

TD N 6 : Les méthodes de fractionnement cellulaire et subcellulaire

Objectifs du cours

- Décrire les techniques utilisées pour séparer les différents types de cellules et organites.
- Connaitre le principe et les types de la centrifugation.

1-Définition

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.

2-Les étapes de fractionnement cellulaire

Cette technique implique deux étapes : homogénéisation et purification

2-1-Homogénéisation (ou broyage)

L'homogénéisation consiste à détruire la membrane plasmique (plus la paroi pour les cellules végétales et fongique). Cette étape conduit à un homogénat contenant tous les constituants de la cellule.

Pour obtenir un homogénat, on place les cellules dans un tube à essai contenant une solution isotonique, cette suspension sera fractionnée par l'un des traitements suivants :

- **Mécanique** : écrasement par un piston.
- **Physique** : avec des ultrasons ou haute pression.
- **Chimique** : avec des détergents (acides ou basiques) ou par des enzymes.

Les milieux de broyage doivent répondre à des exigences chimique et osmotique : leur PH est neutre et leur composition ionique aussi voisine que possible de celle du cytoplasme.

On considère qu'une solution de saccharose 0.25 M est isotonique vis-à-vis de la plupart des organites vésiculaires.

Figure 1 : Homogénéisation

2-2-Purification

La purification consiste à séparer les structures cellulaires en fraction pures par une technique de centrifugation (ou ultracentrifugation).

2-2-1-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 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).

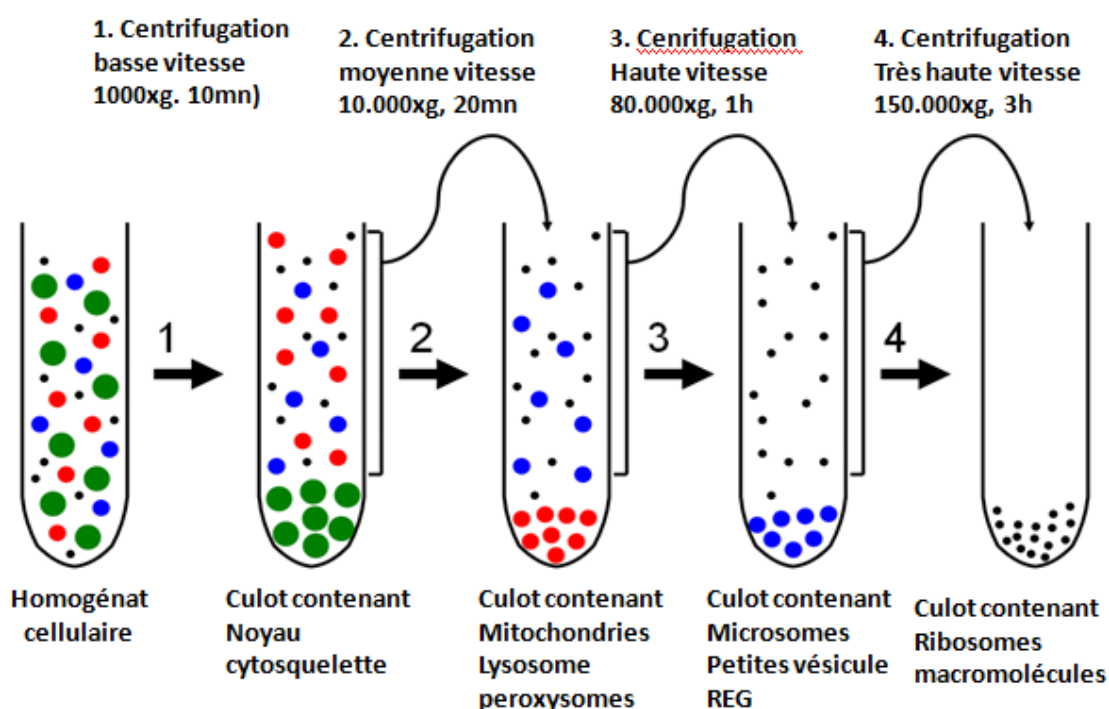


Figure 2 : Fractionnement cellulaire par centrifugation et ultracentrifugation différentielle

2-2-3- centrifugation sur gradient de densité

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 par gradient de densité consiste à déposer une couche mince d'homogénat au-dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Après centrifugation, chaque constituant rejoindra la zone de densité équivalente à la sienne, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond).

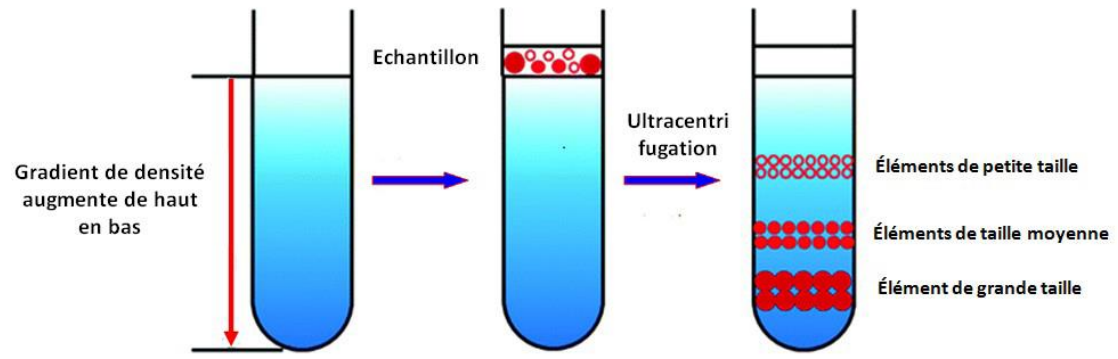


Figure3 : Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité