

## Chapitre 4 : Les méthodes en biologie cellulaire

### Question 1 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. Un vecteur est un moyen de faire rentrer de l'information génétique dans le noyau d'une cellule hôte afin que cette information soit utilisée par la cellule ; les virus et les plasmides sont utilisés comme vecteurs.
- B. Pour des raisons éthiques, les cellules humaines ne sont jamais utilisées en biologie cellulaire.
- C. En transgénèse classique, on injecte de l'ADN linéaire dans un ovocyte fécondé.
- D. La recombinaison homologue a été développée grâce à un système de défense endogène des bactéries.
- E. Une souris chimère est une souris dont seulement une partie des cellules est porteuse d'une mutation.

### Question 1 – Correction : ACE

**A VRAI** Ce sont effectivement les deux grands moyens utilisés pour faire entrer de l'ADN dans une cellule pour que celui-ci soit pris en charge ; ils ont chacun leur avantage et le choix du vecteur dépend du but de l'expérience.

**B FAUX** Au contraire, les cellules humaines sont très utilisées en biologie cellulaire, car elles sont finalement les plus représentatives, à l'échelle de la cellule, de ce qui nous intéresse pour la clinique. On utilise notamment des types cellulaires particuliers (cellules pancréatiques, hépatiques...) ou des modèles de cellules cancéreuses. Attention, on parle ici d'expériences in vitro, la question éthique se pose quand on arrive au stade in vivo, c'est-à-dire au stade de l'organisme entier. C'est lors d'expériences in vivo qu'on se tournera vers des modèles animaux (souris, poissons, embryons de poulets...) ou la question éthique se pose évidemment également, mais qui sont tout de même très utilisés aujourd'hui.

**C VRAI** Il n'y a pas grand-chose à ajouter, c'est le principe de la transgénèse classique : on injecte de l'ADN linéaire dans une cellule et on espère qu'il sera intégré au génome (car ça se fait de manière aléatoire) à un endroit où il sera transcrit ET où il ne causera pas de dommages trop importants.

**D FAUX** C'est un mélange de deux notions. La méthode CRISPR-CAS9 utilise un système de défense endogène des bactéries : en effet, le principe de l'ARN guide (ARNsg) qui attire l'endonucléase CAS9 est un moyen développé par les bactéries pour se défendre de l'attaque d'un virus (lors d'une primo infection, l'ADN viral est intégré au génome de la bactérie qui produira, à partir de cette séquence, l'ARNsg correspondant lors d'infections suivantes → bim bam boom on recrute CAS9 et on dézingue le virus, et ce y compris dans les générations suivantes de bactéries -pas à savoir, pour votre culture G-). ATTENTION, il est possible d'utiliser la recombinaison homologue pour réparer une lésion induite par la méthode CRIPR-CAS9, cependant la recombinaison homologue elle-même est un **mécanisme mis en place par la cellule en cas d'erreur lors de la réplication de l'ADN** et permettant de combler un « trou » grâce à de l'ADN donneur (vous l'avez sûrement vu plus en détail en UE2 ;))

**E VRAI** Quand on fait de la transgénèse classique ou par recombinaison homologue, on utilise des cellules souches totipotentes – les fameuses cellules ES – porteuses de notre mutation après sélection, et on injecte ces cellules à un stade embryonnaire précoce, le blastocyste (ce qui est cool c'est que vous allez faire de l'embryo bientôt, vous allez tout comprendre). Le stade blastocyste est un stade pluricellulaire, ce qui signifie que vous ajoutez une cellule à un organisme – certes indifférencié – en cours de développement. Ainsi, cette cellule qui se multiplie au milieu des autres cellules non-mutées,

va être à l'origine d'une certaine partie des cellules de notre organismes, mais pas de toutes : on aura un individu chimère. Si on veut obtenir un individu dont toutes les cellules portent la mutation, il faut croiser des chimères entre elles : si les cellules germinales de ces chimères portent la mutation, alors l'individu sera porteur de la mutation pour toutes ses cellules.

