

# Chapitre 4: méthodes

# **1. Différentes sources de matériel biologique**

## **2. Méthodes de séparation**

- a. Cellulaire: la cytométrie de flux**
- b. Subcellulaire: la centrifugation**

## **3. Détection des molécules biologiques**

- a. Les isotopes radioactifs**
- b. Les anticorps**

## **4. La microscopie et ses applications**

- a. Les protéines de fusion**

# 1. Différentes sources de matériel biologique

**Virus:** vecteurs viraux, enzymes virales ...  
(reverse transcriptase, ANR polymérases...)

**Procaryotes:** *Escherichia coli*  
Clonages d'ADN, amplification de plasmides  
Production de protéines recombinantes

**Eucaryotes unicellulaires:** *Saccharomyces cerevisiae*  
Production de protéines recombinantes  
Approches génétiques



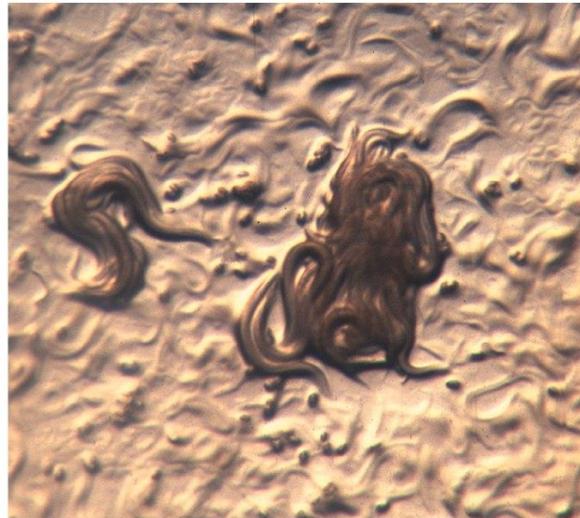
# Animaux

Eucaryotes multicellulaires

*Drosophila melanogaster* :



*Caenorhabditis elegans* :



1 mm

**Ces modèles permettent des approches génétiques car:**

- Cycle reproductif très court
- Descendance très importante
- Faible encombrement

# **Souris (mammifère)**

## **Mutations spontanées**

**Transgéniques: - transgénèse classique:**

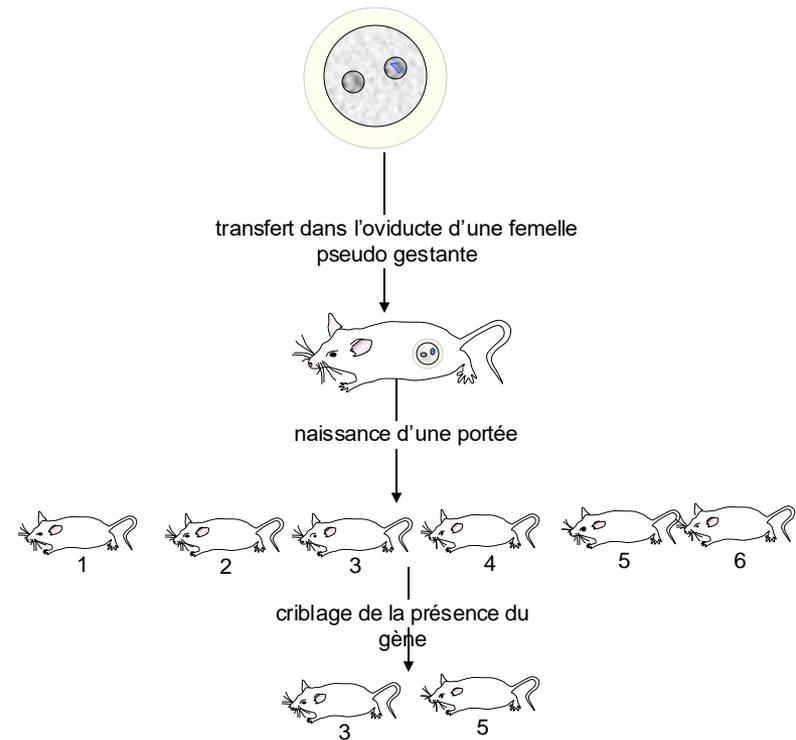
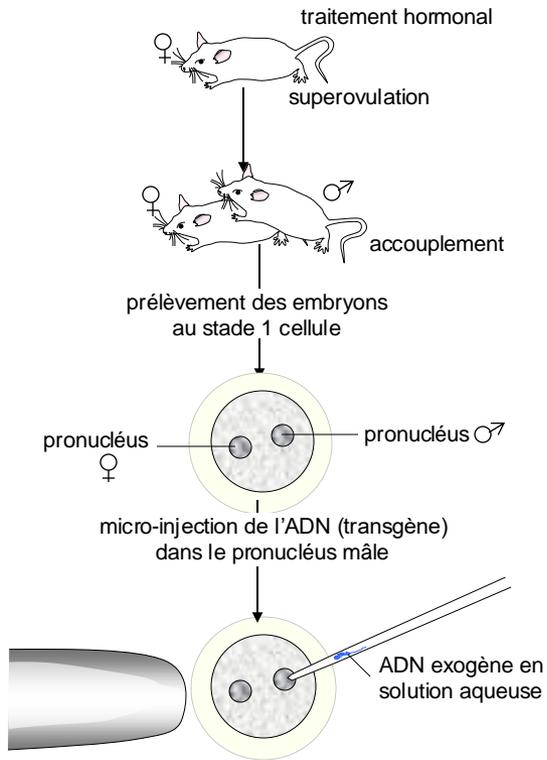
**insertion aléatoire dans le génome**

**- recombinaison homologue: insertion ciblée**

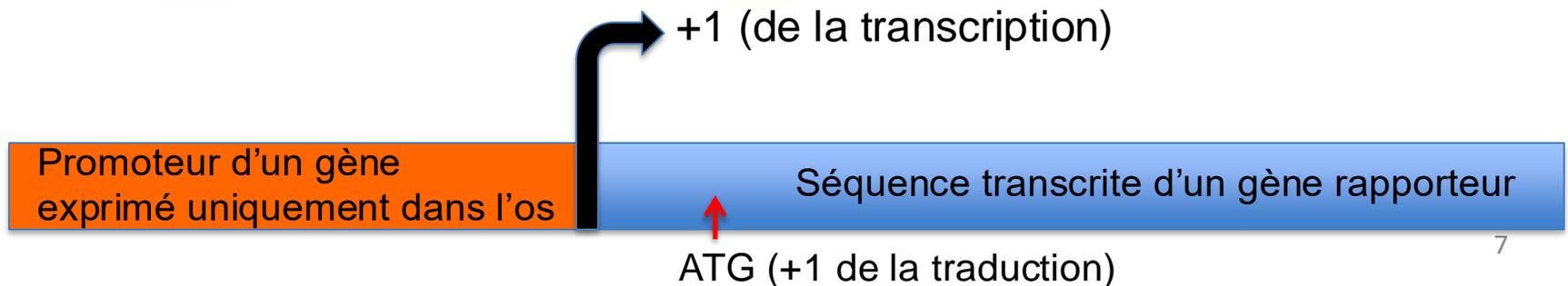
**Inactivation de gènes (Knock-out)**

**Remplacement de gènes (Knock-in)**

# Transgénèse classique chez la souris



Transgène: gène rapporteur de la  $\beta$ galactosidase placé sous le contrôle d'un Promoteur spécifique des os.



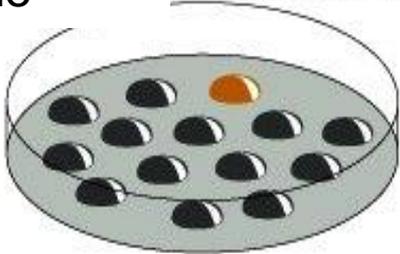
# **Transgénèse par recombinaison homologue chez la souris**

**(A) ES cells growing in culture**



Version mutée d'un gène produite par génie génétique

Introduction d'un fragment d'ADN contenant le gène muté dans les cellules totipotentes



Sélection des rares cellules où le fragment d'ADN a remplacé une copie du gène normal



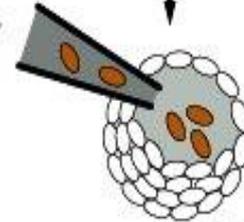
**(B) female mouse**



Collecte d'embryons 3 jours après la fécondation



Injection des cellules dans un embryon précoce (blastocyste)



Embryons hybrides partiellement Formés à partir des cellules recombinées



Introduction des embryons dans une mère porteuse

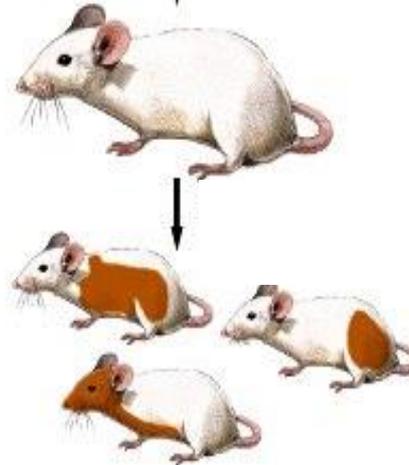




Cellules ES (totipotentes) avec une copie du gène muté



Introduction des embryons dans une mère porteuse



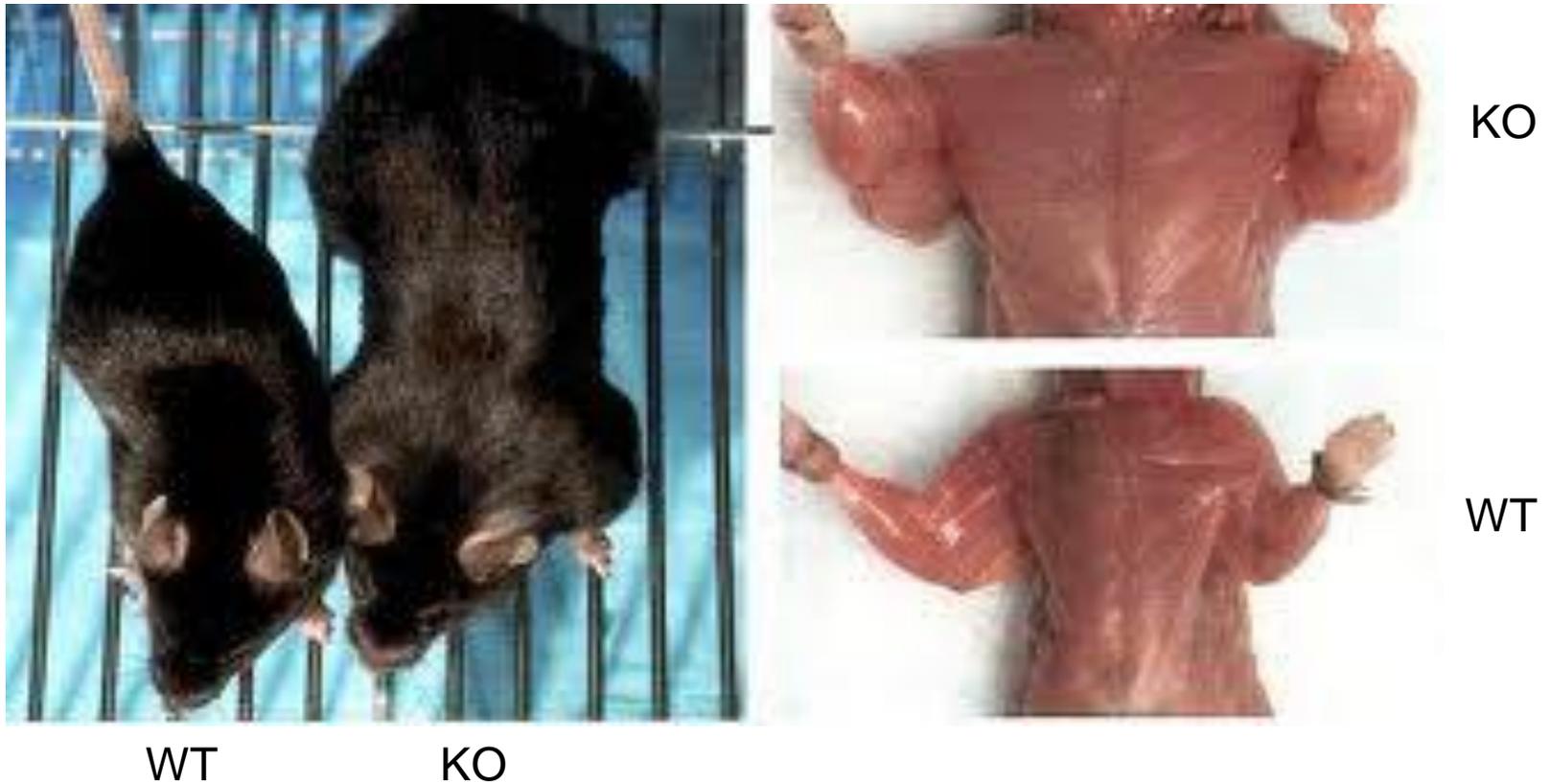
Croisement des chimères pour Identifier celles dans lesquelles lignée germinale est recombina



**Souris transgénique avec une copie du gène ciblé remplacée par la version mutée du gène**

**KO: Knock out**  
**KI : Knock In**

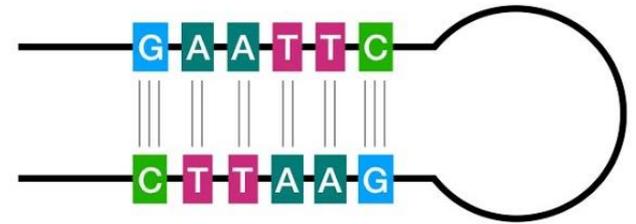
# Souris KO pour le gène de la Myostatine



# Modification du génome par la méthode CRISPR

‘Clustured Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats’

**Palindrome** Désigne un texte ou un mot dont l'ordre des lettres reste le même qu'on le lise de gauche à droite ou de droite à gauche, comme dans la phrase « Elu par cette crapule ».



*A structure of cruciform hairpin DNA with  
A palindromic sequence*

**1987-2002:** découverte des séquences CRISPR:

5 séquences régulièrement espacées et partiellement palindromiques chez *E. coli*, puis dans la plupart des bactéries

**2005:** séquences CRISPR identiques à des séquences de bactériophage

**2007:** découverte du pouvoir protecteur des CRISPR contre les bactériophages de la bactérie lactique *Streptococcus Thermophilus*

**2012:** ce système de défense peut être manipuler pour cibler n'importe quel gène



Illustrations: Niklas Elmehed

## THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020

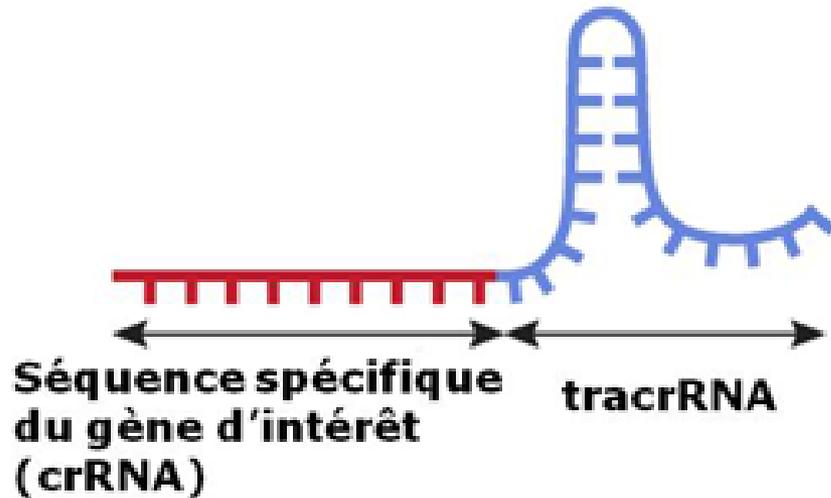
**Emmanuelle  
Charpentier**

**Jennifer A.  
Doudna**

"for the development of a method  
for genome editing"

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

## ARNsg (ARN « single guide »)

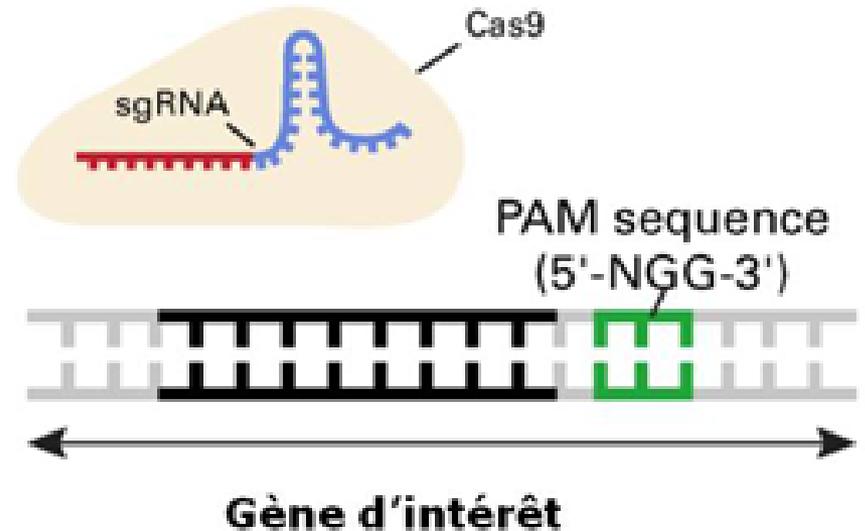


**Sg RNA** : crRNA + tracrRNA

**crRNA** : CRISPR RNA spécifique et complémentaire de la séquence cible d'ADN à cliver

**tracrRNA** : transactivating crRNA se liant à la nucléase Cas9

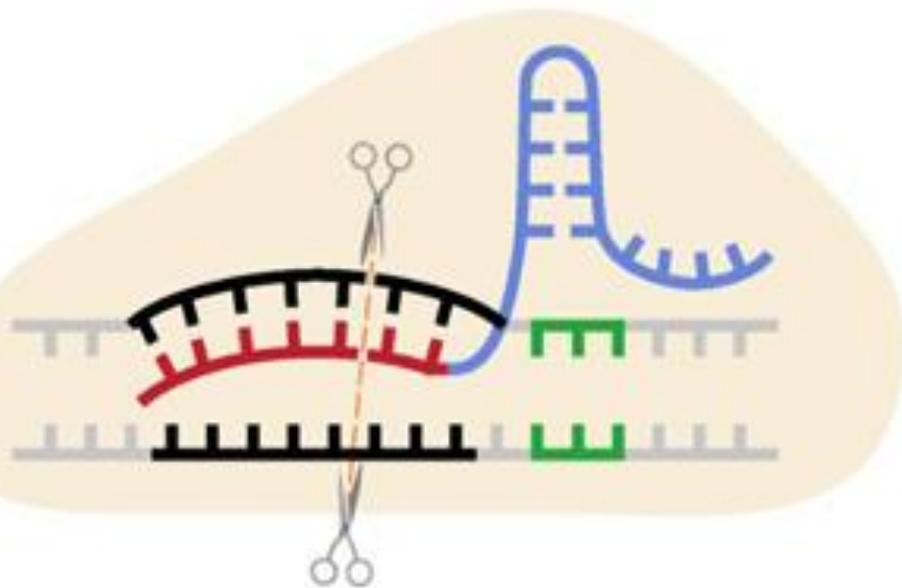
## ARNsg + protéine Cas9



Séquence cible : 20 pb toujours suivies par un motif PAM (NGG)

**PAM** : Protospacer Adjacent Motif

## Coupure spécifique de la séquence d'ADN cible

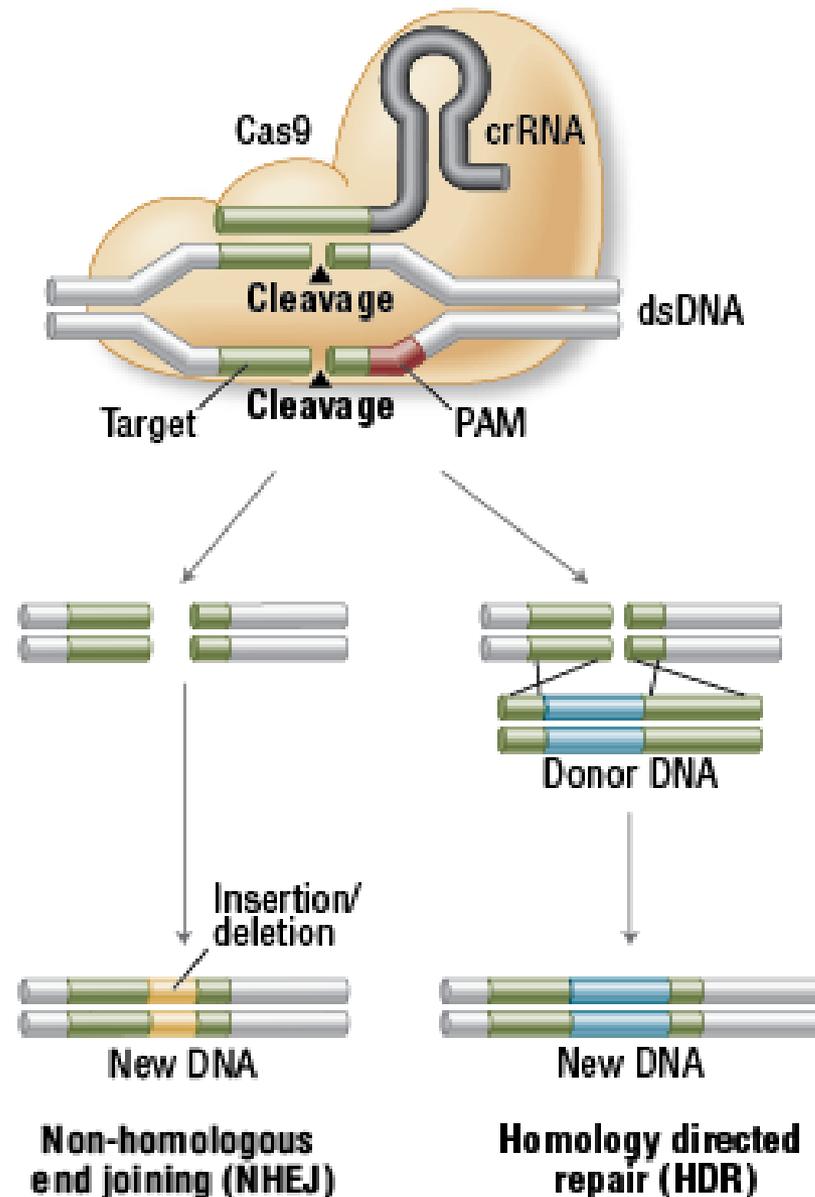


Formation du complexe ARNsg – nucléase cas9 et clivage spécifique du gène d'intérêt dans la cellule

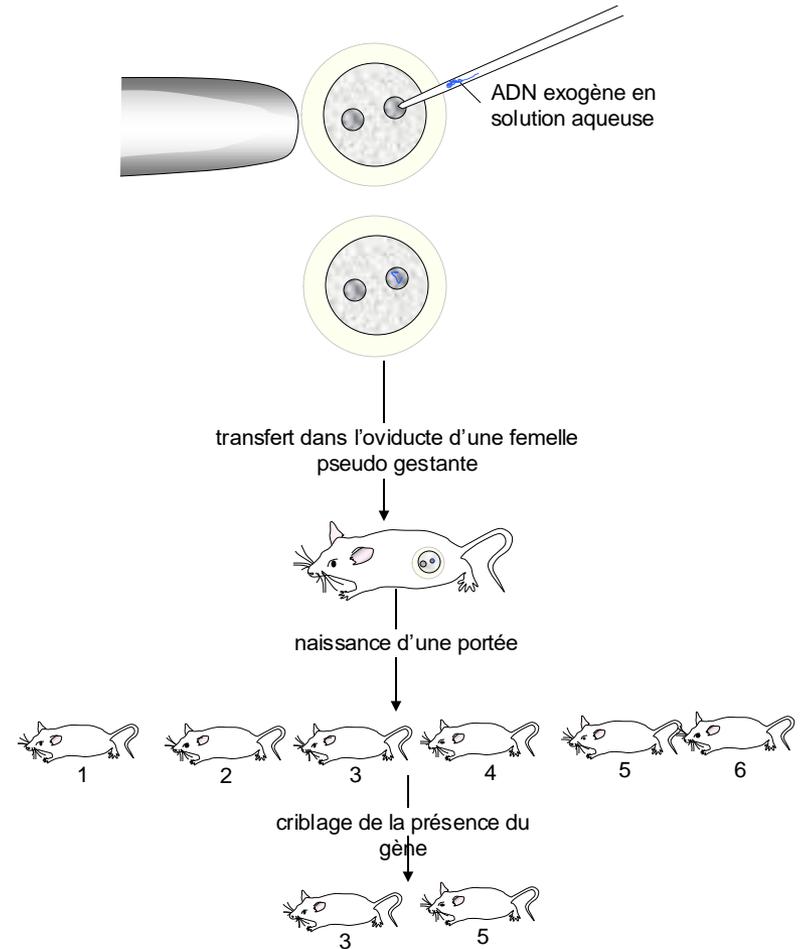
## Résultat de la coupure spécifique de la séquence d'ADN cible



# Deux facons de modifier le genome (cf KO, KI)

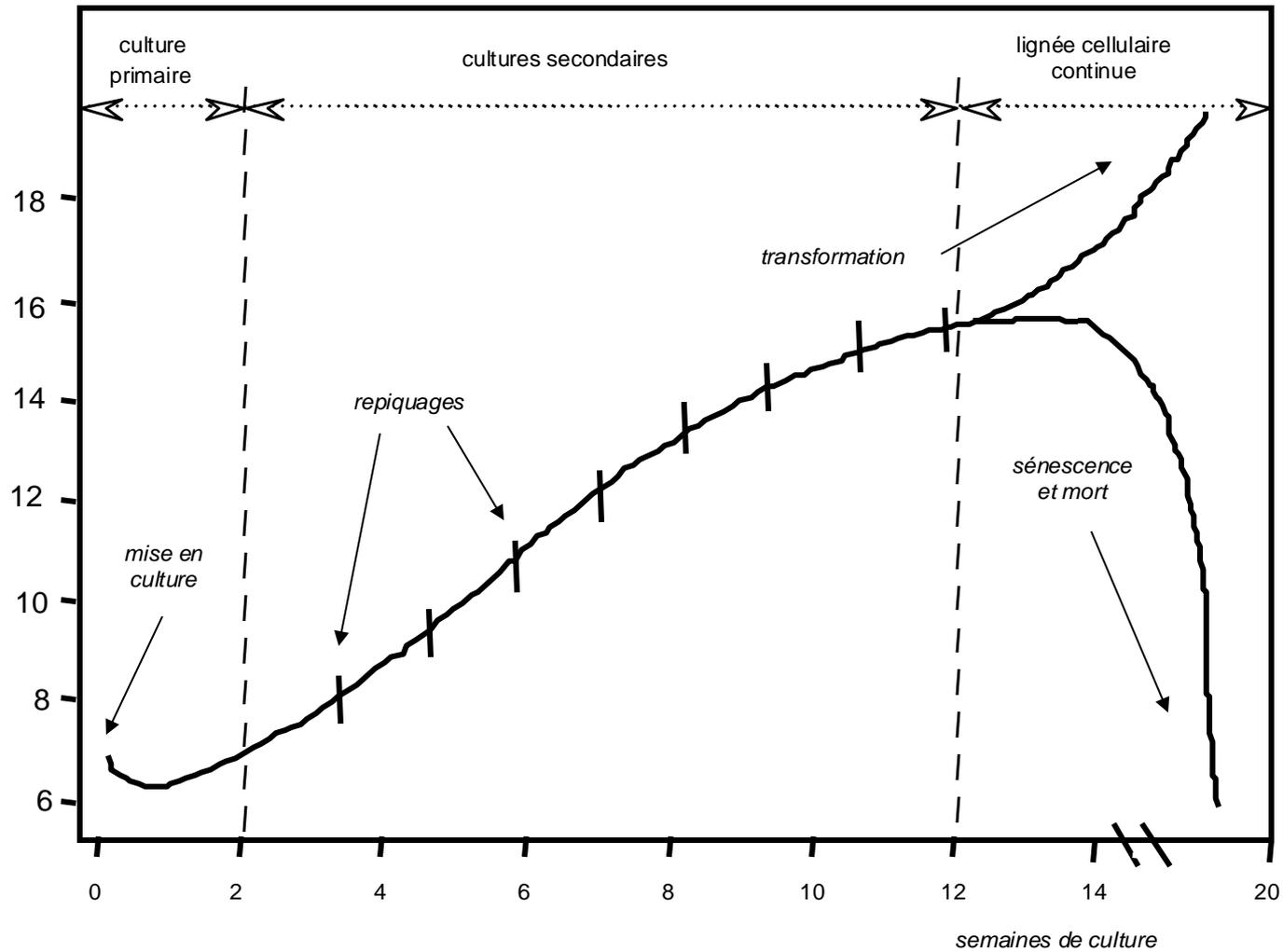


# CRISPR chez la souris: injection des ovocytes comme en transgénèse classique



**Plus de 40 espèces testées avec succès pour l'utilisation des CRISPR**

# Cellules en culture



## Conditions de culture

Milieu nutritif: acides aminés, glucose ...

Facteurs de croissance (sérum)

Atmosphère contrôlé: O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 37° C

Cultures adhérentes: monocouche, inhibition de contact

Caractéristiques courantes des cellules transformées:

- Culture indépendante du support
- Culture indépendante du sérum
- Perte de l' inhibition de contact
- Immortalisées

# Les cellules souches peuvent se différencier en différents types cellulaires

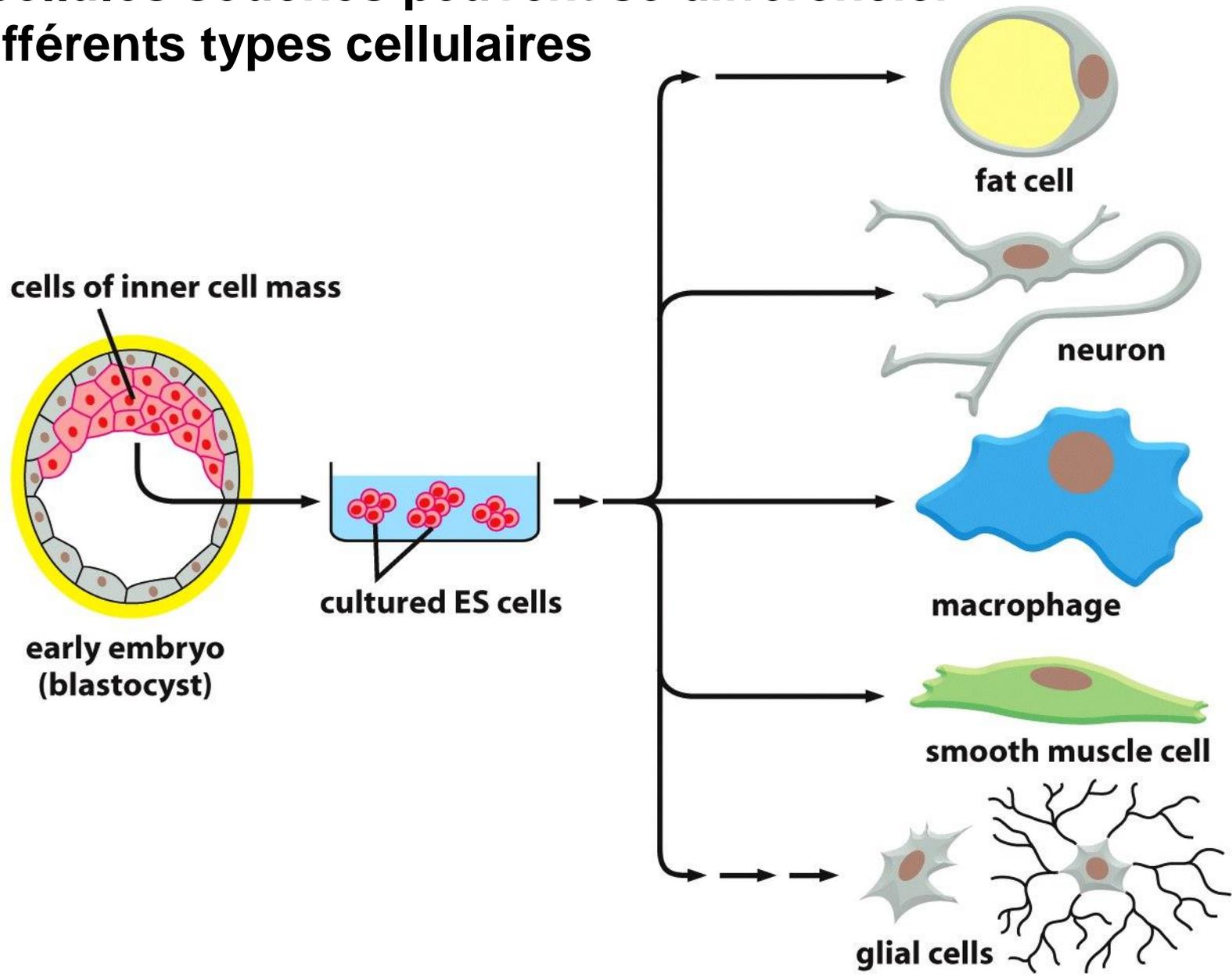


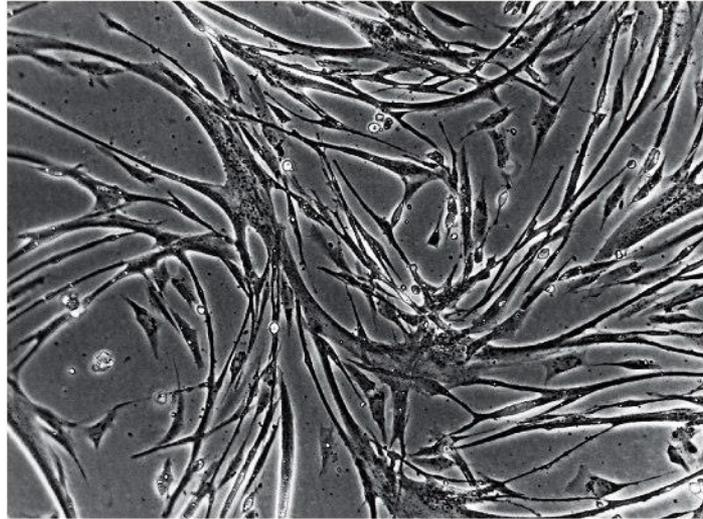
Figure 8-5 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



(A)

