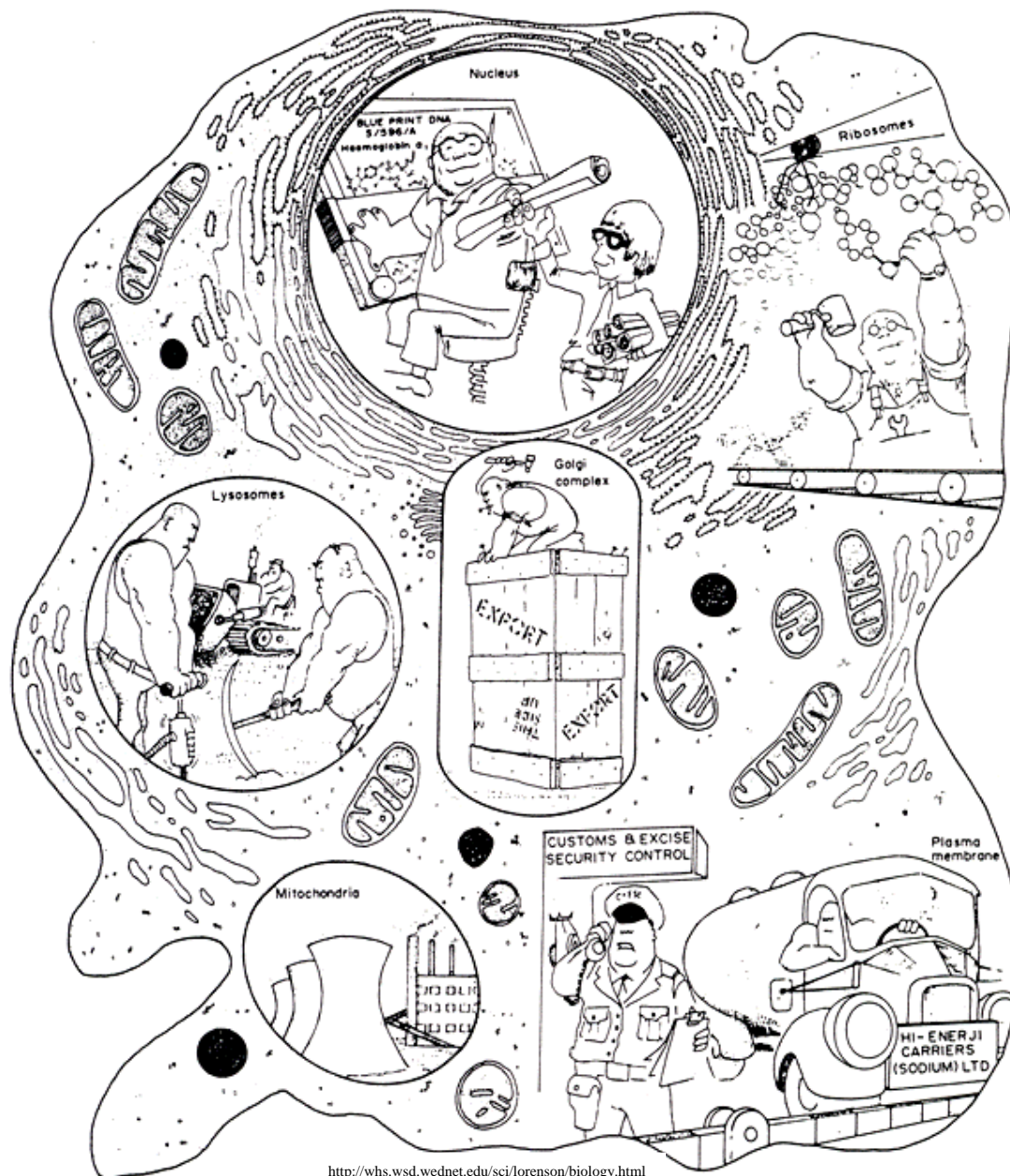


Rédaction d'un protocole moderne pour le travail pratique « *Cellular Fractionation* »



**Travail de fin d'études
Postdiplôme en Did@cTIC**

Corinne Jud

Institut de biochimie, Université de Fribourg (Suisse)
Octobre 2005

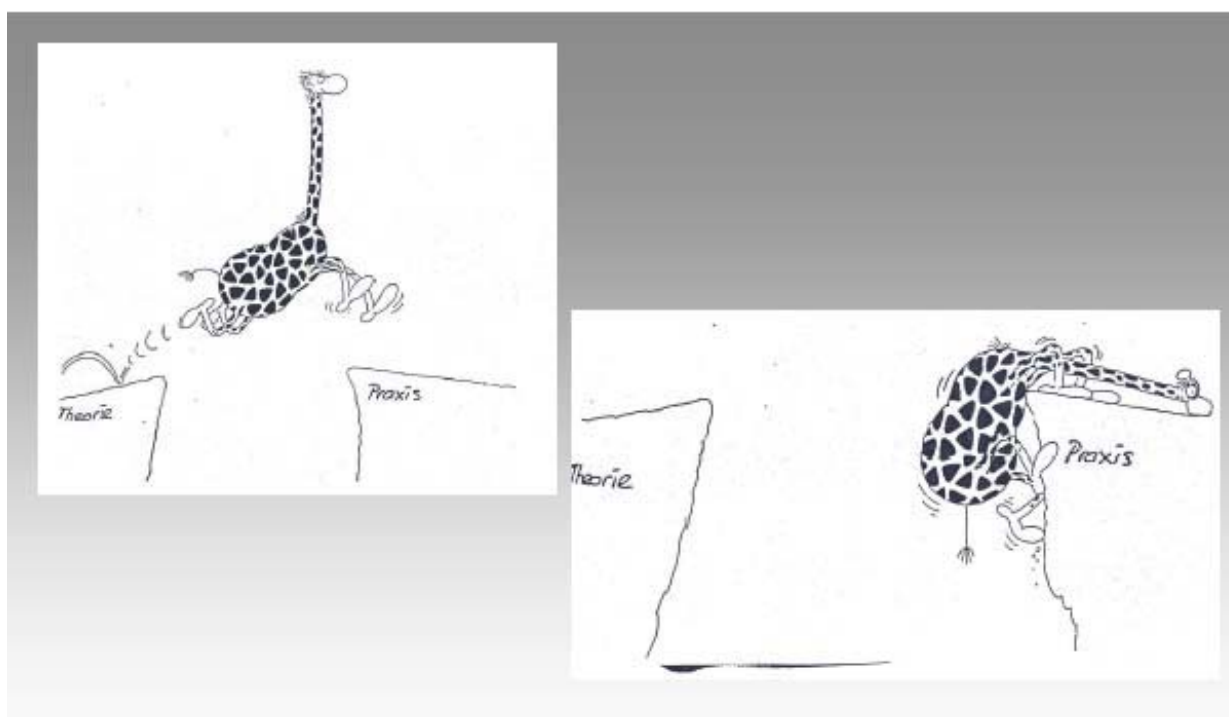
Table des matières

1. Introduction	3
1.1. Projet et motivation	3
1.2. Avis au lecteur	4
1.3. Description de la situation	4
1.4. Vue d'ensemble du TFE	4
2. Description du TP	5
2.1. Le scénario pédagogique	5
3. Evaluation de l'enseignement du TP	10
3.1. Evaluation graphique du questionnaire	10
3.2. Résumé des résultats du questionnaire	13
3.3. Discussion avec les étudiants	13
4. Changements envisagés	13
5. Le nouveau protocole	14
6. Perspectives	14
7. Abréviations	14
8. Remerciements	14
9. Annexe	15
9.1. Questionnaire (page 1)	15
9.2. Le nouveau protocole	16
9.3. L'ancien protocole (2004)	45

1. Introduction

1.1. Projet et motivation

Certainement, chacun des participants de la filière postdiplôme Did@cTIC a sa propre motivation de se lancer dans cette formation continue. La mienne était qu'on m'avait confié la surveillance du travail pratique (TP) « fractionnement cellulaire » pour les biochimistes de la troisième année. Comme je suis convaincue qu'une bonne formation est le meilleur investissement dans le futur de notre société j'aimerais aussi être une assistante compétente. C'est la raison pour laquelle j'ai décidé de suivre le postdiplôme Did@cTIC avec l'amélioration de mon TP comme fil conducteur. J'attendais que cette formation m'apprendrait quelques techniques didactiques pour mieux gérer les étudiants et éveiller leur intérêt à la théorie et aux techniques qui font partie du TP. En plus, j'escomptais des suggestions comment on pourrait mieux harmoniser théorie et pratique. Que ceci n'est pas toujours facile à atteindre est bien illustré par le comique en bas.



1.2. Avis au lecteur

Ce travail ne se veut pas exhaustif, compte tenu de l'ampleur du travail fourni pour l'élaboration du nouveau protocole pour le TP « fractionnement cellulaire ». L'aboutissement de mon parcours de formation au sein du diplôme did@cTIC se revoit essentiellement dans ce nouveau protocole.

Ce TFE fait donc état de la démarche suivie pour y parvenir et des conditions de formation qui m'ont permis d'apporter des améliorations à ma pratique d'enseignement.

1.3. Description de la situation

Le TP « fractionnement cellulaire » a été développé il y a longtemps. Au cours des années beaucoup d'informations concernant les expériences et la littérature originale étaient perdues. En octobre 2004 j'ai dû superviser le TP pour la première fois. Je l'ai donné en collaboration avec l'assistant qui s'en occupait les années précédentes. Malheureusement, le TP ne se déroulait pas du tout comme je l'avais attendu car l'autre assistant qui aurait dû m'expliquer tout était souvent absent vers la fin du TP et aussi le script contenait plusieurs erreurs.

1.4. Vue d'ensemble du TFE

Après avoir décrit la situation vécue l'année passée lors du TP je cite le scénario pédagogique que j'avais établi pour le module EDUA¹ du postdiplôme. Ceci permettra au lecteur de se faire sa propre image du contenu du TP et de ses objectifs. Comme les étudiants ont signalé pendant le TP qu'ils n'étaient pas contents avec son déroulement un questionnaire leur a été distribué pour en trouver les causes. Les résultats de ce questionnaire sont résumés dans la 3^{ème} partie graphiquement et narrativement. Ensuite les changements envisagés éclos du questionnaire sont listés et suivis du nouveau protocole. Finalement, le TFE est arrondi par les perspectives et les remerciements.

¹ EDUA: Conception et mise en oeuvre de dispositifs d'enseignement et d'apprentissage dans l'enseignement supérieur

2. Description du TP

Le TP « fractionnement cellulaire » est donné au début de l'année et il fait partie d'un ensemble de travaux pratiques qui communiquent des techniques de bases de la biochimie. Lors des deux premiers travaux pratiques les étudiants apprennent à isoler des protéines, les séparer et à les visualiser. Le TP « fractionnement cellulaire » suit ces deux TP et a comme but de leur apprendre le fonctionnement des protéines et leur répartition différente dans des organelles distinctes. Pour mieux visualiser le contenu et les objectifs du TP, le scénario pédagogique qui a été effectué lors de l'EDUA va être consigné ci-dessous.

2.1. Le scénario pédagogique (élaboré en collaboration avec Gabriele Hampp)

Description			
Nom de l'activité : Fractionnement Cellulaire (TP pour les étudiants de la troisième année de biochimie)			
Description synthétique (synopsis) : Les apprenants doivent apprendre à homogénéiser des cerveaux de porc. Les composants de l'homogénat sont séparés à l'aide de plusieurs centrifugations (densité, sur un gradient de Ficoll, séparation de phase avec PEG-dextran). On mesure des activités enzymatiques (glucose-6-phosphatase, phosphatase acide, cytochrome oxydase, lactate déhydrogénase, ATPase) dans chaque phase pour déterminer sa pureté. Chaque enzyme est caractéristique pour une organelle (alors une phase). Les enzymes sont dosés avec un test de Bradford. Finalement, l'orientation des vésicules est estimée à l'aide de SDS, mononensine, digitoxigenine et ouabaïne.			
Durée estimée pour l'apprenant (heures/semaines) : 3.125 ECTS	face à face (FaF) : 60-80 h/3-4 semaines	en ligne (@) : selon l'étudiant	travail personnel : 30 h/3 semaines
enseignants : 1	apprenants : 6-7	autres : 1 (la responsable des TPs)	
Objectifs			
Compétences spécifiques (savoir et savoir-faire disciplinaires) : Les étudiants vont connaître les différentes phases qui sont obtenues lors du fractionnement cellulaire et comment on analyse leur pureté. En plus, ils vont apprendre quelles enzymes sont localisées dans quel compartiment cellulaire et quelle est leur fonction.			
Compétences démultiplicatrices (savoir-faire techniques, généraux) : <ul style="list-style-type: none"> • Homogénéiser et fractionner des tissus. • Utiliser des centrifugeuses et des rotors correspondants. • Faire des tests enzymatiques à l'aide d'un spectrophotomètre. • Utiliser le programme Excel pour faire des graphiques. • Déterminer l'orientation des vésicules à l'aide d'un test de vésiculation. 			
Compétences stratégiques (résoudre des problèmes, s'adapter) : <ul style="list-style-type: none"> • Travailler en groupe. • Dans l'avenir, ils vont se rappeler de cette méthode pour résoudre des problèmes (par exemple obtenir des mitochondries ou faire des tests enzymatiques). • En écrivant le rapport, ils sont obligés de faire la synthèse de tout ce qui leur permet de comprendre mieux la relation entre la théorie et la pratique. 			
Compétences dynamiques (savoir-être, vouloir, désirer, détester) : <ul style="list-style-type: none"> • Les étudiants apprennent à se diriger vers un travail spécifique et rester concentrés et motivés même si on passe très longtemps au laboratoire. 			

<ul style="list-style-type: none"> • En plus, ils apprennent à s'organiser le travail eux-mêmes, être précis au travail et en écrivant, gérer une situation où rien ne fonctionne et qu'il faut être patient si quelque chose est compliquée et ne marche pas au premier coup. • Les étudiants devraient être curieux et chercher à comprendre les principes.
Evaluation (outils et critères)
Type d'évaluation (formative, sommative) : Le cours est évalué en forme d'un rapport à la fin des travaux pratiques et en questionnant les étudiants lors du TP.
Fonctions : diagnostique, pronostique, certificative Le rapport donne la preuve qu'ils ont suivi le TP (certificatif). Seulement s'il est accepté, le TP est reconnu et ils ont le droit de faire les examens.
Formes et outils : types de question et d'échelle d'évaluation Les questions posées lors du TP sont des questions de compréhension. Le rapport reflète ce qu'ils ont vraiment compris.

Les ingrédients du scénario	
Dans les 3 phases de l'apprentissage...	
*AVANT	Phase de préparation de la situation d'apprentissage
*PENDANT	Phase de réalisation de la situation d'apprentissage
*APRES	Phase d'intégration et de réinvestissement de la situation d'apprentissage

	AVANT	PENDANT	APRES
	Préparation de la situation	Réalisation de la situation	Intégration et réinvestissement
1. Prise en compte de l'apprenant : <ul style="list-style-type: none"> ▪ caractéristiques individuelles, ▪ projets, ▪ prérequis, ▪ conceptions de l'apprentissage 	<p>Les étudiants ont déjà acquis des connaissances de base pendant des TP précédents en biochimie et en chimie.</p> <p>Ils ont un grand savoir théorique mais peu d'expérience pratique en biochimie.</p> <p>Ils sont forcés de faire ces TP pour pouvoir faire les examens.</p>	<p>Il faut bien expliquer et avoir de la patience car les étudiants ont seulement peu de connaissances (connaissances de base).</p> <p>Il faut essayer de bien répondre à toutes les questions et si nécessaire aussi plusieurs fois.</p> <p>Il faut prendre en compte que ces TP prennent beaucoup de temps aux étudiants et qu'ils n'ont pas que ça à faire.</p>	<p>Les étudiants n'ont pas seulement ce rapport à faire. A cause de ça, il faut leur accorder assez de temps pour le rédiger.</p> <p>Ils ont beaucoup d'information à digérer. Ils ne peuvent pas retenir tout.</p>
2. Motivation	<p>Les étudiants veulent avoir l'attestation pour ce TP (obligatoire pour avoir le droit de passer les examens). En même temps ils veulent aussi faire une bonne impression pour améliorer leur chance</p>	<p>En prenant des notes cohérentes et complètes ils ont moins de problèmes d'écrire le rapport à la fin.</p> <p>Ils ont la chance d'apprendre des techniques qui leur</p>	<p>Ils doivent rendre le rapport pour avoir le droit de passer aux examens. S'ils ne passent pas le TP, ils ne vont pas avoir la signature nécessaire.</p> <p>Ils vont utiliser ce qu'ils ont appris lors de leur diplôme.</p>

	<p>d'avoir une bonne place pour le diplôme.</p> <p>Les TPs donnent une première vue de la vie quotidienne au laboratoire. Pour eux c'est la première fois qu'ils ont cette possibilité.</p>	<p>servent pour plus tard (diplôme). S'ils les apprennent bien ils en tirent le plus pour après.</p> <p>Une grande motivation c'est aussi qu'ils veulent comprendre comment les méthodes se déroulent et ce que sont les principes derrière une méthode. Leur curiosité les motive à tenir.</p>	<p>C'est toujours bien d'avoir des techniques de base en tête.</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------

3 Paradigmes d'enseignement-apprentissage	AVANT	PENDANT	APRES
	Préparation de la situation	Réalisation de la situation	Intégration et réinvestissement
Réception	<p>Lire des chapitres dans des livres, lire les notes du cours, des vieux rapports et des informations tirées du net.</p>	<p>Introduction théorique ex cathedra sur ce qu'on va faire (centrifugation, tests enzymatiques...). Expliquer comment on écrit un journal de labo pour y noter tout ce qu'on fait au laboratoire.</p>	<p>Introduction sur la structure et le contenu du rapport et comment on le rédige.</p>
Imprégnation	<p>Les étudiants ont déjà acquis des connaissances et de l'expérience lors de la deuxième année (TP2).</p> <p>L'assistant peut seulement montrer aux étudiants ce que lui il a appris auparavant. Il est imprégné lui-même.</p>	<p>Montrer des méthodes (pipeter, écrire le « labjournal », ...) et le déroulement pratique.</p>	<p>Les étudiants reçoivent des anciens rapports pour s'orienter.</p>
Pratique	<p>Peut-être les étudiants ont déjà fait une de ces méthodes sous le guidage d'un autre assistant.</p>	<p>Après avoir montré aux étudiants comment il faut faire, ils doivent le faire eux-mêmes sous la supervision de l'assistant (pipetage, centrifuger, homogénéiser, écrire le labjournal, ...).</p>	<p>Le rapport va être corrigé et ils reçoivent un feedback à la fin sur le rapport et leur comportement au laboratoire.</p>
1 - Expérimentation	<p>Les étudiants ont déjà été forcés de se débrouiller eux-mêmes dans des autres TPs en chimie. Là-bas, ils étaient obligés de gérer leur temps indépendamment et de trouver la solution seule.</p>	<p>Au bout d'un moment on laisse les étudiants travailler seules mais on reste à leur disposition. Dès qu'ils constatent un problème pour lequel ils ne trouvent pas la solution, ils peuvent chercher l'assistant.</p>	<p>Ils doivent se débrouiller tout seuls pour le rapport.</p>

2 – Création	Lors des TPs de chimie ils ont dû trouver les méthodes pour synthétiser un produit désiré eux-mêmes en combinant leur savoir pratique et théorique.	Ce qui est écrit dans le protocole ne les oblige pas à faire exactement comme ça. S'ils préfèrent une autre méthode, ils sont libres de l'utiliser. Ce qui compte c'est le résultat correct.	Malgré le fait qu'on ait donné des exemples et des conseils pour la rédaction du rapport, ils sont libres dans l'organisation. Il ne dérange pas de voir leur propre style.
3 - Exploration	Chercher des informations sur internet et à la bibliothèque.	Si les étudiants ont un peu de temps libre ils peuvent s'exercer par simple « plaisir » dans une méthode (répéter un test, compter des cellules, essayer une autre technique pour le même test fait auparavant, ...).	En écrivant le rapport, les étudiants apprennent où ils doivent chercher des informations (les sources doivent être indiquées à la fin du rapport).
4 - Objectivation	Les étudiants doivent apprendre des bases théorétiques et comprendre l'organisation de l'expérience.	Les étudiants vont acquérir des nouvelles méthodes et apprendre à les effectuer indépendamment. Ils apprennent aussi à prendre des notes. En plus, ils doivent faire le lien entre théorie et pratique : pourquoi on le fait, les principes derrière la méthode.	A la fin ils doivent écrire le rapport pour démontrer qu'ils ont compris la théorie et la pratique d'une technique. Les étudiants sont invités à écrire le rapport en anglais pour devenir un peu plus intimes avec « le langage scientifique ».
5 – Evaluation	-	Les étudiants sont questionnés par l'assistant lors du TP pour savoir s'ils ont compris la théorie derrière la technique. La motivation et la présence (liste de présence) de l'étudiant sont aussi prises en compte.	Dans le rapport, les étudiants doivent démontrer une dernière fois s'ils ont tout compris.
6 - Réinvestissement	-	-	Le rapport et les connaissances acquises peuvent être utilisés pendant les TPs suivants et le travail de diplôme.

