
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Ahmed ZABANA de RELIZANE

**Institut des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de
la Vie**

Département de Biologie



Polycopié de cours:

Techniques d'analyses biologiques

Destiné aux étudiants de la 3^{ème} année licence

Spécialité Microbiologie

Spécialité Biochimie

Elaboré par:

Dr. OUCIF Hanane

Maître de Conférence B (C.U.R. Relizane)

SOMMAIRE

| | PAGE |
|---|-------------|
| LISTE DES FIGURES | i |
| CHAPITRE I : METHODES SPECTRALES | 1 |
| 1. INTRODUCTION AUX TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES | 1 |
| 2. LES DIFFERENTES METHODES SPECTROSCOPIQUES | 1 |
| 2.1. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire | 1 |
| 2.2. La spectrophotométrie d'absorption infrarouge : | 2 |
| 2.3. La spectroscopie par fluorescence : | 2 |
| 2.4. La spectrométrie atomique : | 2 |
| 2.5. Les spectroscopies de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : | 3 |
| 2.6. La spectrométrie de masse | 3 |
| CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT | |
| FILTRATION ET ULTRAFILTRATION | 4 |
| I. FILTRATION | 4 |
| 1. PRINCIPE DE LA FILTRATION: | 4 |
| 2. TYPES DE FILTRES | 4 |
| a) Filtres en profondeur | 4 |
| b) Filtres écran | 4 |
| 3. APPLICATIONS | 4 |
| II. ULTRAFILTRATION | 5 |
| 1. PRINCIPE | 5 |
| 2. METHODES | 5 |
| a) Ultrafiltration sur Membranes | 5 |
| b) Ultrafiltration par cartouches de fibres creuses (Filtres à membranes capillaires) | 6 |
| 3. APPLICATIONS | 6 |
| DIALYSE, ELECTRODIALYSE, OSMOSE, OSMOSE INVERSE | 7 |
| 1. CONCENTRATION PAR DIALYSE | 7 |
| 2. ELECTRODIALYSE | 7 |
| 3. OSMOSE | 8 |
| 4. OSMOSE INVERSE | 8 |
| SEDIMENTATION : CENTRIFUGATION, ULTRACENTRIFUGATION | 10 |
| I. INTRODUCTION | 10 |
| II. ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE | 11 |
| 1. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE : | 11 |
| 2. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE : | 11 |
| a) Centrifugation de zone ou zonal | 12 |
| b) Centrifugation isopycnique | 13 |
| III. ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE | 14 |
| IV. CONTROLE DU RESULTAT DE LA CENTRIFUGATION | 14 |
| V. APPLICATIONS DE LA CENTRIFUGATION | 14 |

| | |
|---|----|
| CHROMATOGRAPHIE | 15 |
| I. DEFINITION ET PRINCIPE: | 15 |
| II. LES DIFFERENTES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES : | 15 |
| 1. CLASSIFICATION SELON LA NATURE DES PHASES | 15 |
| 1.1. Phase fixe: | 15 |
| 1.2. Phase mobile: | 16 |
| 2. CLASSIFICATION SELON LA NATURE DES PHENOMENES MIS EN JEU | 16 |
| 2.1. Chromatographie d'adsorption: | 16 |
| 2.2. Chromatographie de partage: | 17 |
| 2.3. Chromatographie ionique: | 17 |
| 2.4. Chromatographie d'exclusion: | 17 |
| 2.5. Chromatographie d'affinité | 18 |
| 3. CLASSIFICATION SELON LA TECHNIQUE MISE EN JEU | 19 |
| 3.1. Chromatographies de surface | 19 |
| 3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) | 19 |
| 3.1.2. Chromatographie sur papier: | 22 |
| 3.2. Chromatographie sur colonne: | 23 |
| 3.2.1. La chromatographie liquide à haute performance HPLC | 24 |
| 3.2.2. La chromatographie en phase gazeuse | 27 |

| | |
|---|----|
| ELECTROPHORESE | 30 |
| I. INTRODUCTION | 30 |
| II. ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER ET ACETATE DE CELLULOSE | 31 |
| III. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL (SUPPORTS SEMI-SOLIDES) | 32 |
| III.1. SEPARATION SUR GEL POLYACRYLAMIDE | 32 |
| III.1.1. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE) | 33 |
| III.1.2. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE) | 33 |
| III.1.3. ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE (2D) | 35 |
| III.2. SEPARATION SUR GEL D'AGAROSE | 36 |
| III.2.1. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE | 36 |
| III.2.2. ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ | 37 |
| III.2.3. IMMUNOELECTROPHORESE | 37 |
| IV. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE | 38 |
| V. BLOTTING'' OU EFFET BUVARD | 39 |

| | |
|---|----|
| CHAPITRE III: MICROSCOPIE ELECTRONIQUE | |
| 1. INTRODUCTION : | 41 |
| 2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION | 41 |
| 3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE | 43 |

| | |
|------------------------------------|----|
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 46 |
|------------------------------------|----|

LISTE DES FIGURES

| | Page |
|---|-------------|
| Figure n°1 : Spectre des rayonnements électromagnétiques | 1 |
| Figure n°2 : Principe de montage d'un filtre écran avec exemple de filtres écran : Unités Millex | 4 |
| Figure n°3 : Principe du filtre écran et du filtre en profondeur avec des exemples de filtres en profondeur | 5 |
| Figure n°4 : Types de montages d'ultrafiltration sur filtres à membranes capillaires | 6 |
| Figure n°5 : Centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire | 11 |
| Figure n°6 : Centrifugation zonale | 12 |
| Figure n°7 : Centrifugation isopycnique | 13 |
| Figure n°8 : Chromatographie d'exclusion moléculaire | 18 |
| Figure n°9 : Chromatographie d'affinité | 18 |
| Figure n°10 : choix de l'éluant en CCM | 20 |
| Figure n°11 : principe de fonctionnement de l'HPLC | 24 |
| Figure n°12 : Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse | 27 |
| Figure n°13 : dispositif d'électrophorèse | 30 |
| Figure n°14 : Électrophorèse sur papier acétate | 32 |
| Figure n°15 : Séparation des macromolécules selon le pourcentage de polyacrylamide | 33 |
| Figure n°16 : Perte de la charge nette et de la structure III et V d'une protéine pendant SDS-PAGE | 34 |
| Figure n°17 : séparation des protéines par SDS-PAGE | 34 |
| Figure n°18 : Electrophorèse bidimensionnelle (2D) | 35 |
| Figure n°19 : électrophorèse sur gel d'agarose | 36 |
| Figure n°20 : électrophorèse en champ pulsé | 37 |
| Figure n°21 : Immunoélectrophorèse croisée | 38 |
| Figure n°22 : dispositif d'une électrophorèse capillaire | 39 |
| Figure n°23 : Western, Northern et Southern blot | 40 |
| Figure n°24 : microscope électronique à transmission | 42 |
| Figure n°25 : microscope électronique à balayage | 44 |
| Figure n°26 : Détecteur Everhart-Thornley | 45 |

CHAPITRE I
METHODES SPECTRALES

1. INTRODUCTION AUX TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

La spectroscopie est l'ensemble des méthodes consistant à mesurer l'absorption ou l'émission par des molécules de certaines quantités de rayonnement électromagnétique. Le spectre des rayonnements électromagnétiques s'étend des rayonnements gamma aux ondes radio de grande longueur d'onde.

La plupart des méthodes spectroscopiques ont en commun le fait que l'échantillon interagit avec un rayonnement électromagnétique. Ce rayonnement peut être absorbé, réémis ou diffusé par les atomes et les molécules de la substance à analyser, menant ainsi à divers types de spectroscopies. Les différentes formes de spectroscopie sont liées aux longueurs d'onde de la lumière comme il est montré dans la figure (Marouf, 2005).

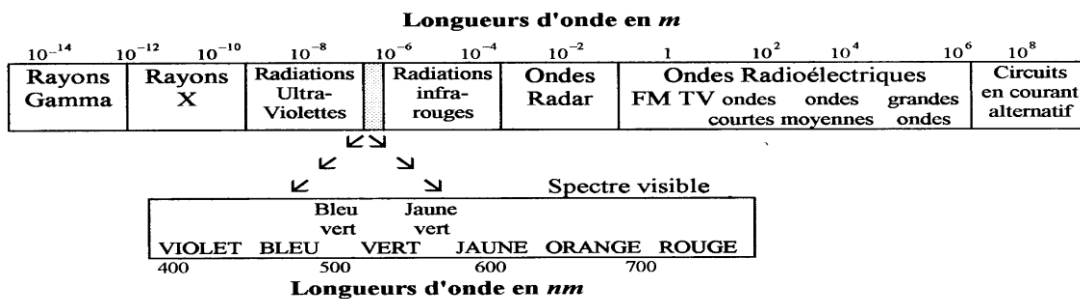


Figure n°1 : Spectre des rayonnements électromagnétiques (Saint-Blanquet, 2006).

2. LES DIFFERENTES METHODES SPECTROSCOPIQUES

2.1. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible ou l'ultraviolet:

Cette méthode est une technique d'analyse très utilisée pour les substances minérales et organiques. L'examen d'un spectre d'absorption permet d'analyser la structure du corps absorbant (analyse qualitative). La proportion de lumière absorbée à une longueur d'onde convenablement choisie permet le dosage du corps absorbant (analyse quantitative). Le spectrophotomètre mesure l'absorbance (reliée à la quantité de lumière absorbée) d'une solution contenant la substance à analyser. L'augmentation de l'absorbance ou la diminution de la transmission de la solution est proportionnelle à la concentration du constituant analysé. Les spectres d'absorption électronique (spectre UV-visible) et les spectres de luminescence sont dus à des transitions effectuées par les électrons de valence entre des états d'énergie stables et des états excités et sont obtenus à des longueurs d'onde comprises entre 0,2 et 1,5 μm , selon les groupements fonctionnels responsables de ces transitions. Ces méthodes d'analyse sont intéressantes car elles permettent de travailler sur de faibles quantités de

substances et ne sont pas destructives (hormis les mesures basées sur des réactions de complexation) vis-à-vis de l'échantillon. Elles s'appliquent à un très grand nombre de dosages (Marouf, 2005).

2.2. La spectrophotométrie d'absorption infrarouge :

Cette technique est efficace pour l'analyse organique, car les liaisons des groupes fonctionnels différents ont des énergies très différentes, et absorbent par conséquent un rayonnement infrarouge à fréquences distinctes. Le spectre d'absorption de la plupart des composés organiques est généralement compliqué, contrairement à leurs spectres UV contenant relativement peu de pics d'absorption ; il est constitué d'un grand nombre de pics dont seulement une partie peut être interprétée avec précision, donnant de nombreux renseignements sur la structure de la molécule. La spectroscopie infrarouge est en raison du grand nombre d'informations données par les spectres IR, l'une des méthodes d'analyses des composés chimiques les plus importantes.

Etant donné que chaque substance a pratiquement son propre spectre infrarouge, il est possible, en comparant les spectres de substances authentiques, d'identifier des composés chimiques et d'analyser quantitativement les composants et les impuretés. L'analyse des spectres infrarouges d'une substance inconnue donne d'ailleurs des informations directes sur les groupes structuraux et peut donc ainsi contribuer effectivement à l'explication de leur configuration (Marouf, 2005).

2.3. La spectroscopie par fluorescence :

Cette méthode utilise le phénomène inverse de la spectrophotométrie d'absorption. La fluorescence d'un composé vient du fait que, éclairé par une radiation électromagnétique à une certaine longueur d'onde, ce composé excité (durée de vie très brève, 1 à 10 nanosecondes) émet de la lumière lors du retour à l'état fondamental. L'énergie absorbée est restituée partiellement, de sorte que la radiation est émise à une énergie inférieure donc une longueur d'onde λ' supérieure à celle de la radiation incidente λ et à une intensité proportionnelle à la concentration de l'échantillon (Marouf, 2005).

2.4. La spectrométrie atomique :

Elle concerne l'application de la spectrométrie aux atomes. Les principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique utilisée en analyse chimique sont : l'émission de flamme et l'absorption atomique (analyse quantitative des éléments à faibles teneurs). L'échantillon soumis à l'excitation thermique d'une flamme se décompose en atomes et en ions, qui émettent ou absorbent respectivement un rayonnement dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet, et aux énergies caractéristiques des éléments impliqués. Si l'atome absorbe de

l'énergie sous forme de rayonnement (choc avec un photon) et qu'il la libère ensuite sous forme thermique ou cinétique, il s'agit de **spectroscopie d'absorption**.

Si l'atome reçoit par contre de l'énergie sous forme de chaleur, il peut atteindre un niveau électronique excité instable et retourner ensuite au niveau fondamental en émettant de l'énergie lumineuse sous forme de photons d'énergie (énergie de transition). Il émet donc un rayonnement constitué de certaines longueurs d'onde spécifiques de l'atome. **La spectroscopie d'émission** consiste à mesurer l'intensité de l'émission de ces longueurs d'onde spécifiques (Marouf, 2005).

2.5. Les spectroscopies de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

Sous l'action d'un champ magnétique, il est possible d'induire des modifications des moments magnétiques de certains noyaux ou des électrons périphériques des atomes. Le spectre RMN d'un composé est constitué de pics. La position des pics et leur intensité relative permettent d'élucider la structure moléculaire. La RMN est basée sur les propriétés magnétiques du noyau. Elle mesure l'énergie nécessaire pour modifier l'alignement des noyaux magnétiques dans un champ magnétique. Les noyaux de certains atomes se comportent comme des aimants microscopiques et s'orientent dans un champ magnétique (Marouf, 2005).

2.6. La spectrométrie de masse :

Cette énumération des méthodes modernes d'analyse serait incomplète sans citer la spectrométrie de masse qui est une méthode d'analyse des ions ou radicaux résultant de la fragmentation d'une molécule soumise à un bombardement, dans une atmosphère gazeuse, sous vide, par faisceau de laser, d'électrons ou d'atomes dont l'énergie peut atteindre quelques dizaines d'électrons-volts. Les fragments chargés électriquement sont séparés selon leur masse après accélération et déviation par passage dans un champ magnétique.

Les données obtenues, sous forme de spectre de masse faisant apparaître les différents types de fragments formés (chacun de ces types étant caractérisés par un rapport spécifique masse/charge : m/e), ainsi que l'intensité de chaque raie qui est fonction du nombre d'ions du type correspondant. La détermination de la masse des fragments et leur comparaison avec les banques de données existantes permettent de reconstituer la structure de la molécule. Même de faible différence de structure se répercutent sur le spectre. Elle est utile pour analyser de faible quantité et couplé souvent aux techniques chromatographiques (CPG-SM et HPLC-SM) (Marouf, 2005).

