

2.2. La centrifugation

I- Définition

La centrifugation est un procédé de séparation mécanique des composés d'un mélange (d'une cellule animale ou végétale) en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge entraînée dans un mouvement de rotation. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide (Fig.1-a,b-). L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée **centrifugeuse**.



Figure 1. –a- La Centrifugation -b- la séparation des globules rouges et du plasma

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 fractionne 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 (Fig.2).

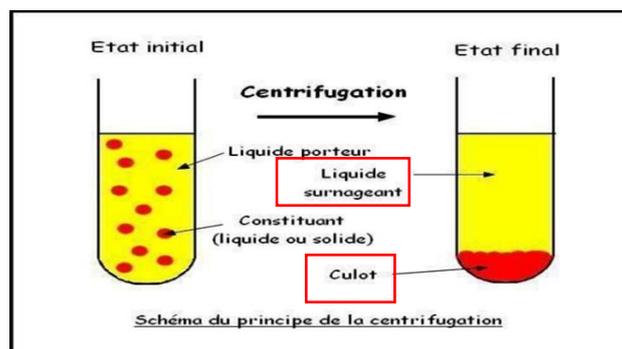


Figure 2. Principe de la centrifugation (Avant et Après).

2. Principe de la technique

Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces : **son poids (force de gravité=la pesanteur descendante)**, dirigé vers le bas, et **la poussée d'Archimède** dirigée vers

le haut. Selon sa densité, supérieure ou inférieure à celle du milieu, la force résultante sera dirigée vers le bas ou vers le haut, le corps descendra ou remontera dans le liquide.

✚ Décantation sous l'effet de la pesanteur descendante (dans le cas normale sans rotation)

Dans le cas normale ou on n'a pas de centrifugation ; les forces qui agissent sur les particules sont de deux types :

- La poussée d'Archimède ascendante (F_a)
- La force de la pesanteur descendante (F_p) (Fig.3).

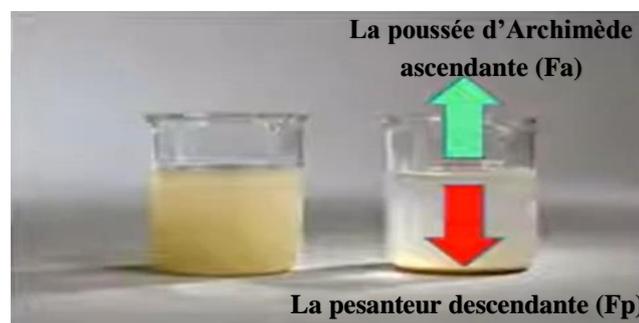


Figure 3. Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide.

✚ Décantation accélérée (centrifugation)

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières. Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à **la gravité**, et à **la poussée d'Archimède**. On faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, **la force centrifuge** qui est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation et qui va pousser les particules vers l'extérieur du rotor, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger.

La force centrifuge est générée en faisant tourner à haute vitesse un rotor pouvant contenir des tubes à centrifuger.

La séparation des composés d'un mélange est réalisable par décantation, sous l'action de la seule gravitation, mais elle nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est souvent inefficace. Il est donc plus efficace d'utiliser la centrifugation. Au cours de cette opération de séparation, les composés dans le fluide situés à une distance r de l'axe de rotation sont soumis à différentes forces:

- La force de pesanteur descendante F_p
- La poussée d'Archimède ascendante F_a
- Une force de friction F_v
- La force centripète F_c'
- La force centrifuge F_c

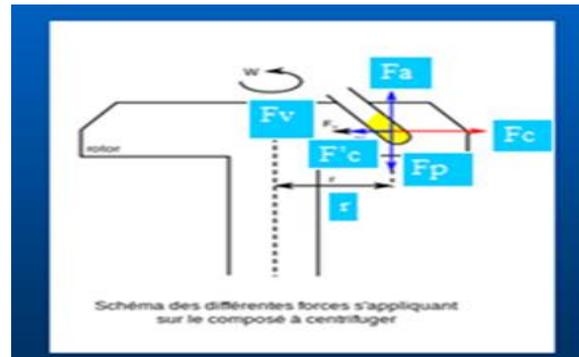


Figure. Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à centrifugation.

- **Accélération centrifuge** : considérons une particule de masse m tourne autour d'un axe passant par O (Fig. 04) à la distance x de celui-ci. Cette particule est soumise à une force 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 . Cette force centrifuge, exprimée en newtons, est donnée par la relation :

$$F_c = m\omega^2 x \quad \text{en m/s}^2 \text{ dont :}$$

- La masse m de composé à séparer.
- La distance x du tube à l'axe de rotation de la centrifugation.
- La vitesse angulaire ω exprimée en radians/seconde ou en tour/minute.

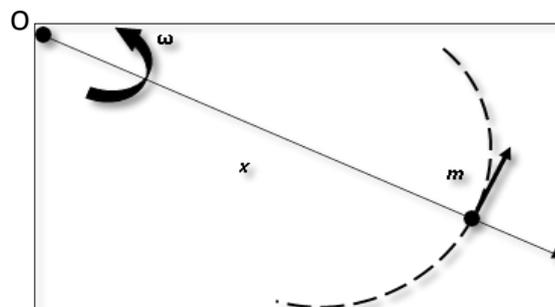


Figure 4. La force centrifuge.

3. Méthodes et appareillage

3.1. La centrifugeuse

Une centrifugeuse est constituée d'une chambre de centrifugation (enceinte) dans laquelle sort l'axe de rotation, qui est relié au **moteur**. Sur l'axe on fixe le **rotor** et dans les emplacements du rotor on met les tubes contenant l'échantillon à centrifuger (Fig.5). Les

échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux. Chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

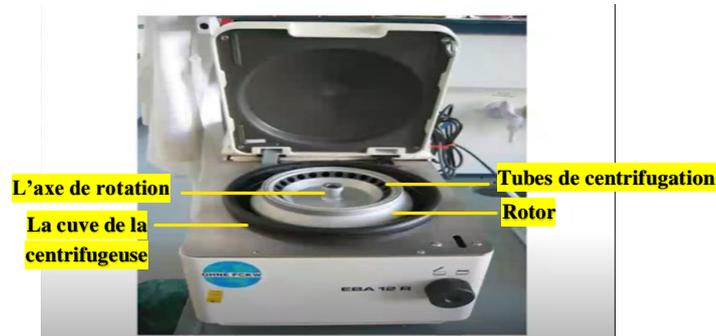
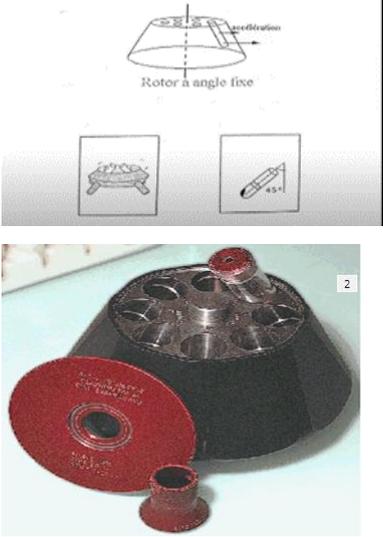
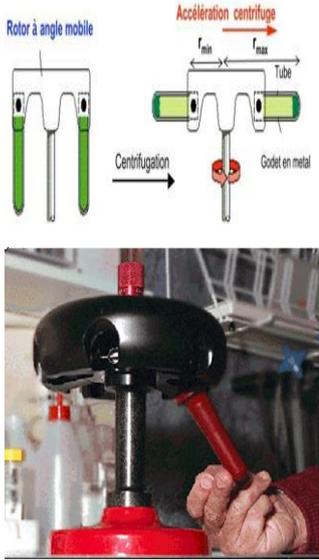
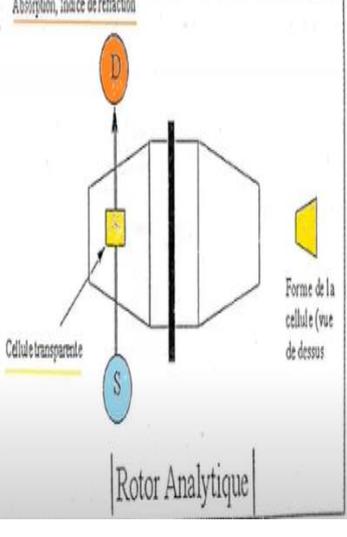


Figure 5. Principaux constituants d'une centrifugeuse.

On a développé une gamme d'appareils en fonction des besoins expérimentaux, particulièrement au niveau des accélérations requises, des volumes de matériel à centrifuger, de la température de travail, etc :

- a. **Centrifugeuses de table:** Les modèles les plus simples, souvent appelées centrifugeuses cliniques, permettent d'atteindre de faibles accélérations (1000 à 3000 xg) à des vitesses de rotation relativement basses (moins de 3000 RPM).
- b. **Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes. Elles permettent d'obtenir des vitesses de rotation de l'ordre de 30 000 RPM, donnant pour les plus petits rotors des accélérations d'environ 20 000 xg . Tous les modèles sont réfrigérés. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger les gros volumes. Certains rotors peuvent même contenir quatre ou six bouteilles de 250 mL.
- c. **Ultracentrifugeuses:** Ce sont des appareils complexes et coûteux qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300 000 xg) en faisant tourner des rotors très rapidement (50-85 000 RPM), ce qui permet la sédimentation des particules ultramicroscopique. 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.
- d. **Microcentrifugeuses:** On a aussi développé des centrifugeuses spécialement conçues pour les micro- volumes très souvent employés en biochimie moderne. Les microtubes à centrifuger sont des petits tubes coniques généralement de 1.5mL.

3.2. Les rotors : Les rotors sont de trois types

1/ Rotor à angle fixe	2/ Rotor à godets oscillants (mobile)	3/ Rotor analytique
<p>Centrifugation oblique (angulaire)= Centrifugation préparative</p> <p>- pour les séparations les plus simples entre culot (cellules, organites, membranes, protéines) et le surnageant. Ces rotors sont utilisés surtout pour des séparations séquentielles, à des vitesses de rotation croissantes.</p>	<p>-Centrifugation horizontale-</p> <p>-Les particules sont séparées grâce à leur densité dans un solvant à gradients de densité (centrifugation en gradient de densité)</p>	<p>-Ultracentrifugation analytique -</p> <p>-Ils sont employés dans le but de déterminer le coefficient de sédimentation des particules (S). -Elle utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 rpm) qui permet la sédimentation des particules ultramicroscopique. -Ils sont couplés à des diapositives optiques (spectrophotomètre, réfractomètre...etc).</p>
 <p>The diagram shows a rotor with a fixed angle, labeled 'Rotor à angle fixe'. Below it are two small images: one of a rotor assembly and another of a tube at a 45-degree angle. The photograph shows a large, dark-colored rotor with a red lid and a red tube, with a small number '2' in the corner.</p>	 <p>The diagram illustrates an oscillating rotor, labeled 'Rotor à angle mobile'. It shows a tube being tilted during centrifugation, with labels for 'Accélération centrifuge', 'r_{min}', 'r_{max}', 'Tube', and 'Godet en metal'. Below the diagram is a photograph of a hand operating a rotor on a centrifuge.</p>	 <p>The diagram shows an analytical rotor, labeled 'Rotor Analytique'. It depicts a transparent cell containing a sample (S) and a detector (D). The diagram is titled 'Absorption, indice de réfraction' and includes labels for 'Cellule transparente' and 'Forme de la cellule (vue de dessus)'. The rotor is shown in a cross-sectional view.</p>

4. Types de centrifugation

Il existe deux catégories principales de centrifugation:

➤ **Centrifugation différentielle**

C'est la méthode la plus commune. Elle permet d'isoler des structures intracellulaires, à partir d'un homogénat initial, en procédant à différentes centrifugations à des vitesses croissantes. Elle se base sur les différences **de vitesse de sédimentation** entre particules qui diffèrent par **densité et dimensions** ; la centrifugation sédimentera d'abord les particules les

plus grandes, puis les plus petites. Si deux particules ont même taille mais différente densité, alors les plus denses sédimentent plus rapidement que les moins denses.

