

# Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA  
VIE



**Shop**



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



**Etudier**



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



**Emploi**



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

## HOMOGENEISATION (SUITE)

Rappel :

Obtention d'un échantillon de composition homogène, avec une concentration en analyte uniforme à travers tout l'échantillon ; c'est le cas pour les échantillons fluides (liquide ou gazeuse) homogènes (constitués d'une seule phase)

Pour les échantillons solides, l'homogénéisation consiste à avoir un échantillon **finement divisé** (pulvérisé), avec une **apparence homogène**, que l'on va suspendre dans une phase liquide organique (**solvant**) ou aqueuse (**tampon**) pour obtenir un **homogénat** (phase solide+ phase liquide).

Au sein de l'homogénat s'effectue un **transfert** de molécules (**solutés**) depuis la phase solide (matrice) vers la phase liquide (solvant/tampon) ; Parmi les solutés transférés doit se trouver l'analyte d'intérêt mais aussi, le plus souvent, d'autres composants (**interférents**) de la matrice.

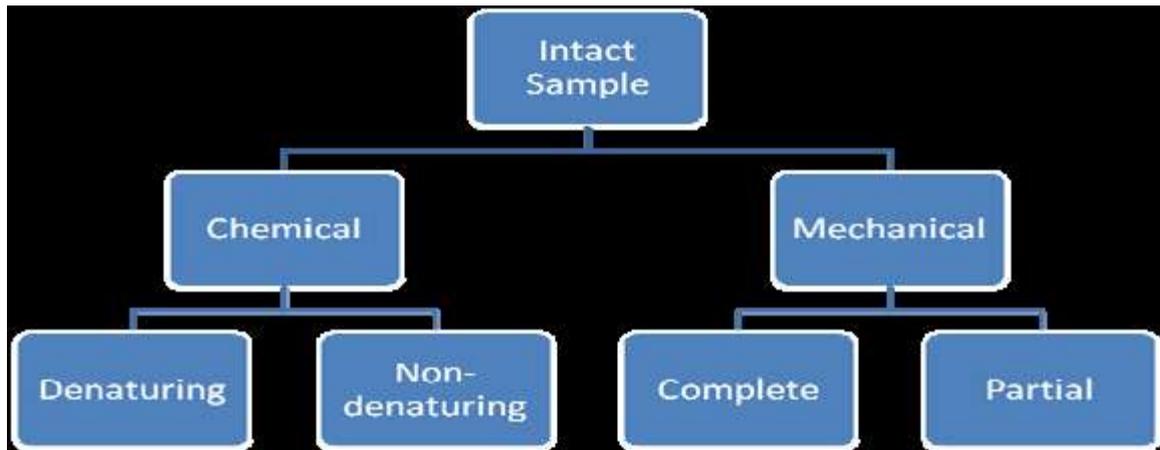
A la fin de l'opération d'homogénéisation, l'homogénat est **clarifié** et la phase liquide (contenant l'analyte) est récupérée et soumise à la suite du protocole (stratégie) d'analyse.

Lors du développement d'une méthode d'homogénéisation, il est nécessaire de considérer les caractéristiques finales de l'homogénat (et de l'analyte) avant de décider des outils et des conditions physiques et chimiques à utiliser pour son obtention ; LA FIN JUSTIFIE LES MOYENS !

Nous en avons déjà parlé.

Nous avons vu durant la séance précédente, que les méthodes utilisées pour désintégrer/homogénéiser les échantillons pouvaient être mécaniques/physiques ou chimiques/biochimiques ; Nous avons aussi vu que cette dichotomie était relativement artificielle et que très souvent le processus d'homogénéisation comportait une combinaison d'actions mécaniques (appareillages) en présence d'actions (bio)chimiques (tampon/solvant).

Le schéma ci-après résume les méthodes d'homogénéisation :



**Figure 1.** Simple schematic of sample disruption options. This simplified scheme does not consider that methods are normally combined during sample disruption. Mechanical homogenization normally makes use of buffers or lysis solutions just as chemical lysis normally requires that the sample contains small particles, which is normally created using a homogenizer

## A-2 – METHODES CHIMIQUES/BIOCHIMIQUES

Les méthodes chimiques ou biochimiques utilisent un tampon (ou un solvant) de lyse pour accomplir l'homogénéisation /désintégration de l'échantillon ; Cette lyse /désintégration (bio)chimique peut être assistée(aidée) par une désintégration mécanique , mais un tampon (solvant) de lyse adéquat, peut à lui seul rompre /désintégrer les parois et membranes cellulaires et solubiliser/capter de façon efficace l'analyte d'intérêt (et autres composants de la matrice).

