TECHNIQUES D'OBSERVATION DES STRUCTURES CELLULAIRES,			
Technique	**Ex.**	**Principe général**	**Résultats attendus**
Microscopie : technique **d'observation** utilisant un microscope, instrument d'optique plus sophistiqué qu'une loupe (comportant plusieurs lentilles), permettant l'observation d'objets de petite taille	TP SV-C BCPST 1	**Microscopie photonique** : utilisant la lumière naturelle ou d'une lampe	Limites d'observation quelques mm à 1 µm ; permet l'étude de matériel **vivant** ; divers résultats en fonction des techniques utilisées (colorants divers…)
	TP SV-C BCPST 1	**Microscopie électronique à transmission MET** : utilisant un faisceau d'électrons à l'origine d'une image de l'objet après l'avoir traversé (électrons **transmis**)	Limites d'observation de **100 µm à 1 nm** ; ne permet, en général, que l'étude de matériel mort (fixé).
	TP SV-C BCPST 1	**Microscopie électronique à balayage MEB :** utilisant un faisceau d'électrons ; l'image obtenue est constituée par les électrons **réfléchis** par la surface de l'objet	Images **tridimensionnelles** de la surface de l'objet. Variante : cryofracture puis ombrage métallique ; observation de répliques : moulages d'une surface
	TP SV-C BCPST 1	**Microscopie confocale :** l'image observée provient des rayons émis par un seul plan de l'objet = : c'est une tranche optique de l'objet, semblable à celle obtenue par un scanner.	L'image observée est parfaitement nette + on peut, par superposition de **coupes sériées** d'un objet reconstituer sa forme tridimensionnelle
	Cours SV-C3 (BCPST1)	**Microscopie de fluorescence :** les cellules à étudier sont incubées avec des anticorps couplés à un fluorochrome pour rechercher une protéine), du DAPI pour l'ADN, .	La molécule recherchée apparaît sous la forme d'un point lumineux alors que le reste du champ est éteint.

TECHNIQUES D'ISOLEMENT, D'IDENTIFICATION DES MOLÉCULES CELLULAIRES			
Technique	**Ex.**	**Principe général**	**Résultats attendus**
Electrophorèse : **séparation et identification** de molécules chargées par migration sur un support poreux (acétate de cellulose) ou gélifié, imprégné d'un solvant et soumis à un champ électrique ; elle dépend de la charge et de la taille des molécules	TP et cours SV-D BCPST 1 Lien vers des vidéos western blot UCLB southern blot	- SDS **PAGE** : **é**lectrophorèse de **protéines** sur **g**el de **p**olyacryl**a**mide, en conditions dénaturantes (SDS, détergent chargé négativement qui se fixe sur la molécule ; la quantité de molécules de SDS fixées sur la protéine est globalement proportionnelle à sa masse moléculaire = séparation des molécules selon leur PM). - Electrophorèse d'acides nucléiques sur gel de polyacrylamide.	- L'électrophorégramme est constitué de diverses bandes qui correspondent aux molécules ; leur taille est déterminée par référence à des témoins (marqueurs de taille) ; l'identification dépend des modalités de la révélation. - Possibilité de transférer les diverses fractions isolées sur une membrane (technique de « *blotting* » ou « buvardage») puis d'y ajouter un anticorps marqué (*western blot* : identification d'une protéine) ou une sonde nucléotidique (*Southern* ou *northern blot* : identification d'une séquence d'ADN ou d'ARN).
	TP SV-D	**Electrophorèse bidimensionnelle de protéines** : deux migrations successives : en conditions non dénaturantes (séparation selon la charge) puis dénaturantes (séparation selon le poids moléculaire).	Les deux migrations successives permettent de mieux discriminer les divers composants protéiques du mélange à analyser
Chromatographie : séparation de substances basée sur leur comportement différent entre une phase mobile (liquide ou gazeuse) et	Chromatographie des pigments (végétaux angiospermes, algues) Chromatographie d'acides aminés TP SV D BCPST 1		Séparation des constituants d'un mélange ; identification possible en référence à un témoin.

une phase fixe (support de migration)		**Chromatographie d'affinité** : fixation sur un support de migration d'un ligand de la molécule à isoler ; le mélange contenant la molécule d'intérêt est versé sur le support ; cette molécule est adsorbée par le ligand alors que les autres sont éluées	Isolement à partir d'un mélange d'une molécule d'intérêt : la molécule retenue par le ligand est récupérée par modification des conditions chimiques qui dissocie le complexe formé avec le ligand.

