

Chapitre 4 : LES TECHNIQUES D'ETUDE DE LA CELLULE

Plan du cours

1. Des tissus aux cellules
2. Des cellules aux organites
3. Des organites aux macromolécules
4. Analyses des macromolécules

Objectifs du cours

- Apprendre les principales techniques d'étude
- Connaitre l'intérêt de ces techniques en cytologie

Introduction

La biologie cellulaire est une discipline à la fois descriptive et expérimentale. La compréhension des mécanismes moléculaires permettant la réalisation des fonctions cellulaires est liée à la capacité d'intégrer des données expérimentales obtenues par différentes techniques. De nombreux instruments d'observation permettent de décrire des macromolécules biologiques et d'établir ainsi des approches fonctionnelles. Le protocole expérimental varie selon le but recherché.

1. Des tissus aux cellules

1.1. La fixation

Afin de réaliser une préparation qui puisse être colorée et observée à loisir au microscope, il faut tout d'abord traiter les cellules avec un fixateur pour les mobiliser, les tuer et les conserver. En termes chimiques la fixation rend les cellules perméables aux colorants et provoque la réticulation de leurs macromolécules, de sorte qu'elles sont stabilisées et figées en position. Certaines des premières techniques de fixation nécessitaient l'immersion dans des acides ou des solvants organiques comme **l'alcool**. Les procédés actuels comprennent habituellement le traitement par des aldéhydes réactifs, en particulier **le formaldéhyde** et **le glutaraldéhyde**, qui forment des liaisons covalentes avec les groupements aminés libres des protéines et relient ainsi des molécules adjacentes. On utilise aussi du **tétraoxyde d'osmium** OsO_4 . On peut aussi utiliser des fixateurs physiques tels que la chaleur et le froid (congélation brusque).

1.2. Les coupes au microtome

La plupart des échantillons tissulaires sont trop épais pour que leurs cellules puissent être examinées directement avec une grande résolution. Après fixation, les tissus sont donc habituellement découpés en tranches très fines (**coupes**), grâce à un microtome, un appareil muni d'une lame métallique tranchante, qui fonctionne un peu comme une machine à couper la viande. Les coupes (épaisses de 1 à 10 μm) sont ensuite étalées à la surface d'une lame de microscope en verre.

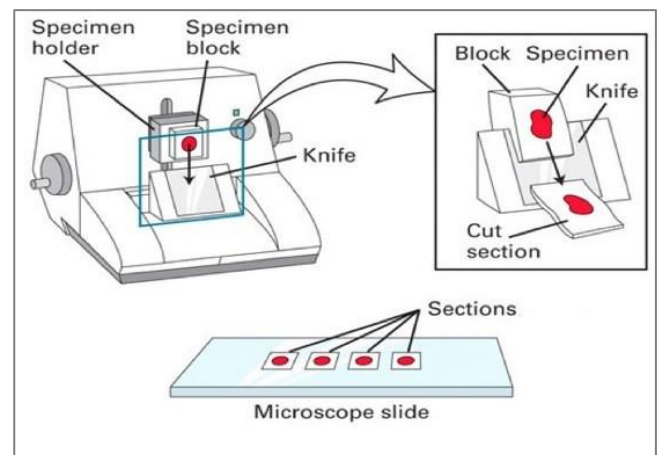


Fig. 1 : Technique de coupe au microtome.

Les tissus sont généralement mous et fragiles, même après fixation, et il est donc nécessaire de les **inclure** dans un milieu de support avant de les couper. Les milieux d'inclusion habituels sont des cires, des résines ou de la paraffine. Sous forme liquide, ces milieux vont imprégner et entourer le tissu fixé ; ils peuvent être ensuite durcis (par refroidissement ou polymérisation) en un bloc solide facilement débité par le microtome.

Le risque que le traitement utilisé pour la fixation et l'inclusion altère la structure de la cellule ou de ses molécules constitutives de façon indésirables est sérieux. Une autre méthode de préparation, la congélation rapide, permet, dans une certaine mesure, d'éviter la fixation et l'inclusion. Le tissu congelé peut être directement découpé avec un cryostat-un microtome spécial qui est maintenu dans une enceinte réfrigérée. Bien que les coupes à congélation obtenues de cette façon évitent certains artéfacts, elles présentent d'autres inconvénients ; les structures natives de molécules individuelles telles que les protéines sont bien conservées, mais la structure de la cellule est souvent désorganisée par des cristaux de glace.

Une fois les coupes réalisées, quelle que soit la méthode, leur coloration est habituellement l'étape suivante.

1.3. La coloration

La grande majorité des cellules dans leur état naturel, même fixées et colorées, sont presque invisibles au microscope photonique ordinaire. Une façon de les rendre visibles consiste à les traiter par des colorants.

On dispose d'un grand choix de colorants, qui portent des noms aussi pittoresques que **vert Malachite**, **noir Soudan** et **bleu de Coomassie**, dont chacun possède une affinité spécifique pour des composants intracellulaires particuliers. L'**hématoxyline** par exemple possède une affinité pour les molécules chargées négativement et qui met donc en évidence la répartition de l'ADN et de l'ARN dans les cellules ; Toutefois, la base chimique de la spécificité de nombreux colorants reste inconnue.

1.4. Le marquage cellulaire par des nanoparticules

Ce sont des particules métalliques qui se fixent sur des molécules organiques spécifiques. Les nanoparticules d'oxydes de fer se fixent *in vitro* sur des ligands spécifiques et les cellules deviennent ainsi détectables par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). C'est une technique non invasive permettant par exemple de visualiser les déplacements *in vitro* de cellules souches.

1.5. L'observation microscopique : La microscopie

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour retraitement.

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons et le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécapage etc....

1.5.1. Caractéristique du microscope

Le microscope est caractérisé par :

- **son grossissement ou puissance** : Egal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire. Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.
- **son pouvoir de résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

La résolution ou le pouvoir séparateur (PS) est définie comme étant la distance minimale séparant deux points individualisables. Chez l'homme le PS est de 0,1 mm à une distance de 25 cm. L'œil humain ne peut distinguer à 25 cm que deux objets distants l'un de l'autre que de 0,1 mm. Au-delà l'image des 02 objets sera unique ou nulle. Le PS du microscope optique est de 0,2 μm alors que celui du microscope électronique est de l'ordre de $\text{\AA}$

1.5.2. Principe de fonctionnement du microscope

Le microscope travaille en :

- **Transmission** : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).
- **Réflexion** : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet. Ce mode de microscopie est peu utilisé, il correspond aux loupes binoculaires ou stéréomicroscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

1.5.3. Conditions d'observation en microscopie

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : l'épaisseur de l'échantillon et le contraste.

