



Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule

TD N°3 : Méthodes de fractionnement cellulaire et subcellulaire

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

Le fractionnement cellulaire se fait en deux étapes:

- **Homogénéisation** : broyage des cellules
- **Purification** : séparation des organites cellulaires par centrifugation ou ultracentrifugation.

2-1-Homogénéisation (ou broyage)

L'homogénéisation consiste à détruire la membrane plasmique (plus la paroi pour les cellules végétales et fongiques). 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** : broyage par un piston.
- **Physique** : avec des ultrasons ou haute pression.
- **Chimique** : avec des détergents (acides ou basiques) ou par des enzymes.

Le milieu de broyage doit répondre à des exigences chimiques et osmotiques : son pH est neutre et sa 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.

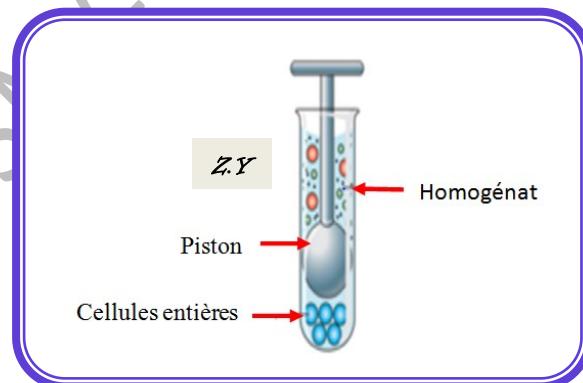


Figure 1 : Homogénéisation mécanique par un piston

2-2-Purification

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

2-2-1-Centrifugation différentielle

- L'homogénat cellulaire 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 surnageants.

- La vitesse de sédimentation des particules (organites, macromolécules,...) dépend de leur taille, de leur forme 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).

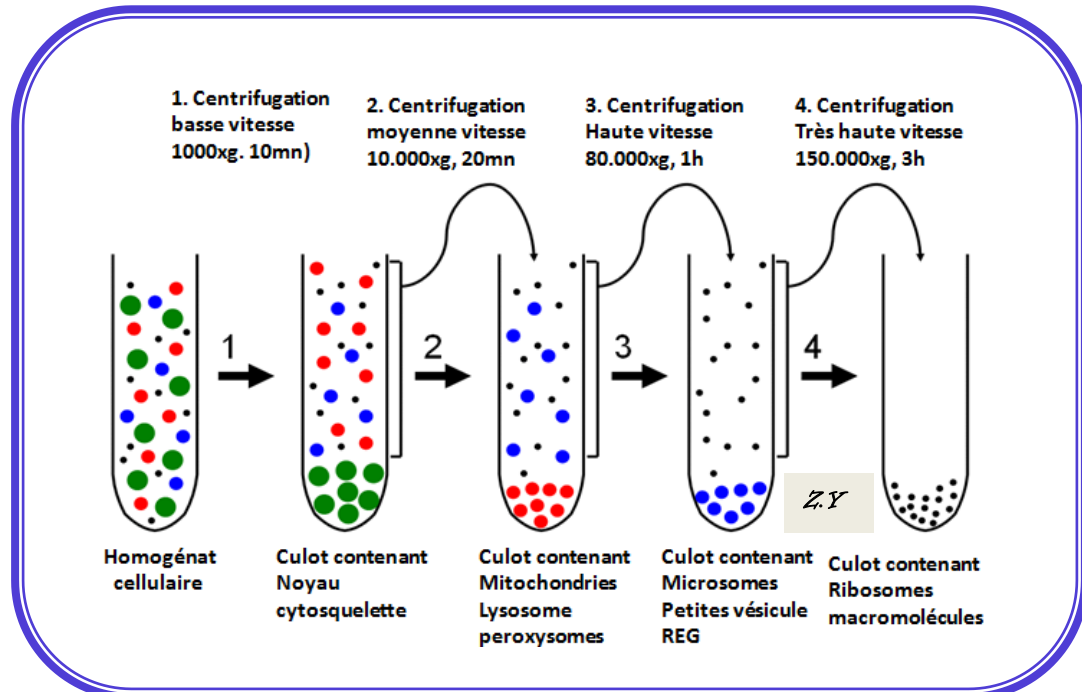


Figure 2 : Fractionnement cellulaire par centrifugation et ultracentrifugation différentielle

2-2-2- Centrifugation sur gradient de densité

- Cette technique permet de séparer en une seule fois des organites et même des petites particules biologiques qui ont des vitesses de sédimentation très voisines.
- 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 élément de l'échantillon se concentre en une zone du tube dont la densité est égale à celle de l'élément, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond).

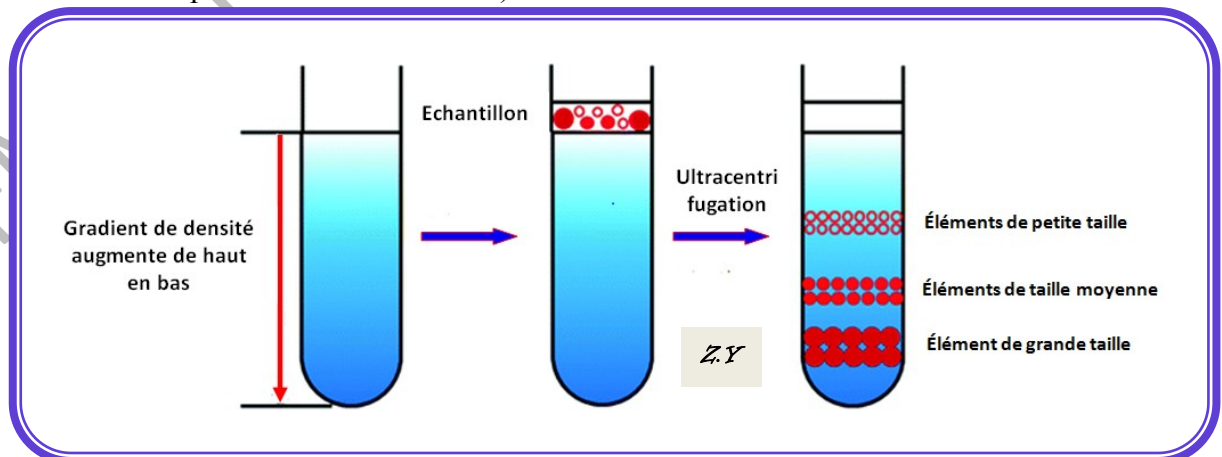


Figure3 : Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité