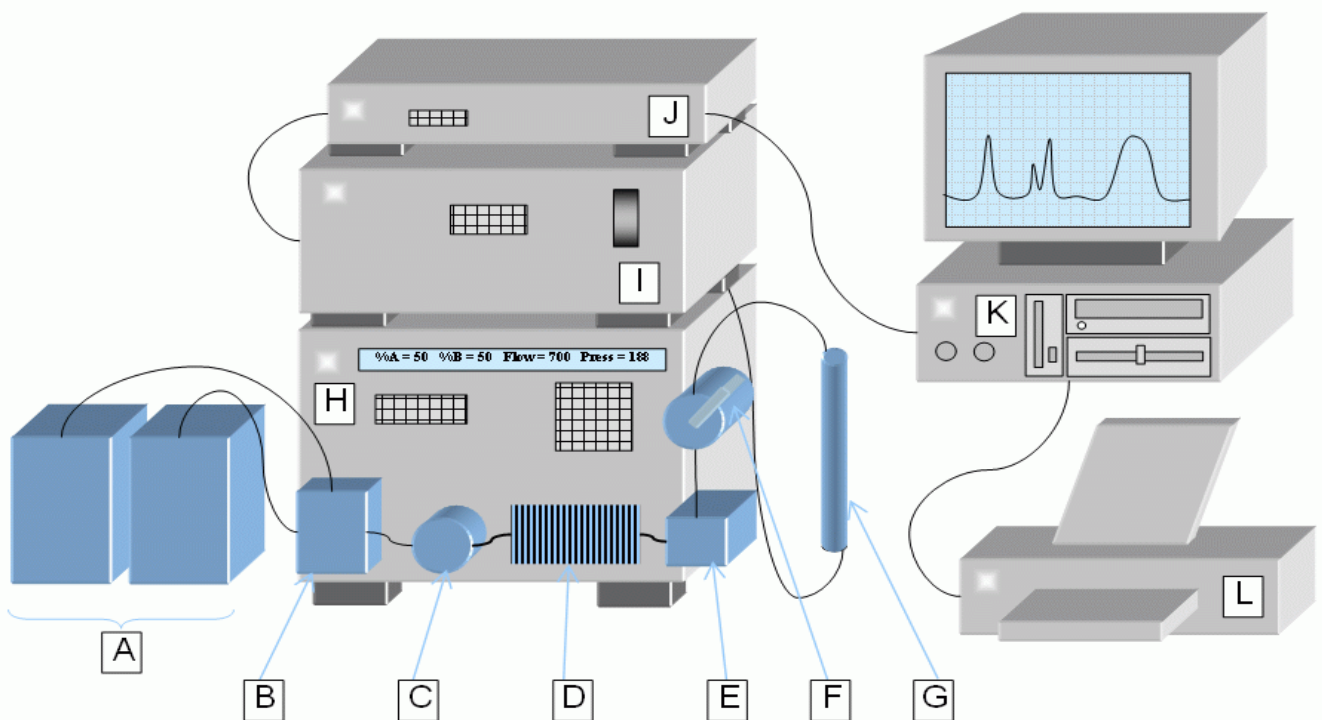


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Ferhat Abbas Setif-1
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biochimie

Polycopié du Cours : Techniques d'Analyses biologiques et physico-chimique



Destiné aux étudiants inscrits en 3^{ème} année
Licence, Option Biotechnologie de santé
Présenté par Dr. Seoussen KADA



SOMMAIRE



Introduction.....1

Solutions et Notion de concentration

I. Solutions et tampons.....2

I.1. Définition2

I.1.1. Solution.....2

I.1.2. Solvant2

I.1.3. Soluté.....2

I.1.4. Suspension.....2

I.1.5. Emulsion.....2

I.2. Notion de concentration2

I.2.1. Concentration pondérale ou massique en poids par unité de volume.....3

I.2.2. Concentration en pourcentage3

I.2.3. Concentration molaire (mol/L, M)3

I.2.4. Normalité (N).....3

I.2.4. Molalité ou concentration molaire massique (mol/kg).....3

I.2.5. Osmolarité (osmol/L).....3

I.3. Dilutions4

I.3.1. Dilution simple4

I.3.2. Dilution successive4

I.4. Solutions tampons.....4

I.4.1. Définition et Principes de base.....4

I.4.2. Facteurs affectant les propriétés tampons.....5

I.4.2.1. Capacité tampon.....5

I.4.2.2. Concentration.....5

I.4.2.3. Température.....5

I.4.3. Principaux produits tampons.....5

I.4.4. Préparation des tampons.....7

I.5. Solutions physiologiques.....7

Méthodes spectrales

I. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	9
I.1. Spectre électromagnétique.....	9
I.1.1. Spectroscopie et spectre	10
I.1.2. Absorption et émission	11
I.1.2.1. Absorption.....	11
I.1.2.2. Emission.....	11
a)-Emission spontanée.....	11
b)- Emission induite.....	11
I.2. Spectrométrie UV-VIS.....	12
I.2.1. Principe.....	12
I.2.2. Spectres dans l'UV-VIS et loi de Beer-Lambert.....	12
I.2.3. Origine d'absorption.....	13
I.2.4. Matériels.....	14
I.2.4.1. Source lumineuse.....	14
I.2.4.2. Monochromateurs.....	14
I.2.4.3. Système porte échantillon.....	14
I.2.4.4. Détecteurs.....	15
I.2.4.5. Photomultiplicateurs.....	15
I.2.4.6. Afficheur.....	15
a)- Spectrophotomètres à mono-faisceau.....	15
b)- Spectrophotomètres à double faisceau	15
I.2.5. Applications de la spectrométrie UV-VIS.....	16
I.2.5.1. Application chimique	16
a)- Analyse quantitative.....	16
b)- Analyse qualitative.....	16
c)- Essais enzymatiques.....	16
I.2.5.2. Application structurale.....	16
II. Spectrofluorimétrie.....	17
II.1. Principe.....	17
II.2. Relations quantitatives.....	18
II.3. Intensité de fluorescence.....	19
II.4. Molécules concernées.....	19
II.5. Appareillage.....	20
II.6. Applications.....	21
III. Spectroscopie d'absorption atomique (SAA).....	22
III.1. Principe	22
III.2. Appareillage.....	22
III.2.1. Source lumineuse.....	22
III.2.1.1. Lampe à cathode creuse.....	22
III.2.1.2. Lampe à décharge sans électrode.....	23
III.2.2. Atomiseur.....	23
III.2.2.1. Atomiseur de flamme.....	23
III.2.2.2. Atomiseur électrothermique.....	24
III.2.3. Sélecteur de longueur d'onde (monochromateur).....	25
III.2.4. Détecteur.....	25
III.3. Avantages et limitations	25
III.4. Applications	26
IV. Spectroscopie d'émission atomique (SEA).....	26
IV.1. Principe.....	26

IV.2. Appareillage	27
IV.2.1. Atomiseurs/ Excitateurs.....	27
IV.3. Avantages et limitations.....	28
IV.4. Applications.....	28
V. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	29
V.1. Propriétés des noyaux	29
V.1.1. Masse d'un noyau.....	29
V.1.2. Charge électrique.....	29
V.1.3. Spin	29
V.1.4. Moment magnétique du noyau.....	30
V.2. Principe de la RMN.....	30
V.3. Signal RMN.....	32
V.3.1. Traitement du signal par transformée de Fourier.....	33
V.3.2. Analyse chimique par RMN.....	34
V.4. Appareillage	35
V.5. Applications	36

Méthodes de fractionnement

I. Méthodes de précipitation.....	37
I.1. Filtration.....	37
I.1.1. Définition	37
I.1.2. Principe	37
I.1.3. Matériel de filtration	37
I.1.3.1. Filtres.....	37
a)- Filtres en profondeur.....	37
b)- Filtres membranes	38
I.1.3.2. Entonnoirs.....	38
a)- Entonnoirs ordinaires	38
b)- Entonnoirs spéciaux.....	38
I.1.4. Classification des filtrations.....	38
I.1.4.1. Diamètre des pores du filtre	38
I.1.4.2. Mode de passage du fluide.....	39
I.1.4.3. Type de pression	39
I.1.5. Ultrafiltration	40
I.1.6. Applications	40
I.2. Centrifugation.....	41
I.2.1. Définition.....	41
I.2.2. Principe.....	41
I.2.3. Calcul de la force gravitationnell.....	42
I.2.4. Types de centrifugation.....	42
I.2.4.1. Centrifugation en gradient de densité	42
a)- Préparation des gradients.....	43
b)- Gradients continus et discontinus.....	43
c)- Type de centrifugation en gradient de densité.....	44
I.2.4.2. Centrifugation différentielle.....	44

I.2.5.	Appareillages	45
I.2.5.1.	Centrifugeuses	45
a)-	Centrifugeuses de table	45
b)-	Centrifugeuses au sol	45
c)-	Microcentrifugeuses	46
d)-	Ultracentrifugeuses	46
e)-	Ultracentrifugeuses analytiques	46
I.2.5.2.	Rotors	46
a)-	Rotors à angle fixe	46
b)-	Rotors à godets mobiles	46
I.2.6.	Applications en biochimie	47
I.3.	Dialyse	47
I.3.1.	Définition	47
I.3.2.	Principe	47
I.3.3.	Facteurs influençant la dialyse	48
I.3.3.1.	Charge électrique de la membrane de dialyse	48
I.3.3.2.	Température	48
I.3.3.3.	Rapport surface de membrane / volume de la solution à dialyser	49
I.3.3.4.	Présence de substances chimiques	49
I.3.4.	Matériel de dialyse	49
I.3.5.	Technique de dialyse	49
I.3.5.1.	Préparation des membranes de dialyse	49
I.3.5.2.	Préparation des Boudins de dialyse	50
I.3.6.	Applications	50
II.	Méthodes chromatographiques	50
II.1.	Définition	50
II.2.	Principe	51
II.3.	Classification	51
II.3.1.	Classification selon la nature des phases	51
II.3.2.	Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu	52
II.3.3.	Classification selon la technique mise en jeu	53
II.4.	Grandeurs fondamentales et définitions	53
II.4.1.	Phase stationnaire (fixe)	53
II.4.2.	Adsorption	53
II.4.3.	Adsorbants	53
II.4.4.	Solvants ou éluants	53
II.4.5.	Notion de temps	54
II.4.5.1.	Temps de rétention	54
II.4.5.2.	Temps mort	54
II.4.5.3.	Temps de rétention réduit	54
II.4.6.	Volume d'éluion ou volume de rétention	54
II.5.	Principales méthodes chromatographiques	55
II.5.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM)	55
II.5.2.	Chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (CCM 2D)	56
II.5.3.	Chromatographie sur couche mince à haute performance (CCMHP)	57
II.5.4.	Chromatographie sur papier	58
II.5.5.	Chromatographie de partage	58
II.5.6.	Chromatographie échangeuse d'ions	59
II.5.7.	Chromatographie d'exclusion	60
II.5.8.	Chromatographie sur colonne	61
II.5.9.	Chromatographie d'affinité	62
II.5.10.	Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	63

II.5.11. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	64
III. Électrophorèse.....	68
III.1. Définition.....	68
III.2. Principe de la migration	68
III.3. Matériels.....	70
III.3.1. Montage	70
III.3.1.1. Montage horizontal.....	70
III.3.1.2. Montage vertical.....	70
III.3.2. Principales matrices d'électrophorèse.....	70
III.3.2.1. Agarose	70
III.3.2.2. Polyacrylamide.....	71
III.3.3. Tampons.....	71
III.3.3.1. Système tampon dénaturant et non-dénaturant.....	71
III.3.3.2. Systèmes tampons continus et discontinus.....	72
III.3.3.3. Tampons de chargement.....	72
III.3.4. Courant appliqué.....	72
III.3.5. Coloration et visualisation.....	72
III.4. Applications	73
III.5. Électrofocalisation	73
III.6. Électrophorèse bidimensionnelle	74
III.7. Immunoélectrophorèse.....	75
III.7.1. Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams.....	75
III.7.2. Electro-immunodiffusion double (électrosynérèse).....	76
III.7.3. Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell).....	76
III.7.4. Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell).....	77
III.7.5. Électrophorèse en champs pulsés.....	77
III.7.6. Électrophorèse capillaire.....	78
Références bibliographiques	79



Liste des Figures



Fig. 1 : Spectres électromagnétiques.....	9
Fig. 2 : Différents types de spectres.....	11
Fig. 3 : Absorbance d'une lumière monochromatique par une solution.....	12
Fig. 4 : Transitions électromagnétiques.....	13
Fig. 5 : Différentes cuves.	14
Fig. 6 : Spectrophotomètre à mono-faisceau.....	15
Fig. 7 : Spectrophotomètres à double faisceau.....	16
Fig. 8 : Diagramme de Jablonski.....	18
Fig. 9 : Composés fluorescent aromatiques.....	20
Fig. 10 : Différentes composantes d'un spectrofluorimètre à lampe à arc xénon.....	20
Fig. 11 : Lampe à cathode creuse.....	23
Fig. 12 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme.....	24
Fig. 13 : Schéma d'un spectrophotomètre avec four en graphite.....	25
Fig. 14 : Représentation des coordonnées polaires d'un noyau H.....	30
Fig. 15 : Mouvement de précession du moment magnétique de spin autour d'un champ magnétique.....	31
Fig. 16 : Basculement de champ magnétique.....	31
Fig. 17 : Emission - réception du signal.....	32
Fig. 18 : a)- FID d'un système élémentaire (un proton isolé) ; b)-FID d'un système complexe.....	32
Fig. 19 : Transformation de Fourier.....	33
Fig. 20 : FID d'un système complexe et sa transformée de Fourier.....	33
Fig. 21 : Formule développée de l'éthanol.....	34
Fig. 22 : Spectre RMN de l'éthanol (simulation).....	34
Fig. 23 : Photo d'un spectromètre RMN.....	35
Fig. 24 : Schéma de spectromètre RMN avec bobines émettrice et réceptrice séparées.....	36
Fig. 25 : Filtration gravimétrique.....	39
Fig. 26 : Filtration sous vide.....	40
Fig. 27 : Centrifugation sur gradient de saccharose.....	43
Fig. 28 : Centrifugation différentielle.....	45
Fig. 29 : Principe de la dialyse.....	48
Fig. 30 : Caractéristique d'un pic d'éluion en chromatographie.....	54
Fig. 31 : Chromatographie sur couche mince.....	55

Fig. 32 : Calcul du rapport frontal.....	56
Fig. 33 : CCM bidimensionnelle	57
Fig. 34 : Chromatographie échangeuse d'anion.....	59
Fig. 35 : Schéma de "trajet " d'un soluté de masse molaire dans la Chromatographie d'exclusion.....	60
Fig. 36 : Tamisage moléculaire.....	61
Fig. 37 : Chromatographie sur colonne.....	62
Fig. 38 : Chromatographie d'affinité.....	63
Fig. 39 : Chromatographie liquide haute performance.....	64
Fig. 40 : Schéma de principe d'un appareil classique de chromatographie en phase gazeuse.....	65
Fig. 41 : Schéma de colonne	66
Fig. 42 : Courant d'évaporation.....	68
Fig. 43 : Courant d'endo-osmose.....	68
Fig. 44 : Montage horizontale.....	70
Fig. 45 : Montage verticale.....	70
Fig. 46 : L'électrofocalisation bidimensionnelle.....	74
Fig. 47 : L'électrophorèse bidimensionnelle.....	74
Fig. 48 : Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams.....	75
Fig. 49 : Electrosynérèse.....	76
Fig. 50 : Electro-immunodiffusion monodimensionnelle.....	77
Fig. 51 : Electro-immunodiffusion bidimensionnelle.....	77
Fig. 52 : Electrophorèse en champs pulsés.....	78
Fig. 53 : Electrophorèse capillaire.....	78



Liste des Tableaux



Tableau I : Classification selon la nature des phases.....	52
Tableau II : Classification selon la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer.....	52



INTRODUCTION



Introduction

Les techniques d'analyses biologique et physico-chimique font partie du quotidien. C'est l'application d'un processus, ou d'une série de processus dans le but d'identifier et/ ou de doser une substance, les constituants d'un mélange, d'une solution ou de déterminer la structure de composés chimiques ou biologique. Ce domaine couvre une gamme de techniques chimiques et instrumentales, employés dans de nombreux secteurs, dans le médical (diagnostic), la biochimie, l'agroalimentaire, l'environnement (pollution) et les industries. Mais avant de choisir une méthode, il est important d'évaluer l'objectif de l'analyse.

En analyse chimique deux catégories de méthodes peuvent être distinguées : la première regroupe les méthodes chimiques, et la seconde qui est en premier plan, comprend les méthodes physico-chimiques utilisant des propriétés particulières de la matière à des mesures en relation avec cette information chimique. Contrairement, les analyses actuelles dont plus de la moitié concernent des composés à l'état de trace évitent d'utiliser les réactions chimiques. Un grand nombre s'effectue par des instruments tels que la spectroscopie appliquée. L'analyse chimique actuelle fait preuve de beaucoup d'innovation, l'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants apportant des possibilités nouvelles.

Ce polycopiée donne un ensemble de base sur les méthodes les plus souvent rencontrées actuellement en analyse physico-chimique et biologique, qualitative, quantitative et structurales, employés dans des secteurs variés soit de la recherche expérimentale ou professionnel dans les différentes industries.

Ce polycopiée est organisé en deux sections : les méthodes spectrales (UV, visible, fluorimétrie, absorption et émission atomique et RMN) et les méthodes séparatifs (filtration, centrifugation, dialyse, chromatographie et électrophorèse). Il offre un panorama détaillé des méthodes actuelles d'analyse et s'adresse aux étudiants des 1^{er} cycle universitaire/ Licence Biotechnologie et santé ou biochimie.



Solutions et Notion de concentration



I. Solutions et tampons

La très grande majorité des réactions chimiques a lieu non pas entre des produits solides, mais en phase liquide. Dans ce dernier état, le milieu homogène facilite les interactions entre les différentes espèces, tandis que dans un mélange hétérogène seules de faibles surfaces sont en contact. C'est pour cette raison qu'avant d'envisager les grands types de réactions analytiques et les principales méthodes, il est souhaitable d'étudier les solutions et les facteurs qui influent sur les réactions chimiques.

I.1. Définition

I.1.1. Solution

Une solution est une phase homogène liquide ou solide, composée de deux types de constituants : un soluté et un solvant.

I.1.2. Solvant

Un solvant est un composé (gaz, liquide, solide) présent en plus grande quantité, dans lequel des substances appelées solutés sont dissoutes ou dispersées.

I.1.3. Soluté

Un soluté est un composé (solide, liquide, gazeux) placé dans le solvant, présent en quantité moins grande que le solvant. Ce soluté peut être de deux natures :

- Un ion on parle donc de solution ionique (exemple un sel)
- Une molécule, on parle de solution moléculaire (solution de glucose)

I.1.4. Suspension

Une suspension est un système liquide hétérogène (liquide + substance non soluble dans ce liquide).

Exp : sable + H₂O.

I.1.5. Emulsion

Une émulsion est un mélange de deux substances liquides non miscibles comme l'eau et l'huile.

I.2. Notion de concentration

Lorsqu'une substance (soluté) est mise en solution, la concentration de cette substance peut être exprimée de diverses façons.

I.2.1. Concentration pondérale ou massique en poids par unité de volume (g/L)

C'est le quotient de la masse d'un constituant par le volume totale du mélange. Elle est définie en gramme par litre de solution (g/L).

Exp : Concentration de l'albumine dans le sang à 33g/L.

I.2.2. Concentration en pourcentage (%)

- Exprimée (P/V), définie comme le nombre de gramme de soluté /100 ml de solution.

Exp : solution de NaCl 9% : 9 g de NaCl dans 100ml de solution.

- Exprimée (V/V), définie comme un volume de soluté (mL) / 100 mL de volume de solution.

Exp : méthanol 80%.

- Exprimée (P/P), définie comme poids de soluté en g /poids de 100 g de solution.

I.2.3. Concentration molaire (mol/L, M)

C'est le quotient de la quantité de substance exprimée en mole par le volume totale du mélange. La concentration molaire est l'échelle de concentration la plus employée on l'appelle aussi molarité. Elle traduit le nombre de molécules grammes ou moles (n) dans un volume V de 1 litre de solution : $M = n/V$.

Ou : **n** = nombre de mole de soluté ; **V** : volume de la solution en litre.

Exp : concentration de la créatinine dans le sérum = 45µmole/L.

I.2.4. Normalité (N)

C'est le quotient de mole d'éléments actifs (ions H⁺, OH⁻, électrons ...etc) par le volume totale de la solution en litre. C'est le nombre d'équivalent gramme de substance dissoute dans un litre de solution.

Eq = poids atomique de l'ion/ valence de l'ion.

Exp : une solution de CaCl₂ contient 1 Eq de calcium et 2 Eq de chlore

$N = n \times M$

Ou : **M** : molarité de la solution ; **n** : nombre de protons

I.2.4. Molalité ou concentration molaire massique (mol/kg)

C'est la quantité de molécules de soluté exprimée en moles par kilogramme de solvant (correspond à une définition poids/poids).

I.2.5. Osmolarité (osmol/L)

C'est le nombre de particules libérées par le soluté dans un litre de solution.

Osmolarité = $M \times n$;

ou : **M** : molarité de la solution ; **n** : nombre de particules libérées par le soluté en solution.

I.3. Dilutions

I.3.1. Dilution simple

Diluer une solution, c'est la rendre moins concentrée (C_2), il s'agit donc de verser une certaine quantité (un volume initial V_1) d'une solution concentrée (C_1) et d'y ajouter une certaine quantité de solvant jusqu'à ce que le volume final soit atteint (V_2). L'équation qui relie ces termes est : $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$.

- C_1 : c'est la concentration de la solution concentrée (on dit aussi la solution mère ou solution initiale).
- V_1 : c'est le volume prélevé à partir de la solution concentrée.
- C_2 : c'est la concentration de la solution diluée (on dit aussi la solution fille ou solution finale).
- V_2 : est le volume de la solution diluée.

I.3.2. Dilution successive

Afin d'éviter de préparer une solution mère ne contenant que quelques milligrammes de soluté par litre, ou de mesurer des volumes minuscules de solution mère, on procède par dilutions successives.

I.4. Solutions tampons

I.4.1. Définition et Principes de base

Ce sont des solutions qui contiennent dans un solvant dissociant comme l'eau :

- Soit un acide faible et un sel d'acide faible ;
- Soit une base faible et un sel de base faible.

Si on ajoute à ces solutions une base forte ou un acide fort, on n'observe qu'une variation minime de pH, cette annulation de la variation du pH correspond à l'effet tampon

Équilibres acido-basiques et équation d'Henderson-Hasselbalch

Tampons anioniques : $\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{sel}] / [\text{acide}]$

Tampon cationique : $\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{base}] / [\text{sel}]$

Général : $\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{forme déprotonée}] / [\text{forme protonée}]$

I.4.2. Facteurs affectant les propriétés tampons

La capacité d'un produit de maintenir un pH dans diverses conditions physico-chimiques dépend de quelques facteurs particulièrement importants pour les processus biologiques.

I.4.2.1. Capacité tampon

La capacité tampon d'un produit ("buffer value", β) est sa capacité de résister à la présence d'acide ou de base. Plus cette valeur est élevée, plus le tampon est efficace. Cette valeur varie en fonction de la différence entre le pH du milieu et le pK du tampon. Elle est évidemment maximale au pK et diminue rapidement. C'est pourquoi un tampon n'est efficace, en pratique, qu'à l'intérieur d'une unité de pH de part et d'autre de son pK. La plupart des tampons utilisés en biochimie ont un β_{\max} de l'ordre de 0.03 à la concentration où on les utilise habituellement.

I.4.2.2. Concentration

La concentration affecte la dissociation du tampon, donc le pH. Ceci se reflète sur la capacité tampon. On doit donc toujours se rappeler que diluer une solution tampon amène le changement de son pH. Ce changement est plus ou moins prononcé dépendant du produit tampon, du pH, du niveau de dilution, etc.

I.4.2.3. Température

La **température** est un autre facteur majeur et comme toute réaction chimique, la dissociation des protons est influencée par la température. Certains produits sont plus affectés que d'autres. Pour évaluer ce phénomène on utilise la valeur $\text{pH}/^\circ\text{C}$. Par exemple, une valeur de 0.1 signifie qu'une augmentation de 10°C entraîne une diminution du pH de 1 unité. Plus cette valeur est grande, plus le tampon est sensible aux variations de température. On devrait donc chercher un produit ayant un $\text{pH}/^\circ\text{C}$ le plus faible possible.

I.4.3. Principaux produits tampons

Les produits tampons doivent être choisis avec soin. Ils devraient combiner le plus des **caractéristiques souhaitables**. Tout d'abord leur pK devrait être le plus près possible du pH qu'on veut maintenir. Sa capacité tampon devrait être la plus forte possible, pour que son efficacité soit maximale. Évidemment, le tampon ne devrait pas inhiber ou perturber les phénomènes biologiques étudiés. Idéalement le tampon devrait être insoluble dans la membrane, donc incapable d'entrer dans les cellules. De plus, si la procédure exige des mesures spectrométriques, le tampon ne devrait pas absorber dans le visible ou l'ultra-violet. Enfin, une éventuelle réaction avec des composantes du milieu doit aussi être évitée : précipitation, chélation d'ions, etc.

➤ Le "**tris**" (tris (hydroxyméthyl) aminométhane) est un des tampons les plus couramment employés en biochimie. C'est un produit synthétique facilement disponible commercialement, en

plus d'être peu coûteux comparé à de nombreux autres. Il est aussi disponible sous forme non dissociée (base) et dissociée (sel de Cl^-) ce qui facilite la fabrication de solutions de pH voulu. Son principal défaut cependant est qu'il est très sensible à la température et à la concentration. De plus, il inhibe plusieurs phénomènes biologiques en plus d'être très soluble dans les membranes, donc susceptible de s'infiltrer dans les cellules et les organites. Enfin sa capacité de chelater fortement certains ions métalliques le rendent nuisible dans certains types d'expériences. Cependant il est abondamment utilisé autant pour la confection de milieux "physiologiques" que comme tampon dans des systèmes électrophorétiques ou autres.

➤ Le système **bicarbonate- CO_2** tente de reproduire le principal système tampon du sang. Son inconvénient principal est qu'il doit être utilisé sous atmosphère de 5 % de CO_2 , exigeant des dispositifs spéciaux d'incubation. De plus, son pK de 6.1 le rend peu efficace à pH 7.4. Malgré toutes ces faiblesses, il est abondamment utilisé dans les cultures de cellules mammaliennes à cause de la base physiologique de sa présence.

➤ Le **phosphate**, sel de Na ou de K, est souvent utilisé dans les solutions physiologiques comme le PBS ("phosphate buffered saline"), les solutions de Ringer, de Krebs-Henseleit, etc. En effet il est présent dans les cellules et le sang, même s'il n'y a qu'un rôle mineur dans le maintien du pH. Mais, même si son pK est de 7.2 (phosphate mono- et dibasique), sa capacité tampon (β) est faible, ce qui le rend plus ou moins efficace. Il a aussi tendance à faire précipiter certains ions divalents, comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} , les rendant moins disponibles pour leurs fonctions biologiques. Enfin, il inhibe plusieurs enzymes ayant le phosphate comme produit réactionnel, en particulier la phosphatase alcaline.

➤ Les **tampons carboxyliques** (citrate, succinate, acétate, etc.) sont aussi employés quelques fois. Comme ce sont des métabolites impliqués dans plusieurs voies, on ne devrait pas les utiliser s'ils risquent d'interférer sur le métabolisme étudié. Certains d'entre eux comme le citrate et le succinate, sont des chelatants assez forts de certains ions divalents, particulièrement le Ca^{2+} et le Mg^{2+} .

➤ Les **tampons zwiterioniques** (ou tampons de Good) ont été développés par Good et ses collaborateurs. Ils comprennent une vingtaine de produits synthétiques, comprenant l'hepes, la pipe, aces, etc. Le but de leur développement était de trouver des produits le plus appropriés possibles aux applications biologiques : résistance aux dilutions et aux changements de température, peu d'effets inhibiteurs sur les processus biologiques, peu d'absorption dans le visible ou l'ultra-violet rapproché, insoluble dans les membranes, pas d'effet chelatant majeur, etc. Ils représentent une gamme de produits ayant une gamme de pK de 6 à 8. Un d'entre eux, l'hepes, a un pK de 7.6,

ce qui lui donne une efficacité réelle dans la zone des pH physiologiques. Certains tampons zwitterioniques, mais pas tous, produisent des radicaux libres. Il convient donc de les utiliser prudemment dans l'étude de phénomènes liés de près ou de loin au stress oxydatif.

➤ Certains **tampons sont volatils** (bicarbonate, ammonium, formate) et peuvent être avantageux si on doit lyophiliser la préparation. En effet ils se subliment sous forme de CO_2 , NH_3 , etc., au lieu de se concentrer au fur et à mesure de la sublimation de l'eau. Pour ce qui est de l'électrophorèse, les tampons à base d'acétate sont particulièrement efficaces.

I.4.4. Préparation des tampons

Il existe fondamentalement deux façons de fabriquer une solution tampon de pH donné :

- La première est simplement de titrer, jusqu'au pH désiré, le tampon, généralement sous sa forme non dissociée, avec un acide ou une base selon le cas. Ce titrage se fait normalement au pHmètre. Il existe aussi des tableaux donnant les proportions de tels mélanges permettant d'obtenir un pH donné.
- L'autre approche est simplement de combiner, dans les proportions requises, la forme non dissociée du produit (acide ou base) avec sa forme dissociée (sel de la base ou de l'acide conjugué). Cette proportion se calcule aisément avec l'équation d'Henderson-Hasselbach. Des tableaux donnant les proportions requises de tels mélanges sont disponibles.

I.5. Solutions physiologiques

Le déroulement normal des phénomènes biologiques nécessite des conditions bien définies de pH, température, condition ionique et pression osmotique, disponibilité de source d'énergie et de métabolite. Donc pour faire des études *in vitro* sur des enzymes, des organites, des cellules, des tissus et des organes, on doit fournir des milieux artificiels avec des conditions similaires à celle du milieu naturel de l'élément à étudier, ces milieux sont appelés milieux physiologiques. Des conditions et principes de base doivent alors être entrepris :

- **Le pH** doit être maintenu pour que les fonctions biologiques qu'on étudie soient préservées. S'il s'agit de cellules animales entières intactes, on garde le pH à 7.4 qui est celui du milieu extracellulaire. S'il d'agit d'organite, on maintiendra le pH au même niveau que celui du cytosol de la cellule (autour de la neutralité). Il faut aussi se rappeler que l'intérieur de certains compartiments, comme les lysosomes, le golgi, etc., est relativement acide, autour de pH 4. Le pH est maintenu par un produit tampon. Dans la culture de cellules mammaliennes, on emploie souvent un indicateur coloré de pH qui aide à visualiser instantanément si le pH s'est trop acidifié. Généralement, on emploie le rouge de phénol qui devient jaune

sous pH 7 alors qu'il est rouge au dessus. Évidemment ce produit n'est pas toxique pour les cellules.

- **Pression osmotique :** Il est important, surtout si on travaille avec des cellules entières, de maintenir une pression osmotique normale. Pour les cellules mammaliennes la valeur normale est de 300-320 mOs. l'osmolarité des milieux qu'on fabrique est mesurée habituellement par un osmomètre. Le saccharose est utilise souvent pour maintenir l'osmolarité. Ce produit n'entre pas dans les cellules animales intactes et n'est pas toxique, en plus il est physiologiquement inerte, non chargé, peu coûteux et très soluble. C'est la principale raison de sa présence (souvent à 250 mM) dans beaucoup de solutions tampons physiologiques. On peut aussi utiliser du NaCl qui est le principal sel des fluides corporels. La présence d'autres facteurs comme les acides aminés, vitamines, glucose, etc. est essentielle.
- **Stérilisation :** La culture de cellules ou de bactéries exige l'emploi de milieu stérile. On peut stériliser à l'autoclave ou par ultrafiltration ("stérilisation froide").



Méthodes spectrales



I. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

I.1. Spectre électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique se présente sous la forme d'onde électromagnétique qui se propage dans le vide à la même **vitesse** que celle de la lumière c ($2.9979 \cdot 10^8$ m.s⁻¹ dans le vide). Seule une partie de ces ondes est visible sous forme de lumière. L'ensemble de ces ondes, visibles ou non, forme ce qu'on appelle le spectre électromagnétique. Le rayonnement électromagnétique peut être caractérisé par sa **longueur d'onde** λ , par le **nombre d'onde** $\tilde{\nu}$ ou encore par la **fréquence** ν :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = 1/\tilde{\nu}$$

L'**énergie** d'un rayonnement électromagnétique E est reliée à sa fréquence par la relation :

$$E = h \nu ; h: \text{constante de Planck.}$$

Le spectre électromagnétique (Fig. 1) s'étend des radiofréquences de plus basse énergie (ou de plus grande longueur d'onde) au rayonnement Gamma de haute énergie (ou de petite longueur d'onde). Le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV-VIS s'exprime par sa longueur d'onde λ , en nm. Cependant, l'unité spectrale utilisée pour la spectroscopie IR est le nombre d'onde $\tilde{\nu}$, exprimé en cm⁻¹.

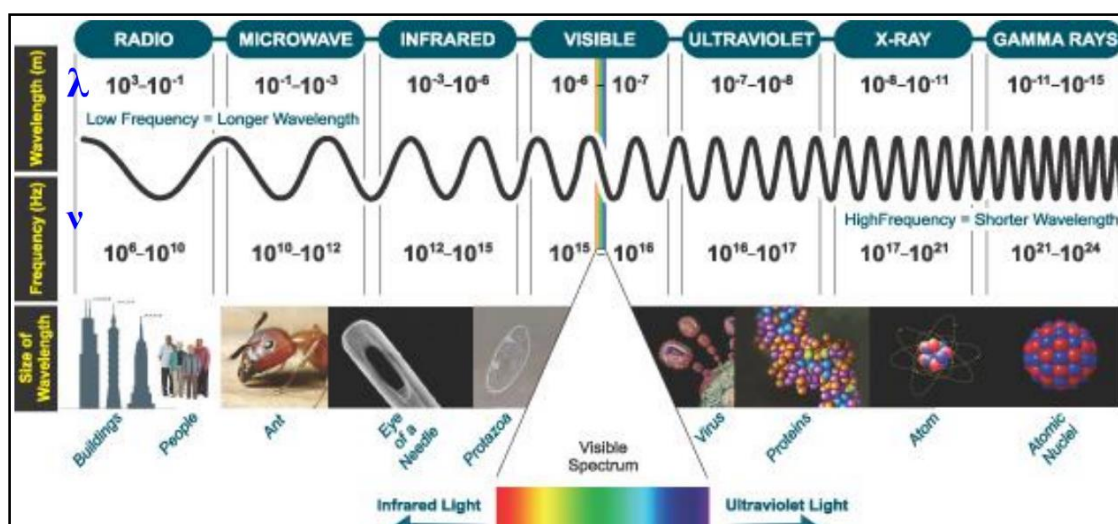


Fig. 1 : Spectres électromagnétiques.

A chacun des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, correspond un type de spectroscopie qui repose sur une interaction particulière de la matière avec ce rayonnement. Ainsi pour le domaine :

- Les domaines γ et RX, le rayonnement est très énergétique et affecte les électrons des orbitales atomiques de noyau. Ces interactions sont utilisées dans la spectroscopie γ et dans la fluorescence X.
- Les domaines UV et visible, le rayonnement est énergétique et affecte les électrons des orbitales atomiques périphériques et/ou des orbitales moléculaires. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie d'émission atomique (SEA), la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) et la spectroscopie moléculaire (UV-VIS).
- Le domaine IR, le rayonnement est faiblement énergétique et ne peut affecter que les modes de vibration des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie IR et la spectroscopie Raman.
- Le domaine radio, le rayonnement est très faiblement énergétique et ne peut affecter que les modes de rotation des molécules, modification d'états de spin électronique (résonance paramagnétique électronique, RPE) et modification d'états de spin nucléaire (résonance magnétique nucléaire, RMN).

I.1.1. Spectroscopie et spectre

La spectroscopie est l'étude du spectre électromagnétique d'un phénomène, visuellement (d'où le suffixe-scopie).

Le spectre est la distribution en énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission, etc. en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. On distingue trois types de spectres :

- Les spectres **continus**, pour lesquels il existe un "signal" pour chaque longueur d'onde ou fréquence (Fig. 2a).
- Les spectres **discontinus**, ou spectres de raies, ou encore spectres discrets, qui ne disposent d'un signal que pour certaines fréquences ou longueurs d'onde spécifiques, caractéristique de la matière irradiée (Fig. 2b).
- Les spectres **combinés** qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret (Fig. 2c).

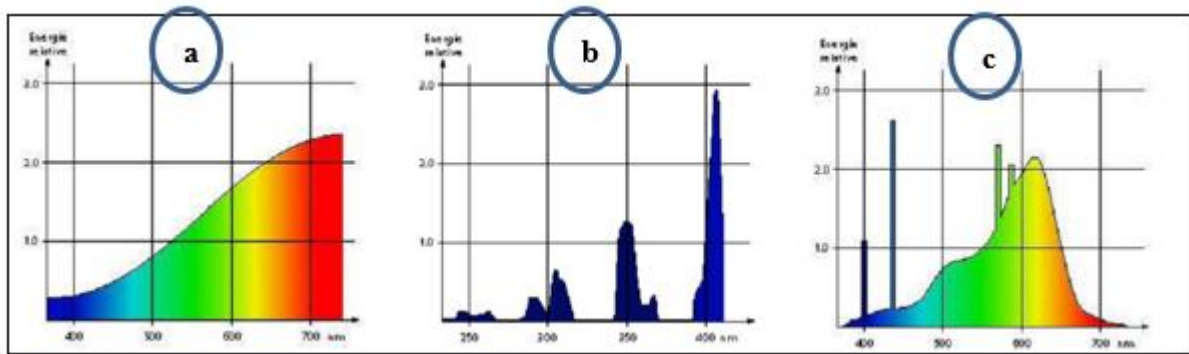


Fig. 2 : Différents types de spectres. **a** : spectre continu, **b** : spectre discontinus, **c** : spectre combiné.

I.1.2. Absorption et émission

Les échanges d'énergie entre les atomes et la lumière sont quantifiés : ils se font par l'énergie apportés par les photons.

I.1.2.1. Absorption

Un atome initialement au repos au niveau fondamental d'énergie E_f peut passer au niveau excité supérieur d'énergie E_e , en absorbant un et un seul photon d'énergie $\Delta E = h\nu = E_e - E_f$.

I.1.2.2. Emission

a)-Emission spontanée

Les états électroniques excités ne sont pas stables. Plus ou moins vite, l'atome retombe dans l'état fondamental en émettant un photon. Le photon peut être émis dans n'importe quelle direction. L'énergie $h\nu$ du photon émis est égale à la différence d'énergie $E_e - E_f$ entre les deux niveaux atomiques (e) et (f).

b)- Emission induite

La présence d'un rayonnement incident peut induire un atome excité à émettre un photon ayant les mêmes caractéristiques que les photons incidents. Cela à condition que l'énergie de ces photons soit "résonnante", c'est-à-dire que $h\nu$ soit égale à l'écart d'énergie entre le niveau supérieur et le niveau inférieur. Dans cette émission induite, le photon créé par l'atome en se désexcitant a la même fréquence et la même direction de propagation que le rayonnement incident.

Lorsqu'un atome est dans son état fondamental, il y reste jusqu'à ce qu'un photon, une décharge électrique, lui apporte l'énergie nécessaire pour passer dans un état excité. Au contraire, lorsqu'un atome est dans un état excité, il se désexcite spontanément et quasi instantanément pour revenir à son état fondamental.

I.2. Spectrométrie UV-VIS

La spectrophotométrie UV-VIS repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche IR (proche UV : 185-400, VIS : 400-800 et très proche IR 800-1100 nm). L'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert.

I.2.1. Principe

Ce type de spectrométrie repose principalement sur des interactions entre les rayonnements électromagnétiques et les électrons des orbitales moléculaires. L'absorption des rayonnements par les molécules est due au passage d'un électron d'un niveau électronique à un autre niveau électronique d'énergie supérieure.

I.2.2. Spectres dans l'UV-VIS et loi de Beer-Lambert

Les spectres dans l'UV- VIS donnent la transmittance ou l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement. La **transmittance**, notée **T**, est donnée par :

$$T = I/I_0$$

Où : I_0 est l'intensité incidente

I : l'intensité transmise.

L'**absorbance A** est définie par : $A = -\log T$

Cette dernière grandeur est très utile en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. Plus un composé est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est importante. Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l (Fig. 3).

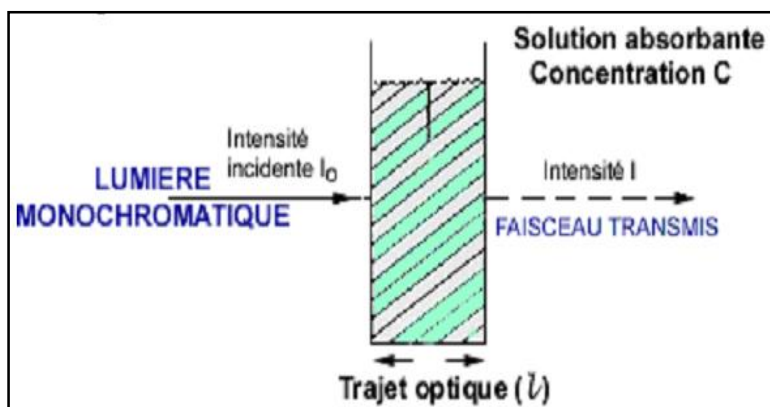


Fig. 3 : Absorbance d'une lumière monochromatique par une solution.

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-k l C}$$

Où :

l : la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

C : la concentration des espèces absorbantes

k : une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = \epsilon l C$.

ϵ est le coefficient d'extinction molaire ; c est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $M^{-1}.cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log T = \epsilon l c$$

I.2.3. Origine d'absorption

Les rayonnements provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Transitions électroniques généralement observées en spectrophotométrie : $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ (Fig. 4). L'absorption d'un photon dans le domaine UV-VIS peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés **chromophores** ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C \equiv C$, $C \equiv N, \dots$).

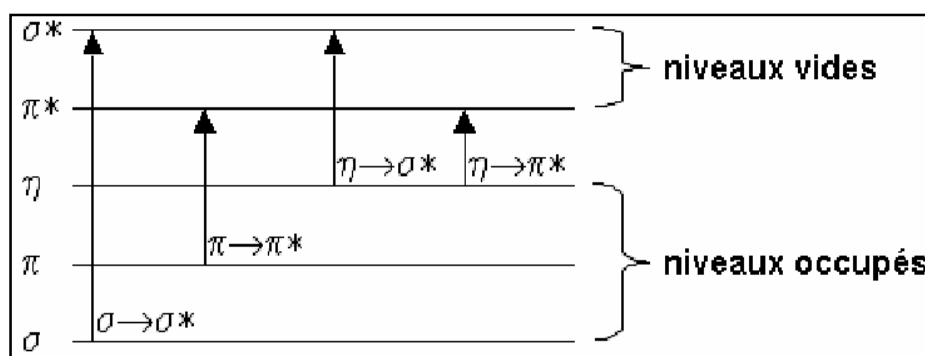


Fig. 4 : Transitions électromagnétiques.

I.2.4. Matériels

I.2.4.1. Source lumineuse

Les sources les plus utilisées sont :

- **Lampe à filament de tungstène (lampe d'iode).** fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 350 et 700 nm (visible).
- **Lampe à arc dans une atmosphère d'hydrogène ou de deutérium** dite lampe à hydrogène ou deutérium. Elle fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 200 et 360 nm. Ainsi de nombreux spectrophotomètres combinent lampe à deutérium et lampe à iode pour couvrir le VIS et l'UV.
- **Lampe à arc en atmosphère de xénon.** C'est une lampe très utilisée en raison de leur large spectre (couvrant le domaine UV et visible) et leur longue durée de vie. Elle fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 260 et 800 nm.
- **Lampe à vapeur de mercure.** Elle donne le spectre d'émission de raies discontinues du mercure, 546 nm, 435 nm, 404 nm, 366 nm, et 313 nm.

I.2.4.2. Monochromateurs

La sélection de la longueur d'onde est réalisée grâce au monochromateur. Il comprend :

- Une fente d'entrée permettant l'entrée d'un fin faisceau polychromatique.
- Un système dispersif de type réseau.
- Une fente de sortie, permet de sélectionner une longueur d'onde précise dispersée et de la diriger vers le porte échantillon.

I.2.4.3. Système porte échantillon

On utilise des "cuvettes" à face optique parallèles, transparentes et déterminant un trajet optique généralement de 1 cm. Le matériau de la cuve renfermant l'échantillon est fondamental :

- Les cuves à usage unique en polystyrène utilisables que dans le visible (Fig. 5 a).
- Les cuves en verre, à nettoyer après usage, ne sont utilisables que dans le visible et sont généralement abandonnées au profit des cuves plastiques à usage unique (Fig. 5 b).
- Les cuves en quartz permettent les mesures dans l'UV et aussi le visible (Fig. 5 c).

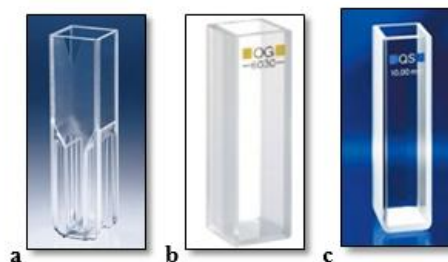


Fig. 5 : Différentes cuves. **a** : cuve en polystyrène, **b** : cuve en verre, **c** : cuve en quartz.

I.2.4.4. Détecteurs

Le principe de base du détecteur est de transformer en courant électrique le signal optique reçu. Il s'agit donc de compter les photons reçus par longueur d'onde en utilisant l'effet photoélectrique.

I.2.4.5. Photomultiplicateurs

Le signal de sortie restant très faible, il nécessite une amplification pour être lisible.

I.2.4.6. Afficheur

a)- Spectrophotomètres à mono-faisceau

Source lumineuse ==> Monochromateur ==> Echantillon ==> détecteur (Fig.6).

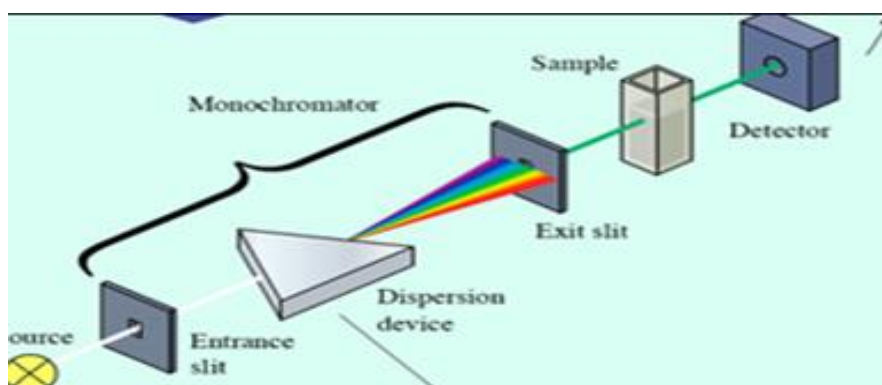


Fig. 6 : Spectrophotomètre à mono-faisceau.

Notion de blanc

Lorsqu'une espèce chimique est solubilisée dans un solvant et placée dans une cellule de mesure, l'absorption mesurée correspond à trois absorptions différentes :

- l'absorption due à la cellule qui peut être en verre, en quartz ou en polymère ;
- l'absorption due au solvant ;
- l'absorption due à l'espèce chimique dissoute.

Les deux premières absorptions ne sont pas dues à l'espèce analysée. Il faut donc les retrancher. Pour ce faire, on mesure l'absorbance de la cellule avec du solvant et on soustrait l'absorbance ainsi obtenue (le blanc) à l'absorbance mesurée avec l'espèce que l'on veut étudier. Il est nécessaire de faire un blanc lorsqu'on utilise un appareil monofaisceau.

b)- Spectrophotomètres à double faisceau

Avec lesquels il n'est pas nécessaire de faire des blancs ou des lignes de bases. Un faisceau traverse le compartiment échantillon et le second le compartiment référence. La soustraction du blanc est faite automatiquement par le logiciel de traitement (Fig.7).

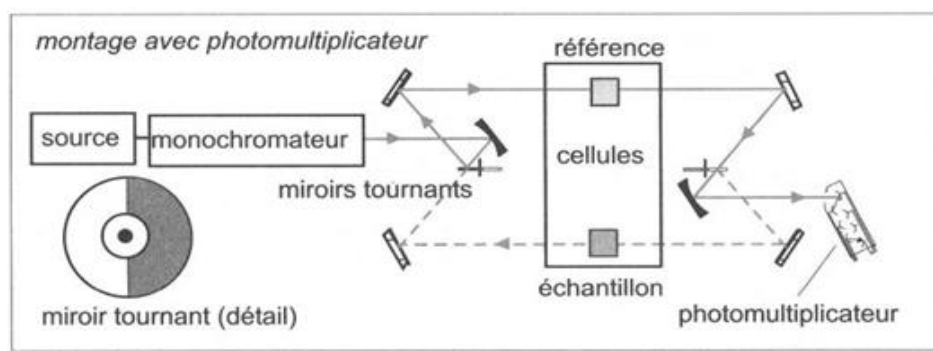


Fig. 7 : Spectrophotomètres à double faisceau.

I.2.5. Applications de la spectrométrie UV-VIS

I.2.5.1. Application chimique

a)- Analyse quantitative (Identification de la concentration d'une substance inconnue)

La spectrophotométrie UV-VIS est utilisée pour mesurer la concentration d'un échantillon inconnu. Pour cela, il faut d'abord choisir sa bande d'absorption spécifique.

b)- Analyse qualitative (identification d'une substance inconnue)

La spectrophotométrie UV-VIS peut être utilisée pour identifier les diverses classes de composés à la fois dans l'état pur et ainsi que dans des préparations biologiques. Ceci est fait en traçant les courbes du spectre d'absorption.

c)- Essais enzymatiques

L'activité enzymatique peut être, facilement et rapidement, calculé lorsque le substrat ou le produit est coloré ou absorbe la lumière dans la gamme des UV. Dans ces cas, le taux d'apparition ou de la disparition d'un produit ou d'un substrat absorbant la lumière peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

I.2.5.2. Application structurale

- Contrôle de purification

Il s'agit l'une des applications les plus importantes de spectrophotométrie UV-VIS. Les impuretés peuvent être détectées très facilement en testant si le composé ne montre pas son spectre d'absorption caractéristique.

- Détermination du poids moléculaire

- Turbidimétrie

Toute particule ou même les bactéries rend la solution trouble. Ils absorbent à une longueur d'onde particulière et ces particules dispersent la lumière incidente. En utilisant cette technique (turbidimétrie), un nombre approximatif de particules en suspension donnée peut être déterminé.

II. Spectrofluorimétrie

Certains composés organique ou minéraux, liquides ou solides, qu'ils soient pur ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine UV-Visible. Parmi les applications en analyse de ce phénomène baptisé photoluminescence se trouve la fluorimétrie. C'est une technique d'analyse utilisant le phénomène de fluorescence. Cette dernière est définie comme l'émission d'un rayonnement électromagnétique par des molécules (dans toutes les directions) sans dégagement de chaleur. A ce phénomène s'associe toute une terminologie caractérisant l'émission (fluorescence, phosphorescence) ou l'excitation (chimiluminescence, bioluminescence, radioluminescence, cathodo-luminescence, photoluminescence, thermoluminescence).

La fluorescence couvre un domaine de longueur d'onde très étendu, la plus connue est la fluorescence moléculaire dont le spectre d'émission se situe dans le visible ou l'ultraviolet. Pour l'étude des métaux lourds, la fluorescence X a été développée, dont le spectre d'émission est formé de rayons X.

Les fluorochromes ou fluorophores sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

II.1. Principe

Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de 10^{-12} seconde.

La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne (retour direct à l'état fondamental) ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence. En effet, l'énergie émise est en général inférieure à l'énergie d'excitation. Cela provient du fait que le centre retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. Cette différence est appelée déplacement de Stokes. Le spectre d'émission (intensité d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du photon émis) dépend de la nature de la molécule fluorescente et des interactions mises en jeu entre cette molécule et son voisinage.

La phosphorescence passe par une étape supplémentaire l'état triplet ou 'il y a retournement de spin. L'émission lumineuse dure donc beaucoup plus longtemps. Pour bien comprendre le phé-

nomène de fluorescence, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski (Fig. 8). C'est un diagramme énergétique comparant les phénomènes de retour à l'équilibre par fluorescence et phosphorescence.

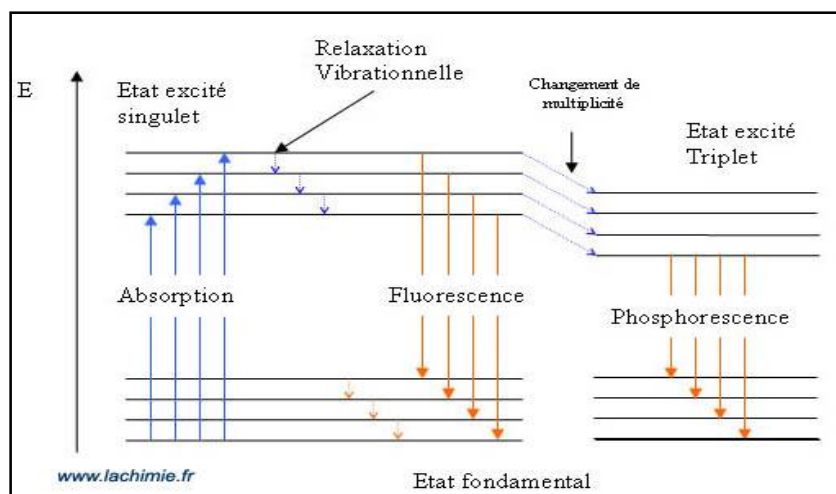


Fig. 8 : Diagramme de Jablonski.

II.2. Relations quantitatives

La fluorimétrie est une méthode de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescente. On mesure la fluorescence qui est proportionnelle à la concentration. On peut trouver cette loi expérimentale à partir de la loi de Beer-Lambert. Le rapport étant appelé rendement quantique.

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité de la lumière absorbée.

$$\text{Soit : } \Phi_f = I_f / I_a = I_f / (I_0 - I) = I_f \cdot I_0 \cdot (1 - I / I_0)$$

Φ_f : le rendement quantique de fluorescence (sans unité)

I_f : l'intensité de fluorescence

I_a : intensité absorbée

I_0 : l'intensité incidente

I : l'intensité transmise

Φ_f est compris entre 0 (absence de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale).

Φ_f dépend de la molécule, du solvant, du pH et de l'empérature. Il ne dépend pas de l'intensité de la source lumineuse et de la longueur d'onde d'excitation (seuls les photons absorbés sont pris en compte).

II.3. Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence, à longueur d'onde λ , est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence.

$$I_f = \Phi_f \cdot I_a = \Phi_f \cdot (I - I_0)$$

L'intensité absorbée, I_a , est donnée, par la loi de Beer Lambert, l'intensité de fluorescence devient alors :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)$$

Or l'appareil ne capte qu'une partie de la fluorescence, on a donc :

$$I_f' = k (\Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)) = K \cdot c$$

k = constant de l'appareillage

L'intensité est exprimée en Einstein par seconde (1 einstein = 6.1023 photons). Elle dépend de la T° , I_0 de la source, de la concentration en solution fluorescente, de l'appareillage, la λ d'excitation et la nature du solvant et du pH.

Le spectre d'excitation d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde fixe et en laissant varier la longueur d'onde d'excitation. Le spectre d'émission d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise aux différentes longueurs d'onde d'émission en excitant avec une longueur d'onde fixe.

II.4. Molécules concernées

Pour que la fluorescence se manifeste, plusieurs caractéristiques sont nécessaires :

- Absorption dans l'UV et le visible.
- Forte probabilité maximale d'absorption (ϵ_{\max}).
- Faible énergie de transition électronique.
- Absence d'atomes ou de groupements favorisant les phénomènes non radiatifs dans la molécule.
- La fluorescence est souvent le privilège des molécules cycliques, rigides et possédantes des liaisons π . Elle est augmentée par la présence de groupe électro-donneurs et diminuée avec les groupes électro-attracteurs (Fig. 9).

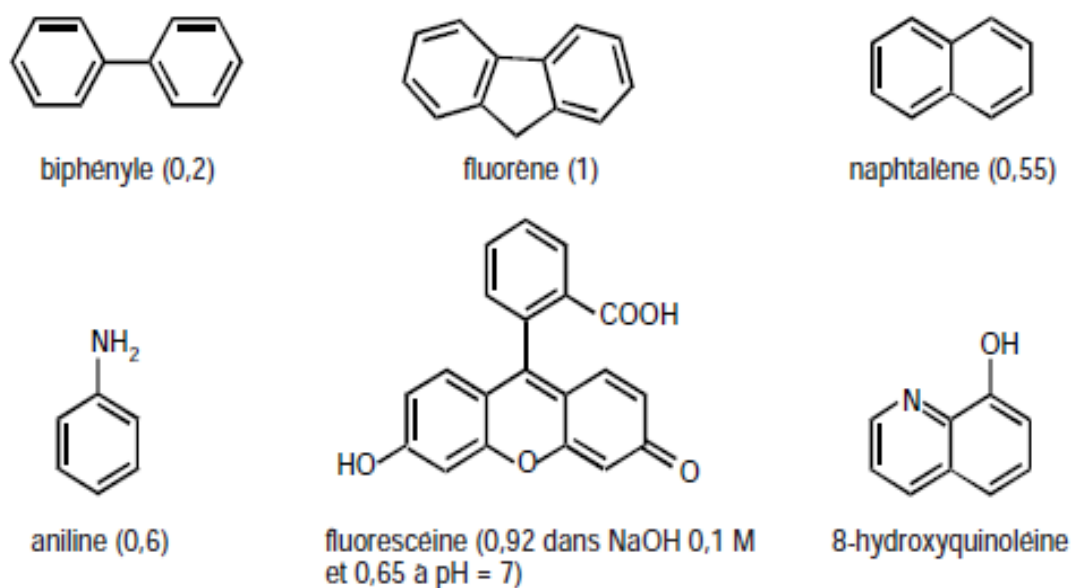


Fig. 9 : Composés fluorescent aromatiques

II.5. Appareillage

Le composé fluorescent se comporte comme une source qui irradie dans toutes les directions. La source excitatrice est souvent constituée par une lampe à arc xénon. La mesure est faite par un photomultiplicateur. Les composants de l'appareil sont démontrés dans la figure 10.

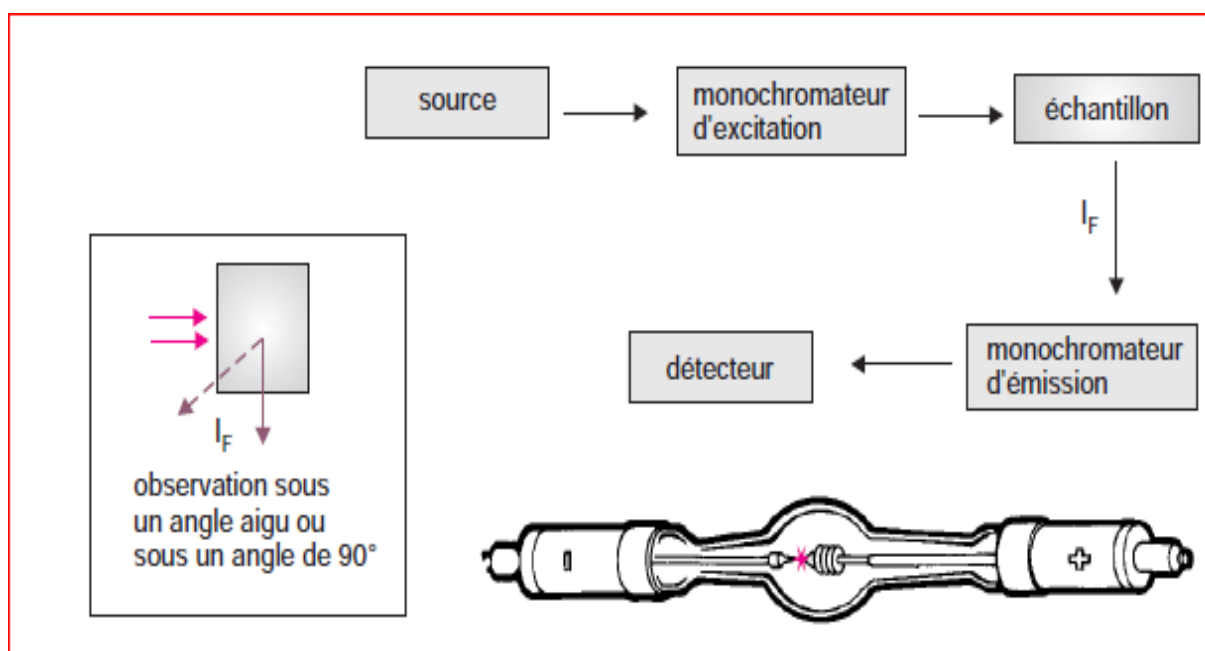


Fig. 10 : Différentes composantes d'un spectrofluorimètre à lampe à arc xénon.

a. Une source lumineuse

- Lampes à arc au xénon : émission continue entre 220 et 700 nm. Leur énergie varie en fonction de la longueur d'onde. Ce sont les plus performantes.
- Les lampes à vapeur de mercure : n'émettent qu'un spectre discontinu (raies entre 254 et 366 nm).
- Les sources lasers : apparition récente, encore peu utilisées.

b. Un monochromateur d'excitation (prisme ou réseau).**c.** Une cuve en quartz.**d.** Un monochromateur d'émission : permet la sélection d'une bande étroite de longueur d'onde d'émission (car après excitation l'échantillon émet dans toutes les directions).**e.** Un photomultiplicateur/photodiode : transforme la lumière émise en courant électrique.**f.** Un système de lecture du signal.**II.6. Applications**

- Méthode sensible et spécifique (identification de traces) comme certains gaz à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre qui sont quantifiés à partir de leur fluorescence.
- Détermination du spectre d'absorption d'une substance dans les conditions où la spectrométrie UV-VIS est inadaptée.
- Permet de tracer le spectre d'excitation d'une molécule à très faible concentration ou en présence de substances absorbantes interférentes.
- Analyse des médicaments ou de substances naturelles à concentration souvent faible dans les milieux biologiques.
- Analyse après excitation à une longueur d'onde déterminée.
- Analyse directe de substances naturellement fluorescentes (ex : quinine et quinidine).
- Les molécules peu fluorescentes sont amplifiées par hétérocyclisation.
- Les molécules non fluorescentes peuvent être rendues fluorescentes par dérivation de fluorescence. Parmi ces composés de dérivation, la fluorescamine et la bromométhoxy-coumarine et 7-hydroxycoumarines.
- En biochimie la fluorescence trouve de nombreuses applications pour quantifier les protéines ou les acides nucléiques au moyen de réactifs qui se fixent spécifiquement sur ces composés.
- La fluorimétrie est également utilisable dans le cadre des méthodes immunologiques en phase homogène ou hétérogène, le traceur étant constitué par la molécule à doser marquée par un fluochrome.

III. Spectroscopie d'absorption atomique (SAA)

La SAA est une technique d'analyse spectrale qui étudie les absorptions ou les émissions de lumière par l'atome libre. Les éléments inorganiques (métaux et non métaux) contenus dans un échantillon sont identifiés et quantifiés grâce à leur spectre atomique. Ceci n'est réalisable qu'à la condition qu'une partie significative de l'échantillon moléculaire, solide ou liquide, soit transformé en gaz atomique (vaporisation et atomisation). La SAA est une technique décrite pour la 1ère fois par Walsh en 1955. Elle fournit un puissant instrument analytique quantitatif.

III.1. Principe

C'est l'analyse par l'absorption de radiations d'une certaine longueur d'ondes (UV-Vis), par des atomes libres à l'état fondamental conduisant à un passage d'un de ses électrons externes d'une orbite électronique à une autre et un changement de l'énergie. Cette absorption est spécifique à chaque élément.

Une source de rayonnement émet des radiations spécifiques correspondant à la différence d'énergie entre l'état fondamental et un état excité de l'échantillon à analyser. L'analyte doit être transformé en atomes libres à l'état fondamental capables d'absorber une partie de ce rayonnement. Le rayonnement non absorbé passe par un monochromateur jusqu'au détecteur. L'absorption est ensuite mesurée,

III.2. Appareillage

L'instrumentation est presque identique pour toutes les méthodes atomiques bien que la configuration des composantes doive y être modifiée. Un spectrophotomètre d'absorption atomique comprend généralement une source, un atomiseur, un monochromateur, un détecteur et un dispositif d'acquisition. La sensibilité est déterminée par la source de rayonnement et l'atomiseur. Puisque les lampes utilisées usuellement ont la même largeur de raies.

III.2.1. Source lumineuse

C'est une source qui émet le spectre des raies caractéristiques de l'élément à analyser. Ainsi, deux types de lampes sont utilisés :

III.2.1.1. Lampe à cathode creuse

Elle est constituée d'une enveloppe de verre scellée contenant une cathode métallique cylindrique creuse et une anode en tungstène ou en nickel, l'enveloppe est aussi pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz. L'ampoule est remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression (Fig.11). Le spectre d'émission comporte des raies intenses qui dépendent de l'élément constituant

la cathode. La sélectivité élevée de la SAA est due au fait qu'on utilise pour chaque élément une lampe particulière.

La lampe à cathode creuse émet le spectre lumineux spécifique à l'élément analysé. La cathode et l'anode de la lampe sont composées uniquement de l'élément dont le spectre lumineux doit être produit. Un potentiel électrique est appliqué entre l'anode et la cathode, ce qui a pour effet d'ioniser le gaz contenu dans la lampe. Les ions de gaz vont ensuite entrer en collision avec la cathode, ce qui déloge des atomes métallique. Ces atomes vont aussi entrer en collision avec les ions de gaz ce qui les fait passer à un état d'excitation. Ils retournent aussitôt à leur état de base ce qui produit l'énergie lumineuse désirée.

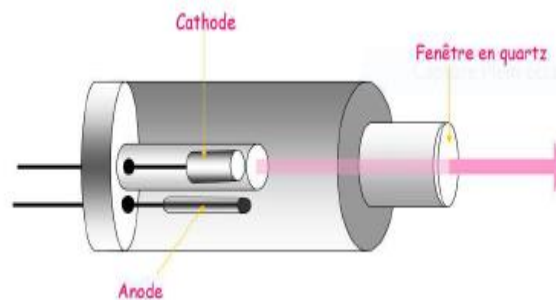


Fig. 11 : Lampe à cathode creuse

III.2.1.2. Lampe à décharge sans électrode

Elle est constituée d'un tube en quartz scellé contenant un gaz inerte et une petite quantité d'une espèce métallique, où d'un de ses sels, le tout sous une pression. L'énergie est fournie par un champ électrostatique intense. Le gaz inerte s'ionise et les ions sont accélérés jusqu'à une énergie nécessaire pour arracher et exciter les atomes métalliques. Il y a alors, tout comme pour la lampe à cathode creuse, une désexcitation radiative caractéristique.

III.2.2. Atomiseur

La SAA nécessite d'avoir les atomes à l'état fondamental, afin d'observer les raies caractéristiques de l'élément. L'atomiseur doit donc fournir des atomes libres sans les exciter. Il faut de la chaleur pour faire passer l'échantillon généralement en solution à l'état d'un gaz atomique. Cette chaleur peut être générée par une flamme ou par un four de graphite. La SAA de flamme analyse seulement les solutions, tandis que la SAA de four de graphite analyse les solutions, les boues liquides et les solides.

III.2.2.1. Atomiseur de flamme

Il consiste en un nébuliseur et un brûleur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse et sous l'effet de la différence de pression, la solution de l'analyte généralement aqueuse, est alors aspirée dans un capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol

constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol contenant le comburant (en général le gaz à haute pression) est mélangé au carburant. Ce mélange arrive au brûleur qui libère une large flamme composée de quatre zones. Le solvant est éliminé dans la zone primaire. Il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. C'est dans la région secondaire qu'a lieu la vaporisation (Fig. 12). L'atomisation a lieu dans la zone tertiaire. La flamme est caractérisée par sa réactivité chimique, sa température et son spectre. La durée du passage de l'échantillon dans la flamme est très courte. Le mélange combustible-comburant utilisé est choisi en fonction de l'échantillon à analyser, La flamme air /acétylène (2500°C) est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments.

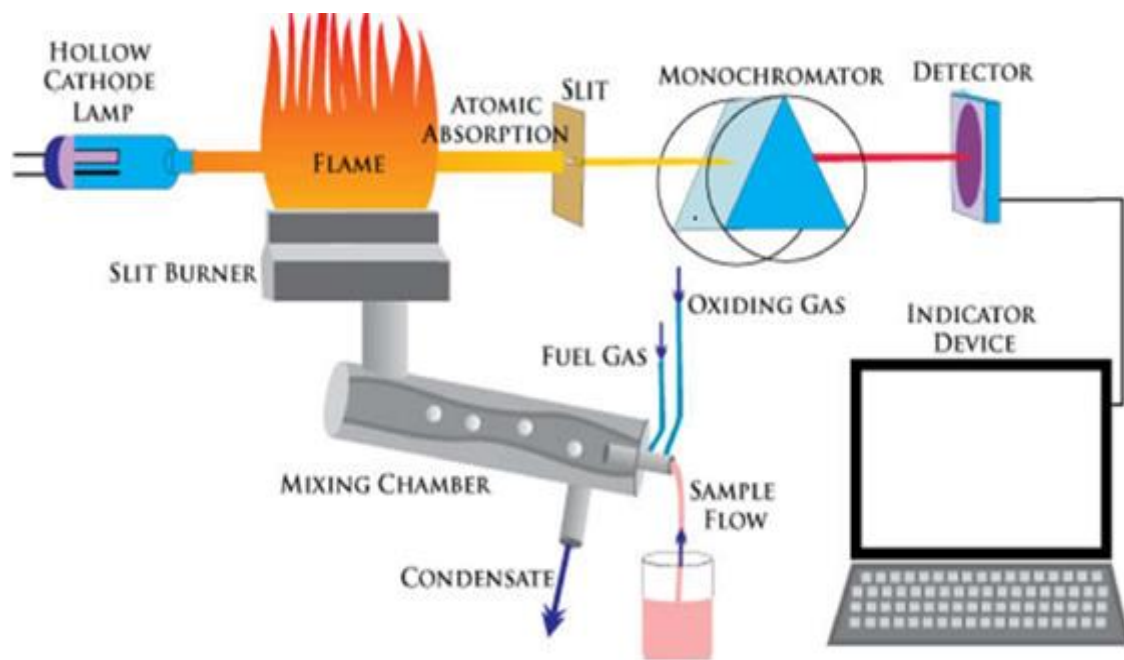


Fig. 12 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme

III.2.2.2. Atomiseur électrothermique

L'atomiseur électrothermique commercial le plus approprié en SAA est le four en graphite ; où l'atomisation se produit dans un four en graphite cylindrique, ouvert aux deux extrémités et qui contient un trou au centre pour la présentation des échantillons (Fig. 13). Deux courants de gaz inertes (argon) sont utilisés.

Cette atomisation se fait en trois étapes ; l'évaporation, la décomposition et enfin l'atomisation proprement dite. Le chauffage de l'échantillon entraîne l'évaporation et la décomposition, grâce à la mise en contact du tube avec des pièces électriques, à travers desquelles on fait passer un courant plus ou moins intense, ce qui a pour effet d'élever la température (2000 à 3000 °C) et ainsi permet d'atomiser l'échantillon en quelques millisecondes.

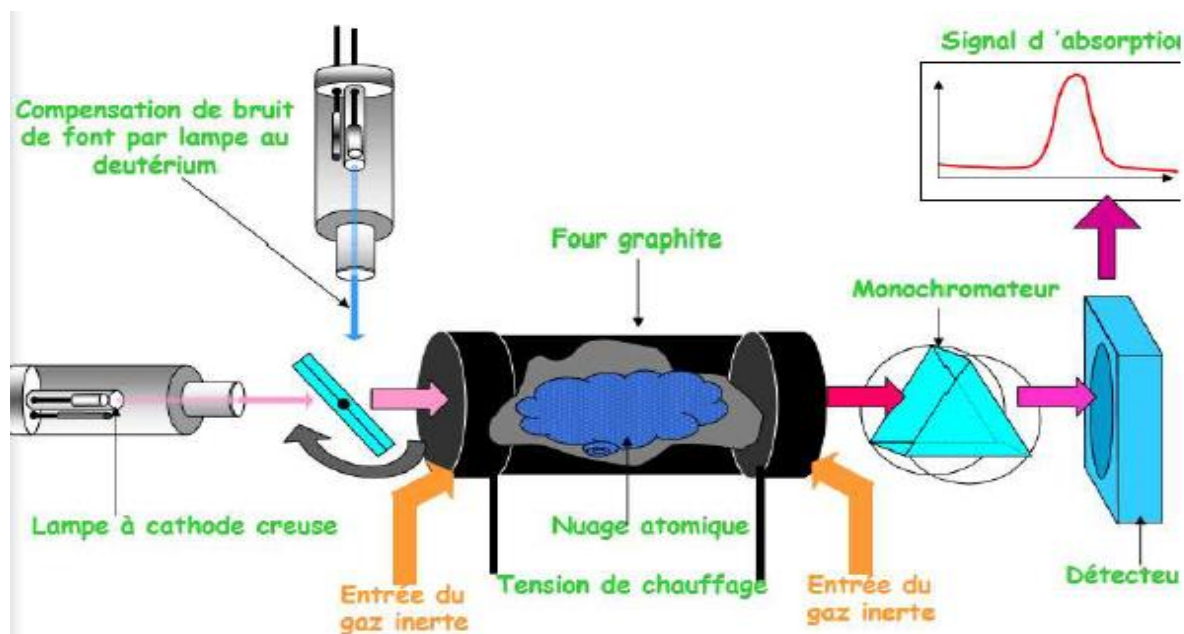


Fig. 13 : Schéma d'un spectrophotomètre avec four en graphite.

III.2.3. Sélecteur de longueur d'onde (monochromateur)

La plupart des instruments de SAA sont munis d'un monochromateur. Son rôle consiste à choisir la raie la plus intense et d'éliminer toute lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille (les raies du gaz de remplissage dans la source, d'éventuelles impuretés ou de l'atomiseur). Un simple filtre de verre est souvent adéquat pour quelques métaux alcalins.

III.2.4. Détecteur

Il mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances. L'absorption spécifique est due à l'élément à doser. L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice. Le détecteur le plus couramment utilisé est un photomultiplicateur.

On a : Absorbance spécifique = Absorbance totale – Absorbance non spécifique

III.3. Avantages et limitations

La SAA est une méthode quantitative simple, rapide, sensible, très sélective et relative (il faut donc faire une courbe d'étalonnage). Elle nécessite une faible quantité d'échantillon. Les solutions étalons sont faciles à préparer. Cependant, on peut noter un certain nombre de limites :

- Pour des raisons technologiques, certains éléments ne peuvent être analysés.
- L'existence parfois d'interférences chimiques sévères.
- L'aspect non qualitatif de la technique impose la connaissance des éléments à doser afin de choisir la source adaptée.

- Ne permet pas l'analyse simultanée d'éléments.
- Nécessité d'avoir des concentrations assez faibles (afin de respecter le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert).

III.4. Applications

La SAA permet l'analyse de presque tous les métaux et métalloïdes (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc...) dans les échantillons biologiques, métallurgiques, archéologiques, pharmaceutiques et atmosphériques. Elle couvre donc un vaste éventail d'applications. Dans le domaine pharmaceutique on peut citer ;

- Dosage du zinc dans les préparations d'insuline ou d'oxyde de zinc.
- Dosage du cobalt dans la Vit B12.
- Dosage du mercure dans les antiseptiques organo-mercuriels.
- Dosage de l'Al et de Mg dans les pansements gastriques.
- Dosage de Mg dans les suppléments nutritionnels.
- Dosage du Ca dans les préparations à base de Ca.
- La recherche de Cd, Zn dans les préparations injectables {adjuvants plastiques}.
- Recherche d'impuretés.
- Analyse des boissons.
- Dosage des oligoéléments et des résidus toxiques dans les aliments.
- Analyse des eaux potables.
- Analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques.
- Dosage du Ca, Sr, Zn dans les os.

IV. Spectroscopie d'émission atomique (SEA)

Cette technique d'analyse élémentaire utilise la mesure de l'émission optique provenant des atomes stimulés, pour soit les identifier soit déterminer leur concentration dans la substance à analyser. Elle est préférable pour le dosage des alcalins (Na, Li et K) dans les fluides et tissus biologiques.

IV.1. Principe

Un atome excité thermiquement ou électriquement à un niveau d'énergie élevé peut émettre des radiations UV-Vis caractéristiques. La substance à analyser est aspirée dans la région de stimulation où elle est vaporisée et atomisée par une flamme, une décharge, ou un plasma. Ces sources d'atomisation fournissent suffisamment d'énergie pour exciter les atomes. Lorsque cette solution est chauffée elle subit plusieurs modifications: changement d'état physique (évaporation du solvant, fusion puis vaporisation du sel), apparition de molécules non dissociées, puis dissociés,

d'atomes neutres à l'état fondamental, puis excités, d'ions non excités puis excités. Le phénomène d'émission atomique n'intéresse qu'une partie des atomes de la solution, ceux à l'état excité. Ces atomes excités retournent à des niveaux plus bas en libèrent des radiations (émission ou luminescence), dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément à doser, dont l'intensité de ces radiations émises est proportionnelle à sa concentration : Parmi les raies émises, la raie de résonance (qui est la plus intense).

$$I = k \cdot C,$$

I : est l'intensité lumineuse émise, k : est un coefficient propre à chaque élément

IV.2. Appareillage

Un spectrophotomètre d'émission a généralement une composition identique à celle d'un spectrophotomètre d'absorption, sauf que, en émission la source des radiations est l'échantillon lui-même. L'appareil comprend :- un nébuliseur-brûleur où la solution à doser est nébulisée dans une flamme air-butane ou air/propane. Le gaz combustible est ensuite mélangé à l'aérosol air/solution à doser. L'atomiseur transforme l'échantillon en un gaz atomique et l'excite.

IV.2.1. Atomiseurs/ Excitateurs

En photométrie d'émission, on cherche l'excitation d'atomes puisque ce sont des atomes excités qui vont émettre des radiations et c'est l'intensité émise qui est mesurée. Pour transformer l'échantillon à l'état d'atomes excités, on fait appel à des atomiseurs basés sur la flamme, les plasmas de gaz, les étincelles, les lasers ou les décharges lumineuses.

a)- Flamme

Cet atomiseur est identique aussi bien en émission qu'en absorption atomique. Les mesures sont effectuées, soit à partir des spectromètres d'absorption atomique à brûleur à condition que la source soit éteinte, soit à partir de photomètres de flamme

b)- Plasma d'argon à couplage inductif (ICP)

Le plasma est constitué par un courant d'argon faiblement ionisé et excité au moyen d'un champ électrique à fréquence radio (typiquement 27 ou 40 MHz) ou micro-ondes.

c)-Arc ou l'étincelle

D'autres procédés d'atomisation sont également utilisés. Ils font soit appel aux arcs ou étincelles électriques pour les échantillons conducteurs, soit à un laser impulsionnel. Ce sont des méthodes utilisées en analyse industrielle.

d)- Excitation à l'aide d'une source à décharge lumineuse

Si l'échantillon est sous forme solide et si possible conducteur du courant électrique, On en fait la cathode d'une sorte de lampe spectrale dont le principe de fonctionnement est identique à celui d'une lampe à cathode creuse. Les atomes érodés de la surface de l'échantillon sont excités par le plasma. Ce procédé est surtout utilisé pour les analyses de surface

IV.3. Avantages et limitations

- ✓ La spectroscopie d'émission présente l'avantage que la sélection de la raie se fait seulement après l'acquisition du spectre. Ainsi, on choisira idéalement une raie où il n'y a pas d'interférences spectrales. On peut donc faire une analyse qualitative de composition, même si l'échantillon est inconnu au départ.
- ✓ Cette technique est très sensible (quelques ppb) et recouvre une gamme dynamique étendue.
- ✓ Cependant on ne peut véritablement doser que les éléments pour lesquels l'étalonnage a été soigneusement réalisé.
- ✓ Certains spectromètres acceptent plus facilement des matrices, tels que les boues ou les sols, pour lesquels les éléments Si, Fe et Al sont largement majoritaires.
- ✓ Elle est enfin moins coûteuse que la spectrométrie de masse appliquée aux éléments mais ne convient pas aux analyses des éléments légers.

IV.4. Applications

- Cette méthode d'analyse incontournable a reçu également diverses applications dans plusieurs domaines (industriel, environnement, métallurgique, médico-légal, pharmaceutique...etc.).
- Les métaux alcalins donnant des flammes colorées, sont facilement dosés en émission. On peut donc utiliser l'émission de flamme en analyse minérale et en biologie pour doser le lithium, le sodium et le potassium (ionogramme) et également certains alcalino-terreux (Ba).
- En bromatologie, on peut l'utiliser en contrôle (ex. doser le sodium et le calcium dans le lait).
- Dernièrement, le laser a été utilisé comme atomiseur pour la détermination de traces d'éléments dans des organes, tissus, dents... etc, d'où l'application de la SAE en médecine légale.
- On peut par exemple l'appliquer au niveau de l'industrie pharmaceutique, en analyse alimentaire, en analyse biologique et en toxicologie (doser les produits toxiques tel que le mercure, cadmium...).

V. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique extrêmement puissante qui permet d'obtenir des informations détaillées sur la structure de composés (liquide ou solide) et les propriétés physico-chimiques qui caractérisent un système (enchaînement atomique et d'obtenir des informations sur l'environnement (nature des voisins proches) des noyaux atomiques).

Cette méthode d'analyse est puissante et très performante, utilisée aussi bien en analyse structurale qu'en analyse quantitative. Le phénomène de RMN correspond à une absorption sélective d'énergie par des noyaux possédant un moment magnétique, placés dans un champ magnétique et irradiés par une onde électromagnétique.

V.1. Propriétés des noyaux

Les noyaux possèdent : Une masse, une charge électrique, un spin et le moment magnétique.

V.1.1. Masse d'un noyau

La masse d'un noyau est la somme de la masse de ses nucléons. La masse dépend alors du nombre de protons (Z) et du nombre de neutrons (N).

V.1.2. Charge électrique

La charge électrique est une propriété fondamentale de la matière qui lui permet d'interagir par le biais de champs électromagnétiques. Il existe deux types de charges électriques, que l'on distingue par leurs signes, positif ou négatif. Des charges de même signe se repoussent, tandis que celles de signes opposés s'attirent. Dans la matière ordinaire, il y a équilibre entre les charges positives et négatives, on parle de neutralité électrique.

V.1.3. Spin

Le spin est une propriété de l'électron et des autres particules de matière. On peut l'interpréter comme un moment angulaire intrinsèque, c'est-à-dire comme si la particule tournait sur elle-même. Comme toute grandeur quantique, le spin est quantifié : il ne peut prendre que des valeurs multiples entières ou demi-entières de la constante de Planck.

- Certains noyaux possèdent un spin nul (généralement ceux de nombre de masse pair) : par exemple, les atomes de carbone 12 et d'oxygène 18
- D'autres ont un spin nucléaire non nul et on peut leur associer un moment magnétique nucléaire : par exemple, l'hydrogène qui n'a qu'un proton.

V.1.4. Moment magnétique du noyau

Le noyau se comporte comme un aimant, du fait de sa rotation et de sa charge. En effet, une particule chargée qui tourne sur elle-même génère un champ magnétique. On s'attend donc à ce que le noyau ait un champ magnétique créé par la conjonction de sa charge et de son spin. Pour décrire l'aimantation du noyau, on lui donne un **moment magnétique**, un vecteur dont la direction est celle de l'axe nord-sud de l'aimant.

V.2. Principe de la RMN

La **spectroscopie RMN** consiste à observer les transitions entre 2 niveaux d'énergie très proches d'un noyau soumis à un champ magnétique. Lorsque l'on soumet un noyau d'hydrogène à un champ H_0 , les noyaux vont s'aligner sur champ magnétique (c'est à dire leur moment magnétique de spin μ). Leur nombre quantique magnétique de spin aura soit comme valeur $m_s = 1/2$, état le plus stable dans le même sens que H_0 , soit $m_s = -1/2$ à l'opposé de H_0 et minoritaire (valable pour les noyaux de nombre de spin $I = 1/2$). Le rapport entre les 2 populations est proche de 1 (Fig.14). Il en résulte une légère aimantation notée M_0 . Une transition électronique entre ces 2 niveaux est possible, d'où le phénomène de résonance. Au niveau macroscopique, l'apparition de 2 niveaux d'énergie avec des populations de spins différentes entraîne une aimantation résiduelle alignée à H_0 .

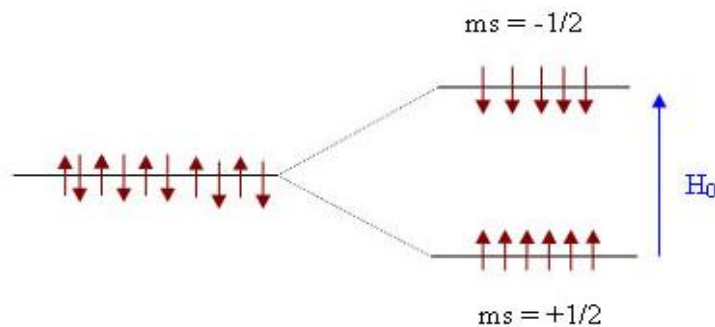


Fig. 14 : Représentation des coordonnées polaires d'un noyau H.

Quand le noyau est soumis à H_0 , il s'aligne sur le champ mais entre aussi en précession, suite à son mouvement de rotation sur lui-même (Fig.15). Le moment magnétique prend une vitesse angulaire proportionnelle à H_0 : $w_0 = \gamma B_0$.

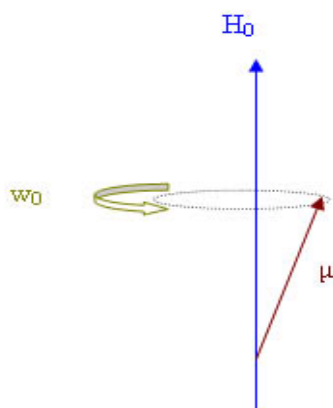


Fig. 15 : Mouvement de précession du moment magnétique de spin autour d'un champ magnétique.

Pour qu'il y ait basculement, il faut appliquer un champ H_1 perpendiculaire à μ (Fig.16) de façon à ce que la force générée fasse basculer μ (règle de Lorentz ou des 3 doigts).

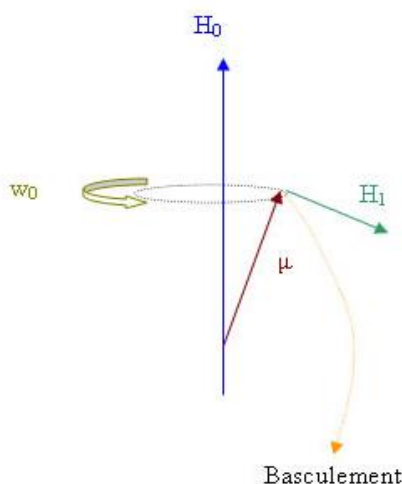


Fig. 16 : Basculement de champ magnétique

Si le champ H_1 est fixe, la condition n'est remplie qu'une fois par rotation, d'où l'obligation de créer un champ tournant H_1 . Concrètement on simule un champ tournant grâce à un solénoïde et un courant alternatif. La vitesse de rotation simulée w_1 doit être égale à w_0 . Il y a résonance et basculement de l'aimantation M_0 . Cette fréquence de résonance est donc proportionnelle au champ magnétique. Par conséquent, si l'environnement électronique perturbe celui-ci, la résonance aura lieu à une fréquence légèrement différente. On parle d'effet d'écran. Les signaux sont placés sur une échelle que l'on appelle déplacement chimique.

V.3. Signal RMN

La mesure du signal RMN est étroitement liée au dispositif d'émission de l'impulsion. Le champ B_1 est induit par la circulation d'un courant dans une bobine solénoïde (Fig.17a). Lorsque l'on coupe l'impulsion B_1 le système de spin retourne à l'équilibre en produisant un champ électromagnétique qui induit un courant dans cette même bobine (Fig.17b). Elle sert donc à la fois de système d'émission et de réception. Ce courant induit est le signal effectivement mesuré.

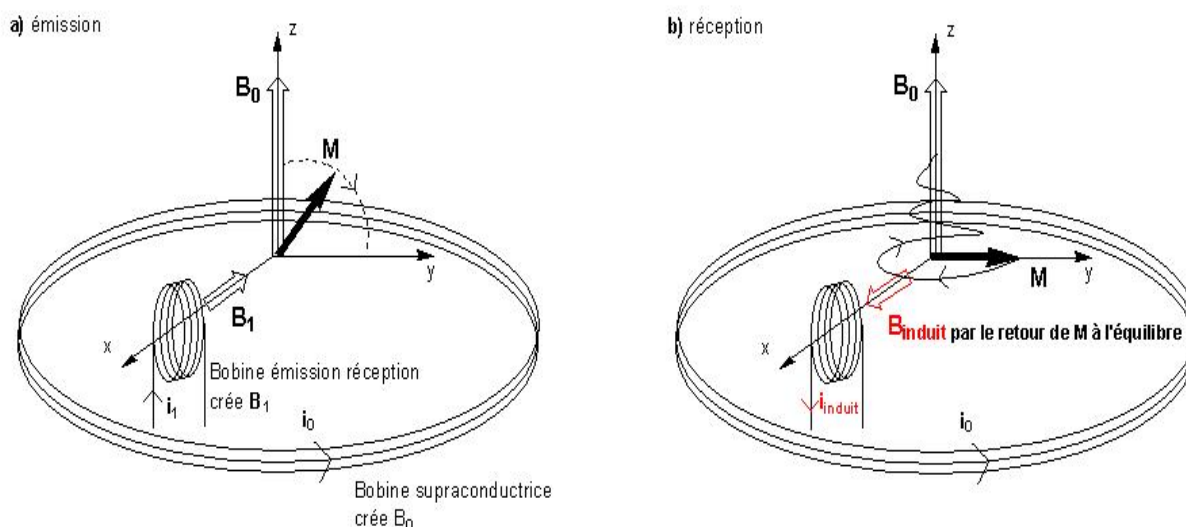


Fig. 17 : Emission - réception du signal.

La courbe qui donne le courant induit en fonction du temps est appelée FID pour Free Induction Decay ou « signal de précession libre » en français. Son allure pour un système élémentaire (un proton isolé) est relativement simple : il s'agit d'une sinusoïde amortie exponentiellement (Fig. 18a). Mais elle se complique très vite avec le nombre de noyaux mis en jeu : on obtient alors une somme de sinusoïdes amorties de caractéristiques différentes et le FID devient ininterprétable (Fig. 18b.) Pour pouvoir exploiter la mesure, il faut faire appel à une opération mathématique de traitement du signal : la transformée de Fourier.

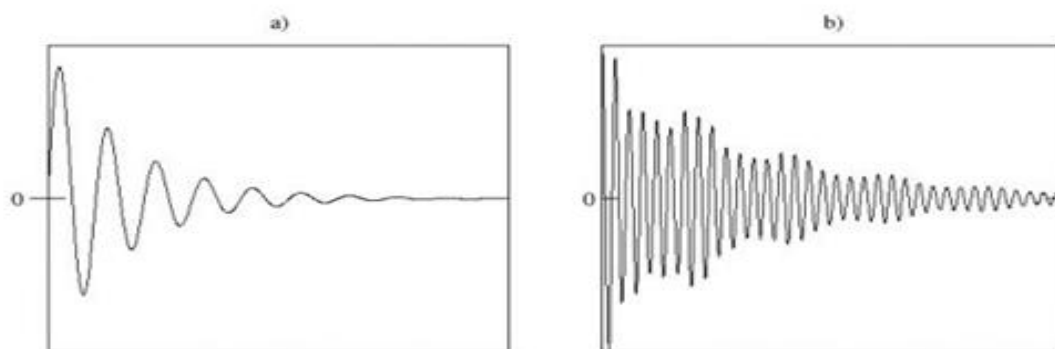


Fig. 18 : a)- FID d'un système élémentaire (un proton isolé) ; b)-FID d'un système complexe.

V.3.1. Traitement du signal par transformée de Fourier

La transformée de Fourier (TF) est une opération mathématique qui permet de déterminer le spectre de fréquence d'un signal temporel $f(t)$. La figure 19 donne la TF de signaux périodiques simples : les fonctions $\cos(t)$, $\cos(2t)$ et leur somme. On constate que la TF de $\cos(t)$ est un pic centré sur 1 et celle de $\cos(2t)$ un pic centré sur 2. La TF de la somme $\cos(t) + \cos(2t)$ fait apparaître deux pics bien séparés centrés sur 1 et 2, on a donc immédiatement les informations sur les fréquences qui composent ce signal. Dans ce cas élémentaire on peut encore trouver cette information en étudiant directement le signal, mais dans le cas d'un signal compliqué comme le FID de la figure 20 la TF devient indispensable.

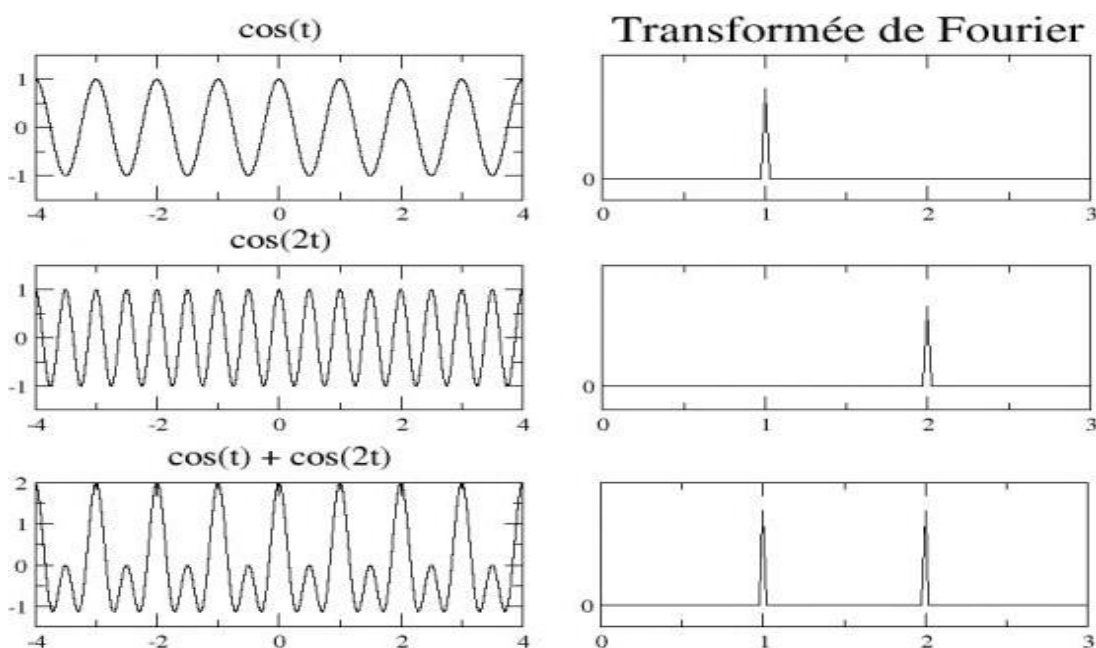


Fig. 19 : Transformation de Fourier

La transformée de Fourier du FID d'un système complexe donne des informations sur les différentes contributions au signal : chaque pic est centré sur la fréquence d'une contribution et sa surface est proportionnelle à l'amplitude de la contribution.

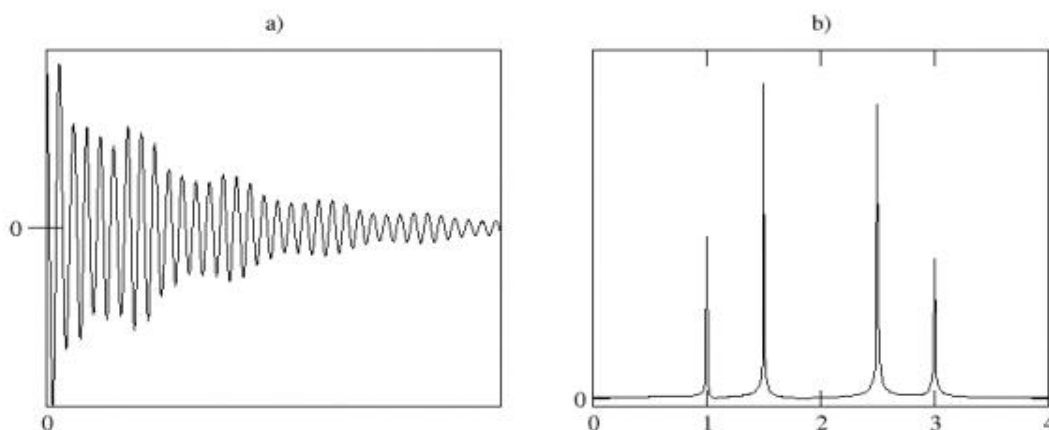


Fig. 20 : FID d'un système complexe et sa transformée de Fourier.

V.3.2. Analyse chimique par RMN

La transformée de Fourier permet de rendre le signal RMN lisible. Pour cela nous raisonnons sur une molécule simple : l'éthanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. La connectivité de chaque atome est donnée sur la formule développée (Fig.21)

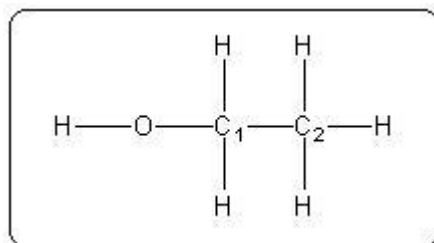


Fig. 21 : Formule développée de l'éthanol.

L'éthanol présente six noyaux d'atome d'hydrogène actif en RMN (par simplification on parle de «proton»). Ses six protons sont soumis à des champs B_0 et B_1 identiques, ils devraient donc présenter la même réponse à l'impulsion B_1 et le signal résultant devrait être la somme des six signaux individuels identiques.

Il y a dans l'éthanol trois groupes de protons différents, portés respectivement par C_1 , C_2 et O. Chaque proton au sein d'un même groupe est soumis à un champ local identique mais les trois champs locaux sont différents (Fig.22). Cela entraîne pour chaque groupe une réponse différente à l'impulsion B_1 , ce qui explique l'existence de trois massifs bien distincts. La sous-structure des massifs est quand à elle due à des phénomènes de couplage entre les spins nucléaires des différents groupes.

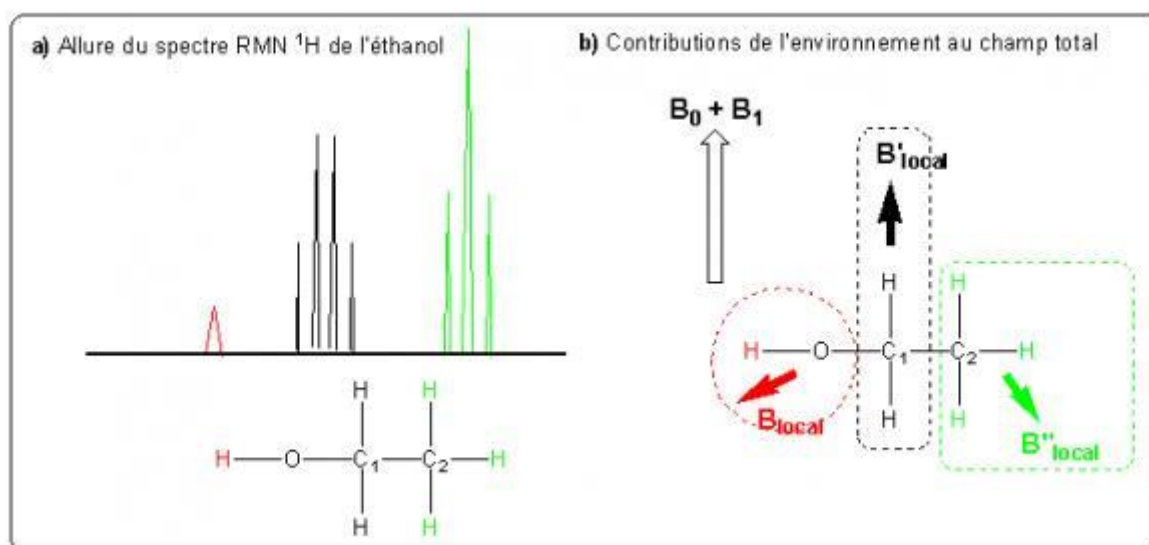


Fig. 22 : Spectre RMN de l'éthanol (simulation).

V.4. Appareillage

D'un point de vue technique, la prise d'un spectre nécessite un matériel relativement complexe du fait de la faible intensité du phénomène mis en jeu (Fig.23). Les parties essentielles du spectromètre RMN à transformée de Fourier (RMN-FT) sont l'aimant, l'émetteur et le récepteur haute fréquence (Fig.24). L'échantillon est préparé dans un tube en verre (tube de verre de 15 cm de long et de 5 ou 10mm de diamètre) borosilicaté dans un solvant dépourvu, si possible, d'atomes correspondant à l'isotope étudié. Par exemple, le solvant de choix pour l'étude des spectres protons est le chloroforme deutérié CDCl_3 . Son choix est issu de plusieurs avantages : le proton du chloroforme est facilement échangé par un deutérium, il est donc peu cher et de plus, le deutérium résonnant à une fréquence différente du proton, il est utilisé pour stabiliser le champ magnétique extérieur, aussi bien dans le temps (stabilité) que dans l'espace (homogénéité). Ces deux aspects du champ sont importants puisque compte tenu de la nature extrêmement ténue du signal, une variation spatiale et/ou une dérive temporelle provoqueront un élargissement important des signaux risquant de faire disparaître les figures de couplage.

Une bobine située dans ce que l'on appelle la *sonde* fournit le rayonnement à haute fréquence et le signal produit est recueilli soit par la même bobine soit par une bobine distincte (Fig.11). Après amplification et report sur un enregistreur x,y , le spectre peut être enregistré et la fréquence de résonance déterminée.

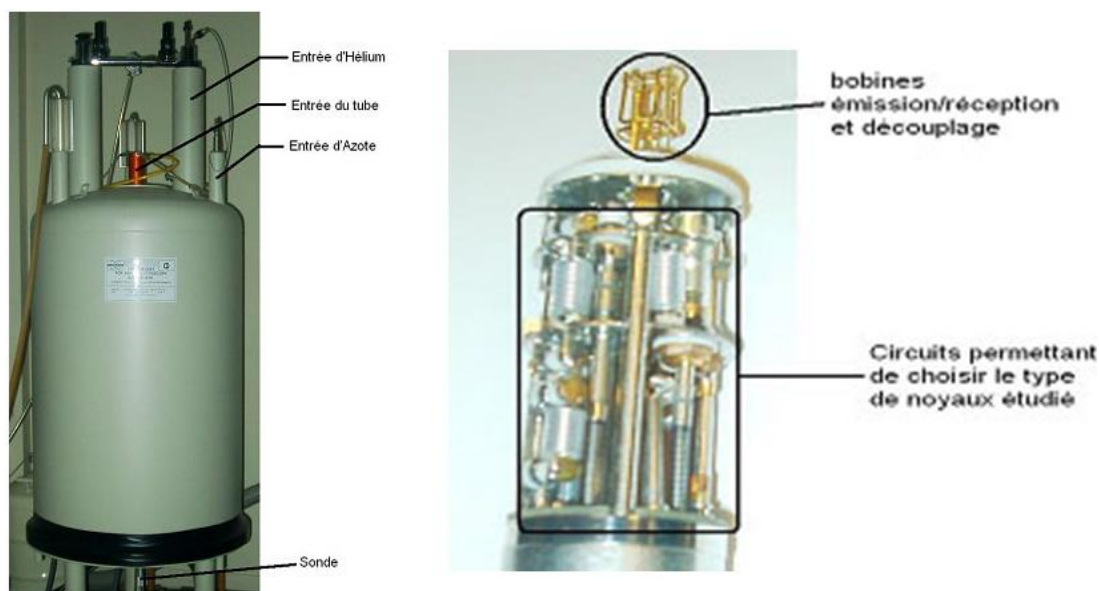


Fig. 23 : Photo d'un spectromètre RMN

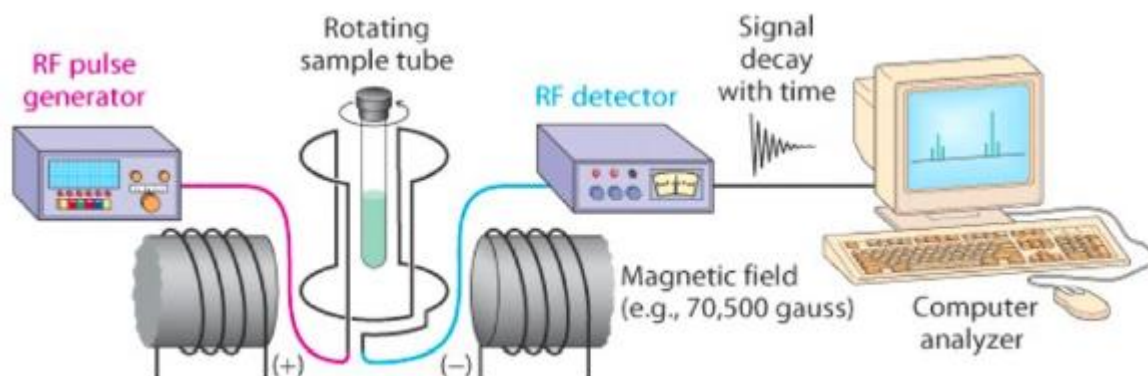


Fig. 24 : Schéma de spectromètre RMN avec bobines émettrice et réceptrice séparées

V.5. Applications

Les domaines d'application sont très variés et concernent l'analyse structurale des substances organiques en solution, la caractérisation des matériaux organiques et inorganiques à l'état solide et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

- La RMN des liquides est un outil de base pour l'étude des petites molécules organiques en solution, substances naturelles ou synthétiques, et l'étude des macromolécules solubles (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, polymères synthétiques).
- La RMN des solides permet d'étudier des substances amorphes ou faiblement cristallines telles que les verres et les polymères naturels ou synthétiques insolubles ; c'est une technique très complémentaire de cristallographie par rayons X. Une technique similaire est destinée à l'étude d'échantillons hétérogènes très variés tels que les supports solides pour la synthèse organiques ou les sols pour une caractérisation environnementale.
- L'IRM, telle qu'elle est pratiquée dans le cadre d'un laboratoire de RMN conventionnel, peut être qualifiée de micro-IRM car elle est adaptée à l'étude d'échantillons de la taille du centimètre avec une résolution de quelques dizaines de micromètres. Elle est applicable à l'étude des matériaux et des tissus biologiques, en particulier pour le suivi au niveau tissulaire des stratégies thérapeutiques.



Méthodes de fractionnement



I. Méthodes de précipitation

I.1. Filtration

I.1.1. Définition

La filtration est la séparation de particules en suspension dans un fluide, par différence de pression à travers un milieu poreux ou une membrane convenable (filtre). L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène (résidu) qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). A La fin de l'opération les particules solides restent sur le filtre et un mélange homogène est récupéré (filtrat). Le procédé, est très simple à mettre en œuvre et ne nécessite ni changement de phase, ni processus chimique.

I.1.2. Principe

La filtration est un procédé de séparation des molécules dissoutes en fonction de leur taille. Cette technique fait appel à des membranes à perméabilité sélective : toutes substances de taille inférieure à celle des pores de la membrane passent (ainsi que les molécules de solvant) alors que les molécules plus grandes sont retenues et concentrées. Une pression est exercée sur la solution à filtrer. Les conditions très douces ne détruisent pas l'activité biologique des molécules les plus fragiles. Par ailleurs, certains filtres présentent certains inconvénients à l'utilisation :

- Le colmatage : pénétration de particules dans les interstices du matériau filtrant ;
- L'adsorption : rétention de certains produits sur le filtre.

I.1.3. Matériel de filtration

I.1.3.1. Filtres

On distingue deux types de filtre : les filtres en profondeur ou d'épaisseur et filtres membranes ou écran.

a)- Filtres en profondeur

Les filtre en profondeur sont constitués de matériaux qui doivent être insoluble, inerte physiquement et chimiquement [papier (cellulose, coton, gaze, fibre de verre, amiante) ou de substances agglomérées (verre fritté, sable, charbon)]. Dans les deux cas, les particules vont se bloquer dans des canaux existant à l'intérieur même du filtre. L'efficacité d'un filtre en profondeur augmente donc avec son épaisseur, par contre elle diminue lorsque la pression appliquée sur le filtre augmente. Il y a plusieurs types :

- ✓ **Papier filtre classique** : Ces filtres sont utilisés sur un support, le plus souvent un entonnoir conique. Il est utilisé soit sous forme sans pli soit sous forme de filtres plissés
- ✓ **Filtres en fibre de verre** : Ils sont utilisés à plat sur un Buchner ou sur un entonnoir avec plaque frittée. Ils sont toujours utilisés pour éliminer des particules dont la taille est inférieure à 1 μm .
- ✓ **Papier filtre séparateur de phase** : C'est un papier hydrophobe placé dans un entonnoir de verre : la phase aqueuse reste sur le filtre, alors que la phase organique le traverse (Type Whatman 1PS peut remplacer une ampoule à décante).
- ✓ **Plaques frittées** : Ce sont des plaques poreuses constituées de poudre de verre agglomérée. Elles sont très utilisées pour les filtrations sous vide.

b)- Filtres membranes

Constitués d'une fine lame percée de pores calibrés (cellulose, acétate de cellulose, nitrate de cellulose, teflon). Ils retiennent à leur surface toutes les particules dont la taille est supérieure à celle des pores du filtre. L'élévation de la pression exercée sur le filtre accélère le débit sans diminuer l'efficacité de la filtration. La rétention de toutes les particules conduit cependant à un colmatage rapide de ces filtres.

I.1.3.2. Entonnoirs

Les entonnoirs sont des instruments de forme coniques destinés à recevoir un matériel filtrant. On distingue deux types :

a)- Entonnoirs ordinaires : en verre, porcelaine ou en polycarbonate

b)- Entonnoirs spéciaux : qui peuvent être en verre ou en porcelaine avec une plaque de fond percée de trous, sur laquelle on dépose une rondelle de papier filtre qui recouvre exactement ce fond.

I.1.4. Classification des filtrations

Les filtrations sont classées selon plusieurs critères :

I.1.4.1. Diamètre des pores du filtre

On peut aussi nommer différemment l'opération de filtration suivant la taille des pores du filtre :

- ✓ **Filtration clarifiante** : lorsque le diamètre des pores se situe entre 10 et 450 μm .
- ✓ **Microfiltration** : lorsque le diamètre des pores se situe entre 10 nm et 10 μm .
- ✓ **Ultrafiltration** : lorsque le diamètre des pores se situe entre 1 et 10 nm.

- ✓ **Osmose inverse** : lorsque le diamètre des pores se situe entre 0.1 et 1 nm. L'**osmose inverse** est un système de purification de l'eau utilisé dans la production d'eau purifiée, et dans l'industrie agro-alimentaire pour concentrer les sirops de fruit, mélasses, moûts, lait...
- ✓ **Filtration frontale** : la plus connue, consiste à faire passer le fluide à filtrer perpendiculairement à la surface du filtre. Cette technique est limitée par le colmatage.
- ✓ **Filtration stérilisante** : lorsque le diamètre des pores est inférieur à 0,22 μm (permet la rétention de micro-organisme).

I.1.4.2. Mode de passage du fluide

Il existe deux principales techniques de filtration :

- ✓ **La filtration frontale**, la plus connue, consiste à faire passer le fluide à filtrer perpendiculairement à la surface du filtre.
- ✓ **La filtration tangentielle**, au contraire, consiste à faire passer le fluide tangentiellement à la surface du filtre. C'est la pression du fluide qui permet à celui-ci de traverser le filtre. Cependant, cette technique est réservée à la filtration des très petites particules allant du nm jusqu'au μm .

I.1.4.3. Type de pression

- ✓ **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 (Fig.25).

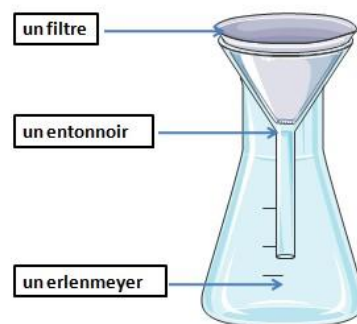


Fig. 25 : Filtration gravimétrique

- ✓ **Filtration sous vide**

Une dépression est créée en aval du matériau filtrant. C'est le mode de filtration utilisée d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Elle s'adapte sur un robinet d'eau froide. Lorsque l'eau y circule, une dépression se crée dans la fiole à vide à laquelle elle est jointe (Fig.6).

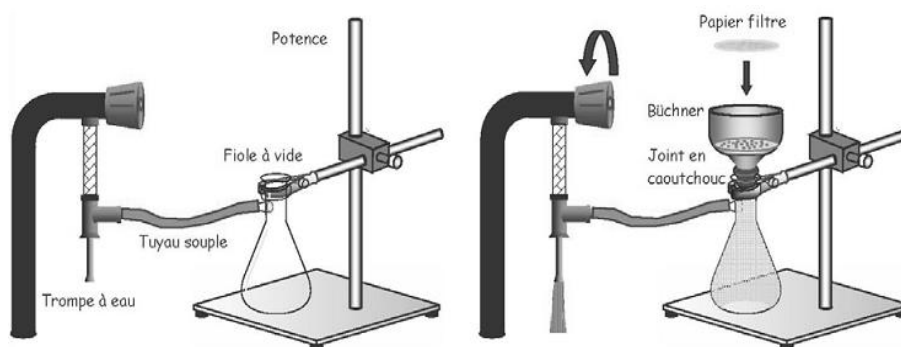


Fig. 26 : Filtration sous vide

✓ Filtration sous pression

La filtration sous pression évite le moussage et l'évaporation du solvant ; elle est d'un emploi fréquent dans l'industrie. Ce dispositif est constitué de deux pièces plastiques, que l'on visse l'une sur l'autre, enserrant un filtre membrane.

I.1.5. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de séparation des molécules dissoutes en fonction de leur taille (500 à 1 000 000 daltons). On utilise des membranes (pores inférieurs à 25 nm) qui peuvent retenir des protéines et des acides nucléiques. Ce qui permet de situer l'ultrafiltration entre l'osmose inverse où les sels sont retenus et la microfiltration où la taille des pores varie de 0,01 à 10 μm . Cette technique fait appel à des membranes à perméabilité sélective. Une pression est exercée sur la solution à filtrer. Le procédé, très simple à mettre en œuvre et ne nécessite ni changement de phase, ni processus chimique. Les conditions très douces ne détruisent pas l'activité biologique des molécules les plus fragiles.

I.1.6. Applications

- ❖ Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir :
 - ✓ soit un liquide clarifié, libérée de particule solide ;
 - ✓ soit un solide essoré de l'excès de liquide
- ❖ **Stérilisation :** De nombreuses molécules biologiques sont sensibles à la chaleur et ne peuvent être stérilisées à l'autoclave. La solution à ce problème est la stérilisation à froid. Les filtres de surface qu'on utilise ont des pores de 0,45 μm ou de 0,22 μm de diamètre.
- ❖ Les applications de l'ultrafiltration et la microfiltration sont plus analytique :
 - ✓ Dessalage de peptides, protéines : fractions obtenues en présence de fortes concentrations de sel.

- ✓ Concentration des anticorps monoclonaux, immunoglobulines, urine, liquide cébrospinal, sérum ...
- ✓ Elimination des oligonucléotides, fragments d'ADN très courts des acides nucléiques.
- ✓ Analyses microbiologiques et tests de stérilité.
- ✓ Les analyses gravimétriques.
- ✓ Les isollements de cellule à partir de liquide céphalo-rachidien.
- ✓ Les analyses de poussière
- ✓ Les isollements de virus.

I.2. Centrifugation

La sédimentation est une technique d'analyse permettant de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur, lorsque la dispersion est formée d'une substance beaucoup plus dense que le liquide (décantation). Lorsque la densité de la substance est plus faible, la sédimentation est gênée par l'agitation thermique, il faut avoir recours à des champs de forces plus intenses. La centrifugation permet de remplacer l'accélération de la pesanteur (g) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse.

I.2.1. Définition

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. On peut ainsi fractionner une préparation en un sédiment (ou "culot"), constitué de matériel plus ou moins solidement entassé dans le fond du tube à centrifuger, et en un surnageant qui sera le liquide résiduel au dessus du sédiment.

I.2.2. Principe

Une particule soumise à un champ gravitationnel tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement. Ce principe fondamental de physique est très utilisé en biochimie pour séparer des précipités, des cellules, des organites et

même des macromolécules. En mettant une préparation biochimique dans le rotor d'une centrifugeuse et en faisant tourner celui-ci, on génère une accélération qui va pousser les particules qui la composent vers l'extérieur du rotor, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger.

La vitesse avec laquelle se déplaceront ces particules est proportionnelle à :

- la force gravitationnelle à laquelle la particule est soumise ;
- la masse de la particule ;
- la différence entre la densité de la particule et celle du solvant.

Et inversement proportionnelle à : la friction avec le milieu, en fonction de la taille et à la géométrie des particules. Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à la gravité, force qui s'exerce du haut vers le bas, et à la poussée d'Archimède, force qui s'exerce du bas vers le haut. En faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, la force centrifuge, qui est une accélération qui s'exerce vers l'extérieur, ce qui entraîne sa sédimentation ou sa remontée.

I.2.3. Calcul de la force gravitationnelle

Dans une centrifugation, il faut connaître la force relative de centrifugation (force de gravité relative, (FGR) en "g" ou l'accélération g. Cependant pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une FGR différente puisque le rayon de rotation est différent. Il faut donc être capable de convertir la vitesse de rotation (RPM, rotations par minute) en FGR. Pour cela on peut se servir d'un nomogramme ou de la formule mathématique de conversion. Celle-ci est :

$$g = w^2 r = 1.119 * 10^{-5} * r * n^2$$

w : vitesse angulaire (rad/s) ; **r** : distance à l'axe de rotation ; **n** : nombre de rotations par minute (rpm).

I.2.4. Types de centrifugation

I.2.4.1. Centrifugation en gradient de densité

Dans cette méthode, les macromolécules sédimentent au sein d'un gradient de densité. Or à l'équilibre elles se stabilisent dans la zone de gradient où la densité des particules est égale à la densité du solvant, ce qui entraîne que la force gravitationnelle est égale à la poussée d'Archimède. On va donc utiliser un solvant dont la densité va varier en fonction de la position dans le tube permettant aux différents constituants de rejoindre la zone de densité équivalente à la leur : on parle de gradient. On peut accentuer ou raffiner les méthodes de séparation en faisant cette centrifugation dans un gradient de concentration.

Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide. S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération. Si la particule est moins dense que celle du milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface (Fig. 27).

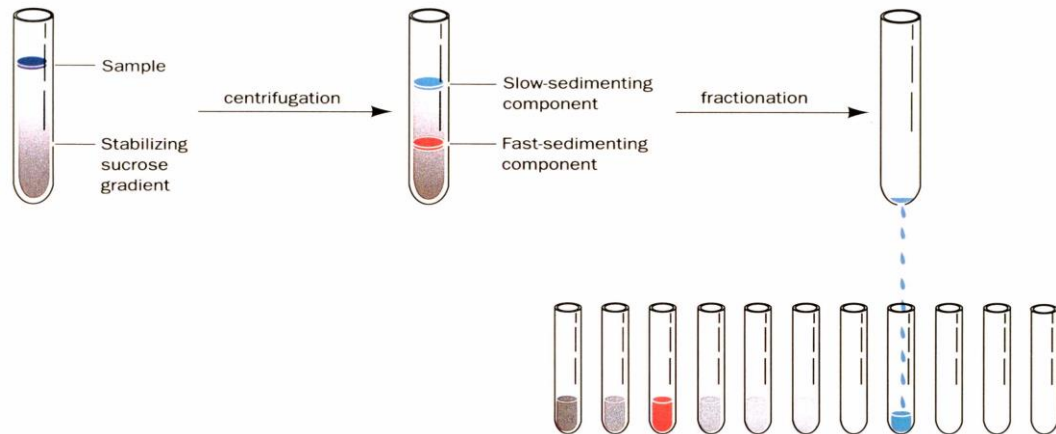


Fig. 27 : Centrifugation sur gradient de saccharose

a)- Préparation des gradients

Pour obtenir des solutions de densités différentes, la méthode la plus classique est d'utiliser des solutions de concentration croissante en saccharose, mais on utilise aussi du chlorure de césium. D'autres molécules sont aussi utilisées mais beaucoup plus marginalement.

On recherche aussi des produits qui sont relativement inertes, peu coûteux, faciles à manipuler, non toxiques, etc. Évidemment aucun produit ne réunit toutes ces qualités et on doit choisir en tenant compte des contraintes expérimentales

b)- Gradients continus et discontinus

Il existe deux types de gradients :

- ✓ **Les gradients discontinus** sont constitués d'un empilement de solutions de moins en moins dense. Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes. Au dessus, leur densité étant plus élevée, ils migrent vers le bas, et au dessous, leur densité étant plus faible ils migrent vers le haut
- ✓ **Les gradients continus** pour lesquels la variation de densité est continue (comme leur nom l'indique). Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes.

Le contenu du tube peut être récupéré par fractions successives, souvent du bas vers le haut, pour utilisation et/ou analyse ultérieure.

c)-Type de centrifugation en gradient de densité

✚ Centrifugation isopycnique

Les molécules soumises à la centrifugation sur le gradient se sépareront selon leur densité, non pas leur masse. La préparation à analyser est mélangée avec le gradient. Chaque type de particule sédimentera jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration correspondant à sa densité. Elle s'immobilisera alors à ce niveau.

✚ Centrifugation de zone ou séparation zonale

La centrifugation peut aussi être utilisée pour des fins analytiques, pour séparer des particules ou des molécules, selon leur taille. Dans ce type d'applications, comme les particules sont homogènes, elles ont toutes la même densité, elles ne diffèrent que par leur taille. Le gradient sert donc à faire en sorte que les particules lourdes sédimentent plus vite que les plus légères, tout en n'atteignant jamais le fond du tube à centrifuger.

I.2.4.2. Centrifugation différentielle

Le principe est de séparer les différents constituants le plus souvent à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une première centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un culot au fond du tube. Tous les autres éléments vont rester dans le surnageant. On récupère alors séparément le surnageant et le culot ce qui revient à avoir séparé les constituants qui les composent. Cette méthode est par exemple couramment utilisée pour récupérer les éléments figurés (les cellules) du sang qui sédimentent pour des accélérations très faibles (quelques dizaines de g).

Au besoin, on peut recommencer un second cycle de centrifugation avec le surnageant précédent, mais avec une accélération plus importante. Progressivement, on sépare ainsi les différents constituants en terminant pas les éléments les plus petits et ayant le moins de différence de densité avec le solvant (Fig. 28).

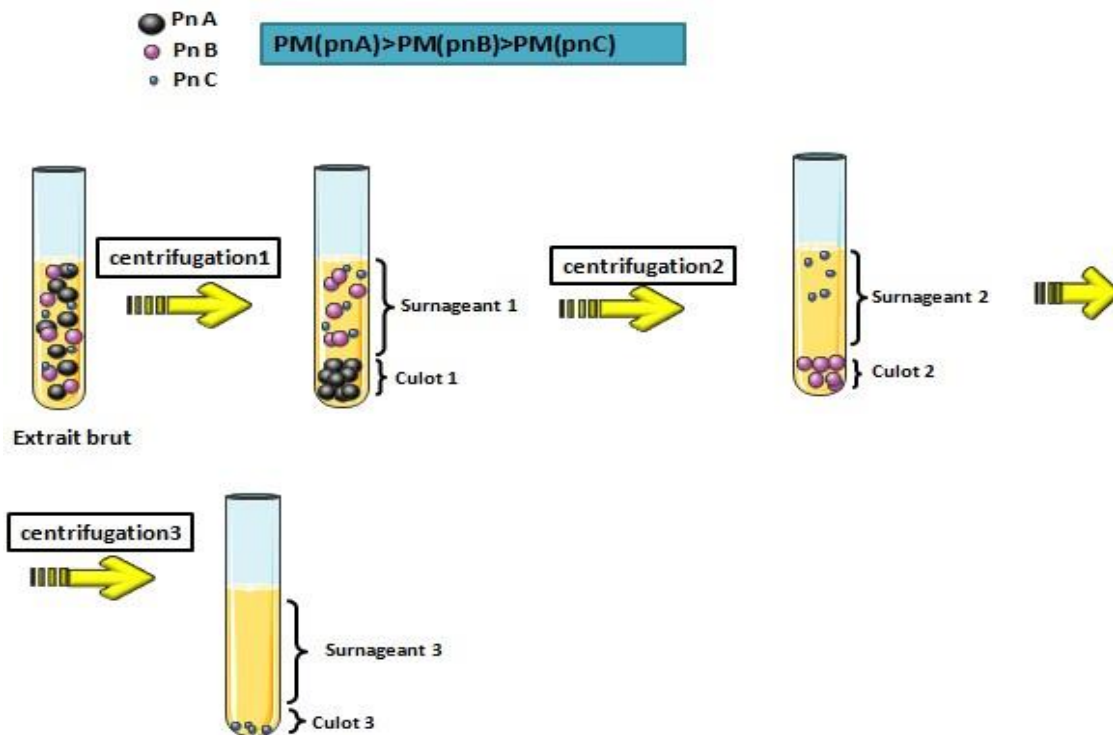


Fig. 28 : Centrifugation différentielle

I.2.5. Appareillages

I.2.5.1. Centrifugeuses

Une gamme d'appareils a été développée en fonction des besoins expérimentaux, particulièrement au niveau des accélérations requises, des volumes de matériel à centrifuger, de la température de travail, etc. La principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor est évidemment la force du moteur qui le fait tourner. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand.

a)- Centrifugeuses de table

Les modèles les plus simples, souvent appelées centrifugeuses cliniques, permettent d'atteindre de faibles accélérations (1000 à 3000 g). Certains modèles sont réfrigérés, certains autres non.

b)- Centrifugeuses au sol

Ces appareils sont un peu plus complexes. Elles permettent d'obtenir des accélérations d'environ 20 000 g. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger des relativement gros volumes.

c)- Microcentrifugeuses

C'est des centrifugeuses spécialement conçues pour les micro-volumes très souvent employés en biochimie moderne. Les centrifugeuses de ce type peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12-15 000 g.

d)- Ultracentrifugeuses

Ce sont des appareils complexes et coûteux qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300 000 g). De telles vitesses de rotation ne peuvent s'obtenir que sous pression très réduite. Les faibles pressions permettent aussi d'éviter la surchauffe du rotor et de l'échantillon. Tous les modèles sont réfrigérés.

e)- Ultracentrifugeuses analytiques

Ce sont des appareils de moins en moins utilisés. Ces centrifugeuses servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines. On peut déterminer avec une grande précision la masse et le coefficient de sédimentation des protéines et autres particules par ultracentrifugation analytique. Cette technique exige un appareillage (centrifugeuse, rotor, etc.) spécialisé à cette fin.

I.2.5.2. Rotors

Il existe deux grands types de rotor : à angle fixe, à godets mobiles.

a)- Rotors à angle fixe

Les rotors à angle fixe sont faits de blocs de métal (aluminium, titane) avec des puits creusés à l'intérieur et inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale, généralement de l'ordre de 15° à 35° selon les modèles. Les tubes à centrifuger sont déposés dans ces puits.

b)-Rotors à godets mobiles

Les rotors à godets mobiles se réorientent lors de la centrifugation. En effet, les godets sont disposés sur des crochets ou un système à bascule. Quand la rotation du rotor débute les godets (et les tubes qu'ils contiennent), sous l'effet de la force centrifuge, se réorientent et passent en position horizontale. Ce genre de rotor est utilisé dans les centrifugations en gradients discontinus ou continus.

I.2.6. Applications en biochimie

- ❖ **Séparation de phases** : La séparation de deux phases liquides non miscibles peut être effectuée de façon beaucoup plus rapide par centrifugation. Le phénol est souvent séparé d'une phase aqueuse de cette façon dans les méthodes d'extraction au phénol des acides nucléiques.
- ❖ **Fractionnement cellulaire** : On utilise fréquemment la centrifugation différentielle pour séparer les composantes cellulaires : Typiquement, on peut sédimenter les noyaux à 1-2000 xg durant 5-10 minutes. Les mitochondries et les chloroplastes tombent à environ 10-15000 xg durant 10-15. minutes. Les ribosomes sont obtenus à 100,000 xg après 1 ou 2 heures.
- ❖ Détermination d'une constante de sédimentation pour l'acide nucléique et certaines organites.
- ❖ Vérification de la pureté d'un extrait macromoléculaire.
- ❖ Détermination d'une masse moléculaire dans l'étude des protéines et des acides nucléiques.

I.3. Dialyse

I.3.1. Définition

La dialyse est une méthode de séparation qui permet d'éliminer, une solution macromoléculaire, des ions ou de petites molécules, par le passage de ceux-ci à travers les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse. Les molécules de petite taille qui traversent la membrane du sac à dialyse sont qualifiées de diffusibles. Celles qui sont trop grosses sont dites non-diffusibles. Le transfert des ions est nettement amélioré et plus accéléré lorsqu'on applique un champ électrique : C'est l'électrodialyse.

L'électrodialyse utilise des membranes anioniques et cationiques. Ce sont des membranes à densité de charge élevée, conçues comme des échangeurs d'ions. Au cours de l'électrodialyse, il peut se produire des variations de pH et une élévation de température qui dénature les protéines.

Les membranes de dialyse habituellement utilisées en biochimie se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de "boudin de dialyse". Il est placé dans un récipient contenant un liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre dialyse.

I.3.2. Principe

La dialyse est basée sur les principes régissant sur la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Trois mécanismes entrent en jeu dans ce processus (Fig. 29) :

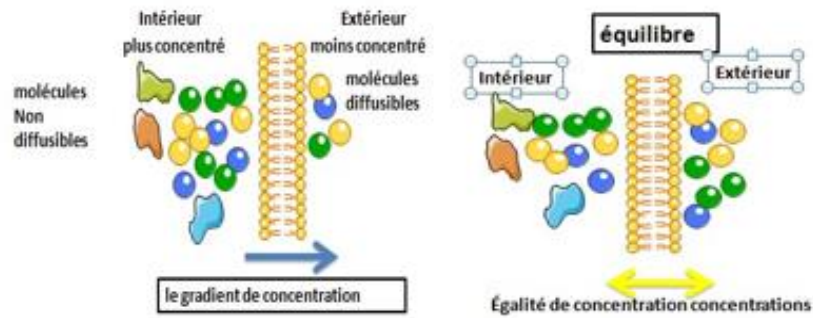


Fig. 29 : Principe de la dialyse

a)- Gradient de concentration

Les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. A l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre. On peut amplifier cette élimination des molécules diffusibles en répétant ce processus.

b)- Gradient électrique

Ce mécanisme implique les charges électriques des molécules. En effet, le gradient électrique joue aussi un rôle. Ce gradient électrique résulte de l'ensemble des espèces chargées de part et d'autre de la membrane.

c)- Osmose

Ce phénomène se produit de façon concomitante avec le mouvement des petites molécules. En effet puisque le contenu du sac de dialyse, au début du processus, est souvent plus concentré que le liquide de contre dialyse, l'eau, par osmose entrera dans le sac. Donc, l'entrée de l'eau dans le sac durant la dialyse fera augmenter le volume de liquide dans le sac.

I.3.3. Facteurs influençant la dialyse

Plusieurs facteurs liés aux caractéristiques de la membrane de dialyse, à la solution de contre dialyse et à la solution à dialyser peuvent affecter le bon déroulement de la dialyse.

I.3.3.1. Charge électrique de la membrane de dialyse

La membrane ne doit pas être chargée électriquement afin de minimiser les phénomènes de répulsion par charge identique ou d'adsorption sur la membrane du produit à dialyser.

I.3.3.2. Température

La vitesse de diffusion d'une substance à travers la membrane s'élève avec l'augmentation de la température qui amplifie l'agitation des molécules et augmente ainsi la probabilité pour une molécule donnée de traverser la membrane.

I.3.3.3. Rapport surface de membrane / volume de la solution à dialyser

Pour un volume donné de solution à dialyser, la vitesse augmente avec la surface de la membrane.

I.3.3.4. Présence de substances chimiques modifiant la vitesse de dialyse en l'inhibant ou en l'augmentant.

I.3.4. Matériel de dialyse

a)- Membranes

Il existe plusieurs matériaux employés pour fabriquer des membranes à dialyser, les plus communément employés sont les esters de cellulose ou d'autres dérivés cellulosiques. On peut obtenir des membranes ayant des niveaux de porosités divers mais faciles à contrôler lors du processus de fabrication, de 100 à un million de dalton (en terme de taille de protéine). Certains fabricants ont mis au point des systèmes de micro-dialyse pour traiter des volumes aussi petits que 250µl.

b)- Dialyseur

Un dialyseur est conçu en utilisant une membrane de grande surface et de faible épaisseur ; d'autre part, la concentration de la substance à dialyser diffusante dans le liquide de contre dialyse est maintenue nulle, soit en utilisant un grand volume de ce liquide, soit en le renouvelant constamment. Il existe plusieurs types de dialyseurs ; le premier dialyseur construit est le dialyseur de GRAHAM, suivi par le dialyseur de MONOD.

I.3.5. Technique de dialyse

I.3.5.1. Préparation des membranes de dialyse

Les membranes de dialyse contiennent glycérine, composés sulfurisés et métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer par trempage. La technique usuelle consiste à placer successivement les membranes une heure dans un mélange à volume égal d'éthanol et d'eau, puis une heure dans une solution de bicarbonate de sodium 10mM. Une heure dans solution diluée d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra Acétate : agent fixant par chélation les métaux lourds) puis deux heures dans de l'eau distillée. La membrane ainsi préparée est conservée à 4°C pendant deux à trois jours dans l'eau. Si le délai de conservation est long, il faut ajouter un inhibiteur de pousse bactérienne et fongique et si la membrane se dessèche, elle devient inutilisable. Avant toute utilisation, il faut rincer la membrane avec le solvant utilisé pour la dialyse.

I.3.5.2. Préparation des Boudins de dialyse

Il faut fermer les boudins de dialyse à leurs deux extrémités par un seul nœud simple. Il faut tester la dialyse avec des billes de verres à l'intérieur du boudin. Ceci permet d'éviter qu'il ne flotte à la surface du liquide de contre dialyse car dans ce cas la surface de contact serait restreinte provoquant ainsi une diminution de la vitesse de dialyse. Il faut assurer une agitation convenable du liquide de contre dialyse afin d'éviter la formation de gradient de concentration des substances diffusibles dans le récipient qui contient le liquide de contre dialyse.

Ceci est particulièrement utile lorsque le volume du liquide de contre dialyse est important. Ce liquide doit être renouvelé fréquemment afin d'accélérer la disparition des substances diffusibles.

Afin d'accélérer le processus de dialyse ou éviter la tendance des sels d'équilibrer leur concentration de part et d'autre de la membrane :

- Il faut changer souvent le tampon de dialyse
- Il faut utiliser un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique
- Il faut mettre le boudin de dialyse sous agitation

I.3.6. Applications

- ✓ Eliminer des produits diffusibles contenus dans les solutions protéiques.
- ✓ Concentrer une solution protéique soit en plaçant le boudin de dialyse contenant cette solution dans un courant d'air, soit en plaçant le boudin dans du polyéthylène glycol (PEG) en poudre. L'eau quitte le boudin pour solubiliser le PEG qui est non diffusible.
- ✓ L'électrodialyse permet de dessaler des échantillons avant de réaliser des chromatographies sur papier.

II. Méthodes chromatographiques

II.1. Définition

La chromatographie est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange et pour purifier des substances. Bien que cette technique ait été développée à l'origine pour séparer des substances colorées (d'où le nom, Chroma qui signifie en grec couleur). La chromatographie est de nos jours utilisée pour séparer tous les types de substances, y compris celles qui sont incolores. Il faut donc employer une technique de révélation efficace pour observer les composés (UV, indice de réfraction, réactif complémentaire, mase après évaporation de l'éluant...).

II.2. Principe

Le principe de base de la technique de chromatographie réside dans la différence d'affinité d'un soluté envers une phase stationnaire (l'adsorbant) et une phase mobile (l'éluant). Evidemment, ces phases ne doivent pas réagir chimiquement l'une avec l'autre. Au contact de ces deux phases, un soluté sera séparé des autres solutés selon sa plus ou moins grande affinité pour ces phases.

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

Les différents composants de l'échantillon ont généralement une vitesse caractéristique qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues dans l'échantillon ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution-étalon (solution commerciale contenant des substances connues, à des concentrations bien connues). Ces substances servent de références et permettent d'identifier ou de doser chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation. Il s'agit de chromatographie *analytique*. Dans d'autres cas, on se contente de séparer les fractions, de les récolter pour les identifier par d'autres techniques : c'est la chromatographie *préparative*.

II.3. Classification

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes.

II.3.1. Classification selon la nature des phases

Dans ce classement la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux et la phase stationnaire peut-être soit un solide finement pulvérisé soit un liquide immobilisé sur une phase fixe (Tableau I).

Tableau I : Classification selon la nature des phases

Classification	Types de chromatographie	Abréviation de nom
Selon la nature de la phase mobile	chromatographie en phase liquide	CPL
	chromatographie en phase gazeuse	CPG
	chromatographie en phase supercritique	CPS
Selon la nature de la phase stationnaire	chromatographie gaz / solide	CGS
	chromatographie gaz / liquide	CGL
	chromatographie liquide / solide	CLS
	chromatographie liquide / liquide	CLL

La CSF représente un cas intermédiaire entre CL et CG, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

II.3.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer (Tableau II).

Tableau II : Classification selon la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer

Types de chromatographie	Caractéristique
Chromatographie d'adsorption	La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires «modèles d'études» étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène. D'autres phases ont été utilisées depuis avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der Waals, hydrogène et des interactions hydrophobes. Il s'agit d'une chromatographie liquide solide.
Chromatographie de partage	La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide). Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL).
Chromatographie par échange d'ions	La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. La rétention des solutés ce fait grâce à des interactions de type ioniques.
Chromatographie d'exclusion	La phase stationnaire est un solide poreux les molécules sont séparé selon leur forme et leur masse moléculaire.
Chromatographie d'affinité	Elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire

II.3.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon le support de la chromatographie on distingue :

- ✚ Chromatographie sur colonne, ou la phase stationnaire est contenue dans un cylindre métallique ou en verre.
- ✚ Chromatographie planaire (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

II.4. Grandeurs fondamentales et définitions

II.4.1. Phase stationnaire (fixe)

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM). La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

II.4.2. Adsorption

C'est la fixation des molécules dissoutes par la phase stationnaire. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée : liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals...

II.4.3. Adsorbants

Ce sont des solides très divisés (l'adsorption étant un phénomène de surface, il faut que l'adsorbant présente la plus grande surface utile possible). La qualité d'un adsorbant dépend de sa pureté, de sa surface, de son homogénéité, de sa teneur en eau.

II.4.4. Solvants ou éluants

Pour un système chromatographique donné, le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant. Plus un éluant est polaire, plus il entraînera facilement une substance polaire. En revanche, un solvant apolaire possèdera un mauvais pouvoir éluant vis à vis des substances polaires mais entraînera facilement un constituant apolaire. On utilise soit un solvant pur soit un mélange de plusieurs solvants de façon à " ajuster " son pouvoir éluant au système chromatographique étudié.

II.4.5. Notion de temps

II.4.5.1. Temps de rétention tr

Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* tr qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée.

II.4.5.2. Temps mort tm

Le temps mort tm est le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

II.4.5.3. Temps de rétention réduit tr'

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du soluté tr' . En d'autres termes, c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit (Fig. 30) :

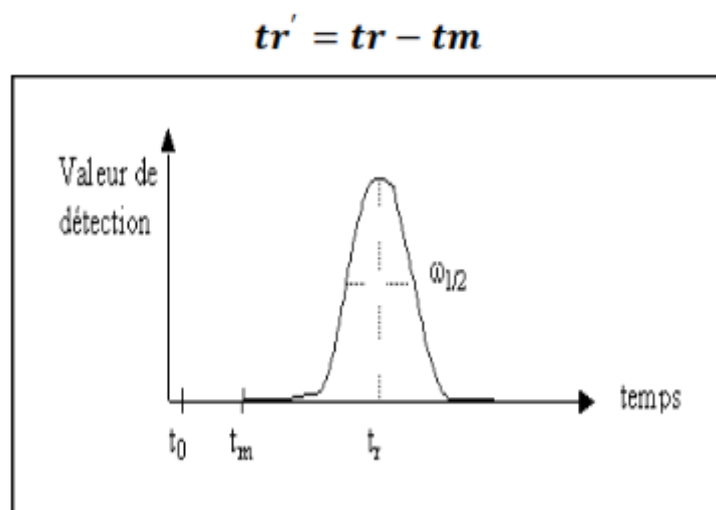


Fig. 30 : Caractéristique d'un pic d'élué en chromatographie

Ici t_0 est le temps du début de l'injection, cependant dans certains ouvrages il symbolise le temps mort.

II.4.6. Volume d'élué ou volume de rétention Vr

Le volume d'élué (de rétention) Vr de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est stationnaire,

$$Vr = tr.D$$

II.5. Principales méthodes chromatographiques

II.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les récents développements de la chromatographie sur couche mince, CCM ou (TLC, pour thin-layer chromatography), lui ont permis de passer du statut de méthode semi-quantitative à celui de méthode quantitative, susceptible de donner des résultats très fiables. Il s'agit désormais d'une technique instrumentale au même titre que les autres formes de chromatographies.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse, essentiellement par capillarité (Fig. 31). En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

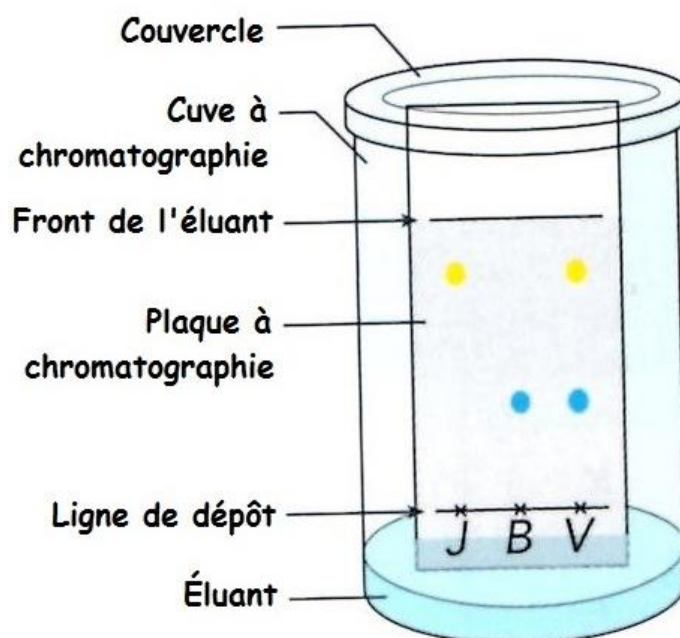


Fig. 31 : Chromatographie sur couche mince

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes: Directement si les substances sont colorées, ou à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer

en taches colorées; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques: les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucre par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.

Le R_f est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée (Fig. 32).

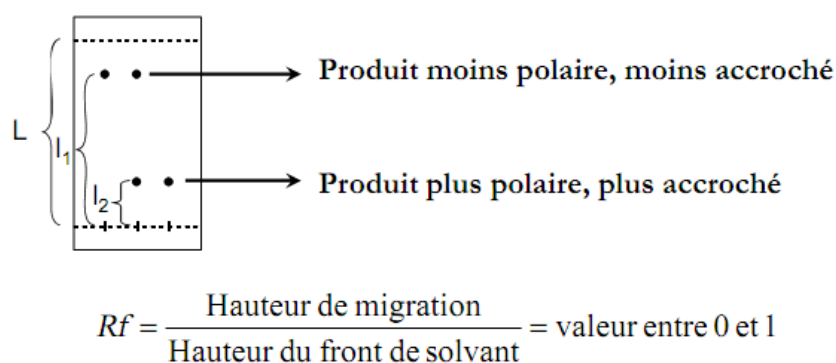


Fig. 32 : Calcul du rapport frontal.

Applications

- La CCM permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique.
- Poursuivre la progression d'une réaction (indique le nombre de composants d'un mélange).
- La CCM est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

II.5.2. Chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (CCM 2D)

Il arrive souvent que la CCM, même en utilisant successivement plusieurs solvants, ne permette pas la séparation des mélanges sur une seule ligne avec une résolution suffisante des constituants, ce problème peut souvent être résolu par la CCM bidimensionnelle (CCM 2D), même dans le cas de composés voisins. Dans cette technique, la séparation est réalisée sur une plaque carrée : on dépose la tâche du mélange des solutés à proximité d'un coin de la plaque et l'on développe d'abord le chromatogramme par un premier mélange de solvants (Fig. 33a). Cette opération terminée (Fig. 33b), on retire le chromatogramme de la chambre de développement, on le sèche et on le tourne de 90° de telle façon que la ligne des taches séparées devienne la nouvelle ligne de dépôts (Fig. 33c). On effectue alors un nouveau développement du chromatogramme par un second mélange de solvants. On réalise ainsi une bonne séparation (Fig. 33d) sur toute la surface carrée de la plaque chromatographique. L'un des avantages importants de la CCM 2D c'est quelle

peut permettre de bonnes séparations de composés de structure très proche sur des plaques mesurant seulement 10 cm x 10 cm.

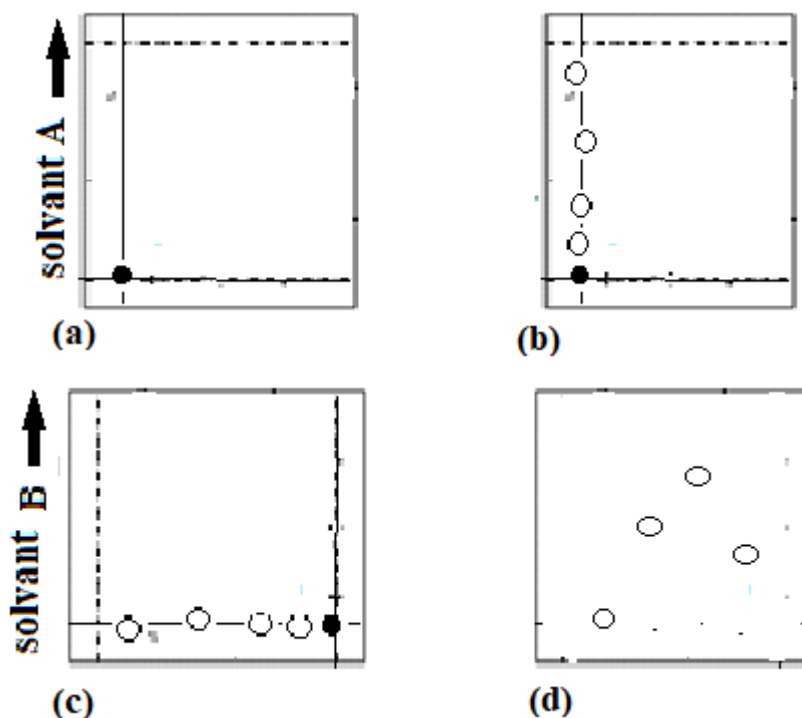


Fig. 33 : CCM bidimensionnelle : (a) Dépôt initial ; (b) résultat du premier développement ; (c) plaque tournée de 90° pour un second développement ; (d) chromatogramme final.

II.5.3. Chromatographie sur couche mince à haute performance (CCMHP)

Les progrès réalisés au niveau de la qualité des adsorbants et des méthodes de dépôt des échantillons ont conduit à une amélioration des résultats de séparations en CCM connu sous le nom de chromatographie sur couche mince à haute performance CCMHP (HP pour high performance thin layer chromatography) pour les séparations dans lesquelles on atteint de hautes résolutions. Dans cette technique les distances d'élution sont raccourcies et des quantités plus faibles de solutés sont utilisées.

Pour préparer les couches de CCMHP, on utilise du gel de silice spécialement purifié ou chimiquement modifié, dont les particules ont un diamètre moyen de 3-5 μm . Les couches préparées avec des adsorbants améliorés peuvent donner environ 5000 plateaux théoriques et donc fournir des résultats supérieurs à ceux de la CCM traditionnelle et d'écourter les temps d'analyse. Les volumes d'échantillon sont de l'ordre de 100-200 nL, ce qui donne des taches compactes de 1-1,5 mm de diamètre, ce qui permet d'augmenter le nombre d'échantillons déposés sur la plaque. L'introduction de l'échantillon sur l'adsorbant est une étape critique en CCMHP, dans la plupart des analyses quantitatives on utilise un dispositif constitué de capillaire en platine iridié de volume fixe.

Dans l'analyse quantitative par CCMHP in situ basées sur des mesures photométriques directes les densitomètres à balayage ont joué un rôle important, ils explorent chacune des taches par réflexion ou par absorption d'un faisceau lumineux. La différence d'intensité lumineuse entre l'adsorbant et les taches se traduit à l'enregistrement par une série de pics dont l'aire correspond à la quantité de substance séparée.

II.5.4. Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est une technique de chromatographie en phase liquide. La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des **phénomènes de partage**. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant, qui se déplace par capillarité, fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

II.5.5. Chromatographie de partage

Il s'agit d'une chromatographie liquide-liquide. Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides non miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase, on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol) : on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée. Tant à la chromatographie de partage classique, on choisit une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire.

II.5.6. Chromatographie échangeuse d'ions

La Chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne, mais la méthode peut être transposée sur couche mince (papier échangeur d'ions) ou réalisée sur « batch » (la résine est mise en présence de la solution et agitée mécaniquement).

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements inusables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

La phase stationnaire doit être insoluble et chimiquement stable ; la structure doit être stable et ses particules de préférence sphériques et uniformes. Elle est un support solide comportant des groupes fonctionnels ionisés : positifs [ammonium quaternaire ($-NR_3^+$), tertiaire ($-NR_2^+$) ou secondaire ($-NR^+$)] ou négatifs [sulfonate ($-SO_3^-$), phosphonate ($-PO_3^{2-}$) et carboxylate (CO_2^-)] permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation.

