

### METHODE D'ETUDE DE LA CELLULE

De manière générale, ces méthodes d'analyse ont un double objectif :

- Etablir un catalogue des molécules constituant un échantillon biologique donné,

Indépendamment de leur fonction

- Repérer dans une fraction, ou localiser dans une structure, une seule espèce moléculaire connue, déjà identifiée, dans le cadre d'une approche plus ciblée, fonctionnelle

## 1. Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire vise, après avoir détruit la membrane plasmique, à séparer les organites cellulaires les uns des autres et à les obtenir aussi pure que possible dans des tubes à essais distincts. Cette technique offre des possibilités expérimentales considérables tant au plan de la biochimie : identification des molécules propres aux organites, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Cette technique implique deux étapes :

**1. L'homogénéisation** (ou broyage), qui implique la destruction de la membrane plasmique et donne un homogénat (extrait acellulaire) ;

**2. La séparation** des organites par des **centrifugations successives**.

### 1. Homogénéisation

Elle a pour objectif de conduire à la destruction des cellules sans détérioration des organites. Le milieu de broyage doit respecter des exigences ioniques, osmotiques et de pH, de façon à ce que les organites (en général des vésicules) ne subissent pas de modification chimique ou de volume. Les méthodes d'homogénéisation sont de type :

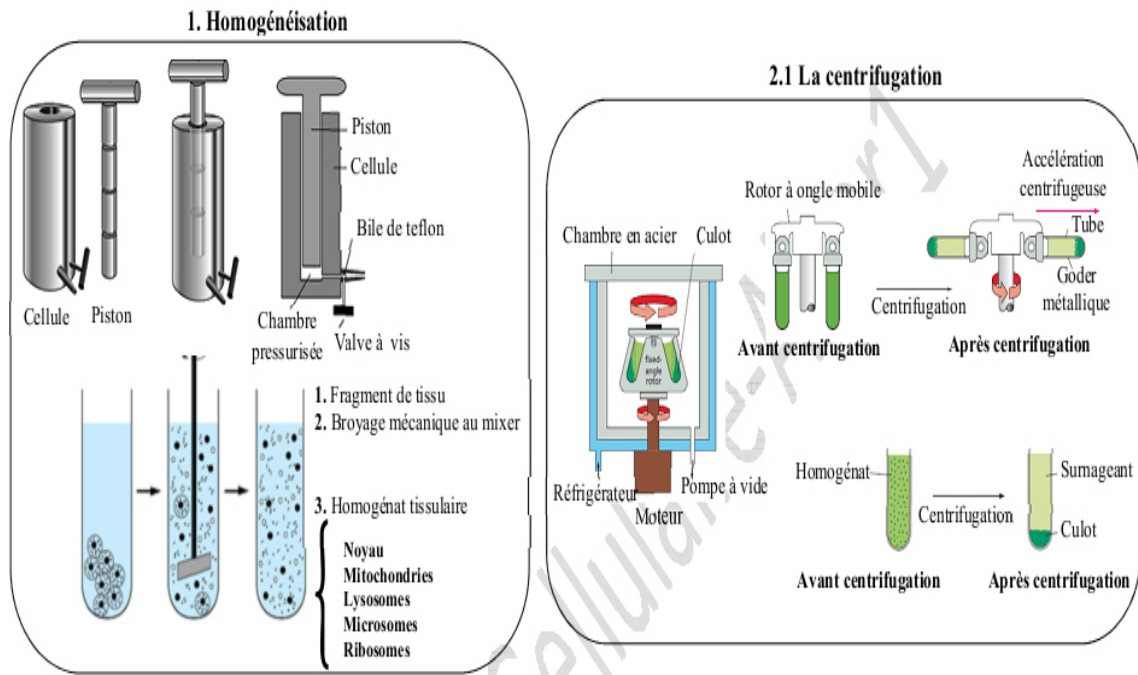
- **Mécanique** (pistons, mixers) ;
- **Physique** (hautes pressions, ultrasons) ;
- **Chimique**: destruction des membranes par des détergents et des parois (cas des cellules végétales ou des bactéries) par des enzymes appropriées tels que cellulases et lysozymes.

En fait, chaque type cellulaire nécessite des conditions de broyage particulières, mais un constant est que cette opération doit être effectuée à basse température (0-4 °C), et le plus rapidement possible, pour minimiser les phénomènes de dégradations chimiques liés à la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés.

### 2. Séparation par centrifugation

Les organites cellulaires sont séparés par une technique de centrifugation (ou ultracentrifugation) jouant sur les différences de vitesse de sédimentation des différentes organites en suspension. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, de sorte que les particules les plus grosses et les plus

denses de l'homogénat forme le premier sédiment (ou culot).



## 2.1. La centrifugation différentielle (Figure 1)

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un **culot** au fond du tube. Les éléments dont l'accélération est trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le **surnageant**. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour récupérer les éléments (les cellules) du sang qui sédimenteront pour des accélérations très faibles

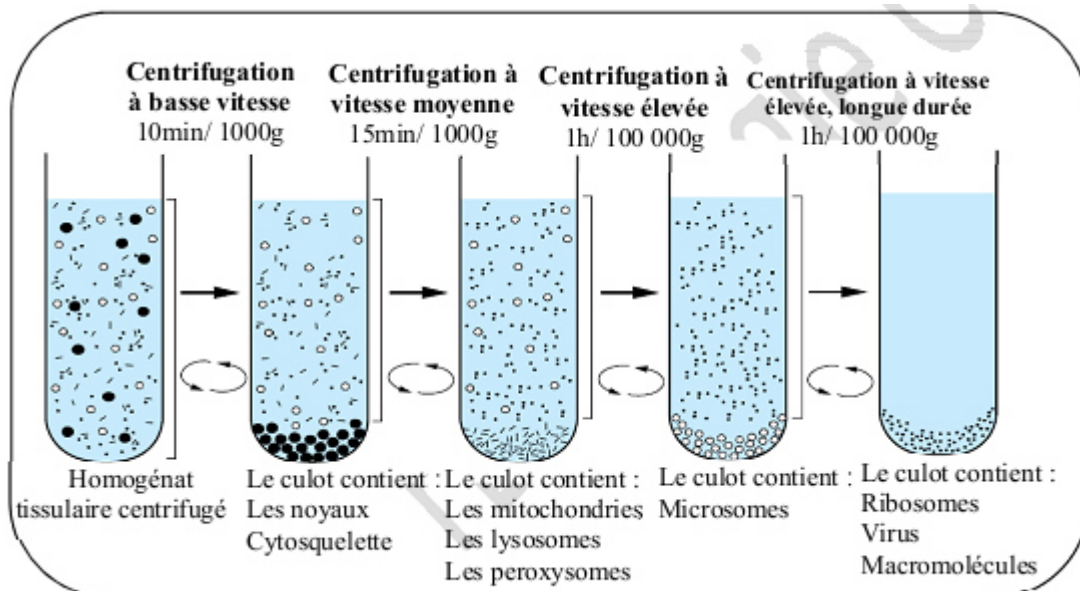


Figure 1: Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

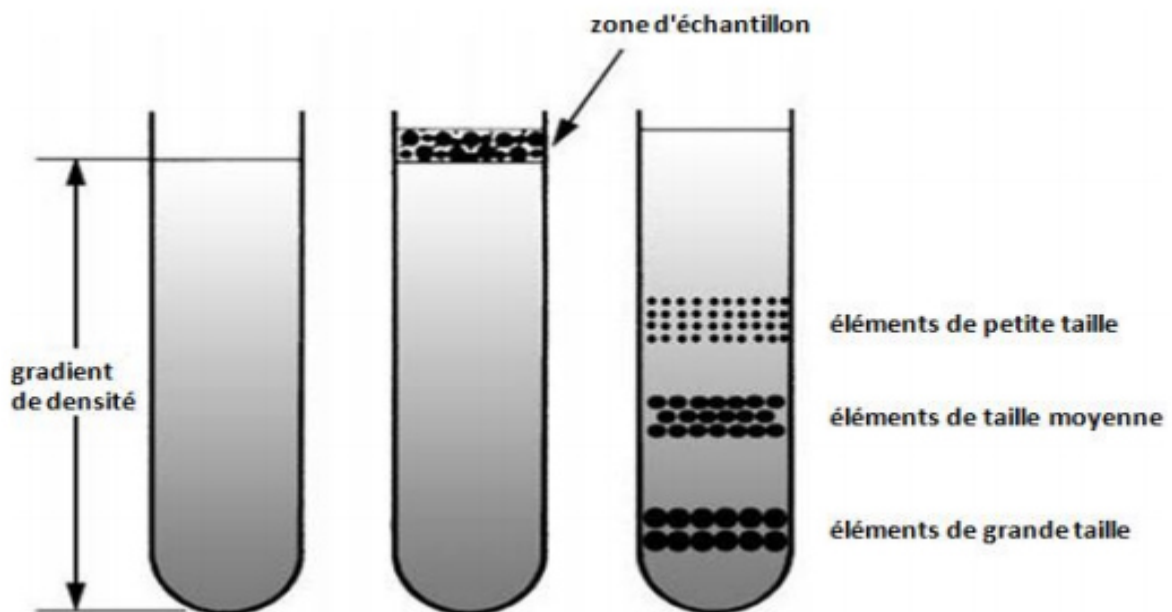
## 2.2. La centrifugation sur gradient de densité (Figure 2)

