

Ultracentrifugation

Introduction

- le comportement des macromolécules en solution, qui sont soumises au champ gravitationnel (facteur accélération $g = 9.81 \text{ ms}^2$), ne démontre aucune évidence de sédimentation
 - l'agitation thermique est suffisante à les garder dispersées de façon homogène en solution
 - à moins qu'elles ne soient agrégées
- c'est seulement lorsque les macromolécules sont assujetties à des accélérations énormes qu'elles commencent à sédimenter.
- L'ultracentrifugeuse fut inventée en 1923 par un chimiste suédois, Theodor Svedberg (prix Nobel de chimie 1926)
- avec ce type de centrifugeuse, il est possible d'atteindre des vitesses de rotation de 80,000 rpm (révolutions par minute) qui donnent lieu à des forces dépassent 600,000 X g
- Avec cette technique, Sverdberg a pu démontrer que les protéines sont des macromolécules de composition homogène et qu'un grand nombre de protéines sont composées de sous-unités.

A. Sédimentation

- la **vitesse** avec laquelle une particule sédimente dans une ultracentrifugeuse **dépend de sa masse**
- la force, $F_{\text{sédimentation}}$, subie par une particule de masse m située à une distance r d'un point autour duquel la particule tourne avec une vitesse angulaire ω (en radians \cdot s $^{-1}$) est égale à la **force centrifuge** ($m\omega^2r$) qui s'exerce sur la particule **moins la force due au déplacement de la solution** par la particule ($V_p\rho\omega^2r$ ou **force de flottaison**)

$$F_{\text{sédimentation}} = m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r$$

où V_p est le volume de la particule en question et ρ est la densité de la solution

- Cependant, le déplacement d'une particule à travers une solution est opposée par une **force qui représente la friction entre la particule et la solution**

$$F_{\text{friction}} = v f$$

où v est la vitesse de migration de la particule et f est le coefficient de friction.

- le coefficient de friction d'une particule peut être déterminé en mesurant sa vitesse de diffusion.

- Sous l'influence d'une force centrifuge, une particule va accélérer jusqu'à ce que toutes les forces soient contrebalancées, soit :

$$m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r = v f$$

où on atteint la phase stationnaire

À quoi peut servir cette technique? **À mesurer la masse de macromolécules**

- La masse molaire de particules, M , est $M = mN$ où N représente la constante d'Avogadro (6.02×10^{23}).
- Le volume d'une particule, V_p , en fonction de sa masse molaire et sa densité,

est:

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

où \bar{V} représente le volume partiel spécifique de la particule qui est défini par le changement en volume lorsque 1g sec de particules est dissous dans une soluté à volume infini.

En substituant V_p et m dans les équations ci-dessus, on obtient :

$$vf = m\omega^2 r - V_p \rho \omega^2 r \rightarrow v_f = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{N} \rightarrow v = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{Nf}$$

Vitesse quand toutes forces sont annulées.

si on manipule l'équation encore, on obtient une relation indépendante de ω et r , et qui est seulement dépendante des propriétés de la protéine en question

on définit alors le **coefficient de sédimentation, S**, par : $\frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf}$

- Le coefficient de sédimentation est analogue au coefficient de mobilité électrophorétique; sa valeur est exprimée en unités de 10^{-13} sec qui sont connues sous forme de **Svedbergs (S)**.

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{l}{\omega^2} \left(\frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf}$$

La relation ci-dessus indique qu'il sera possible de déterminer la masse d'une particule, $m=M/N$, à partir de son coefficient de sédimentation S et de son coefficient de friction f

En effet, jusqu'aux années 1970, la plupart des déterminations des masses moléculaires ont été faites à partir d'une ultracentrifugeuse analytique - un instrument qui permettait la détermination des vitesses de sédimentation

- Bien que de nouvelles techniques sont maintenant utilisées pour mesurer la masse des macromolécules (par ex: chromatographie en gel de filtration, électrophorèse SDS-PAGE), l'analyse des complexes de macromolécules utilise toujours l'ultracentrifugation
- la masse des constituants de ces complexes est souvent exprimé en Svedberg (S)

Par exemple: - le ribosome bactérien

- les sous-unités 30S et 50S sont constitués par les ARNr 5S, 16S et 23S
- les deux sous-unités s'assemblent pour former le ribosome 70S

- le ribosome eucaryote

- les sous-unités 40S et 60S sont constitués par les ARNr 5S, 5.8S, 18S et 23S
- les deux sous-unités s'assemblent pour former le ribosome 80S

- le protéasome 26S

- chez les eucaryotes, complexe multiprotéique impliqué dans la dégradation des protéines

B. La centrifugation préparative.

- Les centrifugeuses préparatives sont conçues pour la préparation d'échantillons possédant des volumes significatifs
- La sédimentation peut être faite dans une solution inerte comme le **saccharose** ou de **chlorure de césium (CsCl)** dans lesquels la concentration et donc la densité augmente du haut vers le bas du rotor
- L'utilisation des gradients de densité augmente de façon significative le pouvoir de résolution de la centrifugeuse.
- Dans le cas de saccharose, ce type de gradient minimise l'agitation d'une solution par convection (qui peut nuire à la résolution). Il faut se rappeler que la densité de la solution doit être moindre que celle de la macromolécule pour qu'il y ait de la migration.

Les gradients de densité ont deux applications:

- 1) **Ultracentrifugation zonale ou en zones.**
- 2) **Ultracentrifugation en gradient de densité à l'équilibre.**

B.1 L'ultracentrifugation en zones.

- Cette technique permet la séparation des particules selon leurs coefficients de sédimentation
- Dans ce type de centrifugation, la solution de macromolécules est déposée sous forme de couche en haut d'un gradient de densité préparé auparavant
- Ce type de gradient minimise l'agitation par échauffement de la solution, ce qui peut nuire à la résolution
- On utilise le saccharose, qui est visqueux et biochimiquement inerte pour former le gradient
- Puisque la vitesse de sédimentation est une fonction plus sensible à la forme d'une macromolécule qu'à sa densité, l'ultracentrifugation en zones sépare les macromolécules de forme similaire selon leur masse
- Pendant la centrifugation, chaque espèce se déplace à travers le gradient à une vitesse largement déterminée par leur coefficient de sédimentation et donc migre comme une zone
- À la fin de l'expérience, la récolte des fractions se fait par l'insertion d'une aiguille au fond du tube de centrifugation et on collectionne le contenu du tube par un collecteur de fraction

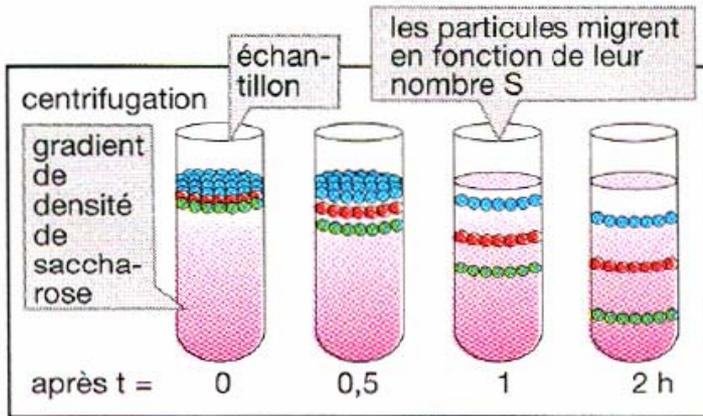
B.2 L'ultracentrifugation par densité d'équilibre.

- Cette méthode de centrifugation, aussi connue sous le nom de **centrifugation isopycnique**, **sépare les macromolécules selon leur densité**
- L'échantillon est dissout dans une solution concentrée d'une substance dense qui diffuse relativement vite comme les sels CsCl et Cs₂SO₄, et qui est subie à des hautes vitesses de rotation
 - Le fort champ centrifuge génère un gradient important de sel dans lequel les composantes de l'échantillon se retrouvent en zone de densités égales à celle de la solution de sel; autrement dit où $(1 - \bar{v}/\rho) = 0$, donc aucune migration puisque $v = 0$
 - la **technique préférée pour séparer des macromolécules qui possèdent une gamme de densités.**

