

République algérienne démocratique & populaire
Ministère de l'enseignement supérieur & de la recherche scientifique



Université de Relizane
Faculté des Sciences et Technologies
Département des Sciences Biologiques

Polycopié

Présenté par : Dr MELLALI Sarah

Intitulé

**Cours de Techniques
d'analyses biologiques**

Ce polycopié est destiné aux étudiants de :
1ère année Master Biochimie Appliquée

Année universitaire : 2021/2022

AVANT PROPOS

Enseignante au niveau de Faculté des Sciences et Technologies, Département des Sciences Biologiques à l'université de Relizane depuis 20 octobre 2019, où j'ai pu intervenir et assurer un panel d'enseignement dans différentes matières. J'étais chargé de cours, de travaux dirigés (TD) et de travaux pratiques (TP) des modules de Culture cellulaire, technique d'analyse Biologique, Bioinformatique, Biologie cellulaire, Zoologie, Biochimie microbienne, Anglais scientifique, Traitement des données informatiques, Mycologie Algologie Virologie et Microbiologie alimentaire.

Dans le cadre de la préparation de l'habilitation universitaire pour le passage au grade de rang magistral "Maître de Conférences A", j'ai choisi de présenter un polycopié englobant le cours de la matière de **Techniques d'analyses biologiques**. Ce module représente une unité méthodologie dans le programme de la 1ère année Master Biochimie Appliquée au niveau de Faculté des Sciences et Technologies, Département des Sciences Biologiques à l'université de Relizane.

Ce module représente également un élément nécessaire et indispensable pour les différents modules qui suivent dans le programme prévu pour la première année et deuxième année master recherche ainsi pour réaliser leur travaux de recherche dans mémoire de fin d'étude et pourquoi pas les travaux de leur doctorat du fait que l'étudiant pourra maîtriser les techniques d'analyse biologique et sera capable de choisir la technique approprier pour l'analyse de ces échantillons .

Cet enseignement détaille cinq axes principaux en Techniques d'analyses biologiques à savoir : Généralités sur les méthodes d'analyses ; Méthodes d'analyses chimiques et électrochimiques ; Méthodes de séparation ; Analyse instrumentale spectroscopique et Hydrodynamique.

Le programme de la présente matière est comme suit :

Table des matières

Avant-propos

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre I : Généralités sur les méthodes d'analyses

I. Généralités:	1
I.1 Classification des analyses :	1

Chapitre II : Méthodes d'analyses chimiques et électrochimiques

I. Introduction.....	4
II. La réaction électrochimique :	4
III. Paramètres expérimentaux :	4
IV. Techniques électrochimiques :	5
IV. 1. Méthodes potentiométriques (potentiométrie):	6
IV. 2. Méthodes Conductimétriques (conductimétrie):	8
IV. 3. Polarographie :	12
V. Intérêt de l'analyse électrochimique (Avantage):	16
VI. Applications l'analyse électrochimique :	16
VII. Terminologie :	17

Chapitre III : Méthodes de séparation

I. Introduction :	18
II. Techniques d'électrophorèse :	18
II.1. Principe :	18
II.2. Déplacement électrophorétique :	19
II.3. Types d'électrophorèse selon le sens de migration:	22
II.4. Types d'électrophorèse selon le type du support:	22
II.4.1. L'électrophorèse libre (en veine liquide) :	23
II.4.2. L'électrophorèse sur support :	24
III. Techniques de chromatographie :	35
III.1. Introduction :	35
III.2. Classification :	35
III.3. Chromatographie sur papier :	37
III.4. Chromatographie sur couches minces (CCM) :	37

III.5.Chromatographie sur colonne :.....	41
III.5.1. Chromatographies en phase liquide (CPL) :.....	43
III.5.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :	53
III.5.3. Les différents modes de chromatographie liquide :	54

Chapitre IV : Analyse instrumentale spectroscopique

I. Introduction :.....	59
II. Types de spectroscopie.....	59
III- Le spectre électromagnétique.....	59
IV. Spectroscopie Ultraviolet-visible :.....	60
IV.1. Principe de Spectroscopie ultraviolette et visible.....	60
IV.2. Appareillage	62
IV.3. Applications de la spectroscopie UV-visible	62
V- Spectrophotométrie d'absorption atomique	63
VI. Spectrométrie de masse :.....	63

Chapitre V : Hydrodynamique

I Introduction.....	65
II Notion de base	65
II.1 Fluide parfait et fluide réel.....	65
II.2 Ecoulement parmanent et non-parmanent	65
II.3 Ecoulement en charge et à surface libre	65
II.4 Fluide compressible et incompressible	65
II.5 Ecoulement uniforme et non-uniforme	66
III Ligne de courant, tube de courant	66
IV Débit volumique, débit massique :.....	66
V. Principe de conservation de la masse :.....	67
VI Equation d'Euler :	67
VII Relation de Bernoulli :.....	68
VIII. Tube de Pitot :	70
IX Tube de Venturi :	71

Références

Liste des figures

Figure 1: schéma de montage pour un dosage volumétrie	2
Figure 2: Les différentes méthodes instrumentales	3
Figure 3 : L'oxydant et le réducteur du couple Ox/Red sont deux espèces conjuguées	5
Figure 4 : Echelle du Ph	7
Figure 5 : Ph mètre	8
Figure 6 : schéma d'un conductimètre	11
Figure 7 : Polarographe	14
Figure 8 : Le polarogramme	15
Figure 9: Principe d'électrophorèse	19
Figure 10 : Le courant d'électro-endosmose	21
Figure 11 : Le courant d'évaporation	21
Figure 12 : Electrophorèse verticale (à gauche) et électrophorèse horizontale (à droite)	22
Figure 13 : type d'électrophorèse selon le support	23
Figure 14 : Electrophorèse libre.	23
Figure 15 : Appareille pour électrophorèse sur papier	24
Figure 16 : électrophorèse sur acétate de cellulose	25
Figure 17 : Migration des protéines sériques	26
Figure 18 : l'électrophorèse sur gel d'agarose	27
Figure 19 : Le calcul d'une quantité d'ADN inconnu	28
Figure 20 : Réalisation d'une électrophorèse en champ pulsé	29
Figure 21 : la relation entre le pourcentage du polyacrylamide et la taille des macromolécules	30
Figure 22 : Dénaturation des protéines par le SDS	30
Figure 23 : Électrophorèse PAGE-SDS	31
Figure 24 : isoélectrofocalisation (IEF)	32
Figure 25 : L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel	33
Figure 26 : révélation des protéines par coloration Nitrate d'argent et Fluorophore "Sypro Orange	34
Figure 27 : illustration de deux phénomènes de sorption : absorption et adsorption.	36
Figure 28 : Montage de la chromatographie sur couche mince	38
Figure 29 : Chromatographie sur couche mince des acides aminés	40
Figure 30 : Exemple d'élution en CCM	41
Figure 31 : principe de la chromatographie sur colonne	42
Figure 32 : schéma de principe d'une chaîne d'HPLC	44
Figure 33 : Schéma du tamisage moléculaire.	45
Figure 34: courbe de sélectivité des colonnes .	45
Figure 35: Représentation d'un gel d'exclusion	46
Figure 36 : les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant	47
Figure 37 : Silices apolaires greffées	48
Figure 38 : Schéma de principe d'une installation de chromatographie sur échangeurs d'ions	49
Figure 39 : principe des échangeurs d'ions	50
Figure 40: Résine échangeuse de cations (résine)	50
Figure 41 : Résine échangeuse d'anions (résine anionique).	50
Figure 42: échangeurs d'ions forts et faibles	51

Figure 43 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.	53
Figure 44 : Chromatographie en phase gazeuse	54
Figure 45 : Chromatogramme d'un constituant	57
Figure 46: Le spectre électromagnétique	60
Figure 47 : Principe de Spectroscopie	60
Figure 48: Schéma de principe du spectromètre UV-visible	62
Figure 49 : spectrophotomètre d'absorption atomique	63
Figure 50 : Ligne et tube de courant pour un écoulement	66
Figure 51: Principe de conservation de masse	67
Figure 52 : Principe de conservation de masse.	68
Figure 53 : Représentation de l'équation de Bernoulli d'un d'un fluide parfait	70
Figure 54 : Tube de Pitot	71

Liste des tableaux

Tableau 1 : Conductivités molaires ioniques à 25 °C d'ions monochargés en solution aqueuse très diluée	9
Tableau 2 : les propriétés physico-chimiques des différents types de techniques de séparation	18

Chapitre 1 :
**Généralités sur les méthodes
d'analyses**

Chapitre I : Généralités sur les méthodes d'analyses

I. Généralités:

Le mot « **analyse** » comporte le suffixe « **lyse** » qui signifie « décomposer » (exp: pyrolyse, hydrolyse, électrolyse, celui qui analyse étant l'**analyste**).

I.1 Classification des analyses : Les analyses peuvent donc être classées :

- ❖ **Selon le type :** analyse qualitative ou quantitative.
- ❖ **Selon le produit cible :** analyse organique ou analyse minérale.
- ❖ **Selon la quantité d'échantillons utilisée :** macro- ou microanalyse. La quantité peut être de l'ordre de quelques grammes ou des fractions de milligramme.
- ❖ **Selon l'automatisme :** analyse manuelle ou automatique. L'analyse automatique est beaucoup utilisée dans l'industrie pour suivre et orienter les paramètres d'un procédé.
- ❖ **Selon le matériel utilisé :** L'analyse peut être par des **méthodes classiques** ou **instrumentales**.

A. **Les méthodes classiques**, incluant la séparation des différents composants de l'échantillon, se classent en:

- ✓ Précipitation
- ✓ Extraction
- ✓ Distillation

❖ **L'analyse quantitative** dans les **méthodes classiques** peut être faite par deux **méthodes chimiques** :

- ✓ **Titrage gravimétrique (Gravimétrie) :** est une technique d'analyse quantitative qui s'appuie sur **la précipitation** de substances peu solubles que l'on pèsera après filtrage, lavage et séchage.
- ✓ **Titrage volumétrique (volumétrie) :** est une technique d'analyse quantitative qui permet la mesure critique d'un volume pour obtenir la valeur de la concentration. Elle consiste à utiliser une solution de concentration connue (appelée titrant ou solution titrante) afin de neutraliser une espèce contenue dans la solution inconnue (solution à titrer).

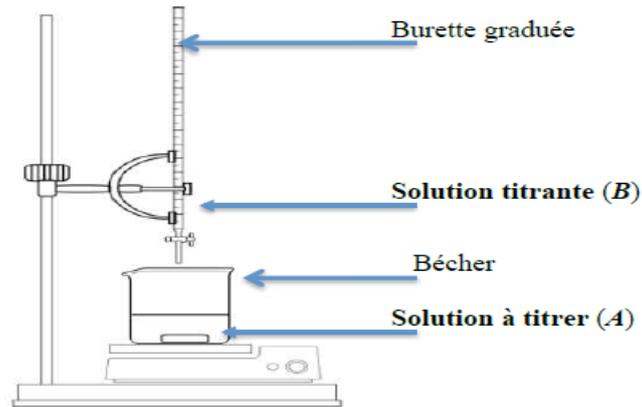


Figure 1: schéma de montage pour un dosage volumétrique

B. **les méthodes instrumentales** : Par contre dans **les méthodes instrumentales** on utilise des équipements qui mesurent une **propriété physique ou chimique** d'une substance ou un facteur qui permet la détermination d'une propriété de cette substance.

- ❖ Les **méthodes instrumentales** se divisent **en trois** catégories ;
- ✓ **Méthodes de séparation** : qui séparent les composants d'un échantillon avant la mesure d'une des propriétés d'un de ces composants.
- ✓ **Méthodes spectroscopiques** : qui utilisent comme mesure la radiation électromagnétique avec différentes gammes du spectre électromagnétique.
- ✓ **Méthodes électrochimiques (techniques électro-analytiques ou physico-chimiques)** : des techniques d'analyse en utilisant de l'électricité, notamment par **électrolyse** (Décomposition chimique produite par un courant électrique) .

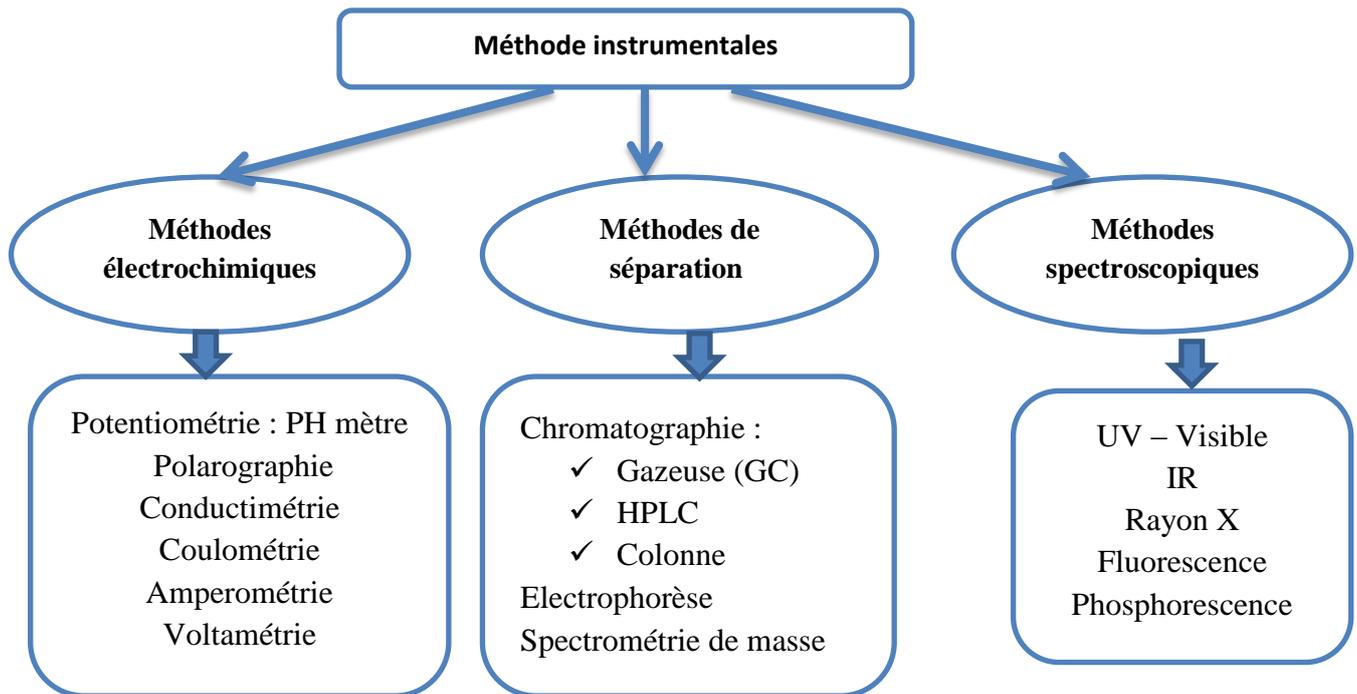


Figure 2: Les différentes méthodes instrumentales

Chapitre 2 :
Méthodes d'analyses chimiques
et électrochimiques

Chapitre II : Méthodes d'analyses chimiques et électrochimiques**I. Introduction**

L'électrochimie est la discipline scientifique qui s'intéresse aux relations entre la chimie et l'électricité, elle est l'étude des techniques qui emploient l'électrostimulation pour analyser la réactivité chimique d'un système. Plus particulièrement, elle analyse la perte et le profit des électrons c.-à-d. l'oxydation et les mécanismes de réduction dans une réaction.

L'électrochimie se présente notamment comme une méthode d'analyse intéressante qui relie des mesures électriques (courant, potentiel, charge etc.) à des paramètres chimiques (concentration, vitesse de réaction...).

II. La réaction électrochimique :

Les réactions électrochimiques sont les phénomènes qui ont lieu à l'interface de deux systèmes conducteurs : (**électronique** : électrodes et **ionique** : solutions) lors du transfert de charge composé de un ou plusieurs électrons. Ces transferts de charges s'accompagnent de modifications des états d'oxydation des matériaux (oxydation ou réduction) et donc de leur nature physico-chimique (dépôt métallique, évolution de gaz, formation d'espèces radicalaires, réactions chimiques couplées entre autres). L'ensemble des réactions élémentaires peut ainsi atteindre un haut niveau de complexité. L'électrochimie permet de mieux appréhender les phénomènes **d'oxydoréduction** et de **corrosion**.

III. Paramètres expérimentaux :

Quatre paramètres principaux sont généralement mesurés dans une expérience électrochimique :

1. **Le potentiel (e)** est défini comme quantité d'énergie ou de force électrique dans un système. Son unité de base est **volt (v)**. Une augmentation d'E indique la disponibilité de plus d'énergie pour la réaction.
2. **Le courant (i)** est la mesure de flux d'électron dans une réaction. L'unité de base de courant est des ampères ou des **ampères de (a)**. Le courant est habituellement mesuré dans le microampère ou l'échelle de nanoamp dans des expériences électrochimiques.

3. La charge (q) indique le nombre d'électrons utilisés selon l'équivalent et son unité de base est le coulomb (c).
4. Le temps (t) indique la durée de l'expérience. Il est exprimé en seconde (s).

IV. Techniques électrochimiques :

L'électrochimie a donné naissance à plusieurs méthodes électro-analytiques qui permettent de faire des mesures quantitatives sur des échantillons variés. Parmi ces méthodes on distingue les techniques basées sur :

- ✓ Mesure de potentiel : **potentiométrie**.
- ✓ Mesure de quantité d'électricité : **coulométrie**.
- ✓ Mesure de conductances électriques : **conductimétrie**.
- ✓ Mesure du courant électrique en fonction du potentiel imposé par l'appareil : **Polarographie**.

Important : La **conductimétrie** étant faite pour les composés **non électro-actifs**, pour les composés **électro-actifs** on utilise les *méthodes statiques* (*courant $I=0$*) comme la **potentiométrie** (mesure du potentiel de manière passive comme le pH-mètre) ou *dynamiques* (*$I>0$*) (mesure du courant électrique en fonction du potentiel imposé par l'appareil) comme la **voltamétrie** ou la **polarographie**.

Rappel : Un composé **électro-actif** est un composé qui peut s'oxyder ou se réduire par voie électrochimique. L'électroactivité d'un composé dépend de sa structure chimique, de la nature de l'électrode et autres facteurs expérimentaux.

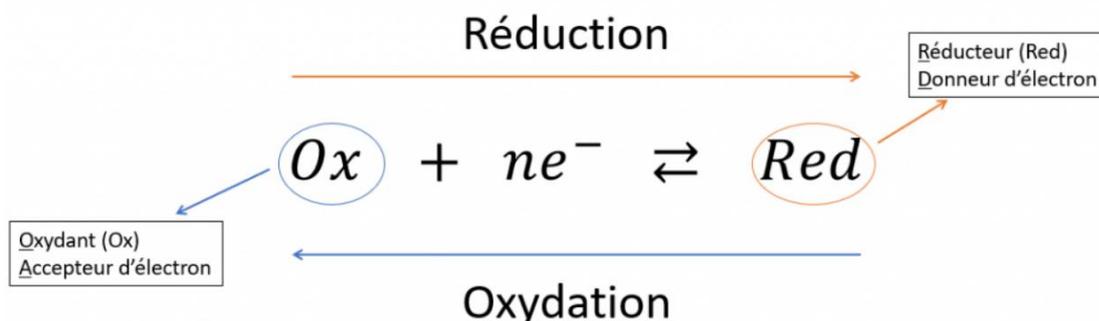


Figure 3 : L'oxydant et le réducteur du couple Ox/Red sont deux espèces conjuguées.

IV. 1. Méthodes potentiométriques (potentiométrie):**A. Principe :**

La potentiométrie est une méthode qui mesure la différence de potentiel entre une électrode plongeant dans la solution à analyser et une électrode de référence (placées dans la même solution) ayant un potentiel fixe et connu. Ces méthodes permettent de mesurer: **pH, potentiel d'oxydo-réduction, oxygène...**

Le potentiel de l'électrode est en effet lié à l'activité des ions présents par la relation dérivée de l'expression de NERNST :

$$E = E_0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \log a_H$$

E = Potentiel mesuré.

E₀ = Constante dépendant du choix de l'électrode de référence et des solutions internes

R = Constante des gaz (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹).

T = Température absolue en degrés Kelvin (K).

n = Charge de l'ion.

F = Constante de Faraday (96 500 C).

a_H = Activité de l'ion dans l'échantillon [H₃O⁺] .

B. Application : Mesure de pH :**❖ Rappel :**

Le **potentiel hydrogène**, noté **pH**, est une mesure de l'activité chimique des hydrons (appelés aussi couramment protons ou ions hydrogène) en solution. Notamment, en solution aqueuse, ces ions sont présents sous la forme de l'ion hydronium.

Plus souvent, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Ainsi, dans un milieu aqueux à 25 °C :

- ✓ une solution de pH = 7 est dite neutre ;
- ✓ une solution de pH < 7 est dite acide ; plus son pH diminue, plus elle est acide ;
- ✓ une solution de pH > 7 est dite basique ; plus son pH augmente, plus elle est basique.

Selon Sørensen le pH est défini comme étant le logarithme négatif de la concentration en ions H₃O⁺, hydronium, issus de la dissociation de molécule:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

Lorsque la concentration en ions H_3O^+ change d'un facteur dix, le pH change d'une unité. Donc la solution est neutre pour des quantités égales de H_3O^+ et d' OH^- . Or c'est le cas lorsque la concentration de $[\text{H}_3\text{O}^+]$ et $[\text{OH}^-]$ est de 10^{-7} mol/L, soit à pH 7.

