

## TP 2 : LA SEPARATION DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Objectifs :

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

Ces techniques consistent à **séparer** les constituants d'une cellule ou d'un organite et comportent deux étapes principales :

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, mixers) ;
- **Physique** (hautes pressions, ultrasons) ;
- **Chimique** : destruction des membranes par des détergents 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 une constante 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

#### 2.1 La centrifugation

Le principe de la centrifugation consiste à soumettre un mélange à une force centrifuge importante, obtenue par rotation d'un rotor dans une enceinte. Dans ces conditions, en fonction de leur taille et leur densité, les constituants sédimentent vers le fond du tube à une certaine vitesse, proportionnelle à leur coefficient de sédimentation  $S$  (unité : le svedberg, du nom de son inventeur). Après cette opération, on obtient, au sein d'un tube à centrifuger, un culot (ou sédiment) et un surnageant contenant ce qui n'a pas sédimenté.

NB : Les ultracentrifugeuses sont des machines très sophistiquées par rapport aux centrifugeuses classiques ; leurs rotors peuvent tourner jusqu'à près de 80 000 tours par minute.

##### 2.1.1 La centrifugation différentielle

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. 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 contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le surnageant. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour récupérer les éléments (les cellules) du sang qui sédimentent pour des accélérations très faibles. Exemple: Isolement des organites cellulaires. Tout d'abord au cours d'une première centrifugation, les constituants les plus lourds sont isolés. Puis, en augmentant la vitesse de sédimentation les constituants de densité croissante seront séparés.

##### 2.1.2 La centrifugation sur gradient de densité

Cette technique permet la séparation des organites cellulaires et même de petites molécules présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques, et ce en fonction de leur densité. Les particules de l'échantillon, déposées au sommet du tube contenant un gradient d'une substance dense non ionique (comme le saccharose ou du glycérol), sont séparées en bandes selon leur vitesse de sédimentation. Il existe 2 **types** de gradient : le gradient isopycnique et gradient isocinétique

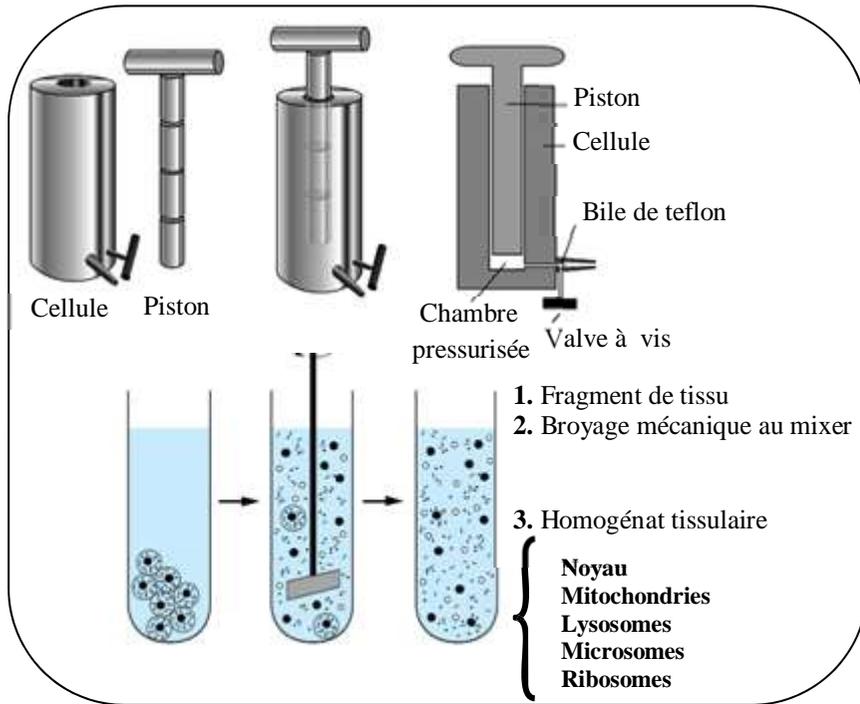
#### a/Séparation isopycnique (sédimentation à équilibre)

Les molécules soumises à la centrifugation sur le gradient de **chlorure de césium** (CsCl) se sépareront selon leur densité. La préparation à analyser est déposée sur le sommet du gradient, puis on centrifuge à équilibre. Chaque type de particule sédimentera jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration correspondant à sa densité. Elle s'immobilisera alors à ce niveau.

