

Chapitre II : Analyses structurales et ultra-structurales

Partie 1 : Méthodes et techniques d'observation des cellules :

I. Introduction :

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle fondamentales des organismes vivants et en raison de sa petite taille (10 à 100 μm) et d'organisation très complexe, la biologie cellulaire à, tout d'abord, besoin d'en obtenir une image agrandie de bonne qualité. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure des progrès scientifiques et technologiques réalisés dans divers domaines. Les microscopes utilisent la déviation d'un flux ondulatoire de particules, soit non chargées (les photons), soit chargées électriquement (les électrons) au travers d'un système de lentilles de manière à former d'un objet à étudier une image agrandie.

Afin d'observer des détails encore plus fins, il faut augmenter la résolution, qui est généralement proportionnelle à la longueur d'onde de la radiation utilisés pour interférer avec les structures étudiées.

Les progrès de la microscopie ont repoussé la frontière entre le visible et l'invisible.

Aujourd'hui, la biologie ne peut plus se passer du microscope.

Pour comprendre la biologie cellulaire contemporaine, il est indispensable de se familiariser avec les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude.

Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule et qui sont toutes basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques:

- les techniques morphologiques.
- les techniques chimiques et biochimiques.
- les techniques physiologiques.

En **culture cellulaire** de nombreux procédés préparatoires des cellules sont utilisés pour une analyse morpho fonctionnelle.

II. Histoire sur l'invention du microscope :

Il est difficile de dire qui a inventé le microscope composé.

- En 1590 : l'opticien hollandais Hans Janssen et son fils **Zacharias Janssen** fabriquèrent le premier microscope.
- Un autre favori au titre d'inventeur du microscope est **Galilée**. Il a développé un microscope composé d'une lentille convexe et d'une autre concave en 1609.
- On attribue en général à **Antoni van Leeuwenhoek** (1632-1723) le fait d'avoir attiré l'attention des biologistes sur les utilisations du microscope, même si des loupes ordinaires étaient déjà fabriquées et utilisées au XVI^e siècle. Les microscopes artisanaux de Van Leeuwenhoek étaient des instruments simples et de taille réduite comprenant une lentille unique mais forte.

- En comparaison, les systèmes à plusieurs lentilles restaient difficiles à mettre au point et il ne fallut pas moins de 150 ans de développement des optiques avant que le microscope composé puisse livrer une qualité d'image équivalente à celle des microscopes simples de Van Leeuwenhoek.

III. La microscopie :

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour traitement.

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : **le microscope optique, aussi appelé photonique**, parce qu'il utilise des photons et le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécapage etc....

A. La microscopie optique ou photonique :

Cette technique est la plus ancienne utilisée. Elle est également celle dont il existe le plus de variantes. Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

- soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Le microscope optique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions (ce qui caractérise son grossissement) et de séparer les détails de cette image (et son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus, en pétrographie pour reconnaître les roches, en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage.

Il ne faut pas le confondre avec la loupe binoculaire qui n'exige pas des échantillons plats de faible épaisseur

Ce microscope il a l'avantage de donner une vue générale des cellules ou des tissus et aussi de permettre l'examen de cellules vivantes ; mais le pouvoir séparateur du microscope optique ne peut dépasser 0,2 μm , le grossissement étant au maximum de 1000.

1. Présentation du microscope optique :

Un microscope optique en général est composé d'un statif (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, d'un tube optique le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités un oculaire permettant de recueillir l'image et des objectifs servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, d'une platine (porte objet) percée d'un trou et munie de pinces pour immobiliser la lame et d'une source lumineuse éclairant la préparation. (Voir TP sur la microscopie).

