الجمهوريةالجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université
Yahia FARES de MEDEA

Faculté des Sciences

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعةيحي فارس بالمدية
كليــة العلــوم

POLYCOPIE DE COURS

« SEPARATION DES POLYMERES »

Auteur :

ZOUAMBIA Yamina

Destiné aux étudiants de

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Niveau : Master 2

Année : 2021/2022

Approuvé par le Conseil Scientifique de la Faculté en date du :

Avant-propos

Ce cours a pour objectif de présenter les bases des méthodes de séparation des macromolécules notamment les bio-macromolécules (exemple : protéines). Dans ce cours, l'étudiant va se familiariser avec les notions de bases des techniques de séparation et apprendre à les utiliser pour la séparation de macromolécules (polymères).

Ce modeste ouvrage est le fruit de cinq années d'enseignement, d'un cours de séparation des polymères assuré en chimie macromoléculaire. Il s'adresse donc aux étudiants de deuxième année master de discipline chimie macromoléculaire, ainsi qu'à tous ceux qui dans d'autres disciplines, s'intéressent à cette science (chimie des matériaux, chimie pharmaceutique et chimie de l'environnement).

Enfin, je serais reconnaissante aux utilisateurs étudiants et enseignants de me faire part de leurs remarques et suggestions.

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction aux méthodes de séparation

I.1. Définition 1

I.2. Types des procédés de séparation 1

I.3. Mélanges à séparer 2

I.4. Généralité sur la séparation des macromolécules 3

Chapitre II : Séparation par techniques de précipitation

II.1. Définition et principe 5

II.2. Précipitation des protéines par modification du pH 5

II.3. Précipitation des protéines par les sels 6

II.3.1. Nature et effet des sels utilisés 6

II.3.2. Comportement des protéines en solutions salines 7

II.3.3. Fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium 8

II.4. Précipitation par les solvants organiques 10

II4.1. Cas des protéines 10

II.4.2. Cas d'un polysaccharide (Pectines) 11

Chapitre III : Techniques de centrifugation

III.1. Définition et principe 13

III.2. Bases théoriques 13

III.2.1. Accélération centrifuge 13

III.2.2. Bilan de forces et équation de la dynamique 13

III.3. Appareillage et type de centrifugeuses 18

III.4. Types de centrifugation 20

III.4.1. Centrifugation préparative 20

III.4.1.1. Centrifugation différentielle 20

III.4.1.2. Centrifugation en gradient de densité 21

III.4.2. Centrifugation analytique 23

III.4.2.1. Détermination du coefficient de sédimentation 23

III.4.2.2. Détermination du poids moléculaire 24

Chapitre IV : Techniques électrophorétiques

IV.1. Définition et principe 26

IV.2. Base théorique 26

IV.2.1. Equation de la dynamique et vitesse de migration 26

IV.2.2. Mobilité électrophorétique U (ou μ) 28

IV.3. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique 28

IV.3.1. pH 28

IV.3.2. Taille de la molécule 29

IV.3.3. Support 29

IV.4. Appareillage d'électrophorèse 29

IV.5. Différentes étapes d'électrophorèse 31

IV.6. Types d'électrophorèse 32

IV.6.1. Electrophorèse de zones 32

IV.6.2. Focalisation isoélectrique 34

IV.7. Electrophorèse sur gel polyacrylamide et estimation du poids moléculaire 35

Chapitre V : Techniques de séparations membranaires

V.1. Définition 37

V.2. Composés séparés et type de séparation membranaire 37

V.3. Ultrafiltration 38

V.3.1. Définition 38

V.3.2. Propriétés des membranes 39

V.3.3. Théorie 41

V.3.3.1. Polarisation de concentration 41

V.3.3.2. Problème technique 42

V.3.3.3. Variation du débit en fonction de pression 43

V.3.3.4. Sélectivité 44

V.3.3.5. Seuil de coupure 44

V.4. Mode d'écoulement d'ultrafiltration : Tangentiel/ Frontal 45

Références bibliographiques

Chapitre

I

Introduction aux méthodes de séparation

I.1. Définition

I.2. Types des procédés de séparation

I.3. Mélanges à séparer

I.4.Généralité sur la séparation des macromolécules

Chapitre I : Introduction aux méthodes de séparation

I.1.Définition

En chimie, un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers :

- **Purification** : des impuretés doivent être extraites du composé d'intérêt ;
- **Concentration** : élimination d'une partie du solvant. Voir aussi Dessiccation ;
- **Fractionnement** : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi, le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

I.2. Types des procédés de séparation

On distingue deux grandes classes de procédés de séparation : les procédés à séparation mécanique et les procédés à séparation par diffusion :

I.2.1. Séparation mécanique :

Elle est basée sur :

- Mouillabilité de surface : flottation ;
- Masse volumique : sédimentation, décantation, centrifugation, flottaison, égouttage, essorage, pressage ;
- Taille des particules (granulométrie) : van, blutage (blutoir), méthodes de séparation membranaire dont le mécanisme de transfert se fait par tamisage (filtration, tamisage), chromatographie d'exclusion stérique ;

- Inertie des particules : cyclonage ;
- Mobilité électrique : électrophorèse, précipitation électrostatique ;
- Mobilité magnétique : séparation magnétique des métaux ferreux et séparation par courant de Foucault des métaux non ferreux.

I.2.2. Séparations par diffusion

- Chromatographie :
  - → Chromatographie de partage ;
  - → Chromatographie d'adsorption ;
- Extraction :
- Séparations thermiques basées sur les transitions de phase :
  - → Point d'ébullition : distillation, évaporation, séchage ;
  - → Point de solidification : cristallisation, recristallisation ;
  - → Point de sublimation : sublimation.
- Méthodes de séparation membranaire dont le transfert se fait par diffusion : osmose inverse, pervaporation.

Une troisième classe de procédé de séparation peut être ajoutée aux deux premières. Cette classe correspond aux procédés de séparation ayant lieu par transfert d'ions :

- Echangeur d'ions ;
- Chromatographie à échange d'ions ;
- Techniques électro-membranaires.

I.3. Mélanges à séparer

Les mélanges à séparer peuvent être :

1- Mélanges hétérogènes :

Solide-solide : tri à la main, tri à la pince, tri magnétique, flottation, flottaison ;

Solide - liquide : décantation, filtration, tamisage, centrifugation, évaporation, distillation ;

Liquides non miscibles : décantation, flottation ;

2- Mélanges homogènes : distillation, cristallisation.

I.4. Généralités sur la séparation des polymères (Macromolécules)

Les polymères ont une masse molaire, une composition chimique, une fonctionnalité et une architecture moléculaire, et il existe une forte demande sur leurs propriétés de distributions.

La performance des matériaux polymères est due à leurs propriétés. Il est donc nécessaire d'avoir des informations détaillées sur les caractéristiques du polymère. La connaissance de la polydispersité est également importante en raison de son influence sur les propriétés physiques des polymères.

La caractérisation complète des polymères nécessite l'utilisation de diverses techniques expérimentales. En effet, les polymères synthétiques ont de multiples sources d'hétérogénéité qui rendent leur caractérisation très complexe.

- Premièrement, ils sont habituellement composés de macromolécules différentes dans leurs degrés de polymérisation (N).
- Deuxièmement, les macromolécules peuvent différer dans leur fonctionnalité (nature chimique du groupement final).

L'information concernant cette deuxième source d'hétérogénéité est très importante pour le chimiste polymériste car les propriétés physico-chimiques et la réactivité du polymère en dépendent fortement.

Dans le cas des copolymères, les macromolécules diffèrent en composition chimique (proportion de chaque type de monomères dans la chaîne).

Les polymères peuvent également avoir différentes architectures (copolymères bloc ou aléatoires, étoiles, polymères ramifiés ou hyperbranchés, dendrimères, etc.).

Parmi les techniques utilisées pour la caractérisation du polymère, les techniques de séparation peuvent donner des informations intéressantes sur la répartition de l'échantillon de polymère selon l'un des paramètres précités (masse moléculaire, fonctionnalité, composition chimique, etc.).

La technique de séparation la plus utilisée pour la caractérisation du polymère est sans aucun doute la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), qui sépare les macromolécules selon leurs volumes hydrodynamiques, un paramètre moléculaire fortement corrélé à la masse moléculaire.

D'autres techniques chromatographiques telles que la chromatographie d'interaction ou la chromatographie au point critique ont été étudiées plus récemment et peuvent apporter des informations intéressantes sur les distributions en composition chimique ou en fonctionnalité.

L'électrophorèse capillaire (CE) a été largement utilisée pour la séparation des polymères naturels tels que les protéines, les peptides, l'ADN ou les polysaccharides. Plus récemment, diverses techniques de séparation électrochimique ont été utilisées pour la caractérisation des polymères synthétiques.

La précipitation sélective des fractions dans les mélanges de polymères s'est révélée utile dans certains cas, bien qu'il soit fréquent que l'écart entre les plages de précipitations soit trop faible pour donner la séparation souhaitée et, en plus, la coprécipitation peut se produire.

L'utilisation de la centrifugation en gradient de densité pour la détermination des masses moléculaires moyennes et l'analyse de mélanges de polymères (différence en composition chimique) a été également utilisée par plusieurs chercheurs.

Chapitre

II

Séparation par techniques de précipitation

II.1. Définition et principe

II.2. Précipitation des protéines par modification du pH

II.3. Précipitation des protéines par les sels

II.3.1. Nature et effet des sels utilisés

II.3.2. Comportement des protéines en solutions salines

II.3.3. Fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium

II.4. Précipitation par les solvants organiques

II.4.1. Cas des protéines

II.4.2. Cas d'un polysaccharide (Pectines)

Chapitre II : Séparation par techniques de précipitation

II.1. Définition et principe

La précipitation est une technique de séparation utilisée pour isoler et purifier les polymères.

Les macromoléculaire biologiques (notamment les protéines) peuvent être précipitées en occasionnant une perturbation du milieu qui les contient, par une modification :

- pH (addition d'acides ou des bases);
- Force ionique (addition des sels) ;
- Température ;
- Constante diélectrique (addition des solvants).

Ce type de fractionnement est basé sur la baisse de la solubilité des macromolécules.

II.2. Précipitation des protéines par modification du pH

Le fractionnement et la précipitation des protéines ont été effectués sur la base de leur solubilité. Les solutions protéiques ne sont pas considérées comme de véritables solutions mais plutôt comme des dispersions colloïdales qui sont stabilisées par des interactions diverses (interactions électrostatiques de répulsion : dipôle - dipôle, ions-dipôle). La déstabilisation ou la précipitation consiste alors à neutraliser ces interactions soit à l'intérieur de la chaine peptidique ou entre les chaines (ion-ion, ion-dipôle et dipôle-dipôle) ou entre les chaines et le solvant (eau).

