

Matière : TAB

Niveau : L3

Chapitre II : La centrifugation et ultracentrifugation

Introduction

De nombreuses 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. Il est possible ainsi de fractionner une préparation en un sédiment (**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.

Parmi les procédés mis en œuvre pour le traitement mécanique des liquides, la sédimentation et la centrifugation sont basées sur la différence de densité des phases en présence.

Les phénomènes physiques utilisés et les forces qui en résultent caractérisent ces deux procédés.

- La sédimentation utilise le champ de l'accélération terrestre
- La centrifugation, le champ de l'accélération centrifuge

I. La sédimentation

1. Définition

La sédimentation est une technique d'analyse permettant de séparer un solide au sein d'un liquide ou un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densités différentes.

Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur.

- Lorsque la préparation est formée d'une substance beaucoup plus dense que le liquide : on parle de **Décantation**
- Lorsque la densité de la substance est plus faible, la sédimentation en est gênée. Il faut avoir recours à des champs de force plus intense.

2. La sédimentation sous l'effet de la pesanteur

On considère une particule de masse m , assimilée à une sphère de volume $v = \frac{4}{3}\pi.r^3$, de rayon r dispersée dans un liquide de viscosité η .

En négligeant un certain nombre de forces secondaires (mouvement Brownien, les forces électriques), trois forces s'appliquent sur la particule (Voir Figure 1)

- 1) **La force du poids** : fonction de sa masse et de la gravité $P=m.g$
- 2) **Les forces de frottement F** : déterminées par la loi de Stokes $F=6.\pi.r.\eta.v$
 η : viscosité du liquide
 v : vitesse de sédimentation
 r : rayon de la molécule
 $6\pi r\eta$: coefficient de frottement
- 3) **La force d'Archimède A** $A=m'.g$ m' : la masse du fluide contenu dans le volume v déplacé

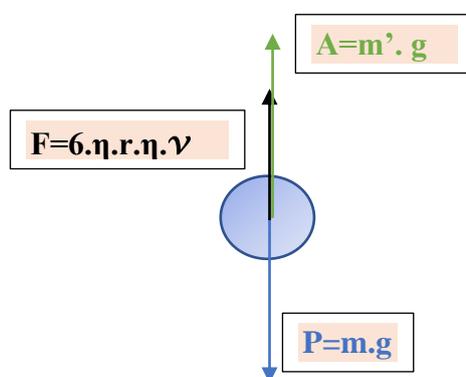


Figure 1

- Lors du déplacement, il faut que : $P > A + F$
- $P = A + F$: pas de mouvement, la particule est au repos
- $P - A - F = 0$: à l'équilibre, la somme des forces est nulle
 $m.g - m'.g - 6\pi r\eta v = 0 \Rightarrow m.g - m'.g = 6\pi r\eta v$ donc :

$$v = \frac{(m - m').g}{6\pi r\eta} \quad \text{vitesse de sédimentation de la particule}$$

II. La centrifugation

1. Définition

La centrifugation est une technique utilisant la force centrifuge pour séparer des fluides de densités différentes ou pour isoler des éléments solides en suspension dans un fluide. Elle permet de séparer des éléments d'un mélange en le faisant tourner à grande vitesse.

2.Principe

- Si on laisse reposer une suspension solide dans une phase liquide, on observe que les particules, sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède, tendent à tomber vers le fond ou à remonter vers la surface selon leur densité et leur taille. Ce procédé, décantation, est relativement lent pour les très fines particules (sensibles à l'agitation thermique) et les liquides visqueux.
- Une particule soumise à un champ gravitationnel tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement
- En mettant une préparation biochimique dans une centrifugeuse et en faisant tourner celle-ci, on génère une accélération qui va pousser les particules qui la composent vers l'extérieur du rotor à centrifuger, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger.

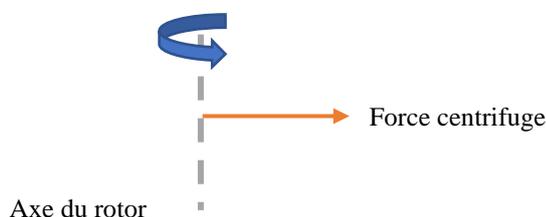
La vitesse avec laquelle se déplaceront ces particules est proportionnelle à

- La force gravitationnelle à laquelle la particule est soumise
- La masse de la particule
- La différence entre la densité de la particule et celle du solvant

Et inversement proportionnelle

- La friction avec le milieu en fonction de la taille et à la géométrie des particules
- Une particule donnée (sous unité de ribosome par exemple) a une vitesse spécifique de sédimentation lors d'une centrifugation parce qu'elle a une combinaison de masse, de densité et de morphologie.
 - On exprime souvent cette caractéristique en **coefficient de sédimentation**, exprimé généralement en **Svedberg (S)** $1\text{S}_{(\text{Svedberg})}=10^{-13}\text{s}$
 - Plus une particule est massive ou dense ou ne génère qu'une faible friction (du à sa forme), plus son S est élevé.

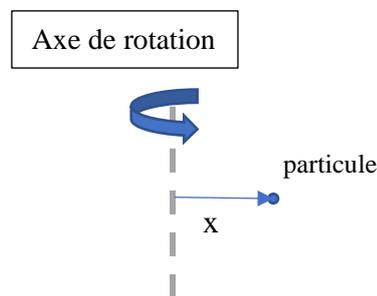
Pour générer une force centrifuge, on fait tourner à haute vitesse un rotor pouvant contenir des tubes à centrifuger. Une force gravitationnelle se forme alors perpendiculairement à l'axe de rotation du rotor (Figure 2)



3.Calculs

Considérant une particule de masse m qui tourne autour d'un axe à la distance x de celle-ci. Cette particule est soumise à une force centrifuge qui tend à l'éloigner de l'axe de rotation. Cette force centrifuge remplace le poids $P=m.g$. Tous se passe comme si on avait remplacé l'accélération de la pesanteur g par une accélération $\gamma=\omega^2.x$ qui représente l'accélération centrifuge.

Tel que γ : accélération centrifuge
 ω : vitesse angulaire de rotation (radian/seconde)
 x : la distance séparant l'axe du rotor de la particule (cm)



Donc pendant la centrifugation $F=m.\gamma \Rightarrow F= m.\omega^2.x$ accélération centrifuge

$\omega=\frac{2\pi}{60}.(rpm)$ sachant que rpm : révolution par minute=tours par minute

$$\gamma=\omega^2.x \Rightarrow \gamma=\left(\frac{2\pi}{60}.(rpm)\right)^2 . X$$

Pour exprimer γ en g, il faut diviser sur la gravité ($g=9,81 \text{ m/s}^2$)

On aura ainsi

$$\gamma=\omega^2.x$$

$$\frac{\gamma}{9,80}=\frac{4\pi^2.(rpm)^2}{3600.9,80}.x \Rightarrow \frac{\gamma}{9,80} = 1,119.(rpm)^2.x \quad x : \text{ est exprimé en cm, il faut le convertir en m}$$

$$\frac{\gamma}{9,80} = RCF \text{ Relative centrifugal force}$$

$$RCF=\frac{FC}{Fg}=\frac{\text{Force centrifuge}}{\text{Force de gravité}}=\frac{m.\omega^2.x}{m.g}=1,119.10^{-5} . (rpm)^2 . x$$

Ainsi lorsque $g=9,80\text{m/s}^2 =980(\text{cm/s}^2)$

$$RCF=\frac{4\pi^2.(rpm)^2.x}{3600.980}=1,119.10^{-5} . (rpm)^2 . x \text{ (cm)}$$

Lors de la centrifugation :

- le poids dans la nature est remplacé par la force centrifuge $F_c = m \cdot \omega^2 \cdot x$
- la force d'Archimède est remplacée par la force de flotation $F_b = m_0 \cdot \omega^2 \cdot x$
- et la force de frottement est remplacée par la force de friction $F_f = \mathcal{F} \cdot v = 6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$
tel que \mathcal{F} est le coefficient de friction et v la vitesse de centrifugation

A l'équilibre

$$\text{Pour que la particule puisse sédimenter } \sum \vec{\text{Forces}} = \vec{0} \Rightarrow \vec{F}_c + \vec{F}_b + \vec{F}_f = \vec{0} \Rightarrow F_c = F_b + F_f$$

Ainsi :

$$F_c - F_b - F_f = 0$$

$$m \cdot \omega^2 \cdot x - m_0 \cdot \omega^2 \cdot x - \mathcal{F} \cdot v = 0 \Rightarrow (m - m_0) \cdot \omega^2 \cdot x - \mathcal{F} \cdot v = 0 \Rightarrow (m - m_0) \cdot \omega^2 \cdot x = \mathcal{F} \cdot v$$

$$v = \frac{(m - m_0) \cdot \omega^2 \cdot x}{\mathcal{F}} \quad \text{Vitesse de centrifugation}$$

