

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*



Université Dr. Tahar Moulay de Saida  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie



Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie  
et Valorisation Biologiques des Plantes

## **POLYCOPIE**

### **Techniques de Dialyse et centrifugation**

Cours, Travaux dirigés et Travaux pratiques

Élaboré par :

Dr. ADLI DJALLAL EDDINE HOUARI

Ce fascicule est destiné aux étudiants de biologie

**3<sup>ème</sup> année** Licence et **1<sup>ère</sup> année** Master

**Spécialité** : Biochimie & Physiologie cellulaire

Microbiologie appliquée

Biotechnologie appliquée

<b>Tableau des matières</b>	
<b>1. DIALYSE.....</b>	<b>02</b>
1.1. Principes généraux.....	<b>02</b>
1.2. Les membranes.....	<b>02</b>
1.3. Facteurs influençant la dialyse .....	<b>03</b>
1.4. Techniques de dialyse.....	<b>04</b>
1.4.1. Préparation des membranes de dialyse .....	<b>04</b>
1.4.2. Préparation des boudins de dialyse .....	<b>05</b>
1.4.3. Montages spéciaux.....	<b>06</b>
1.4.3.1. Dialyse circulaire.....	<b>06</b>
1.4.3.2. Dialyse sur grands volumes .....	<b>07</b>
1.4.3.3. Dialyse sur petits volumes .....	<b>08</b>
1.4.3.4. Dialyse à volume constant .....	<b>08</b>
1.4.3.4. Electro dialyse .....	<b>08</b>
1.4.3.4. A. Osmose .....	<b>09</b>
1.4.3.4. B. Osmose inverse .....	<b>10</b>
1.5. Application de la dialyse.....	<b>11</b>
<b>2. CENTRIFUGATION, ULTRACENTRIFUGATION.....</b>	<b>11</b>
2.1. Théorie de base de la sédimentation .....	<b>12</b>
2.2. Instrumentation.....	<b>14</b>
2.3. Méthodes de séparation par ultracentrifugation préparative.....	<b>15</b>
2.3.1. Centrifugation différentielle .....	<b>15</b>
2.3.2. Centrifugation en gradient de densité.....	<b>17</b>
2.3.2.1. Centrifugation de zone ou zonale.....	<b>17</b>
2.3.2.2. Centrifugation isopycniqne .....	<b>19</b>
2.4. Séparation par ultracentrifugation analytique.....	<b>20</b>
2.5. Contrôle du résultat de la centrifugation .....	<b>21</b>
2.6. Quelques aspects de la réalisation pratique des centrifugations.....	<b>22</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>23</b>

# 1. DIALYSE

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse.

## 1.1. Principes généraux

Les membranes de dialyse habituellement utilisées en biochimie se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de « boudin » de dialyse. Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse. (Figure 01)

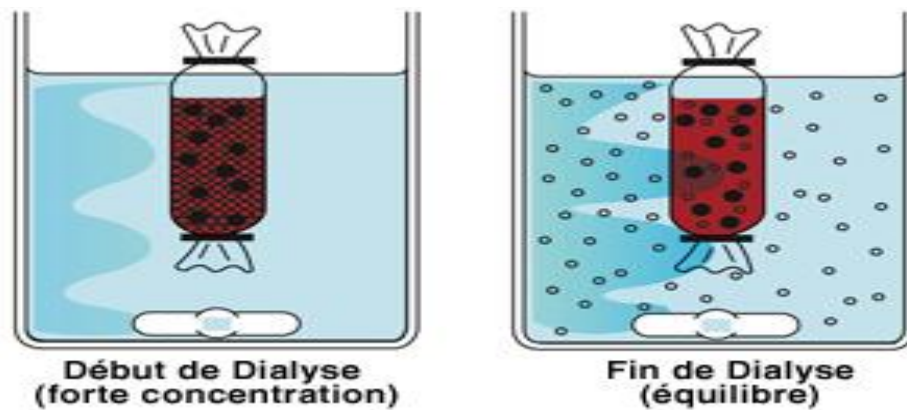


Figure 01 : Schéma générale d'une dialyse

## 1.2. Les membranes

On utilise des membranes en collodion de préparation extemporanée et, actuellement, surtout des tubes de cellophane. Les plus utilisées sont les membranes Visking dont les tailles des pores sont de 2,4 nm (elles laissent passer la ribonucléase pancréatique de diamètre moyen 1,9nm (poids moléculaire 25 000 daltons). Suivant la largeur à plat des cylindres on distingue :

<b>N° de référence</b>	8/32	20/32	27/32	36/32	1 <sup>7/8</sup> SS	3 <sup>1/4</sup> SS
<b>Largeur à plat en cm</b>	1	2,5	3,3	4,4	7,3 à 8,0	11,8 à 13,0

La porosité de ces membranes peut être modifiée par étirement dans le sens longitudinal ou par traitement chimique (acétylation ou action du chlorure de zinc à forte concentration).

### **1.3. Facteurs influençant la dialyse**

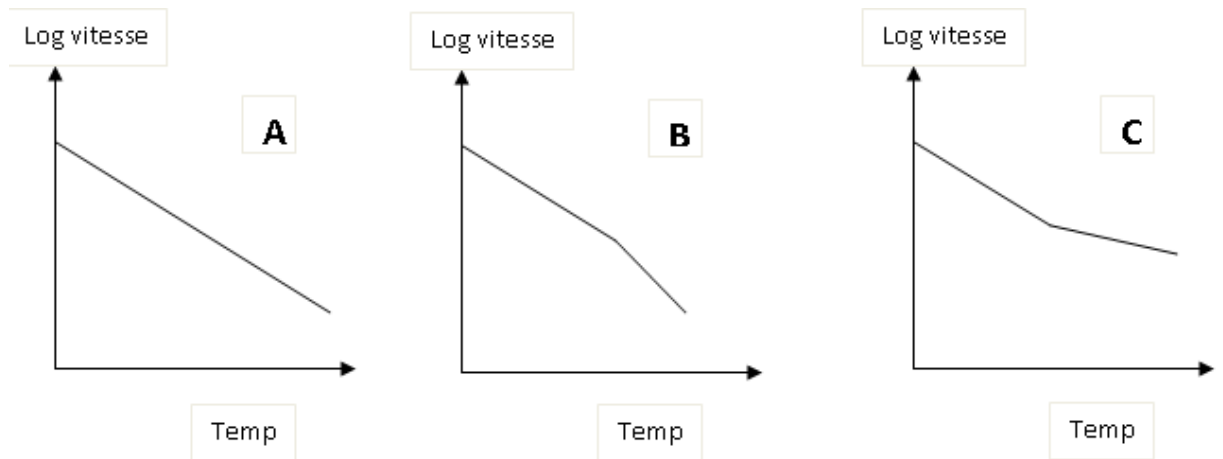
Une membrane de dialyse ne doit pas être chargée électriquement afin de minimiser les phénomènes parasites qui pourraient survenir (répulsion par charge identique ou adsorption sur la membrane s'élève avec l'augmentation de la température qui amplifie l'agitation des molécules et augmente ainsi la probabilité pour une molécule donnée de traverser la membrane. Un facteur important, pouvant modifier considérablement la vitesse de dialyse, est le rapport surface de la membrane/volume de la solution à dialyser.

Pour un volume donné de solution à dialyser, la vitesse augmente avec la surface de la membrane (voir plus loin l'application de la dialyse). La dialyse dépend également du pH du liquide à dialyser et surtout de celui de la contre-dialyse : il n'y a pas de règle précise car suivant la nature des molécules, dialysables ou non dialysables, l'apparition de charges électriques sur la molécule peut ou non ralentir la vitesse de la dialyse.

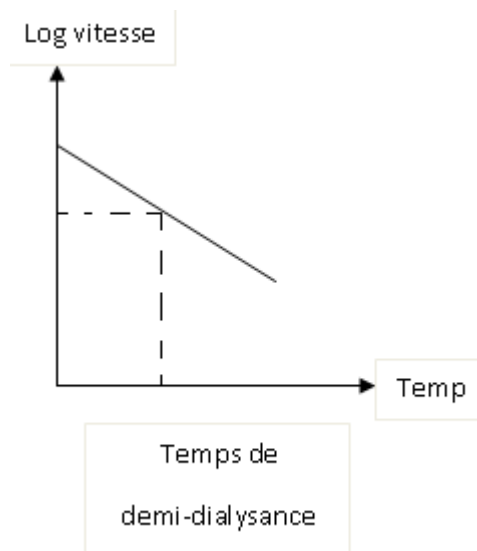
De nombreuses substances peuvent modifier la vitesse de dialyse : ainsi une molécule polypeptidique, l'adréno corticotrophine (ou A.C.T.H), hormone de l'hypophyse antérieure, dialyse contre de l'eau distillée. Si l'eau est remplacée par une solution d'acétate d'ammonium 0,15 M la dialyse est pratiquement inhibée. Souvent ces modifications de vitesse de dialyse sont dues à l'apparition d'agrégats non dialysables. Ceci peut être déterminé par l'étude de la courbe de vitesse de dialyse (Figure 02). L'aspect schématisé en A indique l'absence d'agrégats, en B et C la cassure de la droite indique la présence de plusieurs formes moléculaires d'une même substance (il faut noter que l'aspect d'une courbe de dialyse est celle d'une exponentielle et qu'il est nécessaire pour linéariser le phénomène le phénomène d'utiliser une représentation semi-logarithmique). L'addition de certaines substances comme l'urée peut modifier la vitesse de dialyse de nombreuses substances (en général dans le sens d'une augmentation) ; en effet l'urée agit sur les molécules protéiques en dissociant des structures spatiales ce qui diminue le rayon apparent de la molécule.

