

## I.2. Sédimentation : Centrifugation et ultracentrifugation

### I.2.1. Définition

La **sédimentation** est une technique d'analyse permettant de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur lorsque la dispersion est formée d'une substance beaucoup plus dense que le liquide (décantation) ; lorsque la densité de la substance est plus faible, la sédimentation est gênée par l'agitation thermique ; il faut avoir recours à des champs de forces plus intenses.

La **centrifugation** permet de remplacer l'accélération de la pesanteur ( $g$ ) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (6 à 10 000 tours par minute).

L'**ultracentrifugation** qui utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75 000 tours par minute) permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

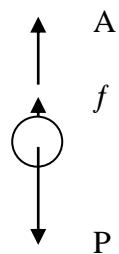
#### Remarque :

- ✓ La sédimentation ne permet pas la séparation de système formé d'une seule phase : mélange homogène ou solution vraie.
- ✓ de la pesanteur  $\Rightarrow$  décantation
- ✓ une force centrifuge  $\Rightarrow$  centrifugation

### I.2.1.1. Etude théorique

#### A. Sédimentation sous l'effet de la pesanteur

On considère une particule de masse  $m$  assimilée à une sphère de rayon  $r$ , dispersée dans un liquide de coefficient de viscosité  $\eta$ . en négligeant un certain nombre de forces secondaires (mouvements browniens, forces électriques, courants de convection), trois forces s'appliquent à la particule :



- 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 Stokes  $f = 6 \pi \eta r v$  ( $v$  est la vitesse de sédimentation).

La relation fondamentale de la dynamique donne (en supposant  $P > A$ ) :

$$m (dv/dt) = (P - A) - 6 \pi \eta r v$$

Son intégration montre que la vitesse acquiert rapidement une valeur limite  $v_1$ , lorsque son accélération est nulle :

$$6 \pi \eta r v_1 = (P - A)$$

Donc :

$$v_1 = (P - A) / 6\pi\eta r = [4/3 \pi r^3 (p - p_1)] / 6\pi\eta r$$

La décantation a lieu si  $P$  est supérieur à  $A$  (particules plus dense que le liquide) ; elle se fait en général lentement, d'autant plus qu'il faudrait faire intervenir l'agitation thermique qui tend, au contraire à disperser les particules au maximum.

### I.2.2. Décantation

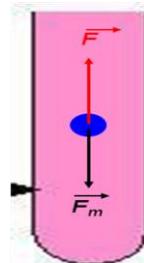
#### I.2.2.1. Définition

- La décantation est une opération de séparation mécanique, par différence de gravité de phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide  $\Rightarrow$  sédimentation sous l'effet de la pesanteur.
- On peut séparer des phases liquides, une phase solide en suspension dans une phase liquide.
- La séparation des composés d'un mélange par décantation nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est donc souvent inefficace.

#### I.2.2.2. Principe

- Si on laisse reposer une suspension solide dans une phase liquide, on observe que les particules sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimète, tendent à tomber vers le fond ou à remonter à la surface selon leur densité et leur taille.
- Soit une particule de volume «  $V$  » et de densité «  $d$  » en suspension dans un liquide de densité  $d_0$
- La masse apparente de la particule en tenant compte de la poussée d'Archimète est :  

$$m = V (d - d_0)$$



Dans ces conditions la particule subit l'action de 2 forces de sens opposées :

- Action de la pesanteur ou force motrice  $\Rightarrow F_m = V (d - d_0) \cdot g$
- Force de friction  $F$  de la part du liquide due à sa viscosité  $\Rightarrow F = f \cdot v$

**g**  $\Rightarrow$ : intensité de la pesanteur

**f**  $\Rightarrow$  coefficient de friction

**v**  $\Rightarrow$  vitesse de chute

**V**  $\Rightarrow$  volume de la particule

$$\text{La vitesse de chute devient constante} \Rightarrow F_m = F \Rightarrow v = \frac{V(d - d_0)}{f} \cdot g$$

$$\text{Particule sphérique de rayon } r \Rightarrow V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$\text{Coefficient de friction} \Rightarrow f = 6\pi\eta r \quad (\text{Loi de Stokes})$$

$$\text{La vitesse de chute devient égale à} \Rightarrow v = \frac{2}{9} \cdot g \cdot (d - d_0) \cdot \frac{r^2}{\eta} \quad \dots 1 \dots$$

**$\eta$** : Coefficient de viscosité ( $\text{g.cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ou poise)

Selon la formule 1, l'efficacité d'une sédimentation dépend :

- ✓ de la différence de densité  $\Rightarrow (d - d_0)$
- ✓ des dimensions de la particule  $\Rightarrow$  la vitesse varie comme le carré du rayon  $r$

**Exemple :** Soit  $d-d_0 = 1$  (g.cm<sup>-3</sup>),  $\eta = 10^{-2}$  poise :

Exemple 1  $\Rightarrow r = 10\mu\text{m} \Rightarrow v = 20$  mètres/ jour

Exemple 2  $\Rightarrow r = 1\mu\text{m} \Rightarrow v = 20$  cm/jour

Exemple 3  $\Rightarrow r = 20\text{A} \Rightarrow v = 0.76\mu\text{m}/\text{jour}$

### I.2.2.3. Validité de la loi de sédimentation par gravité

- ✓ La loi de sédimentation par gravité ne tient pas d'un facteur qui s'oppose à la sédimentation à côté de la viscosité  $\Rightarrow$  le mouvement brownien.
- ✓ Ce mouvement tend à répartir les particules en suspension de la façon la plus homogène possible.
- ✓ Ce mouvement n'est que l'image macroscopique de l'agitation thermique.

