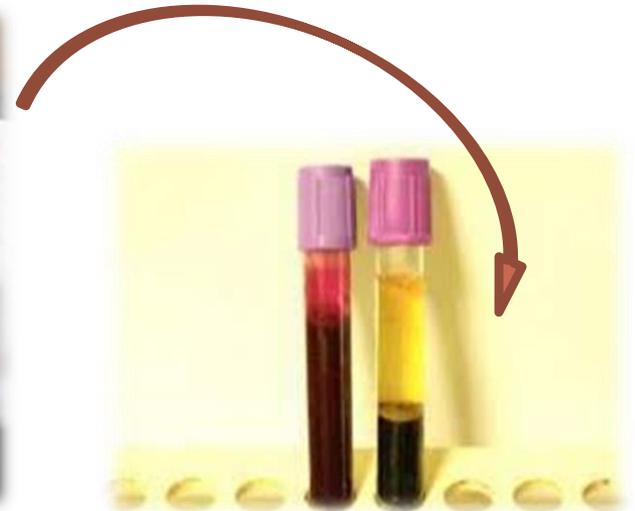


Module: Techniques de laboratoire II :

Centrifugation



Chargée du module: Mme AYOUNI. Z

PLAN DU COURS

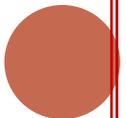


- ❑ Définition

- ❑ Principe de la centrifugation

- ❑ Types de centrifugeuses

- ❑ Caractéristiques des centrifugeuses



I. Définition

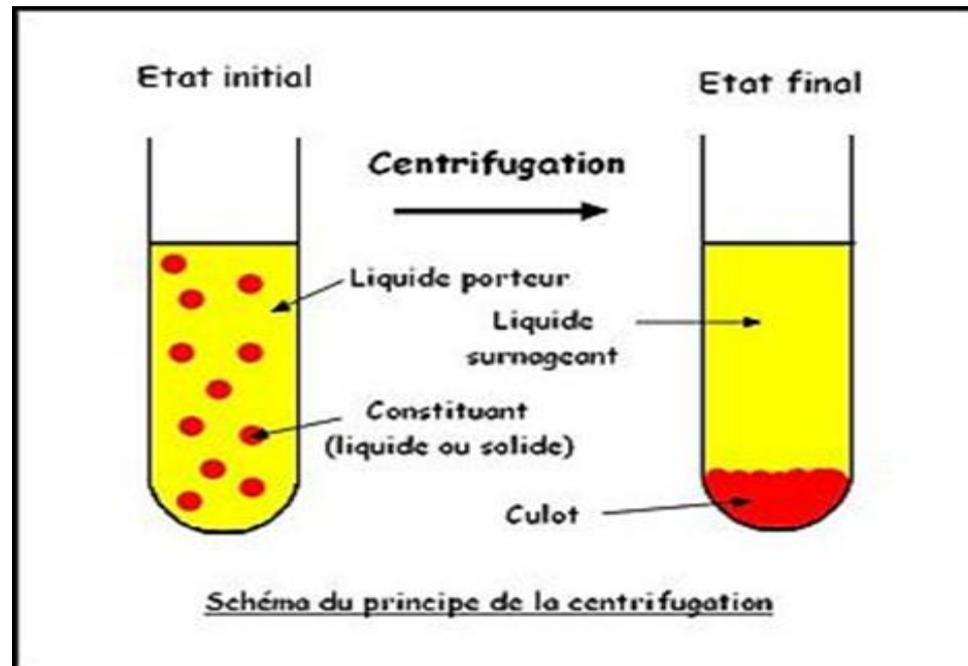
La **centrifugation** est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge.

En biologie ces particules peuvent être des cellules, des organites, des macromolécules.

