

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

II.2. Dialyse et électrodialyse

II.3. Sédimentation Centrifugation et ultracentrifugation

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

II.2. Dialyse et électrodialyse

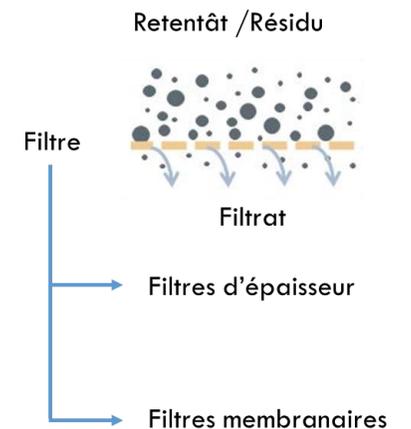
II.3. Sédimentation Centrifugation et ultracentrifugation

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Définition

- Procédé de séparation sans changement d'état : ne modifie pas la nature chimique des phases séparées
- Sépare les constituants d'une dispersion possédant une phase liquide et une ou plusieurs phases dispersées (liquide, solide ou gaz) au travers d'un milieu poreux
- Elle s'appuie sur l'interposition d'une barrière ou médium filtrant / module de filtration
- La filtration est régie par l'action du
 - gradient de pression
 - gradient de concentration
- La filtration est caractérisée par :
 - Echelles de taille de séparation
 - Modes d'écoulement du produit



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Matériel de filtration

Filtres d'épaisseur

- Constitués de matériaux de fibres ou de canalicules qui doivent être insolubles, inertes physiquement et chimiquement
- Matériaux :
 - **Papiers** : de cellulose (papier Whatman) diffèrent par leur forme, leur texture, leur porosité, leur pureté
Inconvénients : pores se bouchent assez rapidement / débit très lent / capacité de rétention réduite
 - **Textiles** : gaze, laine, coton
 - **Fibres** : laine de verre
 - **Terre d'infusion** : argile, célide (kieselguhr) et porcelaine
 - **Matériel fritté** : verre fritté obtenu par compression à température contrôlée de micro-bille de verre
Avantages : pores se bouchent lentement / bon débit / capacité de rétention plus grande
- Inconvénient à l'utilisation
- **Le colmatage** : pénétration de particules dans les interstices du matériau filtrant → Ajout d'adjuvants de filtration
- **L'adsorption** : rétention de certains produits sur les filtres → Nécessité d'agitation

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Matériel de filtration

Filtres membranaires / Membranes filtrantes

- Membranes inertes chimique
- Constitués de cellulose, d'acétate de cellulose, de nitrate de cellulose ou de téflon
- Diamètre des pores est faible :
 - de 5 à 35 nm pour ultrafiltration
 - de 0,1 à 8 μm pour la microfiltration
- Filtration rapide malgré le faible diamètre des pores :
 - faible épaisseur des membranes
 - forte densité de pores part de l'ordre de 10^{10} pores/cm²
- Membranes constituée que par 15 à 35% de la matière, le reste est occupé par des pores (65-85%)
- Membranes à caractère hydrophobe ce qui permet de les sécher rapidement à poids constant

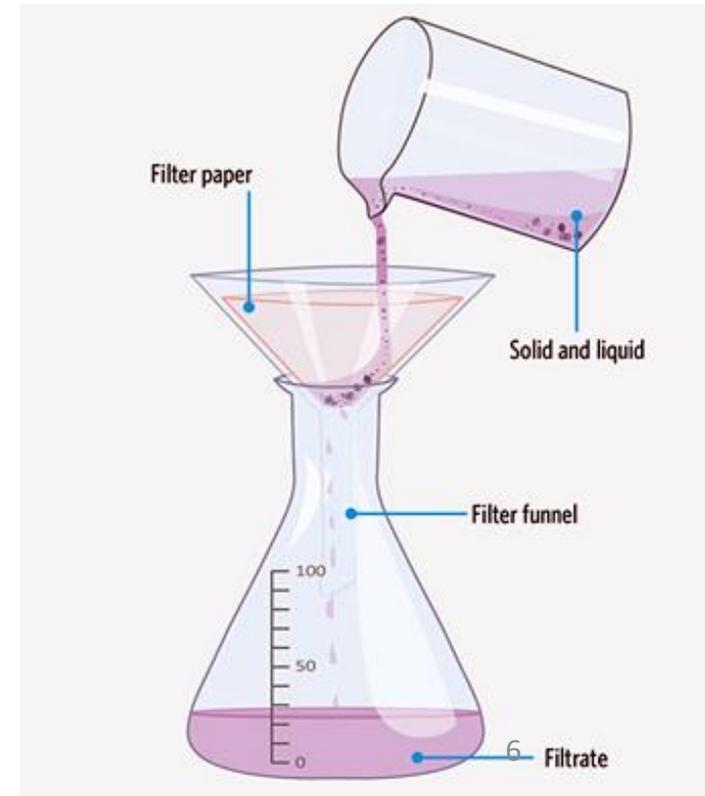
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Méthodes de filtration

Filtration gravimétrique

- 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 papiers sont appliqués avec soin contre l'entonnoir (avec humidification)



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

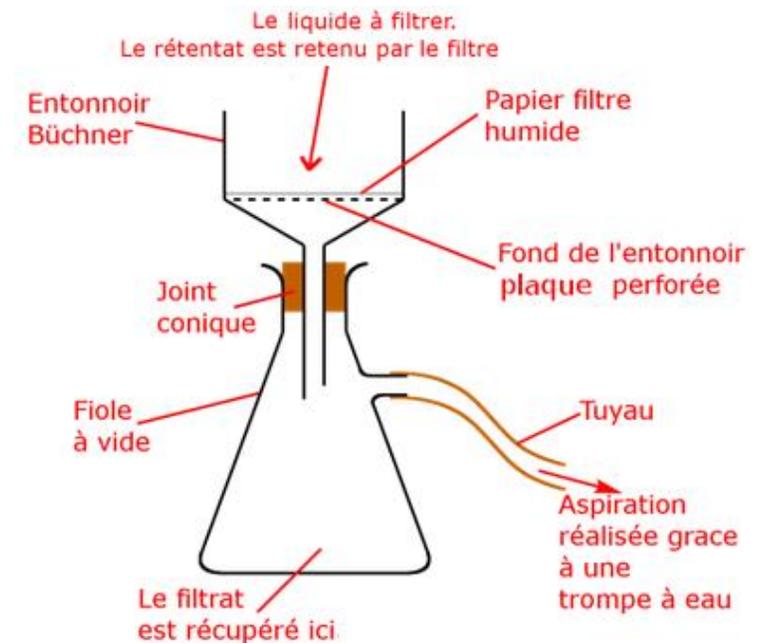
Méthodes de filtration

Filtration sous vide

- La dépression est créée en aval du matériau filtre : effet d'aspiration
- Mode de filtration utilisé pour les verres frités et les membranes filtrantes

Dispositif de Büchner

- Entonnoir à fond plat perforé (verre / porcelaine) qui supporte le filtre
- Entonnoir installé sur une fiole à suction muni d'un bras sur lequel une trompe à eau/pompe à vide est branchée
- Application du vide
- Le filtrat ou le filtre est recueilli



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Méthodes de filtration

Filtration sous vide

- La dépression est créée en aval du matériau filtre : effet d'aspiration
- Mode de filtration utilisé pour les verres frites et les membranes filtrantes

Dispositif Millipore

- Dispositif constitué d'une base destinée à supporter le filtre
- Un réservoir supérieur destiné à contenir la solution à filtrer
- Les deux pièces fixées ensemble de façon hermétique
- Application du vide
- Le filtrat ou le filtre est recueilli



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Méthodes de filtration

Filtration sous pression

- Dispositif constitué de deux pièces plastiques (capsule et seringue) que l'on visse l'une sur l'autre enserrant un filtre membranaire
- Filtration de petit volume poussé dans la capsule avec une seringue
- Au laboratoire, elle est adaptée à la microfiltration stérilisante
- Evite le moussage et l'évaporation du solvant



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Types de filtration

Selon le mode d'écoulement du liquide à filtrer

Filtration frontale

Filtration tangentielle

Selon la taille de diamètre des pores

Microfiltration

Ultrafiltration

Nanofiltration

Osmose inverse

II.1. Filtration

Types de filtration

Filtration frontale (*dead-end filtration*)

- Procédé simple à mettre en œuvre et peu coûteux
- Consiste à faire passer le fluide à épurer perpendiculairement à la surface du filtre
- La matière entrant dans le module de filtration est donc retenue par la membrane
- Limitée par l'accumulation progressive des particules à la surface du filtre
 - Colmatage progressif
 - Débit de filtration limité/arrêté
- Cette filtration est employée pour filtrer des suspensions peu chargées en particules
- Cette filtration n'atteint jamais un état stationnaire, car il nécessite une succession de filtrations et de nettoyages/remplacements du filtre

II.1. Filtration

Types de filtration

Filtration tangentielle (cross-flow filtration)

- Le fluide circule parallèlement à la membrane filtrante qu'il traverse sous l'effet de la pression
- Cisaillement, créé par la circulation tangentielle du fluide, s'oppose au dépôt des particules sur la surface membranaire
- Résistance à l'écoulement et colmatage des membranes sont minimales
- Permet de filtrer (avec un seuil de coupure très bas) des liquides relativement chargés en particules sans perte de charge → Maintien de qualité de filtration constante tout au long de l'opération
- La filtration tangentielle peut s'utiliser de deux manières:
 - Filtrer la solution en éliminant les particules les plus grosses : on s'intéresse au perméat
 - Éliminer du fluide les particules les plus petites : on s'intéresse au rétentat
 - Valoriser les 2 fractions, si elles présentent toutes deux un intérêt industriel

