

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
UNIVERSITE DES FRÈRES
MENTOURI CONSTANTINE

معهد العلوم البيطرية
Institut des Sciences Vétérinaires
Département : Préclinique



Polycopié pédagogique

Travaux Dirigés de Biologie Cellulaire

Destiné aux étudiants de : Première Année Docteur en Médecine
Vétérinaire

Élaboré par : Allaoui Assia

Maitre de conférences A – Maitrise des facteurs de la reproduction
chez les Herbivores

Année universitaire : 2025-2026

1. Intitulés des Travaux Dirigés

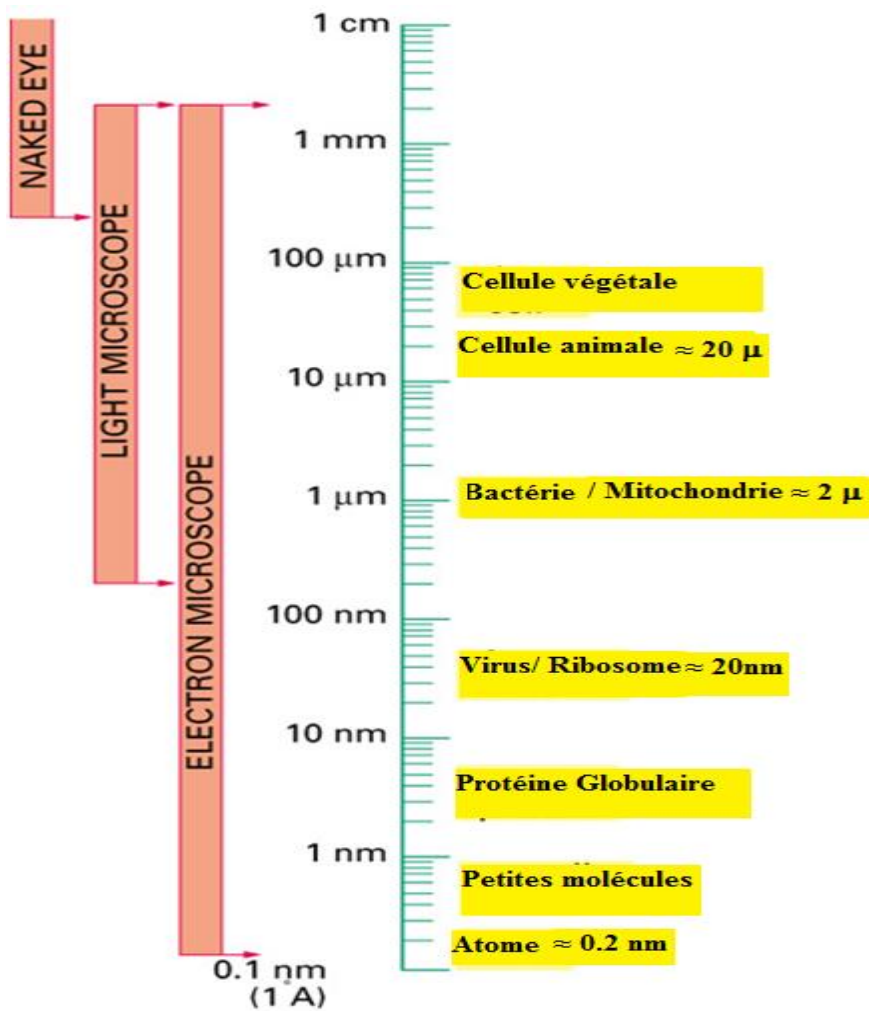
Intitulés des TD		Volume Horaire (15H)
01	Comparaison entre les microscopes, optique et électronique	03H
02	Etapes de préparation des coupes pour l'observation microscopique	03H
03	Méthodes d'étude de la cellule liées à la microscopie électronique	02H
04	Technique de détection et de localisation des composés cellulaires	02H
05	Technique de mise en évidence du mouvement latéral des protéines membranaires	02H
06	Techniques d'isolement des organites cellulaires	03H
Total		15H

TD 1/

Intitulé : Comparaison entre les microscopes, optique et électronique

Analyse en microscopie

Selon leur dimension, les éléments peuvent être visualisés à l'œil nu, ou au microscope. Un microscope est un objet permettant l'observation d'objets invisibles à l'œil nu. Selon la source d'énergie utilisée, il existe deux grands types de microscopes : les **microscopes optiques** (ou photoniques) et les **microscopes électroniques**.



I. Microscope optique

Les microscopes optiques (également appelés microscopes photoniques) ont comme point commun l'utilisation d'énergie lumineuse, c'est-à-dire un faisceau de photons, qui peut être de la lumière blanche (comme en microscopie optique à champ clair) ou d'une longueur d'onde bien précise (comme en microscopie à fluorescence). Le principe d'un microscope, quelque

soit son type, est de grossir l'image observée à l'aide d'un jeu de lentilles. En effet, pour observer la structure cellulaire sous le microscope optique, le principe se base sur la déviation des particules photoniques qui sont des éléments non chargés, ces particules traversent un système de lentilles de manière à former une image agrandie de l'échantillon à examiner. Les objets illuminés deviennent très clairs mais il est souvent nécessaire de procéder à des colorations des tissus afin de les observer. Le microscope optique permet de visualiser des cellules vivantes ou fixés.