CHAPITRE II

METHODES DE SEPARATION ET

DE FRACTIONNEMENT

FILTRATION ET ULTRAFILTRATION

I. FILTRATION

1. PRINCIPE DE LA FILTRATION: sélection de substances par passage sur un filtre.

2. TYPES DE FILTRES

a) Filtres en profondeur

Nature : ils sont constitués de substances fibreuses (amiante, cellulose, coton, fibre de verre...) ou substances agglomérées (verre frité, sable, charbon...) qui créent un réseau de canaux à l'intérieur du filtre.

Capacité de filtration : dépend de l'épaisseur et la pression.

Formes : filtres papier plats ou plissés, filtres en fibre de verre, tubes filtrants, papier séparateur de phase, plaques frittées (filtration sous vide).

b) Filtres écran

Nature : se sont des feuilles très minces de nitrate de cellulose, de fluorure de polyvinyle...

3. APPLICATION

- ✓ Filtration par arrêt des particules à leur surface (préfiltration).
- ✓ Filtration stérilisante (exemple : rincer si application sur culture de cellules, le triton).
- ✓ Utilisation en cytologie (transparisation du filtre par huile d'immersion).
- ✓ Numération indirecte des cellules microbiennes par filtration d'un grand volume de produit peu contaminé.
- ✓ Filtration de l'air (Filtre HEPA) (Guevara, 2012).

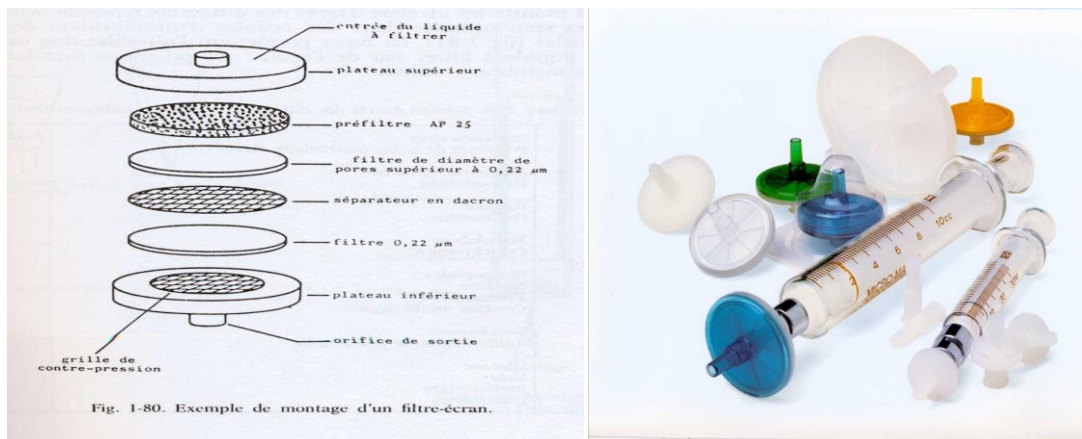


Figure n°2 : Principe de montage d'un filtre écran avec exemple de filtres écran : Unités Millex (Guevara, 2012).

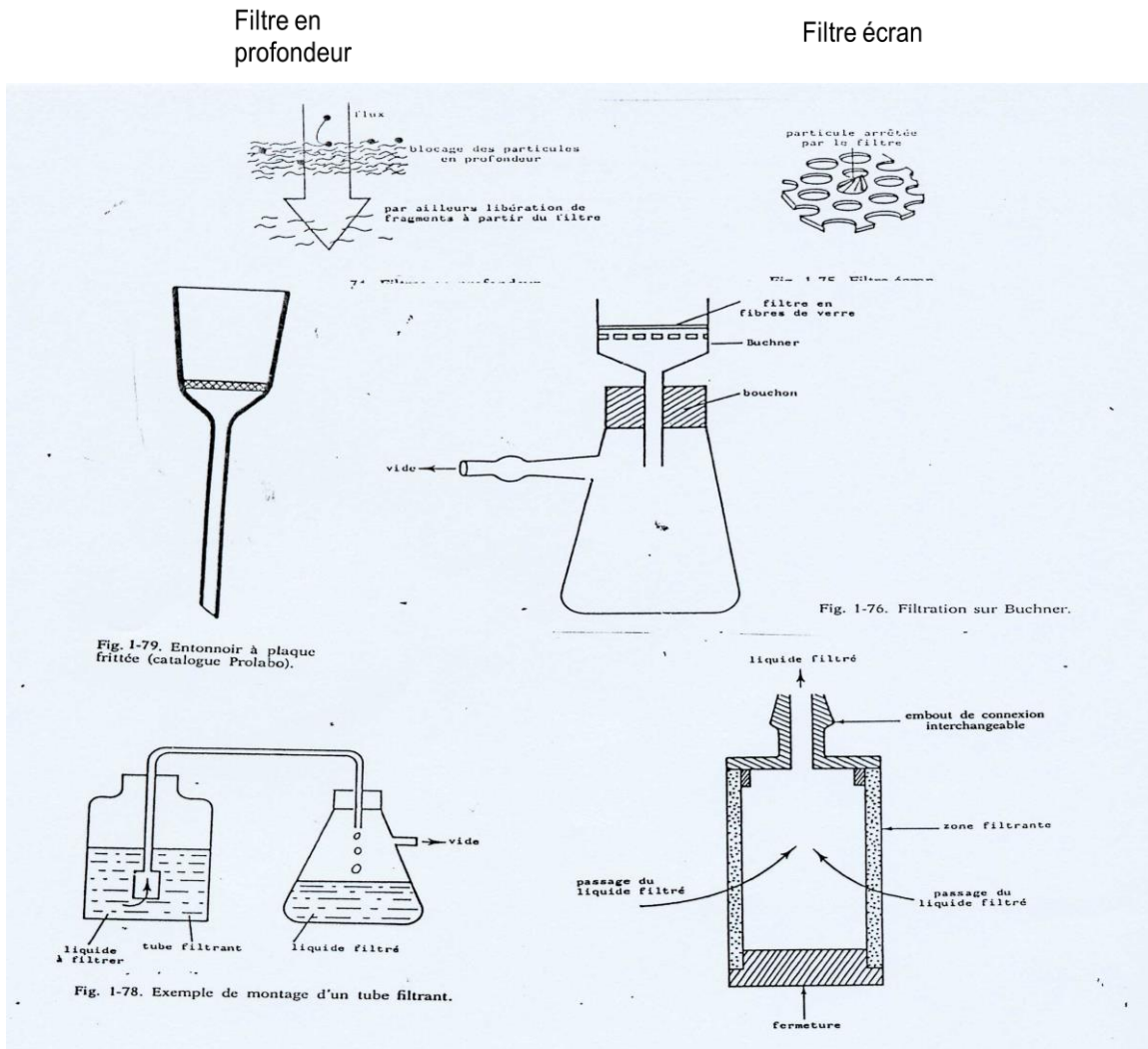


Figure n°3 : Principe du filtre écran et du filtre en profondeur avec des exemples de filtres en profondeur (Guevara, 2012).

II. ULTRAFILTRATION

L'ultrafiltration est une sorte de filtration sur membrane où le liquide traverse une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression (pression transmembranaire).

1. **PRINCIPE** : séparation des substances selon leur taille moléculaire. Les membranes jouent le rôle de filtre écran au niveau moléculaire

2. METHODES

a). Ultrafiltration sur Membranes :

Utilisées dans des cellules d'ultrafiltration (les plus utilisées : Diaflo).

La solution peut être pressurisée soit par l'azote sous pression ou par centrifugation.

Applications : concentrations de molécules, étude de la liaison macro-micromolécules, isolement de virus, suivi de chromatographie sur colonne.

b). Ultrafiltration par cartouches de fibres creuses (Filtres à membranes capillaires):

| | |
|--|------------------------------------|
| 4 types de fibres capillaires: PM >30000 | HFU (Hollow fiber ultrafiltration) |
| PM >5000 | HFD (Hollow fiber dialyse) |
| PM >200 | HFO (Hollow fiber osmose) |
| Gaz | HFG (Hollow fiber gaz) |

Les montages peuvent se faire en macrotubes, béccher, microbéccher ou microtube en T.

Précautions d'utilisation : rinçage, préfiltration millipore, température, pH, pression, solvants organiques, rinçage avant recyclage.

3. APPLICATIONS :

- ✓ dessalage, concentration de liquides biologiques. Ce processus de séparation est utilisé dans l'industrie pour purifier et/ou concentrer des solutions de macromolécules ($10^3 - 10^6$ Da), notamment les protéines.
- ✓ L'ultrafiltration n'est pas fondamentalement différente de la microfiltration ou de la nanofiltration, si ce n'est qu'elle retient des molécules de tailles différentes de ces deux dernières (taille des pores comprise entre 0.001 et 0,1 μm environ) (Guevara, 2012).

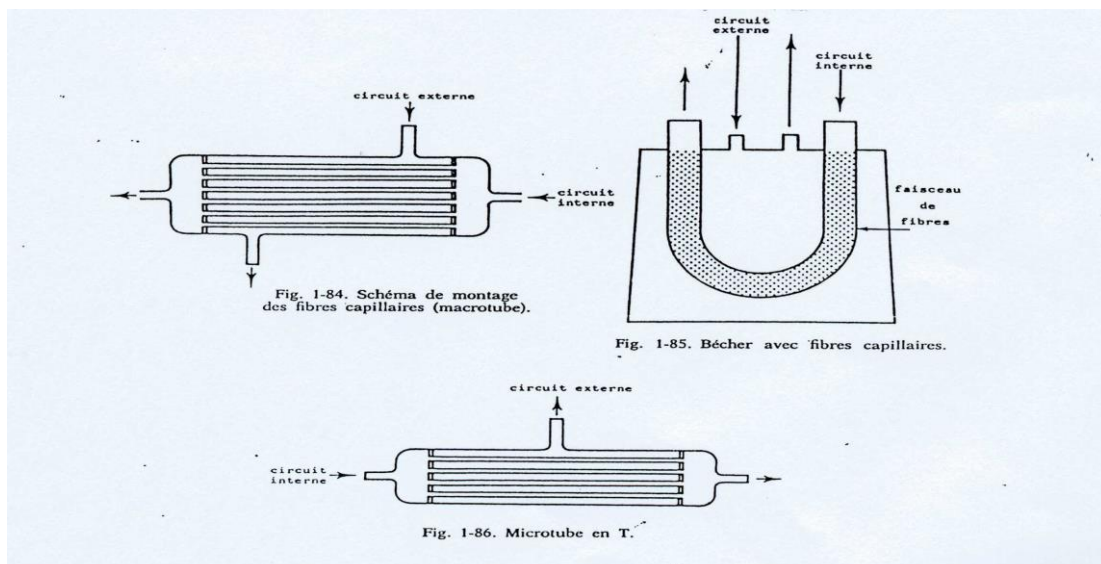


Figure n°4 : Types de montages d'ultrafiltration sur filtres à membranes capillaires (Guevara, 2012).

DIALYSE, ELECTRODIALYSE, OSMOSE, OSMOSE INVERSE

1. CONCENTRATION PAR DIALYSE :

Méthode de purification, permettant de séparer des molécules selon leur taille, par diffusion à travers une membrane hémiperméable, appelée membrane de dialyse. La dialyse est surtout utilisée pour la concentration d'une solution biologique (élimination de solvant) ou pour son dessalement (élimination d'ions d'une solution protéique).

Les membranes de dialyse habituellement utilisées en biochimie se présentent sous forme de tuyaux allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce tuyau est appelé « boudin » de dialyse.

La solution à dialyser est mise dans ce sac qu'on immerge dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse (eau ou autre solvant approprié), pour une durée variant de quelques heures à quelques jours, suivant le coefficient de concentration désiré. L'eau et les petites molécules traversent progressivement la membrane alors que les grosses molécules (non-dialysable) se concentrent dans le compartiment interne. L'équilibre est atteint lorsque la concentration des solutés (petites molécules) est la même dans le dialysat et dans le liquide de contre-dialyse.

La vitesse de diffusion d'une substance à travers la membrane varie en fonction de la nature de cette substance, de la température, de l'agitation, du pH et de la surface d'échange.

Ne nécessitant qu'un appareillage simple et peu coûteux, la dialyse a cependant l'inconvénient d'être une opération de longue durée. On peut augmenter la vitesse de dialyse, en renouvelant constamment le solvant (**Marouf, 2005**).

2. ELECTRODIALYSE :

Technique de séparation analogue à la dialyse mais utilisant un champ électrique pour améliorer le transport des ions à travers la membrane. L'établissement d'un courant de quelques mA permet le passage des anions vers la cathode et des cations vers l'anode. Les ions minéraux sont ainsi éliminés sans perte de produits organiques.

L'opération a lieu dans une cuve à trois compartiments. Le compartiment central servant à contenir le liquide à traiter, est séparé, par une membrane hémiperméable, des deux compartiments latéraux contenant l'un une anode (milieu anodique), l'autre une cathode (milieu cathodique). Ainsi, les anions et les cations, attirés par les électrodes correspondantes sont éliminés et se concentrent à l'extérieur du milieu à traiter. Une tension de quelques volts, 2 volts en général, est suffisante.

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

L'électrodialyse est utilisée dans le dessalement (déméralisation) des eaux saumâtres dont le taux de salinité est inférieur à 500 mg.L⁻¹ (au dessus de ce taux, l'osmose inverse est plus intéressante) et le traitement des sous-produits de l'industrie laitière : les principaux produits concernés sont les lactosérums, résultant de la production de fromage et de caséine. L'électrodialyse constitue une voie alternative au traitement biologique et aux résines échangeuses d'ions pour dénitrater et défluorer l'eau potable. En galvanoplastie, elle sert au traitement d'effluents (eau de rinçage) afin d'enrichir, en les concentrant, les bains de dépôt et de les recycler. L'élévation thermique produite par le courant ne permet pas ces utilisations avec des produits thermolabiles (**Marouf, 2005**).

3. OSMOSE :

L'osmose est un phénomène physique au cours duquel il se produit un flux d'eau entre deux solutions de concentrations moléculaires différentes séparées par une membrane hémiperméable, de telle façon que le solvant aqueux passe de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée jusqu'à ce que la pression exercée sur la solution la plus concentrée atteigne une valeur appelée pression osmotique (P_o), le (ou les) soluté (s) ne pouvant changer de compartiment.

