

II. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules

Ces techniques et procédés permettent la détection, la localisation et la quantification des composés cellulaires en se basant sur leurs propriétés physiques.

1. Matériels cellulaires

La cellule est l'unité fondamentale de point de vue structure et fonction des organismes vivants. Toute cellule dérive d'une cellule préexistante par division.

1.1. Différents types de cellules (voir la partie 01 du cours)

1.2. Les constituants moléculaires de la cellule

1.2.1. Les constituants inorganiques

- **Eau**

De formule chimique H_2O , l'eau est le constituant majeur de la cellule et donc de la matière vivante (60-95% en fonction des êtres vivants). Fondamentale dans les processus biochimiques de la cellule, il joue d'importants rôles à savoir :

- C'est le principal solvant de beaucoup de substances cellulaires (Cytosol, plasma sanguin ...)
- C'est le milieu où se déroule la quasi-totalité des réactions biologiques.
- C'est un régulateur thermique.
- Il peut participer comme substrat (réactif) ou se libérer comme produit dans certaines réactions comme l'hydrolyse.
- Il contribue, par son interaction avec les molécules hydrophiles et/ou hydrophobes, à stabiliser beaucoup de structures cellulaires comme les membranes.

- **Sels minéraux**

Les sels minéraux sont les constituants qui restent (sous forme de cendres) après calcination des tissus organiques. Chimiquement, ce sont des éléments ionisés chargés soit positivement (cations) ou négativement (anions). Les sels minéraux sont essentiels à l'organisme, notamment parce qu'ils :

- Contrôlent l'équilibre hydrique (pression osmotique)
- Règlent l'équilibre acide-base (pH)
- Font partie de certaines structures (os, dents)
- Entrent dans la composition des enzymes, des hormones
- Catalysent de nombreuses réactions du métabolisme
- Leurs concentrations sont étroitement régulées pour assurer le maintien de l'homéostasie (équilibre de fonctionnement) cellulaire.

Selon les quantités mises en jeu dans l'organisme, les sels minéraux sont couramment divisés en deux groupes :

- les éléments principaux ou macroéléments : Ca, P, K, Cl, Na, Mg
- les éléments traces ou oligoéléments : Fe, Zn, Cu, Mn, I, Mo, etc.

1.2.2. Les constituants organiques

Les constituants organiques qui composent le vivant sont classiquement divisés en 4 familles distinctes : les glucides, les lipides, les acides nucléiques et les protéines. Tous sont présents en milieu aqueux et tous possèdent un élément essentiel constitutif de leur structure : le carbone.

1.3. Les préparations d'étude

1.3.1. Cellule entière ou coupes des cellules

Les méthodes utilisées en histologie varient selon le matériel (échantillons ou spécimens) à étudier et les objectifs de l'examen.

a. Cellules entières

Des cellules vivantes peuvent être observées entre lame et lamelle afin d'évaluer certaines de leurs fonctions (par exemple, mobilité, mesure de la fréquence du battement des cellules ciliées, chimiotactisme des granulocytes neutrophiles).

L'examen microscopique est parfois effectué après adjonction de colorants vitaux qui permettent d'évaluer la viabilité cellulaire (bleu trypan et nigrosine qui pénètrent seulement dans les cellules mortes).

b. Coupes de cellules

La préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

La fixation se fait par le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, qui sont des aldéhydes très réactifs. Malheureusement la fixation tue les cellules mais permet leur immobilisation et leur conservation.

La déshydratation permet l'élimination de l'eau en la remplaçant par des solvants de types xylène et toluène.

L'inclusion dans de la résine, cire ou paraffine, permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.

La formation des coupes ultrafines est réalisée par des microtomes.

La coloration des coupes se fait par différents types de colorants ou méthodes de mise en évidence :

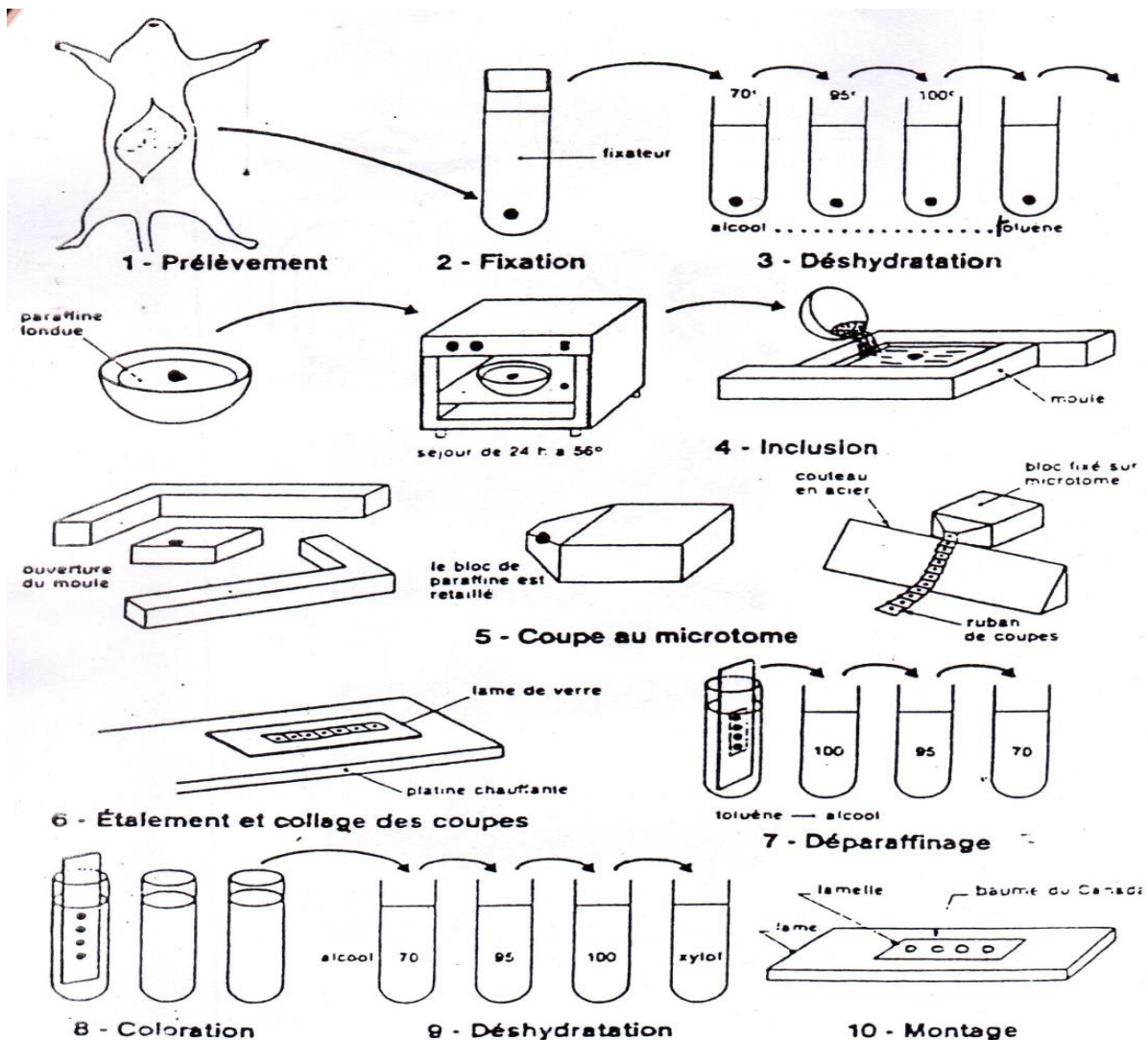
- Les colorants métachromatiques qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le May-Grunwald-Giemsa (MGG), qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins.
- Les colorants histochimiques comme l'acide périodique de Schiff qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides.
- La méthode histo-enzymatique qui permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore.

Le montage rend la préparation observable.

La coloration négative permet de mettre en évidence le contour de petits objets, grâce à des projections de métaux lourds sur la préparation.

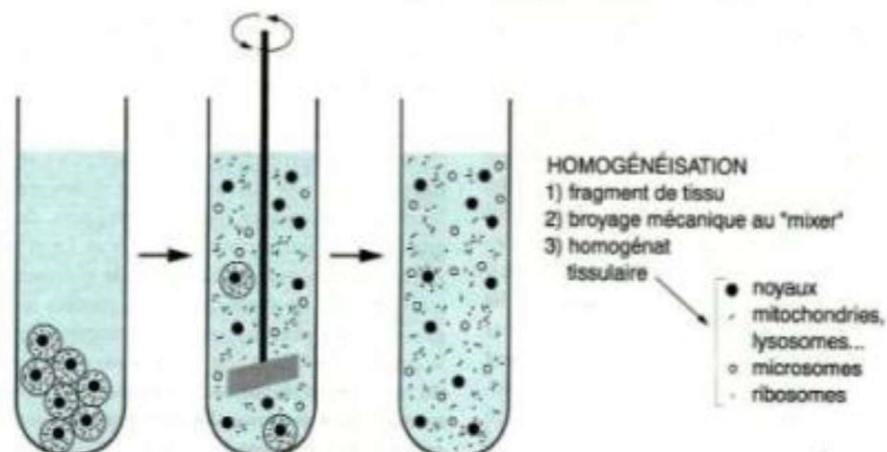
PREMIERE PARTIE : METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

Les ombrages métalliques permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant sous vide une très fine couche métallique avec un certain angle d'incidence entraînant la formation d'ombre portée.



1.3.2. Séparation de différents organites : le fractionnement cellulaire

C'est une technique qui permet d'isoler les organites cellulaires tout en conservant intactes leur structure et leurs propriétés physiologiques. Les organites cellulaires obtenus par cette technique sont vivants et fonctionnels. On peut faire une analyse chimique pour étudier leur composition et étudier leur fonction in vitro dans un milieu synthétique.



1.3.2.1. Broyats cellulaires = homogénats cellulaires

Cette première étape qui conduit à un homogénat, doit conserver autant que possible l'intégrité structurale, biochimique et physiologique des organites des cellules étudiées.

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.

Cette étape consiste à rompre la membrane plasmique et la paroi cellulaire s'il y en a une. Les cellules sont placés en suspension dans ;

- Une solution de pH constant et de contenus salin appropriés, généralement du saccharose isotonique (0,25 M) ou une combinaison de sels similaires à ceux présents à l'intérieur de la cellule afin d'éviter les échanges d'eau.
- Il faut noter que l'eau pénètre dans les cellules lorsqu'elles sont placées dans une solution hypotonique (C'est-à-dire que la concentration en solutés est inférieure à celle qui règne à l'intérieur de la cellule), ce flux osmotique fait gonfler les cellules, affaiblissent la membrane plasmique ce qui facilite sa rupture.
- La solution est conservée à 0°C pour mieux préserver les enzymes (Annuler leurs activités).

Ceci dit différentes techniques sont utilisables à savoir :

a. Techniques mécaniques

a. 1. Le broyage mécanique

Les broyeurs mécaniques sont utilisés pour réduire la taille des particules de différents types de matériaux. Ils sont utilisés dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée. Il existe deux types de broyeurs :

- **L'homogénéisateur de type Dounce**

Il ressemble à une éprouvette dans laquelle s'enfonce un piston serré (**Figure 3**). Le renflement du piston et la zone de broyage du mortier sont souvent en verre fritté.

Le passage des cellules dans l'espace très petit entre le piston et la paroi interne du tube induit leur rupture.



- **L'homogénéisateur de type Potter-Elvehjem**

Il est constitué d'un tube de verre et d'un piston en plastique tels que l'espace annulaire entre le piston et la paroi du tube ne soit que de quelques dixièmes de mm. Le piston tourne à 1000 ou 2000 tours/min et en même temps que le piston tourne, on fait aller et venir le tube verticalement. Les cellules qui passent entre le piston et la paroi du tube sont alors soumises à des forces de cisaillement qui amènent leur éclatement (**Figure 4**).



a. 2. La bombe à disruption

Cette technique consiste à traiter l'échantillon avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. Par la suite, la pression est libérée tout d'un coup ; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclatés.

a. 3. La Presse de French

C'est un cylindre creux en métal dans lequel s'enfonce un piston métallique doué de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide (Figure 5). Il est utilisé en expérimentation biologique pour interrompre la membrane plasmique des cellules en les faisant passer à travers une valve étroite sous haute pression, ce qui déchire leur membrane. Plus que la pression est haute dans le cylindre, plus que la lyse est totale. Cette technique est fiable, efficace et respecte l'activité des enzymes présentes dans les cellules biologiques.

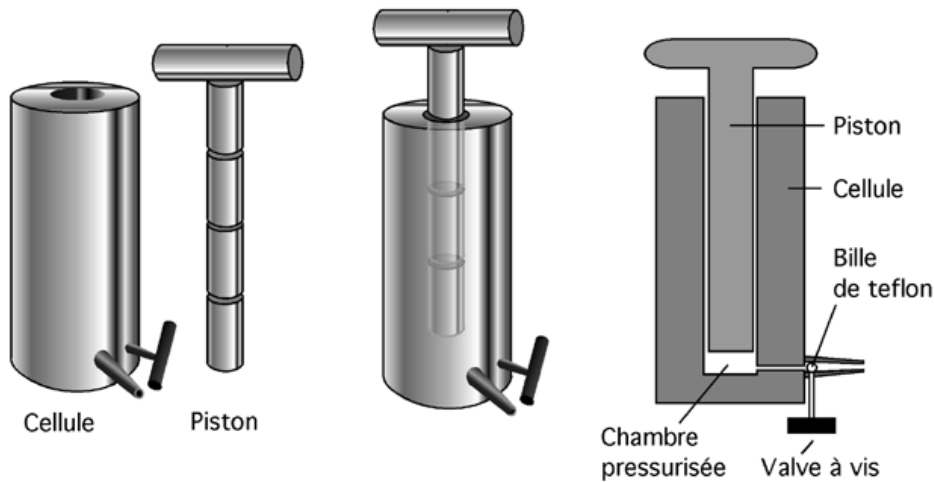


Figure 05. Schéma de la presse de french.

a. 4. La sonication (Ultrasons)

Elle consiste à détruire les cellules par les ultrasons qui sont des ondes de même nature que le son mais dont la gamme de fréquence se situe entre 20 kHz et plusieurs centaines de mégahertz.

Cette gamme est trop élevée pour que l'oreille humaine puisse la percevoir.



La sonication est réalisée grâce à un appareil appelé sonicateur qui permet de transformer l'énergie électrique en vibration mécanique longitudinale le long d'une sonde. Cette dernière permet de casser les cellules biologiques en suspension. Il est indispensable de travailler à basse température et d'effectuer des pauses entre les cycles de sonication afin d'éviter la surchauffe de l'échantillon.

a. 5. La congélation-décongélation

Des cycles de congélation (-20°C) et de décongélation (37°C) permettent de détruire les membranes plasmiques des cellules surtout lorsqu'il s'agit d'une protéine ou d'une enzyme bactérienne. Durant la congélation des cristaux de glace se forment, ce qui provoque la désintégration de la membrane cellulaire.

b. Les Techniques chimiques et enzymatiques

Ces techniques regroupent la lyse ou choc osmotique, la modification de la force ionique ou du pH et la lyse enzymatique.

b. 1. La lyse ou choc osmotique

Le choc osmotique consiste à incuber les cellules fragiles dans une solution hypo osmotique (hypotonique), ce qui permet à l'eau d'entrer dans la cellule la fait gonfler jusqu'à ce que les membranes lipidiques se rompent et laissent passer leur contenu dans le milieu. L'éclatement des organites est l'inconvénient de cette technique.

b. 2. Modification de la force ionique ou du pH

La modification de la force ionique du milieu par addition des ions ou la modification du pH entraînent la rupture des membranes plasmiques de certains types cellulaires. Ces traitements peuvent rendre les membranes plus perméables aux constituants du milieu.

b. 3. Lyse enzymatique

Pour lyser la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique de plusieurs types de cellules (les levures, les plantes et les bactéries), différentes enzymes comme le lysozyme du blanc d'oeuf de poule ou la lyticase de *S. aureus* peuvent être utilisées.