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Selon le mode d'écoulement du liquide à filtrer

Filtration frontale

Filtration tangentielle

Selon la taille de diamètre des pores

Microfiltration

Ultrafiltration

Nanofiltration

Osmose inverse

II.1. Filtration

Types de filtration

Microfiltration tangentielle/ Ultrafiltration / Nanofiltration/ Osmose inverse

- Procédés de séparation en phase liquide par perméation à travers des membranes permselectives sous l'action d'un gradient de pression
- Une membrane permselective : une barrière qui permet certains transferts de matière entre deux milieux qu'elle sépare et qui en interdit d'autres ou, qui en favorise certains par rapport à d'autres

Filtration conventionnelle : diamètre $> 10\mu\text{m}$

Microfiltration tangentielle MFT : diamètre des pores compris entre 0,1 à $10\mu\text{m}$

Ultrafiltration UF : diamètre des pores compris entre 1 à 100nm

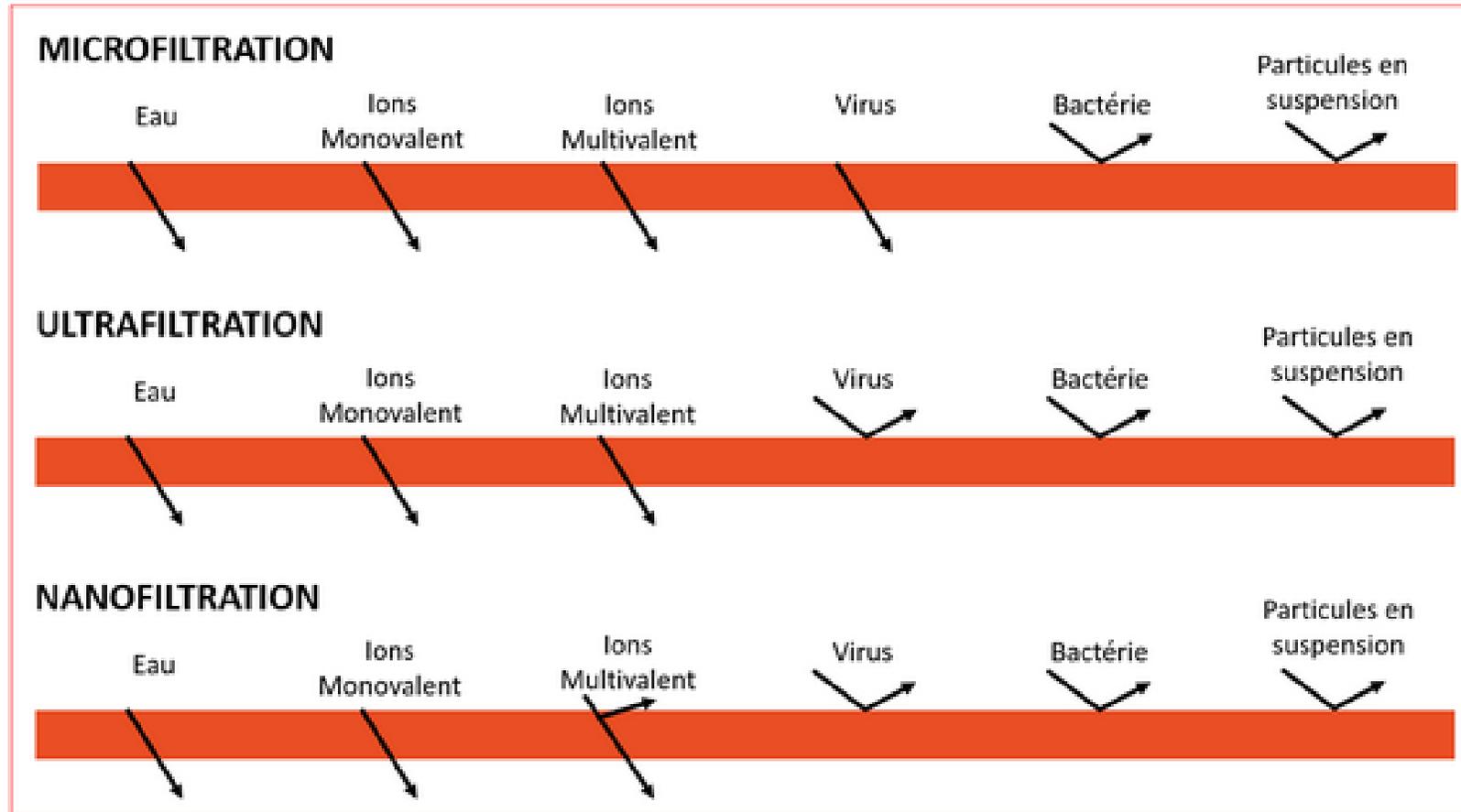
Nanofiltration NF : 1 nm

Osmose inverse OI : diamètre des pores compris entre 0,1 à 1 nm

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Types de filtration

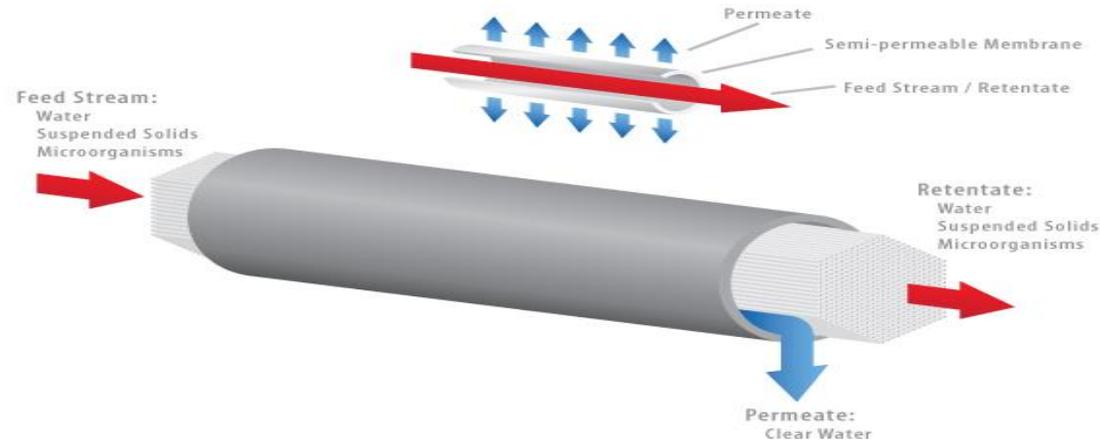


Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Types de filtration

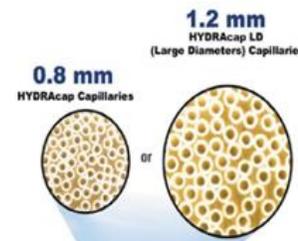
Microfiltration tangentielle MFT



- Procédé de séparation solide-liquide avec des membranes de diamètres de pores compris entre 0,1 et 10 μm
- Rétention des particules en suspension, des bactéries
- Rétention des colloïdes et de certains ions après leur fixation sur des plus grosses particules (complexation)
- Nette différence entre UF et MFT:
 - MFT sépare solide-liquide
 - UF fonctionne en phase liquide homogène



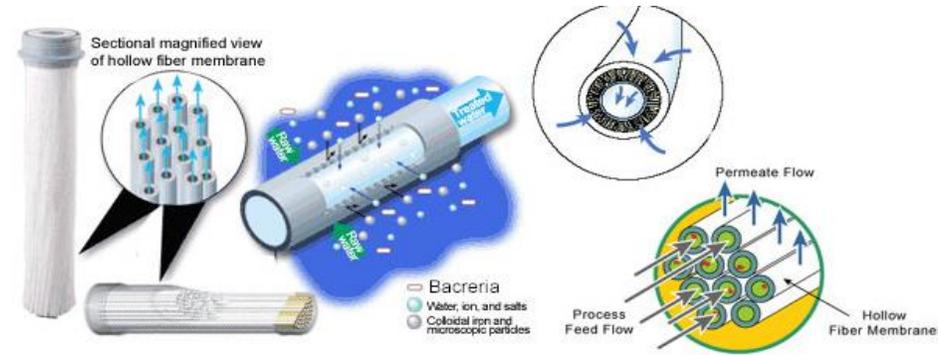
Chapitre II: Méthodes de fractionnement



II.1. Filtration

Types de filtration

Ultrafiltration UF



- Cette technique utilise des membranes microporeuses dont les diamètres de pores sont compris entre 1 et 100 nm
- UF fonctionne en phase liquide homogène
- Rétention des molécules de masse molaire élevée (polymères, protéines, colloïdes)
- Laisse passer les petites molécules (eau, sels)

Applications industrielles

- Concentration de solutions macromoléculaires (protéines, polysaccharides, polymères variés)
- Élimination de macrosolutés présents dans les effluents ou dans l'eau à usage domestique, industriel (électronique) ou médical
- Clarification de moût de fermentation pour l'extraction de produits actifs pharmaceutiques

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Types de filtration

Nanofiltration NF

- Technique séparative à membranes permettant la rétention de composés ayant une taille en solution proche du nanomètre (10 Å)
- Laisse passer les sels ionisés monovalents et les composés organiques non ionisés (< 300 g/mol)
- Rétention des sels ionisés multivalents (calcium, magnésium, aluminium, sulfates...) et les composés organiques non ionisés (> 300 g/mol)
- Mécanismes de transfert sont intermédiaires entre ceux de l'OI et ceux de l'UF

Applications

- Déminéralisation sélective (adoucissement des eaux)
- Concentration de composés organiques de faible masse molaire (antibiotiques)

