

Travail de Maturité

**Analyse et caractérisation de la flore bactérienne
de la souris**

Autrice : Eysan Zeynep Gedik

Lycée : Lycée cantonal de Porrentruy

Discipline : Biologie

Professeur responsable : Coralie Herrmann

Expert : Pascal Lovis

Le parrain de TM : Dr. Ziad Al Nabhani

Date de remise : 06/01/2026

Table des matières

RÉSUMÉ.....	3
1. INTRODUCTION	3
1.1 Motivation.....	3
1.2 Cadre général.....	3
1.2.1 Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes	3
1.2.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	5
1.2.3 Culture cellulaire	7
1.3 But des expériences	7
1.3.1 Comparaison de deux enzymes Taq polymérase lors de PCR	8
1.3.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	8
1.3.3 La culture cellulaire	8
1.4 Hypothèses de recherche	8
1.4.1 Génotypage par PCR : comparaison des deux enzymes	8
1.4.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	9
1.4.3 Culture cellulaire	9
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	9
2.1 Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes.....	9
2.1.1 Isolement d'ADN à partir de biopsies pour le génotypage	9
2.1.2 Migration des produits PCR sur gel d'agarose	11
2.1.2.1 Préparation du gel d'agarose.....	11
2.1.2.2 Électrophorèse.....	11
2.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	12
2.3 Culture cellulaire.....	13
3. RESULTATS :	14
3.1. Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes.....	14
3.2. Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	16
3.3 Culture cellulaire.....	17
4. DISCUSSION.....	18
4.1 Génotypage par PCR : comparaison des deux enzymes	18
4.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux	19
4.3 Culture cellulaire.....	20
5. CONCLUSION	20
6. BIBLIOGRAPHIE :	21
7. REMERCIEMENTS	23
8. DÉCLARATION D'AUTHENTICITÉ	24
9. ANNEXES	25

RÉSUMÉ

Ce Travail de maturité a pour objectif la détermination du génotype de souris par amplification de l'ADN à l'aide de la PCR. Après extraction de l'ADN, deux enzymes de polymérase ont été comparées afin d'évaluer la qualité et la fiabilité de l'amplification. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, permettant d'identifier les génotypes en fonction de la taille des fragments obtenus. Les résultats montrent que la Platinum Taq Polymerase offre une meilleure spécificité et des bandes nettement interprétables. Enfin, une expérience de tri cellulaire par cytométrie en flux ainsi qu'une culture cellulaire ont également été réalisées durant le stage en laboratoire.

1. INTRODUCTION

1.1 Motivation

Mon intérêt pour la biologie et la compréhension du corps humain m'a amenée à m'interroger sur le fonctionnement du système immunitaire, en particulier sur le rôle du microbiote intestinal et son influence sur les cellules de notre organisme. Cette curiosité m'a conduite à réaliser mon travail de maturité au département d'immunologie de l'Université de Berne, sous la supervision du Dr Ziad Al Nabhani, dont les recherches portent sur le développement du système immunitaire chez les jeunes souris. À cette étape cruciale du développement, le contact avec les bactéries du microbiote intestinal façonne la tolérance immunitaire et la résistance aux maladies inflammatoires (Al Nabhani, Z., et al., 2019).

J'ai choisi ce sujet car il me permettait d'observer concrètement le travail effectué dans un laboratoire de recherche et de me familiariser avec les méthodes de biologie moléculaire.

1.2 Cadre général

1.2.1 Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes

Les gènes sont des segments fonctionnels de l'ADN qui portent l'information nécessaire à la synthèse des protéines et au fonctionnement des cellules. Un même gène peut exister sous différentes versions, appelées allèles, ce qui contribue à la diversité génétique entre les individus. L'ensemble des allèles possédés par un individu constitue son génotype.

En recherche biomédicale, certains gènes peuvent être modifiés de manière ciblée afin d'étudier leur fonction ou leur régulation. Lorsqu'un gène modifié est introduit artificiellement dans le génome, on parle de transgène, et les organismes qui le portent sont qualifiés de transgéniques (LCP. Bactériologie, 2021). Ces modèles animaux sont largement utilisés pour mieux comprendre le rôle des gènes dans des processus biologiques complexes, tels que le développement, la différenciation cellulaire ou les réponses immunitaires.

L'identification du génotype d'un organisme, c'est-à-dire la détermination des allèles qu'il possède, repose fréquemment sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN spécifique afin de le rendre détectable. La PCR se déroule en plusieurs cycles successifs de chauffage et de refroidissement : la dénaturation sépare les deux brins d'ADN, l'hybridation permet à des amorces spécifiques de se fixer sur la séquence ciblée, puis l'élongation prolonge ces amorces grâce à une enzyme appelée Taq polymérase. Ce processus conduit à la multiplication exponentielle de la région d'intérêt, qui peut ensuite être visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose (LCP. Biologie moléculaire). Lors de cette étape, l'ADN, chargé négativement, migre vers la borne positive sous l'effet d'un champ électrique. Les fragments de petite taille se déplacent plus rapidement à travers le maillage du gel, tandis que les fragments plus longs sont ralentis. Enfin, certains gènes étudiés en recherche expérimentale ne sont pas localisés sur les chromosomes autosomes, mais sur les chromosomes sexuels X ou Y. Les femelles possèdent deux chromosomes X (XX), tandis que les mâles possèdent un chromosome X et un chromosome Y (XY). Lorsqu'un gène transgénique est situé sur le chromosome X, on parle de mutation liée à l'X. Dans ce cas, la transmission du gène modifié suit un mode d'hérédité particulier, dépendant du chromosome X transmis à la descendance (LCP. Cours de Génétique).

Chez une femelle (XX), trois combinaisons sont possibles : si les deux chromosomes X portent le transgène, la souris est dite homozygote transgénique (tg/tg) ; si un seul X est modifié, elle est dite hétérozygote (tg/WT) ; si aucun ne l'est, elle est dite de type sauvage (WT/WT). (Une souris *wild type* porte uniquement les deux allèles "normaux". En ce sens, elle est homozygote pour l'allèle sauvage, mais par convention, on ne la qualifie pas d'"homozygote", on dit simplement *wild type*, car elle sert de référence pour les comparaisons avec les souris modifiées.) Chez un mâle (XY), la situation est différente, car le chromosome Y ne porte pas ce gène. Ainsi, s'il hérite d'un X transgénique, il est tg/0, et s'il hérite d'un X non modifié, il est WT/0. Le « 0 » indique simplement que le chromosome Y n'a pas d'équivalent du gène étudié.

La lignée Foxp3-CreERT2, qui sera abordée dans ce rapport, est fréquemment utilisée pour l'étude des cellules T régulatrices. Le gène modifié correspondant est localisé sur le chromosome X (Feil, S., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., & Chambon, P., 1996).

1.2.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

Le système immunitaire constitue un réseau hautement organisé de cellules, de tissus et de molécules assurant la défense de l'organisme. Il joue également un rôle central dans le maintien de l'équilibre interne en éliminant les cellules mortes ou anormales. Parmi les cellules du sang, les leucocytes, ou globules blancs, représentent les principaux acteurs de cette défense. Ils se répartissent en deux grandes lignées : la lignée myéloïde, à l'origine des macrophages et des cellules dendritiques, et la lignée lymphoïde, qui comprend les lymphocytes B et T (Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D., 1986).

Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de l'intestin. Parmi eux, les lymphocytes T gamma-delta ($\gamma\delta$) constituent une sous-population particulière, principalement présente dans les tissus épithéliaux comme l'intestin. Ces cellules interviennent dans la surveillance immunitaire locale, la régulation de l'inflammation et le maintien de l'équilibre du tissu intestinal. Leur absence peut modifier le microenvironnement intestinal et influencer le comportement d'autres cellules présentes dans ce tissu (Rampoldi, F., & Prinz, I., 2022 et Kang, I., et al., 2023).

L'intestin contient également des cellules stromales, situées dans la lamina propria, qui assurent le soutien structural du tissu. En plus de ce rôle, elles participent à la régulation des réponses immunitaires locales et interagissent étroitement avec les cellules immunitaires. Une modification des populations lymphocytaires peut donc avoir un impact direct sur l'activité de ces cellules stromales (Wikipedia, Stromal cell).

Pour analyser les différentes populations cellulaires de l'intestin, la cytométrie en flux est utilisée. C'est une technique pour identifier et quantifier les différents types de cellules présents dans un échantillon. Les cellules sont d'abord marquées à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes, c'est-à-dire des molécules fluorescentes capables d'émettre une lumière colorée lorsqu'elles sont excitées par un laser. Chaque cellule passe ensuite individuellement dans un faisceau laser à grande vitesse. Lors du passage, la lumière est diffusée et les fluorochromes émettent des signaux lumineux spécifiques selon les marqueurs exprimés par la cellule (Figure 1). Ces signaux sont captés par des détecteurs et transformés en données numériques par l'appareil (Perez Gonzalez, A., & Jameson, V et How a Flow Cytometer Works, Thermo Fisher Scientific 2025).

