



Méthodes d'analyse biologique

Génie Agrobiologie
 Semestre 2

Pr. F. FAHMI

Année universitaire 2019/2020

1

Méthodes de séparation

Introduction

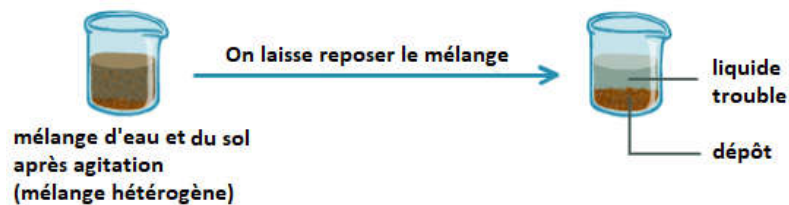
- Ensemble de procédés utilisés pour séparer les constituants d'un mélange.
- Techniques basées sur les différentes propriétés physiques des constituants du mélange.
- Le choix de méthode est en fonction du mélange considéré et des états de ses constituants.
- Si dans un mélange on peut distinguer deux ou plusieurs constituants, le mélange est hétérogène. (exemple : un jus de fruit dans lequel on voit de la pulpe)
- Si on n'en voit qu'un seul, le mélange est homogène. (exemple : l'eau de mer)

2

1- La décantation

C'est un procédé mécanique qui permet de séparer soit:

- Une phase solide de matières en suspension dans un liquide (solide-liquide).

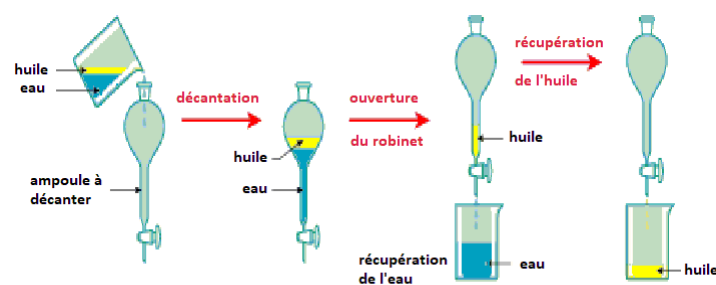


Les particules solides les plus lourdes (sol) se déposent au fond d'un bécher après un certain temps de repos.

La plus grande partie de l'eau pourra ensuite être versée délicatement dans un autre récipient.

3

- Deux phases liquides non miscibles de densités différentes (liquide-liquide).



Séparation de l'huile et de l'eau à l'aide d'une ampoule à décanter.

Le liquide qui possède une grande densité se déplace vers le fond de l'ampoule.

Le liquide qui possède une faible densité se déplace vers le haut.

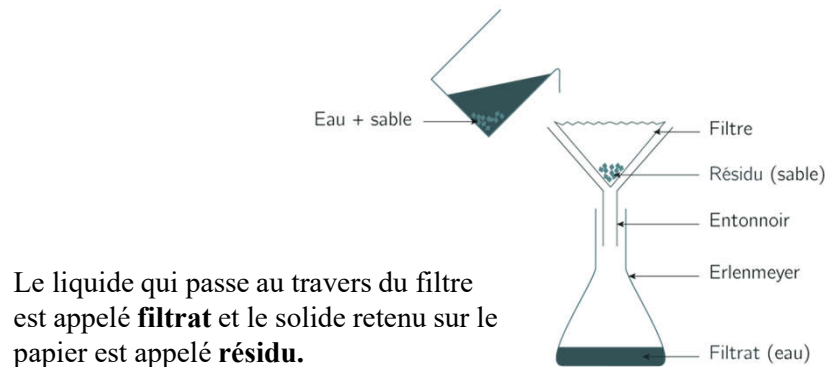
Lorsque les deux phases sont bien distinctes, on peut séparer les deux liquides.

4

2- La filtration

La filtration est utilisée pour séparer un liquide d'un solide qui est insoluble.

- ➡ On utilise un filtre qui permet de retenir les particules solides qui sont plus grosses que les pores (trous) du filtre.



5

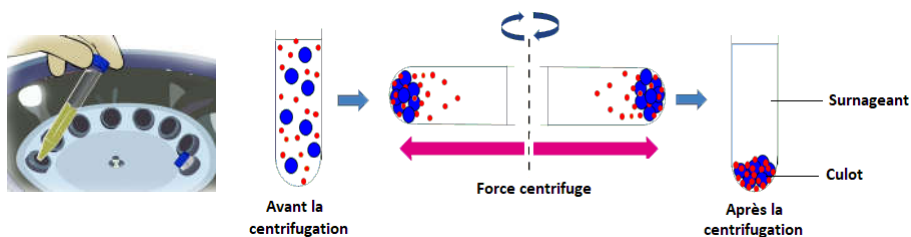
3- La centrifugation

La **centrifugation** est une technique de séparation qui, par l'action de la force centrifuge, permet de séparer de deux à trois phases.



Le mélange est entraîné dans un mouvement de rotation très rapide dans une **centrifugeuse**.

Les particules solides les plus lourdes sont poussées vers le fond du récipient (**culot**) sous l'action de la force centrifuge, alors que les particules plus légères et les liquides restent en surface (**surnageant**).



6

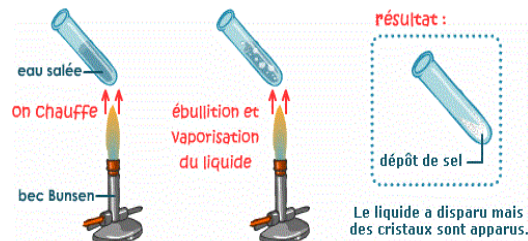
4- L'évaporation

L'**évaporation** est un processus par lequel on élimine la partie liquide d'un mélange en le transformant en gaz.

Le mélange s'évapore naturellement à température ambiante



Accélérer le processus en chauffant le mélange

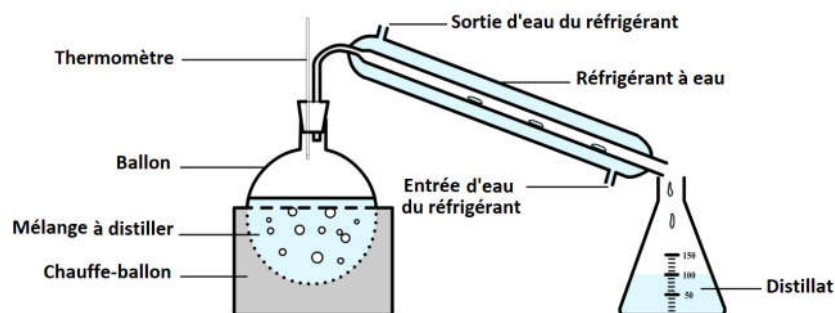


L'évaporation sert à récupérer la partie solide d'un mélange homogène (sel dissous).

7

5- La distillation

La **distillation** est une technique de séparation des mélanges, utilisée pour séparer les constituants d'un mélange homogène liquide ou d'un mélange hétérogène comportant au moins une phase liquide.

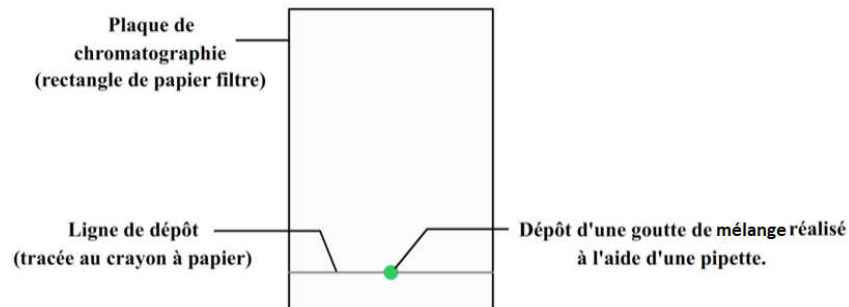


- Le mélange placé dans le ballon est chauffé jusqu'à ébullition.
- L'eau est alors vaporisée tandis que les composés dissous restent.
- La vapeur d'eau traverse ensuite un réfrigérant. A son contact la vapeur d'eau se refroidit et se liquéfie pour former des gouttelettes qui coulent et forment le **distillat** (eau pure).