**Question 2 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :**

- A. L'utilisation d'un plasmide comme vecteur permet de produire une grande quantité de vecteur en peu de temps, grâce à la multiplication des bactéries.
- B. Pour qu'un vecteur soit pris en charge par les mécanismes de transcription endogènes de la cellule, il doit comporter un codon start et un codon stop.
- C. En biologie cellulaire, on priorise l'injection directe de protéines pour éviter le biais de synthèse induit par l'utilisation de vecteurs.
- D. La cytométrie de flux est une méthode quantitative et qualitative.
- E. Plus la taille d'un constituant cellulaire est grande, plus il faudra de cycles de centrifugation pour le récupérer.

**Question 2 – Correction : AD**

**AVRAI** C'est effectivement l'un des intérêts des plasmides : en insérant un gène d'intérêt dans ce brin d'ADN circulaire et en le réinjectant dans les bactéries, la multiplication des bactéries va permettre la multiplication du plasmide, et donc l'obtention d'une grande quantité de vecteur en peu de temps.

**B FAUX** Un vecteur devra effectivement comporter un codon start et un codon stop (s'il code pour une protéine), mais pour que l'**ARNm** produit soit reconnu par le système de **traduction**. Pour la **transcription** on a besoin d'un **promoteur**.

**C FAUX** Au contraire, il est rare d'injecter directement les protéines, pour plusieurs raisons : l'ADN est plus facile à produire, sa synthèse perdure dans le temps, et les mécanismes endogènes de la cellule prennent en charge les modifications post traductionnelle nécessaire au fonctionnement de la protéine.

**D VRAI** La cytométrie de flux permet à la fois d'observer les caractéristiques des cellules, de les trier, et de les quantifier (éventuellement en fonction de ces caractéristiques).

**E FAUX** Plus la taille d'un constituant cellulaire est petite, plus il faudra de cycles de centrifugation pour le récupérer. C'est logique, les constituants les plus lourds descendront plus vite.

**Question 3 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :**

- A. Le SDS-PAGE permet la séparation de molécules en fonction de la charge.
- B. Le SDS permet de rompre les ponts disulfures.
- C. Le bleu de Coomassie permet de révéler les protéines totales.
- D. On peut révéler des protéines grâce à des anticorps sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide.
- E. Le Western Blot est une méthode quantitative qui permet de comparer les quantités de deux protéines différentes.

### Question 3 – Correction : C

**A FAUX** Au contraire, le SDS -PAGE permet de charger négativement toutes les protéines et ainsi de les séparer en fonction de leur masse cellulaire : en effet, on va ensuite appliquer un champ électrique dans lequel elles vont migrer (en direction du pôle + comme elles sont chargées -), plus elles sont lourdes et plus elles seront retenues et donc moins elles migreront.

**B FAUX** C'est le cas des agents dénaturants ; on parle alors de « conditions dénaturantes ». Le SDS, lui, permet uniquement la rupture des liaisons faibles (on s'était un peu embrouillé.e.s lors de la permanence, d'où ce rappel).

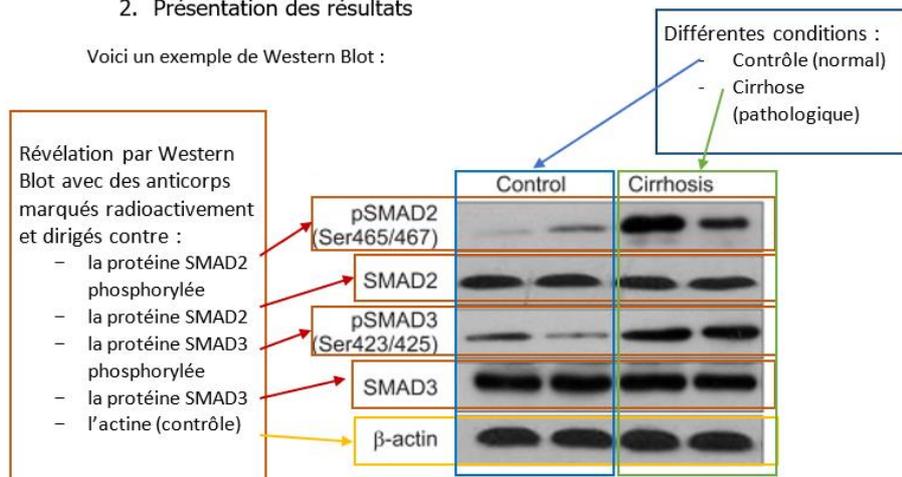
**C VRAI** Yes, contrairement au Western Blot dans lequel on va révéler uniquement les protéines qui nous intéressent grâce à des anticorps, le bleu de Coomassie, en se fixant sur toutes les protéines, permet de révéler les protéines totales, distribuées en fonction de leur poids moléculaire (après migration sur un gel).

**D FAUX** Les gels d'agarose ou de polyacrylamide sont trop fragiles pour ce genre de manipulation, c'est pourquoi on transfère nos protéines/ADN sur une membrane avant révélation.

**E FAUX** Le Western Blot est effectivement une méthode quantitative mais qui permettra uniquement de comparer les quantités d'une même protéine dans deux conditions différentes, autrement dit au sein d'une ligne mais pas d'une colonne.

#### 2. Présentation des résultats

Voici un exemple de Western Blot :



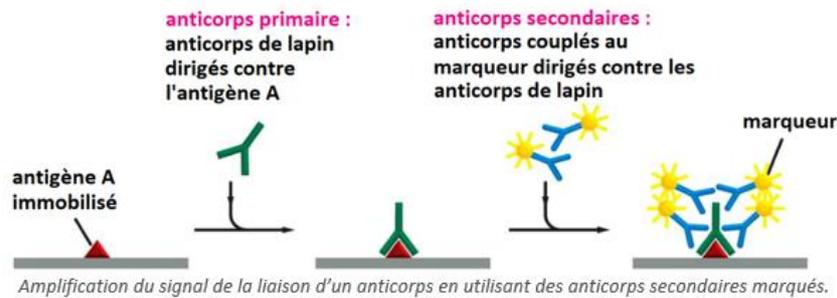
Dans cet exemple du poly, on pourra par exemple comparer les quantités de SMAD2 dans la condition normale (contrôle) et dans la condition cirrhose, et ce grâce à l'actine qui est notre témoin de charge, mais pas entre SMAD 2 et SMAD3 par exemple.

### Question 4 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. Les anticorps secondaires sont uniquement utilisés lorsque l'on cherche à amplifier un signal très faible, sinon cette technique est trop complexe et coûteuse.
- B. Un sérum d'anticorps polyclonal est spécifique d'un antigène.
- C. Dans l'ELISA indirect, le but est de doser un anticorps, alors que l'ELISA par immunocapture permet de doser un antigène.
- D. Une co-immunoprécipitation ne permet jamais de prouver une interaction directe
- E. Pour révéler la présence d'une protéine grâce à un anticorps, il est nécessaire de fixer et de perméabiliser nos cellules, sauf si ces dernières ont un domaine extra-membranaire.

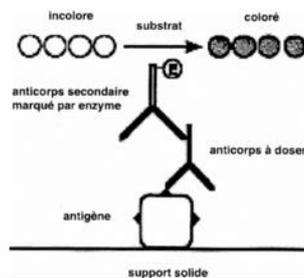
## Question 4 – Correction : BCE

**A FAUX** Au contraire, l'utilisation des anticorps secondaires permet en général de gagner du temps et de l'argent : en effet, plutôt que d'avoir à coupler un anticorps monoclonal spécifique d'une protéine à un fluorochrome, on utilise des anticorps qui reconnaissent la partie Fc (spécifique de l'espèce) des anticorps de l'espèce chez qui on a produit les anticorps spécifiques de notre protéine : si on a un anticorps anti-X produit chez le lapin, il nous suffira d'injecter ces anticorps puis d'utiliser des anticorps anti-lapin fluorescents (que l'on peut produire en grande quantité) pour révéler la présence de notre protéine X :)

