

# Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA  
VIE



**Shop**



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



**Etudier**



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



**Emploi**



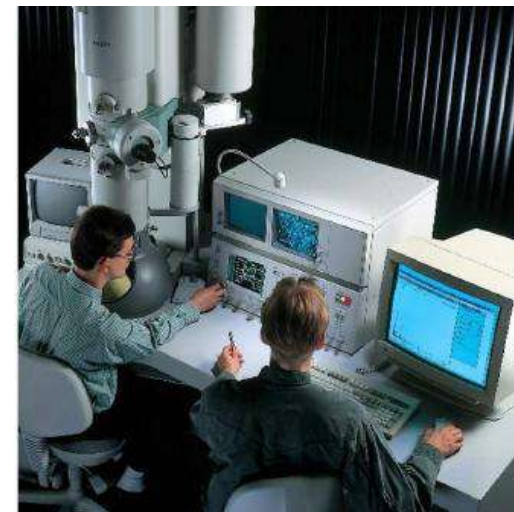
- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENTS

Centrifugation, ultracentrifugation et  
Sédimentation

Jeudi 6 Octobre 2011



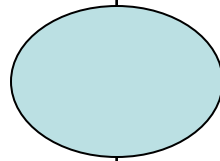
# Principe

- Méthode qui permet de séparer les particules d'un solvant.
- En biologie, il s'agit des composants cellulaires (fractionnement cellulaire)
- Le sang avec de l'héparine contient des éléments qui sédimentent au fond du tube
- C'est régi par la force (pesanteur)
- La loi  $F = m \cdot \gamma$  où  $\gamma$  est l'accélération due à la pesanteur
- La seconde force de friction : loi de Stocks

$$\mathbf{f}' = 6 \cdot \pi \cdot \mathbf{v} \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{v}$$

# Principe schématisé

$$f' = 6 \cdot \pi \cdot v \cdot r \cdot v$$



$$F = m \cdot \gamma$$

# La force de friction

- $f' = 6 \cdot \eta \cdot r \cdot v$
- $\eta$  La viscosité , l'unité c'est la poise ou le poiseuille
- $r$  le rayon de la particule
- $V$  la vitesse de la particule
- Le ficoll augmente la viscosité, donc ralentit la sédimentation
- Jouer sur l'accélération due à la pesanteur en augmentant la vitesse de rotation

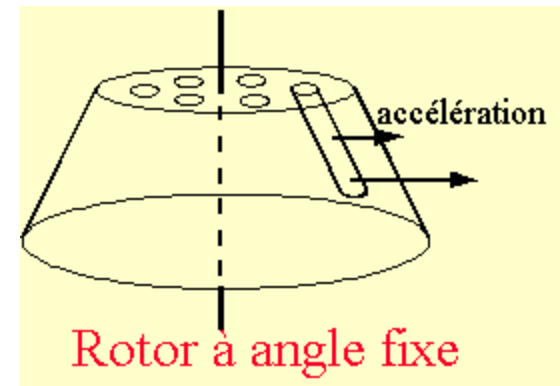
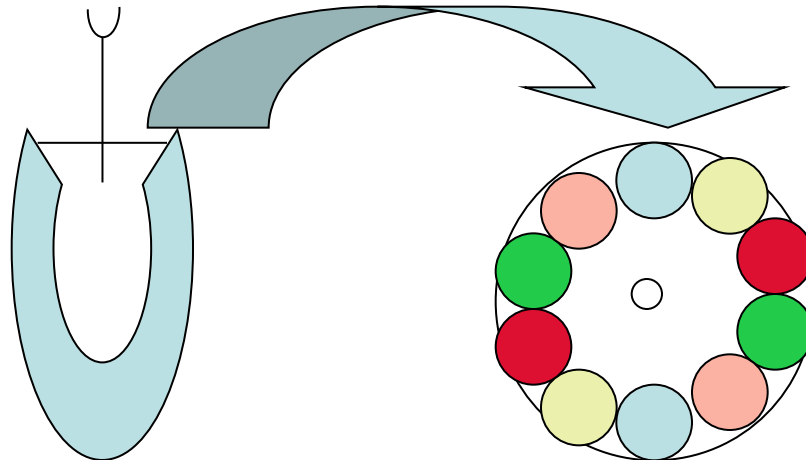
## swinging buckets

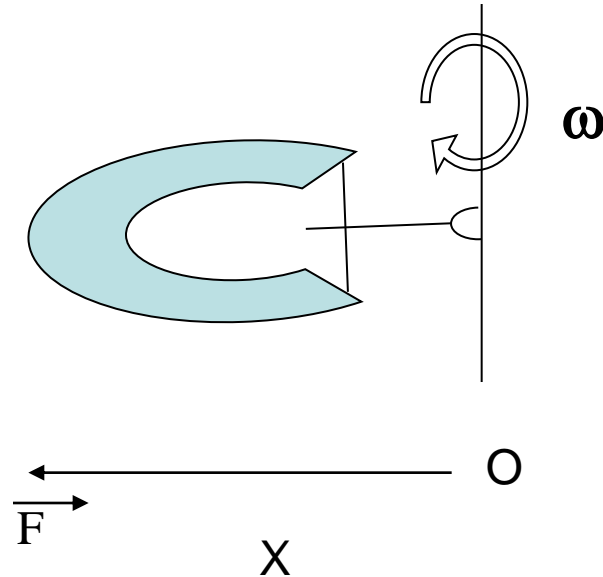


Ce sont des blocs de métal (aluminium, titane) avec des puits creusés à l'intérieur et inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale, généralement de l'ordre de  $15^\circ$  à  $35^\circ$  selon les modèles

# L'accélération par rotation

- $F = m \cdot \gamma = m \cdot \omega^2 \cdot x$
  - $x$  : distance qui sépare l'axe du rotor du fond du tube de centrifugation.
- $\omega$  est la vitesse de rotation angulaire du rotor  $\omega = 2 \pi n/60$      $n$ : Nombre de tours par minute du rotor





$$F = m \cdot \gamma = m \cdot \omega^2 \cdot x$$

$$\omega = 2 \pi n/60$$

$$\gamma = (2 \pi n/60)^2 \cdot x$$

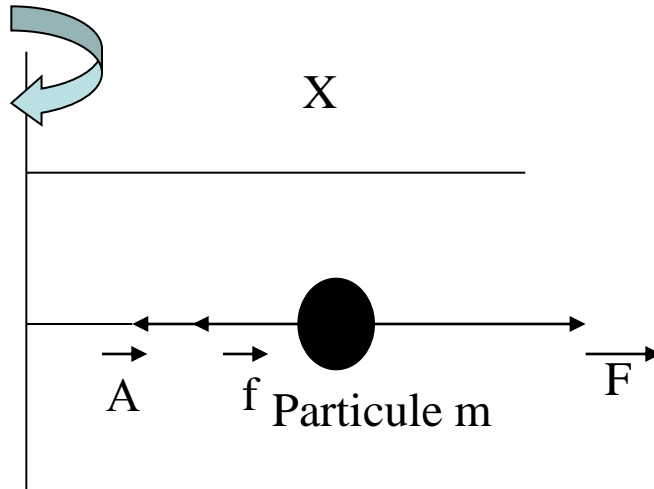
**On dit qu'on fait une centrifugation à y rpm avec le rotor z qui se caractérise avec son rayon équivalent de x dans la formule**

**La règle générale: donner l'accélération en Nombre de g**

$$Ng = \frac{(2 \pi n/60)^2 \cdot x}{9.81}$$



# Principe de la centrifugation



F : Force centrifuge

A : poussée d'Archimède

f : force de friction (frottement)

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r \cdot v$$

La particule sédimente si  $F$  est sup à  $f$

La relation fondamentale de la thermodynamique

$$m \cdot \frac{dv}{dt} = (F - A) - 6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r \cdot v$$

$$m \cdot \frac{dv}{dt} = (F-A) - 6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r \cdot v$$

$$\gamma = \omega^2 \cdot x = \frac{dv}{dt}$$

$$(F-A) = (m - m') \cdot \omega^2 \cdot x$$

Pendant la sédimentation, la vitesse devient constante

Donc l'accélération devient nulle

$$\text{Ainsi; } (F-A) - 6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r \cdot v = 0 \quad ; \quad v = (F-A) / 6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r$$

$$v = \frac{(m - m') \cdot \omega^2 \cdot x}{6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r}$$

$$v = \frac{(m - m') \cdot \omega^2 \cdot x}{6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot r}$$

La vitesse dépend:

Vitesse du rotor

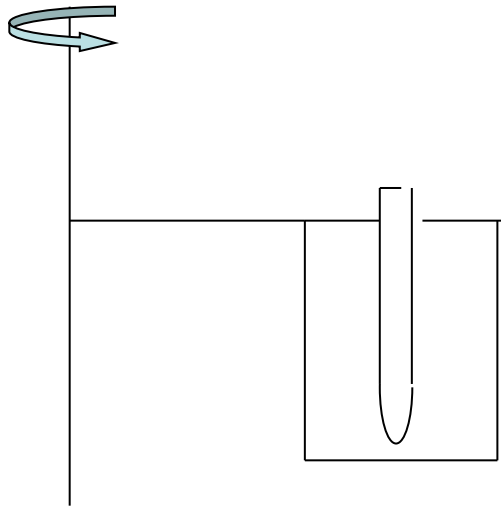
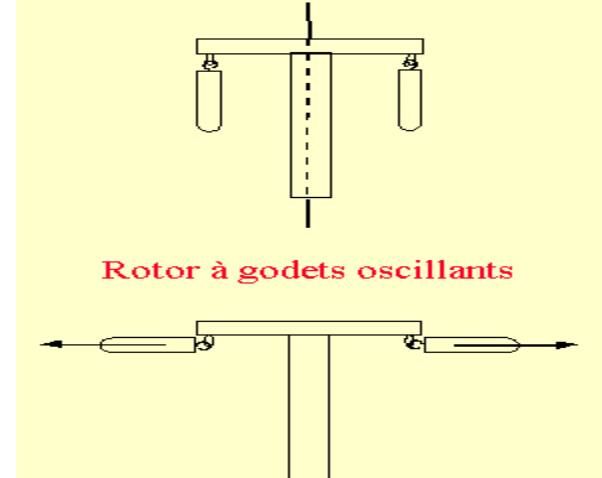
Rayon de centrifugation