1.3.2.2. Fractionnement cellulaires

Si l'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.

a. Principe de la séparation des organites cellulaires

Le fractionnement cellulaire est basé sur la différence de densité des organites. On peut à partir d'un homogénat cellulaire 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 :

$V = Kr^2(dp - dm)g$ 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
- dp = densité de la particule $d = (masse\ d'un\ vol.\ d'un\ corps\ x) / (masse\ du\ même\ vol.\ d'eau)$
- dm = densité du milieu
- g = accélération de la pesanteur

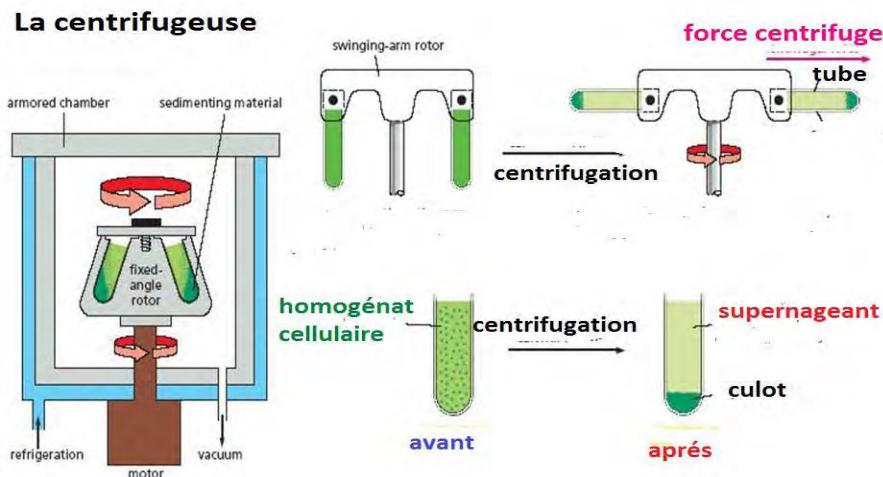
$Kr^2.(dp - dm)$ = coefficient de sédimentation dont l'unité est la seconde. Comme les valeurs des coefficients de sédimentation sont très petites, on les exprime plutôt en unités SVEDBERG (S) pour lesquelles 1 unité S = 10⁻¹³ seconde.

PREMIERE PARTIE : METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

Et comme, la différence de densité des organites de la cellule est très faible, ce qui impliquerait une séparation longue dans le temps. 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.

b. La centrifugation

Le principe de cette technique est que deux particules en suspension dans un liquide (cellules, organites, ou molécules) avec des masses ou des densités différentes gagneront le fond d'un tube à des vitesses très variable sous l'action d'une force centrifuge. Les molécules plus lourdes ou plus denses sédimentent ou descendront plus vite que les molécules plus légères ou moins denses. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant.



L'**ultracentrifugation** ont été construits afin d'obtenir des accélérations élevées c'est-à-dire des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 100.000g ou plus) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces :

- **La gravité** : C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.
- **La poussée d'Archimède**: C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut.
- Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en $x.g$ (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:
 - $g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$

où g est la force relative de centrifugation (RCF = Relative Centrifuge Force), r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et N (rotations par minute: rpm) exprime la vitesse de rotation

b.2. Types d'ultracentrifugation (Préparative et analytique)

Il existe deux principaux types :

b.2.1. L'ultracentrifugation différentielle (Ultracentrifugation Préparative)

On l'appelle ; ultracentrifugation différentielle car basée sur la différence de vitesse de sédimentation des organites, elle-même reposant sur différence de densité des organites ; et ultra pour désigner les faibles différences (comme pour ultrastructure) et utilisation d'accélérations importantes.

PREMIERE PARTIE : METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

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.

Exemple : Isolement des organites cellulaires. Tout d'abord au cours d'une première centrifugation, les constituants les plus lourds sont isolés. Puis, en augmentant la vitesse de sédimentation les constituants de densité croissante seront séparés (Figure 8).