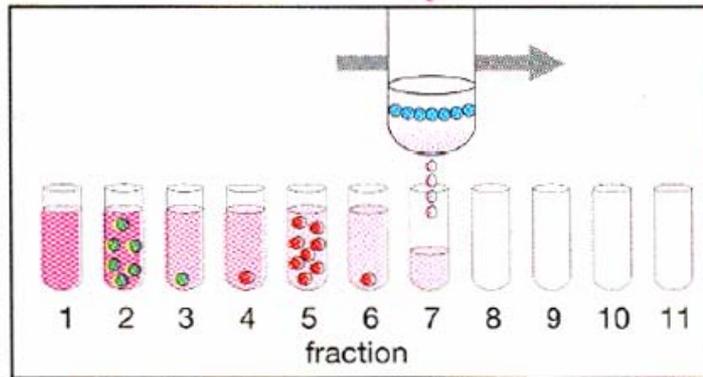
Par exemple:

- acides nucléiques (plasmide vs ADN génomique et ARN total)
- ribosomes et polysomes
- virus
- organites subcellulaires (microsome, mitochondries, ...)

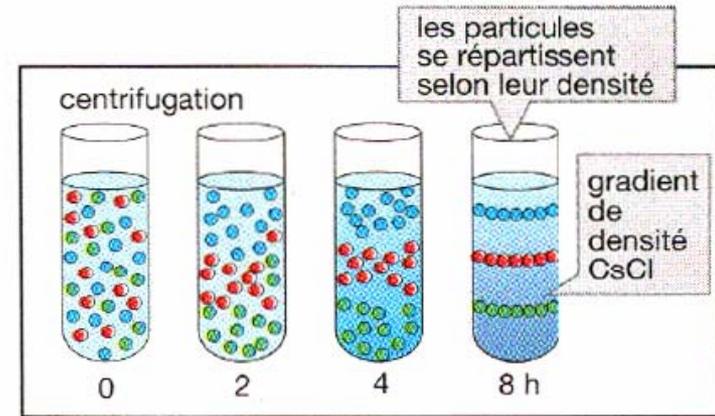
Ultracentrifugation en zones vs isopycniq