Vérification des caractéristiques d'un apprentissage en profondeur	Présent : o Absent : x	Commentaires
Parcours négociés	X	
Unités de temps et de lieux diversifiées	O	Travail au laboratoire et à la maison.
Ressources en provenance des lieux de vie privés et professionnels	O	Ils ont des connaissances des TPs de deuxième année et des formations précédentes. Eventuellement les étudiants ont fait un stage ou un travail d'été dans un laboratoire auparavant. La résistance au stress est très importante. Un contexte stable facilite de tenir et donne de l'énergie.
Évaluation	O	Le TP est évalué à l'aide d'un rapport écrit dans le style d'un papier. Lors du TP les étudiants sont évalués en les questionnant pendant qu'ils travaillent pour savoir s'ils ont compris ce qu'ils font. Pour pouvoir écrire le rapport on les demande de prendre des notes dans le « labjournal ». Ces notes sont contrôlées de temps en temps.
Tâche	O	Le script et le règlement donnent la tâche.
Cohérence entre : objectifs – méthodes – évaluation	O	L'objectif est d'apprendre, de comprendre et de répéter des techniques de base qui sont nouvelles pour les étudiants. La méthode est qu'ils apprennent des techniques en les faisant. L'évaluation est faite pour avoir une indication s'ils ont compris la méthode et la théorie derrière.
Collaboration	O	Les étudiants sont forcés de travailler en groupe (2 à 3) et de travailler aussi avec l'assistant.
Usages des TIC	O	Les étudiants doivent chercher eux-mêmes des informations sur le net et télécharger le script.
Intègre des moments de régulation ou une recherche évaluation à propos du dispositif	O	L'enseignement du TP est évalué en questionnant les étudiants lors du TP et à l'aide d'un questionnaire qui est distribué à la fin du TP.

3. Evaluation de l'enseignement du TP

Pour évaluer le TP et la performance de l'assistant un questionnaire (annexe) a été développé lors du module EDU2² en collaboration avec Gabriele Hampp. Comme la discussion avec les étudiants avait déjà révélé quelques problèmes quelques questions étaient ciblées là-dessus pour en avoir une confirmation. Les autres questions étaient choisies précieusement pour identifier les points faibles du TP le mieux que possible. Pour éviter que les étudiants ne le lisent que superficiellement plusieurs questions étaient formulées une fois dans un sens positive et une fois dans un sens négatif (cf. questions 11 et 15).

3.1. Evaluation graphique du questionnaire

Le questionnaire était distribué aux cinq étudiants qui avaient suivi le TP en 2004. Il leur était demandé de le remplir deux fois, une fois pour chaque assistant. Seules les réponses concernant le TP en général et moi comme assistante vont être évaluées ci-dessous. Tous les étudiants ont rendu le questionnaire (n = 5).

Pour évaluer le questionnaire les chiffres suivants ont été attribués à chaque réponse:

- 0 = ne peu pas être répondu raisonnablement
- 2 = correspond
- 1 = correspond plutôt
- -1 = ne correspond plutôt pas
- -2 = ne correspond pas du tout

La moyenne \pm SEM est finalement graphiquement représentée pour chaque question. Pour mieux visualiser le résultat du questionnaire, les réponses concernant le TP en général (bleu) et celles concernant les ressources (rose ; fig. 3.1) sont groupées dans un graphique séparé de celles concernant l'assistant (violet ; fig. 3.2). Les notes scolaires qui ont été attribuées au TP (3.95 ± 0.3202) et à l'assistant (5.35 ± 0.1) se trouvent tout en haut de chaque graphique. L'échelle des notes scolaire va de 1 à 6 où 6 est la meilleure. Ce système de notation était choisi parce que les étudiants sont familiers avec comme ils le connaissent depuis leur degré inférieur et en même temps c'est celui qui est utilisé à l'université de Fribourg.

² EDU2: travaux pratiques

Fig. 3.1: Evaluation des questions concernant le TP en général (bleu) et les ressources à disposition (rose).

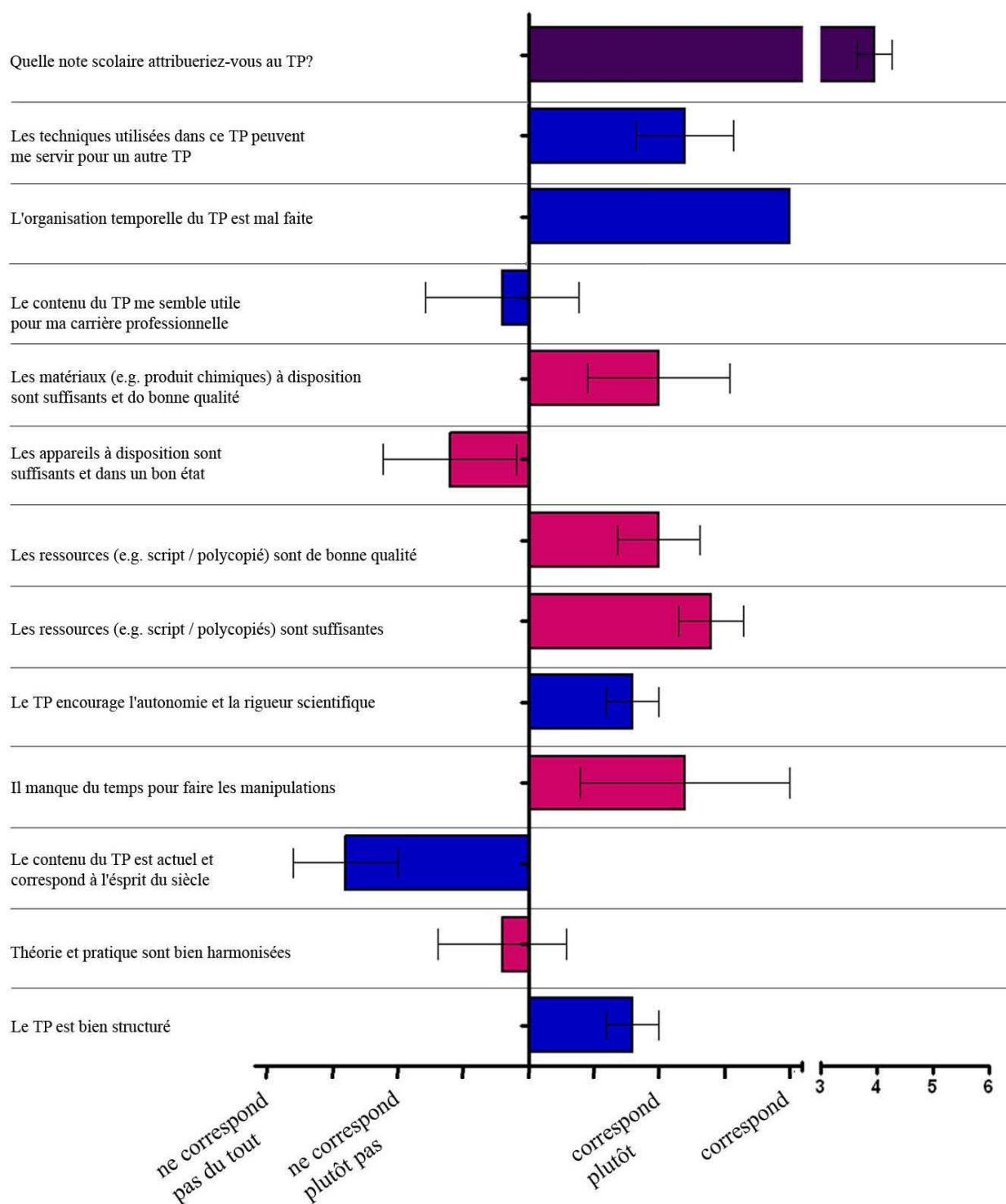
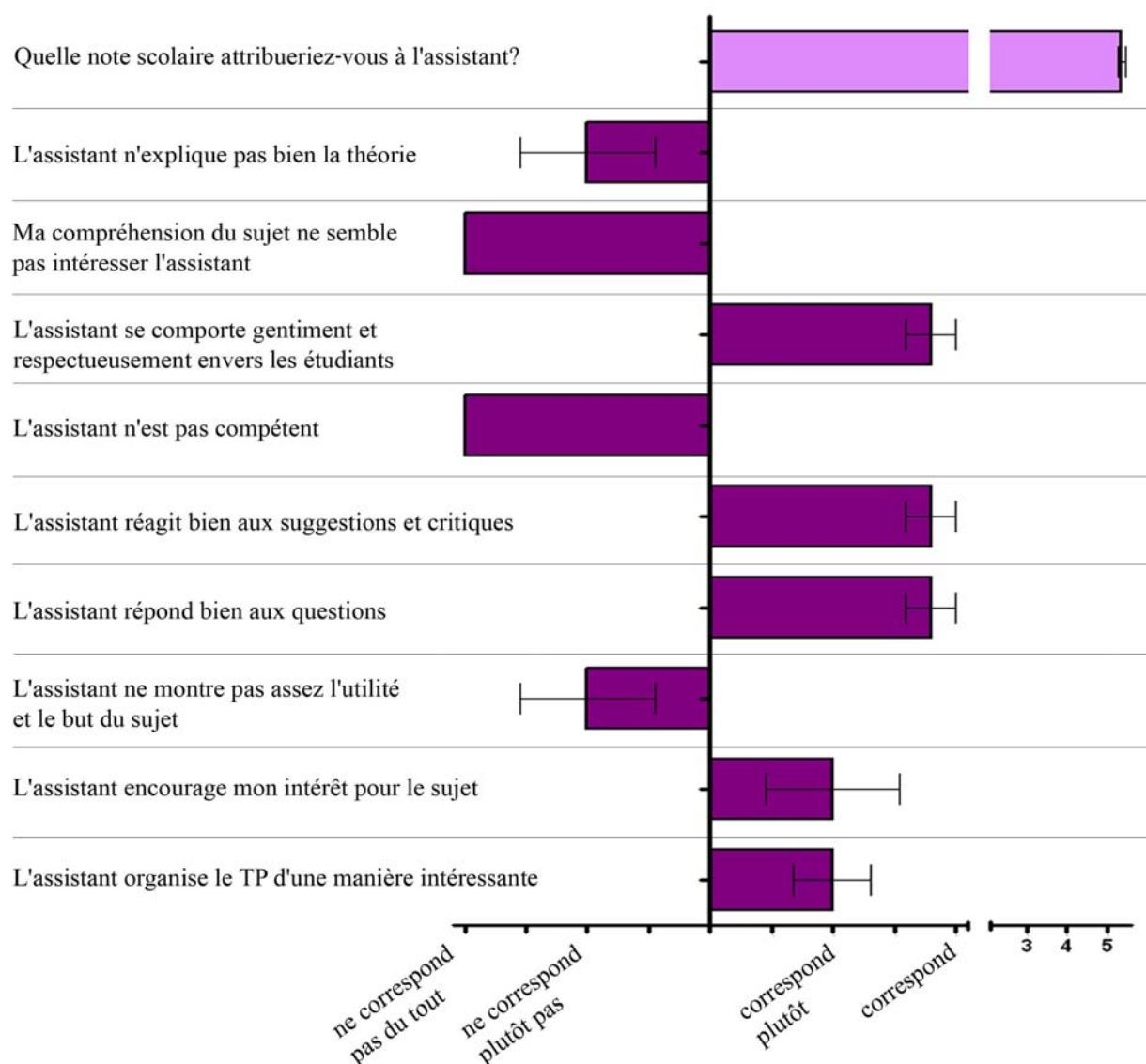


Fig. 3.2: Evaluation des questions concernant l'assistant.

Seulement deux étudiants ont répondu aux questions ouvertes. Leurs réponses sont résumées ci-dessous :

- « Le sujet du TP n'est pas vraiment intéressant. »
- « La partie sur les vésicules n'est pas clairement expliquée. »
- « La 2^{ème} partie de ce TP (vésiculation) n'est pas assez bien été expliquée, ce qui est dommage. »

3.2. Résumé des résultats du questionnaire

Le résultat du questionnaire n'était pas surprenant du tout. A part la dernière partie concernant la vésiculation, les étudiants ont été contents avec l'assistant. Le TP par contre était moins apprécié parce qu'il leur semblait vieilli et ils ne voient pas son utilité pour leur futur. L'état des ressources est satisfaisant malgré le fait qu'il faudrait acheter de nouveaux appareils. Leur intérêt pour le TP descend de grand à faible avec un étudiant qui a un grand intérêt, 3 qui ont un intérêt moyen et un qui a un intérêt faible. Tous trouvent que ce qu'ils ont appris lors du TP n'est que suffisant. Il n'y a qu'un étudiant qui trouve que la somme de travail est idéale les autres la ressentent comme étant trop élevé. Seule la difficulté et la vitesse sont classées comme idéales. Leur opinion plutôt négative se reflète aussi dans la note scolaire de 3.95 ± 0.3202 qu'ils ont attribué au TP.

3.3. Discussion avec les étudiants

Après avoir fait l'évaluation graphique du questionnaire, les étudiants ont reçu un retour sur les résultats lors d'une petite réunion. Malheureusement cette rencontre ne révélait pas de nouveautés mais confirmait ce qu'ils avaient déjà soulevé dans le questionnaire. Outre cela, les étudiants avaient mentionné plusieurs fois qu'ils appréciaient d'avoir été informés sur le résultat et d'avoir eu la possibilité de dire leur opinion.

4. Changements envisagés

Le résultat du questionnaire est assez impressionnant en ce qui concerne l'opinion plutôt négative des étudiants de ce TP. Par conséquent j'ai décidé de rédiger un nouveau protocole qui correspond plus à l'esprit du siècle et qui est plus facile à suivre. En même temps j'essayerai d'agrandir la partie théorique pour rendre le TP plus accessible aux étudiants.

D'habitude chaque TP commence avec une introduction ex cathedra. Jusqu'à présent celle-ci était plutôt lourde parce qu'elle contenait beaucoup de formules. Pour éviter ceci, je vais en intégrer quelques-uns dans le protocole et focaliser l'exposé sur les principes du TP.

5. Le nouveau protocole

Le nouveau protocole suit ci-après dans l'annexe. Son exactitude scientifique fut contrôlée par Dr. Andrea Kütke-Albrecht et par le Professeur Dr. Jean-Luc Dreyer, tandis que l'anglais a été corrigé par notre diplomante anglophone April Bezdek.

6. Perspectives

Le nouveau protocole va être utilisé lors du TP de cet automne et arrondi selon les résultats du questionnaire qui va de nouveau être distribué à la fin du TP. Malheureusement, ces changements ne vont plus être inclus dans ce travail-ci. De toute façon, je me réjouis déjà de voir si le nouveau protocole est bien accepté par les étudiants et s'ils arrivent bien à se débrouiller avec. J'espère que les étudiants de cette année vont être aussi motivés que ceux de l'année passée pour m'aider à améliorer le TP.

7. Abréviations

TFE	travail de fin d'études
TIC	technologies de l'information et de la communication
TP	travail pratique

8. Remerciements

J'aimerais remercier Prof. Dr. Urs Albrecht de m'avoir donné la possibilité de suivre ce postdiplôme de Did@cTIC et Dr. Andrea Kütke-Albrecht de m'avoir laissé ce projet. Par ailleurs, je la remercie pour ses conseils en vue de l'amélioration du protocole.

Un grand merci va aussi vers Prof. Dr. Jean-Luc Dreyer qui m'a aidé à trouver de la vieille littérature et qui a corrigé le manuscrit pour son exactitude scientifique.

Un grand merci encore à April Bezdek qui a corrigé mes fautes d'anglais avec grande passion et qui m'a aussi donné quelques conseils du point de vue d'une étudiante. Je remercie également Ana Moura et Sonja Langmesser pour les corrections apportées.

Mes remerciements s'adressent encore aux étudiants en biochimie de 2004 pour leur exprimer ma gratitude. Leur coopération m'a énormément aidé à améliorer le protocole. Sans eux je n'aurais pas réussi à parvenir à ce résultat !

