

I.1. FILTRATION

I.1.1. Définition

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 ou filtre**. La filtration n'est utilisée que pour les mélanges hétérogènes liquide/solide.

La filtration est la séparation de particules en suspension dans un fluide, par différence de pression à travers une membrane convenable.

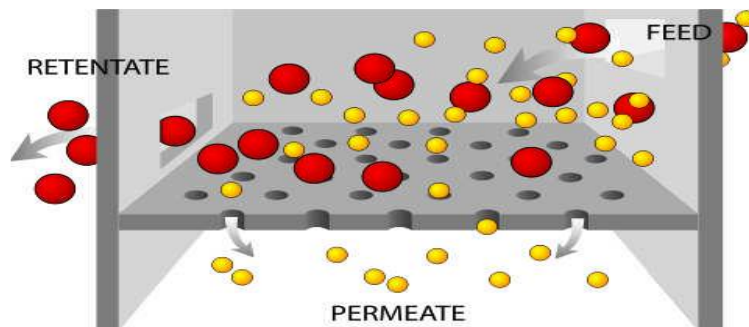
On définit **l'ultrafiltration** comme une séparation de macromolécules en solution dans une phase dispersante alors que la **microfiltration** est une séparation de l'ordre du micromètre.

La **filtration stérilisante** est un cas particulier, les particules étant des microorganismes.

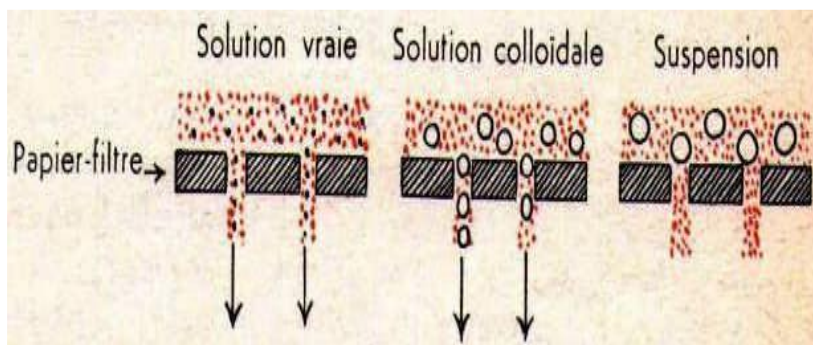
I.1.2. Principe

La filtration repose sur la **rétenction par le filtre** les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous ou pores du filtre.

Le liquide ayant subi la filtration se nomme **filtrat**, et ce que le filtre retient se nomme un **résidu**, "Gâteau" ou retentât.



La filtration ne permet pas de séparer les petites molécules (cristalloïdes) des macromolécules (colloïdes) puisque les molécules colloïdes traversent les filtres au même titre que les solutions vraies ou cristalloïdes.



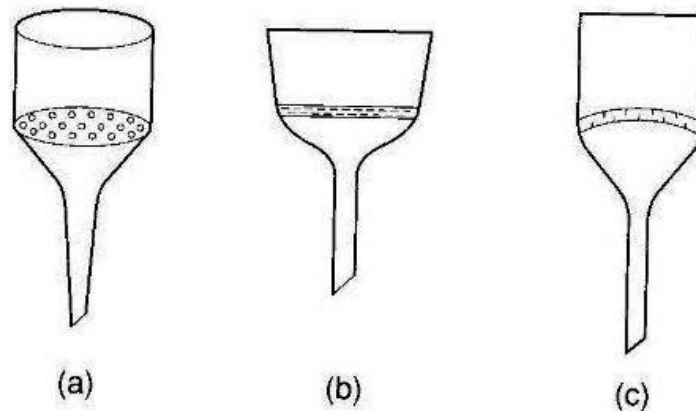
I.1.3. Matériel de filtration

Le matériel le plus simple est constitué d'un **entonnoir de filtration** et d'un **filtre**.

Pour accélérer la filtration, l'entonnoir doit faire un angle le plus voisin possible de 60° et la longueur de la tige doit être de 15cm.

Pour les grandes quantités de produit, on utilise les entonnoirs Buchner.

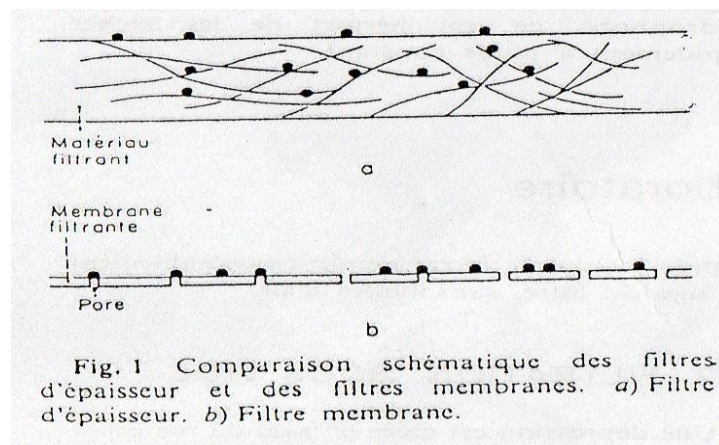
Entonnoirs Buchner : (a) modèle ordinaire en porcelaine, (b) modèle en verre à tamis à entailles, (c) modèle en pyrex.



I.1.3.1. Les filtres

On distingue deux types de filtres :

- **Les filtres d'épaisseur**, qui retiennent les particules dans un réseau de fibres (papier, fibre de verre, amiante) ou de canalicules (matériau fritté) ;
- **Les filtres membranes**, constitués d'une fine lame plastique percée de pores calibrés.



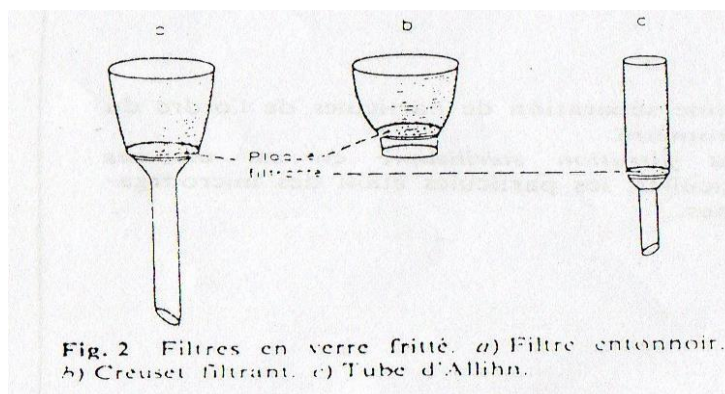
a. Les filtres d'épaisseur

Les filtres d'épaisseur sont constitués de matériaux qui doivent être insolubles, inertes physiquement et chimiquement ; on distingue :

- **Les papiers**, qui diffèrent par leurs formes, leur texture, leur porosité, leur pureté. Un papier à trame serrée permet une filtration très poussée, mais la durée de l'opération s'en trouve allongée. Il existe des papiers filtre sans cendre, déminéralisés par lavage aux acides, d'une très grande pureté et qui, après combustion, n'ajoutent aucun élément étranger au précipité. Il existe un code de couleur ou de numérotage définissant la porosité du papier.

Les matériaux utilisés pour la filtration sont :

- **Les textiles** : gaz, laine, coton ;
- **Les fibres** : laine de verre, amiante ;
- **Les terres d'infusoires, argiles et porcelaines** ;
- **Le matériel fritté** : le verre fritté est obtenu par compression à température contrôlée de microbilles de verre ; selon le diamètre de ces grains et la température de frittage on obtient des porosités différentes, les porosités sont codées de 0 (large pores) à 4 (pores étroits).



Porosité	Diamètre des pores en micromètre
1	20
2	5
3	0.1

Les filtres en verre fritté ont des formes variables.

La filtration industrielle utilise des filtres en métaux frittés (Ex. bronze). Ces différents filtres peuvent présenter certains inconvénients à l'utilisation :

- **Le colmatage** : pénétration de particules dans les interstices du matériau filtrant ;
- **L'adsorption** : rétention de certains produits sur le filtre.

b. Les filtres membranes

Les membranes filtrantes sont constituées de cellulose, d'acétate de cellulose, de nitrate de cellulose ou de téflon. Le diamètre des pores est faible, et varie de 5 à 35nm pour l'ultrafiltration et de 0.1 à 8µm pour la microfiltration.