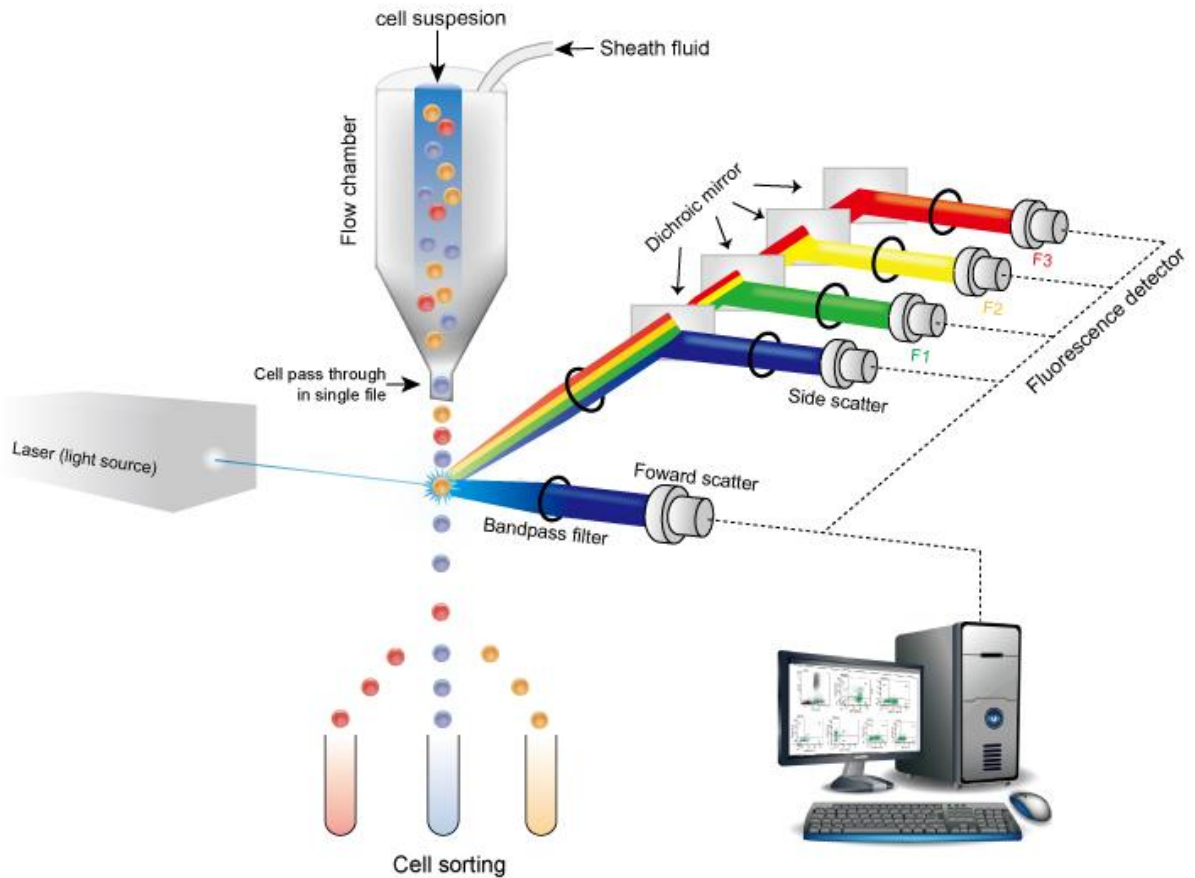


Figure 1 : Le fonctionnement de la cytométrie en flux

Ainsi, cette technique permet d'identifier et de quantifier les cellules en fonction de marqueurs spécifiques appelés CD (Cluster of Differentiation). Par exemple, le marqueur CD45 permet d'identifier les cellules immunitaires, tandis que d'autres marqueurs, comme CD90, CD31 ou EPCAM, sont utilisés pour distinguer les cellules stromales, endothéliales ou épithéliales. Cette approche permet ainsi de comparer la composition cellulaire intestinale et d'évaluer l'impact de l'absence des lymphocytes T $\gamma\delta$ sur les différentes populations analysées (Wikipedia, Classe de différenciation).

Les résultats de la cytométrie en flux sont présentés sous forme de graphiques. Chaque point sur le graphique correspond à une cellule analysée. En plaçant différentes caractéristiques sur les axes du graphique, les cellules se regroupent naturellement en ensembles appelés populations. Ces groupes représentent différents types de cellules ou des cellules ayant des propriétés similaires.

Pour analyser ces populations, on utilise une étape appelée le *gating*. Cela consiste à tracer des zones sur le graphique afin de sélectionner uniquement les cellules qui nous intéressent.

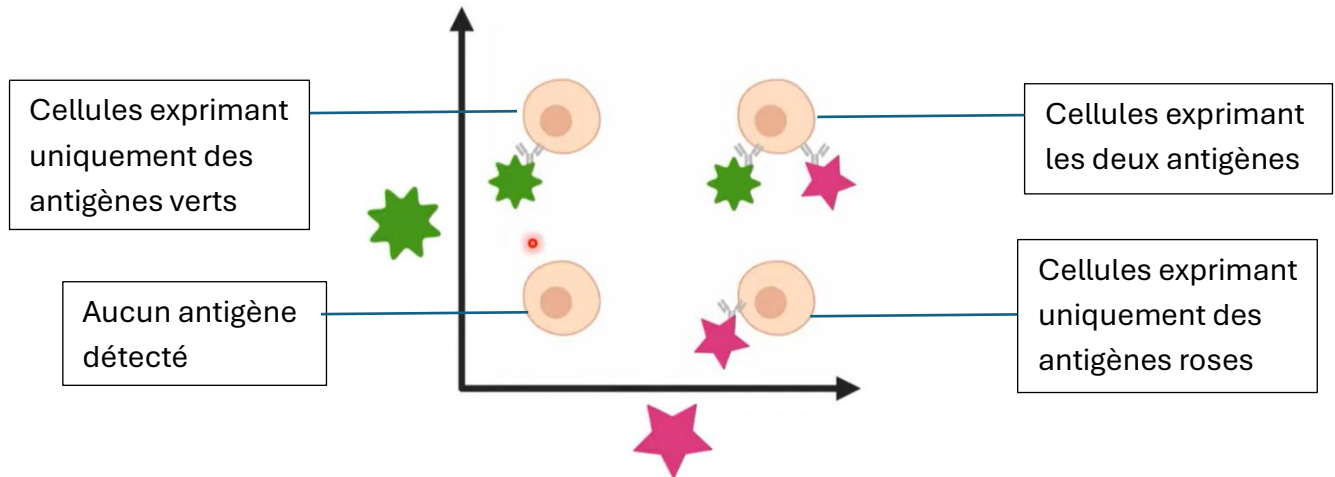


Figure 2 : Schéma simplifié de l'analyse de cytométrie en flux (Emma Sandy, 2019)

Par exemple, on peut d'abord éliminer les débris, puis sélectionner les cellules vivantes, et enfin isoler celles qui expriment un marqueur fluorescent particulier. Cette sélection progressive permet de se concentrer uniquement sur une population précise (Emma Sandy, 2019).

Une fois les cellules sélectionnées, il est possible de mesurer leur nombre ou l'intensité de la fluorescence qu'elles émettent. Cela permet de déterminer si une protéine est présente, absente ou exprimée en plus ou moins grande quantité.

En comparant la proportion de ces populations entre plusieurs échantillons, on peut déterminer comment un traitement, une mutation génétique ou une condition biologique influence la composition et l'activation du système immunitaire.

1.2.3 Culture cellulaire

La culture cellulaire représente un outil fondamental de la biologie moderne. Elle consiste à maintenir des cellules vivantes dans un milieu nutritif artificiel, stérile et contrôlé, contenant notamment du sérum fœtal bovin (FCS). La prolifération des cellules dépend de nombreux paramètres tels que la composition du milieu, la température, le pH, la concentration en dioxyde de carbone et la densité cellulaire (Freshney, R. I., 2016)

1.3 But des expériences

Le but général de ce travail était de se familiariser avec les méthodes expérimentales utilisées en immunologie et de comprendre comment elles permettent d'étudier les interactions entre le microbiote intestinal, les cellules immunitaires et les cellules stromales. Trois expériences ont été réalisées dans ce cadre.

1.3.1 Comparaison de deux enzymes Taq polymérase lors de PCR

La première consistait à réaliser une PCR de génotypage sur des souris de la lignée *Foxp3-CreERT2* × *Ai9*, doublement transgéniques afin d'identifier leur génotype et de comparer l'efficacité de deux enzymes de PCR : la Platinum Taq Polymerase et la GoTaq Green Master Mix. L'objectif était de déterminer laquelle de ces enzymes permettait une amplification plus fiable et une meilleure visualisation des bandes d'ADN.

1.3.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

La deuxième expérience avait pour but d'étudier comment l'absence des lymphocytes T $\gamma\delta$ influence les cellules présentes dans l'intestin, en particulier les cellules stromales et les lymphocytes T $\alpha\beta$ ($CD4^+$ et $CD8^+$). Pour cela, des souris TCR $\gamma\delta$ knock-out (KO), c'est-à-dire des souris chez lesquelles le gène nécessaire à la formation des lymphocytes T $\gamma\delta$ a été inactivé, ont été utilisées. Cette approche permet d'observer, après préparation des tissus et analyse par cytométrie en flux, si le fait de ne pas avoir de T $\gamma\delta$ modifie la composition des populations cellulaires, leur état d'activation et leurs interactions au sein de la lamina propria intestinale.

1.3.3 La culture cellulaire

Enfin, la troisième expérience portait sur la culture cellulaire. Elle avait pour objectif de déterminer comment la densité initiale des cellules influençait leur croissance et leur viabilité. Elle permettait aussi d'observer les effets d'une éventuelle contamination du milieu de culture sur la survie des cellules.