On sait que $m_0 = \rho_{\text{solvant}} \cdot V_{\text{particule}}$

sachant que $V_{\text{particule}} = \bar{V} \cdot m$ \bar{V} : volume partiel spécifique du solvant, c'est l'augmentation de volume due à l'addition de 1g de soluté sec dans un volume infini

$$m_0 = \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V} \cdot m$$

$$\text{On aura ainsi } (m - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V} \cdot m) \cdot \omega^2 \cdot x = \mathcal{F} \cdot v$$

$$(1 - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V}) \cdot m \cdot \omega^2 \cdot x = \mathcal{F} \cdot v$$

En multipliant par le nombre d'Avogadro $\mathcal{N} = 6,022 \cdot 10^{23}$

$$\mathcal{N} \cdot m (1 - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V}) \cdot \omega^2 \cdot x = \mathcal{N} \cdot \mathcal{F} \cdot v \quad \mathcal{N} \cdot m = M \text{ masse moléculaire de la particule}$$

On aura

$$M \cdot (1 - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V}) \cdot \omega^2 \cdot x = \mathcal{N} \cdot \mathcal{F} \cdot v \Rightarrow M = \frac{\mathcal{N} \cdot \mathcal{F} \cdot v}{(1 - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V}) \cdot \omega^2 \cdot x}$$

On sait que $S = \frac{v}{\omega^2 \cdot x}$ coefficient de sédimentation

On aura ainsi

$$M = \frac{\mathcal{N} \cdot \mathcal{F} \cdot S}{(1 - \rho_{\text{solvant}} \cdot \bar{V})} \Rightarrow M = \frac{\mathcal{N} \cdot \mathcal{F} \cdot S}{(1 - \rho_{\text{solvant}} / \rho_{\text{particule}})}$$

$$\bar{V} = \frac{1}{\rho_{\text{particule}}}$$

➤ Le coefficient de diffusion est défini par les relations suivantes

$$D = \frac{R \cdot T}{\mathcal{N} \cdot F} \quad R : \text{constante des gaz parfaits } 8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

4. Méthodes et appareillages

Pour rendre possible la séparation d'une particule au sein d'une suspension, il faut travailler avec de grandes accélérations. Ceci est possible avec des centrifugeuses. Ces appareils comportent les éléments suivants :

- Un moteur capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers tours par minute
- Un rotor capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane), en général conçu pour les rotors des ultracentrifugeuses résistant à de fortes températures
- Une enceinte dans laquelle est disposé le rotor qui est réfrigérée et sous vide (ultracentrifugeuse). Les centrifugeuses de paillasse ne sont pas réfrigérées. En effet, pour des vitesses de rotation importantes, le déplacement du rotor entraînerait un échauffement de l'appareil.

Cette enceinte est de plus blindée pour éviter des accidents en cas d'explosion du rotor. La principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor est la force du moteur qui le fait tourner. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand.

4.1. Les rotors

La dimension du rotor pour maximiser la vitesse de rotation, il faut minimiser le rayon du rotor donc sa taille.

Il existe trois types de rotors

- Les rotors à angles fixes
- Les rotors à godets oscillants
- Les rotors verticaux

1. Les rotors à angles fixes "fixed angle"

Ils sont utilisés pour les sédimentations les plus simples entre **culot** (cellules, membranes, mitochondries) et **suragent**. Ils sont essentiellement utilisés pour des séparations séquentielles à des vitesses de rotation croissantes (**centrifugation différentielle**).

Les rotors à angles fixes sont faits de blocs de métal (aluminium, titane) avec des puits creusés à l'intérieur et inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale, généralement de l'ordre de 15° à 35° selon les modèles. Les tubes à centrifuger sont déposés dans ces puits. Comme ces rotors sont relativement compacts. Ils sont plus faciles de les faire tourner rapidement à cause de leur rayon relativement court. Les particules sédimenteront surtout le long de la paroi du

tube (voir figure suivante). De plus, elles s'accumulent plutôt sur des côtés du fond du tube à centrifuger.

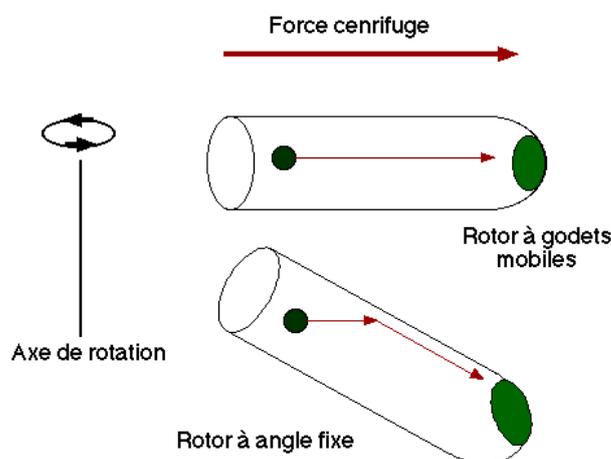


Figure : Sédimentation des particules dans divers types de rotor

➤ Qu'est ce qu'une centrifugation différentielle ?

