

Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule TD N°3 : Fractionnement cellulaire, Autoradiographie et Immunofluorescence

I- Fractionnement cellulaire

La technique de fractionnement cellulaire consiste à **séparer les différents composants de la cellule**, afin **d'analyser leur structure et leur fonction**. Elle comporte deux étapes :

- **Homogénéisation** : broyage des cellules
- **Purification** : séparation des organites cellulaires par centrifugation ou ultracentrifugation.

1-1- Homogénéisation (ou broyage) [Figure1]

L'homogénéisation consiste à détruire la membrane plasmique (plus la paroi pour les cellules végétales et fongiques). Cette étape conduit à un **homogénat** (broyat cellulaire) contenant tous les constituants de la cellule.

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

Pour obtenir un **homogénat**, on place les cellules dans un tube à essai contenant une **solution isotonique**, cette suspension sera fractionnée par l'un des traitements suivants :

- **Mécanique** : broyage par un **piston**.
- **Physique** : avec des **ultrasons** ou **haute pression**.
- **Chimique** : avec des **détergents** (acides ou basiques) ou par des **enzymes**.

Le milieu de broyage doit répondre à des exigences chimiques et osmotiques : son **pH est neutre** et **sa composition ionique aussi voisine que possible de celle du cytoplasme**. On considère qu'une solution de saccharose 0.25 M est isotonique vis-à-vis de la plupart des organites vésiculaires.

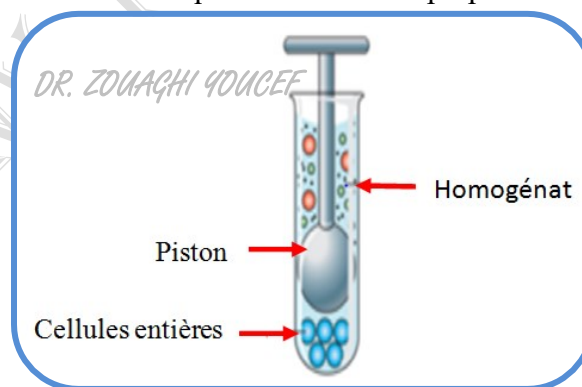


Figure 1 : Homogénéisation mécanique par un piston

1-2- Purification

La purification consiste à **séparer les structures cellulaires** en fractions pures par une technique de **centrifugation** (ou **ultracentrifugation**).

Il y a deux types de centrifugation :

- Centrifugation différentielle
- Centrifugation sur gradient de densité

➤ **Centrifugation différentielle** [Figure2]

- L'homogénat cellulaire est soumis à une **succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissantes**.
- On fractionne l'extrait initial en une **série de culots et de surnageants**.
- La vitesse de sédimentation des particules (organites, macromolécules,...) dépend de leur **taille**, de leur **forme** 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).
- La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** donné en unité **Svedberg (S)**.

