



TD n°01 : Méthode d'étude de la cellule

Généralement, Ces méthodes visent l'un des objectifs suivants :

- Mise en évidence des molécules constituant un échantillon biologique indépendamment de leurs fonctions.
- Etude fonctionnelle d'une molécule connue (déjà identifiée), par repérage au sein d'une fraction ou structure.

1. Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire a pour but, après la destruction de la membrane plasmique, de séparer les organites cellulaires les uns des autres et à les obtenir aussi pure que possible dans des tubes à essais distincts. Cette technique est considérablement utile tant au plan biochimique : détermination des molécules propre aux organites cellulaires, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Cette technique implique deux étapes :

Homogénéisation (Broyage des cellules) : qui consiste à l'obtention un homogénat ou un broyat (extrait acellulaire) par destruction de la membrane plasmique. Elle doit conserver autant que possible la structure, biochimie et physiologie des organites des cellules étudiées, en respectant des exigences ioniques, osmotique et de Ph. Un échantillon doit être fractionné par l'un des traitements suivants :

- **Mécanique :** par un piston.
- **Physique :** avec des ultrasons ou haute pression.
- **Chimique :** destruction des membranes avec des détergents (acides ou basiques) ou par des enzymes ; cas des parois cellulaires (cellules végétales et cellules bactériennes).

Pratiquement, chaque type cellulaire présente des conditions de broyage particulières, toutefois elles doivent tous se faire **en baisse température** (0-4°C) et le plus vite possible afin de minimiser la dégradation chimique suivant la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés.

Séparation par centrifugation ou ultracentrifugation

La suspension cellulaire va être soumise à une force centrifuge afin de séparer les différents organites en se basant sur les différences de vitesse de sédimentation des différentes particules de l'homogénat.

a. La centrifugation différentielle (Figure 1)

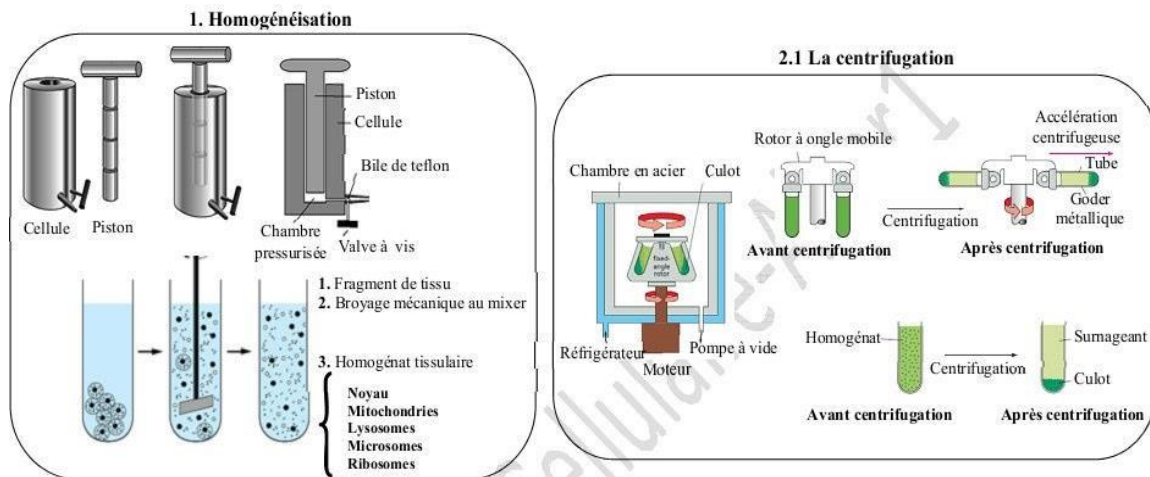
Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants (organites, macromolécules, ...) à en fonction de leur taille par des centrifugations successives à des temps et des accélérations croissantes. On fractionne la suspension initiale en une série de culots et de surnageant.

La centrifugation à gradient de densité

Dans cette méthode, les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité. A l'équilibre, elles se stabilisent dans la zone du gradient où la densité est égale à la sienne. La différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation. Cette dernière peut être modulée en faisant varier cette différence de densité par la création d'un gradient de densité.

- Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide. S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- Si la particule est moins dense que le milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface.

