



## PLATEFORME D'INGÉNIERIE CELLULAIRE ET ANALYSES DES PROTÉINES

### quipements de la plateforme ICAP

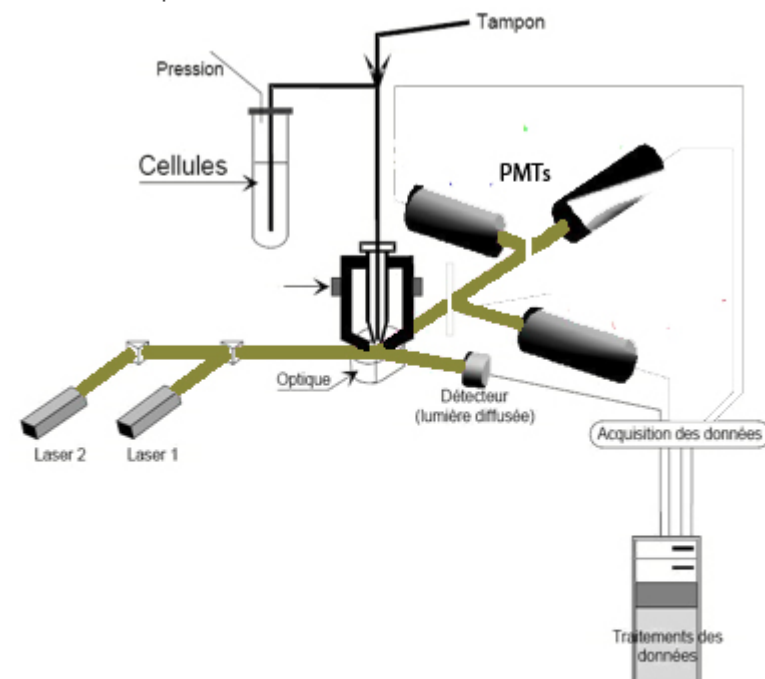
[Accueil](#) > [Équipements](#)

[Cytomètre de flux](#)  
[Microscope confocal](#)  
[Imagerie petit animal](#)  
[Spectrométrie de masse](#)  
[Microdissection laser](#)

### Cytomètre de flux

#### DEFINITION

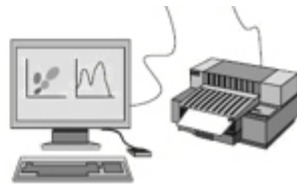
Cette technique consiste à faire défilet très



rapidement (plusieurs milliers/seconde) les unes derrière les autres, des cellules en suspension monocellulaire devant un faisceau laser.

Pour chaque cellule, sont mesurées très précisément : la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes (de 3 à 9 signaux de fluorescence analysés simultanément suivant les appareils) et la lumière diffusée, recueillie dans 2 directions différentes (l'une peut être corrélée avec la taille et la seconde avec la réfringence et la granulosité de la cellule).

L'appareil peut ainsi analyser les cellules selon plusieurs paramètres et définir des "sous populations" homogènes pour les regrouper selon des critères choisis. Pour chaque sous population on peut calculer l'effectif, le pourcentage qu'il représente par rapport à la population totale, la moyenne de chacun des paramètres, les écarts standards, etc... On peut également voir si deux paramètres sont liés entre eux (coefficient de



corrélation...).

Le système acquis sur la plateforme est un cytomètre analyseur BD FACS Canto II. Il est équipé de trois lasers à 488nm, 633nm et 407nm. Il permet l'analyse simultanée de 8

fluorescences.

## APPLICATIONS

Selon la spécificité des réactifs fluorescents utilisés pour colorer les cellules, on a accès à l'étude quantitative de nombreuses caractéristiques : présence d'un antigène, quantité d'ADN ou d'ARN, activité enzymatique, viabilité, etc... Tous ces critères peuvent être mis en corrélation. L'avantage de cette technique est de réaliser des analyses précises sur des critères très différents et très nombreux, de séparer les cellules (y compris clonage et tri de populations très rares) avec une très grande pureté en condition stérile, de ne pas abimer les cellules.

Par contre, les cellules doivent être impérativement mises en suspension. Leur nombre, pour envisager une analyse, doit être de quelques centaines de milliers au minimum. De plus, on ne possède pas d'image des cellules analysées (seulement une quantification en unités arbitraires de chaque paramètre mesuré); on ne peut donc localiser le signal mesuré dans la cellule. Enfin, chaque cellule n'étant analysée qu'à un unique instant donné, on ne peut faire de véritable étude cinétique portant sur une même cellule.

