

## Techniques de séparation

### Introduction

Dans le cas d'un mélange hétérogène constitué d'eau et de particules solides, il existe de nombreuses techniques permettant de les séparer. Les plus simples sont la décantation, la centrifugation et la filtration.

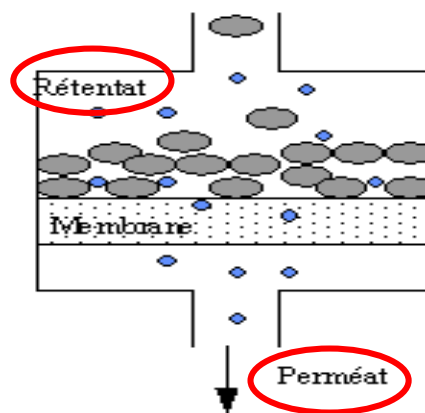
### I- La filtration

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux qui constitue un filtre et retient la phase solide.

L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration est nommé filtrat ou perméat, tandis que la fraction retenue par le filtre est nommée résidu, rétentat ou gâteau.

On récupère après filtration soit le solide, soit le liquide, soit le liquide et le solide.

La filtration est une technique très utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire, de la chimie, de la pharmacie



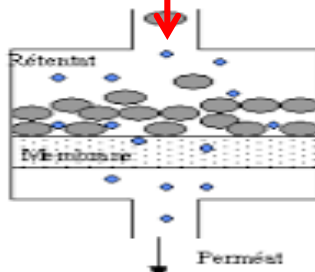
#### La filtration permet de :

- purifier les solutions en éliminant les particules en suspension
- stériliser les solutions en éliminant les microorganismes
- filtrer l'air des zones à atmosphère contrôlée**

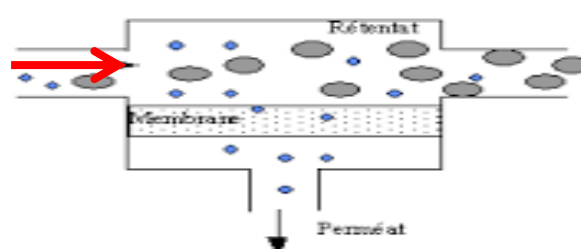
#### Mode de passage du fluide

**Filtration frontale** : l'ensemble du fluide traverse le milieu filtrant, perpendiculairement à la membrane

**Filtration tangentielle** : le fluide est amené tangentiellement à la membrane qui ne se laisse passer que par une partie du fluide



**Filtration frontale**



**Filtration tangentielle**

## Mécanismes de filtration

Si la matière en suspension est retenue à la surface du filtre, la filtration est dite en surface, en gâteau ou en support. Si les matières sont retenues dans l'épaisseur du filtre, elle est dite en volume, en profondeur ou sur lit filtrant.

### Filtration en surface (le criblage ou tamisage)

C'est un phénomène mécanique. Le filtre est une membrane perforée par des pores calibrés et de diamètres voisins. Le filtre retient toutes les particules dont le diamètre est supérieur au diamètre des pores. On parle de filtre-écran ou de filtre membrane.

L'avantage de cette technique est qu'elle ne retient pas les liquides. Les inconvénients sont:

- Pores d'un diamètre de l'ordre du micromètre.
- Possibilité de colmatage du filtre.

Pour pallier le problème de colmatage, il existe trois types de solutions :

- L'augmentation du diamètre des pores du filtre, tant que les critères de filtration sont respectés.
- La mise en place d'une préfiltration, parfois par un filtre aux pores de diamètre plus important ou plus généralement par l'installation d'un cyclone ou d'un multicyclone en amont.
- La mise en place d'un système de décolmatage, par secousse (de plus en plus rare) ou à air comprimé.

### Filtration en profondeur (l'absorption)

Ce mécanisme consiste à retenir à l'intérieur du réseau poreux du filtre des particules dont la taille peut être inférieure au diamètre des pores.

C'est un phénomène physique, avec 2 facteurs principaux :

- Réseau poreux chargé électriquement
- Constitué par de longs et fins canalicules fortement contournés.

Filtres constitués de cellulose, laine, coton.

L'avantage principal est la grande capacité de rétention.

Les inconvénients sont:

- Possibilité de relâcher les particules (relargage ou désorption).
- Absorption de liquides.
- Difficulté de définir la porosité.

## II- Décantation

La **décantation** est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non miscibles dont l'une au moins est liquide. On peut ainsi séparer soit plusieurs liquides non miscibles de densités différentes, soit des solides insolubles en suspension dans un liquide

**Principe:** si on laisse reposer une suspension solide dans une phase liquide, on observe que les particules sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède, tendent à tomber vers le fond ou à remonter à la surface selon leur densité et leur taille. Cette décantation peut cependant être relativement lente pour les très fines particules et les liquides particulièrement visqueux.

## Décantation de matières solides

La décantation consiste à **laisser reposer** un mélange hétérogène suffisamment longtemps pour que les particules solides en suspension tombent **au fond** du récipient. On peut ensuite verser délicatement dans un autre récipient le mélange qui **surname** : on obtient un mélange quasiment homogène.

On appelle alors généralement le liquide « surnageant » et les particules solides déposées au fond du récipient « dépôt ».

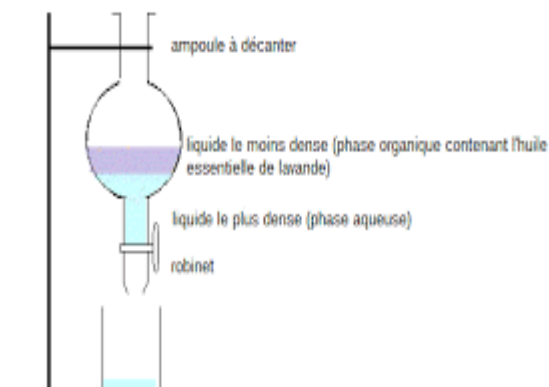


## Séparation de liquides

Lorsque deux liquides ne sont pas miscibles, comme l'huile et l'eau, il suffit de laisser reposer le mélange pour que le liquide le plus dense se place en dessous du liquide le moins dense, et qu'apparaisse une surface de séparation horizontale entre les deux liquides.

Pour séparer deux liquides non miscibles, on utilise une ampoule à décanter. L'**ampoule à décanter** a la forme d'un entonnoir prolongé par un long tube étroit terminé par un robinet. Lors de la décantation, le liquide le plus dense se placera sous le liquide le moins dense. L'ouverture du robinet va permettre de séparer les deux liquides.

Dans les laboratoires de chimie ou de biologie, on utilise couramment ce procédé lors des extractions liquide-liquide impliquant une phase aqueuse et une phase organique.



## Exemples de décantation de la vie courante

- La vinaigrette a tendance à se séparer avec une phase organique en surface (l'huile), une phase aqueuse (vinaigre) et un dépôt au fond constitué des ingrédients solides insolubles (épices)

- La peinture (matière) entreposée forme deux phases distinctes, l'une avec les pigments au fond, une autre en surface composée majoritairement de solvant.
- La lie est un dépôt solide qui peut se former dans le vin, la bière, etc.
- La sédimentation est une décantation naturelle des matières solides en suspension dans l'eau (sables et matières organiques).

### Les limites de la décantation

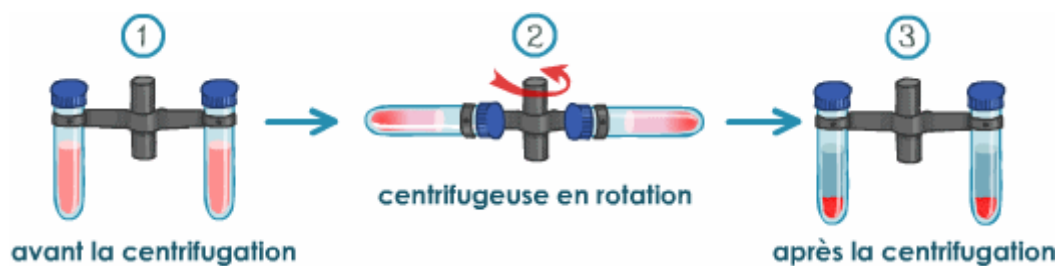
Lors d'une décantation, les particules en suspension se déposent au fond du récipient. La séparation obtenue est parfois partielle, car il reste quelques particules en suspension. Dans certains cas, par exemple lorsque l'eau est mélangée à du sable, la décantation permet d'obtenir un liquide limpide.

