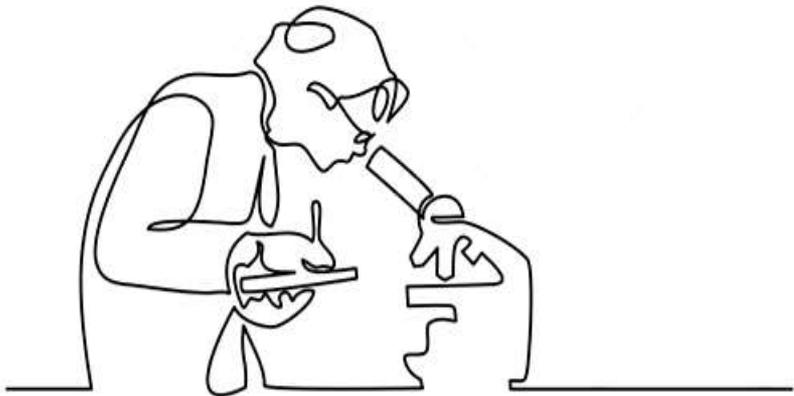
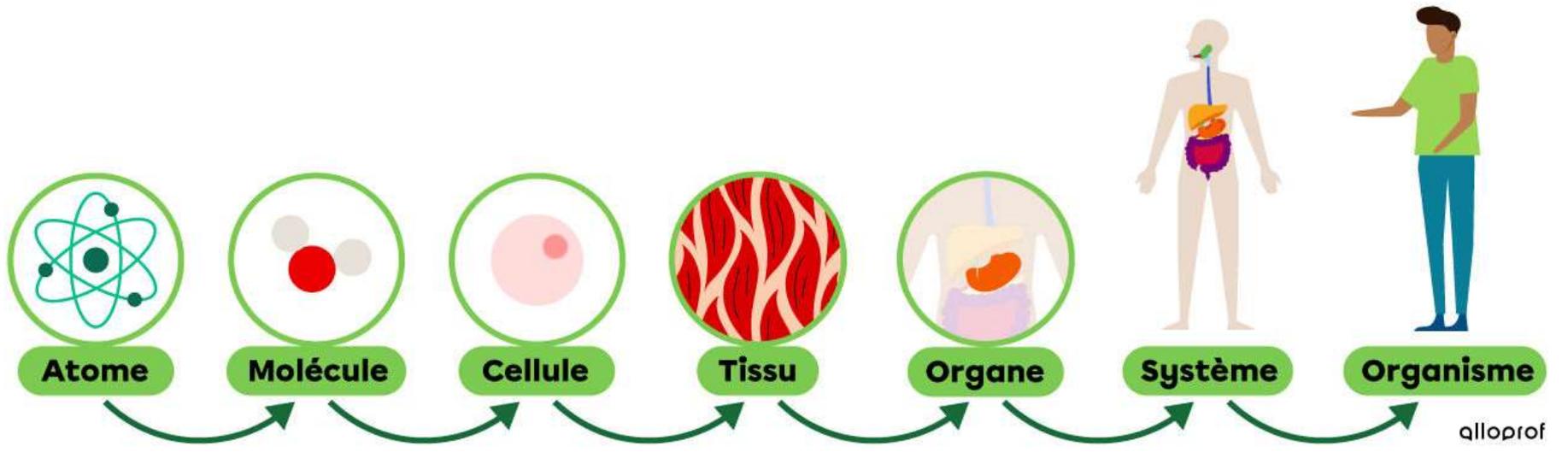


# Techniques d'analyses biologiques



Fév. 2023





# Généralités sur les solutions

**Solution** : Mélange de deux ou plusieurs constituants

Le constituant majoritaire est appelé solvant

Le ou les composés minoritaires sont appelés soluté(s)

# Généralités sur les solutions

**Mole** : Quantité de matière contenant  $6,02 \cdot 10^{23}$  entités (molécule, atome ou ion)

**Concentration molaire** : nombre de moles de soluté / litre de solution (mol/L ou M)

**Masse molaire moléculaire** : la somme des masses molaires atomiques des atomes qui constituent la molécule

ex:  $M_{\text{H}_2\text{O}} = 2 \times M_{\text{H}} + M_{\text{O}} = 2 + 16 = 18 \text{ g/mol}$

# Généralités sur les solutions

**Molalité** : quantité de soluté / 1000 grammes de solvant (mol/Kg)

**Pourcentage massique** : masse soluté x 100 / masse solution (%)

**Masse volumique** : masse / volume (g/L)

**Densité d'un liquide** : Masse volumique du liquide / la masse volumique de l'eau (dans les mêmes T° et pression)

# Généralités sur les solutions

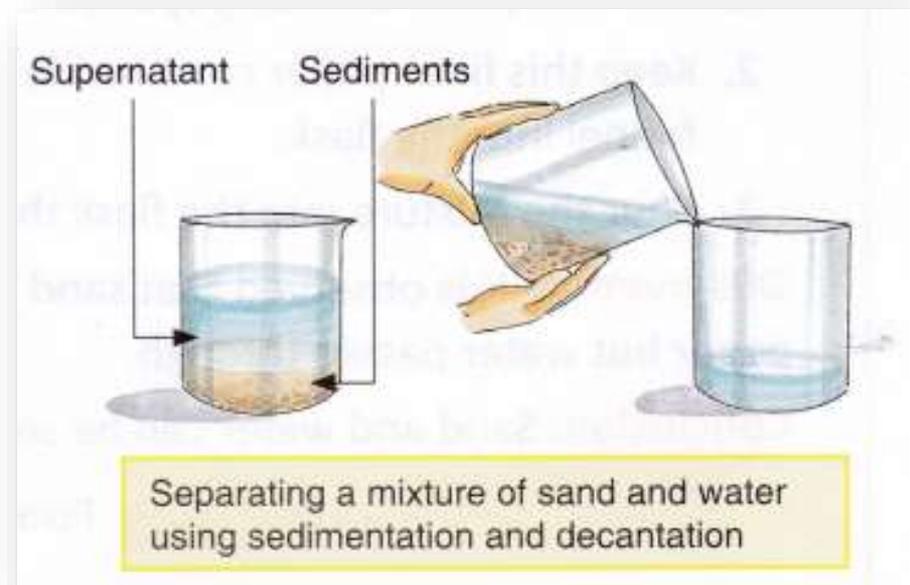
**Exercice :** Calculer la molarité de l'eau à 25°C (on considère que la densité de l'eau = 1 à 25°C)

**Solution :** 1L d'eau > 1000g      et      H<sub>2</sub>O > 18 g/mol

**Molarité = mole/L**      >       $1000\text{g} \times 1 \text{ mole} / 18\text{g} = 55,5 \text{ mole}/1000\text{g}$   
**= 55,5 mole/L**

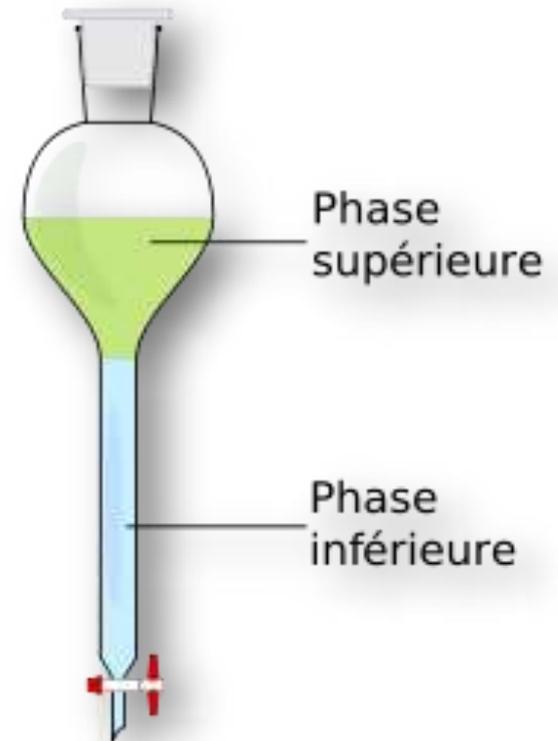
# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 1. La sédimentation :



