



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : **Licence en Toxicologie (L3)**
Matière: Techniques d'Analyse
Cours: **Centrifugation différentielle**



Principe de la technique

La centrifugation permet de séparer des constituants, de tailles et de masses très variables, contenus dans un liquide, des molécules ou même des cellules entières.

Les constituants de l'échantillon sont soumis à:

1. La force **de la gravité**, du haut vers le bas,
2. **La poussée d'Archimède**, force qui s'exerce du bas vers le haut

- Dans la cas de la figure 1, la **poussée d'Archimède** (1) et la **gravité** (2) sont faibles comparées à l'**agitation moléculaire** (3) .

- L'agitation de la molécule pourrait causer un mouvement de la particule, mais comme elle n'a pas de direction précise, la particule ne se déplace pas.

Durant la centrifugation les forces de la gravité et de la poussée d'Archimède deviennent **plus fortes**. Ayant une direction privilégiée, elles peuvent entraîner un mouvement des particules de l'échantillon

- Soit vers le haut, si la poussée d'Archimède est supérieure à la gravité
- Soit vers le bas dans le cas contraire

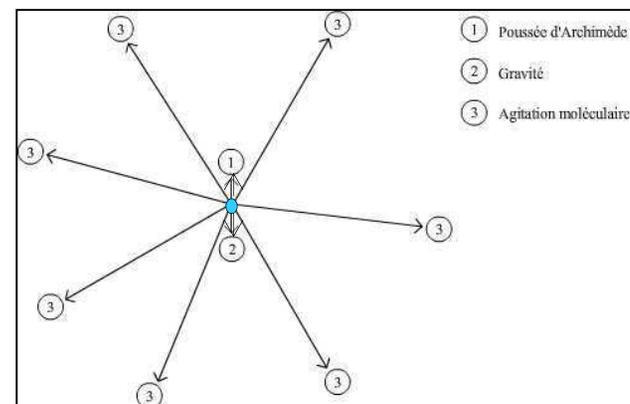


Figure 1 : Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide

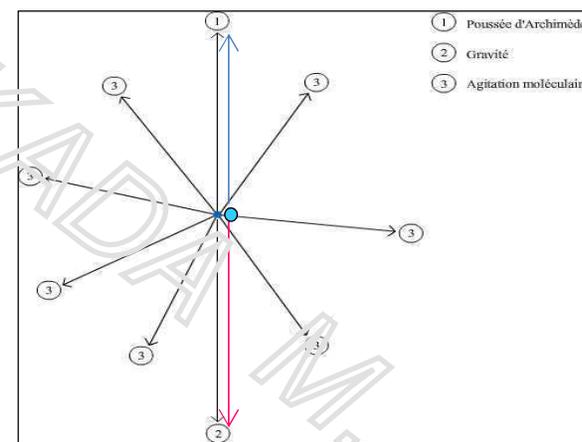


Figure 2 : Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à la centrifugation

- En faisant tourner l'échantillon, une autre force apparaît: la **force centrifuge**,
- C'est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation

Pour l'un ou plusieurs constituants de l'échantillon, l'accélération peut devenir plus forte que l'agitation moléculaire

- Cela entraîne la sédimentation vers le fond du récipient ou sa remontée.

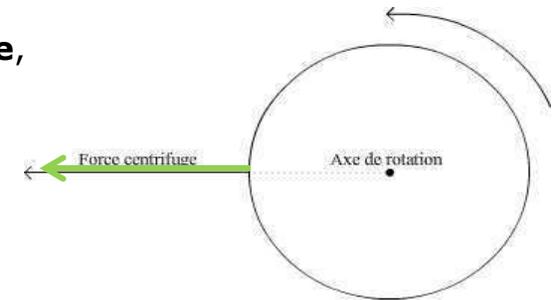


Figure 3 : La force centrifuge

Le matériel

Une centrifugeuse est une machine équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte.

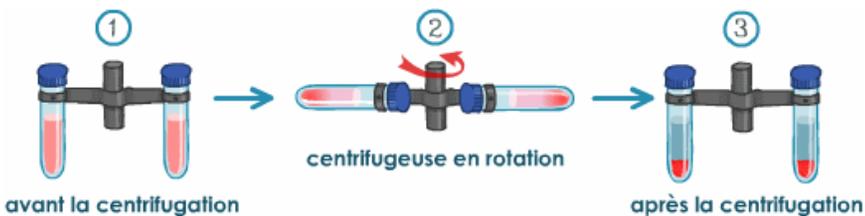
Les centrifugeuses de paillasse ont une vitesse de rotation et un temps d'utilisation limités.

En tournant, l'échantillon chauffe.

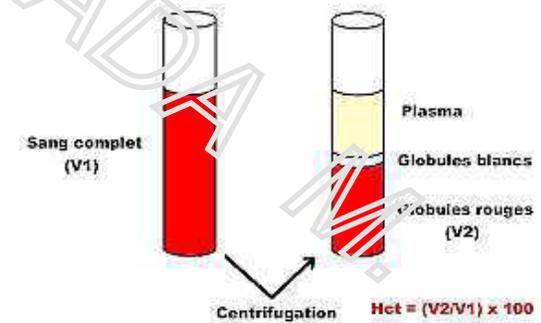
Il faut empêcher cet échauffement grâce à des centrifugeuse réfrigérée et soumises à un vide poussé pour éviter les frottements.



Centrifugeuse de paillasse



Étapes de la centrifugation



Centrifugation du sang

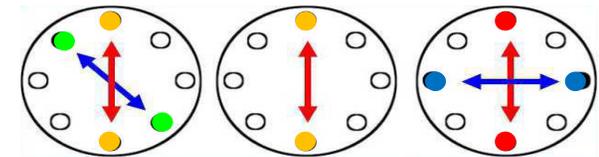
Conditions de sédimentation pour quelques constituants cellulaire

• Noyau	10 minutes à 500 g
• Mitochondries, lysosomes, peroxysomes	10 minutes à 5000 g
• Réticulum endoplasmique, Appareil de Golgi	1 heure à 100 000 g

N'oublions pas !! un rotor qui tourne à haute vitesse (jusqu'à 100 000 rpm) à une grande énergie cinétique. Il peut donc causer **d'importants dégâts** s'il se brise pendant qu'il tourne.

Un rotor doit être **parfaitement équilibré**, c'est à dire que la **masse** en chaque point doit être idéalement identique à celle du point symétrique par rapport à l'axe de rotation.

- L'enceinte de la centrifugeuse est blindée.
- Les normes actuelles imposent qu'un rotor se détachant de son axe à pleine vitesse de rotation doit rester confiné dans l'enceinte de la centrifugeuse.



Équilibrage du rotor de centrifugeuse



La centrifugation différentielle:

Son principe est de séparer les différents constituants à l'aide de **plusieurs cycles de centrifugation**, à accélération croissante.

- Dans une première centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter (ex. cellules) 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 vont rester dans la fraction liquide (surnageant).

-On récupère alors séparément le surnageant, pour recommencer un second cycle de centrifugation avec, mais avec une accélération plus importante.

Progressivement, on sépare les différents constituants en terminant par les éléments les plus petits et ayant le moins de différence de densité avec le solvant.

Les fractions obtenues ne sont pas pures, puisque les échantillons biologiques sont complexes (ex. broyat total d'un tissu).