

TECHNIQUES APPLIQUEES EN BIOLOGIE CELLULAIRE

A. TECHNIQUES D'ISOLEMENT

Techniques qui consistent à séparer les différents organites et composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique et désorganisation de la cellule.

I. FRACTIONNEMENT DES CELLULES ET DES TISSUS

1. But : l'obtention d'un homogénat cellulaire par fractionnement des tissus et des cellules de manière contrôlée.

2. Etapes

2.1. Prélèvement d'une suspension cellulaire ou tissu.

2.2. Homogénéisation : en utilisant des procédés mécaniques doux, les membranes plasmiques des cellules peuvent être rompues, de sorte que le contenu cellulaire est libéré. Quatre procédés sont fréquemment utilisés :

- fractionnement par des ultrasons à haute fréquence,
- utilisation d'un détergent doux pour faire des trous dans la membrane plasmique,
- forcer les cellules à passer à travers un petit trou en utilisant une forte pression et
- cisailler les cellules, entre un broyeur tournant étroitement adapté et les parois épaisses d'un récipient en verre.

2.3. Récupération de l'homogénat cellulaire : qui contient les organites cellulaires intacts, les grosses et les petites molécules du cytosol (enzymes, ribosomes et métabolites).

II. ULTRACENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE (UCD)

L'UCD permet la purification de l'homogénat cellulaire en fonction de la taille et de la densité de ses différents constituants. Des centrifugations répétées à des vitesses progressivement croissantes fractionneront les homogénats cellulaires en leurs composants (organites, particules et molécules) (**figure 1**).

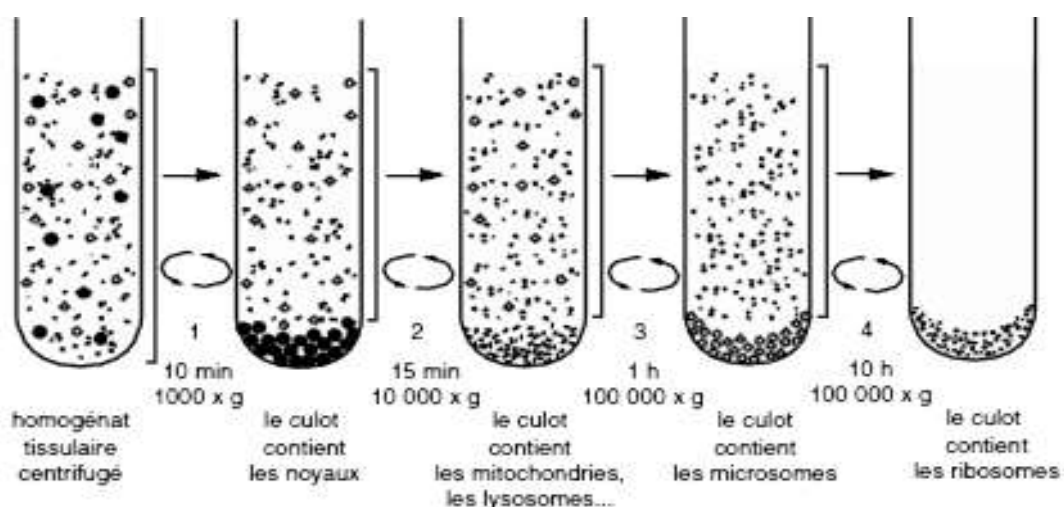


Figure 1 : Les étapes de l'ultracentrifugation différentielle (UCD).

III. CENTRIFUGATION PAR GRADIENT PREFORME

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat cellulaire au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut (**figure 2**). Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera. La vitesse de sédimentation dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le coefficient de sédimentation en unité Svedberg (S).

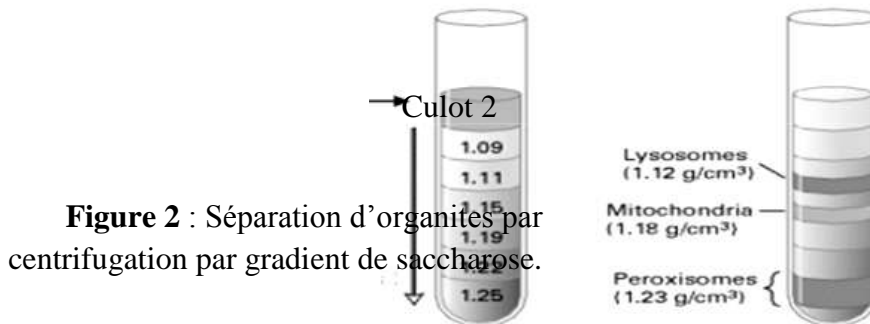


Figure 2 : Séparation d'organites par centrifugation par gradient de saccharose.

