

L'ultracentrifugation

par J. PIERREZ,

U.E.R. A de Médecine

B.P. 184 - 54500 Vandœuvre-les-Nancy.

Depuis une vingtaine d'années, la biologie moléculaire a connu un essor tel qu'elle inspire tantôt des espoirs immodérés, tantôt des craintes peut-être plus justifiées. Cependant, cet essor n'a été possible que grâce à des techniques continuellement améliorées. Pris entre les modes de raisonnements fort différents des biologistes et des physiciens, les biophysiciens évoluent à la limite du théorique et de l'empirique. Ceci explique que les techniques qu'ils ont été amenés à développer (ultracentrifugation, chromatographie,...) sont peu connues des physiciens.

INTRODUCTION.

L'étude des propriétés cinétiques des macromolécules est souvent gênée par les phénomènes de diffusion et l'agitation brownienne qui tend rapidement à rendre les solutions homogènes. Pour que l'homogénéité d'une solution ne soit pas altérée, il est possible d'utiliser un champ de force tel que celui-ci soit beaucoup plus intense que les autres forces agissant sur les macromolécules. Ceci peut être réalisé en mettant en rotation rapide autour d'un axe, une cellule contenant la solution à étudier.

Il est possible, à partir de ce système, de définir un ensemble de paramètres cinétiques permettant de caractériser ou d'isoler chaque type de macromolécules. La caractérisation est le rôle de l'ultracentrifugation analytique, tandis que l'isolation relève de l'ultracentrifugation préparative.

I. BASES THEORIQUES DE L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE.

Considérons une solution dans une cellule placée dans un rotor tournant à une vitesse élevée ω . Il existe deux façons d'aborder les effets de cette situation : soit au niveau de chaque molécule, soit au niveau statistique de l'ensemble des molécules.

1.1. Phénomènes élémentaires.

Soit m , la masse de la molécule, \bar{V} , son volume et ρ la masse volumique du solvant. On suppose que la molécule est à une

distance x de l'axe de rotation. La sédimentation de la molécule ayant lieu à une vitesse faible, on peut à tout moment, considérer que les forces qui s'exercent sur elle, ont une résultante nulle (fig. 1).

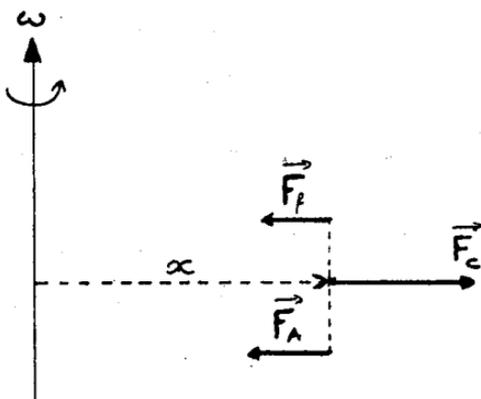


Fig. 1. — Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide en rotation uniforme autour d'un axe.

Les trois forces sont :

- la force centrifuge : $F_c = m \omega^2 x$,
- la poussée d'Archimède : $F_A = \bar{V} \cdot \rho \cdot \omega^2 x$,
- les forces de frottement : $F_f = f_s \cdot (dx/dt)$,

$$m \omega^2 x = \bar{V} \rho \omega^2 x + f_s \cdot dx/dt$$

$$(m - \bar{V} \rho) \omega^2 x = f_s \cdot dx/dt$$

$$(dx/dt) \cdot (1/\omega^2 x) = m(1 - \bar{V} \rho)/f_s.$$

Par définition, on pose $m(1 - \bar{V} \rho)/f_s = s$, coefficient de sédimentation. L'unité est la seconde ; il est numériquement égal à la vitesse de chute dans un champ unité dans les conditions de l'expérience. En fait, les valeurs sont toujours extrêmement grandes, et on lui préfère le Svedberg (S) ($1 S = 10^{-13} s$).

1.2. Phénomène à l'échelle d'une population de macromolécules.

Si l'on s'intéresse à l'ensemble de la population des molécules, on doit appliquer les lois statistiques et en particulier les lois de Fick.

On considère une cellule contenant une solution tournant à grande vitesse : les particules du soluté sédimentent en s'éloignant de l'axe et en faisant apparaître une zone de solvant et

une zone de solution. Comme il y a un gradient de concentration, il y aura un flux de diffusion, qui va s'opposer au flux de sédimentation.

La partie utile de la cellule a la forme d'un secteur cylindrique, l'axe du cylindre étant l'axe de rotation (fig. 2).

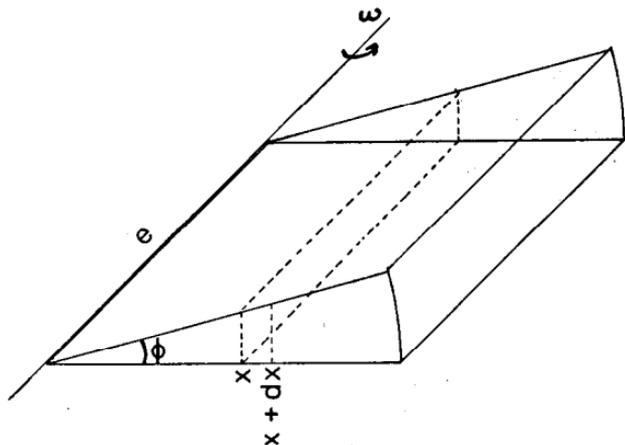


Fig. 2. — Schéma d'une cellule en secteur.

Une description rigoureuse de la distribution de concentration devrait être obtenue à l'aide d'une analyse thermodynamique. Cependant, une meilleure compréhension du phénomène est possible en ne s'intéressant qu'au transport de soluté. Le flux de sédimentation du soluté (J_s) est égal au produit de la vitesse des molécules (dx/dt) et de leur concentration massique en ce point [$c(x)$].

$$J_s = c(x) \cdot dx/dt$$

or :

$$s = (dx/dt) \cdot 1/\omega^2 x$$

d'où :

$$J_s = s \omega^2 c(x) \cdot x.$$

Le flux de diffusion (J_D) est donné en chaque point de la cellule par la loi de FICK :

$$J_D = -D \cdot (\delta c(x)/\delta x).$$

Le flux global de matière dans le sens des x positifs, à travers l'élément de surface considéré à la distance x , sera la somme des deux flux élémentaires résultants : l'un de la sédimentation sous l'action de la force centrifuge, l'autre de la diffusion dans un gradient de concentration éventuel :

$$J = J_s + J_D.$$

La différence entre la quantité de matière qui traverse la face située à la distance x et celle qui traverse la face située à la distance $x + dx$ est égale à la vitesse avec laquelle varie la concentration dans la tranche d'épaisseur dx située à la distance x multipliée par le volume de cette tranche. Dans un secteur cylindrique de hauteur e et d'ouverture ϕ , le volume d'une tranche d'épaisseur dx située à la distance x est égal à $e \phi x dx$. Si le flux est J , le transport de matière par unité de temps à travers la surface en x est $e \phi x J$ et celui à travers la surface $x + dx$ est $e \phi x J + e \phi \cdot (\partial(xJ)/\partial x) dx$, on constate que la variation de quantité de soluté $m(x)$ est :

$$\partial m(x)/\partial t = e \phi x J - (e \phi x J + e \phi \cdot (\partial(xJ)/\partial x) \cdot dx)$$

$$\partial m(x)/\partial t = e \phi x \cdot (c(x)/\partial t) dx$$

d'où :

$$\partial c(x)/\partial t = (\partial(xJ)/\partial x) \cdot (-1/x) = (-1/x) \cdot (\partial/\partial x)(xJ_s + xJ_D)$$

$$\frac{\partial c(x)}{\partial t} = -\frac{1}{x} \cdot \frac{\partial}{\partial x} [s\omega^2 x^2 c(x) - x D \cdot (\partial c(x)/\partial x)].$$

Ceci est l'équation de LAMM, équation fondamentale de l'ultra-centrifugation.

II. UTILISATION DE L'EQUATION DE LAMM.

L'équation de LAMM n'est rigoureusement valable que pour les solutés isomoléculaires, dissous dans un solvant unitaire et incompressible. Elle peut être simplifiée dans quelques cas importants.

II.1. Mesure du coefficient de sédimentation s .

Pour les molécules dont la masse moléculaire serait infiniment grande, le coefficient de diffusion serait égal à 0. De même, pour toutes les molécules s'il n'existe pas de gradient de concentration, l'équation de LAMM s'écrit :

$$\frac{\partial c(x)}{\partial t} = -\frac{1}{x} \cdot \frac{\partial}{\partial x} [s\omega^2 x^2 c(x)].$$

Avec certaines conditions aux limites, l'équation peut être intégrée et on obtient :

$$c(x, t) = c_0 \cdot e^{-2 \omega^2 s t} \quad (\text{éq. 1})$$

pour $x > x_t$ et $t < 0$.

Or, x_t est également une fonction du temps :

$$x_t = x_0 \cdot e^{\omega^2 s t} \quad (\text{éq. 2})$$

où x_0 est la distance à $t = 0$.

En combinant ces deux équations 1 et 2, on obtient la loi quadratique de diluioq :

$$c(x, t) = c_0 \cdot (x/x_0)^2. \quad (\text{éq. 3})$$

Quant à l'équation 2, elle est l'équation de base qui sert au calcul du coefficient de sédimentation ; en effet, on peut encore l'écrire sous la forme suivante :

$$\text{Ln } x_t = \text{Ln } x_0 + \omega^2 st. \quad (\text{éq. 4})$$

En raison des hypothèses qui ont été faites pour établir l'équation 4, celle-ci n'est valable que pour des substances iso-moléculaires de masses moléculaires infiniment grandes, dissoutes dans un solvant incompressible, dans lequel leur coefficient de sédimentation est indépendant de la concentration. Dans ces

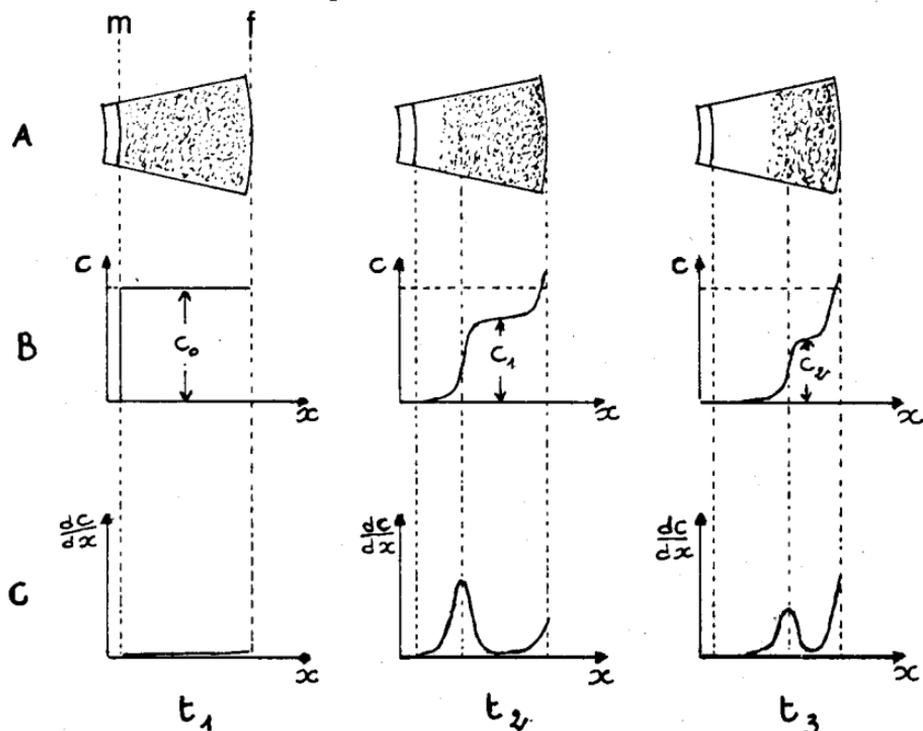


Fig. 3. — Déplacement des molécules d'une solution en fonction du temps. Cas d'une cellule à remplissage homogène :

A) distribution théorique de la concentration le long de la cellule,

B) distribution réelle de la concentration le long de la cellule,

C) distribution réelle du gradient de concentration,

m : ménisque solution-air,

f : fond de la cellule.

conditions, la courbe $C = f(x)$ doit présenter un saut brusque, tandis que la courbe $dc/dx = f(x)$ doit être, l'image d'un gradient infiniment grand. En pratique cependant, on ne peut pas négliger la diffusion. On observe donc des courbes du gradient de concentration semblables à celles de la fig. 3. Le cas échéant, la polymolécularité aura pour effet d'élargir davantage ces courbes.

Expérimentalement, on procède de la manière suivante : d'après l'équation 4, il existe une relation entre x_t et t ,

$$t = (\text{Ln } x_t - \text{Ln } x_0) / \omega^2 s.$$

Si l'on trace graphiquement la relation entre $\text{Ln } x_t$ et t , on obtient une courbe identique à la fig. 4 qui, théoriquement, devrait

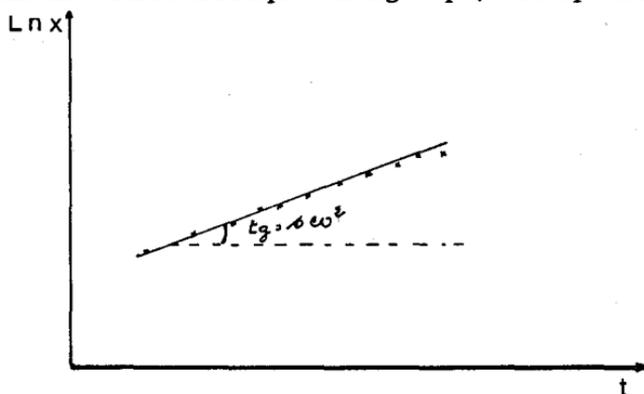
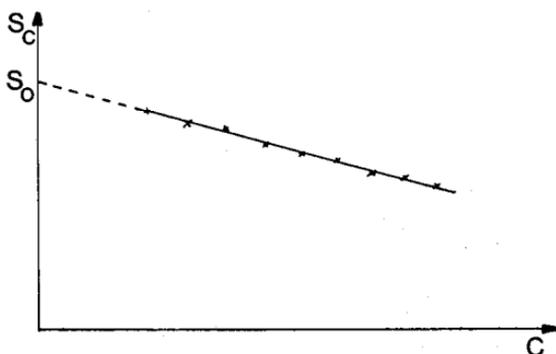


Fig. 4. — Détermination graphique des coefficients de sédimentation.