8

6- La chromatographie

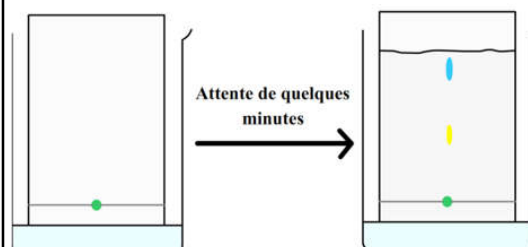
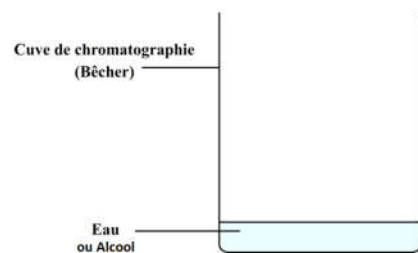
La **chromatographie** sur papier est utilisée pour séparer un mélange de colorants grâce à leurs différentes vitesses de migration.



- On trace la ligne de dépôt à environ 1 cm de la partie inférieure.
- Sur la ligne de dépôt, on dépose une goutte de mélange.

9

- On prépare ensuite la cuve à chromatographie.
- On verse dans de ce dernier de l'eau ou l'alcool à environ 1 cm.



- On doit maintenir verticalement la plaque et plonger sa base dans un solvant.
- Le liquide va alors monter le long de papier par capillarité et entraîne avec lui le colorant vert qui fini par se séparer en deux tâches de couleurs bleu et jaune (molécules).

10

Méthodes de marquage

Introduction

- Les cellules vivantes non pigmentées ne sont pas clairement visibles au microscope à fond claire.



Utiliser des colorants spécifiques pour une observation correcte.

- Cette technique n'est pas suffisante, il faut descendre au niveau moléculaire pour savoir la localisation et la quantité de molécules présente dans une cellule.



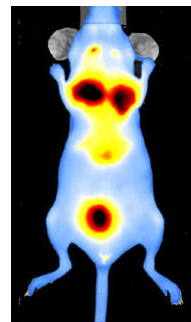
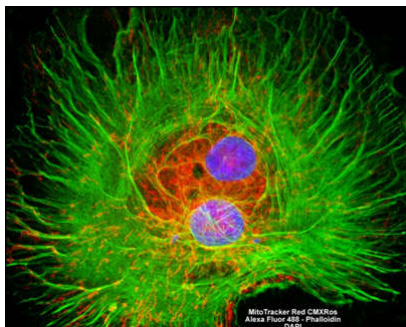
Techniques de marquage

Fixer d'une manière spécifique ce qu'on veut détecter pour le rendre visible au microscope.

11

1- La fluorescence

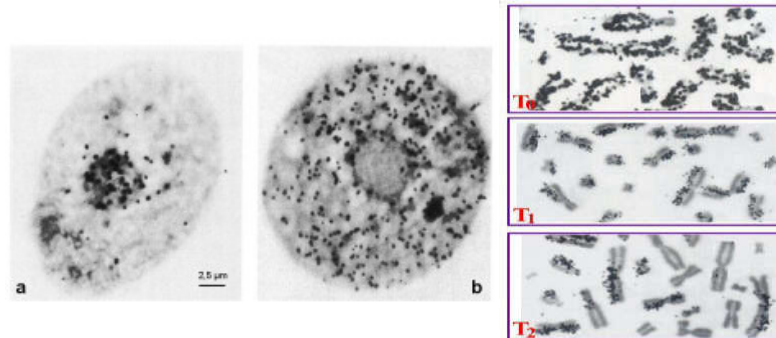
- La **fluorescence** est une émission lumineuse provoquée par l'excitation des électrons d'une molécule.
- Permet de marquer spécifiquement un élément, un organe ou une protéine.
- La molécule de détection est accrochée à une molécule fluorescente (fluorophore, fluorochrome).
- La détection se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence.



12

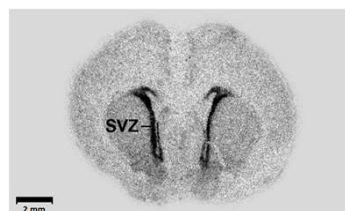
2- La radioactivité

- La **radioactivité** est l'émission de rayonnement par des atomes instables.
- La molécule de détection est un atome radioactif.
- Poser la préparation sur une pellicule photographique qui sera développée au bout d'un certain temps d'exposition (quelques heures à quelques jours). On obtient alors une image dont les zones sombres sont les plus radioactives.



13

- L'autoradiographie permet de travailler sur des préparations de taille importantes, comme des tranches de cerveau (dm²).



- Le principal inconvénient de la radioactivité est son danger.
- Cela oblige à prendre des précautions considérables lors des manipulations.

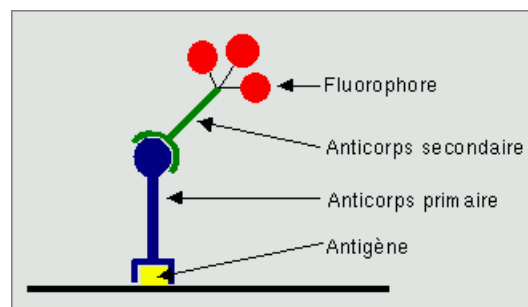
14

3- L'immunomarquage

L'**immunomarquage** consiste à révéler une protéine spécifique sur une coupe de tissu.

Principe :

- utiliser un anticorps spécifique à la protéine recherchée, afin qu'il puisse s'y fixer. D'un autre côté, on couple ce même anticorps à un fluorophore, pour nous permettre de le détecter au microscope.



15

Méthodes optiques

- Étudier l'absorption moléculaire.
- Pour réaliser cette étude, on utilise deux types d'appareils:



Photomètres



Spectrophotomètres

16

Spectrophotométrie

- La **spectrophotométrie** est l'une des techniques analytiques les plus utilisées en biochimie.
- Identifier des molécules à l'aide de leur **spectre d'absorption** de la lumière dans le domaine du visible ou du proche ultraviolet.
- La concentration de composés connus peut être déterminée en mesurant l'absorption de leurs solutions à une ou plusieurs longueurs d'onde.
- De nombreuses réactions enzymatiques peuvent être suivies par spectrophotométrie en observant l'apparition d'un produit ou la disparition d'un substrat.

17

1- Les cuves pour les mesures

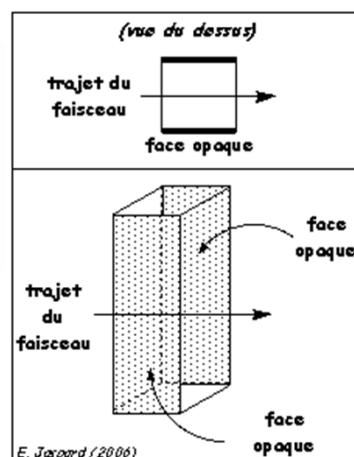
- cuve adaptée à la longueur d'onde :
 - quartz pour les ultra-violets.
 - verre ou polystyrène pour le visible.
- Bien orienter la cuve par rapport à l'axe du faisceau lumineux.