Différence de masse volumique

Coefficient de viscosité

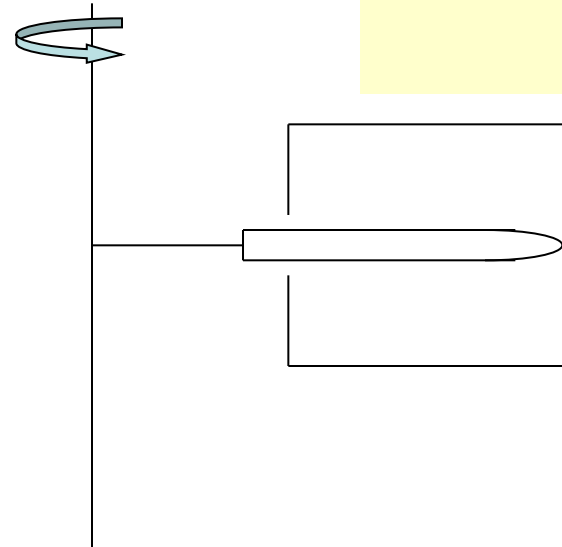
Géométrie des particules dispersées

# Appareillage rotor horizontal



Début de la centrifugation

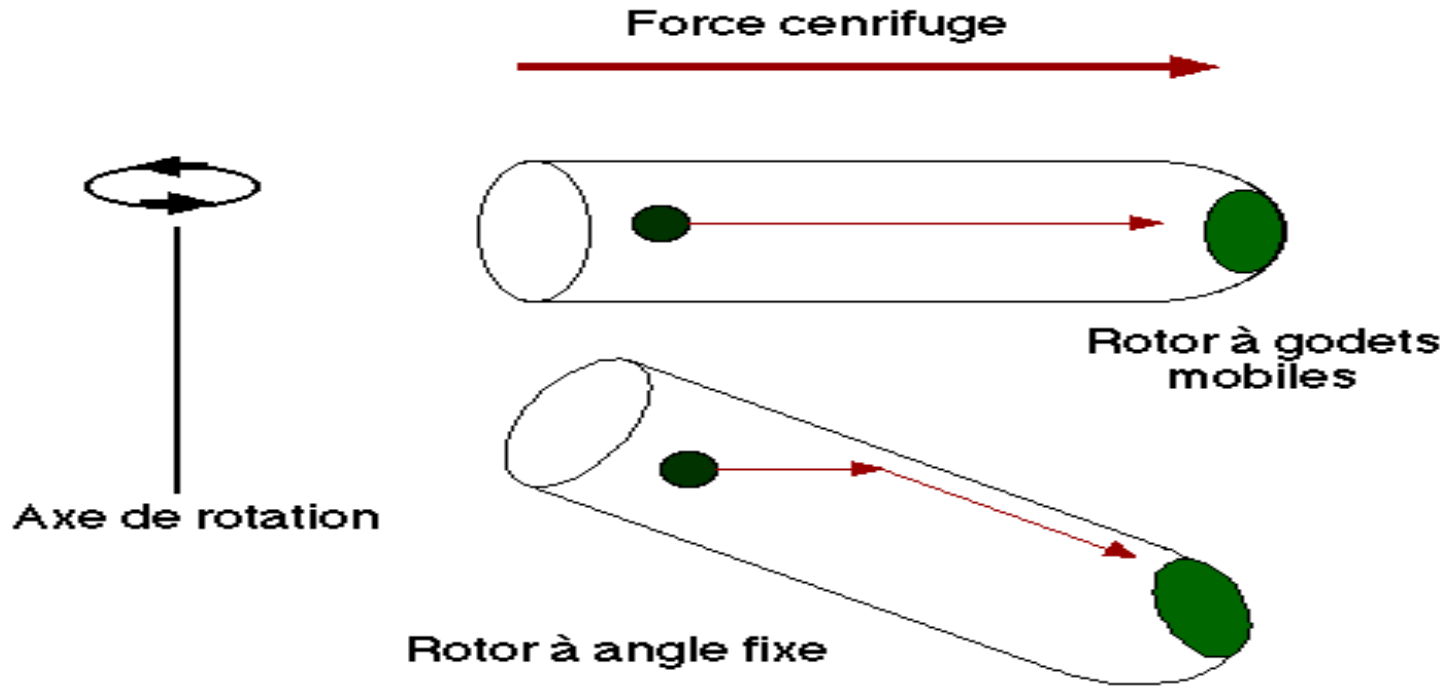
État du repos



au moment de la centrifugation

En rotation

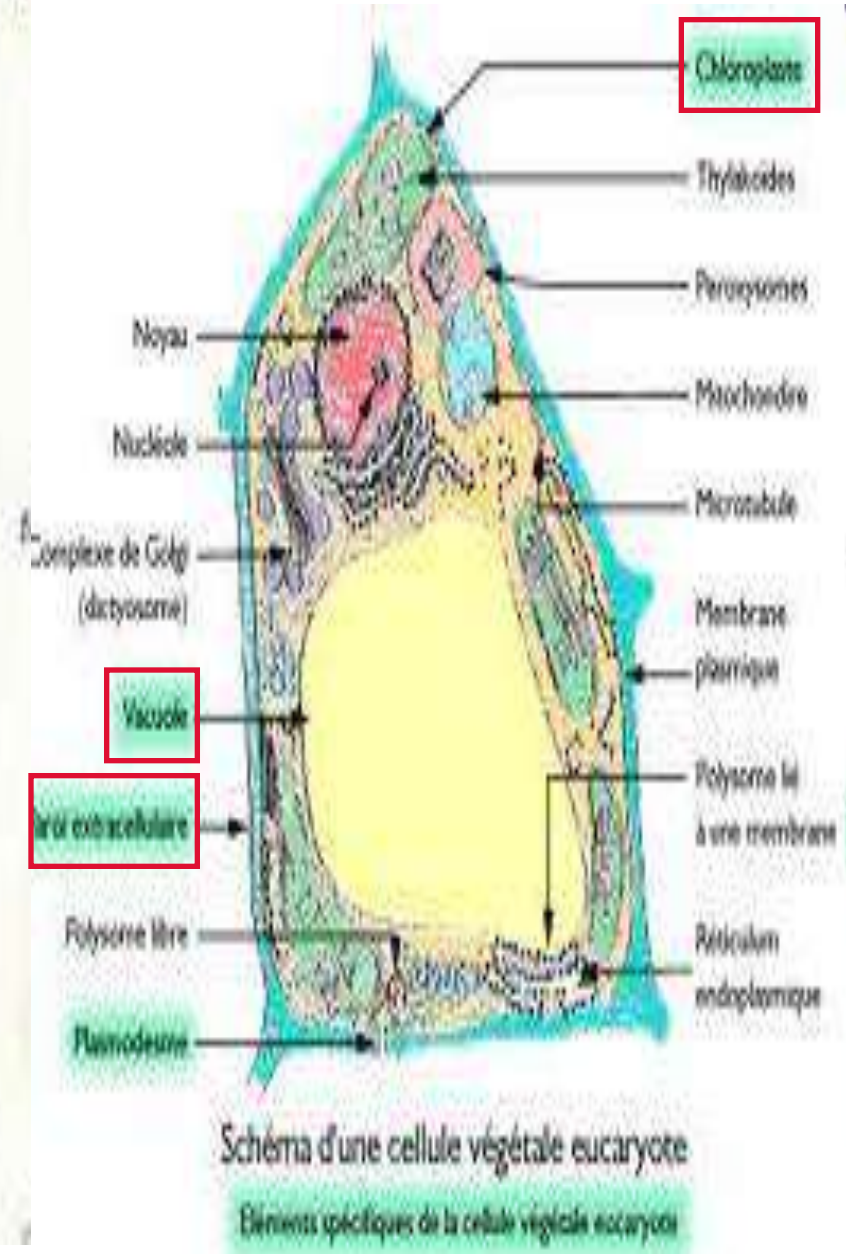
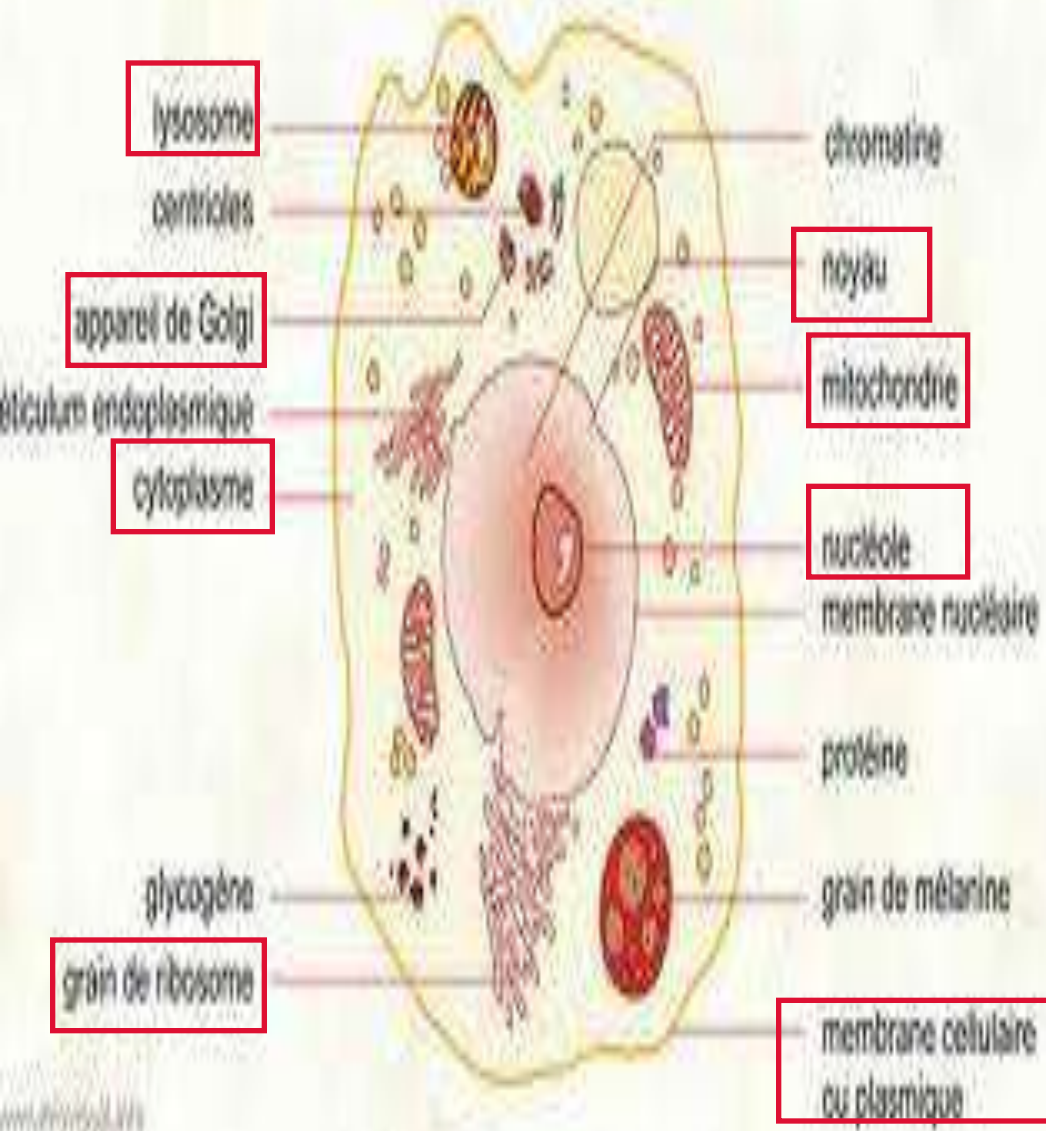
# Forces des Différents types de rotor



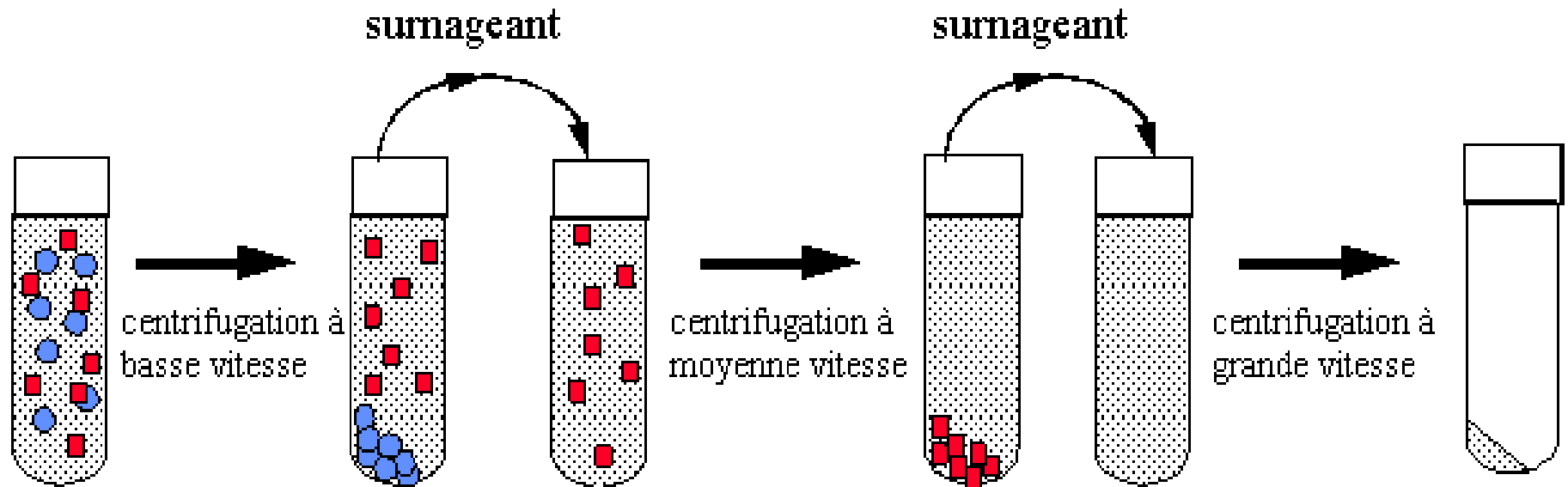
Sédimentation des particules (cercle noir) dans divers types de rotor