On caractérise souvent la dialysance d'une molécule dans des conditions bien définies de surface de membrane, de pH, de température, de concentration ionique etc..., par le temps

de demi-dialysance : temps au bout duquel la concentration de la molécule étudiée a diminué de moitié dans le boudin de dialyse (Figure 03) augmente par passage d'eau de la contre-dialyse vers le boudin. Ce phénomène est dû à la pression oncotique des protéines (la fixation d'ions minéraux par les protéines et l'équilibre des charges électriques de part et d'autre de la membrane créent une pression osmotique plus élevée dans le compartiment contenant les protéines). Dans l'établissement d'une courbe de vitesse de dialyse, ces modifications de volume doivent être mesurées afin de corriger les résultats bruts.



**Figure 02 :** Etude de la dialyse en fonction du temps



**Figure 03 :** Mesure du temps de demi-dialysance

## **1.4. Techniques de dialyse**

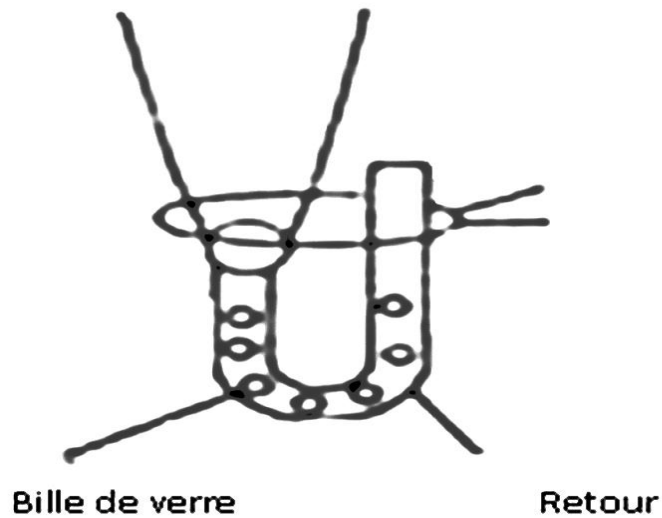
### **1.4.1. Préparation des membranes de dialyse**

Les membranes de dialyse contiennent glycérine, composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer par trempage. La technique usuelle consiste à placer successivement les membranes d'une heure dans la solution de bicarbonate de sodium 10mM, une heure dans une solution diluée d'EDTA (éthylène diamine tétra acétate : agent fixant par chélation les métaux lourds), puis dans l'eau distillée. La membrane ainsi préparée peut être conservée à 4 °C pendant deux à trois jours dans l'eau. Si le délai de conservation est plus long, il faut ajouter un inhibiteur de pousse bactérienne (solution d'azide de sodium) ; si le tube se dessèche il devient alors inutilisable. Avant utilisation il faut rincer la membrane avec le solvant utilisé pour la dialyse.

### **1.4.2. Préparation des boudins de dialyse**

Il faut fermer les boudins à leurs deux extrémités par un nœud simple avec un retour lui-même fermé par un second nœud formé par le fil même qui a servi à serrer le premier nœud. Afin d'immerger complètement le boudin dans le liquide de contre-dialyse, il faut le lester avec des billes de verre placées dans le retour (Figure 04). Ceci permet d'éviter qu'il ne flotte à la surface du liquide de contre-dialyse car dans ce cas la surface de contact serait restreinte provoquant ainsi une diminution de la vitesse de dialyse.

Il faut assurer une agitation convenable du liquide de contre-dialyse afin d'éviter la formation de gradients de concentration des substances diffusibles dans le b écher qui contient habituellement le liquide de contre-dialyse. Ceci est particulièrement utile lorsque le volume du liquide de contre-dialyse est important. Ce liquide doit être renouvelé fréquemment afin d'accélérer dans le boudin la disparition des substances diffusibles.



**Figure 04 :** Fermeture des boudins de dialyse

### **1.4.3. Montages spéciaux**

#### **1.4.3.1. Dialyse circulaire**

Le montage décrit permet de une dialyse rapide (débit du liquide de contre-dialyse : 2 ml /minute) le liquide de contre-dialyse coule le long du boudin. L'enceinte doit être saturée par de la vapeur d'eau afin d'éviter que des phénomènes d'évaporation ne concentrent éventuellement la solution tampon utilisée pour la contre-dialyse (Figure 05).

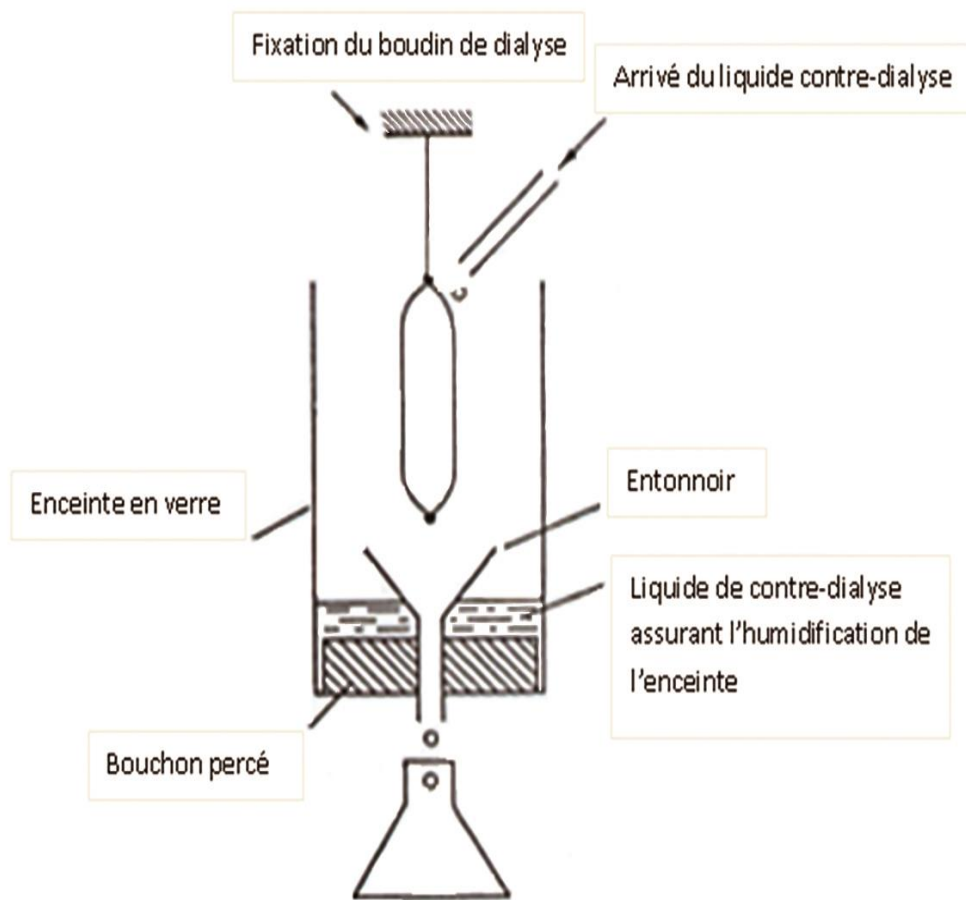
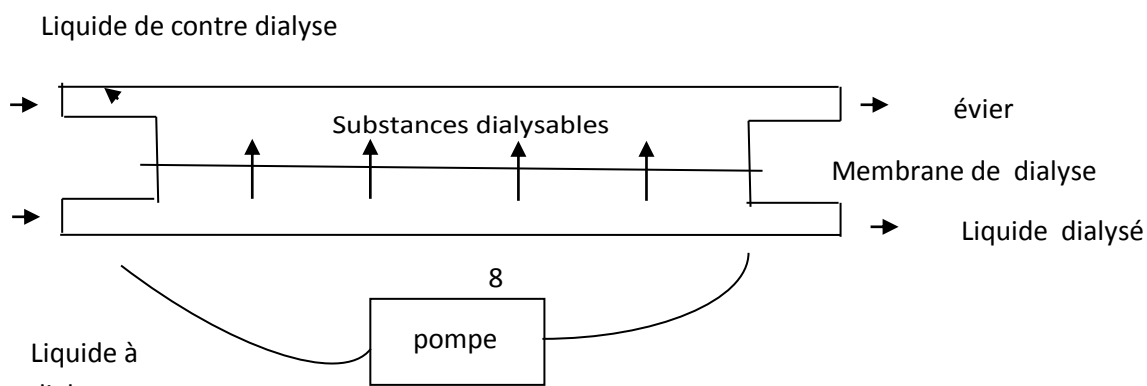


Figure 05 : Dialyse circulaire

### 1.4.3.2. Dialyse sur grands volumes

Il est alors intéressant d'utiliser un système à flux continu (par exemple, un dialyseur utilisé en analyse automatique). Le liquide à dialyser passe au contact du liquide de contre-dialyse dont il n'est séparé que par une membrane : la dialyse s'effectue sur une grande surface. Le liquide de contre-dialyse est renouvelé en permanence alors que le liquide de dialyse repasse sans cesse dans le système grâce à une pompe péristaltique (Figure 06).

