

Module de T.A.P.M.I**TP N° 1 : Fractionnement des composants cellulaires par centrifugation****But du TP**

On se propose dans le cadre de ce TP d'appliquer une technique de laboratoire simple qu'est la centrifugation pour faire le fractionnement des composants cellulaires sur la base d'un gradient de concentration de saccharose. Pour ce faire nous utiliseront comme matériel biologique un tissu végétal (laitue, épinard, menthe, tomate, carotte)/ et ou un tissu hépatique (foie de bœuf) pour isoler essentiellement les noyaux et les chloroplastes des autres organites cellulaires. La vitesse de sédimentation d'une particule sera fonction de la différence entre sa densité et celle du milieu ambiant du gradient de densité.

Matériel et produits chimiques

Centrifugation, godets, mortiers et verrerie courante, solution de saccharose à 3%, 5%, 30%, et 70%, eau distillée, échantillons : laitue, épinard, menthe, tomate, carotte.

Manipulation et aspect pratique

❖ **Préparation des échantillons :** On procède au broyage des échantillons dans un mortier à l'aide de la solution de saccharose à 3% puis on procède à une filtration sur un morceau de gaze. Les filtrats des tissus sont ensuite recueillis dans des tubes à centrifuger.

❖ **Equilibrage des tubes :** Les poids des tubes qui sont face à face dans le rotor doivent être identiques. On parle alors d'équilibrer les tubes à centrifuger. Si on emploie une ultracentrifugeuse, la précision de la pesée est encore plus critique (utilisation d'une balance analytique).

❖ Centrifugation

1. On centrifuge 2000 tours/min durant 10min.
2. Rejeter le surnageant et ajouter 2ml de saccharose à 3% au culot et agiter.
3. Prélever 0.5ml de ce mélange et l'introduire dans un autre tube contenant un gradient de concentration : 1.5ml de saccharose à 5%, 1.5ml de saccharose à 30%, et 1.5ml à 70%.
4. Après centrifugation à 6000 tours/ pendant 10min, les organites cellulaires atteignent leurs positions d'équilibre.

❖ Résultats

1. Prélever à chaque fois une fraction du culot et du surnageant pour observation microscopique (Fixation par la chaleur, coloration dans une goutte de vert de méthyle-pyronine).
2. Observez la position des différentes fractions ou bandes obtenues après centrifugation ainsi leur couleur.
3. Discuter vos résultats.