Cuve en quartz



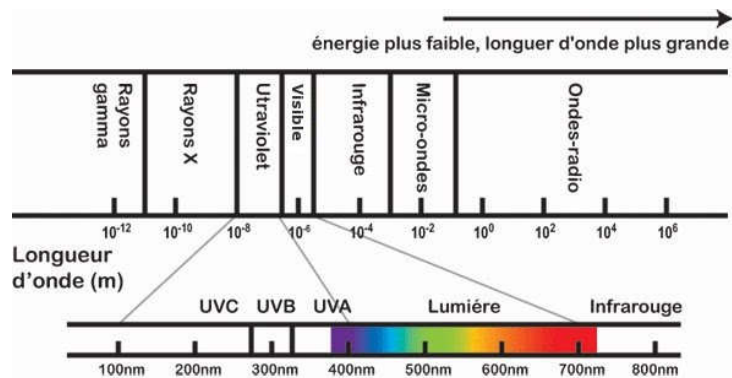
Cuve en polystyrène



E. Jaspard (2006)

18

- Les spectrophotomètres mesurent l'absorption de la lumière appartenant aux domaines du visible et de l'ultraviolet (UV).
- Les longueurs d'onde: de 800 à 400 nm pour le visible, de 400 nm à 220 nm pour UV.



19

2- Loi de Beer - Lambert

- L'absorbance est en fonction de la concentration du soluté comme le montre la loi de Beer - Lambert :

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon \cdot \lambda \cdot C$$

A = absorbance sans unité.

I_0 = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté).

I = intensité lumineuse transmise.

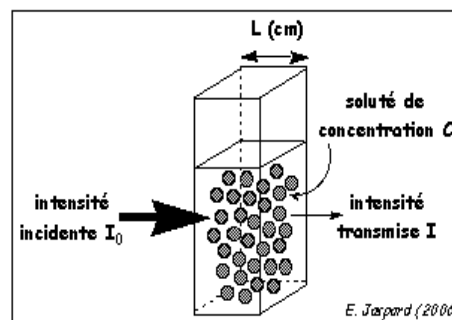
ε = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde) :

1- Si la concentration du soluté est en M (ou mol.L⁻¹), ε est en M⁻¹.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction molaire : ε_M

2- Si la concentration du soluté est en % (masse/volume), ε est en g⁻¹.L.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction pondéral : $\varepsilon_{1\%}$

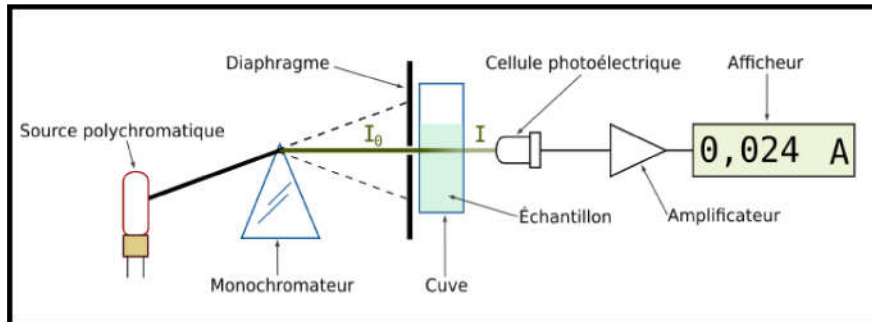
λ = longueur du trajet optique (en cm)

C = concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction).



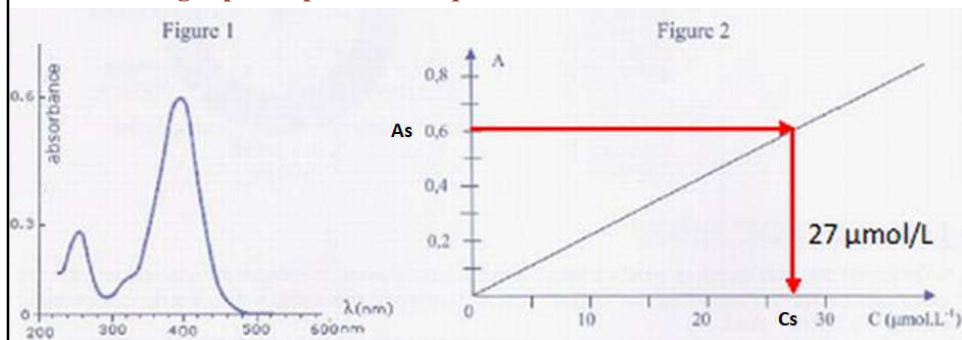
20

Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre



21

3- Titrage spectrophotométrique



- On recherche le maximum d'absorption pour la solution chimique (fig.1).
- On trace la courbe d'étalonnage $A = f(C)$ à l'aide de solutions de concentrations connues (fig.2).
- On place la cuve contenant la solution à titrer dans le spectrophotomètre et on mesure A_S . On lit alors graphiquement C_S sur la courbe d'étalonnage.

22

4- Suivi d'une cinétique chimique lente

- On place le milieu réactionnel dans le spectrophotomètre et on relève A au cours du temps,
- On utilise la droite d'étalonnage $A = f(C)$ pour déterminer la concentration au cours du temps,
- On déduit $x = f(t)$ des concentrations en fonction du temps à l'aide du tableau d'avancement,
- On trace $x = f(t)$.
- L'ordinateur réalise tous les calculs nécessaires et donne $x = f(t)$ à partir des mesures d'absorbance.

23

Microscopie

1- Définition

- La **microscopie** est l'observation d'un échantillon (préparation microscopique) à travers le microscope.
- Elle permet de rendre visible les éléments invisibles à l'œil nu, soit par leur taille, soit par leurs couleurs.

