

# République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la  
recherche scientifique

- **Etablissement : Université de Jijel**
- **Faculté : Sciences de la Nature et de la Vie**
- **Département : MASA**
- **Spécialité : Microbiologie**

## Semestre : 5

- U.E.M : **Techniques d'Analyses Biologique**
- Crédits : 3
- Coefficients : 2

# *Contenu de la matière*

# **I. Méthodes de fractionnement macroscopiques**

- 1. Sédimentation (Décantation & Centrifugation)**
- 2. Filtration, Microfiltration, Ultrafiltration**
- 3. Dialyse et électrodialyse**
- 4. Osmose & Osmose Inverse**



## **II. Techniques Chromatographiques**

- 1. Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M.)**
- 2. Chromatographie d'Exclusion (Tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel)**
- 3. Chromatographie d'Affinité**
- 4. Chromatographie Echangeuse d'Ions (CEI)**
- 5. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**
- 6. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**

**III. Méthodes électrophorétiques**

**VI. Méthodes spectrales**



# *Alphabets Grecques*



<b>N<sup>o</sup></b>	<b>Lettre capitale</b>	<b>Lettre minuscule</b>	<b>Français</b>
<b>1</b>	<b>A</b>	$\alpha$	<b>Alpha</b>
<b>2</b>	<b>B</b>	$\beta$	<b>Bêta</b>
<b>3</b>	<b>Γ</b>	$\gamma$	<b>Gamma</b>
<b>4</b>	<b>Δ</b>	$\delta$	<b>Delta</b>
<b>5</b>	<b>E</b>	$\epsilon$	<b>Epsilon</b>
<b>6</b>	<b>Z</b>	$\zeta$	<b>Zêta</b>

N°	Lettre capitale	Lettre minuscule	Français
7	H	$\eta$	Êta
8	$\Theta$	$\theta$	Thêta
9	I	$\iota$	Iota
10	K	$\kappa$	Kappa

11

 $\Lambda$  $\lambda$ 

Lambda

12

M

 $\mu$ 

Mu

N°	Lettre capitale	Lettre minuscule	Français
13	N	$\nu$	Nu
14	Ξ	$\xi$	Ksi/Xi
15	O	$o$	Omicron
16	Π	$\pi$	Pi

17	P	$\rho$	Rhô
----	---	--------	-----

18	$\Sigma$	$\sigma$	Sigma
----	----------	----------	-------

N°	Lettre capitale	Lettre minuscule	Français
----	--------------------	---------------------	----------

19	T	$\tau$	<b>Tau</b>
----	---	--------	------------

20	Υ	$\upsilon$	<b>Upsilon</b>
----	---	------------	----------------

21	Φ	$\varphi/\phi$	<b>Phi</b>
----	---	----------------	------------

22	X	$\chi$	<b>Khi</b>
----	---	--------	------------

23	Ψ	$\psi$	<b>Psi</b>
----	---	--------	------------

24	Ω	$\omega$	<b>Oméga</b>
----	---	----------	--------------

# Symbole & Préfixe



$10^n$	Préfixe	Symbole
$10^{24}$	<i>Yotta</i>	<i>Y</i>
$10^{21}$	<i>Zetta</i>	<i>Z</i>
$10^{18}$	<i>Exa</i>	<i>E</i>
$10^{15}$	<i>Péta</i>	<i>P</i>
$10^{12}$	<i>Téra</i>	<i>T</i>
$10^9$	<i>Giga</i>	<i>G</i>

$10^n$	Préfixe	Symbole
$10^6$	<i>Méga</i>	<i>M</i>
$10^3$	<i>Kilo</i>	<i>k</i>
$10^2$	<i>Hecto</i>	<i>h</i>
$10^1$	<i>Déca</i>	<i>da</i>
$10^0$	—	—

$10^n$	Préfixe	Symbole
$10^{-1}$	<i>Déci</i>	<i>d</i>
$10^{-2}$	<i>centi</i>	<i>c</i>
$10^{-3}$	<i>Milli</i>	<i>m</i>
$10^{-6}$	<i>Micro</i>	$\mu$
$10^{-9}$	<i>Nano</i>	<i>n</i>

$10^n$	Préfixe	Symbole
$10^{-12}$	<i>Pico</i>	<i>p</i>
$10^{-15}$	<i>Femto</i>	<i>f</i>
$10^{-18}$	<i>Atto</i>	<i>a</i>
$10^{-21}$	<i>Zepto</i>	<i>z</i>
$10^{-24}$	<i>Yocto</i>	<i>y</i>



# Unités, constantes et grandeurs physico-chimiques



## Constantes universelles

<i>Symbole</i>	<b>Nom</b>	<b>Valeur</b>
<b><i>c</i></b>	Vitesse de la lumière (célérité)	299 792 458 m.s <sup>-1</sup>
<b><i>m(e)</i></b>	Masse de l'électron	9,109 390.10 <sup>-31</sup> kg
<b><i>m(p)</i></b>	Masse du proton	1,672 623.10 <sup>-27</sup> kg
<b><i>m(n)</i></b>	Masse du neutron	1,674 929.10 <sup>-27</sup> kg
<b><i>N<sub>A</sub></i></b>	Nombre d'Avogadro	6,022 137.10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup>
<b><i>R</i></b>	Constante des gaz parfaits	8,314 510 J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>

## Unités

Dr Laib

<i>Symbole</i>	Unité	Nom	Notation
<i>A</i>	Ampère	Intensité	I
<i>atm</i>	Atmosphère	Pression*	P
<i>C</i>	Coulomb	Charge électrique	q, Q
<i>Cd</i>	Candela	Intensité lumineuse	
<i>Hz</i>	Hertz	Fréquence	f, u
<i>J</i>	Joule	Energie	E

<i>Symbole</i>	Unité	Nom	Notation
<i>kg</i>	Kilogramme	Masse	m
<i>m</i>	Mètre	Distance	d, l, s
<i>N</i>	Newton	Force	F
<i>Pa</i>	Pascal	Pression *	P
<i>s</i>	Seconde	Temps	t
<i>T</i>	Tesla	Champ magnétique	B

<i>Symbole</i>	Unité	Nom	Notation
<i>torr</i>	Torr	Pression*	P
<i>V</i>	Volt	Tension	U
<i>W</i>	Watt	Puissance	P
<i>Wb</i>	Weber	Flux magnétique	f
<i>Ω</i>	Ohm	Résistance	R

\* 1 atm = 101300 Pa = 1,013 bar = 760 torr = 760 mm Hg



<i>Symbole</i>	Signification	Unité SI	Unité courante
<i>C</i>	Concentration	mol.m <sup>-3</sup>	mol.L <sup>-1</sup>
<i>d</i>	Densité	-	
<i>k</i>	Constante de vitesse	variable	
<i>M</i>	Masse molaire	kg. mol <sup>-1</sup>	g. mol <sup>-1</sup>
<i>m</i>	Masse	kg	
<i>N</i>	Nombre de particules	-	
<i>n</i>	Nombre de moles	mol	
<i>n</i>	Nombre quantique principal	-	
<i>Pf</i>	Point de fusion	°K	°C



<i>Symbole</i>	Signification	Unité SI	<i>Dr Laib</i> Unité courante
<i>T<sub>eb</sub></i>	Température d'ébullition	°K	°C
<i>T<sub>f</sub></i>	Température de fusion	°K	°C
<i>V<sub>m</sub></i>	Volume molaire	L.mol <sup>-1</sup>	
<i>v</i>	Vitesse de réaction	mol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	
<i>μ</i>	Moment dipolaire	D	
<i>ρ</i>	Masse volumique	kg.m <sup>-3</sup>	g.L <sup>-1</sup>
<i>θ</i>	Température, aussi notée T	°K	°C
<i>ξ</i>	Avancement d'une réaction	mol	

# Electricité et Electromagnétisme

*Dr Laib*

<i>Symbole</i>	Signification	Unité SI
<i>B</i>	Champ magnétique	T
<i>C</i>	Capacité de condensateur	F
<i>E</i>	Champ électrique	V.m <sup>-1</sup>
<i>f</i>	Fréquence	Hz
<i>I</i>	Courant électrique	A
<i>j</i>	Densité de courant	A.m <sup>-2</sup>
<i>P</i>	Puissance	W
<i>Q</i>	Quantité d'électricité	C
<i>q</i>	Charge électrique	C

<i>Symbole</i>	Signification	Unité SI
$T$	Période	s
$\epsilon r$	Permittivité relative	F.m <sup>-1</sup>
$\phi$	Flux magnétique	
$\lambda$	Longueur d'onde	m
$\mu$	Moment dipolaire	D
$\mu r$	Perméabilité magnétique relative	H.m <sup>-1</sup>
$\nu$	Fréquence	Hz
$\chi$	Susceptibilité magnétique	
$\omega$	Pulsation d'une onde	rad.s <sup>-1</sup>



# Mécanique

<i>Symbole</i>	<b>Signification</b>	<b>Unité SI</b>
<b><i>a</i></b>	<b>accélération (normale, tangentielle, absolue, d'entraînement, relative, complémentaire)</b>	<b>m.s<sup>-2</sup></b>
<b><i>d</i></b>	<b>Distance</b>	<b>m</b>
<b><i>E</i></b>	<b>Energie mécanique</b>	<b>J</b>
<b><i>Ec</i></b>	<b>Energie cinétique</b>	<b>J</b>
<b><i>Ep</i></b>	<b>Energie potentielle</b>	<b>J</b>
<b><i>f</i></b>	<b>Fréquence</b>	<b>Hz</b>
<b><i>I</i></b>	<b>Moment d'inertie</b>	<b>kg.m<sup>2</sup></b>

<i>Symbole</i>	Signification	Unité SI
<i><b><math>l</math></b></i>	<b>Longueur</b>	<b>m</b>
<i><b><math>S</math></b></i>	<b>Surface</b>	<b>m<sup>2</sup></b>
<i><b><math>T</math></b></i>	<b>Période</b>	<b>s</b>
<i><b><math>t</math></b></i>	<b>Temps</b>	<b>s</b>
<i><b><math>V</math></b></i>	<b>Volume</b>	<b>m<sup>3</sup></b>
<i><b><math>v</math></b></i>	<b>Vitesse</b>	<b>m.s<sup>-1</sup></b>
<i><b><math>W</math></b></i>	<b>Travail d'une force</b>	<b>J</b>
<i><b><math>\nu</math></b></i>	<b>Fréquence</b>	<b>Hz</b>
<i><b><math>\lambda</math></b></i>	<b>Longueur d'onde</b>	<b>m</b>
<i><b><math>\omega</math></b></i>	<b>Vitesse angulaire</b>	<b>rad.s<sup>-1</sup></b>

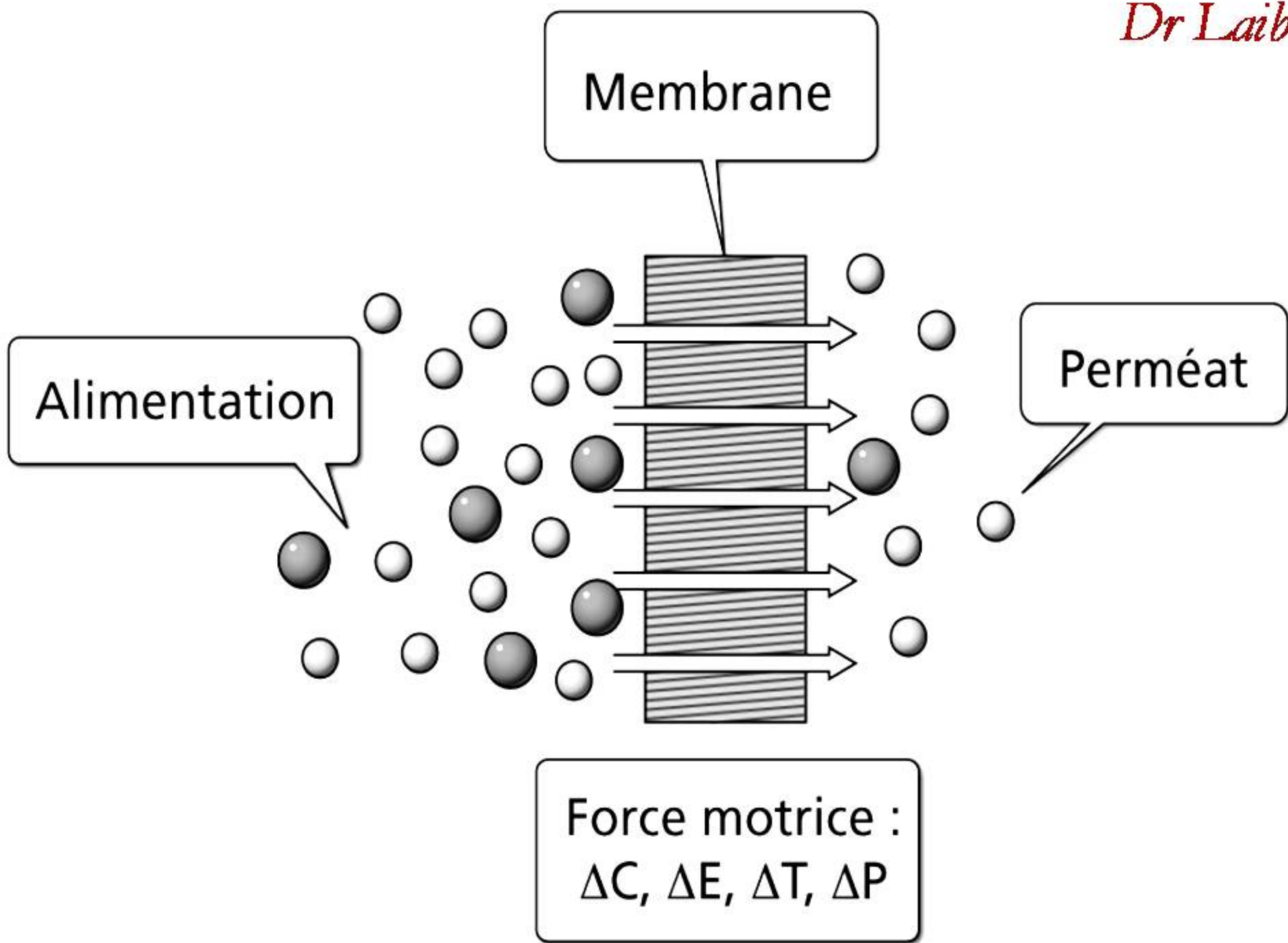


# *Procédés membranaires*

Ce sont des procédés de séparation artificiels qui utilisent une **membrane** qui permet l'**arrêt** ou le **passage sélectif** de certaines substances dissoutes ou non dans un mélange entre les deux milieux qu'elle sépare.