On distingue 2 cas :

- ❖ Particules denses et grosses  $\Rightarrow$  agitation thermique est négligeable  $\Rightarrow$  la loi est vérifiée  $\Rightarrow$  ex1 et ex2.
- ❖ Particules petites  $\Rightarrow$  effet de la pesanteur négligeable devant l'agitation thermique  $\Rightarrow$  loi non vérifiée  $\Rightarrow$  ex3 (résultat théorique).
- ❖ La formule 1 ne s'applique qu'à de grosses particules et non aux petites particules.
- ❖ Pour rendre la loi applicable aux petites particules  $\Rightarrow$  il faut augmenter le champ de force gravitationnelle  $\Rightarrow$  travailler à de très grandes accélérations  $\Rightarrow$  vitesse de chute devient assez rapide  $\Rightarrow$  non perturbée par l'agitation thermique  $\Rightarrow$  utilisation d'une force centrifuge à la place du poids (pesanteur)  $\Rightarrow$  Centrifugation.

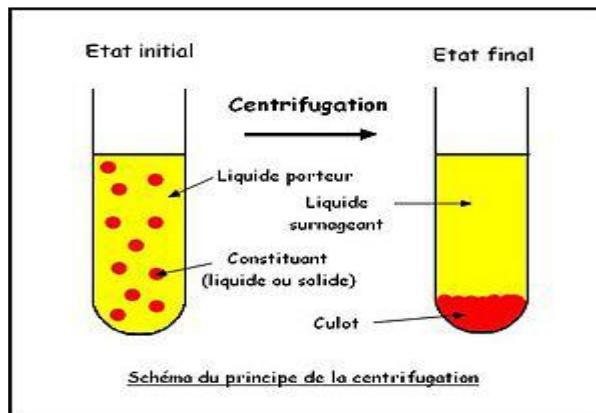
### I.2.3. Sédimentation par centrifugation

#### I.2.3.1. Définition

La centrifugation est une opération de séparation mécanique sous l'action d'une force centrifuge due à la rotation d'un rotor tournant à grande vitesse permettant d'obtenir des champs de gravitation (accélération) supérieures à celui du champ terrestre (g)  $\Rightarrow$  ce qui permet d'accélérer à volonté la sédimentation des particules ou même la provoquer là où elle n'avait pas tendance à se produire spontanément.

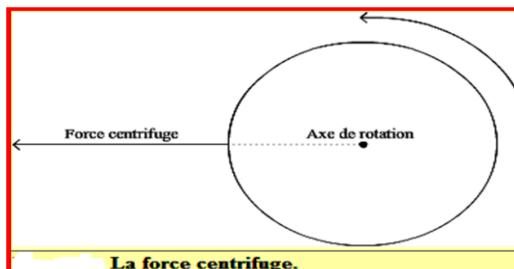
#### I.2.3.2. Principe

Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces : son poids (la pesanteur), dirigé vers le bas, et la poussée d'Archimède dirigée vers le haut. Selon sa densité et sa taille, 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. Ce phénomène est la sédimentation. Ce procédé, la décantation, est cependant relativement lent pour les très fines particules (sensibles à l'agitation thermique) et les liquides particulièrement visqueux.



Pour rendre possible la séparation, il faut travailler avec de très grandes accélérations. Ceci est possible avec des centrifugeuses ou ultracentrifugeuses.

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.



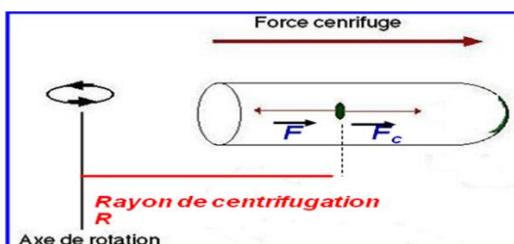
- Pour un constituant donné, en choisissant correctement la vitesse de rotation, l'accélération obtenue peut devenir prépondérante par rapport à l'agitation moléculaire.

#### I.2.3.3. Aspect quantitatif

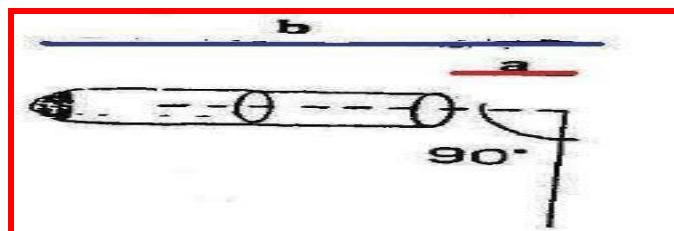
- Soit une particule de masse «  $m$  » tourne autour d'un axe  $\Rightarrow$  Décrit une circonférence de rayon «  $R$  »  $\Rightarrow$  Elle subit une force centrifuge  $F_c$

$$F_c = m \cdot \gamma_r$$

$\gamma_r$  : accélération radiale



- ✓ Le rayon  $R$  correspond à la distance du tube à l'axe de rotation.
- ✓ Il varie le long du tube et augmente au fur et à mesure que la particule descend dans le tube.
- ✓ Pour une particule située au sommet du tube  $R = a$ , alors que  $R = b$  pour une particule placée au fond du tube.



$$\gamma_r = \frac{V^2}{R} \quad \gamma_r = \omega^2 \cdot R \quad V = \frac{2\pi \cdot N \cdot R}{60}$$

$V \Rightarrow$  vitesse linéaire de rotation

$R \Rightarrow$  Rayon de centrifugation ou de rotation

$N \Rightarrow$  nombre de tour par minute

$\omega \Rightarrow$  vitesse angulaire

**La vitesse de chute de cette particule, en suspension dans un liquide de densité  $d_0$**

$$v = \frac{V(d - d_0)}{f} \cdot \gamma_r \quad \text{Ou} \quad v = \frac{2}{9} \cdot \gamma_r \cdot (d - d_0) \cdot \frac{r^2}{\eta}$$

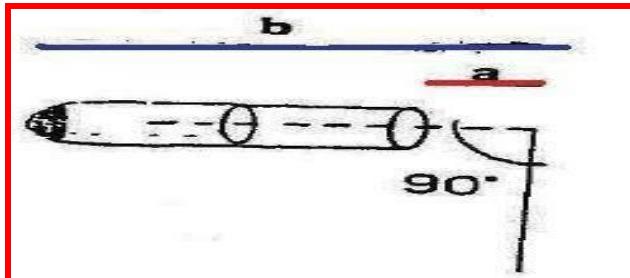
#### I.2.3.4. Calcul de la force gravitationnelle relative (FGR)

Il faut exprimer l'accélération radiale «  $\gamma_r$  » par le nombre «  $g$  »  $\Rightarrow \text{FGR} = \gamma_r = n \cdot g$   
 $n$ , caractérise l'appareil utilisé.

- Le calcul de la FGR est primordial  $\Rightarrow$  pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une FGR différente puisque le rayon de rotation «  $R$  » est différent.
- Il est nécessaire de pouvoir convertir la vitesse de rotation, exprimée en tours par minute (tr/min) ou en rotations par minute (rpm), en FGR  $\Rightarrow$  la formule de conversion est la suivante :

$$\gamma_r = (1.116 \times 10^{-5} \cdot R \cdot N^2) \cdot g \Rightarrow \gamma_r = n \cdot g$$

$$n = 1.116 \times 10^{-5} \cdot R \cdot N^2$$



- FGR est maximale, moyenne ou minimale  $\Rightarrow$  selon que l'on utilise respectivement le rayon au fond, au milieu ou au sommet du tube de centrifugation.

#### I.2.3.5. Coefficient de sédimentation

Le coefficient de sédimentation ( $S$ ) d'une particule ou macromolécule est calculé en divisant la vitesse ( $v$ ) constante à laquelle la particule sédimente (en m/s) par l'accélération appliquée ( $\gamma_r$ ) :

$$S = \frac{v}{\gamma_r} \quad S = \frac{2}{9} (d - d_0) \cdot \frac{r^2}{\eta}$$

«  $S$  » pour une particule sphérique

- Par définition, **le coefficient de sédimentation**, est exprimé en unités Svedberg (S)  $1 \text{ S} = 1.10^{-13} \text{ s}$ , qui est le rapport entre vitesse de la particule et accélération due à la force centrifuge (la vitesse de sédimentation par unité d'accélération). Plus une particule est massive ou dense ou ne génère qu'une faible friction (due à sa forme), plus son  $S$  sera élevé.

**I.2.3.6. Ultracentrifugation** permet la séparation de particules biologiques allant des petites macromolécules jusqu'aux gros édifices supramoléculaires.

- Technique de sédimentation réalisée à des vitesses très élevées
- Accélération radiale  $\gamma r \geq 100.000g$
- Appareil utilisé est dit ultracentrifugeuse, leurs rotors peuvent tourner jusqu'à près de 80 000 tours par minute, et ils fournissent des champs de gravité atteignant 500 000 fois la gravité terrestre.

### A. Types d'ultracentrifugation

#### 1) Ultracentrifugation préparative

- ❖ Le but de l'ultracentrifugation préparative est d'obtenir des préparations purifiées de particules présentes dans un milieu liquide.
- ❖ Centrifugation de volumes importants de solution (jusqu'à un litre de solution).
- ❖ Elle peut être différentielle ou en gradient de densité.

❖ **L'ultracentrifugation différentielle** : C'est à Albert CLAUDE que l'on doit cette technique.

On l'appelle ultracentrifugation **differentielle** car basée sur la **différence de vitesse de sédimentation** des organites, elle-même reposant sur différence de densité des organites ; et **ultra** pour désigner que exploitation de **faibles différences** (comme pour ultra-structure) et utilisation d'**accélérations importantes**.

❖ **L'ultracentrifugation sur gradient de densité** :

Certains organites et macro-molécules sédimentent à des vitesses tellement voisines qu'ils sont très difficiles à séparer par une ultracentrifugation différentielle. C'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes.

La technique d'ultracentrifugation sur gradient de densité (UGD) permet de séparer des organites cellulaires et même des petites particules biologiques présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques, et ce en fonction de leur densité. Elle se base sur le principe suivant : lorsque la densité d'une particule est égale à la densité du solvant elle atteint un niveau d'équilibre.

On travaille dans un **milieu présentant un gradient de densité**, d'où le nom donné à la technique.

On travaille généralement sur un **gradient de saccharose** pour la **purification d'organites** (il existe une centrifugation sur gradient de **chlorure de césum** pour séparer des **molécules d'acides nucléiques** : différences de densités exploitées sont très fines).