2- Types de microscopie



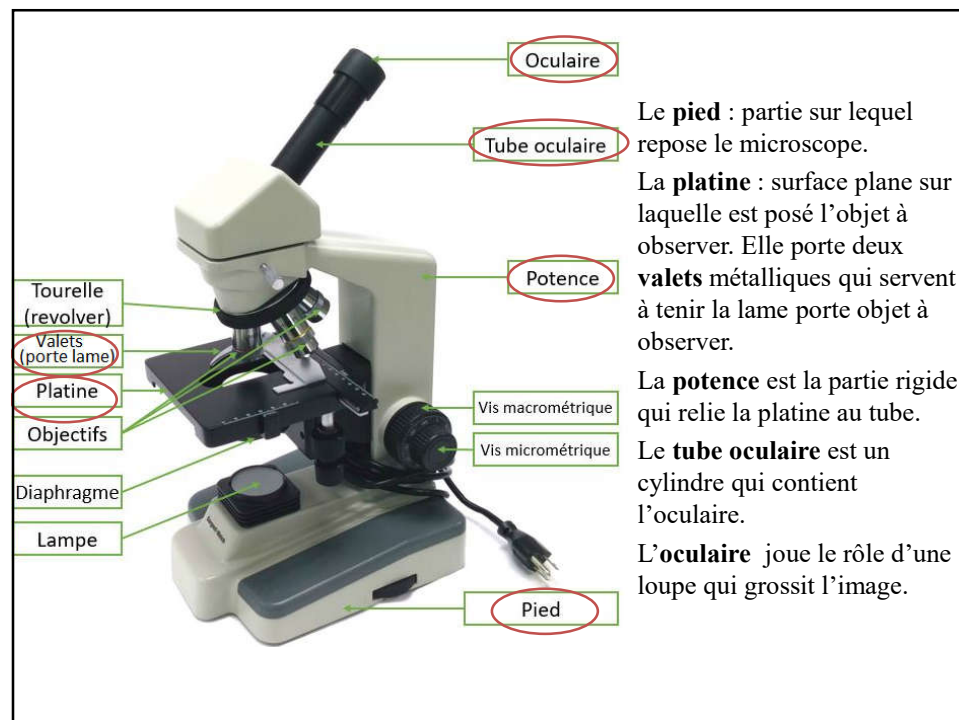
24

a- La microscopie optique

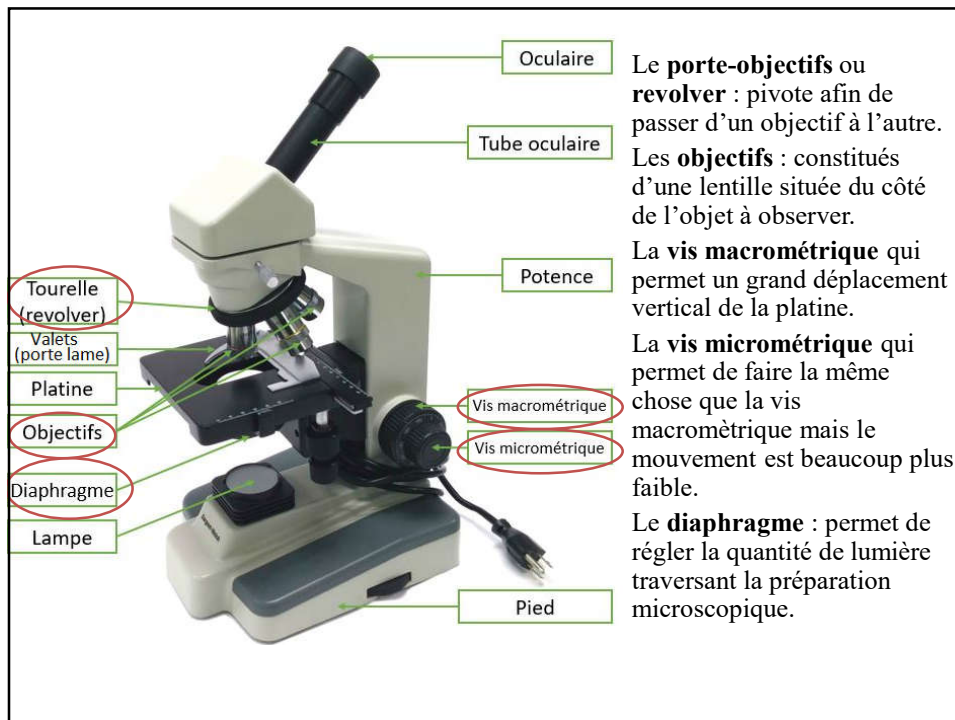
Le microscope optique permet d'observer les cellules qui sont généralement des corpuscules incolores et translucides.

a-1- Description d'un microscope

25



26

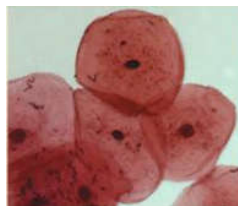


27

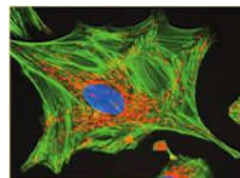
On distingue plusieurs types de microscopie optique :



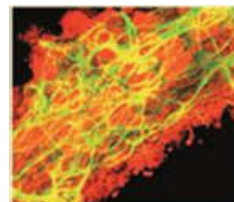
Microscopie optique à fond claire



Microscopie optique à contraste de phase



Microscopie optique à fluorescence



Microscopie optique confocale

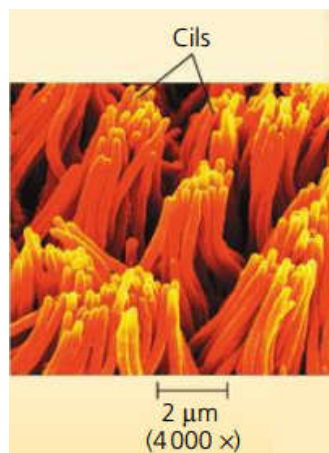
28

b- La microscopie électronique

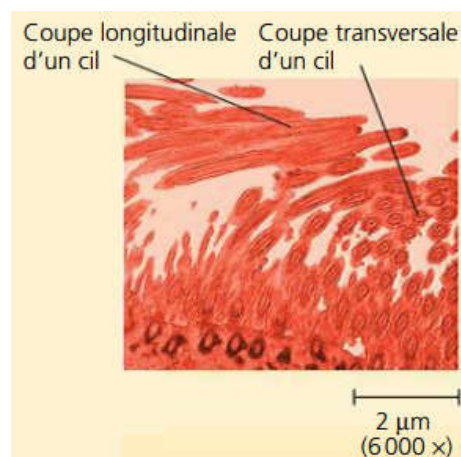
- Le principal intérêt du microscope électronique par rapport au microscope optique est d'augmenter le grossissement.
- Au lieu d'être éclairé, l'objet est bombardé par un faisceau d'électrons.
- L'image mettra en évidence les structures plus ou moins opaques aux électrons.
- L'objet doit être coupé en tranches ultrafines puis imprégné de sels de métaux lourds qui vont se fixer sur les différentes structures intracellulaire et les rendre plus ou moins opaques aux électrons.

29

Types de microscopie électronique :



Le **microscope électronique à balayage (MEB)** est particulièrement utile pour étudier la surface d'un échantillon.



Le **microscope électronique à transmission (MET)** sert à étudier la structure interne d'une cellule

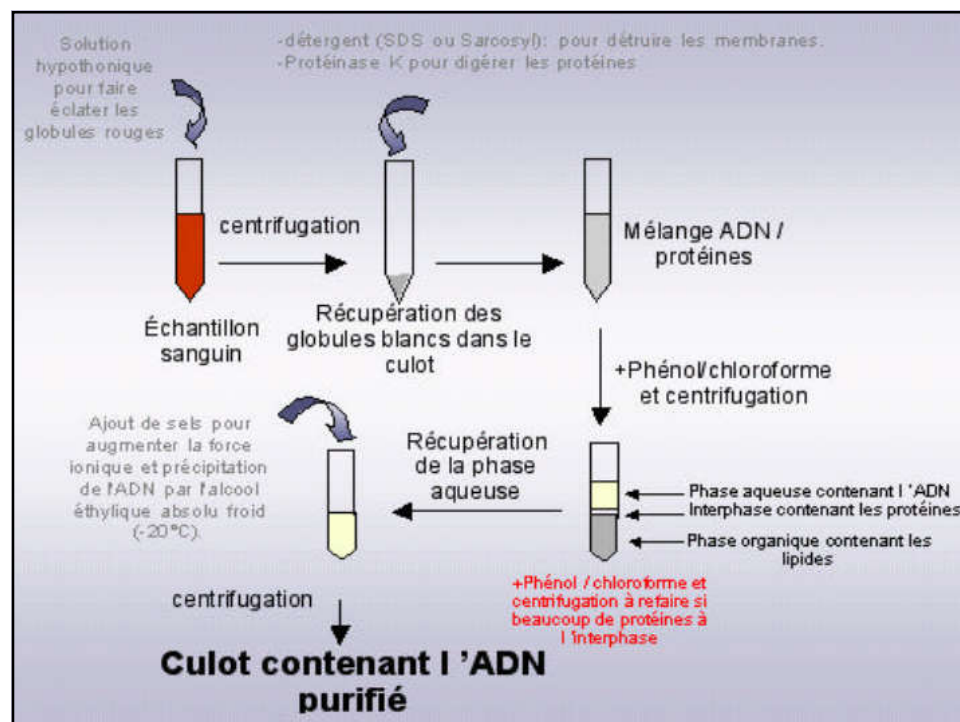
30

Méthodes de de biologie moléculaire

1. Extraction et purification du matériel génétique

- Matériel génétique: présent dans les virus, les bactéries et les cellules.
- **ADN** des cellules eucaryotes animales = ADN nucléaire + ADNmit
 - source : sang, tissus, cultures cellulaires...
- **ARN** = ARNm, ARNt, ARNr
 - sensibilité aux RNAses
 - spécificité tissulaire des ARNm (ADNc)
- quantification par mesure de l'absorption à 260 nm.

31



32

À partir de 5 ml de sang:

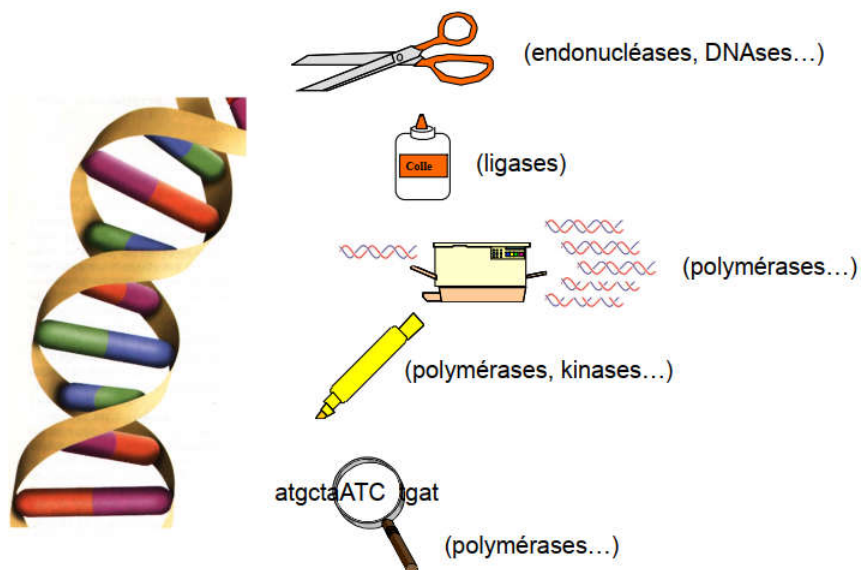
- Hémolyse des globules rouges.
- Récupérations des globules blancs en centrifugeant
- Elimination des protéines par le phénol, qui dissout les lipides et précipite les protéines en laissant les acides nucléiques en solution.
- Récupération de l'ADN dans la phase aqueuse.
- Précipitation à l'Ethanol.

Extraction de l'ARN.

Les ARN sont très instables, des molécules stabilisantes sont ajoutées. Le principe de la purification est le même que pour l'ADN.

33

2. Des outils enzymatiques pour étudier l'ADN

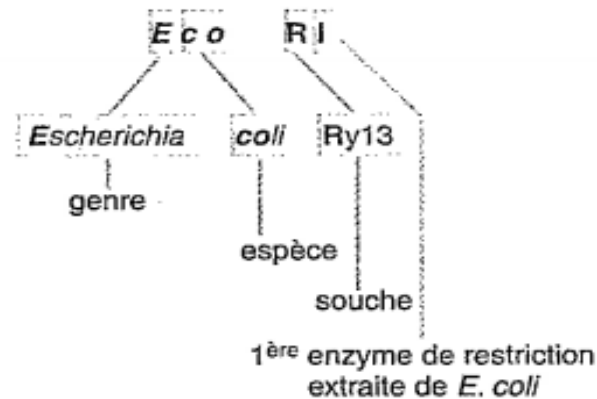


34

2.1. Couper

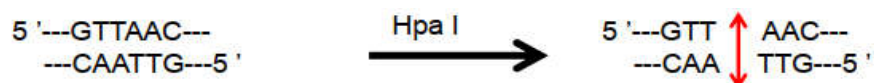
2.1.1 Enzymes de restriction

- Endonucléases capables de couper des séquences nucléotidiques à des sites spécifiques en termes de bases.
- Enzymes d'origine bactérienne et le nom provient du nom de genre et d'espèce de la bactérie dont elles ont été isolées.

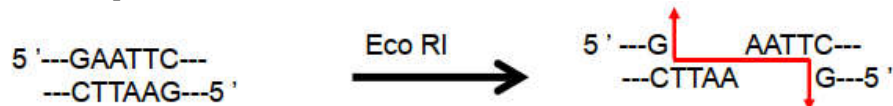


35

- Les enzymes utilisées en biologie moléculaire sont de type II. Elles reconnaissent des séquences palindromiques de 4 à 6 paires de base.
- Coupures franches



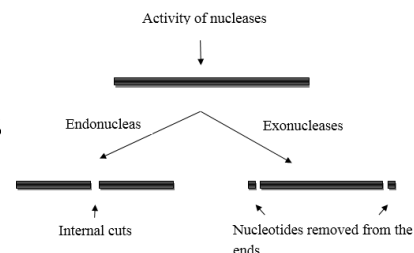
- Coupures cohésives



2.1.2. Endonucléases

- DNase I : - ADN double ou simple brin
- nucléase S1: - ADN simple brin
- RNase A (ARN), H (hybrides ARN/ADN)

2.1.3. Exonucléases : 5' 3' ou 3' 5'



36

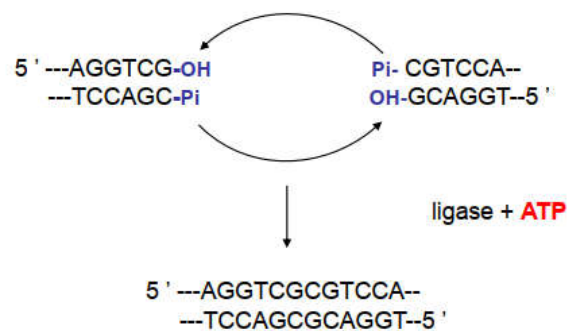
2.2. Synthèse et copie

- activité des polymérases : $5' \longrightarrow 3'$
- ADN polymérases :
 - produit : ADN
 - matrice : ADN simple brin + amorce ADN
- ARN polymérases :
 - produit : ARN
 - matrice : ADN simple brin
- ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase reverse, inverse) :
 - produit : ADN
 - matrice : ARN + amorce

37

2.3. Coller

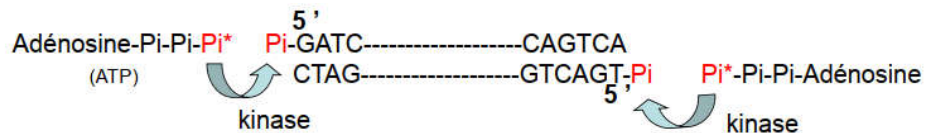
Les ligases catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre un 5' phosphate et un 3'-OH de 2 brins adjacents



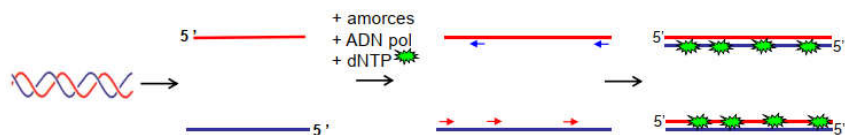
38

2.4. Marquer

- groupes marqueurs : isotopes (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S), fluorophores ...
- marquage aux extrémités
 - extrémité 3'-OH : terminal transférase
 - extrémité 5' - Pi : ATP- γ ^{32}P & T4-kinase



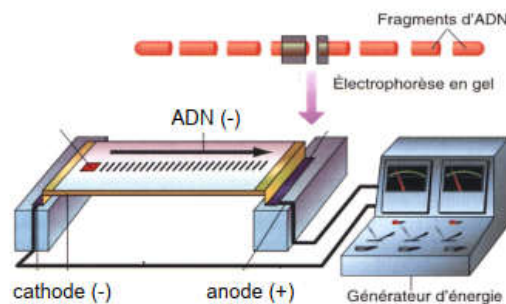
- marquage interne par amorçage aléatoire (random priming)