Le principe de la chromatographie ionique est basé sur les propriétés des résines échangeuses d'ions qui permettent une fixation sélective des anions ou des cations présents dans une solution. Sur la résine échangeuse d'ions conditionnée sous forme d'une colonne chromatographie circule en permanence un éluant. La solution à analyser est injectée et les ions sont fixés sélectivement sur la colonne. Le lavage a été effectué avec le même tampon de conditionnement : les cations (non fixé à la résine) sont éliminés dans le tampon de lavage. Les ions sont ensuite progressivement décrochés en fonction de leur pH ($pH > pHi$, le soluté passe sous forme d'anion). Chaque espèce ionique est séparée et est détectée par conductimétrie à la sortie de la colonne (Fig. 34).

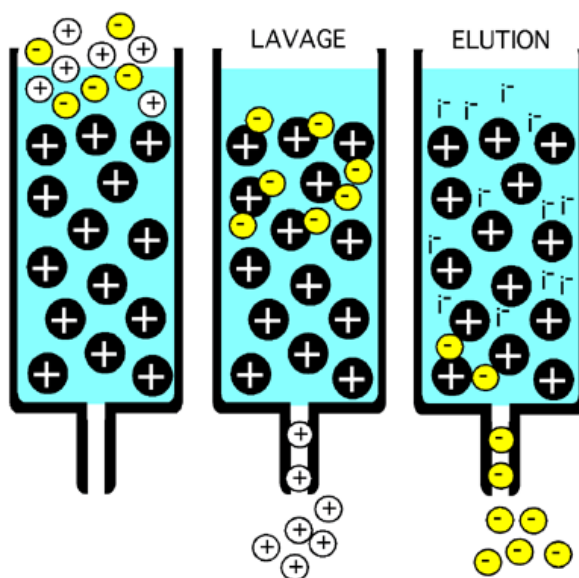


Fig. 34 : Chromatographie échangeuse d'anion.

Applications

L'échange d'ions est utilisé au laboratoire depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de races ioniques dans un échantillon. Cette technique chromatographique s'applique particulièrement à l'analyse et la séparation de sels minéraux, d'acides aminés (hydrolysats de peptides), de peptides (hormonaux en particulier), de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides ionisés, de glucides ionisés...etc

Elle est utilisée aussi pour la décalcification, la décarbonatation d'eaux de boissons, l'élimination de composés amers de jus de fruits, la désacidification de jus d'agrumes, l'acidification du lait en caséinerie, la déminéralisation du lactosérum et la Décoloration de sirop en raffinerie.

II.5.7. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration ou gel perméation ou tamissage moléculaire est fondée sur la "rétention" des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores ; elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores (Fig. 35).

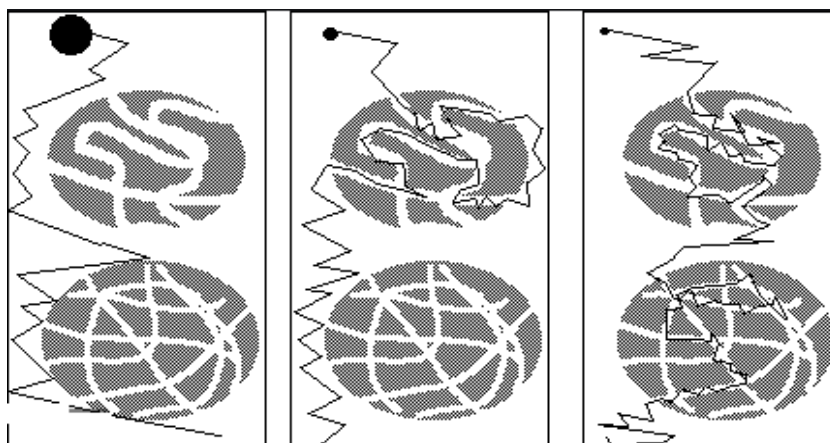


Fig. 35 : Schéma de "trajet " d'un soluté de masse molaire dans la Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux (dextrane, polyacrylamide, agarose) dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à perméation sélective (Fig. 36). On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seul ce dernier peut être utilisé avec des vitesses de phase mobile élevées. Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel. Si le gel est hydrophile on parle de filtration de gel et s'il est à caractère hydrophobe on parle de perméation de gel.

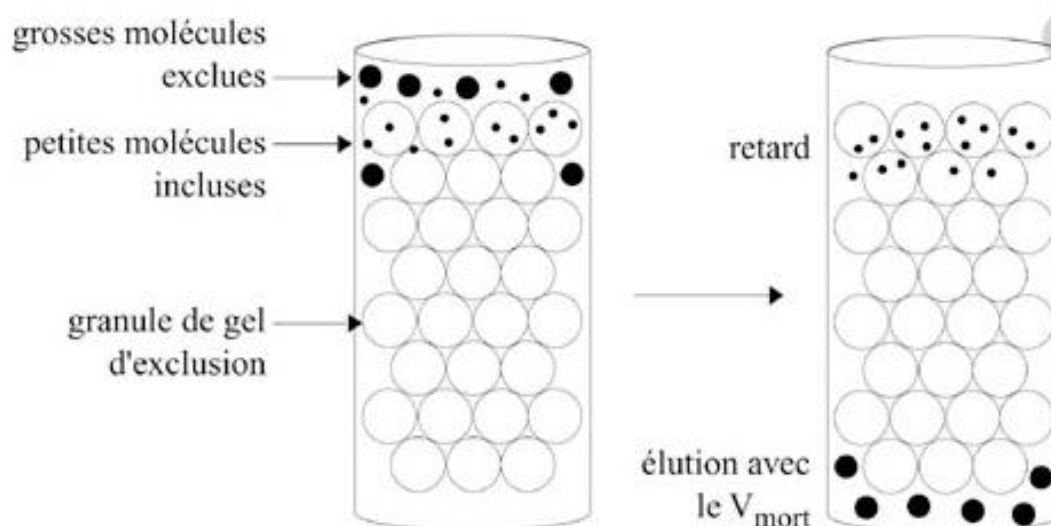


Fig. 36 : Tamisage moléculaire.

Applications

Les applications du tamisage moléculaire sont analytiques ou préparatives, on peut citer à titre d'exemple :

- La déminéralisation des solutions protéiques.
- La séparation de peptides, protéines, triglycérides, osides, dispersion de produit organiques.
- Séparation de virus.
- La détermination des masses moléculaire des macromolécules surtout les protéines.

II.5.8. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative. C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables ; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression (Fig. 37). On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

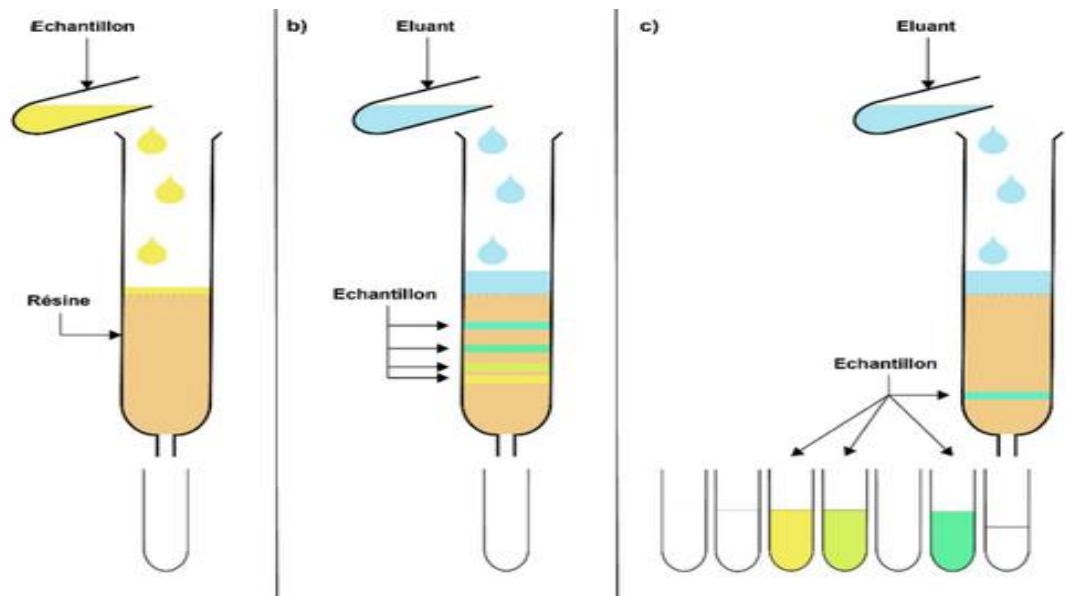


Fig. 37 : Chromatographie sur colonne

II.5.9. Chromatographie d'affinité

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser. Trois types d'affinités sont utilisés : Affinité enzyme-substrat, affinité ligand-récepteur et affinité antigène-anticorps. Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps (Fig. 38). Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

Applications

La technique est adaptée soit à l'analyse soit à la préparation de substances biologiques. Elle est pratiquée selon les cas, en colonne ou en batch. Elle est utilisée :

- En enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatique.
- En immunologie, pour la purification d'anticorps.
- En protéinochimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- En chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr....etc).

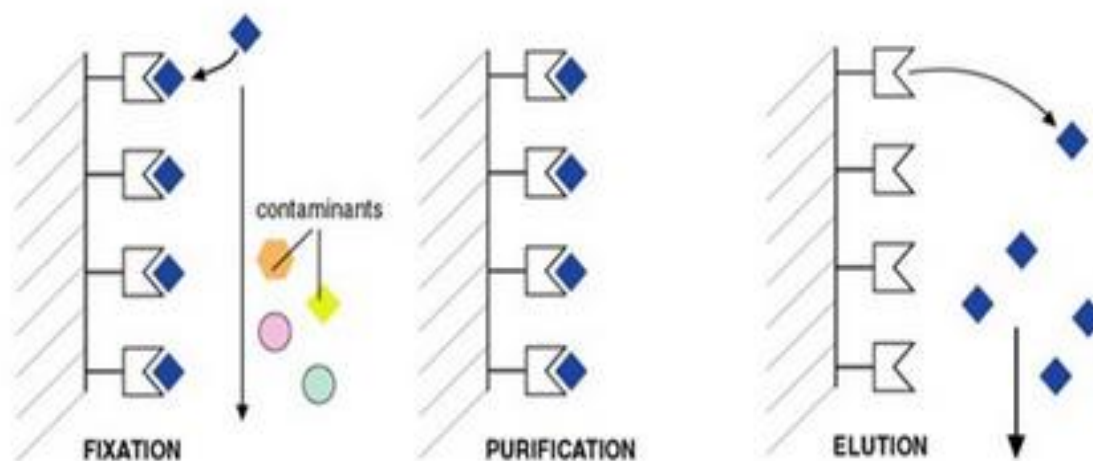


Fig. 38 : Chromatographie d'affinité

II.5.10. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées. Ces phases, constituées de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Ce qui a conduit à exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*. Aujourd'hui le P a été attribué à **Performance** afin de marquer l'innovation de cette technique de séparation.

L'échantillon est injecté dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé (augmentation de la pression). Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (Fig.39). La combinaison de rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation : haute performance.

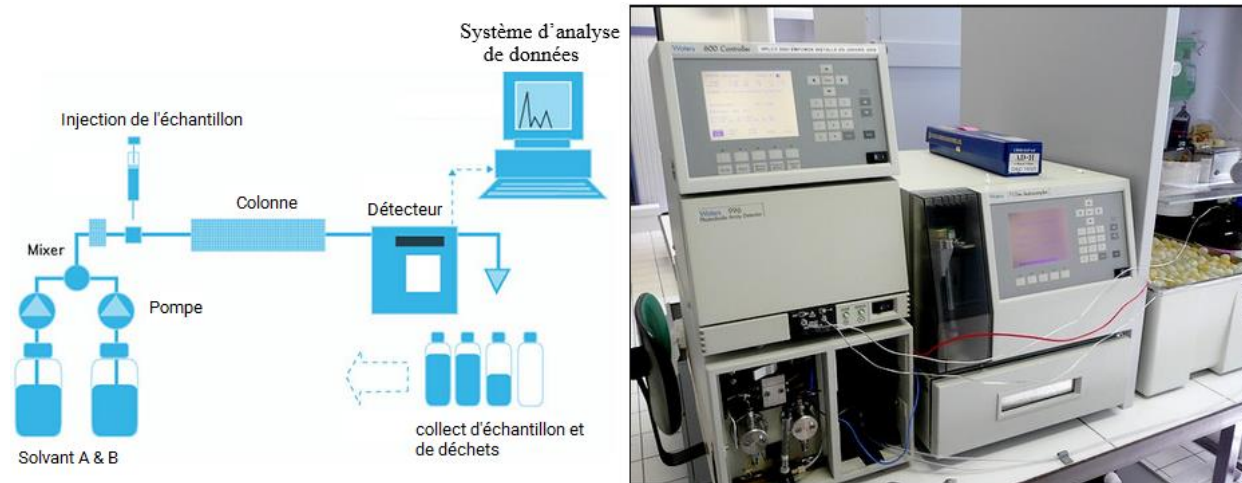


Fig. 39 : Chromatographie liquide haute performance.

II.5.11. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer différents constituants d'un mélange très complexe de gaz ou de liquide en faisant passer une phase gazeuse mobile sur une phase stationnaire adsorbante solide ou liquide. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être volatile par chauffage mais thermostables. Il existe deux types de chromatographies en phase gazeuse selon la phase stationnaire :

- ✚ Chromatographie gaz-solide (CGS) : C'est une chromatographie d'adsorption ; la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.
- ✚ Chromatographie gaz-liquide (CGL) : C'est une chromatographie de partage ; la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

Le principe de séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases, une phase mobile (le gaz vecteur) et une phase stationnaire. Le mélange à analyser est injecté dans la colonne sous forme d'un fluide et est vaporisé dans l'injecteur. Le gaz vecteur l'entraîne dans la colonne de séparation thermostatée. Les composés du mélange se répartissent différemment dans les 2 phases, se déplacent donc à des vitesses différentes. Ce phénomène d'interaction provoque ainsi la séparation des constituants du mélange. Un système de détection adéquate en sortie de la colonne permet de créer un signal qui est enregistré. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité des composés détectés. A leur sortie, ils sont détectés et des pics apparaissent sur l'enregistreur (Fig. 40).

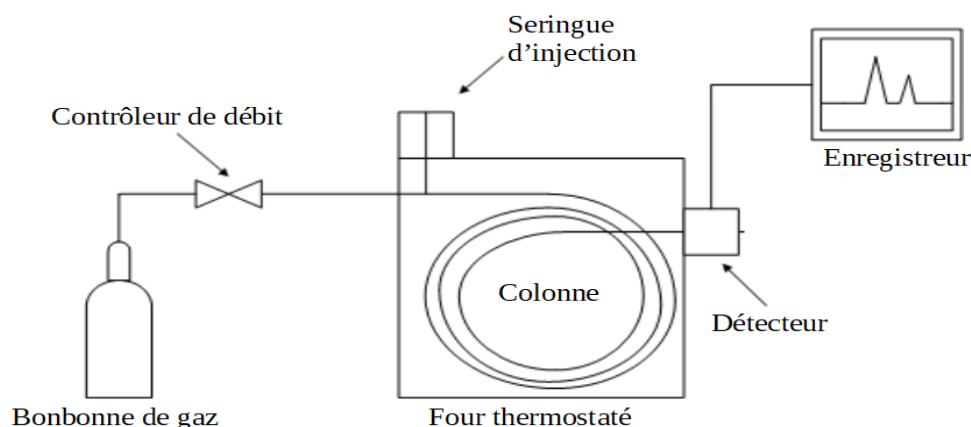


Fig. 40 : Schéma de principe d'un appareil classique de chromatographie en phase gazeuse

a)- Appareillage

Un appareil de CPG comprend schématiquement un injecteur, une colonne contenue dans une enceinte thermostatée (four) et un détecteur relié à un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme. Quel que soit le chromatographe à gaz, on retrouve toujours les principales composantes suivantes :

❖ Gaz vecteur sous haute pression

La phase mobile entraînant les composés dans la colonne est un gaz de préférence chimiquement inerte appelé **gaz vecteur** (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer). Le gaz vecteur, peut-être de l'hélium, de l'azote, de l'hydrogène ou de l'argon, son choix dépend de facteurs tels que la disponibilité, la pureté, la consommation et le type de détecteur utilisé. Ils sont livrés dans des bonbonnes surmontées d'un régulateur de pression. Ces gaz doivent être de pureté analytique, car les impuretés sont responsables des bruits de fond sur le chromatogramme.

❖ Injecteurs

Beaucoup de dispositifs ont été conçus pour introduire l'échantillon mais dans les principales applications, les échantillons sont liquide et sont injectés à l'aide d'une micro-seringue à aiguille hypodermique. On transperce un septum en élastomère et l'on injecte directement l'échantillon dans un compartiment métallique chauffé, situé en tête de colonne. La chambre d'injection possède une double fonction ; provoquer la volatilisation instantanée de l'échantillon introduit et assurer le mélange homogène de la vapeur ainsi formée et du gaz vecteur. La température de la chambre est maintenue généralement de 20 à 30°C au-dessus de celle de la colonne. Pour assurer la vaporisation instantanée de l'échantillon l'injecteur est maintenu à une température d'environ 20°C supérieure à celle du soluté de plus haut point d'ébullition. Le septum doit être capable de supporter cette température. Le choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne utilisée (remplie ou

capillaire) et par la nature des produits à séparer (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures). Il y'a plusieurs mode d'injections.

❖ Four

Le four à bain d'air est destiné à recevoir la colonne et la porter à température désirée, pourvu de résistances chauffantes et d'un système de ventilation pour l'homogénéisation de la température. La régulation est assurée par un thermocouple, grace auquel la variation n'excede pas $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pour un intervalle de fonctionnement allant de la température ambiante jusqu'à 400°C . La température du four peut être identique du début à la fin de la manipulation (conditions isothermes) ou programmée par palier successif (en gradient).

❖ Colonnes

Elles contiennent la phase stationnaire et se présentent sous forme de tubes fins enroulés. Il existe deux types de colonnes : les colonnes ordinaires et les colonnes capillaires (Fig. 41).

- ✚ Les colonnes ordinaires (remplies) sont des colonnes de remplissage, leur diamètre est de 2 à 6 mm, leur longueur est de 1 à 5 m.. Elles sont en tubes d'acier ou verre. Elles sont remplies d'un support poreux et inerte [généralement Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles) sous forme de grains sphériques (d'environ 0.2 mm de diamètre) sur lequel est imprégnée la phase stationnaire.
- ✚ Les colonnes capillaires (à tube ouvert) ne sont pas des colonnes de remplissage, leur diamètre est de 0.10 à 0.32 mm, leur longueur est de 10 à 100 m. Elles sont en tubes d'acier inoxydable ou en silice fondue. La phase stationnaire est directement déposée sur la paroi interne de la colonne sur une épaisseur de 0,05 à 5 μm . Les colonnes standard sont en quartz fondu (silice très pure) et entourées d'une gaine de polymère souple, ce qui leur confère une grande résistance à la torsion.

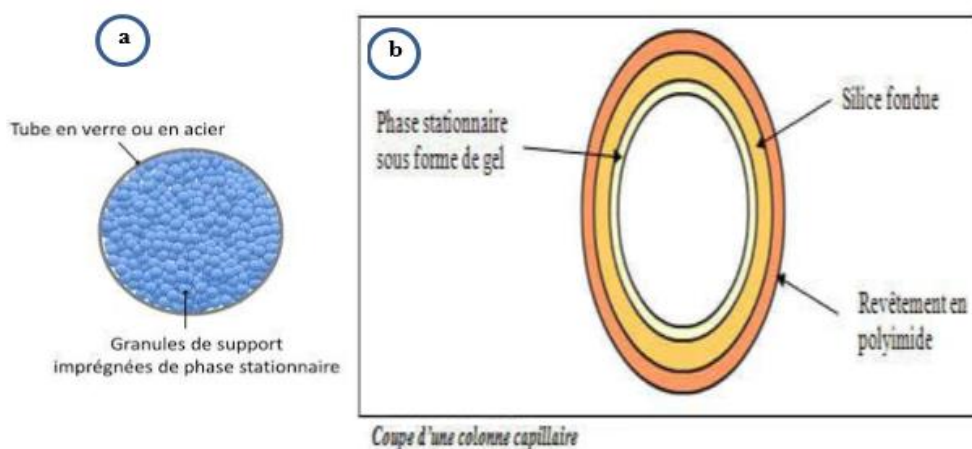


Fig. 41 : Schéma de colonne : **a**-remplie ; **b**-capillaire

❖ Détecteurs

En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Il en existe de nombreux modèles, dont les détecteurs universels

✚ **Détecteur à thermo-conduction ou catharomètre**, basé sur le principe du pont de Wheatstone : le passage des composants va faire varier la tension, cette variation est due à la différence de conductibilité de chaque composant.

✚ **Détecteur à ionisation de flamme (FID)** : C'est le plus utilisé, un FID utilise une flamme hydrogène / air dans laquelle l'échantillon est passé pour oxyder les molécules organiques et produire des ions. Les ions sont collectés et produisent un signal électrique qui est ensuite mesuré.

✚ **Détection par spectrométrie de masse**: La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge.

✚ Autres détecteurs

-**Détecteur azote-phosphore et Détecteur à capture d'électrons** : Ils sont couramment utilisés dans les secteurs de la pharmacie, de l'agroalimentaire et de l'environnement.

-**Détecteur d'émission atomique** est utilisée dans l'analyse de l'essence, du diesel, du pétrole, des polluants de l'environnement dans le sol, l'eau et les effluents et les composés organiques volatils dans l'eau.

-**Détecteur à photométrie de flamme** est une technique utilisée pour analyser les composés contenant du soufre ou du phosphore et les métaux.

-**Détecteur à photo-ionisation** est une technique utilisée pour analyser de nombre hydrocarbures aromatiques et autres composés organiques.

b)- Exploitation des résultats

La CPG est une méthode d'analyse immédiate qualitative et quantitative. Les solutés sont caractérisés par leur temps d'émergence qui est comparé à celui d'un étalon ; en ce qui concerne leur dosage l'aire des pics est proportionnelle à la concentration des solutés ; On peut procéder à un étalonnage de l'appareil en utilisant des étalons, comme en HPLC, les méthodes de calcul sont identiques.

c)- Applications

La CPG est le domaine de l'analyse fine puisque sa sensibilité atteint le pg. Elle s'applique bien à la détection de traces, comme dans le cas de la toxicologie, de la répression des fraudes ou de la médecine légale. En biologie, cette technique est applicable à différents dosages : stéroïdes, acides gras et oses, mais elle nécessite une purification et une stabilisation des échantillons. En microbiologie les produits de fermentation sont analysés par CPG.

III. Électrophorèse

III.1. Définition

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qualitative et quantitative et préparative (identification et dosage) et de fractionnement basée sur la migration différentielle de particules, chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique. Selon la nature des particules chargées on distingue :

- ❖ L'ionophorèse : Les particules chargées sont des ions minéraux ou organiques : cations minéraux, acides aminés, esters boriques d'oses, esters sulfuriques et phosphoriques d'oses....etc.
- ❖ L'électrophorèse : Les particules chargées sont des macromolécules portant des groupes ionisables.
- ❖ La cataphorèse : Les particules qui migrent sont neutres et la charge est acquise par adsorption d'ions étrangers.

III.2. Principe de la migration

La migration dépend de plusieurs facteurs :

✓ Mobilité électrophorétique μ

La mobilité électrique c'est la vitesse de déplacement des particules dans la suspension, et elle dépend de **la charge** et de **la géométrie** de la particule.

✓ La charge Q

La charge dépend du pH isoélectrique de la particule et du pH du tampon.

La différence **pH - pHi** détermine le **signe de la charge Q** d'une particule :

si $\text{pH} > \text{pHi}$	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si $\text{pH} < \text{pHi}$	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si $\text{pH} = \text{pHi}$	charge nette nulle	pas de migration

La différence $\text{pH} - \text{pH}_i$ détermine l'intensité de la charge Q d'une particule.

✓ **La taille**

La taille des molécules a une certaine influence, particulièrement dans le cas où les molécules passent à travers une matrice poreuse. Plus la taille des molécules est petite, relativement à celles des pores, plus les molécules se déplaceront facilement, ce qui implique évidemment qu'elles migreront rapidement.

✓ **L'affinité des molécules pour la matrice.**

✓ **Champ électrique E**

- **Courants liquidiens :** Ils englobe le **Courant d'électrolyse** qui se produit dans les cuves et **entraîne** des modifications du pH des compartiments et le **courant d'évaporation** qui s'accompagne d'un échauffement du support. Pour limiter ce phénomène, la cuve est fermée par un couvercle; on utilise aussi des cuves réfrigérées (Fig. 42).

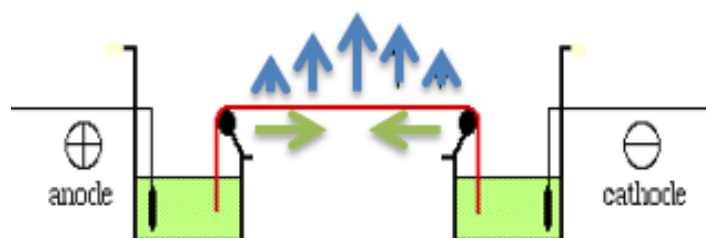


Fig. 42 : Courant d'évaporation.

➤ **Courant d'électro-endosmose**

Dans les conditions expérimentales, le support se charge négativement ; une couche mobile de charges positives se forme dans le solvant, au contact du support et entraîne globalement la phase liquide vers la cathode (Fig. 43). Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules.