B. TECHNIQUES DE COUPES HISTOLOGIQUES

1. But : pour un examen morphologique des cellules ou d'échantillons biologiques (tissus) en microscopie photonique, des procédés préparatoires de l'échantillon sont nécessaires.

2. Etapes : toutes les étapes sont résumées dans la **figure 1**.

2.1. Prélèvement sur le vivant : on distingue quatre catégories majeures de prélèvement : les frottis (ou grattage), les biopsies (fragments de tissu ou d'organe), les organes en intégralité et les liquides d'épanchement divers (pleural, sciatique, péricardique, etc.).

Il existe également des techniques de prélèvement plus sophistiquées : par excision, ponction ou microdissection.

2.1. Fixation : c'est l'action de tuer les cellules, en évitant tout phénomène agonique, de manière à conserver les structures dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant. On peut fixer à l'aide de procédés chimiques (alcool, formol, acide acétique, ...) ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque.

2.2. Déshydratation : pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools à degré croissant (70°, 80°, 90° et 100°) pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations.

2.3. Inclusion : la coupe ne peut être pratiquée que dans une substance assez dure ; c'est pourquoi on imprègne les tissus d'une substance d'enrobage, en général la paraffine. Celle-ci n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine.

Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation. A la dernière étape on remplace l'alcool par du toluène (substitution), on plonge le tissu déshydraté dans la paraffine maintenue liquide à l'étuve entre 50 et 60°C. On refroidit alors et on obtient un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner.

2.4. Réalisation de Coupes : le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide d'un microtome, appareil permettant de découper les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns sous forme de ruban de coupes sériées. On les recueille sur des lames en verre autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.

2.5. Réhydratation : les coupes collées sur la lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique et ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Cela permet de les colorer, car la majorité des colorants sont solubles dans l'eau ou dans l'alcool.

2.6. Coloration : les lames de verre contenant les coupes à observer sont plongées dans un colorant. On dispose de nombreux colorants naturels (ex. le vert de méthyle colore en vert la chromatine, l'hématoxyline colore les noyaux cellulaires en bleu violacé, l'éosine colore le cytoplasme en rose et autres : bleu de méthylène et bleu de toluidine).