Je remercie enfin ma famille, mon copain et mes copains – spécialement Gabriele Hampp et Regula Schöb – de m'avoir soutenu pendant cette année.

9. Annexe

9.1. Questionnaire (page 1)

Evaluation des travaux pratiques (TP) de la 3^{ème} année de biochimie

Sujet du TP :

Donné par:

Ne peu pas être répondu raisonnablement	
Correspond	
Correspond plutôt	
Ne correspond plutôt pas	
Ne correspond pas du tout	

Cochez la réponse qui vous convient le plus :

1. Le TP est bien structuré
 2. L'assistant organise le TP d'une manière intéressante
 3. Théorie et pratique sont bien harmonisées
 4. Le contenu du TP est actuel et correspond à l'esprit du siècle
 5. Il manque du temps pour faire les manipulations
 6. L'assistant encourage mon intérêt pour le sujet
 7. L'assistant ne montre pas assez l'utilité et le but du sujet
 8. Le TP encourage l'autonomie et la rigueur scientifique
 9. Les ressources (e.g. script / photocopiés) sont suffisantes
 10. Les ressources (e.g. script / photocopiés) sont de bonne qualité
 11. L'assistant répond bien aux questions
 12. L'assistant réagit bien aux suggestions et critiques
 13. Les appareils à disposition sont suffisants et dans un bon état
 14. Les matériaux (e.g. produit chimiques) à disposition sont suffisants et de bonne qualité
 15. L'assistant n'est pas compétent
 16. Le contenu du TP me semble utile pour ma carrière professionnelle
 17. L'assistant se comporte gentiment et respectueusement envers les étudiants
 18. Ma compréhension du sujet ne semble pas intéresser l'assistant
 19. L'assistant n'explique pas bien la théorie
 20. L'organisation temporelle du TP est mal faite
 21. Les techniques utilisées dans ce TP peuvent me servir pour un autre TP
 22. Combien de temps investissez-vous par semaine (en dehors de la présence) pour acquérir les connaissances demandées au cours ? - - heures et minutes - -
- | | | | | | |
|--|---------------------|-----------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| | <i>bcp trop bas</i> | <i>trop bas</i> | <i>idéal</i> | <i>trop élevé</i> | <i>bcp trop élevé</i> |
|--|---------------------|-----------------|--------------|-------------------|-----------------------|
23. La difficulté du TP est :
 24. La somme de travail est :
 25. La vitesse du TP est :
 26. Mon intérêt pour le TP est :
 très faible *faible* *moyen* *grand* *énorme*
 27. Ce que j'ai appris lors du TP est :
 très peu *peu* *suffisant* *beaucoup* *énormément*
 28. Quelle note scolaire attribueriez-vous au TP (1 = *insuffisant* ; 6 = *excellent*) ? -
 29. Quelle note scolaire donneriez-vous à l'assistant ? -
 30. Commentaires et suggestions : _____

3rd Year Course in Practical Biochemistry, Inst. Biochemistry, University of Fribourg



Part III. Cellular Fractionation

Contents

Objectives.....	2
Introduction.....	3
1. Cell and tissue homogenization techniques.....	3
2. Centrifugal separation of cellular components.....	4
2.1. Rotors.....	4
2.2. Differential centrifugation or pelleting.....	5
2.3. Density gradient centrifugation.....	5
2.4. Centrifugation in aqueous two-phase systems.....	7
3. Protein determination.....	9
3.1. UV protein determination [280/260 nm].....	9
3.2. Bradford protein assay.....	10
3.3. Lowry protein assay.....	10
3.4. Biuret protein assay.....	10
3.5. BCA method.....	11
4. Marker enzymes to test fraction purity.....	12
5. Vesiculation test.....	13
Experimental part.....	15
1. Outlet.....	15
2. Preparation of synaptic membranes.....	15
3. Purity tests using marker enzymes.....	20
4. Vesiculation test.....	24
Literature.....	28

Objectives

Although sophisticated cell fractionation techniques have been developed in the beginning of the last century they are still frequently used in almost every biochemistry or cell biology lab. In order to analyze and to characterize biochemical processes within distinct organelles it is important to get pure fractions of the organelle of interest.

In this practical course we will learn **how to homogenize** and **how to fractionate** neural tissue [fig.1] to finally isolate synaptic plasma membranes. The purity of each fraction is assessed using **enzymatic tests** that are markers for different organelles. Subsequently, we analyze the vesicular composition of the last fraction by **determining the orientation** of the plasma membrane vesicles.

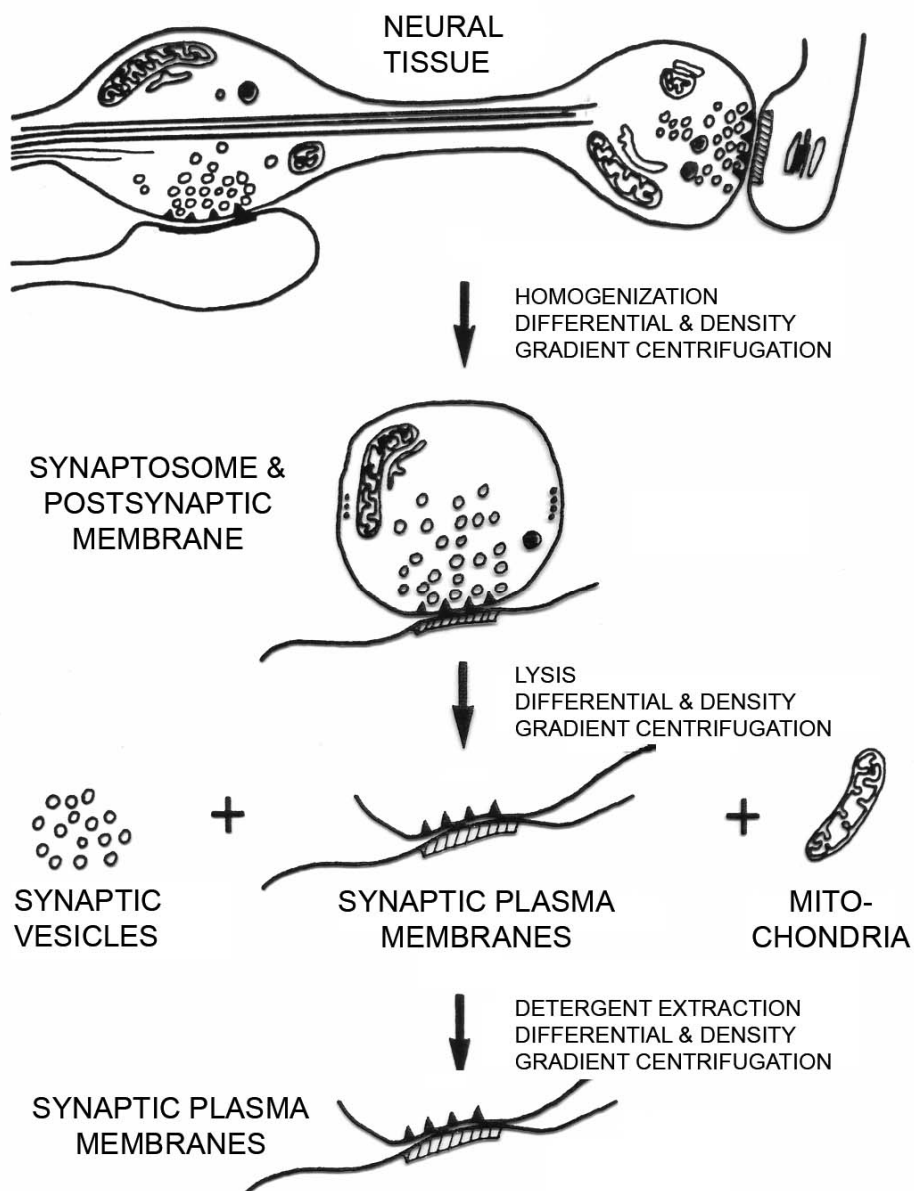


Fig.1: Summary of the cell fractionation steps used to isolate synaptic plasma membranes.

Introduction

All eukaryotic cells consist of compartments surrounded by membranes to allow different biochemical processes to take place at the same time. To investigate and to localize these biochemical processes it is necessary to disrupt cellular anatomy as gently as possible in order to preserve their individual function. Although cell fractionation is defamed to be an old-fashioned technique this basic method still stands at the beginning of many experiments carried out nowadays. In a first step, which also forms the first part of this practical course, the tissue has to be homogenized. Subsequently, distinct organelles are isolated using different centrifugation techniques.

1. Cell and tissue homogenization techniques

Cells and tissues can be fractionated using numerous techniques. A very simple one is to force cells through a very narrow orifice like a syringe. To homogenize tissues one can use a potter (liquid shear), polytron (mechanical shear), nitrogen bomb (gaseous shear), presses and pumps (liquid shear), sonicator (liquid shear), or glass beads (mechanical shear) [Rickwood, 1992, p234]. The way how one homogenizes the tissue depends on the tissue type and on the desired fraction.

After homogenization one gets a very thick and slurry suspension that is called *homogenate* or *extract*. This homogenate consists of a variety of membrane-enclosed organelles of distinct size, charge, and density. When carefully applied the disruption procedures leave organelles such as nuclei, mitochondria, the Golgi apparatus, lysosomes, and peroxisomes largely intact. Provided that the homogenization buffer has been carefully chosen, the different components – including the vesicles derived from the endoplasmatic reticulum (called *microsomes*) – retain most of their original biochemical properties.

A common consequence of tissue homogenization is the liberation of formerly compartmentalized proteases out of lysosomes, membranes, or the cytosol. Their action can be blocked by adding protease inhibitors [table 1] to the homogenization buffer and by consequently working at 4°C. Formerly, every inhibitor had to be added separately, which took a lot of time. Nowadays, protease inhibitor cocktails exist that can be directly added to the homogenate. Calcium ions should be excluded from the buffer because they activate certain proteases and phospholipases. Since EDTA chelates these bivalent ions it is a very potent protease inhibitor. Another important feature of a good homogenization buffer is its neutral pH. An acidic pH would increase the activity of lysosomal proteases.

Table 1: Protease inhibitors [Rickwood, 1992, p244; Evans, 1987; www.serva.de/products/knowledge/061311.shtml]

Inhibitor	Specificity	Normal range	Comments
Amastatin (also epiamastatin)	amino exopeptidase	1 – 10 µg/ml	
Antipain	papain, cathepsin B, trypsin	1 – 10 µg/ml	
Aprotinin	chymotrypsin, kallikrein, trypsin, plasmin	cell culture: 0.01 - 3 µg/ml; other applications: 10 - 250 µg/ml	
Bazamidine	serine proteases	up to 10 mM	
Benzylmalic acid	carboxypeptidases	1 – 10 µg/ml	
Bestatin (also epibestatin)	amino exopeptidases	up to 1 µg/ml	
Chymostatin	cathepsin B, chymotrypsin, papain	1 – 10 µg/ml	
Diisopropylphosphorofluoridate (DFP)	serine proteases	up to 0.1 mM	very toxic
Diprotin A & B	dipeptidylamino peptidases	10 – 50 µg/ml	
Elastatinal	elastase	10 µg/ml	
EDTA	metalloproteases	0.1 – 5 mM	useful general inhibitor
Leupeptin	cathepsin B, papain, plasmin, trypsin	1 – 100 µg/ml	
Pepstatin A	carboxyl proteases (e.g. pepsin, renin)	1 – 10 µg/ml	rather soluble in EtOH or MeOH than in water
Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)	serine proteases	up to 0.1 mM	limited half-life in aqueous buffers; useful general inhibitor
Phosphoramidon	collagenase, thermolysin	1 – 10 µg/ml	not a general zinc protease inhibitor
Sodium tetrathionate	thiol proteases	up to 5 mM	
Tosyl-methyl ketone	papain, trypsin		
Tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone	chymotrypsin		
Trypsin inhibitors types I-IV	chymotrypsin, trypsin		from various sources (e.g. chicken egg white, soybean) and with various activities

2. Centrifugal separation of cellular components

2.1. Rotors

Diverse centrifugal applications demand different rotors that can be classified into four different types: *swing-out* (swinging bucket), *fixed-angle*, *vertical*, and *zonal* rotors [Richwood, 1992, p55-69]. The fixed-angle rotor [fig.2A] is the most widely used rotor type because sedimenting particles have only a short distance to travel before pelleting. Swinging bucket rotors [fig.2B] are often used in density gradient centrifugation because the longer distance of travel may allow a better separation of the particles. Furthermore, it is easier to withdraw the supernatant without disturbing the pellet because the centrifugal force is exerted along the axis of the tube.

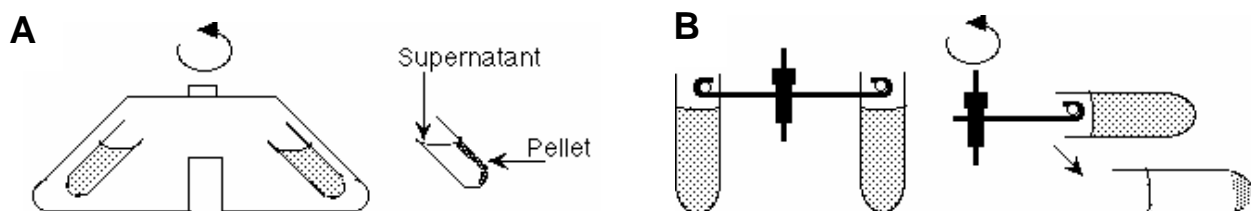


Fig. 2: A: Fixed-angle rotor B: Swing-out rotor

2.2. Differential centrifugation or pelleting

After homogenization the different components of the homogenate have to be roughly separated. To achieve this, a so-called *differential centrifugation* is performed, which separates the components by their mass. In general, the heaviest particles experience centrifugal forces the most and thus, move the fastest to the bottom [fig.3].

For a first crude fractionation it is sufficient to use only low centrifugal forces (e.g. 1000 g for 10 min) to get the *low-speed pellet* (P1) containing nuclei, cell debris, intact cells and some larger sub-cellular components (e.g. parts of the endoplasmatic reticulum bound to the nucleus). At slightly higher speed a complex multilayer pellet forms, containing mitochondria, lysosomes, and peroxisomes. Applying even higher speed, and increasing centrifugation time, one gets a *microsomal fraction*, containing also endosomes and ribosomes [Rickwood, 1992, p248-50]. Since one does not centrifuge until the equilibrium is reached all fractions are impure. However, many contaminants can be removed by several repetitions of re-suspending the pellet and repeating the centrifugation.

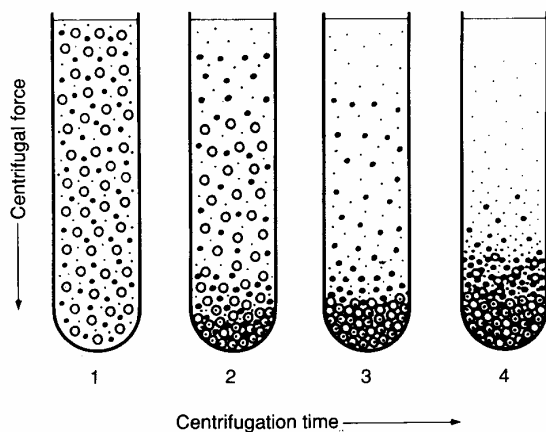


Fig. 3: Schematic representation of the fractionation of particles by *differential centrifugation*. **1:** In the beginning particles are distributed uniformly throughout the solution. **2-4:** Depending on their shape and mass particles pellet with different velocities. [Rickwood, 1992, p11; reproduced from Griffith, 1979]

2.3. Density gradient centrifugation

As already mentioned above, differential centrifugation is the first step of most cell fractionation protocols. After a first rough separation of the different organelles, the pellet, containing the organelle of interest, is re-suspended and subjected to a gradient centrifugation to purify it further. Two sorts of gradient centrifugation exist: the first one is the so-called *rate-zonal centrifugation* [fig.4A] and the second the *isopycnic centrifugation* [fig.4B,C]. The former separates particles according to their sedimentation coefficient (depends more on their molecular mass than on their density) and is not carried out to equilibrium, whereas the latter separates them in respect of their buoyant density [table 2] and is carried out until the solution reaches its equilibrium. Since the practical course will only be focused on rate-zonal centrifugation the following explanations are only true for this sort of gradient centrifugation.

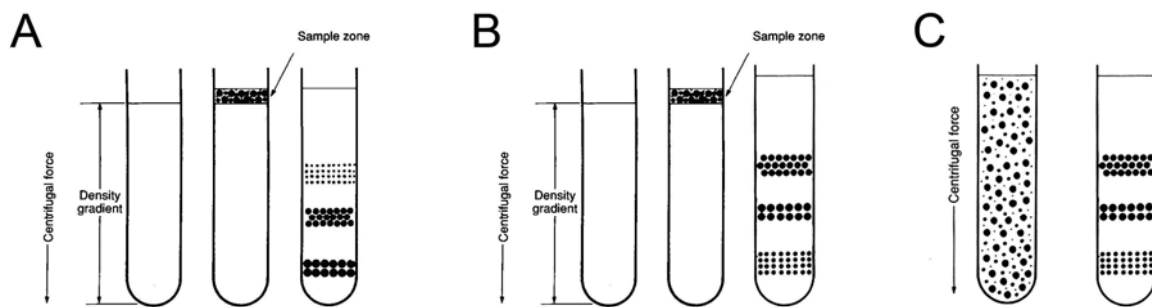


Fig. 4: Schematic representation of gradient centrifugation techniques. **A:** Separation of particles by *rate-zonal* centrifugation. This diagram shows how particles with differing rates of sedimentation form bands in a gradient. First, the centrifuge tube is filled with the density gradient solution, which then is covered with the sample. Under centrifugal force, particles move at different rates, depending on their mass. **B and C:** Separation of particles by isopycnic gradient separation. Note that in isopycnic centrifugation the samples can be layered on top of a preformed gradient (B) or mixed throughout a self-forming gradient (C). Under centrifugal force, the gradient redistributes and sample particles migrate to their isopycnic positions. [adapted from: Rickwood, 1992, p13-16; reproduced from Griffith, 1979]

Table 2: Density [g/ml] of organelles in different media [OptiPreps™ reports, 2000; Evans, 1987; Rickwood, 1992. p252-254]

Organelle	Sucrose	Percoll®	Iodixanol™
Nuclei	> 1.32	not available	1.23 – 1.25
Peroxisomes	1.19 – 1.23	1.07 – 1.08	1.18 – 1.21
Mitochondria	1.17 – 1.21	1.08 – 1.10	1.14 – 1.16
Lysosomes	1.19 – 1.21	1.10 – 1.11	1.11 – 1.13
Golgi	1.05 – 1.12	1.03 – 1.05	1.03 – 1.08
Synaptosomes		1.04 – 1.05	

Rate-zonal centrifugation

After filling a centrifuge tube with a continued or discontinued gradient it is layered with the re-suspended pellet in order to further purify the organelle of interest. During rate-zonal centrifugation the various particles travel through the gradient with a velocity that is determined by their sedimentation coefficient [fig.5]. This causes the formation of distinct bands within the gradient solution that can be isolated separately. The formation of the bands strongly depends on the choice of an adequate gradient medium.