Les applications sont très diverses en raison de la grande variété des réactifs utilisables :

- étude des marquages immunofluorescents,
- étude du cycle cellulaire et ses différentes phases sur des cellules vivantes (Hoescht) ou perméabilisées (iodure de propidium ou iodure de propidium/BrdU) ainsi que le cycle cellulaire de microorganismes comme les levures ou les bactéries,
- étude de l'apoptose des cellules,
- quantification de l'ADN (étude du cycle et de la ploïdie cellulaire...),
- caryotype en flux (analyse et tri de chromosomes),
- activité enzymatique,
- étude des flux ioniques, étude du flux calcique, mesure du pH intracellulaire,
- typage lymphocytaire, ...

### Caractéristiques du Cytomètre de flux

## Microscope confocal

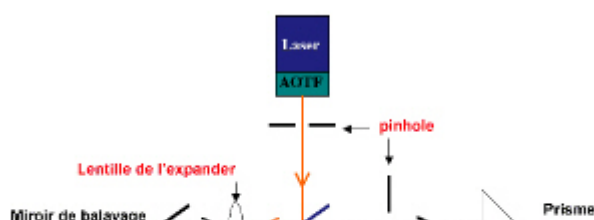
C'est en 1985 que la mise au point de la microscopie confocale à balayage laser a pu voir le jour grâce aux techniques acquises en laser. Le microscope confocal est l'une des grandes avancées en matière d'imagerie. En effet, l'optique ayant atteint (pour l'instant) ses limites, les grandes avancées se sont faites sur la lumière et notamment la microscopie à fluorescence mais celle-ci donne une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de palier à cette inconvénient car seules les images provenant du plan focal sont acquises.

### DEFINITION

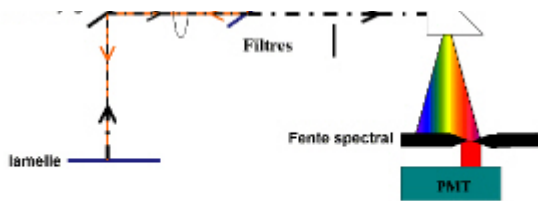
Il provient de la combinaison des mots "conjugaison" et "focal". Il s'explique par le fait que ces deux trous d'aiguilles, placés soit pour l'illumination de l'objet, soit pour la détection de la lumière émise par l'objet, soient positionnés (conjugés) sur le même plan que le plan focal. Ils sont à égale distance du filtre.

### PRINCIPE

**L'émission:** Le rayon laser est d'abord filtré par



l'AOTF (filtre excitation actif, contrôle la puissance des lasers) puis traverse le pinhole d'entrée qui réduit la source à un point lumineux. Le faisceau est ensuite réfléchi par un miroir (semi transparent, dichroïque...) passe par la lentille de l'expander pour ajuster son diamètre à l'objectif. Le galvanomètre va orienter le faisceau pour permettre le balayage de l'échantillon en X-Y, l'acquisition de série z se fait grâce à un moteur galvanométrique.



**La réception :** Le signal excité suit le trajet inverse de l'émission mais traverse le miroir (semi-transparent, filtre dichroïque) puis le pinhole de sortie pour ne laisser que la fluorescence du plan focal. Le signal est alors dispersé en raies par le prisme puis les fentes spectrales vont sélectionner les bandes passantes des longueurs d'ondes de chaque photomultiplicateur. Le signal est alors converti

en numérique puis affiché sur l'écran.

**Le pinhole :** Comme on peut le voir sur la figure le principe essentiel réside dans le "trou d'aiguille" ou pinhole qui n'autorise que la détection des signaux du plan focal (trait continu) et bloque le passage des faisceaux hors plan focal (trait pointillé). Le diamètre du pinhole aura une ouverture correspond à la première tache d'Airy.

#### Les avantages :

- Elimination du signal fluorescent provenant d'autres plans (out of focus) grâce au pinhole,
- Augmentation de la résolution latérale et axiale,
- Acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D,
- Observation simultanée de différentes sondes fluorescentes (de part son système de détection).

#### Les inconvénients :

- La puissance de l'émission laser (entre 1mW et 10mW) entraîne une dégradation des spécimens observés dans tous l'épaisseur,
- Difficulté pour l'observation du vivant dans certains cas,
- La photosensibilité limite le temps total d'exposition d'un spécimen au processus de balayage.

