



TECHNIQUE APPLIQUEES EN BIOLOGIE CELLULAIRE

Cours : technique d'homogénéisation

Partie 1

TECHNIQUE APPLIQUEES EN BIOLOGIE CELLULAIRE

TECHNIQUES D'ISOLEMENT

Objectifs :

1. Décrire les techniques couramment utilisées pour séparer les différents types de cellules et organites

Ces techniques consistent à séparer les constituants d'une cellule ou d'un organite et comportent deux étapes principales :

1. **L'homogénéisation** (ou broyage), qui implique la destruction de la membrane plasmique et donne un homogénat (extrait acellulaire) ;
2. **La séparation** des organites par des centrifugations successives.

1.Homogénéisation

Elle a pour objectif de conduire à la destruction des cellules sans détérioration des organites. Le milieu de broyage doit respecter des exigences ioniques, osmotiques et de pH, de façon à ce que les organites (en général des vésicules) ne subissent pas de modification chimique ou de volume.



Homogénats cellulaires = Broyats 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.

Différentes techniques sont utilisables :

Elles peuvent d'ailleurs se combiner pour une meilleure efficacité.

1. **Mécanique** (pistons, mixers) ;
2. **Chimique** : destruction des membranes par des détergents et des parois (cas des cellules végétales ou des bactéries) par des enzymes appropriées tels que cellulases et lysozymes ;
3. **Physique** (hautes pressions, ultrasons).

1. Mécanique

Une des approches qui a été développée la première est celle du broyage mécanique, essentiellement dérivé des mortiers et des pilons utilisés en chimie ou en pharmacie. Cependant, sauf pour certaines applications spécifiques où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée, cette approche se prête mal au matériel biologique, particulièrement si on doit homogénéiser en milieu liquide.

But : Le broyage mécanique est utilisé pour broyer le matériel biologique en suspension de cellules. Ils sont utilisés dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée.

1.1. Types d'homogénéisateurs :

Les protéines et les acides nucléiques sont le plus souvent récupérés des cellules et des tissus en laboratoire en utilisant des méthodes mécaniques. Plusieurs facteurs entrent en jeu lors du choix de la meilleure méthode pour votre application. Ils comprennent le type de cellule ou de tissu, la taille de l'échantillon, le débit d'échantillon souhaité, l'efficacité et la vitesse de perturbation, la reproductibilité des perturbations, le confinement des échantillons, le nettoyage des perturbateurs et la maintenance des perturbateurs :

- Pour plus d'information et conseils consultez par exemple le Site <https://biospec.com/> (**distributeur Biospecproducts**). Les techniciens peuvent vous aider à faire le bon choix : téléphone 800-617-3363 ou e-mail <https://www.biospec.com/contact/support> .

Broyeurs mécaniques

- A. Broyeurs manuels de tissus
- B. Mélangeurs à lame
- C. Homogénéisateurs à rotor / stator
- D. Perturbateurs de cellules Bead Mill (Beadbeater)
- E. Nouveaux model

A. Les broyeurs manuels de tissus :

Les broyeurs de tissus écrasent (va permettre de diminuer la taille des particules) les tissus en étant pressés entre deux surfaces dures :

- Une surface est de forme concave (le mortier) et l'autre convexe (le pilon).
- Le mortier peut être façonné selon la **géométrie du tube à essai** (Dounce et Potter), auquel cas le pilon est bien ajusté avec un jeu de 0,1 à 0,2 mm entre les parois internes du tube à essai et la surface du pilon. Le tissu est pressé à plusieurs reprises à travers cet espace mortier-pilon.

1. Mortier :

Cette méthode s'adresse au tissu végétale et animale. Les échantillons de tissus mous à haute teneur en eau (par exemple, foie, muscle, fruits), sont très souvent congelés et conservés à des températures de carboglace glace sèche (CO_2 liquide, -80°C) ou d'azote liquide (-196°C) afin de les durcir, puis ils sont facilement fracturés en poudre en utilisant l'action d'écrasement. Ce processus spécial est appelé **cryobroyage**.

Le mortier et le pilon en porcelaine à faible contour ont une surface large de trois pouces. Le pilon s'adapte à toute la surface du mortier pour un concassage et un broyage plus efficace et uniforme. Prise en main facile, poignée à profil bas.

