

---

## Partie expérimentale

---

### Analyses des niveaux d'expression des gènes d'autophagies : P62, GABARALP-2 b et ATG9A au cours de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages.

1) Description comparative des cellules HL-60 contrôles et traitées au PMA

**Cellules HL-60 contrôles** : Présence de nombreuses cellules en suspension, de formes arrondies, de tailles moyennes.

**Cellules traitées au PMA** : Présence de cellules granulées arrondies volumineuses moins nombreuses groupées en amas avec un noyau excentré et des vacuoles dans leur cytoplasme. On remarque aussi que ces cellules ont des prolongements cytoplasmiques et on note aussi la présence de pseudopodes.

**Conclusion** : Ces cellules ayant des prolongements cytoplasmiques sont des macrophages qui peuvent phagocyter des débris cellulaires et les agents pathogènes. Le traitement au PMA des cellules HL-60 est efficace d'autant plus qu'on a une différenciation des cellules en macrophages.

2) Extraction d'ARN

2- 1 Indiquons les valeurs de la lecture d'absorbance à 260 nm, 280nm, 230nm de nos échantillons

	Concentration ng/ $\mu$ l	Ratio 260/280	Absorbance 230 nm	Absorbance 260nm	Absorbance 280 nm
Cellules contrôles	406,38	2,16	9,617	14,722	9,596
Cellules traitées au PMA 1	127,67	2,6	5,425	5,51	3,17
Cellules traitées au PMA 2	70,65	3,26	2,888	4,349	2,602

Calcul de la concentration en ARN (en  $\mu$ g/ $\mu$ l) à partir des absorbances observées

➤ **Cellules contrôles** :

**OGUI Foumilayo**  
**HAMMI Sarah**  
**DIA Mohamed**  
**DIALLO Mamadou**

Concentration =  $406,38 \text{ ng}/\mu\text{l} = 407 \text{ ng}/\mu\text{l}$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = [\text{ARN}] \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = 407 \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000 = \mathbf{0,407 \mu\text{g}/\mu\text{l}}$  ➤

**Cellules traitées au PMA 1 :**

Concentration =  $127,67 \text{ ng}/\mu\text{l} = 128 \text{ ng}/\mu\text{l}$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = [\text{ARN}] \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = 128 \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000 = \mathbf{0,128 \mu\text{g}/\mu\text{l}}$

➤ **Cellules traitées au PMA 2**

Concentration =  $70,65 \text{ ng}/\mu\text{l} = 71 \text{ ng}/\mu\text{l}$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = [\text{ARN}] \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000$

$[\text{ARN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = 71 \text{ ng}/\mu\text{l} : 1000 = \mathbf{0,071 \mu\text{g}/\mu\text{l}}$

Les ratios qui permettent d'évaluer la pureté de notre échantillon d'ADN sont : Abs 260 nm / Abs 280 nm et Abs 260nm /230 nm **Ratio Abs 260 nm/Abs 280 nm :**

Cellules contrôles :  $14,722/9,596 = \mathbf{1,53}$

Cellules PMA 1 :  $5,51/ 3,17 = \mathbf{1,73}$

Cellules PMA 2 :  $4,349/ 2,602 = \mathbf{1,67}$

**Commentaire :** Pour les cellules contrôles :1,53 inférieure à 1,8 donc présence de contaminant protéique ou chimique absorbant fortement à 280 nm. Pour les cellules PMA 1 : 1,73 sensiblement égale à 1,8 donc la solution d'ADN est pure.

Pour les cellules PMA 2 : 1,67 inférieure à 1,8 donc présence de contaminant protéique ou chimique absorbant fortement à 280 nm. Cette différence de valeur entre les deux cellules PMA est due à une mauvaise manipulation lors du TP.

