

Méthodes d'étude et techniques en biologie cellulaire et moléculaire

I L'outil anticorps

Objectif : détecter, localiser, extraire **SPÉCIFIQUEMENT** une protéine

	Ac POLYclonaux (Ac Pc)	Ac MONOclonaux (Ac Mc)
Description	Dirigés contre différents épitopes d'un même antigène Ag	Dirigés spécifiquement contre un seul épitope de l'Ag
Production	Injection d'un Ag à un animal (espèce différente de celle dont l'Ag a été extrait), immunisation puis récupération dans le sérum de l'animal des Ac Pc	Idem Ac Pc mais récupération des LB de l'animal puis formation d'hybridomes (fusion LB/cellule immortelle) => Ac récoltés dans le milieu de culture
Avantages	Sensibilité élevée (nombreux épitopes reconnus)	Spécificité élevée (produits en grande quantité)
Inconvénients	Spécificité faible (variabilité d'un animal à l'autre)	Sensibilité faible (un seul type d'épitope reconnu)

Spécificité : capacité d'agir uniquement avec la cible voulue et d'ignorer les autres (plus la spécificité est élevée, moins il y aura d'interaction perturbatrice (ou bruit de fond) => si un Ac reconnaît des protéines différentes (soit parce qu'elles possèdent un épitope commun, soit parce qu'elles possèdent des épitopes de structure similaire), on parle de **réaction croisée**

Sensibilité : capacité à détecter la cible (plus la sensibilité est élevée, plus il va détecter sa cible, même si elle n'est pas très concentrée)

Exemples : co-immunoprécipitation, test fonctionnel (Ac neutralisant/bloquant => perte de fonction de la protéine => fonction protéine), western-blot, dosage, immunofluorescence => **Triton** : détergent doux => perméabilisation des cellules pour permettre aux Ac de pénétrer

II L'outil marquage

Objectif : détecter un élément d'intérêt (anticorps, molécule...)

	Type de marquage	Méthode de détection
Marqueur radioactif	Isotopes radioactifs (^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{32}P ...) => fixation à un Ac, à une sonde d'hybridation, incorporation dans une molécule en synthèse...	Autoradiographie (MO, ME)
Marqueur fluorescent	Fluorochrome = molécule qui, excitée par une lumière d'une certaine longueur d'onde λ , réémet de la lumière (de λ supérieur) - Organite/molécule : rhodamine 123 (mitochondries), DAPI et Hoechst (ADN), thiazole orange (ARN) - Fonction : carboxyfluorescéine (PH cellulaire), iodure de propidium et bromure d'éthidium (viabilité cellulaire), BrdU-FITC (prolifération cellulaire) - Ac, sonde d'hybridation, protéine	MO à épifluorescence Cytométrie en flux
Marqueur enzymatique	Enzyme qui transforme un substrat en un produit détectable (coloré, précipité métallique...) Enzyme présente <i>in vivo</i> (ex : peroxydase => MEE des peroxysomes) ou liée à un Ac ou à une sonde d'hybridation	MO, ME (selon l'enzyme)
Marqueur métallique	Billes d'or colloïdal	ME

III Microscopie

2 principaux types de microscopie :

- Microscopie **optique** (= microscopies photoniques), utilisant la lumière : 100-500 nm
- Microscopie **électronique**, utilisant un faisceau d'électrons : 0,2-2 nm

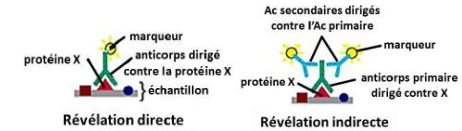
Colorants utilisés pour distinguer les cellules mortes des cellules vivantes :

- Colorants vitaux : rouge neutre, bleu de crésyl
- Colorants des cellules mortes : bleu trypan, bleu de toluidine, hémalum, éosine, fuchsine acide, HES (Hémaroxiline-Éosine-Safran)

IV Immunofluorescence - immuno(histo/cyto)chimie

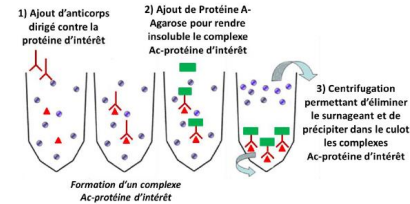
Objectif : localisation spécifique d'une protéine à l'aide d'Ac marqués => méthode **non quantitative**

Protocole : **directe** (1 seul type d'Ac marqué fixant la molécule) ou **indirecte** (2 types d'Ac : un Ac primaire fixant la molécule et un Ac secondaire marqué reconnaissant spécifiquement l'Ac primaire => permet d'amplifier le signal, d'améliorer la sensibilité)

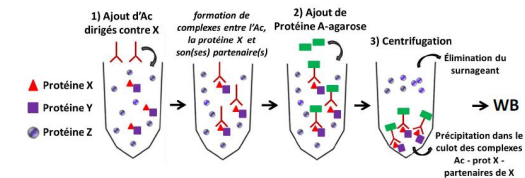


V Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation

Immunoprécipitation : extraire une protéine d'un milieu liquide



Co-immunoprécipitation : mettre en évidence des interactions protéine-protéine



Attention : en condition NON dénaturante afin de préserver les interactions moléculaires
Cette étape est souvent suivie d'un WB en condition dénaturante afin d'identifier les protéines co-immunoprécipitées