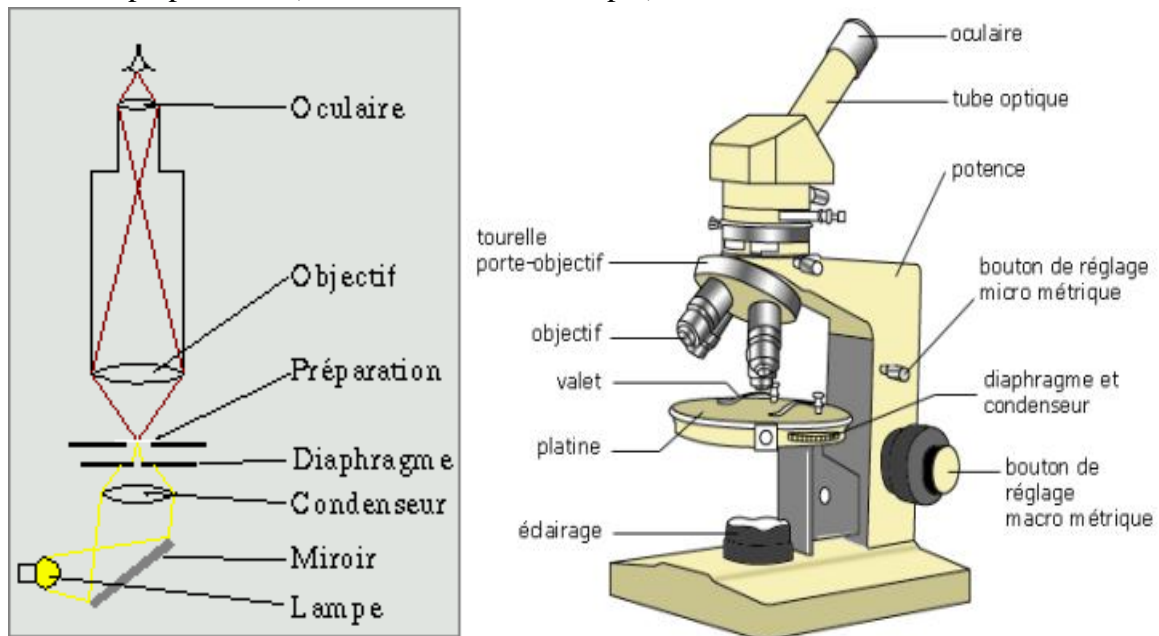


Figure 1 : Schéma d'un microscope optique monocular

Le microscope est caractérisé par :

- **son grossissement ou puissance** : Egal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire. Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.
- **son pouvoir de résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

(La résolution ou le pouvoir séparateur (PS) est définie comme étant la distance minimale séparant deux points individualisables. Chez l'homme le PS est de 0,1 mm à une distance de 25 cm. L'œil humain ne peut distinguer à 25cm que deux objets distants l'un de l'autre que de 0,1 mm. Au-delà l'image des 02 objets sera unique ou nulle.

Le PS du microscope optique est de 0,2 μm alors que celui du microscope électronique est de l'ordre de \AA)

2. Principe du fonctionnement du microscope :

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le microscope optique et pour le microscope électronique à transmission et l'observation par réflexion pour le microscope électronique à balayage.

Donc le microscope travaille en :

Transmission : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

Réflexion : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet. Ce mode de microscopie est peu utilisé, il correspond aux loupes binoculaires ou stéréomicroscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

3. Conditions d'observation en microscopie :

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : l'épaisseur de l'échantillon et le contraste.

L'épaisseur de l'échantillon : pour une observation par transmission l'échantillon doit présenter une faible épaisseur afin de permettre le passage du faisceau incident des photons ou d'électrons d'où la nécessité de faire des coupes très très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm

Le contraste : L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui amplifient les contrastes naturels comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

4. Types de microscopes optiques :

Un certain nombre de microscopes ayant chacun des montages optiques spéciaux ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules dans certaines conditions et améliorer la qualité de celle-ci. Le développement de ces microscopes répond principalement à 2 objectifs

- augmenter les contrastes pour mieux visualiser les structures subcellulaires
- améliorer le pouvoir de résolution (voir des détails de plus en plus petits !)