20  $\mu\text{m}$

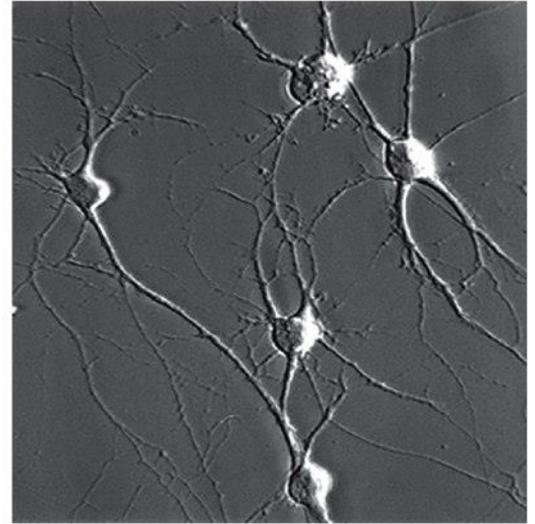
Fibroblastes



(B)

100  $\mu\text{m}$

Cellules musculaires

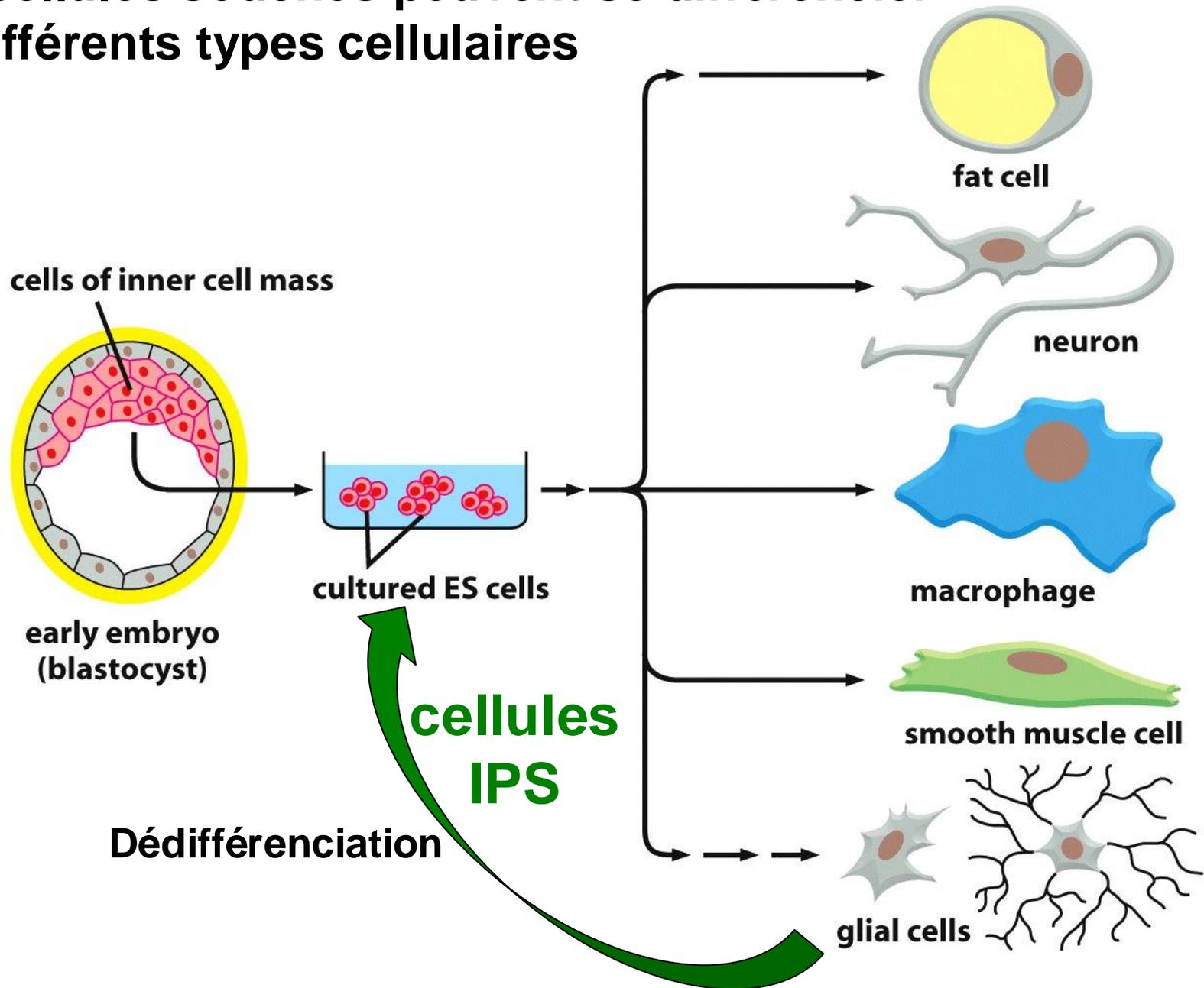


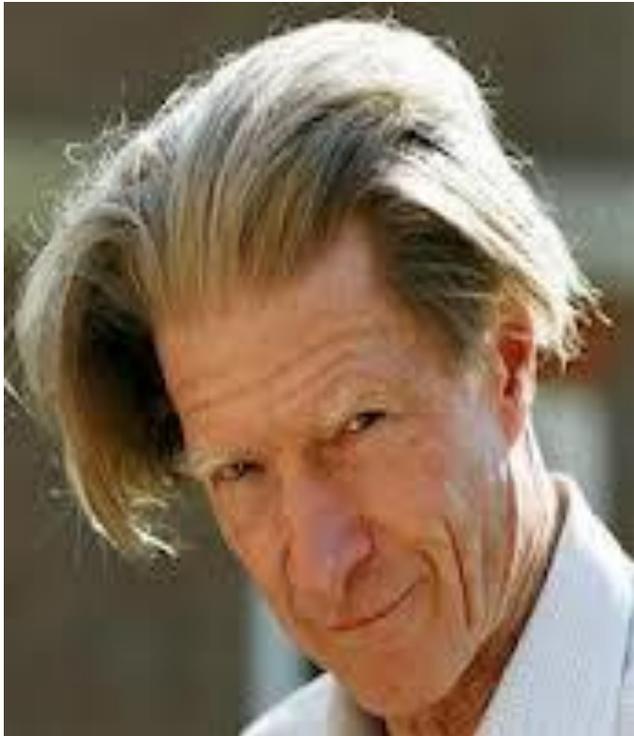
(C)

50  $\mu\text{m}$

Neurones

# Les cellules souches peuvent se différencier en différents types cellulaires





Sir John B. Gurdon



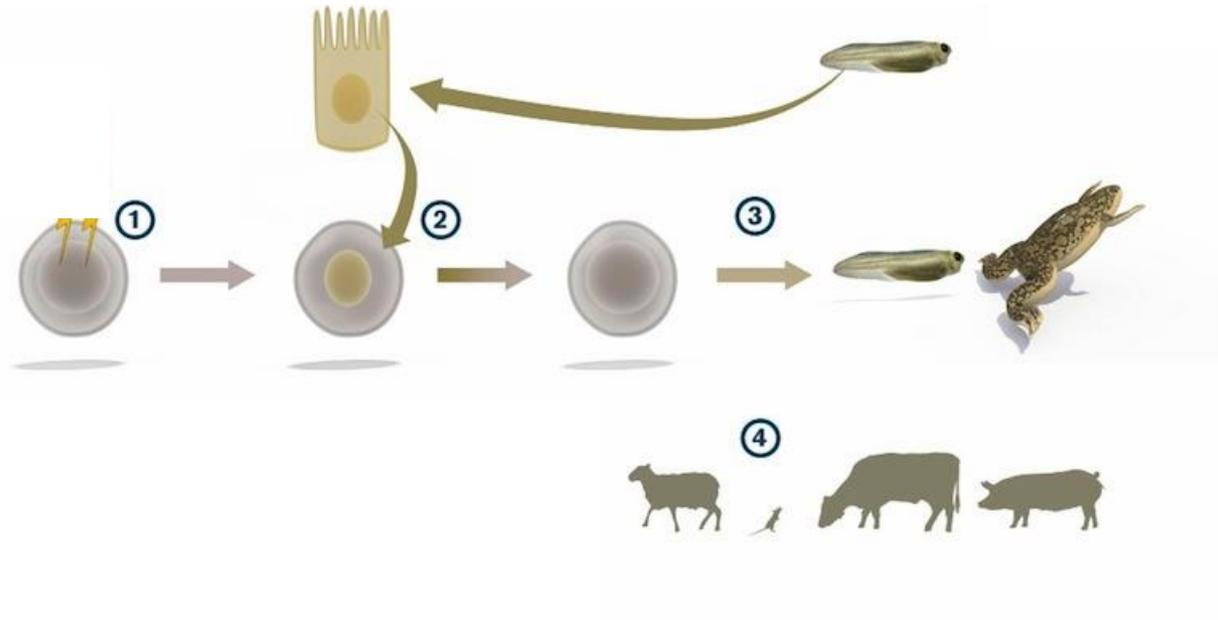
Shinya Yamanaka

## **Prix Nobel de médecine 2012**

1962



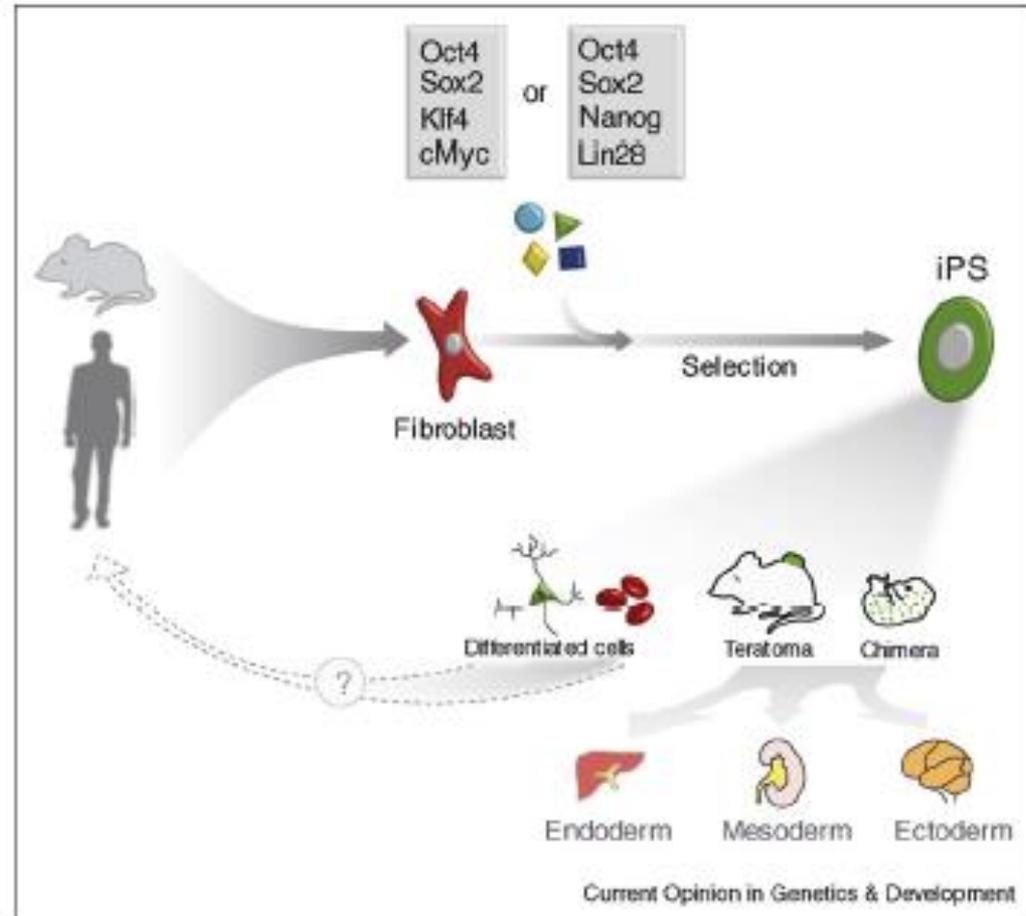
John B. Gurdon

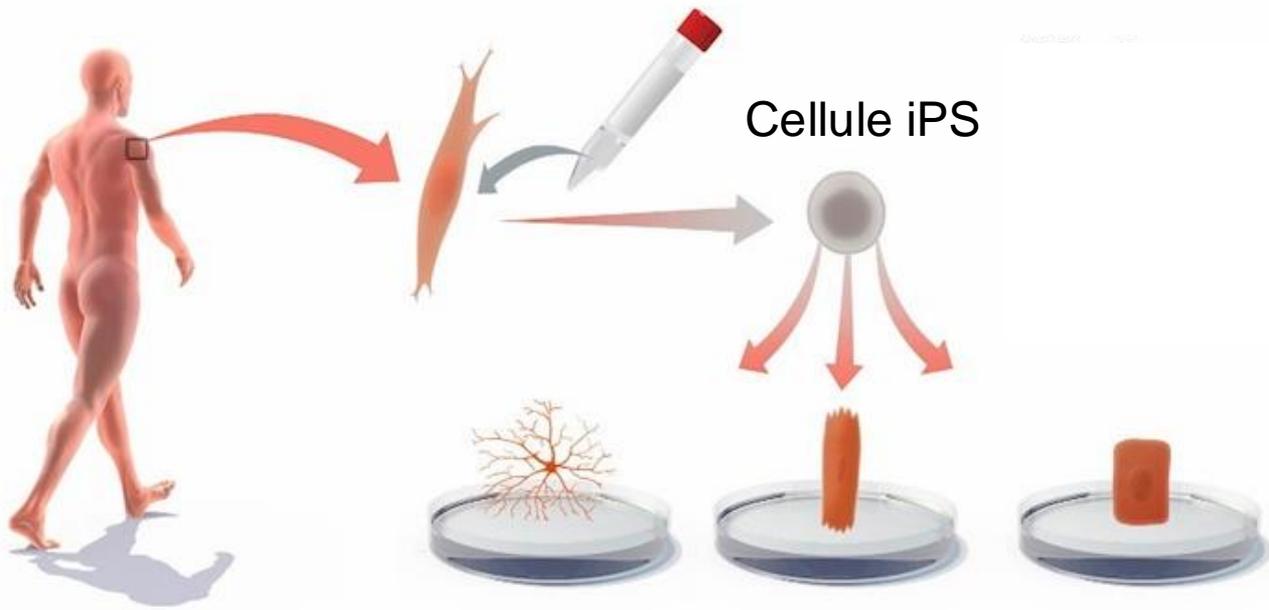


# 2006

4 facteurs de transcription Oct4, klf4, sox2, cMyc permettent de reprogrammer les cellules différenciées en cellules souche.

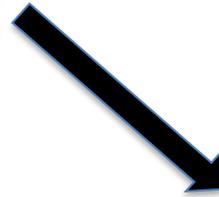
IPS: Cellules Pluripotentes Induites





# Comment faire entrer de l'ADN dans les cellules

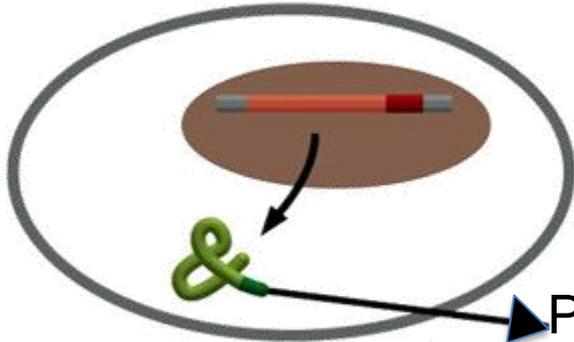
ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm de la protéine d'intérêt



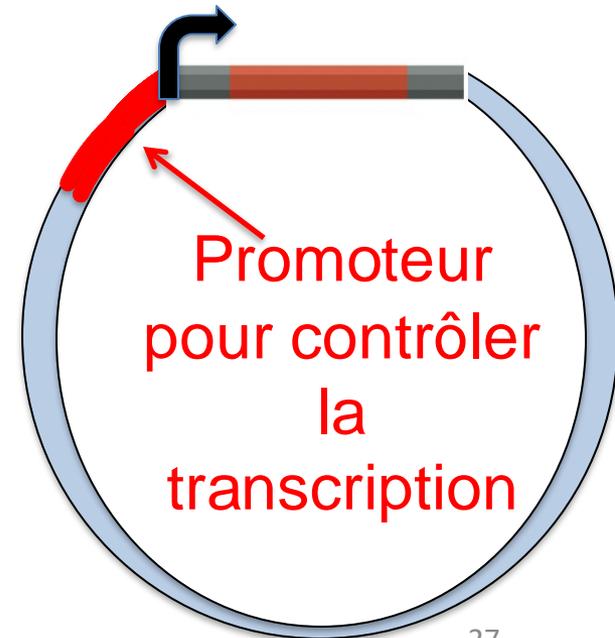
**Vecteur d'expression**

(ADN d'un virus ou d'un plasmide + promoteur + ADNc)

**INTRODUCTION  
DANS LA CELLULE**

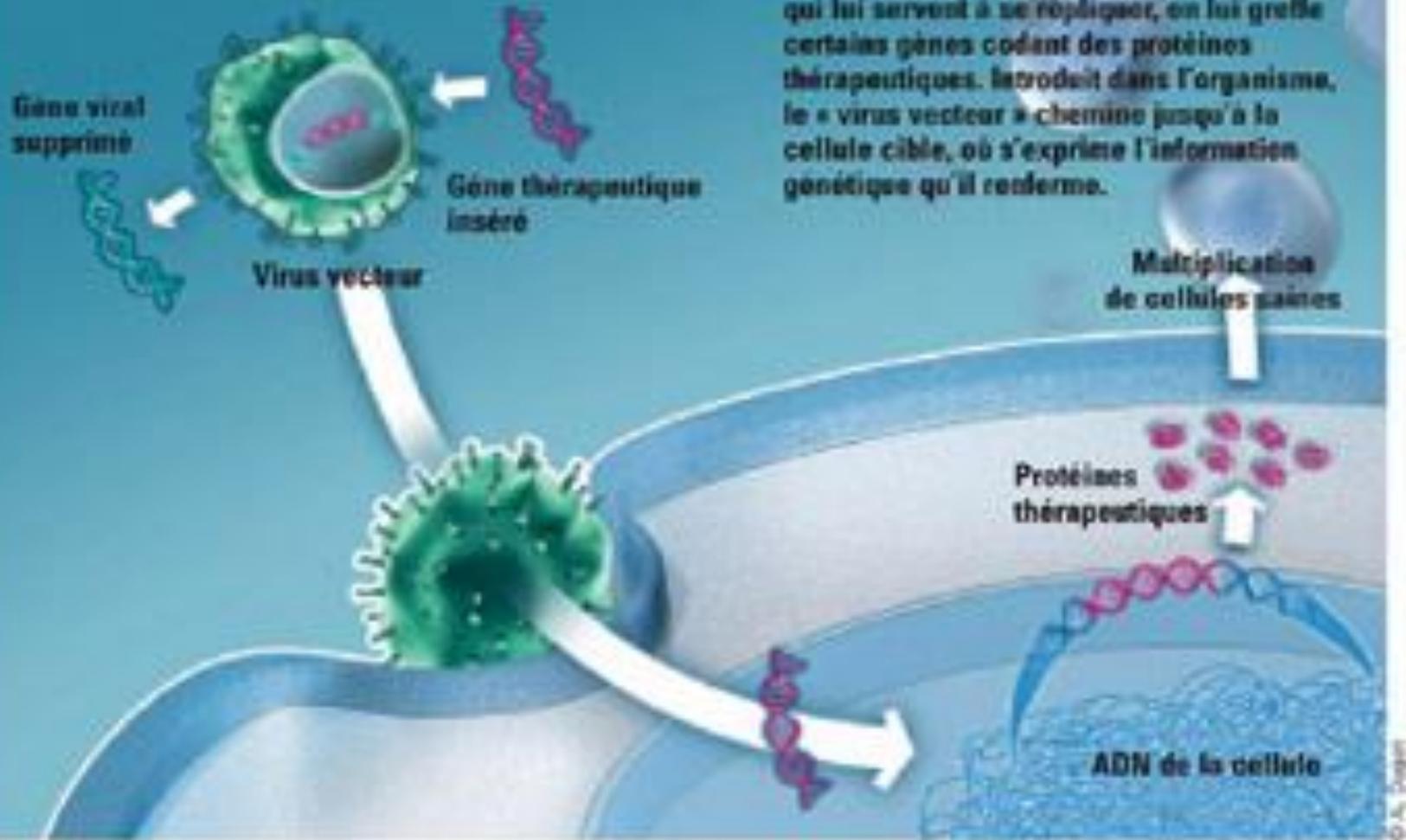


Protéine codée par  
l'ADN mis dans le  
Vecteur d'expression



# DES VIRUS TRANSFORMÉS EN TAXIS

Après avoir dépouillé un virus des gènes qui lui servent à se répliquer, on lui greffe certains gènes codant des protéines thérapeutiques. Introduit dans l'organisme, le « virus vecteur » chemine jusqu'à la cellule cible, où s'exprime l'information génétique qu'il renferme.



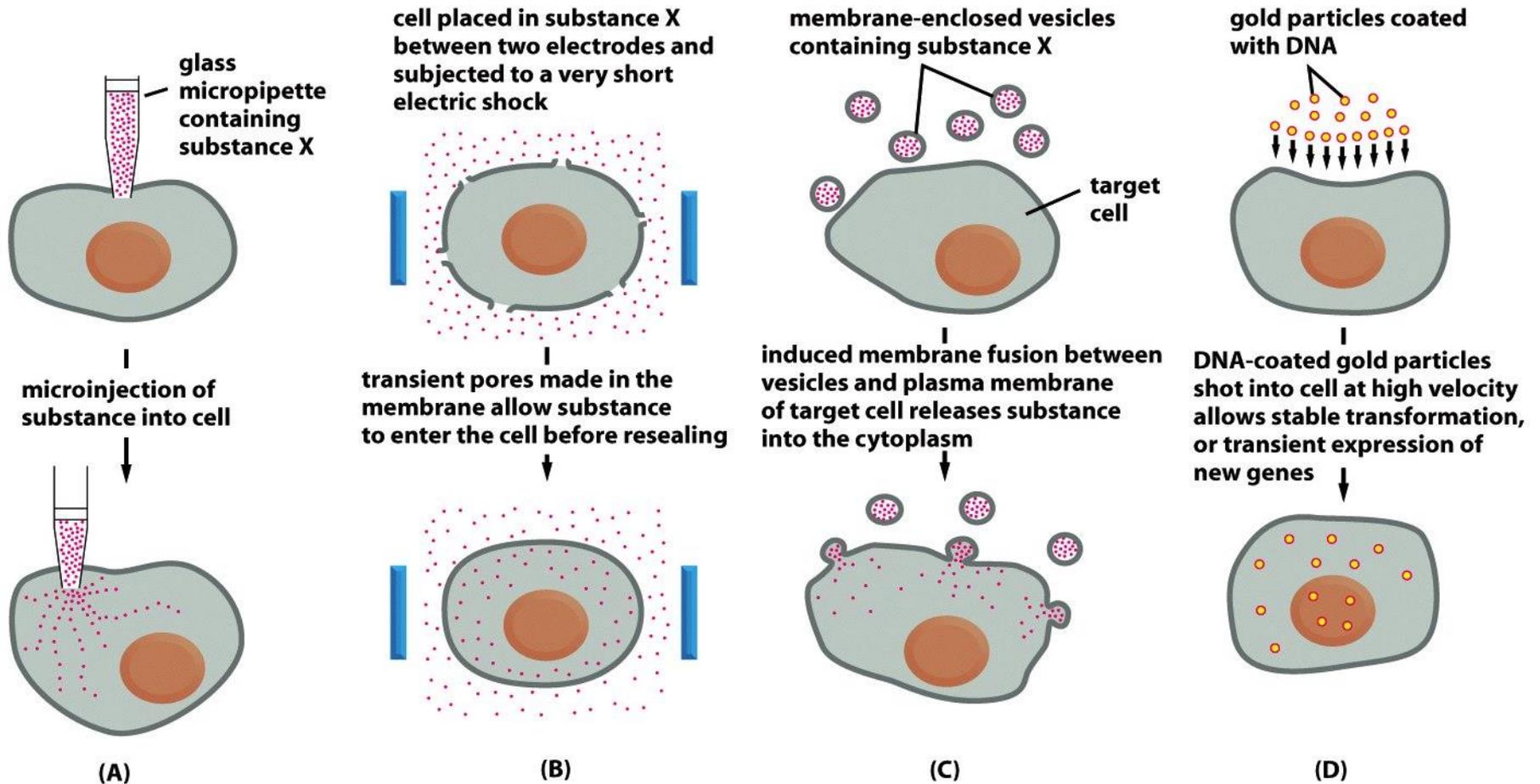
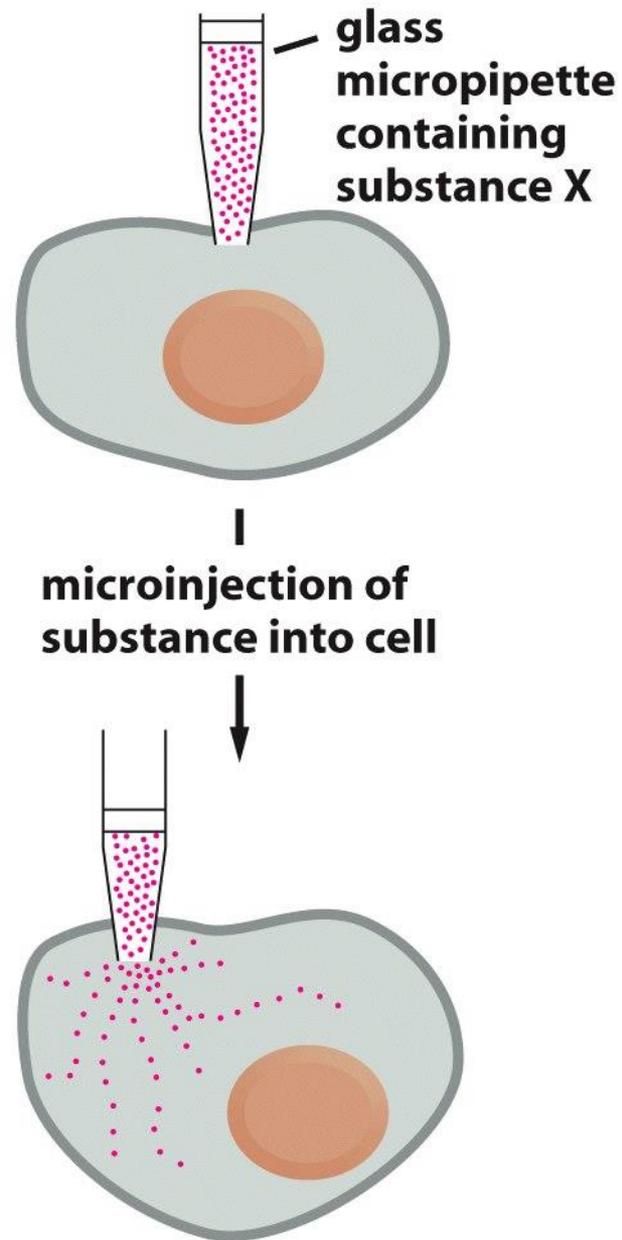


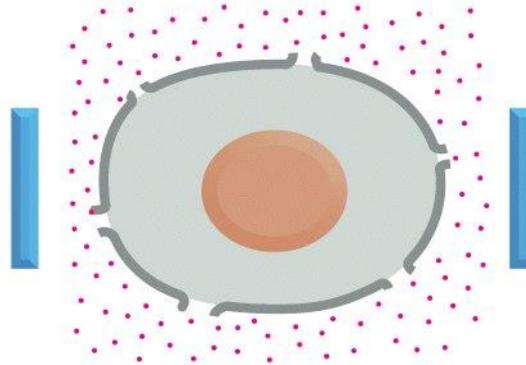
Figure 9-34 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Microinjection

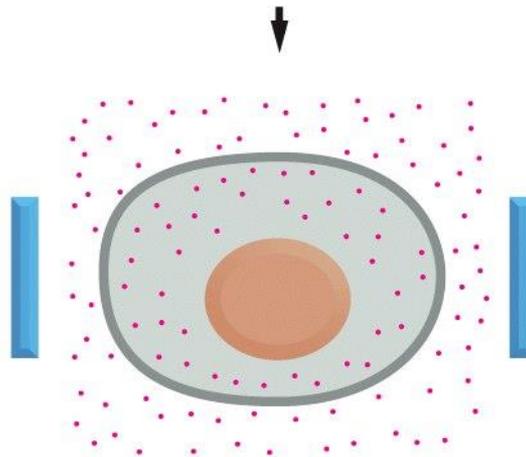


# Electroporation

cell placed in substance X  
between two electrodes and  
subjected to a very short  
electric shock

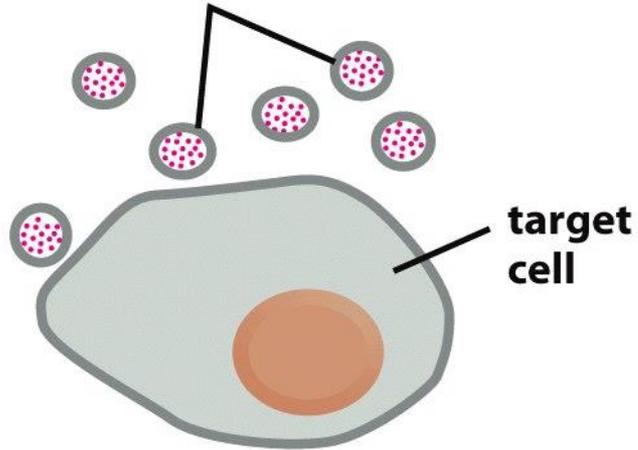


transient pores made in the  
membrane allow substance  
to enter the cell before resealing

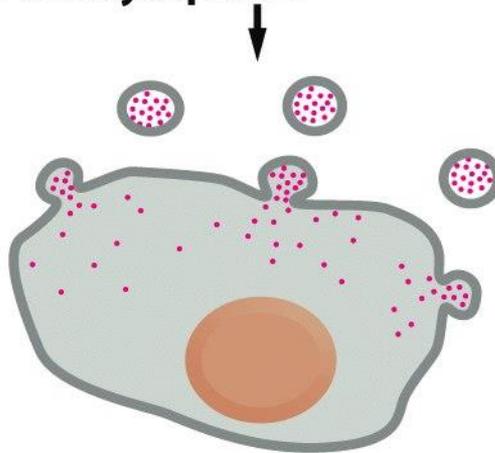


# Lipofection

membrane-enclosed vesicles  
containing substance X

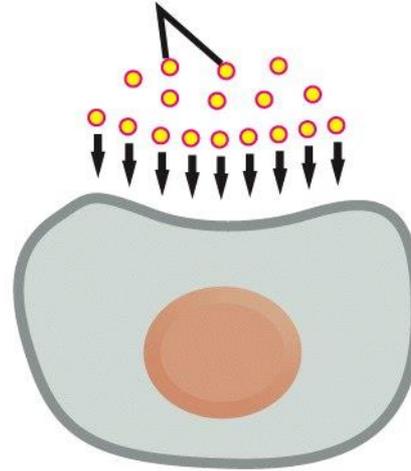


induced membrane fusion between  
vesicles and plasma membrane  
of target cell releases substance  
into the cytoplasm

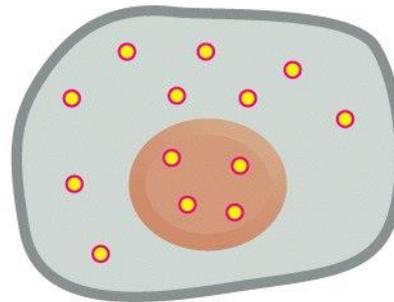


# Bombardement avec des particules d'or ou de tungstène (shotgun)

gold particles coated  
with DNA



I  
DNA-coated gold particles  
shot into cell at high velocity  
allows stable transformation,  
or transient expression of  
new genes



# Pourquoi transférer de l'ADN plutôt que directement les protéines?

Pour avoir une production continue de la protéine d'intérêt



L'ADN est stable dans les cellules, contrairement à la plupart des protéines

Autres raisons:

- On peut utiliser des vecteurs qui se répliquent et ne se perdent pas au fil des divisions cellulaires

- Il est plus facile de produire de l'ADN que des protéines

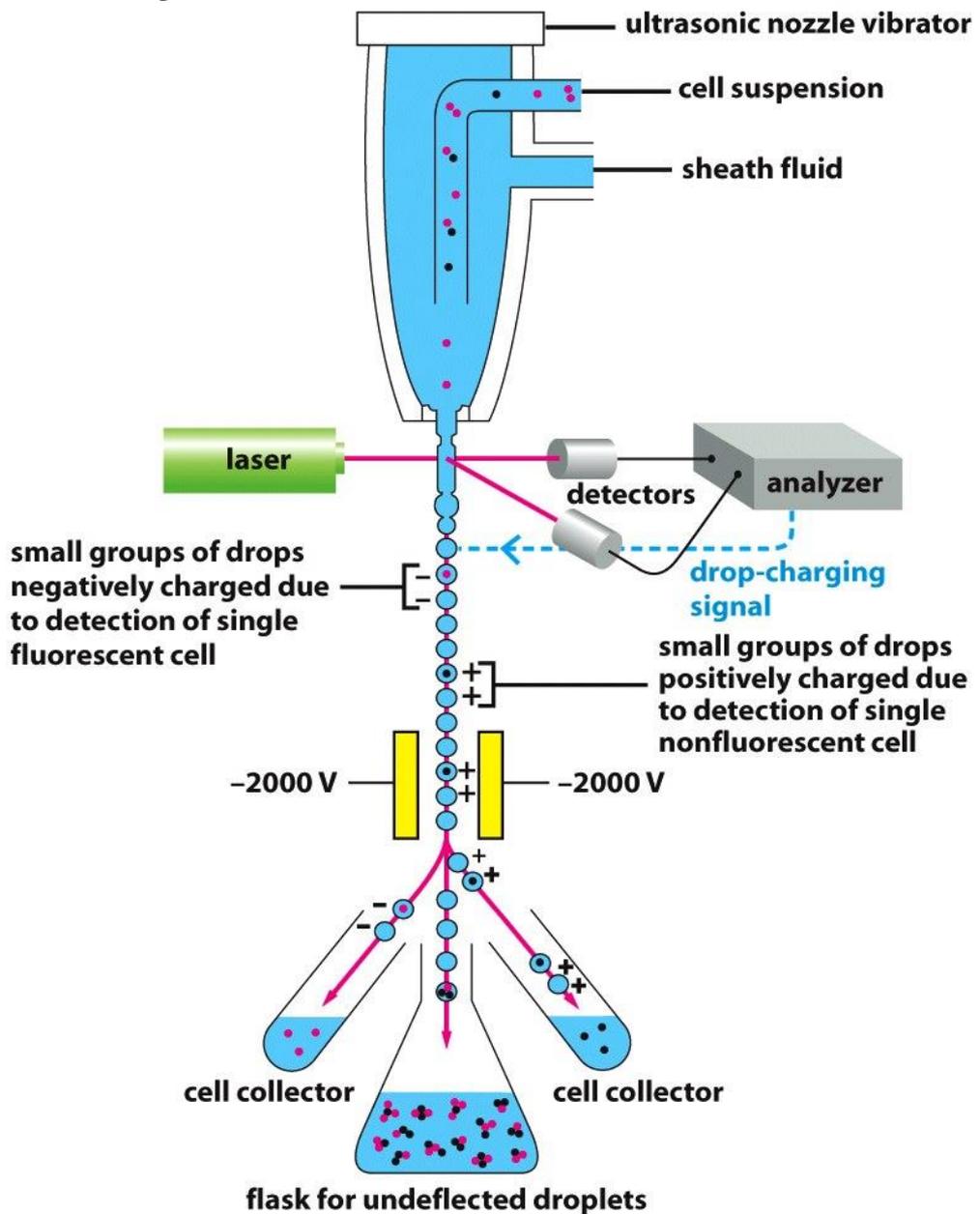
- On ne connaît pas forcément toutes les modifications posttraductionnelles qu'il faut apporter à une protéine pour qu'elle soit fonctionnelle