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**. Les organites les plus denses sont séparés d'abord par centrifugation à basse vitesse (600 g). En augmentant par étapes successives l'accélération de la force centrifuge, on sépare ensuite les organites de plus faible densité jusqu'à obtenir une fraction liquide (cytosol) correspondant au cytoplasme de la cellule (Fig. 6) (Tab.2).

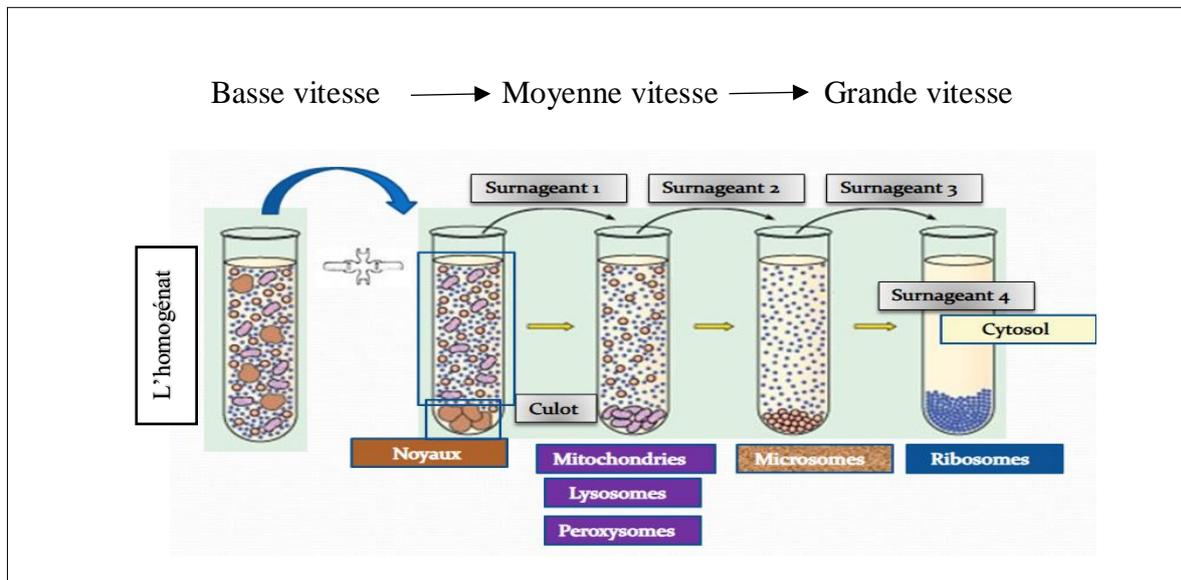


Figure 6. Centrifugation différentielle.

Tableau 2. Condition de sédimentation de quelques constituants cellulaires.

Constituants cellulaires	Condition de sédimentation
Noyau	10min à 500g
Mitochondries, lysosomes et peroxyosomes	10min à 5000g
RE, appareil de Golgi	1heure à 100000g

➤ **Centrifugation à l'équilibre en gradient de densité**

Cette technique est plus compliquée que la précédente mais présente des avantages supplémentaires. Elle nécessite l'établissement d'un gradient de densité dans le tube de centrifugation.

Lors de la centrifugation, la séparation des particules peut être accélérée en travaillant en gradient de concentration. Ceci vient du fait que la vitesse de déplacement des particules est influencée par la différence de densité entre la particule et le solvant utilisé (le milieu).

Si la particule est plus dense que le milieu, elle sédimente. Si par contre sa densité est égale à celle du milieu, elle reste immobile. Quand la densité est moins dense que le solvant, la particule monte dans le tube jusqu'à ce qu'elle trouve une zone où la densité est égale à la sienne sinon elle finira son parcours à la surface du tube: on parle **de 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 (Fig. 7). L'homogénat (La fraction cellulaire) à séparer est placée au-dessus de la solution de saccharose et centrifugée. Après centrifugation, chaque constituant rejoindra la zone de densité équivalente à la sienne, on obtient ainsi **différentes bandes** (la couche la plus dense étant au fond).