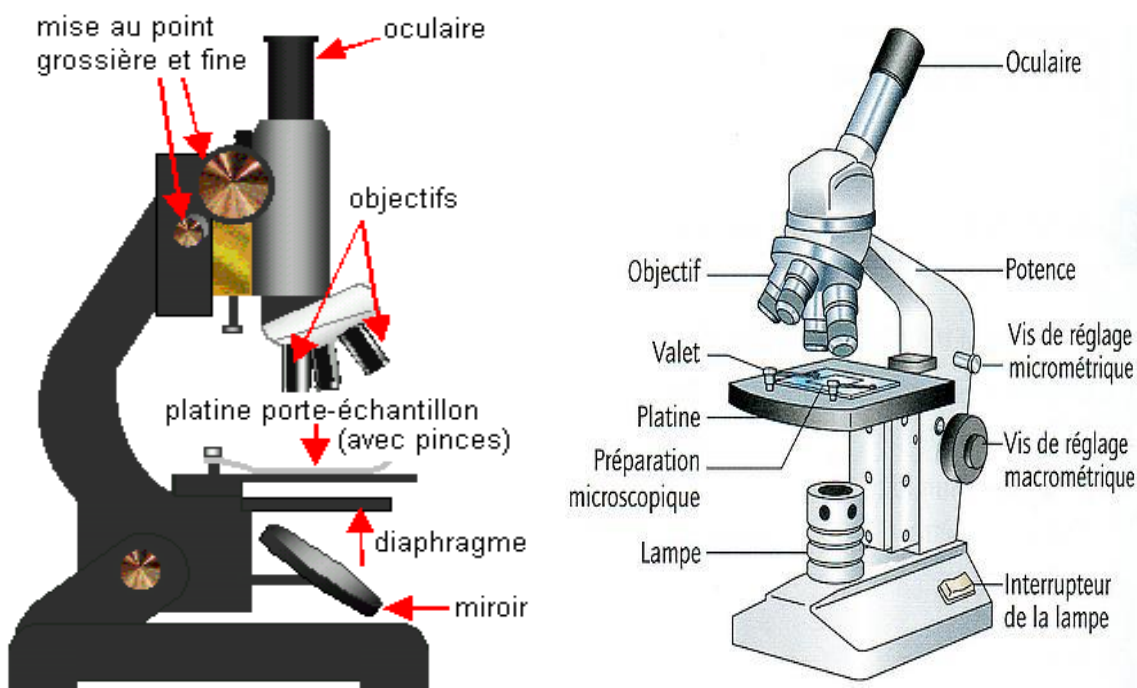


Figure 1 : le Microscope optique et ses constituants

1.1. Principe de fonctionnement

La lumière (composée de photons) passe à travers un condenseur qui concentre le flux lumineux en un rayon de lumière. La lumière ainsi focalisée traverse l'échantillon. La lentille de l'objectif permet un premier grossissement (entre $\times 4$ et $\times 200$) puis la lentille de l'oculaire apporte un deuxième grossissement (en général $\times 4$) et l'œil reçoit enfin l'image agrandie. L'agrandissement final correspond au produit des deux grossissements des deux lentilles de verre. La qualité de l'image dépend du pouvoir de résolution (ou **pouvoir séparateur**) du microscope qui est défini comme étant la distance minimale qui doit séparer deux points

contigus pour qu'ils soient correctement discernés. Le pouvoir séparateur est donné par la formule suivante :

$$d = 0,6 \lambda / n \sin (\alpha)$$

d : pouvoir séparateur λ : longueur d'onde de la source d'énergie (lumière) (0,4m 0,7m)

n : indice de réfraction du milieu α : demi-angle d'ouverture de l'objectif

Ainsi, c'est en jouant sur ces paramètres que l'on peut améliorer la résolution et observer des structures de plus en plus petites.

La limite de résolution du microscope standard est de 0,22 μ m, ce qui permet au final un agrandissement possible de 1 000 fois sans perte de qualité. En dessous de cette limite de résolution le microscope optique ne permet pas d'avoir une image correcte.

Très peu de cellules sont visibles avec le microscope photonique si elles ne sont pas colorées. En effet, la plupart des tissus et des cellules renferment peu de pigments qui pourraient absorber la lumière naturelle, peu de détails sont donc visibles en transmission directe de la lumière naturelle. Des techniques de préparation ont donc été mises au point pour rendre visibles les cellules ou leurs structures internes (exemple : coloration de Gram pour visualiser les bactéries). Des techniques spéciales d'illumination ont également été élaborées.

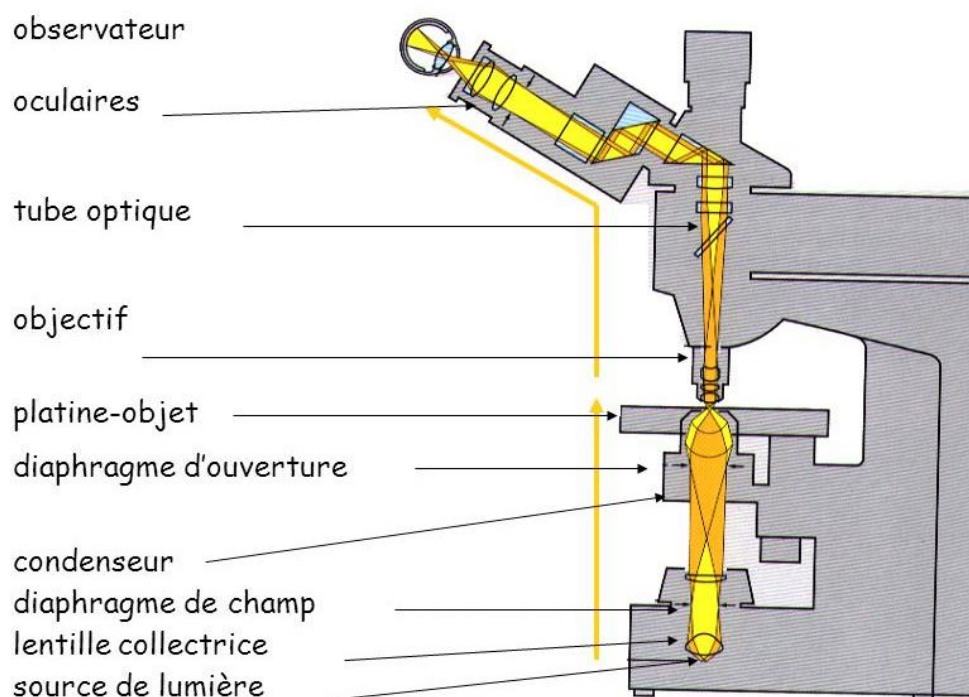


Figure 2 : le trajet optique en lumière transmise

1.2. Types de microscopes optiques

Il existe plusieurs types de microscopes optiques ayant chacun des montages optiques spéciaux. Les microscopes les plus utilisés sont regroupés dans le tableau (1).

Tableau 1 : Les différents types des microscopes optiques

Les types	
1. MO à fond clair	L'observation des structures cellulaires internes après coloration.
2. MO à fond noir	L'observation d'échantillons non colorés et des cellules vivantes et en déplacement.
3. MO à fluorescence	Le marquage fluorescent de structure et de composés macromoléculaires.
4. MO à contraste de phase	La mise en évidence des différences d'indices de réfraction et de contraste.
5. MO inversé	l'observation de cellules en culture.

2. Microscopes électroniques

☐ Principe

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que:

- ☐ Les photons sont remplacés par des électrons.
- ☐ Les lentilles de verre sont remplacées par des lentilles électromagnétiques.
- ☐ La limite de résolution du ME est plus élevée à celle du MO. Elle est de 2 nm (c'est-à-dire 1000 fois plus élevé que le MO).

L'agrandissement du ME peut atteindre jusqu'à 500.000 contre 2000 pour un MO.

2.1. Microscope électronique à transmission (MET)

Dans le MET, les électrons traversent l'échantillon traité par des métaux lourds. Sur l'écran du MET apparaît une image claire et agrandie. L'image est due à l'absorption différentielle des électrons par les différentes structures de l'échantillon.

Le MET se compose essentiellement de:

- ☐ Une source des électrons (fil métallique chauffé à un degré très élevé sous vide). Sous vide, les électrons vont être accélérés en appliquant une différence de potentiel de 10 à 100 kV

- ☐ Espace tubulaire sous vide.
- ☐ Des lentilles électromagnétiques (Bobines) permettent la diffraction du trajet des électrons.

