

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 ...
(Transcriptase inverse ou rétrotranscriptase,
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 :



Ces modèles permettent des approches génétiques car:

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

Souris (mammifère)

Mutations spontanées

(Trembler gène Pmp22, Nude gène Foxn1)

Transgéniques: - transgénèse classique:

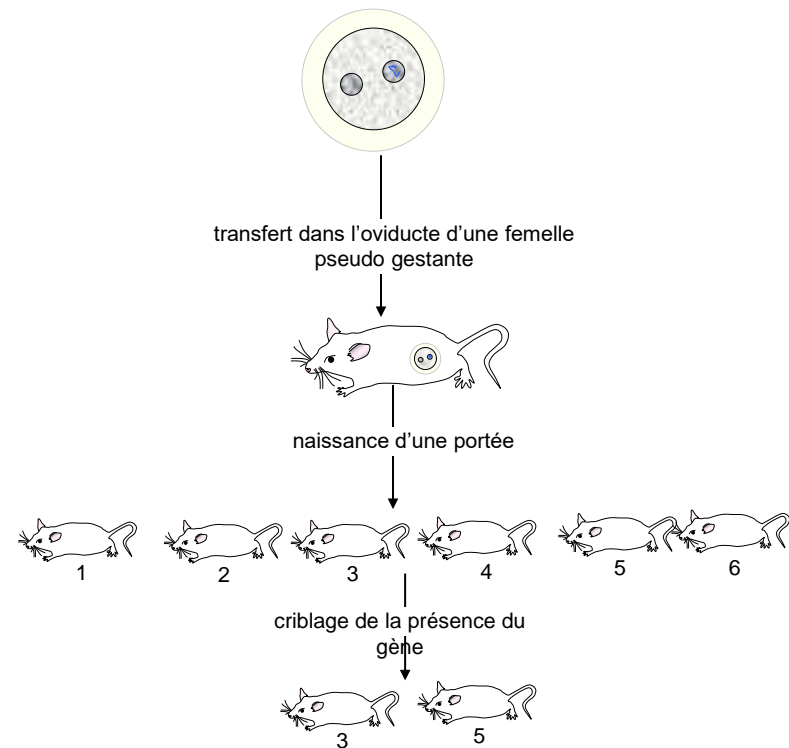
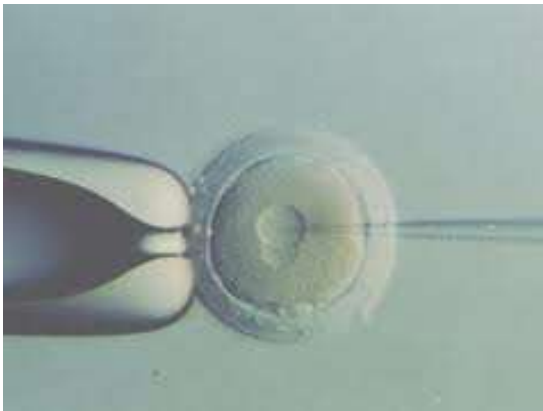
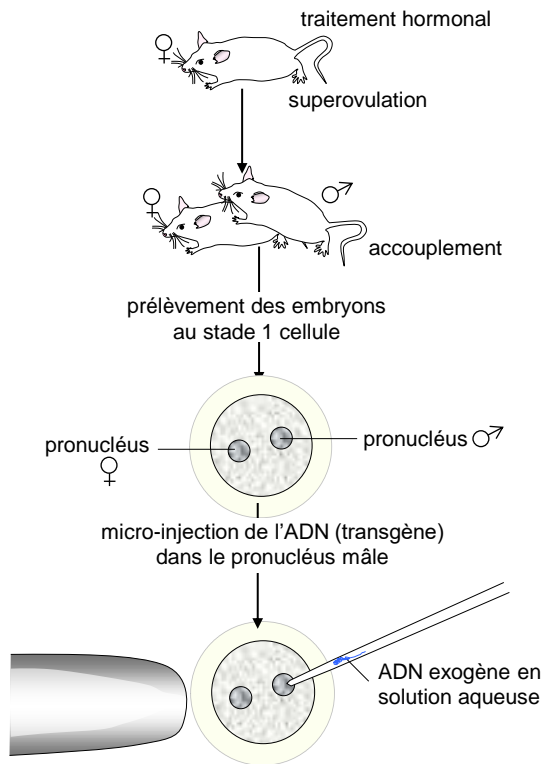
insertion aléatoire dans le génome

- recombinaison homologue: insertion ciblée

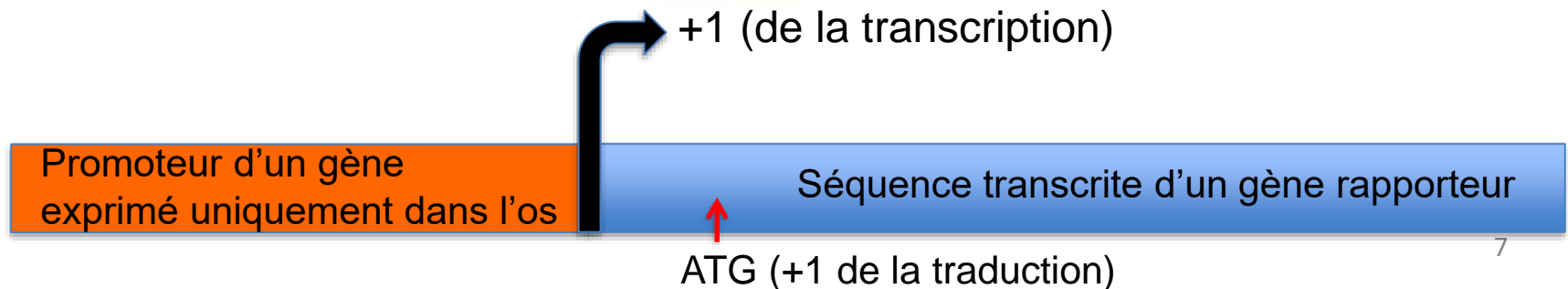
Inactivation de gènes (Knock-out)

Remplacement de gènes (Knock-in)

Transgénèse classique chez la souris



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



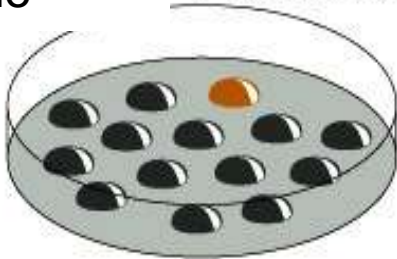
Transgénèse par recombinaison homologue chez la souris

(A) ES cells growing in culture



Introduction d'un fragment d'ADN contenant le gène muté dans les cellules souches (pluripotentes)

Version mutée d'un gène produite par génie génétique



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



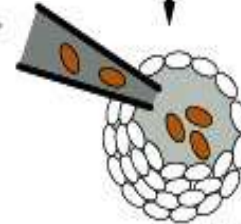
(B) female mouse



Collecte d'embryons 3 jours après la fécondation



Injection des cellules dans un embryon précoce (blastocyste)



Embryons hybrides partiellement
Formés à partir des cellules recombinaées



Introduction des embryons dans une mère porteuse





Cellules ES (pluripotentes) avec
une copie du gène muté



Introduction des embryons
dans une mère porteuse



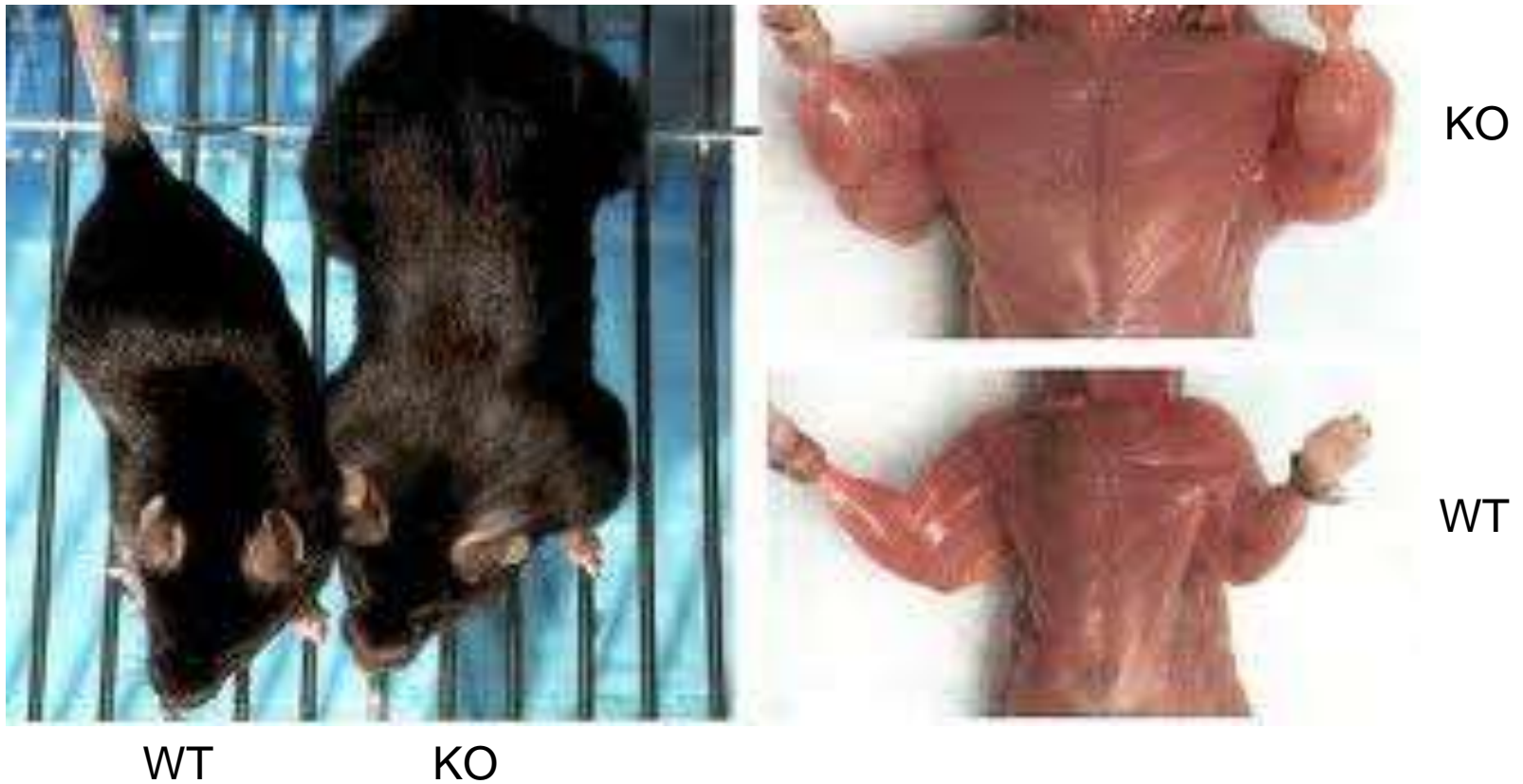
Croisement des chimères pour
Identifier celles dans lesquelles
lignée germinale est recombina



**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 ».

S	A	T	O	R
A	R	E	P	O
T	E	N	E	T
O	P	E	R	A
R	O	T	A	S



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

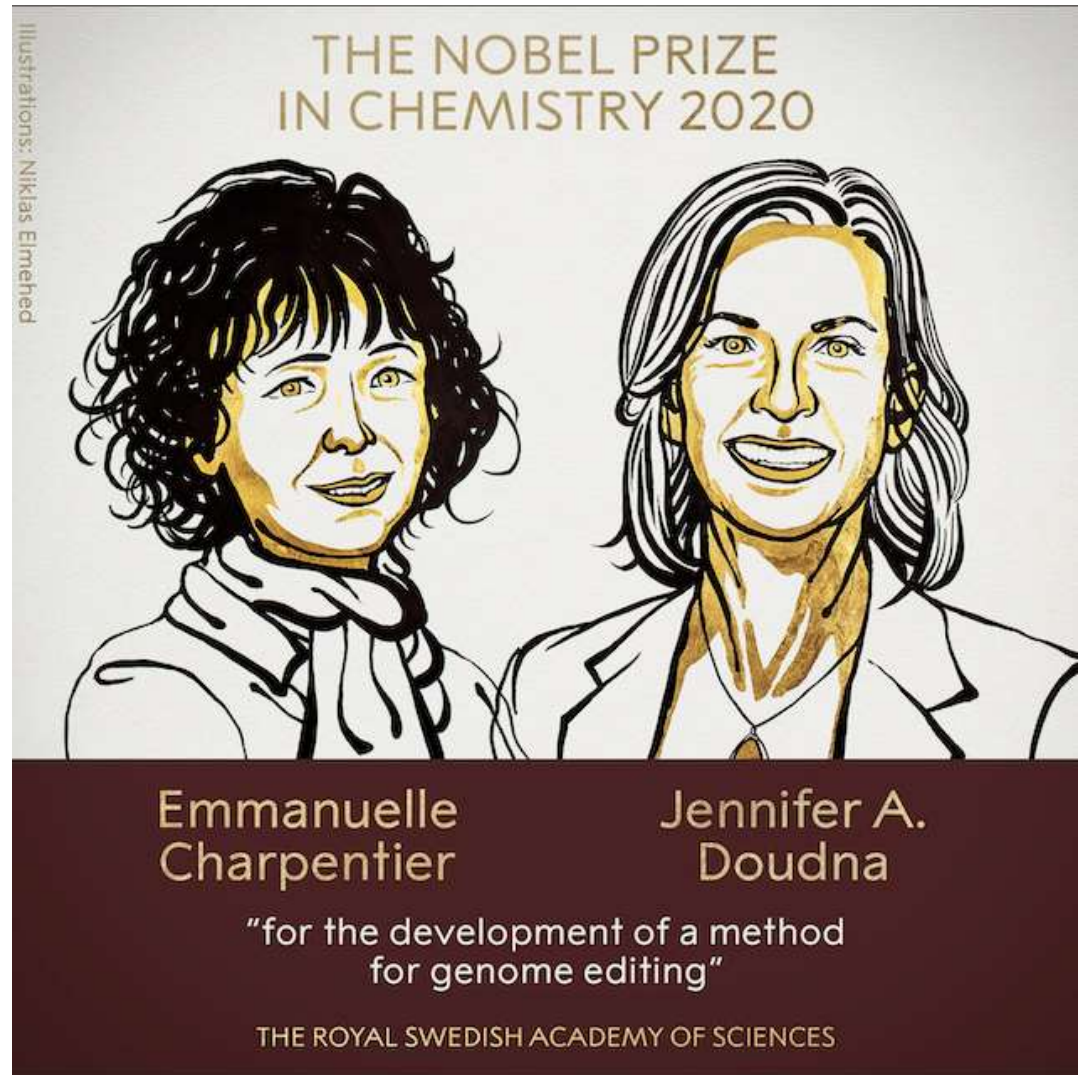
1987-2002: découverte des séquences CRISPR:

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

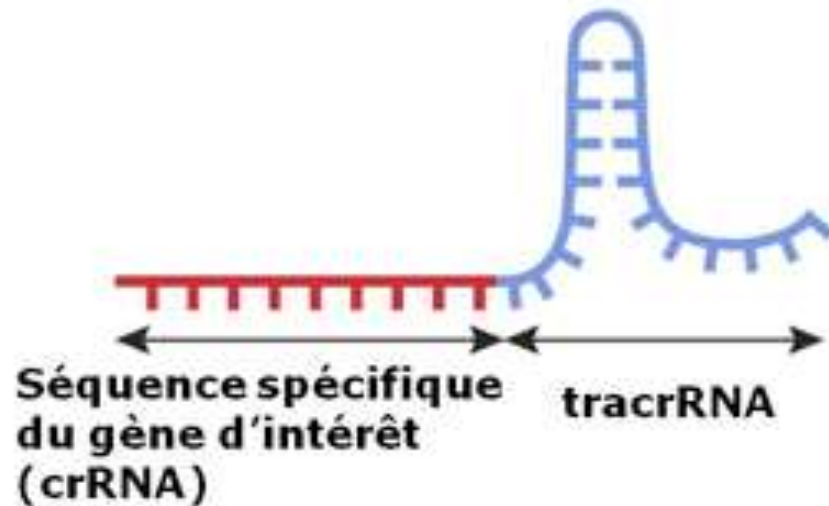
2005: séquences CRISPR identiques à des séquences de bactériophage

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



ARNsg (ARN « single guide »)

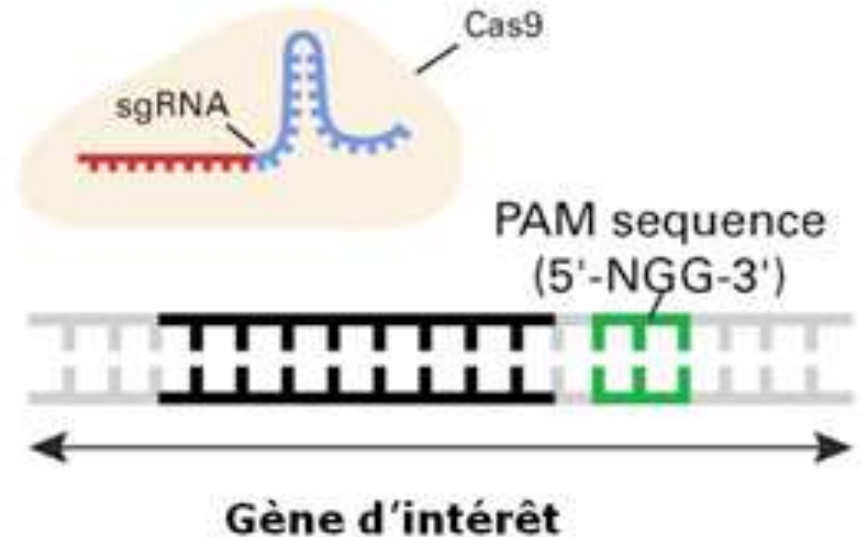


Sg RNA : crRNA + tracrRNA

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

tracrRNA : transactivating crRNA se liant à la nucléase Cas9

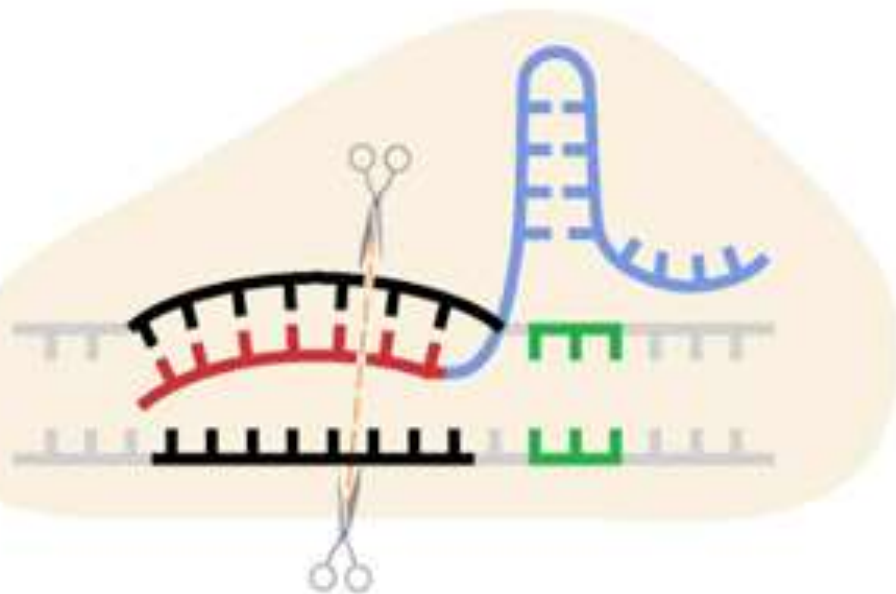
ARNsg + protéine Cas9



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

PAM : Protospacer Adjacent Motif

**Coupure spécifique de la
séquence d'ADN cible**

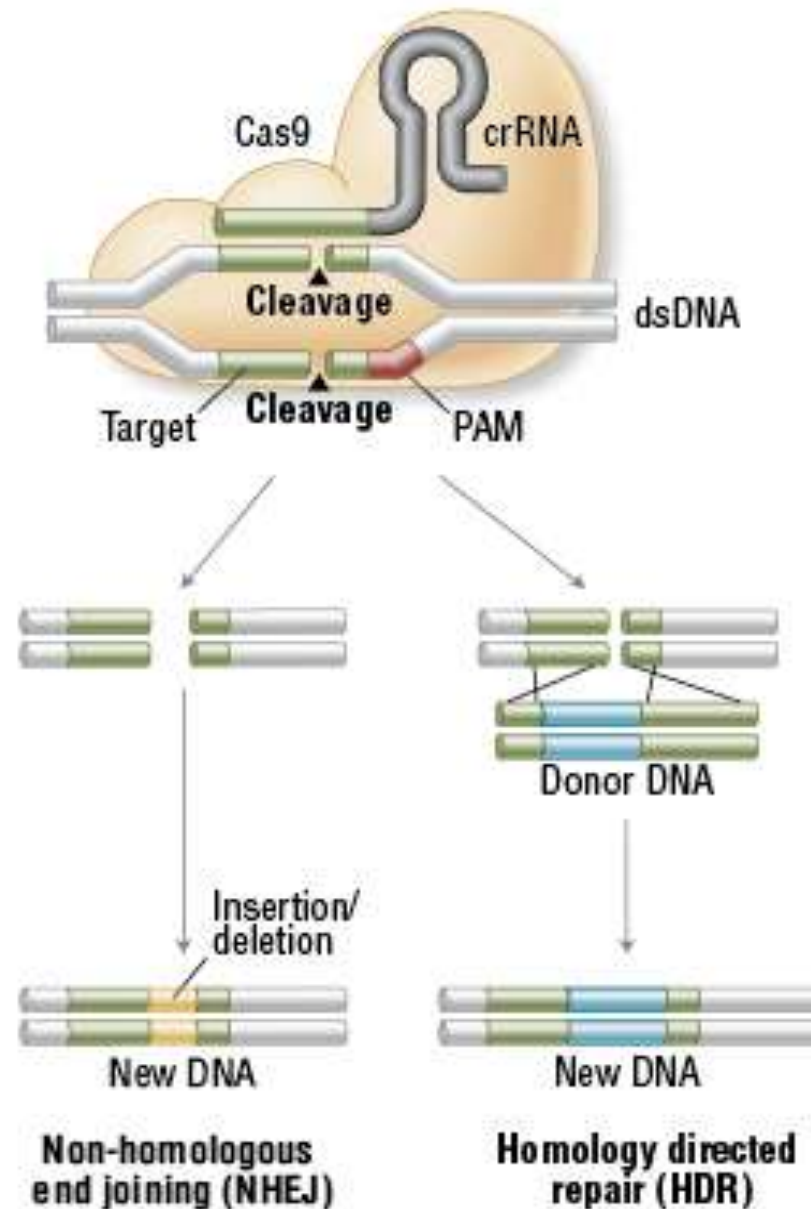


Formation du complexe ARNsg –
nucléase cas9 et clivage spécifique
du gène d'intérêt dans la cellule

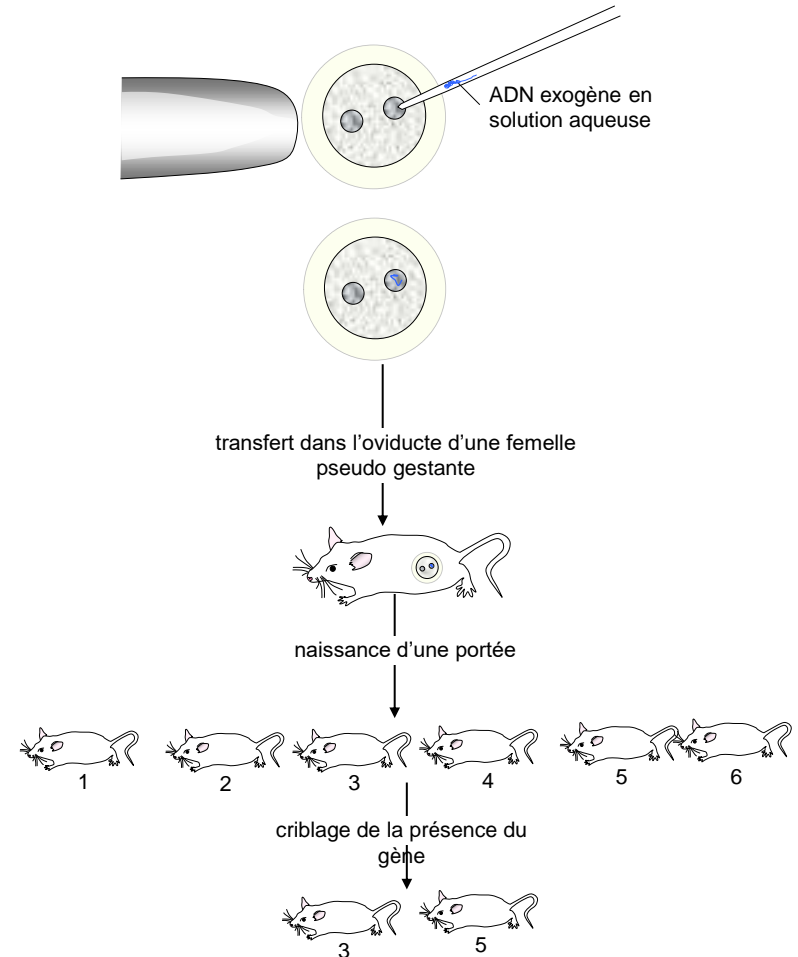
**Résultat de la coupure
spécifique de la séquence
d'ADN cible**



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

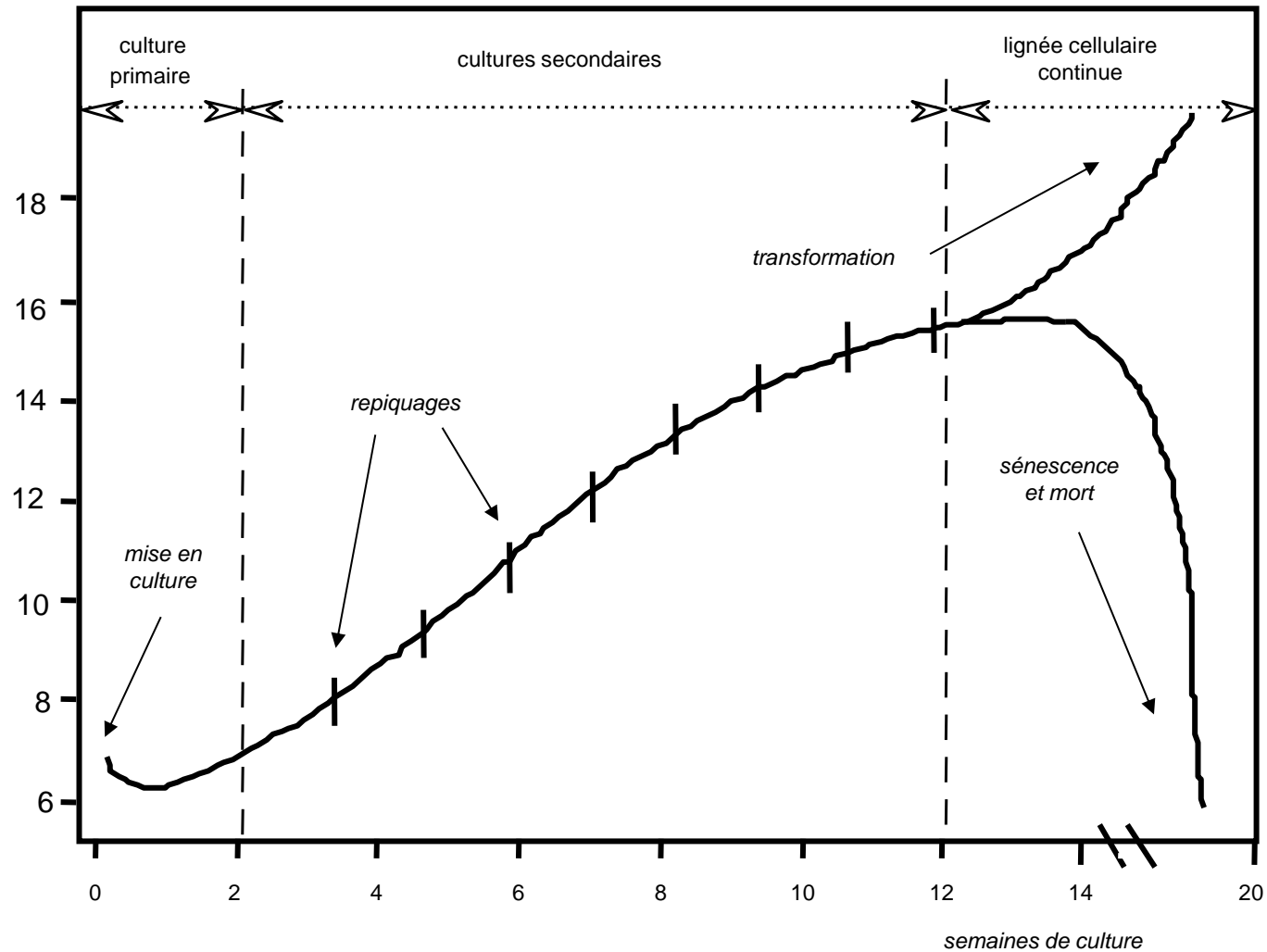


CRISPR chez la souris: injection des ovocytes comme en transgénèse classique



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: O₂/CO₂, 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

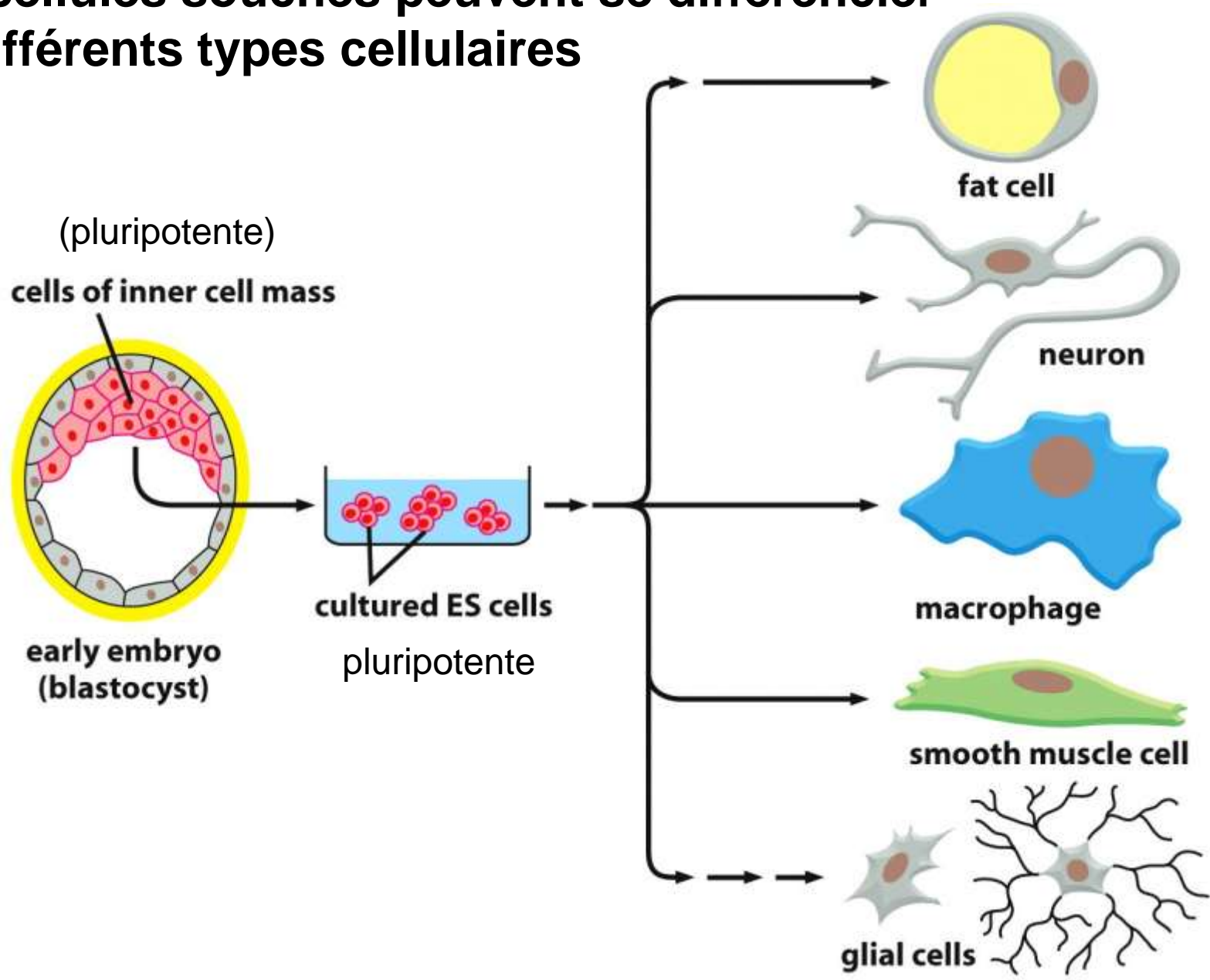
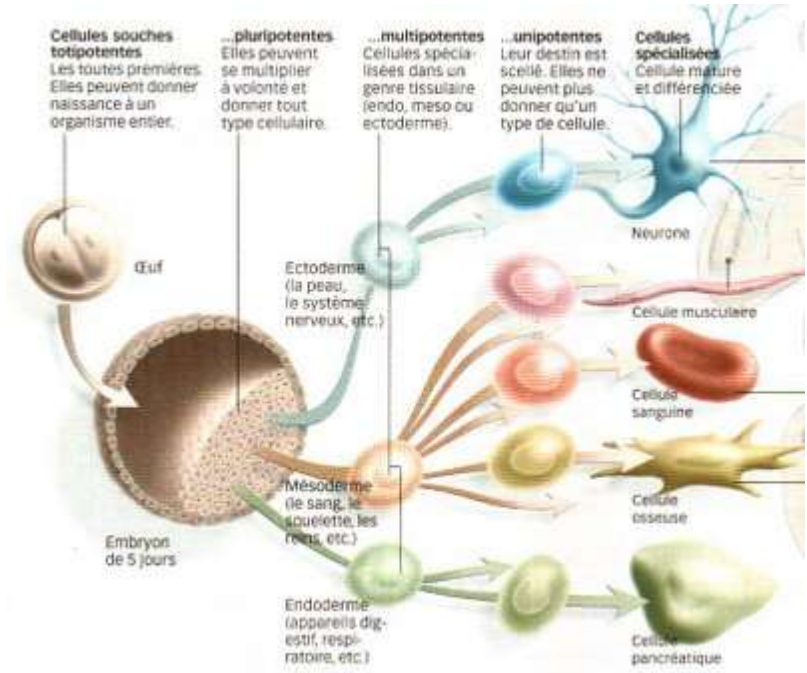
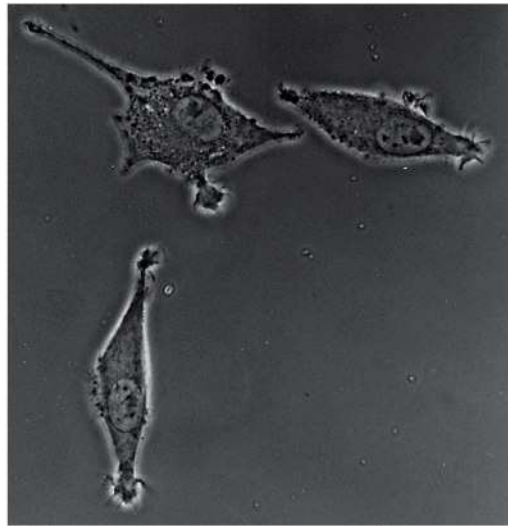