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Types de filtration

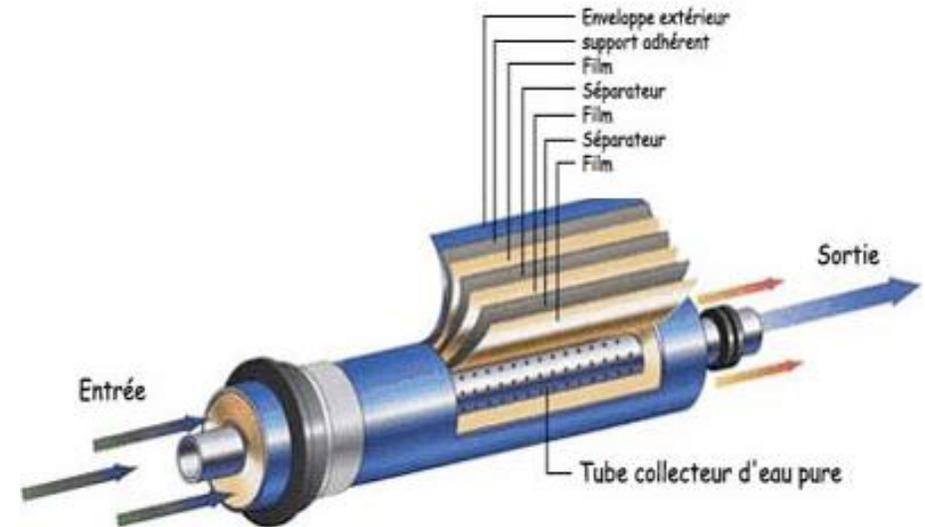
Osmose inverse OI (*Reverse osmosis*)

- Technique utilisant des membranes denses
- Laisse passer le solvant (eau)
- Rétention de tous les solutés, y compris les sels

Applications

typiquement utilisée pour :

- la déminéralisation des eaux (dessalement de l'eau de mer et des eaux saumâtres, production d'eau ultrapure)
- la concentration de solutions (concentration de jus de fruits par exemple)