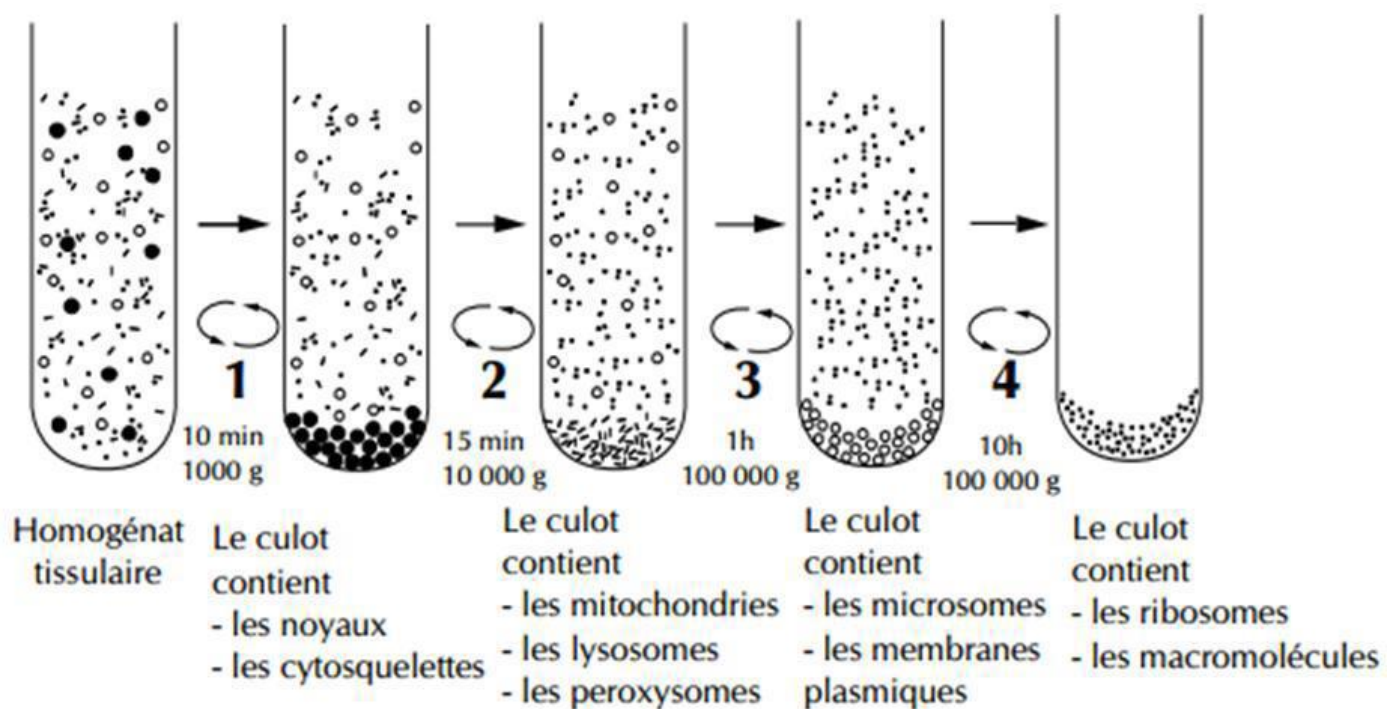


Figure 8. Différentes étapes de l'ultracentrifugation différentielle

b.2.2. L'ultracentrifugation en gradient de densité

Certains organites et macromolécules sédimenteront à des vitesses tellement voisines qu'ils sont très difficiles à séparer par une ultracentrifugation différentielle. C'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes. La technique d'ultracentrifugation sur gradient de densité (UGD) permet de séparer des organites cellulaires et même des petites particules biologiques présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques, et ce en fonction de leur densité.

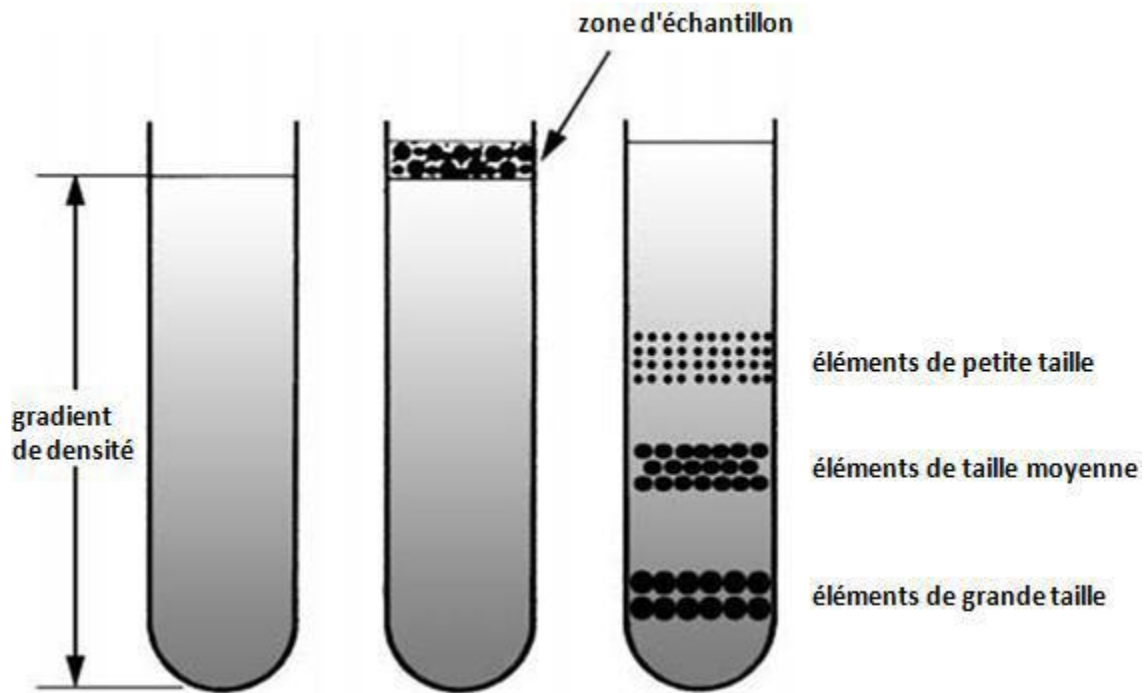


Figure 9 : Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité.