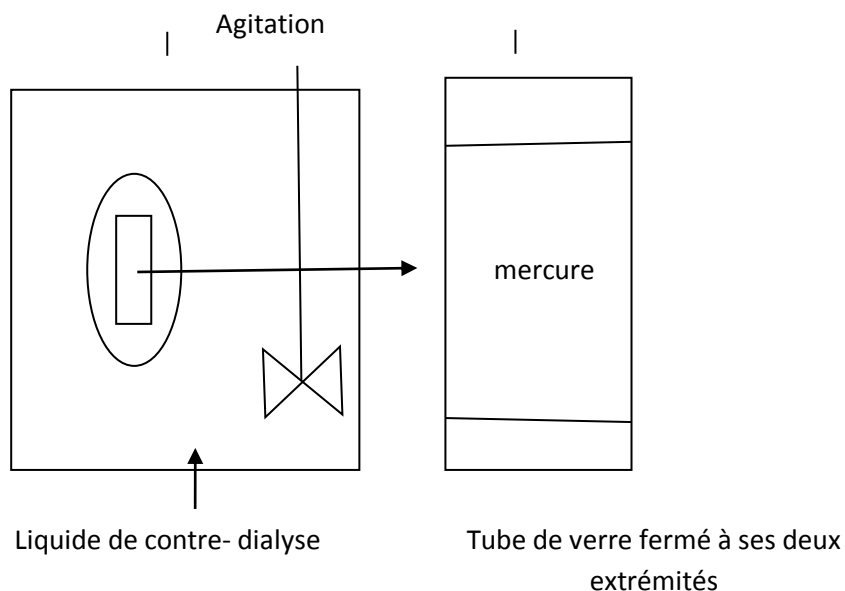




**Figure 06 :** Dialyse en flux continu

### 1.4.3.3. Dialyse sur petits volumes

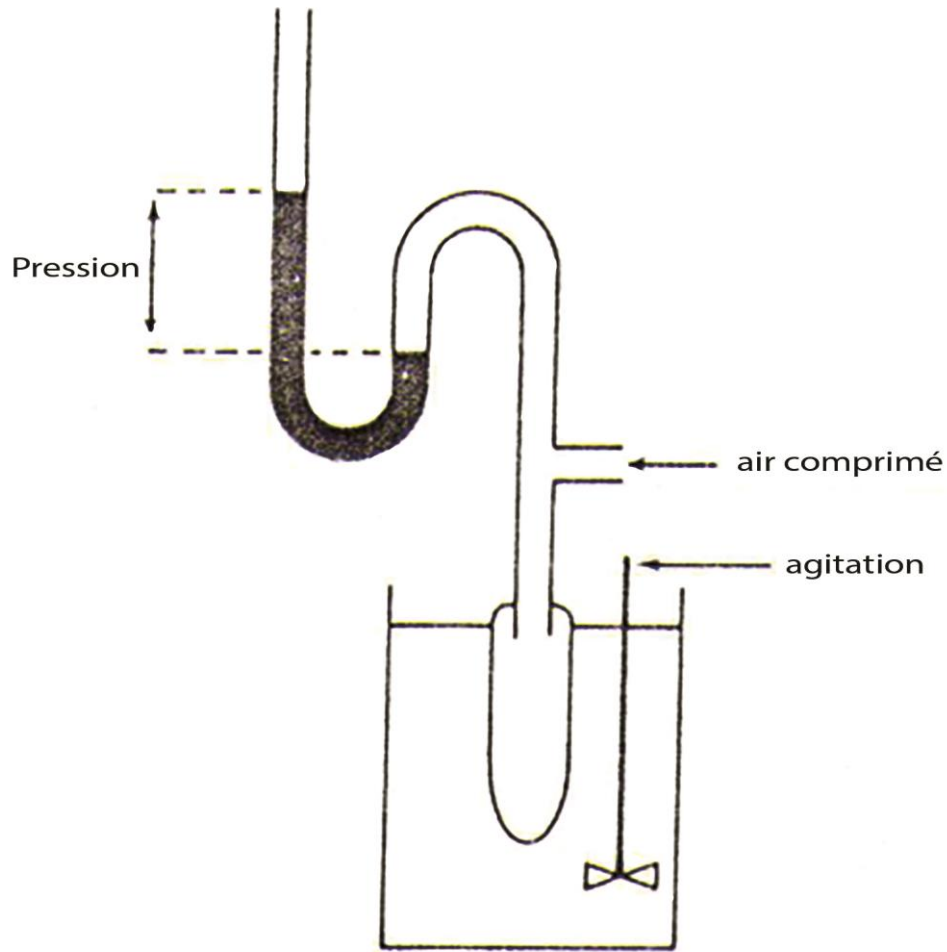
Afin d'augmenter la surface de dialyse, on introduit dans le boudin un tube de verre lesté par du mercure et fermé à ses deux extrémités. Le tube occupe la plus grande partie du volume du boudin et le liquide à dialyser est ainsi en contact sur une plus grande surface avec le liquide de contre-dialyse par l'intermédiaire de la membrane (Figure 07).



**Figure 07 :** Dialyse sur des petits volumes

### 1.4.3.4. Dialyse à volume constant

Le montage décrit permet d'appliquer une pression positive sur le liquide à dialyser. Cette pression peut compenser la pression oncotique des protéines et empêche ainsi l'augmentation de volume normalement observée dans ce cas (Figure 08).

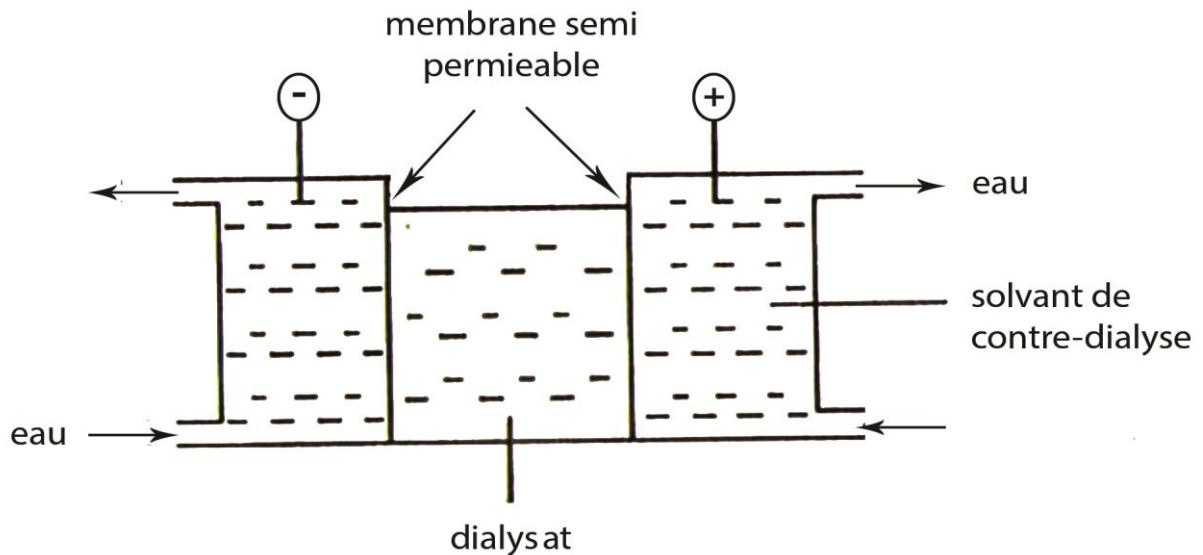


**Figure 08 :** Dialyse à volume constant

#### 1.4.3.5. Electrodialyse

Technique de séparation analogue à la dialyse mais utilisant un champ électrique pour améliorer le transport des ions à travers la membrane. L'établissement d'un courant de quelques mA permet le passage des anions vers la cathode et des cations vers l'anode. Les ions minéraux sont ainsi éliminés sans perte de produits organiques.

L'opération a lieu dans une cuve à trois compartiments (Figure 09). Le compartiment central servant à contenir le liquide à traiter, est séparé, par une membrane hémiperméable, des deux compartiments latéraux contenant l'un une anode (milieu anodique), l'autre une cathode (milieu cathodique). Ainsi, les anions et les cations, attirés par les électrodes correspondantes sont éliminés et se concentrent à l'extérieur du milieu à traiter. Une tension de quelques volts, 2 volts en général, est suffisante.



**Figure 09:** Principe de l'électrodialyse.

L'électrodialyse est utilisée dans la déminéralisation et la désacidification en industrie laitière. L'élévation thermique produite par le courant ne permet pas cette utilisation avec des produits thermolabiles.

#### 1.4.3.5. A. Osmose

L'osmose est un phénomène physique au cours duquel il se produit un flux d'eau entre deux solutions de concentrations moléculaires différentes séparées par une membrane hémiperméable, de telle façon que le solvant aqueux passe de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée jusqu'à ce que la pression exercée sur la solution la plus concentrée atteigne une valeur appelée pression osmotique ( $P_o$ ), le (ou les) soluté (s) ne pouvant changer de compartiment.

La concentration peut aussi être obtenue par osmose si la membrane est imperméable aux solutés. C'est le cas de la dialyse contre une solution macromoléculaire telle que des solutions de polyvinylpyrrolidone (PVP) ou de polyéthylène glycol (PEG). On préfère le PEG que l'on peut trouver dans le commerce à des poids moléculaires moyens de 30 000 ce qui limite d'autant leur diffusion dans le liquide que l'on concentre. La qualité de liquide à concentrer est mise dans le boudin cellulosique qui est mis à dialyser pour une durée variant de 4h à 24h, suivant le coefficient de concentration désiré dans une solution de PEG à 60%. La concentration est faite généralement à 4 °C. Par ce moyen, le passage du PEG dans le concentrat est limité au maximum. Il est essentiel de noter soigneusement la quantité de liquide avant et après concentration pour établir le facteur de concentration.

### 1.4.3.5. B. Osmose inverse

Technique de séparation très fine basée sur le transfert d'eau, entre deux solutions de concentrations différentes séparées par une membrane semi-perméable, se faisant à « l'envers » sous l'effet d'une pression osmotique artificielle (30 à 80 bars) qui contrarie le flux osmotique naturel de la solution la plus concentrée à la moins concentrée, laissant au passage les particules contaminantes de faible poids moléculaire (solides dissous, bactéries, etc.) (Figure 10). La pression osmotique est d'autant plus importante que la concentration est élevée et que la masse molaire est faible. La concentration a lieu sans élévation de température. Le faible débit de cette méthode peut être compensé par l'utilisation de filtres de grandes surfaces.

Les membranes utilisées ont un seuil de coupure compris entre 150 et 1000Da. Deux types de membranes sont utilisés :

- Les membranes cellulosiques : très perméables et très sélective, mais sont sensibles à l'hydrolyse chimique. On ne les utilise qu'à des températures inférieures à 40 °C et dans une zone de pH de 3 à 8. On peut les utiliser jusqu'à 60 bars environ.
- Les membranes en polymères organiques, surtout des polysulfones qui résistent à des pH extrêmes et à des températures de 70 °C. Le flux est limité à 150 l/h/m<sup>2</sup>. On utilise également des membranes en polyamide qui éliminent 90 à 98% des éléments inorganiques, des éléments non ioniques et des molécules organiques dont la masse moléculaire est supérieur à 100 Da.

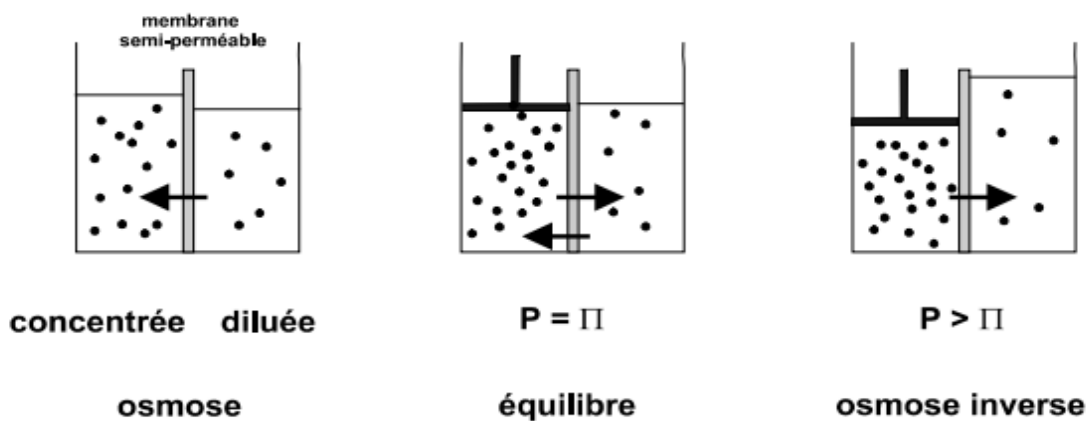


Figure 10 : Principe de l'osmose inverse.

## 1.6. Application de la dialyse

Elles sont multiples : l'électrodialyse permet de dessaler des échantillons avant de réaliser des chromatographies sur papier. La dialyse par boudin permet par exemple les opérations suivantes :

- \* Eliminer des produits diffusibles,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par exemple), contenus dans des solutions.
- \* Equilibrer une solution protéique avec un tampon qui modifie le pH de la solution protéique.
- \* Inversement, apporter dans une solution protéique une substance diffusible placée dans un boudin de dialyse : il est ainsi possible d'apporter progressivement des molécules de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans une solution de protéines.
- \* Concentrer une solution protéique soit en plaçant le boudin de dialyse contenant cette solution dans un courant d'air, soit en plaçant le boudin dans du polyéthylène glycol en poudre. L'eau quitte le boudin pour solubiliser le polyéthylène glycol qui, non diffusible, ne pénètre donc pas dans la solution protéique.
- \* Dessalement des eaux saumâtres.
- \* En industrie laitière : concentration du lactosérum, du lait écrémé et du lait entier,
- \* Concentration des substances actives (antibiotique, acides aminés, vitamines, etc.),
- \* Purification et concentration des arômes naturelles,
- \* Concentration des jus de fruits,
- \* Pratique médicale.
- \*

## 2. CENTRIFUGATION, ULTRACENTRIFUGATION

La centrifugation est essentiellement un moyen de séparer les particules d'une solution. En biologie, les particules sont souvent des cellules, des organites (mitochondries, chloroplastes, etc.) ou de grosses molécules (protéines, acides nucléiques, virus, etc.).

La séparation centrifuge est une variante accélérée de la sédimentation où l'accélération naturelle de la pesanteur ( $g = 9,81 \text{ m.s}^{-1}$ ) est remplacée par une force centrifuge engendrée par le rotor d'une centrifugeuse tournant à grande vitesse.

Il existe deux types de centrifugation : une dite préparative qui permet d'isoler des particules spécifiques, l'autre est appelée analytique permettant de mesurer des propriétés physiques des particules.

## 2.1. Théorie de base de la sédimentation

En l'absence d'agitation, des particules dispersées dans un fluide sont soumises, d'une part, aux forces de pesanteur qui tendent à les faire sédimenter au fond du récipient et, d'autre part, à la poussée d'Archimède qui tend à les faire remonter à la surface : le mouvement des particules dépend donc de l'intensité relative de ces forces. Si elles sont égales, les particules flottent, si la pesanteur l'emporte, les particules sédimentent, et cela d'autant plus vite que leur différence de densité avec le milieu de dispersion est grande.

En tournant un rotor dans une centrifugeuse, une force centrifuge est appliquée à chaque particule dans l'échantillon et chaque particule sédimente à une vitesse proportionnelle à la force centrifuge qui lui est appliquée. La viscosité de la solution contenant l'échantillon et les propriétés physiques de la particule affectent aussi la vitesse de sédimentation de chaque particule individuellement.

A une force centrifuge et à une viscosité du liquide donné, la vitesse de sédimentation de la particule est proportionnelle à la taille (poids moléculaire) et à la différence entre sa densité de la solution.

Lors d'une centrifuge qui tend à les faire sédimenter et, par conséquent, à établir un gradient de concentration, du sommet vers le fond du tube de centrifugation.

A la diffusion qui tend, au contraire à les maintenir en solution uniforme s'opposant à l'établissement de gradient de concentration.

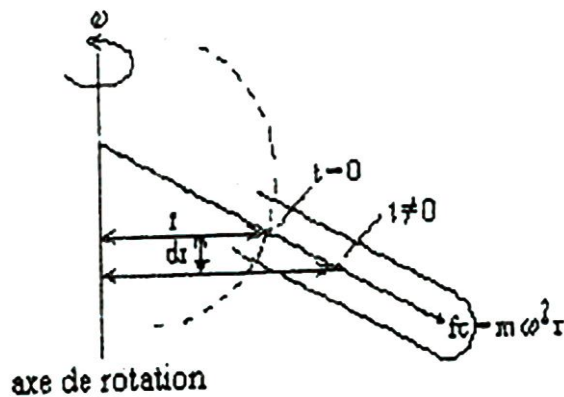
A fin de permettre aux particules de sédimenter, il convient d'utiliser des vitesses de centrifugation suffisamment élevées pour que la force centrifuge,  $f$ , vainque les forces de diffusion (Figure 11).

Le coefficient de sédimentation,  $s$ , d'une substance désigne sa vitesse de sédimentation  $dr/dt$  rapportée au champ de gravité  $\omega^2 r$  :

$$S = (dr/dt).(1 / \omega^2 r)$$

Avec  $r$  = distance à l'axe de rotation (cm)

$\omega$  = vitesse angulaire (radian.sec<sup>-1</sup>)



**Figure 11** : Principe de la centrifugation.

La dimension de  $s$  est un temps, son unité le Svedberg (S) :  $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ sec}$ . Ainsi, une particule dont le coefficient de sédimentation est égale à  $10^{-12} \text{ sec} = 10 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ , a une valeur de 10 S.

Bien que le coefficient de sédimentation augmente avec la poids moléculaire, il ne lui est pas proportionnel, puisqu'il est également influencé par les résistances de friction du solvant et par la forme de la particule. Cependant, dans certaines conditions, le poids moléculaire  $M$  d'une protéine peut être calculé à partir du coefficient de sédimentation grâce à l'équation de Svedberg obtenue en annulant la force centrifuge par la force de friction qui s'y oppose, ce qui se produit quand la vitesse de sédimentation est constante :

- La force centrifuge à laquelle est soumise une molécule de la substance dissoute est :

$$F = M(1 - \nu\rho) \omega^2 r$$

$\nu$  = volume partiel spécifique de la substance. Il correspond à l'augmentation de volume produite quand 1g de soluté sec est ajouté à un grand volume de solvant.

$\rho$  = densité du solvant

- La force de friction est :

$$f' = F \cdot dr / dt$$

F = coefficient de friction, est égal à  $RT / D$

R = constante des gaz parfait ( $8.315 \cdot 10^7$  ergs. mol<sup>-1</sup>.degré<sup>-1</sup>)

T = température absolue (°K)

D = coefficient de diffusion (cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) dans l'eau à 20 °C,  $D = D_{20,w}$

Quand  $f = f'$ , on a:

$$M(1 - v\rho)\omega^2r = (RT/D) (dr / dt)$$

D'où :

$$M = RTs / D(1 - v\rho) \quad \text{équation de Svedberg}$$

Cette équation montre que la masse d'une particule est proportionnelle à son coefficient de sédimentation est inversement proportionnelle ou coefficient de diffusion. Par exemple, une particule ayant un petit poids moléculaire, doit avoir un petit coefficient de sédimentation et devrait montrer une tendance à diffuser rapidement dans les solutions de faible viscosité.

## 2.2. Instrumentation

Si la vitesse de rotation est inférieure à 10 4 tours/min, on a une centrifugeuse. L'ultracentrifugeuse peut atteindre 100 000 tours/min, ou plus et produire un champ de gravité suffisant pour sédimenter les particules ou molécules de masse supérieure à 10 000 daltons.

Les centrifugeuses et ultracentrifugeuses sont composées des éléments suivants :

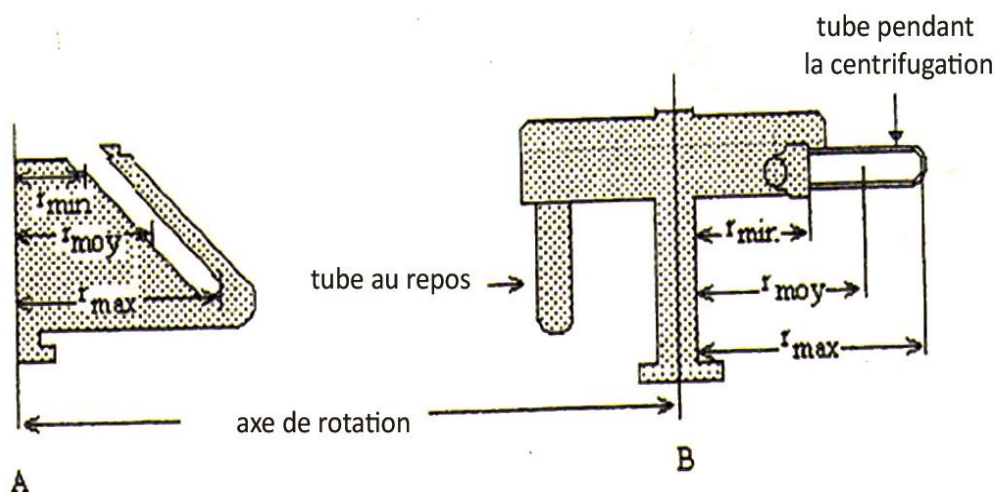
- Un moteur capable de tourner jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de tours par minute,
- Un rotor, capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane généralement pour les rotors des ultracentrifugeuses). Le rotor porte des emplacements, situés symétriquement de part et d'autre de l'axe, destiné à recevoir des tubes contenant les solutions biologiques.