être une droite. En fait, s dépend de la concentration et de la diffusion. Or, la diffusion n'intervient que dans les cas où il existe un gradient de concentration, on obtient donc l'extrapolation de s à la concentration $c(s_c)$ lorsque D tend vers zéro en assimilant la pente à l'origine à la valeur $1/s_c \omega^2$. En ce qui concerne l'influence de la concentration, il suffit d'effectuer une série de mesure de s_c à concentration différente et d'extrapoler à la concentration nulle (fig. 5). On montre théoriquement que s_c varie en fonction de c par la relation :

$$1/s_c = (1/s_0) \cdot (1 + k_s c_0 + k_1^1 c_0^2 + \dots).$$

Les coefficients de sédimentation ainsi obtenus sont mesurés dans des conditions (température et nature des solutions salines) où ces substances conservent toutes leurs propriétés. Afin de pouvoir comparer les coefficients de sédimentations de deux substances différentes, ou ceux d'une même substance dissoute dans deux solvants différents, il faut procéder à un certain nombre de corrections qui tiennent compte des différences entre solvants.

Fig. 5. — Détermination de S_o .

A la suite de SVEDBERG et PERDENSEN, l'habitude a été prise de corriger le coefficient de sédimentation mesuré s_o , en calculant la valeur qu'il aurait si la molécule avait été dissoute dans l'eau à la température de 20° C ($S_{20, w}$) avec :

$$(S_{20, w})_o = (S_{T, SV})_o \cdot \frac{\eta_{T, SV}}{\eta_{20, w}} \cdot \frac{1 - \bar{V}_{20, w} \cdot \rho_{20, w}}{1 - \bar{V}_{T, SV} \cdot \rho_{T, SV}}$$

où :

$(S_{20, w})_o$: coefficient de sédimentation aux conditions standards extrapolé à la concentration nulle,

$(S_{T, SV})_o$: coefficient de sédimentation aux conditions de l'expérience extrapolée à la concentration nulle,

$\eta_{20, w}$: viscosité de l'eau à 20° C,

$\eta_{T, SV}$: viscosité de la solution à la température de l'expérience,

$\bar{V}_{20, w}$: volume spécifique partiel du soluté à 20° C et dans l'eau,

$\bar{V}_{T, SV}$: volume spécifique partiel du soluté à la température et dans le solvant utilisé pour l'expérience,

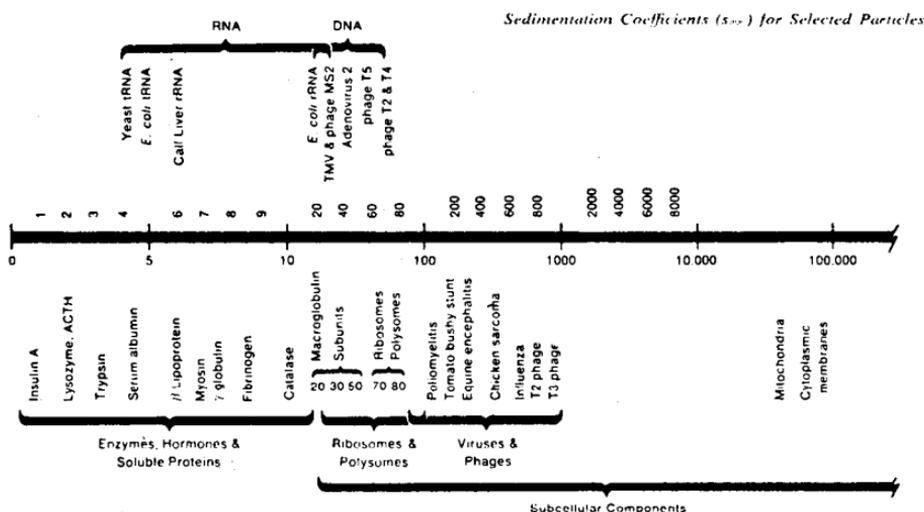
$\rho_{20, w}$: densité de l'eau à 20° C,

$\rho_{T, SV}$: densité de la solution à la température de l'expérience.

Ainsi $(S_{20, w})_o$ est une caractéristique de chaque molécule au même titre que les autres grandeurs physiques habituelles (tableau 1).

Ce type de centrifugation où l'on mesure le coefficient de sédimentation à partir d'une solution homogène est dite centrifugation différentielle de front, puisque l'on mesure x_t au front solvant solution. Cette expérience facile à mettre en œuvre, présente des limites de résolutions dans le cas de la séparation de

TABLEAU 1 :
Coefficients de sédimentation ($S_{20,w}$) de quelques molécules et particules



deux molécules de s voisins. Dans ce cas, on lui préfère la centrifugation différentielle de zone dans laquelle, la solution est déposée au sommet de la colonne de liquide (fig. 6). Ainsi, les différentes familles de molécules vont sédimenter par zone de concentration de forme gaussienne. Dans ces conditions, on admet

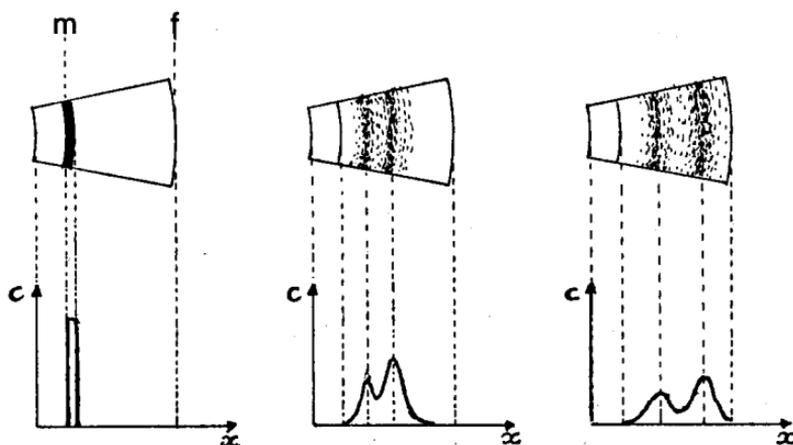


Fig. 6. — Déplacement des molécules dans une solution en fonction du temps. Cas d'une cellule à bande formée.

que x_i de chaque famille de molécule correspond au point de plus grande concentration.

II.2. Cas de l'équilibre de sédimentation.

Un cas d'application très important de l'équation de LAMM est finalement celui où le flux du soluté est égal à zéro. En effet, expérimentalement, la cellule possède des limites, il s'établira donc en son sein, un gradient de concentration tel que les flux de sédimentation et de diffusion s'annihilent. Ce cas est celui de l'équilibre de sédimentation (fig. 7). Lorsque cet équilibre est établi, la concentration C dans chaque élément de volume de la cellule est indépendante du temps. Avec $\partial c/\partial t = 0$, l'équation de LAMM s'écrit :

$$s\omega^2 x c(x) - D \cdot (\partial c(x)/\partial x) = 0$$

ou encore : $s/D = [1/\omega^2 x c(x)] \cdot dc(x)/dx$. (éq. 5)

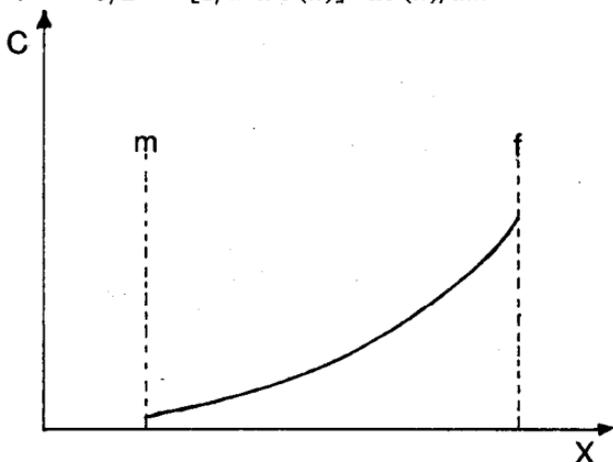


Fig. 7. — Distribution de la concentration à l'équilibre de sédimentation.