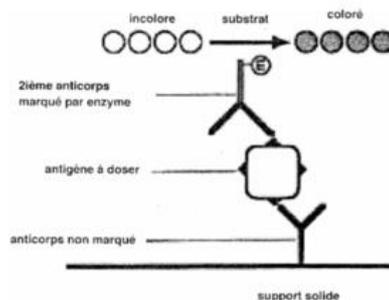


**B VRAI** Attention, un sérum d'anticorps polyclonal n'est pas spécifique d'un épitope, il est en revanche spécifique d'un antigène ;) Les anticorps monoclonaux, eux, sont spécifiques d'un seul épitope (molécule de surface) d'un antigène donné.

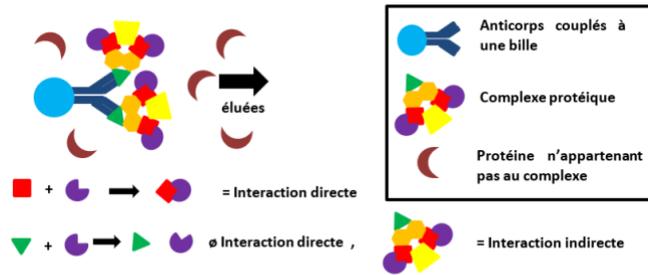
**C VRAI** En ELISA indirect, on fixe un antigène au fond d'une boîte et on quantifie les anticorps récupérés par cette antigène (utilisé en sérologie ou diagnostique de maladies auto-immunes)



En ELISA par immunocapture, c'est l'inverse, on fixe des anticorps et on dose les antigènes récupérés (grâce à des anticorps de révélation).



**D FAUX** En général, l'immunocapture ne permet pas de mettre en évidence une interaction directe mais seulement de prouver que deux protéines font partie d'un même complexe.



Cependant, si l'on effectue une immunocapture sur des protéines purifiées, et qu'on sait donc qu'il ne peut pas y avoir de protéine intermédiaire expliquant la présence de notre deuxième protéine, on peut alors conclure à une interaction directe (cf chapitre des méthodes pour plus de détails).

**E VRAI** Sauf si les protéines que l'on veut révéler sont extra-membranaire, l'utilisation d'anticorps de révélation nécessite de « trouser » la membrane (perméabiliser) afin de faire entrer nos anticorps dans la cellule. On fixe également la cellule afin de conserver son intégrité, ce qui revient également à la tuer.

### Question 5 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. En microscopie électronique, plus une structure est dense, moins elle laisse passer les électrons, et apparaîtra donc blanche
- B. En microscopie confocale, comme on réduit le flou par rapport à la microscopie à épifluorescence, la résolution peut être meilleure que 200nm.
- C. Le FRAP se réalise sur cellules fixées.
- D. La microscopie électronique se fait sur cellules fixées, donc mortes.
- E. La GFP est une protéine de fusion très utilisée en biologie cellulaire.

### Question 5 – Correction : D

**A FAUX** + une structure est dense, moins elle laisse passer les électrons, et + l'image apparaîtra noire. Ce qui est dense apparaît donc noir en microscopie électronique.

**B FAUX** Attention, quelle que soit la situation, en microscopie optique, la résolution n'est jamais meilleure que 200nm !

**C FAUX** En FRAP, on visualise des mouvements de protéines, des synthèses. On travaille donc forcément sur des cellules vivantes. On prend donc des photos à intervalle de temps régulier, ou on réalise de la vidéomicroscopie. Imaginez qu'on ait fixé, donc tué, nos cellules dans cette expérience. Jamais on n'aurait observé un retour de fluorescence vu que tout aurait été figé.

