

Chapitre I : Méthodes de séparation

3) Centrifugation

1) Définition

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut-être constituer de deux phases Liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide. La centrifugation utilise des vitesses de rotation grandes (allant de 6 à 10000 tours par minute). Figure.1

2) Principe

Le principe de fonctionnement des centrifugeuses est basé sur la force centrifuge qui facilite la séparation de différents composants du mélange en fonction de leurs caractéristiques de sédimentation. La force appliquée sur les particules dépend de la vitesse de rotation et du rayon du rotor de la centrifugeuse (figure3).

Ainsi, la force centrifuge fait migrer des composants plus denses et plus gros vers l'extérieur depuis l'axe de rotation. En centrifugation, il est important de différencier la vitesse de centrifugation (Révolutions Par Minute, RPM) et la force centrifuge relative (g ou RCF, Relative Centrifugal Field) car celles-ci sont souvent confondues.



Figure 2 : Bilan des forces

3) Paramètres de centrifugation (aspect théorique)

On considère une particule de masse m assimilée à une sphère de rayon r , dispersée dans un liquide de coefficient de viscosité η .

En négligeant un certain nombre de force secondaire, trois forces s'appliquent à la particule (Figure 1):

- Le poids $P = mg$ (m : masse de la particule)

- La poussée d'Archimède $A = m'g$ (m' : masse de liquide déplacé)

- La force de frottement f dont l'expression est donnée par la loi de Stocks : $f = 6\pi\eta r v$ (v est la vitesse de sédimentation)

3.1) Vitesse angulaire (ω)

Quand la centrifugeuse atteint la vitesse de centrifugation désirée, l'échantillon est soumis à un mouvement circulaire uniforme. La vitesse de rotation ou vitesse angulaire (\dot{A} , exprimé en $\text{rad}.\text{sec}^{-1}$)

$$\omega = d\theta/dt \text{ ou } d\theta = 2\pi n \text{ donc } \omega = 2\pi n/t \text{ ou } t = 1\text{min} = 60\text{s}$$

3.2) Accélération centrifuge

Ou champ centrifuge, généré par le mouvement circulaire uniforme, est dirigé radialement vers l'extérieure et dépend de la vitesse angulaire ω et de distance (r en cm) de l'axe de rotation, selon l'équation :

$$F_c = \omega^2 r \text{ ou } F_c = (2\pi n/60)^2 \cdot r$$

3.3) Force centrifuge

Considérons une particule de masse m tourne autour d'un axe passant par O (Figure. 3) à la distance x de celui-ci. Cette particule est soumise à une force d'inertie centrifuge qui tend à l'éloigner de l'axe de rotation. On montre que cette force est proportionnelle au carré de la vitesse angulaire de rotation ω et sa distance de l'axe de rotation, x . Son expression est

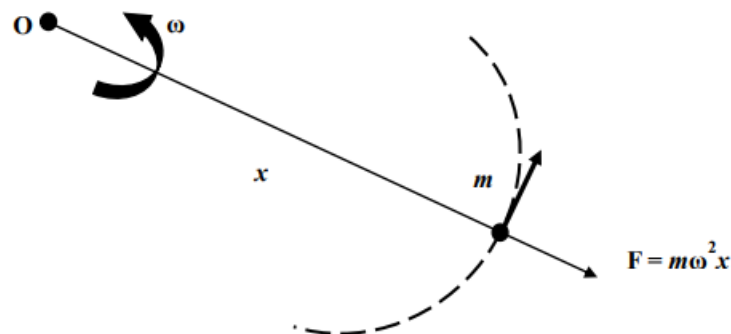


Figure 3. Force centrifuge

- Tous se passe comme si on avait remplacé l'accélération de la pesanteur g par une accélération $\gamma = \omega^2 \cdot x$ qui représente l'accélération centrifuge. Donc

$$F_c = m \cdot \gamma \text{ ou } \gamma = \omega^2 \cdot r \text{ donc } F_c = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

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

3.4) Force centrifuge relative (RCF)

La force appliquée aux particules (par comparaison à la gravité) s'appelle la force centrifuge relative (RCF). (Par exemple, une FCR de 500 x g signifie que la force centrifuge appliquée est 500 fois plus importante que la force gravitationnelle terrestre).

$$RCF = F_c / F_g = \text{Force centrifuge} / \text{Force de gravité} = \omega^2 \cdot x / g$$

3.5) Vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation d'une particule en solution dépend de : la masse de la particule (volume et densité), de la densité et viscosité de la solution et de la forme de la particule.

La vitesse à laquelle sédimente une particule dépend de la loi de Stokes:

$$\frac{dr}{dt} = v = \frac{2}{9} \cdot \frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_{sol}) \cdot \omega^2 r}{\eta}$$

Diagramme illustrant la loi de Stokes pour la vitesse de sédimentation. Les étiquettes pointent vers les termes de l'équation :

- Vitesse de sédimentation de la particule : $\frac{dr}{dt} = v$
- Rayon de la particule : a
- Densité de la particule : ρ_p
- Densité de la solution : ρ_{sol}
- Viscosité de la solution : η
- Champ centrifuge : $\omega^2 r$
- Constante pour une sphère : $\frac{2}{9}$

Pour que une particule sédimente sa densité doit être majeure de la densité de la solution :

$$\rho_p > \rho_{sol}$$

Si la densité de la particule est égale à celle de la solution, alors la vitesse de sédimentation est nulle et la particule ne sédimente pas:

$$\rho_p = \rho_{sol} \rightarrow \rho_p - \rho_{sol} = 0 \rightarrow v = 0$$

$a=d$ = diamètre de la particule en m

4. Types de centrifugation

Il existe deux principaux types de centrifugation.

4.1) Centrifugation différentielle

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 accélération croissante. En centrifugation différentielle, la séparation s'effectue principalement selon la taille des particules FIGURE 4.

4.2) Centrifugation en gradient de densité

On peut accentuer les méthodes de séparation en faisant la centrifugation dans un gradient de densité. En effet, un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant **cad que la densité du liquide continu à changer à mesure que nous déplaçons du haut vers le bas.** Il existe deux types de gradients

- **Centrifugation de zone (zonale ou isocinétique)**

Cette technique permet la séparation des particules selon leurs coefficients de sédimentation. - Dans ce type de centrifugation, la solution de macromolécules est déposée sous forme de couche en haut d'un gradient de densité préparé auparavant. Pendant la centrifugation, chaque espèce se déplace à travers le gradient à une vitesse largement déterminée par leur coefficient de sédimentation et donc migre comme une zone

Un gradient de densité est crée dans un tube (ex. gradient de sucrose) → L'échantillon est déposé sur un milieu (en haut du tube) → La séparation des constituants se fait selon leurs coefficients de sédimentation (les particules les plus denses se déplacent plus rapidement que les moins denses)

- **Centrifugation isopycnique**

L'échantillon est placé dans le tube avec le milieu de densité (ex. Chlorure de césium) → Sous l'influence de la force centrifuge, le chlorure de césium se distribue pour former un gradient continu de densité → Les particules de l'échantillon se déplacent dans le tube et s'arrêtent lorsqu'elles atteignent le niveau de densité égal à la leur

Cette méthode de centrifugation, aussi connue sous le nom de centrifugation isopycnique, sépare les macromolécules selon leur densité. L'échantillon est dissout dans une solution concentrée d'une substance dense qui diffuse relativement vite comme les sels CsCl et Cs₂SO₄, et qui est subie à des hautes vitesses de rotation Le fort champ centrifuge génère un gradient important de sel dans lequel les composantes de l'échantillon se retrouvent en zone de densités égales à celle de la solution de sel;