1.4 Hypothèses de recherche

1.4.1 Génotypage par PCR : comparaison des deux enzymes

Pour la PCR de génotypage, l'hypothèse était que la Platinum Taq Polymerase fournirait une amplification plus spécifique et des bandes plus nettes que la GoTaq Green Master Mix, en raison de sa meilleure fidélité enzymatique. Les résultats attendus étaient que les femelles homozygotes transgéniques (tg/tg) présentent une bande unique à 396 paires de bases correspondant à l'allèle transgénique contenant la séquence *CreERT2* insérée dans le locus *Foxp3*, que les femelles hétérozygotes (tg/WT) présentent deux bandes distinctes à 322 pb et 396 pb, traduisant la présence simultanée des allèles sauvage et transgénique, et que les mâles tg/0 présentent une seule bande à 396 pb, le chromosome Y ne portant pas le locus *Foxp3*. Le contrôle wild type (WT/WT) devait montrer une seule bande à 322 pb, correspondant à l'allèle non modifié. Enfin, le contrôle négatif sans ADN ne devait révéler aucune bande.

1.4.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

Pour la préparation intestinale, l'hypothèse était que l'absence de lymphocytes T gamma-delta dans l'intestin induirait une activation accrue des cellules stromales, associée à une production plus importante de cytokines et à une modification du profil des sous-populations T CD4⁺ et CD8⁺.

1.4.3 Culture cellulaire

L'hypothèse de cette expérience était que la densité initiale des cellules influence leur capacité à se multiplier et à rester viables. Une densité plus élevée devait favoriser la croissance cellulaire grâce à une meilleure communication entre les cellules et à l'échange de signaux favorisant la survie. À l'inverse, une faible densité était supposée limiter ces interactions, entraînant une prolifération plus lente et une viabilité réduite.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes

2.1.1 Isolement d'ADN à partir de biopsies pour le génotypage

L'isolement de l'ADN a été effectué à partir de biopsies d'oreille de souris, en utilisant le kit DirectPCR. Pour chaque échantillon, 100 µL de tampon de lyse DirectPCR(tail) ont été ajoutés à 3 µL de Protéinase K. Les fragments de tissu ont été immergés complètement dans le mélange réactionnel.

Les échantillons ont ensuite été incubés toute la nuit à 56 °C sans agitation afin de permettre la digestion enzymatique des tissus. Le lendemain, la Protéinase K a été inactivée en chauffant les échantillons à 95 °C pendant 10 minutes.

Une brève centrifugation a été réalisée pour faire descendre les débris au fond du tube. Les extraits d'ADN obtenus ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour les analyses de génotypage.

Deux protocoles de réaction PCR ont été employés successivement, selon le type de polymérase utilisé. Dans le premier protocole, la réaction a été réalisée à l'aide de la Platinum Taq Polymerase (ThermoFisher). Le master mix a été préparé pour 20 réactions (17 échantillons et une marge technique), afin d'assurer une homogénéité entre les tubes. Les réactifs ont été ajoutés successivement dans un tube stérile maintenu sur glace, en respectant les volumes suivants : 319 µL d'eau stérile, 60 µL de tampon PCR 10×, 22 µL de chlorure de magnésium (MgCl₂, 50 mM), 11 µL de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs, 10 mM), 80 µL de chaque amorce ZA16 (Foxp3 WT forward), ZA17 (Foxp3 WT reverse), ZA18 (CreERT2 forward) et ZA19 (CreERT2 reverse) (10 µM), puis enfin 8 µL de Platinum Taq Polymerase. L'enzyme, sensible aux variations de température, a été sortie du congélateur juste avant utilisation et ajoutée en dernier. Le mélange a ensuite

été homogénéisé par vortex, puis 29 μL de ce master mix ont été distribués dans chaque tube PCR, auxquels 1 μL d'ADN extrait a été ajouté individuellement, pour un volume final de 30 μL par tube.

Dans le second protocole, une méthode simplifiée a été utilisée grâce au GoTaq Green Master Mix 2 \times (Promega), qui contient déjà le tampon, le chlorure de magnésium (MgCl_2), les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) et la Taq Polymérase. Le master mix a également été préparé pour 20 réactions, avec les volumes suivants : 200 μL de GoTaq Green Master Mix, 40 μL de chacune des quatre amorces (ZA16, ZA17, ZA18, ZA19), et 20 μL d'eau distillée stérile. Après homogénéisation, 19 μL de ce mélange ont été distribués dans chaque tube PCR, puis 1 μL d'ADN a été ajouté pour atteindre un volume final de 20 μL par tube.

Afin de vérifier le génotype des souris utilisées, un protocole de PCR a été mis en place en intégrant des contrôles positifs et un contrôle négatif. Le contrôle négatif consistait en une réaction sans ADN matrice, remplacé par de l'eau stérile, afin de vérifier l'absence de contamination des réactifs.

Plusieurs contrôles positifs ont été inclus afin de valider le bon fonctionnement de la PCR et d'assurer une interprétation fiable des résultats. Ceux-ci comprenaient des ADN de génotype connu : des souris wild type (WT/WT), servant de contrôle positif pour l'allèle sauvage, ainsi que des souris transgéniques homozygotes et hétérozygotes, utilisées comme contrôles positifs pour l'allèle transgénique. La présence de ces différents contrôles permettait de comparer les profils de migration obtenus avec ceux des échantillons expérimentaux et de déterminer leur génotype.

Au total, dix-sept réactions de PCR ont été préparées pour chaque enzyme testée. Parmi celles-ci, huit réactions correspondaient à des ADN de souris dont le génotype n'était pas encore connu. Les neuf réactions restantes étaient dédiées aux contrôles : quatre contrôles positifs transgéniques homozygotes (tg/tg chez les femelles ou tg/0 chez les mâles), trois contrôles positifs transgéniques hétérozygotes (tg/WT), un contrôle positif wild type (WT/WT) et un contrôle négatif sans ADN (1 μL d'eau stérile à la place de l'ADN). L'ensemble des tubes de PCR a été soigneusement étiqueté afin d'éviter toute confusion entre les échantillons expérimentaux et les contrôles.

Les réactions de PCR ont été conduites dans un thermocycleur selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 3 minutes à 94 °C, suivie de 35 cycles composés chacun d'une dénaturation de 30 secondes à 94 °C, d'une hybridation de 30 secondes à 58 °C et d'une élongation de 30 secondes à 72 °C. L'étape finale consistait en une élongation de 5 minutes à 72 °C. Les échantillons étaient ensuite conservés à 12 °C jusqu'à leur récupération.

2.1.2 Migration des produits PCR sur gel d'agarose

Après amplification des fragments d'ADN par PCR, les produits ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de visualiser la présence ou l'absence des allèles d'intérêt.

2.1.2.1 Préparation du gel d'agarose

Une dilution préalable du tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) 50× a été réalisée en mélangeant 20 mL de solution mère 50× avec 980 mL d'eau distillée, afin d'obtenir 1 L de tampon TAE 1×. Ce tampon est utilisé pour maintenir un pH stable et assurer la conductivité électrique nécessaire lors de la migration électrophorétique de l'ADN. Un gel d'agarose à 2 % a ensuite été préparé en dissolvant 6 g d'agarose dans 300 mL de tampon TAE 1×. Le mélange a été chauffé au micro-ondes jusqu'à dissolution complète de l'agarose, produisant une solution homogène et translucide.

Le choix d'une concentration de 2 % d'agarose permet un maillage plus serré, adapté à la séparation de fragments d'ADN de petite taille (ex : 322 pb et 396 pb). En effet, plus la concentration en agarose est élevée, plus les pores du gel sont petits, ce qui ralentit davantage les fragments d'ADN les plus gros et permet une meilleure résolution entre des bandes proches.

Un intercalant d'ADN (GelRed) a été ajouté au gel fondu à raison de 10 μ L pour 300 mL, permettant la visualisation ultérieure des fragments sous lumière UV.

Le gel a ensuite été coulé dans une plaque de coulée (plateau plastique) équipée d'un peigne, puis laissé à température ambiante jusqu'à solidification.

2.1.2.2 Électrophorèse

Une fois le gel solidifié, il a été placé dans la cuve d'électrophorèse (Figure 3), entièrement recouvert de tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) 1×. Le tampon agit à la fois comme conducteur pour le courant électrique et comme support ionique pour la migration de l'ADN.

Trois puits ont été chargés avec l'échelle 1 kb (Promega 1kb DNA Ladder Molecular Weight Marker) à droite du gel, afin de situer la taille des fragments. Cette échelle permet de déterminer la taille approximative des fragments d'ADN amplifiés dans les échantillons. Ensuite, 20 μ L de chaque produit PCR ont été déposés dans les puits restants. La migration a été effectuée à 150 volts pendant 45 minutes. La formation de bulles dans le tampon a permis de vérifier que le courant circulait correctement.

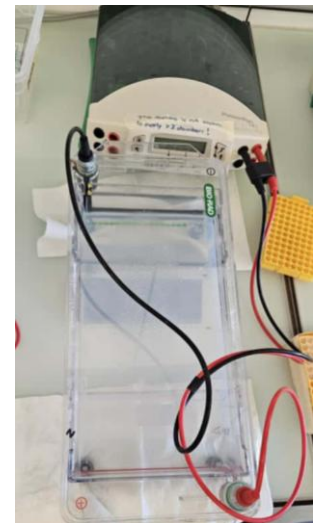


Figure 3 : La cuve d'électrophorèse

Après la migration, le gel a été observé sous lumière UV. Grâce à l'intercalation du GelRed entre les bases de l'ADN, les bandes fluorescentes correspondant aux produits PCR ont pu être visualisées et comparées à l'échelle.