Parmi ces microscopes, nous avons :

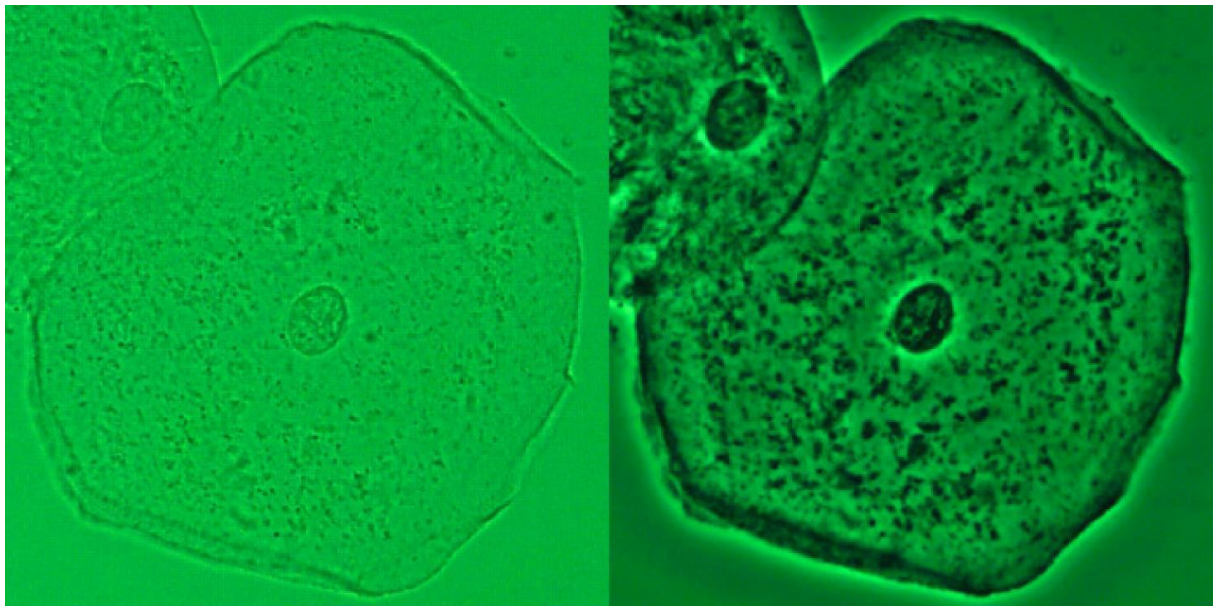
a) Microscope à fond noir :

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des cellules vivantes, en augmentant les contrastes naturels. Dans ce type de microscope, la source de lumière est oblique par rapport à la préparation cellulaire.

Un condenseur spécial illumine la préparation sous une incidence rasante, seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif : le fond du champ d'observation est noir, et le moindre objet apparaît brillamment éclairé. Cela permet d'observer des objets dont la dimension est à la limite extrême du pouvoir séparateur, et qui passeraient inaperçus avec les techniques ordinaires. Mais ces objets devenant des sources lumineuses, leur forme et leur dimension ne peuvent pas être correctement appréciés.

b) Microscope à contraste de phase :

Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation de cellules vivantes. Son principe repose sur l'amplification des contrastes naturels en mettant à profit les différences d'indices de réfraction entre les organites ; différences qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'oeil. La base de cette transformation repose sur les interactions entre les ondes lumineuses : on parle d'interférences. Ce microscope est un bon outil pour l'observation des mouvements des cellules et de leurs organites tels que les mitochondries, les chromosomes, et de suivre les étapes de processus comme la mitose par exemple. Les images de l'observation peuvent être enregistrées par caméra vidéo, les films sont ensuite projetés sur un écran de télévision.



