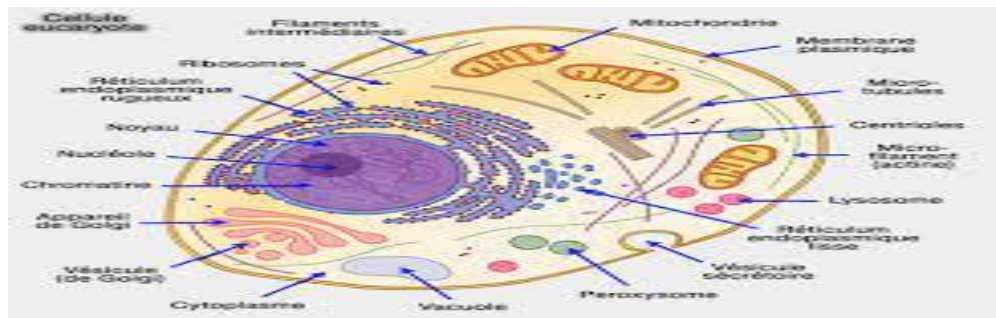


TD N°01
séparation des constituants cellulaires

Les constituants de la cellule :

- Noyau.
- Cytoplasme : ensemble complexe compartimenté en organites , structuré par le cytosquelette et délimité par la membrane plasmique.



Intérêt :

Méthodes permettant l'identification de la nature des constituants chimiques de la cellule.

Les méthodes de fractionnement cellulaire consistent à séparer les différents composants de la cellule par destruction de la membrane plasmique, afin d'analyser leur structure et leur fonction.

Les étapes de fractionnement cellulaire

Cette technique implique deux étapes :

- homogénéisation.
- purification.

1- Homogénéisation

L'homogénéisation consiste à l'obtention un homogénat ou un broyat (extrait acellulaire) par destruction de la membrane plasmique (plus la paroi pour les cellules végétales et fongique). Elle doit conserver autant que possible la structure, biochimie et physiologie des organites des cellules étudiées, en respectant des exigences ioniques, osmotique et de pH. On considère qu'une solution de saccharose 0.25 M est isotonique vis-à-vis de la plupart des organites vésiculaires.

Un échantillon doit être fractionné par l'un des traitements suivants:

- **Physique** : avec des ultrasons ou haute pression.
- **Mécanique** : par un piston et cylindres comme tube de Potter.
- **Chimique** : destruction des membranes avec des détergents (acides ou basiques) ou par des enzymes; cas des parois cellulaires (cellules végétales et cellules bactériennes).

chaque type cellulaire présente des conditions de broyage particulières, toutefois elles doivent tous se faire en basse température (0-4°C) et le plus vite possible afin de minimiser la dégradation chimiques suivant la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés.



Composition de l'homogénat

- Noyaux, mitochondries, lysosomes et peroxysomes.,
- Fragments provenant des ruptures membranaires (plasmique, réticulum, Golgi) se refermant pour donner les microsomes: petites vésicules fermées)

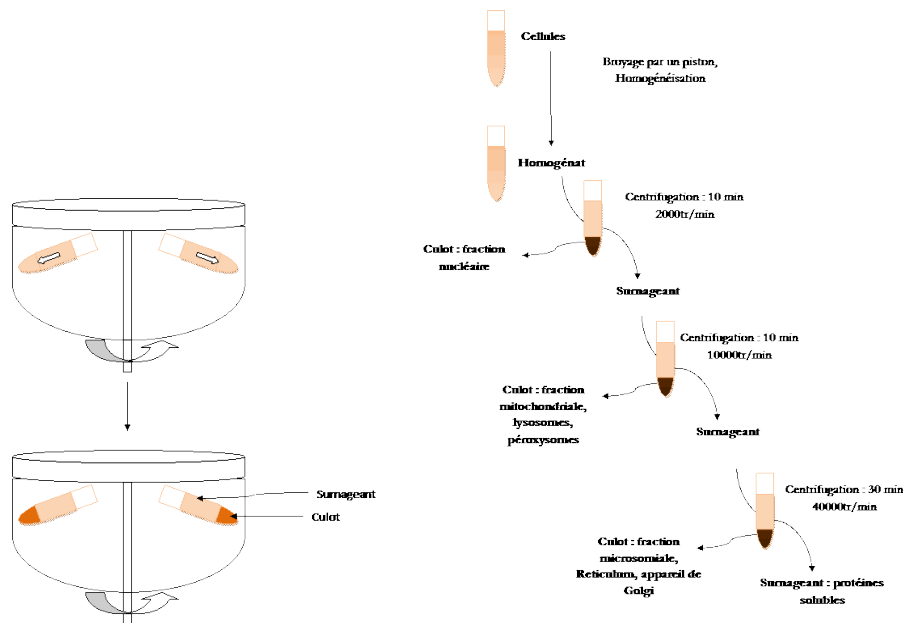
2. Séparation des organites

1- La 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 surageant.