SVEDBERG a su tirer profit de cette situation en établissant l'équation qui porte son nom, en procédant de la manière suivante : au cours de son déplacement dans la cellule de centrifugation, une molécule est soumise à la force de friction F qui, ramené à une mole de molécule, s'écrit :

$$F = N_{av} \cdot f_s \cdot (dx/dt) \quad (\text{éq. 6})$$

où dx/dt est la vitesse de déplacement de la molécule. Lors de la sédimentation, cette force est égale à la force centrifuge. Celle-ci est égale au produit de l'intensité du champ de force $\omega^2 x$ par la masse effective de la particule ; cette dernière est donnée par le volume molaire V_M de la particule et la différence de densité entre particule et solution, donc :

$$F = \omega^2 x V_M \cdot (\rho_2 - \rho). \quad (\text{éq. 7})$$

Le volume molaire est défini par le volume occupé par une mole, soit :

$$V_M = M/\rho_2$$

où M est égal à la masse moléculaire du soluté et ρ_2 à sa densité en solution. Avec cette expression de V_M dans l'équation 7 et en écrivant que les équations 6 et 7 sont égales, elles deviennent :

$$(1/\omega^2 x) \cdot (dx/dt) = M \cdot (1 - \rho/\rho_2)/N_{av} \cdot f_s = s \quad (\text{éq. 8})$$

D'après l'équation 6, on voit que le membre de gauche de l'équation 8 est égal au coefficient de sédimentation s . L'inverse de la densité du soluté est égal au volume spécifique partiel de celui-ci, soit $1/\rho_2 = \bar{V}$. Par ailleurs, SVEDBERG a admis que le coefficient de friction de sédimentation f_s est égal à celui de diffusion f_D , c'est-à-dire $f_s = f_D$ où f_D est donné par :

$$\lim_{c \rightarrow 0} D = RT/N_{av} \cdot f_D = D_0.$$

Ainsi, l'équation devient :

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V} \cdot \rho)} \cdot \frac{s}{D_0} \quad (\text{éq. 9})$$

ou encore :

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V} \cdot \rho) \omega^2} \cdot \frac{1}{x \cdot c(x)} \cdot \frac{dc(x)}{dx}$$

$$M = \frac{2 RT}{(1 - \bar{V} \cdot \rho) \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \ln c(x)}{dx^2}. \quad (\text{éq. 10})$$

D'après les hypothèses qui ont été faites précédemment, les équations 9 et 10 ne sont valables que pour un soluté isomoléculaire, infiniment dilué dans un solvant unitaire.

Expérimentalement, on trace la variation de $\ln c(x)$ en fonction de x^2 (fig. 8). La forme de la courbe ainsi obtenue permet de dire si le soluté est isomoléculaire ou non, si la solution est idéale ou non. Dans le cas idéal, la courbe est une droite. Dans tous les cas, on considère que la pente à l'origine est égale à :

$$\langle M \rangle (1 - \bar{V} \cdot \rho) \cdot \omega^2 / 2 RT.$$

De la même manière que pour le coefficient de sédimentation, obligation est faite d'extrapoler à concentration nulle, de manière à se situer dans les conditions de validité de l'équation 10. En

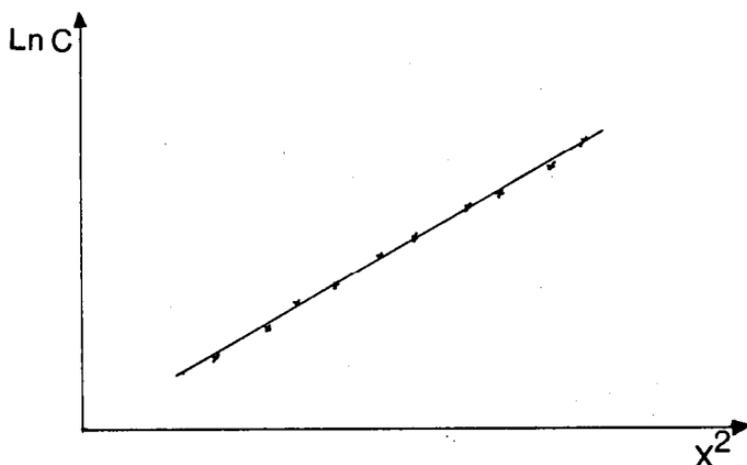


Fig. 8. — Utilisation des résultats obtenus à l'équilibre de sédimentation.

ce qui concerne les effets de température, de solvant, il en est déjà tenu compte par l'intermédiaire de T , \bar{V} et ρ .

11.3. Equilibre de densité.

Supposons que l'on ait une solution saline (chlorure, sulfate de césium, etc.) placée dans une cellule. Si l'on fait tourner cette cellule pendant un temps suffisamment long et à grande vitesse, il se forme au sein de la cellule une sédimentation du sel, donc un gradient de concentration, donc de densité qui, du fait de la diffusion, tend vers une situation d'équilibre.

Le gradient de densité dû à la présence du sel est donné par la formule empirique :

$$d\rho/dx = \omega^2 x/\beta$$

où β est une grandeur qui est fonction de la concentration du sel et surtout de son volume spécifique (tableau 2). On peut admettre que β est une constante sur toute la hauteur de la cellule. Par intégration, on obtient :

$$\rho(x) = \rho_s + (x^2 - x_s^2) \cdot \omega^2/2\beta$$

où ρ_s est la densité initiale du solvant et x_s la distance à laquelle cette densité est conservée.

Soit x_0 la distance à l'axe de rotation où la densité de la solution saline est égale à la densité $1/\bar{V}$ de la macromolécule étudiée. De part et d'autre de cette section, la densité du milieu a pour expression :

$$\rho(x) = 1/\bar{V} + (x - x_0) \cdot d\rho/dx.$$

TABLEAU 2 :
Valeurs de β pour quelques sels couramment utilisés.

Densité à 25°C

 $\beta \cdot 10^{-3}$

	Cathion	Anion			
		Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	SO ₄ ²⁻
	Cs ⁺				
1,20		2,04	1,46	1,17	1,06
1,30		1,55	1,06	0,81	0,76
1,40		1,33	0,89	0,65	0,67
1,50		1,22	0,73	0,55	0,64
1,60		1,17			0,66
1,70		1,14			0,69
1,80		1,12			0,74
1,90		1,12			
	Li ⁺				
1,30		42,3	8,9		
1,40			9,1		
1,50			10,5		
1,60			11,4		
1,70			11,4		
1,80			10,0		

En remplaçant par cette valeur dans la relation 10, toujours valable puisque l'on travaille à l'équilibre, celle-ci devient :

$$M = \frac{RT}{\lambda(x-x_0) \cdot (dq/dx) \bar{V}} \cdot \frac{1}{\omega^2 x \cdot c(x)} \cdot \frac{dc(x)}{dx}$$

d'où l'on déduit :

$$\frac{d \ln c(x)}{d(x-x_0)} = \frac{\lambda M \omega^2 x \bar{V} \cdot (x-x_0)}{RT} \cdot \frac{dq}{d(x)}$$

La zone dans laquelle se concentrent les macromolécules est assez étroite pour que l'on puisse négliger la variation relative de x devant celle de $x-x_0$, on peut donc remplacer la grandeur variable $\omega^2 x$ par $\omega^2 x_0$, de même $(dq/dx)_x$ et peu différente de $(dq/dx)_{x_0}$. On a alors une équation différentielle à variable séparée en c et en $x-x_0$ qui, par intégration donne :

$$c(x)/c(x_0) = \exp(-(x-x_0)^2/2\sigma)$$

avec :
$$\sigma = RT/\bar{V} \omega^2 x_0 M (dq/dx)_{x_0}$$

Le raisonnement précédent est très simplifié, car il faudrait en toute rigueur tenir compte que la localisation de macromolécules dans une zone étroite affecte de façon très sensible la densité du milieu. La répartition des macromolécules n'obéit plus à la relation simple et pour certaines le calcul de λ est vérifié à 20 % près. On résoud simplement le problème, en utilisant des « marqueurs » de densité connus qui servent de repères et permettent de connaître avec précision la densité en un point et cela sans calcul (fig. 9).

