



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة وهران للعلوم والتكنولوجيا "محمد بوضياف"
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكائن الحي و البيئة

People's Democratic Republic Of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Science and Technology of Oran Mohamed BOUDIAF
Faculty of Natural and Life Sciences



Polycopié

Techniques d'analyse microbiologiques

Cours destinés aux étudiants en 3ème année Licence Microbiologie

Réalisé par :
Dr. DELLALI Amina

Année Universitaire 2024/2025

AVANT PROPOS

Le présent polycopié s'inscrit dans le cadre du programme de la spécialité L3 Microbiologie, au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département Vivant et Environnement. Ce cours a pour objectif de fournir aux étudiants une compréhension approfondie des principales techniques utilisées dans l'analyse microbiologique.

À travers quatre chapitres distincts, ce polycopié aborde les outils qui permettent d'étudier et de caractériser les micro-organismes à un niveau de détail précis. Ces méthodes sont fondamentales pour une compréhension avancée des processus biologiques et des interactions dans les systèmes microbiens.

- **Chapitre 1 : Méthodes spectrales**

Les méthodes spectrales, basées sur l'interaction des radiations électromagnétiques avec la matière, afin d'étudier les caractéristiques chimiques et physiques des échantillons.

- **Chapitre 2 : Méthodes de fractionnement**

Les méthodes de fractionnement permettent de séparer et d'analyser les différentes composantes cellulaires des micro-organismes. Ces techniques permettent d'isoler des structures spécifiques comme les membranes, les protéines ou les acides nucléiques.

- **Chapitre 3 : Méthodes de marquage**

Les techniques de marquage sont utilisées pour visualiser et suivre des composants cellulaires spécifiques dans les micro-organismes.

Chapitre 4 : Microscopie électronique

La microscopie électronique est un outil indispensable pour l'observation à haute résolution des micro-organismes. Grâce à cette technologie, il est possible de visualiser des structures subcellulaires et des interactions au sein des cellules avec un niveau de détail inégalé par d'autres techniques.

Ce polycopié est conçu pour fournir aux étudiants une base solide en matière d'analyse microbiologique avancée, en soulignant l'importance de chaque technique dans le cadre de la recherche microbiologique et de ses applications pratiques.

Le programme de la présente matière est comme suit :

Table des matières

Avant-propos	i
Liste des figures	ii
Chapitre 1 : Méthodes spectroscopiques	
1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire	1
1.1. Définition	1
1.2. Le spectre électromagnétique	1
1.3. Le rayonnement ultraviolet (UV)	2
1.4. Domaine UV- visible	2
1.5. Principe	2
1.6. Loi de Beer Lambert	3
1.7. Types & appareillage	4
1.8. Applications	5
2. Fluorimétrie .	7
2.1.Principe	7
2.2.Mesure de la fluorescence	8
2.3.Appareil de mesure	8
3. Spectrométrie d'émission atomique	9
3.1.Définition	9
3.2.Principe	10
3.3.Applications	10
4. Spectrophotométrie d'absorption atomique	11
4.1.Définition	11
4.2.Principe	11
4.3.Appareillage	12
4.4.Applications	13
5. Résonance magnétique nucléaire	14
5.1.Définition	14
5.2.Principe	14
5.3.Appareillage	15
5.4.Applications	17

Chapitre 2 : Méthodes de fractionnement

1. Filtration	18
1.1.Définition et principe	18
1.2.Type de filtration	19
2. Sédimentation	22
2.1.Définition et principe	22
2.2.Appareillage & Applications	23
2.3.Centrifugation et Ultracentrifugation	25
2.3.1. Types et appareillage	26
3. Dialyse et électrodialyse	30
3.1.Concentration par dialyse	30
3.2. Electrodialyse	31
3.3.Osmose	32
3.4.Osmose inverse	32
4. Méthodes chromatographiques	33
4.1.Classification des techniques chromatographiques	34
4.2. Types de chromatographie	34
4.2.1. Chromatographie de partition	34
4.2.2. Chromatographie Sur Couche Mince (C.C.M.)	36
4.2.3. Chromatographie d'exclusion moléculaire	39
4.2.4. Chromatographie d'échange d'ions	43
4.2.5. Chromatographie d'affinité	47
4.2.6. Chromatographie En Phase Gazeuse (C.P.G.)	49
5. Méthodes électrophorétiques	51
5.1.Définition	51
5.2.Principe de l'électrophorèse	52
5.3.Paramètres et conditions de réalisation	53
5.4.Facteurs affectant la vitesse de migration des molécules	55
5.5.Types d'électrophorèse	56
5.6.Applications de l'électrophorèse	62

Chapitre 3 : Méthodes de marquage

1. Les méthodes isotopiques	63
1.1.Définition et principe	63
1.2.Les différents traceurs et leur nature	63
1.3. Détection de la radioactivité et mesure	64
1.4.Utilisations des molécules radioactives comme traceurs	64
2. Dosage radio-immunologique	65
2.1.Principe	65
2.2.Méthodes par compétition	65
2.3.Méthodes Sandwich	66
2.4.Applications	67
3. Dosages radio-enzymatiques	67
3.1.Définition et principe	67
3.2.Techniques quantitatives	68
3.3.Techniques qualitatives	68
3.4.Applications	71

Chapitre 4 : Microscopie électronique

1. Microscopie électronique à transmission	73
1.1.Principe de fonctionnement	73
1.2.Description de l'appareil	74
1.3.Préparation des échantillons	74
2. Microscopie électronique à balayage	75
2.1.Principe de fonctionnement	75
2.2.Composants d'un MEB	76
2.3.Préparation des échantillons	77
Références	78

Liste des Figures

Figure 1 : Spectre électromagnétique	1
Figure 2 : Domaine UV-Visible	2
Figure 3 : Principe de la spectrophotométrie	3
Figure 4 : Mesure d'absorbance d'un échantillon	3
Figure 5 : Appareillage du spectrophotomètre d'absorption moléculaire	5
Figure 6 : Détermination de la concentration sur la courbe d'étalonnage	6
Figure 7 : Diagramme de Jablonski	8
Figure 8 : Schéma représentatif du fluoromètre	9
Figure 9 : Principe de la spectrométrie d'émission atomique	10
Figure 10 : Principe de la SAA	12
Figure 11 : Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA)	13
Figure 12 : principe de la Résonance Magnétique Nucléaire	15
Figure 13 : Spectromètre à Résonance Magnétique Nucléaire	17
Figure 14 : Filtration par gravité	20
Figure 15 : Filtration sous vide	21
Figure 16 : Filtration sous pression	22
Figure 17 : centrifugation différentielle	27
Figure 18 : Conduite d'une dialyse	30
Figure 19 : Principe de l'électrodialyse	32
Figure 20 : Principe de l'osmose inverse	33
Figure 21 : Conduite d'une chromatographie sur couche mince	37
Figure 22 : Principe de la chromatographie d'exclusion moléculaire	39
Figure 23 : Collecteur de fractions	41
Figure 24 : Séquence des opérations depuis le dépôt de l'échantillon jusqu'à l'établissement du diagramme d'élution	41
Figure 25 : Principe de la chromatographie échangeuse d'ions	43
Figure 26 : Principe de chromatographie d'affinité	47
Figure 27 : Principe d'une chromatographe en phase gazeuse	49
Figure 28 : Principe de l'électrophorèse	53
Figure 29 : Principe de l'isoélectrofocalisation	59
Figure 30 : Principe de l'électrophorèse Bidimensionnelle	60

Figure 31 : Principe d'immunoélectrophorèse	62
Figure 32 : Principe des méthodes de marquage isotopique	63
Figure 33 : Réactions Antigène-Anticorps avec marquage	65
Figure 34 : Dosage radio-immunologique par compétition	66
Figure 35 : Dosage radio-immunologique Sandwich	67
Figure 36 : Techniques ELISA	68
Figure 37 : ELISA directe	69
Figure 38 : Détection par western blot	69
Figure 39 : diagramme de la technique Dot blot	70
Figure 40 : Technique Elispot	70
Figure 41 : Microscope électronique	72
Figure 42 : Principe de la microscopie électronique à transmission	73
Figure 43 : Composants d'un microscope électronique à transmission	74
Figure 44 : Observation au microscope électronique à transmission de Vésicules sécrétés par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produisant CprA	75
Figure 45 : Principe d'un microscope électronique à balayage	76
Figure 46 : Composants d'un MEB	77
Figure 47 : Observation d'<i>Helicobacter bilis</i> au microscope électronique à balayage	77

Chapitre 1 : Méthodes spectrales

1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

1.1. Définition

La spectrophotométrie est une technique d'analyse quantitative permettant de déterminer l'absorbance, ou densité optique, d'une substance chimique en solution.

L'absorbance mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. On utilise aussi les termes densité optique, opacité ou d'extinction selon les domaines.

Les rayonnements les plus couramment utilisés en spectrophotométrie sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). Le domaine de l'UV-visible, étudié depuis longtemps, est essentiel pour explorer la nature des liaisons chimiques, bien qu'il fournisse peu d'informations sur la structure moléculaire. De ce fait, son utilisation est aujourd'hui principalement axée sur l'analyse quantitative des substances, conformément à la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un **spectrophotomètre** préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

1.2. Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique est la description de l'ensemble des rayonnements électromagnétiques classés par fréquence, longueur d'onde. Le spectre électromagnétique s'étend théoriquement de zéro à l'infini en fréquence (ou en longueur d'onde), de façon continue.

On le divise en plusieurs grandes classes de rayonnement, qui s'étudient par des moyens particuliers à chacune d'entre elles.

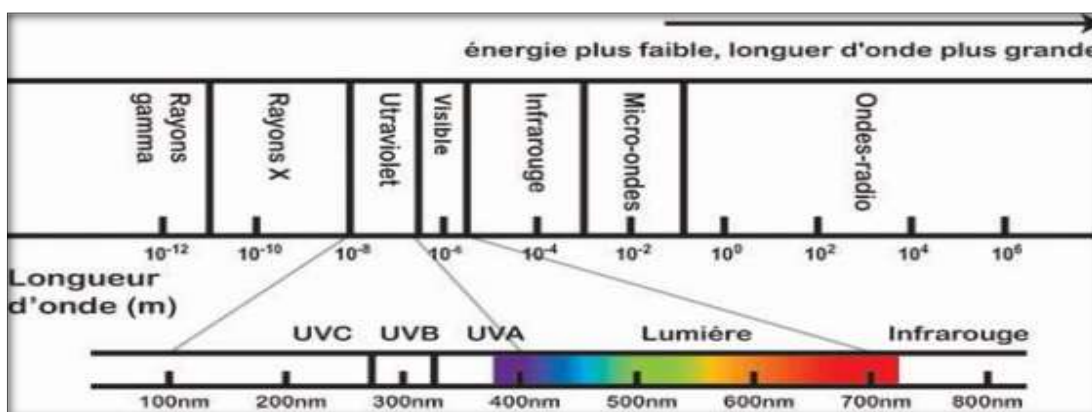


Figure 1 : Spectre électromagnétique

1.3. Le rayonnement ultraviolet (UV)

Les UV, également appelé lumière noire, parce qu'il n'est pas visible à l'œil nu, est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible, mais plus longue que celle des rayons X (**190 à 400 nm**). Il ne peut être observé qu'indirectement, soit par fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés.

1.4. Domaine UV- visible

Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet et du visible.

- Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm.
 - Visible : 400 nm (indigo) -800 nm (rouge).
 - Proche-UV : 200 nm -400 nm
 - UV-lointain : 10 nm- 200 nm

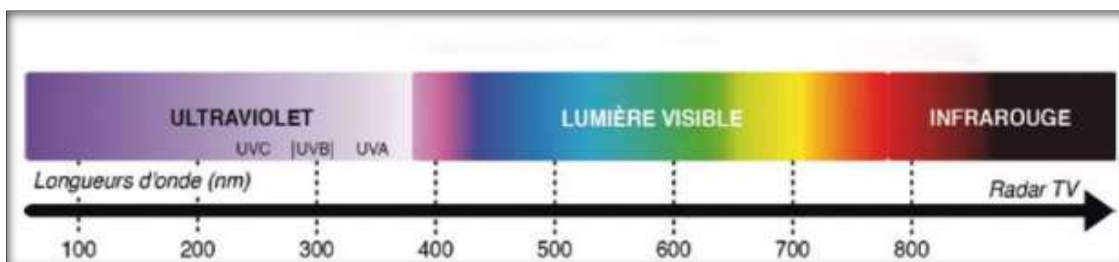


Figure 2 : Domaine UV-Visible

1.5. Principe

Considérons une cuve à faces parallèles remplie d'un liquide absorbant (**Figure 3 et 4**). Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique, correspondant à la couleur de la solution, traverse celle-ci, une partie du rayonnement est absorbée, tandis que le reste est transmis, donnant ainsi la couleur observée. Si I_0 représente l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière transmise après avoir traversé la solution colorée, la relation qui les lie est décrite par la loi de Beer-Lambert.

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

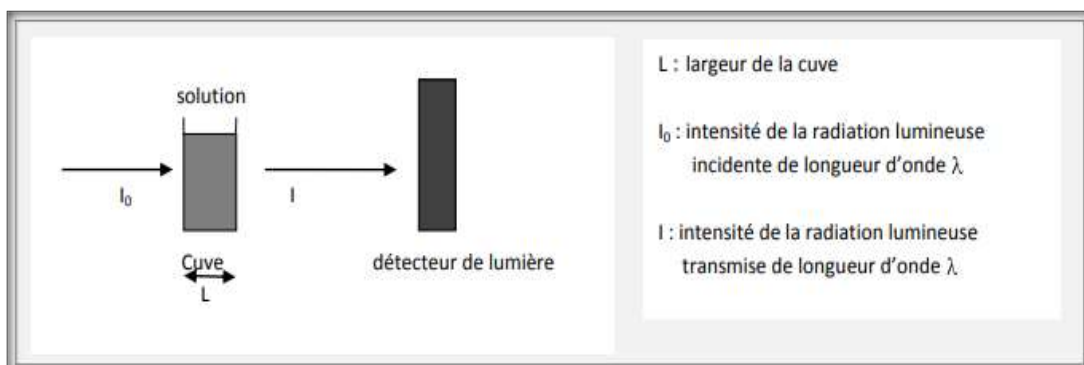


Figure 3 : Principe de la spectrophotométrie

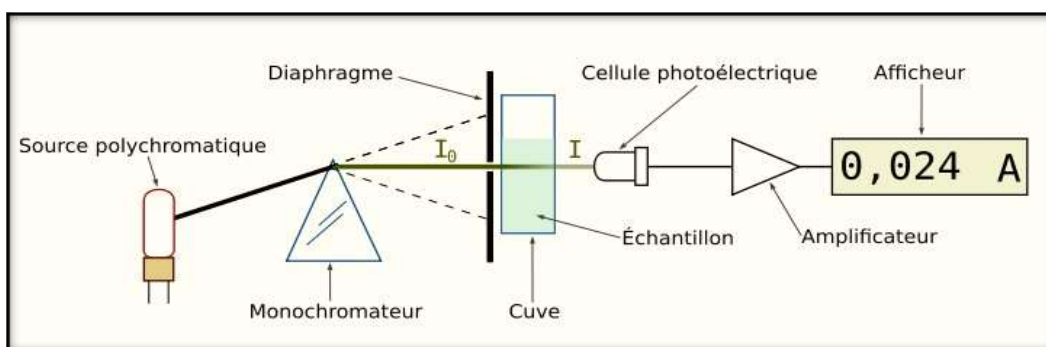


Figure 4 : Mesure d'absorbance d'un échantillon

1.6. Loi de Beer Lambert

La loi de Beer-Lambert est une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse. La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique. Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$

- A_λ est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde λ ;
- c (en mol.L^{-1}) est la concentration de l'espèce absorbante ;
- l (en cm) est la longueur du trajet optique ;
- ε_λ (en $\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce

absorbante en solution. Ce coefficient dépend de :

- La nature de la substance
- La longueur d'onde λ de la lumière
- La nature du solvant
- La température

a. Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

- La lumière utilisée est monochromatique
- La concentration n'est pas trop élevée : $c \approx 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$
- La solution n'est pas fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions
- La dilution n'entraîne pas un déplacement de l'équilibre chimique :
$$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} \text{ (orange)} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{HCrO}_4^- \text{ (incolore en milieu acide)}$$
- La solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entraîneraient une diffusion de la lumière)

1.7. Types & appareillage

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre est constitué de cinq parties :

- Les lampes halogènes ou deutérium destinées à fournir de la lumière
- Un monochromateur servant à isoler la longueur d'onde d'intérêt et éliminer le rayonnement secondaire non désiré
- un compartiment permettant de recevoir la solution échantillon
- Un détecteur destiné à recevoir la lumière transmise et qui la convertit en un signal électrique
- Un dispositif d'affichage numérique permettant d'indiquer l'absorbance ou la transmittance. Le schéma ci-dessous illustre la relation entre ces différentes parties

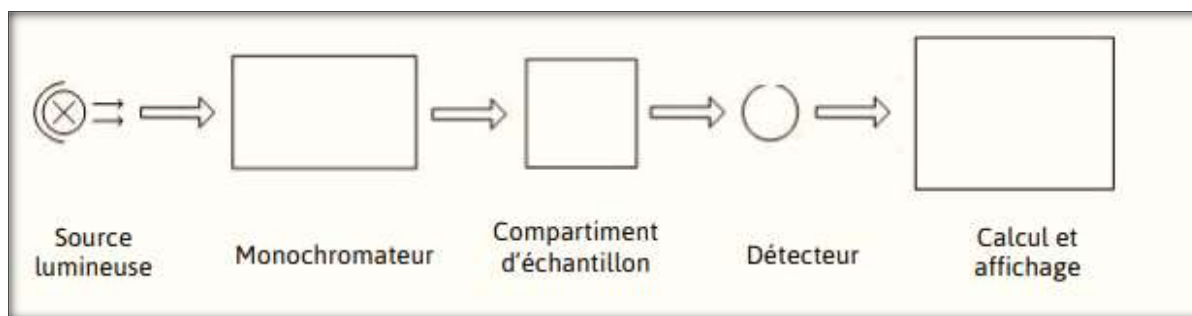


Figure 5 : Appareillage du spectrophotomètre d'absorption moléculaire

Dans le spectrophotomètre, la lumière provenant de la lampe est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur, où le miroir de collimation dirige le faisceau vers le réseau. Le réseau de diffraction disperse le faisceau de lumière pour produire le spectre, dont une partie est focalisé sur la fente de sortie du monochromateur par un miroir de collimation. De là, le faisceau est transmis à un compartiment d'échantillon à travers l'un des filtres, ce qui permet d'éliminer les rayonnements secondaires parasites venant du réseau de diffraction. À la sortie du compartiment d'échantillon, le faisceau est transmis à la photodiode de silicium, grâce auquel il produit un signal électrique qui est affiché sur l'écran à affichage numérique.

1.8. Applications

Cette méthode optique est utilisée essentiellement dans trois buts :

- Doser un composé
- Mettre en évidence une réaction enzymatique par exemple, mettant en jeu des réactifs ayant un pic d'absorption spécifique,
- Identifier un composé

a. Dosage d'un composé

- **Mesure de la concentration :**

En connaissant le spectre d'absorption d'une espèce chimique, il est possible de mesurer la longueur d'onde λ_{max} , les variations de l'intensité I d'un faisceau lumineux traversant une solution de même épaisseur l , mais de concentrations différentes, à une longueur d'onde spécifique. Ces mesures permettent de tracer expérimentalement la courbe $A = f(c)$ représentant l'absorbance en fonction de la concentration de la substance étudiée $l = 1cm$. Cette courbe, appelée courbe d'étalonnage, sert de référence pour déterminer la concentration A d'échantillons inconnus en spectrophotométrie.

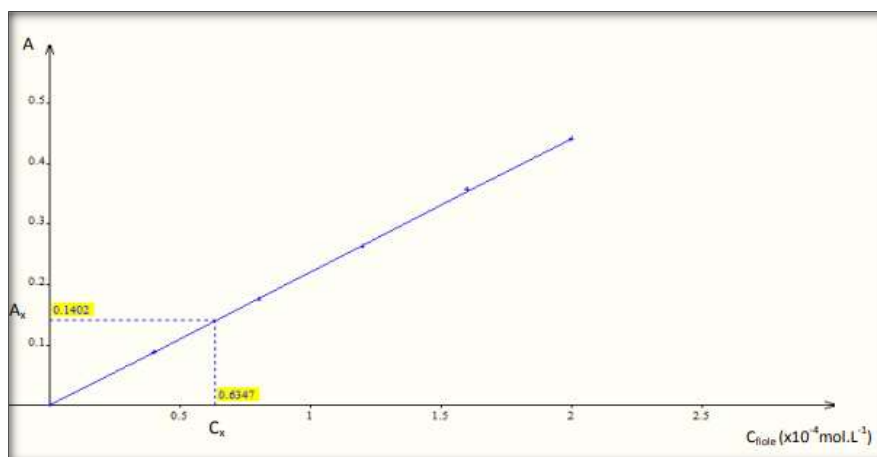


Figure 6 : Détermination de la concentration sur la courbe d'étalonnage

b. Mesure de la réaction enzymatique

Lorsqu'au cours d'une réaction chimique dont on veut étudier la cinétique de l'une des espèces chimique en solution, on peut par spectrophotométrie d'absorption suivre la concentration de cette espèce. Si cette espèce est un réactif, l'absorbance de la solution diminue au cours du temps. Si au contraire, c'est un produit de la réaction, l'absorbance de la solution augmente au cours du temps.

c. Identification d'un composé

De nombreuses substances biologiques ont un spectre caractéristique ce qui signifie qu'elle absorbe les différentes radiations selon une modalité qui varie d'une substance à l'autre. ainsi Loxy hémoglobine absorbe fortement les radiations vertes (578 nm); les protéines du fait des acides aminés aromatiques, acides nucléique absorbe fortement les radiation ultraviolettes à 280 nm.