# CELLULE

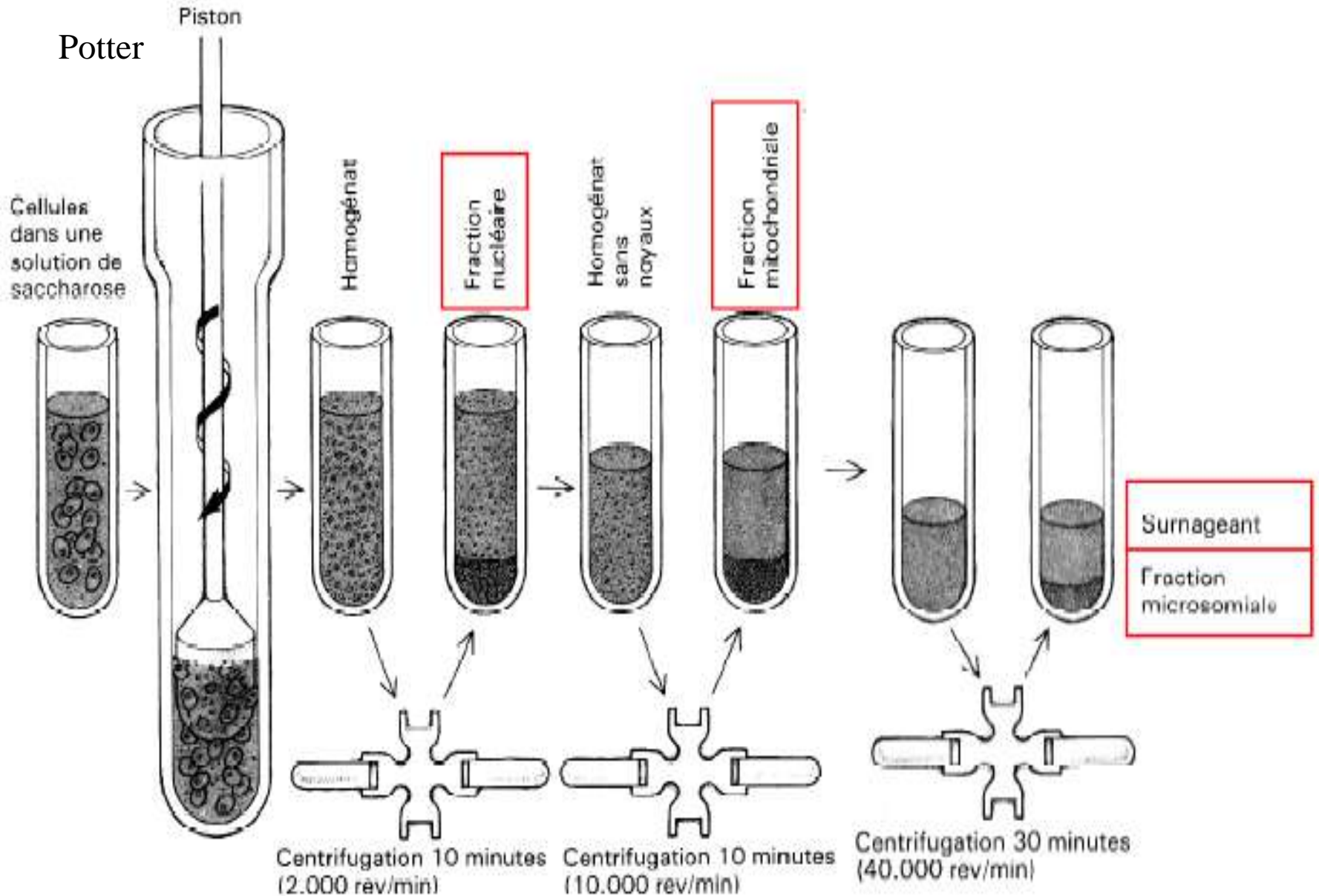


# Centrifugation différentielle



**Rotor à angle fixe**

# Fractionnement cellulaire



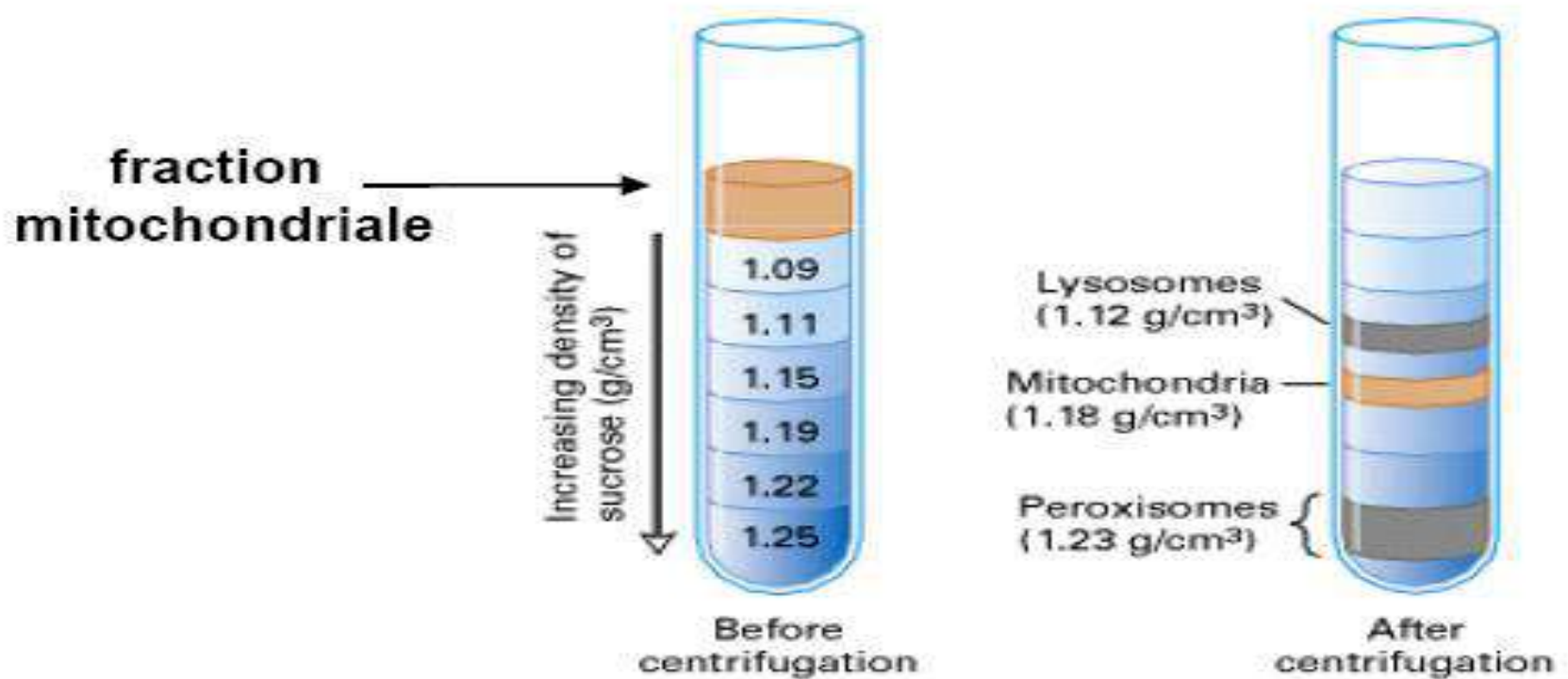


# Fractionnement cellulaire

Typiquement, on peut sédimenter les noyaux à 1-2000 xg durant 5-10 minutes. Les mitochondries et les chloroplastes tombent à environ 10-15000 xg durant 10-15 minutes. Les microsomes, petites vésicules produites lors de l'homogénéisation des compartiments membranaires comme le golgi ou le réticulum endoplasmique, peuvent sédimenter après une trentaine de minutes à cette vitesse. Les ribosomes sont obtenus à 100,000 xg après 1 ou 2 heures.

Le surnageant résiduel contient le matériel cytosolique. Il faut bien comprendre que la centrifugation différentielle ne donne que des préparations grossièrement purifiées.

# Fractionnement sur gradient de saccharose discontinu

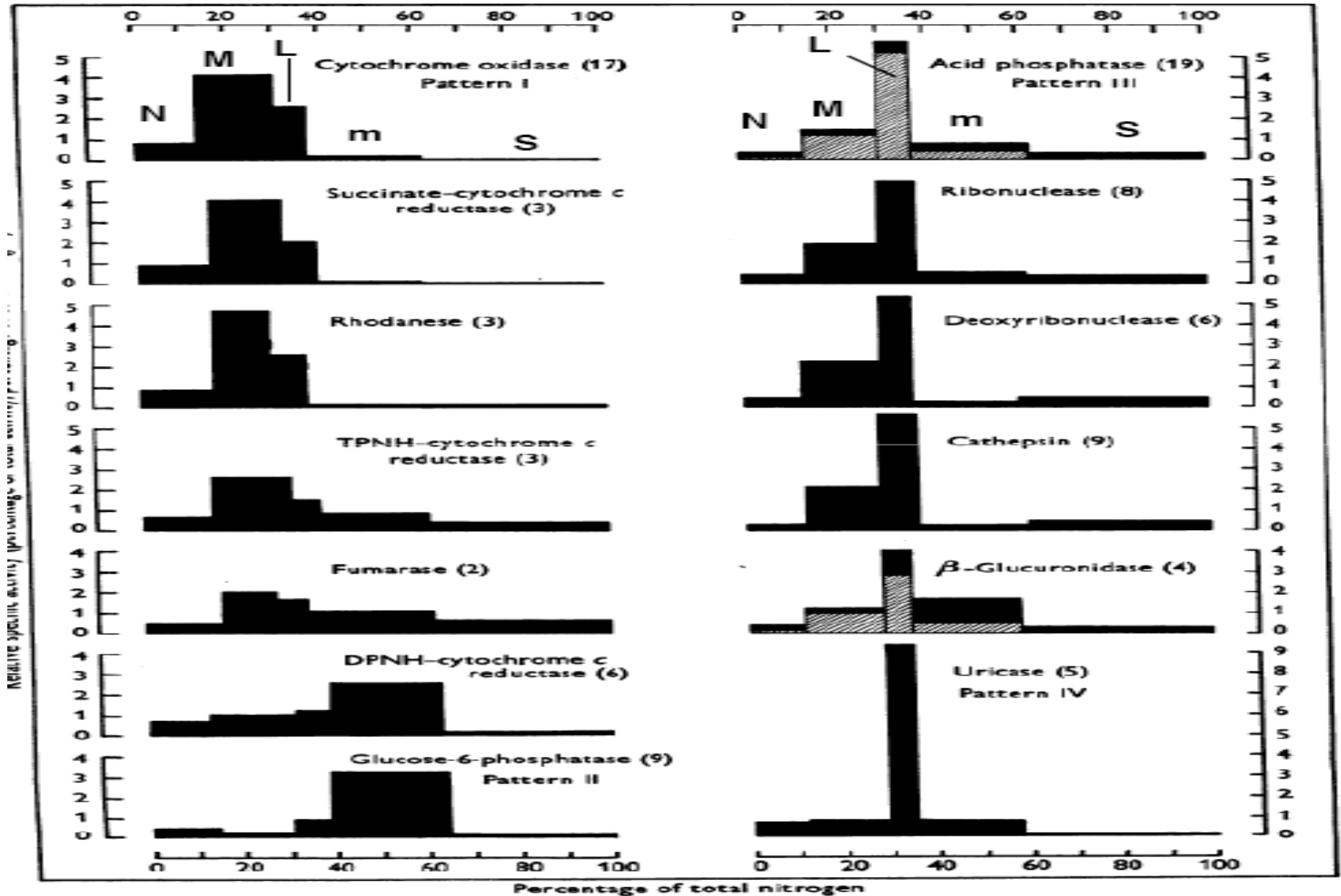


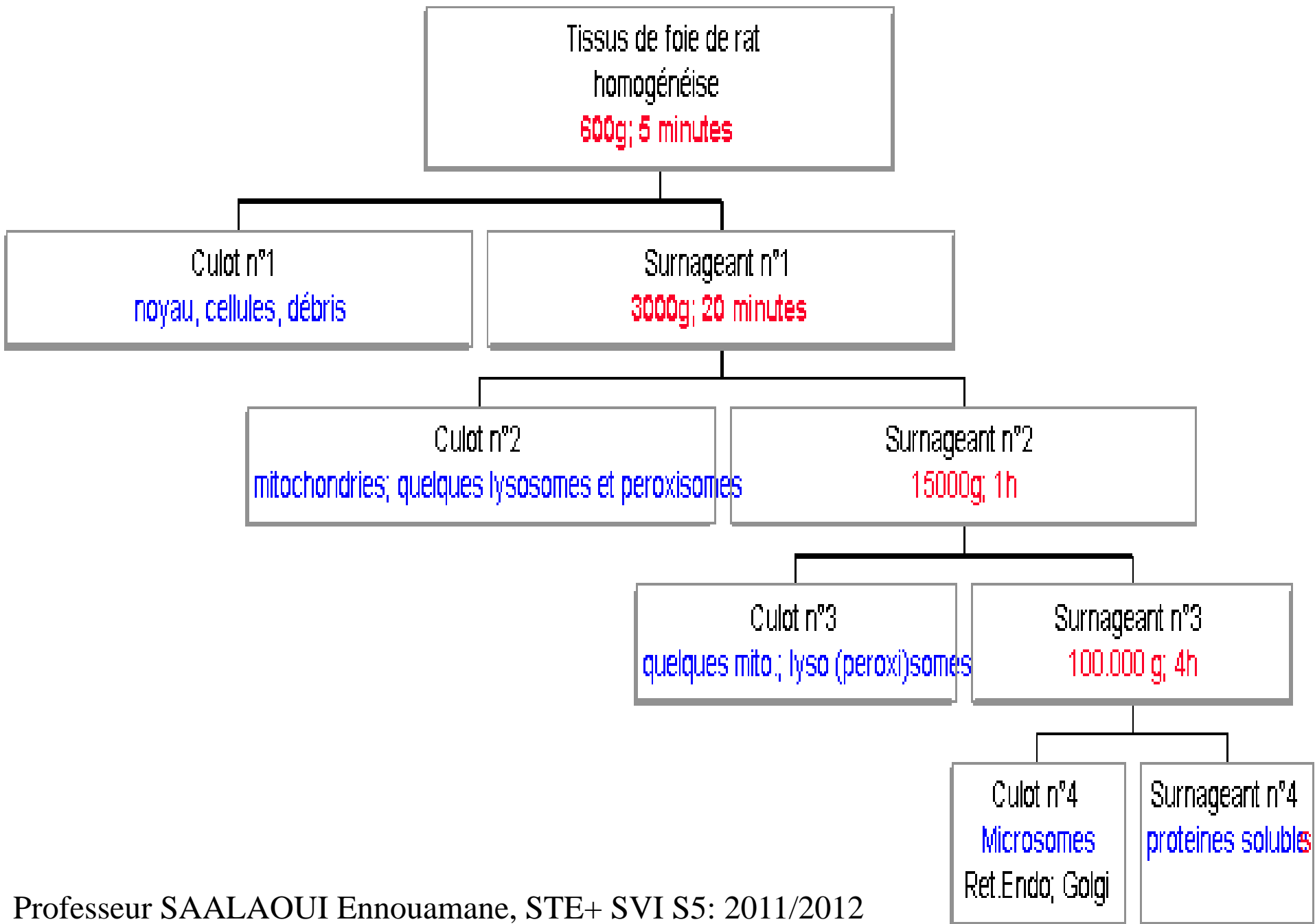
3h, 40.000 rpm

# Généralités

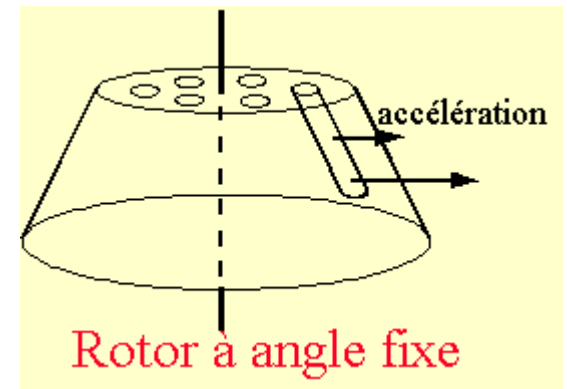
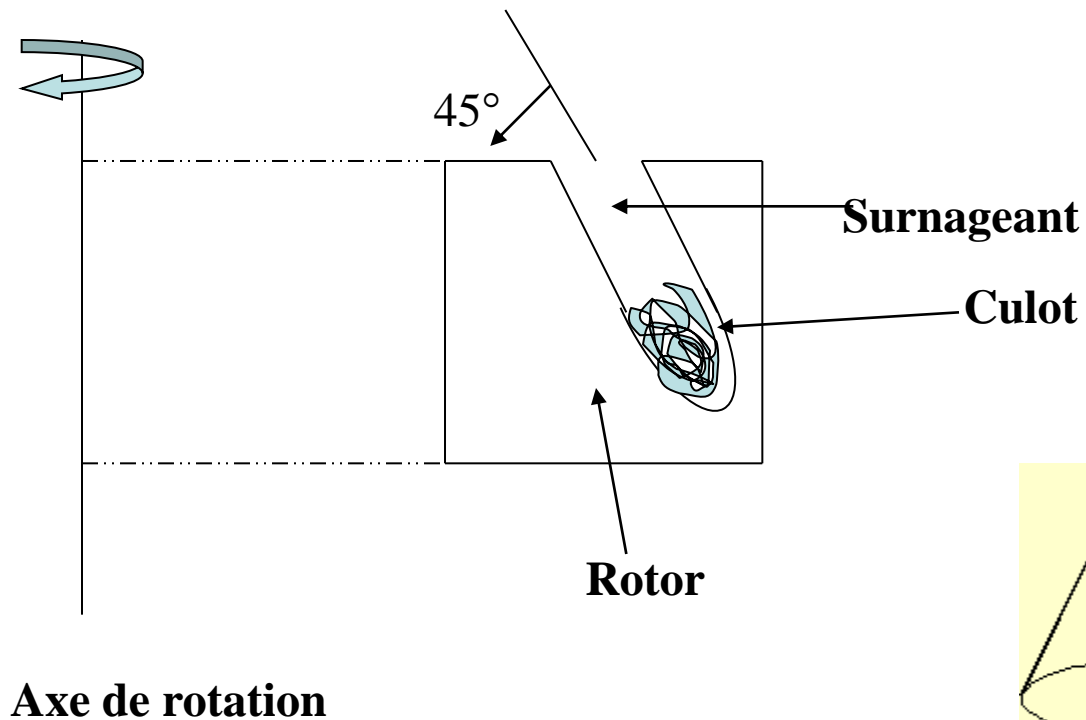
- **Le saccharose**
- **Le chlorure de césium (CsCl)**. D'autres sels de césium peuvent aussi être employés comme le  $\text{CsSO}_4$ .
- **Le Metrizamide**<sup>TM</sup> est un dérivé iodobenzamido du glucose. Il est très soluble et non chargé. Il permet d'atteindre des densités assez fortes de l'ordre de 1.46 et, principal avantage sur le saccharose, il est relativement peu visqueux.
- **Le Ficoll**<sup>TM</sup>, est un polymère de glucose l'épichlorohydrine
- **le Percoll**<sup>TM</sup>, Il s'agit ici de particules de gel de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone.

# Marqueurs enzymatiques des fractions cellulaires



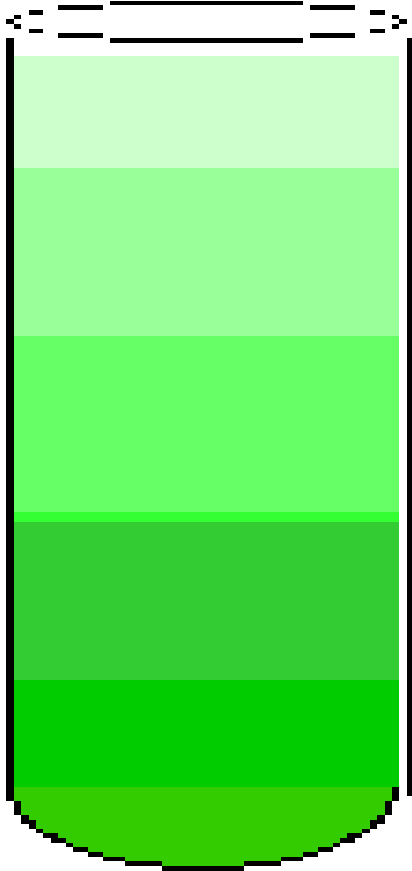


# Rotor oblique

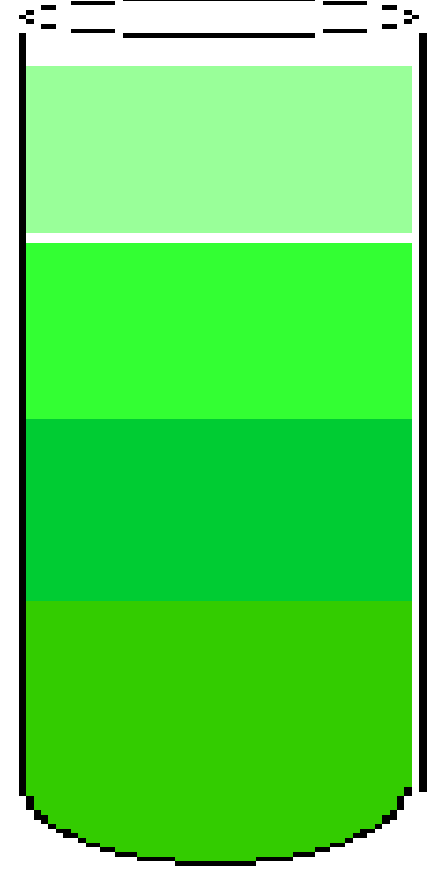


# Ultracentrifugation

- Particule en centrifugation aura un déplacement spécifique à tout instant et une concentration donnée en tout point de la cellule de mesure
- La mesure sera faite par:
  - Réfractométrie (déviation par le gradient de concentration)
  - Absorptiométrie (UV)