**Ratio Abs 260nm /230 nm :**

Cellules contrôles :  $14,722 /9,617 = \mathbf{1,53}$

Cellules PMA 1 :  $5,51 /5,425 = \mathbf{1,01}$

Cellules PMA 2 :  $4,349 /2,888 = \mathbf{1,50}$

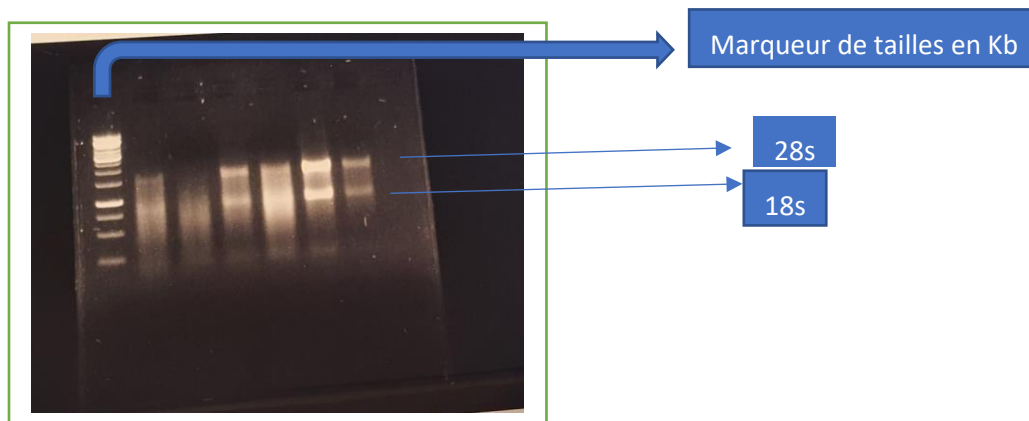
**Commentaire :** Pour les cellules contrôles : 1,53 est inférieure à 1,8 donc présence de contaminant absorbant fortement à 230nm.

Pour les cellules PMA 1 : 1,01 est inférieure à 1,8 donc présence de contaminant absorbant fortement à 230nm

Pour les cellules PMA 2 : 1,50 est inférieure à 1,8 donc présence de contaminant absorbant fortement à 230nm

**Pour la suite des expériences, la présence de l'isothiocyanate de guanidine dans nos échantillons d'ARN a pour risque de dénaturer les protéines en détruisant leur structure tridimensionnelle, ce qui empêche de poursuivre la manipulation du dosage des gènes d'autophagie.**

2-2) Photo à coller du gel annoté



NB : 2 bandes claires signifie que l'ARN est intact

Bandes floues signifie que l'ARN est dégradé. Sur la photo du gel les trois derniers profils sont celui de notre binôme. Les différents critères à observer sur le gel sont : critère de taille ou de 18 S masse

Cellules contrôles : Observation de deux épaisses bandes de grandes tailles et de masses 28S et 18S.

Cellules traitées au PMA 1 : Observation de deux légères bandes de taille moyenne et de masses 28S et 18S.

Cellules traitées au PMA 2 : Absence de bandes due à une mauvaise manipulation lors du TP.

### **Conclusion :**

Les cellules contrôles sont restées intactes, cependant les cellules traitées au PMA ont été dégradées partiellement. La pureté et l'intégrité des ARN permettent donc de poursuivre l'étude.

3- Détails des calculs des réactifs utilisés pour réaliser le mélange réactionnel de reverse transcription et du volume de la solution d'ARN pour prélever 1,5ug d'ARN

$$\text{Vol ARN } (\mu\text{L}) = 1,5 \mu\text{g} / [\text{ARN}] (\mu\text{g}/\mu\text{L})$$

$$\text{Cellules contrôles : Vol ARN } (\mu\text{L}) = 1,5 \mu\text{g} : 0,407\mu\text{g}/\mu\text{L} = 3,68 \mu\text{L}$$

**OGUI Foumilayo**  
**HAMMI Sarah**  
**DIA Mohamed**  
**DIALLO Mamadou**

Cellules traitées PMA : **Vol ARN (μL) = 1,5 μg : 0,128 μg/μl = 11,71 μL**

**Vol amorces R6N (μL) :**  $C_i \times V_i = C_f \times V_f \rightarrow V_i = (C_f \times V_f) : C_i$

$V_i = (0,1 \mu M \times 20 \mu l) / 2 \mu M = 1 \mu l$

**Vol dNTPs (μl) :**  $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$ ,  $V_i = (0,5 \text{ mM} \times 20 \mu l) / 10 \text{ mM} = 1 \mu l$

**Vol Eau (μL) :** **qsp 13 μl** = 15 μL - vol ARN (μL) - 1 μL - 1 μL

**Vol tampon de réaction (μL) :** **5X = 1X**  $d = C_f/V_f$

$d = 1/5$  , **Volume tampon de réaction (μL) = 20 μL x 1/5 = 4 μL** **Vol**

**réverse transcriptase (μL) :**  $C_i = 200 \text{ U}/\mu\text{L}$ , **200 U = 1 μL**

	Quantité /Concentration finale dans le mélange réactionnel	Volume à prélever (μL)
Matrice ARN (Cellules contrôles)	1,5μg	3,68
Matrice ARN (Cellules traitées PMA 1)	1,5 μg	11, 71
Matrice ARN (Cellules traitées PMA 2)	1,5 μg	0,02
Amorces : hexamères aléatoires R6N ( $C_i$ = 2uM)	100 nM	1
Mélange de dNTPS ( $C_i$ = 10 mM)	0,5 mM	1
Eau exempte de RNases (Cellules contrôles)	Qsp 15 μl	9
Eau exempte de RNases (Cellules traitées PMA1)	Qsp 15 μl	1,2
Eau exempte de RNases (Cellules traitées PMA 2)	Qsp 15 μl	12,98

Tampon de réaction 5X	1X	4
Maxima Reverse Transcriptase (Ci = 200U / $\mu$ l)	200U	1
Volume total du mélange réactionnel	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

4- Les trois types d'amorces utilisables lors d'une réaction de réverse transcription et leurs avantages :

- Oligo dT : spécifique pour les ARNm eucaryote
- Amorces spécifiques : spécifique à une matrice
- Amorces aléatoires : pas de spécificité de matrice

5 - Calcul de la concentration en ADNc de notre échantillon après réverse transcription en considérant une efficacité de réverse transcription de l'ARN en ADNc de 100%

Si l'efficacité est de 100% alors la concentration d'ADNc obtenue après la réverse transcription est égale à celle de l'ARNm.

$$C = \text{Masse} / \text{Volume} = 1,5 / 20 = \mathbf{0,075 \mu\text{g}/\mu\text{l}}$$

6- Détails des calculs des réactifs utilisés pour réaliser le mélange réactionnel de ddPCR

Soient C1 la concentration de l'échantillon contrôle lue au spectrophotomètre : C1 = 639,2ng/ $\mu$ l

C2 la concentration de l'échantillon PMA1 lue au spectrophotomètre : C2 = 179,33 ng/ $\mu$ l

C3 la concentration de l'échantillon PMA2 lue au spectrophotomètre : C3 = 241 ,75 ng/  $\mu$ l

$$\text{Echantillon contrôle : } V1 = 700\text{ng} : 639,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = \mathbf{1,095 \mu\text{l}}$$

$$\text{Volume d'eau} = 12 - 1,095 - 2 = \mathbf{8,91 \mu\text{l}}$$

$$\text{Echantillon PMA 1 : } V2 = 700 \text{ ng} : 179,33 \text{ ng}/\mu\text{l} = \mathbf{3,90 \mu\text{l}}$$

$$\text{Volume d'eau} = 12 - 3,9 - 2 = \mathbf{6,1 \mu\text{l}}$$

$$\text{Echantillon PMA 2 : } V3 = 700 \text{ ng} : 241,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = \mathbf{2,89 \mu\text{l}}$$

$$\text{Volume d'eau : } 12 - 2,89 - 2 = \mathbf{7,11 \mu\text{l}}$$

$$\text{Bleu de charge 6X : } d = 1/6$$

	Quantité / Concentration finale	Volume à prélever ( $\mu$ l)
--	---------------------------------	------------------------------

ARN total purifié	700 ng	X
ARN total purifié (Echantillon contrôle)	700 ng	1,095
ARN total purifié (Echantillon PMA 1)	700 ng	3,90
ARN total purifié (Echantillon PMA 2)	700 ng	2,89
Bleu de charge 6X	1X	2
Eau exempte de RNase	Qsp 12 µl	12 – X - 2
Eau exempte de RNase (Echantillon contrôle)	Qsp 12 µl	8,91
Eau exempte de RNase (Echantillon PMA 1)	Qsp 12 µl	6,1
Eau exempte de RNase (Echantillon PMA 2)	Qsp 12 µl	7,11

7- La zone en vert appelée ‘‘ 5’ upstream sequence ‘‘ a pour rôle de réguler la transcription du gène contenant le promoteur (boîte TATA, boîte CAAT ...), le site de fixation initiale de l’ARN polymérase.