Pour obtenir des solutions de densités différentes, deux gradients peuvent être utilisés, un gradient de saccharose formé préalablement à la centrifugation, et un gradient de chlorure de césium (CsCl).



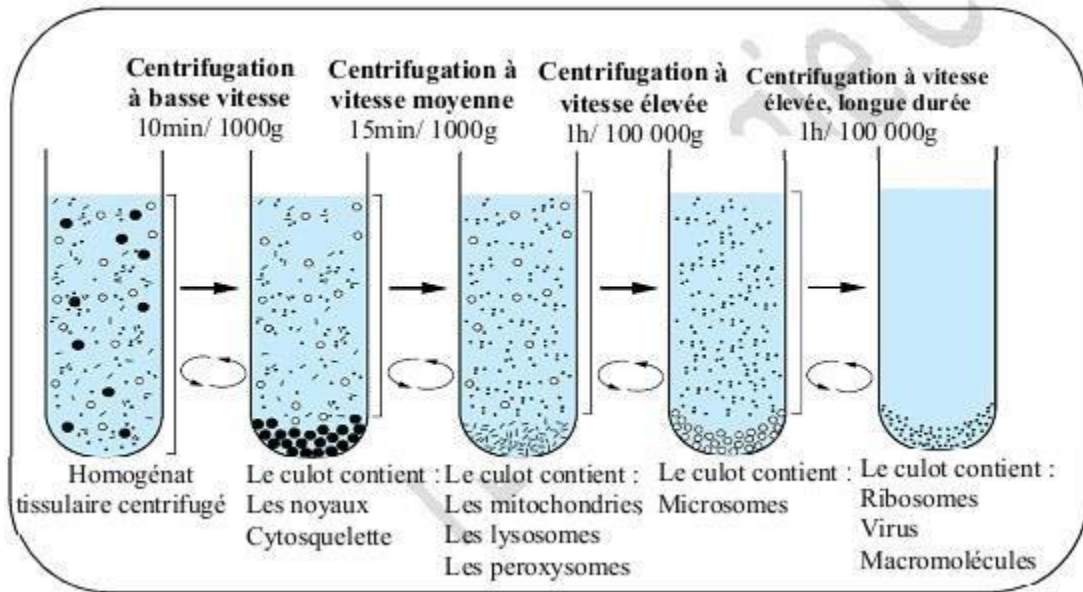


Figure 1: Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation différentielle

