

Chapitre 1 : Centrifugation

Sommaire

page

2.1. Principe.....	2
2.2. Méthodes et appareillage.....	3
2.2.1. Les centrifugeuses.....	3
2.2.2. Les rotors.....	4
2.2.3. Centrifugation en gradient de densité.....	5
2.2.3. 1. Principe.....	5
2.2.3. 2. Méthodes.....	5

Deux liquides non miscibles de densité différente peuvent être séparés en mettant leur mélange dans une ampoule à décantation.

De même, dans un échantillon de sang additionné d'héparine, les éléments cellulaires qui le constituent sédimentent au fond du tube.

2.1. Principe

Une particule soumise à un champ gravitationnel tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement.

En biochimie, ce principe trouve largement sa place lorsqu'on cherche à séparer des précipités, des cellules, des organites ou des macromolécules. Lorsqu'on met, par exemple, une solution biochimique dans un rotor d'un centrifugeur et que celui-ci est soumis à une vitesse de rotation, les éléments constituant l'échantillon, sous l'effet de l'accélération générée, se déplacent vers le fond du tube à centrifuger (fig.2.1). La vitesse à laquelle se déplaceront les particules est proportionnelle à :

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

et inversement proportionnelle à :

- La friction avec le milieu, en fonction de la taille et à la géométrie des particules.

Lorsqu'une centrifugeuse est au repos, les pots placés au niveau du rotor sont en position verticale. Une fois l'appareil est mis en marche, les tubes prennent alors une position horizontale sous l'effet des forces centrifuges générées par la rotation. Les particules à séparer vont se déplacer du centre de l'axe de rotation vers l'extérieur c'est-à-dire du haut en bas du tube (fig.2.2).

L'accélération γ fournie par le centrifugeur est un multiple de g (accélération de la pesanteur).

$$\gamma = R \times N^2 \times 1,118 \times 10^{-5}$$

R : Rayon ou distance de la particule à l'axe de rotation, exprimée en centimètre.

N : Vitesse, exprimée en nombre de tours par minute.

Il est cependant indispensable d'indiquer le temps de la centrifugation car la distance parcourue par la particule est fonction de la durée de rotation du rotor.

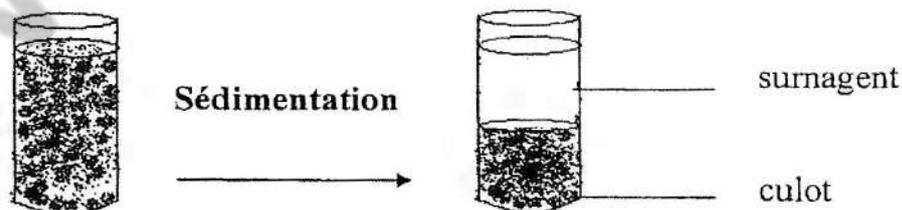


fig. 2.1 : Centrifugation d'un échantillon

2.2. Méthodes et appareillage

Avant de procéder à la centrifugation, il faut, tout d'abord, équilibrer les pots métalliques diamétralement opposés. Pour ceci, une balance de pailleuse doit servir à faire les pesées des pots et puis ramener ces derniers au même poids en ajoutant de l'eau dans le pot le plus léger.

L'eau ajoutée permet, non seulement d'équilibrer les échantillons mais également, de protéger les tubes à centrifuger de tout contact brutal contre la paroi des pots métalliques.

Dans le cas où une centrifugeuse à grande vitesse est utilisée (ultracentrifugeuse, 30 000 x g ou plus), la précision de la pesée est encore plus critique. En effet une différence de 1 g sous gravité normale devient 100 kg à 100 000 x g d'où l'intérêt d'utiliser une balance de précision.

Il existe de nombreux modèles de centrifugeurs; certains sont munis d'un système de réfrigération leur permettant d'éviter le réchauffement dû aux forces de frottement sur l'air des pots et du rotor. A noter également que certaines centrifugations se font horizontalement (figure 2.1) alors que d'autres le font obliquement, tout dépend du modèle de rotor utilisé.

2.2.1. Les centrifugeuses

La force du moteur faisant tourner le rotor reste le principal facteur qui détermine la vitesse de rotation. Plus le rotor est lourd, plus le moteur doit fournir d'avantage d'effort pour le faire tourner.

- **Centrifugeuses de table:** Certains appareils tournent à faible accélération (1000 à 2000 x g), d'autres à des vitesses de rotation relativement basses (moins de 1000 rotations par minute). Cette catégorie de centrifugeurs peut présenter des modèles réfrigérés.
- **Microcentrifugeuses:** Elles sont équipées de façon standard d'un rotor angulaire et peuvent générer des accélérations centrifuges supérieures à 30 000 x g. Les microtubes à centrifuger ont une forme conique d'une capacité maximale de 2 ml et sont faits de polypropylène. Plusieurs tubes peuvent être centrifugés simultanément ; tout dépend de la capacité du rotor (12 à 48 tubes). Les microcentrifugeuses sont très utilisées en biologie moléculaire, en microbiologie et dans la recherche biochimique et génétique.
- **Centrifugeuses au sol :** Ces appareils peuvent centrifuger des volumes beaucoup plus importants et la vitesse de rotation peut atteindre 30.000 tours/min. Selon le modèle, le rotor contient quatre ou six flacons de 250 ml.
- **Ultracentrifugeuses :** Cette catégorie d'appareils peut atteindre des accélérations de 300.000 g. Une telle performance ne peut, donc, qu'engendrer un réchauffement par frottement sur l'air du rotor et des godets. Pour éviter ce genre de problèmes, ces centrifugeurs sont tous réfrigérés et munis d'une pompe à vide pour faire évacuer l'air à l'intérieur de la chambre de rotation.

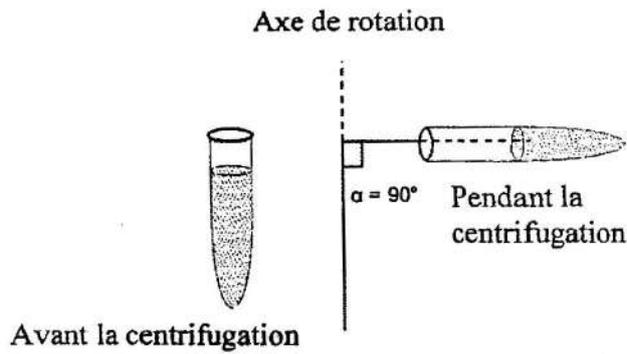


Fig 2.1: Centrifugation horizontale

2.2.2. Les rotors

On distingue trois types de rotors :

- à angle fixe
- à godets oscillants
- analytiques

➤ Rotor à angle fixe

- Ces rotors sont utilisés pour des séparations les plus simples : cellules, organites, membranes. . .etc. Il s'agit surtout de séparations séquentielles à vitesses de rotation croissantes (figure 2.2 et figure 2.3).

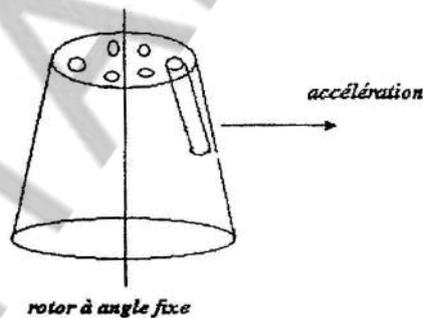


Fig 2.2 : schéma d'un rotor à angle fixe

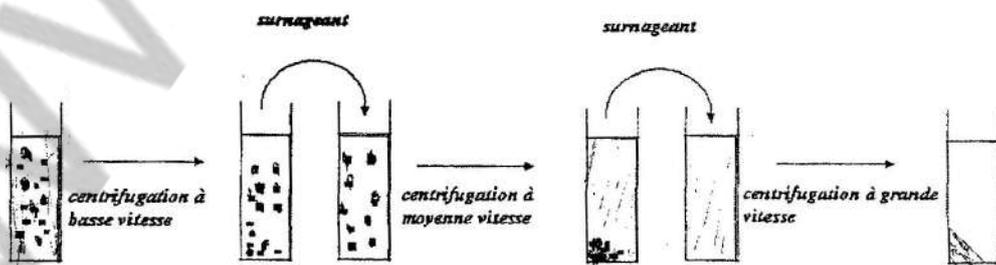
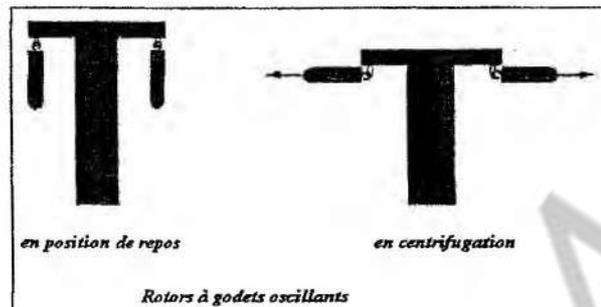


Fig 2.3 : Centrifugation différentielle

➤ Les rotors à godets oscillants

Les particules sont séparées grâce à leur densité dans un solvant à gradients de densité (figure 2.4 et figure 2.5).