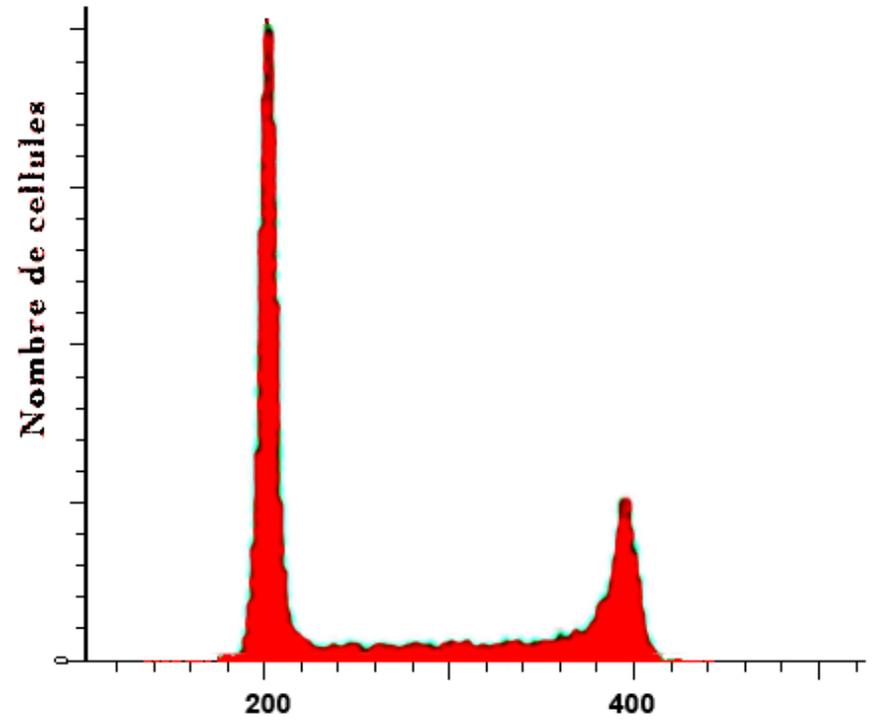
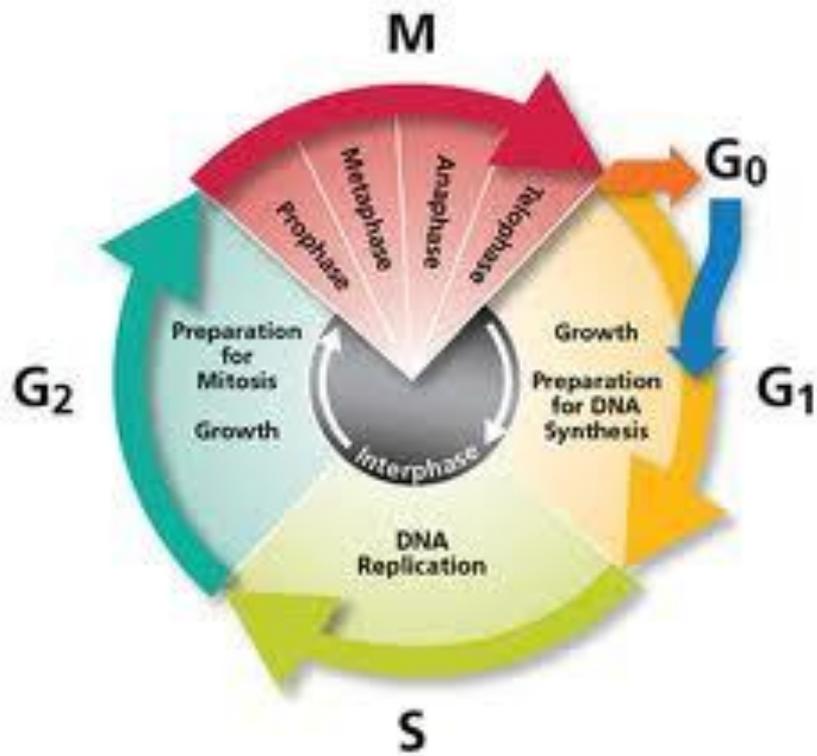
## **2. Méthodes de séparation**

- a. Cellulaire:            la cytométrie de flux**
- b. Subcellulaire:        la centrifugation**
- c. Moléculaires:        - électrophorèses  
                                  (- chromatographies)**

# 2. Méthodes de séparation

## a. Cellulaire: la cytométrie de flux





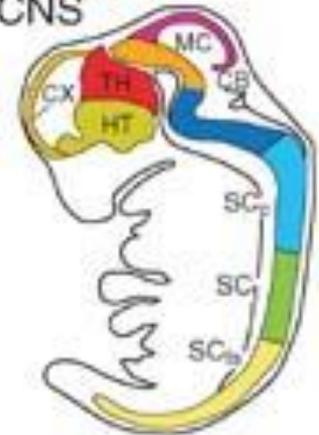
Fluorescence = quantité d'ADN

G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

S

G<sub>2</sub>/M

embryonic  
CNS



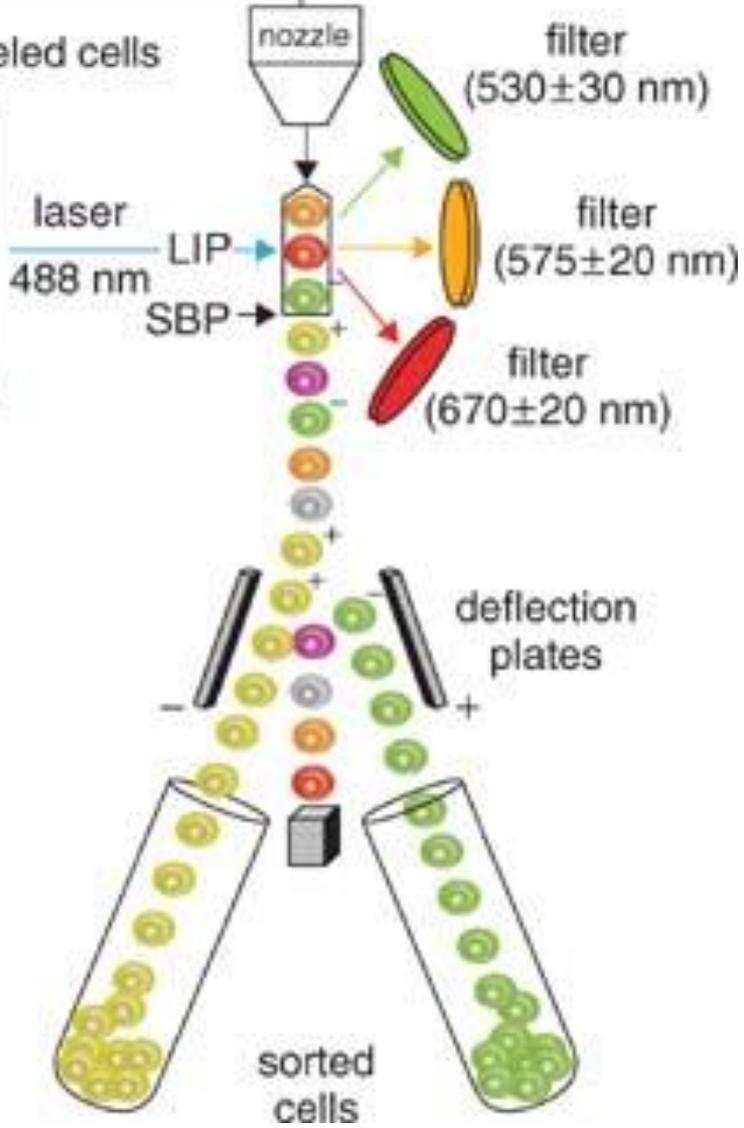
dissection  
dissociation



antibodies  
indicator dyes

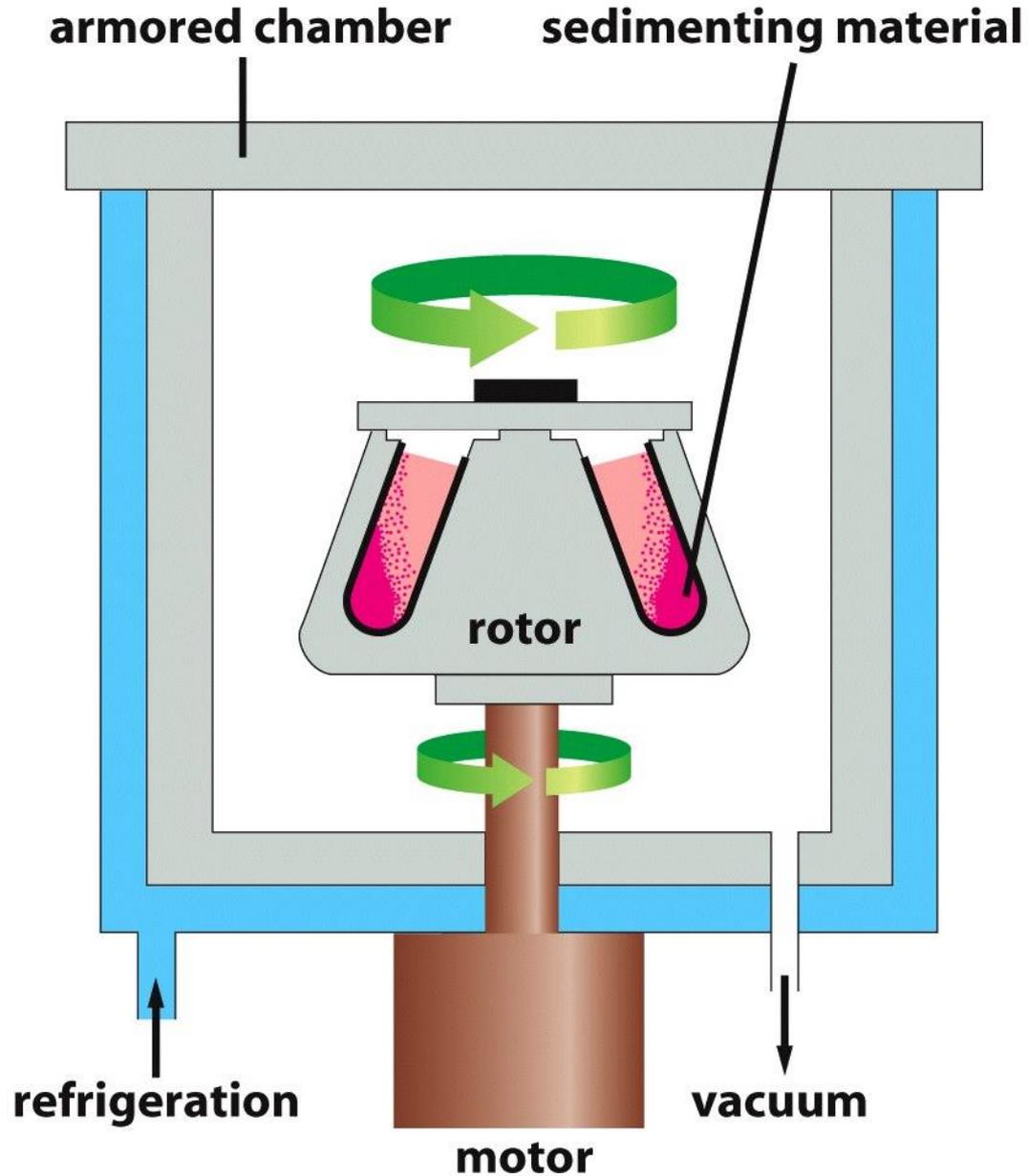


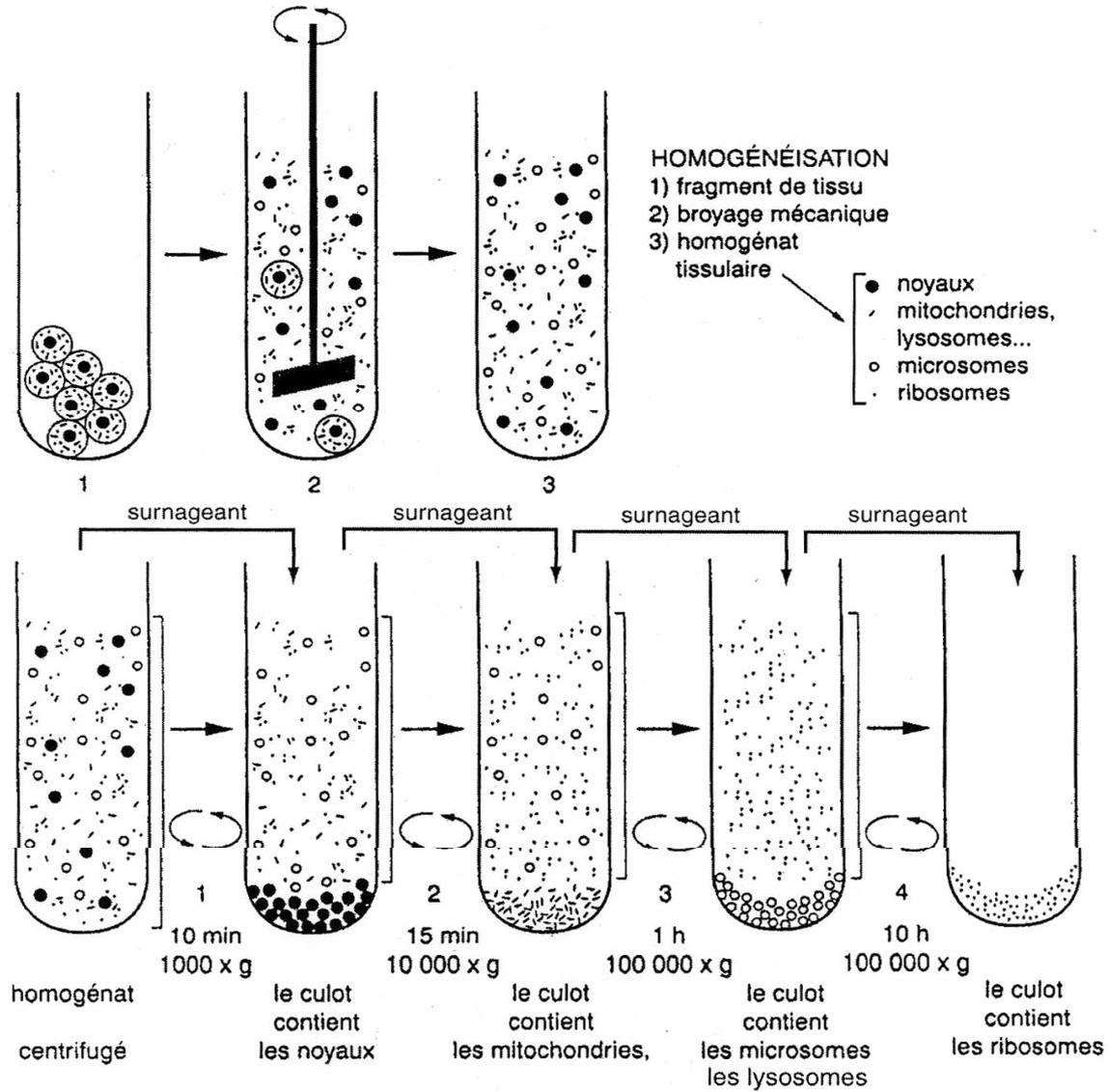
~1000 cells/second



## 2. Méthodes de séparation

### b. Subcellulaire: la centrifugation





Centrifugations successives

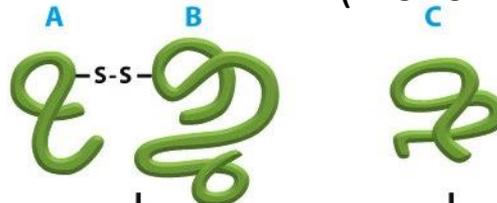
1) basse vitesse 2) vitesse moyenne 3) vitesse élevée 4) vitesse élevée, longue durée

## Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

# Séparation des protéines en fonction de leur taille sur gel de polyacrylamide

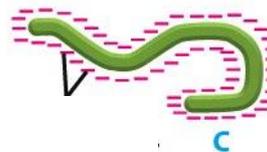
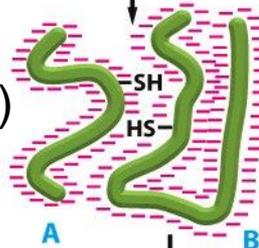
Protéine à deux sous unités (dimérique) liées par un pont disulfure

Protéine à une sous unité (monomérique)



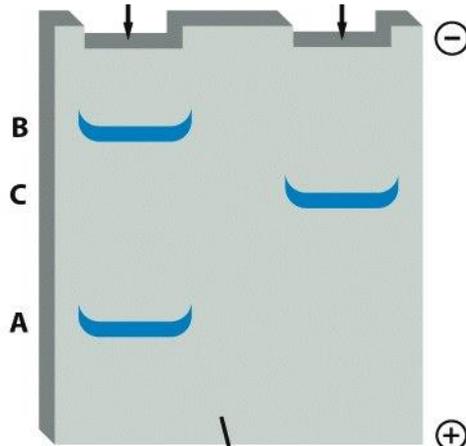
Chauffage en présence de SDS et de mercaptoéthanol

(SDS: dodécylsulfate de sodium)



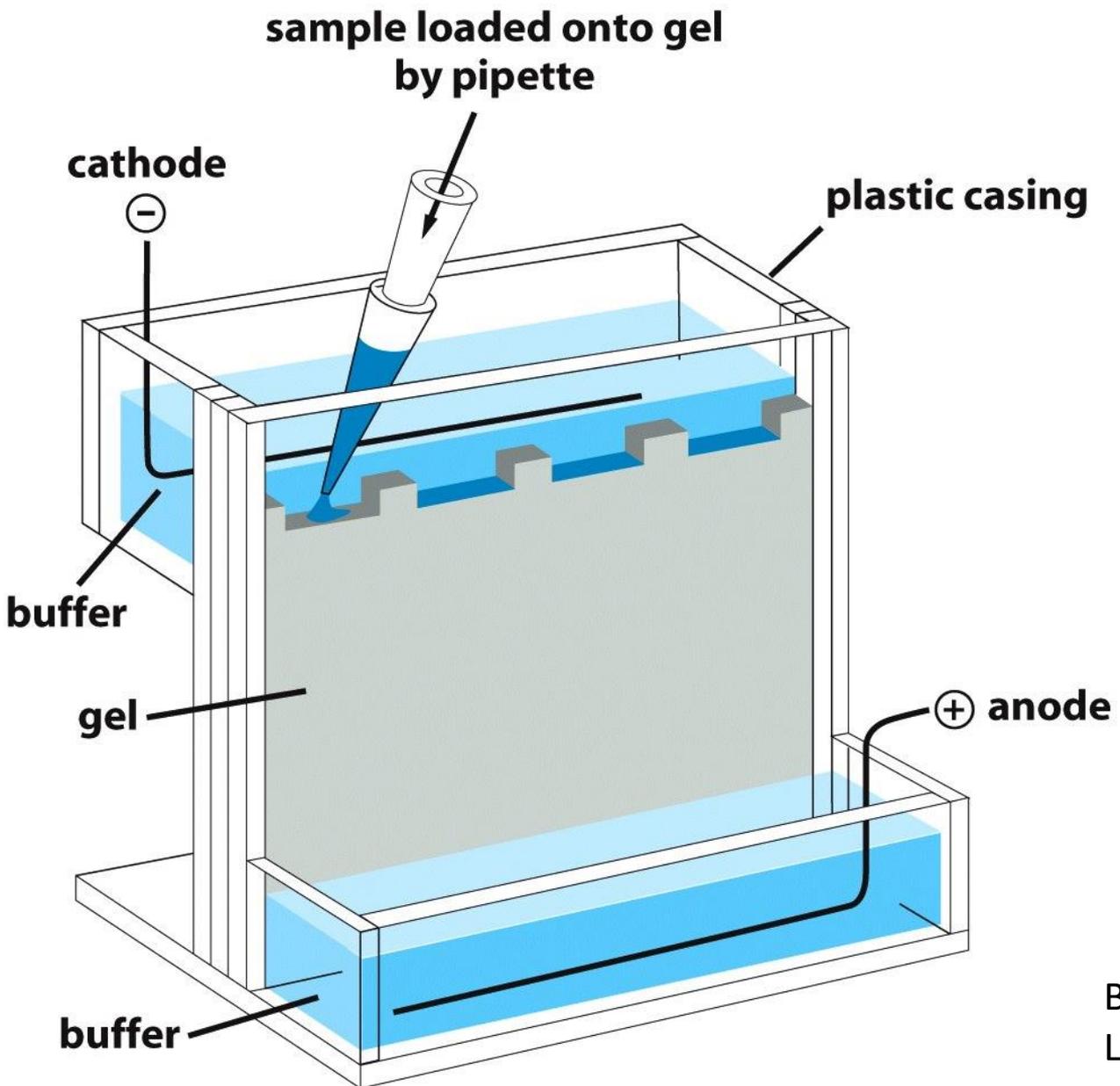
Protéines chargées négativement grâce au SDS

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide



Gel de polyacrylamide

# Electrophorèse



Buffer: tampon  
Loaded: déposé

# Coloration des protéines après séparation en fonction de leur taille sur gel de polyacrylamide

Echantillons déposés sur le gel:

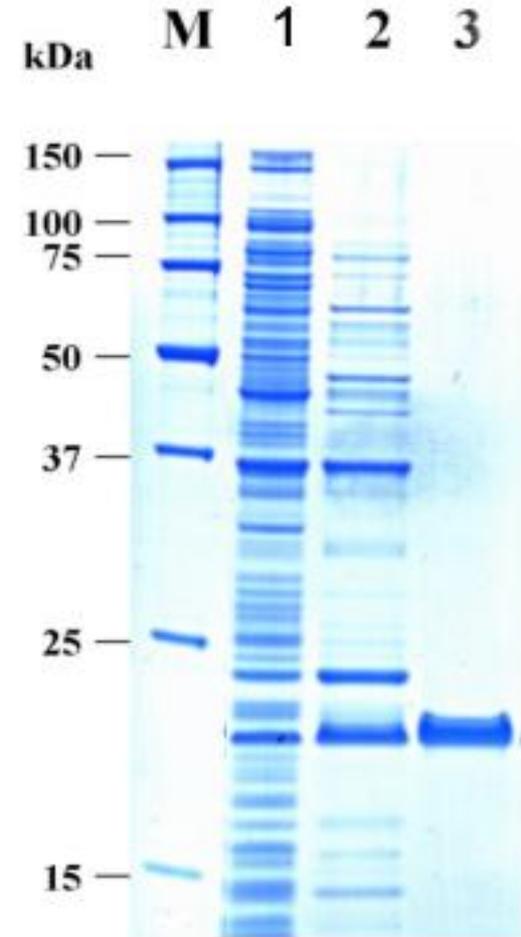
1-3: étapes de la purification d'une protéine:

M: Marqueur de masse moléculaire (en kilo Dalton)

1: Extrait cellulaire

2: Fraction purifiée après une chromatographie

3: Fraction purifiée après une seconde chromatographie  
(contient plus qu'un seul polypeptide)

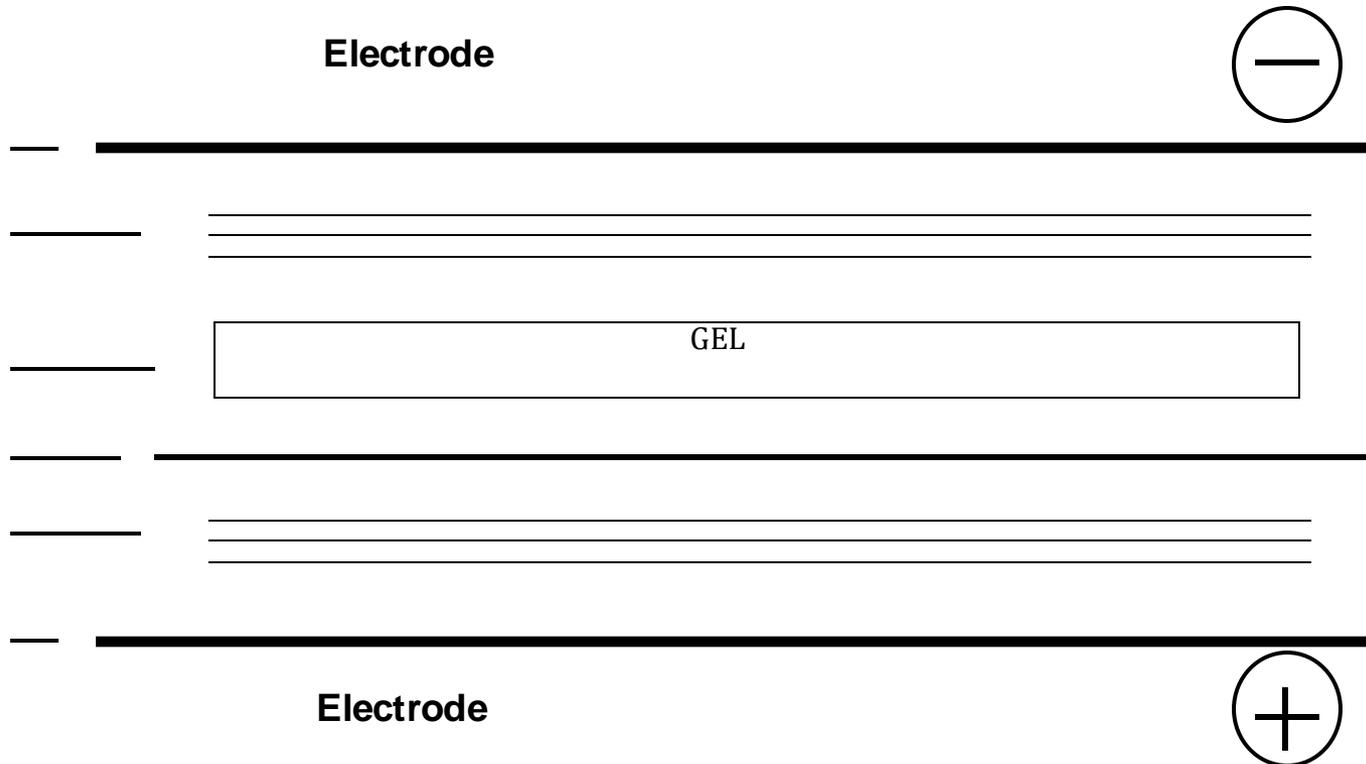


1 Dalton = 1/12 de la masse d'un atome de  $^{12}\text{C}$

Donc 1 Dalton environ = la masse d'un atome d'hydrogène

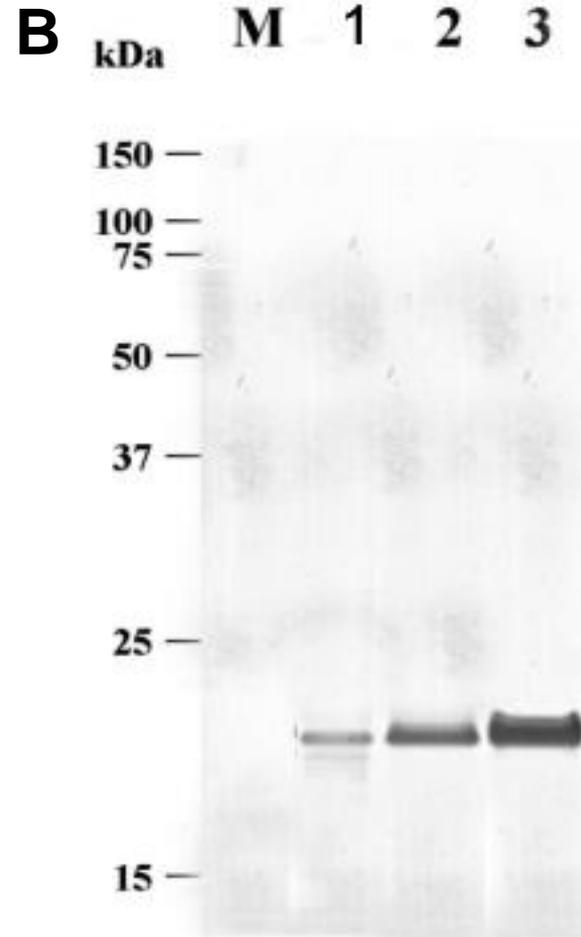
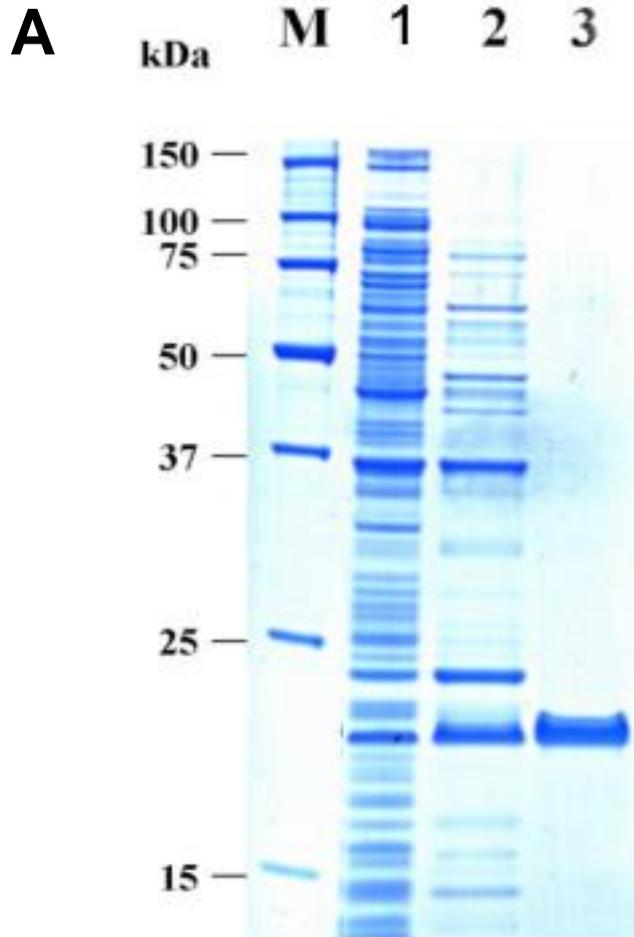
# Electrotransfert des protéines sur membrane

Les gels PAA sont fragiles, pour faire d'autres analyses que la coloration des protéines, on transfère les protéines sur une membrane souple plus facile à manipuler



**A. Coloration d'un SDS-PAGE au bleu de coomassie**

**B. Analyse en western blot du même gel, après transfert des protéines sur membrane de PVDF et détection par un anticorps dirigé contre la protéine purifiée.**



# **3. Détection des molécules biologiques**

**a. Les isotopes radioactifs**

**b. Les anticorps**

## a. Les radioisotopes utilisés en biologie

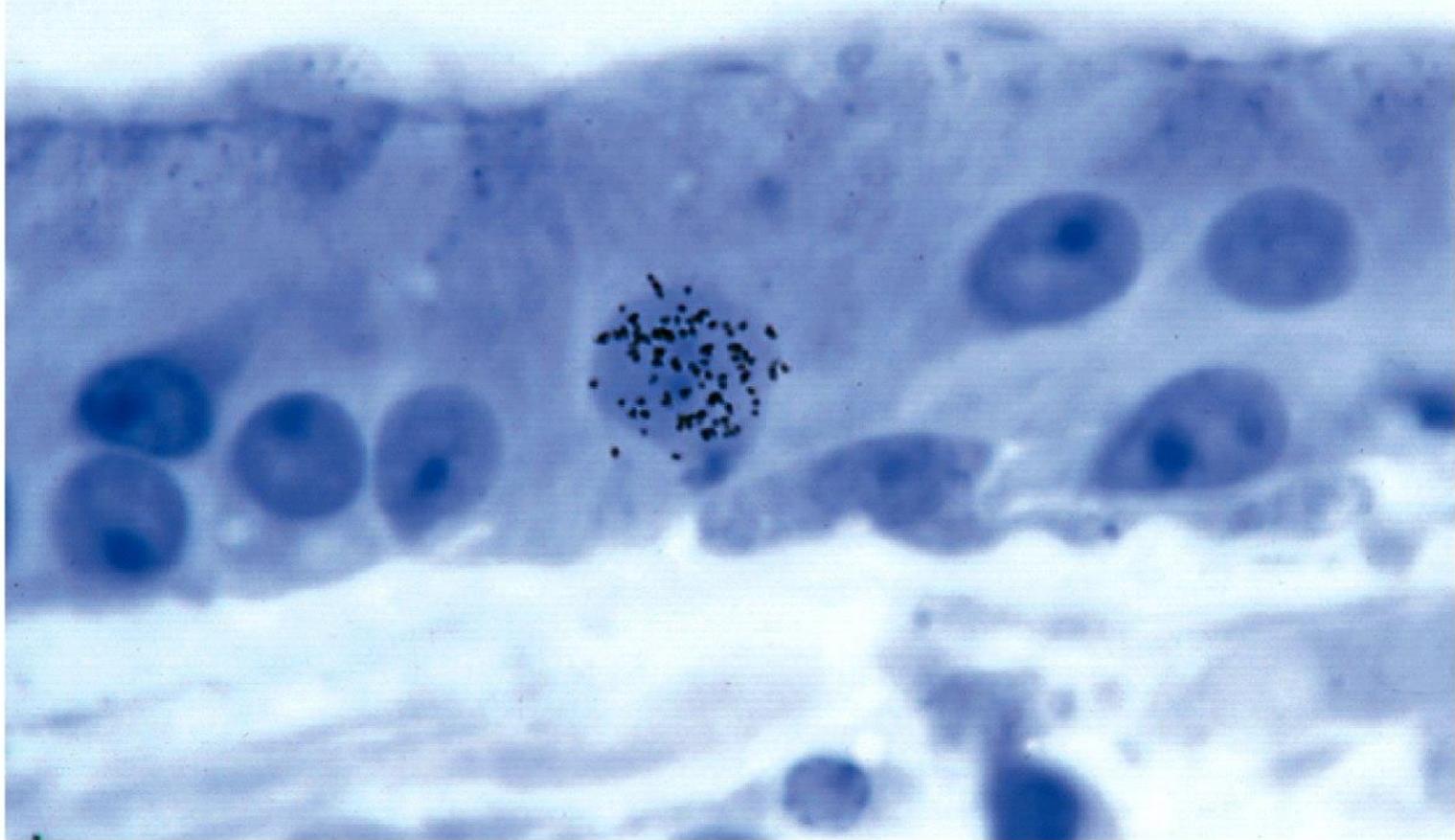
ISOTOPE	HALF-LIFE
$^{32}\text{P}$	14 days
$^{131}\text{I}$	8.1 days
$^{35}\text{S}$	87 days
$^{14}\text{C}$	5570 years
$^{45}\text{Ca}$	164 days
$^3\text{H}$	12.3 years