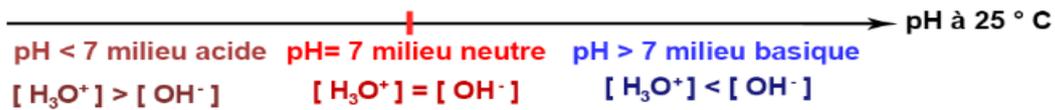


Figure 4 : Echelle du pH

❖ principe :

Pour mesurer le pH on a besoin d'un outil de mesure sensible aux ions hydronium H_3O^+ qui déterminent le pH. Il s'agit d'un voltmètre. Le principe de la mesure consiste à prendre un capteur avec une membrane en verre sensible aux ions hydronium (électrode pH) et à observer la réaction entre la membrane et l'échantillon : **mesure d'un potentiel**. Ce potentiel est comparé à un potentiel de référence délivré par une électrode insensible au pH, par diffusion d'électrolyte vers l'échantillon au travers d'un diaphragme : électrode de référence (Ag/AgCl). Pour un usage plus simple, les 2 électrodes sont combinées en une seule électrode. Le pH d'une solution est alors la différence de potentiel entre les deux électrodes selon l'équation de Nernst

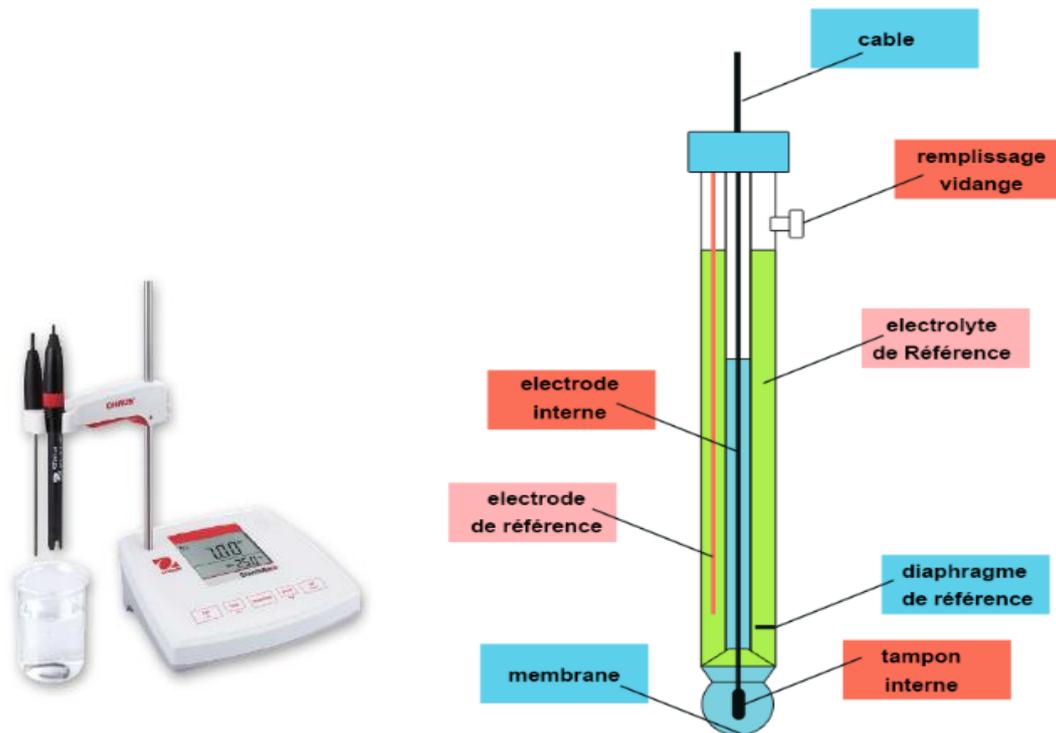


Figure 5 : Ph mètre

IV. 2. Méthodes Conductimétriques (conductimétrie):

A. Définition de la conductivité :

La conductivité (notée σ « **sigma** ») quantifie l'aptitude d'une solution à conduire le courant électrique (laisser se déplacer librement les charges électriques).

B. Conductivité ionique :

La conductivité est directement liée à la **mobilité (notée u_i) des ions i présents au sein de la solution**, qui est la part de la conductivité indépendante de la concentration. La propriété de conduction électrique (ou de résistance) est relative au déplacement des ions (**mobilité ionique des ions u_i**).

Plus un ion est volumineux, plus sa mobilité est faible, et plus sa conductivité est faible. Il s'ensuit que les cations métalliques (ions) possèdent généralement des λ_i° (Lamda) relativement faibles. Pour chaque ion, on définit de plus la **conductivité molaire ionique $\lambda_i(A_i^{Z_i})$** par :

$$\lambda_i(\mathbf{A}_i^{z_i}) = \frac{\sigma_i}{C_i} = |z_i|u_iF$$

$$\sigma = \sum_i \lambda_i(\mathbf{A}_i^{z_i}) C_i$$

z_i : la charge de l'ion,

u_i : La mobilité.

σ : La conductivité.

λ_i : la conductivité molaire ionique.

F : la constante de Faraday en $C.mol^{-1}$ (charge d'une mole de charges élémentaires).

C_i : la concentration en $mol.m^{-3}$. **NB** : C_i en $mol.m^{-3} = 10^3 C_i$ en $mol.L^{-1}$

Les conductivités ioniques s'expriment en $mS m^2 \text{eq}^{-1}$ ($mS =$ milli-simens), et ne doivent pas être confondues avec les conductivités molaires ioniques qui s'expriment en $mS m^2 mol^{-1}$.

NB : Les ions H^+ et HO^- possèdent les conductivités les plus élevées car leur mobilité est très différente de celle des autres ions. En effet ceux-ci, au contraire des autres ions, ne se déplacent pas en entier dans la solution pour porter leur charge : ils se déplacent de proche en proche via un réseau de liaisons hydrogènes : on parle de **mécanisme de Grotthuss**.

ion	λ^0 en $mS.m^2.mol^{-1}$
H_3O^+	34,98
HO^-	19,86
Br^-	7,81
Rb^+	7,78
Cs^+	7,73
I^-	7,68
Cl^-	7,63
K^+	7,35
NH_4^+	7,34
NO_3^-	7,142
Ag^+	6,19
MnO_4^-	6,10
F^-	5,54
Na^+	5,01
CH_3COO^-	4,09
Li^+	3,87
$C_6H_5COO^-$	3,23

Tableau 1 : Conductivités molaires ioniques à 25 °C d'ions monochargés en solution aqueuse très diluée

Exemple : la conductivité d'une solution de chlorure de sodium de concentration $c = [\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] = 2,00 \text{ mol m}^{-3}$ est égale à :

$$\begin{aligned}\sigma &= \lambda_{\text{Cl}^-} \cdot [\text{Cl}^-] + \lambda_{\text{Na}^+} \cdot [\text{Na}^+] \\ \sigma &= 7,63 \times 10^{-3} \times 2,00 + 5,01 \times 10^{-3} \times 2,00 \\ \sigma &= 2,53 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}.\end{aligned}$$

NB : Pour un ion polychargé, on utilise plus souvent la conductivité molaire ionique par mole de charge (aussi appelée conductivité ionique équivalente ou spécifique) :

$$\lambda_i \left(\frac{A_i z_i}{|z_i|} \right)$$

C. Le conductimètre :

❖ Principe :

Un conductimètre est un appareil qui permet de mesurer la **conductivité** σ (exprimée en S.m^{-1}) ou la **résistivité** ρ « Rho » exprimée en $\Omega.m$ (ohms par mètre) d'une solution.

En pratique, l'appareil mesure une **conductance** G (exprimée en Siemens. Ω^{-1}) ou une **résistance** R (exprimée en Ω « Omega ») ($R = 1/G$).

Une tension alternative (100-1000Hz) de faible amplitude (pour éviter les phénomènes d'électrolyse et de polarisation des électrodes) est appliquée entre les deux plaques. La résistance est alors déterminée grâce à un montage électronique complexe (pont de Wheatstone). On définit la conductance comme l'inverse de la résistance R d'une solution et celle-ci se note G :

$$\frac{1}{R} = G$$

La **conductivité notée** σ est proportionnelle à G avec k un facteur de proportionnalité appelé **constante de cellule** qui dépend de la cellule de conductimètre utilisée :

$$\sigma = kG$$

où $k = l/S$ (recommandation I.U.P.A.C) représente la **constante de cellule** en rapport avec les caractéristiques physiques de la cellule de mesure conductimétrique (l : la distance entre les deux plaques et S : la surface réelle des deux plaques).

NB : Pour une cellule conductimétrique neuve la valeur de k donnée par le constructeur est souvent proche de l'unité ($k = 1$).

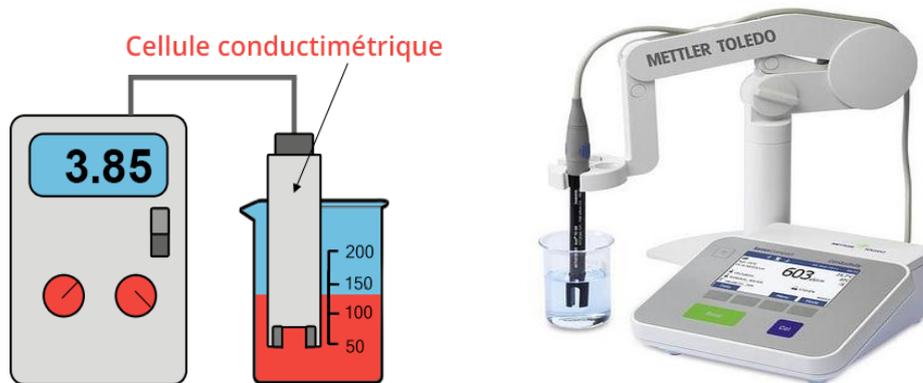


Figure 6 : schéma d'un conductimètre

❖ Application :

•Contrôle de la pureté : dans la déminéralisation et la désionisation de l'eau, la mesure de la conductivité permet de contrôler et d'analyser les eaux permutées, usées, minérales, Elle permet de déterminer la salinité des eaux de mer :

Exemple : la mesure de la Conductivité de l'eau :

La conductivité de l'eau donne une indication de sa qualité comme illustré ci-dessous. La **conductivité de l'eau ultra-pure** est d'environ 0,055 mS/cm à 25°C.

Conductivité (en mS/cm) à 20°C

Eau d'excellente qualité	400	Eau potable	750	Eau industrielle	1500	Eau médiocre
--------------------------	-----	-------------	-----	------------------	------	--------------

Il existe d'autres applications :

- ✓ Détermination des constantes d'équilibre : la constante d'acidité des produits de solubilité ;
- ✓ Analyse des gaz : l'absorption des substances ionisables dans des solvants permet de mesurer la variation de la conductivité ;
- ✓ Détermination du point isoélectrique des acides aminés : la variation de la conductivité en fonction du pH passe par un minimum en ce point ;

- ✓ Etude de la cinétique : souvent en cours de réaction, il se forme des produits dont la conductivité équivalente est différente de celle des réactifs ;
- ✓ Dosage de substances moléculaires : il suffit que ces substances puissent être hydrolysées ;
- ✓ Transport des ions médicamenteux dans l'organisme : l'électrolyte, appliqué sur la peau, est relié au pôle négatif/positif pour faire pénétrer un anion/cation.

Figure : Conductivité de l'eau .

Exercice :

L'eau pure est constituée de H_2O en équilibre avec H_3O^+ et HO^- . Il n'y a présence d'aucun autre ion en solution.

Comme vu dans la précédemment, la réaction d'autoprotolyse conduit à $[H_3O^+] = [HO^-] = 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

NB : $\lambda_{H_3O^+}^\circ = 34,98 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$
 $\lambda_{HO^-}^\circ = 19,86 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$

Quelle est la conductivité de l'eau pure ?

$$\sigma = \lambda_{H_3O^+}^\circ [H_3O^+] + \lambda_{HO^-}^\circ [HO^-]$$

$$\sigma = (35 + 20) \times 10^4 \times 10^{-10} \text{ mS.cm}^{-1}$$

$$\sigma = 55 \times 10^{-6} \text{ mS.cm}^{-1}$$

$$\sigma = 5,5 \times 10^{-8} \text{ S.cm}^{-1}$$

$$\sigma = 0,055 \times 10^{-6} \text{ S.cm}^{-1}$$

$$\sigma = 0,055 \times \mu\text{S.cm}^{-1} = 5,5 \mu\text{S.m}^{-1}$$

IV. 3. Polarographie :

A. Définition :

La polarographie est une méthode électrochimique d'analyse, inventée en 1922 par Jaroslav Heyrovsky, de l'université Charles de Prague. Pour sa découverte, il reçut le prix Nobel de chimie en 1959 en raison des possibilités très variées de cette méthode tant en chimie minérale qu'en chimie organique. De nombreuses variantes ont été conçues et on parle aujourd'hui des polarographies.

Ces méthodes ont en commun l'utilisation d'une électrode particulière appelée **électrode à gouttes de mercure (Hg)** à la surface de laquelle on réalise une oxydation ou une réduction électrochimique en appliquant un potentiel selon un programme pré-établi. La mesure du courant d'électrolyse permet d'accéder à **la concentration** de la substance électrolysée.

Les spécificités propres à l'électrode à goutte de mercure comparées aux électrodes conductrices solides viennent des propriétés particulières de ce métal qui, liquide à température ambiante, permet un renouvellement de la surface active de l'électrode, qui conduit aisément à la formation d'un certain nombre d'amalgames (alliage) avec les métaux et qui permet des réductions à des potentiels très négatifs (réductions impossibles à réaliser sur électrode de platine ou de carbone vitreux). En oxydation, par contre, l'exploration des potentiels en polarographie est limitée par l'oxydation du mercure, ce qui explique qu'une grande partie des applications a concerné des composés électroréductibles.

Dans le cas d'un cas d'un cation métallique, par exemple, la réaction électrochimique mise en jeu est la suivante :



Elle se différencie de sa descendante, la **voltampérométrie**, essentiellement par la nature de l'électrode puisque les méthodologies sont bien souvent identiques. Ses avantages sont nombreux notamment en termes de coûts (analyse et appareillage), de simplicité de l'appareillage et de performances analytiques (limites de détection, analyse multiélémentaire).

Les techniques polarographiques sont utilisables lorsque la solution à étudier contient une ou plusieurs espèces réductibles ou oxydables à une électrode, les concentrations des espèces à analyser étant inférieures à $10^{-3}M$.

B. Principe du polarographe :

On dispose dans la cellule d'électrolyse de **3 électrodes** qui plongent dans la solution à étudier :

- ✓ une **électrode de référence** : électrode au calomel saturé.
- ✓ une **électrode auxiliaire** (anode) : électrode de platine.
- ✓ une **électrode de travail** (cathode) : électrode à goutte de mercure constituée par un capillaire de faible diamètre (20 à 50 μm) alimenté par une colonne de mercure.

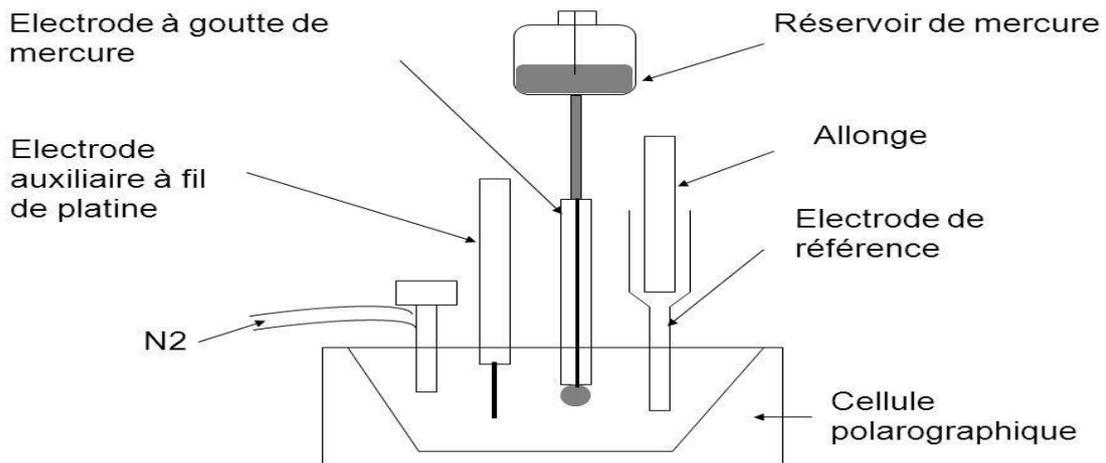


Figure 7 : Polarographe.

Le barbotage dans l'Azote N₂ est utilisé pour se débarrasser de l'oxygène qui pourrait réagir avec les électrodes et altérer la mesure.

Variation linéaire du potentiel :

$$E_{\text{ind}} - E_{\text{ref}} = E_i \pm vt$$

- v : la vitesse du balayage de potentiel
- E_i : potentiel initial
- E_{ref} : potentiel de l'électrode de référence
- E_{ind} : potentiel de l'électrode de mercure

Un avantage important du mercure réside dans le fait qu'à chaque goutte correspond une nouvelle électrode, identique à la précédente du point de vue géométrique, mais ne gardant pas mémoire du phénomène électrochimique ayant affecté les gouttes antécédentes.

En pratique, il résulte de l'application des méthodes d'analyse polarographiques la mesure d'une intensité de courant ou parfois d'une quantité de charges, à un potentiel caractéristique de l'analyse (i_d) ou (i), proportionnel à sa concentration en solution. Pour les analyses

quantitatives, on procède, soit à l'établissement d'une droite d'étalonnage à partir de concentrations connues du soluté à laquelle on se reporte pour la détermination d'une concentration inconnue, soit pour éviter des erreurs de mesures dues aux effets de matrices, à la méthode des ajouts dosés, en effectuant des ajouts de concentrations connues dans la solution contenant le ou les solutés à analyser.

Le polarogramme peut être caractérisé par le potentiel de $\frac{1}{2}$ vague, et l'on a la hauteur (h) qui est proportionnelle à la concentration. Donc pour faire les dosages, on pourra faire une courbe étalon, cela veut dire que l'on pourra avoir une idée de la concentration de la substance à doser par rapport à la hauteur du palier (h).

A retenir : dans la polarographie

- ❖ Un pic est enregistré pour chacun des métaux, dont la position caractérise chaque métal (analyse qualitative)
- ❖ la hauteur détermine la quantité de métal présent (analyse quantitative)
- ❖ C'est donc une méthode **d'analyse quantitative et qualitative**

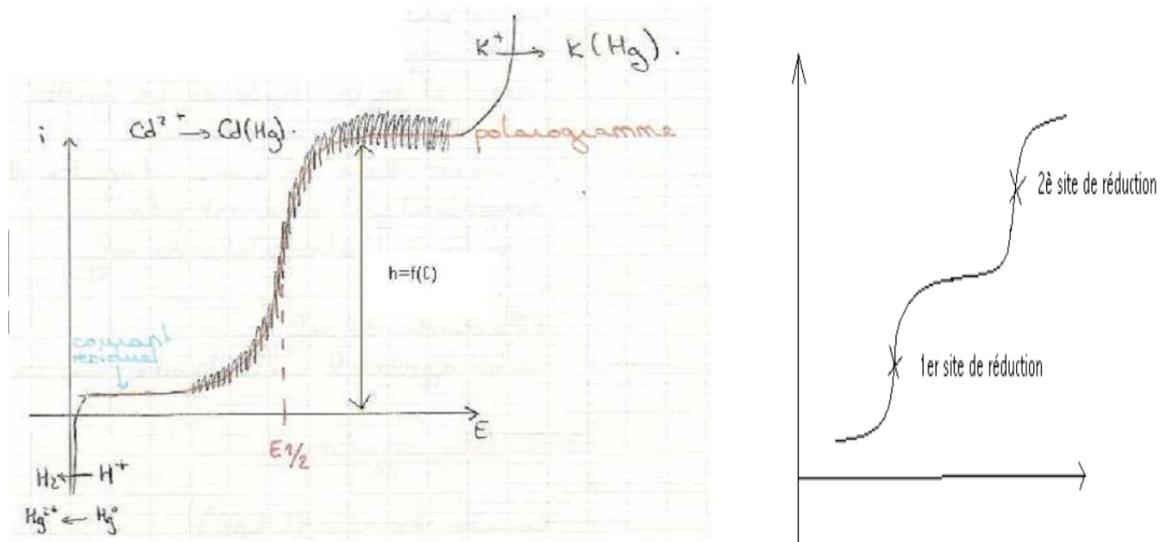


Figure 8 : Le polarogramme

C. Applications de la polarographie :

Les techniques polarographiques couvrent un large domaine d'applications en analyse et peuvent être utilisées en particulier dans les domaines de l'environnement, de l'analyse de l'eau et des eaux résiduaires (exp : dosage des métaux à l'état de trace : zinc, cadmium, plomb et cuivre dans les eaux de mer), de l'industrie pharmaceutique, alimentaire, cosmétique,

pétrolière et nucléaire, de la galvanoplastie, de l'analyse des fluides biologiques et de l'industrie des plastiques et des polymères.