Cette approche nécessite l'analyse de l'échantillon à différentes longueurs d'onde du spectre. L'analyse spectrale est rendu actuellement facile par l'existence de spectrophotomètre enregistreur automatique qui balaye rapidement la totalité du spectre

La composition de la solution à analyser peut influencer sur le spectre d'absorption et pratiquement vrai pour les composés contenant des groupements ionisables sur adjacent à leur centre chromophores exemple adénine et uracile.

De tels composés présentent des changements remarquables dans leur spectre d'absorption en fonction du pH par conséquent tous les spectres d'absorption doivent être accompagnés du pH et de la composition saline au moment de l'essai

2. Fluorimétrie :

La fluorescence est un phénomène d'émission de lumière par des molécules sans production de chaleur. Ce processus s'accompagne d'une terminologie spécifique, distinguant les types d'émission, comme la fluorescence et la phosphorescence, ainsi que les différentes formes d'excitation, telles que la chimiluminescence, la bioluminescence, la radioluminescence, la cathodoluminescence, la photoluminescence et la thermoluminescence.

Les fluorochromes, ou fluorophores, sont des composés chimiques capables d'émettre de la lumière fluorescente après avoir été excités par un rayonnement approprié. La fluorimétrie est la discipline qui étudie cette émission lumineuse, qu'elle se produise en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons situés dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet, en fonction des propriétés du fluorophore.

2.1.Principe :

Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de 10^{-12} seconde.

La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne (retour direct à l'état fondamental) ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence. En effet, L'énergie émise est en général inférieure à l'énergie d'excitation. Cela provient du fait que le centre retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. Cette différence est appelée déplacement de Stokes. Le spectre d'émission (intensité d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du photon émis) dépend de la nature de la molécule fluorescente et des interactions mises en jeu entre cette molécule et son voisinage.

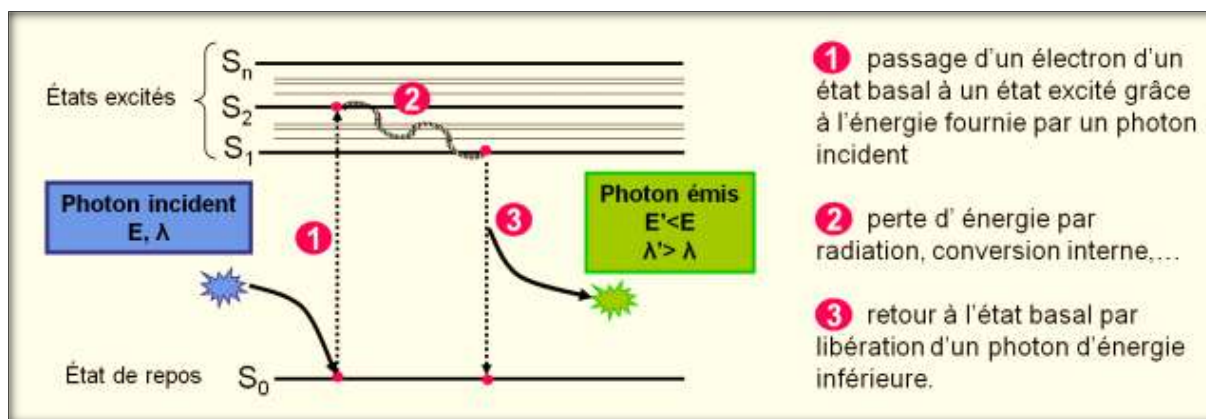


Figure 7 : Diagramme de Jablonski

2.2. Mesure de la fluorescence

2.2.1. Mesure de spectre en excitation

On règle le monochromateur d'émission sur une longueur d'onde bien choisie. On obtient le spectre d'excitation en faisant varier la longueur d'onde du monochromateur d'excitation. On mesure l'intensité émise en fonction de la longueur d'onde du monochromateur d'excitation. Le spectre est normalement le même qu'en absorption classique.

2.2.2. Mesure de spectre en émission excitation ou spectre de fluorescence

On règle le monochromateur d'excitation sur la valeur choisie. On obtient un spectre de fluorescence en faisant varier la longueur d'onde du monochromateur d'émission. On analyse ensuite la longueur d'onde émise en fonction de la longueur d'onde incidente.

2.3. Appareil de mesure

Un fluorimètre, tout comme un photomètre, utilise des filtres comme sélecteur de longueurs d'onde.

- Source lumineuse : Lampe au xénon, deutérium, laser
- Monochromateur d'excitation : Sélection de photon d'excitation
- Cuve : Visible : Verre ou plastique UV : Quartz

- Monochromateur d'émission : Sélection de photon d'émission (placé dans une direction perpendiculaire à celle de la source)
- Détecteur : photomultiplicateur

Mesure du faisceau émis perpendiculairement au faisceau incident, pour éviter que la lumière venant de la source ne fausse pas les mesures.

- Système de recueil et d'analyse des données

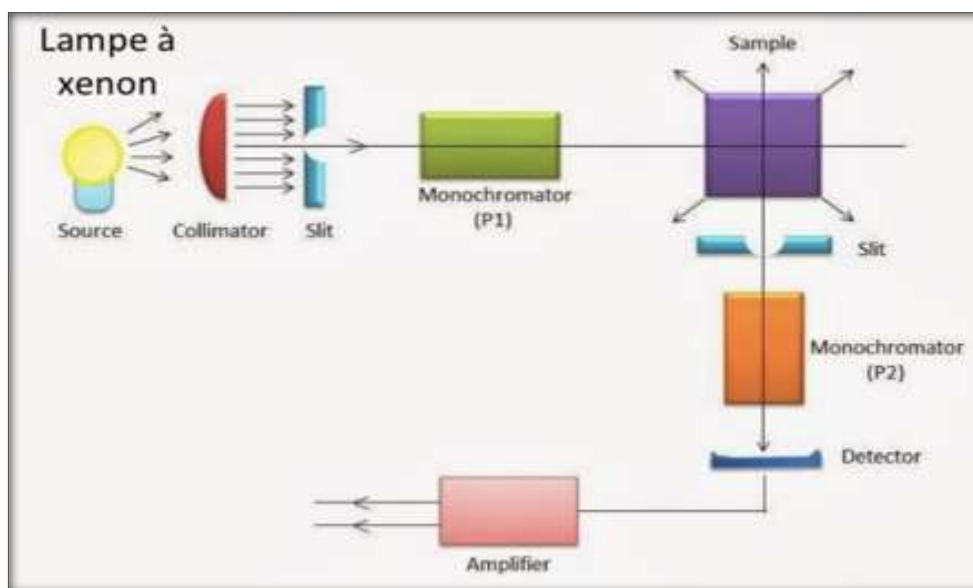


Figure 8 : Schéma représentatif du fluoromètre

3. Spectrométrie d'émission atomique

3.1. Définition :

La photométrie d'émission atomique est une méthode de dosage de certains éléments métalliques. Elle repose sur la capacité des atomes excités à se désexciter en émettant des photons d'une longueur d'onde caractéristique. L'échantillon est introduit dans une flamme (2000–3000 °C) ou un plasma (>7000 °C), qui fournit l'énergie nécessaire à l'excitation. Les flammes permettent surtout le dosage des alcalins (Na, K, Li), de certains alcalino-terreux (Ba) et de quelques autres métaux, tandis que le plasma élargit la gamme des éléments analysables.

3.2.Principe :

En spectrométrie d'émission atomique (SEA), l'échantillon est introduit dans une flamme ou un plasma à très haute température. Cette énergie casse les structures moléculaires et transforme l'élément recherché en vapeur atomique. Les atomes excités passent à des niveaux d'énergie supérieurs puis, en revenant à l'état fondamental, émettent un rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément.

L'intensité du rayonnement est proportionnelle à la concentration de l'analyte. Deux types d'atomiseurs sont utilisés :

- **La flamme** (photométrie d'émission de flamme) pour des températures de 2000–3000 °C.
- **Le plasma** (ICP-OES), gaz ionisé à >7000 °C, permettant un champ d'analyse plus large.

L'atomiseur joue donc un double rôle : produire des vapeurs atomiques et exciter les atomes.

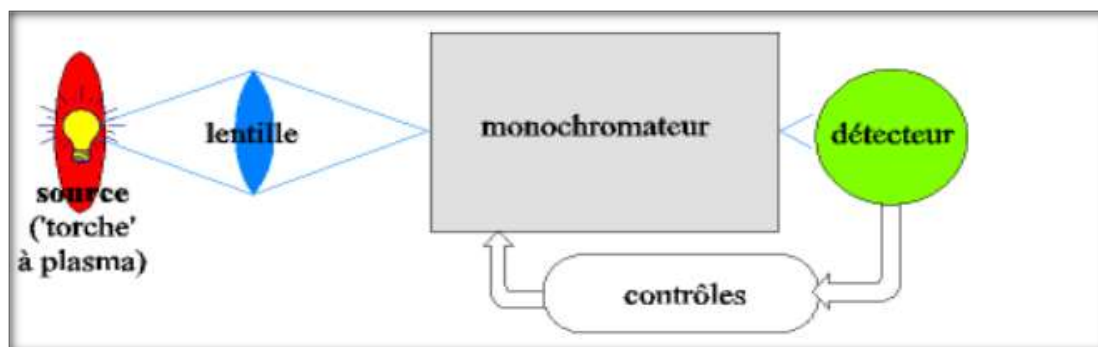


Figure 9 : Principe de la spectrométrie d'émission atomique

3.3.Applications :

Cette méthode d'analyse, devenue incontournable, trouve des applications variées dans les domaines industriel, environnemental, métallurgique, médico-légal ou encore pharmaceutique. Les métaux alcalins, qui produisent des flammes colorées, sont particulièrement faciles à doser par émission, ce qui permet leur utilisation en analyse minérale et en biologie pour la détermination du lithium, du sodium et du potassium (ionogramme), ainsi que de certains alcalino-terreux comme le baryum. Les mesures peuvent être réalisées dans le visible ou l'ultraviolet. En bromatologie, elle sert notamment au contrôle de la teneur en sodium et en calcium dans des produits comme le lait.

4. Spectrophotométrie d'absorption atomique

4.1.Définition :

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est une technique de spectroscopie atomique, principalement utilisée dans le domaine UV-visible pour l'analyse chimique. Elle permet de mesurer la concentration d'environ soixante éléments chimiques (métalliques et non métalliques) à partir d'échantillons liquides. En mode flamme, elle assure le dosage mono-élémentaire des cations majeurs à des concentrations de l'ordre du mg/L.

Son principe repose sur le fait que chaque atome possède une configuration électronique stable appelée état fondamental. Lorsqu'il absorbe de l'énergie lumineuse, l'atome passe à un état excité, instable, et retourne rapidement à son état de base en émettant une énergie lumineuse caractéristique.

4.2.Principe :

La spectrométrie d'absorption atomique en flamme est une méthode d'analyse élémentaire permettant de doser principalement les métaux en solution. Pour être mesurés, les éléments doivent être transformés à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température comprise entre 2000 et 3000 °C afin de détruire les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés.

Le principe repose sur la quantification de l'énergie des atomes. Lorsqu'un électron passe d'une orbite à une autre, l'atome absorbe une quantité d'énergie bien déterminée. En général, ce sont les électrons externes qui sont concernés. Les photons absorbés sont caractéristiques de l'élément présent, et la quantité absorbée est proportionnelle au nombre d'atomes absorbants. Ainsi, la mesure de l'absorbance permet de déterminer la concentration de l'élément étudié.

Cette technique s'appuie sur la loi de Beer-Lambert. Lorsque plusieurs éléments doivent être dosés, l'opération est réalisée séparément pour chacun d'eux, en utilisant une longueur d'onde spécifique et une source de rayonnement adaptée à l'élément recherché.

Les étapes principales de l'analyse par absorption atomique sont les suivantes :

- l'échantillon est transformé en vapeur atomique ;
- les atomes à l'état fondamental absorbent le rayonnement spécifique ;
- l'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité d'atomes de l'élément dosé.

En spectrométrie d'absorption atomique, la formation des vapeurs atomiques peut se faire par

- atomisation par nébulisation dans une flamme
- atomisation électrothermique.

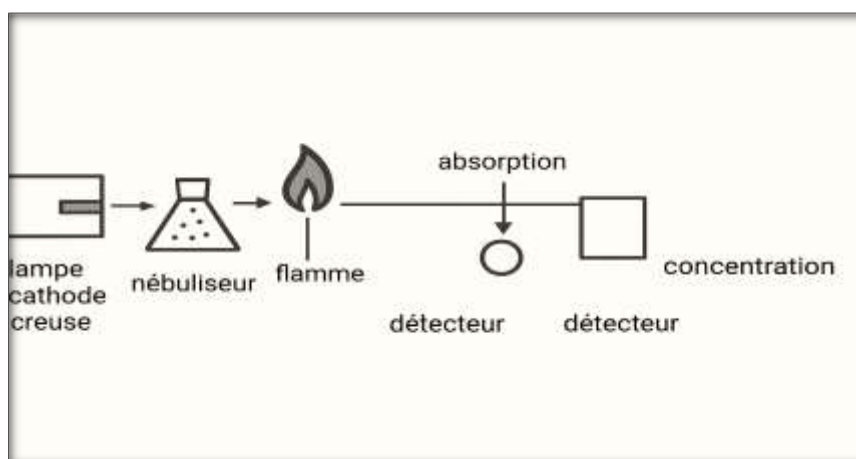


Figure 10 : Principe de la SAA

4.3.Appareillage :

Un spectromètre d'absorption atomique est constitué de plusieurs parties essentielles :

a. Source de rayonnement

La source la plus utilisée est la lampe à cathode creuse. Elle émet un rayonnement monochromatique caractéristique de l'élément à analyser. Chaque élément nécessite une lampe spécifique adaptée.

b. Système de nébulisation et atomisation

- Le nébuliseur transforme l'échantillon liquide en fines gouttelettes (aérosol).
- L'aérosol est introduit dans une chambre de nébulisation, où seule une fraction fine est transportée vers la flamme.
- La flamme (généralement air-acétylène ou protoxyde d'azote-acétylène) agit comme atomiseur : elle évapore le solvant, décompose les sels et libère les atomes libres.

- Dans le cas de l'atomisation électrothermique, un four en graphite est utilisé à la place de la flamme.

c. Système optique

- Le rayonnement issu de la lampe traverse la flamme contenant les atomes libres.
- Un monochromateur sélectionne la longueur d'onde spécifique correspondant à l'élément étudié, éliminant les interférences.

d. Détecteur

- Le plus souvent, il s'agit d'un photomultiplicateur.
- Il mesure l'intensité du rayonnement transmis et convertit le signal lumineux en signal électrique proportionnel à l'absorbance.

e. Système de traitement et d'enregistrement

- L'absorbance est enregistrée puis convertie en concentration à l'aide d'un logiciel ou d'un ordinateur associé à l'appareil.



Figure 11: Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA)

4.4.Applications :

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) permet l'analyse de la majorité des métaux et métalloïdes (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc.) dans les échantillons biologiques, ce qui en fait une technique polyvalente avec un large champ d'applications.

- Détermination des oligo-éléments essentiels (Fe, Zn, Cu, Mn, Mg) nécessaires à la croissance des microorganismes.

- Analyse du rôle des métaux dans l'activité enzymatique des bactéries et champignons.
- Suivi des métaux lourds (Pb, Cd, Hg, Cr) dans des études de toxicité microbienne.
- Étude de l'accumulation des métaux par les microorganismes (biosorption, bioremédiation).
- Contrôle des milieux de culture pour vérifier la présence et la concentration des cations essentiels.

5. Résonance magnétique nucléaire

5.1.Définition :

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique qui repose sur l'interaction des noyaux atomiques possédant un spin avec un champ magnétique externe. Lorsqu'ils sont placés dans ce champ, ces noyaux peuvent absorber une énergie électromagnétique (dans le domaine des ondes radiofréquences) et passer d'un état d'énergie plus bas à un état d'énergie plus élevé. Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission mesurable qui fournit un spectre caractéristique.

Cette technique permet d'obtenir des informations précieuses sur la structure, l'environnement chimique et la dynamique des molécules. Elle est largement utilisée pour l'identification et la caractérisation des composés organiques, l'étude des biomolécules (protéines, acides nucléiques), ainsi que dans le contrôle de la pureté des échantillons.

5.2.Principe :

La résonance magnétique nucléaire repose sur le comportement de certains noyaux atomiques qui possèdent un **moment magnétique**

a. **Alignement dans un champ magnétique externe**

- Lorsqu'un échantillon est placé dans un champ magnétique puissant (B_0), les noyaux se comportent comme de petits aimants et s'orientent selon le champ.
- Deux états d'énergie sont possibles : un état de basse énergie (parallèle au champ) et un état de haute énergie (antiparallèle au champ).

b. **Excitation par une onde radiofréquence**

- Si on applique une impulsion d'ondes radio (RF) d'une fréquence correspondant à la différence d'énergie entre ces deux états, les noyaux absorbent cette énergie et passent à l'état excité.
- c. **Retour à l'état fondamental (relaxation)**
- Les noyaux excités reviennent ensuite à leur état de base en libérant une énergie mesurable sous forme de signal.
- d. **Analyse du signal**
- Le signal enregistré (spectre RMN) dépend de l'environnement chimique des noyaux.
 - Il fournit des informations précises sur la structure et l'organisation des molécules.

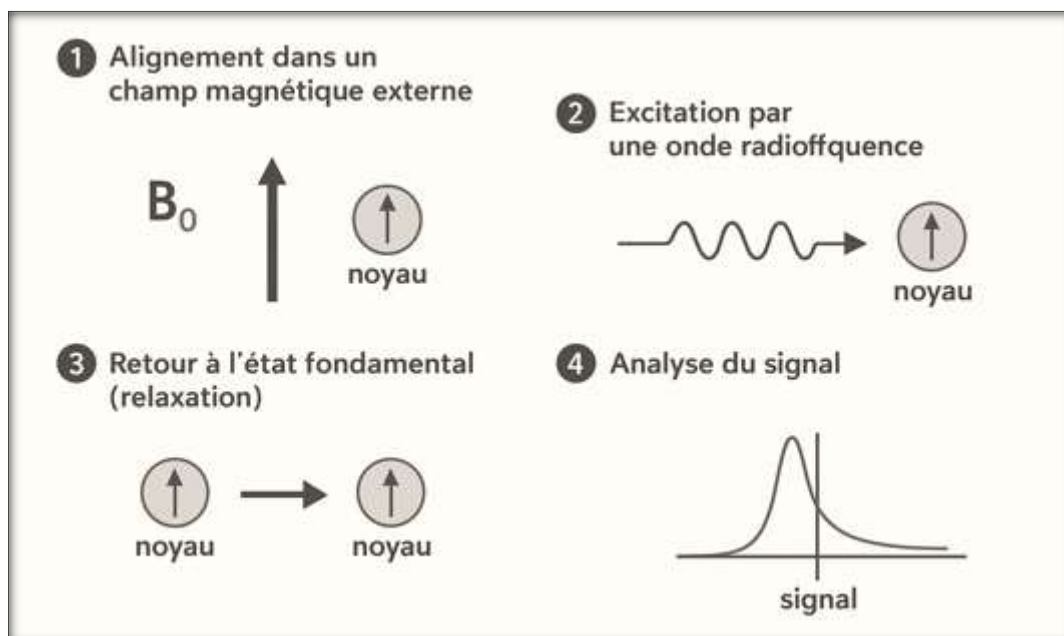


Figure 12 : principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

5.3.Appareillage :

Un spectromètre RMN est constitué de plusieurs parties essentielles :

a. **L'aimant supraconducteur**

- Élément central de l'appareil.
- Produit un champ magnétique intense et homogène (généralement entre 200 et 900 MHz en fréquence de résonance pour ^1H).

- Il est refroidi avec de l'hélium et de l'azote liquides pour maintenir la supraconductivité.
- b. Le système de sonde et la bobine de radiofréquence (RF)**
- Situés au centre de l'aimant, là où l'échantillon est placé dans un tube de RMN.
 - Les bobines envoient des impulsions de radiofréquences pour exciter les noyaux et reçoivent le signal de résonance émis lors de la relaxation.
- c. Le système de shim**
- Ensemble de bobines additionnelles permettant de corriger les petites inhomogénéités du champ magnétique afin d'obtenir un signal net.
- d. Le générateur et l'amplificateur de radiofréquence**
- Produisent les impulsions radio nécessaires pour exciter les noyaux.
- e. Le détecteur et le système de traitement du signal**
- Le signal émis par les noyaux (appelé FID : Free Induction Decay) est enregistré.
 - Un ordinateur applique une transformée de Fourier pour convertir ce signal en spectre RMN exploitable.
- f. L'unité de contrôle et d'analyse informatique**
- Interface logicielle qui permet de programmer les séquences d'impulsions, de contrôler l'aimant et de traiter les spectres obtenus.

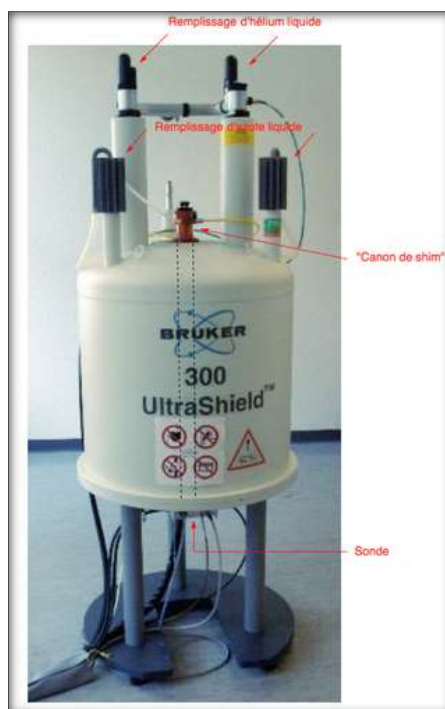


Figure 13 : Spectromètre à Résonance Magnétique Nucléaire

5.4.Applications :

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique très utilisée en microbiologie moderne car elle fournit des informations structurales et fonctionnelles sur les biomolécules.