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)**.

**Figure2: Fractionnement cellulaire par centrifugation sur gradient de densité**



## 2. Autoradiographie

La technique d'autoradiographie a pour objectif de marquer une molécule spécifique avec de la radioactivité. Elle permet de suivre et de localiser des substances au niveau des organites cellulaires (figure 3).

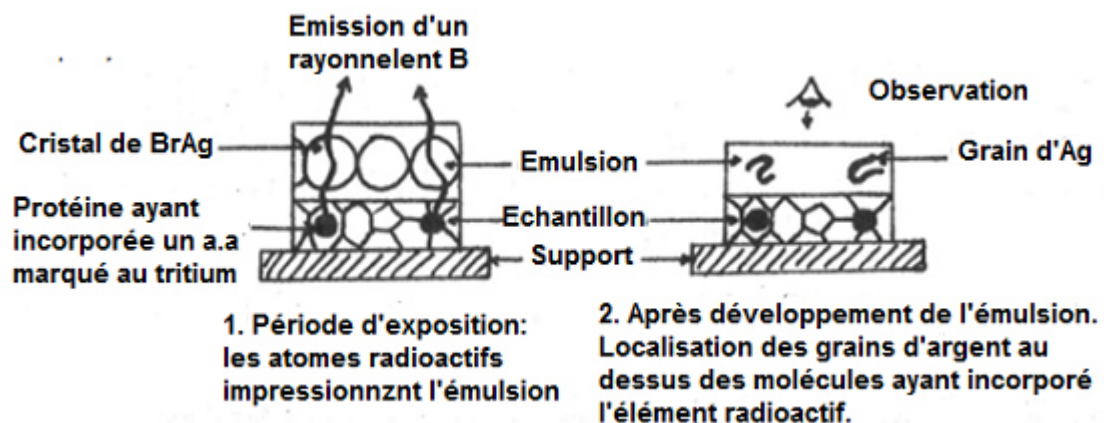
**Le principe :** Cette technique repose sur l'utilisation de produits radioactifs qui possèdent deux propriétés essentielles:

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

## Les étapes

- On fournit à l'organisme un composé radioactif (contenant le plus souvent du  $^{14}\text{C}$  ou du  $^3\text{H}$  = tritium). Il peut s'agir d'une incubation des cellules en contact avec ce composé ou d'une injection directe dans un organisme, Cette étape d'introduction de la radioactivité dans les tissus constitue le pulse.
- On sacrifie l'organisme et l'on réalise des coupes dans les tissus à étudier, ou on prélève les cellules en culture. On fixe le matériel et les composants radioactifs non incorporés sont éliminés par lavage.
- On recouvre le matériel d'une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'Ag). On maintient le tout plusieurs jours ou plusieurs semaines à l'obscurité. Pendant ce laps de temps, les rayonnements émis par les éléments radioactifs vont transformer l'AgBr en Ag métallique.
- On développe le film pour faire apparaître en noir les zones impressionnées (présence des 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

est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. 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. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à 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:** 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 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.

**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.