Elles sont appliquées à l'analyse de constituants principaux et à l'analyse de traces et d'ultratraces. Elles concernent l'analyse en solution de métaux, de molécules inorganiques, organométalliques ou organiques ou des molécules d'intérêt biologique et biochimique. Elles permettent des analyses multiélémentaires et sont non destructives des solutions analysées puisque les quantités de solutés impliqués dans les mesures polarographiques sont négligeables par rapport aux quantités en solution, permettant ainsi des mesures répétitives sur une même solution.

D. Limites de la polarographie classique :

- **Sensibilité** : La polarographie classique est limitée vers les faibles concentrations de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} M.
- **Pouvoir de séparation** : Pour que deux vagues polarographiques soient dissociables, il faut que la différence entre les potentiels de demi-vague soit supérieure à 100 à 200 mV.

V. Intérêt de l'analyse électrochimique (Avantage):

- la cinétique d'une réaction électrochimique dépend de potentiel auquel s'effectue le transfert d'électron,

-la méthode électrochimique est sélective,

Spécifique aux activités plutôt qu'aux concentrations des espèces chimiques

-il est généralement facile d'isoler le produit formé au terme d'une électrolyse;

-l'utilisation des techniques électrochimiques est la méthode de choix pour l'étude et l'établissement du mécanisme réactionnel d'une oxydation ou d'une réduction

- Ces méthodes sont appliquées dans les dosages chimiques quantitatifs.
- Le point d'équivalence est beaucoup plus facile à déterminer.
- Il apparaît souvent comme un point singulier de la courbe.
- La possibilité de travailler avec des concentrations faibles
- La possibilité de travailler en présence d'autres espèces (non électroactives)...

VI. Applications l'analyse électrochimique :

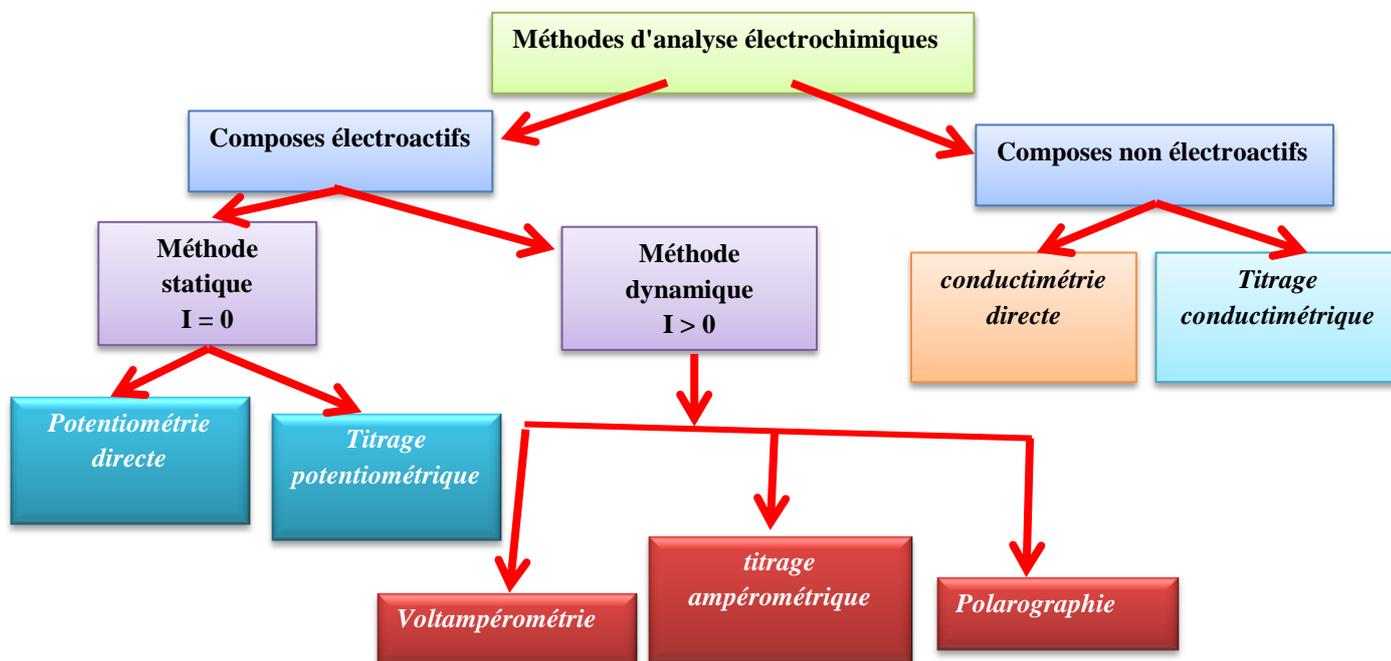
-contrôle de la qualité des produits finis et des matières premières dans l'industrie pharmaceutique

-contrôle des produits cosmétologiques

-contrôle du degré de pollution des eaux

-analyses toxicologiques...

❖ Résumé :



VII. Terminologie :

Electrolyse : Décomposition chimique produite par un courant électrique.

Une réaction d'oxydoréduction : ou réaction redox est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un transfert d'électrons. L'espèce chimique qui capte les électrons est appelée « oxydant » et celle qui les cède, « réducteur ».

La corrosion : La corrosion désigne l'altération d'un matériau par réaction chimique avec un oxydant. Les exemples les plus connus sont l'oxydation des métaux à l'air ou dans l'eau : rouille du fer et de l'acier et formation de vert-de-gris sur le cuivre.

Electrode : Une électrode est un conducteur électronique, ou ionique (ex. : verre) captant ou libérant des électrons.

Calomel saturé : L'électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (KCl) est composée de mercure métallique (Hg) en contact avec du calomel $\text{Hg}_2\text{Cl}_{2(s)}$ lui-même en équilibre avec une solution de KCl saturée. On peut en déterminer le potentiel grâce à un fil de platine plongeant dans le mercure.

Chapitre 3 :
Méthodes de séparation

Chapitre III : Méthodes de séparation

I. Introduction :

Les méthodes de séparation en Biochimie exploitent les propriétés physico-chimiques des molécules. **L'électrophorèse** fait appel essentiellement au caractère de l'ionicité des molécules qui est derrière l'apparition de charges électrique. La taille des molécules interfère avec la charge dans le processus de séparation.

La chromatographie est basée sur l'exploit des propriétés de la polarité, ionicité, taille et la forme des molécules.

Les propriétés suivantes sont utilisées pour définir les différents types de techniques de séparation:

Tableau 2 : les propriétés physico-chimiques des différents types de techniques de séparation

caractère moléculaire	Propriété physico-chimique	Techniques de séparation appropriée
Polarité	- Volatilité	Chromatographie Gaz-Liquide
	- Solubilité	Chromatographie Liquide-Liquide
	- Adsorption	Chromatographie Solide-Liquide
Ionicité	- Charge électrique	Chromatographie d'Echange d'Ions
		Electrophorèse
Taille	- Diffusion	- chromatographie d'exclusion
Forme	- Fixation de ligands	Chromatographie d'Affinité

II. Techniques d'électrophorèse :**II.1. Principe :**

L'**électrophorèse** est une **technique** d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champs électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique. Les composés qui peuvent être transformés en particules chargées par formation de complexes, sont de même sujets à une migration sous l'effet du champ électrique. Parmi les supports utilisés dans la technique d'électrophorèse, on note le gel de polyacrylamide donnant de bonnes résolutions lors de la séparation.

La réalisation de l'électrophorèse nécessite **3 composantes principales:**

- ✓ **Cuve d'électrophorèse** qui porte le support de migration,
- ✓ **Générateur de courant électrique continu**
- ✓ une **cuve de révélation** des produits séparés.

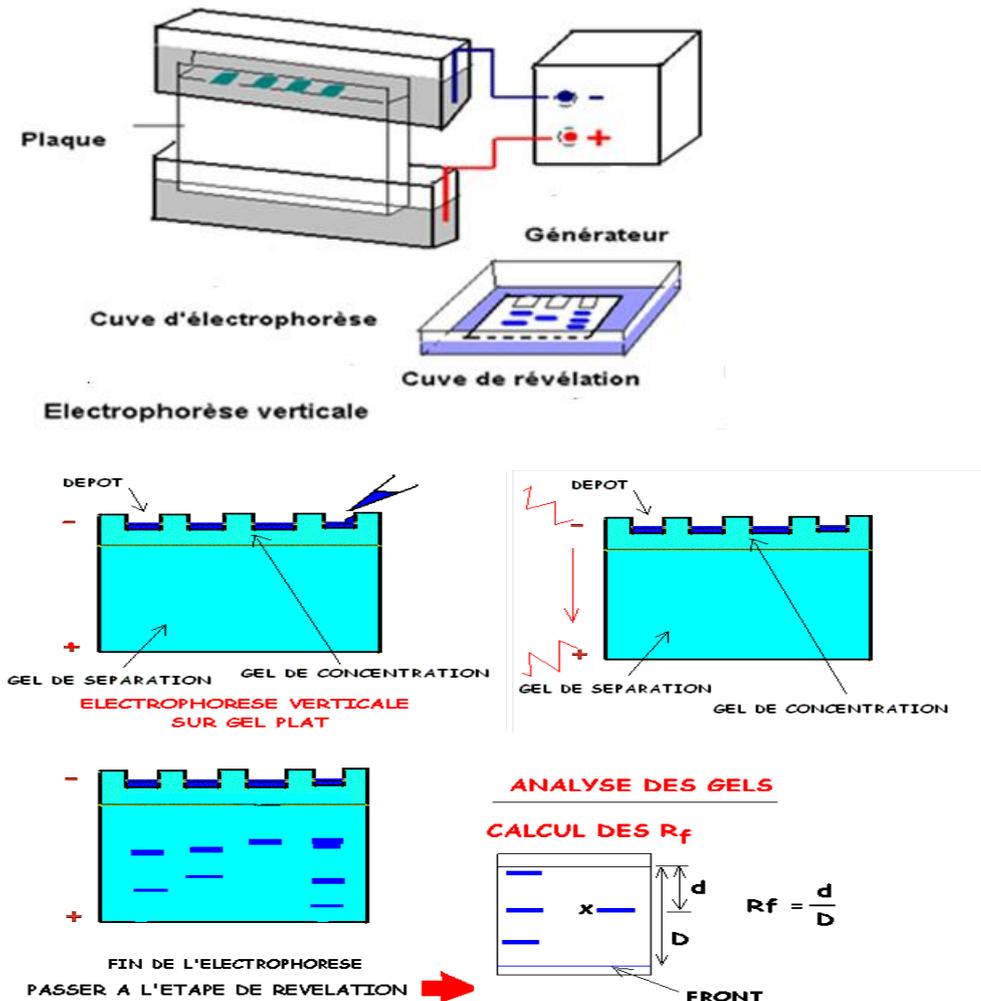
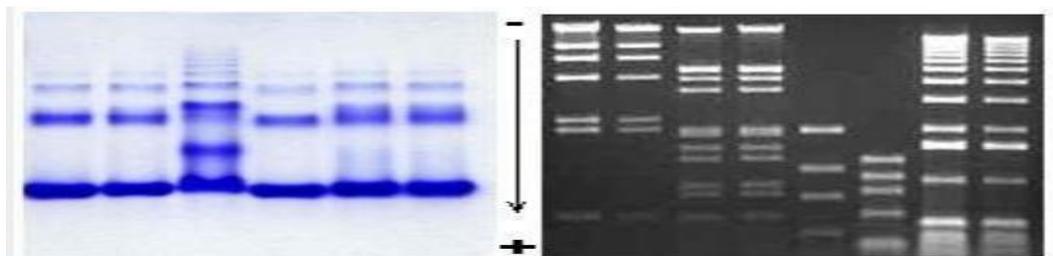


Figure 9: Principe d'électrophorèse



Electrophorèse des protéines révélation par Bleu de coomassie (à gauche)
 électrophorèse des acides nucléiques révélation par Bromure d'éthidium (à droite)

II.2. Déplacement électrophorétique :

La migration dépend de plusieurs facteurs :

A. la mobilité électrophorétique : Sous l'action d'un champs électrique, **E**, une protéine se déplace avec une vitesse, **v**, proportionnelle au champs:

$v = \mu E$, avec μ appelée 'mobilité électrophorétique' $\mu = v / E$; avec : μ en $cm^2.s^{-1}.volt^{-1}$

l, v en cm.s^{-1} et E en volt.cm^{-1}

Le champs électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force, F , sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q ; $F = q E$

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

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

$F' = 6 \pi \eta v r$ avec : v : vitesse de la protéine,
 r : rayon de la protéine
 η : coefficient de viscosité.

Lorsque les 2 forces s'équilibrent (déplacement avec une vitesse constante):
 $F = F'$ soit $q E = 6 \pi \eta v r$

$\mu = \frac{v}{E}$ (1) avec : μ en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$, v en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
 et E en $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

donc : $v = \frac{qE}{6 \pi \eta r}$ (2). (2) dans (1) : $\mu = \frac{q}{6 \pi \eta r}$

❖ Ainsi la mobilité répond aux règles:

- Elle est proportionnelle à sa charge (q).
- Elle est inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu , (η)
- Elle est inversement proportionnelle à son rayon (r).

NB : - La charge Q est en fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant : on appelle pH isoélectrique d'une particule (pH_i ou pI) le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique.

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

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

B. du champ électrique E : $E = v / \mu$

C. Des courants liquidiens :

❖ le courant d'électro-endosmose :

Dans les conditions expérimentales, le support se charge négativement; une couche mobile de charges positives se forme dans le solvant, au contact du support et entraîne globalement la phase liquide vers la cathode.

Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode. Il peut dans certains cas être plus puissant que les forces électriques, ce qui fait que des protéines chargées négativement peuvent globalement migrer vers la cathode.

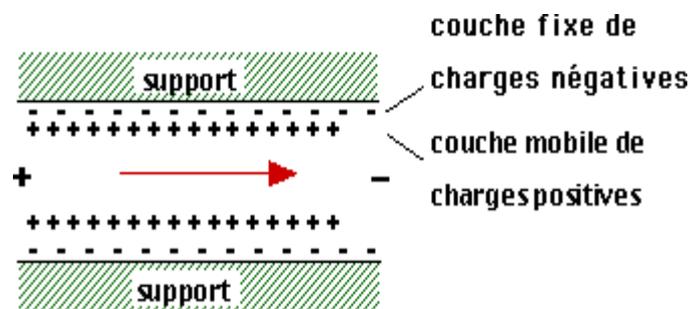


Figure 10 : Le courant d'électro-endosmose

❖ les courants d'évaporation : le passage du courant s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau de la phase liquide; cet effet est maximal au milieu de la bande; il s'établit ainsi un courant liquidien depuis chaque extrémité vers le centre de la bande. Pour limiter ce phénomène, la cuve est fermée par un couvercle; on utilise aussi des cuves réfrigérées

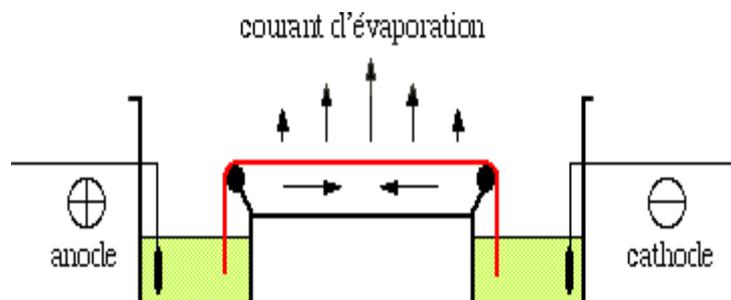


Figure 11 : Le courant d'évaporation

D. De la durée de migration : qui influe sur la distance de migration : $d = v \cdot t$; soit $d =$ distance, $v =$ vitesse et $t =$ temps de passage du courant.

NB : Cette formule n'est pas applicable dans le cas de l'électrophorèse sur support, car les molécules effectuent un trajet non linéaire dans les microcanaux du support poreux.

E. De facteurs liés à la nature du support : adsorption, texture...

II.3. Types d'électrophorèse selon le sens de migration:

- Electrophorèse horizontale
- Electrophorèse verticale

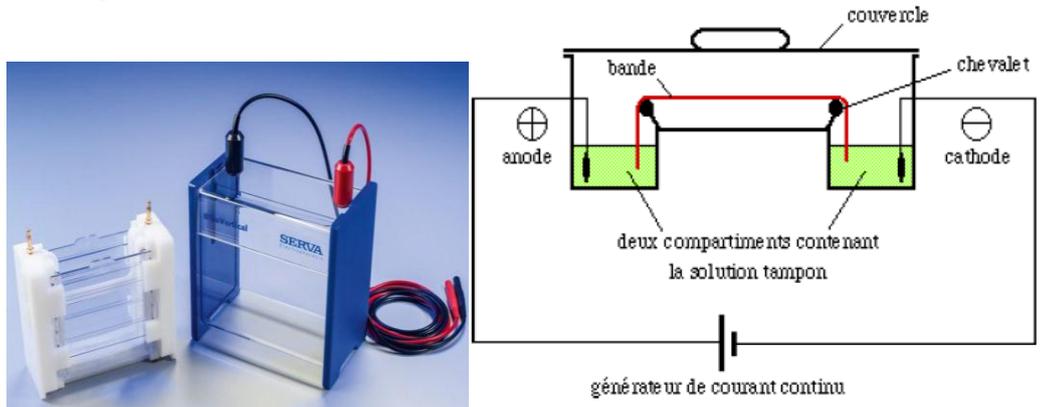


Figure 12 : Electrophorèse verticale (à gauche) et électrophorèse horizontale (à droite)

II.4. Types d'électrophorèse selon le type du support:

Les supports utilisés en électrophorèse sont nombreux, avec des degrés de résolution variables. Leurs types ont permis de distinguer plusieurs appellations en électrophorèse, comme:

- Electrophorèse en veine **liquide**
- Electrophorèse sur **papier** ou **acétate de cellulose**
- Electrophorèse sur **gels (agarose, amidon, polyacrylamide...)**.

NB : Chaque support se caractérise par sa précision de tri et sa facilité d'utilisation. **L'agarose** est souvent utilisé dans la composition d'un milieu pour isoler des acides nucléiques, cependant le **polyacrylamide** est largement utilisé dans le cas du tri des protéines.

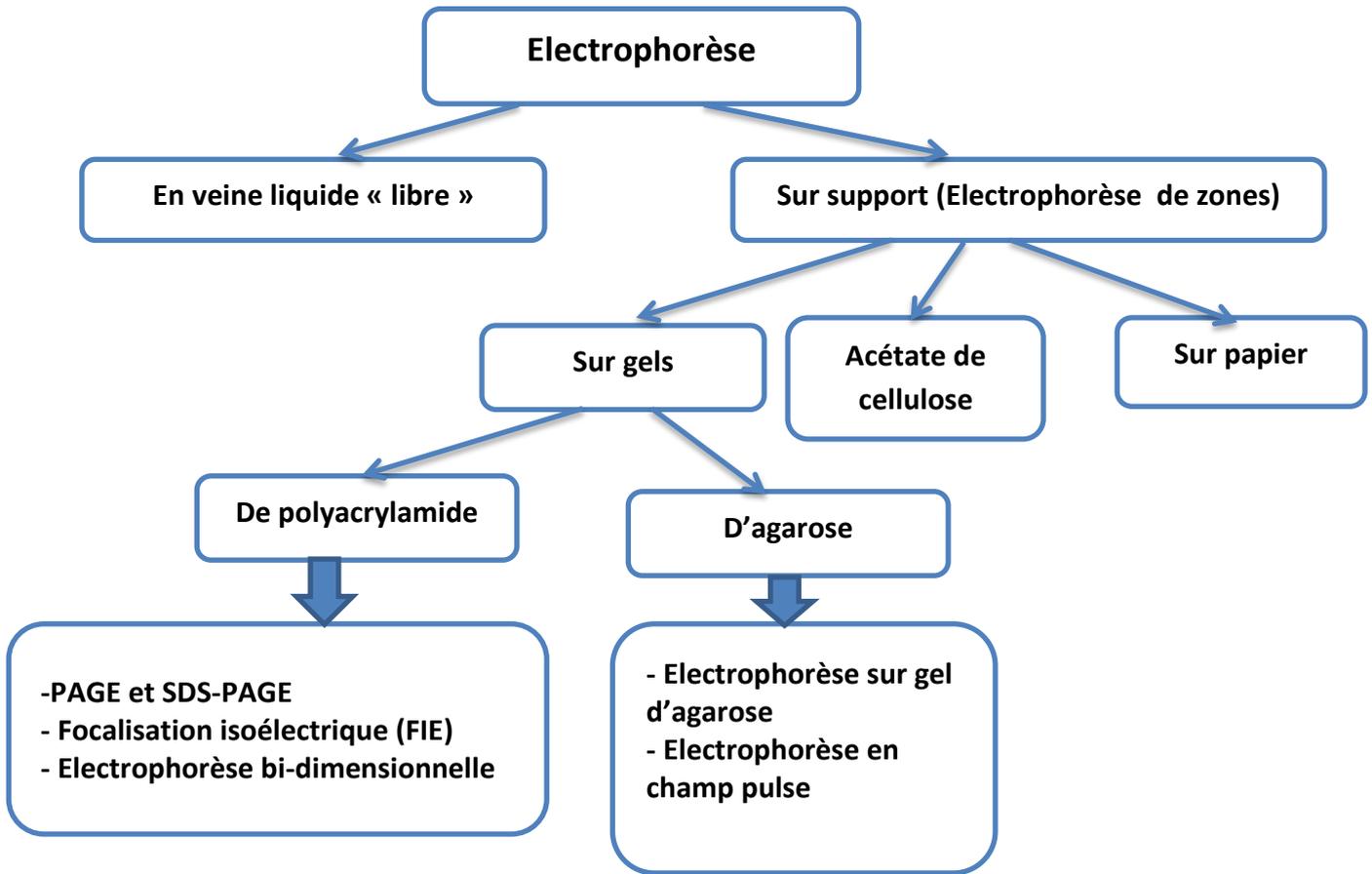


Figure 13 : type d'électrophorèse selon le support

II.4.1. L'électrophorèse libre (en veine liquide) :

Elle est réalisée dans un tube en U de section carrée : la séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). C'est une technique utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines, elle est utilisée également dans le cas de très grosses particules (cellules, organites).