- **L'épaisseur de l'échantillon** : pour une observation par transmission l'échantillon doit présenter une faible épaisseur afin de permettre le passage du faisceau incident des

photons ou d'électrons d'où la nécessité de faire des coupes très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm .

- **Le contraste :** L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui amplifient les contrastes naturels comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

1.5.4. Les microscopes optiques, à lumière ou photoniques

Ils utilisent la lumière visible et leur pouvoir séparateur ne peut dépasser 0,2 μm avec un grandissement maximum de 1000. Ils ont l'avantage de donner une vue générale des cellules ou des tissus et aussi de permettre l'examen de cellules vivantes. Ils permettent des observations sur la dynamique et l'organisation tridimensionnelle *in vivo* d'éléments subcellulaires en liaison avec des données d'immunolocalisation.

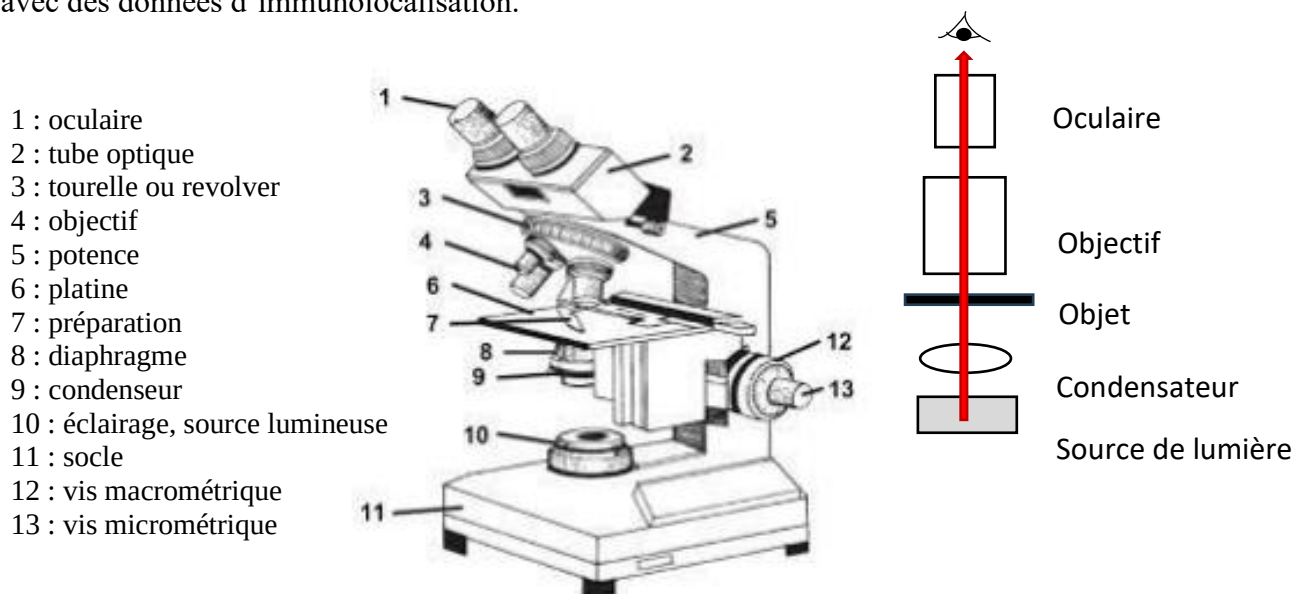


Fig. 2 : Schéma du microscope optique.

Il existe plusieurs variantes du microscope optique ayant chacun des montages optiques spéciaux. Le développement de ces microscopes répond principalement à deux objectifs : (i) augmenter les contrastes pour mieux visualiser les structures subcellulaires, (ii) améliorer le pouvoir de résolution (voir des détails de plus en plus petits).

1.5.4.1. Les microscopes par transmission

C'est le type de microscope le plus courant. Ils utilisent la lumière visible (lumière blanche constituée de plusieurs longueurs d'onde) qui est transmise directement sur la préparation biologique. Ce type de microscope est équipé de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer. Les échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.

1.5.4.2. Les microscopes à contraste de phase et les microscopes à contraste d'interférence différentielle

La possibilité de perte ou d'altération de certains composants cellulaires durant la préparation des échantillons n'a jamais cessé de préoccuper les microscopistes. La seule façon certaine d'éviter ce risque est d'examiner les cellules lorsqu'elles sont vivantes, sans fixation ou congélation. Ceci nécessite des microscopes possédant des systèmes spéciaux ou microscopes à contraste.

Lorsque la lumière passe à travers une cellule vivante, la phase de l'onde lumineuse est changée selon l'indice de réfraction de la cellule : la lumière traversant une partie relativement épaisse ou dense de la cellule, comme le noyau, est retardée et elle changera donc de phase par rapport à la lumière ayant traversé une région voisine plus mince du cytoplasme. Le **microscope à contraste de phase** et le **microscope à contraste d'interférence différentielle** exploitent tous les deux les effets d'interférence produits par la recombinaison de ces deux séries d'ondes, créant alors une image de la structure de la cellule. Ces deux types de microscope photonique sont largement utilisés pour observer les cellules vivantes.