A retenir:

Le phosphore radioactif permet surtout de marquer les nucléotides et les protéines phosphorylées

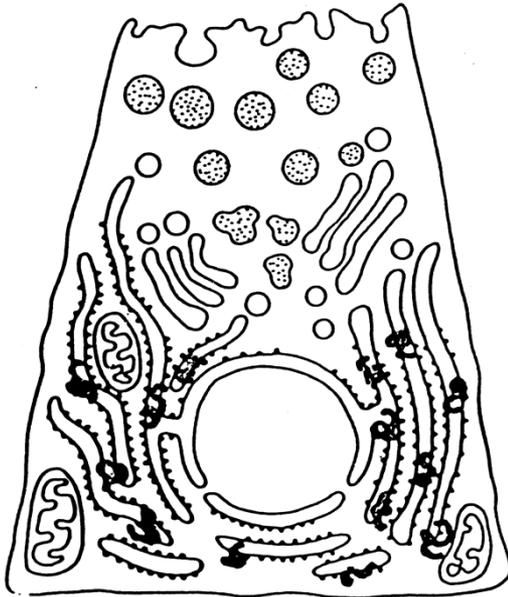
Le soufre radioactif permet surtout de marquer les acides aminés soufrés et donc les protéines

## Incorporation de thymidine tritiée dans une cellule en phase S



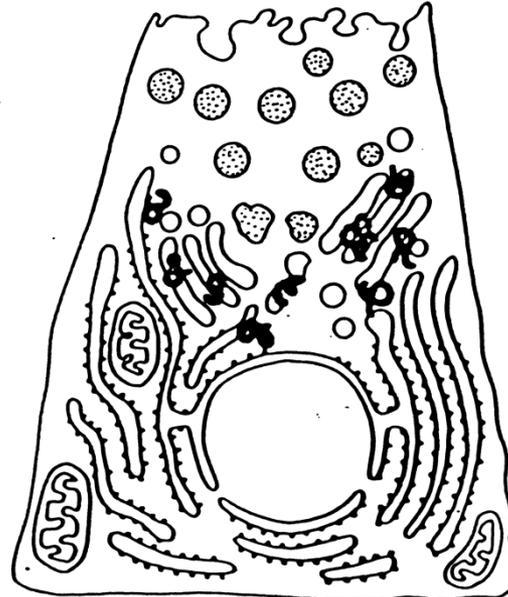
20  $\mu\text{m}$

# Pulse-chase



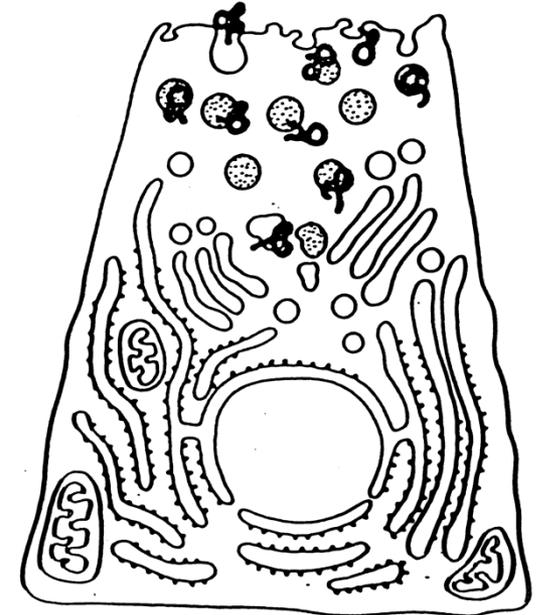
3 minutes

Co-localisation  
des grains d'argent  
et du RE



20 minutes

Co-localisation  
des grains d'argent  
et de l'appareil de Golgi



90 minutes

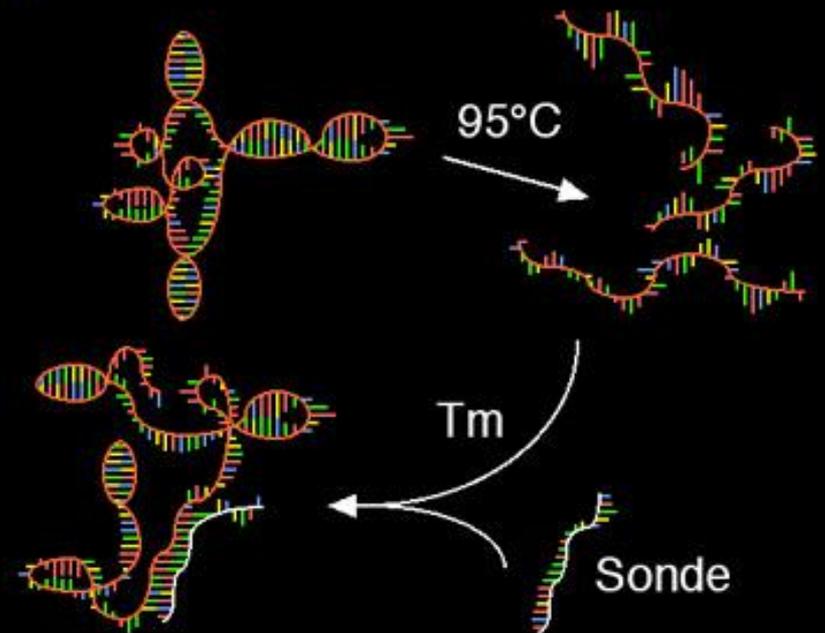
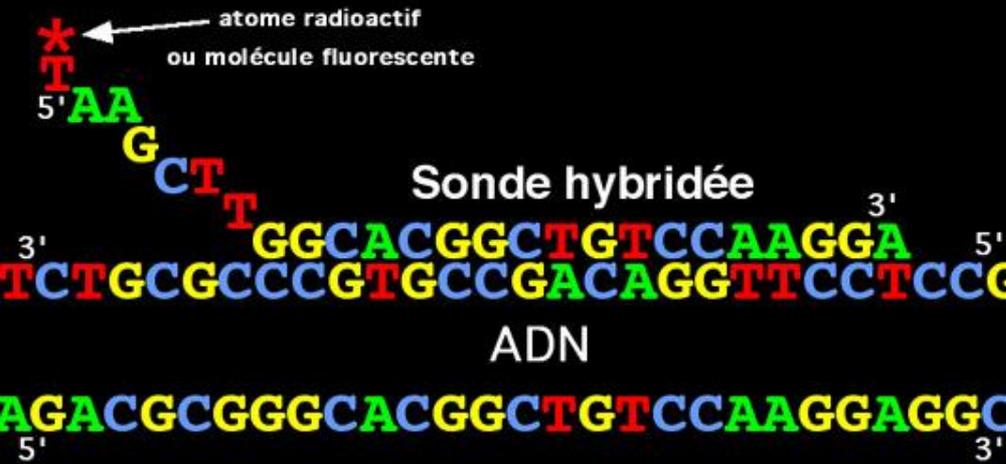
Co-localisation  
des grains d'argent  
et des vésicules  
de sécrétion

Marquage court suivi d'une chasse (3, 20 et 90 min) et d'une autoradiographie  
(cellule du pancréas exocrine)



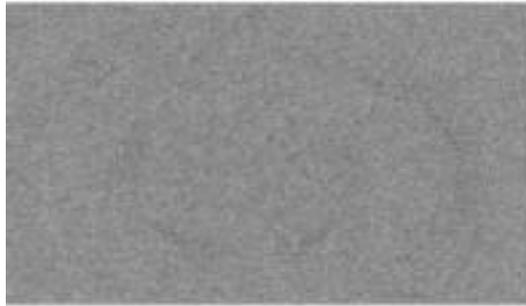
Liaison de Nicotine  $^3\text{H}$  sur des tranches de cerveau

# Hybridation in situ d'acides nucléiques

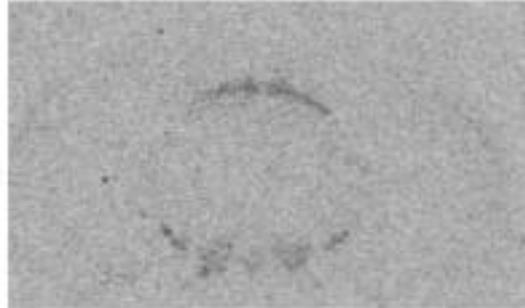


# Expression des sous unités du récepteur nicotinique de l'acétylcholine dans le cerveau

$\alpha 2$



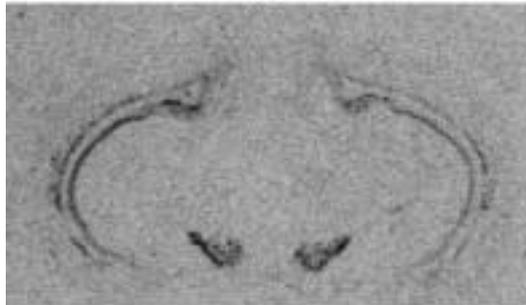
$\alpha 3$



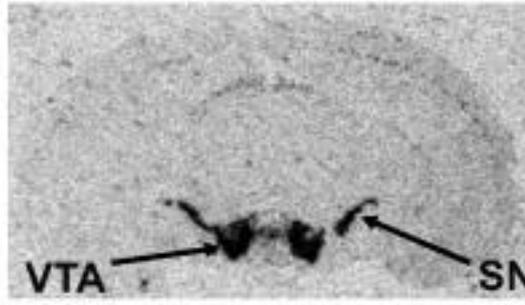
$\alpha 4$



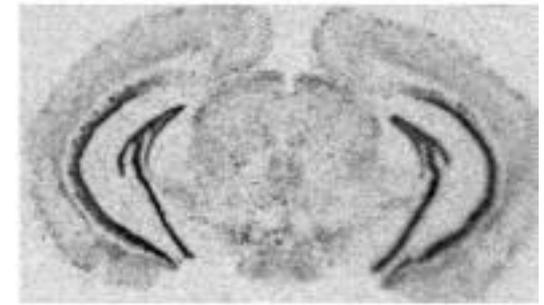
$\alpha 5$



$\alpha 6$



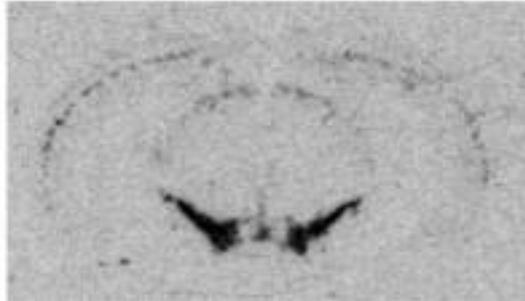
$\alpha 7$



$\beta 2$



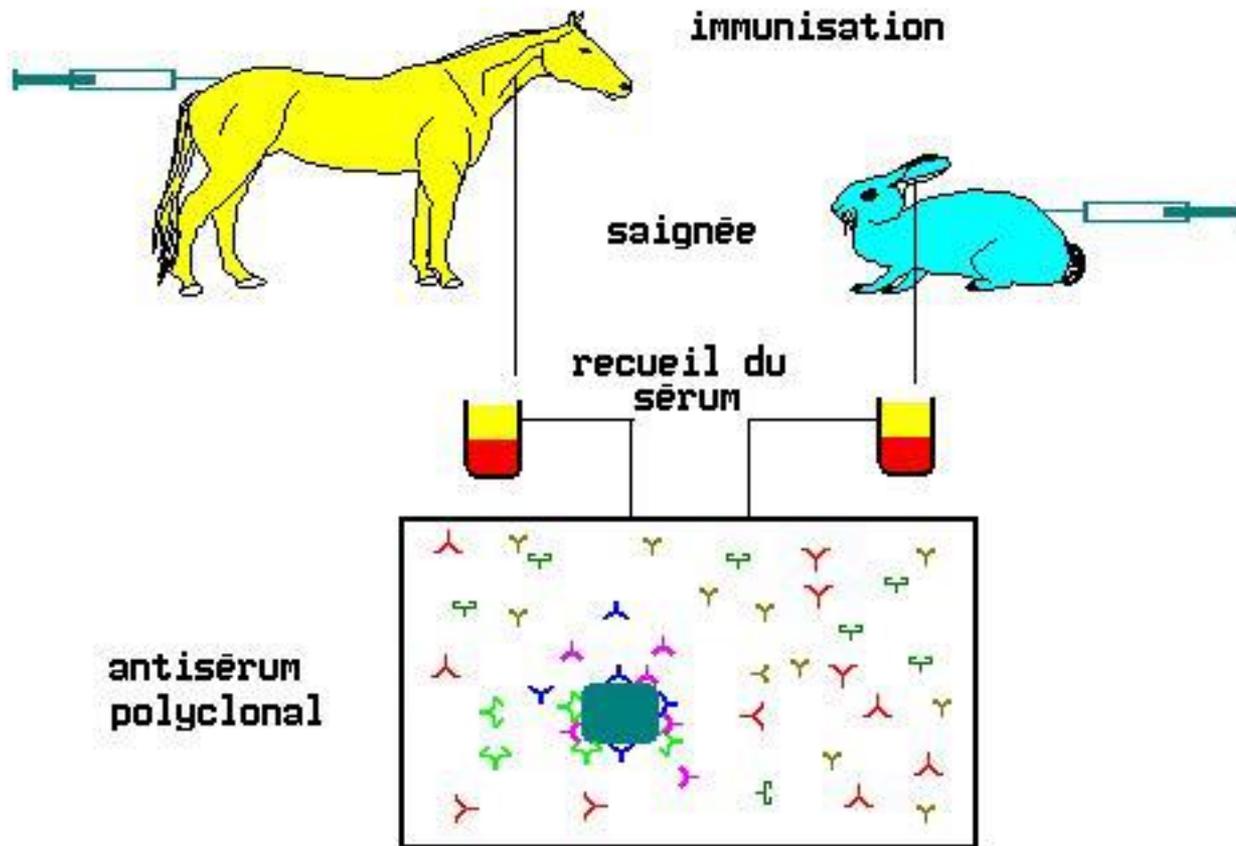
$\beta 3$



$\beta 4$



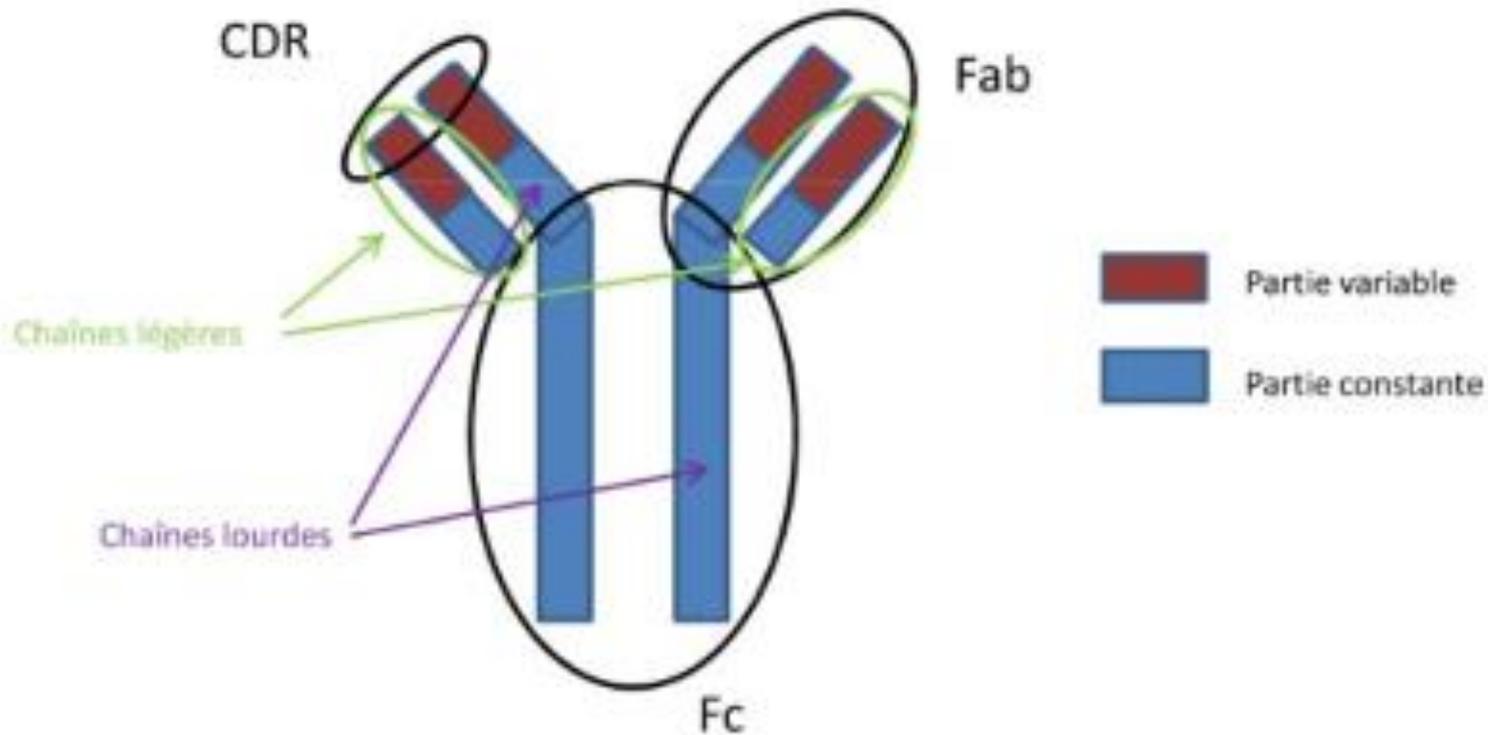
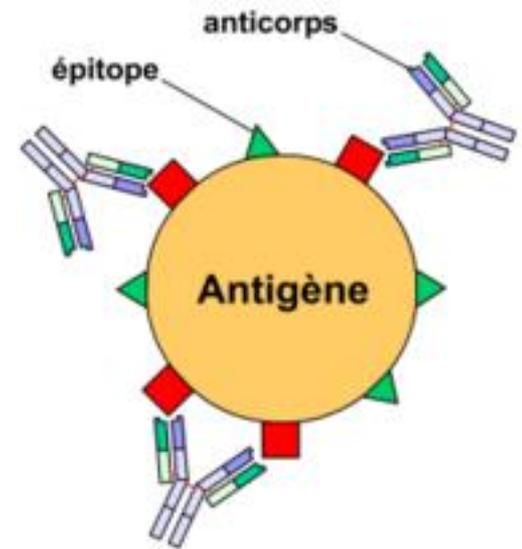
## b. Les anticorps



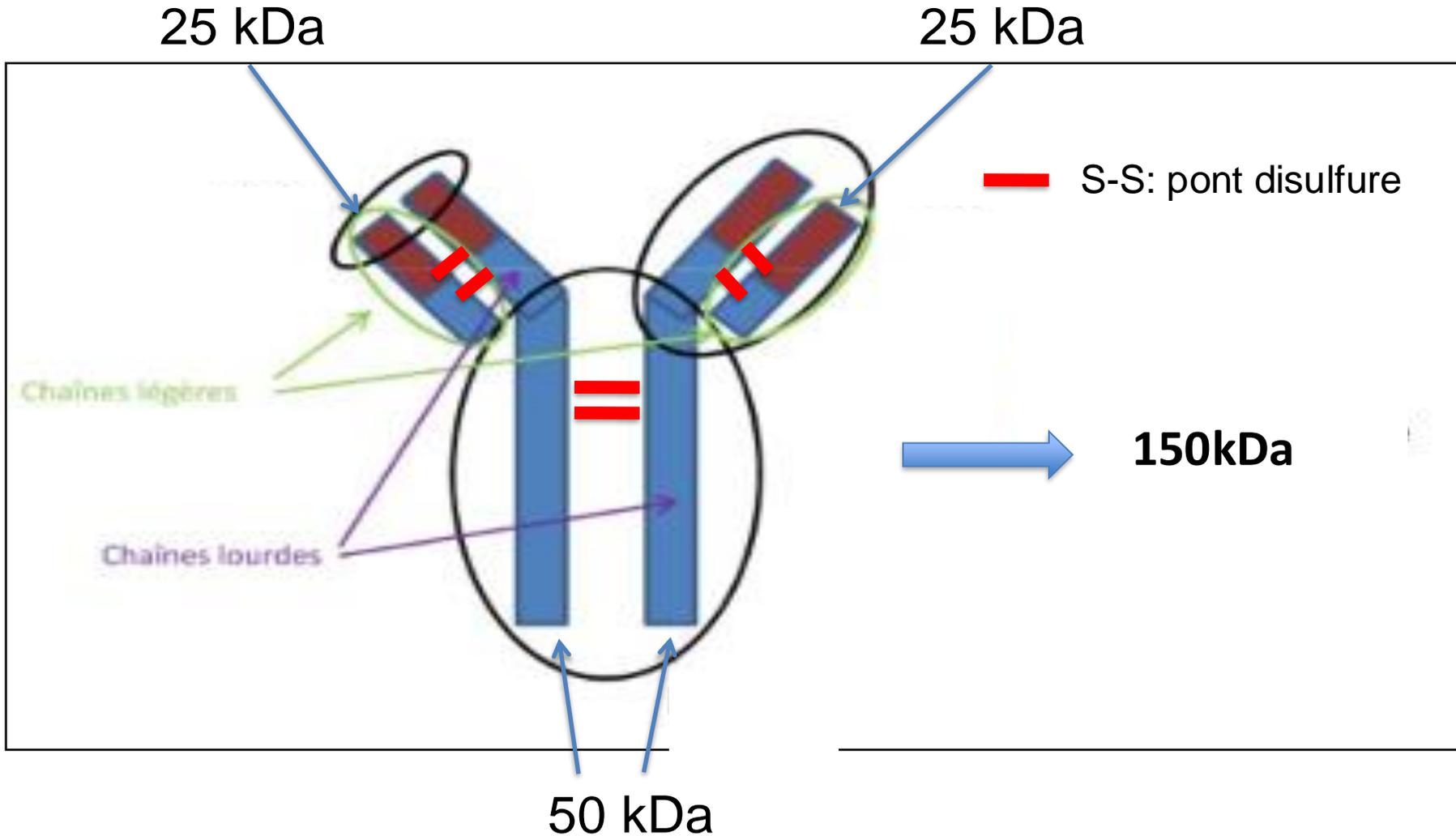
# Structures des anticorps

AC Polyclonale, plusieurs anticorps, plusieurs épitopes

AC Monoclonale, 1 anticorps, 1 épitope



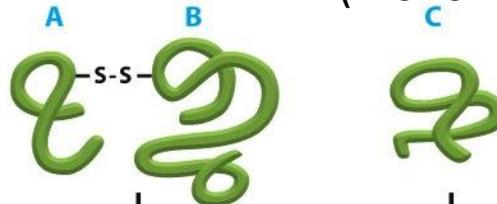
# Les chaînes polypeptidiques des anticorps sont liées par des ponts disulfure



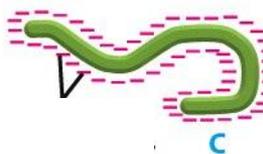
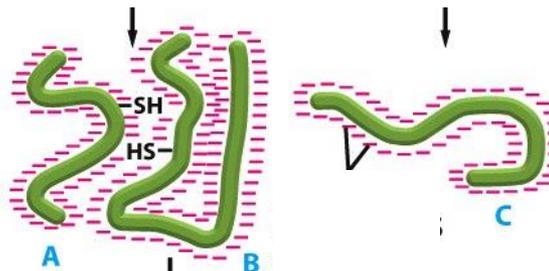
# Séparation des protéines en fonction de leur taille sur gel de polyacrylamide

Protéine à deux sous unités (dimérique) liées par un pont disulfure

Protéine à une sous unité (monomérique)

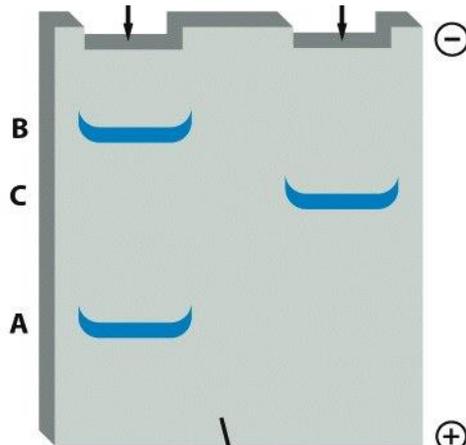


Chauffage en présence de SDS et de mercaptoéthanol



Protéines chargées négativement grâce au SDS

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide



Gel de polyacrylamide

# SDS-PAGE avec des anticorps

Sans agent réducteur

Avec agent réducteur

kDa

kDa

150 —

150 —

100 —

100 —

75 —

75 —

50 —

50 —

37 —

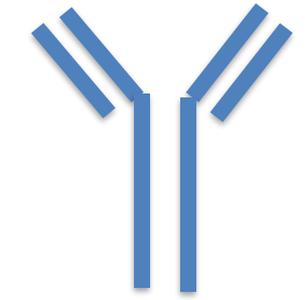
37 —

25 —

25 —

15 —

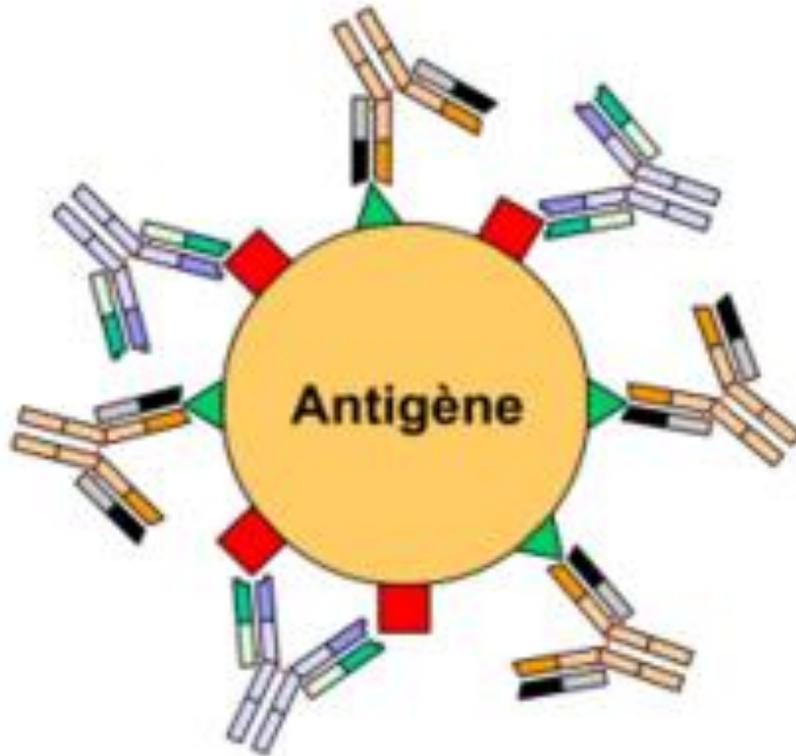
15 —



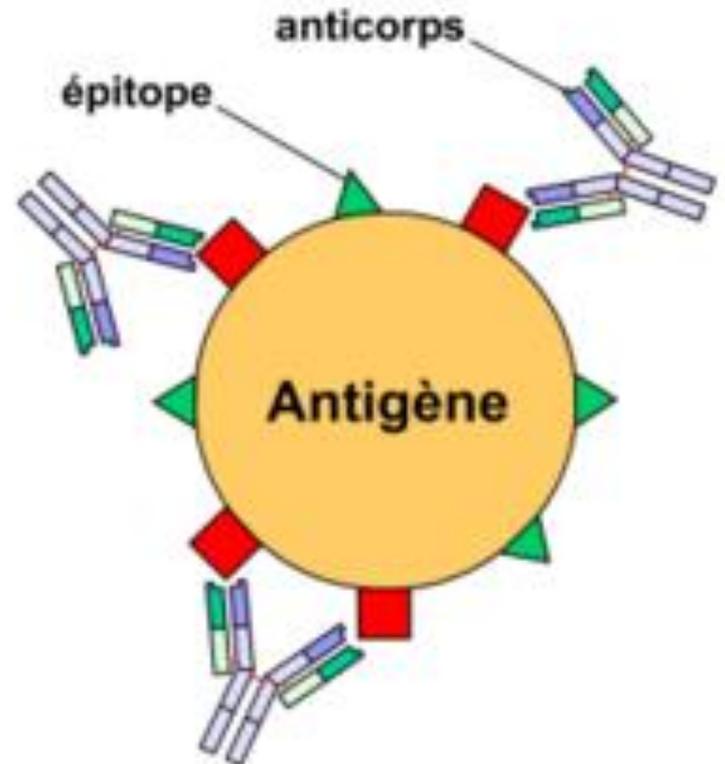
150kDa  
(2x50 + 2x25)



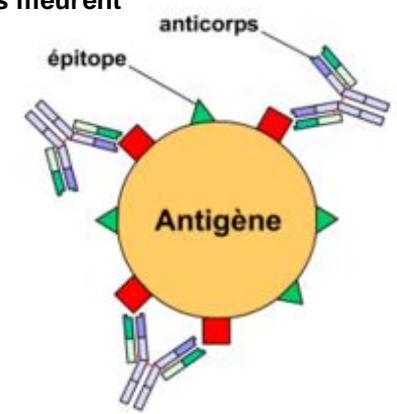
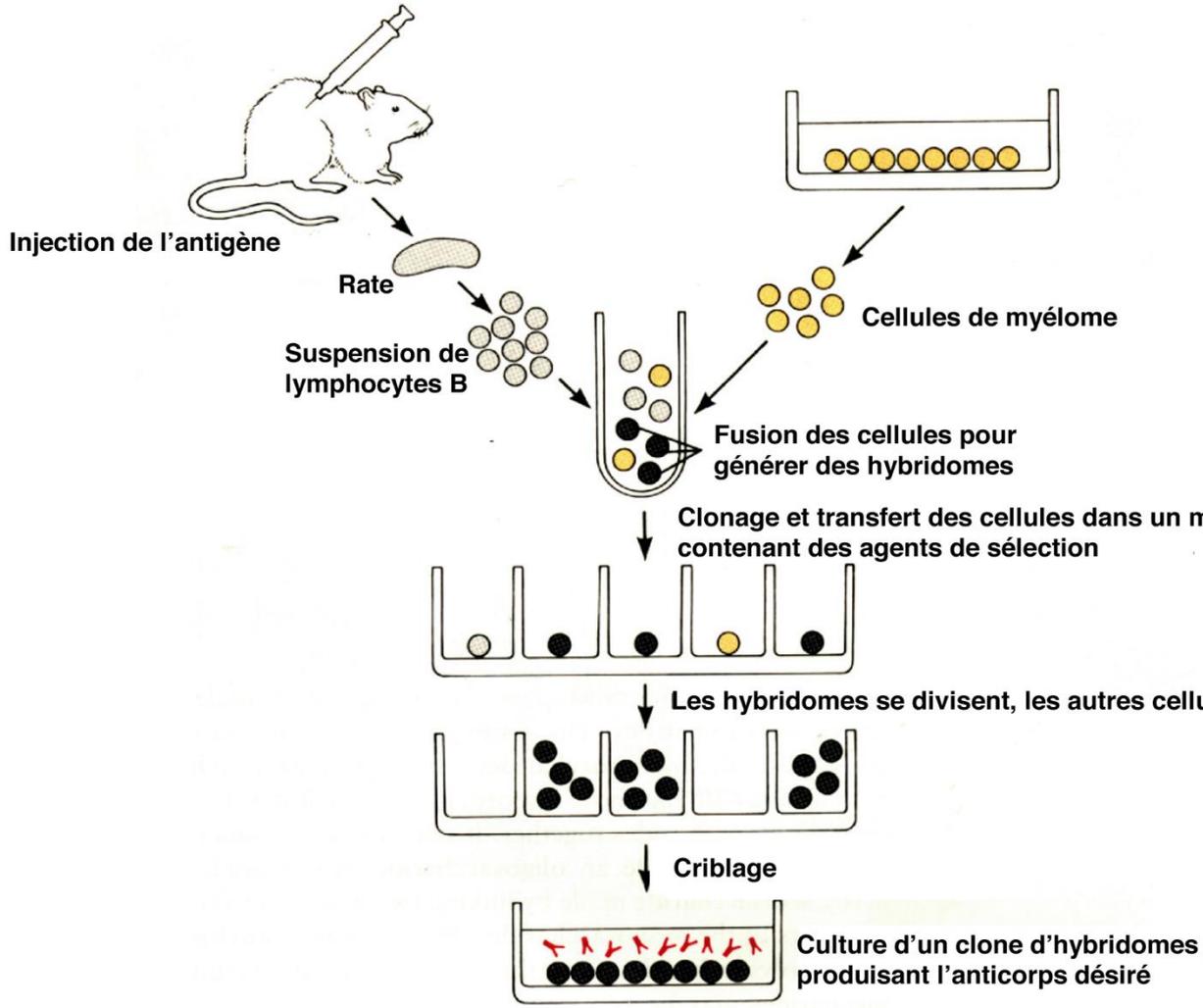
# Serum polyclonal



# Anticorps monoclonaux



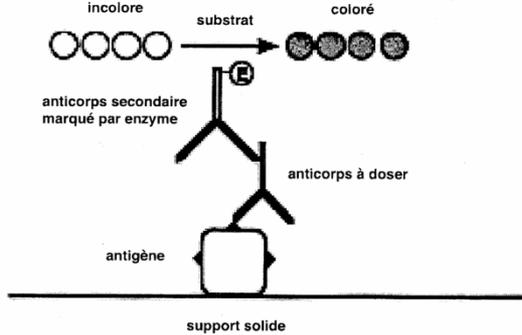
# Production d'un anticorps monoclonal



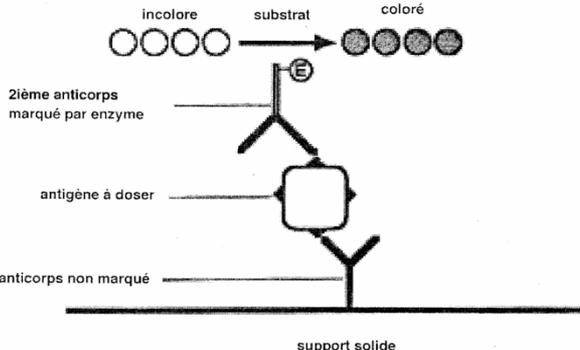
# Différentes façon d'utilise les anticorps

## ELISA

enzyme-linked immunosorbent as littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide



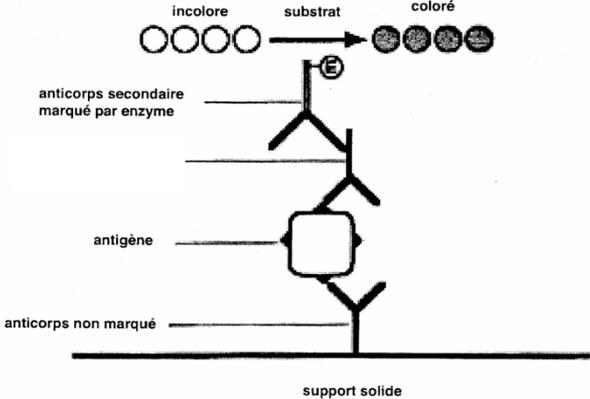
**ELISA indirect: pour détecter un anticorps**



**ELISA par immunocapture : pour détecter un antigène**



**Même principe pour l'immunoprécipitation**



**ELISA en sandwich pour détecter un antigène**

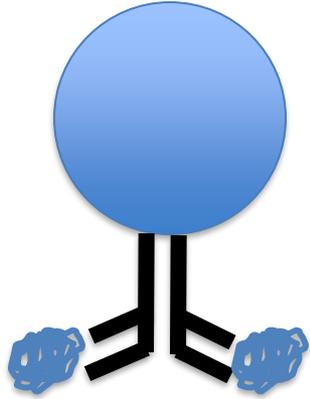
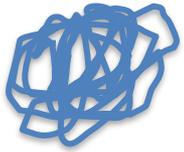


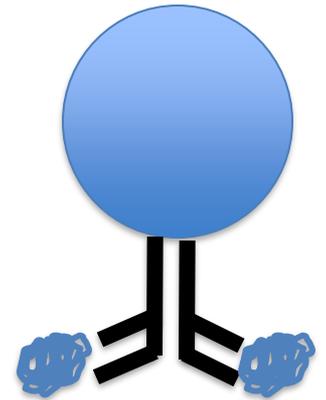
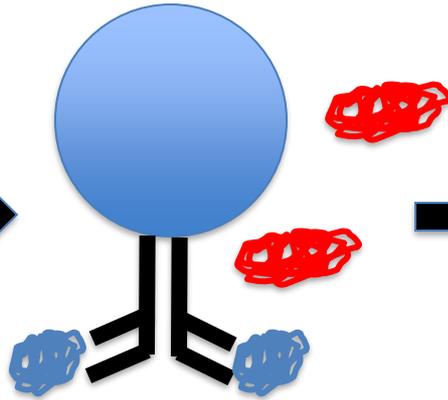
Figure 11 : Différentes méthodes ELISA

# Co-immunoprécipitation

Protéine X



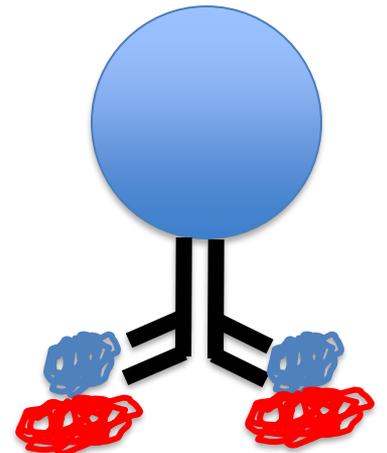
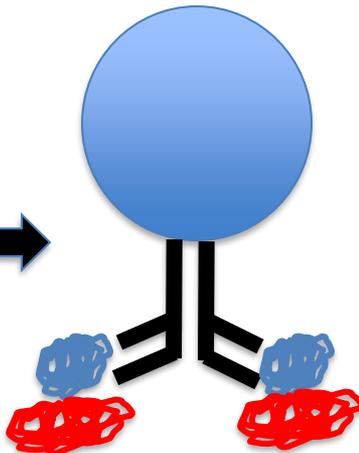
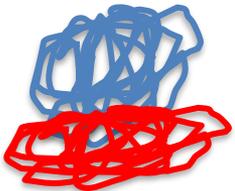
Protéine Y

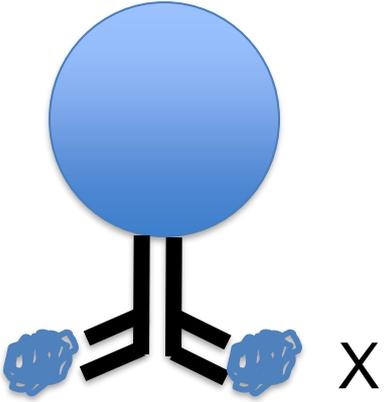


Incubation de l'extrait  
Protéique avec un anticorps  
anti X couplé à des billes

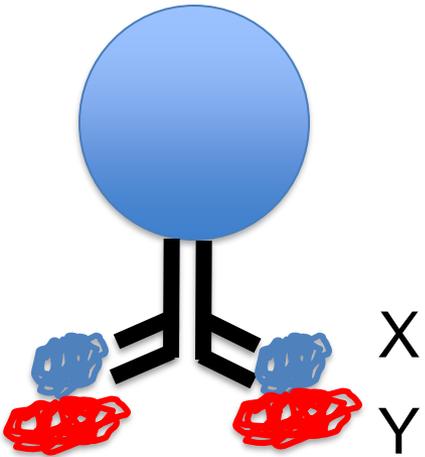
Récupération des billes  
par sédimentation  
(centrifugation)

X et Y  
interagissent

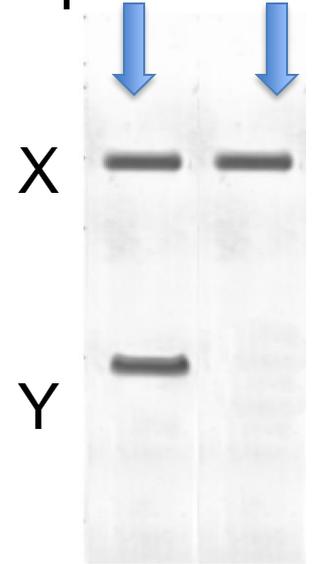




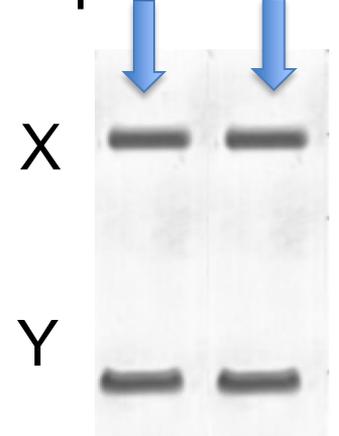
Analyse des protéines précipitées par western blot  
Avec des anticorps anti X et des anticorps anti Y

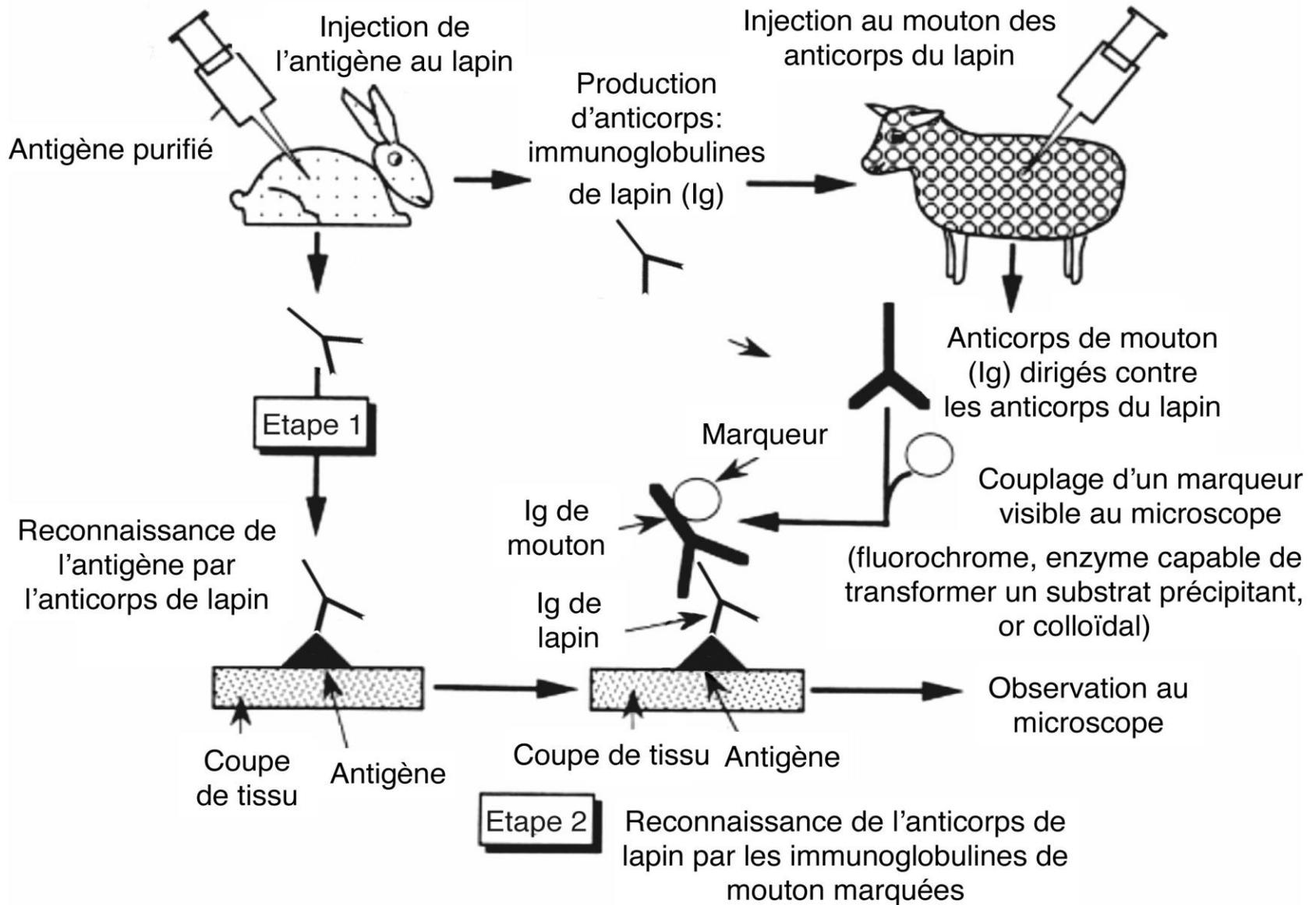


Extrait protéique de départ Billes



Extrait protéique de départ Billes

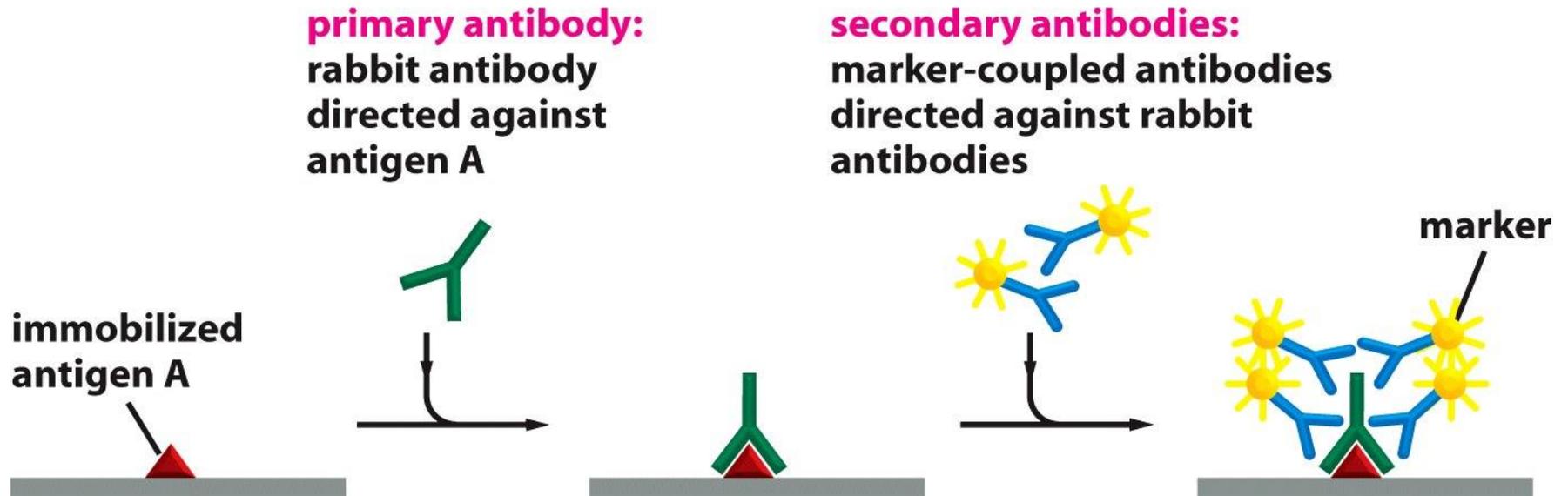




**2 intérêts:** amplification du signal ET un seul anticorps à marquer pour détecter tous les anticorps primaires d'une espèce animale donnée

## Principe de l'immunohistochimie

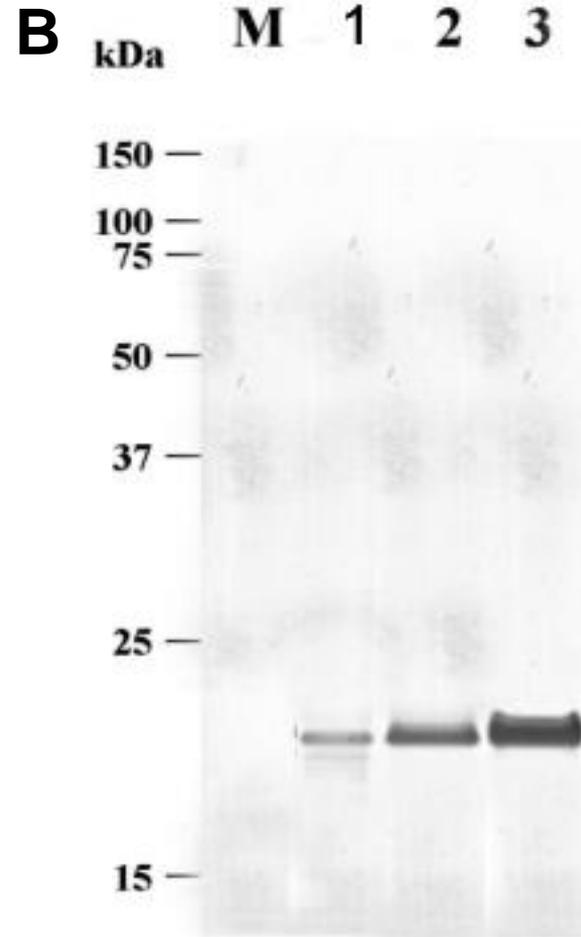
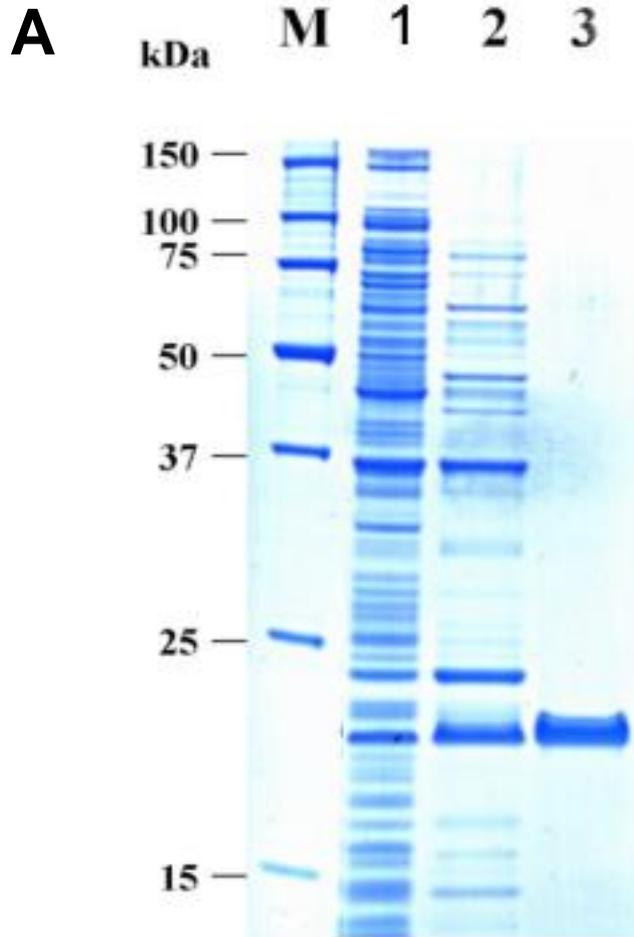
# Immunohistochimie

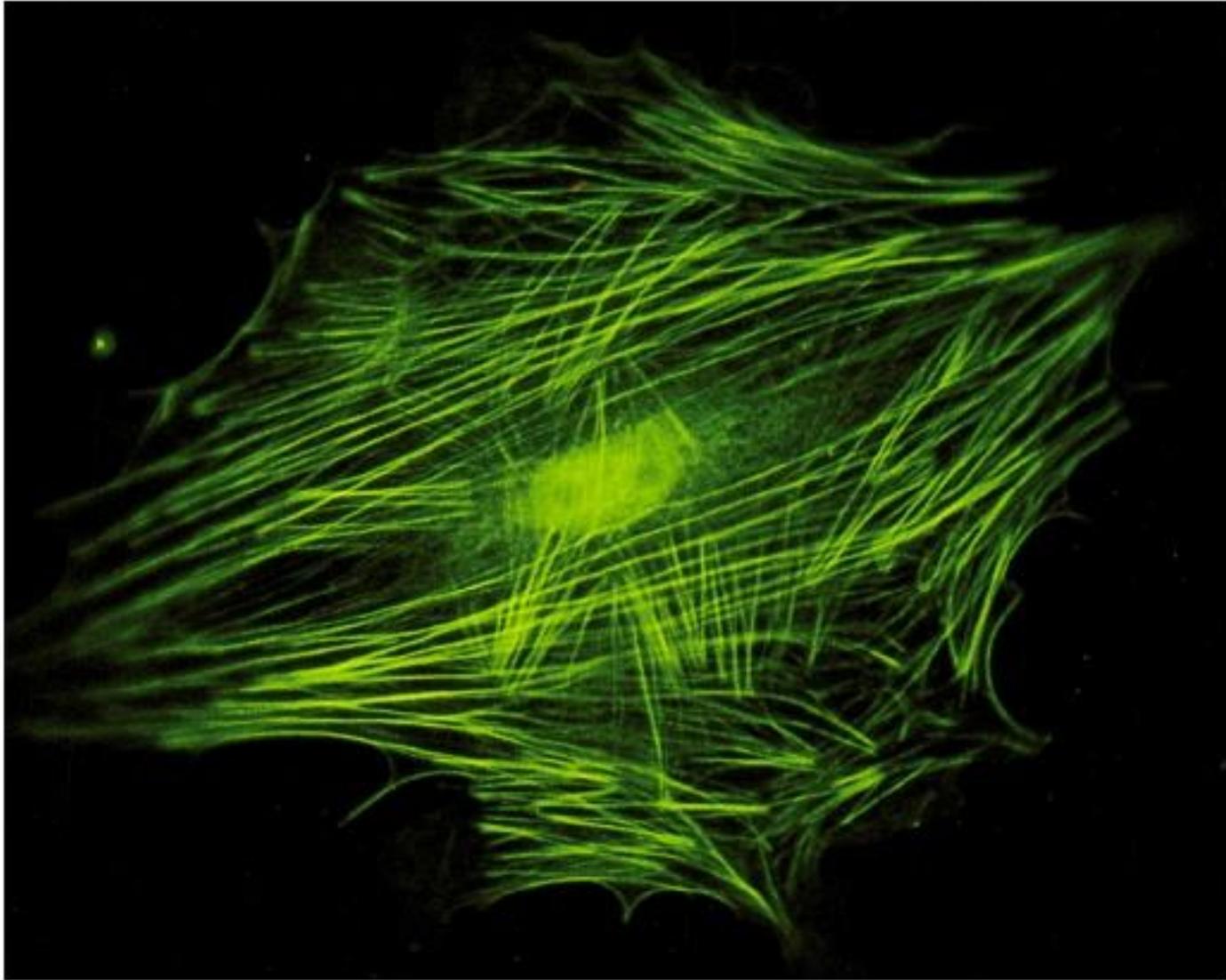


Même principe pour le Western blot et l'immunofluorescence

**A. Coloration d'un SDS-PAGE au bleu de coomassie**

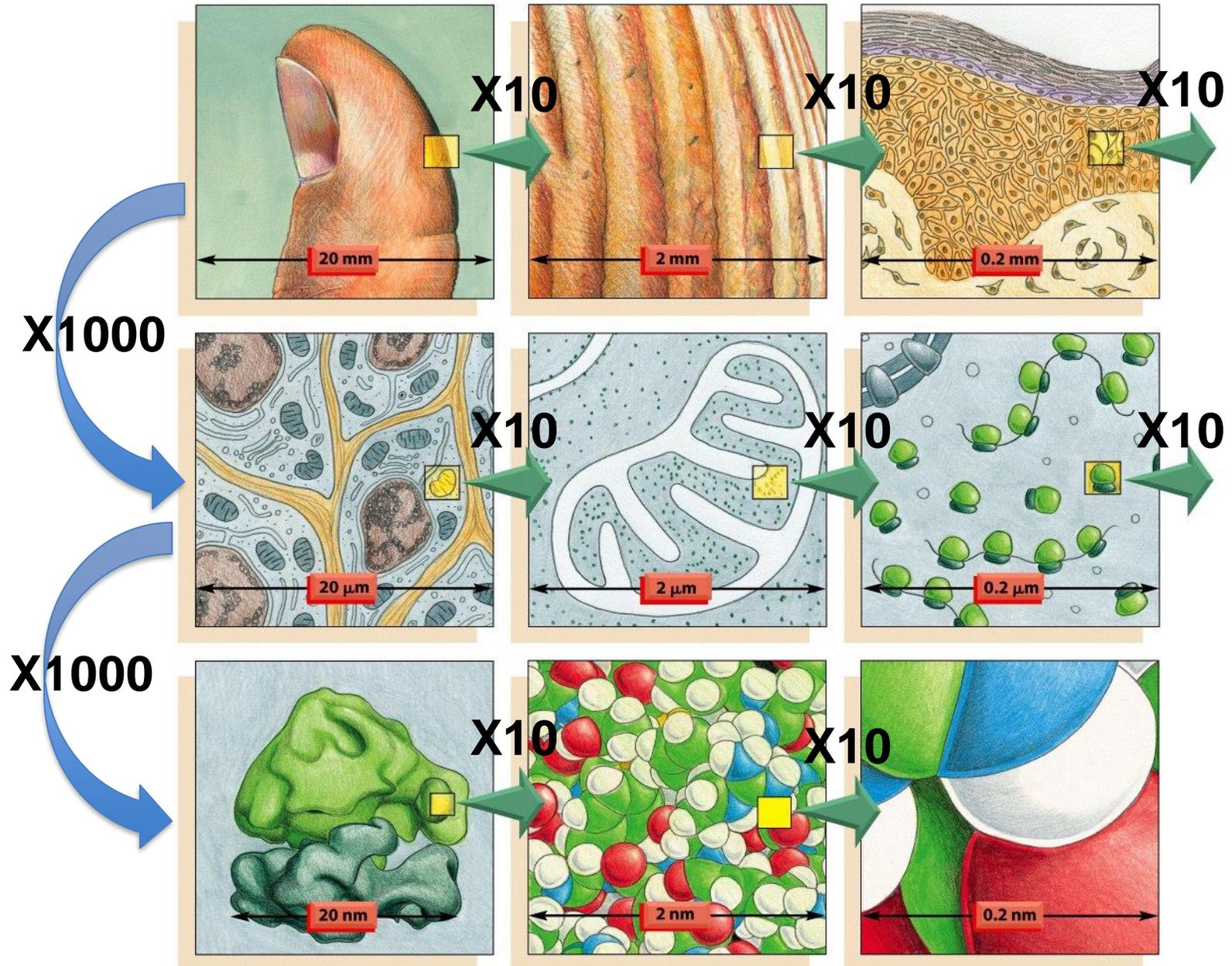
**B. Analyse en western blot du même gel, après transfert des protéines sur membrane de nylon et détection par un anticorps dirigé contre la protéine purifiée.**



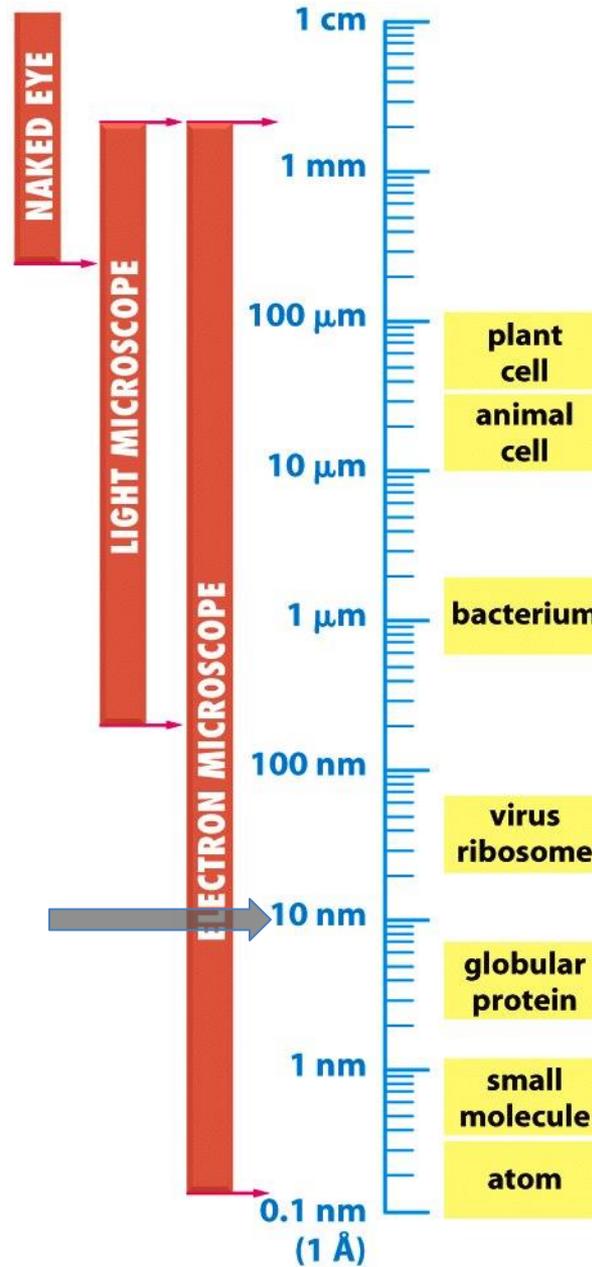


Distribution des filaments d'actine dans un fibroblaste en culture  
(Immunofluorescence indirecte grâce à un anticorps de lapin anti-actine et un anticorps anti-lapin de chèvre)

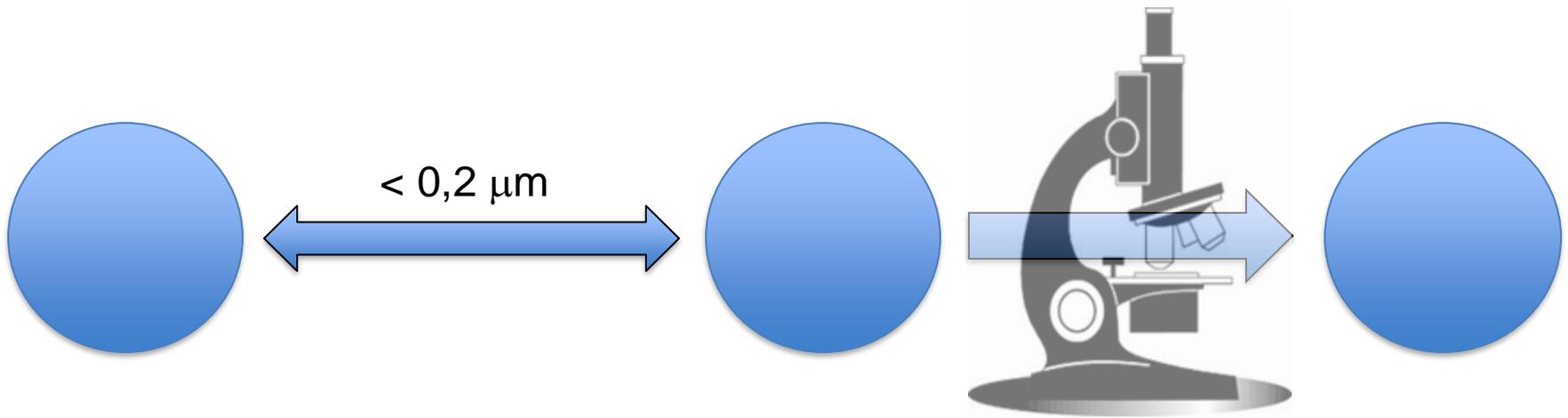
# 4. La microscopie et ses applications



# Microscopie

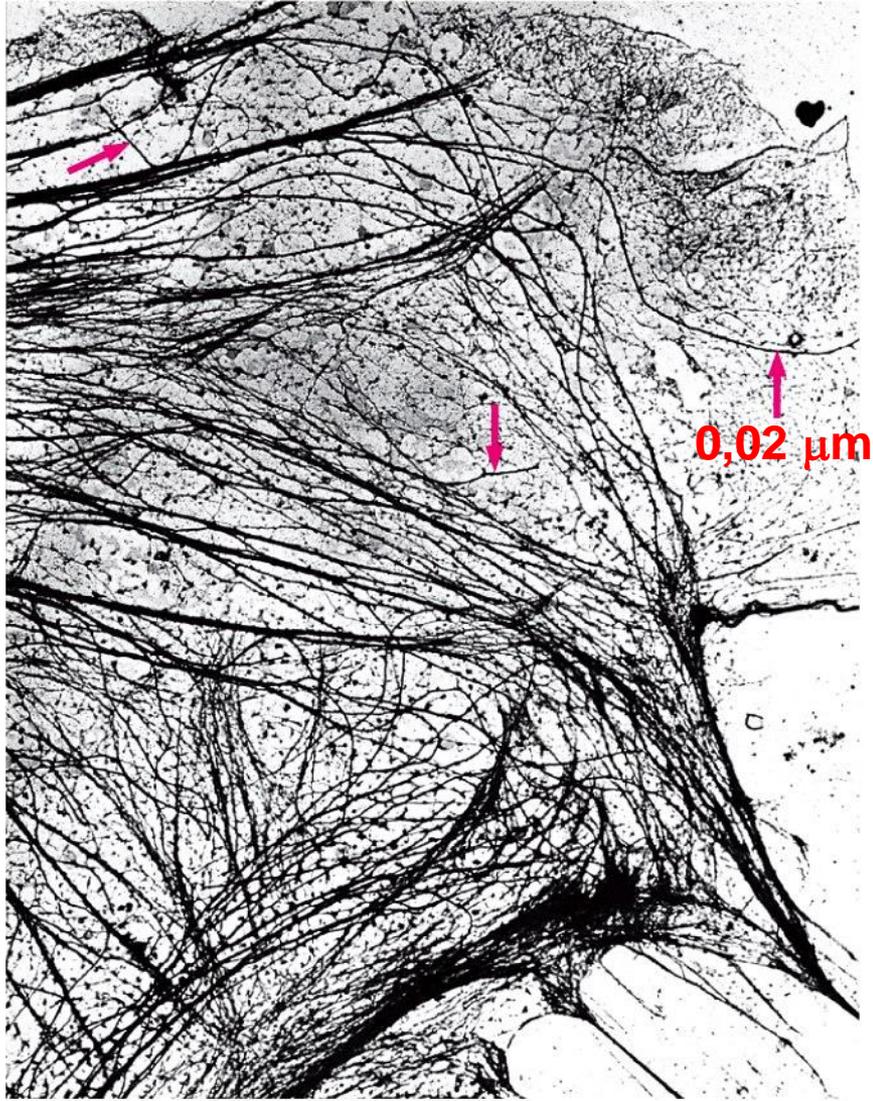


# Ne pas confondre résolution et détection

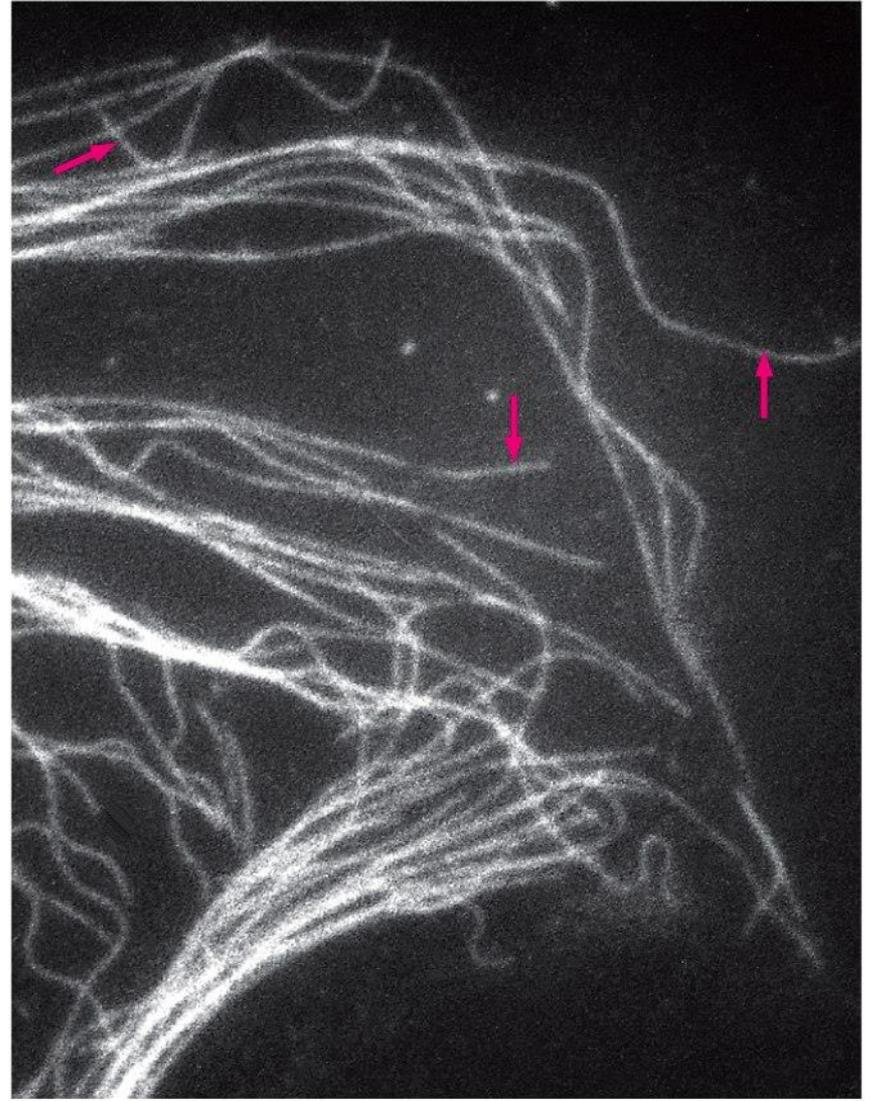


**Résolution: distance séparant deux points en dessous de laquelle ils apparaîtront confondus.**

# Détection/résolution



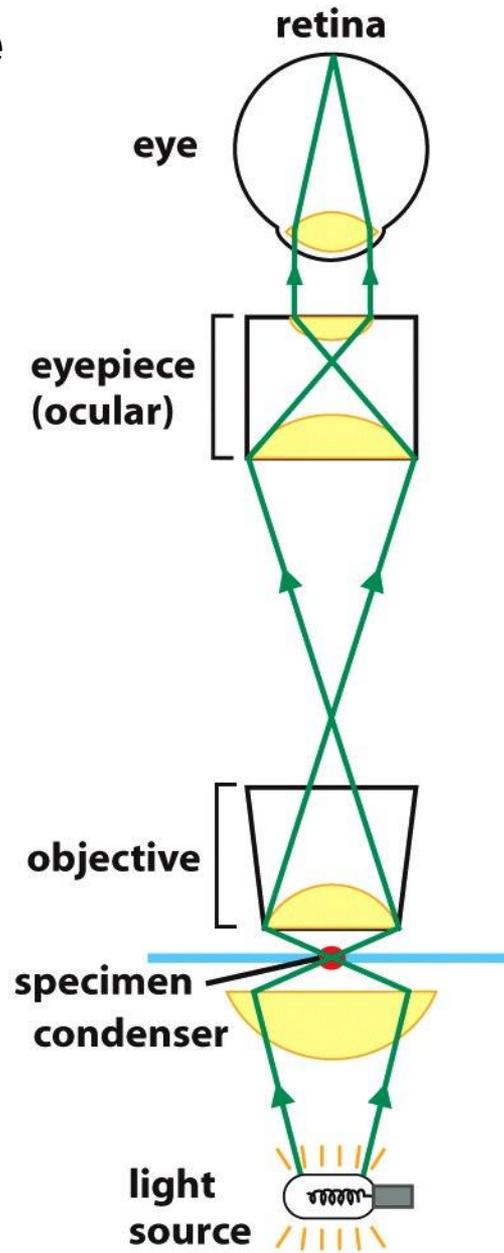
(A)