La partie du mélange retenue par la membrane est appelée **retenat** alors que celle qui traverse cette dernière est appelée **permeat**.

La séparation se fait sous l'action d'une **force motrice**  
**de transfert** qui peut être le **gradient de**  
**concentration, de pression, ou de potentiel**  
**électrique.**



## 1. Osmose

- L'osmose est un phénomène de diffusion des molécules de solvant à travers une membrane semi-perméable qui sépare deux solutions dont les concentrations en produits dissous sont différentes.



La différence de concentration provoque une différence de pression osmotique qui engendre un déplacement du solvant à travers la membrane.

Le solvant passe de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée pour équilibrer les concentrations. Cette différence de concentration joue le rôle de force motrice de transport.



## **2. Osmose inverse (OI)**

L'osmose est un procédé membranaire qui permet le passage de l'eau du milieu le plus concentré vers le moins concentré sous l'effet d'un gradient de pression.

A l'échelle industrielle, les stations d'osmose inverse sont destinées pour la déminéralisation des eaux.

# Reverse Osmosis

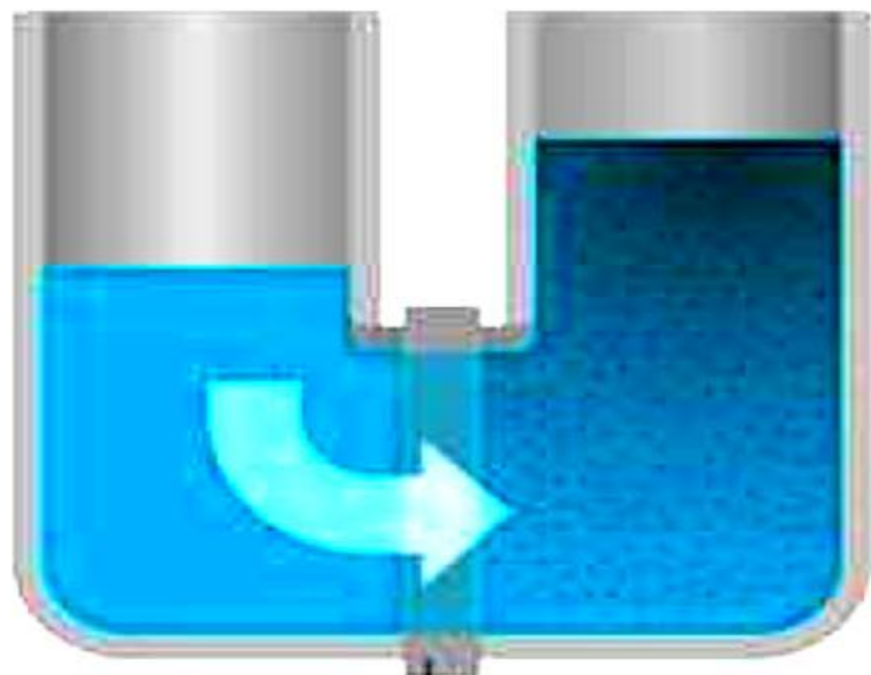
*Dr Laib*

Osmosis



Reverse Osmosis

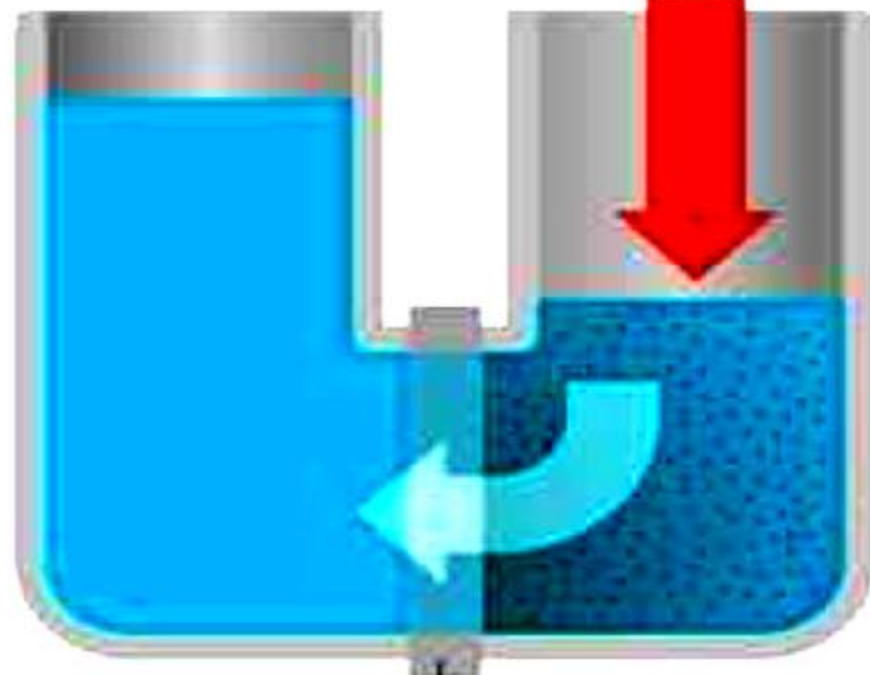
Applied Pressure



Dilute  
Solution

Concentrated  
Solution

Semipermeable  
Membrane



Dilute  
Solution

Concentrated  
Solution

Semipermeable  
Membrane

$\Delta P \sim 60 \text{ bar}$

### **3. Filtration**

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux.



L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu ou retenat.

Suivant la taille des pores du filtre on peut nommer différemment la filtration :

## **4. Microfiltration (MF)**

C'est un procédé de séparation solide-liquide à travers des membranes poreuses dont le diamètre des pores est compris entre 0,1 et 10  $\mu\text{m}$ .

Elle utilise une différence de pression comme force motrice et permet la rétention des bactéries et des particules en suspension.

## **5. Ultrafiltration (UF)**

L'ultrafiltration est une filtration où le liquide traverse une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression.



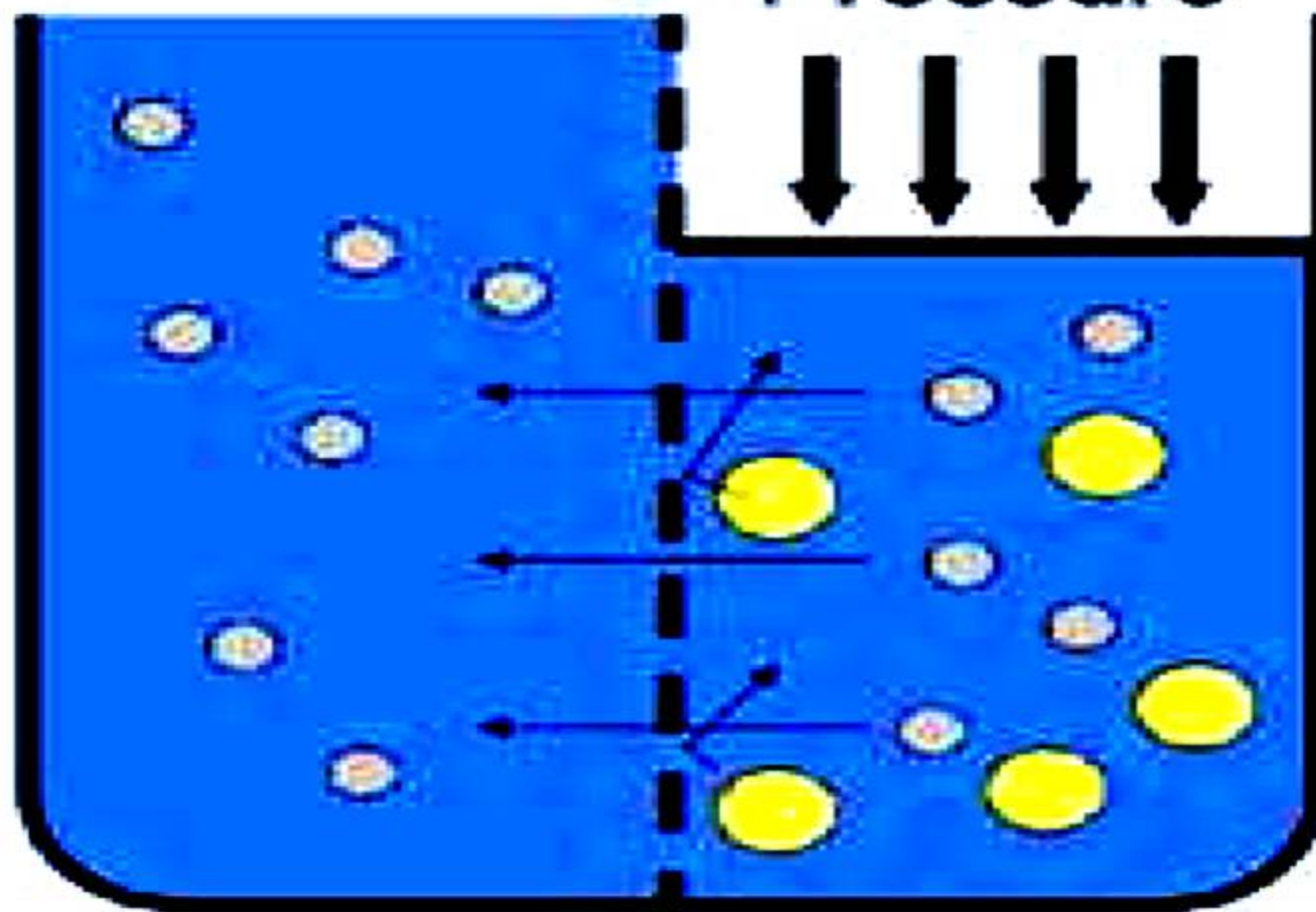
Les particules en solution ou en suspension de haut poids moléculaire sont retenues tandis que l'eau et les molécules de faible poids moléculaire passent à travers la membrane. Les diamètres de pores des membranes (1 et 100 nm).

Ce processus est utilisé dans l'industrie pour purifier et/ou concentrer des solutions de macromolécules ( $10^3$ - $10^6$  gr/mol) notamment les protéines, dessalement des eaux de surfaces et non pas de mer.

# Ultrafiltration

UF Membrane

Pressure



**$\Delta P \sim 5 \text{ bar}$**

## **6. Nanofiltration (NF)**

La nanofiltration se situe sur une échelle de taille, entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration. C'est un procédé membranaire qui permet, comme en osmose inverse, la rétention des sels minéraux avec une pression de fonctionnement plus faible ( $< 20$  bars).



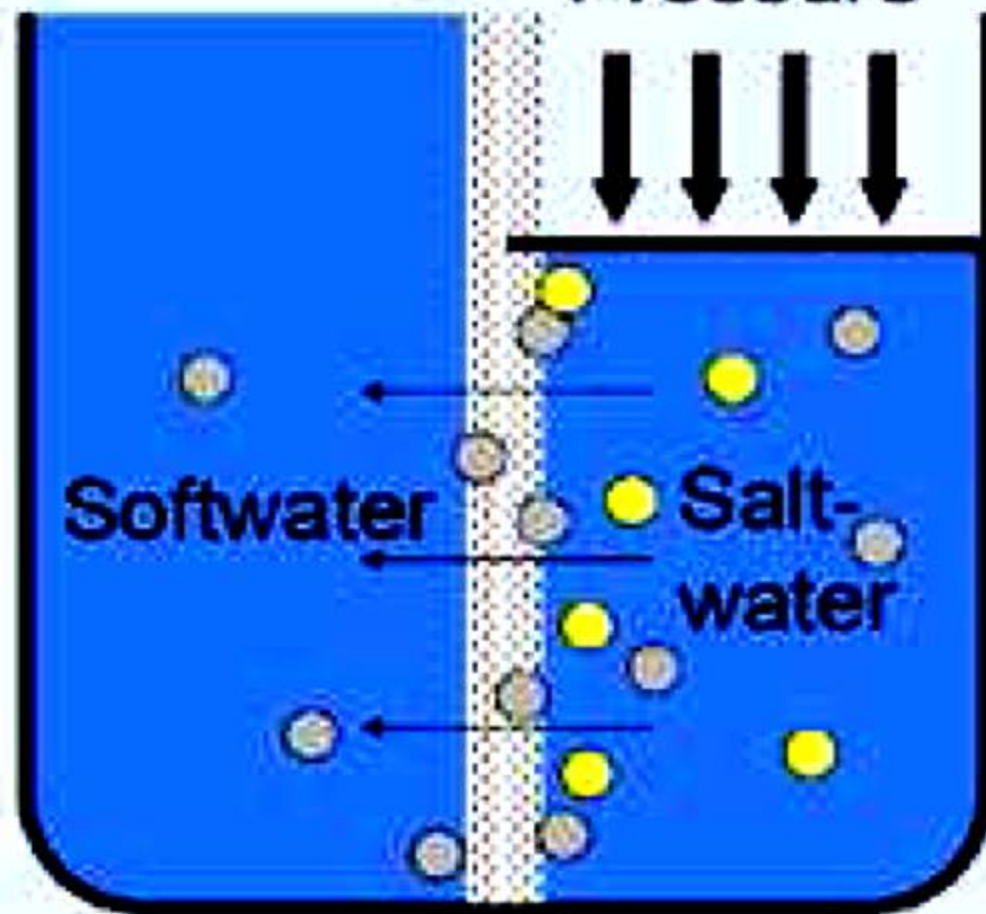
La nanofiltration est un procédé beaucoup plus économique que l'osmose inverse, elle effectue un dessalement partiel et il n'est pas nécessaire de reminéraliser l'eau pour qu'elle soit potable.

# Nanofiltration

*Dr Laib*

Semipermeable Membrane

Pressure



● bivalent ions

● monovalent ions

$\Delta P \sim 10 \text{ bar}$



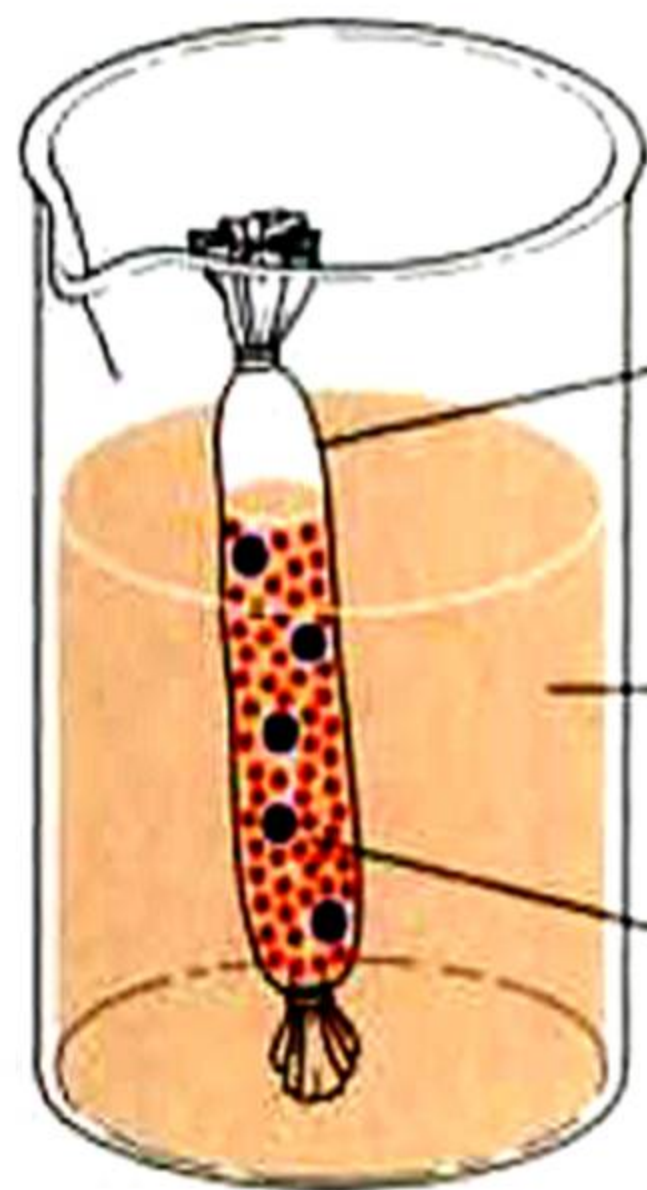
## **7. Dialyse (D)**

La dialyse est une technique de purification des solutions. Le principe consiste à séparer deux solutions par une membrane.

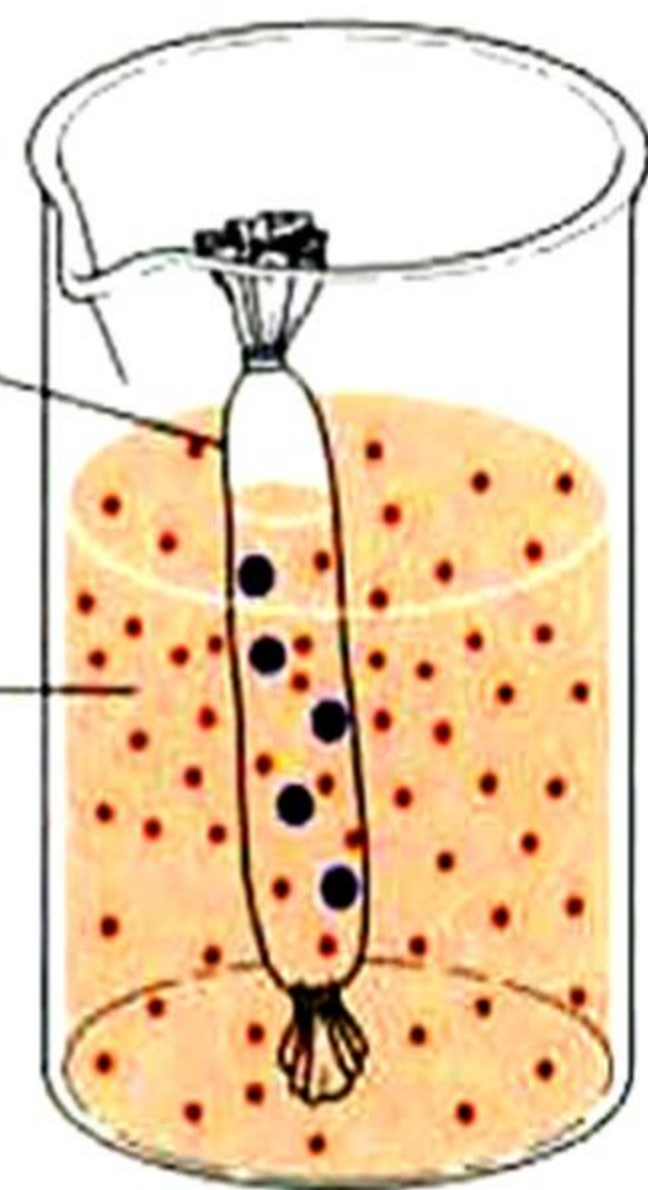
On distingue différents types de membranes, membranes hémiperméables qui ne laisse passer que le solvant et les membranes dialysantes avec des pores de diamètre de l'ordre du nanomètre identiques et connus qui laissent passer le solvant et les solutés en dessous d'une certaine taille.

Par effet de diffusion, les petites molécules traverseront la membrane tandis que les grosses molécules seront retenues d'un côté.

(a) Au début de la dialyse



(b) À l'équilibre



Sac à dialyse

Tampon

Solution concentrée

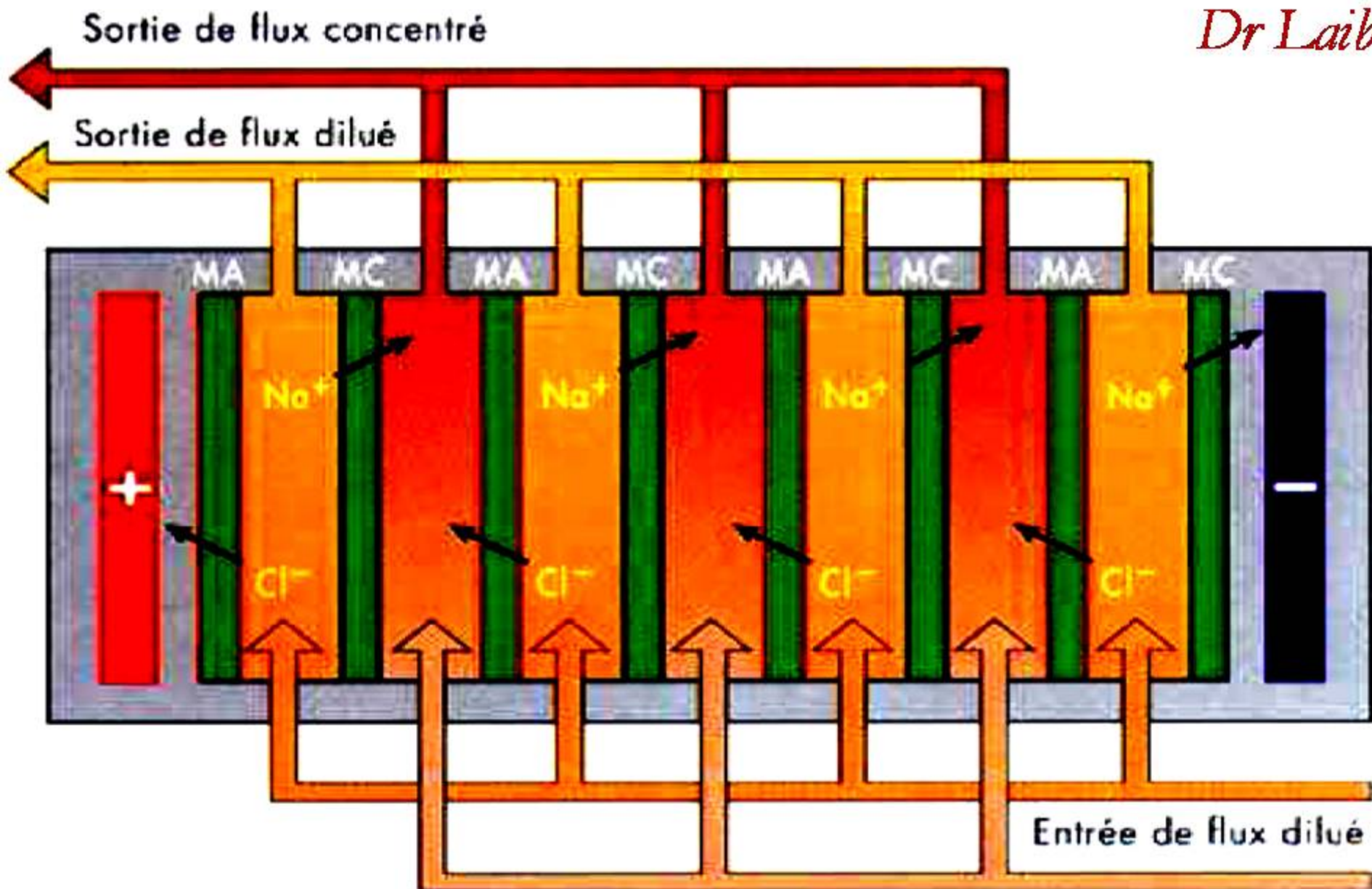


## **8. Electrodialyse (ED)**

Grâce à la disposition alternée des membranes échangeuses d'anions (MEA) et des membranes échangeuses de cations (MEC), les cations migrent vers la cathode en traversant les MEC et sont arrêtés par les MEA.



De même, les anions migrent vers l'anode en traversant les **MEA** et sont stoppés par les **MEC**. Il en résulte une **diminution** de la concentration en espèces ioniques dans certains compartiments (**diluât**) et une **augmentation** dans les autres compartiments adjacents (**concentrât**)



MA : membrane échangeuse d'anions  
MC : membrane échangeuse de cations

Entrée de flux concentré

# *Centrifugation*



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**.

