

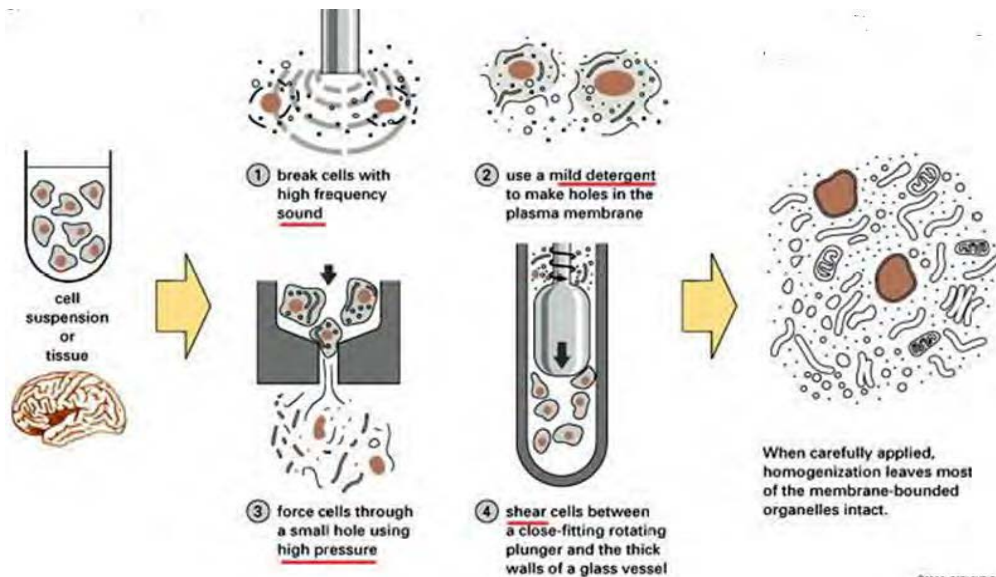
TD N°1 : Les méthodes d'études de la cellule: Le fractionnement cellulaire (l'Ultracentrifugation)

1^{ère} Etape : 1-Définition

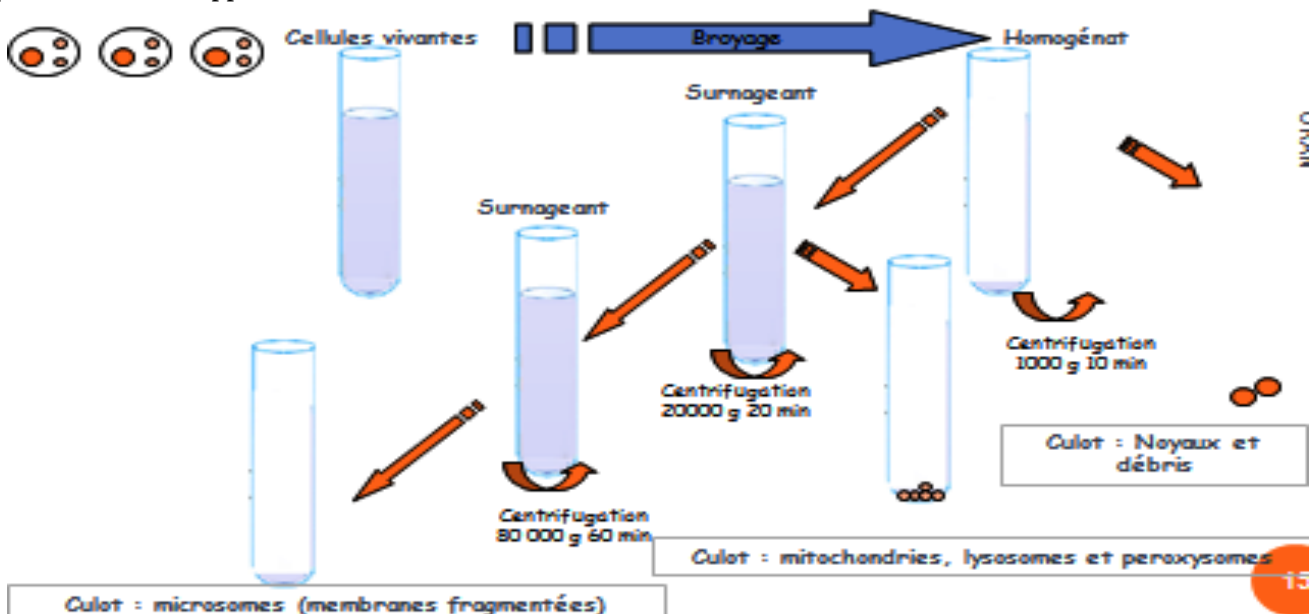
Les méthodes de fractionnement cellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule. Cela consiste à séparer les différents organites cellulaires par **centrifugation** afin d'isoler chacun d'eux pour étudier sa structure et sa fonction. Cette Méthode comporte deux étapes:

- 1) Etape 1 : L'**homogénéisation** : éclatement de la cellule pour récupérer des organites.
- 2) Etape 2 : La **purification** : séparation des organites pour les étudier.

2^{ème} Etape : L'Homogénéisation (ou broyage) : L'homogénéisation : consiste à provoquer l'éclatement de la cellule, et la rupture de la membrane plasmique, en mettant la cellule dans un homogénéisateur. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. Elle consiste à détruire la membrane plasmique (et la paroi pour les cellules végétales) pour obtenir un homogénat contenant tous les constituants de la cellule. Pour cela, on place les cellules dans un tube à essai contenant une solution isotonique à pH neutre (solution de saccharose 0.25 M) qui est fractionnée par l'un des traitements suivants : - **Mécanique** (écrasement par un piston =), **Physique** (avec des ultrasons = High Frequency Sound) ou - **Chimique** (avec détergents ou enzymes =).



