

## LE FONCTIONNEMENT DES MICROSCOPES OPTIQUES ET ELECTRONIQUES

**Microscopie : instrument d'optique plus sophistiqué qu'une loupe (comportant plusieurs lentilles).**

**Objectifs : observer des objets de petite taille ; localiser des structures moléculaires (ou autres) au sein de ces objets de petite taille, en association avec les techniques de marquage.**

**Pouvoir séparateur = pouvoir de résolution (noté  $d$ ) = distance maximale séparant deux points pour qu'ils soient vus distincts l'un de l'autre.** Pouvoir séparateur de l'œil humain = environ 0,1 mm.

Pour un instrument d'optique, le pouvoir séparateur maximum s'obtient par la relation suivante :

$$d = 0,61 \times \frac{\lambda}{n \times \sin a}$$

$\lambda$  = longueur d'onde de la radiation incidente.

$n$  = indice de réfraction du milieu séparant l'objet de l'objectif ( $n = 1$  dans l'air)

$a$  = angle d'ouverture du rayon incident.

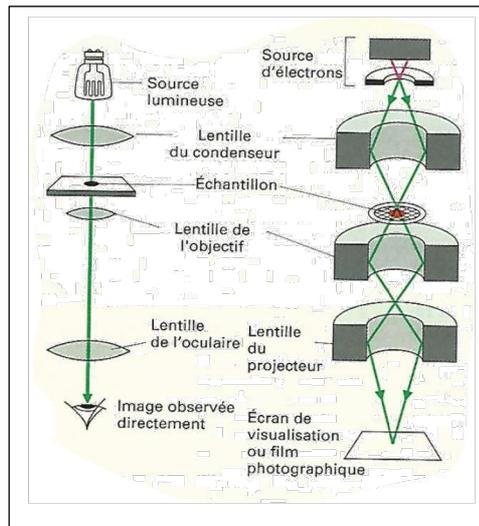
Si on utilise un microscope optique à lumière bleue ( $\lambda = 400$  nm) avec un objectif à immersion (dans de l'huile de cèdre,  $n = 1,51$ ), on obtient un pouvoir séparateur  $d = 0,2$   $\mu\text{m}$ , ce qui correspond à un **grossissement max de x 2000**. Impossible de dépasser cette valeur, quelle que soit la qualité et la précision des lentilles utilisées.

**Microscopes électroniques : faisceau d'électrons concentré, soumis à une très forte accélération :** permet d'obtenir une  $\lambda = 0,005$  nm. En théorie, le pouvoir séparateur d'un microscope électronique de l'ordre du picomètre. En pratique (à cause de limites techniques), il est de l'ordre de **0,1 nm pour les MET (grossissement x 1 000 000), et de 1 nm pour les MEB les plus performants (grossissement x 100 000)**.

### 1- Fonctionnement d'un microscope optique (M.O)

- Observation d'objets de fine épaisseur, traversés par un **rayonnement lumineux**. Le rayonnement traverse ensuite deux lentilles (l'une appelée objectif, l'autre oculaire) qui permettent de grossir l'image.

- Grossissement de l'observation = **grossissement de l'objectif x grossissement de l'oculaire**.



### 2 - Fonctionnement d'un microscope électronique à transmission (MET)

- Semblable à celui d'un microscope optique, mais le rayonnement utilisé est un **faisceau d'électrons concentré projeté sur un écran**.

- Le faisceau traverse la coupe et frappe l'écran (on observe alors une zone claire), ou est absorbé par la coupe (donne une zone sombre sur l'écran) → **observations toujours en noir et blanc**.

**Préparation des échantillons (MO ou MET) : mise au point se fait sur un plan, et le rayonnement utilisé doit traverser l'objet observé DONC doit être très fin** (1 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour le MO, 50 à 100 nm pour le MET).

→ frottis (étalement d'une suspension liquide) ou une coupe (réalisée généralement avec un microtome).

→ Possibilité d'observer des **objets encore vivants seulement au MO**, mais généralement échantillon tué et fixé pour améliorer sa conservation.

→ Subit aussi un traitement permettant d'améliorer les contrastes : coloration pour le MO, imprégnation de substances métalliques au pour le MET.

→ Possibilité de réaliser un marquage spécifique d'une structure, par une substance radioactive, des anticorps ou une sonde nucléotidique (voir fiche correspondante).

## Diversité des microscopes optiques

→ **Microscope à fluorescence** : observer un échantillon marqué avec des substances fluorescentes : le rayonnement lumineux arrive sur le côté (et pas par en-dessous) de l'échantillon, de manière à **exciter les fluorochromes**. On n'observe **que la lumière émise par ces substances fluorescentes**.

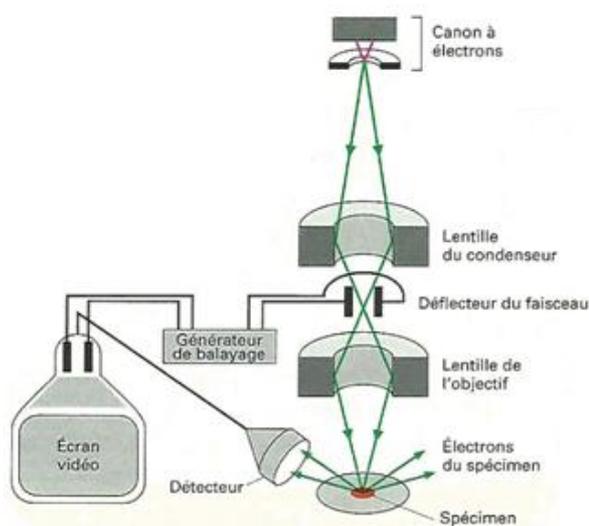
→ **Microscope à contraste de phase** : observer des **cellules vivantes sans coloration** : accentue les contrastes en exploitant les **différences d'indices de réfraction entre les composants observés**.

→ **Microscope polarisant pour lames minces de roches** : utilise les **propriétés de réfringence de la lumière par les minéraux pour les faire apparaître avec des teintes de polarisation spécifiques**.

Rq : Il en existe d'autres : microscopie confocale, à fond noir, etc.

## 3- Fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (MEB) : permet de visualiser les reliefs des objets étudiés.

- MEB plutôt utilisé pour réaliser des observations **en relief de structures relativement grandes**, par exemple une tête d'insecte



- Utilise un faisceau d'électrons (comme MET), mais **ce faisceau ne traverse pas la préparation** : il **balaye l'échantillon**, et **certain électrons sont réfléchés par l'échantillon puis captés par des détecteurs placés au-dessus et sur les côtés de la préparation**. Ce **signal est alors converti en une image en relief** : en effet les électrons sont mieux réfléchés par les protubérances, qui apparaissent lumineuses, et les creux apparaissent sombres sur l'image.

- Échantillon fixé et séché et généralement recouvert d'une **fine pellicule métallisée** (or ou palladium) afin d'améliorer sa résistance, puis observé tel quel (sans réaliser de coupe, l'objectif étant d'observer les reliefs de l'échantillon).

## 4- Cryofracture : Objectif : observer des reliefs à l'échelle cellulaire

- Après fixation, l'échantillon est **congelé instantanément dans l'azote liquide (- 200 °C)**.

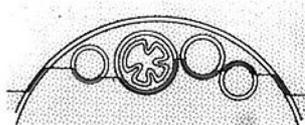
- Placé dans un **système de cryofracture** : **fracturer l'échantillon en deux**.

- Une des 2 faces de la fracture soumise à une **pulvérisation d'un mélange de métal et de carbone, réalisée en biais = ombrage métallique**.

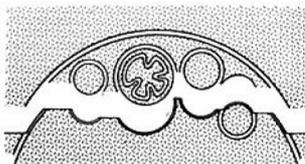
- **Échantillon biologique détruit** : il ne reste que la **réplique fidèle de la surface des structures cellulaires**

- **Observation au MET** : l'ombrage métallique permettant d'obtenir une image **avec une impression de relief**.

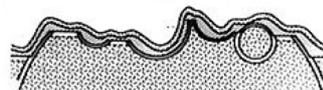
(a) Congélation de l'échantillon entre deux coupelles



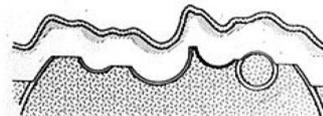
(b) Fracturation de l'échantillon



(c) Pulvérisation de l'échantillon avec du métal et du carbone



(d) Détachement de la réplique et destruction de l'échantillon initial



Étapes de la technique de cryofracture. La réplique obtenue est ensuite observée au MET.

**Objectifs : séparer et purifier des structures cellulaires ou supramoléculaires** (généralement préliminaire à d'autres techniques plus précises).

- **Principe** : repose sur le fait que 2 particules en suspension se déposent au fond d'un tube à des vitesses différentes, en fonction de leurs coefficients de sédimentation, exprimé en Svedberg (S). Il dépend de la densité, mais aussi de la taille et de la forme de la particule.

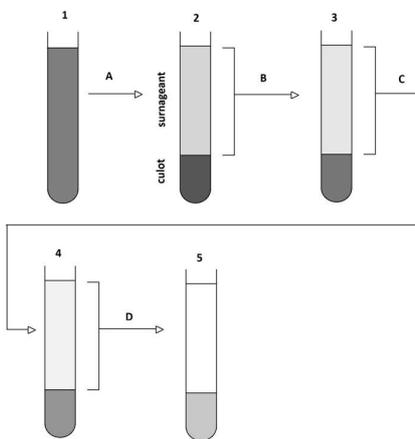
La centrifugation accélère cette sédimentation en soumettant les particules en suspension à des forces centrifuges pouvant atteindre un million de fois la force gravitationnelle → permet la sédimentation de particules de masse molaire jusqu'à 10 kDa.

- Utilisée pour séparer des organites ou de grosses structures cellulaires (ribosomes, etc.).

- 2 grands modes de centrifugations :

→ **La centrifugation différentielle** : permet de séparer un culot (particules sédimentées) d'un surnageant (solution et particules non sédimentées) grâce à une force centrifuge adaptée (suffisante pour faire sédimenter le culot, mais pas pour faire sédimenter le surnageant).

On peut utiliser des vitesses de rotation croissantes pour faire sédimenter des particules de densités décroissantes.



### Principe de la centrifugation différentielle

1. Homogénéat cellulaire

A. Sonication puis centrifugation basse vitesse

2. Le culot contient des cellules entières et les noyaux, le surnageant contient le reste

B. Récupération du surnageant et centrifugation vitesse moyenne

3. Le culot contient les mitochondries, lysosomes, peroxyosomes

C. Récupération du surnageant et centrifugation haute vitesse

4. Le culot contient des petites vésicules, le REG, l'appareil de Golgi

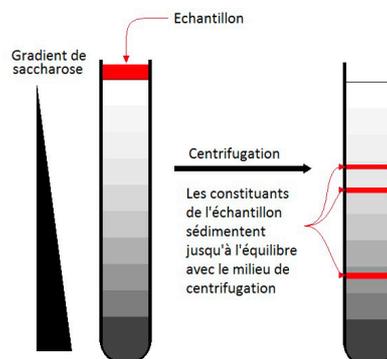
D. Récupération du surnageant et centrifugation très haute vitesse

5. Le culot contient des virus et des macromolécules, le surnageant contient le cytosol.

→ **La centrifugation zonale = centrifugation sur gradient de densité** : permet de séparer des particules en plusieurs groupes selon leur densité, en les centrifugeant dans un tube contenant une solution de saccharose (ou autre substance) de plus en plus concentrée en allant vers le fond du tube.

Les particules centrifugées se positionnent alors dans une zone du gradient de saccharose qui présente une densité identique à la leur.

Technique plus délicate mais permet de mieux séparer et purifier les particules ainsi séparées.



**Objectifs : localiser une molécule spécifique (dans une cellule, un organisme, un extrait purifié, une électrophorèse, etc.).**

**Principe du marquage par isotopes radioactifs**

- La plupart des éléments naturels présentent plusieurs isotopes. Certains de ces isotopes sont **instables, subissent des désintégrations en émettant des rayonnements radioactifs.**
- Les isotopes couramment utilisés en biologie sont le **tritium 3H, le carbone 14 (14C), le phosphore 32 (32P), le soufre 35 (35S), l'iode 131 (131I), etc.**
- Possibilité de produire ces isotopes radioactifs et de les **incorporer à des molécules** (eau, dioxyde de carbone, phosphate, acides aminés, bases azotées, etc.).

- Ces molécules sont suivies dans la cellule ou un autre matériau :

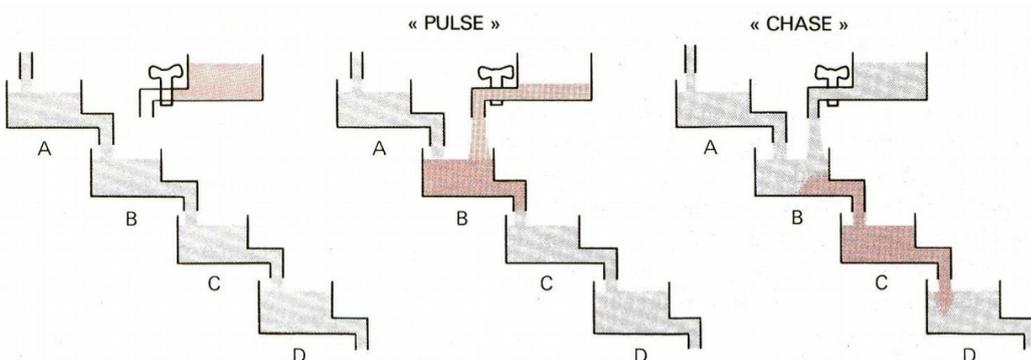
→ **Par autoradiographie** : on réalise une **coupe du tissu, que l'on recouvre d'une émulsion photographique. Les rayonnements provoqués par la désintégration des isotopes radioactifs réduisent les sels d'argent de l'émulsion, faisant apparaître ainsi des points métalliques aux endroits où se trouvent les molécules marquées. Le métal est opaque aux électrons et ces points apparaissent noir au microscope électronique à transmission.**

On **localise ainsi l'isotope radioactif mais sans connaître sa quantité.**

→ **Par dosage** : une partie du tissu est isolée, placée en suspension et la quantité de molécule radioactive mesurée avec un **appareil adapté (compteur Geiger ou scintillateur).** On **quantifie ainsi la quantité d'isotope radioactif, mais sans visualiser sa localisation**

**Pulse-chase** : consiste à fournir aux cellules une molécule précurseur sous forme radioactive, de sorte que les **molécules radioactives se mêlent aux molécules non radioactives déjà présentes dans la cellule.**

Pour améliorer la lisibilité de ce genre d'expérience, on réalise un **pulse** dans lequel la période de marquage est brève, suivie d'une période de **chase** pendant laquelle la molécule radioactive est remplacée par son équivalent non radioactif. Le **prélèvement d'échantillons à intervalles réguliers** permet d'observer la progression de la population de molécules marquées dans la cellule.



**Modèle simplifié illustrant l'intérêt du suivi dynamique par un marquage de type pulse / chase.**

En évacuant les substances marquées du compartiment B, le chase permet de visualiser le déplacement de ces substances vers le compartiment C.

## L'immunomarquage

- Anticorps = protéines produites pour se défendre contre des éléments étrangers = molécules **remarquables par leur spécificité très stricte : reconnaissance d'un antigène, parmi des millions d'autres.**
- **Incroyablement diversifiées** : il existe donc **potentiellement, pour chaque molécule, un anticorps capable de la reconnaître et de la fixer sans affecter les autres.**
- **Très simple de produire des anticorps monoclonaux** (reconnaissant le même antigène), en injectant la molécule qu'on cherche à marquer à une souris. Il suffit ensuite de récupérer, sélectionner et cultiver les plasmocytes de ces souris puis de **purifier les anticorps qu'ils produisent.**

→ **Marquage de l'antigène** en plaçant l'échantillon biologique étudié en présence d'une solution d'anticorps, puis lavage pour éliminer l'excédent d'anticorps non fixés.

→ **Visualisation** se fait par

- **autoradiographie** : anticorps marqués radioactivement,
- **anticorps couplés à des fluorochromes** (molécules fluorescentes) ou à des **particules d'or** (opaques aux électrons et donc formant des points noirs au microscope électronique à transmission).

**Utilisation de fluorochromes (= fluorophores)** : molécules pouvant être excitées par une lumière de longueur d'onde donnée et émettant alors une lumière de longueur d'onde supérieure pendant un temps court. Fluorochromes divers émettant dans le vert (fluorescéine, GFP), jaune (Lucifer Yellow), le rouge (rhodamine, phycoérythrine)...

- **anticorps couplés à une enzyme qui catalyse une réaction dont le produit est coloré.** Chaque enzyme étant capable de fabriquer plusieurs milliers de molécules colorées, le signal visuel **est fortement amplifié.** Cette technique est utilisée par exemple pour les tests ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée).

Pour améliorer la sensibilité de la méthode : **détection indirecte**, avec un **anticorps secondaire capable de se fixer sur l'anticorps primaire, qui lui-même se fixe sur l'antigène recherché.** C'est cet anticorps secondaire qui est marqué : fluorochrome, particules d'or, enzyme, etc.



Technique d'immunomarquage indirect.

Peut être réalisé sur des cellules ou des tissus, on parle d'**immunocytochimie**; ou alors sur des extraits purifiés (voir fiche sur les électrophorèses et les blots).

## Le marquage d'acides nucléiques par sonde complémentaire

Acides nucléiques (ADN et ARN) = molécules caractérisées par leur **séquence**, c'est-à-dire l'enchaînement des nucléotides. On utilise un autre acide nucléique marqué et de séquence complémentaire, appelé **SONDE**, marquée radioactivement, avec un **fluorochrome**, ou avec une enzyme catalysant la fabrication d'un produit coloré.

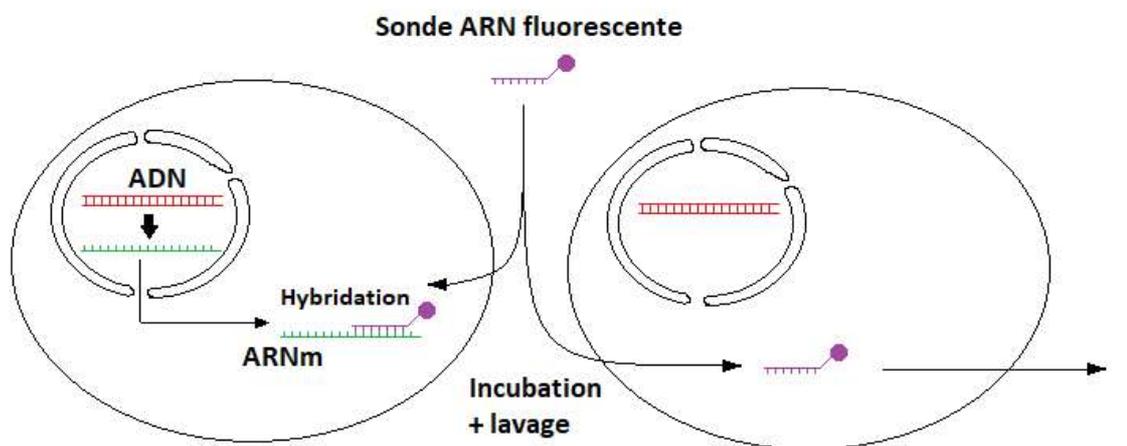
- Sonde ensuite incubée avec la préparation contenant la séquence recherchée. Les deux séquences complémentaires s'hybrident fortement,

étape de lavage permet d'éliminer l'excédent de sonde non fixée.

Visualisation par autoradiographie (si la sonde est marquée radioactivement) ou par une autre technique.

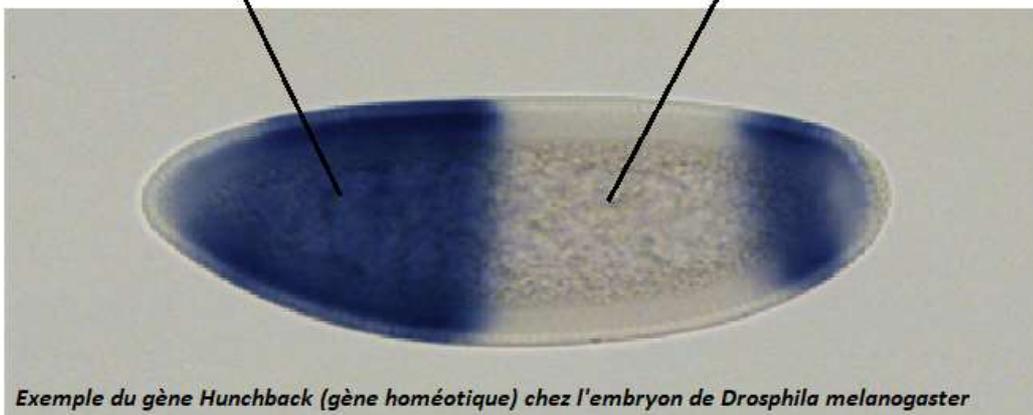
**Hybridation in situ** : marquage d'acides nucléiques directement dans un tissu. Cette technique permet notamment de localiser des ARN messagers et ainsi de savoir dans quel(s) type(s) cellulaire(s) s'exprime le gène correspondant.

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) : révéler une séquence d'ADN ou d'ARN en particulier grâce à une sonde d'ADNc



Expression du gène : cellule fluorescente

Pas d'expression : cellule non fluorescente



**Objectifs : séparer et purifier des molécules à partir d'un mélange en solution.**

**Principe général de la chromatographie : repose sur l'interaction entre des molécules, une phase mobile (généralement un solvant, appelé aussi éluant, dans lequel les molécules sont plus ou moins solubles), et une phase stationnaire (généralement un support solide).**

**Certaines molécules sont fortement associées à la phase stationnaire et migrent lentement, d'autres ont une forte affinité pour la phase mobile et migrent rapidement.**

→ **Chromatographie sur couche mince** : la phase stationnaire = une couche de matériel adsorbant solide (gel de silice, cellulose, etc.). Un échantillon est déposé sur une extrémité du support solide. On fait ensuite remonter une solution contenant un mélange de plusieurs solvants par capillarité à travers la couche mince ou le papier. Les différents composants de l'échantillon migrent à des vitesses différentes dans le support solide **selon leur solubilité relative dans le solvant par rapport à leur affinité au support solide**. → Ils sont ainsi séparés.

Pour quantifier les résultats, on utilise le rapport frontal :

$$RF = \frac{\text{distance entre le dépôt et la tache}}{\text{distance entre le dépôt et le front de migration}}$$

→ **Chromatographie liquide sur colonne** : phase stationnaire = microbilles contenues dans une colonne de verre. La solution contenant les éléments à séparer est déposée au sommet de la colonne et est entraînée avec l'éluant grâce à la force de gravité. En général, on ajoute de l'éluant en permanence pour faciliter l'écoulement : c'est l'**élution**.

→ **Chromatographie par filtration sur gel : sépare les molécules en fonction de leur taille**. Mélange de molécules déposé en haut d'une colonne remplie de billes poreuses. Les molécules les plus petites sont emprisonnées dans les billes et traversent la colonne plus lentement que les grosses, qui passent rapidement entre les billes. On peut les recueillir différentes fractions dans des tubes distincts.

→ **Chromatographie par échange d'ions : sépare les molécules en fonction de leur charge**. Mélange de molécules déposé en haut d'une colonne remplie de billes chargées (soit positivement, soit négativement). Les molécules de même charge que les billes sont repoussées et traversent librement la colonne, tandis que les molécules de charge opposée se fixent sur les billes. Ces dernières sont ensuite récupérées en changeant d'éluant : on fait passer une solution saline dans la colonne, et lorsque les ions se fixent sur les billes, ils en chassent les molécules qui traversent alors la colonne à leur tour.

