

2. CENTRIFUGATION

La cellule (animale, végétale ou microbienne) est riche en molécules (macromolécules et micromolécules) et organites, parmi lesquelles celle qui nous intéresse. Pour séparer un constituant afin qu'on puisse l'étudier, on peut utiliser une méthode qui s'appelle la centrifugation. La centrifugeuse est un dispositif qui sépare les particules des suspensions ou même des macromolécules des solutions selon leur taille, leur forme et leur densité en soumettant ces systèmes dispersés à des champs gravitationnels induits artificiellement, centrifugation.

La sédimentation est une méthode de séparation qui permet de récupérer un solide (une molécule ou un organite) dispersé dans un milieu liquide ou un liquide dispersé dans autre liquide non miscible. Cette opération peut être effectuée automatiquement sous l'effet de la pesanteur quand la substance à séparer a une densité un peu plus élevée que celle du milieu liquide (décantation). La force de la pesanteur est remplacée, dans une centrifugeuse, par une force de centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (6 à 10000 rpm).

2.1. Sédimentation sous l'effet de la pesanteur (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 (**Fig. 01**):

- 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).



Figure 01: Bilan des forces

2.2. Centrifugation

2.2.1 Définition

La centrifugation est une technique de séparation largement utilisée et importante dans de nombreux domaines industriels tels que les industries alimentaires, pharmaceutiques, biotechniques et chimiques. Les molécules suspendues dans un milieu liquide et placées dans un rotor grâce à des tubes amovibles, appelés aussi bouteilles à centrifuger, ne peuvent être centrifugées que lorsque leur densité est plus élevée que celle du milieu dans lequel elles sont dispersées. La centrifugation permet la récupération d'un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à centrifuger peut-être formé de deux phases liquides non miscibles ou d'une suspension.

Lorsque des macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les glucides doivent être séparées, des centrifugeuses normales ne peuvent pas être utilisées et des dispositifs spéciaux appelés ultracentrifugeuses qui génèrent des champs gravitationnels artificiels très puissants sont utilisés.

2.2.2 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. Ainsi, la force centrifuge fait migrer des composants plus denses et plus gros vers l'extérieur depuis l'axe de rotation.

- *Accélération centrifuge*: considérons une particule de masse m tourne autour d'un axe passant par O (**Fig. 02**) 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 :

$$F = m\omega^2x$$

Cette force centrifuge F remplace donc le poids, $P = mg$. Tout se passe comme si avait remplacé l'accélération de pesanteur g par une accélération $y = \omega^2x$, qui représente une accélération centrifuge.

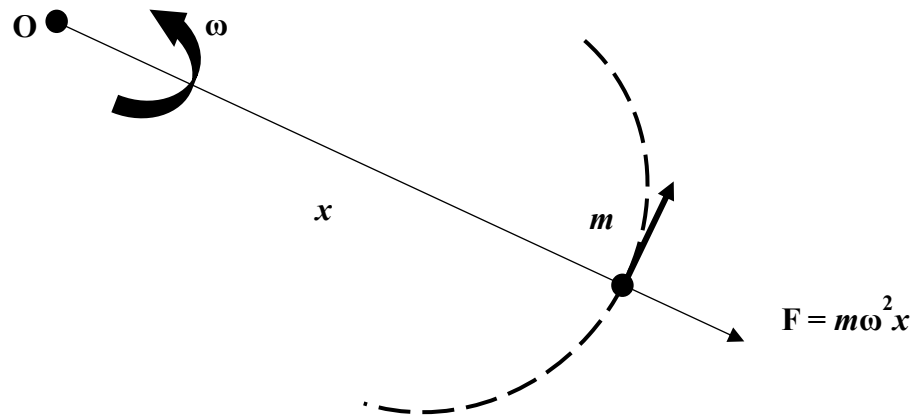


Figure 02: Accélération centrifuge

2.2.3. Appareillages

La centrifugeuse est constituée d'une cuve de la centrifugeuse et des tubes de centrifugation équilibrés deux à deux dans un rotor. Chaque deux tubes doivent être placés symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

Il existe plusieurs types de centrifugeuse selon les besoins expérimentaux (particulièrement au niveau des accélérations requises, des volumes de matériel à centrifuger, de la température de travail, etc): des centrifugeuses à table, des centrifugeuses au sol, ultracentrifugeuse et microcentrifugeuse. Aussi, deux types de centrifugeuse sont utilisés selon la position des tubes en rotation, centrifugeuse horizontale et oblique.

2.2.3.1. Centrifugeurs horizontaux

Ces centrifugeurs sont ainsi nommés car les pots sont horizontaux en rotation. On utilise des tubes à centrifuger à fond conique pour clarifier le liquide, c'est à dire lorsqu'on récupère le liquide surnageant, le culot étant rejeté. On utilise des tubes à fond rond lorsqu'on récupère le culot. En centrifugation horizontale, il est aisé de mesurer le volume de culot de centrifugation.