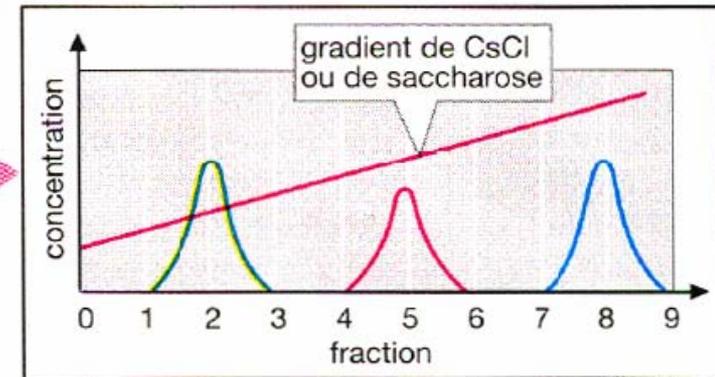
centrifugation de zone



fractionnement

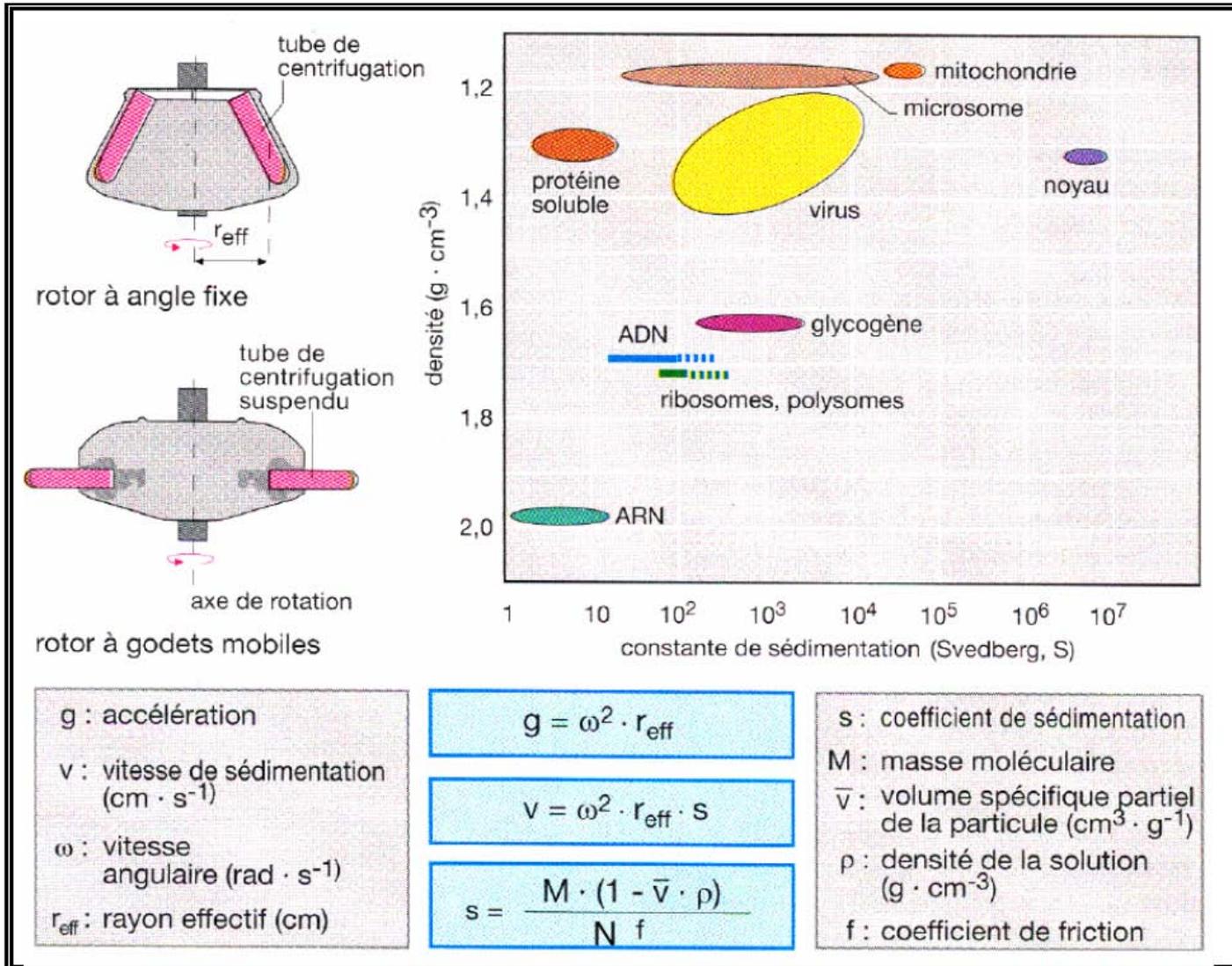


centrifugation isopycniq



mesure

Récapitulation des principes de l'ultracentrifugation



g : accélération
 v : vitesse de sédimentation ($cm \cdot s^{-1}$)
 ω : vitesse angulaire ($rad \cdot s^{-1}$)
 r_{eff} : rayon effectif (cm)

$$g = \omega^2 \cdot r_{eff}$$

$$v = \omega^2 \cdot r_{eff} \cdot s$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N f}$$

s : coefficient de sédimentation
 M : masse moléculaire
 \bar{v} : volume spécifique partiel de la particule ($cm^3 \cdot g^{-1}$)
 ρ : densité de la solution ($g \cdot cm^{-3}$)
 f : coefficient de friction

Utilisation des ultracentrifugeuses

- les ultracentrifugeuses créent un vacuum dans la chambre du rotor pour permettre d'obtenir de très hautes vitesses de centrifugation sans avoir la friction de l'air, ce qui peut amener un échauffement des échantillons
 - les vitesses obtenues sont très élevées (de l'ordre de 80 000 à 100 000 rpm)
- de plus, la chambre du rotor est réfrigérée pour éviter le réchauffement des échantillons
- à ces vitesses, il est essentiel de:
 - bien balancer le rotor pour éviter tout débalancement lors de la centrifugation
 - utilisez le bon rotor!

Ce qui arrive lorsque vous utilisez un rotor incompatible!