2.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

Des intestins grêles et des côlons de souris ont été prélevés immédiatement après euthanasie. Les tissus ont été ouverts longitudinalement et soigneusement lavés avec du PBS stérile afin d'éliminer le contenu luminal et les débris. Les intestins ont ensuite été découpés en fragments d'environ 0,5 à 1 cm à l'aide de ciseaux fins. Avant la digestion de la lamina propria, une première étape de dissociation de l'épithélium a été réalisée afin d'éliminer les cellules épithéliales et de mieux isoler les cellules immunitaires et stromales. Pour cela, les fragments d'intestin ont été incubés dans une solution d'EDTA (5 mM dans PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) à 37 °C sous agitation pendant 15 minutes. Après incubation, les tubes ont été vigoureusement vortexés pour détacher les cellules épithéliales, puis le surnageant a été éliminé et les fragments ont été lavés avec du PBS avant de passer à la digestion enzymatique.

Les fragments restants ont ensuite été transférés dans des tubes coniques de 50 mL contenant une solution de digestion enzymatique composée de collagénase VIII (0,5 mg/mL) et de DNase I (10 U/mL). La DNase I, préparée en resuspendant la poudre enzymatique dans 1 000 μL de PBS stérile, permet de dégrader l'ADN libéré par les cellules mortes et d'éviter la formation d'agrégats cellulaires. Les échantillons ont été incubés à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que le tissu soit complètement dissocié. Après digestion, les suspensions ont été filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 μm , puis resuspendues dans 40 mL d'IMDM complétés de 10 mL de FCS, un milieu nutritif riche en protéines et ions (dont le magnésium) favorisant la viabilité cellulaire.

Les cellules isolées ont ensuite été préparées pour une analyse par cytométrie en flux. Elles ont d'abord été lavées avec du PBS pour éliminer le sérum, puis incubées avec un colorant de viabilité fixable (0,6 μL) dilué dans du PBS pendant 10 à 15 minutes à 4 °C dans l'obscurité. Après cette étape, les cellules ont été lavées avec un tampon FACS (PBS + 2 % FCS + 2 mM EDTA) pour retirer l'excès de colorant. Elles ont ensuite été incubées avec un mélange d'anticorps spécifiques dirigés contre les marqueurs de surface CD45 (6 μL), CD90 (3 μL), CD35 (6 μL), CD31 (6 μL), EpCAM (2 μL) et Pdpn (6 μL), ainsi qu'avec un anticorps bloquant des récepteurs Fc (3 μL) pour limiter les fixations non spécifiques.

Pour chaque échantillon, 50 μL du mélange ont été prélevés et soigneusement homogénéisés à l'aide d'une micropipette. Les tubes ont ensuite été placés au réfrigérateur pendant 45 minutes afin de permettre la fixation spécifique des anticorps sur

leurs cibles. Après incubation, les cellules ont été centrifugées à 2 000 tours par minute pendant 2 minutes pour éliminer le surnageant. Elles ont ensuite été resuspendues dans 30 μ L de solution Fix/Perm (fixation et perméabilisation) et incubées à 4 °C pendant 15 minutes dans l'obscurité. Cette étape permet de stabiliser les structures cellulaires et de préserver les marquages pour l'analyse ultérieure. Les cellules fixées ont ensuite été lavées une dernière fois avec le tampon FACS et conservées à 4 °C jusqu'à leur passage en cytomètre en flux.

2.3 Culture cellulaire

Une culture cellulaire a été réalisée à partir de cellules issues de la rate de souris.

Les organes spléniques ont été traités individuellement dans neuf tubes numérotés de 1 à 9 (Figure 4). Sur chacun de ces tubes, un filtre de 40 μ m a été placé. À l'aide du nylon du filtre, les tissus de rate ont été écrasés manuellement, permettant la libération des cellules dans le tube Falcon.

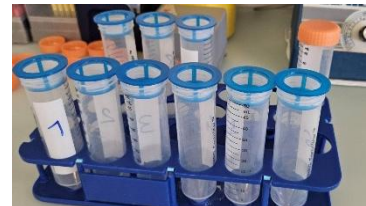


Figure 4 : Les 9 tubes avec le filtre

Une fois la dissociation mécanique terminée, 5 mL de milieu IMDM complété à 5 % de sérum FCS ont été ajoutés dans chaque tube, pour laver le filtre. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1200 tours par minute (tr/min) pendant 5 minutes.

Après centrifugation, un précipité cellulaire s'est formé au fond de chaque tube. Le surnageant a été soigneusement éliminé en renversant doucement les tubes au-dessus de l'évier, en évitant de perturber le culot cellulaire.



Les cellules ont ensuite été incubées avec 1ml de tampon de lyse des globules rouges pour chaque tube pour éliminer spécifiquement les érythrocytes et enrichir la suspension en cellules nucléées. Cette étape est essentielle pour obtenir une population cellulaire propre.

Après la lyse, les cellules ont été lavées par ajout de 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), ce qui arrête la réaction. Les tubes ont à nouveau été centrifugés, puis le surnageant a été éliminé en renversant les tubes au-dessus de l'évier.

Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans 2 mL de milieu IMDM supplémenté à 5 % de FCS. Pour la mise en culture, 200 μ L de la suspension cellulaire de chaque tube ont été prélevés et répartis dans les six puits d'une plaque de culture à

puits ronds. Deux puits ont reçu 1 mL de milieu, deux puits ont reçu 500 μ L de milieu et deux puits ont reçu 200 μ L de milieu. La plaque a ensuite été placée en incubation pendant deux jours dans des conditions de culture standard, à 37 °C et sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

3. RÉSULTATS :

3.1. Génotypage par PCR : comparaison de deux enzymes

Sur l'image du gel (Figure 5), la rangée supérieure correspond aux produits amplifiés à l'aide du GoTaq Master Mix vert, tandis que la rangée inférieure présente ceux obtenus avec la Platinum Taq Polymerase. Les bandes de référence du marqueur de taille (échelle) sont situées à droite du gel.

L'analyse montre que l'enzyme GoTaq n'a pas permis d'obtenir des résultats nets : les bandes apparaissent diffuses, peu marquées et parfois multiples, rendant difficile l'interprétation des génotypes. En revanche, les échantillons amplifiés avec la Platinum Taq Polymerase présentent des bandes nettes, bien séparées et d'intensité homogène, correspondant précisément aux tailles attendues. Ainsi, les échantillons homozygotes transgéniques (tg/tg) présentent une seule bande à 396 pb, tandis que les échantillons hétérozygotes (tg/WT) montrent deux bandes distinctes à 322 pb et 396 pb. Le contrôle wild type (WT) présente uniquement la bande à 322 pb, et le contrôle négatif (H₂O) ne révèle aucune bande, confirmant l'absence de contamination.

L'interprétation des échantillons de génotype initialement inconnu a été réalisée sur la base de ces références. Les échantillons 1 et 5 présentent une seule bande à 396 pb, indiquant un génotype transgénique chez des souris mâles (tg/0), correspondant au génotype recherché. Les échantillons 2, 3 et 4 montrent une seule bande à 322 pb, caractéristique de souris wild type mâles (WT/0). Enfin, les échantillons 6, 7 et 8 présentent deux bandes, l'une à 322 pb et l'autre à 396 pb, révélant un génotype hétérozygote (tg/WT) chez des souris femelles, possédant deux chromosomes X.

