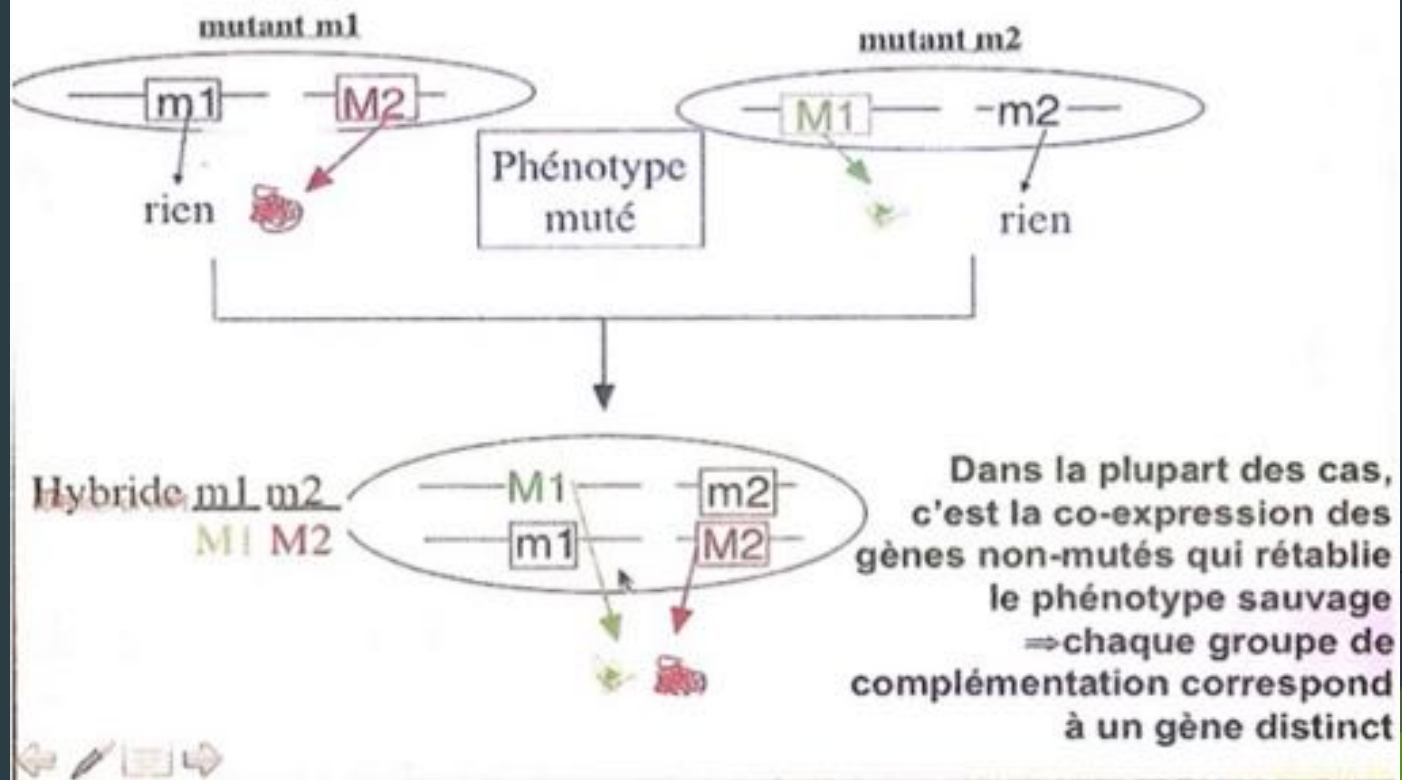
Avant un test de complémentation on réalise un test de récessivité

→ Ce test détermine si les mutations sont bien récessives et non pas dominantes.



Le principe d'un test de complémentation est de fusionner les noyaux de 2 cellules mutantes ayant le même phénotype et observer le phénotype après la fusion, notamment si on a un retour au phénotype sauvage (donc s'il y a complémentation).

Il y a complémentation entre deux mutations -> les deux mutations appartiennent à deux groupes distincts de complémentation.



# Si on obtient un phénotype sauvage:

- ▶ Si le phénotype observé est SAUVAGE, cela veut dire que qu'il y a eu COMPLÉMENTATION
- ▶ Les mutations sont dans des groupes de complémentation DIFFÉRENTS
- ▶ → On suggère que les mutations sont sur des gènes DIFFÉRENTS



*Parenthèse suggérer/démontrer: ici on utilise le terme « **suggérer** » car il est possible que les 2 mutations soient sur le même gène et qu'il y ait quand même eu complémentation (à cause d'un phénomène qu'on appelle **suppression intra-génique**).*





# Si on obtient un phénotype mutant:



- ▶ Si le phénotype observé est **MUTANT**, cela veut dire que qu'il n'y a **PAS** eu complémentation.
- ▶ Les mutations sont dans le **MÊME** groupe de complémentation.
- ▶ → On **démontre** que les mutations sont sur le **MÊME** gène.



# Exemple de tableau de complémentation

Mutations	A	B	C
A	-	+	-
B		-	+
C			-

La mutation A et B complémentent (car il y a un +) !! Donc on peut suggérer que ces mutations ne se trouvent sur des gènes DIFFÉRENTS (donc elles sont dans des groupes de complémentation DIFFÉRENTS) !

B et C complémentent également donc on a un raisonnement analogue.

En revanche A et C ne complémentent pas (car il y a un -), on démontre donc que ces mutations sont sur le MÊME gène (donc dans le MÊME groupe de complémentation)

# QCM Time !

- A) La centrifugation différentielle est synonyme de centrifugation à l'équilibre
- B) À partir de 100g on parle d' « ultracentrifugation »
- C) Avant un test de récessivité on doit réaliser un test de complémentation
- D) Un organisme haploïde est un organisme qui possède 2 copies de chaque chromosome
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses.



- A) La centrifugation différentielle est ~~synonyme~~ de centrifugation à l'équilibre
- B) À partir de 400g on parle d' « ultracentrifugation »
- C) Avant un test de récessivité on doit réaliser un test de ~~complémentation~~
- D) Un organisme haploïde est un organisme qui possède ~~2-copies~~ de chaque chromosome
- E) Les réponses A,B,C et D sont fausses.

Mutants	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11
m1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
m2		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m3			-	+	+	+	+	+	+	+	+
m4				-	+	+	+	+	+	-	+
m5					-	+	+	-	+	+	+
m6						-	+	+	+	+	+
m7							-	+	+	-	+
m8								-	+	+	+
m9									-	+	-
m10										-	+
m11											-

On a le tableau de complémentation suivant:

- A) Un test de récessivité est facultatif mais il est préférable de le faire avant le test de complémentation
- B) m3 complémente avec toutes les autres mutations
- C) m6 et m9 sont dans des groupes de complémentations identiques
- D) On démontre que m11 et m7 sont sur des gènes différents
- E) A,B,C et D sont faux.

Mutants	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11
m1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
m2		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m3			-	+	+	+	+	+	+	+	+
m4				-	+	+	+	+	+	-	+
m5					-	+	+	-	+	+	+
m6						-	+	+	+	+	+
m7							-	+	+	-	+
m8								-	+	+	+
m9									-	+	-
m10										-	+
m11											-

On a le tableau de complémentation suivant:

- A) Un test de récessivité est facultatif mais il est préférable de le faire avant le test de complémentation
- B) m3 complémente avec toutes les autres mutations
- C) m6 et m9 sont dans des groupes de complémentations différents
- D) On démontre que m11 et m7 sont sur des gènes différents
- E) A,B,C et D sont faux.