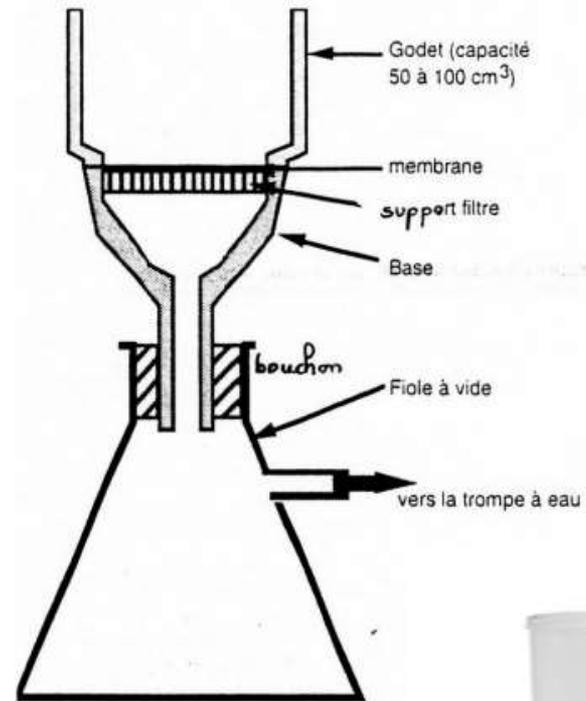
# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 2. La décantation :



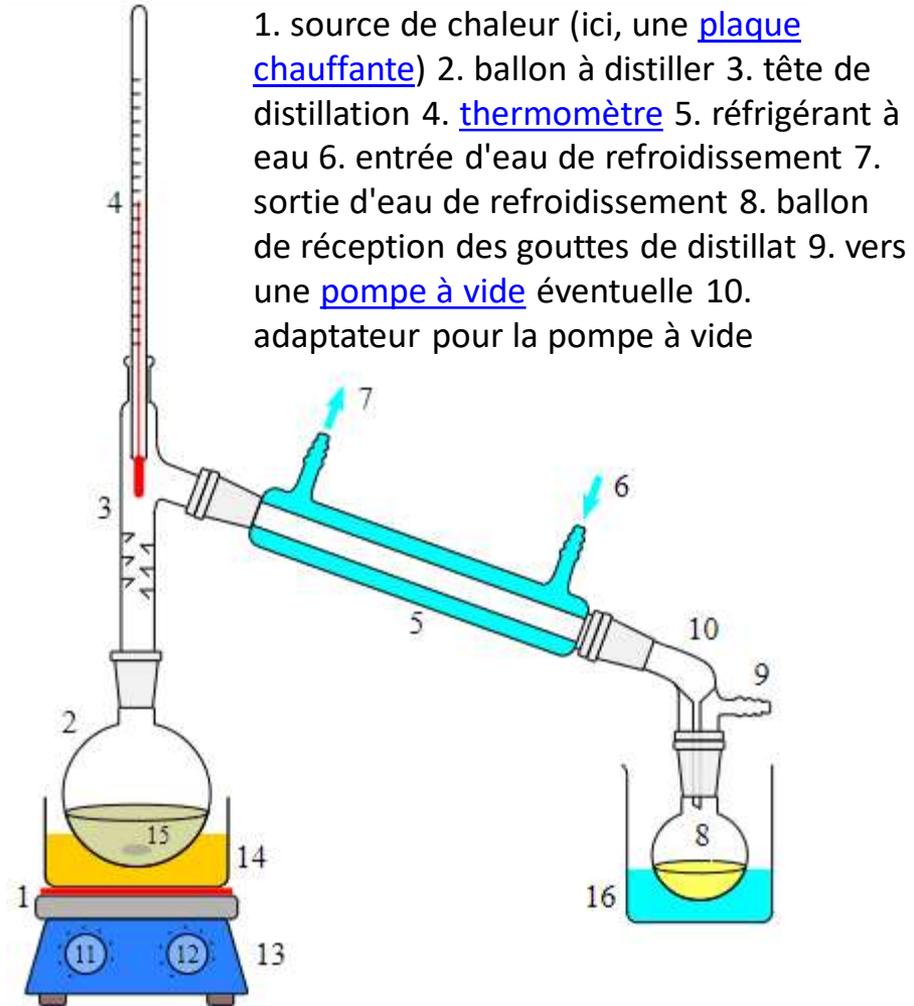
# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 3. La Filtration :



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

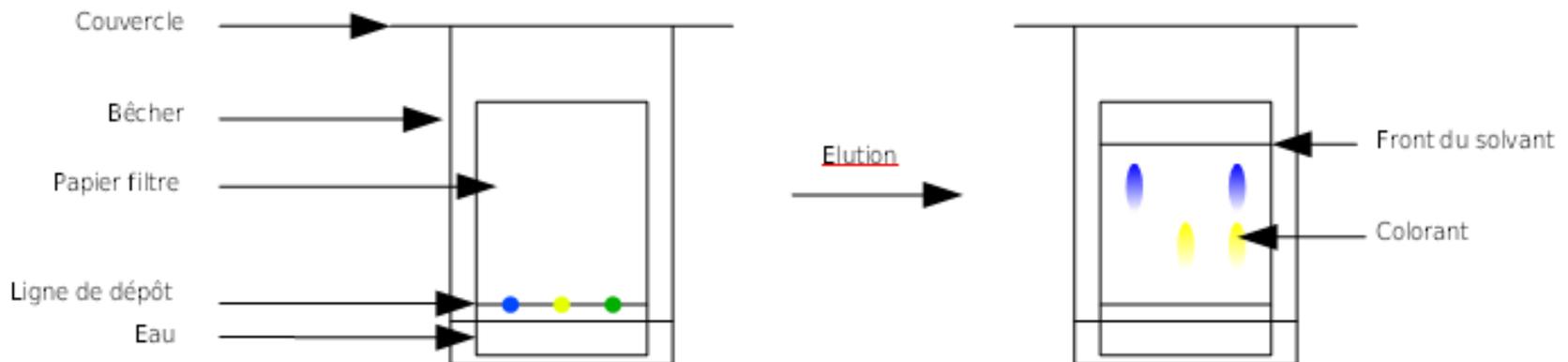
## 4. La Distillation :



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 5. La chromatographie sur papier (CCM):

Séparation des constituants grâce à leurs différentes vitesses de migration par capillarité.



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 6. La précipitation :

Ex: solution de nitrate de plomb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) + solution contenant l'iode =  
formation de l'iodure de plomb ( $\text{PbI}_2$ ) (solide poudreux jaune)



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

La force centrifuge est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation :

$$\text{accélération (m/s}^2\text{)} > \gamma = w^2 r$$

w: vitesse angulaire (rad/s)

r: distance à l'axe de rotation (m).

$$\text{force gravitationnelle relative} > g = 1,119 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

n: nombre de rotations / min

r: distance à l'axe de rotation (cm).

# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

La la vitesse de sédimentation des particules est régie par la loi

de Stokes :

$$V_s = \frac{2r^2 g \Delta\rho}{9\eta}$$

$v_s$  : vitesse de sédimentation,  $r$  : rayon de la particule en solution,  $\Delta\rho$  : différence de densité entre la particule et le solvant,  $g$  : accélération dans la centrifugeuse,  $\eta$  : viscosité de la solution

# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

### Remarques :

- 2 types de rotors : > à angle fixe (15°-35°)



- > à angle mobile : les tubes sont placés dans des godets libres.