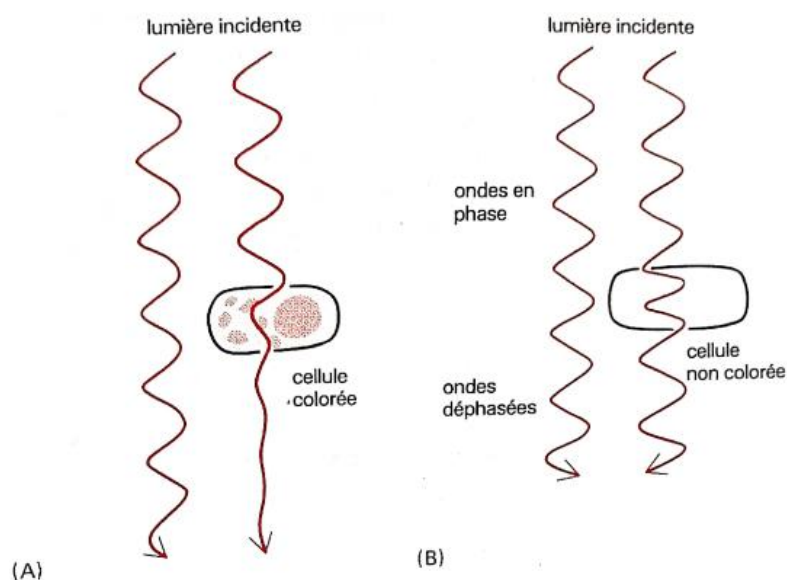


Fig.3 : Deux façons d'augmenter le contraste en microscopie photonique. (A) les régions colorées de la cellule réduisent l'amplitude d'ondes lumineuses de longueurs d'ondes particulières qui les traversent, donnant une image colorée de la cellule, visible de façon courante. (B) la lumière qui traverse la cellule vivante non colorée ne subit pas de variation d'amplitude importante mais la phase de la lumière est modifiée, et on peut rendre visibles de petites différences de phase en exploitant les effets d'interférence au moyen d'un microscope électronique à contraste de phase ou à contraste d'interférence différentielle.

1.5.4.3. Les microscopes à fond noir

Une façon plus simple de voir certains détails d'une cellule vivante consiste à utiliser la lumière dispersée par les divers composants cellulaires. Dans le microscope à fond noir, les rayons lumineux arrivent latéralement, de sorte que seule la lumière dispersée puisse pénétrer dans les lentilles du microscope. La cellule apparaît donc comme un objet lumineux sur un fond noir.

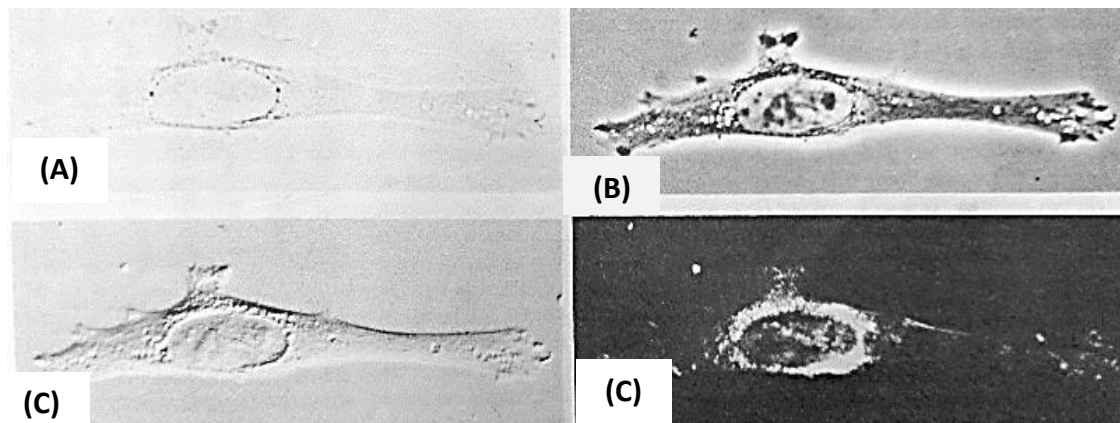


Fig. 4 : Un fibroblaste en culture tissulaire vu avec quatre types différents de microscopie photonique. (A) microscopie sur fond clair, (B) microscopie à contraste de phase, (C) microscopie à contraste d'interférence différentielle, (D) microscopie à fond noir.

1.5.4.4. Les microscopes à fluorescence

La microscopie en fluorescence est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle. Les microscopes à fluorescence nécessitent l'utilisation des rayons ultraviolets et permettent de détecter des structures naturellement fluorescentes ou marquées à l'aide d'un fluorophore. Deux fluorophores couramment utilisés sont *la fluorescéine*, qui émet une fluorescence intense jaune-vert lorsqu'elle est excitée avec une lumière bleue, et *la rhodamine*, qui émet une fluorescence rouge sombre, lorsqu'elle est excitée avec une lumière vert-jaune.

1.5.4.5. Les microscopes confocaux

Ce sont des microscopes optiques qui réalisent des images de faible profondeur de champ. Des séries d'images sont réalisées en positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux. A partir de ces images on obtient une image recomposée par ordinateur. Les microscopes confocaux utilisent une source laser (LASER signifie *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) où la lumière est amplifiée par l'émission simultanée de rayonnement. Le faisceau de lumière émis est très directif et monochromatique. Il peut transporter une intensité lumineuse très importante.

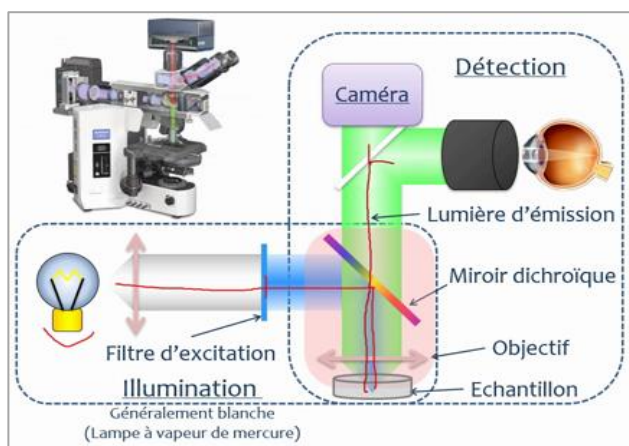


Fig.5 : Principe du microscope à fluorescence.

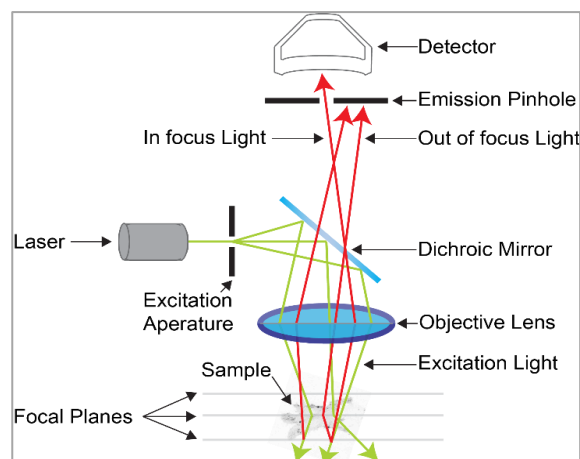


Fig.6 : Principe du microscope confocal.