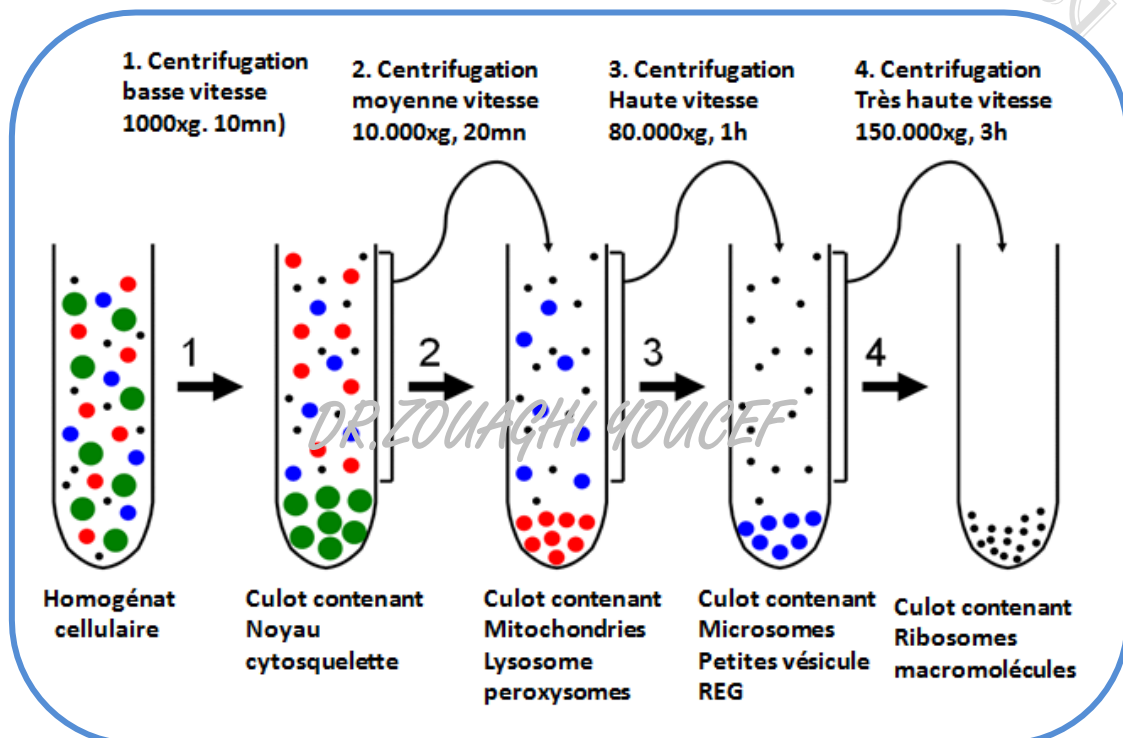


Figure 2 : Fractionnement cellulaire par centrifugation et ultracentrifugation différentielle

➤ **Centrifugation sur gradient de densité** [Figure3]

- Cette technique permet de séparer en **une seule fois** des organites et même des petites particules biologiques qui ont des **vitesse de sédimentation très voisines**.
- La centrifugation par gradient de densité consiste à déposer une couche mince d'homogénat au-dessus de la solution de saccharose dont la **concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut**.
- Après centrifugation, chaque élément de l'échantillon se concentre en une zone du tube dont la densité est égale à celle de l'élément, on obtient ainsi **différentes bandes** (la couche la plus dense étant au fond).

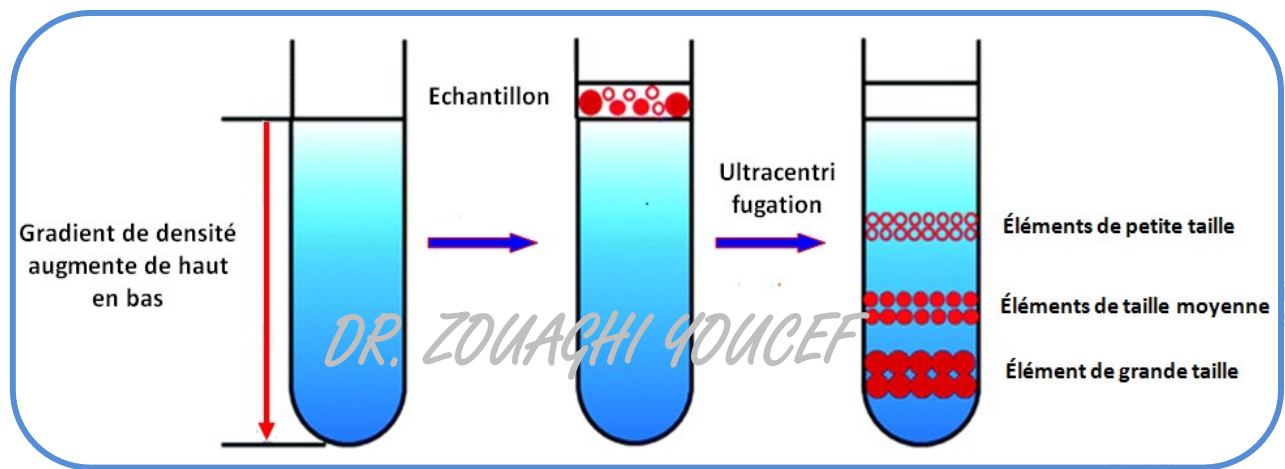


Figure 3 : Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité

2- Autoradiographie [Figure 4]

La technique d'autoradiographie repose sur l'utilisation d'un précurseur métabolique marqué par un isotope radioactif (métabolite renfermant un atome radioactif), qui peut émettre des rayonnements révélés par une émulsion photographique.

Cette technique permet de déterminer le lieu de formation de la molécule, de suivre leur trajet et sa transformation dans la cellule.

➤ Les étapes

- Injection d'une substance radioactive (contenant le plus souvent du C14 ou du H3 = tritium) dans un organisme ou organe. Des cellules peuvent également être incubées dans un milieu contenant cette substance radioactive.
- On sacrifie l'organisme et l'on réalise des coupes dans les tissus à étudier, ou on prélève les cellules en culture. On fixe l'échantillon et les composants radioactifs non incorporés sont éliminés par lavage.
- Recouvrir l'échantillon par une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'argent «BrAg»). 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 le BrAg en Ag métallique.
- Après le développement, on observe à l'aide du microscope la présence des grains d'argent denses situés au dessus des structures contenant l'élément radioactif (localisation des molécules ayant incorporé l'élément radioactif).