2.2.3.2. Centrifugeurs oblique

Les tubes sont logés dans un rotor circulaire appelé couronne dans lequel ils sont inclinés à 45°. Les particules n'effectuent qu'un court parcours au sein d'un liquide, elles migrent horizontalement, atteignent la paroi et glissent le long de celle-ci. Ceci favorise la sédimentation. Il existe des centrifugeuses réfrigérées, thermostatées à 4°C, utilisées pour le fractionnement des enzymes thermolabiles.

2.2.4. Types de centrifugation

2.2.4.1. Centrifugation différentielle

Elle est basée sur des différences de vitesse de sédimentation de particules de tailles et de densités variables. Pour des particules de même masse mais de densités différentes, les plus rapides à sédimenter correspondent à celles présentant la densité la plus élevée. Dans cette technique, le matériel de départ (homogénat) est fractionné en augmentant la vitesse de centrifugation (**Fig. 04**). On s'arrange à ce que le champ gravitationnel appliqué à chaque étape permette de faire sédimenter un constituant cellulaire. On utilise très fréquemment des rotors à angle fixe caractérisés par une inclinaison des tubes de 14 à 40°.

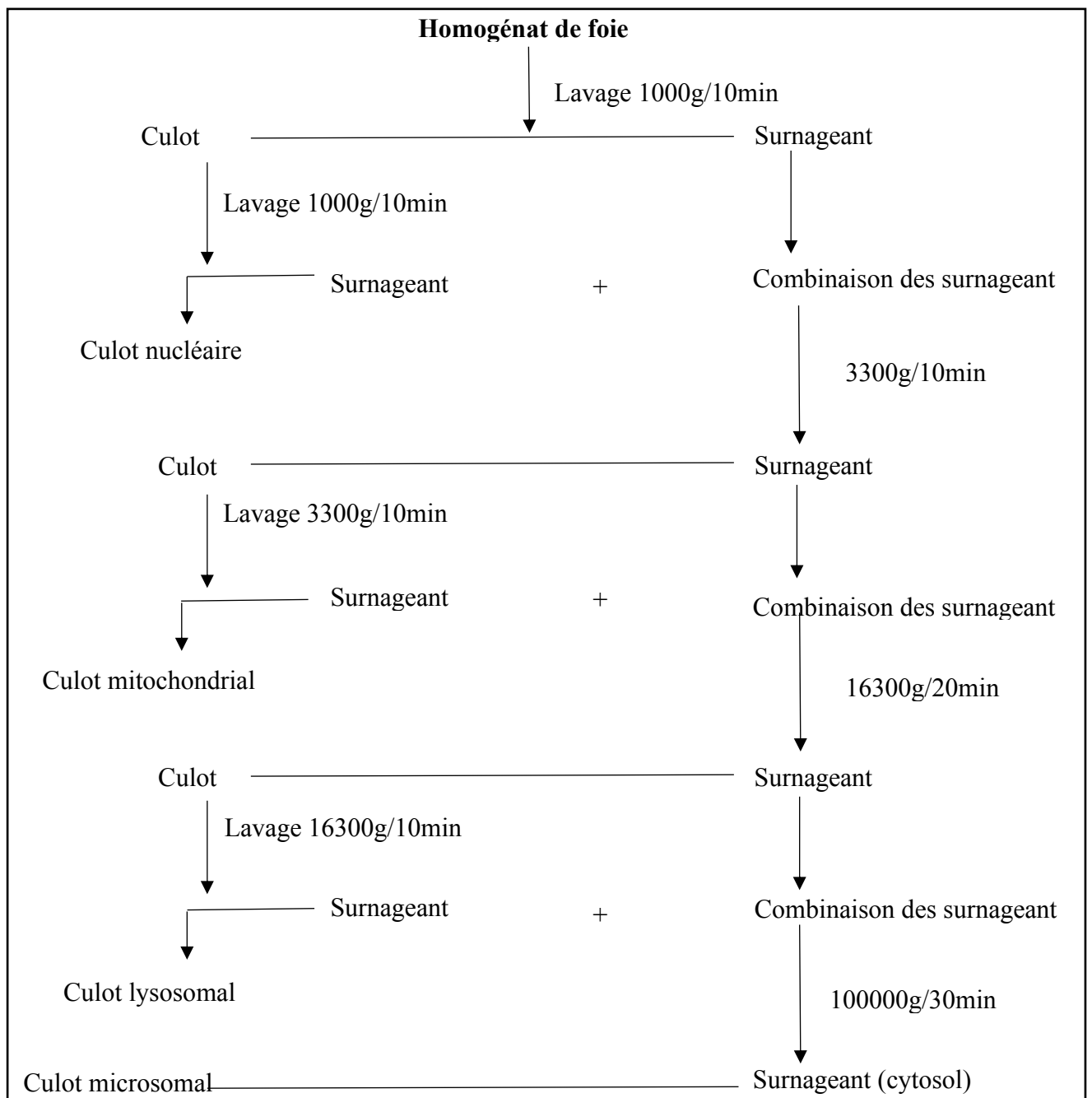


Figure 04: Protocol de séparation d'un homogénat de foie pas centrifugation différentielle

Dans la dernière étape de cet exemple, on récupère le cytosol qui est, habituellement, considéré comme matériel soluble. Cependant, cette dernière étape n'est pas en concordance avec les critères biochimiques de la solubilité, un constituant est dit soluble s'il ne sédimente pas à une centrifugation de $105\ 000g_{av}$ / 1h.