(B)

$10 \mu\text{m}$

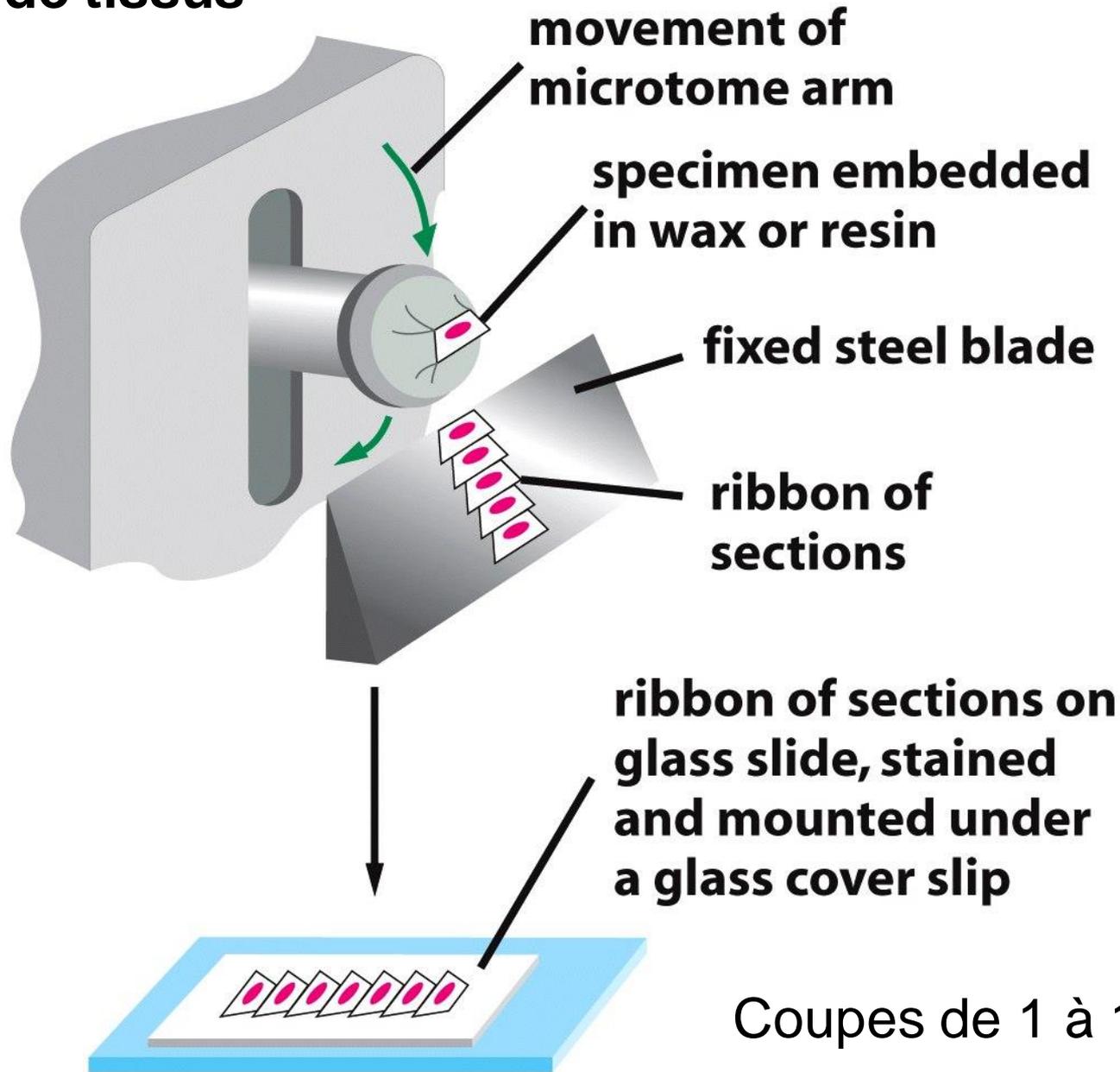
# Microscopie optique



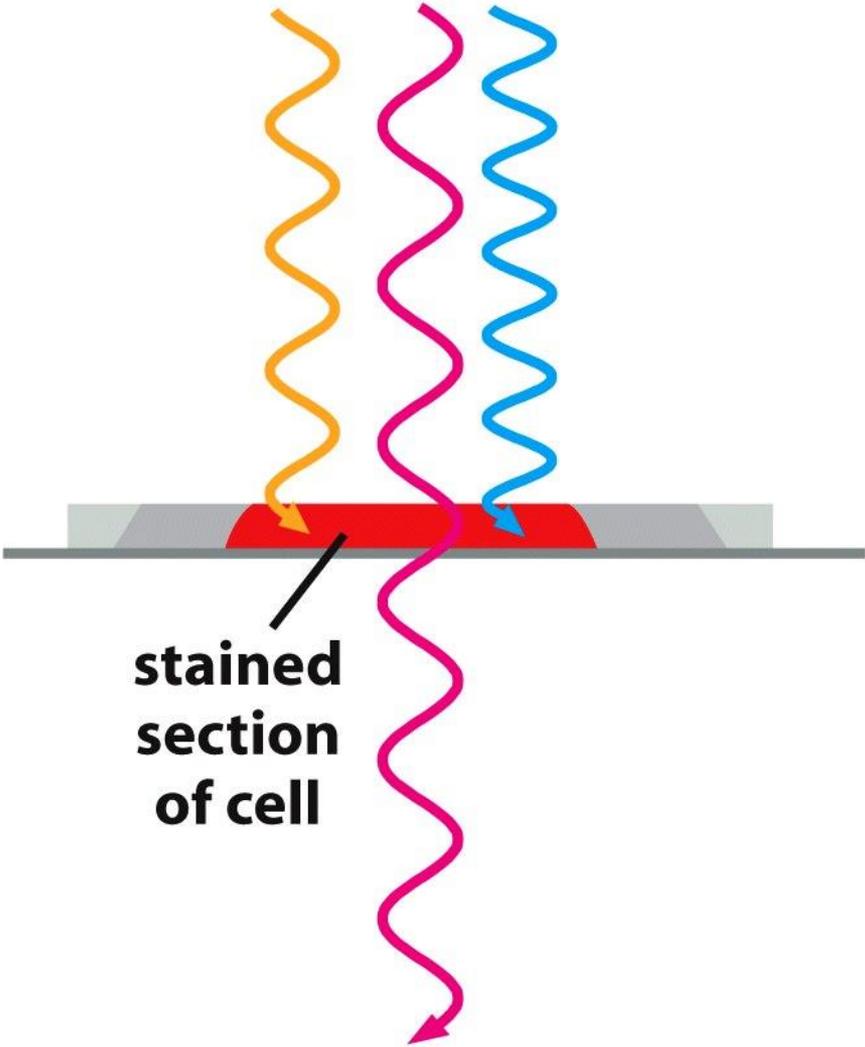
- Cellules: -fixées et colorées (formaldéhyde, glutaraldéhyde)  
ou  
- vivantes
- Coupes de tissus (1 à 10  $\mu\text{m}$  d' epaisseur)



# Coupes de tissus

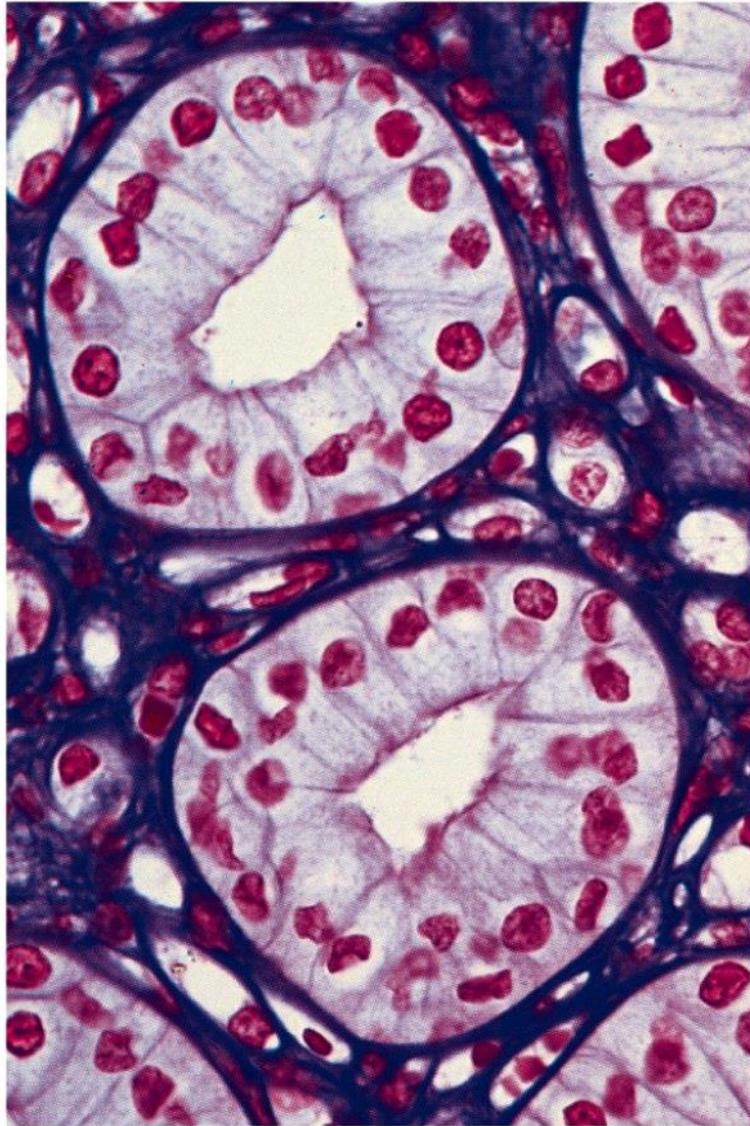


**incident light  
(white)**



**stained  
section  
of cell**

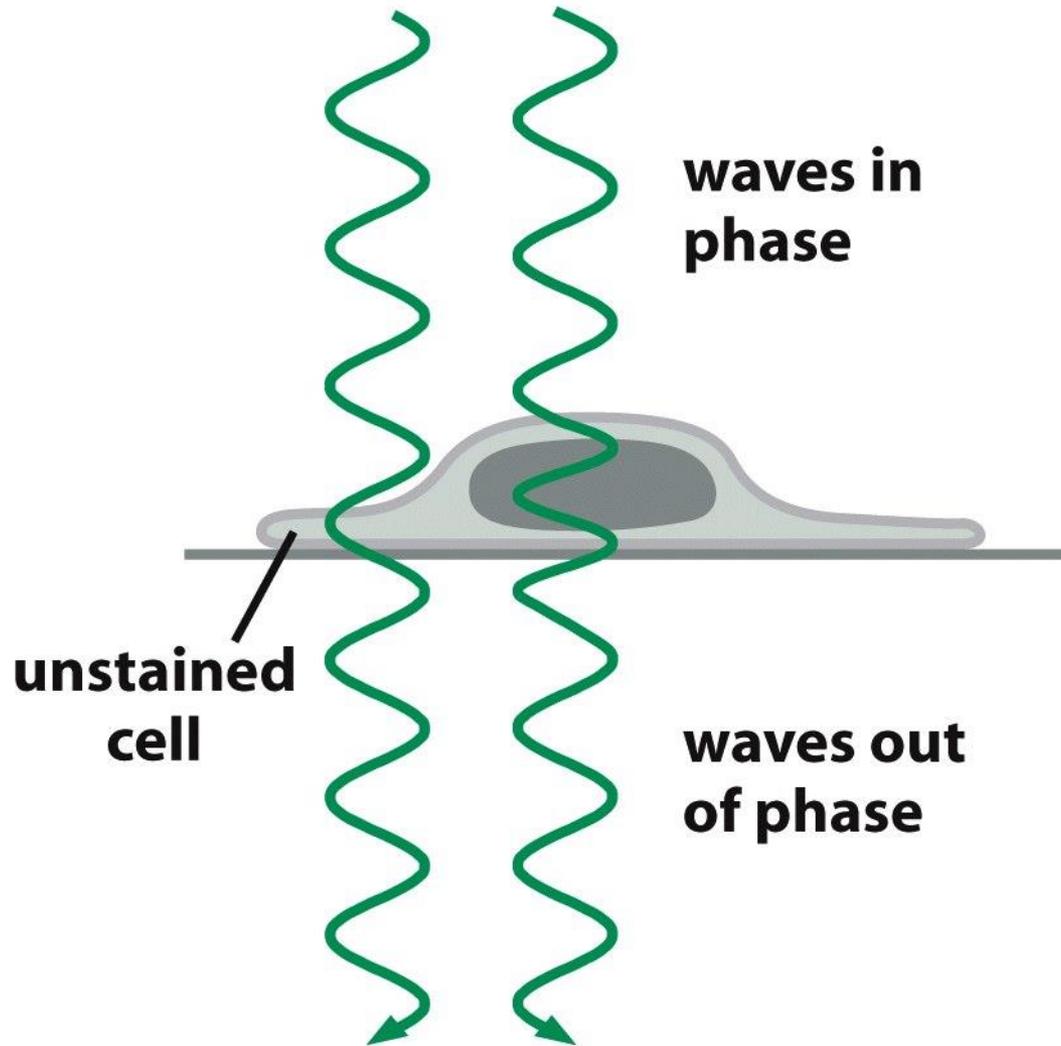
Figure 9-7a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



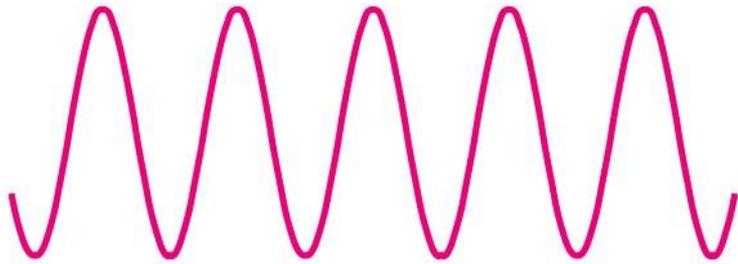
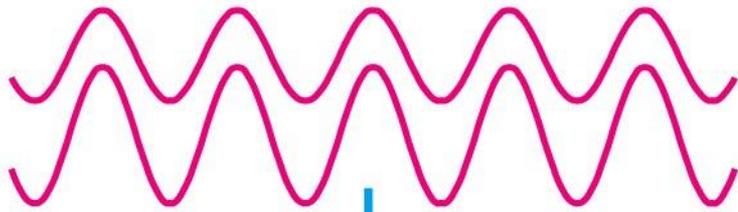
50  $\mu\text{m}$



**incident light  
(green)**

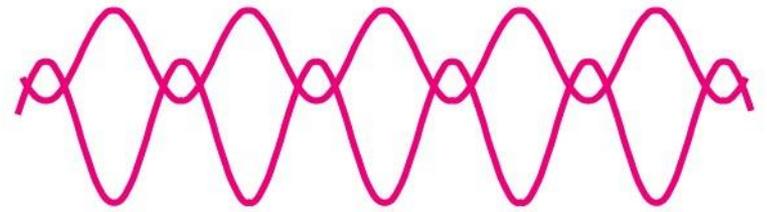


## TWO WAVES IN PHASE



**BRIGHT**

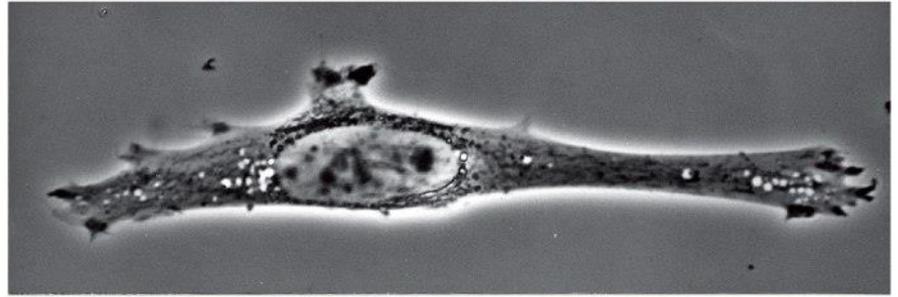
## TWO WAVES OUT OF PHASE



**DIM**

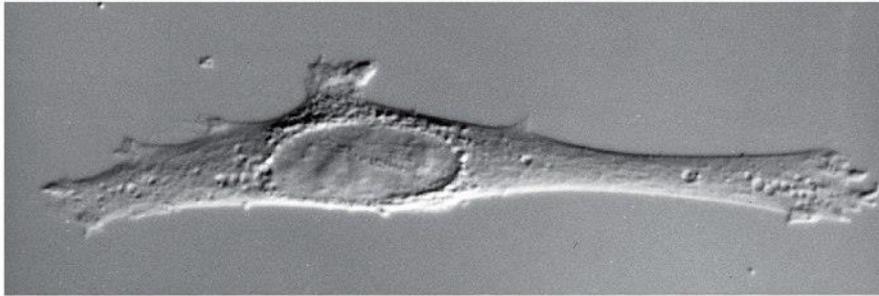


(A)



(B)

Contraste de phase



(C)

Nomarski

50  $\mu\text{m}$

Développé par le physicien hollandais Frederik Zernike (1888-1966) dans les années 1930, ce qui lui valut le prix Nobel de physique en 1953.



# Fluorophores:

longueur d'onde d'emmission supérieure à la longueur d'onde d'excitation

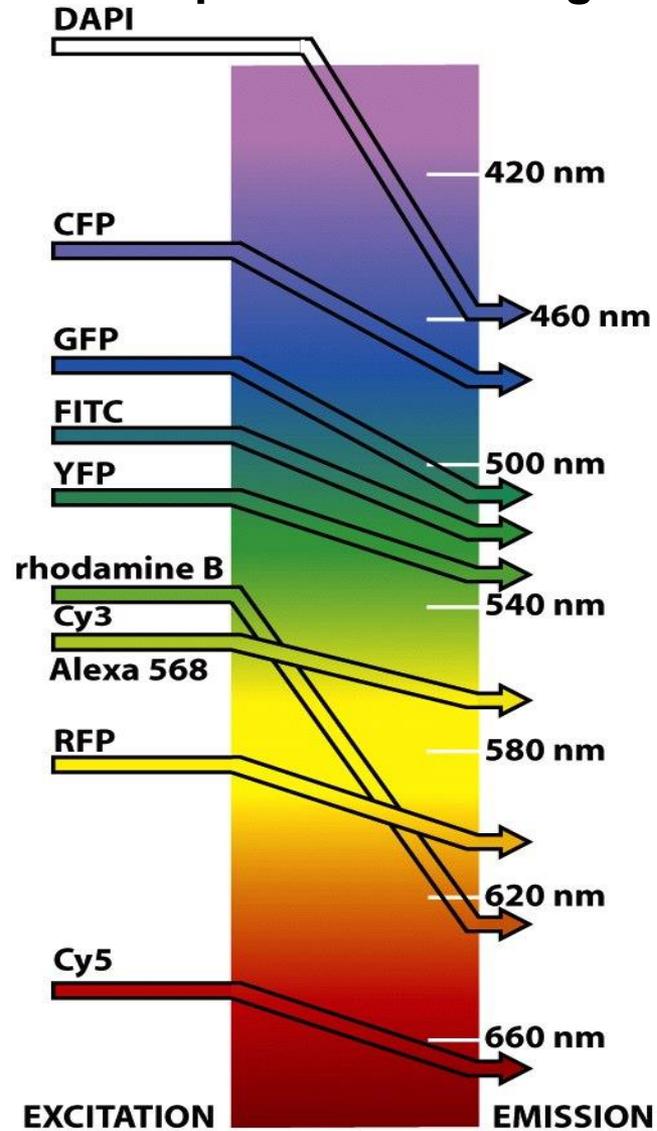
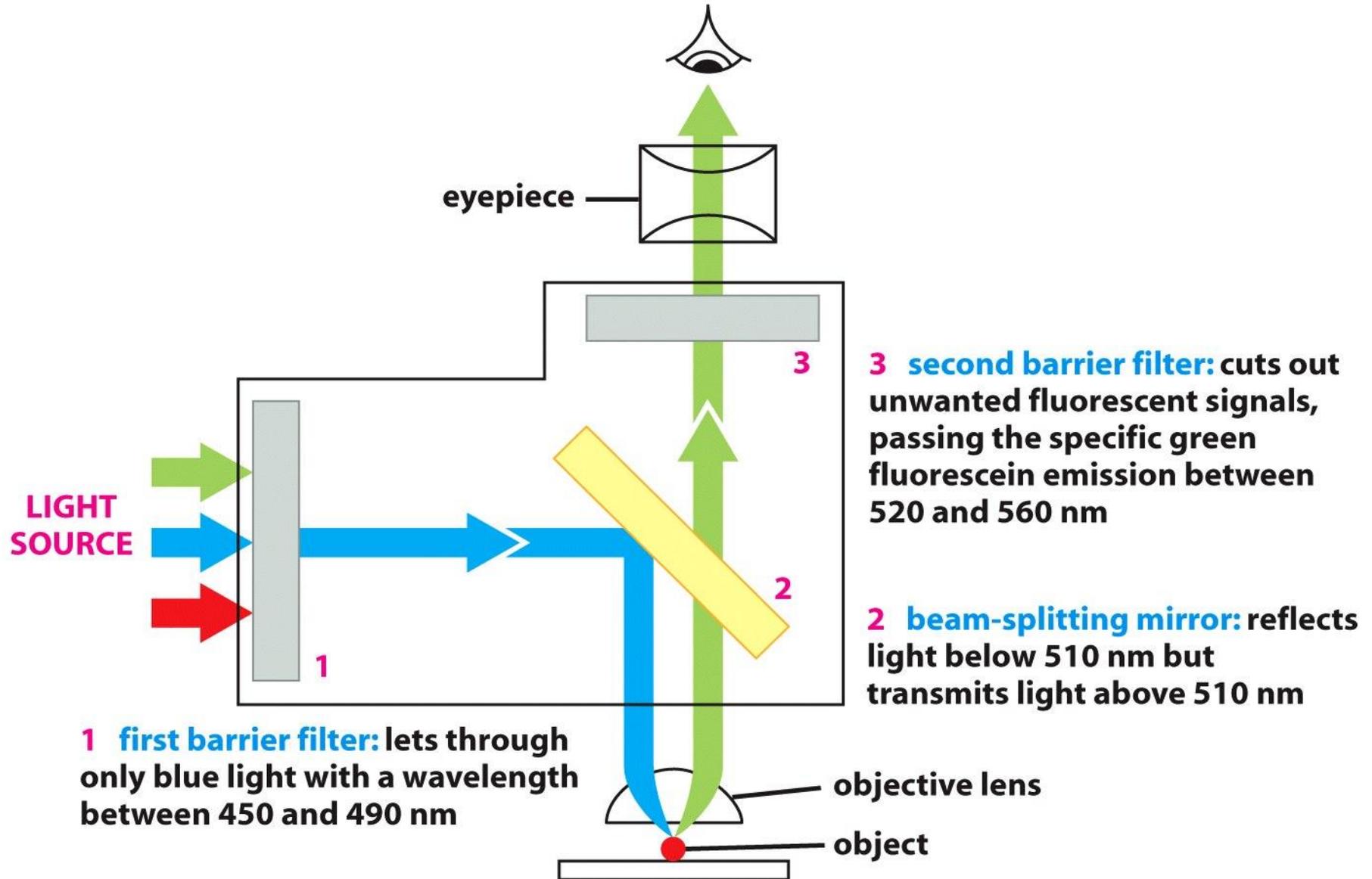


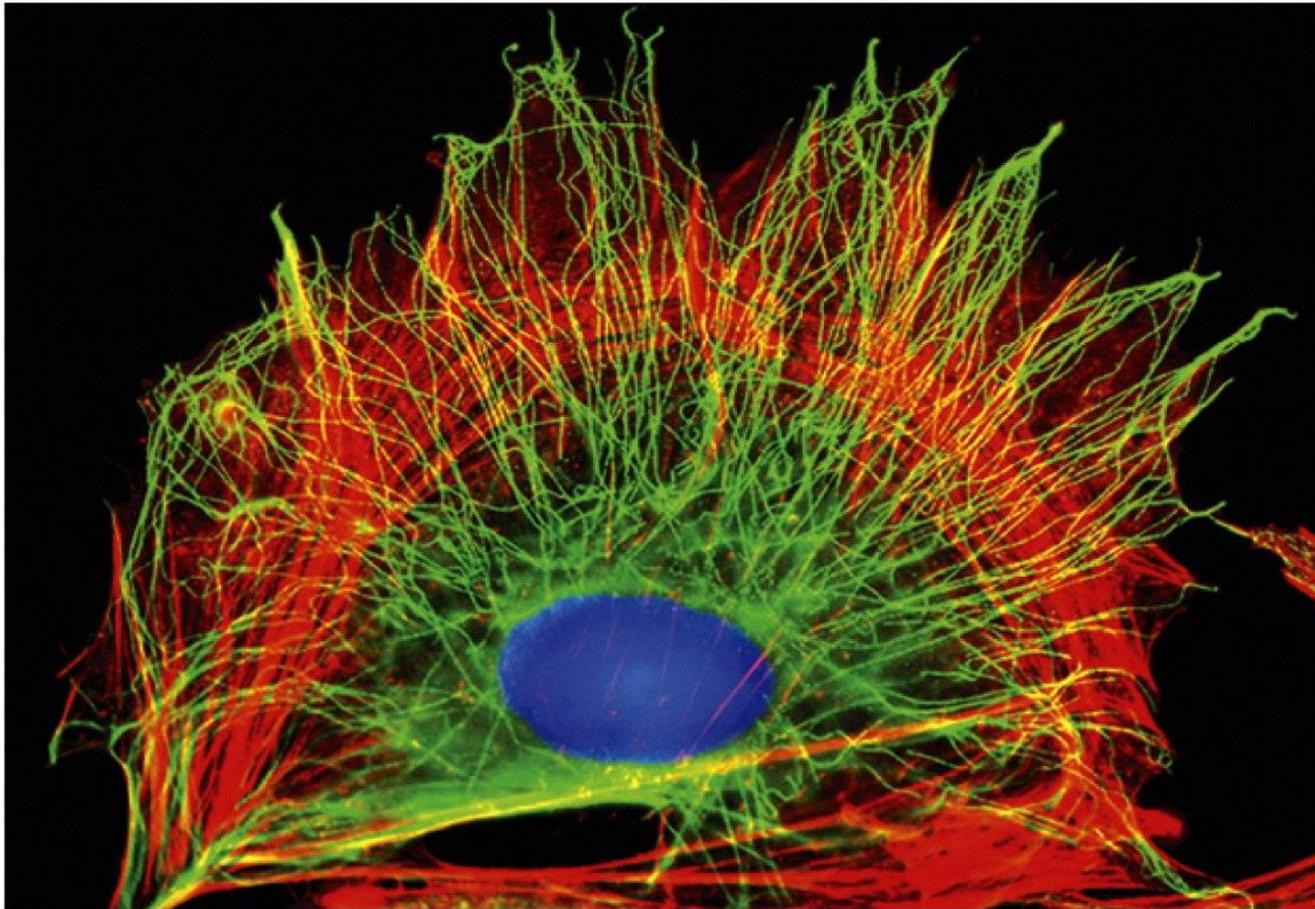
Figure 9-14 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Microscopie à épifluorescence

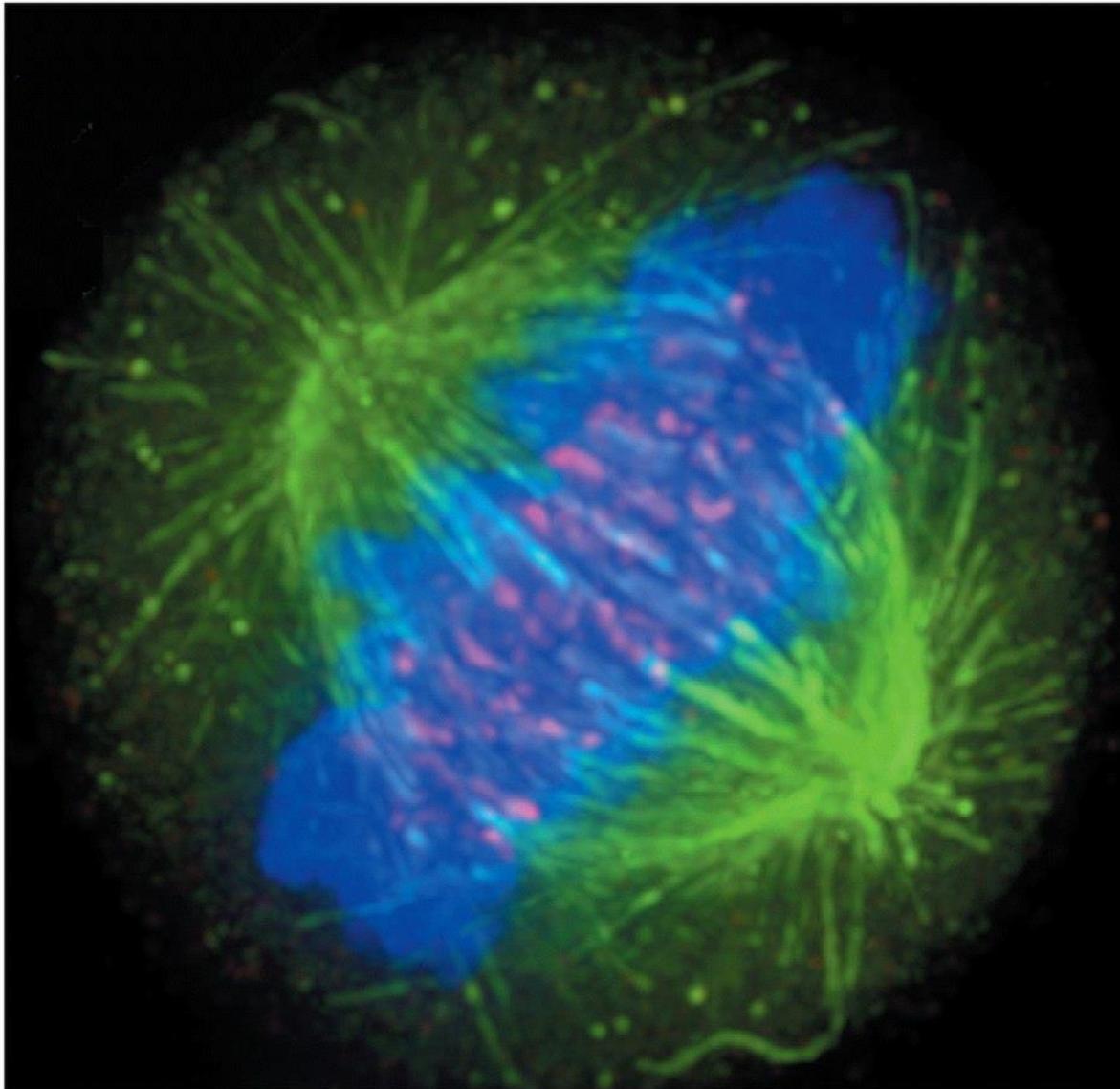


Il existe différentes façons de « diriger » les fluorophores sur les structures à visualiser:

- couplage à des anticorps
- couplage à des molécules affines
- fluorophores affins (DAPI).
- protéines de fusion fluorescentes