Généralement, un solvant est utilisé dont la densité va varier en fonction de la position dans le tube : on parle de gradient. La plupart du temps il s'agit de gradient de saccharose (solution concentrée). Après centrifugation, chaque constituant rejoindra la zone de densité équivalente à la sienne. Le contenu du tube peut être récupéré par fractions successives, souvent du bas vers le haut, pour utilisation ou analyse ultérieure.

2. Les méthodes

2.1 L'électrophorèse

C'est une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique.

Parmi les supports utilisés dans la technique d'électrophorèse, on note le gel de polyacrylamide donnant des bonnes résolutions lors de la séparation. Il existe deux types d'électrophorèse selon le sens de migration : électrophorèse horizontale et verticale

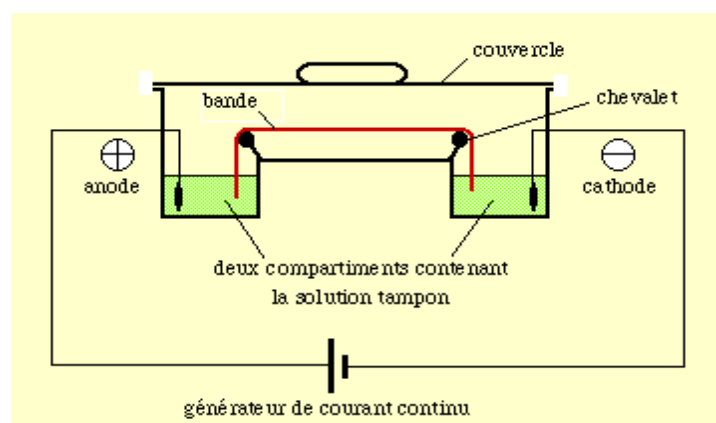


Figure 10. Chambre d'électrophorèse

2.2. Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

Elles sont appliquées soit à un mélange (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 et concernent les techniques d'extraction, de purification, de caractérisation et de dosage. En prend comme exemple les techniques d'extraction, de purification, et de dosage des protéines.

2.2.1. Extraction des protéines

L'extraction d'une protéine à partir d'un tissu commence par la destruction de l'organisation cellulaire (broyage) par des méthodes mécaniques, chimiques ou par l'action d'enzymes qui désorganisent les tissus. Le mélange résultant du matériel biologique ainsi brisé et du solvant appelé extrait brut ou homogénat. Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation : le matériel soluble est recueilli et lavé pour éliminer les petites molécules.

2.2.2. La purification

Diverses méthodes sont ensuite utilisées pour purifier une protéine particulière à partir du mélange.

En chimie, la purification est la séparation de substances chimiques dans le but de décontaminer des substances.

Il existe plusieurs moyens de purification :

- La Filtration : Basée sur le diamètre des particules solides de différentes tailles, qui sont dispersées dans un liquide.
- La centrifugation : Basée sur les différences de densités
- La chromatographie : Basée sur la différence de solubilité
- L'électrophorèse : Basée sur la charge.

2.2.3. Dosage des protéines (exemple de la technique de biuret)

Le **biuret** est un composé organique obtenu par condensation de deux molécules d'urée et élimination d'une molécule d'ammoniac.



En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre II (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Un dosage colorimétrique est donc possible à 540 nm. La molécule de biuret donne la même réaction que les protéines, c'est pourquoi la méthode a été nommée la méthode de biuret.

- Le réactif de coloration utilisé est **le réactif de Gornall**, composé :
 - ↳ De sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) qui donne la coloration bleue du réactif due aux ions cuivre (1,5 g).
 - ↳ D'une solution d'hydroxyde de sodium (soude) à 30 g, qui rend le milieu basique.
 - ↳ 6 g Sel de seignette (tartrate double de sodium et de potassium) qui « chélate » piège les ions Cu^{2+} et évite leur précipitation en milieu alcalin sous forme d'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble.
 - ↳ 1g d'iodure de potassium, pour éviter la réduction des ions cuivriques avant le dosage.
- **Préparation de la solution étalon** A partir d'une solution mère d'albumine (SAB) à 10 g/l, Suivez le tableau ci-dessous (2) pour préparer une gamme d'étalon de 5 tubes variant de 2 à 10 mg d'albumine par tube (les tubes 2 à 6, le tube 1 étant le témoin).