2.7. Observation au microscope photonique

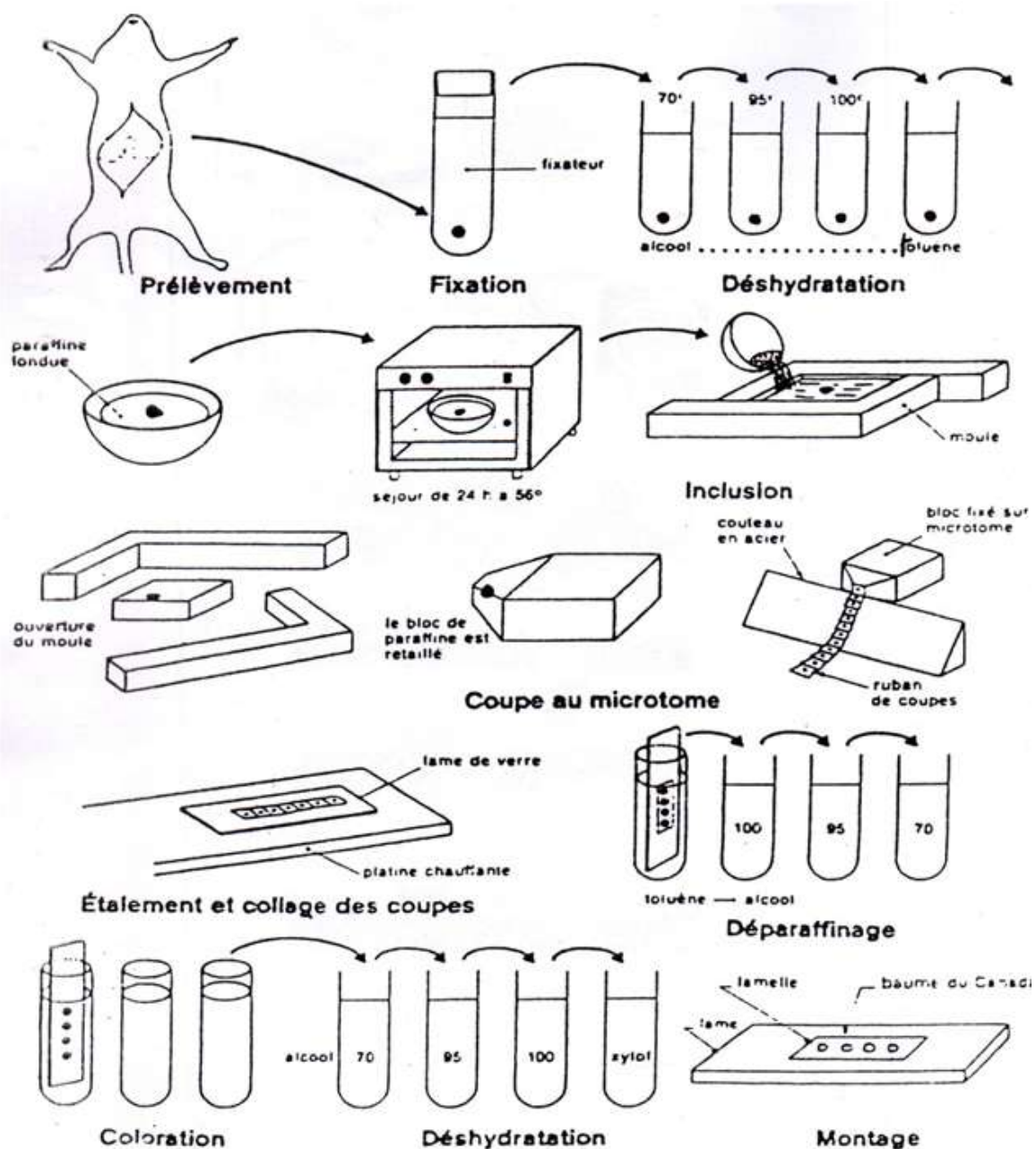


Figure 1 : Les différentes étapes de la technique histologique.

C. TECHNIQUE DES COUPES MINCES OU CYTOLOGIQUES

1. But : obtenir à partir d'un échantillon parfaitement conservé de coupes suffisamment minces (500 à 700Å) pour être transparentes aux électrons, et suffisamment contrastées, pour donner une image nette à l'écran (ou la micrographie).

2. Etapes

2.1. Fixation : la fixation a pour but la conservation (après la mort) des ultrastructures cellulaires sans altération (c'est à dire aussi proche du vivant). On fixe les cellules *in vivo* à l'aide de produits chimiques (tetroxyde d'osmium : OsO_4 ou du glutaraldéhyde : $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) ou d'agents physiques (propane liquide à -196° , l'hélium liquide à -272°). Il s'agit d'une étape critique qui conditionne le succès de l'étude cytologique.

2.2. Rinçage: le rinçage à l'eau permet d'éliminer le fixateur en lui substituant une solution de même pH. Il faut effectuer plusieurs rinçages successifs.

2.3. Déshydratation : elle permet de débarrasser les pièces de leur eau en les plongeant dans des bains d'alcool à concentration croissante ou dans de l'acétone. Le dernier bain se fait à l'oxyde de propylène.

2.4. Inclusion : favorise le durcissement des échantillons, en remplaçant le milieu intracellulaire aqueux par un milieu solide tel que la résine.

2.5. Confection de coupes ultraminces ou ultrafines : découper le fragment en coupes de 500 à 700Å d'épaisseur. Les blocs obtenus sont taillés, les coupes sont effectuées à l'aide d'un ultra-microtome, et recueillies sur une grille métallique couverte d'un film de collodion.

2.6. Contraste : Il s'agit d'une imprégnation par des sels de métaux lourds (comme les sels de plomb, d'uranyle ou de nitrate d'argent) qui augmente le contraste des structures cellulaires.

2.7. Observation directe

2.8. Observation des micrographies prises au MET

D. TECHNIQUE DE CRYODECAPAGE

1. But: le cryodécapsulation permet l'observation des surfaces intraet inter-membranaires, le plus souvent appliquée en microscopie électronique à balayage (MEB). L'observation peut se faire dans certains cas au MET (cas des répliques obtenues à partir de virus ou molécules isolées).