Sédimentation
centrifuge

Centrifugation

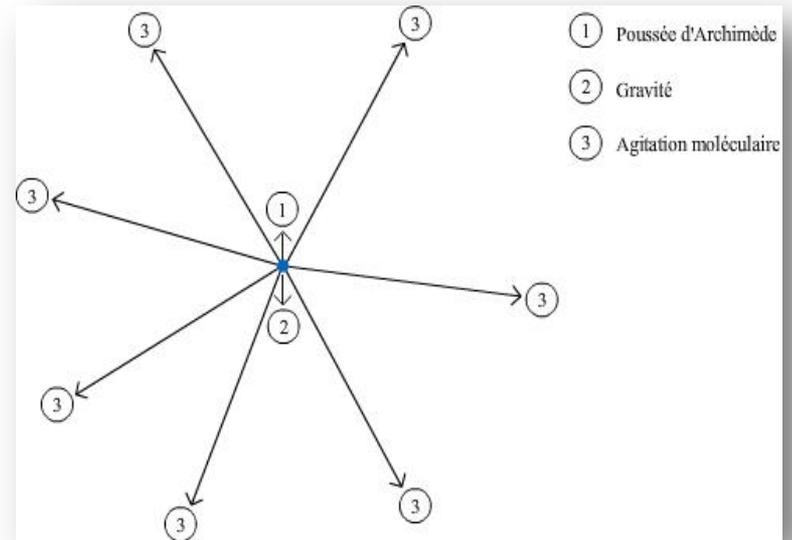
Décantation
centrifuge



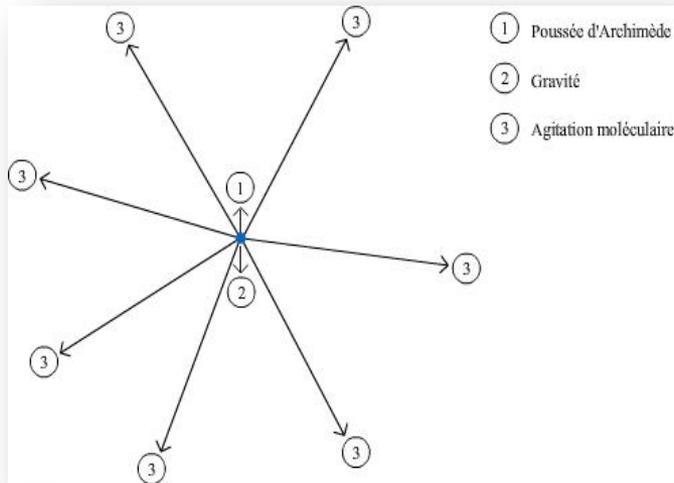
I. Définition

Les constituants contenus dans un liquide, peuvent être séparés par centrifugation. Ces particules sont soumises à plusieurs types de force: la **force de gravité**, la **poussée d'Archimède** et pour la majorité d'entre elles; l'agitation moléculaire.

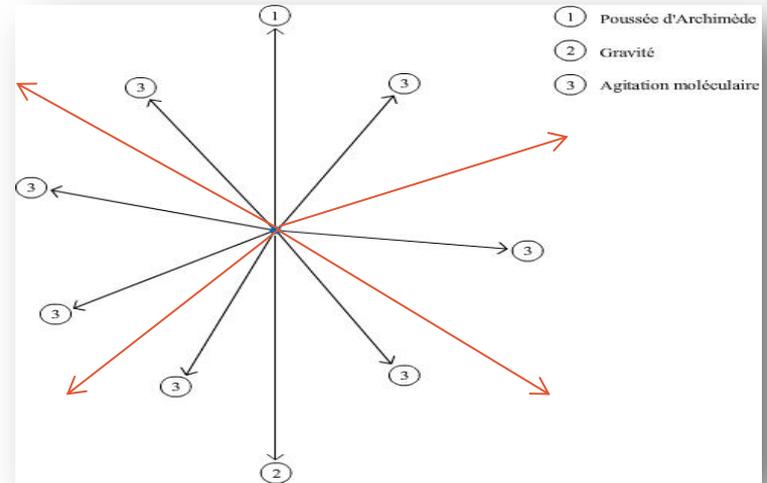
Forces s'exerçant sur une
particule en suspension dans
un liquide