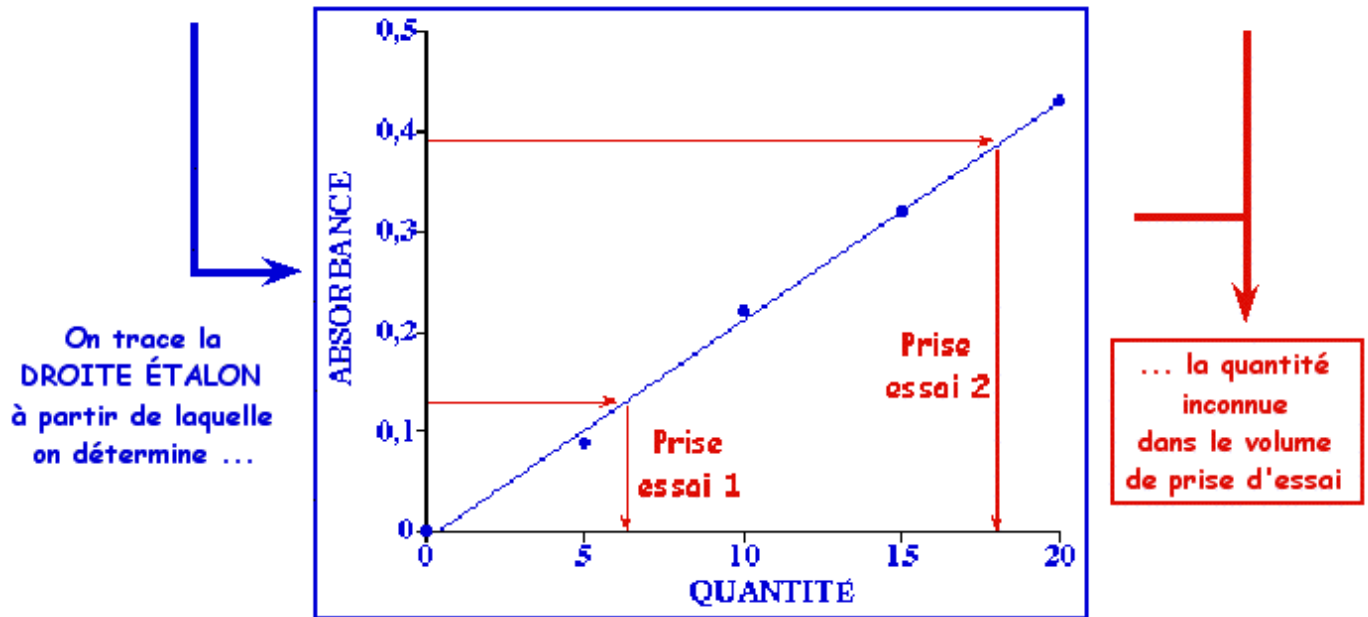


Figure 11. Courbe d'étalonnage $Abs = f(\text{quantité de protéines/tube})$.

2.3 Les méthodes cytochimiques

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

Différents exemples vont être donnés en illustration.

2.2.1. Localisation de polysaccharides : réaction à l'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 étapes.

L'acide périodique (IO_4H) est un oxydant qui coupe les liaisons 1-2 glycol, amino alcool des glucides et des glycoprotéines et forme des poly-aldéhydes. Ces aldéhydes sont ensuite combinés avec le réactif de Schiff (fuchsine acide) qui donne une couleur rouge pourpre avec les structures contenant les aldéhydes (figure 12).

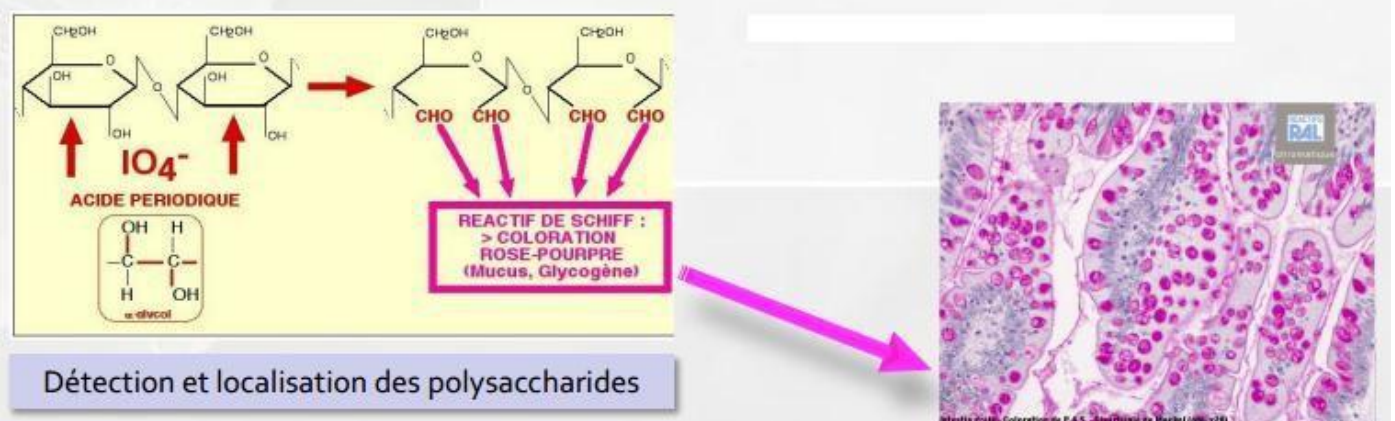


Figure 12. Réaction de localisation des polysaccharides.

2.2.2. Localisation d'acides nucléiques : test de Brachet

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 + rouge pyronine) :

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

PREMIERE PARTIE : METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

- L'emploi d'enzymes d'hydrolyse de façon spécifique soit l'ADN soit l'ARN, cas de DNase et RNase est nécessaire

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.

Résultat :

- noyau contient ADN (chromatine) et ARN (nucléole bien visible)
- 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).

