

Préparation des microsomes et mitochondries de foie

1 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SOUIDI M., PARQUET M., LUTTON C., Improved assay of hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity by use of hydroxyl- β -cyclodextrin and an NADPH regenerating system. Clin. Chim. Acta, 1998 ; 269 :201-217.

SOUIDI M., PARQUET M., FERZOU J., LUTTON C., Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. Life Sciences, 1999 ; 64 :1585-1593.

2 RECUEIL DES MORCEAUX DE FOIE

Préparer le tampon 'microsomes-mitochondries'

	Masse / l	PM
50 mM KH ₂ PO ₄	6,81 g/l	136.09
300 mM Saccharose	102,7 g/l	342.3
0,5 mM Dithiothreitol (DTT)	77,2 mg/l	154.3
10 mM EDTA	3,72 g/l	372.24
50 mM NaCl	2,922 g/l	58.44

Pour un volume final de 1L, ajouter 700mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7,4 avec KOH ou NaOH 5N. Compléter à 1L avec de l'eau distillée.

Conservation à 4°C.

Après le prélèvement de l'ensemble du foie, peser un morceau de 1g et le stocker (dans la glace) dans un pot plastique contenant 3mL de tampon microsomes (le volume de 3mL permet un bon recouvrement du morceau de foie).

Possibilité de congeler les morceaux de foie à -80°C à sec.

3 PREPARATION DES MICROSOMES

Les opérations suivantes sont effectuées dans la glace pour éviter toute altération enzymatique éventuelle.

- Découper en fines lamelles le morceau de foie
- Transvaser dans un Potter de 15mL muni d'un piston en téflon
- Rincer le pot avec 2 fois 2mL du tampon froid
- L'homogénéat est réalisé en effectuant 25 A/R de piston (il est plus facile de déplacer le Potter et son bain de glace que de manier le levier du support de la perceuse!) le variateur étant réglé sur 10 et la perceuse sur 2 (-200tr/min).

L'homogénéat est alors transvasé dans un tube à ultracentrifugation pour rotor TY 70 (préalablement stocké à 4°C).

- Avant centrifugation les tubes sont soigneusement équilibrés par pesée, les joints du couvercle du rotor sont graissés (silicone) avant fermeture.
- L'homogénéat est centrifugé à 20000g (17000 rpm) pendant 20 minutes et à 4°C,
- Le culot est conservé dans la glace pour la préparation des mitochondries.
- Le surnageant est prélevé à la pipette et est centrifugé à 100000g (38000 rpm) pendant 1 heure à 4°C.
- Le culot obtenu est alors resuspendu (bain de glace) dans 1mL de tampon avec une petite seringue équipée d'une aiguille (21 G) sans biseau (25 A/R du piston).
- Après addition de 6mL de tampon, le mélange est à nouveau centrifugé à 100000g pendant 1 heure à 4°C.
- Le culot de microsomes est resuspendu dans 1,2mL de tampon (25 A/R du piston), fractionné (200µL) dans 6 tubes eppendorf et conservé à -80°C.

4 PREPARATION DES MITOCHONDRIES

Dans la glace :

- Ajouter 3mL de tampon au culot 20000 g.
- Resuspendre doucement avec une petite tige en verre et verser dans le Potter.
- Laver le tube d'ultra avec 2mL de tampon (2 fois) et verser dans le Potter. La remise en suspension du culot est réalisée par 10 AR du piston.
- Centrifuger (avec la petite centrifugeuse réfrigérée) à 3400 rpm (2000 g) pendant 10 mn.
- Récupérer le surnageant et le centrifuger (Ultracentrifugeuse, rotor TY 70) à 11000 rpm (9000 g) pendant 10 mn.
- Reprendre le culot dans 1,2mL de tampon (bain de glace) avec une petite seringue équipée d'une aiguille (21 G) sans biseau (25 A/R du piston).
- Fractionner (300µL) dans 4 tubes eppendorf et conserver à -80°C.

Le contenu en protéines (microsomes et mitochondries) est dosé par la méthode Bradford.