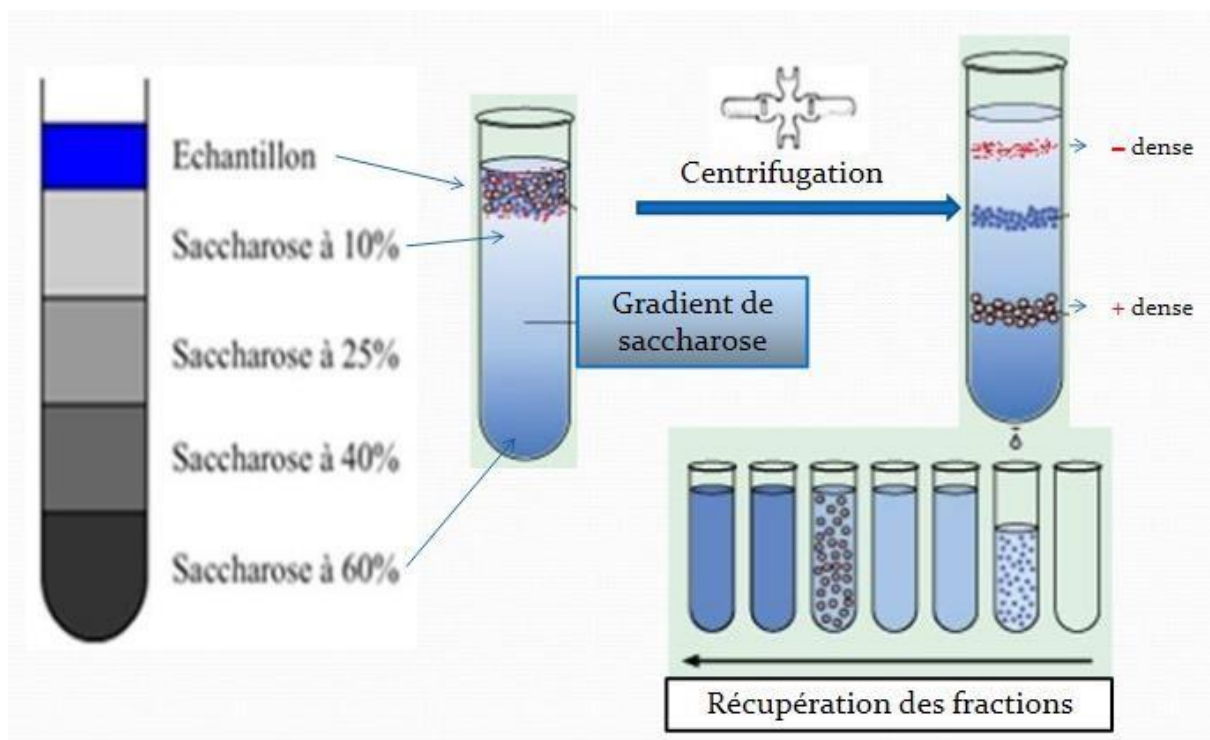


Figure2: Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité

2. Autoradiographie

L'autoradiographie permet de localiser avec précision une espèce moléculaire au sein d'un échantillon cellulaire.

Cette technique repose sur l'utilisation de produits radioactifs qui possèdent deux propriétés essentielles:

- a. Ils sont utilisés par les êtres vivants exactement comme leurs isotopes (éléments chimiques identiques différents par leurs masses atomiques) non radioactifs.
- b. Ils émettent un rayonnement qui peut être repéré par l'utilisation d'une émulsion photographique

Les étapes :

- L'introduction de la radioactivité dans les tissus : On fournit à l'organisme un composé radioactif (^{14}C , ^3H = tritium ou ^{32}P), soit par incubation des cellules en contact avec ce composé ou par injection directe dans un organisme, Cette étape constitue **le pulse**.
- On réalise des coupes dans les tissus à étudier, ou on prélève les cellules en culture. On fixe le matériel.
- On recouvre le matériel d'une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'Ag). On maintient le tout de quelques minutes à plusieurs semaines (en fonction de la quantité de radioactivité et de la nature de l'isotope utilisé) à l'obscurité. Période dans laquelle, les rayonnements émis par ces éléments radioactifs ; vont réduire les grains de bromure d'argent contenus dans l'émulsion en argent métallique.
- On développe le film pour faire apparaître en noir les grains d'argent opaques.
- L'observation simultanée du matériel permet de localiser les molécules ayant incorporé l'élément radioactif (molécules marquées).

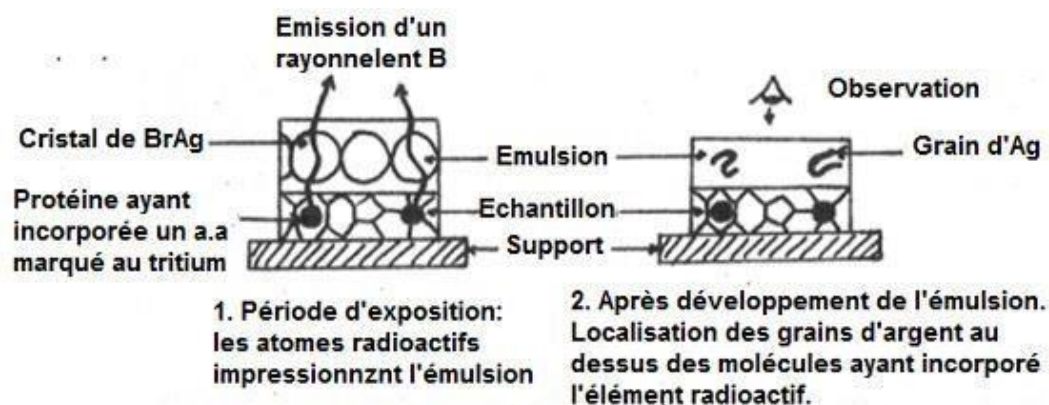


Figure 3 : Principe de la radioactivité incorporée dans un constituant cellulaire par autoradiographie.