II. Principe de la centrifugation



Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide

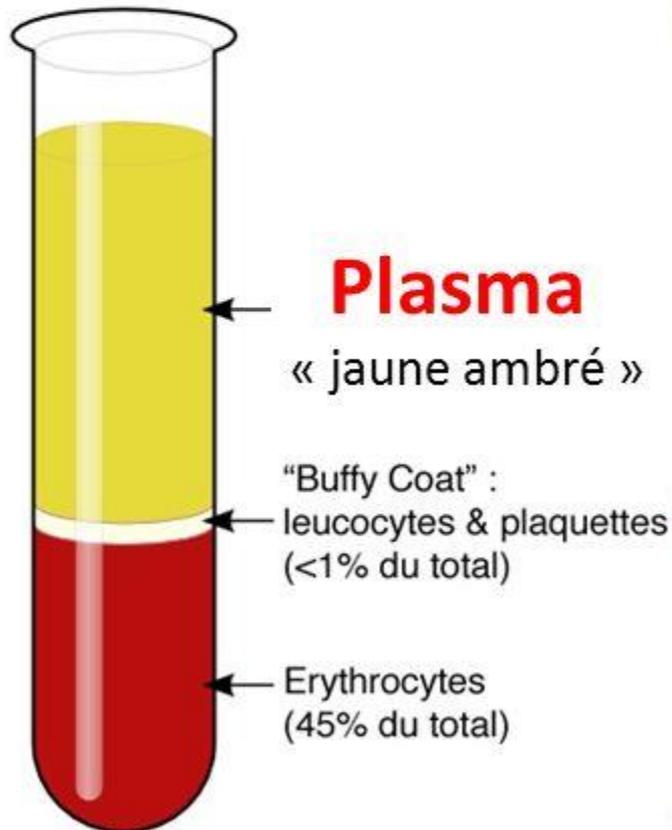
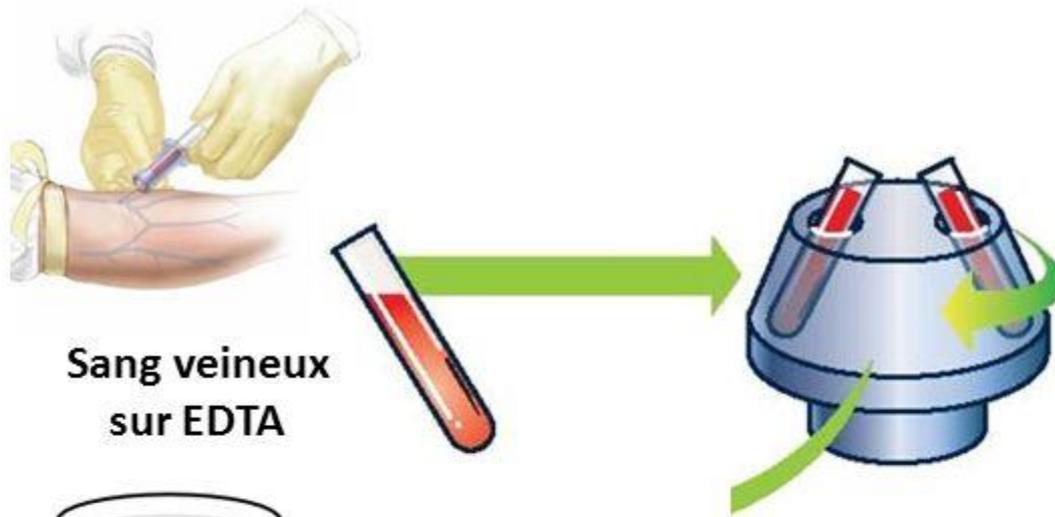


Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à centrifugation

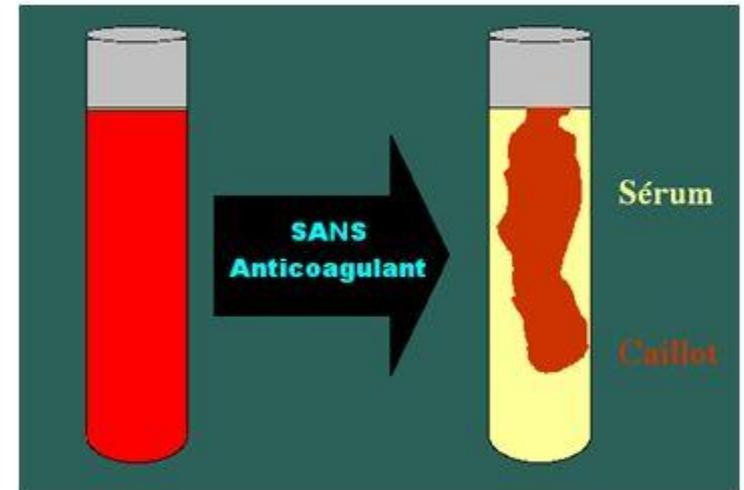
En faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, **la force centrifuge**, qui est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation



Le Plasma (1)



≠ Sérum



Fibrinogène → Fibrine

Éléments cellulaires du Sang

= Hématocrite ≈ 45 %

II. Principe de la centrifugation

* En augmentant γ , on accélère la vitesse de sédimentation des cellules sanguines et on réduit, du coup, le temps d'attente... cela se réalise grâce à **la force centrifuge** des centrifugeuses ;

* Par ailleurs, on peut ralentir la sédimentation en agissant sur la viscosité du milieu en utilisant des produits tel le dextran: polymère de dextrose(glucose) de masse moléculaire très élevée).

III. Types de centrifugeuses.

1. La centrifugeuse à pots basculant (centrifugation à l'horizontale)

Elle présente:

- Axe vertical qui tourne à grande vitesse ;
Cet axe entraine une étoile porte-tubes solidaire de cet axe.
- Des tubes placés dans des pots métalliques de l'étoile porte-tubes

R! Lorsque la centrifugeuse est en **arrêt**, les tubes sont en **position verticale**;
Lorsqu'elle est mise en **marche**, les pots se placent à **l'horizontale**.