(A)

(B)

Figure : Images obtenues à l'aide de la microscopie optique ordinaire (A) et à contraste de phase (B)

c) Microscope à fluorescence :

D'une manière générale, les molécules fluorescentes absorbent des radiations à une longueur d'onde donnée et émettent des radiations de longueur d'onde plus élevée. C'est le cas des substances appelées Fluorescéine qui fluoresce en vert et la Rhodamine en rouge sont des

exemples de ce type de substances largement utilisées dans la biologie cellulaire. Ce microscope est semblable au microscope photonique ordinaire, sauf qu'il est muni d'une source de rayon UV (lampe à UV) et d'un système de filtre qui permet de choisir la longueur d'onde des UV appropriés pour chaque substance. Il est le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome ; à titre d'exemple, on peut aussi détecter la présence d'insuline dans une cellule avec anticorps Anti-insuline marqué par fluorescéine.

d) Microscope à lumière polarisée :

Il permet de détecter des structures biréfringentes qui ont une organisation moléculaire particulière, telles que les microtubules et les chloroplastes et parois des cellules végétales. Les photons lumineux passant à travers certains matériaux tels que les filtres Polaroid ou certains cristaux (Nicol) en ressortent "polarisés" : ils ne vibrent plus que dans un seul plan. Si un second filtre Polaroid ou un second Nicol est disposé sur leur trajet on peut par rotation de ce second filtre les arrêter complètement et obtenir l'extinction totale du faisceau. (Nicol "croisés") Si on place entre les deux filtres croisés un objet actif sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné, le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction. Un microscope à lumière polarisée est équipé d'un premier filtre au niveau du condenseur et un second filtre en position croisée dans le tube optique

e) Microscope à balayage confocal :

Dans ce type de microscope, l'objet est éclairé par un faisceau laser finement focalisé qui balai rapidement à un seul niveau n'éclairant qu'un plan mince de l'objet, on parle de coupes optiques. Les préparations sont souvent traitées par des colorants fluorescents et la lumière émise par la coupe optique éclairée donne une image sur un écran vidéo. Les coupes photographiques d'un cerveau humain prises par un scanner sont un exemple de ce type.

B. La microscopie électronique :

Le microscope électronique est beaucoup plus récent : le premier a été construit en 1931, par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. Puis il s'est répandu à partir des années 60. La résolution d'un microscope électronique peut atteindre 2 angströms, mais généralement les meilleurs microscopes atteignent 20 angströms seulement.

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons ce microscope fonctionne avec des électrons le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons (cathode et anode percée).

L'ensemble du dispositif est placé sous vide. Les lentilles de verre sont remplacées par des bobines électromagnétiques ("lentilles" électromagnétiques) seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images.

Avec ces microscopes on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques Å. On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

1. Types de microscopes électroniques :

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- la microscopie à transmission
- la microscopie à balayage

a) Microscope électronique à transmission (MET):

C'est la technique la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse, ils sont plus ou moins absorbée (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons), l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent similaire à ceux qui équipent les téléviseurs noirs et blanc. Hormis le fait que les absorbeurs d'électrons sont des métaux lourds les mêmes techniques de révélation que pour la microscopie en lumière directe peuvent être utilisées.

b) Microscope électronique à balayage (scanning) (MEB):

Bien que de résolution plus faible que la précédente, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en pseudo 3D.

Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet au préalable recouvert d'une couche métallique. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image. Cet appareil permet de gagner en profondeur de champ, mais son pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission. Il fournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel des surfaces cellulaires, par exemple.

