

METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES

Ces méthodes permettent de connaître **la nature** mais aussi **la localisation** des constituants biochimiques de la cellule.

Selon les recherches envisagées, les matériels cellulaires sont différents.

1. Les matériels cellulaires

1.1. Broyats cellulaires = homogénats cellulaires

* Pour obtenir un broyat cellulaire = homogénat cellulaire **on peut partir**, soit d'une **suspension de cellules**, soit de **fragments de tissu**.

* Homogénat cellulaire = **organites en suspension** + **débris** cellulaires (fragments d'ultrastructures) + **constituants biochimiques en solution**.

1.2. Fractions cellulaires

Si on veut connaître **la composition biochimique** des organites cellulaires, il faut les isoler les uns des autres. La purification d'organite passe par l'obtention de fractions cellulaires. On parle de techniques de **fractionnement cellulaire** = **isolement d'organites cellulaires**.

Le fractionnement cellulaire est réalisé à partir d'un homogénat cellulaire.

* Principe de la séparation des organites cellulaires :

Le fractionnement cellulaire est basé sur la **différence de densité des organites**.

A partir d'un homogénat cellulaire, on peut laisser sédimenter les organites, et observer que leur vitesse de sédimentation est différente car leur densité diffère :

- ✓ les plus denses séimentent les premiers ;
- ✓ les moins denses séimentent par la suite.

La vitesse de sédimentation répond à l'équation suivante :

$V = Kr^2(d_p - d_m)g$ c'est une vitesse $V = dx/dt$ exprimée en m/s

V = vitesse de sédimentation

K = facteur qui dépend de la viscosité du milieu dans lequel sont en suspension les organites

r = rayon de la particule considérée comme sphérique

d_p = densité de la particule $d = (\text{masse d'un vol. d'un corps } x) / (\text{masse du même vol. d'eau})$

d_m = densité du milieu

g = accélération de la pesanteur

$Kr^2.(d_p - d_m)$ = **coefficient de sédimentation** dont l'unité est la seconde. Comme les valeurs des coefficients de sédimentation sont très petites, on les exprime plutôt en unités SVEDBERG (S) pour lesquelles **1 unité S = 10^{-13} seconde**. La différence de densité des organites de la cellule est très faible, ce qui impliquerait une séparation longue dans le temps.

❖ *La centrifugeuse*

On utilise donc la centrifugation pour remplacer la pesanteur par une force centrifuge. L'accélération des particules sous l'effet de l'attraction terrestre, g , est remplacée par une accélération plus élevée notée, f . L'équation donnant la vitesse de sédimentation devient : **$V = Kr^2.(d_p - d_m). f$**

La vitesse d'une centrifugeuse est souvent exprimée en rpm = rotation par minute.