# 1. Différents types de Centrifugeuses

**1. Centrifugeuses de table:** Les modèles les plus simples, souvent appelées centrifugeuses cliniques, permettent d'atteindre de faibles accélérations (**1000 à 3000  $\times g$** ) à des vitesses de rotation relativement basses (moins de **3000 RPM**). Certains modèles sont réfrigérés, certains autres non.



**2. Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes. Elles permettent d'obtenir des vitesses de rotation de l'ordre de **30000 RPM**, donnant pour les plus petits rotors des accélérations d'environ **20000 xg**. Tous les modèles sont réfrigérés.

**3. Microcentrifugeuses:** Spécialement conçues pour les micro-volumes très souvent employés en biochimie moderne. Les microtubes à centrifuge sont des petits tubes coniques en polypropylène de 1.5 ml et assez peu dispendieux.

**4. Ultracentrifugeuses:** Ce sont des appareils complexes et coûteux qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à **300000 xg**) en faisant tourner des rotors très rapidement (**50000-85000 RPM**).



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 et de systèmes de réfrigération.

Les centrifugeuses de ce type peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de **12000-15000 xg**.

Les modèles les moins coûteux n'ont pas de contrôle de vitesse et ne sont pas réfrigérés.



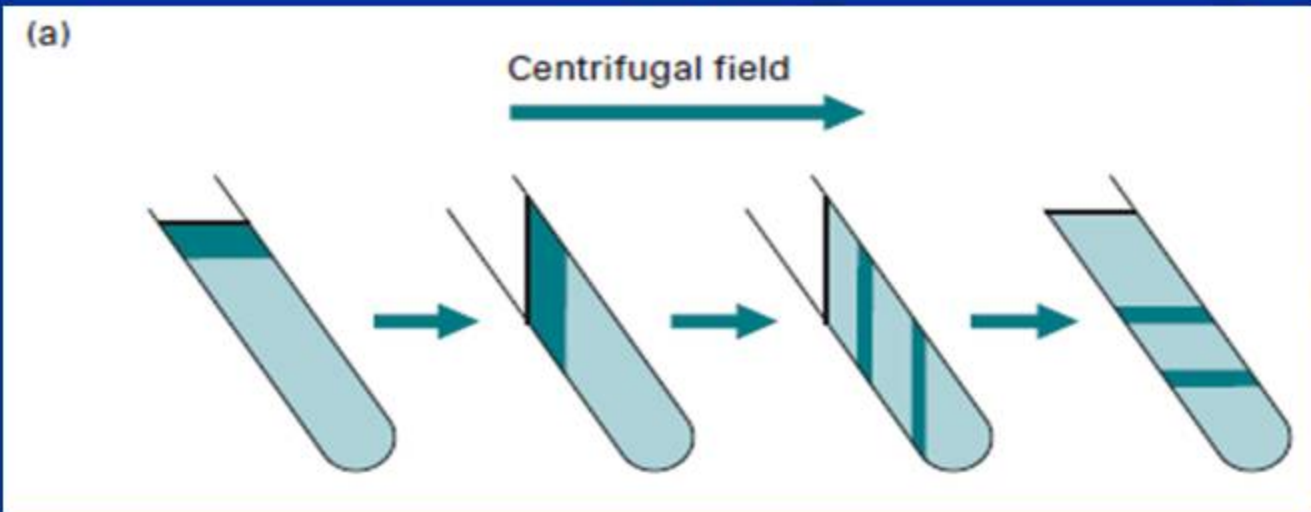
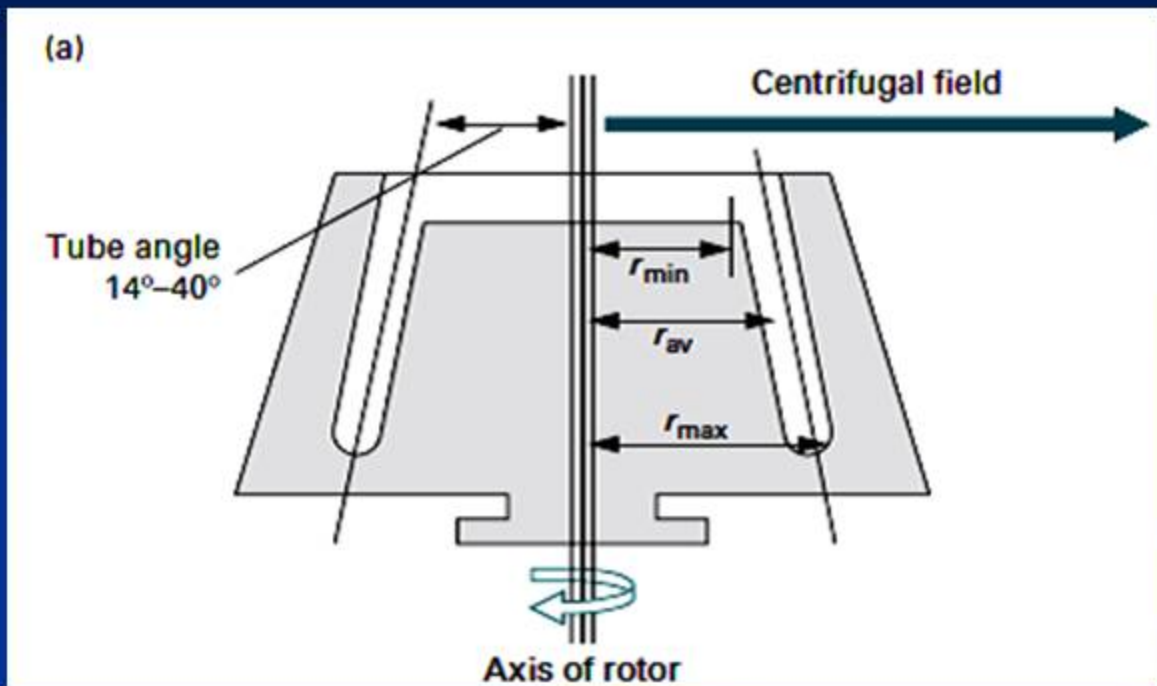
**5. Ultracentrifugeuses analytiques:** Ce sont des appareils de moins en moins utilisés. Ces centrifugeuses servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines.

## 2. Différents types de rotors

### 2.1. Rotors à angle fixe (**fixed angle**) 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  $15^{\circ}$  à  $35^{\circ}$  selon les modèles. Les tubes à centrifuger sont déposés dans ces puits. La plupart des centrifugations à vitesses moyennes et élevées se font avec ce type de rotor.

# 1. Rotors à angle fixe (fixed angle)





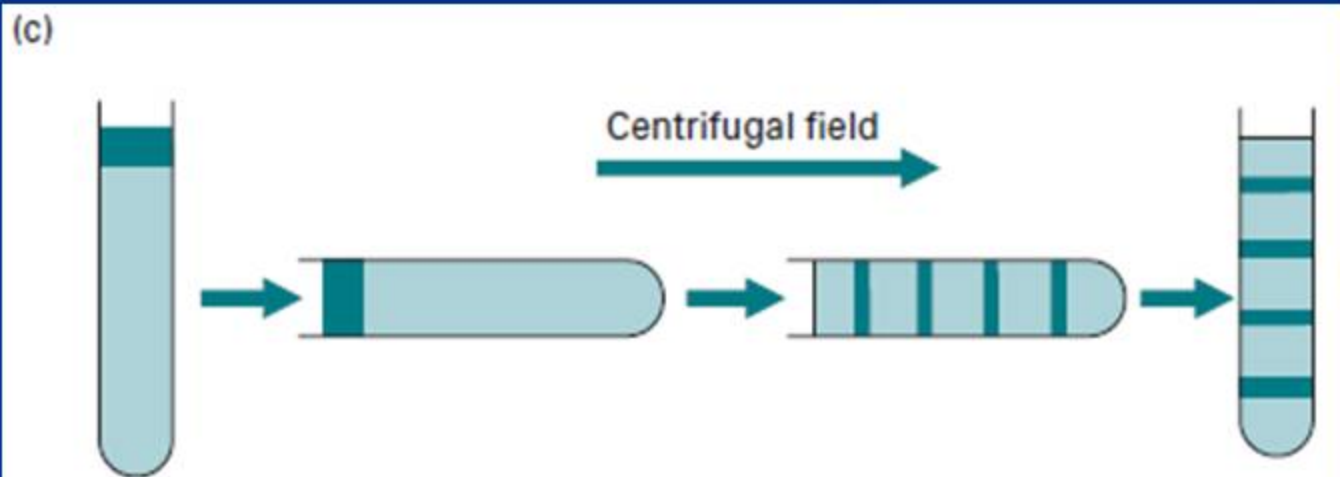
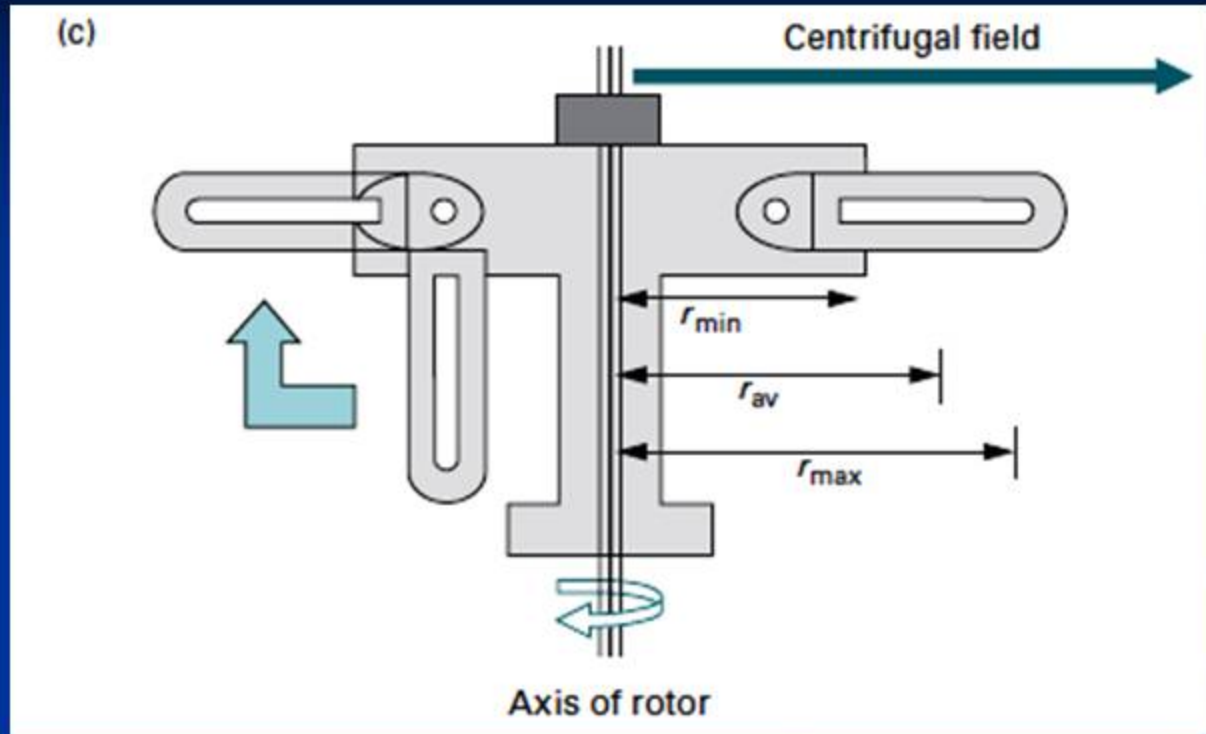
## 2. Rotors à godets mobiles (swinging buckets)

se réorientent lors de la centrifugation. Les godets sont disposés sur des crochets ou un système à bascule.

Quand la rotation du rotor débute les **godets**, sous l'effet de la **force centrifuge**, se réorientent et passent en position **horizontale**. Les **particules** peuvent donc **sédimenter** et s'**accumuler** dans le **fond** du **tube** à **centrifuger** sans jamais heurter les parois du tube.