Les membranes de microfiltration permettent une filtration rapide, malgré le faible diamètre des pores (de l'ordre du µm), cela est dû à leur faible épaisseur et à la forte densité des pores de l'ordre de 10^{10} pores/cm². Ces membranes ne sont finalement constituées que par 15 à 35% de leur volume par de la matière, le reste étant occupé par des pores.

Les autres qualités des filtres membranes sont leur inertie chimique (pour les solvants organiques, on utilise le téflon) et leur caractère hydrophobe, ce qui permet de les sécher rapidement à poids constant.

I.1.3.2. Pores du filtre

Le diamètre des pores du filtre est le premier critère à considérer : 1,0µm, il peut descendre à moins de 0,1µm.

Pour beaucoup de séparations, on choisit en chimie un diamètre de $0,45\mu\text{m}$: **bon compromis entre efficacité et rapidité.**

Pour avoir des substances très finement divisées ou que l'on veut réduire l'activité biologique : **opter pour un diamètre de $0,2\mu\text{m}$.**

I.1.3.3. Matériau du filtre

Une fois la taille de pores déterminée, il faut choisir le matériau du filtre, son support et sa taille.

- ✓ **Solutions aqueuses** : utilisation de membranes en acétate de cellulose ou une membrane fibre de verre-polypropylène.
- ✓ **Solutions non aqueuses ou agressives** : membrane et son support peuvent être en divers autres matériaux, tels que le téflon ou la polysulfone.

I.1.4. Méthodes de filtration au laboratoire

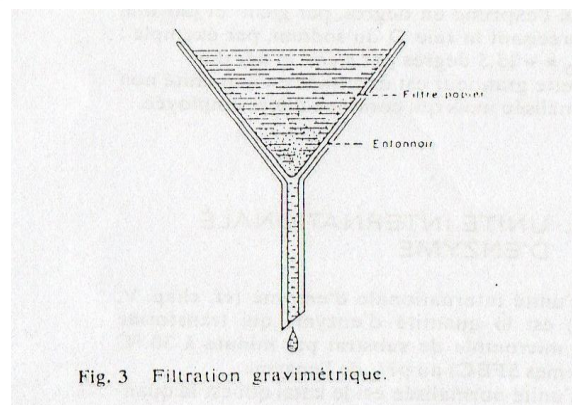
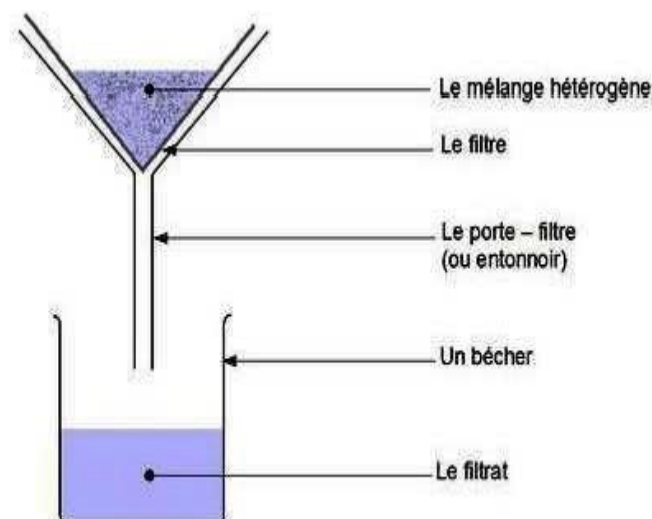
I.1.4.1. Filtration gravimétrique

Le liquide s'écoule sous l'action de **son propre poids** à travers le **filtre**.

Un filtre en papier (ou papier filtre), **lisse** ou **plissé**, est placé sur un entonnoir.

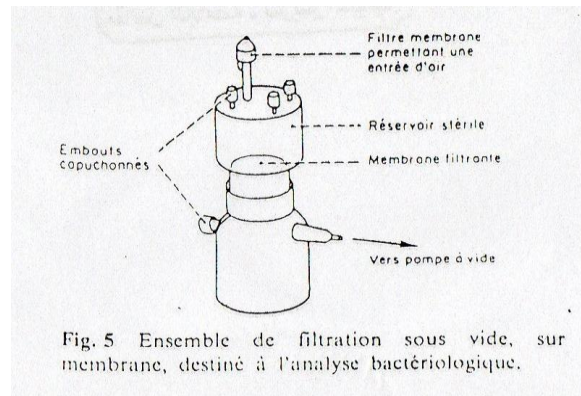
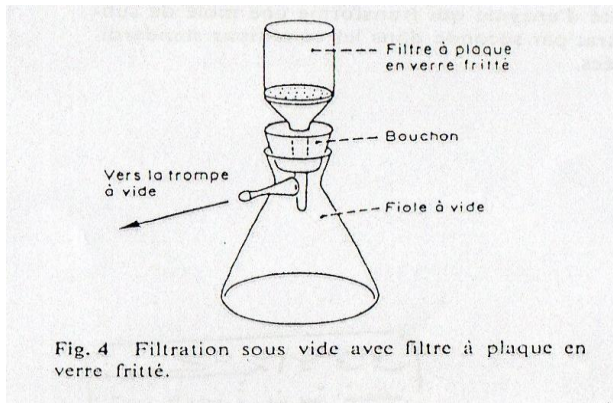
L'entonnoir de laboratoire équipé d'un filtre papier est l'exemple type de cette méthode.

La différence de pression est créée par la hauteur du liquide sur le filtre. Les filtres papier sont appliqués avec soin contre l'entonnoir ; quand cela est possible on humidifie pour faciliter cette application. La filtration est plus rapide lorsque le filtrat emplit convenablement la tige du filtre, sans bulles d'air.



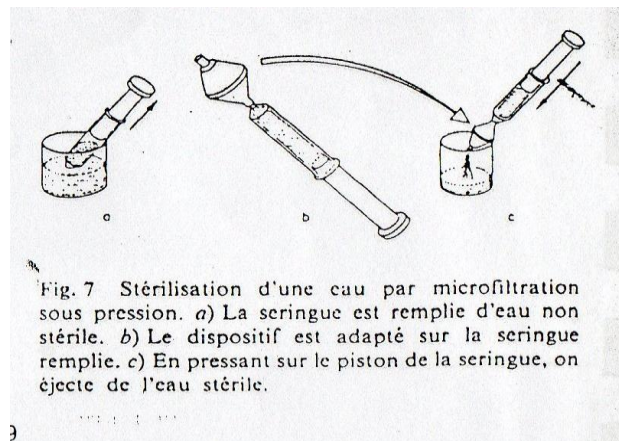
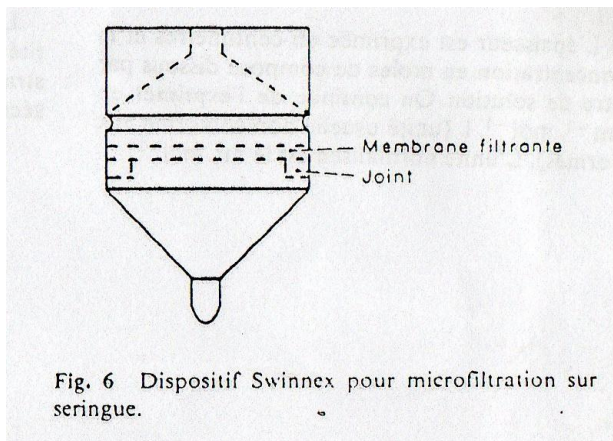
I.1.4.2. Filtration sous vide

Une dépression est créée en aval du matériau filtrant ; c'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes.



I.1.4.3. Filtration sous pression

La filtration sous pression évite le moussage et l'évaporation du solvant ; elle est d'un emploi fréquent dans l'industrie. Au laboratoire, la microfiltration stérilisante à l'aide du dispositif Swinnex Millipore est une filtration sous pression. Ce dispositif est constitué de deux pièces plastiques, que l'on visse l'une sur l'autre, enserrant un filtre membrane.



I.1.5. Applications de la filtration

La filtration est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie.

Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir :

- Soit un liquide clarifié, débarrassé des particules solides ;
- Soit un solide essoré de l'excès de liquide.

Les applications de l'ultrafiltration et de la microfiltration sont plus analytiques : outre la clarification en général et les filtrations stériles, on peut citer également :

- Les analyses microbiologiques et tests de stérilité.
- Les analyses gravimétriques.
- Les isollements des cellules d'un liquide céphalo-rachidien.
- Les analyses de poussières.
- Les isollements de virus.