Ses principales applications sont :

- Analyse des métabolites
- Étude des parois et membranes microbiennes
- Caractérisation des protéines microbiennes
- Étude des interactions microbe–microbe ou microbe–hôte
- Suivi de la fermentation et de la production de biomolécules

Chapitre 2 : Méthodes de fractionnement

1. Filtration

La filtration permet de séparer physiquement un solide d'un liquide en faisant passer le mélange à travers un filtre adapté. Les particules solides sont retenues dans le filtre, tandis que le liquide traverse et est recueilli dans un récipient distinct.

I.1. Définition et principe

La filtration est une opération unitaire de séparation qui vise à isoler une phase fluide (liquide ou gazeuse) des particules solides ou liquides qui y sont dispersées en suspension. Elle consiste à faire passer le mélange hétérogène à travers un milieu poreux appelé filtre, capable de retenir les particules dont la taille est supérieure au diamètre de ses pores. La phase fluide traverse alors le filtre et constitue le filtrat, tandis que les particules solides demeurent retenues à la surface ou dans l'épaisseur du milieu filtrant.

Le filtre peut être constitué de matériaux très variés : papier spécial, membranes de cellulose ou de polymères synthétiques, tissus, toiles métalliques, sable, fibres de verre, céramique ou métal fritté. Dans certains cas, les particules retenues forment elles-mêmes un dépôt appelé gâteau filtrant, qui agit comme une seconde barrière en augmentant la capacité de rétention, mais qui ralentit le passage du fluide.

Le principe de la filtration repose essentiellement sur une action mécanique assimilée à un tamisage :

- les particules de grande taille sont retenues à la surface du filtre,
- les particules plus fines peuvent être piégées dans les canaux du milieu filtrant,
- la phase fluide et les éléments de très petite taille (molécules, ions) passent librement à travers.

L'efficacité et la vitesse de la filtration dépendent de plusieurs facteurs :

- la nature et la porosité du filtre,
- les propriétés du fluide (viscosité, température, volume),
- la taille et la concentration des particules en suspension,
- le mode de filtration :
 - filtration gravitaire (par simple écoulement sous l'effet du poids du liquide),

- filtration sous vide (accélérée par dépression),
- filtration sous pression (fluide forcé à traverser le filtre).

En microbiologie, la filtration occupe une place essentielle car elle permet non seulement de clarifier des solutions, mais aussi de réaliser une stérilisation à froid. Les filtres à membranes de très faible porosité (0,22 μm) retiennent efficacement bactéries, levures et moisissures, ce qui permet d'obtenir des solutions stériles sans les altérer par la chaleur (vitamines, antibiotiques, sérums, enzymes, etc.). On distingue également plusieurs échelles de filtration selon la finesse des pores : microfiltration (micromètres), ultrafiltration (macromolécules, colloïdes), nanofiltration et osmose inverse (petites molécules et ions).

Ainsi, la filtration constitue une méthode polyvalente de séparation et de stérilisation, indispensable aussi bien dans les laboratoires de microbiologie que dans de nombreux secteurs industriels (agroalimentaire, pharmaceutique, biotechnologique).

1.2.Type de filtration

Il existe trois types de filtration :

- ✓ Filtration gravimétrique
- ✓ Filtration sous vide
- ✓ Filtration sous pression

a) Filtration gravimétrique (filtration par gravité)

La filtration gravimétrique est l'une des méthodes les plus simples et les plus anciennes de séparation solide/liquide. Elle repose uniquement sur la force de la gravité, sans recours à une pression supplémentaire ni à une aspiration. Cette technique est couramment utilisée en laboratoire pour séparer des particules solides visibles ou en suspension grossière dans un liquide. Bien qu'elle soit moins rapide et moins efficace que d'autres procédés (filtration sous vide, sous pression), elle demeure une méthode pédagogique, économique et suffisante pour des mélanges peu chargés en solides.

- Principe

Le principe de la filtration gravimétrique repose sur l'utilisation de la seule force de gravité pour entraîner le fluide à travers un milieu poreux, généralement un papier filtre placé dans un

entonnoir. Lorsque le mélange hétérogène est versé, le liquide traverse naturellement les pores du filtre sous l'effet de son poids, tandis que les particules solides dont la taille est supérieure à celle des pores sont retenues à la surface ou piégées dans l'épaisseur du papier. Au fur et à mesure de l'opération, ces particules s'accumulent et forment un dépôt appelé « gâteau filtrant », qui améliore la rétention mais réduit la vitesse d'écoulement. Le liquide clarifié, appelé filtrat, s'écoule à travers le filtre et est recueilli dans un récipient. La rapidité et l'efficacité de cette séparation dépendent de la porosité du filtre, de la viscosité du liquide, ainsi que de la taille et de la concentration des particules en suspension.

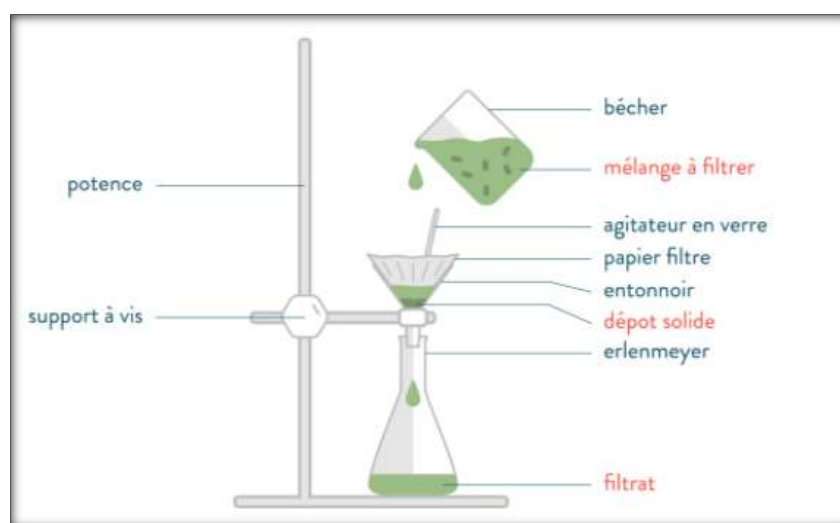


Figure 14 : Filtration par gravité

b) Filtration sous vide

La filtration sous vide est une technique de séparation solide-liquide largement utilisée en laboratoire et en industrie pour accélérer le processus de filtration et améliorer l'efficacité de la récupération des phases. Contrairement à la filtration gravimétrique, qui repose uniquement sur l'action de la gravité, cette méthode utilise une pression réduite créée par une pompe à vide pour forcer le liquide à traverser rapidement le filtre, retenant ainsi les particules solides. Elle permet non seulement de gagner du temps, mais aussi d'obtenir une filtration plus complète et plus nette. Grâce à sa rapidité et sa précision, la filtration sous vide est couramment appliquée dans les domaines de la chimie, de la microbiologie, de la pharmacie et de l'agroalimentaire, notamment pour la préparation d'échantillons, la clarification de solutions et l'isolement de produits solides.

- Principe :

Le principe de la filtration sous vide repose sur la création d'une dépression à l'aide d'une pompe à vide ou d'un dispositif d'aspiration relié à une fiole de Büchner. Cette différence de pression entre l'intérieur de la fiole (pression réduite) et l'extérieur (pression atmosphérique) provoque une aspiration du liquide à travers le milieu filtrant, généralement un papier filtre circulaire disposé sur une plaque perforée dans un entonnoir de Büchner. Les particules solides, trop volumineuses pour traverser les pores du filtre, sont retenues à sa surface et forment un dépôt, tandis que le liquide filtré, appelé filtrat, est rapidement recueilli dans la fiole.

Cette technique présente plusieurs avantages par rapport à la filtration gravimétrique : elle réduit considérablement le temps de filtration, limite les pertes de liquide, améliore la clarté du filtrat et permet un essorage plus efficace du résidu solide. Son efficacité dépend de la qualité du vide appliqué, de la porosité du papier filtre, de la viscosité de la solution et de la quantité de particules solides en suspension.

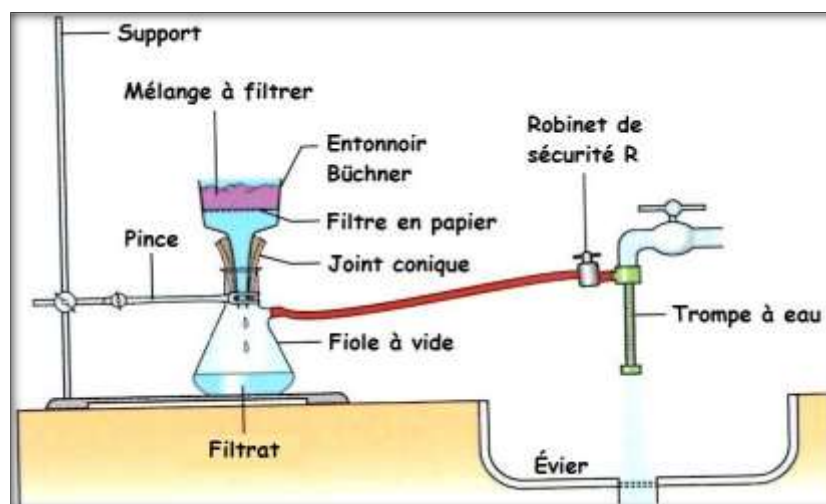


Figure 15 : Filtration sous vide

c) Filtration sous pression

La filtration sous pression est une méthode de séparation des phases solide et liquide qui utilise l'application d'une surpression pour accélérer le passage du liquide à travers un milieu filtrant. Dans cette technique, le mélange hétérogène (suspension solide-liquide) est placé dans un récipient fermé, capable de résister à une pression supérieure

à la pression atmosphérique. L'ajout d'une source de pression, généralement par air comprimé ou par un gaz inerte (comme l'azote), pousse le liquide à travers le filtre, tandis que les particules solides, trop volumineuses pour franchir les pores, restent retenues.

Contrairement à la filtration gravimétrique, limitée par l'action de la gravité, ou à la filtration sous vide, qui repose sur une aspiration par dépression, la filtration sous pression offre un meilleur rendement en augmentant considérablement la vitesse de filtration. Elle est particulièrement avantageuse dans le traitement des liquides visqueux, des suspensions chargées en solides ou des mélanges difficiles à clarifier.

Grâce à sa rapidité, son efficacité et sa capacité à traiter des volumes plus importants ou des échantillons plus complexes, cette technique est largement utilisée dans les laboratoires de recherche, ainsi que dans les industries pharmaceutique, chimique et agroalimentaire, où la pureté et la clarté du filtrat sont des critères essentiels.



Figure 16 : Filtration sous pression

2. Sédimentation

2.1.Définition et principe :

La sédimentation est une opération physique de séparation qui consiste à laisser reposer un mélange hétérogène constitué d'un liquide et de particules solides en suspension, afin que ces dernières se déposent progressivement au fond du récipient sous l'effet de la gravité.

Elle est utilisée pour clarifier un liquide ou concentrer les particules solides, et constitue une étape préliminaire dans de nombreux procédés de traitement et d'analyse, notamment en microbiologie, en chimie et dans le domaine de l'environnement.

Le principe repose sur la différence de densité entre les particules solides et le liquide dans lequel elles sont dispersées. Sous l'action du champ gravitationnel, les particules plus denses que le liquide tend à descendre à une vitesse qui dépend de leur taille, de leur forme, de leur densité et de la viscosité du milieu. Plus les particules sont grosses et lourdes, plus elles sédimentent rapidement, alors que les particules très fines ou colloïdales peuvent rester longtemps en suspension. La sédimentation peut être naturelle (lente, simplement sous l'effet de la gravité) ou accélérée (par centrifugation, qui amplifie la force de gravité et accélère le dépôt).

Ainsi, la sédimentation permet d'obtenir deux phases distinctes dans un même récipient : une phase liquide clarifiée en surface et une phase solide concentrée au fond, appelée sédiment ou dépôt.

2.2. Appareillage & Applications :

L'appareillage dépend de l'échelle (laboratoire ou industrie) et de la finalité recherchée :

a. Au laboratoire

- Éprouvettes graduées et tubes à essai : utilisés pour des sédimentations simples, permettant de mesurer le volume de sédiment formé.
- Centrifugeuses de paillasse : accélèrent la sédimentation grâce à la force centrifuge ; elles existent en modèles :
 - Centrifugeuses simples (pour précipités classiques).
 - Centrifugeuses réfrigérées (pour préserver les échantillons biologiques sensibles).
 - Ultra-centrifugeuses (séparation des macromolécules, virus, organites - cellulaires).

- Colonnes de sédimentation : dispositifs transparents pour observer la vitesse et la dynamique de décantation.

b. À l'échelle industrielle

- Bassins de décantation : vastes réservoirs permettant la décantation des particules lourdes par gravité (traitement des eaux, industrie agroalimentaire).
- Décanteurs lamellaires : structures composées de plaques inclinées augmentant la surface de décantation, ce qui accélère la séparation.
- Clarificateurs : grands appareils circulaires qui séparent les boues des eaux résiduelles.
- Centrifugeuses industrielles : de grande capacité, utilisées pour les suspensions complexes (industries pharmaceutiques, chimiques ou minières).
- Hydrocyclones : exploitent la force centrifuge générée par un flux en spirale pour séparer solides et liquides sans pièces mobiles.

La sédimentation possède des applications transversales dans de nombreux domaines :

- En microbiologie et biologie
 - ✓ Concentration des cellules bactériennes, fongiques ou levuriennes à partir de milieux liquides.
 - ✓ Séparation de fractions cellulaires (noyaux, mitochondries, ribosomes) après lyse des cellules, grâce à l'ultracentrifugation.
 - ✓ Clarification de milieux de culture avant analyses biochimiques.
- En chimie et pharmacie
 - ✓ Séparation de précipités lors de réactions chimiques.
 - ✓ Purification de solutions (élimination des impuretés insolubles).
 - ✓ Préparation de suspensions pharmaceutiques stables en éliminant les particules grossières.
- En environnement

- ✓ Traitement des eaux usées : décantation des matières en suspension (MES) dans des bassins primaires.
- ✓ Clarification de l'eau potable avant filtration et désinfection.
- ✓ Séparation des boues et des sables dans les stations d'épuration.
- En agroalimentaire
 - ✓ Clarification du vin, de la bière et des jus de fruits (séparation des lies, levures mortes ou pulpes).
 - ✓ Élimination des dépôts lors de la production d'huiles végétales.
 - ✓ Décantation des matières grasses ou des suspensions solides.
- En médecine et analyses biomédicales
 - ✓ Test de la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS), indicateur d'un état inflammatoire.
 - ✓ Concentration des cellules dans le sang ou l'urine pour diagnostic.
 - ✓ Isolement de biomarqueurs ou virus par centrifugation spécifique.
- En industrie minière et métallurgique
 - ✓ Séparation des minerais broyés de la pulpe de lavage.
 - ✓ Décantation des boues résiduelles après extraction des métaux.

2.3. Centrifugation et Ultracentrifugation

La centrifugation est une technique utilisée pour séparer les particules présentes dans une solution. En biologie, ces particules peuvent être des cellules, des organites (comme les mitochondries ou les chloroplastes), ou encore de grosses molécules telles que les protéines, les acides nucléiques ou les virus.

Ce procédé repose sur le même principe que la sédimentation, mais de façon accélérée : au lieu de l'action naturelle de la pesanteur ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$), c'est la force centrifuge générée par le rotor d'une centrifugeuse en rotation rapide qui assure la séparation.

On distingue principalement deux types de centrifugation :

- La centrifugation préparative, utilisée pour isoler et récupérer des particules spécifiques.
- La centrifugation analytique, destinée à l'étude et à la mesure des propriétés physiques des particules.

2.3.1. Types et appareillage :

Lorsque la vitesse de rotation est inférieure à 10^4 tours/minute, on parle de centrifugeuse. L'ultracentrifugeuse, quant à elle, peut atteindre des vitesses de 100 000 tours/minute ou plus, générant ainsi un champ gravitationnel artificiel suffisant pour sédimenter des particules ou molécules dont la masse est supérieure à 10 000 daltons.

Les centrifugeuses et ultracentrifugeuses se composent de plusieurs éléments essentiels :

- **Un moteur** capable d'atteindre plusieurs dizaines de milliers de tours par minute.
- **Un rotor**, conçu pour supporter ces vitesses extrêmes (généralement en titane dans le cas des ultracentrifugeuses). Il est muni de logements symétriques destinés à recevoir les tubes contenant les échantillons biologiques.
- **Une enceinte** renfermant le rotor, réfrigérée pour éviter toute élévation excessive de température. Dans les ultracentrifugeuses, cette enceinte est maintenue sous vide poussé afin de réduire la friction de l'air, de contrôler efficacement la température et de limiter les risques de surchauffe. Elle est en outre blindée pour prévenir tout accident en cas d'explosion du rotor.
- **Types de rotors :**
 - **Rotors à angle fixe** : utilisés pour les séparations simples entre le culot (cellules, organites, membranes, protéines) et le surnageant. Ils sont surtout employés dans des protocoles de séparations séquentielles, avec des vitesses de rotation croissantes.
 - **Rotors à godets mobiles** : plus adaptés aux séparations fines. Les godets, suspendus à l'axe du rotor, s'orientent pendant la rotation de manière à rester alignés avec le champ centrifuge. Ce dispositif permet une séparation des particules principalement en fonction de leur densité, notamment grâce à l'utilisation de **gradients de densité**.

a. Centrifugation différentielle :

La centrifugation différentielle est la méthode la plus couramment utilisée pour isoler des structures intracellulaires à partir d'un homogénat. Elle repose sur une succession de centrifugations à des vitesses croissantes, permettant de séparer progressivement les constituants cellulaires en fonction de leur taille et de leur densité.

Le processus débute par le remplissage d'un tube de centrifugation avec l'échantillon en solution. Après une première centrifugation à faible accélération (exemple : 100 g pendant 10 minutes), deux fractions se distinguent :

- un culot contenant les particules les plus lourdes, déposées au fond du tube,
- un surnageant contenant les éléments plus légers qui restent en suspension.

Le surnageant est ensuite récupéré par décantation puis soumis à une nouvelle centrifugation à une vitesse plus élevée (par exemple 20 000 g pendant 20 minutes). Cela permet d'obtenir une nouvelle séparation, avec formation d'un culot supplémentaire et d'un nouveau surnageant.

Le culot peut également être remis en suspension dans un volume réduit de solvant approprié et centrifugé à des vitesses encore plus élevées (exemple : 80 000 g pendant 1 à 2 heures, puis 150 000 g pendant 3 à 5 heures). Cette série d'étapes successives aboutit au fractionnement des constituants cellulaires.

Cependant, cette technique d'ultracentrifugation présente des limites. Elle ne permet pas de séparer parfaitement tous les organites intracellulaires : ainsi, les fractions mitochondriales et lysosomales sont souvent obtenues mélangées, sans distinction complète. Ce type de centrifugation utilise des rotors à angle fixe.

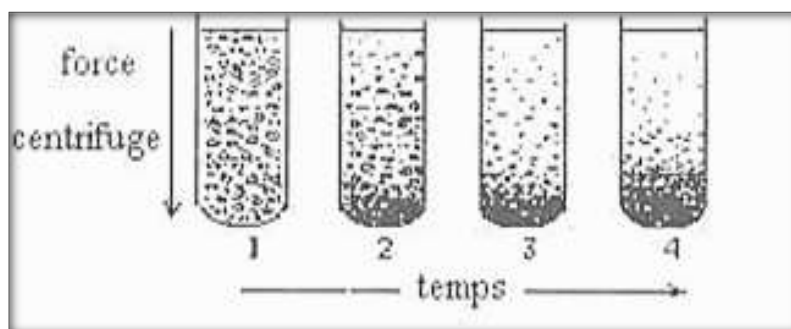


Figure 17 : centrifugation différentielle

➤ Il existe deux méthodes de centrifugation en gradient de densité :

- **Centrifugation de zone ou zonale :**

Dans cette technique, un faible volume de suspension contenant les particules à analyser est déposé sur une colonne de gradient de densité préformée.

Généralement, on prépare un gradient continu de saccharose (par exemple de 5 à 45 %) dans un tube en plastique. Ce gradient est obtenu en mélangeant progressivement une solution concentrée de saccharose avec de l'eau, de façon à ce que la densité soit maximale au fond du tube et minimale à sa surface. L'échantillon à séparer est alors placé au sommet du gradient.

Le tube est ensuite centrifugé, souvent dans un rotor à godets mobiles en position horizontale, à des vitesses et pendant des durées variables selon l'objectif recherché. Chaque particule migre dans le gradient à une vitesse qui dépend essentiellement de sa masse, mais aussi de sa densité et de sa forme. Ce processus conduit à la formation de bandes distinctes ou zones correspondant aux différents types de particules.

La centrifugation est généralement interrompue lorsque l'équilibre est atteint. La localisation des bandes peut être réalisée par observation optique ou en perçant délicatement le fond du tube afin de recueillir son contenu en fractions successives dans de petits tubes, qui seront ensuite analysés. Par exemple, la teneur en protéines de chaque fraction peut être évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm, ce qui permet de répartir les protéines selon leur masse.

Le tube peut également être congelé puis découpé en fines couches pour une analyse ultérieure.

Cette technique est principalement utilisée pour séparer les molécules d'ADN, d'ARN ou encore les structures ribonucléoprotéiques, en fonction de leur taille.

- **Centrifugation isopycnique :**

Ce type de centrifugation repose sur l'utilisation d'une solution très dense, généralement un sel comme le chlorure de césium 6 M, dans laquelle est mélangé l'échantillon à séparer. Sous l'effet de la centrifugation, le chlorure de césium forme un gradient de concentration stable du sommet vers le fond du tube. Ce gradient s'accompagne d'une variation

progressive de la densité, qui atteint un état d'équilibre après un certain temps, dépendant de la vitesse de rotation, de la hauteur de la colonne de liquide, de la nature du sel et de la température.

Lorsqu'une particule est placée dans ce milieu, elle migre jusqu'à la position où sa densité est exactement égale à celle de la solution. Elle y forme alors une bande plus ou moins étroite : on dit que les particules sont isopycniques par rapport au milieu. Des tables de densité permettent de prévoir la position des particules (organites, vésicules membranaires, etc.) et de concevoir un gradient adapté pour les séparer efficacement.

Si l'on centrifuge deux espèces de macromolécules ayant des densités apparentes différentes, elles se placent à des niveaux distincts dans le tube. La séparation repose donc sur leur densité apparente et non sur leur coefficient de sédimentation. Même dans un champ gravitationnel très intense, les particules ne dépassent jamais la région dont la densité correspond à la leur.

Les gradients de densité sont établis avec des composés très solubles capables de modifier fortement la masse volumique du milieu. Le plus utilisé est le chlorure de césium (CsCl), qui forme un gradient stable : la concentration en ions Cs^+ (accompagnés de Cl^- pour équilibrer les charges) est plus élevée au fond qu'au sommet. Typiquement, la densité varie d'environ 0,02 mg/ml entre le haut et le bas du tube. Dans une solution de CsCl, les protéines ont une densité d'environ 1,3 g/ml, l'ADN entre 1,6 et 1,7 g/ml, et l'ARN entre 1,75 et 1,8 g/ml, ce qui permet de les séparer facilement.

Les ions Cs^+ se lient aux groupes phosphate de l'ADN, et dans l'ARN aux groupes phosphate ainsi qu'aux fonctions hydroxyles des riboses, ce qui explique la densité plus élevée de l'ARN par rapport à l'ADN. Pour la séparation des protéines ou des organites, on utilise plutôt des gradients de saccharose ou de dextran.

Cette méthode de centrifugation à l'équilibre offre une très haute résolution et s'avère particulièrement utile pour distinguer des macromolécules marquées par des isotopes lourds (comme ^{15}N ou ^{14}C) de celles contenant les isotopes légers habituels (^{14}N ou ^{12}C). Ainsi, lorsqu'on cultive des cellules dans un milieu enrichi en acides aminés ou nucléosides marqués, on peut séparer les molécules synthétisées avant et après l'incorporation de ces isotopes.

3. Dialyse et électrodialyse :

La dialyse et l'électrodialyse sont des techniques de séparation basées sur la diffusion sélective à travers une membrane semi-perméable. Elles permettent d'éliminer les petites molécules ou les ions d'une solution tout en retenant les macromolécules. La dialyse repose uniquement sur un gradient de concentration, tandis que l'électrodialyse utilise un champ électrique pour accélérer le déplacement des ions à travers des membranes échangeuses d'ions. Ces méthodes sont largement employées en biochimie, en traitement des eaux et dans la purification des solutions biologiques.

3.1. Concentration par dialyse :

La dialyse est une méthode de purification permettant de séparer des molécules selon leur taille, par diffusion à travers une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Elle est principalement utilisée pour concentrer une solution biologique (en éliminant une partie du solvant) ou pour dessaler une solution protéique (en retirant les ions).

En biochimie, les membranes de dialyse se présentent généralement sous forme de tuyaux allongés fermés aux deux extrémités, appelés boudins de dialyse (Figure 18). La solution à traiter est introduite dans ce sac, qui est ensuite immergé dans un récipient contenant le liquide de contre-dialyse (souvent de l'eau ou un autre solvant approprié).

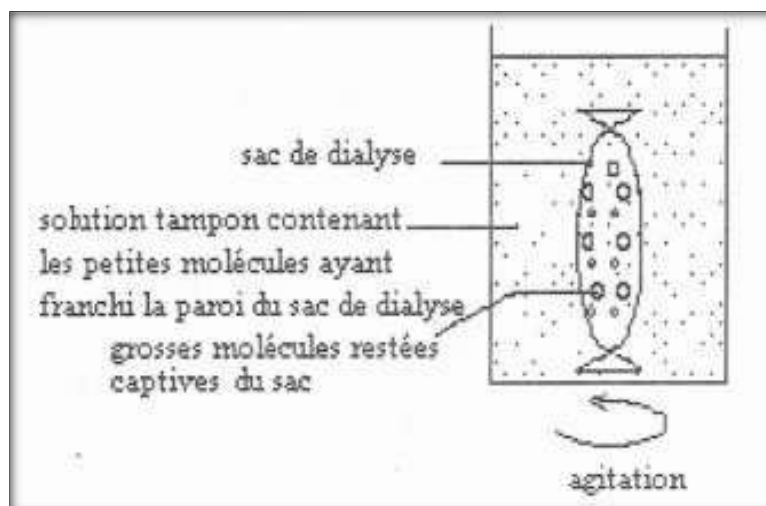


Figure 18 : Conduite d'une dialyse

Au cours de la dialyse, l'eau ainsi que les petites molécules diffusent librement à travers la membrane, tandis que les macromolécules, non dialysables, demeurent à l'intérieur du sac où elles se concentrent progressivement. Le processus peut durer plusieurs heures, voire plusieurs jours, selon le niveau de concentration recherché. L'équilibre est atteint lorsque la concentration des petites molécules devient identique dans les deux compartiments : la solution à dialyser et le liquide de contre-dialyse.

La vitesse de diffusion d'une substance à travers la membrane dépend de plusieurs facteurs, tels que sa nature chimique, la température, l'agitation, le pH ainsi que la surface d'échange.

Bien que la dialyse nécessite un matériel simple et peu onéreux, elle présente l'inconvénient d'être un procédé lent.

3.2.Electrodialyse :

L'électrodialyse est une méthode de séparation similaire à la dialyse, mais elle repose sur l'application d'un champ électrique qui accélère le passage des ions à travers des membranes sélectives. Lorsqu'un courant de quelques milliampères est appliqué, les anions migrent vers la cathode et les cations vers l'anode, permettant ainsi l'élimination des ions minéraux tout en conservant les molécules organiques.

Le système est constitué d'une cuve à trois compartiments : le compartiment central renferme la solution à traiter, tandis que les deux compartiments latéraux séparés du centre par des membranes hémiperméables contiennent respectivement l'anode (milieu anodique) et la cathode (milieu cathodique). Sous l'effet du champ électrique, les ions quittent le compartiment central pour rejoindre les compartiments latéraux correspondant à leur charge, ce qui entraîne leur concentration en dehors de la solution à purifier. Une faible tension, généralement autour de 2 volts, est suffisante pour assurer l'efficacité du procédé. L'électrodialyse est notamment utilisée en industrie laitière pour la déminéralisation et la désacidification.

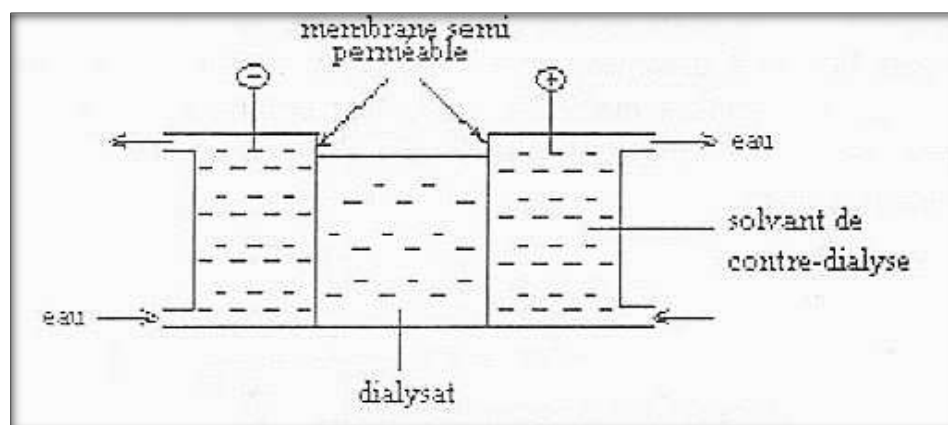


Figure 19 : Principe de l'électrodialyse

3.3. Osmose :

L'osmose est un phénomène physique correspondant au transfert d'eau à travers une membrane hémiperméable séparant deux solutions de concentrations différentes. Le solvant, généralement l'eau, se déplace de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée jusqu'à ce que la pression exercée sur cette dernière atteigne une valeur d'équilibre appelée pression osmotique (P_o). Les solutés, pour leur part, ne traversent pas la membrane et restent dans leur compartiment initial.

3.4. Osmose inverse :

Technique de séparation très fine, l'osmose inverse repose sur le transfert d'eau entre deux solutions de concentrations différentes, séparées par une membrane semi-perméable. Ce transfert se produit « à l'envers » grâce à l'application d'une pression osmotique artificielle élevée (30 à 80 bars), qui s'oppose au flux osmotique naturel allant de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée. Sous cette pression, seule l'eau traverse la membrane, tandis que les particules contaminants de faible masse moléculaire (solides dissous, bactéries, etc.) sont retenues.

La pression osmotique augmente avec la concentration de la solution et diminue lorsque la masse molaire des particules est élevée. Ce procédé permet une concentration sans élévation de température. Bien que le débit soit relativement faible, il peut être amélioré en utilisant des membranes de grande surface (voir Figure 20).

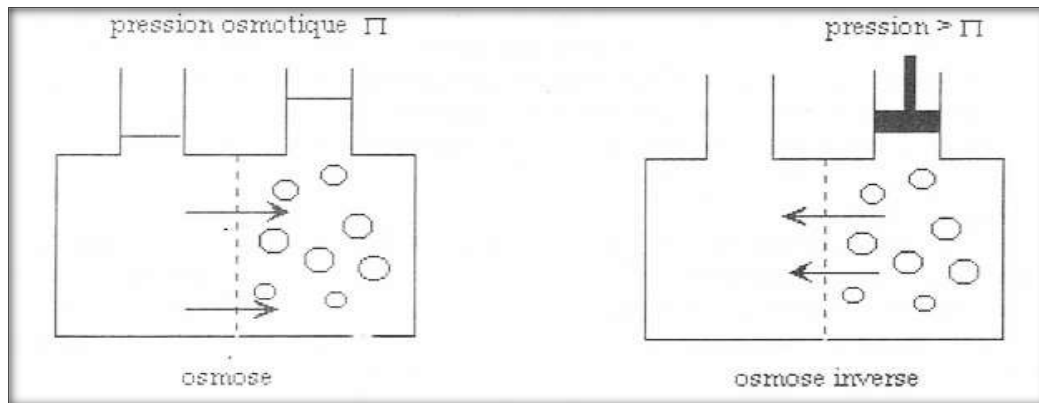


Figure 20 : Principe de l'osmose inverse

- Exemples d'applications :

- ✓ Dessalement Des Eaux Saumâtres,
- ✓ En Industrie Laitière : Concentration Du Lactosérum, Du Lait Ecrémé Et Du Lait Entier,
- ✓ Concentration Des Substances Actives (Antibiotiques, Acides Aminés, Vitamines, Etc.),
- ✓ Purification Et Concentration Des Arômes Naturelles,
- ✓ Concentration Des Jus De Fruits,
- ✓ Pratique Médicale.

4. Méthodes chromatographiques

Le terme chromatographie désigne un ensemble de techniques physico-chimiques universelles, utilisées aussi bien en laboratoire que dans l'industrie, pour permettre la séparation, plus ou moins sélective, et l'identification des différents constituants d'un mélange.

Le principe fondamental de la chromatographie repose sur la différence de répartition des composés entre deux phases non miscibles présentes dans le système : une phase mobile et une phase stationnaire. Les constituants du mélange interagissent différemment avec la phase stationnaire : certains y sont plus fortement retenus, tandis que d'autres sont davantage entraînés par la phase mobile. Cette différence d'affinité conduit à leur séparation par entraînement différentiel.

4.1. Classification des techniques chromatographiques

- Selon la nature des phases utilisées, la chromatographie peut faire intervenir une phase mobile liquide (C.P.L) ou gazeuse (C.P.G ou C.P.V). Dans le cas d'une phase mobile liquide, celle-ci doit présenter des caractéristiques physico-chimiques compatibles avec la phase stationnaire, telles que le pH, la force ionique, la viscosité ou encore l'absorbance. Lorsque la phase mobile est un gaz ou une vapeur, le mélange à analyser doit d'abord être vaporisé, puis entraîné à travers le système par un gaz inerte qui assure uniquement le transport. La phase stationnaire peut alors être constituée soit d'un solide adsorbant, soit d'un liquide déposé sur un support solide inerte.
- Selon la technologie de séparation employée, la chromatographie en phase liquide regroupe différentes techniques comme la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne, cette dernière pouvant fonctionner sous pression, notamment dans le cas de la HPLC.
- Selon le facteur déterminant la séparation, la chromatographie liquide sur colonne permet de mettre en œuvre plusieurs approches. La colonne peut être remplie d'un adsorbant dans le cas de la chromatographie d'adsorption ; d'un solide inerte imprégné d'un liquide hydrophile ou hydrophobe pour la chromatographie de partition en phase normale ou en phase inverse ; d'un solide muni de groupes ionisables pour la chromatographie d'échange d'ions ; d'un matériau à porosité calibrée pour la chromatographie d'exclusion moléculaire ; ou encore de groupements spécifiques pour la chromatographie d'affinité.

4.2. Types de chromatographie

4.2.1. Chromatographie de partition

La chromatographie de partition regroupe l'ensemble des techniques dans lesquelles la phase stationnaire est constituée d'un liquide (chromatographie liquide-liquide) ou d'un gaz (chromatographie liquide-gaz). La séparation des substances repose alors sur leurs différences de solubilité relative entre la phase stationnaire et la phase mobile.

a) Chromatographie de partition en phase normale

Dans la chromatographie de partition en phase normale, la phase stationnaire présente une polarité plus élevée que la phase mobile. Cette configuration est particulièrement adaptée à la séparation de composés organiques très polaires, qui ont tendance à être davantage retenus par la phase stationnaire. La phase mobile, quant à elle, est constituée de solvants organiques faiblement polaires, allant des hydrocarbures non polaires jusqu'aux alcools. Dans ce type de chromatographie, l'augmentation de la polarité de l'éluant entraîne une élution plus rapide des composés à séparer.

b) Chromatographie de partition en phase inverse

Dans la chromatographie de partition en phase inverse, la phase mobile est plus polaire que la phase stationnaire. Celle-ci est constituée d'un support portant à sa surface des groupes fonctionnels apolaires et non humidifiables, tels que des chaînes hydrocarbonées, des noyaux aromatiques, des groupements amines ($-NH_2$) ou d'autres fonctions non polaires fixées sur un gel de silice modifié. La phase mobile est généralement composée de mélanges d'eau avec des solvants organiques miscibles à l'eau, comme le méthanol, l'éthanol ou l'isopropanol.

Dans ce type de chromatographie, l'augmentation de la polarité de l'éluant ralentit l'élution des composés, ce qui revient en pratique à augmenter la proportion d'eau dans le mélange mobile.

4.2.2. Chromatographie Sur Couche Mince (C.C.M.)

Il s'agit d'une méthode chromatographique simple et rapide permettant d'identifier et de séparer un large éventail de substances, qu'elles soient organiques ou même minérales. La phase stationnaire peut être constituée soit d'un solide, comme dans la chromatographie d'adsorption, soit d'un liquide imprégnant un support solide, comme dans la chromatographie de partition. Dans le cas de l'adsorption, les substances à séparer sont retenues à la surface d'un solide finement divisé, déposé en une couche mince et uniforme sur un support tel qu'une plaque de verre, une feuille d'aluminium ou une plaque en polyester rigide. Les dimensions les plus courantes de ces plaques sont de 20×20 cm, bien qu'il existe également des formats plus petits, comme 10×10 cm ou 5×7 cm (Figure 21).

a) Nature des phases utilisées

❖ Phase stationnaire

La phase solide intervient plus ou moins directement comme phase stationnaire, c'est à dire comme phase intervenant dans l'équilibre de distribution des substances à séparer.

- Les phases stationnaires les plus utilisées sont :
 - gel de silice non hydraté ; alumine (Al_2O_3)

Pour ces deux phases, le solide intervient directement dans la fixation des composés à séparer.

- Cellulose : elle intervient aussi surtout comme support d'une phase stationnaire aqueuse en chromatographie de partition.
- Le gel de silice peut contenir un produit fluorescent. Ce produit apparaît vert vif quand on l'éclaire avec un rayonnement ultraviolet de longueur d'onde 254 nm. Il permet de repérer facilement sur la plaque les composés qui absorbent l'ultraviolet : ils apparaissent sous forme de tâches sombres sur un fond fluorescent.

❖ Phases mobiles

La phase mobile est un liquide non miscible avec la phase stationnaire, choisi en fonction de la polarité des substances à séparer. Elle consiste généralement en un mélange de solvants organiques ou en des solutions aqueuses dont le pH et la force ionique sont précisément définis. Dans de nombreux cas, l'utilisation de mélanges de deux ou trois solvants de polarités différentes permet d'obtenir des séparations plus efficaces que l'emploi d'un solvant unique. En chromatographie de partition, les systèmes de solvants employés en chromatographie sur papier peuvent être utilisés tels quels. Le choix de la phase mobile constitue ainsi un élément déterminant pour la réussite de la séparation.

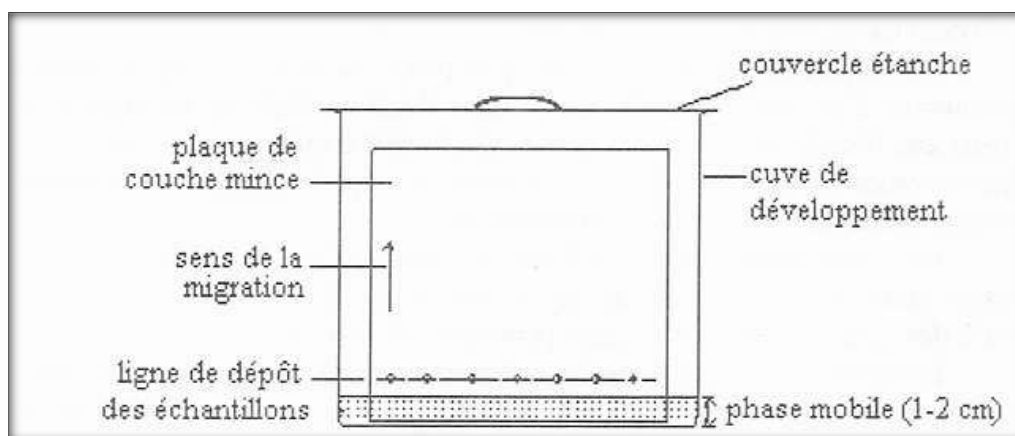


Figure 21 : Conduite d'une chromatographie sur couche mince

b) Interprétation des chromatogrammes

La migration d'une tache sur un chromatogramme est évaluée par le facteur de rétention, ou R_f , défini comme le rapport entre la distance parcourue par le centre de la tache depuis la ligne de dépôt et la distance parcourue par le front du solvant depuis cette même ligne. L'identification des composants repose sur la comparaison de leur R_f et/ou de leur coloration avec celles de substances de référence analysées dans les mêmes conditions. Pour obtenir des valeurs de R_f reproductibles, il est essentiel de maintenir des conditions expérimentales constantes : même composition d'éluant, température stable, cuve préalablement saturée, etc.

Le R_f varie entre 0, indiquant une absence de migration, et 1, correspondant à un composé non retenu. Une correspondance de R_f entre une substance présente dans un mélange et un composé pur de référence constitue un indice d'identification. Toutefois, plusieurs

substances peuvent présenter un même Rf. Dans ce cas, des méthodes de révélation plus spécifiques peuvent être utilisées, ou bien le système chromatographique peut être modifié, en ajustant d'abord la phase mobile puis, si nécessaire, la phase stationnaire. Pour les mélanges particulièrement complexes, une chromatographie bidimensionnelle est souvent employée, car elle améliore nettement la capacité de résolution de la méthode.

c) Applications

Comme pour les autres méthodes chromatographiques, la chromatographie sur couche mince (CCM) présente trois principaux volets :

- ✓ L'analyse qualitative, qui permet d'identifier le nombre de constituants présents dans un mélange et de déterminer leur nature.
- ✓ L'analyse préparative, utilisée pour isoler, à l'état pur, une quantité donnée d'une substance en vue d'études chimiques ou physico-chimiques.
- ✓ L'analyse quantitative, qui vise à mesurer avec précision les proportions de chaque composant du mélange.

La CCM offre plusieurs avantages : elle est peu coûteuse, rapide et très rentable. En un seul développement, il est possible de séparer simultanément plusieurs échantillons disposés côte à côte.

Elle constitue également une excellente technique d'essai, car les conditions de séparation obtenues sur plaque peuvent être directement transposées à la chromatographie en colonne dès lors que les mêmes phases stationnaires et mobiles sont utilisées. Une optimisation préalable sur plaque permet d'ailleurs de déterminer rapidement les conditions de séparation idéales, souvent plus longues à établir en colonne.

Ainsi, la CCM s'impose comme une méthode particulièrement efficace pour l'analyse préliminaire ou de routine de mélanges complexes, ainsi que pour vérifier la présence ou l'absence d'un composé spécifique.

4.2.3. Chromatographie D'exclusion Moléculaire

a) Principe :

Le principe de cette méthode repose sur un véritable tamisage moléculaire : la séparation des molécules se fait essentiellement en fonction de leur taille. Les autres types d'interactions sont minimisés grâce au choix approprié de la phase mobile.

La phase mobile traverse une masse de petites billes solides, très précisément calibrées et percées d'un grand nombre de pores également uniformes. Les molécules dont la taille dépasse le diamètre des pores ne peuvent pas pénétrer dans la matrice du gel. Elles restent donc dans la phase liquide circulant à l'extérieur des grains et sont ainsi les premières à être éluées de la colonne.

À l'inverse, les molécules plus petites diffusent plus ou moins profondément à l'intérieur du gel selon leurs dimensions et leur forme. Leur temps de rétention est donc plus long, ce qui entraîne une élution progressive, de la plus grande masse moléculaire vers la plus faible.

Le terme « exclusion » renvoie donc au fait que les molécules de grande taille sont exclues des pores de la phase stationnaire.

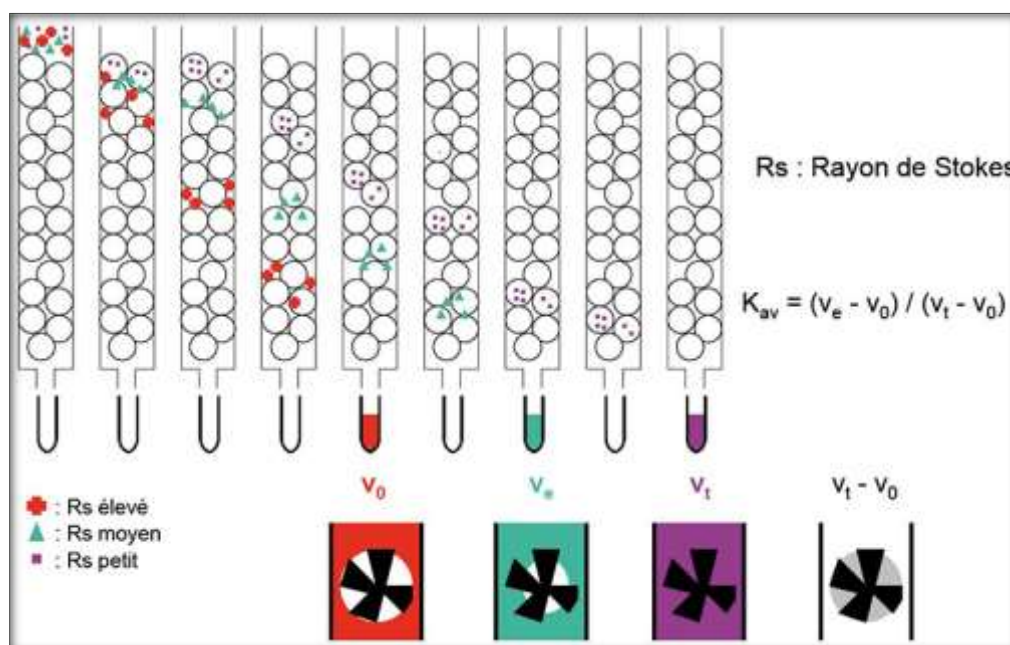


Figure 22 : Principe de la chromatographie d'exclusion moléculaire

b) Les supports chromatographiques

- **Phase stationnaire**

Il existe une large variété de phases stationnaires jouant le rôle de tamis moléculaire. Elles se distinguent principalement par leur porosité, ce qui conditionne leur aptitude à retenir ou non des molécules d'une taille donnée. La limite d'exclusion correspond à la masse molaire (PM) au-delà de laquelle les analytes ne peuvent plus pénétrer dans les pores d'un type de polymère donné ; ils ne sont alors plus séparés.

Le domaine de fractionnement d'un gel désigne l'intervalle de masses molaires compris entre la plus grande molécule capable de pénétrer entièrement dans les pores et la plus petite molécule totalement exclue. Les supports chromatographiques peuvent être constitués de polymères organiques, naturels ou synthétiques, ou encore de supports minéraux modifiés par un réseau organique.

- **Phases mobiles**

Les phases mobiles sont généralement des phases aqueuses de faible salinité (par exemple, solution de NaCl 9 ‰) ou d'un léger pouvoir tampon (par exemple, tampon phosphate 0.05 M, pH 7.0). Pour certaines phases stationnaires particulières

c) Caractérisation du comportement d'un soluté

Les résultats lors d'une filtration sur gel sont généralement exprimés sous la forme d'un diagramme d'élution montrant la variation de concentration du soluté en fonction du volume d'élution.

Le recueil de l'éluat se fait à l'aide d'un collecteur de fractions, fonctionnant soit selon le réglage du temps, soit selon le comptage de gouttes

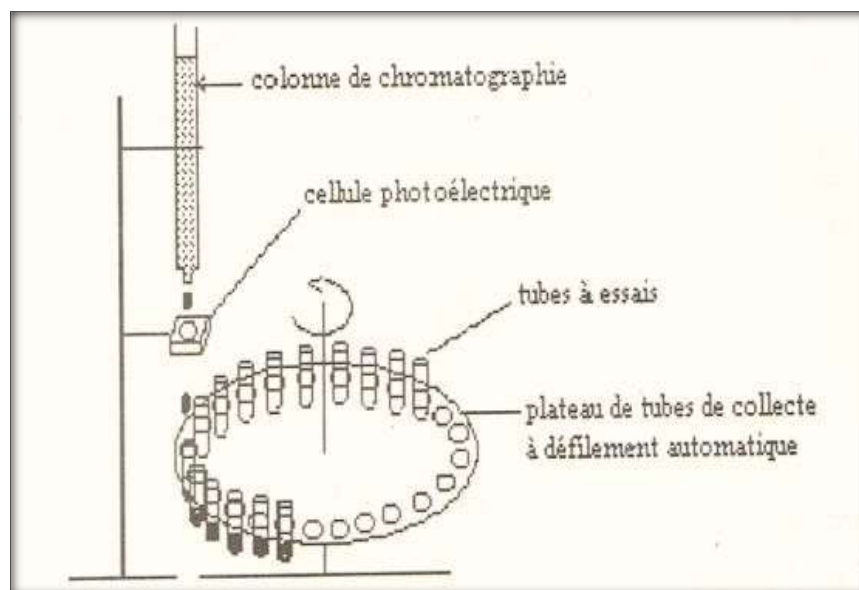


Figure 23 : Collecteur de fractions

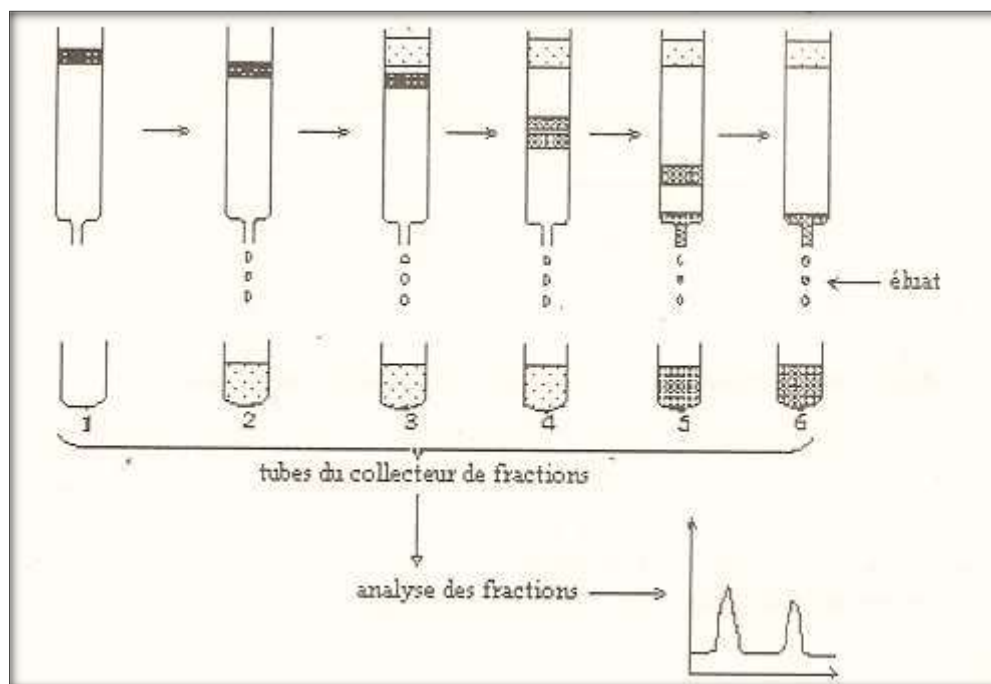


Figure 24: Séquence des opérations depuis le dépôt de l'échantillon jusqu'à l'établissement du diagramme d'élution.

À partir de ces courbes, il est possible de déterminer le volume d'élution (V_e) d'une molécule, c'est-à-dire le volume d'éluant nécessaire pour qu'elle soit entièrement récupérée à la sortie de la colonne. Cependant, le volume V_e ne suffit pas à caractériser à lui seul le comportement chromatographique d'un soluté. Il dépend également du volume total (V_t) du lit de gel ainsi que du volume mort (V_o) de la colonne.

Le coefficient de partage du soluté entre la phase liquide et la phase gel, K_{av} , caractérise mieux son élution :

$$K_{av} = V_e - V_o / V_i = V_e - V_o / V_t - V_o \text{ où}$$

V_o : volume vide ou volume mort ou volume d'exclusion. Il représente le volume d'élution d'une substance totalement exclue du gel. V_o est identique au volume du liquide interstitiel entre les grains du gel.

K_{av} est compris entre 0 (corps exclu) et 1 (corps totalement retenu).

V_i correspond au volume de solvant contenu dans le gel. On le mesure par l'opération suivante : on pèse à l'état sec la phase fixe qui servira pour la colonne (masse m_1). On la repèse ensuite après l'avoir laissé gonfler dans la phase mobile et en avoir rempli la colonne (masse m_2). Connaissant la masse m_3 de la colonne vide, V_i est alors égal à $V_i (m_1) = m_2 (g) - (m_1 + m_3) - V_o$.

d) Applications de la chromatographie d'exclusion moléculaire

✓ Détermination du poids moléculaire :

C'est une technique courante pour la plupart des protéines qui ont une structure globulaire. En effet, il existe une relation simple entre le K_{av} et le poids moléculaire (PM) de la substance. Pour chaque type de gel, il existe une zone de PM où le K_{av} varie linéairement avec le logarithme du PM.

✓ Dessalage des protéines :

Le dessalage constitue l'une des premières applications de la filtration sur gel et reste encore aujourd'hui l'une des plus utilisées. Ce terme désigne non seulement l'élimination des sels présents dans les solutions de macromolécules, mais aussi l'élimination d'autres composés de faible masse molaire. À titre d'exemple, la production de lait sans lactose relève également d'un processus de dessalage.

Dans cette technique, les molécules de forte masse molaire à purifier se déplacent majoritairement dans le volume vide, car elles sont totalement exclues du gel. Les petites molécules, quant à elles, se répartissent de manière relativement homogène entre la phase

stationnaire et la phase mobile. Grâce à cette séparation efficace entre composants lourds et légers, il est possible de travailler sur de grands volumes d'échantillons, pouvant atteindre jusqu'à 30 % du volume total du gel.

Cette méthode de dessalage possède de nombreuses applications. Elle s'avère plus rapide et plus performante que la dialyse, ce qui en fait un choix privilégié pour le traitement de substances biologiques fragiles, telles que les acides nucléiques.

4.2.4. Chromatographie d'échange d'ions

a) Principe

La chromatographie d'échange d'ions est fondée sur la valeur changeante du nombre des groupes acides (charge négative) et celui des groupes basiques (charge positive) à la surface d'une molécule donnée (ex : protéine). La phase stationnaire (appelée dans ce cas, échangeur d'ions) est composée d'une matrice polysidique ou synthétique (résine, silice) à la surface de laquelle des groupements fonctionnels (sites de fixation) négatifs (échangeur anionique) ou positifs (échangeur cationique) sont fixés de façon covalente et répartis selon une densité prédéterminée. La neutralité électrique de l'échangeur est assurée par des ions de charge opposée, appelés contre-ions, qui peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de même signe apportés par la phase mobile

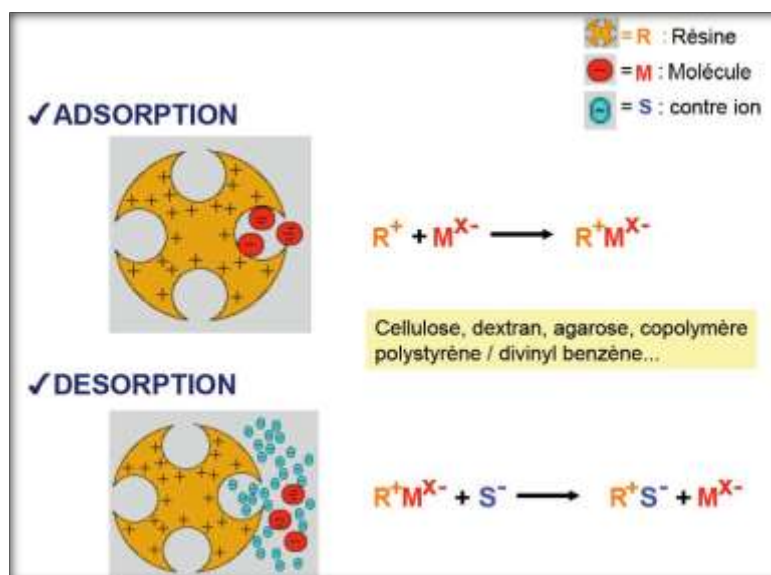


Figure 25 : Principe de la chromatographie échangeuse d'ions

Lorsqu'un mélange de molécules traverse ce type de support, toutes les espèces possédant une charge opposée à celle de l'échangeur sont retenues par interaction électrostatique en remplacement des contre-ions, tandis que celles ayant une charge identique ou neutre le traversent sans être fixées. La désorption des molécules liées s'effectue ensuite en augmentant progressivement la concentration en contre-ions dans la phase mobile (gradient de concentration ou de force ionique) et, si nécessaire, en modifiant le pH (gradient de pH), ou encore en associant ces deux approches.

L'échange d'ions peut être appliqué à toute molécule ionisable (acide, basique ou amphotère). Pour les protéines, certains acides aminés possèdent des groupements acides ou basiques libres, conférant à la macromolécule un caractère de polyélectrolyte amphotère exploité lors de la chromatographie d'échange d'ions. La charge nette d'une protéine correspond à la somme algébrique de ses charges, et elle varie essentiellement avec le pH (fig. 18), ainsi qu'avec la force ionique du milieu.

Il existe un pH pour lequel cette charge nette s'annule, appelé point isoélectrique (pHi) ; les principaux paramètres déterminant l'intensité d'interaction d'une molécule amphotère avec un échangeur d'ions en dépendent directement de

- pH du milieu de travail dont dépend la charge nette et le nombre de groupes chargés de la phase solide susceptible de réagir.
- La concentration des contre-ions entrant en compétition avec la molécule.

L'accroissement de la concentration des contre-ions augmente la compétition vis-à-vis des groupes chargés du support et, de ce fait, les molécules dont la charge nette est la plus faible s'éluent les premières.

b) Phase stationnaire

Les phases stationnaires possèdent un groupement fonctionnel ionisable qui, à l'état ionisé, fixe électrostatiquement des molécules de charge de signe opposé. Ces groupements fonctionnels sont de deux natures :

- ✓ **Anioniques** : ils portent une charge négative et peuvent ainsi retenir des cations. On les appelle « échangeurs de cations ». Ils correspondent soit à des acides forts toujours ionisés (ex. : groupes sulfonates), soit à des acides faibles (ex. : carboxylates), dont le degré d'ionisation dépend du pH de la phase mobile.
- ✓ **Cationiques** : ils portent une charge positive et sont capables de fixer des anions. On les désigne comme « échangeurs d'anions ». Ils regroupent des bases fortes constamment ionisées (ex. : ammonium quaternaire) et des bases faibles (ex. : amines), dont l'ionisation varie selon le pH de la phase mobile

c) Conditions d'élution

Les produits adsorbés sur l'échangeur d'ions peuvent être élués sélectivement en modifiant certaines caractéristiques de la phase mobile, le plus généralement la force ionique et/ ou le pH.

On modifie le pH de la phase mobile pour modifier l'ionisation des molécules ou des sites de fixation ionisables de l'échangeur. Pour supprimer la charge d'un acide, on baisse le pH. Dans le cas d'une base, on augmente le pH. Pour un corps amphotère, on se rapproche de son pH isoélectrique.

On augmente la force ionique de la phase mobile avec un sel ou un tampon.

Les produits retenus, ayant des affinités différentes pour l'échangeur d'ions, il sera donc possible, en choisissant correctement les conditions d'élution, de les séparer.

La modification de la composition de la phase mobile peut se faire de deux manières :

- a. On peut la modifier brutalement, par paliers successifs, que ce soit au niveau de la force ionique ou du pH,
- b. On peut la faire varier très lentement par variation progressive de la composition de la phase mobile au cours de la séparation de façon à augmenter son pouvoir d'élution.

d) Applications de la chromatographie d'échange d'ions :

La chromatographie d'échange d'ions est particulièrement utilisée pour séparer entre elles des molécules ionisables appartenant à une même famille chimique. Le cas le plus classique en est celui des protides

Cette chromatographie est aussi utilisée dans le cas de :

- ✓ Dépollution de l'eau,
- ✓ Déminéralisation de divers composés,
- ✓ Séparation de mélanges de nucléotides et d'acides nucléiques, décoloration durant le raffinage du sucre, élimination de l'acidité (acides organiques) dans le processus de fabrication des jus de fruits.

4.2.5. Chromatographie d'affinité

a. Principe :

Ce procédé ne repose sur aucune propriété physique ou chimique particulière, contrairement aux techniques précédentes. Il utilise plutôt les caractéristiques biologiques de la molécule, notamment sa capacité à former un complexe réversible et très spécifique avec un **ligand**. Ce ligand, généralement de faible masse moléculaire, est fixé de manière covalente et stable sur une **matrice** inerte constituant la phase stationnaire.

Présenté sous une forme accessible à la surface du support, le ligand permet, lors du passage du mélange, de retenir uniquement la molécule ciblée, tandis que les autres composants, n'ayant aucune affinité pour lui, traversent librement la colonne. La molécule d'intérêt est ensuite récupérée à l'état pur grâce à un éluant diminuant son affinité pour le ligand, par ajout d'un compétiteur, ou par modification du pH ou de la force ionique.

Le succès de la séparation dépend notamment du choix de la matrice, du ligand, de la méthode de greffage et des conditions d'éluion. Un exemple typique est l'interaction anticorps–antigène. De même, pour purifier une enzyme, on peut utiliser comme ligand un substrat, un analogue de substrat, un inhibiteur, un effecteur allostérique ou un coenzyme.

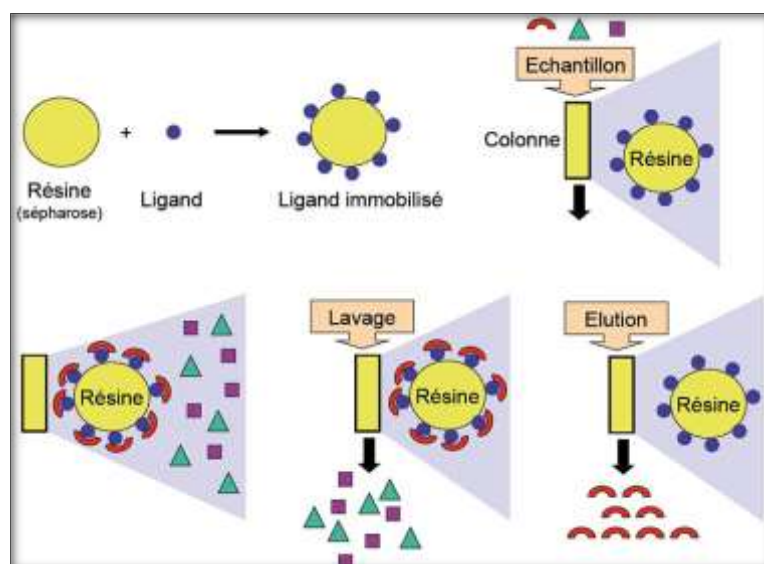


Figure 26 : Principe de chromatographie d'affinité

b. Choix de la matrice :

Le support doit présenter certaines propriétés :

- complètement insoluble dans la phase mobile,
- chimiquement et biologiquement résistant,
- mécaniquement rigide, hydrophile et suffisamment perméable, absence d'interactions non spécifiques (ex : adsorption),
- présence de nombreuses fonctions modifiables pour l'activation et haute capacité de couplage.

c. Choix du ligand et de sa concentration :

Le ligand doit être spécifique de la molécule à purifier et présenter une affinité moyenne (ni trop faible, ni trop forte) vis-à-vis de la molécule recherchée. Le choix de la concentration du ligand est important également, car un excès entraînerait des encombrements stériques non négligeables. La réaction d'activation dépend des conditions physiques (T° , pH), du temps de réaction et de la quantité d'agents d'activation.

d. Choix de la méthode d'élution :

En général, on utilise un compétiteur pour obtenir une élution spécifique. Ce compétiteur a pour but de dissocier le complexe ligand-molécule à purifier en se liant à la molécule à la place du ligand ou au ligand à la place de la molécule. Il devra être en concentration suffisante

4.2.6. Chromatographie En Phase Gazeuse (C.P.G.)

a) Principe :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation basée sur un équilibre de partition et/ou d'adsorption entre une phase mobile gazeuse, qui transporte l'échantillon, et une phase stationnaire pouvant être liquide ou solide. On distingue ainsi la chromatographie gaz-liquide, où un gaz inerte est utilisé comme phase mobile et un liquide comme phase stationnaire, et la chromatographie gaz-solide, qui met en œuvre un solide comme support stationnaire.

Lorsque la phase stationnaire est solide, la séparation repose sur les phénomènes d'adsorption, tandis qu'avec une phase liquide, elle obéit aux lois de partage entre le gaz vecteur et le liquide de la colonne. Dans tous les cas, l'identification des composés s'effectue à partir de leur temps de rétention.

La CPG est limitée à l'analyse de molécules de faible masse molaire (inférieure à 1 000), volatiles ou rendues volatiles après traitement. Comme seule une faible proportion des composés organiques répond à ces critères, ses applications restent relativement restreintes.

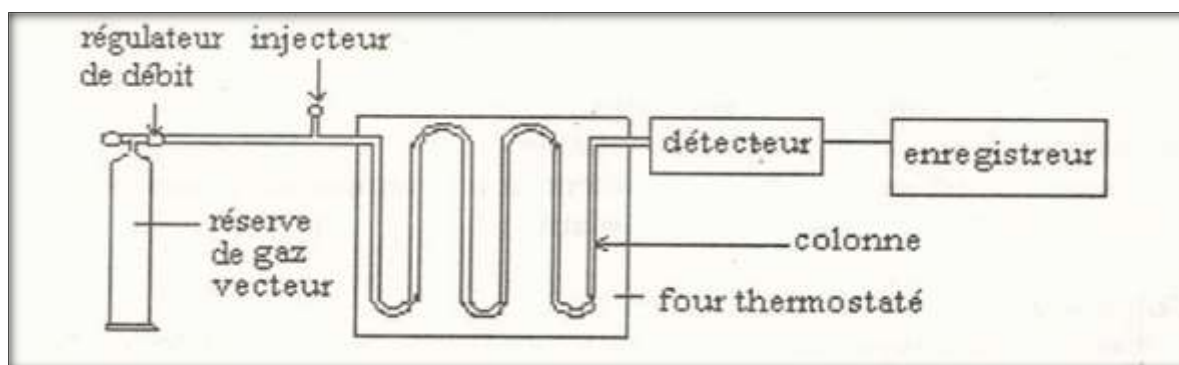


Figure 27 : Principe d'une chromatographie en phase gazeuse

Toute molécule introduite dans ce système chromatographique, à une température suffisamment élevée pour être vaporisée, passe de manière répétée entre la phase stationnaire et la phase mobile. Elle est alors soumise à deux forces opposées :

des forces de rétention exercées par la phase stationnaire, qui tendent à immobiliser la molécule soit par dissolution dans le liquide stationnaire, soit par adsorption physique sur un support solide ; une force d'entraînement due au gaz vecteur, qui transporte la molécule sous forme de vapeur vers la sortie de la colonne.

Les différentes substances d'un mélange passent un temps comparable dans la phase mobile, mais se distinguent par le temps qu'elles passent dans la phase stationnaire. Plus une molécule interagit fortement avec la phase stationnaire, plus sa migration est lente et plus son temps de rétention est élevé. À l'inverse, une faible interaction avec la phase stationnaire entraîne une élution rapide et un temps de rétention court.

Ainsi, chaque composé parcourt la colonne à une vitesse spécifique, ce qui permet leur séparation. Les molécules séparées sont ensuite détectées et analysées à la sortie de la colonne.

b) Description de l'appareil :

- Injecteur :

L'injection de l'échantillon est réalisée à l'aide d'une microseringue (de 1 à 10 μL) à travers un septum en matériau élastique et rétractable (caoutchouc, élastomère, Téflon, etc.), garantissant l'étanchéité du système tout en résistant aux températures élevées. Ce mode d'injection est le plus couramment utilisé avec les colonnes conventionnelles.

Dans le cas des colonnes capillaires, l'injection nécessite une étude plus approfondie, car plusieurs modes d'injection peuvent être mis en œuvre.

L'injecteur est généralement porté à une température supérieure au point d'ébullition du composé le moins volatil afin d'assurer une vaporisation rapide et complète de l'échantillon.

- Colonne :

On distingue deux types de colonnes : les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

Dans le cas des colonnes remplies, la colonne se présente sous la forme d'un tube creux enroulé en spirale, fabriqué en verre, en acier inoxydable ou en aluminium, d'une longueur comprise entre 1 et 5 mètres et d'un diamètre interne variant de 1 à 4 mm. Elle est remplie d'un support poreux et inerte, imprégné d'une phase stationnaire solide qui devient liquide à la température de fonctionnement chromatographique.

Les colonnes remplies dont le diamètre interne est inférieur à 1 mm sont appelées colonnes à micro-remplissage. Leurs performances se situent à un niveau intermédiaire entre celles des colonnes capillaires ouvertes et celles des colonnes remplies classiques de diamètre supérieur à 2 mm.

- Le four :

C'est une enceinte d'environ $30 \times 30 \times 30$ cm, parfaitement isolée de l'extérieur, à l'intérieur de laquelle est placée la colonne. Sa température est contrôlée avec précision et peut être programmée sur une large plage, généralement comprise entre 20 et 400 °C. Une répartition homogène de la température est assurée par un système de ventilation.

- Détecteur :

Il existe de nombreux procédés de détection des variations de composition d'un effluent gazeux. Tous ont pour principe la mesure continue d'une propriété physique du gaz sortant de la colonne, dont les variations traduisent les variations de constitution. Les caractéristiques principales des différents détecteurs sont les suivantes :

- leur sensibilité, c'est à dire leur capacité à détecter de très faibles quantités de produits,
- La qualité de la détection, qui dépend de la valeur du bruit de fond qui doit être le plus faible possible. On considère qu'un pic existe vraiment si sa hauteur est au moins le double de celle du bruit de fond.
- La spécificité ou l'universalité de la détection : en fonction des objectifs, on s'intéressera à toutes les molécules ou seulement une certaine familles chimique.
- La capacité à donner une relation linéaire entre la taille du pic (en hauteur et en surface) et la quantité de produit,
- La rapidité de la réponse,
- Destruction ou non des produits après détection.

c) Types de détecteurs :

- Détecteur par changement de conductivité thermique
- Détecteur à ionisation de flamme
- Détecteur à capture d'électrons
- Détecteur à photo-ionisation
- Détecteur azote-phosphore ou détecteur thermo-ionique
- Détecteur d'émission atomique

5. Méthodes électrophorétiques :

5.1.Définition

L'électrophorèse est une technique physico-chimique de séparation et d'analyse qui repose sur la migration de molécules chargées électriquement sous l'action d'un champ électrique. Les molécules à analyser sont placées dans un milieu conducteur, généralement un support gélifié, et soumises à une différence de potentiel électrique.

Sous l'effet de ce champ, les espèces chargées se déplacent vers l'électrode de signe opposé, ce qui permet leur séparation au sein du milieu support. Cette migration conduit à la formation de bandes distinctes correspondant aux différents constituants du mélange étudié.

L'électrophorèse est largement utilisée en biologie et en biochimie pour l'analyse, l'identification et la comparaison de macromolécules biologiques telles que les protéines et les acides nucléiques.

5.2.Principe de l'électrophorèse :

Le principe de l'électrophorèse repose sur l'application d'un champ électrique à un mélange de molécules chargées placé dans un milieu conducteur, généralement un support gélifié. Lorsque la différence de potentiel est établie entre les deux électrodes, les molécules ionisées subissent une force électrique qui provoque leur déplacement orienté à l'intérieur du support (Figure 27).

Chaque espèce moléculaire migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge. Au cours de cette migration, les différentes molécules du mélange ne se déplacent pas de manière identique, ce qui conduit à leur séparation progressive dans le milieu. Le support joue un rôle de matrice permettant de stabiliser la migration et de maintenir les molécules séparées les unes des autres.

À l'issue de la migration, les molécules se trouvent réparties à différentes positions le long du support, formant des bandes distinctes. Ces bandes peuvent ensuite être mises en évidence par des techniques de révélation adaptées, ce qui permet l'analyse, l'identification et la comparaison des constituants du mélange étudié.

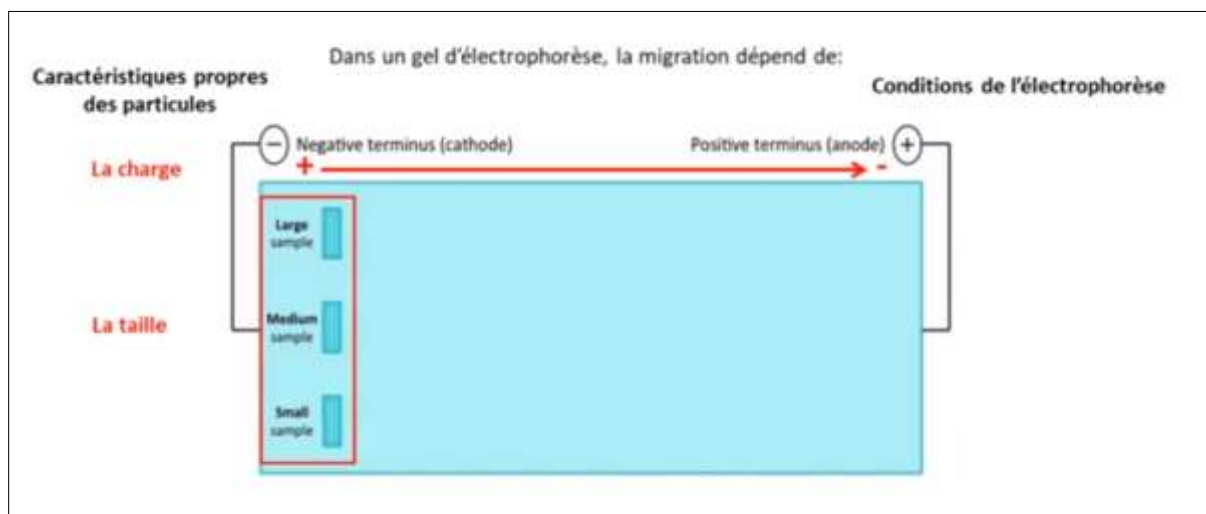


Figure 28 : Principe de l'électrophorèse

5.3. Paramètres et conditions de réalisation

Les paramètres et conditions de réalisation de l'électrophorèse correspondent à l'ensemble des éléments nécessaires pour assurer une migration correcte et une bonne séparation des molécules. Ils comprennent principalement :

- Le milieu support

Il s'agit du support dans lequel se fait la migration (gel d'agarose, gel de polyacrylamide, acétate de cellulose, etc.). Il permet de maintenir les molécules séparées et de stabiliser leur déplacement.

- Le tampon électrophorétique

Le tampon assure la conduction du courant électrique et le maintien d'un pH constant pendant la migration. Il évite les variations chimiques susceptibles d'altérer les molécules analysées.

- Le champ électrique

L'application d'une différence de potentiel entre deux électrodes est indispensable pour provoquer la migration des molécules chargées à travers le support.

- La température

La température doit être contrôlée afin d'éviter l'échauffement du système, qui pourrait modifier la migration ou dénaturer certaines molécules biologiques.

- La durée de migration

Le temps d'électrophorèse doit être suffisant pour permettre une bonne séparation, sans provoquer de diffusion excessive des bandes.

- La préparation de l'échantillon

Les échantillons doivent être correctement solubilisés et déposés dans des zones prévues du support afin d'obtenir des résultats exploitables.

- Conditions de séparation

Selon les conditions de séparation on distingue :

a. Electrophorèse en conditions non dénaturantes :

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

b. Electrophorèse en conditions dénaturantes :

Avant la séparation électrophorétique, les molécules subissent un traitement dénaturant qui détruit leur structure tridimensionnelle native. Ainsi, la séparation se fait essentiellement en fonction de la masse moléculaire. Les principaux agents de dénaturation utilisés sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol, ce dernier réduisant les ponts disulfures des protéines.

Le SDS, à la fois dénaturant doux et surfactant, agit sur les protéines de plusieurs manières :

- Pour les protéines oligomériques, il sépare les sous-unités les unes des autres.
- Il se fixe aux protéines en les enveloppant de charges négatives. Les protéines ainsi transformées en monopolyanions acquièrent une mobilité électrophorétique uniforme.

Cette charge négative globale permet leur migration vers l'anode, tandis que la séparation proprement dite dépend uniquement de la masse moléculaire.

- Les conditions de révélation

À la fin de la migration, des méthodes de coloration ou de révélation sont utilisées pour visualiser les bandes correspondant aux différentes molécules séparées.

Ces paramètres doivent être soigneusement contrôlés pour garantir la fiabilité et la reproductibilité des résultats en électrophorèse.

5.4.Facteurs affectant la vitesse de migration des molécules :

- Charge des molécules

Seules les molécules ionisées ou ionisables sont séparables par électrophorèse : cas des acides aminés, des nucléotides et de leurs polymères notamment. L'état d'ionisation dépend souvent du pH de la solution aqueuse

- Si le pH est supérieur à leur pH_i , elles sont chargées négativement et migrent vers l'anode.
- Si le pH est égal à leur pH_i , leur charge nette est nulle, elles ne migrent pas.
- Si le pH est inférieur à leur pH_i . Elles sont chargées positivement et migrent vers la cathode.

- Tension du champ électrique :

Lorsque la tension appliquée augmente, la vitesse de migration s'accroît également. Toutefois, des tensions trop élevées peuvent provoquer un échauffement excessif, susceptible d'assécher le support ou d'entraîner la dénaturation des protéines. Pour éviter ces effets, le système est généralement refroidi à l'aide d'un circuit d'eau froide. En pratique, les tensions de fonctionnement se situent généralement entre 100 et 200 volts.

- Taille des molécules :

La mobilité électrophorétique diminue à mesure que la taille des molécules augmente. Cet effet est particulièrement marqué dans les gels d'amidon et de polyacrylamide, qui agissent comme des tamis moléculaires. Dans ce contexte, le comportement observé est inverse à celui de la chromatographie d'exclusion : les grosses molécules pénètrent dans les pores du gel mais y sont

ralenties, ce qui les fait migrer plus lentement que les petites molécules.

- Viscosité de la solution :

Les solutions qui imprègnent les supports d'électrophorèse sont parfois visqueuses car assez concentrées. Les vitesses de migration sont donc relativement faibles

5.5.Types d'électrophorèse :

a. Electrophorese De Zone sur support :

Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide (PAGE), etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.).

➤ Les supports :

Sur le plan pratique, l'électrophorèse s'apparente à la chromatographie sur couche mince. Elle est effectuée sur un support plan imbibé d'une solution aqueuse conductrice, entre les extrémités duquel une différence de potentiel est appliquée.

Le support solide peut être chimiquement inerte, comme le papier ou, de préférence, l'acétate de cellulose. Ce dernier constitue le support le plus couramment employé pour l'analyse de routine des protéines sériques.

En revanche, certains supports agissent comme des tamis moléculaires, notamment les gels d'amidon et de polyacrylamide. Ces matrices forment des réseaux poreux qui ralentissent la migration des molécules de grande taille. Ainsi, sur ces supports, la séparation s'effectue à la fois en fonction de la charge électrique et de la masse moléculaire.

- L'acétate de cellulose :

Il s'agit du support le mieux adapté aux analyses de routine en laboratoire de biologie. Quelques microlitres de la solution à analyser (extrait enzymatique, protéines sériques, lipoprotéines, etc.) sont déposés sur la surface de la feuille d'acétate de cellulose, préalablement imprégnée de tampon, sous forme d'une fine ligne à l'aide d'un applicateur spécifique.

À l'échantillon est ajoutée une molécule colorée jouant le rôle d'indicateur de front, choisie pour migrer plus rapidement que les autres constituants du mélange. Elle permet ainsi de suivre la progression de la migration des molécules, généralement invisibles à ce stade.

Après la migration, qui dure environ 30 minutes sous une tension de 230 volts, le support est coloré, puis séché et rendu transparent par un procédé de transparisation. Les différentes fractions séparées sont ensuite mises en évidence à l'aide de colorants spécifiques, permettant leur identification. Chaque composé apparaît sous forme d'une bande fine, perpendiculaire au sens de migration, dont l'intensité est proportionnelle à sa concentration. Les enzymes peuvent être révélées grâce à leur activité spécifique vis-à-vis de substrats adaptés.

- **Le gel de polyacrylamide :**

Grâce à une porosité variable, le gel exerce sur les protéines en migration un effet de filtration dont l'intensité augmente avec la valeur de T. Ainsi, en ajustant les conditions expérimentales, il est possible de séparer des substances présentant des masses moléculaires très différentes.

- **Le gel d'agarose :**

Le gel est constitué à l'aide d'une solution d'agarose dans un tampon déterminé. On la coule a chaud sur une lame de verre elle se solidifie par refroidissement. En choisissant plusieurs concentrations d'agarose, on prépare des gels a différentes dimensions de pores : les gels faiblement concentres larges pores

- **Le gel d'amidon :**

Dans l'électrophorèse en gel d'amidon, la structure même du gel intervient comme un filtre en ralentissant la progression des molécules les plus volumineuses. A partir d'amidon partiellement hydrolyse, en suspension homogène dans un tampon approprié (13 à 15 g pour 100 ml), on obtient par chauffage un gel qui, porte a l'ébullition, revient a état liquide. Celui-ci, coule dans un bac de Plexiglas, se prend en gel par refroidissement, donnant ainsi le milieu filtrant approprié. Les protéines à séparer sont déposées dans une fente pratiquée dans le gel. Après électrophorèse, le gel est coupé dans son épaisseur et les protéines révélées par un des colorants habituels.

b. Isoélectrofocalisation

Cette technique permet de séparer les protéines uniquement en fonction de leur point isoélectrique, c'est-à-dire le pH auquel la protéine présente une charge nette nulle. En effet, l'ionisation des groupements latéraux des acides aminés dépend du pH du milieu. Il existe ainsi, pour chaque protéine, une valeur de pH pour laquelle le nombre de charges positives est égal à celui des charges négatives : cette valeur correspond à son point isoélectrique.

L'isoélectrofocalisation est généralement réalisée dans des gels contenant de faibles concentrations d'acrylamide, de l'ordre de 3 à 5 %, afin de limiter autant que possible l'effet de tamisage sur les protéines de masse moléculaire élevée. La formation du gradient de pH est assurée par l'incorporation dans le gel d'une concentration élevée d'ampholytes, constitués de petits peptides polycarboxyliques et polyaminés d'un poids moléculaire compris entre 300 et 1000 Da. Sous l'action du champ électrique, ces ampholytes migrent et se répartissent selon leurs points isoélectriques, établissant ainsi le gradient de pH.

Différents mélanges d'ampholytes ont été développés pour obtenir des gradients de pH variés. Le choix du gradient dépend de l'objectif de l'expérience. Pour une analyse globale des protéines exprimées dans un système donné, tel qu'un tissu ou des cellules, on privilégie un gradient large, par exemple de pH 3 à 10. En revanche, lorsqu'il s'agit d'étudier une protéine spécifique, le gradient peut être restreint à une plage plus étroite englobant le point isoélectrique de la protéine d'intérêt.

Le gradient de pH est établi avant l'application de l'échantillon lors d'une étape de pré-électrofocalisation, ce qui améliore généralement la migration des protéines. L'isoélectrofocalisation proprement dite permet ensuite à chaque protéine de l'échantillon de migrer jusqu'à son point isoélectrique, où elle se stabilise sous forme d'une bande fine et immobile (Voir Figure 29).

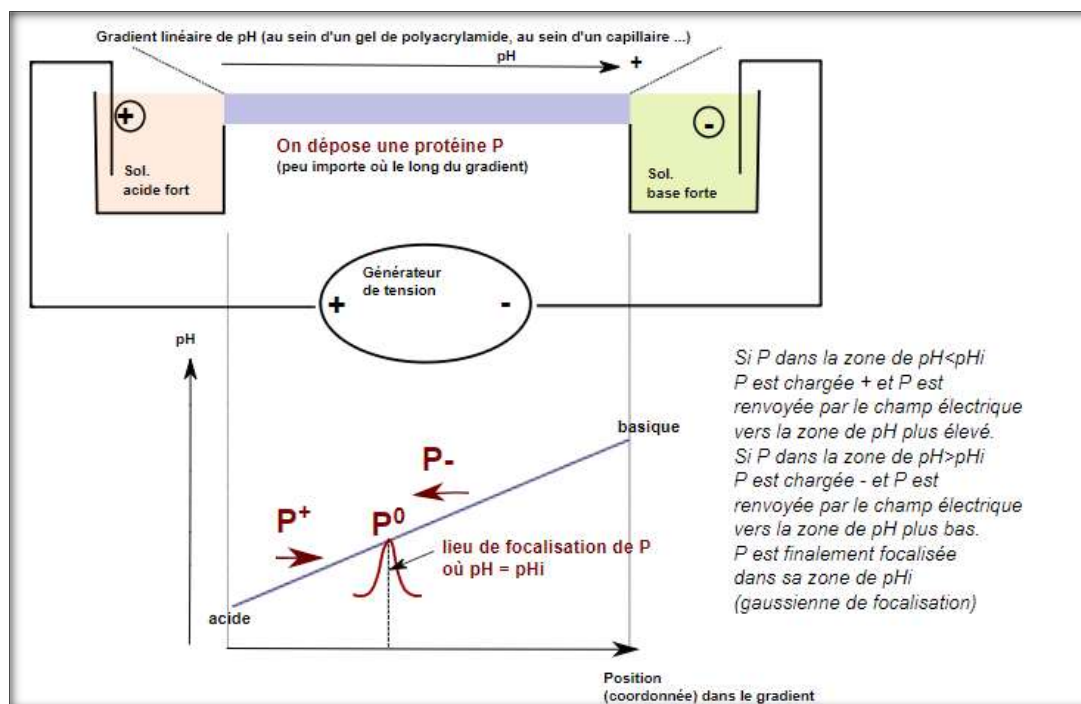


Figure 29 : Principe de l'isoélectrofocalisation

La pré-électrofocalisation et l'isoélectrofocalisation sont réalisées sous des tensions élevées, comprises entre 400 et 3000 volts, pendant une durée variant de 15 à 20 heures selon la longueur du gel. L'isoélectrofocalisation peut être menée soit dans des conditions dénaturantes, par l'ajout d'urée à une concentration de 4 à 9 M dans le gel, favorisant ainsi une meilleure solubilisation des protéines, soit dans des conditions non dénaturantes.