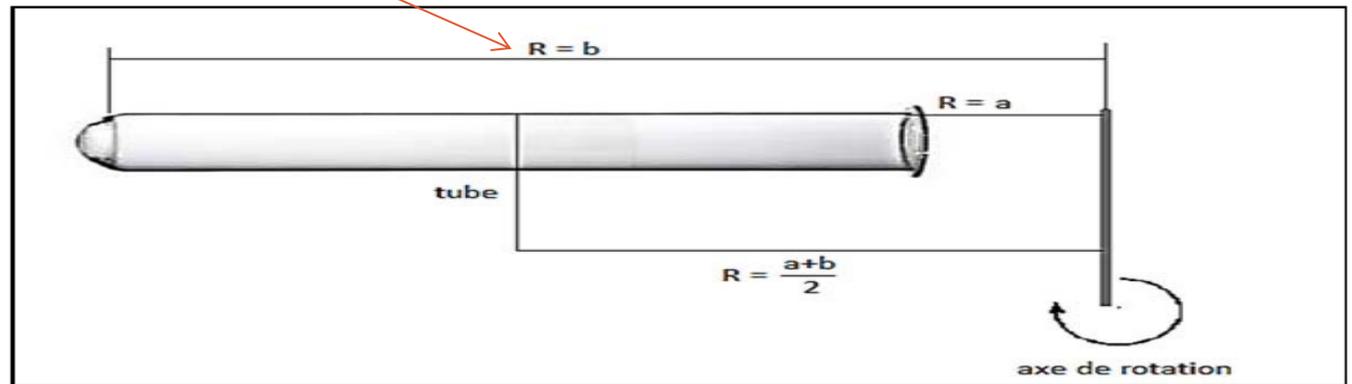
III. Types de centrifugeuses.

L'accélération γ

L'accélération fournie par la centrifugeuse est exprimée en multiples de $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ (exemple : $10000 \times g$)

$$\gamma = R \times N^2 \times 1,118 \times 10^{-5} \quad \text{avec:}$$

R : rayon en cm correspond à la distance du tube à l'axe de rotation ;
 N^2 : carré de la vitesse exprimée en nombre de tours par minutes (ou Révolution Par Minutes = RPM).



- D'après cette formule, l'accélération est proportionnelle au carré de la vitesse de rotation N^2 et au rayon R .
- Le rayon R varie le long du tube (et avec lui l'accélération γ)

III. Types de centrifugeuses.

Variation de R

Conséquence de cette variation de R

- Une particule placée au sommet (R réduit = a) subira une accélération moins importante qu'une particule placée au fond du tube (R plus grand = b).
- Avec une vitesse de centrifugation ($N^2 = x$ tours/mn) constante, l'accélération d'une particule placée au sommet va augmenter au fur et à mesure qu'elle se rapproche du fond.
- Pour tenir compte de cette variation de R , on prend une valeur de R moyenne ($= a+b/2$) pour calculer

III. Types de centrifugeuses.

Reproduire une centrifugation :

L'indication du nombre de tours/min (N^2) d'une centrifugation ne permet pas de reproduire fidèlement cette opération.

Il faudrait indiquer, en plus, **le rayon R** (pour mesurer) et indiquer le type de centrifugeuse utilisée (horizontale, oblique, verticale) ;

Il est nécessaire d'indiquer également **le temps de centrifugation**.

Remarque : on peut utiliser un namogramme (à la place de la formule ci-dessus) pour calculer l'accélération en g en connaissant la valeur du rayon et la vitesse de rotation en RPM.

III. Types de centrifugeuses.

Exemple

- Rayon de rotation 6 cm;
- vitesse de rotation : 14500 rpm

D'après le namogramme ci-après (figure),

$$\gamma = 15000 \text{ g}$$

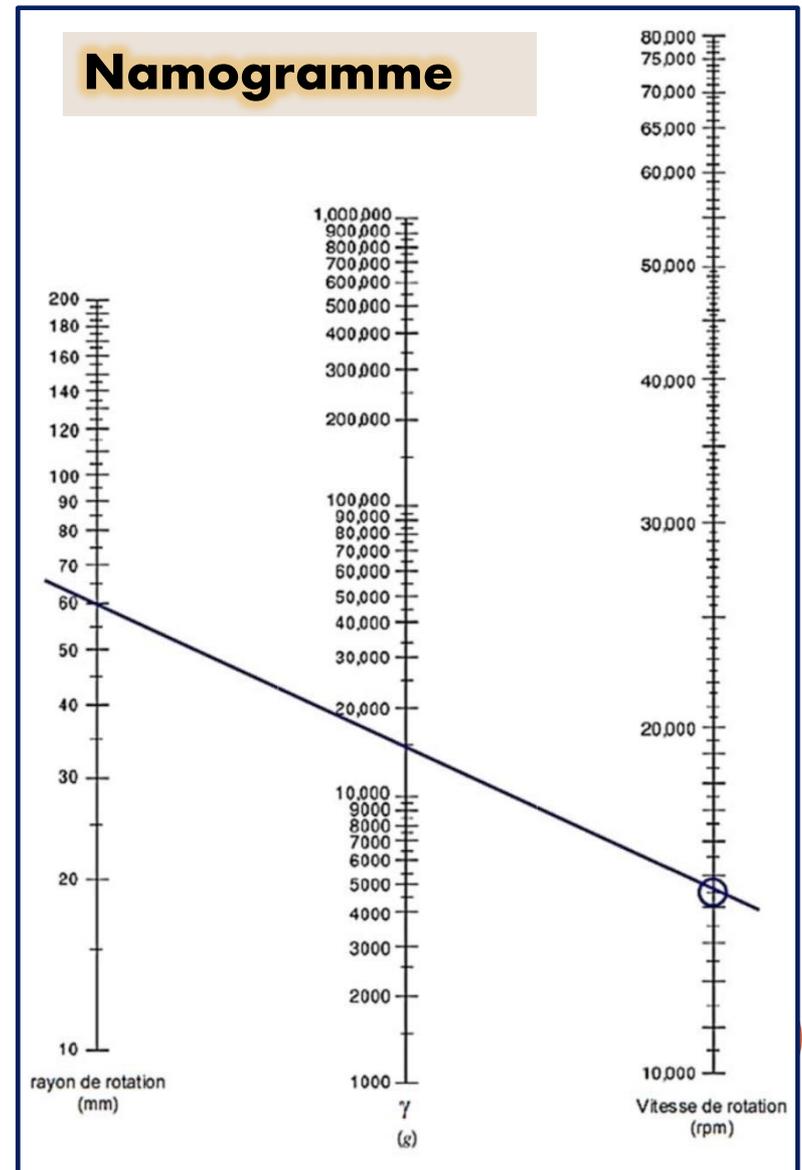
Inversement, si l'on connaît la valeur de γ et le rayon du rotor on peut calculer la vitesse de rotation en rpm pour obtenir une telle accélération

