

Résumé – Méthodes de biologie cellulaire

I. Source du matériel biologique

A. Micro-organismes utilisés dans les laboratoires

1. Virus

Utilisations :

- Ciblage de **cellules spécifiques** dans lesquelles il fait rentrer le **matériel génétique** voulu, par exemple des vecteurs d'expression ;
- **Transcriptase inverse** isolée à partir de rétrovirus.
- On utilise la capacité du virus à infecter pour une intégration du matériel génétique.

2. Procaryotes

Exemple – *Escherichia coli*.

Organisme de base de recherche fondamentale de biologie cellulaire :

- **Amplification de plasmides** ;
- **Synthèse de protéines recombinantes** sans modifications post-traductionnelles.

3. Micro-organismes eucaryotes

Exemple – levures.

Utilisations :

- Étude des mécanismes cellulaires eucaryotes ;
- **Synthèse de protéines recombinantes** avec modifications post-traductionnelles.

B. Animaux utilisés dans les laboratoires

- *Drosophila melanogaster* :
 - étude des mécanismes génétiques et embryonnaires des organismes multicellulaires ; génome facile à reproduire et possède une innervation et des muscles.
- *Caenorhabditis elegans* :
 - organisme très étudié, décrit avec une grande précision ;
- Souris :
 - étude des mammifères ;
 - **production d'anticorps** ;
 - modifications faciles du génome → **souris transgéniques** ;
 - nombreux inconvénients du point de vue éthique.
- Humain.

C. Transgénèse

Deux grands types de modifications génétiques :

- **KO** (Knock Out) = **inactivation d'un gène** ;
- **KI** (Knock In) = **remplacement d'un gène par un transgène**.

⚠ Remplacement gène par transgène ≠ insertion de gène.

Transgénèse classique	Transgénèse par recombinaison homologue
<ul style="list-style-type: none"> Incorporation aléatoire d'ADN. → Peu de contrôle sur l'expression du gène. 	<ul style="list-style-type: none"> Incorporation spécifique d'ADN ; Détourne le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue.
<ul style="list-style-type: none"> Simple insertion d'un gène → Ok pour gènes rapporteurs 	<ul style="list-style-type: none"> KO KI

D. Modification du génome par la méthode CRISPR

Coupe double brin dans une région spécifique :

- Coupe réalisée par Cas9 (= endonucléase) ;
- Spécificité car complémentarité entre séquence à modifier séquence de l'ARN guide (= ARNsg) ;
- Fonctionne chez la plupart des organismes.

Permet :

- KO ;
- KI ;
- Cas9 + facteur de transcription : activation / répression d'un gène ;
- Cas9 + fluorophore : révélation de la portion d'ADN cible.

E. Cellules eucaryotes en culture

- Pour l'étude des mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaire ;
- Culture de cellules : tissu ou boîte de culture (= cellules dissociées du tissu) ;
- Besoin d'un milieu de culture particulier : nutriments, facteurs de croissance, conditions physico-chimiques contrôlés.

Obtention de boîtes de culture :

- Dissociation des cellules du tissu → **Culture cellulaire primaire** ;

- Arrivée à confluence** des cellules (= cellules accolées) : inhibition de contact → **Arrêt de prolifération** ;
- Repiquage** des cellules (= dilution et distribution dans plusieurs boîtes) → **Cultures cellulaires secondaires** ;
- Repiquages répétés tant que les cellules prolifèrent ;
- Certaines arrêtent de proliférer et meurent = **sénescence** ;
- D'autres continuent de proliférer = **Lignée cellulaire continue**, constituée de **cellules immortalisées**.

Cellules primaires / non transformées	Cellules transformées = immortalisées
<ul style="list-style-type: none"> Besoin d'adhérer à une surface pour survivre et proliférer → culture en monocouche ; Prolifération dépendante des facteurs de croissance ; Limitation : inhibition de contact. 	<ul style="list-style-type: none"> Indépendantes de support → Culture en suspension (= cellules dans un liquide) ou en hauteur ; Prolifération indépendante des facteurs de croissance ; Insensibles à inhibition de contact.

F. Les vecteurs d'expression en génie génétique

Vecteur : **portion nucléotidique** exogène permettant d'**exprimer un gène** dans une cellule hôte, par exemple plasmide ou virus. Un vecteur :

- Est constitué de : **promoteur + ADNc de l'ARNm d'intérêt** ;
- Est inclus dans la cellule et reste **épisomique** : non intégré aux chromosomes mais traité comme le reste de l'ADN ;
- Permet **surexpression** de protéine / expression de protéine exogène + stable et transmissible que l'injection de la protéine en elle-même.

5 techniques pour faire entrer de l'ADN dans une cellule :

Virus	Lipofection	Micro-injection	Électroporation	Bombardement par particules
	Vésicules	Manuel	Danger de lésion	Or / tungstène

II. Méthodes de séparation

Définition – Lysat = constituants de la cellule obtenus après sa destruction.