2.2.4.2 Centrifugation en gradient de densité

C'est la méthode préférée pour purifier les organites subcellulaires et les macromolécules dans un milieu de densité variable appelé gradient. Les gradients peuvent être préparés en mettant couche après couche (mode discontinu) le milieu de séparation (par exemple le Saccharose) dans un tube avec la couche la plus lourde (dense) en bas et la plus légère en haut (le mode continu nécessite un appareillage spécifique, centrifugeuse). La fraction cellulaire à séparer est placée au-dessus de tube de centrifugation et centrifugée. La séparation des particules peut être classée en deux catégories: une séparation selon leur taille (Taux de séparation zonale, Rate-zonal separation) et une autre selon la densité des particules ou Isopycnique (Isopycnic separation).

Il existe deux types de gradient de densité, continu et discontinu (**Fig. 05**). Le gradient discontinu doit être préparé avant l'opération par des dépôts successifs de solution de chlorure de césium (CsCl) de densité croissante, alors que le gradient continu est préparé automatiquement (autoformation) au cours de la centrifugation comme celui élaboré à partir d'une solution de CsCl de densité donnée (l'échantillon est mélangé avec le CsCl et se centrifugent au même temps). Les produits les plus utilisés pour préparer les gradients sont: le Saccharose avec une densité maximale de 1.3 g/ml (2.5M) et le chlorure de césium, dont la densité la plus élevée peut atteindre 1.9 g/ml à 7.5mol/L.

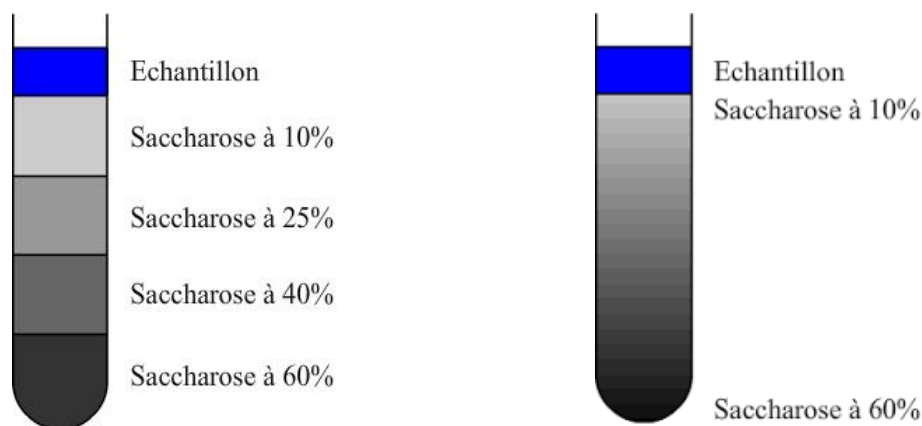


Figure 05: Préparation de gradient de densité de Saccharose, discontinu à gauche et continu à droite

2.3. Ultracentrifugation

Cette technique de séparation est réalisée en utilisant un appareillage spécial, ultracentrifugeuse. Elle utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 rpm) qui permet la sédimentation des particules ultramicroscopique.

Les ultracentrifugeuses représentent un type spécial des centrifugeuses dans lequel le rotor tourne à une vitesse beaucoup plus élevée qu'une centrifugeuse standard. Elles sont utilisées aussi bien pour des applications analytiques que préparatives. Une ultracentrifugeuse analytique est principalement utilisée pour étudier les propriétés des macromolécules ainsi que pour analyser des mélanges complexes de macromolécules. Les vitesses de rotation élevées utilisées dans les ultracentrifugeuses peuvent générer une quantité considérable de chaleur. Par conséquent, un système de refroidissement est nécessaire dans ces dispositifs.

2.4. Applications de la centrifugation

- Détermination du poids moléculaire : notamment pour les acides nucléiques et les protéines ;

- Détermination des constantes de sédimentations : les acides nucléiques, les sous-unités des ribosomes et des ARN ribosomiaux. Certains organites ont les mêmes constantes que les acides nucléiques ;

- Séparation d'un mélange : deux molécules de masse molaires différente sédimentent séparément ;

- Vérification de la pureté d'un mélange de macromolécule : l'obtention d'un seul pic symétrique par l'ultracentrifugation indique une molécule pure ;

- Analyse quantitative : la surface du pic correspond le pourcentage du composé.