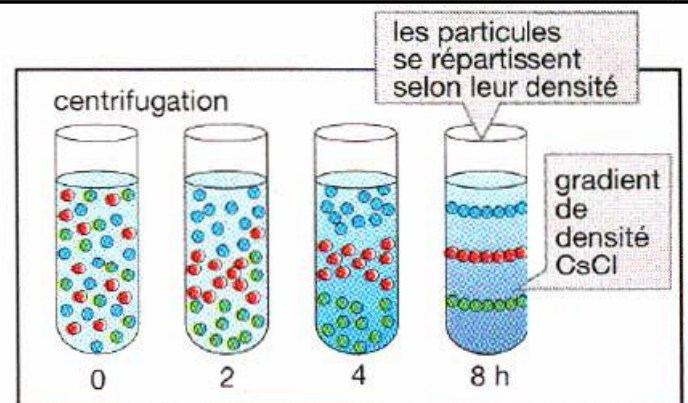
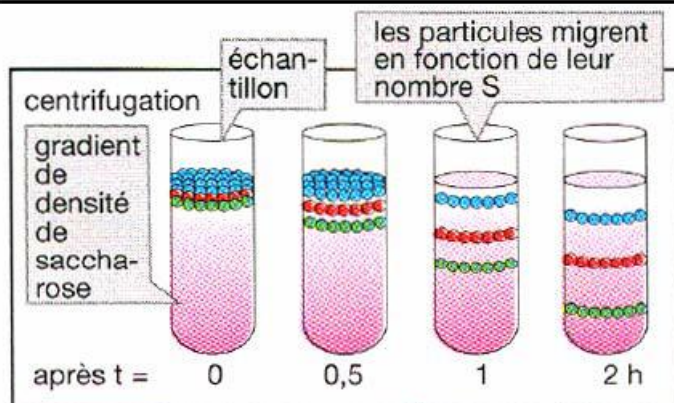
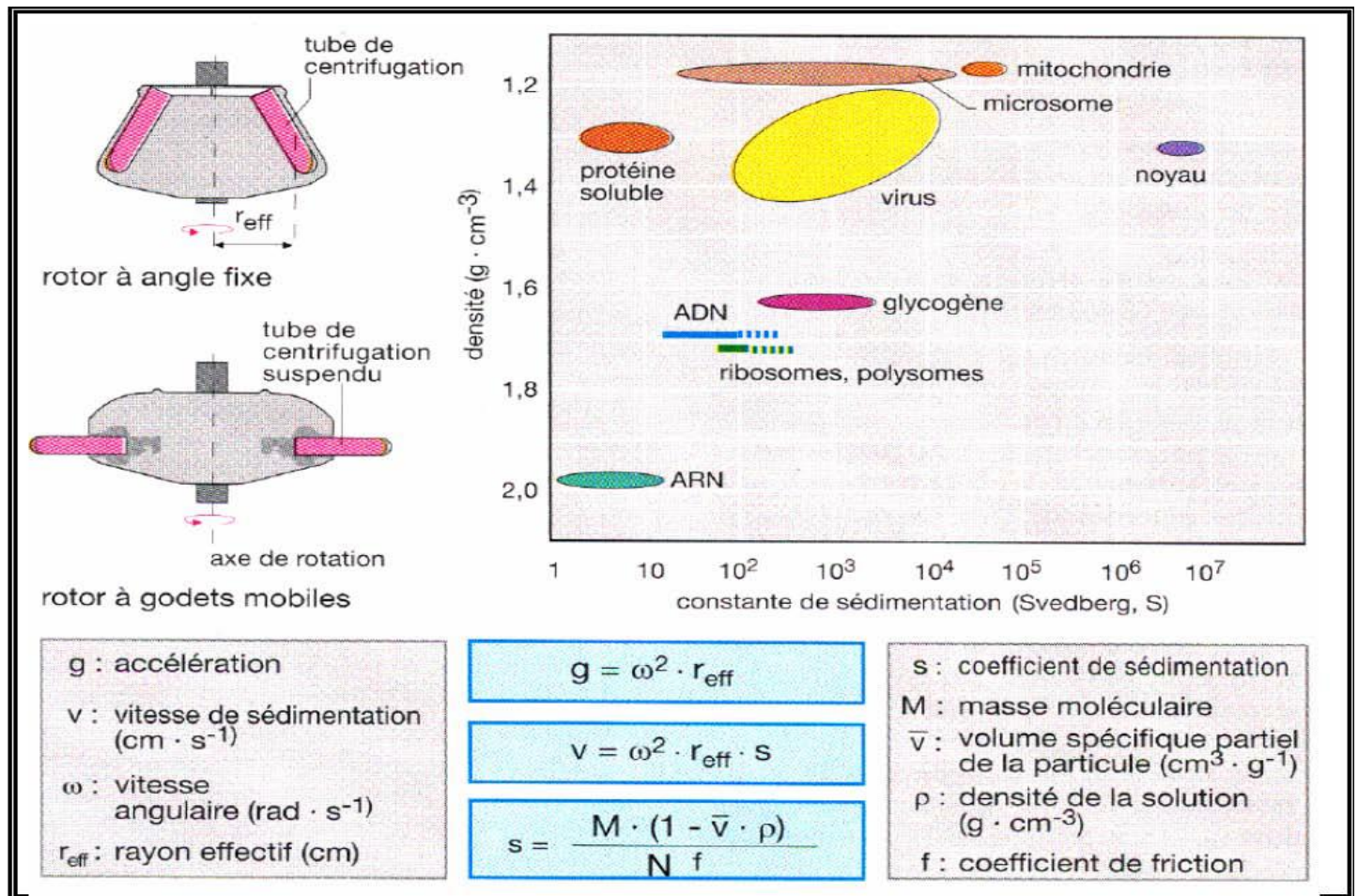
Ainsi, **$f = (rpm \cdot 2\pi/60)^2 \cdot r$ ou $f = \omega^2 r$** on a converti rpm en radian/seconde

L'accélération centrifuge f à laquelle on soumet les organites est généralement exprimée en multiples de g : (on dit, par exemple, centrifugation à x 1000 g) avec $g = 9,81$ m/s.

L'accélération ainsi calculée est exprimée en multiples de g

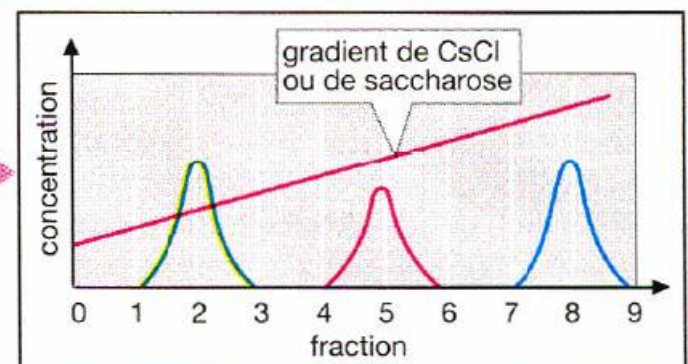
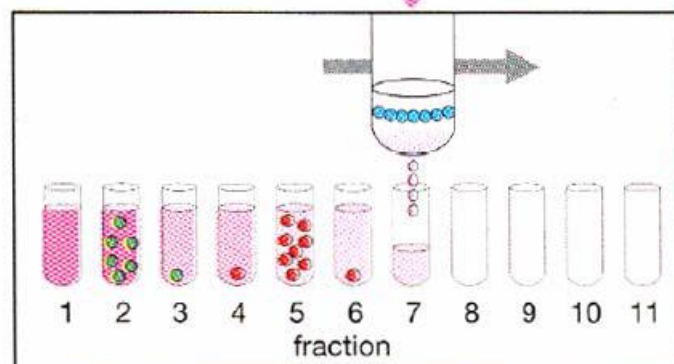
$$\text{RCF} = \text{Relative Centrifuge Force} = 11,17 \cdot r \cdot (\text{rpm}/1000)^2$$

avec r en cm, rpm = rotation par min,



centrifugation de zone

centrifugation isopycnique



* L'ultracentrifugation différentielle :

C'est à Albert CLAUDE que l'on doit cette technique. On l'appelle ultracentrifugation **différentielle** car est basée sur la **différence de vitesse de sédimentation** des organites, elle-même reposant sur différence de densité des organites ; et **ultra** pour désigner que exploitation de **faibles différences** (comme pour ultrastructure) et utilisation **d'accélération importantes**.

On procède en deux temps :

- 1) fabrication d'un homogénat cellulaire
- 2) ultracentrifugation différentielle.

Les centrifugations sont réalisées en milieu refroidi et on doit donc disposer d'un équipement spécial = **ultracentrifugeuse réfrigérée**.

Pratiquement la technique consiste à soumettre un homogénat de tissu à des centrifugations successives de plus en plus rapides. Les accélérations et les temps de centrifugation sont à adapter en fonction de la nature du matériel biologique étudié.

* L'ultracentrifugation sur gradient de densité :