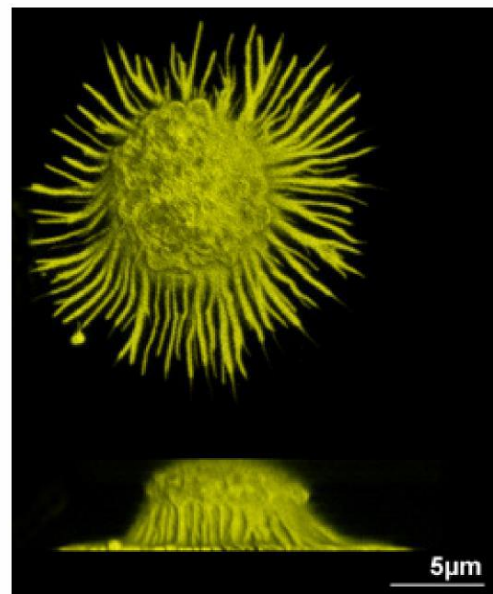
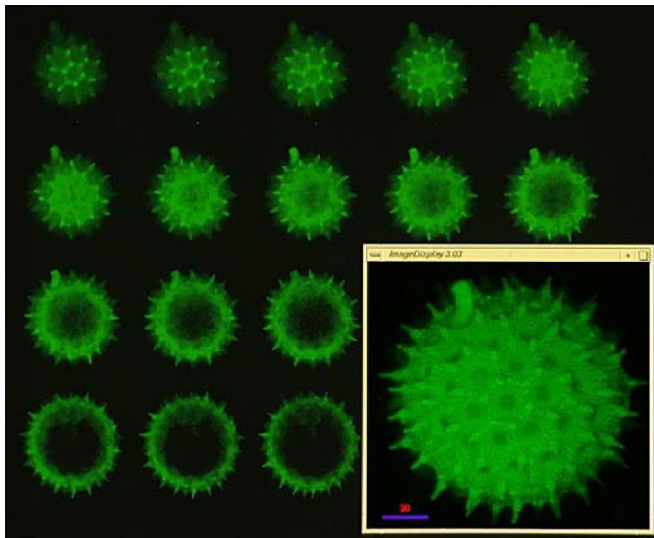
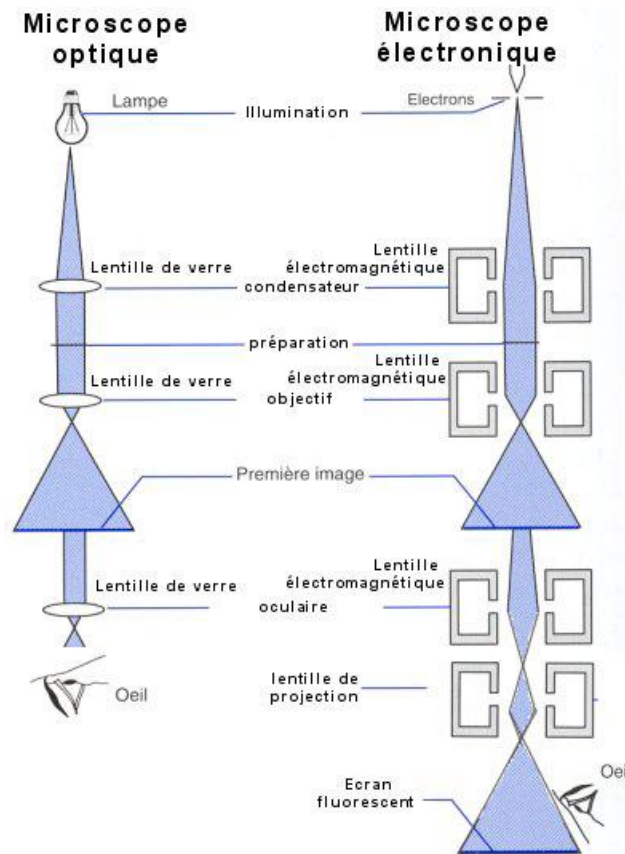


Figure : Images obtenues à l'aide de la microscopie à balayage



M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
<ul style="list-style-type: none"> *grossissement : de 25 à 1500 fois *pouvoir séparateur : environ 0.2μm * préparation est traversée par des photons *longueur d'onde : 0,4 à 0,8 μm *lentilles sont en verre *image : est reçue directement *les coupes au microtome : 2 à 10 μm 		<ul style="list-style-type: none"> * grossissement : 1500à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10A° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 A° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0,05μm
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles 		<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la structure fine de la cellule * on atteint très souvent le niveau moléculaire *a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux)
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> * on ne peut pas pousser l'analyse assez loin 		<ul style="list-style-type: none"> * la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
<ul style="list-style-type: none"> *l'unité est le micromètre ou micron (μm) 1μm = 10⁻³ mm 		<ul style="list-style-type: none"> * l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10⁻⁶ mm ou 10⁻⁹ m

Partie 2 : Les méthodes de fractionnement subcellulaire :

Les méthodes de fractionnement subcellulaire consistent à séparer les différents composants cellulaires par destruction de la membrane plasmique, puis par désorganisation de la cellule.