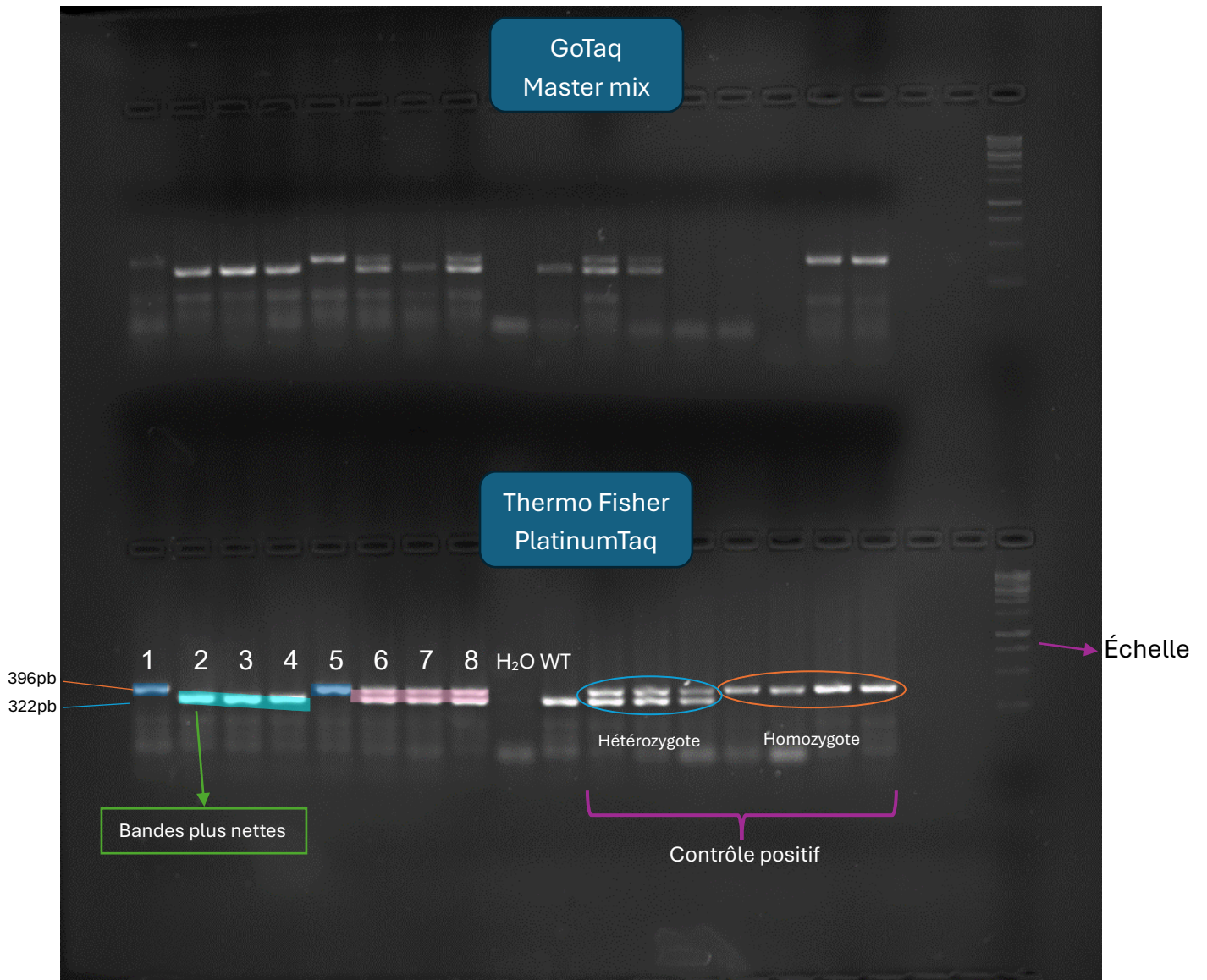


Figure 5 : Résultats de PCR sur le gel d'agarose

3.2. Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

Les graphiques obtenus illustrent la stratégie de gating utilisée pour l'analyse des populations cellulaires intestinales (Figure 6). Les trois graphes supérieurs représentent, de gauche à droite, les étapes successives de sélection des cellules. Dans le premier graphe, les cellules CD45⁺ (marqueur des cellules immunitaires) sont affichées sur l'axe des ordonnées et les cellules EpCAM⁺ (cellules épithéliales) sur l'axe des abscisses. Les cellules doublement négatives (CD45⁻ EpCAM⁻) ont été sélectionnées afin d'isoler les cellules non immunitaires et non épithéliales.

Par la suite, les cellules CD31⁻ ont été retenues afin d'exclure les cellules endothéliales, puis le marquage de l' α SMA (alpha-smooth muscle actin) a été analysé pour évaluer l'état d'activation des cellules stromales. Aucune différence significative n'a été observée entre les souris WT (courbe bleue) et KO (courbe rouge) quant au pourcentage de cellules α SMA⁺. Enfin, le troisième graphe, situé en haut à droite, montre l'expression du marqueur PDGFR α , révélant plusieurs niveaux d'intensité d'expression au sein de la population stromale.

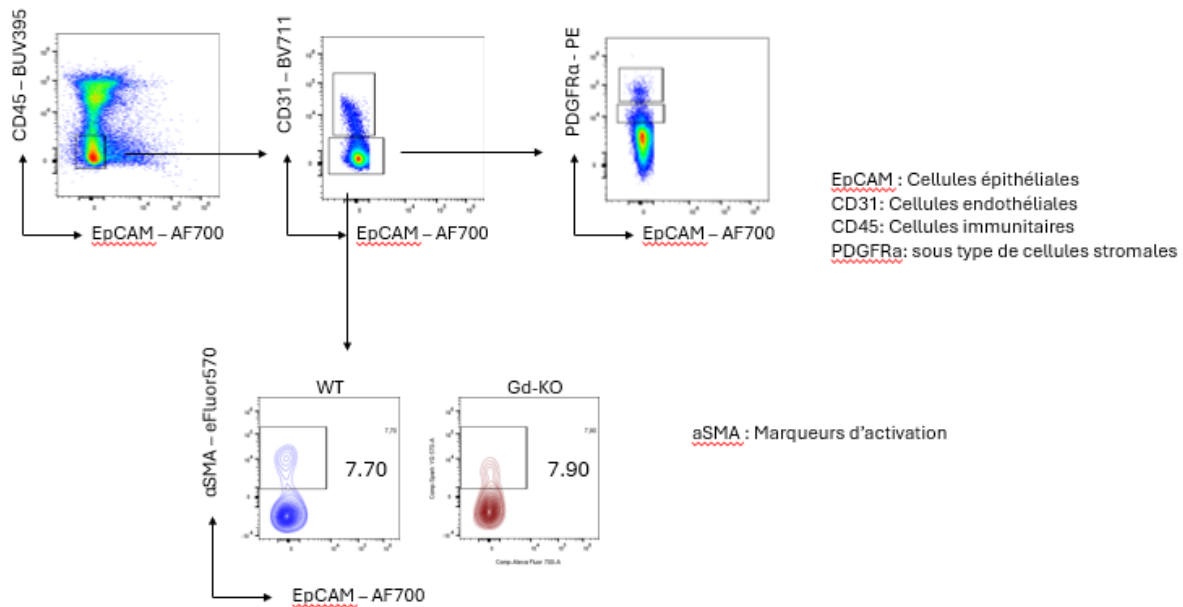


Figure 6 : Les résultats de la cytométrie en flux en forme de graphe

Ces résultats suggèrent que l'absence de lymphocytes $\gamma\delta$ n'entraîne pas de modification majeure de l'activation des cellules stromales intestinales dans les conditions expérimentales testées. Les niveaux comparables d' α SMA indiquent que les cellules stromales conservent un profil fonctionnel similaire, indépendamment de la présence des cellules $\gamma\delta$.

3.3 Culture cellulaire

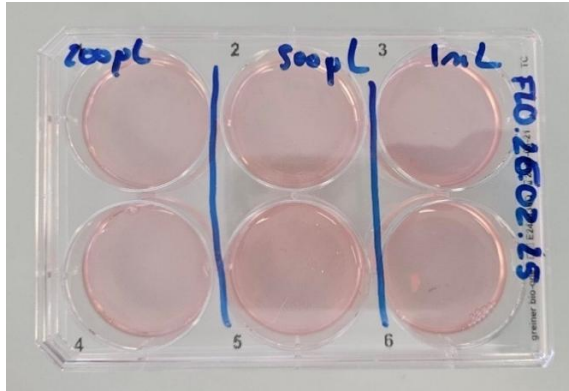


Figure 7 : Les 6 puits de culture cellulaire avant l'incubation

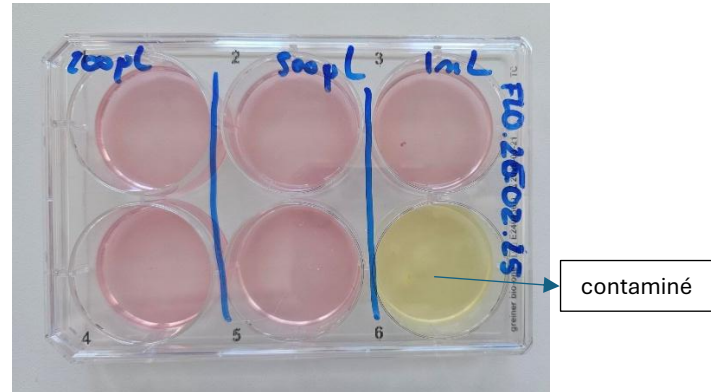


Figure 8 : Les 6 puits après 48h d'incubation

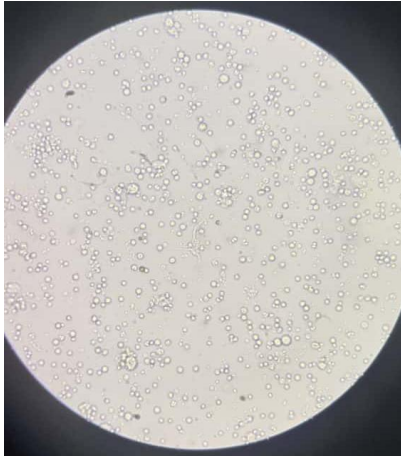


Figure 9 : Le puits numéro 1 (400x)

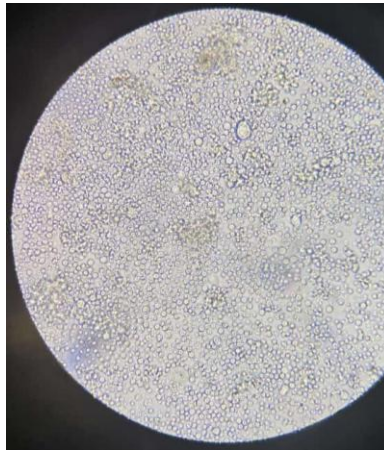


Figure 10 : Puits numéro 2 (400x)

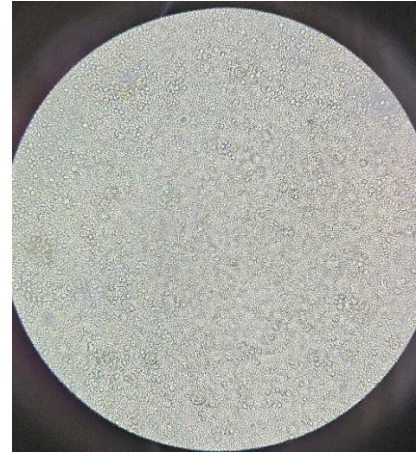


Figure 11 : Puits numéro 3 (200x)

Dans les puits ayant reçu 1 mL de suspension cellulaire, la croissance cellulaire était la plus importante (Figure 11). Le fond du puits apparaissait largement recouvert d'un tapis homogène de cellules adhérentes présentant une morphologie allongée. La coloration au milieu restait rose clair, signe d'un pH stable et d'une activité métabolique soutenue. Dans les puits contenant 500 μ L de suspension cellulaire (Figure 10), la densité observée était intermédiaire. Les cellules adhérentes de morphologie fibroblastique étaient regroupées en amas localisés, laissant encore des zones dégagées, et la couleur du milieu demeurait uniformément rose, indiquant une bonne viabilité cellulaire. En revanche, les puits ayant reçu 200 μ L de suspension cellulaire (Figure 9) présentaient une croissance nettement plus faible. Les cellules étaient peu nombreuses, souvent isolées, et la surface du fond restait



Figure 12 : puit numéro 6 (400x)

et la surface du fond restait

majoritairement vide. Le milieu conservait une teinte rose homogène, traduisant une activité métabolique limitée.