Sucrose is probably the most common gradient medium because it is very cheap, easy to handle, and biochemically very compatible. A shallow gradient of sucrose allows obtaining clear bands because it prevents them from convective mixing in the tube, which normally occurs whenever a denser solution lies on top of a lighter one. Typically, the sucrose gradient increases in concentration toward the bottom of the tube from 5 to 20 %. Another very popular gradient compound is *Ficoll*, which is a neutral polysucrose with a high molecular weight. Its main advantage compared to sucrose is that it is non-osmotic.

Unfortunately, the ideal gradient medium does not exist but it should fulfill as many of the variables listed below as possible [Rickwood, 1992, p93-94]:

- It must be readily soluble in the density range for the specific application.
- It must be inert and not interfere with the biological activity of the separated particles.
- It should not exert a significant osmotic pressure, even at high concentrations.
- It should form solutions of low viscosity.
- It should be affordable.
- It should be readily sterilized.
- It should not absorb in the UV range of the spectrum (i.e. < 400 nm).
- It should be relatively easy to remove from the particles after separation.
- It should not interfere with chemical and enzyme assays.
- It should be compatible with tubes and rotor materials.

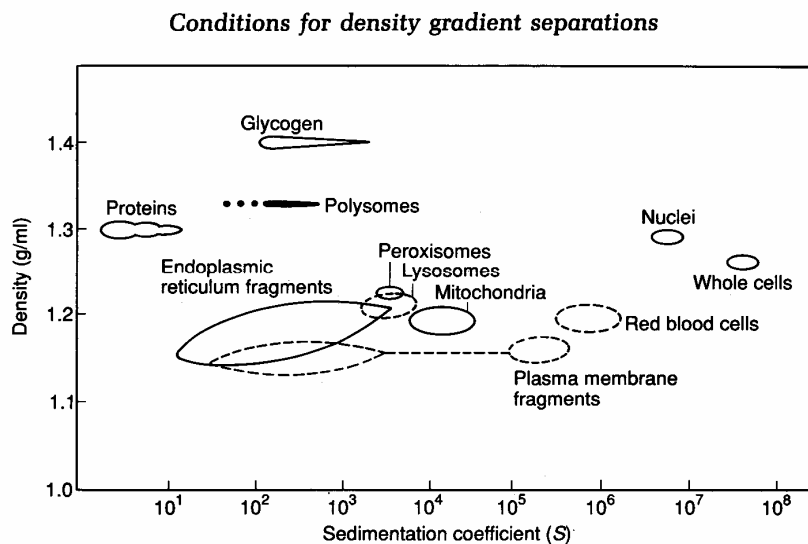


Fig. 5: A sedimentation coefficient – density diagram for rat liver. The diagram shows the distribution of the different components present in the total liver homogenate. The densities of the denser components such as nucleoproteins are estimated values only. [adapted from: Rickwood, 1992, p13-16; reproduced from Hinton & Dobrota, 1976]

2.4. Centrifugation in aqueous two-phase systems

Until the mid 1980s plasma membranes had to be isolated using sucrose or other gradients. It was only by that time that a new water based method revolutionized plasma membrane isolation [Larsson, 1985; Sharpe, 1988; Fisher and Sutherland, 1989]. This *aqueous two-phase system* consists of *polyethylene glycol* (PEG3350) and *dextran* (T500), which are dissolved in a physiological buffer [fig.6].

The purification of plasma membranes primarily depends on surface properties such as charge, density, molecular weight, and hydrophobicity. The system is sensitive enough to separate inside-out and right-side-out membrane vesicles. Not only is the theory behind the experiment strikingly simple but the experimental setup is as well. One only has to mix the sample with a PEG and dextran solution, shake this mixture several times, and then centrifuge. After centrifugation the upper PEG-rich phase contains the plasma membranes, whereas the lower

dextran-rich phase consists of intracellular membranes (e.g. mitochondria, Golgi-apparatus, ER). The order of affinity of animal cell membranes for the upper phase is: ER < mitochondria < lysosomes < Golgi-apparatus < plasma membranes.

To achieve pure preparative fractions manipulations should be carried out at 4°C (temperature sensitive!) and repeated at least two times. Moreover, the two-phase partitioning is affected by factors as composition of the phases, pH, and salt concentrations. In order to get the best results, these factors have to be adjusted for each experiment.

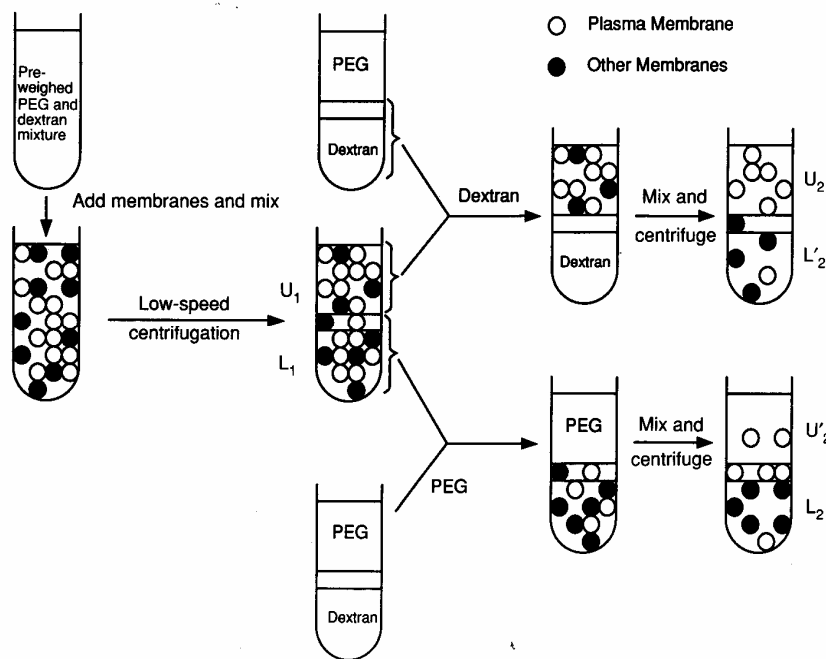


Fig. 6: Purification of plasma membranes by two-phase separation. The cellular fraction containing the plasma membranes and other membranes and organelles is added to a pre-weighed mixture of polyethylene glycol, dextran, and a buffer (pH 6.5 – 7.0) to give a phase system. The centrifuge tube is inverted thoroughly 30-40 times and the phases are then separated by a low-speed centrifugation step. The upper phase (U₁) is removed and then re-partitioned against fresh lower phase. Plasma membranes remaining in the lower phase (L₁) after the first partitioning step are recovered by re-extraction with fresh upper phase. [Rickwood, 1992, p13-16; reproduced from Larsson, 1985]

3. Protein determination [Davies, 1988; www.ruf.rice.edu]

Although protein assays don't tell us anything about what kind of protein is present in a sample they are important to determine the total amount of protein in a sample. This total amount of protein is further used to determine for example the *specific activity* of a measured enzyme within a sample. A good protein assay should be specific, sensitive, and fast.

Unfortunately, the perfect protein assay does not exist. Due to this, one test has to be chosen over another for ease of use or for specific scientific limitations (e.g. interferences). Nowadays, the most commonly used protein assays are the *Bradford* and *bicinchoninic acid (BCA)* assays. Nevertheless, there are other protein assays less used such as the ones described below to give a more complete overview. Table 3 gives an overview of the characteristics of five commonly used protein assays.

Table 3: Comparison of five commonly used protein assays [BioRad kit flyer, cat# 500-0006]

Method	Sensitivity	Chemical interference	Protein/protein variation	Technique: speed / complexity
<i>Bradford</i>	1 µg	slight	significant	rapid / simple
<i>Lowry</i>	1 µg	great	significant	moderate / moderate
<i>Biuret</i>	100 µg	moderate	low	moderate / simple
<i>Absorbance [280 nm]</i>	10 µg	moderate	significant	rapid / simple
<i>BCA</i>	0.5 µg	slight	significant	rapid / simple

3.1. UV protein determination [280/260 nm]

Measuring the absorbance is the easiest and fastest way to determine to amount of protein within a sample. One does neither need to add any other reagent, nor to incubate, nor to prepare a protein standard curve because the relationship of absorbance to protein concentration is linear. However, there may be considerable error due to the widely varying absorption characteristics of different proteins and nucleic acids. Furthermore, any non-protein component absorbing ultraviolet light will interfere with this assay. Additionally, certain detergents (e.g. Triton X-100) also interfere with the test. Due to this, the absorbance assay is most commonly used to determine the total amount of protein within fractions obtained from chromatography columns.

Principle [Layne, 1975]: Amino acids with aromatic rings absorb light maximally at 280 nm. Since the sample may contain nucleic acid contaminations, which absorb at 260 nm this value has to be subtracted from the one measured at 280 nm. The total protein concentration is calculated according to the Warburg and Christian formula:

$$\text{protein concentration [mg/ml]} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

3.2. Bradford protein assay [Bradford, 1976; Read and Northcote, 1981]

As already mentioned above, the Bradford protein assay is one of the most commonly used ones and thus is the one that will be used during this practical course. An advantage of this assay is that it is fast and easy to do and the variability between proteins is small. Furthermore, ready to use Bradford reagents can be bought from many companies (e.g. BioRad). Disadvantages are that the Coomassie Blue does not bind some specific proteins (e.g. trypsin) and that the Bradford reagent is acidic, which precipitates some proteins. Additionally, some detergents like Triton X-100, SDS or Chap interfere with the assay.

Principle: The Bradford protein test is a dye-binding assay based on the observation that the absorbance maximum for an acidic solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 shifts from 465 nm to 595 nm when binding to protein occurs.

3.3. Lowry protein assay [Lowry *et al.*, 1951]

In former times, the 2-step Lowry protein assay was the method of choice for accurate protein determination for cell fractions, enzyme preparations, chromatography fractions and so on. Unfortunately, this test demands a lot of pipeting work and all reagents except the Folin-Ciocalteu reagent (Merck) have to be prepared by oneself. A big disadvantage of this method is that many reagents (e.g. mercaptoethanol, hepes, Triton X-100) used to purify proteins, especially reducing agents, interfere with this method.

Principle: Under alkaline conditions divalent copper ions form a complex with peptide bonds in which they are reduced to monovalent ions (Biuret reaction). These Cu^+ ions and the radical groups of the amino acids tyrosine, tryptophan, and cysteine react with the Folin-Ciocalteu reagent to produce an unstable product that becomes reduced to molybdenum/tungsten blue. The absorbance is read at 750 nm or at 500 nm when too high at the former wavelength.

3.4. Biuret protein assay [Weichselbaum, 1946; Gornall *et al.*, 1949; Layne, 1957]

The Biuret protein assay is very similar to the formerly used Lowry assay; however it involves a single incubation of 20 min. A big advantage is that there are very few interfering agents (e.g. ammonium salts). That's why it can also be used in the presence of detergents (e.g. Triton or desoxycholate), which is not possible for most other assays. Unfortunately, the Biuret assay lacks sensitivity and in consequence consumes much more material than other tests. The name of the assay comes from the compound Biuret (bi-urea), which is formed by heating up urea. This Biuret is the simplest substance that is known to complex with the Biuret reagent.

Principle: The biuret assay is based on the fact that divalent copper ions form tetradentate complexes with opposite pairs of peptide bonded nitrogens under alkaline conditions. Therefore, only substances that contain at least two peptide bonds can be detected. The complexes formed between the peptides and the Biuret reagent produce a purple or blue color that can be measured at 550 nm.

3.5. BCA method [Smith *et al.*, 1985]

The bicinchoninic acid (BCA) assay shows a good combination of sensitivity and simplicity. Furthermore, it is less sensitive to interfering agents and is even resistant to the detergent Triton X-100. However, it is susceptible to chelating reagents (e.g. EDTA), ammonium sulfate, N-acetylglucosamin, glycin, reducing agents (e.g. glucose, DTT, sorbitol) and some pharmaceuticals (e.g. penicillin, vitamin C) [Marshall and Williams, 1991]. Another nice advantage is that the assay is available in kit form (Pierce, Rockford, III). To sum it up it can be said that the BCA assay is used for the same reasons than the Lowry assay except that it is less susceptible to interfering agents.

Principle: As already mentioned above, Cu^{2+} ions are reduced to Cu^+ ions by aromatic amino acids in proteins. These monovalent copper ions form a complex with bicinchoninic acid that can be measured at 562 nm.

Table 3: Marker enzymes [Rickwood, 1992, p265]. Enzymes marked in bold and italic will be measured during the practical course.

Membrane type	Enzymatic or chemical marker	Membrane subtype
Plasma membrane	<i>Na⁺-K⁺ ATPase</i> , adenylate cyclase, specific cell surface receptors	basolateral
	5'-nucleotidase, leucine aminopeptidase, glutamyltranspeptidase, alkaline phosphatase	apical
Endoplasmatic Reticulum (ER)	<i>glucose-6-phosphatase</i> , NADPH-cytochrome C reductase, choline phosphotransferase, cytochrome <i>b₅</i>	
Mitochondria	succinate dehydrogenase, <i>cytochrome oxidase</i>	inner membrane
	monoamine oxidase, kynureinine-3-hydrolase	outer membrane
Golgi apparatus	galactosyltransferase, sialyltransferase, NADP-phosphatase	trans and middle regions
	mannosidase II	cis region
Lysosomes	<i>acid phosphatase</i> , glucuronidase, aryl sulphatase	
Endosomes	monensin-activated Mg^{2+} -ATPase in addition to un-degraded internalized ligands,	
	specific GTP binding proteins <i>rab 7</i>	late endosomes
	specific GTP binding proteins <i>rab 4</i> and <i>5</i>	early endosomes
Peroxisomes	catalase, carnitine palmitoyl transferase	
Cytosol	<i>lactate dehydrogenase</i>	

4. Marker enzymes to test fraction purity

To determine the purity of the obtained fractions, markers for the distinct organelles have to be set up. Usually, one uses the activity of a so-called *marker enzyme* that is confined to a certain organelle. Some generally used marker enzymes are listed in table 3. The biochemical results can then be confirmed by studying morphology using an electron microscope. After measuring enzyme activity the enrichment of the organelle in question can be determined with respect to its specific activity [U/mg] with the following formulas:

$$\text{enzyme concentration} / \text{protein concentration} = \text{specific activity}$$

$$\text{e.g.: } (20 \text{ U/ml}) / (4.0 \text{ mg/ml}) = 5.0 \text{ U/mg}$$

After having determined the specific activity for each fraction the fold enrichment of the enzyme can be calculated by dividing the activity in the second sample by that in the first:

$$\text{specific activity (supernatant 1)} / \text{specific activity (homogenate)} = \text{enrichment}$$

$$\text{e.g.: } (5 \text{ U/mg}) / (2.5 \text{ U/mg}) = 2.0 \text{ fold}$$

Besides the fold enrichment it is also important to determine the total activity of the enzyme. For these calculations, the total amount of protein has to be determined first:

$$\text{volume fraction} * \text{protein concentration} = \text{total protein}$$

$$\text{e.g. } (20 \text{ ml}) * (4 \text{ mg/ml}) = 80 \text{ mg}$$

$$\text{specific activity} * \text{total proteins} = \text{total activity}$$

$$\text{e.g.: } (5 \text{ U/mg}) * (80 \text{ mg}) = 400 \text{ U}$$

Finally, the yield and the contamination degree can also be determined:

$$\text{total activity (fraction)} / \text{total activity (homogenate)} * 100 \% = \text{yield}$$

$$\text{e.g.: } (400 \text{ U}) / (2000 \text{ U}) * 100 \% = 20 \%$$

$$\text{specific activity (fraction)} / \text{specific activity (homogenate)} * 100 \% = \text{contamination degree}$$

$$\text{e.g.: } (5 \text{ U/mg}) / (10 \text{ U/mg}) * 100 \% = 50 \%$$

5. Vesiculation test

During cell fractionation, vesicles of different orientation can be formed due to lysis of membranes. These burst membranes can either remain open (*leaky*) or reseal to form *right-side-out* or *inside-out vesicles* [fig.7]. Leaky vesicles are accessible on both sides for molecules that, otherwise, are not able to penetrate the membrane, like ATP or ouabain.

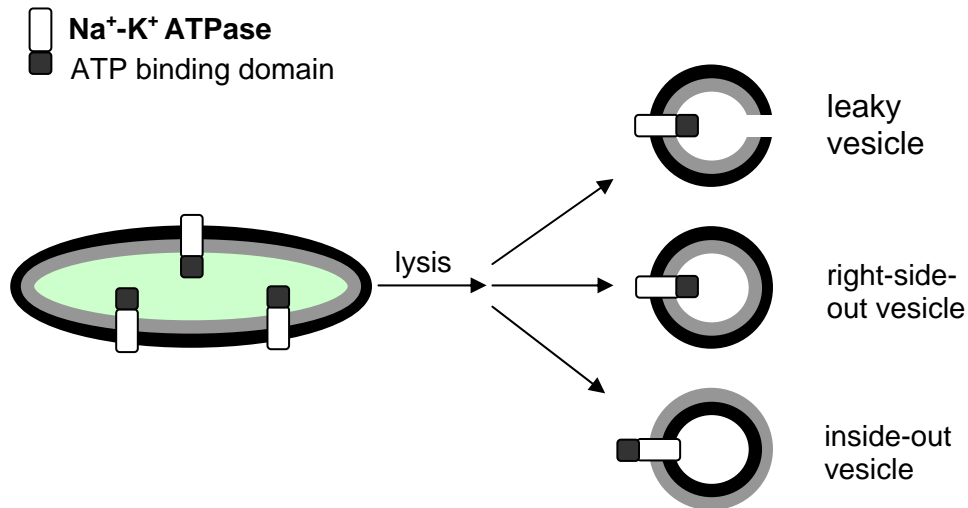


Fig. 7: Formation of different vesicles after membrane lysis

Vesicle orientation can be determined measuring $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity, which depends on the orientation of the enzyme's active site. The use of selective $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase inhibitors in the assay buffer allows to determine the percentage of vesicles that are inside-out (IO), right-side-out (RO), or leaky (L). Ouabain and digitoxigenin are two examples of commonly used inhibitors. Both block the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase by binding to the enzyme while K^+ is bound to it as well, fixing it in the so-called K^+ -conformation [fig.8].

