**République Algérienne Démocratique et Populaire**
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**
**Université Dr. Moulay Tahar SAIDA**
**Faculté des sciences**

**Département de Biologie**

## Polycopie du cours

# Méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant (MSTEV)

**Destiner aux étudiants de 2ème année tronc commun**
**Filières : Sciences biologiques et Biotechnologie**

**Présenté par Dr. CHALANE Fatiha**

**Année: 2020/2021**

**Objectif**

Cette matière permet aux étudiants d’avoir des notions sur les méthodes appliquées à l’étude des vivants : méthodes Cytologiques, méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules et les techniques d’approche aux vivants.

# SOMMAIRE

**I. Méthodes d'étude de la morphologie des cellules** ..... 1
**1. La microscopie** ..... 1
**MICROSCOPIE OPTIQUE** ..... 2
**La microscopie en lumière directe** ..... 2
**La microscopie en contraste de phase** ..... 5
**Technique du microscope à fond noir (microscopie par transmission en champ sombre)** ..... 8
**Technique du microscope à lumière polarisée** ..... 10
**Technique de la microscopie à fluorescence** ..... 12
**Les microscopes électroniques** ..... 15
**Microscope électronique à transmission** ..... 15
**Principe du fonctionnement** ..... 15
**Caractéristiques des électrons** ..... 15
**Les composants de MET** ..... 16
**Préparation des coupes cellulaires ultrafines** ..... 17
**Etapes de fonctionnement de MET** ..... 18
**Le Microscope Electronique à Balayage (MEB)** ..... 20
**Préparation des échantillons** ..... 20
**Détecteur** ..... 22
**II. Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules** ..... 22
**1. Matériels cellulaires** ..... 22
**Différents types de cellules** ..... 22
**Composition chimique de la cellule** ..... 23
**L'eau dans la cellule** ..... 24
**Les substances organiques** ..... 24
**Sels minéraux** ..... 24
**Les préparations d'étude** ..... 25
**Cellule entière ou coupes des cellules** ..... 25
**a) Cellules entières** ..... 25
**b) Coupes de cellules** ..... 25
**Séparation de différents organites : le fractionnement cellulaire** ..... 25

**Broyats cellulaires = homogénats cellulaires** ..... 26
**a. Techniques mécaniques** ..... 26
**a. 1. Le broyage mécanique** ..... 26
**a. 2. La bombe à disruption** ..... 27
**a. 3. La Presse de French** ..... 27
**a. 4. La sonication (Ultrasons)** ..... 28
**a. 5. La congélation-décongélation** ..... 28
**b. Les Techniques chimiques et enzymatiques** ..... 28
**b. 1. La lyse ou choc osmotique** ..... 28
**b. 2. Modification de la force ionique ou du pH** ..... 29
**b. 3. Lyse enzymatique** ..... 29
**Fractions cellulaires** ..... 29
**a. Principe de la séparation des organites cellulaires** ..... 29
**b. La centrifugation** ..... 30
**Principe** ..... 30
**Types d'ultracentrifugation** ..... 31
**L'ultracentrifugation différentielle** ..... 31
**L'ultracentrifugation en gradient de densité** ..... 32
**2. Les méthodes** ..... 33
**Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques** ..... 33
**Extraction des protéines** ..... 33
**La purification** ..... 33
**L'électrophorèse** ..... 33
**Dosage des protéines (exemple de la technique de biuret)** ..... 34
**Les méthodes cytochimiques** ..... 36
**Localisation de polysaccharides : réaction à l'APS (Acide Périodique - réactif de Schiff)** ..... 36
**Localisation d'acides nucléiques : test de Brachet** ..... 37
**Immun cytologie/ immunologie technique (technique de localisation d'antigènes Ag)** ..... 38
**III. Techniques de génie génétique (séquençage d'ADN)** ..... 39

**1. Préparation des acides nucléiques (extraction et purification) ..... 39**

**2. Amplification in vitro des acides nucléiques PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ..... 39**

**PCR ..... 39**

**RT-PCR ..... 40**

**3. Séquençage d'ADN ..... 40**

**Automatisation du séquençage ..... 42**

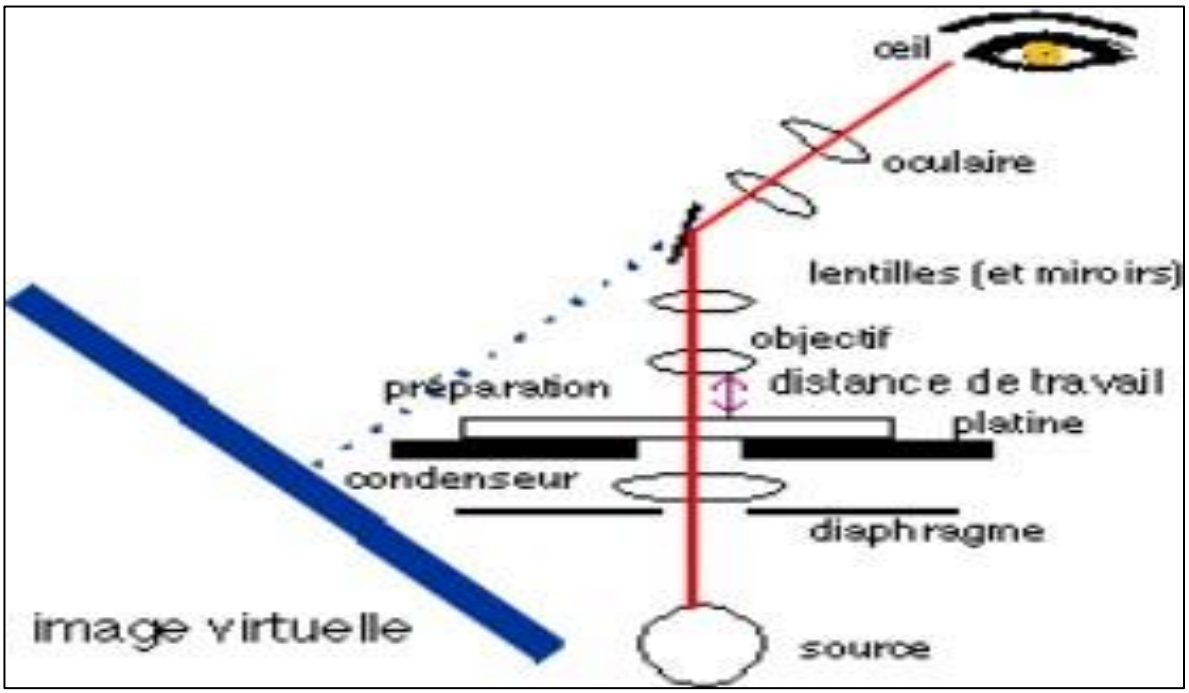
# I.Méthodes d’étude de la morphologie des cellules

# 1.La microscopie

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures à l’échelle microscopique. Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation et émise ensuite 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.

Le but du microscope est de donner accès à la structure microscopique des objets observés. Un microscope sert donc à voir des détails plus fins de l'objet et pas seulement à en faire une image agrandie. La performance principale de cet instrument est donc sa résolution, c'est-à- dire sa capacité à séparer ces détails.

**Résolution et distance de travail**



La résolution est la plus petite distance séparant deux objets que l'on peut distinguer à l'aide du microscope: elle dépend de la qualité des lentilles et de la nature même de la lumière: elle est au maximum de 0,2 µm. On peut l'augmenter en plaçant une goutte d'huile à immersion (huile incolore dans laquelle la lumière se propage à la même vitesse que dans le verre) sur la préparation: on réalise alors une observation "à l'immersion", l'huile remplaçant l'air entre l'objet et l'objectif.

**La distance de travail**

est la distance entre l'objectif et l'objet : elle doit être d'autant plus petite que le grossissement recherché est fort.

Les techniques de révélation permettent aujourd'hui d'identifier de façon précise toutes sortes de molécules et les photographies (sur pellicules ou numériques) peuvent être analysées pour des études quantitatives (taille, nombre et emplacement des éléments observés). 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,
- le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

# MICROSCOPIE OPTIQUE

La technique de microscopie optique est la plus ancienne utilisée.

Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

- soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Donc il existe plusieurs types de la microscopie optique :

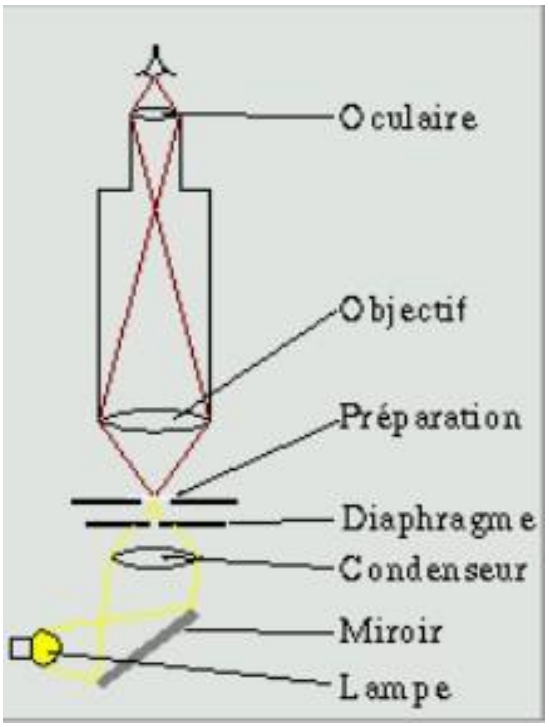
- La microscopie en lumière directe (transmission).
- La microscopie en contraste de phase.
- Le microscope à fond noir.
- Le microscope à lumière polarisée.
- La microscopie à rayons UV (à fluorescence).
- Le microscope à balayage.

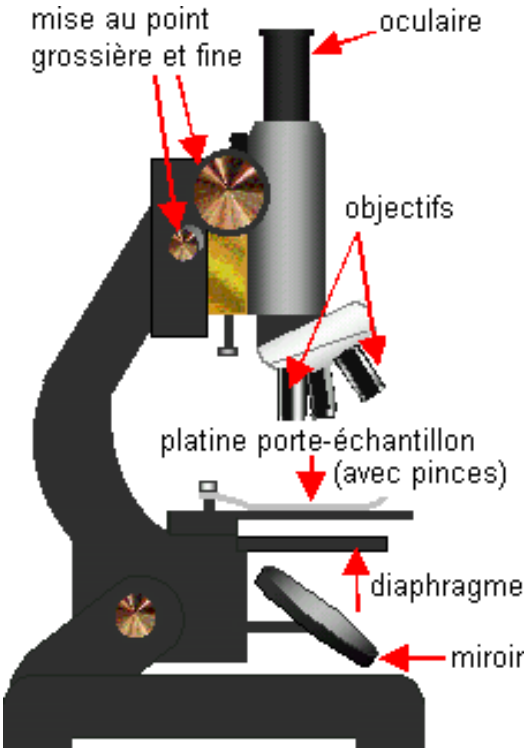
**La microscopie en lumière directe**

C'est le cas le plus simple. Les structures à observer sont colorées, soit qu'elles le soient naturellement, soit comme résultat d'un marquage. La lumière blanche émise par une lampe est concentrée sur la préparation et la traverse. Selon l'intensité de la coloration, la lumière sera plus ou moins absorbée et l'endroit apparaîtra plus ou moins sombre, les zones peu marquées restant relativement claires. La coloration est due soit à un colorant qui se fixe de façon préférentielle à une molécule particulière ou une famille de molécules, soit à un précipité sombre.

Un microscope à transmission comporte principalement les éléments suivants : une source lumineuse, un condenseur, un objectif et des oculaires (voir figure ci-dessous).

**a.Les principaux éléments d'un microscope**




**Source (lampe) :** La première source utilisée était le soleil. Maintenant, la lampe hallogène a remplacé la source naturelle, offrant plus de puissance, une intensité plus constante.

**Miroir** : utilisé pour réfléchir la lumière ambiante pour éclairer l'échantillon **Condenseur** C'est principalement une lentille servant à concentrer la lumière de la source lumineuse sur l'échantillon. Son rôle est essentiel pour la qualité des images, notamment le contraste et la résolution.

**Diaphragme** : ouverture de diamètre variable permettant de régler la quantité de lumière qui éclaire l'échantillon.

**Platine porte-échantillon** : où l'on pose l'échantillon. La platine peut être mobile (gauche-droite et avant-arrière), ce qui permet de balayer l'échantillon et de sélectionner la partie observée.

**Objectif** : L'objectif est le cœur du microscope, l'élément essentiel. Il peut se résumer à une simple lentille à fort pouvoir grossissant. C'est lui qui détermine la résolution optique du microscope. La figure suivante montre un objectif avec un grossissement 60 fois (60x) et une ouverture numérique.

**Oculaires :** Les oculaires servent à grandir l'image fournie par l'objectif (comme une loupe) et à pouvoir regarder l'échantillon sans que l'œil doivent accommoder, pour le confort de l'utilisateur.

**a.Les étapes d'utilisation d'un microscope optique**

Il permet de visualiser des objets très fins, montés dans une goutte d'eau ou de liquide coloré sur une lame porte objet et recouvert d'une lamelle couvre objet très fragile, ou des coupes fixées et colorées selon un protocole qui sera présenté ultérieurement. La lumière qui traverse l'objet remonte dans les lentilles de verre (objectif et oculaire) ce qui agrandit l'objet.

L'observation au microscope passe par les étapes suivantes :

- **Préparation de l'observation :** la préparation à observer est placée sur la platine et centrée pour que la lumière traverse le tube optique donnant un rond lumineux dans l'oculaire.
- **La mise au point** : le petit objectif (faible grossissement) est placé dans l'axe du tube optique. Il faut ensuite regarder dans l'oculaire et, à l'aide de la vis macrométrique de mise au point, remonter le tube jusqu'à l'obtention d'une image nette.
- **Exploration de la préparation** : la préparation est déplacée délicatement jusqu'à trouver l'objet recherché.
- **Changement de grossissement** : il faut placer la zone à agrandir au centre de la platine, puis changer d'objectif en tournant le barillet, sans toucher au réglage précédent. Le changement d'objectif se fait toujours du plus faible au plus fort grossissement. La nouvelle mise au point se fait seulement par la petite vis. Que faire pour ne pas endommager les préparations.

1- Toujours commencer l'observation avec l'objectif le plus faible.

2- N'utiliser la vis macrométrique (la grosse) qu'à faible grossissement.

3- Fixer la lame avec les valets : si l'un d'eux est manquant, ne pas incliner le microscope

4- Ne jamais descendre le tube sans surveiller la platine et la lame en regardant sur le côté.