2.2. Microscope électronique à balayage (MEB)

Le MEB permet d'observer l'objet en trois dimensions. Il est utilisé dans l'étude des surfaces des objets massifs après leur traitement par des substances métalliques réfléchissantes telles que le platine, l'argent et l'or.

Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image.

3. Différence entre microscopes optiques et électroniques

Le tableau (2) résume les principales différences entre les microscopes optiques et électroniques.

Tableau 2 : les principales différences entre MO et ME

	MO	ME
Source d'énergie	Lampe électrique	Filament de tungstène porté à incandescence
Rayonnement	Faisceau lumineux (photons)	Faisceau d'électrons Electrons libres accélérés dans le vide pour traverser ensuite l'échantillon.
Système optique	Lentille de verre	Lentille électromagnétique (champs)
Pouvoir séparateur Résolution	0.2µm	0.2nm (2Å) (peut atteindre 0.05 nm)
L'image	observée directement par les oculaires.	reçue sur un écran fluorescent.
Epaisseur de l'échantillon les coupes au microtome	2 à 10µm	les coupes à l'ultramicrotome : 0,05µm 300-800Å
Grossissement	40 à 2000	500.000(MET)

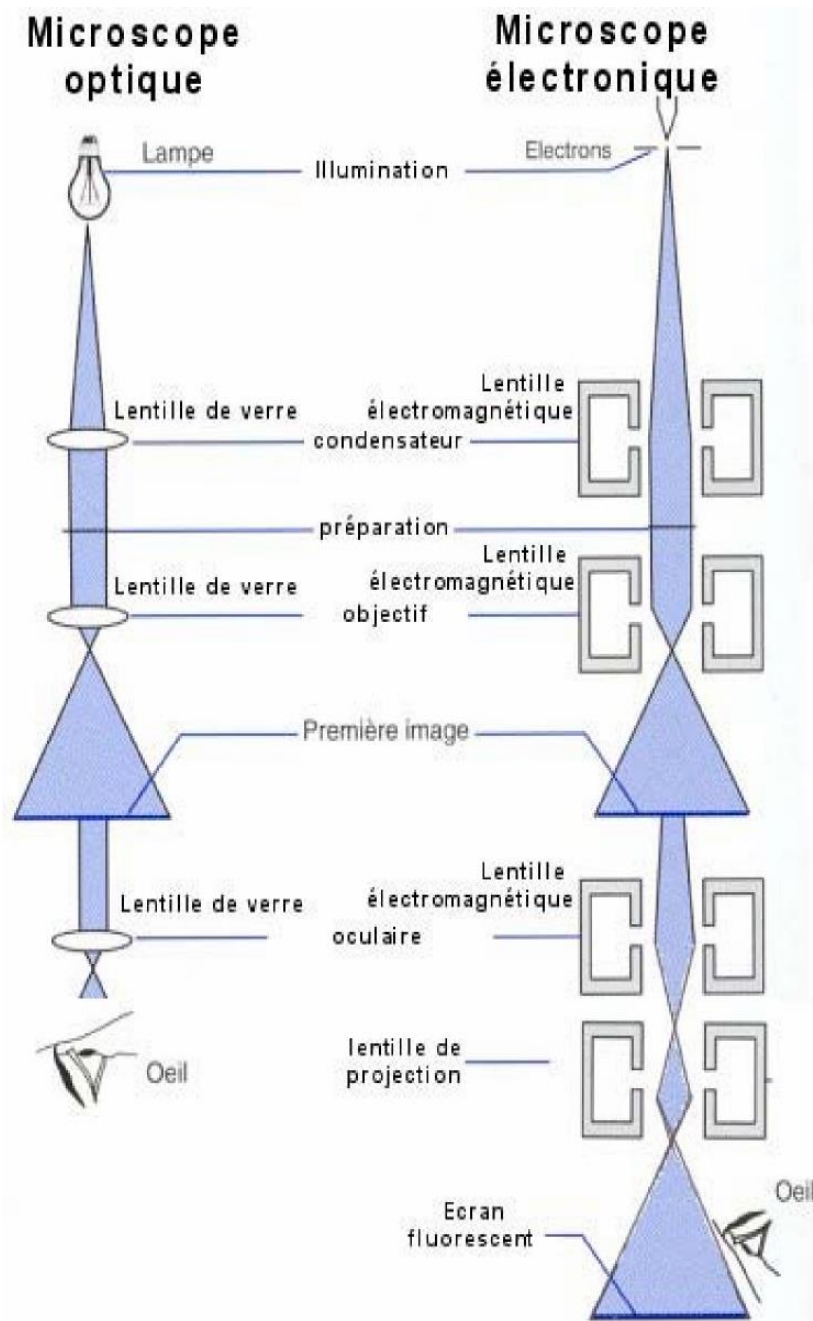


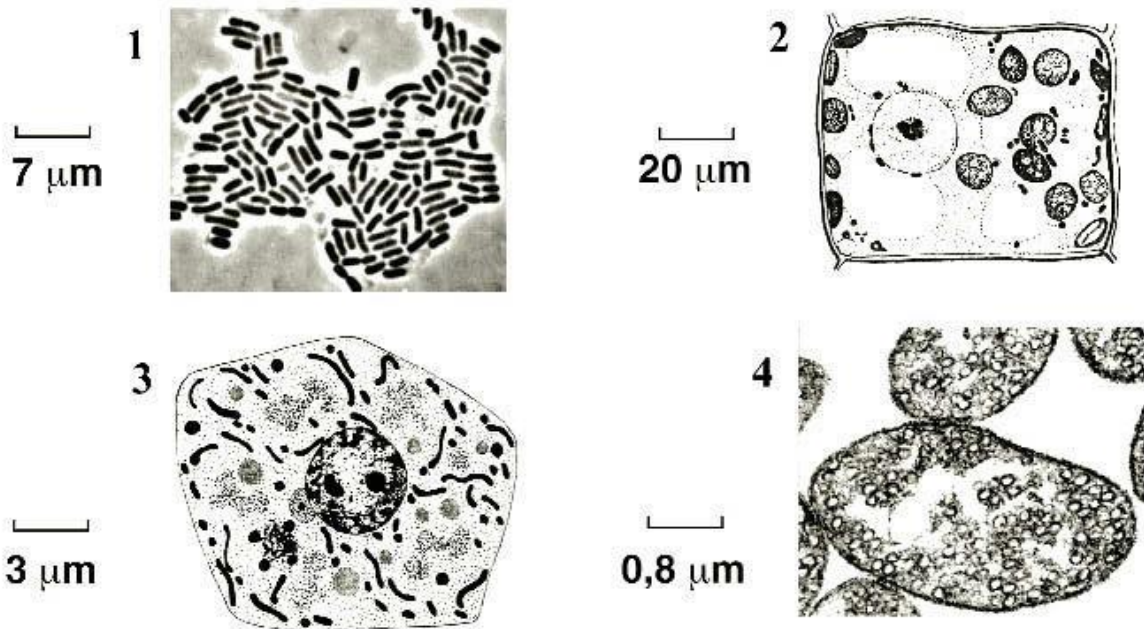
Figure : comparaison entre MO et ME

Le MO est équipé de trois systèmes de lentilles transparentes (verre). Un condenseur D1 concentre la lumière sur l'objet. Un objectif et un oculaire L1 et L2 grossissent l'image.