Ex:

- $\gamma = 15000 \text{ g}$;
- Rayon de rotation 6 cm

D'après le namogramme, $N^2 = 14500$

rpm



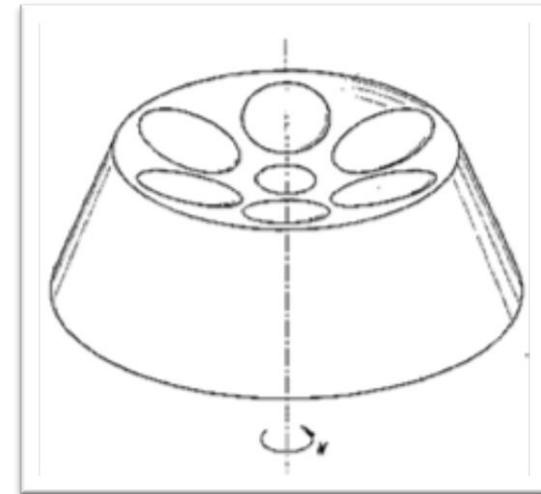
III. Types de centrifugeuses.

2. La centrifugeuse oblique

(angulaire)

Les tubes se placent obliquement dans des orifices adaptés d'un bloc métallique (le rotor). Le rotor est solidaire à l'axe de rotation.

Ce type de centrifugeuses se caractérise par des vitesses de rotation (N^2) plus élevées par rapport aux centrifugeuses horizontales mais, comme le rayon R est plus faible, l'accélération obtenue avec les deux types de centrifugeuses est pratiquement la même.



Centrifugeuse oblique

III. Types de centrifugeuses.

L'équilibre de la centrifugation:

Les pots métalliques (les tubes qu'ils portent) diamétralement opposés doivent avoir exactement le même poids surtout lorsque l'accélération atteint des valeurs élevées (ultracentrifugation). Dans ce cas, un défaut d'équilibrage, même très léger (en mg /en g) peut être très dangereux.

III. Types de centrifugeuses.

3. Les ultracentrifugeuses

Elles diffèrent des centrifugeuses (et des micro-centrifugeuses) classiques par la puissance de leur moteur d'entraînement et par l'établissement d'un vide très poussé dans la chambre de rotation pour éviter l'échauffement du rotor par frottement dans l'air.

La première ultracentrifugeuse a été mise au point vers 1923 par Svedberg ; elle pouvait atteindre une vitesse de 80 000 tours/min et son accélération atteignait les 600 000 x g.

On commence à parler d'ultracentrifugation dès que l'accélération dépasse les 20 000 x g (lorsque l'accélération est à 20 000 x g, on parle de centrifugation

Grâce à elle, Svedberg a montré que les protéines sont des macromolécules de nature homogène et qu'elles sont formées de sous-unités.

III. Types de centrifugeuses.

A- Centrifugation différentielle :

Elle permet de séparer un homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants par une **succession de centrifugations** à **des temps** et **des accélérations progressivement croissants**.

Les composants les plus gros et les plus denses subissent la force centrifuge la plus grande et ils se déplacent le plus rapidement, ils sédimentent pour former un **culot** au fond du tube,

Tandis que les composants plus petits, moins denses, restent en suspension au-dessus en formant un **surnageant**.

