

Centre Universitaire Abd-Elhafid BOUSSOUF, Mila

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Master 1 Biotechnologie Végétale

**TP 2. Séparation des plastes cellulaires par la technique de
Centrifugation**

But de TP

1. Séparation d'organites cellulaire par centrifugation (centrifugation différentielle) (lycopènes de tomate, carotènes de la carotte et chloroplastes des feuillet de laitue).
2. Réalisation d'un gradient discontinu de saccharose (centrifugation à l'équilibre), en utilisant des solutions de saccharose de concentrations décroissantes : 70%, 30%, 5% et 3%.

Principe :

Elle est couramment utilisée en biochimie pour séparer ou analyser des fractions ou des structures cellulaires, des cellules entières, des macromolécules, etc.

La centrifugation est une technique de séparation qui permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. L'appareil qui fait la centrifugation s'appelle centrifugeuse. Elle permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide. Ces techniques consistent à séparer les constituants d'une cellule ou d'un organe et comportent deux étapes principales :

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

I. Matériel :

Centrifugeuse + Tubes à centrifugées, Balance de précision + Spatule + Capsule de pesée, 4 Bêcher de 100ml, Agitateur magnétique + barreau aimanté, 2 Mortier et pilon, 2 Entonnoir + micropipettes (1ml), 3 Bêcher de 50ml ; Agitateur de tubes (vortex).

II. Produits chimiques utilisés : Saccharose et Eau distillée.

III. Echantillons : 3 échantillons (feuillet de laitue, carotte et tomate).

1. Préparation des solutions de saccharose 70%, 30%, 5% et 3%

Le gradient discontinu est formé par des dépôts successifs de solution de saccharose de densité décroissante. Dans un tube, mettre 1ml de saccharose 70% verticalement, ensuite 1ml de saccharose 30% . Enfin, 1ml de saccharose 5% .

2. Préparation des échantillons

On découpe les échantillons (feuillet de laitue, carotte et tomate) chacun dans un mortier en broyant à sec puis on ajoute quelques millilitres de saccharose 3% (dilué) pour permettre l'éclatement des cellules et donc libération des organites dont les plastes (Extraction par osmose), puis on fait une double filtration, pour obtenir des solutions dépourvues de débris cellulaires.

3. Centrifugation préparative

On met 3ml de chaque échantillon dans les tubes de centrifugeuse oblique à une vitesse de 4000 tours par minute pendant 10 mn. Après centrifugation, on obtient pour chaque tube : un culot et un surnageant. On élimine le surnageant et on récupère le culot contenant les organites cellulaires dont les plastes.

4. Centrifugation analytique

On ajoute 2 ml de saccharose 3% pour chaque culot puis on homogénéise en utilisant un vortex. On prélève 0.5ml de chaque échantillon et on l'incube goutte à goutte dans le gradient discontinu de saccharose. On met les tubes dans une centrifugeuse à une vitesse de 2000 tours par mn pendant 10mn.