Microtubules en vert - Filaments d'actine en rouge - ADN en bleu



Vert: microtubulles  
Rouge: centromères  
Bleu: ADN

10  $\mu\text{m}$



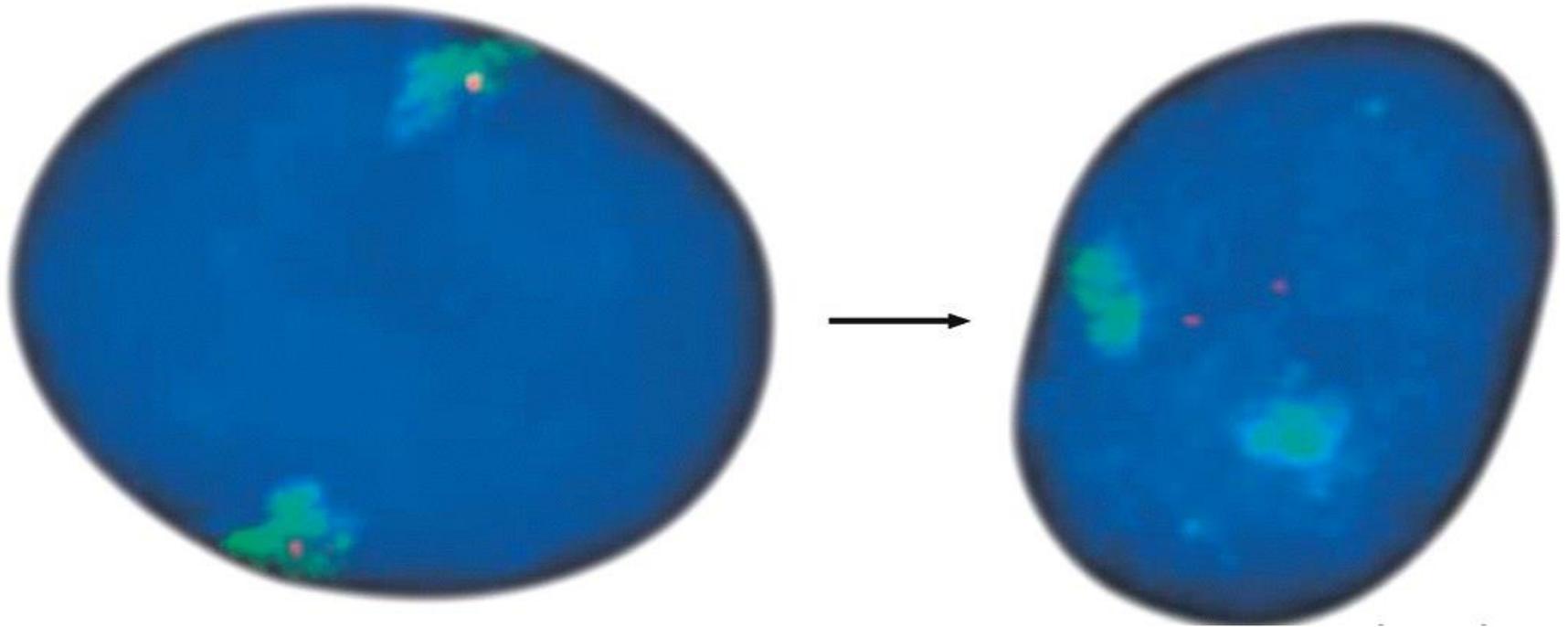
Neurofilament

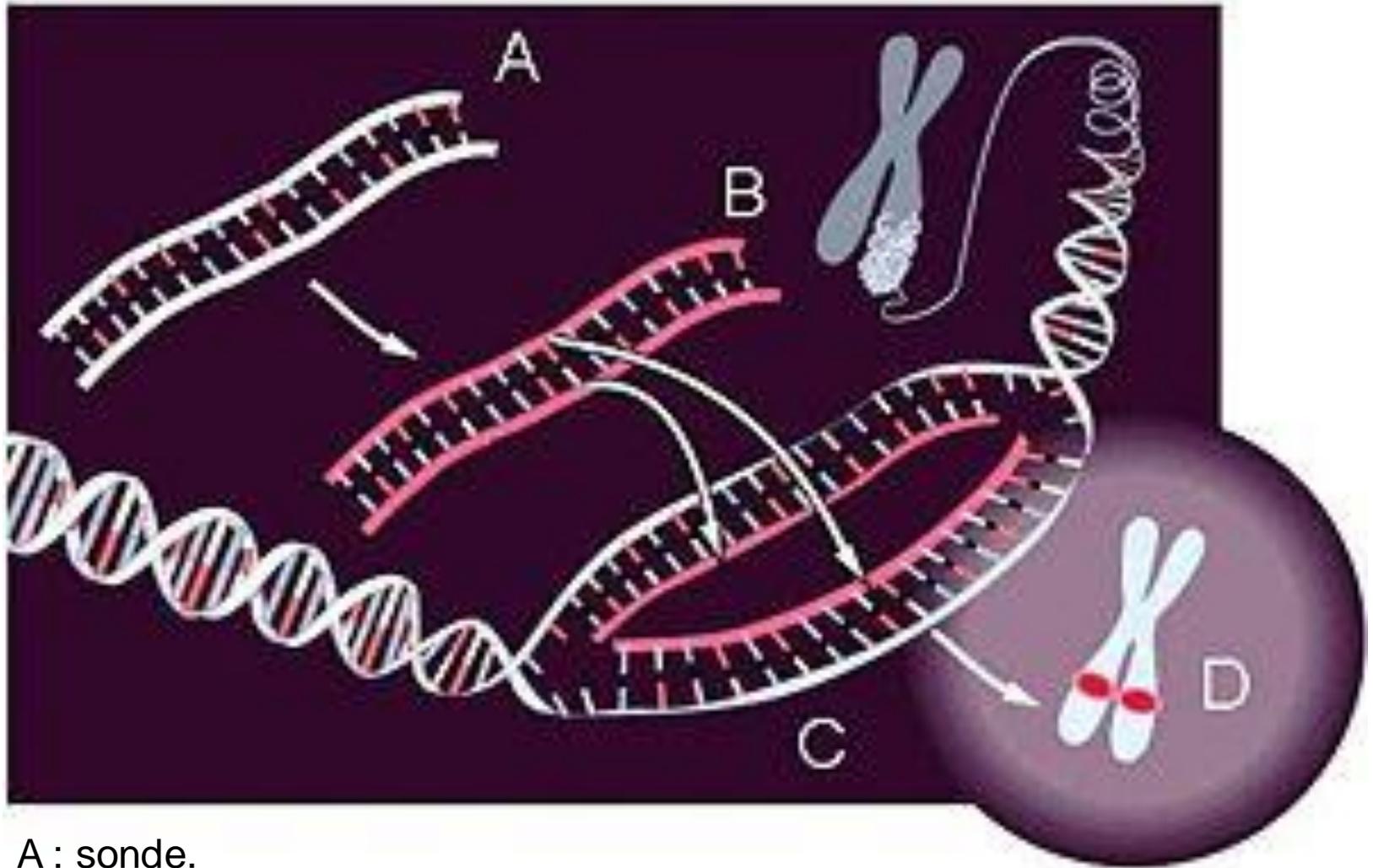
Récepteur de l'acétylcholine

merge

# Immunomarquage des compartiments pré et post synaptiques de la jonction neuromusculaire

# FISH: Fluorescent In Situ Hybridization



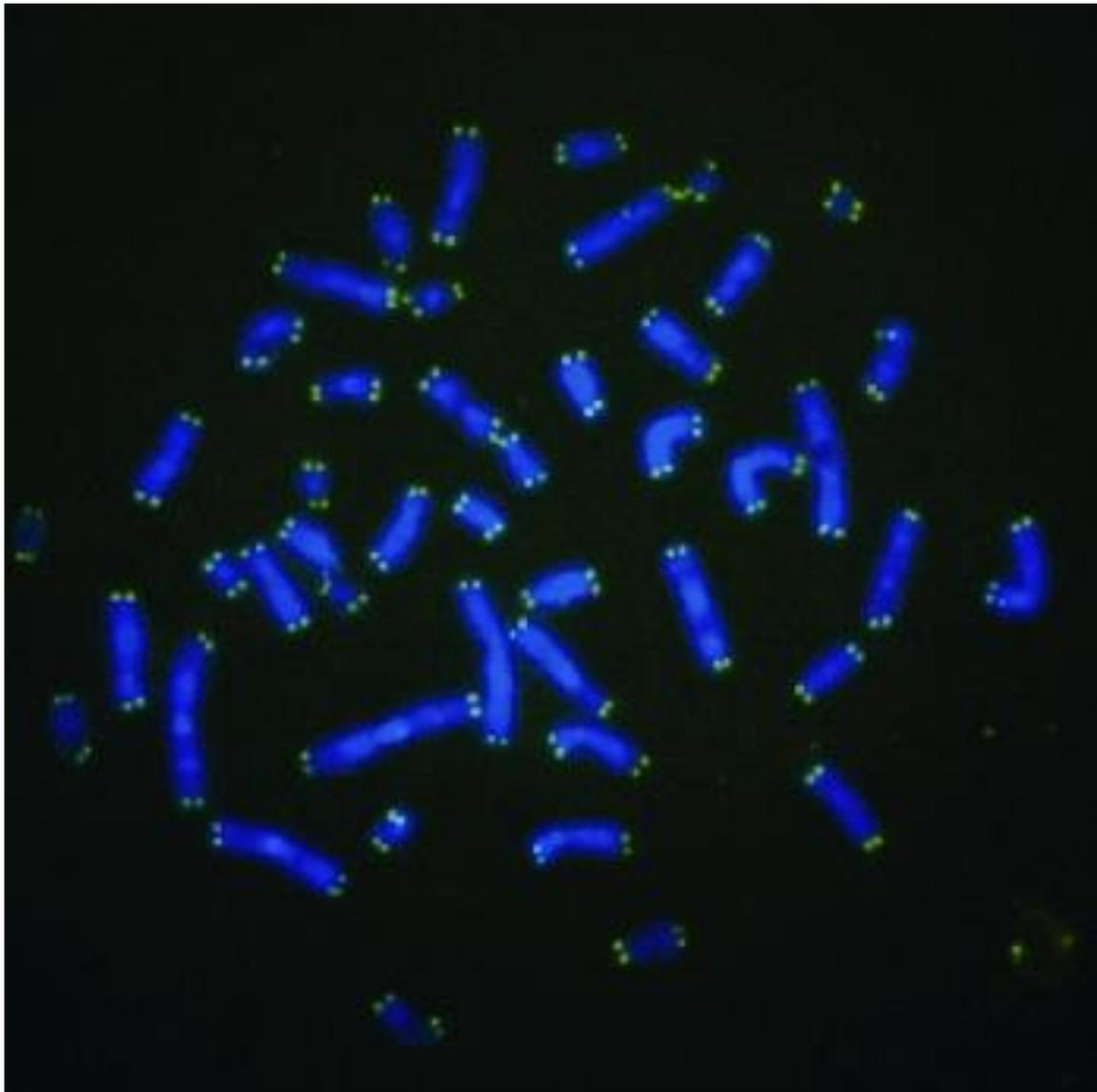


A : sonde.

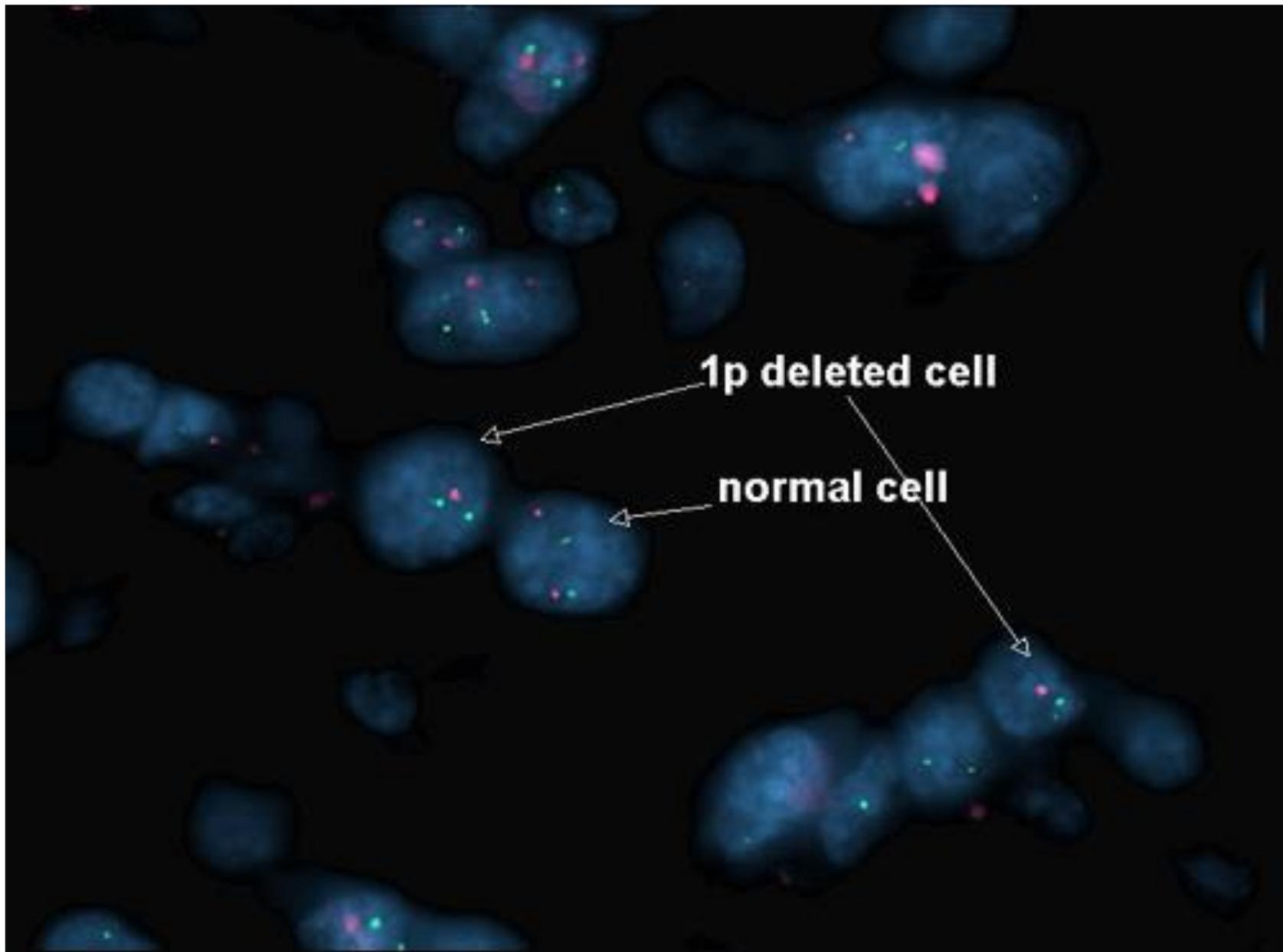
B : sonde colorée à l'aide d'un fluorochrome.

C: hybridation avec l'ADN nucléaire.

D: visualisation de l'endroit où la sonde s'est fixée



**Marquage de télomères sur des chromosomes en métaphase grâce aux répétitions T2AG3: (TTAGGG)**

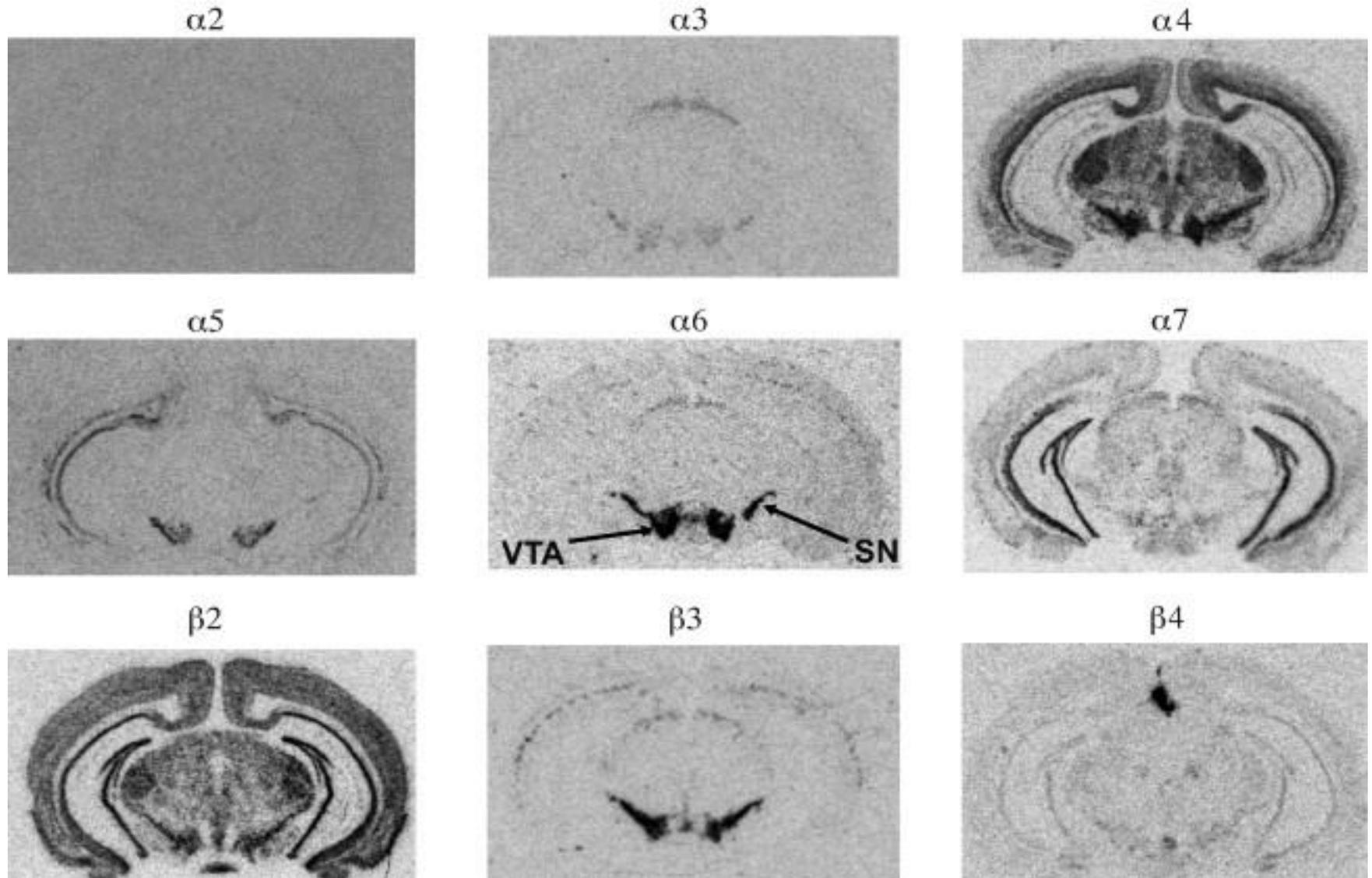


En général le FISH est utilisé  
pour la détection de séquences d' **ADN**

**MAIS**

L' hybridation *in situ* permet également de détecter les **ARN**  
et donc de visualiser les territoires d' expression des gènes

## *In Situ* Hybridization of nAChR Subunits (~ -3.0 mm Bregma)



Expression des sous unités du récepteur nicotinique de l'acétylcholine dans le cerveau

# Hybridation *in situ* sur des larves de poissons zèbre

Liver



Skeletal muscle

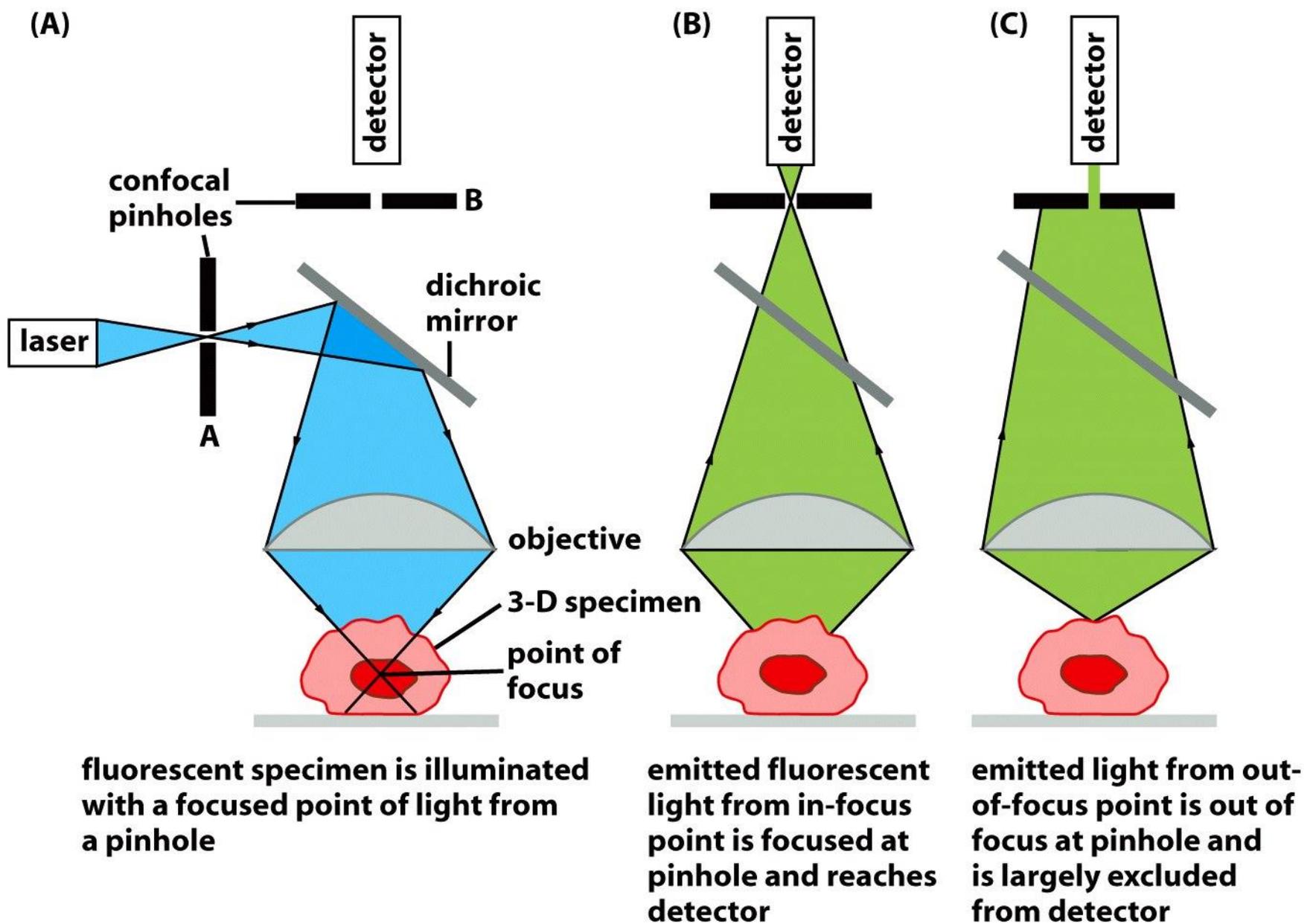


Nervous system

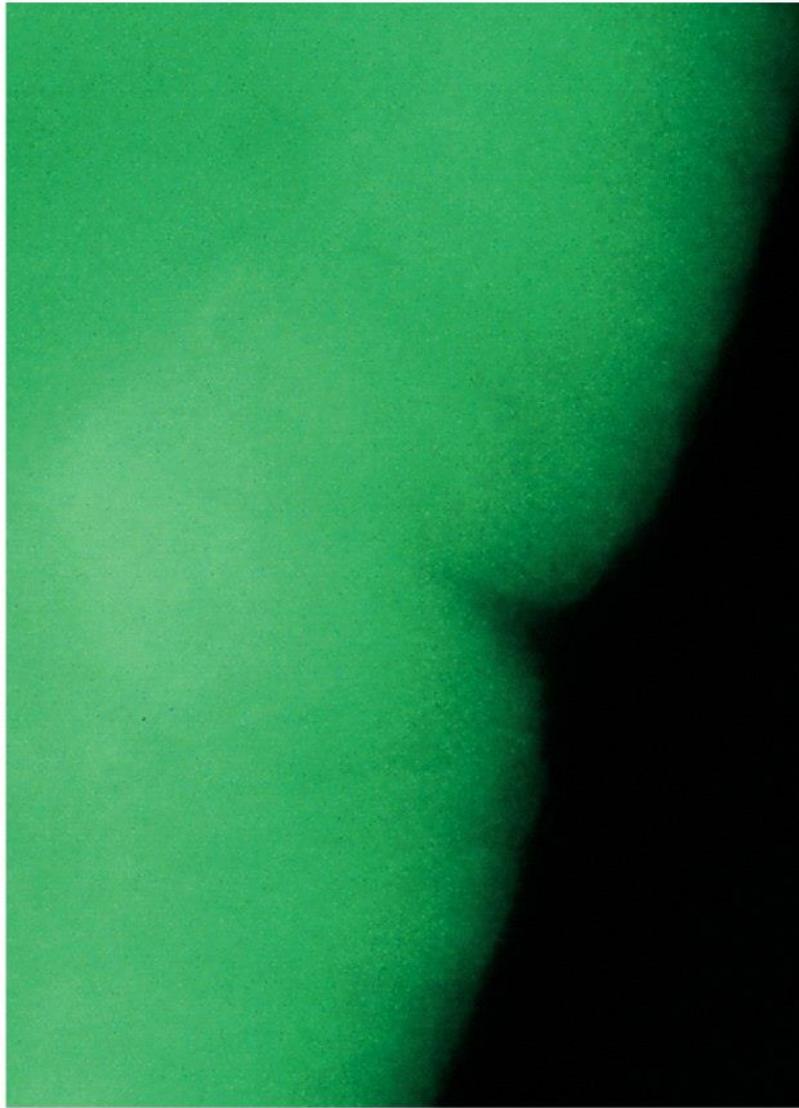




Hybridation in situ pour détecter l'ARNm de la tropomyosine



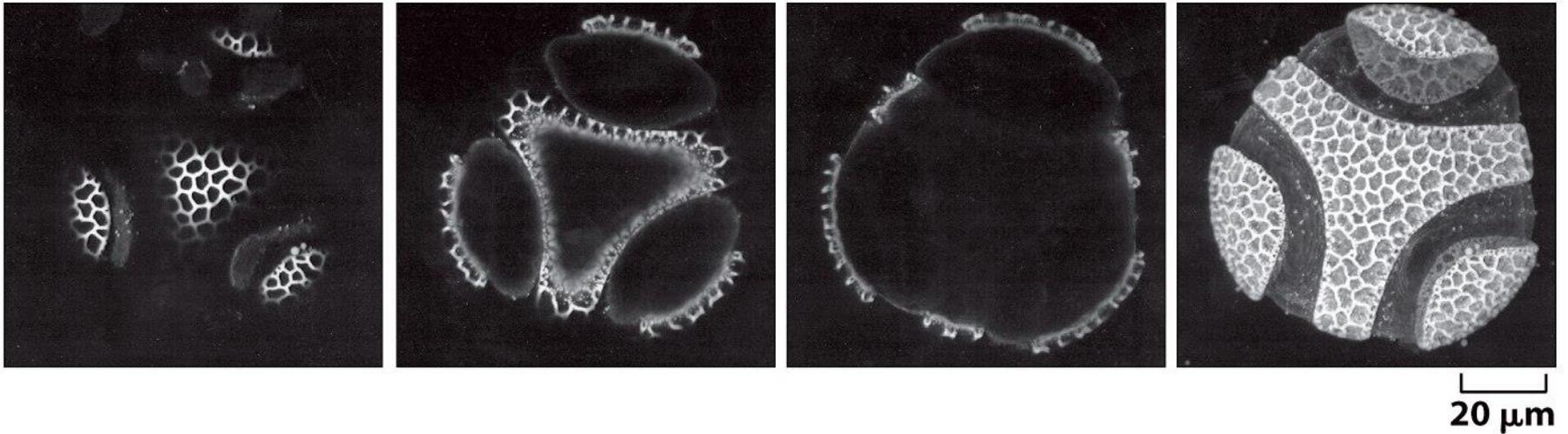
## Principe du microscope confocal



(A) Epifluorescence



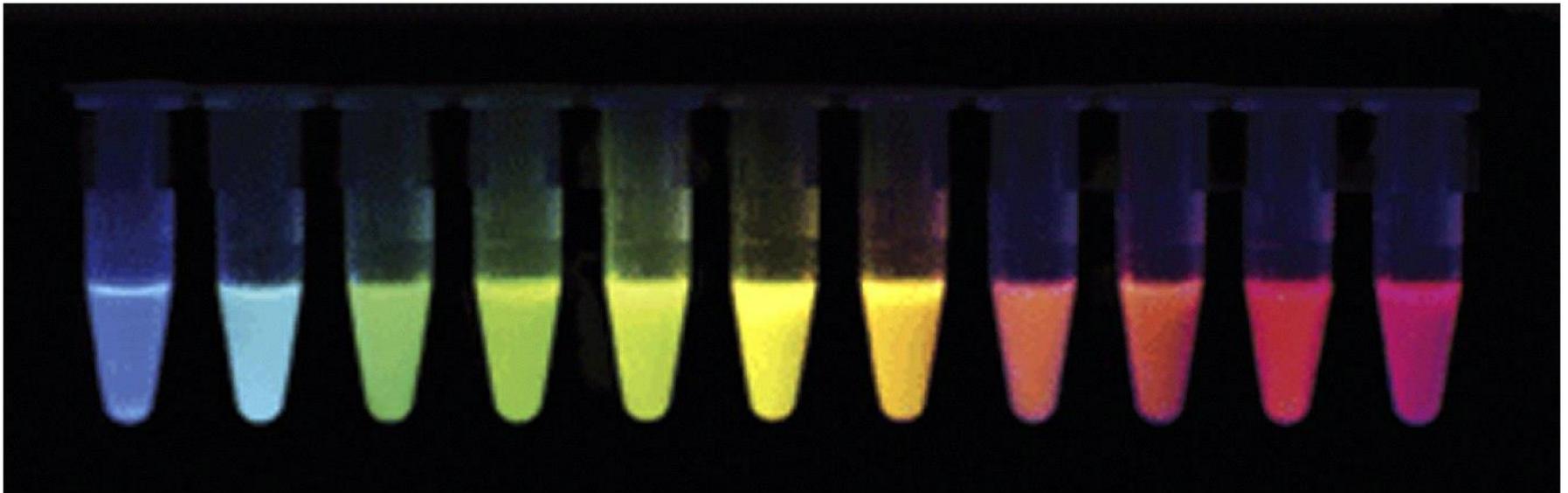
(B) Confocal  $10\ \mu\text{m}$



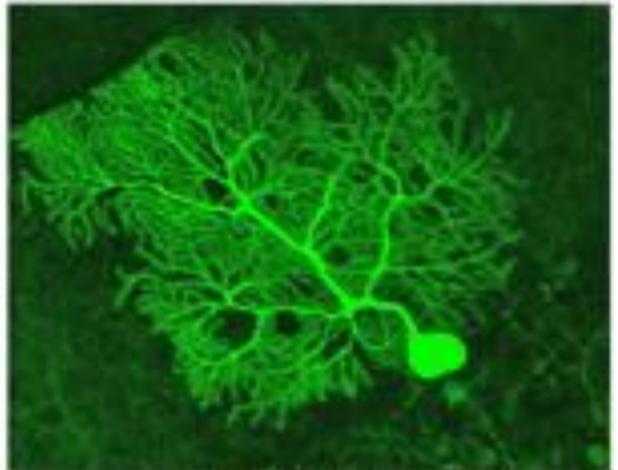
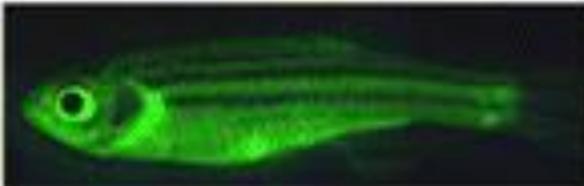
20  $\mu\text{m}$

Figure 9-22 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Les protéines de fusion fluorescentes



# La GFP

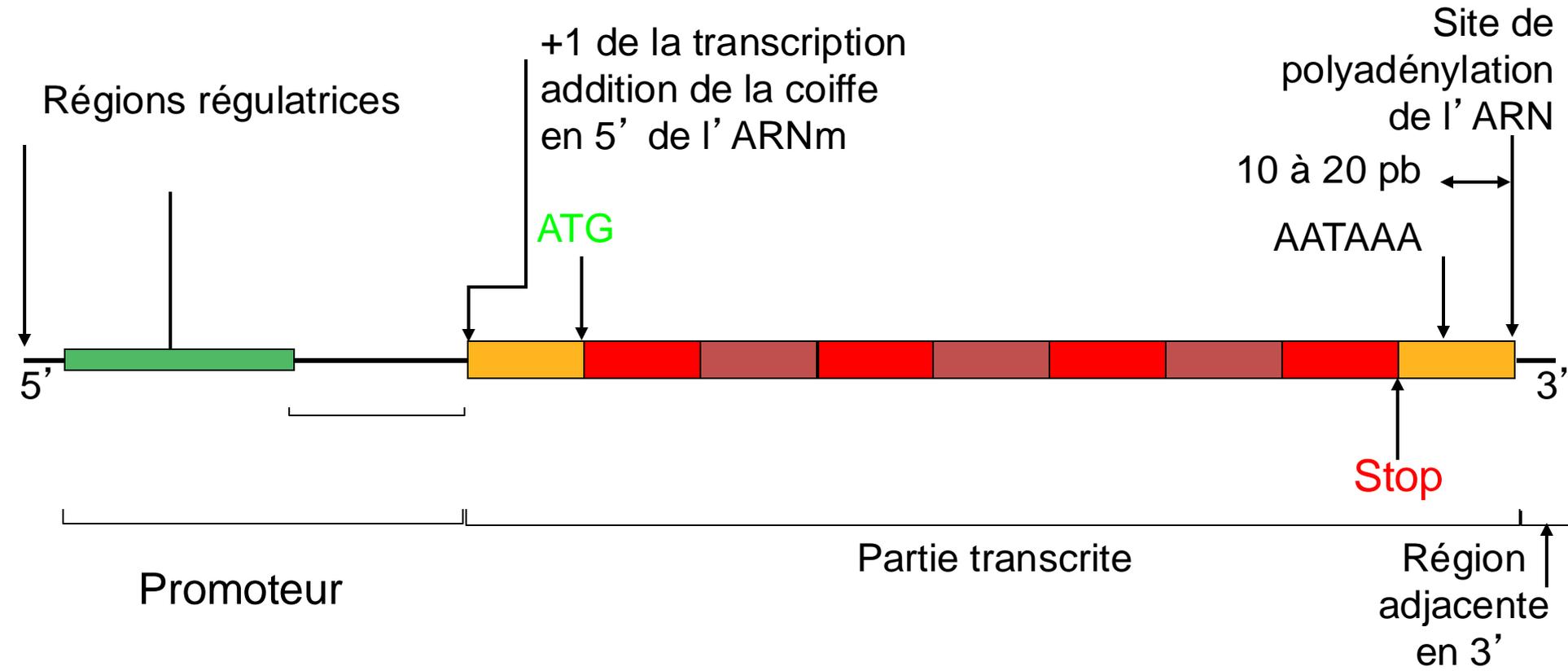


# Anatomie du gène d'une protéine

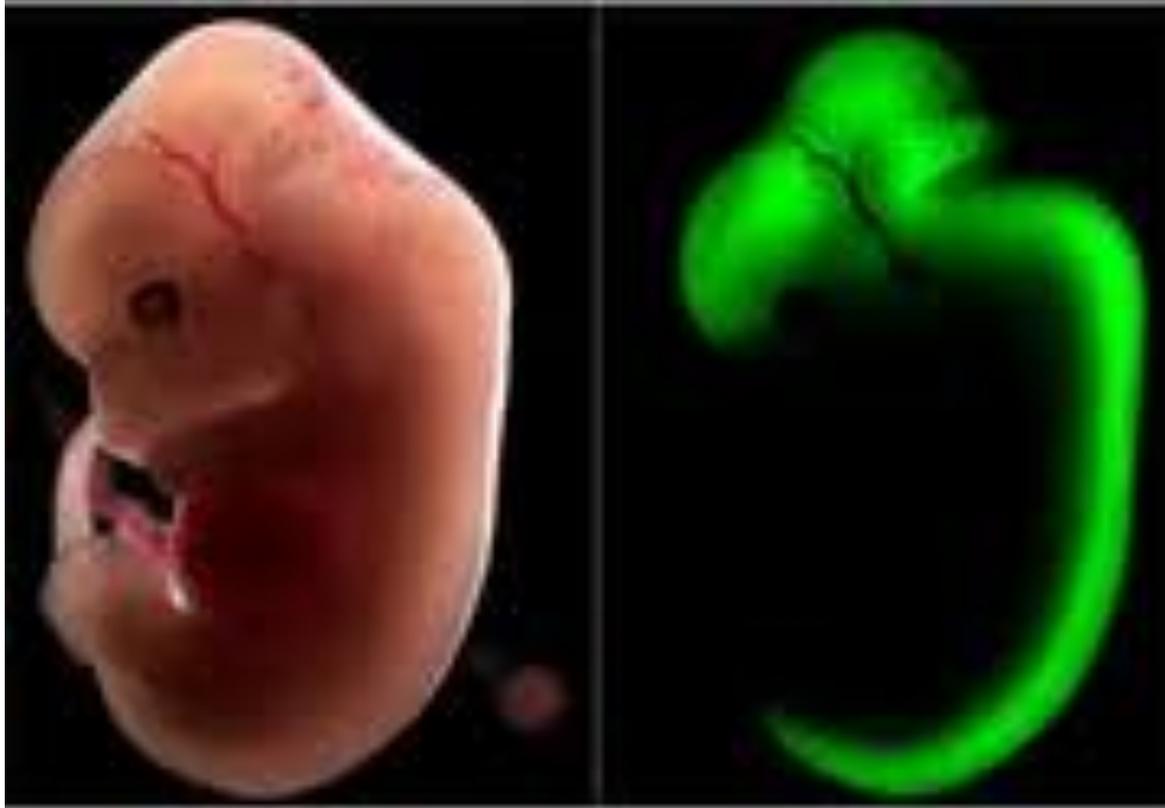
Parties transcrites en introns

Exons codants  
3' UTR/5'UTR

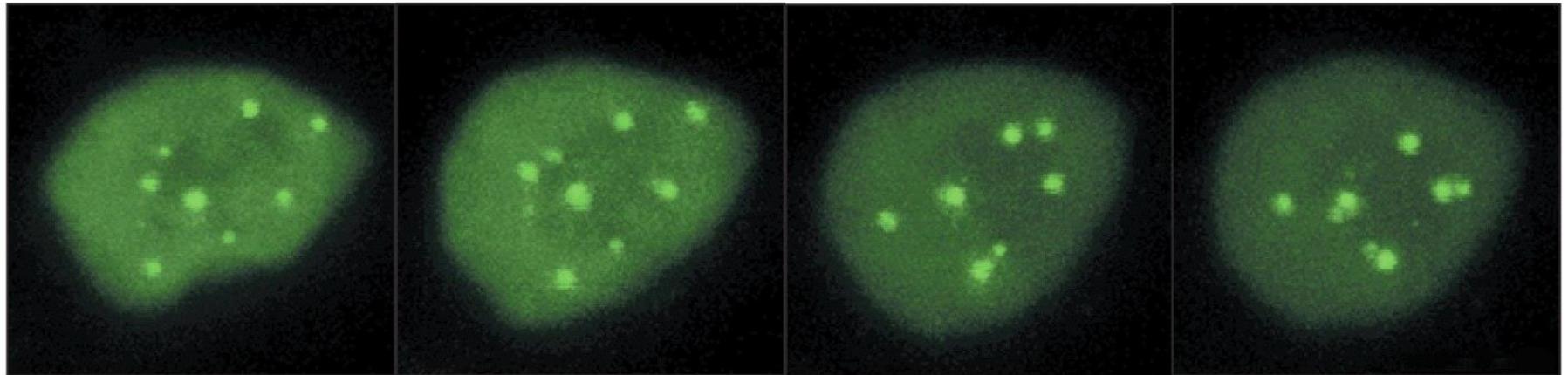
Parties transcrites en exons



GFP utilisée comme gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique du système nerveux.