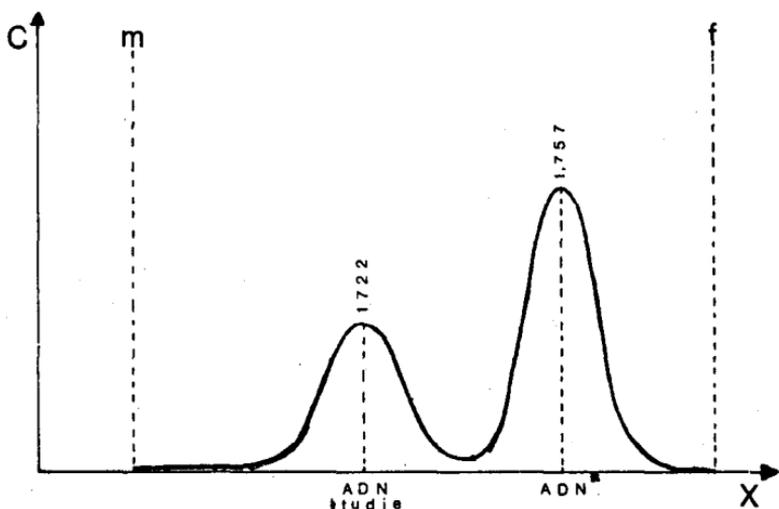


Fig. 9. — Distribution de la concentration d'un mélange de deux acides desoxyribonucléiques (ADN) à l'équilibre de densité :

ρ_s : 1,761, ρ de ADN (marqueur (ADN*)) = 1,757, ρ de l'ADN étudié : 1,722, température 20°C, vitesse : 44 770 RPM.

On notera également que cette méthode permet de déterminer avec une assez bonne précision une densité « apparente » de la substance dans les conditions du milieu où elle se trouve placée. Cette densité peut être notablement différente de celle qui serait mesurée dans un milieu de composition différent et dans lequel, en particulier, l'activité de l'eau serait plus élevée et la concentration en sels plus faible (tableau 3).

TABLEAU 3 :

Influence de la nature du gradient sur la densité des molécules.

molécule ou particule	Densité				
	CsCl	Cs ₂ SO ₄	NaI	KI	Métrizamide
ADN E. Coli	1,692	1,421	1,520	1,488	1,12
ARN E. Coli	1,9	1,663	1,62 - 1,65		1,17
	Saccharose	Ficoll	glycogène		
mitochondrie	1,19	1,136	1,127		1,20 - 1,25

II.4. Autres grandeurs accessibles.

Les trois types d'applications donnés précédemment correspondent à des solutions relativement simples de l'équation de LAMM. Cependant, sa résolution est désormais possible dans des conditions moins strictes grâce à l'évolution de la modélisation mathématique rapidement traitable par informatique. On peut ainsi étudier les solutions dans des phases de transitions avant l'établissement d'un équilibre et sans extrapolation à la concentration nulle. Ceci permet d'atteindre avec une facilité relative des paramètres tels que le coefficient de diffusion, le rayon de STOCKES d'une molécule ou les interactions entre molécules, pour ne donner que quelques exemples.

III. MATERIEL ET METHODES DE DETECTION.

Pour l'étude d'un grand nombre de substances d'intérêt biologique, telle que les protéines, il est nécessaire de soumettre les molécules à des accélérations de l'ordre de 300 000 g. L'accélération gamma est donnée par l'expression $\omega^2 x$ où x est le rayon de rotation et ω la vitesse angulaire. Puisque ω figure au carré, il est *a priori* plus avantageux pour obtenir des accélérations élevées d'avoir à faire à des centrifugeuses à grandes vitesses que des centrifugeuses à grand rayon.

Les vitesses communément utilisées sont de l'ordre de 50 000 t/mn, mais le matériel de pointe peut atteindre 85 000 t/mn. Ces vitesses sont obtenues soit par un moteur électrique, soit par un courant d'huile sous pression faisant tourner une turbine mon-

tée sur l'axe de rotation. Les fluctuations de vitesse inévitablement liées à ces hautes valeurs sont limitées par l'utilisation de rotors massifs (environ 2 kg). Le rotor est la pièce métallique dans lequel est inclus la cellule analytique (fig. 10).

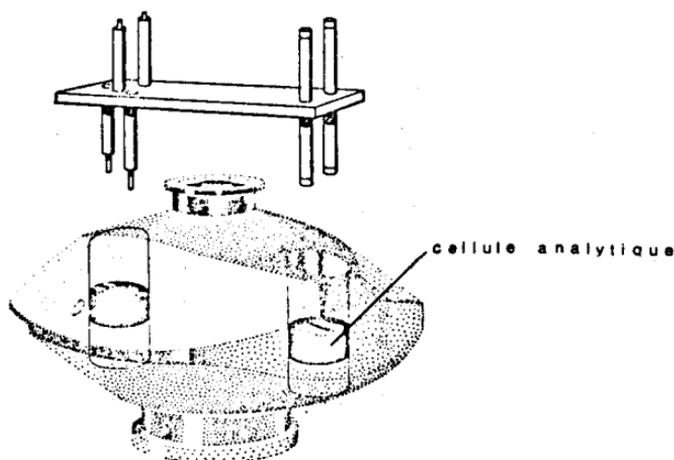


Fig. 10. — Schéma d'un rotor analytique. Diamétralement opposé à la cellule analytique est placé un contrepoids, de telle sorte que le centre de gravité soit toujours placé sur l'axe droit du rotor.

Au-dessus est représenté l'outil d'alignement optique de la cellule.

Se superposant aux problèmes des forces de cohésion des pièces métalliques, l'échauffement dû à la friction des molécules d'air sur le rotor nécessite l'utilisation d'un vide poussé (environ 10 microns de mercure). Le tout doit être maintenu à une température constante déterminée à l'avance, car il est évident que les caractéristiques d'une macromolécule ne sont pas les mêmes suivant la température.

Toutes ces contraintes donnent naissance à des machines dont le faible encombrement et l'esthétique ne sont pas leur principale qualité (photo 1). D'autant qu'à tout ceci, il faut adjoindre une unité optique de façon à suivre le comportement des molécules au sein de la cellule lorsqu'elles sont en rotation. De nombreux procédés optiques ont été ou sont encore utilisés. Aucun ne s'est avéré être idéal, cependant les problèmes d'alignement optique et d'interprétation ont fait préférer trois procédés.

III.1. Interféromètre de Rayleigh.