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

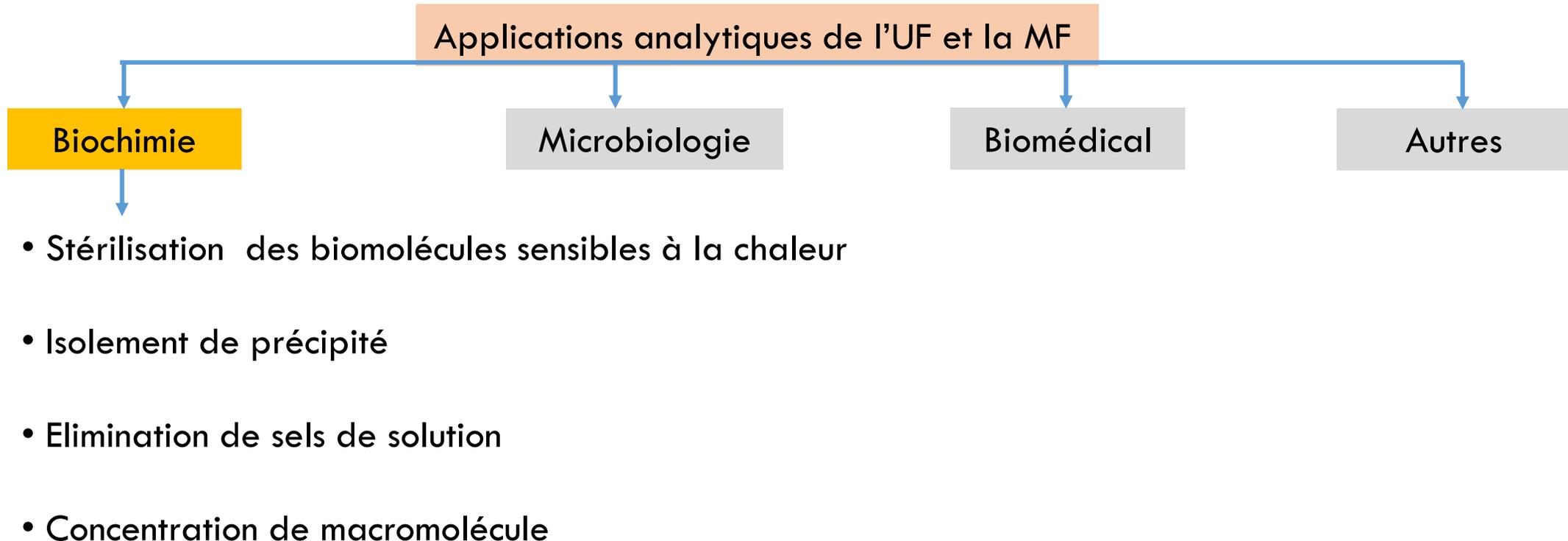
Application



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

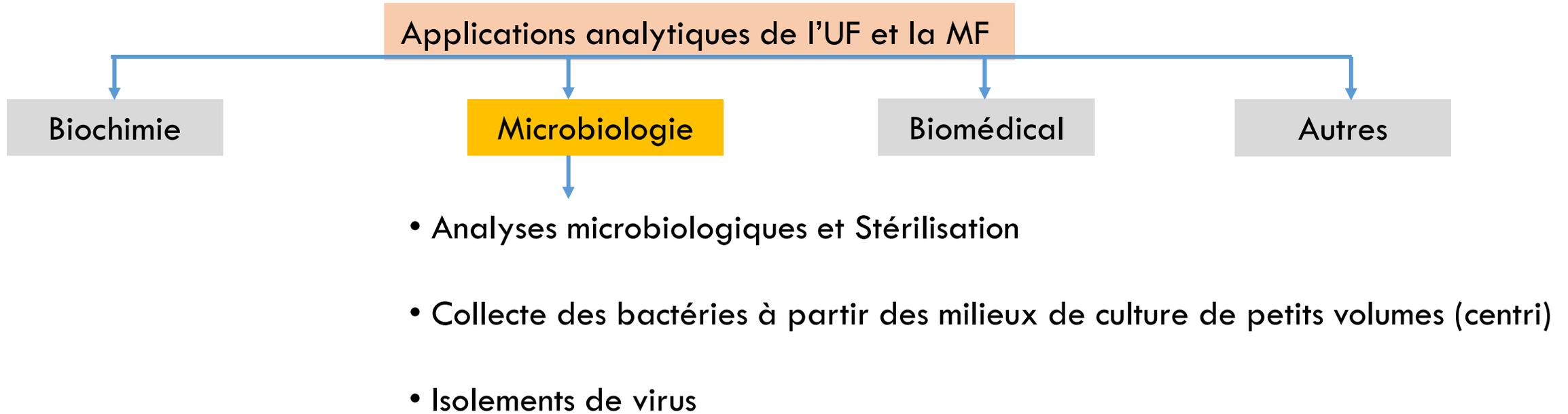
Application



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

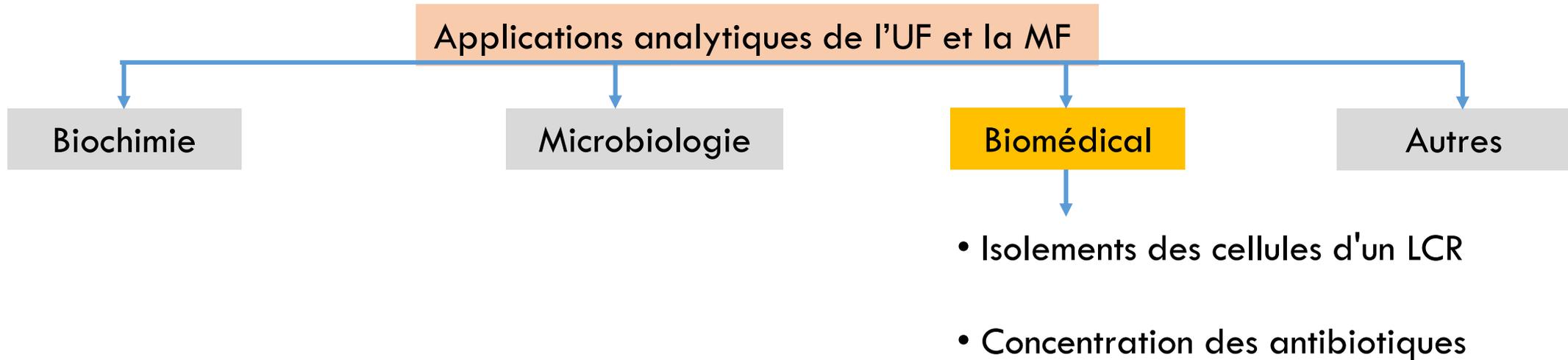
Application



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

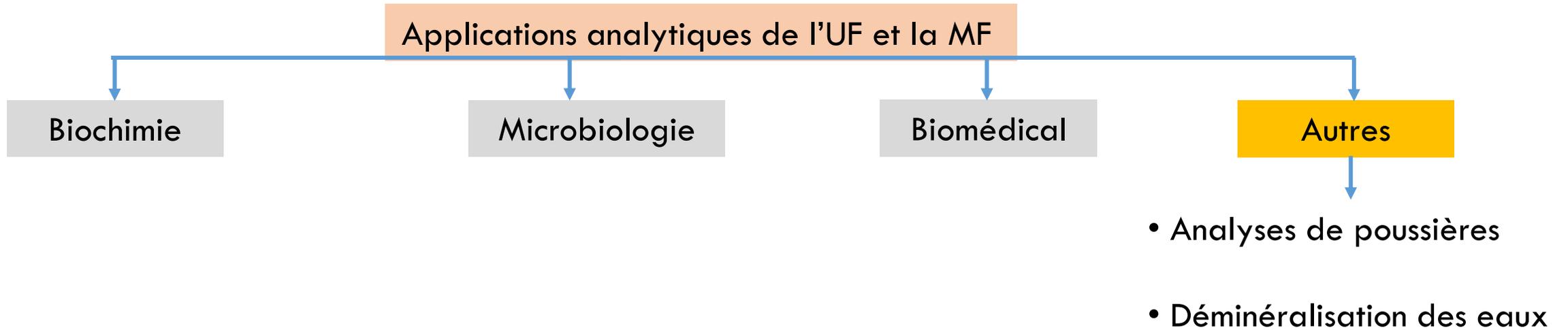
Application



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

Application



Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

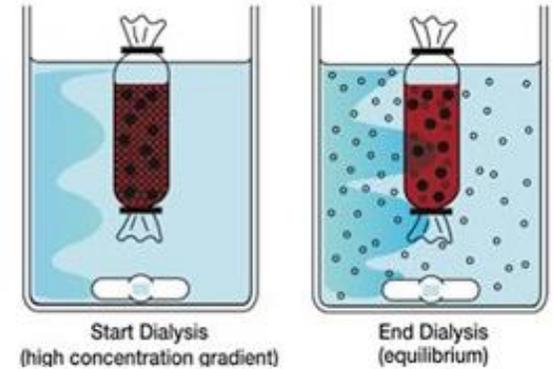
II.2. Dialyse et électrodialyse

II.3. Sédimentation Centrifugation et ultracentrifugation

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

Définition



- La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leurs capacités respectives à franchir les pores d'une membrane semi-perméable → membrane de dialyse
- Elle concerne :
 - des macromolécules (protéines, ADN, polymères synthétiques, anticorps)
 - des molécules biologiques plus petites (oligonucleotides et peptides)
- Les membranes de dialyse habituellement utilisé en biochimie se présente sous forme de cylindre allongés fermé aux deux extrémités → boudin de dialyse
- Il contient du liquide à dialyse et placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse → liquide de contre dialyse

II.2. Dialyse Electro dialyse

Appareillage/ Méthode de dialyse

- Une membrane de dialyse ne doit ne doit pas être chargée électriquement afin de minimiser les phénomènes parasite (répulsion par charge identique ou adsorption sur la membrane du produit à dialyse)
- Utilisation de cellulose modifiée de type Visking ou spectra/por
- Transparente/opaque, rigide/souple
- Large gamme de dimensions et de seuil de coupure (taille maximale des molécules pouvant passer la membrane entre 1000 et 60000 Da)



II.2. Dialyse Electro dialyse

Appareillage/ Méthode de dialyse

Préparation des membranes de dialyse

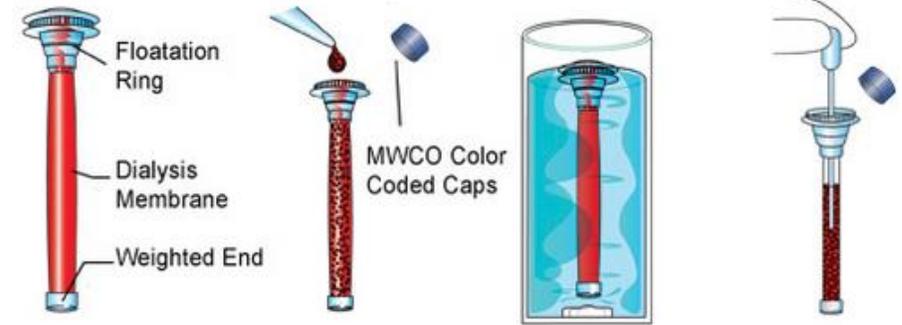
- Les membranes de dialyse peuvent contenir de la glycérine, des composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer par trempage
- méthode usuelle : placer successivement les membranes
 - 1h dans un mélange à volume égal d'éthanol et d'eau
 - 1 h dans une solution de bicarbonate de sodium 10 mM
 - 1h dans une solution diluée d'EDTA (chélateur de métaux lourds)
 - 2h dans de l'eau distillée
- Actuellement les membrane de dialyse se présente sous forme prétraitée
- La membrane préparé peut-être conserver à +4°C pendant 2 à 3 jours dans l'eau
- Si le délai de conservation est plus long → ajouter un inhibiteur de pousse bactérienne (azoture de sodium) si
- Avant utilisation, rincer la membrane avec le solvant utilisé pour la dialyse

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

Appareillage/ Méthode de dialyse

Préparation du boudin de dialyse



- Le boudin de dialyse doit être fermé à ses deux extrémités (nœuds ou pince lestée)
- Le boudin est lesté dans le liquide de contre-dialyse afin de l'immerger complètement
- Eviter que le boudin ne flotte à la surface du liquide de contre-dialyse
 - diminuer la surface de contact
 - provoquer ainsi une diminution de la vitesse de dialyse
- Assurer une agitation du liquide de contre-dialyse afin d'éviter la formation de gradient de concentration des substances diffusible autour du boudin (utile lorsque le volume du liquide de contre dialyse est important)
- le liquide de contre dialyse doit être renouvelé fréquemment afin d'accélérer la disparition dans le boudin des substances diffusible → Dialyse extensive

II.2. Dialyse Electrodialyse

Appareillage/ Méthode de dialyse

Montage spéciaux : Dialyse en flux continu

- Dialyse sur grand volume → utiliser un système à flux continu
- Le liquide à dialyser passe au contact du liquide de contre-dialyse dont il n'est séparés que par une membrane
- La dialyse effectué sur une grande surface
- Le liquide de contre-dialyse est renouvelé en permanence
Le liquide de dialyse repasse sans cesse dans le système grâce à une pompe péristaltique
- Principe utilisé en dialyse médicale

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electro dialyse

Appareillage/ Méthode de dialyse

Montage spéciaux : Microdialyse

- Dialyse sur petit volume jusqu'à 300 μ l
- Différente formes (capillaires, tubes, plaques)
- Il existe aussi des appareils de microdialyse permettant de dialyser plusieurs échantillons en parallèle (contre le même tampon de contre-dialyse) et pour des volumes qui peuvent être inférieur à 50 μ l



II.2. Dialyse Electrodialyse

Facteurs influençant la dialyse

Plusieurs facteurs importants peuvent influencer considérablement sur la vitesse de dialyse :

- L'épaisseur de la membrane
- Le rapport surface de la membrane/volume de solution à dialyser
- La température

II.2. Dialyse Electrodialyse

Avantages et inconvénients

Avantages

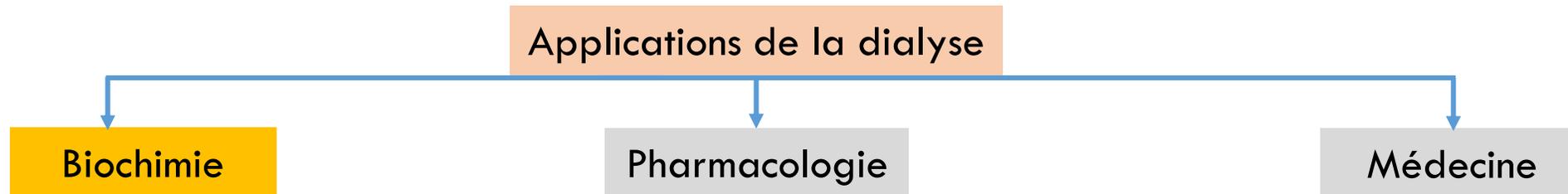
- Technique peu coûteuse
- Conditions douce
- Dispositif prêt à l'emploi
- Grande variété de dispositifs disponibles
- Manipulation reproductible grâce au multi dialyseur
- Grande vitesse de dialyse avec de récents dispositifs

Inconvénient

- Temps d'attente de l'équilibre souvent lent
- Les métaux lourds, glycérine, composés sulfurés dans certainement membranes

II.2. Dialyse Electrodialyse

Application de la dialyse

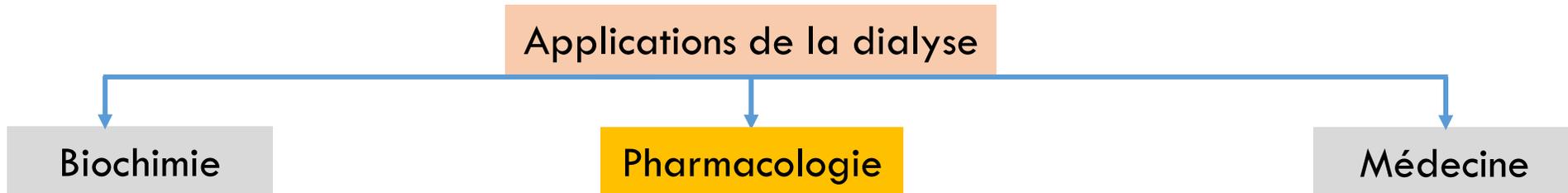


- Dessaler les échantillons par dialyse simple ou électrodialyse
- Equilibrer une solution protéique avec un tampon qui modifie le pH de la solution protéique
- Eliminer des produits diffusibles contenant des solutions protéique de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou urée
- Inversement apporter dans une solution protéique une substance diffusible placer dans un boudin de dialyse
- Concentrer une solution protéique en plaçant le boudin dans du PEG en poudre:
l'eau quitte le boudin pour solubiliser Le PEG qui, nom diffusible, ne pénètre pas dans la solution protéique