Utile pour broyer des produits chimiques, des matières biologiques et pharmaceutiques sèches, des graines, des épices, etc. à faible coût.

- L'abrasif utilisé est souvent le sable de Fontaine bleu de granulométrie régulière et très fine.



Figure : Broyeurs mécaniques de type mortier.

2. L'homogénéisateur de type Dounce :

Cet appareil ressemble à une éprouvette (aux parois épaisses) dans laquelle s'enfonce un piston serré. Le passage des cellules dans l'espace très petit entre le piston et la paroi interne du tube induit leur rupture. Suivant la taille des cellules, on utilise des Dounce « clearance » différentes. La clearance est l'espace compris entre le piston et la paroi du bol.

Double action :

- un premier broyage par la partie cylindrique du piston ;
- une homogénéisation très fine dans le fond conique.

Description :

Broyeur constitué d'un cylindre à fond conique avec réservoir et d'un piston à embout conique. Idéal pour le broyage et l'homogénéisation des cellules coriaces.

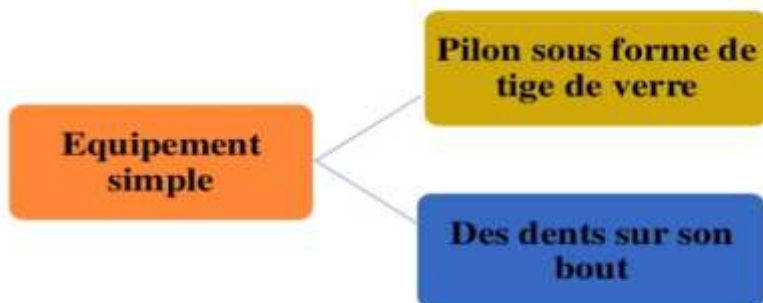


Figure : Broyeurs mécaniques en verre de type Dounce (Piston et cylindre).

A. 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.

Homogénéisateur d'Elvehjem de potier



La manipulation du pilon se fait manuellement



Figure : Broyeurs mécaniques en verre de type potter.

Autres model Broyeurs manuels de tissus

Les broyeurs manuels de tissus sont disponibles en version jetable ou non jetable, ils constituent un moyen rentable d'homogénéiser / broyer une grande variété d'échantillons et conviennent également pour les travaux sur le terrain.

BioVortexer

Le BioVortexer est un entraînement à moteur alimenté par batterie conçu pour faire tourner **des tiges d'aitation** ou **des pilons** en **plastique** dans des microtubes de 1,5 ml. Tournant à des milliers de tours par minute, il permet de disperser rapidement les pastilles centrifuges ou de broyer de petits échantillons de tissus.



Mortier et pilon en porcelaine à profil bas.

Le mortier et le pilon en porcelaine à faible contour ont une surface large de trois pouces. Le pilon s'adapte à toute la surface du mortier pour un concassage et un broyage plus efficace et uniforme. Prise en main facile, poignée à profil bas. Utile pour broyer des produits chimiques, des matières biologiques et pharmaceutiques sèches, des graines, des épices, etc. à faible coût.



Potter-Elvehjem

Les homogénéisateurs de tissus Potter-Elvehjem sont conçus pour l'homogénéisation manuelle des tissus mous tels que le cerveau et le foie par cisaillement mécanique.

Le pilon Potter-Elvehjem est en acier inoxydable avec une pointe en PTFE qui est utilisé en conjonction avec un mortier en verre borosilicaté. Tous les pilons Potter-Elvehjem sont compatibles avec l'agitateur aérien Omni pour les applications motorisées.



BioMasher

L'homogénéisateur mono-utilisateur BioMasher est une solution idéale pour extraire les protéines et les acides nucléiques des tissus mous et des cellules où la contamination croisée d'échantillon à échantillon est une préoccupation. Le BioMasher se compose d'un microtube de 2,0 ml, d'un filtre de 80-145 µm et d'un homogénéisateur.

L'échantillon est placé à l'intérieur du filtre puis homogénéisé à l'aide de la sonde d'homogénéisateur jetable. Le microtube est ensuite centrifugé pour filtrer les particules solides. Le filtre est retiré pour accéder à l'homogénat au fond du microtube.

Le joint torique permet d'obtenir une étanchéité plus étroite entre l'homogénéisateur et la paroi du microtube, garantissant ainsi le traitement d'échantillons plus durs.