Dans le ME, le faisceau de photons est remplacé par un faisceau d'électrons émis sous vide, accélérés par une forte différence de potentiel et canalisés par une série de lentilles (électromagnétiques).

Exercice

Voici des schémas et des photos de différents types de cellules. Avec l'aide des barres d'échelle, calculez leurs dimensions exactes et identifiez celles que vous considérez comme Procaryotiques ou Eucaryotiques. Parmi les cellules Eucaryotes, savez-vous distinguer les cellules animales des cellules végétales ? Justifiez vos réponses.



Résultat

Les cellules 1 et 4 sont de très petite taille (respectivement $1,5\ \mu\text{m}$ et $3,4\ \mu\text{m}$) et visiblement non ou peu compartimentées ; il s'agit de Procaryotes. Les cellules 2 et 3 sont de taille bien supérieure (respectivement $80\ \mu\text{m}$ et $14\ \mu\text{m}$) et possèdent de nombreux organites, dont le noyau, volumineux et très reconnaissable ; il s'agit donc d'Eucaryotes. La cellule 2, qui possède de grandes vacuoles, des chloroplastes et une paroi épaisse, est une cellule végétale ; la cellule 3 est donc de type animal.

TD 2/

Intitulé : Etapes de préparation des coupes pour l'observation microscopique

Introduction

En raison du faible pouvoir pénétrant des électrons et des photons, les objets observés doivent être extrêmement fins (coupes de 50 à 80 nm), ce qui nécessite des techniques spécifiques de coupe des échantillons.

Lorsque le matériel biologique est massif (tissus animaux ou végétaux : foie, cerveau, muscle..., ou tige, feuille, racine...), il faut préalablement le débiter en tranches fines et régulières, qui seront ensuite colorées. Dans une cellule de 20 µm de diamètre, on peut débiter 200 à 400 coupes ultrafines.

Les étapes de ce protocole diffèrent dans la mesure où l'observation se fait sous microscopie photonique ou électronique.

A- Techniques de préparation des coupes

1. **Fixation** : a pour but de tuer les cellules tout en modifiant le moins possible leurs structures internes. On utilise à cet effet des mélanges variés, contenant des substances connues pour dénaturer et coaguler essentiellement les protéines : acides, alcools, aldéhydes, certains sels... Ces fixateurs, dits coagulants, doivent être adaptés à la nature du matériel biologique analysé et au type de coloration employé ultérieurement.

Exemples : Microscopie Optique : Chaleur, alcool ou formol,

Microscopie Electronique : Glutaraldéhyde, acide osmotique

2. **Déshydratation** : a pour but d'éliminer l'eau de l'échantillon et de la remplacer par un solvant du milieu utilisé pour l'inclusion ; elle consiste en une série de bains dans des alcools de plus en plus concentrés. Cette opération doit être progressive pour que la substitution n'entraîne pas de déformation des tissus. Un dernier bain est réalisé dans un mélange alcool/solvant organique du milieu d'inclusion, pour arriver enfin à avoir l'échantillon dans ce solvant pur : xylène, toluène...
3. **Inclusion ou Enrobage** : a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante, qui permettra une coupe fine et régulière. Cette substance, dont les molécules remplacent en fait les molécules d'eau initiales, est souvent la paraffine ou la résine Epoxy qui est liquide à 60 °C et dure à la température ambiante ; soluble

dans les solvants cités plus haut, elle pénètre très aisément dans les tissus. Après plusieurs bains à 60 °C et durcissement de la résine, on obtient un «bloc» qui pourra être correctement coupé et qui sert aussi de moyen de stockage des échantillons.

Exemples : Microscopie Optique : Paraffine

Microscopie Electronique : Résine synthétique Epoxy

4. **Coupe** : a pour but de réaliser des sections fines et transparentes de l'objet inclus. On utilise un **microtome** pour la microscopie optique, muni d'un rasoir métallique, qui donne des coupes sériées ; celles-ci sont collées avec une solution de gélatine sur des lames de verre, séchées et déparaffinées avec du xylène ou du toluène. Seule la matière organique de la coupe subsiste sur la lame.

Exemples : Microscopie Optique : Microtome à lame métallique de type Rasoir -de l'ordre de 5 à 7 µm

Microscopie Electronique : Ultramicrotome à lame de verre ou de diamant - de l'ordre de 0.1 µm et moins

5. **Réhydratation** : ceci nécessite l'emploi d'une série d'alcools de titres décroissants, pour arriver à l'eau.
6. **Coloration** : permet de teinter de façon différentielle les divers territoires de l'échantillon biologique.
 - **pour la microscopie** optique tous les colorants utilisés étant hydrosolubles ils colorient l'échantillon et permettent le passage de la lumière.
 - **pour la microscopie électronique** c'est des métaux lourds qui sont utilisés afin d'augmenter le faible contraste résultant du peu d'interaction entre les électrons et les surfaces biologiques.