Figure 8-5 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Les cellules souches et le potentiel de différenciation

- Les cellules souches **totipotentes** : pouvant donner tout type cellulaire, et donc un organisme entier avec ses annexes embryonnaires
- Les cellules souches **pluripotentes** : capables de donner tous les types cellulaires sauf les annexes embryonnaires
- Les cellules souches **multipotentes** : susceptibles de donner différents types de cellules, mais spécifiques d'un lignage cellulaire donné (endoderme, mesoderme ou ectoderme)
- Les cellules souches **unipotentes** : qui ne peuvent donner qu'une seule sorte de cellule (elles peuvent cependant s'auto-renouveler par division asymétrique)

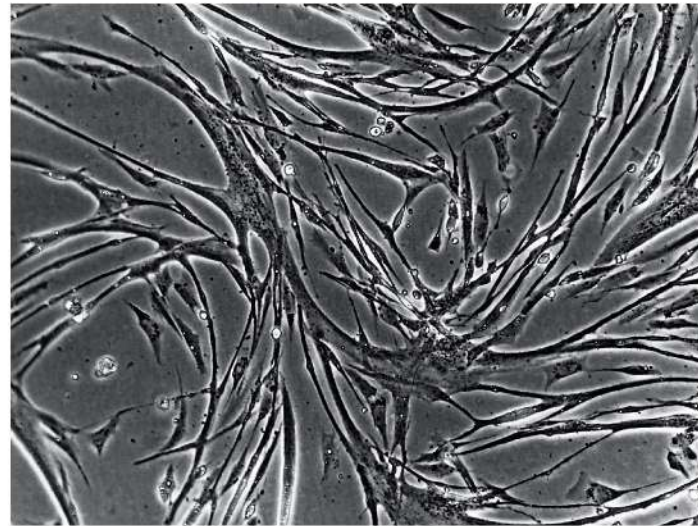




(A)

20 μm

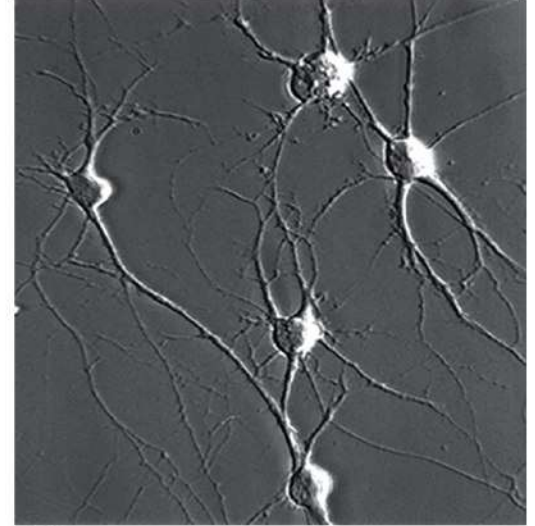
Fibroblastes



(B)

100 μm

Cellules musculaires

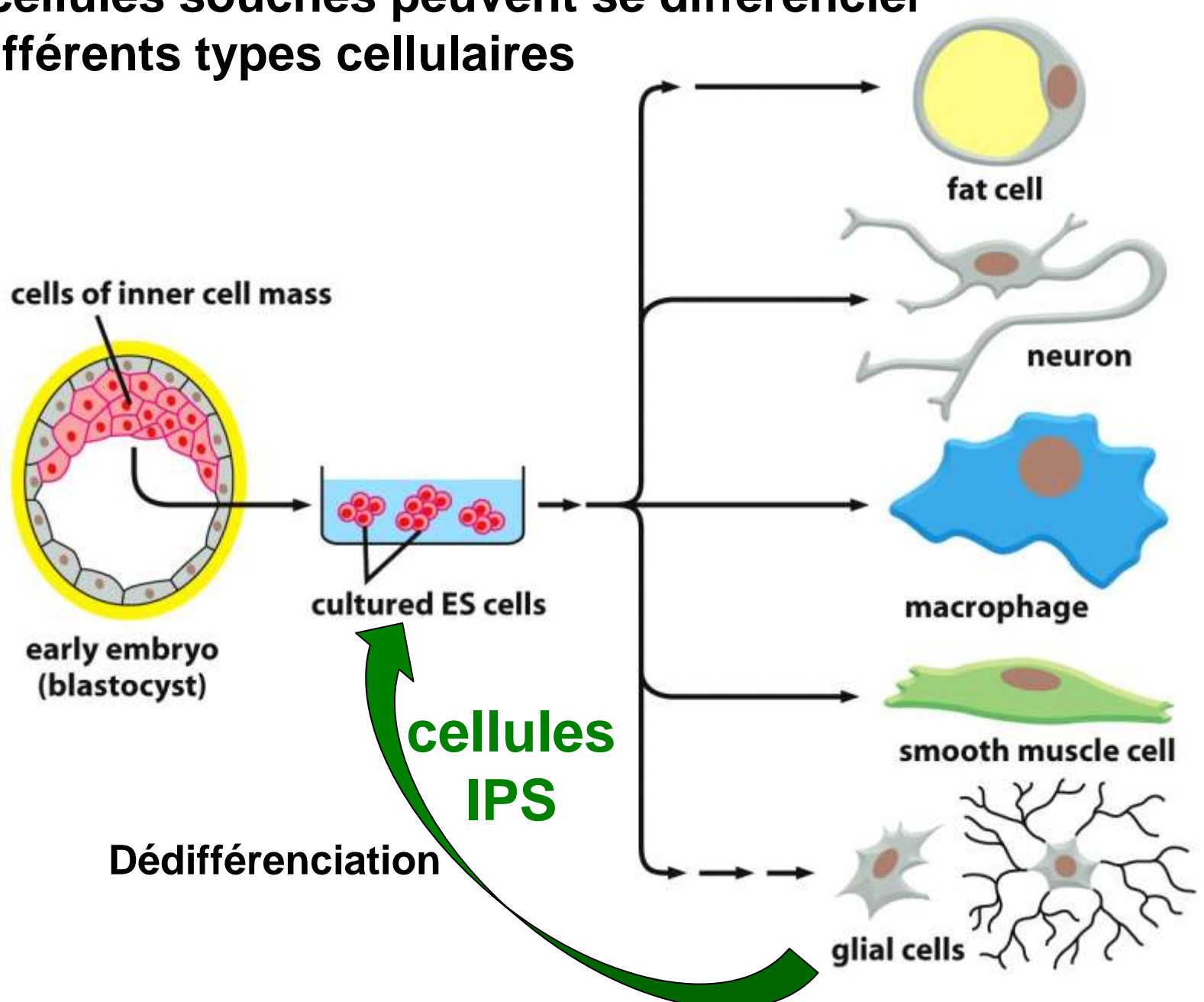


(C)

50 μm

Neurones

Les cellules souches peuvent se différencier en différents types cellulaires





Sir John B. Gurdon



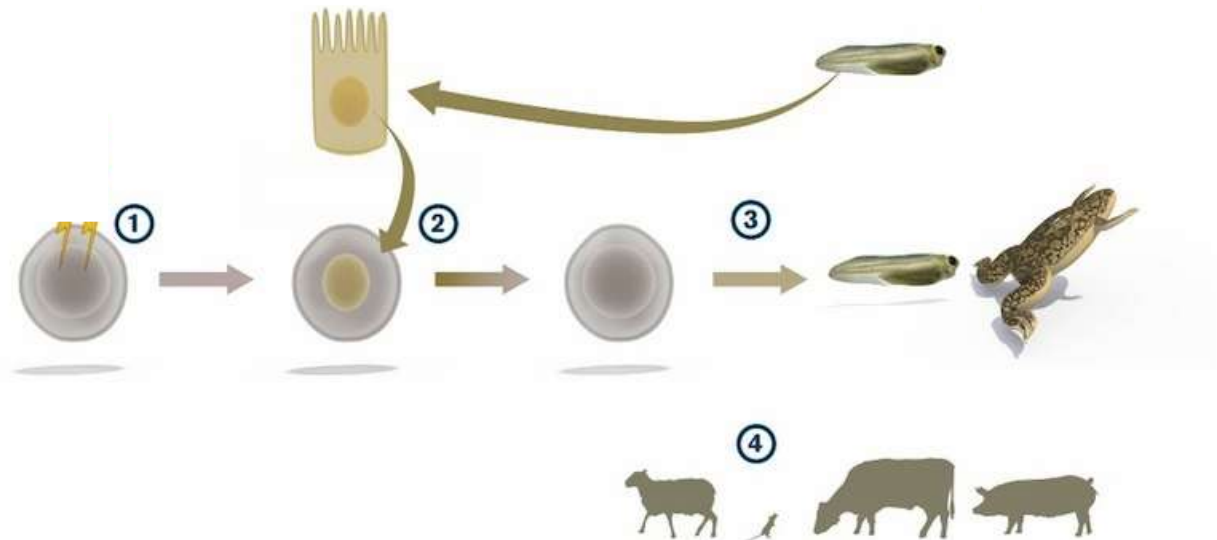
Shinya Yamanaka

Prix Nobel de médecine 2012

1962



John B. Gurdon

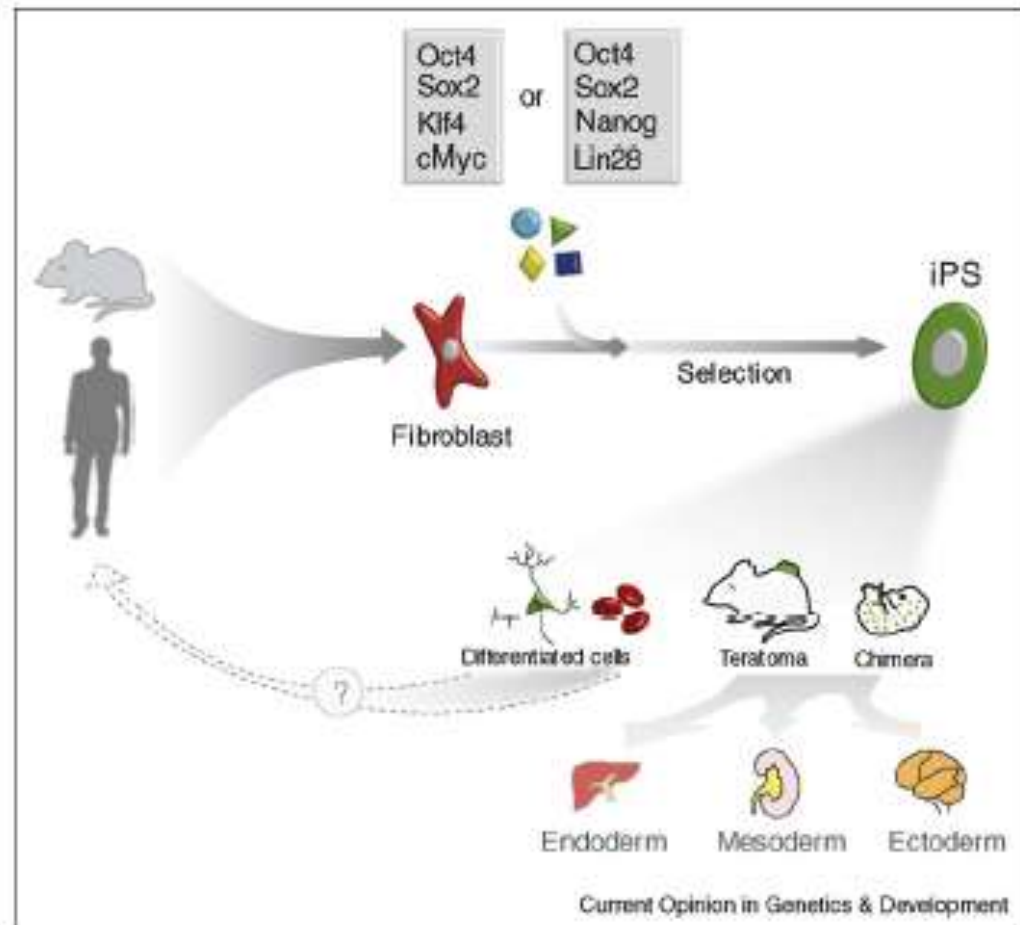


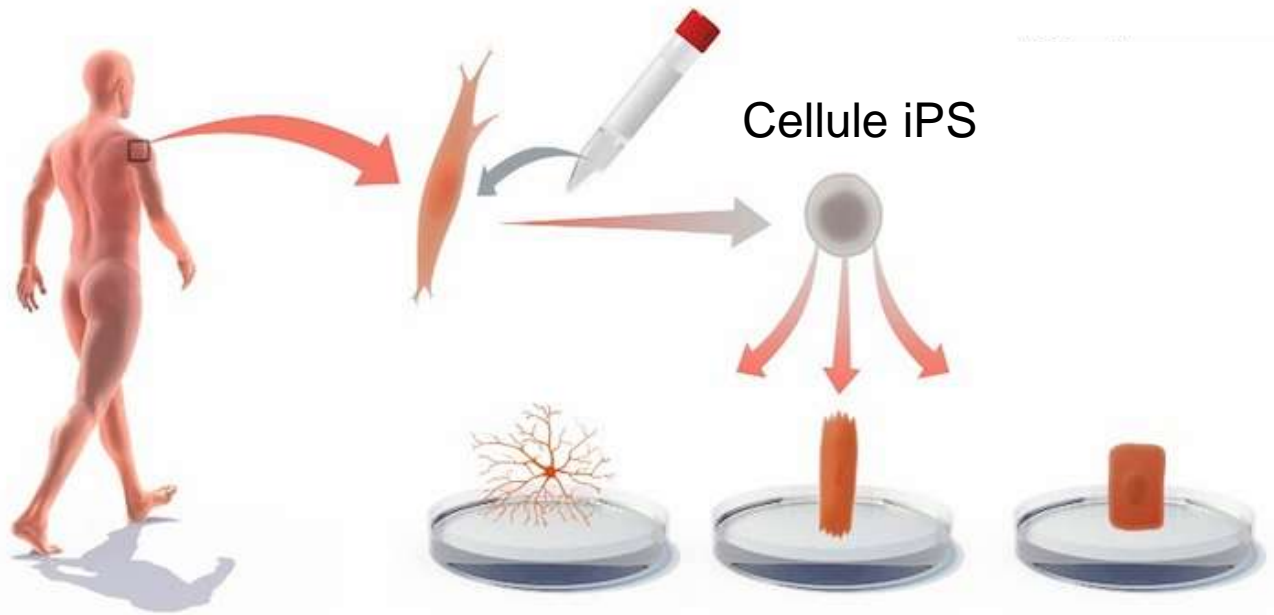


2006

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

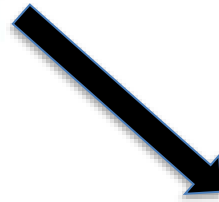
IPS: Cellules Pluripotentes Induites





Comment faire entrer de l'ADN dans les cellules

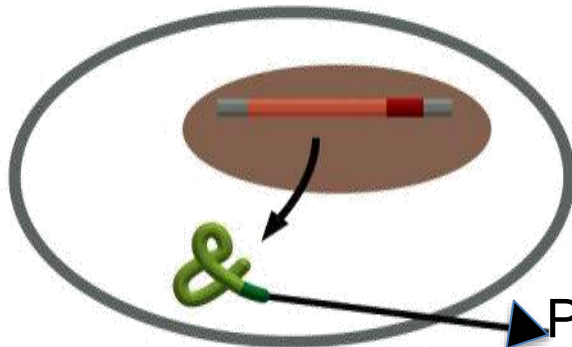
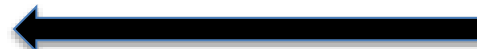
ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm de la protéine d'intérêt



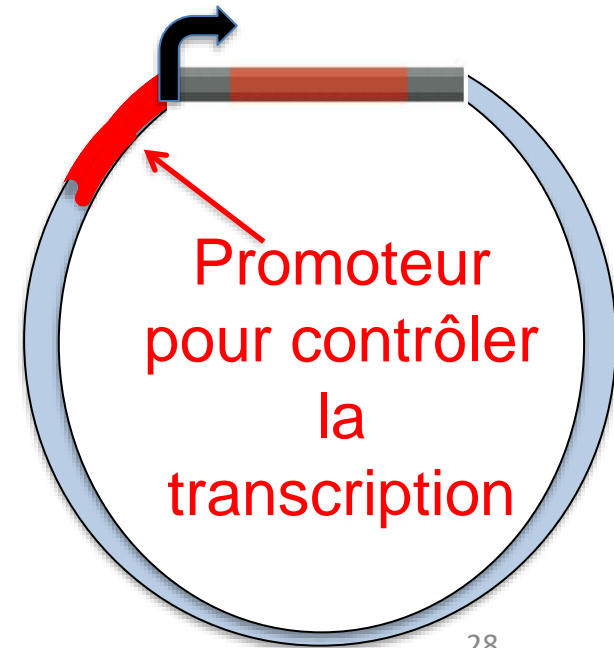
Vecteur d'expression

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

**INTRODUCTION
DANS LA CELLULE**

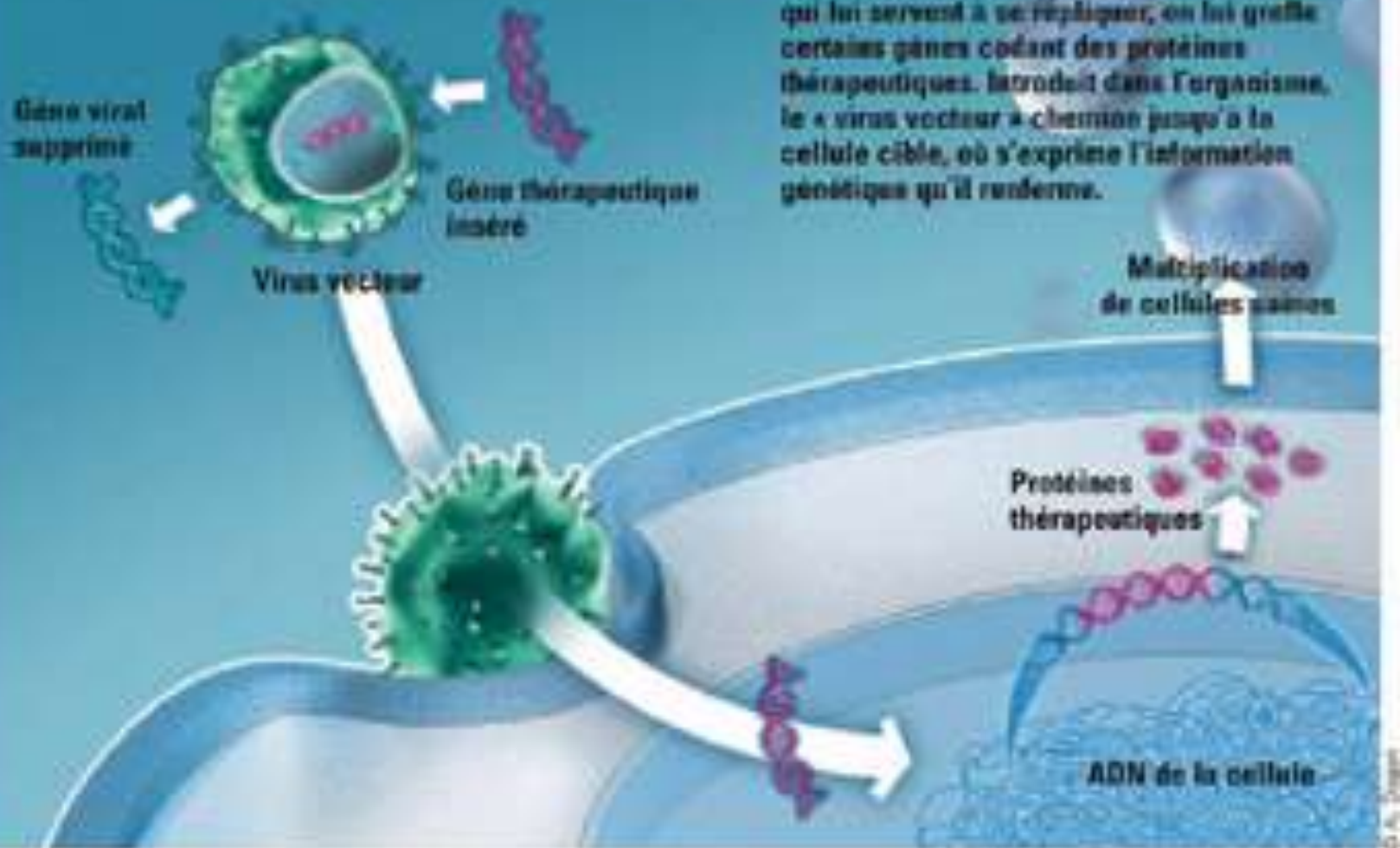


Protéine codée par
l'ADN mis dans le
Vecteur d'expression

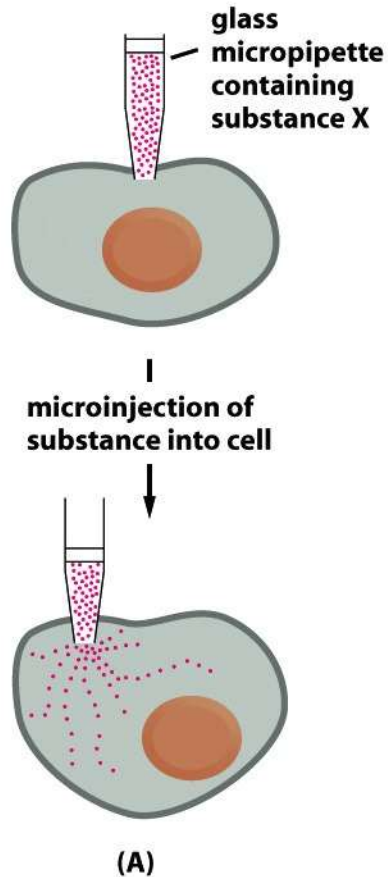


DES VIRUS TRANSFORMÉS EN TAXIS

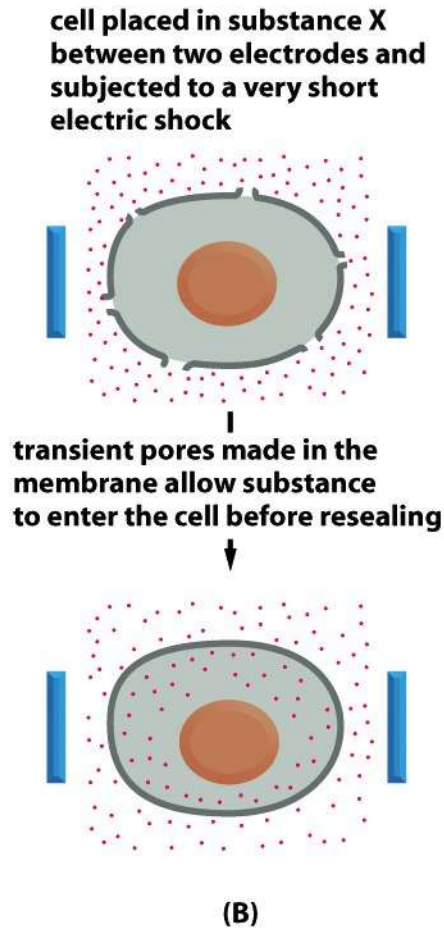
Après avoir dépouillé un virus des gènes qui lui servent à se répliquer, on lui greffe certains gènes codant des protéines thérapeutiques. Introduit dans l'organisme, le « virus vecteur » chemine jusqu'à la cellule cible, où s'exprime l'information génétique qu'il renferme.



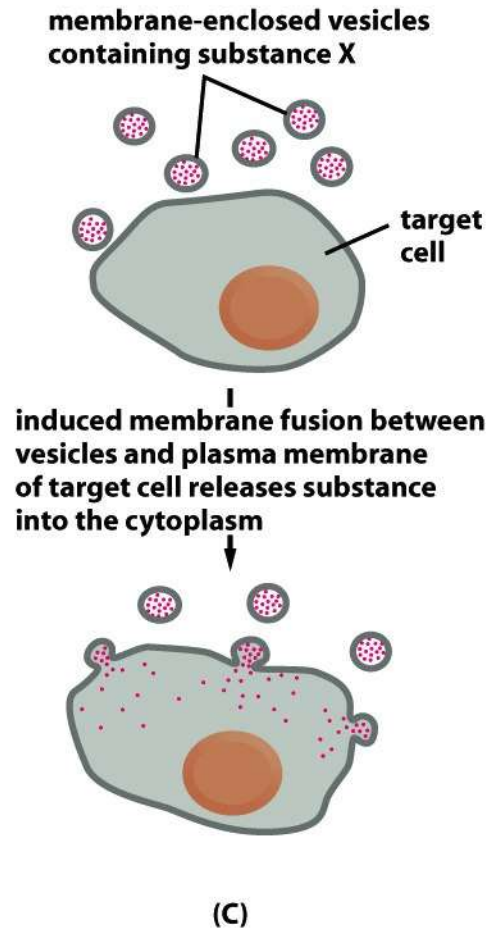
microinjection



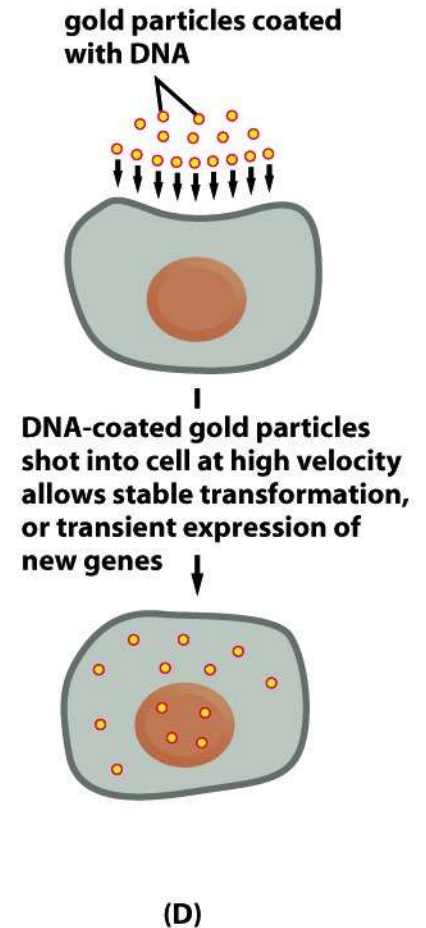
electroporation



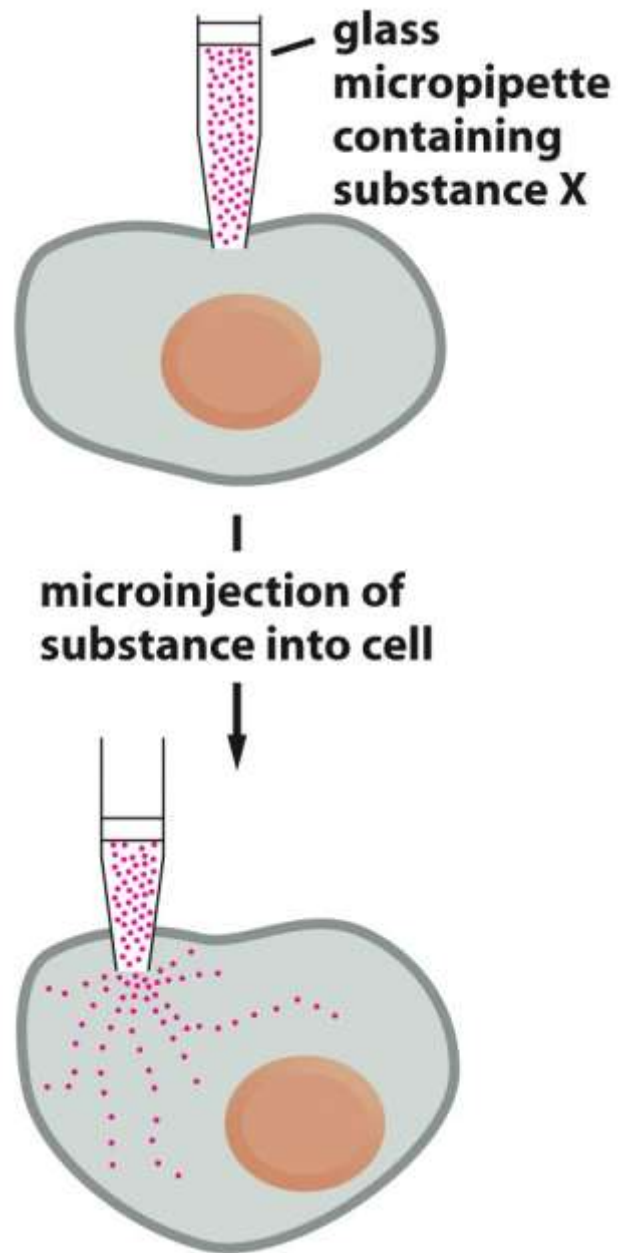
lipofection



Shotgun et magnetofection

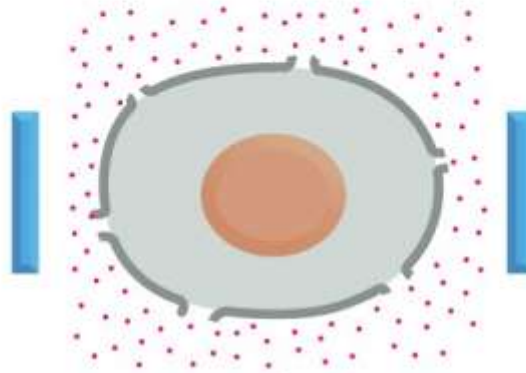


Microinjection

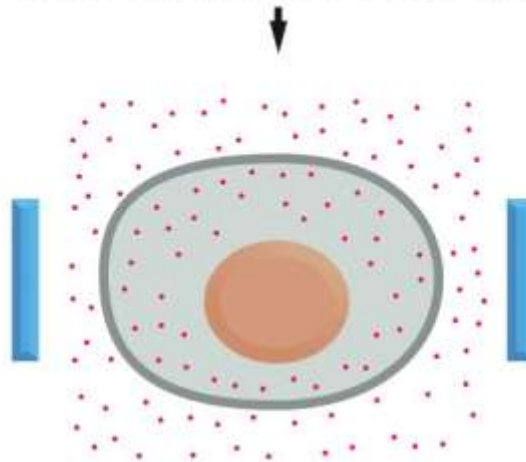


Electroporation

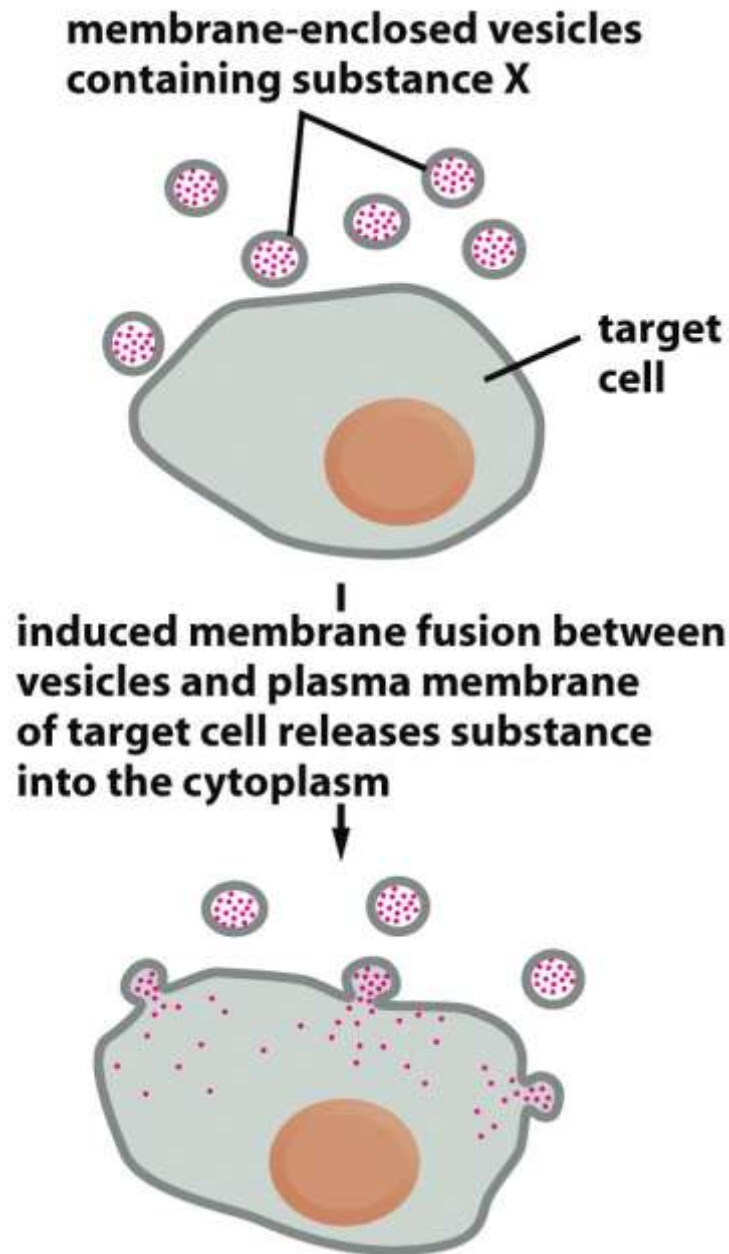
cell placed in substance X
between two electrodes and
subjected to a very short
electric shock