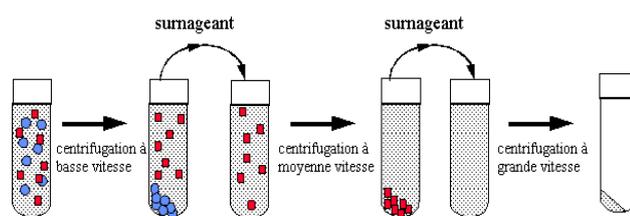
- Elle dépend de la taille et le poids des particules
- Dans ce type de centrifugation, le principe est de séparer les différents constituants, le plus souvent, à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélérations croissantes.
- Dans une première centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un culot au fond du tube. Tous les autres éléments vont rester dans la fraction liquide appelée surnageant.
- Cette méthode est utilisée par exemple pour récupérer les éléments figurés du sang (les cellules) qui

Sédimentent pour des accélérations très faibles

Au besoin, on peut recommencer un second cycle de centrifugation avec le surnageant précédent mais avec des accélérations plus importantes.

Progressivement, on sépare ainsi les différents constituants en terminant par les éléments les plus petits et ayant moins de différences de densité avec le solvant

Centrifugation différentielle



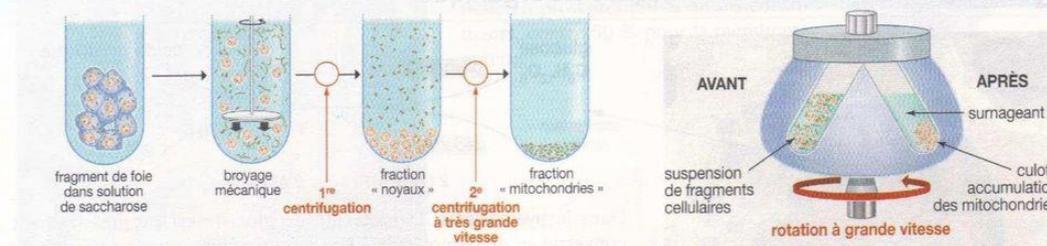
Rotor à angle fixe

Exemple

Préparation d'une suspension riche en mitochondries

Pour étudier le rôle des mitochondries, il est nécessaire de les isoler. Pour cela, on utilise des cellules particulièrement riches en mitochondries, par exemple des cellules du foie.

Les cellules subissent d'abord un broyage mécanique modéré afin de libérer les constituants sans trop les léser. Le broyat est ensuite centrifugé : la rotation à grande vitesse des tubes contenant les extraits cellulaires permet de séparer les constituants cellulaires et d'obtenir une fraction riche en mitochondries. L'isolement réel des mitochondries nécessite cependant une centrifugation à très grande vitesse (imparfaitement réalisée avec une centrifugeuse de lycée).



10

2. Rotors horizontaux, mobiles ou à godets oscillants

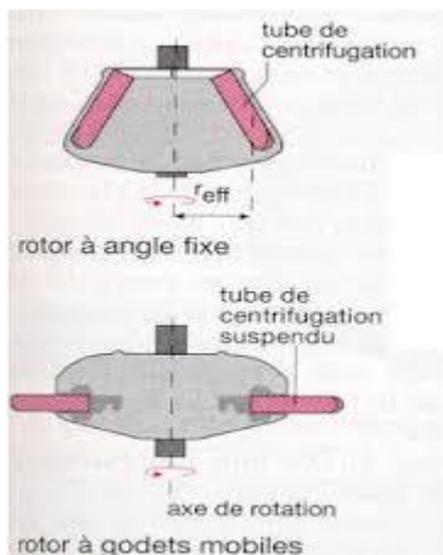
Ils se réorientent lors de la centrifugation.

Les godets sont disposés sur des crochets, lors de la centrifugation, grâce à la force centrifuge, les tubes passent en position horizontale. Les particules sédimentent directement dans le fond du tube à centrifuger.

Ils sont généralement utilisés dans les centrifugations en **gradient continu** ou **discontinu** (séparations plus fines) car la force centrifuge s'exerce dans le sens de la longueur du godet. Les particules sont alors séparées en fonction de leur densité.

