

LA CENTRIFUGATION

1. Définition

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

2. Principe de la technique

La centrifugation permet de **séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus** dans un liquide, depuis les molécules jusqu'aux 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, on pourrait donc s'attendre qu'avec le temps tous les constituants finissent par tomber au fond du récipient dans lequel ils se trouvent en **sédimentation** ou remontent à la surface. Mais pour la majorité d'entre eux, un autre phénomène intervient qui empêche ce résultat : l'agitation moléculaire qui est de très loin plus importante que la gravité et la poussée d'Archimède, de sorte que les effets de ces dernières sont négligeables

En faisant **tourner** l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, la **force centrifuge (Fig.01)**, 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, notée g , est fonction de la vitesse angulaire de rotation et de la distance à l'axe de rotation:

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

w : vitesse angulaire (rad/s);

r : distance à l'axe de rotation;

n : nombre de rotations par minute (rpm).

Notons que le tube contenant l'échantillon n'étant pas plat, dans une expérience donnée la distance au rotor est comprise dans une fourchette. Par convention, dans les protocoles en dehors de toute autre précision, on donne l'accélération obtenue au fond du tube, c'est à dire à la distance maximale.

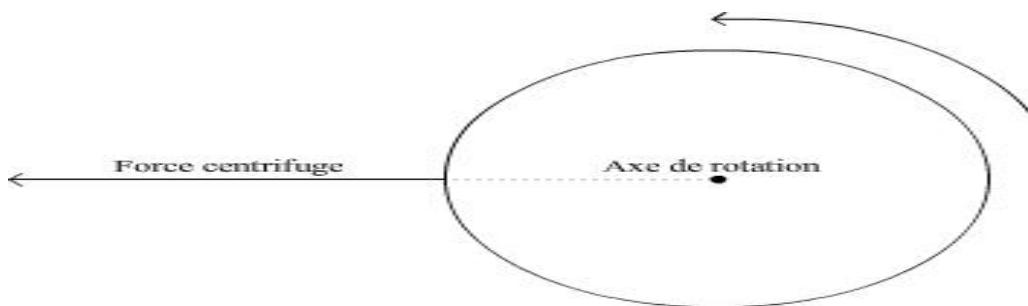


Figure 01. force centrifuge

2.1. Le coefficient de sédimentation

Lors d'une centrifugation, la vitesse de sédimentation d'une particule va être fonction de sa masse, de son volume et de la densité du solvant (poussée d'Archimède), de l'accélération à laquelle elle est soumise, mais également aux forces de frottement liées à son déplacement dans la solution. La **vitesse de sédimentation** mais mesurée expérimentalement par un **coefficient de sédimentation** exprimé en Svedberg (**S**).

3. Matériel de centrifugation

La centrifugeuse est l'appareil utilisé pour la centrifugation. La centrifugeuse est constituée d'un axe de rotation enfermé dans une chambre de centrifugation. A l'exception des centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps d'utilisation sont relativement limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, la chambre de la centrifugeuse doit être réfrigérée (**Fig. 02**).

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

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.



Figure 02. force centrifuge

3.1.Type de centrifugeuses

La force du moteur qui le fait tourner constitue la principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand. Selon les besoins expérimentaux (accélérations, volume du matériel à centrifuger, la température de travail), plusieurs types de centrifugeuse ont été développés.

- **Centrifugeuses de paillasse (ou cliniques):** Constituent les modèles les plus simples et sont caractérisées par de faibles accélérations (1000 à 3000 g). Elles peuvent être réfrigérées.
- **Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes et caractérisés par des accélérations de l'ordre de 20000 g. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger

des volumes relativement gros. Certains rotors peuvent même contenir quatre ou six bouteilles de 250 ml. Tous les modèles sont réfrigérés.

- **Ultracentrifugeuses:** Comme leur nom indique, ce sont des appareils qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300000 g). Tous les modèles sont réfrigérés. Les rotors ne peuvent contenir qu'une dizaine de tubes de 40 ml. De telles vitesses de rotation ne peuvent s'obtenir que sous pression très réduite. Les faibles pressions permettent aussi d'éviter la surchauffe du rotor et de l'échantillon. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces appareils doivent donc être munis de pompe à vide.
- **Micro-centrifugeuses:** Ce sont des centrifugeuses spécialement conçues pour les microvolumes. Elles peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12 à 15000 g.

4. Rotors

Le rotor qui supporte les tubes contenant les échantillons doit à la fois être suffisamment solide pour supporter les forces qui s'exercent sur lui et le plus léger possible, sa propre masse étant soumise à l'accélération centrifuge. Le meilleur matériau actuel est le titane, avec son excellent rapport poids/résistance. On le réserve pour les rotors de forte capacité et/ou à haute vitesse de rotation. On utilise sinon des alliages d'aluminium, plus rarement de l'acier (pour des rotors ne tournant pas très vite). Chaque rotor possède une vitesse maximum de rotation (donc d'accélération) pour laquelle il est garanti.