#### b) Ultracentrifugation analytique

- ❖ Méthode d'analyse des macromolécules en solution.
- ❖ Ne diffère de la 1<sup>ère</sup> que par le caractère des résultats  $\Rightarrow$  Renseignent sur les caractéristiques physiques des molécules  $\Rightarrow$  masse, taille, forme et composition.
- ❖ Réalisée toujours en gradient de densité.
- ❖ Deux types d'expériences existent  $\Rightarrow$  la vitesse de sédimentation et l'équilibre de sédimentation.

#### I.2.4. Différents types de centrifugation

##### I.2.4.1. La centrifugation différentielle

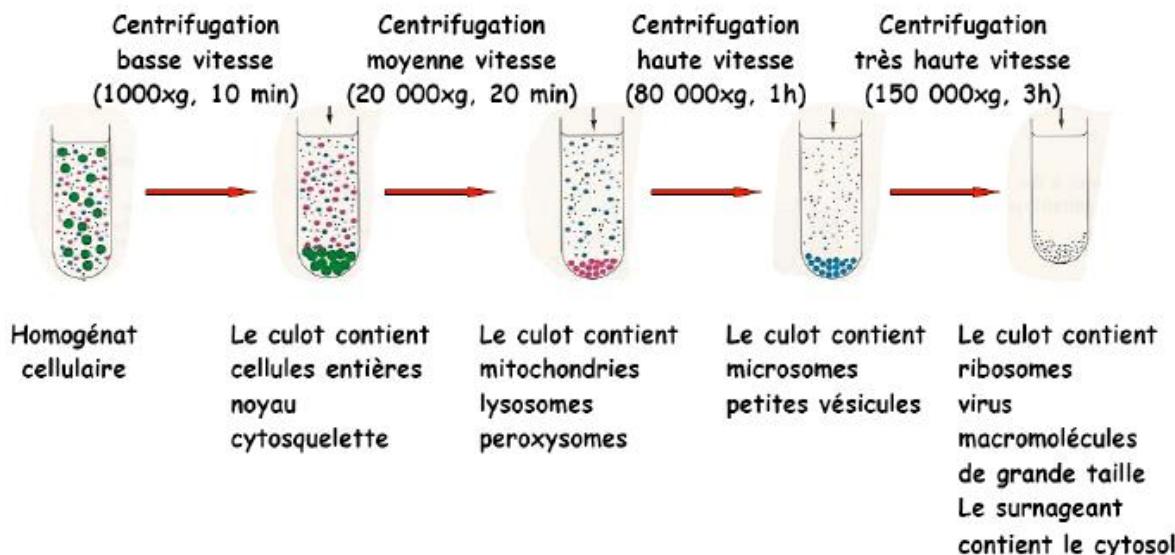
- Elle sépare les éléments selon leur taille.
- Les éléments les plus gros se retrouvent au fond du culot et les plus léger dans le surnageant.
- Réalisée lorsque les particules à séparer possèdent des densités et des tailles assez différentes.
- Sépare les particules par une succession de centrifugation aux conditions de temps et d'accélérations croissantes.

**Principe**

- ❖ Dans une 1<sup>ère</sup> centrifugation à faible accélération  $\Rightarrow$  les éléments les plus massifs vont sédimer et former un *culot* au fond du tube.
- ❖ Tous les autres éléments, pour lesquels l'accélération a été trop faible ou pour lesquels le temps de centrifugation a été trop court, restent dans le surnageant.

On récupère le surnageant et on recommence un second cycle de centrifugation, mais avec une accélération plus importante  $\Rightarrow$  progressivement, on sépare les différents constituants en terminant par les éléments les plus petits le moins de différence de densité avec le solvant.

**Les éléments se déposent selon leur poids et leur taille.**

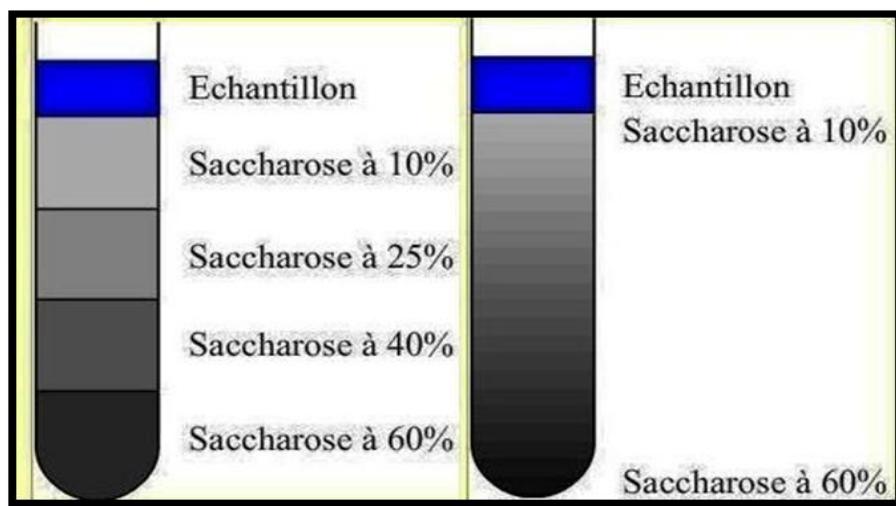


**I.2.4.2. Centrifugation en gradient de densité**

- ❖ La vitesse de sédimentation d'une particule (organite, macromolécule, ...)  $\Rightarrow$  est fonction de la différence entre sa densité et celle du milieu ambiant ( $d - d_0$ ).
- ❖ Améliorer la séparation de particules  $\Rightarrow$  effectuées la centrifugation dans un gradient de densité.