La vitesse de sédimentation des particules (organites, macromolécules,...) dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, de sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forme le premier sédiment **(ou culot)**.

La vitesse de sédimentation est définie par le coefficient de sédimentation donné en unité **Svedberg (S)**.



2- La centrifugation sur gradient de densité

Certains organites et macromolécules sédimentent à des vitesses tellement voisines qu'ils sont très difficiles à séparer par une ultracentrifugation différentielle. C'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes. La technique d'ultracentrifugation sur gradient de densité (UGD) permet de séparer des organites cellulaires et même des petites particules biologiques présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques, et ce en fonction de leur densité

La centrifugation à gradient de densité est la séparation de molécules où la séparation est basée sur la densité des molécules lorsqu'elles traversent un gradient de densité sous une force centrifuge.

Principe de la centrifugation par gradient de densité :

La centrifugation à gradient de densité est basée sur le principe que les molécules se déposent sous une force centrifuge jusqu'à ce qu'elles atteignent un milieu de densité identique à la leur. Dans ce cas, un milieu avec un gradient de densité est utilisé, qui doit soit diminuer la densité, soit augmenter la densité.

Les molécules d'un échantillon se déplacent dans le milieu lorsque l'échantillon est mis en rotation, créant une force centrifuge.

Les molécules les plus denses commencent à se déplacer vers le bas à mesure qu'elles traversent le gradient de densité.

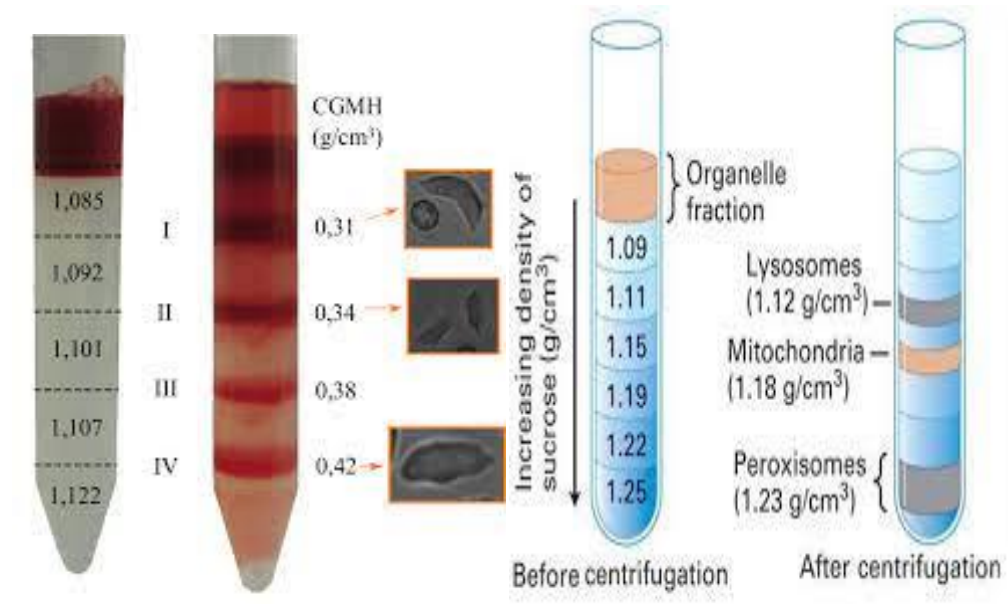
Les molécules deviennent alors suspendues à un point où la densité des particules est égale au milieu environnant.

De cette manière, des molécules de densités différentes sont séparées au niveau de différentes couches qui peuvent ensuite être récupérées par différents procédés.

Étapes de la centrifugation en gradient de densité

- Un gradient de densité d'un milieu est créé en déposant doucement la concentration inférieure sur les concentrations supérieures dans un tube à centrifuger.
- L'échantillon est ensuite placé sur le gradient, et les tubes sont placés dans une ultracentrifugeuse.

- Les particules traversent le gradient jusqu'à ce qu'elles atteignent un point où leur densité correspond à la densité du milieu environnant.
- Les fractions sont retirées et séparées, obtenant les particules sous forme d'unités isolées.



TD N°02: culture cellulaire

C'est une technique de laboratoire pour faire vivre des cellules in vitro, C'est le prélèvement de cellules, d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance.

Le but est de : - multiplier des cellules ou de les maintenir vivantes pour les utiliser.

- Cultiver des cellules d'origine végétale ou animale de différentes sources.
- Les cellules peuvent être manipulées facilement
- Les cellules peuvent être congelées tout en gardant leur potentiel de division et leur patrimoine génétique
- Source continue homogène de cellules utilisables dans différents domaines : recherche, santé, cosmétique...
- Les cellules permettent de minimiser l'utilisation d'animaux de laboratoire