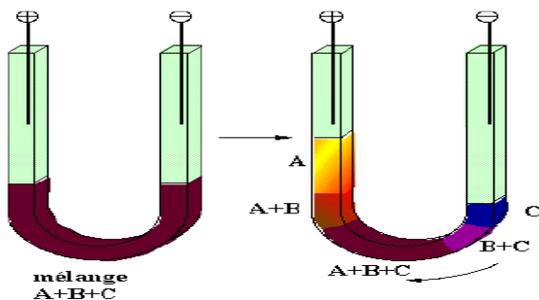


Figure 14 : Electrophorèse libre.

II.4.2. L'électrophorèse sur support :

Les différents supports d'électrophorèse de zones qui peuvent être utilisés sont : l'électrophorèse du papier, de l'acétate de cellulose, ou un support semi solide (des gels), ces supports doivent être homogène, poreux et inerte.

L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné. Elle permet l'obtention après migration d'une séparation en zones distinctes en bandes des molécules chargées. Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

II.4.2.1. Electrophorèse sur papier:

L'utilisation d'un support papier, elle est assez peu résolutive et peu utilisée de nos jours.

La migration des molécules s'effectue principalement en fonction de la **charge globale**, et en conditions non dénaturantes.

Habituellement employé dans un montage horizontal, servant surtout à séparer **des acides aminés ou d'autres petites molécules chargées**. Le dépôt et la migration des échantillons se font en surface.

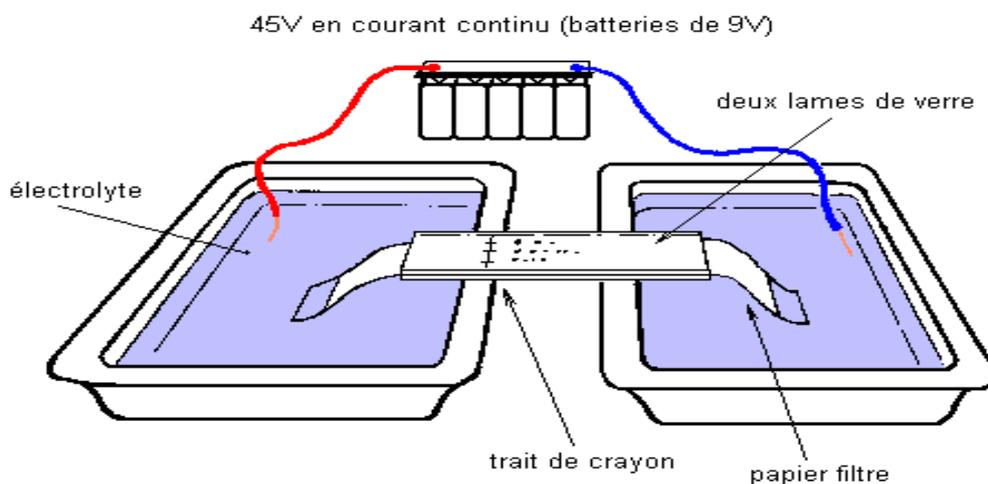


Figure 15 : Appareil pour électrophorèse sur papier.

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.

II.4.2.2. Électrophorèse sur acétate de cellulose : L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des **protéines sériques** mais elle est de plus en plus remplacée par les électrophorèses sur gel.

Exemple : Séparation des protéines sériques

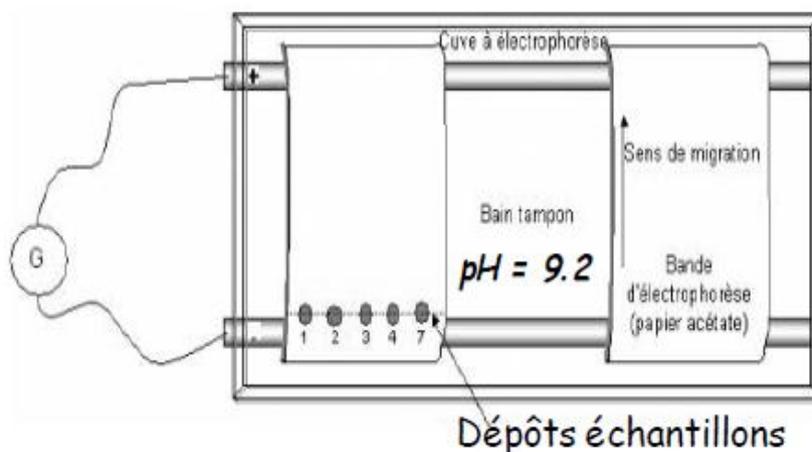


Figure 16 : électrophorèse sur acétate de cellulose

Milieu basique: protéines chargées (-)

- extrémités des bandes plongées dans tampon d'électrophorèse conducteur (pH = 9.2)
- application champ électrique
- dissolution échantillon dans solution conductrice
- migration le long de la bande

Vitesse de migration dépend : magnitude de la charge + taille molécules

- coloration des protéines (rouge Ponceau)
- analyse densité optique des bandes
- Intensité coloration proportionnelle concentration protéines

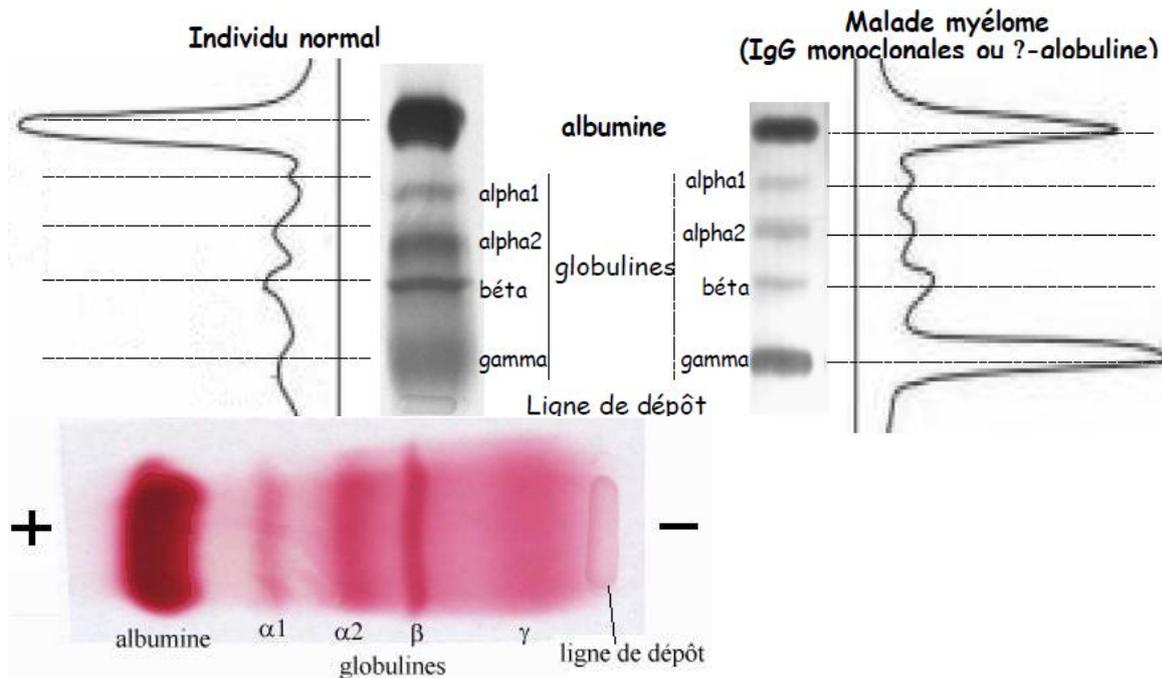


Figure 17 : Migration des protéines sériques

Interprétation : A chaque bande correspond une classe de protéines. Plus la bande est foncée, plus il y a de protéines.

Les protéines les plus petites (albumine) migrent le plus loin, les plus grosses (gamma-globulines) migrent moins loin.

II.4.2.3. *Electrophorèse sur gels* :

La séparation des molécules s'effectue selon leur ratio **charge / masse** sous l'effet de la mobilité électrophorétique et celui de la filtration du gel (taille des pores limite vitesse de migration).

Il existe plusieurs types de gel: gel de polyacrylamide, du gel d'agarose, du gel d'amidon, du gel de silice. Les gels les plus couramment utilisés sont : **Polyacrylamide et agarose.**

A. Électrophorèse sur gel d'amidon : L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile pour l'analyse et **la séparation des isoenzymes**. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétiques 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.

B. Électrophorèse sur gel d'agarose : L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer **les protéines** « taille >500 kDa (kiloDalton) », **l'ADN et l'ARN** (taille >1500pb) en fonction de leurs poids moléculaires.

Gel d'agarose a une grande taille de pores => séparation très grosses molécules.

Généralement les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. La migration des molécules s'effectue du pôle négatif vers le pôle positif.

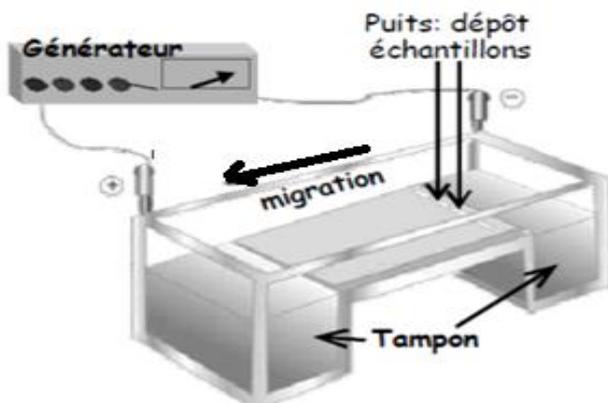


Figure 18 : l'électrophorèse sur gel d'agarose

❖ **Exemple d'application de l'électrophorèse sur gel d'agarose: séparation des acides nucléiques**

Les acides nucléiques sont des macromolécules **polyanioniques** (uniformément **chargées négativement** => charge relative constante) ; dans ce cas la charge n'est plus un critère de **discrimination**; la taille et structure le restent. C'est l'effet « tamis moléculaire » du gel : plus les molécules sont de petite taille, plus vite elles passent au travers des pores du gel ; un ADN de structure serrée (ex: plasmide superenroulé) migrera plus vite qu'une structure lâche (plasmide circulaire ou linéarisé).

Plus un gel est concentré en agarose, plus les pores seront de petite taille => discrimination de molécules plus petites.

Les étapes d'électrophorèse :

➤ **Évaluation de l'avancement de la séparation** : pour ne pas laisser migrer trop longtemps (sinon, risque de perte des échantillons):

Echantillons mélangés à 2 colorants (tampon de charge) avant dépôt dans le gel :

- ✓ **Bleu de bromophénol** dont migration est comparable à un fragment d'ADN de 300pb (tout petit fragment: migration très rapide)

- ✓ **Xylène cyanol** dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 4000pb (très gros fragment: migration la plus lente)
 - **Révélation** des bandes d'ADN par **coloration** : **Bromure d'Ethidium (BET)** / UV. Le BET s'**intercale** entre les plateaux de paires de bases. Eclairé par UV courts (UV 200-300nm) => fluorescence orangée. Visualisation : transilluminateur UV.
Seuil de détection : quelques nanogramme
 - **Évaluation** des **masses moléculaires** des protéines séparées, on utilise des standards => estimation de la quantité d'acide nucléique
 - Intensité de **fluorescence** d'échantillon comparée avec la quantité connue (standard)
C'est-à-dire le mélange d'acides nucléiques de masses moléculaires connues.

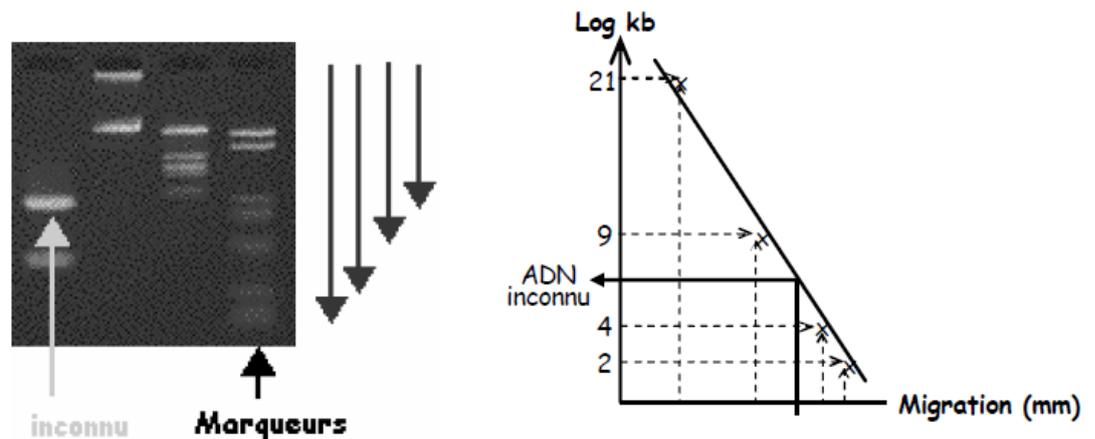


Figure 19 : Le calcul d'une quantité d'ADN inconnu

❖ Electrophorèse en champ pulse :

Cette technique est utilisée lorsque l'électrophorèse en gel d'agarose ne permet pas de séparer de très grosses molécules d'ADN (la taille : 50 kb - 10^{aine} Mb).

Dans les concentrations classiques d'agarose => porosité < 1µm, cependant une molécule d'ADN de taille 50 kb étiré ≈ 18µm, donc l'ADN ne peut se déplacer dans le gel que par reptation. Champ électrique assure l'allongement ADN dans sens du champ.

Champ pulsé assure changement orientation et/ou polarité du champ, alternativement au cours du temps

Principe : 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.

Les étapes :

- ✓ Séparation : gel d'agarose (1%)
- ✓ Application d'un courant électrique
- ✓ Modification orientation du champ au cours du temps
- ✓ Réorientation champ électrique => **réorientation** ADN
- ✓ Réorientation ADN dans un nouveau champ => retarde la migration
- ✓ **Temps de réorientation** sera proportionnel à **longueur** de l'ADN

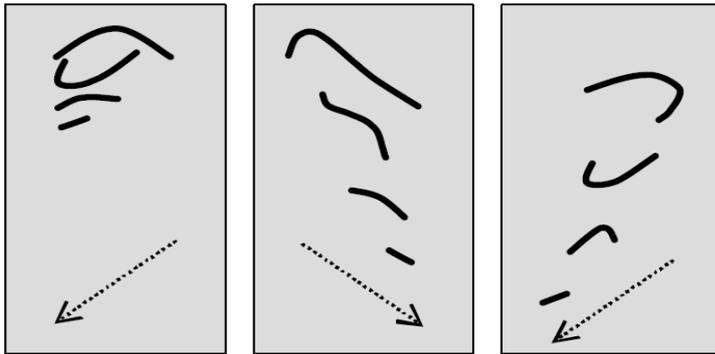
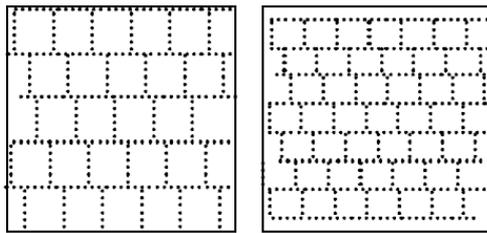


Figure 20 : Réalisation d'une électrophorèse en champ pulsé

C. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) : Les gels, formés entre deux plaques de verre, sont obtenus par polymérisation d'un mélange d'acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et de bisacrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$), ce qui aboutit à la formation d'un réseau réticulé. Les concentrations en acrylamide et le ratio acrylamide/bisacrylamide déterminent la taille des pores et donc les capacités résolutes du gel, le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).

Ces techniques peuvent être utilisées pour séparer des **protéines ou bien des acides nucléiques (de courte séquence : taille <1000 pb)** en condition **native ou dénaturante**. L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un montage vertical, les échantillons étant déposés dans des puits localisés au sommet du gel.



modification % polyacrylamide (3-30%)
 ↳ ≠ tailles des pores (tamis moléculaire)

% polyacrylamide dans gel dépend de la
 taille des macromolécules à séparer

(Tableau donné à titre d'exemple)

polyacrylamide	Gamme séparation
7.5 %	40-400 kDa
10 %	20-300 kDa
12 %	15-200 kDa
15 %	6-90 kDa

Figure 21 : la relation entre le pourcentage du polyacrylamide et la taille des macromolécules à

❖ **Electrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE :**

Le gel est surtout utilisé avec les protéines qui peuvent être:

✓ **Natives** (migration en fonction de leur taille et charge sous forme repliée).

✓ **Dénaturées** par différents agents tels que le **SDS** (sodium dodécyl sulfate CH₃-(CH₂)₁₀-OSO₃⁻ Na⁺), qui dénature complètement les protéines (surtout en présence d'urée et de β-mercaptoéthanol qui coupe les ponts disulfure). Du fait que le SDS est un détergent anionique qui défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules sont chargées de la même façon, et la séparation est alors uniquement en fonction de la masse molaire. Cette méthode permet de déterminer rapidement une masse moléculaire approximative.

NB : Electrophorèse SDS-PAGE: c'est une séparation de protéines qui est réalisée en condition dénaturante, en présence de SDS.

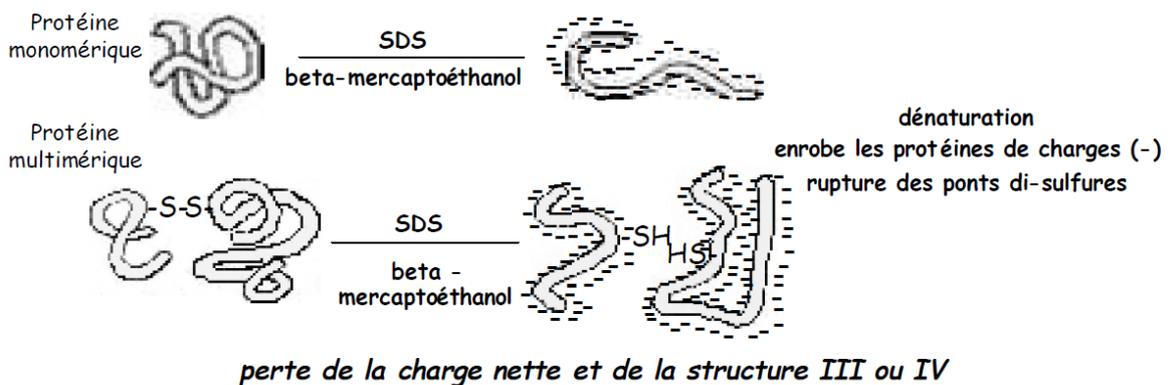


Figure 22 : Dénaturation des protéines par le SDS

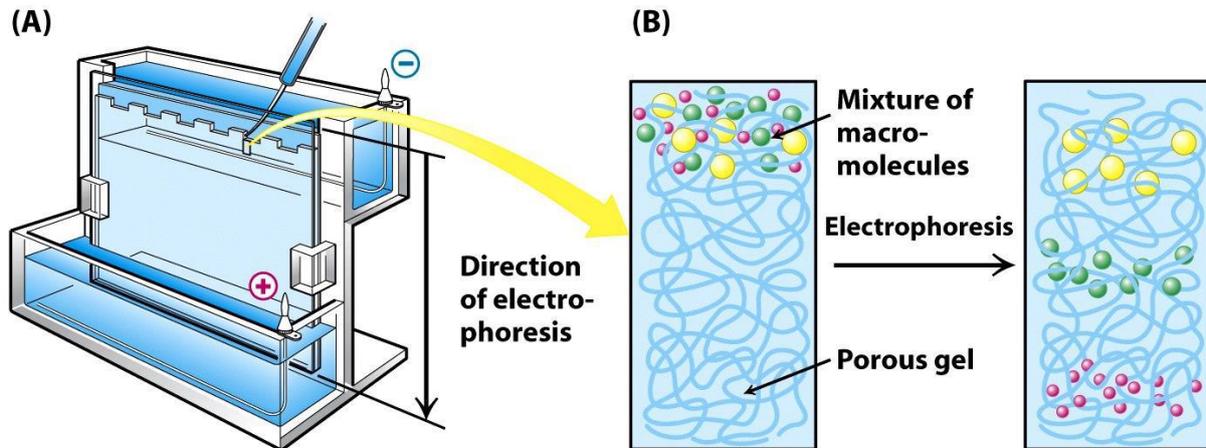


Figure 3-7
 Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Figure 23 : Électrophorèse PAGE-SDS

❖ Focalisation isoélectrique (FIE) :

On sait que les protéines ont une charge qui leur permet de migrer dans un champ électrique. La vitesse de cette migration est proportionnelle à la charge qui elle-même est proportionnelle à la différence entre le pH du milieu et le **pI (points isoélectriques)** de la protéine. Au pI, la protéine ne possède aucune charge nette, donc à un pH égal au pI, les protéines ne peuvent pas se déplacer dans le champ électrique.