3. La chromatographie (mise en évidence en 1903 par Mikhail TSWETT botaniste russe)

C'est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés d'un échantillon quelconque. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite **stationnaire**, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite **mobile**, se déplace au contact de la première et entraîne avec elle les composés de l'échantillon à étudier avec des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

Les éléments de la chromatographie sont :

- **L'échantillon** : C'est la solution qui contient les composés à analyser.
- **La phase stationnaire**: elle peut être solide ou liquide. C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne, Les granules peuvent : être poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.
- **La phase mobile**: C'est un liquide ou gaz qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant avec lui les composés de l'échantillon. Elle doit être soluble et interagir avec les composés de l'échantillon et non pas avec la phase stationnaire.
- **La colonne**: C'est le support de la phase stationnaire (gel ou résine). A travers lequel, la phase mobile passe. Elle peut être en verre, en plastique ou en inox et de différentes dimensions.

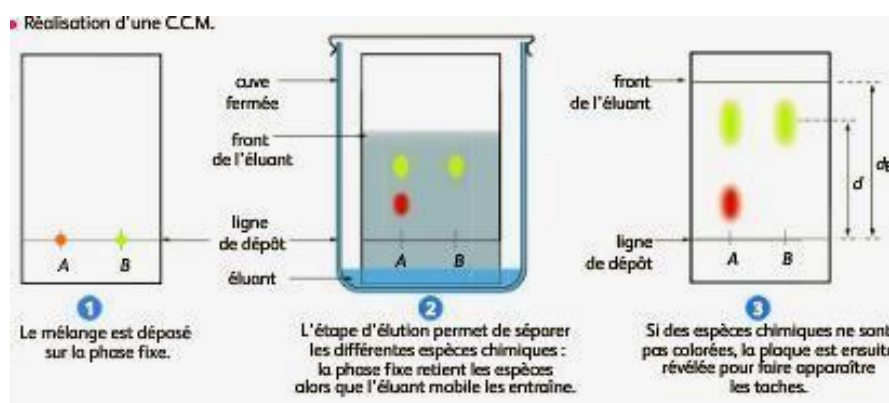


Figure 4 : Chromatographie sur couche mince.

4. L'électrophorèse : est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules

non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

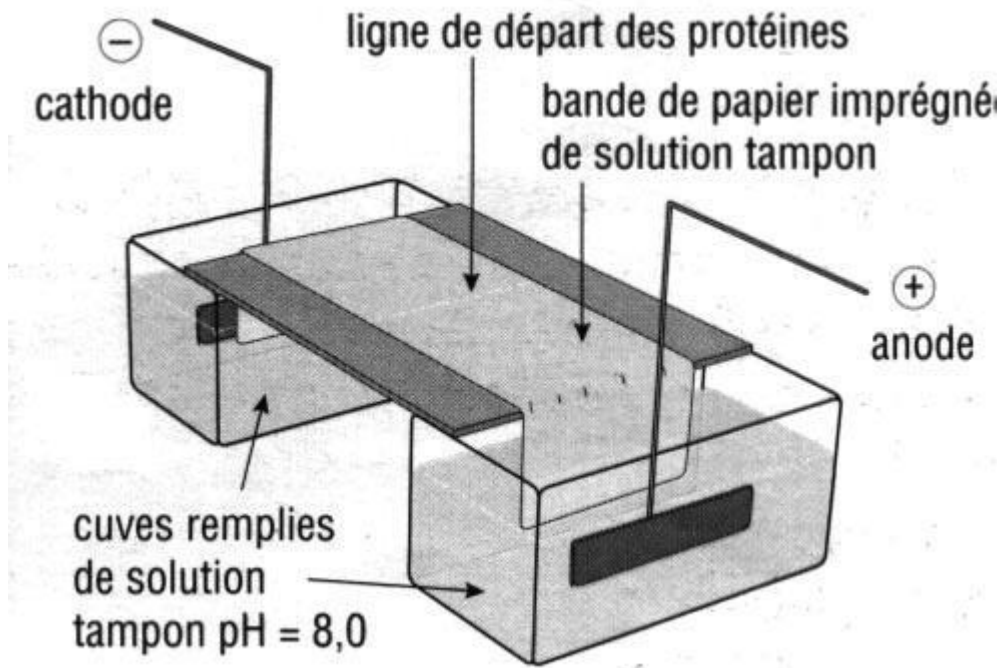


Figure 5 : Electrophorèse