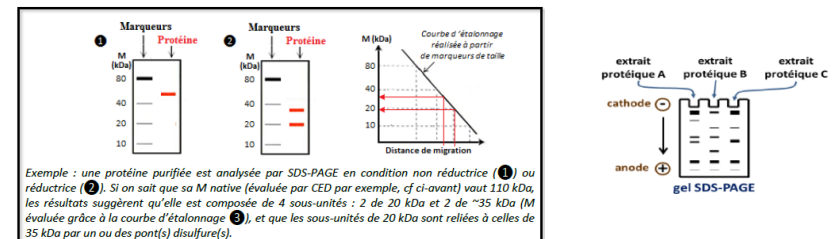
Remarque : on peut aussi faire du ChIP (immunoprécipitation de chromatine) pour déterminer si une protéine est fixée sur l'ADN (et sur quelle séquence) => lyse cellulaire et fragmentation de la chromatine (souvent par sonification = ultrasons pour rompre l'ADN), immunoprécipitation et enfin analyse de l'ADN co-précipité (généralement par PCR après élimination des protéines et extraction de l'ADN)

VI Western Blot (WB)

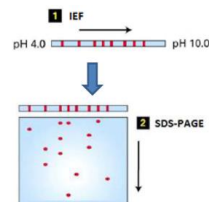
Objectif : **expression ou non, quantité** (grâce à un témoin expérimental*), **forme/taille d'une protéine** (poids moléculaire PM en kDa) => permet éventuellement de détecter des modifications d'une protéine, de déterminer la composition d'une protéine oligomérique en sous-unités

Protocole :

- 1 Séparation des protéines suivant la **TAILLE** (plus la protéine est petite, plus elle va migrer loin) par **électrophorèse*** (**SDS-PAGE** le + souvent : gel de polyacrylamide + dodécyl-sulfate de sodium = détergent qui dénature les protéines en dissociant les chaînes protéiques unies par des liaisons non covalentes et qui masque leur charge propre en leur donnant une charge négative $\pm \beta$ -mercaptoéthanol = agent réducteur => réduit les ponts disulfures) sous l'effet d'un champ électrique entre 2 électrodes (migration des charges « - » vers l'anode « + »)
- 2 Transfert sur membrane, incubation avec des Ac marqués avec une enzyme, lavages (éliminent l'excès d'Ac), révélation (Ac marqué)



*Types d'électrophorèses : PAGE natif (charge + taille + forme), SDS-PAGE (taille), isofocalisation (gradient de pH => immobilisation dans la zone de PH = pHi), bi-dimensionnelle/2D (focalisation isoélectrique puis SDS-PAGE : pHi + taille => permet de séparer des molécules de tailles très voisines et un très grand nombre de protéines)



*Témoin expérimental = protéine présente en quantité équivalente dans tous les échantillons quelles que soient les conditions expérimentales

- > Vérifier la réussite de la technique
- > Comparer les quantités de protéines d'intérêt d'une condition à l'autre

VII Sondes et hybridation

Objectif : reconnaître spécifiquement un acide nucléique cible (ADN ou ARN, sous forme simple brin) à l'aide d'une sonde marquée (ADN, ARN, oligonucléotide de synthèse sous forme simple brin), de **séquence complémentaire** de la cible

Protocole :

1. Isolement de l'ADN/ARN, (digestion par une ou des enzyme(s) de restriction si ADN), séparation par électrophorèse (conditions dénaturantes pour les ARN pour éliminer les structures secondaires)
2. (Dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin : chaleur, pH extrêmes, solvants organiques comme l'urée, le formamide)
3. Transfert sur membrane
4. Ajout des sondes d'hybridation :
 - Homoduplex = duplex formé par association de brins parfaitement complémentaires
 - Hétéroduplex = duplex formé par association de brins NON parfaitement complémentaires (NB : plus une sonde est grande, plus la formation d'hétéroduplex est favorisée)
5. Lavages puis révélation

Stringence : plus la stringence est élevée ($\uparrow$ T°C, $\downarrow$ force ionique), plus l'hybridation est défavorisée donc plus on favorise les appariements spécifiques, entre séquences de complémentarité élevée



Southern Blot : mise en évidence mée (présence ou non) et/ou évaluation quantité/taille d'une séquence d'ADN => mée de remaniements de grande taille (délétions, amplifications), mutation ponctuelle touchant un site de restriction

- > Limites : nécessite une grande quantité d'ADN (=> problématique en diagnostic prénatal), long (8-10 jrs), peu ou pas quantitatif

Northern Blot : idem Southern Blot mais pour l'ARN + spécificité tissulaire, ARNm différents (gène homologues, épissage alternatif...)