Exemple de couple d’amorces :

Amorces sens : 5’ -AGT CGC CGC CGT CGC TGC CG - 3’ (1- 20) Amorces

anti-sens : 5’ -CAT CCA CTT CAT GGC GGC GG -3’ (120 -100)

8- Explication :

Le choix de la seconde température (55°C) lors de l’amplification par PCR repose sur l’existence et la spécificité de l’amplification de l’ADN. Si la température de l’hybridation est trop élevée, les amorces ne s’hybrideront pas avec la matrice. Cependant si la température est basse, les amorces s’hybrideront de manière non spécifique donc on aura une possibilité d’amplification d’un autre ADN que celui étudié.

9- Cette étape est la digestion d’ADN contaminant par la DNase. Ce dernier correspond à l’ADN génomique des cellules.

Déduction : Le résultat positif signifie que l’ADNase n’a pas éliminé la totalité de l’ADN génomique et que la séquence d’intérêt est présente sur l’ADN contaminant donc les amorces s’hybrideront.

10 – Calcul de la quantité ADNc (en ng) déposé dans le mélange réactionnel de ddPCR

Si 1 µl  700 ng

20 µl  Y

**OGUI Foumilayo**  
**HAMMI Sarah**  
**DIA Mohamed**  
**DIALLO Mamadou**

$$Y = (700 \text{ ng} \times 20 \text{ } \mu\text{l}) / 1 \mu\text{l}$$

$$Y = 14000 \text{ ng}$$

Calcul du nombre de copies d'ADNc de chaque gène d'intérêt dans le mix réactionnel

$$\begin{aligned} \text{Nombre de copies ADNc mix} &= \text{Concentration (copies ADNc / } \mu\text{l mix)} \times V \text{ mix (} \mu\text{l)} \\ &= \text{Concentration (copies ADNc / } \mu\text{l mix)} \times 20 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Déduction pour chaque gène le nombre de copies d'ADNc/ng d'ADNc dosé

$$\text{Nombre de copies d'ADNc / ng d'ADNc dosé} = \text{Nombre de copies d'ADNc / mélange réactionnel} : 14 \mu\text{g}$$

Nom de l'échantillon	Concentration en transcrits du gène (copies d'ADNc / $\mu\text{L}$ mélange réactionnel)			Nombre de copies d'ADNc / mélange réactionnel			Nombre de copies d'ADNc / ng d'ADNc dosé		
	MAP1LC3B	P62	ATG9	MAP1LC3B	P62	ATG9	MAP1LC3B	P62	ATG9
H2O	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HL-60 contrôles	13	64,2	6,2	260	1284	124	18	91	8
HL-60 PMA	29,7	140	16,3	594	2800	326	42	200	23

11-Analyse de l'expression des gènes de l'autophagie MAP1LC3B, P62, ATG9 entre les échantillons " HL-60 contrôles " et " HL-60 traitées au PMA "

HL -60 contrôle : Expression basale des gènes de l'autophagie surtout celle du gène P62.

HL-60 PMA : Forte expression des gènes de l'autophagie par rapport aux échantillons HL-60 contrôles. On en déduit que le PMA favorise une production importante des protéines associées aux gènes de l'autophagie (MAP1LC3B, P62, ATG9).

**Hypothèses :**

**OGUI Foumilayo**  
**HAMMI Sarah**  
**DIA Mohamed**  
**DIALLO Mamadou**

D'après la question 1) le PMA induit la différenciation des HL-60 en macrophages.

L'autophagie serait impliquée dans la différenciation des cellules en macrophages.

L'autophagie pourrait être déclenchée pour donner suite à une réponse immunitaire faisant intervenir les macrophages.

12- A ne pas traiter