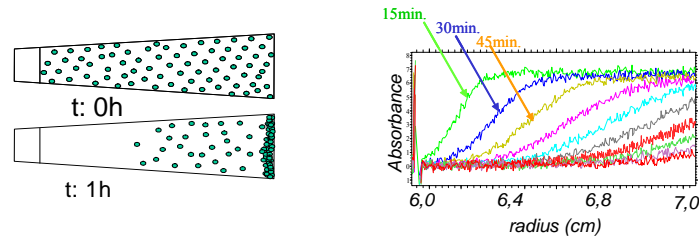


## LE PRINCIPE :

La centrifugation permet d'observer le mouvement de macromolécules en solution soumises à un champ de force centrifuge, à l'aide de deux systèmes de détection, l'absorbance et l'interférence.

Lors de la centrifugation, les macromolécules sont entraînées vers le fond de la cellule. Ce mouvement est observé, par la mesure de **l'absorbance** et du déplacement des franges d'interférence, **en fonction de la distance à l'axe de rotation, à différents temps**. On mesure ainsi l'évolution de la répartition des particules dans la solution en fonction du temps.



La sédimentation dépend, pour chaque soluté d'au moins deux paramètres :

- le coefficient de sédimentation,  $s$ , qui traduit la vitesse de la particule en réponse au champ de force centrifuge.
- le coefficient de diffusion,  $D$ , qui traduit la capacité de la particule à diffuser, en réponse aux gradients de concentration.
- Pour des particules en interaction, il faut introduire des paramètres traduisant l'apparition et la disparition du matériel (constante cinétiques d'association dissociation, constantes d'équilibre...).

L'équation de Lamm décrit l'évolution de la concentration  $c$  d'un type de particules idéales (sans interaction) en fonction de temps  $t$  et de la distance à l'axe de rotation,  $r$  :

$$\text{Equation de Lamm : } (\partial c / \partial t) = -1/r \cdot \partial / \partial r [r (c s \omega^2 r - D \cdot \partial c / \partial r)].$$

$\omega$  : vitesse angulaire en rad/s.

Le coefficient de sédimentation,  $s$ , dépend de la masse molaire de la particule,  $M$ , de son volume partiel spécifique  $\bar{v}$  (l'inverse de sa densité) et de sa taille exprimée par son rayon hydrodynamique ou de Stokes  $R_s = R_H$ ; pour le solvant, de sa densité et viscosité,  $\rho^\circ$  et  $\eta^\circ$  :

$$\text{Equation de Svedberg : } s = M \cdot (1 - \bar{v} \rho^\circ) / (N_A \cdot 6 \pi \eta^\circ R_s)$$

D'autre part,  $D$  et  $R_s$  sont reliés, via le coefficient de friction  $f$  :

$$\begin{aligned} \text{Relation de Stokes:} & \quad f = 6 \pi \eta^\circ R_s \\ \text{Relation de Einstein-Stokes:} & \quad D = RT / N_A \cdot f \end{aligned}$$

$R$ : constante des gaz       $T$ : température (°K)

Rapport  $f/f_{\min}$ : On peut comparer le coefficient de friction  $f$  (et donc le rayon de Stokes) au coefficient de friction minimum  $f_{\min}$  qu'aurait la particule si c'était une sphère compacte de rayon  $R^\circ$ .

$$f = f/f_{\min} f_{\min} \quad R_s = f/f_{\min} R_{\min}$$

$R_{\min}$  peut se calculer avec  $M$ ,  $\bar{v}$  (le volume par gramme).

$f/f_{\min}$  est plus grand que 1, à cause de l'hydratation, de la rugosité de la surface et d'anisotropie ou non compacité de la forme de la particule. Pour une particule globulaire compacte,  $f/f_{\min}$  est compris entre 1.2 et 1.3 : nous considérons par défaut  $f/f_{\min} = 1.25$ . Pour une particule légèrement asymétrique  $f/f_{\min}$  tend vers 1.5. Pour le virus de la mosaïque du tabac (forme de bâton):  $f/f_{\min} = 2.6$ . Pour les protéines dépliée,  $f/f_{\min}$  dépend de  $M$  et atteint  $f/f_{\min} = 3$  pour  $M = 220$  kDa.