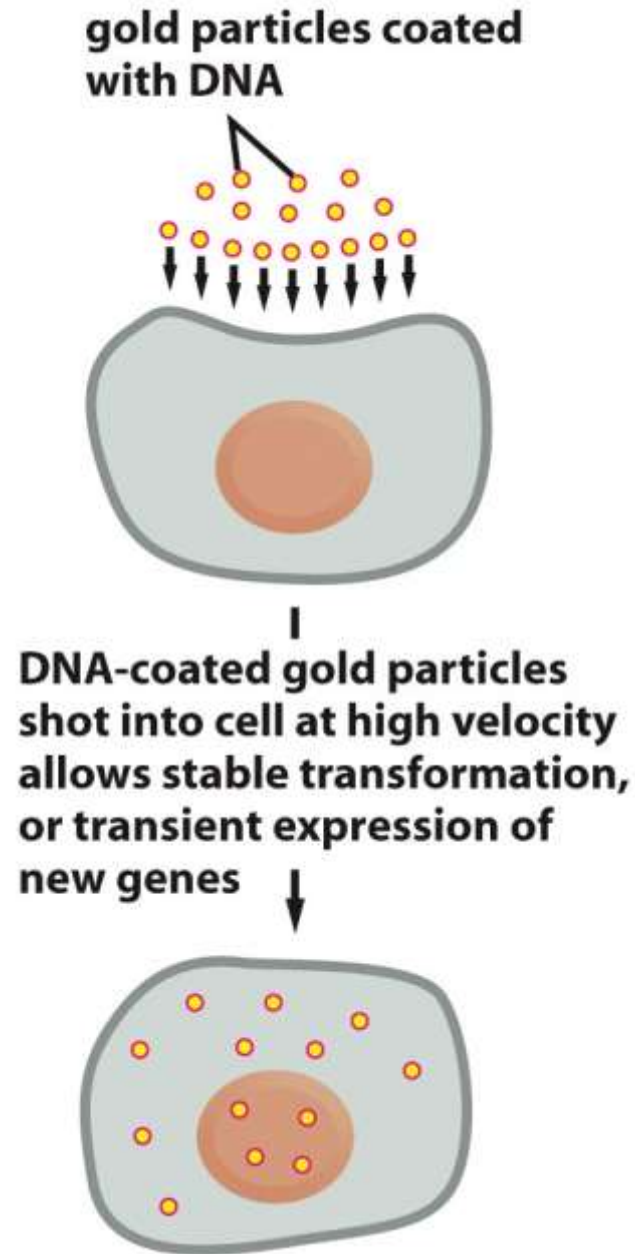
transient pores made in the
membrane allow substance
to enter the cell before resealing



Lipofection



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



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:

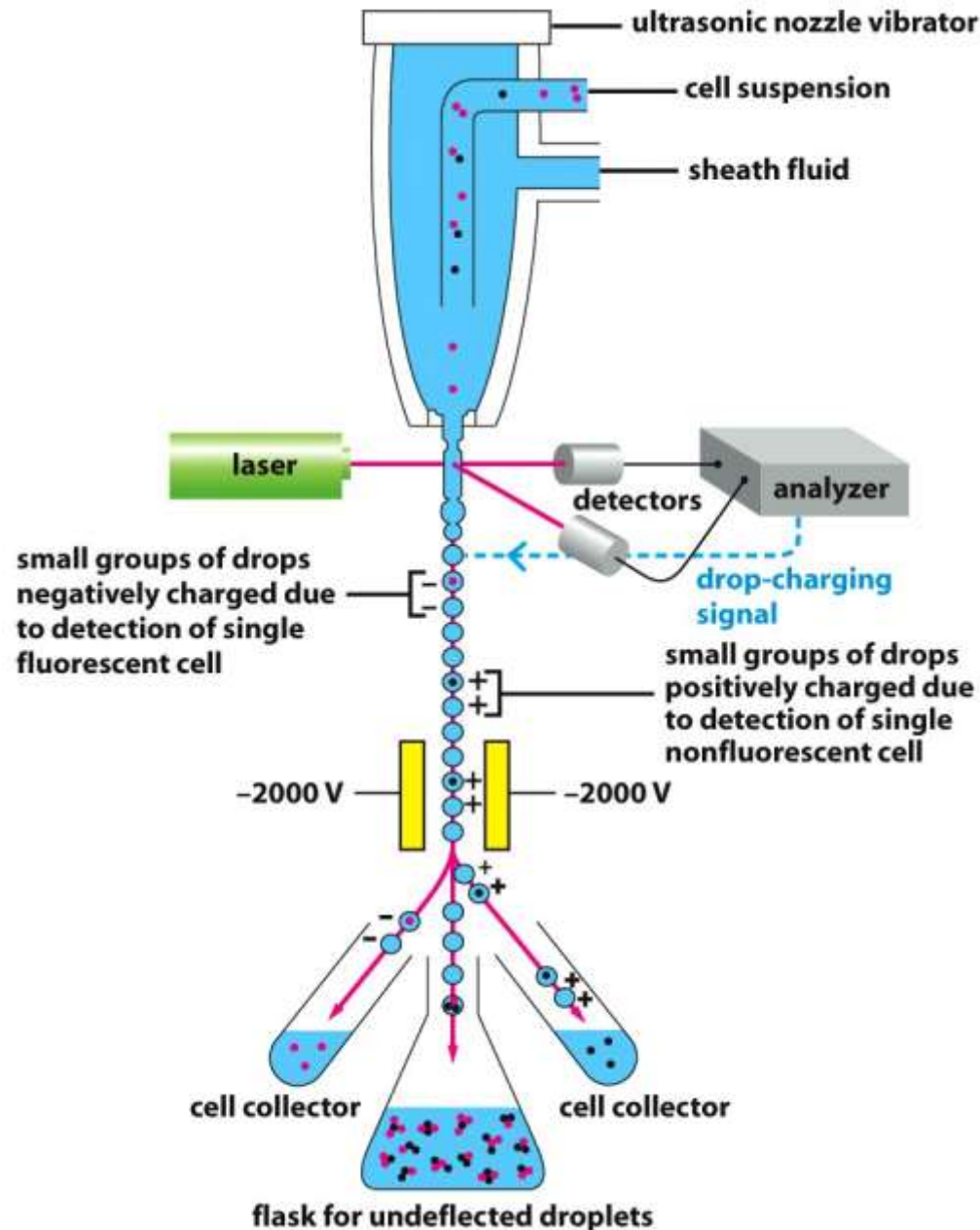
- On peut utiliser des vecteurs qui se répliquent et ne se perdent pas au fil des divisions cellulaires
- Il est plus facile de produire de l'ADN que des protéines
- On ne connaît pas forcément toutes les modifications posttraductionnelles qu'il faut apporter à une protéine pour qu'elle soit fonctionnelle

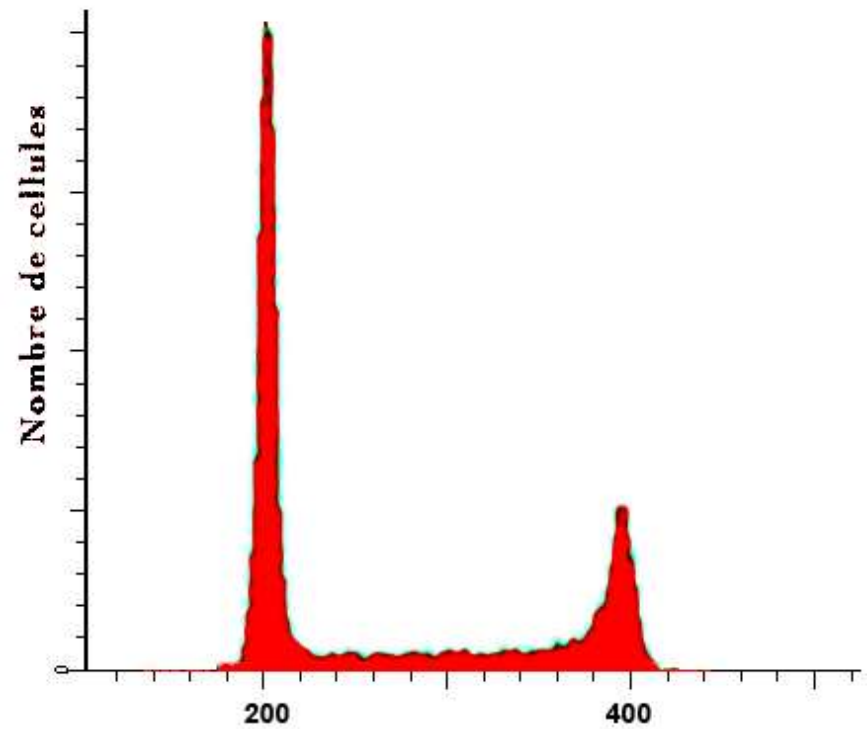
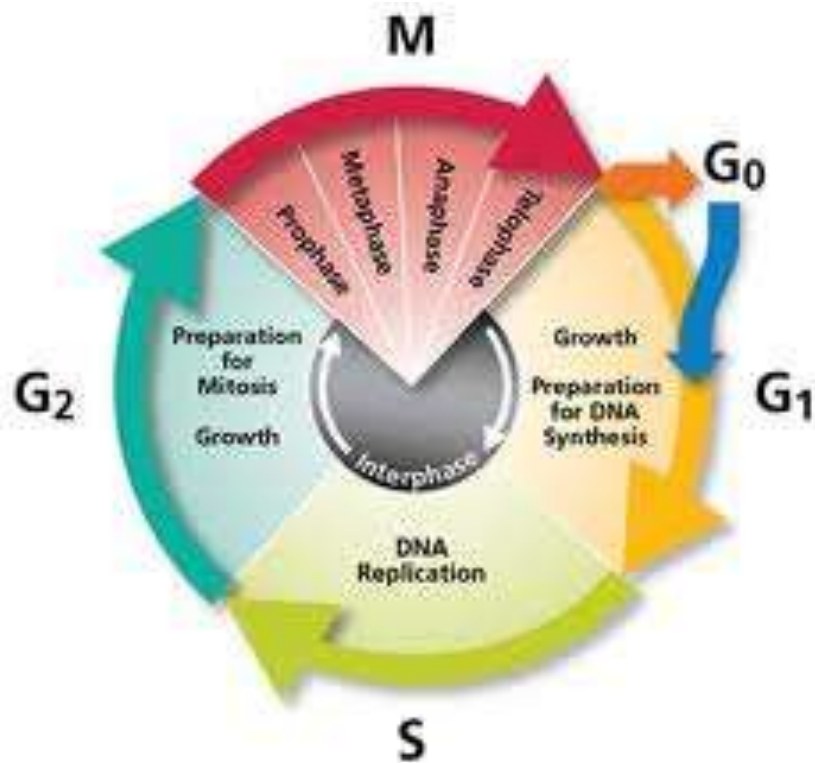
2. Méthodes de séparation

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

2. Méthodes de séparation

a. Cellulaire: la cytométrie de flux





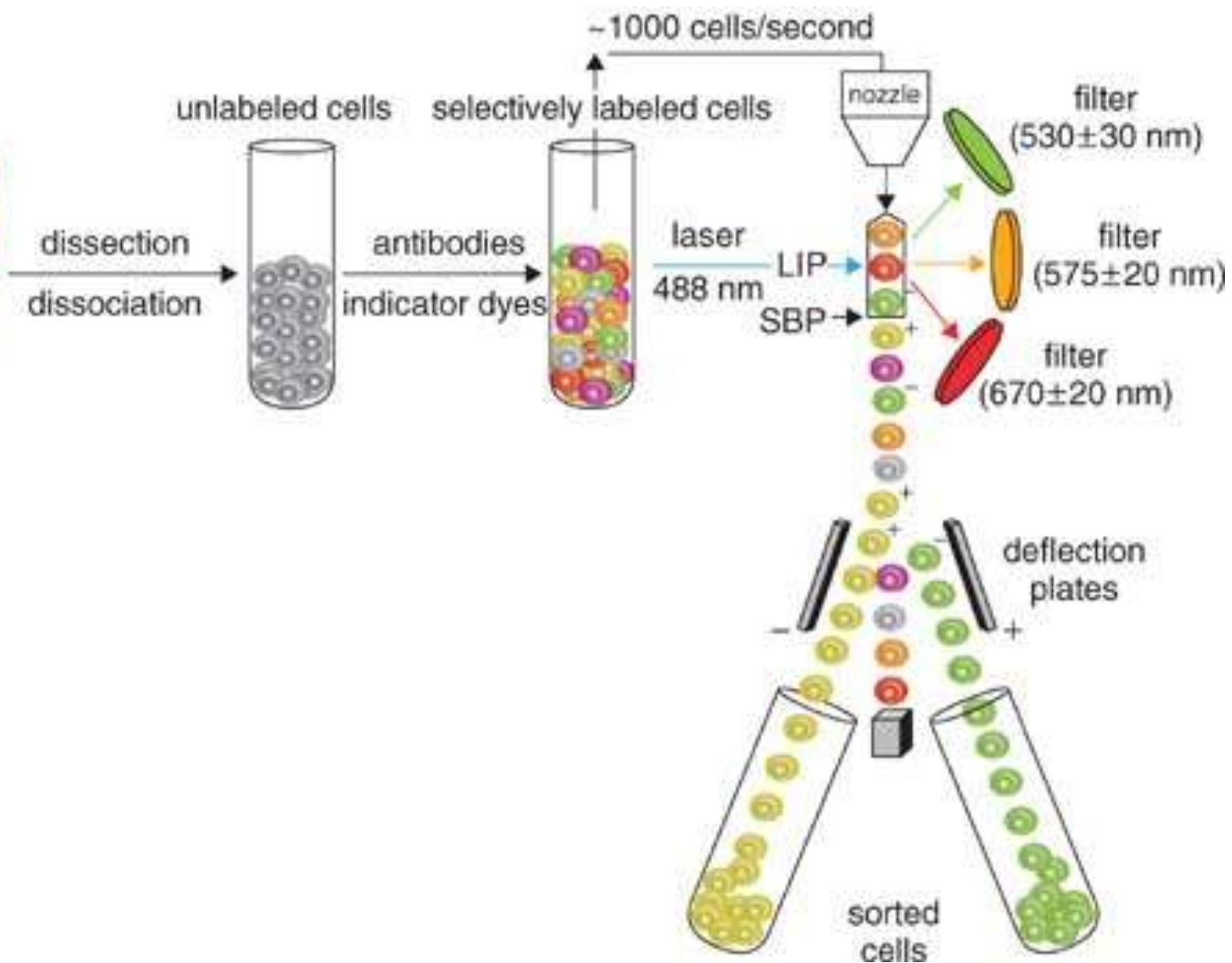
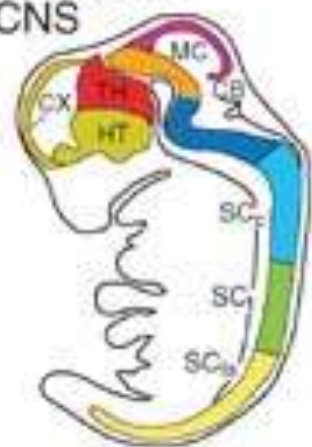
Fluorescence = quantité d'ADN

G₀/G₁

S

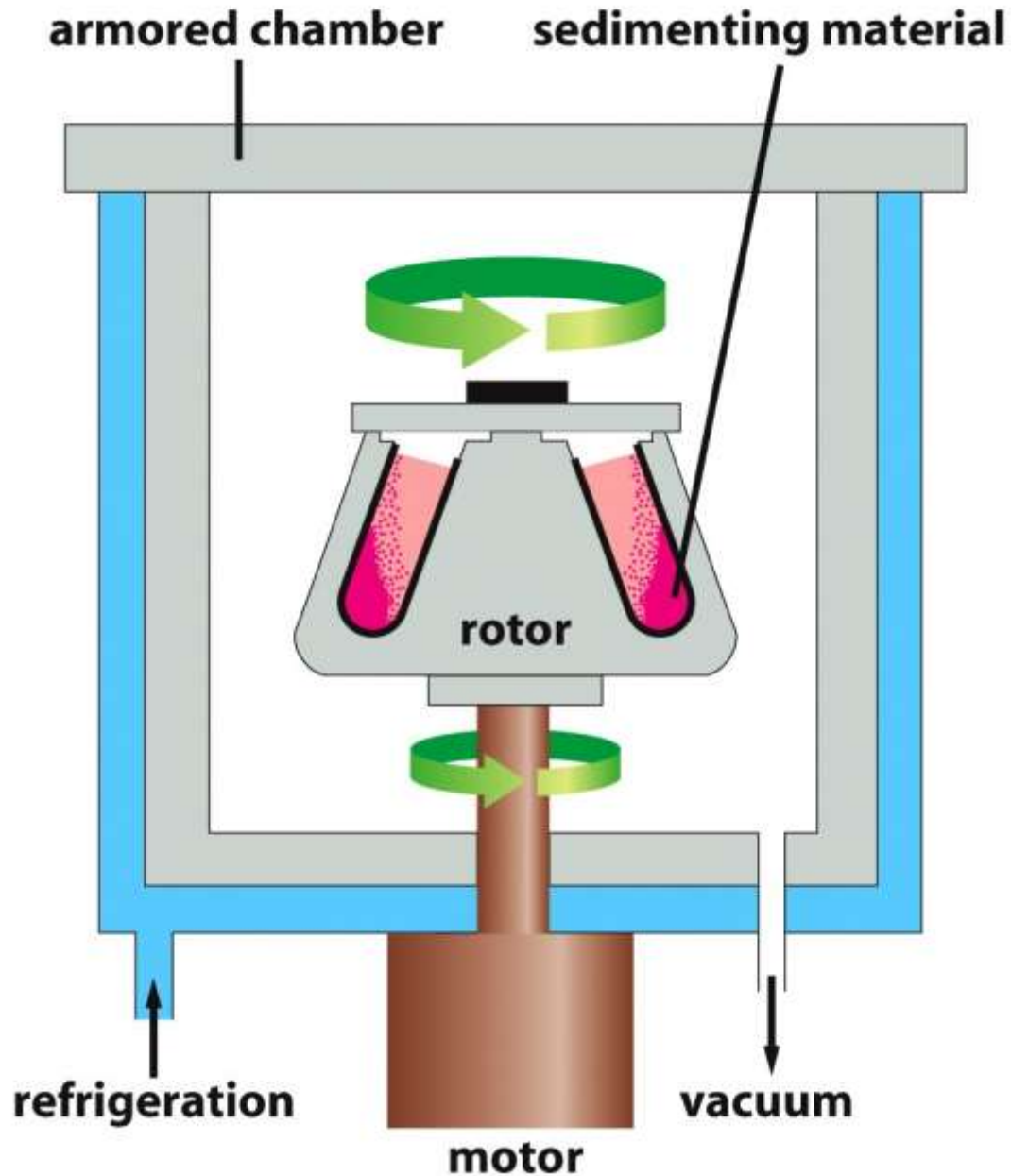
G₂/M

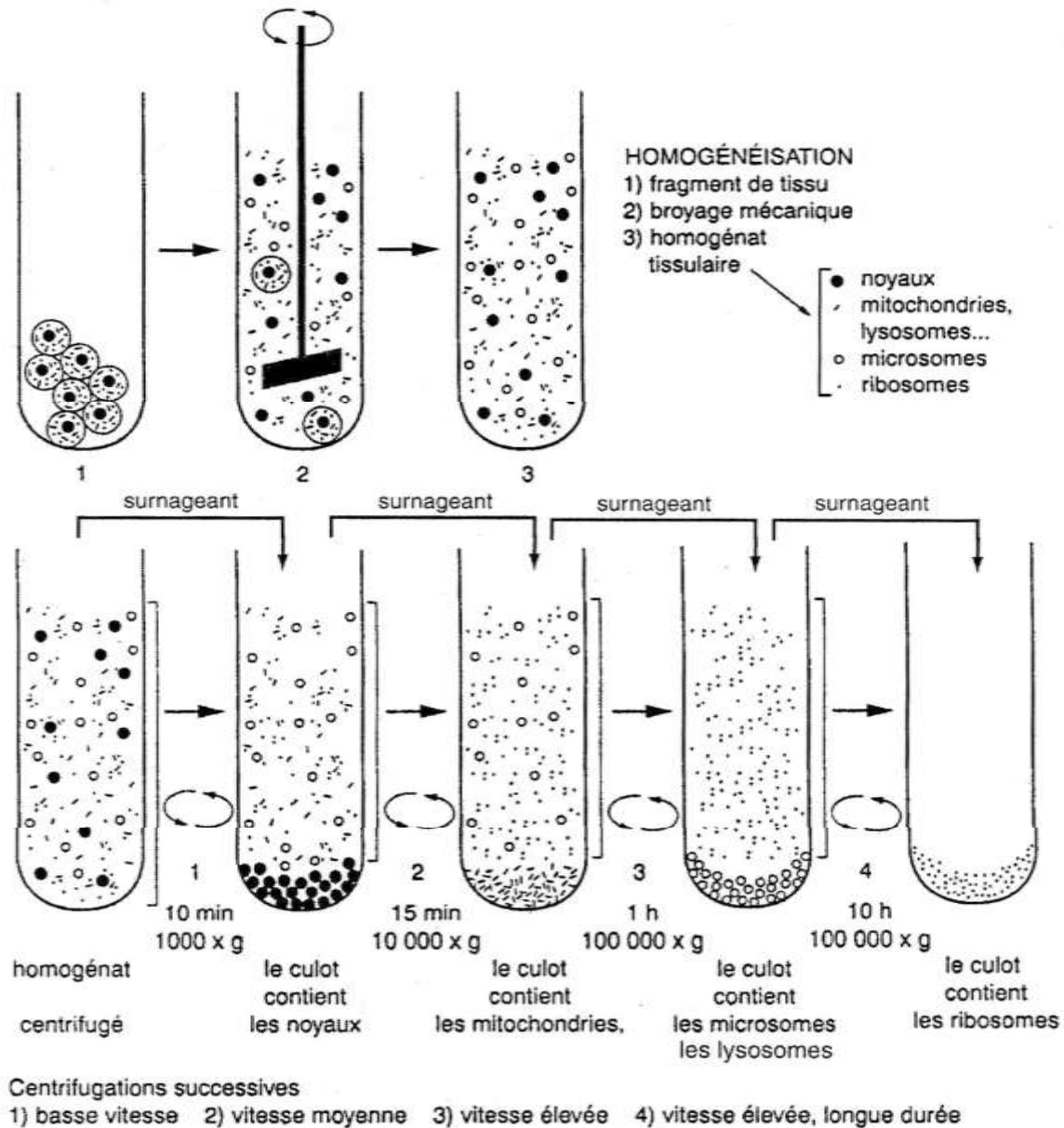
embryonic
CNS



2. Méthodes de séparation

b. Subcellulaire: la centrifugation



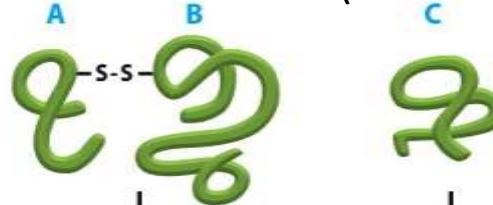


Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

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

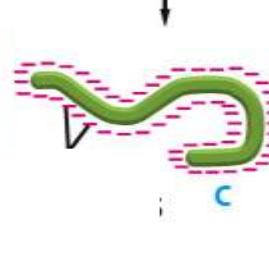
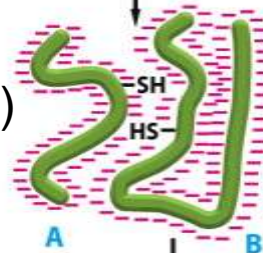
Protéine à deux sous unités
(dimérique) liées par un pont disulfure

Protéine à une sous unité
(monomérique)



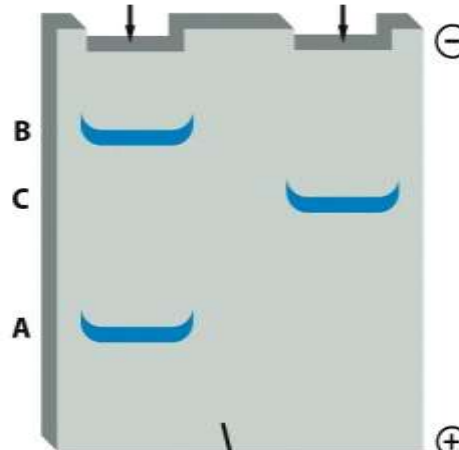
Chauffage en présence de SDS et de mercaptoéthanol

(SDS: dodécylsulfate de sodium)



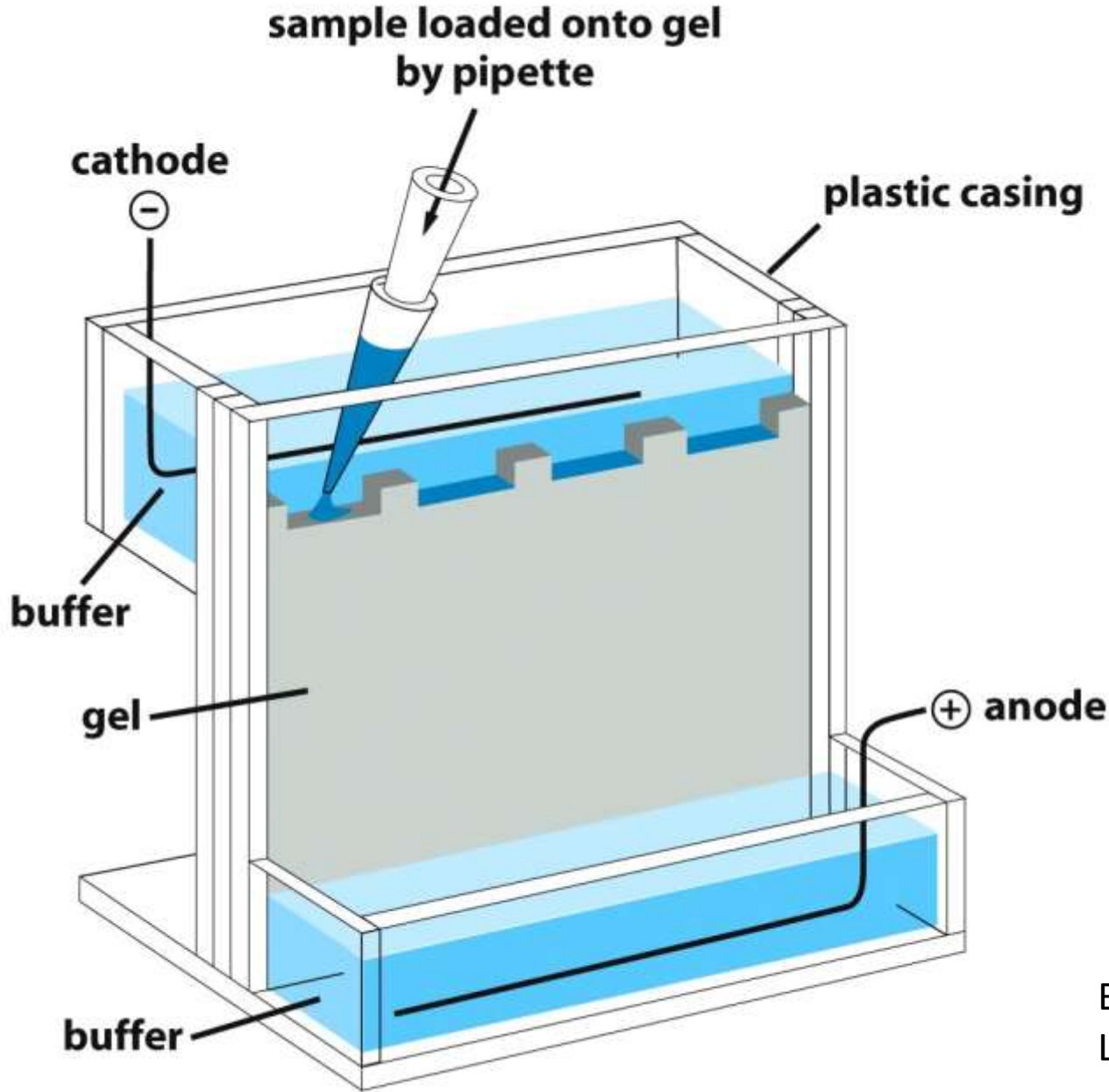
Protéines chargées négativement
grâce au SDS

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:

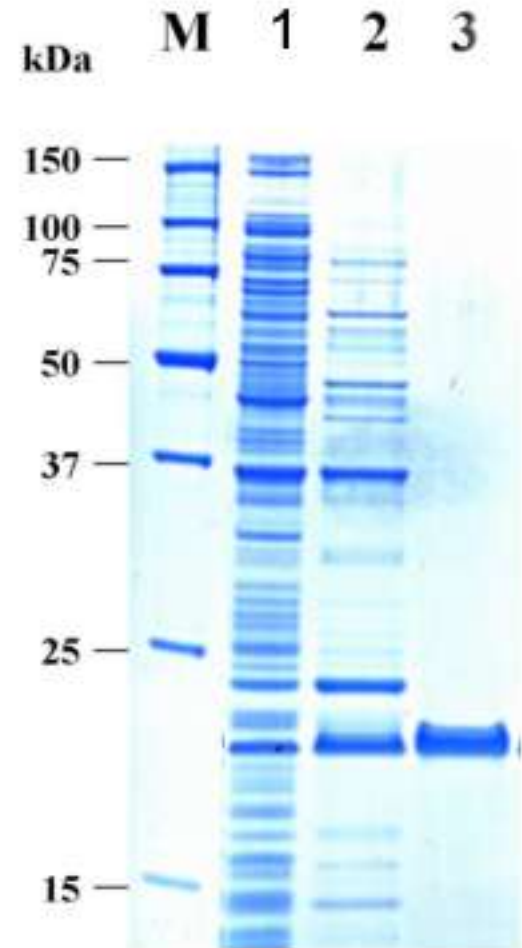
1-3: étapes de la purification d'une protéine:

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)

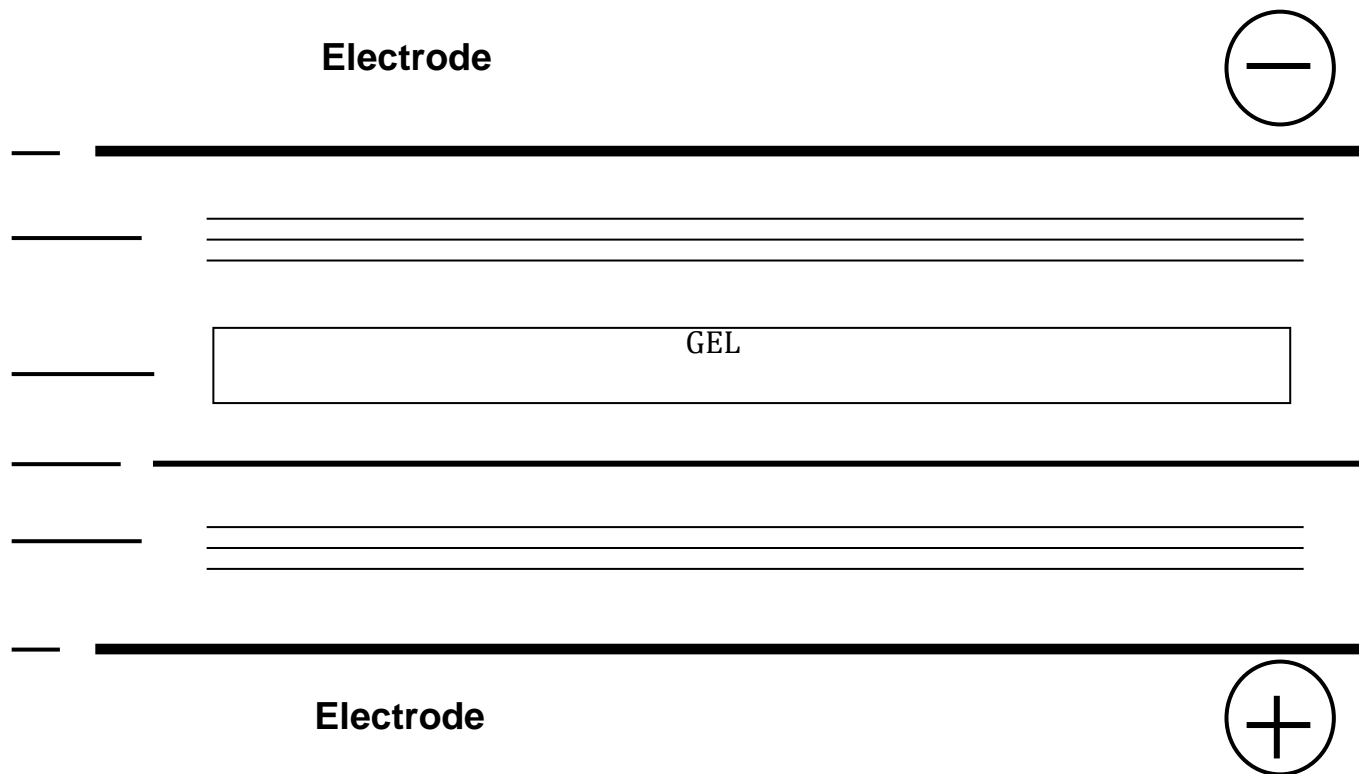


1 Dalton = 1/12 de la masse d'un atome de ^{12}C

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

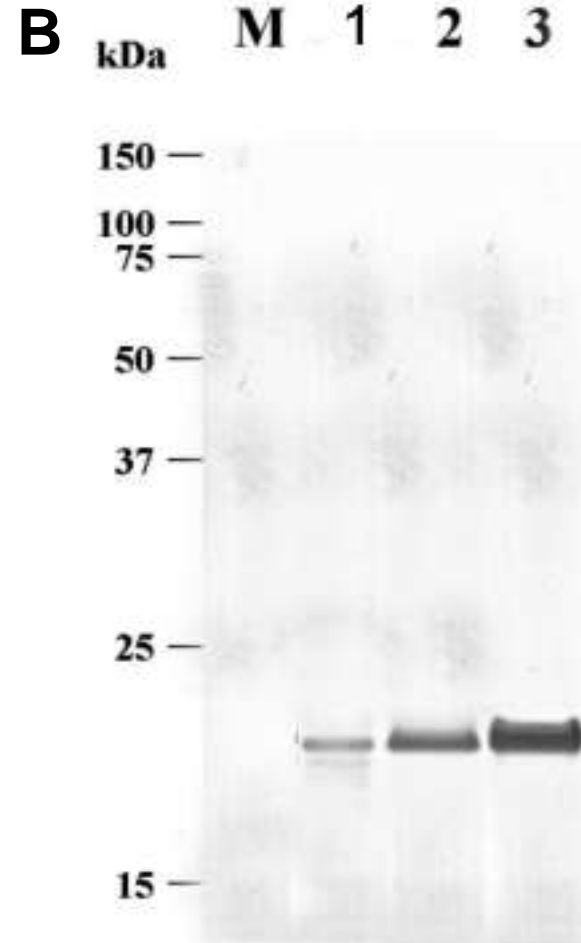
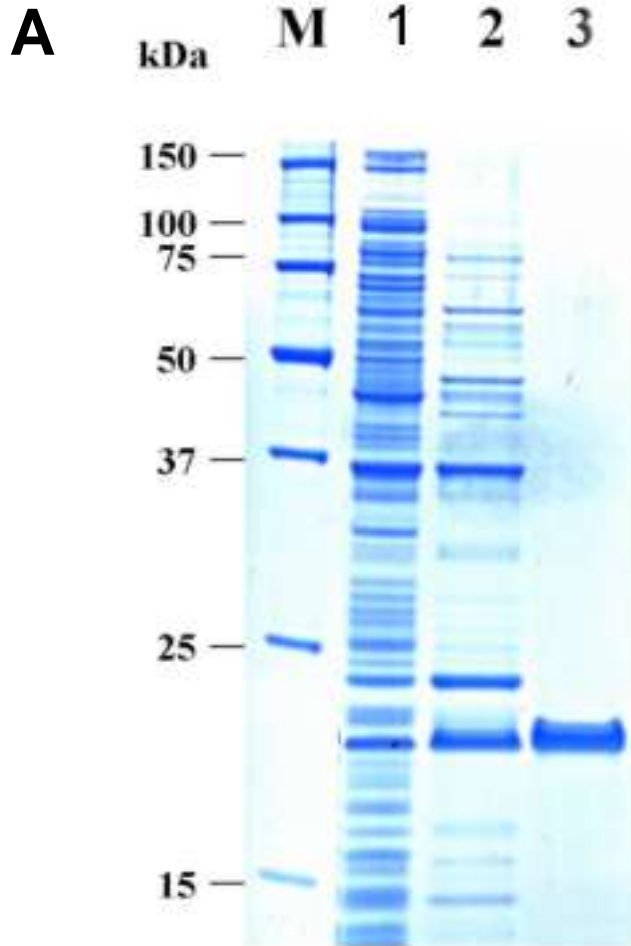
Electrotransfert des protéines sur membrane