→ **Chromatographie d'affinité : on fixe sur les billes de la colonne une substance capable de se fixer très fortement sur la molécule recherchée** (anticorps, ou bien le ligand spécifique d'une protéine). Seule la molécule ayant une affinité élevée pour la substance fixée sur les billes reste dans la colonne, toutes les autres la traversent librement. Pour récupérer cette molécule, on fait passer une **solution dénaturante** dans la colonne, qui **détruit les liaisons faibles et détache la molécule des billes** → purifie une seule molécule bien spécifique dans un mélange complexe.

## ÉLECTROPHORESES ET TRANSFERTS SUR MEMBRANE (BLOTS)

### ÉLECTROPHORESES

**Objectifs : séparer voire purifier des molécules à partir d'un mélange en solution ; détecter une molécule spécifique parmi celles qui ont été ainsi séparées (blot) ; estimer l'expression d'un gène précis (northern blot) ou la présence d'une protéine particulière (western blot) ; mettre en évidence une interaction ADN/ protéine (retard sur gel).**

**Principe général de l'électrophorèse : technique qui permet de séparer des molécules (généralement des protéines ou des acides nucléiques) dans un mélange. Ce mélange est déposé sur un support solide poreux soumis à un champ électrique. Le support peut être un gel (d'agarose, de polyacrylamide, etc.) ou une bande (de papier, d'acétate de cellulose, etc.).**

**Les molécules se déplacent à une vitesse déterminée par leurs propriétés chimiques : masse, encombrement (les molécules lourdes et encombrantes se déplacent lentement) et / ou charge (les molécules chargées négativement migrent vers l'anode, et les molécules chargées positivement migrent vers la cathode ; plus une molécule est chargée, plus elle migre vite).**

Coloration non spécifique : les molécules sont visualisées en utilisant un colorant non spécifique. Dans le cas de l'ADN, on utilise par exemple du bromure d'éthidium (BET), qui devient fluorescent aux ultraviolets en présence d'ADN. Pour les protéines, on utilise couramment du bleu de Coomassie.

#### Électrophorèse en conditions non dénaturantes

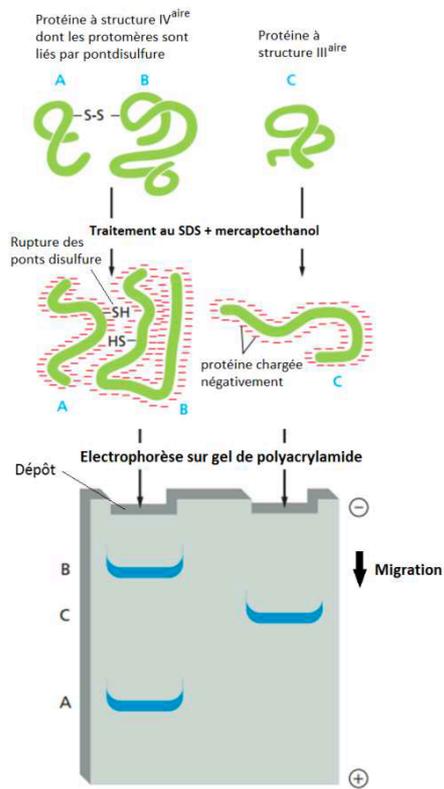
- La plus simple. Dans ces conditions, les acides nucléiques et la majorité des protéines sont **toujours chargés négativement** : ces molécules migrent donc vers la cathode.
- Un **marqueur de taille** = mélange de fragments de tailles connues, souvent utilisé pour déterminer la taille des fragments analysés.
- Technique surtout utilisée pour séparer les acides nucléiques (ADN et ARN), qui n'ont pas de forme tridimensionnelle spécifique et pour qui la charge est proportionnelle à la taille. **Leur vitesse de migration ne dépend donc que de leur taille.**
- Les protéines : leur migration en conditions non dénaturantes dépendrait de trois facteurs différents : **leur masse, leur encombrement, et leur charge** → d'où utilisation conditions suivantes

#### Électrophorèse en conditions dénaturantes : généralement du SDS (DodécylSulfate de Sodium).

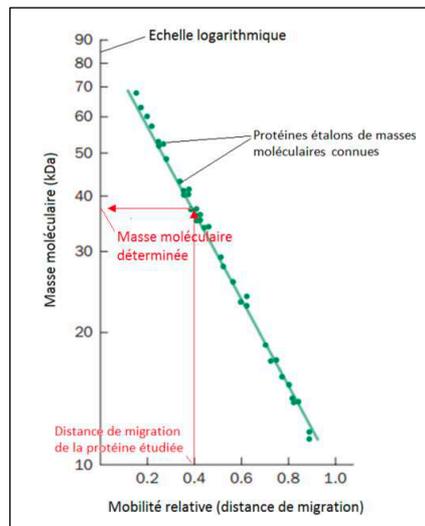
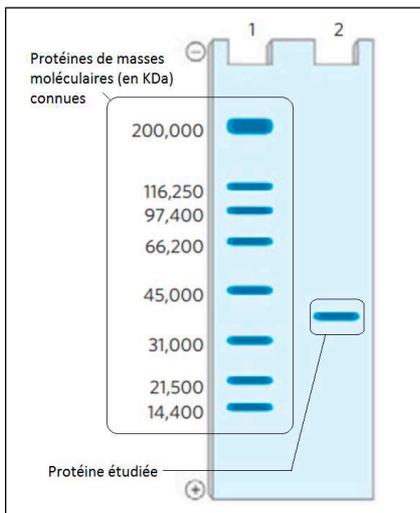
**Objectif : séparer les protéines uniquement en fonction de leur masse, en traitant le mélange avec un agent dénaturant. Les protéines ainsi dénaturées passent ainsi à l'état de simples chaînes polypeptidiques. Le SDS permet aussi de charger négativement les protéines de façon homogène. Ainsi, au cours de l'électrophorèse, les protéines migrent dans le gel (généralement de polyacrylamide) à une vitesse qui dépend de leur masse.**

Remarque 1 : on peut également réaliser un traitement au  $\beta$  mercapto-éthanol, qui réduit les ponts disulfure : la conséquence de ce traitement est la séparation des sous-unités d'une protéine liées par ponts disulfure.

Remarque 2 : en général, on dépose dans la première piste un mélange de protéines de masses moléculaires connues, qui servira d'« échelle » pour déterminer la taille des autres protéines.



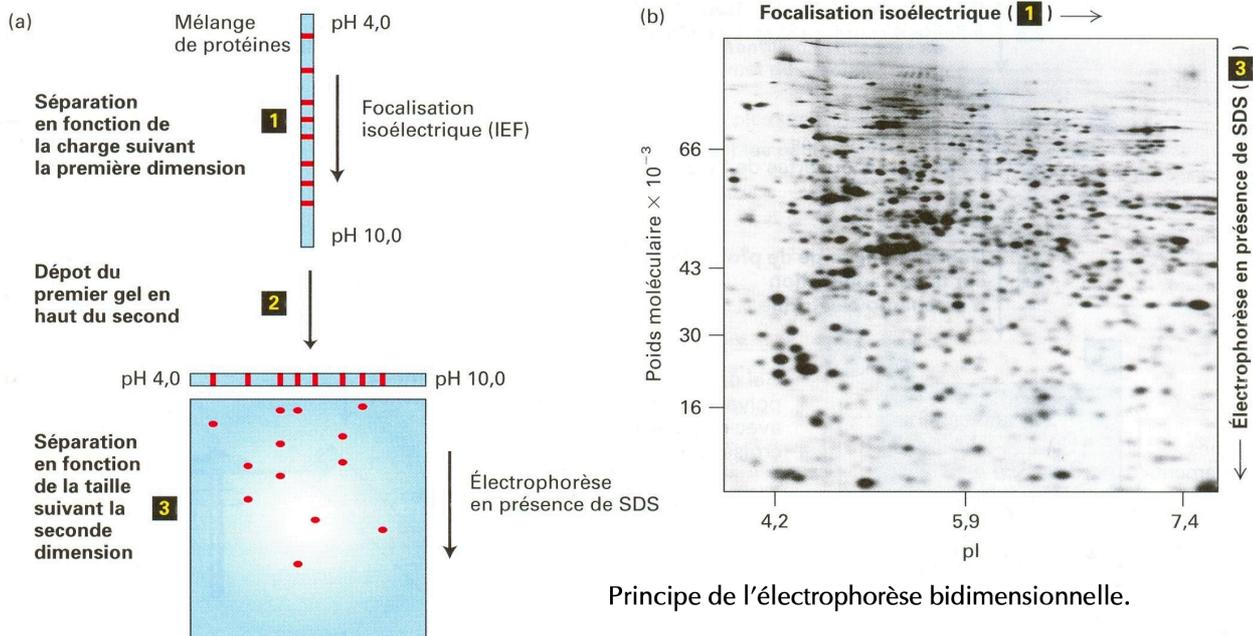
**Application : Déterminer la masse moléculaire d'une protéine en étudiant les résultats d'une électrophorèse en conditions dénaturantes :**



*Rq : La bande correspondant à une molécule sera d'autant plus marquée que la quantité de molécule est importante.*

**La focalisation isoélectrique :** permet de séparer les protéines en fonction des charges portées par leurs acides aminés, en les faisant migrer sur un gel présentant un **gradient de pH et soumis à un fort courant électrique** : Ainsi, au sein du gel présentant le gradient de pH, chaque protéine migre jusqu'au niveau de son **pH isoélectrique**.

**L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines :** associe les 2 techniques précédentes. Les protéines sont d'abord **séparées en fonction de leur charge** par focalisation électrique sur une bande mince. La bande de gel est ensuite tournée à 90 ° et appliquée sur un gel de polyacrylamide imprégné de SDS (électrophorèse en conditions dénaturantes), ce qui permet de séparer les protéines **en fonction de leur masse**. **Chaque tache correspond à un seul polypeptide, caractérisé par son point isoélectrique et sa masse moléculaire.**



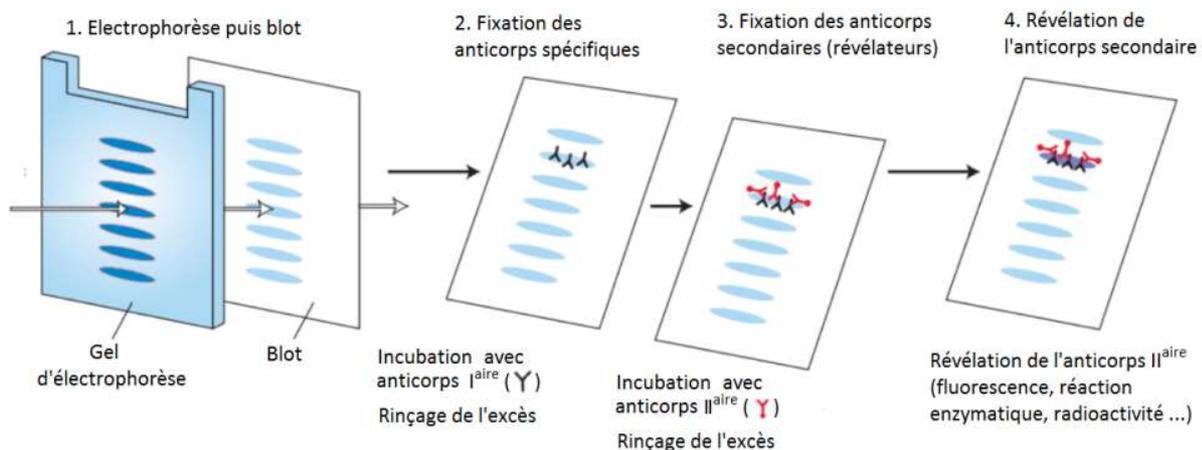
### TRANSFERT SUR MEMBRANE OU BLOT (EN ANGLAIS).

