

1.2. Broyats cellulaires = homogénats cellulaires

1. Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire vise, après avoir détruit la membrane plasmique, à séparer les organites cellulaires les uns des autres et à les obtenir aussi pure que possible dans des tubes à essais distincts. Cette technique offre des possibilités expérimentales considérables tant au plan de la biochimie : identification des molécules propres aux organites, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Cette technique implique deux étapes :

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. Les méthodes d'homogénéisation sont de type :

- **Mécanique** (pistons, mortier et pilon, mixeurs) ;
- **Physique** (ultrasons) ;
- **Chimique** : destruction des membranes par des détergents (acides ou basique) et des parois (cas des cellules végétales ou des bactéries) par des enzymes appropriées tels que cellulases et lysozymes.

En fait, chaque type cellulaire nécessite des conditions de broyage particulières, mais un constant est que cette opération doit être effectuée à basse température (0-4°C), et le plus rapidement possible, pour minimiser les phénomènes de dégradations chimiques liés à la libération d'enzymes à partir d'organites détériorés.

2. Séparation par centrifugation

Les organites cellulaires sont séparés par une technique de centrifugation (ou ultracentrifugation) jouant sur les différences de vitesse de sédimentation des différentes organites en suspension. La vitesse de sédimentation des particules 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 forment le premier culot.

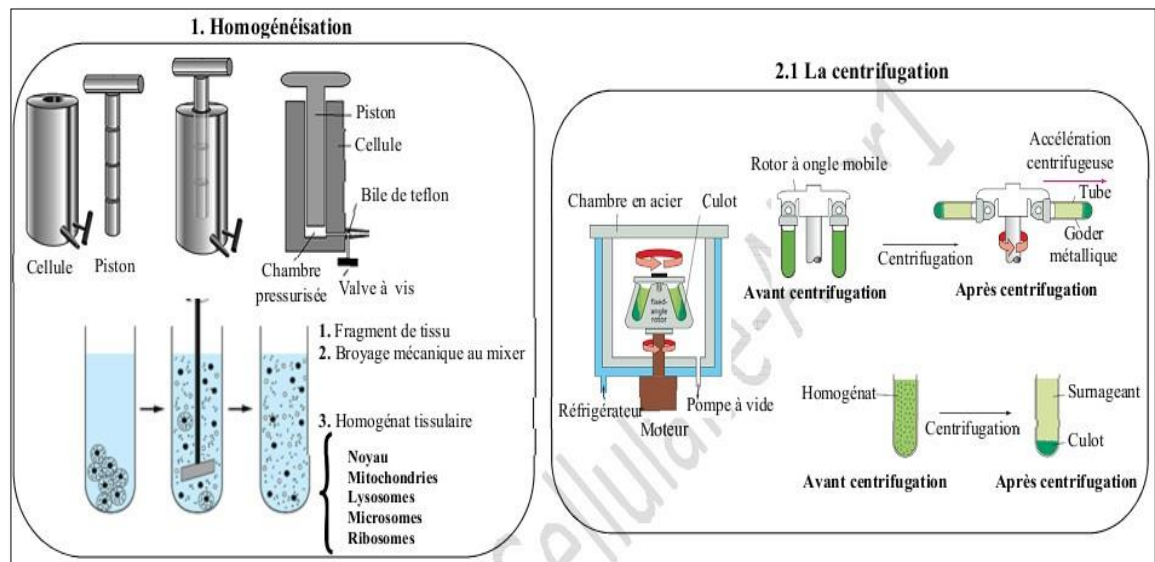


Figure 01. Principe de l'homogénéisation et de la centrifugation.

🚦 La Centrifugation Différentielle (CD)

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par taille et masse. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un **culot** au fond du tube. Les éléments dont l'accélération est trop faible pour contre balancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le **surnageant** (Figure 02).

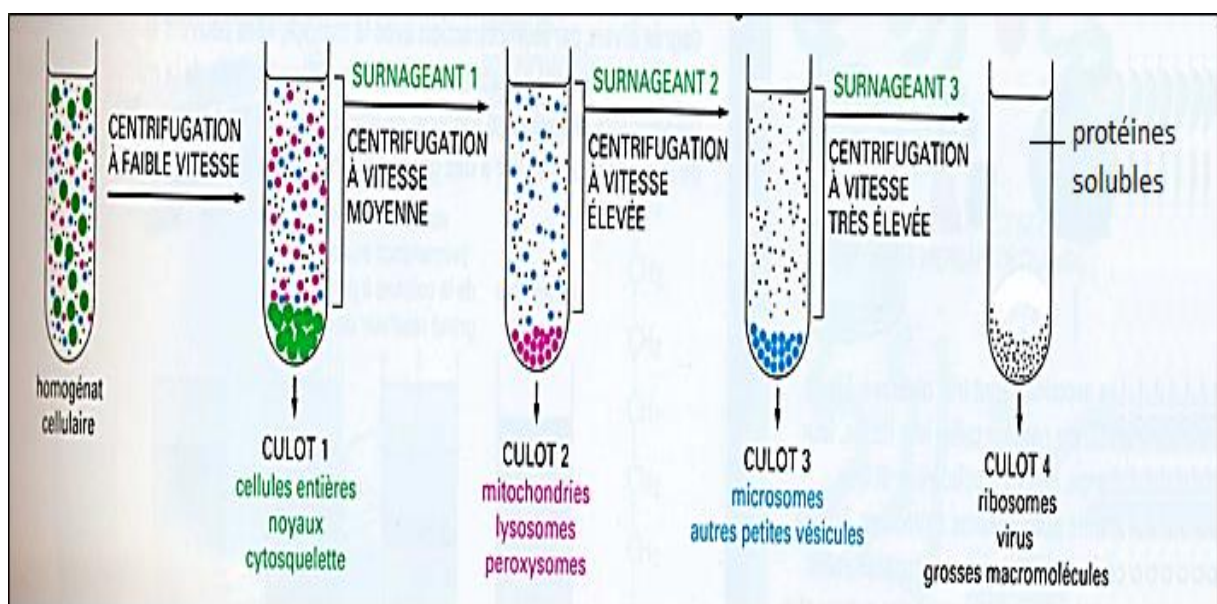


Figure 02. Etapes d'une centrifugation différentielle.

La Centrifugation sur Gradient de Densité (CGD)

Dans cette méthode, les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité. A l'équilibre, elles se stabilisent dans la zone du gradient où la densité est égale à la sienne. La différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation. Cette dernière peut être modulée en faisant varier cette différence de densité par la création d'un gradient de densité.

- Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide.
- S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- Si la particule est moins dense que le milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface.

Les **gradients** peuvent être préparés en mettant couche après couche (mode discontinu) le milieu de séparation (par exemple le Saccharose) dans un tube avec la couche la plus lourde (dense) en bas et la plus légère en haut (Fig. 03). L'homogénat (La fraction cellulaire) à séparer est placée au-dessus de la solution de saccharose et centrifugée. 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).

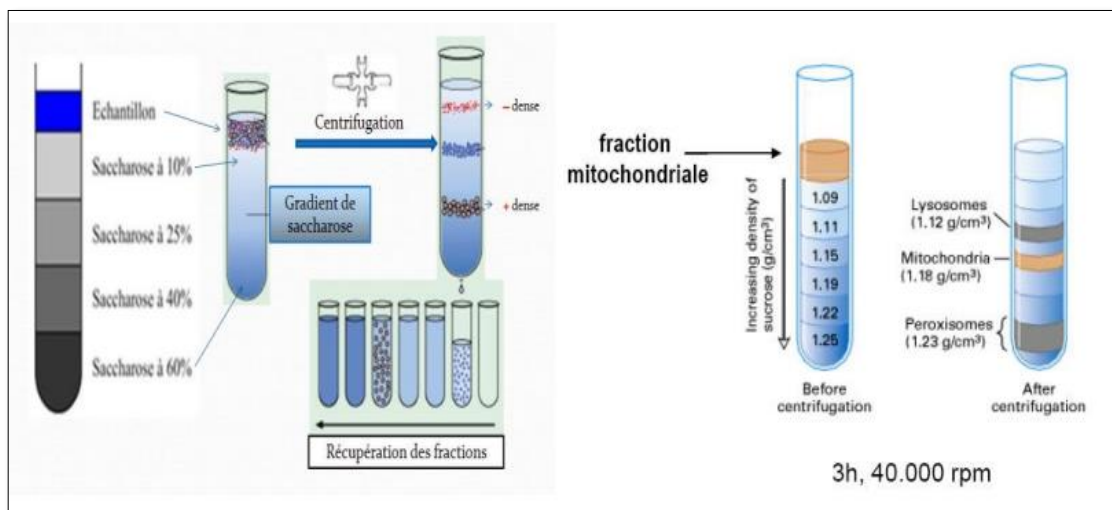


Figure 03. Centrifugation par gradient de densité (gradient discontinu).

Remarque : Parmi les produits permettant de faire des gradients de concentration, on peut citer : **le Saccharose** et **le chlorure de césium (ClCs)**, dont la densité la plus élevée peut atteindre.