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

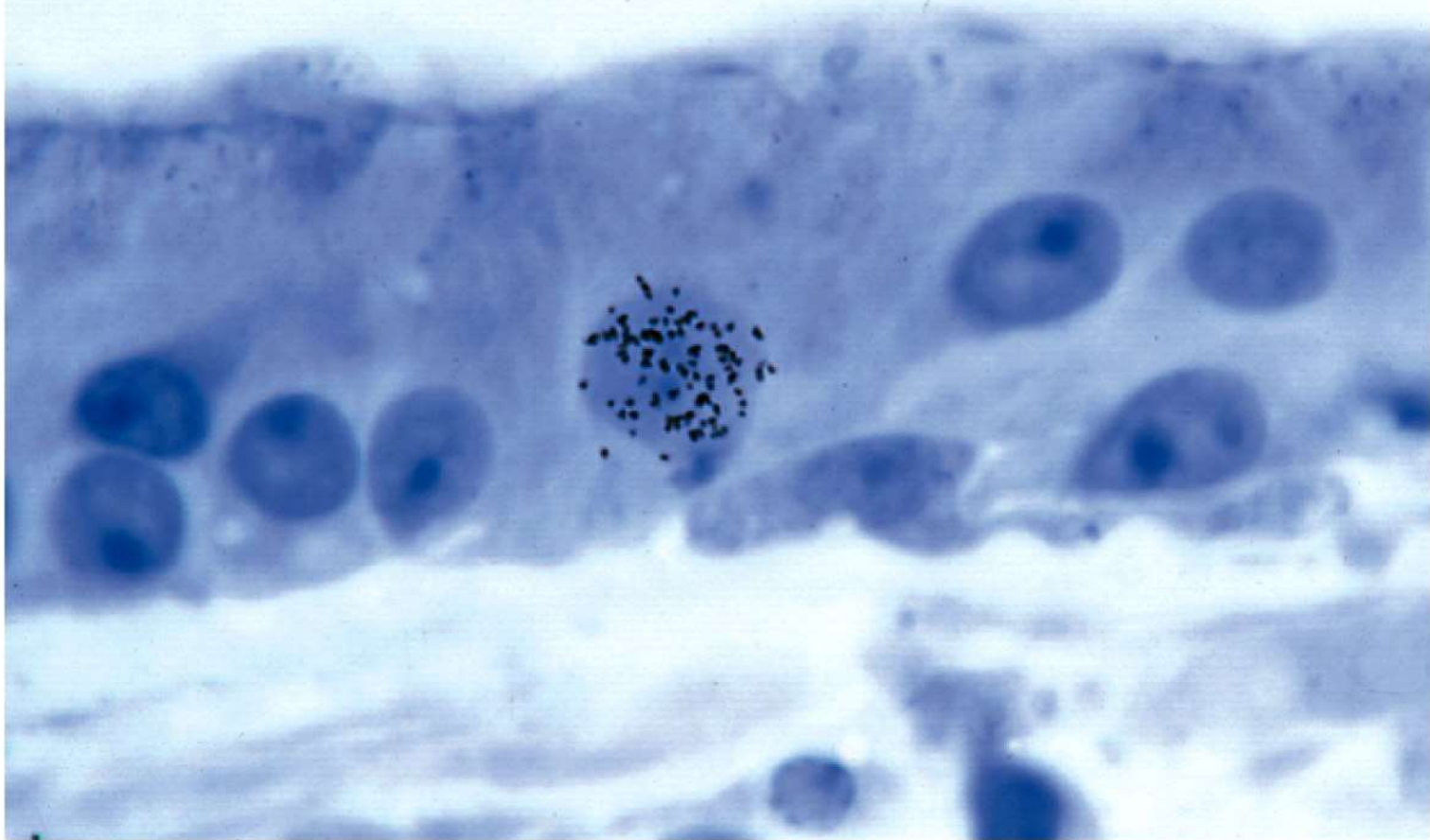
ISOTOPE	HALF-LIFE
^{32}P	14 days
^{131}I	8.1 days
^{35}S	87 days
^{14}C	5570 years
^{45}Ca	164 days
^3H	12.3 years

A retenir:

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

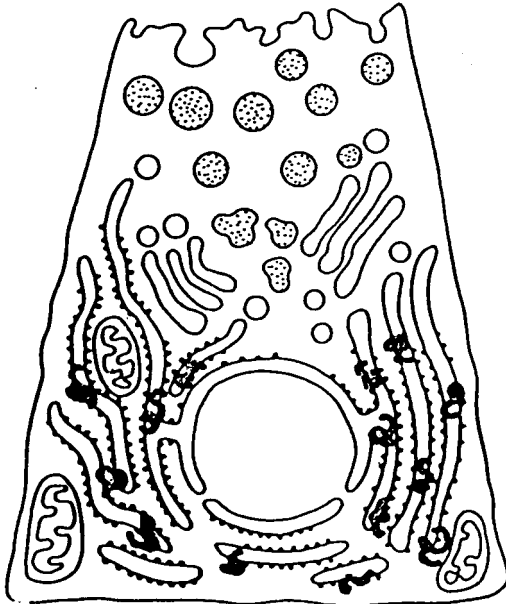
Le soufre radioactif permet surtout de marquer les acides aminés soufrés et donc les protéines

Incorporation de thymidine tritiée dans une cellule en phase S



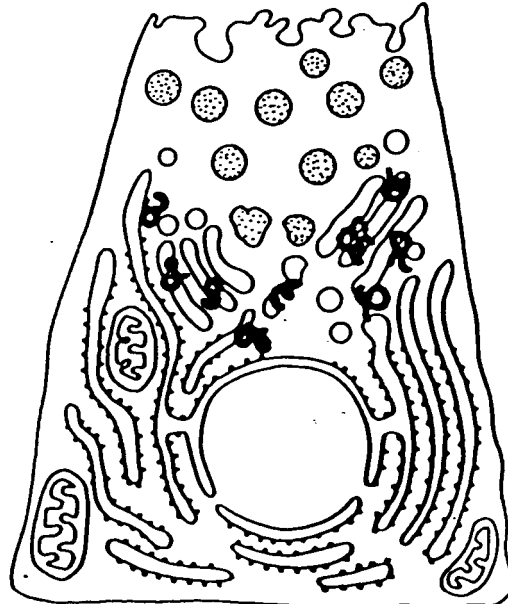
20 μm

Pulse-chase



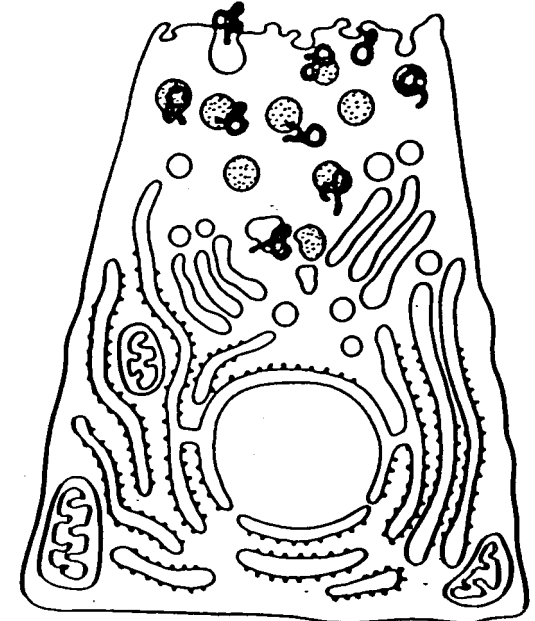
3 minutes

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

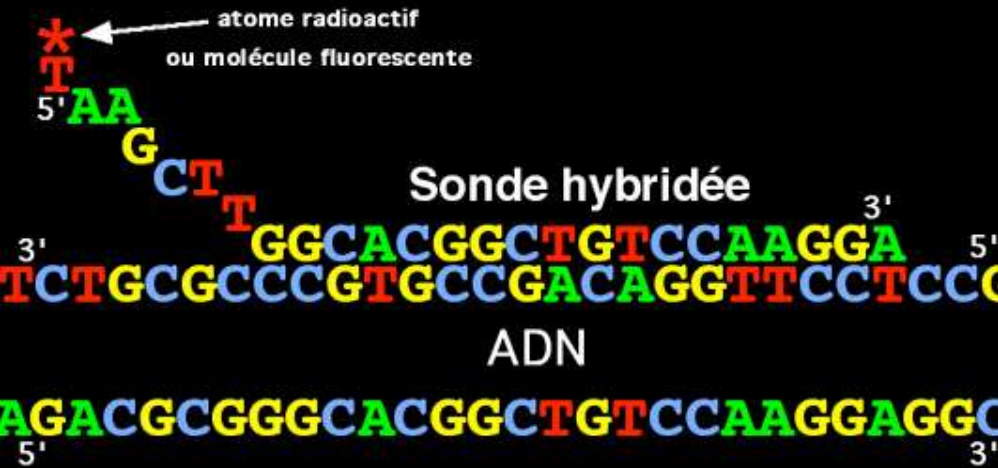
Pulse : Cysteine ^{-35}S

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

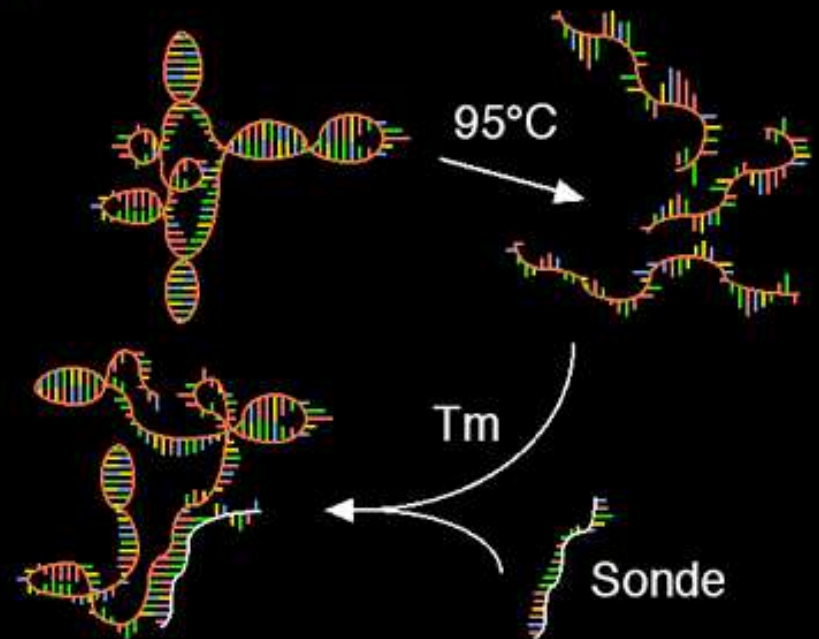


Liaison de Nicotine ³H sur des tranches de cerveau

Hybridation in situ d'acides nucléiques

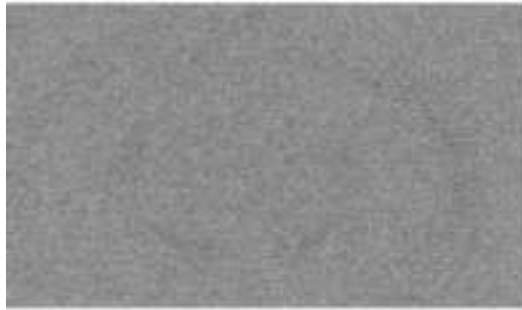


Hybridation d'une sonde



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

$\alpha 2$



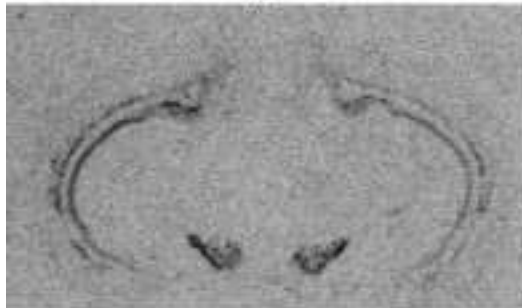
$\alpha 3$



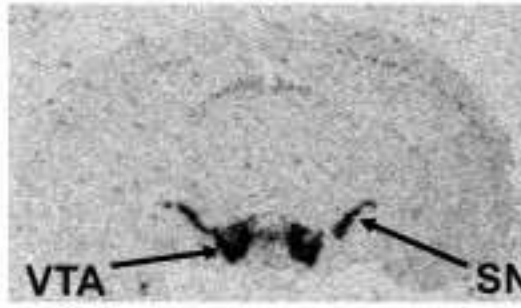
$\alpha 4$



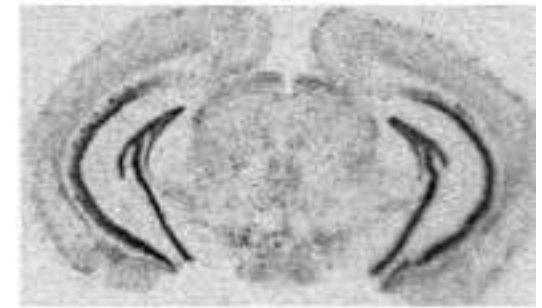
$\alpha 5$



$\alpha 6$



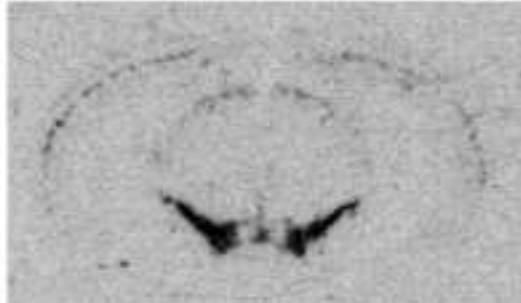
$\alpha 7$



$\beta 2$



$\beta 3$

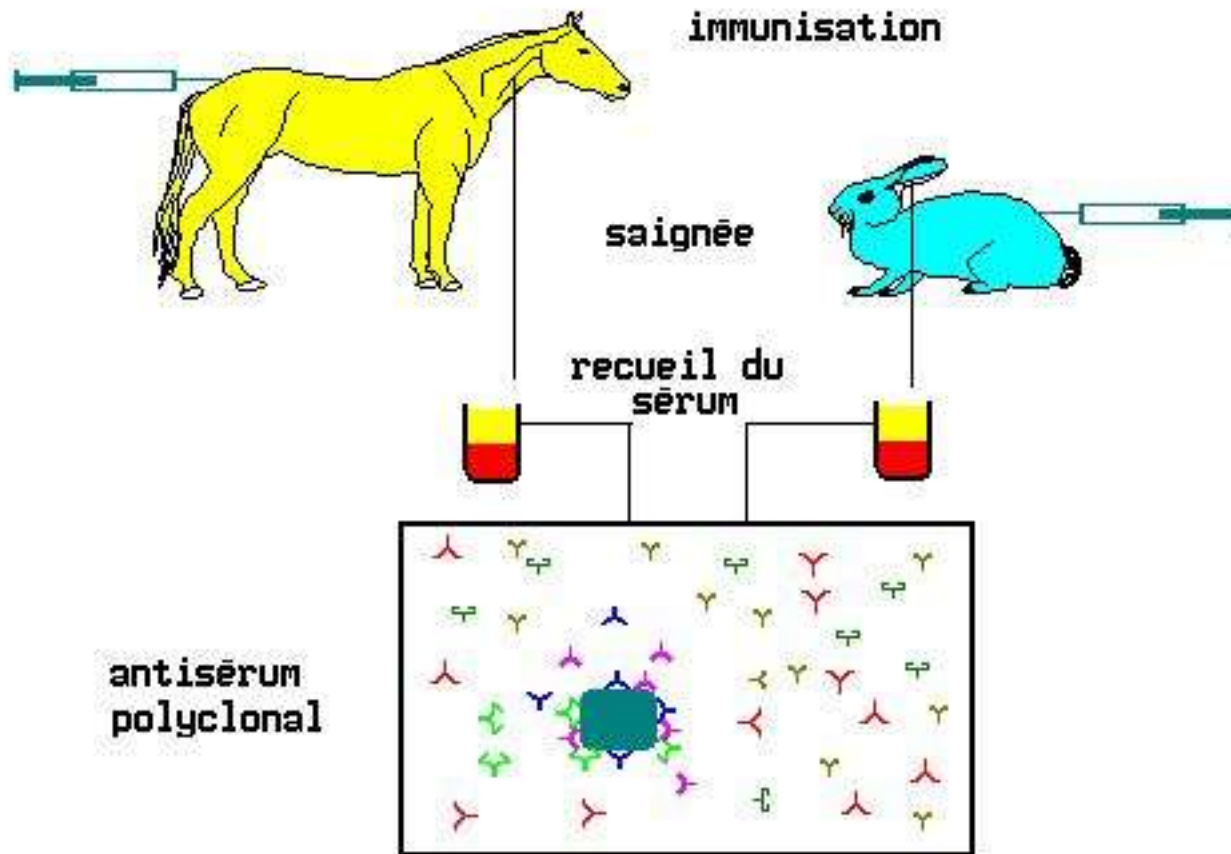


$\beta 4$



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

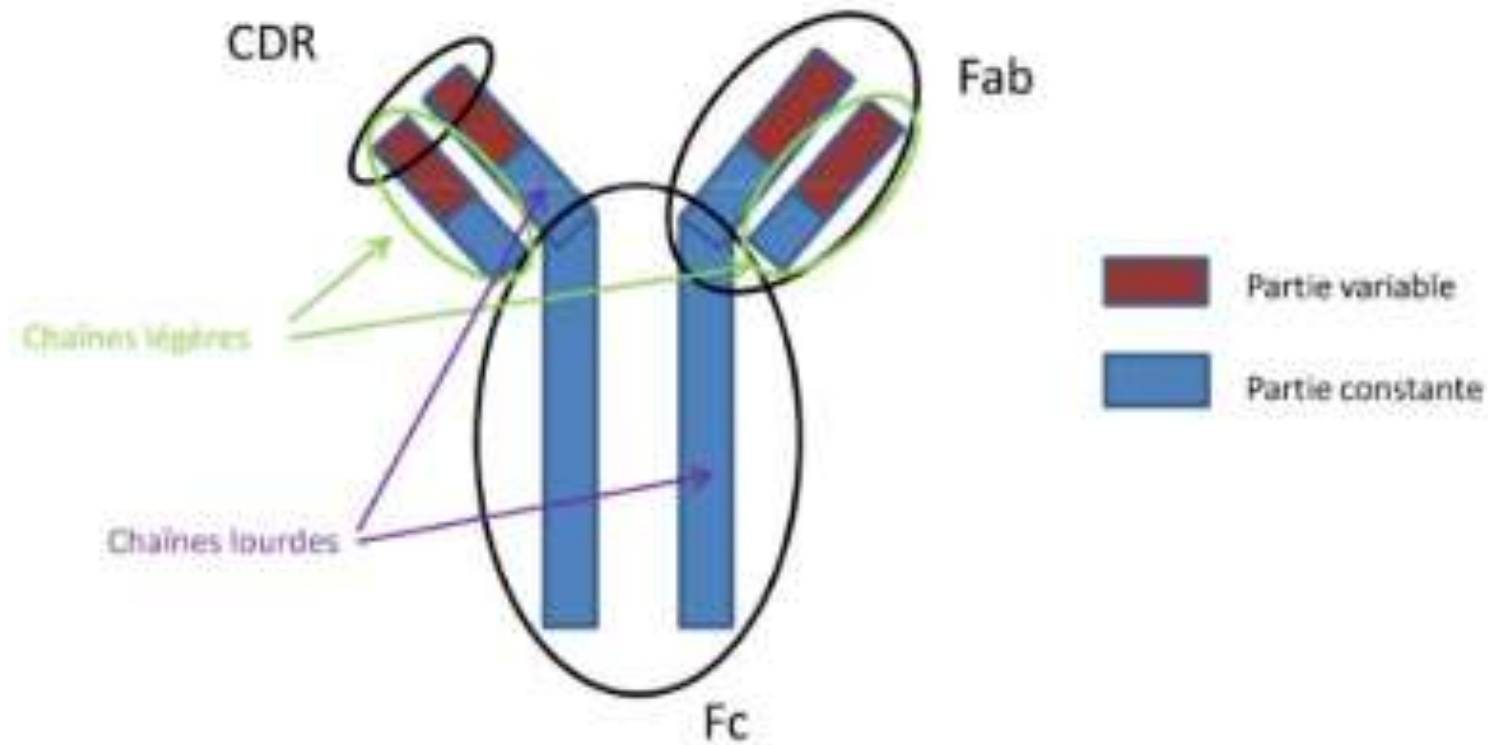
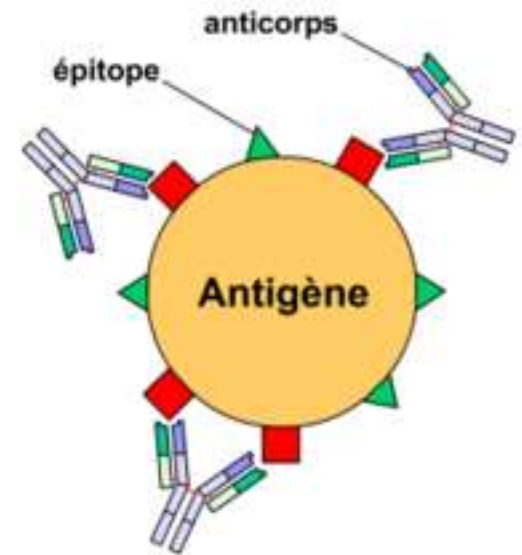
b. Les anticorps



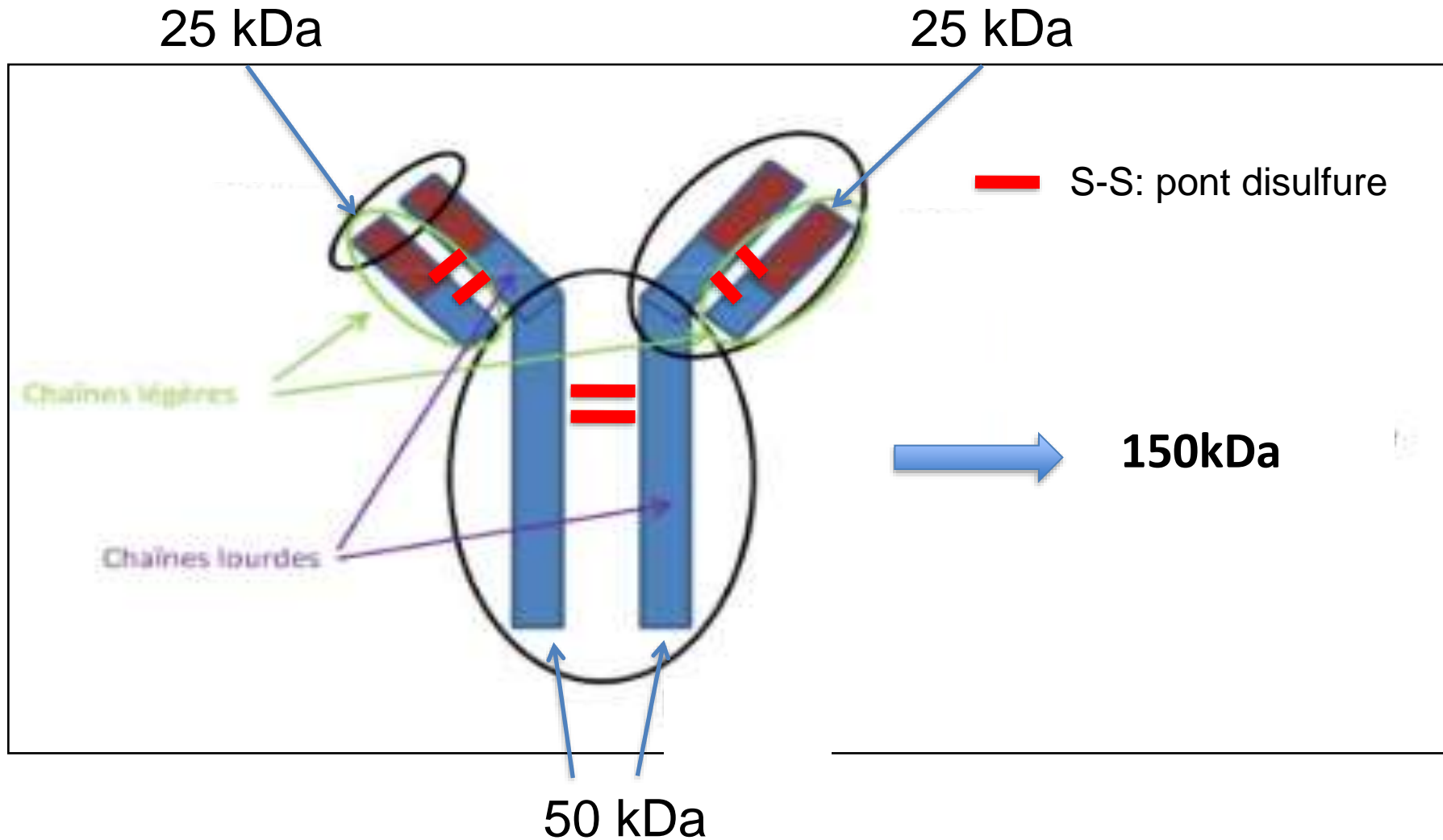
Structures des anticorps

AC Polyclonale, plusieurs anticorps, plusieurs épitopes

AC Monoclonale, 1 anticorps, 1 épitope



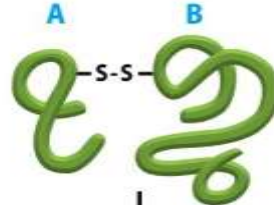
Les chaînes polypeptidiques des anticorps sont liées par des ponts disulfure



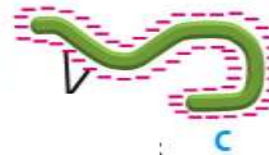
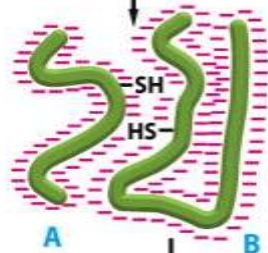
Séparation des protéines en fonction de leur taille sur gel de polyacrylamide

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

Protéine à une sous unité
(monomérique)

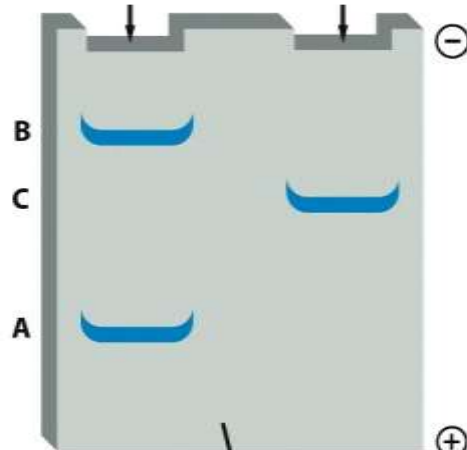


Chauffage en présence de SDS et de mercaptoéthanol



Protéines chargées négativement
grâce au SDS

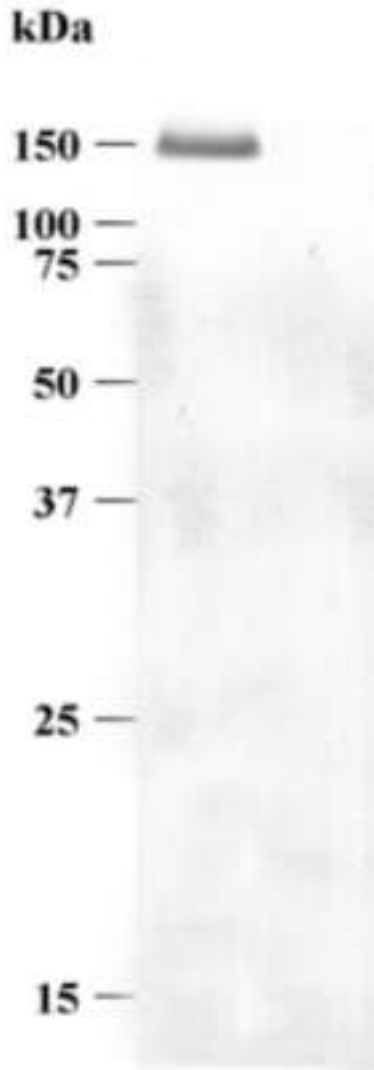
Electrophorèse sur gel de polyacrylamide



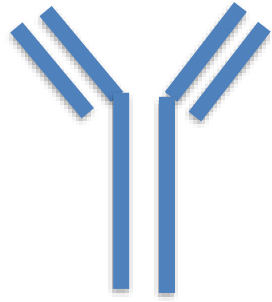
Gel de polyacrylamide

SDS-PAGE avec des anticorps

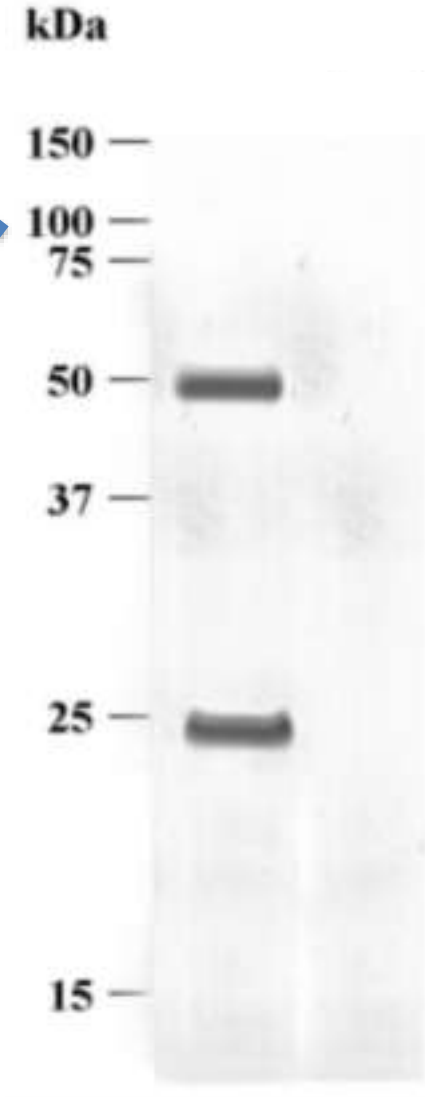
Sans agent réducteur



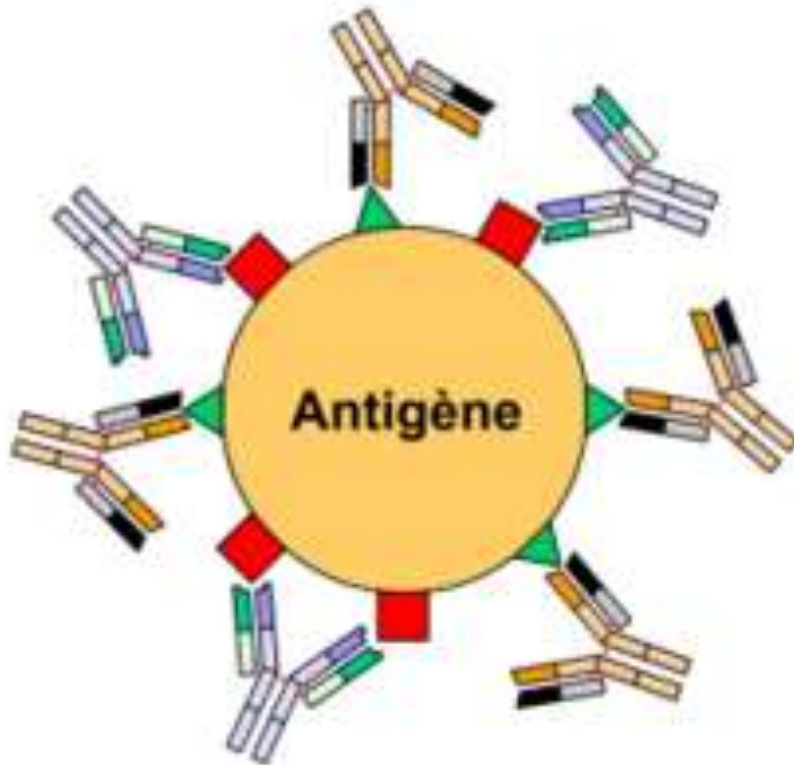
150kDa
(2x50 + 2x25)



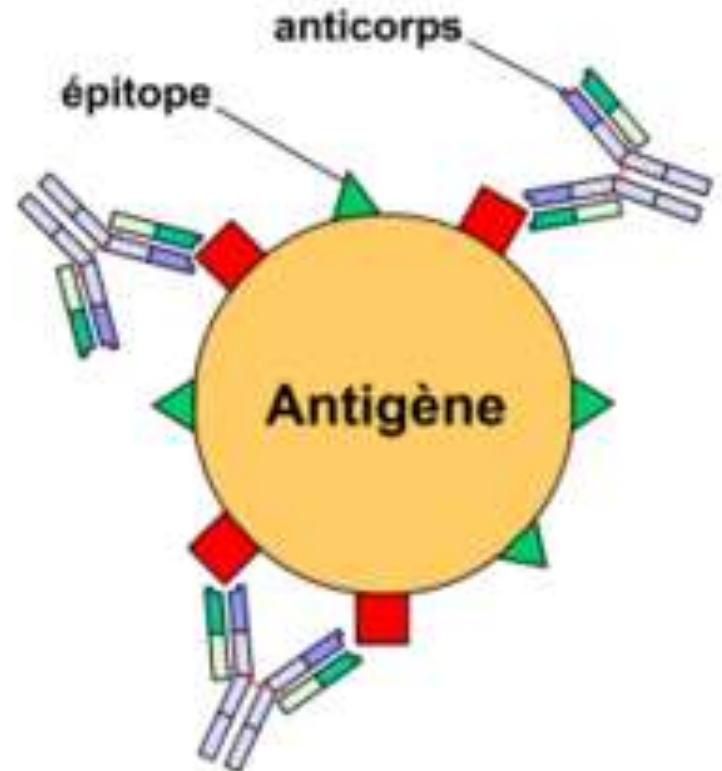
Avec agent réducteur



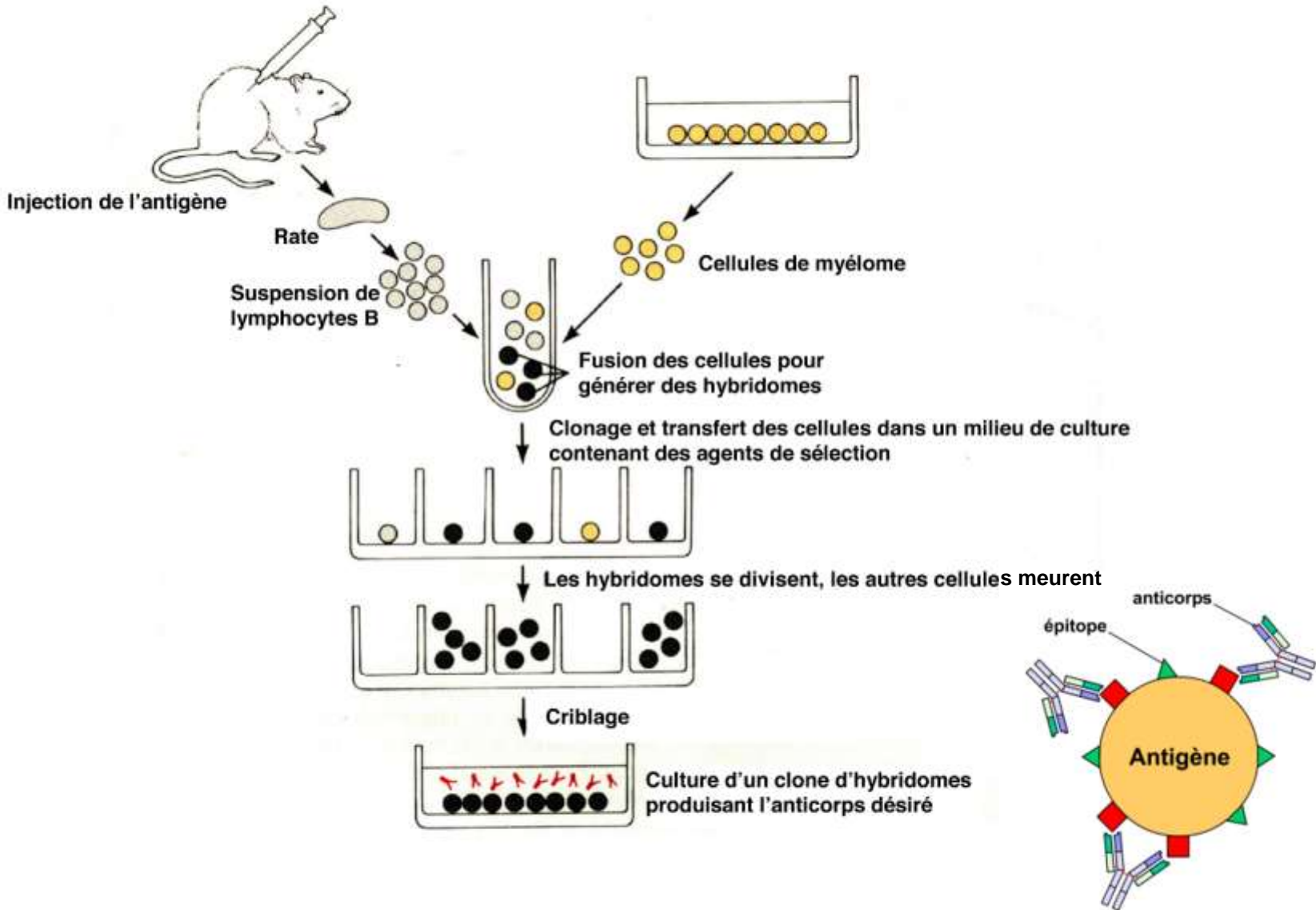
Serum polyclonal



Anticorps monoclonaux

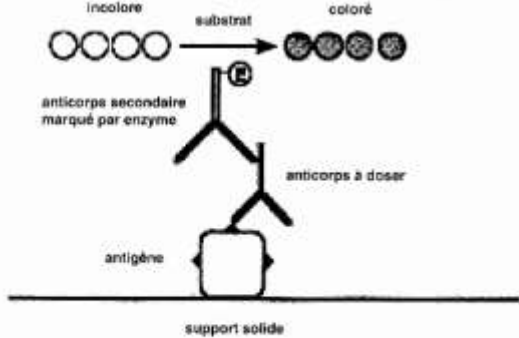


Production d'un anticorps monoclonal

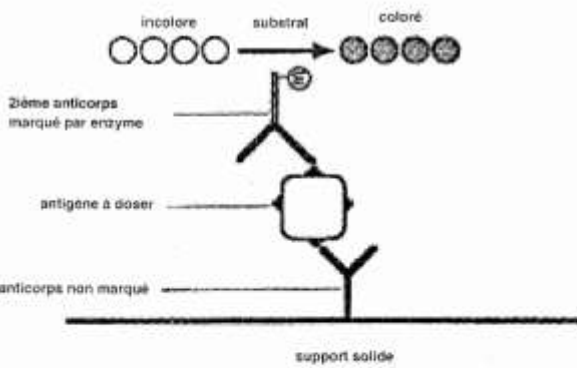


Différentes façon d'utilise les anticorps

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



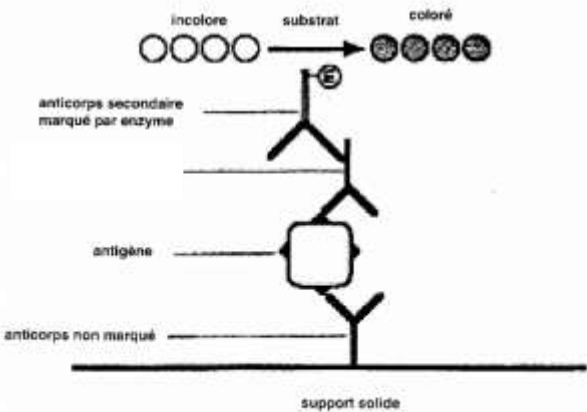
ELISA indirect: pour détecter un anticorps



ELISA par immunocapture : pour détecter un antigène



Même principe pour l'immunoprécipitation



ELISA en sandwich pour détecter un antigène

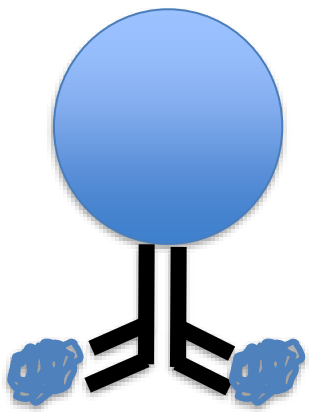
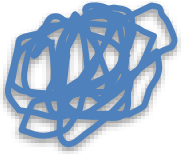


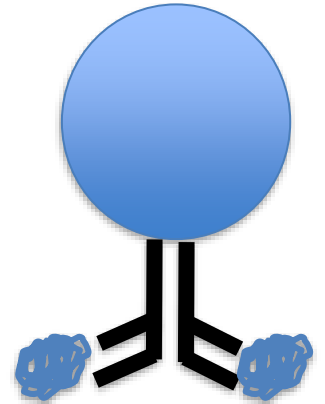
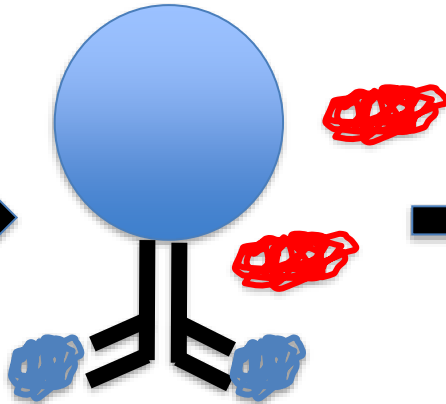
Figure 11 : Différentes méthodes ELISA

Co-immunoprécipitation (IP)

Protéine X



Protéine Y

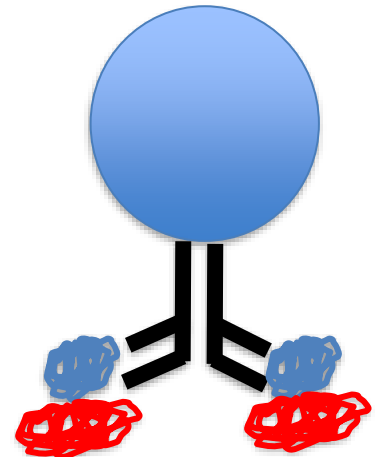
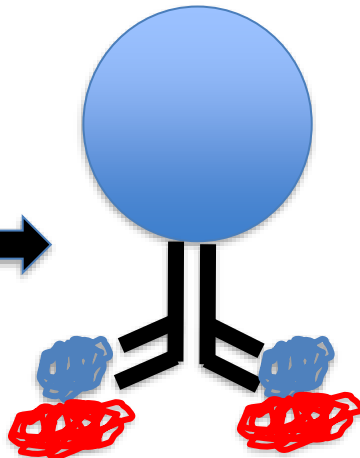


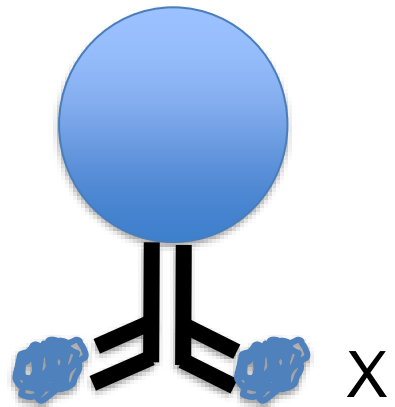
Incubation de l'extrait
Protéique avec un anticorps
anti X couplé à des billes

Récupération des billes
par sédimentation
(centrifugation)



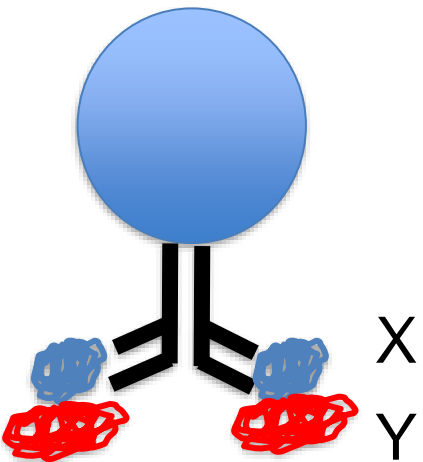
X et Y
interagissent





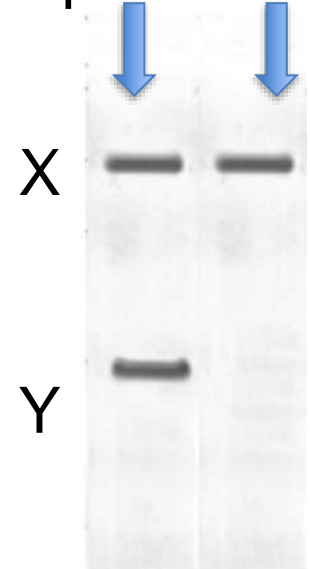
Analyse des protéines
précipitées
par western blot

Avec des anticorps anti X
et des anticorps anti Y



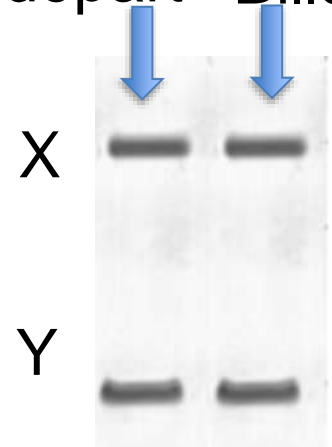
Extrait protéique
de départ

Billes



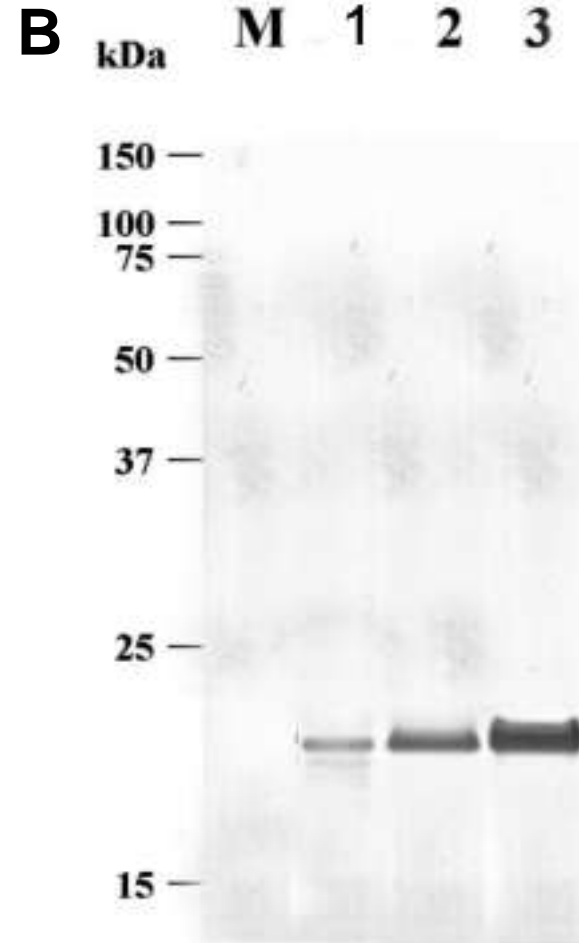
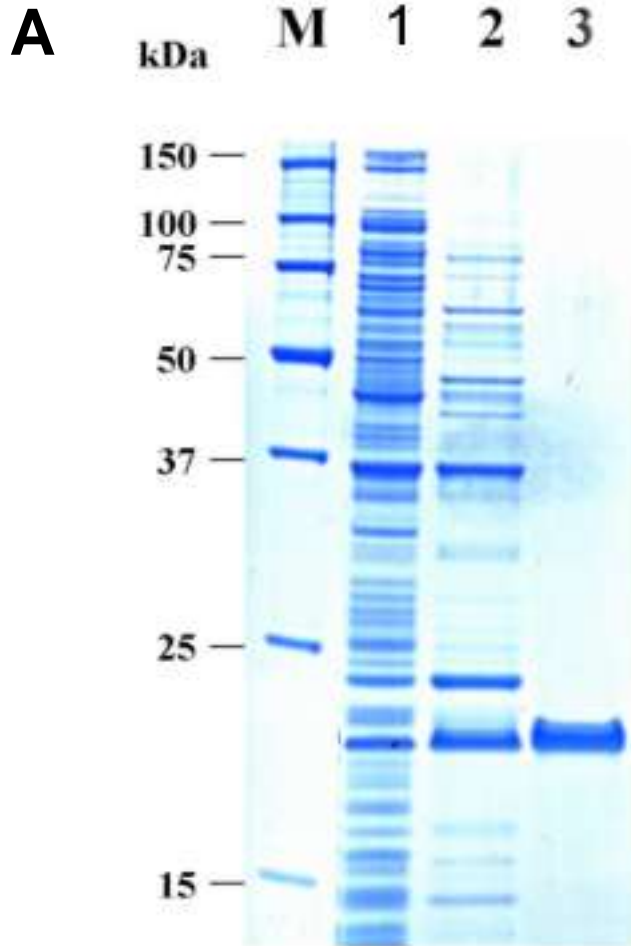
Extrait protéique
de départ

Billes

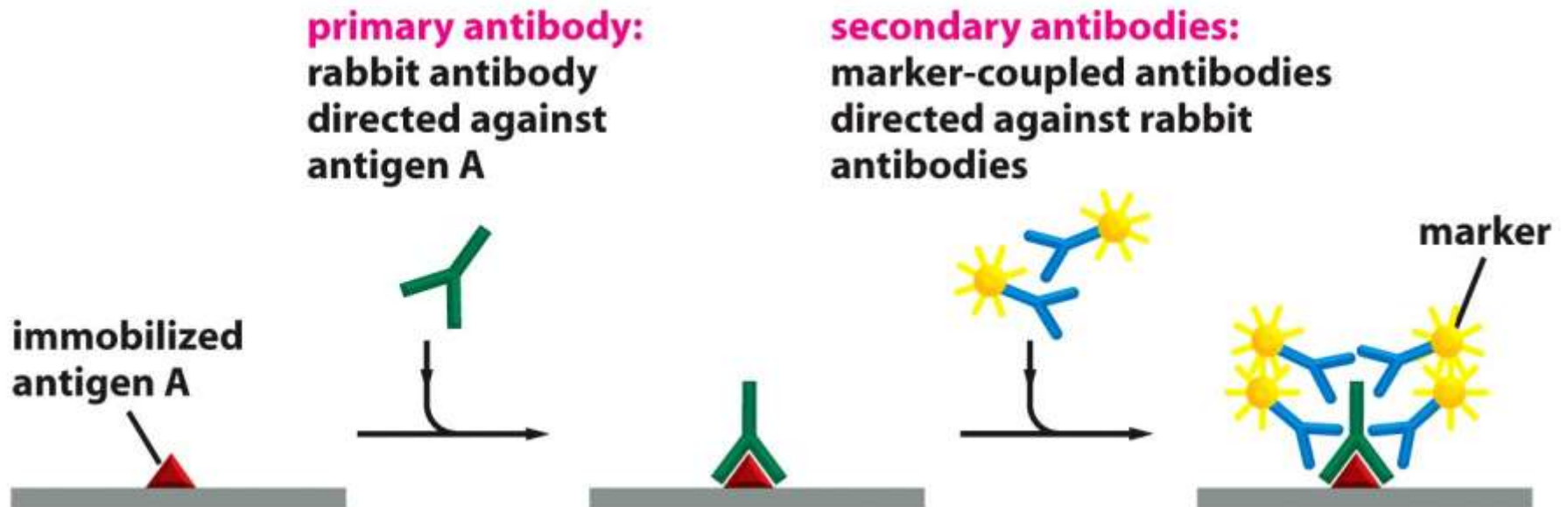


A. Coloration d'un SDS-PAGE au bleu de coomassie

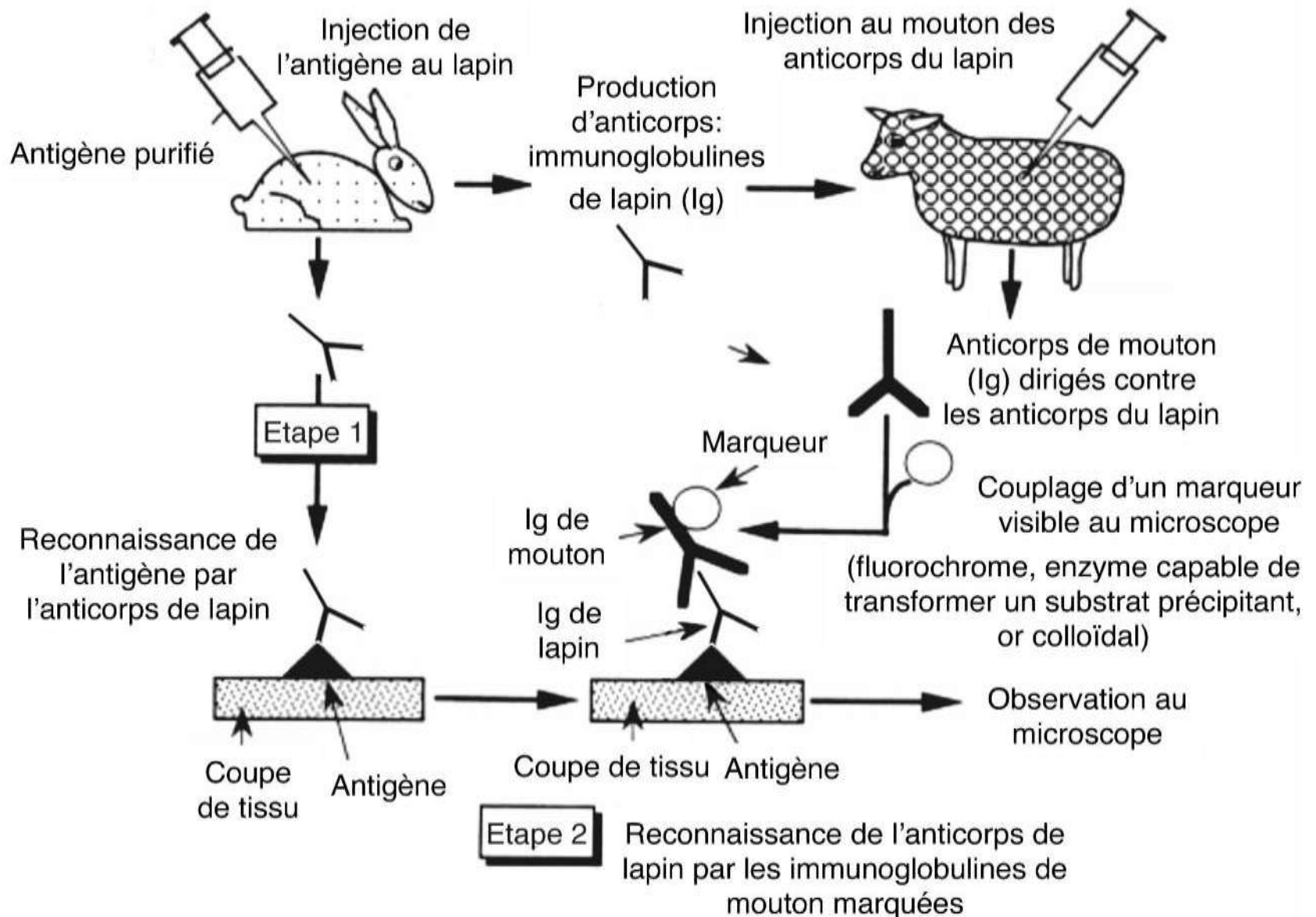
B. Analyse en western blot du même gel, après transfert des protéines sur membrane de PVDF et détection par un anticorps dirigé contre la protéine purifiée.



Immunohistochimie

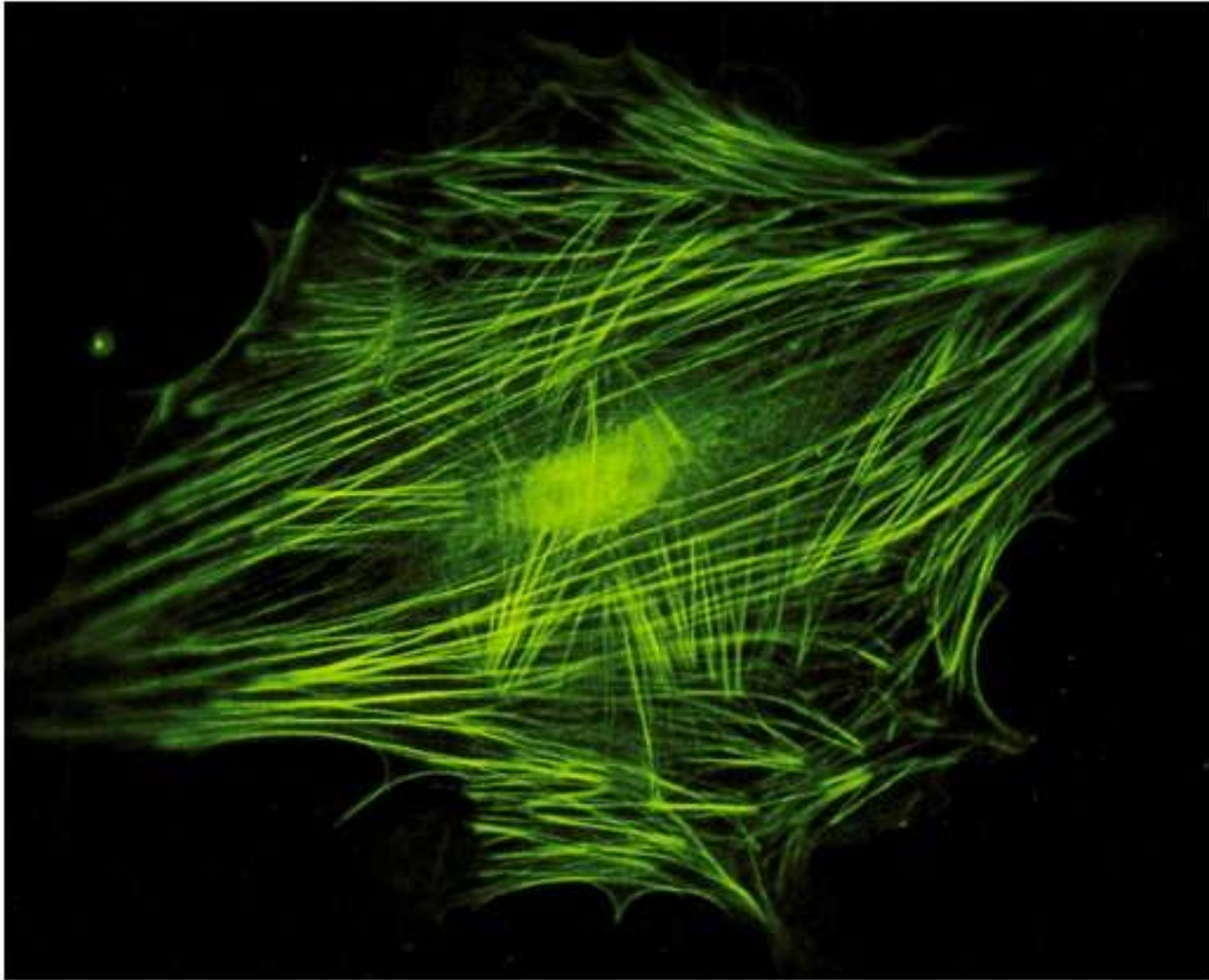


Même principe pour le Western blot et l'immunofluorescence



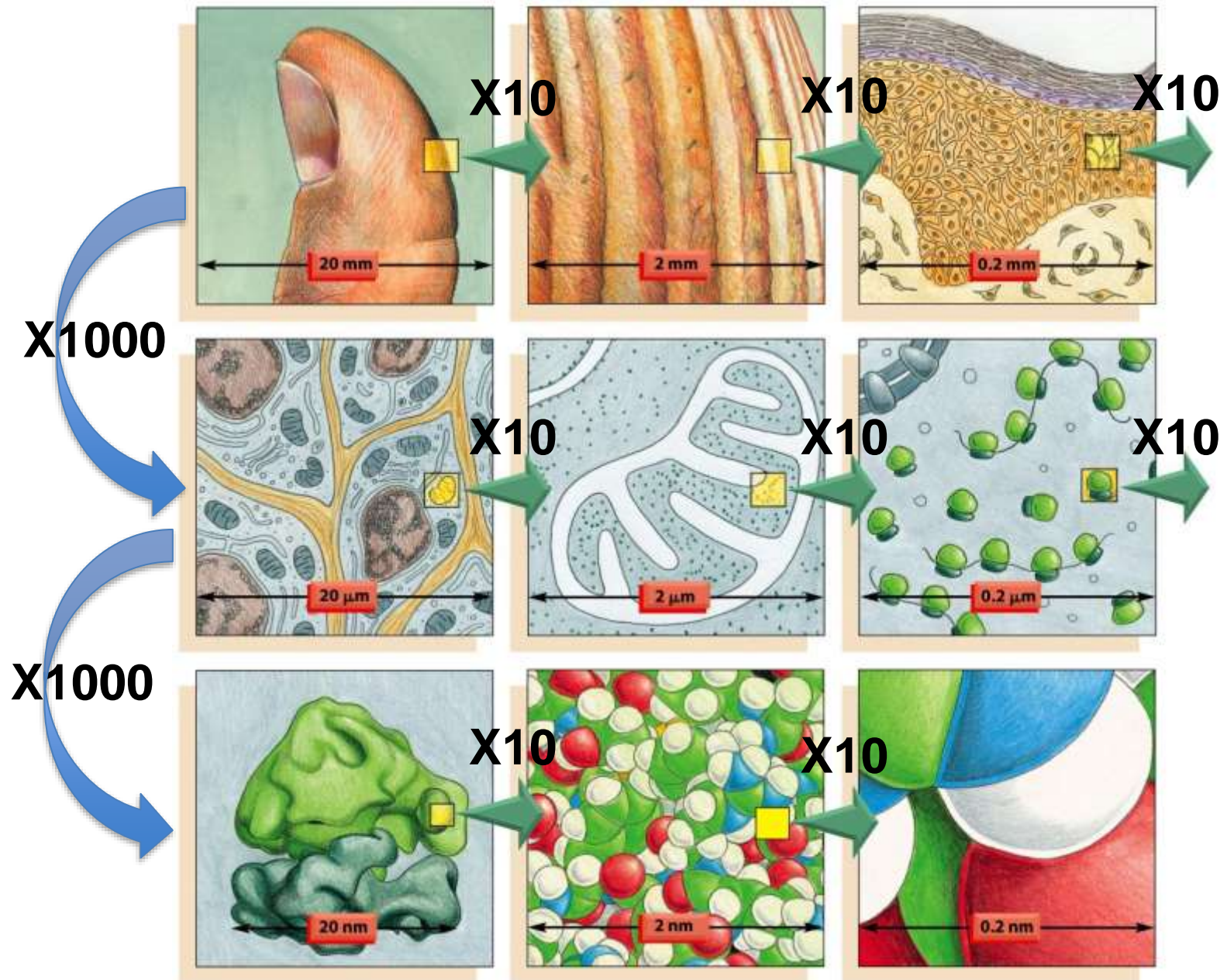
2 intérêts: amplification du signal ET un seul anticorps à marquer pour détecter tous les anticorps primaires d'une espèce animale donnée

Principe de l'immunohistochimie

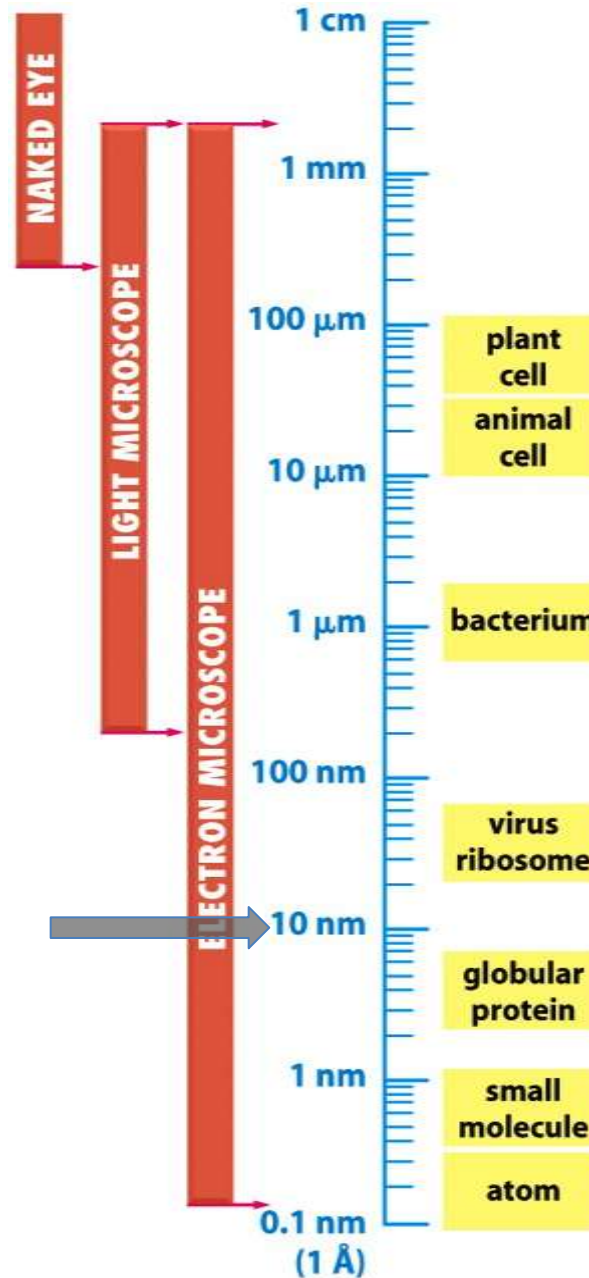


Distribution des filaments d'actine dans un fibroblaste en culture
(Immunofluorescence indirecte grâce à un anticorps de lapin anti-actine et un anticorps anti-lapin de chèvre)

