

Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

## **Master de Mycologie et Biotechnologie Fongique**

### **UE Méthodologique 01**

**Matière : Méthodes Physico-Chimiques d'Etude des Molécules  
Biologiques (Crédits : 09 ; Coefficients : 05)**

**Par le**  
**Dr Khaled BOULAHROUF**  
**Maître de Conférences classe B**  
**Année Universitaire 2019-2020**

## **1. Extraction**

### **1.1. Introduction**

D'origine naturelle ou anthropique (relatif à l'activité humaine comme l'érosion des sols, la pollution par les pesticides etc.), les substances trouvées dans l'environnement requièrent l'usage de méthodes d'analyse polyvalentes. Il s'agit à la fois d'extraire, d'analyser et d'identifier des composés extrêmement diversifiés. Elles supposent également l'application de procédures rigoureuses opérant par étapes.

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques. Avant d'extraire, il faut Préparer rigoureusement les échantillons qui est une étape fondamentale du processus analytique, le prétraitement des échantillons consiste soit à pré-concentrer des substances en teneur trop faible pour pouvoir être détectées directement, soit à les séparer d'une matrice excessivement complexe. Si les chercheurs consacrent près de 60% du temps requis pour réaliser une analyse globale à cette étape préliminaire, c'est parce que, selon plusieurs études, elle représente près de 30% des erreurs dans les résultats.

L'extraction de molécules organiques est une phase primordiale dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique.

En effet, si les hommes se soignent depuis des millénaires à l'aide de plantes, c'est tout simplement car elles contiennent des molécules présentant une activité thérapeutique spécifique.

Or les plantes sont d'un emploi souvent délicat et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes pouvant, dans certains cas, entraîner la mort.

Il convient donc d'isoler les composés actifs seuls.

### **1.2. Intérêt de l'extraction**

Nous l'avons vu, le but est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peu passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament.

Il existe ainsi des campagnes de recherches de plantes dont, par extraction, nous pourrions éventuellement tirer les médicaments de demain.

Ces campagnes ont lieu à travers le monde mais on pourra noter que le continent sud-américain présente un potentiel de découverte important en raison de conditions climatiques particulières et les conditions d'accès parfois difficiles ont pu préserver des écosystèmes particuliers.

Mais il se pose ici un problème éthique puisque les ressources naturelles peuvent parfois être pillées par des personnes voulant mettre la main sur des composés encore inconnus.

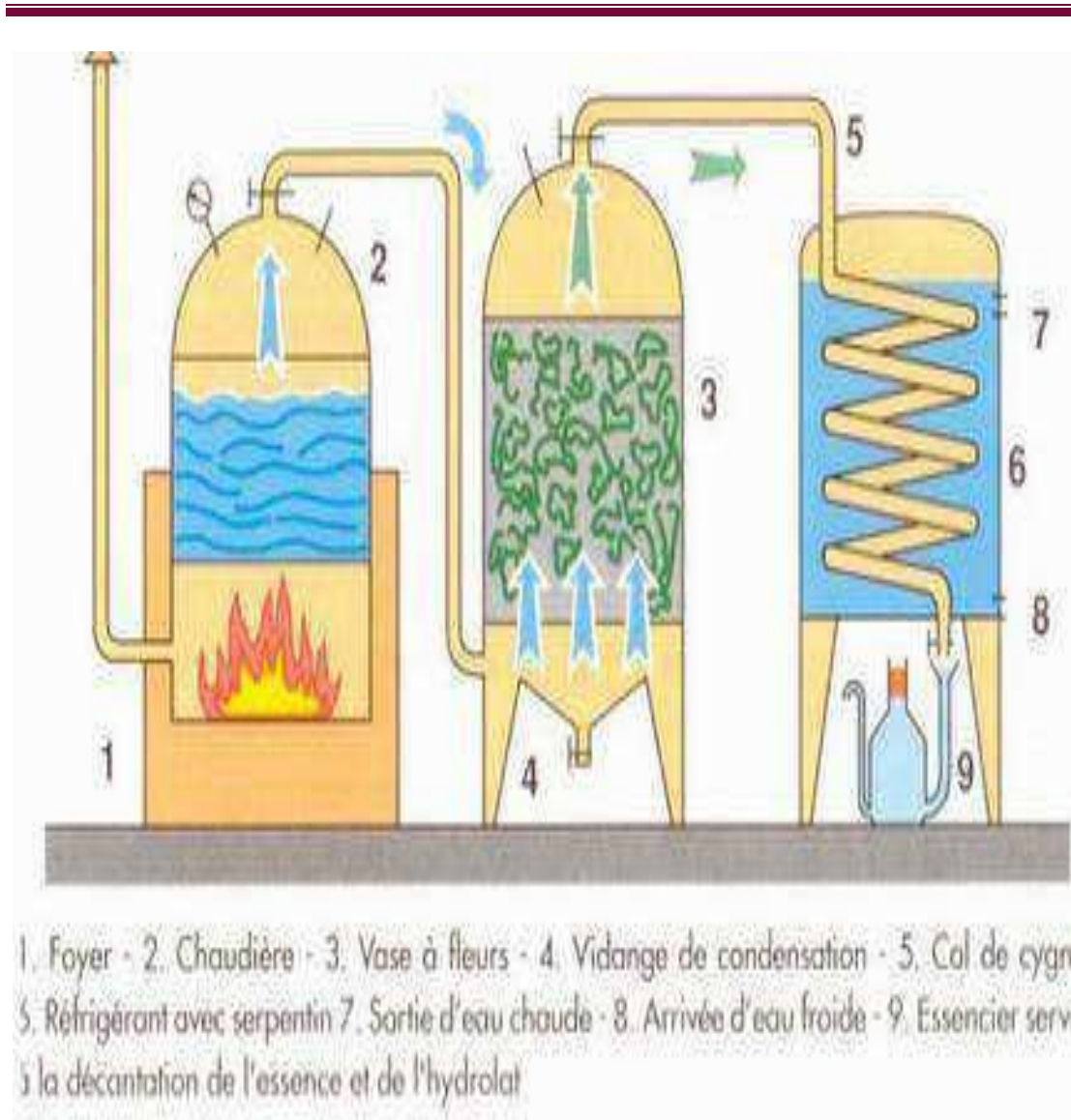
### **1.3. Les méthodes d'extractions classiques**

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne.

#### **1.3.1. L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation consiste, comme son nom l'indique, à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau.

C'est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles.



Dans la pratique, on place les matières à extraire dans une chaudière avec de l'eau et on chauffe ; ou bien on fait passer de la vapeur d'eau dans un récipient contenant les dites matières.

La vapeur d'eau produite va entraîner avec elle un composé donné selon un phénomène physique particulier : la création d'un azéotrope.

Il s'agit en fait d'un mélange de composés, non miscibles, (ici l'eau et une molécule odorante) dont la température d'ébullition est inférieure à celle du composé le moins volatil.

La vapeur d'eau chargée en molécules organiques est condensée puis récupérée. Il y a alors séparation en deux phases : l'une aqueuse et l'autre organique, cette dernière contenant le

composé que l'on a cherché à extraire. L'extraction de la nicotine du tabac peut, par exemple, être réalisée de cette façon.

**Mais cette technique montre rapidement ses limites lorsque l'on veut extraire des molécules 'fragiles' qui ne résisteront pas au chauffage.**

### **1.3.2. L'enfleurage à froid**

Nous sommes ici typiquement dans le domaine de la parfumerie et il ne semble pas y avoir d'autres applications. Cette méthode est particulièrement employée lorsque l'hydrodistillation dénature les molécules à extraire. Les fleurs sont disposées sur des châssis de verre enduit de graisse et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces.



**Figure 3 :** enfleurage à froid de pétales de roses

Lorsque que le parfumeur considère que la graisse est saturée, elle est raclée et mélangée à un peu d'alcool pour obtenir des pommades ou bien épuisée par de l'alcool. On obtient alors un liquide nommé l'absolu

Le principe est assez simple :

Les molécules odorantes étant des composés volatils, au lieu de les laissez s'échapper dans l'air, elles sont captées par la graisse qui a la propriétés de les dissoudre.

Lors de l'ajout d'alcool les molécules organiques passent dans ce solvant.

### **1.3.3. L'extraction par des solvants**

L'extraction par solvant, généralement un solvant volatil peu soluble dans l'eau (alcane léger, acétate d'éthyle...) permet d'extraire des molécules à partir de milieux aqueux. La séparation solvant/eau s'effectue par simple décantation. Dans cette méthode, les plantes (car en général, il s'agit principalement de ce type d'organismes) sont mélangées à un solvant organique dans des récipients des tailles et de forme variables. Les molécules organiques étant solubles dans les solvants employés, il est particulièrement aisé de séparer les constituants recherchés de leur enveloppe végétale. Le mélange est ensuite filtré pour récupérer le solvant chargé des composés.



**Figure 3** : extracteur de 1m3 de marque E&E Verfahrenstechnik GmbH



**Figure 4 :** chaîne d'extraction continue des Laboratoires Pierre Fabre. La plante est acheminée d'un bout à l'autre de l'extracteur en sens inverse à celui du solvant. La plante se trouve ainsi d'abord en contact avec un solvant riche en substances actives. Plus la plante avance à travers l'extracteur, plus elle rencontre un solvant de pauvre et par donc présentant un pouvoir d'extraction plus important.

L'inconvénient de cette méthode est en fait son principal composant : le solvant...



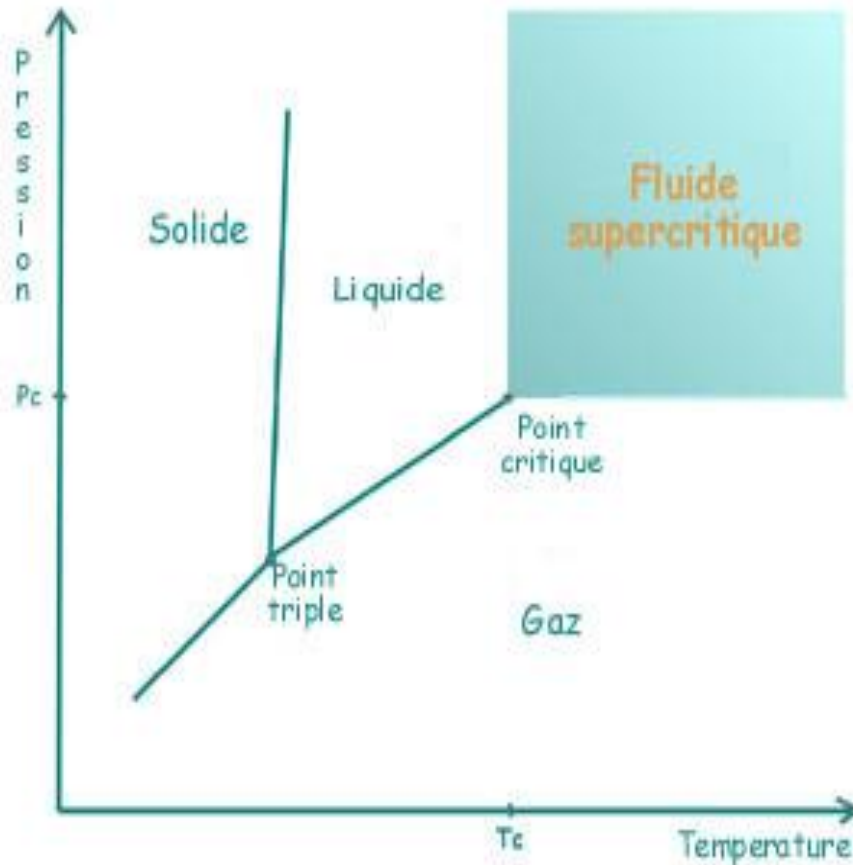
En effet, étant donné les quantités mise en œuvre, les risques de pollution et d'inflammation ne peuvent être réduits à zéro...De plus, les composés à extraire étant emprisonnés dans la cellule par la membrane cellulaire, il faudra donc des solvants capables de la traverser.

Enfin, il arrive que des traces de solvant soient présentes dans le produit final (les molécules à extraire) ou bien dans la matière végétale après traitement.

#### **1.3.4. Les fluides supercritiques**

L'utilisation de fluides supercritiques est assez récente (fin des années 1970 pour l'aspect industriel) et seul le CO<sub>2</sub> est aujourd'hui universellement employé, en raison de sa disponibilité (on ne le rejette par tonnes...) et des conditions relativement simples d'obtention.

Un fluide est qualifié de supercritique quand il placé au-delà de son point critique.



**Figure 5 :** diagramme schématisé des trois états d'un composé.

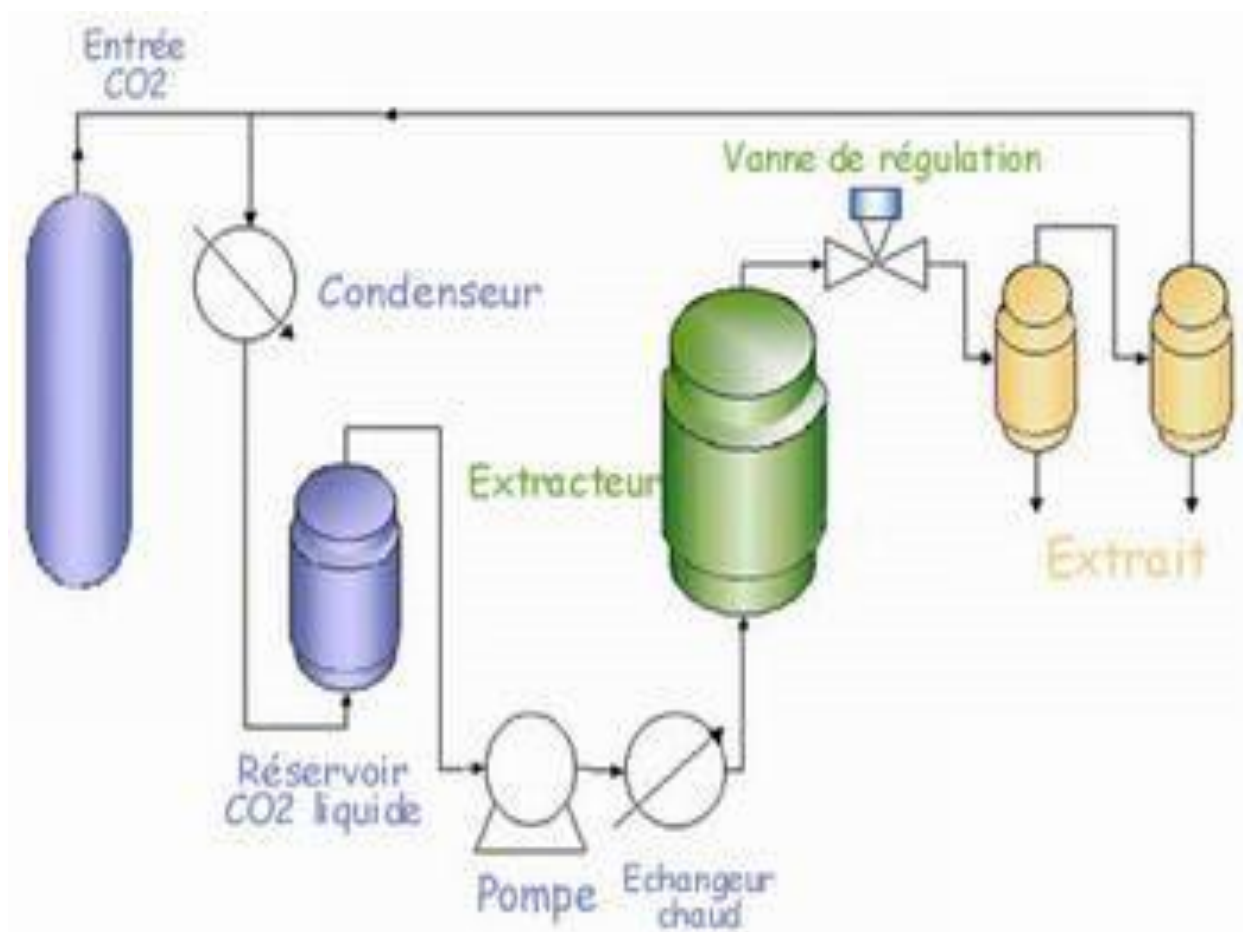
Ainsi, lorsque l'on porte un composé (liquide ou gazeux) dans des conditions de pression et de températures particulières, il cessera d'être liquide ou gazeux pour se trouver à la fois à l'état liquide et gazeux, l'équilibre entre ces deux états se faisant de manière continue. Le fluide supercritique présente alors des propriétés solvantes tout à fait remarquables.

Ainsi, si l'on expose une matière organique à un fluide supercritique, l'état gazeux pénétrera dans les cellules et s'y trouvera en équilibre avec son état liquide dans lequel les molécules vont se dissoudre.

Le liquide étant également en équilibre avec l'état gazeux, la vapeur va entraîner hors de la cellule les molécules que l'on cherche à extraire.

Ce type de phénomène est unique est permet de contourner le problème de la barrière cellulaire que certains solvant ne peuvent franchir.

Pour récupérer les composés organiques que l'on a cherché à extraire, il suffit de laisser le CO<sub>2</sub> s'échapper sous forme de gaz en le ramenant dans des conditions de pression et de température plus classiques.