- 1) **L'homogénéisation** : consiste à provoquer l'éclatement de la cellule, et la rupture de la membrane plasmique, en mettant la cellule dans un homogénéisateur. On obtient un homogénat avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées microsomes.

Broyats cellulaire (homogénats cellulaires) :

Pour obtenir un broyat cellulaire = homogénat cellulaire on peut partir, soit d'une **suspension de cellules**, soit de **fragments de tissu**.

L'homogénat cellulaire est constitué d'**organites en suspension, de débris** cellulaires (fragments d'ultrastructures) ainsi que les **constituants biochimiques en solution**.

Différentes techniques sont utilisables : Elles peuvent d'ailleurs se combiner pour une meilleure efficacité :

a) **Mortier + abrasif** :

Cette méthode s'adresse à des fragments de tissus.

Les morceaux de tissu sont très souvent congelés immédiatement par immersion dans de l'azote liquide (- 196°C) ou de la carboglace (CO₂ liquide, - 80 °C) afin de les durcir.

L'abrasif utilisé est souvent le sable de Fontainebleau de granulométrie régulière et très fine.

b) **Mixeur** :

C'est un appareil muni de pales en rotation. Exemple : le disperseur ultra-Turrax.

c) **Le Potter-Elvehjem** :

Il est constitué d'un tube de verre et d'un piston en plastique tels que l'espace annulaire entre le piston et la paroi du tube ne soit que de quelques dixièmes de mm.

Le piston tourne à 1000 ou 2000 tours/min et en même temps que le piston tourne, on fait aller et venir le tube verticalement.

Les cellules qui passent entre le piston et la paroi du tube sont alors soumises à des forces de cisaillement qui amènent leur éclatement.

d) **Le choc osmotique** :

On place les cellules dans un **milieu hypotonique**.

Le milieu intracellulaire étant plus concentré qu'à l'extérieur, l'eau entre de façon massive à l'intérieur des cellules sous l'effet de l'osmose. Le volume cellulaire augmentant, la membrane plasmique n'y résiste pas et la cellule éclate.

Lorsque les cellules sont délimitées par une paroi, celle-ci peut protéger les cellules de la lyse car la présence de la paroi (contre laquelle vient se plaquer la mb plasmique) crée une force de turgescence qui s'oppose à l'entrée de l'eau par osmose.

Pour neutraliser l'intervention de la paroi, on la digère au préalable en plaçant les cellules dans une solution isotonique tamponnée contenant des enzymes capables d'hydrolyser les constituants pariétaux :

Exemple : cellulases et pectinases pour les cellules végétales, lysozyme pour les cellules bactériennes, chitinase pour levures et moisissures.

e) **Vibrateur ultrasonique :**

Cet appareil émet des ultrasons dont on peut régler la fréquence et l'intensité en fonction du matériel cellulaire étudié. La membrane plasmique se rompt sous l'effet des vibrations engendrées par la propagation des ondes.

Comme pour le choc osmotique, des cellules débarrassées de leur paroi seront fragilisées et donc plus facilement lysées avec ce type de technique.

Conditions de manipulation :

- On met l'échantillon biologique dans une **solution tamponnée et isotonique** ou légèrement hypertonique (sauf pour la technique du choc osmotique). De façon à ne pas altérer les structures cellulaires.

- On travaille entre **0-4°C**, afin d'empêcher tout fonctionnement enzymatique. En effet la compartimentation cellulaire n'est pas entièrement conservée cf. un certain nombre d'organites sont abîmés. Leur structure n'étant plus intacte, ils libèrent des enzymes capables de catalyser certaines dégradations indésirables (ex : activité hydrolases stockées dans les lysosomes).

La préparation d'homogénats cellulaires est donc réalisée en chambre froide ou bien on place le récipient contenant l'échantillon biologique dans un bain de glace pilée.