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

Application de la dialyse

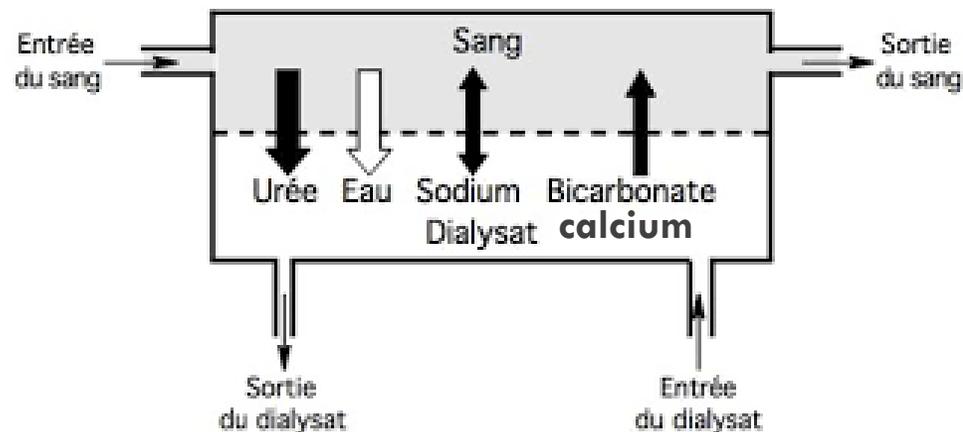
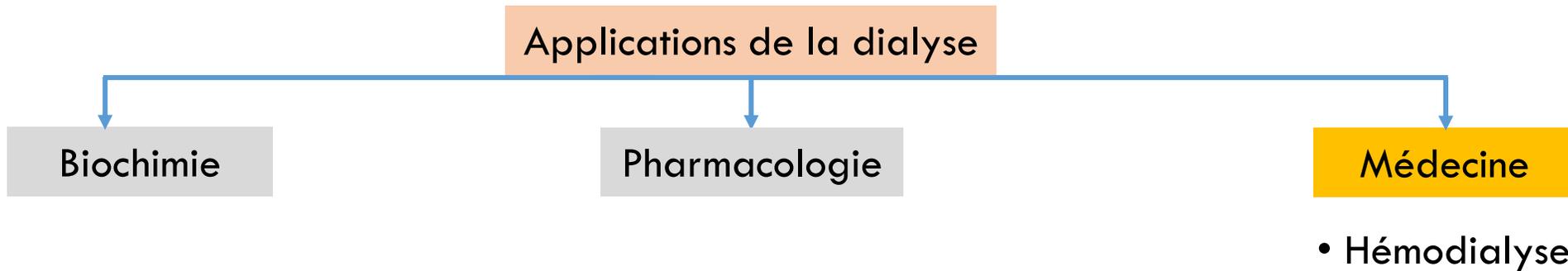


- Analyse des complexes protéines-ligand
- Etude de la liaison des médicaments aux protéines

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electro dialyse

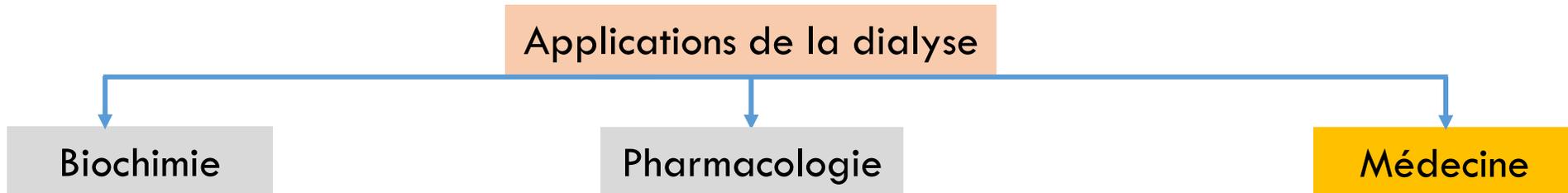
Application de la dialyse



Echange entre le sang du patient et une solution de dialyse (dialysat) de composition proche de celle du plasma normal au travers d'une membrane dialysante

II.2. Dialyse Electrodialyse

Application de la dialyse



- Microdialyse et quantification des neurotransmetteurs

Objectifs de la microdialyse cérébrale

- Analyser les molécules issues de la fente synaptique lors de la neurotransmission
- Administration d'agents pharmacologiques et observation de leurs effets (dynamique ou cinétique)

II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse

- L'électrodialyse permet l'élimination d'espèces ionisées (chargées):
 - Espèces minérales (sels minéraux NaCl ou ions métalliques Fe, Cu)
 - Espèces organiques (acides organiques faibles)

Application de l'électrodialyse

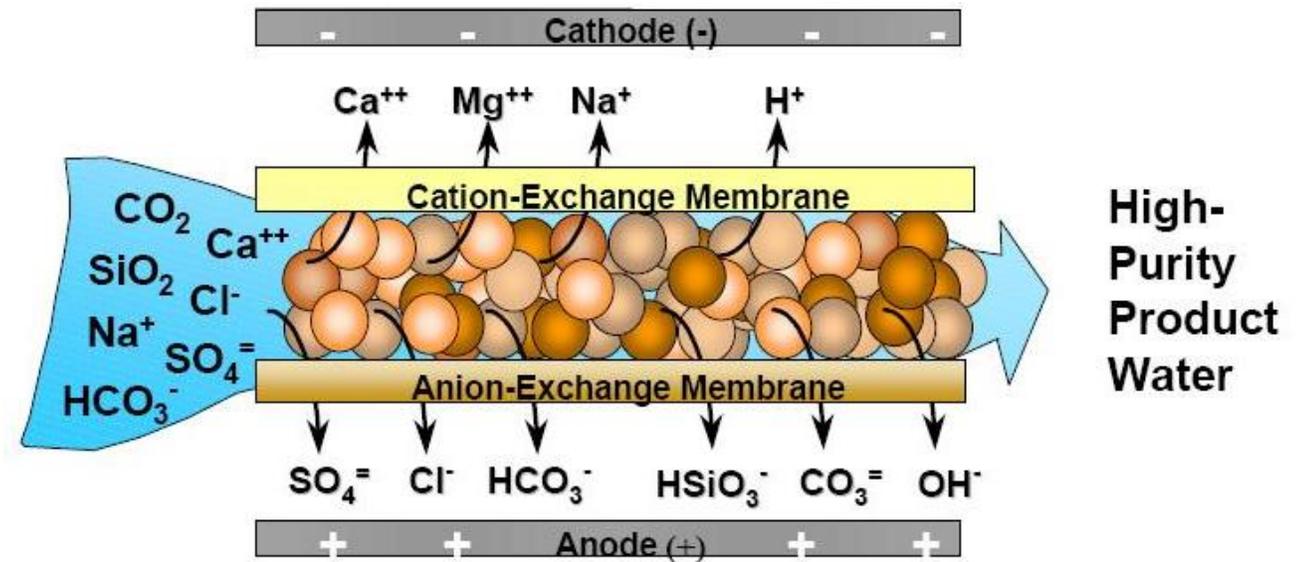
Elle permet l'extraction et la reconcentration d'espèces ionisés dans le but de :

- Dépolluer un effluent
- Dessaler une solution (eau)
- Récupérer des produits valorisables
- Purifier des solutés neutres

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse



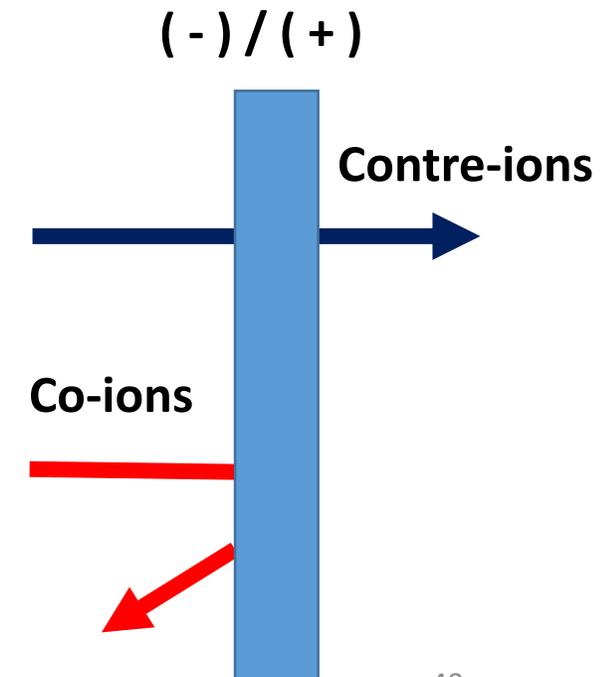
- Le montage d'électrodialyse est formé de 2 compartiments périphériques (liquide de contre dialyse) séparés du compartiment central (liquide à dialyser) par des membranes semi-perméables
- L'établissement d'un courant continu (quelques milliampères) permet le passage des anions vers l'anode et des cations vers la cathode
- Les ions minéraux sont éliminés sans perte de produit organique
- L'élévation thermique produite par le courant ne permet pas cette utilisation avec des produits thermolabiles (utilisation d'appareils réfrigérés)

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

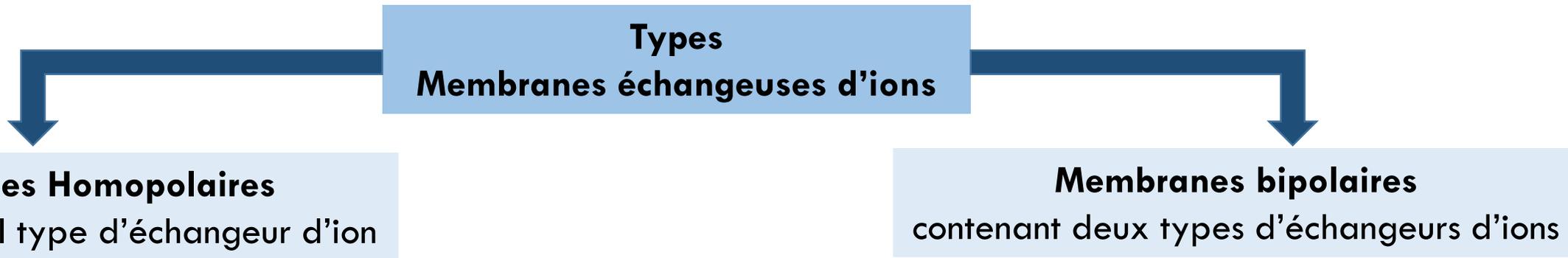
Electrodialyse

- Membrane échangeuses d'ions sont des membranes porteuses de charge électriques
- Elles permettent un transfert sélectif d'espèces chargés selon leur signes de charge
- Les particules qui ne portent pas de charges électriques ne seront pas éliminés