**Southern blot pour le transfert d'ADN / northern blot pour le transfert d'ARN / western blot pour le transfert de protéines**

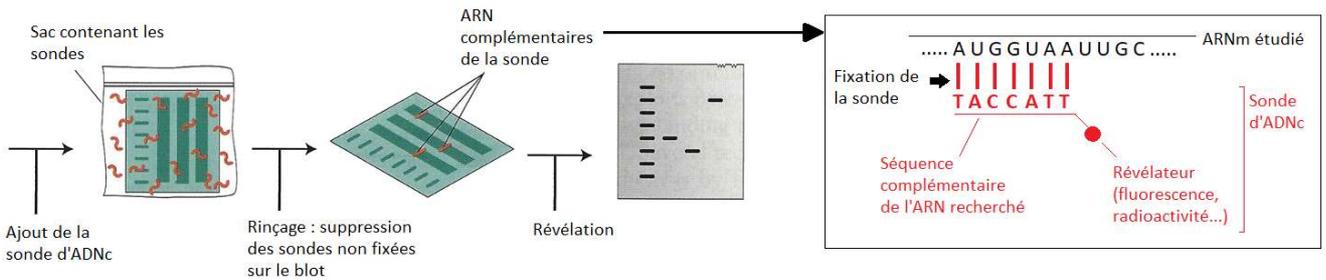
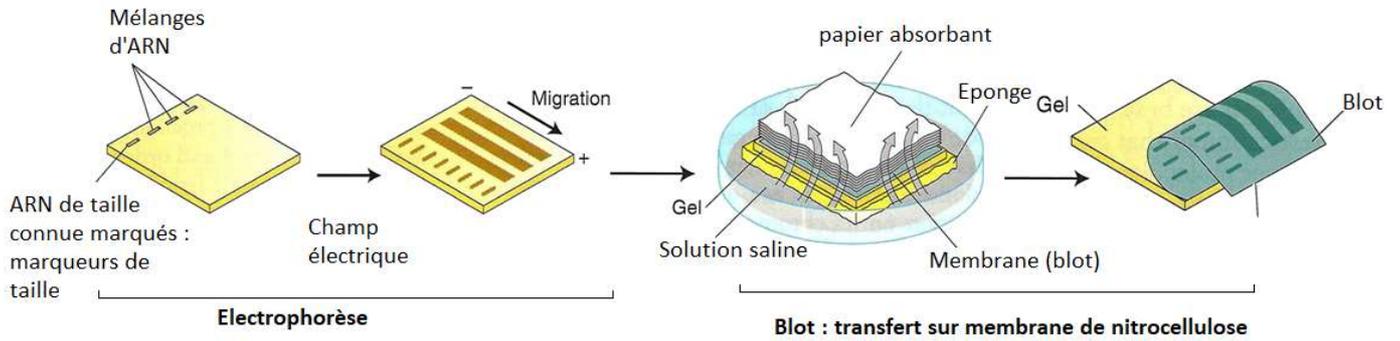
Technique de blot inventée par Edwin Southern pour l'ADN. Les termes northern et western blot (sans majuscules) sont des jeux de mots autour de son nom !

**Objectif : mettre en évidence de manière spécifique une seule molécule parmi toutes celles qui ont migré dans l'électrophorèse.**

**Principe : Transfert des molécules du gel de l'électrophorèse vers une membrane ou buvard = support plus stable et plus solide suivi d'un marquage spécifique de la molécule recherchée parmi toutes les molécules séparées : pour les acides nucléiques, le marqueur utilisé est généralement une sonde marquée, et pour les protéines, ce marqueur est généralement un anticorps spécifique. Le marqueur se fixe sur la molécule recherchée, et on lave la membrane pour éliminer l'excès de marqueur. On révèle ensuite la membrane avec la technique adaptée (autoradiographie, fluorescence, etc.).**



## Bilan : northern blot issu d'une électrophorèse d'ARN



Dans un blot, on révèle souvent, en plus de la molécule recherchée, une molécule dont on sait par avance qu'elle sera présente en quantité constante peu importe le traitement : c'est le « témoin » de charge ou contrôle de charge (n'a pas la valeur d'un témoin + ou - expérimental ; charge = remplissage du puit électrophorétique). Les témoins de charge sont des **CONTROLES** importants : ils indiquent si les échantillons ont été chargés de manière égale dans les différents puits et que molécules ont été adéquatement transférées sur la membrane au cours du blot.

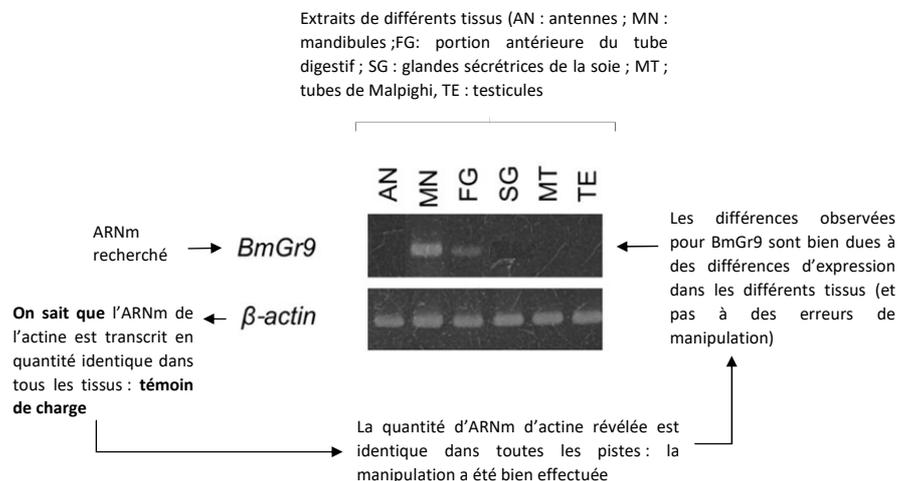
Les témoins de charge sont :

→ Des molécules **OMNIPRESENTES** EXPRIMEES A DES NIVEAUX ELEVES

→ Molécules qui n'interfèrent pas avec les molécules étudiées.

Ainsi, si ce contrôle est valide on peut associer les variations de largeur de bandes des molécules étudiées comme des variations de présence/synthèse.

Exemple : on vérifie par northern blot la présence de l'ARNm d'une protéine appelée BmGr9 dans différents tissus chez la drosophile.

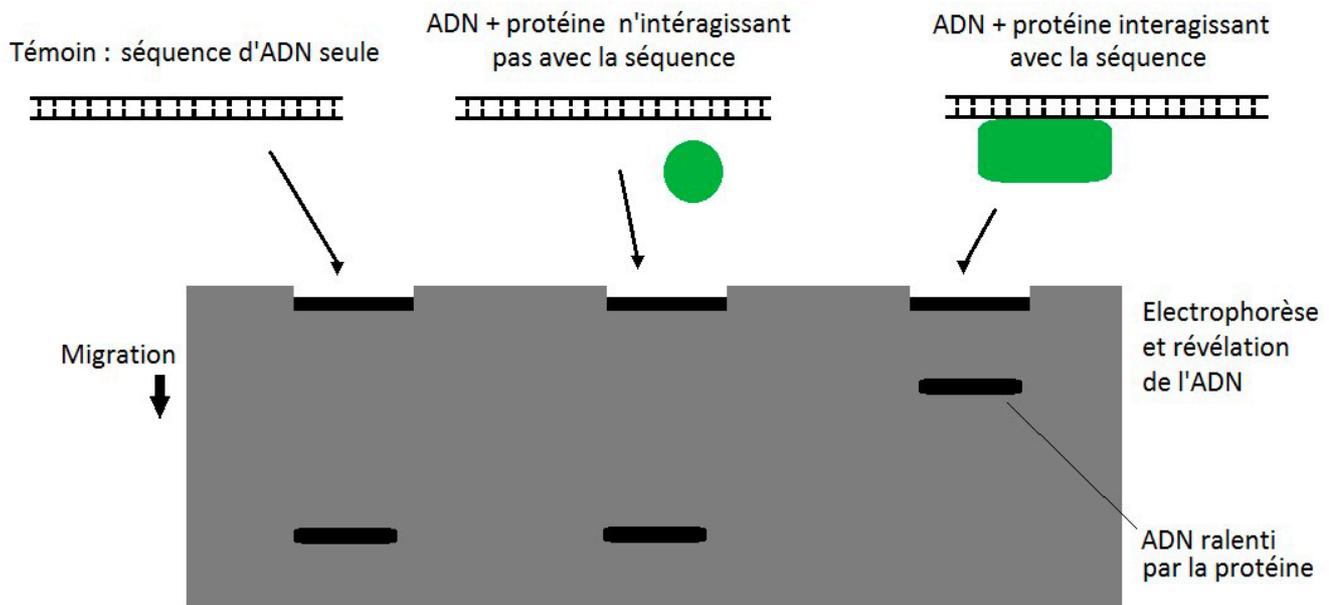


## LE RETARD SUR GEL ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Objectif : mise en évidence d'interaction ADN-protéine par différence de vitesse de migration électrophorétique

Principe : Le retard sur gel permet de vérifier si une protéine est liée à une séquence d'ADN.

Électrophorèse, en conditions non dénaturantes : on incube un ADN en présence d'une protéine dont on pense qu'elle se fixe sur cette portion, et un ADN témoin sans protéine. On fait ensuite migrer le tout sur gel d'électrophorèse, puis on révèle la position de l'ADN dans le gel avec une sonde (southern blot). Comme on est en conditions non dénaturantes, la protéine reste fixée sur l'ADN ce qui forme un complexe beaucoup plus lourd que l'ADN isolé : le fragment qui fixe la protéine migre donc moins loin que le fragment sans protéine, il est en retard sur le fragment sans protéine.

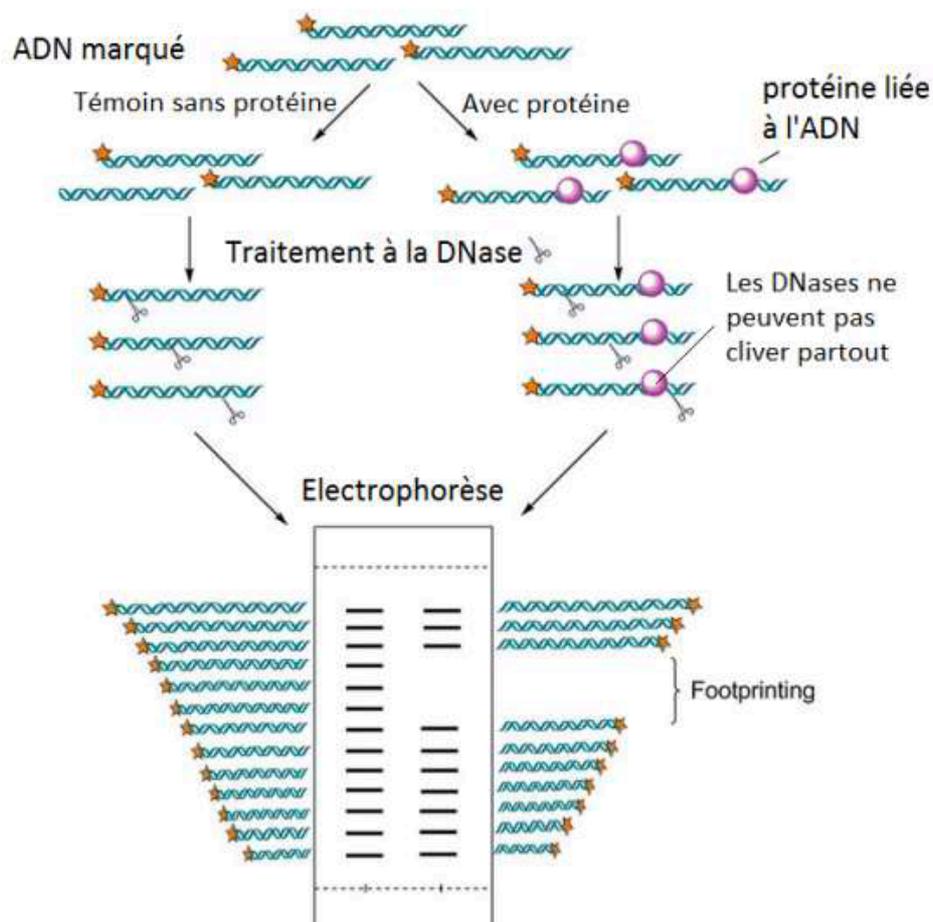


## LE FOOTPRINT

Objectif : mise en évidence d'interaction ADN-protéine par digestion différentielle de l'ADN et révélation électrophorétique

La technique footprint consiste à mettre en présence une portion d'ADN dont une extrémité est marquée (fluorescence, radioactivité) et une protéine dont on pense qu'elle se fixe sur cette portion d'ADN. On ajoute ensuite des DNases (enzymes hydrolysant l'ADN) qui vont cliver l'ADN partout où il est accessible, c'est-à-dire partout sauf là où la protéine s'est potentiellement fixée. On fait la même chose sans la protéine dont on pense qu'elle se fixe sur l'ADN : c'est le témoin.

