

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



UNIVERSITE 8 Mai 1945 de GUELMA
FACULTE SNV STU
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Polycopié de cours pour le master Biologie Moléculaire et Cellulaire

Techniques D'analyses Biochimiques

Préparé par : Dr : HAMDIKEN Malika

Année : 2021

Table des matières

Introduction	
Chapitre I : Généralités	
I. Technologie des équipement et Techniques d'analyses	01
I.1. Introduction	01
I.2. Performances et critères de choix d'une méthode d'analyse	01
I.2.1. Fidélité	01
I.2.2. Justesse	02
I.2.3. Exactitude	02
I.2.3. Reproductibilité	02
I.2.4. Sensibilité	02
I.2.5. Robustesse	03
I.2.6. Spécificité	03
I.3. Classification des techniques d'analyses	04
I.4. Validation d'une méthode d'analyse	05
I.5. Equipement de laboratoire	04
II. Vue d'ensemble des techniques et équipements des laboratoires	05
II.1. Balance	05
II.1.1. Types de balance	05
II.2. Centrifugeuse	05
II.3. Appareils à vide	06
II.4. Microscope optique	06
II.4.1. Types de microscopes	06
II.4.1.1. Microscope en lumière directe	06
II.4.1.2. Microscope en contraste de phase	07
II.4.1.3. Microscope à fluorescence	07
II.5. Polarimètre	07

II.6. Spectrophotomètre	08
II.7. pH mètre	08
Chapitre II : Techniques d'extraction	
I. Introduction	09
II. Extraction liquide – liquide et solide – liquide	09
II.1. Extraction liquide – liquide	09
II.1.1. Solvants d'extraction	10
II.1.1.1. Propriétés des solvants d'extraction	10
II.1.1.2. Quelques solvants d'extraction	10
II.1.2. Extraction liquide - liquide discontinue	11
II.1.3. L'extraction liquide - liquide continue	12
II.2. L'extraction solide - liquide	12
II.2.1. Méthodes d'extraction continue	13
II.2.1.1. Montages	13
II.3. Récupération du soluté	14
II.3.1. Lavage de la phase organique	14
II.3.2. Séchage de la phase organique	14
II.3.3. Evaporation du solvant d'extraction	15
III. Distillation	15
III.1. Principe	15
III.2. Techniques pratiques de la distillation	16
III.2.1. Distillation simple	16
III.2.1.1. Applications	18
III.2.2. Rectification	18
III.2.3. Distillation sous pression réduite	19
III.2.2.1. Principe et conséquences	19
III.2.4. Hydrodistillation et entraînement à la vapeur	20
III.2.4.1. Hydrodistillation	20
III.2.4.2. Entraînement à la vapeur	21
III.3. Description d'une opération de distillation	23
I. Filtration et ultrafiltration	25
I.1. Filtration	25

I.1.1. Différents types de filtres	25
I.1.1.1. Les filtres en profondeur	25
I.1.1.2. Filtres « écrans »	26
I.1.2. Procédés de filtration	27
I.1.2.1. Filtration par gravité	27
I.1.2.2. Filtration sous vide	27
I.1.2.3. Filtration sous pression	28
I.2. Ultrafiltration	28
I.2.1. Utilisation	30
II. Centrifugation et ultracentrifugation	31
II.1. Centrifugation	31
II.1.1. Base théorique	31
II.1.2. Appareillage	33
II.1.2.1. Rotors	33
II.1.3. Type de centrifugeuses	34
II.1.4. Types de centrifugation	35
II.1.4.1. Centrifugation différentielle	35
II.1.4.2. Centrifugation en gradient de densité	35
III. chromatographie	37
III.1. Définition	37
III.2. Nature des phases	38
III.2.1. Phase stationnaire "fixe"	38
III.2.2. Phase mobile	38
III.3. Classification des techniques chromatographiques	38
III.3.1. Classification selon la nature des phases	38
III.3.2. Classification selon le mécanisme de séparation	39
III.3.2.1. Chromatographie d'adsorption	39
III.3.2.2. Chromatographie de partage	39
III.3.2.3. Chromatographie ionique	40
III.3.2.4. Chromatographie d'exclusion	40
III.3.2.5. Chromatographie d'affinité	40
III.3.3. Classification selon les procédés utilisés	40

III.4. Chromatographie planaire	41
III.4.1. Chromatographie sur papier (CP)	41
III.4.1.1. Principe	41
III.4.1.2. Chromatographie bidimensionnelle	42
III.4.1.3. Applications	43
III.4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	43
III.4.2.1. Principe	44
III.4.2.2. Matériel	45
III.4.2.3. Conduite de la chromatographie (les étapes de séparation)	46
III.4.2.4. Techniques de révélation (visualisation des substances séparées)	47
III.4.2.5. Analyse qualitative	48
III.4.2.6. Analyse quantitative	48
III.4.2.7. Applications	49
III.5. Chromatographie sur colonne	49
III.5.1. Chromatographie d'exclusion	49
III.5.1.1. Principe	49
III.5.1.2. Types de gels	50
III.5.1.4. Détermination de la masse molaire d'une molécule	51
III.5.1.5. Applications	53
III.5.2. Chromatographie d'échange d'ions	53
III.5.2.1. Principe	53
III.5.2.2. Différents types d'échangeurs d'ions	54
III.5.2.3. Applications	56
III.5.3. La chromatographie d'affinité	57
III.5.3.1. Principe	57
III.5.3.2. Support	58
III.5.3.3. Mode opératoire	58
III.5.3.4. Applications	60
III.5.4. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	60
III.5.4.1. Principe	60
III.5.4.2. Appareillage	61
III.5.4.3. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne	66

III.5.4.4. Optimisation d'une méthode HPLC	69
III.5.4.5. Validation d'une méthode HPLC	70
III.5.4.6. Chromatogramme	70
III.5.5. La chromatographie sur colonne en phase gazeuse (CPG)	71
III.5.5.1. Principe d'une installation de CPG	71
III.5.5.2. Description d'un chromatographe	72
III.5.5.2.1. Gaz	73
III.5.5.2.2. Injecteur	74
III.5.5.2.3. Colonne	74
III.5.5.2.4. Le four	75
III.5.5.2.5. Détecteur	76
III.5.5.3. Analyse qualitative en CPG	77
III.5.5.4. Analyse quantitative en CPG	77
III.5.5.5 Applications	77
IV. Electrophorèse	78
IV.1. Principe	78
IV.2. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique	79
IV.2.1. Echantillon	79
IV.2.2. Tampon	79
IV.2.3. La température	79
IV.2.4. La force ionique du tampon	80
IV.2.5. Support	80
IV.2.5.1. Adsorption	80
IV.2.5.2. L'électroosmose	80
IV.2.5.3 Tamisage moléculaire	81
IV.2.6. Champ électrique	81
IV.2.7. Durée	82
IV.3. Appareillage	82
IV.3.1. Montage horizontal	83
IV.3.2. Montage vertical	83
IV.4. Principales matrices d'électrophorèse	83
IV.4.1. Papier	83

IV.4.2. Acétate de cellulose	84
IV.4.3. Agarose	84
IV.4.4. Amidon	84
IV.4.5. Polyacrylamide	85
IV.5. Types d'électrophorèse	85
IV.5.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes	85
IV.5.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes	85
IV.5.2.1. L'électrophorèse libre, en veine liquide	86
IV.5.2.2. Electrophorèse de zone	87
IV.5.3. Autres types d'électrophorèse	97
IV.5.3.1. Isoélectrofocalisation	97
IV.5.3.2. Electrophorèse bidimensionnelle	98
IV.5.3.3. Electrophorèse capillaire (EC)	99
IV.5.3.4. Electrophorèse en champ pulsé	102
IV.5.3.5. Immunoélectrophorèse	103

Introduction

L'extraction et la séparation des molécules biologiques et/ou macromolécules constituent une étape essentielle pour entreprendre une étude ou pour effectuer un dosage. Les techniques d'analyse utilisées en biochimie et en biologie, basées sur le comportement des macromolécules en solution, sont très diversifiées. A côté de l'électrophorèse et de la chromatographie qui figurent parmi les méthodes les plus répandues, d'autres techniques d'analyses méritent d'être présentées. Ainsi les méthodes de séparation en phase aqueuse et d'ultrafiltration, par exemple, constituent d'autres stratégies pour la mise en œuvre d'un protocole de séparation, voire de purification. Si la description des techniques les plus diverses laisse bien évidemment un choix plus étoffé, elle permet néanmoins d'accroître les chances de mener à bien une telle tâche.

Connaître le principe de ces techniques et savoir les utiliser à bon escient, présente, pour l'étudiant mais aussi pour le chercheur, un réel atout. Ce document a été écrit dans ce but. Outre la part importante consacrée aux méthodes d'analyse, ce support des cours aborde aussi

certaines techniques analytiques. Certaines d'entre elles, relativement récentes, peuvent susciter un grand intérêt et constituer même une alternative à un protocole d'analyse déjà établi.

Ce document s'adresse tout particulièrement aux étudiants de master 1 spécialisés en biologie moléculaire et cellulaire en vue de se familiariser avec les techniques de séparation ou d'analyse. Les méthodes traitées dans ce support sont classées en méthodes d'extractions et méthodes spectrales et autres méthodes. Chacune d'elles fait l'objet d'une étude qui s'appuie sur les idées de base pour se prolonger par les principales techniques instrumentales correspondantes. L'ensemble est illustré par des figures ou des schémas permettant de présenter rapidement le principe d'une technique ou le résultat obtenu afin de garantir au texte toute sa clarté.

CHAPITRE I

GENERALITES

I. Technologie des équipement et Techniques d'analyses

I.1. Introduction

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique.

On a pour habitude de regrouper ces opérations élémentaires en quelques étapes principales, s'insèrent dans une procédure analytique c'est la méthode d'analyse.

La détection d'une biomolécule (protéine, acide aminé, sucre, acide nucléique, acide gras, vitamine, enzyme, hormone, lipide...) ainsi que l'évaluation de sa concentration ou de sa quantité peuvent être faites à l'aide de plusieurs méthodes d'analyses telles que les méthodes spectrale, électrophorétiques, chromatographiques...ect.

En fait, le choix d'une méthode de traitement de l'échantillon constitue une de plus grandes préoccupations scientifiques dans le domaine analytique.

I.2. Performances et critères de choix d'une méthode d'analyse

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques, critères qui qualifient les performances de la méthode, le premier objectif étant toujours d'obtenir une information pertinente au moindre coût. On voit ainsi que le choix d'une méthode d'analyse constitue en tant que tel un problème analytique qu'il va falloir résoudre en empruntant la démarche de l'analyticien, ce qui veut dire bien poser le problème au départ et le traduire en termes d'analyse(s) qu'il faudra réaliser.

Les méthodes doivent être choisies sur la base de leurs performances compte tenu des spécifications convenues. Les principales spécifications techniques sont les suivantes :

I.2.1. Fidélité

Représente l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants effectués sur différentes prises d'essais d'un même échantillon homogène. De façon plus précise, la répétabilité – qui est un terme équivalent – représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus avec la même méthode, sur un même

échantillon homogène, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même matériel et dans un court intervalle de temps.

I.2.2. Justesse

Représente l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur conventionnellement vraie de l'échantillon (la valeur de référence acceptée).

I.2.3.Exactitude

Qui va concerner un résultat seul et représente l'accord entre le résultat d'un mesurage et la valeur vraie du mesurande. Cette notion est la combinaison d'une erreur systématique, liée à la justesse de la méthode, et d'une composante aléatoire, liée à la mesure elle-même et qui dépend donc de la fidélité de la méthode.

I.2.3.Reproductibilité

Qui, à la différence de la répétabilité, considère les résultats obtenus avec une même méthode et sur un même échantillon homogène, mais dans des laboratoires différents et par différents opérateurs utilisant différents équipements. Des études collaboratives « encore appelées analyses inter-laboratoires ou circuits d'analyses » permettent d'évaluer cette reproductibilité. On donnera aussi parfois un sens restreint à cette notion de reproductibilité, en considérant par exemple, dans un même laboratoire, différents opérateurs utilisant le même matériel ... ou un même opérateur qui exécute la même analyse mais à des dates très éloignées les unes des autres, etc.

I.2.4.Sensibilité

Elle est exprimée par une concentration, cette qualité est surtout importante dans la détermination de composés habituellement présents en très faible quantité, comme les enzymes et surtout les oligo-éléments ou les hormones.

Elle représente la pente de la droite d'étalonnage ; si la courbe d'étalonnage n'est pas une droite, la sensibilité à une concentration donnée sera définie comme la pente de la tangente à la courbe à cette concentration. Il est clair que plus la sensibilité sera élevée plus il sera facile de distinguer 2 échantillons de concentration voisine. Il apparaît également qu'une augmentation de la sensibilité permettra d'obtenir des limites de détection ou de quantification plus basses.

I.2.5. Robustesse

La robustesse de la méthode caractérise le fait qu'une légère modification des conditions expérimentales (un ou plusieurs paramètres) ne modifie que très peu la réponse mesurée. Cette propriété est bien sûr très intéressante si plusieurs opérateurs doivent intervenir pour réaliser une même série d'analyses ou si l'on ne dispose que d'opérateurs peu expérimentés.

I.2.6. Spécificité

Elle mérite une mention toute particulière, car elle enseigne sur le fait que la réponse mesurée n'est pas perturbée par des espèces physicochimiques autres que l'analyte considéré. L'application d'une méthode d'analyse spécifique n'exigera donc pas de prendre des précautions particulières si la matrice de départ et par suite le milieu de mesure ont été modifiés. Si la méthode de mesure est-elle même spécifique, il en résultera que l'étape préalable de traitement de l'échantillon sera très allégée avec, en conséquence, un gain de temps considérable et une forte diminution des causes d'erreurs.

- ✚ Il est bien évident que rechercher l'exactitude du résultat aura un certain coût : Pouvoir disposer d'une méthode juste demandera un investissement non négligeable pour l'étudier, en vue de sa validation... ou alors on fera appel, si elle existe, à une méthode de référence qui ne sera pas forcément la mieux adaptée à l'environnement du laboratoire, si l'on doit en particulier effectuer de grandes séries d'analyses. Mais la justesse ne sera pas forcément une nécessité, si l'on peut se contenter de valeurs relatives destinées à être comparées entre elles dans le cadre d'une étude particulière menée au sein du laboratoire.
- ✚ De même, la répétabilité a un prix, qui se traduit le plus souvent dans l'achat de matériel de précision et d'instruments de mesure plus sophistiqués. Or cette recherche de la précision n'a souvent pour but que d'obtenir une variance attachée à la répétition des analyses telle que les effets qu'on veut mettre en évidence ne soient pas masqués.
- ✚ Or la rapidité de la méthode et son aptitude à l'automatisation représentent aussi 2 critères essentiels pour pouvoir diminuer si besoin le délai de réponse et, dans tous les cas, augmenter la cadence des analyses, ce qui implique une diminution de leur coût.

I.3. Classification des techniques d'analyses

Les méthodes d'analyses biologiques peuvent être classées selon trois modalités :

- ✚ Selon le type de méthodes qualitatives ou quantitatives, l'analyse quantitative permet de déterminer la concentration des différents composés recherchés. Elle est en cela complémentaire de l'analyse qualitative ou l'on cherche uniquement à déterminer si tel ou tel composé est ou non présent.
- ✚ Selon l'automatisme en analyse manuelle ou automatique, l'analyse automatique est beaucoup utilisée dans les laboratoires qui reçoivent de nombreux échantillons de même type.
- ✚ Selon la quantité d'échantillon utilisée en macro ou microanalyse, selon la technique utilisée, cette quantité peut-être de l'ordre de quelques grammes ou des fractions de milligramme. Des techniques de microanalyse ont surtout été développées en analyse qualitative (réactions sur des gouttes de solution).

I.4. Validation d'une méthode d'analyse

Cette validation constitue un outil indispensable pour vérifier périodiquement les performances des réactifs fournis par les fabricants ou développés par le laboratoire. La validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique et d'en préciser les limites de validité. Les performances analytiques des méthodes sont évaluées sur plusieurs critères universellement reconnus. Les protocoles d'évaluation de ces critères sont standardisés en varient peu selon les pays. La standardisation permet de simplifier et d'optimiser le travail d'évaluation, d'uniformiser la présentation des données et de permettre un jugement comparatif des résultats obtenus par des laboratoires différents.

I.5. Equipement de laboratoire

L'équipement de laboratoire est classé en équipement consommable représenté essentiellement par la verrerie, à savoir béchers, éprouvettes, fioles, pipettes, pissettes, etc., et non consommable représenté par les appareils de mesure (analyses quantitatives : balances, centrifugeuse, polarimètre, pHmètre, colorimètre, photomètre, etc et analyse qualitative : telle

que la chromatographie et l'électrophorèse). Ces appareils doivent faire l'objet d'une manière systématique d'entretien (vérification), d'étalonnage (calibrage) et de maintenance.

La maintenance consiste essentiellement à entreprendre des actions de réparation pour la remise en état de fonctionnement d'un équipement (en marche ou à l'arrêt) suite à des pannes d'origine diverses (électrique, accidentelle, etc.). Ces actions sont de deux sortes : les réparations suite à des pannes et les réparations suite aux vérifications effectuées par l'utilisateur (laborantin, étudiant, etc.). Cependant, une maintenance préventive existe, dépend principalement de l'emploi correct et surtout soigneux suite à une connaissance parfaite du principe de fonctionnement de l'appareil.

II. Vue d'ensemble des techniques et équipements des laboratoires

II.1. Balance

Est l'un des éléments du matériel de laboratoire le plus utilisés, la plupart des balances sont conçues pour être simples à utiliser. Cependant, un pesage précis est essentiel pour parvenir à des résultats expérimentaux précis, de ce fait il est important d'apprendre à utiliser et à étalonner une balance de laboratoire correctement.

La balance calcule la masse de l'objet à soumettre à l'analyse (quantité de la matière), exprimée en mg, g ou kg. Aussi, la balance.

II.1.1. Types de balance

Les balances couramment utilisées dans les laboratoires sont de deux types : mécanique et électronique. Le premier type regroupe plusieurs modèles : à ressort, à curseur, d'analyse (balances à deux plateaux) et tout le reste. Le second, regroupe une myriade de variétés, qui sont disponibles aujourd'hui, elles sont plus sensibles, plus précises, plus faciles et plus pratiques.

II.2. Centrifugeuse

La centrifugeuse est un équipement destiné pour des activités de laboratoire afin de : séparer deux (ou plus) phases liquides de différentes densités ; defractionner une phase solide en suspension dans une phase liquide par sédimentation (la partie située dans le fond du tube est appelée culot et la partie supérieure est appelée surnageant).

Il existe une grande variété de modèles dans diverses tailles avec une classe d'appareils en fonction des besoins expérimentaux allant du centrifugeur à des vitesses relativement basses, moyennes, haute vitesse, et à l'ultra vitesse. Ceux avec une vitesse relativement faible sont utiles pour la séparation rapide d'une protéine. Ceux à haute vitesse sont principalement utilisés pour la séparation de cellules entières, des débris cellulaires, ou des organites plus grands

tels que les noyaux, les mitochondries, etc., ceux à ultra vitesse, vitesse très élevée, sont utilisés dans la séparation de petits organites.

II.3. Appareils à vide

La filtration consiste à séparer les particules solides se trouvant dans un liquide. Il existe deux modes de filtration. La filtration simple sous pression atmosphérique (par gravité : pour cela, nous utilisons un entonnoir de forme conique ; un filtre généralement en papier, conique ou plissé, qui doivent être sans cendre et qui sont classés par porosité (les filtres dits lents avec une porosité très fine et les filtres dits rapides avec une porosité plus grande) ; une fiole erlenmeyer afin de recueillir le liquide. Le second mode est la filtration sous vide (par aspiration sous pression réduite), pour cela nous utilisons : des entonnoirs de forme spéciale ; aussi des filtres et des fioles spéciales ; et comme particularité, nous utilisons un système d'aspiration souvent plus rapide et plus efficace.

II.4. Microscope optique

Un équipement de laboratoire destiné pour l'examen d'une structure, à l'échelle petit, elle peut être ainsi observée à l'œil nu, photographiée ou enregistrée sur un ordinateur. Le principe du microscope optique est basé sur les types d'interaction entre les lentilles, la structure (objet) à observer et la lumière. Cette dernière peut être : absorbée, déphasée ou émise, d'où nous avons trois types de microscopes optiques : à lumière directe, à contraste de phase et à fluorescence.

II.4.1. Types de microscopes

II.4.1.1. Microscope en lumière directe

Microscope d'usage simple. La lumière blanche issue d'une lampe est concentrée sur la structure à observer et la traverse, soit à l'état naturel (plus ou moins colorée), soit après coloration qui peut être : simple par utilisation de colorants acides (éosine, acide picrique ;

colorent uniformément la cellule) ; on différencie par utilisation des colorants basiques (fuchsine, violet de gentiane ; ayant une affinité pour un composant). La structure non colorée reste relativement claire. Tandis que, celle colorée (contrastée) apparaîtra plus ou moins sombre à cause de la lumière qui est plus ou moins absorbée. Il faut noter qu'en microscopie, cette structure constitue la catégorie des objets d'amplitude (des objets colorés qui absorbent la lumière et ainsi changent sa distance maximale parcourue) facilement observable en fond clair.

II.4.1.2. Microscope en contraste de phase

Microscope d'usage spécial pour la catégorie d'objet de phase (objets transparents qui font diffraction de la lumière) difficilement observable en fond clair (un défaut de ce type de microscope, mais qui est mis à profit pour ou créer des contrastes). La structure qui est plus transparente, constitue cette catégorie, elle dévie la lumière et a pour résultat un déphasage (un retard ou un freinage) entre les rayons.

Le principe de microscope en contraste de phase est donc : « décompenser le déphasage produit par la structure par l'action d'une plaque de phase qui va ramener l'état à celui qui serait donné par un objet d'amplitude et transpose ainsi les contrastes de phases en contrastes d'amplitudes, ainsi l'objet transparent devient contrasté sans l'action de colorant ». Ce microscope permet d'observer la structure vivante.

II.4.1.3. Microscope à fluorescence

Ce type de microscope utilise la lumière blanche, issue d'une lampe, filtrée de manière à ne laisser passer que l'ultraviolet à courte longueur d'onde sur la structure à observer, qui va l'absorber en émettant des radiations de longueur d'onde plus grande dite de fluorescence.

La lumière a traversé la structure, va être renouvellement filtrée de manière à isoler ce qui reste de la lumière excitatrice et ne laisser passer que les radiations de fluorescence.

II.5. Polarimètre

Instrument de rotation optique mesure une propriété de certaines molécules biologiques appelées chiralité qui est définie simplement par la direction gauche ou droite et scientifiquement elle désigne la capacité du produit à exister sous une ou deux formes miroir ou énantiomères.

Chaque énantiomère fait tourner la lumière polarisée dans une direction opposée. Vers la droite, la molécule est appelée dextrogyre (D) ou énantiomère (+). Vers la gauche, la molécule est appelée lévogyre (L) ou énantiomère (-). Donc, le principe du polarimètre est basé sur le changement de direction ou la rotation du plan de la lumière polarisée qui se produit lorsque cette lumière traverse une substance optiquement active dite énantiomère.

II.6. Spectrophotomètre

Équipement que l'on trouve probablement dans tous les laboratoires de Biologie (Biochimie et Microbiologie) et de Chimie. C'est un instrument utilisé afin d'identifier et déterminer la concentration des molécules biologiques, aussi utilisé afin de suivre la cinétique de croissance bactérienne ou celle d'une réaction enzymatique. Il consiste à mesurer la densité optique d'une molécule dans un échantillon biologique.

II.7. pH-mètre

Un pH-mètre, comme son nom l'indique, est un instrument qui mesure la concentration en ions hydrogène d'une solution en mesurant la capacité d'un courant électrique de passer à travers cette solution.

Un pH-mètre de paillasse se compose de deux parties : l'électrode et le boîtier électronique : Un bras porte-électrodes et sonde de température ; Une électrode de pH dite électrode combinée qui mesure l'électricité passée à travers la solution. Elle se compose d'un élément de mesure (électrode de verre ou de mesure) et un élément de référence (électrode de référence)

CHAPITRE II

TECHNIQUES D'EXTRACTION

I. Introduction

L'extraction est une méthode de purification repose principalement sur l'utilisation d'un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ces propriétés chimiques et/ou physiques. Elle consiste à transférer un composé d'une phase à une autre :

- ✚ D'une phase liquide à une autre phase liquide.
- ✚ D'une phase solide à une phase liquide.

Suivant la manière et le moyen utilisé, différentes techniques d'extraction sont disponibles.

II. Extraction liquide – liquide et solide – liquide

II.1. Extraction liquide – liquide

Elle est basée sur la différence de solubilité d'un soluté dans deux phases non miscibles, c'est un transfert de matière d'une phase où il est difficilement isolable à une autre phase où la séparation est facilitée.

Le système comprend une phase d'alimentation contenant initialement le soluté et une phase d'extraction (liquide) destinée à recevoir le soluté. La phase à extraire est une solution aqueuse, la phase d'extraction est constituée par un solvant organique à bas point d'ébullition.

Une extraction liquide-liquide est la succession de plusieurs étapes élémentaires. La première étape est la mise en contact des deux phases. Pour augmenter la surface d'échange, la phase à extraire et la phase d'extraction sont mélangées. La seconde étape consiste à obtenir l'équilibre du système (saturation de la phase d'extraction) qui est régi par les lois de la diffusion et de la solubilité (coefficient de partage). La dernière étape est la séparation des phases (décantation).

II.1.1. Solvants d'extraction

II.1.1.1. Propriétés des solvants d'extraction

Les solvants d'extraction doivent :

- ✚ Dissoudre le mieux possible le produit à extraire.
- ✚ Être facilement éliminés après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas.
- ✚ Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire, pour éviter les problèmes de séparation.
- ✚ Être inertes chimiquement vis-à-vis de la solution à extraire.
- ✚ Être aussi peu toxiques que possible.
- ✚ Ils ne doivent pas être miscibles au solvant à extraire. Ils ne doivent pas former une seule phase.

II.1.1.2. Quelques solvants d'extraction

Le tableau II.1 regroupe les avantages et les inconvénients des solvants les plus usuels lors des extractions.

Tableau II.1 : Avantages et inconvénients de quelques solvants usuels pour les extractions

Solvants	T _{éb.} en °C	densité	Avantages	Inconvénients
Cyclohexane	81	0,78	Peu toxique	Facilement inflammable
Dichloro-1,2-éthane	83	1,26	Peu inflammable	Modérément toxique, vapeurs irritantes
Dichlorométhane	40	1,34	Facile à éliminer	Forme des émulsions, nocif
Éther éthylique	35	0,71	Facile à éliminer	Très inflammable
Hexane	69	0,66	Facile à éliminer	Très inflammable
Pentane	36	0,63	Facile à éliminer	Très inflammable
Toluène	111	0,87	Peu toxique	Inflammable
Trichloroéthylène	87	1,46	Ininflammable	Modérément toxique

II.1.2. Extraction liquide - liquide discontinue

Il existe plusieurs modèles d'ampoules à décanter (Figure II.1). Celles ayant la tubulure au-dessus du robinet sont les plus utiles, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc de mieux séparer.

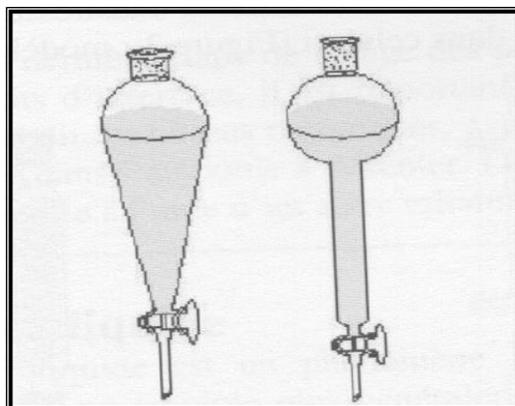


Figure II.1 : Divers modèles d'ampoules à décanter

L'extraction est schématisée comme suit (Figure II.2) :

- ✚ La solution aqueuse contient un mélange de molécules représentées par des croix,
- ✚ Le solvant d'extraction (zone ombragée) est ajouté et agité vigoureusement avec la solution aqueuse,
- ✚ Les phases sont séparées, la phase la plus dense coule en premier, puis la moins dense.

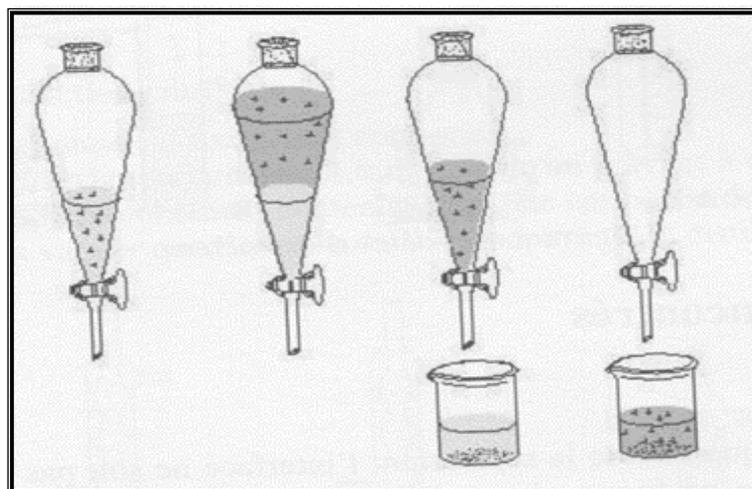


Figure II.2 : Processus d'extraction liquide-liquide discontinu

II.1.3. L'extraction liquide - liquide continue

Lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire. Il existe deux modèles selon la densité du solvant qui circule de façon à recueillir le produit à extraire dans celui-ci (Figure II.3).

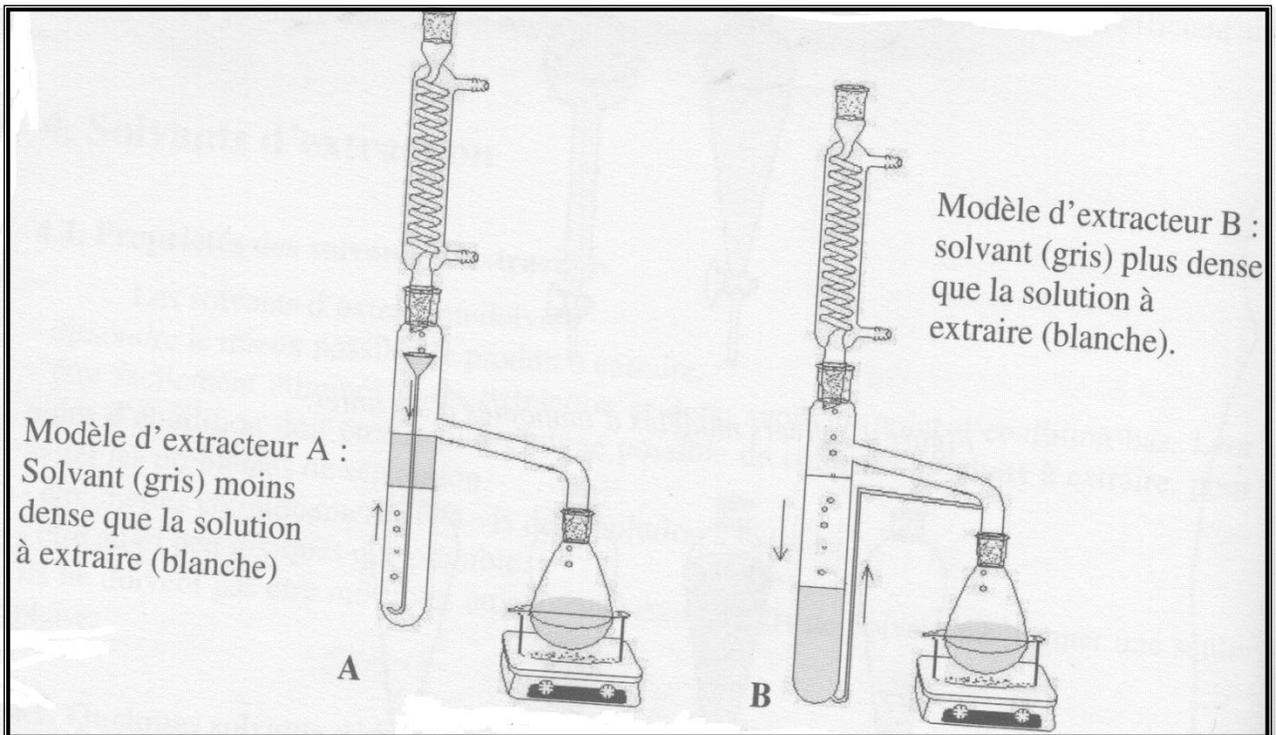


Figure II.3 : Modèles d'extracteur.

II.2. L'extraction solide - liquide

L'extraction solide - liquide est un phénomène lent et bien que l'extraction discontinue existe (macération), on emploie plus généralement des procédés d'extraction continus. La pulvérisation du solide permet d'augmenter la surface d'échange et par conséquent la vitesse de transfert.

II.2.1. Méthodes d'extraction continue

Il y a deux techniques d'extraction continue :

- ✚ La percolation ou lixiviation consiste à faire passer un solvant à travers une couche de substance pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier épais.
- ✚ L'entraînement à la vapeur que l'on voit dans le chapitre de la distillation.

II.2.1.1. Montages

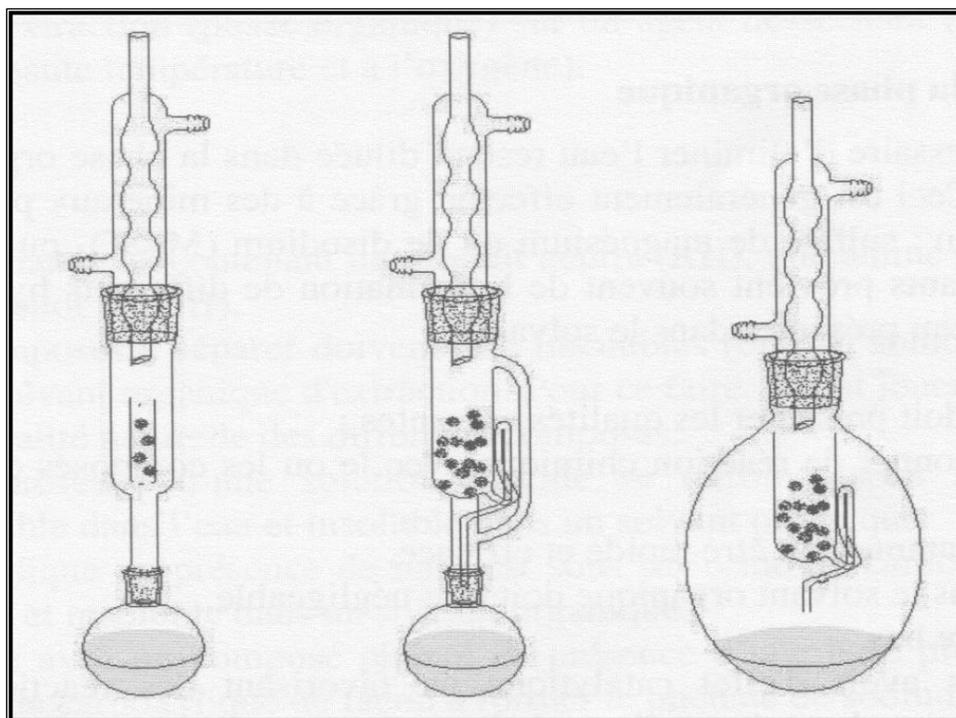


Figure II.4 : Montage A

Montage B

Montage C

Montage A : montage simple d'extraction solide_liquide

Montage B : extracteur de Soxhlet, le soluté est mis à l'intérieur avec du papier poreux. Il faut que le composé résiste à la chaleur, car le montage est souvent porté au reflux.

Montage C : Extracteur de Kumagawa

II.3. Récupération du soluté

Deux étapes sont essentielles pour la récupération du soluté : en premier lieu, il faut laver la phase organique, afin de revenir à un milieu neutre, en second lieu, il faut sécher le soluté obtenu. Il peut alors être concentré par évaporation du solvant d'extraction.

II.3.1. Lavage de la phase organique

Le lavage de la phase organique permet de neutraliser la solution d'extraction.

- ✚ Si le pH est acide, un lavage par une solution de carbonate de disodium (Na_2CO_3), d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) ou de soude diluée (NaOH) est nécessaire.
- ✚ Si le pH est basique, on effectue un lavage par une solution d'acide chlorhydrique ou sulfurique diluée (HCl ou H_2SO_4).

Un lavage à l'eau ou avec une solution saturée de chlorure de sodium permet d'éliminer les excès d'acide ou de base résiduels ou de diminuer la quantité d'eau présente dans le solvant organique (salting-out ou relargage).

II.3.2. Séchage de la phase organique

Il est nécessaire d'éliminer l'eau restant diluée dans la phase organique et donc de sécher celle-ci. Ceci est généralement effectué grâce à des minéraux possédant une forte affinité pour l'eau : sulfate de magnésium ou de disodium (MgSO_4 ou Na_2SO_4). L'action de ces déshydratants provient souvent de la formation de différents hydrates par capture des molécules d'eau présentes dans le solvant.

Le déshydratant doit présenter les qualités suivantes :

- ✚ Il ne doit pas donner de réaction chimique avec le ou les composés organiques dissous dans le solvant.
- ✚ L'action déshydratante doit être rapide et efficace.
- ✚ Sa solubilité dans le solvant organique doit être négligeable.
- ✚ Son prix doit être bas.

- ✚ Il ne doit pas avoir d'effet catalytique en favorisant des réactions telles que la polymérisation, la condensation ou l'oxydation.

De façon générale, il vaut mieux agiter la phase organique avec le minimum de déshydratant pendant plusieurs minutes (pour favoriser le contact des deux phases solide/liquide), plutôt que d'utiliser d'emblée une quantité importante de déshydratant qui provoque une perte de produit par adsorption. Pour savoir si la phase organique est sèche,

La faire tourner. Si de petits cristaux non agrégés tournent dans la phase organique c'est qu'elle est sèche, sinon, il est nécessaire de rajouter du desséchant.

La phase organique est ensuite filtrée sur coton, directement dans le ballon qui sert à son évaporation. Il faut penser à bien laver la verrerie, le desséchant et le coton avec le même solvant organique pour éviter les pertes de produit.

II.3.3. Evaporation du solvant d'extraction

L'opération d'évaporation est généralement réalisée au rotavapor, mais on peut aussi concentrer le solvant dans un montage à distiller classique en ayant préalablement séché la phase d'extraction (phase organique) sur un agent desséchant (sauf si le produit n'est pas stable à haute température et à l'oxygène).

III. Distillation

III.1. Principe

La distillation est un procédé qui permet la séparation de différentes substances liquides à partir d'un mélange. Elle consiste à porter le mélange à ébullition et à recueillir, après une succession de vaporisation et de condensation, une fraction dite légère appelée le distillat. Celui-ci correspond au produit le plus volatil qui a le point d'ébullition le plus bas et qui distille en premier. Dans le ballon, il reste la fraction dite lourde appelée le résidu. La conception de l'appareil dépend de la nature du mélange à séparer.

Le principe des différentes techniques de distillation fait appel aux lois qui régissent l'équilibre liquide - vapeur des corps purs et des mélanges.

Les applications usuelles de la distillation sont :

- ✚ L'élimination d'un produit en cours de réaction chimique ou d'un solvant,
- ✚ L'isolement d'un composé naturel ou de plusieurs composés, obtenus après une réaction chimique,
- ✚ La purification d'un composé.

III.2. Techniques pratiques de la distillation

III.2.1. Distillation simple

Une distillation est dite simple lorsque l'appareillage est monté sans colonne à distiller et sans analyseur pour réguler le prélèvement du reflux. Le distillat est le produit d'une seule opération d'ébullition et de condensation. C'est la distillation élémentaire (Figure II. 5).

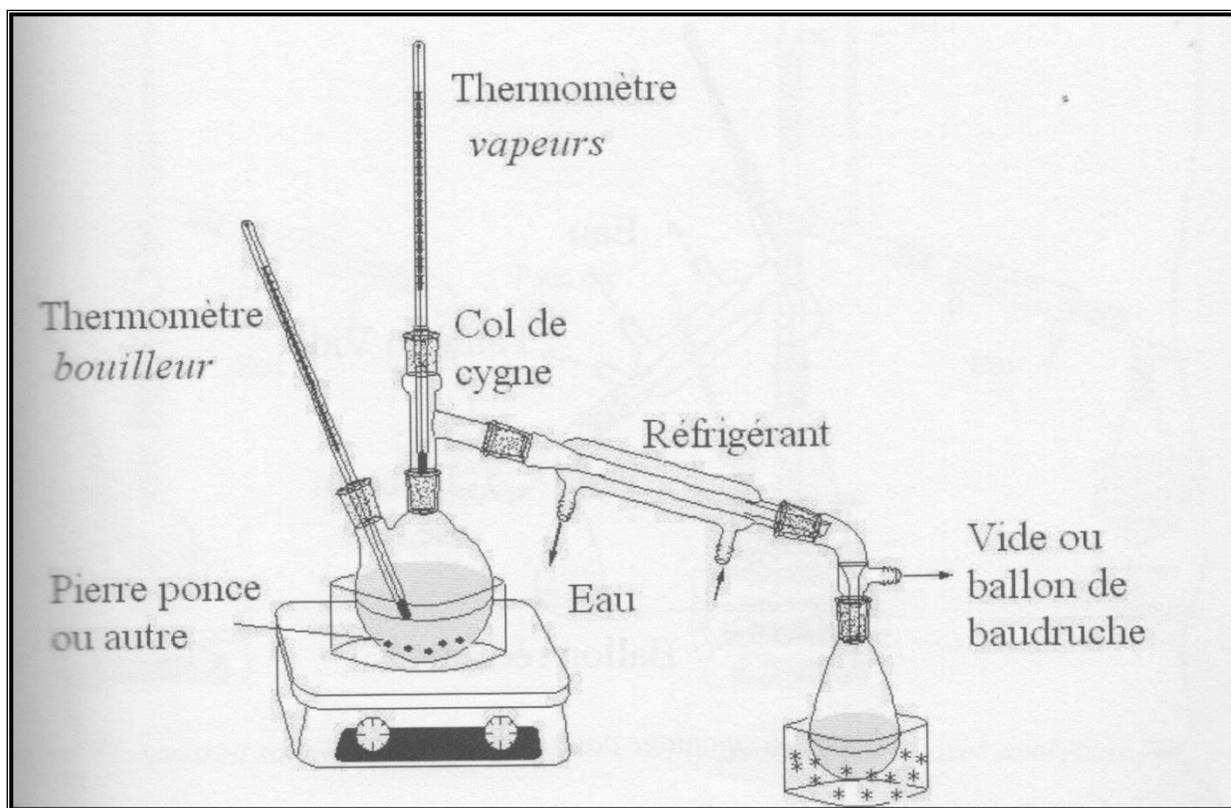


Figure II.5 : Distillation simple.

Le pouvoir séparateur de ces systèmes est proche d'un plateau théorique et la retenue est environ égale à zéro, car il n'y a pas de volume de la colonne.

Voici quelques conseils pour une distillation simple :

- ✚ Le montage est toujours réalisé de gauche à droite.
- ✚ Le chauffage peut se faire à l'aide de bain d'huile (huile minérale pour les températures inférieures à 150 C° ou, beaucoup plus rarement, huile de silicone pour les températures supérieures à 150 C°) ou avec une calotte chauffante.
- ✚ Le choix du bouilleur dépend de la quantité de mélange à distiller.
- ✚ Pour de faibles volumes, il est préférable d'utiliser des ballons en forme de poire (ballon conique). Les ballons sphériques conviennent à tous les moyens de chauffage et à toutes les distillations.
- ✚ La génération de microbulles dans le bouilleur s'effectue soit avec une agitation créée à l'aide d'un barreau aimanté, soit avec de la pierre ponce ou du carborandum. Cela permet de réguler l'ébullition.

Il existe des appareils pour microdistillation (Figure II.6). Ce sont des appareils monobloc, sans colonne de Vigreux. Ils servent à distiller de petites quantités de liquide.

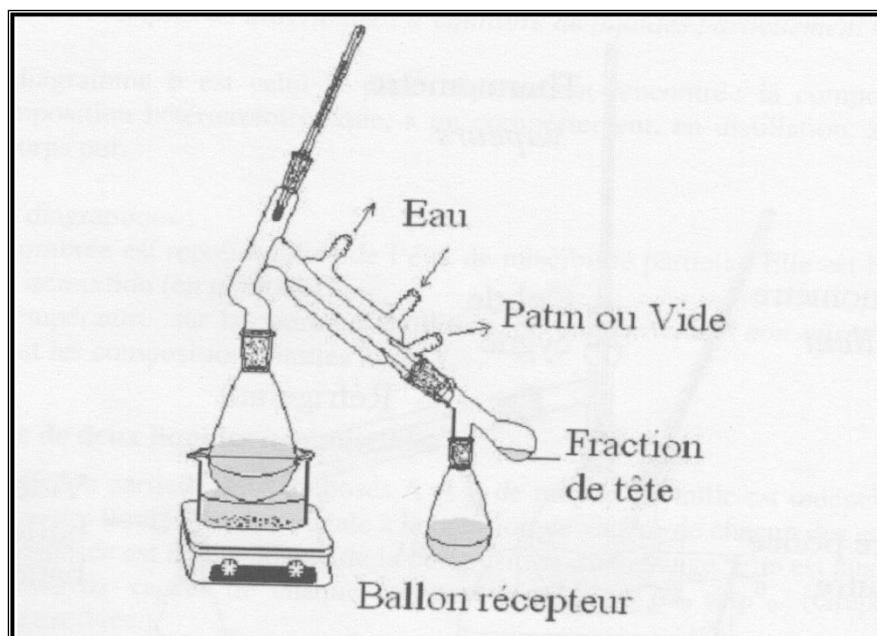


Figure II.6 : Montage pour microdistillation

Lors de la distillation d'un mélange ayant tendance à mousser, il convient d'utiliser une colonne de vide intercalée entre le bouilleur et le col de cygne. Ceci permet d'éviter l'entraînement de gouttelettes liquides par la vapeur montante.

Il est préférable d'équiper l'appareil de deux thermomètres : l'un dans le bouilleur pour éviter la surchauffe du mélange et l'autre en tête de colonne pour contrôler la température de vapeur T_{vapeur} , puis celle de la distillation $T_{\text{distillation}}$.

III.2.1.1. Applications

Les applications de la distillation simple sont :

- ✚ La déminéralisation de l'eau.
- ✚ La distillation d'un mélange non miscible
- ✚ La concentration ou l'élimination d'un solvant dans lequel est dissous un solide ou un liquide peu ou non volatil

III.2.2. Rectification

La rectification s'effectue avec un ballon et une colonne de type Vigreux qui peut être surmontée d'un col de cygne ou d'un analyseur (Figure II.7 et Figure II.8). Le pouvoir séparateur de ce type de distillation est plus grand que pour une distillation simple.

Il est à noter qu'au niveau industriel le principe de la rectification est poussé à son maximum grâce à l'utilisation de distillateurs à plateaux. Ceux-ci contiennent plusieurs étages et chaque plateau possède une température qui lui est propre, certains de ces plateaux sont reliés à des systèmes d'extraction.

Le choix de la colonne et de la tête de colonne dépend de la difficulté de la séparation, de la quantité à distiller, de la température de distillation et de la nature chimique des composés à distiller.

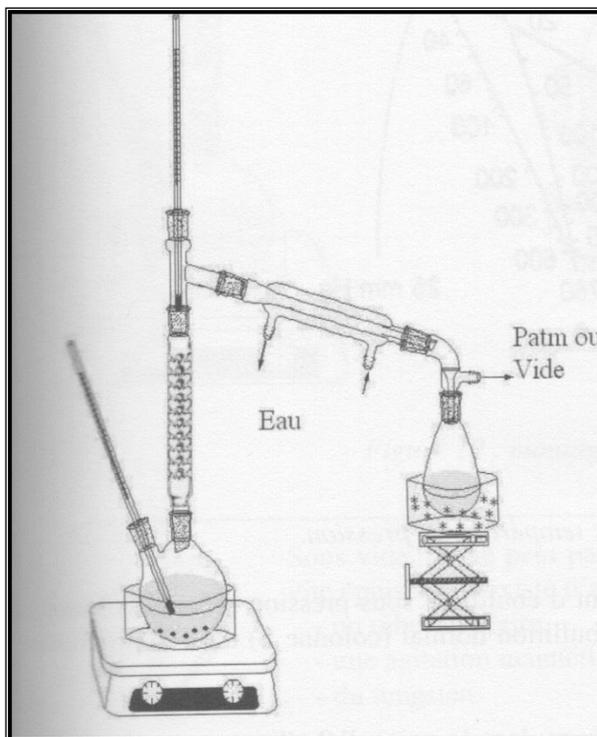


Figure II.7 : Appareil sans analyseur

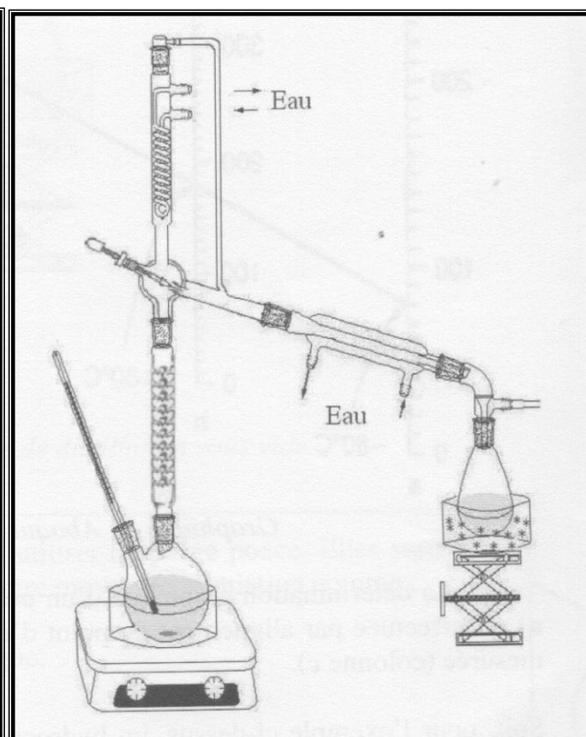


Figure II.8 : Appareil avec analyseur

Ces appareils sont utilisés pour la purification d'un composé, l'isolement des constituants d'un mélange et le déplacement de l'équilibre de réaction chimique par élimination d'un composé réactionnel.

III.2.3. Distillation sous pression réduite

III.2.2.1. Principe et conséquences

La distillation sous pression réduite permet d'améliorer nettement les séparations, la température d'ébullition est abaissée par réduction de la pression imposée

✚ Appareils classiques

La distillation sous pression réduite est utilisée pour :

- ✚ Des composés à haut point d'ébullition (température supérieure à 150 °C),
- ✚ Des composés instables à pression atmosphérique (soit par dégradation thermique, soit par oxydation à l'air) (Figure II.9).

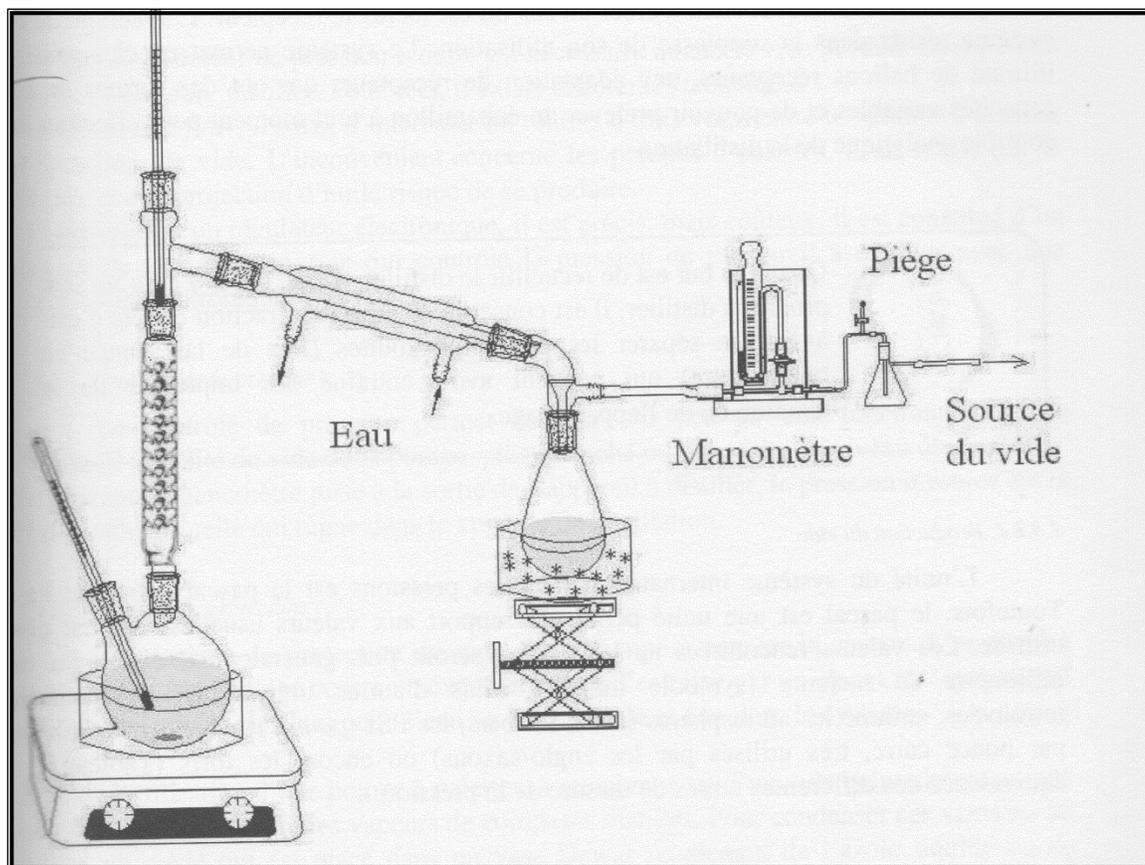


Figure II.9 : Montage de la distillation sous vide

III.2.4. Hydrodistillation et entraînement à la vapeur

III.2.4.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'un liquide organique. Son principe est basé sur celui de la distillation des mélanges binaires ou partiellement miscibles. Quelque soit la nature du liquide organique, le mélange a une température d'ébullition inférieure à 100 °C. Les hydrodistillations sont souvent utilisées pour récupérer des huiles essentielles. L'essence est entraînée par la vapeur sous la forme d'un hétéroazéotrope (Figure II.10)

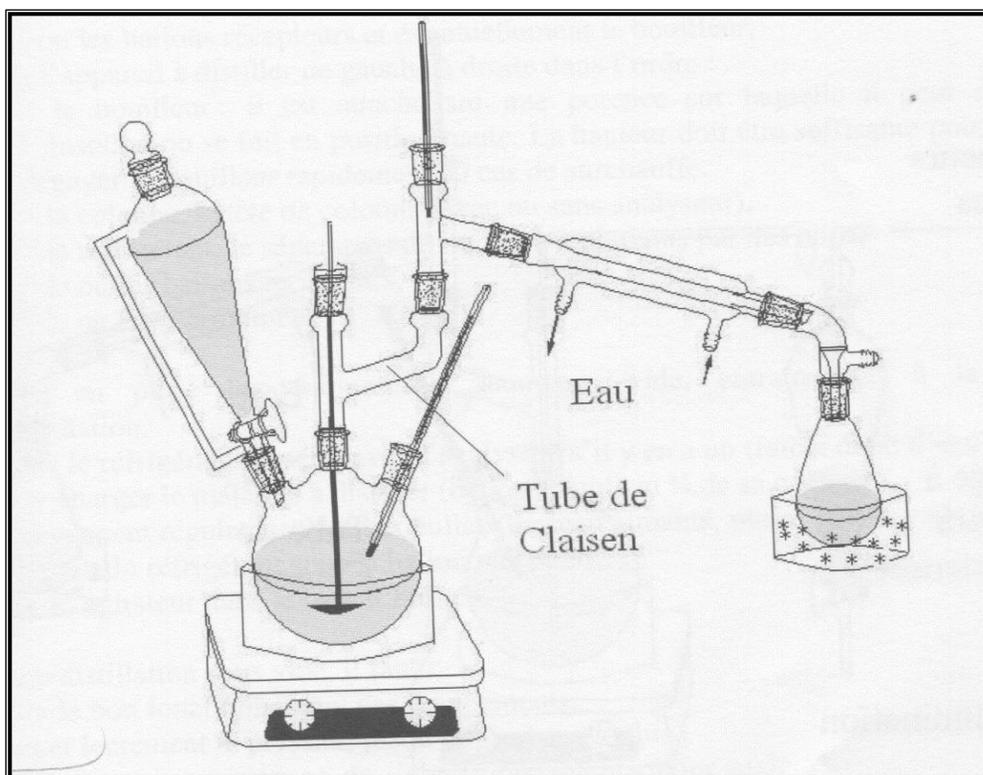


Figure II.10 : Appareil pour hydrodistillation

Un montage de distillation simple est aisé à mettre en œuvre et convient parfaitement quand l'entraînement du composé organique nécessite une faible quantité d'eau. L'appareil à hydrodistiller correspond à l'appareillage simple auquel on ajoute une ampoule de coulée isobare. Celle-ci permet une recharge en eau au cours de la distillation. Une agitation magnétique ou mécanique est nécessaire pour avoir une meilleure répartition entre les deux phases. Comme pour la distillation sous vide, on n'utilise pas de pierre ponce.

Il est possible d'utiliser un montage identique pour éliminer l'eau d'un mélange. Dans ce cas, l'ampoule est chargée d'un solvant formant un azéotrope avec l'eau afin d'en diminuer le point d'ébullition (toluène).

III.2.4.2. Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur est une méthode qui consiste à injecter de la vapeur d'eau dans un liquide organique. La solution organique est alors chauffée par cette vapeur d'eau. La phase organique est alors distillée par entraînement avec la vapeur d'eau (Figure II.11). Si la

vapeur provient d'une alimentation sous pression réduite, la température de la vapeur injectée est la température d'entraînement qui est supérieure à 100 °C. Cette vapeur est désignée sous l'appellation de vapeur vive ou surchauffée.

Dans ce cas, la proportion en composé organique dans le distillat est supérieure à la proportion obtenue par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur non surchauffée.

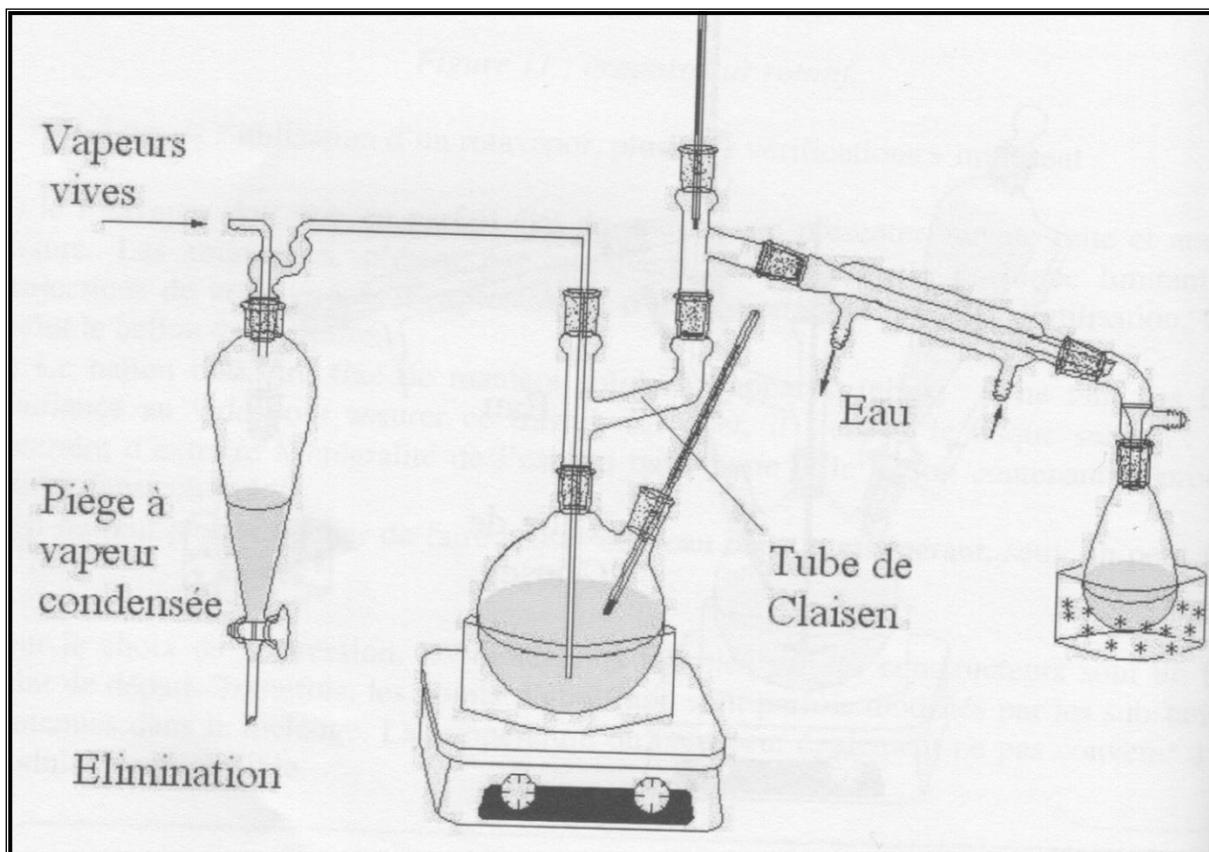


Figure II.11 : Appareil pour entraînement à la vapeur surchauffée

L'entraînement à la vapeur est une méthode qui remplace avantageusement l'extraction lorsque des problèmes d'émulsion apparaissent (manque de sélectivité du solvant ou risque de contamination du solvant). Ce montage remplace la distillation classique lorsque l'on veut diminuer la température d'ébullition du composé organique.

Les principales applications sont l'isolement des huiles essentielles (parfumerie,

- ✚ Pharmacie, industrie alimentaire), l'isolement ou l'extraction d'un composé organique d'un milieu très hétérogène (difficile à extraire ou à distiller).
- ✚ Le barbotage à la vapeur engendre une bonne agitation qui dispense de l'utilisation d'un agitateur.

III.3. Description d'une opération de distillation

La distillation suit une procédure particulière, car il faut penser à :

- ✚ Tarer le ou les ballons récepteurs et éventuellement le bouilleur,
- ✚ Monter l'appareil à distiller de gauche à droite dans l'ordre:
 - Le bouilleur : il est attaché sur une potence sur laquelle il peut coulisser. L'installation se fait en position haute. La hauteur doit être suffisante pour pouvoir dégager le bouilleur rapidement en cas de surchauffe.
 - La colonne, la tête de colonne (avec ou sans analyseur),
 - Le réfrigérant, le séparateur de fraction, maintenus par des clips,
 - Le ou les ballons récepteurs,
 - Le ou les thermomètres,
- ✚ Mettre en place les équipements annexes : vide, entraînement à la vapeur, hydrodistillation,
- ✚ Brancher le réfrigérant en série avec l'analyseur s'il y en a un (faible débit d'eau),
- ✚ Peser et charger le mélange à distiller (ballon rempli au 3/4 de sa capacité),
- ✚ Mettre un agent régulateur de microbulles (barreau aimanté, pierre ponce, carborandum),
- ✚ Mettre un bain réfrigérant sous le ballon récepteur,
- ✚ Mettre un agitateur dans le bain d'huile.

Pour une distillation sous vide, il faut :

- ✚ Vérifier le bon fonctionnement des équipements,
- ✚ Diminuer lentement la pression jusqu'à la valeur voulue,

- ✚ Chauffer jusqu'au voisinage de l'ébullition, ralentir pour maîtriser l'apport calorifique aux alentours de la température d'ébullition.
- ✚ Si l'analyseur fait défaut, il convient de chercher le réglage de chauffage optimum pour avoir un débit de prélèvement régulier.
- ✚ Si le dispositif comporte un analyseur, le robinet est fermé au départ. Lorsque le mélange est au reflux total, le distillat est prélevé lentement en modérant l'ouverture de l'analyseur avec le robinet.
- ✚ Chaque nouvelle fraction impose le changement de ballon récepteur.

CHAPITRE III

TECHNIQUES DE SEPARATION

I. Filtration et ultrafiltration

I.1. Filtration

La filtration est l'opération qui consiste à séparer les particules solides qui se trouvent en suspension dans un liquide. Dans ce but, la suspension à filtrer est versée sur un filtre qui laisse passer le liquide mais retient les matières solides. Le liquide recueilli après filtration est appelé filtrat, le solide déposé sur le milieu filtrant est appelé gâteau.

Le milieu filtrant est composé de papier ou d'une matière granulaire qui forme des canaux étroits dans lesquels circule le liquide (par exemple verre fritté).

I.1.1. Différents types de filtres

Deux types de filtres sont disponibles : les filtres dits « en profondeur » et les filtres dits « écran », ils diffèrent sur leur principe et leurs applications

I.1.1.1. Les filtres en profondeur

Ils sont constitués de substances fibreuses (fibres de verre, cellulose, coton,) ou de substances agglomérées (sable, charbon, verre fritté) qui créent un réseau de canaux à l'intérieur du filtre, réseau dans lequel viennent se bloquer les substances arrêtées par la filtration. L'efficacité d'un filtre « en profondeur » augmente donc avec son épaisseur, mais diminue quand la pression exercée sur le filtre augmente. Il en existe différentes sortes :

Papiers filtres

Le filtre, utilisé sur un support de type entonnoir conique ou Büchner, peut être plat ou plissé. Le type de papier est différent selon que la filtration souhaitée est rapide par exemple :

- ✓ Les filtres pour filtrations rapides (Whatman n° = 4 et 9)
- ✓ Les filtres pour filtrations à vitesse moyenne (Whatman n° = 1 et 7)
- ✓ Les filtres pour filtrations très lentes (Whatman n° = 5 et 6)

Plaques frittées

Il s'agit de plaques poreuses constituées de poudre en verre agglomérée présentée dans un entonnoir et permettant la filtration sous vide. Leur nettoyage nécessite un lavage à l'acide sulfochromique et un rinçage abondant à l'eau distillée.

✚ Filtre en fibres de verre ou verre borosilicaté

Ils sont de forme circulaire et toujours utilisés à plat sur Buchner ou sur entonnoir avec plaque frittée, leurs pores sont plus étroits que ceux des filtres en papier.

✚ Tubes filtrants

Ils sont constitués de microfibrilles de verre reliées entre elles par une résine et se présentent sous forme de cylindres creux pouvant être montés sur des embouts de connexion. Ils peuvent être utilisés pour clarifier rapidement de grands volumes de solutions.

✚ Papier filtres séparateurs de phases

Le papier filtre séparateur de phases Whatman IPS peut remplacer une ampoule à décanter, il s'agit en effet d'un papier hydrophobe qui, placé sur un entonnoir en verre, retient la phase aqueuse tandis que la phase organique traverse le filtre.

I.1.1.2. Filtres « écrans »

Sont des membranes millipores, ils sont formés de polymères de cellulose (nitrate de cellulose) comportant un très grand nombre de pores calibrés. Les dimensions de ces pores varient selon les filtres de 0.025 μm à 8 μm alors que l'épaisseur du filtre est de 0.15 mm. Ces filtres résistent pendant 30 minutes au moins à la fois à des températures de 125° et à des pressions élevées. Ce qui permet leur stérilisation par autoclavage. Les filtres "écran" arrêtent les particules à leur surface de sorte que leur capacité de rétention des impuretés est faible. C'est pourquoi, habituellement, la filtration sur filtre "écran" est précédée d'une filtration sur un filtre en profondeur en amiante-cellulose ou en fibres de verre ; ce filtre est souvent appelé alors préfiltre (Fig III.1).

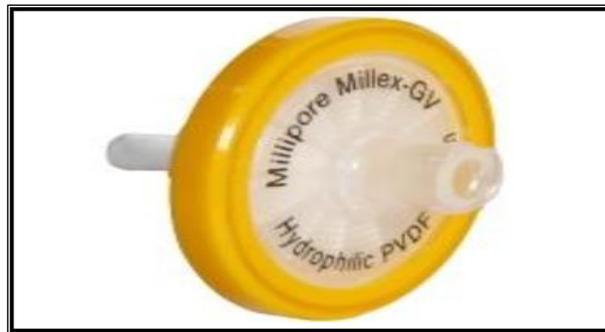


Figure III.1 : La membrane millipore.

I.1.2. Procédés de filtration

I.1.2.1. Filtration par gravité

Elle utilise un dispositif plus simple qui est simplement un entonnoir conique muni d'un filtre membrane (filtre plissé en papier) que dépose sur un récipient ou une fiole jaugée. Cette méthode est très lente, et pose souvent le problème de colmatage, avec possibilité d'adsorption des protéines sur la surface du filtre.

I.1.2.2. Filtration sous vide

Elle nécessite la création d'un vide qui fait aspirer le liquide, tandis que les particules restent sur la membrane. On utilise généralement un Büchner (un entonnoir en porcelaine à fond plat perforé pour permettre l'écoulement du liquide ou le filtrat. Ce fond supporte un filtre de forme circulaire). Le Büchner est installé sur Erlenmeyer muni d'un bras latéral sur lequel on peut brancher une pompe aspirante (pompe à vide) (Fig III.2).

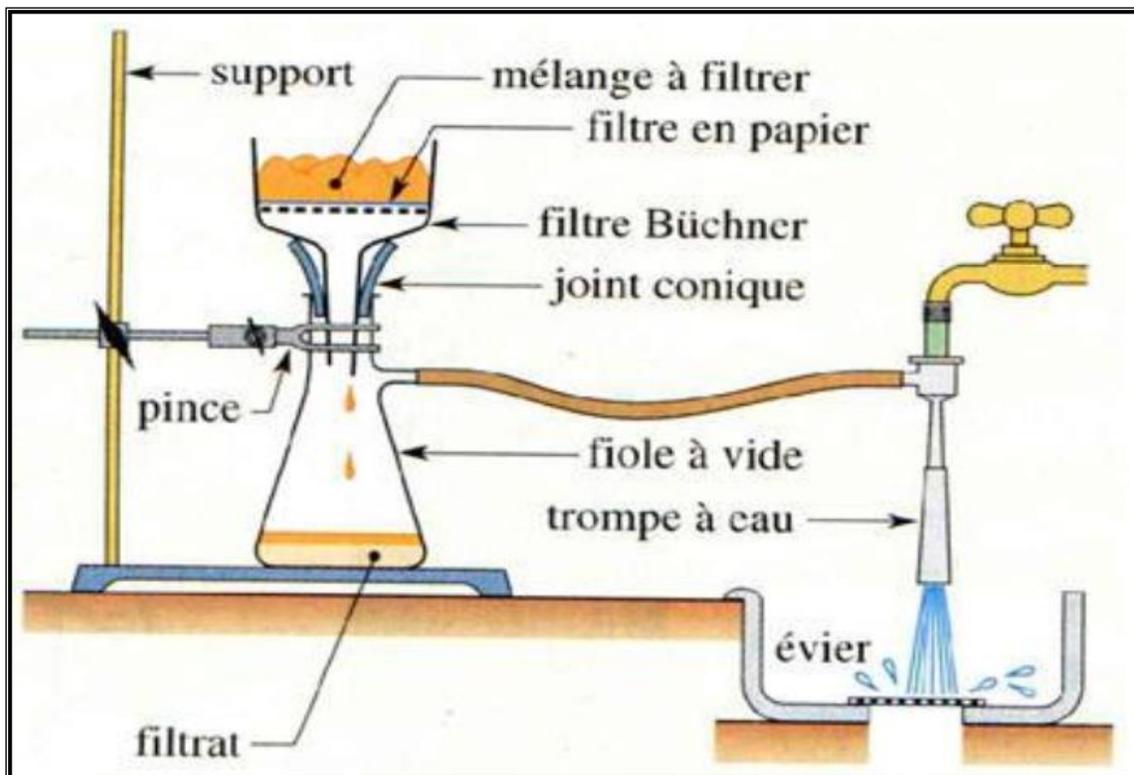


Figure III.2 : Filtration sous vide

I.1.2.3. Filtration sous pression

Il s'agit d'exercer une pression sur le liquide à filtrer de façon à accélérer l'écoulement du filtrat. Cela implique l'utilisation de membranes ou filtres synthétiques qui résistent.

I.2. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de séparation de molécules dissoutes et/ou de leur matière en suspension dans le solvant en fonction de leur taille. Cette technique fait appel à des membranes à perméabilité sélective qui permettent à toute substance de taille inférieure à celle des pores de la membrane de passer. Les molécules de plus grandes tailles sont alors retenues mais aussi concentrées puisque la membrane est perméable au solvant. Une pression est exercée sur la solution à ultrafiltrer. Le procédé, très simple à mettre en œuvre, ne nécessite ni changement de phase, ni processus chimique. Les conditions très douces ne détruisent pas l'activité biologique des molécules les plus fragiles.

L'ultrafiltration couvre un très large domaine de masse moléculaire (500 à 1 000 000 Da soit une taille de 1 à 20 nm). Ce domaine d'application permet de la situer entre celui de l'osmose inverse où les sels sont retenus et celui de la microfiltration où la taille des pores varie de 0,01 à 10 μm (Fig III.3).

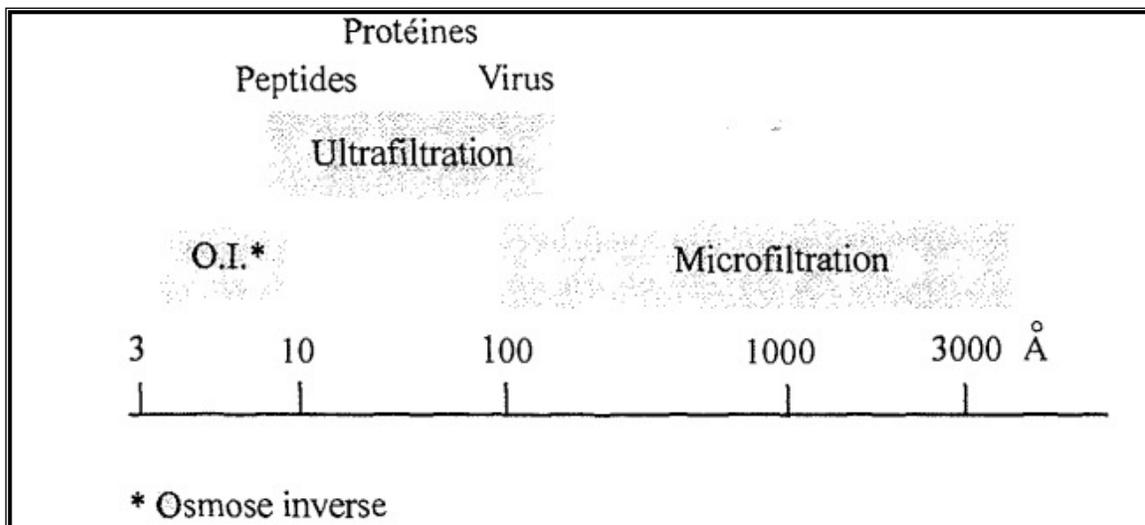


Figure III.3 : Domaine d'application d'ultrafiltration

La structure des membranes filtrantes se différencie de celle des microfiltres par le fait qu'elle présente une surface anisotrope capable de retenir les composés à la surface et non à l'intérieur. Cette propriété facilite le passage des molécules au travers de la membrane.

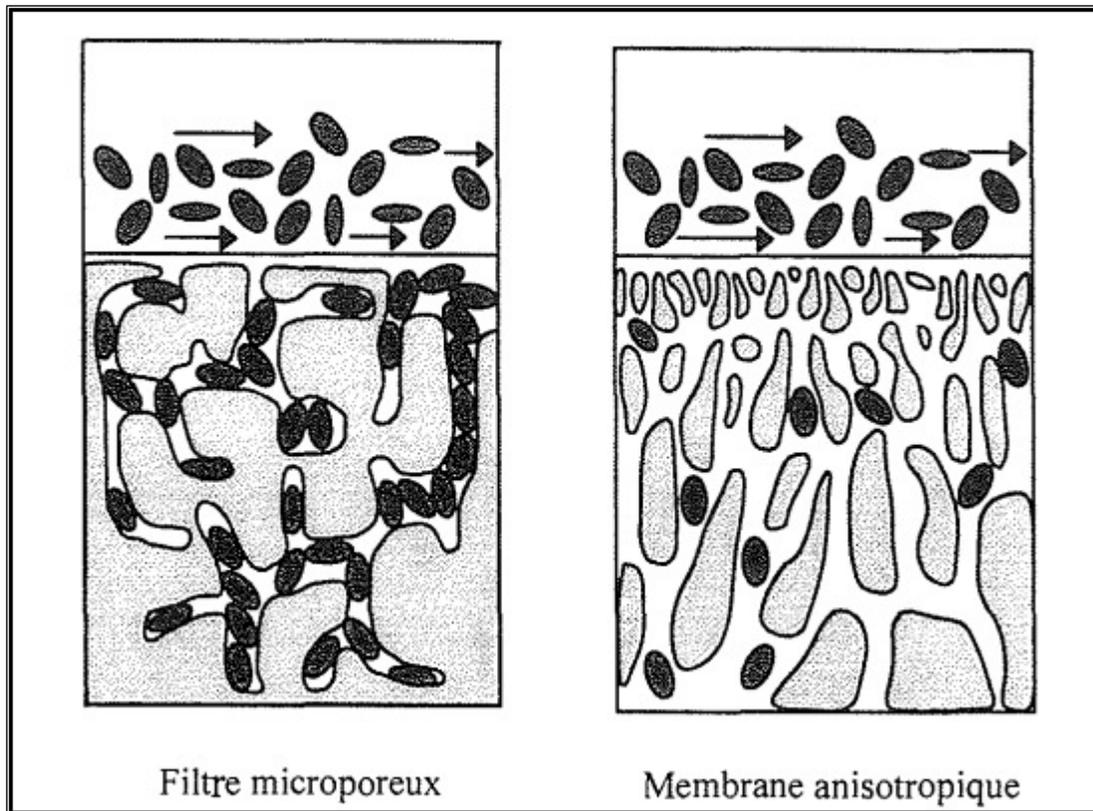


Figure III.4 : Exemples des filtres utilisés dans l'ultrafiltration

Les membranes jouant le rôle de filtres « écran » au niveau moléculaire. On définit les membranes d'ultracentrifugation par leur seuil de coupure exprimé masse moléculaire relative MR. En particulier elles sont utilisées dans des cellules d'ultracentrifugation (Fig III.5).

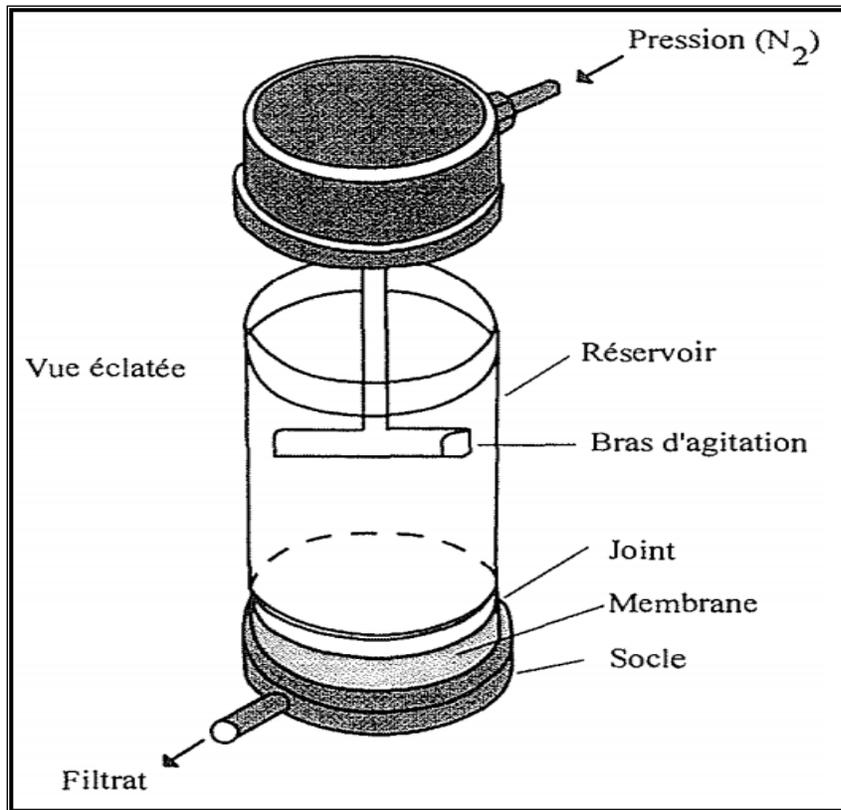


Figure III.5 : Cellule d'ultrafiltration.

I.2.1. Utilisation

Les applications sont très diverses

- ✚ Dessalage des fractions obtenues après précipitation par les sels.
- ✚ Concentration d'anticorps monoclonaux, immunoglobulines, urine, liquide cébrospinal, sérum ...
- ✚ Purification de fragments de restriction isolés après électrophorèse.

Remarque : l'ultrafiltration assurant le dessalage des échantillons remplace avantageusement la dialyse et la chromatographie.

II. Centrifugation et ultracentrifugation

II.1. Centrifugation

Les techniques de centrifugation sont basées sur le comportement des particules soumises à une force centrifuge. Les particules sont généralement suspendues dans un milieu liquide et placées dans un rotor grâce à des tubes amovibles appelés aussi bouteilles à centrifuger. Les particules et les molécules différant par la densité et la taille peuvent être séparées selon leur propre vitesse de sédimentation. Selon leur utilisation, les techniques de centrifugation forment deux groupes distincts :

✚ Centrifugation préparative

Elle concerne la séparation, l'isolement, la purification de cellules, d'organites cellulaires, d'acides nucléiques, de protéines, de lipoprotéines, de polysaccharides,

✚ Centrifugation analytique

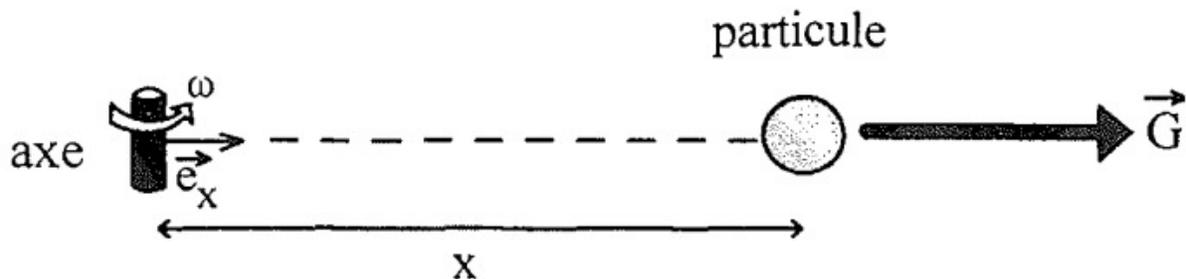
Elle est destinée à l'étude des macromolécules pures ou virtuellement pures. Cette technique fournit des informations sur la pureté, le poids moléculaire et la forme de la macromolécule.

II.1.1. Base théorique

La sédimentation est le mouvement relatif d'une particule ou d'une molécule autour d'un axe par rapport au récipient qui la contient. Dans le référentiel du récipient, le mouvement de rotation uniforme engendre un champ de forces centrifuges G égal à :

$$\vec{G} = \omega^2 x \vec{e}_x$$

où (ω est la vitesse angulaire (rad s^{-1}) et x la distance radiale.

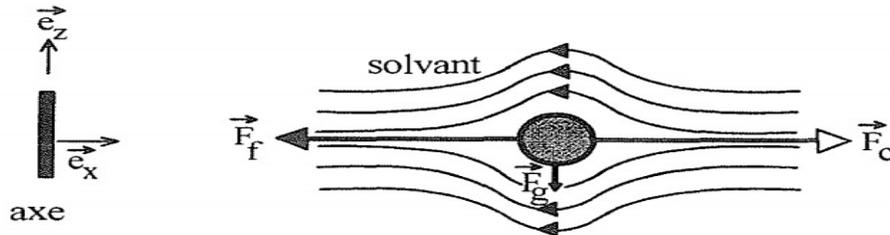


Différentes forces s'exercent sur la particule : la force de gravitation F_g , la force centrifuge F_c et une force de friction F_f due au frottement avec les molécules du solvant, égale au

produit f_v , f étant le coefficient de friction et v la vitesse de sédimentation. L'axe de rotation étant vertical, l'équation fondamentale de la dynamique :

$$\vec{F}_g + \vec{F}_c + \vec{F}_f = m \frac{d\vec{v}}{dt}$$

Où m est la masse élémentaire de la particule.



Pour une particule sphérique et rigide de rayon r , la relation précédente s'écrit :

$$-\frac{4}{3} \pi r^3 (\rho - \rho') g \vec{e}_z + \frac{4}{3} \pi r^3 (\rho - \rho') \omega^2 x \vec{e}_x - f \vec{v} = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho \frac{d\vec{v}}{dt}$$

Où ρ et ρ' sont respectivement les masses volumiques de la particule et du solvant. Le phénomène de sédimentation des particules dissoutes ou suspendues dans une solution est dû à la rotation du récipient autour de l'axe vertical. Dans ces conditions, le choix de la vitesse angulaire et de la distance du récipient à l'axe de rotation est tel que les forces verticales sont négligeables devant les forces axiales.

En introduisant l'expression du coefficient de friction f donné par la loi de Stokes:

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

Où η est la viscosité du solvant, l'équation fondamentale de la dynamique devient :

$$\frac{4}{3} \pi r^3 (\rho - \rho') \omega^2 x - 6 \pi \eta r v = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho \frac{dv}{dt}$$

Les résultats expérimentaux montrent que les vitesses de sédimentation sont faibles (quelques centièmes de mm par seconde), et se calcule à partir de :

$$v = \frac{2 r^2 (\rho - \rho') \omega^2 x}{9 \eta}$$

II.1.2. Appareillage

Une centrifugeuse est composée des éléments suivants :

- ✚ Un moteur capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers de tours par minute.
- ✚ Un rotor, capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane généralement pour les rotors des ultracentrifugeuses).
- ✚ Une enceinte dans laquelle est disposé le rotor, qui est réfrigérée et sous vide.

II.1.2.1. Rotors

Les rotors doivent supporter des accélérations importantes mais ils doivent être suffisamment légers pour que le moteur parvienne à les faire tourner.