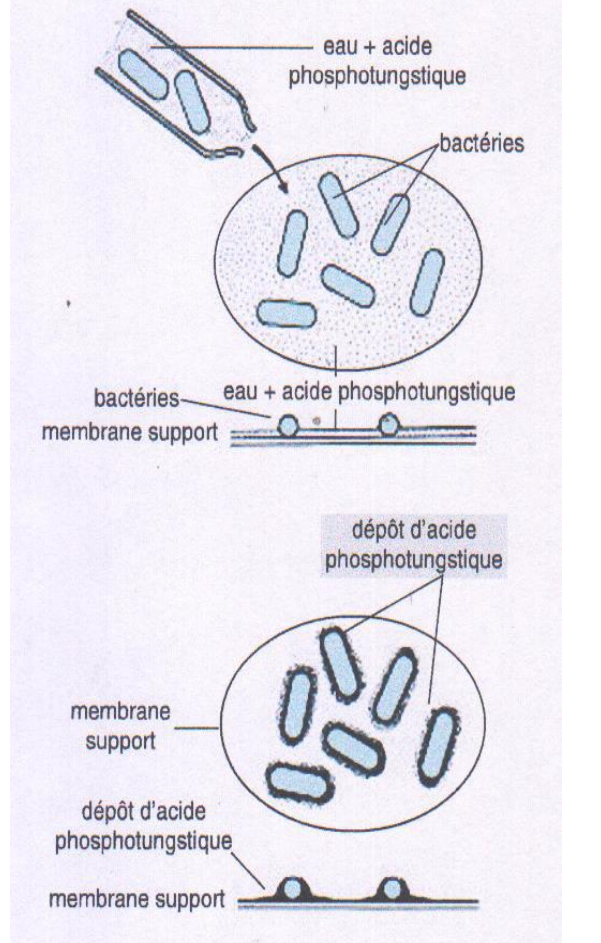
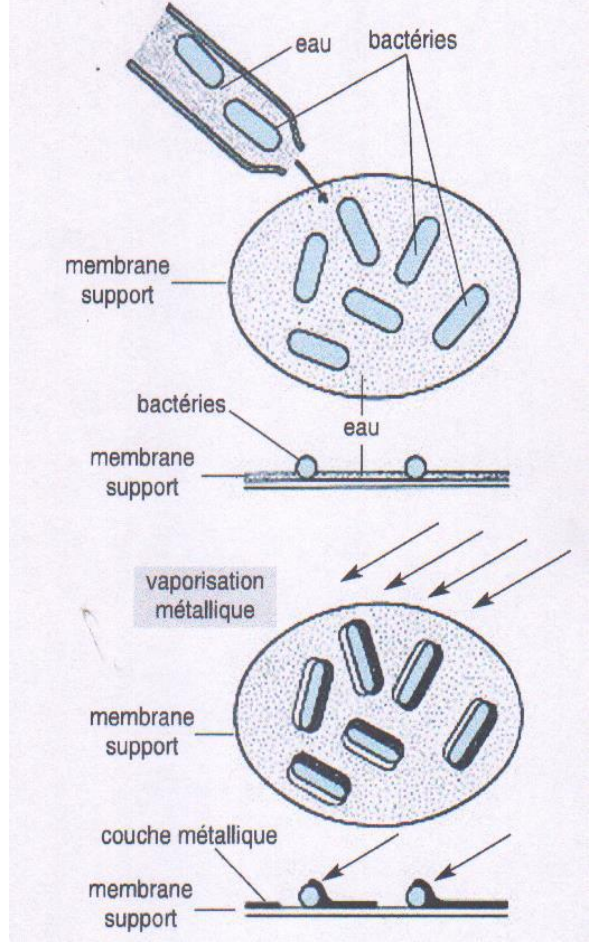
Exemples : Microscopie Optique : Bleu de méthylène, rouge neutre...

Microscopie Electronique : Sels de métaux lourds : Citrate de plomb

B-Techniques d'observation des formes et des surfaces cellulaires

Il existe des échantillons et objets de très petites dimensions, de forme relativement simple (molécules, Virus ou éléments cellulaires isolés : organites ou fragments d'organites) possédant de très fins détails qui ne nécessitent pas de coupe en particulier dans le cas de structures fibreuses (protofilaments protéiques, flagelles, queue de certains Virus...).

L'observation de ces derniers au microscope électronique à transmission pose un problème de manque de contraste, auquel nous pouvons pallier en utilisant l'une de ces deux techniques :

1- COLORATION NÉGATIVE	2- OMBRAGE MÉTALLIQUE
<p>Principe : consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à plonger l'ensemble dans une solution de sel de métal lourd, qui est drainée. et les traces de solution qui restent se concentrent sur les angles ou sur les bords des objets.</p>	<p>Principe : consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à exposer l'ensemble à des vapeurs métalliques (obtenues en vaporisant sous vide une électrode métallique) et ceci sous incidence pour avoir une ombre formée.</p>
	
<p>Figure 5. Principe de la coloration négative Après évaporation du solvant contenant le «colorant» et accumulation de ce dernier autour des particules ou des cellules déposées sur une membrane-support, on obtient un effet de halo permettant de voir ces particules en négatif, en microscopie électronique.</p>	<p>Figure 6. Principe de l'ombrage métallique Après évaporation du solvant contenant les particules ou les cellules en suspension, celles-ci sont déposées sur une membrane-support. On procède ensuite à une opération de vaporisation métallique latérale sous vide ; celle-ci conduit à une accumulation localisée de métal qui créera un effet «d'ombre portée» lors de l'examen en microscopie électronique.</p>

Lors de l'observation de tissus massifs, et de leurs composants interne qui ne sont pas le résultat d'une coupe, mais celui d'une fracture, on parle de cryofracture et cryodécapage.

3- Cryofracture et cryodécapage

Cette technique constitue un développement de la technique dite d'ombrage métallique mise au point dix ans plus tôt, elle est d'abord basée sur la congélation très rapide d'un tout petit échantillon biologique (moins de 1 mm³), dans de l'azote liquide (– 196 °C). L'étape cruciale du protocole est la fracture, et non la coupure, de l'échantillon congelé, et ceci à très basse température. Cette cryofracture dégage une surface irrégulière à travers l'échantillon, et c'est cette surface qui sera observée.

On réalise ensuite le décapage de la surface de l'échantillon en sublimant, sous vide et à basse température, une fine pellicule de glace superficielle ; ce qui a pour effet d'augmenter très légèrement les reliefs des structures (cryodécapage).

On enchaîne avec un ombrage métallique, sous vide et à froid, pour renforcer les reliefs). Un film de carbone uniforme et très fin est ensuite vaporisé par-dessus la surface métallisée pour la renforcer et couvrir les zones non atteintes par le métal. On a ainsi réalisé un vrai moulage extrêmement précis de la surface fracturée de l'échantillon : la réplique ; c'est elle qui est observée au microscope électronique à transmission. Avant l'observation, il faudra la décoller de l'échantillon par décongélation, la rincer et enfin la déposer sur une grille de microscopie électronique.