Cette technique présente un excellent pouvoir de résolution, permettant de séparer les protéines du plasma sanguin en plus de quarante bandes, contre environ quinze bandes obtenues par électrophorèse de zone. Par ailleurs, l'utilisation d'une faible quantité d'ampholytes rend la méthode économique. Une expérience standard peut être réalisée dans un tube d'environ 6 cm de longueur et de 5 mm de diamètre interne.

c. L'Electrophorèse Bi Dimensionnelle (EBD) :

Cette méthode repose sur la séparation électrophorétique des protéines en fonction de deux paramètres distincts : le point isoélectrique et le poids moléculaire, au moyen de deux migrations successives réalisées selon des directions perpendiculaires. L'association de ces deux critères indépendants confère à cette technique un très fort pouvoir de résolution.

La première dimension correspond à l'isoélectrofocalisation, qui permet de séparer les protéines selon leurs points isoélectriques. Cette étape est généralement réalisée dans des gels cylindriques de polyacrylamide de faible diamètre, compris entre 1 et 2 mm, soumis à des tensions élevées de l'ordre de 400 à 1000 V pendant 15 à 20 heures. Les polypeptides migrent alors au sein d'un gradient de pH et se fixent à la position correspondant à leur point isoélectrique.

Une fois la première dimension effectuée, le gel est déposé sur un gel en « plaque » de deuxième dimension. Ce gel contient un pourcentage de polyacrylamide supérieur à celui du gel de la première dimension (ce qui permet d'augmenter l'effet de tamisage moléculaire). Il peut aussi contenir du sodium dodécyl sulfate (SDS) ce qui permet de séparer les protéines de l'échantillon selon leur PM (Figure 30).

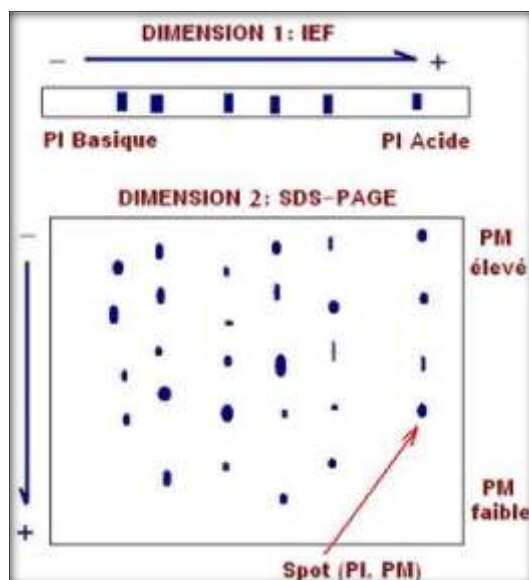


Figure 30 : Principe de l'électrophorèse Bidimensionnelle

- **Applications :**

L'électrophorèse bidimensionnelle peut être utilisée comme technique de purification, aboutissant à l'obtention de quantités faibles, mais utilisables, d'une protéine donnée. Ainsi, les spots visualisés après électrophorèse peuvent être découpés et utilisés, après élution de la protéine, pour la préparation d'anticorps spécifiques. Les autres applications de cette technique sont multiples : depuis la vérification de la pureté d'un échantillon (détection des fraudes) jusqu'à des études de variabilité génétique, en passant par le suivi des variations d'expression

en fonctions de différents facteurs : développement, différenciation, traitements (drogues, stress, hormones, etc.). La technique d'électrophorèse bidimensionnelle peut, par exemple, servir à comparer l'expression de protéines dans des conditions différentes. Il faut alors réaliser des électrophorèses correspondant à chacune des conditions à étudier

d. L'immunoélectrophorèse :

Il s'agit d'une technique dérivée de l'électrophorèse exploitant la capacité des complexes antigène-anticorps à former, *in vitro*, des précipités. L'immuno-électrophorèse se déroule en deux étapes successives. Dans un premier temps, le mélange protéique à analyser, considéré comme un ensemble d'antigènes, est séparé par électrophorèse sur une fine couche de gélose à partir d'un petit puits de dépôt aménagé à l'une des extrémités du gel. À l'issue de la migration électrophorétique, une solution d'anticorps spécifiques, sous forme d'immun-sérum dirigé contre la protéine recherchée, est déposée dans une gouttière creusée parallèlement au sens de migration.

Les protéines antigéniques séparées et les anticorps diffusent ensuite dans la gélose jusqu'à leur rencontre. La réaction antigène-anticorps qui se produit à ces zones de contact entraîne la formation d'arcs de précipitation, chacun étant caractéristique d'une protéine donnée. La mise en évidence et l'identification de ces arcs peuvent, si nécessaire, être améliorées par une coloration spécifique des protéines (Figure 31).

Cette méthode combine successivement le fort pouvoir séparatif de l'électrophorèse et la grande spécificité des réactions immunochimiques. Elle permet ainsi de réaliser des analyses qualitatives d'une très grande finesse, capables de mettre en évidence des constituants présents à l'état de traces. À titre d'exemple, l'utilisation d'un antisérum de mouton dirigé contre l'ensemble des protéines humaines permet d'obtenir au moins une trentaine d'arcs de précipitation à partir du sérum sanguin humain.

Cette technique est notamment utilisée pour la mise en évidence d'anomalies qualitatives et semi-quantitatives significatives. L'interprétation des résultats repose sur la comparaison des profils obtenus chez les patients avec ceux d'échantillons de référence analysés dans les mêmes conditions. Le pouvoir de résolution peut être considérablement renforcé grâce à la variante appelée immuno-électrophorèse croisée (crossed immunoelectrophoresis), dont le principe est

présenté dans la figure 30.

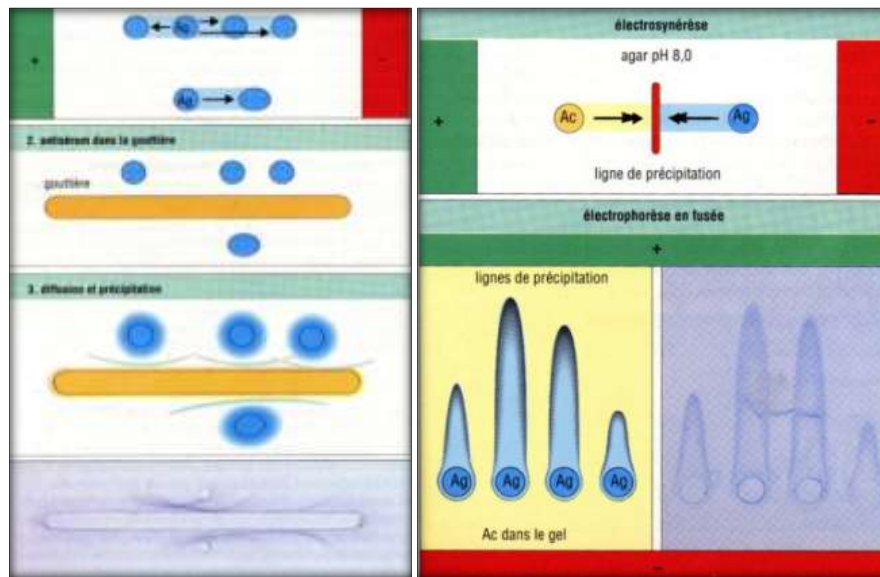


Figure 31 : Principe d'immunoélectrophorèse

5.6.Applications de l'électrophorèse :

Bien qu'elle puisse s'appliquer à tous les corps ionisables, l'électrophorèse reste surtout appliquée à l'analyse des protides et, plus spécialement, des protéines et aussi les acides nucléiques.

➤ Acides aminés :

On réalise souvent des électrophorèses à deux dimensions pour analyser des mélanges d'acides aminés. L'identification des acides aminés se fait en faisant subir l'électrophorèse à des solutions standards d'acides aminés.

➤ Protéines :

Des électrophorèses simples ou doubles permettent de séparer entre elles les protéines d'un mélange complexe qui ne contient au départ que des protéines. Selon le support, on réalise :

- ✓ Séparation selon la charge (sur acétate de cellulose). Le choix du pH est important.
- ✓ Séparation selon la charge et la masse (sur gel d'amidon ou de polyacrylamide), en conditions non dénaturantes.

Chapitre 3 : Méthodes de marquage

1. Les méthodes isotopiques

1.1. Définition et principe

Les méthodes isotopiques reposent sur l'utilisation d'isotopes radioactifs comme marqueurs pour étudier les processus biologiques et chimiques. Un isotope est une variante d'un élément chimique ayant le même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons. Certains isotopes sont radioactifs et émettent des rayonnements lors de leur désintégration.

Le principe du marquage isotopique consiste à incorporer un isotope radioactif dans une molécule d'intérêt pour suivre son comportement dans un système biologique ou chimique. Les rayonnements émis permettent ensuite de détecter et quantifier la molécule marquée. Cette technique est utilisée en biologie, médecine, biochimie et en sciences de l'environnement.

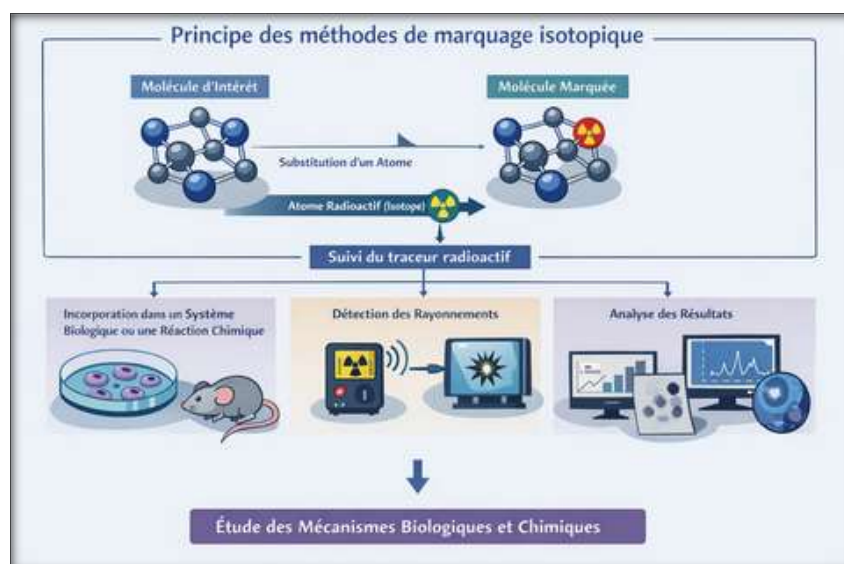


Figure 32 : Principe des méthodes de marquage isotopique

1.2. Les différents traceurs et leur nature

Les isotopes utilisés comme traceurs radioactifs sont classés selon leur type d'émission :

- **Isotopes β^- (bêta moins) :**
 - **Tritium (^3H)** : Utilisé pour l'étude des interactions biologiques et les tests de liaison aux récepteurs.
 - **Carbone-14 (^{14}C)** : Utilisé en datation et en biologie moléculaire.

- **Phosphore-32 (^{32}P)** : Utilisé pour marquer l'ADN et l'ARN en biologie moléculaire.
- **Isotopes β^+ (bêta plus) :**
 - **Fluor-18 (^{18}F)** : Utilisé en Tomographie par Emission de Positons (TEP) pour le diagnostic des cancers.
- **Isotopes γ (gamma) :**
 - **Technétium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)** : Utilisé en imagerie médicale.
 - **Iode-131 (^{131}I)** : Utilisé pour le traitement des maladies thyroïdiennes.

a) Choix du traceur

Le choix du traceur dépend de plusieurs critères :

- Type de rayonnement (α , β , γ)
- Demi-vie de l'isotope
- Nature de l'échantillon (liquide, solide, tissu vivant)
- Sensibilité de la méthode de détection utilisée

1.3. Détection de la radioactivité et mesure

Les techniques de détection des isotopes radioactifs incluent :

- **Compteurs Geiger-Muller** : détection des particules bêta et gamma.
- **Scintillation liquide** : mesure des émissions β^- avec un milieu de scintillation.
- **Gamma-caméra** : détection des rayons γ pour les applications médicales.
- **Autoradiographie** : technique permettant de visualiser la distribution des isotopes radioactifs.

1.4. Utilisations des molécules radioactives comme traceurs

- **Suivi des voies métaboliques** : par exemple, marquage du glucose avec du fluor-18 pour l'imagerie médicale.
- **Détection de cancers et de maladies** : utilisation de radioisotopes pour la localisation de tumeurs.

- **Recherche biomédicale** : études des réactions enzymatiques et des mécanismes cellulaires.

2. Dosage radio-immunologique

2.1.Principe

Le dosage radio-immunologique repose sur la compétition entre un antigène à doser et un antigène marqué radioactivement pour la liaison à un anticorps spécifique. La quantité de radioactivité mesurée est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène à analyser

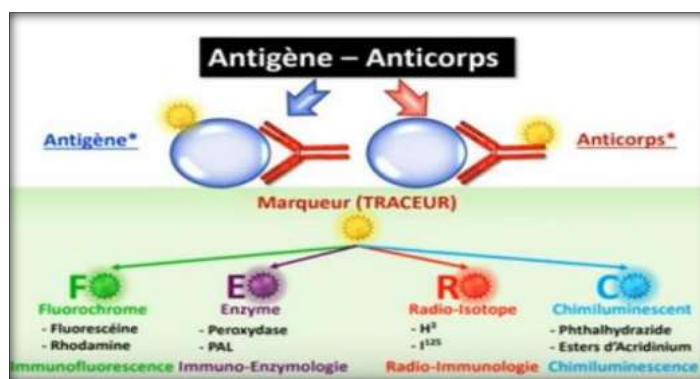


Figure 33 : Réactions Antigène-Anticorps avec marquage

Il existe deux méthodes de dosage radio-immunologique : par compétition et Sandwich

2.2.Méthodes par compétition :

Les méthodes par compétition, également appelées méthodes par défaut d'anticorps ou radio-immuno-dosage (Radio Immuno Assay, RIA), reposent sur un principe de compétition entre un antigène marqué et un antigène non marqué pour un nombre limité de sites de liaison sur l'anticorps.

Dans ce type de méthode, la concentration des anticorps est volontairement inférieure à la concentration totale des antigènes, ce qui entraîne une compétition pour la fixation sur les sites anticorps et la formation simultanée des complexes [AC–AG*] et [AC–AG]. Lorsque la concentration en anticorps et en antigène marqué (AG*) est maintenue constante, l'augmentation de la concentration en antigène non marqué (AG) provoque

une augmentation de la formation du complexe [AC–AG] au détriment du complexe [AC–AG*].

Si une technique permet de séparer les antigènes libres des complexes formés, sans perturber l'équilibre de la réaction, il devient alors possible de déterminer la concentration de l'antigène en mesurant le signal du marqueur radioactif. À l'équilibre, la proportion entre les formes libre et liée de l'antigène marqué reflète directement la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon, selon la relation des rapports entre les fractions libres et liées.

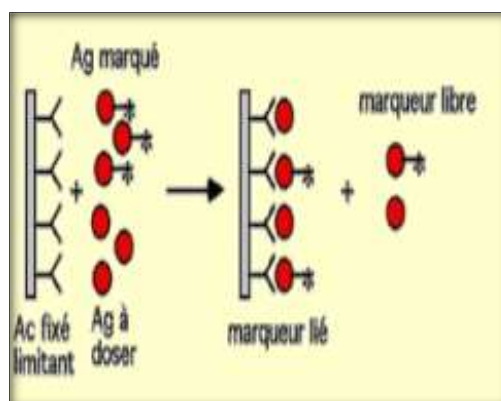


Figure 34 : Dosage radio-immunologique par compétition

2.3.Méthodes Sandwich :

Développées plus récemment, ces méthodes ont connu un essor important avec l'introduction des anticorps monoclonaux et visent à remplacer les méthodes par compétition.

Leur principe repose sur plusieurs caractéristiques distinctives (Figure 35). Elles se déroulent en présence d'un excès d'anticorps, ce qui favorise une fixation complète de l'antigène. Un premier anticorps (AC1), fixé sur un support solide, capte spécifiquement l'antigène (AG) présent dans la solution ; la quantité d'AC1 immobilisée est suffisante pour offrir un nombre de sites de liaison supérieur au nombre de molécules d'antigène.

Un second anticorps marqué (AC2*), utilisé comme révélateur, est ensuite ajouté. Il se fixe sur l'antigène déjà lié à l'AC1, reconnaissant un épitope différent. L'antigène se retrouve ainsi « pris en sandwich » entre les deux anticorps (AC1 et AC2*).

Après un simple lavage, les complexes formés (AC1–AG–AC2*, notés B*) sont séparés des anticorps marqués libres (AC2*, notés F*). Le signal fourni par le marqueur de l'AC2* est alors proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon.

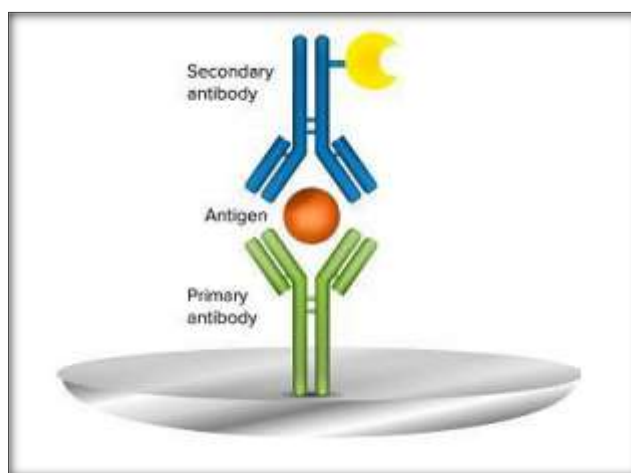


Figure 35 : Dosage radio-immunologique Sandwich

2.4.Applications

- **Dosage des hormones** : cortisol, insuline, TSH.
- **Diagnostic des maladies auto-immunes** : détection des anticorps anti-nucléaires.
- **Marqueurs tumoraux** : détection précoce des cancers.

3. Dosages radio-enzymatiques

3.1. Définition et principe

Ce sont des techniques immunologiques dans lesquelles l'un des constituants de la réaction immunitaire, l'antigène ou l'anticorps, est couplé à une enzyme. Les enzymes les plus couramment utilisées sont la phosphatase alcaline, la peroxydase et la β -galactosidase. Le marquage enzymatique doit être réalisé de manière à ne pas altérer la spécificité ni l'affinité de l'anticorps, ni la structure de l'antigène. Pour chaque enzyme employée, un substrat chromogène spécifique est ajouté au milieu réactionnel ; sous l'action de l'enzyme, ce substrat est transformé en un produit coloré absorbant la lumière à une longueur d'onde

donnée. Ces techniques peuvent être utilisées à des fins qualitatives, avec une lecture visuelle directe, ou quantitatives, par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

3.2. Techniques quantitatives :

a. Techniques ELISA :

Le principe de la technique ELISA repose sur une réaction spécifique entre un antigène et un anticorps, dont l'un est immobilisé sur un support solide. Un anticorps ou un antigène marqué par une enzyme se fixe sur le complexe formé. Après lavage, un substrat est ajouté et l'enzyme catalyse une réaction produisant un signal coloré. L'intensité de ce signal, mesurée visuellement ou par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité d'antigène ou d'anticorps présent dans l'échantillon. Il existe plusieurs variantes méthodologiques des techniques ELISA (Figure 36)

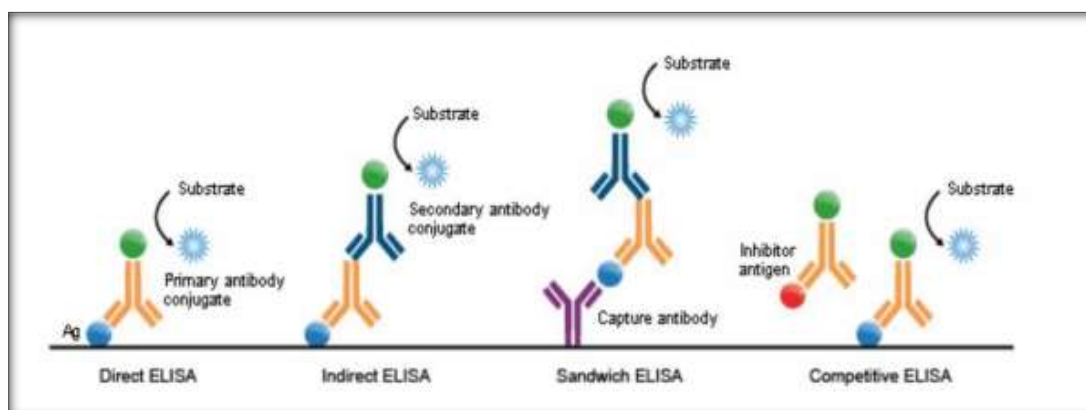


Figure 36 : Techniques ELISA

3.3. Techniques qualitatives :

a. ELISA directe :

En immunohistochimie, cette technique permet de détecter la présence d'antigènes dans un tissu en utilisant un anticorps spécifique couplé à une enzyme. L'observation et l'analyse se font ensuite au microscope optique (Figure 37).

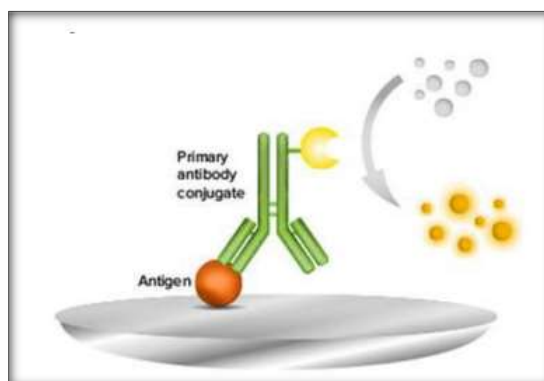


Figure 37 : ELISA directe

b. Western blot :

Il s'agit d'une technique immunoenzymatique appliquée sur des membranes de nitrocellulose. Elle comprend deux étapes principales : la séparation des protéines par SDS-PAGE à haute résolution, suivie du transfert des bandes d'antigènes sur la membrane (blotting). La détection de la protéine d'intérêt se fait ensuite directement à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à un traceur, ou indirectement via un anticorps primaire et un anticorps secondaire associé à un traceur enzymatique, générant un précipité coloré. Cette méthode permet une analyse qualitative, voire semi-quantitative (Figure 38).