2. Principe: pour l'obtention d'une réplique de l'échantillon étudié.

1. Etapes

3.1. Congélation : les échantillons sont congelés à température dans l'azote liquide (à -196°C), on obtient un bloc de glace.

3.2. Fracture du bloc : à l'aide d'une lame refroidie, le plan de fracture passe toujours par les zones de moindre résistance qui sont en générales les espaces inter-membranaires (espace péri nucléaire de l'enveloppe nucléaire) ou bien les régions intra-membranaires qui correspondent aux parties hydrophobes (feuillet clair) de la bicouche lipidique, on obtient dans ce dernier cas une hémimembrane.

3.3. Élimination de la couche de glace : on élimine la glace superficielle par sublimation.

3.4. Confection de la réplique : elle se fait en deux temps, on dépose par vaporisation en biais une couche de platine qui assure l'ombrage de la réplique. On rajoute à l'aide d'une vaporisation verticale, une couche de carbone qui servira à consolider la couche de platine.

3.5. Élimination de l'échantillon biologique qui a servi de matrice, par dissolution en utilisant un solvant approprié.

3.6. Lavage de la réplique et observation au MEB (dans le cas général)

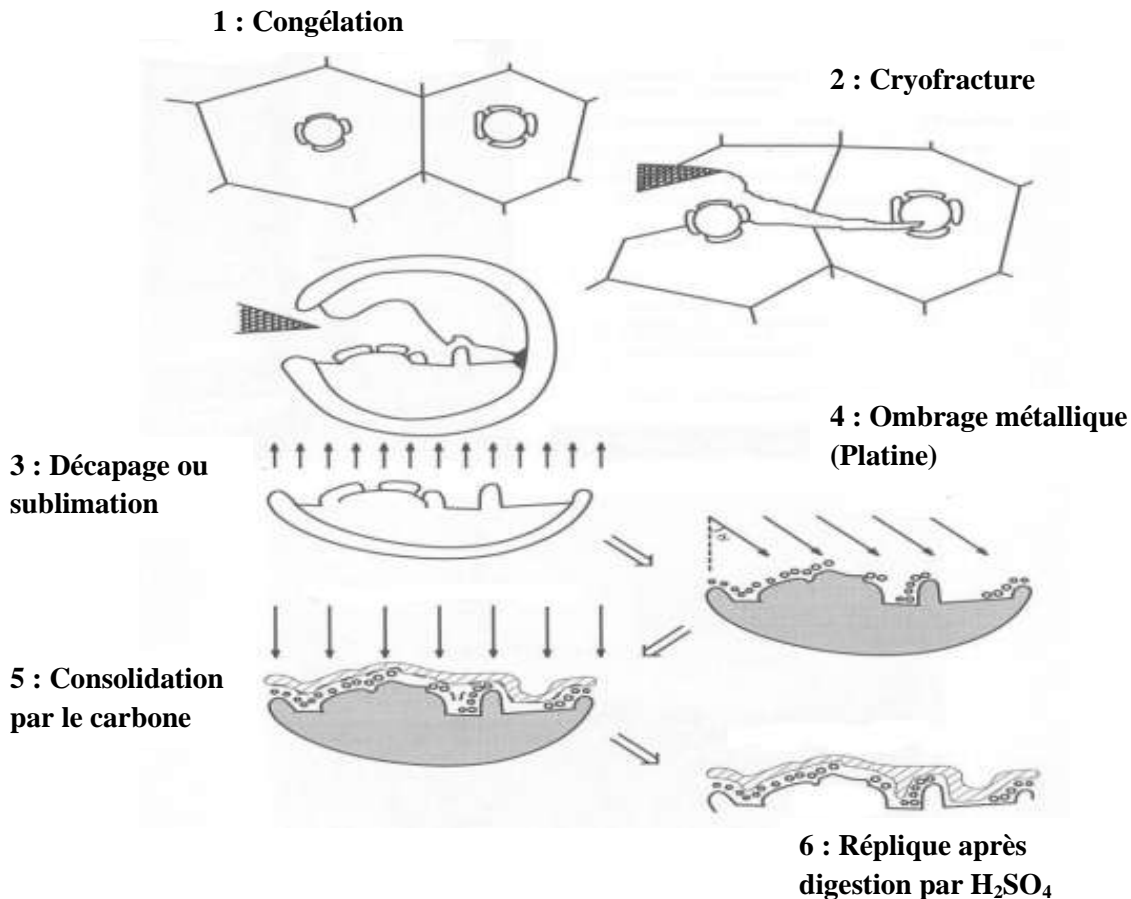


Figure 2 : Les différentes étapes de la technique de Cryodécapsulation.