I.2. SEDIMENTATION : 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.

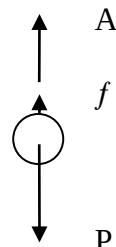
Remarque:

- ✓ 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 **η** . 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 :

$$v_1 = (P - A) / 6\pi\eta r \quad [4/3 \pi r^3 (\rho - \rho_1)] / 6\pi\eta r$$

La décantation a lieu si P est supérieur à A (particules plus denses 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.

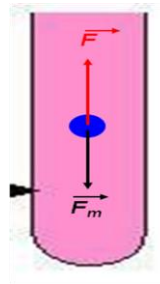
I.2.2. Décantation

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'Archimède, 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'Archimède 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 $\Rightarrow F_m = V(d-d_0).g$
- Force de friction F de la part du liquide due à sa viscosité $\Rightarrow F = f.v$

$g \Rightarrow$ intensité de la pesanteur

$f \Rightarrow$ coefficient de friction

$v \Rightarrow$ vitesse de chute

$V \Rightarrow$ volume de la particule

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

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

Coefficient de friction $\Rightarrow f = 6\pi.\eta.r$ (Loi de Stokes)

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

η : Coefficient de viscosité ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$ 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 $\Rightarrow$ vitesse varie comme le carré du rayon r

Exemple:

Soit $d-d_0 = 1 \text{ (g.cm}^{-3}\text{)}$, $\eta = 10^{-2}$ poise:

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

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

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

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

- ✓ La loi de sédimentation par gravité ne tient pas compte 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 accélération $\Rightarrow$ 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.

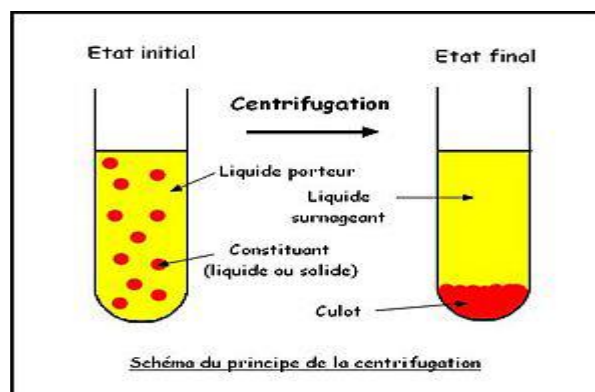
I.2.3. Sédimentation par centrifugation

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) supérieurs 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.

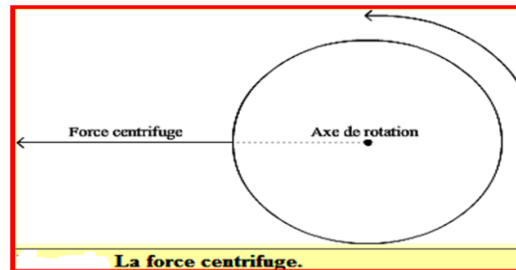
I.2.3.2. Principe

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.



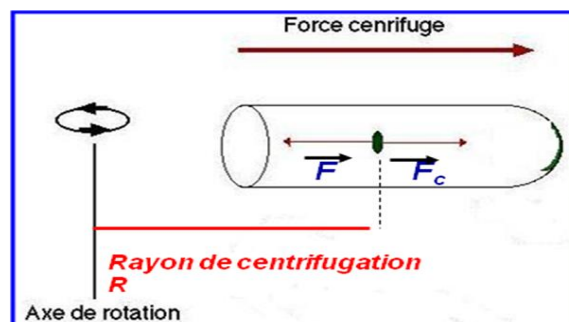
- Pour un constituant donné, en choisissant correctement la vitesse de rotation, l'accélération obtenue peut devenir prépondérante par rapport à l'agitation moléculaire.

I.2.3.3. Aspect quantitatif

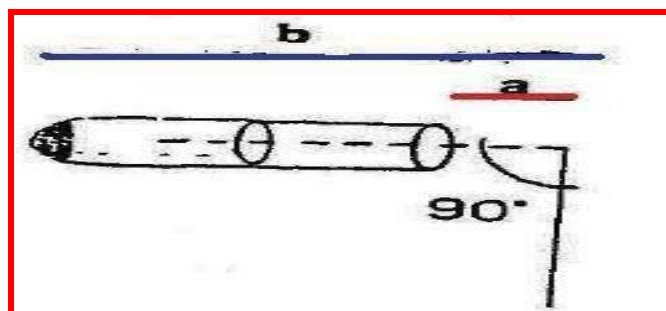
- Soit une particule de masse « m » qui tourne autour d'un axe $\Rightarrow$ Décrit une circonférence de rayon « R » $\Rightarrow$ Elle subit une force centrifuge F_c

$$F_c = m \cdot \gamma_r$$

γ_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 ⇒ vitesse linéaire de rotation

R ⇒ Rayon de centrifugation ou de rotation

N ⇒ nombre de tour par minute

ω ⇒ vitesse angulaire

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

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

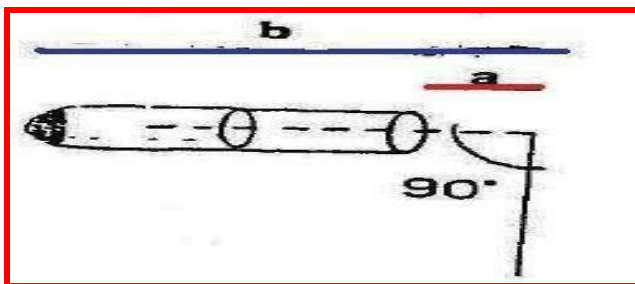
I.2.3.4. Calcul de la force gravitationnelle relative (FGR):

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

- Le calcul de la FGR est primordial ⇒ 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 ⇒ 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 ⇒ 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 (γ_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 $\gamma r \geq 100\ 000g$*
- *L'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 **différentielle** car basée sur la **différence de vitesse de sédimentation** des organites, elle-même reposant sur la différence de densité des organites ; et **ultra** pour désigner l'exploitation de **faibles différences** (comme pour ultra-structure) et l'utilisation **d'accélération importantes**.

❖ L'ultracentrifugation sur gradient de densité :

Certains organites et macromolécules 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 césium** 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 1ère 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 (Ultracentrifugation préparative)

I.2.4.1. La centrifugation différentielle

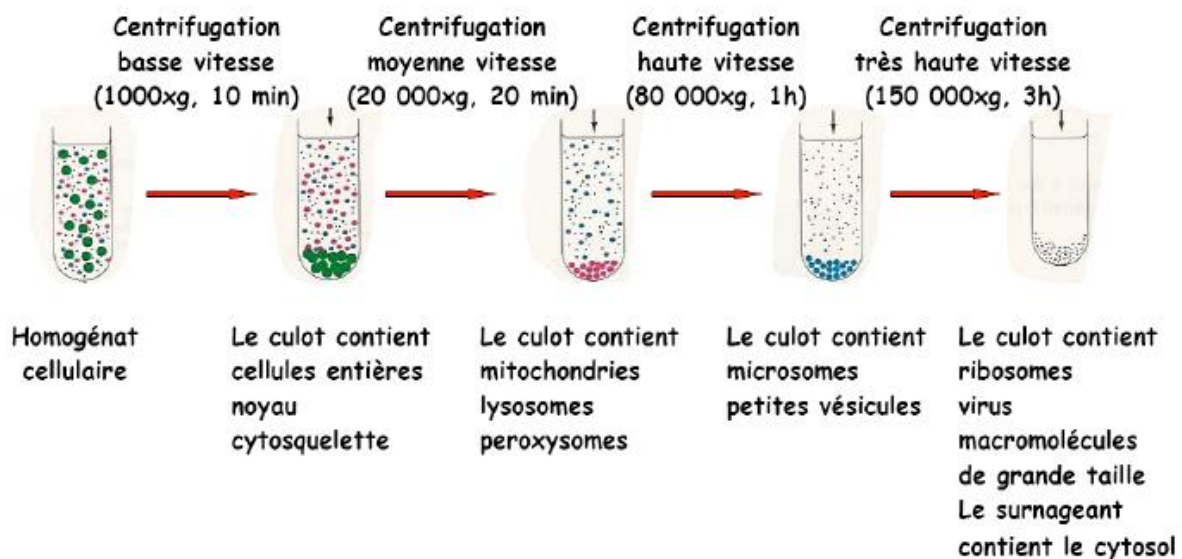
- Elle sépare les éléments selon leur taille.
- Les éléments les plus gros se retrouvent au fond du culot et les plus légers dans le surnageant.
- Réalisée lorsque les particules à séparer possèdent des densités et des tailles assez différentes.
- Sépare les particules par une succession de centrifugation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

Principe

- ❖ Dans une 1^{ère} centrifugation à faible accélération $\Rightarrow$ les éléments les plus massifs vont sédimenter 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 ayant 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

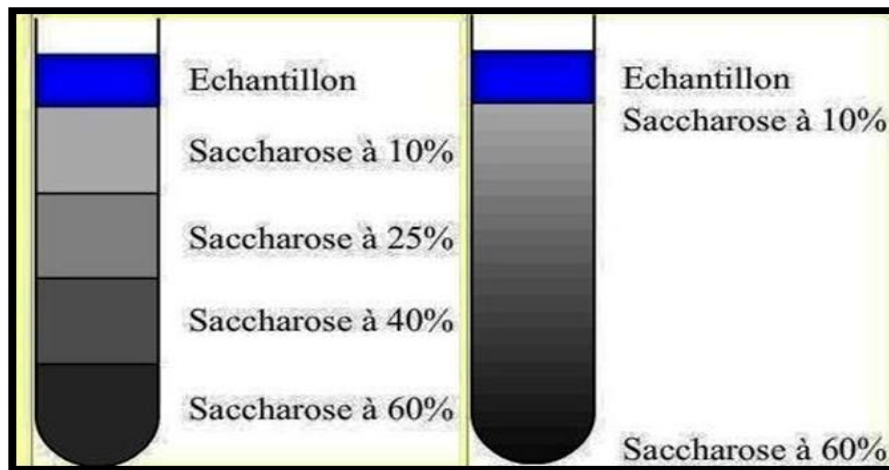
- ❖ La vitesse de sédimentation d'une particule (organite, macromolécule, ...) $\Rightarrow$ est fonction de la différence entre sa densité et celle du milieu ambiant ($d-d_0$).
- ❖ Améliorer la séparation de particules $\Rightarrow$ effectuées la centrifugation dans un gradient de densité.

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 ≤ 1.3 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 ≥ 1.3 g/ml.

❖ **Le bromure de potassium** $\Rightarrow$ isolement des fractions lipoprotéiniques.

C. Effet du gradient

❖ **1^{er} cas** : aucune différence de densité $\Rightarrow$ pas de sédimentation quelle que soit l'accélération.

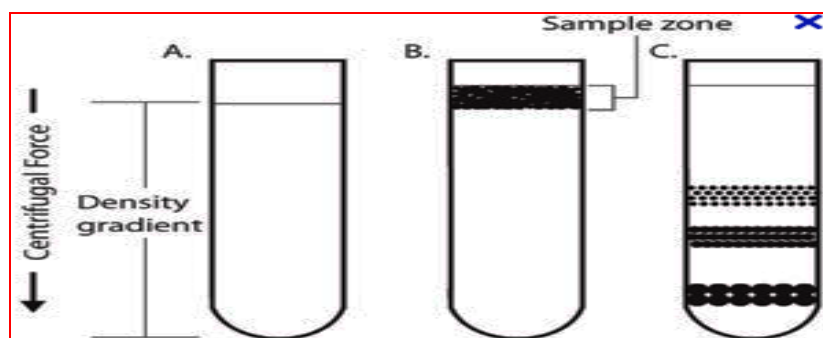
❖ **2^{ème} cas** : la densité de la particule est plus grande que celle du milieu ambiant $\Rightarrow$ il y a sédimentation d'autant plus rapide que la différence de densité est grande.

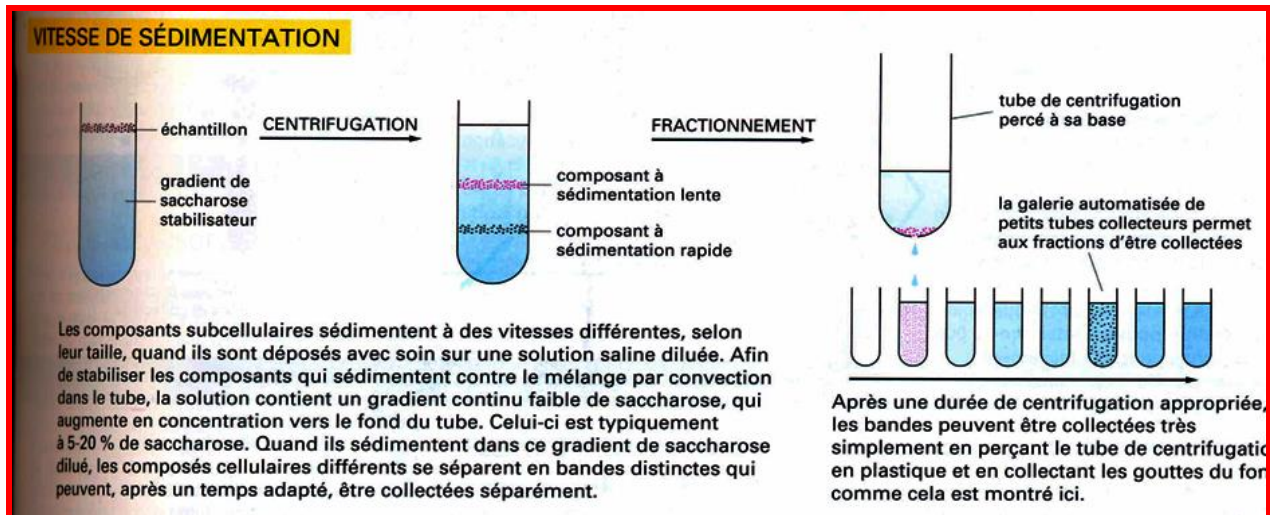
❖ **3^{ème} cas** : la particule s'élève jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité du milieu ambiant identique à la sienne (elle peut éventuellement flotter).

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:

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

$R \Rightarrow$ 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

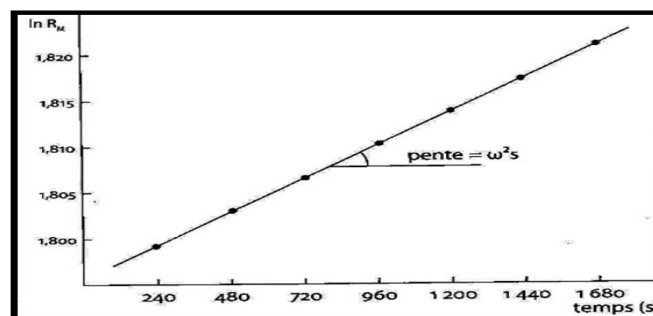
$v \Rightarrow$ volume partiel spécifique de la macromolécule $\Rightarrow$ l'inverse de sa densité.

$S \Rightarrow$ coefficient de sédimentation déterminé par 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 .

➤ L'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).

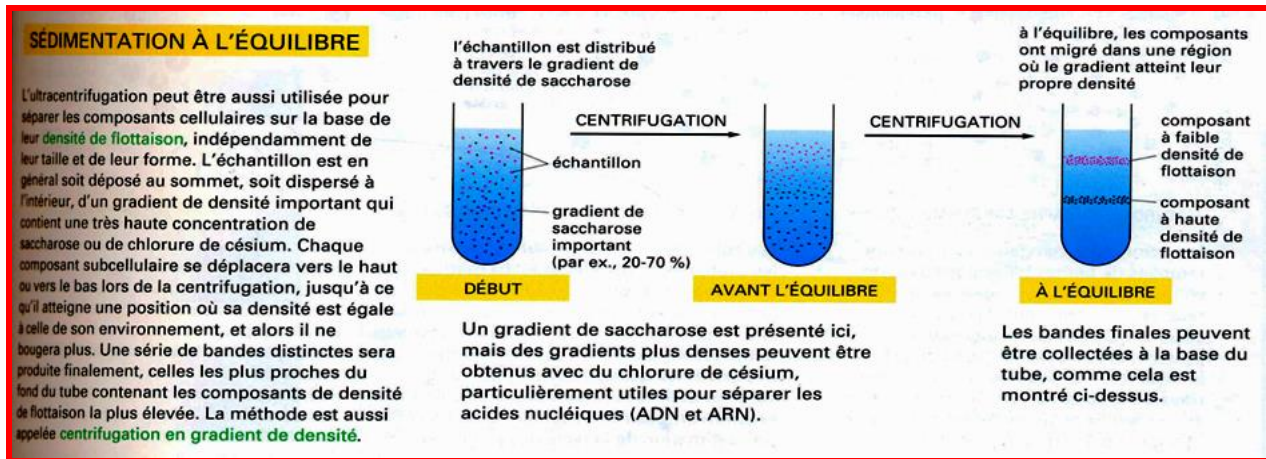
Utilisation d'un gradient de densité continu recouvrant les densités des différentes particules.