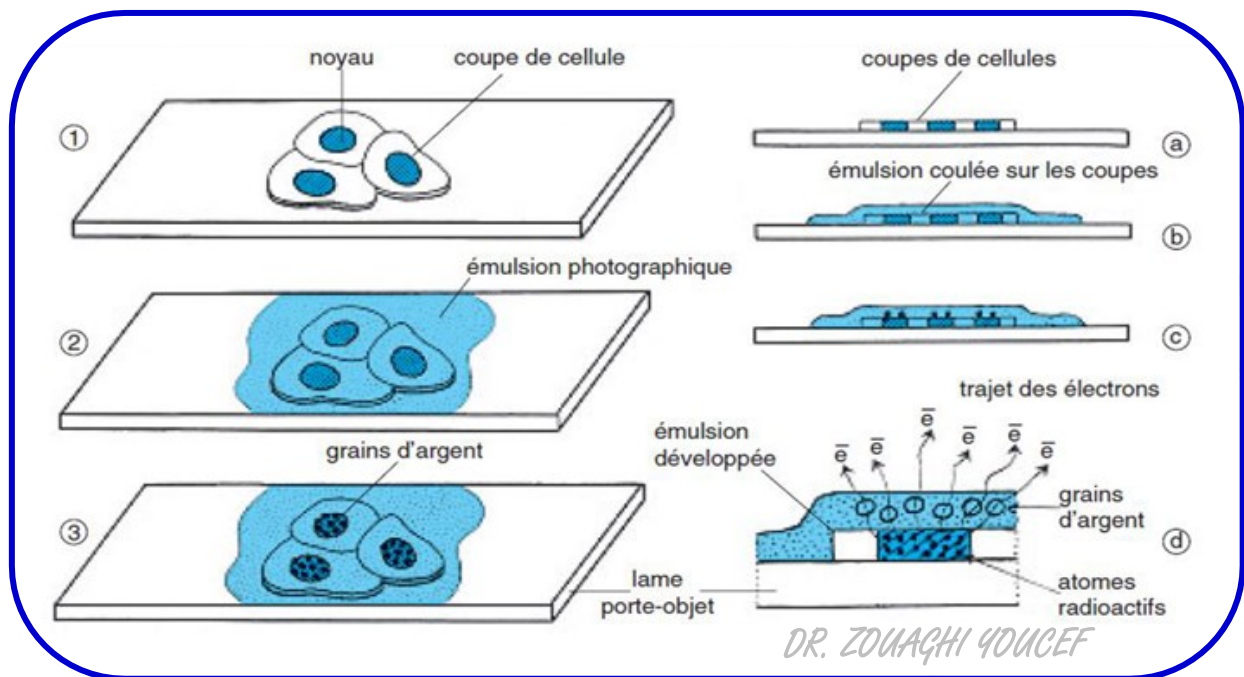


Figure4 : Principe de l'autoradiographie

La technique est ici appliquée à des coupes traitées pour la microscopie photonique. Les cellules analysées ont incorporé, avant le traitement, un précurseur radioactif spécifique de l'ADN (thymidine tritiée), de sorte que seuls les noyaux apparaîtront marqués après développement de l'émulsion. (1) Coupes de cellules marquées collées sur une lame de verre. (2) Coulage d'une émulsion photographique à l'obscurité (3) Aspect des coupes de cellules après développement de l'émulsion. (a), (b) et (c) : aspect en coupe des préparations 1, 2 et 3 ; (d) : secteur agrandi de (c).

3-L'immunofluorescence [Figure 5]

La technique d'immunofluorescence utilise des anticorps spécifiques et des fluorochromes pour visualiser les molécules biologiques dans les préparations cellulaires ou tissulaires. La lecture nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence.

➤ Les étapes

Pour détecter une substance P dans une cellule, on devra suivre les étapes suivantes :

- Une protéine P est prélevée d'une souris et injectée à un lapin, celui-ci réagit en produisant des anticorps anti-P.
- Fixer une substance fluorescente (fluorescéine) sur l'anticorps anti-p.
- Après avoir ajouté les anticorps marqués à la préparation cellulaire, ils se fixent sur la l'antigène P en formant le complexe antigène P-anticorps fluorescent.
- L'observation sous UV au microscope à fluorescence permet la localisation de la substance P, grâce à la fluorescence émise par la fluorescéine.