On réalise ensuite une électrophorèse des fragments d'ADN obtenus en conditions dénaturantes (afin de supprimer l'interaction ADN/protéine) et on révèle les fragments obtenus. Dans le cas de l'ADN incubé en présence de la protéine qui s'y fixe, certains fragments seront absents. Cela correspond à la zone où la protéine était fixée, zone qui n'a pas pu être digérée par la DNase.



## L'IMMUNOPRECIPITATION

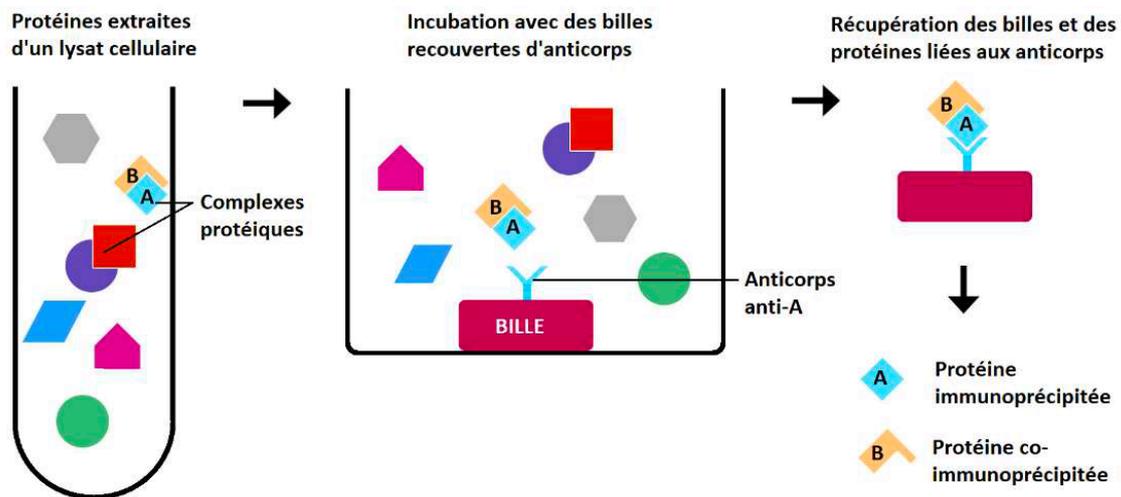
**Objectifs :** purifier une molécule dans un mélange en solution ; mettre en évidence une interaction spécifique entre deux molécules. Les molécules concernées sont généralement des protéines ou éventuellement des acides nucléiques.

### Immunoprécipitation d'une protéine (ou une autre molécule)

**Principe :** purifier une protéine grâce à des anticorps spécifiques, que l'on mélange à la solution contenant la protéine recherchée.

Un échantillon biologique est mis en présence de billes recouvertes d'anticorps spécifique d'une molécule A. Cette molécule va établir des liaisons faibles avec l'anticorps et donc être fixée sur la bille. Si une molécule B est fixée sur cette molécule A, elle va également être retenue par la bille.

Une centrifugation provoque la sédimentation des billes sur lesquelles sont fixés les anticorps et donc la protéine recherchée, que l'on peut détacher en ajoutant une solution dénaturante.



**Objectifs : modifier génétiquement un organisme, par insertion (ou suppression) d'un gène, dans le but d'étudier l'effet de ce gène, ou pour une utilisation technique ou industrielle.**

**Principe :**

→ Utilisation d'enzymes de restriction = enzymes capables de couper l'ADN au niveau de séquences spécifiques (contrairement à des DNases non spécifiques, qui le digèrent de manière aléatoire). Ces séquences (longueur de 4 à 8 bases) sont généralement des palindromes : les deux brins possèdent la même séquence quand on les lit chacune dans le sens 5' -3'.

→ Peut ainsi couper le génome de n'importe quel être vivant en un ensemble de fragments appelés fragments de restriction, relativement peu nombreux. Par exemple, la probabilité de trouver la séquence spécifique de l'enzyme EcoRI est de 0,00024, c'est-à-dire qu'elle se répète toutes les 4000 paires de bases environ.

→ La digestion est reproductible : avec le même fragment d'ADN et la même enzyme, on obtient toujours les mêmes fragments de restriction.

### Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Les enzymes de restriction ont longtemps été utilisées pour détecter des mutations, par une technique appelée RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Par exemple, une substitution affectant le gène de la globine  $\beta$  est à l'origine de la drépanocytose (anémie falciforme). Cette mutation affecte un site de restriction pour l'enzyme MstII : il est présent dans l'allèle HbA (allèle permettant la fabrication d'une hémoglobine normale), et absent dans l'allèle HbS, (allèle provoquant la fabrication d'une hémoglobine non fonctionnelle). Ce site constitue ainsi un **marqueur génétique très simple**.

Le dépistage s'effectue en effectuant une extraction d'ADN (réalisable par exemple par amniocentèse pour effectuer un dépistage sur un fœtus), en amplifiant le gène de la globine  $\beta$  par PCR, en digérant l'ADN avec l'enzyme de restriction MstII, puis en réalisant une électrophorèse suivie par un Southern blot avec une sonde complémentaire du gène de la globine  $\beta$ . L'allèle HbA est digéré et on observe deux fragments sur la membrane. L'allèle HbS n'est pas digéré et on n'observe qu'un seul grand fragment.

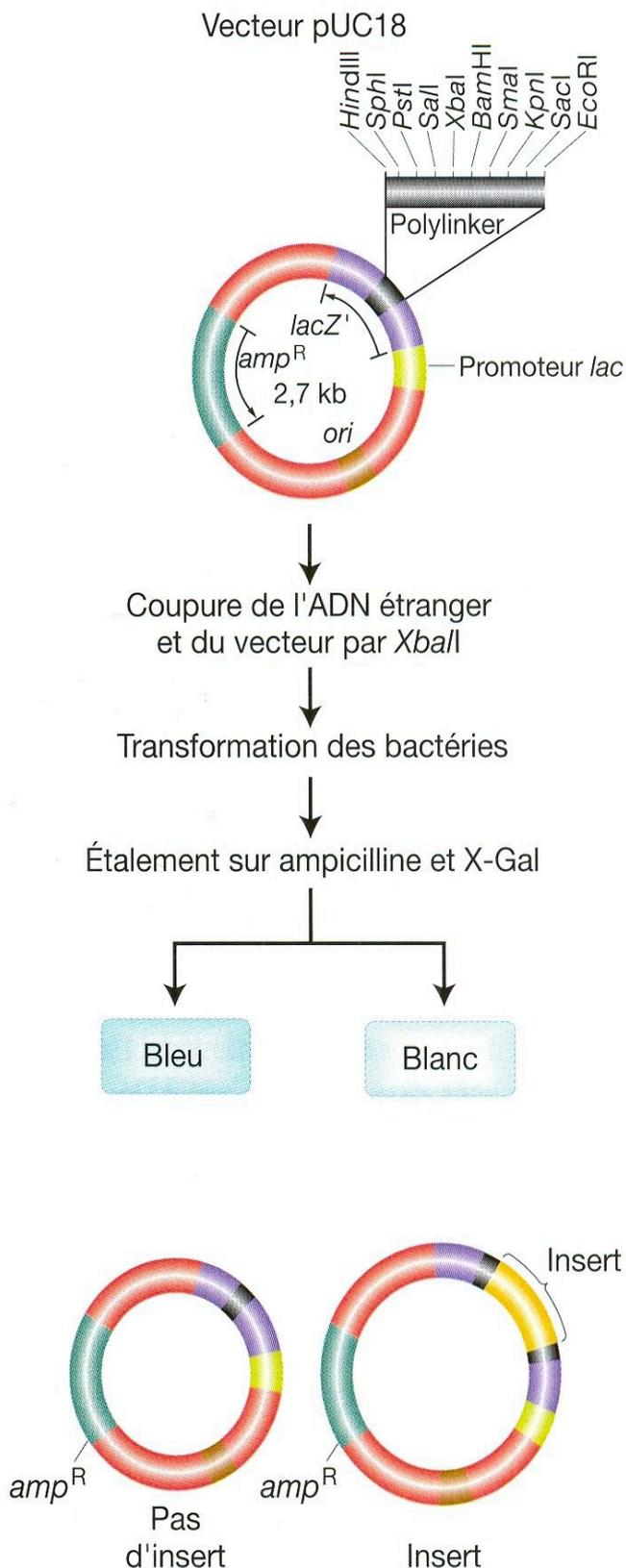
### Obtention d'ADN recombinant

Certaines enzymes de restriction coupent l'ADN en produisant des **extrémités saillantes, ou collantes, au niveau desquelles on a une courte séquence simple brin**. Ces extrémités peuvent se reconnaître par complémentarité. Certaines enzymes, appelées **ligases**, peuvent ressouder deux brins d'ADN ainsi en contact par leurs extrémités. En pratique, ces enzymes sont utilisées pour **assembler des fragments d'ADN différents, digérés séparément par la même enzyme de restriction**. On obtient ainsi des **molécules d'ADN recombinant**.

Ces assemblages se réalisent de manière **aléatoire**, l'enjeu de ces techniques est de parvenir à **sélectionner des ADN recombinants intéressants et de faire en sorte qu'ils puissent s'exprimer**.

## Transgénèse bactérienne

**Plasmides** = courts fragments d'ADN bactérien circulaires, que les bactéries peuvent s'échanger ou intégrer par simple contact : **transformation bactérienne**. Pour réaliser des ADN recombinants pouvant être intégrés à des bactéries, on fabrique et on utilise des plasmides standards contenant des gènes bien précis ainsi que des sites de restrictions parfaitement localisés permettant de réaliser des restrictions et des ligations.



Exemple : vecteur pUC18 est long de 2,7 kb, et contient :

- une **origine de répllication** : permet à la bactérie de répliquer le plasmide
- un **gène de résistance à l'ampicilline** = **antibiotique** puissant
- un **gène codant la  $\beta$ -galactosidase** (appelé lacZ'). Cette enzyme est utilisée comme **marqueur** : convertit un substrat artificiel, le X-Gal, en une molécule de couleur bleue;
- une région appelée **polylinker**, située à l'intérieur du gène lacZ', possédant **plusieurs sites de restriction**, et dans laquelle il est possible **d'insérer un ADN donneur** (appelé insert).

Fragment d'ADN d'intérêt (ex : gène de l'insuline humaine) isolé après avoir découpé ses extrémités à l'aide d'une enzyme de restriction spécifique. La **même enzyme de restriction** est utilisée pour ouvrir le plasmide au niveau du polylinker. Le fragment d'ADN d'intérêt et le plasmide sont ensuite mis en présence d'une ligase, et certains plasmides intègrent ainsi le fragment d'ADN d'intérêt avant de se refermer (obtention d'un plasmide recombinant).

On provoque l'intégration des plasmides recombinants dans des bactéries par **électroporation** (membrane rendue poreuse grâce à des impulsions électromagnétiques intenses et concentrées). Les bactéries ayant intégré les plasmides peuvent être **repérées et sélectionnées grâce à un criblage** : on les étale sur une boîte de culture contenant un antibiotique (l'ampicilline) et une molécule de marquage (l'X-gal), et on les laisse se multiplier :

→ les bactéries n'ayant pas intégré de plasmide ne contiennent pas le gène de résistance à l'ampicilline et meurent sur le milieu de culture;

→ les bactéries ayant intégré un plasmide mais dépourvu d'insert contiennent le gène de résistance à l'ampicilline et le gène codant la  $\beta$ -galactosidase, elles se développent et forment des colonies sur le milieu de culture, de couleur bleue.

→ les bactéries ayant intégré un plasmide recombinant (avec un insert) contiennent le gène de résistance à l'ampicilline mais le gène codant la  $\beta$ -galactosidase n'est pas fonctionnel, elles se développent et forment des colonies sur le milieu de culture, de couleur blanche.