Principe

➤ L'échantillon est mélangé au gradient qui n'est pas préformé $\Rightarrow$ Le gradient s'établira au cours de la centrifugation (gradient autoformé).

➤ Les particules d'échantillon migrent dans le gradient $\Rightarrow$ Chaque particule s'immobilisera lorsqu'elle atteint la zone de gradient de même densité qu'elle-même $\Rightarrow d-d_0 = 0 \Rightarrow$ vitesse = 0 $\Rightarrow$ position isopycnique $\Rightarrow$ centrifugation à l'équilibre.

➤ Le temps de centrifugation n'a pas d'importance $\Rightarrow$ Il faut laisser le temps aux particules d'atteindre leur position d'équilibre $\Rightarrow$ vitesse de centrifugation faible $\Rightarrow$ temps de centrifugation long (un jour ou plus).



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

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

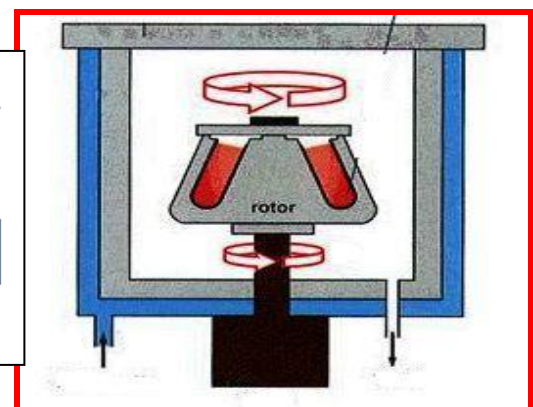
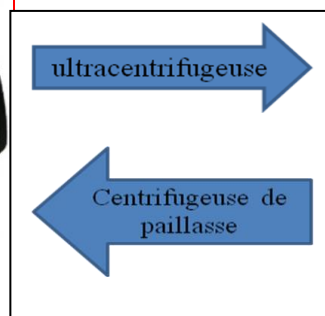
C_2 et C_1 concentrations de la particule estimées aux distances X_1 et X_2 à l'axe de rotation. Il suffit de tracer la droite $\ln(C_2/C_1) = f(X_2^2 - X_1^2)$ dont la pente est égale à:

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

Les concentrations C_1 et C_2 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.
- L'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.



Réfrigération

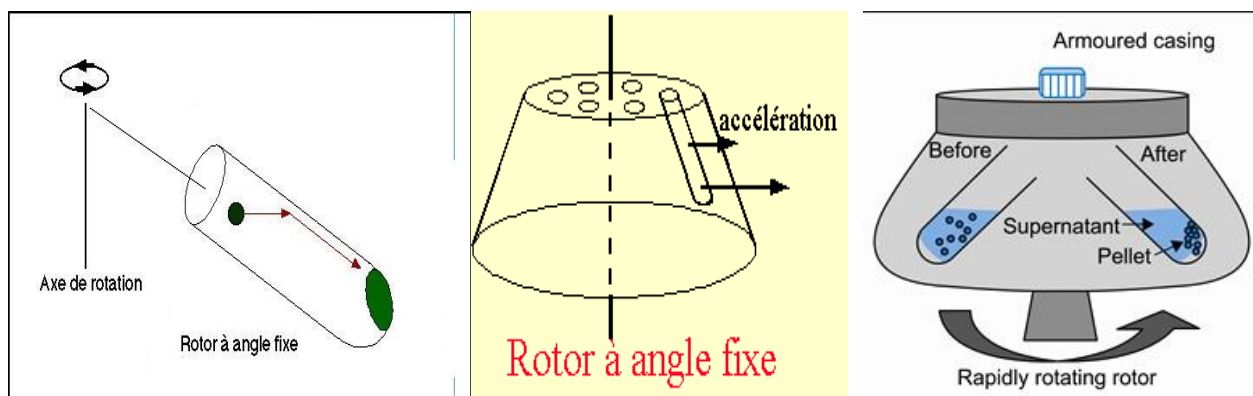
vide

I.2.5.1. Rotors

- Le rotor est le bloc qui supporte les tubes contenant les échantillons ; il 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 $\Rightarrow$ vitesse spécifiée sur le rotor $\Rightarrow$ 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.

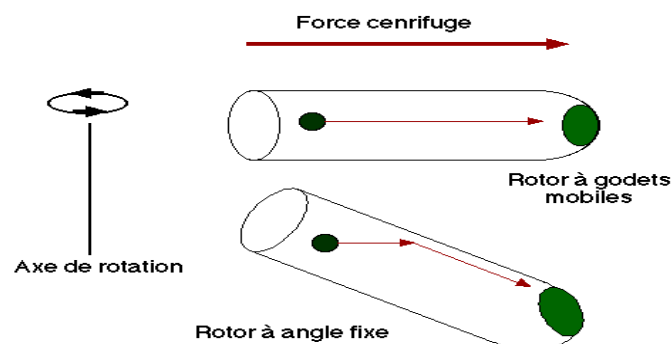
A. Les rotors à angle fixe (fixed angle)

- ✓ Les rotors à angle fixe sont utilisés 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 $\Rightarrow$ ces puits sont inclinés par rapport à l'horizontale (de 15 à 35°).
- ✓ Le rayon de ces rotors étant relativement court $\Rightarrow$ vitesse de rotation rapide.
- ✓ Les particules sédimentent le long des parois des tubes $\Rightarrow$ s'accumulent sur les côtés du fond des tubes.
- ✓ Ce rotor ne peut pas être utilisé pour la centrifugation en gradient de densité.
- ✓ Ce type de rotor est parfaitement adapté à une centrifugation différentielle.



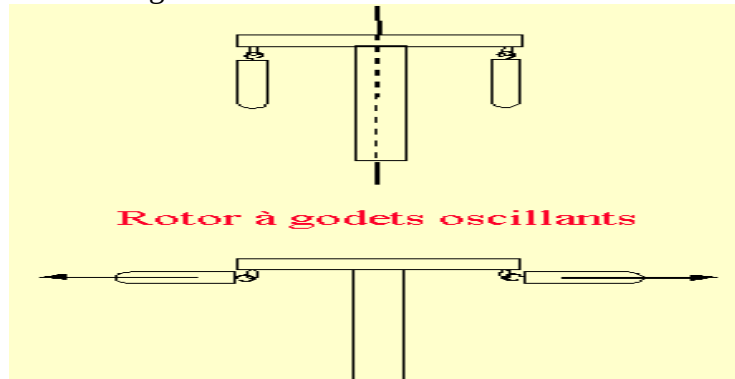
B. Rotors à godets mobiles (swinging buckets)

- ✓ Les 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 $\Rightarrow$ vitesse de centrifugation élevée



I.2.5.2. Equilibrage du rotor

- Quel que soit le rotor utilisé, un point crucial concerne l'équilibrage.
- Un rotor doit être parfaitement équilibré $\Rightarrow$ 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 $\Rightarrow$ il faut équilibrer les tubes deux à deux $\Rightarrow$ 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 $\Rightarrow$ 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* $\Rightarrow$ la centrifugation différentielle est couramment employée pour séparer des constituants cellulaires.
- ❖ *Séparation de particules selon leur taille ou leur densité* $\Rightarrow$ 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.*

I.3. DIALYSE

La dialyse est une méthode de séparation qui permet d'éliminer, d'une solution macromoléculaire, des ions ou de petites molécules, par le passage de ceux-ci à travers une membrane jouant le rôle de tamis.