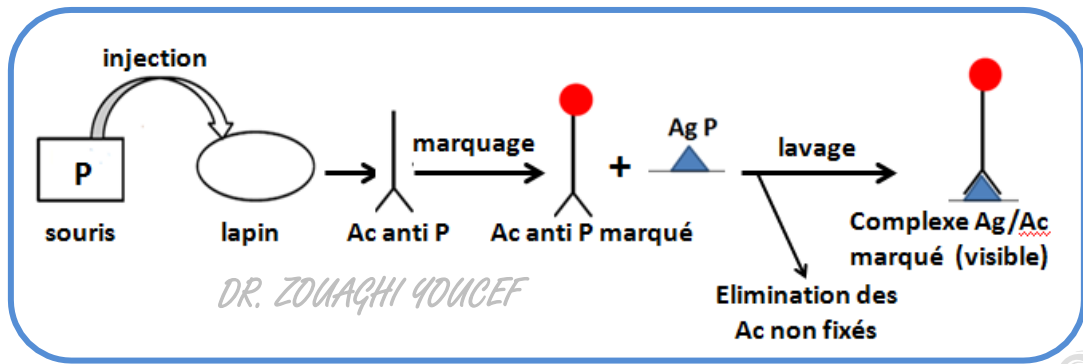


Figure 5 : Principe général d'immunofluorescence

La technique de l'immunofluorescence peut être **directe** ou **indirecte**.

✓ **Immunofluorescence directe** [Figure 6]

- L'anticorps spécifique de l'antigène est appelé **l'anticorps primaire**.
- La réaction se fait en une **seule étape**.
- Cette technique directe est utilisée **quand la quantité d'antigène dans la coupe des cellules est très importante**.

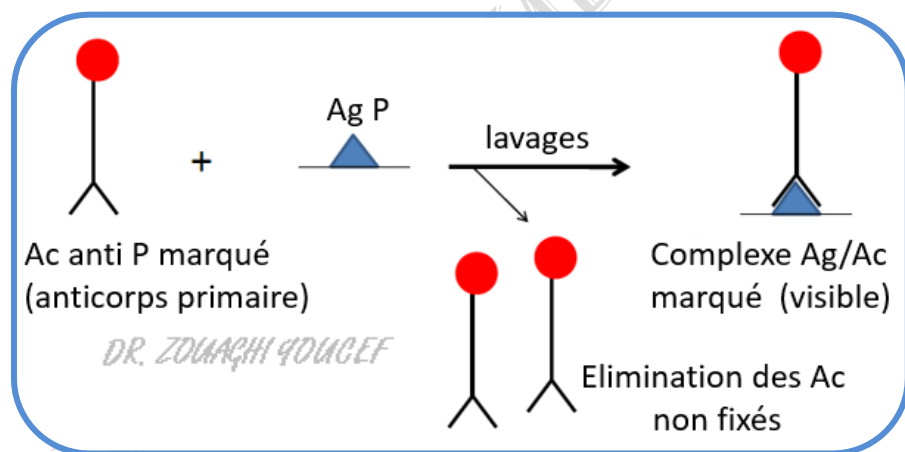


Figure 6 : Principe de l'immunofluorescence directe

✓ **Immunofluorescence indirecte** [Figure 7]

- Cette méthode consiste à **utiliser successivement 2 anticorps**
- L'anticorps primaire qui se lie à l'Ag **n'est pas marqué**.
- L'anticorps primaire est détecté par un **autre anticorps secondaire marqué**.
- L'intérêt de cette méthode est de permettre **l'amplification du marquage**. Une seule molécule d'Ac primaire est reconnue par de nombreuses molécules d'Ac secondaire marquées.

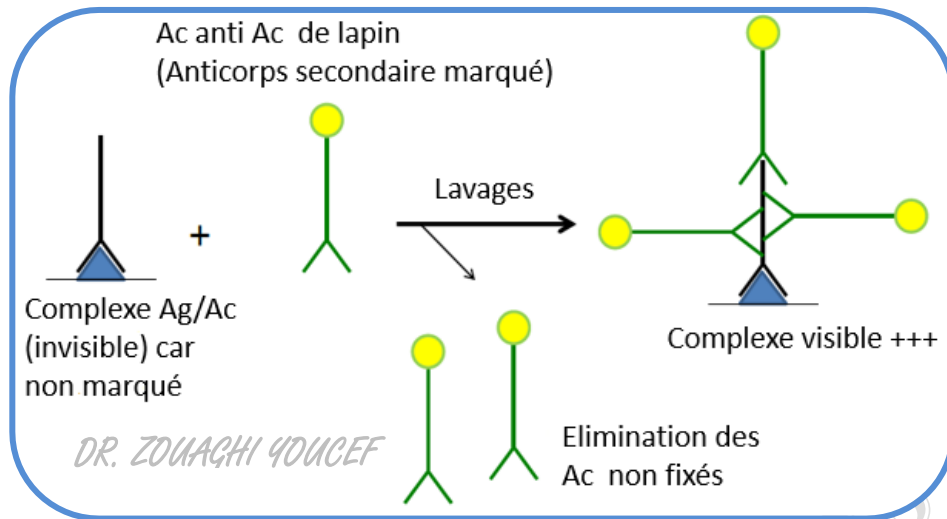


Figure 7 : Principe de l'immunofluorescence indirecte