II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse



Membrane échangeuse d'anions MEA

Permettent le transfert d'anions (-) et contiennent des groupements chargés positivement fixés à une matrice de polymère tels que $-R_2NH^+$, $-RNH_2^+$, $-R_3N^+$

Membrane échangeuse de cations MEC

Permettent le transfert de cations (+) et contiennent des groupements chargés négativement fixés à une matrice de polymère tels que $-SO_3^-$, $-COO^-$

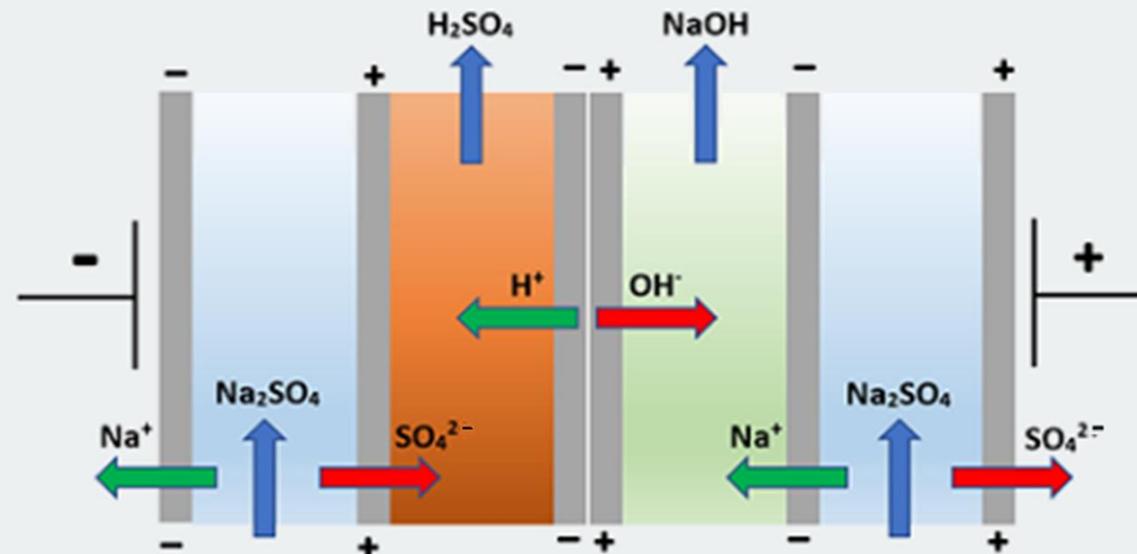
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse aux membranes bipolaires EDBM

Membranes Bipolaires MBP : type spécial de membrane aux propriétés échangeuses d'ions pour lesquelles une face est seulement perméable aux anions et l'autre aux cations.

Contrairement aux autres procédés membranaires, l'EDBM ne s'utilise pas à des fins de séparation, mais afin de réaliser une réaction chimique à la jonction bipolaire de la membrane, où les couches cationiques et anioniques sont en contact direct.



Représentation schématique de l'obtention d'une base et d'un acide à partir du sel correspondant par utilisation de membranes bipolaires.

II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse aux membranes bipolaires EDBM

Caractéristiques de l'EDBM

- Sépare l'eau en ions hydroxydes et en protons avec un voltage relativement faible
- Etant donné l'absence de réaction à l'électrode, aucune réaction d'oxydoréduction n'a lieu. Il n'y a donc pas de sous-produits.
- Produit d'un acide et d'une base à partir de sels organiques et inorganiques en un seul procédé.
- Contrôle le taux de concentration d'acide et de base.
- Différent du procédé électrolytique. Il n'y a pas besoin d'électrode entre chaque cellule, et donc moins de gaz sont générés.
- Produit moins de solution « déchet »
- Peut soutenir des opérations continues pour un temps long puisqu'aucun procédé de régénération n'est nécessaire

II.2. Dialyse Electrodialyse

Electrodialyse aux membranes bipolaires EDBM

Exemples d'application de l'EDBM

- Production d'acide organique à partir de sel organique
- Production d'acides aminés à partir de sels d'acides aminés
- Production d'acides et de bases à partir de solutions déchets de sels.
- Production d'acides et de bases à partir de sels inorganiques.

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.1. Filtration

II.2. Dialyse et électrodialyse

II.3. Sédimentation Centrifugation et ultracentrifugation

II.3. Sédimentation

Définition

- Technique qui permet de séparer une dispersion solide/liquide ou une dispersion liquide / liquide non miscibles
- Séparation basée sur la différence de densité
- Séparation régie par la force de la pesanteur (gravité) ou la force centrifuge
- Cela n'est possible que si le mélange est en suspension et non en solution.

Décantation

Centrifugation

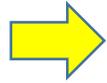
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Décantation

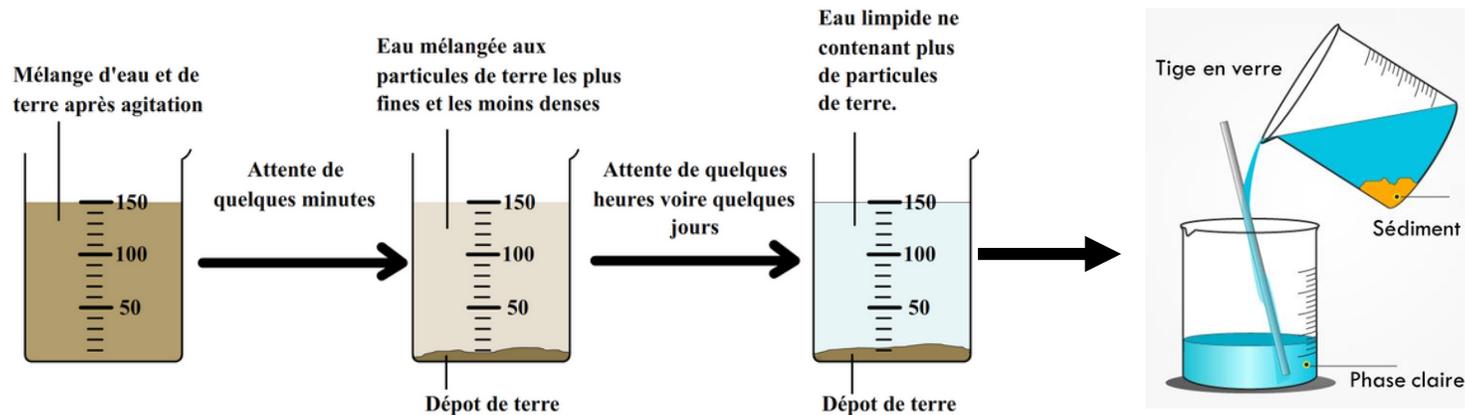
Définition

Méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange hétérogène comportant au moins une phase liquide grâce à l'action de la gravité

Liquide + Solide



Décantation par Transvasement



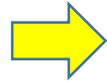
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Décantation

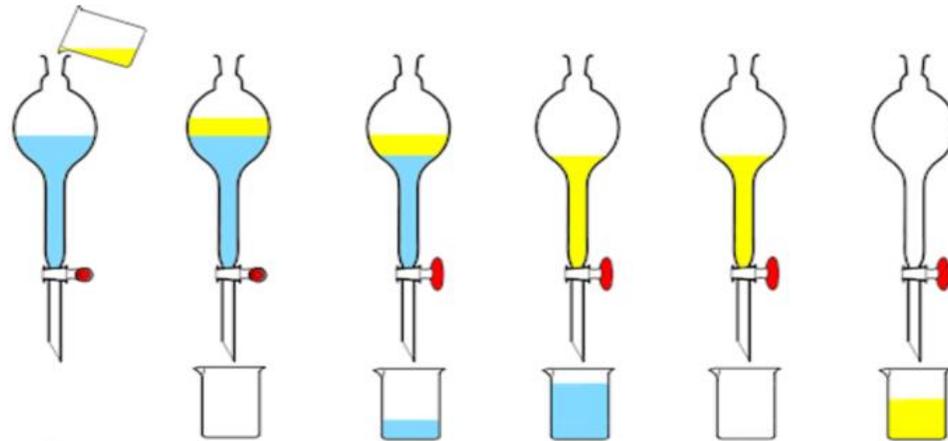
Définition

Méthode qui permet de séparer les constituants d'un **mélange hétérogène** comportant au moins **une phase liquide** grâce à l'action de la gravité