# Video time lapse des corps de Cajal



Fusion GFP-protéine Sm des snRNP

5  $\mu$ m

ATG

STOP



GFP

ATG

STOP



cDNA protéine Sm

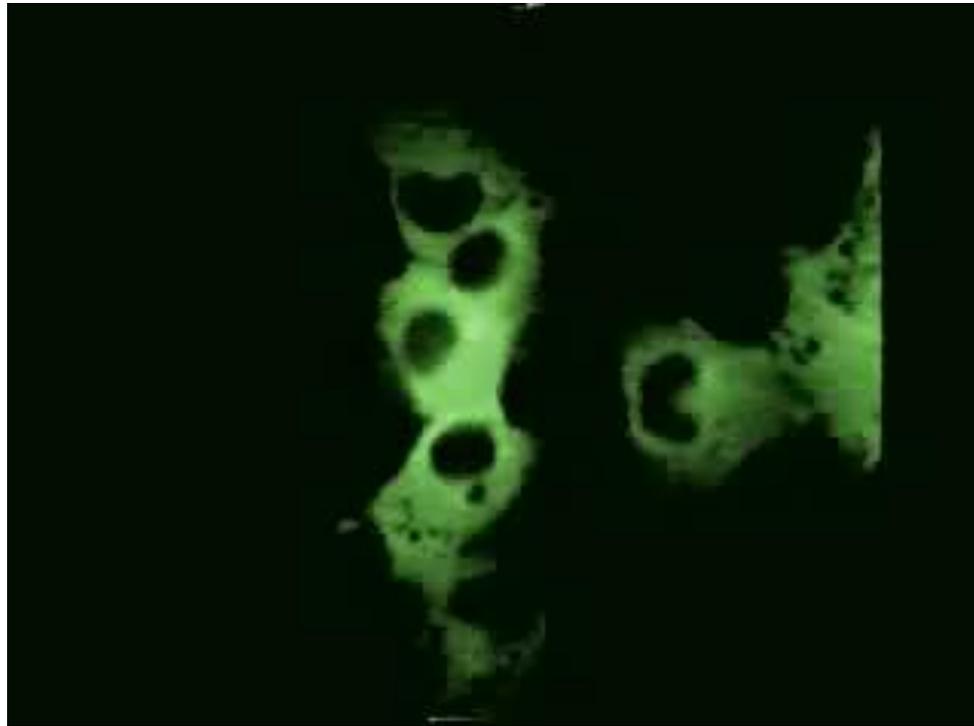
ATG

ATG

STOP



GFP — AChR



Visualisation des mouvements entre le cytosol et le noyau  
de NF-AT couplée à la GFP

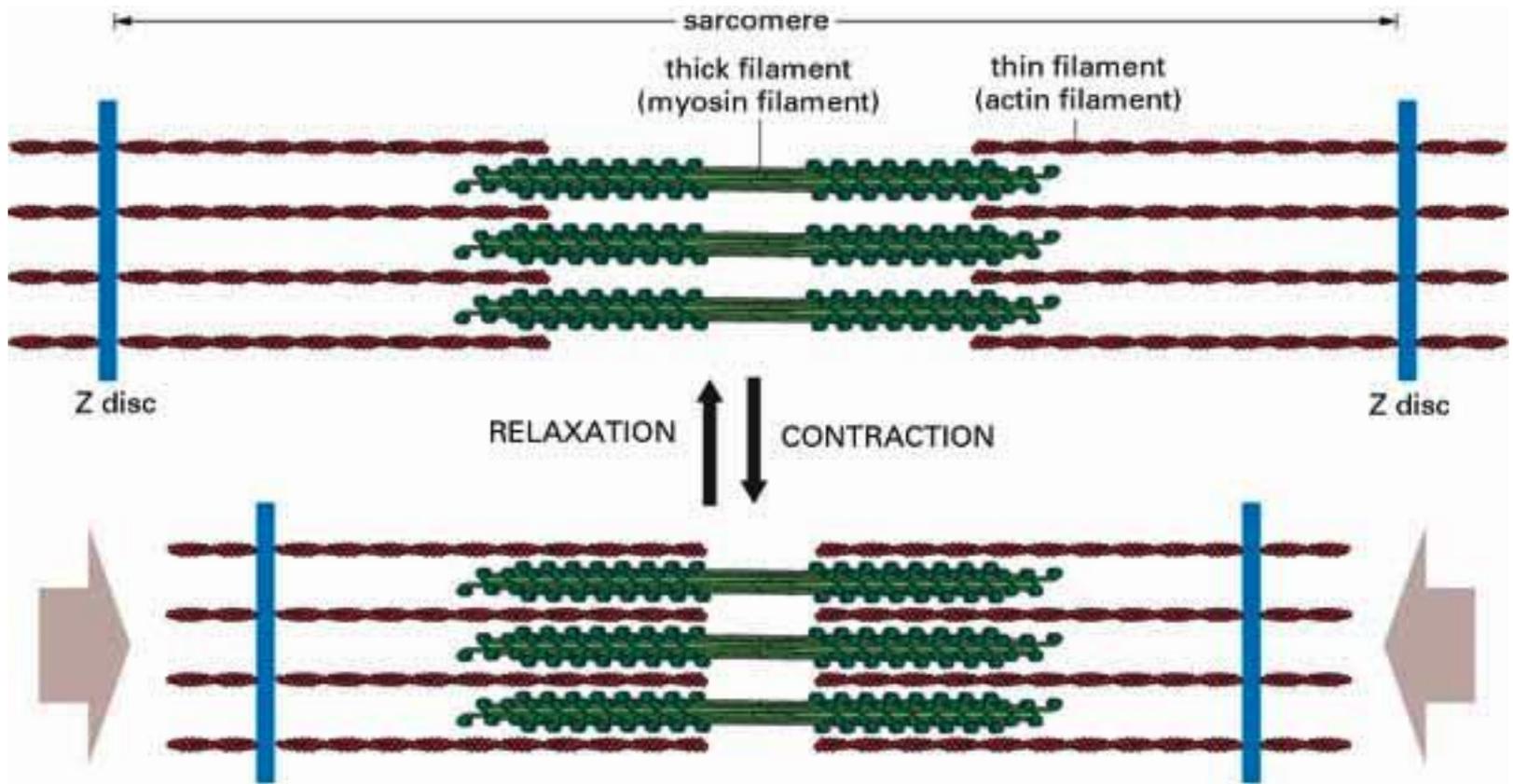
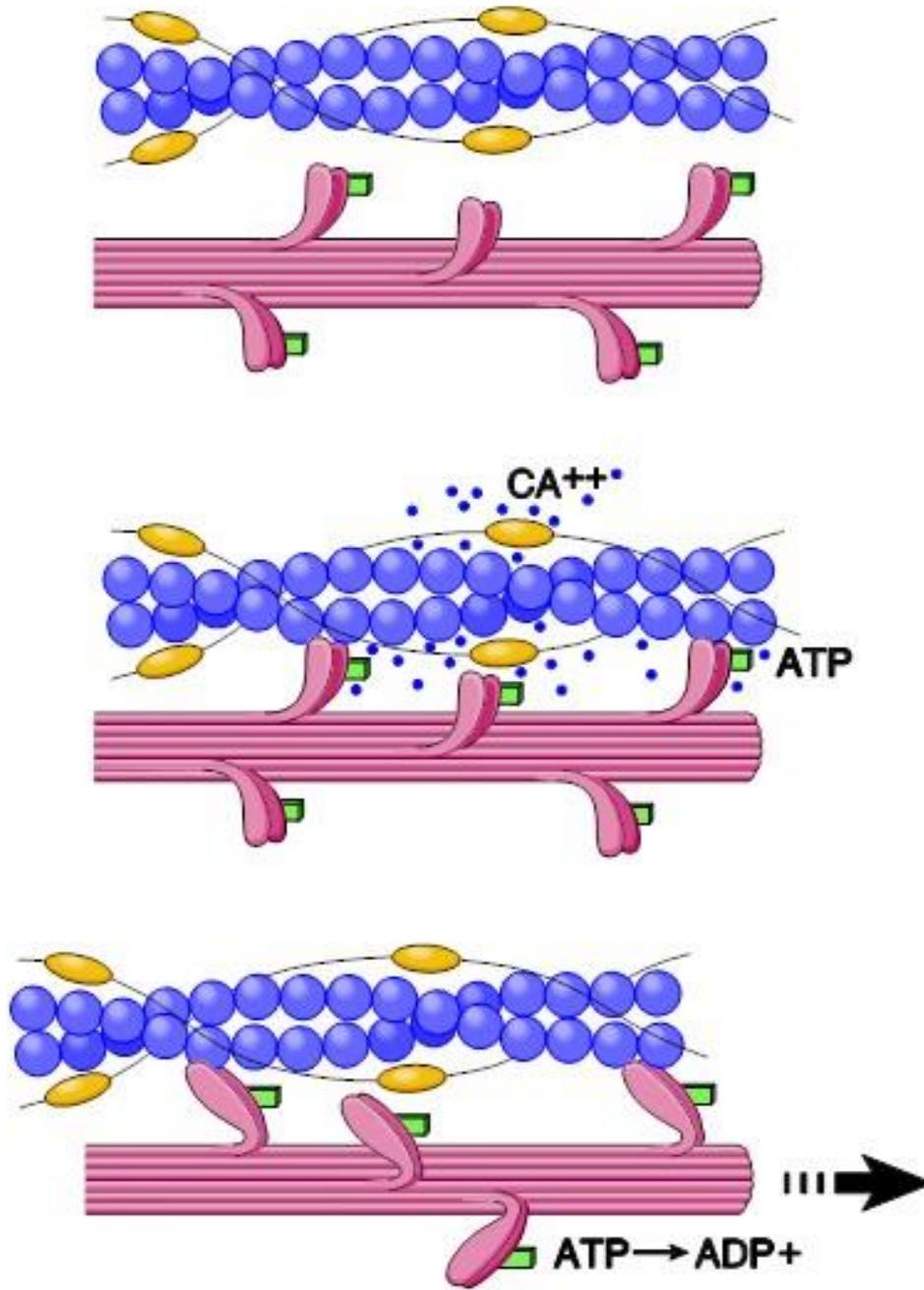
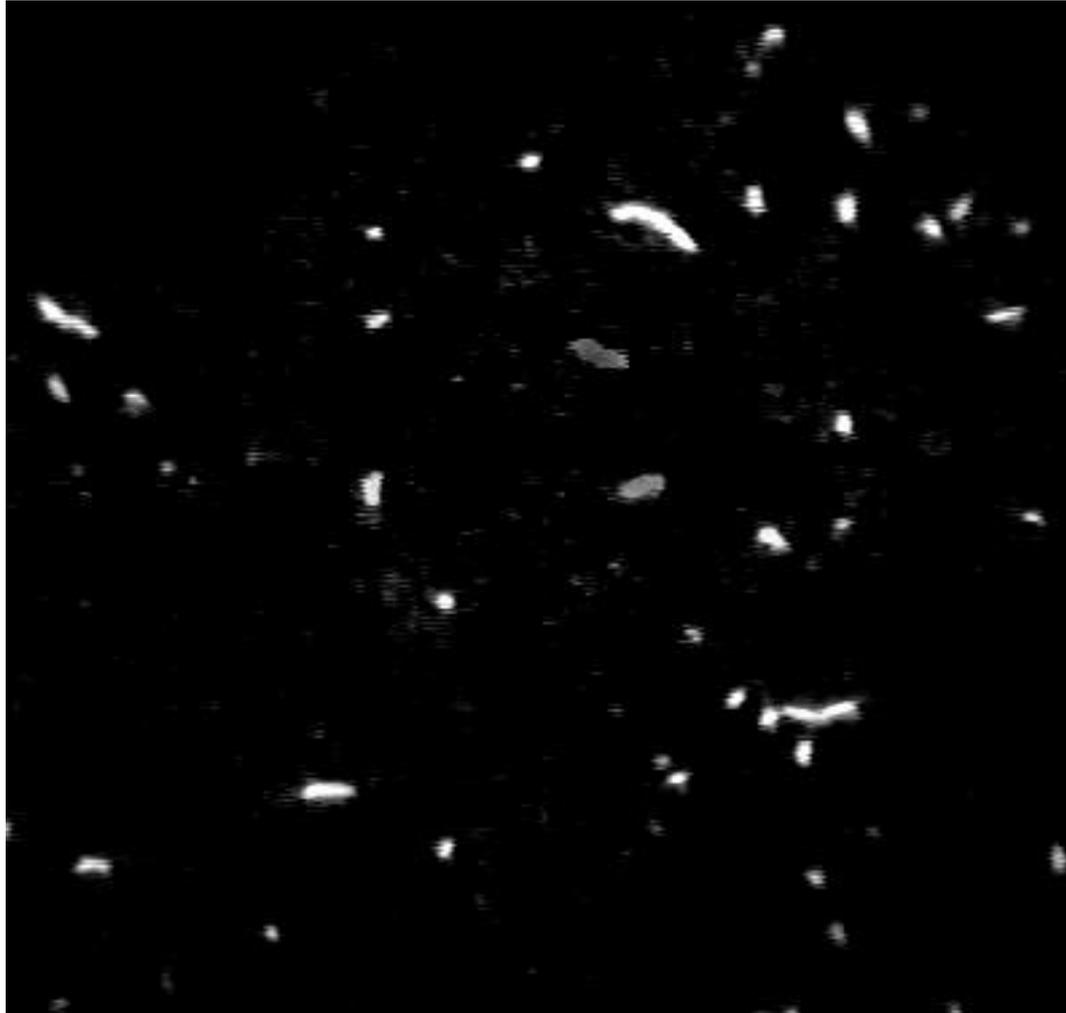


Figure 8-26 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

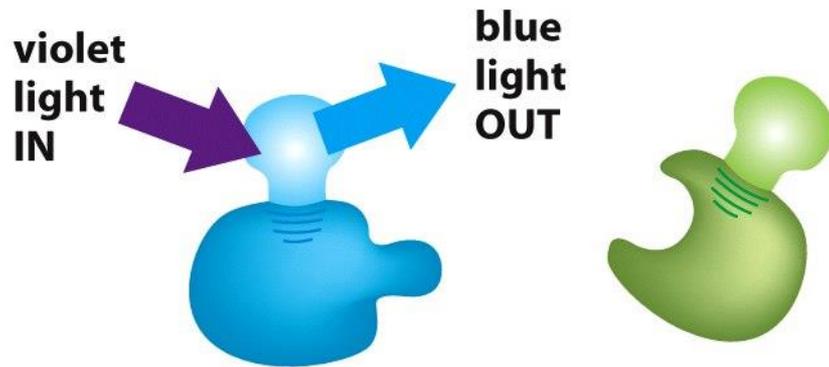
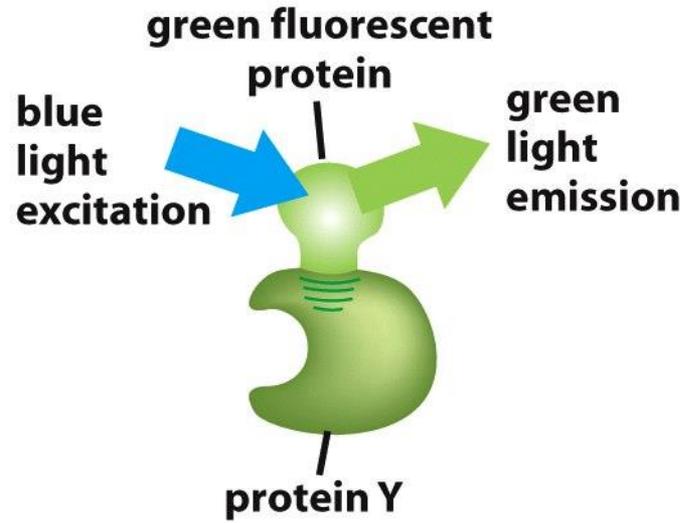
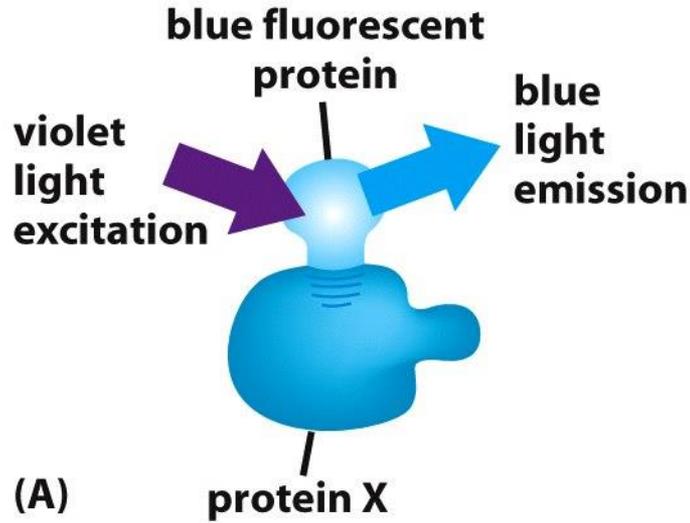


Déplacement de filaments d'actine-GFP sur une lame de verre recouverte de myosine.

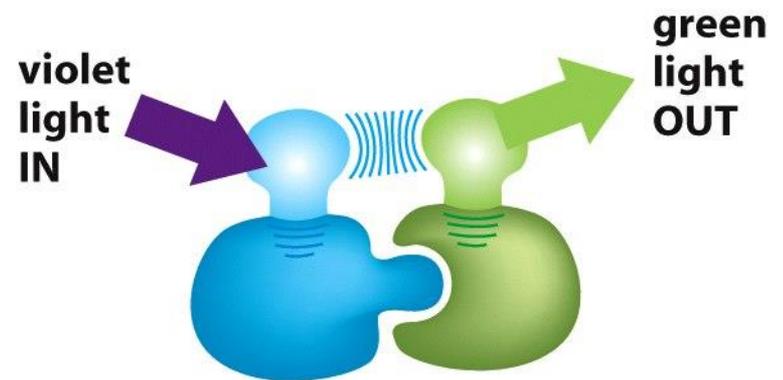


# Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

(Transfert d'énergie par Résonance en fluorescence)

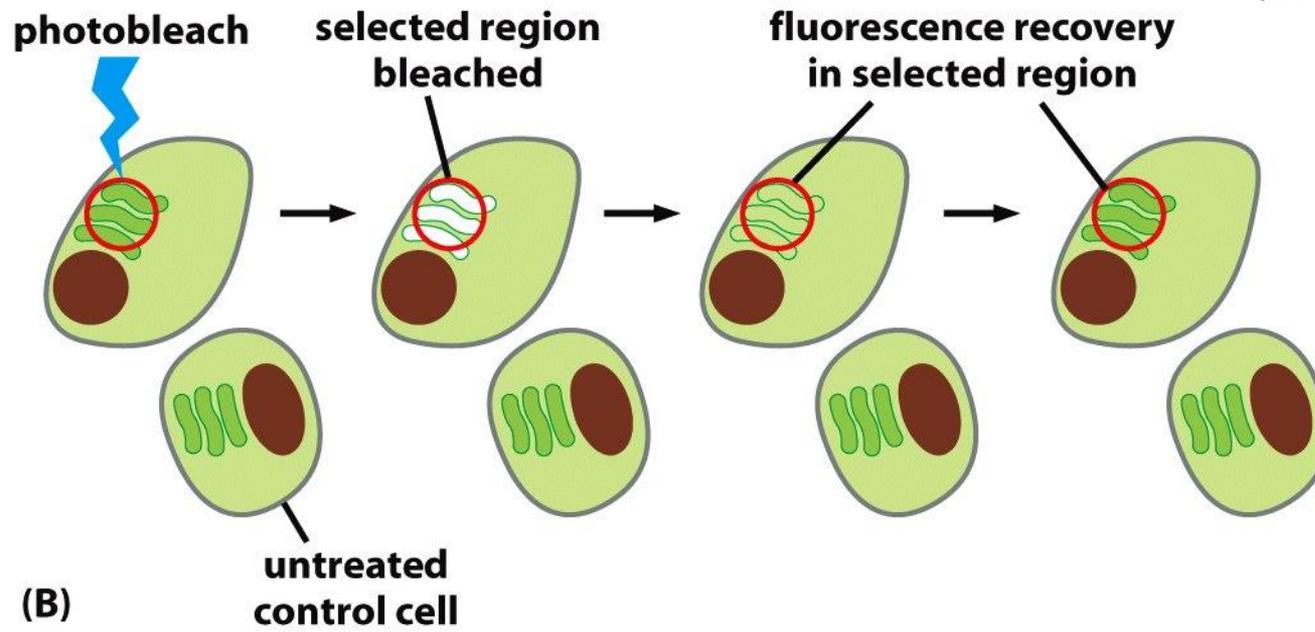
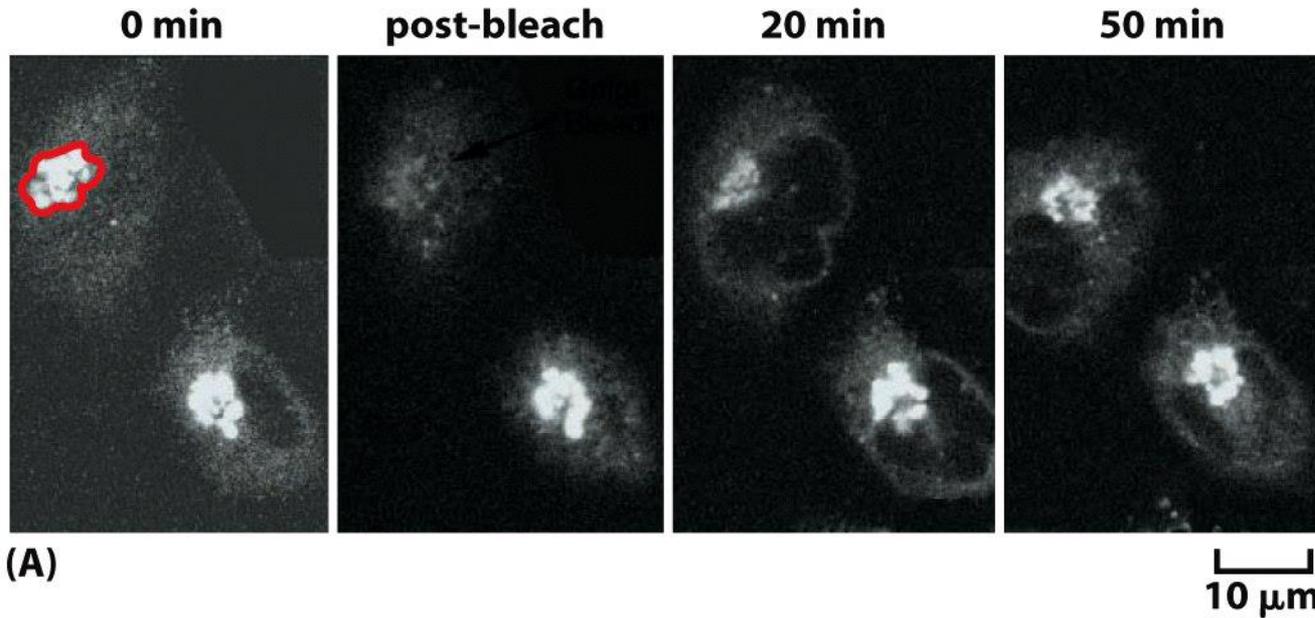


**(B) NO PROTEIN INTERACTION**  
NO EXCITATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN,  
BLUE LIGHT DETECTED



**(C) PROTEIN INTERACTION**  
FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER,  
GREEN LIGHT DETECTED

# Principe du FRAP (Fluorescence Recovery After Photo bleaching) (Récupération de Fluorescence Après Photo blanchiment)



# Microscopie électronique

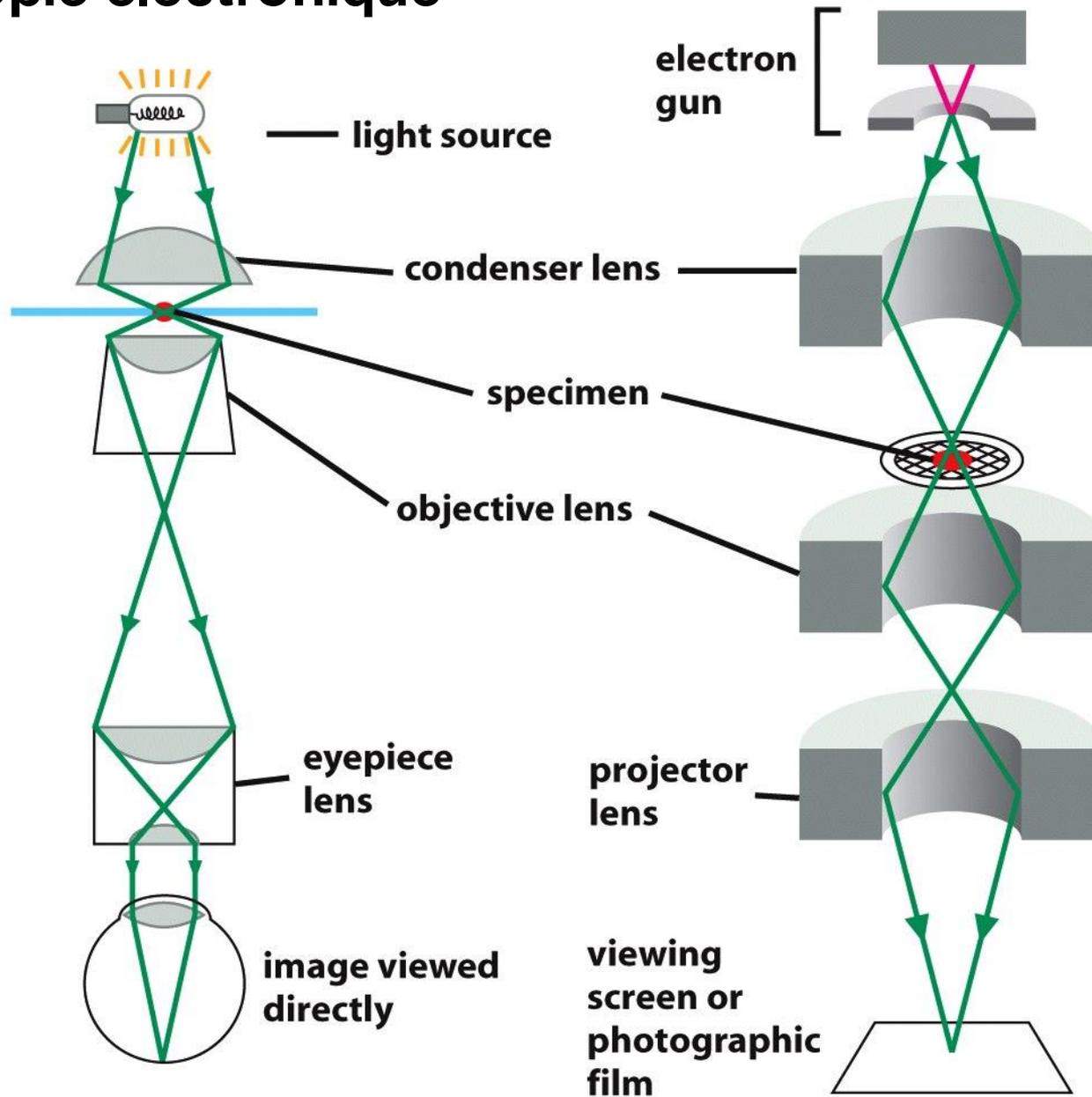
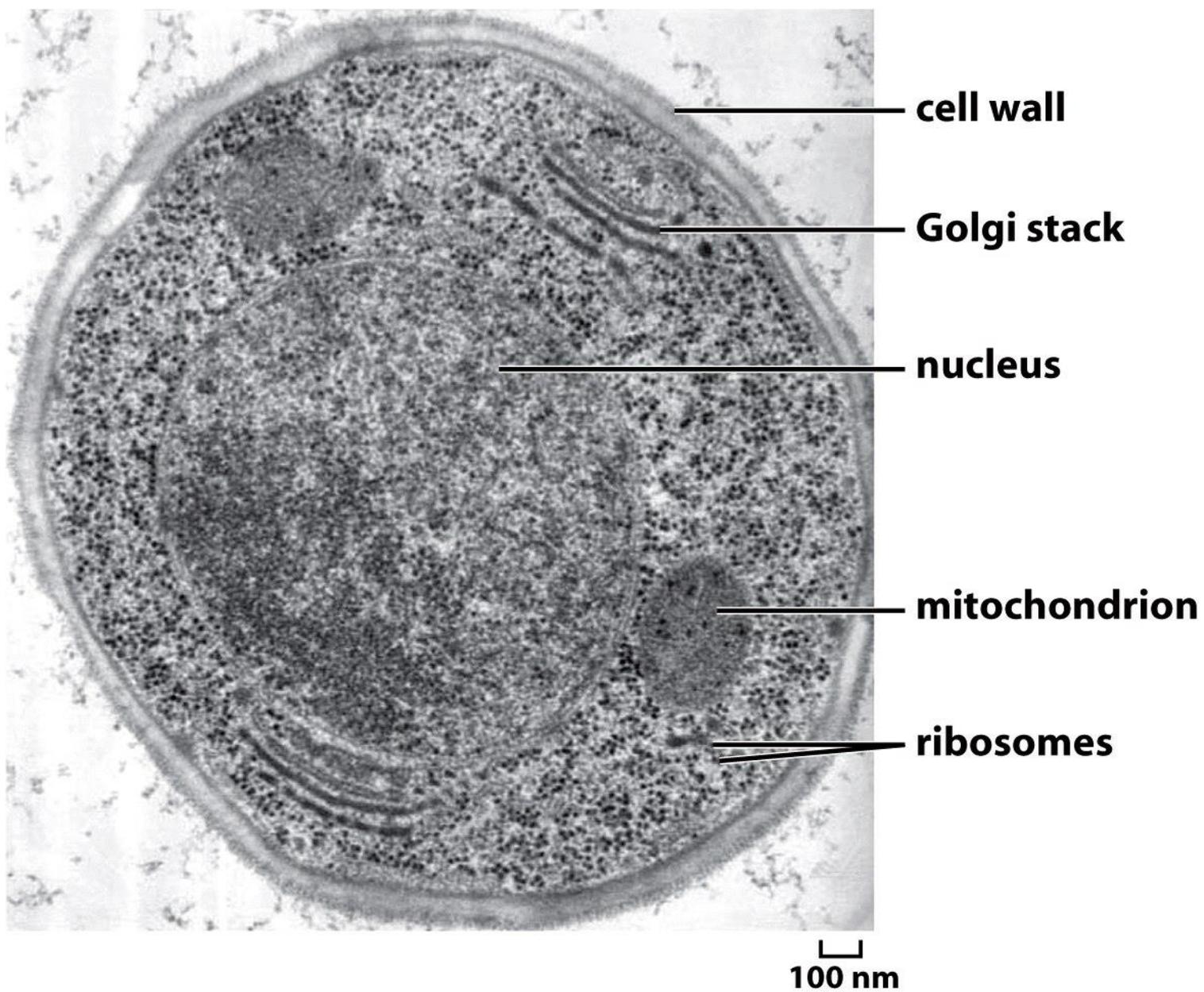


Figure 9-42 (part 1 of 2) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Immuno marquage en microscopie electronique avec des billes d'or greffées aux anticorps : « Immunogold »