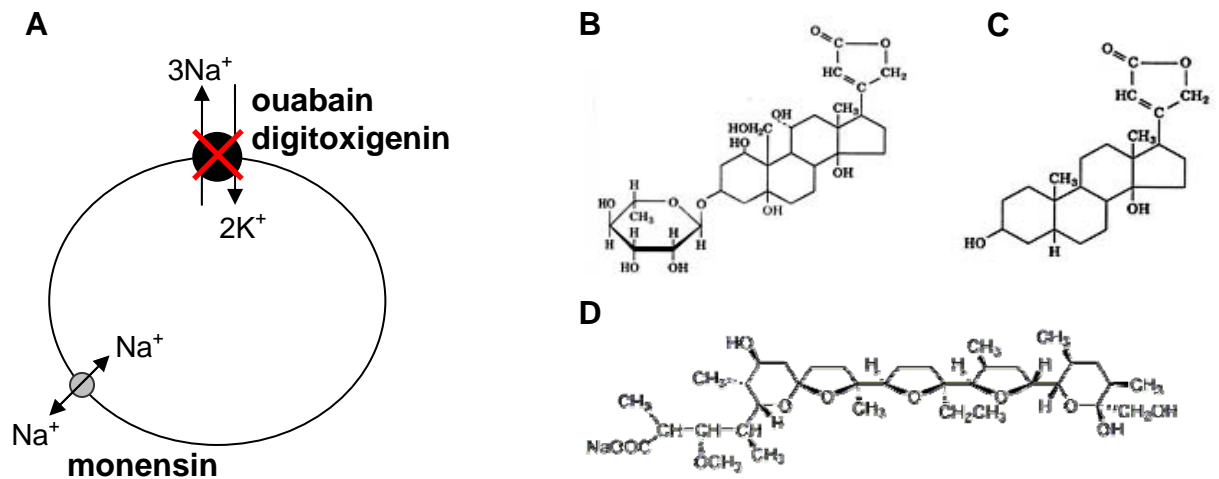


Fig.8: A: Mechanisms by which ouabain, digitoxigenin and monensin influence the Na⁺-K⁺ ATPases. Digitoxigenin and ouabain both block the Na⁺-K⁺ ATPase by binding next to the site where K⁺ does. A big difference between the two substances is that membranes are impermeable to the former whereas they are permeable to the latter. **B:** Ouabain is a cardioactive glycoside that is obtained from the seeds of *Strophanthus grantus* and other plants of the *Apocynaceae*. It is used as an arrow poison or prescribed to treat congestive heart insufficiency (increases heart muscle contraction like glycosides of the *Digitalis* group). **C:** Digitoxigenin is a cardenolide formed by the flower *Digitalis purpurea*. **D:** Monensin is a sodium and proton selective ionophore which allows these ions free passage through membranes. It is formed by *Streptomyces cinnamonensis* and used as an antiprotozoal agent.

Experimental part

1. Outlet

1. 2-3 freshly thawed pig brains have to be homogenized. Thereafter synaptic membranes have to be isolated using differential and gradient centrifugation. Finally, the synaptic membranes are further purified using a PEG-dextran aqueous two-phase system.
2. In order to determine both purity and contamination degree of the different fractions, the enzymatic activity of marker enzymes has to be measured.
3. The orientation of the synaptic vesicles (*upper phase*) has to be determined using a vesiculation test where the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ activity is measured in the presence or absence of inhibitors (ouabain, digitoxigenin, monensin).

2. Preparation of synaptic membranes

2.1. Important

1. All manipulations have to be done at 4°C (always!!!) and as fast as possible to limit enzymatic deactivation and unavoidable proteolysis within the cell homogenate.
2. Prepare 24 aliquots (100 µl each) of the following fractions:
 - Crude homogenate
 - P2 (pellet obtained after the second differential centrifugation)
 - Synaptosomes (interface obtained after gradient centrifugation)
 - Upper phase (obtained after PEG-dextran separation)
 - Lower phase (obtained after PEG-dextran separation)

The samples will be used for the subsequent enzyme and vesiculation tests.

3. It is important to measure the volume of each fraction correctly in order to calculate the total enzyme activity later on.

2.2. Solutions

All solutions have to be freshly prepared in the morning of **the same day** the fractionation is carried out.

solution	composition	quantity to prepare
solution 1	10 % sucrose (weight/volume) 2 mM benzamidine (10 ml of a 0.5 M stock solution) 1 mM EDTA (5 ml of a 0.5 M stock solution) 1 mM PMSF (10 ml of a 250 mM stock solution)	2.5 l
solution 2	Ficoll 7.5% (w/v) dissolved in sol. 5	100 ml
solution 3	Ficoll 13% (w/v) dissolved in sol. 5	100 ml
solution 4	Tris 10 mM pH 7.5 (3 ml of a 1 M stock solution) 2 mM benzamidine (1.2 ml of 500 mM stock) 1 mM EDTA pH 7.4 (0.6 ml of a 0.5 M stock)	300 ml
solution 5	10 % sucrose, fresh (prepare just before use)	1 l
solution 6	7.314 g polyethylene glycol P4000, 8.064 g dextran T-500, 32 g of a 1 M sorbitol solution 0.5 g of a 10 mM Na ₂ EDTA solution 2.5 g 0.2 M phosphate buffer (pH 7.8) Caution: it takes between 2-3 h to dissolve everything!	Adjust to 100 g with dH ₂ O.

To speed up the fractionation procedure as much as possible the following stock solutions are prepared **the day before**:

- 0.5 M benzamidine-hydrochloride hydrate (Fluka, cat# 12073)
M_r = 156.62+aq
Prepare 20 ml and store it at -20°C.
Dilutions: 4 ml/l = 2 mM; 1.2 ml/300 ml = 2 mM
- 0.5 M EDTA pH7.4 (Fluka, cat# 3677)
M_r = 452.24
Prepare 100 ml. Adjust pH to 7.4 with NaOH to dissolve EDTA. Store it at 4°C.
Dilutions: 2 ml/l = 1 mM; 0.6 ml/300 ml = 1 mM
- 250 mM PMSF (Fluka, cat# 93482)
M_r = 174.20
Prepare 20 ml in 100 % EtOH and store 5 ml aliquots at 4°C.
Dilutions: 4 ml/l = 1 mM
- 0.2 M phosphate buffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH 7.8
Solution A: 0.2 M Na₂HPO₄ (prepare 200 ml)
Solution B: 0.2 M NaH₂PO₄ (prepare 25 ml)
A mixture of x ml A and y ml B, diluted to a total volume of 200 ml gives the pH-value of the buffer solution as indicated (store at 4°C):

pH	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
x ml A	92	87.7	81.5	73.5	62.5	21	39	28	19	13	8.5	5.3
y ml B	8	12.3	18.5	26.5	37.5	49	61	72	81	87	91.5	94.7

[Fluka BioChemika MicroSelect, p153; Gomori, 1955]
- 1 M Tris-HCl pH 7.5 (Fluka, cat# 93362)
M_r = 121.14
Prepare 200 ml and store it at 4°C.
Dilutions: 3 ml/300 ml = 10 mM

Substances to weigh **the day before**:

1. Sucrose (D+) 10 % for 2.5 l of solution 1
2. Ficoll 70 (Fluka, cat# 46326) 7.5 % (w/v) for 100 ml of solution 2 (to be dissolved in solution 5)
3. Ficoll 70 (Fluka, cat# 46326) 13 % (w/v) for 100 ml of solution 3 (to be dissolved in solution 5)
4. Sucrose (D+) 10 % for 1 l of solution 5
5. 7.314 g Polyethylene glycol (PEG) P4000 (Fluka, cat,#95904) (to be added to solution 6)
6. 8.064 g dextran T-500 (Amersham, cat# 17-0320) (to be added to solution 6)
7. 1 M sorbitol (D) (Fluka, cat# 85530)
 $M_r = 182.18$
Prepare a 50 ml stock and then weigh 32 g of this stock solution (to be added to solution 6)

Besides the solutions the following things also have to be prepared either **the day before** or just before the experiment:

1. Put several liters of dH₂O to the cold-storage chamber
2. Cool down the centrifuge to 4°C
3. Ice boxes
4. All the rotors (GSA, SV288, SS34) used later on and the Ficoll solutions have to be put to the cold-storage chamber (4°C)
5. Garbage bags

2.3. Procedure

Figure 9 summarizes the fractionation steps listed below to give an overview.

A) Homogenization

1. Clean two pig brains from their meninges (on ice!). Weigh the brains before washing them 3 times with 5 volumes (i.e. 5 times the weight of the brains) of ice cold 10 % sucrose (sol.1) in a 1 l plastic beaker. Add 2 ml of antifoam A (Fluka, cat# 10794) to avoid the formation of foam during the subsequent homogenization.
2. Add two volumes of 10 % sucrose (sol.1). Homogenize 6x during 10 seconds using a polytron homogenizer (small head piece). Start at low-level (stage one on polytron) and increase speed during homogenization.
3. *Measure the volume and store 24 fractions of 0.1 ml.*

B) Prepare Ficoll-gradients (4 tubes)

4. Add 10 ml of solution 3 (Ficoll 13%) to each tube and overlay it carefully with 13 ml of solution 2 (Ficoll 7.5%) using a peristaltic pump (speed 166). Do not keep the gradient for more than 1 hour.

C) Differential centrifugation

5. Centrifuge the homogenate in the oblique bottles with purple caps for 5 min at 3'000 rpm (rotor GSA). Decant the supernatant (S1) very carefully and store it in a clean recipient (4°C). P1 precipitates should not be collected.
6. Centrifuge the supernatant S1 for 15 min at 15'000 rpm (rotor SS34). Balance the centrifuge tubes with sucrose solution if necessary. The supernatant S2 is discarded. If there is some S1 left, fill the same tubes and centrifuge again. Re-suspend P2 in 16 ml of 10 % sucrose (sol.1) using a glass homogenizer.
7. *Measure the volume of P2 and store 24 fractions of 0.1 ml*

D) Density gradient centrifugation

8. Overlay four Ficoll-gradients with 4 ml of P2 suspension (using a Pasteur pipette), balance the tubes with 10 % sucrose (sol.1) if necessary.
9. Centrifuge in a vertical rotor (SS90 or SV-288) for 100 min at 18'500 rpm.
10. Collect the interface band (approx. 10 ml) with a Pasteur pipette and dilute it with two volumes of Tris-EDTA (sol.4).
11. *Measure the volume and store 24 fractions of 0.1 ml.*
12. Centrifuge during 45 min at 18'500 rpm (SS34 rotor)

E) Lysis (osmotic shock)

13. Re-suspend P3 in 2 ml of 10 % sucrose (sol.1) and add 5 volumes of 10 mM Tris-EDTA (sol.4).
14. Keep on ice for 30 min before you centrifuge for 45 min at 18'500 rpm (SS34).

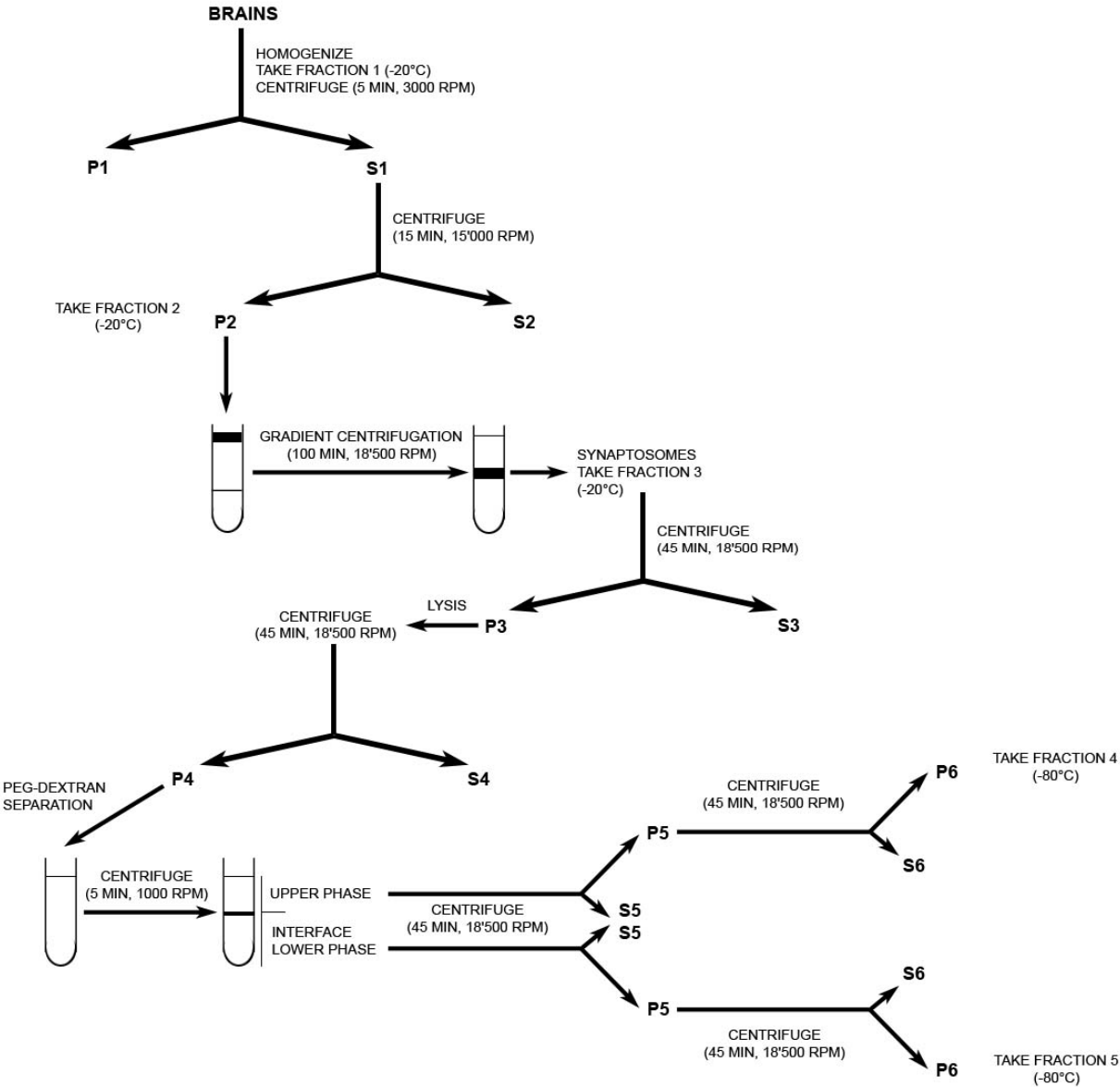
F) Aqueous two-phase separation (PEG-dextran)

15. Mix P4 in 5 ml of 10 % sucrose (sol.1). Add 32 g of PEG-dextran (sol. 6) to a 50 ml Falcon tube and overlay sol. 6 with suspended P4 (Caution: mix well the PEG-dextran solution at 4°C!).
16. Invert the tube 40 times before centrifuging at 1'000 rpm for 5 min at 4°C.
17. Collect the upper and the lower phase (together with interface) separately.
18. Dilute each phase in 5 volumes of 10 % sucrose (sol. 1) and centrifuge for 45 min at 18'500 rpm (SS34).
19. Wash the pellets with 20 ml of 10 % sucrose (sol. 1) and centrifuge for 45 min at 18'500 rpm (SS34)
20. Re-suspend the pellets in 3 ml of 10 % sucrose (sol. 5) using a glass homogenizer.
21. *Measure the volumes and keep 12 fractions of 0.1 ml and 2x 0.9 ml of each phase.*

G) Summary of the fractions to be frozen

- 20°C: raw homogenate
- 20°C: P2 (pellet obtained after the second differential centrifugation)
- 20°C: synaptosomes (Ficoll interface)
- 80°C: upper phase (obtained after the aqueous two-phase separation)
- 80°C: lower phase and interphase (obtained after the aqueous two-phase separation)

Fig. 9: Schematic overview of the protocol for the fractionation of subcellular organelles and membranes of pig brains



3. Purity tests: evaluation of the results using enzymatic assays

The purity of the different fractions will be determined by measuring the enzyme activity of the following marker enzymes within each fraction: glucose-6-phosphatase (microsomes), acid phosphatase (lysosomes), cytochrome oxydase (mitochondria), lactate dehydrogenase (cytoplasm), ouabain-sensitive Na^+ - K^+ ATPase (cellular membranes). Since the assays of the two first enzymes are based on the measurement of free phosphate they will be carried out together. All enzymatic tests listed above as well as a Bradford protein estimation are carried out on all five fractions (listed under 2.3G) to determine the degree of contamination of each fraction.

3.1. Bradford protein assay [Bradford, 1976]

The Bradford assay (BIO-RAD, cat# 500-0006) will be used to determine the amount of total protein within each fraction. Make a standard curve with 0, 1, 2, 5, 10, and 20 μg BSA. All the samples have to be mixed well and incubated at room temperature for 10 to 20 min before measuring the absorption at 595 nm. For more details see the manufacturer's manual.

BSA standard curve	samples
x μl of BSA [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	x μl of fraction
800-x μl dH ₂ O	800-x μl dH ₂ O
200 μl Bradford reagent	200 μl Bradford reagent

3.2. Glucose-6-phosphatase

Solutions:

1. 0.1 M glucose-6-phosphate (sodium salt, Fluka, cat# 49280, store at -20°C)
2. 35 mM L-histidine-HCl buffer pH 6.5 (Fluka, cat# 53369, store at 4°C)
3. 10 mM EDTA
4. Substrate solution: Mix 0.1 M glucose-6-phosphate, 35 mM histidine buffer pH 6.5, and 10 mM EDTA in the ratio of 2:5:1
5. Control solution: Mix 35 mM histidine buffer pH 6.5, and 10 mM EDTA in the ratio of 7:1
6. 8 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA, store at 4°C)
7. 2.5 % (w/v) ammonium molybdate (Fluka, cat# 09878) in 2.5 M H_2SO_4 (RT)
8. Reducing solution: 0.5 g 1-amino-2-naphthol-4-sulphonic acid, 1.0 g anhydrous Na_2HSO_4 in 200 ml NaHSO_3 (*Caution*: must be freshly prepared!)

Experimental procedure [Aronson and Touster, 1974; Rickwood, 1992, p371-72]:

1. Add 50 μl of extract to 0.45 ml of substrate solution (sol.4) and control solution (sol.5).
2. Prepare also a reagent blank containing 0.45 ml of sol.4 and 50 μl of sol.2 to determine the background hydrolysis of the substrate. At the same time prepare a set of standards of known phosphate concentration using monobasic potassium phosphate.
3. Incubate at 37°C for 30 min.
4. Stop the reaction by adding 2.5 ml of cold TCA and keep the acidified sample for 20 min at 0°C .
5. Centrifuge at 3500 rpm for 10 min at 4°C .