5- Aux grossissements supérieurs, n'utiliser que la vis micrométrique.

6- Si la vis semble bloquée, il faut s'assurer que l'objectif n'appuie pas sur la lame.

**La microscopie en contraste de phase**

Cette technique permet d'observer les cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine. C'est donc l'une des rares qui permet d'observer des cellules vivantes. Elle est ainsi très utilisée en ingénierie cellulaire. Le principe est basé sur le fait que les structures biologiques sont transparentes.

Cette technique permet de transformer une différence d'indice de réfraction dans l'échantillon en une différence d'intensité. Le principe consiste à éclairer l'échantillon avec un anneau lumineux (obtenu en plaçant une plaque percée d'un anneau dans le condenseur) et à récupérer la lumière avec un objectif spécial comportant une plaque de phase, c'est-à-dire une plaque avec un anneau (de la taille de l'image de l'anneau du condenseur par l'objectif) entrainant un déphasage de la lumière qui le traverse (figure 1).

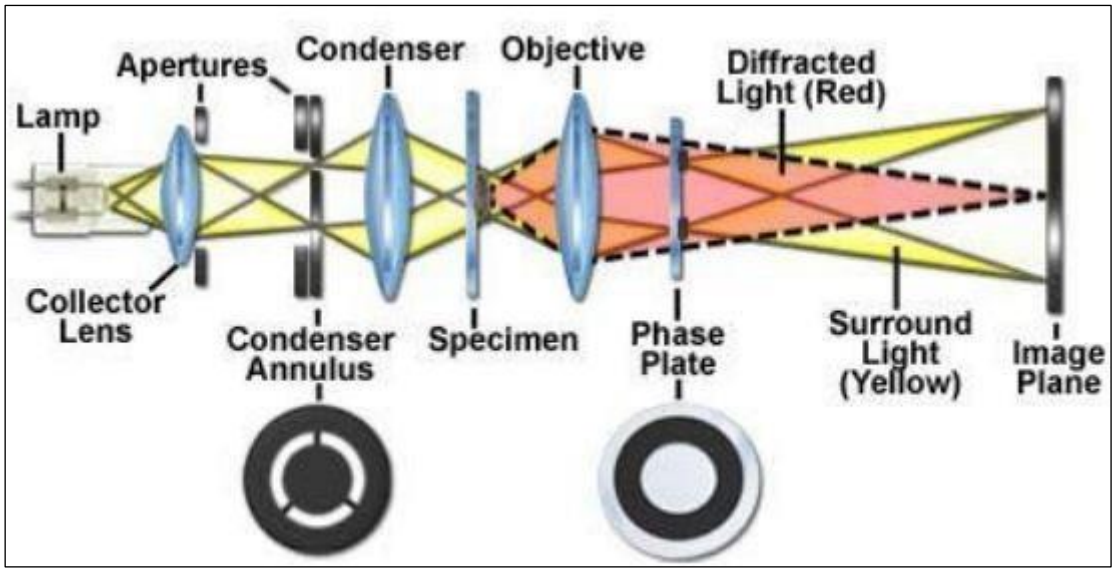
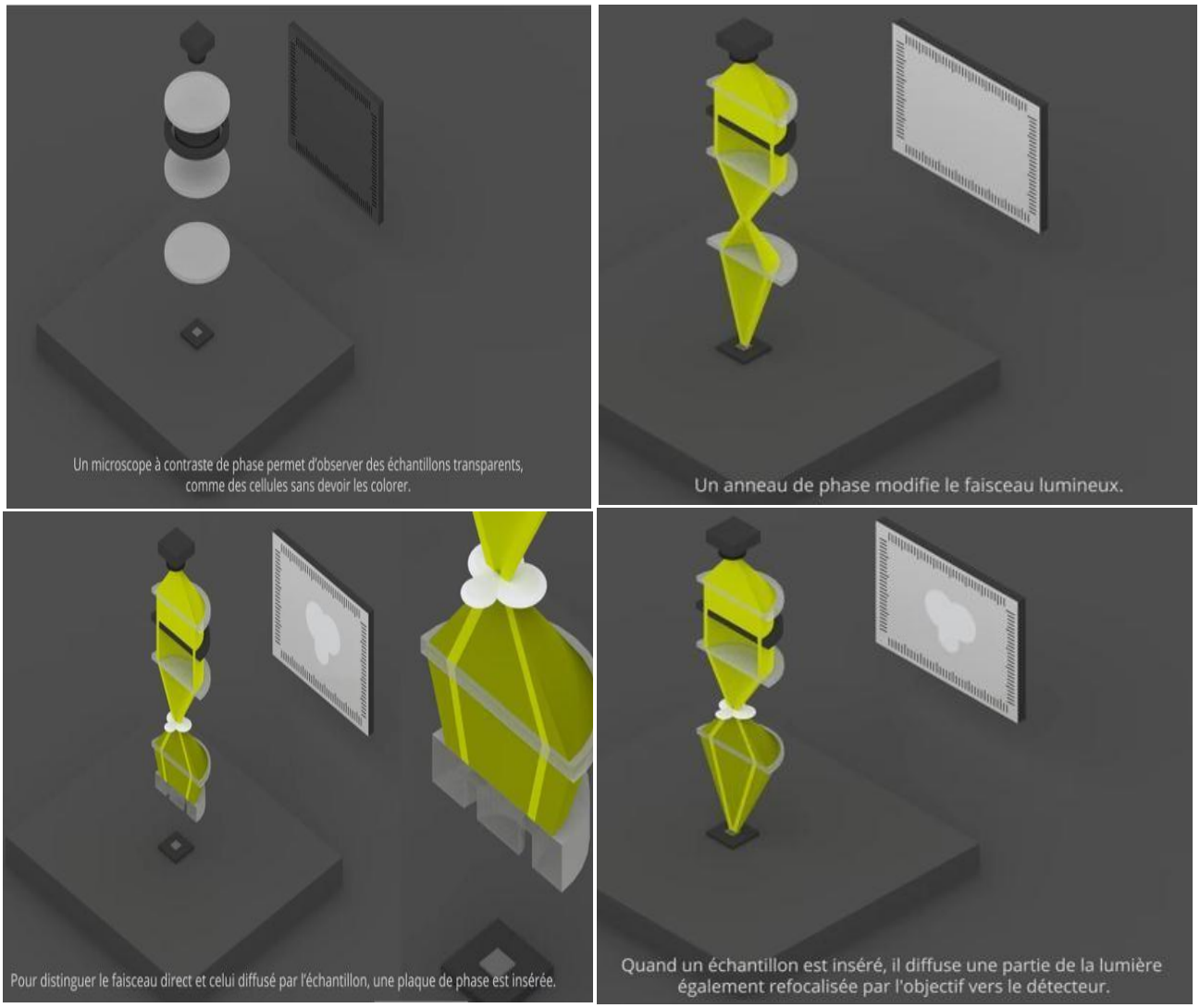
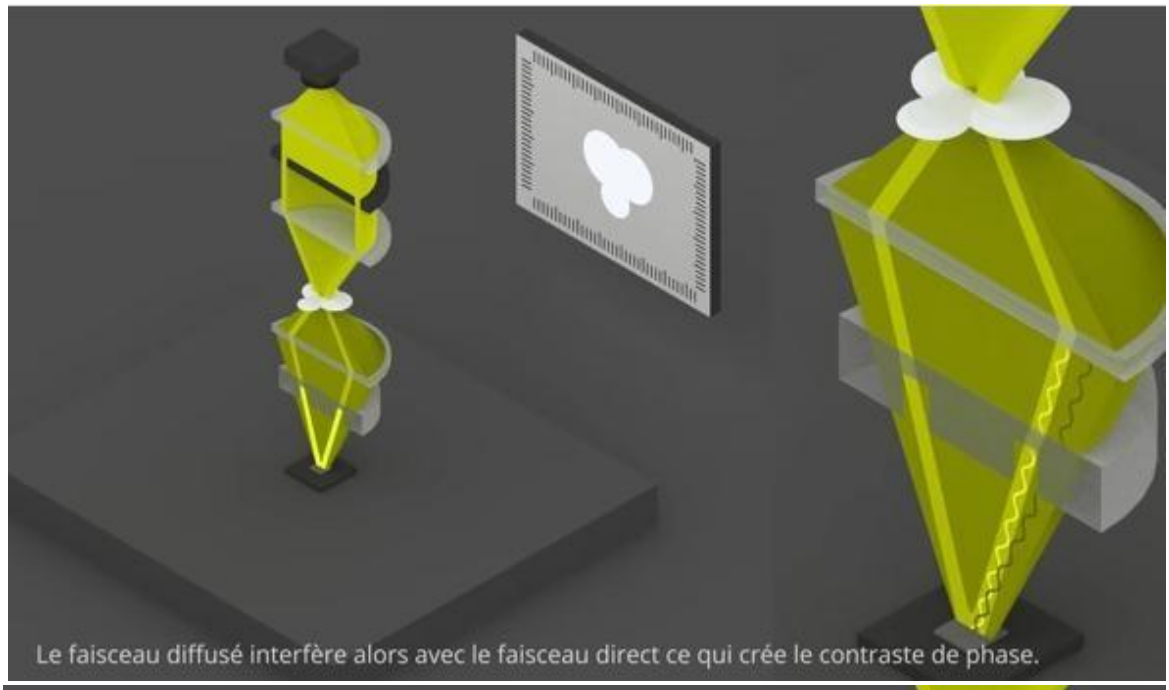


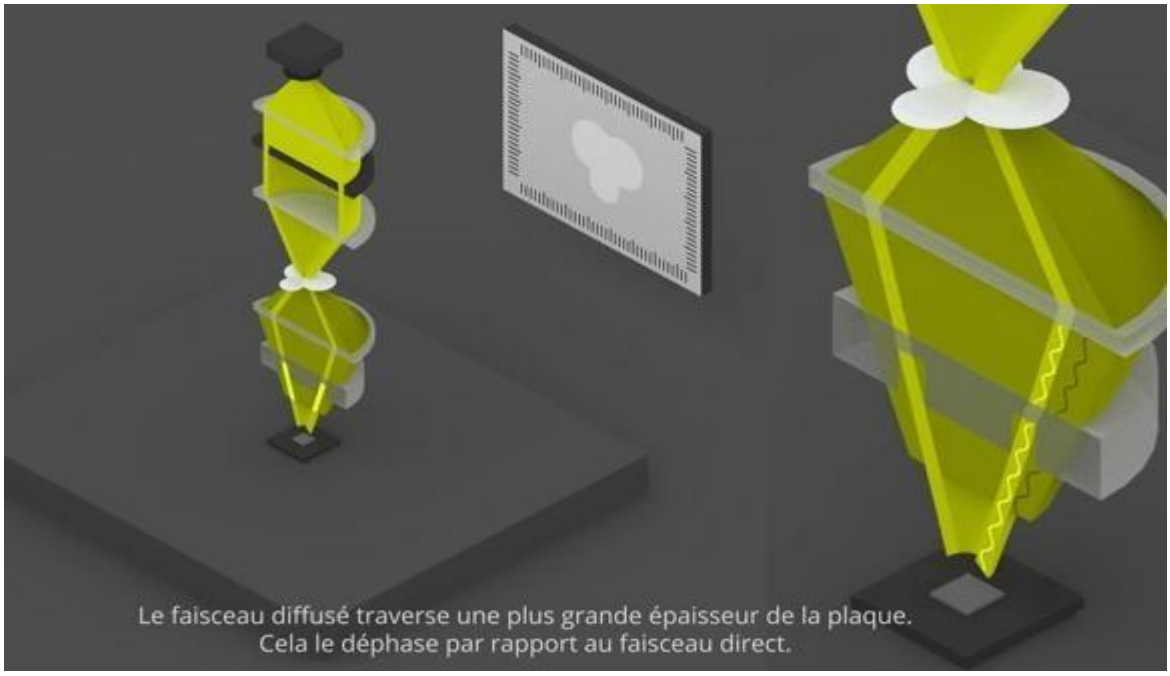

**Figure 1.** Microscope en contraste de phase

Seule la lumière non-déviée par l'échantillon passera par cet anneau et sera ainsi en opposition de phase avec la lumière réfractée (qui passe dans le reste de la plaque de phase). Il s'ensuit des interférences destructrices au plan image ce qui permet d'observer des variations d'amplitude correspondantes à des variations de l'indice de réfraction de l'échantillon. L'alignement de la plaque de phase et de l'anneau du condenseur est particulièrement important pour obtenir cet effet.

## Mode de fonctionnement






**Technique du microscope à fond noir (microscopie par transmission en champ sombre)**

Le microscope à fond noir est un microscope optique utilisé pour augmenter les contrastes (répartition de la lumière entre les parties claires et sombres) des objets transparents.

Avant le développement de la microscopie à contraste de phase dans les années 1930, la microscopie à fond sombre était la seule méthode de renforcement du contraste pour des objets non colorés.

Le microscope à fond noir (ou en champ sombre) permet d'améliorer le contraste d'échantillons qui sont transparents et difficilement observables au microscope optique classique. L'échantillon est éclairé de derrière de telle façon que l'éclairage ou La lumière source (transmise) ne tombe pas (n'atteint pas) directement dans l'objectif ; Seule la lumière déviée par l'échantillon atteint l'objectif (seule la lumière diffusée et donc déviée par l'échantillon peut être observée). Le fond de l'image apparaît donc sombre, tandis que les objets de l'échantillon paraissent clairs et le contraste est ainsi fortement amélioré, sans nécessiter la coloration d'un échantillon pourtant transparent (figure 2).

La microscopie à fond noir est adaptée aux échantillons non colorés. Elle permet d'observer des structures vivantes et en déplacement comme des bactéries ou des organismes unicellulaires.

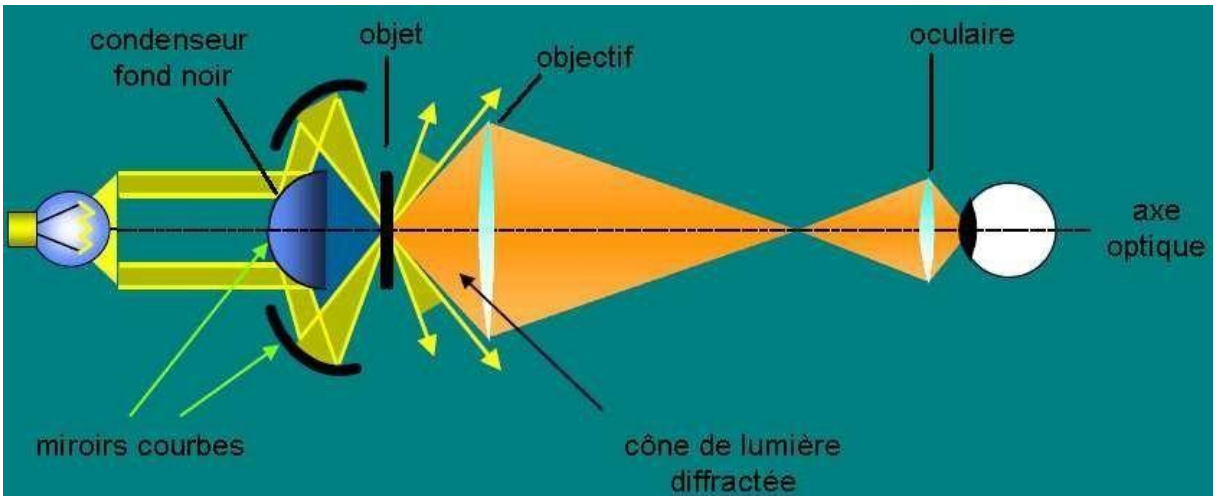
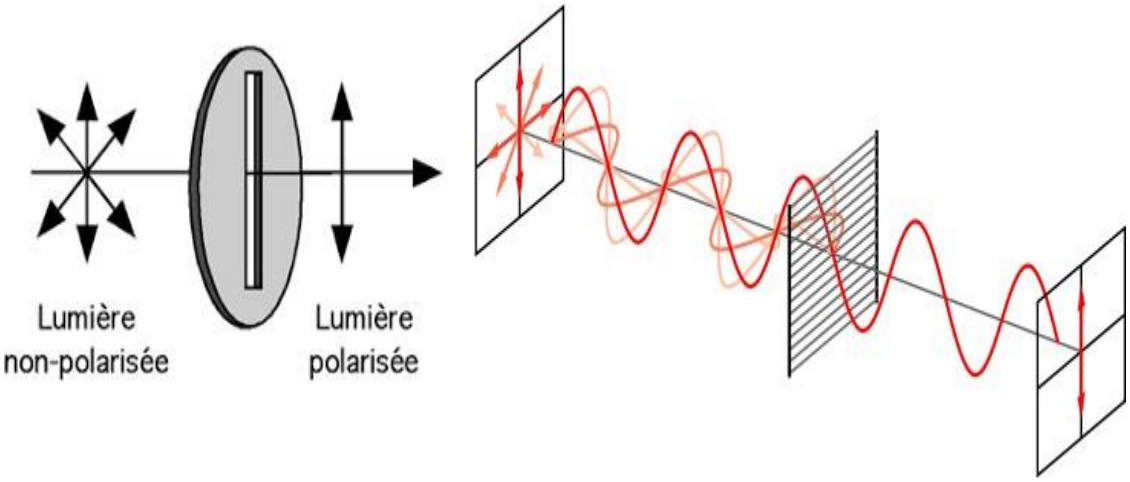



**Figure 2.** Microscope à fond noir.

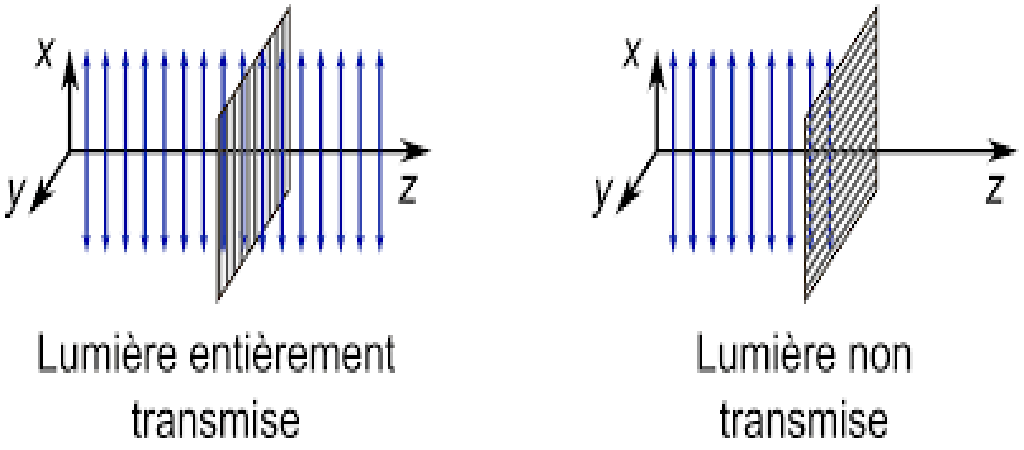
**Technique du microscope à lumière polarisée**

Il est utilisé en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux dans les roches. Le microscope en lumière polarisée est un microscope optique dont la technologie repose sur l'utilisation d'un faisceau de lumière polarisée (des ondes vibrant dans une seule direction). Pour assurer la polarisation de la lumière, un polariseur est placé après la source de lumière, avant l'échantillon.

Le deuxième polariseur, appelé l'analyseur, est placé après l'échantillon et

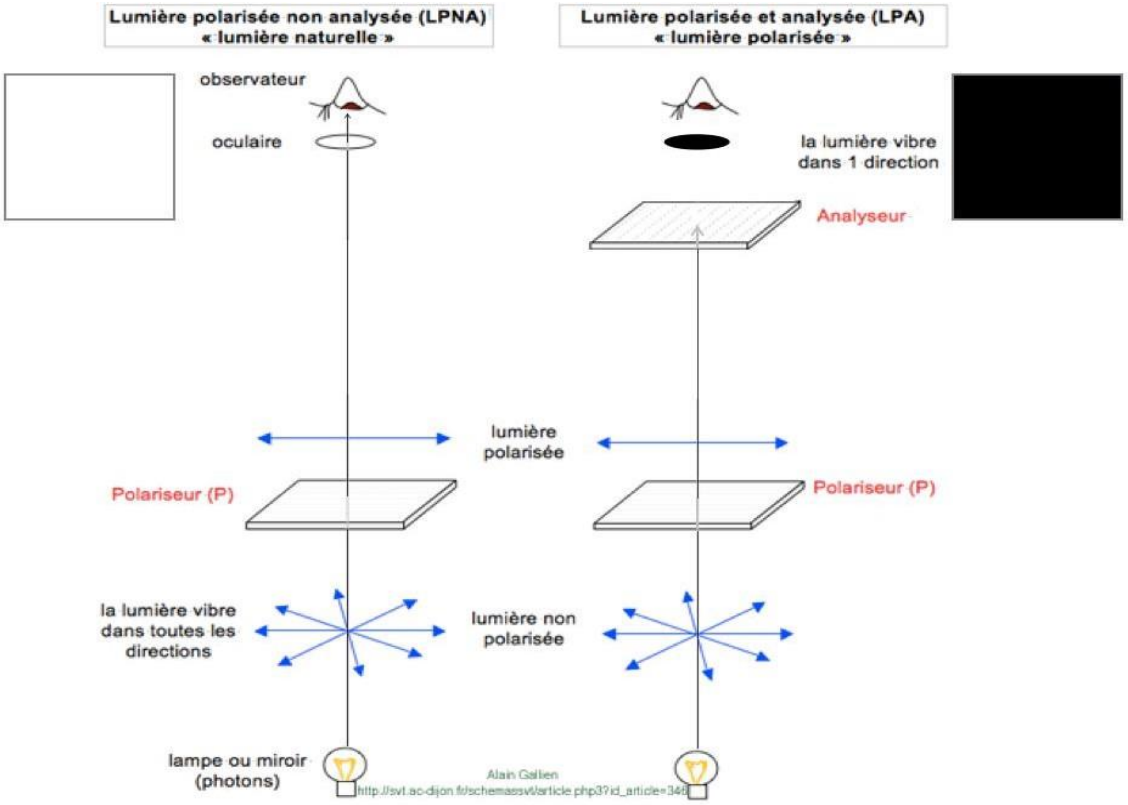



Perpendiculairement au premier polariseur et ne peut donc pas laisser passer la lumière premièrement polarisée.

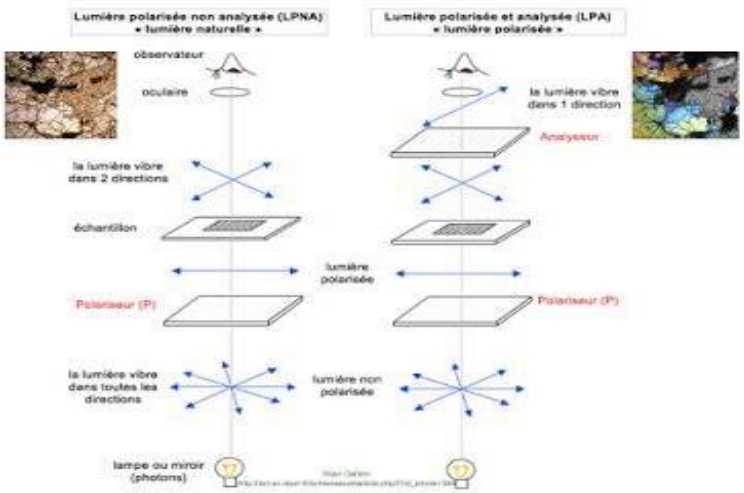



Lumière entièrement transmise

Lumière non transmise




Et comme la plupart des minéraux, suivant la direction de polarisation, la lumière n'aura pas la même vitesse. Lorsqu'un rayon lumineux pénètre dans un cristal, il se dédouble en deux rayons de polarisation différente qui se propagent avec une vitesse différente, c'est la biréfringence (On peut aussi décrire ce phénomène comme une rotation de la polarisation).

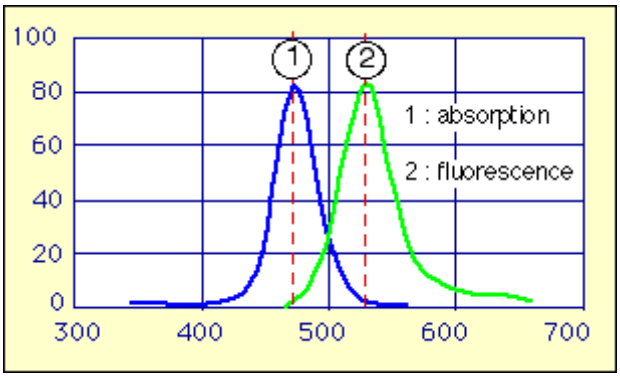



Donc le filtre analyseur placé après l'échantillon corrige et laisse passer la polarisation tournée

**Technique de la microscopie à fluorescence**

Un lecteur de fluorescence, aussi appelé fluorimètre, est un appareil qui permet d'exciter des échantillons contenant des fluorophores, à des longueurs d'ondes précises et de mesurer l'intensité de la fluorescence émise.

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Donc la molécule fluorescente (échantillon) est caractérisée par deux spectres : son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.

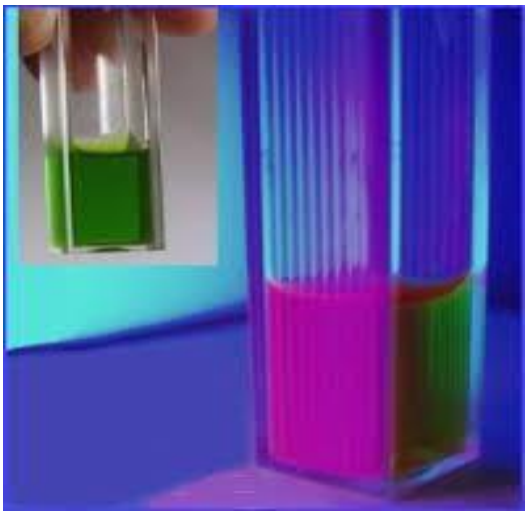



Cet appareil permet d'analyser la lumière réémise par fluorescence d'un échantillon éclairé par une lumière d'une longueur d'onde donnée. Il est très utile pour analyser aussi bien des substances fluorescentes naturellement (comme la chlorophylle) que des substances fluorescentes fixées artificiellement sur des molécules comme marqueurs appelées fluorochrome ou fluorophore (qui est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation avec une longueur d'onde précise).

**Exemple**

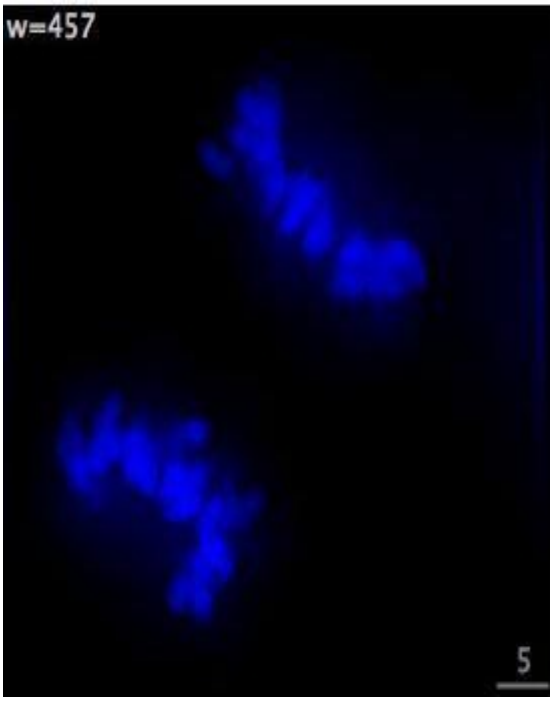
En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes comme

-la chlorophylle qui absorbe à 430 nm (bleu) et reflète le vert (fluoresce en vert).



Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes,

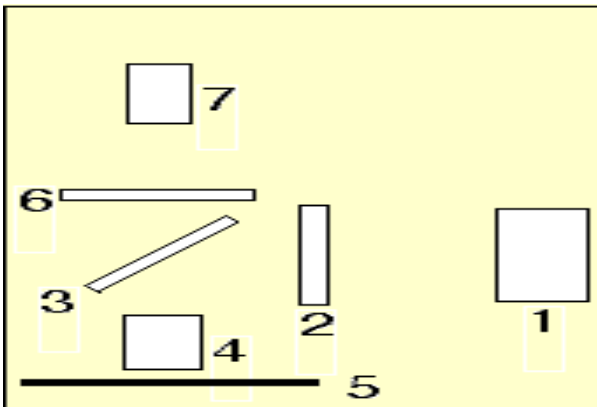
Comme le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Le DAPI est un fluorochrome : quand le DAPI absorbe la lumière UV (350 nm), il émet une fluorescence bleue brillante (450-490 nm) ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN grâce à un microscope à fluorescence.

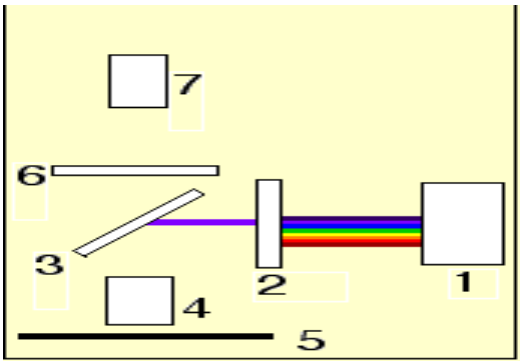


- **Le filtrage dans un microscope à fluorescence**

Le microscope doit être équipé d'un jeu de filtres correspondant aux caractéristiques fluorochrome ou fluorophore

1-lampe
2-filtre d'excitation
3-miroir dichroïque
4-objectif
5-préparation
6-filtre d'émission
7-oculaire

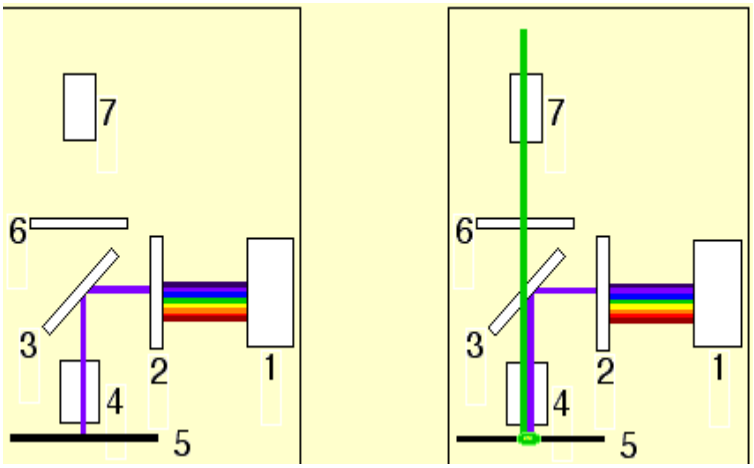



2- Le filtre d'excitation permettant la sélection des radiation absorbées par le fluorophore.

3- Le miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations émissent par le fluorophore.

6- Un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations émissent par le fluorophore.



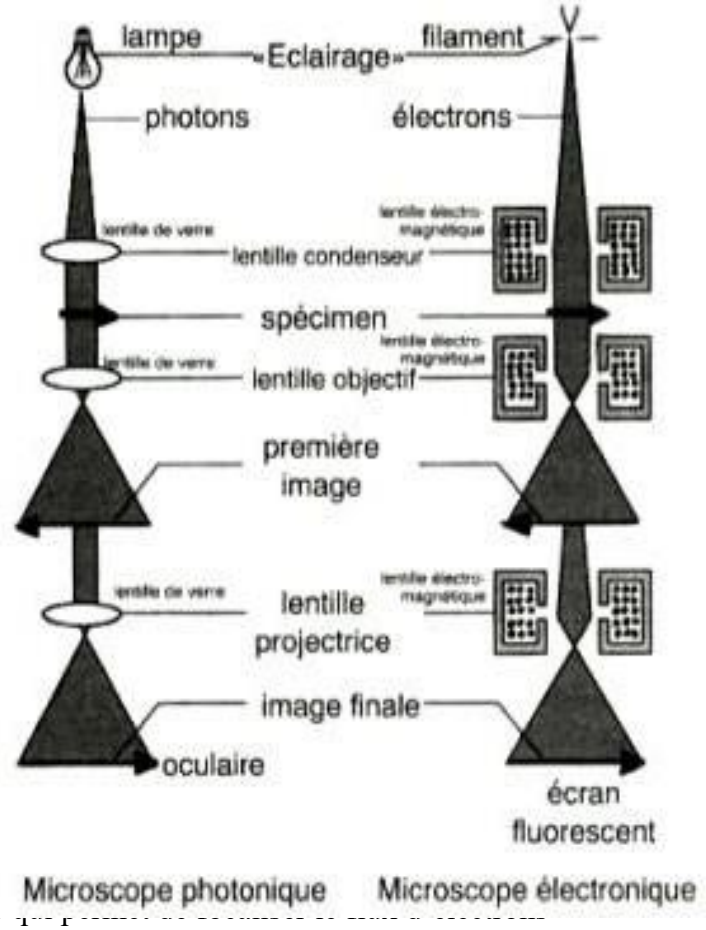
## Les microscopes électroniques

### Microscope électronique à transmission

### Principe du fonctionnement

Le fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET) est basé sur l'émission des électrons de longueur d'onde courte qui seront, au cours de leur trajet, convertis en rayons lumineux de longueur d'onde plus longue

Il est comparable à celui du microscope photonique. La source S est une cathode chargée négativement qui émet des électrons (au lieu des photons) qui sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel entre la cathode et l'anode. Le vide poussé à l'intérieur du ME est nécessaire au déplacement des eélectrons. Les électrons traversent 3 lentilles électromagnétiques L1, L2,




L3 et l'objet. - L1 : le condenseur de la même charge [illegible] sur l'objet. - L2 et L3 jouent le rôle d'objectif et permettent l'agrandissement de l'objet.

### Caractéristiques des électrons

Les avantages majeurs du rayonnement électronique sont

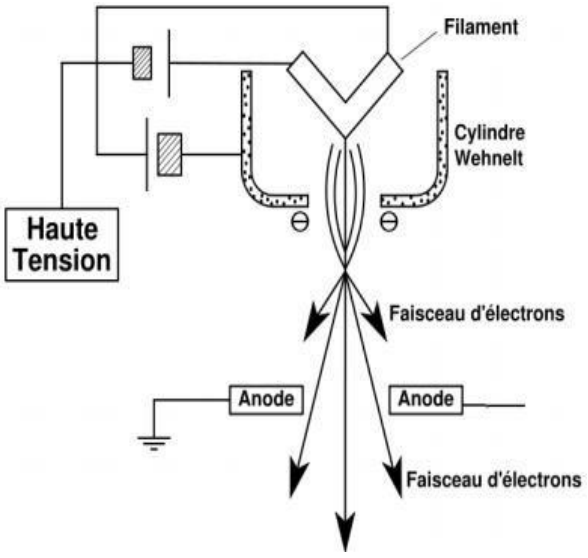
- sa faible longueur d'onde, faible taille et masse ce qui lui permet de donner une résolution excellente.
- Les sources électroniques sont aussi très brillantes, ce qui permet d'obtenir une forte densité de particule dans un faible volume.
- De plus, ces particules interagissent fortement avec la matière.

**Les composants de MET**

**1.Le canon à électrons**

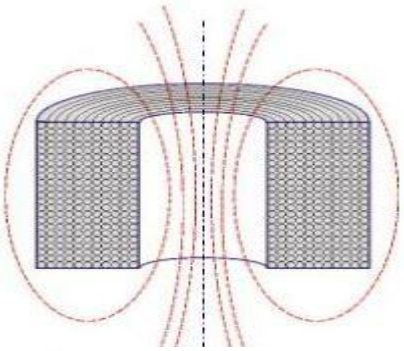
pour produire les électrons Le filament de tungstène est chauffé et est maintenu à un voltage négatif de 1 à 50 kV par une cathode chaude (3000°C effet thermoionique).

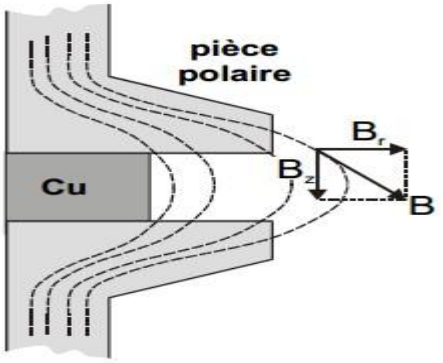
- ✓ Le Wehnelt qui est un cylindre autour de la pointe est légèrement polarisé négativement (entre 0 et 200 V) par rapport à la cathode, ce qui fait converger ou focaliser les électrons vers une région de diamètre (do) appelé le cross-over.
- ✓ Les électrons sont ensuite excités et accélérés par la forte tension d'une anode positive (jusqu'à 200 kV).




**1.Lentilles électromagnétiques**

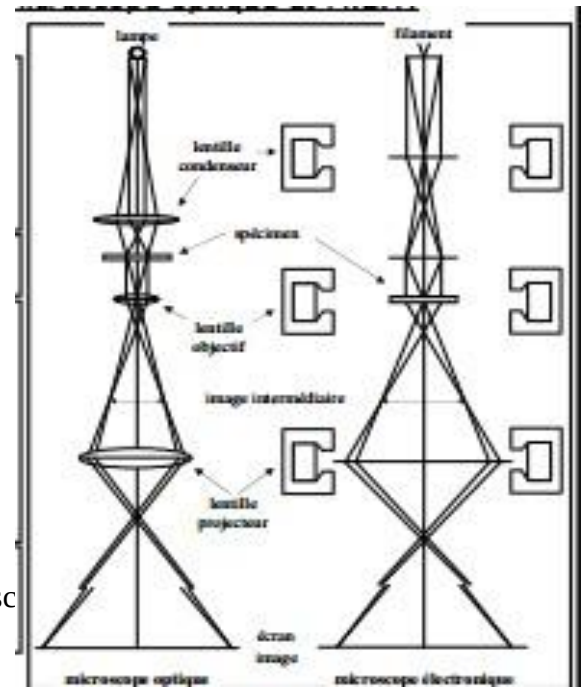
- ✓ L'action d'un champ magnétique sur une particule chargée, de charge q et de vitesse v est l'équivalent de l'optique traditionnelle mais appliquée aux particules chargées.
- ✓ Pour obtenir une lentille électromagnétique, on utilise une bobine torique parcourue par un courant électrique qui engendre un champ magnétique axial (chargé négativement) ou Le faisceau électronique est dévié vers l'axe (cas d'une lentille convergente) tout en subissant un mouvement de rotation autour de l'axe.
- ✓ Ou un champ radial (chargé positivement) Le faisceau électronique est dévié vers l'extérieur.





**a.Lentilles 1 (condenseur)**

Elle permet de condenser les électrons en un faisceau d'électrons sur quelques nm jusqu'à 0,1 mm de la surface de l'objet. Plus la tache électronique est réduite, plus l'analyse est précise et le grandissement du microscope élevé.




**b.Lentille-objectif**

Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon, et ressort avec des informations sur la structure de l'échantillon. Ces informations sont ensuite amplifiées par le système de lentilles objectif du microsc

**c.Lentilles Projecteur**

Elles récoltent les électrons et les convertit en photons afin que les électrons deviennent visibles sur un écran fluorescent (le rayonnement électronique n'est pas visible). L'image détectée est dirigée vers un ordinateur.

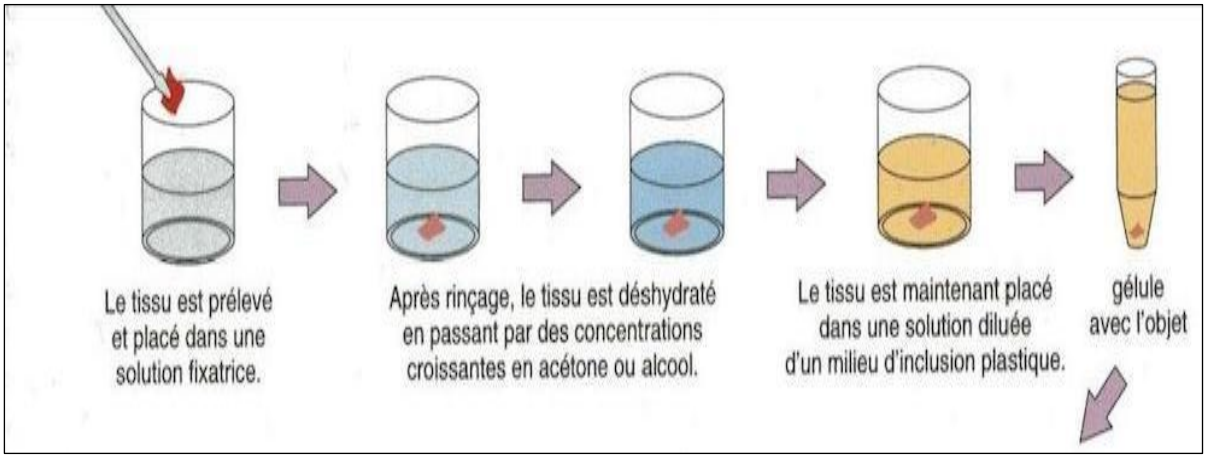
**Préparation des coupes cellulaires ultrafines**

Les cellules doivent être coupées en tranches très fines (50 à 100 nm) pour permettre aux électrons de les traverser, pour cela :

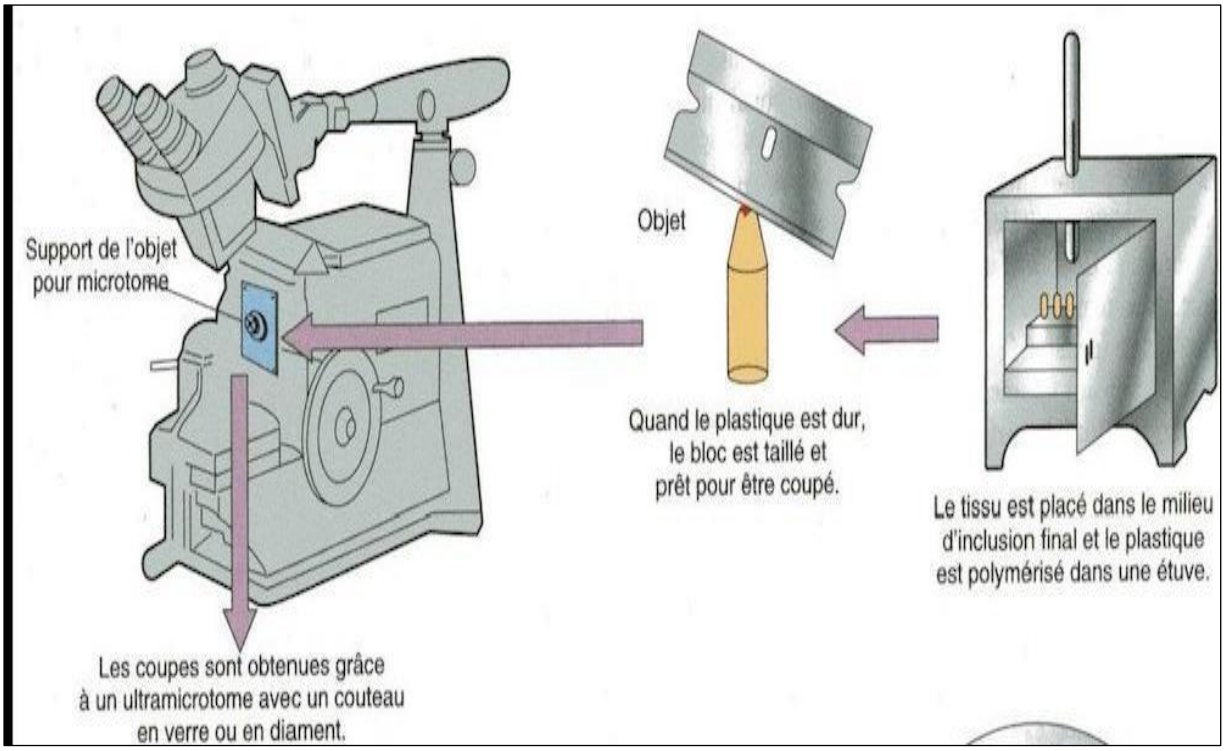
Les cellules sont tuées par des fixateurs (glutaraldéhyde) qui préservent les structures cellulaires.