Toute centrifugation nécessite d'équilibrer parfaitement le rotor, en particulier par la pesée des tubes contenant le liquide à centrifuger. Il existe trois grands types de rotors

- ✚ **Rotors à angle fixe** : ils sont faits de blocs en métal (aluminium, titane) dans lesquels sont creusés des puits servant de logements aux tubes de centrifugation, ces puits sont inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale (de 15 à 35°). Le rayon de ces rotors étant relativement court, il est assez facile de les tourner rapidement. Les particules sédimentent le long des parois des tubes et s'accumulent sur les cotés du fond des tubes de centrifugation (Fig III.6)
- ✚ **Rotors à godets mobiles** : dans ce système mobile, les godets disposés sur des crochets ou sur un système à bascule se réorientent quand débute la rotation du rotor et passent en position horizontale sous l'effet de la force centrifuge. Les particules peuvent ainsi sédimer directement dans le fond des tubes de centrifugation, sans heurter les parois des tubes. Ce type de rotor est principalement utilisé pour des centrifugations en gradient, discontinu ou continu (Fig III.6).
- ✚ **Rotors verticaux** : Ils sont moins répandus et peuvent être utilisés pour des centrifugations en gradient. Comme les rotors à angle fixe, les rotors verticaux sont des blocs de métal résistants mais dont les puits destinés à contenir les tubes sont verticaux. Donc, lors de l'accélération, le gradient contenu dans le tube se réoriente horizontalement de façon perpendiculaire à l'axe de rotation. A l'arrêt de la centrifugation, le gradient revient en position verticale dans le tube, parallèlement à l'axe de rotation. L'avantage des rotors verticaux est leur capacité à atteindre de

grandes vitesses de rotation, ce qui réduit considérablement les durées de centrifugation.

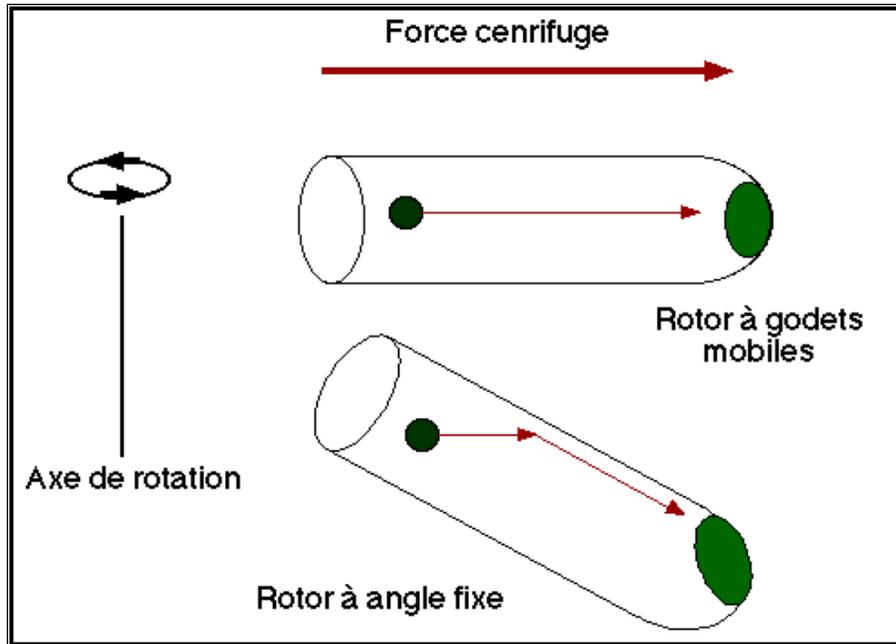


Figure III.6 : Centrifugation en rotor à angle fixe et en rotor à godets mobiles.

II.1.3. Type de centrifugeuses

Selon les besoins expérimentaux (accélérations, volume du matériel à centrifuger, la température de travail), plusieurs types de centrifugeuse ont été développés :

- ✚ **Centrifugeuses de table (ou cliniques)** : permettent d'atteindre des vitesses généralement assez basses (pour les modèles les plus simples) et de faibles accélérations (1000 à 2000 g), elles peuvent être non réfrigérées
- ✚ **Microcentrifugeuses** : sont spécialement conçues pour les microvolumes d'utilisation maintenant classique. Les microtubes à centrifuger sont des petits tubes coniques de 1,5 ml, les accélérations peuvent atteindre 12000 – 15000g et les centrifugeuses peuvent être réfrigérées.
- ✚ **Centrifugeuses au sol** : permettent d'obtenir des accélérations jusqu'à environ 20 000g pour les plus petits rotors (vitesse de rotation de l'ordre de 30 000 tr.min⁻¹) et sont réfrigérées. Les volumes que l'on peut centrifuger sont assez importants.

- ✚ **Ultracentrifugeuses** : sont des appareils plus perfectionnés, permettant d'obtenir des accélérations très élevées (jusqu'à près de 500 000 g) avec des vitesses de rotation très rapides (jusqu'à près de 100 000 tr.min). Elles disposent d'un système permettant de faire le vide afin de pouvoir obtenir de telles accélérations sans entraîner de surchauffe du rotor ni de l'échantillon, et d'un système de réfrigération. Les volumes sont assez limités.

II.1.4. Types de centrifugation

II.1.4.1. Centrifugation différentielle

Cette méthode est basée " sur des différences de vitesse de sédimentation de particules de tailles et de densités variables. Pour des particules de même masse mais de densités différentes, les plus rapides à sédimenter correspondent à celles présentant la densité la plus élevée. Dans cette technique, le matériel de départ (homogénat) est fractionné grâce à un accroissement du champ gravitationnel. On s'arrange à ce que le champ appliqué à chaque étape permette de faire sédimenter un constituant cellulaire.

Dans ce type de centrifugation, 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 (pour lesquels l'accélération a été trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou pour lesquels le temps de centrifugation a été trop court) vont rester dans la fraction liquide appelée alors 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 sédimenteront pour des accélérations très faibles (quelques dizaines de g) (Fig III.7).

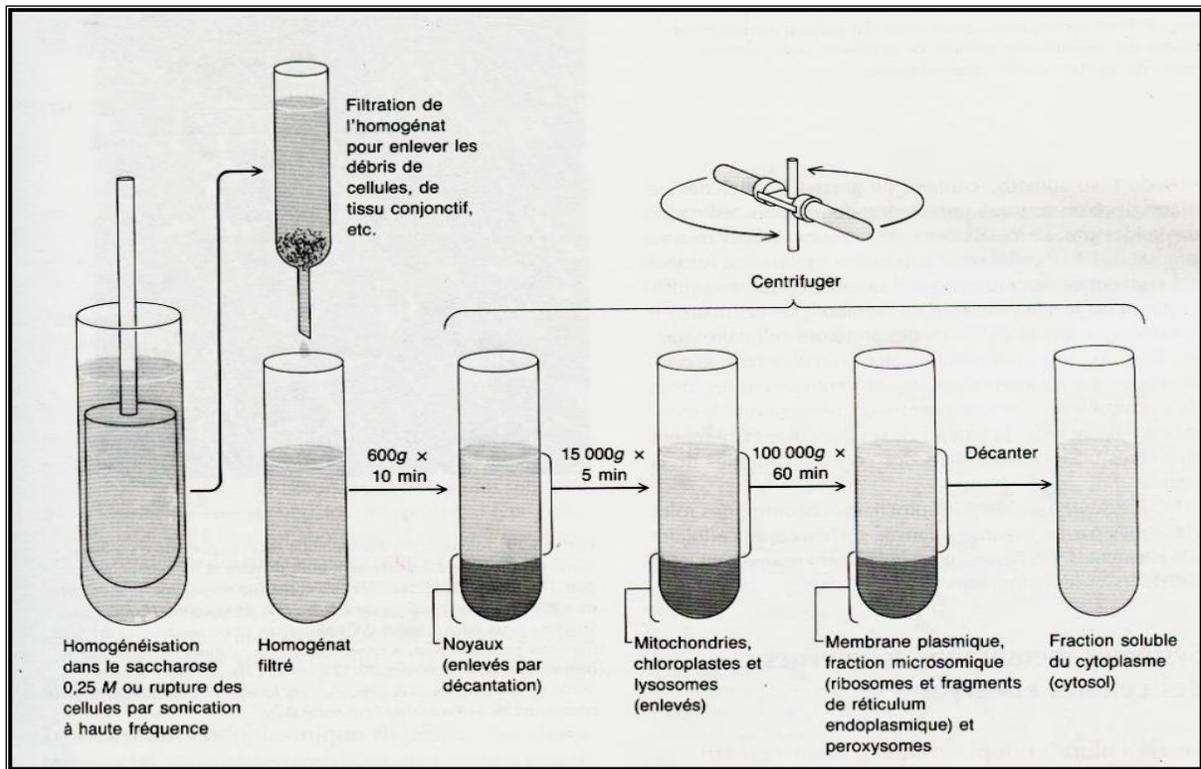


Figure III.7 : isolement des organites cellulaire (centrifugation différentielle).

II.1.4.2. Centrifugation en gradient de densité

C'est une technique basée aussi sur des différences de vitesse de sédimentation dues à la taille et à la densité des particules. Les particules sédimentent dans un milieu de densité variable appelé gradient. Pour ce type de centrifugation, bien qu'il soit encore possible d'utiliser des rotors à angle fixe, on préfère employer des rotors à angle mobile qui améliorent la séparation des constituants et minimisent les perturbations dues à la réorientation du gradient. Les particules, contrairement à la centrifugation différentielle, sédimentent sous forme de bande ou de zone ce qui a permis de désigner cette technique par le terme de centrifugation zonale. Il existe deux types de gradients

✚ Gradients discontinus

Ils 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. Il arrive de limiter le gradient à deux densités seulement avec une solution inférieure très dense (Fig III.8).

🌈 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 parfois visibles à l'œil nu (Fig III.9).

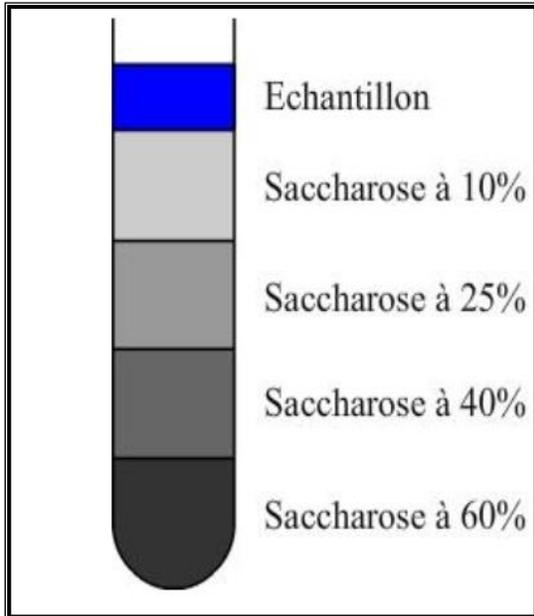


Figure III.8 : Gradient discontinu

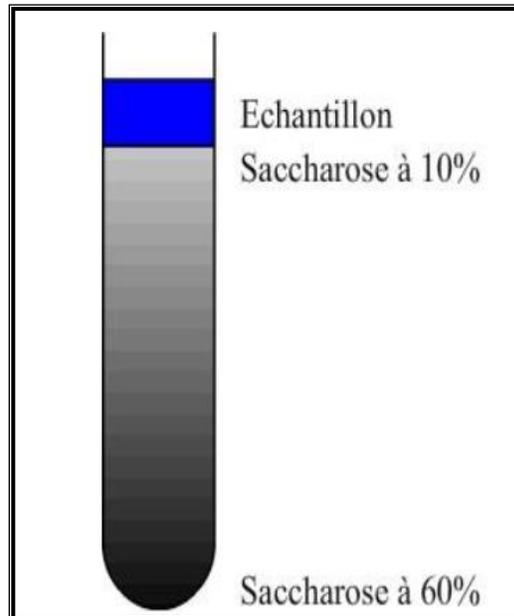


Figure III.9 : Gradient continu

III. chromatographie

III.1. Définition

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes permettant de séparer les éléments (molécules, ions...) d'un mélange en solution plus ou moins complexe. Le mélange à chromatographier entraîné par une phase mobile circule au contact d'une phase stationnaire liquide ou solide. Des interactions physiques ou chimiques s'établissent entre la phase stationnaire qui possède une très grande surface de contact, et les molécules à séparer. Des échanges rapides et réversibles se produisent dont la force dépend de la nature chimique des molécules à séparer. Celles-ci sont plus ou moins retenues selon l'importance de leur interaction avec la phase stationnaire. Les molécules sont alors entraînées plus ou moins vite

en fonction de leurs propriétés physicochimiques, ce qui peut être effectuée dans un but analytique quantitatif ou qualitatif ou dans un but préparatif.

III.2. Nature des phases

III.2.1. Phase stationnaire "fixe"

Est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane.

La phase stationnaire peut être solide ou liquide. Les solides : silice ou alumine traitées permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leur 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 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 absorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide volatil et thermiquement stable imprégnant un granule poreux.

III.2.2. Phase mobile

Est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

- Soit un gaz : (ex ; chromatographie en phase gazeuse) : la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.
- Soit un liquide : (ex : chromatographie sur papier, couche mince ou colonne) : la phase mobile est appelée éluant.

III.3. Classification des techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être classées en trois modalités.

III.3.1. Classification selon la nature des phases

- ✓ La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz
- ✓ La phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- ✚ Chromatographie liquide-solide (LSC).

- ✚ Chromatographie liquide-liquide (LLC).
- ✚ Chromatographie gaz-solide (GSC ou GC).
- ✚ Chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).

III.3.2. Classification selon le mécanisme de séparation

Les techniques chromatographiques peuvent être classées selon le mécanisme de séparation qu'elles mettent en jeu et les propriétés de la phase stationnaire, on distingue ainsi

- ✚ Chromatographie de partage
- ✚ Chromatographie d'adsorption
- ✚ Chromatographie ionique
- ✚ Chromatographie d'affinité
- ✚ Chromatographie d'exclusion

III.3.2.1. Chromatographie d'adsorption

La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption. Les phases stationnaires ont fait beaucoup de progrès depuis Tswett, qui utilisait le carbonate de calcium, alumine, gel de silice ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire)

III.3.2.2. Chromatographie de partage

Elle utilise la différence de solubilité des molécules entre deux phases mobiles et stationnaire 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.

III.3.2.3. Chromatographie ionique

La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

III.3.2.4. Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Selon la nature, aqueuse ou organique de la phase mobile, cette technique est désignée par filtration sur gel ou perméation de gel. Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion.

III.3.2.5. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant). Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur). Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

III.3.3. Classification selon les procédés utilisés

Selon le support de la phase stationnaire, on distinguera :

- ✚ **Chromatographie sur colonne** (regroupant notamment la chromatographie à haute performance HPLC et la chromatographie en phase gazeuse CPG) : la phase stationnaire est dans un tube étroit et la phase mobile progresse par gravité ou différence de pression.
- ✚ **Chromatographie plane** (qui regroupe la chromatographie sur couche mince CCM et la chromatographie sur papier) : la phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie sur papier) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :

- ✚ La chromatographie par développement : les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire.
- ✚ La chromatographie d'éluion : les substances sont entraînées hors de la phase mobile.

III.4. Chromatographie planaire

III.4.1. Chromatographie sur papier (CP)

III.4.1.1. Principe

Elle utilise des feuilles de papier filtre maintenues verticalement dans une enceinte fermée (cuve chromatographique). La phase stationnaire est constituée par l'eau, toujours présente, absorbée sur le papier. La phase mobile est un solvant organique (ou un mélange des solvants). Avant de réaliser la chromatographie, on dépose sur le papier une goutte d'échantillon à analyser.

Le passage du solvant réalise un partage des substances à séparer entre l'eau qui imprègne le papier et la phase mobile. Selon le sens de développement du chromatogramme, elle est disposée au fond de la cuve à la base de la feuille de papier, de sorte qu'elle monte dans le papier par capillarité (chromatographie ascendante), ou bien près du sommet, dans une augette qui permet au solvant de s'écouler progressivement de haut en bas à travers toute la feuille (chromatographie descendente) (Fig.II.10).

Lorsque le développement est achevé, on sort la feuille de papier (appelée chromatogramme), on sèche et on la révèle, c'est-à-dire que l'on fait apparaître par un procédé approprié, sous forme de taches, les diverses molécules qui ont été séparées.

Chaque composé est défini par son R_f , (abréviation de « Rapport frontale »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par l'échantillon}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Le R_f est une valeur caractéristique d'un composé pour les conditions de chromatographie données (Fig.III.11) .

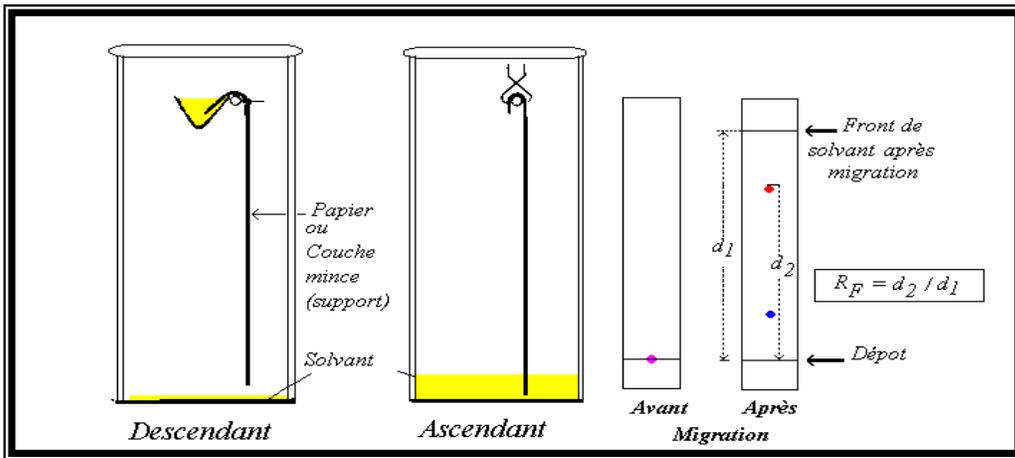


Figure III. 10. La chromatographie ascendante et descendante

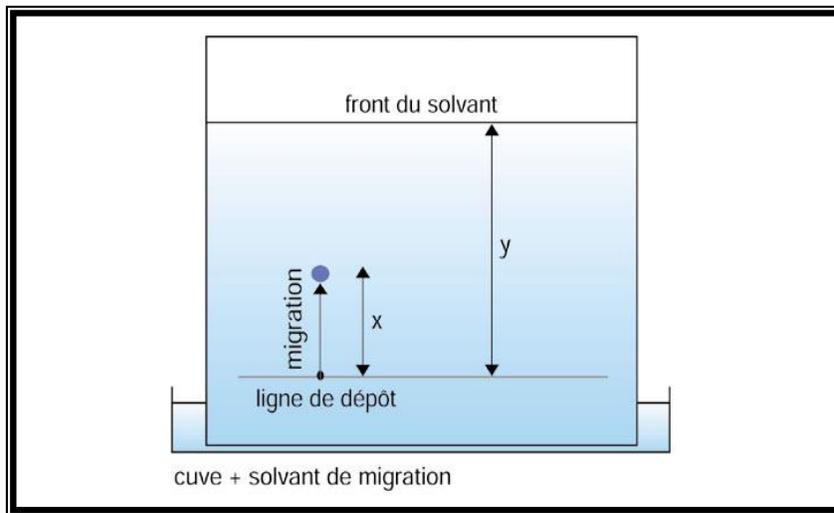


Figure III.11. Rapport frontal

III.4.1.2. Chromatographie bidimensionnelle

La première séparation (monodimensionnelle) est souvent améliorée par une deuxième chromatographie où le papier séché résultant de la 1^{ère} séparation est tourné de 90° puis soumis à 2^{ème} séparation en utilisant une autre phase mobile différente de la première (Fig.III.12) .

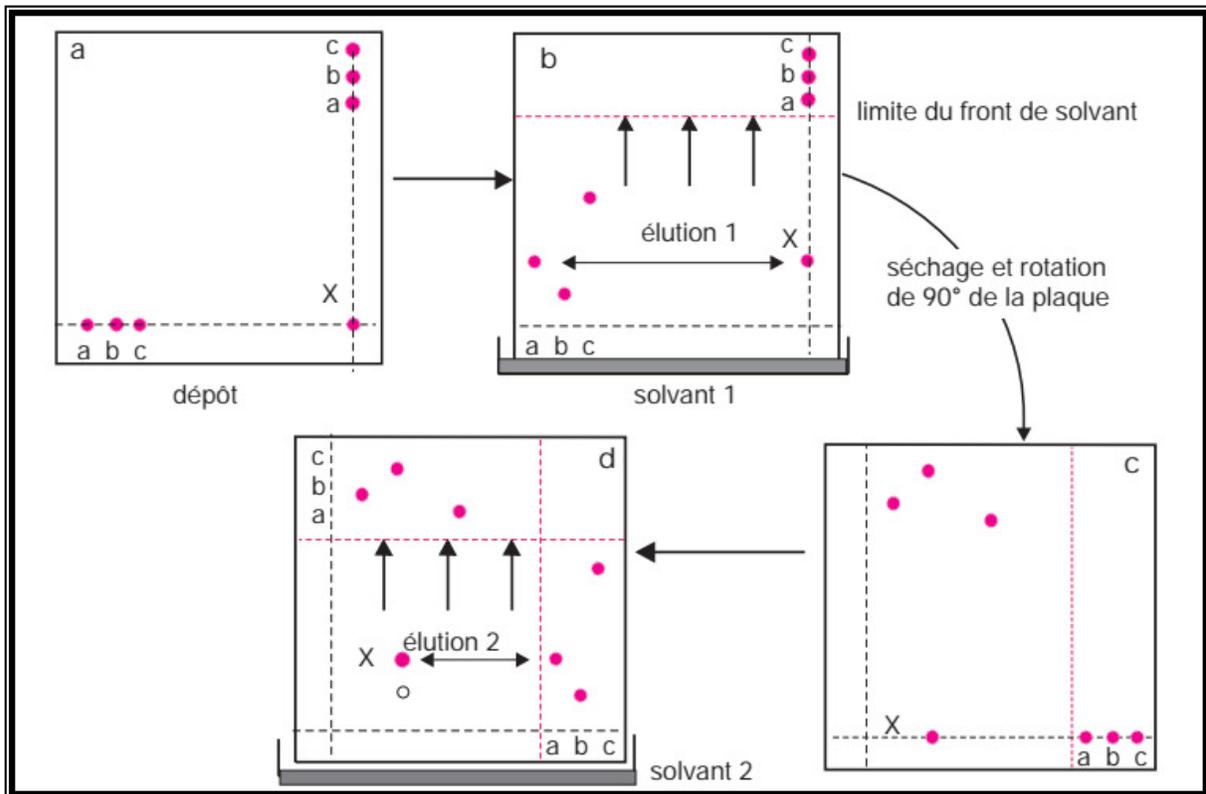


Figure III. 12. Schéma d'une chromatographie bidimensionnelle.
a) première chromatographie ; b) deuxième chromatographie

III.4.1.3. Applications

La chromatographie sur papier est utilisée pour la séparation et l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres, les flavonoïdes etc....

III.4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM ou TLC (Thin Layer Chromatography) est une technique complémentaire de la CLHP, ayant sa propre spécificité. Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. Méthode sensible, de faible coût, elle utilise des phases stationnaires fixées sur des supports souples (polymère, aluminium) ou rigide (verre). Des améliorations de la fabrication et de la qualité de la phase stationnaire ont permis l'émergence de la chromatographie sur couche mince à haute performance ou HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography). Cette technique,

grâce à une phase stationnaire constituée de très fines particules de silice, est capable de donner rapidement des séparations à haute résolution, avec une sensibilité pouvant rivaliser avec les autres techniques chromatographiques.

III.4.2.1. Principe

- ✚ La chromatographie sur couche mince repose principalement sur des phénomènes d'adsorption.
- ✚ La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants (état liquide), et la phase stationnaire est généralement un adsorbant (solide) maintenu (fixé) sur une plaque de verre, de plastique, ou d'aluminium.
- ✚ L'échantillon ou le mélange à analyser (soit liquide ou soluble dans un solvant volatil) est déposé ponctuellement sur la phase stationnaire, les constituants de l'échantillon sont élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque.
- ✚ Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant. Cette vitesse dépend d'une part à des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, et d'autre part à sa solubilité dans la phase mobile (la hauteur variant en fonction du composé et du solvant).
- ✚ Généralement en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapide que les composants polaires (l'existence de groupements OH libre sur la phase stationnaire) donc le composé montera haut s'il a peu d'interactions avec le support ou bien s'il a une forte affinité pour le solvant (Fig.III.13) .

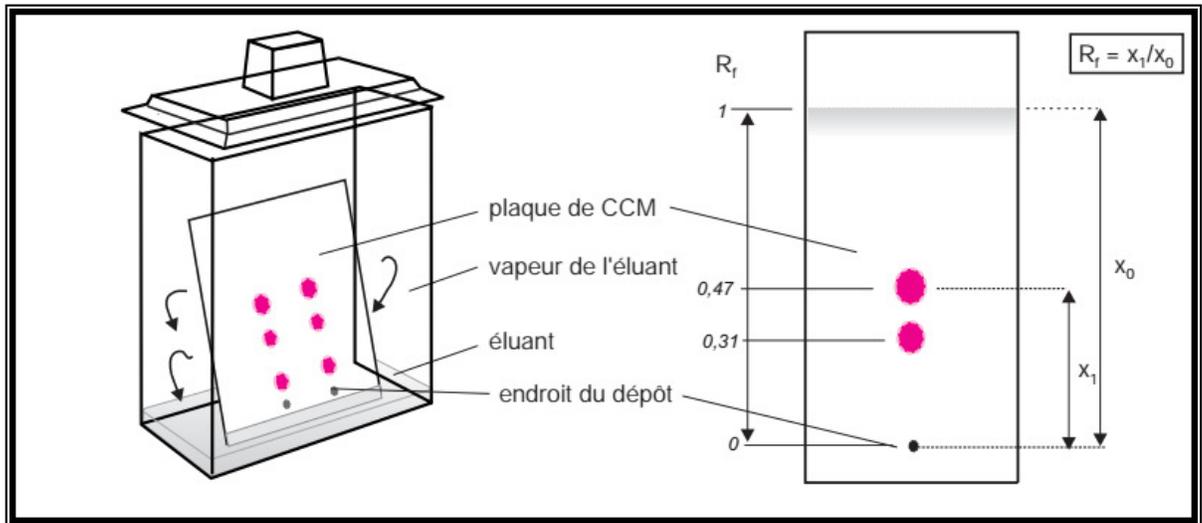


Figure III. 13. Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.

III.4.2.2. Matériel

🧪 Cuve chromatographique

Un récipient habituellement en verre, se forme variable, fermé par un couvercle étanche (pour saturer la cuve avec l'évaporation de solvant et pour éliminer l'interaction avec l'atmosphère extérieur) (Fig.III.14) .

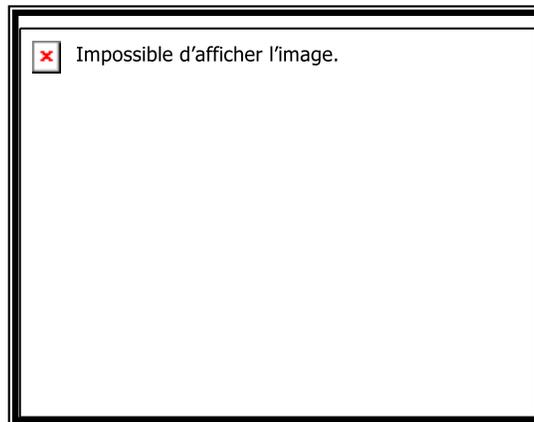


Figure III. 14 : Cuve chromatographique

✚ Phase stationnaire

Une couche d'environ 0.25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de paris), d'amidon ou un polymère organique. Cette couche mince est simplement séchée ou peut subir d'autre traitement, comme une cuisson qui permettent de maintenir sa cohésion ou de l'activer.

✚ Echantillon

Environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

✚ Eluant

Un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

III.4.2.3. Conduite de la chromatographie (les étapes de séparation)

- ✚ On trace à l'aide d'un crayon à la pointe émoussée une ligne horizontale située à une distance de 1 à 2 cm du bord inférieur de la plaque en faisant attention à ne pas rayer le support.
- ✚ On marque les emplacements de dépôts à effectuer ; ils doivent être espacés d'au moins 2 cm. Le dépôt des échantillons à séparer est l'étape la plus délicate ; il s'effectue à l'aide d'un capillaire.
- ✚ On dépose quelques microlitres d'échantillon et l'on sèche. La zone de dépôt doit être aussi petite que possible, inférieur à 5 mm
- ✚ La phase mobile choisie pour le développement dépend de la nature de l'adsorbant et de celle des molécules.
- ✚ La phase mobile est versée dans la cuve et on laisse les vapeurs de solvant saturer la cuve.
- ✚ La plaque est placée verticalement dans la cuve contenant la phase mobile, la cuve doit rester immobile tout le temps du développement.
- ✚ La migration du solvant s'effectue de façon ascendante, le solvant montant par capillarité, la ligne supérieur d'imbibition de la plaque est appelée front de solvant.

III.4.2.4. Techniques de révélation (visualisation des substances séparées)

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier).

Lorsque les composants de l'échantillon analysés sont colorés (chlorophylle, xanthophylle...) leur séparation est observable sur la plaque (donc on mesure le R_f directement).

Dans le cas contraire. On doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

✓ Utilisation d'un réactif spécifique de coloration (méthode chimique)

✚ Les acides aminés : ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet.

✚ Les halogénoalcane: le nitrate d'argent.

✚ Les acides organiques : indicateurs colorés. Apparaissent comme des taches jaunes sur fond vert par simple pulvérisation d'un indicateur de pH : le vert de bromocresol.

✚ Les sucres : réactif de molisch qui utilise le pouvoir réducteur de sucre (réactif à base d'aniline).

✓ Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate

Donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques :

✚ L'iode: on plonge la plaque dans un bocal contenant un fond d'iode broyé. Les composés apparaissent sous forme des taches brunâtres.