Il existe ainsi une valeur particulière du pH pour laquelle la protéine n'a pas de charge, c.-à-d., le nombre de charges positives égalise celui des charges négatives. Cette valeur constitue le point isoélectrique pH_i pour lequel la protéine est la moins hydratée, ie, qu'elle a la solubilité minimale.

Un pH proche de pH_i minimise les répulsions électrostatiques et au contraire favorise les attractions électrostatiques comme le montre la figure II.1.

Au point isoélectrique, les protéines ont très peu (ou pas du tout) d'interactions électrostatiques avec les ions du solvant et ont une forte tendance à former des agrégats entre elles ou avec d'autres protéines aux propriétés similaires ce qui se traduit par une précipitation appelée précipitation isoélectrique.

Pour un pH au-dessous du pH_i, la protonation et la neutralisation de certains groupements à la surface des protéines provoque une répulsion électrostatique. De même, la déprotonation des protéines pour un pH supérieur au pH_i s'accompagne d'une répulsion électrostatique.

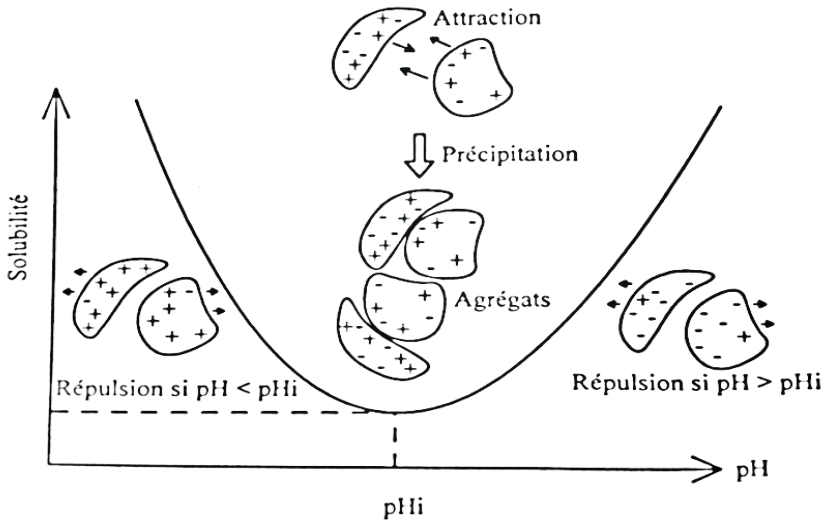


Figure II.1. Précipitation des protéines par changement du pH

II.3. Précipitation des protéines par les sels

II.3.1. Nature et effet des sels utilisés

Un grand nombre de sels neutres ou légèrement acides ont été utilisés pour solubiliser, précipiter ou fractionner les protéines par différentes procédures. Les sels les plus utilisés sont : NaCl, Na_2SO_4, $(NH_4)_2\ SO_4$, Mg SO_4, KCl, $CaCl_2$.

Les solutions saturées de NaCl présentent une force ionique faible que celle des sulfates d'ammonium raison pour laquelle elles sont limitées en application. Néanmoins, certaines protéines fibreuses, solubles en milieu faiblement acide, peuvent être fractionnées avec NaCl ou kCl comme par exemple : Kératine et collagène.

Le phosphate de potassium, en solutions concentrées, présente une densité et une viscosité très élevées qui rendent très difficile la décantation des précipités.

II.3.2. Comportement des protéines en solutions salines

Les solutions salines à forces ioniques inférieures à celles du milieu isotonique (0.15M) *(Deux liquides sont isotoniques lorsqu'ils ont une même pression osmotique avec une même concentration en substances dissoutes)* peuvent causer la précipitation de certaines protéines. Une fois précipitée, la protéine peut être resolubilisée réversiblement par un apport de sels favorisant l'augmentation de la force ionique du milieu. Ce phénomène est désigné par le terme « Salting in » (Figure II.2). A l'inverse, les sels présents à haute concentration, conditionnant une force ionique supérieure à celle rencontrée dans les tissus, provoque la précipitation de nombreuses protéines, cet effet est le « Salting out ».

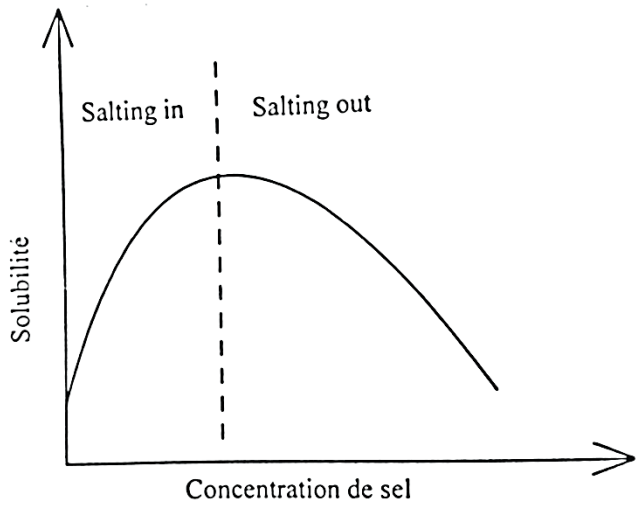


Figure II.2. Variation de la solubilité des protéines en fonction de la concentration du sel

La précipitation des protéines se produit par neutralisation des charges de surface, ce qui réduit l'activité chimique de la protéine, ie, les ions du sel affaiblissent les interactions polaires engagées entre la protéine et l'eau, ce qui réduit l'eau autour de celle-ci.

La concentration de sels nécessaire pour occasionner la précipitation des protéines dépend :

→ Du nombre et de la distribution des charges ;

→ Des groupements polaires non-ioniques de surface ;

→ Du nombre et de la distribution des groupements hydrophobes.

Le tableau II.1 donne un classement des groupes ioniques des sels suivant leur efficacité à précipiter.

Tableau II.1. Classement des groupes ioniques des sels selon leur pouvoir Salting-out

	Groupes ioniques classés selon leur pouvoir de Salting-out							
	+ ⟶ -							
Anions	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	CH_3COO^-	Cl^-	NO_3^-	ClO_4^-	I^-	SCN^-
Cations	NH_4^+	Rb^+	K^+	Na^+	Cs^+	Li^+	Mg^{2+}	

II.3.3. Fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium

A. Mode d'ajout du sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium peut être employé en plusieurs manières différentes. Nous pouvons citer :

- Utilisation des concentrations croissantes en sel : additions fractionnées des cristaux de sel séparées par des périodes d'équilibrage ;
- Utilisation des concentrations décroissantes en sel (relargage partiel du précipité) ;
- En opérant par dialyse : la protéine est dans le sac et le sel placé à l'extérieur. Cette méthode est sélective mais très lente d'où son utilisation limitée ;
- Par emploi d'une solution saturée de sel : son inconvénient réside dans la dilution importante de la préparation.

B. Conditions de travail

- Avant de débuter la précipitation, l'homogénat ou l'extrait doit être clarifié par centrifugation ;

- L'extrait est souvent tamponné à un pH neutre sauf exception ;
- Dans la plupart des cas, la force ionique du milieu est proche des conditions physiologiques ;
- Le volume du milieu est sans importance mais la concentration doit se situer entre 5 et 30 mg de protéine / cm^3. Cette concentration quoique élevée favorise la stabilité des protéines et minimise leur dénaturation. De plus, cette concentration est un compromis entre le rendement et la sélectivité de la précipitation. Un accroissement de la teneur en protéine élève le rendement mais diminue la sélectivité. Au contraire, une faible teneur protéique ne permet pas une précipitation complète ou donne lieu à aucune précipitation.
- Les acides nucléiques peuvent interférer, ils doivent être retirés du milieu en ajoutant dans le milieu de la protamine, de la Streptomycine ou encore du $MgCl_2$ qui provoquent la formation de complexe facilement éliminés par centrifugation.
- Si le milieu contient des polysaccharides comme l'amidon ou le Glycogène, un apport d'amylases ou de carbohydrolases évite leur co-précipitation avec les protéines.
- Lors de l'addition de sel, l'agitation du milieu doit être très lente pour éviter la pénétration de l'air dans la solution qui peut occasionner une oxydation des protéines susceptible de les dénaturer.

C. Avantages du sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium est le sel le plus utilisé, ses avantages majeurs sont :

- A saturation, il est à une molarité suffisante pour causer la précipitation de la plupart des protéines.
- Il ne produit pas une chaleur excessive lors de la dissolution, ce qui permet à la chaleur générée d'être facilement dissipée.
- Même à saturation (4M à 20°C), il possède une densité moyenne de 1.235 n'interfère pas avec la sédimentation des protéines précipitées.
- En solutions concentrées, il prévient ou limite la croissance bactérienne.

- Il protège la plupart des protéines de la dénaturation. Cette propriété est utilisée dans la conservation des protéines purifiées en solutions saturées de sulfate d'ammonium.

Le fractionnement par le sulfate d'ammonium à grande concentration conduit généralement à un facteur de purification situé entre 2 et 5 ce qui constitue une limitation de l'usage de ce sel.

II.4. Précipitation par les solvants organiques

II.4.1. Cas des protéines

Les alcools sont très utilisés pour précipiter les acides nucléiques, les polysaccharides et les protéines.

Les solvants organiques dans une large mesure précipitent les macromolécules en modifiant leur hydratation. Ils diminuent aussi l'activité de l'eau ce qui provoque une baisse de la solvatation des macromolécules chargées. L'immobilisation des molécules d'eau par les solvants organiques (par simple hydratation) s'accompagne d'une diminution de la constante diélectrique du milieu aqueux ce qui déplace les molécules d'eau situées au niveau des zones apolaires à la surface des protéines. Ces molécules d'eau sont remplacées par les molécules du solvant organique. Ce déplacement s'accompagne d'une meilleure solubilité de ces zones apolaires mais l'effet global sur les macromolécules correspond à une baisse de la solubilité.

L'acétone, l'éthanol, le méthanol et le butanol sont miscibles à l'eau, mais occasionnent une élévation de la température du milieu. Ils ont tous tendance à dénaturer les protéines, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés au-dessus de 0°C.

La précipitation par les solvants organiques est affectée par la taille de la macromolécule : une faible quantité de solvant est nécessaire pour faire précipiter les molécules de grandes tailles tandis que cette quantité est nettement plus importante pour les petites. Ceci, s'explique par le fait que les molécules de grande taille

s'agrègent facilement entre elles puisqu'elles ont plus de chance à posséder des zones chargées ce qui donne des agrégats de poids faciles à précipiter.

Le phénomène de formation des agrégats est en effet dû à l'existence de zones chargées comme le montre la figure II.3.