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

*Dr Laib*

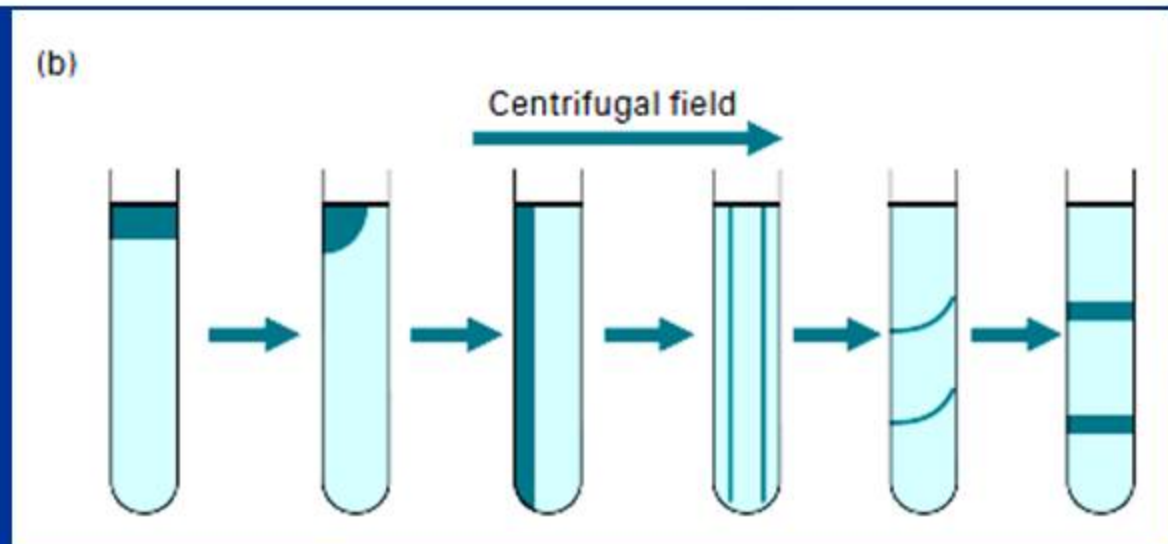
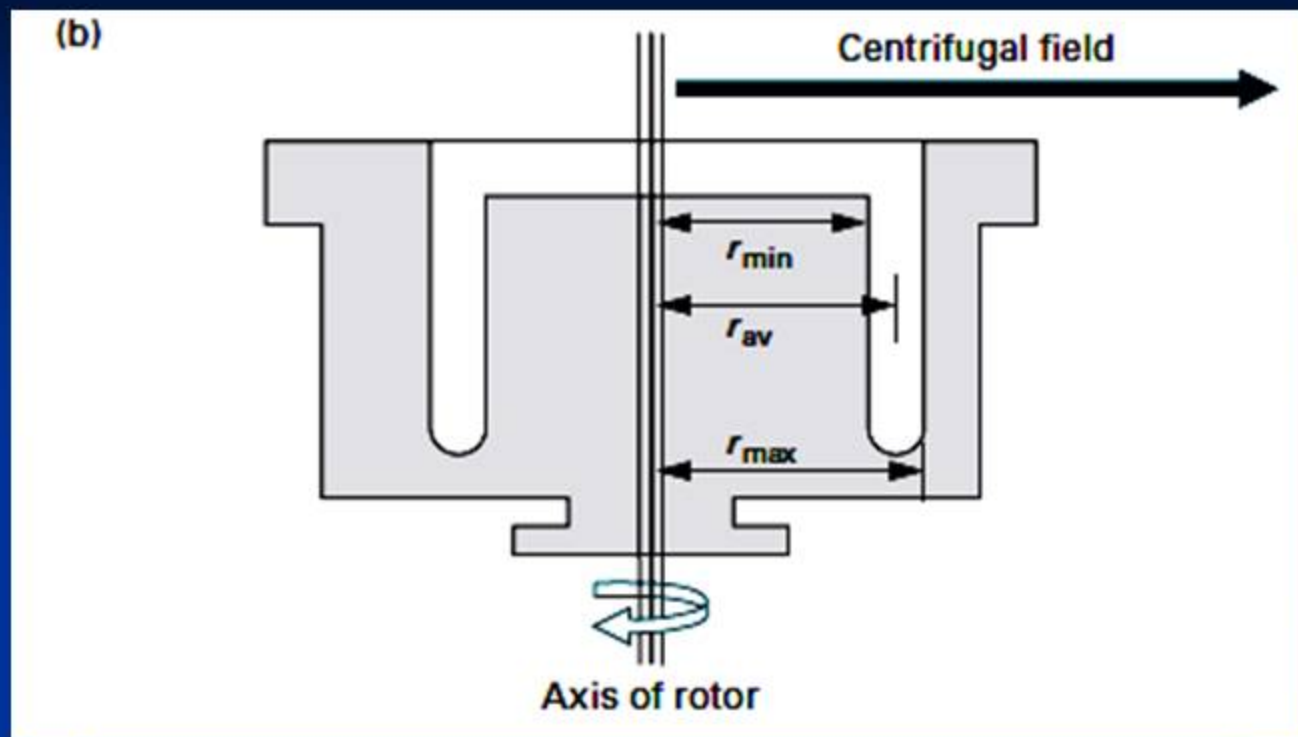




**3. Rotors verticaux (Vertical rotor)** sont beaucoup moins répandus et sont essentiellement **utilisés** pour les **gradients** de type **isopicniques** ou **zonaux**.

### 3. Rotors verticaux (Vertical rotor)

*Dr Laib*



La séparation s'opère par l'action de la force

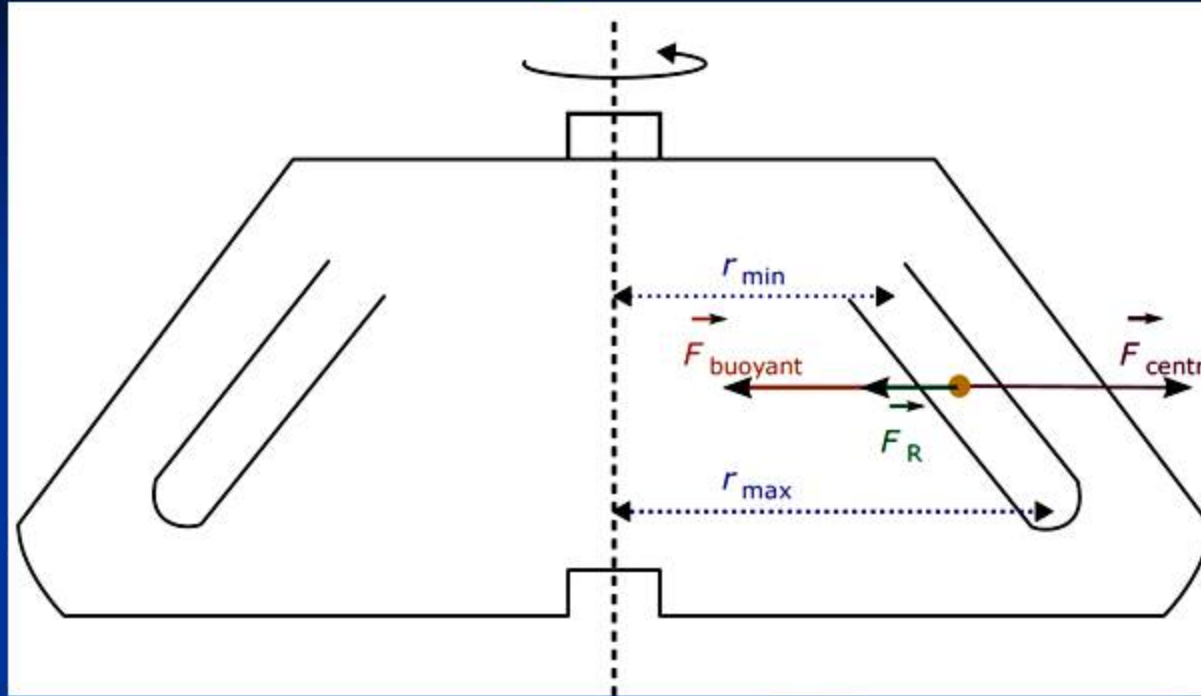
Centrifuge **F<sub>c</sub>** sur les composés. Cette force centrifuge,

Exprimée en **Newtons**, est donnée par la relation **F<sub>c</sub> =**

**m $\omega^2$**  en m/s<sup>2</sup> dont :

- La masse **m** du composé à séparer
- La distance **r** du tube à l'axe de rotation de la centrifugeuse
- La vitesse angulaire  **$\omega$**  exprimée en **radians par seconde** ou en **tour par minute**.

### 3. Principe de la centrifugation



Au cours de la centrifugation, les composés dans le fluide situés à une distance  $r$  de l'axe de rotation sont soumis à différentes forces : la force de **friction** ( $F_R$ ), la force centrifuge ( $F_{\text{centr}}$ ) et la force de **flottaison** ( $F_{\text{flottaison}}$ )



# *Centrifugation*



## 1. Vitesse angulaire ( $\omega$ )

Quand la centrifugeuse atteint la vitesse de centrifugation désirée, l'échantillon est soumis à un mouvement circulaire uniforme. La **vitesse de rotation** ou **vitesse angulaire** ( $\omega$ ) exprimé en **rad.sec<sup>-1</sup>**; **rpm** est la fréquence de rotation en tour par min) est :

$$\omega = 2\pi \text{ rpm} / 60 \text{ rad sec}^{-1}$$

## 2. Accélération (champ) centrifuge

**Le champ centrifuge**, généré par le mouvement circulaire uniforme, est dirigé radialement vers l'extérieure et dépend de la vitesse angulaire ( $\omega$ ) et de distance (**r en cm**) de l'axe de rotation, selon l'équation:

$$f = \omega^2 r \text{ ou } f = (2\pi \text{ rpm}/60)^2 r$$

### 3. Force centrifuge

La **force centrifuge** ( $F_c$ ) qui agit sur l'échantillon dépend de sa masse ( $m$ ), de la vitesse angulaire ( $\omega$ ) et de distance ( $r$ ) de l'axe de rotation, selon l'équation:

$$F_c = m.f = m(2\pi \text{ rpm}/60)^2 r$$

$$F_c = m\omega^2 r$$



## 4. Champ Centrifuge Relative (RCF)

**RCF** est le **rapport** entre la **force centrifuge appliquée** par la centrifugeuse sur la particule et la **force de gravité** ( $F_g = m.g$  où  $g = 981\text{cm.sec}^{-2}$ )

$$\text{RCF} = F_c / F.g = m\omega^2 r / m.g = \omega^2 r / g$$

- Le Champ Centrifuge Relatif est exprimé en nombre de  $g$

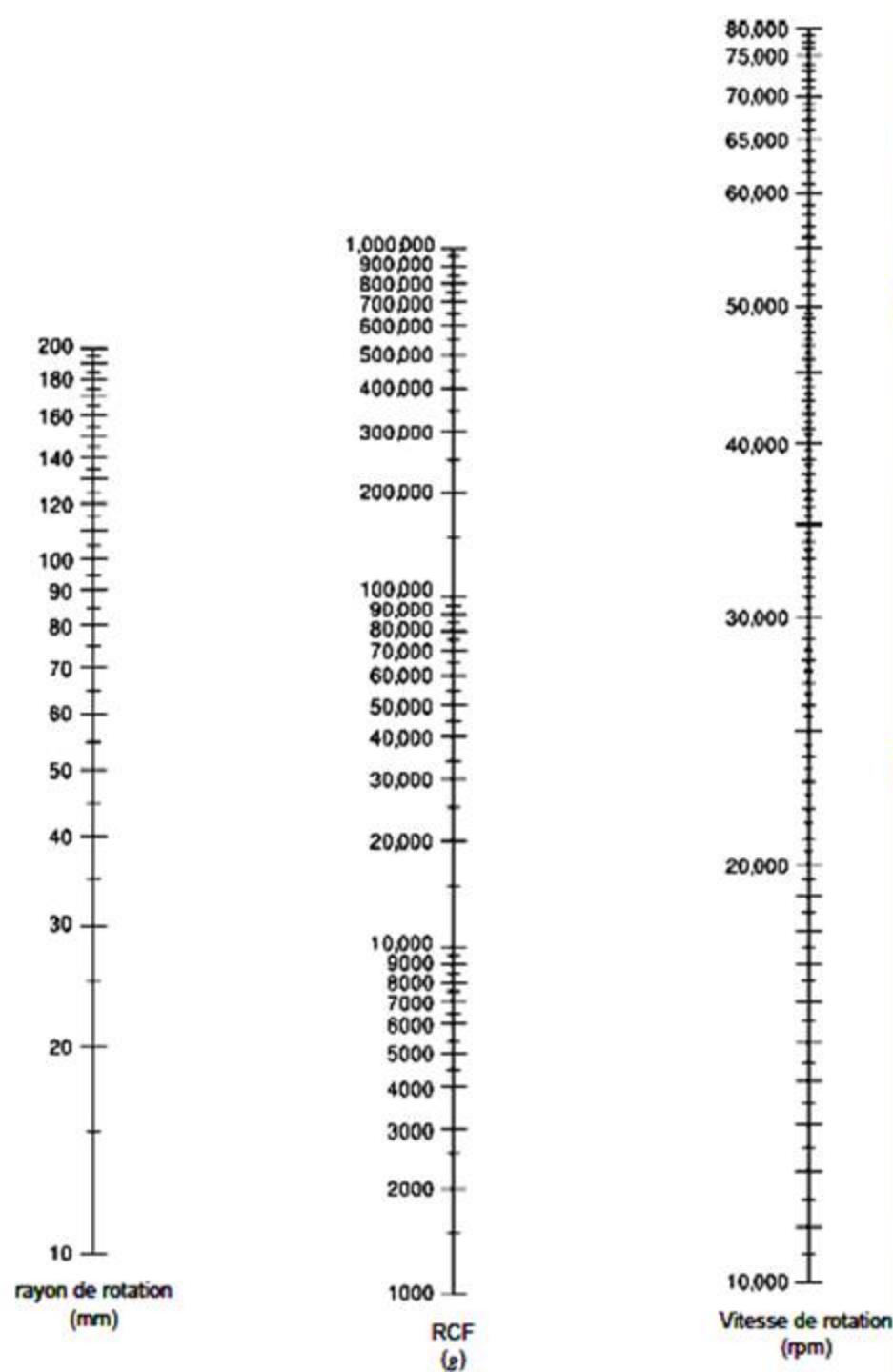


Si l'on exprime la vitesse angulaire en tours par minute (**rpm**) et on substitue à ***g*** sa valeur (**981cm.sec<sup>-2</sup>**), on obtient:

$$\text{RCF} = (2\pi \text{ rpm}/60)^2 \cdot r/981 = 1.118 \cdot 10^{-5} \text{ rpm}^2 \cdot r$$