La concentration peut aussi être obtenue par osmose si la membrane est imperméable aux solutés. C'est le cas de la dialyse contre une solution macromoléculaire telle que des solutions de polyvinylpyrrolidone (PVP) ou de polyéthylène glycol (PEG). On préfère le PEG que l'on peut trouver dans le commerce à des poids moléculaires moyens de 30000 ce qui limite d'autant leur diffusion dans le liquide que l'on concentre. La quantité de liquide à concentrer est mise dans le boudin cellulosique qui est mis à dialyser pour une durée variant de 4h à 24h, suivant le coefficient de concentration désiré dans une solution de PEG à 60%. La concentration est faite généralement à 4°C. Par ce moyen, le passage du PEG dans le concentrat est limité au maximum. Il est essentiel de noter soigneusement la quantité de liquide avant et après concentration pour établir le facteur de concentration (**Marouf, 2005**).

4. OSMOSE INVERSE :

Technique de séparation très fine basée sur le transfert d'eau, entre deux solutions de concentrations différentes séparées par une membrane semi-perméable, se faisant à « l'envers » sous l'effet d'une pression osmotique artificielle (30 à 80 bars) qui contrarie le flux osmotique naturel de la solution la plus concentrée à la moins concentrée, laissant au passage des particules contaminantes de faible poids moléculaire (solides dissous, bactéries, etc.). La pression osmotique est d'autant plus importante que la concentration est élevée et que la masse molaire est faible. La concentration a lieu sans élévation de température. Le

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

faible débit de cette méthode peut être compensé par l'utilisation de filtres de grandes surfaces. Les membranes utilisées ont un seuil de coupure compris entre 150 et 1000 Da. Deux types de membranes sont utilisés :

- Les membranes cellulosiques : très perméables et très sélectives, mais sont sensibles à l'hydrolyse chimique. On ne les utilise qu'à des températures inférieures à 40°C et dans une zone de pH de 3 à 8. On peut les utiliser jusqu'à 60 bars environ.
- Les membranes en polymères organiques, surtout des polysulfones qui résistent à des pH extrêmes et à des températures de 70°C. Le flux est limité à 150 l/h/m². On utilise également des membranes en polyamide qui éliminent 90 à 98% des éléments inorganiques, des éléments non ioniques et des molécules organiques dont la masse moléculaire est supérieure à 100 Da.

L'eau obtenue est d'excellente qualité et peut être utilisée dans de nombreux domaines.

Les applications de l'osmose inverse concernent surtout le traitement des eaux et la concentration des solutions :

Dessalement des eaux saumâtres pour produire de l'eau potable,

Préparation d'eau ultra pure pour l'électronique et la pharmacie.

En industrie laitière : concentration du lactosérum, du lait écrémé et du lait entier.

Concentration des substances actives (antibiotique acides, aminés, vitamines, etc.).

Purification et concentration des arômes naturelles. Concentration des jus de fruits (**Marouf, 2005**).

SEDIMENTATION : CENTRIFUGATION, ULTRACENTRIFUGATION

I. INTRODUCTION

La centrifugation est essentiellement un moyen de séparer les particules d'une solution. En biologie, les particules sont souvent des cellules, des organites (mitochondries, chloroplastes, etc.) ou de grosses molécules (protéines, acides nucléiques, virus, etc.).

La centrifugation sépare les composants cellulaires en fonction de la taille et de la densité. Les composants les plus gros et les plus denses subissent la force centrifuge la plus grande et ils se déplacent le plus rapidement. Ils sédimentent pour former un culot au fond du tube, tandis que des composants plus petits, moins denses, restent en suspension au-dessus formant le surnagent.

La séparation centrifuge est une variante accélérée de la sédimentation où l'accélération naturelle de la pesanteur ($g = 9,81 \text{ m s}^{-1}$) est remplacée par une force centrifuge engendrée par le rotor d'une centrifugeuse tournant à grande vitesse.

Si la vitesse de rotation est inférieure à 10^4 tours/min (rpm), on utilise une **centrifugeuse**. Alors que l'**ultracentrifugeuse** peut atteindre 100 000 (rpm) ou plus et produire un champ de gravité suffisant pour sédimenter les particules ou molécules de masse supérieure à 10 000 daltons, à température réfrigérée.

De plus, les rotors utilisés dans les centrifugeuses sont de deux types :

- A angle fixe pour les séparations les plus simples entre culot (cellules, organites, membranes, protéines) et le surnagent. Les tubes sont placés dans des logements creux généralement inclinés entre 15 et 40°. La surface du liquide, horizontale à l'arrêt, devient verticale en rotation sous l'effet de l'accélération centrifuge. Ces rotors sont utilisés surtout pour des séparations séquentielles, à des vitesses de rotation croissantes.
- A godets mobiles, utilisés pour des séparations plus fines, parce que la force de centrifugation s'exerce dans le sens de la longueur du godet. En effet, il est mobile autour de son point de suspension à l'axe du rotor et s'oriente en cours de rotation pour que l'axe reste colinéaire avec le champ. On peut alors séparer des particules, essentiellement en fonction de leur densité, en utilisant des gradients de densité.

Il existe également un troisième type de rotors, les rotors verticaux, mais ils sont beaucoup moins utilisés (**Marouf, 2005**).

II. ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE

Elle permet d'isoler des particules spécifiques.

1. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE :

C'est la méthode la plus commune. Elle permet d'isoler des structures intracellulaires, à partir d'un homogénat initial, en procédant à différentes centrifugations à des vitesses croissantes.

Typiquement, on peut sédimenter les noyaux à 1000-2000 g durant 5-10 min. les mitochondries et les chloroplastes tombent à environ 10000-15000 g durant 10-15 min. les microsomes, petites vésicules produites lors de l'homogénéisation des compartiments membranaires comme le golgi ou le réticulum endoplasmique, peuvent sédimenter après 30 min à cette vitesse. Les ribosomes sont obtenus à 100000 g après 1 ou 2 heures. Le surnageant résiduel contient le matériel cytosolique. Ces valeurs indicatives des conditions de sédimentation peuvent varier en fonction du matériel utilisé, la composition des membranes pouvant en particulier modifier la densité des constituants. On constate que des constituants différents sédimenteront approximativement dans les mêmes conditions. Pour pouvoir les séparer il faut d'autres méthodes, par exemple une centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose qui permet de séparer les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Ce type de centrifugation utilise des rotors à angle fixe (Marouf, 2005).

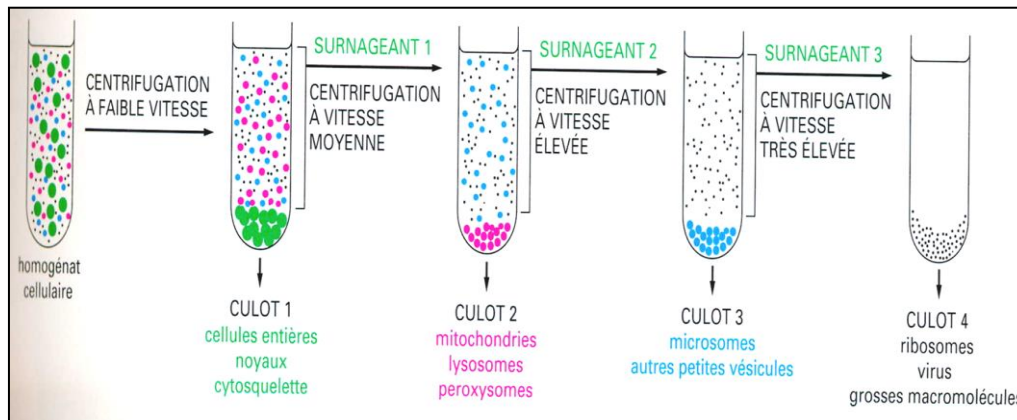


Figure n°5 : Centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire (Guevara, 2012).

2. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE :

Cette technique nécessite l'établissement d'un gradient de densité dans le tube de centrifugation. Le fluide du gradient de densité est constitué d'un soluté de faible poids moléculaire dans un solvant contenant les particules de l'échantillon suspendues. Le gradient de densité utilisé ici est un élément auxiliaire : il sert simplement à stabiliser les produits séparés dans des zones en évitant les courants de convection. Il existe deux méthodes de centrifugation en gradient de densité :

a. Centrifugation de zone ou zonal

Dans la plupart des techniques courante, un gradient de densité continu de saccharose (exemple, de 5 à 45 %) est d'abord préparé dans un tube à centrifuger en plastique par un système qui mélange une solution concentrée de saccharose à de l'eau dans un rapport décroissant au fur et à mesure que le tube est rempli, de telle sorte que la densité du milieu soit la plus grande à l'extrémité inférieure du tube.

Un petit volume de mélange à séparer est déposé à la partie supérieure du gradient préformé. L'ensemble est soumis à centrifugation à des vitesses et pendant des durées qui dépendent du but recherché.

Cette technique permet la séparation des particules selon leurs coefficients de sédimentation. Puisque la vitesse de sédimentation est une fonction plus sensible à la forme d'une macromolécule qu'à sa densité, l'ultracentrifugation en zones sépare les macromolécules de forme similaire selon leur masse. Pendant la centrifugation à grande vitesse du tube dans un rotor à godets mobiles, en position horizontale chaque espèce se déplace à travers le gradient à une vitesse largement déterminée par leur coefficient de sédimentation et donc migre comme une zone.

A la fin de l'expérience, la récolte des fractions se fait par l'insertion d'une aiguille au fond du tube de centrifugation et on collectionne le contenu du tube par un collecteur de fraction. En déterminant la concentration en protéines pour chaque fraction par mesure de la densité optique à 280 nm ; on détermine la répartition des protéines dans le tube, ce qui permet de les classer selon leur masse. Le tube en plastique peut aussi être congelé et coupé en couches minces pour une analyse éventuellement. Cette technique est principalement employée pour séparer les molécules d'ADN, d'ARN ou les structures ribonucléoprotéiques selon leur taille (Marouf, 2005).

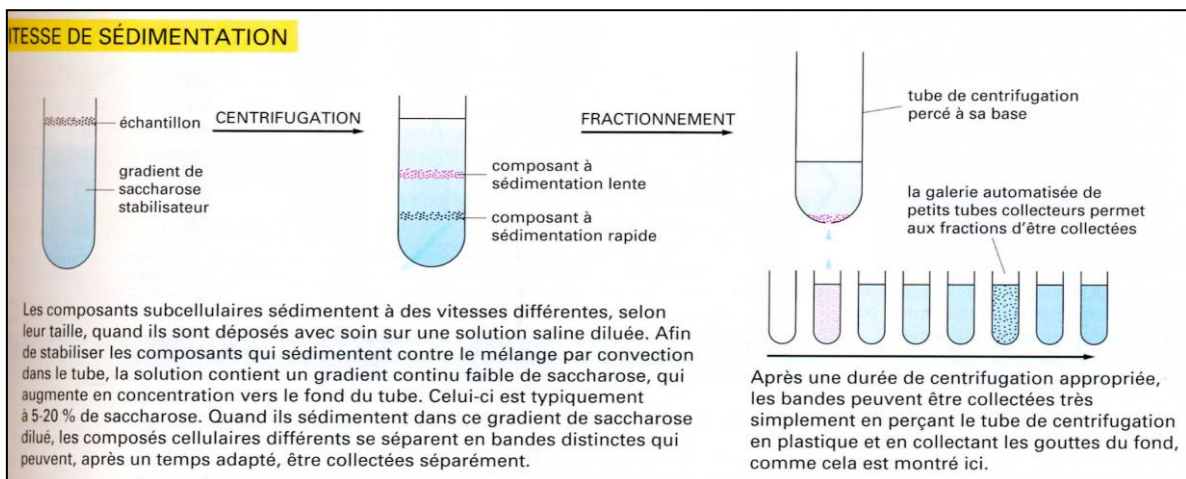


Figure n°6 : Centrifugation zonale (Guevara, 2012).

b. Centrifugation isopycnique

Dans ce type de méthode, les macromolécules soumises à la centrifugation sur le gradient se sépareront selon leur densité, non pas leur coefficients de sédimentation (masse).

L'échantillon est dissout dans une solution concentrée d'une substance dense qui diffuse relativement vite comme les sels CsCl et CsSO₄, puis on centrifuge à l'équilibre. Chaque type de particule sédimentera jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration correspondant à sa densité. Elle s'immobilisera alors à ce niveau.

Les gradients de densité sont établis à l'aide de composés très solubles dans l'eau, capable de modifier très sensiblement la densité ou masse volumique du milieu. Le composé le plus utilisé dans la formation d'un gradient de densité pour une sédimentation à l'équilibre, est une solution aqueuse de chlorure de césium CsCl. Il s'établit un gradient contenant plus d'ions Cs⁺ au fond du tube qu'au sommet. Dans une centrifugation typique, le milieu de centrifugation est d'environ 0.02 mg/ml plus dense au fond du tube qu'au sommet. Les densités des protéines, de l'ADN et de l'ARN, dans une solution de CsCl, sont respectivement de 1.3, 1.6 à 1.7 et de 1.75 à 1.8 g/ml environ et donc facilement séparable. Les ions se lient aux protéines et aux acides nucléiques ; l'ion Cs⁺ se lie aux groupes phosphate de l'ADN et dans l'ARN aux groupes phosphate ainsi qu'aux fonctions hydroxyles des riboses, ce qui augmente plus la densité de l'ARN que celle de l'ADN.

Pour séparer les protéines ou les organites, on utilise souvent des gradients de concentration de saccharose ou de dextran (sucre polymérisé).

Les gradients de densité atteignent un état d'équilibre après un certain temps de centrifugation qui dépend de la vitesse de centrifugation, de la hauteur de la colonne liquide, de la nature du sel et de la température (Marouf, 2005).

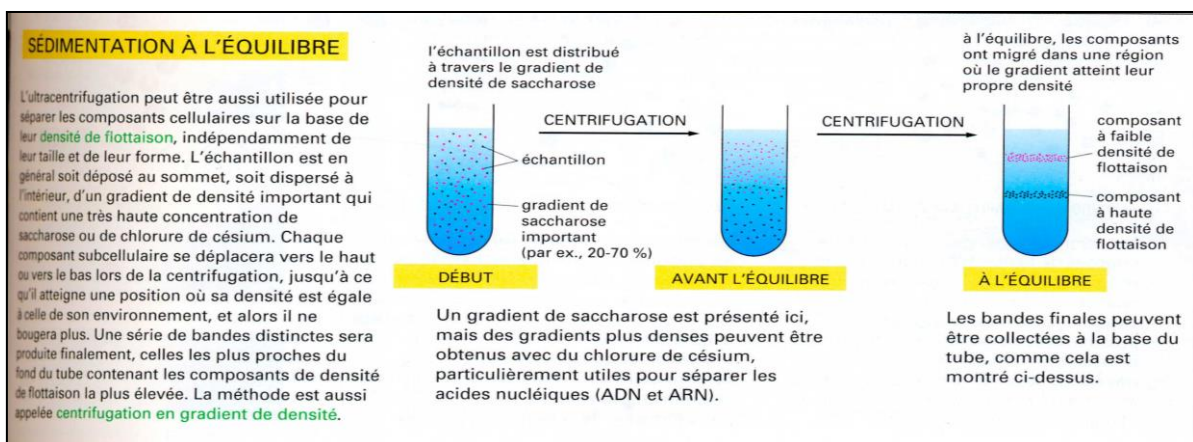


Figure n°7 : Centrifugation isopycnique (Guevara, 2012).

III. ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Elle permet de mesurer les propriétés physiques des particules. Une centrifugeuse analytique possède un système d'observation et de mesure permettant de suivre la migration des particules dans une solution homogène au cours de l'expérience, autorisant ainsi la détermination du coefficient de sédimentation (s), à l'aide d'une mesure optique de la concentration (absorbance) ou d'une variation de concentration (différence d'indice de réfraction) (Marouf, 2005).

IV. CONTROLE DU RESULTAT DE LA CENTRIFUGATION

Quelque soit la variante technique employée pour la préparation de fractions cellulaires, on doit toujours s'assurer que la fraction recueillie ne contient que l'organite ou les particules à étudier. Ce contrôle peut être fait soit grâce à des critères morphologiques (microscopie électronique), soit grâce à des critères biochimiques (recherche d'enzymes marqueurs) (Marouf, 2005).

V. APPLICATIONS DE LA CENTRIFUGATION

Séparation et purification de macromolécules, détermination de la constante de sédimentation ou la masse molaire d'une macromolécule.

CHROMATOGRAPHIE

I. DEFINITION ET PRINCIPE:

La chromatographie désigne un ensemble de techniques employés tant pour la séparation plus ou moins sélective et l'identification des constituants d'un mélange (chromatographie analytique) que pour l'obtention à l'état pur d'une certaine quantité de composés destinés à d'autres usages (chromatographie préparative).

Le principe fondamental des méthodes chromatographiques est que pour séparer deux composés, on exploite leur différence de répartition entre deux phases non miscibles, qu'on retrouve toujours dans tous les systèmes chromatographiques : phase mobile et phase stationnaire. Les constituants d'un mélange seront plus ou moins retenus sur la phase stationnaire et plus ou moins entraînés par la phase mobile, d'où leur séparation par entraînement différentiel (Marouf, 2005).

On définit un coefficient de partition K (Antonot *et al.*, 1998):

$$K = \frac{\text{Masse de soluté dans la phase stationnaire par unité de volume}}{\text{Masse de soluté dans la phase mobile par unité de volume}}$$

II. LES DIFFERENTES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES :

1) CLASSIFICATION SELON LA NATURE DES PHASES

1.1. Phase fixe:

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince).

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux (Antonot *et al.*, 1998).

1.2. Phase mobile:

La phase mobile est: soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur, soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée éluant (**Antonot et al., 1998**).

✓ Selon la nature de la phase mobile, on distingue:

- la chromatographie en phase liquide CPL
- la chromatographie en phase gazeuse CPG
- la chromatographie en phase supercritique CPS

La chromatographie en phase supercritique est une chromatographie dans laquelle la phase mobile est un gaz comprimé (à sa température et à sa pression critique) ou une phase liquide / vapeur de même densité (au-delà de la température critique, le gaz ne peut être liquéfié quelle que soit sa pression). Avec cette phase mobile, le plus souvent l'anhydride carbonique, la durée de l'analyse est de 5 à 10 fois plus courte qu'avec les phases mobiles liquides. De viscosité très faible, cette phase mobile permet un couplage facile avec des détecteurs comme le spectromètre de masse ou le détecteur par mesure de la diffusion de la lumière (**Cuq, 2007**).

2) CLASSIFICATION SELON LA NATURE DES PHENOMENES MIS EN JEU

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

2.1. Chromatographie d'adsorption:

Elle est illustrée par la séparation chromatographique classique, sur colonne remplie ou sur couche mince, des composés moléculaires.

Polarité des phases:

Les séparations sont basées sur le principe de polarité c'est à dire l'existence de dipôles.

Phase mobile:

Le pouvoir éluant d'un liquide dépend de sa propre polarité. Les liquides classés ci-dessous le sont par polarité croissante. On obtient ainsi une série éluotropique.

Ether de pétrole, cyclohexane, tétrachlorométhane, trichloréthène, toluène, benzène, dichlorométhane, éther diéthylique, trichlorométhane, éthanoate d'éthyle, pyridine, propanone, propan-1-ol, éthanol, méthanol, eau, acide éthanoïque.

Adsorbants:

Les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires.

Papier, cellulose, Kieselguhr, terre de diatomées, Amidon, Sucres, Talc, Carbonate de sodium, Oxyde de magnésium, Gel de silice, Alumine, Charbon activé.

Le gel de silice et l'alumine sont les adsorbants les plus utilisés. En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Il est cependant possible de traiter un adsorbant pour modifier ses capacités d'adsorption et ses propriétés:

Plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible (ce qui a pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de sites d'adsorption pour le soluté), plus il est polaire ou actif (**Antonot et al., 1998**).

2.2. Chromatographie de partage:

Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire.

L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase: ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée (**Antonot et al., 1998**).

2.3. Chromatographie ionique:

La phase mobile est une solution tampon aqueuse et la phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre, lesquelles ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces phases permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions, de même signe, présents dans la phase mobile. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases (**Antonot et al., 1998**).

2.4. Chromatographie d'exclusion:

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à perméation sélective. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Cette technique est encore appelée filtration sur gel ou perméation de gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique).

Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel.

Un mélange de solutés de masses molaires variables traverse une épaisseur donnée de gel: les grosses molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et éluées les premières; les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leur migration est freinée en diffusant dans le gel. La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires (Antonot *et al.*, 1998).

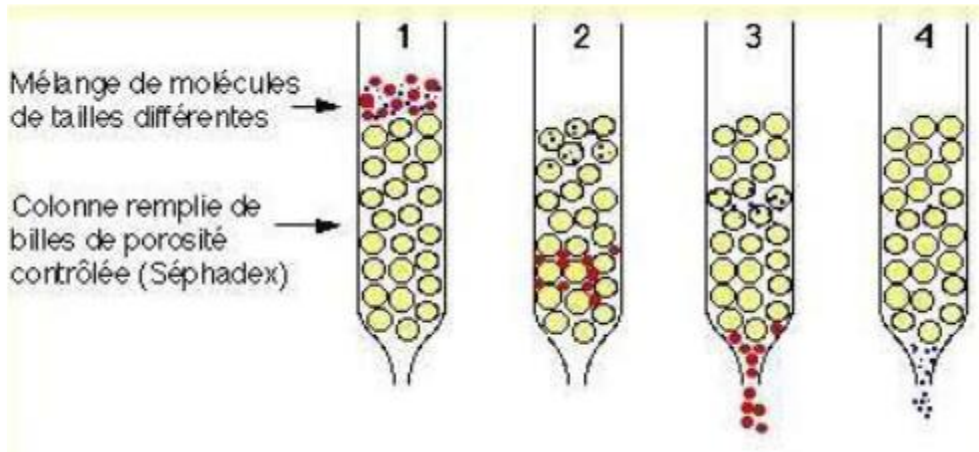


Figure n°8: Chromatographie d'exclusion moléculaire (Safi, 2009).

2.5. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité consiste à greffer, sur un support solide inerte, un ligand présentant une interaction ligand-molécule conduit à une fixation ou une rétention de cette dernière.

L'éluion est ensuite effectuée au moyen d'un solvant qui favorise la dissociation du complexe ligand-macromolécule. Cette technique est surtout utilisée en biologie dans le cas de la purification des protéines, dans des processus de séparation de cellules, de virus, d'acides nucléiques...etc (Safi, 2009).

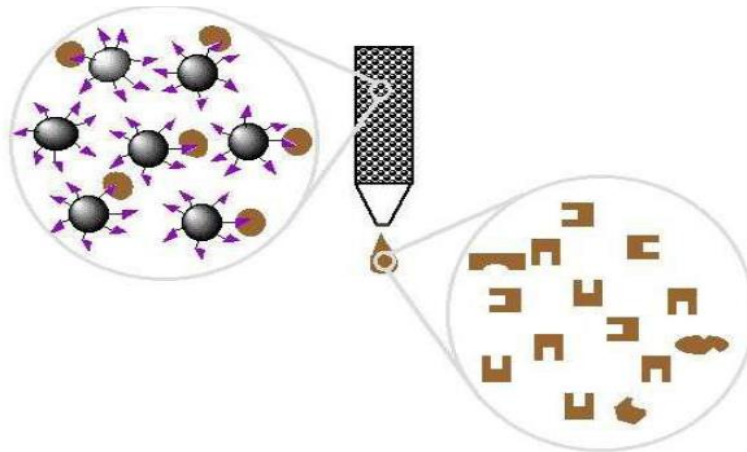


Figure n°9: Chromatographie d'affinité (Safi, 2009).

3) CLASSIFICATION SELON LA TECHNIQUE MISE EN JEU

Selon la technologie mise en jeu on distingue:

- La chromatographie sur colonne
- La chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

3.1. Chromatographies de surface

3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Définition et principe de la technique:

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. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (**Antonot et al., 1998**).

Adsorbants et plaques chromatographiques.

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose. Les plaques vous seront fournies prêtes à l'emploi.

Choix de 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.

Une méthode simple pour trouver l'éluant approprié consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants, en concentration d'environ 2 à 5% en volume. A l'aide d'une micropipette, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée d'environ 1 cm. Le meilleur éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue.

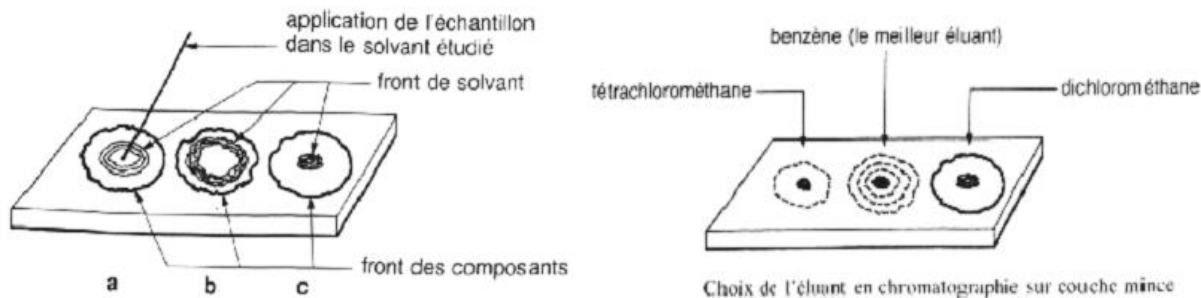


Figure n°10: choix de l'éluant en CCM

Une autre méthode consiste à déposer une solution des substances à analyser en plusieurs points, séparés d'environ 2 cm. Après séchage, on applique au centre de chaque point une micropipette remplie de solvant; Après diffusion, l'éluant qui convient sépare les solutés.

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 (**Antonot et al., 1998**).

Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment 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 tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large (**Antonot et al., 1998**).

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer. On peut aussi utiliser l'extrémité, un peu émoussée, d'un cure-dent. On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

Développement de la plaque.

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : 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; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords. 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.

Il existe un autre type, la chromatographie descendante : la plaque est suspendue dans la cuve par une attache en position verticale et le solvant qui se trouve dans un réservoir placé en haut de la cuve, descendra le long de la plaque entraînant la migration (cas de la chromatographie sur papier descendante) (**Antonot *et al.*, 1998**).

Révélation.

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

- directement si les substances sont colorées
- à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques: les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.
- Toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254$ nm). L'emploi de couches non additionnées de produits fluorescents permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

dans l'UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254 \text{ nm}$) ou à ondes longues ($\lambda_{\max} > 366 \text{ nm}$) par suite de la fluorescence propre des composés.

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal)

d_i : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

d_s : distance parcourue par le front du solvant

Pour un couple éluant et support déterminé, R_f est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience. R_f est toujours indépendant de la longueur de bande utilisée (Antonot *et al.*, 1998).

Chromatographie bidimensionnelle

Dans le cas d'un mélange complexe ou de composés très proches du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques, on procède à une chromatographie bidimensionnelle qui permet une séparation parfaite : l'échantillon est placé à un coin d'une plaque ou papier carré et chromatographié dans un mélange de solvants. A la fin de cette première séparation, la feuille est séchée et retournée d'un angle de 90 degré et chromatographiée dans une autre phase mobile.

3.1.2. Chromatographie sur papier:

Principe de la technique et applications:

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

Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, le ou les solvants organiques doivent y être assez solubles. Des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment utilisés en mélange avec de l'eau pour développer un chromatogramme.

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

Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont: une durée de développement beaucoup plus longue et une séparation généralement moins bonne (**Antonot *et al.*, 1998**).

Papier:

On peut utiliser du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes. Les marques principales sont Whatman, Schleicher et Schüll, Durieux, 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 des taches très denses et uniformes. La description de l'analyse par chromatographie sur papier est identique à celle sur couche mince (**Antonot *et al.*, 1998**).

3.2. Chromatographie sur colonne:

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. Elle présente cependant plusieurs inconvénients:

- De grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- La durée de l'élution est généralement très grande
- La détection des composés exige une attention constante.

Elle est adaptée à la purification de faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais (**Antonot *et al.*, 1998**).