1.5.4.6. Les microscopes à lumière polarisée

Il permet de détecter des structures biréfringentes qui ont une organisation moléculaire particulière, telles que les microtubules et les chloroplastes et parois des cellules végétales. Les photons lumineux passant à travers certains matériaux tels que les filtres Polaroid ou certains cristaux (Nicol) en ressortent "polarisés" : ils ne vibrent plus que dans un seul plan. Si un second filtre Polaroid ou un second Nicol est disposé sur leur trajet on peut par rotation de ce second filtre les arrêter complètement et obtenir l'extinction totale du faisceau (Nicol "croisés"). Si on place entre les deux filtres croisés un objet actif sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné, le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction. Un microscope à lumière polarisée est équipé d'un premier filtre au niveau du condenseur et un second filtre en position croisée dans le tube optique.

1.5.5. Les microscopes électroniques

Les microscopes électroniques permettent de distinguer la structure fine de la cellule. Ils reposent sur l'utilisation de faisceaux d'électrons et leur pouvoir séparateur est de 4 Å. Ils peuvent être à transmission (MET) ou à balayage (MEB).

La microscopie à transmission est utilisée sur des coupes fines. Les structures de l'objet étudié sont claires ou sombres selon qu'elles laissent ou non passer les électrons. Dans sa conception globale, le MET est semblable à un microscope photonique en lumière directe, bien qu'il soit plus grand et inversé. La source lumineuse est un filament ou cathode qui émet un faisceau d'électrons focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse. L'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent similaire à ceux qui équipent les téléviseurs noirs et blancs. Hormis le fait que les absorbeurs d'électrons sont des métaux lourds les mêmes techniques de révélation que pour la microscopie en lumière directe peuvent être utilisées.

Alors que le MET utilise les électrons qui traversent l'échantillon pour former une image, le MEB utilise les électrons qui sont diffusés ou émis par la surface de l'échantillon. L'échantillon étudié est fixé, déshydraté, et recouvert d'une fine couche de métal lourd, puis balayé par un faisceau très étroit d'électrons. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image. Bien que de résolution soit plus faible que celle du MET (son pouvoir séparateur est plus faible que celui du MET), le MEB permet de gagner en profondeur de champ, donnant des images absolument spectaculaires en pseudo 3D des surfaces cellulaires.

1.6. L'imagerie par résonance magnétique ou IRM

Le signal est constitué d'ondes électromagnétiques de longueur d'onde élevée et la discrimination spatiale est obtenue en analysant la fréquence du signal. Cette dernière est proportionnelle à la position de l'échantillon en présence de gradients de champ magnétique. Cette technique permet d'observer certaines structures tissulaires mais n'atteint pas une résolution cellulaire.

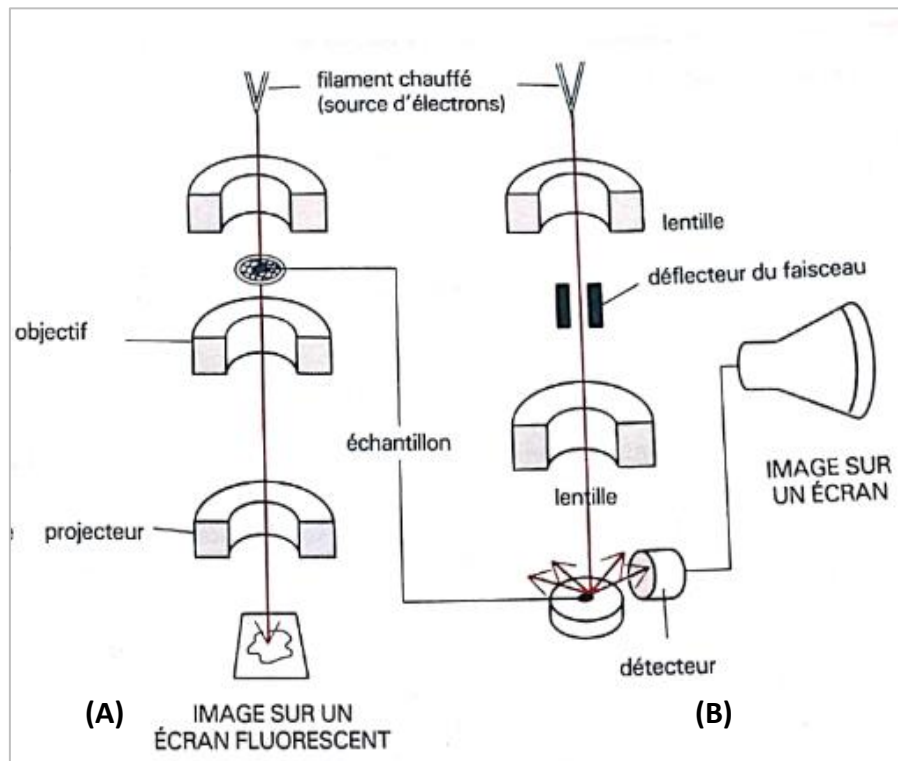


Fig.7 : Schéma du microscope électronique, (A) à Transmission, (B) à Balayage.

Tableau 1 : Comparaison entre microscope électronique et microscope photonique ME

M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
*grossissement : de 25 à 1500 fois *pouvoir séparateur : environ $0.2\mu\text{m}$ * préparation est traversée par des photons *longueur d'onde : $0,4$ à $0,8\mu\text{m}$ *lentilles sont en verre *image : est reçue directement *les coupes au microtome : 2 à $10\mu\text{m}$		* grossissement : 1500 à 200000 fois * pouvoir séparateur : $10\text{\AA}$ * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de $0,05\text{\AA}$ * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : $0,05\mu\text{m}$
Avantages		
* on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles		* on peut voir la structure fine de la cellule * on atteint très souvent le niveau moléculaire * a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux)
Inconvénients		
* on ne peut pas pousser l'analyse assez loin		* la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble - des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
* l'unité est le micromètre ou micron (μm) $1\mu\text{m} = 10^{-3}\text{ mm}$		* l'unité est le nanomètre (nm) $1\text{nm} = 1\text{ millimicron} = 10^{-6}\text{ mm}$ ou 10^{-9} m

1.7. La cryométrie en flux

Cette technique permet l'analyse de cellules en suspension dans un flux liquidien passant rapidement devant un faisceau laser. La lumière diffusée et émise est ensuite détectée par une série de capteurs et les données qui en résultent sont analysées par un ordinateur.