**Figure 6 : représentation schématique d'une chaîne d'extraction**

L'extraction est donc ici plus poussée et surtout beaucoup plus sûre et propre puisque nous éliminons totalement la présence de solvant et donc de polluant.

Pour information, le CO<sub>2</sub> supercritique est employé à une température d'environ 30°C pour des pressions allant de 74 à 300 fois la pression atmosphérique.

Cette méthode est particulièrement utilisée pour préparer le café décaféine ou pour extraire les fragiles composés des baies de rose.

#### **1.4. Méthodes actuelles**

##### **1.4.1. L'extraction en phase solide (Solid Phase Extraction/SPE)**

Elle permet d'isoler des substances chimiques présentes dans un liquide (l'eau, par exemple) grâce à l'utilisation d'un polymère absorbant conditionné généralement sous forme de cartouches filtrantes. Elle s'avère très efficace en matière de pré-concentration des traces dans des milieux très dilués ou pour la purification des échantillons. •La micro-extraction en phase solide sur fibre (Solid Phase Micro-Extraction/SPME) s'utilise pour extraire des substances chimiques présentes dans un gaz ou un liquide (par exemple, l'air ou l'eau) et opère au moyen d'un polymère absorbant recouvrant une fibre de verre de quelques millimètres de long et mise en contact de l'échantillon. La SPME ne nécessitant ni solvants ni appareils spécifiques, elle s'avère donc simple à mettre en œuvre. Il s'agit d'une technique novatrice utilisée de plus en plus pour la surveillance de la qualité de l'air ou l'analyse de micropolluants organiques dans les eaux.

##### **1.4.2. L'extraction en phase solide déposée sur barreau d'agitation magnétique (Stir Bar Sorptive Extraction/SBSE)**

Elle s'applique plus généralement à l'extraction des substances chimiques présentes dans un liquide (l'eau). Cette extraction s'effectue au moyen d'un polymère absorbant, recouvrant un barreau d'agitation (magnétique) mis en mouvement dans l'échantillon. Basée sur le même principe que la SPME, elle permet d'extraire de plus grandes quantités d'analytes et donc de gagner en sensibilité.

##### **1.4.3. L'extraction par solvant (voir paragraphe 1.3.3.)**

Généralement un solvant volatil peu soluble dans l'eau (alcane léger, acétate d'éthyle...) permet d'extraire des molécules à partir de milieux aqueux. La séparation solvant/eau s'effectue par simple décantation.

##### **1.4.4. La chromatographie ionique préparative**

Elle repose sur l'interaction d'espèces ioniques en milieu aqueux avec des résines échangeuses d'ions, permet d'extraire des substances inorganiques (ions) présentes à l'état de traces à partir d'une matrice environnementale complexe.

## **2. Les solvants organiques**

### **2.1. Définitions**

Un solvant est une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène. Les solvants sont ainsi utilisés pour extraire (industrie chimique, pétrochimique, pharmaceutique et alimentaire), dissoudre (dégraissage) et suspendre (peintures) des substances généralement insolubles dans l'eau ou pour modifier les propriétés physiques d'un matériau (exp. Diluant).

Un solvant est un liquide qui a la propriété de dissoudre et de diluer d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans lui-même se modifier. C'est un liquide qui permet, après ajouts des réactifs, d'obtenir une phase liquide homogène. Le terme solvant organique se réfère aux solvants qui sont des composés organiques qui contiennent des atomes de carbone. D'après Cohr, un solvant organique est un composé chimique ou un mélange qui est liquide entre 0°C et 200°C approximativement, qui est volatil et relativement inerte chimiquement. Les solvants peuvent aussi être utilisés pour extraire les composés solubles d'un mélange, l'exemple le plus commun étant l'infusion de thé dans de l'eau chaude (L'eau est le solvant le plus courant).

Pour les solutions liquides (phase uniforme liquide contenant plusieurs espèces chimiques), si l'une des espèces est très largement majoritaire (au moins un facteur 100), on l'appelle le «solvant». C'est le cas de l'eau pour les solutions aqueuses (par exemple une solution aqueuse de sulfate de cuivre: l'eau est le solvant et les ions sulfate et cuivre les solutés). Donc, le solvant est le liquide le plus abondant, le soluté le moins abondant.

### **2.2. Classification**

Les solvants organiques sont classés en trois familles:

#### **2.2.1. Solvants hydrocarbures**

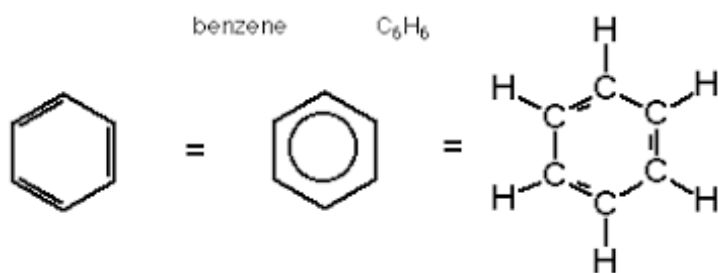
Les hydrocarbures constituent la classe des solvants organiques la plus répandue. Les solvants de cette catégorie ne contiennent que du carbone et de l'hydrogène dans leur structure moléculaire. On distingue les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques ainsi que les mélanges pétroliers complexes.

##### **a) Hydrocarbures aliphatiques (alcanes, alcène)**

On distingue les hydrocarbures aliphatiques saturés (alcanes) qui ne contiennent que des liaisons simples des hydrocarbures insaturés qui contiennent au moins une double liaison. Les composés saturés ont la formule  $C_nH_{2n+2}$  mais seules les molécules avec cinq carbone ou plus sont des solvants liquides à la température normale. Les chaînes carbonées peuvent être linéaires (n-hexane) ou ramifiées (iso-pentane). Les composés insaturés (les alcènes) sont moins répandus comme solvants sauf pour certains produits naturels comme les terpènes. Les solvants aliphatiques sont utilisés notamment dans les adhésifs (exp. L'hexane).

### b) Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylène)

Ils possèdent un cycle insaturé à six atomes de carbone comme le benzène (Figure 1). La série aromatique comprend tous les liquides volatils dont la structure moléculaire comporte le noyau benzénique:



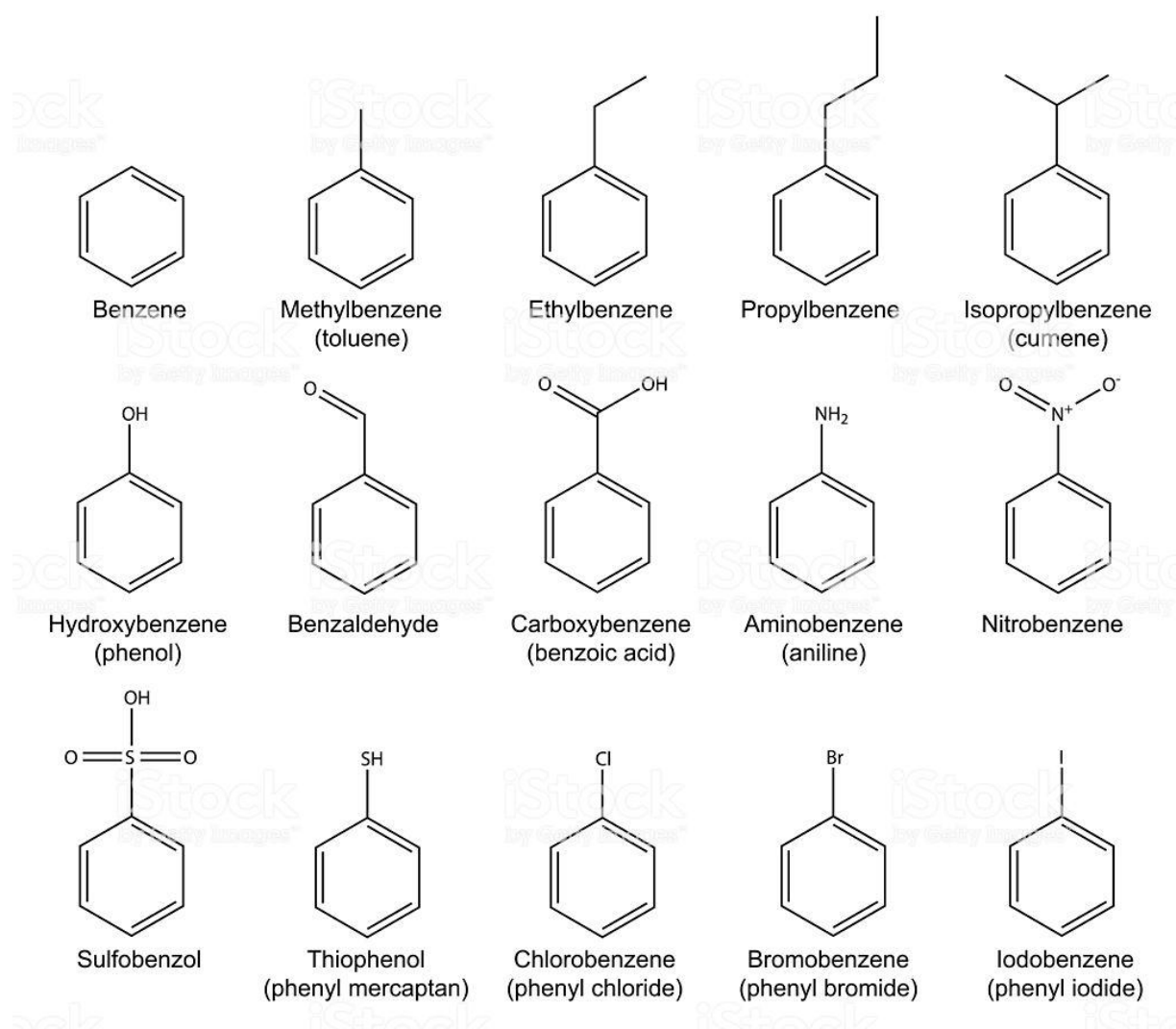
**Figure 1** : structure et représentation du benzène.

Les solvants aromatiques comportent un seul cycle benzénique avec une ou plusieurs chaînes latérales (le toluène, le xylène, etc.). Ces composés sont largement utilisés dans la formulation de peintures industrielles. Le terme d'hydrocarbure aromatique lourd est utilisé lorsqu'il ya trois carbones ou plus au total sur une ou plusieurs chaînes latérales.

- **Les dérivés du benzène** On parle de dérivé benzénique ou de dérivé du benzène pour les composés comportant un noyau central de benzène substitué par un à six groupes (Tableau 1). Par exemple, le phénol et le toluène sont des dérivés benzéniques monosubstitués, le premier possédant un groupe hydroxyle, le second un groupe méthyle attaché au noyau benzénique. Lorsque le noyau benzénique possède plus d'un

substituant leur répartition spatiale est la cible d'une nomenclature spéciale, et on répartit les composés dans les différents groupes, ortho, méta et para en fonction de la position respective de chaque groupe.

**Tableau 1** : les dérivés du benzène



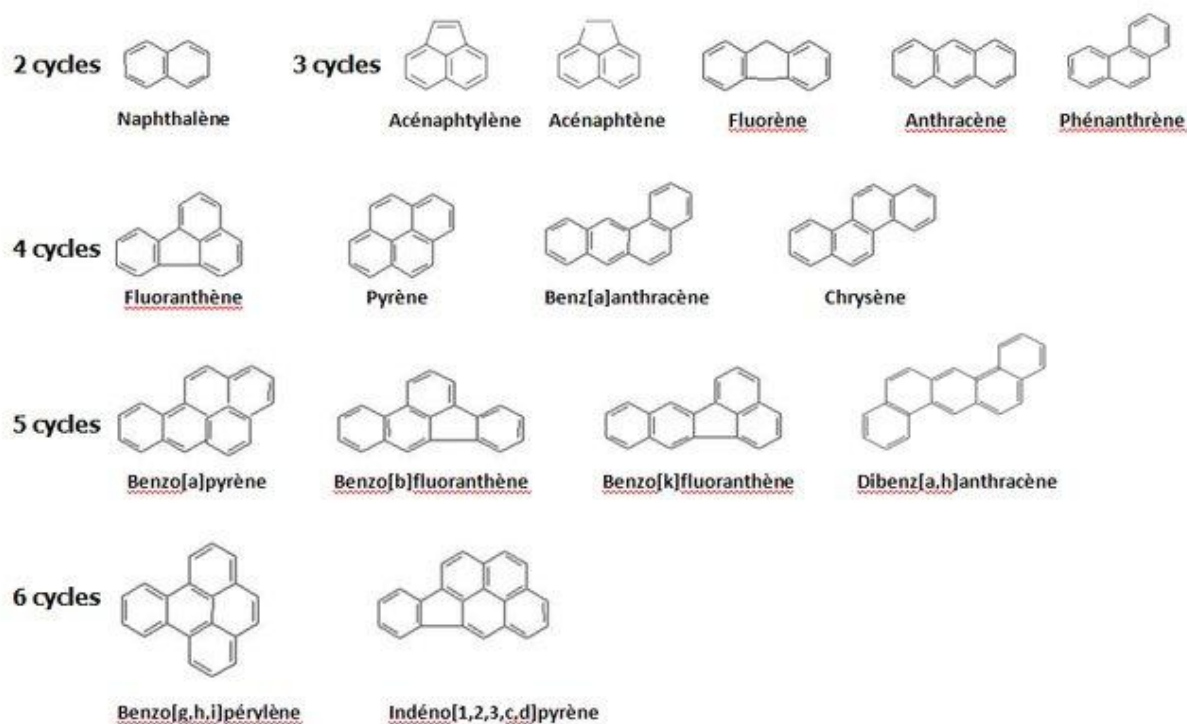
Les composés comportant un cycle benzénique partagent un certain nombre de propriétés, notamment :

- ils sont en général aromatiques (à quelques exceptions);
- leur ratio carbone-hydrogène est élevé; de ce fait, ils brûlent avec une flamme jaune dégageant beaucoup de fumée;

-la forte concentration en charge négative sur le cycle le rend nucléophile, et favorise les réactions de type substitution électrophile aromatique.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques Ce sont des composés comportant plusieurs cycles benzéniques fusionnés (Tableau 2). Parmi lesquels les plus courants le naphthalène, constitué de deux cycles benzéniques fusionnés, l'anthracène qui en compte trois, alignés, le pyrène (quatre, non-alignés) etc.

**Tableau 2:** quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques



**2.2.2. Solvants oxygénés** Ils regroupent plusieurs classes.

#### a) Les alcools

Ils sont des composés organiques dont l'un des carbones est lié à un groupe hydroxyle. Ce sont des solvants oxygénés de synthèse (exp. méthanol, éthanol, etc.). Ils résultent de la substitution de l'hydrogène sur un hydrocarbure R-H par la fonction -OH pour donner R-OH. Un alcool monohydrique est un alcool qui contient une seule fonction hydroxyle par



molécule. Les alcools de faible masse moléculaire se présentent à température ambiante comme des liquides incolores; les alcools plus lourds comme des solides blanchâtres. Ils sont solubles dans l'eau. La solubilité diminue cependant en fonction de la masse moléculaire de l'alcool. Les alcools ont des densités et des tensions superficielles semblables à plusieurs cétones aliphatiques. Ils possèdent une large gamme de taux d'évaporation et un excellent pouvoir solvant pour divers polymères et résines. Les alcools sont utilisés dans la formulation de détergent, de produits de soins personnels, de revêtements, adhésifs et encres.

#### **b) Les glycols:**

Ils sont appelés aussi polyols ou polyalcools. Ce sont des composés organiques caractérisés par un certain nombre de groupes hydroxyle (au moins deux groupes). Par rapport aux alcools simples, l'augmentation du nombre de groupes hydroxyle entraîne une augmentation très importante de leur point d'ébullition et de leur viscosité ainsi qu'une solubilité accrue dans l'eau. Ils sont peu volatils. L'éthylène glycol est le plus simple des diols. C'est un liquide incolore, inodore et peu volatil avec une faible viscosité. Il est utilisé notamment comme antigel dans les radiateurs d'automobile et dans les peintures en phase aqueuse. Un autre diol c'est le propylène glycol, il est moins toxique, et employé dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

#### **c) Les cétones**

Elles sont caractérisées par le groupement fonctionnel carbonyle  $-C=O$ , où un atome de carbone est relié à un atome d'oxygène par une double liaison. Les cétones de faibles poids moléculaires sont solubles dans l'eau. A partir de  $C_5$ , cette solubilité est presque nulle. Ce sont des solvants de haut pouvoir de dissolution, de faibles viscosités et sont miscibles avec les hydrocarbures. Elles ont généralement des densités plus faibles que celles des autres solvants oxygénés. Elles ont aussi de faibles tensions superficielles et offrent une large gamme du taux d'évaporation. Ces solvants sont très volatils et inflammables. Ils sont employés dans les nettoyants et les dégraissants industriels. Les principaux sont l'acétone ( $CH_3-C(=O)-CH_3$ ), la méthyléthylcétone. Il existe également des cétones aromatiques comme la cyclohexanone ou les quinones qui comportent deux fonctions cétone.