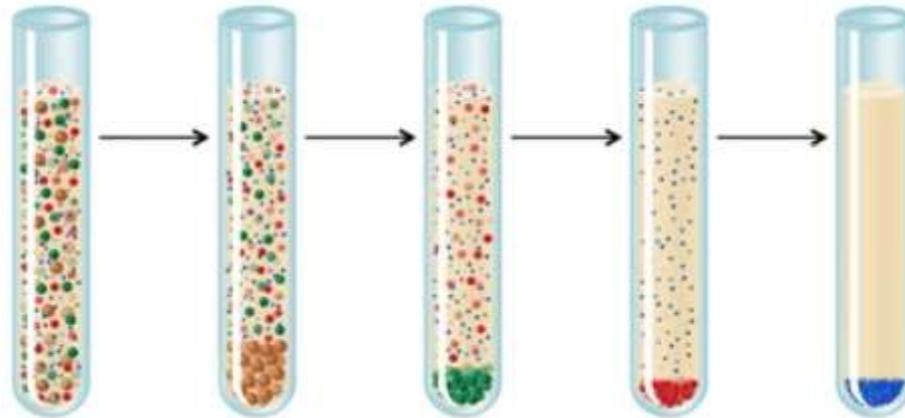


# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

### La centrifugation différentielle :

- Séparer les différents constituants le plus souvent à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante.



# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

### La centrifugation différentielle :

- |  |       |                      |
|--|-------|----------------------|
| Ex :                                       | Noyau | 500g - 10 min        |
| Mitochondries , lysosomes, peroxyosomes    |       | 5 000 g - 10 minutes |
| Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi |       | 1 heure à 100 000 g  |

# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

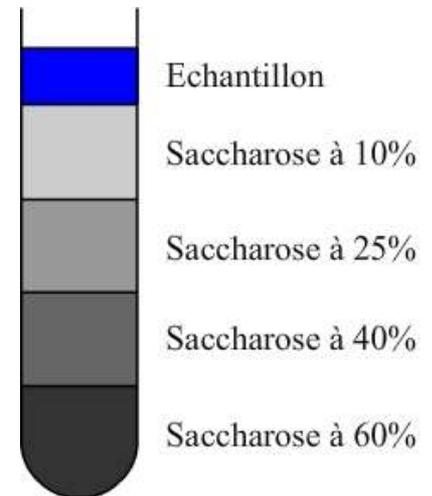
## 7. La centrifugation :

# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

La centrifugation à l'équilibre (à gradient de densité) :

### 1. Les gradients discontinus =

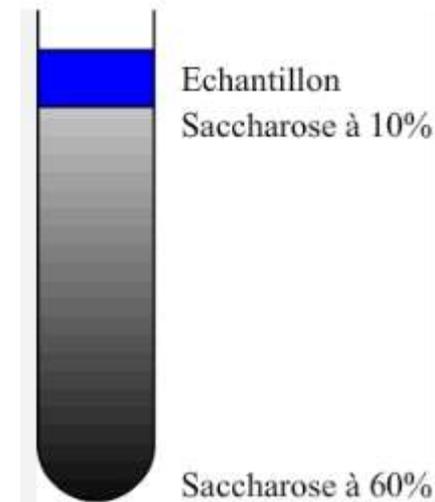


# TECHNIQUES DE SEPARATION DES MELANGES

## 7. La centrifugation :

La centrifugation à l'équilibre (à gradient de densité) :

### 1. Les gradients continus.



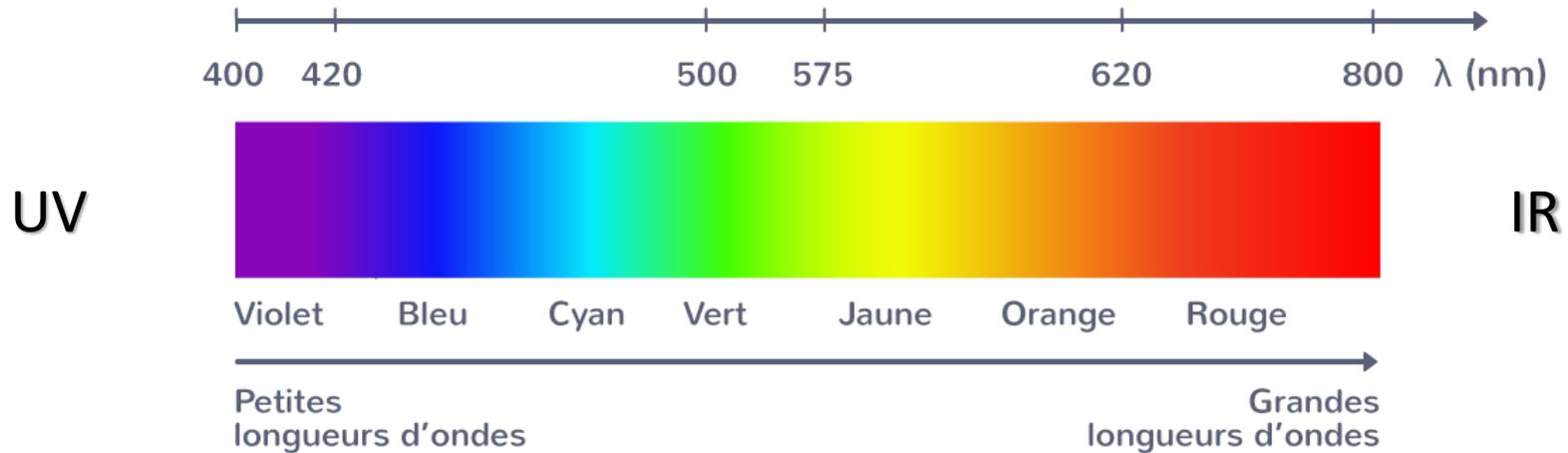
# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie :

# Spectrophotométrie UV-Visible

## La Spectrophotométrie :

Rappel :

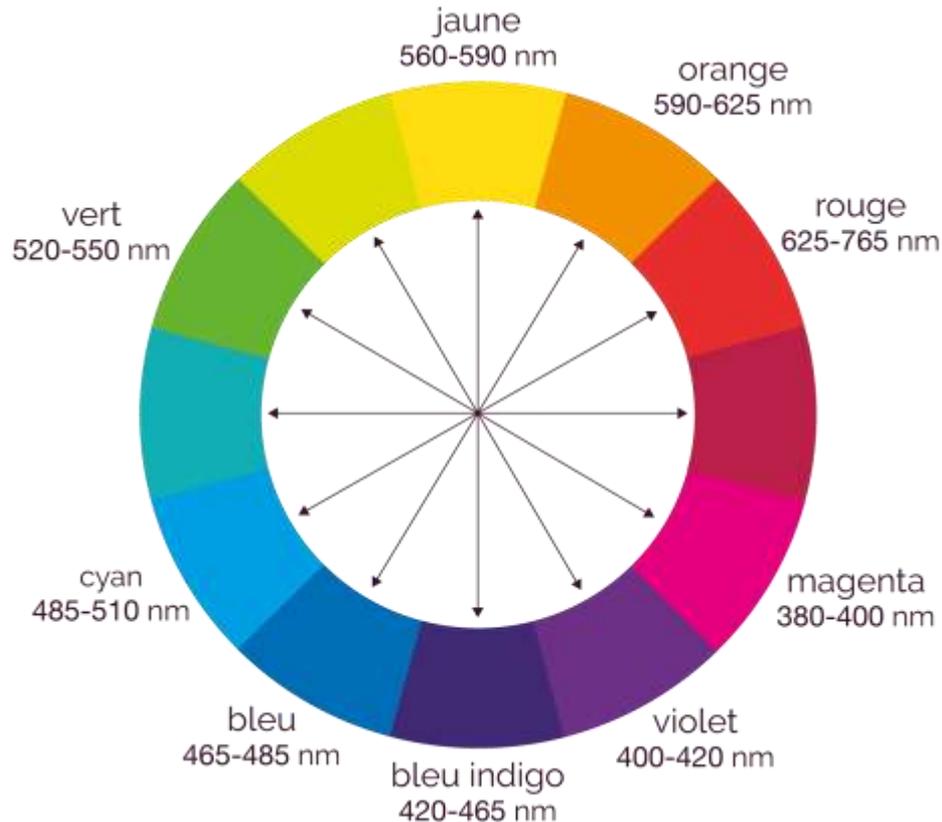


# Spectrophotométrie UV-Visible

## La Spectrophotométrie :

### Rappel :

Couleur  
absorbée



Couleur  
observée

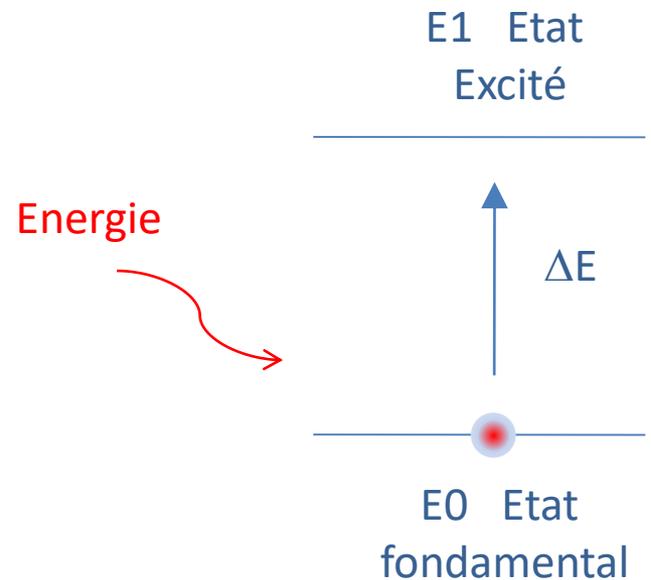
# Spectrophotométrie UV-Visible

## La Spectrophotométrie :

### Excitation électronique et groupement fonctionnels :

#### La transition électronique :

- Absorption d'énergie lumineuse > excitation électronique :
- Certains électrons de la molécule sont projetés de leur orbitale (état fondamental) à une orbitale de niveau supérieure



# Spectrophotométrie UV-Visible

## La Spectrophotométrie :

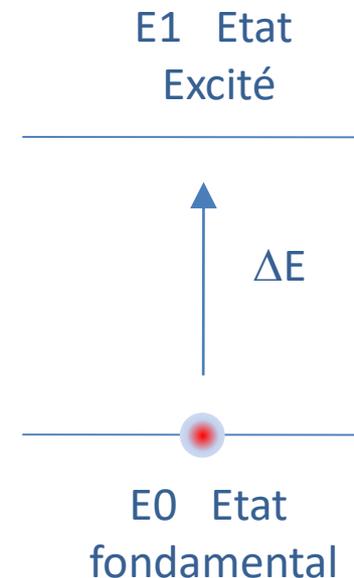
### Excitation électronique et groupement fonctionnels :

#### La transition électronique :

Les électrons les plus facilement excitable sont ceux des **groupements fonctionnels** :

- Les **électrons  $\pi$**  > des doubles liaisons
- Les **électrons  $n$**  > les doublets d'électrons libres

Energie



# Spectrophotométrie UV-Visible

## La Spectrophotométrie :

### Excitation électronique et groupement fonctionnels :

#### La transition électronique :

>>>> Les composés qui contiennent que des groupements fonctionnels simples absorbent la lumière ultraviolette > le cas de la majorité des composés organiques incolores. Ex : Acide acétique  $\lambda_{\max} = 208\text{nm}$

>>>> Les composés qui contiennent plusieurs groupements conjugués absorbent la lumière visible. Ex: Amaranthe (rouge)  $\lambda_{\max} = 525\text{nm}$

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie :

Excitation électronique et groupement fonctionnels :

La transition électronique :

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie :

La loi de Beer-Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon c x$$

A : absorbance (sans unité)

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire ou d'extinction ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

X : longueur de la cuve (cm)

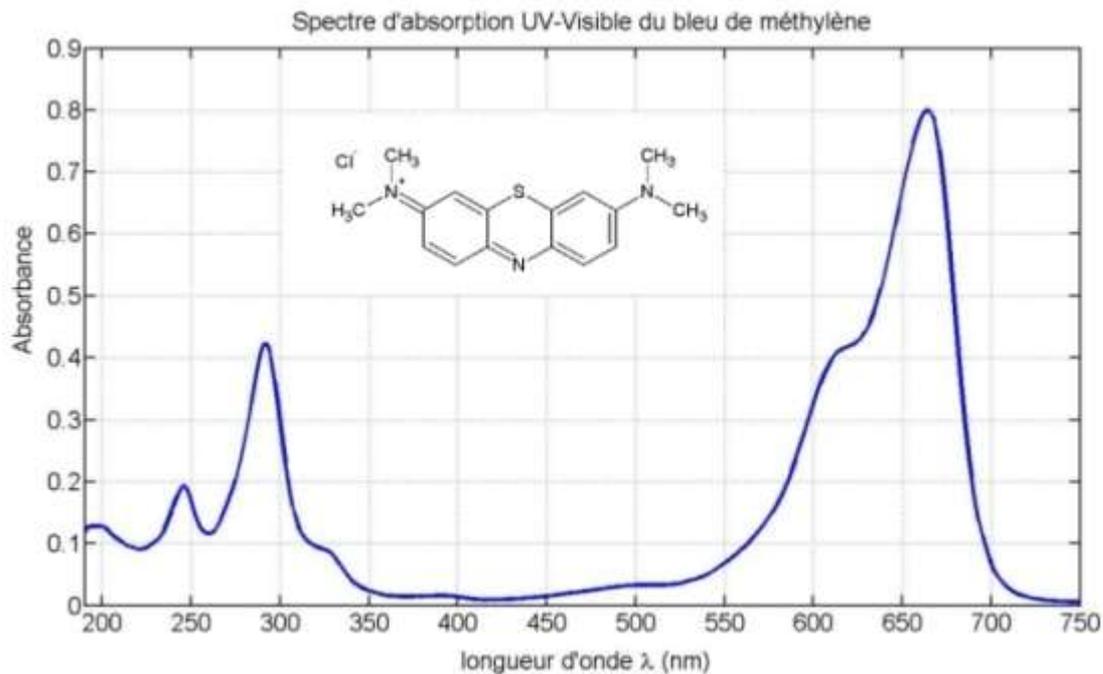
$I_0$  : intensité de la lumière incidente

I : intensité de la lumière transmise

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie :

Le spectre d'absorption UV-visible :



<https://www.maxicours.com/se/cours/spectres-ultraviolet--visible/>

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Dosage d'un seul élément :

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie :      Méthodologie :

⇒ Dosage d'un seul élément :

Substance incolore + réactif de coloration → produit coloré

Conditions :

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Dosage d'un seul élément :

Substance incolore + réactif de coloration → produit coloré

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Mélange de plusieurs éléments :

- La loi Beer-Lambert étant linéaire >

$$A = \varepsilon_1 C_1 X + \varepsilon_2 C_2 X + \varepsilon_n C_n X \dots$$

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Mélange de plusieurs éléments :

Limites >>

# Spectrophotométrie UV-Visible

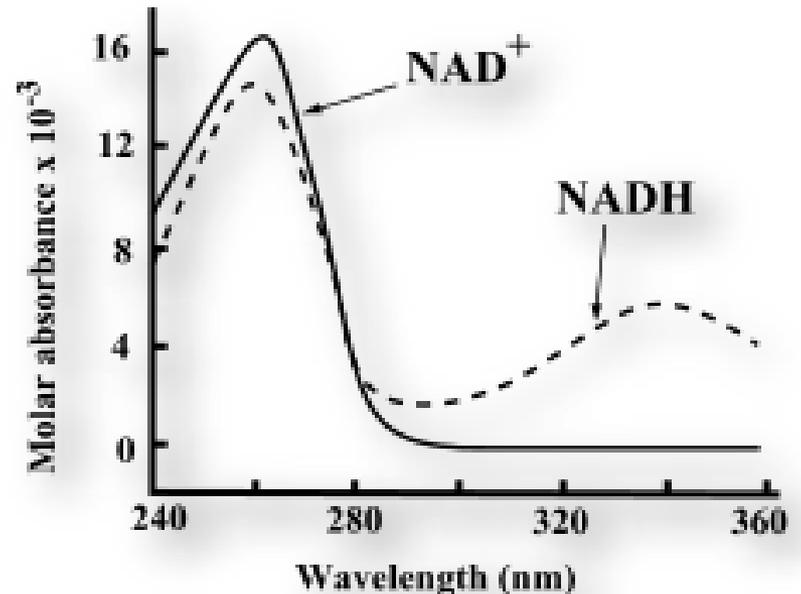
La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Suivi de la cinétique d'une réaction chimique :

# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

➔ Dosage colorimétrique indirect par les méthodes enzymatiques :

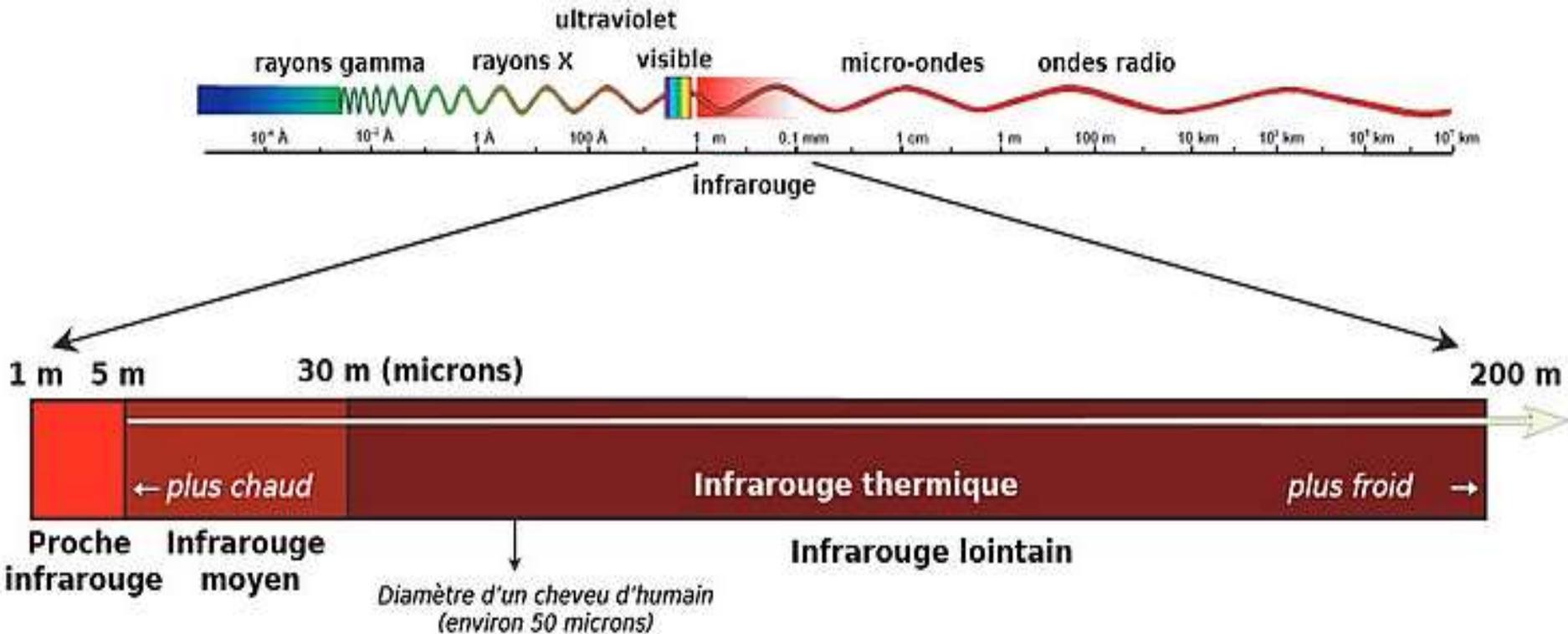


# Spectrophotométrie UV-Visible

La Spectrophotométrie : Méthodologie :

⇒ Remarques :

# Spectrophotométrie IR



longueurs d'onde utilisées en analyse par spectroscopie infrarouge :

$\lambda$  : 2,5  $\mu\text{m}$  à 25  $\mu\text{m}$

ou nombre d'onde  $\sigma$  : 4000  $\text{cm}^{-1}$  à 400  $\text{cm}^{-1}$

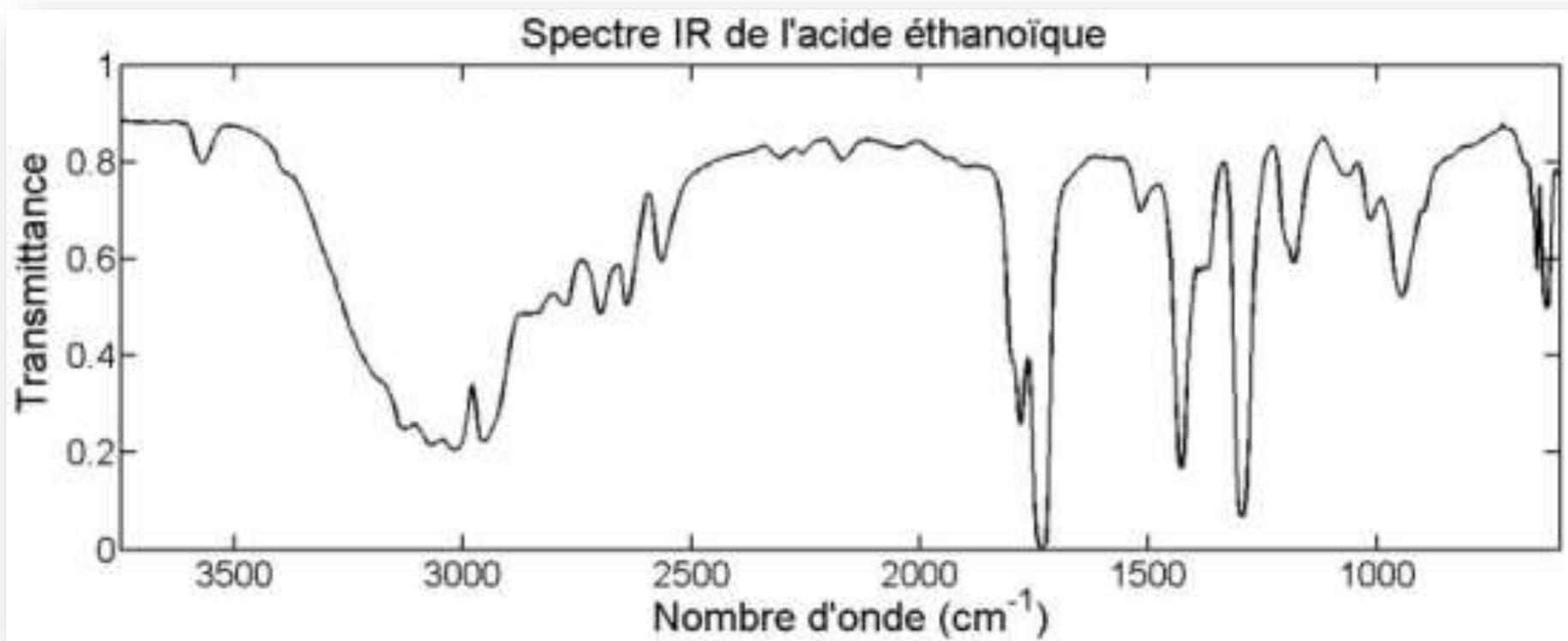
# Spectrophotométrie IR

- Spectroscopie visible >> Transitions entre les niveaux d'énergie électroniques
- Spectroscopie infrarouge >> Transitions entre les niveaux d'énergie de vibration et de rotation des liaisons moléculaires.
- Chaque type de liaison (C-C, C-H, C-O, ...) possède une fréquence de résonance qui lui est spécifique

# Spectrophotométrie IR

- La spectroscopie infrarouge (IR) permet d'identifier les **groupements fonctionnels** présents dans une molécule.
- Détecte les **élongations** et les **déformations** des liaisons.
- adaptée surtout pour la détection de **liaisons asymétriques**  
>> qu'on trouve dans les groupes fonctionnels ( O-H, C=O, NH<sub>2</sub> ... ).

# Spectrophotométrie IR



# Spectrophotométrie IR

## Interprétation d'un spectre infrarouge

Un spectre IR comprend 4 régions importantes :

1/ Environ 4 000 – environ 2 500  $\text{cm}^{-1}$  : régions d'étirement des liaisons C-H, N-H et O-H

2/ Environ 2 500 – 2 000  $\text{cm}^{-1}$  : régions d'étirement des liaisons triples  $\text{C}\equiv\text{C}$  ou  $\text{C}\equiv\text{N}$

3/ Environ 2 000 – 1 500  $\text{cm}^{-1}$  : régions d'étirement des liaisons doubles  $\text{C}=\text{C}$  ou  $\text{C}=\text{O}$

4/ En deçà de 1 500  $\text{cm}^{-1}$  : régions des liaisons simples C-O, C-F, C-Cl...

# Spectrophotométrie IR

## Interprétation d'un spectre infrarouge

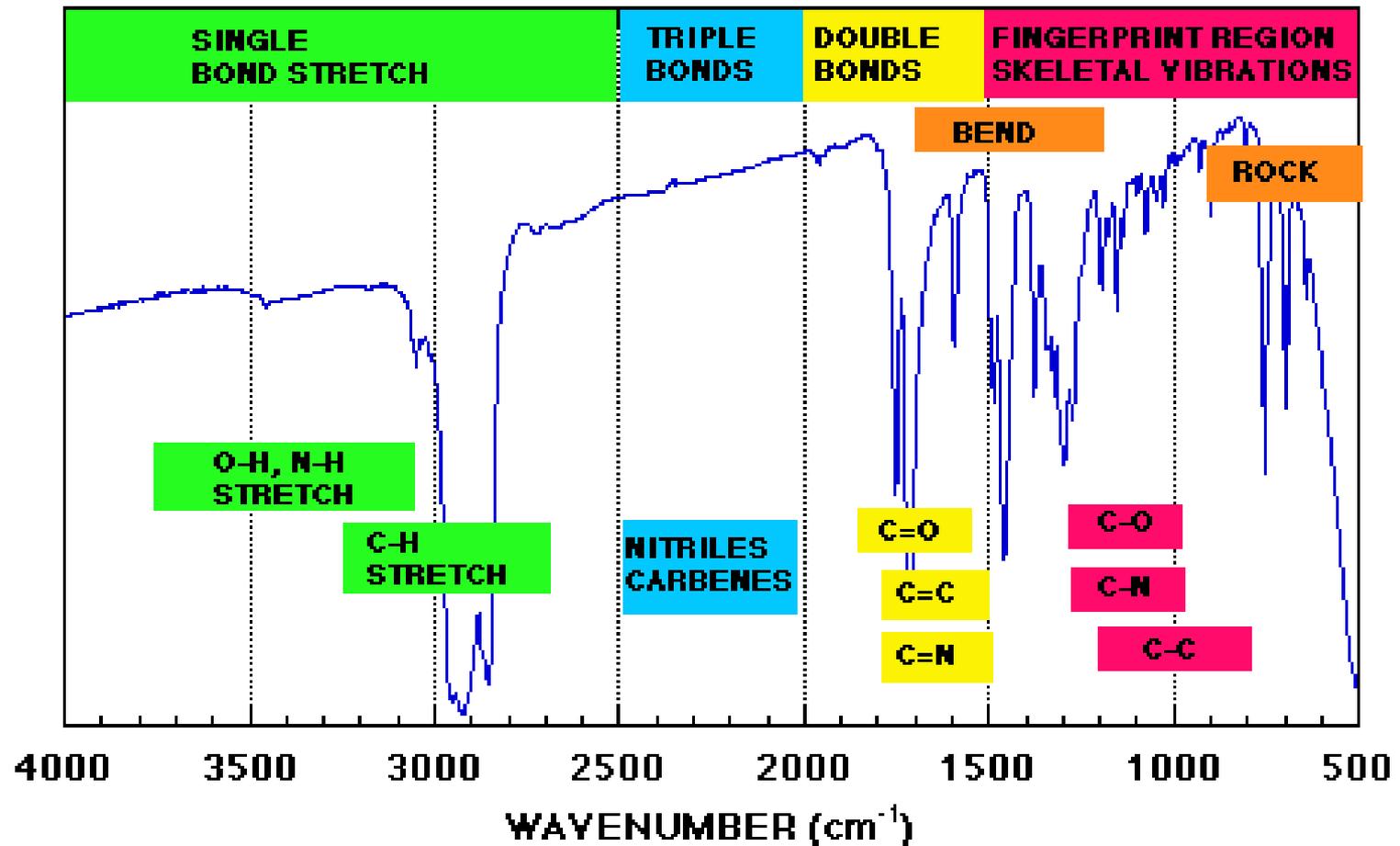
Remarques :

-

# Spectrophotométrie IR

## Interprétation d'un spectre infrarouge

<https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/tableIR.html>



# Spectrophotométrie IR

## Interprétation d'un spectre infrarouge

Liaison	Groupe d'atomes caractéristique	Fonction ou famille	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensité
O – H (libre)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 580 – 3 670	Forte
O – H (liée par liaison H)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 200 – 3 400	Forte
	Carboxyle -COOH	Acide carboxylique	3 200 – 3 400	Forte
N – H	C – NH –	Amine, amide	3 100 – 3 500	Moyenne
C – H	Cycle benzénique - $\text{C}_6\text{H}_5$	Composés aromatiques	3 030 – 3 080	Moyenne
		Alcane	2 810 – 3 000	Forte
		Alcène	3 000 – 3 100	Moyenne
C = O	Carbonyle	Aldéhyde, cétone	1 650 – 1 730	Forte
	Carboxyle	Acide	1 680 – 1 710	Forte
	CO-O-C	Ester	1 700 – 1 740	Forte
	CO-N	Amide	1 650 – 1 700	Forte
C = C		Alcène	1 625 – 1 680	Moyenne
C – O		Alcool, acide, ester	1 050 – 1 450	Forte
C – C		Alcane	1 000 – 1 250	Forte
C – Cl		Chloroalcane	700 – 800	Forte
C – Br		Bromoalcane	600 – 750	Forte
C – I		Iodoalcane	500 – 600	Forte

Attention :

plusieurs facteurs structuraux peuvent modifier les valeurs de nombre d'onde attendus.

Ex : présence d'un système conjugué affaiblie une double liaison C=O

# CHROMATOGRAPHIE

Méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés.

But : Séparer + identifier + quantifier des composés au sein d'échantillons divers

# CHROMATOGRAPHIE

## Principe de base >>

Equilibre de [composé] lorsqu'il est mis en présence de deux phases **non miscibles** :

**Phase stationnaire** = emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support

**Phase mobile** = se déplace au contact de la première

>> si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes provoquant leur séparation

# CHROMATOGRAPHIE

1<sup>ère</sup> chromatographie = 1906 par le botaniste russe  
Mikhaïl Tswett. Séparer les pigments (en grec: «  
chromato ») d'une feuille d'épinard.

Tswett avait observé la séparation des colorants  
végétaux lorsqu'il filtrait leur solution dans l'éther de  
pétrole, sur une colonne de carbonate de calcium.

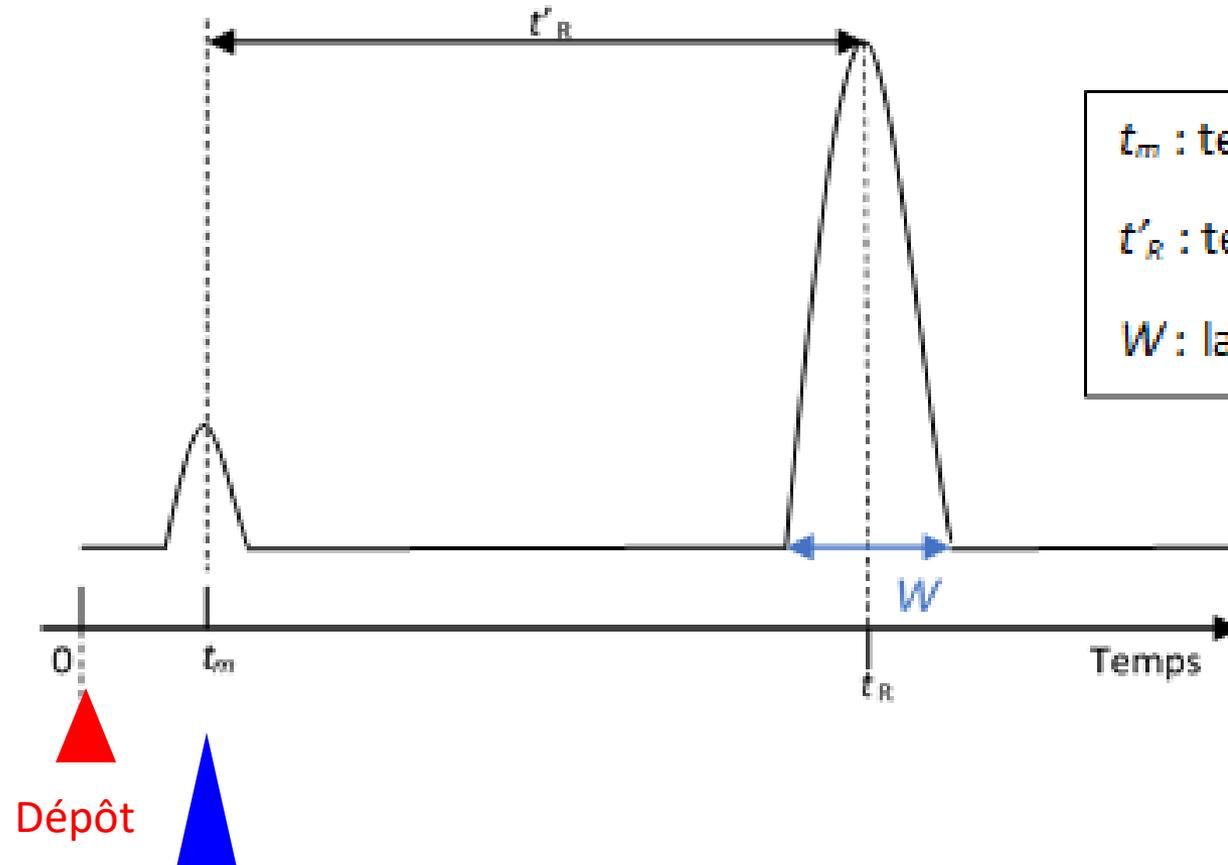
# CHROMATOGRAPHIE

L'expérience de base en chromatographie :

1. .

# CHROMATOGRAPHIE

Le chromatogramme :



$t_m$  : temps mort

$t'_R$  : temps de rétention réduit

$W$  : largeur du pic

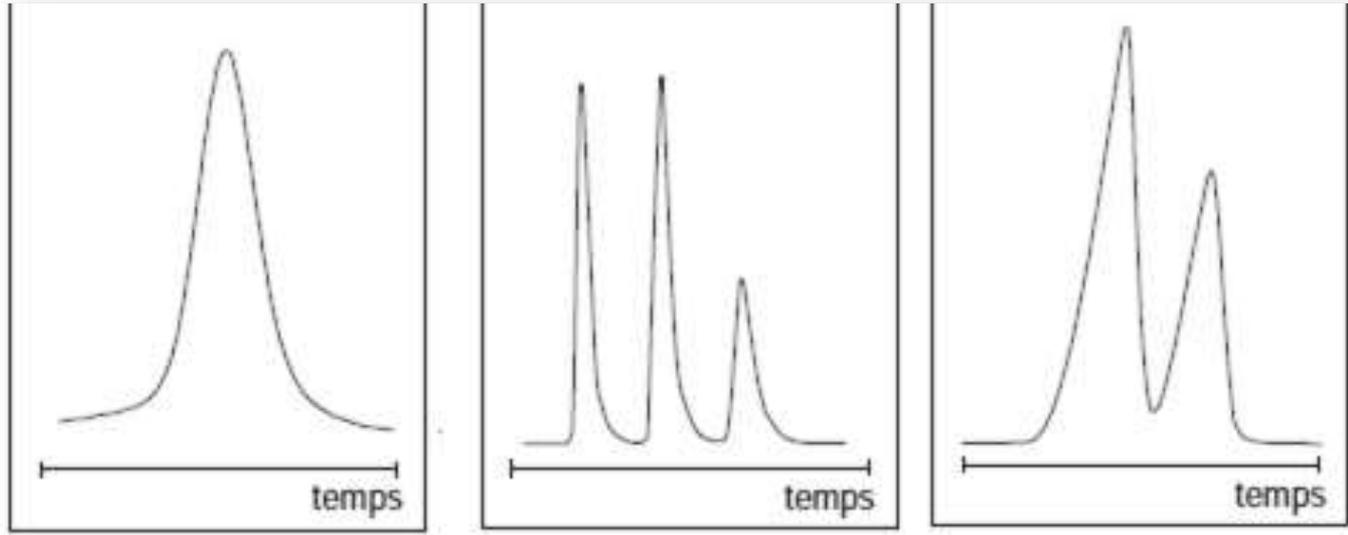
Dépôt

Soluté non retenu

Par la phase stationnaire

# CHROMATOGRAPHIE

## Le chromatogramme :



Situation idéale



Phase stationnaire saturée

La montée du pic est plus rapide que la descente  
(facteur de trainée plus important



Situation inversée : le constituant  
est trop retenu dans la phase  
stationnaire, le temps de rétention  
est allongé et la montée du pic est  
plus lente que la descente.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

Principe CPG : analyse des molécules :

- > volatiles naturellement
- > Molécules rendues volatiles par des réactions de dérivation à des températures ne provoquant pas leur décomposition.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

But : Séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre :

Une phase mobile >> gazeuse

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

But : Séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre :

Une phase stationnaire >> Solide (chromatographie d'adsorption – GSC)

→ solide poreux

>> liquide (chromatographie de partage – GLC)

→ Colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide

→ Colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

Gaz vecteur



Régulateur de  
Pression  
débitmètre



Entrée échantillon



Enceinte thermostatée (-30 > 450°C)

Injecteur



colonne



Détecteur



Sortie  
Gaz vecteur



Traitement  
signal

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

### Gaz vecteur et régulateur de débit :

- Hélium, N<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>
- Doit être exempt de traces d'impuretés  
(vapeur d'eau, O<sub>2</sub>...)

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

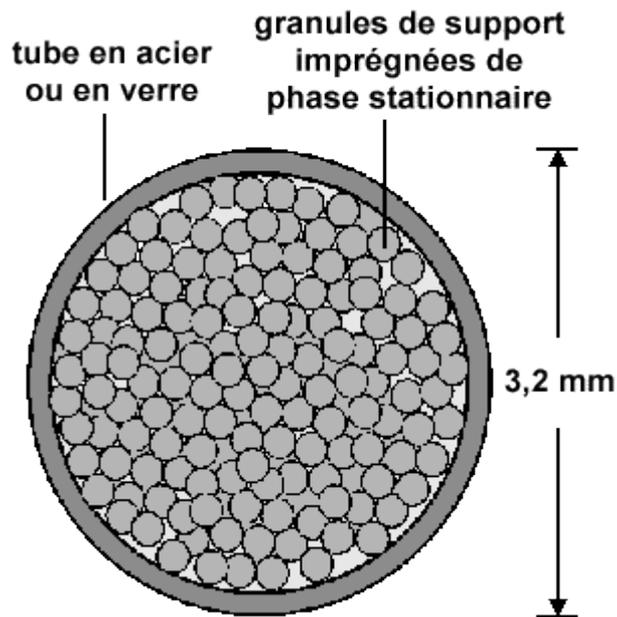
**Chambre d'injection:**



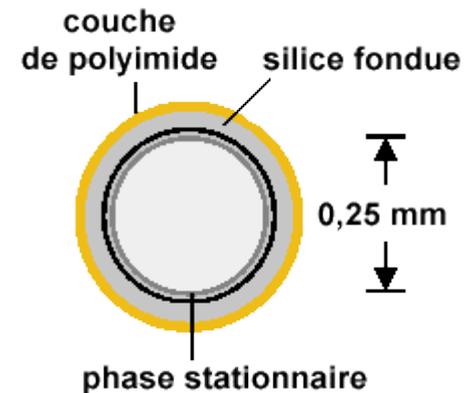
# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

### Colonnes :



**Colonnes remplies  
ou à garnissage (packed)**



**Colonne capillaire  
(open tubular).**

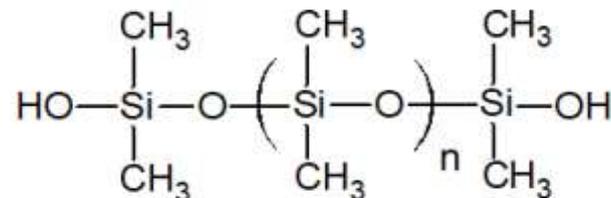
# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

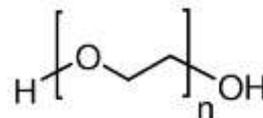
### Colonnes :

Phase stationnaire : deux types de composés :

➤ Polysiloxane (silicone)



➤ Polyéthylèneglycols (PEG)



Chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurels mineures.

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

### Colonnes :

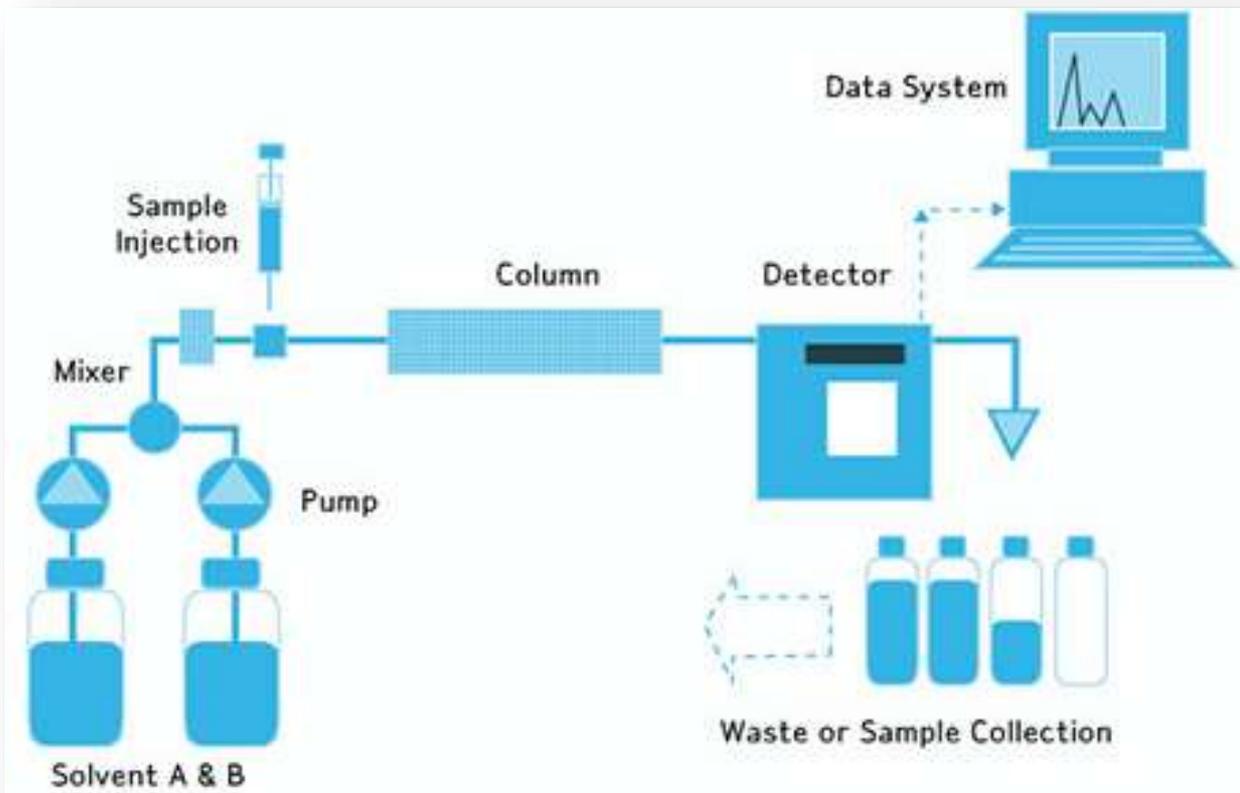
Molécules	Exemples	Phases stationnaires
non-polaires liaisons C-H et C-C	hydrocarbures normaux (n-alcane)	SPB-octyl
		poly(méthylsiloxane), SE-30
		SPB-5, PTE-5, SE-54
polaires liaisons C-H et C-C liaisons C-Cl, -Br, -F liaisons C-N, -O, -P, -S	alcools, éthers, thiols, amines, acides carboxyliques, esters et cétones	poly(méthylphénylsiloxane)
		poly(cyanopropylméthylsiloxane)
		PEG, Carbowax 10, 20M
polarisables liaisons C-H et C=C et acétyléniques	alcènes aromatiques	poly(cyanopropylsiloxane)
		poly(cyanopropylphénylsiloxane)
		TCEP

# CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

## CPG

**Détecteurs :**

# Chromatographie en phase liquide



1/ système de pompage, 2/ injecteur,  
3/ colonne 4/ détecteur



# Chromatographie en phase liquide

**Système de pompage :**

# Chromatographie en phase liquide

**Colonnes :**

# Chromatographie en phase liquide

**Solvants :**

# Chromatographie en phase liquide

## Détecteurs :

- Deux types de détection basés :
  - sur les propriétés générales (solvant + soluté); ex: indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique,...
  - sur les propriétés des solutés; ex: UV, polarographie, radioactivité, MS ...

# Chromatographie en phase liquide

## Détecteurs :

Détecteurs en chromatographie phase liquide				
Type	Limite de détection		Sensibilité	
	commercial	optimum	au débit	à la température
Absorption UV	100 pg - 1 ng	1 pg	non	faible
Fluorescence	1 - 10 pg	10 fg	non	faible
Réfractométrie	100 ng - 1 µg	10 ng	oui	$10^{-4} / ^\circ\text{C}$
Électrochimie	10 pg - 1 ng	100 fg	oui	1,5% / °C
Conductimétrie	500 pg - 1 ng	500 pg	non	2% / °C
FT-IR	1 µg	100 ng	non	faible
Polarimétrie	-	1 ng	-	oui
Spectrométrie de masse	100 pg - 1 ng	1 pg	-	-