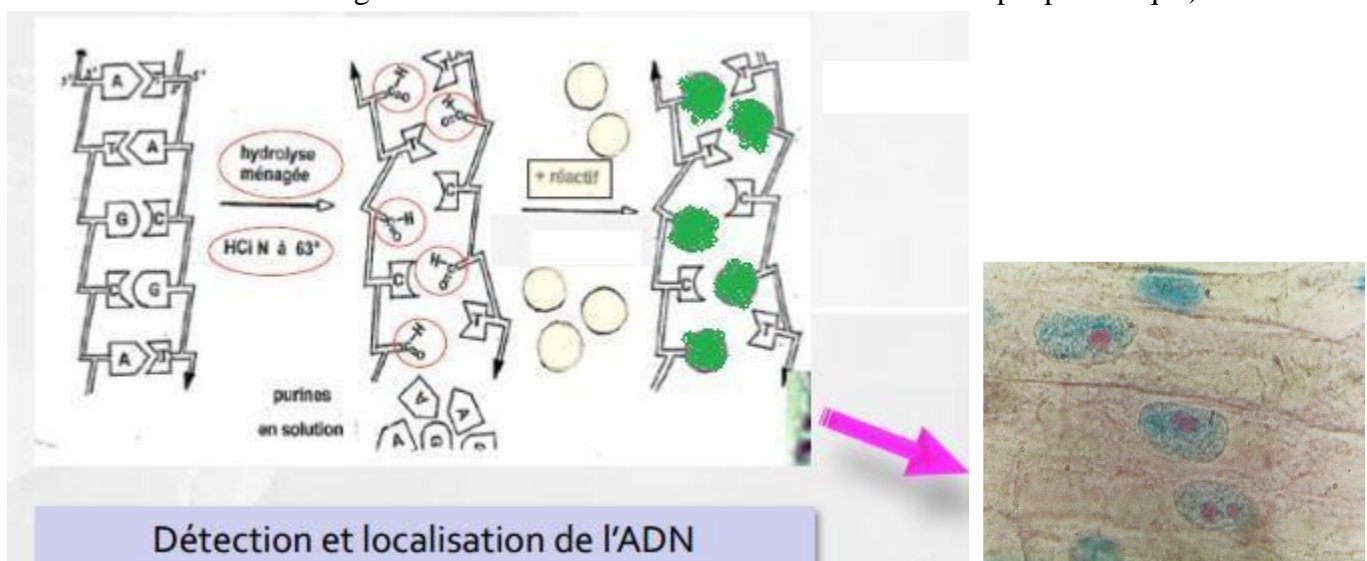


Figure 13. Réaction de localisation de l'ADN.

2.4. Immun cytologie/ immunologie technique (technique de localisation d'antigènes Ag)

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 étapes :

1. formation du complexe Ag-Ac = complexe immunitaire : la coupe est trempée dans un bain contenant l'anticorps primaire en solution.
2. révélation de la présence des complexes immunitaires : utilisation d'outils immunologiques marqués, appelé anti-anticorps = anti-immunoglobuline = anti-Ig = antiglobuline marquée secondaire. Il existe différentes façons de marquer les "anticorps révélateurs" :
 - par des enzymes capable de donner un produit coloré détectable ----> observation **en microscopie photonique par transmission.**
 - par des fluorochromes ----> **observation au microscope à fluorescence.**

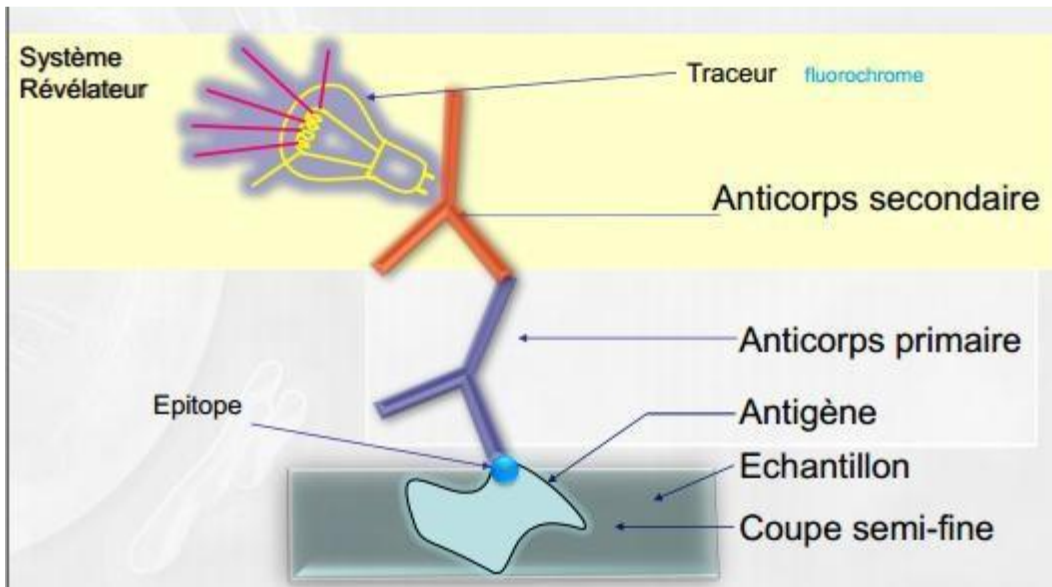


Figure 14. Technique de localisation d'antigènes Ag