6. Transfer 1.0 ml of supernatant to a glass test tube
7. Add 1.15 ml of distilled water, 0.25 ml ammonium molybdate solution, and 100 μ l of the reducing solution.
8. Heat all tubes (assay and control tubes for each sample and reagent blank) at 100°C for 10 min.
9. Cool and read the absorbance at 820 nm against a buffer blank.
10. Correct each assay tube absorbance for the absorbance in the control and reagent blank tube.

Note: Phosphate contamination from tubes and reagents can falsify the result. Glass tubes and containers must be acid washed and then rinsed 2-3 times with distilled water. Some plastics are also unsuitable due to phosphate contaminations.

3.3. Acid phosphatase

Solutions:

1. 16 mM *p*-nitrophenyl-phosphate (Fluka, cat# 71768, store at -20°C)
2. 180 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 (RT)
3. 0.25 M NaOH
4. Reaction buffer: mix equal volumes of sol.1 and sol.2
Caution: Prepare freshly before use!

Experimental procedure [Estrom, 1961; Walter and Schütt, 1970; Bergmeyer *et al.*, 1974; Rickwood, 1992, p375]:

1. Pre-heat the reaction buffer (sol. 4) to 37°C
2. Add 50 μ l of extract (0.1-1.0 mg/ml protein), or nothing for the blank, to 200 μ l of reaction buffer
3. Incubate the mixture at 37°C for 60 min and stop the reaction by addition of 0.6 ml sol.3
4. Add 50 μ l extract to the blank
5. Centrifuge 1 min at 13'000 rpm
6. The absorption of the supernatant is read at 405 nm against the blank
7. The amount of product formed is determined either by calculation ($\epsilon_0 = 9620$) or from a standard curve of *p*-nitrophenol (0.1 mM).

3.4. Cytochrome oxidase

Solutions:

1. 0.1 M phosphate buffer pH 8.0
2. 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 splashed in nitrogen
3. 1 % (w/v) cytochrome C (Sigma, cat# C-2436) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (sol. 2)

Experimental procedure [Hodges and Leonard, 1974; Wharton and Tzagoloff, 1967; Duncan and Mackler, 1966; Cooperstein and Lazarow, 1951; Erecinska and Wilson, 1978]:

1. Add some (tip of spatula) sodium dithionite (Fluka, cat# 71699) to 3 ml of sol. 3
2. Pre-equilibrate an Econo-PacTM 10DG column (BIO-RAD, cat# 732-2010) with sol. 2 according to manufacturer's instructions
3. Apply the mixture containing the reduced cytochrome C on the column to separate it from the sodium dithionite (the pores retain everything smaller than 6000 Daltons; cytochrome C has 12'400 Daltons).
4. Collect the liquid
5. Add 50 μ l reduced cytochrome C (directly from the column) and 10 μ l extract to 1 ml phosphate buffer pH 8.0 (sol. 1)
6. Measure the absorption at 550 nm every 30 s for 5 min
 $\epsilon_0 = 19'000 \text{ Mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$

3.5. Lactate dehydrogenase (LDH)

Solutions:

1. 50 mM phosphate buffer pH 7.7 containing 7 mg sodium pyruvate per 100 ml
2. NADH (25 mg in 3 ml 1 % NaHCO₃)

Experimental procedure:

1. Only use PMMA cuvettes (Plastibrand, cat# 759115)
2. Mix 1.5 ml reaction buffer and 50 μ l extract
3. Set the spectrophotometer to zero (with reaction buffer / extract mixture)
4. Add 25 μ l NADH, mix, and immediately read the absorption at 340 nm every 30 s for 5 min
 $\epsilon_0 = 6'220 \text{ Mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$

3.6. ATPase

Solutions:

1. 0.4 M Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 30 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 3 mM EDTA
2. 0.002 M 2,4-dinitrophenol (dissolve in EtOH and store aliquots at -20°C)
3. 0.06 M ATP (dissolve in water and store aliquots at -20°C)
4. 22.5 % (w/v) trichloroacetic acid (dissolve in water and store at RT or 4°C)
5. 2.5 N H₂SO₄ (dissolve in water and store at RT)
6. 10 % (w/v) ammonium molybdate (dissolve in water) (Fluka, cat# 09878)
7. 4:1 isobutanol/petrol-ether (boiling point: 100-120°C)
8. 1 N H₂SO₄ in EtOH
9. 0.05 % SnCl₂ in 2.5 N H₂SO₄ (to be prepared at the last moment)

Experimental procedure:

1. Prepare a standard curve using potassium phosphate (monobasic; ranging from 100 nmoles to 1 μmoles phosphate in 100 μl H₂O) diluting it in 200 μl TCA and 150 μl H₂O. Subsequently, treat the samples as described in step 4
2. Prepare a blank using water
3. *Incubation:* Mix 650 μl reaction buffer (sol. 1) with 50 μl sol. 2, 50 μl sol. 3 and 250 μl H₂O. Incubate at 37°C for 5 min before adding 50 μl of extract. Incubate again for 10 min at 37°C before stopping the reaction with 250 μl sol. 4. Put it on ice for 15 min and centrifuge down the precipitate.
4. *Extraction:* 400 μl of the supernatant are mixed with 100 μl sol. 5 before 100 μl sol. 6 are added. The solution is mixed well before 1 ml sol. 7 is added. Mix it again and let it stand for 15-30 min to separate phases. Take out 700 μl of the organic phase (upper) and mix it with 700 μl sol. 8. Add 100 μl sol. 9, mix well, and incubate for 15 min at RT. Read the absorption at 650 nm.

4. Vesiculation test

4.1. Principle [Carafoli and Caroni, 1983]

The Na⁺-K⁺ATPase activity is measured under different conditions:

- a. In the presence of SDS
- b. In the presence of monensin
- c. In the presence of digitoxigenin

In the absence of a detergent, the activity of ouabain sensitive Na⁺-K⁺ATPase is exclusively measured on leaky vesicles.

a. *In the presence of SDS [0.3 mg/ml]:*

SDS opens membranes. The total Na⁺-K⁺ATPase activity is measured after 30 min of pre-incubation of the membranes [0.5 mg proteins/ml] at room temperature in the HEPES-Tris buffer (pH 7.1). This suspension is then diluted 50x with the reaction buffer. The liberated phosphate group (ATP → ADP + P_i) is measured according to the method of Stewart.

b. *In the presence of monensin:*

Monensin is a sodium ionophore which allows the free passage of sodium through membranes. In consequence, it retardates the exit of potassium from inside-out vesicles thus allowing to longer keep active Na⁺-K⁺ATPases located on these vesicles. Na⁺-K⁺ATPases located on right-side-out vesicles, on the other hand, are not active under such conditions because their ATP-binding site is inside and thus not accessible for the ATP provided with the buffer.

c. *In the presence of digitoxigenin:*

Digitoxigenin is membrane-permeable and blocks Na⁺-K⁺ATPases located on inside-out vesicles.

4.2. Solutions

1. Pre-incubation buffer

Buffer A: 20 mM HEPES pH 7.1

Buffer B: 20 mM HEPES pH 7.1 + 0.3 mg/ml SDS

2. Reaction buffer C (initial conditions)

a. 75 mM Tris and 1 mM EGTA pH 7.4

b. 1.2 M sodium chloride

c. 10 mM magnesium chloride

d. 10 mM ATP

Buffer C = 6 ml (sol. a) + 3 ml (sol. b) + 3 ml (sol. c) + 3 ml (sol. d)

Caution: to be prepared just before use!!!

3. Effectors

a. 10 mM ouabain (Fluka, cat# 75640)

Dissolve ouabain in warm H₂O and store aliquots at -20°C. **Caution:** sensitive to light!

b. 50 mM monensin (Fluka, cat# 69864)

Dissolve monensin in 100 % EtOH and store aliquots at -20°C.

c. 100 μM digitoxigenin (Fluka, cat# 37020)

Dissolve digitoxigenin in 100 % EtOH and store aliquots at -20°C.

4. Stop solution

0.05 N perchloric acid (Fluka, cat# 30755)

5. 1 % malachite green solution in water and store at -20°C
6. Triton X-405
Dilute 5 ml of Triton-X405 (70 % solution) to 100 ml.
With age, the Triton solutions become inhibitory to color development and reduce the linearity of the standard curve. The stock 70 % solution should be replaced yearly [Stewart, 1974].
7. Stewart buffer
4 mM ammonium molybdate sodium salt (Fluka, cat# 09878)
0.8 N perchloric acid (Fluka, cat# 30755)
0.6 mM malachite green (Fluka, cat# 32745)
0.032 % Triton X-405 (Fluka, cat# 93425)
Dissolve 6.0 g of ammonium molybdate tetrahydrate in about 600 ml water. Mix in 100 ml of perchloric acid (60-62 %). Add 30 ml of malachite green solution and make up to a final volume of 1000 ml. Let the mixture stand for 30 min or more, filter through Whatman No. 1 paper. To the filtrate add 3.0 ml of Triton-X405 solution. Stable at least 2 months at 5°C in the dark. Before analysis add another 6 ml of Triton X-405 solution. Color reagent containing 9 ml of Triton solution/1000 ml may need re-filtering after 2 days [Stewart, 1974].

4.3. Experimental procedure [Kodama *et al.*, 1986; Gonzalez-Romo *et al.*, 1992]

The vesiculation test is only carried out with the upper phase, containing the Synaptosomes, in duplicates.

A. Pre-equilibration of the vesicles

The vesicles (ca. 1-2 mg/ml) are diluted to 1 mg/ml in either reaction buffer A or B (containing SDS) for 30 min at RT. In case the vesicles have a lower protein concentration, you should skip this step and continue under C.

B. ATPase activation

The pre-equilibrated vesicles are incubated for 10 min at 37°C in buffer C with or without effectors according to the following scheme (volumes in µl):

	1	2	3	4	5	6
buffer C	250	250	250	250	250	250
H₂O	230	180	180	130	230	180
vesicles in A	20	20	20	20	—	—
vesicles in B	—	—	—	—	20	20
ouabain	—	50	—	—	—	50
monensin	—	—	50	50	—	—
digitoxigenin	—	—	—	50	—	—

Prepare also a blank containing only buffer A or B for each of the 6 reactions. Make at least duplicates. Increase the amount of vesicles if necessary and adapt SDS.

C. ATPase activation for low protein concentrations

Pre-equilibrate 40 μ l of extract with 4 μ l of SDS [1.5 mg/ml] for 10 min at 37°C for experiments 5 and 6. The blank is prepared as described under B.

	1	2	3	4	5	6
buffer C	250	250	250	250	250	250
H ₂ O	210	160	160	110	206	156
Extract	40	40	40	40	40	40
SDS [1.5 mg/ml]	—	—	—	—	4	4
ouabain	—	50	—	—	—	50
monensin	—	—	50	50	—	—
digitoxigenin	—	—	—	50	—	—

D. Phosphate determination

The reaction is stopped after 10 min with 2.5 ml 0.05 N perchloric acid. Centrifuge the mixture to eliminate eventual precipitates.

Mix 250 μ l supernatant with 750 μ l Stewart buffer and read the absorption at 640 nm against the corresponding blanks.

4.3. Explanations

A. Measurement 1: without detergent / without inhibitor

- All ATPases are measured on leaky (L) and inside-out (IO) vesicles.
- ATPases on right-side-out (RO) vesicles are not measured because ATP binding sites are located inside the vesicles.

→ $[ATPases L] + [ATPases IO]$

B. Measurement 2: without detergent / with ouabain

- All ATPases except the ouabain-sensitive Na⁺-K⁺ATPase are measured on L vesicles.
- All ATPases are measured on IO vesicles because membranes are impermeable to ouabain.
- ATPases on RO vesicles are not measured because ATP binding sites are located inside the vesicles.

→ $([ATPases L] - [Na^+-K^+ATPases L]) + [ATPases IO]$

C. Measurement 3: without detergent / without inhibitor / with monensin

- Monensin allows the free passage of Na⁺ across the membranes. Since Na⁺ ions choose the easiest way to cross membranes K⁺ ions take longer to get out of the vesicles. In consequence, the Na⁺-K⁺ATPase is active much longer.
- All ATPases are measured on L and IO vesicles.
- ATPases on RO vesicles are not measured because ATP binding sites are located inside the vesicles.

→ $[ATPases L] + [ATPases IO]$

D. Measurement 4: without detergent / with digitoxigenin / with monensin

- Membranes are permeable to digitoxigenin, which blocks the Na⁺-K⁺ATPase.
- Monensin slows down Na⁺-K⁺ATPases. Consequently, digitoxigenin has enough time to cross the membranes of IO vesicles and to block their Na⁺-K⁺ATPases.
- Digitoxigenin blocks Na⁺-K⁺ATPases on L vesicles.

- ATPases on RO vesicles are not measured because ATP binding sites are located inside the vesicles.

$$\rightarrow ([ATPases\ L] - [Na^+-K^+ATPases\ L]) + ([ATPases\ IO] - [Na^+-K^+ATPases\ IO])$$

E. Measurement 5: with SDS / without inhibitor

- SDS makes the membranes permeable for ATP.
- All ATPases are measured on L, RO, and IO vesicles.

$$\rightarrow [ATPases\ L] + [ATPases\ IO] + [ATPases\ RO]$$

F. Measurement 6: with SDS / with ouabain

- SDS makes the membranes permeable for ATP and ouabain
- Ouabain blocks the Na^+-K^+ ATPases on all vesicles.

$$\rightarrow ([ATPases\ L] - [Na^+-K^+ATPases\ L]) + ([ATPases\ IO] - [Na^+-K^+ATPases\ IO]) + ([ATPases\ RO] - [Na^+-K^+ATPases\ RO])$$

These measurements allow you to calculate the percent of vesicles that are L, IO, and RO within the fraction “upper phase”.

Calculations:

$$1 - 2 = Na^+-K^+ATPases\ L$$

$$3 - 4 = Na^+-K^+ATPases\ L + Na^+-K^+ATPases\ IO$$

$$5 - 6 = Na^+-K^+ATPases\ L + Na^+-K^+ATPases\ IO + Na^+-K^+ATPases\ RO = 100\ %$$

Literature

1. Aronson NN and Touster O (1974), *Methods Enzymol.* **31**:90
2. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M (1974), *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU), 2nd ed., Academic Press, Inc., New York, **1**:495-496
3. Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
4. Caroni P and Carafoli E (1983): The regulation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger of heart sarcolemma. *Eur J Biochem.* **132**:451-460
5. Cooperstein J and Lazarow A (1951), *J. Biol. Chem.*, 665-670
6. Davies EM (1988): Protein assays: A review of common techniques. *Am. Biotech. Lab.*, 28-37
7. Duncan HM and Mackler B (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**:1694-
8. Engstrom L (1961), *Biochim. Biophys. Acta* **52**:36
9. Erecinska M and Wilson DF (1978): Cytochrome C oxidase: A synopsis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**(1):1-14
10. Evans WH. Organelles and membranes of animal cells. In Findlay JBC, Evans WH (eds): *Biological Membranes: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1987: 1-36
11. Fisher D and Sutherland IA (ed.) (1989): Separations using aqueous phase systems. Applications in *Cell Biology and Biotechnology*. Plenum Press, New York
12. Fluka catalog BioChemika MicroSelect
13. Gomori G (1955), *Methods Enzymol.*, **1**:143
14. Gonzalez-Romo P, Sanchez-Nieto S, Gavilanes-Ruiz M (1992): A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem*, Feb. 1, **200**(2):235-238
15. Gornall AG, Bardawill CS, David MM (1957)
16. Griffith OM (1979), *Ultracentrifuge rotors: a guide to their selection*. Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA, USA
17. Hinton RH and Dobrota M (1976): Density gradient centrifugation. North Holland, Amsterdam
18. Hodges RK and Leonard RT (1974), *Meth. Enzymol.*, **32** :398 (Biomembranes, Part B)
19. Kodama S, Tamaki N, Mukai T, Yonekura Y, Torizuka K, Suzuki Y, Tamaki S, Nohara R, Kambara H, Kawai C (1986): Asynchronous wall motion in patients with ischemic heart disease assessed by higher-order harmonics of the Fourier series. *J Cardiogr Suppl*, **8**:25-32, Japanese
20. Larsson, C. (1985), *Modern methods of plant analysis*, Springer, Berlin, edited by Linskins HF and Jackson JF, **1**:85-104
21. E. Layne (1957): Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.*, **3**:447 - 454
22. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**:265
23. Marshall T and Williams K (1991): Drug interference in the Bradford and 2,2-bicinchoninic acid protein assays. *Anal. Biochem.*, **198**:352-354
24. OptiPrepsTM Reports, (2000), **3**

25. Read S, Northcote D (1981): Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, **116**:53-64
26. Rickwood D (1992): Preparative Centrifugation: a practical approach. Oxford University Press, New York, USA, ISBN 0 19 96320 1 (h/b) → available in Prof. Conzelman's office
27. Sharpe PT (1988), *methods of cell separation*, laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Burdon RH and van Knippenberd (eds.), Elsevier, Amsterdam, 107-142
28. Smith PK *et al.* (1985): Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**:75-85
29. Stewart DJ (1974): Sensitive automated methods for phosphate and (Na⁺ plus K⁺)-ATPase. *Analytical Biochemistry*, **62**(2):349-364
30. Stoscheck CM (1990): Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, **182**:50-69
31. Walter K and Schütt Ch in Bergmeyer HU (ed) (1970): Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage, Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim / Bergstrasse, 818-821
32. Weichselbaum TE (1946), *Am. J. Clin. Pathol. Suppl.* 10, 40
33. Wharton DC and Tzagologg A (1967), *Meth. Enzymol.*, **10**:245-50
34. www.ruf.rice.edu/~bioslabs/bios211/index.html

9.3. Ancien protocole (2004)

FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

INTRODUCTION

- 1- *Protéases & Inhibiteurs de protéases*
- 2- *Milieux de séparation*
- 3- *Centrifugation*
- 4- *Méthode générale de fractionnement cellulaire & fractionnement dirigé*
- 5- *Tests de pureté*
- 6- *Séparation de phases*

PARTIE EXPERIMENTALE

- 1- *Objectifs*
- 2- *Préparation des membranes synaptiques*
 - a- *Homogénat*
 - b- *Centrifugation différentielle*
 - c- *Centrifugation sur gradient*
 - d- *Lyse (Choc osmotique)*
- 3- *Tests de pureté*
- 4- *Tests de vésiculation*

Introduction

Le fractionnement cellulaire permet de localiser les diverses activités métaboliques de la cellule, d'évaluer le rôle de chaque organite intracellulaire, de faciliter la purification d'enzymes ou de constituants cellulaires définis. Il permet aussi l'étude de la biogenèse des divers composants cellulaires, du transport intracellulaire, de l'assemblage des membranes et des facteurs de régulation et de contrôle du dynamisme cellulaire.