**A. Types de gradients**

- ❖ **Gradients discontinus**
- ✓ Obtenus en superposant avec délicatesse dans le tube de centrifugation des solutions de densités progressivement décroissantes  $\Rightarrow$  variation discontinue de la densité.
- ❖ Gradients continus  $\Rightarrow$  dans lequel la variation de densité est graduelle le long du tube à centrifuger.



## B. Produits chimiques utilisés dans la constitution des gradients

- ❖ **Le saccharose**  $\Rightarrow$  utilisé pour la séparation des fractions cellulaires  $\Rightarrow$  permet d'atteindre des densités de l'ordre de 1.3g/ml  $\Rightarrow$  séparation de particules dont la densité  $\leq 1.3\text{g/ml}$ .
- ❖ **Le chlorure de césium**  $\Rightarrow$  séparation des acides nucléiques  $\Rightarrow$  permet d'atteindre des densités de l'ordre de 1.9g/ml  $\Rightarrow$  séparation de particules dont la densité  $\geq 1.3\text{g/ml}$ .
- ❖ **Le bromure de potassium**  $\Rightarrow$  isolement des fractions lipoprotéiniques.

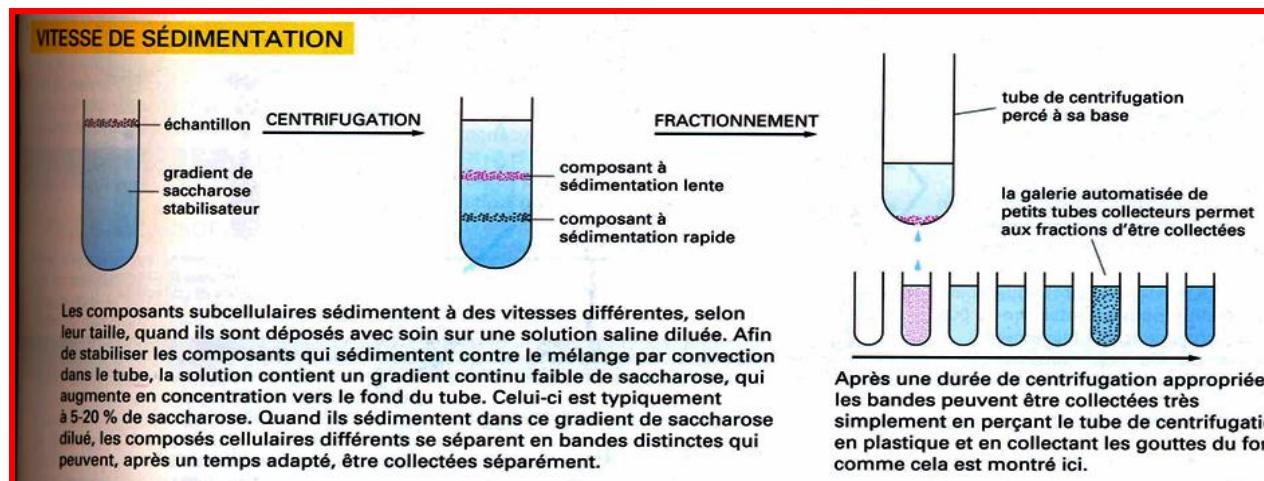
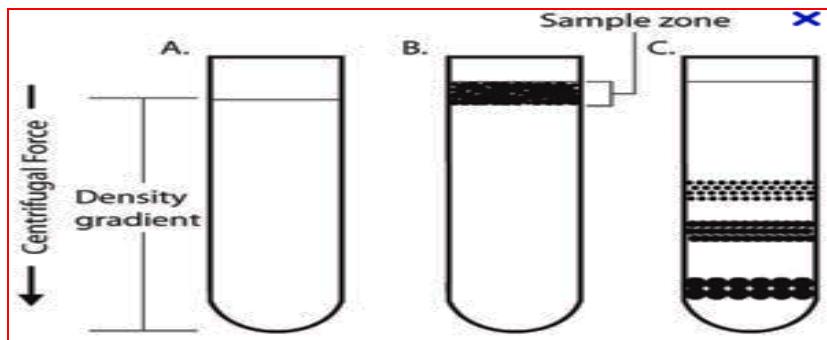
## C. Effet du gradient

- ❖ **1<sup>er</sup> cas** : aucune différence de densité  $\Rightarrow$  pas de sédimentation quelle que soit l'accélération.
- ❖ **2<sup>ème</sup> cas** : la densité de la particule est plus grande que celle du milieu ambiant  $\Rightarrow$  il y a sédimentation d'autant plus rapide que la différence de densité est grande.
- ❖ **3<sup>ème</sup> cas** : la particule s'élève jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité du milieu ambiant identique à la sienne (elle peut éventuellement flotter).

## D. Types de centrifugation en gradient de densité

### 1. Centrifugation zonale (ou technique de vitesse de sédimentation)

- ❖ Dans cette méthode on mesure la vitesse de sédimentation.
- ❖ Particules les plus lourdes  $\Rightarrow$  sédimentant plus rapidement  $\Rightarrow$  séparation des macromolécules selon leurs constantes de sédimentation  $\Rightarrow$  selon leur PM  $\Rightarrow$  non selon leur densité. .
- ❖ La solution contenant les particules à séparer est déposée au-dessus du gradient, préformé ou non, continu ou discontinu.
- ❖ La centrifugation est arrêtée avant d'atteindre l'équilibre  $\Rightarrow$  lorsque les particules les plus lourdes parviennent au fond du tube (2 à 3 heures).
- ❖ Les particules d'une même espèce  $\Rightarrow$  même vitesse de sédimentation  $\Rightarrow$  se regroupent en zones séparées.
- ❖ Le gradient de densité ne sert qu'à ralentir la sédimentation et stabiliser les bandes.