Dans ce cas, on fait interférer les rayons lumineux ayant traversé la cellule contenant la solution avec les rayons ayant traversé à la même cote une cuve témoin remplie de solvant à l'aide

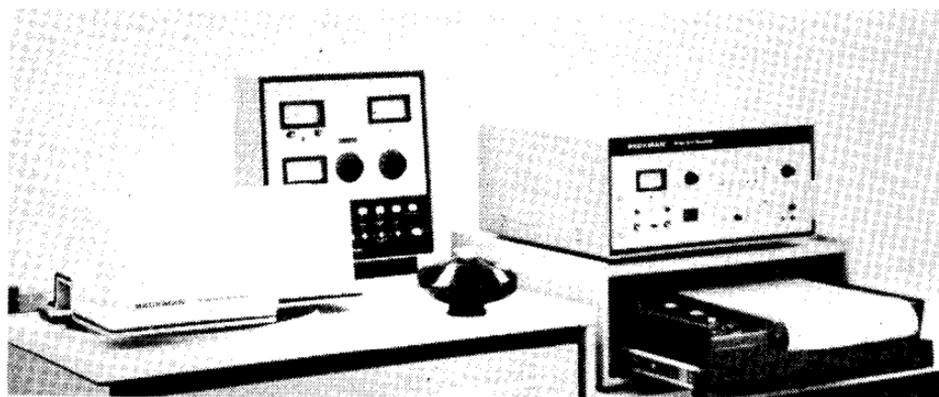


Photo 1. — Ultracentrifugeuse et son unité optique analytique UV.

d'un interféromètre de RAYLEIGH (qui utilise le principe des trous d'YOUNG). On utilise deux fentes verticales éclairées par une même source linéaire verticale. On obtient dans ce cas un système de franges verticales. Deux rayons situés à la même cote qui traversent l'un la cellule témoin, l'autre la cellule de la solution, parcourent le même chemin optique, quand ils sont situés à une cote telle que les molécules de solutés n'y sont pas présentes. Dans ce cas, la frange centrale reste dans le plan de symétrie du montage. A toutes les côtes des autres régions, la frange centrale est décalée et toutes les franges latérales sont décalées de la même quantité (fig. 11). Avec une bonne approximation, le décalage latéral AB est proportionnel à la différence de concentration en soluté entre la cuve témoin et la cuve de l'échantillon à la cote considérée. Sur une droite verticale, la distance entre deux franges est la distance entre deux niveaux pour lesquels la concentration correspond à une différence de marche d'une longueur d'onde. Avec ce montage, il est possible de déterminer avec une bonne précision le rapport entre la concentration C_0 et le décalage des franges dans la partie supérieure de l'image.



Fig. 11. — Interférogramme.

III.2. Méthode du Schlieren.

S'il existe un gradient de concentration dans une cellule, il existe un gradient d'indice. La méthode du SCHLIEREN consiste à transformer la variation d'indice en une déviation dans l'espace du faisceau optique traversant la cellule.

Soit une source F (fig. 12) éclairée par une lumière monochromatique, L une lentille donnant un faisceau parallèle, L' une lentille formant l'image de F sur P. P contient une fente fine d'inclinaison variable. Entre P et la surface d'observation P' (généralement une plaque photo) est placée une lentille cylindrique à axe vertical qui a pour effet d'amplifier les déplacements horizontaux.

L'ensemble (lentille de caméra + lentille cylindrique) donne une image de P sur P'.

La cellule analytique est placée entre L et L'. Quand il n'y a pas de gradient de l'indice dans la cellule, l'image de F est une horizontale dans P et cette image traverse la fente en son milieu. L'image donnée par la lentille cylindrique sera une ligne verticale appelée ligne de base.

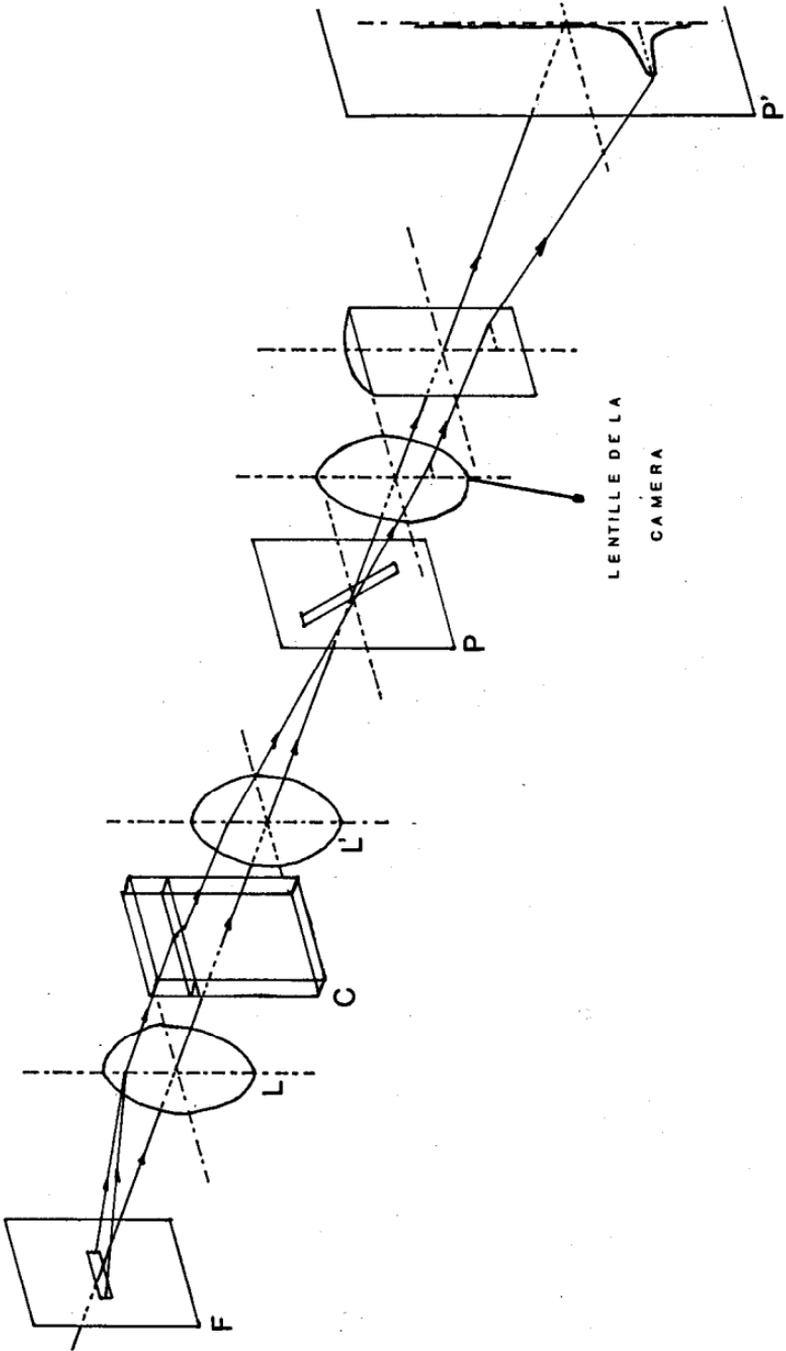


Fig. 12. — Schéma de l'optique schlieren.

S'il existe un gradient d'indice dans la cellule, les rayons lumineux seront déviés vers les indices croissants (principe de FERMAT) et nous verrons que cette déviation est proportionnelle au gradient d'indice ; donc pour différents gradients d'indices, on aura différentes lignes horizontales dans P, déplacées verticalement. De ce fait, les rayons où le gradient d'indice est maximum seront les plus déviés. Il s'ensuit que pour un gradient d'indice donné, le faisceau lumineux va traverser P en un point plus ou moins éloigné latéralement du centre de ce plan. Mais, les rayons traversant P, ne passeront plus par l'axe vertical de la lentille cylindrique et celle-ci va amplifier le déplacement horizontal. Ceci signifie que le système fente inclinée - lentille transforme un déplacement vertical en un déplacement horizontal.