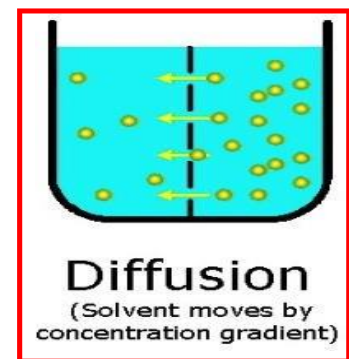
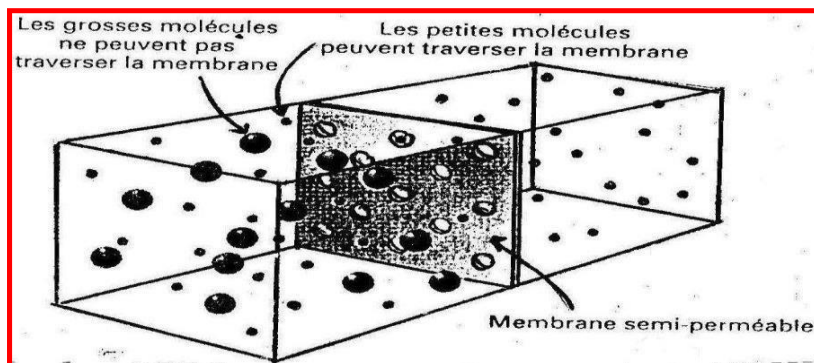
Le transfert des ions est nettement amélioré lorsqu'on applique un champ électrique : c'est l'électrodialyse. En analyse automatique, en flux continu la dialyse remplace toutes les opérations de purification (déprotéinisation, centrifugation, etc.). La dialyse n'est pas seulement une méthode de purification : elle a été utilisée comme méthode de concentration des protéines. Cette technique permet également d'équilibrer l'échantillon à analyser avec le tampon, avant d'effectuer une électrophorèse.

I.3.1. Définition

La dialyse est la *diffusion* ou *l'échange* de substances dissoutes (solutés) entre deux liquides de compositions différentes à travers une membrane sélective (semi-perméable) appelée membrane de dialyse. C'est un processus efficace permettant de séparer les molécules selon leur taille, mais lent car il est basé sur les lois de la diffusion.

I.3.2. Principe

Séparation des substances selon leurs capacités à franchir une membrane de dialyse (porosité définie). Principe basé sur la différence de vitesse de diffusion entre molécules de tailles différentes à travers une membrane de dialyse. Les molécules de tailles ou dimensions supérieures aux diamètres des pores de la membrane restent d'un côté de la membrane. Les molécules les plus petites, diffusent facilement à travers la membrane.



Les molécules diffusibles traversent la membrane selon leur gradient de concentration $\Rightarrow$ déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré.

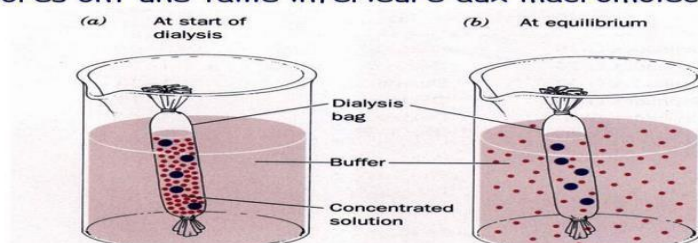
À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre.

La dialyse permet de séparer les cristalloïdes des colloïdes $\Rightarrow$ Les colloïdes ne traversent pas les membranes de dialyse.

La dialyse permet de séparer les cristalloïdes des colloïdes $\Rightarrow$ Les colloïdes ne traversent pas les membranes de dialyse.

c. La dialyse est une forme de filtration moléculaire

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semiperméables dont les pores ont une taille inférieure aux macromolécules



I.3.3. Membranes de dialyse

Les membranes à dialyse utilisées en laboratoire se présentent sous forme de cylindre allongé qu'il faut fermer aux deux extrémités ; lorsqu'il est rempli de liquide qu'on veut dialyser, ce cylindre prend le nom de boudin de dialyse. Ces membranes sont caractérisées par une limite d'exclusion «cut-off » ou seuil de coupure $\Rightarrow$ qui donne une idée de la taille des molécules qui ne pourront pas la traverser (de masse supérieure à la limite) et de celles qui pourront diffuser (de masse inférieure à la limite).

- ❖ Le cut-off $\Rightarrow$ représente la taille maximale des molécules qui peuvent passer la membrane semi-perméable. Le cut-off s'exprime en masse moléculaire.
- ❖ Autrefois, on utilisait $\Rightarrow$ le parchemin, la vessie de porc et la baudruche.
- ❖ Les membranes en collodion de préparation extemporanée ne sont plus utilisées.
- ❖ Actuellement, on emploie les membranes de cellulose modifiée transparentes ou opaques, rigides ou souples. Les membranes en esters de cellulose sont adaptées aux protéines $\&$ elles ont peu d'affinité pour les protéines.

I.3.4. Facteurs influençant la dialyse (vitesse de diffusion d'une substance)

- ❖ **Une membrane de dialyse** ne doit pas être chargée électriquement $\Rightarrow$ diminution des phénomènes parasites $\Rightarrow$ répulsion par charge identique ou adsorption sur la membrane du produit à dialyser $\Rightarrow$ utilisation de celluloses modifiées.
- ❖ **Épaisseur de la membrane** $\Rightarrow$ plus elle est faible, plus la vitesse de dialyse sera grande.
- ❖ **Rapport surface de la membrane/volume de la solution à dialyser** $\Rightarrow$ la vitesse augmente avec la surface de la membrane.
- ❖ **Température** $\Rightarrow$ la vitesse de diffusion d'une substance s'élève avec l'augmentation de la T° ; elle amplifie l'agitation des molécules $\Rightarrow$ augmentant la probabilité pour une molécule donnée de traverser la membrane.
- ❖ La dialyse dépend également du pH du liquide à dialyser et de celui de contre-dialyse.

I.3.5. Méthodologie

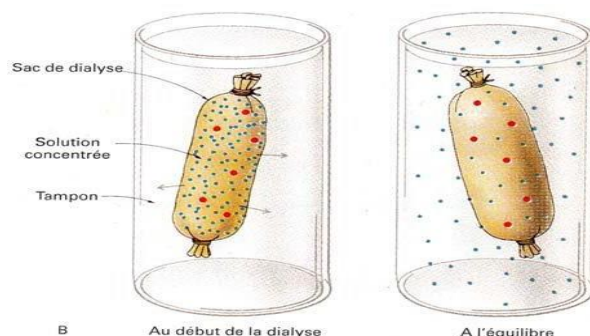
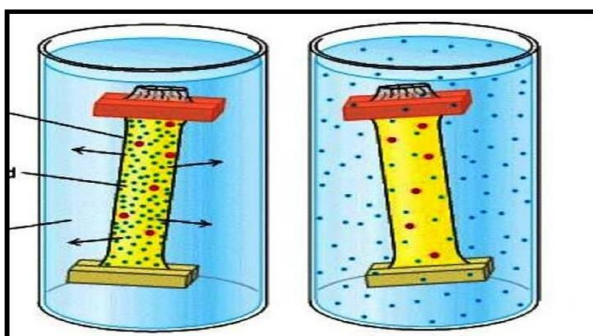
Il existe 3 types de montage pour faire des dialyses

- ✓ *Dialyse en milieu clos*
- ✓ *Dialyse en continu*
- ✓ *Électrodialyse*

I.3.5.1. Dialyse en milieu clos

Les membranes de dialyse se présentent sous forme de cylindre allongé qu'il faut fermer aux deux extrémités par un nœud.

Ce cylindre contient le liquide à dialyser $\square$ le cylindre prend le nom de boudin de dialyse. Le boudin est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse.



NB :

Pour l'élimination complète des molécules diffusibles :

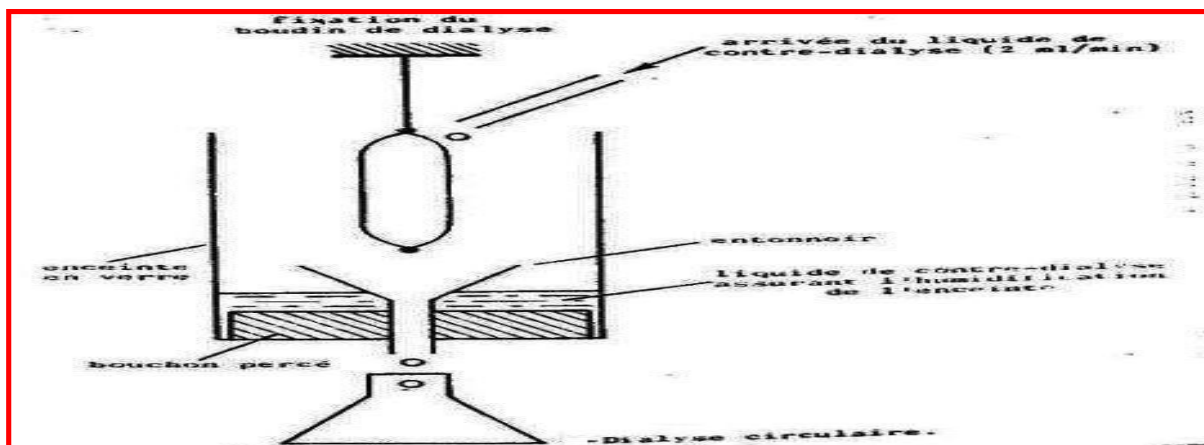
- ✓ assurer une agitation convenable du liquide de contre-dialyse $\Rightarrow$ évite la formation de gradients de concentration des substances diffusibles dans le récipient contenant le liquide de contre-dialyse.
- ✓ renouvellement du liquide de contre dialyse $\Rightarrow$ accélération de la dialyse $\Rightarrow$ disparition des substances diffusibles (dialyse extensive).
- ❖ Dilution du liquide à dialyser :
 - Le contenu du sac à dialyse est souvent plus concentré que le liquide de contre-dialyse.
 - L'eau, par osmose, entrera dans le sac de dialyse $\Rightarrow$ courant endosmotique.
 - Augmentation du volume de liquide dans le sac $\Rightarrow$ dilution de l'échantillon.

I.3.5.2. Dialyse en continu

a) Dialyse circulaire

Permet une élimination plus importante des molécules diffusibles que la dialyse en milieu clos. Le boudin est exposé à un courant continu du solvant désiré. Le courant continu du liquide de contre-dialyse :

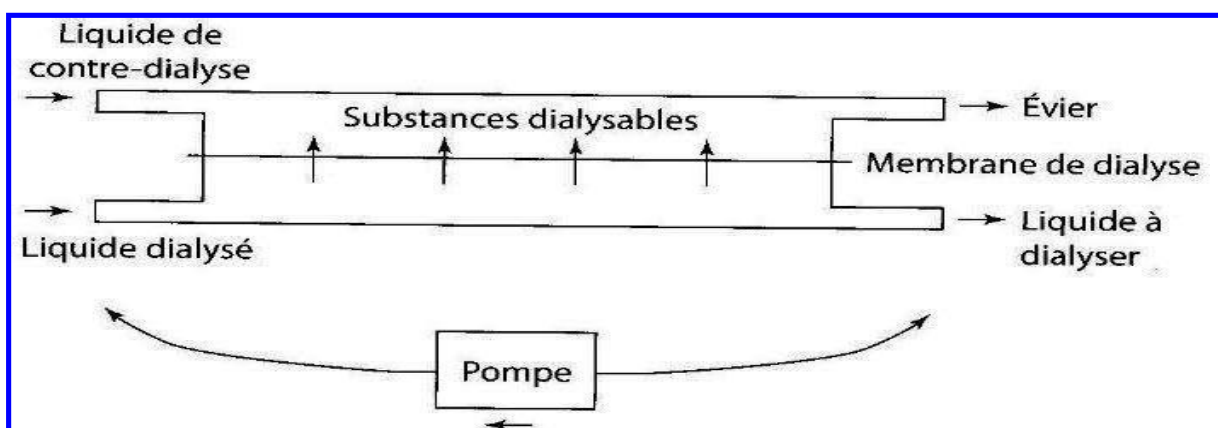
- $\Rightarrow$ les petites molécules n'atteignent jamais une concentration d'équilibre.
- $\Rightarrow$ continuent de diffuser en dehors du sac à dialyse.



b) Dialyse sur grands volumes

La dialyse s'effectue sur une grande surface. Le liquide à dialyser passe au contact du liquide de contre-dialyse dont il n'est séparé que par une membrane.

Le liquide de contre-dialyse est renouvelé en permanence. Le liquide de dialyse repasse sans cesse dans le système grâce à une pompe.



I.3.5.3. Électrodialyse

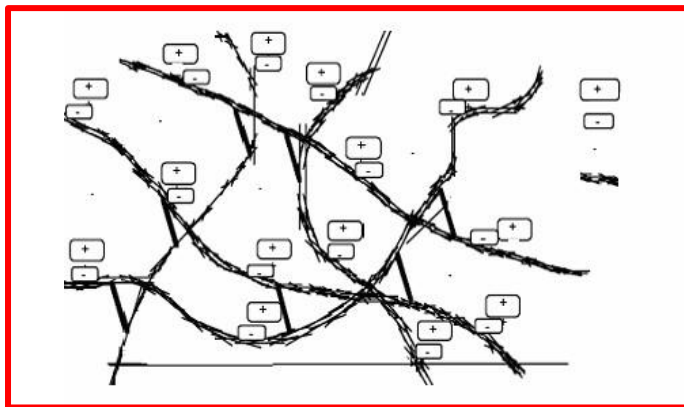
A. Définition

L'électrodialyse est un procédé de nature électrochimique. Il permet d'extraire en partie ou en totalité les ions contenus dans une solution, en conservant des substances pas ou très peu ionisées.

L'électrodialyse est une dialyse réalisée sous l'influence d'un champ électrique $\Rightarrow$ accélération de la diffusion.

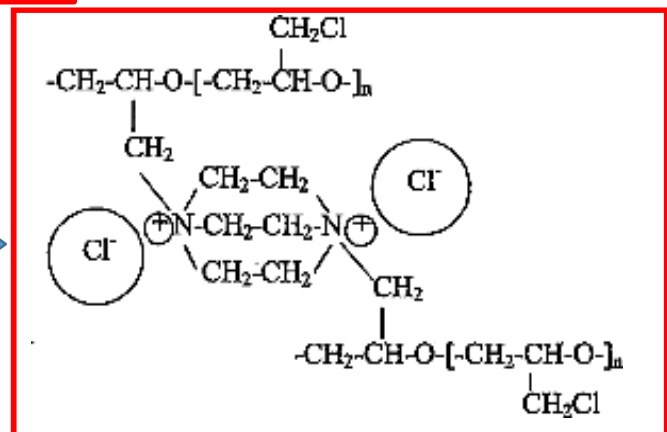
L'extraction des ions se fait par migration des ions à travers des membranes sélectives (anioniques ou cationiques).

- Les membranes cationiques (MC) $\Rightarrow$ constituées de polystyrène sulfonaté ;
- Les membranes anioniques (MA) $\Rightarrow$ constitués de polystyrène avec des ammoniums quaternaires.



Membrane cationique

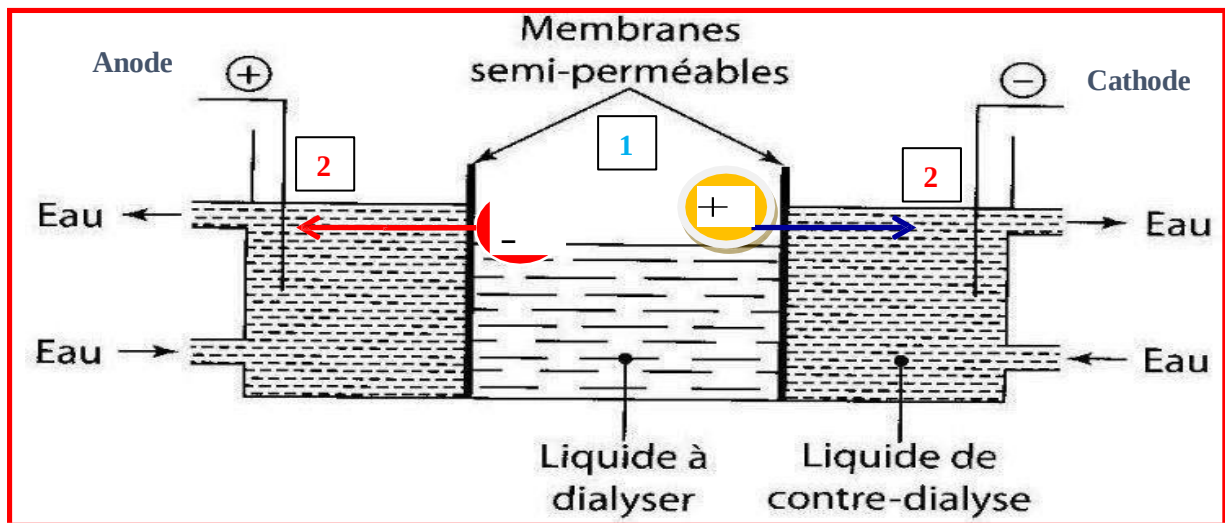
Membrane anionique



B. Principe

Un électrodialyseur fonctionne de la manière suivante :

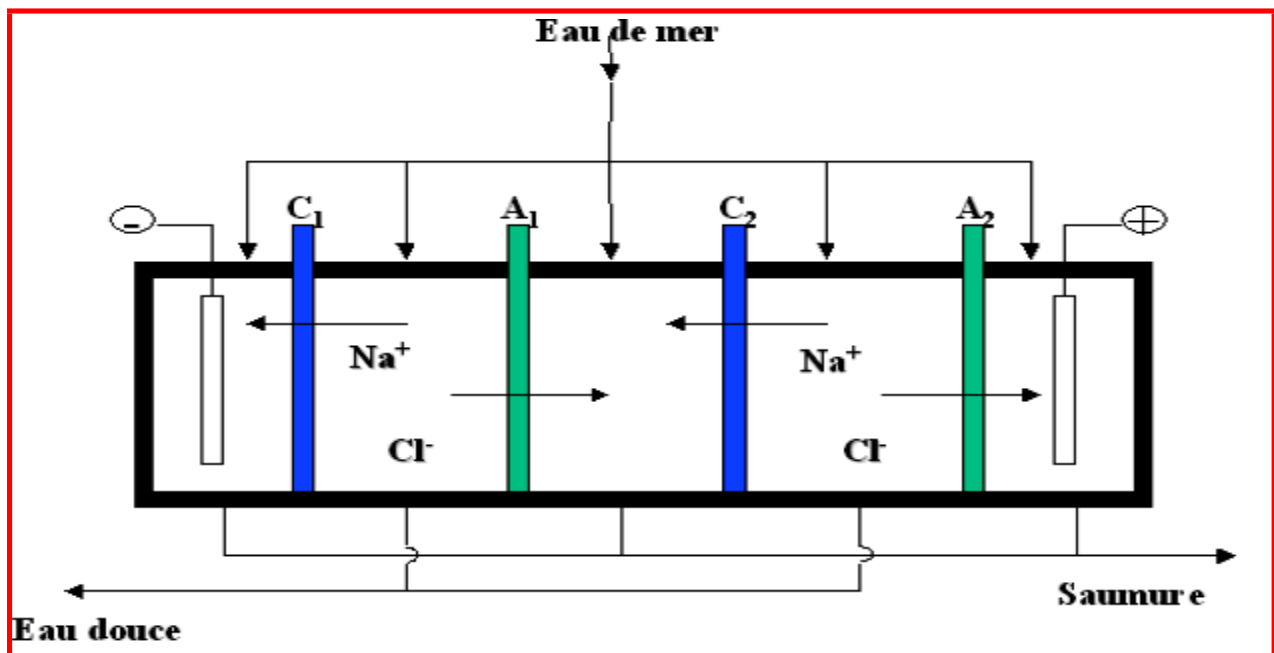
- 2 compartiments (1) et (2) séparés par des membranes alternativement anioniques et cationiques.
- Seuls les anions peuvent traverser une membrane anionique et seuls les cations peuvent traverser une membrane cationique :
- Les cations migrent dans le sens du courant électrique $\Rightarrow$ Ils sortent du compartiment (1) en traversant la membrane cationique ;
- Les anions migrent dans le sens inverse du courant électrique $\Rightarrow$ ils sortent du compartiment (1) en traversant la membrane anionique.



- ✓ En conséquence, le compartiment (1) s'appauvrit en sel dissous.
- ✓ Les particules qui ne portent pas de charge électrique ne sont pas éliminées.
- ✓ Les ions minéraux sont ainsi éliminés sans perte de produits organiques.
- ✓ L'élévation thermique produite par le courant ne permet pas cette utilisation avec des produits thermolabiles.

NB

L'électrodialyse est utilisée pour le dessalement d'eau de mer. En fin de chaîne de traitement on récupère à la fois de l'eau douce et du saumure.



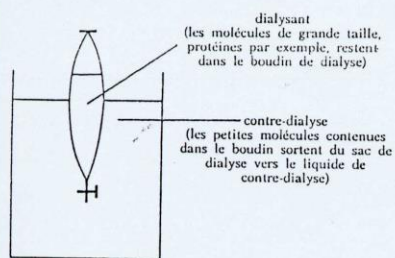


Fig. 1-64. Schéma général d'une dialyse.

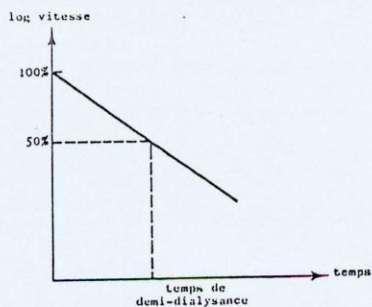


Fig. 1-66. Mesure du temps de demi-dialysance.

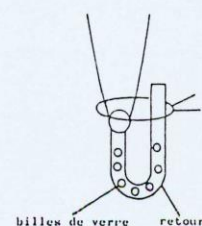


Fig. 1-67. Fermeture des bouchons de dialyse.

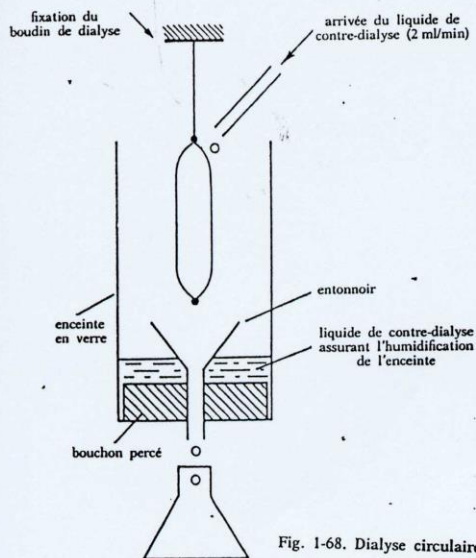


Fig. 1-68. Dialyse circulaire.

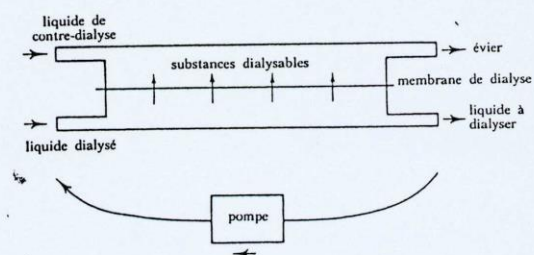


Fig. 1-69. Dialyse en flux continu.

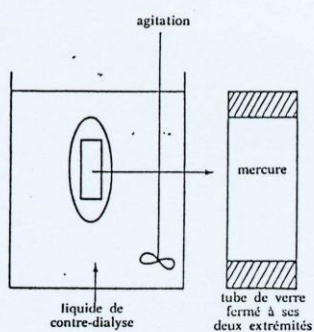


Fig. 1-70. Dialyse sur petits volumes.

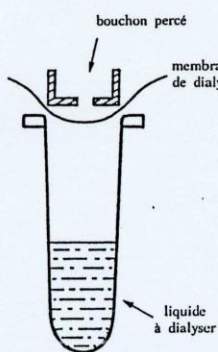


Fig. 1-71. Dialyse de petits volumes.

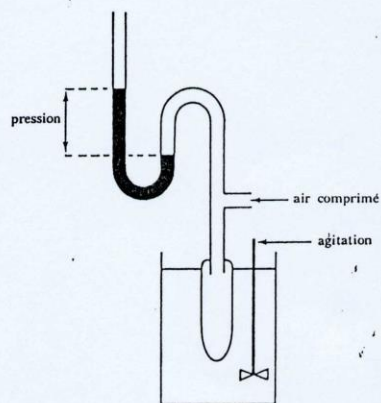


Fig. 1-72. Dialyse à volume constant.

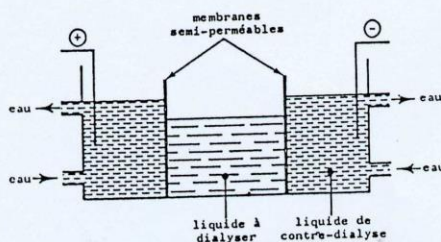


Fig. 1-73. Electro-dialyse.