Cette technique est employée pour la mesure du PM grâce à l'équation de Svedberg :

$$PM = \frac{R \cdot T \cdot S}{D(1 - v \cdot d_0)}$$

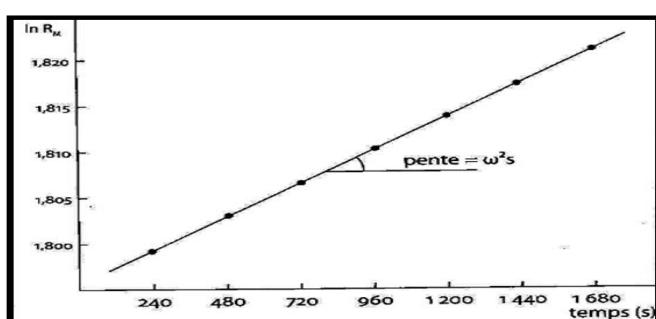
$R \Rightarrow$  constante des gaz parfaits  $\Rightarrow 8.251 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$   
 $T \Rightarrow$  température absolue  
 $D \Rightarrow$  coefficient de diffusion  
 $d_0 \Rightarrow$  densité du solvant

$v \Rightarrow$  volume partiel spécifique de la macromolécule  $\Rightarrow$  l'inverse de sa densité.

$S \Rightarrow$  coefficient de sédimentation déterminé de la pente de la droite :

$$\ln(X_1/X_2) = f(t) \Rightarrow \text{La pente} = \omega^2 \cdot S$$

- $X_1$  et  $X_2$  distances parcourues par la particule entre les temps  $t_1$  et  $t_2$ .
- Ultracentrifugeuse analytique est équipée d'un système optique qui permet de suivre le déplacement de la particule et de mesurer les distances  $X_1$  et  $X_2$ .



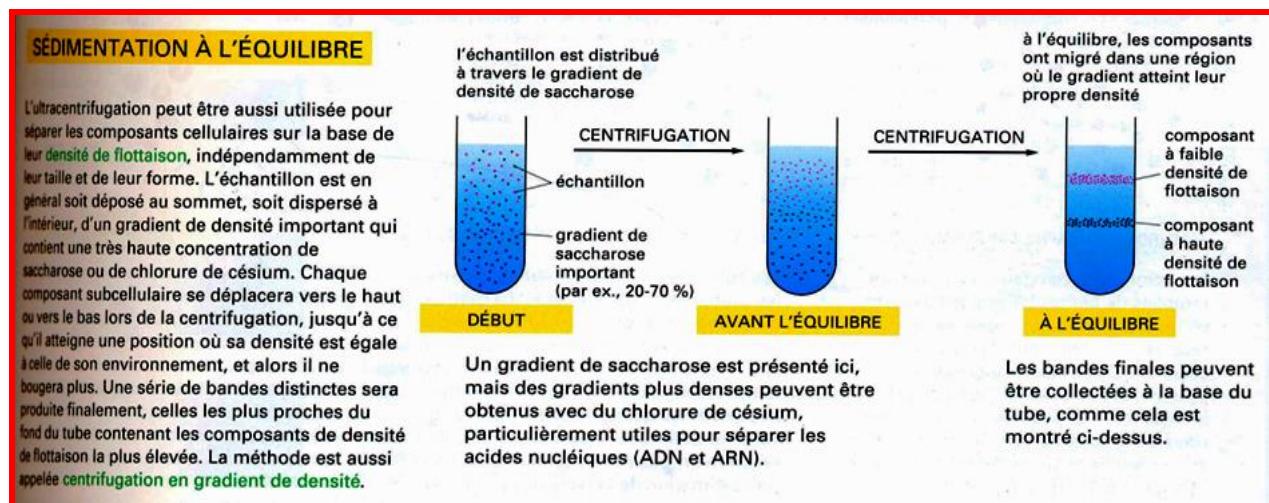
## 2. Centrifugation à l'équilibre ou isopycnique

- Séparation des particules selon leur densité  $\Rightarrow$  non selon leur PM (non selon leurs constantes de sédimentation).

Utilisation d'un gradient de densité continu recouvrant les densités des différentes particules.

### Principe

- Échantillon est mélangé au gradient qui n'est pas préformé ⇒ Le gradient s'établira au cours de la centrifugation (gradient autoformé).
- Les particules d'échantillon migrent dans le gradient ⇒ Chaque particule s'immobilisera lorsqu'elle atteint la zone de gradient de même densité qu'elle-même ⇒  $d-d_0 = 0 \Rightarrow$  vitesse = 0 ⇒ position isopycnique ⇒ centrifugation à l'équilibre.
- Le temps de centrifugation n'a pas d'importance ⇒ Il faut laisser le temps aux particules d'atteindre leur position d'équilibre ⇒ vitesse de centrifugation faible ⇒ temps de centrifugation long (un jour ou plus).