Soit y la déviation mesurée sur le plan P'. D'après les lois régissant les lentilles cylindriques, il est possible d'écrire :

$$y = KY \quad \text{avec} \quad Y = e \operatorname{tg} \theta \quad (\text{fig. 13})$$

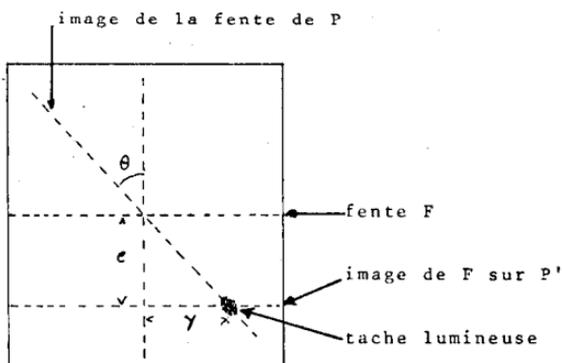


Fig. 13. — Schéma optique.

Soit α la déviation des rayons lumineux à la sortie de la cellule analytique (fig. 14). On suppose que le gradient d'indice est

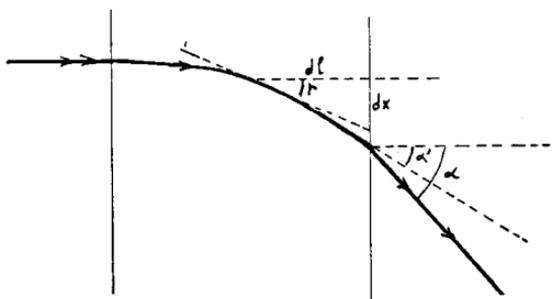


Fig. 14. — Schéma optique.

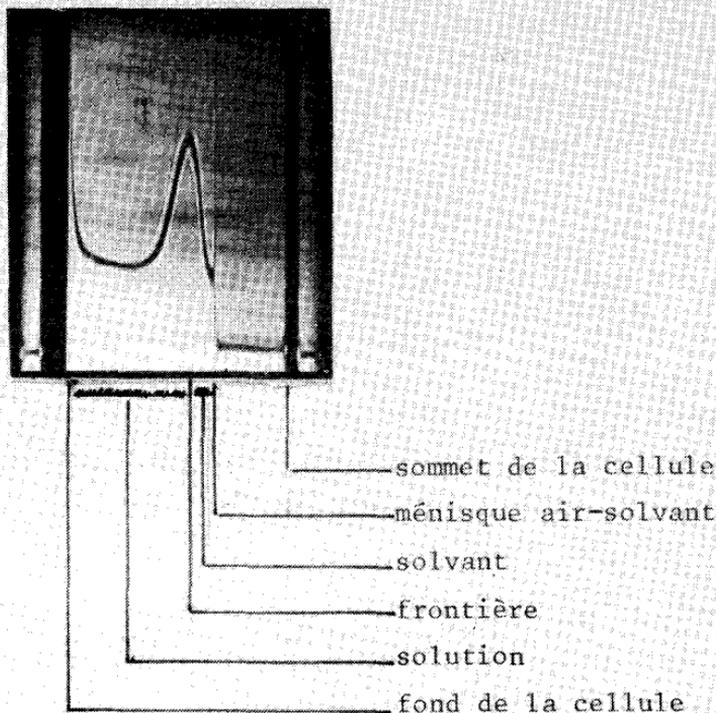


Photo 2. — Photo obtenue par l'optique Schlieren lors d'une centrifugation de front.

constant dans la zone traversée. Si l'on désigne par r l'angle du rayon avec l'horizontale, on peut écrire d'après DESCARTES :

$$n \cdot \cos r = C^{\text{te}}$$

$$dn \cdot \cos r - n \cdot \sin r \cdot dr = 0$$

Si dx est le déplacement vertical et dl l'élément de déplacement du rayon lumineux :

$$dx/dl = \operatorname{tg} r \Rightarrow dx = \operatorname{tg} r \cdot dl$$

$$dr = (dn/n) \cdot (dl/dx) \Rightarrow \int dr = \int (dn/dx) \cdot (dl/n) = (dn/dx) \cdot (l/n) = \alpha'.$$

Il se produit une réfraction à la sortie de la cuve :

$$n \sin \alpha' = \sin \alpha,$$

ce qui implique $n \alpha'$ peu différent de α , d'où

$$n \alpha' = \alpha = q \frac{dn}{dx}.$$

Si d est la distance de la cellule au plan P,

$$e = d \cdot \operatorname{tg} \alpha \simeq d \cdot \alpha$$

$$\Rightarrow y = K \cdot \operatorname{tg} \vartheta \cdot d \cdot \varrho \left(\frac{dn}{dx} \right).$$

On montre ainsi que le déplacement y est proportionnel à dn/dx donc le déplacement y sera proportionnel au gradient de l'indice n puisque n varie suivant la position du faisceau lumineux dans la cellule.

III.3. Absorptiomètre ultraviolet.

L'absorption d'un faisceau lumineux de longueur d'onde donnée par une substance varie en fonction de la concentration C suivant la loi de BEER. $\operatorname{Ln}(I_0/I) = \varepsilon c \varrho$, où I_0 est l'intensité lumineuse incidente, I l'intensité transmise, ϱ l'épaisseur traversée et ε une constante caractéristique de la substance. La concentration du soluté à tout niveau peut être calculée à partir de l'absorbance $A = \operatorname{Log}(I_0/I)$ à ce niveau.

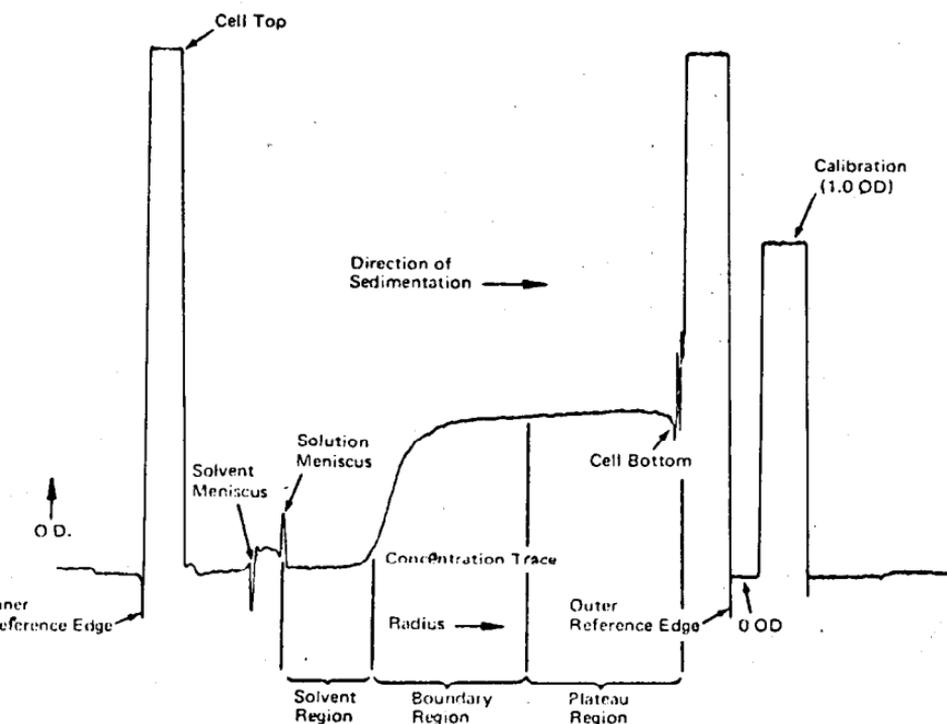


Fig. 15. — Enregistrement par balayage UV d'une sédimentation de front.

On forme par transmission l'image de la cellule éclairée avec une lumière de longueur d'onde absorbée par le soluté et non absorbée par le solvant sur un photomultiplicateur. Ce PM est partiellement occulté par une fente fine de telle sorte qu'elle ne voit qu'une épaisseur très fine de la cellule. L'ensemble est monté sur un chariot afin de pouvoir balayer l'ensemble de la cellule. La réponse du PM est proportionnelle à l'éclairage de la portion de l'image derrière laquelle se trouve la fente. Cette réponse convenablement amplifiée est envoyée sur un enregistreur qui donne directement la courbe de concentration en fonction de la distance à l'axe de rotation (fig. 15).