L'appareillage utilisé pour la mise en œuvre

- support : choix avec nature chimique, granulométrie, état physique (sec ou humide)
- colonne : choix de la forme (rapport hauteur / diamètre) qui doit être adapté au type de chromatographie choisi ; taille de la colonne; préparation de la colonne (vérification de l'homogénéité du support = remplissage et le vérifier expérimentalement; garder les colonnes préparées (basse pression; chambre froide))
- réservoir de phase mobile et pompe : préparation de la phase mobile et vérification de son débit (stabilité) et de la pression

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

- introduction de l'échantillon à analyser
- élution : appareil à gradient ou non : gradient ; gradient discontinu et Gradient continu ou absence de gradient (isocratique)
- détecteur : détection des solutés et leur quantification
- système informatique : stockage et traitement des informations, commande et contrôle du système

Les principales méthodologies

Chromatographie à basse pression : technique souvent manuelle; mise en œuvre préparative.

Chromatographie à moyenne et haute pression : grand degré d'automatisation et d'informatisation : toutes parties performantes : appareillage sophistiqué, utilisation aidée par l'informatique; mise en œuvre analytique et industrielle.

3.2.1. La chromatographie liquide à haute performance HPLC

La chromatographie liquide à haute performance rend possible les critères suivant : une sélectivité optimale, un temps d'analyse court et une sensibilité de détection élevé.

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

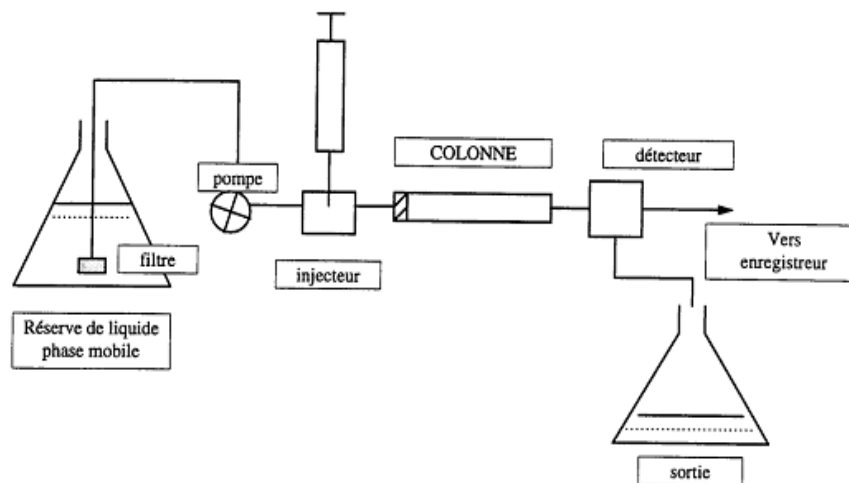


Figure n°11 : principe de fonctionnement de l'HPLC (Safi, 2009).

Réservoir de phase mobile

Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse. L'emploi d'un vase clos permet d'éviter l'évaporation, surtout si l'un des

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte (**Safi, 2009**).

Système de pompage

La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire l'utilisation d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants de composition constante dans le temps.
- en mode gradient, c'est-à-dire l'utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques microlitres/mn à plusieurs ml/min.

Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage (généralement une vanne RHEODYNE). Il existe des boucles de différents volumes, exemple une boucle de 20 μ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative (**Safi, 2009**).

Colonnes

Les colonnes de HPLC sont usuellement en acier inoxydable. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 μ m. Depuis peu, existent des micro colonnes à haute performance qui ont un diamètre de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes qui sont remplies de particules de 3 à 5 μ m. présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant. Cette dernière propriété est d'une importance considérable car les solvants de haute pureté pour la HPLC sont très coûteux.

La colonne est souvent précédé pour augmenter sa durée de vie, d'une précolonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette précolonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μ m (**Safi, 2009**).

Détecteurs

Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluat en sortie de colonne ce qui permet de détecter le passage des composés successifs.

Parmi les détecteurs utilisés : Spectromètres UV-visible, détecteur électrochimique, par conductibilité, de radioactivité, fluorimétrie, réfractomètre et spectromètre de masse.

Phase mobile

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la CLHP; ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué par ultra sons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement par exemple azote, argon, hélium..; il assure une bonne reproductibilité et évite l'apparition d'une oscillation sur la ligne de base. Malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 µm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices par les particules. Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de type de chromatographie.

- Il faut utiliser en priorité les mélanges suivants:
 - méthanol - eau
 - acétonitrile - eau
 - tétrahydrofurane – eau

On fait d'abord les essais avec une forte proportion d'eau puis on augmente progressivement la proportion en solvant organique jusqu'à obtention d'une bonne séparation. Avec un mélange de solvants de composition constante, il n'est pas toujours possible d'obtenir une bonne résolution et une durée d'analyse raisonnable. Pour concilier les deux, on peut opérer par élution graduée c'est-à-dire par augmentation graduelle du pourcentage de solvant ayant la force d'élution la plus élevée. Il existe sur le marché des appareils programmés permettant d'obtenir des gradients d'élution (**Safi, 2009**).

Phase stationnaire

Les phases stationnaires en CLHP sont très variées: On peut travailler par échange d'ions ou par perméation sur gel d'où les nombreuses possibilités d'application de la méthode. La silice est l'adsorbant choisi lorsqu'on désire effectuer un chromatographie solide-liquide. Elle s'applique bien aux composés organiques de masse inférieure à 2000 et à la séparation de composants renfermant des groupements fonctionnels différents. Par contre la séparation est difficile si les composés à dissocier sont peu polaires et elle requiert une grande quantité de solvant organique.

La chromatographie de partage est beaucoup plus usuelle, d'autant que le développement de phases stationnaires greffées peu polaires autorise l'emploi de phases mobiles aqueuses dans lesquelles le solvant organique est en faible proportion. Ces phases sont formées par silanisation des groupements hydroxyle de la silice. Dans ce cas la chromatographie est dite à polarité de phase inversée car plus le solvant est polaire (proportion élevée en eau), moins il entraîne les substances organiques peu polaires: Ces dernières sont davantage retenues par la phase stationnaire faiblement polaire (**Safi, 2009**).

3.2.2. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) est une variante de la chromatographie de partition et/ou d'adsorption entre une phase mobile gazeuse, vecteur du mélange à analyser et une phase stationnaire constituée par un support imprégné ou non d'un liquide fixe. On distingue entre la chromatographie gazeuse-liquide utilisant un gaz inerte comme phase mobile et un liquide visqueux comme phase stationnaire et la chromatographie gaz-solide utilisant une matière solide comme phase stationnaire.

Dans tous les cas, la séparation et la définition des migrations reposent sur la notion de temps de rétention au sein de la colonne (**Antonot *et al.*, 1998**).

Dans tout appareil de chromatographie en phase gazeuse on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

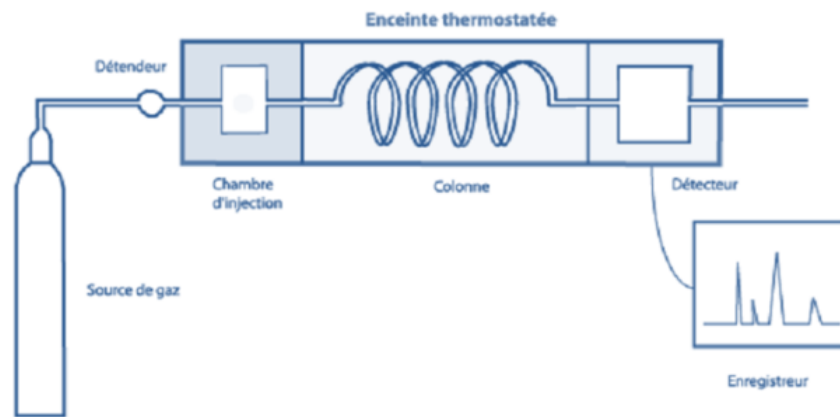


Figure n°12: Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse

Réservoir de gaz vecteur

Le gaz vecteur doit être d'une grande pureté, inerte par rapport aux substances à chromatographier, de très faible viscosité (la viscosité des gaz augmentant avec la température, il y aurait d'importantes diminutions de débit) ; à conductibilité thermique compatible avec le système de détection. Les plus employés sont : l'azote, l'argon, l'hélium et l'hydrogène. Il est conservé dans des bouteilles métalliques sous forte pression ; introduit après passage dans des détendeurs dans le système chromatographique sous des pressions allant de 1 à 4 bars. La qualité de la chromatographie est liée au débit du gaz vecteur ; les régulateurs permettent de contrôler et de choisir la vitesse désirée ; qui varie suivant le diamètre des colonnes (**Antonot *et al.*, 1998**).

Injecteur:

Il permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. Sa température doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil.

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

Les solutions ne doivent pas être trop concentrées et injection rapide pour éviter les élargissements de pics. La chambre d'injection a une double fonction: volatilisation instantanée de l'échantillon introduit et mélange homogène de la vapeur ainsi formée et du gaz vecteur. Attention à la décomposition thermique des substances de l'échantillon.

Pour rendre l'échantillon volatil, car les échantillons sont rarement d'emblée volatils. Ils sont transformés en dérivés volatils stables par une réaction chimique, appelée dérivation, qui peut se faire soit par : réaction de silylation (utilisation du triméthylsilane), réaction d'alkylation ou réaction d'acylation (**Antonot *et al.*, 1998**).

Colonne

C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte (ex : brique pilée, alumine etc... soigneusement calibrée) ou bien la phase stationnaire peut être solide où le greffage est possible.

On distingue les colonnes à remplissage proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Le support remplissant la colonne est constitué de grains dont les dimensions varient de 60 à 70 µm; ils sont à base soit de matériau réfractaire soit de silice. La phase stationnaire est un liquide peu volatil, formant environ 10% de la masse du support non imprégné.

Par ailleurs, on utilise des colonnes capillaires, formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz, dont le diamètre intérieur est de l'ordre de 0,2 à 0,5 mm et la longueur de 50 à 100 m, ou davantage. L'adsorbant y est fixé sous forme d'une fine couche collée à la paroi du tube, ou bien la phase stationnaire est fixée en film mince, sans support, sur cette même paroi. Dans tous les cas, ces colonnes comportent un canal central largement ouvert, offrant peu de pertes de charge à la progression du gaz porteur.

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

On distingue les phases apolaires et les phases polaires. Les premières sont à base d'hydrocarbures aliphatiques saturés ou de silicones (squalane, apiezon,...). Les secondes sont des polymères possédant des fonctions polaires: polyols, polyesters, polyamides.

Les adsorbants les plus classiques sont les adsorbants minéraux, tels le charbon actif, l'alumine, les tamis moléculaires. Ils sont pratiquement indispensables pour l'analyse des gaz, car ceux-ci sont peu solubles dans les phases stationnaires, et donc mal séparés par elles. Cependant, la désorption de ces gaz sur les adsorbants est lente, ce qui provoque généralement des traînées des pics. On utilise aussi des adsorbants organiques à haut poids moléculaire. Ce sont des copolymères (du type styrène + divinylbenzène). Ils ont l'avantage de permettre toutes sortes d'analyses (**Antonot *et al.*, 1998**).

Performances des colonnes :

On ne doit jamais effectuer d'analyse CPG sans avoir stabilisé l'ensemble de l'appareil en débit de gaz vecteur et en température pendant au moins deux heures.

En dehors des périodes d'utilisation, les colonnes doivent être bouchées pour éviter l'humidité pouvant se solubiliser dans la phase stationnaire, ainsi que l'oxydation de celle-ci.

Plus la température de colonne est basse, meilleure est la séparation, mais cela risque d'allonger le temps d'analyse.

Le choix de la phase stationnaire conditionne la bonne séparation des constituants. Il faudra la choisir polaire ou apolaire en fonction de la nature des substances à séparer.

Le gaz employé (phase mobile) est un gaz inerte (hélium ou azote). Ce gaz vecteur ou gaz porteur pousse les constituants à travers la colonne. En chaque point de cette dernière, il se produit un équilibre entre la fraction du constituant en phase stationnaire et en phase mobile.

L'ensemble des organes décrits ci-dessus est placé dans des enceintes thermostatées à des températures programmées selon la disposition des organes et la nature de l'échantillon à analyser (**Antonot *et al.*, 1998**).

Le détecteur

Les substances à détecter sont dans un état physique particulier, d'où des détecteurs particuliers. La modification des propriétés physiques et chimiques du gaz vecteur du fait de la présence des solutés conduit à la transformation de ces différences de propriétés en signaux électriques, amplifiés, enregistrés et éventuellement, transcrits sous forme graphique par un enregistreur. On observera des pics saillants par rapport à une ligne de base. Parmi les détecteur utilisés : catharomètre, détecteur à ionisation de flamme, à capture d'électrons, à photo-ionisation, à photométrie de flamme, d'émission atomique et spectromètre de masse.

Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur (**Antonot *et al.*, 1998**).

ELECTROPHORESE

I. INTRODUCTION

Electrophorèse : Méthode de séparation de particules chargées électriquement (séparation, caractérisation ou purification de molécules d'intérêt).

Applications principales: biochimie et biologie moléculaire (Séparation des protéines et des acides nucléiques).

Principe : migration de molécules chargées (perte de neutralité électrique) dissoutes ou en suspension dans un solvant, sous l'effet d'un **champ électrique**.

Champ électrique : générateur de courant continu

Support du champ : tampon conduisant le courant d'un pôle à l'autre

En fonction des caractéristiques propres des molécules et des conditions d'électrophorèse, la vitesse de migration est différente pour les différentes molécules chargées et permet leur séparation les unes des autres :

Cation : chargé +. Attiré lors de l'électrolyse par la **CATHODE (ou électrode négative)**

Anion : chargé -. Attiré lors de l'électrolyse par l'**ANODE (ou électrode positive)**

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon. Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant. Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge (**Barani, 2007**).

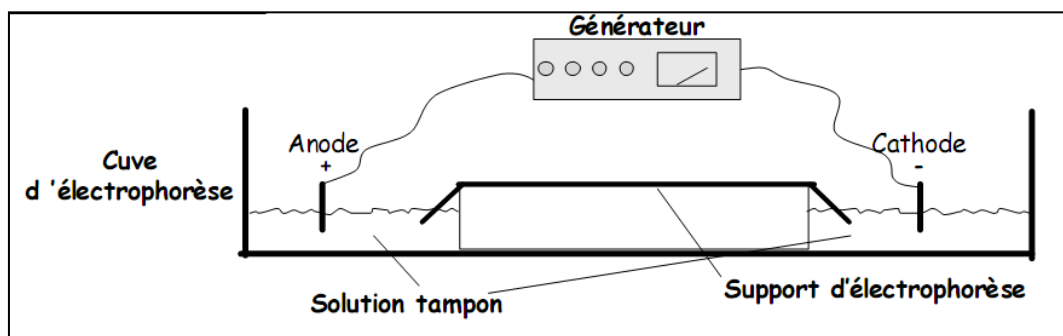


Figure n°13: dispositif d'électrophorèse (**Barani, 2007**).

LES SUPPORTS ÉLECTROPHORÈSES

Liquide => "électrophorèse en veine liquide". Pour les très grosses particules (cellules, organites); presque plus utilisée. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH et de concentration convenables dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre.

Support poreux => “électrophorèse de zone”. Obtention après migration d’une séparation en zones distinctes (bandes) des molécules chargées.

- **Différents supports d’électrophorèse de zones :**

Papier, acétate de cellulose, semi-solide (gels)

- **Deux types de montage peuvent être mis en place:**

Montage horizontal: Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande. Les extrémités du support plongent dans un tampon d’électrode, créant une mince couche d’eau à sa surface.

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

- **Différents types d’électrophorèse sur gel**

Electrophorèse sur gel d’agarose, électrophorèse en champ pulsé, électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), électrophorèse bi-dimensionnelle et immuno-électrophorèse.

Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en **conditions dénaturantes** (Détergents type SDS ou urée) (**Barani, 2007**).

II. ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER ET ACETATE DE CELLULOSE

Migration des molécules principalement en fonction de la charge globale, et en conditions non dénaturantes (peu utilisée de nos jours)

Électrophorèse sur papier et acétate de cellulose

Milieu basique: protéines chargées (-)

- extrémités des bandes plongées dans tampon d’électrophorèse conducteur (pH = 9.2)
- dissolution échantillon dans solution conductrice
- application champ électrique
- migration le long de la bande.
- Vitesse de migration dépend : la magnitude de la charge et la taille des molécules
- coloration des protéines (rouge Ponceau)
- analyse densité optique des bandes. Intensité de la coloration proportionnelle à la concentration des protéines.

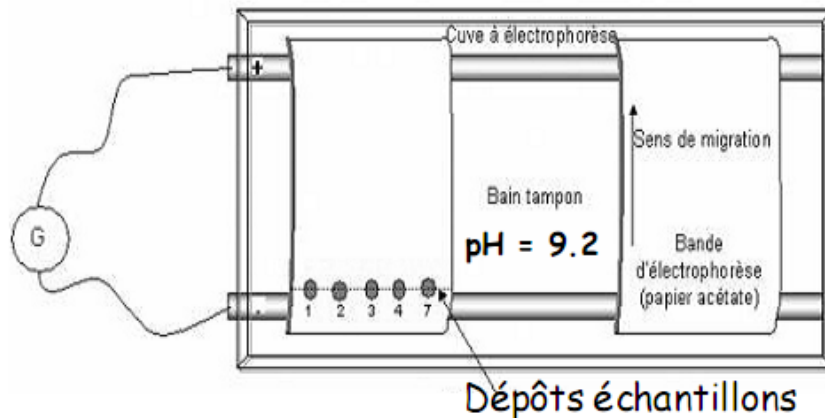


Figure n°14: Électrophorèse sur papier acétate (Barani, 2007).

III. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL (SUPPORTS SEMI-SOLIDES)

- Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse.
- Conjuguent mobilité électrophorétique + effet filtration du gel (taille des pores limite la vitesse de migration).

Les molécules chargées atteignent rapidement une vitesse : $V = qE/f$

q: charge particule, E: champ électrique, f: coef. frottement particule/solvant

Théorie de l'électrophorèse : Mobilité u dans un champ électrique au sein d'un gel

$\text{Log } u = \text{Log } u_0 - KrC$ $\text{Log } u_0 =$ mobilité en milieu liquide, $Kr =$ coef. de retardement dû au gel (fonction masse moléculaire), $C =$ concentration du gel

Ainsi, la vitesse de migration dépend aussi de la masse moléculaire.

Deux types de matériaux peuvent être utilisés:

Agarose : colloïde naturel extrait d'algue rouge (Gracilaria). Grande taille de pores => séparation de très grosses molécules : Protéines >500kDa, Ac. Nucléiques >1500pb.

Polyacrylamide : de l'acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ est mis à polymériser avec du NN' méthylène-bis-acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, donnant des chaînes latérales linéaires.

On peut aussi faire des électrophorèses sur gel **d'amidon** (Barani, 2007).

III.1. SEPARATION SUR GEL POLYACRYLAMIDE

Séparation/purification de **protéines** ou de petits fragments **d'Acides Nucléiques** (taille <1000 pb) (purification d'oligonucléotides de synthèse (élimination nucléotides libres), détermination de séquences d'ADN).

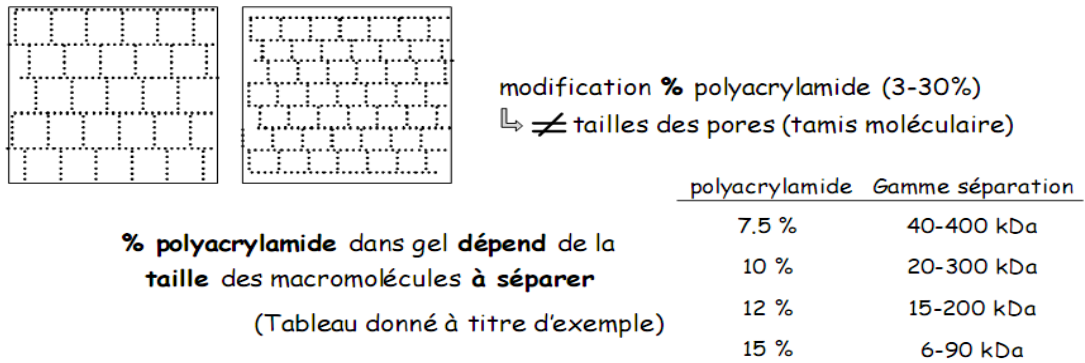


Figure n°15 : Séparation des macromolécules selon le pourcentage de polyacrylamide

III.1.1. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)

- Séparation / purification d'un mélange de **PROTEINES**
- Possible détermination de la taille et la composition en sous unité d'une protéine
- Protéines : charge nette positive ou négative, reflet du mélange d'acides aminés dont elles sont formées
- Si on applique un champ électrique à une solution contenant des protéines, la Vitesse de migration dépend de :
 - ✓ la charge nette des molécules
 - ✓ la forme et la taille des molécules
 - ✓ la tension du champ électrique
 - ✓ la viscosité de la solution conductrice

C'est l'électrophorèse PAGE qui a tendance à remplacer celles sur acétate de cellulose

Pour séparer des protéines, on utilise le + souvent une électrophorèse particulière réalisée en conditions dénaturante (SDS-PAGE) (**Barani, 2007**).

III.1.2. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

Séparation de protéines réalisée en condition dénaturante, en présence de SDS : Sodium Dodécyl Sulfate, détergent anionique. Les extraits protéiques mis à bouillir en présence d'un détergent et d'un agent réducteur.

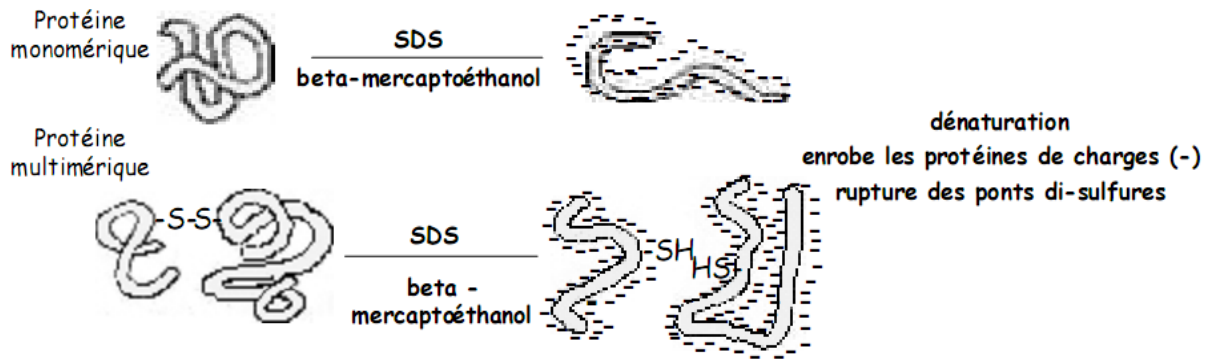


Figure n°16: Perte de la charge nette et de la structure III et V d'une protéine pendant SDS-PAGE (Barani, 2007).

Conditions SDS-PAGE => suppression facteurs FORME et CHARGE lors de la migration.

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE avec une SDS-PAGE.

SEPARATION DES PROTEINES UNIQUEMENT EN FONCTION DU FACTEUR TAILLE :

- Préparation d'un gel de séparation (résolution, 6-15% polyacrylamide) contenant du SDS
 - Un gel concentrateur (stacking gel, 3 à 5%) est coulé en haut du gel de séparation
- => entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation
- => affine les bandes avant leur entrée dans le gel de résolution

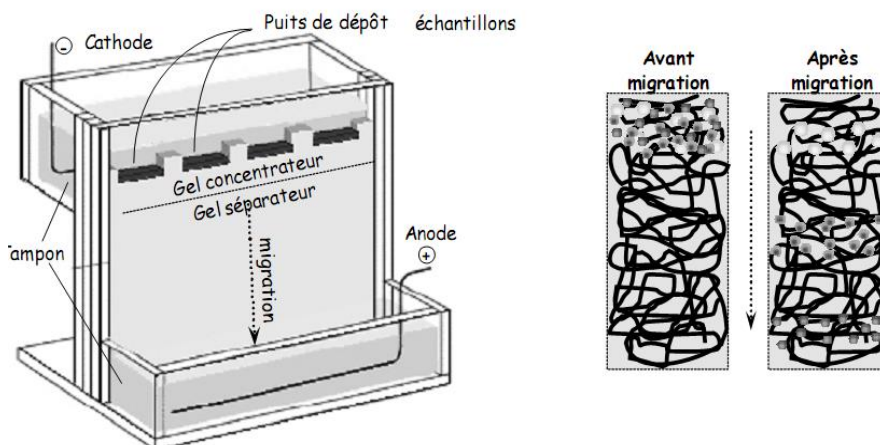


Figure n°17: séparation des protéines par SDS-PAGE (Barani, 2007).

- Évaluation des masses moléculaires des protéines séparées, on utilise des standards = mélange de protéines de masses moléculaires connues.
- **Révélation des protéines séparées dans le gel :** coloration au bleu de Coomassie, nitrate d'argent (plus sensible), ou nouveaux colorants fluorescent. Ce qui permet une

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

visualisation de l'ensemble des protéines dans le gel. Pour la détection spécifique => utilisation d'anticorps marqués (western blot) (Barani, 2007).

III.1.3. ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE (2D)

- Lorsqu'il existe des bandes protéiques très proches => chevauchement.
- Séparation par électrophorèse SDS-PAGE (unidimensionnelle): résolution <50 protéines
- Pour séparer plus de bandes : combinaison de deux modes de séparation dans 2 dimensions
- Électrophorèse bi-dimensionnelle : résolution >1 000 protéines différentes.
-

DIMENSION 1

Séparation des protéines en fonction de la charge par **Focalisation Isoélectrique (FIE)**

- La charge nette d'une protéine varie avec le pH. A pH_i : charge nette nulle.
- Valeur de pH_i spécifique d'une protéine, qui ne migre plus dans un champ électrique
- On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi grâce à des mélanges d'ampholytes (petits peptides polycarboxyliques et polyaminés). On soumet alors à un fort courant électrique

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 (Barani, 2007).

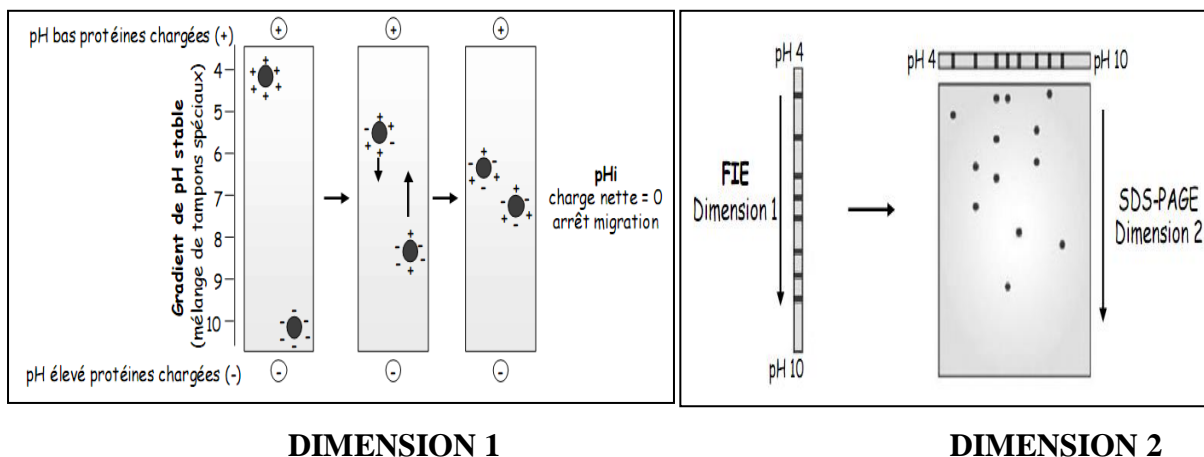


Figure n°18: Electrophorèse bidimensionnelle (2D) (Barani, 2007).

III.2. SEPARATION SUR GEL D'AGAROSE

III.2.1. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Exemple d'application: séparation des acides nucléiques

Acides nucléiques= macromolécules polyanioniques uniformément chargées =>charge relative constante => La charge n'est plus un critère de discrimination; la taille et structure le restent. C'est l'effet "tamis moléculaire" du gel : + les molécules sont de petite taille, + vite elles passent au travers des pores du gel ; un ADN de structure serrée (ex: plasmide super enroulé) migrera + vite qu'une structure lâche (plasmide circulaire ou linéarisé). Plus un gel est concentré en agarose, + les pores seront de petite taille => discrimination de molécules + petites.

- Evaluation 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). Visualisation : transilluminateur UV => fluorescence orangée. 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 échantillon comparée avec quantité connue (standard) : mélange d'acides nucléiques de masses moléculaires connues (**Barani, 2007**).