La cryométrie en flux permet de mesurer la taille des cellules, leur granularité ou l'intensité d'un marquage moléculaire par un fluorochrome. Elle permet également de quantifier de l'ADN et d'étudier ainsi les cycles cellulaires ou la multiplication de cellules tumorales.

1.8. Culture de cellules

La culture de cellules donne des populations de cellules génétiquement et physiologiquement stables. Elle permet d'étudier *in vitro* (milieu stérile, facteurs de croissance, T° idéale.) ou *in vivo*, le comportement dans des conditions expérimentales d'un fragment de tissu vivant (explant), de cellules dissociées (cellules embryonnaires, lignées cellulaires) ou de cellules isolées (microorganismes procaryotiques : bactéries, cyanophycées ; ou eucaryotiques unicellulaires : protistes, algues, champignons).

L'obtention de lignées mutantes et la possibilité de mettre en œuvre des démarches de la génétique classique et moléculaire permettent de « décortiquer » un grand nombre de fonctions capitales dans la vie des cellules : cycle cellulaire, synthèse et sécrétion des protéines

2. Des cellules aux organites : Le fractionnement cellulaire

La lyse des membranes cellulaires par broyage mécanique (cas de cellules végétale) et à l'aide de détergents ou de lysozymes (cas de cellules animales) permet d'extraire les organites et les macromolécules. Ceux-ci sont ensuite ultra-centrifugés. La séparation des constituants peut alors se faire par centrifugation.

2.1. La centrifugation en gradient de densité

La vitesse de sédimentation d'une cellule, d'un organite ou d'une macromolécule dépend de la différence entre sa densité et celle du milieu environnant. Cette dernière varie en fonction de la concentration d'un produit chimique soluble dans l'eau ; le saccharose et des polymères de glucose sont utilisés pour la séparation de cellules et le chlorure de Césium (CsCl) pour celle des acides nucléiques.

La vitesse de sédimentation est modifiée en faisant varier la différence de concentration du milieu ambiant et en créant un gradient de concentration.

Une particule donnée a une vitesse spécifique de sédimentation lors d'une centrifugation, du fait de sa masse, de sa densité et de sa morphologie. Cette caractéristique de sédimentation est exprimée en unités Svedberg (S).

2.2. La centrifugation différentielle

Elle permet la séparation d'organites et de macromolécules en fonction de leur taille, par une succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissants.

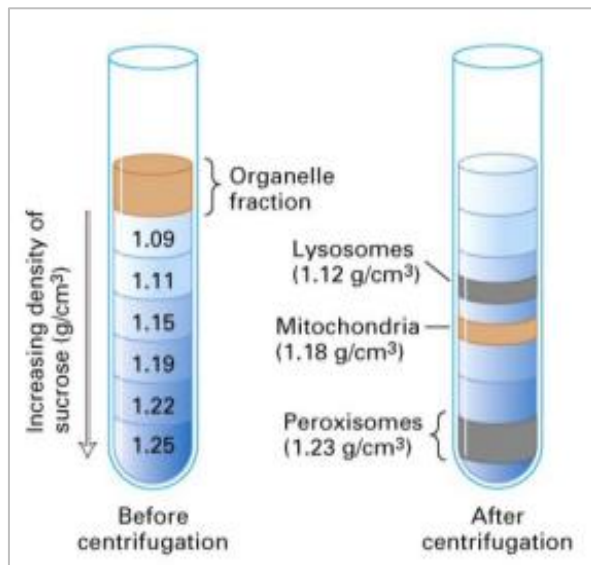


Fig.8 : Centrifugation en gradient de densité

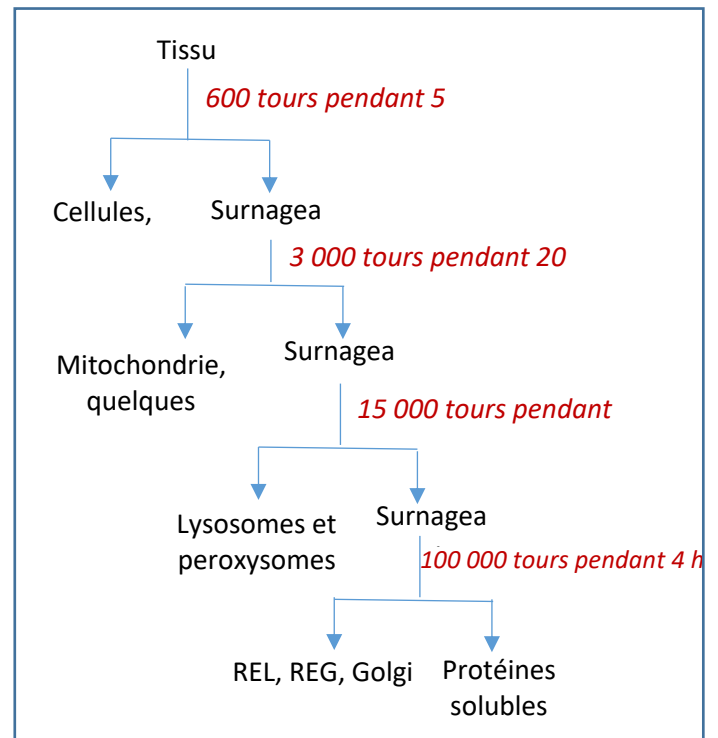


Fig. 9 : Schéma du principe de la centrifugation différentielle.

3. Des organites aux macromolécules

3.1. La microscopie électronique par ombrages métalliques

Les ombrages métalliques permettent l'examen des caractéristiques de surface par microscopie électronique à transmission avec une grande résolution. Une fine couche d'un métal lourd tel que la platine est vaporisée sur l'échantillon déshydraté. Le métal est vaporisé de biais, de sorte que la couche déposée soit plus mince en certains endroits qu'en d'autres. Ce processus est appelé **ombrage** car un effet d'ombre est créé, qui donne à l'image un aspect tridimensionnel. Certains échantillons ombrés de cette façon sont suffisamment minces ou suffisamment petits pour que le faisceau d'électrons les traversent directement ; c'est le cas de molécules isolées, de virus et de parois cellulaires. Mais, pour des échantillons plus épais, le matériel organique de la cellule doit être éliminé par dissolution après ombrage de sorte que seule subsiste la mince réplique métallique de la surface de l'échantillon. La réplique est consolidée par un film de carbone et peut ainsi être placée sur une grille et examinée, de la manière habituelle, avec le microscope électronique à transmission.