## 5. Nomogramme

- **Exemple 1:** rayon de rotation  
9 cm; vitesse de rotation  
12000 rpm. **RCF = ?**
- **Exemple 2:** RCF = 15000 g;  
rayon de rotation = 6 cm.  
**Vitesse de rotation = ?**



## 6. Force de sédimentation ( $F_s$ )

La force de sédimentation  $F_s$  qui s'exerce sur une particule est égale à la force de centrifugation moins la force de flottaison exercée par la solution:

$$\blacksquare F_s = F_c - P_A$$

$$\blacksquare F_s = m_p \omega^2 r - V_p \rho_{sol} \omega^2 r$$

$$\blacksquare F_s = V_p \rho_p \omega^2 r - V_p \rho_{sol} \omega^2 r$$

$$\blacksquare F_s = V_p (\rho_p - \rho_{sol}) \omega^2 r$$

$$\blacksquare F_s = \frac{4}{3} \pi a^3 (\rho_p - \rho_{sol}) \omega^2 r$$

$$m_p = V_p \rho_p$$

$$V_p = \frac{4}{3} \pi a^3$$

Cependant le déplacement d'une particule dans une solution est contrecarré par la force de friction  $F_0$  :

$$F_0 = v \, 6\pi\eta a$$

- $v$  = vitesse de sédimentation
- $6\pi\eta a$  = coefficient de friction
- $\eta$  = viscosité de la solution



## 7. Vitesse de sédimentation

Quand la **force de sédimentation** et la **force de friction** s'équilibrent le **mouvement est rectiligne uniforme** et on obtient:

$$F_0 = F_s$$

The diagram shows the equation for sedimentation velocity  $v$  enclosed in a red box. Labels with arrows point to various parts of the equation:

- Vitesse de sédimentation de la particule** points to  $v$ .
- Constante pour une sphère** points to the fraction  $\frac{2}{9}$ .
- Rayon de la particule** points to  $a^2$ .
- Densité de la particule** points to  $\rho_p$ .
- Densité de la solution** points to  $\rho_{sol}$ .
- Viscosité de la solution** points to  $\eta$ .
- Champ centrifuge** points to  $\omega^2 r$ .

$$v = \frac{2}{9} \frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_{sol})}{\eta} \cdot \omega^2 r$$

$$\bullet \quad v \cdot 6\pi\eta a = \frac{4}{3}\pi a^3 (\rho_p - \rho_{sol}) \omega^2 r$$

$$\bullet \quad v = \frac{4}{3}\pi a^3 (\rho_p - \rho_{sol}) \omega^2 r / 6\pi\eta a$$

The diagram shows the equation for sedimentation velocity  $v$  enclosed in a red box. Arrows point from descriptive labels to the variables in the equation:

- Vitesse de sédimentation de la particule** points to  $v$ .
- Constante pour une sphère** points to the fraction  $\frac{2}{9}$ .
- Rayon de la particule** points to  $a^2$ .
- Densité de la particule** points to  $\rho_p$ .
- Densité de la solution** points to  $\rho_{sol}$ .
- Viscosité de la solution** points to  $\eta$ .
- Champ centrifuge** points to  $\omega^2 r$ .

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_{sol})}{\eta} \cdot \omega^2 r$$

## 8. Coefficient de sédimentation

La vitesse de sédimentation est la vitesse à laquelle sédimente une particule dépend de la loi de Stokes.

Une formulation plus pratique de l'équation de la vitesse de sédimentation est celle qui utilise le coefficient de sédimentation:

Vitesse de sédimentation  
de la particule

$v$

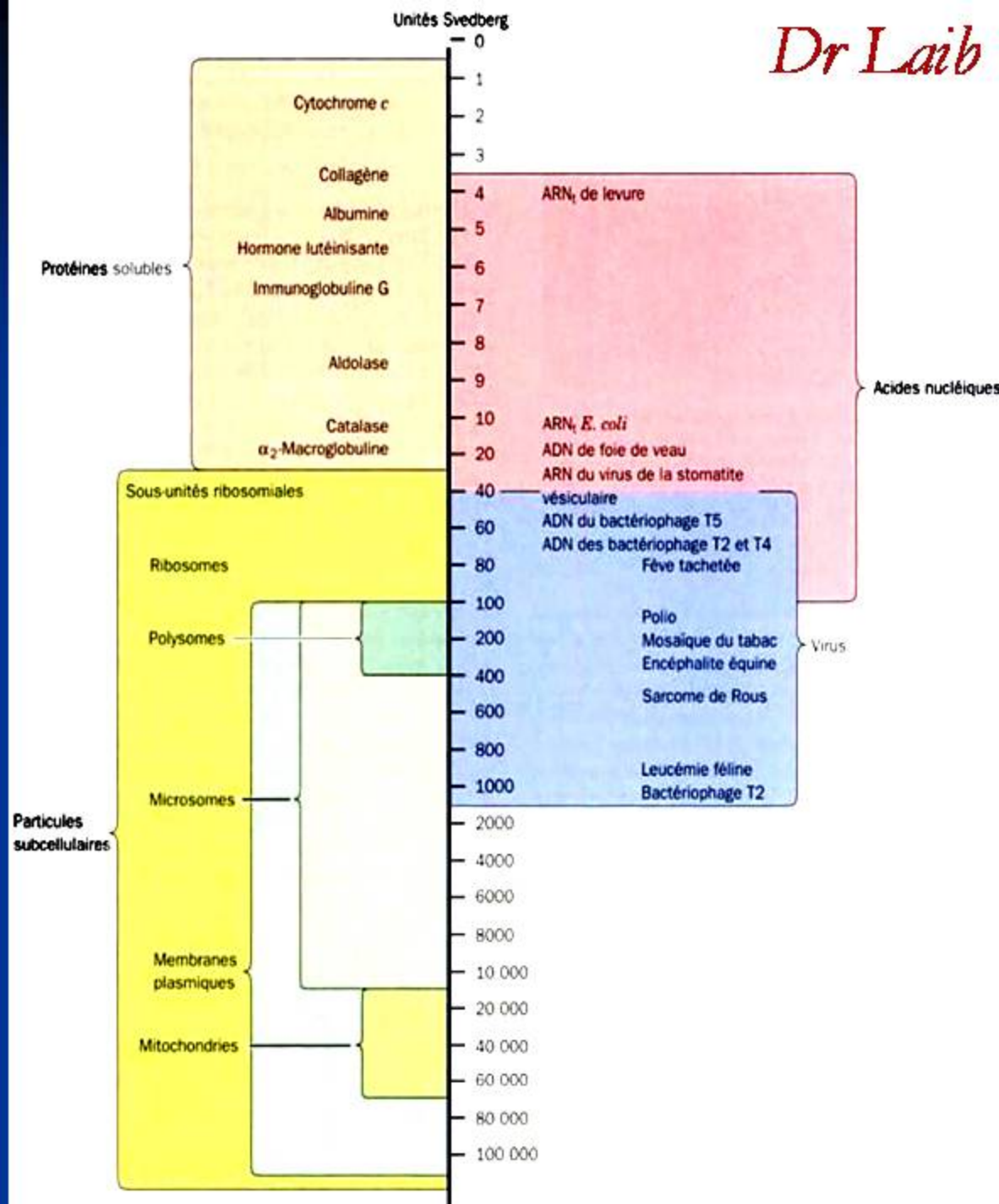
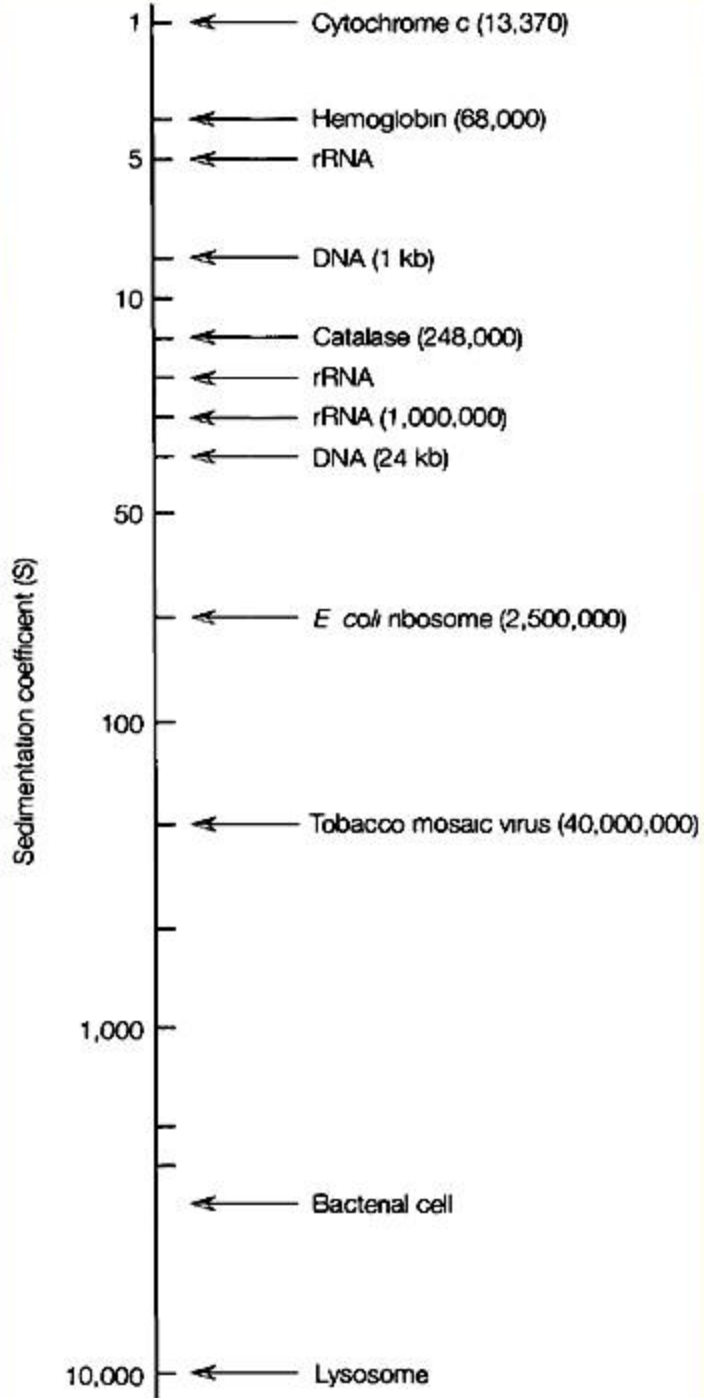
$\frac{2}{9}$