III. Types de centrifugeuses.

Exemple : «Centrifugation d'un tissu de foie du rat homogénéisé »

Centrifugation 1 ($600 \times g / 5\text{min}$), on obtient

Le culot 1 (noyaux, cellules, cytosquelettes) + **surageant 1** ;

Centrifugation 2(du surageant 1 à $20\,000 \times g / 20\text{min}$), On obtient

Le culot 2 (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes) + **surageant 2** ;

Centrifugation 3(du surageant 2 à $100\,000 \times g / 1\text{h}$; On obtient

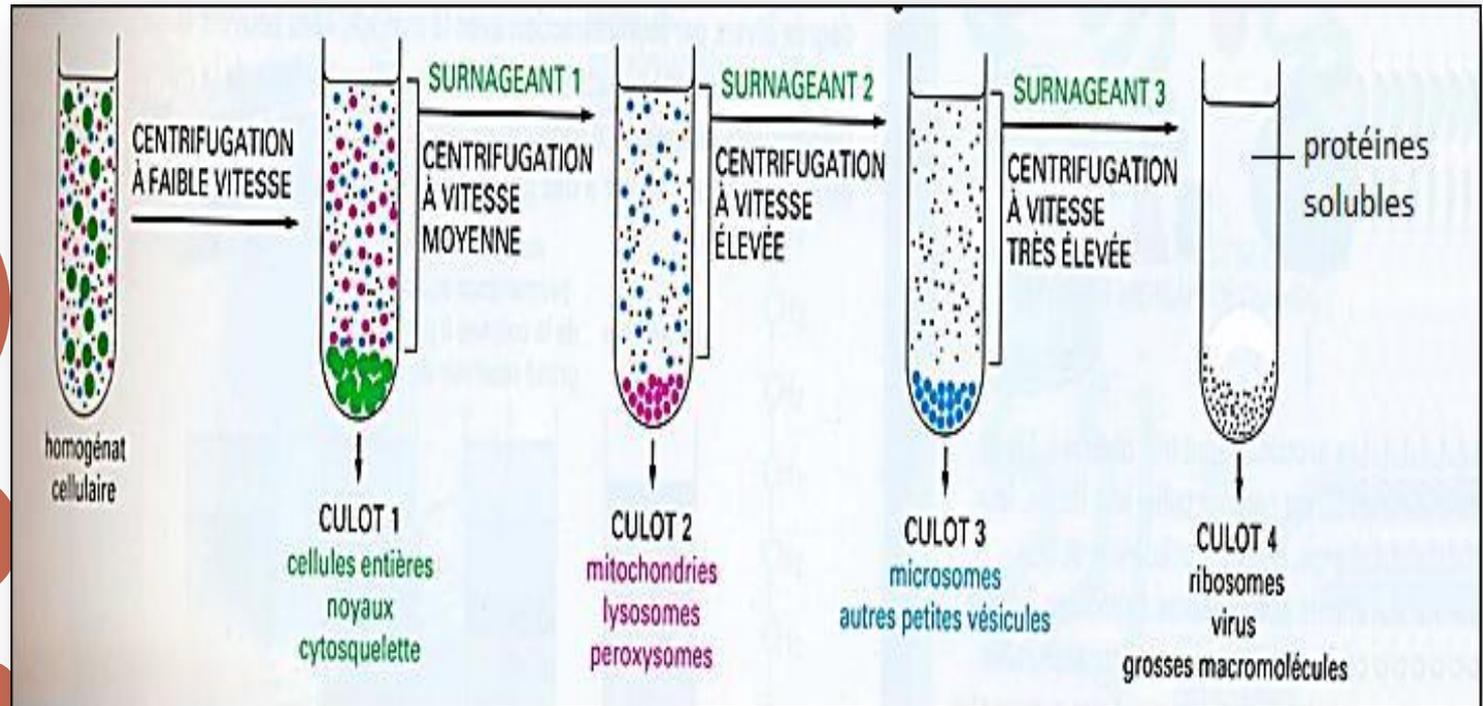
Le culot 3 (microsomes, autres petites vésicules) + **surageant 3** ;

Centrifugation 4(du surageant 3 à $150\,000 \times g / 3\text{h}$; On obtient

Le culot 4 (ribosomes, virus) + **surageant 4** (protéines solubles);

III. Types de centrifugeuses.

Exemple : «Centrifugation d'un tissu de foie du rat homogénéisé »



III. Types de centrifugeuses.

B- Centrifugation zonale (à gradient de densité) :

On dépose le mélange (l'échantillon) à la surface d'un gradient de **saccharose** préalablement formé, les molécules vont migrées d'autant plus vite qu'elles sont plus volumineuses, sous formes de bandes bien distinctes.

Une fois les constituants séparés, on récolte les fractions du gradient pour les analyser ultérieurement par un trou pratiqué par aiguille au fond du tube (figure).

Analyse de la taille des polyribosomes

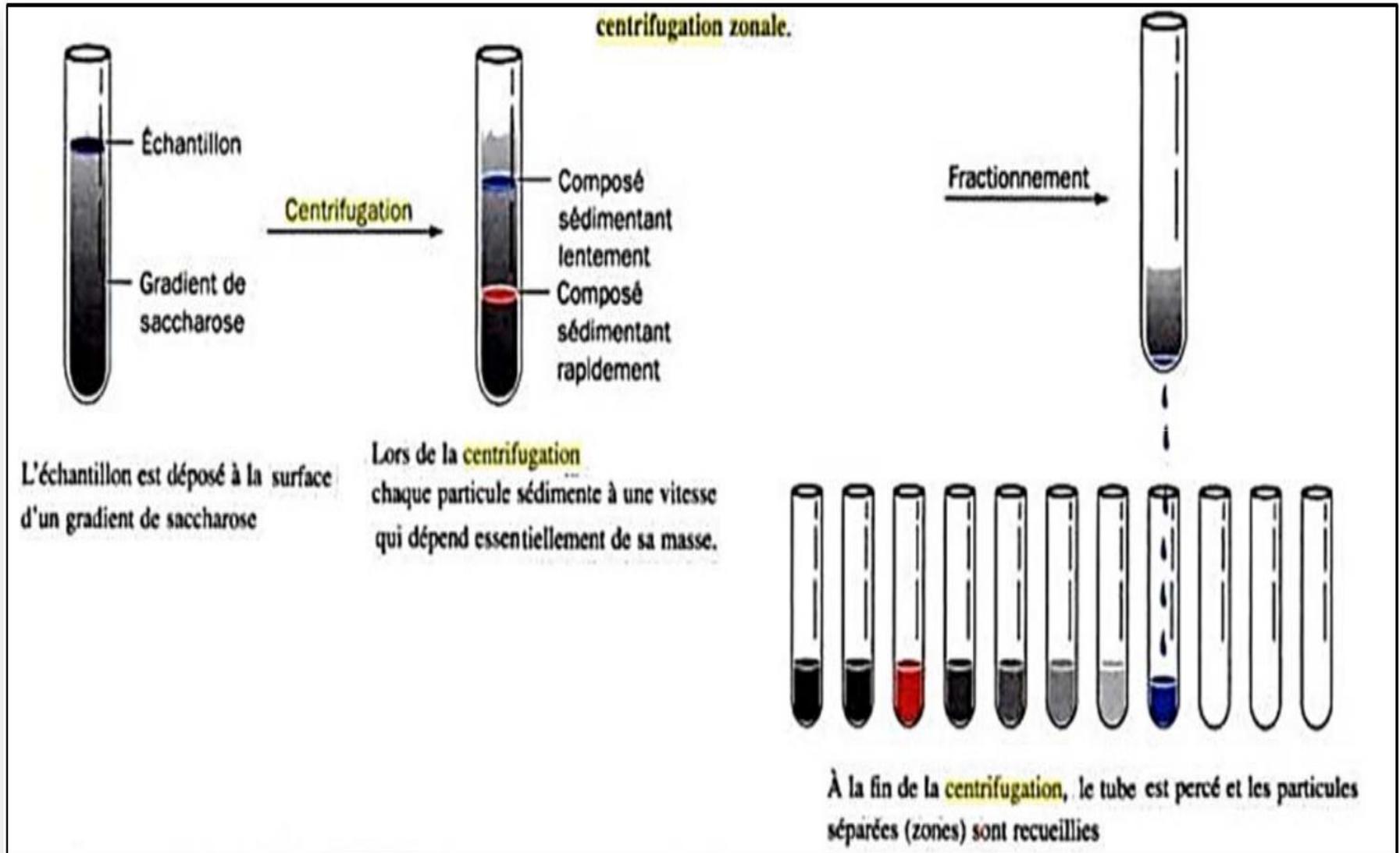
III. Types de centrifugeuses.

Très important :

- ❖ L'échantillon doit être centrifugé juste assez longtemps pour séparer les molécules recherchées en zones distinctes ;
- ❖ si un échantillon est centrifugé brièvement, les molécules ne seront pas suffisamment séparées ;
- ❖ s'il est centrifugé plus longtemps que nécessaires, toutes les molécules finiront dans un culot au fond du tube.

L'utilisation d'un gradient de densité augmente la résolution de la centrifugation.

III. Types de centrifugeuses.



III. Types de centrifugeuses.

C- Centrifugation à l'équilibre (isopycnique) :

- Elle sépare les particules selon leur densité à l'équilibre.
- L'échantillon est dissous dans une solution contenant une substance (qui va former le gradient après centrifugation)
- Le mélange est centrifugé à grande vitesse jusqu'à ce que la solution soit à l'équilibre. Les composants de l'échantillon vont s'y équilibrer sous forme de bandes aux endroits où leur densité est égale à celle de la solution.