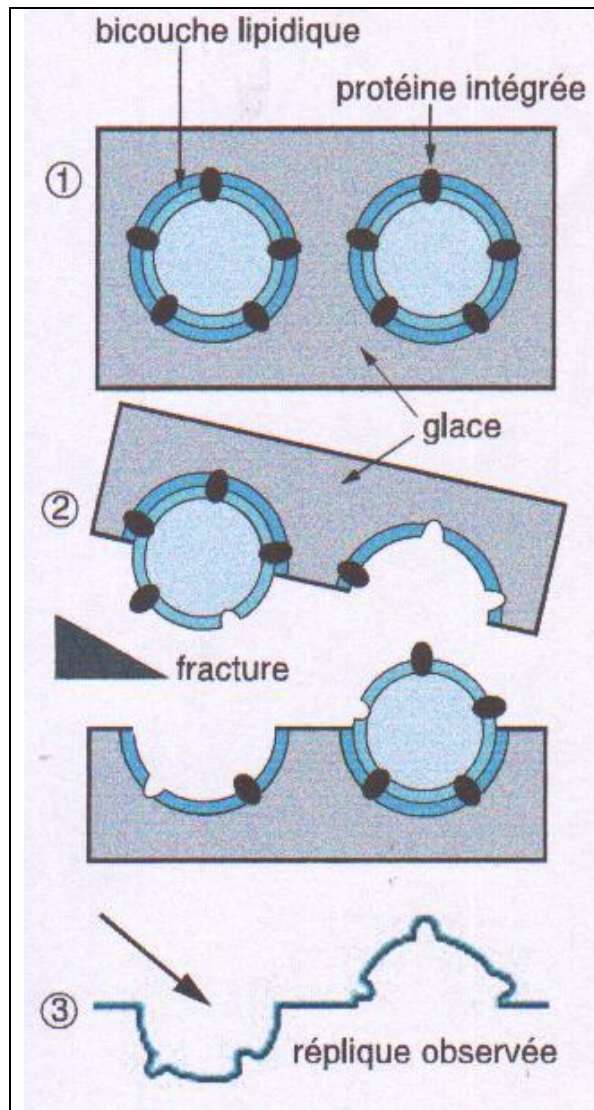


Figure : Principe de la formation des images lors du protocole de cryofracture/cryodécapage (1) Exemple de deux protéoliposomes inclus dans la glace. (2) Fracture de la glace dégageant soit la partie concave (à gauche), soit la partie convexe (à droite) des vésicules. (3) Aspect de la réplique métallique obtenue après ombrage unidirectionnel (flèche) et vaporisation de carbone. La fracture fait apparaître la face supérieure ou l’empreinte de la face inférieure des protéines intrinsèques, en fonction de leur degré d’enfouissement dans la bicouche. La réplique métallique de cette surface présente ainsi des « creux » ou des « bosses », selon les cas.

TD 3/ Volume Horaire : 02H

Intitulé : Technique de détection et de localisation des composés cellulaires

Objectif : Connaître les techniques permettant de visualiser précisément la position de certains composés au sein de la cellule.

I. L'autoradiographie

L'**autoradiographie** est une technique qui vise à enregistrer l'image de molécules marquées par des isotopes radioactifs, pour les localiser avec précision dans des tissus ou des cellules ou lors de réactions chimiques. Le principe est donc d'apporter aux cellules un **précurseur radioactif** de la molécule à détecter. Par exemple, des acides aminés radioactifs permettront de mettre en évidence des protéines. Pour cela, on fait synthétiser ces acides aminés (généralement par des bactéries) dans un milieu contenant un isotope radioactif : cela peut être du tritium (^3H), du carbone ^{14}C ou soufre ^{35}S .

L'autoradiographie se déroule ensuite en deux phases : la phase de *pulse* et de *chasse*. Lors du **pulse**, les coupes de tissu vivant sont mises dans un milieu dit "chaud" contenant le précurseur radioactif.

Lors de cette phase, les cellules vont utiliser les précurseurs pour fabriquer des macromolécules qui deviendront donc radioactives. Cette phase de pulse doit être relativement courte pour que seules quelques molécules soient marquées (et pas l'intégralité de la cellule) et pour éviter que la radioactivité ait un effet cytotoxique trop important.

Ensuite vient l'étape de **chasse**. Les cellules contenant les marqueurs radioactifs sont ensuite transférées dans un milieu "froid", c'est-à-dire sans précurseur radioactif. Lors de cette phase, les cellules synthétisent de nouveau des macromolécules non-radioactives, mais conservent tout de même les molécules marquées durant la phase de pulse.

Reste alors à visualiser ces molécules. Pour cela, on recouvre la préparation d'une solution contenant des ions argent Ag^+ . Les ondes émises par la radioactivité vont alors former des grains d'argent métallique Ag(s) à partir des ions et ainsi révéler indirectement la présence de la molécule marquée. Ces grains d'argent seront alors visibles en microscopie optique ou électronique.