**Transgénèse d'organismes eucaryotes** : plus difficile car ceux-ci sont beaucoup plus difficile à transformer génétiquement (il n'intègre que très rarement de l'ADN d'origine étrangère). Les techniques sont donc différentes, plus longues et plus complexes.

Chez les plantes : utilisation d'**Agrobacterium tumefaciens** = bactérie qui insère l'information génétique contenue dans un de ses plasmides dans le génome de son hôte. Transformation génétique d'une souche d'A. tumefaciens, puis infection de cellules végétales par cette souche. Les cellules végétales et la plante ainsi obtenues contiennent le gène utilisé pour la transformation de la bactérie.

Jusqu'à récemment, la transgénèse animale était très difficile à réaliser : on injectait un fragment d'ADN recombinant dans le noyau d'une cellule embryonnaire en espérant que cet ADN s'insère dans un chromosome. Le taux d'échec était considérable (de l'ordre de 99,9%). Tout a changé avec la découverte du système **CRISPR / Cas9 en 2012** : permet de réaliser des modifications génétiques directement dans des cellules vivantes, avec des taux de réussites **de l'ordre de 50 % sur les cellules animales**. Cette technique a permis une banalisation de la manipulation génétique depuis quelques années : obtention simplifiée d'organismes transgéniques, thérapie génétique, etc..

## LE SYSTÈME CRISP-Cas9

**Objectif : Transfert d'une séquence d'ADN d'intérêt dans une cellule qui en est dépourvue**

→ Clonage et constitution de banques d'ADN génomique

→ Expression d'un gène d'intérêt dans une cellule qui ne l'exprime pas naturellement (expression ectopique).

→ Mutagenèse dirigée.

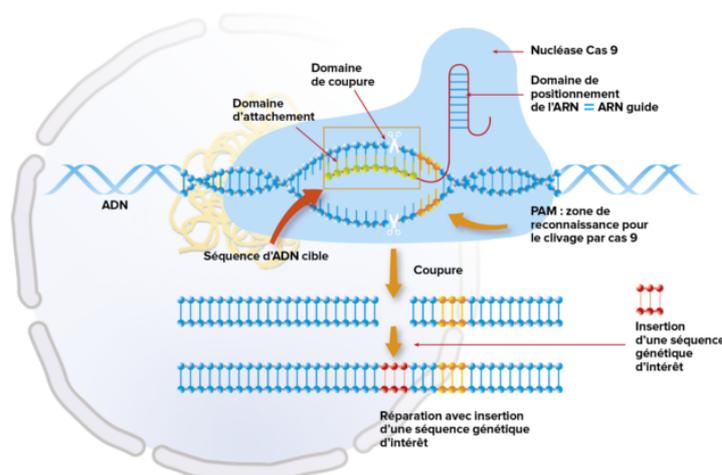
2012 : Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna

**Principe : Cas9 est une enzyme capable de couper l'ADN au niveau d'une séquence bien précise, que l'expérimentateur peut définir lui-même (contrairement aux enzymes de restriction). Il est constitué d'un « ARN guide », qui se lie à une séquence spécifique de l'ADN et guide l'enzyme Cas9, qui coupe l'ADN.**

CRISPR-Cas9 est un complexe formé de deux éléments : d'un côté, un **brin d'ARN, de séquence homologue à celle de l'ADN que l'on veut exciser, et de l'autre, une endonucléase, le Cas9**. Dans la cellule, le brin d'ARN va reconnaître la séquence homologue sur l'ADN et s'y placer. L'enzyme Cas9 se charge alors de couper la chaîne ADN complémentaire à ce brin ARN. Le trou laissé par le passage du CRISPR-Cas9 pourra alors être comblé par n'importe quel nouveau fragment d'ADN.

<https://www.youtube.com/watch?v=RplWR12npqM>

### Retouche génomique par le système CRISPR - Cas 9



© SEMAE

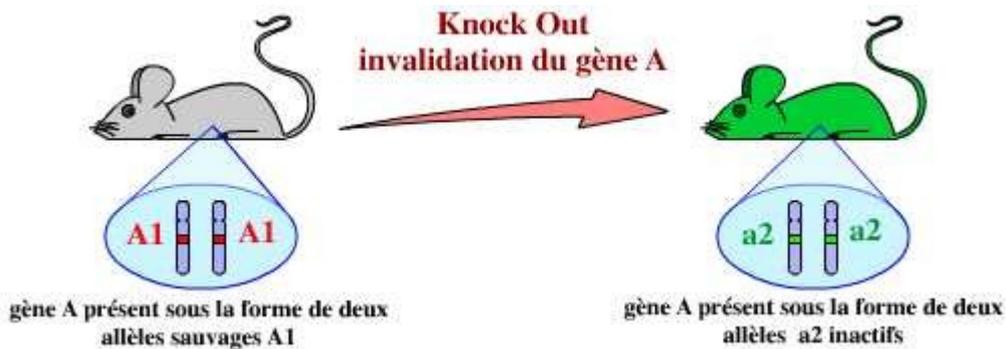
## INVALIDATION D'UN GÈNE PAR LA TECHNIQUE DU KNOCK-OUT

**Objectif :** étudier la fonction d'un gène en l'inactivant totalement.

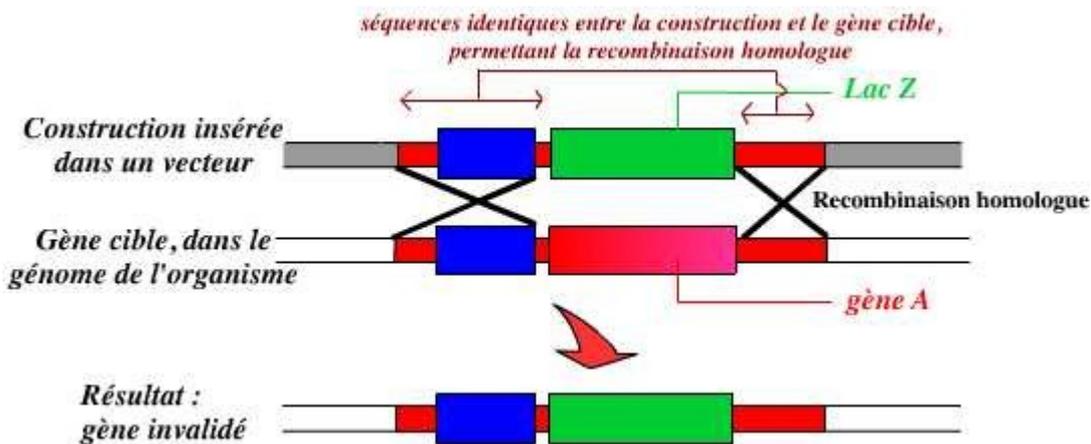
**Principe :** L'étude de mutants est longue et fastidieuse. Une approche efficace et récente consiste à éliminer un gène, c'est-à-dire à remplacer, dans le génome de l'organisme, le gène fonctionnel par une version modifiée ne permettant pas son expression : c'est ce que l'on appelle l'invalidation d'un gène, ou plus communément le knock-out (KO) d'un gène.

### Principe du knock-out par recombinaison homologue

Méthode « traditionnelle » de knock-out. Cette technique consiste à remplacer les deux copies d'un gène par deux copies d'un autre allèle (le plus souvent inactif), ou par un autre gène (par exemple LacZ) selon le principe de la **recombinaison homologue**.



→ La première étape est la création d'un vecteur, portant le gène de remplacement (en vert sur le schéma ci-dessous) associé à la séquence promotrice (en bleu) et aux séquences qui bordent le gène étudié (en rouge) afin de permettre la recombinaison. Le vecteur est par exemple un plasmide bactérien. Le plasmide est introduit dans des cellules souches embryonnaires, où se réalise la recombinaison homologue.

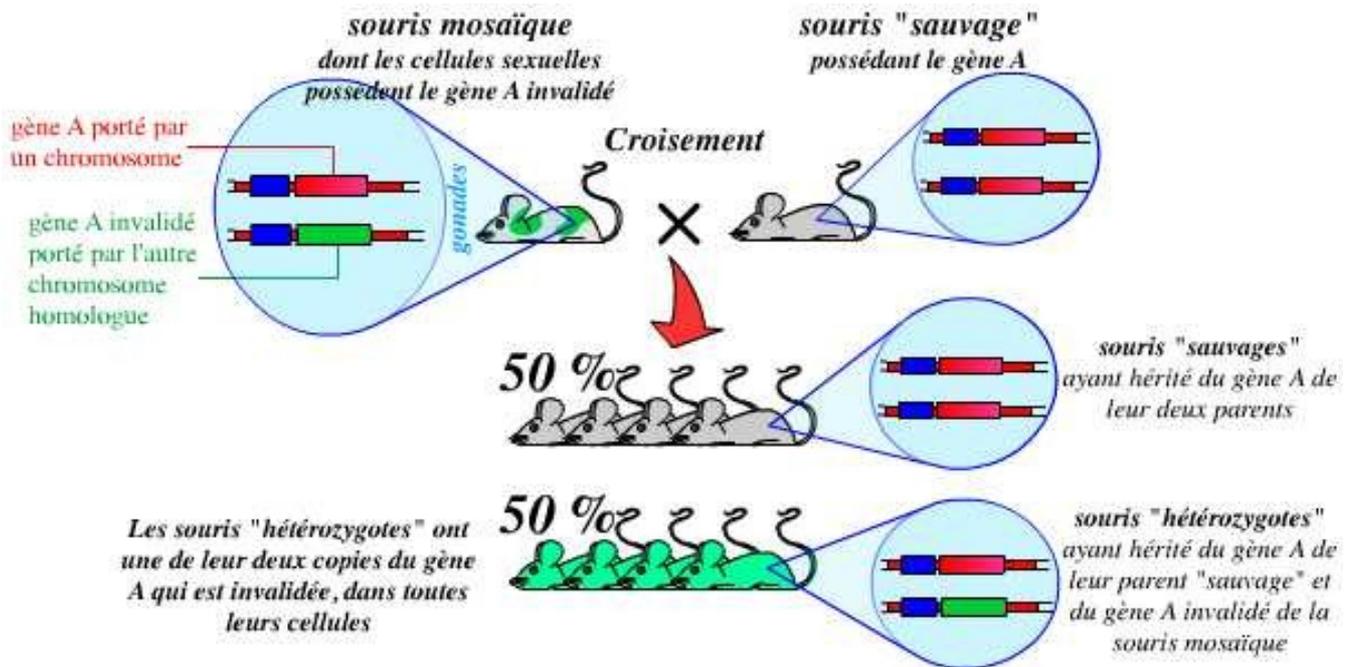


Dans cet exemple, le gène A est remplacé par un autre gène, lacZ. Ce remplacement est permis par la présence de séquences identiques entre la construction et le génome de l'organisme, au niveau desquelles peut se réaliser une recombinaison homologue.

→ Les cellules souches effectivement modifiées sont sélectionnées puis injectées dans de très jeunes embryons de souris. Elles s'intègrent à ces embryons. Les souris qui en résultent sont « mosaïques », en partie constituées de

cellules modifiées pour le gène étudié. Celles dont les cellules de la lignée germinale dérivent des cellules souches modifiées sont sélectionnées et croisées avec des souris sauvages : la descendance comprend 50 % d'individus hétérozygotes (+/-) pour le gène étudié.

Enfin, les souris « hétérozygotes » obtenues sont croisées entre elles : 25 % de leurs descendants sont homozygotes pour le gène invalidé(-/-), ce sont des souris « knock-out ».



## GENES RAPPORTEURS

**Objectifs :** Construction d'un gène chimère en associant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec un gène dont l'expression produit une protéine traçable en microscopie. Cela permet de savoir où et dans quelle condition une protéine est exprimée, et potentiellement de suivre sa localisation au cours du temps.

### Principe

Par une technique de transgénèse, un gène rapporteur est fusionné au gène étudié, ou mis sous le contrôle d'une séquence régulant l'expression de ce dernier (promoteur ou autre). Il est transcrit en même temps que le gène étudié. Le produit de l'expression du gène rapporteur (protéine) étant observable (fluorescence, etc.), il rendra directement compte de l'expression du gène étudié.