- > Assez peu sensible (elle ne permet pas de détecter de faibles quantités d'ARN, contrairement à la RT-PCR)

Hybridation in situ : mée/évaluation quantité d'une séquence d'ARN/ADN dans un échantillon biologique dont la structure a été préservée

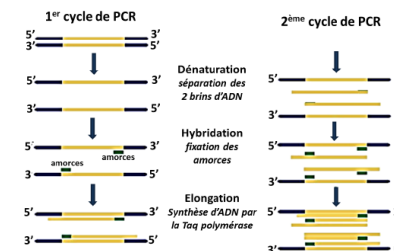
- > Localisation +++ (si le marquage est fluorescent, on parle de **FISH = Fluorescent In Situ Hybridization**)

VIII PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

Objectif : amplifier spécifiquement une séquence d'ADN (PCR) ou d'ARNm sous forme d'ADN (RT-PCR) ± quantifier les transcrits

Protocole :

1. (Transcription inverse si ARNm : obtention d'un ADN complémentaire = ADNc)
2. Dénaturation des 2 brins d'ADN par $\uparrow$ T°C (chauffage à 95°C environ) => molécules d'ADN monocaténares = ADNmc qui servent de matrice
3. Hybridation des amorces nucléotidiques ($\downarrow$ T°C pour permettre une bonne fixation des amorces sur l'ADN) : amorces = 20^{ème} de nucléotides pour assurer la spécificité de l'amplification (on limite le risque qu'elles s'hybrident avec des séquences qu'on ne souhaite pas amplifier)
4. Élongation de l'ADN à partir des amorces grâce à une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) ($\uparrow$ T°C)



Nombreux cycles de copie successifs (une 30^{ème} généralement) : N cycles = 2^N copies

Applications des produits de PCR (liste non exhaustive) :

- Mise en évidence de mutations ponctuelles par hybridation des produits PCR avec des sondes oligonucléotidiques (séquences normales et mutées) => technique dite du « dot-blot »
- Analyse de restriction (PCR RFLP) : une mutation ponctuelle, si elle crée OU abolit un site de restriction, modifie les fragments obtenus après digestion par l'enzyme reconnaissant ce site => elle est à l'origine d'un « polymorphisme de longueur des fragments de restriction » (RFLP)
 - => L'amplification par PCR d'une région d'ADN contenant le site muté, suivie d'une digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction concernée et d'une électrophorèse des fragments obtenus, permet de mettre en évidence la mutation
 - => Méthode de diagnostic d'une mutation ponctuelle connue
- Introduction du produit PCR dans un vecteur : **clonage** du produit PCR
- Séquençage direct du produit PCR
- Analyse électrophorétique des produits PCR (ex : QF-PCR) : variation du nombre de copies (délétions, duplications...)
- (RT)-PCR en temps réel :
 - Système fluorescent (fluorochrome sur la sonde qui va être repéré une fois libéré) permettant de détecter, cycle après cycle (= « en temps réel »), la formation des amplicons



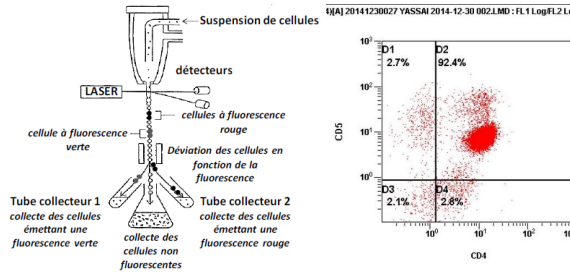
- Quantification d'un fragment d'ADN ou d'ARN d'intérêt présent initialement dans un échantillon
 - ✓ Relative = comparaison du gène d'intérêt à un gène de référence
 - ✓ Absolue = utilisation d'une gamme étalon (obtenue par dilutions d'un échantillon de référence dont on connaît la concentration)
- Étudier l'expression d'un gène, déterminer le nombre de copies d'un gène (=> diagnostic de CNV par délétion, duplication)
- Génotypage par discrimination allélique : PCR avec 2 sondes Taqman différentes (1 sonde reconnaissant l'allèle sain et 1 sonde reconnaissant l'allèle muté avec 2 fluorochromes différents) => mesure de la fluorescence émise par chacun des 2 fluorochromes pour déterminer si le sujet ne possède que l'allèle sain (homozygote sain : 1 seule fluorescence), possède l'allèle sain et l'allèle muté (hétérozygote : 2 fluorescences), ne possède que l'allèle muté (homozygote muté)
- Plus sensible et plus précise que le Southern et Northern blots

IX Séquençage

Cf. maladies génétiques

X Cytométrie en flux (CMF)

Objectif : compter et caractériser des cellules marquées défilant à grande vitesse dans le faisceau d'un laser puis les trier en fonction de la qualité et/ou de la quantité de la lumière réémise (diffusion ou fluorescence)



Applications : diagnostic/suivi d'affections hématologiques/cancérologique, immunologie (détection/identification des sous-types des cellules impliquées dans l'immunité), cycle cellulaire (suivi de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle)...

XI Culture cellulaire

Conditions de culture : 37°C, atmosphère stérile et humide avec 5-10% de CO₂, milieu de culture nutritif (sels minéraux, nutriments, facteurs de croissance) de pH = 7

3 types de cultures cellulaires :

- **Organotypique :** culture d'un fragment d'organe (explant) prélevé sur une personne vivante (= biopsie)
 - Avantage : conservation de l'architecture du tissu prélevé
 - Inconvénient : durée de vie de l'explant très courte
- **Cellules dissociées :** dissociation des cellules d'une biopsie par agitation mécanique (37°C) en présence de **trypsine** (enzyme protéolytique permettant la rupture des liaisons cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire) => culture primaire (recouvrement de la surface du support) puis repiquage des cellules (**trypsine** => détache les cellules du support et mise en suspension) => culture secondaire (autre support) puis repiquages successifs
 - Avantage : obtention d'un grand nombre de cellules
 - Inconvénient : durée de vie limitée (≈ 30 repiquages), perte de l'architecture, modification possible des cellules
- **Lignées cellulaires « immortelles » :** peuvent proliférer et être repiquées indéfiniment (ex : cellules HeLa = cellules cancéreuses du col de l'utérus, d'origine humaine : cellules artificiellement immortalisées par ajout de produits chimiques cancérogènes ou infection par un virus oncogène puis clonées)
 - Avantage : cultivables indéfiniment
 - Inconvénient : propriétés ≠ différentes de celles des cellules de l'organisme