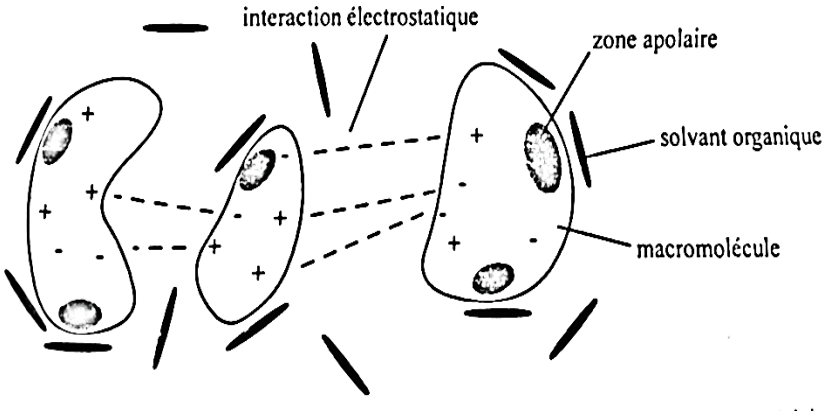


Figure II.3. Agrégation des protéines par ajout du solvant organique

II.4.2. Cas d'un polysaccharide (Pectine)

La pectine est un carbohydrate structural présent dans toutes les plantes. Seules les céréales n'en comportent pas. C'est un hétéropolysaccharide complexe avec une composition variable selon l'origine de la matière première et les méthodes d'extraction.

A l'échelle industrielle, les pectines sont extraites à partir des écorces d'agrumes et des marcs de pomme sous des conditions modérément acides. Le schéma classique d'extraction des pectines se compose de plusieurs étapes :

- Prétraitement de la matière première : blanchiment, lavage.
- Solubilisation de la pectine : milieu acide à chaud.
- Purification de la solution de pectine : séparation de l'extrait visqueux/résidu.
- Précipitation de la pectine : alcools / sels

La précipitation alcoolique est obtenue en mélangeant l'extrait clarifié à l'éthanol, méthanol ou à l'isopropanol. Le précipité gélatineux est séparé par filtration.

Lors de la solubilisation d'un polymère, il y a compétition entre les interactions macromolécule / solvant et les interactions macromolécule / macromolécule.

La solubilité des pectines dans l'eau est liée à l'état d'ionisation des groupements carboxyles mais aussi au degré de polymérisation et à leur distribution. En effet, l'ionisation des fonctions carboxyliques permet l'individualisation des chaînes grâce aux répulsions électrostatiques entre les charges et donc la solubilisation du polymère. A l'inverse, l'ajout d'un solvant organique à une solution pectique minimise l'état d'ionisation des fonctions carboxyliques (formation des groupements méthylesters dans le cas du méthanol) et favorise les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes qui permettent la gélification du polysaccharide (formation d'un précipité).

Chapitre

III

Techniques de centrifugation

III.1. Définition et principe

III.2. Bases théoriques

III.2.1. Accélération centrifuge

III.2.2. Bilan de forces et équation de la dynamique

III.3. Appareillages et types de centrifugeuses

III.4. Types de centrifugation

III.4.1. Centrifugation préparative

III.4.1.1. Centrifugation différentielle

III.4.1.2. Centrifugation en gradient de densité

III.4.2. Centrifugation analytique

III.4.2.1. Détermination du coefficient de sédimentation

III.4.2.2. Détermination du poids moléculaire

Chapitre III : Techniques de centrifugation

III.1. Définition et principe

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut-être constituer soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. Cette technique fait partie des opérations unitaires en génie des procédés.

C'est une technique basée sur le comportement des particules soumises à une force centrifuge : les particules et les molécules déférant par la densité et la taille peuvent être séparées selon leur propre vitesse de sédimentation.

III.2. Bases théoriques

III.2.1. Accélération centrifuge

Lorsqu'une particule sphérique de rayon r et de masse m subit un mouvement de sédimentation autour d'un axe de rotation, ce dernier crée un champ d'une accélération centrifuge **G :**

$$G = \omega^2 X \qquad \text{(III.1)}$$

Avec :

ω : la vitesse angulaire exprimée en radians par seconde (rad/s) ou en tour par minute (trs/min).

X : distance radiale ie : distance à partir de l'axe de rotation de la centrifugeuse (m).

III.2.2. Bilan de forces et équation de la dynamique

A. Forces influençant le mouvement rotatif de la particule

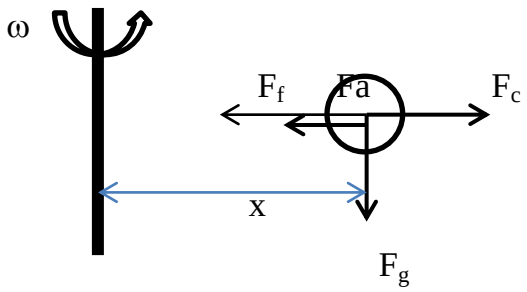
Au cours de cette opération de séparation par centrifugation, les particules sont soumises à différentes forces qui sont :

$\rightarrow$ Force de gravitation (pesanteur) : Fg

→ Poussée d'Archimède : Fa

→ Force de friction (frottement avec les molécules du solvant) : F_f

→ Force centrifuge : Fc



Force de gravitation (pesanteur) : Fg

$$F_g = m\ g \qquad \text{(III.2)}$$

Avec :

m : la masse de la particule en kg

g : gravité terrestre en m/s^2 (9,81)

→ **Force de friction F_f (frottement avec les molécules du solvant)**

$$F_f = f\ V = 6\prod \eta\ r\ V \qquad \text{(III.3)}$$

Avec :

f : coefficient de friction ;

v : vitesse de sédimentation de la particule (m/s) ;

η : viscosité du milieu (Poiseuille = Pa.s = N. m^{-2}.s= kg.m. s^2 m^{-2}. s= kg m^{-1}. s^{-1}) ;

R : rayon de la particule (m).

→ **Poussée d'Archimède : Fa**

$$Fa = m'\omega^2\ X = \rho'\ v\ \omega^2\ X = \rho'\ 4/3\ \prod\ r^3\omega^2\ X \qquad \text{(III.4)}$$

Avec :

ρ' : masse volumique du solvant (kg/m^3)

r : rayon de la particule (m)

ω : vitesse angulaire (rad/s).

→ **Force centrifuge : Fc**

$$F_c = m\,\omega^2\,X = \rho\,v\,\omega^2\,X = \rho\,4/3\,\prod r^3\omega^2\,X \qquad \text{(III.5)}$$

Avec :

ρ : masse volumique de la particule (kg/m^3)

r : rayon de la particule (m)

ω : vitesse angulaire (rad/s)

X : distance à partir de l'axe du rotor (m)

B. Vitesse et coefficient de sédimentation

Lors d'une centrifugation, la vitesse de sédimentation d'une particule va être fonction de sa masse, de son volume et de la densité du solvant (ce qui détermine la poussée d'Archimède), de l'accélération à laquelle elle est soumise, mais également aux forces de frottement liées à son déplacement dans la solution, forces qui vont dépendre de la taille et de la forme de la particule. La vitesse de sédimentation fait donc intervenir de nombreuses variables, c'est pourquoi elle n'est pas calculée mais mesurée expérimentalement.

→ **Equation fondamentale de la dynamique**

L'axe de la rotation étant verticale, l'équation fondamentale de la dynamique s'écrit :

$$\overrightarrow{Fg} + \overrightarrow{Ff} + \overrightarrow{Fa} + \overrightarrow{Fc} = m\,\frac{dV}{dt} = m\,\vec{a} \qquad \text{(III. 6)}$$

$$Fc - Fa - Ff = m\frac{dV}{dt} \qquad \text{(III. 7)}$$

La particule atteint un état d'équilibre (arrêt de la sédimentation) où : dv/dt = 0, l'équation III.7 s'écrit alors comme suit :

$$\rho\,4/3\,\prod r^3\omega^2\,X - \rho'\,4/3\,\prod r^3\omega^2\,X - 6\prod\eta\,r\,V = 0 \qquad \text{(III.8)}$$

→ **Vitesse de la sédimentation (V)**

La vitesse de la sédimentation v(m/s) d'une particule soumise à un mouvement rotatif autours d'un axe est donc exprimée par la relation suivante :

$$V = \frac{2\,r^2(\rho - \rho')\omega^2\,X}{9\,\eta} \qquad \text{(III. 9)}$$

Avec :

ρ : masse volumique de la particule (kg/m^3)

ρ' : masse volumique du solvant (kg/m^3)

r : rayon de la particule (m)

ω : vitesse angulaire (rad/s)

X : distance à partir de l'axe du rotor (m)

η : viscosité du milieu (Poiseuille = Pa.s = N. m^{-2}.s= kg . m. s^2 m^{-2}. s = kg m^{-1}.s^{-1}) ;

Dans ce cas, le temps de sédimentation est calculé comme suit :

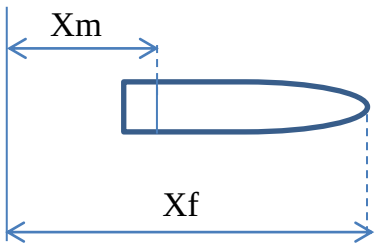
$$V = dx/dt$$

$$dt = dx/V = \frac{9\,\eta}{2\,r^2(\rho-\rho')\omega^2\,X}dX = \frac{9\,\eta}{2\,r^2(\rho-\rho')\omega^2}\frac{dX}{X} \qquad \text{(III.10)}$$

$$t = \frac{9\,\eta}{2\,r^2(\rho-\rho')\omega^2}\,ln\frac{Xf}{Xm} \qquad \text{(III.11)}$$

Xm : distance radiale de l'axe du rotor au ménisque du liquide (m) ;

Xf : distance radiale de l'axe du rotor jusqu'au fond du tube (m)



La formule permettant le calcul de la vitesse de sédimentation ne s'applique que pour les particules sphériques. Les molécules allongées sédimentent 10 fois moins vite

comparées aux molécules sphériques de mêmes masses. Pour tenir compte de la forme des molécules, la relation de vitesse a été réécrite comme suit :

$$V = \frac{2\,r^2(\rho - \rho')\omega^2\,X}{9\,\eta\left(\frac{f}{f_0}\right)} \qquad \text{(III. 12)}$$

Avec :

f : coefficient de friction de la molécule,

f_0 : coefficient de la friction d'une sphère de même masse ($f_0 = 6\prod\eta\, r$)

Le coefficient de friction exprime le degré de frottement de la molécule à sédimenter avec les molécules du solvant.