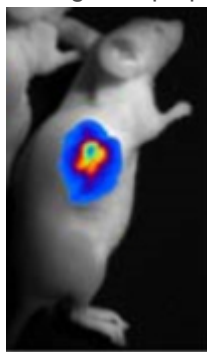
Le système acquis sur la plateforme est un microscope confocal Zeiss LSM780.

Il est équipé de quatre lasers et d'une chambre d'incubation.

#### Caractéristiques du microscope confocal Zeiss LSM780

## Imagerie petit animal

L'imagerie optique in vivo chez le petit animal s'est développée très récemment. On distingue les techniques de fluorescence qui s'appuient sur la détection de fluorochromes après excitation transcutanée par un laser et les techniques de bioluminescence qui reposent sur l'utilisation de molécules qui émettent naturellement des photons après injection d'un substrat donné. Dans les deux cas ces techniques sont particulièrement bien adaptées au suivi de cellules. On sait en effet construire des cellules qui vont synthétiser une molécule fluorescente (la plus connue est la Green Fluorescent Protein ou GFP) ou une « enzyme bioluminescente » comme la Luciférase. Il est alors possible dans les deux cas d'étudier une population de cellules en particulier de cellules tumorales humaines implantées chez la souris et qui produisent de la GFP ou de la Luciférase. On peut alors caractériser au cours du temps le développement ou la régression du cancer, la présence de métastases, l'effet d'agents pharmaceutiques. Ces techniques permettent également le suivi de l'expression génique sur le même principe que celui détaillé plus haut, le gène rapporteur pouvant être par exemple le gène codant pour la Luciférase.



Outre leur simplicité de mise en œuvre (la détection se fait généralement par une simple caméra CCD refroidie) et leur coût modéré, ces techniques présentent également l'avantage d'une résolution temporelle élevée bien adapté à l'étude des phénomènes cinétiques rapides. Néanmoins ces techniques d'imagerie 2D fournissent une information généralement qualitative et souffrent pour la bioluminescence ou l'utilisation de la GFP d'être limitées aux études des couches superficielles des tissus, du fait de la pénétration limitée de la lumière. De plus, des possibilités de coupler ces techniques avec un système d'imagerie par rayons X permettent de compléter dans certains cas les analyses.

Le système acquis sur la plateforme est le Photon Imager.

#### Applications :

cancérologie, immunologie, endocrinologie et études environnementales.

L'imagerie sur animal vivant anesthésié permet le suivi dans le temps d'un même animal (affranchissement des différences interindividuelles) ainsi qu'une réduction du nombre d'animaux utilisés.

## Modèles :

lignées cellulaires humaines et murines cancéreuses (sein, ovaire, prostate, colon, ...), Xénogreffes sous cutanées et orthotopiques, lignées transgéniques développant des cancers (Tramp, MMTV-neu).

## In situ :

souris immunodéprimées en portoirs ventilés (Nude, Scid...), souris traitées par traceurs radioactifs en zone contrôlée, souris immunodéprimées et/ou soumises à un traitement par un radio-isotope.

[Caractéristiques de la station de travail Photon Imager](#)

# Spectrométrie de masse

[Spectrométrie de masse](#) | [Chromatographie liquide](#)

## INTRODUCTION

La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, organites, tissu, organe ou organisme à un moment donné et sous des conditions données.

Dans la pratique, la protéomique s'attache à identifier les protéines extraites d'une culture cellulaire, d'un tissu ou d'un fluide biologique, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leurs modifications post-traductionnelles ainsi que leur quantité.

Elle peut également permettre de quantifier les variations de leur taux d'expression en fonction du temps, de leur environnement, de leur état de développement, de leur état physiologique et pathologique, de l'espèce d'origine. Elle étudie aussi les interactions que les protéines ont avec d'autres protéines, avec l'ADN ou l'ARN, avec des substances. La protéomique fonctionnelle étudie les fonctions de chaque protéine.

L'analyse protéomique est une étude dynamique. Un seul génome peut conduire à différents protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de la différenciation, de la réponse à différents signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique, ...

Le protéome reflète les répercussions de ces événements cellulaires au niveau tant traductionnel que post-traductionnel. De ce point de vue, seule une analyse protéique directe peut donner une image globale des systèmes biomoléculaires dans leur complexité.

## DIFFERENTES ETAPES DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE

Les méthodologies mises en œuvre pour l'analyse du protéome peuvent schématiquement être séparées en deux grands groupes : dans le premier peuvent être regroupées les méthodes expérimentales, reposant principalement sur les techniques de séparation et d'analyse des protéines. Un second groupe de méthodes, fait appel à l'analyse d'images et à la bio-informatique.