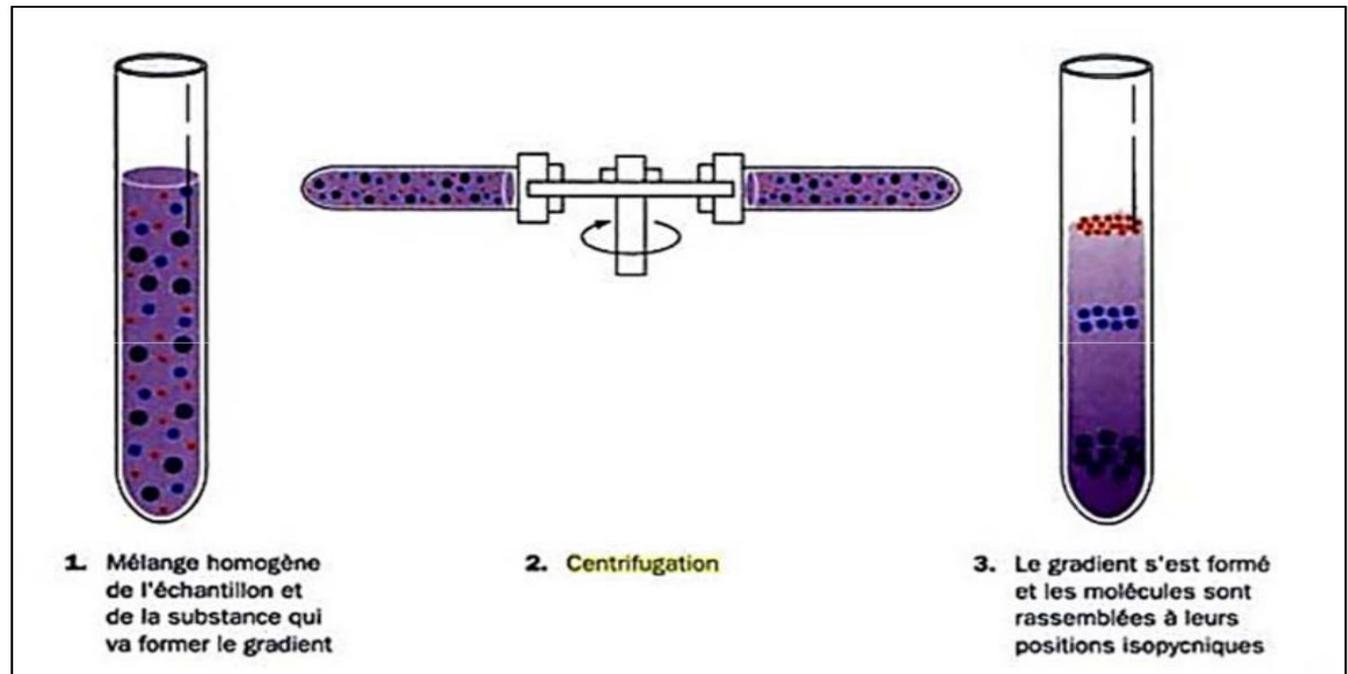
Différents types d'ADN peuvent être séparés par centrifugation isopycnique sur un gradient de CsCl.

III. Types de centrifugeuses.

Ces bandes sont recueillies en fractions séparées après ponction du tube.

Cette méthode est particulièrement utilisée pour séparer des mélanges dont les constituants ont des densités très différentes (ADN, ARN, virus, certains organites cellulaires comme les ribosomes...)

Par contre, elle n'est pas appropriée pour séparer des mélanges de protéines car la plupart des protéines ont des densités très semblables.



II. Types de Centrifugeuses



Centrifugeuse de laboratoire



Centrifugeuse de paillasse



Centrifugeuse de paillasse
réfrigérée

IV. Caractéristiques des centrifugeuses :

✓ La réfrigération :

Il existe des centrifugeuses **réfrigérées** (pour éviter l'échauffement des pots/ du rotor au cours de la centrifugation) et **non réfrigérées**.

✓ La minuterie :

Pour prérégler le temps de centrifugation.

✓ L'accélération

Elle peut aller jusqu'à $20000 \times g$ pour les centrifugeuses (peut atteindre $1\ 000\ 000 \times g$ pour les ultracentrifugeuses).

✓ L'arrêt de la centrifugation :

Doit être progressif pour éviter de remettre en suspension des cellules, des macromolécules séparées.

L'arrêt progressif se fait à l'aide d'un courant de faible voltage qui tente de faire tourner l'axe de rotation dans le sens inverse ce qui le freine progressivement jusqu'à arrêt total.

IV. Caractéristiques des centrifugeuses :

Les caractéristiques des tubes :

- ✓ **Matière** : verre /plastique /métal...
- ✓ **Volume** : en ml (eppendorf 1 à 2 ml, ..., 50 ml, ...), en μ l (tubes Beckman de 400 μ l, ... pour micro-centrifugeuses)
- ✓ **Forme du fond** : rond /cylindro-conique

CONCLUSION

La centrifugation est donc une très bonne technique de séparation. Cette technique permet de séparer plus rapidement les produits qu'une décantation classique grâce à la force centrifuge.



I. Définition



Merci pour votre attention