→ **Coefficient de sédimentation (S)**

Le coefficient de sédimentation exprimé en seconde est exprimé comme suit :

On a : $V = S\,\omega^2\,X \quad \Rightarrow \quad S = V/\omega^2\,X$

$$S = \frac{2\,r^2(\rho - \rho')}{9\eta(\frac{f}{f_0})} \qquad \text{(III. 13)}$$

Le coefficient de sédimentation ne dépend que de la nature de la particule et du milieu dans lequel elle baigne ; il est aussi connu comme la constante de Svedberg S et s'exprime en seconde (s) ou en Svedberg(S) tel que : **1 S = 10^{-13} s.**

→ **Nombre de gravité g**

La **vitesse angulaire** est exprimée en fonction du nombre de tours par min : **n** (trs/min), elle peut être exprimée en en rad/s comme suit :

$$\omega = \frac{2\pi n}{60} \qquad \text{(III. 14)}$$

On définit l'**accélération centrifuge** (m/s^2)

$$G = \omega^2\,X = \frac{4\,\pi^2 n^2}{3600}X \qquad \text{(III. 15)}$$

Son rapport avec la constante de gravité terrestre g (g = 9.81 m/s^2) nous donne le **nombre de g** exprimant que l'accélération centrifuge est un nombre multiple de la constante de gravité terrestre :

$$Nombre\ de\ gravité\ g\ =\ \frac{4\,\pi^2 n^2}{3600\ x\ 9.81} X \qquad \text{(III. 16)}$$

Une centrifugation effectuée à 2000g équivaut à placer une molécule dans un champ de force centrifuge représentant 2000 fois la gravité terrestre. Le nombre de g est donc une accélération centrifuge exprimée en g (en nombre de fois de gravité).
Appelé aussi ***RCF : Champ relatif de centrifugation***

III.3. Appareillages et types de centrifugeuses

La centrifugeuse est l'appareil utilisé pour la centrifugation. Une centrifugeuse est une machine équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte. Excepté pour les centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps typique d'utilisation sont relativement limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, l'enceinte est réfrigérée et souvent soumise à un vide poussé pour éviter les frottements. Par ailleurs, un rotor qui tourne à haute vitesse (jusqu'à 100 000 rpm) possède beaucoup d'énergie cinétique. Les tubes à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux, donc, chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.



Figure III.1. Centrifugeuse de paillasse

Les centrifugeuses les plus utilisées, classées selon leur axe de rotation, sont :

→ **Centrifugeuse oblique** : le godé est incliné de 14° à 45° (Figure III.2). Ce type de centrifugeuse présente un bon aérodynamisme permettant d'atteindre des vitesses élevées. De plus, les particules traversent un court parcours au sein du liquide, où elles migrent horizontalement en atteignent la paroi puis elles glissent le long de celle-ci. Ceci favorise la sédimentation.

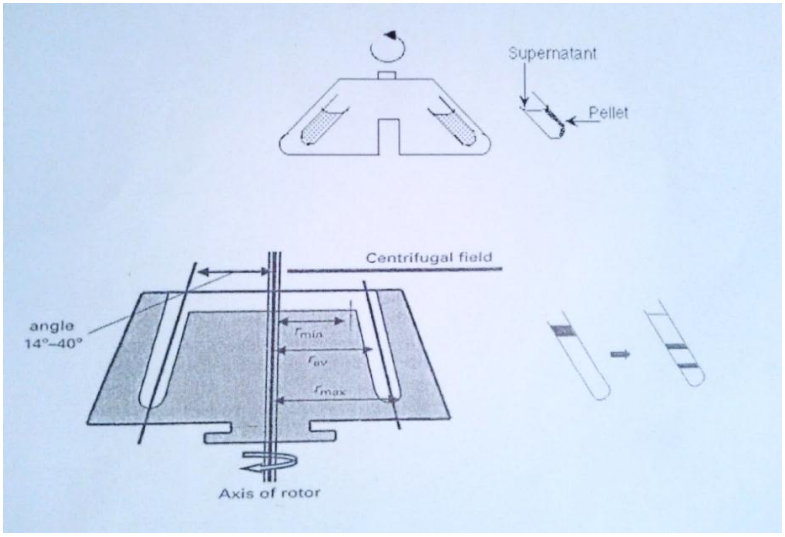


Figure III.2. Centrifugeuse oblique

→ **Les centrifugeuses horizontales** : le godé est initialement vertical et horizontal pendant la centrifugation. Ce type de centrifugeuse présente mauvais aérodynamisme du rotor et les particules à sédimenter traversent un long parcourt le long du liquide (Figure III.3).

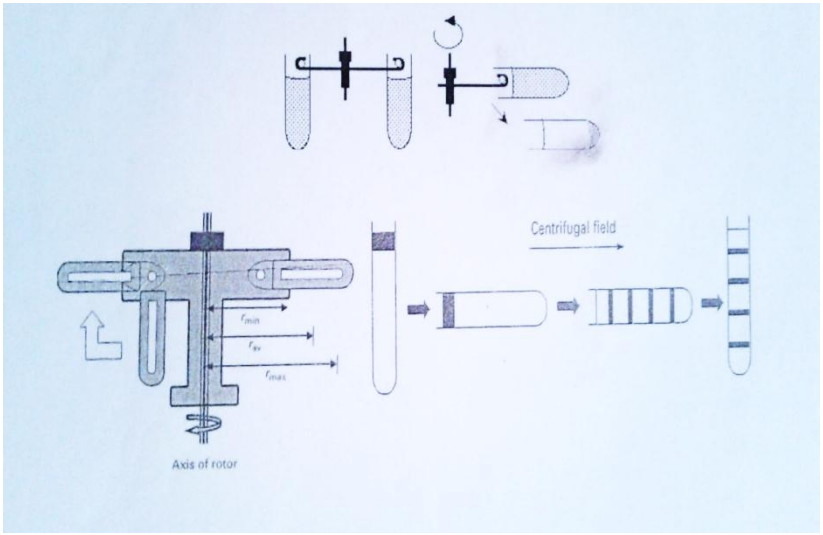


Figure III.3. Centrifugeuse horizontale

III.4. Types de centrifugation

Selon leur objectif, nous avons deux types de centrifugation :

- ***Centrifugation préparative*** : elle concerne la séparation, l'isolement et la purification des cellules, d'organites cellulaires, des protéines, des polysaccharides…….
- ***Centrifugation analytique*** : elle est destinée à l'étude des macromolécules pures ou virtuellement pures. Cette technique fournie des informations sur la pureté, le poids moléculaire et la forme de la macromolécule.

III.4.1. Centrifugation préparative

On distingue deux types : centrifugation différentielle et centrifugation en gradient de densité.

III.4.1.1. Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle fait référence à la forme la plus simple de la centrifugation. Elle est basée sur des différences de vitesse de sédimentation de particules de tailles et de densités variables. Dans ce type de centrifugation, le principe est de séparer les différents constituants le plus souvent à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une première centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un culot au fond du tube. Tous les autres éléments (pour lesquels l'accélération a été trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou pour lesquels le temps de centrifugation a été trop court) vont rester dans la fraction liquide appelée alors surnageant. On s'arrange à ce que la vitesse appliquée à chaque étape permette de faire sédimenter un constituant cellulaire. Enfin, on récupère séparément le surnageant et le culot (Figure III.4).

Pour ce type de centrifugation, on utilise très fréquemment des rotos fixes caractérisés par une inclinaison des tubes allant de 14° à 40°.

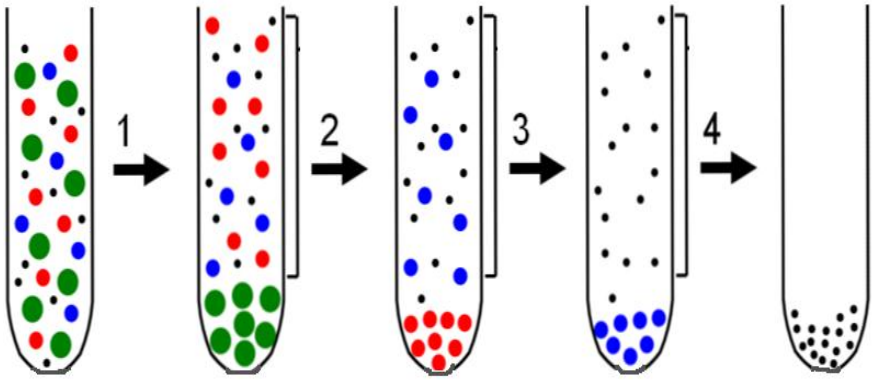


Figure III.4. Centrifugation différentielle

III.4.2.1. Centrifugation en gradient de densité

C'est une méthode basée aussi sur des différences de vitesse de sédimentation de particules de tailles et de densités variables. Dans cette méthode, les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité. A l'équilibre, les particules se stabilisent dans la zone du gradient où la densité du solvant égale à celle de la particule. La différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation :

- ✓ Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera rapidement.
- ✓ Si la densité de la particule égale celle du milieu, il n'y aura aucune sédimentation.
- ✓ Si la densité de la particule est faible que celle du 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.

Dans la centrifugation en gradient de densité, les particules sédimentent sous forme de bande ou de zone ce qui a permis de désigner cette technique par le terme de centrifugation zonale.

La centrifugation par gradient de densité est la méthode indiquée pour la purification d'organelles sub-cellulaires et de macromolécules. Les gradients de densité peuvent être réalisés en superposant des couches de milieu à gradient, du sucrose par exemple, dans un tube de façon à ce que la couche la plus lourde se trouve au fond et

la plus légère sur le dessus, en continu ou non. La fraction cellulaire que l'on cherche à séparer est ensuite placée sur la couche supérieure et centrifugée. La séparation par gradient de densité peut être classée en deux catégories : la séparation zonale (taille) et la séparation isopycnique (densité).

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). La solution de sels de césium ou de saccharose est appelée gradient de densité. Il existe deux types de gradients :

A. **Gradients discontinus** : formés de plusieurs couches successives de milieux de densités différentes (Figure III.5). Ce type de gradient est généralement réalisé avec des moyens sommaires. La plupart du temps il s'agit de gradient de saccharose. Après centrifugation, chaque constituant rejoindra la zone de densité équivalente à la sienne. Le gradient (saccharose ou CsCL) sert donc à faire en sorte que les particules lourdes sédimentent plus vite que les plus légères, tout en n'atteignant jamais le fond du tube à centrifuger. Le contenu du tube peut être récupéré par fractions successives, souvent du bas vers le haut.

B. **Gradients continus** : Ce sont des gradients pour lesquels la variation de densité est continue. Une solution de chlorure de césium (CsCl) de densité donnée soumise à une force de gravité intense forme spontanément un gradient de densité continu. Les molécules soumises à la centrifugation sur le gradient de CsCl se sépareront selon leur densité. La préparation à analyser est déposée sur le sommet du gradient, puis on centrifuge à équilibre. Chaque type de particule sédimentera jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration correspondant à sa densité. Elle s'immobilisera alors à ce niveau formant des bandes (Figure III.5).

