

**Cours : TECHNIQUES SEPARATIVES EN BIOCHIMIE**

Chapitre 3 : La Centrifugation : Principe, Méthodologie et Applications

Nombre d'heures : 6h (4h théorique, 2h TD) Enseignant : [A. Allouche]

**Sommaire**

|  |    |
|--|----|
| Introduction .....   | 1  |
| Partie 1 : Principes Physiques de la Sédimentation en Centrifugation .....               | 2  |
| 1.1. La force centrifuge et la force de sédimentation .....                              | 2  |
| 1.2. Le facteur k : paramètre de l'efficacité de sédimentation .....                     | 3  |
| 1.3. Vitesse de sédimentation et coefficient de sédimentation (s) .....                  | 4  |
| Partie 2 : Matériel et Méthodologie Expérimentale .....                                  | 5  |
| 2.1. Les types de centrifugeuses .....   | 5  |
| 2.2. Les rotors : cœur de la séparation .....  | 6  |
| 2.2.1. Rotor à angle fixe .....  | 6  |
| 2.2.2. Rotor balancé (swinging bucket) .....   | 7  |
| 2.2.3. Autres types de rotors .....  | 7  |
| 2.3. Les tubes et échantillons .....   | 8  |
| Partie 3 : Stratégies de Séparation : Centrifugation Differentielle et Isopycnique ..... | 9  |
| 3.1. Centrifugation différentielle .....   | 9  |
| 3.2. Centrifugation isopycnique (ou à l'équilibre de densité) .....                      | 10 |
| Partie 4 : Applications en Biochimie Alimentaire et Physiologie Végétale .....           | 11 |
| 4.1. Applications en biochimie alimentaire .....   | 11 |
| 4.1.1. Séparation des phases dans les émulsions (lait) .....                             | 11 |
| 4.1.2. Purification de protéines et d'enzymes d'intérêt .....                            | 11 |
| 4.2. Applications en physiologie végétale .....  | 12 |
| 4.2.1. Fractionnement subcellulaire (chloroplastes, mitochondries) .....                 | 12 |
| 4.2.2. Étude des complexes enzymatiques .....  | 12 |
| Conclusion et Perspectives .....   | 13 |
| Annexes (Schémas) .....  | 14 |
| Références Bibliographiques .....  | 16 |

## Synthèse du Document

### Introduction

La centrifugation est une technique de séparation fondamentale en biochimie et biologie cellulaire. Elle permet d'isoler, de purifier et d'analyser des composants cellulaires (organites, membranes, macromolécules) ou des constituants alimentaires en exploitant les différences de leurs propriétés physiques (masse, taille, densité, forme) grâce à l'application d'un champ centrifuge. Ce cours a pour objectif de détailler les principes physiques qui régissent la sédimentation, le matériel utilisé, les stratégies expérimentales et leurs applications concrètes dans les domaines de la biochimie alimentaire et de la physiologie végétale.

## Partie 1 : Principes Physiques de la Sédimentation en Centrifugation

### 1.1. La force centrifuge et la force de sédimentation

Lorsqu'une particule est soumise à une rotation rapide, elle subit une force centrifuge ( $F_c$ ) qui la pousse radialement vers l'extérieur. Cette force s'oppose à la force de frottement visqueux ( $F_f$ ) du milieu et à la poussée d'Archimède. La force nette responsable de la sédimentation est donnée par la formule :

$$F_{\text{séd}} = m * \omega^2 * r * (1 - \bar{v}\rho)$$

Où :

- $m$  = masse effective de la particule
- $\omega$  = vitesse angulaire (en radians/seconde)
- $r$  = rayon de rotation (distance entre la particule et l'axe de rotation)
- $\bar{v}$  = volume spécifique partiel de la particule
- $\rho$  = densité du milieu

Cette équation montre que la séparation dépend de la masse et de la densité de la particule, mais aussi des paramètres instrumentaux ( $\omega$  et  $r$ ).

Schéma 1 (Annexe p.14) : Représentation des forces en jeu dans un tube en rotation.

· Illustration d'un tube dans un rotor montrant la force centrifuge ( $F_c$ ) dirigée vers l'extérieur, la force de frottement ( $F_f$ ) opposée au mouvement, et la trajectoire de sédimentation d'une particule.

### 1.2. Le facteur k : paramètre de l'efficacité de sédimentation

La vitesse relative de centrifugation (RCF) ou "nombre de g" est une grandeur plus parlante que la vitesse de rotation (tr/min) car elle standardise la force appliquée indépendamment du type de centrifugeuse.

$$RCF = (\omega^2 * r) / g \text{ (où } g = \text{accélération de la gravité, } 9.81 \text{ m/s}^2\text{)}$$

$$\text{On utilise souvent la formule approchée : } RCF = 1.118 * 10^{-5} * r * (\text{tr/min})^2$$

Le facteur k est un indicateur de l'efficacité d'un rotor pour sédimenter une particule. Un k faible indique une haute efficacité (la particule sédimente rapidement).

$$k = (\ln(r_{\text{max}} - r_{\text{min}})) * (10^{13}) / (3600 * \omega^2) \approx (2.53 * 10^{11}) / (\text{tr/min})^2 * \ln(r_{\text{max}} / r_{\text{min}})$$

### 1.3. Vitesse de sédimentation et coefficient de sédimentation (s)

La vitesse de sédimentation ( $dx/dt$ ) d'une particule est proportionnelle au champ centrifuge appliqué. Le coefficient de proportionnalité est le coefficient de sédimentation de Svedberg (s).  $s = (dx/dt) / \omega^2 x$  (où x est la distance à l'axe de rotation)

L'unité de s est le seconde (s), mais on utilise le Svedberg ( $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$ ). Ce coefficient dépend directement de la masse et de la forme de la particule.

## Partie 2 : Matériel et Méthodologie Expérimentale

## 2.1. Les types de centrifugeuses

· Centrifugeuses de paillasse : Faible vitesse ( $\leq 10\,000$  tr/min), RCF max  $\sim 10\,000$  g. Pour précipitations grossières (cellules, gros précipités). · Centrifugeuses réfrigérées : Vitesses et forces moyennes (jusqu'à  $\sim 20\,000$ - $25\,000$  tr/min,  $\sim 60\,000$  g). Essentielles pour le fractionnement cellulaire à froid. · Ultracentrifugeuses : Vitesses très élevées (jusqu'à  $100\,000$  tr/min, RCF  $> 500\,000$  g). Equipées d'un système sous vide pour éviter l'échauffement par frottement. Pour séparer les ribosomes, virus, macromolécules.

## 2.2. Les rotors : cœur de la séparation

Schéma 2 (Annexe p.15) : Types de rotors et chemins de sédimentation.

· Illustration comparative des rotors à angle fixe et balancé, montrant la longueur et l'angle du trajet de sédimentation des particules. · Rotor à angle fixe : Les tubes sont maintenus à un angle fixe (e.g.,  $45^\circ$ ). Chemin de sédimentation court mais efficace. Les particules sédimentent contre la paroi du tube et glissent vers le fond. Risque de remise en suspension lors de l'arrêt. · Rotor balancé (swinging bucket) : Les tubes sont suspendus et pivotent pour se placer à l'horizontale lors de la rotation. Le chemin de sédimentation est long et droit, permettant une séparation très nette de gradients de densité. Idéal pour les centrifugations isopycniques. · Autres rotors : Rotors verticaux (pour les gradients très rapides), rotors à bol continu (pour de grands volumes).

## 2.3. Les tubes et échantillons

Le choix du tube est crucial : compatibilité chimique (verre, polypropylène, polycarbonate), résistance mécanique à la RCF, et propriétés optiques (transparence pour la lecture des gradients).

# Partie 3 : Stratégies de Séparation

## 3.1. Centrifugation différentielle

Principe : Séparation basée principalement sur la taille et la masse des particules. On applique une série de centrifugations à des vitesses et durées croissantes. Protocole type :

1. Homogénat cellulaire  $\rightarrow 1000$  g, 10 min  $\rightarrow$  Culot : noyaux, cellules intactes.
2. Surnageant  $\rightarrow 10\,000$  g, 20 min  $\rightarrow$  Culot : mitochondries, chloroplastes, lysosomes.
3. Surnageant  $\rightarrow 100\,000$  g, 60 min  $\rightarrow$  Culot : microsomes (fragments de RE), ribosomes.
4. Surnageant final : fraction cytoplasmique soluble. Schéma 3 (Annexe p.15) : Principe de la centrifugation différentielle.

· Représentation séquentielle d'un tube montrant l'empilement progressif des culots de tailles différentes après augmentation de la vitesse.

## 3.2. Centrifugation isopycnique

Principe : Séparation basée uniquement sur la densité des particules. L'échantillon est déposé au sommet d'un gradient de densité préformé (e.g., saccharose, Percoll®). Sous l'effet de la force centrifuge, chaque particule migre jusqu'à la position où sa densité est égale à celle du gradient (isodensité). Elle s'y arrête. Avantage : Séparation très fine de particules de tailles similaires mais de densités différentes (e.g., ADN vs ARN, différents types de lipoprotéines).

# Partie 4 : Applications

## 4.1. En Biochimie Alimentaire

· Standardisation du lait : Centrifugation à basse vitesse pour écrémage (séparation de la crème (graisses) du lait écrémé). · Purification de la caséine : Précipitation par centrifugation différentielle après ajustement du pH. · Purification d'enzymes (e.g., pectinases, protéases) à partir d'extraits bruts pour des études cinétiques ou des applications industrielles.

#### 4.2. En Physiologie Végétale

· Fractionnement subcellulaire : Isolation pure de chloroplastes (centrifugation différentielle sur gradient Percoll®) pour étudier la photosynthèse in vitro. · Isolation de mitochondries à partir de tissus de pomme de terre ou de germes de soja pour étudier la respiration cellulaire. · Séparation de polysaccharides ou de complexes protéiques impliqués dans la structure de la paroi cellulaire.

### Conclusion et Perspectives

La centrifugation est une technique incontournable, polyvalente et robuste. Sa maîtrise théorique (calcul de RCF, choix du rotor) et pratique (préparation des gradients, manipulation des culots) est essentielle pour tout biochimiste. Les développements futurs concernent l'automatisation, l'intégration avec d'autres techniques analytiques (e.g., couplage centrifugation-chromatographie) et l'utilisation de milieux de gradient plus sophistiqués.

### Annexes : Schémas

Page 14 Schéma 1 : Principes physiques de la sédimentation (Un schéma clair montrant un rotor vu de dessus avec un tube. Des flèches illustrent : - La force centrifuge ( $F_c$ ) large, dirigée vers l'extérieur. - La force de frottement ( $F_f$ ) plus petite, dirigée vers l'intérieur. - Le trajet d'une grosse particule (●) et d'une petite particule (○) sédimentant à différentes vitesses.) Légende : "Influence de la masse et de la force centrifuge sur la sédimentation."

Page 15 Schéma 2 : Types de rotors et chemins de sédimentation (Un diagramme comparatif avec deux colonnes :

· Colonne gauche "Rotor à angle fixe" : Dessin d'un rotor avec tubes inclinés. Flèches montrant un trajet de sédimentation court et incliné vers la paroi. · Colonne droite "Rotor balancé" : Dessin d'un rotor avec les tubes à l'horizontale. Flèches montrant un trajet de sédimentation long et vertical.) Légende : "Comparaison des chemins de sédimentation dans les rotors à angle fixe et balancé."

Schéma 3 : Centrifugation différentielle (Une série de 4 tubes illustrant les étapes :

· Tube 1 : "Homogénat" - Mélange hétérogène. · Tube 2 : "Low Speed" - Gros culot au fond, surnageant trouble. · Tube 3 : "Medium Speed" - Culot moyen supplémentaire, surnageant moins trouble. · Tube 4 : "High Speed" - Petit culot serré, surnageant clair.) Légende : "Séparation séquentielle des particules par centrifugation différentielle à vitesses croissantes."

### Références Bibliographiques

1. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.). W.H. Freeman. (Chapitre 2)
2. Boyer, R. (2012). *Biochimie et Biologie Moléculaire* (2nd ed.). De Boeck. (Chapitre 4)
3. Ninfa, A. J., Ballou, D. P., & Benore, M. (2010). *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology* (2nd ed.). Wiley.
4. Graham, J. M. (2001). *Biological Centrifugation*. BIOS Scientific Publishers.