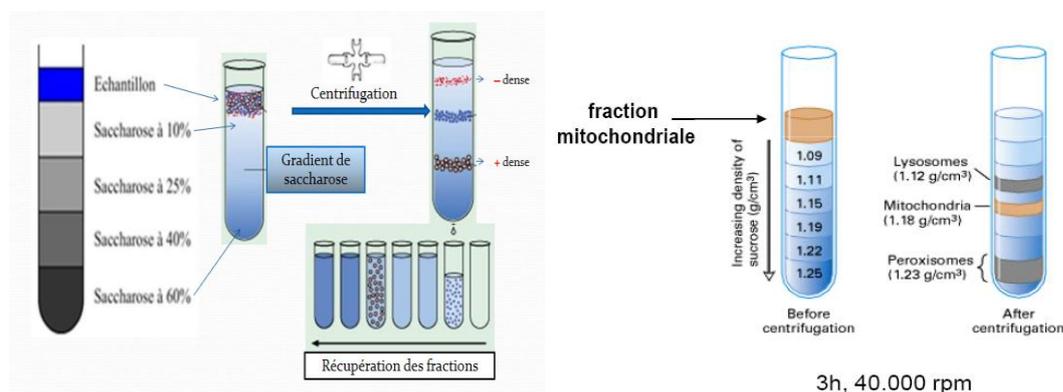


Figure 7. Centrifugation par gradient de densité (gradient discontinu).

Parmi les produits permettant de faire des gradients de concentration, on peut citer: 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.

Il existe deux types de gradients :

- **les gradients discontinus**, sont préparés avant l'opération par des dépôts successifs de solution de chlorure de césium (CsCl) ou du saccharose de densité croissante (on prépare 4 solutions de concentration différentes) (Fig.8).

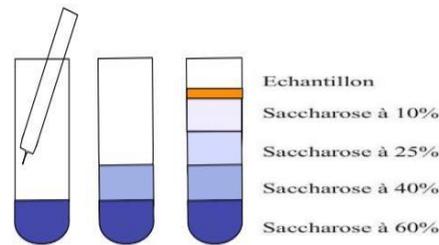


Figure 8. Exemple de gradient discontinu de Saccharose.

- **les gradients continus**, pour lesquels la variation de densité est continue (comme leur nom l'indique) (Fig.9). Ils sont préparés automatiquement à l'aide d'un formeur de gradient 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).

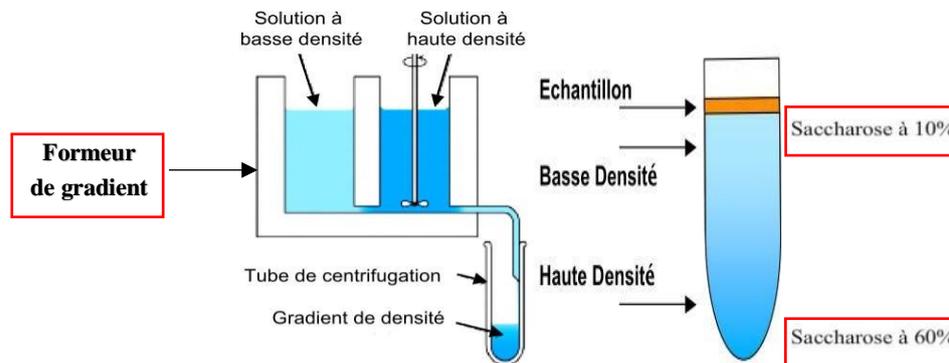


Figure 9. Exemple de gradient continu de Saccharose en utilisant un formeur de gradient.

5. Application à la biochimie

- Séparation de phases : La séparation de deux phases liquides non miscibles qui peut être effectuée de façon beaucoup plus rapide par centrifugation. Il suffit de les centrifuger quelques minutes et la séparation se fera.
- Fractionnement cellulaire : la centrifugation différentielle est utilisée fréquemment pour séparer les composantes cellulaires. Évidemment les vitesses exactes et les durées de centrifugation peuvent varier en fonction du type de tissus, du tampon ou d'autres facteurs.
- 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.