✚ Le permanganate: la plaque peut être plongée dans une solution de permanganate de potassium: une espèce incolore qui réagit avec le permanganate donne une tache blanche ou jaune sur un fond rose.

✓ La plaque contient un indicateur fluorescent

On expose la plaque à un rayonnement UV et les composés sont relevés sous forme des taches sombres.

✓ Les UV (254 nm)

En exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés (systèmes conjugués ou aromatiques) apparaissent sous forme des taches brillantes (Fig.III.15) .

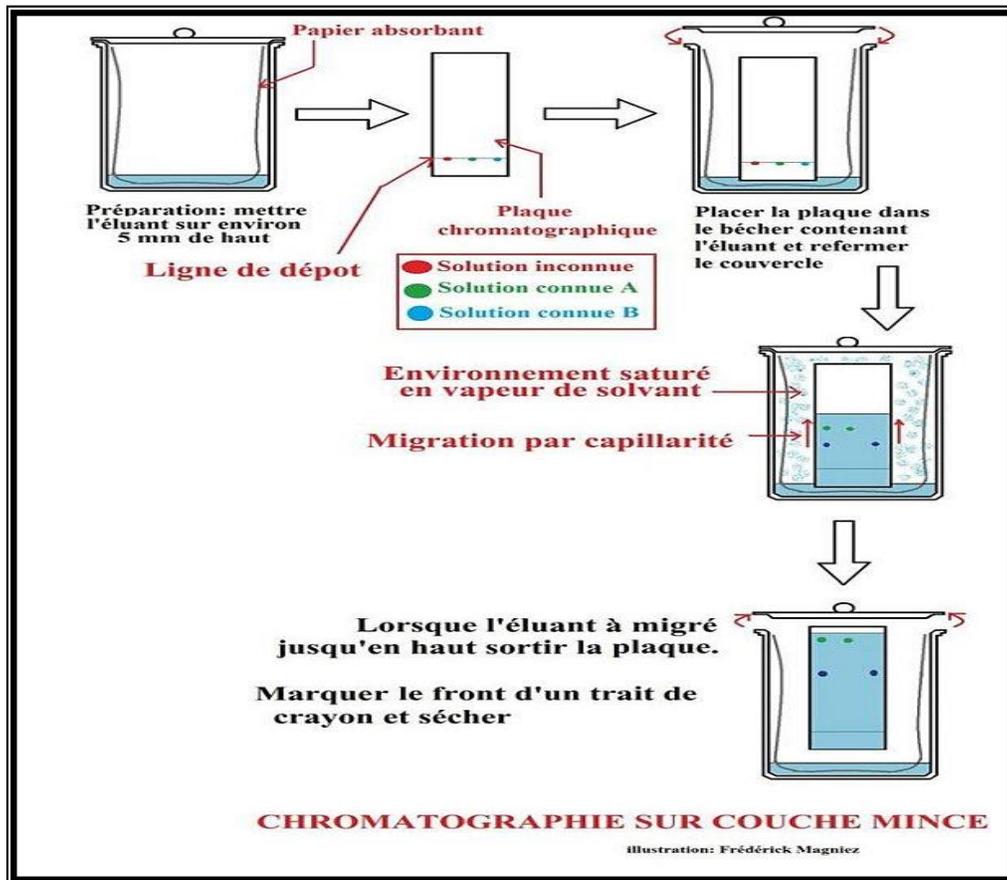


Figure III. 15 : Description d'une analyse par CCM

III.4.2.5. Analyse qualitative

- ✚ L'analyse qualitative par CCM repose sur les calculs de R_F .
- ✚ Si les témoins sont placés à côté de l'échantillon, les taches ayant parcouru la même distance sont des substances de la même nature que les constituants de l'échantillon).

III.4.2.6. Analyse quantitative

Pour valider une méthode de dosage par CCM il faut non seulement disposer d'un moyen de quantification des taches, mais aussi définir les paramètres habituels (spécificité, étendue du domaine de linéarité, précision...). Dans ce but, la plaque à examiner est déplacée sous l'optique d'un densitomètre (ou scanner) qui mesure soit l'absorption soit la fluorescence à une ou plusieurs longueurs d'onde. Cet appareil conduit à un pseudochromatogramme comportant des pics dont on peut mesurer les aires. Il s'agit en fait d'une image isochrone de

la séparation à l'instant final. En CCM il suffit de quelques ng d'un composé absorbant dans l'UV pour former une tache décelable.

III.4.2.7. Applications

Séparation des molécules de petites tailles comme : acides aminés, acides gras, les sucres simples, les pigments, médicaments.

- ✚ C'est une technique de haute sensibilité elle est indiquée pour séparer les substances de faible volume.
- ✚ La CCM est employée dans des divers domaines : chimie, biochimie, biologie, agroalimentaire, environnement, pharmaceutique, clinique, toxicologie....., elle permet la séparation et l'analyse de nombreuses substances comme les lipides, les acides organiques, les carbohydrates, les peptides, les phénols, les colorants naturels et synthétiques, les vitamines et les composants inorganiques.
- ✚ Elle permet un contrôle, aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, si l'analyte, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.
- ✚ La CCM indique le nombre de composants d'un mélange. On peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

III.5. Chromatographie sur colonne

III.5.1. Chromatographie d'exclusion

III.5.1.1. Principe

Le terme d'exclusion moléculaire qui est aussi synonyme de gel filtration, gel perméation ou de tamisage moléculaire, est utilisé pour désigner la séparation des molécules de tailles différentes par des composés organiques polymériques capables de s'hydrater de manière importante et de donner grâce à un réseau tridimensionnel particulier une matrice poreuse appelée gel. Ce gel, commercialisé sous forme de billes ou de grains, constitue la phase stationnaire.

Dans ce type de chromatographie, les particules les plus larges sont complètement exclues, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas pénétrer dans la phase stationnaire, elles passent entre les grains de polymère. Au contraire, les petites molécules sont

distribuées entre la phase mobile et la phase stationnaire puisqu'elles peuvent diffuser dans les pores du gel, ce comportement ne fait pas partie de l'exclusion moléculaire (Fig. III.16).

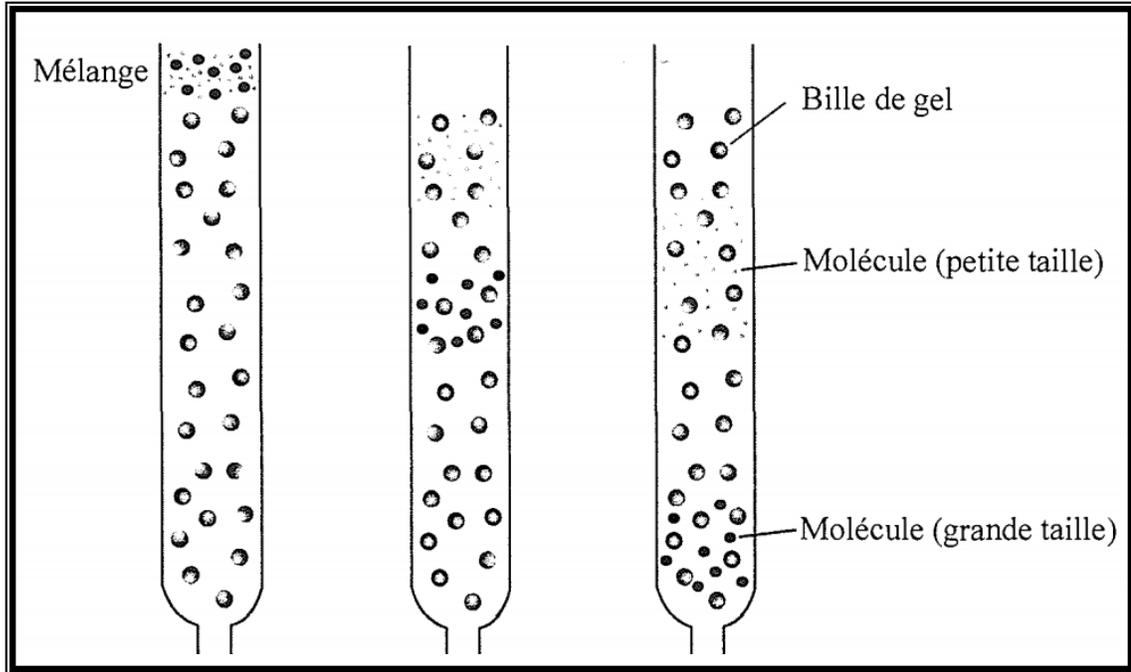


Figure III.16 : Tamisage moléculaire

III.5.1.2. Types de gels

Le support solide est constitué de polymères, dont les chaînes sont plus ou moins pontées pour varier la taille des pores, et qui gonflent en se remplissant d'eau. Les matériaux principaux sont :

✚ Le dextrane

Sous son nom commercial de Sephadex; il s'agit de polyglucose, obtenu par fermentation d'une solution de saccharose par *Leuconsostoc mesenteroides*). Il ne peut en général pas avoir des pores très gros.

✚ Le polyacrylamide

Il est fabriqué par polymérisation linéaire d'acrylamide. Il donne un gel très solide capable de contenir des pores de grande taille. Ce produit est commercialisé sous le nom de Bio-gel P.

✚ L'agarose

Est un polymère linéaire de D-galactose et d'anhydro-3,6 galactose, connu sous le nom de sepharose ou Bio-gel A (Tab.III.01) .

Tableau III.1: Les différents types de gel et leur capacité de rétention.

Type de gel	Capacité de rétention (Da)
Dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1000-5000
Sephadex G-75	3000-70000
Sephadex G-200	5000-800000
Polyacrylamide	
Bio-gel P2	200-2000
Bio-gel P6	1000-6000
Bio-gel P-150	15000-150000
Bio-gel P-300	60000-400000
Agarose	
Sepharose 2B	2 000000-2500000
Sepharose 4B	300000-3000000
Bio-gel A-0,5M	30000-500000
Bio-gel A-15M	30000-15000000
Bio-gel A-150M	5000000-15000000

III.5.1.4. Détermination de la masse molaire d'une molécule

Un mélange de molécules que l'on appelle standards, de masses molaires connues, est séparé par chromatographie de filtration sur gel:

✚ Chaque molécule est éluée avec un volume d'éluion V_e .

- ✚ Par ailleurs, le volume d'exclusion du gel (V_0) est le volume d'élution d'une molécule non retardée par le gel, c'est-à-dire une molécule de taille supérieure à celle des billes et qui n'y diffuse pas.
- ✚ Enfin, le volume total du gel (V_t) est la somme du volume des billes et du volume externe aux billes : il est donné par le volume d'élution d'une molécule qui diffuse totalement dans les billes et qui est donc totalement retardée.
- ✚ On définit le coefficient de partition :

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

- ✚ On trace la droite étalon : $\log(\text{masse molaire}) = f(K_d)$
- ✚ On détermine le volume d'élution d'une molécule X dans les mêmes conditions de chromatographie que pour le mélange des standards
- ✚ On reporte le K_D de la molécule X sur la partie linéaire de la droite étalon et ainsi on détermine sa masse molaire (Fig.III.17).

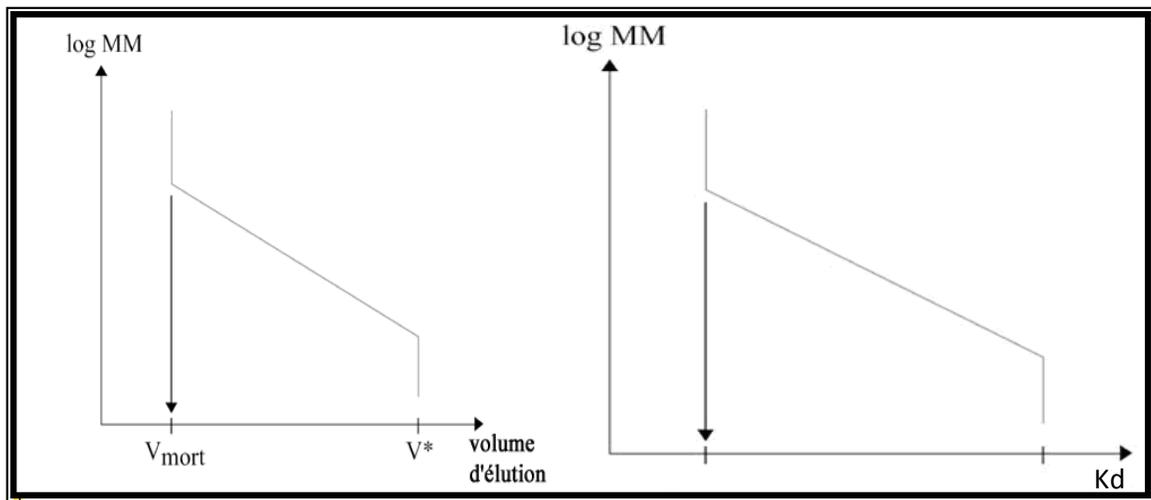


Figure III.17 : Variation de la masse molaire en fonction de K_d et V_e

III.5.1.5. Applications

Les applications de l'exclusion moléculaire sont très diverses :

- ✚ Purification de protéines, peptides, polysaccharides, hormones, cofacteurs, acides nucléiques.
- ✚ Détermination du poids moléculaire puisque le volume d'élution est approximativement une fonction linéaire du log(poids moléculaire) dans la zone de séparation (domaine d'application).
- ✚ Concentration : les substances de haut poids moléculaire peuvent être concentrées par addition de gel sec (Sephadex G25 par exemple) qui en s'hydratant absorbe les petites molécules (solvant).
- ✚ Dessalage : une colonne de gel (Sephadex G25) sépare les substances de haut poids moléculaire éluées dans le volume d'exclusion, des sels qui sont retenus. Cette méthode s'applique aux acides nucléiques, protéines et polysaccharides.

III.5.2. Chromatographie d'échange d'ions

De nombreuses substances biologiques (amino-acides, protéines, ...) possèdent des groupes ionisables et peuvent ainsi avoir une charge nette positive ou négative. Les substances ainsi chargées peuvent être séparées des mélanges grâce à l'utilisation d'échangeurs d'ions.

III.5.2.1. Principe

Cette technique de chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaire. Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie.

Le principe est simple : une colonne est composée d'une résine chargée soit positivement (pour séparer des anions) soit négativement (pour séparer des cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.

III.5.2.2. Différents types d'échangeurs d'ions

Il existe deux types d'échangeurs d'ions, nommés échangeurs cationique et anionique. Les échangeurs cationiques possèdent des groupes chargés négativement qui attirent les molécules positivement chargées. Ces échangeurs sont aussi appelés échangeurs acides puisque leur charge négative résulte généralement de la protolyse de groupe acide. Les échangeurs anioniques sont chargés positivement et sont capables d'attirer les molécules chargées négativement. Le terme d'échangeur basiqué est aussi utilisé pour décrire ces échangeurs dans la mesure où les charges positives résultent de la fixation de protons par des groupes basiques.

- ✚ Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:
 - ✓ Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quel que soit le pH).
 - ✓ Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
 - ✓ Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).
 - ✓ Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).

- ✚ Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- ✓ Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
- ✓ Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

Les échangeurs d'ions sont des billes qui portent des groupements ionisables dont la charge est positive ou négative (Fig.III.18 et Tab.III.02).

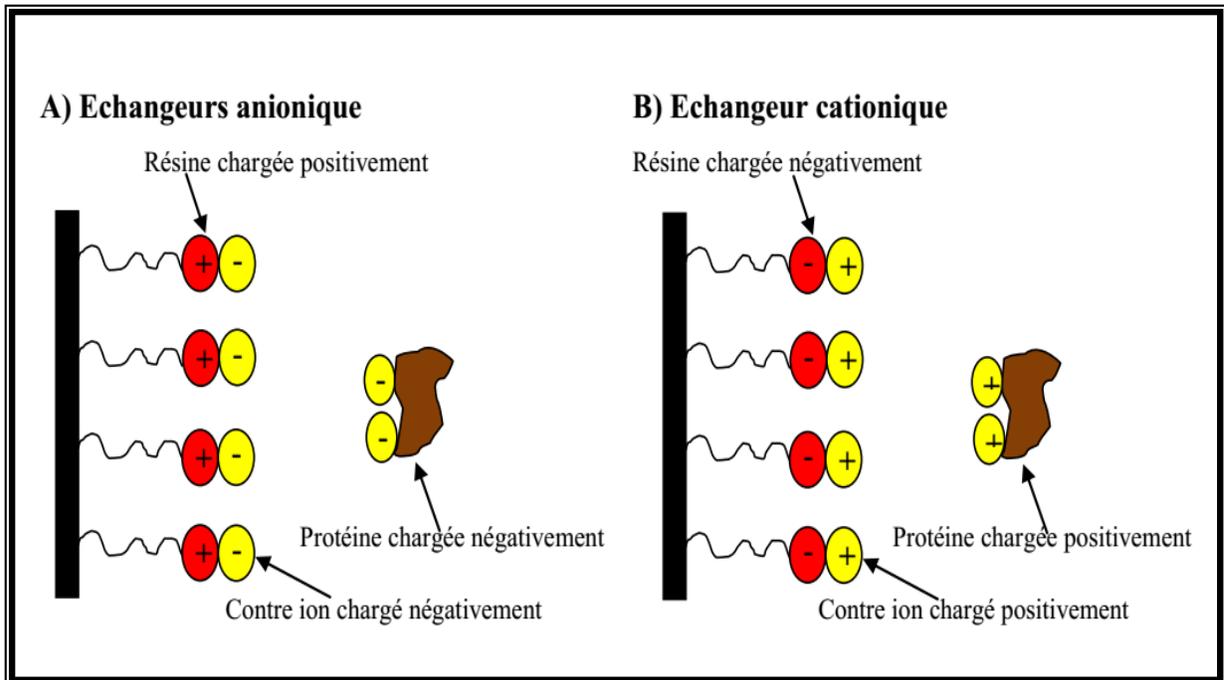


Figure III.18. Les différents types d'échangeurs ioniques.

Tableau III.02 : Exemples des échangeurs ioniques

Type	Polymère	Groupe	Produits commerciaux
Faiblement acide (cation)	Acide polyacrylique	$-\text{COO}^-$	Amberlite IRC50 Bio-Rex 70
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2 \text{COO}^-$	CM-Sephadex Cellex-CM
	Agarose	$-\text{CH}_2 \text{COO}^-$	CM-Sepharose
Fortement acide (cation)	Polystyrène	$-\text{SO}_3^-$	Amberlite IR120 Bio-Rad AG50 Dowex 50
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	SP-Sephadex
	Agarose	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	DEAE-Sepharose
Faiblement basique (anion)	Polystyrène	$-\text{CH}_2 \text{N}^+\text{HR}_2$	Amberlite IR45 Bio-Rad AG3 Dowex WGR
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	DEAE-Cellulose Cellex D
	Agarose	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	DEAE-Sepharose
Fortement basique (anion)	Polystyrène	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Amberlite IRA 401 Bio-Rad AG1 Dowex 1
	Polystyrène	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Amberlite IRA410 Bio-Rad AG2 Dowex 2
	Cellulose ou Dextran	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	QAE-Sephadex Cellex T

III.5.2.3. Applications

La chromatographie par échange d'ions s'applique à un grand nombre de molécules biologiques chargées. Les acides nucléiques sont séparés sur échangeur anionique.

Certains polysaccharides et peptidoglycanes selon leurs charges sont aussi retenus. Les protéines sont stables dans un domaine étroit de pH, aussi l'échangeur sélectionné doit opérer dans ce domaine. Généralement si l'analyte est plus stable au-dessous de son point isoélectrique, il a une charge nette positive, et un échangeur cationique doit être utilisé. De même si l'analyte est plus stable au-dessus de son point isoélectrique (charge nette négative) un échangeur anionique doit être mis en œuvre. Pour les substances stables dans un large domaine de pH, les deux types d'échangeurs peuvent être utilisés.

III.5.3. La chromatographie d'affinité

III.5.3.1. Principe

Cette chromatographie exploite les propriétés des interactions biologiques afin de séparer et de purifier les substances. En conséquence, la chromatographie d'affinité est théoriquement capable de permettre une purification à partir de mélanges complexes et ceci en une seule étape. Cette technique a été à l'origine développée pour la purification d'enzymes. Depuis, elle a été étendue aux acides nucléiques, aux immunoglobulines, aux récepteurs membranaires et même aux cellules et à des fragments cellulaires. Cette technique nécessite que le matériel à isoler soit capable de se lier réversiblement à un ligand spécifique, lequel est attaché à une matrice insoluble.

Dans des conditions normales, seul l'analyte doit se lier au ligand. La méthode demande une connaissance de la structure et de la spécificité biologique de l'analyte à purifier. Dans le cas d'enzyme, le ligand peut être un substrat ou un inhibiteur réversible ou encore un activateur. La réussite de la purification, liée à la formation réversible du complexe.

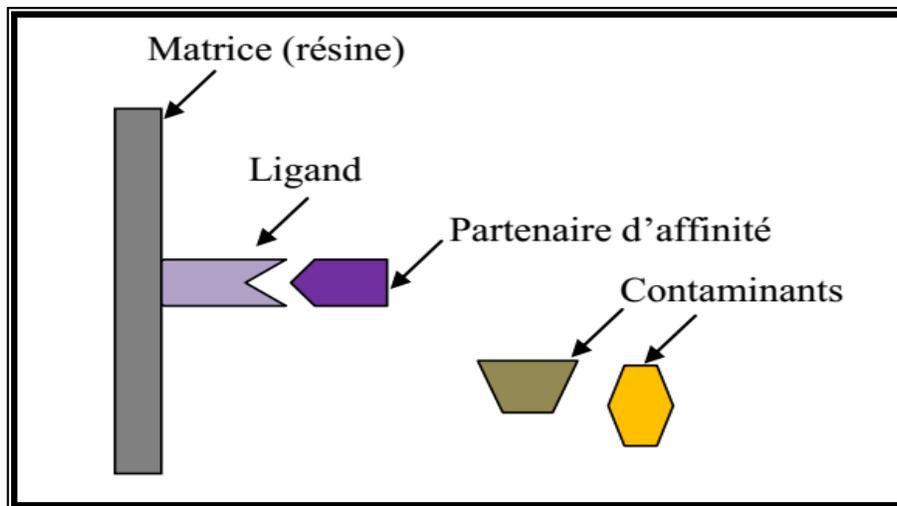


Figure III.19. Principe de la chromatographie d'affinité.

III.5.3.2.Support

Les particules uniformes, sphériques ou rigides peuvent être utilisées. Les dextrans réticulés (Sephacryl), l'agarose (Sepharose), les gels de polyacrylamide (Bio-Gel P) constituent les exemples les plus communs.

III.5.3.3. Mode opératoire

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur le support. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité. On y fait passer la solution aqueuse contenant la substance à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. Des lavages successifs permettent d'éliminer toute trace de produits indésirables. Enfin, on élue la substance retenue en décomposant le complexe (Fig.III.20).

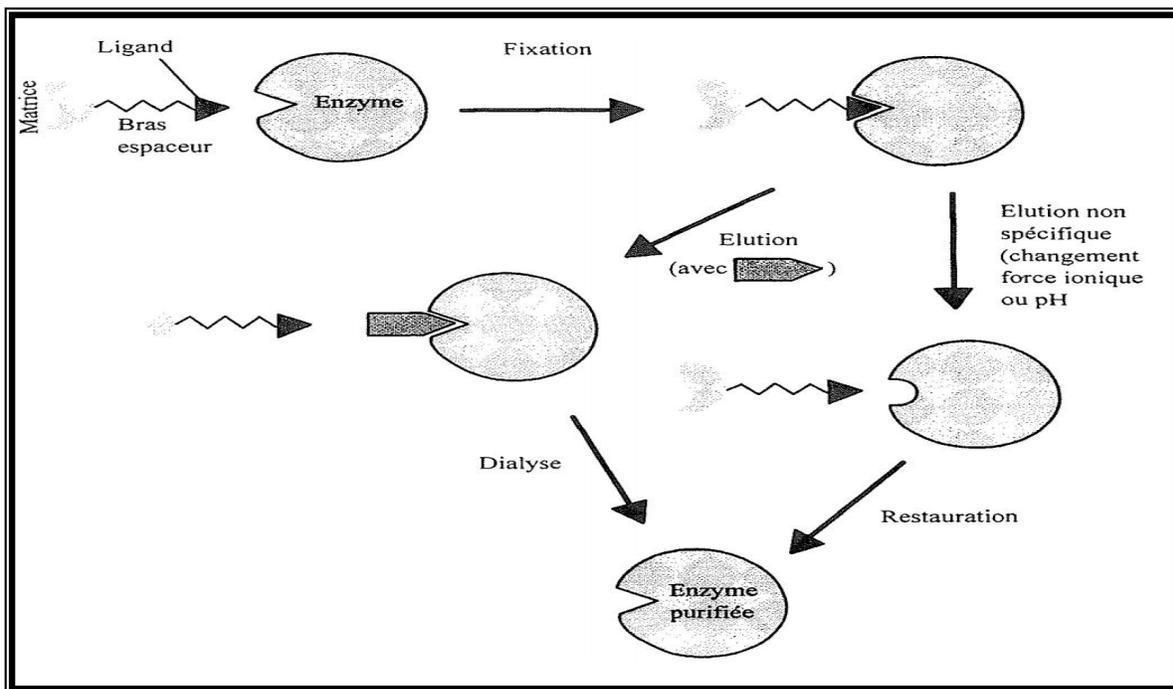


Figure III.20 : Les différentes étapes d'une chromatographie d'affinité.

L'éluion de la macromolécule fixée est effectuée soit spécifiquement (avec un compétiteur) soit non spécifiquement. Dans ce dernier cas le changement du pH peut être effectué par addition d'acide acétique dilué ou de NH₄OH. Il en résulte un changement de l'ionisation des groupes du ligand affaiblissant l'interaction entre le ligand et la macromolécule cible. Dans de nombreux cas, la variation de pH provoque un changement de conformation de la macromolécule cible qui lui fait perdre son affinité pour le ligand. Il est nécessaire après éluion de restaurer l'activité biologique de la macromolécule en dialysant par exemple.

Le changement de la force ionique constituant l'autre alternative, est très souvent effectué avec un éluant contenant 1 M NaCl.

Dans le cas de l'éluion spécifique, on utilise des substrats ou des inhibiteurs réversibles (si la macromolécule est une enzyme par exemple). On choisit généralement des compétiteurs ayant une affinité supérieure à celle présentée par le ligand immobilisé. Le tableau suivant présente quelques gels d'affinité commerciaux et leurs applications.

Tableau III. 3 : Quelques gel d'affinité commerciaux

Ligand	Macromolécules purifiées
2', 5' ADP	Déshydrogénases à NADP
Poly (A)	RNA à séquence poly (U). Protéines spécifique à RNA (polymérase).
Concanavoline A	Glycoprotéines, glycopeptides, glycolipides, fragments membranaires.
Protéine A (protéine de la paroi du staphylocoque doré)	IgG.
Lectine (<i>Triticus vulgare</i>)	Macromolécules et cellules contenant du N-acétyl(β-glucosamine).

III.5.3.4. Applications

La chromatographie d'affinité est adaptée, soit à l'analyse, soit à la préparation de substances biologiques. Elle a été utilisée en:

- ✚ Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- ✚ Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- ✚ Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- ✚ Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

III.5.4. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

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.

C'est une méthode de séparation analytique dont développement de phases stationnaires a permis de représenter les différents types de la chromatographie conventionnelle (chromatographie dite basse pression). L'HPLC n'est pas un nouveau type de chromatographie mais résulte de l'aboutissement des progrès de l'instrumentation en ce sens qu'elle met en oeuvre des pressions de pompage élevées, des colonnes de microparticules qui minimisent le temps des cinétiques d'absorption, de partage, d'exclusion ou d'affinité des molécules tout en augmentant la vitesse de flux de la phase mobile.

III.5.4.1. Principe

Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc 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. La migration forcée d'une phase liquide au contact d'une phase stationnaire se retrouve dans plusieurs techniques chromatographiques. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes

d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage.

III.5.4.2. Appareillage

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement.

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux) (Fig.III.21).

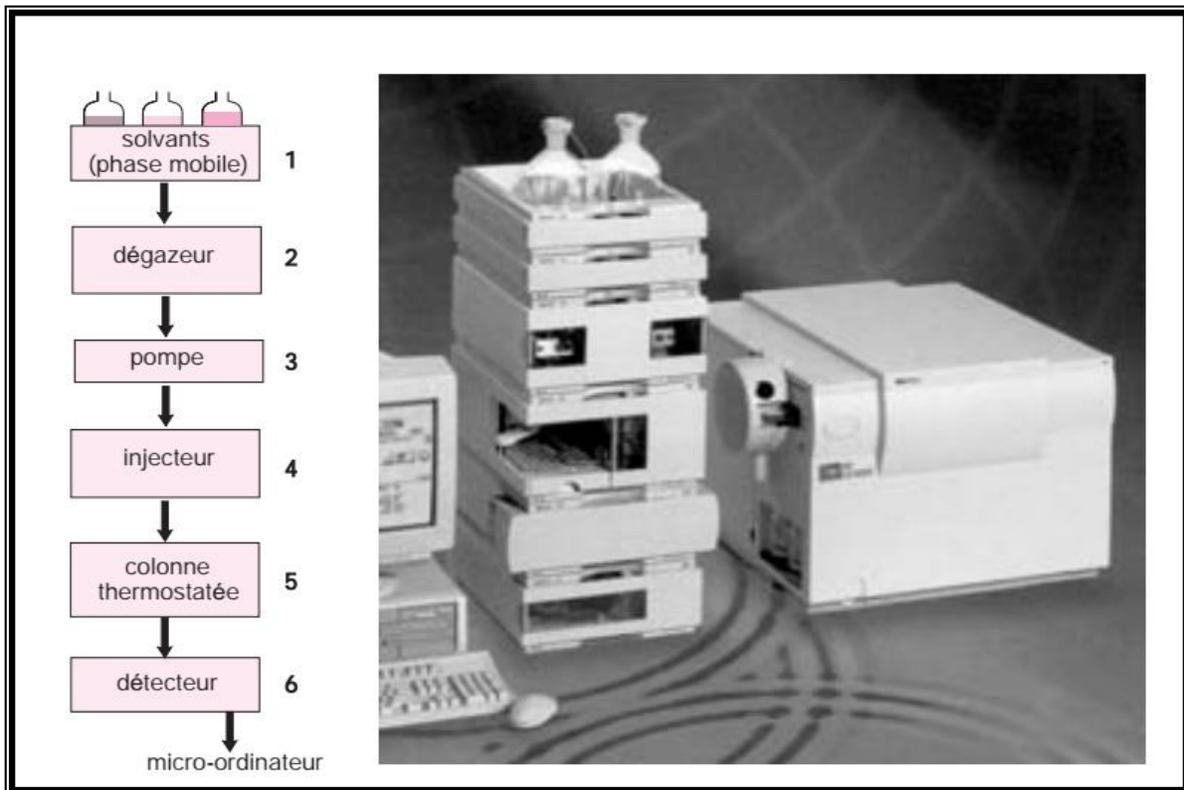


Figure III.21: Schéma d'une installation de HPLC

✚ Le réservoir de la phase mobile

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion (mélange

de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé.

La pompe

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars). Selon la phase mobile on distingue deux types de chromatographie :

- La chromatographie isocratique où la composition de la phase mobile est maintenue constante pendant la séparation (Fig III. 22) .
- La chromatographie en gradient où la composition de la phase mobile varie progressivement ou par paliers (Fig III. 23) .

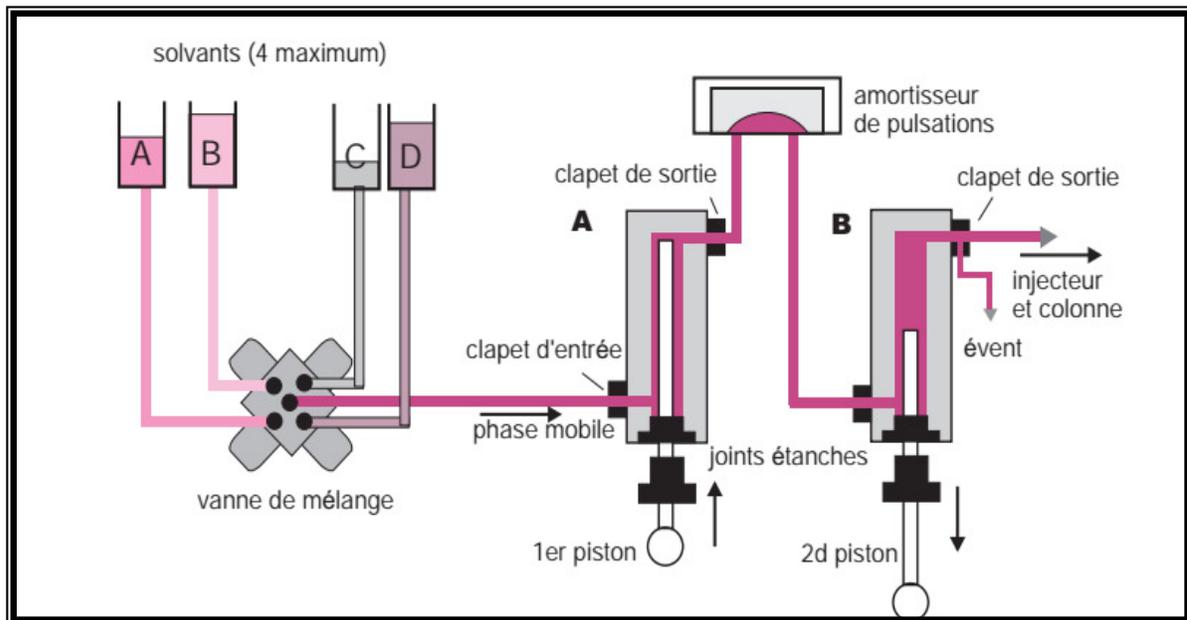


Figure III. 22 : Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

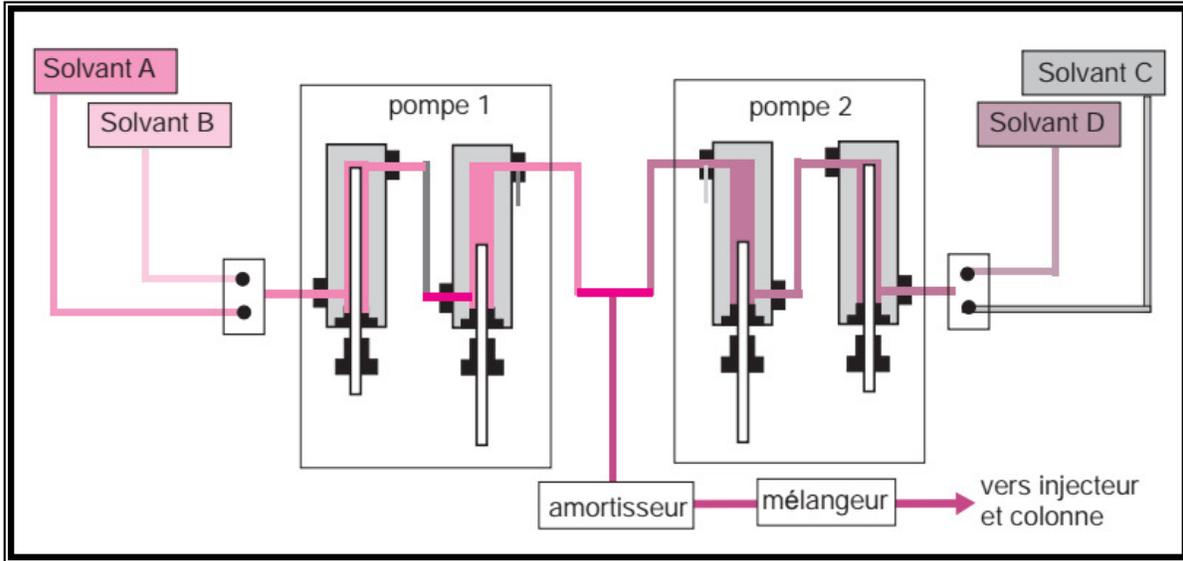


Figure III.23 : Exemple de configuration pour gradient haute pression.

✚ L'injecteur

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- ✓ Manuelle : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile (FigIII.24).
- ✓ Automatique : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne (FigIII.25).



Figure III.24 : Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties

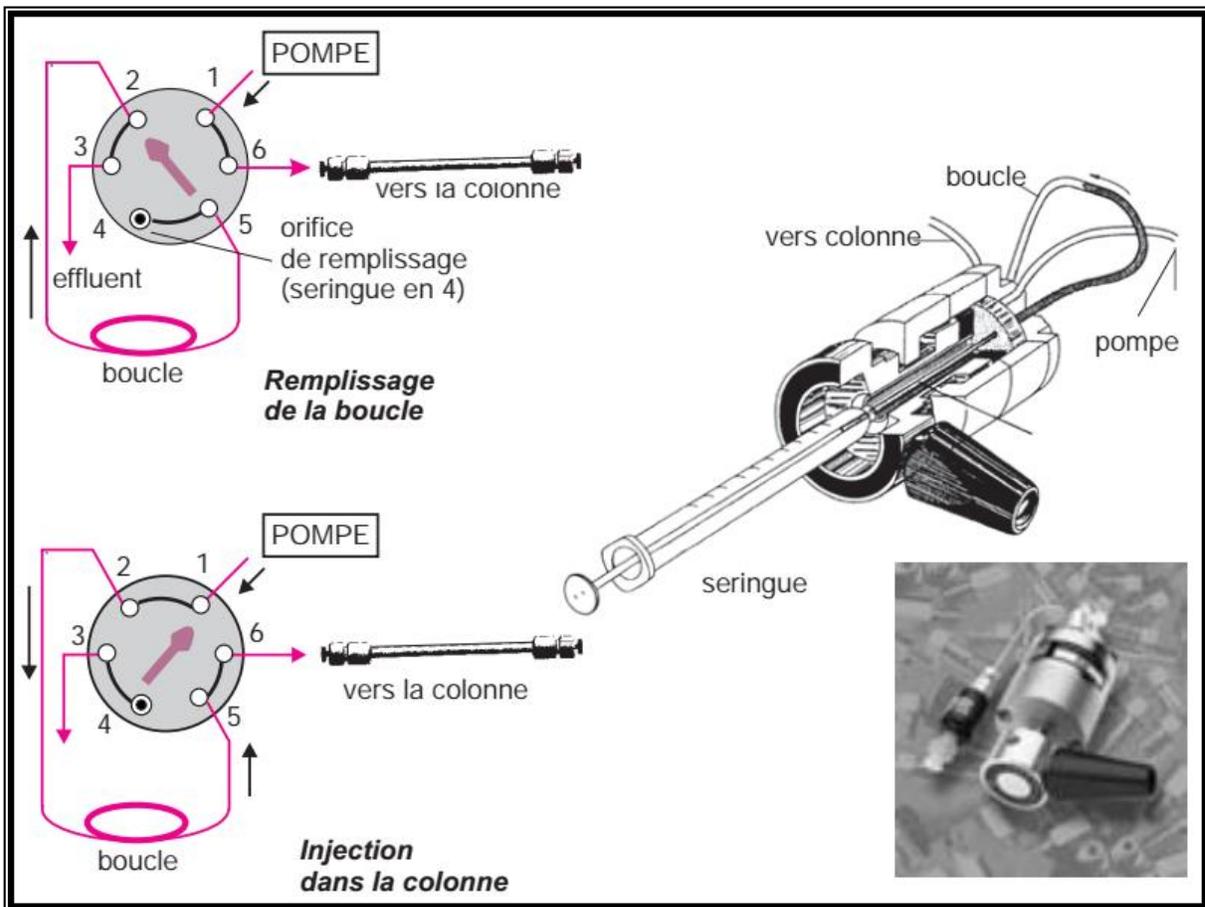


Figure III.25 : Injection avec une boucle.

✚ La colonne

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm, sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées narrow-bore (DI 2-4 mm), micro-bore (DI 1-2 mm), capillaires remplis (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse (FigIII.26).

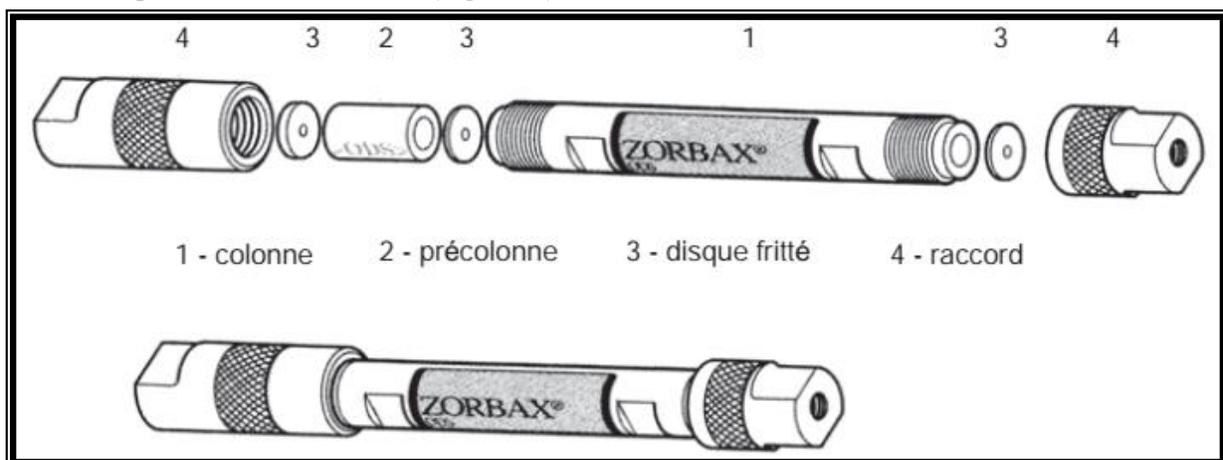


Figure III.26 : Colonne standard et précolonne de CLHP.

✚ Phases stationnaires

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe.

Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le gel de silice tient une place prépondérante

✚ Le détecteur

Les systèmes de détection doivent avoir une sensibilité suffisamment haute et stable pour mesurer une quantité d'échantillon appliquée sur la colonne souvent très faible. En outre, cette détection se faisant dans une cellule de faible volume nécessite une énergie lumineuse

importante. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- ✓ La variation de température
- ✓ La pression
- ✓ L'instabilité électronique

III.5.4.3. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne

L'efficacité de la colonne

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques.

Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L , la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. Il existe une équation dite équation de Knox en chromatographie liquide à haute performance qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile. L'efficacité N traduit la finesse des pics.

$$\text{HEPT} = H = L / N$$

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux :

- ✓ De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.

- ✓ De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- ✓ Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande.

Dans le cas où les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon la relation:

$$N = 16(tr/\omega)^2$$

Si les pics sont non symétriques:

$$N=5,54 (tr/ \omega 1/2)^2$$

Avec :

Tr : temps de rétention.

ω : largeur de pic à la base.

$\omega 1/2$: largeur de pic à mi-hauteur.

La résolution R_s

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention.

La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (tr_2 - tr_1) / (\omega 1/2(1) + \omega 1/2(2))$$

Avec :

Si $R_s < 1$: une mauvaise résolution.

Si $1 < R_s < 1,5$: une résolution acceptable.

Si $R_s \geq 1,6$: une bonne résolution.

Si $1,4 < R_s < 1,6$: une résolution optimale.

- ✓ Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics: la distance séparant les sommets de deux pics mesurés par les temps de rétention tr_2 et tr_1 .
- ✓ La largeur des pics à la base $\omega 1/2$ (pic1) et $\omega 1/2$ (pic2).

✚ La Sélectivité α

On définit la sélectivité α d'une séparation par le rapport de facteur de distribution (k_1 et k_2) de deux solutés. Plus k est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

La valeur de k dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

α est égale à 1 lorsque n'a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs.

✚ Les grandeurs de rétention

✓ Temps de rétention

Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté t_r et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'éluion et de la nature de colonne utilisée.

Le temps de rétention t_r d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part. A un instant t , le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et à la concentration C_s dans la phase stationnaire, leur rapport est appelé coefficient de partage noté K .

$$K = C_s / C_m$$

Le coefficient de partage dépend de trois types d'affinités : la première celle entre le soluté et la phase mobile, la deuxième entre le soluté et la phase stationnaire, la troisième entre les deux phases. La surface ou la hauteur du pic chromatographique est proportionnelle à la masse ou à la concentration du produit injecté.

✓ Temps mort

Le temps mort est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté t_m ou t_0 et exprimé en minutes.

$$t_m = t_0 = L / V$$

Avec:

L : la longueur de la colonne.

V : la vitesse de la phase mobile.

✓ **Volume de rétention**

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Il est lié au temps de rétention **tr** d'un soluté et au débit d'écoulement de la phase mobile **D**. Le volume de rétention est noté **Vr**.

$$V_r = t_r \cdot D$$

✓ **Facteur de rétention k'**

Le facteur de rétention **k'** représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de **k'** différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de **tr** et deux valeurs de **k'** différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire.

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

III.5.4.4. Optimisation d'une méthode HPLC

Réussir une bonne séparation des mélanges en un temps court par une méthode HPLC nécessite une optimisation de plusieurs paramètres. La géométrie de la colonne, le débit, la température, la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire sont des paramètres qui influent énormément sur le temps d'élution et la résolution en chromatographie.

Les objectifs de l'optimisation d'une méthode HPLC sont divers, les plus importants sont :

- ✓ La réduction du temps d'analyse ;
- ✓ L'augmentation de la résolution entre les analytes ;
- ✓ La réduction des coûts d'analyse;

- ✓ La réduction des quantités de solvant ;
- ✓ L'augmentation de la durée de vie du matériel.

III.5.4.5. Validation d'une méthode HPLC

En industrie pharmaceutique, l'interprétation des données issues des résultats de contrôle d'un produit pharmaceutique par HPLC ne serait fiable que si la méthode utilisée est valide, or toute valeur expérimentale est entachée d'une incertitude de mesure qui limite l'applicabilité de la méthode utilisée.

En effet, la validation d'une méthode de contrôle d'un médicament par HPLC garantit que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront suffisamment proches de la vraie valeur.

La validation analytique d'une méthode HPLC repose sur l'étude de plusieurs paramètres conformément aux normes nationales et internationales.

III.5.4.6. Chromatogramme

Sur le chromatogramme, chaque pic correspond à un produit détecté. Un pic idéal a une forme de Gaussien. Le chromatogramme fournit une information qualitative : le temps de rétention (ce temps est identique pour un produit dans des conditions identiques) et une information quantitative : la surface et la hauteur des pics qui sont proportionnelles à la quantité de produit. Afin de pouvoir doser un produit, il faut faire une courbe de calibration : quantité de produit en fonction de la surface du pic.

III.5.5. La chromatographie sur colonne en phase gazeuse (CPG)

Cette technique, appelée aussi GLC (gaz liquide chromatography), est basée sur la répartition des analytes entre un liquide et une phase gazeuse. Elle est largement utilisée aussi bien comme méthode qualitative et quantitative d'un grand nombre de analytes du fait de sa haute sensibilité, de sa reproductibilité et de sa rapidité. C'est la technique appropriée pour la séparation d'analytes à faible polarité.

La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone qui imprègne une matrice solide, inerte et granuleuse. L'ensemble est contenu dans une colonne d'acier ou de verre de 1 à 3 m de long (généralement enroulée sur elle-même) et de 2 à 4 mm de diamètre. La phase mobile est constituée d'un gaz vecteur inerte comme l'azote, l'hélium ou l'argon. La colonne est maintenue à une température élevée par l'intermédiaire d'un four. Sous l'effet de la température les analytes sont volatilisés et peuvent être séparés. La base de cette séparation correspond à la différence des coefficients de partage des analytes volatilisés entre la phase liquide et la phase gazeuse.

III.5.5.1. Principe d'une installation de CPG

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre (Fig.III.27).

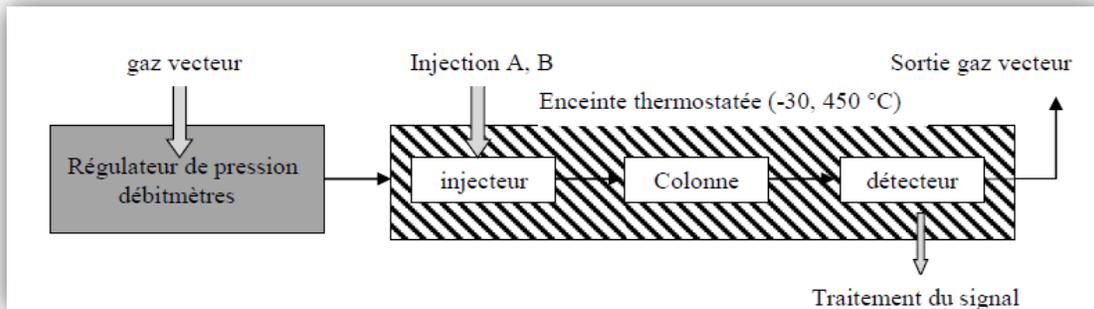
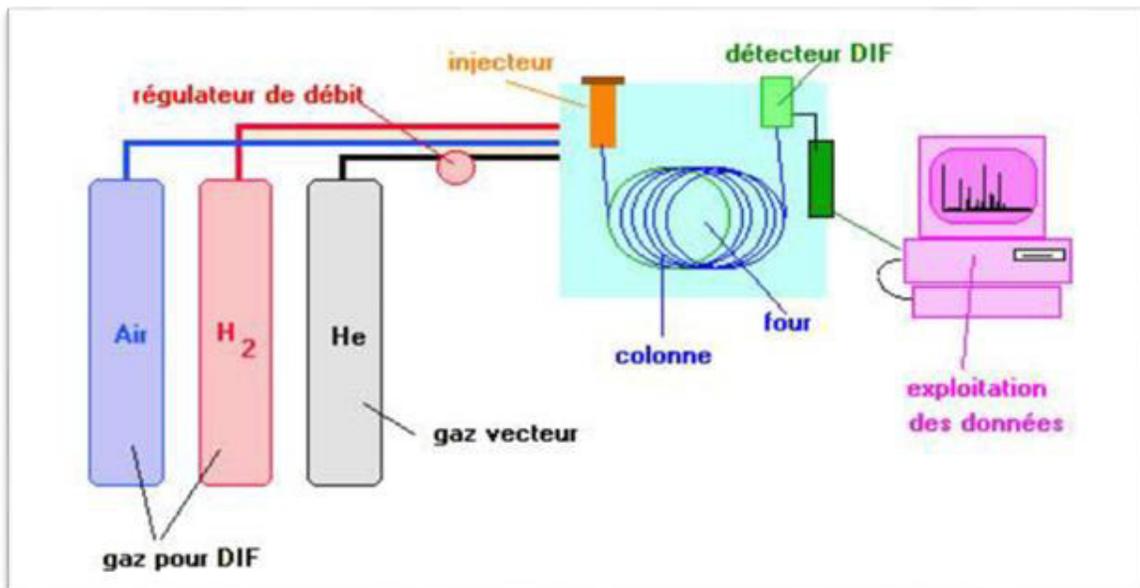


Figure III.27 : Principe de CPG

III.5.5.2. Description d'un chromatographe

Les appareils de chromatographie gazeuse sont appelés chromatographes (Fig.III.28). Ils sont principalement composés :



FigureIII.28 : Un chromatographe de CPG

III.5.5.2.1. Gaz

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H₂ et séparation de l'air pour N₂), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe. La principale propriété des gaz vecteurs est leur insolubilité dans les liquides. Leur signal électrique n'apparaîtra pas sur le chromatogramme.

III.5.5.2.2. Injecteur

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur.

Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

- ✚ Le gaz porteur, de préférence préchauffé, entre dans une chambre chauffée, obturée par une pastille d'élastomère, le septum, qui assure l'étanchéité.
- ✚ A l'aide d'une seringue hypodermique de petite capacité, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection (Fig.III.29).

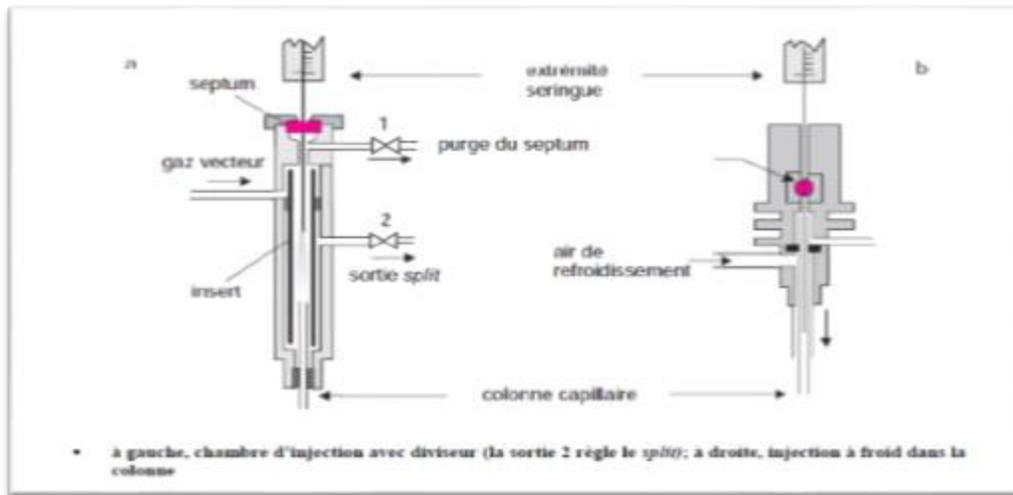


Figure III.29: injecteur

III.5.5.2. 3. Colonne

La colonne est placée dans un four pour maintenir une température suffisante afin de garder les solutés en phase gazeuse pendant l'analyse. Elle peut être métallique, en plastique pour des séparations à basse température, en verre. Diverses formes ont été utilisées : rectilignes, en U, en spirales (la plus répandue).

Il existe deux types de colonnes, les colonnes remplies (ou colonnes à garnissage) et les colonnes capillaires. Elles n'offrent pas les mêmes performances. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne (Fig.III.30).

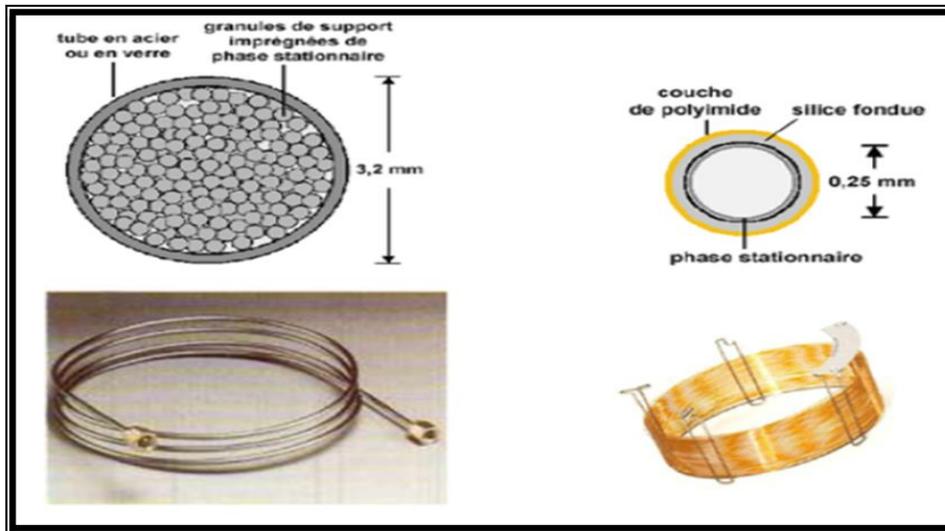


Figure III.30: Colonnes remplies et capillaires utilisées en CPG

III.5.5.2.4. Le four

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « isotherme ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « gradient ».

III.5.5.2.5. Détecteur

Certains détecteurs sont universels, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules.

- ✚ Détecteur à conductibilité thermique (TCD) : Ce détecteur universel, son principe repose sur la mesure des variations de conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition. Il s'agit d'un catharomètre comportant deux thermistors identiques, placés dans deux minuscules cavités d'un bloc métallique thermostaté à une température supérieure à celle de la colonne. L'un d'eux est baigné par le gaz vecteur prélevé en amont de l'injecteur et l'autre par le gaz vecteur en aval de la colonne.
- ✚ Détecteur à ionisation de flamme (FID) : Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible entre deux électrodes. L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable.
- ✚ Détecteur à photo-ionisation (PID) : Ce détecteur assez sélectif mais peu répandu, convient aux hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques. La collecte des électrons libérés par une électrode reliée à la borne d'un électromètre permet des mesures de concentrations.
- ✚ Détecteur thermoionique NPD: Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice

- ✚ Détecteur à photo-ionisation: pour les dérivés aromatiques. Les composés à analyser sont ionisés par un faisceau UV. Des électrodes collectent les ions formés
- ✚ Un MS : spectromètre de masse, utilisant principalement l'impact électronique ou l'ionisation chimique comme modes d'ionisation.

III.5.5.3. Analyse qualitative en CPG

La nature des composants est donnée par le temps au bout duquel apparaît le pic (temps de rétention). C'est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. Pour mettre en relation le temps et la nature chimique, on se sert d'un échantillon de référence (témoins).

L'identification des composés dont les temps de rétention sont voisins et les spectres de masse presque identiques (certains types d'isomères) est évidemment difficile. Une méthode actuelle consiste à choisir un standard interne ou un composé dont on sait qu'il est présent dans tous les échantillons à analyser et par l'intermédiaire du logiciel d'analyse on bloque la valeur de son temps de rétention pour les différentes analyses, mêmes si elles sont effectuées avec des appareils différents. Ceci a pour effet de conserver également les temps de rétention des autres composés du mélange, facilitant leur identification. Cette approche qui évite de recourir aux indices de rétention est possible avec les appareils modernes.

III.5.5.4. Analyse quantitative en CPG

Une fois identifiée les solutés intéressants, le chromatogramme permet aussi une analyse quantitative grâce à la mesure de l'aire des pics on utilise essentiellement la triangulation ;

III.5.5.5 Applications

La CPG est la chromatographie la plus utilisée pour les analytes non polaires, volatiles et qui ne nécessitent pas de dérivation., en particulier, l'acides gras, d'acides aminés, d'oses, de stéroïdes, de toxiques, de médicaments...

IV. Electrophorèse

IV.1. Principe

L'électrophorèse est une technique d'analyse repose sur la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Beaucoup de molécules biologiques comme les acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, ... possèdent des groupes ionisables et existent en solution en tant qu'espèces chargées, soit à l'état cationique (+) soit à l'état anionique (-).

Dans un champ électrique généré par un courant continu, les espèces anioniques se déplacent vers l'anode (+) tandis que les espèces cationiques vers la cathode (-). La force électrique F s'exerçant sur la particule est :

$$F = Q \cdot E$$

Les forces de frottement, F' , dues à la viscosité (η) vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner ;

$$f = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante ; on peut alors écrire :

$$Q \cdot E = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{soit} \quad v = Q \cdot E / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

On définit pour chaque particule sa mobilité μ , de manière indépendante du champ électrique, par la relation suivante :

$$\mu = v/E \quad (= \text{vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm})$$

$$\text{soit encore: } \mu = Q / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs : q , (η) et r .

Elle est proportionnelle à sa charge (q), inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η) et son rayon (r). La mobilité est une caractéristique de chaque particule, il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

IV.2. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

IV.2.1. Echantillon

La migration étant dépendante du pH, la plupart des analytes peuvent s'apparenter La vitesse de migration augmente avec la charge nette de l'analyte qu'elle soit positive ou négative. La vitesse dépend aussi de la taille des molécules : elle diminue avec des molécules de grande taille, ceci est dû à l'accroissement des forces de friction et des forces électrostatiques exercées par le milieu. Les molécules de tailles similaires mais de formes différentes (protéines globulaires ou fibreuses) ont des migrations très différentes dues aussi aux forces de friction et aux forces électrostatiques.

IV.2.2. Tampon

Il détermine le pH et le stabilise. Toutefois il affecte la migration des analytes et occasionne des phénomènes de diffusion lorsque le ou les analytes sont très solubles dans le tampon. Ces phénomènes de diffusion peuvent être minimisés en appliquant un haut voltage pendant une courte durée au moment du dépôt des échantillons. Le tampon, en contact avec les électrodes, est normalement le même. Toutefois dans certains cas, notamment en SDS-PAGE le tampon d'électrode disposé dans chaque réservoir peut être différent.

IV.2.3. La température

L'augmentation de la température accroît rapidement la conductivité du tampon, ce qui influence par voie de conséquence la force ionique du tampon. Il est alors primordial de

maintenir une T ° constante durant l'expérimentation, et d'utiliser un courant de faible intensité, ce qui réduit la libération de la chaleur dans le bac d'électrophorèse par effet joule.

IV.2.4. La force ionique du tampon

Si la force ionique du milieu augmente, le courant vecteur s'accroît. Le courant transportant l'échantillon diminue. L'augmentation du courant contribue à élever la température. A faible force ionique, la migration de l'échantillon est favorisée et la production de chaleur est réduite, cependant la diffusion et la perte de résolution sont plus élevées. Le choix de la force ionique est un compromis et doit être effectué dans une gamme allant de 0,05 à 0,10 M. La force ionique (Fi) est calculée par :

$$F_i = \frac{1}{2} \sum C Z^2$$

Où C est la concentration molaire de l'ion et Z sa charge.

IV.2.5. Support

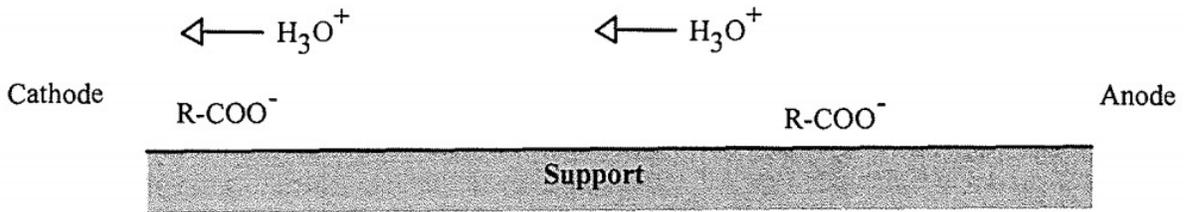
Bien que le support est relativement inerte, il peut occasionner une adsorption, un phénomène d'électrosmose et un tamisage moléculaire. Chacun de ces facteurs influence la vitesse de migration de l'analyte.

IV.2.5.1. Adsorption

C'est une rétention des analytes qui se manifeste par des traînées et donne aux taches (après révélation) la forme de "comète". Ce phénomène se traduit par une perte de résolution et une diminution de la migration.

IV.2.5.2. L'électrosmose

Ce phénomène résulte de l'apparition d'une différence de charge entre les molécules d'eau, du tampon et du support. Cette différence peut être occasionnée par l'adsorption d'ions du tampon sur le support ou la présence de groupes négatifs ou positifs stationnaires sur le support (groupes carboxyles, sulfate, . . .). Il en résulte la formation d'ions hydroxonium due à la neutralisation des charges.



La force faisant migrer les ions hydroxonium vers la cathode peut déplacer des analytes neutres. Ce phénomène se traduisant par une accélération du mouvement des cations et un ralentissement de celui des anions peut facilement être mis en évidence en déposant comme analyte un composé neutre comme l'urée ou le glucose et en examinant un éventuel déplacement.

IV.2.5.3 Tamisage moléculaire

Cet effet est rencontré dans le cas de gel réticulé (agarose, amidon, polyacrylamide). De tels gels possédant une porosité donnée, facilitent la migration des petites molécules mais freinent celle des molécules de grande taille.

IV.2.6. Champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide : on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide : on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte.

Les particules à séparer peuvent être de nature et de taille très différentes : des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines.

IV.2.7. Durée

Le déplacement des molécules est d'autant plus long que le temps de l'opération soit prolongé. Il faut admettre par ailleurs que la prolongation du temps de migration n'améliore en aucun cas la séparation, car la diffusion des solutés sera importante, et de façon irrégulière. En plus, la résolution de l'électrogramme risque d'être compromise.

IV.3. Appareillage

L'électrophorèse se fait dans une cuve d'électrophorèse (faite en matière plastique, transparente ou pas) permet de contenir le tampon de migration tout en le couplant au système électrique (générateur) par le biais d'électrodes, généralement de platine. Cette cuve peut être munie d'un couvercle qui permet d'éviter l'évaporation trop rapide du tampon de migration du à son échauffement durant l'électrophorèse par effet Joule.

Un système de circulation du tampon peut être mis en place pour éviter les problèmes de distribution non homogène des ions au cours de la migration et de trop fort échauffement.

Plusieurs types de matrices solides sont utilisées pour permettre le déplacement des échantillons, il y a celles sur lesquelles la migration se fait à la surface (électrophorèse sur papier, électrophorèse sur acétate de cellulose, etc), et il y a des supports qui forment un gel poreux après gélification (matrice d'agarose, de polyacrylamide, etc) ce qui permet la migration à l'intérieur de la matrice.

Selon le support utilisé, on distingue :

IV.3.1. Montage horizontal

Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande. Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface (Fig III.31).

IV.3. 2. Montage vertical

Utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou, plus rarement d'agarose. Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre. Durant la gélification on aura pris soin de faire des puits où on déposera les échantillons. Chaque extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel (Fig III.32) .

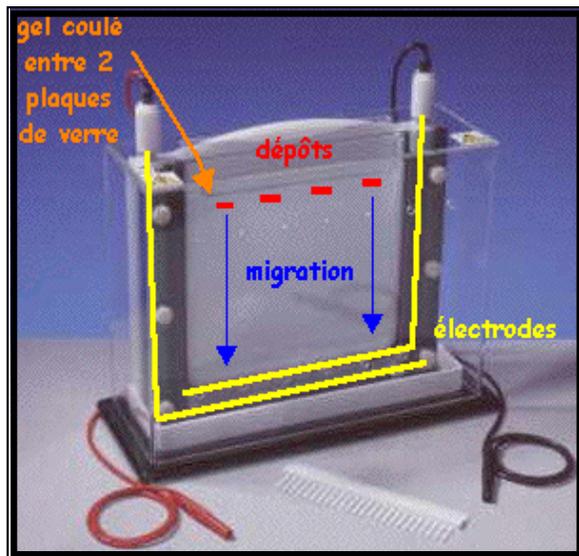


Figure III.31. Montage vertical

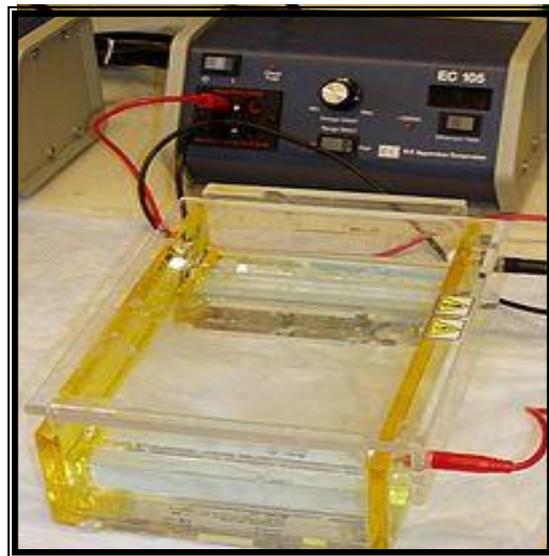


Figure III.32. Montage horizontal

IV.4. Principales matrices d'électrophorèse

IV.4.1. Papier

Ce type de support a permis la séparation d'acides aminés, de peptides, de protéines et de nucléotides. Toutefois, des diffusions considérables se produisant, surtout à bas voltages,

font que ce type de support est de moins en moins utilisé. Le papier Whatman est le plus utilisé.

IV.4.2. Acétate de cellulose

Un dérivé de cellulose qui se présente en bande uniforme n'occasionne qu'une très faible adsorption des échantillons. C'est un support commode pour la séparation de substances radioactives. Par contre, ce support ne se prête pas à un travail préparatif. L'acétate de cellulose est moins hydrophile que le papier et donne une meilleure résolution. En outre, ce type de support présente l'avantage d'être rendu translucide, après séparation et coloration, grâce à un traitement avec une huile appropriée ce qui permet la quantification. L'utilisation de l'acétate de cellulose s'applique aux mêmes substances que celles définies pour le papier. Des applications particulières ont été faites dans le cadre de la biochimie médicale (séparation des protéines du sang par exemple).

IV.4.3. Agarose

C'est un polymère de Galactose et de 3.6 anhydrogalactose, Employé généralement à une concentration allant de 1 % à 3%, l'agarose contient une grande quantité d'eau. Il présente de larges pores qui n'opposent qu'une faible friction aux molécules de poids moléculaire moyen. En conséquence, le mouvement des ions y est très rapide, les phénomènes d'electroosmose demeurent importants notamment si les groupes sulfates n'ont pas été éliminés pendant la préparation de l'agarose. L'agarose se prête bien aux colorations histochimiques une fois la séparation achevée. Ce type de support permet aussi la détection de protéines antigéniques grâce à l'immunoélectrophorèse. Le peu d'effet de tamisage moléculaire a permis l'analyse d'ADN et de produits de restriction (fragments d'ADN) qui a fait de l'agarose le support de choix pour cette technique.

IV.4.4. Amidon

Très rarement employé de nos jours, ce polysaccharide forme avec l'eau une suspension qui, après chauffage à 100 °C puis refroidissement, forme un gel poreux dont les mailles très larges permettent la séparation d'un grand nombre de protéines hétérogènes en faisant intervenir la filtration moléculaire associée à la charge.

IV.4.5. Polyacrylamide

C'est un polymère formé à partir d'acrylamide $\text{CH}_2\text{-CH(-CONH}_2\text{)}$ qui est l'unité de base et de bis-acrylamide (N,N'-méthylène-bis-acrylamide $(\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH})_2\text{CH}_2$) qui est l'agent de pontage. Plus la concentration d'acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et les molécules les mieux séparées seront celles de petits poids moléculaires. Les gels sont caractérisés par un pourcentage d'acrylamide qui varie entre 3 et 30% ce qui permet d'effectuer une séparation de molécules allant d'un poids moléculaire de 10^6 à 10^4 . Cependant, en pratique, on utilise surtout la gamme allant de 4 à 20% puisqu'à 3% un gel reste une pâte aux propriétés mécaniques médiocres et qu'à 30% le gel est opaque et cassant.

IV.5. Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

IV.5.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle.

IV.5.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS (Fig.III.33) est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons : Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres. Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative (Fig.III.34). Les protéines transformées

en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

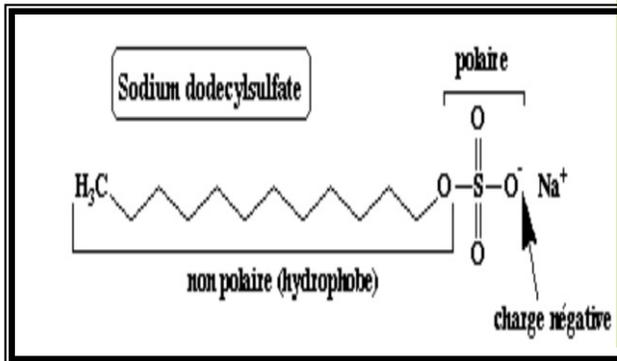


Figure III.33 : Structure chimique du SDS

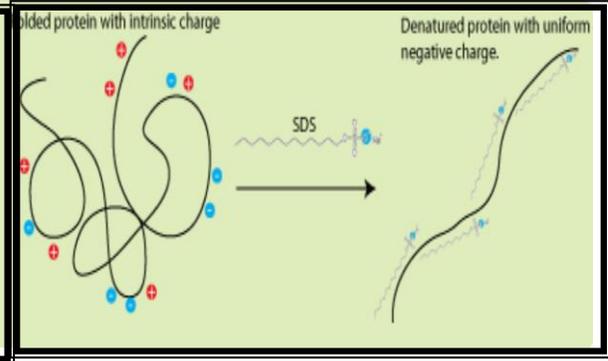


Figure III.34. Action du SDS sur les protéines

Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse

IV.5.2.1. L'électrophorèse libre, en veine liquide

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon de pH et de concentration convenable dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage couteux, mise en œuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules) (Fig III.35) .

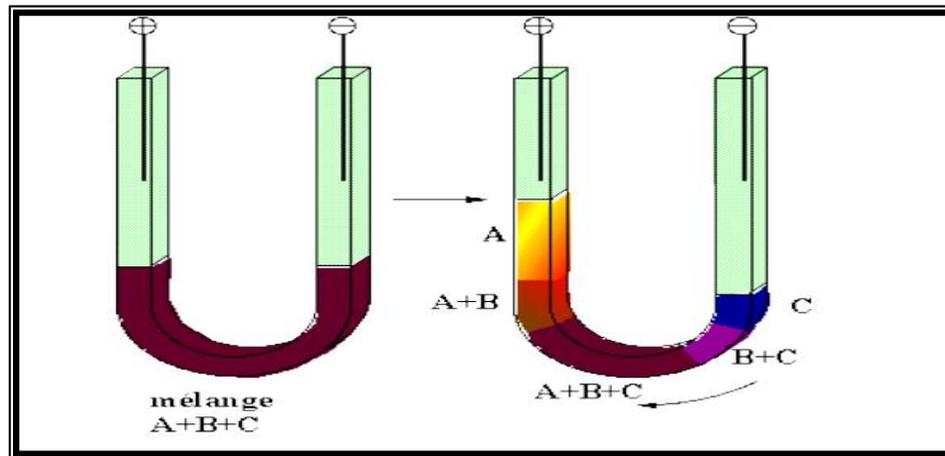


Figure III.35 : appareillage pour l'électrophorèse libre, en veine liquide

IV.5.2.2. Electrophorèse de zone

En électrophorèse de zones, et à la différence de l'électrophorèse liquide, les protéines se déplacent dans un support hydraté solide (ce qui limite la diffusion) et réticulé (effet de tamisage moléculaire). Le grand pouvoir de résolution de cette technique est précisément dû à ce que les protéines sont séparées en fonction de leurs deux caractéristiques physicochimiques les plus importantes : charge électrique nette et encombrement moléculaire.

Depuis les débuts de l'électrophorèse, divers types de supports ont été utilisés : papier, acétate de cellulose, gel d'agar, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, gel de polyacrylamide-agarose, etc. Selon le type de protéine étudié et le type de problème à résoudre, on s'oriente vers le type de support que l'on juge le plus favorable après des essais souvent empiriques. Il est cependant souhaitable de bien considérer les facteurs importants suivants :

- ✚ Pouvoir de séparation.
- ✚ Régularité de la séparation entre les différentes parties du gel.
- ✚ Résistance mécanique (plus grande fragilité des gels d'amidon).
- ✚ Simplicité de préparation (gels de polyacrylamide).
- ✚ Problèmes d'électroendosmose.
- ✚ Répétabilité de la structure (gels commercialisés prêts à l'emploi).
- ✚ Coût et pureté des produits commerciaux disponibles.

✚ Toxicité (acrylamide).

Les supports qui sont actuellement les plus utilisés pour l'étude des protéines sont les gels de polyacrylamide (PAGE) continus ou discontinus, c'est-à-dire avec gel de concentration et gel de séparation. Les bandes d'acétate de cellulose, les gels d'agar (immunoélectrophorèse). L'électrophorèse en gel d'amidon est de moins en moins utilisée mais peut fournir une très bonne résolution avec certaines protéines ou enzymes. Les gels d'agarose sont également utilisés pour l'électrophorèse des acides nucléiques

✚ **Electrophorèse sur papier**

Cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine (Fig III.36).

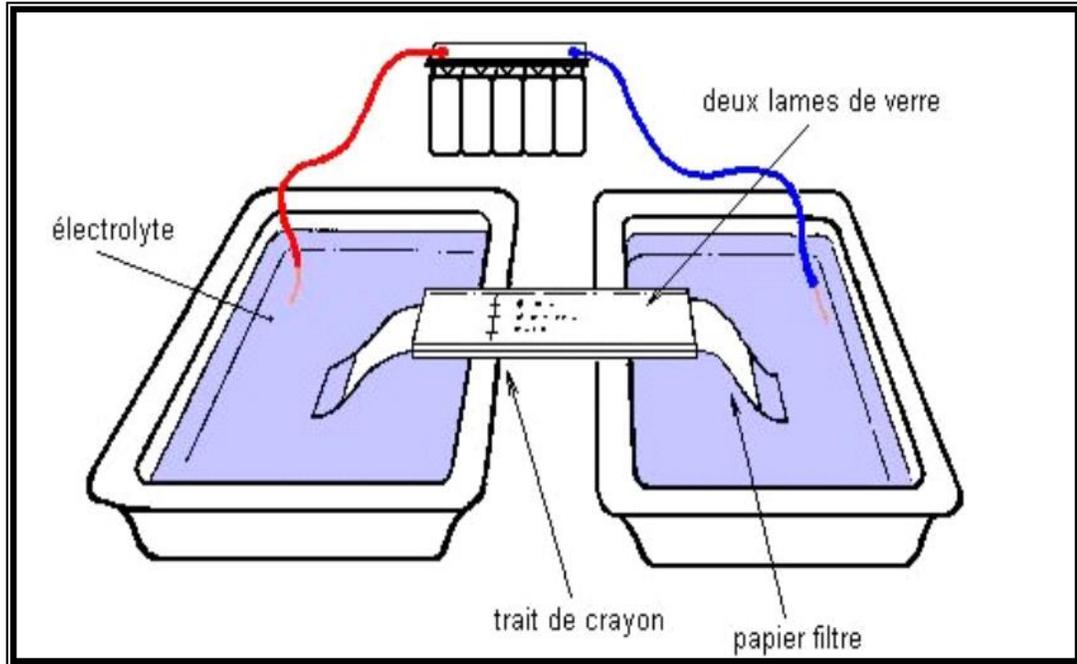


Figure III.36: Appareillage pour l'électrophorèse sur papier.

✚ Electrophorèse sur Acétate de cellulose

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier, la feuille d'Acétate qui remplace le papier filtre offre une résolution des fractions en un temps de migration plus court. On utilise préférentiellement ce support pour la séparation des protéines du sérum et du plasma. La migration est réalisée dans un tampon, en générale à pH 8.6 pendant 30mn, à 230 V, suivie d'une coloration au rouge ponceau. Après décoloration (Acide acétique) et séchage, la bande révèle 5 fractions. Une lecture densitométrique de la coloration de chaque fraction est assurée par un analyseur automatique qui fournit un tracé densitométrique à 5 pics correspondant à l'albumine et aux globulines $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ et γ . La surface de chaque pic est exploitée (planimétrie); les résultats sont donc obtenus en pourcentage de la surface totale et en concentration (g/l) à partir du taux de protéines totales. (Fig. III.37 et Fig III.38)

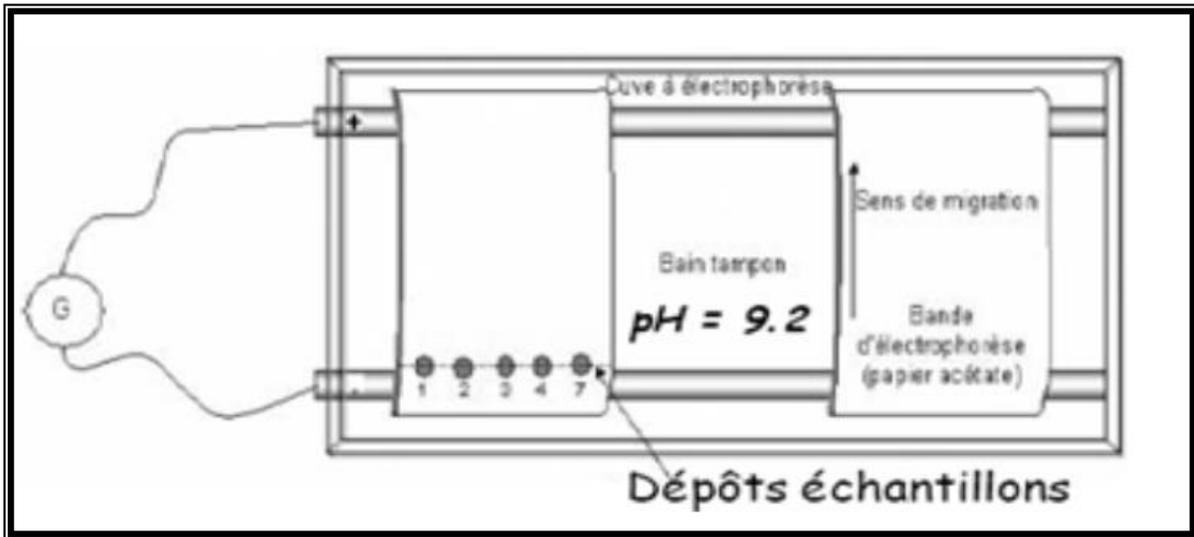


Figure III.37 : Appareillage pour l'électrophorèse sur acétate de cellulose.

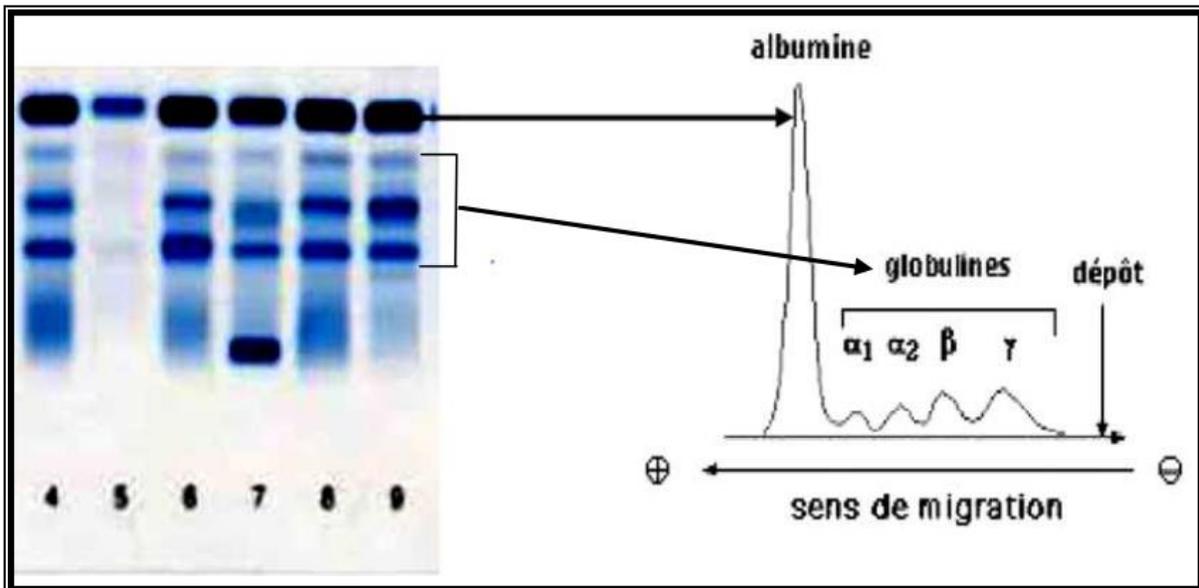


Figure III.38 : Plaque d'acétate de cellulose et profil électrophorétique avec 5 fractions

✚ Electrophorèse sur gel d'amidon

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétique des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes.

✚ Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines. Elle utilisée en biochimie et en biologie moléculaire :

- ✚ Soit à des fins analytiques : pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité,
- ✚ Soit à des fins préparatoires, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng). L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible ; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside. L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (surfusion) Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne font pas tant que la température reste inférieure à 100 °C. D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont

principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (Fig III.39).

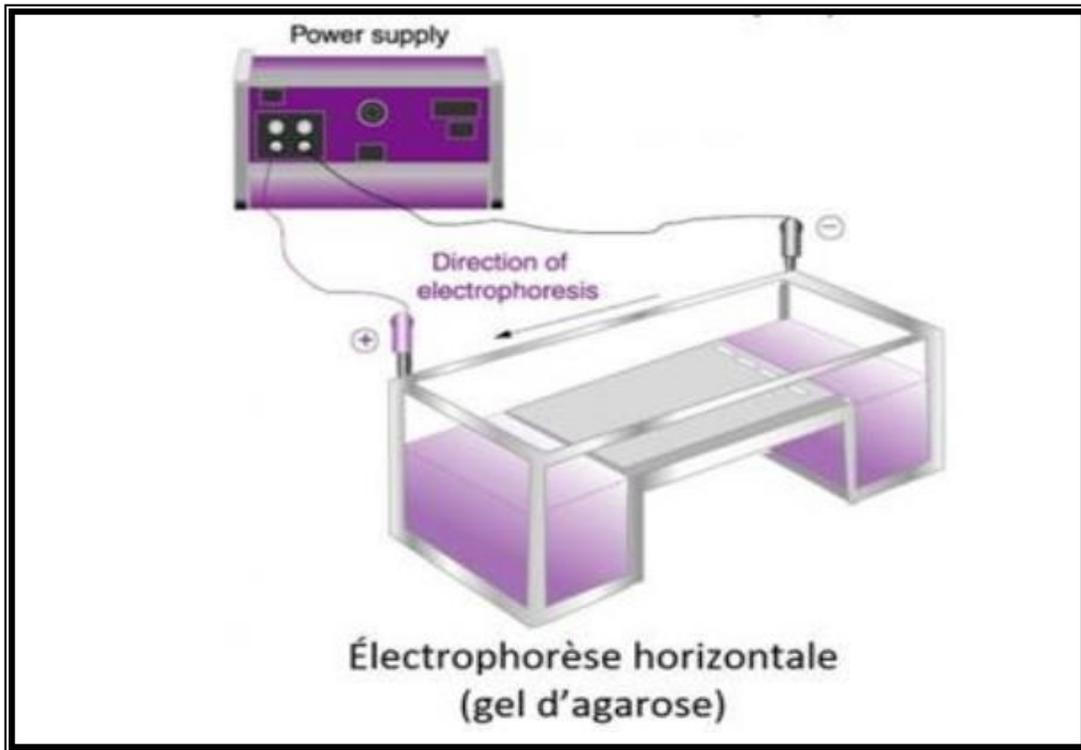


Figure III.39 : Appareillage utilisé pour l'électrophorèse en gel d'agarose.

✚ Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

a) L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Cette technique aussi appelé PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est très utilisée en immunologie, dans l'étude des protéines et également utilisée pour le séquençage de l'ADN.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'acrylamide (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de bisacrylamide qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel. La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs : le

TEMED (N,N,N',N' tetraméthyl-éthylènediamine) et l'ammonium persulfate qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.

Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.

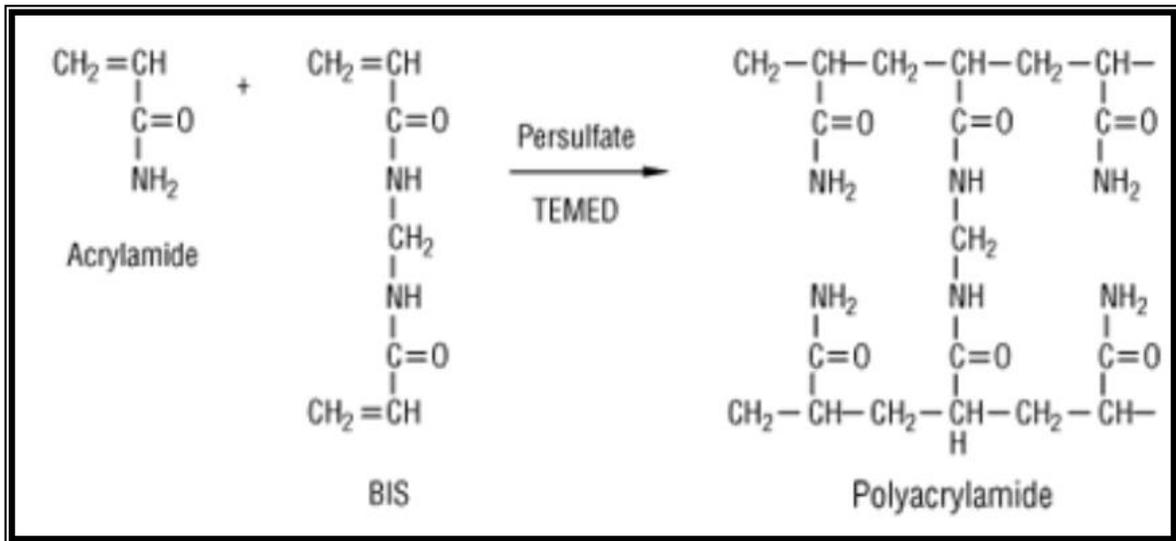


Figure III.40 : Formation du gel de polyacrylamide.

