

PURIFICATION DES MITOCHONDRIES DE MUSCLE

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 béchers, 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 les muscles (quadriceps = cuisse) et les placer dans du **tampon isolement muscle (4°C)**. Eliminer les poils, le muscle superficiel (blanc) et les dépôts de graisse qui restent parfois attachés.

6/ Mettre les muscles dans 30 ml de **tampon isolement muscle (4°C)** contenant 0,2% de BSA (bovine serum albumine) délipidée.

7/ Emincer le muscle aux ciseaux en le coupant en tout petits morceaux.

| Cette étape est cruciale pour obtenir une bonne préparation de mitochondries musculaires !!!!

8/ Ajouter la protéase (subtilisin Sigma P-5380) à raison de 6 mg pour 30ml et continuer à émincer le tissu pendant l'action de la protéase (1 min).

9/ 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.

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

11/ Rajouter du **tampon isolement muscle (4°C)** pour remplir le tube à centrifuger afin d'arrêter l'action de la protéase (~ 60ml).

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/ **Récupérer le surnageant** en le filtrant sur un tube Falcon de 50 ml surmonté d'une toile à fine trame. Eliminer le culot (contenant les noyaux et les débris cellulaires). Compléter avec du **tampon isolement muscle avec BSA (4°C)** pour équilibrer les tubes.

| Attention à bien humecter le filtre au préalable avec du tampon d'isolement et à ne pas coller le tube Falcon sur le tube à centrifuger pour que l'air puisse s'échapper.

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

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

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

15/ Resuspendre le culot avec 1 petit volume (~ 1ml) de **tampon isolement muscle (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 !!!!).

16/ Compléter avec du **tampon isolement muscle (4°C)** jusqu'à remplir le tube

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

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

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

20/ Resuspendre le culot avec 300 µl de **tampon stock (4°C)**.

21/ Conserver les mitochondries dans la glace.

22/ Doser les protéines mitochondriales.