Les gènes rapporteurs doivent obéir à 3 conditions :

- Être étranger au génome de l'organisme modifié afin que leur produit n'intervienne pas dans le métabolisme,
- Leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise afin de déterminer dans quel tissu s'exprime le gène étudié,
- Leur produit doit être quantifiable afin de mesurer l'activité de la séquence régulatrice du gène étudié.

Les gènes rapporteurs utilisés sont **repérables**, lorsqu'ils sont exprimés, par :

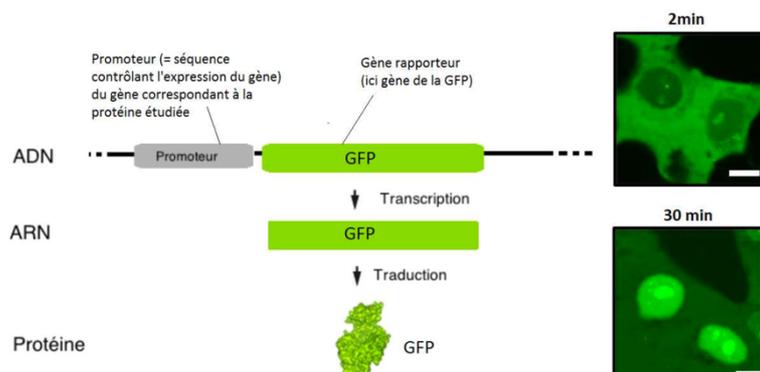
→ **Une bioluminescence** = production et émission de lumière par un organisme vivant. Celle-ci résulte d'une réaction chimique au cours de laquelle de l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse. **Ex : gène de la luciférase.** Luciférase = enzyme qui contrôle l'oxydation de la luciférine : émission d'une lumière verdâtre. La luciférase la plus connue est celle de la luciole ou ver luisant ;

→ **Une fluorescence** : le gène de la **GFP** (Green Fluorescent Protein), **naturellement présent chez une méduse (Aequoria victoria) a pour produit d'expression une protéine fluorescente verte (la GFP), qui émet une lumière verte lorsqu'elle est excitée par la lumière.** Observable à l'aide d'un microscope à fluorescence. prix Nobel de chimie en 2008.

→ **Une activité enzymatique** : le gène **GUS** code une enzyme (la  $\beta$  glucuronidase, enzyme lysosomale humaine) qui colore en bleu les cellules où il est actif, mais il est létal.

→ le gène **lacZ** code la  $\beta$ -galactosidase (LacZ) chez de nombreuses bactéries comme Escherichia coli. Cette enzyme est capable d'hydrolyser le lactose en galactose et glucose. Cette enzyme peut également catalyser l'hydrolyse de X-gal (galactose lié à un noyau indole), composé incolore, libérant le noyau indole qui forme par oxydation un composé bleu précipitant sur le site de la réaction.

Exemple ci-contre : technique du gène rapporteur utilisant la GFP. Ici le gène rapporte la localisation d'une protéine virales, qui passe du cytosol au noyau des cellules infectées au cours du temps (barre d'échelle : 5 $\mu$ m)



## L' ADN ou ARN ANTISENS

**Objectif : mimer l'effet de la mutation d'un gène afin d'étudier ses effets. L'ADN ou ARN antisens bloque empêche la fabrication de la protéine codée par le gène. Les ARN ont une durée de vie beaucoup plus faible que les ADN, ce qui peut être intéressant dans certaines situations. Équivalent au phénomène naturel de contrôle de la traduction par des micro ARN ou des ARN interférents**

**Principe : ADN antisens = ADN de séquence complémentaire à l' ARN messager issus de la transcription d'un gène d'intérêt. Cet ADN antisens a aussi une séquence complémentaire du brin codant du gène.**

**Une solution d'ADN antisens peut être appliquée à une cellule ou un organisme vivant. Cette manipulation est équivalente à une mutagenèse dirigée mais peut être limitée dans le temps. On peut ainsi tester les effets de « mutations » qui seraient létales si leurs effets étaient prolongés. Cette technique est aussi utilisée pour le traitement de certaines maladies génétiques, de cancers, du diabète, etc. (thérapie antisens).**

**Objectifs : réaliser de très nombreuses copies d'un gène d'intérêt et/ ou mesurer la quantité d'un fragment d'ADN (ou d'ARN) connu.**

**Principe de la PCR : méthode de synthèse in vitro d'ADN mise en point par Kary Mullis en 1986 (prix Nobel de chimie en 1993). Technique facile, rapide et peu coûteuse, qui permet d'obtenir des milliards de copies d'un fragment donné d'ADN. Consiste à réaliser une synthèse in vitro d'ADN en suivant les mêmes étapes que ce qui se passe dans le vivant au cours de la réplication.**

**Possible de la réaliser à partir d'une quantité très limitée d'ADN (quelques pg), comme un extrait d'ADN à partir d'une goutte de sang séché. La longueur de ce fragment peut atteindre quelques kb, c'est-à-dire la taille d'un gène moyen. Au-delà de cette taille, la technique n'est plus performante.**

Milieu réactionnel dans de petits tubes : on ajoute tous les constituants nécessaires à la réplication de l'ADN :

- **un extrait d'ADN contenant l'ADN à amplifier** (généralement extrait à partir d'un échantillon biologique) ;
- **de l'ADN polymérase thermostable** : généralement de la **Taq polymérase** issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, qui résiste à une température de **95 °C** ;
- **des amorces spécifiques = petits fragments d'ADN synthétisés chimiquement (20 nucléotides environ) dont la séquence est complémentaire de régions bien précises situées de part et d'autre de la région que l'on cherche à amplifier** (plus précisément, du côté 3' des deux brins composant le fragment d'ADN). Pour réaliser une PCR, il faut connaître ces séquences et donc avoir un minimum d'informations a priori sur le fragment à amplifier.
- **des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP)** : fournissant le **matériel** constituant l'ADN et l'**énergie** nécessaire à la polymérisation.

Le mélange est placé dans un thermocycleur qui change la température quasi instantanément.

- **dénaturation de l'ADN** : ADN double brin → ADN simple brin ;
- **hybridation** : permet aux amorces de se fixer sur l'ADN à amplifier ;
- **élongation** : l'ADN polymérase synthétise des brins complémentaires à partir des brins initiaux servant de matrices, comme elle le fait normalement dans une cellule. On obtient ainsi deux copies pour chaque exemplaire du fragment à amplifier.

Ces trois étapes constituent un **cycle de PCR**. Une PCR de **35 cycles** (valeur habituelle) permet ainsi théoriquement d'obtenir  $2^{35} = 34$  **milliards de copies d'ADN à partir d'un seul fragment d'ADN**. En pratique c'est un peu inférieur, à cause des interférences entre molécules d'ADN quand celui-ci commence à être très concentré.

**Technique de PCR quantitative** : Une PCR quantitative (QPCR) ou PCR en temps réel : permet de mesurer la quantité initiale d'un fragment d'ADN précis dans un échantillon. Le protocole est le même, mais on ajoute un colorant spécifique de l'ADN double brin au milieu réactionnel, ce qui permet de mesurer la quantité d'ADN à chaque cycle de PCR.

**Technique de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)** : associe deux techniques : la transcription inverse, ou rétrotranscription, correspond à la synthèse d'un brin d'ADN (appelé ADN complémentaire ou ADNc) à partir d'une matrice d'ARN, grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse ; l'amplification par PCR du ou des brins d'ADNc obtenus par transcription inverse, ce qui permet d'en obtenir de très nombreux exemplaires. Pratiquement toujours réalisée avec une PCR quantitative, ce qui permet de déterminer très précisément la quantité d'ARN initial. La RT-PCR est ainsi utilisée pour étudier finement l'expression de certains gènes, mais aussi pour mesurer la charge virale d'un patient en mesurant la quantité d'ARN viral.

## LE SEQUENÇAGE DE L'ADN

**Objectif : déterminer la séquence de fragments d'ADN (plus ou moins longs) préalablement purifiés.**

**Principe : Utilisation de didésoxyribonucléotides marqués.**

méthode de Sanger (du nom de Frederick Sanger, prix Nobel de chimie en 1958 pour le séquençage de l'insuline, et en 1980 pour le séquençage de l'ADN).

Cette technique, repose sur la réalisation d'une PCR modifiée, dans laquelle on utilise une seule amorce, et où on ajoute, en plus des dNTP habituels, de petites quantités de didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces ddNTP, une fois incorporés dans l'ADN, arrêtent la polymérisation car la fonction hydroxyle nécessaire à la liaison avec le nucléotide suivant est absente. Ces ddNTP sont marqués avec quatre fluorochromes de couleurs différentes (un pour chaque base azotée).

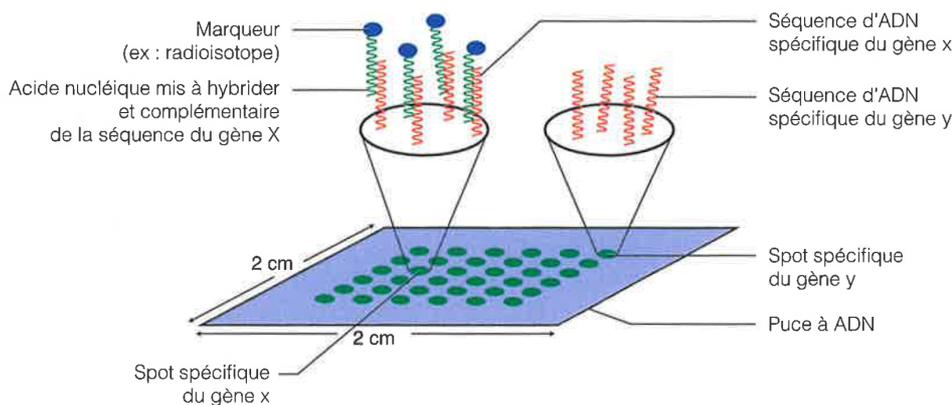
## LES MICROPUCES A ADN

**Objectif : estimer en une seule manipulation l'expression d'un très grand nombre de gènes dans des cellules données → Profil transcriptomique d'une cellule = identification des ARN qu'elle transcrit.**

**Principe :**

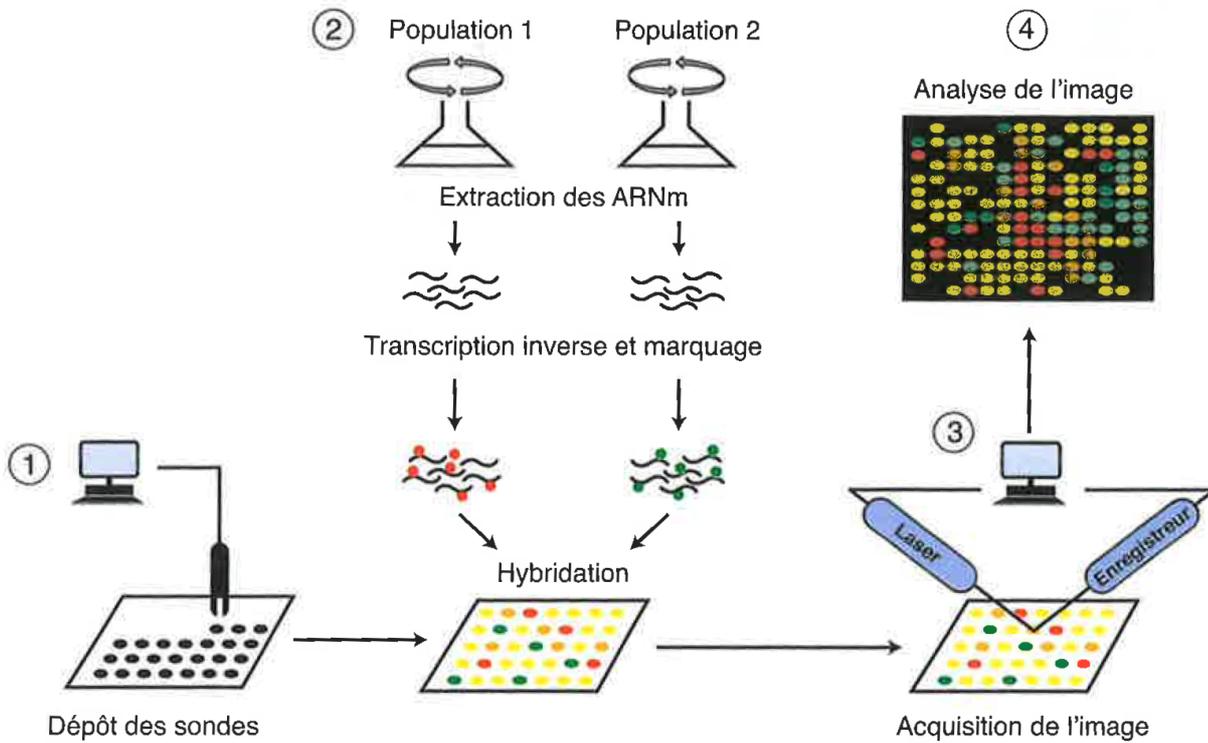
Les ARN sont convertis en ADN complémentaire par transcription inverse (l'ADNc a l'avantage d'être plus stable), et ces ADNc sont marqués à l'aide de fluorochromes. Une puce à ADN (DNA chip ou DNA microarray) est une lame de verre avec plusieurs milliers de puits correspondant chacun à un gène différent.