Liquide + Liquide



Décantation avec ampoule à décanter



II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

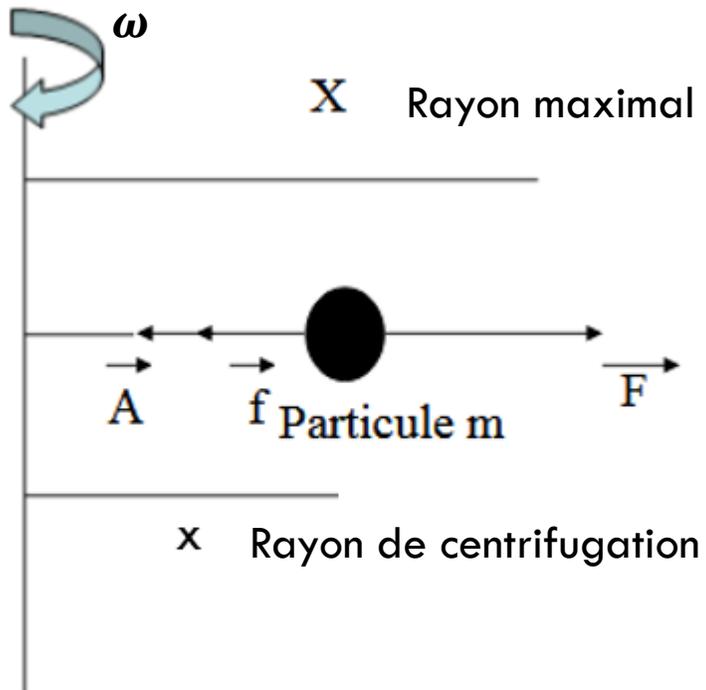
Définition

- Technique importante utilisée dans les domaines de la biochimie, bio-cellulaire et moléculaire et la médecine
- Méthode de séparation de mélange hétérogène. En biologie il s'agit fractionnement cellulaire
- Une centrifugation est régie par la force centrifuge ($\times g$) appelée force centrifuge relative (FCR ou RCF)
- Permet de remplacer l'accélération de la pesanteur (g) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (10 à 10 000 tpm)
- L'ultracentrifugation utilise des vitesses encore plus grandes allant jusqu'à 75 000 ou 100 000 tpm

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Aspect théorique



Force appliquée à la particule centrifugée

A : poussé d'Archimède

f : force de frottement (loi de Stokes)

$$f = 6 \pi \eta r v$$

v : vitesse de sédimentation

η : viscosité dynamique du fluide

r : rayon de la sphère (particule)

F : force de centrifugation

$$F = m \gamma$$

$\gamma (= \omega^2 \cdot X)$: accélération centrifuge

ω : vitesse angulaire de rotation

La particule sédimente que si :

$$F > A + f$$

$$v = \frac{(p - p') \cdot \omega^2 \cdot X}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

p : masse volumique de la particule

p' : masse volumique du liquide

Vitesse de sédimentation dépend de :

- la vitesse de rotation du rotor ω
- le rayon de centrifugation X
- la différence de masse volumique
- Le coefficient de viscosité de la phase dispersante η
- La géométrie des particules dispersées

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Expression de l'accélération centrifuge en nombre de g (Ng)

- langage courant utilise 600 g, 5000 g, 9500 g → Savoir calculer le Ng à partir des paramètres qui ont dépendent :

n: la vitesse de rotation exprimé en t.p.m (tours. Min -1)

X: rayon de centrifugation moyen (distance séparant l'axe du rotor et le fond du tube de centrifugation)

$$Ng = \frac{(2\pi.n)^2 . X}{(60)^2 . 9,81}$$

$$ACR(g) = 1,118 . 10^{-5} . X(cm) . n^2(tpm)$$

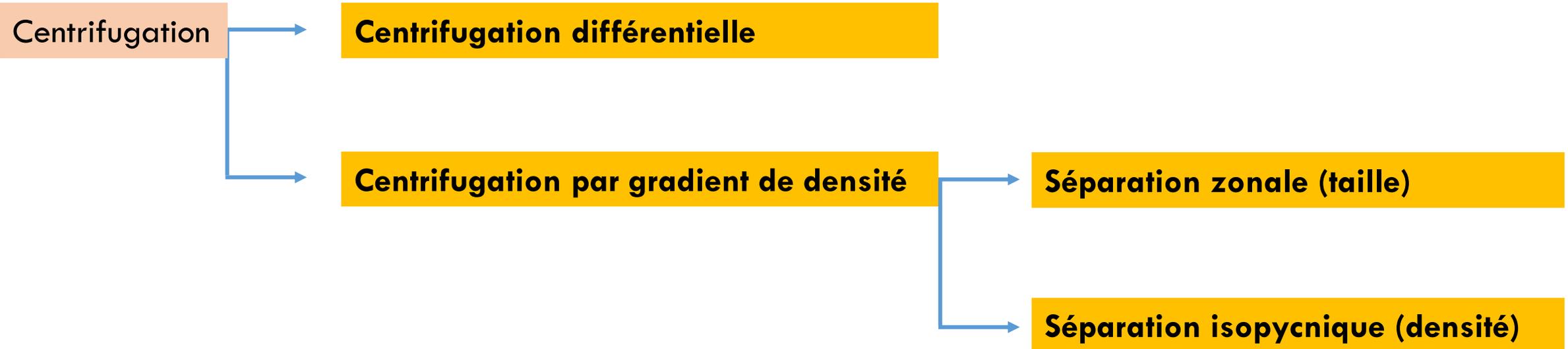
Exemples

Vitesse en tours par min	Rayon maximal (cm)	Accélération Ng
4000	16,3	2 900
10 000	16,1	18 000
75 000	8,13	511 100

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Types de centrifugation

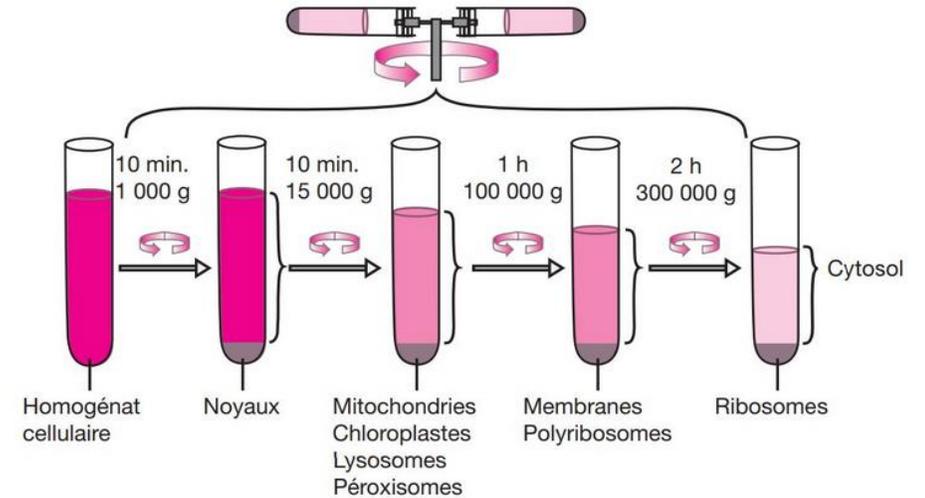


Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Types de centrifugation

Centrifugation différentielle



- La séparation s'effectue principalement selon la taille des particules
- Couramment utilisée pour la récupération de culots et l'obtention de préparations partiellement pures d'organelles sub-cellulaires et de macromolécules
- Une rupture des tissus ou cellules est requise afin de libérer leur contenu → Mélange brut (homogénat)
- Centrifugation d'un homogénat de cellules → **Culot + Surnageant**
- Un homogénat de cellules peut être soumis à une série de forces g et de durées croissantes afin de générer des culots d'organelles partiellement purifiées
- La centrifugation différentielle sert d'étape préliminaire à des purifications plus avancées réalisées par centrifugation en gradient de densité

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Types de centrifugation

Centrifugation par gradient de densité

- Méthode indiquée pour la purification d'organelles sub-cellulaires et de macromolécules
- Les gradients de densité peuvent être réalisés en superposant des couches de milieu à gradient (de sucrose, de césium,...) dans un tube
- La couche la plus lourde se trouve au fond et la plus légère sur le dessus, en continu ou en discontinu
- La fraction cellulaire que l'on cherche à séparer est placée sur la couche supérieure et centrifugée

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

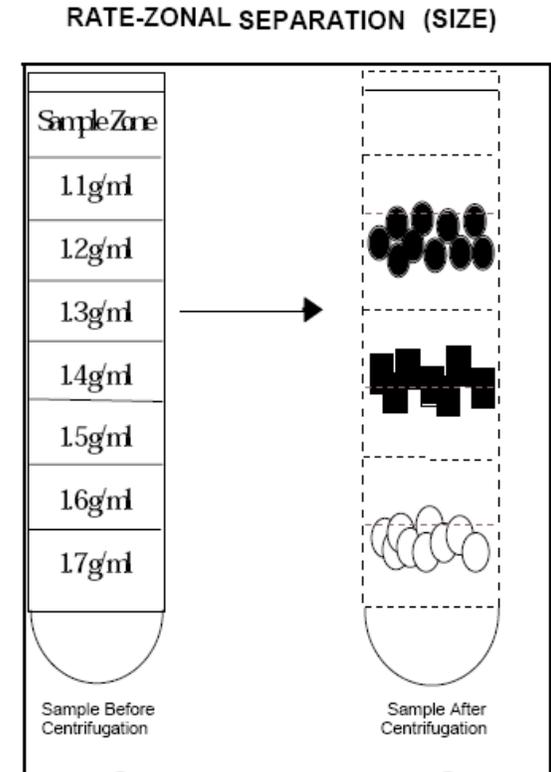
Types de centrifugation

Centrifugation par gradient de densité : Séparation zonale (taille)

- La séparation zonale se base sur la taille des particules et la masse plutôt que sur la densité des particules
- Applications courantes comprennent la séparation d'organelles cellulaires comme les endosomes, les protéines

Exemple: les classes d'anticorps ont toutes des densités très similaires mais des masses qui diffèrent d'où le choix de la séparation zonale basée

- Certains types de rotor sont plus appropriés à ce type de séparation que d'autres



II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Types de centrifugation

Centrifugation par gradient de densité : Séparation zonale (taille)