$\frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_{sol})}{\eta}$

Coefficient de sédimentation  
de la particule

$\omega^2 r$

$S$





# *Ultracentrifugation*

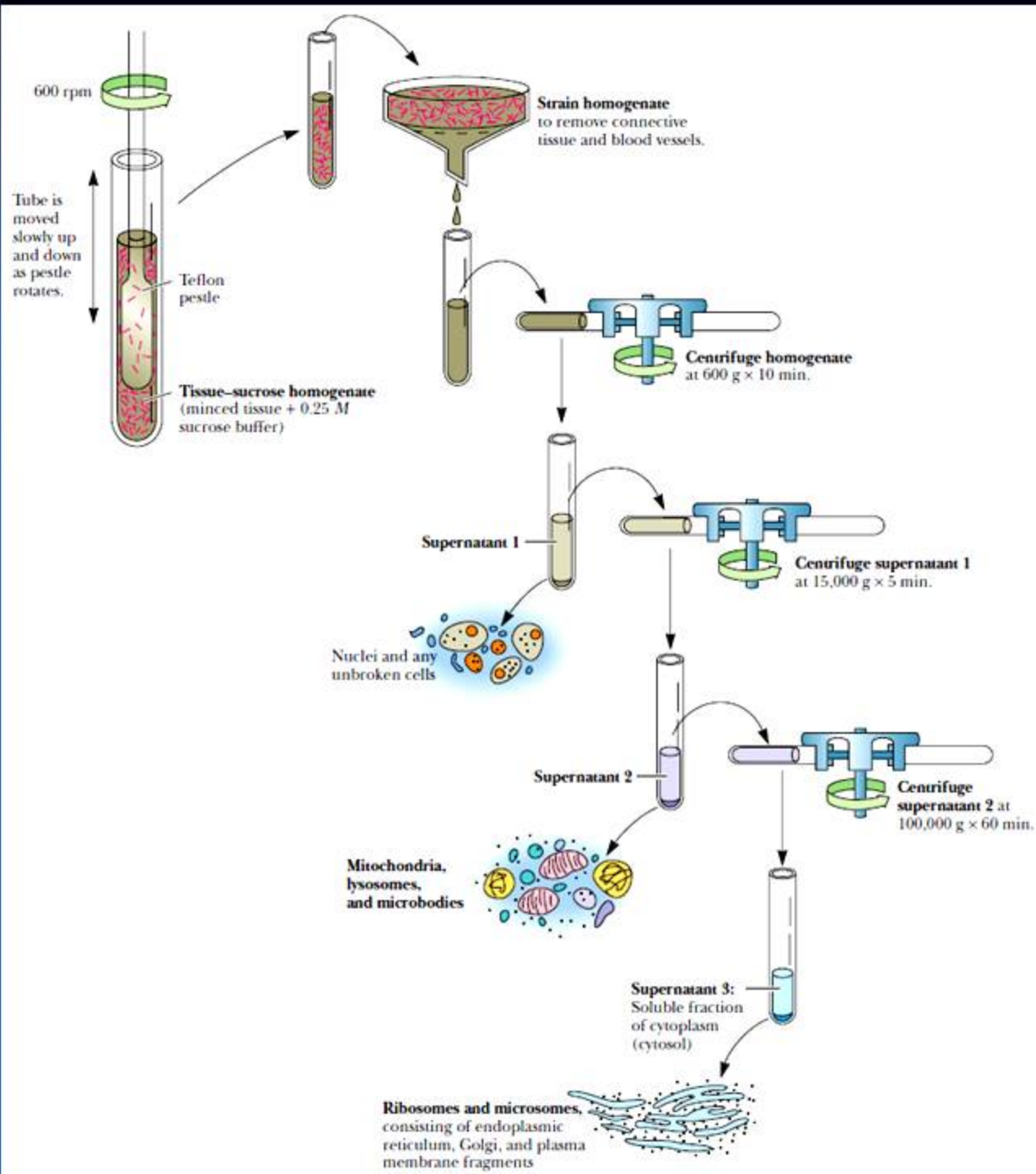
- L'ultracentrifugeuse peut atteindre des vitesses de rotation de l'ordre de **80000 à 100000 rpm** qui donnent lieu à des **forces** qui peut dépasser **100000 g**.
- Les **ultracentrifugeuses** créent un vacuum dans la **chambre du rotor** pour permettre d'obtenir de très **hautes vitesses de centrifugation sans** avoir la **friction de l'air**, cette **chambre** est **réfrigérée** pour éviter le **réchauffement** des **échantillons** à ces **vitesses**.

# 1. Ultracentrifugation préparative

*Dr Laib*

## 1.1. Différentielle

Elle permet de **séparer** les **particules** de l'**homogénat** (organites, macromolécules, ...) en fonction de leur **taille** et de leur **densité** par une **succession** de **centrifugations** à des **temps** et des **accélération**s croissants.





## 1.2. Ultracentrifugation en gradient de densité

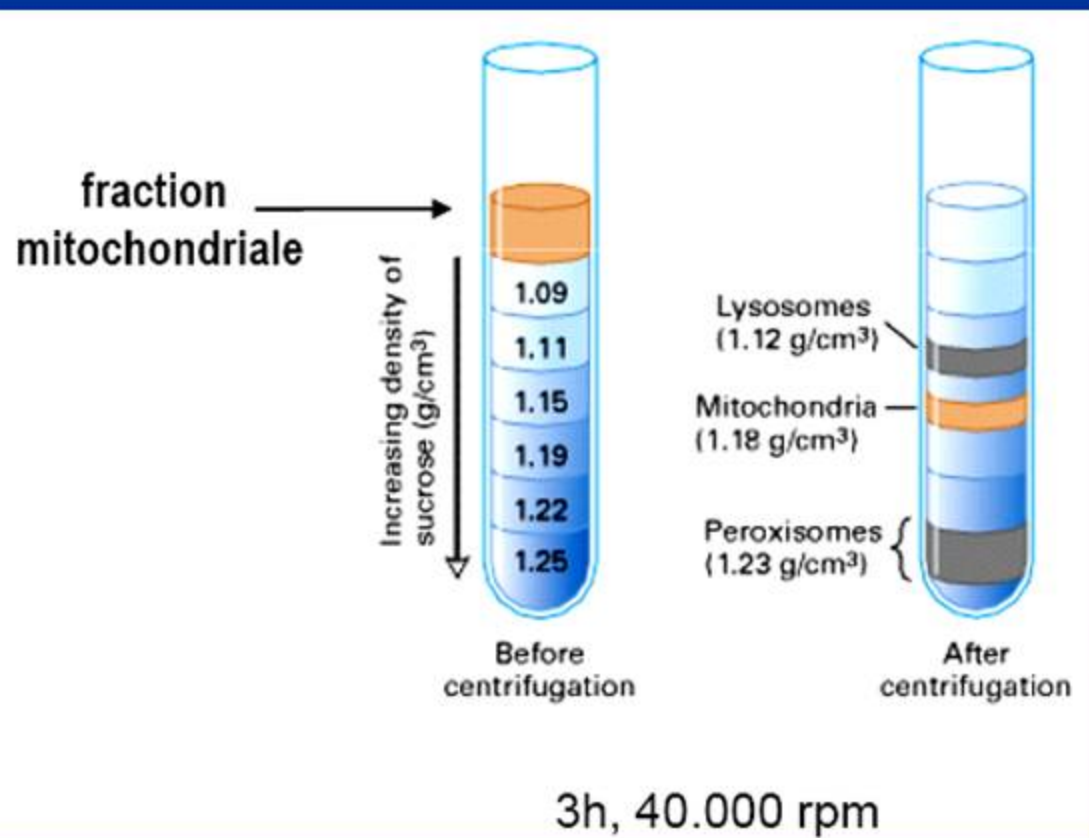
Il convient de distinguer, d'une part la **centrifugation de zone** qui sépare les macromolécules suivant leurs **constantes de sédimentation**, d'autre part la **centrifugation isopycnique** dont le **gradient de densité** constitue le **principe** même de la méthode.

## 1.2.1. Ultracentrifugation de Zone

*Dr Laib*

Dans l'**ultracentrifugation zonale**, une suspension protéique est soigneusement déposée au-dessus d'un **gradient de densité de saccharose**. Au cours de la centrifugation, chaque particule traverse le gradient en fonction de son **coefficient de sédimentation** (les molécules se sépareront selon leur densité et non leur masse).

L'ultracentrifugation zonale est utilisée pour des complexes macromoléculaires, des particules et des fractions membranaires.

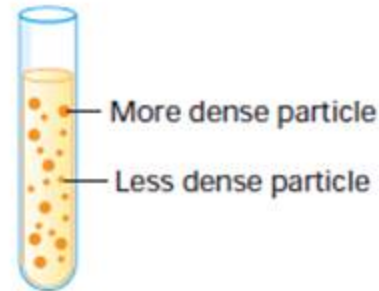


Fractionnement sur  
gradient de saccharose

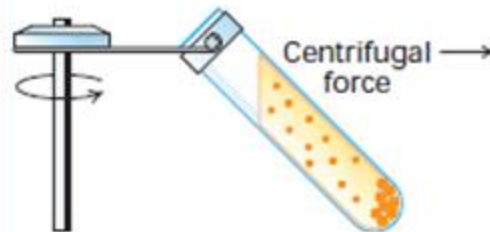


(a) Differential centrifugation

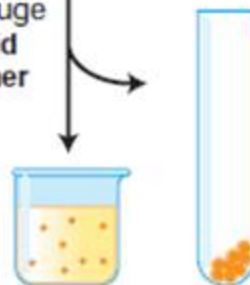
**1** Sample is poured into tube



**2** Centrifuge  
Particles settle  
according to mass

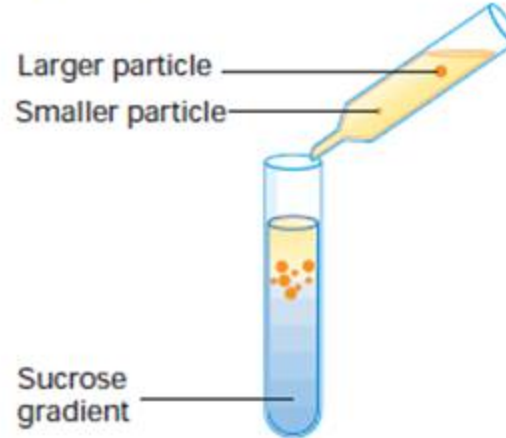


**3** Stop centrifuge  
Decant liquid  
into container

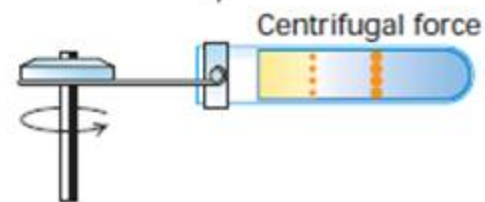


(b) Rate-zonal centrifugation

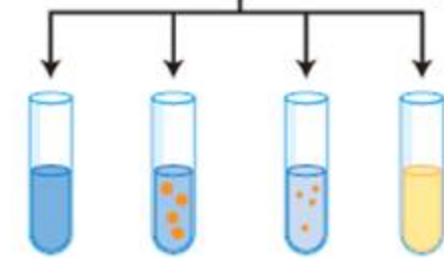
**1** Sample is layered on top of gradient



**2** Centrifuge  
Particles settle  
according to mass



**3** Stop centrifuge  
Collect fractions  
and do assay



Decreasing mass of particles

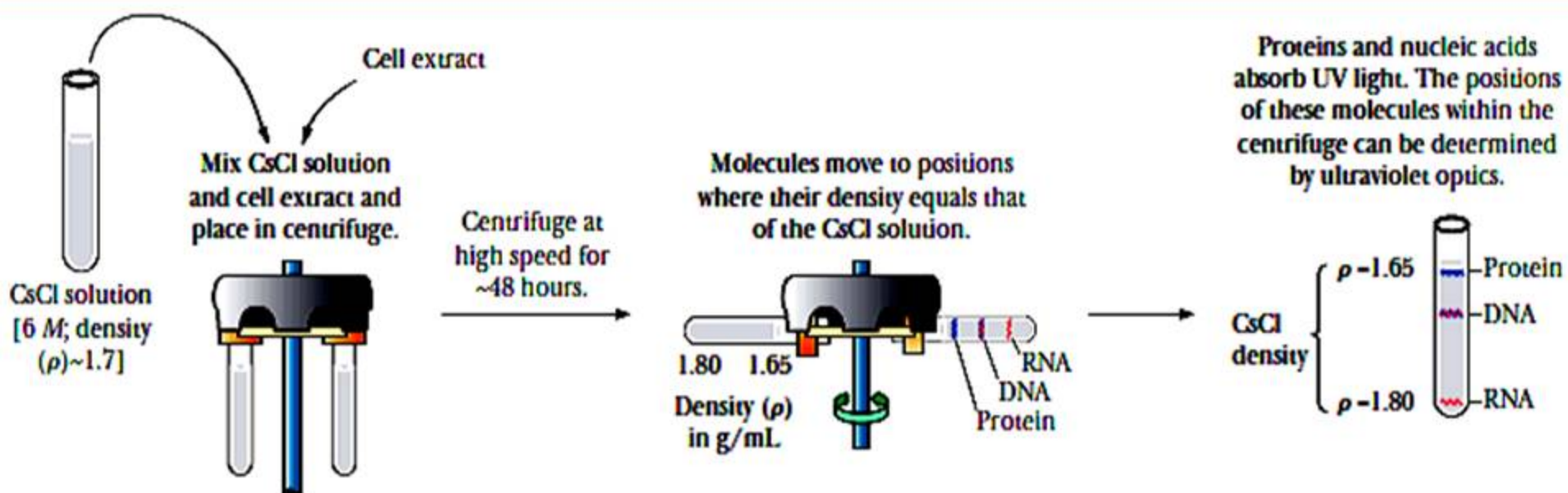


## 1.2.2. Gradient isopycnique

*Dr Laib*

La centrifugation est **complète** jusqu'à l'**équilibre** (chlorure de césium  $\text{CsCl}$ ,  $\text{CsSO}_4$  séparation selon la **densité**).