Un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant. On peut donc moduler cette vitesse en faisant varier de façon continue ou discontinue cette différence de densité en créant un gradient de concentration. (Voir figure)

Inconvénient : Ils ne peuvent pas atteindre des vitesses très élevées parce que les godets en position horizontale allongent le rayon du rotor, ce qui est plus difficile de lui conférer des vitesses élevées.



Rotor à godet mobile

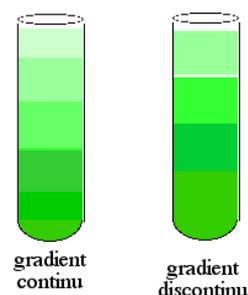
Qu'est-ce que la centrifugation à l'équilibre ?

Dans une centrifugation à l'équilibre, les différents constituants atteignent des positions dont ils ne vont plus bouger car étant en équilibre.

L'équilibre est atteint lorsque la densité d'une particule est égale à la densité du solvant, ce qui entraîne que la force gravitationnelle est égale à la poussée d'Archimède. C'est pour cela qu'on va utiliser un solvant dont la densité va varier en fonction de la position dans le tube permettant aux différents constituants de rejoindre la zone de densité équivalente à la sienne : on parle dans ce cas de **gradient**. C'est une **centrifugation sur gradient de densité**.

Gradients continus et discontinus

- On peut faire des gradients discontinus en juxtaposant une par-dessus l'autre des solutions ayant des différences suffisantes de densités. On obtient ainsi des gradients discontinus. On peut facilement fabriquer des gradients discontinus en déposant une sur l'autre deux ou trois couches de solutions de diverses densités.
- On peut aussi obtenir des gradients continus où la variation de densité est graduelle le long du tube à centrifuger.



Fabrication des gradients

Les variations de densités sont obtenues en faisant varier la concentration d'un produit chimique dans la solution. Divers produits peuvent être utilisés pour faire ces gradients. Ils doivent être très solubles en solution aqueuse, ce qui permet d'obtenir des densités suffisantes. On recherche aussi des produits qui sont relativement inertes, peu coûteux, faciles à manipuler, non toxiques, etc.

- Le **saccharose** ("sucrose") est très souvent employé. Il permet d'atteindre des densités assez élevées, de l'ordre de 1.3 g/mL avec du saccharose 2.5 M. Ce produit a l'avantage d'être peu coûteux, électriquement neutre et plutôt inerte pour la plupart des fractions cellulaires. Son principal défaut est sa viscosité à forte concentration, ce qui rend son utilisation plus difficile. Il est aussi à déconseiller si la pression osmotique est un facteur important, par exemple dans l'isolement de cellules entières.
- Un autre produit couramment utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques, est le **chlorure de césium (CsCl)**. Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de 1.9 g/mL à 7.5 mol/L. Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage. Son coût et le fait qu'il s'agisse d'un sel, donc de molécules chargées, réduisent son champ d'application.
- D'autres produits peuvent aussi être utilisés pour séparer des cellules ou des organites par gradient de densité. Cependant, ils sont souvent restreints à des applications particulières. Leur coût peut aussi être prohibitif.

Centrifugation isopycniqne en gradient continu

Dans ce type de méthode, les molécules soumises à la centrifugation sur le gradient se sépareront selon **leur densité**, non pas leur masse. La préparation à analyser est déposée sur le sommet du gradient, puis on centrifuge à équilibre. Chaque type de particule sédimentera jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration correspondant à sa densité. Elle s'immobilisera alors à ce niveau. Il est même possible de faire des gradients générés durant la centrifugation elle-même, sous l'influence directe du champ gravitationnel.

- La borne inférieure du gradient doit être inférieure à la plus faible densité des particules à séparer.
- La borne supérieure du gradient devrait être supérieure à la densité la plus élevée des particules à séparer.

Centrifugation zonale en gradient continu

La centrifugation peut aussi être utilisée pour des fins analytiques, pour séparer des particules ou des molécules, selon leur taille. Dans ce type d'applications, comme les particules sont homogènes, elles ont toutes la même densité, elles ne diffèrent que par leur taille. Le gradient sert donc à faire en sorte que les particules lourdes sédimentent plus vite que les plus légères, tout en n'atteignant jamais le fond du tube à centrifuger. On ne centrifuge donc pas à équilibre. Le gradient, dont la concentration maximale est moins dense que les particules, ne sert qu'à ralentir la sédimentation. On arrête donc la sédimentation quand les plus lourdes sont rendues vers le bas du tube à centrifuger et que le niveau désiré de séparation est obtenu.