Critères d'une centrifugation zonale réussie

- La densité de la solution échantillon doit être inférieure à celle de la portion présentant la plus faible densité du gradient
- La densité de la particule échantillon doit être supérieure à celle de la portion présentant la plus forte densité du gradient
- La longueur de trajet du gradient doit être suffisante pour permettre la séparation
- Le facteur temps est aussi important. Si vous effectuez des lots trop longs, la totalité des particules pourrait sédimenter dans le fond du tube

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

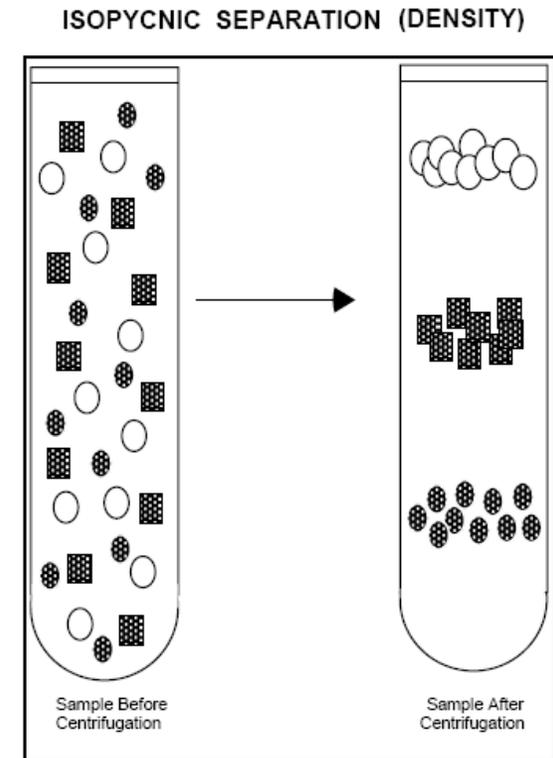
Types de centrifugation

Centrifugation par gradient de densité : Séparation isopycnique (densité)

- La séparation se base sur la densité des particules
- Les particules sont entraînées vers le fond jusqu'au point où la densité de la solution environnante est identique à celle de la particule
- Equilibre atteint, la durée de la centrifugation n'a aucune influence sur la migration de la particule

Exemple : séparation des acides nucléiques dans un gradient CsCl

- Différents milieux à gradient peuvent être utilisés pour les séparations isopycniques



II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Types de centrifugation

Centrifugation par gradient de densité : Séparation isopycnique (densité)

Critères d'une centrifugation isopycnique réussie

- La densité de la particule échantillon doit se trouver dans les limites des densités de gradient
- Toute longueur de gradient est acceptable
- La durée de centrifugation doit être assez longue pour permettre aux particules d'atteindre leur point isopycnique
- Les durées de centrifugation excessives n'ont aucun effet indésirable

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Centrifugeurs

Vitesse de centrifugation

Classes de centrifugeuses et leurs applications

	Classes de centrifugeuses		
	Low-speed	High-speed	Ultra-speed
Vitesse maximale (rpm x 1000)	10	28	100 - 150
FCR maximale (x 1000)	7	100	800 - 900
Applications			
Bactéries	oui	oui	(oui)
Cellules de plantes & animales	oui	oui	(oui)
Noyaux	oui	oui	(oui)
Précipités	quelquefois	souvent	(oui)
Fractions membranaires	quelquefois	quelquefois	oui
Ribosomes			Oui
Macromolécules			Oui
Virus	Dr. A. Braik Seridi	Année 2023/2024	Souvent
			Oui

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Centrifugeurs

Centrifugeurs horizontaux

Rotors

Centrifugeurs obliques

Centrifugeurs verticaux

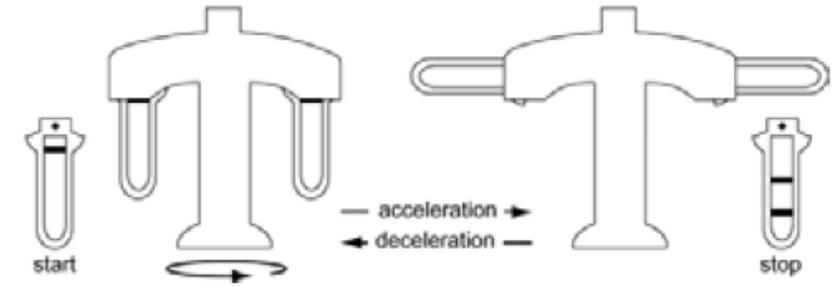
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Rotors à godets oscillants /horizontaux

- Les tubes d'échantillons chargés dans des godets suspendus à la verticale au repos. Ils sont horizontaux en rotation
- Utilisation de tube à fond conique pour la clarification
- Utilisation de tube à fond rond quand le culot est récupéré
- Utile pour mesurer le volume du culot de centrifugation
- Les particules qui sédimentent traversent une grande épaisseur de liquid. Ce qui est efficace pour la séparation en gradients de densité
- Mauvais aérodynamique du rotor



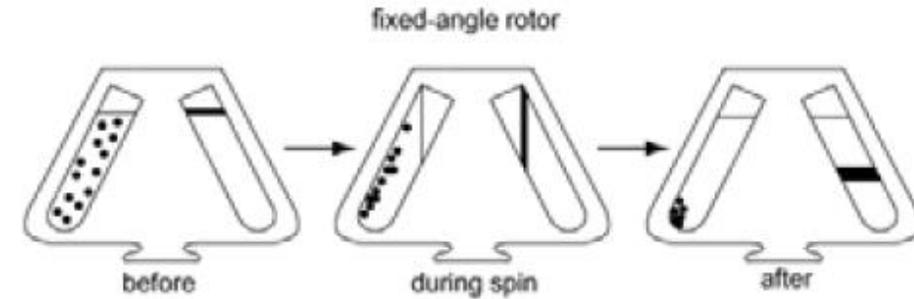
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Rotors à angle fixe / obliques

- Tubes inclinés à 45° et logés dans un rotor circulaire (courotte)
- Bon aérodynamisme permettant d'atteindre des vitesses élevées
- Les particules traversent une petite épaisseur de liquide
- Les particules migrent horizontalement, atteignent la paroi et glissent le long de cette paroi
- Utilisé dans les applications de sédimentation (précipite des bactéries, des levures et autres cellules de mammifères)
- Utile pour les séparations isopycniques de macromolécules comme les acides nucléiques



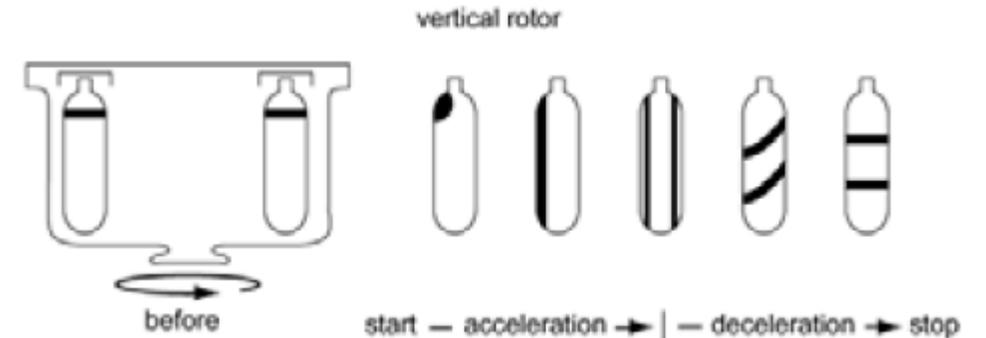
Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Rotors verticaux

- Les tubes sont maintenus en position verticale pendant la rotation.
- Ne convient pas aux applications de sédimentation
- Très efficace pour les séparations isopycniques (densité) en raison de son trajet court.
- Les applications comprennent l'isolation d'ADN de plasmide, d'ARN et de lipoprotéines



Remarque

- Il existe des centrifugeurs réfrigérés thermostatés à 4 °C, utilisés pour le fractionnement d'enzymes thermolabiles

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Sélection des tubes de centrifugation

- Préviens les déversements ou pertes d'échantillons
- Garantit la compatibilité chimique
- Facilite la récupération des échantillons

Facteur de sélection de matériau (plastique) de tubes

- Clarté
- Résistance chimique
- Mécanisme d'étanchéité

Chemical Compatibility of Popular Tube Materials

Tube Plastic type	Clarity	Chemical Resistance*
Polypropylene (PP)	Opaque	Good
Polyallomer (PA)	Opaque	Good
Polycarbonate (PC)	Clear	Poor
Polyethylene terephthalate (PET)	Clear	Poor

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Appareillage

Conditions d'utilisation d'une centrifugeuse

L'utilisation d'un centre et plusieurs exige Le respect d'un certain nombre de règles de manière à prévenir les accidents

- Toutes les pièces en rotation de la centrifugeuse doit être placée à l'intérieur d'un épais carter muni d'un dispositif de verrouillage → Impossibilité à ouvrir en cas de marche
- La centrifugeuse doit être équilibré (par pesée 0,1 g près)
- La centrifugeuse doit être amener progressivement à son régime de rotation maximal
- Les tubes à centrifuger doivent être protégés contre la casse

Chapitre II: Méthodes de fractionnement

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Application



- Sédimentation de cellules
- Sédimentation de virus
- Séparation d'organelles sub-cellulaires
- Isolation de macromolécules l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides

II.3. Sédimentation : Centrifugation et Ultracentrifugation

Application

- Détermination d'une constante de sédimentation (des unités 30s et 50s de ribosome d'*Escherichia coli* et des ARN ribosomiaux 5S et 23S)
- Détermination d'une masse molaire cette technique est adapté à l'étude des protéines et des acides nucléiques
- Séparation d'un mélange ou de macromolécules
- Vérification de la pureté d'un extrait macromoléculaires (de protéine ou d'acide nucléique)