3.2. La microscopie électronique par coloration négative

Bien que les macromolécules isolées, telles que l'ADN ou de grosses protéines, puissent être visualisées facilement en microscopie électronique si elles sont ombrées par un métal lourd pour créer un contraste, on peut les voir de façon plus détaillée en utilisant la coloration négative. Dans ce cas, les molécules déposées sur un mince film de carbone (qui est presque transparent aux électrons) sont lavées avec une solution concentrée d'un sel de métal lourd comme l'acétate d'uranyle. Une fois l'échantillon séché, un film très mince de sel de métal recouvre tout le support de carbone, excepté là où se trouve la macromolécule adsorbée. Les

macromolécules étant beaucoup plus perméables aux électrons que la coloration métallique environnante, on obtient une image inverse ou négative de la molécule. La coloration négative est particulièrement utile pour voir des agrégats macromoléculaires de grande dimension comme les virus ou les ribosomes, et pour observer l'agencement des sous-unités dans les filaments protéiques.

3.3. La microscopie électronique par cryofracture et cryodécapage

La cryofracture a pour but de localiser des protéines membranaires. La fracture réalisée suit le milieu de la bicouche lipidique car il offre un minimum de résistance.

Le principe de la cryofracture est **la congélation ultra rapide d'échantillons de très petite dimension dans de l'azote ou du propane liquide afin de les figer tout en conservant les propriétés structurales**. Les échantillons sont ensuite fracturés afin de réaliser une empreinte de la surface pour analyser la structure interne.

Les étapes sont les suivantes :

- L'échantillon est d'abord vitrifié dans de l'azote liquide à -170 °C ou du propane liquide à -200 °C ;
- La fracture est réalisée au niveau de la zone hydrophile de la bicouche lipidique ;
- Un gaz de particules de platine et de carbone est projeté sur la surface fracturée ;
- Une réplique est obtenue par dépôt de métal avec une épaisseur variant selon le relief ;
- Afin d'obtenir une plus grande résistance, du carbone est vaporisé ;
- L'échantillon est étudié en microscopie électronique à transmission.

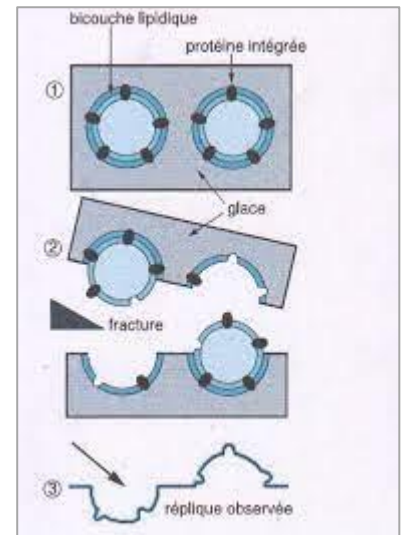


Fig. 10 : Principe de la cryofracture

Une autre technique importante et voisine est **le cryodécapage** qui peut être utilisé pour examiner l'extérieur comme l'intérieur des cellules. Dans cette technique, les cellules sont aussi congelées à très basse température, et le bloc congelé est fracturé avec la lame d'un couteau. Mais cette fois, le niveau de glace est abaissé autour des cellules (et dans une moindre mesure, à l'intérieur de la cellule), par la sublimation de la glace dans le vide lorsqu'on augmente la température (un procédé appelé lyophilisation). Les parties de la cellule mises à nu par le procédé de cryodécapage sont ensuite ombrées par évaporation de platine pour donner une réplique, comme précédemment.

3.4. L'électrophorèse

C'est une technique permettant la séparation et la caractérisation, dans un champ électrique, de macromolécules telles que les protéines et les acides nucléiques, en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge électrique. Sur les acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements phosphate du squelette. La charge d'une protéine dépend elle, de sa composition en acides aminés et du pH du milieu dans lequel elle se trouve.

On distingue :

- L'électrophorèse en veine liquide

Le support est constitué par une solution tampon dont les ions conduisent le courant, fourni par un générateur de courant continu, d'un pôle à l'autre.

La technique permet de réaliser des mesures optiques à travers le tube en U. On peut ainsi vérifier la pureté de protéines.

- L'électrophorèse de zones

Elle utilise un support poreux, homogène et au maximum inerte, stabilisant la phase liquide. Les différents types d'électrophorèses de zones sont dénommés en fonction du type de support utilisé : **les électrophorèses sur gel de polyacrylamide** (SDS-PAGE, électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide) ou **sur gel d'agarose**. Ce type d'électrophorèse est utilisé pour différencier les différentes classes de protéines sériques : β , γ , α_2 , α_1 .

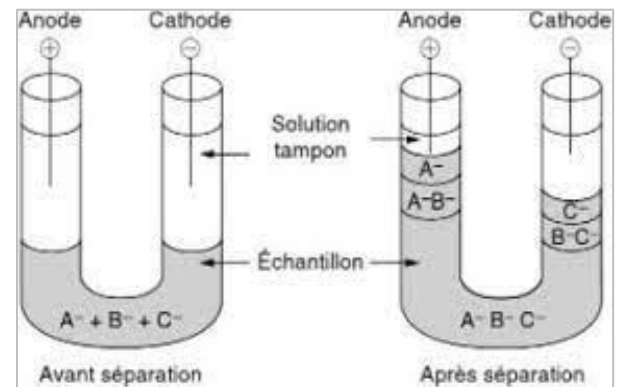


Fig.11 : Principe de l'électrophorèse en veine liquide

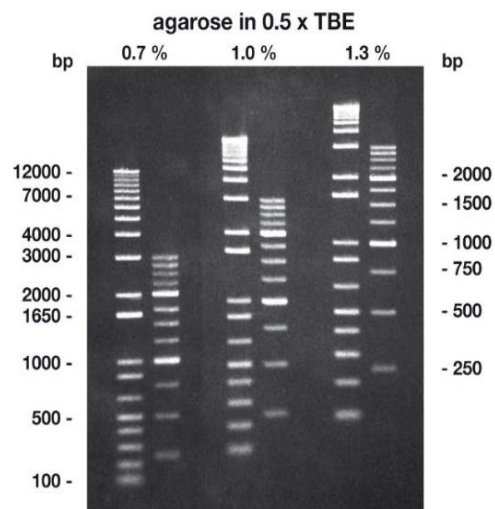
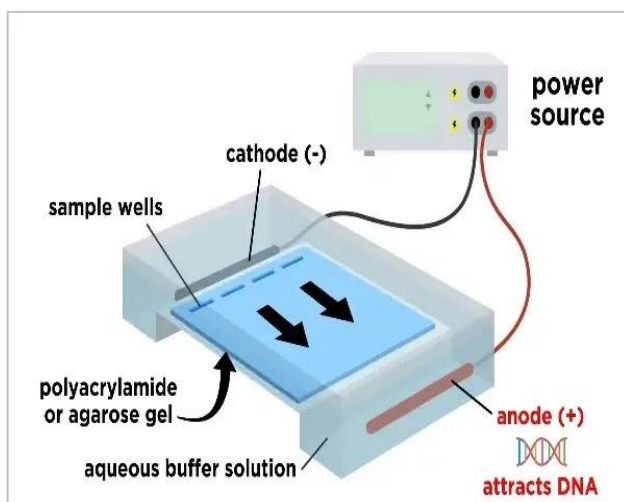