- ✚ Avant que le mélange réactionnel n'ait durci, il est coulé dans un récipient formé par deux plaques de verres et polymérise en une couche mince de gel de quelques Millimètres.
- ✚ Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel.
- ✚ Le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH ~9 pour que toutes les protéines aient une charge négative).
- ✚ Un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées. Les protéines migreront vers l'anode (+) selon leur ratio charge/masse (Fig III.41) .

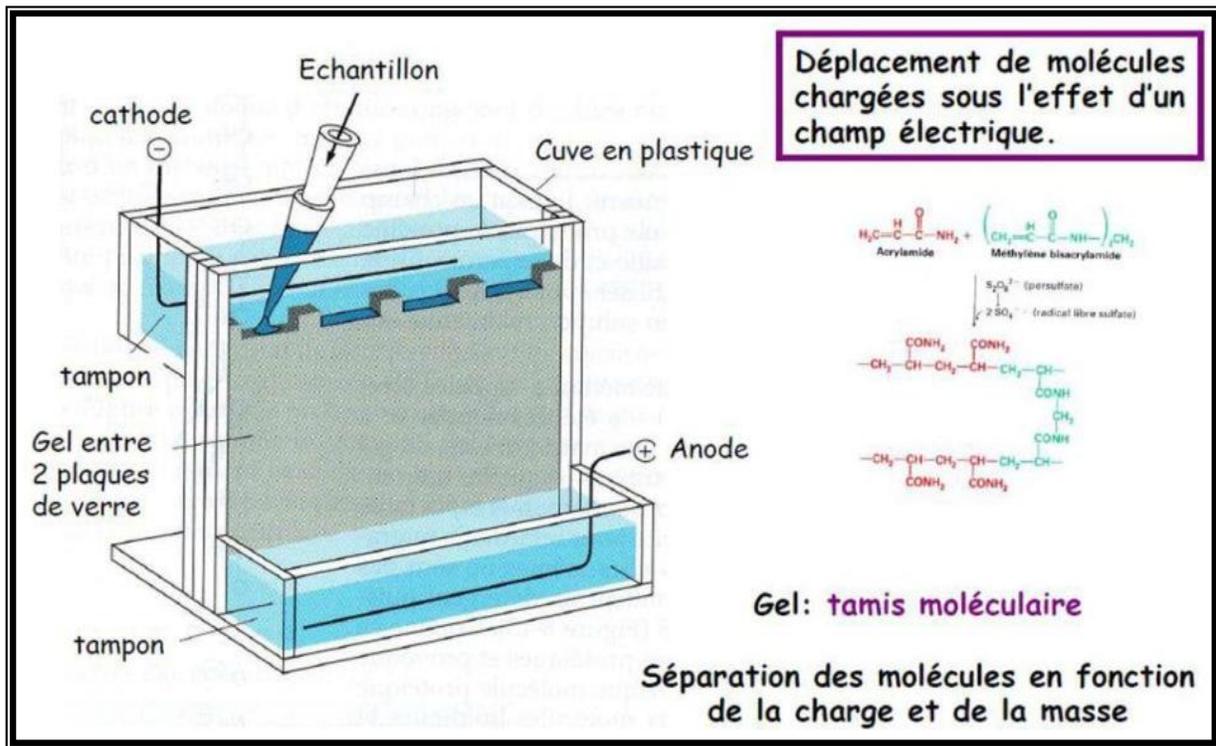


Figure III.41. Electrophorèse PAGE

b) L'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Une variante de cette technique consiste à utiliser du SDS (Sodium Dodécylsulfate) qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

- ✚ Les protéines sont dites dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.
- ✚ Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique. La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines.

- ✚ Par conséquent le rapport charge/masse sera le même pour toutes les protéines de même masse et la séparation électrophorétique du gel avec du SDS dépendra uniquement du phénomène de gel-filtration par les pores du gel.
- ✚ Cette méthode donne la meilleure résolution et les bandes sont les plus résolues de toutes les méthodes d'analyse- en utilisant des marqueurs de poids moléculaires connus.
- ✚ Cette méthode possède deux grands avantages par rapport à l'électrophorèse ordinaire : l'utilisation de SDS dissout les agrégats et les particules insolubles qui peuvent causer des problèmes en bloquant les pores du gel et la mobilité électrophorétique possède une relation directe avec le poids moléculaire.
- ✚ Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est démoulé, séché puis plongé dans un colorant (exp : bleu de Coomassie, nitrate d'argent, bleu noir naphthol...)

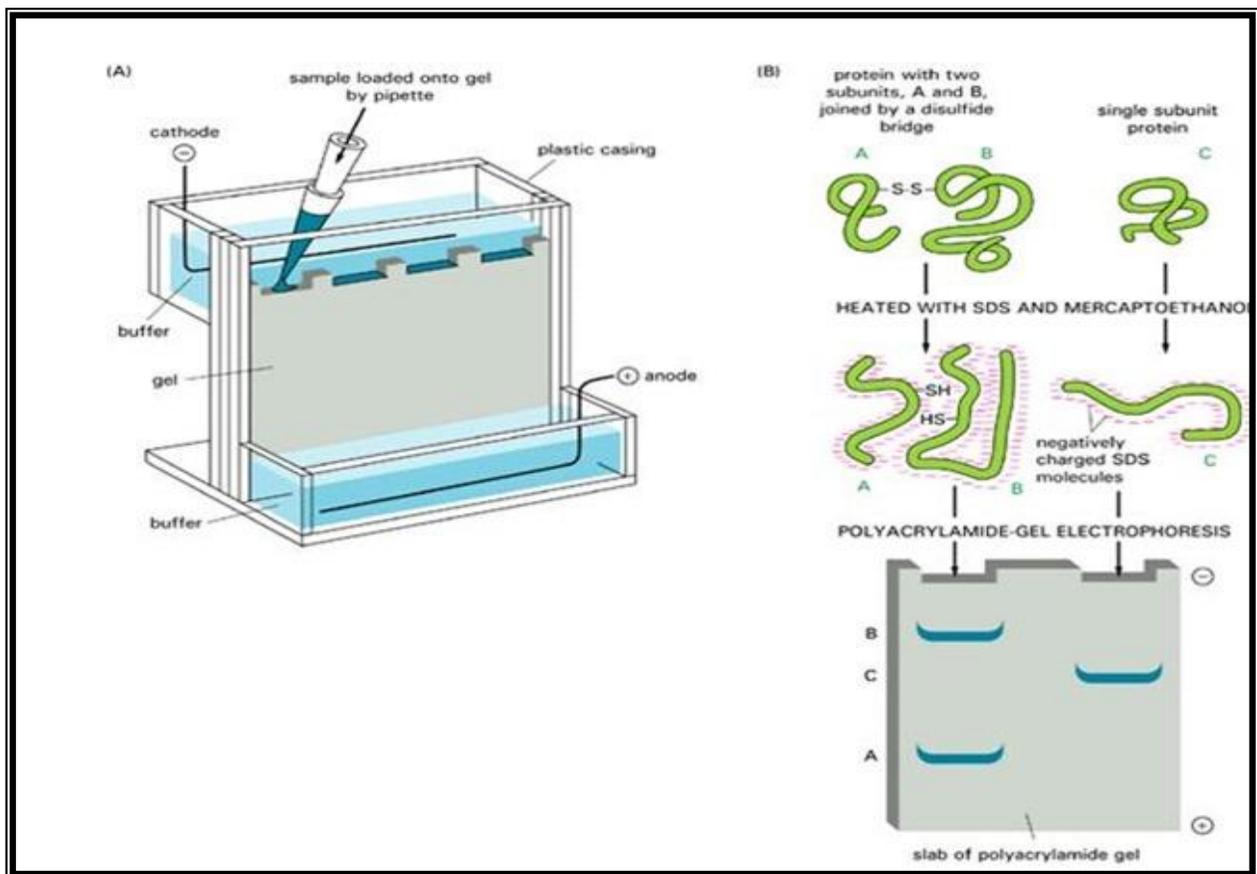


Figure III.42. Electrophorèse SDS-PAGE

✚ Détermination de la masse moléculaire par SDS-PAGE

Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique (R_f) au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue.

Dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement (R_f) et l'extrapolation de ce R_f sur la droite : $\text{Log } M = f(R_f)$, permettent la détermination de sa masse moléculaire (Fig.III.43). A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) on trace la droite d'étalonnage $\text{Log } M = f(R_f)$.

Le rapport frontal (R_f) représente le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration.

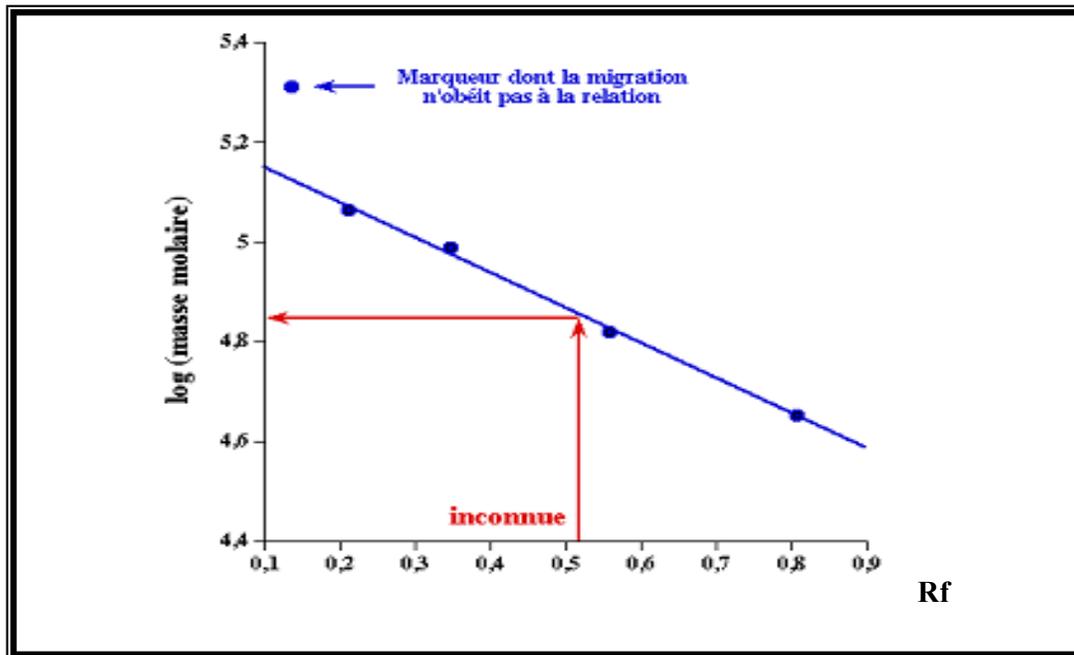


Figure III.43 : Mobilité des protéines en fonction du logarithme de leur masse moléculaire.

IV.5.3. Autres types d'électrophorèse

Il existe d'autres types d'électrophorèse : isoélectrofocalisation, électrophorèse bidimensionnelle, électrophorèse capillaire ; électrophorèse en champ pulsé et immunoelectrophorèse.

IV.5.3.1. Isoélectrofocalisation

La focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (valeur de pH à laquelle la molécule ne présente aucune charge nette).

L'IEF est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles un gradient de pH est préétabli. Le gradient de pH est réalisé en imprégnant le gel avec un mélange de substances amphotères de points isoélectriques différents. Lorsque la différence de potentiel est appliquée, les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leur point isoélectrique et réalisent un gradient de pH entre les deux électrodes. Les protéines déposées migrent vers l'anode ou la cathode selon leur charge mais, au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge: elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle (elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre point isoélectrique. Les ampholytes sont des mélanges d'un certain nombre de molécules de faible masse moléculaire, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine (Fig III.44) .

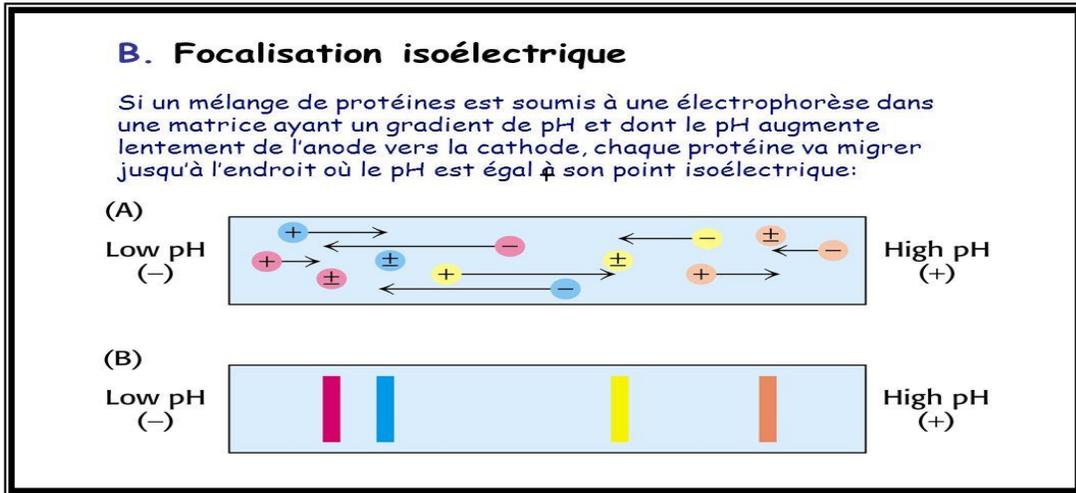


Figure III.44 : Principe de l'isoélectrofocalisation

IV.5.3.2. Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pH_i) et leur masse moléculaire. La séparation se fait en deux dimensions : La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pH_i par isoélectrofocalisation (IEF) et la deuxième dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS (Fig III.45).

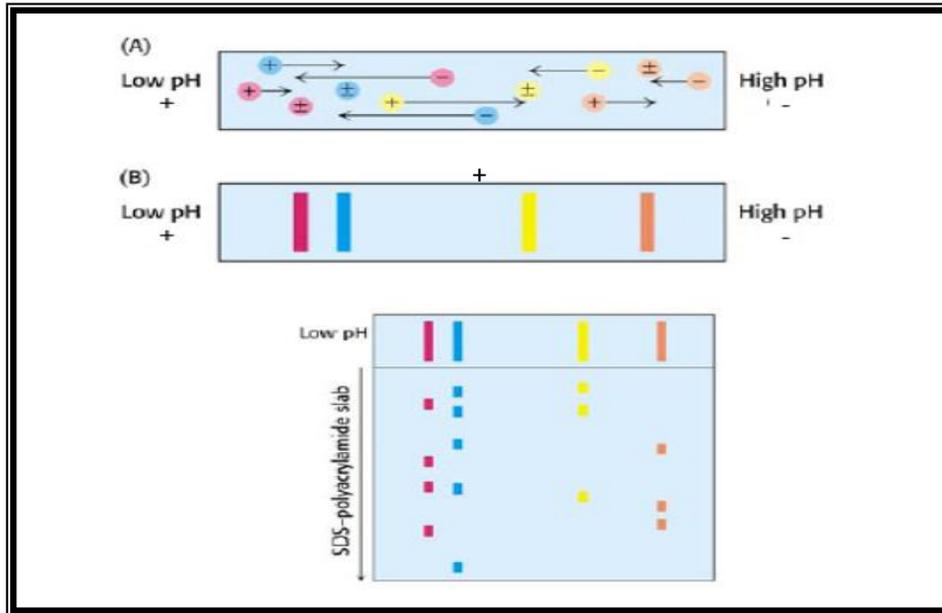


Figure III.45 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

IV.5.3.3. Electrophorèse capillaire (EC)

✚ Principe

L'électrophorèse capillaire correspond à une adaptation de la méthode générale d'électrophorèse ; c'est un compromis entre électrophorèse classique et chromatographie liquide haute performance. Le principe est basé sur la migration différentielle sous l'effet d'un champ électrique, des espèces neutres ou chargées, dans un capillaire étroit rempli d'électrolytes (Fig III.46).

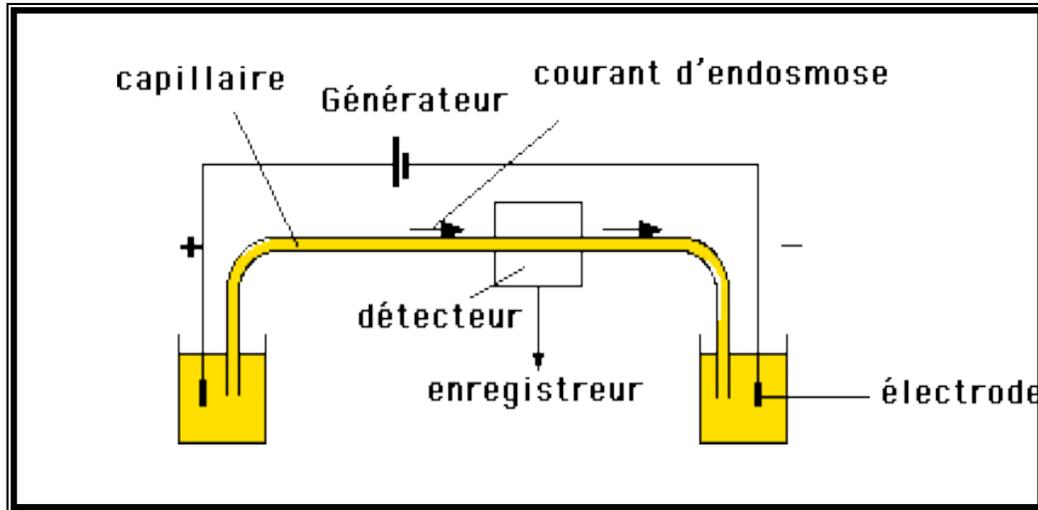


Figure III.46 : Principe de l'électrophorèse capillaire

✚ Mécanisme de migration

La séparation des composés par électrophorèse capillaire résulte de deux mécanismes de transport, l'électromigration et l'électro-osmose.

a) Migration électrophorétique (Électromigration)

L'électromigration résulte du déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. La vitesse linéaire acquise (ou vitesse électrophorétique) est alors fonction du champ électrique et de la mobilité électrophorétique de l'ion selon la relation suivante :

$$V_{ep} = m_{ep} E$$

Avec : V_{ep} : vitesse électrophorétique (cm . s)

E : champ électrique (V . cm)

m_{ep} : mobilité électrophorétique (cm² . V . s)

La mobilité électrophorétique d'une espèce chargée est fonction de sa charge électrique et de sa taille. Le transport des cations s'effectue dans le sens du champ électrique et le transport des anions dans le sens opposé.

b) Migration électroosmotique

Phénomène parasite en électrophorèse traditionnelle, la migration électroosmotique est à la base des séparations en électrophorèse capillaire. En effet, les parois des capillaires en silice fondue portent des groupements silanols « SiOH » chargés négativement pour des $pH > 2$. Les groupements silanols au contact de l'eau s'ionisent en SiO^- .

Ces sites anioniques fixes attirent des cations présents dans la solution et les ordonnent en deux couches dont l'une est collée à la paroi et l'autre quelque peu mobile. Entre ces deux couches naît le potentiel zêta. Lors de l'établissement d'un champ électrique tangentiel à cette interface, les cations de charge opposée à celles de la surface du capillaire de silice migrent vers la cathode et entraînent avec eux les molécules électrolytiques de l'échantillon : c'est le flux électroosmotique (FEO) (Fig III.17).

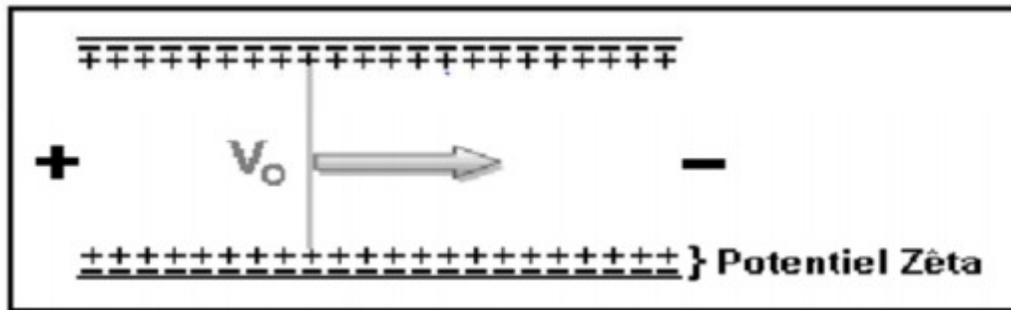


Figure III.47 : Représentation du flux électroosmotique.

La vitesse linéaire de cet écoulement (v_{eo}) est alors proportionnelle à l'intensité du champ électrique E et à la mobilité électroosmotique m_{eo}

$$v_{eo} = m_{eo} E$$

La migration des molécules provient de la somme des vitesses de ces deux phénomènes. Ainsi, lorsqu'un champ électrique est appliqué, les cations se déplacent à une vitesse correspondant à la somme des flux électrophorétiques et électroosmotiques.

Les molécules neutres ne dépendent que du FEO et les anions sont plus retenus, car leur vitesse correspond à la somme des flux électroosmotiques et des migrations électrophorétiques opposées au champ électrique. (FigIII.48)

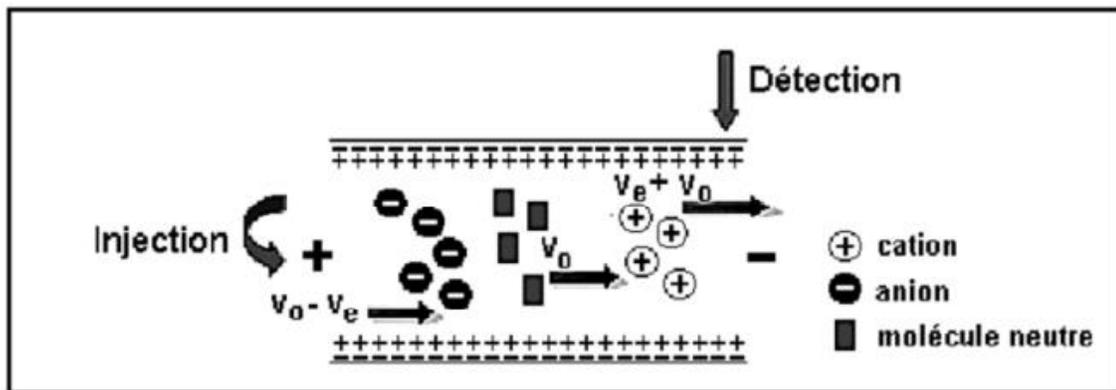


Figure III.48 : Principe de la séparation en électrophorèse capillaire

IV.5.3.4. Electrophorèse en champ pulsé

En 1984, Schwartz et Cantor, proposent une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose dont le pouvoir de séparation peut aller au moins jusqu'à 9 000 kb. Cette technique est utilisée lorsque l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide ne permet pas de séparer des molécules d'ADN dont la taille excède 50000 paires de bases (50 kb). Les fragments d'ADN à séparer sont soumis à l'action alternative de deux champs électrophorétiques perpendiculaires agissant à une certaine fréquence et à une certaine valeur des champs, judicieusement choisies en fonction de la taille des fragments à séparer. L'un des champs étire le fragment d'ADN et lui permet de sortir du piège dans lequel il était bloqué, l'autre assure l'avancement du fragment au sein du gel. (Fig III.49)

Grâce à cette technique, il est pratiquement possible, pour tous les organismes à petit génome, procaryotes et eucaryotes inférieurs, de localiser très rapidement un gène quelconque. Par exemple, 16 des 17 chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être séparés par ce type d'électrophorèse. Donc, le marqueur de tailles utilisé le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

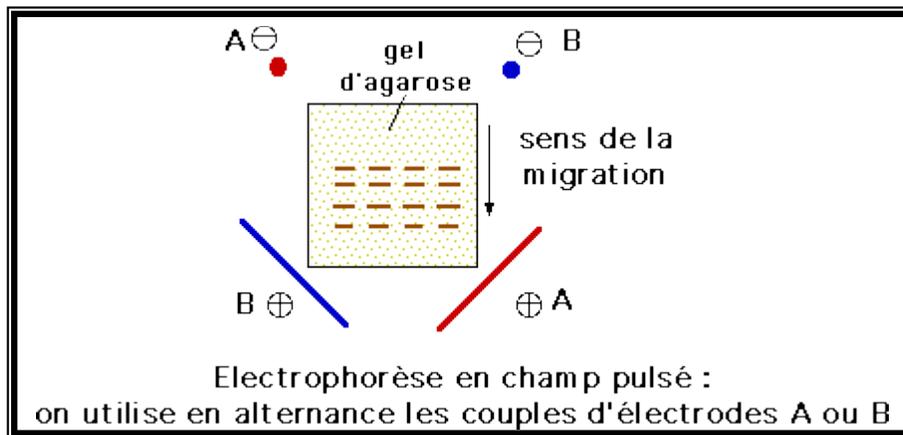


Figure III.49 : Electrophorèse en champ pulsé

IV.5.3.5. Immunoélectrophorèse

La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps". On mettra de côté l'immunoblot, qui consiste à visualiser des protéines sur un gel (la fixation d'Ac étant révélée par un second anticorps marqué). Les techniques ci-dessous utilisent le fait qu'à des concentrations adéquates, du fait de la présence de familles d'anticorps (polyclonaux) et de la bivalence de ces anticorps, il se forme des agrégats (= réaction d'immunoprécipitation. Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

Références bibliographiques

- 1) Audigié, Cl., Dupont, G., Zonzain F. (1995). Principes des méthodes d'analyse biochimique. *Tome 1, Doin Editeurs, Paris.*
- 2) Audigié, Cl., Dupont, G., Zonzain, F. (1995). Principes des méthodes d'analyse biochimique. *Tome 3, Doin Editeurs, Paris.*
- 3) Bernard Hainque, Bruno Baudin et Philippe Lefebvre. (2008). Appareillage et Méthodes en Biochimie Moléculaire. *Médecine-Sciences Flammarion.*
- 4) Blessum, C; Jeppsson, JO; Aguzzif, JO; Bernon, H. (1999). L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique, *Annales de biologie clinique.*
- 5) Bourguet, E; Augé, C. (2008). Les techniques de laboratoire : Purification et Analyse des composés organiques. *Ellipses Edition Marketing*
- 6) Burgot, G., Burgot, J-L. (2006). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. *2^{ème} édition . Editions Médicales internationales., TEC & DOC.*
- 7) Burgot, G et Burgot, JL. (2011). Méthodes instrumentales d'analyses chimique et application : méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. *Lavoisier, paris.*
- 8) Frederic P, Miller, Agnes F, Vandome, John Mcbrewster. (2010). Chromatographie en phase liquide: chimie analytique, chimie organique, Biochimie, Chromatographie, Chromatographie sur couche mince. *Iphascript publishing.*
- 9) Mahuzier, G., Hamon, M., Ferrier, D., Prognon, P. (1999). Chimie analytique. Méthodes de séparation. *Tome 2. 3^{ème} édition, Masson, Paris.*
- 10) Rouessac, F et Rouessac, A. (1998). Analyse Chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. *4^{ème} éd., Masson éd.*

- 11) Rouessac, A., Rouessac, F ; Cruché, D., Duverger-Arfulso, C., Martel A. (2004). Analyse Chimique: Méthodes et technique instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés. Partie. 7^e édition. Dunod, Paris.
- 12) Rouessac, A et Rouessac, F. (2004). Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés. 6^e édition, Dunod, Paris.
- 13) Rouessac, A et Rouessac, F. (2009). Analyses chimiques : méthodes et techniques instrumentales. 7^{eme} Ed, Dunod, paris.
- 14) Rouessac, A et Rouessac, F. (2011). Techniques instrumentales d'analyse chimique en 23 fiches Dunod, Paris.
- 15) Sine, J-P. (2003). Biochimie-Biologie : Séparation et analyse des biomolécules, méthodes physicochimiques. Ed, Ellipses, paris.
- 16) Skoog, D.A; West; D.M., F. J. Holler. (1991). Chimie Analytique, 7^{ème} éd., de Boeck éd.
- 17) Taverna, M; Le Potier, I; Morin, P. (2003). L électrophorèse capillaire : Principe. *Technique de l'ingénieur*.
- 18) Tranchant, J. Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse, (1995). 4^{ème} éd., Masson Rosset, R; Caude, M; Jardy. (1991). Chromatographies en phase liquide et supercritique. 3^{ème} éd., Masson éd.,