E. TECHNIQUE DE L'AUTORADIOGRAPHIE

1. But et principe

- On fournit à une cellule vivante durant un temps très bref (en anglais pulse) un métabolite renfermant un atome radioactif (le plus souvent le tritium : H³ ou le carbone : C¹⁴), elle l'utilise comme l'atome non radioactif dans ses synthèses. L'atome radioactif va se retrouver incorporé dans les constituants naturels de la cellule et va servir de traceur.

- On choisit comme porteur de cet atome radioactif une molécule susceptible de s'incorporer spécifiquement dans une macromolécule (ex. Thymidine pour l'ADN, Uridine pour l'ARN, Leucine

pour les protéines et Glucose pour les polysaccharides). On dilue le surplus de la radioactivité en mettant les cellules dans un milieu contenant le précurseur non radioactif.

- La détection de la radioactivité se fait par application d'une émulsion photographique liquide ou d'un film solide (formé de cristaux de bromure d'argent). On met la préparation à l'obscurité durant un certain temps (**figure 1**).

- Le rayonnement émis par les atomes radioactifs impressionne l'émulsion et transforme les cristaux de bromure d'argent en grains d'argent métalliques. L'émulsion est ensuite révélée comme un film photographique. Les grains d'argent métalliques sont localisés au dessus des cellules ayant incorporé les atomes radioactifs. Le nombre de grains d'argent métalliques renseigne sur l'intensité du phénomène étudié.

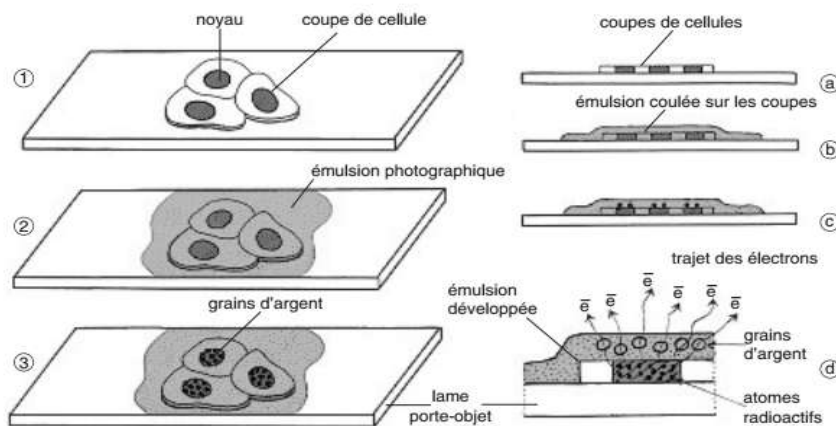


Figure 1: Les étapes de la technique d'autoradiographie.

(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).

F. TECHNIQUE DE LA COLORATION NEGATIVE

1. But : observation de petits échantillons tels que les virus, bactéries et aussi macromolécules comme l'ADN, la myosine ...

2. Principe : est basé sur l'augmentation du contraste par utilisation de produits imperméables aux électrons comme l'acide phosphotungstique.

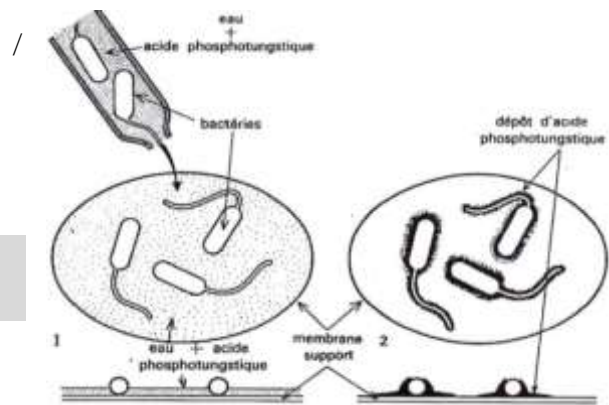
3. Etapes

3.1. Préparation de la solution constituée par l'échantillon et l'acide phosphotungstique (2%).

3.2. Dépôt d'une goutte de ce mélange sur la grille porte objet recouverte d'une membrane ayant de l'affinité avec l'acide phosphotungstique (des liaisons s'établissent entre la membrane et l'acide phosphotungstique imperméable aux électrons).