L'observation microscopique a également révélé la présence de deux types cellulaires distincts : des cellules rondes non adhérentes, flottant librement dans le milieu, et des cellules adhérentes de morphologie fibroblastique, allongées et bien fixées au fond du puits (Figure 10). Ces dernières formaient par endroits des grappes denses, dont le mouvement simultané lors de la manipulation de la plaque confirmait leur cohésion et leur ancrage. La présence de grappes plus nombreuses dans les conditions à forte densité cellulaire suggérait une activité de prolifération plus importante.

Le puits 6 se distinguait des autres par une coloration jaune prononcée du milieu et un aspect trouble visible à l'œil nu (Figure 8). L'observation au microscope a mis en évidence un voile diffus rappelant un brouillard (Figure 12), la présence de cellules mortes en suspension et de petites structures mobiles compatibles avec une contamination bactérienne (Figure 13). Une possible présence de champignons a également été relevée.

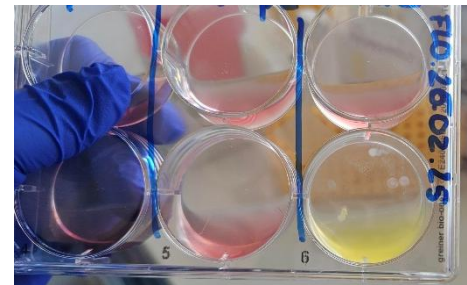


Figure 13 : Observation d'une formation bactérienne au fond du puits

Ces éléments confirmaient la contamination du milieu de culture. Dans ce puits, aucune cellule vivante adhérente n'était observable et la structure du tapis cellulaire était complètement détruite.

4. DISCUSSION

4.1 Géotypage par PCR : comparaison des deux enzymes

Lors de cette expérience, deux enzymes de PCR ont été comparées afin d'évaluer leur efficacité pour le géotypage de souris : la Platinum Taq Polymerase et la GoTaq Green Master Mix. L'hypothèse de départ était que la Platinum Taq permettrait une amplification plus spécifique et des bandes plus nettes, en raison de sa meilleure fidélité enzymatique. Les résultats obtenus confirment cette hypothèse, puisque la Platinum Taq a généré des bandes nettes, bien définies et facilement interprétables sur le gel d'agarose, tandis que la GoTaq a produit des bandes plus diffuses et parfois moins distinctes.

Ces observations sont en accord avec d'autres études qui ont comparé la performance des différentes polymérases. Miura et al. (2013) ont montré que certaines enzymes de PCR, comme la Platinum Taq, offrent une amplification plus spécifique et plus stable que les mélanges standards (Miura, M., et al., 2013) Cette spécificité accrue est particulièrement importante dans des expériences de géotypage, où l'identification précise des allèles est essentielle.

La Platinum Taq Polymerase est une enzyme *hot-start*, activée uniquement après une étape de chauffage initiale, ce qui limite l'amplification non spécifique et la formation de dimères d'amorces au début de la réaction. À l'inverse, la GoTaq Green Master Mix est une polymérase classique, active dès la préparation du mélange réactionnel, ce qui peut expliquer la présence de bandes moins nettes (Wikipedia, *Hot start PCR*).

Les bandes observées à 322 pb et 396 pb correspondent précisément aux tailles attendues pour les allèles sauvage et transgénique, ce qui confirme la validité du protocole de génotypage et la fiabilité des résultats obtenus avec la Platinum Taq Polymerase.

Néanmoins, il est important de souligner que la GoTaq Green Master Mix pourrait donner de meilleurs résultats après optimisation de certains paramètres expérimentaux, tels que la température d'hybridation des amorces ou la concentration en chlorure de magnésium ($MgCl_2$). Cette expérience met donc en évidence l'importance du choix de l'enzyme de PCR en fonction de l'objectif expérimental et des exigences de précision du protocole.

4.2 Analyse des cellules intestinales par cytométrie en flux

Plusieurs marqueurs ont été utilisés : CD45 (cellules du système immunitaire), CD31 (cellules endothéliales) et Pdpn/gp38 (cellules stromales). Les cellules stromales ont été identifiées par le profil $CD45^- CD31^- Pdpn^+$ (Powell et al., 2015) Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le soutien structurel du tissu intestinal, mais aussi dans la régulation du système immunitaire local. Elles participent à la réparation tissulaire, à la tolérance immunitaire et à la production de cytokines, des molécules de communication cellulaire (Cellules stromales. Institut Pasteur, 2022).

Les résultats montrent que la méthode utilisée permet d'isoler les cellules stromales intestinales. La qualité et la viabilité des cellules obtenues démontrent que la digestion enzymatique et la filtration ont bien fonctionné. Cependant, comme il s'agissait d'une expérience exploratoire, les différences entre souris WT et KO n'ont pas pu être mesurées précisément.

L'hypothèse de départ était que l'absence des lymphocytes T $\gamma\delta$ pourrait rendre les cellules stromales intestinales plus actives et induire un profil pseudo-inflammatoire, caractérisé par une augmentation de la production de cytokines et une modification des sous-populations de lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$). Cependant, l'analyse par cytométrie en flux n'a pas mis en évidence de différences significatives entre les souris WT et les souris dépourvues de lymphocytes T $\gamma\delta$, ni en termes de proportion des cellules stromales, ni dans la répartition des sous-populations T $CD4^+$ et $CD8^+$. Ainsi, dans les conditions expérimentales de cette étude, l'hypothèse initiale n'est pas confirmée par les résultats obtenus (Nanno, M., & Shiohara, T., 2023)

Une limite importante de cette expérience est que seules les cellules de la lamina propria ont été analysées, alors que les lymphocytes T $\gamma\delta$ se trouvent principalement dans l'épithélium intestinal. Il est donc probable qu'une partie importante de leur rôle ait échappé à cette analyse. Malgré cela, cette expérience démontre qu'il est possible d'isoler efficacement les cellules stromales et de les marquer pour des analyses ultérieures plus précises. Elle constitue une étape préparatoire importante pour de futures études sur la sécrétion de cytokines et la comparaison fonctionnelle entre souris normales et KO.

4.3 Culture cellulaire

Un des puits s'est distingué par un changement de couleur du milieu de rose à jaune et un aspect trouble, signe d'une contamination bactérienne. Cette couleur jaune provient d'une acidification du milieu, causée par la prolifération microbienne et l'accumulation de déchets métaboliques (Eppendorf, 2019). Au microscope, un brouillard, des cellules mortes et de petites structures mobiles évoquant une contamination bactérienne ont été observés, confirmant la contamination du milieu.

Ces résultats suggèrent que la densité initiale influence directement la prolifération cellulaire. Les conditions à forte inoculation semblent favoriser une expansion cellulaire plus rapide et homogène, tandis que les conditions à faible densité se traduisent par une croissance lente et éparse.

L'observation d'une contamination dans un des puits rappelle aussi l'importance des conditions de stérilité, notamment le port de gants, la stérilisation des surfaces avec de l'éthanol et l'utilisation d'une hotte à flux laminaire.

5. CONCLUSION

L'ensemble de ces expériences a permis de tirer plusieurs conclusions importantes. Tout d'abord, la Platinum Taq Polymerase s'est révélée plus performante que la GoTaq Green Master Mix pour le génotypage, en produisant des résultats plus nets et plus fiables. Ensuite, la préparation intestinale a permis d'isoler correctement les cellules stromales de la lamina propria, confirmant la validité du protocole utilisé. Enfin, l'expérience de culture cellulaire a démontré que la densité initiale influence directement la croissance, la morphologie et la viabilité des cellules, tandis qu'un manque de stérilité entraîne une contamination du milieu de culture.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de tester une optimisation du protocole PCR pour la GoTaq, d'étendre l'analyse FACS avec des marqueurs intracellulaires, et de poursuivre les cultures cellulaires sur plusieurs jours afin d'étudier la croissance à long terme.

6. BIBLIOGRAPHIE :

Sites internet :

Wikipedia, *Stromal cell*

https://en.wikipedia.org/wiki/Stromal_cell (consulté le 19.11.2025)

Perez Gonzalez, A., & Jameson, V. (s.d.). *Introduction to flow cytometry*. Melbourne Cytometry Platform.

https://biomedicalsciences.unimelb.edu.au/_data/assets/pdf_file/0012/3549837/MCP-introduction-to-flow-cytometry-final.pdf (consulté le 5.09.2025)

How a Flow Cytometer Works. Thermo Fisher Scientific.

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html> (consulté le 14.10.2025)

Wikipedia, *Classe de différenciation*

https://fr.wikipedia.org/wiki/Classe_de_diff%C3%A9renciation (consulté le 17.09.2025)

Wikipedia, *Hot start PCR*

https://en.wikipedia.org/wiki/Hot_start_PCR (consulté le 29.12.2025)

Cellules stromales. Institut Pasteur.

<https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/cellules-stromales-maestros-formation-intestin> (consulté le 22.12.2025)

Eppendorf, *How to recognize bacterial contamination in your cell culture*, 2019

<https://www.eppendorf.com/de-de/lab-academy/life-science/cell-biology/bacterial-contamination/>

Wikipedia, *Cell culture*

https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture (consulté le 27.12.2025)

Université de Mila. (s.d.). *Immunologie appliquée : chapitre IV* [PDF].

https://elearning.univ-mila.dz/a-2023/pluginfile.php/88154/mod_resource/content/0/ChapitreIV.pdf (consulté le 4.11.2025)

Alpha-Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibody

<https://www.thermofisher.com/antibody/product/Alpha-Smooth-Muscle-Actin-Antibody-clone-1A4-Monoclonal/50-9760-82> (consulté le 30.12.2025)

Études scientifiques

Al Nabhani, Z., et al. (2019). *A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in Adulthood*. *Immunity*.