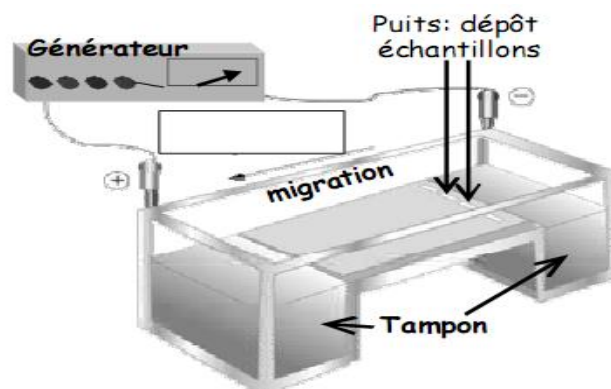


Figure n°19: électrophorèse sur gel d'agarose (**Barani, 2007**).

III.2.2. ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

- Résolution de très gros ADN (50 kb - 10 Mb)
- Dans les concentrations classiques d'agarose => porosité < 1µm
- ADN 50 kb étiré ~ 18µm. Ne peut se déplacer dans le gel que par reptation
- Champ électrique => allongement ADN dans le sens du champ => Reptation à partir d'une extrémité
 - ⇒ Vitesse de migration = constante quelle que soit la taille de la molécule
- ADN > 50 kb => Absence de pouvoir séparateur du gel (plus d'effet tamis moléculaire)
 - ⇒ Champ pulsé : changement orientation et/ou polarité du champ, alternativement au cours du temps

Réalisation d'une électrophorèse en champ pulsé : Séparation : gel d'agarose (1%). Application d'un courant électrique. Modification orientation du champ au cours du temps. Réorientation du champ électrique => réorientation ADN. Réorientation ADN // nouveau champ => retarde la migration. Temps de réorientation proportionnel à longueur de l'ADN (Barani, 2007).

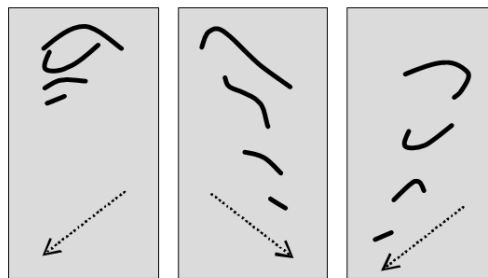


Figure n°20: électrophorèse en champ pulsé (Barani, 2007).

III.2.3. IMMUNOELECTROPHORESE

La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps". Les techniques ci dessous utilisent la propriété qu'ont les complexes Ag-Ac de donner *in Vitro* des précipités = réaction d'immunoprécipitation. Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

Immunoélectrophorèse monodimensionnelle

L'échantillon est placé dans un puits pratiqué dans le gel d'agarose puis séparé en ses différents composés sous l'effet du courant électrique. L'antisérum (Ac spécifique à la protéine rechercher) est placé dans la gouttière parallèle au sens de la migration après 10-20 h, diffusion des molécules d'Ag et d'Ac. Des arcs de précipitation sont formés par chaque Ag associé à son Ac correspondant. La visualisation se fait par coloration des protéines.

Le pouvoir de résolution peut être amélioré par :

Immunoélectrophorèse croisée :

On sépare les protéines dans une première dimension en gel d'agarose. On coule ensuite un gel contenant l'immunsérum polyspécifique, puis on réalise la seconde dimension, le champ électrique est appliqué perpendiculairement au sens de la 1^{ère} migration (Lafont, 2005).

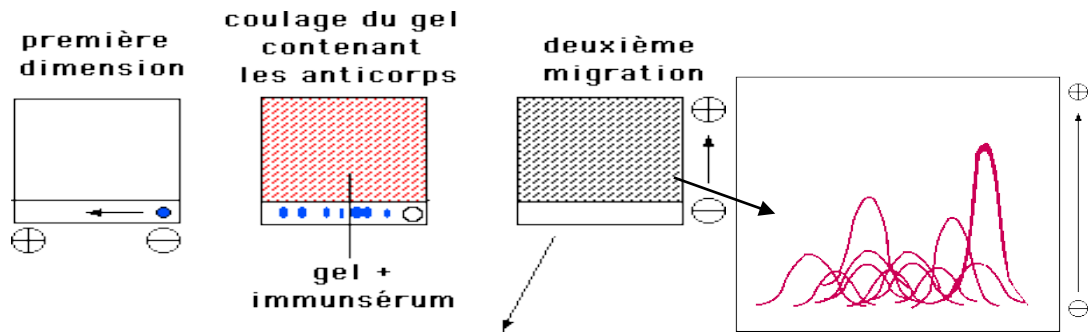


Figure n°21: Immunoélectrophorèse croisée (Lafont, 2005).

IV. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Electrophorèse = migration d'espèces électriques chargées, dissoutes ou suspendues dans un électrolyte, à travers lequel passe un courant électrique.

Electrophorèse capillaire (CE) = séparation d'espèces ioniques dans un tube capillaire rempli d'un électrolyte.

La séparation des composants par CE dépend de la migration différentielle des analytes dans un champ électrique appliqué :

V migration électrophorétique (u_p) d'un analyte vers l'électrode de charge inverse :

$$u_p = \mu_p E \quad \mu_p : \text{mobilité électrophorétique}, \quad E : \text{force champ électrique}$$

Mobilité électrophorétique: proportionnelle à la charge ionique de l'échantillon et inversement proportionnelle à toute force de friction.

Forces de friction présentes dans le tampon : viscosité du milieu, taille et forme de l'ion

Séparation par CE repose sur la présence d'un flux de solution électriquement induit dans le capillaire, flux électroosmotique (EOF), pour pomper les solutés vers le détecteur (Barani, 2007).

La mobilité $\mu_e = q/6\pi\eta r$ ($\eta \rightarrow$ viscosité de l'électrolyte, $r \rightarrow$ rayon solvaté de l'ion)

Vitesse de migration électrophorétique: $V_e = \mu_e \times E$ (Champ électrique $E = V/L$, Vitesse $V = l/t_m$)

Mobilité $\mu_{féo} : \mu_{féo} = \epsilon \zeta / 4\pi\eta$

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

vitesse de migration électro osmotique : $V_{féo} = \mu_{féo} \times E$ ($E = V/L$) ($v = d/t$)

Toute espèce est soumise à μ_e et $\mu_{féo}$, et migre donc avec une mobilité apparente

$$\rightarrow \mu_a = \mu_{féo} + \mu_e \quad \text{d'où } V_{app} = (\mu_{féo} + \mu_e) E \quad (\text{vitesse apparente})$$

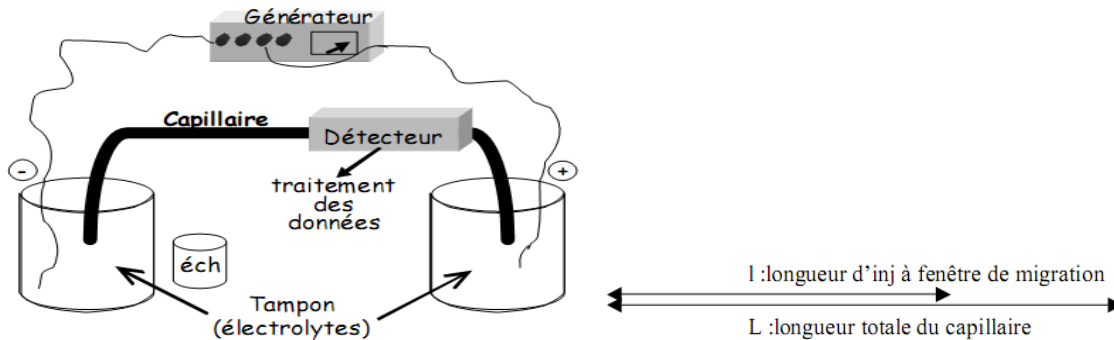


Figure n°22: dispositif d'une électrophorèse capillaire (Barani, 2007).

Réalisation d'une CE

- ✓ Le capillaire (10-100 μ m diamètre) rempli d'une solution d'électrolyte conduisant le courant à l'intérieur du capillaire
- ✓ Voltage élevé (15-30 kV), V migration très rapide
- ✓ Injection de l'échantillon (capillarité, pression, siphonage ou électroinjection). Quelques nanolitres d'échantillon
- ✓ Le capillaire passe au travers du détecteur (absorption UV, fluorimétrie, conductimétrie)
- ✓ Ions, positifs et négatifs, attirés à travers le capillaire, dans le même sens, par EOF
- ✓ Analytes séparés pendant leur migration = mobilité électrophorétique différente
- ✓ Haute résolution, très sensible. Utilisation d'un équipement d'analyse automatisé, temps d'analyses très courts (utilisation hauts voltages), détection en temps réel des pics séparés.

V. BLOTTING'' OU EFFET BUVARD

Définition : Réalisation d'une réplique exacte de gels sur des membranes, suivie d'une détection spécifique. Technique de transfert sur membranes (hybridation moléculaire):

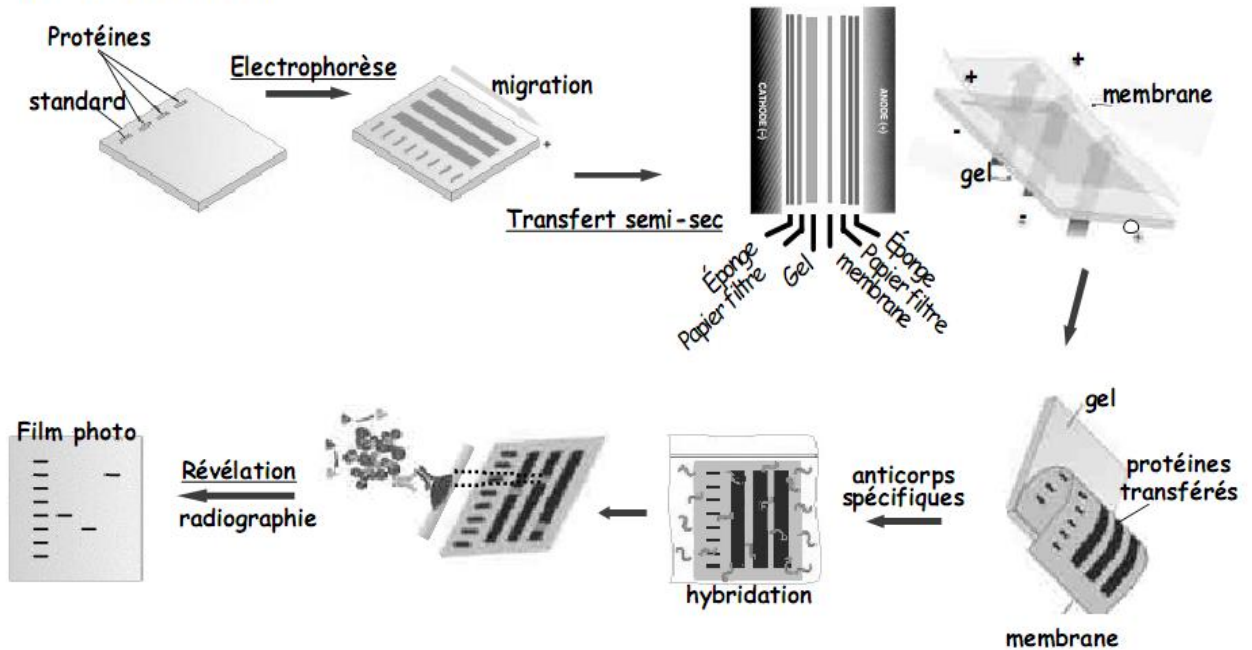
Analyse d'ADN (Southern Blot), d'ARN (Northern Blot) et de protéines (Western Blot)

- ✓ Séparation ADN, ARN ou protéines par électrophorèse
- ✓ Transfert : réplique du gel sur une membrane
- ✓ Localisation (hybridation à l'aide d'1 sonde ou d'1 anticorps)
- ✓ Révélation des molécules d'intérêt
- ✓ Quantification des molécules d'intérêt

CHAPITRE II : METHODES DE SEPARATION ET DE FRACTIONNEMENT

Les différents types de membranes de transfert : **Nitrocellulose** : la plus utilisée. **PVDF** : support hydrophobe (polyvinylidene difluoride), **Nylon** : support chargé + (Barani, 2007).

WESTERN BLOT



SOUTHERN & NORTHERN BLOTS

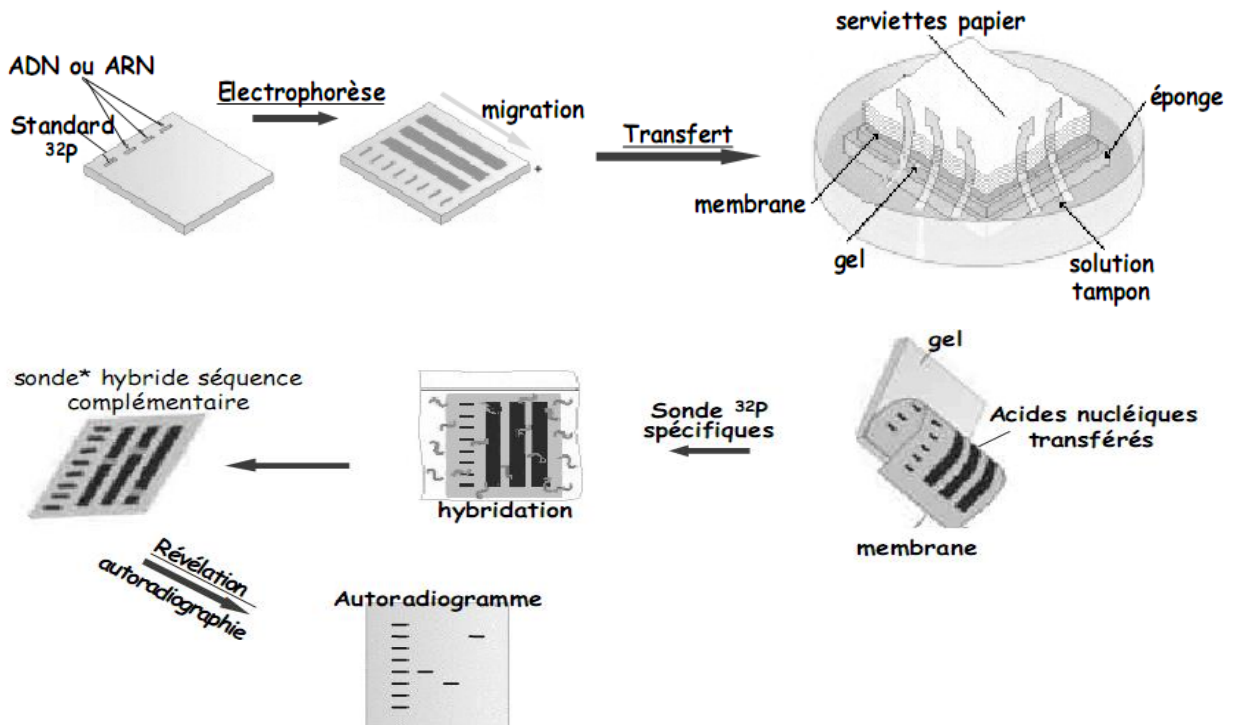


Figure n°23: Western, Northern et Southern blot.