Cette technique est aussi employée pour la mesure du PM grâce à l'équation :

$$R.T.\ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) = PM(1-v.d_0)\frac{\omega^2}{2} \cdot (X_2^2 - X_1^2)$$

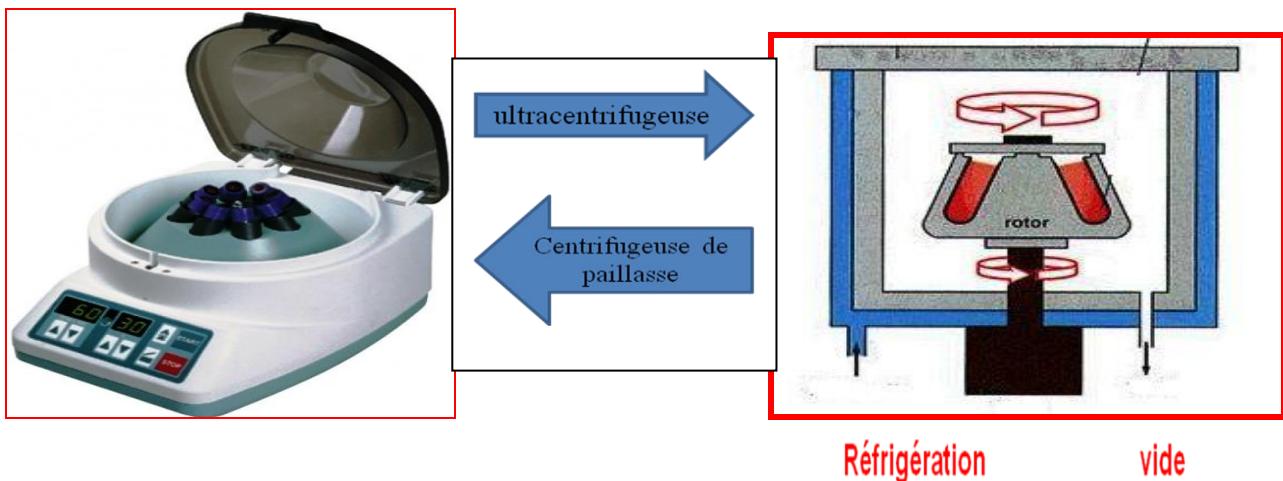
$C_2$  et  $C_1$  concentrations de la particule estimées aux distance  $X_1$  et  $X_2$  à l'axe de rotation. Il suffit de tracer la droite  $\ln(C_2/C_1) = f(X_2^2 - X_1^2)$  dont la pente est égale à :

$$pente = \frac{\ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right)}{X_2^2 - X_1^2}$$

Les concentrations C1 et C2 sont déterminées en fonction du temps par un système optique qui équipe l'ultracentrifugeuse adaptée à ce type d'analyse.

#### I.2.5. Matériel

- Une centrifugeuse est une machine ayant un axe de rotation enfermé dans une enceinte.
- Cette enceinte peut être réfrigérée afin d'empêcher l'échauffement des échantillons ou non réfrigérée.
- Enceinte est souvent soumise à un vide poussé pour éviter les frottements entre le rotor et l'air ⇒ éviter l'échauffement des échantillons ⇒ ultracentrifugeuse.
- Un rotor qui tourne à haute vitesse (jusqu'à 100 000 rpm) possède beaucoup d'énergie cinétique ⇒ il peut donc faire beaucoup de dégâts en cas de problème ⇒ l'enceinte de la centrifugeuse est blindée.

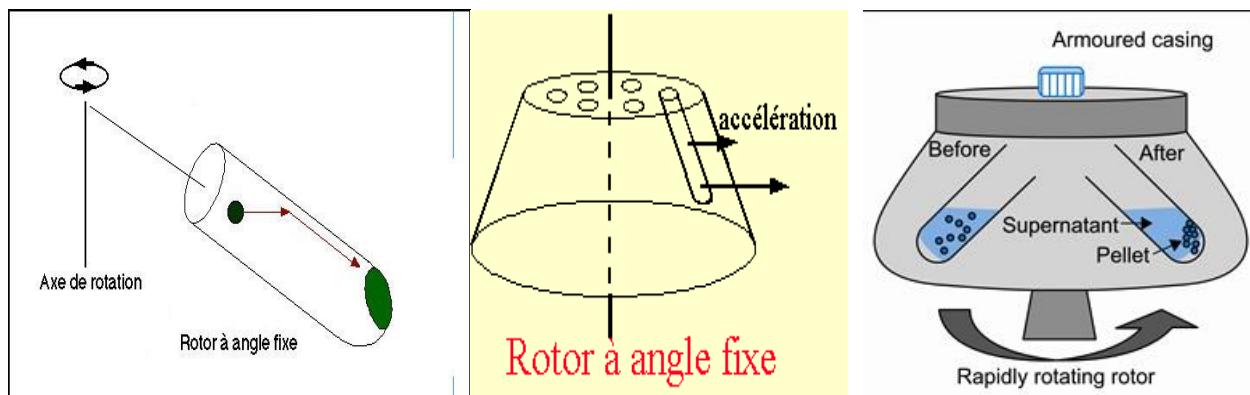


### I.2.5.1. Rotors

- Le rotor est le bloc qui supporte les tubes contenant les échantillons doit à la fois être suffisamment solide pour supporter les forces qui s'exercent sur lui.
- Chaque rotor possède une vitesse maximum de rotation pour laquelle il est garanti ⇒ vitesse spécifiée sur le rotor ⇒ elle doit être respectée sous peine d'endommager le rotor et/ou le moteur.
- Il existe deux grands types de rotors, les rotors à angle fixe, et les rotors à godets mobiles. Il existe également un troisième type de rotors, les rotors verticaux, mais ils sont beaucoup moins utilisés.