TECHNIQUES DE SUIVI DE LA DYNAMIQUE DE LA CELLULE OU DE SES CONSTITUANTS

Technique	Ex.	Principe général	Résultats attendus
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	Traceurs de lignage cellulaire en biologie du développement BCPST1 SV-D et SV-H BCPST2	Fluorochromes divers émettant dans le vert (fluorescéine**,** GFP**),** jaune (Lucifer Yellow), le rouge **(**rhodamine**,** phycoérythrine)… Marquage des molécules d'intérêt : - par couplage des fluorochromes avec des anticorps spécifiques des molécules d'intérêt (immunofluorescence) - par couplage par génie génétique de la protéine à étudier avec la GFP	utilisation de fluorochromes (accès ENS) Repèrage et localisation de molécules d'intérêt
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).
Techniques diverses révélant la dynamique moléculaire au sein des cellules Très courte animation sur le FRAP	TP SV-D BCPST 1 (exp de Palade sur dynamique sécrétoire pancréatocyte)	***Pulse – chase*** - Incubation de cellules vivantes en présence d'un acide aminé radioactif pendant un temps court (*Pulse*) - Puis incubation en présence d'une grande quantité de ce même acide non marqué pendant des durées variables (Chase) avant fixation et analyse des résultats	Analyse des résultats par fractionnement cellulaire (on mesure la radioactivité de chaque fraction) ou en MET (on localise la radioactivité au sein de la cellule). On reconstitue le cheminement de la protéine marquée (synthétisée en présence de l'acide aminé marqué) dans la cellule au cours du temps
		Suivi de particules uniques par marquage spécifique de la molécule d'intérêt ; choix d'un marqueur stable et de petite taille (nanomolécules d'or, nanocristaux semiconducteurs, fluorochromes…)-	Reconstitution du cheminement de la molécule étudiée avec une bonne résolution spatiale (quelques nm) et temporelle (quelques ms) meilleure que pour le *pulse-chase*.
	Cours BCPST1 SV-C2	**FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)**	Mise en évidence de la fluidité membranaire Mise en évidence de la dynamique du cytosquelette

Techniques d'électrophysiologie cellulaire

Technique / Outil	Ex	Principe général	Résultats
Voltage clamp	Cours BCPST 2 SV-I	Enregistrement de courants ioniques transmembranaires sur un neurone	Identification de courants liés à des modifications de la perméabilité membranaire aux ions suite à l'imposition d'un voltage
Patch clamp	Cours BCPST 2 SV-I	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

Outils spécifiques pour l'étude du génome et du transcriptome

Technique / Outil		Principe général	Résultats
Enzymes outils du génie génétique		**Endonucléases** de restriction **Transcriptase inverse** ADN et ARN polymérases Ligases	Découpage de l'ADN en fragments de restriction Constitution de banques d'ADNc, d'ADN génomique
Sondes nucléotidiques	Cours BCPST 2 sur développement	Séquence nucléotidique connue pouvant s'hybrider avec une séquence d'intérêt (ADN dénaturé ou ARN)	Mise en évidence de la maturation des ARNm par hybridation ADN / ADNc Identification d'ADN ou ARN après électrophorèse et buvardage. Identification d'ARN d'intérêt par **hybridation *in situ***.
PCR		Polymérisation *in vitro* à haute température d'une séquence d'ADN ou d'ARN (RT-PCR) à partir d'une amorce spécifique.	Amplification d'une séquence d'ADN donnée pour la transfecter ou l'analyser.
qRT-PCR	Cours BCPST1 sur contrôle de l'expression génétique	Polymérisation à haute température d'une séquence d'ADNc rétro-transcrite d'un ARN.	Etude du transcriptome : quantification d'un ARN d'intérêt
Transgenèse CRISP-Cas 9 en 3 minutes Un exemple d'application agronomique du CRISP-Cas-9	Cours BCPST1 SV-F et cours BCPST2 SV-F4 et SV-H	Transfert d'une séquence d'ADN d'intérêt dans une cellule qui en est dépourvu pour la reproduire ou l'exprimer. Le système ***CRISP-Cas9*** coupe l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule. 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.	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 (cf ci-dessous).
Mutagenèse dirigée	Cours BCPST1 SV-F et cours BCPST2 SV-H	Mutation d'un gène d'intérêt par différentes techniques (transgenèse, **technique du KO**)	Obtention de mutants d'un gène d'intérêt permettant d''établir les conséquences de l'inactivation du gène.
Puce à ADN	Cours BCPST1 SV-F et cours BCPST2 SV-H	Hybridation d'ADNc (rétrotranscrits des ARN d'une cellule et marqués avec un fluorohrome) avec des fragments d'ADN retenus sur un support (puce). Traitement informatique.	Profil transcriptomique d'une cellule = identification des ARN qu'elle transcrit.
Gène rapporteur	Cours BCPST1 SV-F et cours BCPST2 SV-H	Gène codant une protéine dont l'activité provoque une coloration des cellules ; placé, dans une construction génétique, sous le contrôle du promoteur d'un gène	Etude de la transcription d'un gène d'intérêt par des cellules ou un tissu en culture.

		d'intérêt, il rend compte de l'expression du gène d'intérêt par les cellules où il a été transfecté.	
Retard sur gel	Cours BCPST1 sur contrôle de l'expression génétique SV- F Cours BCPST 2 SV-H	Comparaison de la migration électrophorétique d'une séquence nucléotidique incubée seule ou avec une protéine nucléaire.	Mise en évidence de l'interactions entre ADN et protéines : si elle existe, la migration en présence de protéine va moins loin.