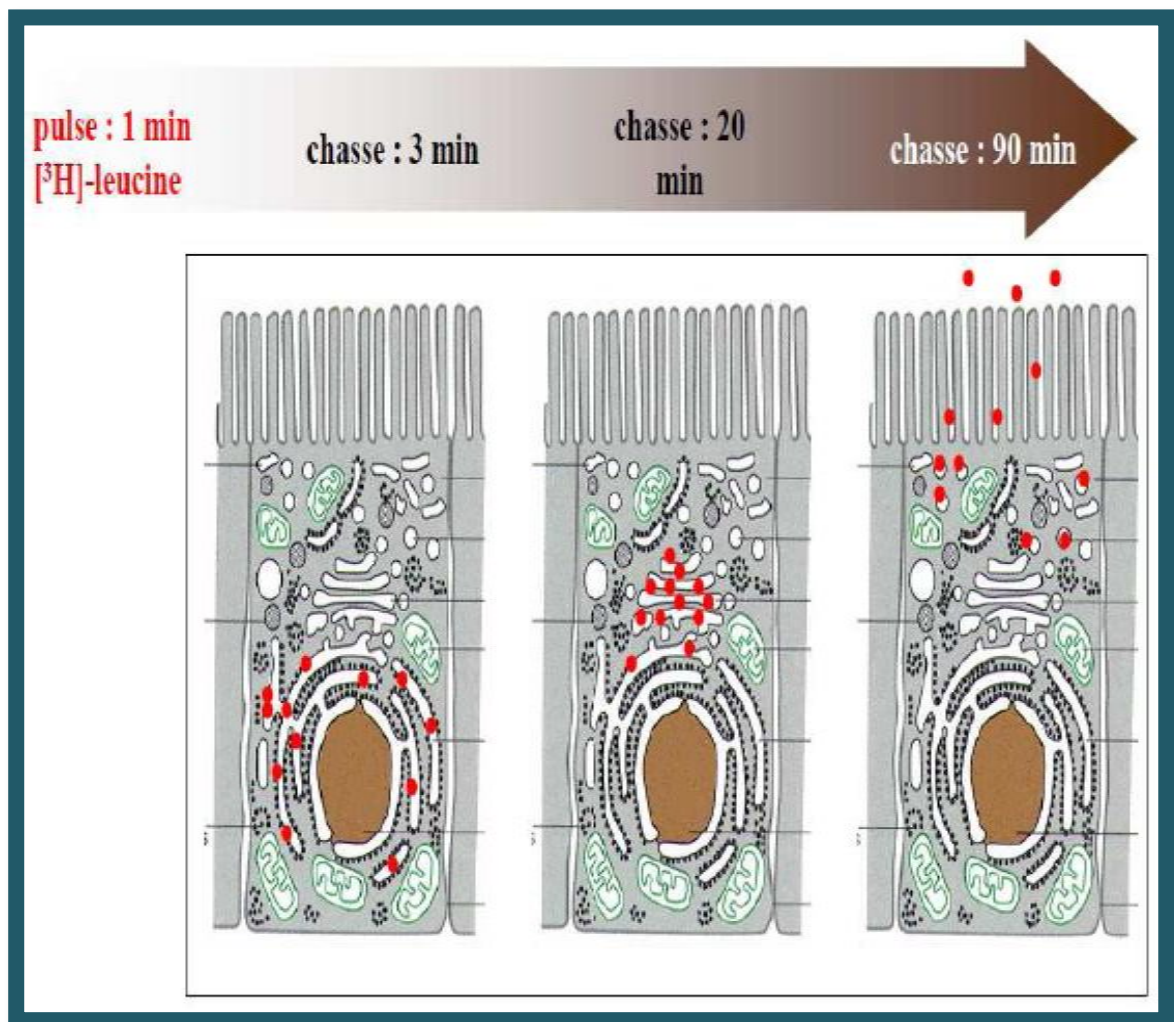


Figure : La voie de sécrétion ou le trafic membranaire : expérience de Palade (Palade et ses collaborateurs ont pu suivre en 1964 le devenir d'une protéine). **L'expérience permet d'identifier le lieu initial de synthèse des protéines (pendant le *pulse*), et leurs voies de transport au sein de la cellule (pendant la *chasse*)**

II. L'immunodétection ou immunohistochimie

L'**immunohistochimie** est une méthode de localisation de molécules (généralement des **protéines**) dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'**antigènes** au moyen d'**anticorps**. Pour rappel, un antigène est une macromolécule spécifiquement reconnue par un anticorps. Pour les protéines, le motif reconnu est appelé épitope. Un anticorps est une protéine quaternaire produite par les **lymphocytes B**, constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Ces chaînes portent à leur extrémité des régions variables qui reconnaissent spécifiquement un motif moléculaire.

L'immunohistochimie consiste à utiliser la spécificité de reconnaissance des anticorps pour détecter les molécules qui nous intéressent. Il faut donc produire en quantité les anticorps, à l'aide d'une technique dite des anticorps monoclonaux. Ensuite, il s'agit de rendre ces anticorps observables en microscopie afin de pouvoir détecter la protéine d'intérêt. Pour cela, on couple l'anticorps avec un des marqueurs suivants :

- Un fluorochrome : molécule émettant une lumière fluorescente lorsqu'elle est excitée avec une certaine longueur d'onde
- Un atome radioactif, permettant une détection par autoradiographie. On peut aussi y ajouter un atome métallique pour une observation en directe.
- Une enzyme transformant un substrat incolore en produit coloré, comme pour la cytoenzymologie.

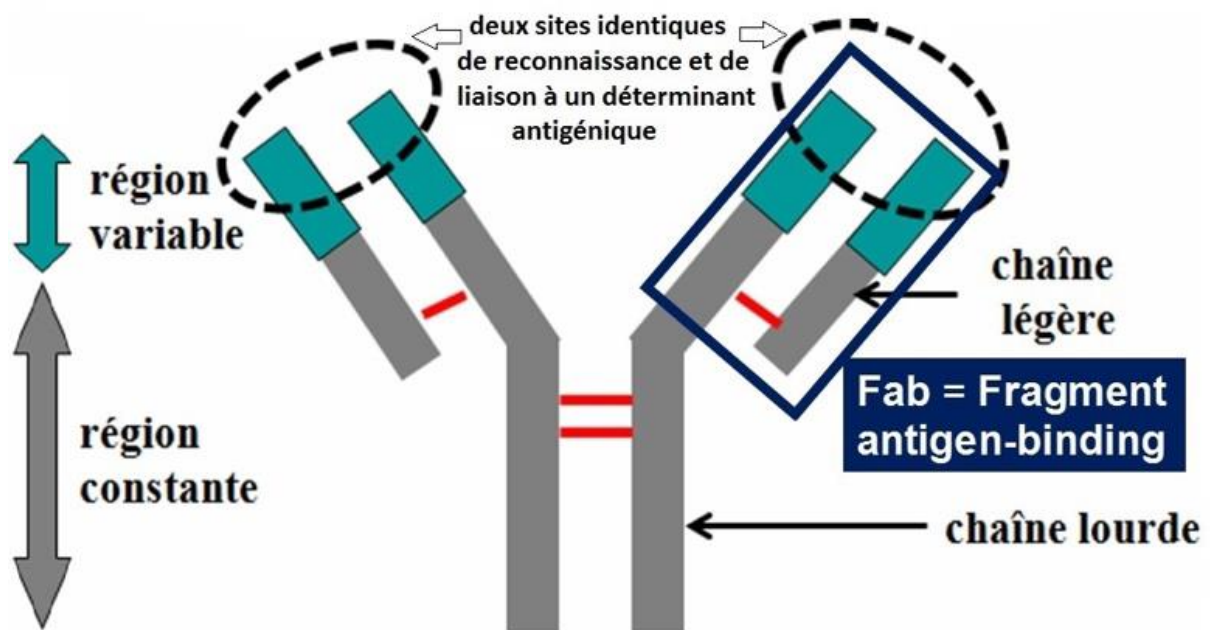


Schéma de l'organisation fonctionnelle d'un anticorps

TD 4 Fluidité membranaire et Technique de mise en évidence du mouvement latéral des protéines membranaires

Questions

1. Décrire une expérience classique permettant de démontrer la fluidité de la membrane cytoplasmique des cellules animales en culture.
2. A quoi est due la fluidité membranaire
3. Quels sont les facteurs qui l'influencent
4. Quelle est l'importance de la fluidité pour la membrane

Réponses

1. On peut démontrer l'existence de la fluidité membranaire chez les cellules animales en culture au moyen d'une expérience utilisant des hétérocaryons : cellules « hybrides » issues de la fusion de deux cellules (ici, d'espèces différentes : Homme/souris). Des marqueurs immunologiques (anticorps anti- protéines membranaires marqués par des fluorochromes différents) sont utilisés pour visualiser et suivre le déplacement latéral des protéines spécifiques de chaque type cellulaire, une fois que la fusion des cellules est obtenue.

Au cours du temps les observations obtenues sont les suivantes :

- Si les protéines de souris et les protéines humaines sont localisées peu de temps après la fusion cellulaire entre les deux cellules, elles occupent des domaines distincts sur l'hétérocaryon. Les domaines membranaires provenant de la cellule de souris sont séparés de ceux qui sont issus de la cellule humaine ;
- Par contre, si la localisation a lieu 30 minutes à une heure après la fusion, il est impossible d'attribuer des domaines précis à chaque protéine sur l'hétérocaryon. Les domaines membranaires ne sont plus séparés dans l'espace : il y a eu déplacement latéral des protéines dans le plan de la membrane.