Quelque soit le rotor utilisé, **un point crucial concerne l'équilibrage**. Un rotor doit être parfaitement équilibré, c'est à dire que **la masse** en chaque point doit être idéalement **identique à celle du point symétrique** par rapport à l'axe de rotation ; l'expérimentateur doit équilibrer les échantillons qu'il va centrifuger en les pesant. Pour cela, il faut équilibrer les tubes deux à deux, chaque couple de tubes devant être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

Il existe essentiellement deux grands types de rotors (**Fig.03**), 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.

- **Les rotors à angle fixe**

Ils sont faits de blocs de métal (aluminium, titane) avec des puits creusés à l'intérieur et inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale, généralement de l'ordre de 15° à 35° selon les modèles. Les tubes à centrifuger sont déposés dans ces puits. Comme ces rotors sont relativement compacts. Ils sont plus faciles de les faire tourner rapidement à cause de leur rayon relativement court. Les particules sédimenteront surtout le long de la paroi du tube. De plus, elles s'accumulent plutôt sur des côtés du fond du tube à centrifuger. Pour certains types de particules cela engendre une friction qu'elles ne peuvent pas supporter et se brisent. Cependant, la plupart des centrifugations à vitesses moyennes et élevées se font avec ce type de rotor.

- **Les rotors à godets mobiles**

Se réorientent lors de la centrifugation. En effet, les godets sont disposés sur des crochets ou un système à bascule. Quand la rotation du rotor débute les godets (et les tubes qu'ils contiennent), sous l'effet de la force centrifuge, se réorientent et passent en position horizontale. Les particules peuvent donc sédimerter directement dans le fond du tube sans jamais heurter les parois du tube. En effet, les godets en position horizontale allongent énormément le rayon du rotor, ce qui rend plus difficile de lui imprimer des vitesses de rotations élevées.

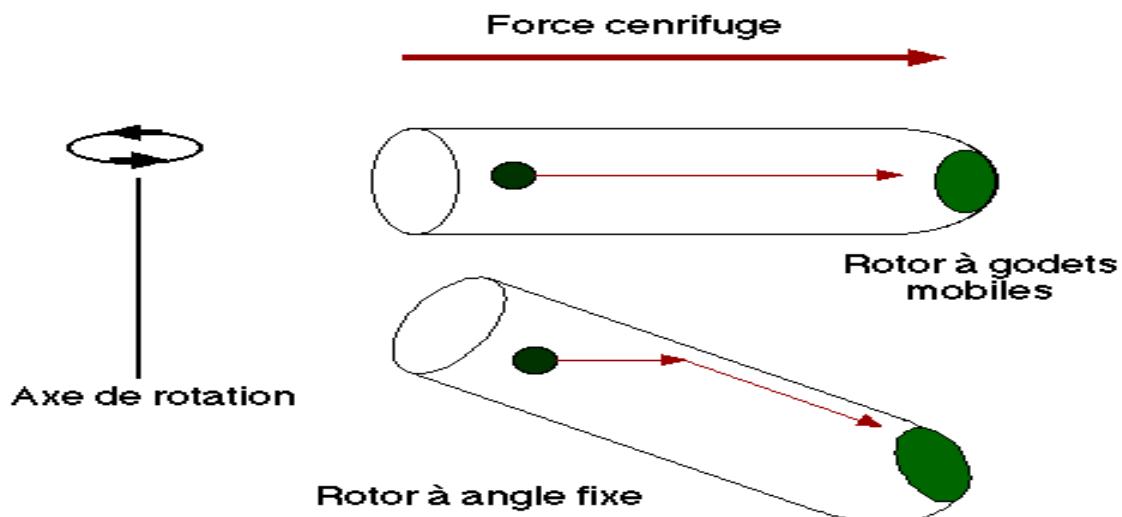


Figure 03. Types de rotors

5 . Techniques de centrifugation

Il existe deux principaux types de centrifugation.

5.1. La centrifugation différentielle

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimerter et former un culot au fond du tube. Les éléments dont l'accélération est trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le surnageant. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour récupérer les éléments (les cellules) du sang qui sédimentent pour des accélérations très faibles.

Exemple: Isolement des organites cellulaires. Tout d'abord au cours d'une première centrifugation, les constituants les plus lourds sont isolés. Puis, en augmentant la vitesse de sédimentation les constituants de densité croissante seront séparés (**Fig. 04**).

Au besoin, on peut recommencer un second cycle de centrifugation avec le surnageant précédent, mais avec une accélération plus importante. Progressivement, on sépare ainsi les différents constituants en terminant pas les éléments les plus petits et ayant le moins de différence de densité avec le solvant.