2) Fractionnement cellulaire :

Afin d'analyser leur structure ou leur composition, il peut être intéressant de séparer les différentes structures présentes dans la cellule.

Il faut d'abord les isoler les uns des autres. La purification d'organite passe par l'obtention de fractions cellulaires. On parle de techniques de **fractionnement cellulaire = isolement d'organites cellulaires**.

Le fractionnement cellulaire est réalisé à partir d'un homogénat cellulaire

Principe de la séparation des organites cellulaires :

Le fractionnement cellulaire est basé sur la **différence de densité des organites**.

On peut à partir d'un homogénat cellulaire laisser sédimenter les organites, et observer que leur vitesse de sédimentation est différente car leur densité diffère :

- les plus denses séimentent les premiers ;
- les moins denses séimentent par la suite.

La vitesse de sédimentation répond à l'équation suivante :

$V = Kr^2 (dp - dm) g$ c'est une vitesse $V = dx/dt$ exprimée en m/s

V = vitesse de sédimentation

K = facteur qui dépend de la viscosité du milieu dans lequel sont en suspension les organites

r = rayon de la particule considérée comme sphérique

d_p = densité de la particule $d = (\text{masse d'un vol. d'un corps } x) / (\text{masse du même vol. d'eau})$

d_m = densité du milieu

g = accélération de la pesanteur. L'accélération centrifuge est exprimée en multiples de l'accélération de pesanteur terrestre notée **g**. L'accélération à laquelle on soumet les échantillons atteint des valeurs de 100 000 à 200 000 **g**.

$Kr^2 \cdot (d_p - d_m)$ = **coefficient de sédimentation** dont l'unité est la seconde.

Comme les valeurs des coefficients de sédimentation sont très petites, on les exprime plutôt en unités SVEDBERG (S) pour lesquelles **1 unité S = 10^{-13} seconde**

La différence de densité des organites de la cellule est très faible, ce qui impliquerait une séparation longue dans le temps. On utilise donc la centrifugation pour remplacer la pesanteur par une force centrifuge.

Les différentes fractions issues de la centrifugation peuvent ensuite être identifiées et analysées chimiquement.

a) L'ultracentrifugation différentielle :

C'est à Albert CLAUDE que l'on doit cette technique.

On l'appelle ultracentrifugation **différentielle** car basée sur la **différence de vitesse de sédimentation** des organites, elle-même reposant sur différence de densité des organites ; et **ultra** pour désigner que exploitation de **faibles différences** (comme pour ultrastructure) et utilisation **d'accéléérations importantes**.

On procède en deux temps : la fabrication d'un homogénat cellulaire suivi d'une ultracentrifugation différentielle.

Les centrifugations sont réalisées en milieu refroidi et on doit donc disposer d'un équipement spécial qui est l'**ultracentrifugeuse réfrigérée**.

Pratiquement la centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. L'homogénat est placé dans une centrifugeuse ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé :

- A 600g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.
- A 15 000g, pendant 5 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.
- A 100 000g (ultracentrifugation), pendant 60 minutes on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes.
- A 300 000g, pendant 2heures on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