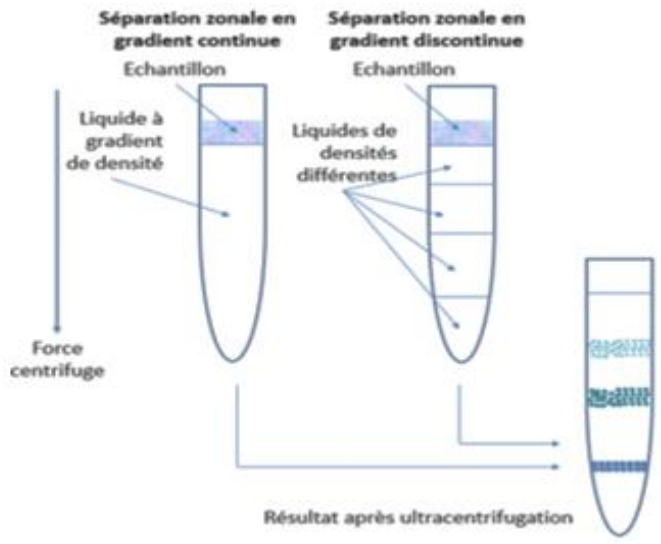


Figure III.5. Centrifugation en gradient de densité

III.4.2. Centrifugation analytique

La centrifugation analytique fait référence à une centrifugeuse à haute vitesse utilisée dans les processus analytiques. Elle est utilisée pour obtenir des informations sur les types de molécules dans un échantillon particulier en connaissant la forme générale, les changements de conformation et la stœchiométrie des sous-unités. En tant que technique analytique, elle permet de déterminer le coefficient de sédimentation (S) de la macromolécule. Elle peut également être utilisé pour déterminer la vitesse de sédimentation des macromolécules et leurs poids moléculaires.

III.4.2.1. Détermination du coefficient de sédimentation

Le coefficient de sédimentation (S) est déterminé grâce à la technique de centrifugation en gradient continu qui est une technique préparative et analytique à la fois. Pour ce faire, on utilise une ou plusieurs molécules (marqueurs) de S et de poids moléculaire (PM) connue que l'on centrifuge avec l'échantillon. Dans le cas des protéines on choisit souvent le lysozyme ($S_{20,\ eau}$ = 2.15 ; PM = 17200) et la catalase ($S_{20,eau}$ = 11.6, PM = 250000).

Pour un temps de centrifugation donné, les marqueurs se positionnent dans le gradient proportionnel à leur S. Si le gradient (généralement le saccharose) est linéaire, le fractionnement de ce dernier permet de tracer le coefficient de sédimentation en

fonction de la distance où se positionne la bande de centrifugation par rapport au ménisque de la solution (Figure III.6). Avec cette représentation, il est ensuite aisé de déduire le coefficient de sédimentation de la macromolécule étudiée.

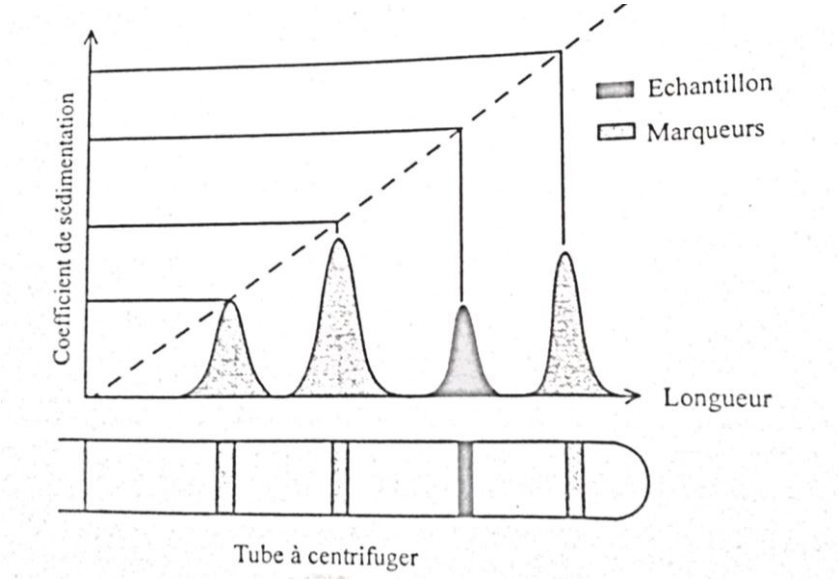


Figure III.6. Variation du coefficient du sédimentation en fonction de la distance de la bande de centrifugation

III.4.2.2. Détermination du poids moléculaire (PM)

La mesure expérimentale de S par ultracentrifugation et la connaissance du coefficient de diffusion D permettent de déterminer la masse molaire moléculaire de la macromolécule. Ceci est déterminé grâce à l'équation de Svedberg qui s'exprime comme suit :

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{V}\rho')} \qquad \text{(III. 17)}$$

Avec :

M: poids moléculaire de la biomolécule (Kg/mol)

ρ' : masse volumique du solvant à 0°C (Kg/m^3)

$\bar{V}$: volume spécifique partiel : c'est l'augmentation du volume due à l'addition de 1g de la biomolécule (m^3/kg)

D: coefficient de diffusion (m^2/s)

R: constante des gaz parfaits (J/mol/K)

T : température (K)

S: coefficient de sédimentation (s)

→ **Coefficient du friction molaire (F)** : peut-être exprimé en fonction du coefficient de diffusion (D) comme suit :

$$F = \frac{RT}{D} = f\,N \qquad \text{(III. 17)}$$

Avec :

F : coefficient de friction molaire,

f : coefficient de friction (kg/s)

N : nombre d'Avogadro.

D : coefficient de diffusion (m^2/s)

Chapitre

IV

Techniques électrophorétiques

IV.1. Définition et principe

IV.2. Base théorique

IV.2.1. Equation de la dynamique et vitesse de migration

IV.2.2. Mobilité électrophorétique U (ou µ)

IV.3. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

IV.3.1. pH

IV.3.2. Taille de la molécule

IV.3.3. Support

IV.4.1.1. Centrifugation différentielle

IV.4.1.2. Centrifugation en gradient de densité

IV.4.2. Centrifugation analytique

IV.4.2.1. Détermination du coefficient de sédimentation

IV.4.2.2. Détermination du poids moléculaire

Chapitre IV : Techniques électrophorétiques

IV.1. Définition et principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. C'est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle permet de déplacer des particules (ou molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective : les anions (chargés négativement) migrent vers l'anode (potentiel positif) et les cations (chargés positivement) migrent vers la cathode (potentiel négatif). En ce qui concerne les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules.

IV.2. Base théorique

IV.2.1. Equation de la dynamique et vitesse de migration

Une particule de rayon r et de charge électrique q, placée dans un champ électrique E, au sein d'un milieu neutre de viscosité η est soumise à une force F qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé comme le montre la figure IV.1.

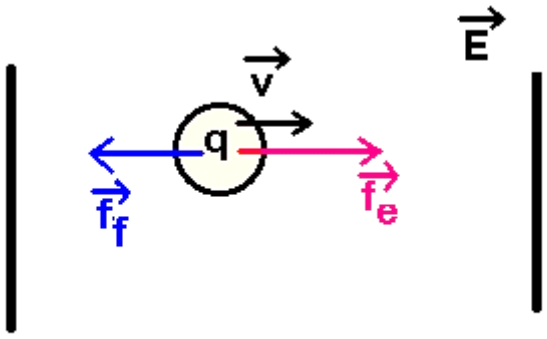


Figure IV.1. Dispositif d'électrophorèse

Les différentes forces exercées sur le mouvement de la particule en électrophorèse sont :

1- ***Force électrique*** **(F_e)** : elle est donnée par la formule suivante :

$$F_e = q\,E \qquad \text{(IV. 1)}$$

Avec :

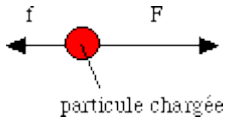
F_e : force électrique (N)

q : charge de la molécule (c)

E : intensité du champ électrique (volt/cm).

2- ***Force de frottement*** **(F_f)** : elle est due à la viscosité du milieu, elle est au sens opposé du mouvement de la particule. La force de frottement est exprimée par la relation suivante :

$$F_f = 6\,\pi\,\eta\,r\,v \qquad \text{(IV. 2)}$$



Avec :

v : vitesse de migration de la particule (m/s)

η : viscosité du milieu (Poiseuille = Pa.s = kg m^{-1}. s^{-1})

r : rayon de la particule (m)

- **Equation de la dynamique** : en appliquant un champ électrique, la vitesse de la particule s'accroit et tend très rapidement à une valeur limite (v) pour laquelle les deux forces (force électrique et force de frottement) s'équilibrent. La particule se déplace alors à vitesse constante. L'équation de la dynamique sera :

$$F_e + F_f = 0$$

$$q\,E = 6\,\pi\,\eta\,r\,v \qquad \text{(IV. 3)}$$

La vitesse limite s'écrit :

$$v = \frac{q\,E}{6\,\pi\,\eta\,r} \qquad \text{(IV. 4)}$$

IV.2.2. Mobilité électrophorétique U (ou µ)

La mobilité est une caractéristique de chaque particule. Elle représente la vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm. La mobilité électrophorétique est définie de manière indépendante du champ électrique, par la relation :

$$U = \frac{v}{E} \qquad \text{(IV. 5)}$$

$U = \frac{v}{E}$ $(= vitesse\ de\ migration\ pour\ un\ champ\ électrique\ de\ 1\ volt/cm)$

Soit encore :

$$U = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\,\pi\eta\,r} \qquad \text{(IV. 6)}$$

IV.3. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

IV.3.1. pH

La mobilité électrophorétique est étroitement dépendante du pH. Donc afin de maintenir un état d'ionisation constant le milieu doit être tamponné.

La charge q est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant. Pour les molécules de petite taille, on peut prévoir la valeur du pHi en calculant le pH isoionique, pH pour lequel la charge nette est nulle, à partir des pKa des différents groupements ionisables de la molécule ; mais cela n'est pas possible pour les macromolécules, car leur environnement ionique modifie notablement leur charge réelle.

La différence pH - pHi détermine le signe de la charge q d'une particule :

→ si pH > pHi charge nette négative (anion) migration vers l'anode

→ si pH < pHi charge nette positive (cation) migration vers la cathode

→ si pH = pHi charge nette nulle pas de migration

La différence pH - pHi détermine l'intensité de la charge q d'une particule : plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante.

La vitesse de migration augmente avec la charge nette de l'analyte qu'elle soit positive ou négative.

IV.3.2. Taille de la molécule

La vitesse dépend aussi de la taille des molécules. Les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. La mobilité électrophorétique diminue avec des molécules de grande taille, ceci est dû à l'accroissement des forces de friction et des forces électrostatiques exercées par le milieu. Les molécules de tailles similaires mais de formes différentes (protéines globulaires ou fibreuses) ont des migrations très différentes dues aussi aux forces de friction et aux forces électrostatiques.