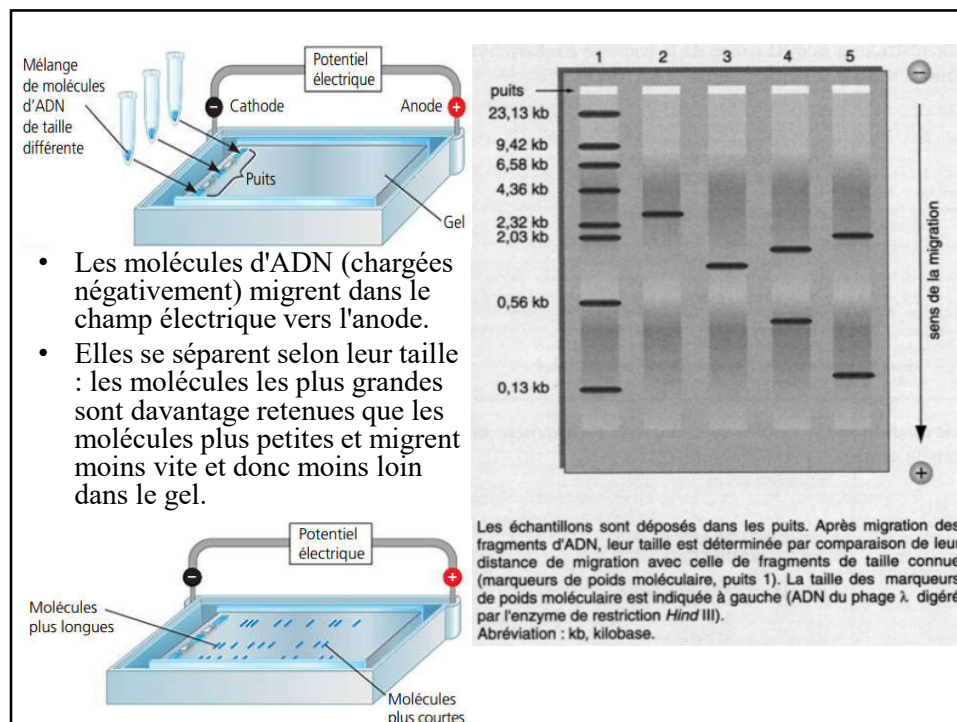
39

3. Séparation de fragments d'ADN : électrophorèse sur gel (agarose, acrylamide...)

- L'action d'une enzyme de restriction sur une molécule d'ADN génère des fragments de restriction.
- Ces fragments d'ADN peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide.
- Le mélange contenant l'ADN coupé est déposé à une extrémité du gel qui est ensuite soumis à un champ électrique.



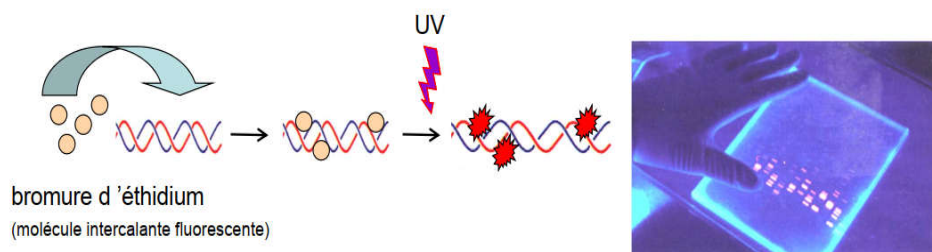
40



41

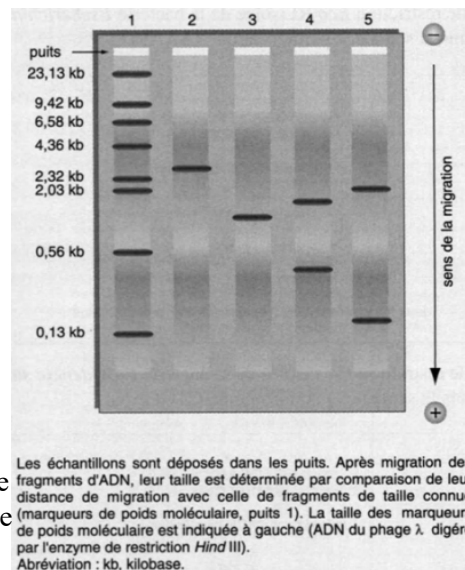
Visualisation de l'ADN

- Afin de visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'éthidium.
- Cette molécule s'intercale entre les bases des acides nucléiques et a la propriété d'émettre une fluorescence rouge orange lorsqu'elle est excitée par la lumière ultraviolette.
- Le gel est observé sous une lampe à U.V. et les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium deviennent visibles.



42

- Il est possible de déterminer la taille des fragments de restriction obtenus en comparant leur mobilité à celle de fragments d'ADN de taille déterminée (marqueurs de taille).



- Dans certains cas, les molécules à séparer ont été préalablement marquées par l'incorporation d'un isotope radioactif, ce qui permet une détection facile par autoradiographie

L'électrophorèse sur gel permet de séparer les acides nucléiques ou les protéines selon leur taille, leur charge électrique ou d'autres propriétés physiques.

43

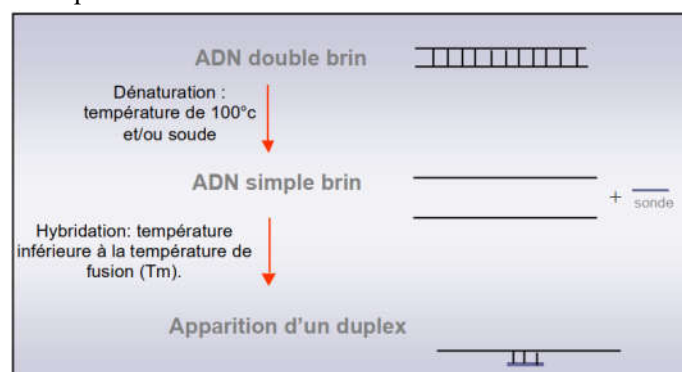
4. Hybridation moléculaire

4.1. Sondes moléculaires et hybridation

- **Hybridation** : association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité
- **Sonde** : séquence d'ADN complémentaire de la séquence cible.

Principe:

Cette technique permet la détection d'une séquence cible dans un mélange d'acide nucléique.



44

- Facteurs ayant une influence sur l'hybridation
 - la température: la température optimale d'hybridation est en général inférieure au T_m de la sonde
 - la taille des fragments ou des sondes
 - la force ionique: l'hybridation est accélérée en forte concentration saline
 - la nature des hybrides : la stabilité des hybrides (des plus stables aux moins stables est la suivante: $ARN/ARN > ARN/ADN > ADN/ADN$)
- Types de sondes
 - **sonde génomique** : fragment obtenu par coupure de l'ADN génomique
 - **sonde ADNc** : sonde ADN obtenue par transcription reverse d'un ARNm messager (= séquence codante)
 - **sonde oligonucléotides** : ADN (ou ARN) simple brin de 18 à 50 nucléotides synthétisé chimiquement

45

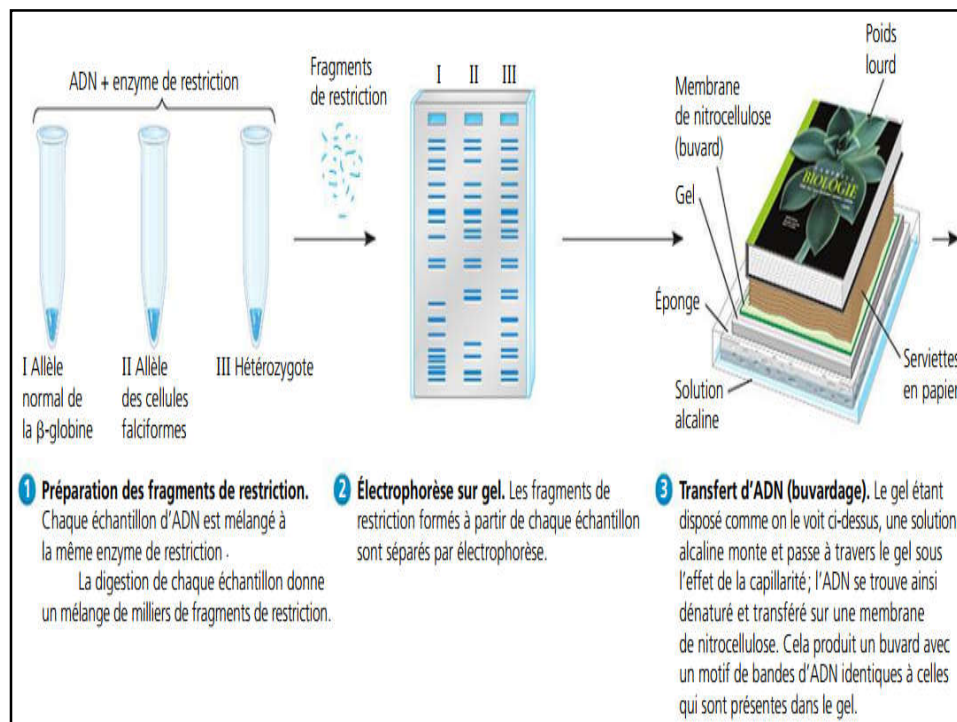
4.2. Hybridation sur support : Southern blot (ADN), northern blot (ARN)