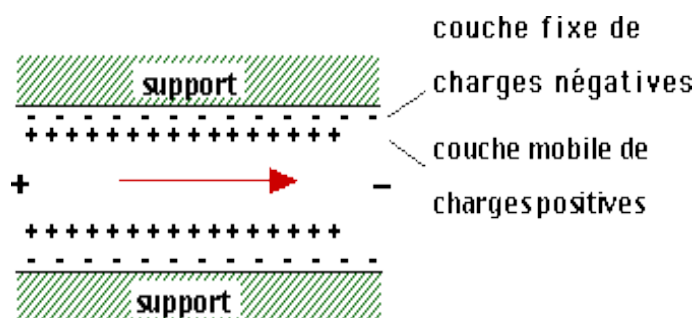


Fig. 43 : Courant d'endo-osmose.

III.3. Matériels

III.3.1. Montage

Il y a deux types :

III.3.1.1. Montage horizontal

Ce genre de montage (Fig. 44) est surtout utilisé pour les matrices comme l'acétate de cellulose ou le papier où les échantillons se déplacent à sa surface (matrice est sous forme de bande étroite). On utilise aussi des montages horizontaux pour des matrices d'agarose lors de l'électrophorèse d'acides nucléiques ou d'immuno-électrophorèse.

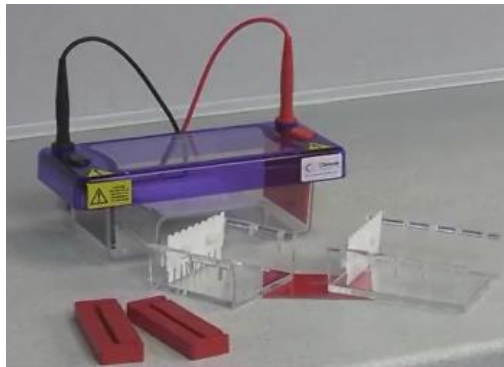


Fig. 44 : Montage horizontale.

III.3.1.2. Montage vertical

Ce genre de montage (Fig.45) est surtout utilisé pour les matrices comme les gels de polyacrylamide ou, plus rarement, d'agarose. Les échantillons se déplacent généralement à l'intérieur de la matrice.



Fig. 45 : Montage verticale.

III.3.2. Principales matrices d'électrophorèse

La matrice d'une électrophorèse est le support physique sur lequel ou dans lequel l'échantillon sera déposé et ses molécules migreront. Il y a plusieurs types de matrices : Papier, Acétate de cellulose, Amidon, Agarose et polyacrylamide.

III.3.2.1. Agarose

L'agarose, un est un polysaccharide colloïde naturel extrait d'une algue, les gels d'agarose ont de grands "pores" et sont utilisés essentiellement pour séparer les grandes molécules d'une

masse moléculaire supérieure à 200 kDa. C'est la matrice très souvent utilisée pour l'électrophorèse des acides nucléiques. linéaire. Les immuno-électrophorèses sont aussi faites sur gel d'agarose. De plus en plus, on utilise cette matrice pour la séparation des protéines sériques

III.3.2.2. Polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide sont obtenus par polymérisation du monomère acrylamide en présence d'un autre monomère bifonctionnel et donc réticulant, le N,N'-méthylène bisacrylamide (ou un équivalent). La polymérisation est en général initiée par du persulfate d'ammonium en présence de l'accélérateur N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED). Le TEMED catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate. Les radicaux libres initient la polymérisation.

Généralement, le mélange acrylamide/bisacrylamide/solution est coulé entre deux plaques de verre et des intercalaires de faible épaisseur. La polymérisation est terminée en quelques minutes.

La porosité des gels obtenus dépend de la concentration totale en monomères et de la proportion d'agent monomère réticulant (le bisacrylamide).

III.3.3. Tampons

La séparation efficace par l'électrophorèse de gel d'agarose ou de polyacrylamide dépend de la maintenance efficace du pH dans la matrice. Les différentes catégories des systèmes disponibles de tampons pour l'électrophorèse sont : dénaturants et non-dénaturants, continus et discontinus.

III.3.3.1. Système tampon dénaturant et non-dénaturant

La séparation sur la base du poids moléculaire exige l'inclusion des agents dénaturants, qui déroulent les brins d'acides nucléiques et éliminent l'influence de la forme sur leur mobilité. Dénaturer exige la perturbation de ces liaisons d'hydrogène. Les systèmes tampons dénaturants les plus utilisés incluent l'urée et le formamide comme dénaturants d'ADN. Les systèmes tampons dénaturants pour les protéines incluent l'utilisation du sulfate dodécylque de sodium (SDS). SDS est un détergent anionique qui dénature des structures secondaires et tertiaires (mais pas de liaisons disulfures), et applique une charge négative pour chaque protéine en proportion de sa masse. Chauffer les échantillons à au moins 60 °C dénature les molécules en aidant le SDS à se lier. En conséquence, quand ces échantillons sont électrophorésés, les protéines se séparent selon la masse seulement, avec un très peu d'effet des différences compositionnelles. Les molécules d'ADN sont négativement chargées ; donc l'addition du SDS dans le gel est seulement dans le but d'augmenter la puissance de résolution des bandes.

III.3.3.2. Systèmes tampons continus et discontinus

Dans les systèmes tampons continus, l'identité et la concentration des composants du tampon sont les mêmes dans le gel et le réservoir. Bien que les systèmes tampons continus sont faciles à préparer et donnent une résolution adéquate pour certaines applications, les bandes tendent à être plus larges et par conséquent une résolution plus pauvre en ces gels. Ces systèmes sont employés pour la plupart des formes de l'électrophorèse de gel d'agarose d'ADN.

Les systèmes discontinus utilisent différents tampons pour le réservoir et le gel, et souvent deux différents tampons dans le gel. Les systèmes discontinus se concentrent les échantillons dans une zone très étroite avant la séparation, conduisant à l'amélioration de la résolution et la netteté de la bande. Le gel est divisé en gel de concentration (pH 6.8) en haut du pourcentage faible de l'acrylamide et le gel de séparation (pH 8.8) en bas avec un pourcentage d'acrylamide plus élevé.

Les gels de concentration et de séparation, contiennent seulement du chlorure comme anion mobile, alors que le tampon de réservoir contient la glycine en tant que son anion, à un pH de 8.8. L'avantage principal du système discontinu est ce que ce système de gel peut tolérer des échantillons de plus grand volumes.

III.3.3.3. Tampons de chargement

Le tampon de chargement contient du glycérol ou du saccharose qui rendent plus dense l'échantillon et lui permet donc de rester au fond du puits de chargement. Il contient aussi des colorants qui permettent de suivre la migration des échantillons à travers le gel comme le bleu de bromophénol.

III.3.4. Courant appliqué

La tension du courant est en fonction de la longueur des fragments et la concentration du gel. Plus elle est élevée, plus les échantillons migrent vite. Cependant, la haute tension cause une augmentation énorme de la température du tampon et du courant dans un temps très court. Par conséquent, il est recommandé de ne pas dépasser 5-8 V / cm et 75 mA pour les gels de taille standard ou 100 mA pour les minigels.

III.3.5. Coloration et visualisation

La façon la plus simple de visualiser des protéines est de les colorer. Avant de procéder à cette coloration, il faut fixer les protéines, en mettant le gel dans un acide dilué comme l'acide acétique ou l'acide trichloroacétique 1 à 10%.

Le colorant le plus couramment utilisé est le bleu de Coomassie. Il ya aussi rouge Ponceau, Amido-schwartz (noir) et vert de lissamine.

La décoloration se fait en transférant le gel dans une solution méthanolique acide. On obtient un gel transparent avec les bandes de protéines colorées.

L'agent d'intercalation le plus couramment utilisé pour rendre visible les bandes d'ADN à la lumière ultraviolet est le bromure d'ethidium. Le colorant peut être inclus à la fois dans le tampon et le gel.

III.4. Applications

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides. Elle permet dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques) de séparer des molécules non ioniques, comme des hormones stéroïdes par exemple.

- Séparation des protéines sériques sur acétate de cellulose
- Electrophorèse sur gel polyacrylamide SDS-PAGE

C'est une technique largement utilisée dans la biochimie, la médecine légale, de la génétique et de la biologie moléculaire pour séparer les protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique (en fonction de la longueur de chaîne polypeptidique ou le poids moléculaire). SDS-PAGE d'échantillons ayant une charge identique due à la liaison de la SDS conduisant à la migration par fractionnement par taille.

III.5. Électrofocalisation

L'électrofocalisation ou focalisation isoélectrique utilise avantageusement la charge que possède chaque protéine à un pH donné. Elle consiste en une migration, induite par un courant électrique, des protéines dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur pHi moment auquel elles cessent de migrer, puisque leur charge nette est nulle. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication. Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel.

Cette technique, qui sépare les polypeptides en fonction de leur charge plutôt que de leur masse, est très sensible : elle peut distinguer des protéines dont la différence de pHi est aussi faible que 0,01 unité de pH.

L'électrofocalisation bidimensionnelle est une méthode qui permet d'obtenir une courbe de titrage d'une protéine donnée (charge = fonction du pH). On prépare un gel dans lequel on établit le gradient de pH, puis on dépose dans une rigole centrale la solution de protéine, après quoi on tourne la plaque de 90° et on fait à nouveau passer un courant électrique (Fig.46).

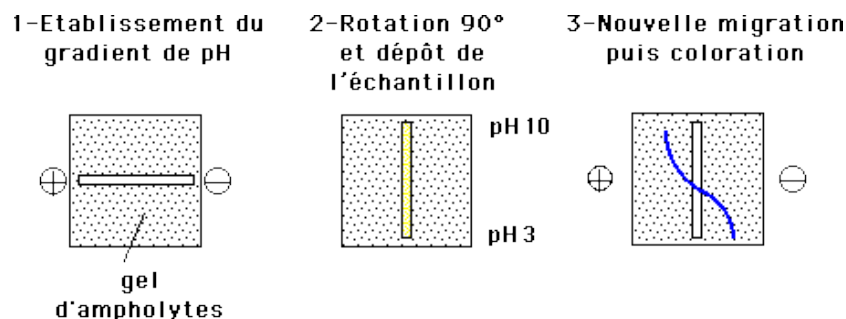


Fig. 46 : L'électrofocalisation bidimensionnelle

III.6. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est l'une des méthodes les plus puissantes et les plus communes pour la séparation de centaines à milliers de protéines extraites à partir des tissus, des cellules, etc. Le principe de la séparation des protéines dans l'électrophorèse bidimensionnelle est effectué en deux étapes principales : 1^{ère} dimension et 2^{ème} dimension. Dans la 1^{ère} dimension, les protéines sont résolues en fonction de leur point isoélectrique et séparées en bande étroite dans un gradient de pH dont on utilise la focalisation isoélectrique (Fig.47). Dans la 2^{ème} dimension, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par SDS- PAGE. Les deux séparations sont effectuées en gel de polyacrylamide. Les protéines sont plus efficacement séparées par électrophorèse bidimensionnelle plutôt que SDS-PAGE.

Une caractéristique remarquable d'électrophorèse bidimensionnelle est que la résolution obtenue au cours de la 1^{ère} séparation n'est pas perdue quand le gel est joint au gel SDS-PAGE dans la 2^{ème} électrophorèse.

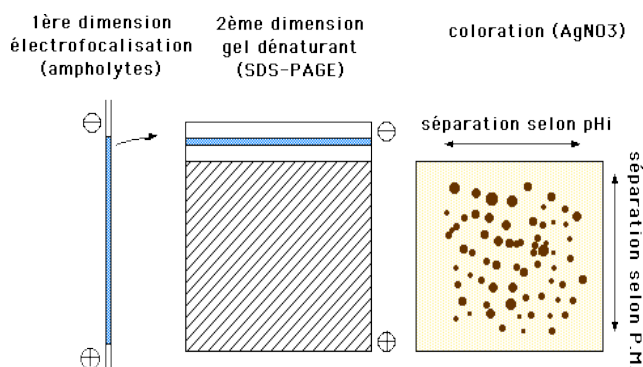


Fig. 47 : L'électrophorèse bidimensionnelle

III.7. Immunoélectrophorèse

Immunoélectrophorèse est un nom général pour un certain nombre de méthodes biochimiques de séparation et caractérisation de protéines basant sur l'électrophorèse et la réaction avec des anticorps. Toutes les variantes de l'immunoélectrophorèse exigent des immunoglobulines, également connus comme des anticorps réagissant avec les protéines à séparer ou à caractériser. Cette technique est utilisée pour la détection de petites quantités de protéines et l'étude de la pureté d'une protéine en permettant la confirmation de la présence d'un seul antigène.

Le gel d'agarose 1% d'environ 1 mm d'épaisseur tamponnée à un pH élevé (environ 8.6) est, traditionnellement préféré pour l'électrophorèse, ainsi que pour la réaction avec des anticorps. L'agarose a été choisi comme une matrice, car il a de larges pores permettant le passage libre et la séparation des protéines, mais aussi fournit un ancrage pour les protéines immunoprécipitées et des anticorps spécifiques. Le pH élevé a été choisi parce que les anticorps sont pratiquement immobiles à pH élevé.

Les immunoprécipités peuvent être vu dans le gel d'agarose humide, mais ils sont colorés avec des colorants des protéines comme bleu de Coomassie Brilliant dans le gel séché. A la différence de SDS-gel électrophorèse, l'électrophorèse en agarose permet des conditions natives, en préservant la structure native et les activités des protéines à investiguer, donc l'immunoélectrophorèse permet, en plus de la séparation électrophorétique, la caractérisation de l'activité enzymatique et la liaison du ligand etc.

Il existe en fait tout un ensemble de techniques qui utilisent des anticorps associés à des séparations électrophorétiques. On peut distinguer les techniques suivantes :

III.7.1. Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

Cette technique est utilisée pour la séparation et l'identification d'un mélange d'antigène (Ag). Le support utilisé est le gel d'agarose qui comporte deux types de puits : un puits ponctuel pour le dépôt de l'Ag (sérum à analyser) et un puits en forme de rigole pour le dépôt de l'anticorps (Ac). Dans un premier temps, l'électrophorèse est menée sur gel après le dépôt du sérum. Dans un deuxième temps l'Ac est déposé dans la rigole. Cet Ac pourra être spécifique d'une protéine recherchée ou être un mélange d'Ac. Ag et Ac se diffusent dans le gel. Lorsque l'Ag rencontre son Ac spécifique, le complexe Ac-Ag précipite (Fig.48). Le maximum de précipitation se produit lorsque le rapport Ag-Ac correspond à la zone d'équivalence. Lorsque la précipitation Ag-Ac est complètement finie, la plaque est lavée par une solution saline. La révélation se fait par le colorant approprié (bleu de Coomassie). L'identification s'effectue par comparaison à un sérum de contrôle

normale traité dans les mêmes conditions. Avec un antisérum total, on peut par exemple distinguer 30-40 protéines dans le sérum humain.

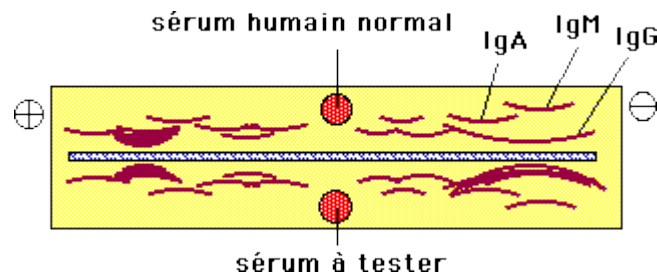


Fig. 48 : Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

III.7.2. Electro-immunodiffusion double (électrosynérèse)

Cette méthode dérive en fait de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony. Elle consiste à accélérer la diffusion par un champ électrique. Les conditions électrophorétiques sont choisies de façon à ce que les antigènes et les anticorps migrent en sens inverse (Fig. 49), ceci est possible car le pHi des Immunoglobulines est supérieur à celui de beaucoup de protéines.

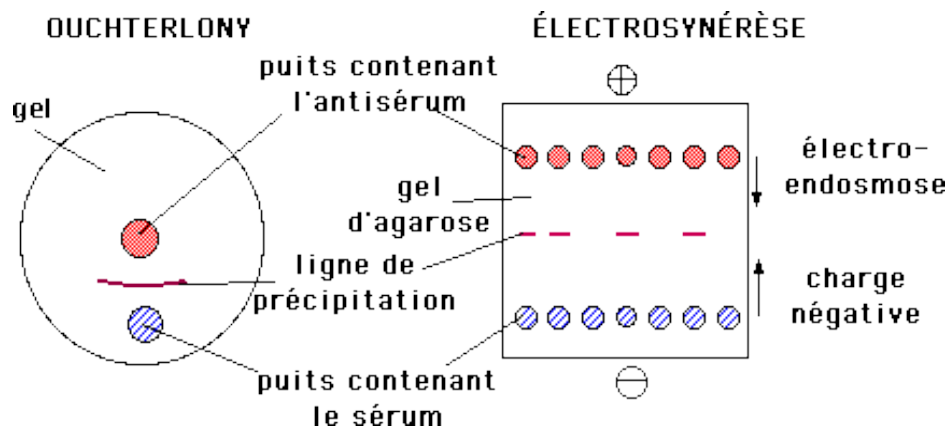


Fig. 49 : Electrosynérèse

III.7.3. Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell)

Il s'agit d'une méthode quantitative qui permet la détermination d'un antigène particulier présent dans un mélange. Les protéines sont déposées sur des gels contenant l'antisérum. On se place à pH où les Ig migrent peu. Les protéines se déplacent et rencontrent les anticorps qui forment alors des précipités en forme de fusée appelés "rockets" dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en protéine. On utilise une partie des puits pour faire un étalonnage (Fig.50).

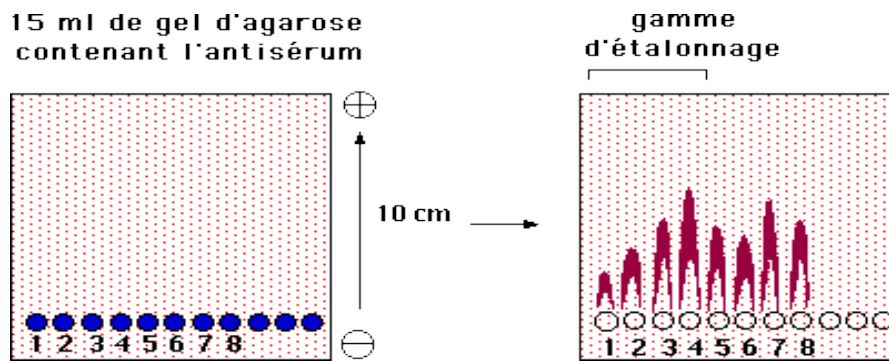


Fig. 50 : Electro-immunodiffusion monodimensionnelle

III.7.4. Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell)

On sépare les protéines dans une première dimension en gel d'agarose. On coule ensuite un gel contenant l'immunsérum polyspécifique, puis on réalise la seconde dimension (Fig .51).

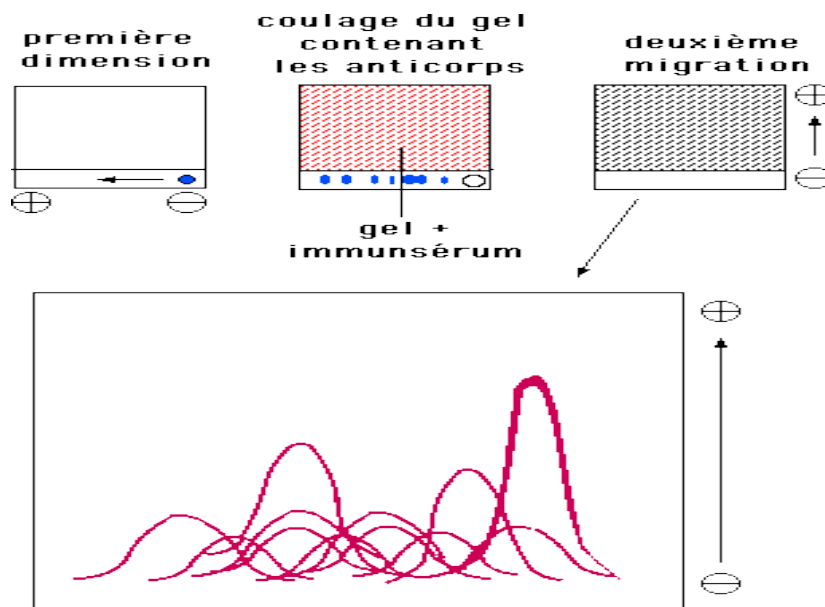
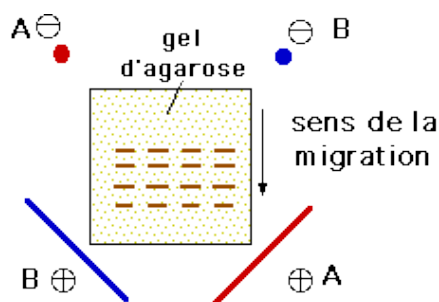


Fig. 51 : Electro-immunodiffusion bidimensionnelle

III.7.5. Electrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille. L'emploi de deux champs orthogonaux utilisés en alternance fait que les molécules d'ADN, qui mettent un certain temps à s'orienter dans le sens du champ électrique, ne migrent que lorsque celle-ci est réalisée (Fig.52). Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue.



Electrophorèse en champ pulsé :
on utilise en alternance les couples d'électrodes A ou B

Fig. 52 : Electrophorèse en champs pulsés

III.7.6. Electrophorèse capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la **rapidité**, de la très grande **résolution** et, partant, de la très grande **sensibilité** de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50 μm et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 -30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption UV, fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible (Fig.53). Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (on injecte seulement quelques nanolitres de l'échantillon).

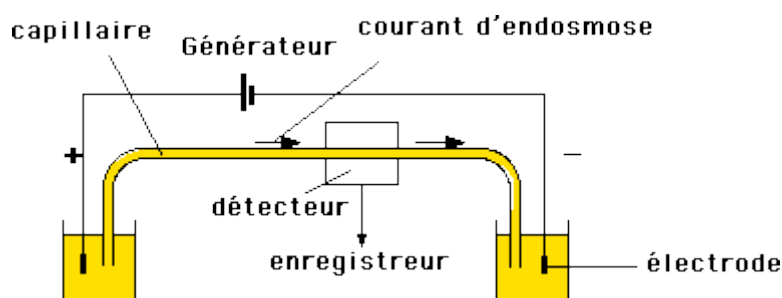


Fig. 53 : Electrophorèse capillaire

Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides,... le nombre de plateaux est de l'ordre de 500000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable (on peut séparer des peptides différant d'un acide aminé, des mélanges complexes d'oligonucléotides, des fragments tryptiques de peptides ; la méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse,...). La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.



BIBLIOGRAPHIE



Références bibliographiques

- Audigié D., Dupont G., Zonszain F. (1995). Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome 1. Ed Doin; Paris, Pp: 4-81.
- Audigié D., Dupont G., Zonszain F. (1983). Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome 2. Ed Doin; Paris, Pp: 1-41.
- Babailov S.P. (2008). Lanthanide paramagnetic probes for NMR spectroscopic studies of molecular conformational dynamics in solution: Applications to macrocyclic molecules. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectr.* 52, 1-21.
- Braithwaite A. and Smith F.J. (1999). Chromatographic Methods. Fifth Edition. Kluwer Academic Publishers. London. Pp: 887.
- Bria M. and Watkin P. (1997). La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions ou l'aide à la détermination structurale des molécules organiques, *Act. Chim.*, 2, 24-35.
- Bottrill M., Kwok L. and Long N.J. (2006). Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chem. Soc. Rev.* 35(6), 557.
- Boyer R.F. (1986). Modern experimental biochemistry, Addison-Wesley Publishing Co, Reading (Mass., USA), Pp.29-38.
- Cohen Y. (1981). Abrégé de chimie analytique. TOME 1. Chimie des solutions. Ed Masson, Paris, Pp: 1-68.
- Constans A. (2004). Building a Better Buffer. *The Scientist*, 18(5):39.
- Cserhati T. (2008). Multivariate Methods in Chromatography: A Practical Guide. Edition by John Wiley and Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, England.
- Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H. and Jones K.M. (1986). Data for biochemical research, Clarendon Press, Oxford, Pp: 417-48.
- Kamoun P. (1991). Appareils et Méthodes en biochimie. Ed Flammarion, Paris. Pp: 33-117.
- Kazakevich Y. and Lobrutto R. (2007). HPLC Pharmaceutical Scientists. John Wiley and Sons, Canada.
- Koehler J. and Meiler J. (2011). Expanding the utility of NMR restraints with paramagnetic compounds: Background and practical aspects. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectr.* 59, 360-389.
- Mendham J., Denny R.C., Barnes J.D. and Thomas M. (2008). Analyse chimique quantitative de Vogel. Ed De boek. Paris, Pp: 30-338.
- Moldoveanu S.C. and David V. (2002). Sample preparation in Chromatography. Edition by Elsevier Science. Pp: 102-105.
- Plummer DT. (1987). An Introduction to Practical Biochemistry (third édition.). Ed McGraw-Hill, London. Pp: 35-51.

Rouessac F. and Rouessac A. (2004). Analyse chimique: Méthode et techniques instrumentales modernes. Ed Dunod, Paris, Pp: 1-309.

Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J. and Kowalska T. (2008). Thin layer Chromatography in phytochemistry. Edition by Taylor and Francis Group.