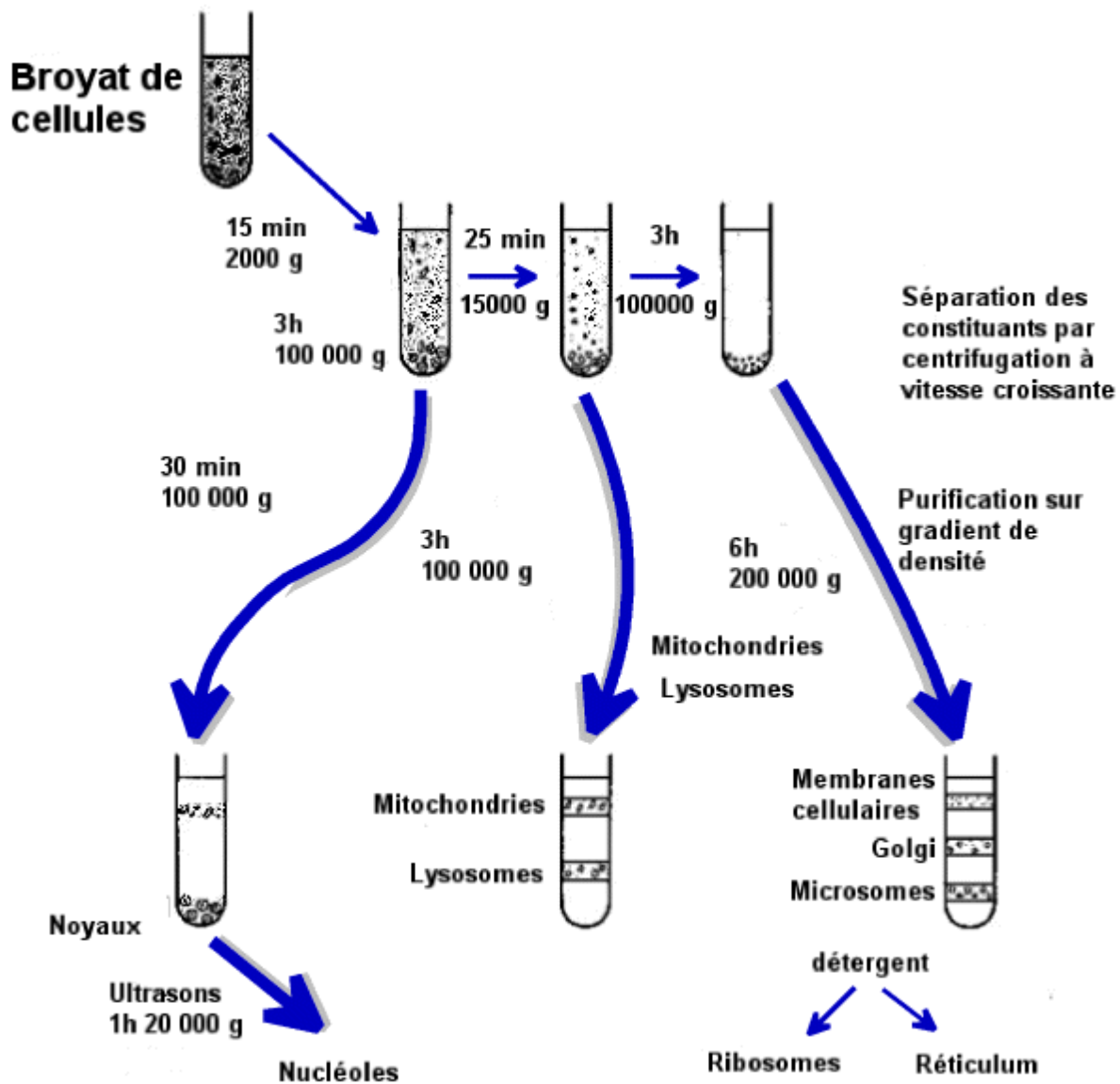
Cette technique permet de séparer **en une seule fois** des organites qui ont des **vitesse de sédimentation très voisines**. On travaille dans un **milieu présentant un gradient de densité**, d'où le nom donné à la technique.

Principe :

On a vu précédemment que la vitesse de sédimentation est en fonction de la différence ($d_p - d_m$), or quand $d_p = d_m$ donc $V_{sed} = 0$, l'organite s'immobilise ainsi dans la zone ou la couche de gradient de densité qui correspond à sa propre densité.

Les différents organites vont donc s'étager sur toute la hauteur du tube de centrifugation. La technique de centrifugation différentielle intervient rarement à partir d'un homogénat cellulaire, mais elle est plutôt **pratiquée après l'ultracentrifugation différentielle à partir d'une fraction cellulaire donnée** afin de la purifier.

On travaille généralement sur un **gradient de saccharose** pour la **purification d'organites** (il existe une centrifugation sur gradient de **chlorure de césium** pour séparer des **molécules d'acides nucléiques** : différences de densités exploitées sont très fines).



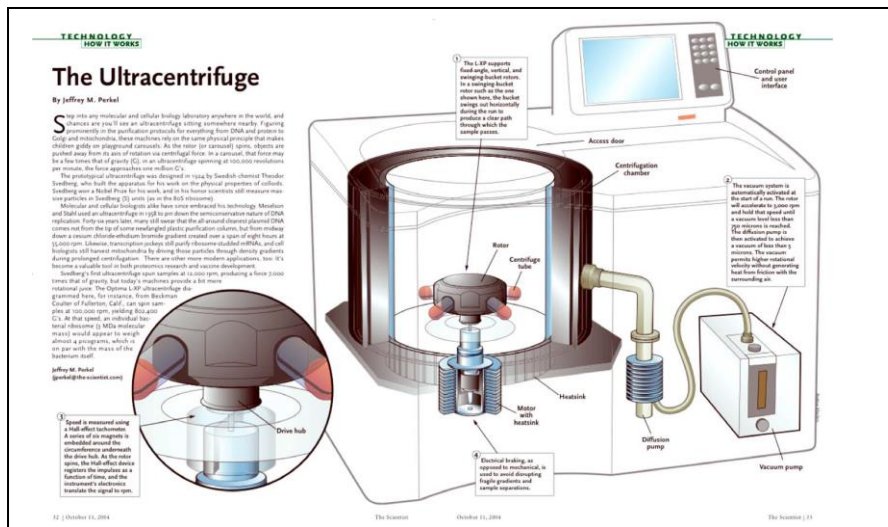
Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules



Ultracentrifugeuse de sol
100000 rpm; 800000 g



Centrifugeuse de pailasse réfrigéré
30000 rpm; 64000 g



Dégâts provoqués par une ultracentrifugeuse mal équilibré



2. Les méthodes

2.1. Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

Elles sont appliquées soit à des homogénats, soit à des fractions cellulaires à partir desquels on obtiendra des **extraits bruts = constituants biochimiques en solution**. Elles consistent à rechercher la **nature et la concentration des constituants biochimiques** : glucides, lipides, protéines et acides nucléiques.