Les échantillons fixés sont lavés dans l'eau, puis déshydratés par des solvants organiques (acétone).

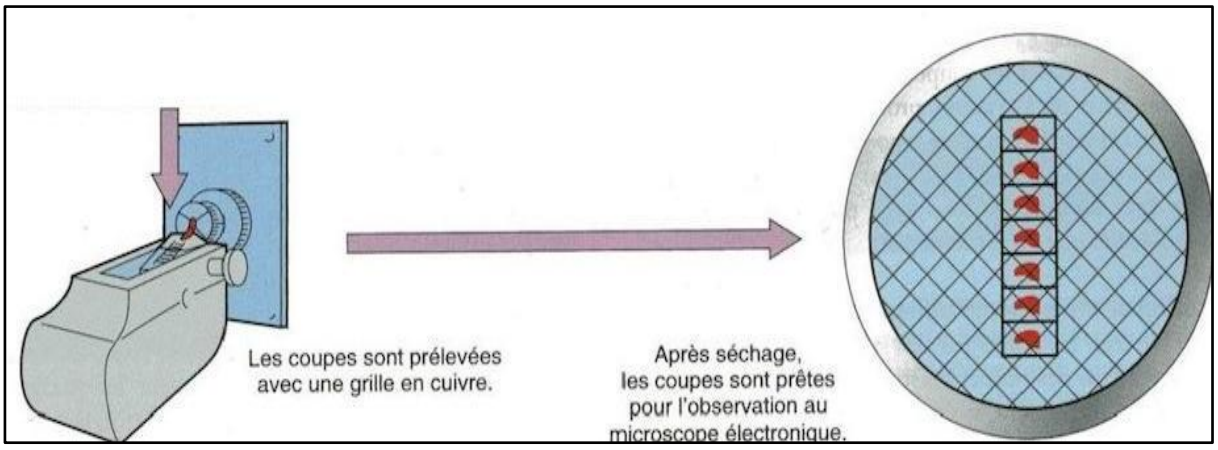
Les échantillons sont inclus dans un bloc de résine ou plastique.



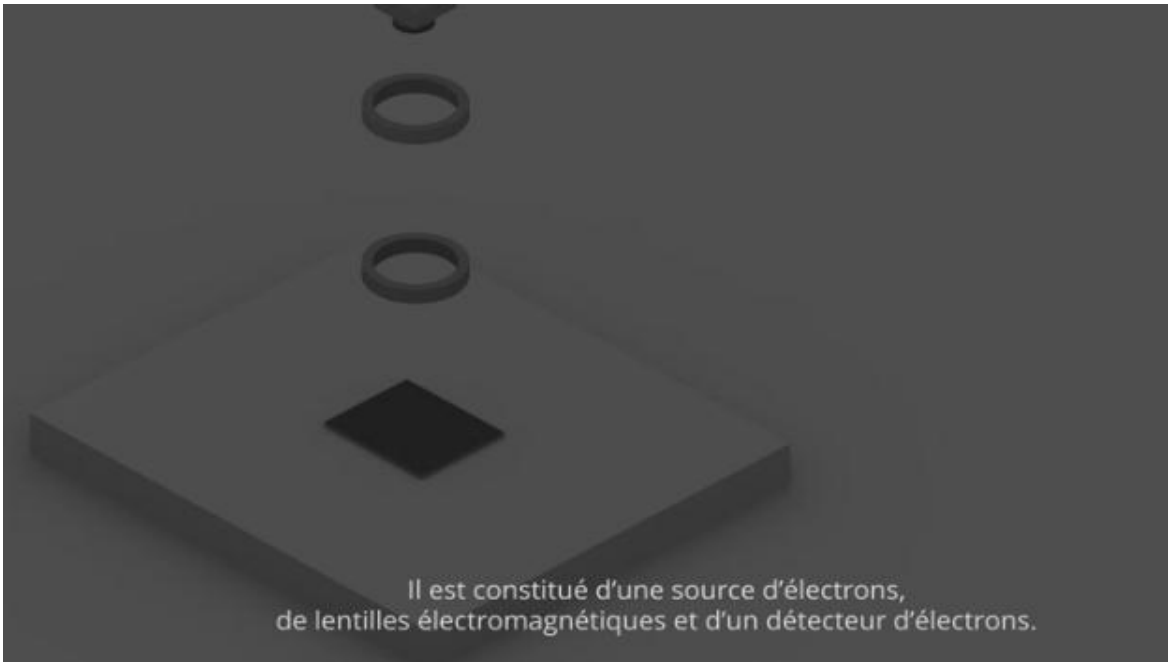
Les blocs de résine renfermant l'échantillon sont ensuite coupés à l'aide d'un ultra microtome (qui est un appareil de très grande précision qui permet des coupes de 80 à 100 nm d'épaisseur) muni d'un couteau de verre ou de diamant.

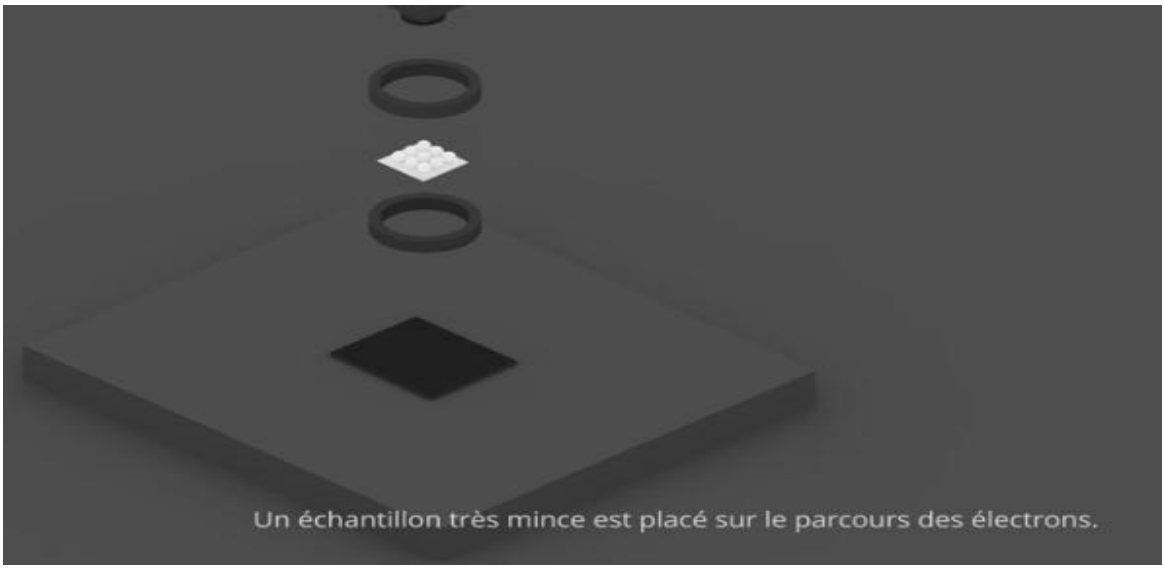


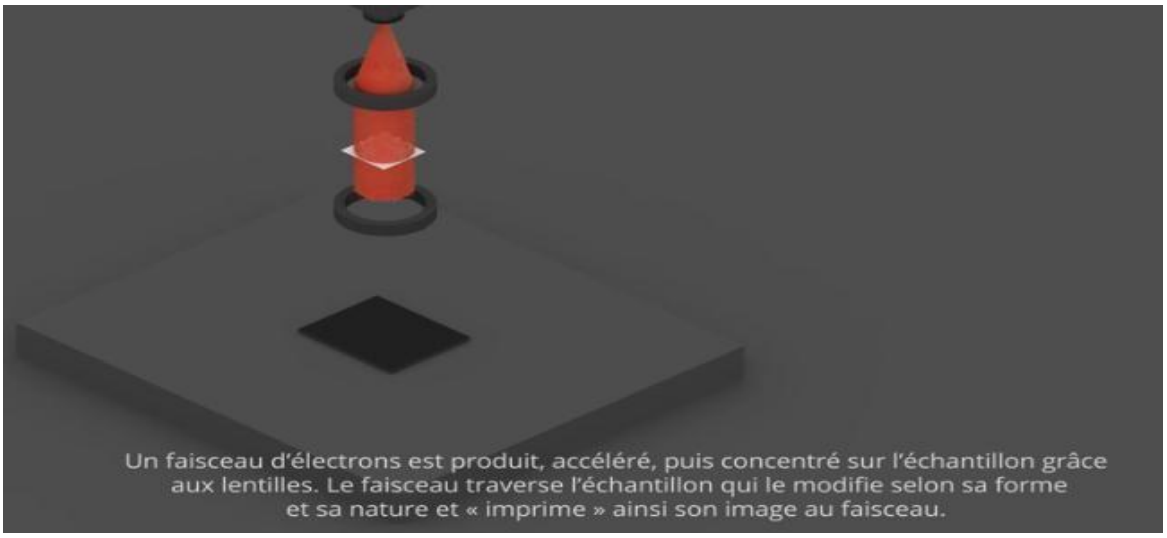
Les coupes cellulaires sont recueillies sur une grille en cuivre. La grille est trempée dans une solution de métaux lourds (uranium, plomb) pour noircir les structures cellulaires et augmenter le contraste (des liaisons s'établissent entre les membranes et le métal imperméable aux électrons.

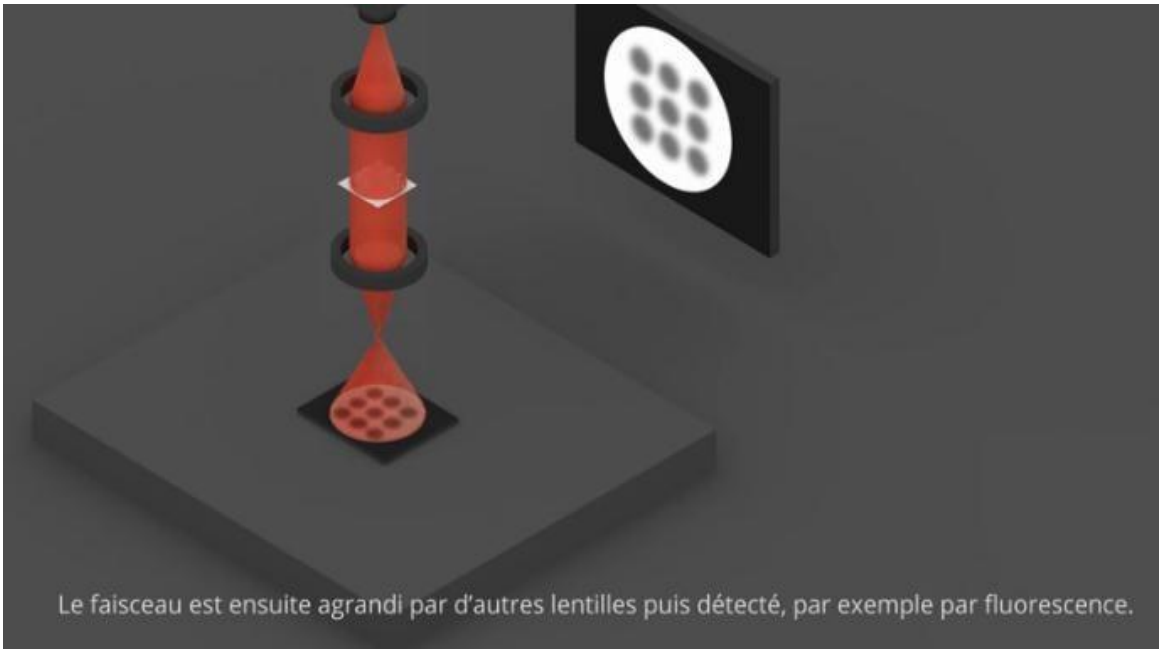



**Etapes de fonctionnement de MET**




Un échantillon très mince est placé sur le parcours des électrons.


Un faisceau d'électrons est produit, accéléré, puis concentré sur l'échantillon grâce
aux lentilles. Le faisceau traverse l'échantillon qui le modifie selon sa forme
et sa nature et « imprime » ainsi son image au faisceau.


Le faisceau est ensuite agrandi par d'autres lentilles puis détecté, par exemple par fluorescence.