La membrane cellulaire est d'abord rompue mécaniquement et les constituants intracellulaires sont purifiés par centrifugation. Au cours de la rupture cellulaire, les organites doivent être maintenus intacts, y compris les constituants étroitement reliés entre eux ou à la membrane cellulaire (réticulum endoplasmique, Golgi...). Diverses méthodes sont utilisées pour cette première opération fondamentale (homogénéisation -avec piston en téflon, en verre, en métal, ultrasonication, usage de détergents, rupture par friction des billes de verre, passage forcé dans une seringue à travers une membrane de faible porosité...) selon le type de tissu et selon le résultat désiré.

Protéases:

Un problème engendré par la rupture cellulaire est la libération et l'activation d'enzymes hydroélectriques (protéases). Des enzymes cytosoliques membranaires ou lysosomales, préalablement compartimentés, sont libérés. L'action est bloquée par l'addition d'un inhibiteur (table 1) dans le milieu et en conduisant toutes les opérations à froid et rapidement. Des ions bivalents (Ca^{2+}) sont à éviter, car ils activent certaines protéases, bien que la NMgCl_2 1-5 empêche souvent une rupture des noyaux

Table 1. Inhibiteurs de protéases

Inhibiteur	Spécificité	Concentration normale	Commentaire
Amastatin (epiamastatin)	Amino exopeptidase	1 – 10 µg / ml	
Antipain	Papain, cathepsin B, Trypsin	1 – 10 µg / ml	
Bazamidizine	Serine Proteases	Up to 10 mM	
Benzylmalic acid	Carboxypeptidase	1 – 10 µg / ml	
Bestatin (epibestatin)	Amino exopeptidases	Up to 1 µg / ml	
Chymostatin	Cathepsin B, Chymotrypsin, Papain	1 – 10 µg / ml	
Disopropylphosphorofluoridate (DFP)	Serine proteases	Up to 0.1 mM	Very toxic
Dioprotin A & B	Dipeptidylamino peptidases	10 – 50 µg / ml	
Elastatinal	Elastase	10 µg / ml	
EDTA	Metalloproteases	0.1 – 5 mM	Useful general inhibitor
Leupeptin	Cathepsin B, Papain, Plasmin, Trypsin	1 – 100 µg / ml	
Pepstatin B	Carboxyl proteases (Pepsin, Renin)	1 – 10 µg / ml	Soluble in EtOH or MeOH rather than water
Phenylmethylsulphonyl Fluoride (PMSF)	Serine proteases	Up to 0.1 mM	Limited half-life in aqueous buffers. Useful general inhibitor
Phosphoramidon	Collagenase, thermolysin	1 – 10 µg / ml	

Milieux de séparation :

Les milieux de séparation des composants cellulaires sont basés sur les différences des vitesses de sédimentation (fonction du poids, de la taille et de la forme de l'organite) et de la densité... La séparation se fait généralement dans le sucrose (Ultra pur) le percoll (silice enrobée de polyvinylpyrrolidone), de métrizamide ou le Nycodenz (milieux de gradients iodés) ou ficoll, selon la viscosité, l'osmolarité de la densité désiré. La complexité des composants subcellulaires de densité et de coefficients de sédimentation similaires requiert une combinaison de ces milieux selon les cas. Les membranes plasmiques sont mieux séparées dans un mélange PEG-dextran, pour lequel elles présentant une affinité particulière (Séparation de phases).

Centrifugation

Beaucoup d'expériences en biochimie exigent une ou plusieurs étapes de centrifugation. Cette technique permet d'exposer des échantillons à de fortes accélérations qui permettent la séparation des constituants. On peut ainsi fractionner une préparation en un sédiment (ou culot), constitué de matériel plus ou moins solidement entassé dans le fond du tube à centrifuger, et en un surnageant qui sera le liquide résiduel au-dessus du sédiment.

On distingue :

- a- **La centrifugation à l'équilibre** : la particule en question est centrifugée à une vitesse et durant un temps tels qu'elle soit en équilibre avec un milieu de densité/viscosité donnée ; ce type de centrifugation est généralement réalisé dans un gradient de densité continu. Cette

technique est employée, par exemple, pour caractériser une protéine pure, mais pas pour un fractionnement cellulaire.

- b- La centrifugation différentielle** : la particule est centrifugée pour une courte période dans un milieu standardisé à fin de la séparer grossièrement d'autres composants de densités très différentes ; on ne cherche pas à atteindre l'équilibre
- c- La centrifugation sur gradient** : le gradient peut être continu ou discontinu. Généralement un gradient discontinu est employé lors de centrifugation différentielle.
- d- La centrifugation de zone** : elle permet une séparation très fine d'organites de densités voisines (en gradient continu & presque jusqu'à l'équilibre).

Les organites intracellulaires sont séparés par centrifugation différentielle, sur gradient discontinu.

Table 2 : Forces nécessaires pour sédimenter les composants cellulaires

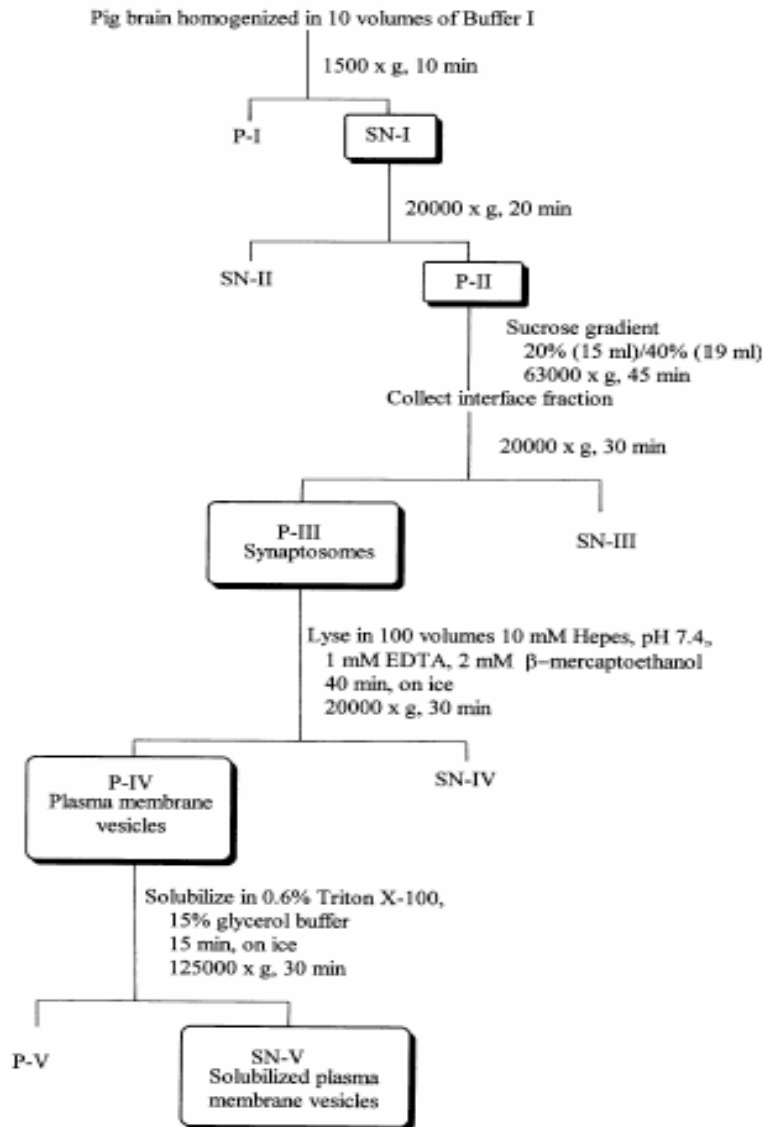
Cell Component	x g _{max}	Time (min)	g / min
Whole cells	500	5	500
Nuclei	500	7	3500
Chloroplasts	2000	2	4000
Mitochondria	6000	15	90 000
Golgi apparatus Dictyosomes	10 000	20	200 000
Plasma membrane	16 000	20	320 000
Peroxisomes	17 500	20	350 000
Endoplasme reticulum Besicles (microsomes)	17 500	20	350 000
Microvesicles	20 000	20	400 000

Les valeurs indiquées sont approximatives, correspondent à des composants cellulaires suspendus dans une solution de Sucrose 0.25 M et centrifugés dans des tubes standards en utilisant un retord vertical.

Méthode générale

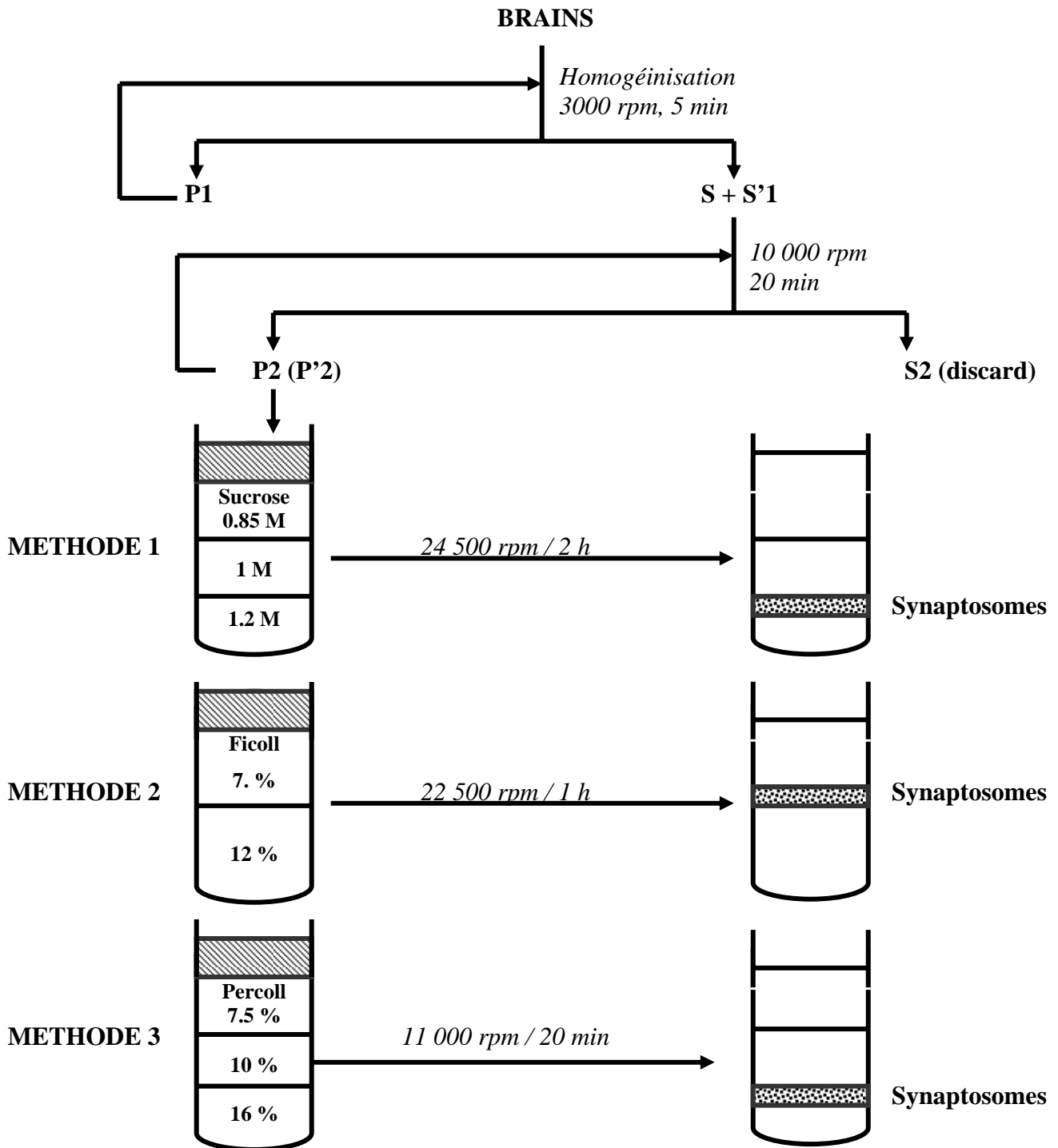
Une méthode classique de fractionnement cellulaire suit le schéma suivant. Diverses adaptations sont nécessaires, particulièrement lors d'un fractionnement dirigé. La préparation simultanée de toutes les fractions cellulaires, pratiquement possible, est très délicate ; dans la plus part des cas, on ne s'intéresse qu'à une fraction cellulaire bien déterminée.

Schéma 1 : fractionnement cellulaire, méthode générale



Fractionnement dirigé

Ce type de fractionnement a pour but d'obtenir les membranes des terminaisons synaptiques dans un minimum de temps. Le tissu nerveux est composé de neurones soutenus par des cellules gliales. Les terminaisons pré- et post-synaptiques ainsi que les vésicules intracellulaires stoquant les neurotransmetteurs (synaptosomes) peuvent être obtenues par l'une des méthodes de séparation illustrées ci-dessous. Dans le cadre de notre TP, la **méthode 2** sera employée,



Tests de pureté

Les résultats d'un fractionnement cellulaire sont évalués par le dosage d'enzymes marqueurs. En général, on combine cette étude avec une étude morphologique, au microscope électronique de la fraction obtenue. Les enzymes marqueurs d'organites cellulaires sont indiquées dans le tableau ci-après :

Fraction		Marker	EC number
Plasma membrane	baso-lateral	Adenylate cyclase Na ⁺ K ⁺ ATPase	4.6.1.1 3.6.1.37
	apical	5'-nucleotidase leucineaminopeptidase	3.1.3.5 3.4.11.1
Endoplasmic reticulum		glucose-6-phosphatase NADPH-cyt.C reductase epoxide hydrolase	3.1.3.9 1.6.2.4 3.3.2.3
Golgi apparatus <i>trans</i> & middle region		galactosyltransferase NADP-phosphatase	2.4.1.38 3.6.1.22
Mitochondria	inner membrane	succinate deshydrogènase cytochrome oxydase	1.3.99.1 1.9.3.1
	outer membrane	monoamine oxydase kynurenine-3-hydroxylase	1.4.3.4 1.14.13.9
Lysosomes		acid phosphatase β -glucoronidase	3.1.3.2 3.2.1.31
Endosomes		monensin activated Mg ²⁺ ATPase	3.6.1.3
Peroxisomes		catalase carnitine palmitoyl transferase	1.11.1.6 2.3.1.21
Cytosol		lactate deshydrogenase	1.1.1.22

Séparation de phases

La séparation de phases dans le système PEG-dextran permet de purifier rapidement les membranes plasmiques, exploitant ainsi diverses propriétés de celles-ci (charge électrique, densité, poids & hydrophobicité). La méthode est basée sur une répartition différentielle des composants d'un échantillon entre trois compartiments d'un système à deux phases (phase supérieure, interface & phase inférieure). L'affinité pour la phase supérieure des organites cellulaires est comme suit : réticulum endoblastique < mitochondries < lysosomes < appareil de Golgi < membrane plasmique.

Cette méthode permet donc aisément de séparer p. ex. les mitochondries des membranes cellulaires. La force ionique, l'osmolarité, le pH et la température ont une énorme influence sur la pureté de la préparation de membranes.

FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Objectifs

- 1- Deux cerveaux de porc sont fraîchement extraits (ou décongelés), puis homogénéisés et les membranes synaptiques sont partiellement purifiées par centrifugation différentielle et centrifugation sur gradient de Ficoll. Les membranes synaptiques sont ensuite purifiées par séparation de phase sur PEG-dextran.
- 2- On analyse ensuite la pureté des membranes ainsi obtenues par un dosage enzymatique des enzymes marqueurs, en vue de définir le taux de contamination par des divers organites cellulaires
- 3- Par un test de vésiculation, nous allons déterminer l'orientation des vésicules synaptiques.

Important :

- 1- *L'expérience doit être conduite le plus rapidement possible et toujours à froid (4°C), pour limiter la désactivation enzymatique et la protéolyse inévitables sur un extrait de cellules cassées*
- 2- *Conserver 14 tubes eppendorf de 0.1 ml (sur glace) des fractions suivantes :*
 - a- *Homogénat brut*
 - b- *P2 (culot de la centrifugation à 14000 rpm x10 min, après resuspension dans 16 ml de sucrose 10%),*
 - c- *Synaptosomes (interface Ficoll 7.5 % -13 % avant la séparation de phase, après dilution dans 2 volumes de Tris-EDTA)*
 - d- *Séparation de phase (PEG-dextran), phase supérieure,*
 - e- *Séparation de phase (PEG-dextran), phase inférieure + interphase.*
Congeler chacune des fractions à -20DC et la phase supérieure de la séparation de phase par congélation dans l'azote liquide.
- 3- *Mesurer chaque fois les volumes des diverses fractions, en vue d'en calculer l'activité totale.*

PREPARATION DES MEMBRANES SYNAPTIQUES

Solutions

Toutes les solutions sont préparées le jour même, le matin en arrivant, (pesées à faire la veille) et dissoutes dans l'eau froide (4°C).

- 1- Sucrose 10 % 1 litre contenant 2 mM Benzamidine, 1 mM EDTA et 1mM PMSF
- 2- Ficoll 7.5 % dans sucrose 10 %
- 3- Ficoll 13 % dans sucrose 10 %
- 4- Tris 10 mM pH 7.5 contenant 2 mM Benzamidine et EDT A 1 mM pH 7.4
- 5- Sucrose 10 % : 1 litre,
- 6- Solution PEG-dextran: 7.314 g Polyéthylenglycol P4000, 8.064 g dextran T-500, 32 g d'une solution sorbitol 1 M, 0.5 g d'une solution Na₂EDTA 10 mM et 2.5 g de tampon phosphate 0.2 M pH 7.8. Ajuster à 100 g avec H₂O (env. 49.622 g). Temps de dissolution: 2-3 heures.

Préparation

1. Refroidir la centrifugeuse Sorvall
2. 2 grands bacs à glace
3. Sacs-poubelles
4. Mettre au froid : rotor (GSA, SS90, SS34), pompe péristaltique et balance.

Préparation des gradients

5. 10 ml de Solution 3 (Ficoll 13 %) (avec pipette), superposer délicatement 13 ml de Solution 2 (Ficoll 7.5 %) (avec pompe péristaltique). À garder maximum 1 heure.