L'homogénat est conservé à 0°C pour la **préservation maximale** des structures et fonctions des différents constituants cellulaires et des enzymes. Il contient deux ensembles (Noyaux, mitochondries, lysosomes et peroxysomes) et des Fragments membranaires (plasmique, réticulum, Golgi) se refermant immédiatement pour donner de **petites vésicules** appelées **microsomes**



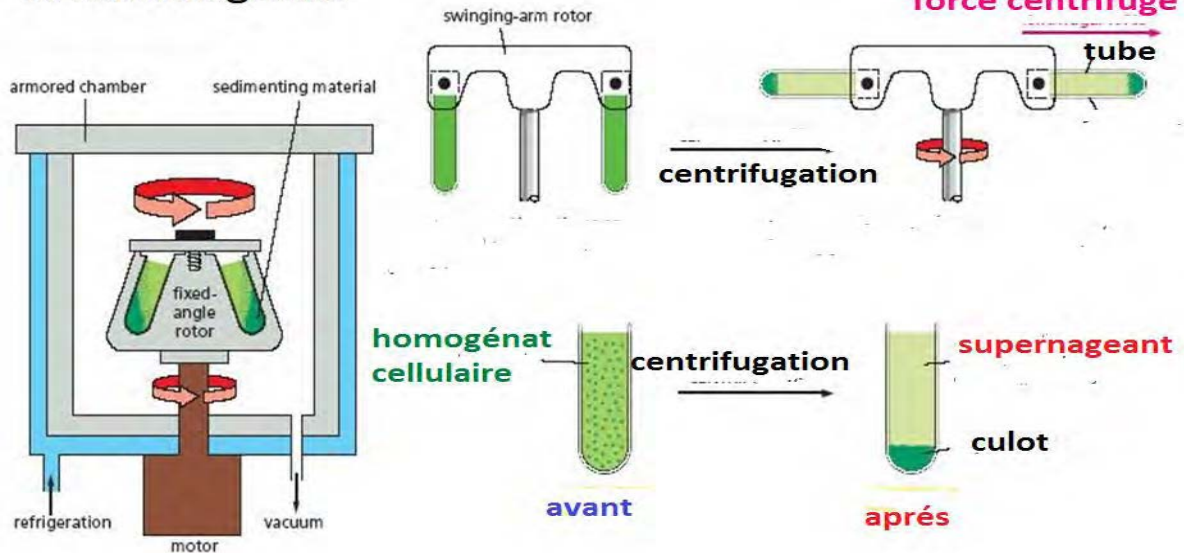
3^{ème} Etape : La Purification: Séparation des structures cellulaires en fractions pures par centrifugation.

A/ Séparation des organites par centrifugation sur gradient de densité préformé:

Dépôt d'une fine couche de l'homogénat à la surface du gradient contenu dans le tube à centrifuger : solution de saccharose ou de glycérol dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut du tube, variation linéaire et continue ou bien discontinue et par paliers à vitesse élevée pendant quelques heures. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

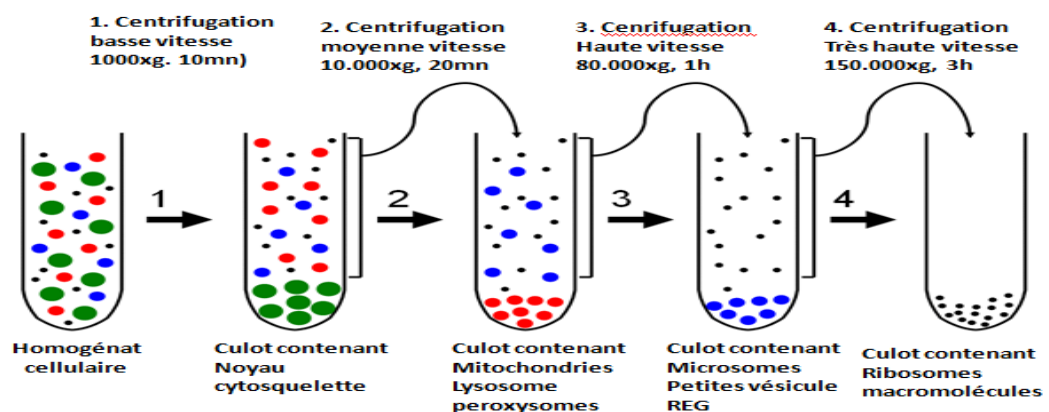
Technique : Permettant d'obtenir une séparation des constituants cellulaires en une seule étape d'un grand degré de pureté ne permettant de **manipuler que de petits volumes de matériel biologique**.

La centrifugeuse



B/ Centrifugation différentielle: L'homogénat est soumis à une succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissantes. On fractionne l'extrait initial en une série de culots et de surnageant. La vitesse de sédimentation dépend surtout de la densité des particules dont les plus denses de l'homogénat forme le premier sédiment (ou culot) et chacun est caractérisé par le coefficient de sédimentation donné en unité Svedberg (S), (la couche la plus dense au fond).

Remarque: Série de centrifugations de plus en plus longues et plus rapides pour fractionner l'extrait initial en **une série de culots et surnageant**. Technique préparatoire rapide, **simple et permettant de manipuler de grande quantité de matériel** sans donner cependant de fractions parfaitement pures.



L'ultracentrifugation différentielle: à chaque vitesse, des organites se déposent et seront prélevés :

- ✦ A 600g à 1000g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation
 - ✦ A 10 000g, pendant 15 - 20 mn, c'est la sédimentation
 - ✦ A 80 000 à 100 000g (ultracentrifugation), pendant 60 mn, c'est la sédimentation
 - ✦ A 200 000g, pendant 2heures on observe la sédimentation
- Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.