IV.3.3. Support

Bien que les supports de migration soient relativement inertes, certains phénomènes peuvent être rencontrés :

- **Adsorption :** certains supports peuvent retenir des analytes par adsorption (présence de groupements fonctionnels : hydroxyles). Cette adsorption engendre des trainés de la migration entrainant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme. Le papier est le support qui présente le plus d'adsorption pour la plupart des molécules biologique ce qui limite son utilisation.
- **Tamisage :** les supports des gels réticulés (agarose, amidon, polyacrylamide) ressemblent à un tamis. De tels gels possédant une porosité donnée, facilitant la migration des petites molécules mais freinent celle des molécules de grandes tailles. Si la concentration augmente, le phénomène de tamisage accroît aussi de façon proportionnelle.

IV.4. Appareillage d'électrophorèse

L'appareillage usuel d'une électrophorèse est représenté sur la figure IV.2. Il est constitué de :

→ Un générateur du courant continu relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui permet la migration des molécules.

→ Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments contenant une solution tampon de migration.

→ Des accessoires comme le support d'électrophorèse, le couvercle, 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.

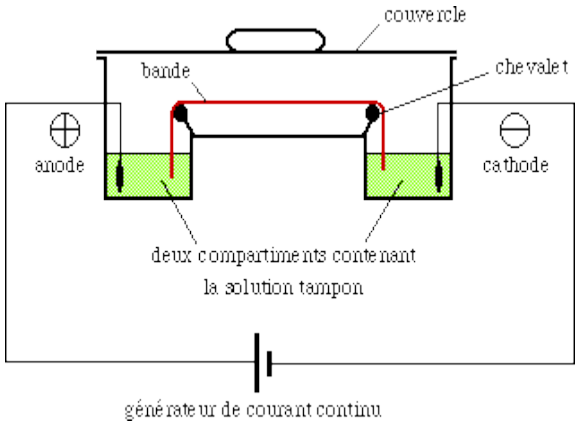


Figure IV.2. Dispositif expérimental d'électrophorèse

L'appareil d'électrophorèse peut avoir deux types de montage :

1- **Montage horizontal** : utilisé surtout pour les matrices en couche mince : silice, papier, acétate de cellulose. Les deux bouts de la matrice plongent dans une solution tampon (Figure IV.3). Les échantillons se déplacent sur la surface de la matrice en couche mine. Après séparation et coloration, la matrice peut être translucide par un traitement avec une huile appropriée ce qui permet la quantification.

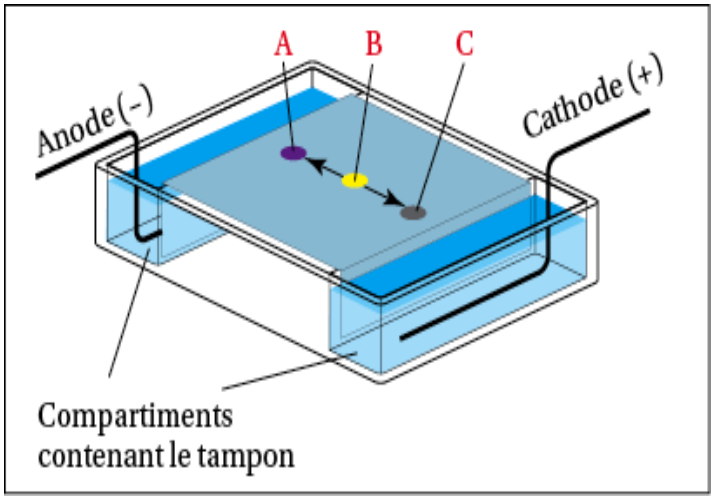


Figure IV.3. Electrophorèse sur couche horizontale

2- **Montage vertical** : utilisé surtout pour les matrices gels (gel d'amidon, gel d'agarose, gel de polyacrylamide. Pour ce type de montage, les échantillons se déplacent généralement à l'intérieur de la matrice. La matrice est préparée en formant une plaque de verre/gel/plaque de verre. Durant la gélification, des puits sont formés pour le dépôt des échantillons. Chaque extrémité du gel est en contact avec une solution tampon (Figure IV.4). Cette migration permettra la séparation de diverses espèces moléculaires qui migreront à des vitesses différentes. La révélation et l'analyse quantitative se fait par fluorescence.

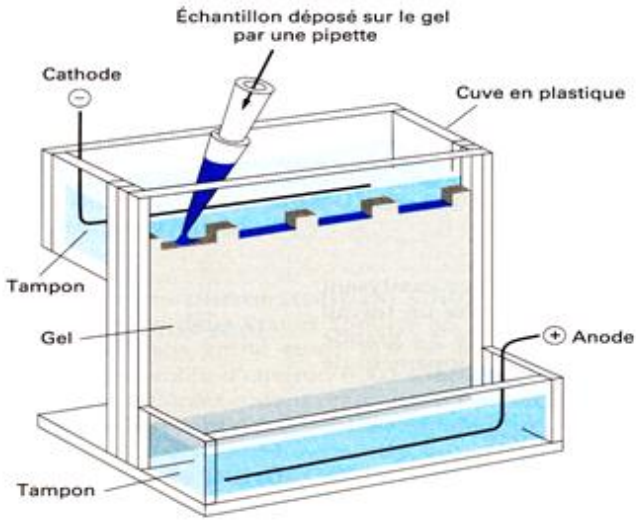


Figure IV.4. Electrophorèse sur couche verticale

IV.5. Différentes étapes d'électrophorèse

Elle se déroule en 3 étapes : le dépôt, la migration et la révélation.

1- **Dépôt** : quelques microlites du mélange à séparer sont déposés sous forme d'un trait à quelques centimètres d'une des extrémités du support préalablement imbibé par la solution tampon. L'extrémité du dépôt est le côté opposé du sens de migration des analytes au pH considéré. Exemple : afin de séparer les protéines sériques à pH 8.5, nous déposons le sérum près de la cathode, car à ce pH les protéines sériques sont chargées négativement et déplacent vers l'anode.

2- **Migration** : faire passer pendant un temps convenable (45 min), un courant adéquat (sous un voltage déterminé).

3- **Révélation** : le courant est interrompu, le support est retiré et les différentes fractions sont révélées sous forme de zones (bande de migration) à l'aide d'un réactif approprié qui se lie fortement aux macromolécules donnant une certaine couleur ou qui provoque une fluorescence.

IV.6. Types d'électrophorèse

IV.6.1. Électrophorèse de zones

C'est la forme la plus simple d'électrophorèse. Elle est utilisée pour des séparations analytiques comme elle peut être utilisée pour des séparations préparatives. Les principales applications utilisent 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 convenable, poreux, inerte et imprégné de tampon (papier, dérivés de cellulose, polyoside « agarose », polyacrylamide...). Les fractions séparées par électrophorèse de zone migrent comme des zones individuelles.

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.). Les principales électrophorèses zonales sont : électrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose et polyacrylamide).

IV.6.1.1. Electrophorèse sur couche mince

Selon la nature du support on distingue :

A. **Electrophorèse sur papier :** peu résolutive, elle servait surtout à séparer des molécules de petites tailles (acides aminés) et peut être utilisée pour de grosses molécules (protéines). Le dépôt et la migration des échantillons se font en surface sur un montage horizontal (rarement vertical). Parmi ses inconvénients : phénomènes d'absorption et grande quantité d'échantillon à analyser.

B. **Electrophorèse sur acétate de cellulose** : Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement certain type de macromolécules (groupes de protéines). Elle utilise des feuilles d'acétate de cellulose fines très poreuses et fragiles. Le dépôt et la migration se font sur un montage horizontal.

C. **Electrophorèse sur silice :** très résolutive, elle permet de séparer les macromolécules protéiques. Elle utilise des couches minces de silice préparées sur plaque de verre. Après dépôt des échantillons, les deux extrémités de plaque (déposée horizontalement) sont reliées au tampon d'électrophorèse par du papier filtre imbibé du même tampon.

IV.6.1.2. Electrophorèse sur gel

L'utilisation de gels a remplacé les supports poreux, utilisés en couche mince, pour la séparation de substances à hauts poids moléculaire (protéines, acides nucléiques, polysaccharides). Grace à leurs propriétés physiques, leur hydrophilie et leur insolubilité dans l'eau, les gels permettent une meilleure résolution comparés aux supports utilisés en couche mince. Selon la nature du gel utilisé, on distingue :

A. **Electrophorèse sur gel d'amidon** : Elle est particulièrement utile pour l'analyse et la séparation des isoenzymes. Elle utilise des gels préparés à partir d'un amidon partiellement hydrolysé. Ces gels forment des matrices à porosité variable selon la concentration des solutions d'amidon utilisées.
B. **Électrophorèse sur gel d'agarose** : Elle est utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les protéines, l'ADN, l'ARN en fonction de leurs poids moléculaires. Les gels d'agarose ont de grands pores et sont utilisés essentiellement pour séparer les macromolécules d'un poids moléculaire supérieure à 200 kDa. Ce gel est utilisé sur une plaque en verre horizontale à cause de sa faible adhésion sur le verre.
C. **Électrophorèse sur gel de polyacrylamide** : Elle est couramment utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques de petite taille (particulièrement en séquençage). Le gel de polyacrylamide est polymérisé entre deux plaques de verre ou à l'intérieur des tubes cylindriques de verre, où il forme un gel poreux. L'échantillon est déposé dans des puits localisés au sommet du gel en montage vertical.

IV.6.2. Focalisation isoélectrique

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). Les protéines et autres molécules amphotères peuvent être séparées dans un gradient de pH où la région anodique est à un pH inférieur à celui de la région cathodique.

Au-dessous de leur point isoélectrique les analytes sont chargés positivement, ils migreront vers la cathode. Au cours de leur déplacement, ils rencontrent un milieu dont le pH augmente progressivement. Arrivées dans une certaine zone où le pH = pHi, les analytes sont à l'état de Zwitterion et leur mouvement cesse. Les analytes ayant un point isoélectrique différents forment des bandes stationnaires dans le gradient de pH (focalisation des bandes). Le dépôt peut être proche de l'anode, proche de la cathode ou au milieu (figure IV.5). Il s'agit d'une méthode à haute résolution qui peut aller jusqu'à 0.01 unité de pH ce qui permet de séparer des analytes de petites différences de pHi.