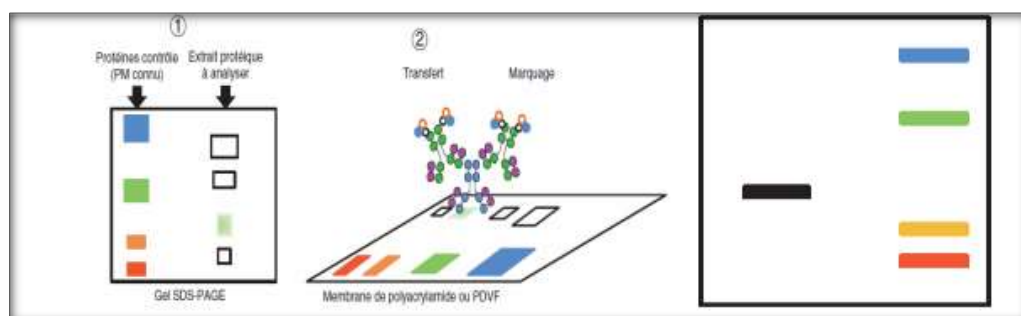


Figure 38 : Détection par western blot

c. Immunodot :

L'immunodot (dot-blot) est une technique dérivée du western-blot où les antigènes sont déposés directement sur des bandelettes de nitrocellulose, sans séparation préalable des protéines sur gel. Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique de type indirect,

principalement utilisée pour détecter des anticorps. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'un cercle ou d'un trait coloré (Figure 39).

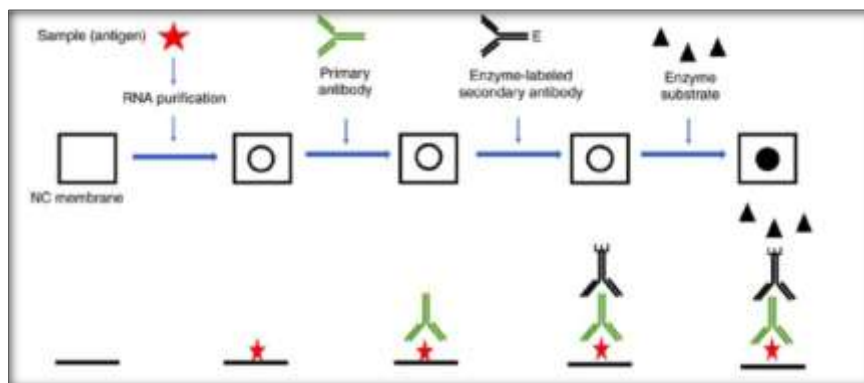


Figure 39 : diagramme de la technique Dot blot

d. Elispot :

Il s'agit d'une variante de la technique ELISA, utilisée pour détecter les cellules produisant des cytokines. Les puits de la plaque sont recouverts d'anticorps spécifiques à la cytokine d'intérêt, dans lesquels sont cultivées les cellules du patient. Les cytokines sécrétées sont captées localement par les anticorps présents. Les étapes suivantes suivent le principe de l'ELISA sandwich classique. Un résultat positif apparaît sous forme de spots colorés, chaque spot correspondant à une cellule productrice (Figure 40).

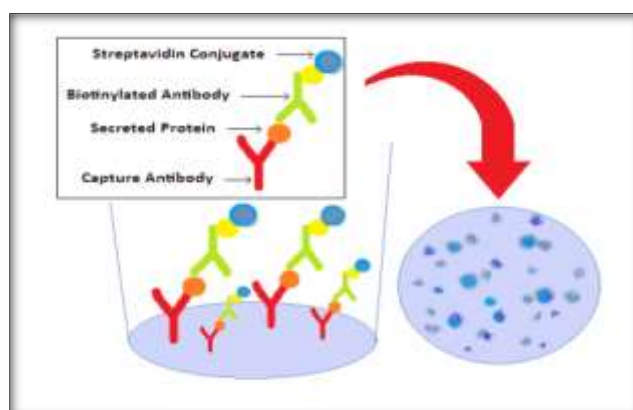


Figure 40 : Technique Elispot

3.4.Applications

- **Diagnostic des déficiences enzymatiques** : maladies génétiques.
- **Dosage des neurotransmetteurs** : dopamine, sérotonine.
- **Médecine nucléaire** : suivi des traitements.

Chapitre 4 : Microscopie électronique

Un faisceau d'électrons est utilisé pour la formation de l'image, l'objet étant bombardé par ces électrons. Le microscope électronique emploie des lentilles électrostatiques et magnétiques afin de focaliser le faisceau et de construire l'image. Cette technique permet de révéler l'ultrastructure des cellules eucaryotes et d'approfondir l'observation de l'organisation des cellules procaryotes. La longueur d'onde des électrons étant beaucoup plus courte que celle de la lumière visible, le microscope électronique offre une résolution nettement supérieure, pouvant atteindre jusqu'à deux millions de fois celle des microscopes optiques.



Figure 41 : Microscope électronique

On distingue, en fonction du type d'image obtenue, deux grandes catégories de microscopes : les microscopes conventionnels à transmission, dont la conception s'inspire directement de celle des microscopes photoniques, et les microscopes à balayage, dont le principe est proche de celui des systèmes de télévision.

Dans les microscopes à transmission, une zone relativement large de l'échantillon est éclairée à l'aide d'un ensemble de lentilles condenseurs. Après la traversée de l'échantillon, un système optique constitué de plusieurs lentilles (objectif, intermédiaire et projective) permet de former une image agrandie ou un cliché de diffraction.

À l'inverse, dans les microscopes à balayage, le système d'éclairage focalise une sonde primaire fine qui balaie la surface de l'échantillon. Il n'existe pas de système optique après l'échantillon ; ce sont des détecteurs et des spectromètres adaptés qui recueillent les différents signaux issus de l'interaction entre la sonde et la matière. L'image est alors reconstruite grâce au balayage séquentiel de la sonde et à la visualisation synchronisée des signaux détectés.

1. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission (MET, ou TEM pour Transmission Electron Microscopy) est une technique de microscopie qui repose sur la transmission d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon extrêmement mince. Les interactions entre les électrons et la matière traversée permettent la formation de l'image, avec une résolution pouvant atteindre 0,08 nanomètre. Les images produites sont souvent complexes et nécessitent une interprétation appuyée sur des bases théoriques pour en tirer une analyse correcte.

1.1.Principe de fonctionnement :

Le principe de la microscopie électronique à transmission (MET) repose sur la transmission d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon très mince. Les électrons sont produits par un canon à électrons, accélérés sous vide, puis focalisés sur l'échantillon à l'aide de lentilles électromagnétiques condenseurs.

Lorsqu'ils traversent l'échantillon, les électrons interagissent avec la matière : une partie est transmise tandis qu'une autre est diffusée ou absorbée, selon la structure et la densité des constituants. Ces différences d'interaction créent un contraste.

Les électrons transmis sont ensuite collectés par un système de lentilles (objectif, intermédiaire et projective) qui forme une image agrandie. Celle-ci est observée sur un écran fluorescent ou enregistrée par un détecteur, permettant l'étude détaillée de l'ultrastructure interne de l'échantillon.

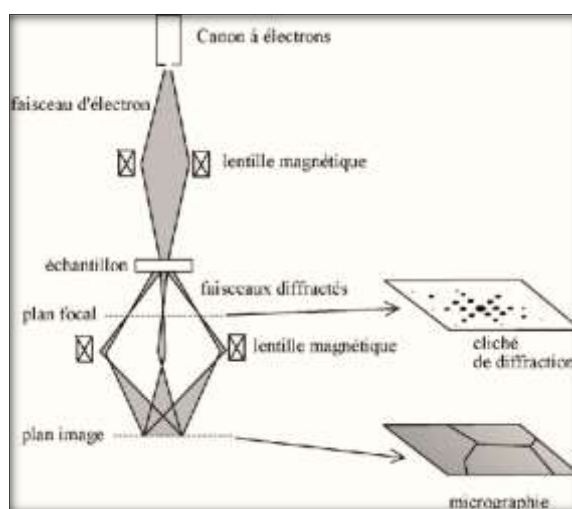


Figure 42 : Principe de la microscopie électronique à transmission

1.2. Description de l'appareil

- **Source d'électrons** : Fournit le faisceau primaire (filament de tungstène, LaB_6 , source à émission de champ FEG).
- **Lentilles électromagnétiques** : Condenseur (contrôle l'intensité du faisceau), objectif (formation de l'image) et projecteur (agrandissement).
- **Système de détection** : Écran fluorescent, caméra CCD, détecteurs à semi-conducteurs, détecteurs à comptage direct.
- **Système de vide** : Ultra-vide nécessaire pour éviter la diffusion des électrons par les molécules de gaz.
- **Porte-échantillon** : Permet le maintien et le positionnement précis de l'échantillon, avec possibilité de refroidissement, chauffage ou inclinaison.

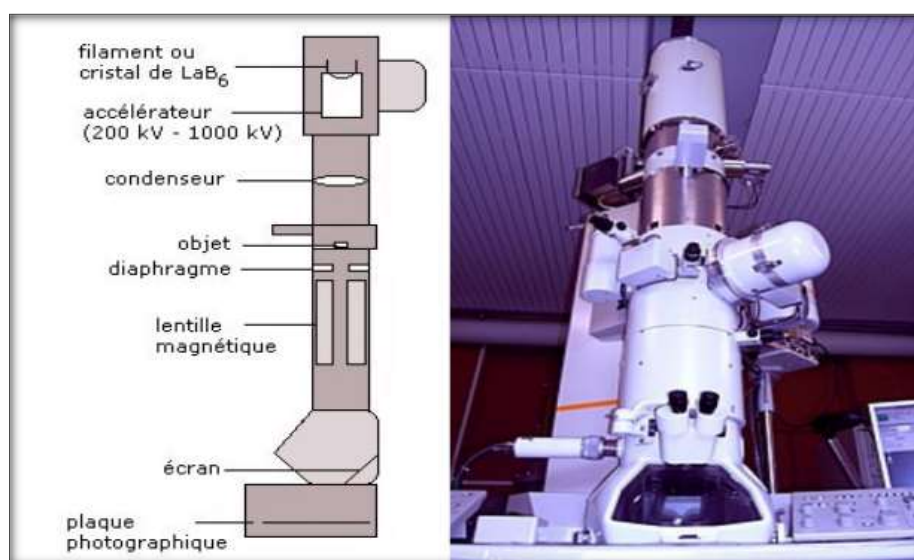


Figure 43 : Composants d'un microscope électronique à transmission

1.3. Préparation des échantillons :

La préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique en transmission constitue une étape essentielle, car elle conditionne en grande partie la qualité des résultats obtenus. Étant donné que le faisceau d'électrons doit traverser l'échantillon, celui-ci doit présenter une épaisseur extrêmement faible, idéalement de quelques nanomètres. Les méthodes de préparation varient selon le domaine d'application du MET, notamment entre la biologie et la science des matériaux. La figure ci-dessous montre des Vésicules sécrétées par *Pseudomonas aeruginosa* produisant CprA obtenue par observation au microscope électronique à transmission.

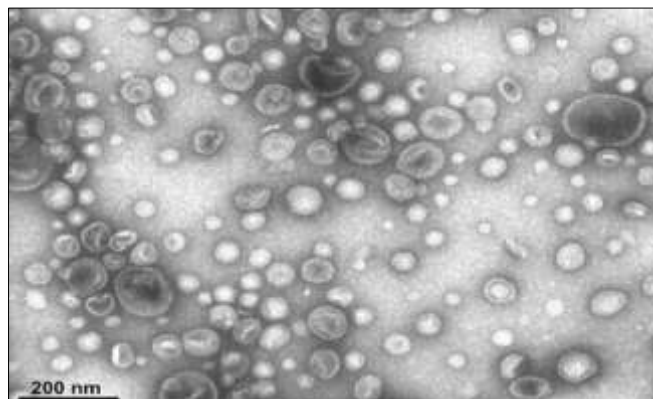


Figure 44 : Observation au microscope électronique à transmission de Vésicules sécrétés par *Pseudomonas aeruginosa* produisant CprA

2. Microscopie électronique à balayage

La **microscopie électronique à balayage (MEB)** est une technique d'imagerie qui permet d'analyser la surface d'un échantillon avec une grande profondeur de champ et une résolution nanométrique. Contrairement à la microscopie électronique en transmission (MET), où le faisceau d'électrons traverse l'échantillon, en MEB, les électrons interagissent avec la surface et produisent des signaux secondaires qui sont détectés pour reconstruire une image détaillée.

La MEB est utilisée dans de nombreux domaines scientifiques et industriels, notamment en sciences des matériaux, biologie, géologie et nanotechnologies. Son principal atout réside dans sa capacité à fournir des images tridimensionnelles de haute résolution tout en permettant une analyse chimique détaillée.

2.1.Principe de fonctionnement

Dans un microscope électronique à balayage, un faisceau d'électrons est dirigé vers l'échantillon à observer. L'interaction entre ce faisceau et la matière entraîne l'émission de différents signaux. Parmi ceux-ci, les électrons secondaires de faible énergie sont attirés vers un détecteur dédié, où le signal est amplifié ; chaque point d'impact du faisceau correspond ainsi à un signal électrique.

L'intensité de ce signal dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact, qui influence le rendement en électrons secondaires, et de la topographie locale de la surface. Le balayage progressif du faisceau sur l'échantillon permet ainsi d'obtenir une image ou une

cartographie détaillée de la zone analysée. Par ailleurs, les électrons rétrodiffusés fournissent une image présentant un contraste chimique sur les surfaces planes, tandis que l'émission de rayons X permet la réalisation d'analyses chimiques par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS).

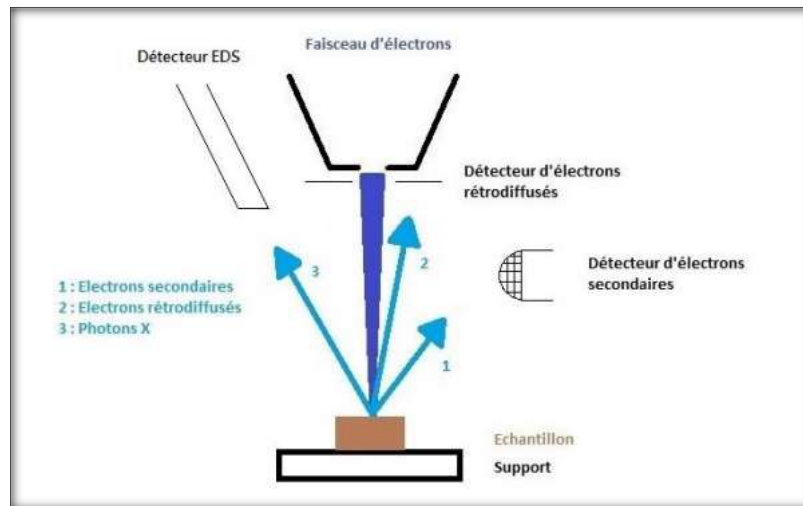


Figure 45 : Principe d'un microscope électronique à balayage

2.2. Composants d'un MEB

- **Source d'électrons** : Produit le faisceau d'électrons (filament de tungstène, LaB_6 , FEG).
- **Lentilles électromagnétiques** : Focalisent et ajustent le faisceau d'électrons (condenseur et objectif).
- **Système de balayage** : Contrôle le mouvement du faisceau pour couvrir l'échantillon ligne par ligne.
- **Chambre d'échantillon** : Maintient l'échantillon sous vide et permet son positionnement.
- **Détecteurs** : Collectent les électrons secondaires, rétrodiffusés, rayons X et photons cathodoluminescents.
- **Système d'acquisition et d'affichage** : Convertit les signaux en images exploitables et permet l'analyse des données.

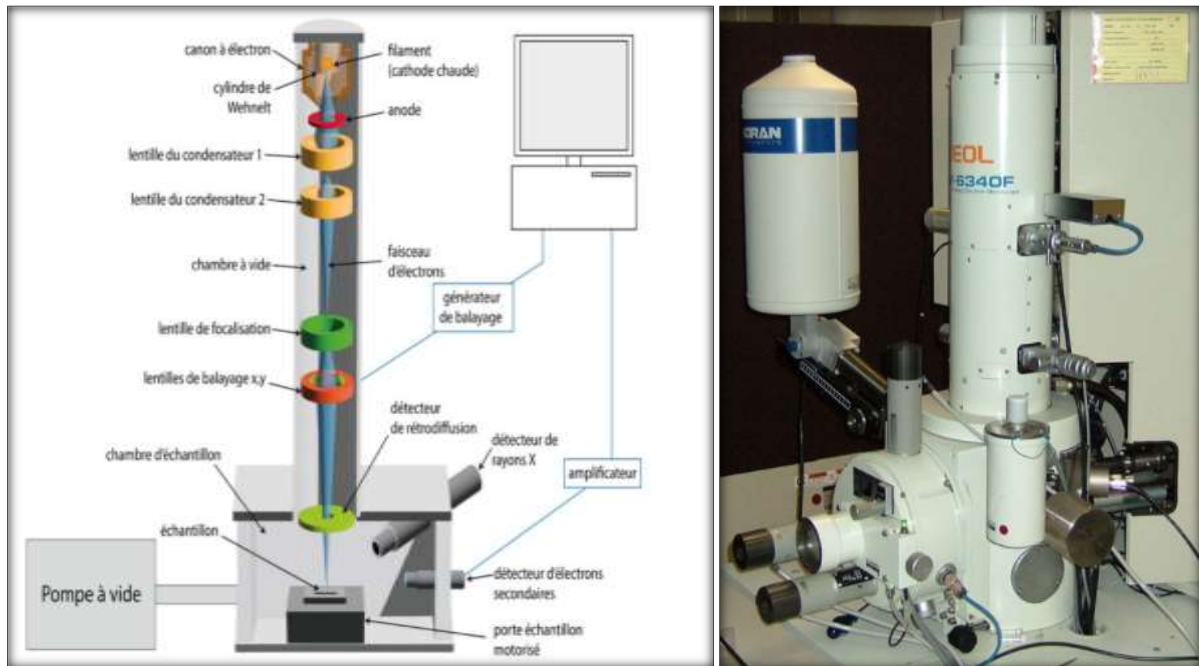
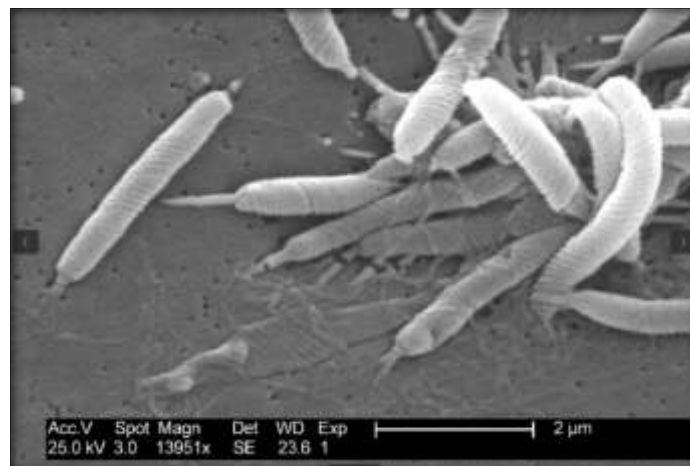


Figure 46 : Composants d'un MEB

2.3.Préparation des échantillons :

L'utilisation d'un microscope électronique à balayage en mode conventionnel, à une pression d'environ 10^{-3} Pa, impose deux exigences principales aux échantillons : ils doivent être électriquement conducteurs et capables de supporter les conditions de vide. Les échantillons métalliques présentent l'avantage de satisfaire généralement ces deux conditions. En revanche, lorsque la surface de l'échantillon n'est pas conductrice, notamment en présence d'oxydes ou de revêtements de surface, il est nécessaire de procéder à une métallisation préalable afin de permettre une observation correcte.

Figure 47 : Observation d'*Helicobacter bilis* au microscope électronique à balayage

Références

1. Collins, C. H., & Kennedy, D. A. (1999). *Laboratory-acquired infections: History, incidence, causes and prevention* (4th ed.). Butterworth-Heinemann.
2. De Graeve, J., Berthou, F., & Prost, M. (1985). *Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse : Technologie et applications dans les domaines de l'environnement, la pharmacologie et la biologie*. Masson.
3. Gavrilovic, M., Maginot, M. J., Schwartz-Gavrilovic, C., & Wallach, J. (1996). *Manipulations d'analyses biochimiques*. Doin.
4. Guillaumin, D. (1980). *La pratique du microscope électronique à balayage en biologie*. Elsevier Masson.
5. Guiraud, J., & Galzy, P. (1980). *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Éditions de l'Usine.
6. Herzberg, M., & Revel, M. (1972). *Atlas de biologie moléculaire : Microscopie électronique des molécules informatives*. Hermann.
7. Hocine, S. (2017). *Méthodes d'analyse spectroscopiques en chimie organique*. Éditions universitaires.
8. Larpent, J.-P., & Larpent-Gourgau, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie* (3e éd.). Lavoisier Tec & Doc.
9. Le Hir, A., Chaumeil, J.-C., & Brossard, D. (2009). *Pharmacie galénique*. Masson.
10. Marouf, A. (2001). *Analyse instrumentale à l'usage des biologistes*. Dar El Gharb.
11. Moussard, C., & Tagu, D. (2003). *Principes des techniques de biologie moléculaire* (2e éd. revue et augmentée). INRA.
12. Multon, J.-P. (1981). *Techniques d'analyses et contrôle dans les industries agroalimentaires* (Tomes 1 & 2). Tec & Doc.
13. Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., & Killington, R. (2000). *L'essentiel en microbiologie*. Berti.
14. Pinta, M. (1971). *Spectrométrie d'absorption atomique* (Tome 1). Masson.
15. Rouessac, F., Rouessac, A., & Cruché, D. (2004). *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.
16. Rouessac, F., Rouessac, A., & Cruché, D. (2004). *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes* (6e éd.). Dunod.
17. Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. De Boeck.