- Donc la **focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF)** est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques.

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).

L'échantillon protéique est déposé dans un large puits au centre du gel. Les protéines migrent dans une direction ou dans l'autre jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur point isoélectrique, point où elles cessent de migrer.

Dans l'IEF, le **gel de polyacrylamide** doit être de forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration.

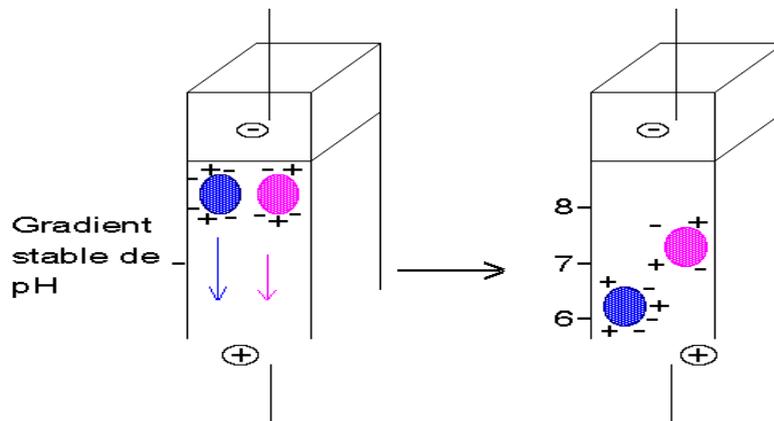


Figure 24 : isoélectrofocalisation (IEF)

❖ **Electrophorèse bi-dimensionnelle (2D) :**

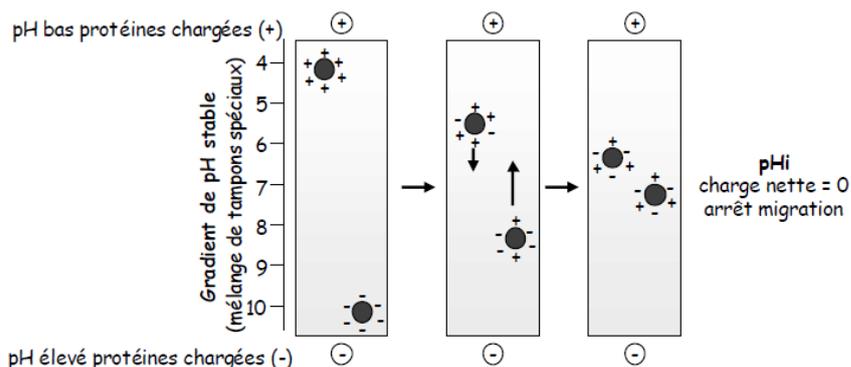
L'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer les protéines :

- ✓ dans une première dimension par focalisation isoélectrique (IEF) selon leur point isoélectrique (pHi)
- ✓ et dans une deuxième direction, perpendiculaire à la première, selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS (PAGE-SDS).

Cette méthode à une résolution très élevée, elle permet la séparation de plus >1 000 protéines différentes dans le sérum. On peut établir de cette manière la "carte d'identité protéique" des principaux tissus et organes humains.

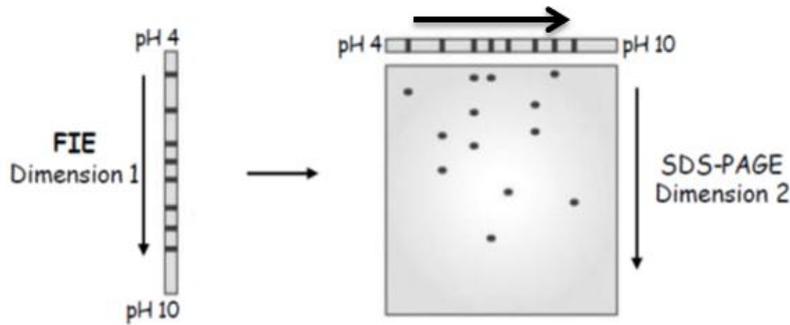
Dimension 1 : Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation

Isoélectrique (FIE)



Les protéines migrent vers la position du gradient = pHi et s'y immobilisent

Dimension 2 : Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE



Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction perpendiculaire.

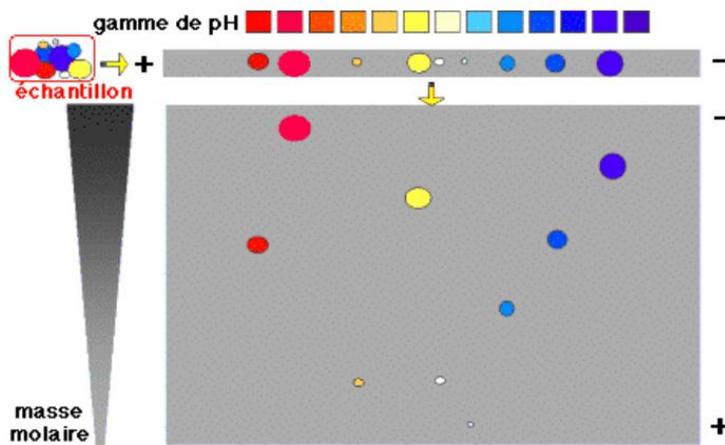


Figure 25 : L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel

❖ Les méthodes de révélation des protéines:

Après l'électrophorèse 2D, les protéines séparées (de 100 ng à 0,1 ng de protéine par spot) sont détectées par coloration des gels. Plusieurs procédés de sensibilité différente existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D:

Bleu de coomassie : 30 -50 ng, faible sensibilité, présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines.

Bleu colloïdal : 5 à 10 fois plus sensible.

Nitrate d'argent : forte sensibilité (0,1 ng) (**photo de droite ci-contre**), elle présente néanmoins certains inconvénients : la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode.

Fluorophore "Sypro Orange, SyproRed, Sypro Ruby" : forte sensibilité (1 à 10 ng) (**photo de gauche ci-contre**), avec une reproductibilité, une facilité et une rapidité meilleures que celles de la coloration au nitrate d'argent.

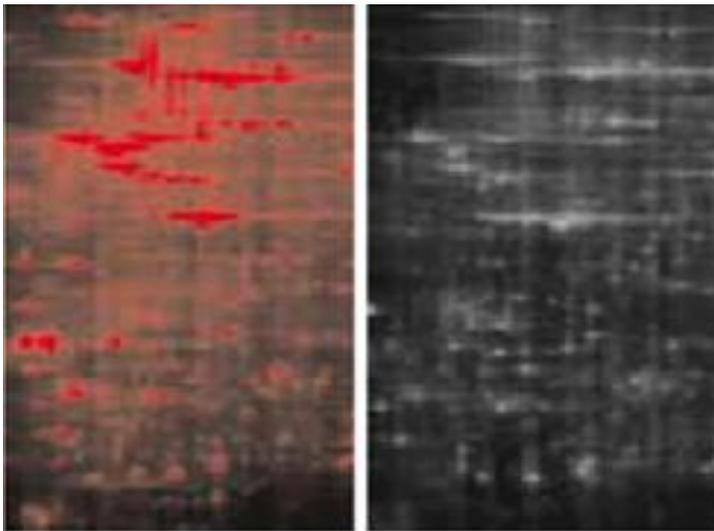


Figure 26 : révélation des protéines par coloration Nitrate d'argent (à droite) et Fluorophore "Sypro Orange, SyproRed, Sypro Ruby" (à gauche)

L'autoradiographie des gels 2 : D'après incorporation dans les protéines d'isotopes radioactifs comme le ^{35}S ou le $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ est extrêmement sensible. En effet, elle permet de visualiser des quantités très faibles de protéines (de l'ordre de 1 à 100 pg).

III. Techniques de chromatographie :

III.1. Introduction :

Le terme 'chromatographie' ('chromatography', en anglais) vient du Grec 'Khrôma' = couleur et 'Graphein' = écrire) implique une série de techniques reliées par un principe commun: la migration différentielle des substances à séparer à travers une phase solide poreuse (**phase fixe ou stationnaire**), sous l'impulsion d'un fluide vecteur (**phase mobile**).

III.2. Classification :

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

- ✓ Classification selon la nature des phases
- ✓ Classification selon le phénomène chromatographique mis en œuvre
- ✓ Classifications selon les procédés utilisés

A. Classification selon la nature des phases :

- ❖ **la phase mobile** est un fluide, donc soit:
 - ✓ un liquide : la chromatographie en phase liquide CPL
 - ✓ un gaz : la chromatographie en phase gazeuse CPG
 - ✓ un fluide "supercritique" : la chromatographie en phase supercritique CPS
- ❖ **la phase stationnaire** est soit un solide, soit un liquide. La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :
 - ✓ chromatographie liquide—solide (cas de Tswett) (LSC)
 - ✓ chromatographie liquide—liquide (LLC)
 - ✓ chromatographie gaz—solide (GSC ou GC)
 - ✓ chromatographie gaz—liquide (GLC ou GC)

B. Classification selon le phénomène chromatographique :

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distinguera donc :

- ❖ la **chromatographie d'adsorption** (LSC, GSC) : la phase stationnaire est un solide. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire.

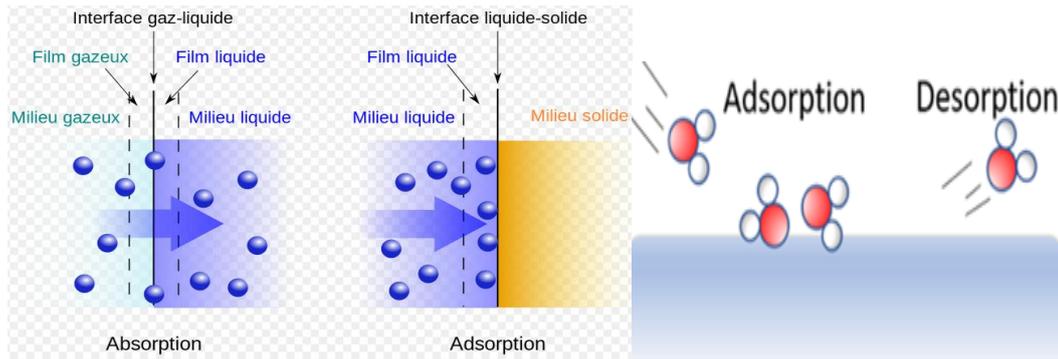


Figure 27 : illustration de deux phénomènes de sorption : absorption et adsorption.

- ✓ la **chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- ❖ la **chromatographie de partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage). La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide.
- ❖ la **chromatographie d'échange d'ions** (IEC), La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- ❖ la **chromatographie d'exclusion** (SEC) où la phase stationnaire est un solide poreux, se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC)

C. Classifications selon les procédés utilisés :

- ✓ Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :
 - la chromatographie sur **colonne**
 - la chromatographie sur **papier**
 - la chromatographie sur **couche mince**.
- ✓ 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'élution** (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

III.3. Chromatographie sur papier :**A. Principe :**

La chromatographie sur papier (CP) est une méthode de séparation qui repose sur des phénomènes de partage liquide-liquide qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange.

La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle.

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité.

Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

B. Support utilisé:

Les principales marque du papier filtre sont Whatman, Schleider et Schüll, Durieux et Arches. Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse.

Par exemple, le papier Whatman n°1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n°4 ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant les taches très denses et uniformes.

C. Applications :

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

Ses plus grands **inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince** sont :

- une durée de développement beaucoup plus longue
- une séparation généralement moins bonne.

III.4. Chromatographie sur couches minces (CCM) :**A. Principe :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long

d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent essentiellement par capillarité à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

B. L'appareillage :

- **la cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- **la 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) l'amidon ou un polymère organique.
- **l'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- **l'éluant** : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

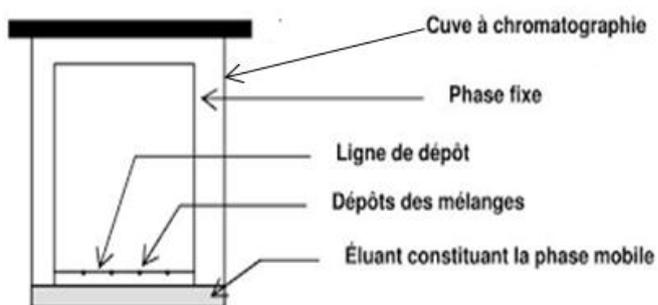


Figure 28 : Montage de la chromatographie sur couche mince

C. Adsorbants et plaques chromatographiques :

- les adsorbants employés en CCM selon l'ordre d'importance décroissante, sont: le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose. Ils sont des plaques fournies prêtes à l'emploi.

D. L'éluant :

-L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est **trop polaire** ; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Choix de l'éluant dans le cas d'analyses :

- **d'hydrocarbures** : hexane, éther de pétrole ou benzène.
- **de groupements fonctionnels courants** : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- **de composés polaires** : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.
 - ❖ Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté.
 - ✓ **La solubilité** : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
 - ✓ **La polarité** de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre

E. Dépôt de l'échantillon :

-L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, comme le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

-Il est important que le diamètre de la tâche ne dépasse pas 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire

F. Développement de la plaque :

-la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte **par capillarité**.

-Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve puis on introduit la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

-Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

On peut utiliser une chromatographie bidimensionnelle dans le cas où le mélange contient des solutés de polarités voisines : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

G. Révélation :

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

A l'oeil nu : le cas d'un produit coloré

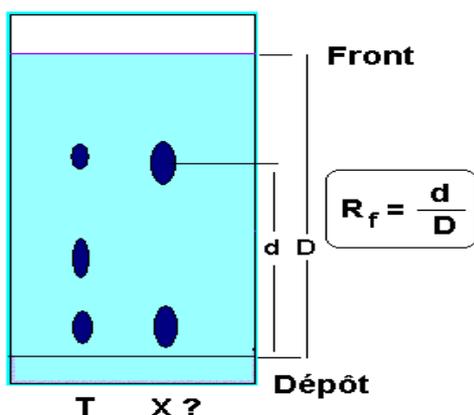
Radiation UV : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous formes de tache brillantes.

Fluorescence : si un indicateur de fluorescence est incorporé à l'adsorbant ; la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à radiation UV. Les composés sont révélés sous forme de taches sombres.

Iode : l'iode réagit avec un grand nombre de composé organique en formant des complexes jaunes. La révélation est réalisée en mettant la plaque, préalablement séchée en présence de quelque cristaux d'iode dans un récipient; fermé ensuite pour saturé de vapeur.



Figure 29 : Chromatographie sur couche mince des acides aminés

H. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal) :**Figure 30** : Exemple d'élution en CCM

d : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)

D : distance parcourue par le front du solvant

Nous déterminerons ensuite, le ratio frontal $R_f = d/D$, ce dernier étant le rapport entre la distance parcourue par le soluté, divisé par la distance parcourue par le front du solvant. Ce paramètre, nous informera sur la bonne séparation des composés.

I. Applications de la CCM :

Il existe plusieurs applications de la CCM :

- ✓ -Elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.
- ✓ -De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

III.5. Chromatographie sur colonne :**A. Principe :**

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la silice ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique. La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la silice et avec l'éluant. Ce procédé

permet de séparer les différents composants d'un produit mais aussi de purifier le produit d'une réaction.

❖ **Les paramètres influençant la séparation sont :**

Le diamètre et la hauteur de la colonne

La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie

Le débit de l'éluant et sa polarité

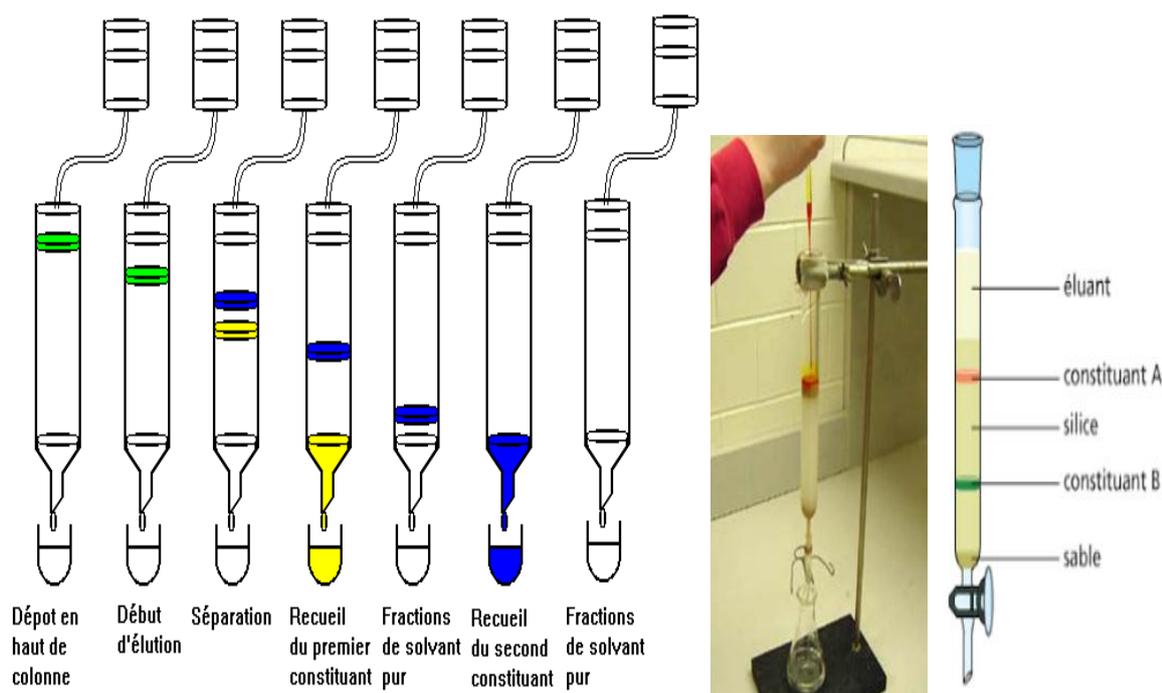


Figure 31 : principe de la chromatographie sur colonne

❖ **Interprétation :**

Soit deux produits de polarité différente (rouge et vert) qui migrent à travers une colonne de silice :

La séparation des différents constituants d'un mélange (de couleur bleue et jaune pour la démonstration) est déposée sur une colonne de chromatographie.

Le composé jaune interagit peu avec la phase fixe, il est donc peu retenu; il sort le premier, entraîné par le débit de la phase mobile.

Au contraire, le composé bleu interagit plus fortement avec la phase fixe, migre plus lentement et donc sort plus tard de la colonne.

❖ **Inconvénients :** La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

Elle nécessite une grande quantité d'éluant

La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures) La détection des composés exige une attention constante

Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.

III.5.1. Chromatographies en phase liquide (CPL) :

C'est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative ; Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un solide divisé (phase stationnaire) qui est soit placé dans un tube (colonne chromatographique), soit fixé sur une surface inerte. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

- Chromatographie liquide à haute performance
- La chromatographie d'exclusion
- La chromatographie d'adsorption
- La chromatographie d'adsorption en phase inverse
- La chromatographie sur échangeurs d'ions
- La chromatographie d'affinité

A. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP):

❖ Principe :

La Chromatographie Liquide Haute Performance, initialement chromatographie liquide haute pression, est basée sur les mêmes principes que la chromatographie sur colonne et met en oeuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage que d'absorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. C'est une technique d'analyse qualitative et quantitative qui permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange liquide, même à l'état de traces.

L'échantillon doit être totalement **soluble** dans la phase mobile qui sera appelé **solvant d'élution** (solvant ou mélange de solvants). Celui-ci doit être poussé par une pompe à **haute pression** afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges.

Le grand intérêt de cette méthode réside dans le fait que le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui diminue le temps nécessaire pour séparer les composants. Le débit élevé engendre une augmentation de la pression au sein de la colonne.

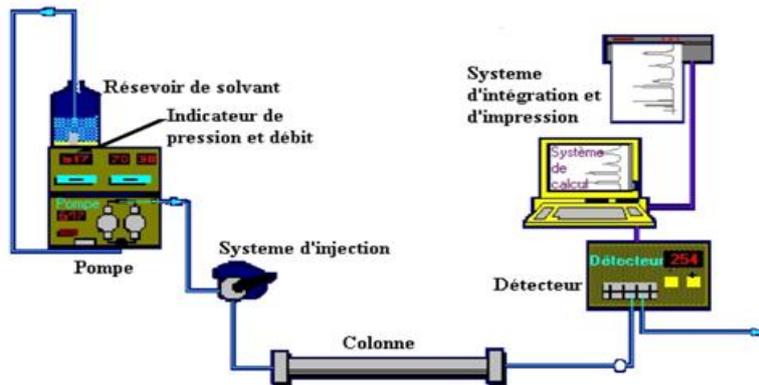


Figure 32 : schéma de principe d'une chaîne d'HPLC

❖ **Appareillage :**

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- ✓ un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- ✓ un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE).
- ✓ une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- ✓ Un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés dans un mélange.

Applications :

-La CLHP présente un champ d'application très vaste (molécules sensibles à la chaleur ou de hautes masses moléculaires) en raison d'un choix important de phases stationnaires et de l'évolution des détecteurs.

La technique chromatographique est très utilisée dans plusieurs domaines de la science; en particulier:

- Industrie des produits pharmaceutique et vétérinaires
- Domaine environnementale (Pesticides, Hydrocarbures...)
- Dans la biologie
- Analyse des mycotoxines

B. La chromatographie d'exclusion :**❖ Principe :**

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration, perméation de gel. Elle permet la séparation des molécules à travers des granules de gel poreux en fonction de la taille et la forme de la protéine.

La phase stationnaire est un solide poreux :

Les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0).

Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élué et le logarithme de la masse moléculaire.

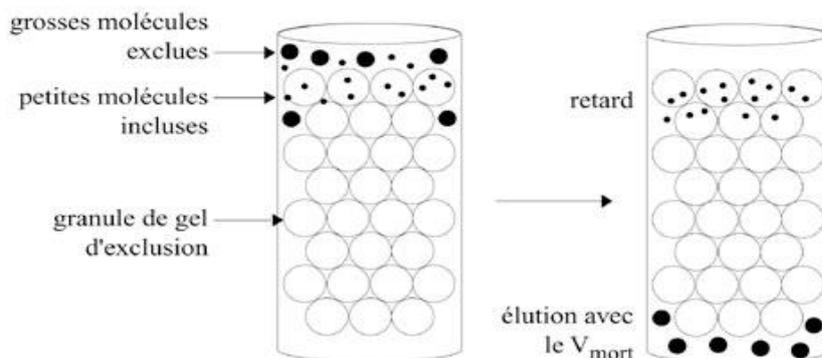


Figure 33 : Schéma du tamisage moléculaire.

Les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

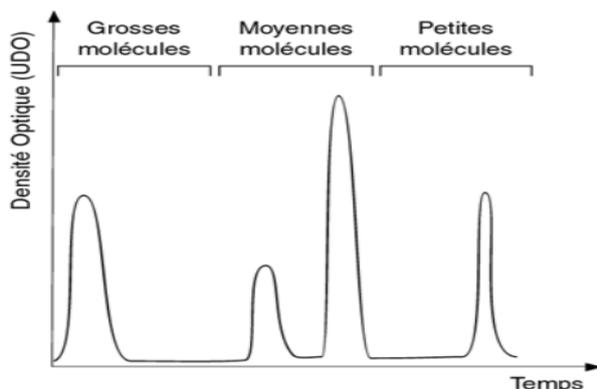


Figure 34: courbe de sélectivité des colonnes .

- ❖ **Types de gels :**
- ✓ **Gels hydratés (les plus utilisés) :** le Séphadex™ (G10 à G200) qui sont des polyosides bactériens de type dextran et le Sépharose™ (agarose).
- ✓ **Gels permanents :** ce sont des copolymères organiques ou bien des minéraux (silice).

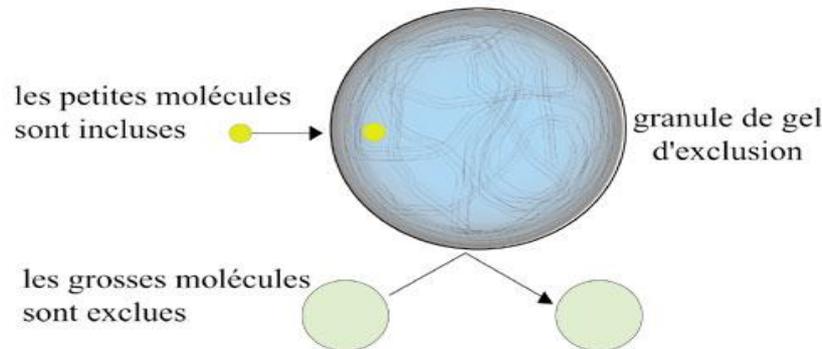


Figure 35: Représentation d'un gel d'exclusion.

❖ Applications :

-Cette technique est très utilisée pour la séparation ou l'élimination de sels ou de petites molécules dans les solutions protéiques : dessalage, échange de tampons ...

-Cette technique est également appliquée au fractionnement de mélanges de macromolécules et à la détermination (approximative) de la masse molaire des protéines.

C. La chromatographie d'adsorption :

❖ Principe :

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

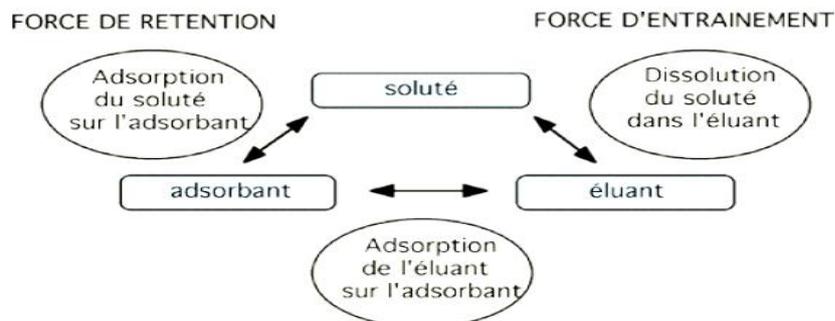


Figure 36 : les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant

L'adsorption est la fixation plus ou moins énergétique d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide; elle met en jeu des liaisons à faible énergie (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques...). Pour être utilisable à des fins séparatives, l'adsorption doit être réversible.

L'éluion ou désorption consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un solvant appelé éluant.

❖ **Les adsorbants :**

Ce sont des solides très divisés (l'adsorption est un phénomène de surface); c'est ainsi que 1 g d'alumine pour chromatographie peut représenter une surface de l'ordre de 100 m². On distingue :

- Les adsorbants faibles: l'alumine, le talc ou le carbonate de sodium.
- Les adsorbants forts : le gel de silice.

NB : une phase stationnaire constituée d'un adsorbant polaire (le gel de silice), d'un soluté polaire adsorbé et d'un solvant polaire (le méthanol). Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le soluté. En revanche, un solvant apolaire comme l'éther de pétrole possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entraînera un soluté apolaire.

❖ **Applications :**

La chromatographie d'adsorption est utilisée pour séparer des molécules organiques de masse molaire 100 à 1000 g/mol et de polarité moyenne; par exemple : lipides : stérols et stéroïdes, c phospholipides, pigments, médicaments, oses et oligosides, acides aminés et oligopeptides.

La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques notamment sur colonne en HPLC.

NB : les molécules apolaires sont pas ou peu retenues, et sont éluées les premières (= elles migrent au front en CCM).

-Les molécules trop polaires risquent d'être adsorbées de façon irréversible, et ne sont donc pas éluées (= elles resteraient sur la ligne de dépôt en CCM).

D. La chromatographie d'adsorption en phase inversées :**❖ Principe :**

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité.

Elle est constituée, la plupart du temps, par des **silices apolaires greffées**. Il existe des greffons apolaires de taille différente, de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18), donc de polarités différentes.

La phase mobile est polaire et hydrophile. Les séparations sont fondées sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Ainsi, plus un soluté est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire.

A l'inverse, plus un soluté est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile liquide. Donc les composés polaires sont récoltés en premier à l'inverse d'une séparation par chromatographie classique.

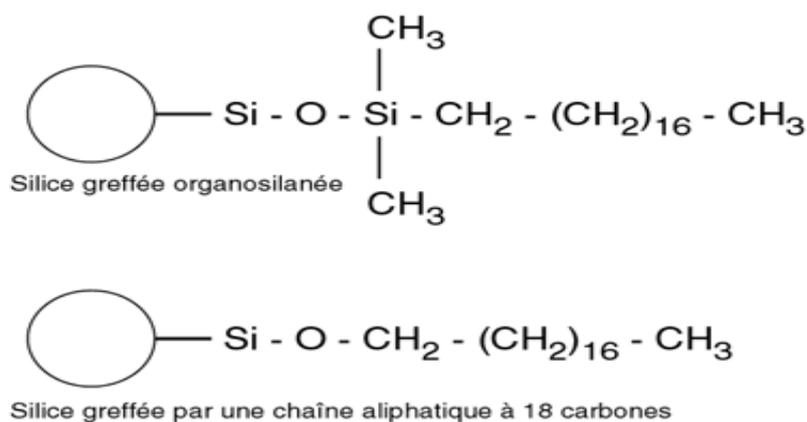


Figure 37 : Silices apolaires greffées

❖ Applications :

Dans la pratique, cette chromatographie ne s'applique qu'en HPLC, elle porte le nom de RP-HPLC (ou Reverse Phase HPLC, ou HPLC en phase inverse). La RP-HPLC s'applique bien à la séparation de petites molécules apolaires : lipides, acides aminés, peptides.

E. La chromatographie sur échangeurs d'ions :**❖ Principe :**

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions

retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.

La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables. La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne.

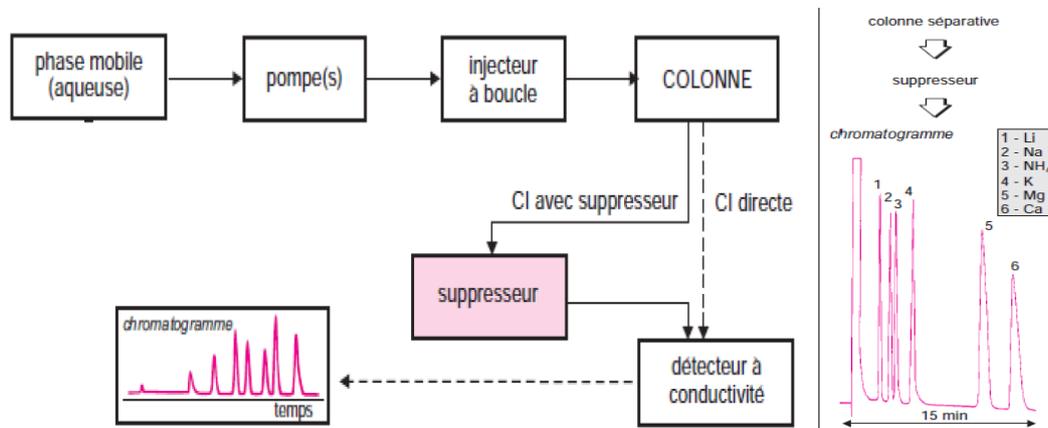


Figure 38 : Schéma de principe d'une installation de chromatographie sur échangeurs d'ions

❖ Les échangeurs d'ions :

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

Nature :

La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisables.

-**Les supports** peuvent être :

- minéraux : silice
- organiques : résine polystyrénique, cellulose, dextrane

-**Les groupements fonctionnels** sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

- les échangeurs de cations portent des groupements chargés (-)
- les échangeurs d'anions portent des groupements chargés (+)

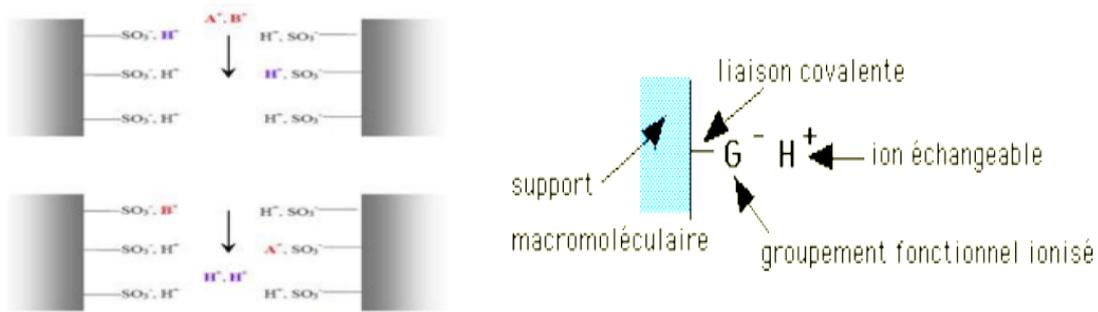


Figure 39 : principe des échangeurs d'ions

❖ Remarque :

Résine cationique : qui échange réversiblement des cations. Une résine cationique est chargée négativement.

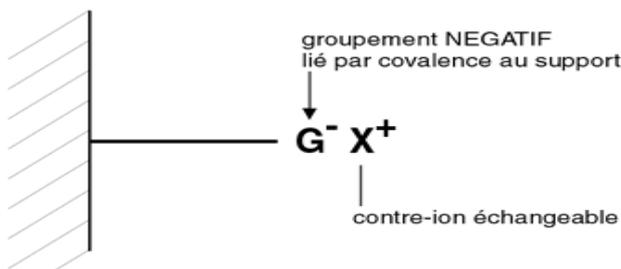
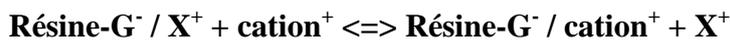


Figure 40: Résine échangeuse de cations (résine)

Résines anioniques : qui échangent réversiblement des anions. Une résine anionique est chargée positivement.

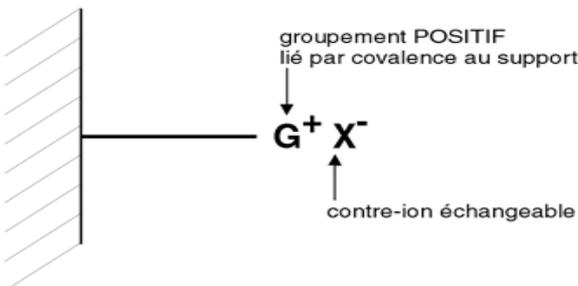
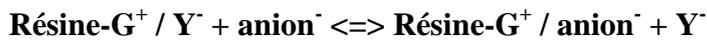


Figure 41 : Résine échangeuse d'anions (résine anionique).

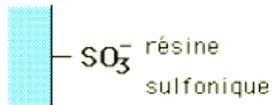
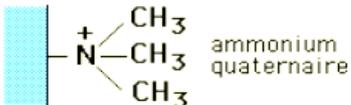
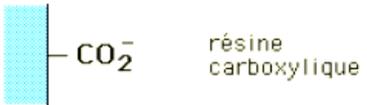
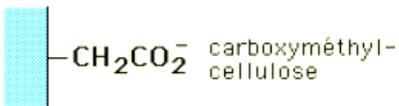
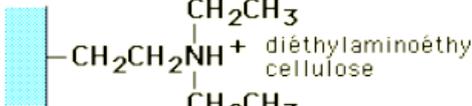
ECHANGEURS DE CATIONS	ECHANGEURS D'ANIONS
FORTS	
	
FAIBLES	
	
	

Figure 42: échangeurs d'ions forts et faibles

❖ **Classification des résines cationiques classées selon leurs aptitudes à l'ionisation :**

✓ **Résines cationiques fortes :**

Sulfoniques : très fortement ionisées, quel que soit le pH

• **Résine sous forme acide :**



(contre-ion : H^+)

Résine sous forme sodique :



(contre-ion : Na^+)

✓ **Résines cationiques intermédiaire :**

à groupement phosphorique



✓ **Résines cationiques faibles :**

à groupement carboxylique : non ionisées en milieu fortement acide



à groupement carboxyméthyl



✓ **Résines cationiques très faibles :**

phénoliques : uniquement ionisées en milieu alcalin

• **Résine-O⁻ / H⁺ Résine-O⁻ / Na⁺**

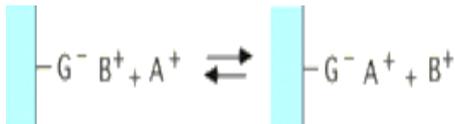
❖ **Classification des résines anioniques classées selon leurs aptitudes à l'ionisation :**✓ **Résines anioniques fortes :**

résines à groupements aminés quaternaires.

résines à groupements aminés tertiaires.

✓ **Résines anioniques faibles :**

résines à groupements aminés secondaires et primaires.

❖ **Réaction d'échange d'ions :**

Le système peut s'écrire : $\text{Br} + \text{As} \rightleftharpoons \text{Ar} + \text{Bs}$ (r = fixé sur la résine; s = en solution)

La constante de sélectivité est donnée par la relation :

$$K_B^A = \frac{[\text{Ar}][\text{Bs}]}{[\text{As}][\text{Br}]}$$
 et

Si $K_B^A > 1$ la résine a une affinité préférentielle pour le soluté A

Si $K_B^A < 1$ la résine a une affinité préférentielle pour le soluté B

❖ **Applications :**

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

F. La chromatographie d'affinité :❖ **Principe :**

Le principe consiste à utiliser une phase stationnaire constituée d'un support macromoléculaire (silice, polymère) sur lequel on a greffé une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler. Ceux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués.

Trois types d'affinités sont utilisés :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

❖ **Les étapes d'une chromatographie d'affinité** : il existe 3 étapes :

- ✓ **Fixation** : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.
- ✓ **Purification** : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.
- ✓ **Elution** : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluat.

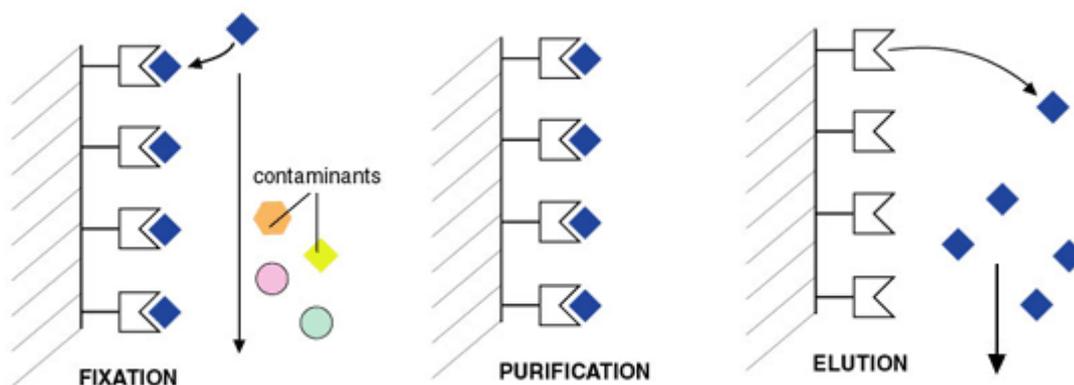


Figure 43 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

III.5.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Principe : Elle est appliquée pour les substances volatiles. Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N₂). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

Cette méthode permet de séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire qui peut être

- liquide (chromatographie de partage - GLC) : C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.
- solide (chromatographie d'adsorption - GSC) : C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

❖ **Appareillage** Il est constitué de 3 parties:

- ✓ un injecteur

- ✓ une colonne placée dans une enceinte thermostatée
- ✓ un détecteur

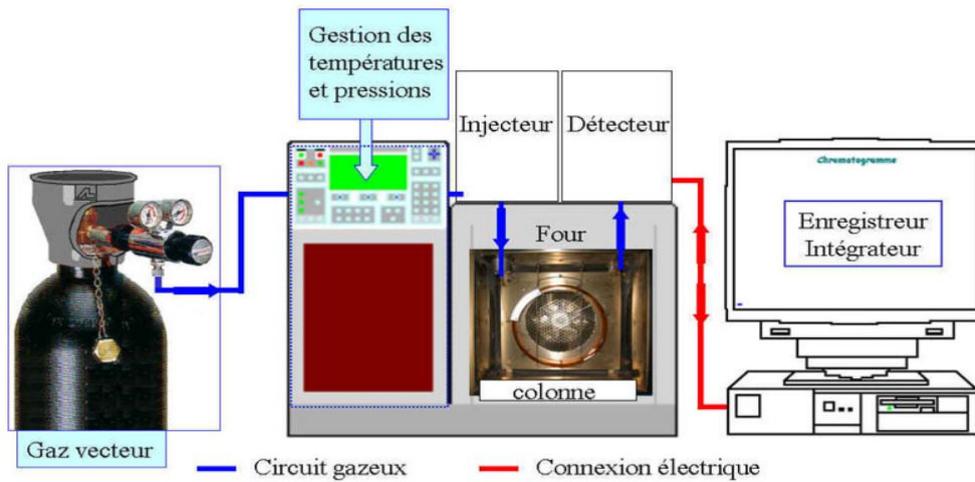
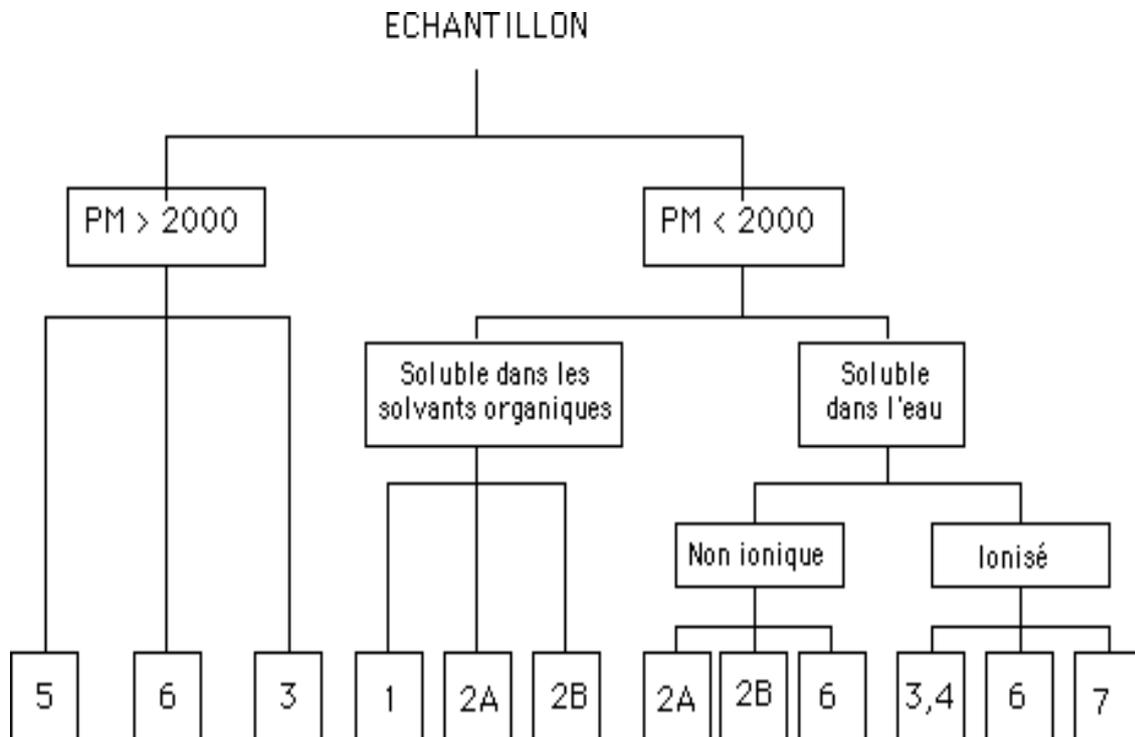


Figure 44 : Chromatographie en phase gazeuse

III.5.3. Les différents modes de chromatographie liquide :

Le choix de tel ou tel mode obéit à des règles logiques directement liées à la nature des composés à séparer :



On dispose d'un grand nombre de modes de chromatographie. Certains ont un champ d'application très large, d'autres au contraire correspondent à des applications très spécialisées.

On distinguera dans ce qui suit :

- 1 - chromatographie d'adsorption
- 2 - chromatographie de partage (en phase directe (2A) ou inverse (2B))
- 3 - chromatographie d'échange d'ions (+ chromatographie ionique)
- 4 - chromatographie de paires d'ions
- 5 - chromatographie d'exclusion (séparation selon la taille)
- 6 - chromatographie d'affinité
- 7 - chromatographie adaptée à la séparation d'énantiomères

A. La chromatographie de partage :

La chromatographie de partage (ou chromatographie liquide-liquide) met en jeu un mécanisme de partition entre solvants que constituent respectivement par la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire peut être constituée par un film liquide (non miscible avec la phase mobile bien sûr) imprégné sur un support rigide (silice) ou fixé par liaison covalente (phases greffées).

Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles, mais dans ce cas une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits. Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

L'équilibre de répartition du soluté entre les deux phases mobile et stationnaire s'exprime par l'équation:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

K : coefficient de distribution ou de partage qui dépend de la nature des constituants.

C_M et C_S : concentrations respectives du soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire.

La séparation de deux ou plusieurs corps sera d'autant efficace que leurs coefficients de partage respectifs seront différents.

Il y'a deux modes de chromatographie de partage :

- **mode normal** : La phase stationnaire est polaire et la phase mobile est un solvant non polaire.

- **mode inverse** : La phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est un solvant polaire.

❖ Terminologie :

➤ Tamis moléculaire :

Un matériel solide et poreux qui a la propriété d'agir comme un tamis à l'échelle moléculaire.

Il s'agit d'une classe d'adsorbant qui a la capacité de retenir certaines molécules à l'intérieur de ses pores. Dans l'idéal, il possède des pores de petite taille distribués de manière homogène. Il a de ce fait une grande surface spécifique.

➤ **Chromatogramme :**

Un chromatogramme est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (par rapport à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution). Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic
Analyse quantitative : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics.

➤ **L'adsorption :**

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

➤ **Elution :**

L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

➤ **Le temps mort :**

Le temps mort (t_m) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

➤ **Le temps de rétention**

Le temps de rétention (t_r) 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. Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à l'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile (Fig.13).

➤ **Le temps de rétention réduit**

Le temps de rétention réduit (t_r') représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

$$t_r' = t_r - t_m$$

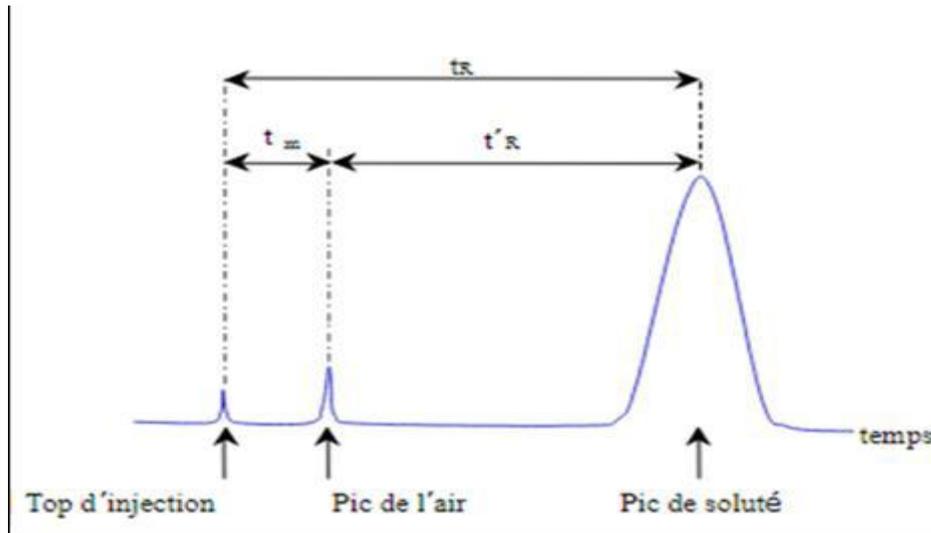


Figure 45 : Chromatogramme d'un constituant

➤ **Le volume de rétention**

Connaissant le débit D de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit le volume de rétention (V_r)

$$V_r = t_r \times D$$

$$V_r = t_r \times u \cdot s \cdot \varepsilon$$

u : vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

s : section droite de la colonne

ε : porosité de la phase stationnaire ($\approx 0,75$ pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_m = t_m \times D$$

Le volume de la phase stationnaire désigné par V_s est calculé en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

➤ **Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile**

La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté v est égale à :

$$v = L/t_r$$

L : longueur de la colonne

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est égale à :

$$u = L/t_m$$

➤ **Le facteur de capacité**

Le facteur de capacité (ou facteur de rétention) k' exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expression:

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

k' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique $1 < k' < 10$.

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations :

$$t_r = t_m(1 + k')$$

et

$$V_r = V_m(1 + k')$$

Chapitre 4 :
Analyse instrumentale
spectroscopique

Chapitre IV : Analyse instrumentale spectroscopique**I. Introduction :**

La spectroscopie ou spectrométrie est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique, c'est-à-dire de sa décomposition sur une échelle d'énergie, ou toute autre grandeur se ramenant à une énergie (fréquence, longueur d'onde, etc.).

La spectrophotométrie est le domaine qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétiques dans le domaine de la lumière visible. La spectrométrie, ou spectroscopie, est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution.

II. Types de spectroscopie

On fonction de spectre utilisé, et la nature de la substance à analyser on a plusieurs techniques :

a- Spectroscopie UV-visible = spectrophotométrie = spectroscopie d'absorption moléculaire. La technique de spectrométrie d'absorption UV-visible est la plus utilisé dans les laboratoires d'analyses biologiques

b- Spectroscopie d'absorption atomique (SAA) : La spectrométrie atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, c'est à dire lorsque celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Ce sera le cas si les énergies mises en jeu sont modérées.

c- Spectroscopie Infrarouge (IR) : dans cette technique on peut exciter les modes de vibration (élongation et déformation des liaisons).

d- Spectroscopie de masse (SM) : généralement couplé avec la chromatographie en phase gazeuse (CG/SM), appliquée surtout pour l'analyse et la détermination de la structure des huiles essentielles.

e- Résonance Magnétique nucléaire (RMN) : très utilisée pour la détermination de la structure des molécules d'origine végétales (flavonoïdes, alcaloïdes, ... etc.)

III- Le spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont classées et réparties en fonction de leur longueur d'onde ou de leur fréquence ; cette répartition est appelée spectre électromagnétique. Ce spectre est représenté

sur la figure suivante, qui consiste en une bande contenant tous les types de rayonnement électromagnétique qui existent dans l'univers.

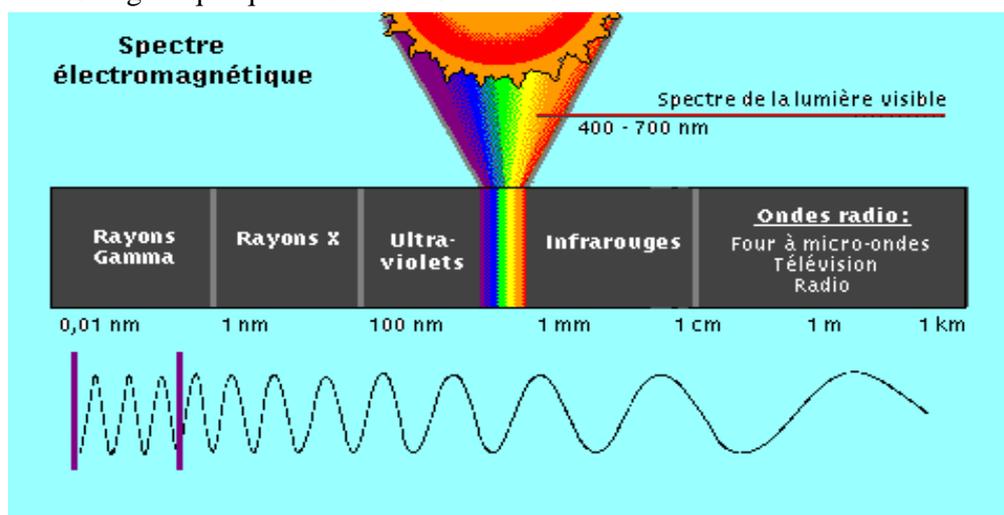


Figure 46: Le spectre électromagnétique

IV. Spectroscopie Ultraviolet-visible :

IV.1. Principe de Spectroscopie ultraviolette et visible

Soit une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon d'épaisseur l , l'absorbance vérifie la loi de Beer-Lambert soit :

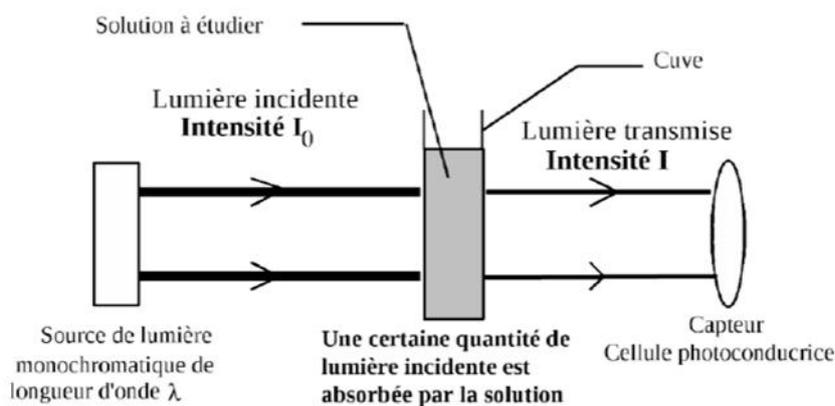
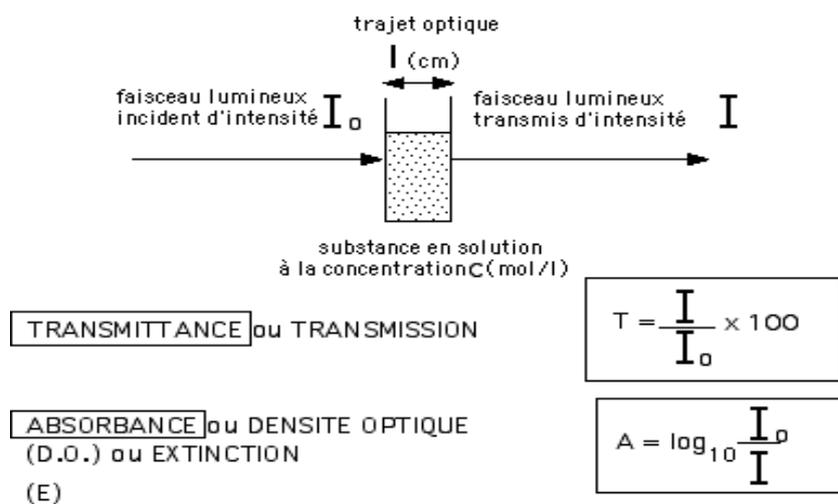
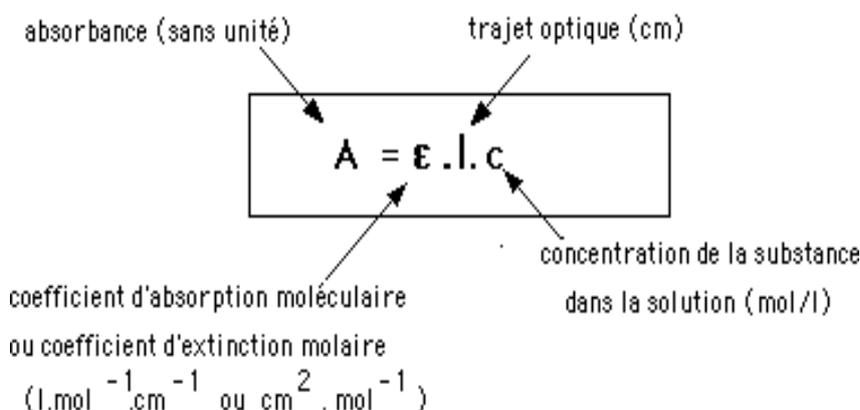


Figure 47 : Principe de Spectroscopie

Le spectre UV-Visible est le tracé de A (absorbance) en fonction de λ (en nm) Bande d'absorption caractérisée par : sa position λ_{max} (nm) et son intensité ϵ_{max} ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) ou coefficient d'absorption molaire. A une longueur d'onde donnée, pour une solution donnée, pour une épaisseur e de solution traversée par la lumière, l'absorbance A est proportionnelle à la concentration C de la solution étudiée.



Loi de Beer-Lambert :



A. Conditions de validité de la loi de Beer Lambert :

La loi de Beer Lambert est valable dans des conditions très précises :

- La solution doit être homogène dans les solutions hétérogènes, il existe des phénomènes de diffusion qui entraînent une baisse accélérée de l'intensité résultante.
- La solution doit être diluée si la concentration est très importante, la relation $A = f(C)$ n'est plus linéaire, il faut un monochromatisme très poussé pour éviter des interférences de certaines substances, enfin pour deux substances en solution absorbant les photons à la même longueur d'onde, l'absorbance sera égale à la somme des absorbances, de chacune des substances il y a une additivité de $A (S1 + S2) = A (S1) + A (S2)$.

❖ En résumé :

Cette relation, n'est valide que dans certaines conditions,

- ✓ la lumière incidente doit être monochromatique
- ✓ la solution doit être suffisamment diluée
- ✓ la solution doit être homogène (pas de précipité, ni de gaz)
- ✓ le soluté ne doit pas donner de réaction sous l'effet de la lumière

B. Applications de la loi de Beer-Lambert

Cette loi est utilisée pour de nombreux dosages d'espèces chimiques colorés. Pour des composés incolores, il est parfois possible de fabriquer des complexes colorés. Cette loi n'est valable que pour les faibles concentrations est en général pour des absorbances inférieures à 1.

La loi de Beer-Lambert est également utilisée dans certains détecteurs comme ceux utilisés en HPLC.

IV.2. Appareillage

Le spectrophotomètre permet la comparaison d'un faisceau lumineux avant et après passage dans un échantillon. Un spectrophotomètre comporte : (Figure)

- ✓ Une source de lumière blanche
- ✓ **Un monochromateur** composé d'un réseau et d'une fente qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde autour d'une valeur choisie
- ✓ **Une cuve** qui contient l'échantillon à étudier
- ✓ **Un détecteur** qui mesure l'intensité lumineuse après la traversée de la cuve

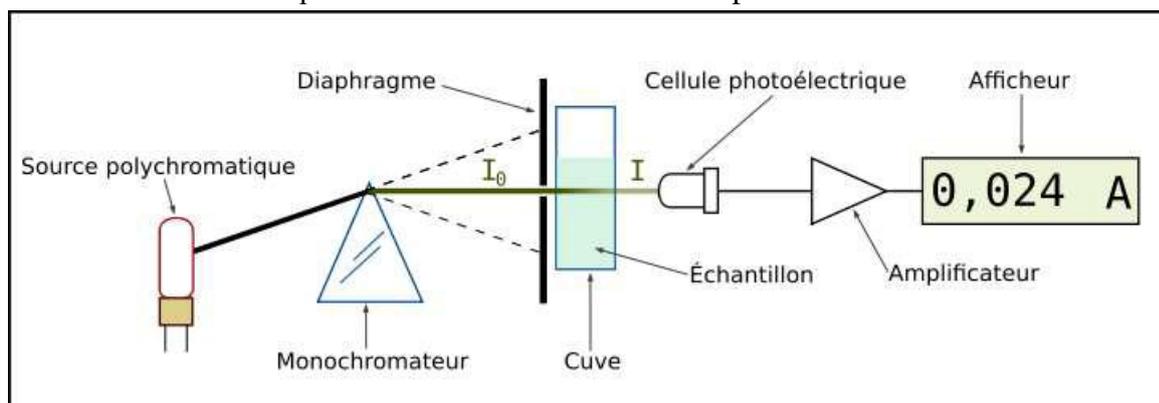


Figure 48: Schéma de principe du spectromètre UV-visible

IV.3. Applications de la spectroscopie UV-visible

✓ En biochimie clinique

Cette méthode permet en biochimie clinique de doser de nombreux paramètres essentiellement sérique ou plasmique (sérum ou plasma) les principaux sont le glucose, cholestérol, triglycérides, protéines (hémoglobine, albumine, ...), urée, créatinine et calcium, bilirubine conjuguée et non conjuguée,

✓ Dans le domaine végétal

- Dosage des polyphénols (méthode de Folin Ciocalteu)
- Dosage des flavonoïdes (méthode d' AlCl_3)
- Dosage des tannins (méthode de la catéchine)
- Dosage des caroténoïdes, de la vitamine C, des alcaloïdes,

✓ En biologie moléculaire :

Il est utilisé lors de l'extraction d'ADN, pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

✓ En microbiologie :

La densité d'une culture bactérienne est estimée par sa turbidimétrie mesurée par l'absorbance d'un échantillon à 600nm.

✓ En enzymologie

Les activités enzymatiques :

Transaminase (ALAT : Alanine Amino-transférase et ASAT : Aspartate Aminotransférase), amylase, phosphatase alcaline, LDH (lactate déshydrogénase), ...

V- Spectrophotométrie d'absorption atomique

La **spectrométrie d'absorption atomique** (*Atomic absorption spectroscopy* en anglais ou **AAS**) est une technique servant à déterminer la concentration de certains métaux dans un échantillon. En 2010, elle peut servir à mesurer la concentration de plus de 60 métaux différents en solution. Elle fait partie des méthodes classiques d'analyse en chimie analytique. Basée sur des méthodes optiques, elle conduit aussi bien à des résultats qualitatifs qu'à des données quantitatives. L'absorption est utilisée généralement pour faire un dosage, l'élément est connu, on détermine une concentration.

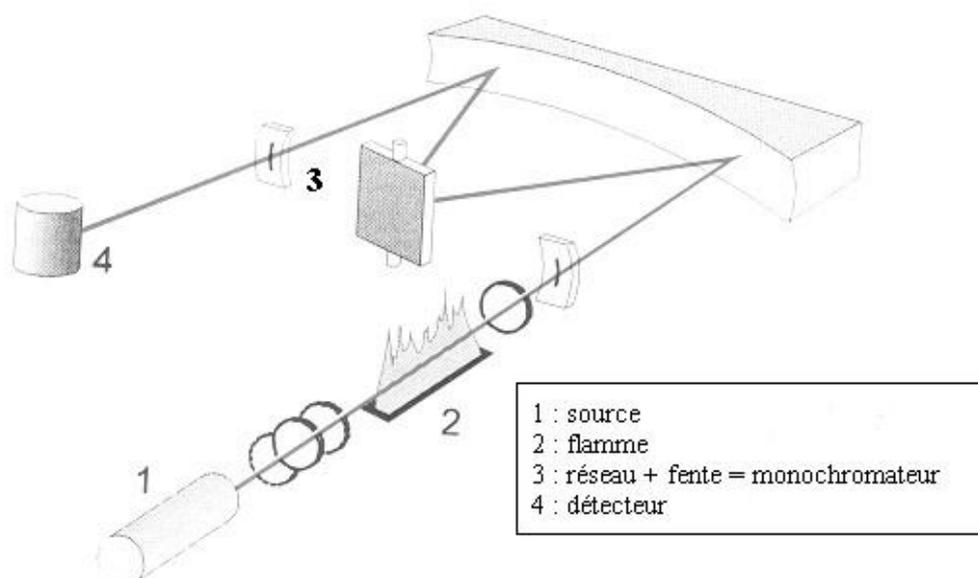


Figure 49 : spectrophotomètre d'absorption atomique

VI. Spectrométrie de masse :

Principe : Le spectromètre de masse est un appareil qui fait correspondre à chacune des masses des éléments d'un corps (atomes, molécules, fraction ou association de molécules, radicaux, etc.), après ionisation, sous vide élevé, une indication chiffrée renseignant sur la présence et les quantités relatives des éléments constitutifs de ce corps.