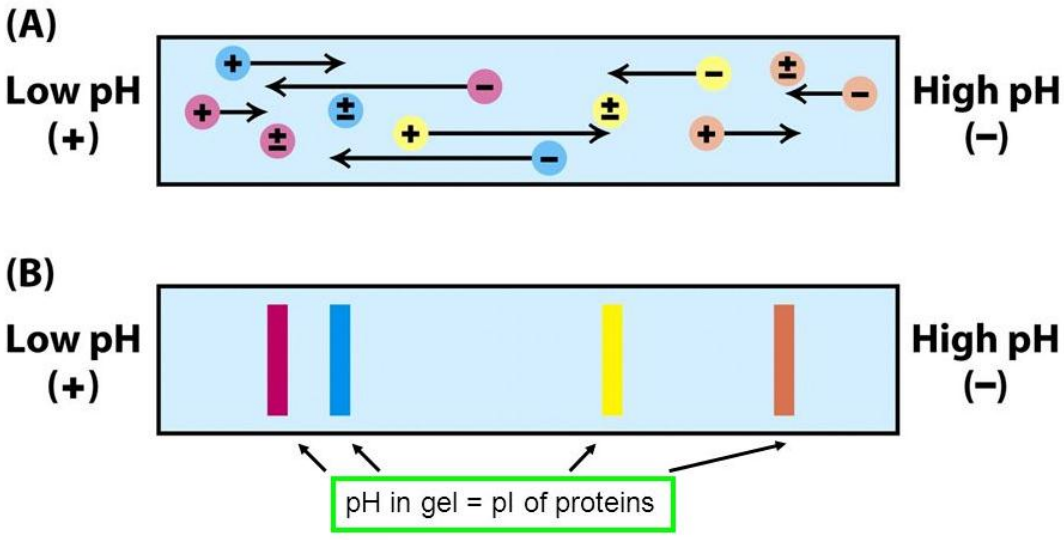


Figure IV.5. Focalisation isoélectrique

IV.7. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et estimation du poids moléculaire

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) connue sous le nom SDS-PAGE (PAGE : poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) est la méthode la plus employée pour séparer et déterminer le poids moléculaire des protéines.

L'électrophorèse SDS-PAGE, repose comme toute technique électrophorétique, sur la séparation de molécules chargées dans un champ électrique. La particularité de cette technique est de soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant avec le SDS et le β mercaptoéthanol.

Le dodécylsulfate de sodium est un détergent anionique (CH_3-$(CH_2)_{10}$-CH_2-O-SO_3^- Na^+). Il se fixe sur la périphérie des chaines de protéines tout en leur conférant une charge négative. Donc, la structure spatiale des protéines sera détruite comme le montre la figure IV.6. Le SDS forme une micelle qui se déplace vers l'anode (+), dont la charge négative est proportionnelle à la longueur de la chaine peptidique c-à-d, à la masse de la protéine.

De plus pour dénaturer les protéines, on utilise à la fois un détergent comme le SDS et un agent réducteur comme le β- mercaptoéthanol 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.

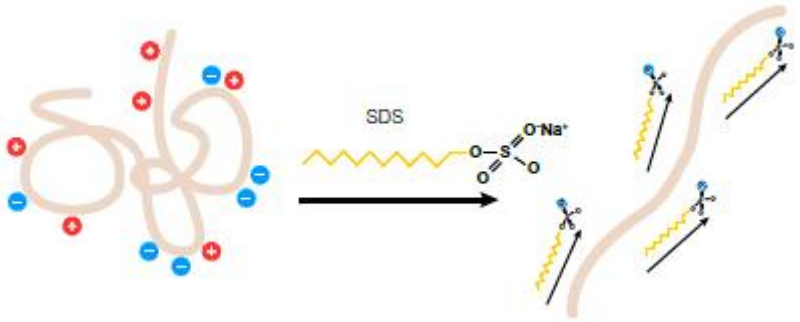


Figure IV.6. Destruction de la structure de la protéine en présence de SDS

Le fait que le SDS rende toutes les molécules négatives, la séparation sera alors uniquement en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la masse

moléculaire et le rapport frontal : R_f (R_f = distance de migration d'un composé/ front de migration (fm)).

Il est donc possible de calibrer les distances de migration avec des marqueurs de poids moléculaire connu et de déterminer par extrapolation celui d'une protéine inconnue (Figure IV.7).

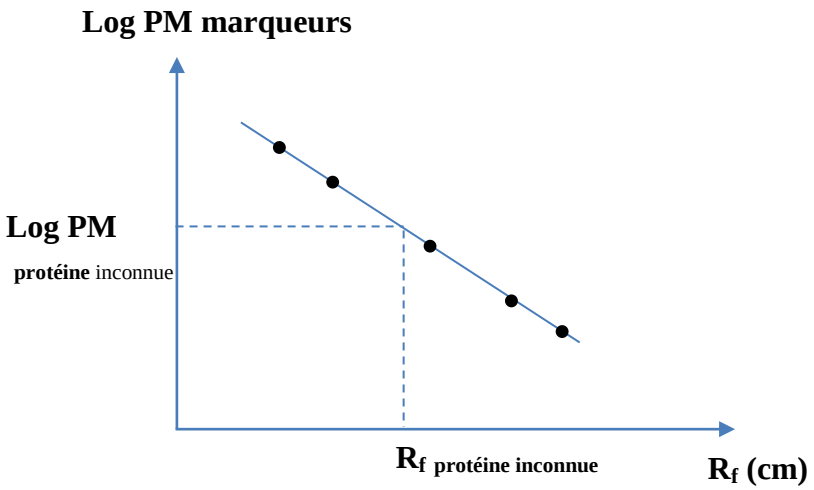


Figure IV.7. Variation de log (PM) en fonction du rapport frontal

Mobilité relative des analytes

Pour pouvoir déposer, lorsque les puits sont recouverts par le tampon, la densité des échantillons est artificiellement augmentée par addition de saccharose ou de glycérol (10, 15%). Un marqueur électrophorétique (colorant) est souvent utilisé pour déceler une anomalie de migration. Il peut être additionné à l'échantillon ou utilisé seul.

Le calcul de la mobilité relative des différents analytes est établi par rapport à la migration du marqueur. Ainsi, si U_i représente la mobilité de l'analyte i, sa mobilité relative U_{ri} est donnée par la relation :

$$U_{ri} = U_i / U_d = d_i / d_d \qquad \text{(IV.7)}$$

U_d : mobilité du marqueur

d_i et d_d : distances de migration de l'analyte i et du marqueur

Chapitre

V

Techniques de séparation membranaires

V.1. Définition

V.2. Composés séparés et type de séparation membranaire

V.3. Ultrafiltration

V.3.1. Définition

V.3.2. Propriétés des membranes

V.3.3. Théorie

V.3.3.1. Polarisation de concentration

V.3.3.2. Problème technique

V.3.3.3. Variation du débit en fonction de pression

V.3.3.4. Sélectivité

V.3.3.5. Seuil de coupure

V.4. Mode d'écoulement d'ultrafiltration : Tangentiel/ Frontal

Chapitre V : Techniques de séparation membranaires

V.1. Définition

Les méthodes de séparation membranaire sont des procédés de séparation utilisant comme agent séparant une membrane synthétique qui est une couche mince de matière. Elle permet l'arrêt ou le passage sélectif de certaines substances dissoutes ou non dans un mélange en fonction de leur taille. L'épaisseur d'une membrane peut varier entre 100 nm et jusqu'à un peu plus de 1 cm. La partie du mélange retenue par la membrane est appelée rétentat (ou concentrat) alors que celle qui traverse cette dernière est appelée perméat. La séparation se fait sous l'action d'une force motrice de transfert selon un mécanisme de séparation défini. Les caractéristiques des membranes sont déterminées par deux paramètres : la perméabilité et la sélectivité.

V.2. Composés séparés et type de séparation membranaires

Les mélanges à séparer peuvent être :

→ Homogènes : liquides miscibles ou gaz-gaz (perméation gazeuse...).

→ Hétérogènes : liquides non miscibles, liquide-solide, liquide-gaz.

Les méthodes de séparation membranaires sont classées selon la taille des composés à séparer. Les principales méthodes sont regroupées dans le tableau suivant :

Taille des composés à séparer (nm)	Type de composés à séparer	Exemples de méthodes de séparation membranaire
$> 10^4$	Particules fines ou grossières : sable, levure, pollen, cheveux, poil	Filtration et tamisage
10^4 - 10^2	Microparticule, macromolécules (polymères), microorganismes, quelques virus, colloïdes	Microfiltration
10^2 - 10^0	Nanoparticules, macromolécules, la plupart des virus	Ultrafiltration
10^0 - $10^{-0.5}$	Molécules	Nanofiltration, osmose inverse
$< 10^{-0.5}$	Molécules, sels dissous	Pervaporation, osmose inverse

V.3. Ultrafiltration

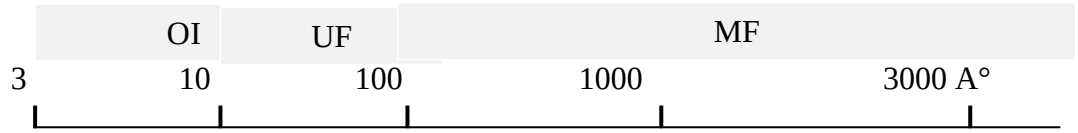
V.3.1. Définition

L'ultrafiltration (UF) est une méthode de séparation membranaire par laquelle des particules en solution ou en suspension (nanoparticules, macromolécules, la plupart des virus) sont séparées du mélange liquide (sang, eau, lait, etc.) qui les contenait en fonction de leur taille.

Elle fait appel à des membranes à perméabilité sélective qui permettent à toute substance de taille inférieure à celle des pores de la membrane de passer. Les molécules de plus grandes tailles sont alors retenues mais aussi concentrées puisque la membrane est perméable au solvant. Une pression est exercée sur la solution à filtrer.

L'UF couvre un très large domaine de masse moléculaire (500 à 1 000 000 Da soit une taille de 1 à 20 nm). Ce domaine d'application permet de la situer entre celui de

l'osmose inverse où les sels sont retenus et celui de la microfiltration où la taille des pores varié de 0.01 à 10µm.



L'ultrafiltration est utilisée pour retenir des espèces chimiques de différentes natures :

- Virus et bactéries,
- Macromolécules : enzymes, protéines, polysaccharides, polymères variés….
- Macro-solutés plus au moins nocifs, présents dans les effluents industriels ou dans l'eau destinée à un usage médical,
- Alcool polyvinylique dans les eaux de mère de l'industrie de textile,
- Substances huileuses maintenues en suspension dans l'eau.