## L'EXPERIENCE :

- 1- Déterminer les paramètres de l'échantillon et du tampon :  $v_{bar}$ , poids moléculaire,  $s$ , densité et viscosité : **SEDNTERP**, S-RHouMnew.xls et/ou mesure de la densité (densimètre DMA5000) et de la viscosité (AMVn)
- 2- Choisir la vitesse : **SEDFIT**
- 3- Lancer l'expérience : **XLI**
- 4- Analyser les données : **SEDFIT**

## PRINCIPE DU TRAITEMENT DE DONNEES

On utilise le traitement de donnée SEDFIT, développé par P. Schuck, NIH, (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>). Ce programme utilise des solutions numériques de l'équation de Lamm. Il simule des profils de sédimentation pour des particules caractérisée par  $s$  et  $D$ , compte tenu les paramètres expérimentaux (vitesse angulaire, temps, géométrie de la cellule).

**Notre analyse va consister :**

### 1 : A caractériser une distribution de coefficients de sédimentation

On considère un grand nombre de particules (typiquement 200), pour lesquelles on relie de manière plausible coefficient de sédimentation et coefficient de diffusion (donc  $M$  et  $R_s$ ), via des valeurs choisies (*input*) pour le coefficient  $f/f_{\min}$  (typiquement 1.25) et  $\bar{v}$ . On cherche la meilleure combinaison du signal de ces particules rendant compte des données expérimentales. On obtient une distribution de coefficients de sédimentation  $c(s)$ , aussi appelée distribution de particules.

Rq: Méthode extrêmement puissante et relativement robuste. C'est parce que le phénomène du transport est dominé par la sédimentation des particules. La diffusion affecte la dispersion des fronts dans les profils de sédimentation. Comme l'analyse considère la diffusion de manière certes imparfaite mais suffisamment précise, on obtient des  $c(s)$  avec une grande résolution. Comme l'analyse considère globalement beaucoup de profils de sédimentation, les bruits systématiques sont aisément évalués, ce qui augmente aussi les possibilités de l'analyse.

Attention cependant dans le cas de systèmes très polydisperses. Le traitement mathématique peut conduire à des « oscillations » artéfactuelles dans les  $c(s)$ . Il y a possibilité qu'une distribution large et régulière de particules soit modélisée comme une série de pics, ou la contribution d'une particule soit splittée en 2 pics. Il y a donc danger de surinterprétation, particulièrement pour des échantillons polydisperses.

- C est pourquoi on utilise généralement une procédure de régularisation (généralement maximum d'entropie), qui impose la recherche d'une distribution régulière.

- La comparaison des distributions obtenues avec plusieurs procédures d'analyse (*input parameter*, choix des profils expérimentaux), ou systèmes de détection pour un même échantillon, ou issus d'échantillons à différentes concentration (différents signal/bruit) permet de discerner les espèces discrètes d'un continuum.

- L'effet du choix de la valeur de  $\bar{v}$  dans l'analyse  $c(s)$  doit aussi être évaluée quand  $\bar{v}$  n'est pas connu ou quand dans un même échantillon, on a des particules avec des  $\bar{v}$  différents.

### 2 : Interpréter les $c(s)$ en termes de masse molaires.

Ceci ne peut être fait qu'avec une hypothèse pour  $f/f_{\min}$  et  $\bar{v}$ . On utilise généralement  $f/f_{\min} = 1.25$  (particule globulaire compacte) pour estimer  $M$ . Une particule de forme anisotrope ou étendue aura un  $M$  sous-évalué.  $\bar{v}$  est connu ou bien approximé ( $\bar{v}=0.74$  ml/g) pour les protéines.

### 3. A caractériser un composé en $s$ et $D$ (donc $M$ ou $M_b$ et $R_s$ )

L'analyse en un composé non-interagissant n'est possible que pour des échantillons homogènes et sans interaction. La superposition des  $c(s)$  obtenus pour des échantillons à des concentrations différentes est utilisée pour décider si ce modèle peut être considéré. Le modèle à 2 ou 3 espèces non-interagissantes ou le modèle hybride (une espèce +  $c(s)$ ) peuvent être intéressants dans des cas spécifiques.

### 4: Signal et concentration

Les pics des  $c(s)$  sont caractérisés par leur "signal", absorbance,  $A$ , ou nombre de frange,  $J$ , qui sont reliés à la concentration,  $c$ , en mg/ml, par le trajet optique,  $l$  (cm), le coefficient d'extinction  $E_{0.1\%}$  (Absorbance pour 1 mg/ml et  $l=1$ cm) et l'incrément d'indice de réfraction,  $\partial n/\partial c$  (ml/g), de la particule, et la longueur d'onde du laser ( $\lambda=6.75 \cdot 10^{-5}$ cm):

$$A = E_{0.1\%}lc \quad ; \quad J = c (\partial n/\partial c)l/\lambda$$