XII Pulse-chas(s)e

Objectif : identifier le lieu de synthèse et le devenir de molécules d'intérêt

Protocole :

- 1 PULSE : marquage d'une molécule par incorporation d'un précurseur radioactif (ose, AG, uridine tritiée, thymidine tritiée, AA)
- 2 CHASSE : après le pulse, le précurseur marqué est éliminé du milieu et/ou des précurseurs non marqués sont ajoutés en grande quantité de façon à permettre au processus étudié de se poursuivre (utilisation préférentielle du précurseur non marqué par effet de dilution)
- 3 Autoradiographie : fixation (ex : paraformaldéhyde) d'échantillons prélevés à des moments différents (la molécule radioactive est présente, suivant le temps de chasse, à différents endroits) puis révélation au microscope

XIII Patch clamp

Objectif : mesurer le potentiel de membrane ou le courant électrique passant à travers la membrane plasmique pour évaluer les flux d'ions reflétant l'activité des canaux ioniques ou conductance (une pipette en verre contenant une électrode est fixée à la mb cellulaire), stimulus d'ouverture, probabilité d'ouverture, sélectivité ionique

XIV Protéines de fusion

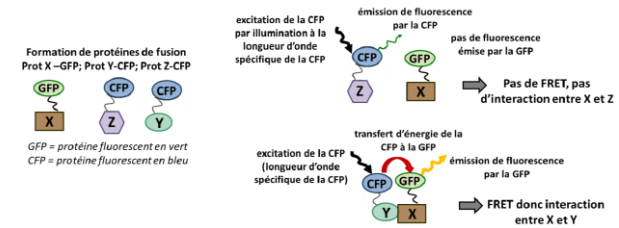
Objectif : localiser, extraire plus facilement une protéine d'intérêt par immunoprécipitation/WB/immunofluorescence

Protocole : génie génétique => production d'un gène chimérique (par recombinaison de gènes) codant la protéine d'intérêt « fusionnée »/liée de manière covalente à une autre protéine (ou un peptide) qui lui sert d'étiquette (tag => Ac anti-tag), inséré dans un vecteur d'expression

Remarque : certaines protéines comme la GFP (Green Fluorescent Protein) sont naturellement fluorescentes => anti-GFP après fusion

XV FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Objectif : détecter, dans les cellules vivantes, des interactions entre protéines d'intérêt



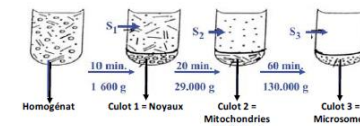
Condition de fluorescence : distance séparant les 2 molécules très faible car interaction

XVI Fractionnement cellulaire par centrifugation

Objectif : séparer les différents constituants cellulaires (fonctionne également pour séparer des protéines)

Protocole :

- 1 Obtention de l'homogénat : choc osmotique (cellules placées dans une solution hypotonique => afflux massif d'eau dans les cellules => rupture de la membrane plasmique), techniques mécaniques
- 2 Centrifugation : rotation à grande vitesse de l'homogénat afin d'accélérer la sédimentation (= dépôt au fond du tube) des constituants cellulaires => différentielle (série de centrifugations à vitesses et durées croissantes), gradient de densité (croissante vers le fond du tube)



XVII Test rapporteur

Objectif : étudier la régulation transcriptionnelle d'un gène d'intérêt



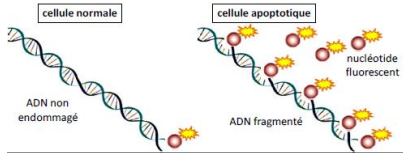
Protocole :

- 1 Introduction dans la cellule d'une construction avec un gène rapporteur (= codant pour une protéine dont l'expression est facilement détectable/mesurable => ex : GFP, luciférase...) placé en aval des séquences promotrices dont on souhaite étudier la fonction
- 2 Mesure de l'expression de la protéine codée par le gène rapporteur :
 - Sa détection indique que le gène rapporteur a été transcrit donc que le promoteur contient les séquences nécessaires à la transcription d'un gène
 - Son absence signifie que le gène rapporteur n'a pas été transcrit donc que le promoteur n'est pas fonctionnel : soit ce promoteur ne contient pas de séquences régulatrices activatrices de la transcription (type enhancer), soit il contient des séquences inhibitrices (type silencer) qui ont empêché l'activation de la transcription

XVIII Méthode TUNEL

Objectif : détecter des cellules en apoptose

Protocole : marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par des nucléotides fluorescents via la terminal-transférase (tdt) => mise en évidence de la fragmentation de l'ADN nucléaire (résultant de l'activation d'endonucléases au cours de l'apoptose)



XIX Modèles animaux

Critères de choix : facilité d'élevage (coût et espace), développement rapide/cycle de vie court, petite taille, données biologiques, pertinence chez l'homme (gènes homologues)