**Extraction** : la première étape consiste généralement à extraire les protéines d'un échantillon biologique. Cette étape est cruciale : une mauvaise extraction peut produire la dégradation des protéines et compliquer, voir rendre impossible, l'identification des protéines. Les protéines membranaires, comportant de nombreux acides aminés hydrophobes et donc peu soluble, restent difficiles à étudier.

**Séparation** : la seconde étape permet de séparer les protéines en fonction de leurs caractéristiques physiques ou chimiques ou en fonction de leurs affinités pour un ligand.

L'électrophorèse sépare les protéines dans un gel polyacrylamide en fonction de leur taille lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. La méthode d'électrophorèse de référence pour la protéomique est l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).

La chromatographie utilise la différence d'affinité des protéines entre une phase mobile et une phase stationnaire.

## Recherche des protéines d'intérêt par analyse d'image

La coloration des protéines en gel 2-DE reposent principalement sur l'emploi de colorants organiques tel que le bleu de Coomassie, de métaux tels que le nitrate d'argent, ou encore par sur des sondes fluorescentes. La gamme de détection varie d'un facteur d'environ 10000 entre les méthodes utilisant le bleu de Coomassie (détection de spots contenant une quantité de protéine de l'ordre du µg) et celles utilisant le nitrate d'argent qui permettent d'atteindre 0,1 ng. Les colorants fluorescents sont moins sensibles que le nitrate d'argent, cependant ont une plus grande reproductibilité et gamme dynamique.

Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée, les spots d'intérêt une fois détectés sont excisés du gel afin d'être identifiés par spectrométrie de masse.

## Identification par spectrométrie de masse

L'identification par SM repose sur une mesure précise de la masse de peptides ionisés. D'une façon très générale les protéines sont digérées par une endopeptidase (le plus souvent la trypsine) et, ensuite analysées par SM.

Une des approches utilisées est l'établissement de cartes peptidiques massiques (« peptide mass fingerprinting »). La masse des peptides obtenus après digestion protéasique est comparée aux cartes de masses théoriques des protéines répertoriées dans les banques de données.

Lorsque les échantillons sont trop complexes (ex : cultures cellulaires, fluides biologiques, ...), on utilise la spectrométrie de masse tandem (MS/MS). Dans ce cas, certains fragments peptidiques analysés lors d'une première SM sont choisis et fragmentés. Les pics de masse obtenus constituent une représentation de la séquence protéique, dans laquelle deux pics adjacents diffèrent par la masse d'un acide aminé perdu lors de la fragmentation du peptide analysé.

### **Interrogation des bases de données**

La dernière étape est l'interrogation des bases de données. Les différentes informations récoltées sur les protéines (masse apparente, masse réelle, point isoélectrique, taille des fragments après digestion enzymatique, séquence partielles) sont comparées aux bases de données génomiques ou protéomiques en ligne. Les logiciels fournissent alors une liste de protéines et leurs probabilités associées.

L'organisme dont le génome n'a pas encore été séquencé, Seuls certains organismes, dénommé organisme modèle, ont leurs génomes complètement séquencés et disponibles en ligne. Dans le cas contraire, les organismes sont étudiés par homologie avec les organismes connus.

## **APPLICATIONS**

**Identification de protéines dans des mélanges complexes :** L'identification de protéines dans des mélanges complexes requiert des instruments capables de détecter un très grand nombre de peptides avec une très bonne sensibilité. En effet, la résolution de ces instruments permet de distinguer des peptides très proches en masse, qui ne seraient ni séparés ni détectés dans un spectromètre de masse moins résolutif. Ceci est très utile, dans ce type d'approche dite « Bottom up », pour obtenir plus d'information sur les acteurs protéiques présents dans des mélanges très complexes. De plus, la large gamme dynamique permet d'obtenir des résultats de qualité, même sur des peptides minoritaires dans l'échantillon.

**Séquençage De Novo :** L'analyse par séquençage De Novo est souvent une opération difficile, en partie à cause du grand nombre d'interprétations possibles des fragments obtenus en MS/MS. Ce phénomène est amplifié dès lors que l'on considère pour l'interprétation, d'éventuelles modifications surtout dans les espèces où le génome n'est pas encore connu ou entièrement décrypté.