On peut ainsi couvrir une grande partie voire l'intégralité du génome d'un organisme. L'utilisation de ces micropuces permet de visualiser les différences d'expression des gènes à l'échelle du génome dans son ensemble ( le northern blot, ne permet d'étudier qu'un seul gène à la fois).



**Visualisation des résultats :** L'utilisation de la technique d'hybridation à l'aide de puces à ADN a permis par exemple de faire de très grands progrès dans le domaine du diagnostic de différentes maladies. Dans ce cadre, les ARN des deux populations cellulaires, 1 et 2, dont les transcriptomes doivent être comparés, est préparé. De l'ADNc de chacun des échantillons est produit par rétro-transcription, et marqué avec des fluorochromes de couleurs différentes, par exemple en rouge pour la population 1 et en vert pour la population 2. Les ADNc sont ensuite hybridés avec les puces à ADN. A l'aide d'un scanner qui permet d'analyser le type de fluorescence et son intensité,

chaque spot de la puce est analysé.



- pas de couleur : le gène n'est exprimé dans aucun des deux types de cellules ;
- couleur rouge : le gène est exprimé dans les cellules 1 ;
- couleur verte : le gène est exprimé dans les cellules 2 ;
- couleur jaune (vert + rouge) : le gène est exprimé dans les deux types de cellules.

## LE PROFIL D'HYDROPATHIE (ou profil d'hydrophobicité) D'UNE PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE ET SON ANALYSE

**Objectif :** reconstituer partiellement la structure d'une protéine membranaire.

**Principe :** permet de prédire quelles sont les parties de la chaîne polypeptidique qui traversent la bicouche. Il s'agit d'un graphique représentant le degré d'hydrophilie ou d'hydrophobie des chaînes latérales des acides aminés au fur et à mesure de la séquence polypeptidique.

Le degré d'hydropathie des acides aminés est déterminé grâce à une échelle, la plus couramment utilisée est celle de Kyte et Doolittle. Les acides aminés hydrophobes possèdent un indice positif, et les acides aminés hydrophiles ont un indice négatif. Par exemple, l'isoleucine, un acide aminé à radical apolaire, a un indice d'hydropathie de + 4,5 .

Un profil d'hydropathie est réalisé par un programme informatique qui calcule, pour chacune des positions dans la séquence polypeptidique d'une protéine, la valeur moyenne de l'index d'hydropathie d'un segment de 10 à 20 acides aminés centré autour de cette position. **Une valeur positive de l'index correspond à un comportement hydrophobe du segment et une valeur négative correspond à un comportement hydrophile.**

Les segments de 20 à 25 acides aminés dont l'index d'hydropathie est positif correspondent à des secteurs hydrophobes intégrés au sein de la bicouche phospholipidique sous la forme d'hélices  $\alpha$  transmembranaires. Les segments situés au-dessous de l'axe des abscisses correspondent à des secteurs hydrophiles situés d'un côté ou de l'autre de la bicouche. Le nombre d'hélices transmembranaires est variable : une seule (glycophorine) ou plusieurs (7 pour la bactériorhodopsine).

### Prédiction de la localisation d'hélice $\alpha$ d'une protéine par profil d'hydrophobicité

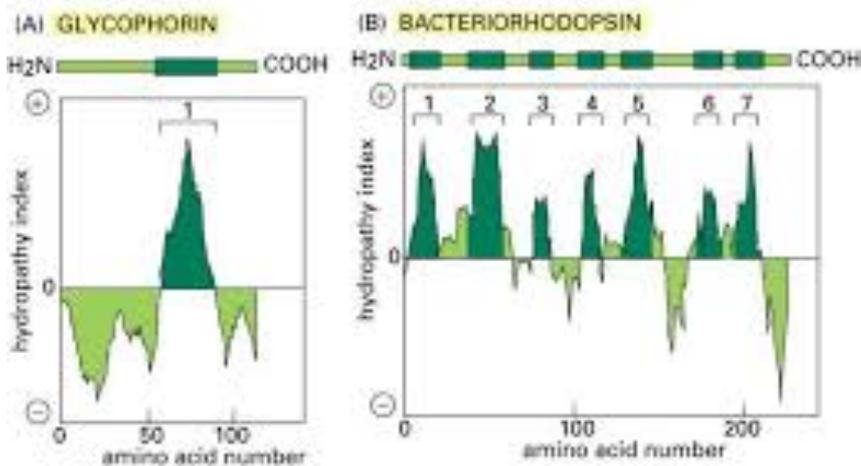


Figure 10-20 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## TECHNIQUES D'ELECTROPHYSIOLOGIE

**Objectifs :** réaliser des mesures de part et d'autre de membranes voire de canaux membranaires isolés (patch-clamp). On peut mesurer soit une différence de potentiel électrique (« tension ») soit un courant ionique (« intensité »).

→ Enregistrement de courants sur des fractions de membranes cellulaires voire sur un canal ionique unitaire

→ Identification de canaux ioniques

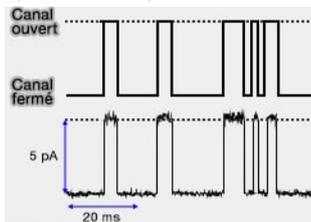
→ Caractérisation des propriétés de ces canaux

### Technique de patch-clamp

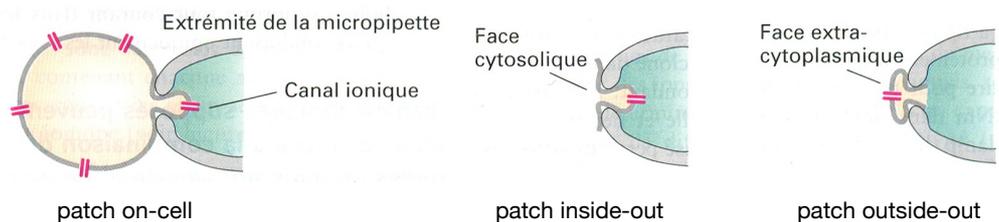
**Objectif :** étudier le comportement d'un (ou d'un très petit groupe de) canal ionique unique (ou éventuellement un autre type de protéine membranaire), alors qu'avec le voltage-clamp on étudie le comportement de la membrane dans son ensemble.

**Principe :** On utilise pour cela des électrodes encore plus fines, et l'électrode utilisée pour mesurer le courant n'est pas introduite dans la cellule, mais elle est appliquée avec une légère succion contre la membrane de manière à entourer un seul canal ionique (ou un petit groupe). On peut ainsi mesurer le courant entrant ou sortant à travers ce canal ionique, et donc les flux d'ions correspondant, dans des conditions contrôlées (différentes valeurs de voltage imposé, présence ou absence de ligand, d'agoniste ou d'antagoniste, etc.). En aspirant avec l'électrode de patch-clamp, il est possible de détacher le fragment de membrane contenant le canal et ainsi de l'étudier de manière totalement isolée.

<https://www.youtube.com/watch?v=mVbkSD5FHOW>



Enregistrement de courants ioniques par patch-clamp et interprétation.



Les trois configurations utilisées pour la technique de patch clamp.

### Technique de voltage imposé ou voltage-clamp

**Objectif :** Enregistrement de courants ioniques transmembranaires sur un neurone et identification de courants liés à des modifications de la perméabilité membranaire aux ions suite à l'imposition d'un voltage

**Principe :** 2 électrodes introduites dans la cellule :

Une électrode utilisée pour contrôler la différence de potentiel électrique à travers la membrane de la cellule (la tension, ou voltage, est donc imposée),

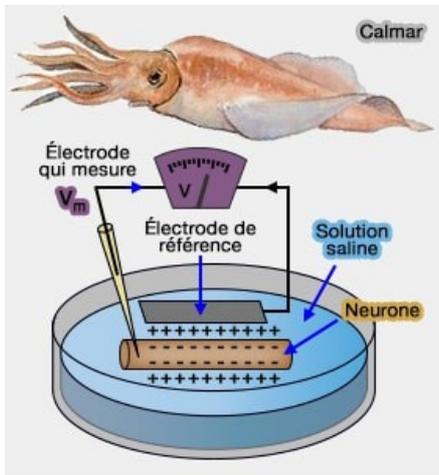
L'autre utilisée pour mesurer le courant transmembranaire nécessaire pour maintenir cette tension.

En pratique, on détermine si le voltage imposé provoque :

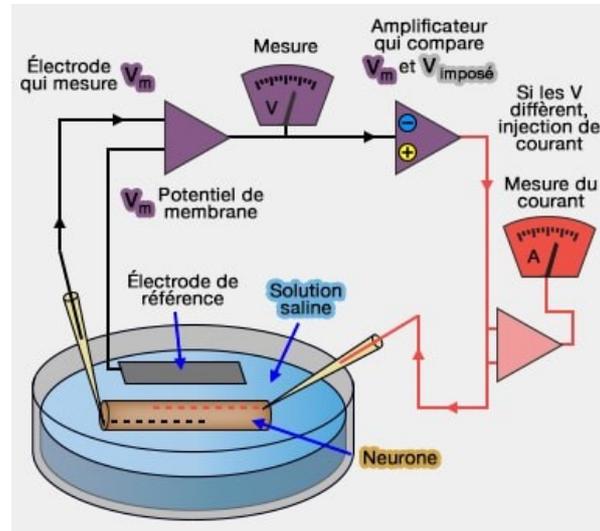
- un courant entrant, c'est-à-dire l'entrée de cations ou la sortie d'anions de la cellule ;

- un courant sortant, c'est-à-dire la sortie de cations ou l'entrée d'anions dans la cellule.

On peut aussi déterminer la conductance membranaire à certains ions, c'est-à-dire la perméabilité de la membrane pour ces ions :  $G = 1 / R = 1 (\text{courant}) / V (\text{voltage})$ .



Mesure d'une différence de potentiel électrique.



Circuit utilisé pour la technique de voltage-clamp.

Et en plus...

### OPTOGENETIQUE (cf doc annexe)

**Cytométrie en flux** : analyse individuelle de chaque cellule d'une suspension passant devant une source lumineuse permettant de mesurer diverses caractéristiques.

- Les cellules d'une suspension, éventuellement marquées par une ou plusieurs sondes fluorescentes, sont entraînées par un liquide provoquant leur passage une par une devant un laser.
- Les signaux émis par chaque cellule sont analysés informatiquement.

Indications sous la forme de données statistiques, sur la taille des cellules ; leur granulosité, qui renseigne sur la densité des organites, la compaction de la chromatine , l'intensité de la fluorescence (marqueur d'un processus biologique fonction du protocole).

### FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

<https://www.youtube.com/watch?v=ejj3mVPmXUQ>

- Mise en évidence de la fluidité membranaire
- Mise en évidence de la dynamique du cytosquelette