**Le Microscope Electronique à Balayage (MEB)**

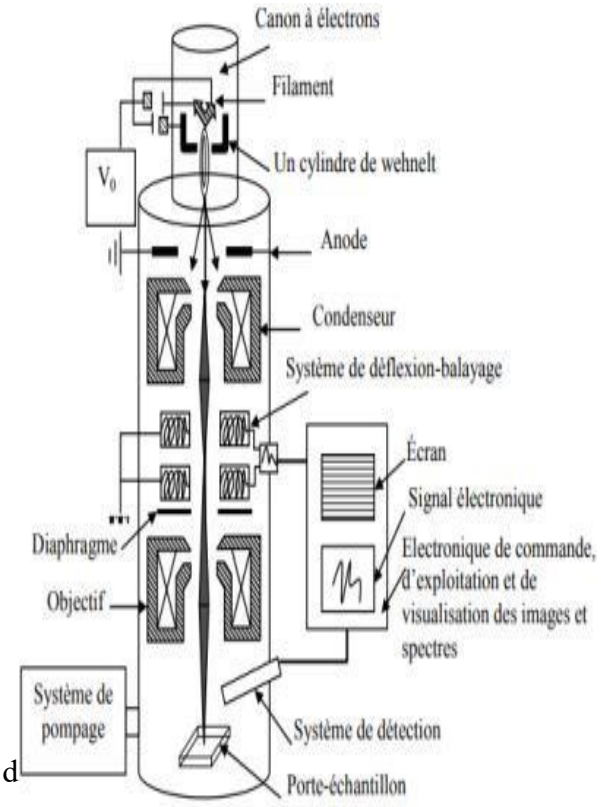
Est un outil d'observation de la topographie des surfaces. Il apporte des informations sur la structure et la texture d'un échantillon et donne des images proche d'une image en trois dimensions. Le microscope électronique à balayage est principalement constitué de :

Une colonne maintenue sous un vide

une source d'électrons **appelée canon à électrons** ; le plus classique est le canon triode constitué d'une cathode formée d'un fil de tungstène chauffé vers 2700Kv.

Un ensemble de lentilles électromagnétiques : le « **condenseur** » destiné à former un faisceau fin et intense et **l'objectif** » qui permet de focaliser le faisceau sur la surface à examiner ;

Un diaphragme objectif,




**Un dispositif de déflexion** « bobines déflectrices électromagnétiques » piloté par un générateur de balayage permettant le balayage de l'échantillon par la sonde électronique

- ✓ Une platine porte-échantillon mobile.
- ✓ Des détecteurs d'électrons.
- ✓ Un système de visualisation d'image couplé d de balayage.

**Préparation des échantillons**

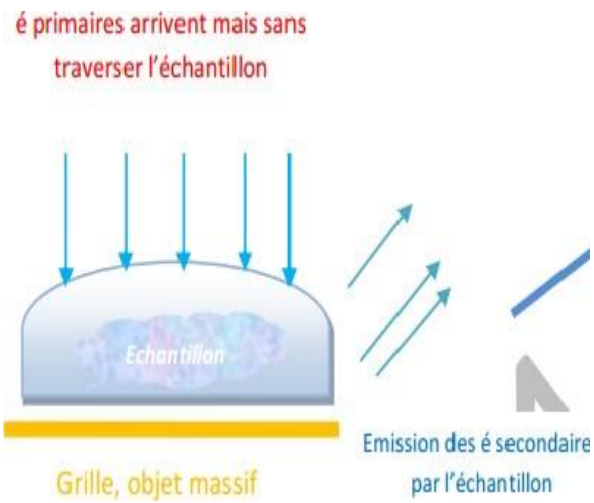
Le but de la préparation d'un échantillon pour le MEB est de produire un objet qui conserve la forme et les propriétés superficielles du vivant, mais qui est totalement déshydraté, en vue de l'observation sous vide.

**Principe**

Il est basé sur l'augmentation du contraste (non pas l'échantillon mais l'espace qui l'entoure) par utilisation de produits imperméables aux électrons comme l'acide phosphotungstique. Ce qui produit une image en négatif.

Etapes de la technique : les différentes étapes de la technique de la coloration négative sont résuméescomme suit :

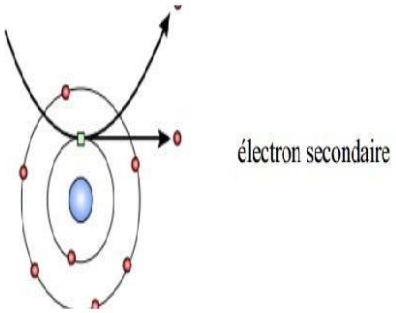
- Préparation de la solution constituée de l'échantillon et de l'acide phosphotungstique (2%).
- Dépôt d'une goutte de ce mélange sur la grille porte objet recouverte d'une membrane ayant de l'affinité avec l'acide phosphotungstique (des liaisons s'établissent entre la membraneet l'acide phosphotungstique imperméable aux électrons).
- Laisser sécher de manière ou l'acide phosphotungstique ne se retrouve que sur la surface de la membrane, autour de l'échantillon mais pas au-dessus de ce dernier. Les électrons 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.



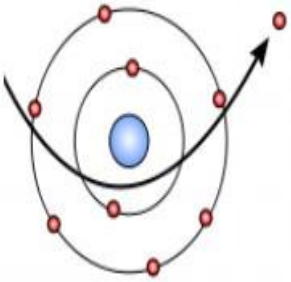

**Diffusion des électrons :**

Il existe deux cas

- Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Quand il interagit avec les électrons d'un atome, il ressort avec perte d'énergie. Un électron secondaire est émis, l'atome est ionisé et devenu claire. C'est le processus d'interaction ou diffusion inélastique.



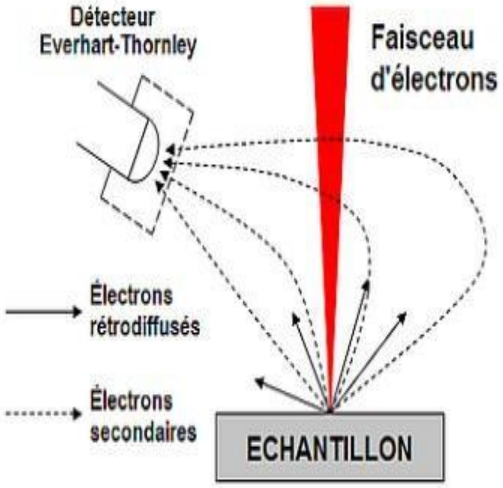
- Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Il ressort sans perte d'énergie il s'appelle un électron rétrodiffusé (il n'a pas échangé d'énergie avec les atomes de l'échantillon). C'est le processus d'interaction ou diffusion élastique. L'électron incident est rétrodiffusé élastiquement.



**Détecteur**

Ce détecteur est entouré, pour sa partie récoltante, d'une cage électrique attirant les électrons considérés

Les interactions électrons primaires- échantillon génèrent des signaux sous formes d'électrons désexcitatés (secondaires). Cette désexcitation de ces électrons se traduit par des rayons lumineux sous forme d'image construite sur l'écran luminescent.



# II.Méthodes d’étude de la composition biochimique des cellules

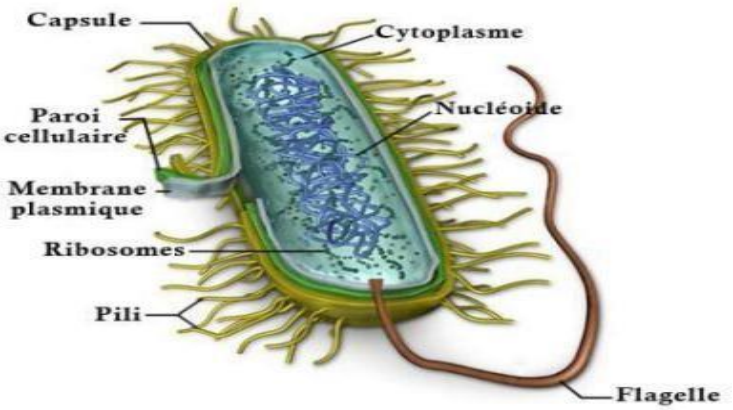
## 1. Matériels cellulaires

La cellule est l’unité de base de point de vue structure et fonction des organismes biologiques. Toute cellule dérive d’une cellule préexistante par division.

**Différents types de cellules**

Il existe deux types fondamentaux de cellules :

Les cellules procaryotes (pro = primitif; caryon = noyau): cellules sans vrai noyau c'est-à-dire que le matériel génétique n'est pas enfermé dans une enveloppe nucléaire et sans organites.




Les cellules eucaryotes (eu =vrai, caryon= noyau): le noyau est délimité par une enveloppe nucléaire. Des membranes internes délimitent des compartiments cytoplasmiques appelés organites.

Parmi les cellules eucaryotes on distingue deux types de cellules : animale et végétale

Les cellules animale et végétale (figure 3) sont entourées par une membrane plasmique et présentent, en grande partie les mêmes organites. Mais, La cellule végétale est caractérisée par:

- La présence d'une paroi squelettique
- La présence des plastes.
- Une vacuole de grande taille pouvant occuper la plus grande partie du volume cellulaire.

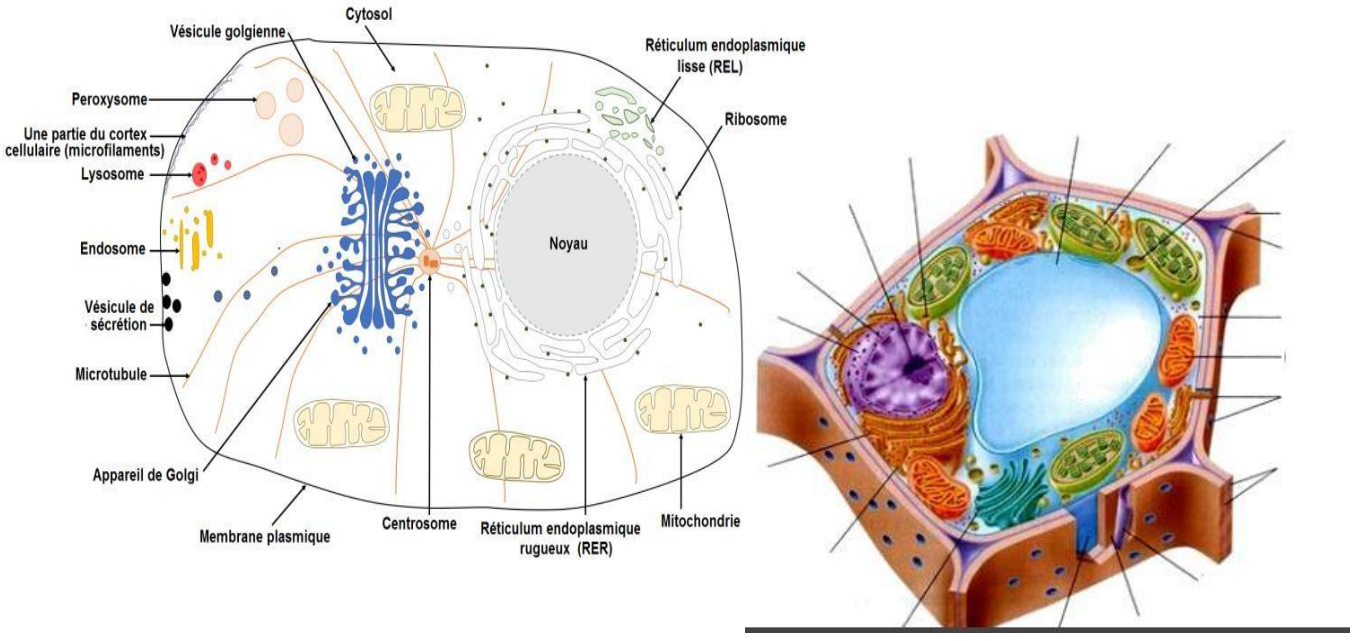



**Figure 3.** Les cellules eucaryotes (animale et végétale).

**Composition chimique de la cellule**

Les êtres vivants sont composés de trois types de matières qu'on peut découvrir successivement lorsqu'un échantillon vivant est exposé à la chaleur (tableau 1):

- De la vapeur d'eau se dégage en premier révélant la présence de l'eau. Sa teneur dépasse en général les 60 %.
- L'échantillon devient noir à cause de la combustion d'une matière riche en carbone : la matière organique.
- A la fin de la combustion, il persiste de cendres composées d'éléments minéraux.

**Tableau 1.** Composition chimique de la cellule

| Composants | Pourcentage de la masse totale |
|---|---|
| Eau | 70% |
| Protéines | 18% |
| Lipides | 5% |
| ADN | 0,25% |
| ARN | 1,1% |
| Polyosides | 2% |
| Molécules simples (acides aminés, acides gras, glucose) | 3% |
| Ions minéraux | 1% |

**L'eau dans la cellule**

L'eau est la molécule la plus abondante dans les cellules vivantes. Elle dépasse les 60 % de la matière vivante. Ses rôles les plus importants sont :

- C'est le solvant de beaucoup de substances cellulaires.
- C'est le milieu où se déroule la quasi-totalité des réactions biologiques.
- 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.

**Les substances organiques**

- Ce sont des molécules dont l'atome principal est le carbone. La molécule la plus simple est le méthane qui comprend un atome de carbone associé à 4 atomes d'hydrogène. Il existe quatre types de molécules organiques:

- Les glucides

- Les lipides
- Les protéines
- Les acides nucléiques

**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
- 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.**

**Les préparations d'étude**

**Cellule entière ou coupes des cellules**

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

**a. Cellules entières**

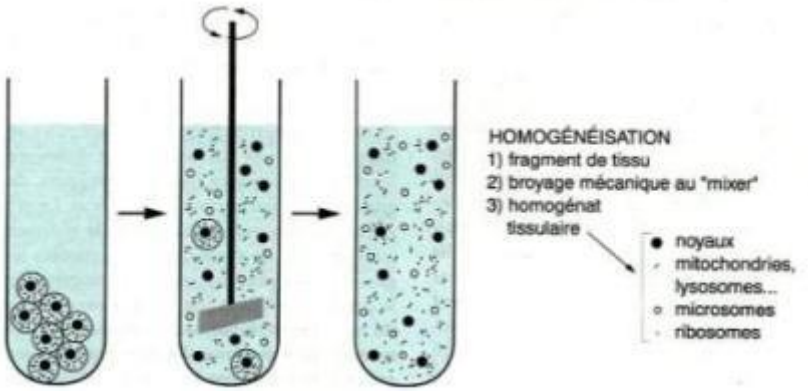
Des cellules vivantes peuvent être observées entre lame et lamelle afin d'évaluer certaines de leurs fonctions (par exemple, mobilité, mesure de la fréquence du battement des cellules ciliées, chimiotactisme des granulocytes neutrophiles). L'examen microscopique est parfois effectué après adjonction 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**

Voir 1.2.1.4. chapitre 1 Préparation des coupes cellulaires ultrafines.

**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.




**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.

le tissu cellulaire est broyé dans les conditions suivantes :

- Dans une solution de saccharose isotonique par rapport au milieu intracellulaire pour éviter les échanges d'eau.
- Dans une solution à pH constant pour éviter les échanges de protons.
- A 0°c pour annuler l'activité enzymatique.

Différentes techniques sont utilisables :

**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 4). 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).

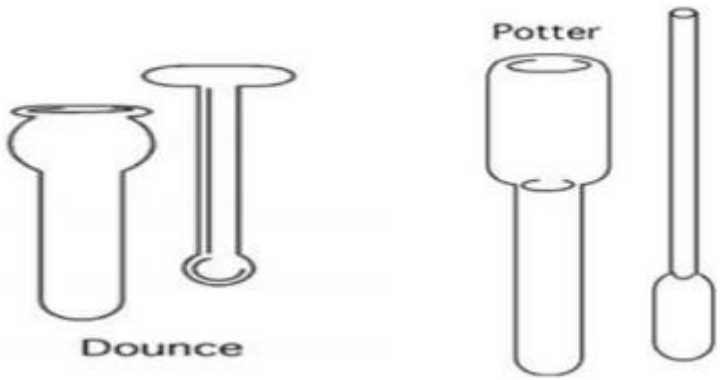



**Figure 4.** Broyeurs mécaniques en verre.

**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 faits 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.

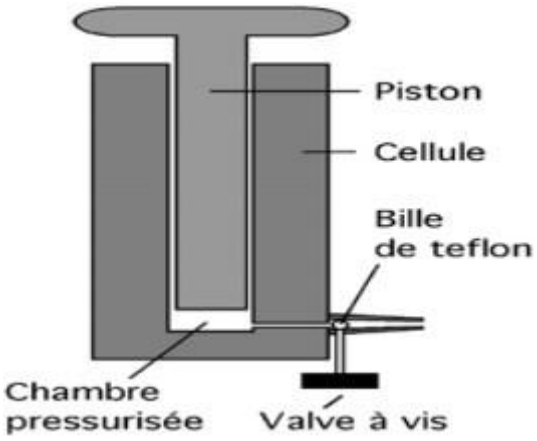



**Figure 5.** Schéma de la presse de french.

**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 entrainent 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'œuf de poule ou la lyticase de S. aureus peuvent être utilisées.

**Fractions cellulaires**

Si l'on veut connaitre 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 sédimentent les premiers.
- les moins denses sédimentent par la suite.

La vitesse de sédimentation répond à l'équation suivante :

$$\mathbf{V = Kr^2(dp - dm)g}$$ 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.

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**

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

**L'ultracentrifugation** utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

**Principe**

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différentes contenus dans un liquide.

Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces (figure 6) :

- 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.

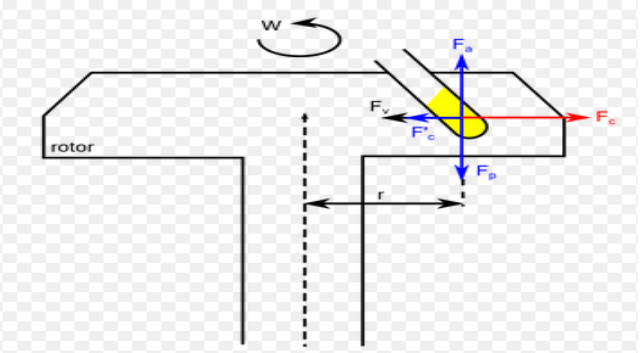



**Figure 6.** Différentes forces appliquées

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:

$$\mathbf{g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2}$$

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.

**Types d'ultracentrifugation**

Il existe deux principaux types :

**L'ultracentrifugation différentielle**

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.

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 sédimentent 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 7).

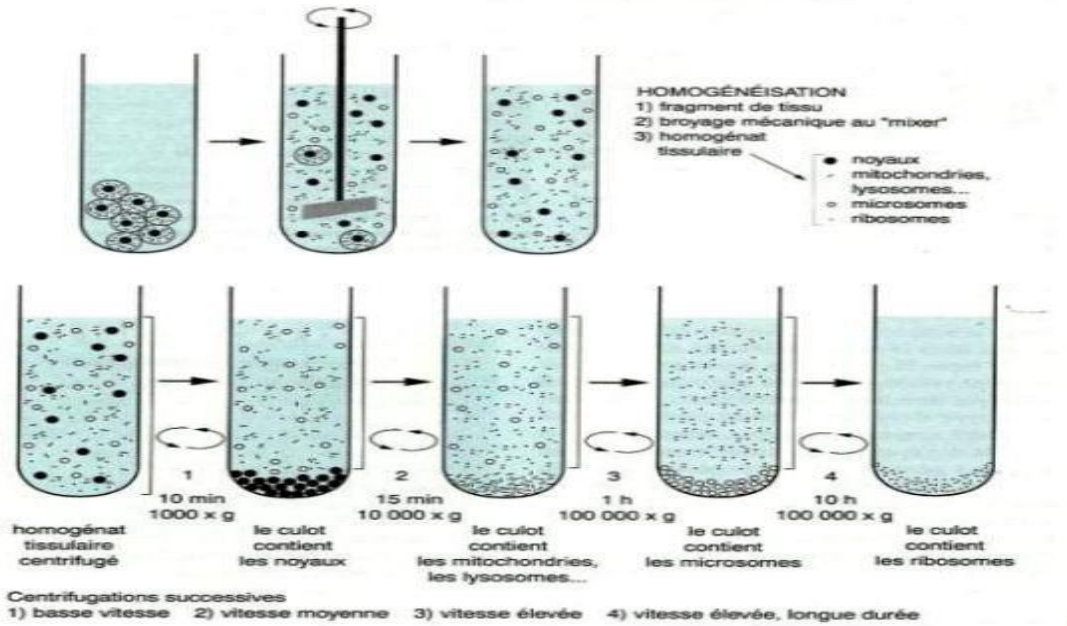



**Figure 7.** Différentes étapes de l'ultracentrifugation différentielle

**L'ultracentrifugation en gradient de densité**

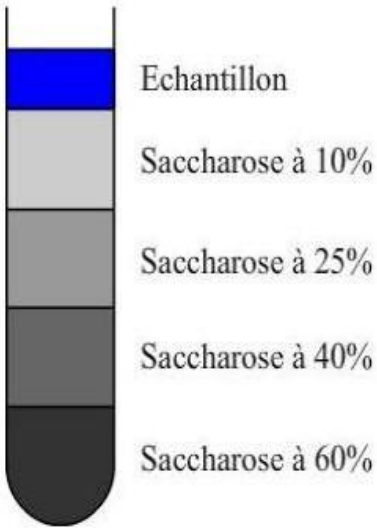
Cette technique permet de séparer en une seule fois des organites qui ont des vitesses de sédimentation très voisines (cf. très faibles différences de densité). On travaille dans un milieu présentant un gradient de densité, d'où le nom donné à la technique.

**Principe** : On a vu précédemment que la vitesse de sédimentation est fonction de la différence (dp - dm), or quand dp = dm Vsed = 0, l'organite s'immobilise ainsi dans la zone ou 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.

Pour obtenir des solutions de densités différentes, deux gradients peuvent être utilisés, un gradient de saccharose formé préalablement à la centrifugation, et un gradient de chlorure de césium (CsCl). Il existe deux types de gradients:

**A) Les gradients discontinus**

Le gradient est préformé par des dépôts successifs de solution de saccharose de densité croissante (Figure 8). Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes. Au dessus, leur densité étant plus élevée, ils migrent vers le bas, et au dessous, leur densité étant plus faible ils migrent vers le haut. Il arrive de limiter le gradient à deux densités seulement avec une solution inférieure très dense. **Figure 8.** Centrifugation en gradient discontinu.




**B) Les gradients continus** Ce sont des gradients pour lesquels la variation de densité est continue. Une solution de CsCl de densité donnée soumise à une force de gravité intense forme spontanément un gradient de densité continu (Figure 9). Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes.

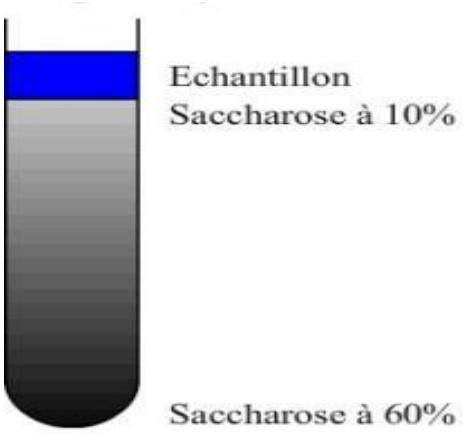



**Figure 9**. Centrifugation en gradient continu.

# 2. Les méthodes

## 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.

**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.

**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.

**L'électrophorèse**

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

Des particules chargées (protéines ou acides aminés) sous l'effet d'une solution tampon et les différents pHi sont donc placés dans un champ électrique créé par une tension

continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-) (figure 10).

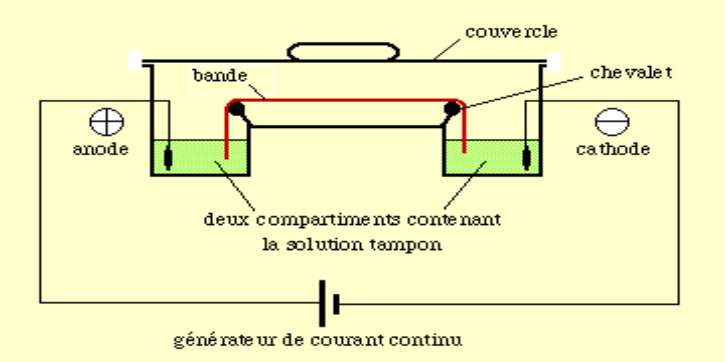



**Figure 10.** Chambre d'électrophorèse.

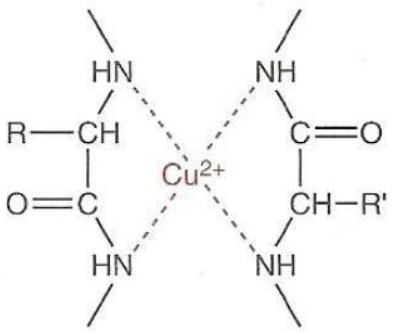
**Dosage des protéines (exemple de la technique de biuret)**

**Principe**

Le **biuret** est un composé organique obtenu par condensation de deux molécules d'urée ($C=O(NH_2)_2$ et élimination d'une molécule d'ammoniac ($NH_3$)

$2\ CO(NH_2)_2 \rightarrow H_2N\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH_2 + NH_3 \uparrow$

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 :




**Réactif de GORNALL**

- De sulfate de cuivre ($CuSO_4$, $5H_2O$) 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 $Cu(OH)_2$ 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).

Tableau 2. Gamme d'étalonnage

| Tube N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | Echant |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SAB 10g/l (ml) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 | - |
| Eau physiologique (ml) | 1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 | - |
| Solution échantillon (ml) | | | | | | | 1 |
| Réactif de Gornall (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Mélanger puis incuber les tubes à l'obscurité pendant 30min puis lire l'absorbance à 540nm Contre T1 | | | | | | | |
| Protéine en mg par tube | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | X |
| Abs à 540nm | | | | | | | |

Cette proportionnalité (figure 11) permet alors de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser.

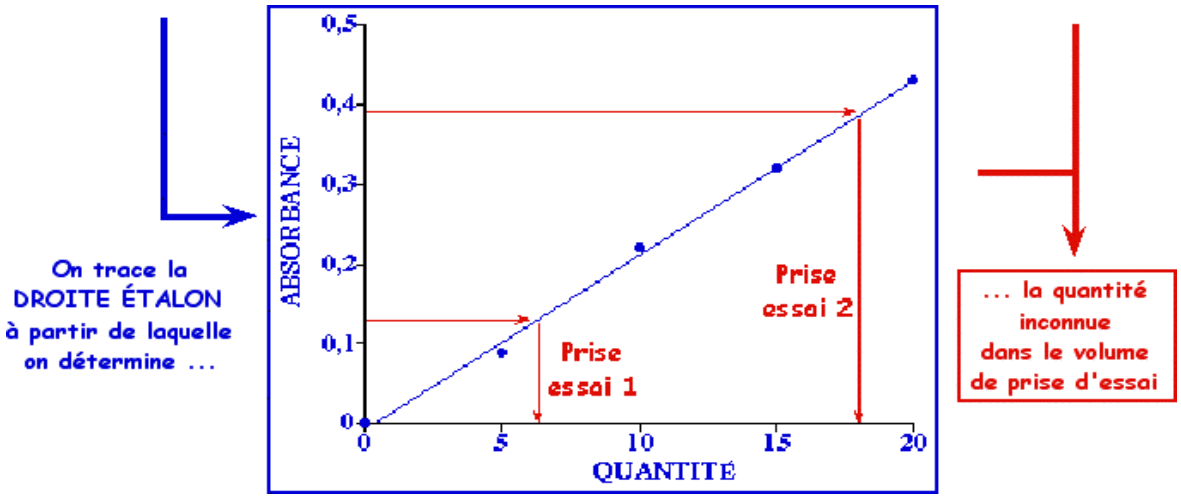



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage Abs= f (quantité de proteines/tube).

## 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.

**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).

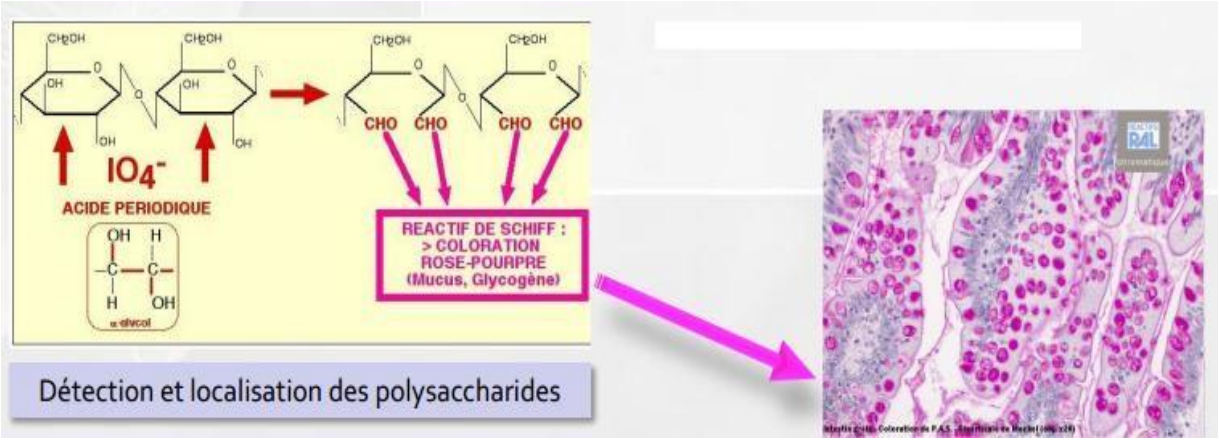



**Figure 12.** Réaction de localisation des polysaccharides.

**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**

● L'emploi d'enzymes d'hydrolyse de façon spécifique soit l'ADN soit l'ARN, cas de DNase et RNase est nécessaire (figure 13).