Feil, S., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., & Chambon, P. (1996). *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. *PNAS*, 93(20), 10887–10890.

Rampoldi, F., & Prinz, I. (2022). *Three layers of intestinal $\gamma\delta$ T cells talk different languages*. *Frontiers in Immunology*, 13, 859032.

Kang, I., et al. (2023). *Double-edged sword: $\gamma\delta$ T cells in mucosal homeostasis*. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(4), 1070–1082.

Miura, M., et al. (2013). *Comparison of DNA polymerases for polymerase chain reaction in genetic analysis*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 15(1), 62–69.

Powell et al. (2015). *Inflammation, Innate Immunity, and the Intestinal Stromal Cell Niche: Opportunities and Challenges*. *PMC*.

Nanno, M., & Shiohara, T. (2023). *The intestinal $\gamma\delta$ T cells: functions in the gut and in distant organs*. *International Immunology / PMC*.

Livre et cours de biologie

LCP. (2021). *Bactériologie : Cours de bactériologie, Option spécifique, 2ème année* (vers. 2.0). Lycée Cantonal de Porrentruy. Section 3.2 « Génétique bactérienne », p. 6.

LCP. *Biologie moléculaire : Introduction aux techniques de biologie moléculaire* (OS3, vers. 2). Lycée Cantonal de Porrentruy. Section 3.4.2 « Amplification par PCR », p. 13–15.

LCP. *Génétique* (OS3, vers. 2.0). Lycée Cantonal de Porrentruy. Section 4.3 « L'hérédité liée au sexe », p. 33–34.

Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (1986). *Immunologie fondamentale et appliquée*. MEDSI, Paris.

Freshney, R. I. (2016). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell, Hoboken.

Vidéo

Emma Sandy, Flow Cytometry & FACS, 2019

<https://www.youtube.com/watch?v=haTSQ7-ZPPk>

Images

Image de page de titre

<https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/microbiotes-moins-connu-microbiote-mycobiotite-intestinal-86267/>

Schéma de flow cytométrie

<https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>

Thermo Fisher, Ladder

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.fishersci.ca%2Fshop%2Fproducts%2Fpromega-benchttop-dna-markers-5%2Fprg7541>

Health Tree Foundation, Lymphocytes (annexes)

<https://healthtree.org/lymphoma/community/articles/questions-about-lymphoma>

(consulté le 10.10.2025)

7. REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Ziad Al Nabhani pour m'avoir acceptée et accueillie à l'Université de Berne, au sein de la section d'immunologie, durant une semaine. Je le remercie également pour le soutien constant qu'il m'a apporté tout au long de mon Travail de maturité, ainsi que pour ses explications claires de notions complexes, toujours adaptées à mon niveau.

Je souhaite ensuite remercier chaleureusement Floriane Cherrier, qui m'a fait découvrir son quotidien au laboratoire et qui a pris le temps de m'expliquer avec patience l'ensemble des aspects théoriques liés à mon projet. Sa disponibilité et son accompagnement ont été essentiels à la réalisation de la partie pratique de ce Travail de maturité, qui en constitue un élément central.

Enfin, je remercie sincèrement Madame Coralie Herrmann, professeure responsable de mon Travail de maturité, pour son encadrement attentif et rigoureux. Elle a consacré beaucoup de temps à la correction de plusieurs versions de mon travail, apportant des remarques précises et constructives qui ont joué un rôle déterminant dans la qualité finale de la partie écrite. Son soutien moral dans les moments plus difficiles, ainsi que la confiance qu'elle m'a toujours accordée, ont été d'une grande importance tout au long de ce projet.

8. DÉCLARATION D'AUTHENTICITÉ


Déclaration

Je déclare par la présente que j'ai réalisé ce travail de manière autonome et que je n'ai utilisé aucun autre moyen que ceux indiqués dans le texte.

Je déclare également que j'ai respecté le contenu du chapitre 9 du guide du travail de maturité : « plagiat et IA : bonnes pratiques ». Tous les passages inspirés ou cités d'autres auteurs sont dûment mentionnés comme tels. Les recours à l'IA pour l'aide à l'élaboration de mon travail de maturité sont également mentionnés.

Je suis conscient que de fausses déclarations peuvent conduire le Lycée cantonal à déclarer le travail non recevable et m'exclure de la session d'examens à laquelle je suis inscrit.

Ce travail de maturité reflète mes opinions, il n'engage que moi-même, et non le professeur ni l'expert qui m'ont accompagné dans ce travail.

Lieu et date : Bassecourt Signature : 
30.12.2025

Autorisation

Le Lycée cantonal requiert votre autorisation afin qu'un exemplaire de votre Travail de maturité soit mis à la disposition des étudiants du Lycée cantonal, par le biais de la médiathèque de l'école.

- Oui, j'accepte que mon Travail de maturité soit enregistré dans les collections de la médiathèque du lycée cantonal et mis à disposition des étudiants du lycée cantonal.
- Oui j'accepte que mon travail de maturité soit prêté à des lecteurs externes au lycée.
- Non je n'accepte pas que mon Travail de maturité soit enregistré dans les collections de la médiathèque du lycée cantonal et mis à disposition des étudiants du lycée cantonal.
- Non je n'accepte que mon travail de maturité soit prêté à des lecteurs externes au lycée.

Lieu et date : Bassecourt Signature : 
30.12.2025

9. ANNEXES

Annexe 1 : GoTaq® G2 Master Mixes, PROMEGA protocol

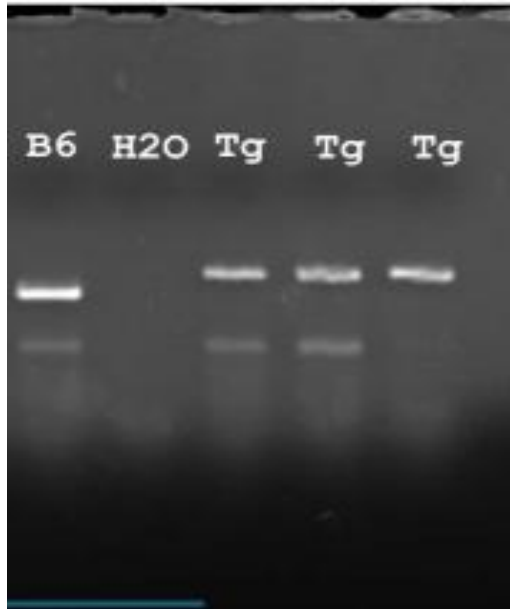
Master Mix	20µl reaction (µL)	final concentration
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X	10	1X
Primer #1 (10uM) _ ZA16	2	Same PCR
Primer #2 (10uM) _ ZA17	2	
Primer #3 (10uM) _ ZA18	2	
Primer #4 (10uM) _ ZA19	2	
Nuclease free water	1	-
Template gen. DNA	1	<250ng/rxn

PCR-Programm	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Hold
Temperature	94°C	94°C	58	72°C	72°C	12°C
Time	3 min.	30 sec	30 sec	30	5 min.	∞
Cycles	1	35			1	-

1,5% gel agarose

Analyse		
Transgene _ M	396pb	-
WT	-	322pb

Primer ID	JAX Primer	Primer Type	Sequence 5' → 3'
GtP_1 _ ZA16_350_WT-for	14125	WT_fw	CCT AGC CCC TAG TTC CAA CC
GtP_2 _ ZA17_350_WT-rev	14126	WT_rev	AAG GTT CCA GTG CTG TTG CT
GtP_3_ ZA18_350_Mutant_cre-for	14127	Cre_fw	TTA CGG CGC TAA GGA TGA CT
GtP_4_ ZA19_350_Mutant_Ert2-rev	15302	ERT2_rev	TCA CTG AAG GGT CTG GTA GGA



Annexe 2 : Platinum Taq Polymerase Protocol

	30µl reaction (µL)	final concentration
Master Mix		
H2O Nuclease free	15,95	
10x Buffer	3	
MgCl ₂ (50mM)	1,1	
dNTP (10mM)	0,55	
Primer #1 (10uM) _ ZA16	2	
Primer #2 (10uM) _ ZA17	2	
Primer #3 (10uM) _ ZA18	2	
Primer #4 (10uM) _ ZA19	2	SAME PCR
Taq-Polymerase	0,4	
Total MM	29	
Template gen. DNA	1	<250ng/rxn

Annexe 3 : General FACS staining protocol

FACS buffer: DPBS + 2% FCS + 2mM EDTA

- In V-bottom 96-well plates
- Use max 2 Mio cells for staining
- All centrifugation steps at 2000 rpm, 2 min, 4°C

1. Viability staining

- Wash cells with 200ul DPBS (to remove medium and FCS completely)
- Resuspend cells in 100ul viability dye diluted in DPBS (*eF506: 1:300; eF450: 1:1000*)
- Incubate for 10-15 min on ice in the dark
- Add 100ul of FACS Buffer and spin down
- Wash with 200ul FACS Buffer

2. Surface staining

- Resuspend cells in 25-50ul antibody cocktail diluted in FACS Buffer (mix well!!!)
- incubate for 20-30 min on ice in the dark (*incubation time/conditions might vary depending on the antibodies used!**)
- Add 150ul of FACS Buffer and spin down

* *NKp46 staining: incubate 15min on RT, followed by 30min on ice*

If biotinylated antibody is used:

- Resuspend cells in 50ul streptavidin diluted in FACS Buffer
- incubate for 15 min on ice in the dark
- Add 150ul of FACS Buffer and spin down

- Wash with 200ul FACS Buffer

3A. Surface staining only: Fixation (necessary, if not acquired on the same day)

- Resuspend cells in 100ul Cytofix (BD, no dilution)
- incubate for 15 min on ice in the dark
- Add 150ul of FACS Buffer and spin down
- Wash with 200ul FACS Buffer
- Resuspend in 200ul FACS Buffer and store at 4°C until measurement

3B. Intracellular staining:

- Resuspend cells in 100ul Fixation/Perm solution (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set Invitrogen #00552300; *3 parts diluent and 1 part concentrate*)
- incubate for 45 min on ice in the dark
- Add 150ul of Permeabilization Buffer (diluted 1:10 in dH2O) and spin down
- Wash with 200ul Permeabilization Buffer
- Resuspend cells in 25-50ul intracellular antibody cocktail diluted in Perm Buffer (mix well!!!)
- incubate overnight at 4°C (or at least 1h) in the dark
- Add 150ul of Perm Buffer and spin down
- Wash with 200ul PermBuffer
- Resuspend in 200ul PermBuffer and store at 4°C until measurement

Staining of compensation beads:

- If possible, always use exactly the same antibody which was used in the panel to prepare compensation beads
- Viability dye does not stain beads → use cells for compensation (*make sure that there are enough dead cells/heat kill some cells!*)
- Stained beads can be stored at 4°C in the dark and used for months

- Add 1 drop of compensation beads to a 2ml FACS tube
- Add 0.5 ul of antibody, mix well and incubate for a few minutes in the dark
- Add 1 ml of FACS Buffer and spin down
- Wash with 1 ml FACS Buffer
- Resuspend in 500ul-1 ml FACS Buffer

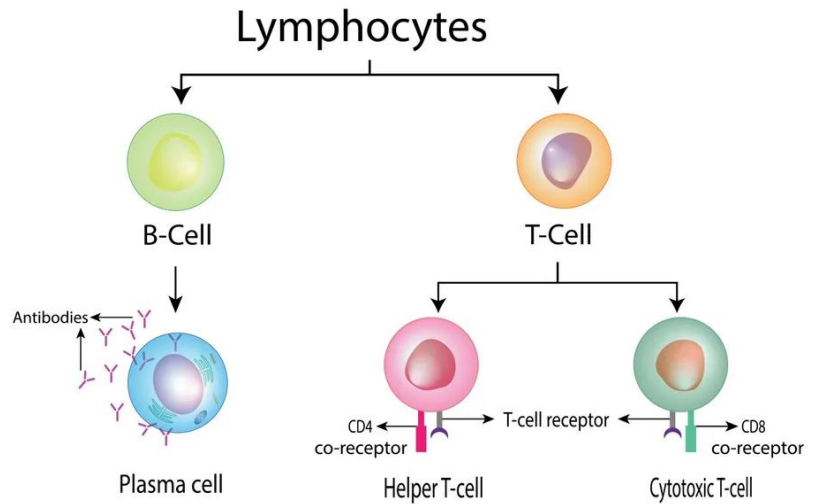
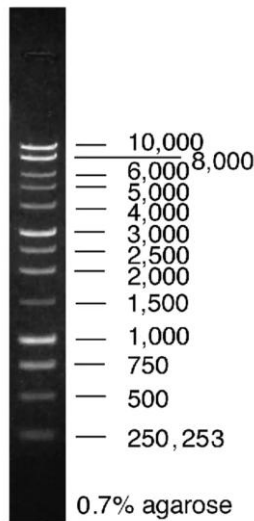


Figure 14 : L'échelle utilisée pour le génotypage Figure 15 : Health Tree Foundation, différents types de lymphocytes

Annexe 4 : Préparation intestinale:

Anticorps cible	Volume utilisé	Fonction
CD45	6 µL	Marqueur des cellules hématopoïétiques
CD90 (Thy1)	3 µL	Marqueur des cellules stromales et lymphocytaires
CD35	6 µL	Marqueur du complément (cellules B, FDC)
CD31	6 µL	Marqueur des cellules endothéliales
EpCAM	2 µL	Marqueur des cellules épithéliales
PDPN (Podoplanine)	6 µL	Marqueur des cellules stromales/fibroblastes

Utilisation de l'IA : ChatGPT (Déc. 2025) <https://chatgpt.com/>

L'intelligence artificielle a été utilisée exclusivement comme soutien linguistique, pour la reformulation stylistique et la correction orthographique, sans intervention sur l'analyse, les résultats ou l'interprétation scientifique.

Prompt : je vais écrire les remerciements pour mon travail de maturité, tu peux le mettre dans la meilleure forme possible pour mon rapport : tout d'abord j'aimerais remercier à Dr. Ziad al Nabhani pour m'accepter et m'accueillir à l'université de Bern dans la section immunologie durant une semaine et de m'avoir accordé son soutien pour mon travail de

maturité. Ensuite j'aimerais remercier à Floriane Cherrier pour m'avoir montré son quotidien au laboratoire et de m'avoir expliqué toutes les parties théoriques avec patience. Elle était la pour la partie la plus importante de mon TM qui est la partie pratique. Après j'aimerais remercier à Coralie Herrmann qui est ma professeur de TM et qui a pris le temps de corriger plusieurs version de mon travail avec précision qui a joué un rôle très important pour la partie écrite donc le travail final. Elle m'a aussi accordé un soutien moral dans les situations difficiles et a toujours cru en moi.

Réponse : Voici une version parfaitement adaptée à un Travail de maturité :

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Ziad Al Nabhani pour m'avoir acceptée et accueillie à l'Université de Berne, au sein de la section d'immunologie, durant une semaine. Je le remercie également pour le soutien qu'il m'a accordé tout au long de mon Travail de maturité et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je souhaite ensuite remercier chaleureusement Florianne Cherrier, qui m'a fait découvrir son quotidien au laboratoire et qui a pris le temps de m'expliquer avec patience l'ensemble des aspects théoriques liés à mon projet. Sa disponibilité et son accompagnement ont été essentiels à la réalisation de la partie pratique de ce Travail de maturité, qui en constitue un élément central.

Enfin, je remercie sincèrement Madame Coralie Herrmann, professeure responsable de mon Travail de maturité, pour son encadrement attentif et rigoureux. Elle a consacré beaucoup de temps à la correction de plusieurs versions de mon travail, apportant des remarques précises et constructives qui ont joué un rôle déterminant dans la qualité finale de la partie écrite. Son soutien moral dans les moments plus difficiles, ainsi que la confiance qu'elle m'a toujours accordée, ont été d'une grande importance tout au long de ce projet.

Prompt : Trouve toutes les fautes d'orthographe dans ce texte : « ... »





Contrat de parrainage

Dans le cadre des travaux de maturité

Les personnes suivantes :

L'élève

Prénom/Nom : Eysan Zeynep Gedik
 Adresse, Ville : Rue de l'Avenir 26 Bassecourt 2854 Switzerland
 Email : eysanzeynep123@gmail.com

L'enseignant·e

Prénom/Nom : Coralie Herrmann
 Ecole : Lycée de Porrentruy
 Adresse, Ville : Route de Bure 21, 2900 Porrentruy
 Canton : Jura
 Email : coralie.herrmann@divlyc.ch

La marraine ou le parrain

Prénom/Nom : Ziad Al Nabhan
 Institution : Department for Biomedical Research - University of Bern
 Adresse, Ville : Muretstrasse 35, office G804, 3008 Bern
 Email : ziad.alnabhan@unibe.ch

s'engage dans le parrainage d'un travail de maturité dans la ou les discipline(s) suivante(s) :

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Biologie | <input type="checkbox"/> Mathématiques |
| <input type="checkbox"/> Chimie | <input type="checkbox"/> Physique |
| <input type="checkbox"/> Géosciences | <input type="checkbox"/> Interdisciplinaire avec lien MINT |
| <input type="checkbox"/> Informatique | |

Contrat de parrainage

Titre (provisoire) du travail de maturité : Identification des cellules immunitaires de la rate pendant le sevrage

Date du rendu du travail : 6.01.2026

Dates (prévues) pour effectuer la partie pratique : 24 Février - 28 Février

La marraine ou le parrain s'engage à accueillir l'élève en s'adaptant à son niveau de connaissance.

L'élève et l'enseignant-e s'engagent à :

- envoyer une copie (papier ou électronique) du travail de maturité terminé à la marraine ou au parrain de même que
- le formulaire de fin de travail à la SCNAT (cela permet de mettre le résumé ou le travail en ligne sur le site Internet maturitywork.scnat.ch, et d'obtenir une attestation de collaboration de la SCNAT),


Quelques extraits des directives :

- La responsabilité du travail de maturité, en particulier de sa qualité, est de la responsabilité de l'élève, et non pas de l'enseignant-e, de la marraine ou du parrain.
- L'encadrement du travail de maturité (mais non pas son contenu) est de la responsabilité de l'enseignant-e de gymnase.
- La marraine ou le parrain apporte un soutien ponctuel, en complément du soutien de l'enseignant-e, ce qui implique une forte notion de collaboration et de collégialité entre la marraine ou le parrain et l'enseignant-e.

Lieu, date : 27.2.2025


Signature élève


Signature enseignant-e


Signature marraine-parrain

Merci de renvoyer ce formulaire à :

Académie suisse des sciences naturelles SCNAT
Commission pour l'encouragement de la relève
Maison des Académies
Laupenstrasse 7, Postfach
3001 Berne
E-mail: mint@scnat.ch