IV. CENTRIFUGATION PREPARATIVE.

L'ultracentrifugation analytique, si elle permet l'étude des solutions interdit pratiquement toute isolation d'un type de molécule, car les quantités utilisées sont très faibles de l'ordre de 500 μ l. Par contre, les paramètres qu'elle détermine donnent la possibilité de travailler sur de plus grandes quantités en utilisant d'autres types de rotors. En effet, ceux-ci peuvent prendre des formes tout à fait différentes, car on ne cherche plus à observer ce qui se passe dans la solution.

Les séparations sont faites soit selon le coefficient de sédimentation, soit d'après les densités.

Si dans une solution complexe, on connaît les coefficients de sédimentation de chaque composant, il est possible dans des conditions déterminées (type de rotor, vitesse, température, solvant) de déterminer le temps que mettront les molécules d'un type donné à sédimenter, c'est-à-dire à venir former au fond d'un type un culot récupérable. Ce culot représente une fraction très enrichie dans le type de molécules donné.

De la même manière, en fonction des densités, on peut créer des gradients de densités, de telle sorte que les molécules viennent se concentrer en un point du tube correspondant à leur densité propre.

Les rotors préparatifs sont de trois types :

— les rotors à godets oscillants (fig. 16).

Il s'agit d'axes sur lesquels sont accrochés verticalement des godets métalliques dans lesquels sont glissés des tubes contenant les solutions à étudier. Lors de la mise en mouvement du rotor, les godets pivotent autour d'un axe auxiliaire de façon que leurs génératrices soient perpendiculaires à l'axe de rotation. Ces rotors présentent une longue distance de sédimentation (hauteur du tube de 4 à 12 cm), ce qui permet une très bonne séparation, mais leur

volume utile est réduit du fait des forces qui s'exercent sur les axes (de 14 à 200 ml suivant les vitesses maximum);

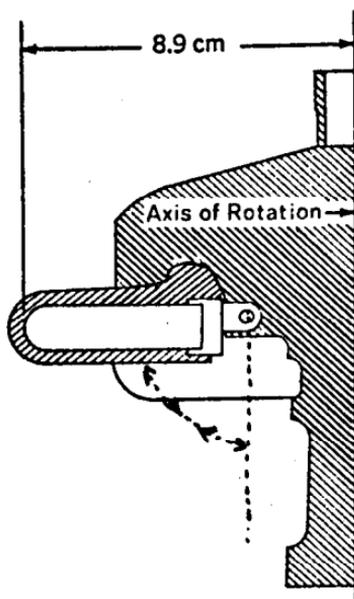


Fig. 16. — Coupe d'un rotor à godets oscillants (rotor beckman, type SVG 5 Ti).

— les rotors à angles fixes (fig. 17).

La réalisation mécanique d'un rotor à godets pivotants est délicate pour une centrifugeuse à grande vitesse. Ces rotors sont fragiles et leur capacité est faible. En outre, dans certains cas, ce type de rotor n'est pas celui qui donne les meilleurs résultats.

On utilise le plus souvent des rotors dans lesquels les tubes ont une inclinaison fixe sur l'axe de rotation. Leur principal avantage est une grande facilité de construction. En outre, ils ont la forme d'un corps de révolution sans aucune saillie et par suite un faible coefficient de frottement sur l'air.

Le déplacement des molécules dans un rotor de ce type ne se fait pas suivant la même trajectoire simple que dans un rotor dont les godets sont perpendiculaires à l'axe. Une molécule quelconque soumise à la force centrifuge se déplace sur un rayon perpendiculaire à l'axe. Dans ce mouvement, elle rencontre la paroi du tube située vers l'extérieur après un temps très inférieur à celui qu'il lui aurait fallu pour atteindre le fond si le tube avait été horizontal. Elle aura ensuite tendance à suivre la paroi et à

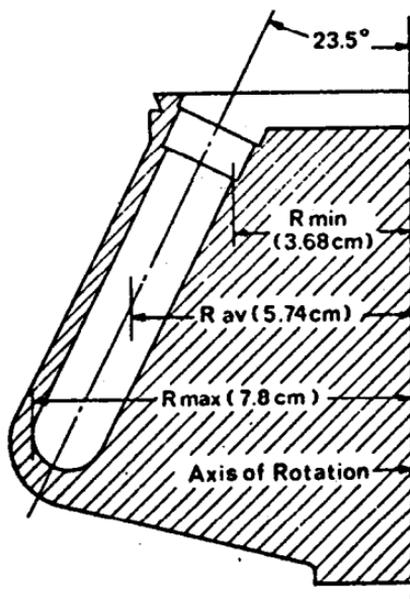
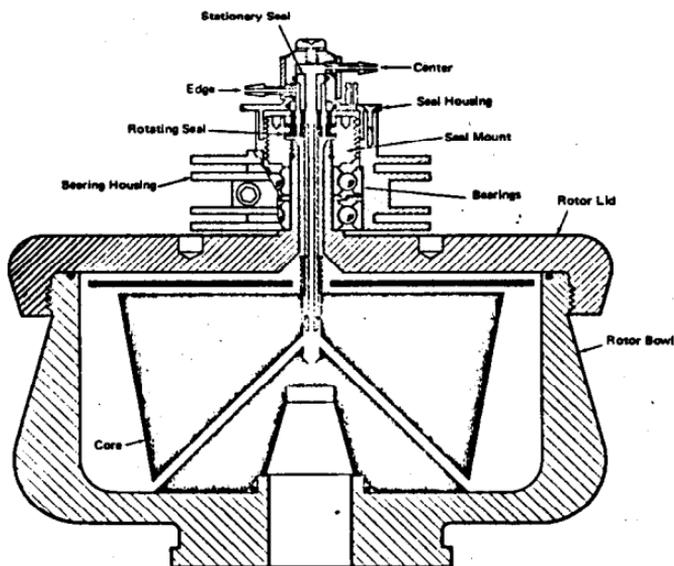


Fig. 17. — Coupe d'un rotor à angle fixe (rotor beckman, type FA 65).



Coupe 18. — Coupe d'un rotor zonal.

venir au voisinage de la génératrice la plus extérieure, puis à suivre cette génératrice jusqu'au fond du tube, pour former finalement un culot.

Le volume de ces rotors varie de 16 ml à 2 000 ml ;

— les rotors zonaux (fig. 18).

Bien que le volume utile des rotors précédents soit appréciable, la quantité d'échantillon que l'on peut traiter est limitée par le diamètre du tube et l'épaisseur initiale de la courbe d'échantillon. Le seul moyen pratique de traiter une quantité d'échantillons appréciable au cours d'une seule centrifugation est d'augmenter cette épaisseur initiale et la surface couverte par l'échantillon. Dans ce but, on crée les rotors zonaux : ils ont une forme de cylindre ou de cuve dans lequel le volume varie comme le carré de la distance radiale à l'axe de rotation. La cavité cylindrique de ces rotors est divisée en secteurs par un noyau à ailettes d'où le nom de zonal ; le rotor est fermé par un couvercle fileté. La solution est introduite et prélevée du rotor en cours de rotation par l'intermédiaire du palier d'étanchéité. Les volumes utiles sont de l'ordre de 1,5 l à 2 l, mais la quantité d'échantillons traitables représente 10 % du volume, tandis qu'ils ne correspondent qu'au maximum à 5 % du volume dans les autres rotors.