SOLUTIONS

Solutions à préparer :

- * Benzamidine hydrochloridacée hydrate, 20 ml
Stock 500 mM dans H₂O
Conserver à -20°C
- * EDTA, 100 ml
Stock 500 mM dans H₂O
Attention : Ajuster à pH 7.4 avec du NaOH sinon l'EDTA ne se dissout pas
Conserver à 4°C
- * PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 20 ml
Stock 250 mM dans de l'EtOH absolu
Préparer des aliquôts de 5 ml et conserver à 4°C
- * Tampon Phosphate (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄), 200 ml
Stock 200 mM dans H₂O, pH 7.8
Conserver à 4°C
- * Tris-HCl, 200 ml
Stock 1 M dans H₂O, pH 7.5
Conserver à 4°C

Solutions à peser à l'avance (à garder à 4°C) :

- * Sucrose 10 %
- * Ficoll 7.5 %
- * Ficoll 13 %
- * PEG (polyéthylène Glycol) P4000, 7.31 g
- * Dextran T-500, 8,06 g
- * Sorbitol, 32 g d'une solution à 1 M

Les trois derniers produits sont à utiliser pour la solution PEG-dextran

PROCEDURE**1- Homogénéat**

- 1- Prélever 2 cerveaux de pore (congelés). Peser le matériel obtenu. Laver les cerveaux 3x dans 5 volumes de Sucrose 10 % (sol. 1) dans un récipient plastique, ajouter quelques gouttes de « antifoam de Sigma » pour éviter la mousse lors de l'homogénéisation
- 2- Ajouter 2 volumes de Sucrose 10 % (Sol. 1) (2x le poids du cerveau pesé), homogénéiser 6x durant 10 secondes à l'aide d'un homogénéisateur polytron (petite tête). **Mesurer le volume et garder 24 fractions de 0.1 ml**

2- Centrifugation différentielle

- 3- Centrifuger dans les bouteilles obliques à bouchon violet, 5 min à 3 000 rpm (rotor GSA.). Décanter très délicatement le surnageant. Le précipité P1 ne doit pas être récolté
- 4- . Centrifuger le surnageant S 1 (dans les tubes blancs « a gradient ») 10 min à 14 000 rpm (rotor SS34). Décanter totalement le surnageant S2. Resuspendre le culot P2 dans 16 ml de sucrose 10 % (utiliser l'homogénéisateur en verre) **Mesurer le volume de P 2 et garder 24 fractions de 0.1 ml**

3- Centrifugation sur gradient

- 5- Porter avec une pipette pasteur 4 ml de la suspension P2 sur le gradient (4 gradient au total), compléter si nécessaire avec du sucrose 10 %
- 6- Centrifuger dans le rotor vertical (SS90) 90 min à 20 000 rpm
- 7- Prélever la bande à l'interface (env. 10 ml) avec une pipette pasteur et la diluer avec deux volumes de Tris-EDTA. **Mesurer le volume de et garder 24 fractions de 0.1 ml**
- 8- Centrifuger durant 30 min à 20 000 rpm (SS34 rotor)

4- Lyse (Choc Osmotique)

- 9- Reprendre le culot dans 2 ml de sucrose 10 %, ajouter 5 volumes de Tris 10 mM
- 10- Traiter à 4°C (glace) durant 30 min puis centrifuger pendant 30 min à 20 000 rpm (SS34)

5- Séparation de phase

- 11- Le culot est homogénéisé dans 5 ml de sucrose 10 %. On porte ceci sur 32 g de solution PEG-dextran (tubes Falcon 50 ml) (Attention, bien homogénéiser la solution PEG-dextran à 4°C)
- 12- Effectuer 40 inversions, Puis centrifuger à 1000 rpm pendant 5 min
- 13- Récolter séparément :
 - Phase supérieure
 - Phase inférieure + interface
- 14- Diluer chacune des phases dans 5 volumes de sucrose 10 % et centrifuger durant 30 min à 20 000 rpm (SS34)
- 15- Laver les culots avec 20 ml de sucrose 10 % et centrifuger durant 30 min à 20 000 rpm (SS34)
- 16- Reprendre les culots dans 3 ml de sucrose 10 % et homogénéiser dans un homogénéisateur en verre.
Mesurer les volumes de chaque phase et garder 24 fractions de 0.1 ml de chaque phase.

6- Congélation des différentes fractions à -20°C

- 17- Homogénat brut
- 18- P2: Culot de la centrifugation à 14000 rpm 10 min, après resuspension dans 16 ml de sucrose 10 %
- 19- Synaptosomes: interface Ficoll 7.5 % - 13 %, après dilution dans deux volumes de Tris-EDTA
- 20- Séparation de phase: Tout congeler
 - Phase supérieure dans l'Azote liquide
 - Phase inférieure + interphase

TESTS DE PURETE : EVALUATION DES RESULTATS PAR DOSAGE ENZYMATIQUE

Les enzymes suivantes sont des marqueurs d'un organite cellulaire et seront dosés dans les diverses fractions: Glucose-6Phosphatase (microsomes), Phosphatase acide (lysosomes), Cytochrome oxydase (mitochondries), Lactate deshydrogenase (Surnageant cytoplasmique), Na⁺ -K⁺, ATPase ouabaine-sensible (membranes cellulaires). Le dosage des 2 premiers enzymes est basé sur la mesure du phosphate libéré et sera effectué ensemble.

Un test Bradford est effectué et toutes les enzymes mentionnées sont dosés dans les 5 fractions suivantes :

- 1- Homogénat brut
- 2- P2 (culot de la centrifugation a 10 000 rpm x20 min)
- 3- Synaptosomes (interface Ficoll 7.5 % - 13 %) avant la séparation de phase
- 4- Séparation de phase - phase supérieure
- 5- Séparation de phase - phase inférieure (avec interface)

Déterminer ainsi le degré de contamination de chaque fraction par des organites non désirés.

1. Bradford

2. Glucose-6-phosphatase

Solutions:

- a- Tampon Tris-HCl 50 mM, glucose-6-phosphate 3 mM a pH 7.7
- b- Méthol: 25 g de pyrosulfite de potassium sont dissous dans 60 ml d'eau et 0.2 g de 4-méthyl-amino-phenol-sulfate dans 20 ml d'eau. On mélange et on dilue a 100 ml. La solution est filtrée
- c- Molybdate d'ammonium: 5 g de molybdate d'ammonium sont dissous dans 40 ml d'eau et dilués à 100 ml par de l'acide sulfurique 2N.
- d- Acétate de sodium 2.5 M
- e- Acide trichloroacétique 25 % (TCA)
- f- NaOH 2 N contenant 0.1 % de p-nitrophenol

Exécution :

- 1- 0.5 ml de tampon et 50 μ l d'extrait sont incubés durant 15 min à 38°C
- 2- La réaction est arrêtée avec 125 μ l de TCA 25 %
- 3- Centrifuger 10 min a 3500 rpm
- 4- Neutraliser 0.5 ml de surnageant par du NaOH 2N contenant 0.1 % de p-nitrophenol (Ajouter la soude jusqu'à neutralisation complète du TCA tout en contrôlant avec un papier pH)
- 5- Ajouter 100 μ l de molybdate d'ammonium et 50 μ l de Méthol et incuber 15 min
- 6- Ajouter 200 μ l d'Acétate de sodium 2.5 M et lire l'extinction à 691 nm après 5 min

3. Phosphatase acide

Solutions:

- a- Tampon citrate 50 mM contenant 0.02 % de Triton, pH 5.4
- b- P-nitrophenyl-phosphate 55 mM (ca. 2 ml)
- c- Tampon de dosage: Tampon citrate 50 mM à pH 5.4 contenant du Triton X-100 à 0.02% et du P-nitrophenyl-phosphate 55 mM

Exécution :

- 1- A 0.5 ml de tampon incubé a 38°C, ajouter 25 µl d'extrait
- 2- Incuber 30 min a 38°C et arrêter la réaction par 1 ml de NaOH 0.1 N
- 3- Prendre la DO a 405 nm ($\Sigma = 18.500$)

4. Cytochrome oxydase

Solutions:

- a- Tampon phosphate 0.1 M pH 8.0
- b- Tampon phosphate 0.1 M barboté dans l'azote pH 7.0
- c- Cytochrome C à 1% dans du tampon phosphate 0.1 M, pH 7.0

Exécution :

- 1- A 3 ml de cytochrome C dans le tampon phosphate (barboté dans l'azote), ajouter une pointe de spatule de dithionine solide
- 2- Passer cette solution sur une colonne de Biogel-PIO (Sephadex G-25) équilibrée dans le tampon phosphate 0.1 M, pH 7.0
- 3- A 1 ml de tampon pH 8.0, ajouter 50 µl de cytochrome C réduit (Fraîchement passé sur la colonne) et 10 µl de d'extrait
- 4- Mesurer la DO a 550 nm en mode cinétique durant 5 min ($\Sigma = 19.0$)

5. Lactate deshydrogène

Solutions:

- a- Tampon phosphate 50 mM à pH 7.7 contenant 7 mg de pyruvate de sodium par 100 ml
- b- NADH (25 mg dans 3 ml de NaHCO₃ à 1 %)

Exécution :

A 1.5 ml de tampon, ajouter 25 µl de NADH. Ajouter 50 µl d'extrait et prendre la DO à 340 nm en mode cinétique durant 5 min ($\Sigma = 6.22$)

6. ATPase

Solutions:

- a- Tampon Tris-HCl 0.4 M, NaCl 200 mM, KCl 30 mM, CaCl₂ 4 mM, EDTA 3 mM, pH 7.4
- b- Dinitrophenol 0.002 M (solubilise dans de l'EtOH et conserve à -20°C)
- c- ATP 0.06 M (fraîchement solubilisé dans de l'eau et gardé à -20°C)
- d- Acide trichloracétique 22.5 % (w/v) (solubilisé dans de l'eau et conservé à 4°C)
- e- H₂SO₄ 2.5 N (solubilisé dans de l'eau)
- f- Molybdate d'ammonium à 10 % (w/v) (solubilisé dans de l'eau)
- g- Isobutanol/petrol-ether (b.p. 100 - 120°C) 4:1
- h- H₂SO₄ 1 N (solubilisé dans de l'EtOH)
- i- SnCl₂ 0.05 % dans H₂SO₄ 2.5 N (à préparer au dernier moment)

Exécution :

- 1- Préparer une courbe standard de phosphate de potassium (entre 100 nmol et 1 μ mol de phosphate dans 0.1 ml dilué dans 0.4 ml de TCA 22.5 % (solution d) et 0.3 ml d'eau, puis traité comme sous 4)
- 2- Préparer également des blancs avec de l'eau
- 3- **Incubation** : à 0.65 ml de tampon (a) ajouter 50 μ l. de solution (b), 50 μ l. de solution (c) et 250 μ l d'eau, incubé 5 min à 37°C. Ajouter 50 μ l d'extrait et incubé 10 min à 37°C. arrêter la réaction par 250 μ l de solution (d) et laisser dans la glace durant 15 min puis centrifuger le précipité.
- 4- **Extraction** : à 0.4 ml de surnageant, ajouter 0.1 ml de solution (e), mélanger et incubé avec 0.1 ml de solution (f). Mélanger et ajouter 1 ml de solution (g). Bien mélanger et laisser séparer les phases à température ambiante durant 15–30 min. Prélever 0.7 ml de la phase organique et mélanger avec 0.7 ml de solution (h). Ajouter 0.1 ml de solution (i), mélanger et incubé durant 15 min à température ambiante, puis lire l'extinction à 650 nm.

TEST DE VESICULATION : DETERMINATION DE L'ORIENTATION DES VESICULES

1. Principe

L'estimation de l'orientation des vésicules se fait par la mesure de l'activité de Na⁺, K⁺-ATPase. Elle est basée sur l'orientation des sites actifs de l'ATPase. En absence de détergent, l'activité de Na⁺, K⁺-ATPase sensible à l'ouabaine est dû à des vésicules ouvertes (« leaky ») dont les deux cotes sont accessibles à des agents imperméables aux membranes comme l'ATP ou l'ouabaine.

On mesure l'activité de Na⁺, K⁺-ATPase dans diverses conditions : **a)** en présence de SDS, **b)** en présence de monensine et **c)** en présence de digitoxigénine.

- a- En présence de SDS (0.3 mg/ml), on mesure l'activité totale de Na⁺, K⁺-ATPase. Ceci est réalisé après 30 min de preincubation des membranes (0.5 mg de protéines/ml) à température ambiante dans du tampon HEPEStris pH 7.1. Cette suspension est diluée 50x avec le milieu réactionnel. Le phosphate libéré est mesuré selon la méthode de Stewart.
- b- La *monensine*, ionophore à sodium, permet le passage libre de Na⁺ et retarde la sortie de K⁺ des vésicules « inside-out » ce qui permet d'activer plus longtemps la Na⁺, K⁺-ATPase de ces vésicules-ci, tandis que celle des vésicules « rightside-out » n'a pas d'activité, le site de fixation de l'ATP se trouve à l'intérieur
- c- La *digitoxigénine*, pour sa part, bloque l'ATPase dans les vésicules « inside-out ». La membrane est en effet perméable à cette substance dont le site de fixation se trouve à l'intérieur.

Par ces substances aux propriétés spécifiques et différentes, il est possible d'estimer l'orientation des vésicules

2. Solutions

1- Milieu de pré incubation

A- Tampon HEPES, 20 mM, pH 7.1

B- Tampon HEPES, 20 mM, pH 7.1 additionné de SDS à 0.3 mg/ml

2- Milieu de réaction de base (C), conditions initiales

a- Tampon EGTA-Tris 75 mM, pH 7.4 / Tris 75 mM, EDTA 1 mM

b- NaCl 1.2 M

c- MgCl₂ 10 mM

d- ATP 10 mM

Avant utilisation, mélanger 6 ml de **(a)**, 3 ml de **(b)**, 3 ml de **(c)** et 3 ml de **(d)**.

3- Effecteurs ajoutés au milieu (C), conditions initiales

a- Ouabaine. 10 mM, solubilisé dans de l'eau chaude et conservé à -20°C

b- Monensine 50 µM, solubilisé dans de l'EtOH et conservé à -20°C

c- Digitoxigénine 100 µM, Solubilisé dans de l'EtOH et conservé à -20°C

4- Solution STOP

Acide perchlorique 0.05 N

5- Milieu de Stewart, conditions finales

- a- Molybdate d'ammonium 4 mM
- b- Acide perchlorique 0.8 M
- c- Vert de malachite 0.6 mM, solubiliser dans de l'eau et conserver à -20°C
- d- Triton X-405 0.032%

3. Exécution**1- Préparation du milieu de Stewart**

On dissout 5.1 g de molybdate d'ammonium dans 600 ml d'eau, mélanger y 90 ml d'acide perchlorique (60 - 62 %), puis 27 ml de vert de malachite 1 %, compléter à 1000 ml.

Laisser reposer 30 min puis filtrer sur papier Wattman 1. Ajouter ensuite 3 ml de Triton X-405 dilue (cette solution est stable 2 mois à 5°C, a l'abri de la lumière).

Avant l'analyse ajouter 5 ml de Triton X-405

2- Pré-équilibration des vésicules

Les vésicules (ca. 1-2 mg/ml) sont diluées à 1 mg/ml dans les milieux A ou B puis incubés 30 min à température ambiante

3- Activation de l'ATPase

Les vésicules pre-equilibrees sont incubées 10 min à 37°C dans le milieu e selon le schéma suivant : il y a 6 incubations différentes (suivant les effecteurs ajoutés). Préparer un blanc (avec Le tampon A ou B à la place des vésicules) et au moins 2 échantillons pour chaque incubation

Pipeter ainsi pour chaque série de mesure :

	1	2	3	4	5	6
Milieu C	500	500	500	500	500	500
H₂O	460	360	360	260	460	360
Vésicules dans A	40	40	40	40	=====	=====
Vésicules dans B	=====	=====	=====	=====	40	40
Ouabaïne	=====	100		=====	=====	100
Monensine	=====	=====	100	=====	=====	=====
Digioxigénine	=====	=====	=====	100	=====	=====

4- Dosage du Phosphate

- a- La réaction de l'ATPase est arrêtée après 10 min de l'incubation à 37°C avec 5 ml d'acide perchlorique glace 0.05N
- b- Centrifuger pour éliminer les éventuels précipités
- c- Le phosphate est dose par adjonction de 0.5 ml de surnageant à 1.5 ml de milieu de Stewart
- d- Prendre la DO à 640 nm contre le blanc correspondant à chaque incubation
- e- Dosage de phosphate

5- Explications

- 1- Correspond à l'activité des ATPases de toutes les membranes présentes. Cependant, seules les ATPases ouabaïne nous intéressent. En outre, les ATPases de membranes right-side-out ne sont pas mesurées (car le site de liaison de l'ATP est intracellulaire) ; également les ATPases de membranes inside-out ne sont pas mesurées, puisque pour celles-ci on ajoute du sodium du côté intracellulaire. Donc, seules les membranes *leaky* sont ainsi mesurées
- 2- L'ouabaïne bloque sélectivement la Na⁺, K⁺-ATPase Cette mesure correspond donc à l'activité de l'ATPase moins celle de la Na⁺, K⁺-ATPase sensible à l'ouabaïne des vésicules accessibles, (vésicules L)

1 - 2 = l'activité de la Na⁺, K⁺-ATPase - ATPase des vésicules leaky (L)

- 3- La menensine permet l'entrée de Na⁺ dans les vésicules « inside -out » (IO) pour rendre le Na⁺ accessible au site extracellulaire. On mesure ainsi l'activité de l'ATPase des vésicules L et des vésicules IO, mais pas RO «< rightside-out ») puisque l'ATP n'est pas accessible pour celles-ci
- 4- En présence de digotoxigénine, on bloque la liaison de l'ATP sur les vésicules accessibles (IO et L). Ceci correspond donc à l'activité de l'ATPase des vésicules L et IO moins l'activité de la Na⁺, K⁺ATPase de ces mêmes vésicules

3 - 4 = l'activité de la Na⁺, K⁺-ATPase - ATPase des vésicules L et IO

- 5- Correspond à l'activité totale maximale de l'ATPase de toutes les membranes, car il y a un pré traitement avec du SDS
- 6- Correspond à l'activité totale de l'ATPase de toutes les membranes moins celle de la Na⁺, K⁺-ATPase sensible à l'ouabaïne.

5 - 6 = activité totale max Na⁺, K⁺ -ATPase - ATPase de toutes les vésicules (L+IO+RO)

À partir de toutes ces données, on peut estimer le pourcentage de chaque population de vésicules.