

PURIFICATION DES MITOCHONDRIES DE FOIE

L'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle. L'anesthésie modifiant les propriétés des mitochondries (surtout pour mito de foie), les animaux sont obligatoirement sacrifiés par dislocation cervicale ou par décapitation si le sang doit être récupéré. Les solutions nécessaires sont décrites dans le document "**Solutions mitochondries (Foie - Muscle)**".

La veille :

1/ Se noter au minimum la veille sur **le planning d'utilisation** de la centrifugeuse de la salle de prélèvement.

2/ Mettre le tampon d'extraction à décongeler à 4°C (si on ne veut pas perdre de temps le matin suivant !!!!).

Le jour même :

3/ En arrivant, mettre la centrifugeuse à refroidir à 4°C. Mettre le tampon de respiration à décongeler.

4/ Préparer le matériel nécessaire : instruments de chirurgie, pinces, ciseaux, bac à glace, 2 béciers, potter, 4 tubes à centrifuger, papier alu pour le rat, pipettes de 5ml et de 1ml + embouts.

┌ Tout le matériel pour les prélèvements se trouve dans le placard "bas"
└ de la salle de prélèvement.

Etape à faire en chambre froide (4°C) :

5/ Après sacrifice de l'animal, prélever le foie et retirer au maximum diaphragme, veines et autres adhérences et le placer dans ~30ml de **tampon isolement foie (4°C)**.

6/ Couper le foie en petits morceaux et agiter pour éliminer le sang au maximum. Vider le liquide dans l'évier (attention au foie). Rincer avec du **tampon isolement foie (4°C)** jusqu'à ce qu'il soit clair.

7/ Transvaser les morceaux de foie dans un autre bécier contenant **30ml de tampon isolement foie (4°C)**. Emincer les morceaux au maximum et transvaser le tout dans le potter.

8/ Broyer le contenu du Potter (vitesse 500 tours) par plusieurs passages du piston en téflon (1 passage = 1 montée + 1 descente) jusqu'à obtention d'un milieu homogène. Attention à ne pas trop créer de succion.

9/ Mettre l'homogénat dans un tube à centrifuger gros volume (~ 80 ml).

La suite se fait en maintenant les tubes dans la glace :

10/ Equilibrer les tubes et centrifuger à 800 g (rcf) pendant 10 minutes à 4°C.

| L'équilibrage des tubes est capital pour éviter d'endommager la centrifugeuse.

11/ Eliminer les lipides (couche blanche) du surnageant avec papier absorbant par capillarité.

12/ **Récupérer le surnageant** et éliminer le culot (contenant les noyaux et les débris cellulaires). Compléter avec du tampon pour équilibrer les tubes.

13/ Centrifuger à 8000 g (rcf) pendant 10 minutes à 4°C.

14/ Eliminer le surnageant par retournement du(des) tube(s) en veillant **à ne pas décoller le culot !!!**

15/ Eliminer les lipides (dépôts blancs sur la paroi des tubes) avec du papier absorbant et **récupérer le culot**.

16/ Resuspendre le culot avec 1 petit volume (~ 1 ml) de **tampon isolement foie (4°C)**.

| La resuspension se fait à la pipette de 1 ml par projection du tampon en décollant doucement le culot et en l'homogénéisant (tout ceci en maintenant le tube dans la glace !!!!).

17/ Compléter avec du **tampon isolement foie (4°C)** jusqu'à remplir le tube.

18/ Centrifuger à 8000 g (rcf) pendant 10 minutes à 4°C.

19/ Eliminer le surnageant par retournement du tube en veillant **à ne pas décoller le culot !!!**

20/ Mettre le tube à l'envers sur du papier absorbant afin d'éliminer au maximum le tampon restant.

21/ Resuspendre le culot avec 500 µl de **tampon isolement foie (4°C)** ou de **tampon stock (4°C)**.

22/ Conserver les mitochondries dans la glace.

23/ Doser les protéines mitochondriales.