- Permet aux chercheurs de détecter des séquences nucléotidiques particulières dans un échantillon complexe d'ADN.
- Southern blot peut servir notamment à comparer les fragments de restriction produits à partir de différents échantillons d'ADN génomique.
- Northern blot permet d'analyser l'expression d'un gène. Une variation de la quantité d'ARN d'un échantillon à un autre reflète une variation d'expression du gène correspondant.

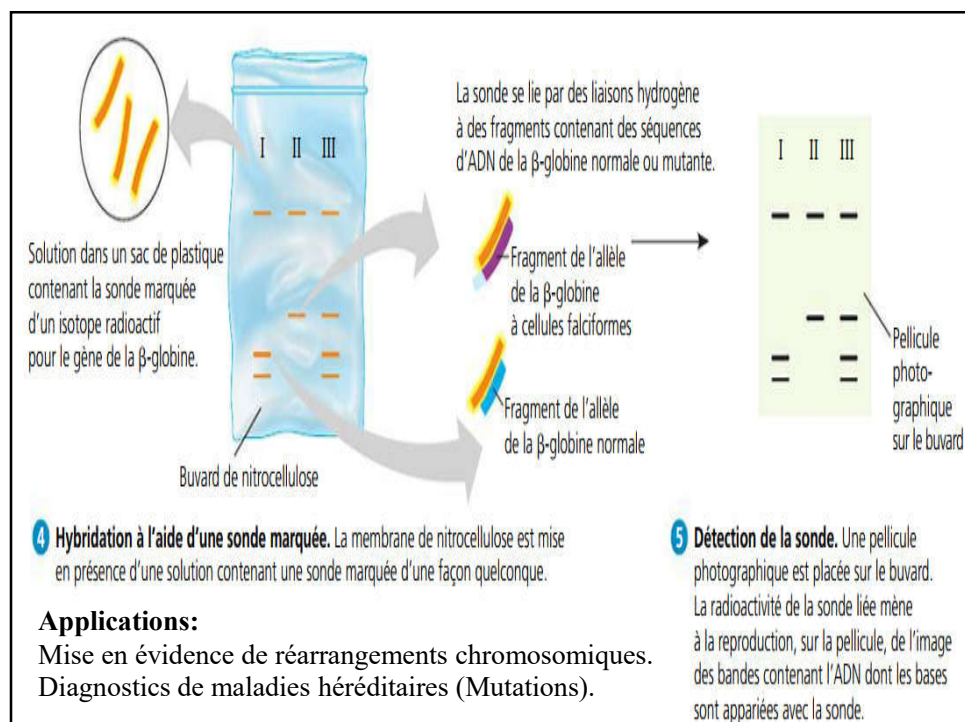
TECHNIQUE :

Dans cet exemple, nous comparons des échantillons d'ADN génomique provenant de trois individus : un homozygote pour l'allèle normal de la β -globine (I), un homozygote pour l'allèle mutant des cellules falciformes (II) et un hétérozygote (III).

46

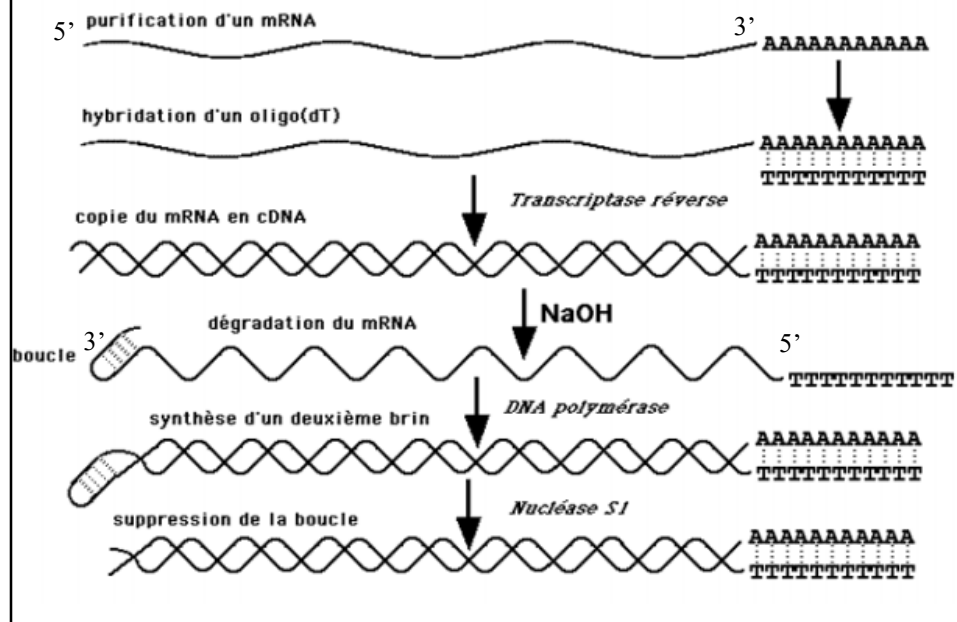


47



48

4.3. Synthèse d'un ADNc



49

- ARNm est mis en contact avec une amorce poly-T, qui hybride avec la queue poly-A de l'ARNm.
- La transcriptase reverse reconnaît l'amorce et initie la production d'un brin d'ADN complémentaire du messager de départ.
- RNase H reconnaît les dimères ADN-ARN et dégrade l'ARNm.
- Le brin d'ADN fabriqué forme spontanément à son extrémité 3' une boucle en épingle à cheveux en s'hybridant sur lui-même.
- L'extrémité 3' de cette boucle va servir de site de démarrage pour la ADN polymérase qui va synthétiser un brin de ADN complémentaire du premier.
- Une nucléase spécifique du ADN simple brin supprimera la boucle de l'extrémité. L'ADNc double brin est prêt.

