

Chapitre 7 : Centrifugation

1. Définition

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide.

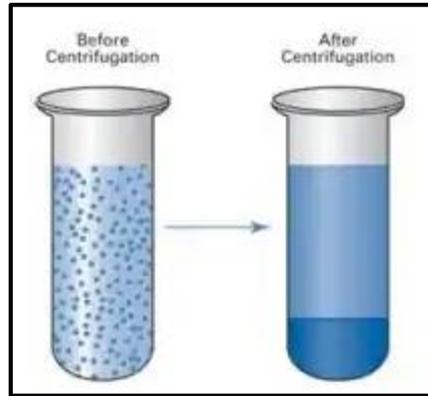


Figure 1 : Centrifugation.

L'appareil utilisé est appelée centrifugeuse. Les centrifugeuses utilisées à cette fin sont des machines tournant à grande vitesse afin d'imprimer une accélération importante à leur contenu. Elles permettent notamment d'accélérer la décantation de suspensions liquides ou la sédimentation de particules colloïdales.



Figure 2 : Centrifugeuse.

2. Principe

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, force qui s'exerce du haut vers le bas, et à la poussée d'Archimède, force qui s'exerce du bas vers le haut. En dehors du cas particulier dans lequel ces deux forces sont parfaitement équilibrées (voir plus bas « La centrifugation à l'équilibre »), on pourrait donc s'attendre qu'avec le temps tous les constituants finissent par tomber au fond du récipient dans lequel ils se trouvent (sédimentation) ou remontent à la surface. 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. L'accélération obtenue, notée g, est fonction de la vitesse angulaire de rotation et de la distance à l'axe de rotation. Elle est donnée par la formule suivante :

$$g = w^2 r = 1,119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

avec :

- w : vitesse angulaire (rad/s) ;
- r : distance à l'axe de rotation ;
- n : nombre de rotations par minute (rpm).

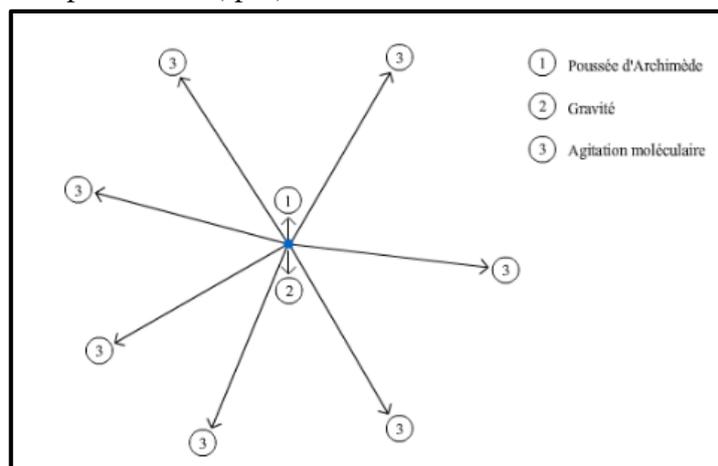


Figure 3 : Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide.

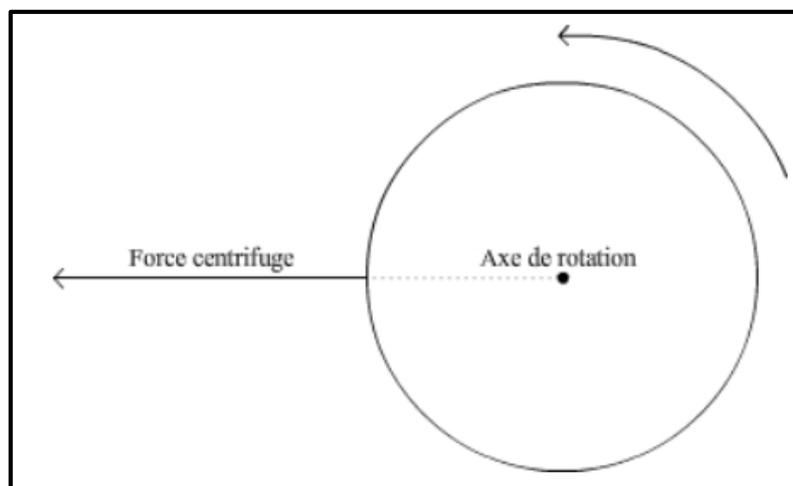


Figure 4 : Force centrifuge.

3. Types de centrifugation

3.1. 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. 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°.

3.2. 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).

3.3. 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.

4. Application

- 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 masses molaires différentes séparent ;
- 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 au pourcentage du composé.