La centrifugation différentielle par exemple d'un broyat tissulaire permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses constituants.

A 600g, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette.

- A 15 000g, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes.
- A 100 000g (ultracentrifugation), on observe la sédimentation de la membrane plasmique et des grands polysomes.
- A 200 000g, on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes.
- Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

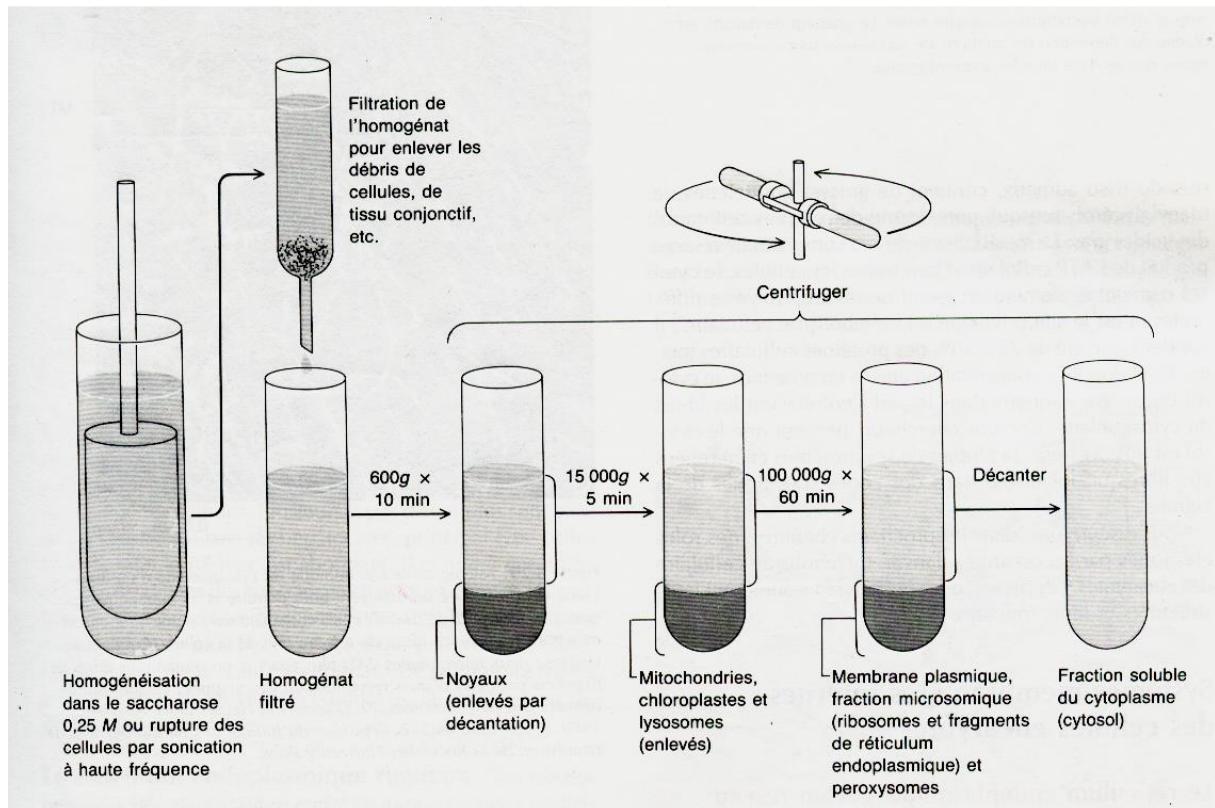


Figure 04. Isolement des organites cellulaires.

5.2. La centrifugation en gradient de densité (à l'équilibre)

Dans une centrifugation à l'équilibre, les différents constituants atteignent une position dont ils ne vont plus bouger, car étant en équilibre. Or l'équilibre est atteint lorsque la densité d'une particule est égale à la densité du solvant. On va donc utiliser un solvant dont la densité va varier en fonction de la position dans le tube permettant aux différents constituants de rejoindre la zone de densité équivalente à la sienne : on parle de gradient. Pour obtenir des solutions de densités différentes, la méthode la plus classique est d'utiliser **des solutions de concentration croissante en saccharose, mais on utilise aussi du chlorure de césium (Fig.05)**.

La centrifugation par gradient préformé consiste à déposer une mince couche d'homogénat au dessus de la solution de saccharose dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut. Les différents constituants de l'homogénat sédimentent tous

à des vitesses différentes, on obtient ainsi différentes bandes (la couche la plus dense étant au fond) que l'on séparera. La **vitesse de sédimentation** dépend de la taille des molécules, de la forme des particules et de la densité.