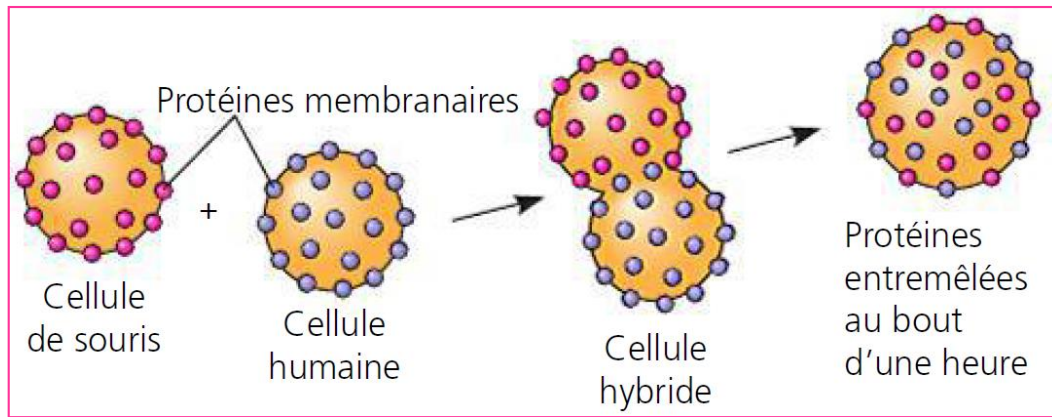


Figure 6 : Différentes étapes de l'expérience utilisant des cellules « hybrides » et démontrant l'existence de la fluidité membranaire chez les cellules animales (**Faucher et Lachaine 2012**).

2. La fluidité membranaire est due aux mouvements de diffusions latérales des protéines mais surtout des lipides. Ces déplacements sont à la base de la fluidité membranaire. Lors d'un déplacement latéral: chaque molécule lipidique peut se mouvoir latéralement dans le plan d'une même couche. Ces mouvements sont rapides. Les phospholipides changent de position 10^7 fois par seconde. Un phosphoglycérolipide peut se déplacer à la vitesse moyenne de $2\mu\text{m}$ /seconde.

Il est à noter que ces mouvements de déplacements latéraux dans le plan de la membrane (autrement dit au sein d'une hémimembrane) sont possibles et fréquents, contrairement aux mouvements de diffusion transversale en flip-flop (autrement dit échanges entre hémimembrane) qui sont extrêmement difficiles et rares pour les lipides, et impossibles pour les protéines.

3. Les facteurs qui influencent la fluidité des membranes sont les suivants : la température (agitation moléculaire) ; la nature des acides gras des lipides membranaires (leur longueur et leur saturation ou insaturation) ; la richesse en cholestérol.

4. Importance de la fluidité pour la membrane

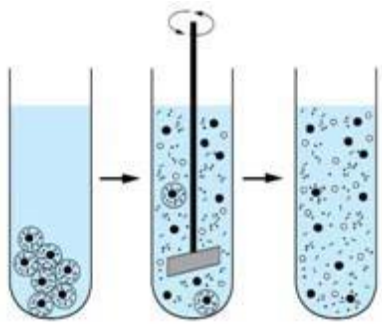
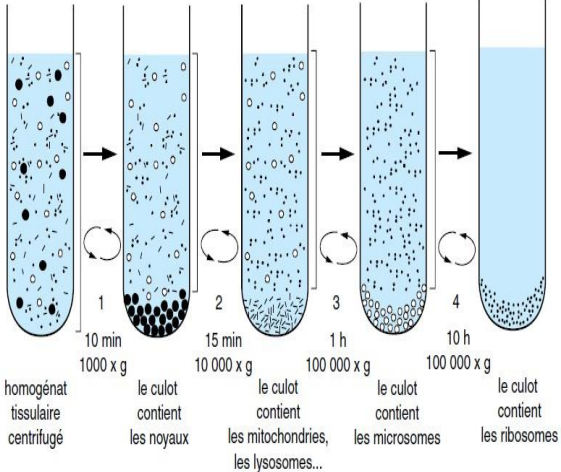
- Si la membrane est percée ou déchirée, les molécules de phospholipides qui s'étaient écartées les unes des autres peuvent à nouveau se rapprocher et fermer l'ouverture ce qui permet à la membrane de se réparer d'elle-même

- La membrane peut varier facilement sa taille : Lors des différents phénomènes physiologiques **d'endocytose, les mouvements des cellules ou leurs croissance** l'ajout de nouvelles molécules de phospholipides, qui en se joignant aux autres, permettent à la membrane de s'agrandir. Inversement, elle peut réduire sa taille cas **de l'exocytose par exemple**, si on enlève des molécules.
- La fluidité permet à la cellule de se diviser : Il suffit de resserrer l'équateur de la sphère pour obtenir deux sphères.
- Pour les protéines membranaires : Grâce a la fluidité, les protéines peuvent s'unirent a des zones des la membranes et former des structures solides (jonctions , les récepteurs , les synapses).

TD 5/

Intitulé : Techniques d'isolement des organites cellulaires

1. Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Homogénéisation	Centrifugation
<p>1. Fragment de tissu 2. Broyage mécanique au mixer 3. Homogénat tissulaire</p> 	 <p>Centrifugations successives 1) basse vitesse 2) vitesse moyenne 3) vitesse élevée 4) vitesse élevée, longue durée</p>

Les différentes classes d'organites se distinguent par leur taille, leur forme et leur densité; les variations des deux premiers paramètres peuvent être très grandes (les noyaux atteignent 10 μm de diamètre tandis que les ribosomes mesurent 15-20 nm) alors que celles relatives à la densité restent faibles (de 1,1 environ pour les mitochondries, les lysosomes ou les peroxysomes, à 1,6 pour les ribosomes).

Après centrifugation classique, ces particules se sédimentent avec une vitesse accrue et différente selon leurs caractéristiques hydrodynamiques, de sorte que l'on peut fractionner l'homogénat. Le principal paramètre déterminant la vitesse de sédimentation est la masse, de sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forment le premier sédiment (ou culot) rassemblé au fond du tube à centrifuger, le liquide surnageant contenant les plus petites et les plus légères. Le surnageant et le culot sont séparés par décantation.

L'homogénat initial obtenu à partir d'un fragment de tissu (1 à 3) est fractionné, par 4 centrifugations de plus en plus fortes, en une série de 4 sédiments contenant des organites ou

des particules de masse de plus en plus faible, et un surnageant final à partir duquel plus rien ne peut être sédimenté.

2. La technique du gradient de densité à l'équilibre

Cette technique utilise l'ultracentrifugation qui est très sophistiquée par rapport à la centrifugation classique. Le principe est, que les particules ou les molécules se séparent sur la base de leur densité. Dans cette méthode, les molécules soumises à la centrifugation sur le gradient 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. Il est même possible de faire des gradients générés durant la centrifugation elle-même, sous l'influence directe du champ gravitationnel