#### **d) Les esters organiques**

**Ils** sont une famille de solvants oxygénés caractérisés par la présence d'un groupement carboxyle au sein d'une chaîne de carbone et d'hydrogène plus au moins longue. Ils sont obtenus par réaction d'un acide organique avec un alcool. Les esters ont de faibles tensions superficielles et se présentent dans une large gamme de taux d'évaporation. Ce sont des liquides incolores. Ceux de faibles poids moléculaires sont partiellement solubles dans l'eau. Les acétates sont les esters les plus utilisés comme solvant. Ils sont volatils à température ambiante. Il existe également des acétates complexes ou mélange produits à partir de fractions pétrolières. Ils sont utilisés notamment dans la formulation des peintures, de laques, d'adhésifs et d'encres.

#### **e) Les éthers**

**Ils** sont une famille de substances oxygénées. Ils sont caractérisée par la liaison éther, formée d'un atome d'oxygène -O- situé entre deux groupements R et R'. Ils résultent de la déshydratation de deux alcools pour former la liaison R-O-R' où R et R' sont des chaînes plus au moins complexes et ramifiées qui peuvent se rejoindre pour former un cycle. Les éthers aliphatiques sont peu solubles dans l'eau alors que les éthers alicycliques le sont plus. Les éthers utilisés comme solvants sont des liquides volatils à température ambiante. Ils sont incolores et d'odeur caractéristique. Ils sont utilisés comme solvants réactionnels. Les éthers sont plus au moins solubles dans l'eau et dans les hydrocarbures. Ils sont tous inflammables. Les éthers ont tendance à former des peroxydes et des hydroperoxydes qui posent des problèmes de sécurité en raison de leur potentiel explosif.

#### **f) Les éthers de glycol**

Ils constituent un groupe de solvants oxygénés dérivés de l'éthylène glycol ou du propylène glycol. Aux conditions normales d'utilisation, sont des liquides incolores à odeur légèrement éthérée, modérément volatils et de viscosité moyenne. Leur large utilisation tient à leur caractère amphiphile qui leur confère une affinité à la fois pour les composés polaires (eau, alcool, cétone) et les composés apolaires (hydrocarbures). Les éthers de glycol sont donc de bons solvants pour de nombreuses substances et peuvent être utilisés pour rendre miscibles des solvants autrement non-miscibles. On les trouve aussi comme principaux composants dans les colles, les encres, les peintures, les vernis, les diluants, les cosmétiques notamment

les teintures pour cheveux, les produits d'entretien comme les lave vitres, les produits pour la mécanique et la métallurgie (dégraissants).

### **2.2.3. Solvants halogénés**

Les solvants halogénés sont des hydrocarbures où l'on a remplacé un ou plusieurs atomes d'hydrogène par des atomes d'halogènes (brome, chlore, fluor, iode). Les solvants chlorés sont les plus répandus suivis des fluorés. La plus grande partie des solvants halogénés est issue des hydrocarbures aliphatiques. À part les plus petites molécules qui sont gazeuses (chlorométhane, dichlorométhane, chloroéthane, chloroéthylène, bromométhane), tous les dérivés halogénés couramment utilisés sont des liquides incolores. Les solvants chlorés ne sont pas ou peu inflammables, de même que les dérivés fluorés. Ils ont tous des points d'ébullition et des densités plus élevés que ceux des hydrocarbures correspondants. Ils sont moins volatils et insolubles dans l'eau mais sont d'excellents solvants pour de nombreux polymères synthétiques, huiles et graisses minérales. Les solvants halogénés sont largement utilisés dans le dégraissage à la vapeur de surfaces métalliques (trichloréthylène). D'autres applications incluent le décapage de peinture (dichlorométhane) et le nettoyage à sec (perchloréthylène).

### **2.3. Autre classification**

Selon leur structure moléculaire, les solvants sont classés aussi en :

**2.3.1. Solvants protiques polaires (solvants protogènes):** possédant un ou plusieurs atomes d'hydrogène susceptible(s) de former des liaisons hydrogène. Par exemple, l'eau, le méthanol, l'éthanol, etc.

**2.3.2. Solvants aprotiques polaires:** possédant un moment dipolaire non nul et dénués d'atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogène. Par exemple, l'acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), le diméthylsulfoxyde (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ), le tétrahydrofurane (THF,  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ), etc.

**2.3.3. Solvants aprotiques apolaires:** possédant un moment dipolaire permanent nul. Par exemple, le benzène, les hydrocarbures: alcanes linéaires ou ramifiés, alcanes cycliques, alcènes, etc.

### **2.4. Utilisations des solvants**

Un solvant organique désigne tout composé organique utilisé seul ou en association avec d'autres agents, sans subir de modification chimique, pour dissoudre des matières premières, des produits ou des déchets, ou utilisé comme agent d'extraction (extraction des principes actifs à base de plantes) et de séparation analytique ou préparative.

Au XIX<sup>e</sup> siècle, l'industrie a développé de nouveaux solvants. Avec eux, les chercheurs ont isolé des espèces chimiques de certaines plantes pour en faire le principe actif de médicaments (un anti-inflammatoire venant de la reine des prés, un anticancéreux venant de l'if,...).

Les solvants servent comme milieux réactionnels, agents de nettoyage pour dissoudre des salissures, ou comme dissolvant, disperseur, correcteur de viscosité, correcteur de tension superficielle, plastifiant ou agent protecteur, adjuvants et diluants (peinture, vernis, encres, colles, pesticides), dégraissants (le perchloroéthylène qui est utilisé pour le nettoyage à sec purifiants (parfums, médicaments), décapants (élimination des peintures, vernis, colles), support pour le conditionnement, le transport et la mise en œuvre de cosmétiques, peintures et encres.

#### **4. Différentes techniques de chromatographie et leurs domaines d'application**

##### **4.1. Présentation de la technique**

La chromatographie est une technique séparative analytique et/ou préparative. Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile, à l'aide d'une phase mobile, liquide ou gazeuse, de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour, respectivement, la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents.

À partir de ce principe très général, il existe de très nombreux types de chromatographie en fonction de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile, et de la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier. En effet, selon les cas, les facteurs physico-chimiques qui interviennent comme critère de séparation sont totalement différents : ce peut être la masse moléculaire, la charge, l'hydrophilie/hydrophobicité, la structure tridimensionnelle, etc. Évidemment, le choix est

effectué au cas par cas en fonction des besoins. Il n'est d'ailleurs pas rare d'utiliser successivement plusieurs types de chromatographies différentes au cours d'une même purification.

#### 4.2. La chromatographie d'exclusion

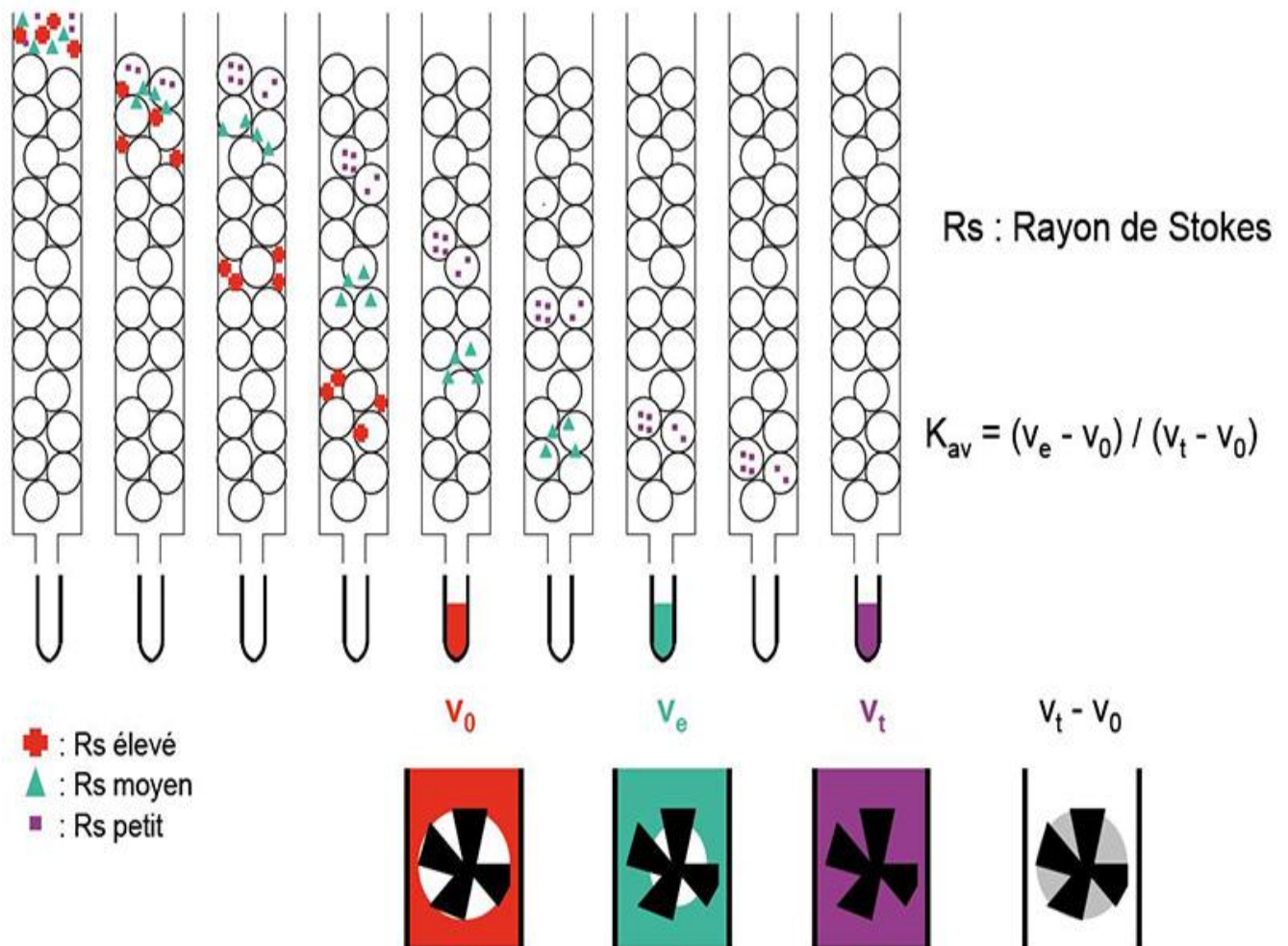
Ce type de chromatographie, également appelé **tamissage moléculaire** ou **gel-filtration**, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme intervienne également. La séparation des constituants va se faire selon leur rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique, noté  $R_s$ . Ce rayon peut être calculé selon la relation suivante :

$$R_s = k_B T / 6 \pi \eta D$$

avec

- **$k_B$** : constante de Boltzmann
- **$T$**  : température en Kelvin
- **$\eta$**  : viscosité du milieu (ici du tampon)
- **$D$**  : coefficient de diffusion

Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses. Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes (**figure 1**).



**Figure 1** : principe de séparation de la chromatographie d'exclusion

Rs correspond au rayon de Stokes (ou rayon hydrodynamique). On constate qu'un Rs élevé ne permet l'accès qu'au volume correspondant aux espaces séparant les billes (couleur rouge). Plus le Rs est faible, plus les molécules ont accès aux espaces situés à l'intérieur des billes (couleurs verte et violette), donc plus la progression dans la colonne est lente.

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est donc solide (les billes) et la phase mobile est liquide (un tampon dont le flux entraîne les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut séparer efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente. Le tableau 1 donne quelques exemples classiques de résines commerciales.

**Tableau 1:** exemple de résines et de leur capacité de fractionnement

Type de résine	Fractionnement efficace (Da)
<i>Sephadex G15</i>	0 - 1 500
<i>Sephadex G50</i>	1 500 - 30 000
<i>Séphadex G200</i>	5 000 - 800 000
<i>Biogel P-2</i>	100 – 1800
<i>Biogel P-10</i>	1 500 - 20 000
<i>Biogel P-100</i>	5 000 - 100 000
<i>Biogel P-300</i>	60 000 - 400 000
<i>Sepharose 6B</i>	$< 4.10^6$
<i>Sepharose 2B</i>	$2.10^6 - 40.10^6$
<p>Selon la nature chimique de la résine et sa réticulation (qui déterminent la taille des pores) on dispose de la capacité à séparer des molécules extrêmement différentes en terme de masse moléculaire. Il faut donc choisir une résine</p>	



adaptée à la molécule à purifier, ce qui est déterminé au cours de la mise au point de la méthode de purification.

**Nature chimique des différentes résines citées :**

*Séphadex G* : Dextran réticulé (épichlorohydrine)

*Biogel P* : Acrylamide/bisacrylamide

*Sépharose* : Agarose

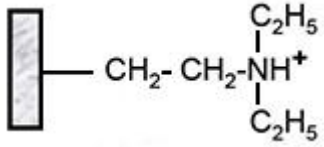
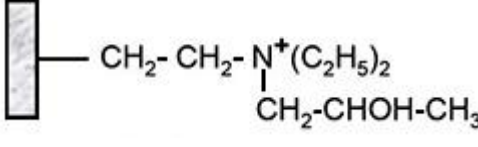
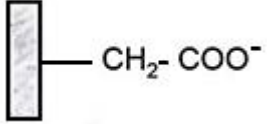
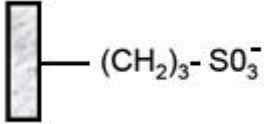
C'est une technique très simple à mettre en œuvre, peu onéreuse, qui est très peu destructrice pour les constituants à séparer, mais dont la résolution (capacité à séparer des molécules dont les caractéristiques sont proches) est modeste.

#### 4.3. La chromatographie échangeuse d'ions

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées **positivement** (chromatographie échangeuse d'anions) ou **négativement** (chromatographie échangeuse de cations). Les principaux groupements utilisés pour fabriquer des résines chargées sont (tableau 2) :

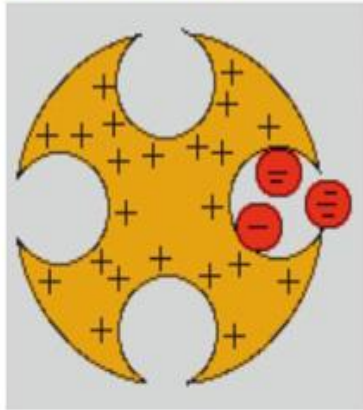
**Tableau 2** : résines échangeuses d'ions

<b>Résines échangeuses d'anions (chargées positivement)</b>	
Faible ( $Pka \approx 10$ d'où $pH \leq 9$ )	Fort ( $Pka$ élevé)
Diéthylaminoéthyl (DEAE)	Diéthyl(2 hydroxypropyl)aminoéthyl (QAE)

	
<b>Résines échangeuses de cations                  (chargées négativement)</b>	
Faible (Pka ≈ 4 d'où pH ≥ 5)	Fort (Pka ≈ 2)
Carboxyméthyl (CM) 	Sulphopropyl (SP) 

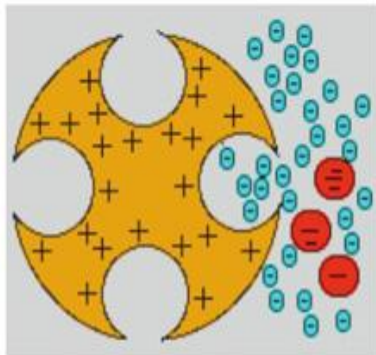
Si on prend l'exemple de la chromatographie échangeuse d'anions, la résine étant chargée positivement, seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci. Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement (c'est le « non-fixé ») (Figure 2). Il convient bien entendu que la résine soit la plus neutre possible pour éviter tout autre type d'interaction avec les molécules (hormis les interactions électrostatiques). Il peut s'agir de cellulose, de dextrane, d'agarose, de copolymères polystyrène/divinyl benzène, etc.

## ✓ ADSORPTION



Cellulose, dextran, agarose, copolymère polystyrène / divinyl benzène...

## ✓ DESORPTION



**Figure 2** : principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions

L'élution des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'élution contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine. On peut, soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup), ou, au contraire, augmenter progressivement la concentration ionique (on parle de gradient) ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en

fonction de la force de leurs interactions électrostatiques. Pratiquement dans ce dernier cas de figure, on utilise deux solutions tampon, l'une de faible concentration ionique et l'autre de forte concentration ionique. Deux pompes pilotées aspirent et mélangent ces deux solutions selon un rapport qui varie avec le temps (la proportion de solution de forte concentration ionique augmentant progressivement). Le produit de ce mélange est utilisé dans la colonne.

Un autre moyen consiste à modifier la charge de la ou des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (**chargés positivement**) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (**chargés négativement**). En baissant le pH, on favorise donc l'apparition d'une charge nette positive pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. La transition entre une charge nette négative et une charge nette positive se fait à la valeur du  $pH_i$ . Encore une fois, on peut choisir d'appliquer directement un tampon au pH très bas, ou d'utiliser un gradient de pH. Dans les deux cas, chaque espèce moléculaire se détache de la résine lorsque le pH de la solution devient égal ou inférieur au  $pH_i$  de la molécule. Pratiquement, pour appliquer un gradient de pH, on procède de la même manière que pour appliquer un gradient de concentration ionique (mélange variables de deux solutions, l'une basique et l'autre acide).

Bien entendu le principe est exactement le même pour la chromatographie échangeuse de cations, à ceci près que les espèces moléculaires retenues étant celles qui sont positives, il faut augmenter le pH pour les décrocher.

#### **4.4. La chromatographie de partage**

##### **4.4.1. Principe**

Dans la chromatographie de partage, le principe de la séparation provient d'un paramètre appelé **coefficient de partage**. Une molécule a généralement une affinité différente selon les milieux. On pense en particulier à une molécule polaire qui a une affinité supérieure pour des milieux polaires, et une molécule apolaire qui a une affinité supérieure pour les milieux apolaires. Si ces milieux ne sont pas miscibles entre eux (exemple d'un liquide

polaire comme l'eau et d'un liquide apolaire comme de l'huile), la molécule va se répartir entre ces deux milieux au prorata de son affinité respective pour chacun d'entre eux. On peut alors définir un coefficient de partage entre ces deux milieux. Ce coefficient est une constante tant que l'on reste dans les mêmes conditions (température, pression, etc.).

Dès lors, si on fait progresser un mélange de molécules avec comme phase stationnaire l'un des deux milieux et comme phase mobile l'autre milieu, chaque espèce moléculaire va se partager entre ces deux phases selon son coefficient de partage. Plus les molécules se partagent dans la phase mobile, plus elles progresseront rapidement, et moins il leur faudra de temps pour sortir de la colonne. On peut ainsi calculer les temps relatifs mis par les différentes molécules pour sortir de la colonne dans des conditions données (température, longueur de colonne, etc.). Cette information est à la base de l'identification des composants connus qui sont séparés par cette méthode.

Ce principe se décline essentiellement en deux types de chromatographies assez différentes dans leurs mise en œuvre : la chromatographie de partage en phase gazeuse et la chromatographie liquide de haute performance ou HPLC.

#### **4.4.2. La chromatographie de partage en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles. La chromatographie de partage en phase gazeuse utilise comme principe de séparation le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un film liquide très fin qui recouvre la surface intérieure d'un tube (la colonne), **et la phase mobile** est un gaz (d'où son nom).

Cette technique nécessite de vaporiser l'échantillon à analyser avant son injection dans la colonne. Pour cela, l'échantillon doit être chauffé. Cela suppose que les molécules d'intérêt ne soient pas dégradées à la température utilisée pour vaporiser l'échantillon. En général, le gaz utilisé est le plus neutre possible. Le plus souvent, on utilise de l'hélium ou de l'azote. L'hydrogène possède également des caractéristiques très intéressantes, mais s'agissant d'un gaz dangereux (risque d'explosion), il est beaucoup moins utilisé.

Cependant, la chromatographie de partage de loin la plus utilisée est la HPLC.

#### 4.4.3. La HPLC (chromatographie liquide de haute performance)

La HPLC (*high-performance liquid chromatography* pour chromatographie liquide de haute performance, anciennement appelée *high-pressure liquid chromatography* pour chromatographie liquide à haute pression) est largement utilisée comme technique analytique et préparative. Comme son nom l'indique, la phase mobile est liquide, et non gazeuse comme dans le type de chromatographie qui vient d'être présenté. Cela dit, le principe de la séparation reste le même, à savoir le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse ou RP-HPLC pour *reverse phase – high performance liquid chromatography*). (Tableau 3)

**Tableau 3** : caractéristiques comparées de la HPLC en phase normale et en phase inverse

	HPLC en phase normale	HPLC en phase inverse
<b>Phase stationnaire</b>	Polaire	Apolaire
<b>Phase mobile (mode gradient)</b>	Gradient de plus en plus polaire	Gradient de plus en plus apolaire
<b>Élution des composés</b>	Les plus polaires sont élués en dernier	Les plus apolaires sont élués en dernier

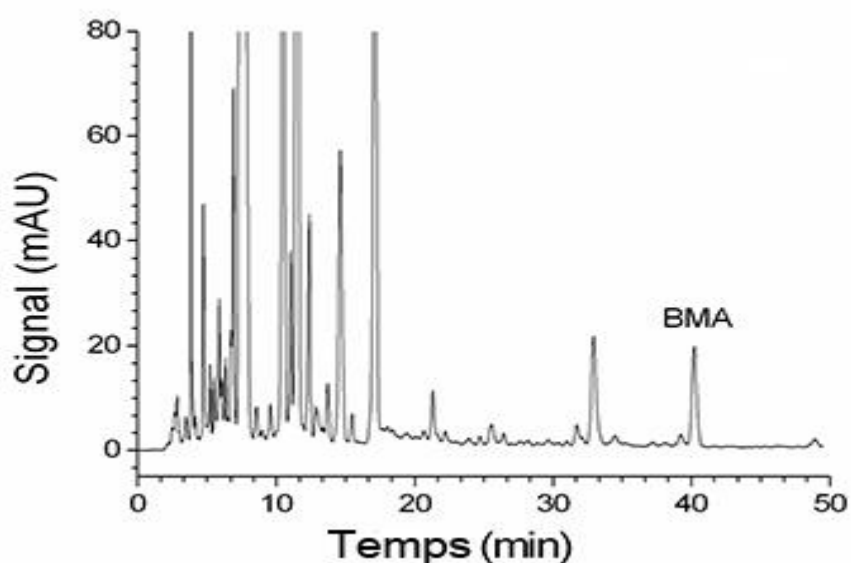
En phase normale, les colonnes sont souvent constituées de fines particules (augmentation de la surface de contact) de gel de silice, qui portent des fonctions silanols polaires (-OH). Ce matériau a cependant un inconvénient : il se dégrade avec le temps, ce qui impacte la reproductibilité des résultats. En phase inverse, on utilise souvent de fines particules de gel de silice mais sur lesquelles on a greffé, sur les groupements – OH, des chaînes apolaires (alkyles en C4, C6, C8, C18, Phényl, Cyano, etc.). Outre le fait que cela rend le support apolaire, cela permet également de le stabiliser dans le temps. En fonction des chaînes greffées, on obtient des colonnes plus ou moins hydrophobes que l'on choisira selon la nature des molécules à séparer.

Concernant la phase mobile, comme solvant polaire, on utilise le plus souvent l'eau. Les solvants apolaires sont beaucoup plus nombreux et seront choisis en fonction des molécules à séparer. Ils sont plus ou moins apolaires selon les cas (Tableau 4). L'hydrophilie/hydrophobicité recherchée est obtenue par un mélange de ces différents solvants dans des proportions choisies. La phase mobile peut être binaire (eau + un solvant organique) ou ternaire (eau + deux solvants organiques). La colonne peut être éluée avec un mélange qui ne varie pas au cours du temps (**on parle de mode isocratique**) ou au contraire qui varie au cours du temps (**mode gradient**), en modifiant les proportions relatives des solvants polaires et apolaires.

**Tableau 4 :** quelques solvants employés comme phase mobile en HPLC

<b>Solvants polaires</b>	- Eau - DMSO (diméthylsulfoxyde) - Acétonitrile - Acide acétique
<b>Solvants de polarité moyenne</b>	- Méthanol - Ethanol - Chloroforme

	<ul style="list-style-type: none"><li>- Propan-2-ol</li><li>- THF (tetrahydrofurane)</li><li>- Propanol</li></ul>
<b>Solvant fortement apolaire</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fluorobenzene</li><li>- Bromoethane</li><li>- Chloroethane</li><li>- Cyclohexane</li></ul>
Ces solvants sont classés du plus polaire au plus apolaire.	

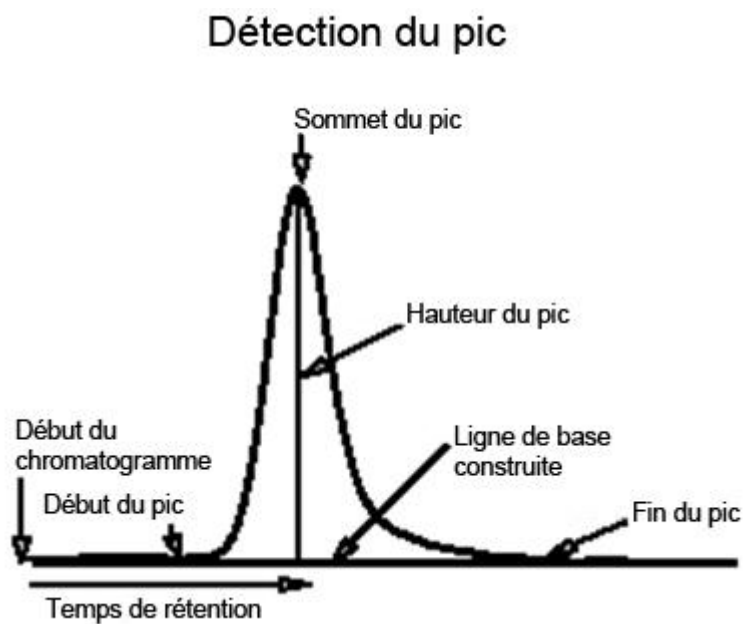


**Figure 3** : exemple d'enregistrement en sortie de colonne HPLC : enregistrement total (BMA) : solution standard de Benzoylmesaconine

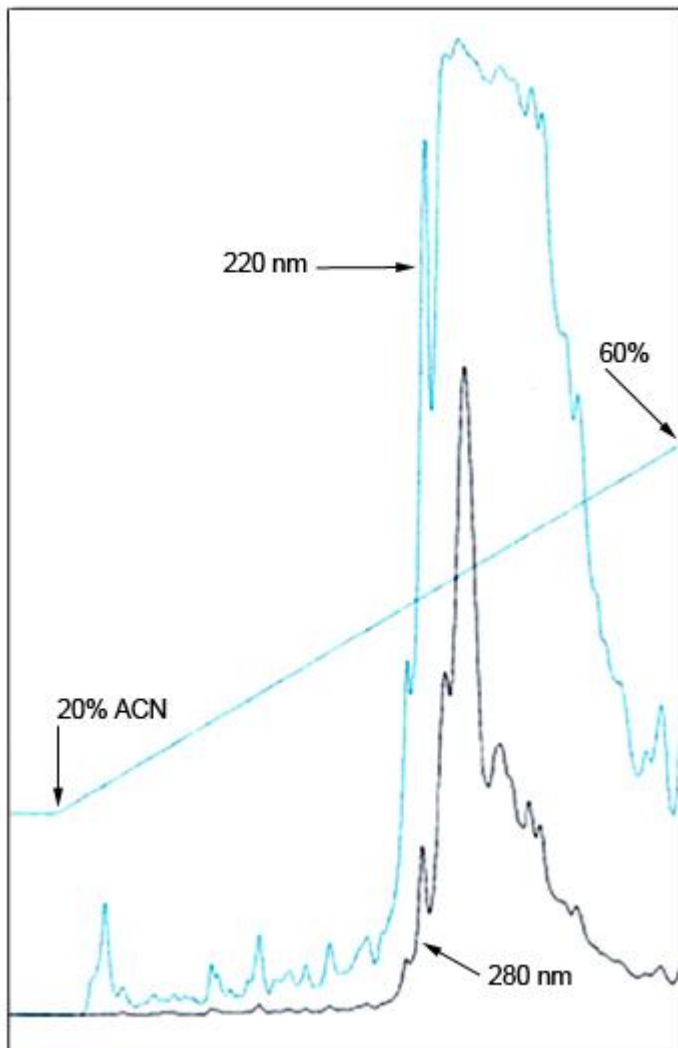
En sortie de colonne, un détecteur mesure en continu l'absorbance du liquide à une longueur d'onde choisie en fonction de la molécule recherchée, ce qui permet de suivre la sortie des différentes molécules de la colonne. On obtient un tracé correspondant à la variation de l'absorbance de l'éluant en sortie de colonne en fonction du temps (figure 3). Chaque pic



correspond dans l'idéal à la sortie d'une unique espèce moléculaire qui modifie l'absorbance de l'éluant. Le temps qui s'écoule entre l'injection du mélange dans la colonne et le sommet d'un pic correspond au **temps de rétention de la molécule** (figure 4). Ce temps est caractéristique d'une molécule pour un ensemble donné de paramètres (nature et taille de la colonne, nature et débit de l'éluant, pression, température, etc.).



**Figure 4** : temps de rétention



**Figure 5 : pics rapprochés**

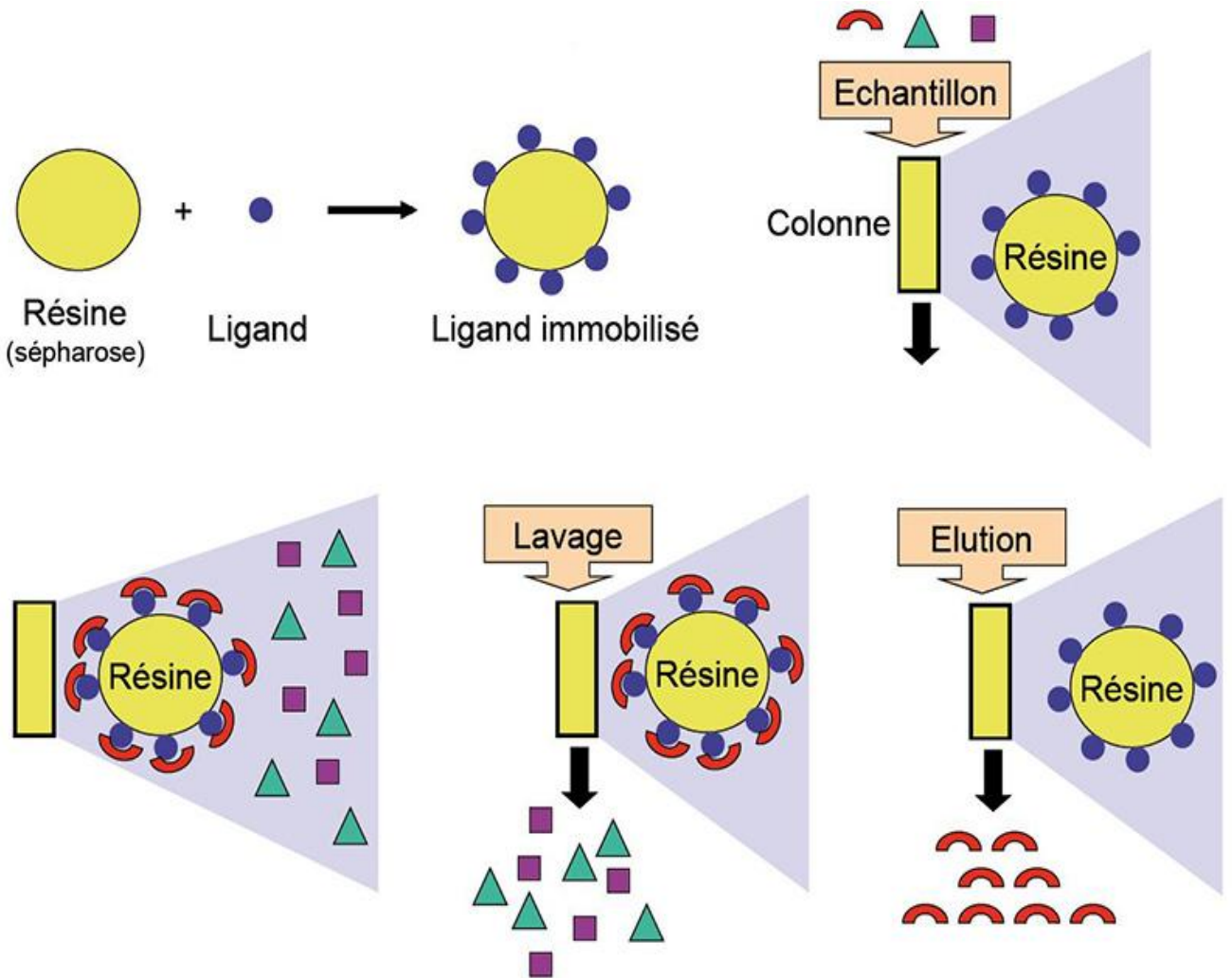
On distingue différents pics qui sont trop rapprochés pour être totalement individualisés (ACN = Acétonitrile).

Les différentes molécules présentes dans un mélange initial ayant chacune un temps de rétention différent, on obtient une série de pics étalée dans le temps. Bien entendu, il arrive souvent que les temps de rétention de deux ou plusieurs molécules différentes soient trop proches pour que leurs pics respectifs soient totalement séparés (figure 5). On a alors un mélange de deux ou plusieurs molécules, plus ou moins enrichi pour chacune d'entre elles.

Dans une HPLC analytique, on peut récupérer séparément, en sortie de colonne, le liquide correspondant à chaque pic et l'analyser pour déterminer la nature de chaque molécule. Dans une HPLC préparative, on peut se contenter de récupérer en sortie de colonne le liquide du pic dans lequel se trouve la molécule d'intérêt. Il suffit pour cela de récupérer le liquide qui sort de la colonne après un temps  $t$  correspondant au temps de rétention de la molécule d'intérêt. Bien entendu, il est nécessaire d'avoir déterminé au préalable ce temps de rétention.

#### **4.5. La chromatographie d'affinité**

Dans la chromatographie d'affinité, la séparation des molécules va se faire selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique fixé sur une résine. Toute la subtilité de la technique consiste à choisir judicieusement le ligand qui est utilisé. Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier. Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine vont se lier (dans l'idéal, une seule espèce moléculaire). Il faut, bien sûr, que la résine porteuse soit la plus neutre possible, pour éviter la fixation non spécifique d'autres espèces moléculaires. Après avoir éliminé le « non-fixé » en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée, par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique, de pH différent, ou comportant une forte concentration d'une molécule possédant également de l'affinité pour le ligand (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation) (figure 6).



**Figure 6 :** principe de séparation de la chromatographie d'affinité

L'avantage de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

L'inconvénient de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié. Il faut donc, dans une première étape, trouver un ligand suffisamment spécifique (ce qui détermine la sélectivité de la purification) et qui possède pour la molécule d'intérêt une affinité ni trop faible (il faut une interaction suffisante pour que cette molécule soit retenue), ni trop forte (car il faut pouvoir la décrocher). Une fois

la « perle rare » trouvée, il faut, dans une seconde étape, purifier ce ligand avant de le coupler à une résine porteuse. La purification du ligand est nécessaire car l'utilisation d'un mélange entraînerait une forte probabilité de fixer des molécules autres que celle d'intérêt. Le couplage est, lui, généralement simple, des matériels et techniques bien rodés étant disponibles.

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

#### **4.6. Conclusion**

La chromatographie est une technique qui se décline selon de multiples variantes pour séparer des constituants dans un but soit analytique, soit préparatif. Cet ensemble de techniques, parfois très différentes dans leur mise en œuvre, est très utilisé en laboratoire comme dans les établissements scolaires (la chromatographie des chlorophylles d'un végétal est un grand classique). S'agissant de séparer des molécules pouvant être très variées dans leur composition, poids moléculaire ou forme, la chromatographie nécessite le plus souvent une étape de mise au point pour trouver le protocole adapté. Il est également rare de pouvoir purifier convenablement une molécule en une seule étape, et il est généralement nécessaire de réaliser successivement plusieurs types de chromatographies, ou de coupler cette technique avec d'autres techniques de purification (centrifugation, électrophorèse, précipitation, etc.). Vous trouverez, dans le tableau 5, une comparaison entre les différents types de chromatographie.

**Tableau 5** : comparaison de quelques caractéristiques des différents types de chromatographie

Type de chromatographie	Exclusion	Echangeuse d'ions	HPLC	Affinité
<b>Concentration</b>	Ne concentre pas l'échantillon	Concentre l'échantillon	Concentre l'échantillon	Concentre l'échantillon
<b>Résolution</b>	Résolution modérée	Résolution modérée à élevée	Bonne résolution	Très bonne résolution
<b>Capacité</b>	Capacité modérée	Haute capacité	Capacité modérée	Haute capacité
<b>Récupération de l'activité</b>	Bonne récupération de l'activité	Bonne récupération de l'activité	Dénaturation possible des protéines par les phases mobiles organiques	Bonne récupération de l'activité
<b>Observations diverses</b>	Utilisable pour changer de tampon Compatibilité avec les détergents	Très bonne sélectivité Larges domaines d'application	Technique simple Technique limitée avec des masses	Très bonne sélectivité Purification significative en

			moléculaires élevées	une seule étape  Résines coûteuses
--	--	--	-------------------------	---

## 5. Électrophorèse

### 5.1. Principe de la technique

L'électrophorèse est une **technique séparative**. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également **parfois** pour purifier des molécules solubles. Elle n'est donc pas adaptée à la séparation des lipides. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules.

À partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations. Ce chapitre présente les principales sortes d'électrophorèse, leurs intérêt et limite.

### 5.2. Le support

La migration des molécules doit au minimum être guidée. Elle peut ainsi être réalisée dans un fin tuyau, on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Cette technique est assez complexe à mettre en œuvre et ne permet pas une séparation optimale des différents constituants c'est pourquoi elle n'est pas beaucoup utilisée.

Notons qu'il ne faut pas confondre l'électrophorèse en veine liquide avec la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui utilise également des capillaires. En effet, dans les deux cas le facteur utilisé pour la séparation les molécules est totalement

différent Mais dans la grande majorité des cas, l'électrophorèse utilise un support. Les plus courants sont **le papier, l'acétate de cellulose, les gels d'agarose et les gels de polyacrylamide.**

Idéalement, le support d'une électrophorèse devrait être parfaitement inerte chimiquement, contrairement à ce qui se passe pour certains types de chromatographie. **Seul un effet mécanique ralentissant la progression** des molécules est recherché, ce qui permet d'améliorer la séparation. Bien entendu, cet idéal n'est jamais totalement atteint, et c'est particulièrement vrai pour le papier et l'acétate de cellulose.

De ce fait, l'électrophorèse sur ces supports met à profit les interactions différentielles qui existent entre certaines classes de molécules et le support pour leur séparation (exemple de la séparation des protéines sériques), mais cela ne permet pas une très bonne résolution. Par ailleurs, ces supports se distinguent des gels d'agarose et de polyacrylamide en ce sens que la migration s'effectue en surface de la bande de papier ou d'acétate de cellulose (qui présente une pellicule de solution tampon), alors qu'elle s'effectue dans l'épaisseur des gels.

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer. Ainsi, les gels forment un maillage tridimensionnel. Les molécules doivent donc progresser dans les pores ; les espaces libres situés entre les mailles du filet. On conçoit aisément que plus les molécules sont encombrantes, plus leur progression sera difficile donc lente. Il arrive même un moment où leur encombrement ne leur permet plus de progresser du tout. Au-delà de cette limite, il n'y aura donc aucune séparation.

À l'inverse, des molécules très petites, comparées aux pores, ne seront pratiquement pas freinées, **et par suite mal séparées.** En fonction de la taille des pores, on peut donc efficacement séparer des molécules situées dans une fourchette approximative de masses moléculaires. On peut, bien sûr, adapter la réticulation du gel à l'échantillon à traiter en choisissant la concentration du produit (Tableau 1). Cela suppose d'avoir une idée de la nature des molécules que l'on souhaite séparer. Dans le cas contraire, on peut faire plusieurs gels différents, voire faire un gel présentant un gradient de concentration en polyacrylamide.



**Tableau 1** : gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration en acrylamide.

Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en kDa
7,5%	45-400
10%	22-300
12%	13-200
15%	2,5-100

La réalisation d'un gel de **polyacrylamide** se fait par polymérisation d'une solution d'**acrylamide** (qui forme des chaînes) par du **bisacrylamide** qui lie ces chaînes entre elles (on parle de pontage). En fonction de la concentration de départ de la solution d'acrylamide, le réseau obtenu sera plus ou moins réticulé, permettant la séparation de molécules plus ou moins massives.

D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN.

L'acrylamide-bisacrylamide forme des réseaux beaucoup plus réticulés, ils sont donc indiqués pour séparer des molécules de masses moléculaires moins élevées, typiquement les protéines.

Notons que des fragments d'ADN de tailles limitées peuvent nécessiter l'utilisation de gels d'acrylamide plutôt que d'agarose. C'est en particulier le cas des fragments utilisés pour le séquençage qui ne dépassent généralement pas quelques centaines de nucléotides et dont le gel doit permettre de séparer des fragments dont la taille diffère d'un seul nucléotide. Pour les molécules les plus petites, comme les acides aminés, les gels ne conviennent pas pour leur séparation.

L'électrophorèse sur papier ou acétate de cellulose ne présente évidemment pas les mêmes contraintes puisque les molécules restent en surface. Il est en particulier possible de séparer les molécules les plus petites. En revanche, la résolution est assez limitée et il peut être préférable d'utiliser d'autres techniques de séparation telle que la chromatographie.

### **5.3. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes**

Dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes, les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. Les étapes préalables permettant l'obtention de la solution contenant les molécules à séparer doivent éviter les conditions dénaturantes.

Sauf cas particulier, il faut donc éviter les pH élevés ou au contraire très bas, les traitements à des températures élevées, les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel) et les agents chimiques dénaturants qui seront évoqués au paragraphe suivant. Les résultats obtenus sont toujours délicats à interpréter concernant la structure des molécules, car la séparation se fait en fonction de nombreux critères. Pour un support et un voltage donnés, la vitesse de migration dépendra de :

- **La charge native de la molécule.** Plus la charge est importante, plus la vitesse de migration sera importante. Signalons que cette charge native peut varier en fonction du pH, qui est le plus souvent fixé par l'expérimentateur au moyen de l'utilisation d'une solution tampon. Signalons également que selon le signe de la charge native, les molécules pourront migrer vers l'anode (molécules chargées négativement) ou vers la cathode (molécules chargées positivement) et que, pour les protéines, il convient donc de faire le dépôt à mi-chemin des deux électrodes, sauf à vouloir séparer une protéine dont on connaît la charge. Enfin, toutes les molécules non chargées ne seront pas séparées puisqu'elles ne migreront pas du tout. Cette question ne se pose pas pour les acides nucléiques (ADN et ARN) ; les acides phosphoriques qu'ils contiennent leur donnant une charge toujours négative.
- **La masse moléculaire.** Plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible. Rappelons que le choix du support est

essentiel. En effet, un support mal choisi peut entraîner une absence de migration (molécule trop grosse pour le maillage du support) ou au contraire une mauvaise, voire aucune séparation (molécule trop petite pour le maillage du support).

- **La structure tridimensionnelle.** En effet, à masse moléculaire égale, une molécule pourra, selon sa forme, être plus ou moins ralentie dans sa progression par le support. Par exemple, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse. On citera comme meilleur exemple la séparation de molécules d'ADN circulaires identiques (donc de même masse moléculaire) mais présentant des états de surenroulement différents (ce qui influence l'état de compaction de l'ADN).

Cette technique présente certains avantages comme celui de permettre la séparation de molécules multimériques entières. En revanche, outre l'interprétation délicate, il est fréquent que les molécules présentes dans l'échantillon soumis à électrophorèse s'agrègent entre elles, formant de très gros ensembles impossibles à séparer.

Pour terminer, citons une variante de cette technique qui consiste à utiliser un gel dont le pH varie selon un gradient entre les deux électrodes. Chaque molécule chargée verra sa charge varier au fur et à mesure de son déplacement (le pH étant différent en chaque point du gel) jusqu'au moment où la molécule va atteindre son point isoélectrique. N'étant plus chargée, elle ne va plus se déplacer : on est à l'équilibre. On sépare donc les différentes molécules en fonction de leur point isoélectrique d'où le **nom d'isoélectrofocalisation**.

#### 5.4. L'électrophorèse en conditions dénaturantes

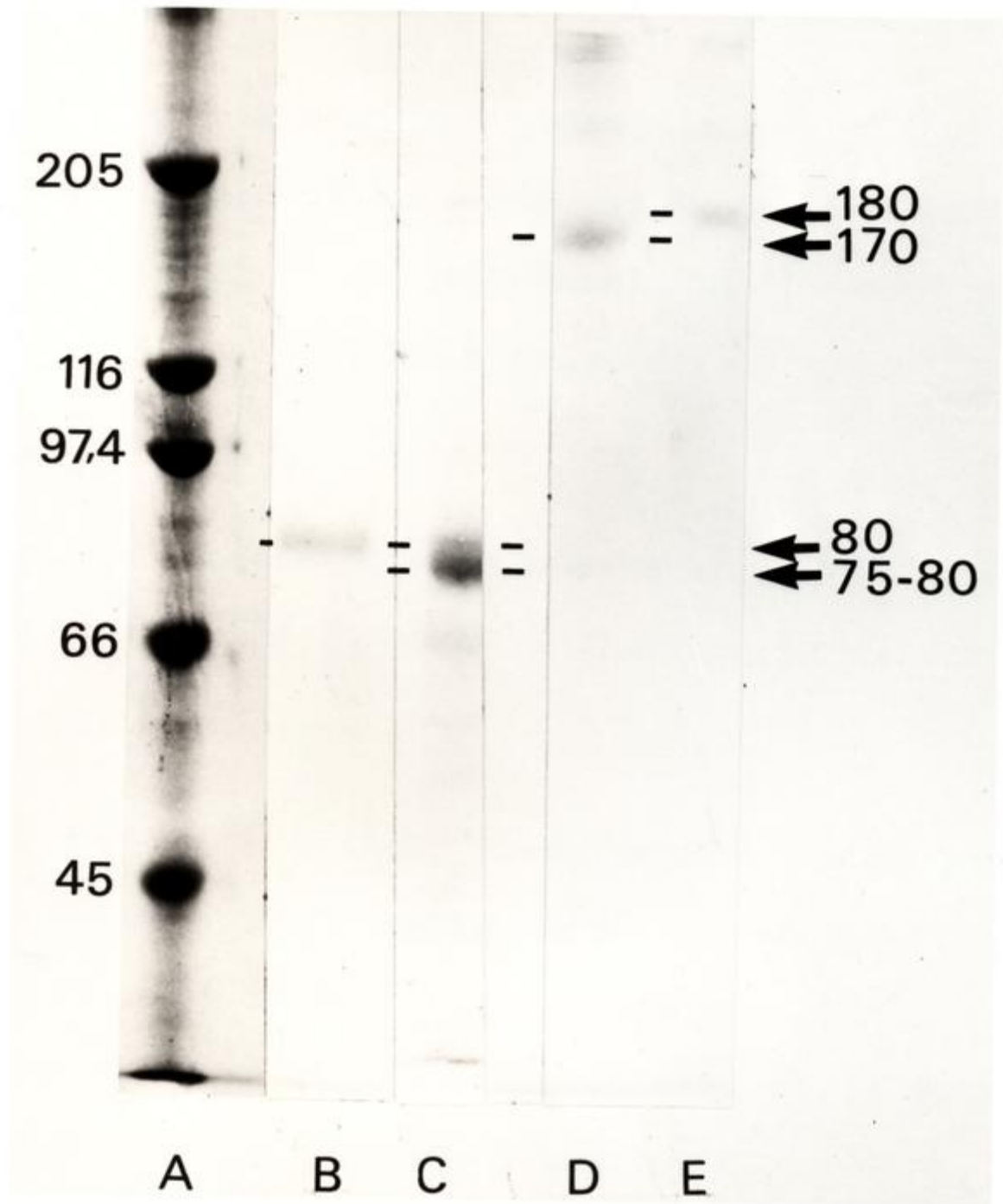
Comme son nom l'indique, dans cette variante, les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont les traitements thermiques, les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), et, bien sûr, l'utilisation **d'agents dénaturants comme l'urée ou le SDS (sodium dodécyl sulfate)**. Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes. Non seulement, il

dénature les protéines, mais il se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante, c'est-à-dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire.

Or, le SDS est une molécule chargée négativement. En sa présence, toutes les protéines vont donc adopter la même forme (déroulées) avec une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire. On estime ainsi qu'il se fixe en moyenne environ deux molécules de SDS par acide aminé. Sauf cas particulier, la charge native est faible donc négligeable par rapport aux charges portées par le SDS. Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses). La séparation se fait donc uniquement en fonction de la masse moléculaire. Par voie de conséquence, l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non dénaturante. Autre avantage, l'utilisation d'un détergent permet de solubiliser les protéines hydrophobes, et en particulier les protéines membranaires, qui ne peuvent pas être séparées par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Comme le support le plus adapté pour séparer les protéines est le gel de polyacrylamide (compte tenu du fait qu'une protéine typique fait autour de 50 kDa) on parle couramment de SDS-PAGE (pour *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ou gel de polyacrylamide **en présence de SDS**). L'urée est, elle, généralement utilisée pour dénaturer l'ADN.

Un autre agent chimique couramment utilisé est le  $\beta$ -mercaptoéthanol. C'est un agent réducteur qui a pour propriété de réduire les ponts disulfures des protéines, donc de détruire ces pontages covalents qui ne sont pas cassés par le SDS. Cela permet de séparer les différents polypeptides reliés par de tels ponts au sein d'une même protéine. La comparaison de SDS-PAGEs avec et sans  $\beta$ -mercaptoéthanol d'un même échantillon est donc riche d'informations sur la structure quaternaire des protéines (Figure 1).



**Figure 1 :** analyse électrophorétique d'une molécule purifiée en présence ou en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol\*

(\*) Les mêmes échantillons ont été soumis à séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide (7,5 %)-bisacrylamide (0,2 %), après dénaturation par du SDS, en **présence** (A, B, C) ou en **absence** (D, E) de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le gel est coloré au bleu de Coomassie. On constate que les masses moléculaires apparentes observées sont plus élevées en absence (170 ou 180 kDa) qu'en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (bande diffuse à 75-80 ou 80kDa). On peut en déduire que la molécule isolée est composée de deux polypeptides reliés par un ou plusieurs pont(s) disulfure(s) interchaînes. Signalons que la protéine native est composée de deux unités de 170/180 kDa qui sont dissociées par le SDS. Une électrophorèse en conditions non dénaturantes aurait donc donné une bande au-delà des 300 kDa

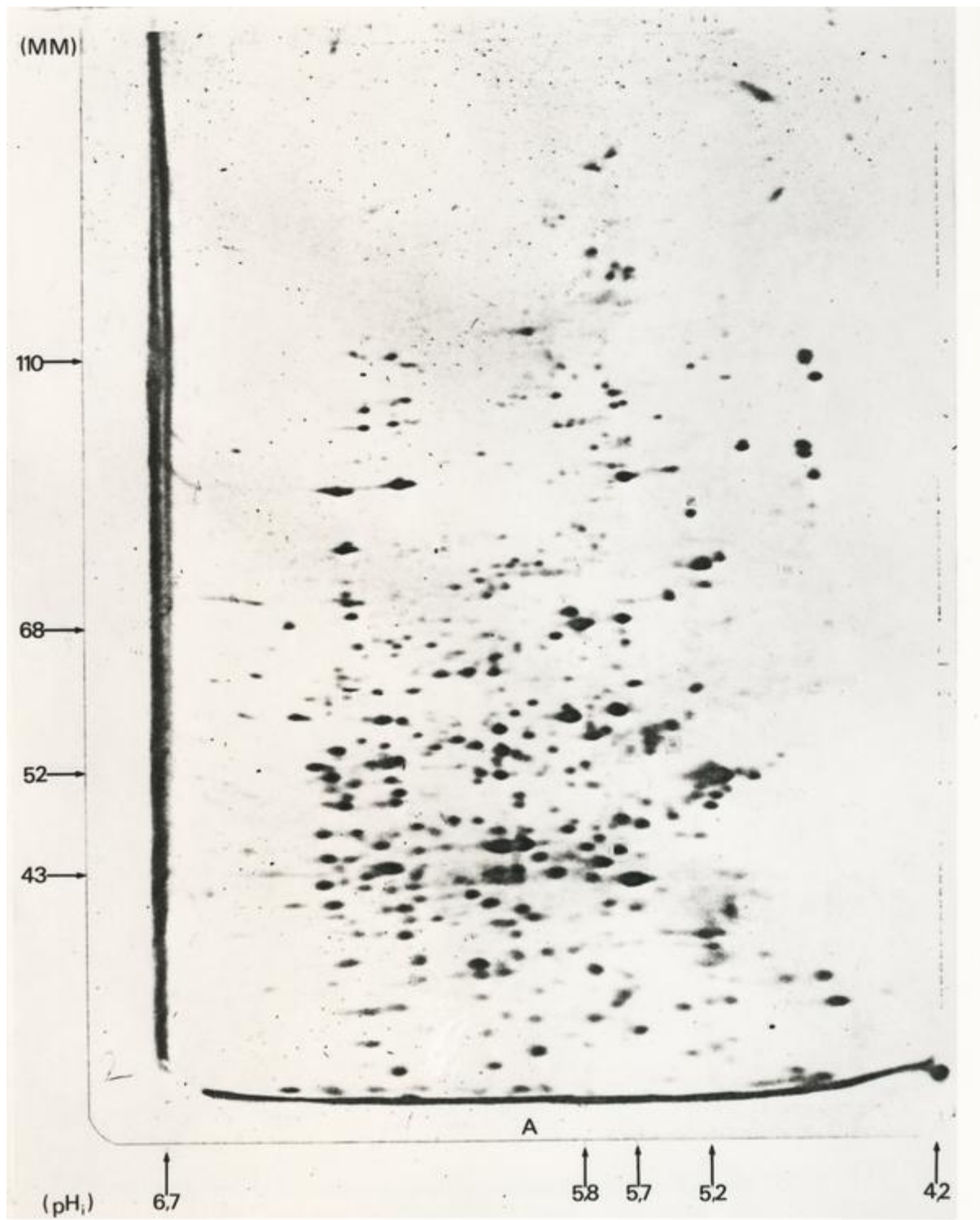
**Colonne A** : marqueurs de masse moléculaire (avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol);

**Colonnes B et E** : marqueur DBH (dopamine- $\beta$ -hydroxylase) purifiées à partir de phéochromocytomes de rat ;

**Colonnes C et D** : marqueur DBH purifiées à partir de phéochromocytomes humains.

### 5.5. L'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle ne fait que reprendre les deux types d'électrophorèses présentées dans les deux paragraphes précédents, mais appliquées successivement sur le même gel selon deux orientations différentes.



**Figure 2** : analyse de protéines totales d'ovocytes sur un gel bidimensionnel

---

La migration initiale a été réalisée en conditions dénaturantes (SDS), en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. La révélation est obtenue par autoradiographie, les protéines produites par l'ovocyte ayant été marquées au moment de leur synthèse par l'utilisation de méthionine-<sup>35</sup>S (marquage métabolique).

L'axe des abscisses donne le point isoélectrique des différentes protéines séparées.

L'axe des ordonnées leur masse moléculaire apparente. On identifie de très nombreux spots dont certains ont une même masse moléculaire apparente (situés sur une même ligne horizontale). Un gel de ce type permet donc de séparer de très nombreuses protéines en une seule étape.

On commence par faire un SDS-PAGE permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Cependant, dans un échantillon complexe comme un broyat total d'un tissu, le nombre de protéines est tel (plusieurs milliers), que de nombreuses molécules possèdent une masse moléculaire apparente identique, et ne sont donc pas séparées les unes des autres lors de cette première étape.

On réalise alors une isoélectrofocalisation à 90 degrés de la première migration, d'où le nom d'électrophorèse bidimensionnelle. A l'issue de cette deuxième étape permettant de séparer les molécules selon un second critère, leur point isoélectrique, on obtient des spots sur toute la surface du gel (Figure 2). Plusieurs centaines de spots peuvent ainsi être individualisés sur des gels de grande taille. Ce pouvoir de résolution très intéressant est particulièrement mis à profit en génomique, domaine qui étudie l'expression moléculaire du génome dans son ensemble.

D'un point de vue pratique, on passe d'une électrophorèse en présence de SDS à une électrophorèse en condition non dénaturante. Il faut donc éliminer le SDS entre les deux par lavage, ce qui permet une renaturation partielle des protéines (ce qui n'est pas très important) mais surtout l'élimination des charges portées par le SDS pour retrouver la charge native des molécules. Si la renaturation n'est pas essentielle c'est parce que l'isoélectrofocalisation est



une technique à l'équilibre, donc la vitesse de migration n'intervient pas. Par contre il est important de commencer par le SDS-PAGE pour éviter les problèmes liés, en particulier, aux agrégats, mais aussi parce que dans le cas contraire, les différents polypeptides qui composent une même molécule seraient tous regroupés au même point isoélectrique correspondant au point isoélectrique global de la protéine.

### 5.6. Quelques techniques de révélation

Après séparation, **les molécules doivent pouvoir être localisées**. Il est évident que la méthode de révélation dépendra de la nature des molécules à mettre en évidence. Mais un souci est à prendre en compte : il faut rapidement stabiliser l'emplacement des molécules. En effet, dès la fin de l'électrophorèse, la diffusion reprend ses droits, avec pour conséquence une perte de résolution (les molécules regroupées à un endroit précis ayant tendance à se disperser). **Pour cela on peut fixer les molécules sur leur support en plongeant le gel dans une solution contenant un mélange de méthanol et d'acide acétique**, ce qui a pour effet de dénaturer définitivement les protéines et de les fixer au support.

Ultérieurement, on peut aussi déshydrater le gel pour une conservation de longue durée.

Mais on peut également transférer les molécules sur un autre support sur lequel elles se fixeront fortement. C'est ce que l'on appelle un *blot*. Ce second support est une membrane de nitrocellulose, un papier établissant cette fois des interactions chimiques avec les molécules. Une fois les molécules transférées, on peut leur faire subir différents traitements, ce qui n'entraînera pas leur décrochage.

**Pour l'ADN**, la méthode la plus classique est d'utiliser un agent intercalant fluorescent tel que le bromure d'éthidium. Cette molécule plate va s'insérer entre les bases des nucléotides. Lorsqu'on éclaire cette molécule avec des UV à courtes longueurs d'ondes (autour de 300 nm), elle réémet de la lumière visible rouge orangée. On peut observer directement la lumière produite ou faire une photographie. Signalons qu'il faut utiliser des protections adaptées lors de cette révélation. En effet, une longueur d'onde de l'ordre de 300 nm correspond à des rayons UV très énergétiques. D'autre part, les lampes utilisées sont

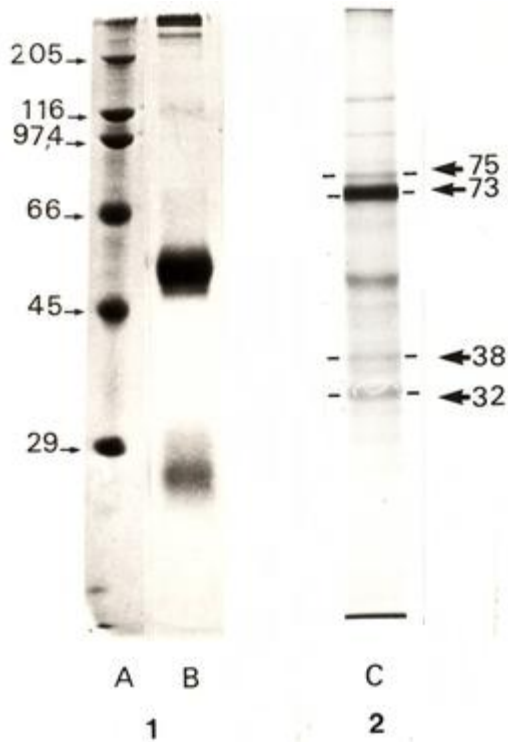
généralement d'assez forte puissance. La peau et surtout les yeux doivent donc être protégés : port de vêtements longs, de gants et d'un masque transparent anti-UV (des lunettes anti-UV protègent les yeux mais pas la peau du visage : bronzage « retour de ski » garanti en une minute). Les méthodes chimiques utilisant des colorants sont moins utilisées car ils sont moins sensibles.

**Pour les protéines**, il y a de multiples façons de faire. La plus simple est d'utiliser un colorant, le bleu de Coomassie, avant de déshydrater le gel. La technique est très simple (cinq minutes d'incubation dans une solution contenant le colorant) mais sa sensibilité reste modeste. On peut aussi utiliser une coloration beaucoup plus sensible au nitrate d'argent, mais cette méthode est plus longue et complexe à mettre en œuvre.

Après transfert sur membrane de nitrocellulose on peut utiliser des méthodes indirectes basées sur la reconnaissance spécifique antigène-anticorps. On parle alors d'*immunoblot*.

Une autre possibilité consiste à faire une autoradiographie, ceci dans le cas où des molécules comportant des atomes radioactifs sont présentes (marquages métaboliques par exemple). La figure 5 présente deux exemples de révélation d'un même échantillon.

Cette liste est loin d'épuiser la variété des techniques existantes, d'autres méthodes étant disponibles en fonction des particularités des molécules étudiées.



**Figure 3 :** comparaison d'une coloration au bleu de Coomassie et d'une autoradiographie d'un gel d'électrophorèse

L'échantillon testé est le résultat d'une immunoprécipitation de DBH (dopamine- $\beta$ -hydroxylase) humaine marquée lors de sa synthèse par l'utilisation de méthionine<sup>35</sup>S (ce marquage a été rendu possible car la protéine a été synthétisée dans des œufs de Xénope, suite à l'injection dans cet œuf de l'ARNm humain purifié codant pour la DBH). La séparation électrophorétique a été réalisée par SDS-PAGE en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

**L'image 1** montre le résultat de la coloration du gel au bleu de Coomassie et **l'image 2** le résultat de l'autoradiographie du même gel.

En coloration au bleu de Coomassie, on constate la présence d'une bande très importante de masse moléculaire apparente égale à 50 kDa environ. Cette bande correspond à la chaîne lourde des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation et ne correspond donc pas à la protéine d'intérêt (de même pour la bande d'environ 25 kDa de masse moléculaire apparente qui correspond à la chaîne légère des anticorps).

En revanche, par autoradiographie, seules les molécules marquées sont révélées avec une bande largement majoritaire située à **73 kDa de masse moléculaire apparente, correspondant à la DBH**. On remarquera que cette bande est invisible sur le gel coloré au bleu de Coomassie, ce qui illustre bien la différence de sensibilité entre les méthodes de révélation disponibles. Les autres bandes observées (plus faibles) correspondent soit à des produits de dégradation, soit à d'autres protéines qui sont également reconnues par les anticorps utilisés, soit à des contaminants. En effet, étant donné la sensibilité de l'autoradiographie, il faut très peu de contaminants pour voir apparaître une bande.

**Colonne A** : marqueurs de masse moléculaire ; **colonnes B et C** : immunoprécipitation d'un surnageant de culture d'ovocytes injectés avec le l'ARNm humain de DBH, coloration au bleu de Coomassie (**B**) ou révélation par autoradiographie (**C**).

## **6. Techniques d'analyse spectroscopique**

### **6.1. Généralités**

La spectroscopie est l'étude des interactions d'un rayonnement électromagnétique avec la matière (atomes, molécules, ions...). Les techniques spectroscopiques permettent de sonder la matière par différentes méthodes.

Il est possible d'interpréter les résultats de cette interaction pour en déduire des informations quant à la structure atomique et moléculaire de la matière irradiée et/ou pour doser cette matière.

Une technique spectroscopique à pour principe d'irradier (radiations électromagnétiques) un corps et de voir quelles sont les conséquences de cette radiation sur ce corps, à l'exception de la spectrométrie de masse qui possède un spectre d'une molécule ionisée se déplaçant dans un champ magnétique.

Selon la technique mise en jeu, on pourra déduire des spectres obtenus des informations à caractère structural.

Quelques exemples de techniques spectroscopiques

- Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-visible)
- Spectrophotométrie d'émission et d'absorption
- Spectroscopie infra-rouge (IR)

- Spectroscopie Raman (La **diffusion Raman**, ou **effet Raman**, est un phénomène optique découvert indépendamment en 1928 par les physiciens Chandrashekhara Venkata Râman et Leonid Mandelstam)
- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)
- Spectroscopie de résonance magnétique paraélectronique (RPE)
- Spectrométrie de masse (SM)
- Spectroscopie photo-électronique

Avant de débiter le cours, il est important de préciser l'étymologie des termes (spectrophotométrie et spectroscopie) :

**-spectro** : se rapporte à des spectres

**-photo** : se rapporte à la lumière

**-métrie**: se rapporte à des mesures

Pour les spectres réalisés avec de la lumière, on parlera de spectrophotométrie (UV, visible par exemple)

Si tu fais un spectre avec des rayons X, on parlera de spectroscopie X

Si tu utilises un appareil de masse, on parlera de spectroscopie de masse

## 6.2. Le rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique, dont la lumière est un exemple, est une forme d'énergie constituée d'ondes. Une onde électromagnétique est une variation périodique de champ électrique et magnétique (**Figure 1**) pouvant se propager parmi les milieux matériels comme immatériels (vide). Elle est caractérisée par plusieurs grandeurs physiques :

- **La longueur d'onde ( $\lambda$ )** : elle exprime le caractère oscillatoire périodique de l'onde dans l'espace. Elle est mesurée en mètre dans le système international (SI), ou en l'un de ses sous multiples. Autrement dit une longueur d'onde ( $\lambda$ ) est une distance parcourue pendant une vibration c'est à dire la distance entre deux crêtes ou deux creux (**Figure 1**). Dans le système usuel, on utilise souvent le **nanomètre** (nm) comme unité. **Pour rappel, 1 nanomètre (nm) =  $10^{-9}$  m**
- **La période (T)** : elle présente le temps nécessaire pour que l'onde effectue un cycle. Son unité est la seconde.

- **La fréquence ( $\nu$ ) ou ( $f$ )** : elle représente l'inverse de la période ( $1/T$ ), elle traduit le nombre le nombre de cycles par unité de temps. Elle s'exprime en Hertz. Un Hz équivaut à une oscillation par seconde. Par exemple les ondes électromagnétiques utilisées en télédétection spatiale ont des fréquences très élevées :

Le kilohertz soit **1 kHz =  $10^3$  Hz**  
Le mégahertz soit **1 MHz =  $10^6$  Hz**  
Le gigahertz soit **1 GHz =  $10^9$  Hz**

La propagation de ces ondes s'effectue à une vitesse qui dépend du milieu considéré. Dans le vide, la vitesse de propagation est égale à  $3.10^8$  m/s. Longueur d'onde et fréquence sont inversement proportionnelles et unies par la relation suivante

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

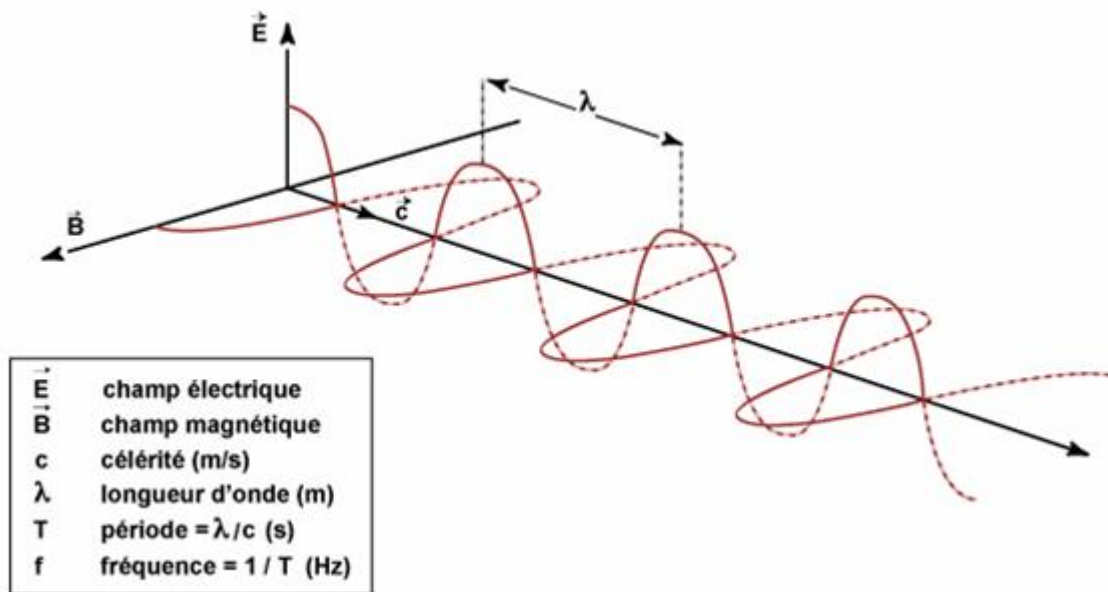
- $\lambda$  : longueur d'onde de l'onde électromagnétique
- $c$  : vitesse de la lumière ( $3.10^8$  m/s)
- $\nu$  : la fréquence de l'onde

Par conséquent, plus la longueur d'onde est petite, plus la fréquence est élevée, et réciproquement.

L'énergie d'un rayonnement électromagnétique est reliée à sa fréquence par la relation

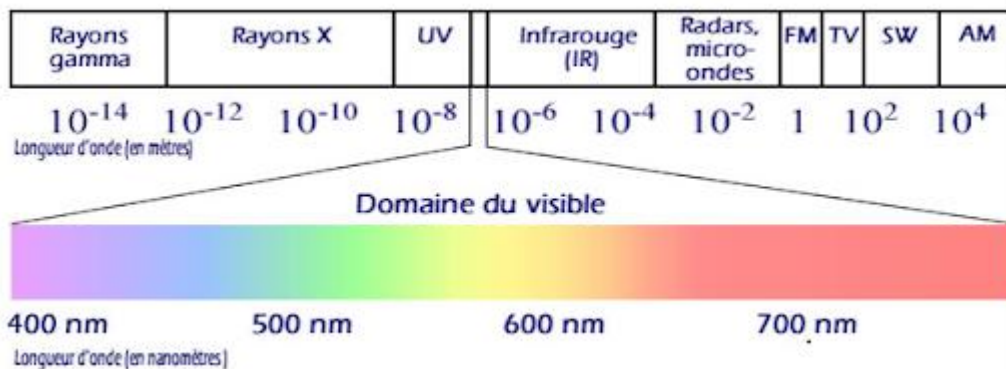
$$E = h\nu \text{ (E : énergie de l'onde électromagnétique)}$$

- $\nu$ : fréquence de l'onde électromagnétique
- $h$  : constante de Planck ( $6.625.10^{-34}$  J.s)



**Figure 1 :** nature et propagation d'une onde électromagnétique

Les radiations électromagnétiques (émises par une source de rayonnement électromagnétique) forment le spectre électromagnétique.



**Figure 2 :** spectre des ondes électromagnétique

En partant **des ondes les plus énergétiques**, on distingue successivement (**Figure 2**) :

- **Les rayons gamma ( $\gamma$ )** : ils sont dus aux radiations émises par les éléments radioactifs. Très énergétiques, ils traversent facilement la matière et sont très dangereux pour les cellules vivantes. Leurs longueurs d'onde s'étendent de  $10^{-14}$  m à un  $10^{-12}$  m.
- **Les rayons X** : rayonnements très énergétiques traversant plus ou moins facilement les corps matériels et un peu moins nocifs que les rayons gamma, ils sont utilisés

notamment en médecine pour les radiographies, dans l'industrie (contrôle des bagages dans le transport aérien), et dans la recherche pour l'étude de la matière (rayonnement synchrotron). Les rayons X ont des longueurs d'onde comprises entre  $10^{-12}$  m et  $10^{-8}$  m.

• **Les ultraviolets** : rayonnements qui restent assez énergétiques, ils sont nocifs pour la peau. Heureusement pour nous, une grande part des ultraviolets est stoppée par l'ozone atmosphérique qui sert de bouclier protecteur des cellules. **Leurs longueurs d'onde s'échelonnent  $10^{-8}$  m à  $4 \cdot 10^{-7}$  m.**

• **Le domaine visible** : correspond à la partie très étroite du spectre électromagnétique perceptible par notre œil. C'est dans cette portion du spectre que l'on peut distinguer l'ensemble des couleurs de l'arc en ciel, du bleu au rouge. **Il s'étend de  $10^{-7}$  m (lumière bleue) à  $8 \cdot 10^{-7}$  m (lumière rouge).**

• **L'infrarouge** : rayonnement émis par tous les corps dont la température est supérieure au zéro absolu ( $-273^{\circ}\text{C}$ ). En télédétection, on utilise certaines bandes spectrales de l'infrarouge pour mesurer la température des surfaces terrestres et océaniques, ainsi que celle des nuages. La gamme des infrarouges couvre les longueurs d'onde allant  $8 \cdot 10^{-7}$  m à  $10^{-3}$  m (un millimètre).

• **Les ondes radar ou hyperfréquences** : Cette région du spectre est utilisée pour mesurer le rayonnement émis par la surface terrestre et s'apparente dans ce cas à la télédétection dans l'infrarouge thermique, mais également par les capteurs actifs comme les systèmes radar.

Un capteur radar émet son propre rayonnement électromagnétique et en analysant le signal rétrodiffusé, il permet de localiser et d'identifier les objets, et de calculer leur vitesse de déplacement s'ils sont en mouvement. Et ceci, quelque soit la couverture nuageuse, de jour comme de nuit.

Le domaine des hyperfréquences s'étend des longueurs d'onde de l'ordre du centimètre jusqu'au mètre.

• **Les ondes radio** : Ce domaine de longueurs d'onde est le plus vaste du spectre électromagnétique et concerne les ondes qui ont les plus basses fréquences. Il s'étend des longueurs d'onde **de quelques cm à plusieurs km.**



Relativement faciles à émettre et à recevoir, les ondes radio sont utilisées pour la transmission de l'information (radio, télévision et téléphone). La bande FM des postes de radio correspond à des longueurs d'onde de l'ordre du mètre. Celles utilisées pour les téléphones cellulaires sont de l'ordre de 10 cm environ.

### 6.3. Analyse structurales par les méthodes spectroscopiques

#### 6.3.1. Introduction

C'est la confrontation de toutes ces méthodes qui fournit des informations sur la structure des molécules. Nous allons voir les techniques suivantes **et qui sont largement les utilisées en Sciences Biologie**) :

- **Ultra-Violet / Visible** : apporte des informations relatives à la structure électronique de certains composés.
- **Infra-Rouge** : permet d'identifier certains groupes fonctionnels d'une molécule, tels que C=O, OH,... , elle fournit également une région d'empreintes fonctionnelles en rapport avec le squelette de la molécule.
- **Spectrométrie de Masse** : mesure la masse moléculaire (**cette partie fera l'objet d'un paragraphe à part portant le N° 6.4**).

Les atomes, les molécules possèdent une énergie électronique mais également du fait de leur mouvement de vibration et de rotation, une énergie de vibration et une énergie de rotation.

$$E_{\text{totale}} = E_e (\text{électronique}) + E_v (\text{de vibration}) + E_j (\text{de rotation})$$

Le passage d'un niveau d'énergie  $E_m$  à un niveau d'énergie supérieur  $E_n$  s'accompagne d'une absorption d'un rayonnement de fréquence  $\nu$  telle que

$$\Delta E = E_n - E_m = h \nu.$$

-si la configuration électronique  $e$  varie donc c'est une transition électronique. L'absorption se situe dans le **visible ou l'ultraviolet (800 à 200 nm)**.

- si  $\nu$  varie donc c'est une transition vibrationnelle. L'absorption se situe dans **l'infrarouge moyen (200 à 4000 cm<sup>-1</sup>)**.

-si seul  $j$  varie donc c'est une transition de rotation pure. L'absorption se situe dans **les micro-ondes ou le lointain infrarouge (0,1 à 200 cm<sup>-1</sup>)**.

Dans tous les cas, l'énergie du rayonnement électromagnétique est **absorbée** par les molécules, ce qui leur permet de passer sur un niveau d'énergie supérieure

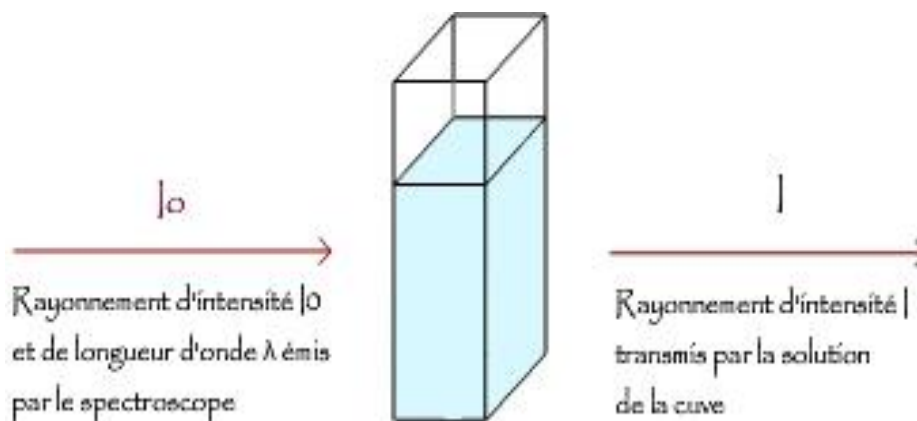
### 6.3.2. Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-visible)

#### a) Principe d'une spectroscopie

L'échantillon à analyser est traversé par un rayonnement lumineux de longueur d'onde allant de 100-800 nm. Les photons issus du rayonnement transfèrent aux composés analysés une énergie qui excite les molécules, atomes ou ions traversés. Ainsi une partie du rayonnement incident est absorbé. L'étude du rayonnement après passage à travers la substance analysée permet d'obtenir des informations sur sa nature.

#### b) L'absorbance

Lorsque la solution est placée dans un spectroscope, elle reçoit un rayonnement d'intensité  $I_0$ . Comme expliqué précédemment, elle en diffuse une partie et absorbe l'autre. L'intensité ( $I$ ) du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial ( $I_0$ ) (voir schéma ).



#### Schéma de principe de lecture d'un échantillon en spectroscopie UV-visible.

À partir de ces intensités on définit l'absorbance. L'absorbance est une grandeur sans unité qui est d'autant plus grande que le rayonnement est absorbé (**La loi de Beer**

**Lambert**). L'absorbance  $A$  mesurée par un spectroscope dépend de plusieurs facteurs :

- La largeur L de cuve de spectroscopie,
- La concentration C de la substance dissoute,
- Le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$ , aussi appelé coefficient d'extinction molaire. Il s'agit d'une grandeur qui dépend de l'espèce dissoute en solution, du solvant utilisé et de la longueur d'onde du rayonnement.

Ces grandeurs sont liées par la loi de **Beer-Lambert** :  $[A=\epsilon.C.L]$

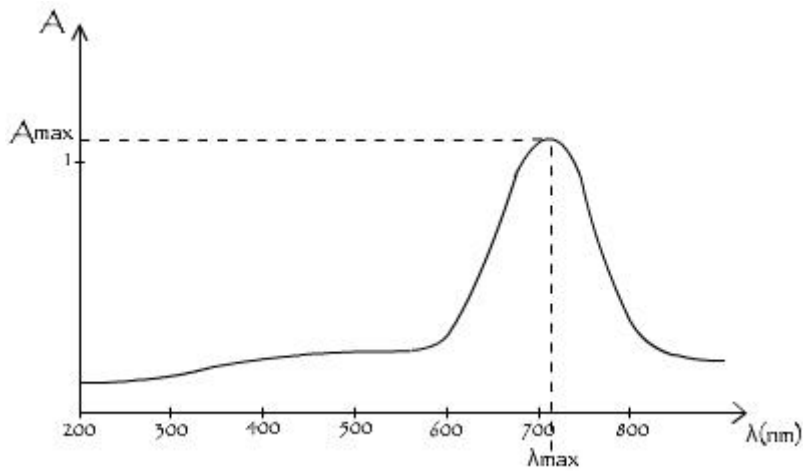
- avec  $\epsilon$  en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
- c en  $mol.L^{-1}$
- L en cm
- A sans unité

Étant donné que le coefficient d'absorption molaire dépend de la longueur d'onde du rayonnement, l'absorbance en dépend également.

### c) Le spectre UV-Visible

Afin d'obtenir un spectre UV-visible, la solution est soumise aux rayonnements dont la longueur d'onde est comprise dans l'intervalle 200-400 nm (domaine des ultraviolets) et dans l'intervalle 400-800 nm (domaine de la lumière visible). Pour chaque longueur d'onde, l'absorbance est mesurée et les données recueillies sont utilisées pour tracer les variations de l'absorbance (en ordonnées) en fonction de la longueur d'onde (en abscisse). Le graphique ainsi obtenu constitue un spectre UV-visible.

Un spectre UV-visible comporte toujours une longueur **d'onde** ( $\lambda_{max}$ ) pour laquelle l'absorbance est maximale ( $A_{max}$ )



**Figure 1 :** spectre UV-visible d'une molécule.

$\lambda_{\max}$  est une grandeur caractéristique du composé analysé. Elle peut donc permettre d'identifier l'espèce chimique en solution. Cependant des molécules proches peuvent avoir des  $\lambda_{\max}$  très similaires. La forme du spectre a aussi son importance. Il peut exister des maxima locaux (plusieurs pics) également caractéristiques du composé. La spectrométrie UV-visible n'est pas la plus efficace pour identifier une molécule inconnue. En effet, les spectrométries infrarouge et de masses, ainsi que la RMN, sont plus puissantes.

Par contre elle est très utilisée pour :

- L'analyse quantitative d'une molécule connue,
- Le suivi de l'évolution d'une concentration d'une molécule donnée lors d'une réaction chimique,
- Comme détecteur en aval d'une autre méthode d'analyse (CCM, chromatographie liquide).

#### **d) Analyse quantitative**

La spectrométrie UV-visible selon la loi de Beer-Lambert permet d'utiliser cette technologie pour mesurer la concentration d'une molécule en solution. En effet, dans des conditions données (solvant et cuve fixes), la concentration en solution d'une molécule est proportionnelle à son absorbance. Elle est donc très utilisée pour l'analyse quantitative de molécules connues. Dans ce cas, on se place à la longueur d'onde maximale  $\lambda_{\max}$  à laquelle le composé absorbe afin de faciliter la mesure. S'il s'agit d'un mélange de molécules, on s'assure que seule la molécule à doser absorbe à la longueur d'onde choisie, qui peut alors être différente de  $\lambda_{\max}$ . Ensuite, on réalise une échelle de teinte à la longueur d'onde choisie. C'est-à-dire que la molécule à analyser est préparée à plusieurs concentrations connues à partir d'un

standard commercial, dans les mêmes conditions que ce que l'on souhaite analyser (solvant, cuve...). La droite de l'absorbance en fonction de la concentration en la molécule est alors tracée (régression linéaire). L'absorbance de l'échantillon est alors reportée sur le graphique et l'on détermine la concentration correspondante.

### **e) Suivi de vitesse de réaction**

La spectrométrie UV-visible est également une technique de choix pour le suivi de réaction chimique, notamment pour évaluer la vitesse de réaction. En effet, la réaction chimique peut se dérouler directement dans la cuve et l'appareil effectue des mesures à intervalles réguliers. Cela évite les lourdeurs et incertitudes des méthodes traditionnelles nécessitant des prélèvements à intervalles réguliers. En effet, même si la réaction est stoppée dans le prélèvement par refroidissement rapide dans un bain de glace (trempe), il est difficile de garantir un arrêt total et instantané de la réaction. De plus, il faut prévoir le dosage de chacun des prélèvements, ce qui peut se révéler fastidieux.

### **f) Le déroulé d'une analyse**

On dissout la substance à analyser dans un solvant approprié. La solution obtenue est versée dans une cuve destinée à être placée dans le spectroscope. Afin de ne pas fausser les mesures, la cuve et le solvant choisis ne doivent pas absorber les rayonnements émis par le spectroscope. Les faces de la cuve placée dans le faisceau UV-visible doivent être parfaitement propres et exemptes de rayures. Elle peut être nettoyée au moyen de papier joseph (papier très fin n'entraînant pas de micro-rayures). En versant le mélange dans la cuve, il faut également s'assurer qu'aucune bulle ou impureté pouvant impacter le rayonnement incident ne soit présentes. Le logiciel dédié à l'appareil permet de commander l'analyse voulue (longueur d'onde, nombre de mesures) et restitue le résultat (spectre, valeurs d'absorbance...) en quelques secondes.

### **g) L'appareillage**

L'appareillage est assez simple et extrêmement robuste. Il ne nécessite pas d'entretien fréquent à part celui de la cuve (amovible) qui doit être parfaitement propre et sans rayures. Il

existe également des cuves jetables pour une plus grande facilité d'entretien. Il est constitué d'une lampe (source du rayonnement) émettant dans tout le spectre UV-visible (lampe avec filament de tungstène, ou à arc au xenon par exemple), d'un monochromateur et d'un détecteur du rayonnement final. Le tout est relié à un ordinateur qui en permet le contrôle. Le monochromateur permet de sélectionner les longueurs d'onde de travail. Il est basé sur le principe d'un réseau de diffraction permettant de séparer les longueurs d'onde à la manière d'un prisme. Pour un bon fonctionnement, la lampe doit être régulièrement changée. Le réseau de diffraction doit être vérifié afin de s'assurer qu'il n'y a pas un décalage entre la longueur d'onde demandée et la longueur d'onde réelle. Pour ce faire au moins une fois par an, des filtres très précis sont placés à la place de la cuve et l'on vérifie que la longueur d'onde détectée correspond bien à la longueur d'onde théorique.