➤ Les rotors analytiques

Ils sont employés dans le but de déterminer le coefficient de sédimentation des particules.

2.2.3. Centrifugation en gradient de densité / concentration

2.2.3. 1. Principe

Lors de la centrifugation, la séparation des particules peut être accélérée en travaillant en gradient de concentration. Ceci vient du fait que la vitesse de déplacement des particules est influencée par la différence de densité entre la particule et le solvant utilisé.

Si la particule est plus dense que le milieu, elle sédimente. Si par contre sa densité est égale à celle du milieu, elle reste immobile. Quand la densité est moins dense que le solvant, la particule monte dans le tube jusqu'à ce qu'elle trouve une zone où la densité est égale à la sienne sinon elle finira son parcours à la surface du tube.

2.2.3. 2. Méthodes

Parmi les produits permettant de faire des gradients de concentration, on peut citer : le saccharose, le chlorure de césium et le ficoll.

- **Le saccharose** : Très utilisé grâce à différents avantages. En effet, il peut atteindre des concentrations élevées : 1.3 g/mL (2,5 M de sucrose), moins coûteux, électriquement neutre et pratiquement inerte pour les préparations cellulaires.
- **Le chlorure de césium** : Il peut atteindre des densités élevées : 1.9 g/mL à 7.5 mol/L. Pourtant son inconvénient c'est qu'il s'agit d'un sel donc de molécules chargées, réduisant son champ d'action.
- **Le ficoll** : C'est un polymère de glucose comme le séphadex. Il peut atteindre des concentrations élevées sans pour autant générer des pressions osmotiques.

A noter qu'avec ces produits on peut faire des gradients continus et des gradients discon

Chapitre 2 : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Sommaire

page

3.1. Principe.....	7
3.1.1. Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS.....	7
3.1.2. Lois de l'absorption.....	7
3.2. Spectre d'absorption lumineuse.....	8
3.3. Instrumentation.....	9
3.3.1. Eléments constitutifs.....	9
3.3.2. Appareils.....	11
3.4. Applications.....	11

3.1. Principe

3.1.1. Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS

Le Principe de la spectrométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible est basé sur l'absorption du rayonnement dans l'intervalle séparant 190 et 800 nm. Le domaine de l'UV couvre de 190 à 400 nm alors que celui du visible correspond à la tranche 400 – 800 nm (fig. 3.1).

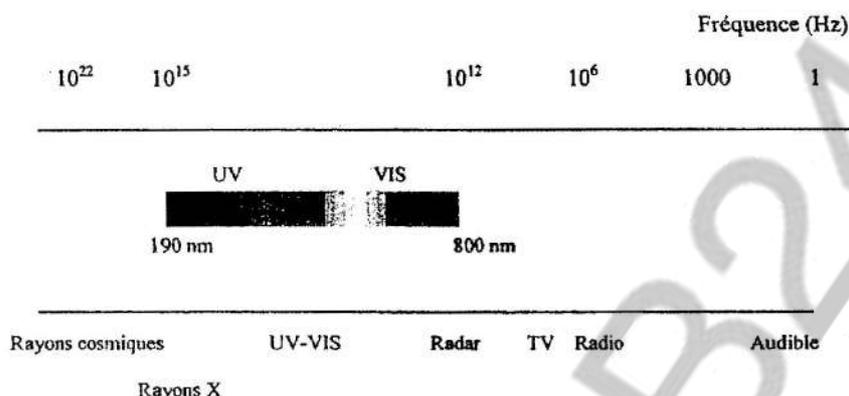


Fig. 3.1 : Domaine spectral du rayonnement électromagnétique

3.1.2. Lois de l'absorption

Lorsqu'on fait traverser par un faisceau de lumière monochromatique une cuve carrée contenant une solution aqueuse d'une substance donnée, une partie de la lumière incidente est absorbée par les molécules de la solution dans le tube. Si l'énergie de la lumière incidente est I_0 et celle de la lumière transmise est I , la loi de Beer-Lambert est exprimée par la formule :

$$I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot l} \quad \text{et}$$

$$\text{Log } I_0 / I = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Avec :

c ; la concentration de la substance en moles par litre dans le solvant.

l ; la longueur du trajet optique c'est-à-dire du tube contenant la solution (en cm)

ϵ ; le coefficient d'absorption moléculaire, spécifique de la solution pour la longueur d'onde choisie.

La valeur ($\text{Log } I_0 / I$) est désignée par le terme densité optique (DO) alors que le rapport ($\text{Log } I / I_0$) est nommé transmission, exprimée, en général, en pourcentage.

Si $I = I_0$ le milieu est transparent. Dans ce cas, le rapport $I / I_0 = 1$ et la transmission est de 100% et la densité optique $DO = 0$. Par contre, lorsque le milieu est opaque, le rapport $I / I_0 = 0$, donc la transmission est nulle et la densité optique tend vers l'infini.

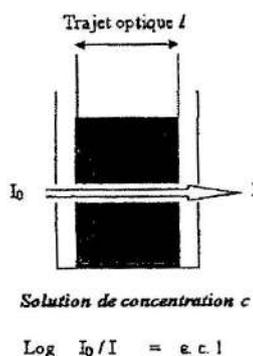


Fig. 3.2 : schéma d'une chambre d'absorption

3.2. Spectre d'absorption lumineuse

Pour chaque substance biologique ou chimique, si nous étudions la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente, nous remarquerons que cette absorbance varie d'une molécule à l'autre (fig.3.3). Il s'agit donc d'une vraie empreinte digitale pour chaque substance étudiée. Cette caractéristique permet de déterminer facilement une substance, même dans un mélange.

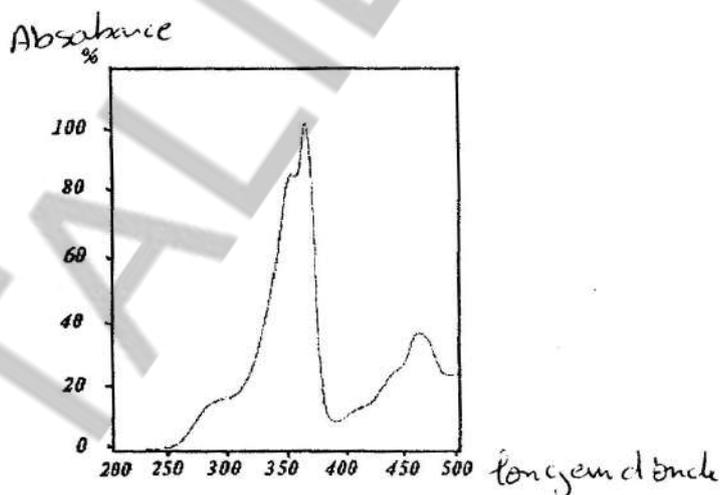


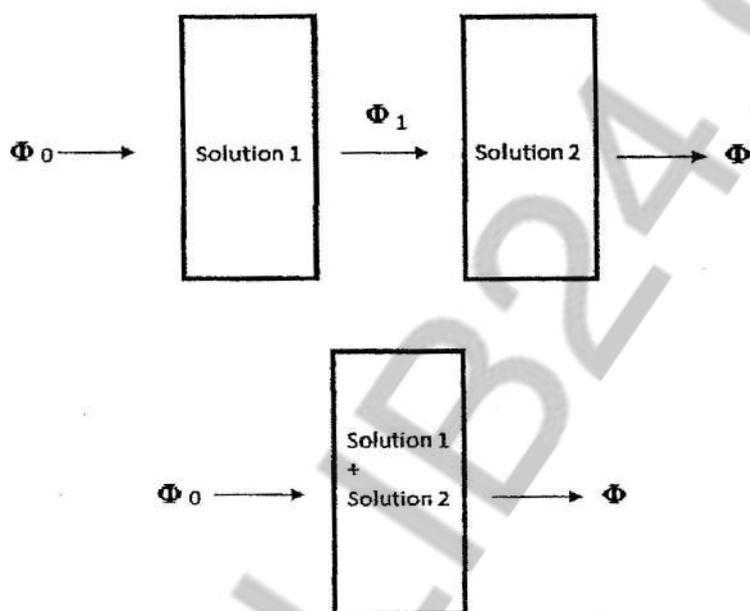
Fig. 3.3 : Spectre d'absorption de piarsélénol.

Nous remarquons pour cet exemple que l'absorbance maximale se situe à 375 nm. C'est habituellement à une longueur correspondant au maximum d'absorbance que l'on travaille pour étudier la molécule et mesurer son coefficient d'absorption moléculaire.

Les spectres des substances sont tracés dans le visible et l'ultraviolet.

3.3. Additivité des absorbances

Si 2 solutions absorbent à la même longueur d'onde, l'absorbance du mélange est égale à la somme de leurs absorbances : $A = A_1 + A_2$



$$A = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2) l = A_1 + A_2$$

3.4. Instrumentation

Suivant l'étendue du domaine des longueurs d'onde, on peut parler soit des spectrophotomètres, soit des photomètres. En effet, lorsque l'appareil présente les différentes longueurs d'ondes du domaine ultraviolet – visible, en général du 200 nm à 800 nm, il s'agit d'un spectrophotomètre. Par contre, lorsque seules certaines longueurs d'onde sont disponibles, on parle de photomètre. Dans ce chapitre, on traitera uniquement la première catégorie d'appareils.

3.4.1. Eléments constitutifs

Un spectrophotomètre comprend 4 parties essentielles : Source de lumière, monochromateur, cuve et détecteur.

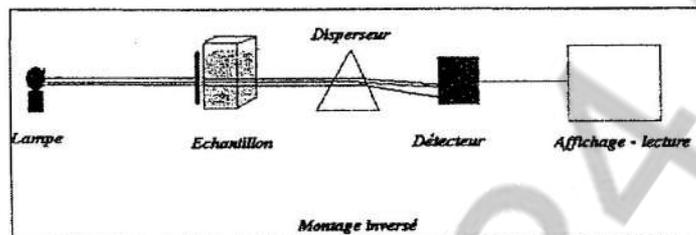
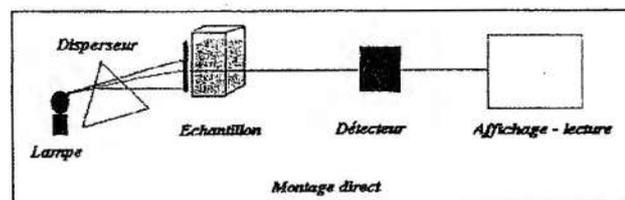


Fig . 3.4 : Schéma de montages en spectrophotométrie

➤ Les cuves

Les cuves en verre sont utilisées pour des lectures de la densité optique dans le visible alors que pour l'U.V., on utilise des cuves en quartz. Généralement, ces cuves ont un trajet optique de 1 cm, ce qui permettra donc de simplifier la formule de calcul des densités optiques. Au moment de remplissage des cuves, éviter la formation des bulles d'air sur les parois, faute de quoi, des erreurs de lecture peuvent être commises.

Certaines cuves appelées cuves à vidange, sont munies d'un orifice inférieur que l'on peut relier à un système de vidange, pompe à vide, pour accélérer les mesures. De même, il existe des chambres de lecture à deux orifices, l'un d'entrée et l'autre de sortie. Ces cuves sont utilisées dans des systèmes de lecture continue, en chromatographie par exemple.

Souvent, les cuves sont à l'origine des problèmes de lecture. C'est ainsi que des précautions rigoureuses doivent être prises quotidiennement pour garder, le plus longtemps possible, ces cuves en bon état. Il existe des gestes simples lors de la manipulation avec ce genre d'outils. A la fin de chaque lecture, les cuves sont bien lavées à l'eau ou avec un mélange sulfochromique, du bichromate de potassium dans de l'acide sulfurique concentré, selon le solvant utilisé. Parfois un trempage, pendant une nuit, dans un mélange pepsine (1%) - HCl (N/10) s'avère nécessaire lorsqu'on travaille avec des solutions protéiques. Eviter également tout contact avec d'autres matériaux et empêcher l'accumulation de la poussière sur la surface des cuves.

Pour éviter tous ces problèmes, les laboratoires préfèrent, actuellement, travailler avec des cuves en polystyrène à usage unique.

Les cellules photoélectriques

Sous l'action de la lumière, un semi conducteur libère des électrons qui passent d'un niveau énergétique bas à un niveau énergétique haut. C'est un effet photoélectrique permettant la transformation de l'énergie lumineuse en énergie électrique.

3.4.2. Appareils

Deux catégories d'appareils à distinguer : les photomètres et les spectrophotomètres.

➤ Photomètres.

La source de lumière est souvent une lampe à tungstène ne fournissant qu'une lumière monochromatique dans le visible. Les lectures des différents tubes de dosage sont successives.

➤ Spectrophotomètres.

Ces appareils peuvent être appliqués dans tout le domaine de l'UV- Visible. Le monochromateur est un prisme ou un réseau.

3.5. Applications

Parmi les domaines utilisant la technique de la spectrométrie d'absorption moléculaire, on peut noter : chimie, biologie, pharmacie, agroalimentaire, environnement. . .etc. C'est grâce aux améliorations et performances apportées à cette technique que le nombre d'utilisateurs ne cesse d'augmenter. Il suffit uniquement de citer l'analyse multivariable offrant la possibilité d'analyser plusieurs constituants tout en limitant les phénomènes d'interférence spectrale ou physico-chimiques.

Technique également utilisée pour mesurer le coefficient d'absorption moléculaire ϵ , caractéristique d'une substance à une longueur d'onde donnée. De même, on peut l'utiliser pour déterminer la concentration d'un produit dans une solution donnée. Couplée à une chromatographie sur colonne, la technique permet de suivre la concentration des protéines dans les éluats.

Lorsque le milieu est complexe et la substance à doser ne présente pas un spectre caractéristique, on peut développer une coloration entre la substance considérée et un produit chimique. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle à la concentration de la substance recherchée.

Chapitre 3 : Chromatographie

Sommaire

page

3.1. Définition	13
3.2. Les différents types de chromatographie	13
3.2.1. Chromatographie en phase liquide	14
3.2.1.1. Chromatographie de partage	14
a. Chromatographie de partage.....	14
b. Chromatographie d'exclusion.....	14
b ₁ . Principe.....	14
b ₂ . Propriétés du gel.....	15
b ₃ . Applications.....	16
3.2.1.2. Chromatographie d'adsorption	17
a. Chromatographie d'adsorption.....	17
b. Chromatographie d'échange d'ions.....	18
b ₁ . Principe.....	18
b ₂ . Classification.....	18
b ₃ . Propriétés.....	19
b ₄ . Utilisation.....	20
c. Chromatographie d'affinité.....	20
c ₁ . Principe.....	20
c ₂ . Méthodologie.....	20
3.2.2. Chromatographie en phase gazeuse	22
3.2.2.1. Principe	22
3.2.2.2. Méthodologie et appareillage	22
a. Appareillage.....	22
a ₁ . Injecteur.....	23
a ₂ . Colonnes.....	23
a ₃ . Détecteur.....	24
b. Méthodologie.....	24
b ₁ . Phase stationnaire.....	24
b ₂ . Phase mobile.....	25
b ₃ . Application.....	25

3.1. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation qui s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles: l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.
On définit un coefficient de partition K :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Où C_s , concentration dans la phase stationnaire
 C_m , concentration dans la phase mobile

Plus K est grand, plus le composé est absorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

3.2. Les différents types de chromatographie

Selon les phases mobiles et selon les mécanismes de séparation.

En chromatographie, on distingue deux phases : une phase stationnaire fixe et une phase mobile.

➤ Phase fixe:

Elle peut être solide ou liquide. Les solides comme la silice et l'alumine traitées, grâce à leurs propriétés adsorbantes, permettent la séparation des constituants des mélanges. Ces solides peuvent être utilisés pour remplir des colonnes chromatographiques (chromatographie par gravitation et en HPLC) ou étalés sur des plaques en verre, en aluminium ou sur une feuille en plastique. Des liquides peuvent également jouer le rôle de phase fixe. C'est le cas de la chromatographie sur papier où l'eau, retenue par un phénomène d'adsorption sur la cellulose, joue le rôle de la phase stationnaire. De même, en chromatographie en phase gazeuse, la phase stationnaire est représentée par un liquide peu volatile, imprégnant un support inerte, un granulé poreux, par exemple.

➤ Phase mobile:

Elle peut être soit un gaz (chromatographie en phase gazeuse) et la phase mobile est appelée gaz vecteur, soit un liquide et où elle prend le nom d'éluant.

3.2.1. Chromatographie en phase liquide

3.2.1.1. Chromatographie de partage

La phase stationnaire est, soit un solide poreux inerte enrobé de liquide, soit un solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non polaires.

b. Chromatographie de partage

Cette chromatographie est fondée sur la différence de solubilité des particules à séparer dans deux fluides non- miscibles. Technique utilisée en chromatographie sur papier où l'un des fluides est un liquide fixé sur le papier et constitue donc la phase stationnaire, et l'autre est un liquide ou un gaz constituant la phase mobile (figure 4.1). Le principal facteur entrant dans la séparation est le coefficient de partage. Plus une substance est soluble dans la phase mobile plus elle migre loin et inversement. Un autre facteur intervenant dans la séparation est la polarité. Ainsi, en HPLC, la phase stationnaire est peu ou non polaire alors la phase mobile est polaire (eau ou mélange eau- méthanol). Ce type de chromatographie prend le nom chromatographie de partage en phase inversée.

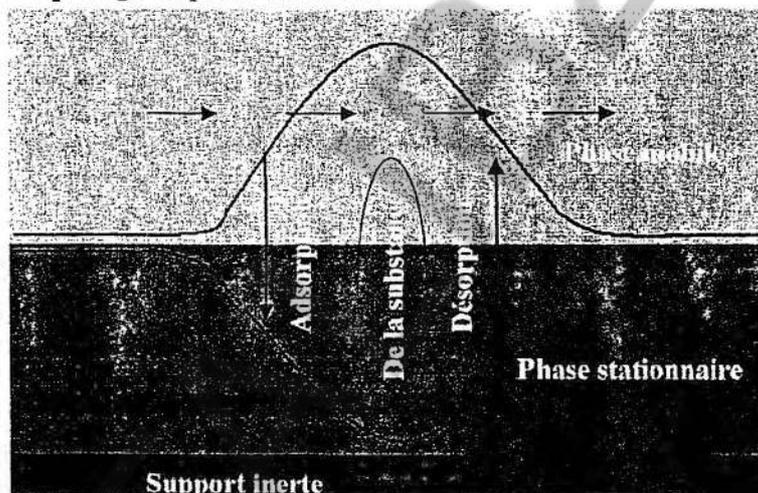


Figure.4.1 : Répartition des molécules d'un composé entre deux phases non- miscibles.

b. Chromatographie d'exclusion

• b₁. Principe

La phase stationnaire est constituée d'un gel formé d'un polymère poreux dont les pores varient en fonction des diamètres des espèces à séparer. Les molécules dont la taille est supérieure au diamètre des pores du gel, c'est-à-dire supérieure à la limite d'exclusion de ce gel, ne peuvent pas y pénétrer et seront éluées les premières (figure 4.2). Tandis que les molécules plus petites, entrent dans le gel et seront retardées par la réticulation de celui-ci.

Lorsqu'un mélange de solutés de poids moléculaires variables est placé dans une colonne en verre contenant un gel de séphadex, les molécules formant le mélange à séparer quittent le gel dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

Pour chaque particule du mélange, on détermine son volume d'éluion V_e correspondant au volume d'éluat nécessaire pour provoquer l'évacuation de la particule hors de la colonne.

Quant au volume mort (V_0) de la colonne, il correspond au volume du solvant d'éluion nécessaire pour faire sortir toutes les particules totalement exclues de la colonne. Souvent, on utilise le bleu dextran dont le poids moléculaire est de 2 000 000, totalement exclu des séphadex G.

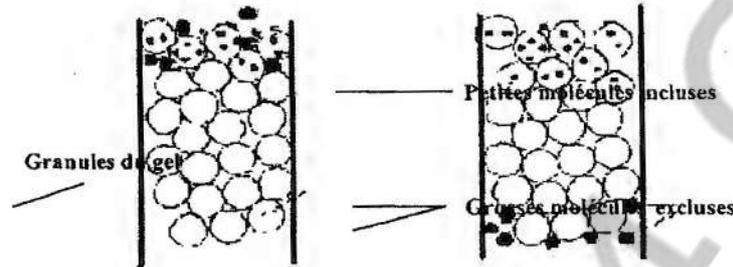


Fig.4.2: Schéma d'un gel filtration

• b.2 Propriétés du gel

- Propriétés physiques

Les différents gels de séphadex diffèrent les uns des autres par leur degré de réticulation et leur capacité de gonflement. D'après le nom du séphadex utilisé, on peut être renseigné sur la capacité de rétention de l'eau par le gel: c'est-à-dire le volume en ml d'eau retenu par 1 g de séphadex sec. Ainsi un séphadex G50 possède un indice de rétention de 5 ml par g alors qu'un G75 a un indice de 7,5 ml par g.

- Propriétés chimiques

Les gels séhadex ne sont solubles dans aucun solvant. Ils sont stables dans l'eau, les solutions alcalines, salines, faiblement acides et les solvants organiques. Ils peuvent également supporter des températures allant jusqu'à 110°C.

- Propriétés chromatographiques

Les différents séphadex utilisés sont classés suivant la limite supérieure correspondant à la taille d'une substance éluee dans le volume mort et la limite inférieure indiquant la taille d'une substance dont le volume d'éluion est égale au volume du gel (tableau 4.1). Seulement, parfois à taille moléculaire identique, les substances ne seront pas toutes éluees de la même façon : les formes cycliques sont retardées par rapport aux non cycliques. A force ionique faible, les groupements carboxyliques des séphadex peuvent également intervenir en créant des liaisons ioniques avec les groupements chargés positivement, ce qui fait retarder les substances à charge positive. Ce phénomène disparaît quand on fait augmenter la force ionique.

Séphadex	Domaine de fractionnement pour peptides et protéines globulaires
G. 10	≤ 700
G. 15	≤ 1500
G. 25	1000 – 5000
G.50	1500 – 30 000
G.75	3 000 – 70 000
G.100	4 000 – 150 000
G.150	5 000 – 400 000
G.200	5 000 – 800 000

. **Tableau 4.1:** Domaines d'exclusion des différents séphadex de type G

• **b.3. Applications**

• **Séparation des molécules à différents poids moléculaires**

Sur une chromatographie gel filtration, les molécules de poids moléculaire élevé sortent les premières de la colonne suivies des petites selon l'ordre décroissant de la masse moléculaire. Des molécules de même poids moléculaire et de nature chimique différente peuvent également être séparées en changeant la force ionique du tampon d'élution.

• **Détermination des poids moléculaires**

En utilisant des étalons de masse moléculaire connue, sur la même colonne de gel filtration, il est très simple de déterminer les poids moléculaires des substances constituant la solution étudiée. En effet, le volume d'élution des protéines globulaires, par exemple, est proportionnel au logarithme de leur poids moléculaire. Il suffit donc de tracer la représentation graphique de la gamme d'étalonnage : $\log MM = f(V_e)$. Et connaissant le volume d'élution de chaque particule détectée, à la sortie de la colonne, grâce à un photomètre, on peut reporter les résultats sur le graphique et en déduire les poids moléculaires des constituants du mélange (figure 4.3).

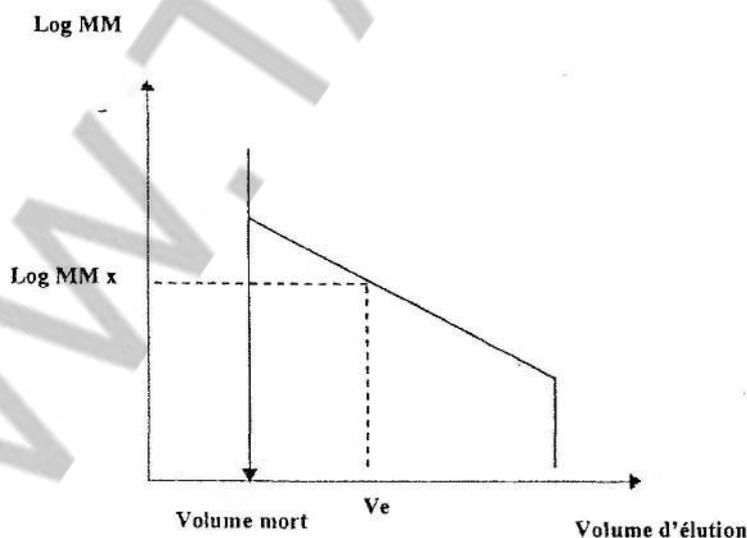


Figure .4.3 : Variation du volume d'élution en fonction de log MM.

- **Autres applications**

- Dessalage
- Concentration
- Séparation de complexes antigène-anticorps. . .

3.2.1.2. Chromatographie d'adsorption

a. Chromatographie d'adsorption

Dans le cas de la chromatographie d'adsorption, la répartition des molécules se fait entre la phase mobile et la surface de la phase stationnaire qui n'est pas liquide et par conséquent ne fait pas partie de la constitution du système solvant. Un mécanisme montrant l'adsorption et la désorption des substances est illustré dans la figure 4.4.

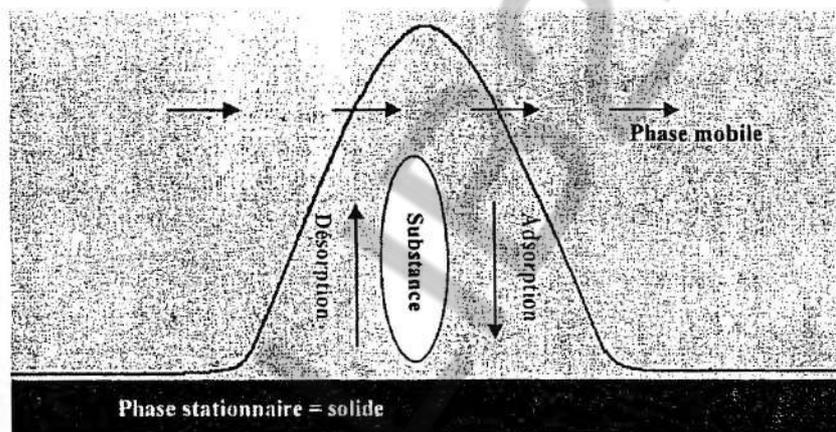


Figure 4.4: Répartition des solutés entre une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide.

Il faut noter que l'adsorption est un phénomène d'interface contrairement à l'absorption.

Polarité des phases : En chromatographie d'adsorption, les séparations des solutés se font sur le principe de polarité.

- **Phase mobile :** Le pouvoir éluant d'un liquide dépend de sa propre polarité. La liste qui illustre par ordre croissant la polarité des différents liquides.

- éther de pétrole
- cyclohexane
- tétrachlorométhane
- trichloréthène
- toluène
- benzène
- propan-1-ol
- éthanol
- méthanol

- eau
- acide éthanoïque

- **Adsorbants** : Les plus utilisés sont le gel de silice et l'alumine. Plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Souvent, on cherche à traiter les adsorbants pour les rendre plus actifs car plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible plus il est actif et par conséquent polaire.

- Papier, cellulose
- Amidon
- Sucres
- Talc
- Carbonate de sodium
- Oxyde de magnésium
- Gel de silice
- Alumine
- Charbon activé

b. Chromatographie d'échange d'ions

b.1 Principe :

Les échangeurs d'ions sont des composés formés de macromolécules hautement polymérisées. Insolubles, ils portent des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

b.2 Classification :

➤ Résines cationiques :

Celles qui échangent des cations. Elles portent un groupement négatif lié par liaison de covalence à un support (figure 4.5).

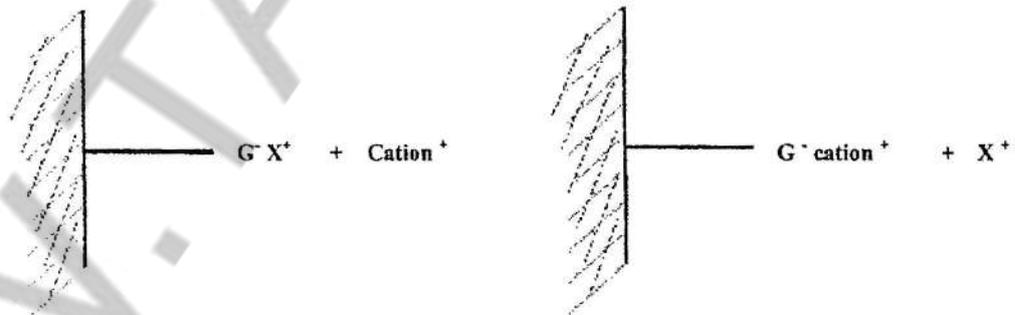


Fig 4.5: Résine cationique

Les échangeurs cationiques les plus utilisés sont : les résines sulfoniques – SO_3^- (fortes) et les résines carboxyliques – COO^- (moyennes).

➤ Résines anioniques :

Celles qui échangent des anions. Elles portent un groupement positif lié par liaison de covalence à un support (figure 4.6).

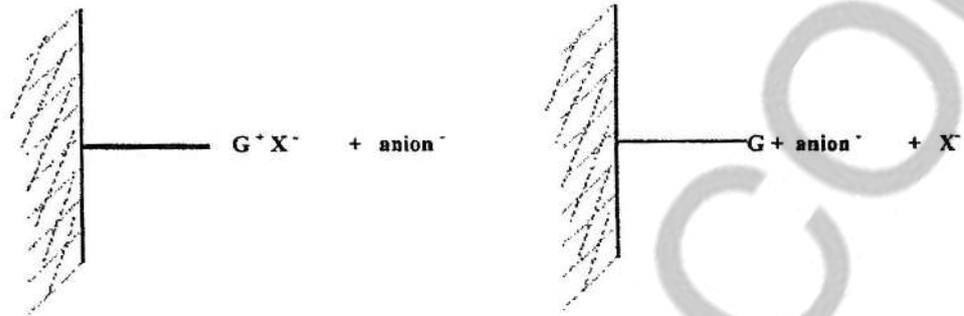
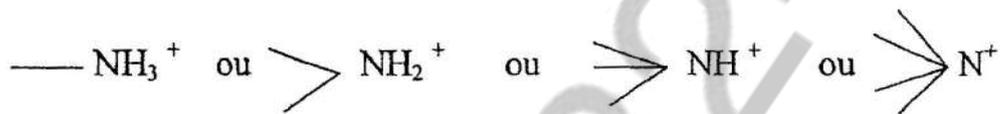


Fig 4.6: Résine anionique

Les résines anioniques les plus utilisées sont à groupements amines : amines primaires, secondaires, tertiaires, ion ammonium quaternaire).



> Résines amphotères :

Ces résines à la fois des charges positives et des charges négatives.

b.3 Propriétés :

• Force ionique

Les résines se comportent comme des acides ou des bases. Leur degré d'acidité ou de basicité dépend des groupes fonctionnels portés par ces matrices. C'est ainsi qu'on peut les classer en résines acides ou basiques fortes, moyennes ou faibles.

Prenons, par exemple, le cas d'un échangeur cationique faible dont l'ion échangeable est H^+ . si on fait passer par cette résine une solution de NaCl, il va s'établir l'équilibre suivant :



Les ions H^+ ont donc quitté la résine pour aller dans le liquide et seront par la suite remplacés par les ions Na^+ . Une fois l'équilibre est établi, on obtient les $[H^+]_{ech}$ et $[H^+]_{liq}$ respectivement dans l'échangeur et dans le liquide. Il en est de même pour les ions Na^+ : $[Na^+]_{ech}$ et $[Na^+]_{liq}$. On définit ainsi un coefficient de partage ou d'équilibre K qui est exprimé comme suit :

$$K_{H^+/Na^+} = \frac{\frac{[H^+]_{liq}}{[Na^+]_{liq}}}{\frac{[H^+]_{ech}}{[Na^+]_{ech}}}$$

- **Capacité**

On définit la capacité totale d'une résine comme étant une constante égale au nombre total de charges de l'échangeur ; elle s'exprime en équivalents par unité de poids ou de volume.

Par exemple : nombre de millimoles (mmol) d'ions que la résine peut échanger par gramme de résine sèche (ou moins souvent par unité de volume : par ml de résine humide).

En plus de la capacité théorique d'une résine, on distingue la capacité utile qui dépend de l'ionisation des groupements fonctionnels de l'échangeur dans les conditions de pH du tampon utilisé, de la température et également des concentrations des éléments ionisables à séparer.

b.4 Utilisation :

Les résines sont souvent utilisées après tassage dans une colonne en verre ou en plastique. L'une des extrémités de la colonne doit être fermée à l'aide d'une plaque de verre fritté ou d'un fragment de laine de verre pour empêcher la résine de sortir de la colonne. Eviter de laisser des bulles d'air lors du remplissage de la colonne. Pour cela, un dégazage, sous vide, de la suspension de résine est recommandé. Il est également important d'éviter les dégagements gazeux lors du passage de l'échantillon, exemple lorsqu'on fait passer du bicarbonate dans une résine cationique (dégagement de CO_2). Pour les résines réutilisables, la régénération est indispensable pour remettre l'échangeur en « forme ». Exemple : Une résine carboxylique est régénérée à l'aide d'une solution de soude 2N, suivie d'une solution d'acide chlorhydrique 2 fois normale.

En pratique, la capacité de rétention d'une résine dépend de plusieurs facteurs dont la taille des particules, la vitesse de passage de l'échantillon, la taille et la forme de la colonne. . .

c. Chromatographie d'affinité

Par opposition aux autres techniques de séparation chromatographique qui font appel aux propriétés physico-chimiques (solubilité, charge électrique, taille), la chromatographie d'affinité quant à elle est basée sur des interactions spécifiques, liaison enzyme-substrat ou encore antigène-anticorps.

c.1 Principe

L'effecteur est une molécule liée, par liaison de covalence, à un support macromoléculaire, chimiquement inerte et insoluble. L'effecteur présente une affinité biologique pour une substance de l'échantillon à analyser.

c.2 Méthodologie

➤ Le support :

Les plus utilisés sont : agarose, carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide... L'agarose, par exemple, est un polymère de dérivés osidiques, à nombreuses fonctions alcool permettant la fixation du ligand. L'avantage des billes d'agarose est que la porosité est élevée, ce qui élimine toute possibilité de tamisage moléculaire. Sa large utilisation pour ce type de chromatographie est appuyée, également, par le fait que le phénomène d'adsorption non spécifique est très faible surtout à des concentrations salines élevées.

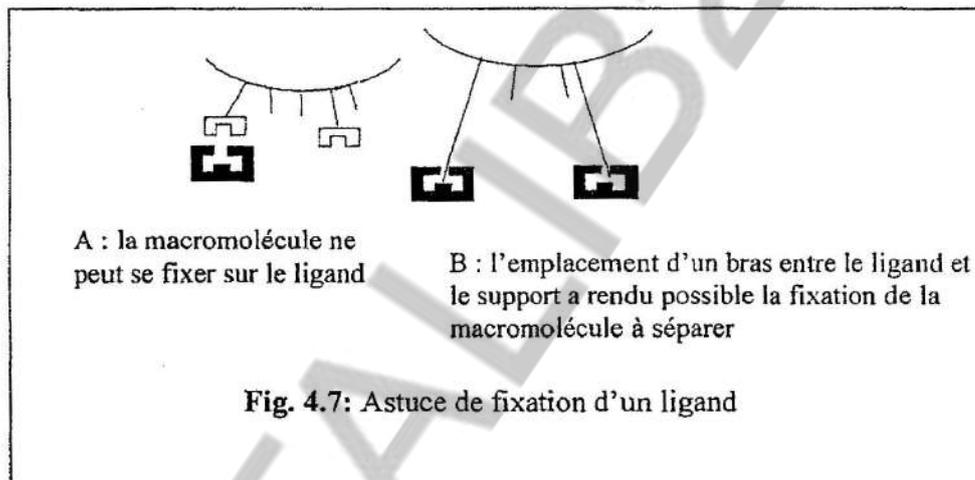
Pour les billes de gel polyacrylamide, la faible porosité constitue un handicap pour la séparation des protéines à haut poids moléculaire mais tout en gardant son utilisation pour les petites et moyennes molécules d'autant plus qu'il s'agit d'un gel résistant aux agents chimiques.

On note également la cellulose et ses dérivés chargés. Leur utilisation est très limitée à cause des phénomènes d'adsorption non spécifique.

➤ Le ligand :

C'est une molécule présentant une grande affinité pour le substrat à purifier. Parmi les effecteurs possibles, choisir celui qui présente la meilleure affinité pour la substance recherchée. Quand le ligand est chargé électriquement, des artefacts de séparation, dus à des phénomènes non spécifiques, peuvent avoir lieu.

Lorsque des encombrements stériques empêchent la bonne fixation de la molécule à séparer, on peut insérer un bras entre le support et le ligand (Figure 4.7).



➤ Les étapes d'une chromatographie d'affinité:

- **Fixation** : De l'ensemble des molécules présentes dans un mélange de substances et placé sur une colonne d'affinité, seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur le support (figure 4.8).

- **Purification** : Au fur et à mesure de faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées. Seule donc la molécule ayant une affinité pour l'effecteur sera retenue.

- **Elution** : La molécule purifiée est séparée de la colonne et est recueillie dans des fractions d'éluat (éluat).

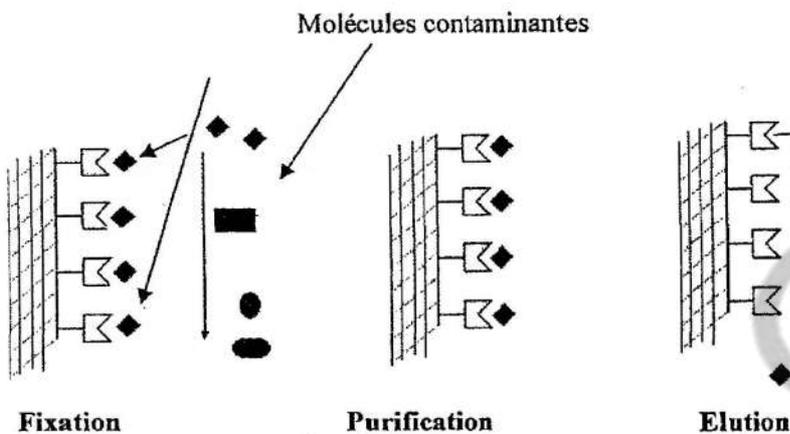


Figure.4.8: Les étapes d'une chromatographie d'affinité.

3.2.2 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse, appelée encore CPG, est utilisée pour la séparation des molécules de faible poids moléculaire, volatiles ou rendues volatiles après un traitement chimique.

3.2.2.1 Principe

Il s'agit d'une chromatographie de partage faisant intervenir deux phases : l'une, la phase mobile, est un gaz d'où l'appellation de la technique et l'autre, la phase stationnaire, est soit un liquide, soit un solide.

Lorsque la phase stationnaire est un solide, on parle de chromatographie gaz-solide. Alors que dans le cas d'une phase stationnaire liquide, on a affaire à une chromatographie gaz-liquide. Dans ce dernier cas, la phase stationnaire liquide est retenue par support inerte.

3.2.2.2 méthodologie et appareillage

a. Appareillage

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse est une enceinte formée de trois parties (figure 4.9):

- Un injecteur
- Une colonne
- Un détecteur

L'ensemble est porté à haute température et traversé par gaz vecteur qui sert à transporter les substances à séparer. Le gaz vecteur le plus souvent utilisé est l'hélium ou encore l'hydrogène, l'azote. . .

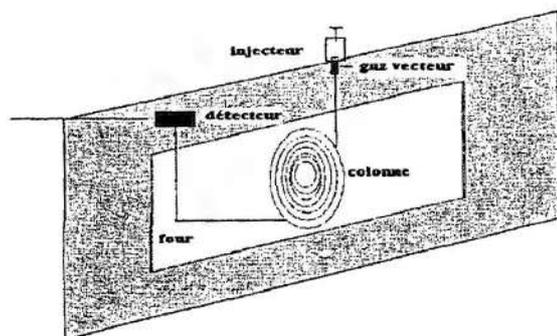


Fig.4.9: Schéma des éléments constituant un appareil à chromatographie en phase gazeuse

a.1. Injecteur

Il sert à introduire le mélange à analyser dans la colonne. Cette opération est faite à l'aide d'une micro seringue pour solutions liquides (volume inférieur à 100 μ l) ou à l'aide d'une vanne à boucles pour les mélanges gazeux. La chambre d'injection est reliée à la colonne et traversée par le gaz vecteur.

L'injection peut être faite à chaud ou à froid.

a.2. Colonnes

Deux types de colonnes existent (figure 4.10) :
 - Colonnes remplies
 - Colonnes capillaires

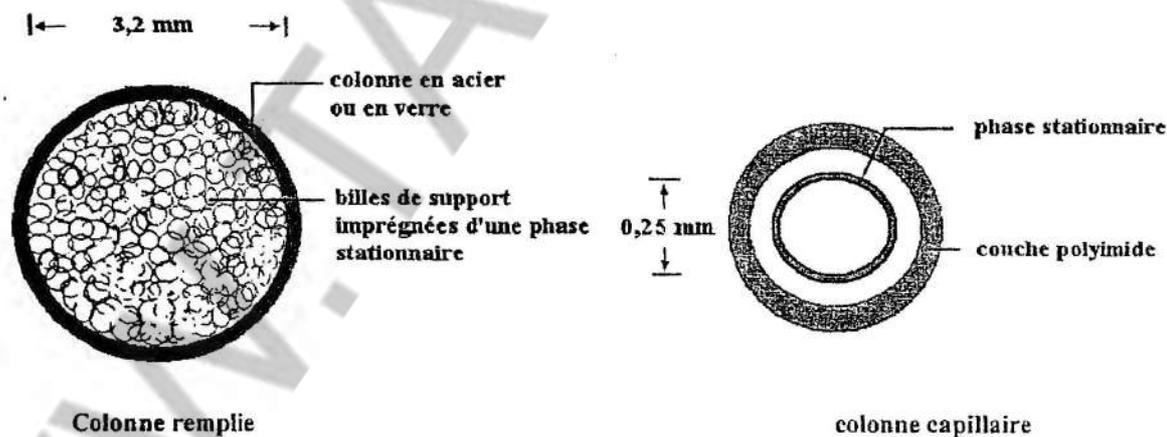


Fig.4.10: schéma de coupes de colonnes de chromatographie en phase gazeuse

La colonne est formée d'une spirale creuse en verre ou en métal

➤ **Colonnes remplies**

On peut distinguer :

- Des colonnes à remplissage pour des chromatographies gaz-solide. La phase stationnaire est un granulé polymérique de gel de silice (matériel poreux atteignant jusqu'à 500 m²/g) ou un polymère organique (type éthylvinylbenzène-divinylbenzène dont le diamètre des pores varie de 0,0075 à 0,8 mm).
- Des colonnes à remplissage pour des chromatographies gaz liquide. La phase stationnaire est un liquide imprégnant un support poreux et inerte. Le support peut être du gel de silice ou provenant de terre de diatomées.

Les caractéristiques des colonnes remplies sont :

- ❖ Diamètre interne variant de 3,2 mm à 6,4mm
- ❖ Longueur de 0,5 à 3 m
- ❖ L'acier est inoxydable, assez inerte et bon conducteur de la chaleur.

➤ **Colonnes capillaires**

Les caractéristiques de ces colonnes sont :

- ❖ Diamètre interne variant de 0,2 mm à 0,75mm
- ❖ Longueur : 15 à 100 mètres
- ❖ Silice fondue recouverte d'une couche en polyimide

a.3. Détecteurs

Il existe quatre types de détecteurs :

- ❖ Détecteur à conductibilité thermique – catharomètre
- ❖ Détecteur à ionisation de flamme
- ❖ Détection par spectroscopie infrarouge
- ❖ Détection par spectrométrie de masse

b. Méthodologie

Le traitement de l'échantillon varie selon les produits utilisés :

- Les produits à séparer sont directement volatilisables sans traitement préalable. Dans ce cas, les substances sont mises à l'extraction et éventuellement à la purification. Elles sont ensuite solubilisées dans un solvant organique volatil. Un aliquote de cette solution est alors injecté pour la chromatographie.
- Les substances ne sont volatiles à la température du four du chromatographe ou bien détruites dans ces conditions. Dans ce cas, les substances à chromatographier sont extraites dans un solvant puis transformées en produits volatils.

Le choix des phases est d'une importance capitale:

b.1. Phase stationnaire

- Cas d'une chromatographie gaz-liquide (CGL) : Le support est un matériau solide et inerte sur lequel est imprégné un liquide constituant la phase stationnaire. Le liquide peut être un hydrocarbure, un polyalcool ou un autre constituant choisi suivant son pouvoir solvant vis-à-vis de la substance à séparer. Plus la substance à séparer est soluble dans le liquide plus le temps de rétention est élevé.
- Cas d'une chromatographie gaz-solide (CGS) : La phase stationnaire est un adsorbant comme par exemple la silice ou l'alumine.

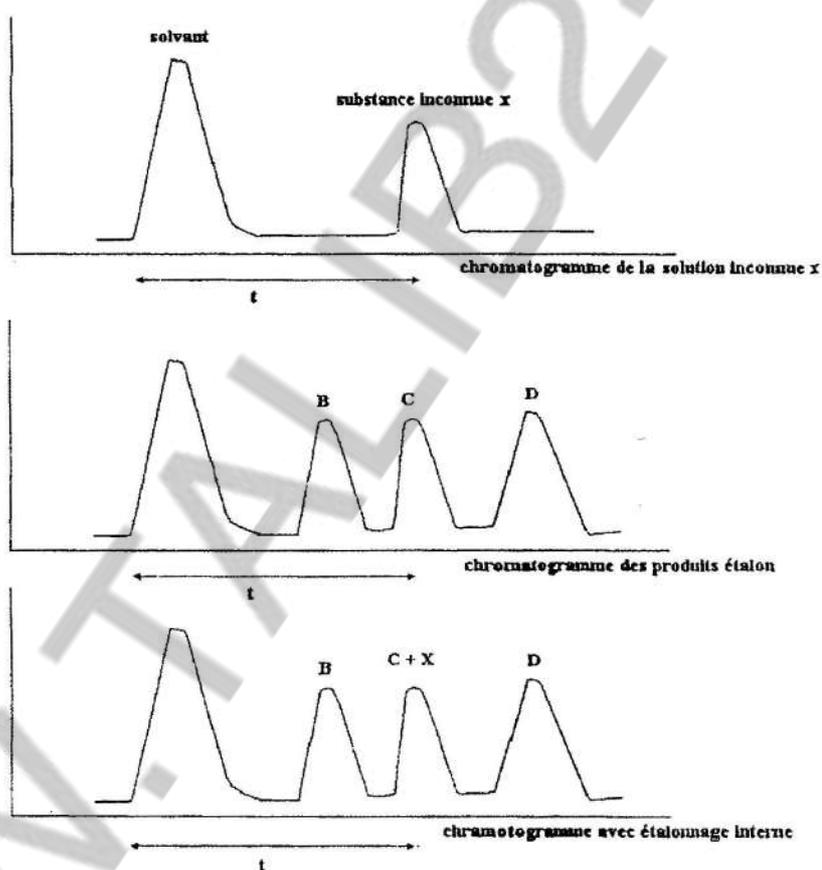
b.2 Phase mobile

Les gaz vecteurs les plus utilisés sont l'hélium, l'hydrogène et l'azote. Le choix du gaz dépend de la viscosité de ce dernier et de la nature du détecteur; le catharomètre nécessite l'emploi d'un gaz à haute conductivité (l'hélium ou l'hydrogène).

b.3. Application

La chromatographie en phase gazeuse permet l'identification des substances par leur temps de migration ou temps de rétention (figure 4.11) et, également, la détermination des concentrations des substances par mesure de la surface de leurs pics respectifs.

La CPG est largement utilisée pour le dosage des acides gras libres, des acides aminés, des stéroïdes. . .etc.



La position du pic C confirme que X est bien de même nature que C

Fig.4.11: Identification d'une substance par CPG

Chapitre 4 : L'électrophorèse

Sommaire

page

5.1. Principes	27
5.1.1. Force ionique du tampon.....	27
5.1.2. Température.....	27
5.1.3. pH du tampon.....	27
5.1.4. Courant électrique continu.....	27
5.2. Caractéristiques des molécules	28
5.3. Instrumentation et méthodologie	28
5.3.1. Montage horizontal.....	28
5.3.2. Montage vertical.....	29
5.3.3. Principales matrices électrophorétiques.....	29

L'électrophorèse est le déplacement des particules chargées dans un champ électrique formé par un courant continu.

5.1. Principes

Les molécules chargées migrent vers l'électrode de charge opposée à la leur: celles qui sont chargées négativement, les anions, migrent vers l'anode; celles qui sont chargées positivement, les cations, migrent vers la cathode; celles qui ne sont pas chargées, neutres, restent immobiles.

Le déplacement des particules en électrophorèse dépend de plusieurs facteurs :

5.1.1 Force ionique du tampon

Le déplacement d'une particule augmente quand la force ionique μ du tampon diminue. Celle-ci est définie selon la formule suivante :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i V_i^2$$

Avec C_i : concentration molaire des ions
 V_i : valence des ions

5.1.2 Température

Dans les bacs d'électrophorèse se produit un échauffement dû à la libération de la chaleur. Ceci provoque une augmentation de la conductivité du tampon. Il est donc conseillé de travailler avec des courants de faible intensité pour éviter cette dissociation de la chaleur. L'élévation de la température fait aussi évaporer le solvant ce qui augmente encore la conductivité.

5.1.3 pH du tampon

En électrophorèse, les substances chargées positivement se dirigent vers la cathode alors que celles chargées négativement se dirigent vers l'anode. Une substance non chargée ne migre pas. Pour une substance amphotère, le pH du milieu joue un rôle important. A un pH supérieur au pH_i de la molécule, celle-ci se charge négativement et se dirige l'anode. Par contre lorsque le pH du milieu tampon est inférieur au pH_i de la molécule, celle-ci se charge négativement et se dirige vers la cathode. A un $pH = pH_i$, la molécule reste immobile.

5.1.4 Courant électrique continu

Une particule chargée se déplace plus rapidement avec l'augmentation du courant électrique. Seulement, il faut chercher un moyen de refroidissement du système pour faire face à l'effet de Joule dans le cas où on cherche à augmenter l'intensité du courant électrique.

5.2. Caractéristiques des molécules

- ❖ C'est la **charge** des molécules qui constitue la **caractéristique fondamentale** dans le déplacement en électrophorèse. Par sa nature, elle **détermine** la direction de déplacement c'est-à-dire vers l'anode ou la cathode et également la vitesse de migration.
Pour les molécules biologiques, la charge nette de la **particule** dépend de son PI (potentiel isoélectrique) et du pH du milieu (solvant de migration).
- ❖ La **taille** des molécules joue un rôle important dans la **séparation** des particules en électrophorèse. Parfois, elle peut même constituer l'**élément fondamental** dans cette séparation. En effet, lorsque le support de migration est un gel poreux, les petites molécules, vu leur taille, circulent plus librement que des molécules de taille supérieure. Ces dernières seront donc retardées par les mailles du gel et migreront moins loin que les petites molécules. Ce phénomène est surtout rencontré dans le cas des électrophorèses sur gel polyacrylamide dans des conditions dénaturantes en présence de SDS (Sodium dodécylsulfate).
- ❖ L'**affinité** des substances à séparer vis-à-vis de la matrice électrophorétique constitue également un facteur important dans la **séparation** des constituants de l'échantillon. Plus une substance a de l'affinité pour un support moins elle migre plus loin. Ce phénomène constitue souvent un **problème de séparation** car un support doit être le plus inerte possible pour ne pas gêner le déplacement des molécules. Pourtant, on connaît bien un exemple où l'affinité joue un rôle important dans la séparation des protéines du sérum. En effet l'albumine et les globulines sériques ont des affinités différentes à l'acétate de cellulose, c'est ce qui fait la différence lors de leur séparation sur cette matrice.

5.3. Instrumentation et méthodologie

- Il existe différents types de matrice solide qui sont utilisées pour permettre le déplacement des particules d'un échantillon. A noter que sur certaines matrices, la migration des substances se fait à la surface: papier, acétate de cellulose, etc. On a aussi celles qui forment un support poreux permettant la migration à travers les réticulations et les mailles tissées après polymérisation du gel: agarose, polyacrylamide, etc.
- La résolution des échantillons dépendra de la méthode utilisée. Les protéines pourront être séparées de façon individuelle, comme dans le cas de l'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. D'autres types d'électrophorèse, acétate de cellulose par exemple lors de la séparation des protéines sériques, ne permettront qu'un fractionnement en groupes de protéines.

5.3.1. Montage horizontal

Certaines matrices sont souvent utilisées pour ce type de montage ; c'est le cas de l'acétate de cellulose ou le papier sur lesquelles les particules se déplacent à la surface (figure 5.1). Ces matrices sous forme de bandes fines, étroites et longues, plongent les deux extrémités dans le tampon de migration, solution d'électrolytes. La surface du support est alors imprégnée du tampon permettant la fermeture du circuit électrique entre les deux électrodes du système électrophorétique. Sur la couche mince du liquide crée à la surface vont se

déplacer les ions, créant un courant qui entraînera les particules chargées dans l'échantillon et ceci dans le sens inverse de leur charge respective.

On utilise aussi des montages horizontaux pour des matrices d'agarose pour la séparation d'acides nucléiques ou en immuno-électrophorèse.

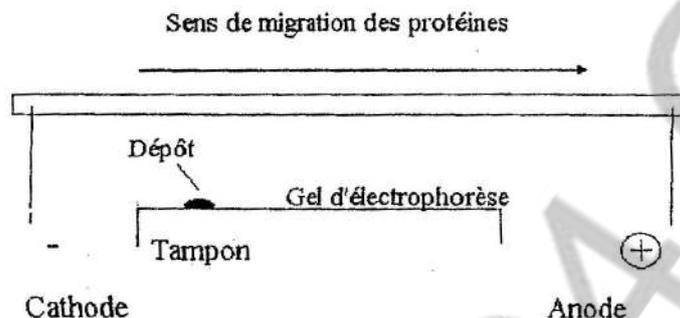


Fig 5.1: Cuve d'électrophorèse : montage horizontal

5.3.2. Montage vertical

Seuls certaines matrices sont utilisées pour ce type de montage ; c'est le cas des gels de polyacrylamide. Avant tout lancement de ce type d'électrophorèse, il faut préparer le gel qui sera monté entre deux plaques en verre ou en plastique. Une fois le gel aura polymérisé, on fera monter le dispositif dans une chambre d'électrophorèse à montage vertical. Les deux extrémités du gel plongent dans le solvant de migration qui, soumis à un courant électrique, peut circuler à travers les mailles du gel réticulé. Cette circulation du tampon entraînera le déplacement des substances constituant le mélange à séparer et à des vitesses différentes. Ceci a pour conséquence la séparation des molécules de l'échantillon.

5.3.3 Principales matrices électrophorétiques

- **Papier** : Souvent utilisé en montage horizontal et à basse tension (100 à 200 volts). Il sert surtout à séparer les protéines, les acides aminés et les petites molécules chargées. La révélation peut se faire en utilisant des colorants non spécifiques (rouge ponceau, par exemple) ou spécifiques (Noir Soudan pour les lipides et réactif de schiff pour les fractions glucidiques des protéines).
- **Acétate de cellulose**: Technique principalement réservée aux protéines en montage horizontal. Elle est simple, pratique et pas chère, ce qui a fait d'elle une technique très utilisée. Elle s'applique surtout en biologie pour diagnostiquer des maladies sériques.
- **Polyacrylamide**: Le montage est vertical et la polymérisation du gel se fait entre deux plaques de verre. Lors du montage du gel et avant sa réticulation, on fait placer, du côté haut du gel, une sorte de peine qui va laisser son empreinte après polymérisation. Une fois le peigne est retiré, des petits puits seront tracés à son emplacement et qui serviront par la suite pour le dépôt des échantillons. Ces gels servent souvent pour la séparation des protéines et des petites molécules d'acides nucléiques (figure 5.2).
- **Agarose**: La polymérisation du gel d'agarose se fait à partir d'une molécule, le dextran. Ce gel est utilisé en montage horizontal puisqu'il n'adhère pas convenablement au verre. Contrairement au polyacrylamide, l'agarose ne tisse sa

polymérisation par des liaisons covalentes mais au contraire, ce sont des liaisons hydrogène qui lient les longues molécules de dextran.
A cause de sa porosité permettant la séparation des grosses molécules, le gel d'agarose est très utilisé pour la séparation des acides nucléiques et également lors de la séparation des protéines sériques en biologie clinique.

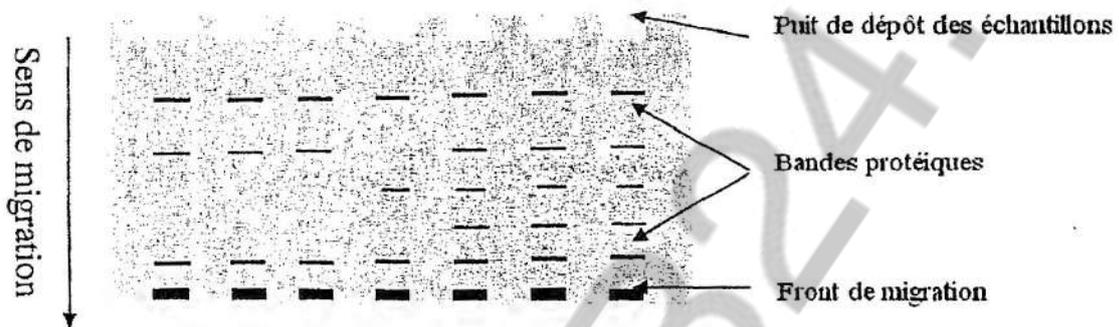


Fig 5.2: Schéma d'un électrophorogramme sur gel polyacrylamide