Elles sont **très nombreuses** (chromatographie, électrophorèse...etc) et concernent les techniques d'extraction, de purification, de caractérisation et de dosage.

2.2. Les méthodes cytochimiques

Ces méthodes permettent de **localiser les constituants biochimiques** à l'intérieur des cellules. Ces méthodes **s'adressent à des coupes**.

* Localisation de polysaccharides : réaction à l'APS

APS = Acide Périodique - réactif de Schiff

C'est la méthode la plus employée pour localiser les polysaccharides dans la cellule.

Elle se réalise sur des **coupes tissulaires** en **deux temps** :

- 1) **oxydation des polysaccharides** par l'acide périodique IO_4H . Il y a alors **formation de fonctions aldéhydes** à partir de certaines fonctions alcool (= groupement hydroxyle) des oses qui constituent les polysaccharides. La coupe est trempée dans un bain d'AP.
- 2) **mise en évidence des fonctions aldéhydes** apparues par le **réactif de Schiff**. La coupe est immergée dans un bain de réactif de Schiff. On obtient une **coloration rouge** dans les régions cellulaires riches en polysaccharides. La coupe est ensuite **observée au microscope photonique par transmission**.
- 3) Pour **connaître la nature des polysaccharides** détectés dans les différentes régions de la préparation, on effectue au préalable une **digestion enzymatique**. La coupe est trempée dans une solution tamponnée d'une enzyme donnée (ex. la glycogénase). Puis on réalise la réaction APS. On compare la première lame et de la seconde, et on recherche les zones dans lesquelles la coloration rouge a disparu. On en déduit alors la localisation du polysaccharide recherché (ex glycogène).

* Localisation d'acides nucléiques : test de Brachet et réaction de Feulgen

Cette technique est employée pour localiser les acides nucléiques dans la cellule. Elle est toujours réalisée à partir de coupes. Ce test combine :

➤ une méthode de coloration au mélange [vert de méthyle + pyronine] :

- vert de méthyle ----> ADN vert
- pyronine ----> ARN rouge

➤ l'emploi d'enzymes capables d'hydrolyser de façon spécifique soit l'ADN soit l'ARN, c-à-d DNase et RNase. Le traitement par les nucléases est nécessaire pour vérifier la spécificité de la coloration, car la coloration au vert de méthyle-pyronine n'est pas très spécifique.

coupe A sert de témoin et n'est pas traitée par les nucléases ;

coupe B est traitée par la DNase ;

coupe C est traitée par la RNase.

Puis ces trois coupes sont colorées par le mélange vert de méthyle-pyronine et sont observées au microscope photonique par transmission.

➤ noyau contient ADN (chromatine) et ARN (nucléole bien visible, mais transcription partout aussi) ;

➤ cytoplasme contient ARN pas d'ADN (l'ADN mitochondrial et chloroplastique n'est pas visible à l'intérieur de ces organites car sont rarement observables en microscopie photonique).

* Localisation d'antigènes (Ag) et d'anticorps (Ac) : utilisation des "outils anticorps"

Ce sont des **méthodes très générales** car à partir du moment où on a l'Ac on peut localiser n'importe quel Ag c'est à dire n'importe quelle molécule. Ces méthodes reposent donc sur la propriété de reconnaissance spécifique des anticorps.

On travaille toujours à **partir de coupes tissulaires**.

La méthode se déroule en **deux temps** :

- 1) **formation du complexe Ag-Ac** = complexe immun : la coupe est trempée dans un bain contenant l'anticorps en solution ;
- 2) **révélation de la présence des complexes immuns** : utilisation d'outils immunologiques marqués, par exemple anti-anticorps = anti-immunoglobuline = anti-Ig = antiglobuline marquée.

Il existe **différentes façons de marquer les "anticorps révélateurs"** :

- par des **enzymes** capables d'utiliser un substrat chromogène c.à.d. capable de donner un produit coloré détectable ----> observation en microscopie photonique par transmission ;
- par des **fluorochromes** ----> observation au microscope à fluorescence ;
- par des **radioisotopes** ----> autoradiographie puis observation de la coupe et de la plaque photographique en parallèle au microscope photonique ou électronique.