Un tampon adéquat doit par ailleurs posséder des propriétés/caractéristiques physico (bio) chimiques (température, pH, force ionique, constante diélectrique, viscosité...) compatibles avec une stabilité optimale de l'analyte.

C'est en fonction du résultat escompté (qualité de l'analyte), et de la nature de l'échantillon de départ que la lyse (bio) chimique utilise différentes combinaisons des paramètres du tampon, dont les principaux sont : le pH, la présence de détergents (surfactants), de chaotropes ou d'enzymes ; D'autres additifs sont souvent inclus dans le tampon de lyse afin d'optimiser la stabilité de l'analyte.

### **a-pH, Lyse alcaline**

Lors de la lyse alcaline (pH basique), l'agent actif (lysant) est l'ion  $\text{OH}^-$ . Le tampon de lyse contient de l'Hydroxyde de Sodium (NaOH) et les ions  $\text{OH}^-$  réagissent avec la membrane plasmique en rompant les liaisons ester des acylglycerol (phospholipides) de la membrane ce qui la perméabilise et la désintègre ; Très souvent le tampon alcalin est additionné d'un détergent comme le SDS (Sodium DodecylSulfate) qui s'insère dans la membrane fragilisée par les ions  $\text{OH}^-$  et solubilise (détache) les protéines membranaires, participant ainsi à la désintégration totale de la membrane.

Le pH utilisé est compris entre 11,5 et 12,5 et par conséquent l'analyte en question doit être stable dans ces conditions ; Cette méthode est très utilisée pour extraire les acides nucléiques microbiens mais ne permet pas l'obtention de protéines natives (fonctionnelles)

### **b- Détergents**

Les détergents ou surfactants sont des composés organiques (de synthèse ou naturels) qui ont la propriété de rompre les interactions entre les interfaces hydrophobes et hydrophiles. Puisque la membrane plasmique est une bicouche lipidique constituée par l'association (non covalente) de molécules hydrophobes et de molécules hydrophiles, les détergents s'insèrent dans cette structure et la désintègrent ; Les détergents sont capables de rompre les interactions lipide-lipide, lipide-protéine et protéine-protéine, ils sont aussi capables de dénaturer les protéines cytosoliques et former des micelles avec ces protéines.



Le SDS (sodiumdodecylsulfate) est un détergent anionique comportant une « tête » Sulfate hydrophile et une « queue » hydrophobe formée de 12 atomes de carbone (dodecyl ou lauryl) ; IL est utilisé non seulement dans les laboratoires (en particulier pour isoler les protéines membranaires) mais aussi dans les détergents domestiques.

Le CTAB (CetylTrimethylAmmoniumBromide) est un détergent cationique utilisé lors de l'extraction de l'ADN des plantes

Les détergents zwitterioniques possèdent , en même temps, des groupes anioniques et des groupes cationique et leur charge électrique nette et neutre.

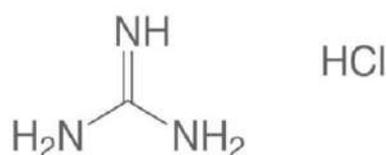
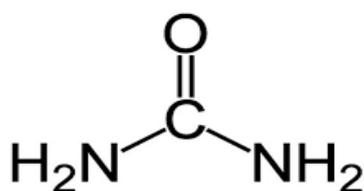
Le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) est un détergent zwitterionique très utilisé pour isoler des protéines à l'état natif (non dénaturées)

Les détergents non ioniques ont une « tête » polaire mais non ionisée, comme un glycoside (sucre) . Ils ont tendance à être moins « énergiques » (moins puissants) et ne dénaturent pas les protéines bien que toujours capables de désintégrer la membrane ; Ils agissent en dispersant les molécules faiblement associées. Parmi ces détergents on trouve le Triton , le Brij et d'autres.