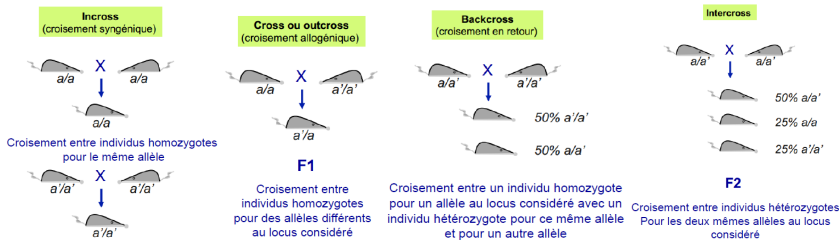
Différents modèles :

- *C. elegans* (nématode) : l'un des animaux pluricellulaires les mieux caractérisés au niveau génomique, génétique et embryologique, étude de l'apoptose +++
- *Drosophile* : homologie intéressante avec l'homme, étude du développement +++
- *Zebrafish* : développement embryonnaire observable à travers les œufs qui sont transparents, systèmes visuel/rénal/sanguin proche de l'homme
- *Souris* : physiologie comparable à l'homme, disponibilité de cellules souches embryonnaires, durée de vie entre 1 et 3 ans, 20 jours de gestation, femelles fertiles de l'âge de 6-8 semaines jusqu'à environ 14 mois, environ 8 portées d'environ 9, possibilité de cultiver *in vitro* l'œuf fécondé jusqu'au stade blastocyste, superovulation (TT hormonal) possible pour obtenir plusieurs dizaines d'embryons au stade préimplantatoire

Différents types de lignées :

- Lignées **consanguines** : tous les individus sont homozygotes à tous les locus = génétiquement identiques
 - Peuvent être obtenues en croisant à partir de géniteurs quelconques les frères et sœurs sur au moins 20 générations
 - Inconvénients : en général peu prolifiques, ne sont pas représentatives de l'espèce
- Lignées **non consanguines**
- Lignées **congéniques** : lignée d'un fond génétique dans laquelle a été transférée une portion de génome d'un autre fond génétique => obtention des lignées congéniques par backcross successifs

Différents types de croisements :



Règle des 3 R :

- **Reduce** (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation :
 - Limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables
 - Réduction des répétitions inutiles (éviter répétition d'études antérieures, faites dans un autre pays)
 - Rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation (soumis à un comité d'éthique)
- **Refine** (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption ou « end-points »)
- **Replace** (Remplacer) les modèles animaux par d'autres voies alternatives (*in vivo* => *in vitro* ou « *in silico* »)

XX Clonage

Objectif : étudier l'activité transcriptionnelle d'un promoteur par la méthode du gène rapporteur, produire de grande quantité de protéines en vue d'analyse structurale (cristallographie) ou fonctionnelle (mutagenèse dirigée), produire des protéines recombinantes à utilisation thérapeutique, étudier des interactions protéine-protéine par la méthode du double hybride

Protocole :

- 1 Isolement de l'ARNm codant pour la protéine à produire à partir de cellules humaines productrices de la protéine
- 2 Rétrotranscription en ADNc par une **reverse transcriptase** avec ajout d'adaptateurs (linkers) contenant des sites de restriction
- 3 Conversion en **ADN bicaténaire** via une **ADN polymérase**
- 4 Incorporation dans un **plasmide** (= vecteur circulaire, en général « épisomal » = pas intégré dans le génome de la cellule hôte) : une enzyme de restriction coupe l'ADN-bc autour des sites de restriction (palindromes = séquence identique sur les 2 brins lus dans le même sens) ainsi que le vecteur, l'ADN-bc s'incorpore, la ligase referme.
- 5 Introduction du plasmide dans la cellule hôte : choc thermique, électroporation, lipofection
- 6 Sélection du plasmide : **gène de résistance à un antibiotique** (Amp^r : résistance à l'ampicilline), gène LacZ codant la β-galactosidase => culture des cellules hôtes dans un milieu avec l'ATB (les bactéries qui survivent portent le gène concerné) et les colonies sont blanches
- 7 **Extraction** :
 - Produits **très fragiles** => la fragilité ⚡ avec la **complexité de la molécule** (peptides moins fragiles que protéines) => toutes les opérations sont pratiquées à 0°C pour préserver la conformation et l'activité de ces molécules (dénaturation par la chaleur, les alcools), molécules **hydrosolubles**
 - La protéine doit être **active et non immunogène, stable** et avec le **meilleur rendement**
 - Protéine **secrétée** : centrifugation + filtration (=> élimination cellule hôte) puis extraction + purification
 - Protéine **non sécrétée** : rupture de la cellule hôte puis centrifugation + filtration puis extraction + purification
- 8 **Purification** :
 - **Méthodes chromatographiques en milieu aqueux** : échange d'ions, exclusion (Séphadex), partage (cellulose, oxycellulose), adsorption (hydroxyapatite), affinité (phosphate de Ca hydraté)
 - **Cristallisation au pH** (isoélectrique) : molécules amphotères, charge globale nulle au pH => solubilité minimale au pH
 - **Électrophorèse**