On réalise un gradient de densité (continu ou discontinu) encadrant la masse volumique de la protéine. Au bout d'un **temps** suffisamment **long** de centrifugation, **grande vitesse de centrifugation**, la protéine s'arrête au niveau où sa **densité** est **égale** à celle du **solvant**.



## 2. Ultracentrifugation analytique

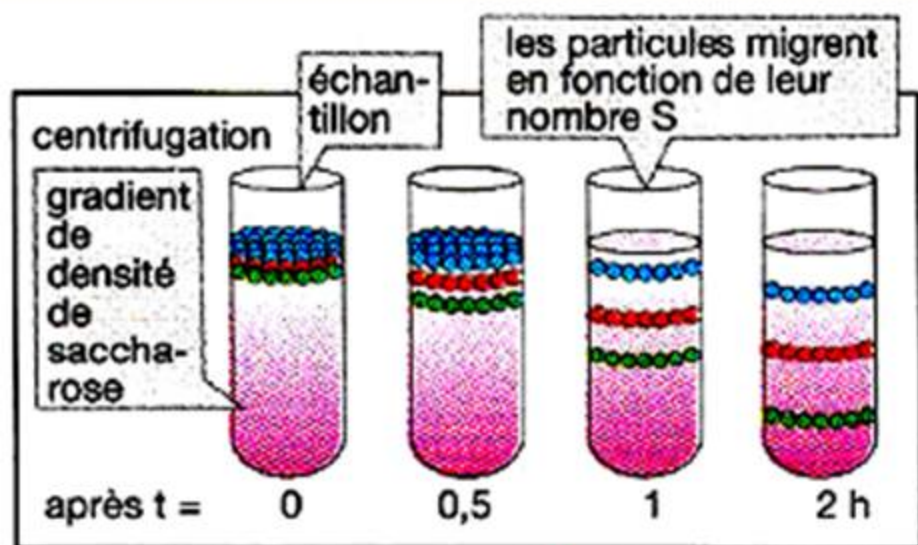
Ultracentrifugation analytique Diffère de l'ultracentrifugation préparative par les résultats attendus ;

Renseigne sur les caractéristiques physiques des molécules ;

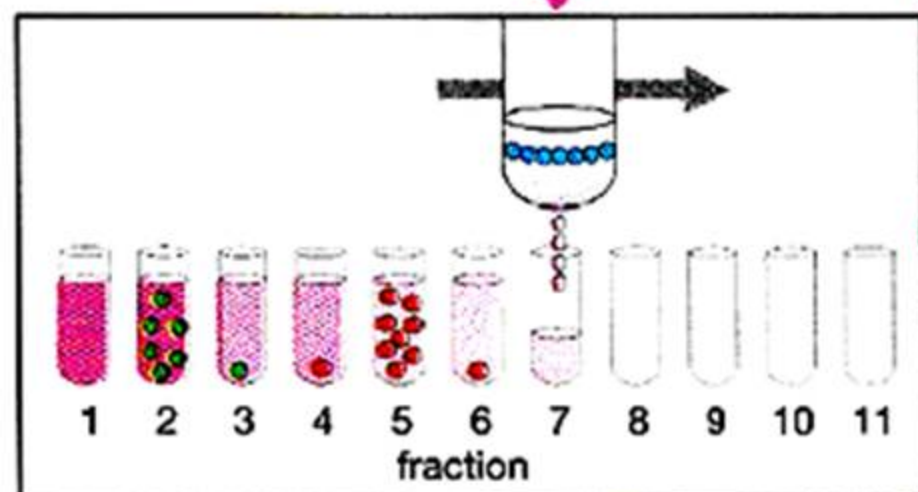
La migration est souvent suivie par stroboscopie → coût.



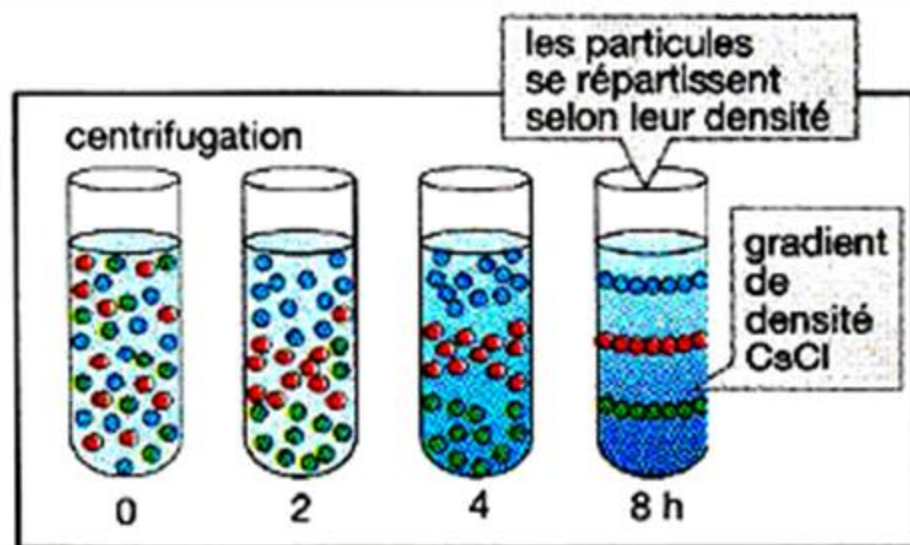
# Ultracentrifugation en zones et isopycnique *Dr Laib*



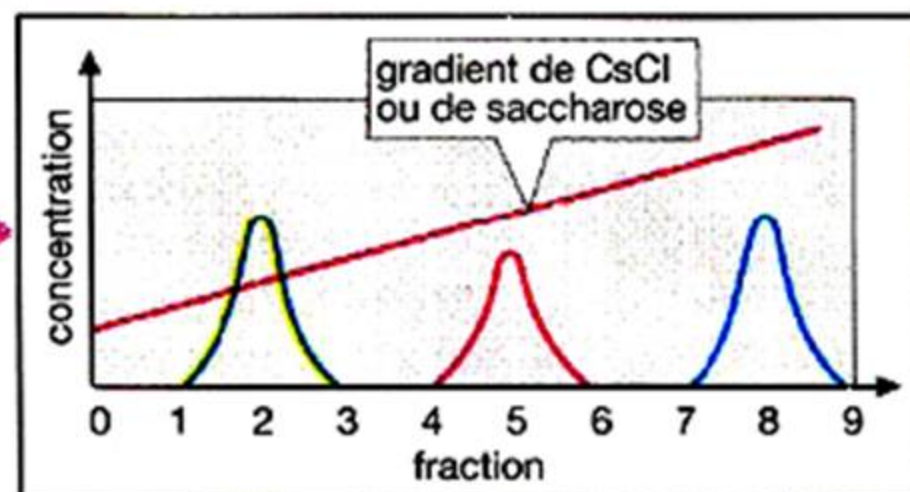
centrifugation de zone



fractionnement



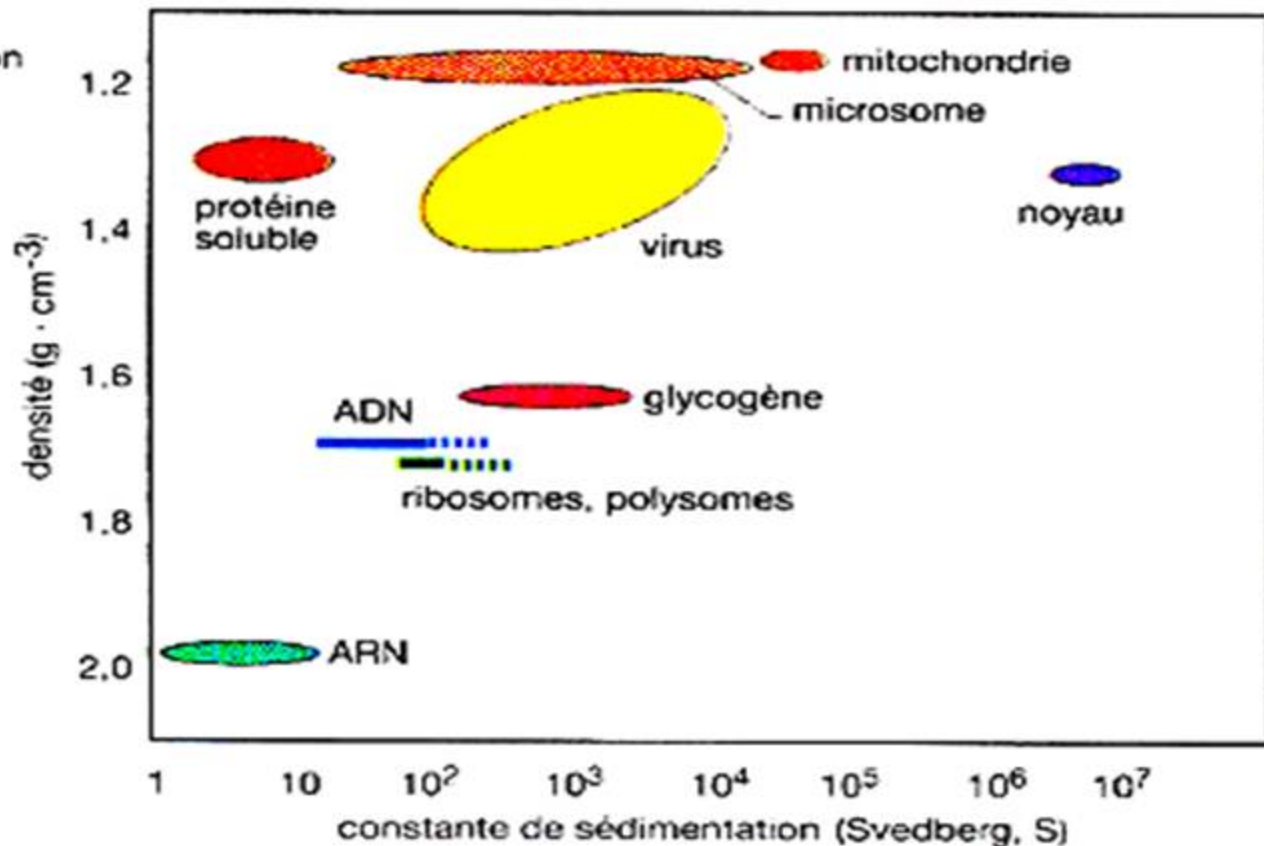
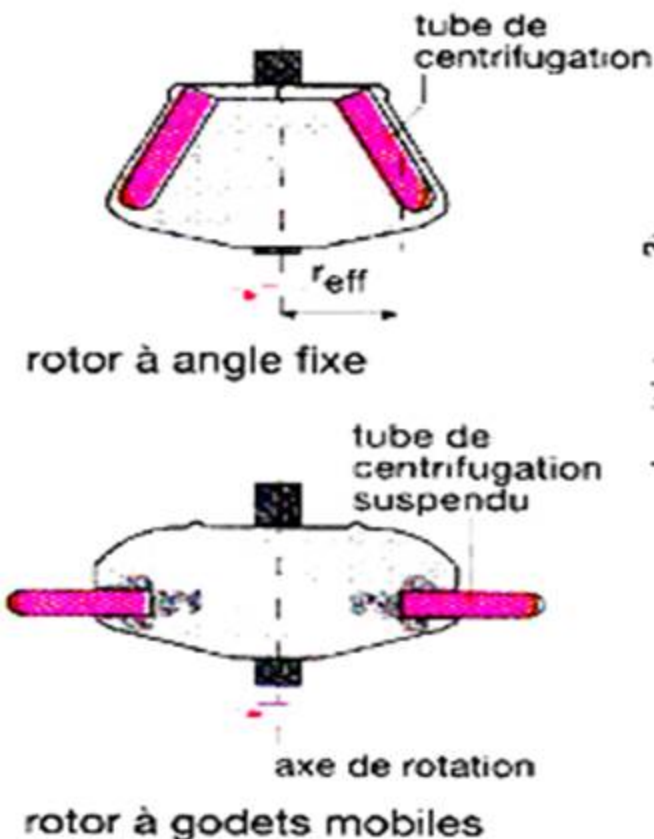
centrifugation isopycnique



mesure



# Récapitulation (principes de l'ultracentrifugation) *Dr Laib*



$g$  : accélération

$v$  : vitesse de sédimentation ( $cm \cdot s^{-1}$ )

$\omega$  : vitesse angulaire ( $rad \cdot s^{-1}$ )

$r_{eff}$  : rayon effectif (cm)

$$g = \omega^2 \cdot r_{eff}$$

$$v = \omega^2 \cdot r_{eff} \cdot s$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N f}$$

$s$  : coefficient de sédimentation

$M$  : masse moléculaire

$\bar{v}$  : volume spécifique partiel de la particule ( $cm^3 \cdot g^{-1}$ )

$\rho$  : densité de la solution ( $g \cdot cm^{-3}$ )

$f$  : coefficient de friction