50

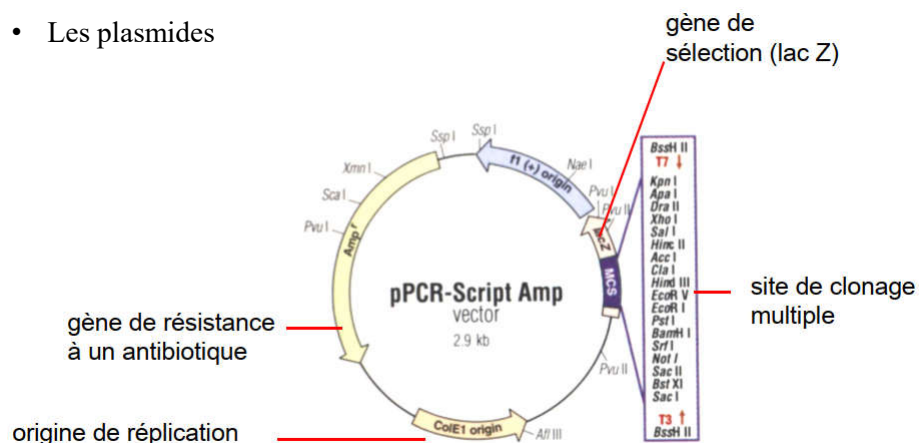
5. Le clonage moléculaire

- Obtenir une population de bactéries, de cellules ou d'organismes qui contiendront le même matériel génétique.
 - population homogène de cellules identiques (population clonale).
 - organisme vivant identique à un organisme d'origine.
- Clonage:**
 - pour amplifier et conserver une séquence d'ADN.
 - pour exprimer une séquence d'intérêt.
 - pour introduire un gène dans des cellules ou des organismes.
 - pour produire une protéine d'intérêt...
- Principales étapes du clonage:**
 1. **préparation** de l'**insert** à cloner (fragment d'ADN d'intérêt) et du vecteur
 2. **intégration**-ligation de l'insert dans le vecteur
 3. **transformation** de l'hôte par le vecteur recombiné
 4. **sélection** des hôtes recombinants

51

5.1. Vecteurs

- Les plasmides



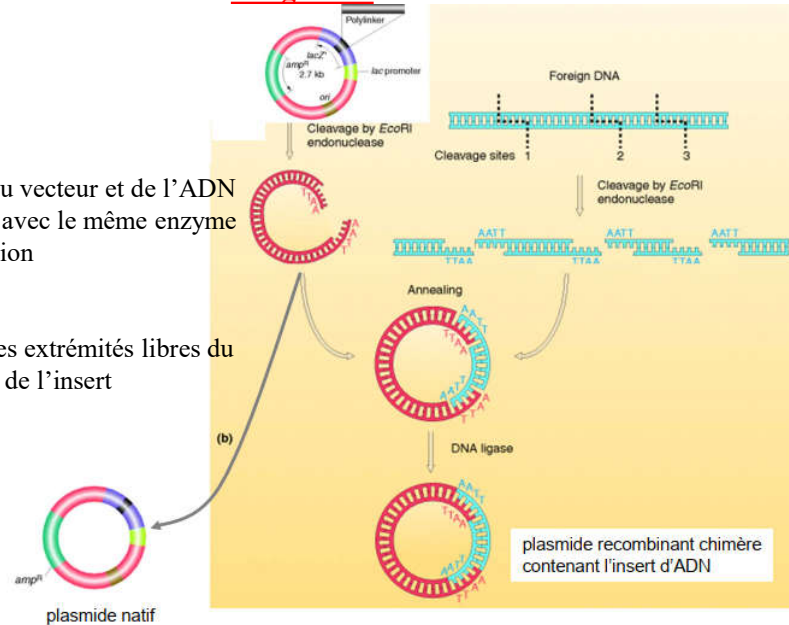
- Origines : phages, cosmides, vecteurs viraux...

52

5.1. Intégration, transformation et sélection d'un vecteur recombinant

Intégration

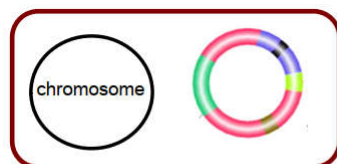
- coupure du vecteur et de l'ADN à intégrer avec le même enzyme de restriction
- ligation des extrémités libres du vecteur et de l'insert



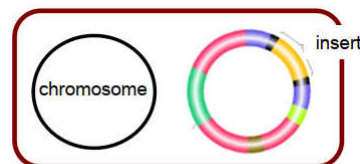
53

Transformation et sélection des bactéries hôtes

- Les plasmides sont introduits dans les bactéries : la transformation

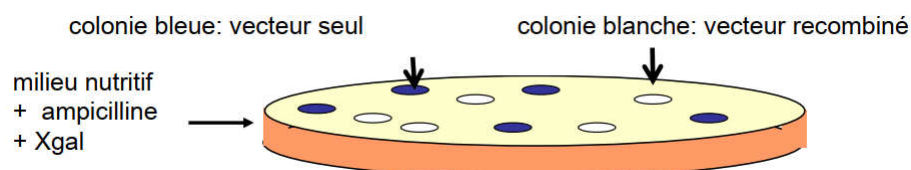


bactérie avec plasmide natif recircularisé

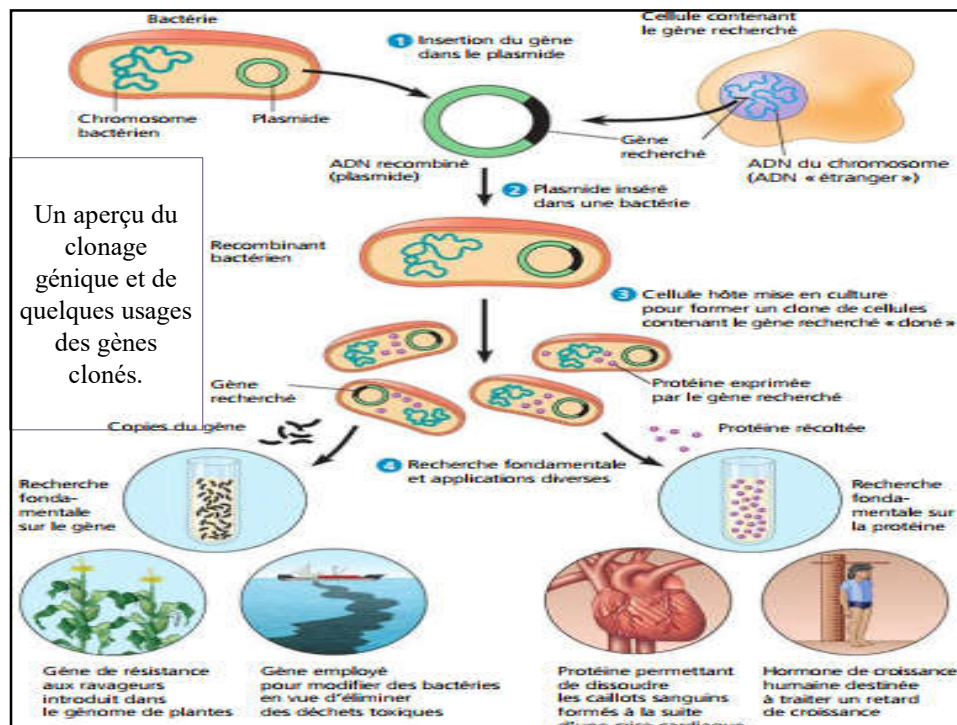


bactérie avec plasmide recombinant

- les bactéries ayant intégré un plasmide sont sélectionnées grâce aux 2 gènes de sélection présents dans le vecteur (ex choisi : gène de résistance à l'ampicilline et gène permettant l'expression de la β -galactosidase).



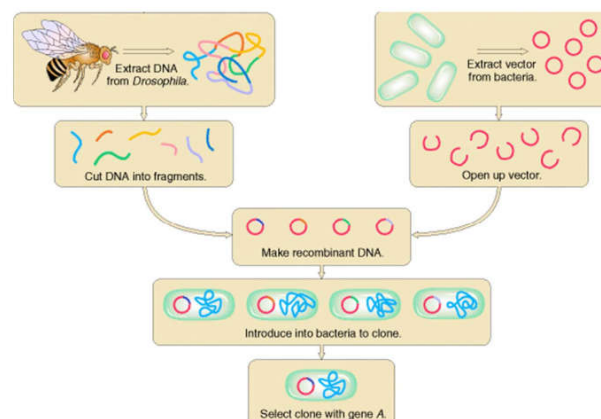
54



55

6. Les « banques » d'ADN

- banque génomique
 - obtenue en intégrant des fragments d'ADN génomique dans des vecteurs.
 - représente tout le matériel génétique



- banque ADNc :
 - obtenue en intégrant des fragments d'ADNc dans des vecteurs
 - ne représente que l'ADN exprimé dans les cellules à partir desquelles l'ARNm a été extrait

56