

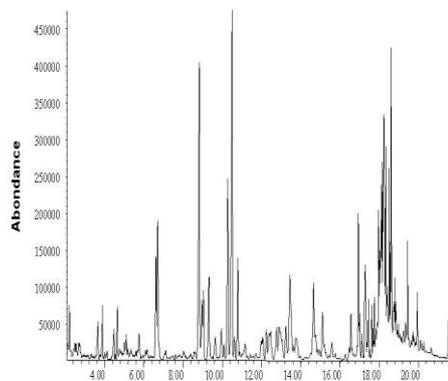
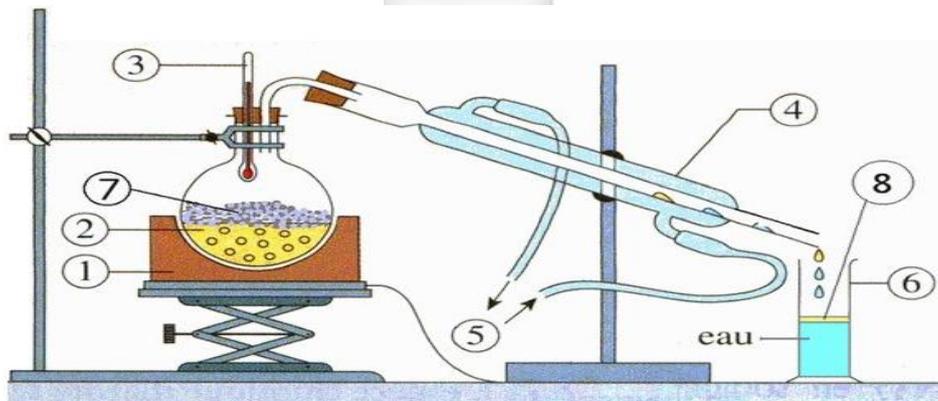
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ferhat Abbas de Sétif

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Polycopié du Cours: Techniques d'extraction, de purification et de conservation

Master I: Analyses biochimiques

Présenté par **Dr. BENABDALLAH Hassiba**



Année: 2015/2016

Intitulé du Master: Analyses Biochimiques

Intitulé de la matière: Techniques d'extraction, de purification et de conservation.

Semestre: 02

Contenu de la matière:

- 1) Solvants organiques.
- 2) Types d'extraction (solvant, aqueuse, vapeur etc.).
- 3) Moyens de purification: filtration, centrifugation, chromatographie, électrophorèse.
- 4) Techniques de conservation: froid (cryoconservation), évaporation, lyophilisation.

Sommaire

Chapitre I: Les solvants organiques

I) Définitions	1
II) Classification	1
1. Solvants hydrocarbures.....	1
1. 1. Hydrocarbures aliphatiques (alcanes, alcène).....	1
1. 2. Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylène).....	2
1. 3. Mélanges pétroliers complexes.....	4
2. Solvants oxygénés.....	5
3. Solvants halogénés.....	6
III) Utilisations	7
IV) Propriétés physico-chimiques	8
V) Toxicité des solvants	9

Chapitre II: Types d'extraction

I) Introduction	13
II) Définitions	13
III) Intérêt de l'extraction	14
IV) Types d'extraction	14
4. 1. Enfleurage.....	14
4. 2. Extraction par solvant.....	15
4. 3. Types d'extraction par solvant.....	16
4. 3. 1. Extraction directe.....	16
4. 3. 2. Extraction liquide-liquide.....	16
4. 3. 2. 1. Principe.....	17
4. 3. 2. 2. Types d'extraction liquide-liquide.....	17
A) Extraction liquide-liquide discontinue.....	17
B) Extraction liquide-liquide continue.....	18
4. 3. 3. Extraction solide-liquide.....	18
4. 4. Extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau).....	20
4. 5. Extraction des protéines.....	21
4. 5. 1. Techniques mécaniques.....	21
4. 5. 1. 1. Le broyage mécanique.....	21
4. 5. 1. 2. La bombe à disruption.....	22

4. 5. 1. 3. La Presse de French.....	22
4. 5. 1. 4. La sonication (Ultrasons).....	22
4. 5. 1. 5. La congélation-décongélation.....	23
4. 5. 2. Les Techniques chimiques et enzymatiques.....	23
4. 5. 2. 1. La lyse ou choc osmotique.....	23
4. 5. 2. 2. Modification de la force ionique ou du pH.....	23
4. 5. 2. 3. Lyse enzymatique.....	23
4. 6. Extraction des acides nucléiques.....	23

Chapitre III: Moyens de purification

1. La filtration

I) Définition de la purification.....	25
II) Moyens de purification.....	25
2. 1. Filtration.....	25
2. 1. 1. Principe de la filtration.....	25
2. 1. 2. Matériel de filtration.....	26
2. 1. 2. 1. Les filtres.....	26
a) Les filtres d'épaisseur (épais ou en profondeur)	26
b) Les filtres membranes (écrans ou de surface)	27
2. 1. 2. 2. Les entonnoirs.....	27
a) Les entonnoirs ordinaires.....	27
b) Les entonnoirs spéciaux.....	27
2. 1. 3. Méthode de filtration.....	28
2. 1. 3. 1. Filtration gravimétrique (filtration par gravité)	28
2. 1. 3. 2. Filtration sous vide.....	29
2. 1. 3. 3. Filtration sous pression.....	29
2. 1. 3. 4. Ultrafiltration	30

2. La centrifugation

2. 1. Introduction	31
2. 2. Définition	31
2. 3. Principe	31
2. 4. Matériel de centrifugation.....	31
2. 5. Type de centrifugeuses	32
2. 6. Types de centrifugation.....	33
2. 6. 1. La centrifugation différentielle	33

2. 6. 2. La centrifugation en gradient de densité	34
3. La chromatographie	
3. 1. Historique.....	37
3. 2. Définition.....	37
3. 3. Principe.....	37
3. 4. Types de chromatographie.....	38
3. 4. 1. Chromatographie sur colonne.....	38
3.4.1. 1. Chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)	42
3. 4. 1. 2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	44
3. 4. 1. 3. Chromatographie d'affinité.....	47
3. 4. 1. 4. Autres types de chromatographie sur colonne.....	50
A. Chromatographie d'interaction hydrophobe.....	50
B. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	51
4. L'électrophorèse	
4. 1. Historique.....	53
4. 2. Définition.....	53
4. 3. Principe.....	54
4. 4. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique.....	54
4. 4. 1. Nature de la molécule.....	54
4. 4. 2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse.....	54
4. 4. 3. Support.....	54
4. 4. 4. Champ électrique	55
4. 5. Types d'électrophorèse.....	55
4. 5. 1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes.....	55
4. 5. 2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes.....	55
4. 5. 3. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre).....	56
4. 5. 4. Electrophorèse de zone sur support.....	56
4. 6. Autres types d'électrophorèse.....	61
4. 6. 1. Electrophorèse bidimensionnelle.....	61
4. 6. 2. Isoélectrofocalisation.....	61
4. 6. 3. Electrophorèse en champ pulsé.....	63
4. 6. 4. Immunoélectrophorèse.....	63
Chapitre IV: Techniques de conservation	
I) Définition de la conservation.....	65

II) Les techniques de conservation	65
2. 1. La conservation par séchage.....	65
2. 1. 1. La déshydratation.....	66
2. 1. 2. La lyophilisation.....	66
2. 1. 3. Le fumage et le salage.....	68
2. 2. La conservation par chaleur.....	69
2. 2. 1. La pasteurisation.....	69
A) La pasteurisation basse.....	69
B) La pasteurisation rapide à haute température.....	70
2. 2. 2. L'appertisation.....	70
2. 3. La conservation par froid.....	71
2. 3. 1. La cryoconservation	71
2. 3. 2. La réfrigération.....	72
2. 3. 3. La congélation.....	72
2. 3. 4. La surgélation.....	73
2. 4. La conservation par agents chimiques.....	73
Références bibliographiques	75

CHAPITRE I: LES SOLVANTS ORGANIQUES

I) 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.

II) Classification

Les solvants organiques sont classés en trois familles:

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.

1. 1. 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).

1. 2. Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylène)

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

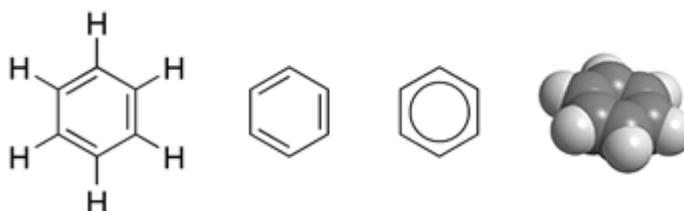


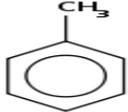
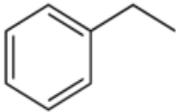
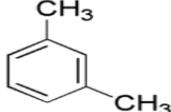
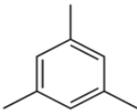
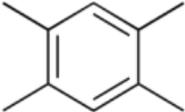
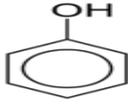
Figure 1. Structure et représentation du benzène.

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 (**Tab. 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. Par exemple, il existe trois isomères du crésol, en fonction de la disposition des groupes hydroxyle et méthyle sur le cycle; si les deux groupes sont voisins, il s'agit de l'isomère *ortho* (1,2-méthylphénol), s'ils sont séparés par un atome de carbone non substitué, il s'agit de l'isomère *méta* (1,3-méthylphénol) et s'ils sont opposés sur le cycle, il s'agit de l'isomère *para* (1,4-méthylphénol). De même, le xylénol possède deux groupes méthyles et un groupe hydroxyle, ce qui lui donne six isomères.

Tableau 1: Représentation de quelques dérivés benzéniques.

 <p>Toluène</p>	 <p>Éthylbenzène</p>	 <p>paraxylène</p>	 <p>métaxylène</p>
 <p>Mésitylène</p>	 <p>Durène</p>	 <p>Biphényle</p>	 <p>Phénol</p>

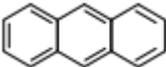
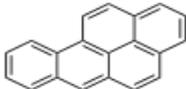
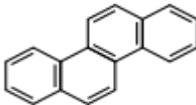
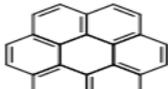
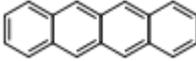
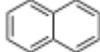
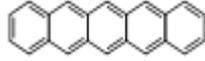
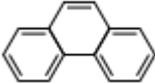
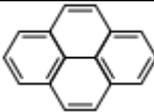
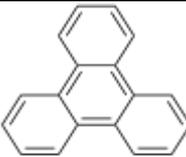
Les composés comportant un cycle benzénique partagent un certain nombre de propriétés, notamment:

- 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 (**Tab. 2**). Parmi lesquels les plus courants le naphthalène, constitué de deux cycles benzéniques fusionnés, l'anthracène qui en compte trois, alignés, le tétracène (quatre, alignés) et le pentacène (cinq, alignés). Le phénanthrène et le triphénylène sont des exemples d'hydrocarbures aromatiques polycycliques avec connexions non linéaires. Les héliènes et le corannulène sont particulièrement présents dans les dérivés lourds du pétrole et du charbon (goudron de houille: combustible minéral provenant de la décomposition et de la transformation des végétaux au cours du temps). Ils font partie des polluants organiques persistants les plus répandus, restant dans l'environnement marin sur les plages très longtemps après une marée noire. Ils sont toxiques, et la plupart du temps cancérigènes.

Tableau 2: Quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques.

 Anthracène	 Benzo[a]pyrène	 Chrysène	 Coronène
 Corannulène	 Tétracène	 Naphthalène	 Pentacène
 Phénanthrène	 Pyrène	 Triphénylène	 Ovalène

1. 3. Mélanges pétroliers complexes

Les raffineries de pétrole, en plus de produire les hydrocarbures simples, fabriquent des mélanges complexes d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou comportant les deux séries à la fois. La plupart des solvants pétroliers commercialisés sont donc des mélanges obtenus par séparations physiques du pétrole brut. Ces coupes pétrolières se distinguent par leur gamme de point d'ébullition et leur composition chimique, selon les fractions dont ils sont dérivés et les divers traitements auxquelles elles sont soumises: hydrodésulfuration (pour enlever l'hydrogène sulfuré), hydrotraitement (hydrogénation catalytique qui convertit les aromatiques en alicycliques, aussi appelés naphténiques), extraction par solvant (pour extraire les aromatiques) ou reformage catalytique (pour augmenter notamment la teneur en aromatiques).

On peut les grouper en trois grandes catégories, comportant chacune plusieurs sous-catégories.

- Les mélanges à plus faible point d'ébullition sont utilisés principalement dans les adhésifs, les peintures et l'industrie du caoutchouc. Les pluparts sont désormais hydrotraités et comportent peu de n-hexane.
- Les mélanges à un point d'ébullition plus élevé: Les essences minérales sont utilisées dans les peintures et pour le dégraissage. Ce sont des mélanges composés principalement d'hydrocarbures aliphatiques (et alicycliques) avec, selon les catégories, une fraction d'hydrocarbures aromatiques lourds, ne dépassant généralement pas 25%.
- Les mélanges à haut point d'ébullition: comprenant principalement des hydrocarbures aromatiques lourds, qui ont un pouvoir de dissolution sensiblement plus élevé que les catégories précédentes.

2. Solvants oxygénés

Ils regroupent plusieurs classes:

- **Les alcools:** 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.

- **Les glycols:** 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.
- **Les cétones:** 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 nettoyeurs 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.

- **Les esters organiques:** 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.
- **Les éthers:** 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.
- **Les éthers de glycol:** 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 étherée, 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).

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. A 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).

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

- **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.
- **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 (CH_3CN), le diméthylsulfoxyde (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), le tétrahydrofurane (THF, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), etc.
- **Solvants aprotiques apolaires**: possédant un moment dipolaire permanent nul. Par exemple, le benzène, les hydrocarbures: alcanes linéaires ou ramifiés, alcanes cycliques, alcènes, etc.

III) Utilisations

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^e 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.

IV) Propriétés physico-chimiques

Les solvants sont souvent des liquides transparents avec une odeur caractéristique. Certains solvants organiques se dissolvent dans l'eau. D'autres ne se mélangent pas, mais plutôt qu'ils forment une couche séparée avec une limite visible entre eux.

Habituellement, certains solvants ont une température de fusion faible et s'évaporent facilement et faire bouillir à basse température, tandis que d'autres s'évaporent plus lentement et faire bouillir à des températures élevées. La plupart des solvants organiques ont une densité inférieure à celle de l'eau, tandis que quelques-uns sont plus denses que l'eau. A l'exception des solvants halogénés, la plupart des solvants sont plus légers que l'eau.

Tableau 3: Structure chimique et caractéristiques de certains solvants.

Solvant	Formule chimique	Température d'ébullition	Constante diélectrique	Masse volumique
Solvants aprotiques apolaires				
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	80,75 °C	1,9	0,7786 g·ml ⁻¹
Hexane	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ - CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2,0	0,655 g·ml ⁻¹
Benzène	C ₆ H ₆	80 °C	2,3	0,879 g·ml ⁻¹
Toluène	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2,4	0,867 g·ml ⁻¹
Éther diéthylique	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ - CH ₃	35 °C	4,3	0,713 g·ml ⁻¹
Chloroforme	CHCl ₃	61 °C	4,8	1,498 g·ml⁻¹
Acétate d'éthyle	CH ₃ -C(=O)-O- CH ₂ -CH ₃	77 °C	6,0	0,894 g·ml ⁻¹
Solvants aprotiques polaires				
1,4-Dioxane	/-CH ₂ -CH ₂ -O- CH ₂ -CH ₂ -O-\	101 °C	2,3	1,033 g·ml⁻¹

Tétrahydrofurane (THF)	$\begin{array}{c} /-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}- \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\backslash \end{array}$	66 °C	7,5	0,886 g·ml ⁻¹
Dichlorométhane (DCM)	CH_2Cl_2	40 °C	9,1	1,326 g·ml⁻¹
Acétone	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$	56 °C	21	0,786 g·ml ⁻¹
Acétonitrile (MeCN)	$\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{N}$	82 °C	37	0,786 g·ml ⁻¹
Diméthylformamide (DMF)	$\text{H}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$	153 °C	38	0,944 g·ml ⁻¹
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	$\text{CH}_3-\text{S}(=\text{O})-\text{CH}_3$	189 °C	47	1,092 g·ml⁻¹
Solvants protiques polaires				
Acide acétique	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	118 °C	6,2	1,049 g·ml⁻¹
<i>n</i> -Butanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ \text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$	118 °C	18	0,810 g·ml ⁻¹
Isopropanol (IPA)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}(-\text{OH})- \\ \text{CH}_3 \end{array}$	82 °C	18	0,785 g·ml ⁻¹
Propanol	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	97 °C	20	0,803 g·ml ⁻¹
Ammoniac	NH_3	-33,35 °C	22	0,7 g·ml ⁻¹ à -33 °C
Éthanol	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$	79 °C	24	0,789 g·ml ⁻¹
Méthanol	CH_3-OH	65 °C	33	0,791 g·ml ⁻¹
Acide formique	$\text{H}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	101 °C	58	1,21 g·ml⁻¹
Eau	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$	100 °C	80	1,000 g·ml ⁻¹

V) Toxicité des solvants

Aucun solvant n'est inoffensif. Ils ont tous des effets sur la santé, variables selon les produits et la nature de l'exposition professionnelle, qui peuvent être locaux (picotements: sensations de piqûres, irritations) ou généraux (ou encore systémiques: vertiges, états ébriés, intoxications aiguës, coma...). Ces produits s'avèrent souvent dangereux pour l'environnement

et la santé humaine. Les solvants peuvent pénétrer dans l'organisme de trois manières: voie respiratoire (grâce à leur volatilité), voie cutanée (quel que soit l'état de la peau), voie digestive (absorption accidentelle). Ils sont alors soit éliminés sous forme inchangée dans l'air expiré, soit fixés dans les tissus, soit métabolisés par le foie puis éliminés dans les selles, les urines et l'air expiré. Le foie a notamment pour rôle de transformer les substances étrangères telles que les solvants, en produits éliminables. Certaines étapes de cette transformation peuvent aboutir à des dérivés hautement toxiques. Les solvants peuvent provoquer des maladies de la peau, des lésions chroniques du cerveau et le cancer.

- Les homologues supérieurs du benzène (toluène, xylène) ont été incriminés dans la survenue d'un syndrome psycho-organique. Le toluène, le xylène et le styrène sont des narcotiques et des irritants cutanés et respiratoires. Le benzène est particulièrement toxique vis à vis de la moelle osseuse, d'où l'interdiction de son utilisation à des concentrations supérieures à 1%.
- Les hydrocarbures chlorés sont potentiellement hépto- et néphrotoxiques et ont une action déprimante sur le système nerveux central. Certains d'entre eux sont aussi toxiques pour le système nerveux périphérique. Certains dérivés des hydrocarbures aliphatiques (donnant naissance dans l'organisme à des époxydes) sont mutagènes et cancérigènes.
- Les alcools exercent une action narcotique et irritante. Leur inhalation peut provoquer des vertiges et des céphalées. Les vapeurs de butanol peuvent léser la cornée (membrane de l'œil).
- Bien que les cétones soient modérément toxiques, elles ont une action narcotique. Le méthyl-n-butylcétone provoque des neuropathies périphériques.
- Les éthers ont des propriétés anesthésiques et narcotiques. Certains sont hépatotoxiques. Les dérivés chlorés du méthyléther sont cancérigènes.

Des contacts répétés avec des solvants peuvent en outre avoir des effets sur le système nerveux, le sang (hématotoxicité, cancer), le foie ou les reins (insuffisances rénales ou hépatiques, cancers), le système de la reproduction (fertilité, grossesse), le système endocrinien et cardiovasculaire. Certains solvants peuvent aussi avoir des effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes. Ces effets toxiques ou ces pathologies apparaissent parfois plusieurs années après l'exposition.

a) Effets sur le système nerveux central

Le système nerveux est l'organe le plus sensible et le premier à montrer des effets dus à une exposition aux solvants. La majorité des solvants étant liposolubles altèrent la couche lipidique de la membrane de la cellule nerveuse et de la myéline (une action démyélinisante sur le tissu nerveux). A forte concentration et lors d'exposition aiguë, les solvants dépriment le

système nerveux. A faible concentration, ils provoquent des troubles du comportement et des perturbations psychomotrices telles que: asthénies, céphalées, troubles de la mémoire et de la vigilance, vertiges et troubles de l'humeur. Ces manifestations sont en général réversibles à l'arrêt de l'exposition.

Dans le cas de mélange de solvants, des effets neurocomportementaux ont été décelé alors que l'intensité d'exposition de chaque solvant considéré isolément est faible. L'exposition chronique aux vapeurs de divers solvants peut engendrer un syndrome psycho-organique, caractérisé par un déficit intellectuel et des troubles émotionnels.

b) Effets sur le système nerveux périphérique

L'exposition chronique à certains solvants (n-hexane, méthylbutylcétone, mélange de solvants) pourrait favoriser le développement d'une neuropathie périphérique. Des polyneuropathies périphériques sont caractérisées par une dégénérescence anoxale, et se manifestent principalement par des symptômes de crampes musculaires, de faiblesse, d'engourdissements, de picotements et de douleur, surtout au niveau des membres inférieurs.

c) Effets sur la peau

Etant donné les propriétés lipophiles de la plupart des solvants, ils exercent une action dégraissante, d'où sécheresse, crevasses (déchirure) et irritation de la peau. Dans certains cas, les solvants peuvent même déclencher des processus allergiques conduisant à l'installation de véritables eczémas (exéma: maladie de la peau).

d) Effets sur les voies respiratoires

Les symptômes d'irritation des voies respiratoires chez les travailleurs exposés aux émanations (odeur) des solvants ne sont pas exceptionnels.

e) Effets sur les reins

Il ne fait pas de doute qu'une exposition massive à des solvants puisse provoquer des lésions rénales. Plusieurs enquêtes épidémiologiques semblent confirmer l'hypothèse qu'une glomérulonéphrite chronique (éventuellement auto-immune) pourrait être induite par l'exposition aux solvants. L'atteinte rénale auto-immune pourrait aussi bien être induite par une exposition aiguë ou chronique aux solvants. Certains solvants (notamment les halogénés) exercent une action toxique directe sur le rein.

f) Effets sur le foie

L'exposition aiguë à certains solvants comme le tétrachlorure de carbone, le 1,2-dichloroéthane, le diméthylformamide peut engendrer une hépatite aiguë cytolytique, plus rarement une atteinte cytolytique et cholestasique suite à l'exposition à des solvants comme le tétrachloréthane.

g) Effets sur le système hématopoïétique

Le benzène connu pour son action aplasante et leucémogène. Bien qu'il soit actuellement soumis à une réglementation très stricte on le retrouve en quantités non négligeables dans les carburants et comme impureté dans les autres solvants. Le toluène et le xylène ne sont pas hématotoxiques. L'action dysplasante d'autres solvants comme le styrène et les éthers de glycol n'est pas à exclure.

h) Effets cancérigène

Plusieurs solvants, ou leurs métabolites, ont des propriétés mutagènes et/ou cancérigènes et/ou tératogènes. L'action cancérigène du benzène n'est plus un thème de discussion; D'autres solvants sont soupçonnés êtres cancérigènes ainsi les solvants halogénés, le tétrachlorure de carbone, le 2-nitropropane sont suspectés provoquer ou augmenter le risque de cancer du foie.

i) Effets sur la fonction de reproduction

La majorité des solvants passent la barrière placentaire d'où ils ont été soupçonnés dans plusieurs études avoir des effets sur la reproduction à titre d'exemple avortements spontanés, retard de croissance intra-utérine, et faible poids de naissance et malformations (en particulière du système nerveux central, bec de lièvre). Certains solvants sont même incriminés dans les troubles de la spermatogenèse et par conséquent la fertilité masculine.

CHAPITRE II: TECHNIQUES D'EXTRACTION

I) Introduction

L'extraction est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, sur la base de propriétés chimiques ou physiques.

L'homme utilise des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité, par différentes techniques:

- **La filtration:** Depuis les temps préhistoriques, l'homme utilise un lit de sable ou de mousse pour rendre une eau boueuse (pleine de boue) limpide (claire et transparente).
- **Le pressage:** Consiste à exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus, ou à écraser des fleurs pour extraire les arômes.
- **L'enfleurage:** Est une forme d'extraction utilisée en parfumerie. Il repose sur le pouvoir d'absorption d'une huile essentielle par les corps gras. Par exemple, les fleurs fragiles sont posées sur des cadres enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact; en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes.
- **La décoction:** Cette méthode est très ancienne. Elle consiste à chauffer la racine ou l'écorce d'une plante avec de l'eau; jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante et les constituants se dissolvent.
- **L'infusion:** Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes (les feuilles ou les fleurs) finement broyées puis les laisser tremper pour dissoudre leurs principes actifs.
- **La macération:** Consiste à laisser séjourner à froid un solide dans un liquide pour en extraire les constituants solubles dans ce liquide.
- **L'extraction par solvant:** C'est un procédé qui permet d'extraire des composés qui ne peuvent pas l'être avec de l'eau.
- **L'entraînement à la vapeur ou l'hydrodistillation:** Cette technique date de l'Égypte ancienne. Elle consiste à extraire les parfums des plantes (huiles parfumées ou huiles essentielles) par de la vapeur d'eau.

Nous ne pourrions appliquer que les méthodes d'extraction par hydrodistillation ou bien par solvants, l'enfleurage étant trop long et coûteux en matière première (pour un litre d'absolu de jasmin, il faut compter un tonne de fleurs).

II) Définitions

L'extraction consiste à transférer un composé d'une phase à une autre:

- D'une phase liquide à une autre phase liquide.
- D'une phase solide à une phase liquide.

C'est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques.

III) Intérêt de l'extraction

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut 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.

IV) Types d'extraction

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

4. 1. Enfleurage

Il consiste à extraire naturellement le parfum des fleurs grâce à l'absorption effectuée par les corps gras. Il existe deux types d'enfleurage: à chaud et à froid selon la résistance de la plante à la chaleur. Cette méthode est particulièrement employée lorsque l'hydrodistillation dénature les molécules à extraire.

- Enfleurage à chaud (macération): consiste à faire infuser les fleurs ou autres éléments odorants dans des matières grasses, huiles ou graisses, préalablement chauffées. Les mélanges obtenus sont ensuite filtrés à travers des tissus afin d'obtenir des onguents parfumés.
- Enfleurage à froid: Les fleurs les plus fragiles qui ne supportent pas la chaleur sont disposées sur des châssis de verre enduit de graisse et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces. Lorsque le parfumeur considère que la graisse est saturée, elle est grattée 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 (**Fig. 1**).



Figure 1. Enfleurage de pétales de rose.

Le principe est assez simple:

Les molécules odorantes étant des composés volatils, au lieu de les laisser s'échapper dans l'air, elles sont captées par la graisse qui a la propriété de les dissoudre. Lors de l'ajout de l'alcool les molécules organiques passent dans ce solvant.

4. 2. Extraction par solvant

Elle consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant. Celui-ci peut être de l'eau, mais généralement il s'agira d'un solvant organique: éthanol, cyclohexane, éther de pétrole, toluène, etc. Dans l'extraction par solvant, les plantes sont mélangées à un solvant. Les composés à extraire étant emprisonnés dans la cellule par la membrane cellulaire, il faudra donc des solvants capables de la traverser. En plus, il arrive que des traces de solvant soient présentes dans les molécules à extraire ou bien dans la matière végétale après traitement.

L'extraction par solvant fait intervenir trois étapes.

- La mise en contact du solvant avec la substance contenant le composé à extraire: Elle peut se faire directement par le solvant d'extraction ou en faisant intervenir d'abord l'eau. On fait alors agir le solvant sur une décoction, une infusion ou une macération.
- La décantation: Est réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter. En fonction de la nature du solvant utilisé et en particulier de sa densité par rapport à celle de l'eau (1,00), la phase organique à récupérer se situera au dessus ou en dessous.
- Le séchage et la filtration: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau.

Généralement, on veut ensuite évaporer le solvant pour récupérer l'extrait seul, il faudra donc aussi que le solvant soit volatil (température d'ébullition faible).

Le choix du solvant obéit à trois critères et nécessite la connaissance d'un paramètre physique caractéristique de ce solvant.

- L'état physique du solvant: Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction.
- La miscibilité du solvant: Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
- La solubilité: Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à-dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).

- La densité du solvant: Il est nécessaire de connaître ce paramètre car c'est lui qui détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au dessus ou en dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter.

Les solvants d'extraction doivent être aussi:

- Facilement éliminés après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire.
- Inertes chimiquement vis-à-vis de la solution à extraire.
- Peu toxiques que possible.

Tableau 1: Avantages et inconvénients de quelques solvants d'extraction.

Solvants	Température d'ébullition (°C)	Densité	Avantages	Inconvénients
Cyclohexane	81	0,78	Peu toxique	Facilement inflammable
Dichloro-1,2-éthane	83	1,26	Peu inflammable	Modérément toxique, vapeurs irritantes
Dichlorométhane	40	1,34	Facile à éliminer	Forme des émulsions, nocif
Ether éthylique	35	0,71	Facile à éliminer	Très inflammable
Hexane	69	0,66	Facile à éliminer	Très inflammable
Pentane	36	0,63	Facile à éliminer	Très inflammable
Toluène	111	0,87	Peu toxique	Inflammable
Trichloroéthylène	87	1,46	Ininflammable	Modérément toxique

4. 3. Types d'extraction par solvant

Il existe plusieurs types d'extraction par solvant.

4. 3. 1. Extraction directe

L'espèce chimique est extraite d'un produit naturel par macération puis filtration (par exemple l'extraction des arômes des zestes d'orange).

4. 3. 2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est l'une des techniques de préparation d'échantillons les plus anciennes. C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles.

L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

L'extraction liquide-liquide est la succession de plusieurs étapes. La première étape est la mise en contact des deux phases. Pour augmenter la surface d'échange, la phase à extraire et la phase d'extraction sont mélangées. La seconde étape consiste à obtenir l'équilibre du système (saturation de la phase d'extraction) qui est régi par les lois de la diffusion et de la solubilité (coefficient de partage). La dernière étape est la séparation des phases (décantation).

4. 3. 2. 1. Principe

Du fait que l'eau ne s'évapore pas facilement, l'espèce chimique est difficilement récupérable si elle est en solution dans l'eau. Dans ce cas, il faut utiliser un solvant organique dans lequel la substance est très soluble (beaucoup plus que dans l'eau), celle-ci va passer de l'eau au solvant organique. Il faut que l'eau et le solvant organique ne soient pas miscibles.

L'extraction liquide-liquide est l'une des opérations les plus pratiquées dans un laboratoire de chimie organique. Elle consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique ou inversement, en utilisant pour cela deux solvants (l'un aqueux et l'autre organique), non miscibles, mis en contact intime.

En pratique, cette extraction est une étape de préparation d'échantillons très utilisée présentant de multiples inconvénients lorsqu'elle est pratiquée avec une ampoule à décanter:

- ✓ Multiplication des étapes d'extraction pour obtenir un rendement optimum.
- ✓ Utilisation d'importants volumes de solvants organiques dont les coûts de recyclage deviennent de plus en plus chers.
- ✓ Difficulté d'émulsion qui ne permet pas la récupération de 100% de l'extrait.
- ✓ Traces d'éluant dans le raffinat qui nécessite un traitement supplémentaire de l'échantillon avant l'étape d'évaporation.

4. 3. 2. 2. Types d'extraction liquide-liquide

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide.

A) Extraction liquide-liquide discontinue

Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter. Il existe plusieurs modèles d'ampoules à décanter (**Fig. 2**). Celles ayant la tubulure au dessus du robinet sont les plus utilisées, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc de mieux séparer les deux phases.



Figure 2. Les différents types d'ampoule à décanter.

B) Extraction liquide-liquide continue

Lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire.

4. 3. 3. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide.

Pratiquement, il est impossible de dissoudre un seul composé, d'autres constituants de la phase solide ont été entraînés avec lui, quelque soit le solvant utilisé. En laboratoire de chimie organique, on utilise parfois des appareils plus efficaces, les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa, qui fonctionnent en continu (**Fig. 3**).

A) Techniques de dissolution

- ✓ Il faut avant tout réduire le prélèvement en fines particules ce qui favorise l'action du solvant en augmentant la surface de contact.
- ✓ Il est possible de procéder en continu ou effectuer des phases successives d'extractions suivies de filtration ou de centrifugation.

Extracteur de Soxhlet	Extracteur de Kumagawa
	
L'extracteur de Soxhlet est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur: Franz Von Soxhlet.	Très proche de l'extracteur de Soxhlet, le Kumagawa a l'avantage de pouvoir être utilisé à des températures bien supérieures et d'être moins encombrant grâce à la cartouche incorporée dans le porte-ballon.

Figure 3. Les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa.

B) Principes des techniques de dissolution

Les principes des techniques de dissolution sont les suivants:

- ✓ **La variation du pouvoir solvant:**
 - La dissolution fractionnée: Consiste à utiliser initialement des liquides à faible pouvoir solvant puis à augmenter progressivement la capacité de dissolution par l'emploi des solvants de plus en plus actifs.
 - Le gradient de dissolution: Consiste à utiliser de mélanges de solvants.
- ✓ **La limitation du volume de solvant:** Afin d'éviter l'utilisation de grands volumes de solvants, il faut réaliser l'extraction et la concentration dans le même appareil.

En règle générale, un solide ne se laissera pas traverser par un liquide. Il est donc nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives par utilisation d'un extracteur de Soxhlet, ou alors sa variante plus économique.

C) Appareil de Soxhlet

Le Soxhlet est constitué d'un (Fig. 4):

- ✓ Ballon contenant une réserve de solvant.
- ✓ Extracteur proprement dit permettant le contact entre le solvant et le solide dans une cartouche poreuse.
- ✓ Siphon qui permet l'évacuation de la solution vers le ballon.
- ✓ Réfrigérant à eau qui permet la condensation des vapeurs de solvant dans la cartouche.

Le solide est toujours en contact avec le solvant pur grâce au remplissage régulier de la cartouche, ce qui présente les meilleures capacités de solubilisation des composés à extraire.

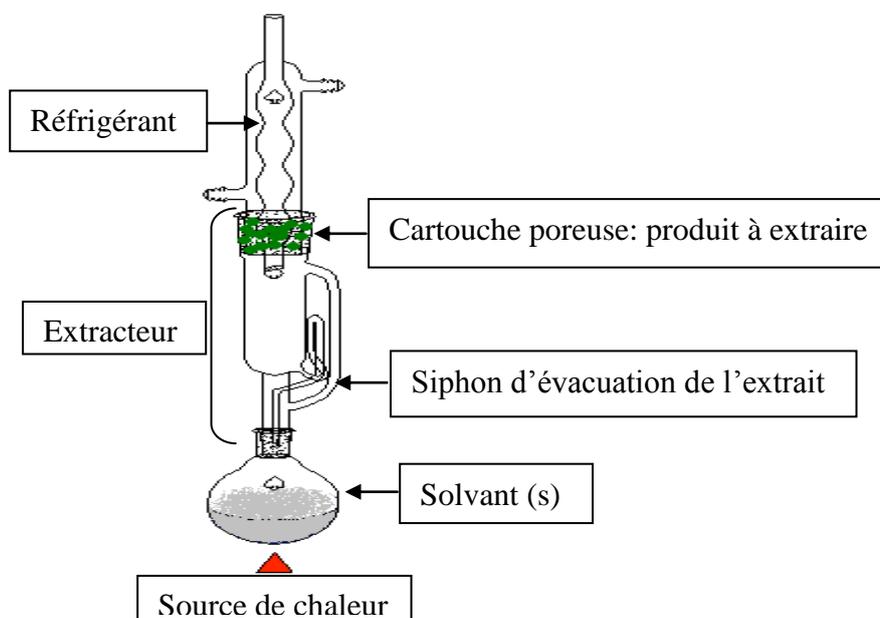


Figure 4. Schéma d'un appareil de Soxhlet.

Le Soxhlet permet:

- ✓ Le lavage d'un composé solide par un solvant dans lequel il est totalement insoluble. Les impuretés sont extraites vers le ballon et le solide pur est récupéré dans la cartouche.
- ✓ La recristallisation d'un composé par un solvant dans lequel il est modérément soluble. Les impuretés insolubles restent dans la cartouche tandis que le composé cristallise dans le ballon récepteur par refroidissement lorsque la solution est assez concentrée.

D) Mode opératoire

- ✓ Il est important de rajouter quelques grains de carborundum (cristal de carbure de silicium SiC) ou de pierre ponce dans le mélange pour éviter une élévation de la température sans ébullition.
- ✓ Le bon fonctionnement du siphon nécessite un volume suffisant du solvant dans le ballon.
- ✓ Le solide est placé dans la cartouche, elle-même insérée dans l'extracteur.
- ✓ Le système de chauffage est mis en marche et réglé de façon à ce que les cycles remplissage/vidange de la cartouche se fassent de façon rapprochée.
- ✓ Le système peut être laissé sans surveillance particulière si la vidange est régulière.

4. 4. Extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau)

L'hydro-distillation consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. C'est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles (**Fig. 5**). Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résisteront pas au chauffage.

La vapeur d'eau produite va entraîner avec elle un composé donné selon un phénomène physique particulier: la création d'un azéotrope (mélange de deux liquides qui bout à température fixe et ne se distille pas en bouillant). Il s'agit en fait d'un mélange de composés, non miscibles, (l'eau et une molécule odorante). La vapeur d'eau chargée en molécules organiques est condensée puis récupérée. Le liquide obtenu est appelé distillat. Il y a donc séparation de deux phases: l'une aqueuse et l'autre organique, cette dernière contenant le composé à extraire. Pour récupérer l'huile essentielle, il faut procéder à une extraction liquide-liquide.

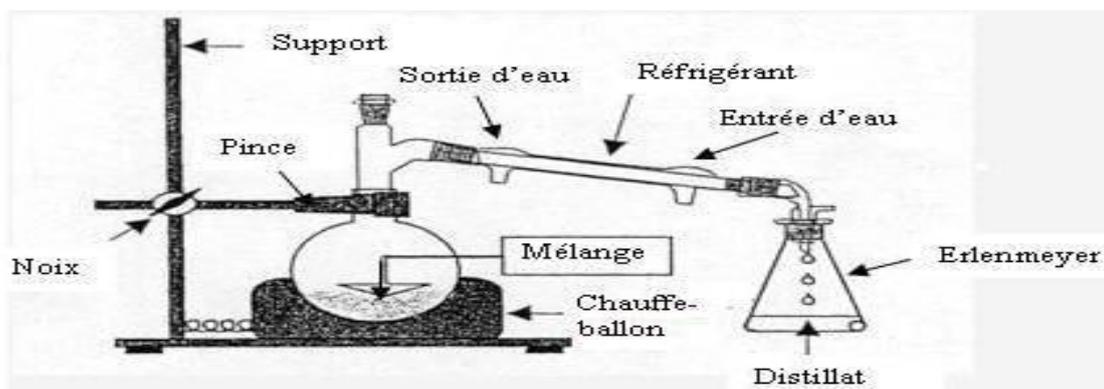


Figure 5. Schéma d'une hydro-distillation.

L'hydro-distillation fait intervenir les étapes suivantes:

- ✓ L'entraînement à la vapeur: Consiste à bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Par la suite, ces vapeurs sont condensées à l'aide d'un réfrigérant.
- ✓ Le relargage: Consiste à rendre les huiles essentielles, qui sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau, moins solubles par l'ajout du chlorure de sodium. De cette manière, il sera plus facile de récupérer ces huiles essentielles.
- ✓ La décantation: Est réalisée dans une ampoule à décanter, dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles se situe au dessus (**Fig. 6**).
- ✓ Le séchage et la filtration: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, il est important de faire agir un déshydratant (C'est le séchage). Pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau il faut réaliser une filtration.

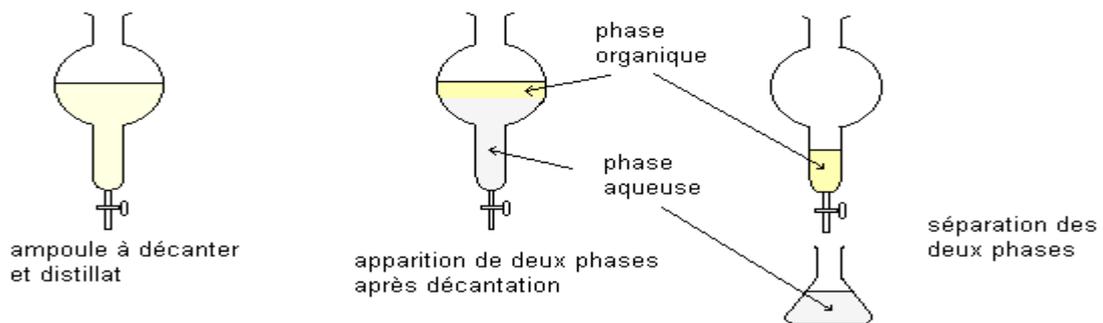


Figure 6. Processus de la décantation après hydro-distillation.

4. 5. Extraction des protéines

L'extraction d'une protéine à partir d'un tissu commence par la destruction de l'organisation cellulaire par des méthodes mécaniques, chimiques ou par l'action d'enzymes qui désorganisent les tissus. Le mélange résultant du matériel biologique ainsi brisé et du solvant est appelé extrait brut ou homogénat. Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation: le matériel soluble est recueilli et dialysé pour éliminer les petites molécules. Diverses méthodes sont ensuite utilisées pour purifier une protéine particulière à partir du mélange.

4. 5. 1. Techniques mécaniques

4. 5. 1. 1. Le broyage mécanique

Les broyeurs mécaniques sont utilisés pour réduire la taille des particules de différents types de matériaux. Ils sont utilisés dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée. Il existe deux types de broyeurs:

A) L'homogénéisateur de type Dounce

Il ressemble à une éprouvette dans laquelle s'enfonce un piston serré (**Fig. 7**). Le renflement du piston et la zone de broyage du mortier sont souvent en verre fritté. Le passage des cellules dans l'espace très petit entre le piston et la paroi interne du tube induit leur rupture.

B) L'homogénéisateur de type Potter-Elvehjem

Il s'agit d'un pilon composé d'une tige d'acier et un renflement de téflon ainsi que d'un mortier de verre épais (**Fig. 7**).

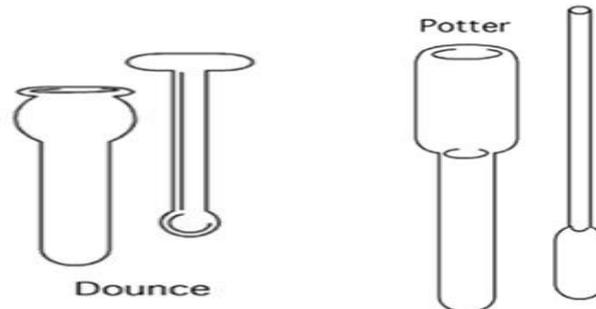


Figure 7. Broyeurs mécaniques en verre.

4. 5. 1. 2. La bombe à disruption

Cette technique consiste à traiter l'échantillon avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. Par la suite, la pression est libérée tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclater.

4. 5. 1. 3. La Presse de French

C'est un cylindre creux en métal dans lequel s'enfonce un piston métallique doué de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide (**Fig. 8**). Il est utilisé en expérimentation biologique pour interrompre la membrane plasmique des cellules en les faisant passer à travers une valve étroite sous haute pression, ce qui déchire leur membrane. Plus que la pression est haute dans le cylindre, plus que la lyse est totale. Cette technique est fiable, efficace et respecte l'activité des enzymes présentes dans les cellules biologiques.

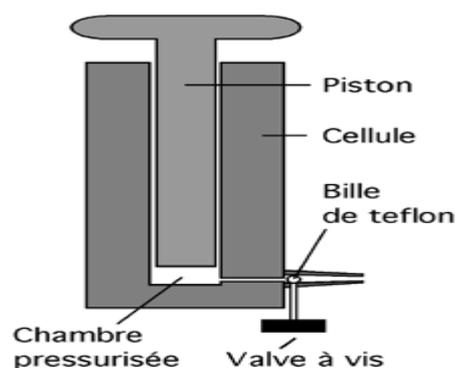


Figure 8. Schéma de la presse de french.

4. 5. 1. 4. La sonication (Ultrasons)

Elle consiste à détruire les cellules par les ultrasons qui sont des ondes de même nature que le son mais dont la gamme de fréquence se situe entre 20 kHz et plusieurs centaines de mégahertz. Cette gamme est trop élevée pour que l'oreille humaine puisse la percevoir.

La sonication est réalisée grâce à un appareil appelé sonicateur qui permet de transformer l'énergie électrique en vibration mécanique longitudinale le long d'une sonde. Cette dernière permet de casser les cellules biologiques en suspension. Il est indispensable de travailler à basse température et d'effectuer des pauses entre les cycles de sonication afin d'éviter la surchauffe de l'échantillon.

4. 5. 1. 5. La congélation-décongélation

Des cycles de congélation (-20°C) et de décongélation (37°C) permettent de détruire les membranes plasmiques des cellules surtout lorsqu'il s'agit d'une protéine ou d'une enzyme bactérienne. Durant la congélation des cristaux de glace se forment, ce qui provoque la désintégration de la membrane cellulaire.

4. 5. 2. Les Techniques chimiques et enzymatiques

Ces techniques regroupent la lyse ou choc osmotique, la modification de la force ionique ou du pH et la lyse enzymatique.

4. 5. 2. 1. La lyse ou choc osmotique

Le choc osmotique consiste à incuber les cellules fragiles dans une solution hypo-osmotique, ce qui permet à l'eau d'entrer dans la cellule la fait gonfler jusqu'à ce que les membranes lipidiques se rompent et laissent passer leur contenu dans le milieu. L'éclatement des organites est l'inconvénient de cette technique.

4. 5. 2. 2. Modification de la force ionique ou du pH

La modification de la force ionique du milieu par addition des ions ou la modification du pH entraînent la rupture des membranes plasmiques de certains types cellulaires. Ces traitements peuvent rendre les membranes plus perméables aux constituants du milieu.

4. 5. 2. 3. Lyse enzymatique

Pour lyser la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique de plusieurs types de cellules (les levures, les plantes et les bactéries), différentes enzymes comme le lysozyme du blanc d'œuf de poule ou la lyticase de *S. aureus* peuvent être utilisées.

4. 6. Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN consiste à isoler l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN sont:

- La lyse cellulaire par des méthodes physiques ou chimiques permet d'accéder à l'ADN.
- L'élimination ou la séparation des lipides membranaires et des débris cellulaires se fait généralement à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate et par centrifugation.
- L'élimination ou la dénaturation des protéines de l'extrait cellulaire est effectuée à l'aide d'une protéase.
- L'élimination de l'ARN est effectuée par addition de RNase qui dégrade rapidement l'ARN en ribonucléotides.
- La précipitation/agrégation/élution de l'ADN.

CHAPITRE III: MOYENS DE PURIFICATION

1- La filtration

I) Définition de la purification

En chimie, la purification est la séparation de substances chimiques dans le but de décontaminer des substances.

II) Moyens de purification

Il existe plusieurs moyens de purification:

- La filtration.
- La centrifugation.
- La chromatographie.
- L'électrophorèse.

2. 1. Filtration

La filtration est une méthode mécanique utilisée pour séparer un solide d'un liquide ou d'un gaz en faisant passer le mélange par une membrane ou un chiffon fin, par l'aide d'un entonnoir.

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie ou par de nombreuses espèces animales, principalement aquatique. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu (aussi communément appelé "gâteau" ou rétentat).

La microfiltration est une séparation de particules de l'ordre de micromètre.

La filtration stérilisante est un cas particulier, les particules étant des microorganismes.

Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir:

- Un liquide clarifié, débarrassé des particules solides.
- Un solide essoré de l'excès de liquide.

2. 1. 1. Principe de la filtration

La filtration est une séparation selon le diamètre des particules solides de différentes tailles, qui sont dispersées dans un liquide. La différence de pression force le liquide à passer à travers le filtre alors que les particules solides restent à la surface.

Deux phénomènes accompagnent souvent la filtration:

- **Le premier phénomène est le colmatage:** La pénétration des particules dans les interstices [petits espaces vides entre les parties du filtre] de la matière filtrante provoque le phénomène du colmatage. Ceci modifie la porosité et ralentit la filtration.
- **Le deuxième phénomène est l'adsorption:** Il résulte de la charge électrique qui possède la matière filtrante. Ceci induit la rétention de certains produits par le filtre malgré que leurs dimensions permettent leur passage à travers les pores du filtre.

2. 1. 2. Matériel de filtration

Le matériel de filtration regroupe les filtres et les entonnoirs.

2. 1. 2. 1. Les filtres

Il existe deux types de filtre, les filtres d'épaisseur et les filtres membranes. L'utilisation de l'un de ces deux types dépend du but de l'expérience, de la qualité et la quantité du matériel à filtrer. Ils peuvent être utilisés séparément ou ensemble, selon les besoins. Les filtres doivent être inerte chimiquement et physiquement vis-à-vis du liquide à filtrer; insolubles et ne subissent aucun changement d'état physique (gonflement, rétrécissement, distorsion).

a) Les filtres d'épaisseur (épais ou en profondeur)

Ils retiennent les particules dans un réseau de fibres (papier, amiante, cellulose, coton, fibre de verre, etc.) ou de canalicules (verre fritté, sable, charbon, etc.). L'efficacité d'un filtre en profondeur augmente avec son épaisseur par contre elle diminue lorsque la pression appliquée sur le filtre augmente.

Les matériaux utilisés dans les filtres d'épaisseur sont:

- ✓ Les papiers filtres classiques, qui diffèrent par leur formes (en feuilles rectangulaires, circulaires, plissées, etc.), leur texture (lâche, fine), leur porosité, leur pureté (brut, purifié, sans cendre, etc.). Il existe des papiers filtre sans cendres, déminéralisés par lavage aux acides, d'une très grande pureté et qui, après combustion, n'ajoutent aucun élément étranger au précipité. Il existe un code de couleur ou de numérotation définissant la porosité du papier.
- ✓ Les textiles: gaze, coton, laine.
- ✓ Les fibres: laine de verre, amiante.
- ✓ Les terres d'infusoires, argiles et porcelaine.
- ✓ Le matériel fritté: le verre fritté est obtenu par compression à température contrôlée de microbilles de verre. Des porosités différentes sont obtenues selon le diamètre de ces grains et la température de frittage. Les porosités sont codées de 0 (larges pores) à 4 (pores étroits).

b) Les filtres membranes (écrans ou de surface)

Les plus utilisés sont les membranes millipores (**Fig. 1**). Ils sont constitués d'une fine lame plastique percée de pores calibrés. Les membranes filtrantes sont constituées de cellulose, d'acétate de cellulose, de nitrate de cellulose ou de téflon. Le diamètre des pores est faible, et varie de 5 à 35 nm pour l'ultra-filtration et de 0.1 à 8 µm pour la microfiltration.

Les membranes de la microfiltration permettent une filtration rapide, malgré le faible diamètre des pores, cela est dû à leur faible épaisseur et à la forte densité des pores (10^{10} pores/cm²). Ces membranes ne sont constituées que par 15 à 35% de leur volume par de la matière, le reste étant occupé par des pores.



Figure 1. La membrane millipore.

2. 1. 2. 2. Les entonnoirs

Ce sont des instruments en forme de cône, terminés par un tube et destinés à recevoir un matériel filtrant. Deux types d'entonnoirs sont distingués:

a) Les entonnoirs ordinaires: peuvent être en verre, en porcelaine ou en polycarbonate (**Fig. 2**).



Figure 2. L'entonnoir ordinaire.

b) Les entonnoirs spéciaux: Sont des entonnoirs dont la partie plate est perforée et sur laquelle on place de papier filtre (**Fig. 3**). Ils peuvent être en verre ou en porcelaine. Deux types d'entonnoirs se distinguent dans cette catégorie:

- Les entonnoirs de BUCHNER: Utilisés pour la filtration de quantités assez importantes de solide.
- Les entonnoirs de HIRSCH: Utilisés pour la récupération de petites quantités de solide.

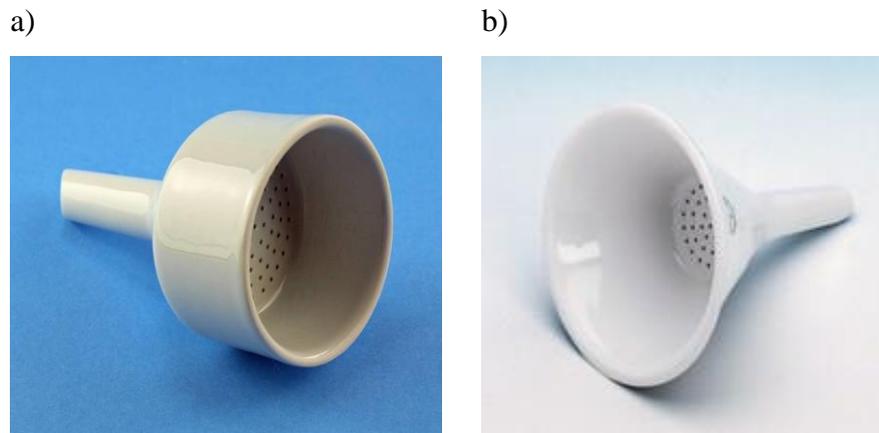


Figure 3. Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b).

2. 1. 3. Méthodes de filtration

La filtration consiste à séparer les constituants d'un mélange liquide -solide par passage à travers un milieu filtrant. Elle est beaucoup plus rapide que la sédimentation. Il existe plusieurs procédés de filtration.

2. 1. 3. 1. Filtration gravimétrique (filtration par gravité)

Dans cette méthode, l'entonnoir de laboratoire équipé d'un papier filtre est utilisé (**Fig. 4**). La différence de pression est créée par la hauteur du liquide sur le filtre.

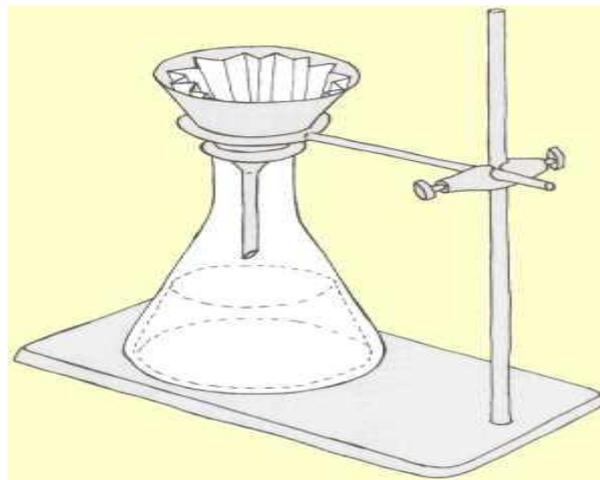


Figure 4. La filtration par gravité.

La filtration gravimétrique présente les inconvénients suivants:

- La filtration est lente.
- La difficulté de récupération de la phase solide isolée, surtout lorsqu'elle est peu abondante.

- La séparation est incomplète: le solide retient une quantité non négligeable de liquide.

2. 1. 3. 2. Filtration sous vide

La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant (**Fig. 5**). C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs spéciaux adaptés sur une fiole à succion, dans laquelle on crée une dépression, sont utilisés. L'entonnoir est adapté sur la fiole par l'intermédiaire d'un cône en caoutchouc, qui collera à la fiole et l'entonnoir lorsque la dépression est établie.

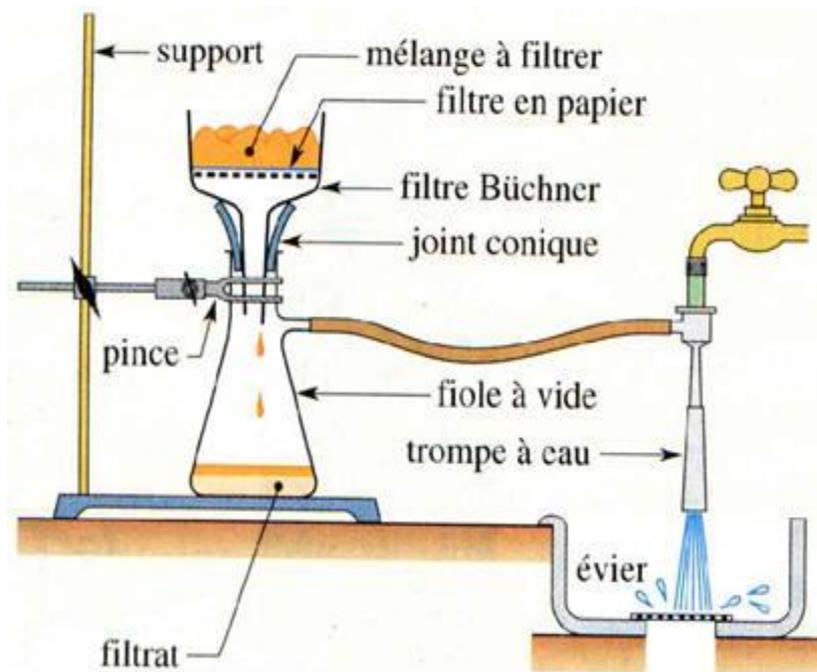


Figure 5. La filtration sous vide.

2. 1. 3. 3. Filtration sous pression

La vitesse de filtration est augmentée en exerçant une pression sur le liquide à filtrer en amont du matériel filtrant représenté par une membrane filtrante (**Fig. 6**). La filtration sous pression évite le moussage et l'évaporation du solvant; elle est d'un emploi fréquent dans l'industrie. Ce système de filtration sous pression avec membranes filtrantes existe également sous forme de cartouches filtrantes (millipore) adaptable sur une seringue pratique pour la filtration des petits volumes de solution à filtrer.

Au laboratoire, la microfiltration stérilisante à l'aide du dispositif Swinnex Millipore est une filtration sous pression. Ce dispositif est constitué de deux pièces plastiques, que l'on visse l'une sur l'autre enserrant une membrane filtrante.



Figure 6. La filtration sous pression.

2. 1. 3. 4. Ultrafiltration

C'est une séparation de macromolécules en solution dans une phase dispersante. Il s'agit d'une membrane avec une porosité très faible (25 nm) qui peut retenir les protéines et les acides nucléiques. Elle permet la concentration des solutions de macromolécules et l'élimination de la plupart des contaminants de petite masse moléculaire (sels, glucides...).

Les applications de l'ultrafiltration et de la microfiltration sont plus analytiques, outre la clarification et les filtrations stériles, on cite également:

- Les analyses microbiologiques et tests de stérilité.
- Les analyses gravimétriques.
- Les isollements des cellules d'un liquide céphalo-rachidien.
- Les analyses de poussières.
- Les isollements de virus.

CHAPITRE III: MOYENS DE PURIFICATION

2- La centrifugation

2. 1. Introduction

La sédimentation est une technique d'analyse permettant de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur lorsque la dispersion est formée d'une substance plus dense que le liquide (décantation). La centrifugation permet de remplacer l'accélération de la pesanteur (g) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (6 à 10000 tours par minute).

2. 2. Définition

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

L'ultracentrifugation utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

2. 3. Principe

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différentes contenus dans un liquide. Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces:

- La gravité: C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.
- La poussée d'Archimède: C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut.

Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en x.g (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:

$$g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$$

où g est la force relative de centrifugation, r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et N (rotations par minute: rpm) exprime la vitesse de rotation.

2. 4. Matériel de centrifugation

La centrifugeuse est l'appareil utilisé pour la centrifugation. La centrifugeuse est constituée d'un axe de rotation enfermé dans une chambre de centrifugation. A l'exception des centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps d'utilisation sont relativement

limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, la chambre de la centrifugeuse doit être réfrigérée (**Fig. 1**).

Les échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux. Chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

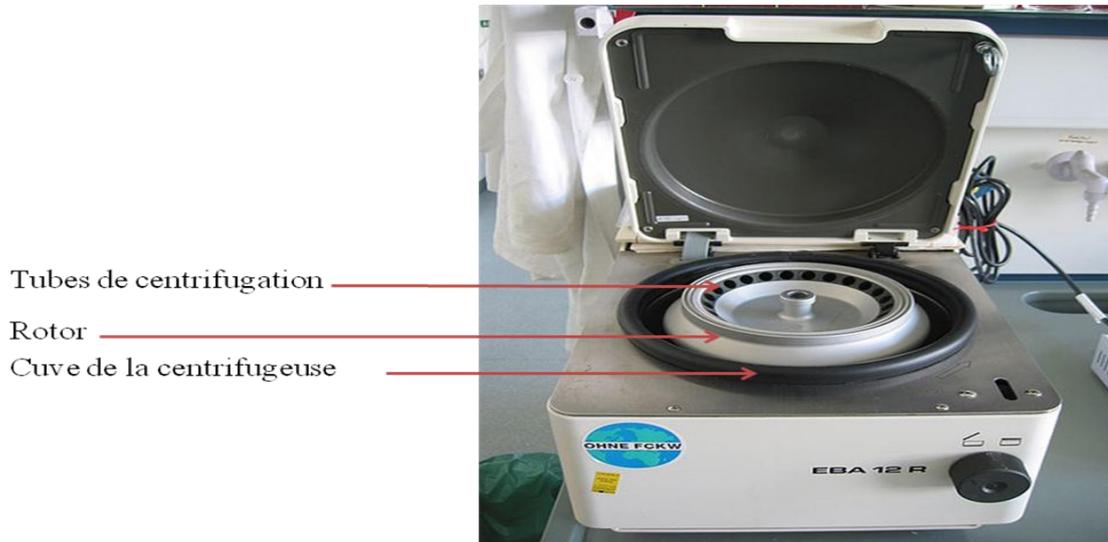


Figure 1. Centrifugeuse.

2. 5. Type de centrifugeuses

La force du moteur qui le fait tourner constitue la principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand. Selon les besoins expérimentaux (accélérations, volume du matériel à centrifuger, la température de travail), plusieurs types de centrifugeuse ont été développés.

- **Centrifugeuses de table (ou cliniques):** Constituent les modèles les plus simples et sont caractérisées par de faibles accélérations (1000 à 3000 g). Elles peuvent être réfrigérées.
- **Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes et caractérisés par des accélérations de l'ordre de 20000 g. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger des volumes relativement gros. Certains rotors peuvent même contenir quatre ou six bouteilles de 250 ml. Tous les modèles sont réfrigérés.
- **Ultracentrifugeuses:** Comme leur nom indique, ce sont des appareils qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300000 g). Tous les modèles sont réfrigérés. Les rotors ne peuvent contenir qu'une dizaine de tubes de 40 ml.
- **Micro-centrifugeuses:** Ce sont des centrifugeuses spécialement conçues pour les micro-volumes. Elles peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12 à 15000 g.

- **Ultracentrifugeuses analytiques:** Elles servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines. Elles sont moins utilisées.

Selon l'axe de rotation, il existe trois catégories de machines à centrifuger:

- ✓ Les centrifugeuses horizontales: Sont ainsi nommées car les pots sont horizontaux en rotation. Des tubes à centrifuger à fond conique sont utilisés pour clarifier un liquide (pour récupérer le liquide surnageant et rejeter le culot). Alors que les tubes à fond rond sont utilisés pour récupérer le culot. Ce type de centrifugeuse présente quelques inconvénients: mauvais aérodynamisme du rotor et, de plus, les particules qui sédimentent doivent traverser une grande épaisseur de liquide
- ✓ Les centrifugeuses verticales: Sont des centrifugeuses avec un bol à assiettes ou à chambre qui tourne sur un axe vertical.
- ✓ Les centrifugeuses obliques: Dans ce type de centrifugeuses, les tubes sont logés dans un rotor circulaire appelé couronne dans lequel ils sont inclinés à 45°. A l'inverse de centrifugeuses horizontales, ce type de centrifugeuses présente un bon aérodynamisme permettant d'atteindre des vitesses élevées. De plus, les particules n'effectuent qu'un court parcours au sein d'un liquide, elles migrent horizontalement, atteignent la paroi et glissent le long de celle-ci. Ceci favorise la sédimentation.

2. 6. Types de centrifugation

Il existe deux principaux types de centrifugation.

2. 6. 1. La centrifugation différentielle

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un culot au fond du tube. Les éléments dont l'accélération est trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le surnageant. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour récupérer les éléments (les cellules) du sang qui sédimentent pour des accélérations très faibles.

Exemple: Isolement des organites cellulaires. Tout d'abord au cours d'une première centrifugation, les constituants les plus lourds sont isolés. Puis, en augmentant la vitesse de sédimentation les constituants de densité croissante seront séparés (**Tab. Fig. 2**).

Tableau. Conditions de sédimentation de quelques constituants cellulaires.

Constituants cellulaires	Conditions de sédimentation
Noyau	10 minutes à 500 g
Mitochondries, lysosomes, peroxyosomes	10 minutes à 5000 g
Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi	1 heure à 100000 g

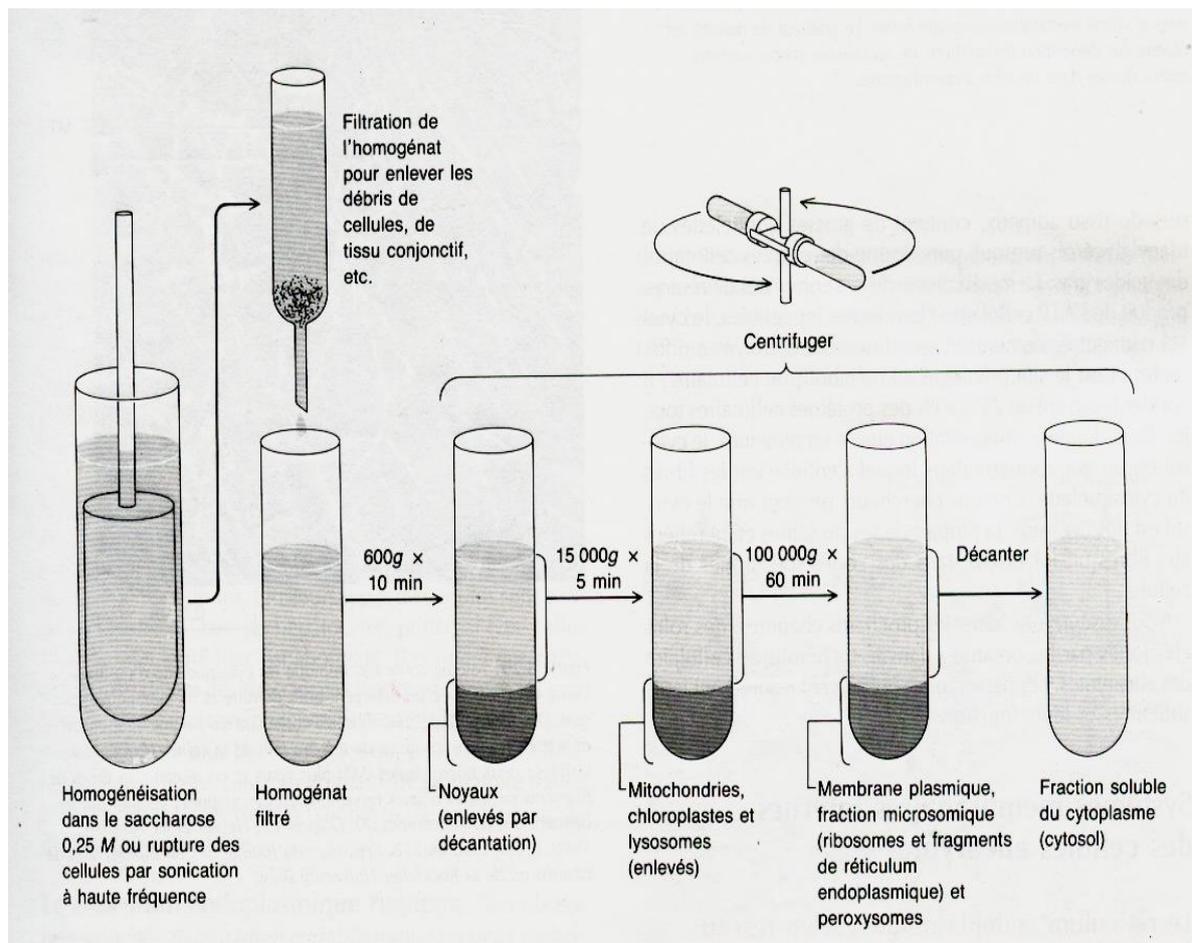


Figure 2. Isolement des organites cellulaires.

2. 6. 2. La centrifugation en gradient de densité

Dans cette méthode, les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité. A l'équilibre, elles se stabilisent dans la zone du gradient où la densité est égale à la sienne. La différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation. Cette dernière peut être modulée en faisant varier cette différence de densité par la création d'un gradient de densité.

- Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide.
- S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- Si la particule est moins dense que le milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface.

Pour obtenir des solutions de densités différentes, deux gradients peuvent être utilisés, un gradient de saccharose formé préalablement à la centrifugation, et un gradient de chlorure de césium (CsCl).

Il existe deux types de gradients:

A) Les gradients discontinus

Le gradient est préformé par des dépôts successifs de solution de CsCl de densité croissante (**Fig. 3**). Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes. Au dessus, leur densité étant plus élevée, ils migrent vers le bas, et au dessous, leur densité étant plus faible ils migrent vers le haut. Il arrive de limiter le gradient à deux densités seulement avec une solution inférieure très dense.

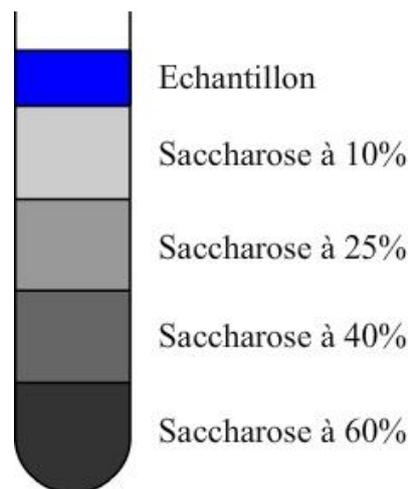


Figure 3. Centrifugation en gradient de densité discontinu.

B) Les gradients continus

Ce sont des gradients pour lesquels la variation de densité est continue. Une solution de CsCl de densité donnée soumise à une force de gravité intense forme spontanément un gradient de densité continu (**Fig. 4**). Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes.

Exemple de gradient continu

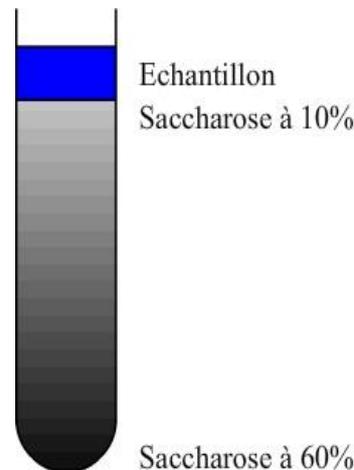


Figure 4. Centrifugation en gradient de densité continu.

Les gradients les plus utilisés sont:

➤ **Le saccharose (sucrose)**

Il est très souvent employé. Il permet d'atteindre des densités assez élevées, de l'ordre de 1.3 g/ml avec du saccharose 2.5 M. Ce produit est peu coûteux, électriquement neutre et inerte pour la plupart des fractions cellulaires.

➤ **Le chlorure de césium**

Il est couramment utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques. Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de 1.9 g/ml à 7.5 M. Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage. Son coût et le fait qu'il s'agisse d'un sel, donc de molécules chargées, réduisent son champ d'application. D'autres sels de césium peuvent aussi être employés comme le sulfate de césium (CsSO_4).

CHAPITRE III: MOYENS DE PURIFICATION

3- La chromatographie

3. 1. Historique

La chromatographie (du grec chroma: couleur et graphein: écrire) a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett dans les années 1900. La première chromatographie a été réalisée par ce botaniste en 1905. Il a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l'éther de pétrole. Des bandes colorées qui se déplacent le long de la colonne à des vitesses propres sont obtenues.

Le prix Nobel de chimie est attribué en 1952 aux biochimistes Martin et Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.

3. 2. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

3. 3. Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire.

3. 4. Types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie en phase liquide (CPL):
 - Chromatographie sur couche mince (CCM).
 - Chromatographie de partage centrifuge (CPC).
 - Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), à séparer ou à purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé (**Tab. 1**).

3. 4. 1. Chromatographie sur colonne

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- La phase stationnaire: support solide.
- La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la colonne est très lent.
- La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Le choix du type de chromatographie et du support dépend de la nature des composés à séparer (**Tab. 1**).

Tableau 1: Choix du type de chromatographie et du support.

Type de chromatographie	Nature de l'adsorbant	Nature des composés à séparer
Adsorption	Gel de silice	Molécules organiques simples, molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substances à haut poids moléculaire.
	Oxyde d'aluminium	Vitamines, alcaloïdes, colorants, substances à caractère nucléophile.
Partage	Gel de silice	Substances très polaires.
	Oxyde d'aluminium	Substances très polaires.
	Kieselguhr	Sucres et composés amphotères, acides aminés.
Partage en phase inverse	Film E.C.S. 511 V	Composés hydrophiles de séries homologues.
	Film E.C.S. 541 V	
	Polyamide	Phénols et dérivés nitrés aromatiques.
	Cellulose	Acides gras et leurs esters méthyliques.
Electrophorèse	Gel de silice	Amines, acides aminés et peptides, colorants
	Oxyde d'aluminium	Hétérocycles azotés polynucléaires
	Kieselguhr	Acides nucléiques
Echange d'ion	DEAE Ecteola Sephadex Dowex	Composés dont la charge électrique dépend du pH. (Nucléotides et acides carboxyliques)

A) Eléments chromatographiques

Les éléments de la chromatographie sont: L'échantillon, la phase stationnaire, la phase mobile, la colonne, la pompe, le détecteur, le collecteur de fractions et l'enregistreur.

- ✓ L'échantillon: C'est la solution qui contient les composés à analyser.
- ✓ La phase stationnaire: C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne (**Tab. 2**). Les granules peuvent: être poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.

Tableau 2: Les différents types de granules en fonction des différents types de chromatographie.

Type de chromatographie	Type de granules
Chromatographie d'exclusion stérique	Poreuses (réticulées)
Chromatographie échangeuse d'ion	Portent une charge ionique positive ou négative
Chromatographie d'affinité	Portent un site d'affinité

- ✓ **La phase mobile:** C'est un liquide qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant avec lui les composés de l'échantillon. Elle doit être soluble et interagir avec les composés de l'échantillon et non pas avec la phase stationnaire.
- ✓ **La colonne:** C'est le support de la phase stationnaire (gel ou résine). A travers lequel, la phase mobile passe. Elle peut être en verre, en plastique ou en inox et de différentes dimensions (**Fig. 1**).



Figure 1. La colonne chromatographique.

- ✓ **La pompe:** Elle permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne (**Fig. 2**).



Figure 2. La pompe.

- ✓ **Le détecteur:** Il évalue la quantité de chacun des composés séparés et envoie un signal électronique vers l'enregistreur (**Fig. 3**). Par exemple, les protéines sont détectées grâce à un détecteur UV-visible.



Figure 3. Le détecteur.

- ✓ **L'enregistreur:** Il dessine les pics en fonction de leur intensité (**Fig. 4**).



Figure 4. L'enregistreur.

- ✓ **Le collecteur de fractions:** permet de collecter les fractions de l'échantillon (**Fig. 5**).



Figure 5. Le collecteur de fraction.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Effectuer l'élution.
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

3. 4. 1. 1. Chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

C'est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire et de leur forme. La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer. Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc élués en premier. Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel, leurs migration est donc retardée (**Fig. 6**).

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards.

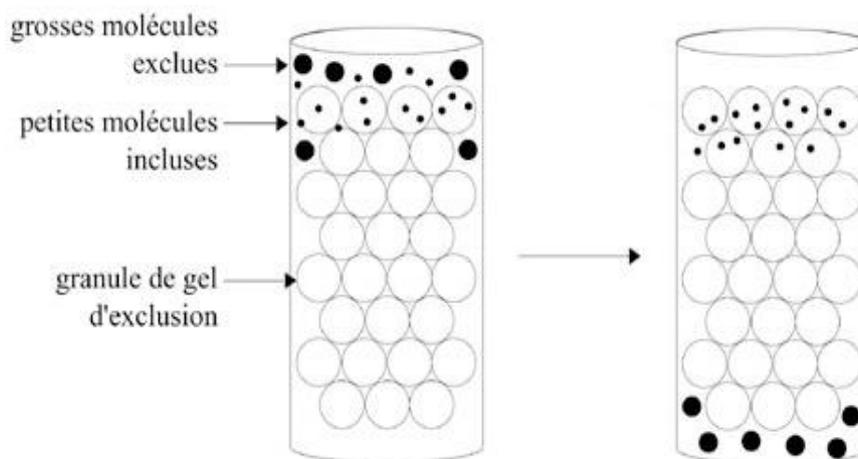


Figure 6. Tamisage moléculaire.

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

- **Le diamètre des pores (la porosité):** Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation (séparation microporeuse ou macroporeuse).
- **L'inertie chimique:** Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.
- **La stabilité physico-chimique:** Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.
- **La taille et la forme des particules (la granulométrie):** Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance.
- **La forme:** La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.
- **La nature:** Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose.

- **La consistance:** Elle varie selon la nature et le degré de réticulation des gels. On distingue:
 - **Les xérogels:** Sont des gels semi-rigides qui ne gardent pas leur forme initiale lorsque la phase dispersante est éliminée.
 - **Les aerogels:** Sont des gels rigides intéressants lorsqu'on travaille avec des débits élevés ou sous forte pression.

Les différentes étapes de la chromatographie d'exclusion stérique regroupent:

- ✓ Le choix du gel: Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer (**Tab. 3**).
- ✓ Le choix de la phase mobile: Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire.
- ✓ La préparation du gel: Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.
- ✓ Le remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.
- ✓ L'équilibration de la colonne: C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).
- ✓ L'injection de l'échantillon.
- ✓ L'élution: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon.
- ✓ La collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.

Tableau 3: Les différents types de gel et leur capacité de rétention.

Type de gel	Capacité de rétention (Da)
Dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1000-5000
Sephadex G-75	3000-70000
Sephadex G-200	5000-800000
Polyacrylamide	
Bio-gel P2	200-2000
Bio-gel P6	1000-6000
Bio-gel P-150	15000-150000
Bio-gel P-300	60000-400000
Agarose	
Sepharose 2B	2 000000-25000000
Sepharose 4B	300000-3000000
Bio-gel A-0,5M	30000-500000
Bio-gel A-15M	30000-15000000
Bio-gel A-150M	5000000-150000000

- ✓ La régénération du gel: Pour éliminer les contaminants, le gel est lavé par une solution saline. Le gel est conservé à 2-4°C après addition d'un agent antimicrobien et de conservation (azide de sodium).

Applications de la chromatographie d'exclusion stérique

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

- Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) et la purification d'une protéine après marquage à l'iode 131.
- Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques (immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.
- Fractionnement de petites molécules: Il regroupe l'analyse de peptides (en analyse alimentaire dans les fromages), l'analyse d'enzymes et l'analyse de colorants dans les produits alimentaires.
- Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.
- Détermination des poids moléculaires: La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la γ -globuline (160000).

3. 4. 1. 2. Chromatographie échangeuse d'ions

Elle permet la séparation de molécules chargées (La séparation est en fonction de la charge électrique). La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisées. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution (**Fig. 7**).

C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée échangeur d'ion, des contre ions échangeables ou mobiles et un soluté ou protéine chargé.

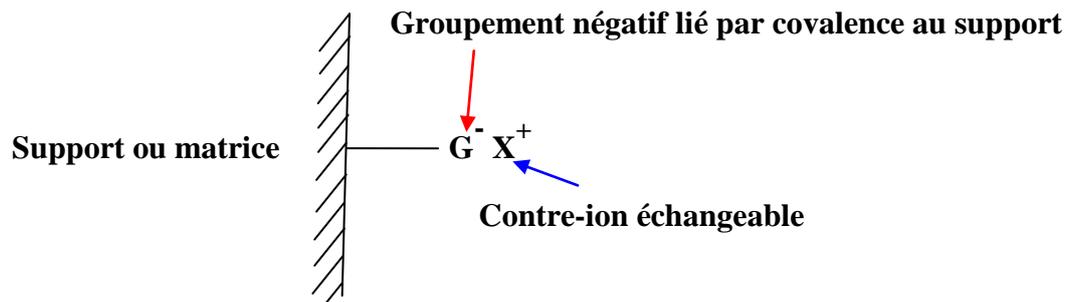


Figure 7. Schéma d'une résine échangeuse de cations (résine cationique).

A) Les échangeurs d'ions

Ce sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie (**Fig. 8**):

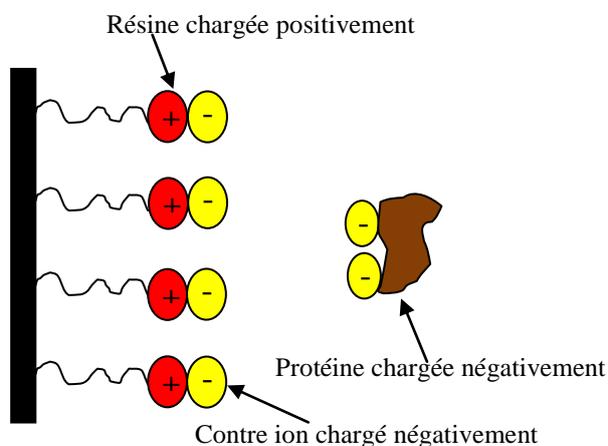
1. Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quelque soit le pH).
- Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
- Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).
- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).

2. Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
- Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

A) Echangeurs anionique



B) Echangeur cationique

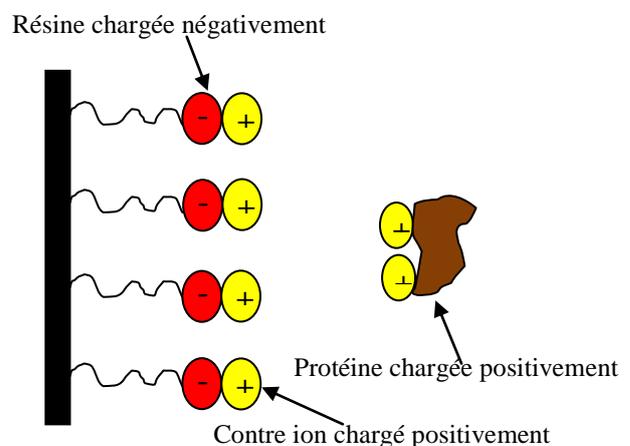
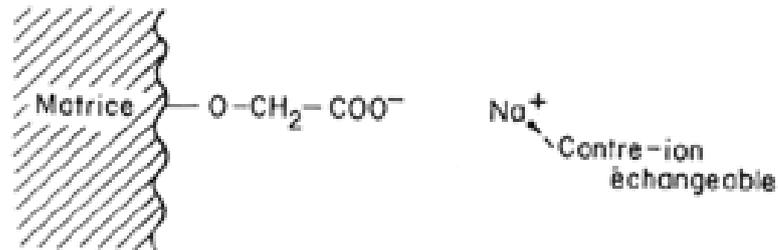


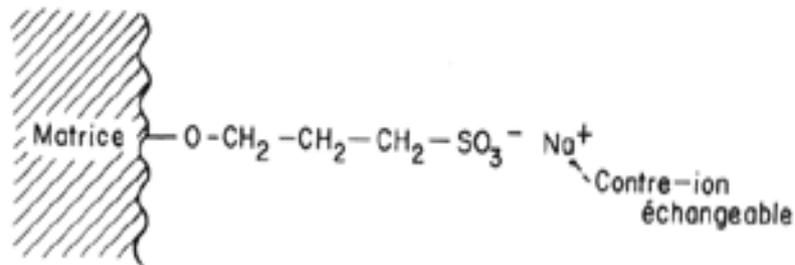
Figure 8. Les différents types d'échangeurs ioniques.

Les échangeurs cationiques sont:

- Le CM-polyoside (carboxyméthyle): c'est un échangeur faible.

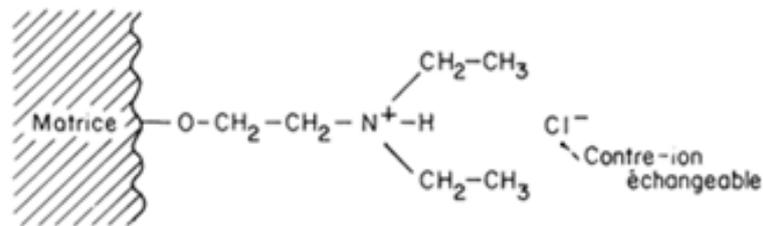


- Le SP-polyoside (sulfopropyle): C'est un échangeur fort.

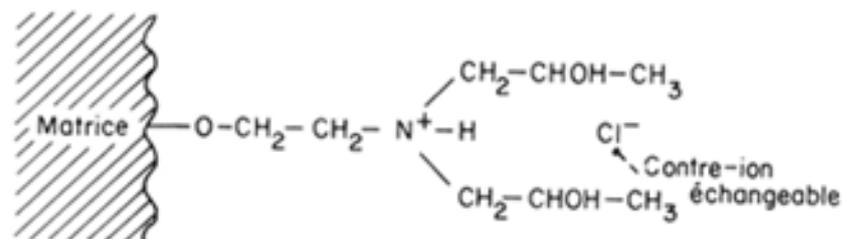


Les échangeurs anioniques sont:

- Le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle): C'est un échangeur faible.



- Le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle): C'est un échangeur fort.



B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir le gel.
- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne (fixation des contres ions).
- Injecter l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines).

- Effectuer l'éluion (étape de désorption par la Fi ou pH).
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une éluion soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu.

Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

- Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.
- Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de concentration plus élevée (exp. Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...)).

C) Applications

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon. Elle s'applique à l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés.

3. 4. 1. 3. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant) (**Tab. 4; Fig. 9**). Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur). Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

Tableau 4: Exemples de ligand et d'affinant.

Ligand	Affinant
Une enzyme	Le substrat ou l'inhibiteur
Un antigène	L'anticorps
Une hormone	Le récepteur

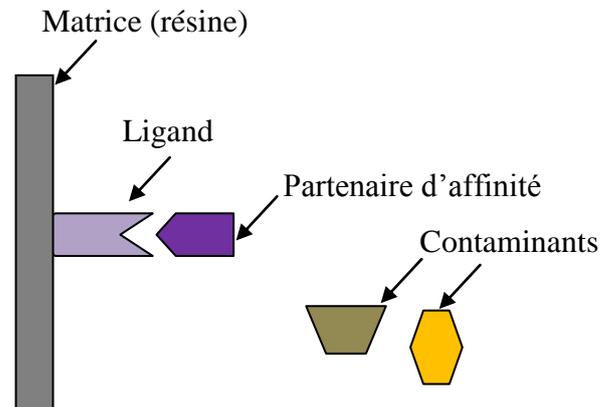


Figure 9. Principe de la chromatographie d'affinité.

- **La phase stationnaire (le gel):** Est constituée d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux (matrice ou résine) par l'intermédiaire d'une chaîne latérale: le bras fixateur. Le support peut-être en dexran, en agarose ou en polyachrylamide. Ce sont des particules uniformes. Il doit être insoluble dans l'eau, stable chimiquement et mécaniquement et doit porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des bras fixateurs
- **Le bras fixateur:** C'est une chaîne polycarbonnée (C₆-C₈) intercalée entre la matrice et le ligand.
- **Le ligand:** Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

Les effecteurs utilisés sont:

- Pour la purification des enzymes:
 - Des substrats et analogue de substrat.
 - Des inhibiteurs réversibles.
 - Des effecteurs allostériques.
 - Des coenzymes.
- En immunologie:

- Des haptènes.
- Des antigènes.
- Des anticorps.
- Pour l'étude des protéines réceptrices:
 - Des hormones.

A) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Laver la colonne pour éliminer les substances non adsorbées.
- Eluer les substances adsorbée ou fixée.
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur le support. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité. On y fait passer la solution aqueuse contenant la substance à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. Des lavages successifs permettent d'éliminer toute trace de produits indésirables. Enfin, on élue la substance retenue en décomposant le complexe (**Fig. 10**).

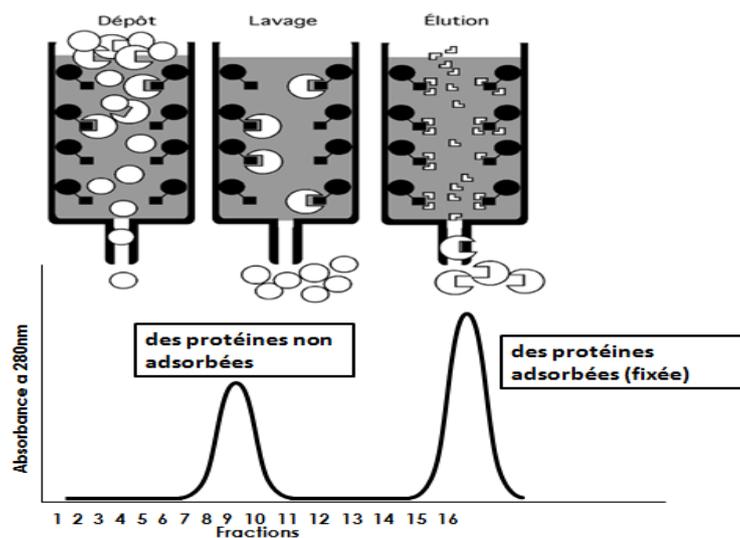


Figure 10. Les différentes étapes de la chromatographie d'affinité.

B) Elution

Pour éluer les substances adsorbées, il est nécessaire de modifier certains paramètres:

- Le pH: Le substrat voit alors ses charges électriques se modifier et son affinité pour le ligand changer voire disparaître (élution non spécifique).
- La force ionique en augmentant la concentration en sels (élution non spécifique).
- La composition en ajoutant un composé (un tampon d'élution qui contient un compétiteur ou un ligand non fixé) dont l'affinité avec le ligand est plus forte (élution spécifique).

C) Applications

La chromatographie d'affinité est adaptée, soit à l'analyse, soit à la préparation de substances biologiques. Elle a été utilisée en:

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

3. 4. 1. 4. Autres types de chromatographie sur colonne

A. Chromatographie d'interaction hydrophobe

Le gel de chromatographie d'interactions hydrophobes porte un groupement hydrophobe tel qu'un noyau phénol à l'extrémité d'une chaîne carbonée.

Dans la figure (11) suivante, les parties hachurées représentent les régions de caractère hydrophobe en surface de la protéine.

1^{ère} étape: La protéine à séparer est fixée sur le support chromatographique en présence d'une forte concentration en sel: Dans un milieu à haute force ionique, les molécules d'eau de l'enveloppe d'hydratation des protéines sont mobilisées pour hydrater les anions et les cations issus de la dissociation du sel, c'est le phénomène de "salting-out". Il en résulte une modification de l'organisation des molécules d'eau autour des protéines et ce changement d'environnement est thermodynamiquement favorable à l'établissement d'interactions hydrophobes entre les régions hydrophobes à la surface des protéines et le groupement hydrophobe porté par la phase stationnaire.

2^{ème} étape: Après rinçage du gel afin d'éliminer les protéines non adsorbées, l'élution des protéines fixées est obtenue: En faisant passer un tampon de force ionique décroissante, les ions du sel étant ainsi progressivement éliminés. Les acides aminés chargés ou polaires à la surface des protéines peuvent de nouveau établir des liaisons hydrogène avec la phase mobile, c'est-à-dire que la solubilité des protéines dans la phase mobile redevient maximale et elles sont éluées.

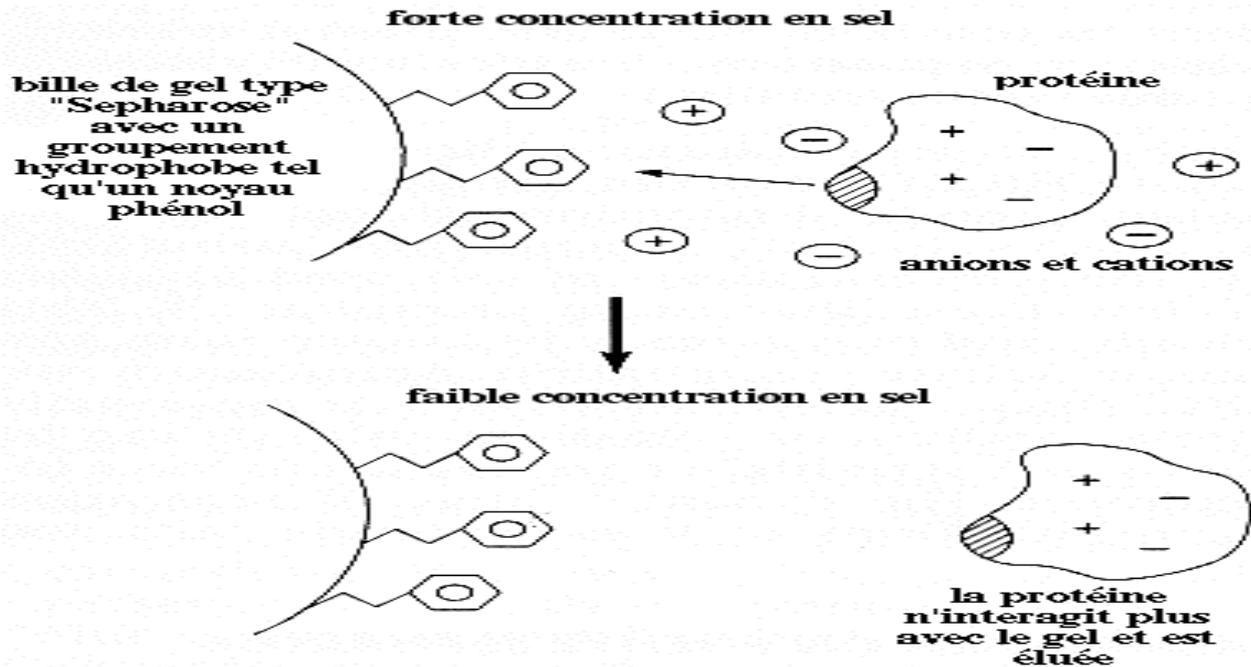


Figure 11. Chromatographie d'interaction hydrophobe. Inspiré de: "Strategies for Protein Purification and Characterization" Marshak *et al.* (1996)- Cold Spring Harbor Laboratory Press.

B. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Elle a été utilisée depuis 1975 et elle a réduit en moyenne de dix fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- Des composés thermosensibles.
- Des composés très polaires.
- Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules: un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données (**Fig. 12**).

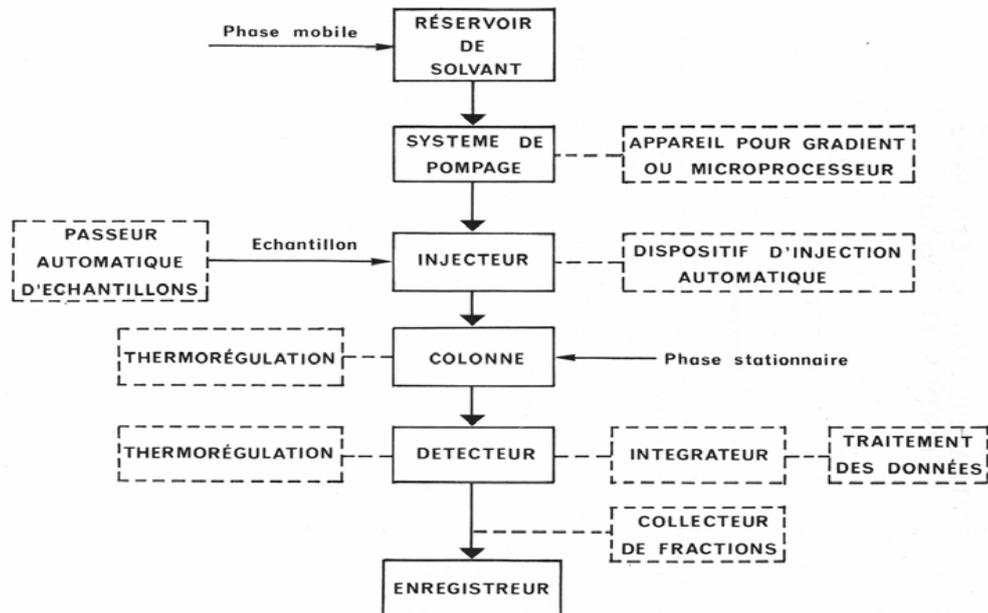


Figure 12. Appareillage de l'HPLC.

CHAPITRE III: MOYENS DE PURIFICATION

4- L'électrophorèse

4. 1. Historique

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892. Ils se sont inspirés des études de Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1937, Ame Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube. Il a pu obtenir sur le pôle positif des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle négatif des protéines de charge plus positive comme les globulines.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier.

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines.

En 1955, O. Smithies met au point l'électrophorèse en gel d'amidon.

En 1957, Joachim Kohn sépare les phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

4. 2. Définition

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-).

4. 3. Principe

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

4. 4. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

Plusieurs facteurs peuvent influencer la mobilité électrophorétique.

4. 4. 1. Nature de la molécule

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. De même, la charge des molécules influence directement leur mobilité. La charge est fonction du pH pour les molécules ionisables, de la force ionique et de la formation éventuelle de complexes. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse.

4. 4. 2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse

La présence d'ions étant nécessaire au passage du courant, un compromis est obtenu avec une force ionique comprise entre 0.05 et 1 mol/l. Le pH influe sur l'ionisation des acides faibles et bases faibles, pour lesquels il s'avère nécessaire de travailler dans un milieu tamponné.

A pH et force ionique identiques, deux tampons de nature différente ne produisent pas toujours des mobilités électrophorétiques identiques. Certaines substances ajoutées au tampon de migration modifient aussi les comportements électrophorétiques. Ainsi:

- La présence d'EDTA ou d'acide citrique favorise par complexation la séparation de certains ions minéraux.
- Les ions boratés forment avec les sucres des complexes chargés rendant ainsi possible leur séparation.
- L'addition d'urée modifie le comportement électrophorétique des macromolécules par rupture de liaisons hydrogène.

4. 4. 3. Support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration entraînant un élargissement

des zones sur l'électrophorégramme. Ces propriétés adsorbantes sont liées à la présence de certains groupements fonctionnels comme les hydroxyles.

4. 4. 4. Champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide: on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide: on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte.

Les particules à séparer peuvent être de nature et de taille très différentes: des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines.

4. 5. Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

4. 5. 1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

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

4. 5. 2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS (**Fig. 1**) est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative (**Fig. 2**). Les protéines transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

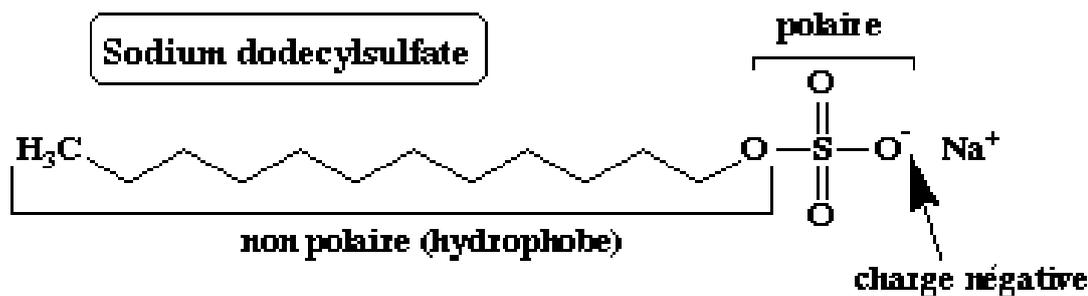


Figure 1. Structure chimique du SDS.

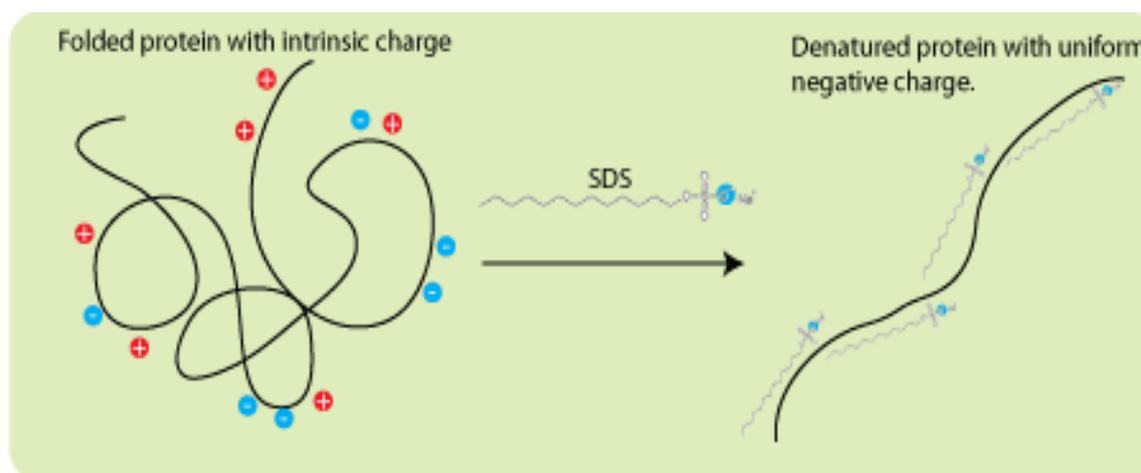


Figure 2. Action du SDS sur les protéines.

Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse:

4. 5. 3. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre)

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon de pH et de concentration convenable dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage couteux, mise en œuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

4. 5. 4. Electrophorèse de zone sur support

Les mobilités obtenues en ce type d'électrophorèse sont plus faibles que celles de l'électrophorèse en veine liquide. Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de

l'agarose, du polyacrylamide (PAGE), etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.). Electrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide).

Les fractions séparées par électrophorèse de zone migrent comme des zones individuelles. La taille des pores pour le support en gel peut influencer la vitesse de migration (ralentissement du déplacement des grosses molécules).

A) Appareillage d'électrophorèse

L'appareillage usuel est constitué de **(Fig. 3)**:

- Un générateur du courant continu stabilisé relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.
- Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments. Chaque compartiment est rempli du tampon de migration.
- Des accessoires comme le support d'électrophorèse, les plaques de verre pour couler le gel et les peignes pour creuser des puits dans le gel, dans lesquels les composés à analyser seront déposés.

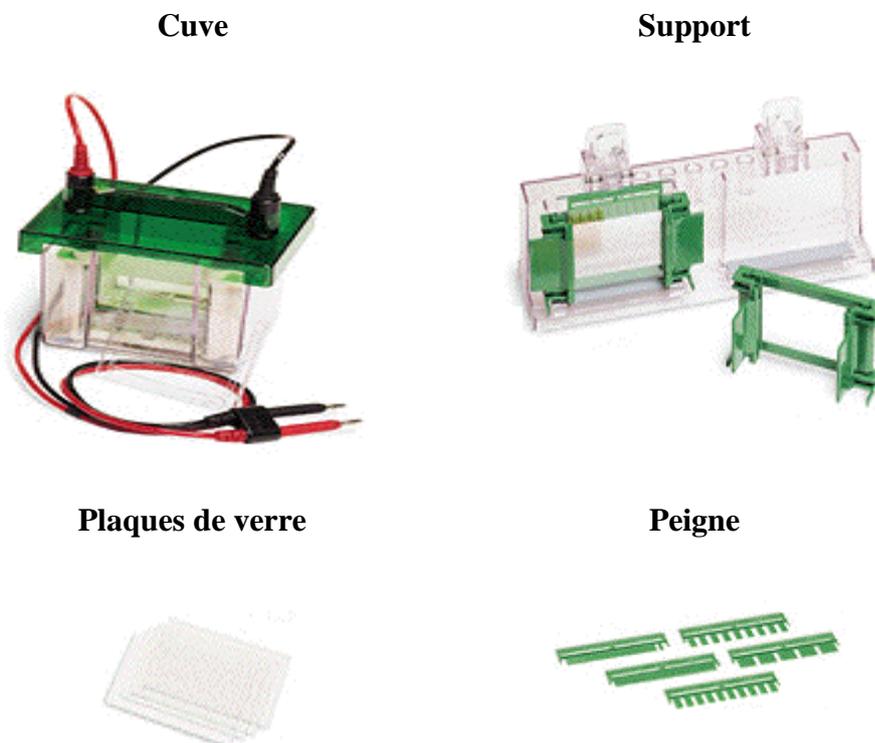


Figure 3. Appareillage d'électrophorèse.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel de concentration et le gel de séparation.
- Couler le gel de séparation entre des plaques de verre fixées sur un support suivi par le gel de concentration.
- Déposer un peigne entre ces plaques.
- Retirer le peigne après polymérisation du gel (formation des puits).
- Déposer l'échantillon et les marqueurs de masse moléculaire dans les puits.
- Placer les plaques de verre contenant le gel polymérisé dans une cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve avec le tampon de migration.
- Mettre en marche le générateur de courant.
- Enlever le gel à partir des plaques à la fin de la migration.
- Colorer puis décolorer le gel.
- Analyser le gel.

➤ **Préparation du gel**

Elle consiste à préparer deux gels: un gel de séparation dont les pores sont serrés et un gel de concentration dont les pores sont lâches.

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule réticulée utilisée comme support d'électrophorèse. C'est un copolymère d'acrylamide qui forme des chaînes et de NN'-méthylène bis-acrylamide qui assure le pontage entre les chaînes de polyacrylamide (**Fig. 4**). La polymérisation de l'acrylamide nécessite la présence de deux catalyseurs: Le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine: TMEDA) et le persulfate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière. La porosité du gel varie en fonction du taux de l'acrylamide, de bis-acrylamide, du TEMED (**Fig. 5**) et du persulfate d'ammonium. Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer (**Tab. 1**). Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.

Tableau 1. Pourcentage d'acrylamide en fonction de la taille des protéines à séparer.

Acrylamide (%)	Gamme de séparation (KDa)
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2,5-100

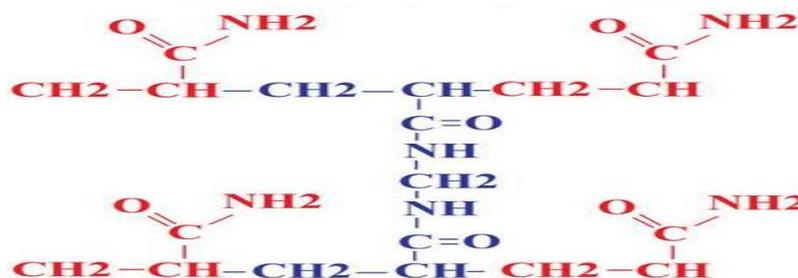
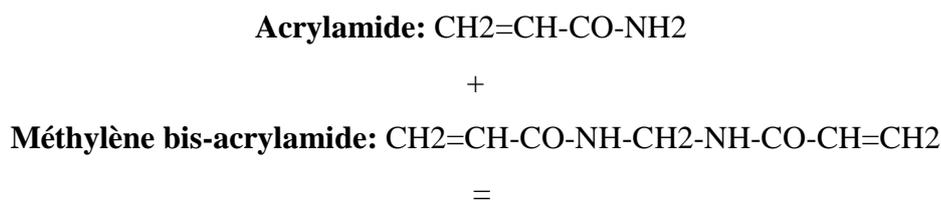


Figure 4. Formation du gel de polyacrylamide.

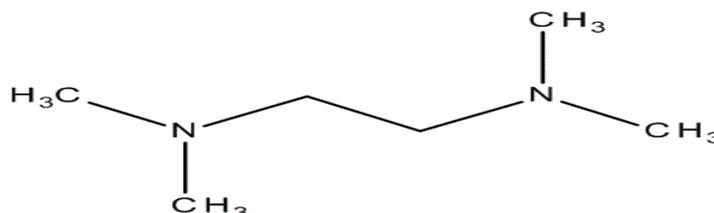


Figure 5. Structure chimique du TEMED.

Le gel de séparation permet la séparation de la solution à analyser. La densité typique de ce gel peut être 6, 8, 10, 12, ou 15%. Plus le gel est dense meilleure sera la séparation des composés. Le gel de concentration est coulé en haut du gel de séparation et sa densité est de l'ordre de 5%. Il permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation.

➤ **Préparation de l'échantillon:** L'échantillon est soumis à l'action de plusieurs composés:

- Le β mercaptoéthanol: Composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociées.
- Le SDS: Composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative.
- Le sucrose ou le glycérol: Qui donnent une densité à l'échantillon permettant ainsi à ce dernier d'être déposé facilement au fond des puits.
- Le bleu de bromophénol: Est également utilisé comme marqueur coloré afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou en gel d'agarose.

En conséquence, les protéines sont dénaturées (elles ont perdu leur structure tridimensionnelle) et n'ont plus de ponts disulfures (elles sont sous une forme monomérique).

- **Les marqueurs de masse moléculaire:** La détermination de la masse moléculaire des protéines inconnues nécessite l'utilisation des protéines standards de masse moléculaire connue.
- **Le tampon de migration:** Il contient des électrolytes qui sont responsables du transport du courant électrique. Si la concentration de ces électrolytes est faible, la totalité du courant est transportée par le soluté et une faible proportion est transportée par les électrolytes, ce qui entraîne la migration des protéines et donc leur séparation. Le tampon d'électrophorèse est constitué de glycine qui joue le rôle de conducteur de courant.
- **La coloration:** Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est démoulé, séché puis plongé dans un colorant. Les protéines sont révélées par une coloration spécifique (par exemple avec le bleu de Coomassie).
- **La décoloration:** Une succession de bains dans la solution de décoloration permet d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique.

C) Applications

L'électrophorèse est utilisée pour vérifier la pureté d'une fraction chromatographique et pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue à l'aide des protéines standards.

❖ Détermination de la masse moléculaire

Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique (R_f) au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue.

Dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement (R_f) et l'extrapolation de ce R_f sur la droite: $\text{Log } M = f(R_f)$, permettent la détermination de sa masse moléculaire (**Fig. 6**).

A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) (**Tab. 2**) on trace la droite d'étalonnage $\text{Log } M = f(R_f)$.

Le rapport frontal (R_f) représente le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration (F_m).

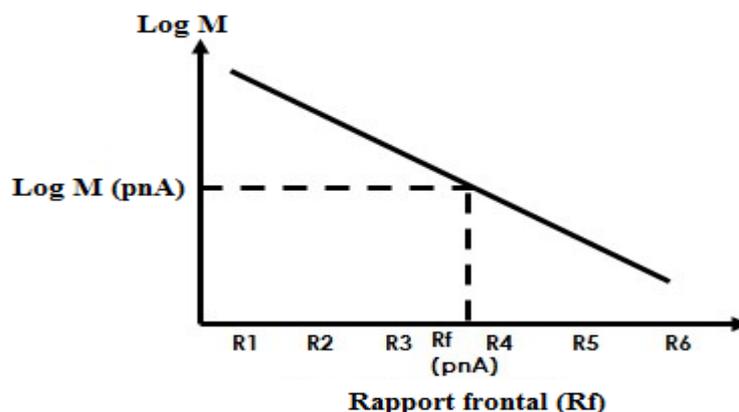


Figure 6. Mobilité des protéines en fonction du logarithme de leur masse moléculaire. (pnA: protéine A de masse moléculaire inconnue).

Tableau 2. La masse moléculaire et les rapports frontaux de quelques protéines standards.

Protéines	Phosphorylase b	Albumine	Ovalbumine	Anhydrase carbonique	Inhibiteur de la tyrosine	Lactalbumine
MM (kDa)	97	66	45	30	20.1	14.4
Rf (cm)	0.11	0.23	0.41	0.56	0.80	0.95

4. 6. Autres types d'électrophorèse

Il existe d'autres types d'électrophorèse: Electrophorèse bidimensionnelle, isoélectrofocalisation, électrophorèse en champ pulsé et immunoélectrophorèse.

4. 6. 1. Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pH_i) et leur masse moléculaire. La séparation se fait en deux dimensions: La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pH_i par isoélectrofocalisation (IEF) et la deuxième dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS.

4. 6. 2. Isoélectrofocalisation

La focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (valeur de pH à laquelle la molécule ne présente aucune charge nette).

L'IEF est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles un gradient de pH est préétabli. Le gradient de pH est réalisé en imprégnant le gel avec un mélange de substances amphotères de points isoélectriques différents. Lorsque la différence de potentiel est appliquée,

les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leur point isoélectrique et réalisent un gradient de pH entre les deux électrodes. Les protéines déposées migrent vers l'anode ou la cathode selon leur charge mais, au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge: elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle (elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre point isoélectrique (**Fig. 7**)).

Les ampholytes sont des mélanges d'un certains nombre de molécules de faible masse moléculaire, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine.

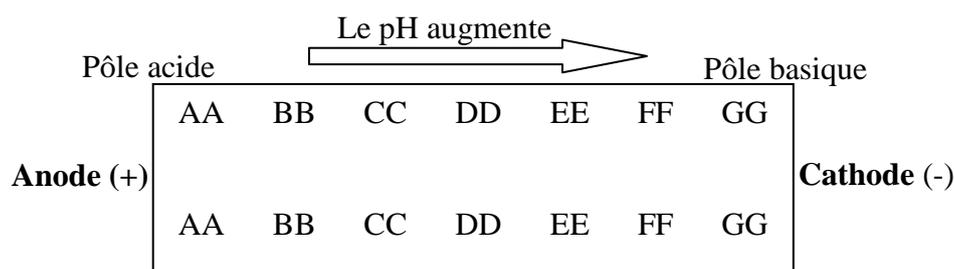


Figure 7. Gradient de pH en isoélectrofocalisation.

A, B, C, D, E, F et G sont des ampholytes de pH_i croissant de pH_i^A à pH_i^G . Les ampholytes à pH_i acide migrent vers l'anode, les ampholytes à pH_i basique migrent vers la cathode.

L'échantillon protéique est déposé dans un large puits au centre du gel. Les protéines migrent dans une direction ou dans l'autre jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur point isoélectrique, point où elles cessent de migrer.

Dans l'IEF, le gel de polyacrylamide doit être de forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration.

L'IEF est utilisée pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine inconnue par l'utilisation des marqueurs de point isoélectrique (standards), en traçant la droite d'étalonnage: $pH_{i \text{ standards}} = f(R_f)$. Il ya une relation linéaire entre le point isoélectrique des protéines et leur rapport frontal (**Fig. 8**).

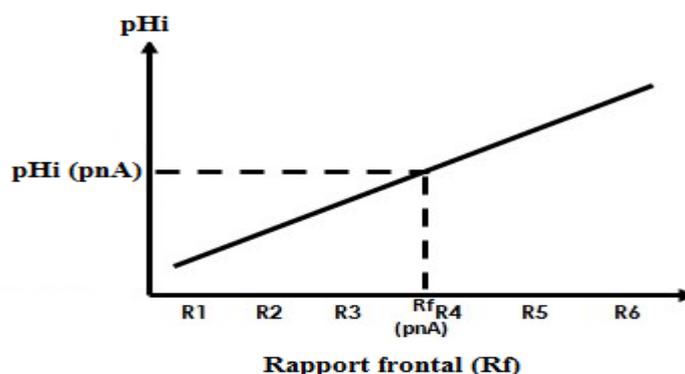


Figure 8. Mobilité des protéines en fonction de leur point isoélectrique.
(pnA: protéine A de pH_i inconnu).

4. 6. 3. Electrophorèse en champ pulsé

En 1984, Schwartz et Cantor, proposent une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose dont le pouvoir de séparation peut aller au moins jusqu'à 9 000 kb. Cette technique est utilisée lorsque l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide ne permet pas de séparer des molécules d'ADN dont la taille excède 50000 paires de bases (50 kb).

Les fragments d'ADN à séparer sont soumis à l'action alternative de deux champs électrophorétiques perpendiculaires agissant à une certaine fréquence et à une certaine valeur des champs, judicieusement choisies en fonction de la taille des fragments à séparer. L'un des champs étire le fragment d'ADN et lui permet de sortir du piège dans lequel il était bloqué, l'autre assure l'avancement du fragment au sein du gel.

Grâce à cette technique, il est pratiquement possible, pour tous les organismes à petit génome, procaryotes et eucaryotes inférieurs, de localiser très rapidement un gène quelconque. Par exemple, 16 des 17 chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être séparés par ce type d'électrophorèse. Donc, le marqueur de tailles utilisé le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. 6. 4. Immunoélectrophorèse

Cette technique permet de séparer les composés par électrophorèse et de les détecter par réaction immunologique par formation d'arc de précipitation entre antigène et anticorps. Les précipités peuvent être facilement visualisés sur un gel. Donc, c'est une méthode qui associe l'électrophorèse de protéines (Ag) à une immuno-diffusion contre des Ac spécifiques.

Les antigènes sont séparés en électrophorèse de zones sur une lame de gel d'agar tamponné à pH variable de 8.2 à 8.6 est percée de deux puits au centre. Les fractions protéiques particulièrement mobiles du sérum (sérum-albumine, α_1 lipoprotéine, α_1 antitrypsine, haptoglobine, transferrine, β lipoprotéine, etc.) migrent vers l'anode à pH 8.2-8.6, comme sur l'acétate de cellulose (sens 1) (**Fig. 9**). Par contre, les fractions les moins mobiles comme les IgG sont entraînées vers la cathode par le courant d'électro-endosmose. Elles migrent donc en apparence vers la cathode bien que chargées négativement (sens 2) (**Fig. 9**).

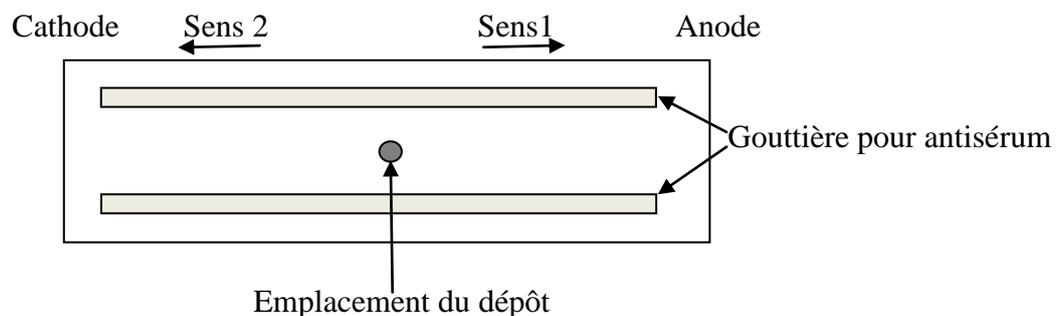


Figure 9. Lame d'immunoélectrophorèse.

L'antisérum spécifique est déposé dans une rigole découpée parallèlement à la direction de la migration électrophorétique (**Fig. 10**). La plaque est placée en chambre humide pendant 24 à 48 heures. Après cette période, les arcs de précipitation apparaissent.

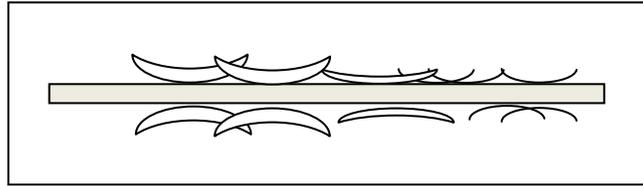


Figure 10. Immunoélectrophorèse d'un sérum.

Cette technique est une méthode analytique qui permet de dénombrer une trentaine de protéines dans le sérum humain.

L'exploitation de la plaque est faite visuellement:

- Par observation directe sur fond noir, ou à la loupe éclairante.
- Par photographie et agrandissement.
- Par coloration après lavage et séchage.

L'interprétation des résultats nécessite la comparaison de l'échantillon à analyser et un sérum normal. La comparaison porte sur:

- La position électrophorétique des arcs.
- Leur forme et leur épaisseur.
- Leur netteté.

Remarque:

- Un arc épais, plus long et plus près de la rigole indique un accroissement de la teneur en cette protéine.
- Un arc plus fin, plus court et plus éloigné de la rigole indique l'inverse.
- Un arc flou qui indique un mauvais rapport stoechiométrique Ag-Ac, près de la rigole, signifie une augmentation de l'antigène; éloigné de la rigole, une diminution.

CHAPITRE IV: TECHNIQUES DE CONSERVATION

I) Définition de la conservation

La conservation est le maintien et la préservation d'un élément dans un état constant. Ce mot est rencontré dans plusieurs domaines:

- En cinématographie, la conservation et la restauration des films.
- En finance, la conservation de titres.
- En politique, l'idéologie de conservation est appelée conservatisme.
- En écologie, la conservation de la nature et la conservation de la biodiversité.
- En agroalimentaire, la conservation des aliments.

Sécher, saler, acidifier, confire dans la graisse ou le sucre ont été longtemps les seuls moyens connus et pratiqués pour conserver les aliments avant la découverte, par Nicolas Appert, de la stérilisation par la chaleur. Après la découverte de l'intérêt des traitements par la chaleur, une nouvelle étape a été franchie avec la conservation par le froid. Les esquimaux savaient conserver leurs aliments dans la glace. C'est en 1876 que Charles Tellier inventa la première armoire conservatrice, ancêtre de notre réfrigérateur. En 1929, Clarence Bird-Sey inventait le procédé de surgélation.

D'autres procédés ont été utilisés avec succès: déshydratation, lyophilisation, etc. Quel qu'en soit le principe ou le protocole, un procédé de conservation a pour but soit de bloquer ou de ralentir l'évolution des flores microbiennes de l'aliment, soit de les détruire.

II) Les techniques de conservation

Il existe plusieurs moyens de conservation.

2. 1. La conservation par séchage

Le séchage est l'une des plus anciennes méthodes de conservation des aliments. Il fait intervenir la chaleur. Le séchage solaire (fruits, viande, poissons) fait participer le rayonnement UV. Cette technique est très répandue dans les pays chauds et secs mais aussi fréquemment dans les pays industrialisés à l'aide de techniques artificielles comme les fours et les séchoirs. Elle est simple, peu agressive, économique et surtout naturelle. La plupart des procédés de séchage nécessitent le contrôle de la température, de l'humidité, de la turbulence de l'air, du temps, etc. Les produits à sécher doivent être choisis et préparés avec soin pour limiter la charge microbienne (lavage, blanchiment, etc.), car le séchage ne fait souvent que stabiliser la flore. Parmi les techniques de conservation par séchage: la déshydratation, la lyophilisation et le salage-fumage.

2. 1. 1. La déshydratation

Cette technique de stabilisation est très ancienne: Elle est basée sur la baisse de l'activité d'eau du produit. Dès la plus haute antiquité, des grains, des fruits, des viandes, des poissons ont été séchés au soleil. Plus tard, le séchage a été effectué dans des fours. Aujourd'hui, les denrées sont déshydratées par différentes techniques: séchoirs à air chaud, cylindres chauffants, etc. Le but de la déshydratation est d'éliminer la plus grande partie de l'eau liée présente dans le produit pour empêcher le développement de micro-organismes et bloquer l'activité enzymatique.

Il existe des tunnels de déshydratation comparables aux tunnels employés pour la congélation. Les aliments sont soumis à un courant d'air chaud et sec. L'air est à la fois la source de chaleur (par convection) et le véhicule permettant l'élimination de la vapeur d'eau.

Les produits obtenus par déshydratation (lait en poudre, céréales, fruits secs) peuvent être conservés à température ambiante dans des emballages les protégeant de l'humidité. Les techniques actuelles de déshydratation permettent de conserver les qualités nutritionnelles des denrées alimentaires.

2. 1. 2. La lyophilisation

La lyophilisation (sublimation de l'eau à froid ou cryodessiccation) est un procédé très utilisé qui conserve les propriétés de l'aliment. Elle a été inventée en 1906 par les français Arsène d'Arsonval et F. Bordas. Le produit est d'abord congelé puis placé à pression réduite et chauffé. Le solvant passe directement de l'état solide à l'état de vapeur (sublimation). Le solvant sublimé est généralement de l'eau, mais ce peut être également un alcool. La durée moyenne d'un cycle de lyophilisation est comprise entre 60 et 72 heures. Ce procédé de conservation a différentes applications à savoir les produits biologiques (protéines, enzymes, micro organismes...), les actifs pharmaceutiques et cosmétiques et les produits alimentaires.

La lyophilisation consiste à enlever l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Le réchauffement de l'eau à l'état solide à très basse pression conduit à sa sublimation (passage directement de l'état solide à l'état gazeux). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et sera capturé par congélation à l'aide d'un condenseur. Ce procédé préserve particulièrement bien les propriétés et la structure du produit sensible à la chaleur. Il permet la réhydratation rapide grâce à la structure poreuse des poudres et la petite humidité résiduelle.

Trois phases majeures sont à distinguer dans un cycle de lyophilisation:

A) La congélation

C'est la phase la plus critique du cycle de lyophilisation car elle doit garantir que le produit à lyophiliser ne sera pas altéré. Elle consiste à diminuer de manière lente la température

du produit à une valeur comprise entre -20°C et -80°C , de façon à bloquer l'eau sous forme solide (sans cristaux) dans la situation où elle se trouvait à l'état liquide; pour éviter la lésion des cellules, des vaccins, des enzymes, ou tout autre principe actif. Par contre, la trop rapide congélation d'un produit très liquide, produit de petits cristaux de glace qui poussent le produit actif vers le haut, ce qui peut également le dénaturer.

B) La dessiccation primaire (la sublimation)

C'est une étape de sublimation effectuée sous vide. Durant laquelle, l'eau contenue dans le produit passe de l'état solide à l'état gazeux. Elle est effectuée à une température supérieure à -20°C et consiste à extraire l'eau libre, qui est sous forme de glace libre (ou interstitielle). La chaleur est apportée au produit sous un vide qui varie de $5\ \mu\text{bar}$ à $500\ \mu\text{bar}$ selon le produit à lyophiliser. Ceci permet la sublimation de la glace. Au passage à ces niveaux de vide, la chaleur est principalement apportée par radiation ou conduction avec les étagères contenant le fluide caloporteur (fluide chargé de transporter la chaleur entre deux ou plusieurs sources de température), la convection pouvant être considérée comme nulle.

La température pendant le cycle peut varier selon le produit et les besoins de production. La vapeur d'eau est captée par un piège froid ou condenseur et la déshydratation du produit se poursuivra en continu. Le flux de sublimation à l'intérieur de lyophilisateur est déterminé par le niveau de vide, la température du produit et le temps de dessiccation. Un flux de vapeur trop élevé peut emporter avec lui le produit à lyophiliser. Un cycle trop court laissera trop d'eau dans le produit, qui pourra être dégradé lors de la dessiccation secondaire. Par contre, un cycle trop long peut dégrader certaines molécules actives. Lorsque la plus grande partie de l'eau s'est sublimée, le produit initial a perdu environ 80 à 90% de son eau.

C) La dessiccation secondaire (le séchage final)

C'est une étape qui s'effectue toujours sous vide à une température n'excédant pas 50°C . Le vide est poussé jusqu'aux environs $5\ \mu\text{bar}$. Elle consiste à enlever l'eau «captive» du produit par désorption, car des molécules d'eau restent piégées en surface. C'est une étape délicate, car poussée trop loin, elle peut dénaturer le produit. Pour arracher les molécules, la température du produit est maintenue ou augmentée jusqu'à des valeurs positives. L'opération peut être compléer en baignant le produit dans une atmosphère d'azote, dont les molécules prendront la place des quelques molécules d'eau restantes. A la fin du cycle, le produit est sec à 95% ou plus.

La lyophilisation peut s'effectuer naturellement (séchage aux montagnes) ou, plus rapidement, dans un appareil appelé lyophilisateur (**Fig. 1**). Le lyophilisateur est un appareil qui permet de lyophiliser, par dessiccation sous vide à basse température, des produits et des

microorganismes. Il est composé au minimum d'une enceinte frigorifique pouvant être tirée au vide et d'une surface plus froide faisant office de piège frigorifique.



Figure 1. Photo d'un lyophilisateur.

2. 1. 3. Le fumage et le salage

Le fumage (fumaison) est l'un des plus anciennes méthodes de conservation utilisé depuis le Paléolithique. Il se fait en complément du salage. Le fumage des viandes ou des poissons combine l'action de la chaleur (déshydratation) à celle des produits de pyrolyse (antiseptiques) tels que le formol, les acides organiques, les acides pyroliques, les alcools, les cétones, les phénols, les crésols, etc.); de plus, il ya une action sur la saveur, la couleur et la texture.

Le fumage consiste à soumettre un aliment à l'action de la fumée (composés gazeux) qui se dégage lors de la combustion de végétaux. Durant ce processus, il se produit une élimination partielle de l'eau dans l'aliment et une imprégnation des composants de fumée en lui même. La fumée est le résultat de la pyrolyse du bois. Elle contient en moyenne 50% de particules solides (suie, goudron, résine), 25% de composés volatiles (phénol, acides organiques) et 25% d'eau.

Le salage (salaison) est une méthode de conservation basée sur l'utilisation du sel sec. Pour une bonne déshydratation et empêcher le développement des microbes et des bactéries, il faut compter environ 15% de sel selon le poids du produit à conserver. Le chlorure de sodium est le plus utilisé comme sel pour absorber l'eau présente dans des aliments comme les fromages et les poissons.

2. 2. La conservation par chaleur

L'utilisation de la chaleur est un procédé de destruction de microorganismes très efficace et très répandu. La cuisson, l'ébullition et le blanchiment sont des procédés très anciens, auxquels ils se rajoutent les processus industriels de pasteurisation et stérilisation (appertisation). La chaleur agit au niveau de l'agitation moléculaire. Elle provoque une augmentation de la vitesse des réactions métaboliques et de la vitesse de croissance, puis rapidement la dénaturation des composés microbiens et en particulier des protéines enzymatiques. Alors, il est observé une diminution puis un arrêt de la croissance, puis quand le niveau de modification devient important et irréversible, la mort.

2. 2. 1. La pasteurisation

La pasteurisation (débactérisation thermo-contrôlée) tire son nom des travaux de Louis Pasteur sur la stabilisation des vins au XIX^e siècle. C'est lui qui la découvre en 1865. Elle désigne un traitement thermique qui détruit, de manière plus au moins totale, des éléments microbiens sous leur forme végétative. En réalité, la pasteurisation se fait parfois dans des conditions éliminant de manière certaine les microorganismes pathogènes (*Staphylococcus*, *Salmonella*, etc.) mais pas forcément toutes les formes végétatives: certaines, thermorésistantes, peuvent survivre au côté de formes sporulées. La thermo-résistance de certains éléments dépend du milieu dans lequel la pasteurisation est pratiquée. Plus le milieu est acide, moins la résistance à la chaleur est élevée. Par exemple, dans un jus de fruit ayant un pH inférieur à 4.5, tous les microorganismes seront détruits tandis que pour un produit ayant un pH supérieur à 4.5 (produits carnés), les micro-organismes résistants à plus de 100°C ne seront pas détruits. Dans ce cas, on parle des semi-conserves.

La pasteurisation a été au départ généralement pratiquée à des températures inférieures à 100°C, mais elle a évolué vers une baisse du temps et une élévation de température (**Tab. 1**). Elle sert à détruire les bactéries des aliments sans pour autant changer leur composition, leur saveur ou leur valeur nutritive. Elle s'applique dans divers cas: lait, vinaigre, jus de fruit, etc. Un élément pasteurisé doit être conditionné dans un emballage étanche et conservé au froid (+4°C) afin de prévenir la multiplication des bactéries qui n'auraient pas été détruites. Pour la conservation des vitamines, ce processus est le moins agressif des techniques thermiques.

Plusieurs procédés de pasteurisation existent, parmi lesquels:

A) La pasteurisation basse

Le produit est maintenu au moins trente minutes à 60-65°C dans une enceinte à double paroi dans laquelle se trouve de l'eau chaude. Ce procédé a été abandonné pour le lait (il était

essentiellement destiné à inactiver *Mycobacterium bovis*). Il est encore très utilisé pour les corps gras et les jus de fruits.

B) La pasteurisation rapide à haute température

Elle consiste à chauffer l'aliment un temps très court, de quinze secondes à deux minutes, à une température élevée (70 à 90°C). Le produit est placé entre des plaques d'acier inoxydable chauffées par un circuit d'eau chaude. L'industrie laitière recourt à ce procédé pour préparer le lait pasteurisé. Elle est utilisée aussi pour pasteuriser des purées de légumes, des potages. C'est une alternative à la pasteurisation basse pour tous les produits concernés par ce type de traitement.

Tableau 1: Barèmes de pasteurisation.

Denrée	Température et temps nécessaire
Lait	30 minutes à 60°C ou 15 secondes à 72°C
Crèmes/Crèmes dessert	30 minutes à 71°C ou 16 à 20 secondes à 82°C
Jus de pommes en bouteilles	30 minutes à 77°C
Boissons gazeuses à base de jus de fruit	30 minutes à 66°C

2. 2. 2. L'appertisation

En 1785, un confiseur, Nicolas Appert, eut l'intuition d'un procédé de conservation qui devait révolutionner les habitudes alimentaires, éliminer le scorbut et faire naître toute une industrie: il enferma des légumes dans des bouteilles étanches qu'il plongea un temps prolongé dans de l'eau bouillante. L'aspect des légumes restait identique pendant plusieurs mois, leur goût était préservé. Cette technique de conservation est appelée «appertisation» autrement dit stérilisation par la chaleur couplée à un conditionnement étanche. Elle correspond à un traitement permettant d'éliminer tous les microorganismes (y compris sous forme sporulée). Les paramètres du traitement sont supérieurs à ceux de la pasteurisation et ils varient selon le produit entre dix minutes à 115°C et trente minutes à 121°C (**Tab. 2**).

Les traitements thermiques à haute température présentent l'inconvénient d'inactiver une proportion non négligeable de diverses vitamines. Or, la relation température/durée est différente pour les microorganismes et pour les vitamines. Un chauffage long à température modérée détruit les vitamines et n'est pas suffisant pour inactiver les microorganismes. Au contraire, un traitement pendant un temps très court à haute température est suffisant pour inactiver les bactéries tout en préservant les vitamines. Ce procédé est utilisé pour la conservation des liquides. Le lait, par exemple, est chauffé en couche mince une à deux secondes à 140°C-150°C: c'est le traitement ultra haute température (UHT). Ces laits sont conditionnés aseptiquement en récipients étanches et stériles; ils peuvent être conservés plusieurs mois à température ambiante.

Tableau 2: Barèmes d'appertisation.

Denrée	Durée (minutes)	Température (°C)
Haricots verts au naturel	2 à 4	121
Petits pois à l'étuvée	10 à 15	121
Sardines à l'huile	2 à 4	121
Corned-beef	6 à 4	121
Champignons	6 à 10	121

L'appertisation est donc un procédé de conservation qui associe deux techniques:

- Le conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux micro-organismes à toute température inférieure à 55°C.
- Un traitement par la chaleur qui a pour but de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes de l'aliment, d'autre part les micro-organismes et leurs toxines, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à la consommation humaine.

2. 3. La conservation par froid

Le froid est un bon agent de stabilisation des produits alimentaires. Il entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes. Il prolonge ainsi la durée de vie des denrées alimentaires en limitant leur altération. Néanmoins, les micro-organismes éventuellement présents ne sont pas détruits et peuvent reprendre leur activité dès le retour à une température favorable.

L'action du froid en particulier de la réfrigération est limitée; en effet, le froid ne fait que ralentir les processus: la conservation a donc une durée limitée (date limite de consommation).

Plusieurs procédés de stabilisation des aliments font appel au froid:

2. 3. 1. La cryoconservation

C'est la conservation, notamment de tissus organiques, à très basses températures (utilisation d'azote liquide). C'est une technique de fixation ou de stabilisation des matériaux biologiques (cellules, tissus, organes, ou des embryons) par la congélation. Dans les préparations histologiques, la cryoconservation (cryofixation) est employée pour maintenir la forme existante, la structure et la composition chimique de tous les éléments constitutifs des spécimens. Ces derniers sont de petits échantillons de plantes ou de tissus d'origine animale, des suspensions cellulaires de micro-organismes ou de cellules en culture, des suspensions de virus et des échantillons de macromolécules purifiées (comme les protéines).

La cryoconservation consiste à refroidir les petits échantillons à une température de -80°C ou au-dessous pour empêcher tout mouvement et activité métabolique et préserver la structure interne. Le principe de cette technique est de maintenir l'échantillon dans l'azote liquide (-196°C), plus simple et un peu moins cher, ou dans la phase vapeur le surmontant (entre -196°C et -130°C); plus sûr mais requérant une technicité un peu supérieure et un équipement plus important. L'échantillon est préalablement conditionné en tubes étanches résistants au froid extrême.

2. 3. 2. La réfrigération

Elle consiste à baisser la température d'un aliment à des valeurs légèrement supérieures à son point de congélation. L'intérêt de la réfrigération consiste à inhiber le développement des germes mésophiles, dont la plupart des microorganismes pathogènes. La réfrigération qui utilise une température comprise entre 0°C et 4°C empêche la multiplication de nombreux germes mais pas celle des germes psychrophiles. A partir de 10°C, l'évolution de la flore mésophile n'est que ralentie.

La conservation prolongée d'une denrée alimentaire et sa sécurité vis-à-vis des microorganismes pathogènes impliquent donc:

- Une réfrigération à la température la plus basse possible.
- Une réfrigération continue (la chaîne du froid ne doit pas être interrompue).

La réfrigération est souvent associée à d'autres procédés de stabilisation des aliments: pasteurisation, addition d'un conservateur, etc.

La réfrigération ne s'utilise que pour quelques jours et est effectuée dans un réfrigérateur ou dans une chambre froide. Elle réduit les phénomènes d'oxydation et préserve les saveurs. Elle est aussi utilisée à grande échelle pour conserver des fruits (pommes, poires) plusieurs mois dans les stations fruitières. La durée de stockage varie selon les aliments (produits frais et/ou semi-conserves).

2. 3. 3. La congélation

La congélation est une technique consistant à abaisser la température d'une denrée alimentaire de façon à faire passer à l'état solide généralement l'eau, qu'il contient. Cette cristallisation de l'eau contenue dans la denrée permet de réduire l'eau disponible pour des réactions biologiques et donc de ralentir ou arrêter l'activité microbienne et enzymatique. La congélation à -18°C permet une stabilisation totale vis-à-vis des microorganismes et entraîne une mortalité plus au moins importante selon la nature des germes et la vitesse de refroidissement. La conservation au froid, à une température inférieure à -18°C ou égale à -24°C ± 2°C est utilisée pour:

- Certains milieux de culture et des réactifs.
- Des souches bactériennes.
- Des échantillons pour analyse.

La congélation lente d'un tissu commence par la cristallisation de l'eau des espaces extracellulaires. Ce phénomène accroît leur concentration en soluté et crée, par osmose, un appel d'eau en provenance des cellules. Celles-ci se déshydratent, deviennent plasmolysées. La cristallisation reste essentiellement extracellulaire. Alors, que l'évolution d'un tissu soumis à une congélation rapide est sensiblement différente. Les germes de cristallisation se forment simultanément dans les compartiments extra et intracellulaires.

2. 3. 4. La surgélation

Un produit surgelé est un aliment très frais ayant subi une congélation ultrarapide. Il s'agit donc d'un cas particulier de congélation. La surgélation (-40°C et même - 80°C), comme la congélation, permet une stabilisation totale vis-à-vis des microorganismes et entraîne une mortalité plus au moins importante selon la nature des germes, celle de l'aliment, la vitesse de refroidissement et la température de stockage.

Les produits surgelés conservent toute leur texture, leur saveur et peuvent être conservés plus longtemps. Ils peuvent se conserver à -18°C pendant plusieurs mois (voire une année) sans modification notable des nutriments. Toutefois, pour certaines denrées d'origine animale, la présence d'une activité résiduelle des enzymes peut causer le rancissement (altération des corps gras entraînant une modification désagréable de leur odeur et de leur saveur) des matières grasses au stockage.

2. 4. La conservation par agents chimiques

Les additifs de conservation ou conservateurs chimiques sont utilisés dans le but de prolonger la durée de conservation des aliments. Les produits microbiostatiques ou microbicides susceptibles d'être ajoutés aux aliments sont qualifiés de conservateurs alimentaires. Un bon conservateur doit être bactéricide plutôt que bactériostatique; il doit agir sur les levures et les champignons, il doit être actif sur les germes pathogènes et sur ceux responsables d'altérations, il doit être stable et inoffensif (absence de toxicité) et sans action sur la valeur nutritionnelle.

Les effets des conservateurs alimentaires peuvent être spécifiques (acides caprylique, déshydroacétique, sorbique et propionique, acide benzoïque et benzoates, nitrites, anhydride sulfureux, éthanol, antibiotique, etc.) ou résulter de modifications de certaines propriétés de l'aliment comme le pH (acide acétique, citrique, formique, tartrique, lactique, etc.) ou l'activité de l'eau (chlorure de sodium, saccharose, etc.). L'adjonction de sel ou de sucre modifie le goût

de l'aliment et permet d'abaisser l'activité de l'eau à des valeurs pour lesquelles seule une flore non dangereuse pour le consommateur est susceptible de survivre ou de se multiplier.

Références bibliographiques

- 1) Audigé CI., Dupont G., Zonzain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome I. Chap. 2: Méthodes de fractionnement: filtration, sédimentation (centrifugation et ultracentrifugation), électrophorèse, chromatographie. Doin Editeurs, Paris, 1995: 7-84.
- 2) Bach-Nga PHAM. Cahier de formation: Immunoglobulines monoclonales. Biologie médicale. Chap. : Electrophorèse des protéines du sérum. A. Daunizeau. 2003, 28: 26-46.
- 3) Bégin D., Gérin M. Solvants industriels. Les grandes familles de solvants organiques. Chap. 2: Utilisation et aspects physico-chimiques. Ed. Masson, 2002: 13-38.
- 4) Bourguet E., Auge C. Les techniques de laboratoire: Purification et analyse des composés organiques. Chap. 2: L'extraction; Chap. 5: La chromatographie. Ellipses Edition Marketing S.A., 2008: 19-27; 77-96.
- 5) Burgot G., Burgot J-L. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Partie I: Méthodes de séparation chromatographiques et électrophorétiques. Editions Médicales internationales. 2^{ème} édition, TEC & DOC, 2006: 3-194.
- 6) Caron F. Electrophorèse de l'ADN en champ pulsé. MINI-SYNTHESE. Médecine/Sciences, 1988, 1(4): 46-49.
- 7) Cicolella A. Les composés organiques volatils (COV): Définition, classification et propriétés. Rev. Mal. Respir. Elsevier Masson SAS, 2008, 25: 155-163.
- 8) Cohr K.H. Definition and practical limitation of the concept of organic solvents. In: Chronic effects of organic solvents on the central nervous system and diagnostic criteria, world health organization. Regional office for Europe, Copenhagenn, 1985: 43-55.
- 9) Darnell J., Lodish H., Baltimore D. La cellule biologie moléculaire. Chap. 5: Principes de l'organisation et du fonctionnement de la cellule. Edition VIGOT, 1989: 131-186.
- 10) Dhaliwal A. Extraction et purification de l'ADN. Rutgers University, New Jersey, United States. 2013.
- 11) Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Chap. 2: Matériel principal du laboratoire de microbiologie. Edition: TEC & DOC. 2007: 23-45.

- 12) Guernet M., Hamon M. Abrégé de chimie analytique. Tome 1: Chimie des solutions. Chap. 1: Solvants et solutions. 2^{ème} édition. MASSON, 1981: 1-16.
- 13) Guide intérimaire de surveillance médico-environnementale des travailleurs exposés à des solvants industriels. Chap. 2: Problèmes de santé associés à l'exposition aux solvants. 1985: 26-65. Commission de la Santé et Sécurité au Travail. Comité Provincial en Santé au Travail de l'Association des Directeurs de département de santé communautaire.
- 14) Guiraud J-P. Microbiologie alimentaire. Partie A: Rappels de microbiologie. Chap. 5: Destruction et élimination des microorganismes: Agents antimicrobiens. Partie B: Microbiologie alimentaire. Chap. 2: Rôle et action des microorganismes dans les aliments. Dunod, Paris, 2003: 67-79; 107-133.
- 15) IARC. Some petroleum solvents. In: IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 47, International Agency For Research on Cancer, Lyon, France, 1989: 43-77.
- 16) Leyral G., Vierling E. Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaire. Première partie: Microbiologie des aliments. Chap. VI: Conservation des aliments. 3^{ème} édition. Doin, 2001: 141-160.
- 17) Mahuzier G., Hamon M., Ferrier D., Prognon P. Chimie analytique. Méthodes de séparation. Tome 2. 3^{ème} édition. Masson, Paris, 1999: 1-312.
- 18) Marshak D-R. Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual. Plainview, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- 19) Regnault J-P. Microbiologie générale. Chap. 8: Contrôle des microorganismes. Edition Vigot, 1990: 397-462
- 20) Rouessac A., Rouessac F. Cruché D., Duverger-Arfulso C., Martel A. Analyse Chimique: Méthodes et technique instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés. Partie 1: Méthodes séparatives. Chap. 1: Chromatographie, aspects généraux; Chap. 2: Chromatographie liquide haute performance; Chap. 7: Chromatographie d'exclusion stérique. 7^e édition. Dunod, Paris, 2004: 7-35; 35-60; 115-122.
- 21) Schwartz D-C., Cantor C-R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984, 37: 67-75.

- 22) Smith C-L., Matsumoto T., Niwa O., et al. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.* 1987, 15: 4481-4489.
- 23) http://www.exchem.fr/introduction_a_extraction.htm
- 24) <https://fr.wikipedia.org/wiki/Entonnoir>
- 25) <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/centrifugation/centrifugation.html>
- 26) http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/centrifugation.html
- 27) <http://www.biolineaires.com/articles/dossier/975-conservation-par-sechage.html>
- 28) <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5d.html>