La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales. La spectrométrie de masse a récemment élargi son champ d'application, qui était classiquement limité à l'étude des petites molécules organiques ($PM < 2.000$), pour permettre actuellement d'étudier des macromolécules ($PM \dots > 100.000$), dont il est possible de déterminer le PM à une unité près !

Donc il analyse des petites molécules, des protéines (détermination du P.M).

La spectrométrie de masse permet donc de déterminer le poids moléculaire d'une substance, et les diverses fragmentations renseignent sur sa structure : les cassures s'effectuent en des sites privilégiés, par exemple au niveau des liaisons peptidiques ou osidiques pour les peptides et les polyosides respectivement.

Il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer la masse moléculaire des protéines, Comme **l'électrospray** (ou ion-spray)

Chapitre 5 :
Hydrodynamique

Chapitre V : Hydrodynamique**I Introduction**

L'hydrodynamique c'est la partie de l'hydraulique qui s'intéresse surtout aux mouvements des fluides. L'étude des principes de conservation de la masse, l'écoulement tubulaire (laminaire/turbulent), les mesures du débit,...

L'hydrodynamique étudie un grand nombre de problème d'ordre pratique lié au mouvement du liquide tel que : le mouvement de l'eau dans les conduites et dans les canaux, les turbomachines,...

II Notion de base**II.1 Fluide parfait et fluide réel**

Un fluide parfait est un fluide dépourvu de la viscosité. Ses particules glissent les unes sur les autres sans frottement, sans tourner sur elles-même et sans tourbillonner, donc sans perte de charge. En mécanique des fluides, un fluide est dit parfait s'il est possible de décrire son mouvement sans prendre en compte les effets de frottement.

Contrairement à un fluide parfait, qui n'est qu'un modèle pour simplifier les calculs, pratiquement inexistant dans la nature, un fluide réel se caractérise par sa viscosité ce qui conduit à une perte d'énergie à cause des frottement le long du mouvement du fluide.

II.2 Ecoulement parmanent et non-parmanent

Un régime est dit parmanent quand en un point ou dans une section, la vitesse moyenne, le débit, la pression, et tous autres paramètres restent constante dans le temps. Alors qu'on régime non-parmanent (variable) se caractérise par la variation de ces paramètres dans le temps du même point ou de la même section.

II.3 Ecoulement en charge et à surface libre

L'écoulement en charge c'est un écoulement sous-pression qu'on le trouve dans les conduites à section pleine. Alors que l'écoulement à surface libre qui a lieu dans les cours d'eau et les canaux artificiels, son plan d'eau supérieur étant libre et il est en contact direct avec l'atmosphère, et l'écoulement se fait par gravité.

II.4 Fluide compressible et incompressible

On sait que la compressibilité des gaz est très élevée et influe beaucoup sur leur comportement. Par contre les liquides sont très peu compressibles. En pratique on les

considèrent comme incompressibles. Un fluide est dit incompressible lorsque le volume occupé par une masse donnée ne varie pas on appliquant une pression extérieure.

II.5 Ecoulement uniforme et non-uniforme

L'écoulement uniforme est subdivisé en un écoulement uniforme et un autre non-uniforme (varie).

D'une section à une autre section, si rien ne varie (vitesse moyenne, débit) le long d'une distance, l'écoulement est dit uniforme. C'est le cas de l'écoulement dans les tuyaux rectilignes, loin des singularités.

L'écoulement non-uniforme diffère par la variabilité des paramètres. On le rencontre dans les cas où la vitesse moyenne change avec la présence d'un changement de section, même si le débit reste le même.

III Ligne de courant, tube de courant

On appelle lignes de courant, des lignes tangentes en chacun de leur point à la direction des vecteurs de vitesses d'écoulement à l'instant « t ». Cette ligne est tracée par une série de points dans le liquide en mouvement. On peut dire que la ligne de courant représente le parcours d'une masse élémentaire de fluide. L'ensemble des filets d'écoulement traversant une section quelconque perpendiculaire aux flux général détermine un tube d'écoulement de courant.

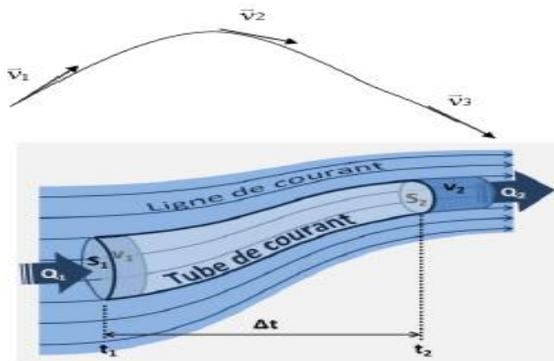


Figure 50 : Ligne et tube de courant pour un écoulement

IV Débit volumique, débit massique :

En hydraulique, on utilise souvent la notion de débit et la vitesse moyenne d'écoulement.

Le débit du liquide est la quantité du liquide passant par unité de temps par une section d'écoulement donnée du courant, on distingue :

- Le débit volumique « Q » mesuré en m³/s ou en l/s : étant le volume de liquide qui traverse une section par unité de temps

$$Q = \text{volume} / \text{temps} = \text{vitesse} \times \text{section} \quad (Q = \text{volume} / \text{temps} = V \times S)$$

- Le débit massique « » mesuré en Kg/s : étant la masse de liquide qui traverse une section par unité de temps

$$m = \text{masse volumique} / \text{temps} \quad (= m/t = \rho \times \text{volume} / \text{temps} = \rho \times Q)$$

avec

V : vitesse moyenne en m/s ;

S : section transversale de la conduite en m² ;

ρ : masse volumique du liquide en m³/s

V. Principe de conservation de la masse :

Soient S₁ et S₂ deux sections normales d'un petit tube de courant, ρ₁ et ρ₂ les masses spécifiques, V₁ et V₂ les vitesses scalaires moyennes du fluide qui traverse ces sections.

Selon le principe de conservation de la masse, les débits de masse à travers S₁ et S₂ sont égaux en régime stationnaire:

$$\rho_1 S_1 V_1 = \rho_2 S_2 V_2$$

Dans le cas d'un liquide incompressible : ρ₁ = ρ₂ ,

Ce qui donne S₁ V₁ = S₂ V₂ c'est le débit volumique

Ce résultat s'applique notamment à l'écoulement d'un liquide dans un tuyau de section variable. C'est *l'équation de continuité d'un filet liquide incompressible*.

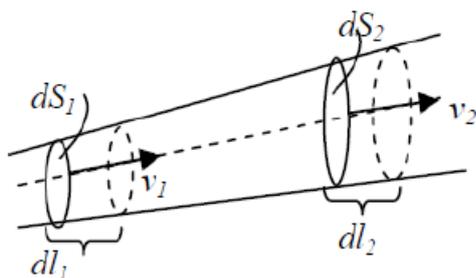


Figure 51: Principe de conservation de masse

VI Equation d'Euler :

Prenons un tube de courant ayant à l'intérieur un volume infinitésimal de fluide dont l'aire de section est « S », la longueur « ds » et de masse « m ». à cet endroit le tube de courant fait un

angle « α » avec l'horizontale. A la section 1, la pression est « P » et à la section 2, la pression est « $P + dP$ ». de la section 1 à la section 2, il y a un changement de vitesse « dv » et une hausse de niveau « dx ».

A la section (1) la force $F_1 = P.S$

A la section (2) la force $F_2 = -(P + dP).S$ (sens inverse de l'écoulement)

La projection de la masse dans le sens d'écoulement : $- m.g.\text{Sin}(\alpha)$

Selon la deuxième loi de Newton, la poussée nette est égale à $Qm.dv$, donc :

$$-dP.S - m.g. \text{Sin}(\alpha) = Qm.dv = (\rho. V. S). dv$$

On a : $m = \rho. S.dx$ et $\text{Sin}(\alpha) = dz / dx$

$$-dP.S - (S.dx . \rho.g). dz / dx = \rho.V.S. dv$$

En simplifiant, on obtient une relation très importante en mécanique des fluides, *l'équation d'Euler*.

$$\frac{dP}{\rho} + g.dz + v.dv = 0$$

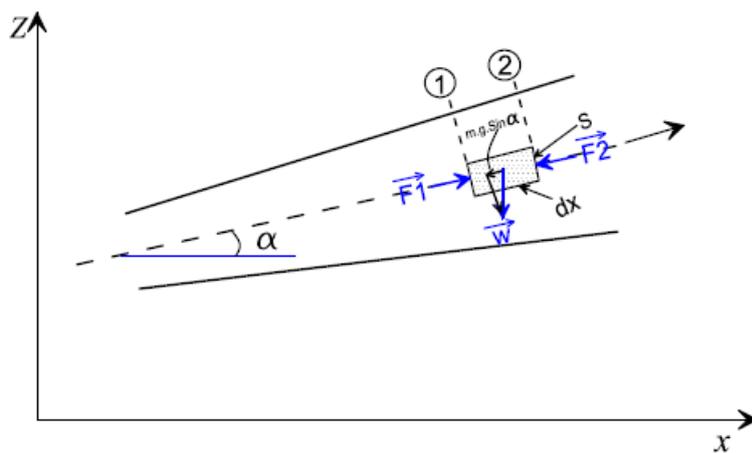


Figure 52 : Principe de conservation de masse.

VII Relation de Bernoulli :

Appliquons l'équation d'Euler à l'écoulement du liquide parfait ; la masse volumique étant invariable, il devient facile d'intégrer chaque terme de cette équation entre deux sections quelconques, 1 et 2 :

$$\int_1^2 \frac{dP}{\rho} + \int_1^2 g \cdot dz + \int_1^2 v \cdot dv = 0$$

Ce qui donne :

$$P_1/\rho + g \cdot z_1 + v_1^2/2 = P_2/\rho + g \cdot z_2 + v_2^2/2$$

Cette relation peut s'écrire sous la forme :

$$P_1/\rho g + z_1 + v_1^2/2g = P_2/\rho g + z_2 + v_2^2/2g$$

C'est l'équation de Bernoulli (1700-1782)

Expression dans laquelle

P : désigne la pression,

z : la hauteur par rapport à un niveau de repère,

v : la vitesse du courant.

L'unité pour les trois termes est le joule par newton, c'est-à-dire d'énergie par unité de poids :

$$\frac{J}{N} = \frac{N \cdot m}{N} = m$$

a. L'équation de Bernoulli peut s'interpréter en terme de hauteur

$$z + \frac{P}{\rho g} + v^2/2g = Cte \quad [m]$$

z : hauteur géométrique / altitude

$\frac{P}{\rho g}$: hauteur due à la pression / hauteur manométrique , $z + \frac{P}{\rho g}$: hauteur piézométrique

$v^2/2g$: hauteur due à la vitesse / hauteur capable

Les trois hauteurs donnent la hauteur de la charge totale

b. L'équation de Bernoulli peut s'interpréter en terme de pression

$$z\rho g + P + \frac{1}{2}\rho v^2 = Cte \quad [Pa]$$

P : pression statique

$z\rho g + P$: pression hydrostatique

$\frac{1}{2}\rho v^2$: pression cinétique ou pression dynamique (elle résulte du mouvement)

Les trois termes donnent la pression totale (ou la charge)

c. L'équation de Bernoulli peut s'interpréter en terme d'énergie

multiplions tous les termes de l'équation par un volume « V »

$$z \cdot \rho \cdot g \cdot V + P \cdot V + \frac{1}{2} \rho \cdot v^2 \cdot V = Cte \cdot V \quad [Joule]$$

$Epr = P \cdot V$: Energie de pression ;

$Ep = z \cdot \rho \cdot g \cdot V = m \cdot g \cdot z$: Energie potentielle ;

$Ec = \frac{1}{2} \rho \cdot v^2 \cdot V = \frac{1}{2} m \cdot v^2$: Energie cinétique

$E_m = C^{te} \cdot V$: Energie totale / energie mécanique

d. Représentation graphique de l'équation de Bernoulli

Nous pouvons représenter les trois hauteurs de l'équation de Bernoulli pour différentes sections d'une conduite. Il devient facile, et parfois très utile, d'en faire une représentation graphique.

Vu qu'il s'agit d'un fluide parfait, l'énergie totale par unité de poids demeure constante ; elle détermine une droite parallèle au plan de référence, la ligne de charge énergétique ou plus simplement ligne de charge. La somme des deux premiers termes ($z + P/\rho g$) détermine une ligne qu'on appelle la ligne piézométrique.

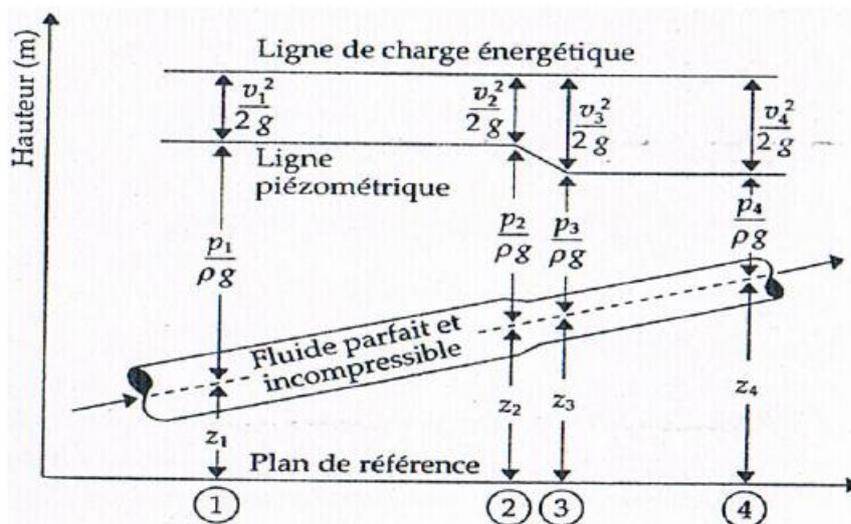


Figure 53 : Représentation de l'équation de Bernoulli d'un d'un fluide parfait

VIII. Tube de Pitot :

Le tube de pitot est largement utilisé comme une sonde portative pour mesurer la vitesse d'un écoulement. Il s'agit d'un tube de faible diamètre ≈ 5 mm.

La formule utilisée pour le cas d'un tube de Pitot, qui donne la vitesse en fonction de la différence de hauteur.

$$V = C_v \cdot \sqrt{2g \cdot \Delta h}$$

Avec :

C_v : coefficient de vitesse dont la valeur est fournie par le fabricant de l'instrument ou obtenue par étalonnage. Dans le cas des appareils bien conçus $C_v = 0.98$

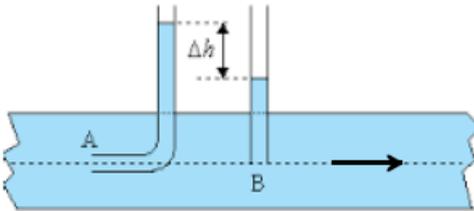


Figure 54 : Tube de Pitot

IX Tube de Venturi :

Considérons l'écoulement d'un fluide incompressible dans un Venturi dont l'entrée est « S1 », la section de la gorge « S2 » et la section de sortie « S3 ». Les tubes piézométriques placés au niveau des sections 1, 2 et 3 indiquent des hauteurs h_1 , h_2 et h_3 .

En supposant qu'il n'y a aucune perte de charge dans ce tronçon de conduite, et l'écoulement est permanent, l'équation de Bernoulli s'écrit :

$$h_1 + \frac{V_1^2}{2g} = h_2 + \frac{V_2^2}{2g} = h_3 + \frac{V_3^2}{2g} \dots \dots \dots (1)$$

V_1 , V_2 et V_3 sont les vitesses moyennes dans les sections 1, 2 et 3

en appliquant l'équation de continuité, on a :

$$V_1 S_1 = V_2 S_2 = V_3 S_3 = Q \dots \dots \dots (2)$$

Q : étant le débit volumique passant dans le Venturi

On va chercher la valeur de la vitesse « V_2 » en fonction de « V_1 ». En remplaçant dans la formule (1) la valeur V_1 , on trouve finalement la relation suivante :

$$V_2 = \sqrt{\frac{2g(h_2 - h_1)}{\left(\frac{S_2}{S_1}\right)^2 - 1}} \quad \text{et} \quad Q = S_2 \times \sqrt{\frac{2g(h_2 - h_1)}{\left(\frac{S_2}{S_1}\right)^2 - 1}}$$

En réalité le débit déterminé par cette relation est inférieur à la valeur réelle mesurée expérimentalement. Cette différence est décrite par le coefficient de débit « C_q », ce coefficient peut être déterminé expérimentalement, il est généralement compris entre 0.9 à 0.99

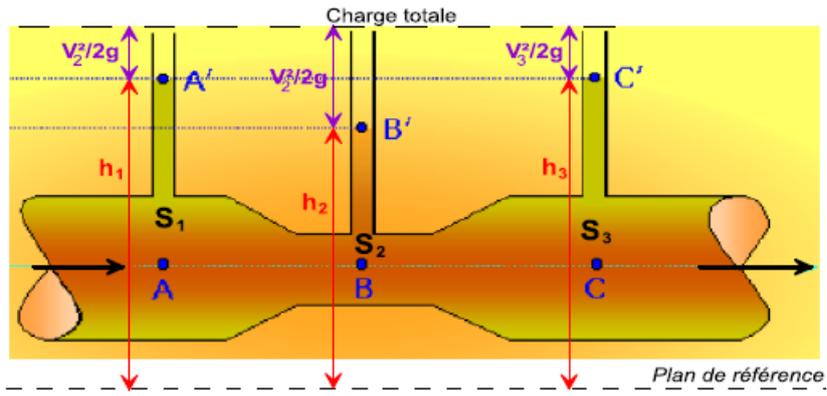


Figure 55: Tube de Venturi

Références

- ✓ Aude Barani, LES MÉTHODES D'ÉLECTROPHORÈSE : L'ESSENTIEL. 2007. Faculté de Médecine Jacques Lisfranc Université Jean Monne.
- ✓ Bahlous El-Ouafi S. (2002). Hydraulique, cours et exercices. *CPU*.
- ✓ Beaudy J.P et Rolland J.C (1995). Mécanique des fluides appliquée. *Berger*.
- ✓ Ben Hamouda R. (2008). Notions de mécanique des fluides. *CPU*.
- ✓ BENSADDEK SALAH, Conception d'électrode modifiée à base de zéolithe/nickel Application en hydrogénation électrocatalytique, mémoire Magister, 14/12/2010, université oran 1
- ✓ Biaou A.C (2009). Cours d'hydraulique routière. *2iE*.
- ✓ Bniaiche E. (2013). Écoulement à surface libre. *ITSMAERB*, PPT online.
- ✓ Bourrier R. (1991). Les réseaux d'assainissement : calculs, applications, perspectives. *Lavoisier TEC et DOC*.
- ✓ Bulletin de l'Union des Physiciens (BUP), septembre 2010, volume 104, pages 777-795.
- ✓ Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.
- ✓ Burgot, G., Burgot, J.-L., 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.
- ✓ Carlier M. (1998). Hydraulique générale et appliquée. *Eyrolles*.
- ✓ Céline Christophe. Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies "Silicium et Polymères" pour l'étude du stress oxydant. Application à la biochimie cutanée. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2010. Français.
- ✓ Chimie générale expérimentale, J. Piard, De Boeck
- ✓ Chimie physique expérimentale, B. Fosset et coll., Éditeurs des sciences et des arts.
- ✓ Chow V.T. (1959). Open Channel hydraulics. *McGraw-Hill*.
- ✓ Degoutte G. (2006). Diagnostic, aménagement et gestion des rivières (Hydraulique et morphologie fluviales appliquées). *Lavoisier TEC et DOC*.
- ✓ Gaaloul N. (2013). Notions de mécanique des fluides. Cours. *CPU*.
- ✓ Heftmann, E., 1983. Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. P. A, Fundamentals and techniques.
- ✓ Huber, L., 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Wiley Online Library.
- ✓ J. M. Savéant, Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry, Wiley-Blackwell 2006.
- ✓ J. TACUSSEL, J. J. FOMBON (1974). La méthode polarographique impulsionnelle, appliquée à l'analyse des traces, en milieu marin. XXXIII, p. 125-143.
- ✓ Khabchi, M.E., 1993. Chromatographie en phase liquide: contribution à l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'élution.
- ✓ Khabchi, M.E., 1993. Chromatographie en phase liquide: contribution à l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'élution.
- ✓ Léger C., Bertrand P., Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies Chem. Rev. 2008 108(7), p. 2379 doi:10.1021/cr0680742 (b)
- ✓ M. Baaziz. livre Sciences de la vie. Biochimie, 2012 takween.com

- ✓ Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.
- ✓ Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M., 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.
- ✓ Miller, J.M., 2005. Chromatography: concepts and contrasts. John Wiley & Sons.
- ✓ Rosset, R., Caude, M., Jardy, A., 1982. Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Issy-les-Moulineaux (Hauts-de-Seine): Masson.
- ✓ Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition- Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.
- ✓ Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., 2004. Analyse chimique-6ème édition- Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.
- ✓ Shriver-Atkins, 3ème édition, 2001, De Boeck.
- ✓ Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.
- ✓ Yost, R.W., Ettore, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.
- ✓ Yost, R.W., Ettore, L.S., Conlon, R.D., Vaumoron, J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.