**D VRAI** Cela est + explicite en histologie, mais il est bien de le savoir pour la biologie cellulaire. Pour rappel, en microscopie électronique, on n'éclaire pas l'échantillon avec de la lumière, mais on utilise un faisceau d'électron. Afin d'éviter l'interaction des électrons avec l'air, l'échantillon à observer est donc placé sous vide. Or le vide n'est pas une condition viable pour les cellules. On travaille donc avec des cellules fixées. De plus, parfois on est amenés à préparer l'échantillon avec des particules de métal lourd (car denses aux électrons) pour mieux visualiser certaines structures. Ce traitement n'est pas compatible avec la vie cellulaire.

**E FAUX** La GFP seule n'est pas une protéine de fusion. C'est du fait de ses propriétés fluorescentes qu'on la fusionne à d'autres protéines, par exemple une protéine X, et c'est là qu'on parlera de protéine de fusion X-GFP.

### **Question 6 – Indiquez la ou les affirmation(s) correcte(s) :**

- A. CRISPR est une endonucléase découverte récemment et permettant de cibler et de modifier n'importe quel gène.
- B. On peut utiliser un virus pour injecter de l'ADN dans une cellule.
- C. En transgénèse classique, on ne peut pas contrôler le lieu d'insertion du gène dans l'ADN de la cellule hôte.
- D. Afin d'étudier l'effet du génotype sur le phénotype, on peut utiliser le principe de mutagenèse aléatoire suivi d'un séquençage de l'ADN.
- E. En cytométrie en flux, afin de déterminer en quelle phase du cycle cellulaire est notre cellule, on détecte la quantité d'ADN de la cellule qui passe devant le détecteur.

### **Question 6 – Correction : BCDE**

**A FAUX** Ne lisez pas trop vite ;-). Dans la méthode CRISPR-CAS9, c'est CAS9 qui est l'endonucléase. "CRISPR" veut dire "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", soit "Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées", c'est-à-dire que CRISPR désigne des séquences d'ADN, pas une protéine.

**B VRAI** On a en gros 2 façons d'injecter du matériel génétique dans une cellule, deux façons qu'on appelle vecteurs : les plasmides ou les virus. Pour insérer le plasmide, on peut utiliser l'électroporation, la lipofection, la micro-injection ou le bombardement. Le principe du fonctionnement d'un virus est qu'il va chercher à insérer son matériel génétique dans les cellules qu'il infecte pour qu'il y soit répliqué et que la cellule infectée produise du virus.

#### Récapitulatif :

Insérer ADN dans une cellule -> Vecteur :

- Plasmide
  - Électroporation
  - Lipofection
  - Micro-Injection
  - Bombardement
- Virus

**C VRAI** Effectivement, le lieu de l'insertion dépend du hasard.

**D VRAI** La mutagenèse aléatoire consiste en l'induction de mutations situées au hasard dans le génome, par exemple avec l'utilisation de rayons X. Après avoir induit ces mutations, on observe le phénotype obtenu, et on séquence le génome. On pourra donc potentiellement établir des liens entre certains gènes et la fonction de la protéine qu'ils codent. Prenons un exemple : imaginons que le séquençage après traitement aux rayons X montre que le gène A est muté. On observe sur le phénotype une anomalie au niveau du métabolisme du glucose. On pourra donc supposer que le gène A code pour une protéine dont la fonction est impliquée dans le métabolisme du glucose. Des expériences complémentaires permettront de le vérifier.

**E VRAI** On sait qu'en fonction de la phase dans laquelle se trouve une cellule, sa quantité d'ADN ne sera pas la même. Il y a une quantité  $n$  d'ADN en phase G1, une quantité intermédiaire en phase S lorsque la cellule est en pleine réplication, et enfin une quantité  $2n$  en phase G2/M. Si par exemple on marque l'ADN au DAPI (qui est un agent intercalant émettant de la fluorescence bleue), une cellule en phase G2 sera deux fois + fluorescente qu'une cellule en phase G1. Après passage des cellules devant le détecteur, elles vont donc être chargées positivement ou négativement selon l'intensité de fluorescence détectée et on pourra donc séparer les cellules selon la phase du cycle dans laquelle ils sont par l'intermédiaire de leur quantité d'ADN.