Remarque : notion d'isochizomères = enzymes de restriction reconnaissant un même site, mais coupant dans des conditions différentes (ex : des isochizomères peuvent être sensibles à la méthylation de l'ADN : une enzyme peut couper les séquences CG qu'elles soient méthylées ou non alors que l'autre enzyme ne coupe les séquences CG que si elles ne sont pas méthylées => en comparant les résultats obtenus avec ces enzymes, il est possible de préciser l'état de méthylation d'îlots CpG de l'ADN et donc d'émettre une hypothèse sur l'activité d'un gène

Mode de production : **fermenteur** (bactéries, levures), **bioréacteur** (cellules de mammifères), animaleries spécialisées, **serres** ou plein champ (plantes transgéniques)

Cellule hôte bactérienne = procaryote (<i>E. coli</i>)	Cellule eucaryote (levures, cellules de mammifères*)
Multiplication rapide et aisée => grande capacité de production	Multiplication plus lente => production moins importante
Pas d'excision-épissage	Machinerie d'excision-épissage
Absence de certaines modifications post-traductionnelles (ex : glycosylation)	Modifications post-traductionnelles (ex : glycosylation)
Ex : insuline, interféron	Ex : insuline, EPO

*CHO (Chinese Hamster Ovary)

Remarque : promoteur nécessaire pour la transcription de l'insert : promoteurs + ou - forts (ex : expression élevée avec des promoteurs viraux), tissus-spécifiques (ex : en thérapie génique), inducibles (ex : système « Tet-on », système « Tet-off »...)

Remarque : la PCR, parce qu'elle permet également une amplification ciblée d'une séquence (*in vitro*) peut être dans certains cas une alternative au clonage

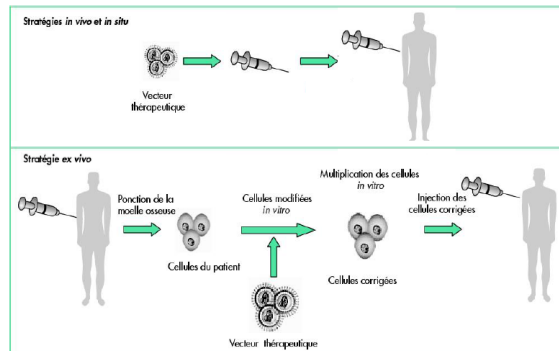
XXI Les stratégies de gain, perte ou modification de fonction

Objectif : étudier la **fonction cellulaire d'une protéine**, faire exprimer une protéine manquante ou défectueuse (**thérapie génique**)

Technique = **transfection** => introduire des acides nucléiques exogènes (plasmide dans le noyau, ARN et si-ARN dans le cytoplasme par lipofection ou électroporation) pour les faire exprimer par la cellule

Gain de fonction : **surexprimer la protéine normale** par insertion d'un « **transgène** »

- Étudier la **fonction cellulaire**
- **Thérapie génique** (seule la somatique est autorisée, pas la germinale car il est interdit de modifier l'hérédité du malade)
 - Applications : introduction d'un transgène permettant l'expression d'une protéine déficiente dans une maladie (ex : mucoviscidose), rétablissement dans les cellules tumorales de l'expression de certains gènes protecteurs...
 - Difficultés : transfert efficace, expression durable, ciblage des cellules, effets secondaires (réactions immunitaires/inflammatoires, mutagenicité suite à l'intégration du transgène dans le génome)
 - Vecteurs utilisés : vecteurs viraux (adénovirus +++), les + utilisés => conservent leur pouvoir infectieux (capable de pénétrer de manière efficace et ciblée dans des cellules et de faire exprimer leur génome par une cellule hôte), dépourvus de pouvoir pathogène (virus « déficient ») mais immunogénicité, risque pathogène, intégration mutagène, ciblage peu efficace



- **Gène suicide** en cancérologie codant une enzyme convertissant un médicament inactif en composé cytotoxique (mais effets secondaires dus notamment à un ciblage imparfait)

Perte de fonction : inhiber l'expression de la protéine :

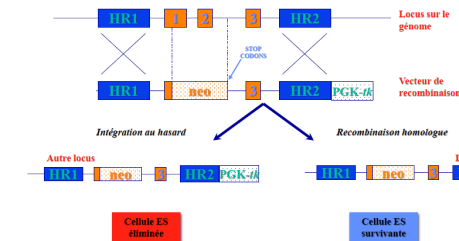
- Stratégie antisens :
 - **siRNA** : petits ARN introduits artificiellement dans une cellule de séquence parfaitement complémentaire de celle de l'ARNm cible => destruction par le complexe RISC, peut agir successivement sur plusieurs molécules d'ARNm
 - **Oligomorpholinos** : oligonucléotides de synthèse, modifiés chimiquement pour être très stables au cours des générations => fixation sur l'ARNm => encombrement stérique qui empêche la machinerie de traduction (ribosomes) de lire l'ARNm
- Mutant dominant négatif : introduction d'un **gène** (au sein d'un vecteur d'expression) ou d'un **ARNm** codant une **forme mutée** de la **protéine** => la protéine mutée, largement majoritaire, entre en compétition avec la protéine sauvage et altère son action

Animaux transgéniques :

- Principe : ajout d'un gène, invalidation d'un gène (« Knock out » KO), modification ou remplacement d'un gène (« Knock in » KI)
- Protocole : transgène introduit dans des **cellules souches embryonnaires (ES)** placées dans un **blastocyste** (car les cellules ES ne possèdent pas le pouvoir organisateur de l'œuf au stade 1) qui est implanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante (accouplement avec un mâle vasectomisé) puis croisement des animaux obtenus => obtention d'animaux hétérozygotes et homozygotes
- Applications : création de modèles animaux de maladies génétiques ou de cancer pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques ou tester des solutions thérapeutiques, étude de la régulation ou de la fonction d'un gène *in vivo*, production de protéines...