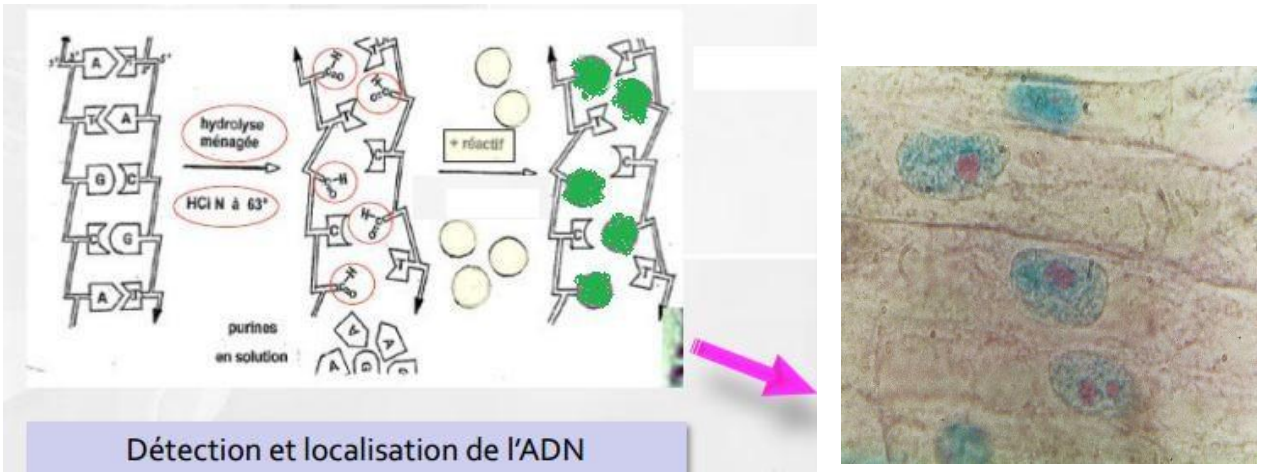



**Figure 13.** Réaction de localisation de l'ADN.

## 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 (figure 14). On travaille toujours à partir de coupes tissulaires.

La méthode se déroule en deux étapes :

- 1) formation du complexe Ag-Ac = complexe immun : la coupe est trempée dans un bain contenant l'anticorps primaire en solution.
- 2) révélation de la présence des complexes immuns : 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.

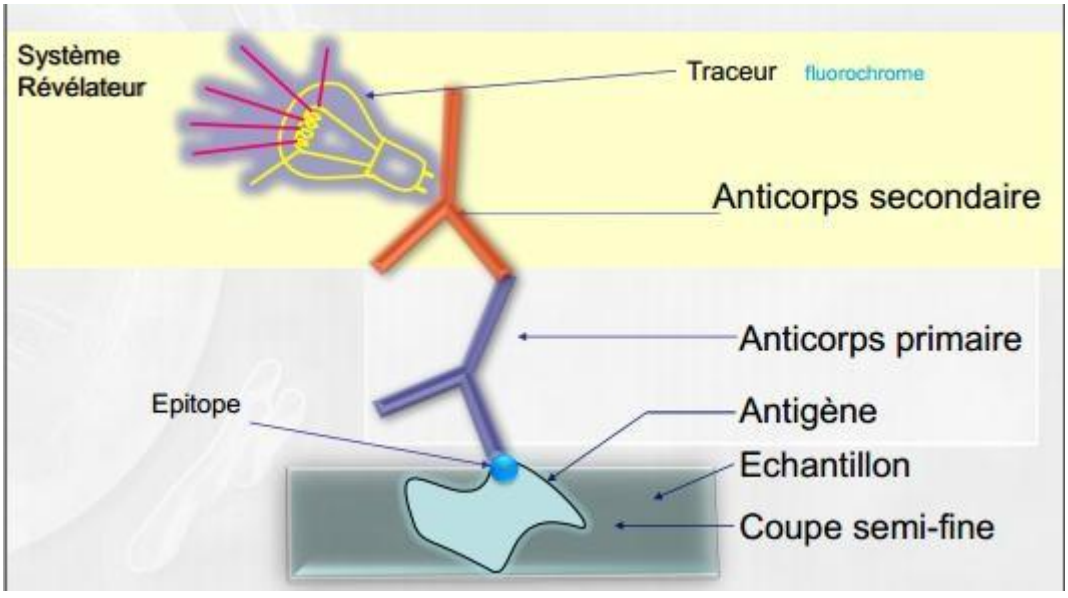



**Figure 14.** Technique de localisation d'antigènes Ag

# II. Techniques de génie génétique (séquençage d'ADN)

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La méthode se déroule en plusieurs étapes :

## 1. Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)

L'extractation de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN,…).
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

## 2. Amplification in vitro des acides nucléiques PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

### PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour avoir réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes.
1- Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin : **dénaturation** est réalisée à environ 95°C.

2- Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques : **hybridation (qui est un** appariement entre des bases complémentaires amorce-partie ADN à amplifier à l'aide de l'ADN ligase, elle se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C).

3- Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire à l'aide de ADN polymérase. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin : **polymérisation** est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins

complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Le nombre de cycle est défini par l'expérimentateur selon le degré d'amplification souhaité, dans la plupart des cas, ce nombre est d'environ 30 (un facteur d'amplification de l'ordre de $2^{30}$).

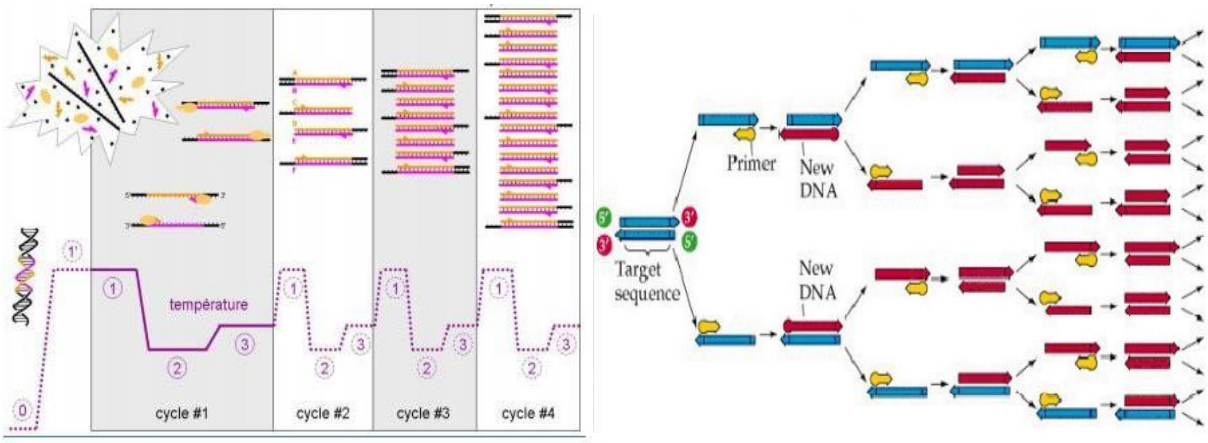



**Figure 15.** Evolution de la température et amplification d'ADN par PCR.

**RT-PCR**

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé.

## 3. Séquençage d'ADN

Actuellement la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de Sanger.

Cette méthode génère des fragments d'ADN terminés par l'une des quatre bases marquées au préalable, car l'élongation de la chaîne s'arrêtera après l'incorporation d'un didésoxynucléotide (ddNTP) (figure 16). C'est le principe sur lequel baser cette méthode.

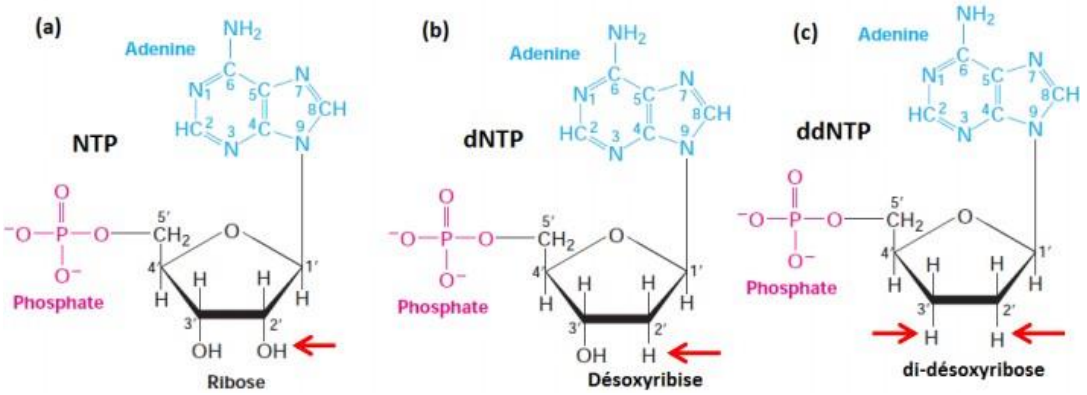



**Figure 16.** Les différentes formes des nucléotides.

Dans le ddATP, le groupement 3'-OH est remplacé par un hydrogène. Cette modification empêche la poursuite de la synthèse de l'ADN qui continue normalement sur le 3-OH

La méthode de Sanger permet de déterminer une séquence inconnue par l'intermédiaire d'une copie d'ADN simple brin. Réalisé grâce à l'ADN polymérase et une amorce spécifique. Pour mieux comprendre le principe de séquençage, on utilise des ddNTP non marqués.

Alors on utilise quatre tubes séparés contenant les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP), ADN polymérase; amorce, eau purifiée de nucléases, MgCl2 et l'ADN à séquencer.

Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation.

● La détermination de l'enchaînement des nucléotides dans un fragment d'ADN simple brin par la méthode de Sanger comporte deux étapes:

1- Synthèse du brin complémentaire d'un brin matrice à l'aide d'une polymérase à partir d'une amorce, en présence des 4 dNTPs et d'un ddNTP qui joue le rôle de terminateur de chaîne (absence de 3'-OH). Quatre réactions en parallèle sont nécessaires, chacune avec l'un des terminateurs présents en faible quantité.

2- Séparation par électrophorèse (PAGE) des fragments synthétisés, le nombre de ces fragments dépend du nombre de résidus nucléotidiques. Donc la position des terminateurs dans la séquence (figure 17).

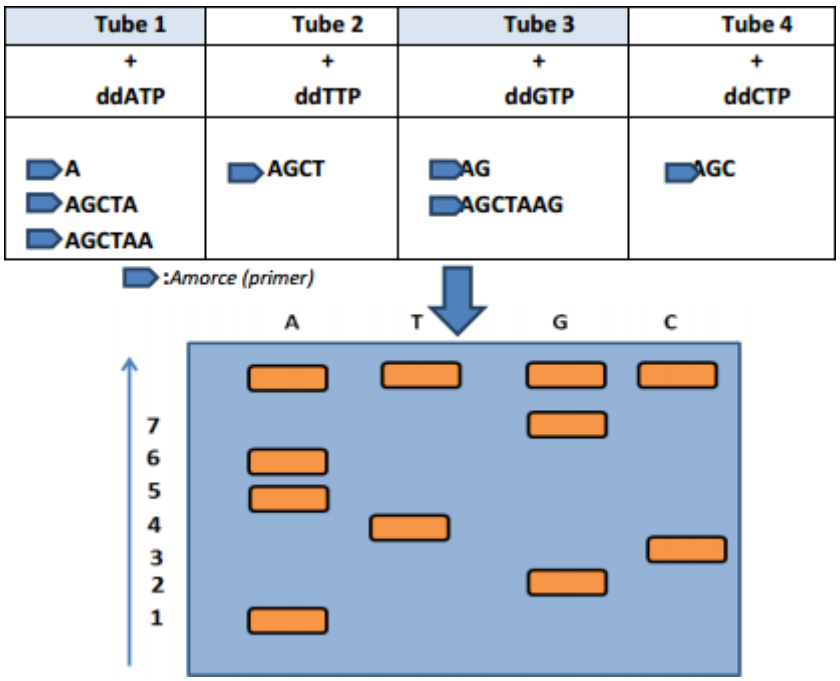
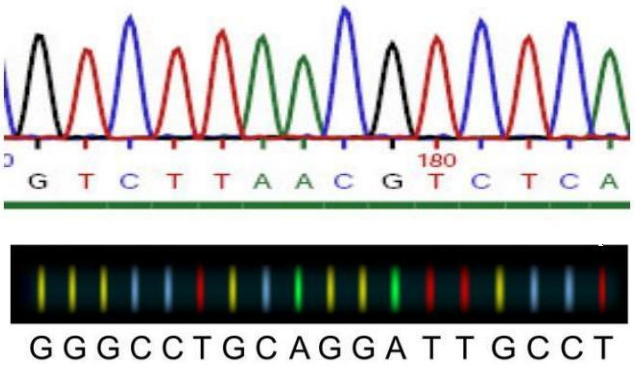



**Figure 17.** Séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger.

**Automatisation du séquençage**

Dans le séquençage automatique, des marqueurs fluorescents sont utilisés, un marqueur différent pour chaque ddNTP (bleu, rouge, vert, orange...etc.). La polymérisation se fait dans un seul tube contenant le mélange réactionnel et les quatre ddNTPs.

● Les didésoxynucléotides sont marqués avec des fluorescences différentes, cela permet de faire une seule réaction et une seule lecture. Le séquenceur détecte la fluorescence et repère la taille des fragments d'ADN.




● On obtient donc des courbes de fluorescences qui sont interprétées en termes de nucléotides.

**Références**


- CHADLI Aicha, Polycopie cours de Biologie cellulaire, Ecole supérieure d'agronomie Mostaganem,2018.
- CHALANE Fatiha, Polycopie de cours de Biologie Végétale, Ecole supérieure d'agronomie Mostaganem,2018.
- CHALANE Fatiha, Polycopie de cours Travaux pratique de physiologie végétale, Université Dr. Moulay Tahar Saida.2020.
- Folco Laverdière,Anja Holstein,Laurent Thiebaut,Robert Mallee,Guillaume Gravejat,Benjamin Desclozeaux, Dossier Couplage :Les principales méthodes d'analyse,1999.
- https://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/methodes-detudes-cellulaires.htm