3.3. Laisser sécher de manière à ce que l'acide phosphotungstique ne se retrouve que sur la surface de la membrane, autour de l'échantillon mais pas au dessus de ce dernier.

3.4. À l'observation, les e^- qui arrivent sur la surface de l'échantillon vont le traverser et poursuivre leur trajet vers l'écran luminescent. Les e^- qui arrivent sur la surface de la membrane recouverte d'acide phosphotungstique seront retenus ; par conséquent, l'échantillon aura un aspect clair sur un fond très dense (**figure 1**).



G. TECHNIQUE DE L'OMBRAGE METALLIQUE

1. But : rendre visible de très petites particules isolées et également visualiser l'ADN et l'ARN et dans l'étude des surfaces (cryofracture).

2. Principe : 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.

3. Etapes : se déroulent dans une cloche où sous vide (**figure 1**).

3.1. Les molécules ou les particules, dissoutes ou suspendues dans l'eau, sont directement étalées à la surface d'une grille carbonée pour la microscopie électronique.

3.2. Vaporisation d'une très fine couche métallique (or ou platine), à la surface de la préparation. La projection de métal est réalisée sous un angle assez incliné par rapport au plan de la grille celle-ci conduit à une accumulation localisée de métal qui donne un effet «d'ombre portée» lors de l'examen en microscopie électronique.

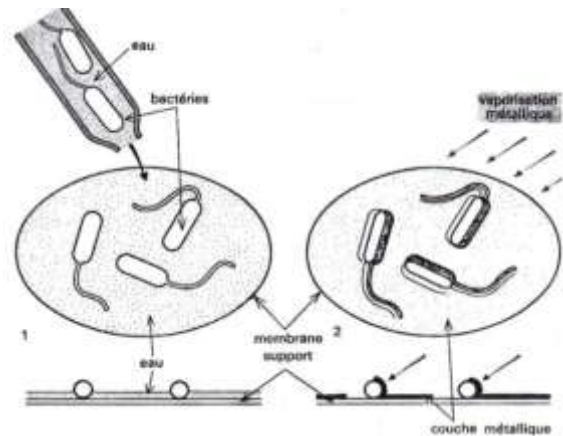


Figure 1 : La technique de l'ombrage métallique.

H. TECHNIQUE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

1. Principe : c'est une technique d'immunomarquage qui utilise des anticorps spécifiques à la molécule d'intérêt ainsi que des fluorochromes. Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Un fluorochrome est une substance chimique capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation.

2. Etapes

Pour détecter une substance X dans une cellule (1 et 2), on injecte à l'animal (ex. lapin) un antigène, celui-ci réagit en fabriquant des anticorps anti X (3). Une molécule fluorochrome (ou fluorescine) est directement fixée sur l'anticorps (3) formant un complexe (Anticorps anti X- Fluorochrome).

Le complexe se fixe sur la substance X (4). L'observation sous UV au microscope à fluorescence ou confocale permet la localisation de la substance X, grâce à la fluorescence émise par la fluorescine (5) (**figure 1**).

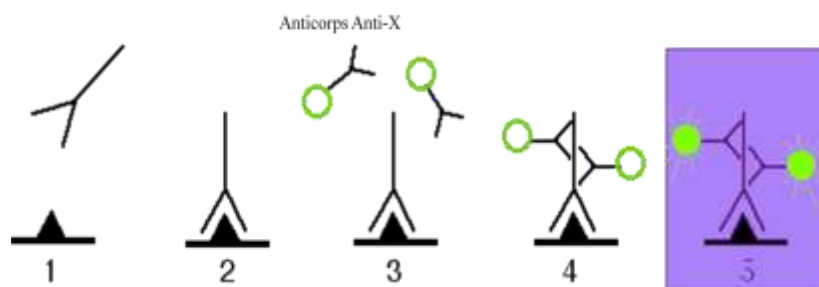


Figure 1: Les étapes de la technique de l'immunofluorescence.