### c- Les Chaotropes

Les chaotropes sont des molécules capables de rompre les interactions faibles **intermoléculaires**, comme les liaisons hydrogènes entre molécules d'eau ou alors les interactions hydrophobes entre les protéines. Les chaotropes rompent aussi les interactions faibles **intramoléculaires** et dénaturent les protéines et sont souvent utilisés pour cela lors de l'extraction des Acides nucléiques (l'ARN en particulier).

Les chaotropes les plus utilisés sont l'urée et les sels de guanidine ; Ces composés sont utilisés à forte concentration ( 6 à 9 molaire)



#### d- Les Enzymes

La lyse par les enzymes est une lyse biochimique. Des enzymes comme le lysosyme, la lysostaphine, la zymolase, cellulase, protease, pectinase et glycanase sont toutes des enzymes commerciales et peuvent être utilisées dans différentes instances.

L'avantage de la lyse enzymatique réside dans sa spécificité ; Le lysosyme est par exemple utilisé pour la lyse bactérienne, la chitinase pour les levures et les pectinases et cellulase pour les cellules végétales

La paroi cellulaire de levures, de champignons ou de végétaux contient généralement un mélange de polysaccharides différents, et sa lyse/dégradation /perméabilisation nécessite un mix (cocktail/mélange) d'enzymes de spécificité différentes.

Les enzymes peuvent en particulier être utilisées comme première étape de traitement des cellules pour éliminer les composants de la paroi cellulaire avant de désintégrer la membrane plasmique ; les cellules dépourvues de leur paroi sont appelées protoplastes ou spheroplastes, et sont utilisables dans les expériences de transformation génétique et peuvent être facilement lysées par le lysozyme ou autre méthode chimique .

#### e- Autres additifs (au tampon de lyse)

Tout tampon ou solvant de lyse, doit non seulement permettre la libération effective de l'analyte d'intérêt de ses attaches intracellulaire, mais doit aussi garantir une stabilité optimale à cet analyte une fois solubilisé dans le tampon.

La stabilité de l'analyte dépend de sa nature chimique et est en particulier critique pour les composés macromoléculaires tels que les protéines.

Le cytosol contient de grandes concentrations de solutés dans un environnement réducteur. Lorsque les cellules sont rompues, les solutés se trouvent rapidement dilués ce qui favorise leur diffusion, en particulier les sous-unités d'une même protéine peuvent se dissocier alors que d'autres perdent

leur cofacteurs ; Des stabilisateurs osmotique comme le sucrose ou le sorbitol peuvent être ajouté au tampon de lyse pour éviter la dissociation et la diffusion des solutés faiblement associés.

Différentes méthodes d'homogénéisation entraînent l'introduction d'air dans les homogénats, l'oxygène apporté change le statut redox du milieu et peut provoquer l'oxydation des solutés (normalement à l'état réduit). Des composés antioxydants comme le glutathion, le dithiothreitol ou le beta-mercapthoethanol sont souvent ajoutés pour contrer l'effet néfaste des oxydants

Lors de la preparation de protéines, il est important d'ajouter des inhibiteur de proteases au tampon d'homogeneisation. En effet, la rupture des cellules libere les proteases (et autres hydrolases) contenues dans les lysosomes des cellules animales ou les vacuoles de cellules vegetales ou espace periplasmique microbien.

Table 4.6 A summary of extraction methods which are best used with different tissue.

Method	Animal tissue	Animal cell culture	Plant tissue	Plant cell cultures	Bacteria	Yeast	Fungi (filamentous)
Osmotic shock		π					
Grind in liquid N <sub>2</sub>	π	π	π	π	π	π	π
Grind with acid washed sand	π	π	π	π	π		
Homogeniser, e.g., Dounce	π	π	π	π			
Ultra sonicator		π		π	π	π	
Blenders	π	π	π	π			
Blenders with beads	π	π	π	π	π	π	π
Polytron	π	π	π	π			
Ballotini beads		π		π	π	π	π
Compression/Expansion		π		π	π		
Freezing/Thawing		π		π	π	π	
Enzyme treatment, e.g., <b>lysozyme</b> or lysozyme + detergents					π		
Enzyme treatment, e.g., Lyticase						π	

# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

### Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