Systèmes permettant la réalisation de modifications ciblées :

- **Recombinaison homologue** avec sélection par la néomycine (élimine les cellules qui n'ont pas intégré le gène) et la gancyclovir (élimine les cellules qui ont intégré le gène au hasard)

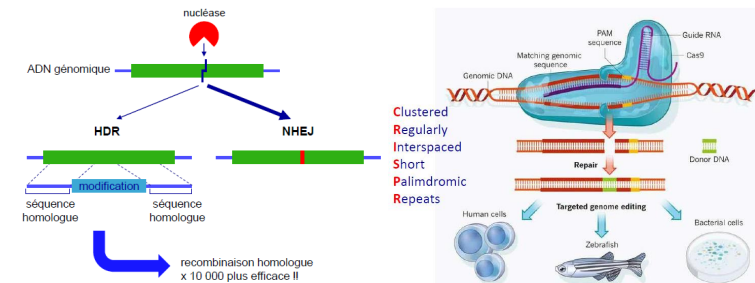


Aspects importants :

- Utilisation d'un transgène cloné dans la même souche que les cellules ES
- Régions d'homologie de grande taille (environ 5 à 10 kb)
- Structure locale de la chromatine
- Interrompt les séquences essentielles
- Bonne stratégie de criblage (PCR et Southern - sondes externes +++)
- Se débarrasser si possible des marqueurs de sélection

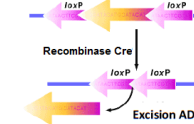
- Système **CRISPR/Cas9** :

- **ARN guide** avec séquence complémentaire de la séquence cible
- **Motif PAM** (Protospacer Adjacent Motif) en 3' de la séquence à cibler
- Nucléase **Cas9** : système bactérien de protection contre les ADN étrangers (viraux), induction de cassures double-brin dans l'ADN => inactivation du gène ou introduction de gènes hétérologues à travers 2 types de réparation :
 - ✓ La jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ = **N**on **H**omologous **E**nd **J**oining) : introduit des mutations par insertion ou délétion d'un nucléotide => permet l'invalidation du gène cible par décalage du cadre de lecture et apparition d'un codon stop prématuré
 - ✓ La recombinaison homologue (HDR = **H**omology **D**irected **R**epair) : permet l'intégration d'un fragment d'ADN



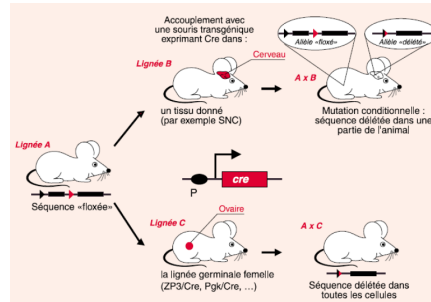
Modification conditionnelle : contrôle du lieu et/ou du moment de réalisation d'une modification => système **Cre-LoxP**

- Séquences **loxP** (= **L**ocus of **x** over **P**) = 2 séquences d'ADN palindromiques (= 30 nucléotides) reconnues par l'enzyme Cre : une région encadrée par des séquences Lox est dite « **floxxée** »
- **Cre** (= **C**auses **R**ecombination) = recombinaison assurant l'élimination d'une région floxxée => on place le gène codant Cre sous contrôle d'un promoteur judicieusement choisi (inductible par un agoniste spécifique)



- Intérêts :

- La présence de la mutation dans toutes les cellules de la souris ne permet parfois pas d'obtenir des informations sur la fonction du gène muté
- Lorsque la mutation entraîne à l'état homozygote une létalité embryonnaire, il est impossible d'étudier la fonction du gène
- Lorsqu'un gène est exprimé dans plusieurs tissus, son invalidation provoque parfois un **phénotype complexe** difficile à analyser

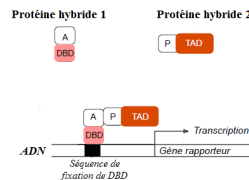


XXII Double hybride

Objectif : mise en évidence d'interactions physiques entre molécules (interactions protéine-protéine, protéine-ADN)

Principe : vecteurs d'expression, permettant la présence conjointe d'un :

- Gène rapporteur** (= gène dont le produit d'expression est aisément repérable => ex : gène de la luciférase), placé sous contrôle d'une séquence promotrice sur laquelle peut se fixer un FT, protéine-hybride DBD
- Protéine DBD (DNA Binding Domain du FT)-protéine A (« Appât »)
- Protéine P (« Proie »)-TAD (domaine de transactivation de la transcription du FT)
- 2 témoins négatifs : DBD-protéine A seule, Protéine P-TAD seule



Si expression du gène rapporteur => interaction physique entre A et P

Applications :