A. Cytométrie en flux : séparation de cellules

Séparation (le tri) et **analyse** de cellules selon leur taille, granulosité, fluorescence ou même quantité en ADN.

B. Ultracentrifugation : fractionnement cellulaire

Séparation des organites cellulaire après mixage de la cellule : particules séparées dans un champ gravitationnel artificiel plus ou moins fort créé par rotation d'un tube.

Vitesse de migration varie avec la taille ou la forme des particules :

- **Plus grosses migrent plus vite** ;
- Moins de frottement migrent plus vite.

Différents types de centrifugation :

- **Différentielle** = en fonction de la **taille et la forme** des particules :
 - ordre de migration des particules dans le culot : noyau > mitochondries > microsomes + lysosomes > ribosomes ;

Définition – Microsome = constituant du réticulum endoplasmique.

- Isopycnique = **à l'équilibre** = en fonction de la **densité** des particules :
 - particules migrent dans le tube jusqu'à ce que leur densité soit la même que celle du milieu.

C. Électrophorèse : séparation de molécules

En fonction de la **charge** / du **poids** et l'analyse des quantités.

Principe :

- Migration différentielle dans un **gel** de molécules dénaturées, sous **l'influence d'un champ électrique** ;
- **Force de migration** des molécules dépend de :
 - leur **charge** ;
 - le champ électrique ;
 - leur **poids** : plus ou moins ralenties par le gel.

Séparations en fonction de :

- La **charge** : **protéines**, pas acides nucléiques car tous chargés – ;
- La **masse moléculaire** avec **SGS-PAGE** pour les **protéines** : protéines couvertes de SDS à **charge** – pour empêcher les liaisons faibles mais pas les ponts disulfures. **Protéines plus petites = qui migrent plus loin**.

Révélation par différentes techniques :

- **Bleu de Coomassie** : révèle **toutes les protéines** ;
- **DAPI** : agent intercalent fluorescent de l'**ADN** ;

III. Détection de molécules biologiques

A. Isotopes radioactifs

Désintégration spontanée d'isotopes radioactifs. Détection par **autoradiographie**.

Radioisotopes utilisés :

- ^{32}P : tous les acides nucléiques et les phosphates des protéines ;
- ^{131}I ;
- ^{35}S : toutes les protéines ;
- ^3H : toutes les molécules.

Techniques correspondantes :

- **Pulse-Chase** → Suivi temporel de molécules néosynthétisées ;
- Études de couples ligand-récepteur.

B. Anticorps

Liaison spécifique sur un **épitope** (= partie d'un **antigène**).

Obtention : injection d'une protéine (= antigène) à un animal, production d'anticorps contre la protéine, prélèvement dans le sang de l'animal.

Structure de 150 kDa :

- 2 chaînes lourdes de 50 kDa ;
- 2 chaînes légères de 25 kDa ;
- Reliées par des ponts S-S.

Dans un anticorps :

- 2 parties variables identiques reconnaissant l'antigène ;
- 1 partie constante à tous les anticorps d'une même espèce (= Fc).

Anticorps monoclonaux	Sérum polyclonal
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anticorps identiques, dirigés contre le même épitope. <p>Produits à partir d'un clone unique de lymphocyte B. Production artificielle possible à partir d'hybridomes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mélange d'anticorps différents dirigés contre des épitopes différents d'un même antigène. <p>Produits à partir de différents clones de lymphocytes B.</p>

Révélation : fixation sur l'anticorps :

- D' ^{131}I → **autoradiographie** ;
- De molécules fluorescentes → **microscopie optique** ;
- De billes d'or → **microscopie électronique** ;
- D'enzymes qui produisent des molécules colorées → **test ELISA** pour la purification d'anticorps ou d'antigène :
 - **indirect** : détection + dosage d'un anticorps ;
 - **par immunocapture** : détection + dosage d'un antigène ;
 - **en sandwich** : détection et dosage d'antigène en faible quantité.

Amplification du signal : anticorps primaires dirigés contre la protéine cible, puis secondaires marqués et dirigés contre l'anticorps primaire → plusieurs AC secondaires se fixent sur un seul AC primaire, signal amplifié.

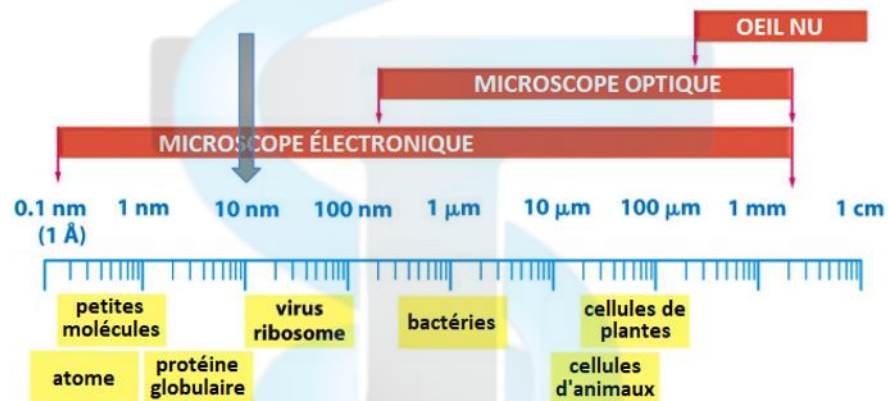
Applications :

- **Co-immunoprécipitation** : **chromatographie d'affinité avec un anticorps** → récupération d'une protéine spécifique et des autres protéines liées à celle-ci (**purification d'un complexe protéique**). Puis **Western Blot** avec des **anticorps** dirigés contre une autre protéine du complexe → **prouve une interaction entre 2 protéines** ;
- **Immunohistochimie** : détermination de la localisation tissulaire d'une molécule au microscope grâce à un anticorps couplé à un fluorochrome détectable par microscopie optique.

⚠ En immunohistochimie, fixation (mort) et perméabilisation des cellules.

IV. Microscopie

A. Ordres de grandeur



Ordres de grandeurs de différents éléments et limites des différentes méthodes d'observation.

B. Détection et résolution

1. Détection

C'est la possibilité de **détecter la présence d'un objet**.

Limite de détection : très faible.

2. Résolution

C'est la possibilité de dire si deux **objets** sont réellement **séparés**.

Limite de résolution : dépend de la **diffraction**, **200 nm** en **microscopie optique**. C'est la distance entre deux points en dessous de laquelle ces points sont confondus = limite de la MO (microscopie optique).

C. Microscopie optique (MO)

	Objet regardé et but	Principe
Classique	<ul style="list-style-type: none"> Cellules fixées et colorées ; Cellules vivantes (non fixées) ; Coupes de tissu. 	<ul style="list-style-type: none"> Coloration spécifique des cellules ; Éclairage du prélèvement ; Grossissement.
Contraste de phase	Cellule avec une image plus contrastée → Discernement des contours des cellules et des organites.	
De Nomarski	Cellule avec impression de relief.	Contraste interférentiel.
Épifluorescence	Molécules avec un fluorochrome dans des cellules fixées ou vivantes → Possibilité de voir une colocalisation .	<ul style="list-style-type: none"> Éclairage de la cellule au laser ; Absorption de la lumière par le fluorochrome : renvoie une lumière d'une autre couleur.
Confocale	Semblable à l'épifluorescence mais on s'affranchit des flous → Image plus nette et possibilité d'exploration en 3D.	Blocage d'un certain nombre de rayons provenant de l'image grâce à un diaphragme devant le détecteur.

1. FISH

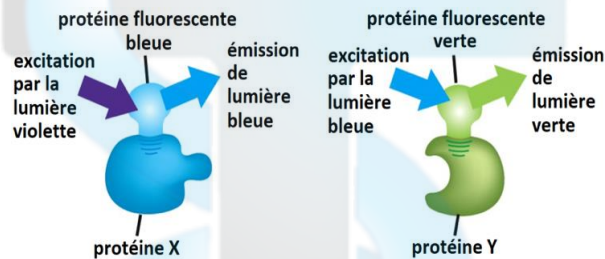
Hybridation in-situ de sondes nucléotidiques fluorescentes à de l'ADN / ARN et révélation par MO de molécules spécifiques.

2. Protéines de fusion

- **Protéine cible + protéine fluorescente** (ex : GFP) couplées (= mises côte à côte). Expression par introduction d'un vecteur dans la cellule ;
- Observation de déplacement de protéines dans cellule vivante (par vidéo-microscopie), détection de protéine par un AC couplé à GFP, etc.

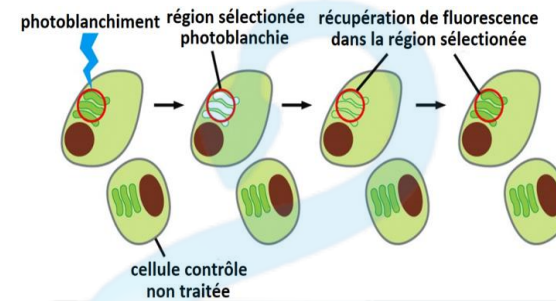
3. FRET

Preuve d'interaction directe entre 2 protéines : longueur d'onde d'émission de la 1^{ère} doit correspondre à la longueur d'absorption de la 2^{nde}.



4. FRAP

Étude de la dynamique (vitesse de transport, diffusion, synthèse) d'une protéine dans la cellule. Basée sur le principe du **photoblanchiment** = perte de fluorescence d'un fluorochrome sans perte de la fonction de la protéine de fusion. Utilisation de la **vidéo-microscopie sur des cellules vivantes**.



D. Microscopie électronique

Principe **similaire à la MO**. Différence = **faisceau d'électrons** traverse la cellule pour former une image. → Plus précis, **limite de résolution = 1 nm**.

Besoin de tranches ultrafines, possibilité de **révélation par des anticorps couplés à des billes d'or** opaques aux électrons.