- Une enceinte dans laquelle est disposé le rotor, qui est réfrigérée et sous vide poussé dans le cas des ultracentrifugeuses pour éviter l'échauffement exagéré dû à la friction du rotor contre l'air et faciliter le contrôle de la température,
- Cette enceinte est, de plus, blindée pour éviter des accidents en cas d'explosion du rotor.

Les rotors sont de trois types :

- A angle fixe pour les séparations les plus simples entre culot (cellules, organites, membranes, protéines) et le surnageant (Figure 12 A). Ces rotors sont utilisés surtout pour des séparations séquentielles, à des vitesses de rotation croissantes,
- A godets mobiles, utilisés pour des séparations plus fines, parce que la force de centrifugation s'exerce dans le sens de la longueur du godet (Figure 12 B). En effet celui-ci est mobile autour de son point de suspension à l'axe du rotor et s'oriente en cours de rotation pour que l'axe reste colinéaire avec le champ. On peut alors séparer des particules, essentiellement en fonction de leur densité, en utilisant des gradients de densité,
- Analytique, utilisés pour une mesure très précise des coefficients de sédimentation.



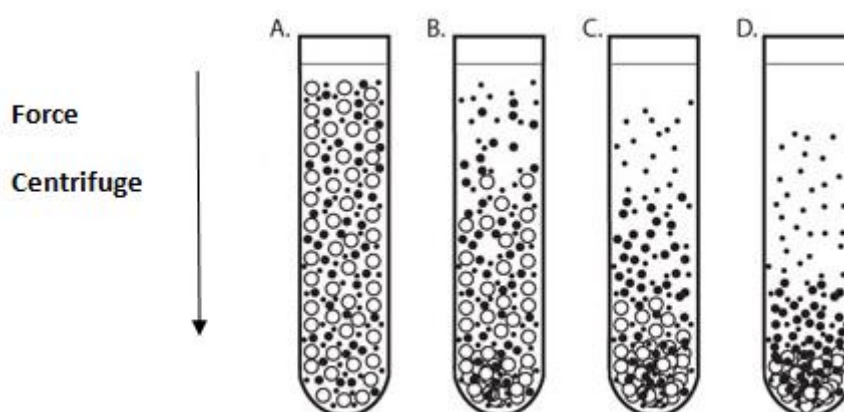
**Figure 12 :** Rotor angulaire (A) et rotor à godets mobiles (B).

## 2.3. Méthodes de séparation par ultracentrifugation préparative

### 2.3.1. Centrifugation différentielle

C'est la méthode la plus commune. Elle permet d'isoler des structures intracellulaires, à partir d'un homogénat initial, en procédant à différentes centrifugations à des vitesses croissantes.

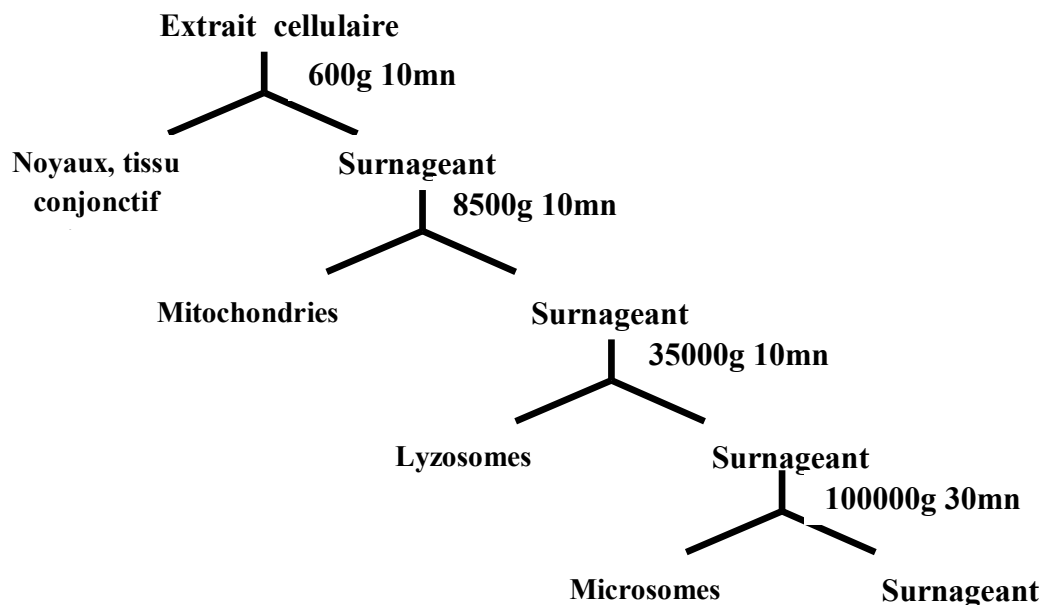
Le tube de centrifugation est rempli initialement avec un mélange uniforme d'une solution d'échantillon. Après centrifugation, d'abord à basse accélération (ex : 1000g, 10 minutes), on obtient une séparation de deux fractions : un culot contenant les éléments les plus denses qui se disposent au fond des tubes de centrifugation et une solution surnageant de particules non sédimentées (Figure 13).



**Figure 13 :** Centrifugation différentielle.

Les deux fractions sont récupérées par décantation du surnageant. Celui-ci peut être recentrifugé à des vitesses plus élevées (ex : 20 000g, 20 minutes) pour obtenir une purification supplémentaire avec formation d'un nouveau culot et d'un nouveau surnageant (Figure 28). Le culot peut être recentrifugé en augmentant constamment la vitesse de rotation (ex 80 000g, 1 à 2 heures puis 150 000g, 3 à 5 heures, etc), après sa remise en suspension dans un petit volume de solvant approprié. Cette méthode est utilisée pour fractionnement des constituants cellulaires. Les principales étapes nécessaires au fractionnement complet des cellules sont résumées dans la figure 14. Cette

technique d'ultracentrifugation ne permet cependant pas la séparation de tous les organites intracellulaires. Ainsi, le plus souvent, les fractions mitochondriales et lysosomales sont mélangées et ne peuvent être séparées complètement.



**Figure 14** : Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle.

### 2.3.2. Centrifugation en gradient de densité

Cette technique est plus compliquée que la précédente mais présente des avantages supplémentaires. Elle nécessite l'établissement d'un gradient de densité dans le tube de centrifugation. Le fluide du gradient de densité est constitué d'un soluté de faible poids moléculaire dans un solvant contenant les particules de l'échantillon suspendues. Le gradient de densité utilisé ici est un élément auxiliaire : il sert simplement à stabiliser les produits séparés dans des zones en évitant les courants de convection.

Il existe deux méthodes de centrifugation en gradient de densité :

### **2.3.2.1. Centrifugation de zone ou zonale**

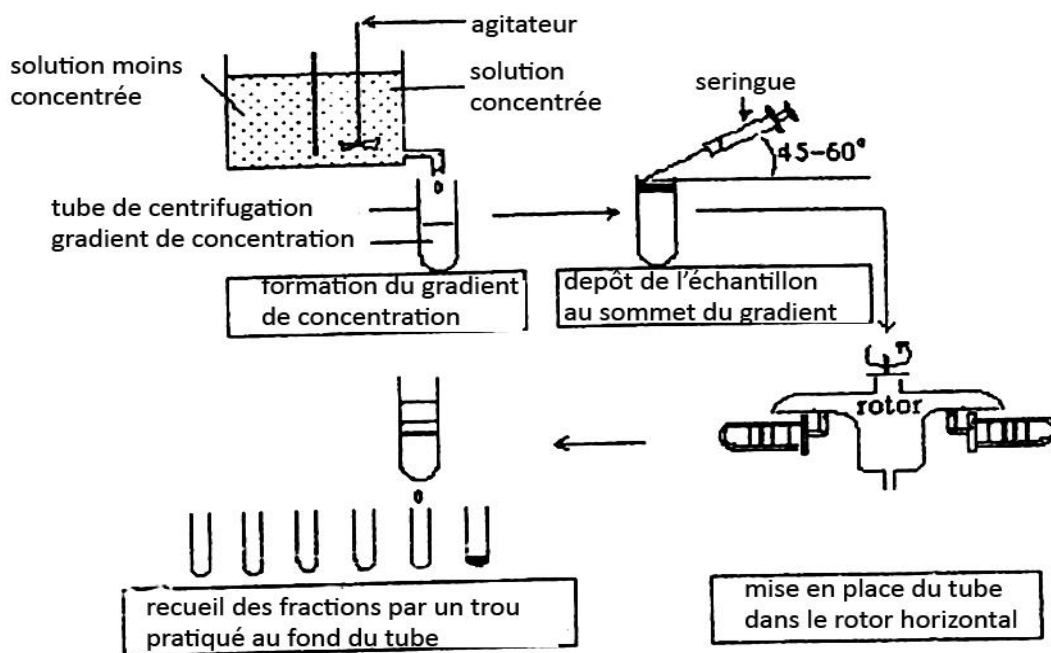
Dans cette technique, un faible volume de suspension contenant les produits à analyser est déposé sur une colonne de gradient préformé.