- Cribler une banque d'expression à la recherche de partenaires potentiels d'une protéine A
- Étudier des interactions constitutives mais aussi des interactions conditionnelles (ex : interaction entre X et A uniquement après que X a fixé un ligand, interaction entre plusieurs protéines au sein d'un complexe multiprotéique)
- Pas applicable à toutes les protéines : applicable aux protéines solubles mais pas aux protéines membranaires notamment

XXIII Chromatographies

Principe général : les composants d'un mélange sont déposés sur une colonne contenant une phase stationnaire (le support de chromatographie : gel, résine) => chaque type de **composant** migrera ± **rapidement en fonction des interactions établies avec la phase stationnaire** => **détection** des protéines en sortie de colonne (dosage)

Type de chromatographie	Critère de séparation/d'élution
Exclusion stérique = exclusion diffusion = gel filtration Support = grains (microbilles) de gel poreuses	Volume (taille et forme => MM) : migration d'autant plus ralentie/volume d'élution d'autant plus grand que le volume est petit (étalonnage du gel avec des protéines de MM connues pour pouvoir estimer la MM d'une protéine d'intérêt)
Échange d'ions (CEI) Support = billes de résines : Chargées « + » (CE d'anions) : diéthylaminoéthyl Chargées « - » (CE de cations) : carboxyméthyl	Charge : volume d'élution d'autant plus grand que la protéine est « acide » (+ de charges « - ») en CE d'anions, que la protéine est basique (+ de charges « + ») en CE de cations Compétition avec un contre-ion (aussi de charge contraire à celle de la résine) en concentration croissante (ex : NaCl)
Phase inverse : élution par ↑ concentration d'un solvant organique hydrophobe (ex : acétonitrile) => séparation des protéines à l'état dénaturé Interaction hydrophobe : élution par ↑ concentration d'un solvant peu polaire ou par ↓ de [sels] => séparation des protéines à l'état natif Support hydrophobe	Hydrophobicité : volume d'élution d'autant plus grand que la protéine est hydrophobe (interactions favorisées par une concentration en sels élevée)
Affinité* Support = ligand (Ac...) de la protéine d'intérêt	Fixation spécifique : les protéines fixées sont retenues sur la colonne puis seront ensuite éluées par changement du pH, de force ionique...

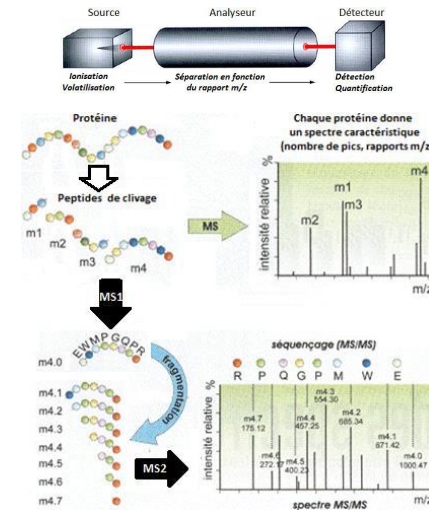
*Méthode dérivée = immunocapture => ligand fixé à de billes magnétiques qui ne sont pas dans une colonne mais mélangées à la solution d'intérêt et qui sont recueillies grâce à un aimant

XXIV Spectrométrie de masse (MS)

Objectif : déterminer la **masse moléculaire** (MM) et la **quantité** d'un composé (grande précision), **séquencer un peptide**, mettre en évidence avec précision des **modifications post-traductionnelles**...

Principe :

- Ionisation de la protéine (production d'un « ion moléculaire ») + passage en phase gazeuse => rapport m/z
- Analyse par un analyseur qui sépare les peptides/protéines en fonction de leur rapport entre masse et charge (rapport m/z)
- Comparaison avec une banque de données pour trouver la séquence



MS en tandem (MS/MS) : un peptide (sous forme d'ion moléculaire) est isolé après une 1^{ère} MS et fragmenté au niveau de ses liaisons peptidiques, les différents fragments sont analysés par une 2^{ème} MS

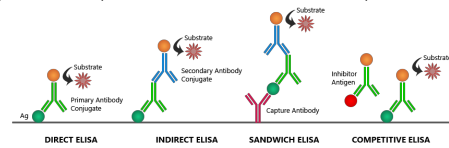
Clivage des protéines : BrCN (bromure de cyanogène : coupe après Met), protéases (ex : trypsine coupe après Arg et Lys)

XXV Dosage des protéines

Dosage général des protéines totales : dosage direct par spectrophotométrie, dosage après réaction colorimétrique (ex : Biuret, bleu de Coomassie) => mesure de l'absorbance à 280 nm (AA aromatiques), à 215 nm (liaison peptidique)

Dosage spécifique d'une protéine d'intérêt :

- Dosage **immunochimique** (Ac) : si la protéine n'est pas une enzyme, on la dose en mesurant la fixation d'un ligand spécifique :
 - Immunoturbidimétrie (quantification du trouble du milieu)
 - **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) = « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée »
 - ✓ Enzyme aisément repérable fixée à un Ac (éventuellement couplé à un 2^e Ac primaire lié au substrat d'intérêt)



- ✓ Applications : détecter et/ou quantifier la **présence d'un Ac ou d'un Ag dans un échantillon** (m.o, allergènes...)
- ✓ Avantages : sensible, spécifique, quantitative, peu coûteuse

- Dosage de l'**activité** : si la protéine est une enzyme, sa quantité est proportionnelle à son activité