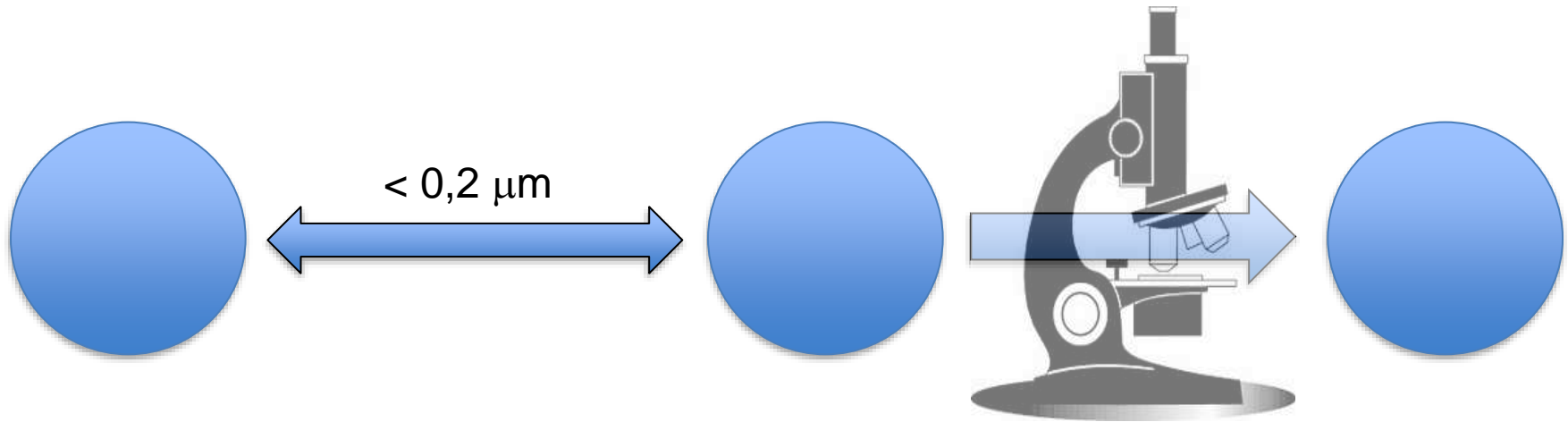
4. La microscopie et ses applications



Microscopie

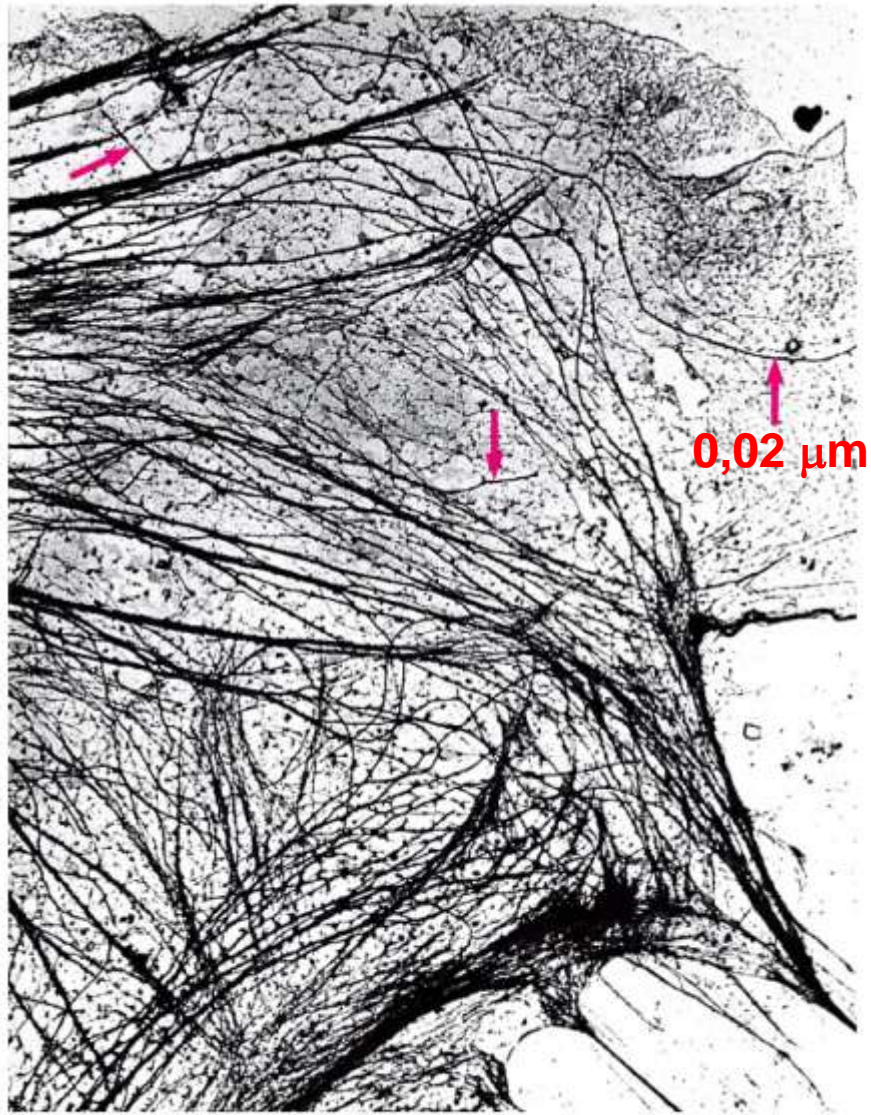


Ne pas confondre résolution et détection

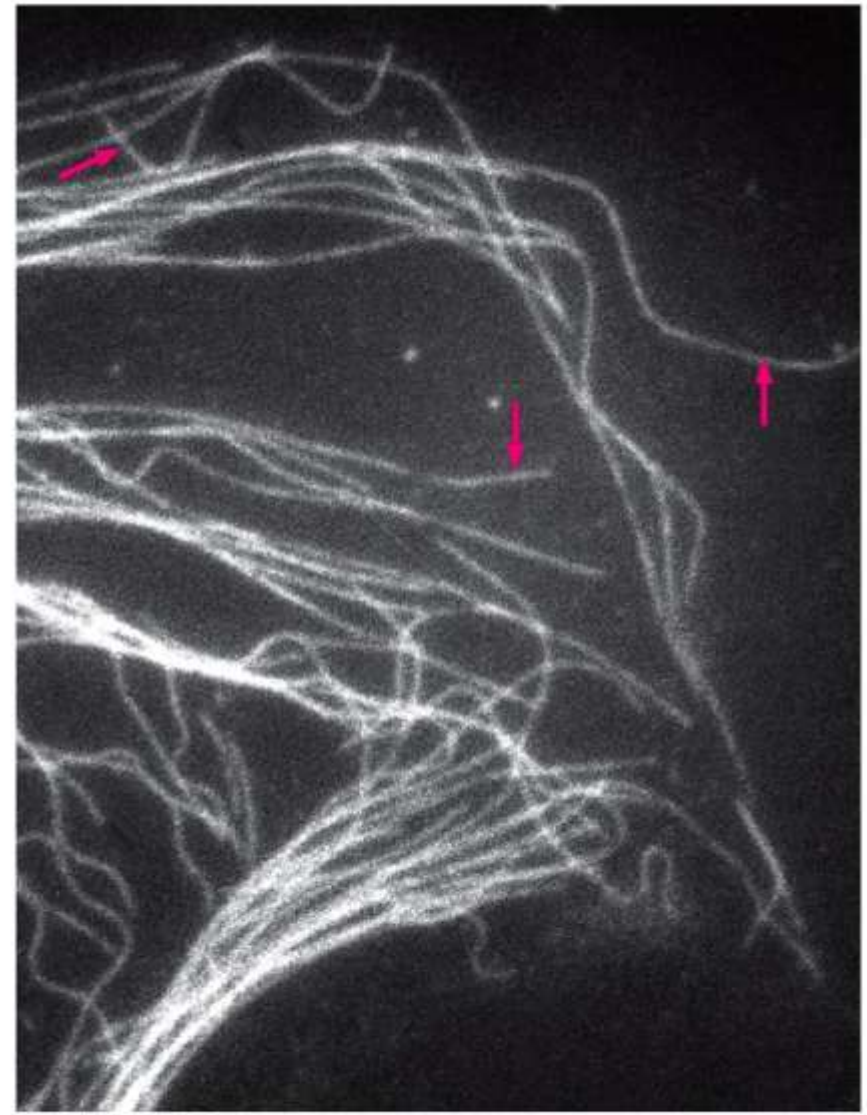


Résolution: distance séparant deux points en dessous de laquelle ils apparaîtront confondus.

Détection/résolution



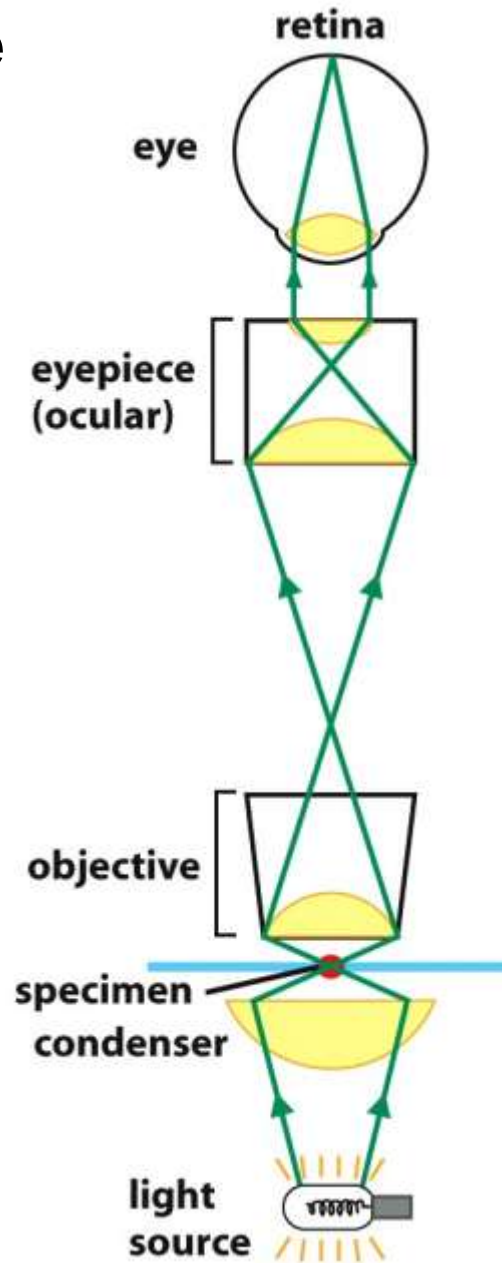
(A)



(B)

$10\ \mu\text{m}$

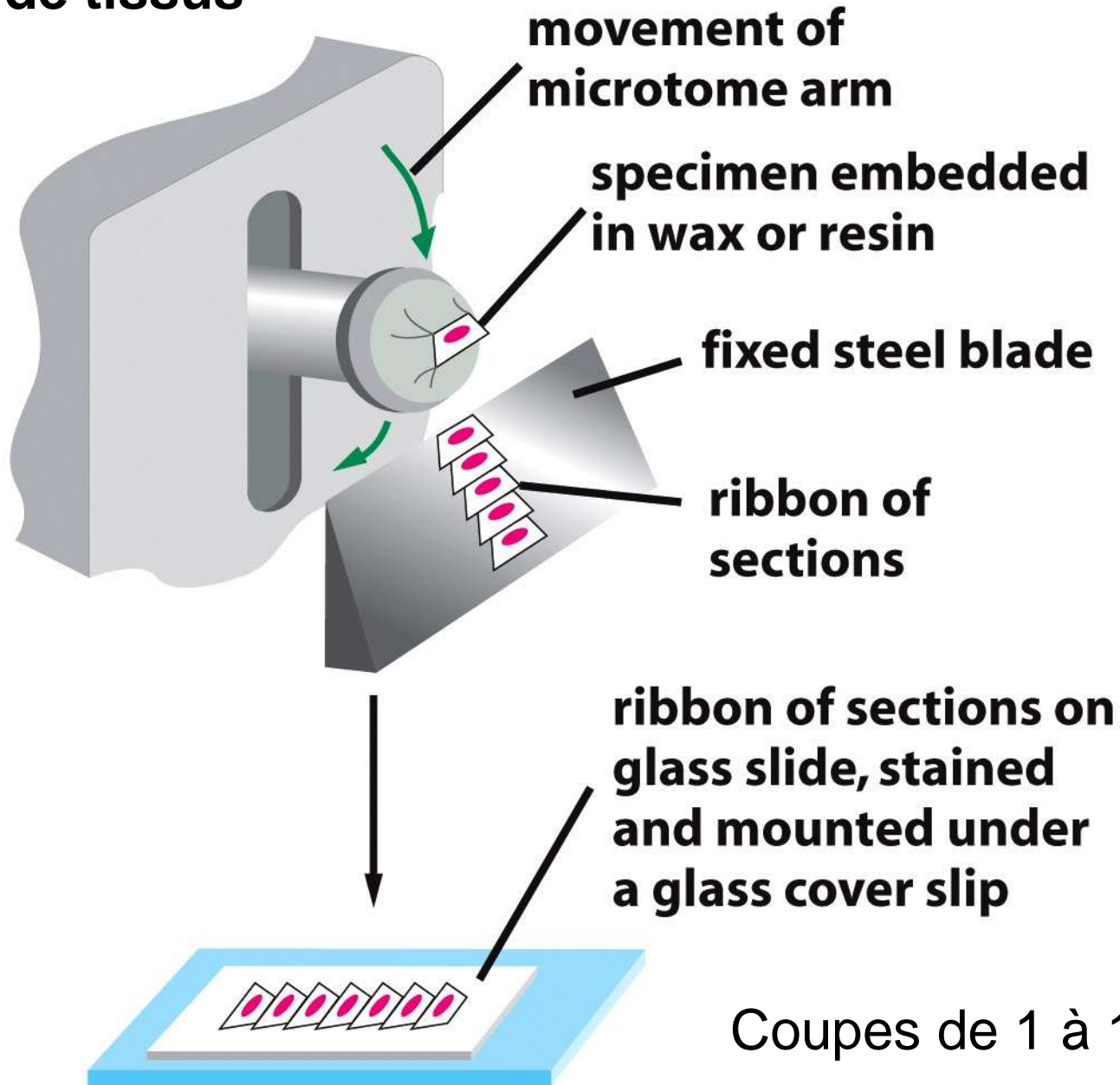
Microscopie optique



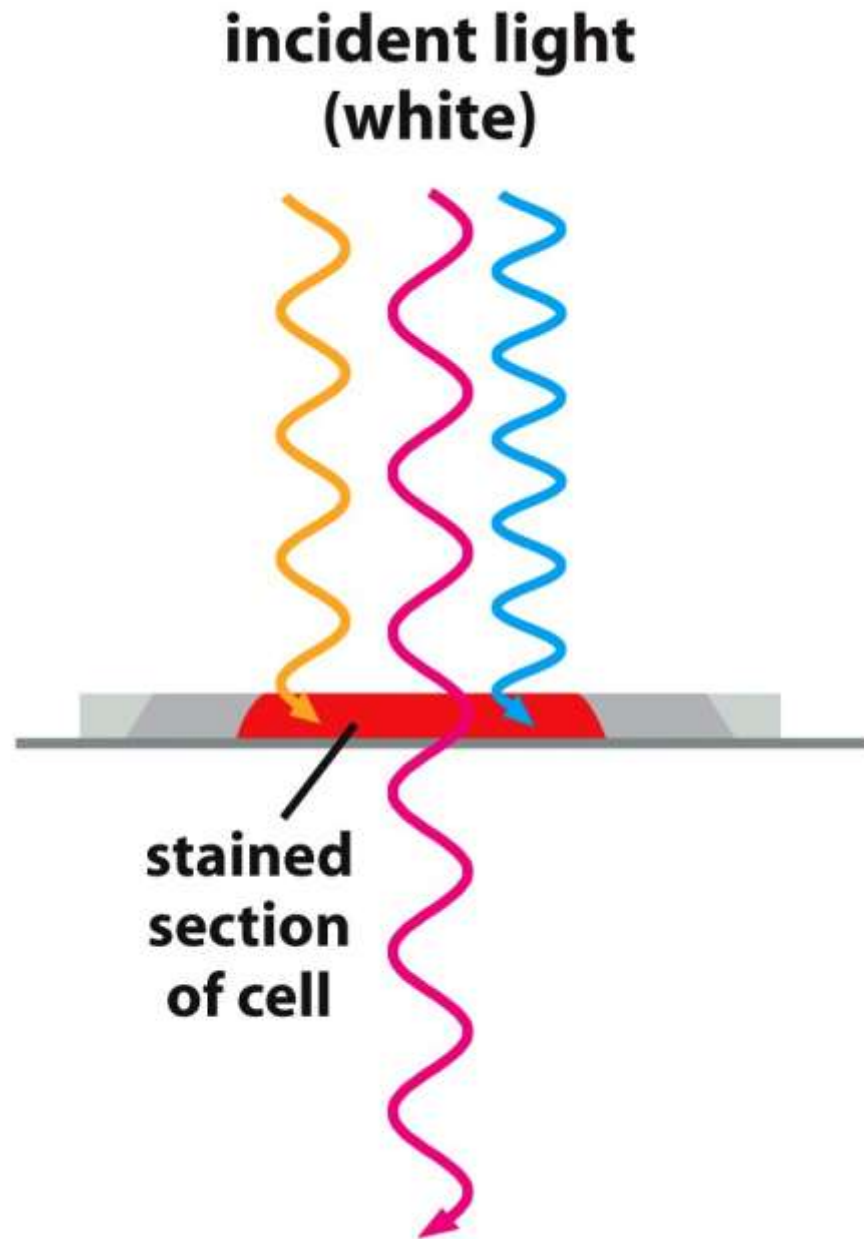
- Cellules: -fixées et colorées (formaldéhyde, glutaraldéhyde)
 ou
 - vivantes
- Coupes de tissus (1 à 10 μm d' épaisseur)

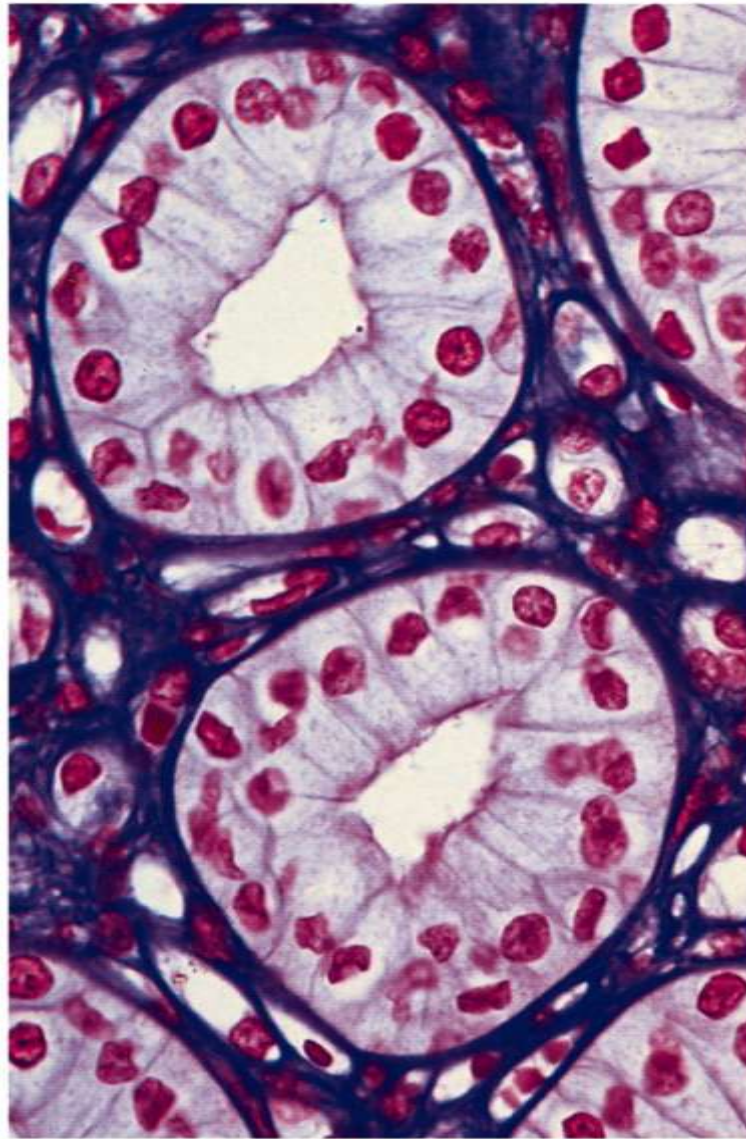


Coupes de tissus

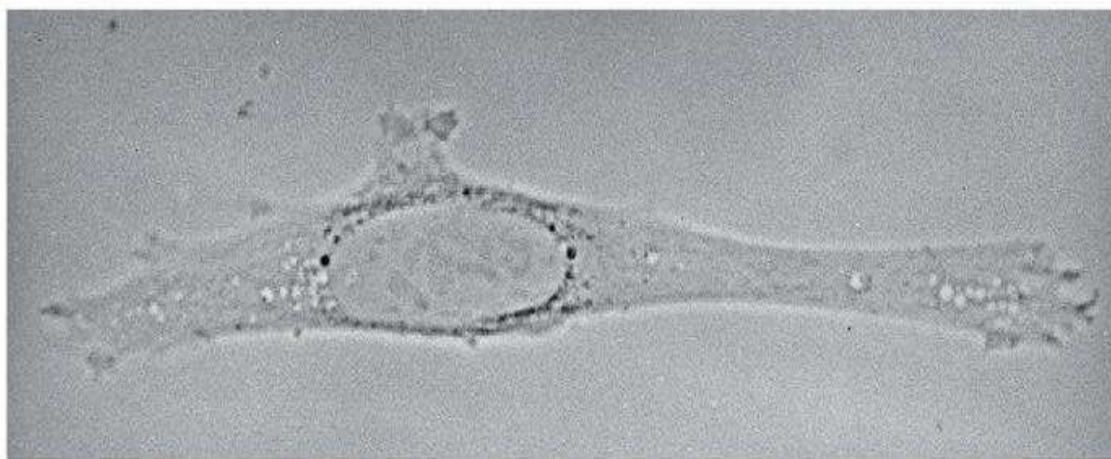


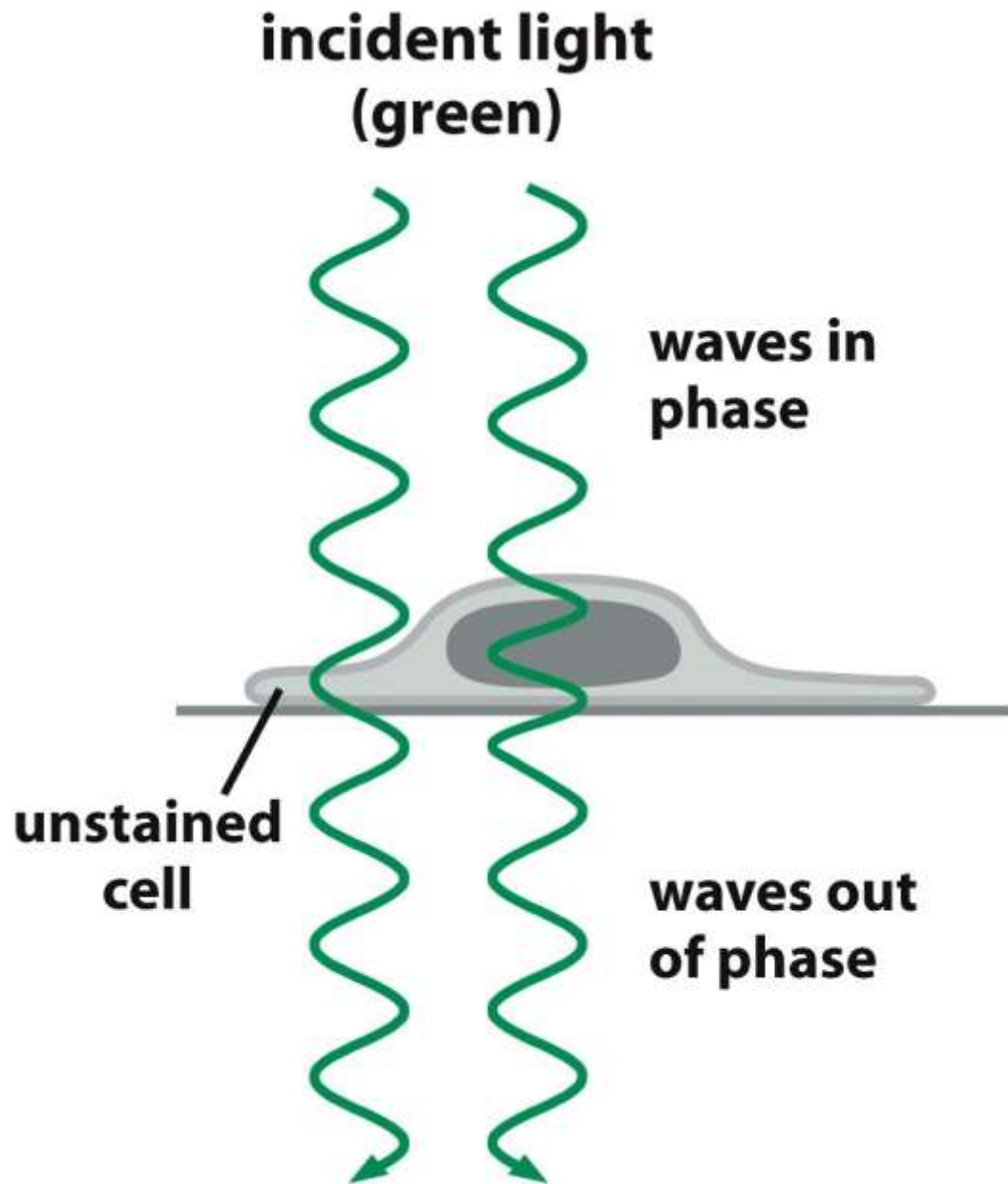
Coupes de 1 à 10 microns



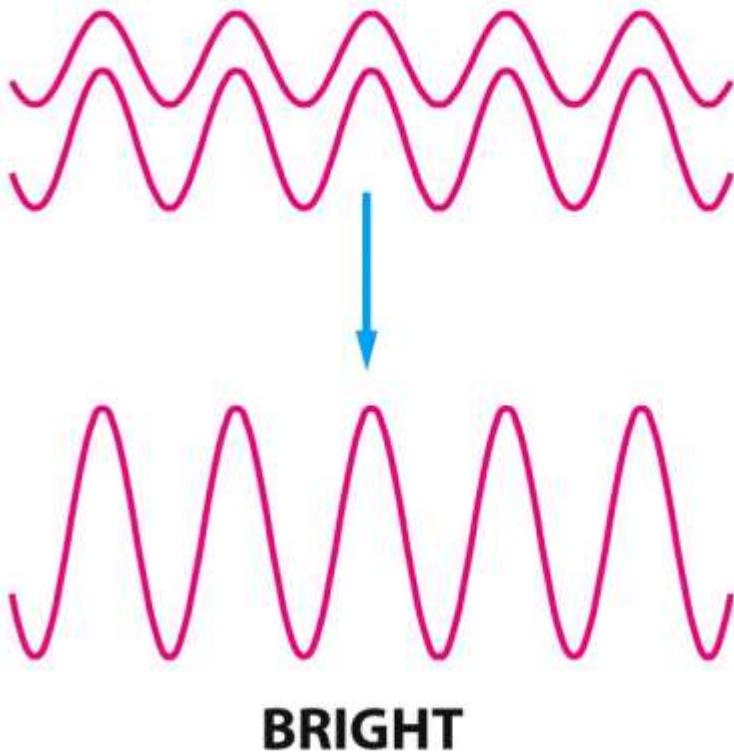


50 μm

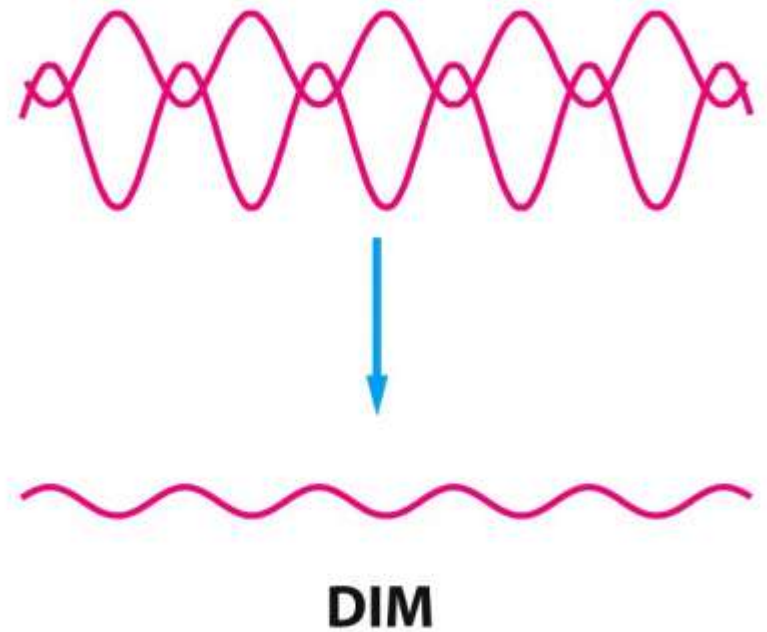


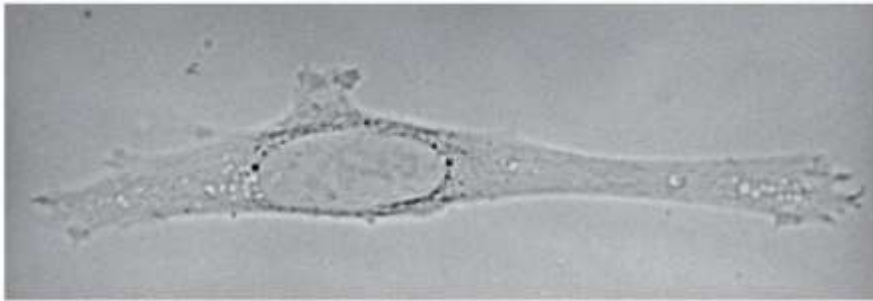


TWO WAVES IN PHASE

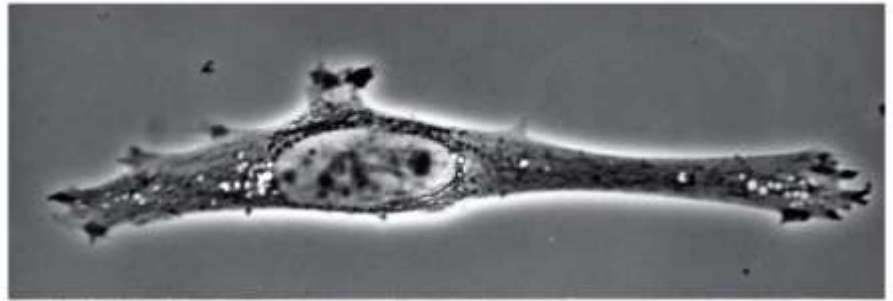


TWO WAVES OUT OF PHASE



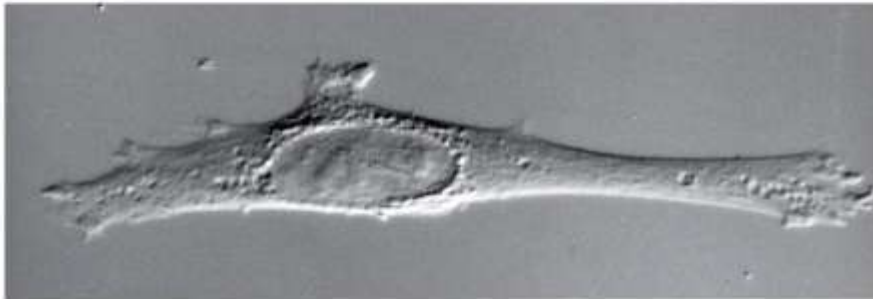


(A)



(B)

Contraste de phase



(C)

Nomarski

50 μm

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

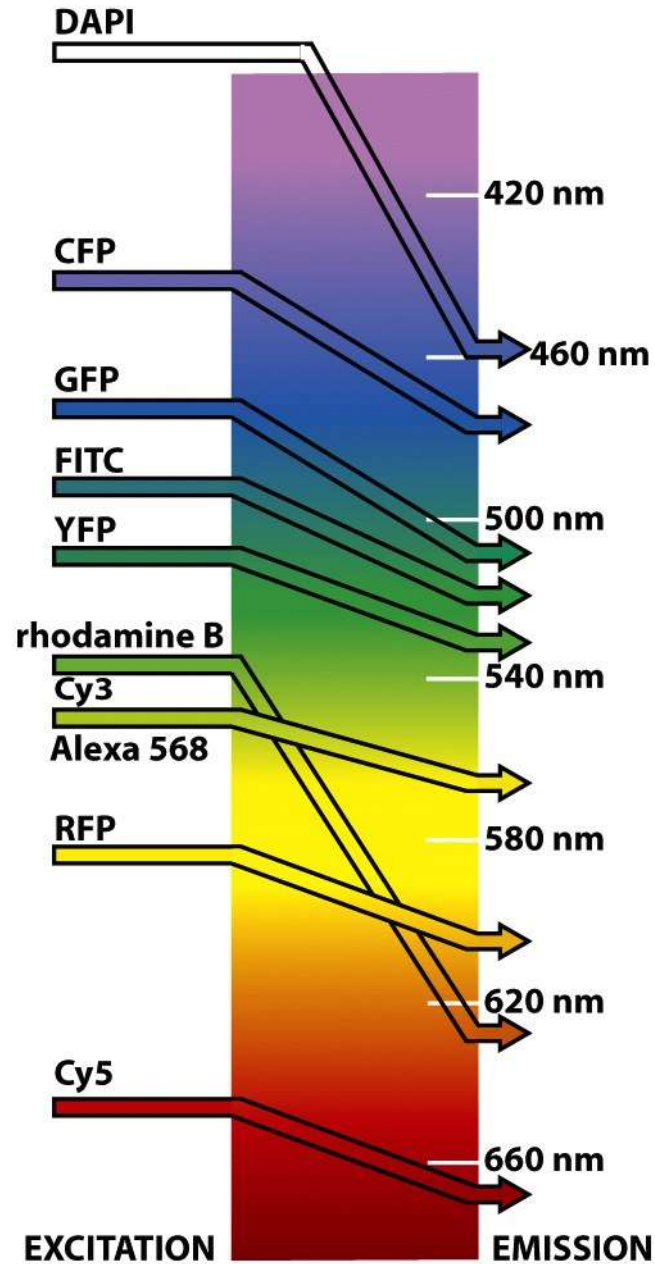
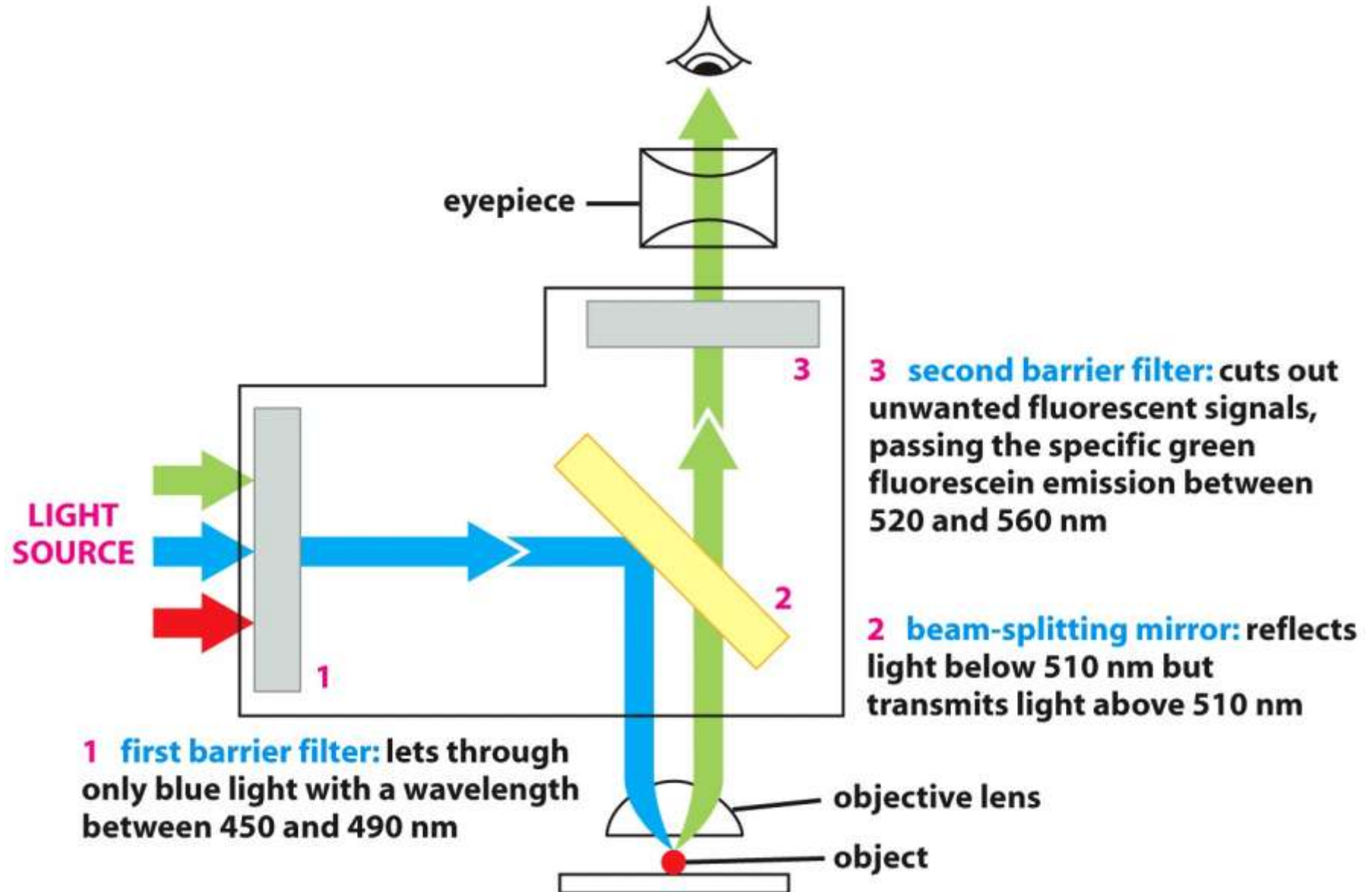


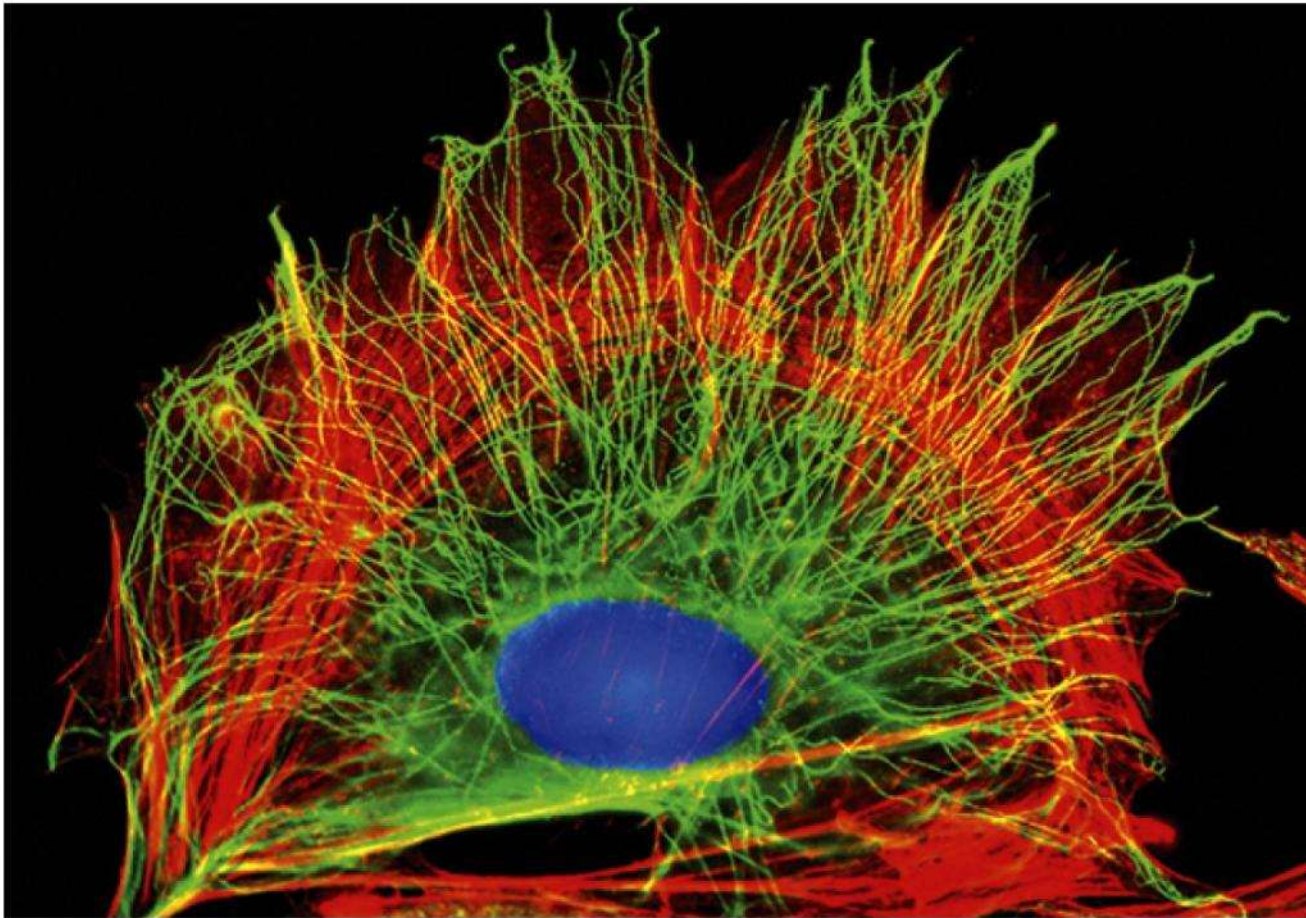
Figure 9-14 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Microscopie à épifluorescence

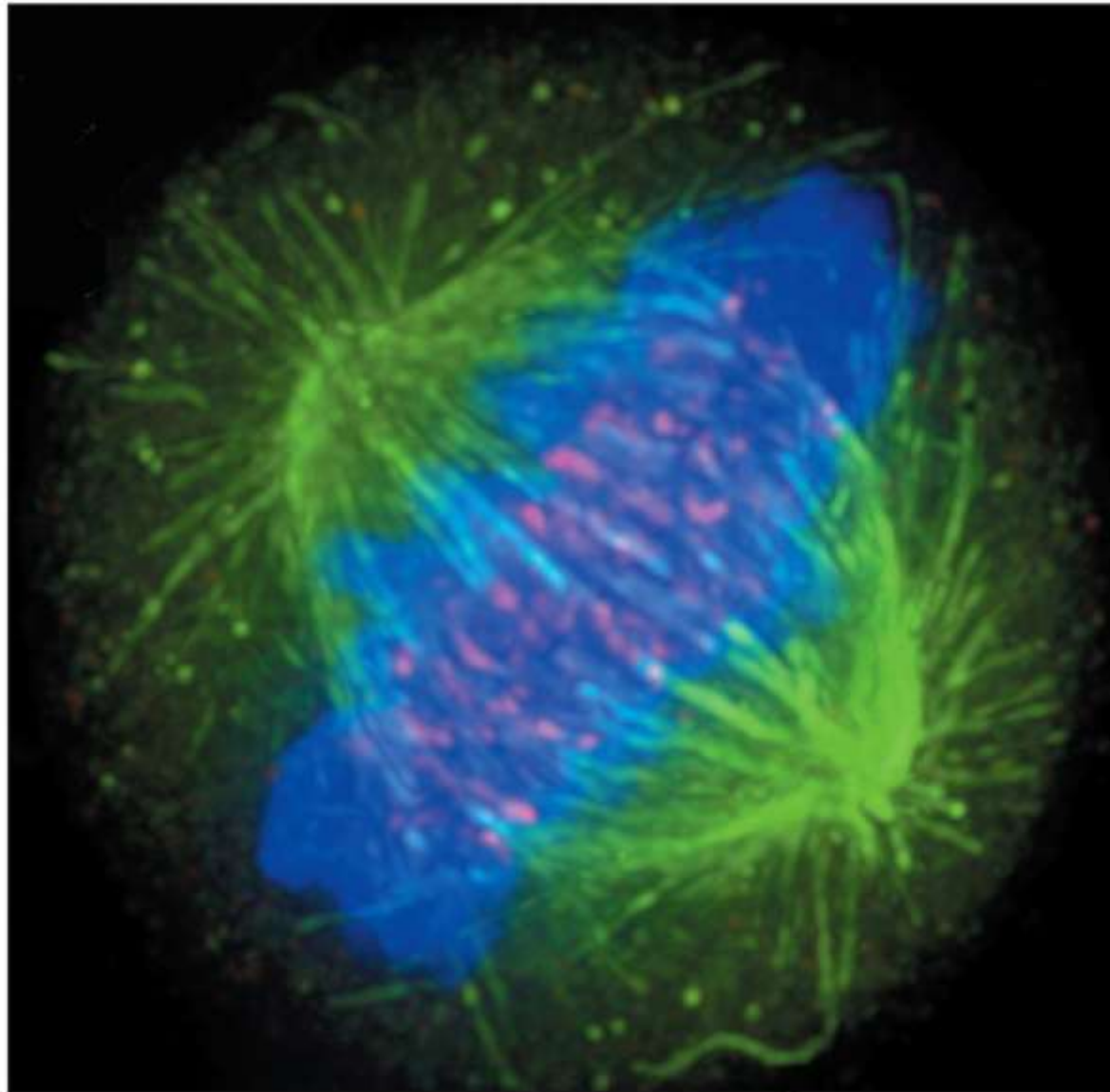


Il existe différentes façons de « diriger » les fluorophores sur les structures à visualiser:

- 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 μm



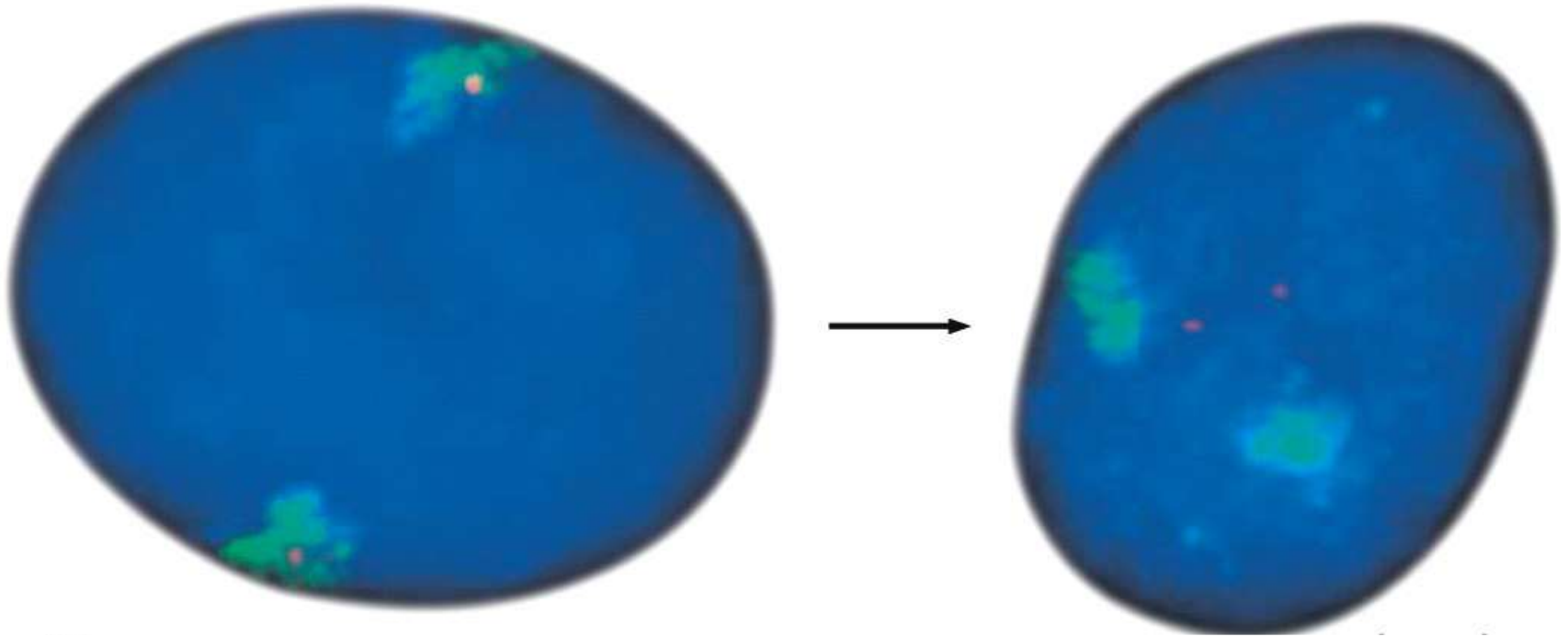
Neurofilament

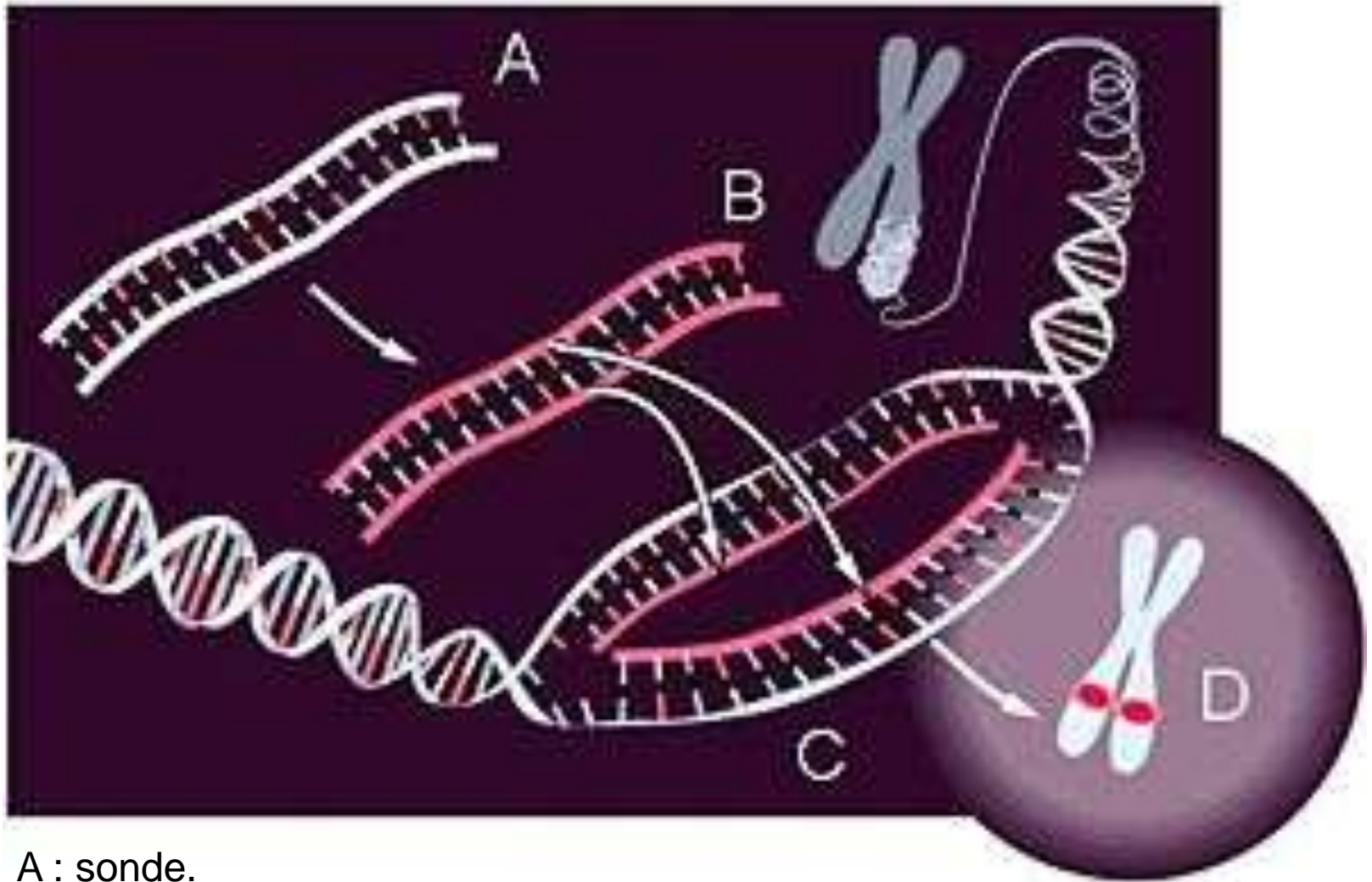
Récepteur de l'acétylcholine

merge

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

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization



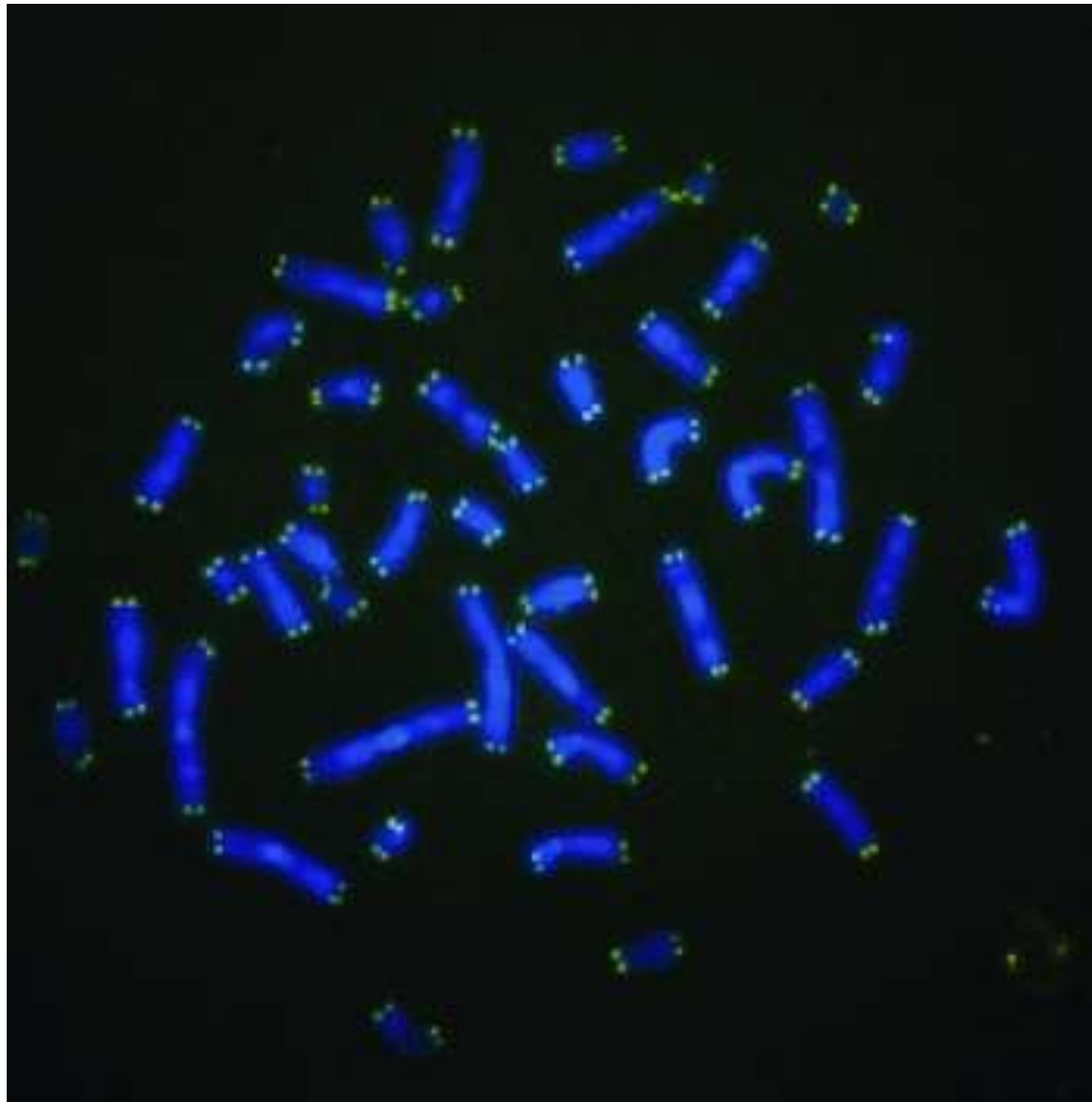


A : sonde.

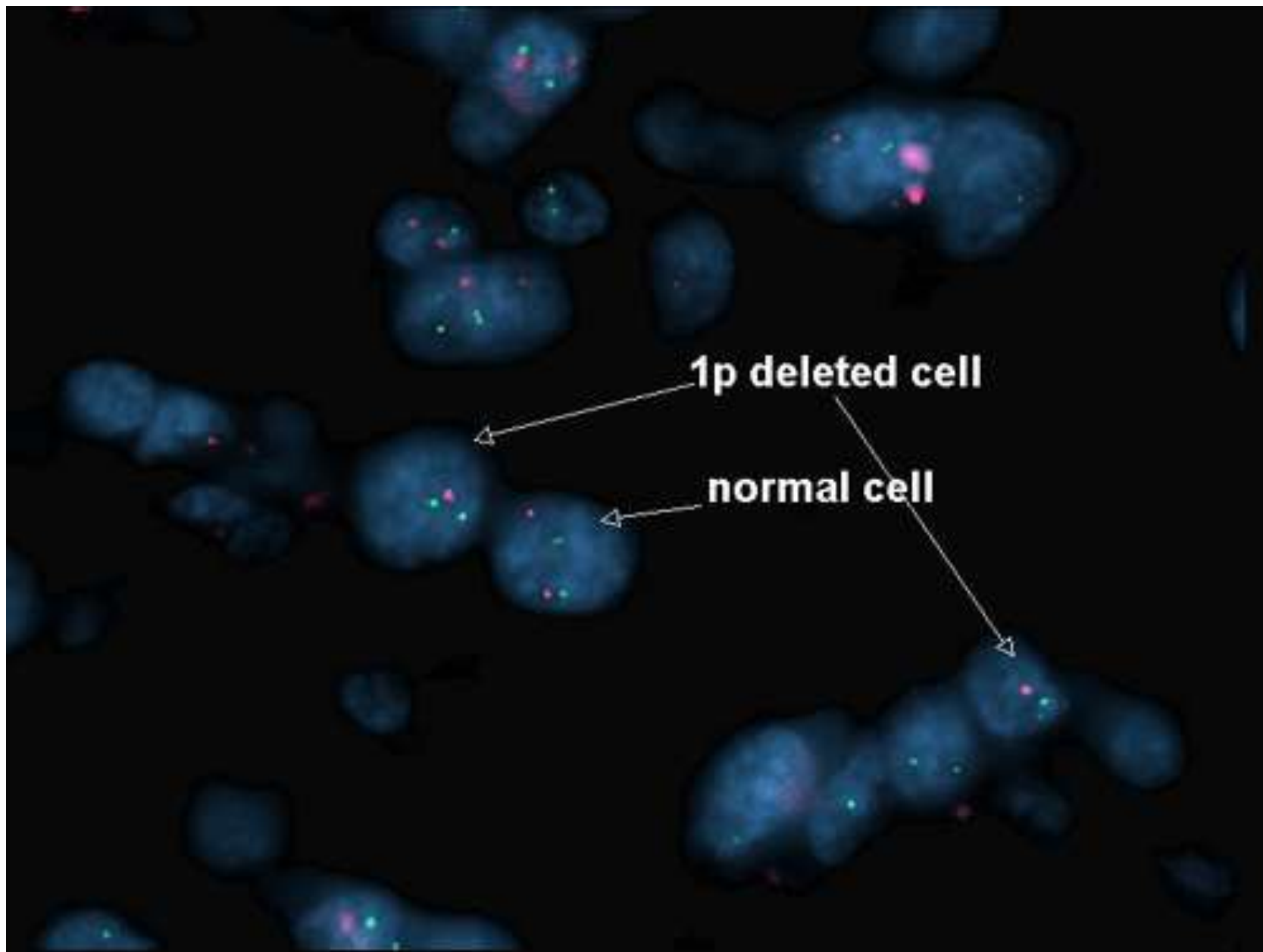
B : sonde colorée à l'aide d'un fluorochrome.

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)**



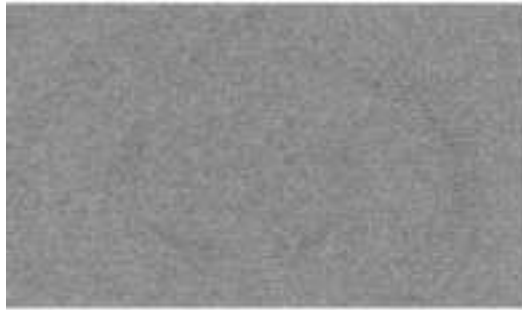
En général le FISH est utilisé
pour la détection de séquences d' **ADN**

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)