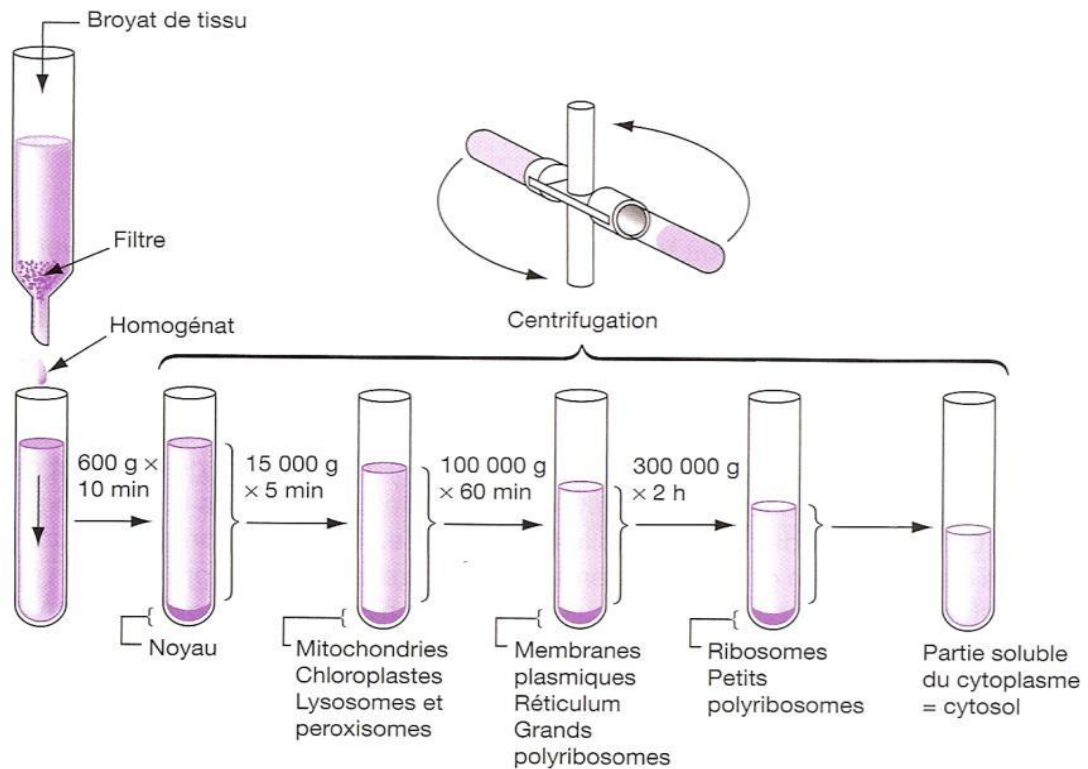


Figure : Centrifugation différentielle. D'après breuil (2007).

b) La Centrifugation par gradient préformé :

Cette technique permet de séparer **en une seule fois** des organites qui ont des **vitesses de sédimentation très voisines** (cf. très faibles différences de densité).

On travaille dans un **milieu présentant un gradient de densité**, d'où le nom donné à la technique.

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera.

La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité. La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation** en unité **Svedberg (S)**.

Principe :

On a vu précédemment que la vitesse de sédimentation est fonction de la différence ($d_p - d_m$), or quand $d_p = d_m$ $V_{sed} = 0$, l'organe s'immobilise ainsi dans la zone ou couche de gradient de densité qui correspond à sa propre densité.

Les différents organites vont donc s'étager sur toute la hauteur du tube de centrifugation.

La technique de centrifugation différentielle intervient rarement à partir d'un homogénat cellulaire, mais elle est plutôt **pratiquée après l'ultracentrifugation différentielle à partir d'une fraction cellulaire donnée** afin de la purifier.

On travaille généralement sur un **gradient de saccharose** pour la **purification d'organites** (il existe une centrifugation sur gradient de **chlorure de césium** pour séparer des **molécules d'acides nucléiques** : différences de densités exploitées sont très fines

- **Confection du gradient :**

Il est réalisé dans le tube à centrifuger avant le dépôt de la fraction cellulaire à analyser et la centrifugation (en centrifugation sur gradient de chlorure de césium le gradient de densité s'établit pendant la centrifugation). Le dispositif utilisé est le suivant :

- **Vérification de la pureté des fractions :**

- Cette vérification peut se faire par une **observation au microscope électronique**, mais cette technique n'est **pas réalisable par tous les types de laboratoire** amenés à effectuer du fractionnement cellulaire ;

- on peut alors rechercher les **activités enzymatiques connues pour être compartimentées spécifiquement à l'intérieur d'un organite donné** : ex une enzyme mitochondriale détectée dans une fraction "noyau" est le signe de la présence de mitochondries, c'est à dire d'une contamination, donc d'une pureté imparfaite.