Dans la plupart des techniques courantes, un gradient de densité continu (5 à 45% , par exemple) de saccharose (exemple, 5 à 45%) est d'abord préparé dans un tube à centrifuger en plastique par un système qui mélange une solution concentrée de saccharose à de l'eau dans un rapport décroissant au fur et à mesure que le tube est rempli, de telle sorte que la densité du milieu soit la plus grande à l'extrémité inférieure du tube (Figure 15). Un petit volume du mélange à séparer est déposé à la partie supérieure du gradient. L'ensemble est soumis à centrifugation à des vitesses et pendant des durées qui dépendent du but recherché. La centrifugation à grande vitesse du tube dans un rotor à godets mobiles, en position horizontale, amène chaque type de particules à sédimenter à sa propre vitesse déterminée essentiellement par le poids de la particule, mais aussi par sa densité et sa forme, ce qui se traduit par des bandes séparées ou zones.

Habituellement, la centrifugation est arrêtée lorsque l'équilibre est atteint. La position des bandes peut être localisée optiquement ou par le recueil soigneux du contenu du tube en perçant un trou de petite taille à son extrémité inférieure ; des échantillons successifs sont recueillis dans une série de petits tubes qui seront analysés dans l'ordre de leur recueil. En déterminant la concentration en protéines pour chaque fraction par mesure de la densité optique à 280 nm, on détermine la répartition des protéines dans le tube, ce qui permet de les classer selon leur masse.

Le tube plastique peut également être congelé et coupé en couches minces pour une analyse éventuelle.

Cette technique est principalement employée pour séparer les molécules d'ADN, d'ARN ou les structures ribonucléoprotéique selon leur taille.



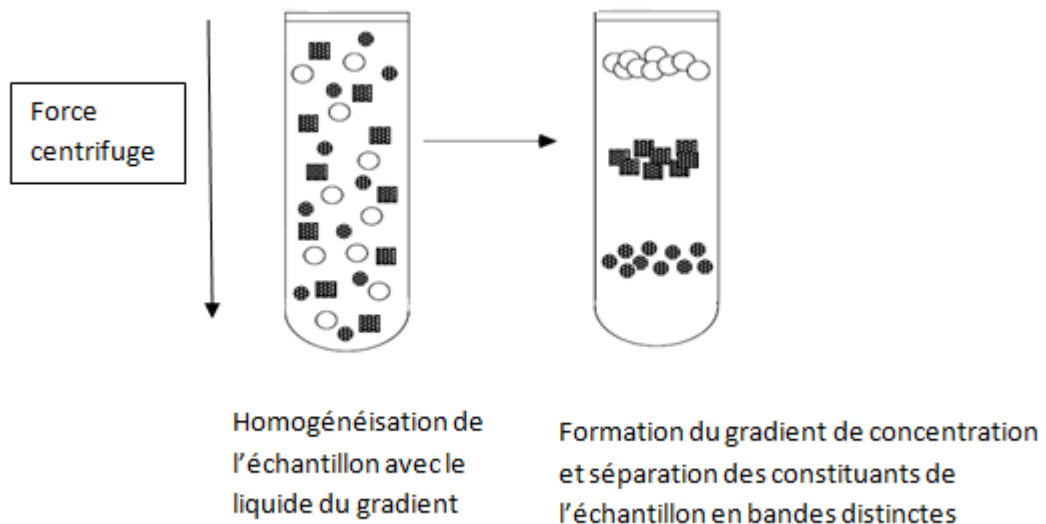
**Figure 15 :** Conduite d'une centrifugation zonale.

### 2.3.2.2. Centrifugation isopycnique

Ce type de centrifugation utilise une substance en solution très dense d'un sel tel que le chlorure de césium 6M à laquelle est mélangé l'échantillon à séparer. Pendant la centrifugation, le chlorure de césium sédimente en formant un gradient de concentration stable entre le sommet et le fond du tube (Figure 16). A cette variation de concentration est liée une variation de densité ou gradient de densité. Ce gradient de densité atteint un état d'équilibre après un certain temps de centrifugation ; celui-ci dépend de la vitesse de centrifugation, de la hauteur de la colonne liquide, de la nature du sel et de la température.

Si on mélange initialement une particule avec la solution saline telle que sa densité encadre celle de la particule, cette dernière formera une bande plus ou moins étroite dans le tube de centrifugation à la position où sa masse volumique est égale à celle de la solution saline. On dit alors que les particules sont isopycniques par rapport au milieu. Il existe des

tables fournissant les masses volumiques de nombreuses particules (vésicules membranaires, organites, etc.) qui permettent de séparer les unes des autres les différentes particules en choisissant convenablement le gradient fabriqué.



**Figure 16:** Centrifugation isopycnique.

Lorsqu'on centrifuge deux espèces de macromolécules dont les densités apparentes sont différentes elles occupent dans le tube de centrifugation des positions différentes, on réalise une séparation de macromolécules basée sur leurs différentes de densités apparente et non plus leurs coefficients de sédimentation. Même dans un champ de gravité très intense, les particules ne peuvent sédimenter au delà de la région du gradient de même densité qu'elles.

Les gradients de densité sont établis à l'aide de composés très solubles dans l'eau, capables de modifier très légèrement la densité (ou masse volumique) du milieu. Le composé le plus utilisé dans la formation d'un gradient de densité pour une sédimentation à l'équilibre, est une solution aqueuse de chlorure de césium ( $\text{CsCl}$ ). Il s'établit un gradient contenant plus d'ions  $\text{Cs}^+$  (et plus de  $\text{Cl}^-$  qui se déplace en même temps que le  $\text{Cs}^+$  pour neutraliser les charges) au fond du tube qu'au sommet. Dans une centrifugation typique, le milieu de centrifugation est d'environ 0.02 mg/ml plus dense au fond qu'au sommet dans une solution de  $\text{CsCl}$ , sont

respectivement de 1.3 de 1.6 à 1.7 et de 1.75 à 1.8 g/ml environ, et donc facilement séparables.

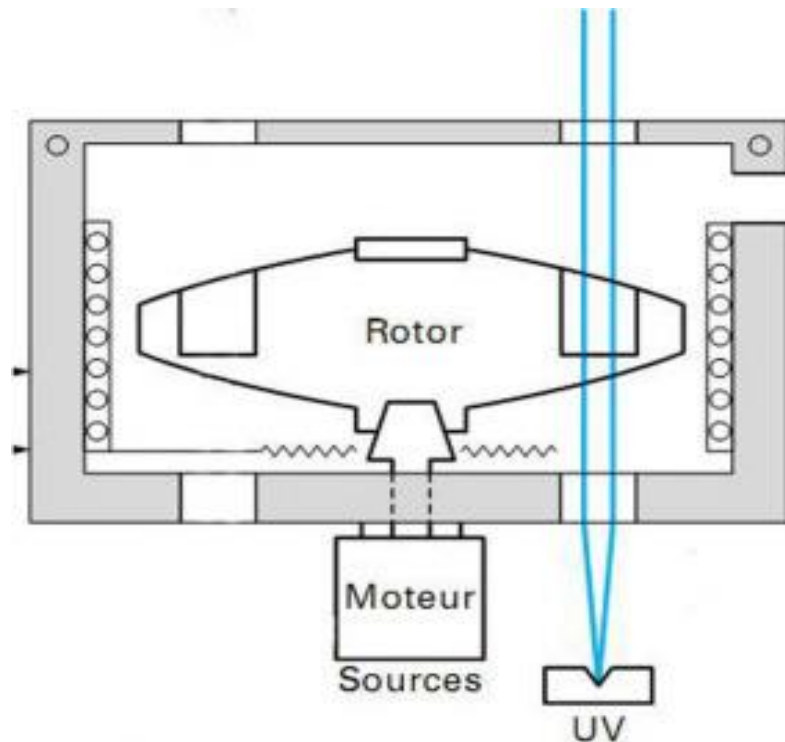
Dans une solution de CsCl, les ions se lient aux protéines et aux acides nucléiques ; l'ion Cs<sup>+</sup> se lie aux groupes phosphate de l'ADN, et dans l'ARN, aux groupes phosphate ainsi qu'aux fonctions hydroxyles des riboses, ce qui augmente plus la densité de l'ARN que celle de l'ADN.

Pour séparer les protéines ou les organites, on utilise souvent des gradients de concentration de saccharose ou de dextran (sucre polymérisé).

Cette centrifugation à l'équilibre a une très grande résolution et est particulièrement utile pour distinguer des macromolécules dont le <sup>12</sup>C ou le <sup>14</sup>N habituel est substitué par les isotopes lourds <sup>13</sup>C ou <sup>15</sup>N. Ainsi, lorsque des cellules sont cultivées avec des isotopes lourds, il est possible de séparer physiquement les molécules fabriquées par la cellule, avant l'addition de ces isotopes lourds, de celles fabriquées après. Une illustration parfaite de cette application a été l'expérience de Stahl montrant la réplication semi-conservative de l'ADN.

#### **2.4. Séparation par ultracentrifugation analytique**

Une centrifugeuse analytique (Figure 17) possède un système d'observation et de mesure permettant de suivre la migration des particules dans une solution homogène au cours de l'expérience, autorisant ainsi la détermination du coefficient de sédimentation (s), à l'aide d'une mesure optique de la concentration (absorbance) ou d'une variation de concentration (différence d'indice de réfraction).



**Figure 17 :** Ultracentrifugeuse analytique.

## 2.5. Contrôle du résultat de la centrifugation

Quelque soit la variante technique employée pour la préparation de fractions cellulaires, on doit toujours s'assurer que la fraction recueillie ne contient que l'organe ou les particules à étudier et qu'il n'existe pas dans cette préparation d'éventuelles contaminations par une autre fraction cellulaire. Ce contrôle peut être fait soit grâce à des critères morphologiques (microscopie électronique), soit grâce à des critères biochimiques (recherche d'enzymes marqueurs).

Ainsi, les phosphatases acides et la  $\beta$ -glucuronidase caractérisent les fractions lysosomales ; la catalase, les peroxyosomes. Les transférases d'oses sont spécifiques des vésicules golgiennes et la 5'-nucléotidase est l'enzyme la plus spécifique de la membrane cytoplasmique. Enfin, pour les mitochondries, la membrane externe peut être marquée par la présence de la monoamine oxydase alors que la membrane interne l'est par la présence de la succino-deshydrogénase.

De plus, il convient de bien choisir préalablement le tissu que l'on va utiliser en fonction de l'organe à étudier : le tissu hépatique convient particulièrement à l'étude des



mitochondries alors que les hématies constituent le matériel de choix pour toute recherche portant sur les membranes plasmiques.

## 2.6. Quelques aspects de la réalisation pratique des centrifugations

Les gradients de densité utilisée en centrifugation isopycniqne sont des gradients à l'équilibre ; ils s'établissent au cours de la centrifugation.

De manière générale, on mélange initialement les macromolécules à centrifuger avec la solution saline dont la densité a été convenablement choisie.

Si on se propose de préparer  $v$  ml d'une solution dont la densité est  $\rho$ , la masse  $m_o$  de sel à utiliser est donnée par :

$$m_o = v \cdot \rho \cdot F$$

$F$  étant la fraction en poids du sel dans une solution aqueuse donnée et la masse  $m$  de tampon, ou de solution macromoléculaire ou d'eau à ajouter est :

$$M = v \cdot \rho - m_o$$

C'est ainsi que pour obtenir 3ml de CsCl à la densité  $\rho = 1.760$  ( $F = 0.589$ ), on a pesé :

$$m_o = 3 \cdot 1,760 - 3,110 = 2,170 \text{ ml de tampon.}$$

Il est bon de vérifier que la solution finale a bien la densité voulue. On peut le faire soit par pycnométrie, soit par réfractométrie. Dans le second cas, on utilise la relation qui existe entre densité et indice de réfraction des solutions salines concentrées.

Exemple : cas du CsCl à 25 °C

$$\rho^{25} = 10,2402 \eta^{25} - 12,6483 \text{ pour les densités comprise entre 1,00 et 1,38}$$

$$\rho^{25} = 10,681 \eta^{25} - 13,4974 \text{ pour les densités supérieures à 1,37.}$$

A la fin de la centrifugation, les macromolécules forment des bandes étroites dans le tube de centrifugation et on peut, ainsi, déterminer la position, éventuellement la forme. A cette fin, on collecte le contenu du tube de centrifugation de la même manière que lors de la centrifugation de zone....

## Travaux dirigés

### **Exercice 1 : décanteuse centrifuge à bol et vis**

On considère une décanteuse centrifuge à bol et vis alimentée par une suspension contenant des particules de 10 microns à un débit de  $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ . La vitesse de rotation du bol est de  $500 \text{ tr} \cdot \text{mn}^{-1}$ , sa longueur est de 1.5 m, son rayon est de 40 cm et le diaphragme est réglé de façon à retenir un volant de liquide en rotation dans la centrifugeuse de 10 cm.

Calculer le nombre de g ou facteur g auquel est soumis la solution dans l'appareil.

Calculer la vitesse  $V_s$  de sédimentation des particules dans l'appareil.

Calculer la section de l'écoulement dans la centrifugeuse et en déduire la vitesse linéaire du liquide  $V_L$ .

Calculer à quelle distance de l'alimentation les particules seront collées au bol.

Calculer enfin le temps de séjour et l'inventaire de la solution dans la centrifugeuse.

Données : rayon du bol  $R=40 \text{ cm}$ , hauteur du volant de liquide  $h=0.1 \text{ m}$ , longueur utile du bol 1.5 m, vitesse de rotation du bol  $\omega=500 \text{ tours} \cdot \text{mn}^{-1}$ ,  $\rho_s=1700 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $\rho_L=1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  et  $\mu_L=10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ .

Accélération centrifuge  $\omega^2 R$ ,  $\omega$  en  $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 1 tour =  $2\pi$  radians.

### **Exercice 2 :**

Une centrifugeuse tourne avec une vitesse de 6000 tr/mn. 1. Déterminer l'accélération et la force centrifuge pour une particule sphérique de densité 1,35 située à 11,5 cm de l'axe de rotation ? 2. Sachant que cette particule parcourt 3 cm en 20 minutes. Calculer la constante de Svedberg ? 3. Si la viscosité du milieu est  $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ Pl}$ . Quel sera le rayon de la particule ? 4. Déterminer la masse molaire de la particule. En déduire le coefficient de diffusion à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ?

### **Exercice 3 : Séparation de l'hémoglobine du sang par centrifugation**

La molécule est soumise à l'accélération  $a = \omega^2 R$  due au mouvement de rotation imprimé au tube par le rotor de la centrifugeuse ( $\omega$  vitesse de rotation du rotor en rad/s et  $R$  la distance entre la molécule et l'axe du rotor)

$R=6 \text{ cm}$  ;  $\omega = 1,57 \cdot 10^3 \text{ rad/s}$ .

1/ Calculer l'accélération  $a$  ?

2/ Calculer le rapport  $a/g$  ?

3/ Calculer  $v_2$  ?

4/ Quelle serait la durée  $t_2$  (en secondes puis en heures) nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance de 1 mm ?

## **TP 1 : LE NOYAU INTERPHASIQUE**

### **But**

- Elle va permettre de familiariser les étudiants avec une technique de laboratoires simple basée sur le fractionnement cellulaire. Les étudiants peuvent ainsi purifier les noyaux de cellules hépatiques et préparer l'ADN à partir de ces noyaux.

### **I. Fractionnement cellulaire**

A- Matériel

**1. Matériel biologique** : foie de bœuf

**2. Réactifs** : NaCl 0,9%; Tampon TKM (Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, pH 7,5; Saccharose 0,88 M et 1,1 M dans le tampon TKM

**3. Autre matériel** : Waring Blendor, centrifugeuse, filtres

B. Mode opératoire

#### **1. Préparation des noyaux**

- Par groupe environ 5 g de foie, laver le tissu par du NaCl 0,9%
- Homogénéiser au Warning Blendor (1 minute à vitesse maximale) dans du saccharose **0,88 M** (10 ml par g de tissu)
- Filtrer sur plusieurs épaisseurs de gaze; répartir l'homogénat dans des tubes de 5 ml.
- Faire 1 prélèvement pour observation au microscope (Prélt. 1).
- Centrifuger 10 minutes à 1000 g (2000 r.p.m)
- Eliminer le surnageant délicatement.
- Remettre le culot en suspension dans 2ml environ de saccharose **0,88 M** à l'aide d'une pipette pasteur.
- Dans un autre tube de 5 ml, préparer un coussin de saccharose **1,1 M** (2 ml).
- Déposer délicatement sur le coussin de saccharose, le matériel remis en suspension précédemment.
- Centrifuger 10 minutes à 1000g.
- Prélever une fraction de culot et du surnageant pour observation.

#### **2. Extraction de la chromatine par NaCl 2M**

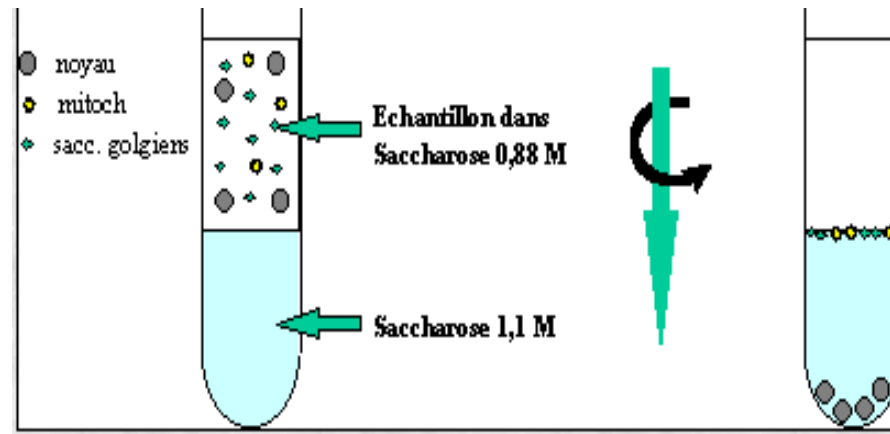
- Remettre le culot en suspension dans 2 ml de NaCl 2M
- Centrifuger 10 minutes à 1000g
- Verser le surnageant contenant la chromatine dans un bêcher

#### **3. Précipitation du DNA par l'éthanol**

- Ajouter environ 3-4 volumes d'éthanol 95° froid dans le bêcher contenant la chromatne.
- Agiter doucement à l'aide d'un agitateur en verre

#### **4. Traitement des prélèvements sur lame.**

- fixer par la chaleur
- Monter dans une goutte de vert de Méthyle-pyronine (V.M.P)
- Comparer les prélèvements 1 et 2.
- Conclusions sur la méthode de fractionnement.



### SEDIMENTATION SUR COUSSIN DE SACCHAROSE

### PROPRIETES DES DIFFERENTS ORGANITES DES CELLULES HEPATIQUES

ORGANITES	% DES PROTEINES CELLULAIRES	DIAMETRE (µm)	DENSITE D'EQUILIBRE EN GRADIENT DE SACCHAROSE (g/ml)
Hépatocyte	100	20	1,20
Noyau	15	5-10	1,32
Sacculs golgiens	2	2	1,10
Mitochondries	25	1	1,20
Vésicules du RE	20	0,1	1,15
Membranes plasmiques	2	-	1,15
Lysosomes	2	0,5	1,20
Protéines solubles	30	0,01	-

### TP 2 :

#### But

- Savoir déterminer la durée et la vitesse de centrifugation pour chaque spécimen
- Connaître le fonctionnement de la centrifugeuse
- Connaître les erreurs pré-analytiques

**1. La centrifugation en analyse médicale** La centrifugation est une technique qui utilise la force centrifuge pour séparer les différents composants d'un fluide. Au laboratoire médical, elle est principalement utilisée pour séparer le plasma ou le sérum à partir de prélèvements sanguins ou pour obtenir un sédiment urinaire. Le sang est collecté dans des tubes résistants à la centrifugation qui sont ensuite placés dans une centrifugeuse. Pendant la centrifugation, les composants du sang ou des urines les plus lourds sont entraînés au fond du tube, accélérant

une sédimentation naturelle. Ils sont ainsi séparés du surnageant, du plasma s'il s'agit de sang anticoagulé ou du sérum si le sang a coagulé naturellement.