$\alpha 2$



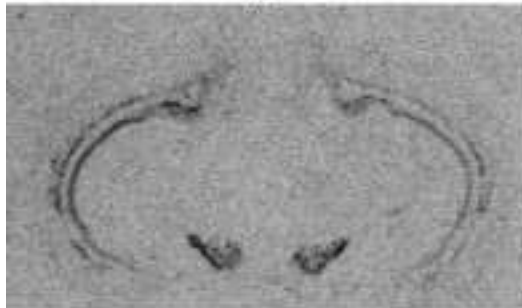
$\alpha 3$



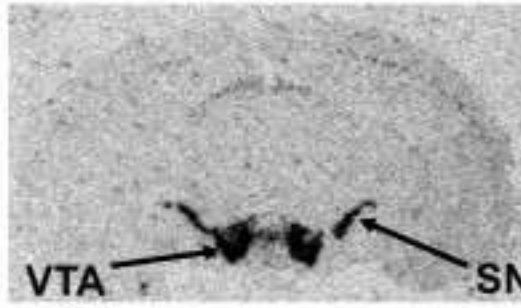
$\alpha 4$



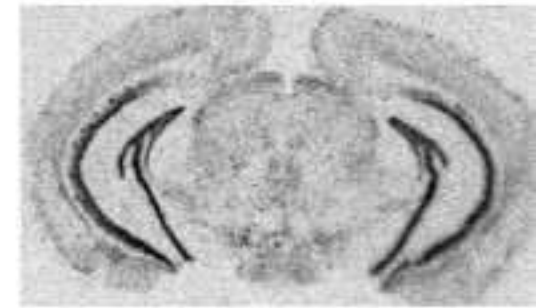
$\alpha 5$



$\alpha 6$



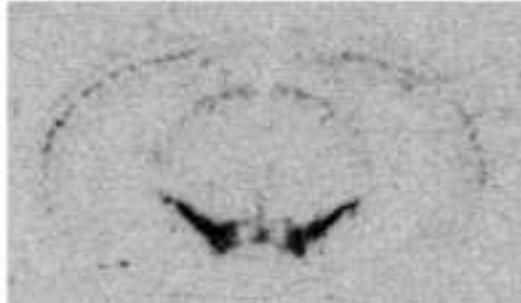
$\alpha 7$



$\beta 2$



$\beta 3$



$\beta 4$



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

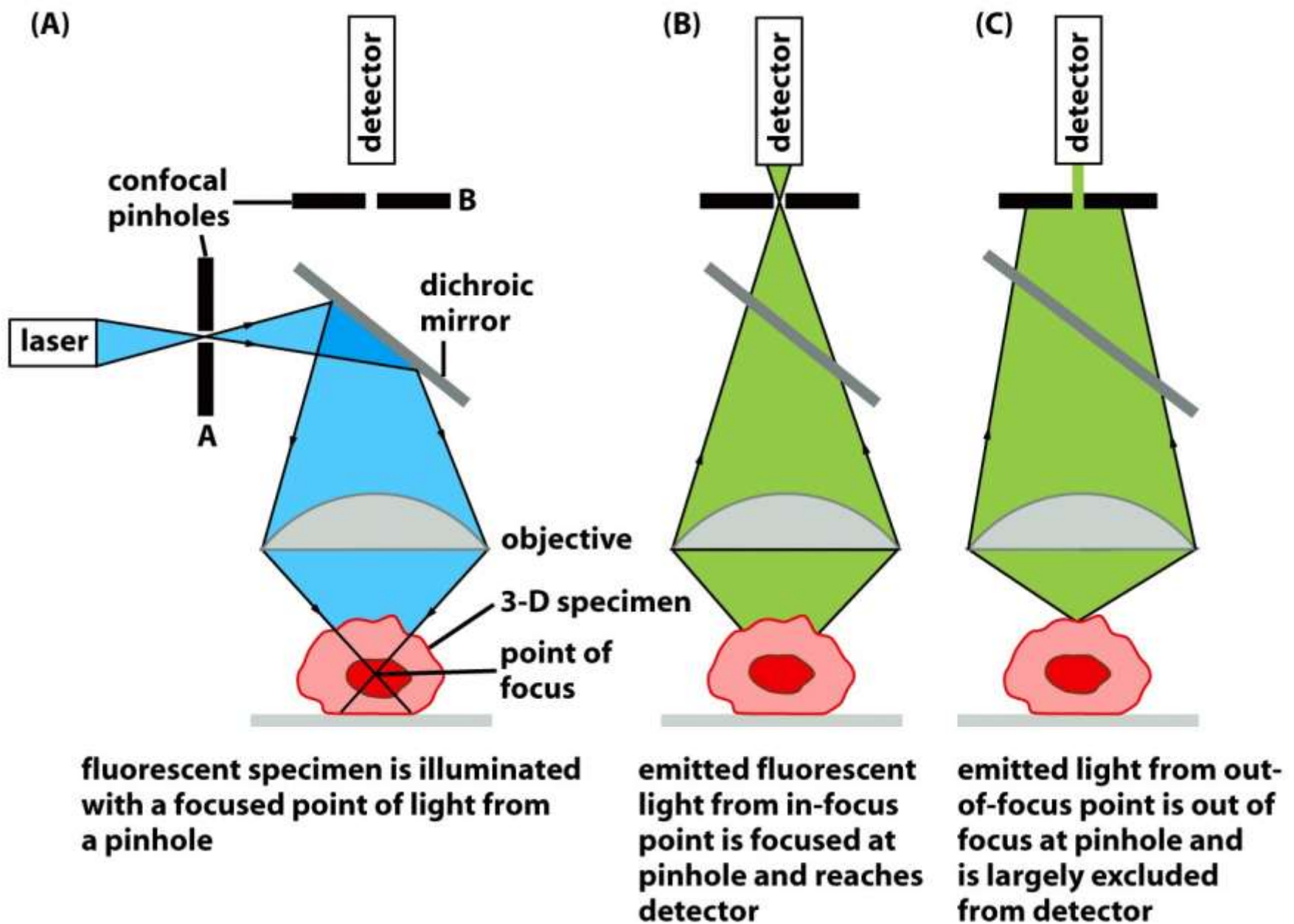


Nervous system

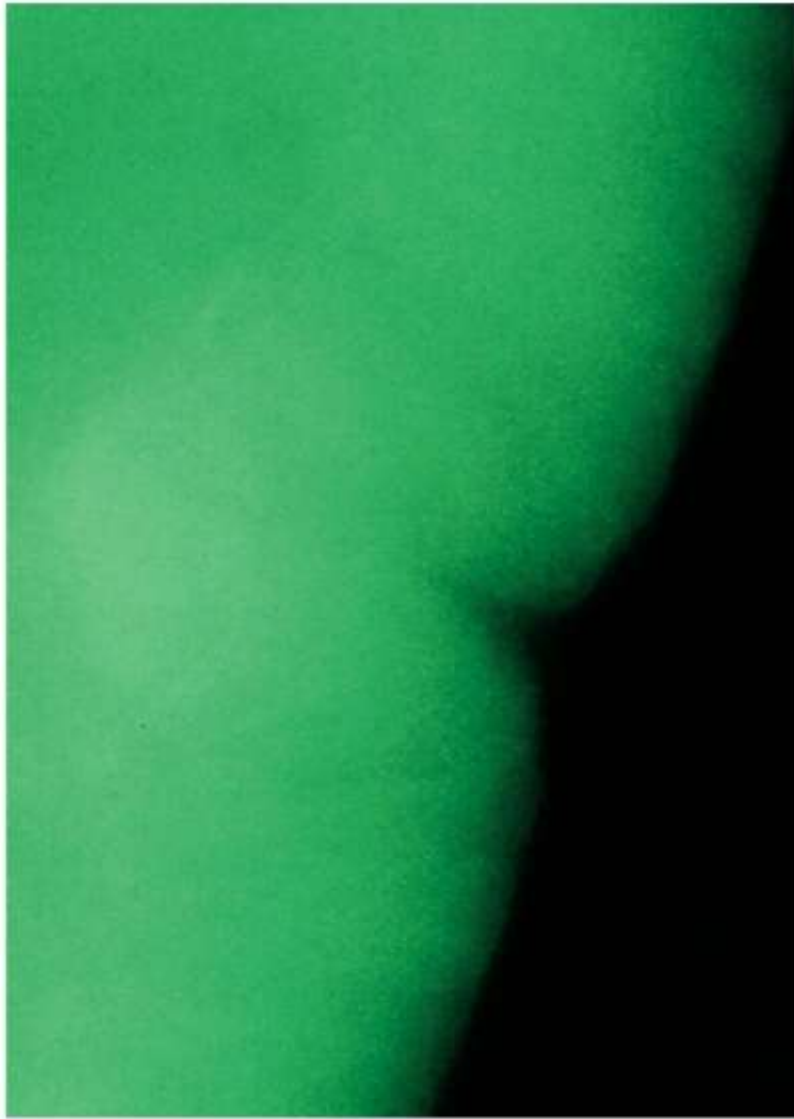




Hybridation in situ pour détecter l' ARNm de la tropomyosine



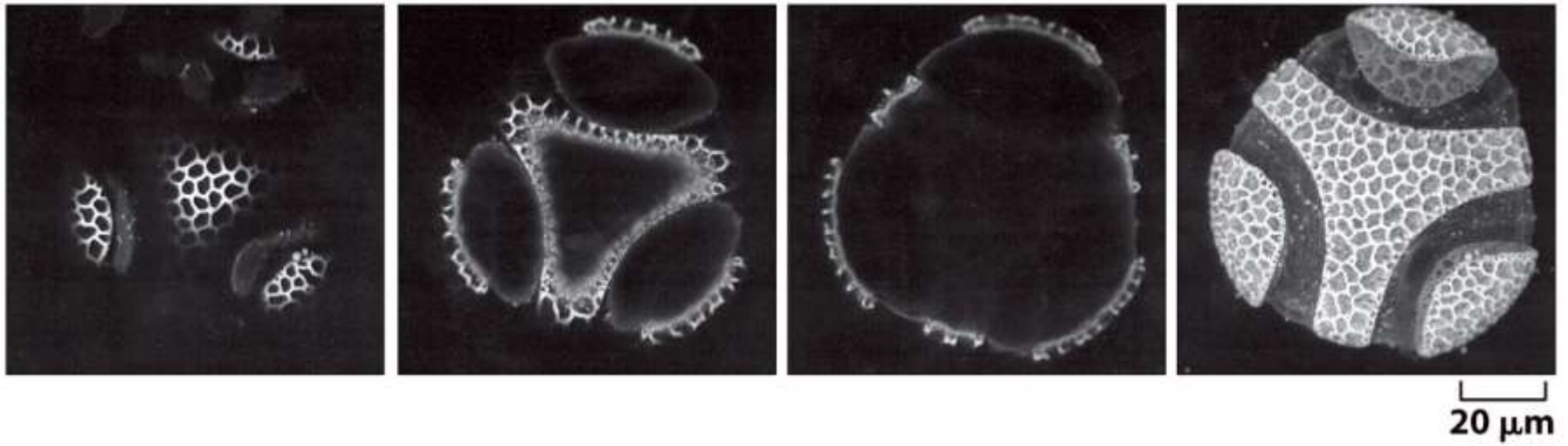
Principe du microscope confocal



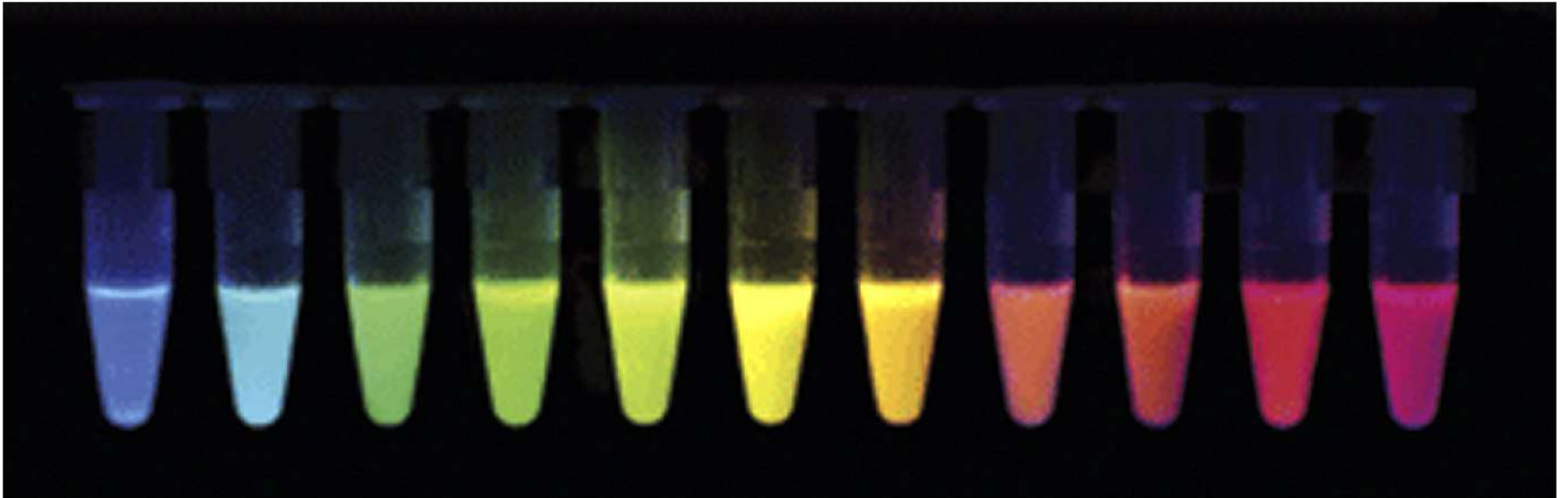
(A) Epifluorescence



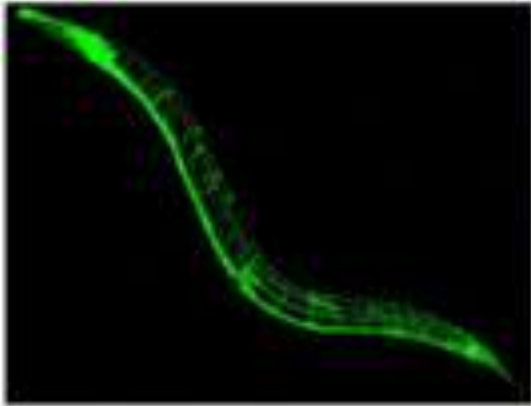
(B) Confocal 10 μm



Les protéines de fusion fluorescentes



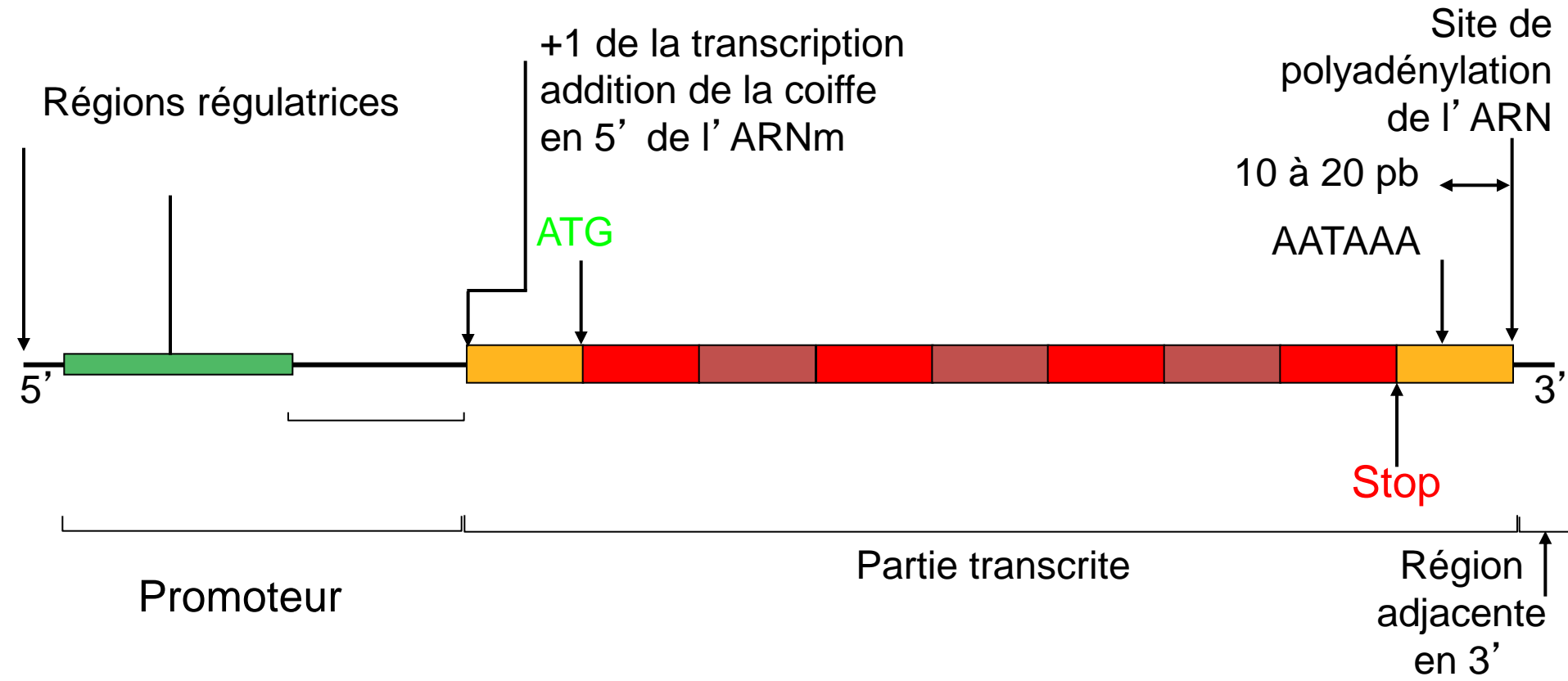
La GFP



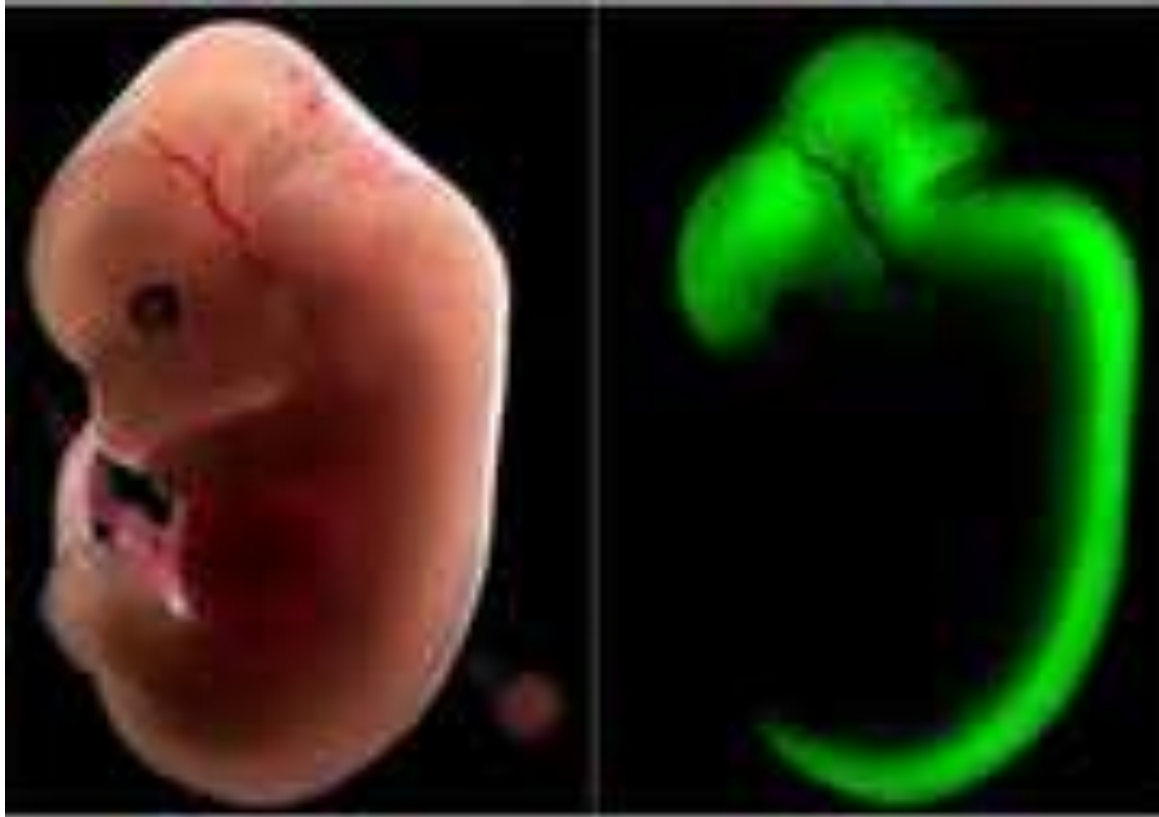
Anatomie du gène d'une protéine

Exons codants
3' UTR/5'UTR

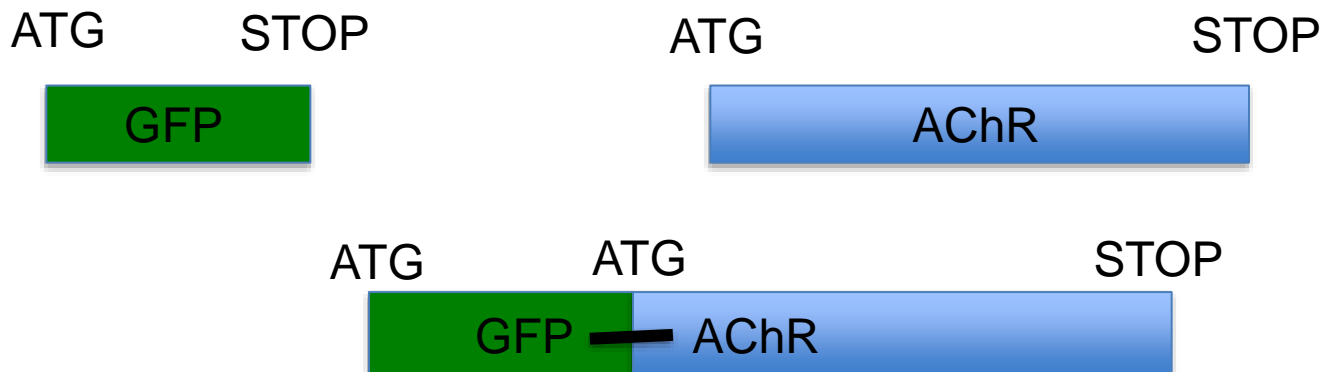
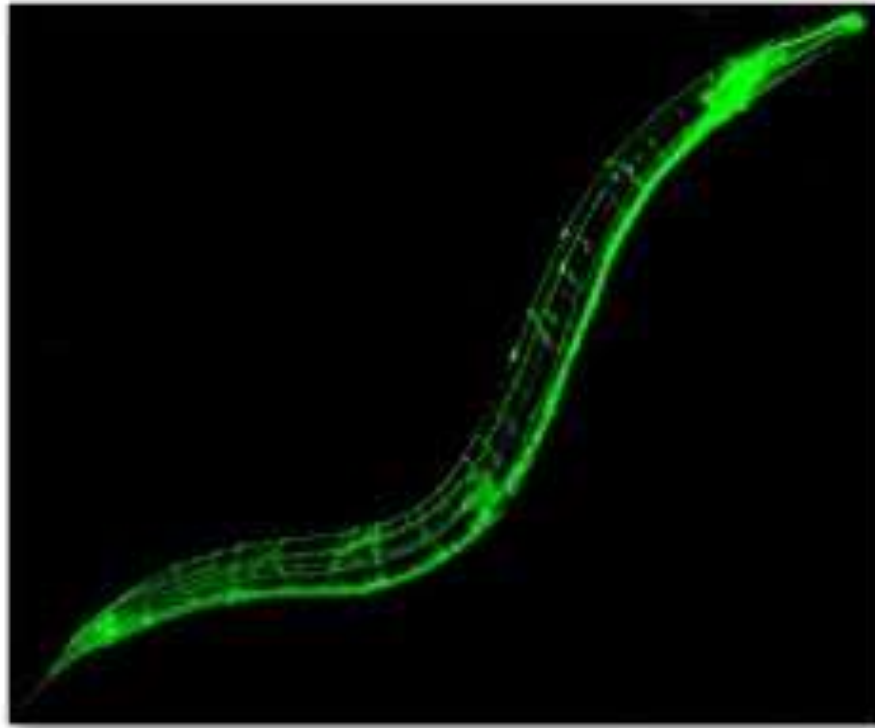
Parties transcrites en introns
Parties transcrites en exons



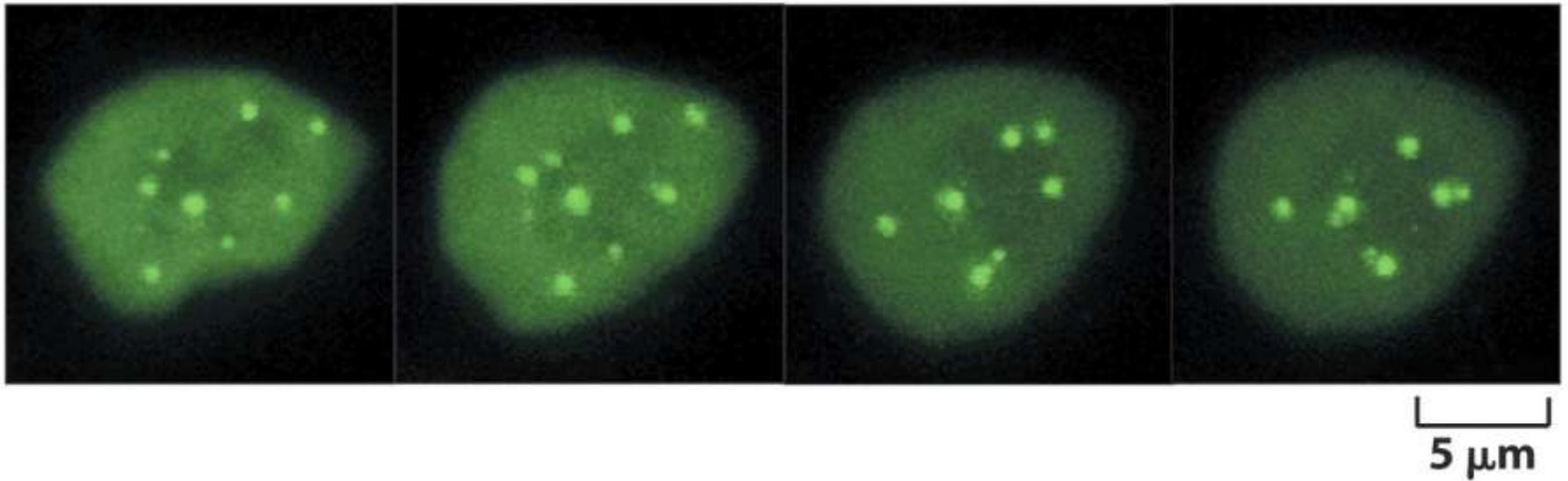
GFP utilisée comme gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique du système nerveux.



GFP fusionnée à une sous unité du récepteur de l'acétylcholine de *c.elegans*.



Video time lapse des corps de Cajal



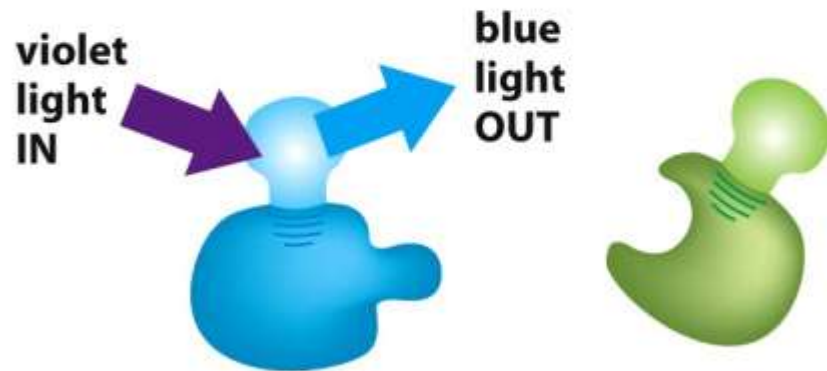
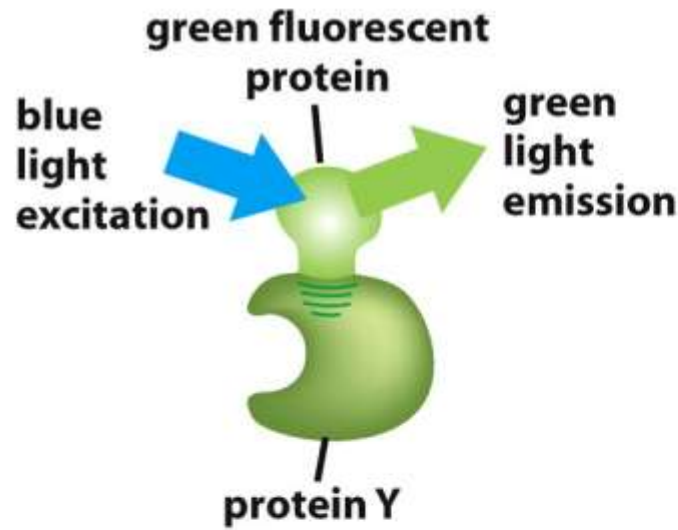
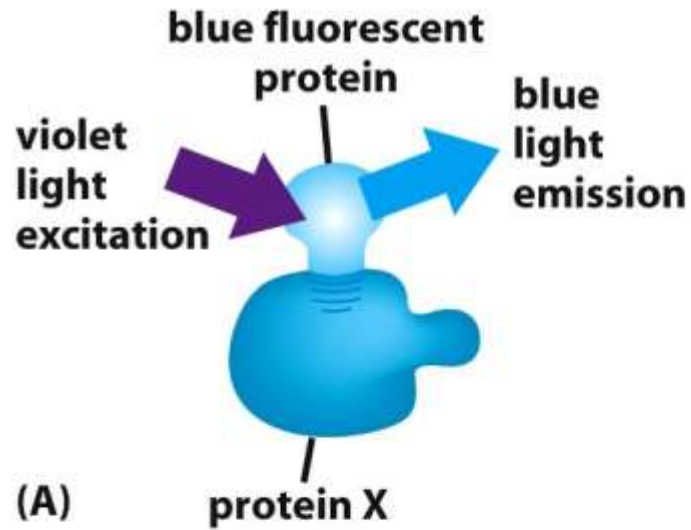
Fusion GFP-protéine Sm des snRNP



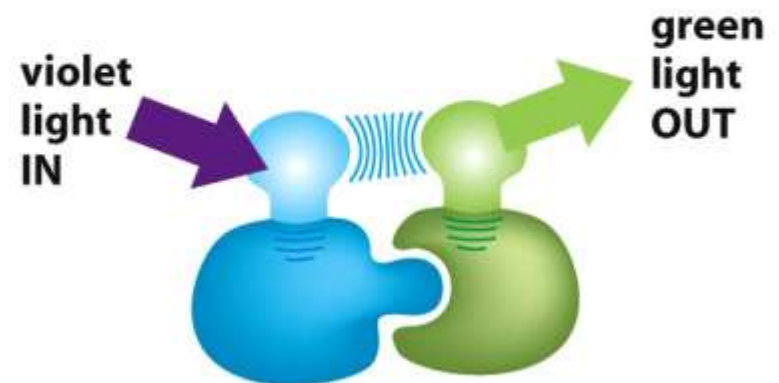
Visualisation des mouvements entre le cytosol et le noyau
de NF-AT couplée à la GFP

Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

(Transfert d'énergie par Résonance en fluorescence)



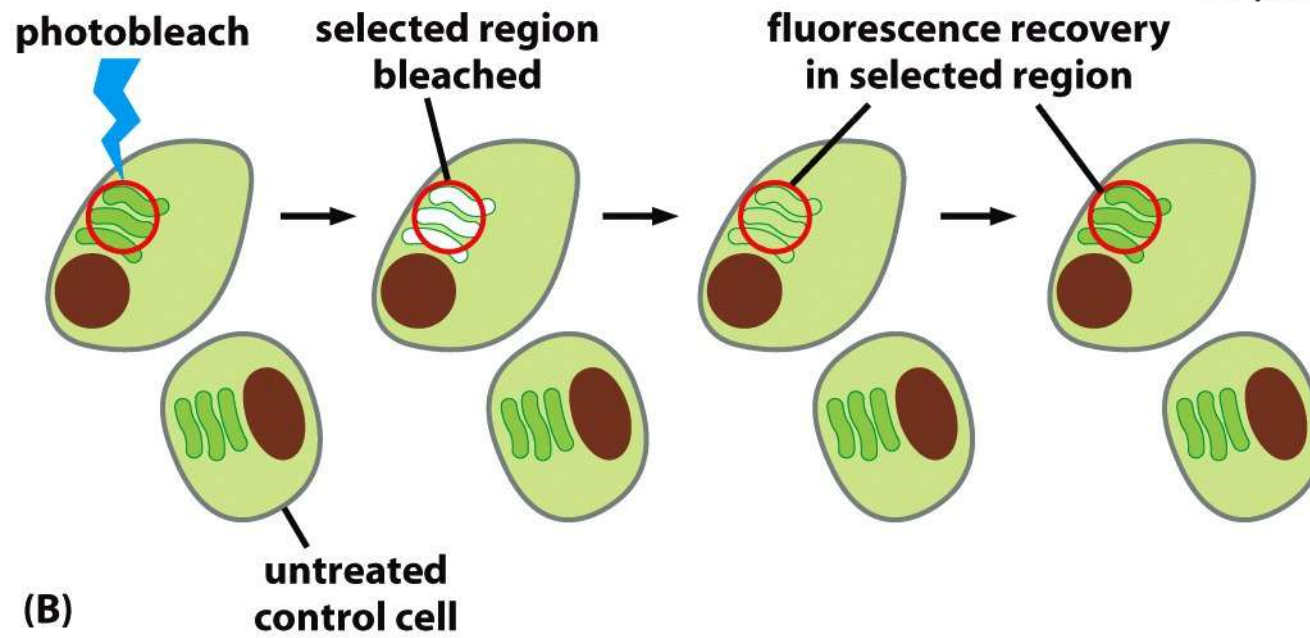
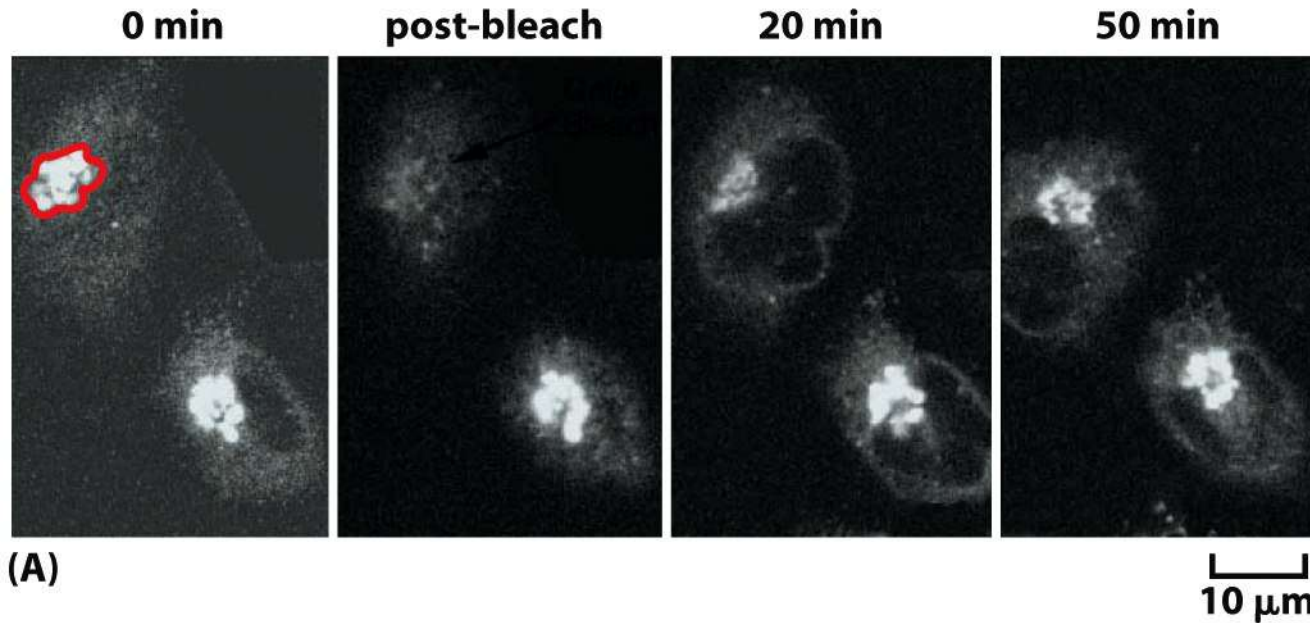
(B) NO PROTEIN INTERACTION
NO EXCITATION OF GREEN
FLUORESCENT PROTEIN,
BLUE LIGHT DETECTED



(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 electronique

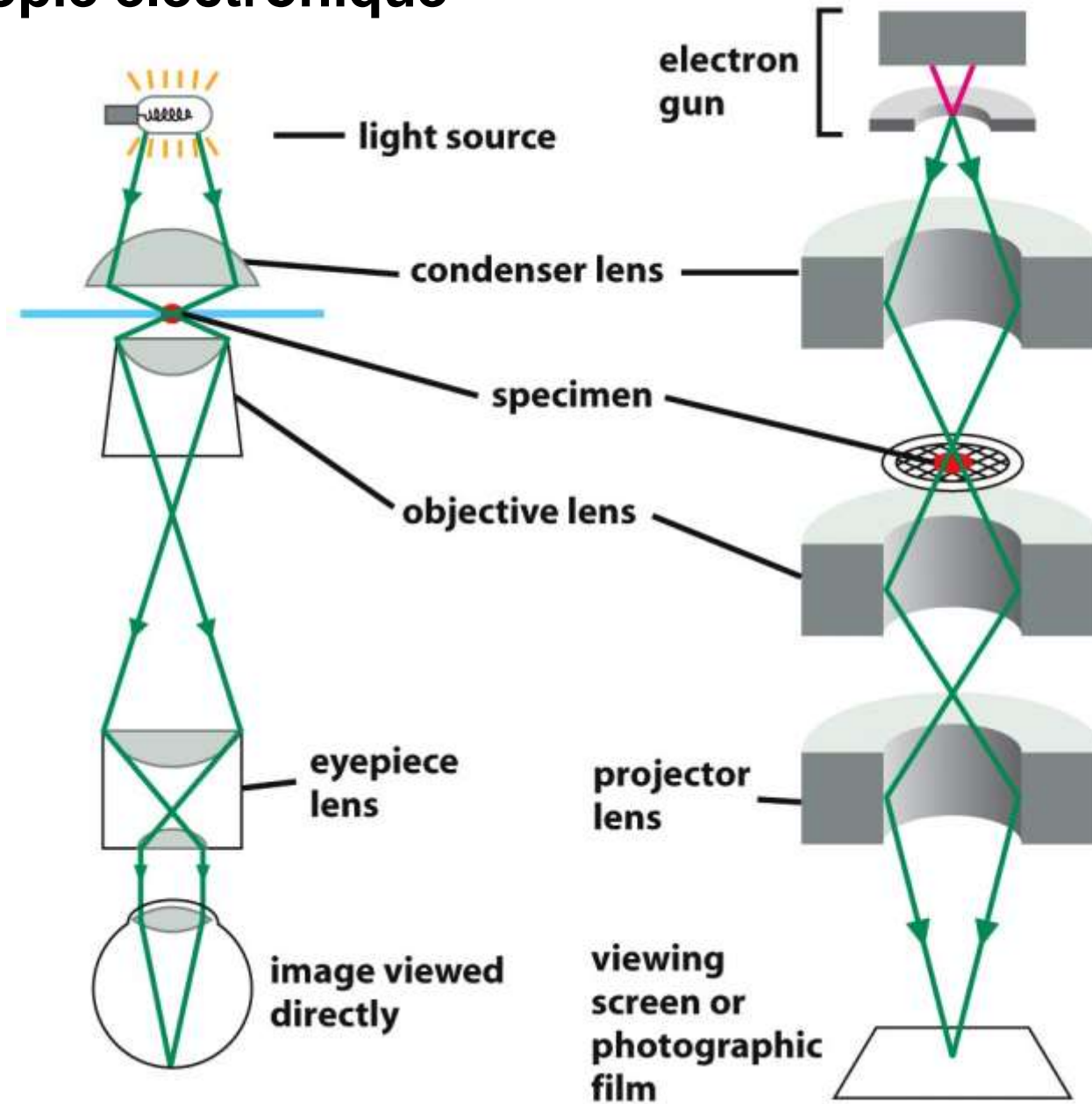


Figure 9-42 (part 1 of 2) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