Fig.12 : Principe de l'électrophorèse sur gel

3.5. La chromatographie

La chromatographie, une technique développée à l'origine pour séparer des petites molécules, comme les oses et les acides aminés, est l'une des méthodes les plus généralement employées pour le fractionnement des protéines. On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

La phase mobile en chromatographie peut être :

- soit un gaz (**chromatographie en phase gazeuse**), la phase mobile est alors appelée **gaz vecteur** ou **gaz porteur** ;
- soit un liquide (**chromatographie sur papier, couche mince ou colonne**), la phase mobile est alors appelée **éluant**.

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (**chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC**) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (**chromatographie sur couche mince ou CCM**).

3.5.1. Chromatographie de partage

Une goutte de l'échantillon est déposée sur une feuille d'un papier absorbant (dans la **chromatographie sur papier**) ou sur une plaque de plastique ou de verre recouverte d'une mince couche d'un matériel absorbant inerte comme la cellulose ou un gel de silice (**chromatographie en couche mince**). On laisse ensuite un mélange de solvants, composé par exemple d'eau et d'un alcool, imprégner la feuille à partir d'un bord. En migrant à travers la feuille, le liquide sépare les molécules de l'échantillon selon leur solubilité relative dans les deux solvants. Les solvants sont choisis de telle façon que l'un d'eux soit adsorbé plus fortement que l'autre par le matériel absorbant et forme une couche de solvant immobile à la surface de la feuille. Dans chaque région de la feuille, les molécules s'équilibrent entre le solvant immobile et le solvant en migration : celles qui sont les plus solubles dans le solvant fortement adsorbé passent plus de temps dans la couche immobile et sont retardées par rapport à celles qui sont les plus solubles dans l'autre solvant et qui migrent plus rapidement. Plusieurs heures après, la feuille est séchée et colorée afin de repérer l'emplacement des différentes molécules.

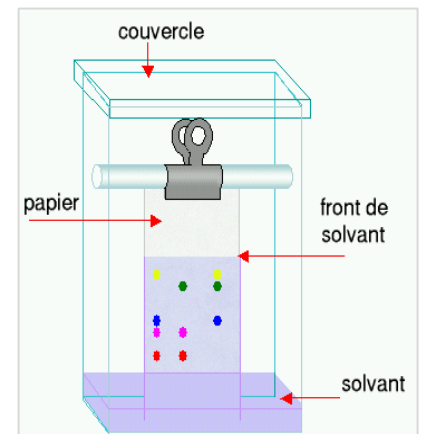


Fig.13 : Principe de la chromatographie sur papier.

3.5.2. Chromatographie sur colonne

On fait passer l'échantillon (mélange de protéines en solution) à travers une colonne contenant une matrice poreuse. Les différentes protéines sont retardées à des degrés différents par leur interaction avec la matrice et peuvent ainsi être collectées séparément, dans leur état natif fonctionnel, au fur et à mesure qu'elles s'écoulent au bas de la colonne. Suivant le choix de la matrice, les protéines peuvent être séparées selon leur charge (**chromatographie par échange d'ions**), leur hydrophobicité (**chromatographie par hydrophobicité**), leur taille (**chromatographie par filtration sur gel**), ou leur capacité à se fixer à des groupements chimiques particuliers (**chromatographie d'affinité**).

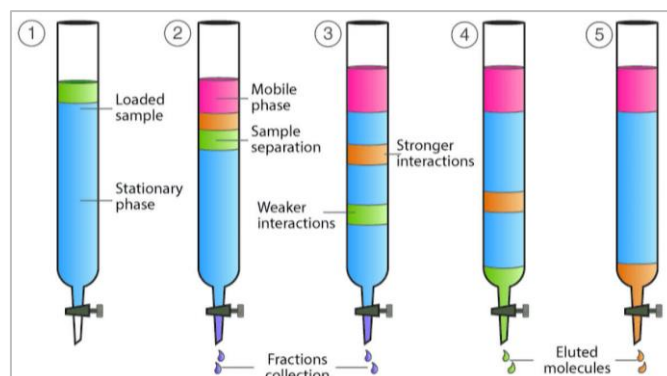


Fig. 14 : Principe de la chromatographie sur colonne.

3.6. Le dosage spectrophotométrique

Il permet de déterminer la concentration massique d'une solution. Les spectrophotomètres mesurent la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée, appelée **absorbance**, par les molécules en solution. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration de la substance. Après établissement d'une droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration, on peut ainsi déterminer des concentrations inconnues, notamment de protéines en solution.

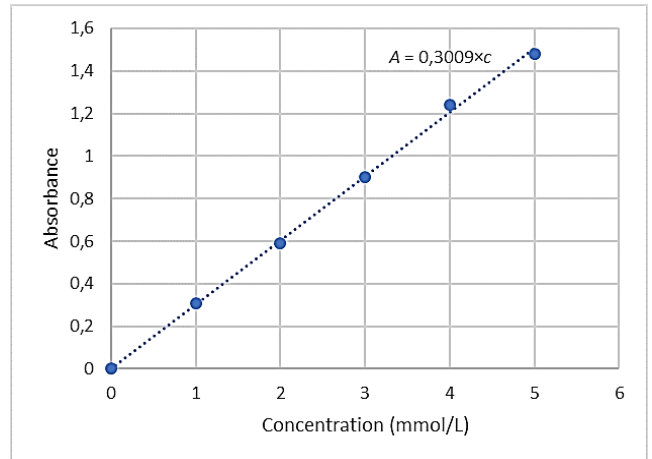


Fig. 15 : Courbe d'étalonnage

4. Analyse des macromolécules

4.1. Le clonage de l'ADN

Le clonage consiste en l'isolement et l'amplification d'une séquence donnée d'ADN. Le clonage nécessite donc l'insertion de la séquence à cloner dans un vecteur pouvant être répliqué. Ces vecteurs peuvent être :

- Des plasmides se répliquant de manière autonome dans des bactéries hôtes ; on peut y insérer des fragments d'une taille inférieure à 15 kb.
- Des cosmides qui utilisent les propriétés d'intégration du génome des phages sans donner naissance à des particules infectieuses ; ils permettent d'insérer des fragments dont la taille peut atteindre 100 kb
- Des chromosomes artificiels de levure.