**2. Temps et vitesse de centrifugation** Une centrifugation optimale doit être assez intense pour permettre une sédimentation totale des cellules (absence de cellules en suspension dans le surnageant) tout en étant suffisamment douce pour ne pas lyser les cellules sanguines (libération de leur contenu dans le liquide surnageant), ou les éventuelles cellules présentes dans les urines. D'une manière générale, les indications sont les suivantes.

- Sérum : après coagulation complète (au minimum 30 minutes à température ambiante, le temps peut être prolongé si le patient est sous anticoagulant), centrifuger le tube entre 1300 et 2500 g pendant 10 à 15 minutes. Certains tubes avec gel séparateur contiennent un activateur de coagulation et pourront être centrifugés moins longtemps entre, 2000 – 4000 g.
- Plasma : centrifuger le tube entre 1300 et 3000 g pendant 5 à 15 minutes, ceci peut être fait immédiatement après le prélèvement.
- Sédiment urinaire : centrifuger l'échantillon à 400 g pendant 5 minutes. Ne pas dépasser ces recommandations car les culots ont tendance à être trop compacts et les leucocytes à former des amas. La durée et la vitesse de centrifugation requises dépendent du type d'échantillon, du type de tube choisi (se référer aux indications du fabricant de tubes), ainsi que de la centrifugeuse utilisée (rayon du rotor).

**3. Chargement de la centrifugeuse** Les tubes doivent impérativement être disposés dans le rotor de façon à éviter tout déséquilibre. Ainsi le poids (en grammes) des tubes qui se font face dans le rotor doit être similaire. Si le nombre de tubes à centrifuger est impair, on placera en face du tube unique un autre tube contenant le volume d'eau nécessaire pour obtenir un poids identique. Un déséquilibre dans le chargement du rotor (tube plus lourd d'un côté que de l'autre) peut avoir des conséquences dramatiques : rupture de l'axe et expulsion du rotor car soumis à des vitesses énormes, d'où le risque de dommages dans le laboratoire et de blessures du personnel.

4. Calcul de la vitesse de rotation pour une centrifugeuse précise

- Le nombre g indique la force requise pour obtenir une centrifugation optimale. Il est également dénommé force centrifuge relative (RFC) et permet de calculer la vitesse de rotation nécessaire pour un tube et une centrifugeuse donnés.

- La relation entre la vitesse du rotor exprimée en tours ou en rotations par minute (rpm), la force centrifuge relative (RCF) ou g et la distance entre le centre du rotor et le fond du tube (r = rayon de rotation en mm) est décrite par la formule :

$$\text{rpm} = 1000 \times \sqrt{\frac{\text{RCF}}{r \times 1,118}}$$

- Pour déterminer la vitesse de rotation : 1. identifier la RCF nécessaire : se référer aux indications fournies par le fabricant du tube. 2. identifier le rayon (= la moitié du diamètre) du rotor de la centrifugeuse : consulter le mode d'emploi de la centrifugeuse ou lire directement sur le rotor. 3. appliquer la formule de calcul.

Exemple : le rayon de rotation d'un rotor (r) est de 86 mm. A quelle vitesse faudra-t-il programmer la centrifugeuse pour obtenir une accélération (RCF) de 1300 g ?

$$\rightarrow \text{rpm} = 1000 \times \sqrt{\frac{1300}{86 \times 1,118}} = 3677 \approx 3700$$

- Plusieurs fabricants de tubes ou de centrifugeuse proposent un calculateur en ligne sur leur site Internet.

- La vitesse de rotation peut également être déterminée en ayant recours à un nomogramme : 1. identifier la force centrifuge et le rayon de la centrifugeuse comme ci-dessus.

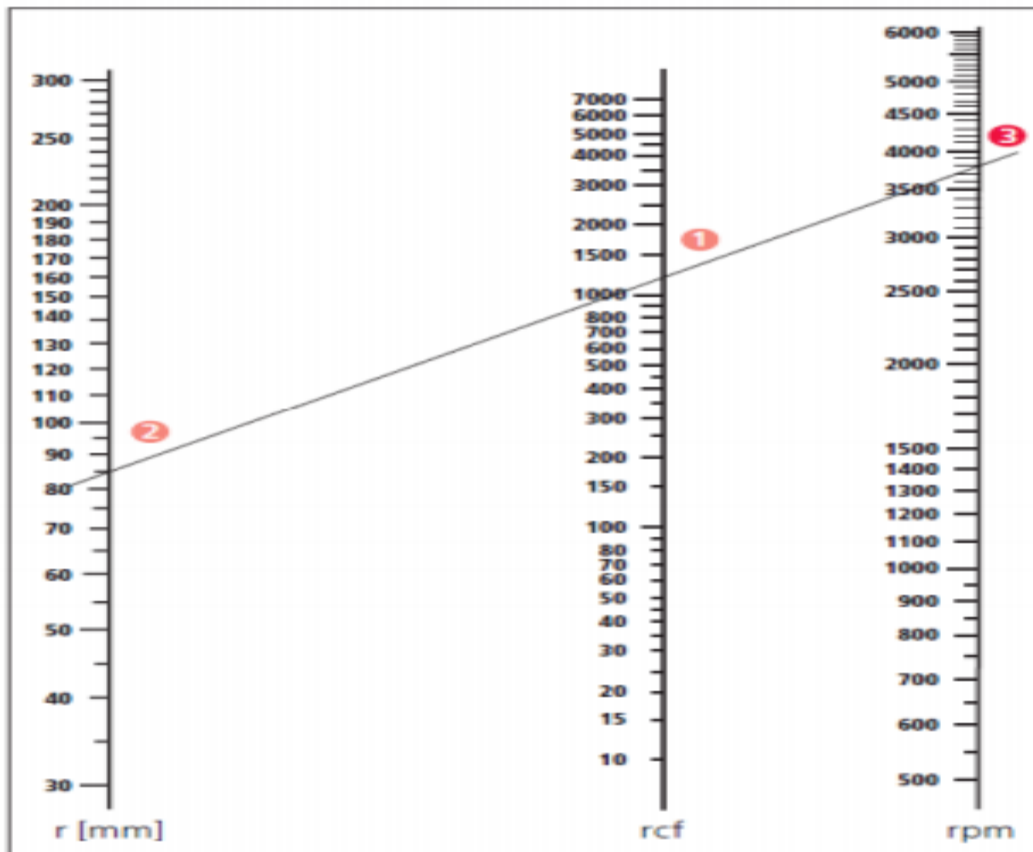
1. sur l'échelle représentant la force centrifuge, marquer la valeur de la force centrifuge requise ①.

3. sur l'échelle représentant le rayon, marquer la valeur du rayon de la centrifugeuse ②.

4. relier les deux marques en prolongeant le trait pour couper l'échelle représentant les rotations par minute.

5. lire la valeur indiquée par le point d'intersection sur l'échelle des rotations par minute pour obtenir la vitesse de rotation à régler sur la centrifugeuse ③.

Avec l'exemple ci-dessus : rpm (③)  $\approx$  3700



**Figure 1:** Nomogramme

5. Entretien et maintenance de la centrifugeuse Le rotor et les accessoires doivent être nettoyés et désinfectés régulièrement. La qualité des analyses peut être affectée par un appareil sale (risque de contamination croisée). Un programme de maintenance doit être prévu pour vérifier que la vitesse de centrifugation est bien celle attendue (voir les recommandations de maintenance du fournisseur).

6. Erreurs pré-analytiques liées à la centrifugation Une centrifugation incorrecte peut provoquer par exemple une augmentation du taux de potassium, de phosphate inorganique ou de lactate déshydrogénase (LDH).

6.1 Température La centrifugation est en général réalisée à température ambiante, mais pour certains analytes labiles il faut régler la température de centrifugation à la température adéquate (tenir aussi compte que la température augmente durant la centrifugation).

6.2 Temps de centrifugation Le temps de centrifugation doit correspondre à l'échantillon. Pour les spécimens anticoagulés, le fabricant du tube indique le temps optimal de façon à ce qu'il ne reste plus de plaquettes dans le plasma.

**6.3 Tubes avec gel séparateur** Les tubes avec gel ne doivent jamais être re-centrifugés car la re-centrifugation de tels tubes peut avoir des conséquences sur les résultats, des particules de gel peuvent se détacher et se mélanger au sérum. Conseil : si l'échantillon devait être re-centrifugé, transférer le sérum ou le plasma du tube primaire dans un autre tube propre et sec, puis le re-centrifuger.

**6.4 Re-centrifugation des échantillons conservés** Une pseudo augmentation du potassium peut être observée sur des sérums re-centrifugés, après 12 heures de conservation.

## Références Bibliographiques:

- Biochimie. Donald Voet, Judith G. Voet. 4<sup>ème</sup> édition. Wiley .2016. Page 141.
- Centrifugation: Essential Data. David Rickwood, T. Ford, J. Steensgaard. Wiley, 14 juin 1994 - 114 pages.
- Analyse instrumentale. Manuel à l'usage des biologistes. Marouf abdelrazak. 2<sup>ème</sup> édition 2005. DAR EL GHARB.
- Appareils et méthodes en biochimie. P Kamoun ,Flammarion, Médecine-Sciences, Paris (1977).
- Dialyse. Jean PASTOR, Anne-Marie PAULI. Professeurs à l'Université d'Aix-Marseille II, Faculté de Pharmacie : Laboratoire de Chimie Analytique. Techniques de l'ingénieur. <https://www.techniques-ingenieur.fr/>
- Ultracentrifugation. Lucette BARDET ; Professeur à la faculté de pharmacie de Montpellier. Editions : Techniques de l'ingénieur. <https://www.techniques-ingenieur.fr/>

## QUELQUES SITES SUR INTERNET

<https://books.google.dz/books?isbn=1428900136>

<https://books.google.dz/books?isbn=3540678689>