CHAPITRE III
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1) INTRODUCTION :

Le microscope électronique utilise le même principe de lentilles et de faisceaux qu'un microscope optique. Ce qui varie, c'est que le microscope électronique est doté de lentilles électromagnétiques et d'un faisceau d'électrons, alors qu'un microscope optique utilise un faisceau de lumière et des lentilles en verre. La résolution des microscopes électroniques est beaucoup plus grande (le grossissement atteint 2 millions de fois, contre 2.000 fois avec un microscope optique).

Le microscope électronique est composé d'un canon à électrons (qui fournit le faisceau électronique), de lentilles électromagnétiques et d'un système de détecteurs d'électrons. Ces éléments sont placés dans un vide poussé (**Bortoluzzi et al., 2012**).

Il existe plusieurs sortes de microscope électronique. Les plus connus sont :

- le microscope électronique à transmission ;
- le microscope électronique à balayage.

2) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Le microscope électronique en transmission (MET) analyse le faisceau d'électrons «transmis» à travers l'échantillon très mince à observer. La résolution peut atteindre 0,08 nanomètre. Le microscope électronique en transmission est un microscope électronique permettant de visualiser des objets bien plus petits que des cellules.

Technique du microscope électronique en transmission

Le microscope électronique en transmission (MET ou TEM en anglais) utilise un faisceau d'électron à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée (**Bortoluzzi et al., 2012**).

Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Des coupes très fines de l'échantillon sont réalisées à l'ultramicrotome (de 60 à 100 nanomètres). Des colorations aux métaux lourds sont également possibles pour augmenter les contrastes de structures particulières des échantillons, préalablement placées sur des grilles d'observation.

Utilisation du microscope électronique en transmission

Si la préparation des échantillons est plus longue et plus contraignante que pour une microscopie optique, la résolution offre une vue incomparable des structures. La microscopie

électronique en transmission permet de visualiser les organites intracellulaires, des virus, des cristaux...

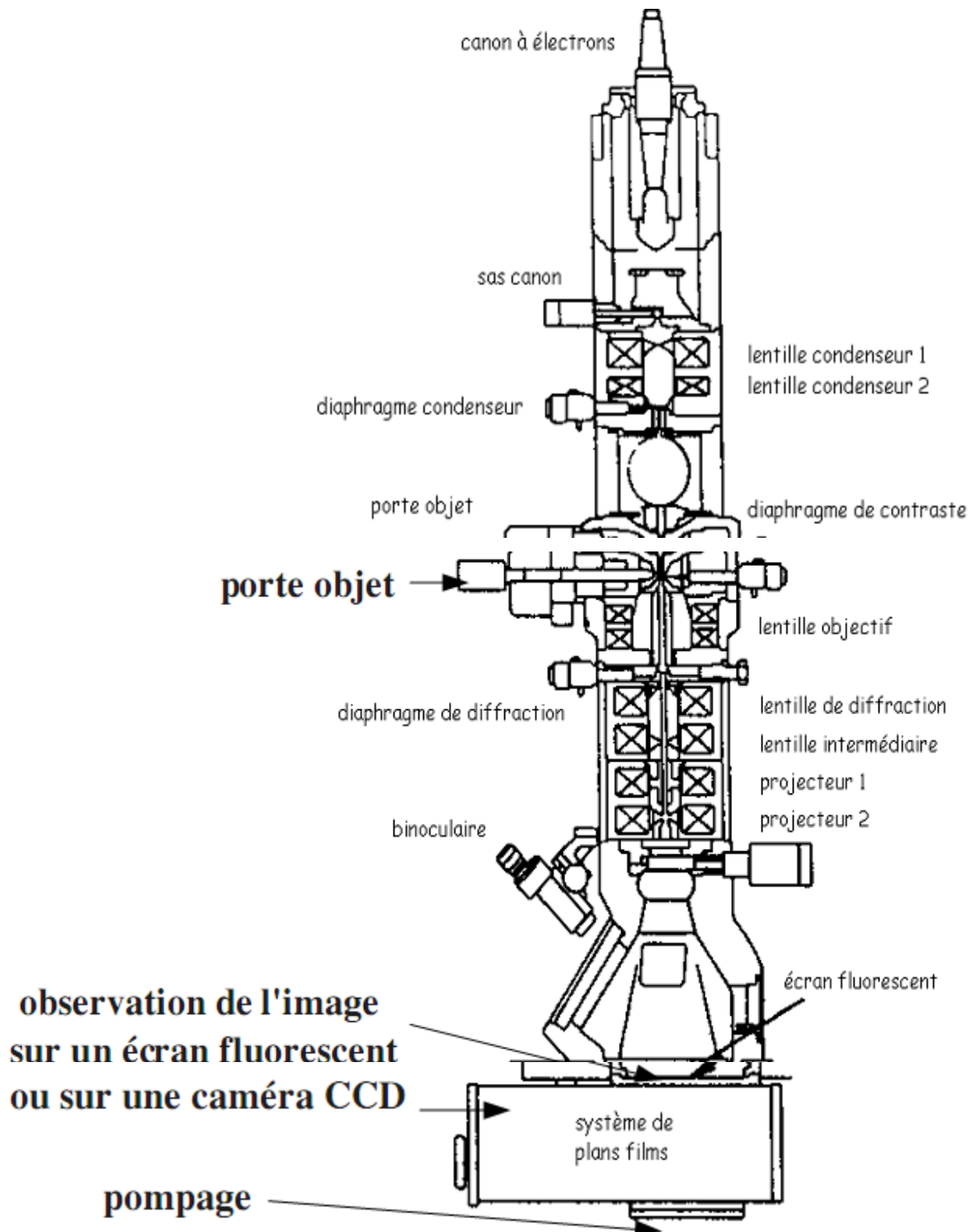


Figure n°24: microscope électronique à transmission (Bortoluzzi *et al.*, 2012).

3) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

La microscopie électronique à balayage (MEB) a permis, du fait de sa profondeur de champ, l'observation du relief d'échantillons massifs.

Contrairement au MET et au microscope optique, l'image n'est pas formée par une lentille objectif. L'image est formée de manière séquentielle en balayant la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons. Le MEB fournit des images de la surface en relation avec le mode de diffusion des électrons par l'échantillon (**Bortoluzzi et al., 2012**).

Les différentes particules émises, électrons secondaires, rétrodiffusés et photons X permettent une polyvalence d'analyse. Une analyse en fluorescence X locale peut être réalisée sur une zone rectangulaire ou sur un point de l'échantillon ($1\mu\text{m}^3$) et permet une analyse en composition chimique. Il faut réussir à faire des compromis pour obtenir la meilleure analyse possible.

Technique du microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour *scanning electron microscopy*) utilise un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon.

L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie.

Le nombre d'électrons secondaires et rétrodiffusés émis varie en fonction du point d'impact du faisceau d'électrons sur la surface. Ces électrons sont amplifiés puis détectés dans des détecteurs et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la topographie de l'échantillon et de fournir une image en relief (**Bortoluzzi et al., 2012**).

La préparation des échantillons est contraignante. Ils doivent être déshydratés puis subir un traitement pour devenir conducteur (fixation des tissus, nettoyage). L'échantillon est ensuite placé sur le porte-objet.

Utilisation du microscope électronique à balayage

Grâce au microscope électronique à balayage, il est possible de voir la surface d'objets, de bactéries, de matériaux... La grande profondeur de champ est un atout de ce microscope et peut ainsi produire des images qui sont une bonne représentation en trois dimensions de la structure de l'échantillon. La résolution (1 nanomètre) est en revanche moins bonne que celle du microscope électronique en transmission (0,1 nanomètre).

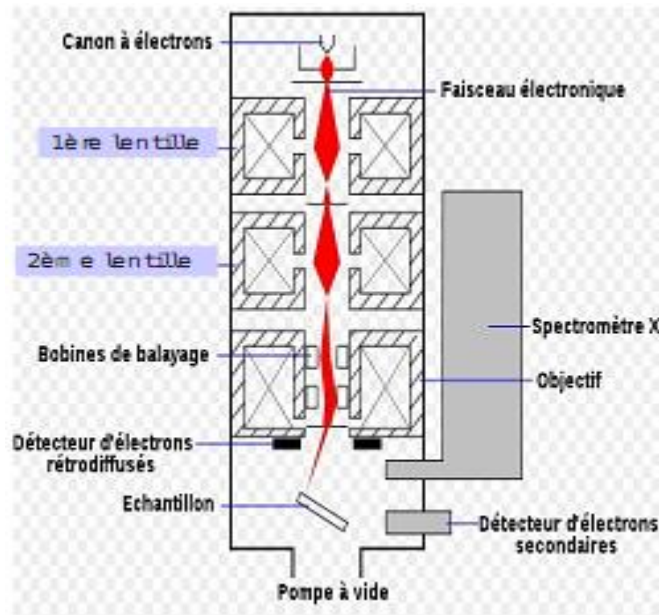


Figure n°25: microscope électronique à balayage (Bortoluzzi *et al.*, 2012).

Emission d'un électron secondaire:

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Quand il interagit avec les électrons d'un atome, il ressort avec perte d'énergie. Un électron secondaire est émis, l'atome est ionisé. C'est le processus d'interaction ou diffusion inélastique. L'électron primaire peut aussi subir une interaction inélastique avec un électron libre entre deux plans atomiques d'un matériau cristallin analysé.

La détection de ces électrons fournit une information sur la topographie de l'échantillon sur une profondeur de 10 nm. L'analyse de ces électrons permet d'obtenir une image caractéristique de la surface. Ces électrons représentent un bon outil pour l'observation des contours, de la morphologie de l'échantillon (Bortoluzzi *et al.*, 2012).

Emission d'un électron rétrodiffusé (back-scattered electron) :

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Il ressort sans perte d'énergie, en gardant son énergie cinétique et sa quantité de mouvement. Il n'a pas échangé d'énergie avec les atomes de l'échantillon. Il a subi une interaction coulombienne avec les atomes "diffuseurs". C'est le processus d'interaction ou diffusion élastique. L'électron incident est rétrodiffusé élastiquement.

"Les centres diffuseurs qui induisent dans leur environnement un champ électrique très intense peuvent faire subir à l'électron un changement de direction allant jusqu'à 180°.

Plus le numéro atomique de l'atome est élevé, plus le signal est intense et plus la zone de l'image est claire. C'est le contraste de phase. L'image obtenue est donc fonction de la composition chimique de l'échantillon (**Bortoluzzi et al., 2012**).

Emission d'un photon X:

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Un électron d'une couche interne est éjecté. Il est remplacé par un électron d'une couche supérieure. Un photon d'énergie égale à la différence entre les deux niveaux d'énergie électronique est émis. Le vide de la couche supérieure est comblé par un autre électron d'une couche encore supérieure avec émission d'un photon. Une cascade est ainsi créée. L'étude des photons X permet une analyse quantitative de la composition chimique de l'échantillon (**Bortoluzzi et al., 2012**).

Détecteur Everhart-Thornley

Ce détecteur est entouré, pour sa partie récoltante, d'une cage électrique attirant les électrons considérés: on collecte les électrons secondaires et rétrodiffusés. La détection des électrons secondaires est primordiale et c'est cette détection qui permet d'obtenir une image en «relief» avec un MEB. Ce détecteur est toujours utilisé aujourd'hui dans les MEB modernes (**Bortoluzzi et al., 2012**).

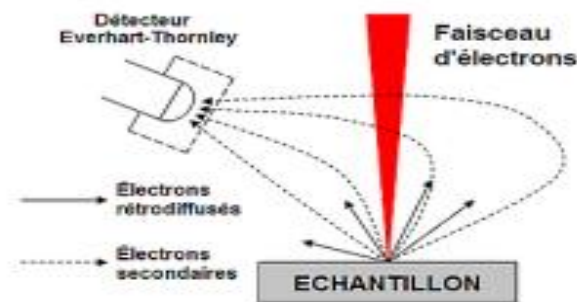


Figure n°26: Détecteur Everhart-Thornley (**Bortoluzzi et al., 2012**).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Antonot E., Marchal R. et UMBER J. (1998). Stage MAFPEN – Chromatographie. Lycée Louis Vincent – METZ. 50p.

Barani A. (2007). Les méthodes d'électrophorèse : l'essentiel. Premier Cycle d'Etudes Médicales. Faculté de Médecine Jacques Lisfranc. Université Jean Monnet. 13p.

Bortoluzzi J., Malatrait B., Ribstein L. et BASSEZ M.-P. (2012). Les microscopes électroniques. Projet tutoré 2ème année DUT Chimie. Université de Strasbourg. <http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/Vie-Instrumentation2/MEB-MET-Bortoluzzi-Malatrait-Ribstein-Bassez-091012.pdf>

Cuq J.-L. (2007). Chromatographie liquide. Université Montpellier 2 Sciences et Techniques. 97p.

Guevara T. (2012). Matériel biologique et approches expérimentales : méthodes préparatives et/ou séparatives. <https://www.slideserve.com/tyne/materiel-biologique-et-approches-experimentales-m-thodes-pr-paratives-et>

Lafont R. (2005). Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Biologie et Multimédia - Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>

Marouf A. (2005). Analyse instrumentale à l'usage des biologistes. 2ème édition DAR EL GHARB. 276p.

Safi M. (2009). Cours chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Département de chimie. Faculté des sciences et techniques de Mohammedia. Université Hassan II. 22p.

Saint-Blanquet C. (2006). Eléments de rayonnement thermique. Chapitre 1 : Définitions et lois du rayonnement Thermique. http://www.sciences.univ-nantes.fr/sites/claude_saintblanquet/rayonnem/11defloi/11defloi.htm