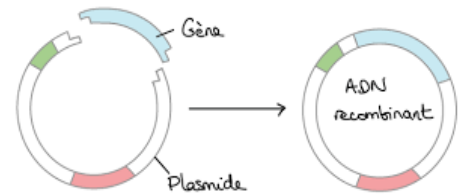


Fig. 16 : Le clonage de l'ADN

4.2. Le Southern blot

Cette technique permet d'analyser la structure d'un gène (ADN) à partir d'un fragment de celui-ci. Elle repose sur l'utilisation de deux outils : les enzymes de restriction et les sondes.

Les enzymes de restriction

Elles coupent l'ADN en des sites spécifiques. Les fragments obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose puis fixés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose.

Les sondes

Ce sont des fragments d'ADN complémentaires de la séquence recherchée, radioactifs ou couplés à un anticorps. Après reconnaissance de la séquence, l'ensemble est détecté par autoradiographie ou réaction immunologique.

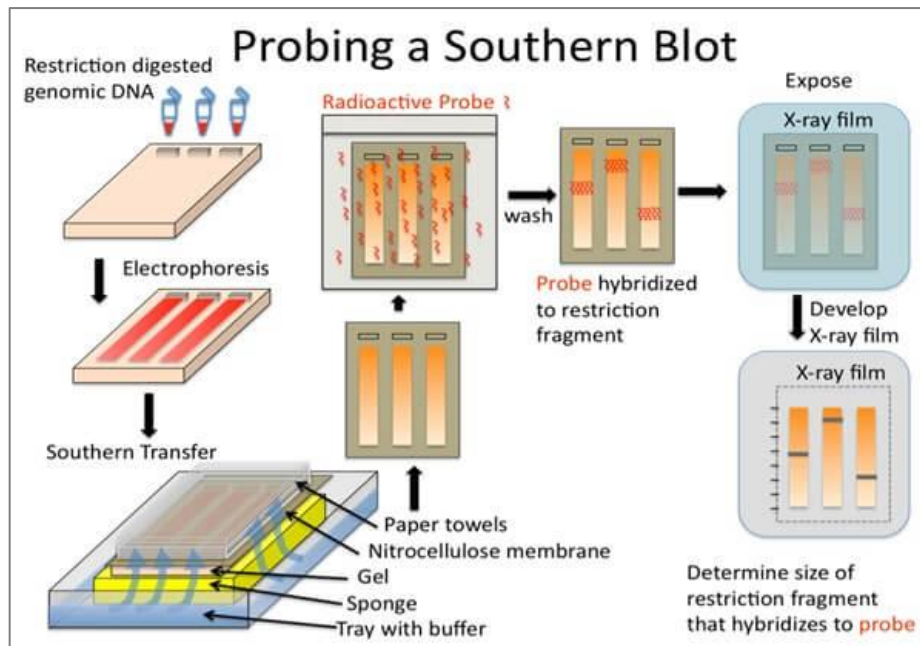


Fig. 17 : Schéma du principe du Southern blot.

4.3. Le marquage radioactif : l'autoradiographie

Les radioisotopes sont employés pour suivre les molécules dans les cellules et les organismes. L'expérience type consiste à fournir aux cellules un précurseur sous sa forme radioactive, de sorte que les molécules radioactives se mêlent aux molécules préexistantes non marquées. Les rayonnements émis par l'isotope radioactif peuvent ainsi être repéré par l'utilisation d'une émulsion photographique.

Technique :

- On fournit à l'organisme un composé radioactif (contenant le plus souvent du ^{14}C ou du ^3H = 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. C'est le « **chase** ».
- 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).

4.4. L'immunomarquage ou immunocytochimie

L'immunomarquage permet l'identification *in situ*, sur coupe histologique, d'un antigène cellulaire ou tissulaire. La technique est basée sur une réaction spécifique « Antigène-Anticorps » utilisant des anticorps mono ou polyclonaux. Ces anticorps peuvent être conjugués à une substance fluorescente (détectée par immunofluorescence), à une molécule radioactive (détectée par radioactivité), à une enzyme qui réagit à son substrat en donnant une coloration facile à observer au microscope optique en lumière blanche ou ultraviolette (cytoenzymologie), ou à une particule opaque aux électrons (pour la MET).

Cette méthode permet d'identifier des protéines caractéristiques de l'expression de tumeurs : la kératine dans les lymphomes malins, des facteurs protéiques intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, et des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone dans les cancers du sein.

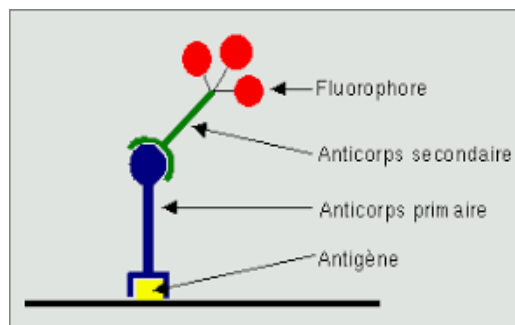


Fig. 18 : Schéma du principe de l'immunomarquage.

4.5. La diffraction aux rayons X

Contrairement à la lumière visible, ou aux faisceaux d'électrons, les rayons X ne peuvent être focalisés après leur passage au travers d'un échantillon pour former une image de type habituel. Au lieu de cela, la structure du spécimen est déduite par la technique de diffraction des rayons X.

La diffraction permet de déterminer la structure tridimensionnelle d'une molécule. Elle est fonction de la propriété des rayons X d'être diffractés lorsqu'ils rencontrent des obstacles. Selon l'espacement et la disposition des atomes, les rayons seront déviés de manière différente. Ex structure en double hélice de la molécule d'ADN par la cristallographie de diffraction de rayons X.