**Recherche modifications post-traductionnelles :** Les modifications post-traductionnelles sont les éléments clés de la signalisation cellulaire et des interactions entre les cellules au sein des organismes complexes. L'analyse de masse des fragments pourra se faire avec ce type d'instrument, apportant ici une meilleure spécificité, de part la précision de masse ; ainsi on aura des résultats beaucoup plus fiable. Par ailleurs, certains ions fragment « signant » une modification particulière seront facilement reconnaissables, et identifiés sans ambiguïté, c'est le cas par exemple des phospho-tyrosines qui jouent des rôles clés dans les processus de signalisation cellulaire.

**Analyse « Top Down » :** Il est également possible de travailler directement sur des protéines de petites et moyennes tailles. L'intérêt de cette technique est qu'elle n'utilise pas de digestion enzymatique (« Bottom up ») et permet d'identifier directement une protéine en fragmentant celle-ci dans le spectromètre de masse. Grâce à la haute résolution du système, il est possible à partir de l'analyse des spectres de fragmentation d'identifier la protéine. Cette méthode est complémentaire de l'approche classique par digestion enzymatique, et permet également de mettre en évidence d'éventuelles modifications.

## **Microdissection laser**

Les techniques de microdissection ont pour but d'isoler, sous un contrôle morphologique, des cellules ou des groupes de cellules pour effectuer des études de biologie moléculaire. En effet, la complexité des tissus a rendu les résultats des techniques biologiques « classiques » souvent d'interprétation difficile : les tissus analysés pour le contenu en protéines ou en ARN ou en ADN l'étaient de façon globale. L'ensemble des cellules constituant un tissu était broyé quel que soit leur type tissulaire (tissus épithéliaux, tissu conjonctif de soutien, vaisseaux, nerfs etc....) mélangeant ainsi tous les extraits cytosoliques.

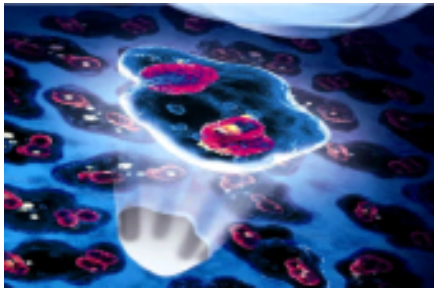
Les techniques de microdissection se sont toujours voulues comme une alternative aux méthodes globales permettant, grâce à un contrôle morphologique, une hyper-sélection des cellules à analyser.

Avec l'apparition des techniques de PCR, la microdissection proprement dite a permis une approche moléculaire des tissus examinés mais tout en ayant la certitude d'avoir un matériel cellulaire très purifié pour les analyses moléculaires.

Le système acquis sur la plateforme est PALM® MicroBeam.

### **PRINCIPE**

La lumière “ laser ” pour Light Amplification by Stimulated Emission of



Radiation, est d'une parfaite monochromaticité et elle possède une cohérence spatiale et temporelle très élevée. Dans un faisceau laser, à la différence d'un faisceau lumineux standard, les photons émis sont tous de même longueur d'onde et de même fréquence.

Le principe de formation est lié à un phénomène physique appelé émission induite. De manière à obtenir la plus grande intensité de lumière laser dans une direction bien précise, on oblige les photons stimulés à traverser plusieurs fois le milieu émetteur de manière à induire à chaque traversée de nouveaux photons.

Les lasers utilisés en biologie ont une longueur d'onde située soit dans l'infrarouge soit dans l'ultraviolet ; ils fonctionnent en mode continu ou en mode par impulsion. L'énergie libérée par une onde lumineuse est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. La forte densité de puissance et la localisation très précise des faisceaux laser ont permis son application biologique pour la découpe des tissus. En effet, pour obtenir une découpe précise il faut un laser d'une haute énergie et très focalisé. La haute concentration des photons va détruire les ponts chimiques existant dans les tissus.

Le diamètre focal du laser dépend également de la longueur d'onde, de la qualité du faisceau (proche de la diffraction), de l'ouverture numérique de l'objectif et des phénomènes d'absorption liés au spécimen étudié et aux milieux traversés.

## APPLICATIONS

La microdissection laser n'endommage la morphologie et la chimie de l'échantillon rassemblé, ni cellules environnantes. Cette technique peut être exécuté sur une variété d'échantillons tissulaires incluant le sang, des préparations cytosoliques, des cultures cellulaires. C'est pourquoi, elle constitue une méthode utile pour étudier l'ADN ou l'ARN mais aussi les protéines contenues dans des cellules cibles. En effet, de nombreuses études ont montré l'intérêt du couplage de cette technique avec une analyse protéomique dans le but d'identifier certaines protéines spécifiques dans le cas de certains cancers par exemple

[Caractéristiques du système PALM® MicroBeam](#)