#### A. Les rotors à angle fixe (fixed angle)

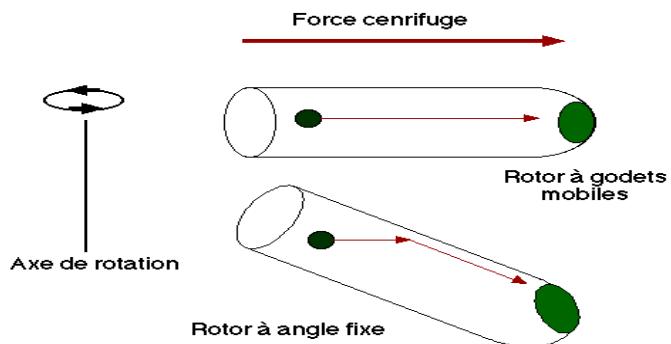
- ✓ Rotors à angle fixe pour les séparations les plus simples entre culot (cellules, organites, membranes, protéines plus ou moins agrégées selon les cas) et le surnageant. Utilisé surtout pour des séparations séquentielles, à des vitesses de rotation croissantes.
- ✓ Faits de blocs de métal avec des puits creux servant de logements aux tubes de centrifugation ⇒ ces puits sont inclinés par rapport à l'horizontale (de 15 à 35°).
- ✓ Le rayon de ces rotors étant relativement court ⇒ vitesse de rotation rapide.
- ✓ Les particules sédimentent le long des parois des tubes ⇒ s'accumulent sur les côtés du fond des tubes.
- ✓ Rotor ne peut pas être utilisé pour la centrifugation en gradient de densité.
- ✓ Ce type de rotor est parfaitement adapté à une centrifugation différentielle.



#### B. Rotors à godets mobiles (swinging buckets)

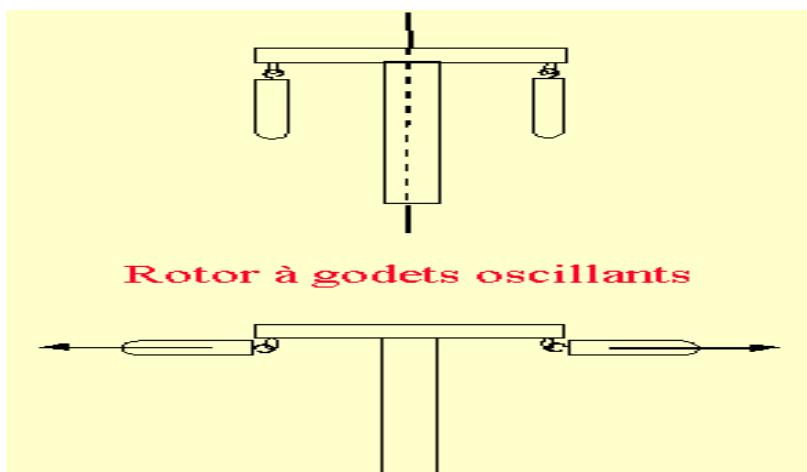
- ✓ Godets disposés sur des crochets se réorientent quand débute la rotation du rotor et passent en position horizontale sous l'effet de la force centrifuge.
- ✓ Les particules sédimentent directement dans le fond des tubes sans heurter les parois des tubes.

- ✓ Ce type de rotor est principalement utilisé pour des centrifugations en gradient, discontinu ou continu.
- ✓ Vitesse de centrifugation faible.



### C. Les rotors à godets axillants

- ✓ sont utilisés pour des séparations plus fines, parce que la force de centrifugation s'exerce dans le sens de la longueur du godet. En effet celui-ci est mobile autour de son point de suspension à la potence. On peut alors séparer des particules, essentiellement en fonction de leur densité, en utilisant comme solvant des gradients de densité



### D. Rotors verticaux

- ✓ Utilisés pour des centrifugations en gradient.
- ✓ Faits de blocs de métal résistants ⇒ vitesse de centrifugation élevée



### I.2.5.2. Equilibrage du rotor

- Quelque soit le rotor utilisé, un point crucial concerne l'équilibrage.
- Un rotor doit être parfaitement équilibré ⇒ la masse en chaque point doit être idéalement identique à celle du point symétrique par rapport à l'axe de rotation.
- Expérimentateur doit équilibrer les échantillons qu'il va centrifuger ⇒ il faut équilibrer les tubes deux à deux ⇒ chaque couple de tubes devant être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.
- Il n'est pas nécessaire que tous les tubes aient exactement la même masse ⇒ La tolérance est fonction de l'accélération qui sera imposée.

### I.2.6. Applications de la centrifugation

- ❖ Séparation de deux phases liquides non miscibles qui peut être accélérée en les soumettant à une centrifugation de quelques minutes.
- ❖ Fractionnement subcellulaire ⇒ la centrifugation différentielle est couramment employée pour séparer des constituants cellulaires/
- ❖ Séparation de particules selon leur taille ou leur densité ⇒ fractionner les lipoprotéines sériques en gradient de densité, ou pour purifier des protéines ou des acides nucléiques, en gradient essentiellement et par une méthode zonale.
- ❖ Mesure de la constante de sédimentation (S), de la masse moléculaire et de la densité.
- ❖ Vérification de la pureté d'un extrait macromoléculaire.
- ❖ Analyse quantitative.