Un mélange liquide qui ne décante pas, bien que composé de liquides non miscibles ou de solides insolubles, s'appelle un colloïde. Par exemple dans le lait pasteurisé, contrairement au lait frais, la crème ne surnage pas sur le lait. Les particules de gras trop fines sont émulsionnées. Souvent, la centrifugation suffisamment poussée permettra tout de même de forcer la décantation.

Lorsque la décantation est difficile ou lorsque l'on veut accélérer le processus, on peut utiliser la centrifugation qui utilise la force centrifuge au lieu de la gravitation.

### III. La centrifugation

La centrifugation est un procédé de séparation mécanique des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge entraînée dans un mouvement de rotation. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse.



### Principe de la technique

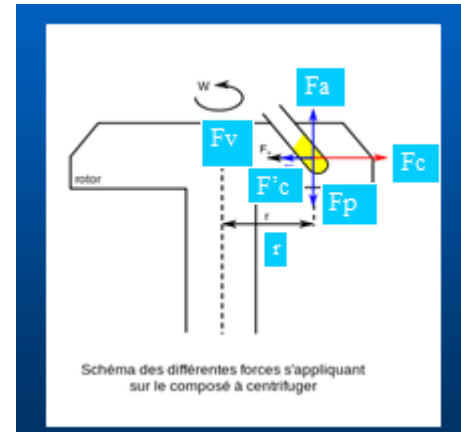
Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces : son poids, dirigé vers le bas, et la poussée d'Archimède dirigée vers le haut. Selon sa densité, supérieure ou inférieure à celle du milieu, la force résultante sera dirigée vers le bas ou vers le haut, le corps descendra ou remontera dans le liquide.

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières. Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à la gravité, et à la poussée d'Archimède. On faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, la force centrifuge qui est une accélération qui s'exerce radialement vers

l'extérieur de l'axe de rotation et qui va pousser les particules vers l'extérieur du rotor, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger. La force centrifuge est générée en faisant tourner à haute vitesse un rotor pouvant contenir des tubes à centrifuger. Elle est exprimée en newton.

La séparation des composés d'un mélange est réalisable par décantation, sous l'action de la seule gravitation, mais elle nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est donc souvent inefficace. Il est donc plus efficace d'utiliser la centrifugation. Au cours de cette opération de séparation, les composés dans le fluide situés à une distance  $r$  de l'axe de rotation sont soumis à différentes forces:

- La force de pesanteur descendante  $F_p$
- La poussée d'Archimède ascendante  $F_a$
- Une force de friction  $F_v$
- La force centripète  $F_c$
- La force centrifuge  $F_c$



La séparation s'opère par l'action de la force centrifuge  $F_c$  sur les composés. Cette force centrifuge, exprimée en newtons, est donnée par la relation  $F_c = m\gamma_c$  avec  $\gamma_c = r\omega^2$  en  $m/s^2$  dont :

- La masse  $m$  du composé à séparer
- La distance  $r$  du tube à l'axe de rotation de la centrifugeuse
- La vitesse angulaire  $\omega$  exprimée en radians par seconde ou en tour par minute.

Le rapport de la force centrifuge  $F_c$  sur le poids  $F_p$  est appelé **intensité de la pesanteur artificielle** et s'exprime en "g". Les valeurs utilisées en centrifugation sont d'environ 400 à 10 000 g ce qui correspond à des vitesses de rotation de l'ordre 2 000 à 10 000 tr/min suivant le rayon des rotors.

\*La vitesse avec laquelle se déplaceront ces particules est proportionnelle à

- la force gravitationnelle à laquelle la particule est soumise
- la masse de la particule
- la différence entre la densité de la particule et celle du solvant, et inversement proportionnelle à
- la friction avec le milieu, en fonction de la taille et à la géométrie des particules.

### Méthodes et appareillage (Centrifugeuses)

On a développé une gamme d'appareils en fonction des besoins expérimentaux, particulièrement au niveau des accélérations requises, des volumes de matériel à centrifuger, de la température de travail, etc.

**Centrifugeuses de table:** Les modèles les plus simples, souvent appelées centrifugeuses cliniques, permettent d'atteindre de faibles accélérations (1000 à 3000  $xg$ ) à des vitesses de rotation relativement basses (moins de 3000 RPM). Certains modèles sont réfrigérés, certains d'autres non.

**Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes. Elles permettent d'obtenir des vitesses de rotation de l'ordre de 30 000 RPM, donnant pour les plus petits rotors des accélérations d'environ 20 000 xg. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger des relativement gros volumes. Certains rotors peuvent même contenir quatre ou six bouteilles de 250 mL.

**Ultracentrifugeuses:** Ce sont des appareils complexes et coûteux qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300 000 xg) en faisant tourner des rotors très rapidement (50-85 000 RPM). De telles vitesses de rotation ne peuvent s'obtenir que sous pression très réduite. Les faibles pressions permettent aussi d'éviter la surchauffe du rotor et de l'échantillon. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces appareils doivent donc être munis de pompe à vide et de systèmes de réfrigération. Les volumes sont quelque peu limités, généralement on ne trouve pas de rotors pouvant contenir plus d'une dizaine de tubes de 40 mL.

**Microcentrifugeuses:** On a aussi développé des centrifugeuses spécialement conçues pour les micro-volumes très souvent employés en biochimie moderne. Les microtubes à centrifuger sont des petits tubes coniques généralement de 1.5 mL fait de polypropylène et assez peu dispendieux. Les centrifugeuses de ce type peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12-15 000 x g. Les modèles les moins coûteux n'ont pas de contrôle de vitesse et ne sont pas réfrigérés.

**Ultracentrifugeuses analytiques:** Ce sont des appareils de moins en moins utilisés. Ces centrifugeuses servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines. D'autres techniques beaucoup moins coûteuses sont utilisées de nos jours: électrophorèse, filtration sur gel...

## Utilisation

Beaucoup d'expériences en biochimie exigent une ou plusieurs étapes de centrifugation.

La centrifugation est utilisée dans trois principaux domaines :

- la séparation de différentes espèces les unes des autres :
  - dans le quotidien : essorage de la salade (ex:essoreuse à salade), essorage du linge (ex:machine à laver), extraction du jus des fruits et légumes<sup>7</sup> ;
  - dans l'industrie alimentaire: séparation de la crème du lait (écrémage)<sup>8</sup>, élimination des particules de la bière ou du vin (clarification), extraction des huiles et des matières grasses (extraction de l'huile d'olive), extraction du miel (apiculture) ;
  - dans les laboratoires : pour récupérer un précipité, pour séparer des éléments figurés dans le sang (globules rouges, globules blancs, plaquettes en suspension dans le plasma sanguin), séparation de composés cellulaires pour étude biochimique ou moléculaire ;
  - dans le domaine du nucléaire : pour enrichir l'uranium avec l'isotope léger <sup>235</sup>U ;
- l'analyse chimique:
  - centrifugation analytique ;
- la mise en forme des matériaux :
  - coulée par centrifugation pour les métaux et le béton ;
  - moulage par centrifugation pour les matières plastiques et les matériaux composites ;
  - fabrication de la barbe à papa.

## **Application à la biochimie**

Les centrifugeuses sont couramment utilisées par les laboratoires de biologie, afin de séparer des cellules, des protéines, ou encore de purifier des virus.

### **Fractionnement cellulaire**

On utilise fréquemment la centrifugation différentielle pour séparer les composantes cellulaires. Évidemment les vitesses exactes et les durées de centrifugation peuvent varier en fonction du type de tissus, du tampon ou d'autres facteurs.

Typiquement, on peut sédimenter les noyaux à 1-2000 xg durant 5-10 minutes. Les mitochondries et les chloroplastes tombent à environ 10-15000 xg durant 10-15 minutes. Les "microsomes", petites vésicules produites lors de l'homogénéisation et la fragmentation des compartiments membranaires comme le Golgi ou le réticulum endoplasmique, membrane plasmique. Etc. peuvent sédimenter après une trentaine de minutes à 15-30000 xg. Il faut comprendre que les "microsomes" ne sont pas des particules qui existent en tant que telles dans une cellule intacte. Ce sont des artefacts de la méthode du bris de la cellule. Ils contiennent néanmoins le contenu enzymatique ou autre composante des structures cellulaires (Golgi, réticulum) à partir desquelles ils sont formés.

Les ribosomes sont obtenus à 100,000 xg après 1 ou 2 heures. Le surnageant résiduel contient le matériel cytosolique. La centrifugation différentielle ne donne que des préparations grossièrement purifiées.