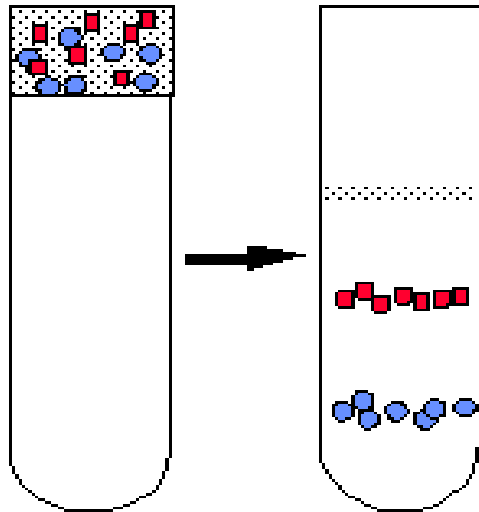
**gradient  
continu**



**gradient  
discontinu**



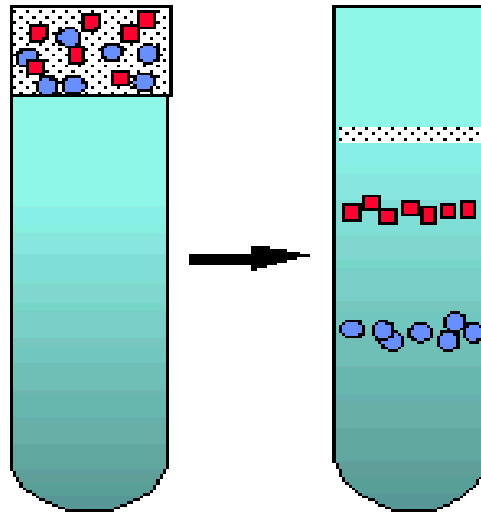
### Séparation en fonction de S



solvant homogène

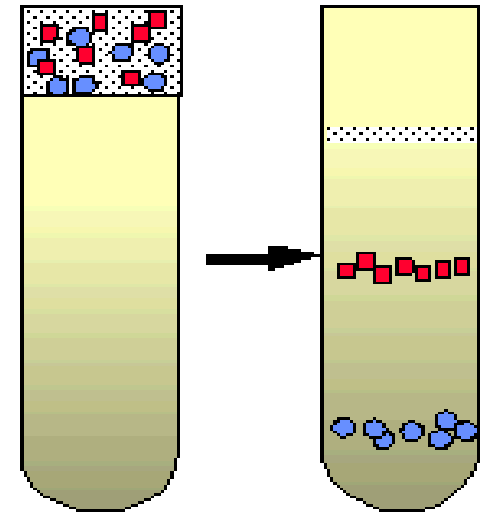
arrêt avant formation d'un culot

### Séparation en fonction de densité (isopycnique)



gradient de densité

### Séparation linéaire en fonction de S



gradient isocinétique

arrêt avant formation d'un culot

## Rotor à godets oscillants

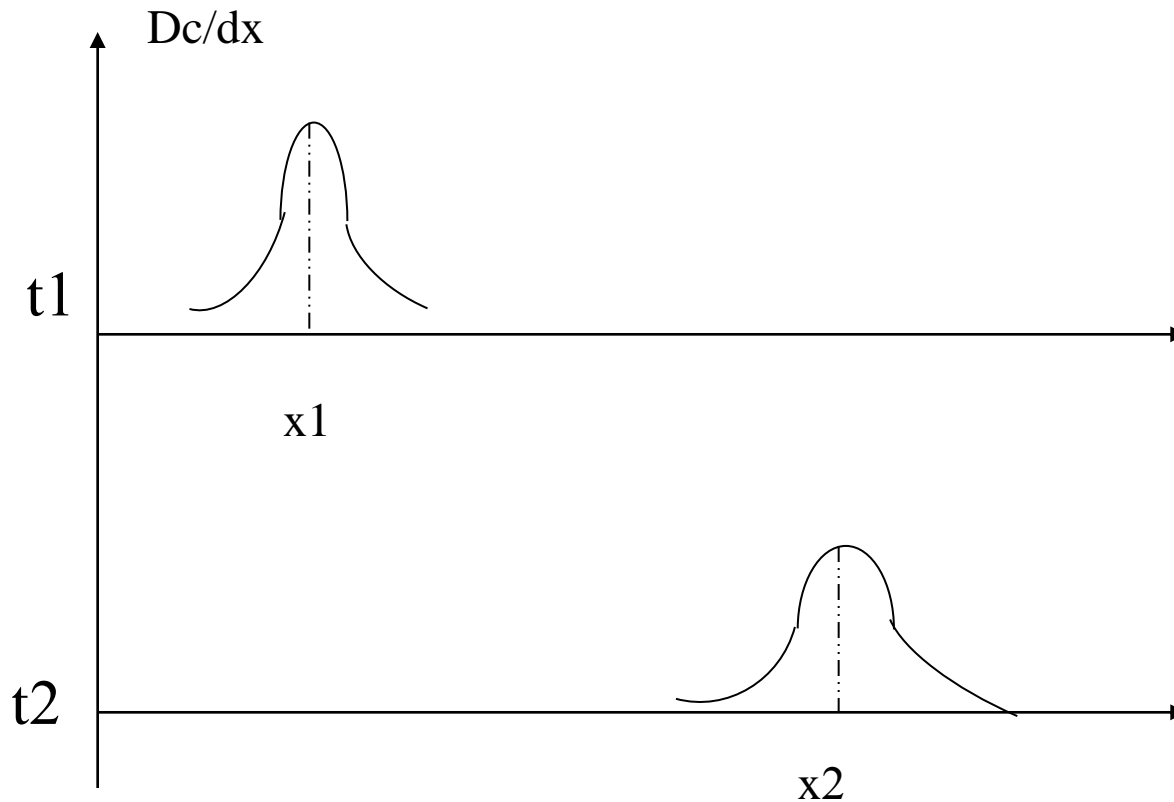
Le terme "isopycnique" uniquement aux gradients auto-générés. Cependant ce terme s'applique à tous les cas où on centrifuge à équilibre dans un gradient continu.

**Séparation zonale en gradient continu** : selon leur taille (Le gradient, dont la concentration maximale est moins dense que les particules, ne sert qu'à ralentir la sédimentation).

# Séparation des résumés

- la séparation des polyribosomes libres et membranaires du reste des fractions cellulaires.
- Une application classique de cette approche est l'analyse de la taille des polyribosomes,

# ultracentrifugation



La vitesse de sédimentation  $V = (x_2 - x_1) / (t_2 - t_1)$

# La diffusion

- Avec le temps la diffusion augmente et prend de l'ampleur qu'il ne faut pas négliger par rapport à la sédimentation
- Il finissent par s'annuler à l'équilibre et les particules ne se déplacent plus.
- Le facteur déterminant c'est la densité

# Gradient de densité

- A l'équilibre , la molécule se stabilise au niveau de sa densité
- On a des gradient continus
- On a des gradients discontinus
- On a des gradients isopicniques

# Conseils pour une centrifugation

- S'assurer que le dispositif de verrouillage est bien fermé;
- Équilibrer les tubes
- La rotation maximale
- Les tubes doivent être conformes et protégés

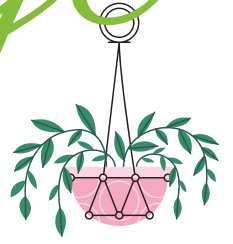
# Applications

- Constante de sédimentation
- La masse molaire d'une macromolécule
- Séparation de macromolécules
- Purification de macromolécules

- Une grande part des polluants déversés dans les eaux se retrouve dans les sédiments ; aussi a-t-on pu dire que ces derniers se comportent comme des indicateurs de pollution à mémoire, témoins du degré de pollution
- Les sédiments constituent donc un biotope privilégié pour rechercher l'état de pollution d'un écosystème aquatique.
- **Propriétés physiques et hydrauliques de sédiments marins en vue de réutilisation en remblais**



# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

### Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