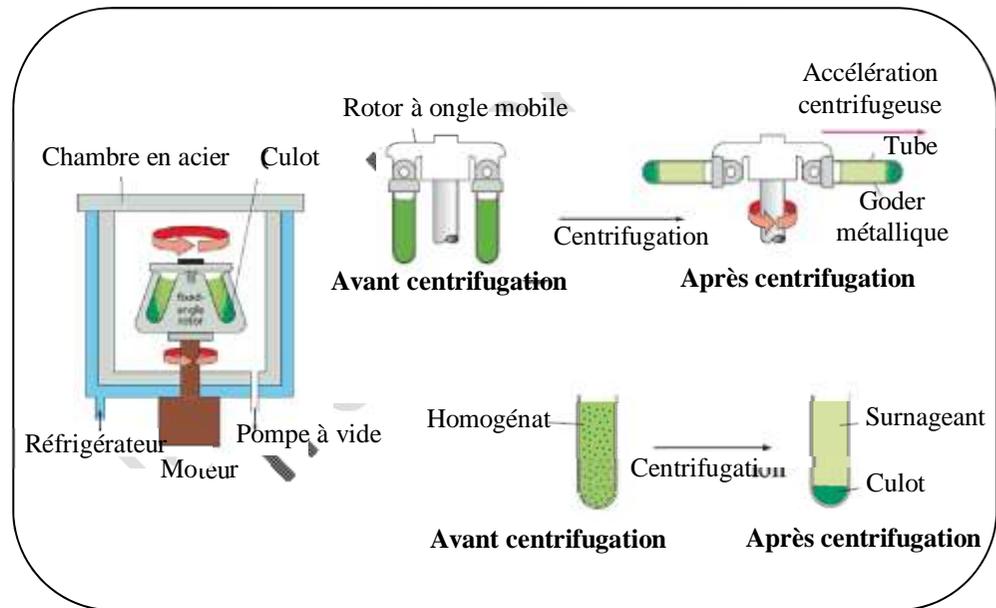
#### b/Gradient isocinétique (de zone)

La centrifugation peut aussi être utilisée pour des fins analytiques, pour séparer des particules ou des molécules, selon leur taille. Dans ce type d'applications, comme les particules sont homogènes, elles ont toutes la même densité, elles ne diffèrent que par leur taille. Le gradient (saccharose ou CsCl) sert donc à faire en sorte que les particules lourdes sédimentent plus vite que les plus légères, tout en n'atteignant jamais le fond du tube à centrifuger. On ne centrifuge donc pas à équilibre. Le gradient, dont la concentration maximale est moins dense que les particules, ne sert qu'à ralentir la sédimentation. On arrête donc la sédimentation quand les plus lourdes sont rendues vers le bas du tube à centrifuger et que le niveau désiré de séparation est obtenu.

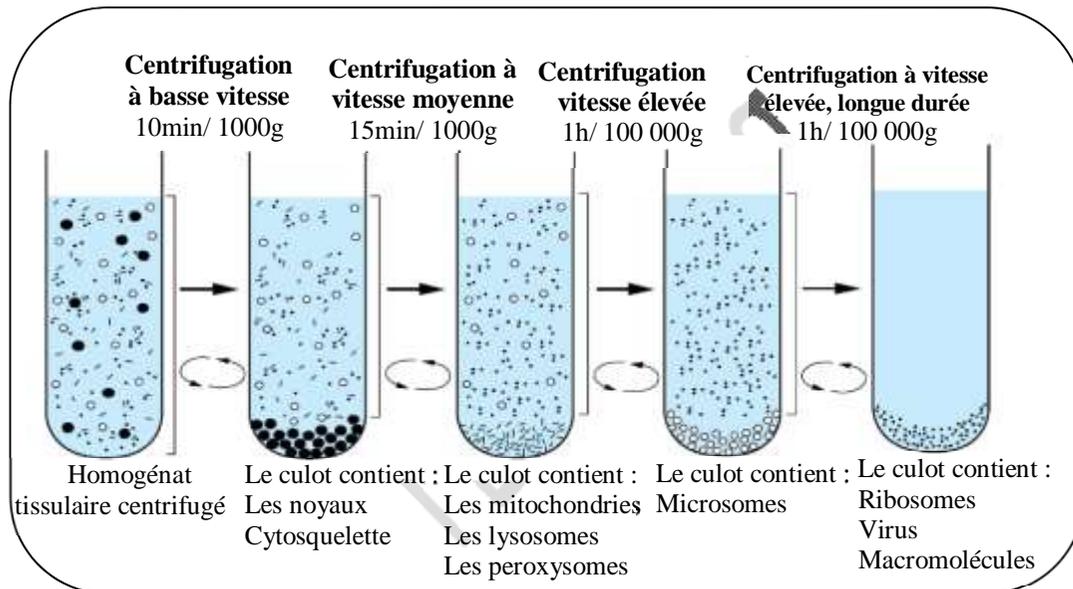
# 1. Homogénéisation



# 2.1 La centrifugation



## 2.1.1 Centrifugation différentielle



## 2.1.2 Centrifugation sur gradient de densité