#### **h) La couleur des espèces chimiques**

Si le maximum d'absorbance correspond à une longueur d'onde appartenant au domaine des ultraviolets (200 - 400 nm) alors celle-ci est incolore. Si  $\lambda_{\max}$  appartient au domaine du visible (400 - 800 nm) alors l'espèce chimique possède la couleur complémentaire de celle correspondant à  $\lambda_{\max}$ . Les molécules conjuguées, c'est à dire possédant une alternance de simples et doubles liaisons, les aldéhydes et les cétones absorbent très bien les UV. Ceci permet de pouvoir facilement détecter ce type de molécule par spectrométrie UV après une CCM ou une chromatographie liquide notamment.

### **6.3.3. Spectrophotométrie InfraRouge (IR)**

#### **a) Principe de la spectrophotométrie infrarouge**

Contrairement aux autres techniques spectroscopiques d'absorption, une très large gamme de substances peuvent être analysées par spectrophotométrie infrarouge.

Quel que soit l'état (solide, liquide ou gazeux), les atomes d'une molécule ont une certaine mobilité les uns par rapport aux autres : ils sont dotés de mouvements de vibrations qui modifient légèrement et périodiquement la longueur et l'orientation des liaisons.

Il existe différents type de déformation des liaisons. Par exemple, pour les molécules possédant au minimum 3 atomes, voici les principaux :

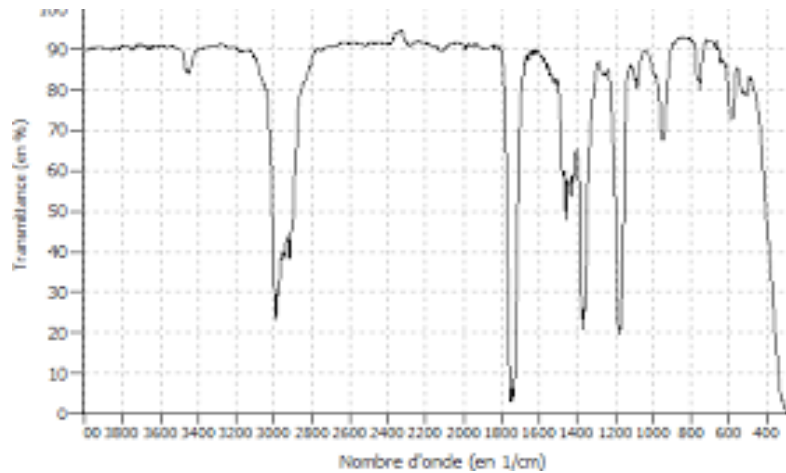
- **Étirement symétrique** : les deux atomes "extérieurs" s'éloignent et se rapprochent simultanément de l'atome central.
- **Étirement asymétrique** : quand l'un des atomes "extérieurs" se rapproche, l'autre s'éloigne de l'atome central.
- **Cisaillement** : les atomes "extérieurs" se rapprochent et s'éloigne l'un de l'autre dans le plan de la molécule.
- **Torsion** : un des atomes "extérieurs" se déplace d'avant en arrière du plan de la molécule, tandis que l'autre effectue le chemin inverse.

Les molécules organiques peuvent absorber des rayonnements infrarouge qui modifient l'état de vibration de leurs liaisons.

La longueur d'onde de l'absorption de ces rayonnements dépend principalement de la nature des atomes liés, de la nature de la déformation et du type de liaison ( simple, double ou triple), mais aussi des liaisons voisines et du solvant utilisé.

**La loi de Beer-Lambert** est toujours valable dans la région des infrarouges, cette méthode est donc également quantitative.

#### **b) Exemple de spectre infrarouge**



Afin de faciliter la comparaison des spectres de molécules issues de laboratoires et d'appareils différents, le spectre infrarouge obtenu représente souvent la transmittance en pourcentage en fonction du nombre d'ondes. En effet, l'utilisation de l'absorbance brute, entraînerait d'importantes variations d'intensités d'un appareil à l'autre rendant plus difficile l'existence de bases de données communes.

- **L'axe des abscisses**

Il comporte le nombre d'onde noté  $\sigma$  qui correspond à l'inverse de la longueur d'onde : **[ $\sigma=1/\lambda$ ]**

- avec  $\lambda$  en centimètres (cm)
- $\sigma$  en centimètres moins un ( $\text{cm}^{-1}$ )

Par ailleurs cet axe est gradué de gauche à droite de manière décroissante.

- **L'axe des ordonnées**

Il comporte la transmittance qui est une grandeur notée T, sans unité mais en général exprimée sous forme d'un pourcentage.

- $(I_0)$  est l'intensité du rayonnement incident du spectroscope
- $(I)$  est l'intensité du rayonnement après la traversée de la cuve du spectroscope



- (T) est exprimée en pourcentage

La transmittance exprime la proportion de rayonnement traversant la cuve sans être absorbée :

- Si pour une longueur d'onde donnée il n'y a pas d'absorption alors  $T = 100 \%$
- Si pour une longueur d'onde donnée un rayonnement est totalement absorbé alors  $T = 0 \%$

### c) Le rayonnement infrarouge

Les infrarouges correspondent à des rayonnements dont la longueur d'onde est comprise entre 800 nm et 1 mm, mais la spectroscopie IR ne fait en général appel qu'à ceux compris approximativement entre 2,5  $\mu\text{m}$  et 25  $\mu\text{m}$  ce qui correspond à un intervalle de nombre d'onde compris entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ , appelés infrarouge moyens. Il existe également des appareils utilisant le proche infrarouge, ne permettant cependant pas l'identification de molécule.

### d) Identification des liaisons grâce à un spectre infrarouge

Il est possible de distinguer deux zones différentes sur un spectre infrarouge :

- L'intervalle des nombres d'onde compris entre 400 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  comporte des pics et bandes d'absorption caractéristiques de l'espèce chimique analysée. Cette zone correspond à "l'empreinte digitale" de l'espèce chimique et permet de l'identifier à partir de spectres infrarouge connus.
- L'intervalle des nombres d'onde compris entre 1400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  comporte les bandes d'absorption des différents types de liaison (avec cependant quelques exceptions pour des liaisons dont les bandes se situent en dessous de 1400  $\text{cm}^{-1}$ ).

### e) Les plages d'absorption des principales liaisons :

Liaison	Plage d'absorption ( en $\text{cm}^{-1}$ )
Entre un hydrogène et un carbone comportant uniquement des liaisons simples	2850 - 2960

---

Entre un hydrogène et un carbone comportant une double liaison	3010 - 3100
Entre un hydrogène et un carbone comportant un triple liaison	vers 3300
Entre deux carbone triplement liés	2100 - 2260
Entre un carbone et un oxygène liés par une liaison simple	1000 - 1300
Entre un carbone et un oxygène liés par une double liaison	1700 - 1750
Entre un oxygène et un hydrogène	3590 - 3650

La présence de liaisons hydrogènes (liaisons intermoléculaires que peut former l'hydrogène avec un oxygène, azote ou fluor par exemple), peut modifier certaines plages d'absorption.

En effet, la liaison d'un hydrogène avec un oxygène d'une autre molécule entraîne une élongation de la liaison dans la molécule initiale. En conséquence, la fréquence de vibration de la liaison est affaiblie, et le nombre d'onde devient plus petit. Par exemple, la présence de liaisons hydrogènes sur des fonctions alcool va décaler le pic vers 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

Aussi le pic aura tendance à s'élargir car toutes les fonctions alcools ne possèdent pas de telles liaisons et donc vibreront aux fréquences classiques. L'identification de molécule **pourra se faire en étudiant les plages d'absorption, mais aussi (et surtout) grâce à l'utilisation de base de données de spectre de molécules connues.**

#### f) L'appareillage en spectrophotométrie infrarouge

L'appareillage en spectrophotométrie infrarouge est relativement simple, compact et peu coûteux. Il nécessite :

- une lampe émettant un faisceau de lumière infrarouge,
- une cellule réceptionnant l'échantillon,
- un interféromètre, permettant de s'affranchir d'un échantillon référence
- et un détecteur.

Le tout est relié à un ordinateur permettant le traitement du signal obtenu ainsi que le paramétrage de l'analyse.

### **g) Déroulement de l'analyse en spectroscopie infrarouge**

L'analyse infrarouge est l'une des rares permettant l'analyse de composés dans les trois états : solides, liquides et gazeux.

- **À l'état gazeux** ne nécessite pas de préparation spécifique d'échantillons mais la cellule doit être large car les gaz **n'absorbent pas beaucoup** les rayons infrarouge (faible densité de molécules)
- **À l'état liquide**, dans les laboratoires d'analyse chimique, quelques gouttes de la solution sont placées entre deux pastilles de sels (chlorure de sodium, bromure de potassium) qui n'absorbent pas les rayons infrarouge. La pastille est ensuite placée dans l'appareil. Dans l'industrie agroalimentaire le liquide est directement pompé dans la cellule.
- **À l'état solide**, il existe plusieurs techniques dépendant du type d'appareil :
  - certains, permettent de directement déposer un film de poudre.
  - d'autres imposent la formation d'une pastille. Pour ce faire, la poudre à analyser est mélangée avec un sel (les mêmes que ceux cités précédemment) puis comprimée à l'aide d'une presse hydraulique. La pastille est ensuite placée dans l'appareil.
  - enfin, dans les matières plastiques notamment, il est possible de découper un microfilm directement analysable. Ainsi, l'analyse peut conserver l'intégrité de l'échantillon

Si l'analyse infrarouge est très rapide, peu coûteuse, relativement peu gourmande en échantillon, cette analyse possède tout de même quelques limites. Par exemple, si le but est d'identifier une molécule, il est nécessaire que le produit analyser **soit le plus pur possible**, ce qui n'est pas toujours facile à obtenir, surtout dans des quantités suffisantes.

## **6.4. Spectrométrie de masse**

### **6.4.1. Généralités.**

Cette technique n'est pas une interaction entre les ondes électromagnétiques et la matière comme les autres techniques spectroscopiques.

C'est une technique analytique permettant de séparer les atomes ou les molécules sous forme **d'ions selon leur masse**

#### 6.4.2. Intérêts

- détermination de la masse moléculaire par un (spectromètre haute résolution ce qui nous donne la masse exacte et la formule brute)
- identification des structures grâce aux produits fragmentés de la molécule à étudier (fragmentation) et à la bibliothèque de spectres de masse

#### 6.4.3. Applications

- chimie organique et pharmaceutique,
- biochimie (peptides, protéines,...)
- médical : analyses et détection
- géologie, archéologie
- environnement (qualité de l'air, de l'eau,...)

#### 6.4.4. Spectromètre de masse (Figure 1)

Un spectromètre de masse est constitué au minimum :

- d'un système d'introduction de l'échantillon
- d'une source d'ions ou chambre d'ionisation
- d'un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge
- d'un détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur

Le vide étant fait dans chacun de ces éléments.



**Figure 1** : structure d'un spectromètre de masse

#### 6.4.5. Principe.

-introduction dans le spectromètre de l'échantillon directement par couplage chromatographie et spectrométrie de masse (GC/MS\*, HPLC/MS\*).

(\*) **SM** : spectrométrie de masse ; **MS** : mass spectrometry (en anglais).

-ionisation du composé sous forme gazeuse. Cette partie est appelée **la source** (d'ions) ou chambre d'ionisation

-accélération puis séparation des ions sous l'action d'un champ électrique et/ou magnétique

Cette partie du spectromètre est appelé **l'analyseur**, étude des trajectoires des ions sous l'action des champs. Ces trajectoires dépendent de la masse divisée par sa charge (**m/z**). En général **z** est toujours égal à 1 Les ions traversent l'analyseur sous vide poussé ( $10^{-4}$  Pa =  $10^{-9}$  bar) afin d'éviter les collisions

- Détection : "comptage" des ions ayant des valeurs **différents m/z**. Cette partie est appelée **détecteur**

Les performances (résolution, limite en masse, sensibilité) de l'appareil dépendent du mode d'ionisation, de la nature de l'analyseur et du détecteur.

#### 6.4.6. Spectres

**Les Spectres obtenus sont de deux types** : pics plus ou moins larges ou en barres selon la résolution de l'instrument (Figure 2).

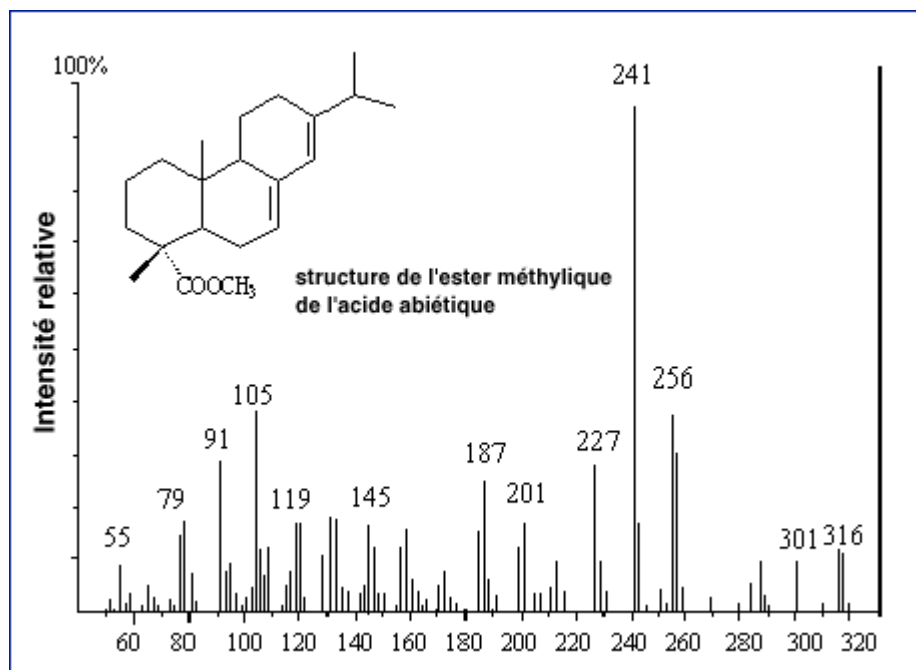


Figure 2 : exemple de spectre

-axe des abscisses : masse moléculaire en Daltons ou en unité de masse atomique

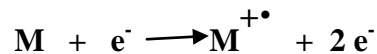
-axe des ordonnées : intensité relative ou abondance relative

#### 6.4.7. Ionisation

##### a) Ionisations classiques dite dures

- Par impacte électronique

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est **ionisé** par **bombardement électronique à 70eV**. L'ion ainsi obtenu, appelé **ion moléculaire**, permet la détermination de la **masse molaire** du composé. Il peut y avoir **des ruptures des liaisons chimiques** au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi **des ions fragments**



**M** : molécule d'intérêt c'est-à-dire la molécule à étudier

**M<sup>+•</sup>** : molécule d'intérêt ionisée (**ion radicalaire**)

- **Par ionisation chimique (CI)\***

(\* ) c'est en anglais. En français Ionisation Chimique (**IC**)

-axe des ordonnéGaz réactif G comme CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, isobutane,... ionisé par IE **ce qui donne G<sup>+</sup>**. puis des réactions secondaires donnent l'ion **MH<sup>+</sup>** en plus de **GH<sup>+</sup>**



**MH<sup>+</sup>** : appelé ion pseudomoléculaire dont la masse est égale à **M+1** (masse de H est égale à 1 Dalton)

Ces deux types d'ionisation (IE et CI) sont adaptées aux molécules organiques relativement volatiles dont la masse moléculaire ne dépasse pas 1000 Daltons (**Da**)

#### **b) Ionisations douces**

L'ionisation douce est destinée aux macromolécules biologiques de masse moléculaire (**M**) très élevée (200 000 Da) notamment les peptides et les protéines. Nous allons voir les deux types d'ionisation largement utilisées en Sciences Biologiques.

- **MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)**

Échantillon mélangé (molécule d'intérêt) à une matrice (ratio 1/50 000) absorbant à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) laser ce qui entraîne un transfert de **H<sup>+</sup>** entre matrice photoexcitée et échantillon puis désorption des ions

- Ionisation douce □ pas de fragmentation - M très élevée (□ 500 000)

- **Electrospray (ESI) (souvent couplé à HPLC) ou électronébulisation**

Electrospray produit entre un capillaire métallique et une contre-électrode ce qui permet la formation de gouttelettes chargées, puis on fait évaporer Evaporation le solvant par de l'azote (N<sub>2</sub>) chaud ce qui fait diminuer de la taille des gouttes créant une très forte densité de charge puis explosion Coulombienne des gouttes. On obtient un ion-moléculaire multi-chargé qui traverse l'analyseur du spectromètre de masse.

#### **6.4.8. Analyseurs**

- **Electromagnétique (EB)**

Analyseur à double focalisation (en direction et en énergie)

-haute résolution donc masse exacte

---

-adapté à divers modes d'ionisation  
-coût, limité en masse

- **Quadripôle**

-simple, peu coûteux, peu encombrant  
- adapté au couplage GC,  
-faible résolution (500)  
-limité en masse (2000 Da)

- **Analyseur à temps de vol (TOF : Time of Flight)**

- pas de limitation en masse en théorie (jusqu'à 300 000 Da)  
-grande sensibilité  
-résolution moyenne (5000)

Ces deux derniers analyseurs couplés aux méthodes d'ionisation **douces** sont les plus utilisés en Biologie par exemple le **spectromètre MALDI-TOF**