Il existe deux types de gradients :

- **Les gradients discontinus** sont constitués d'un **empilement de solutions de moins en moins denses**. Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes.
- **Les gradients continus** pour lesquels la variation de densité est continue. Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes parfois visibles à l'œil nu (diffusion de la lumière).

Dans les deux cas la vitesse de sédimentation ne doit pas intervenir. Il est donc nécessaire de laisser le temps aux particules d'atteindre leur position d'équilibre ce qui implique des temps de centrifugation assez longs. Bien entendu, les particules les moins denses peuvent se retrouver au sommet du tube (particules moins denses que la solution la plus haute) et les particules les plus denses peuvent former un culot (particules plus denses que la solution la plus basse). Le contenu du tube peut être récupéré par fractions successives, souvent du bas vers le haut, pour utilisation et/ou analyse ultérieur.

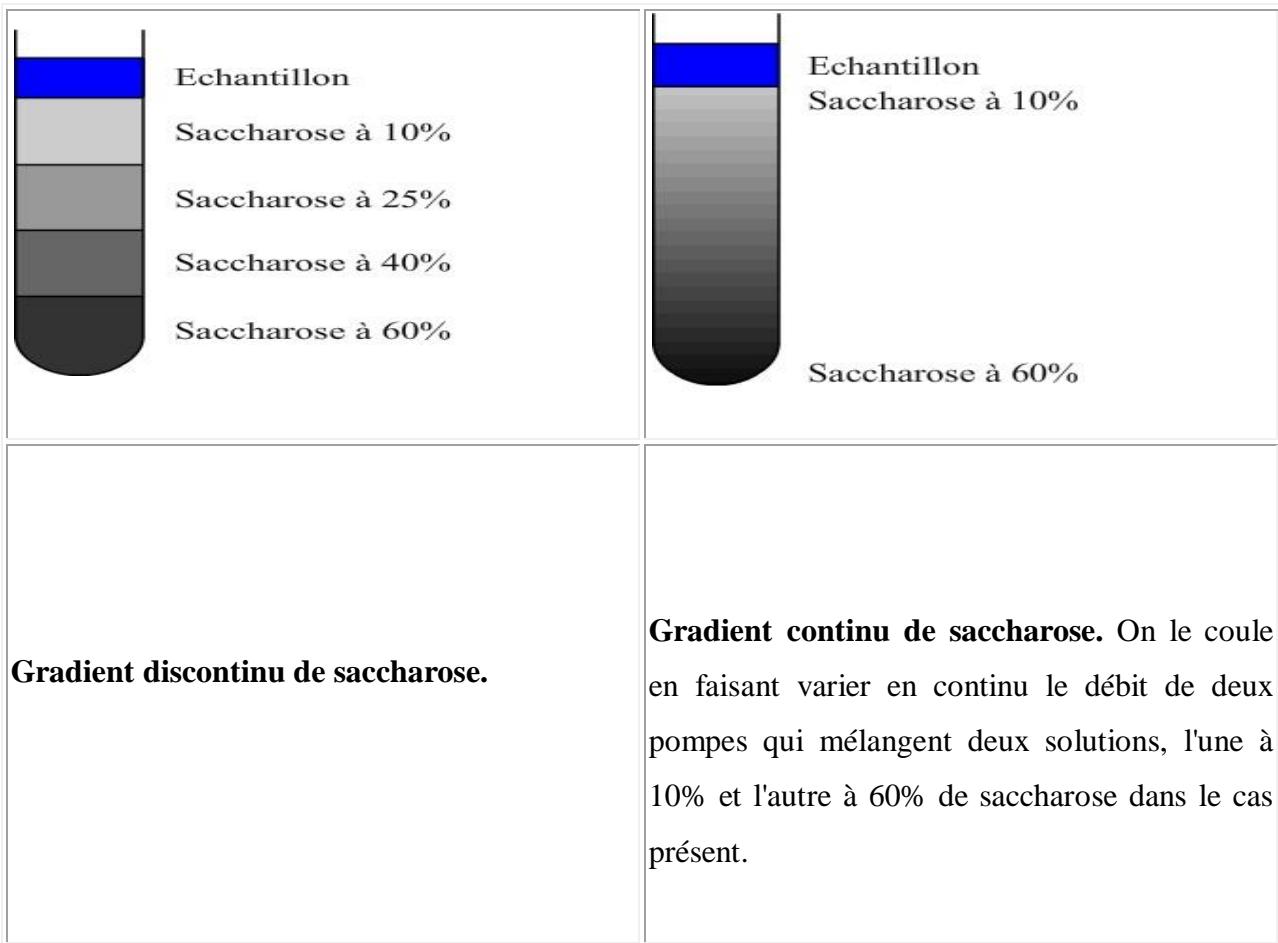


Figure 05. Isolement des organites cellulaires.