V.3.2. Propriétés des membranes

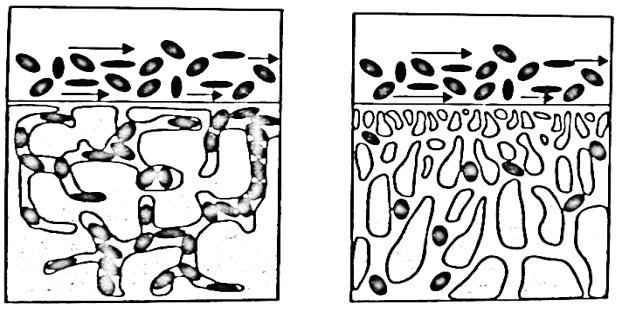
Les membranes sont des matériaux poreux ou denses composés de matières minérales ou organiques ou hybrides, homogènes ou plus généralement composites. Il existe différents types de membranes :

- Les membranes minérales (ou inorganique)
- Les membranes organiques

Les principaux avantages et incovénients des memebranes minérales et organiques sont donnés dans le tableau suivant :

Type de membrane	Exemple	Avantages	Inconvénients
Membranes organiques	Cellulosique	-Perméabilité sélective, -Sélectivité élevée, -Mise en ouevre aisée, -Peu couteuse, -Faibled'adsorption (Protéines)	-Sensible à la température (≤30°C), -Sensible au pH=3 et 8, Optimum (5-6) -Sensible au chlore -Sensible au compactage -Sensible aux µO
	Polymère	- Meilleure stabilité chimiqe (pH) - Meilleure stabilité thermique - Meilleure stabilté mécanique	Exemple : Polyamide -Sensible au chlore -Faible perméabilité -Adsorbent les protéines
	Téflon	-Résistant aux agents corrosifs -Résistance thermique (à 70°C) -Résistance mécanique élevée	//
Membranes Minérales		-Résistant aux pH 1-14 -Résistance thermique (0-200°C) -Résistance mécanique élevée (jusqu'à 300 bars)	//

La structure des membranes filtrantes se différencie de celle des microfiltres par le fait qu'elle présente une surface anisotropique capable de retenir les composés à la surface et non à l'intérieur (Figure V.1). Cette propriété facilite la passage des molécules au travers de la membrane.



Filtre microporeux Membrane anisotropique

Figure V.1. Structure des memebranes et des filtres

Ainsi, l'élevation de la concentration des espèces dissoutes retenues sur la membrane est désignée par le terme de polarisation de surface. L'accumulation des molécules sur la membrane tend à déminuer le débit de filtration. Cette diminution varié de manière logarithmique en fonction de la concentration des espèces retenues.

Cette accumulation engendre la formation d'une couche gélatineuse augmentant ainsi la rétention des microsolutés qui ne peuvent plus passer normalement à travers la membrane. Le contrôle de la polarisation de surface s'effectue grâce à un appreillage chargé d'éloigner ces molécules de la surface filtrante et de les remettre en suspension. Le mouvement est obtenu par différentes techniques, toutes basées sur la recirculation de la masse de matière à ultrafiltrer.

V.3.3. Théorie

***Porosité* :** rapport entre le volume total des pores et le celui du matériau,

Densité des pores : nombre de pores par unité de surface de la membrane,

Hétéroporosité : distribution des pores selon leur diamètre,

V.3.3.1. Polarisation de concentration

La pression s'exercant sur la solution à filtrer crée un flux de solides et d'eau vers la surface de la membrane. Il s'établit alors un gradient de concentration, la concentration maximale de soluté étant à la surface de la membrane. Ce phénomène est appelé polarisation de concentration. Le flux J est la mesure du débit ramené à l'unité de surface ($dm^3/h/m^2$) (ou $m^3/h/m^2$, $l/h/m^2$) et peut se calculer par :

$$J = K\ ln\frac{C_G}{C_B} = k\ ln\frac{\text{Cm} - \text{Cp}}{C_{\ 0} - \text{Cp}} \qquad \text{(V. 1)}$$

K : coefficient de transfert de masse du soluté ;

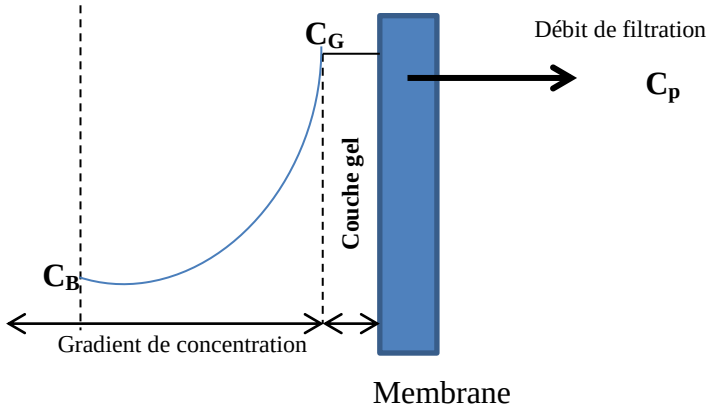
C_G : concentration du soluté de la couche gel ;

C_B : concentration totale de soluté ;

($C_G = C_m - C_p$) : C_p : concentration à la sortie,

C_m : concentration à la membrane (dépend de T et pH)

($C_B = C_0 - C_p$) : C_0 : concentration initiale,



V.3.3.2. Problème technique

Les effets de la polarisation sont limités par des méthodes visant à réduire l'épaisseur de la couche de gel. La méthode la plus courante est la filtration tangentielle. Le liquide à traiter circule en balayant la surface membranaire et entraine tout amas pouvant s'y être formé. Le principe peut se schématiser ainsi (Figure V.2) :

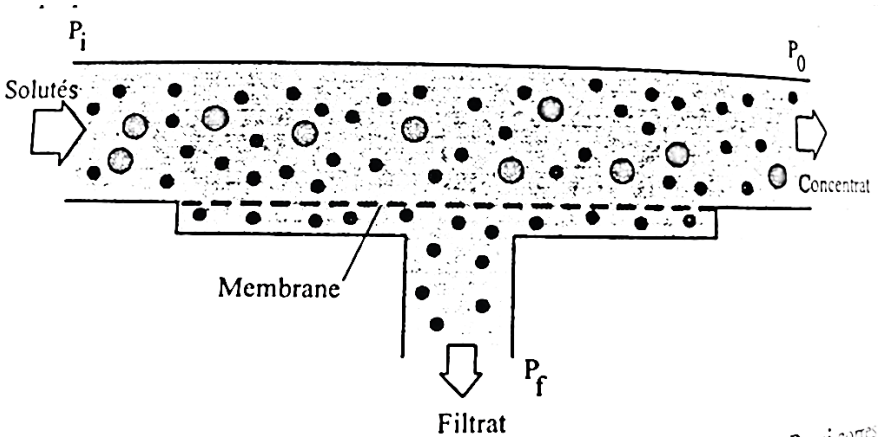


Figure V.2. Principe de filtration tangentielle

Lors de la filtration du liquide à traiter, il se produit une perte de charge :

$$\Delta P = P_i - P_0 \qquad (V.2)$$

P_i : pression initiale,

P_0 : pression à la sortie

La force qui véhicule les molécules à travers la membrane est P_f. On définit une pression moyenne transmembranaire égale à :

$$\Delta P_{TM} = \frac{P_i - P_0}{2} - P_f \qquad (V.3)$$

En général, la sortie du filtrat étant à pression atmosphérique P_f égale à 0, d'où :

$$\Delta P_{TM} = P_i - \frac{\Delta P}{2} \qquad (V.4)$$

Du point de vue pratique, le débit J varie en fonction de ΔP_{TM} par la relation suivante :

$$J = \frac{\Delta P}{R_m + R_G} \qquad (V.5)$$

R_m : résistance membranaire, cette dernière est considérée constante ;

R_G : résistance de la couche gel, elle augmente avec la formation du gel ;

V.3.3.3. Variation du débit en fonction de ΔP

Nous avons une variation linéaire du flux en fonction de ΔP jusqu'à un certain point correspondant à la formation de gel (Figure V.3). L'accroissement de la résistance de la couche de gel atteint un maximum jusqu'à un maximum (J_{lim}) et devient indépendant de ΔP. Enfin : le flux limite décroit régulièrement, c'est le Colmatage de la membrane.

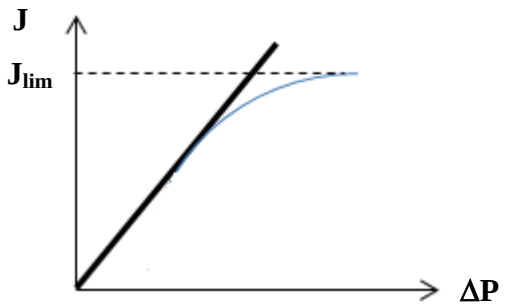


Figure V.3. Variation du flux en fonction de ΔP

V.3.3.4. Sélectivité

La sélectivité d'une membrane est, en général, définie par le taux de rejet (appelé aussi taux de rétention) de l'espèce (sel, macromolécule, particule) que la membrane est censée retenir :

$$r = 1 - (C_p/C_0) \qquad (V.6)$$

C_0 = concentration de l'espèce à retenir dans la solution

C_p = concentration de la même espèce dans le perméat

V.3.3.5. Seuil de coupure

Dans le cas de l'ultrafiltration, l'efficacité de la membrane est, en général, caractérisée par le seuil de coupure (cut-off en anglais). Il s'agit de la masse molaire (g/mol) correspondante à une rétention pratiquement totale (90 % le plus souvent)

d'une macromolécule déterminée. Celle-ci se mesure en g/mol ou en Da. Le seuil de coupure peut être déterminé graphiquement par le tracé du taux de rejet TR en fonction de la masse molaire du soluté.

Seuil de coupure : masse molaire du soluté le plus petit retenu à 90 %

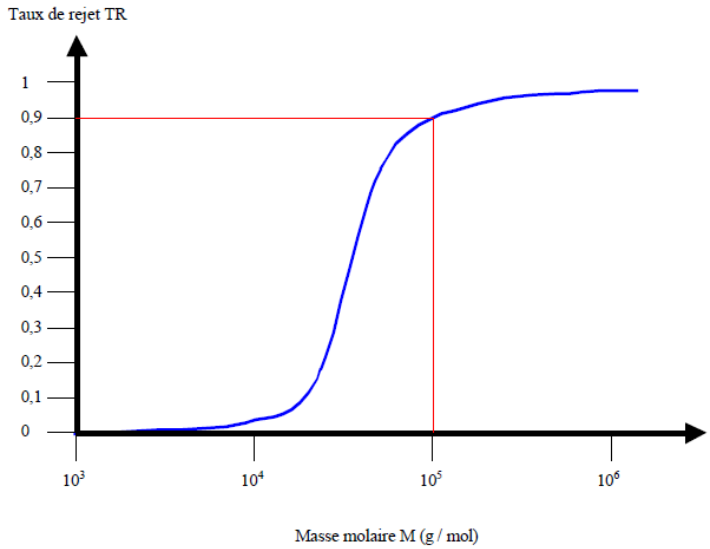


Figure V.4. Variation du taux de rejet en fonction de la masse molaire

Le seuil de coupure (cut-off) indique la taille à partir de laquelle les molécules seront entièrement retenues. Le seuil de coupure est une masse moléculaire (ex: seuil = 15 000, signifie que toutes les molécules dont la masse moléculaire est supérieur à 15 000 seront retenues à 100%).

V.3.3.6. Mode d'écoulement d'ultrafiltration : Tangentiel / Frontal

L'ultrafiltration et les autres procédés de séparation par membrane mettant en jeu un gradient de pression peuvent être conduits selon deux modes d'écoulement en fonction des contraintes, et notamment de la qualité de l'effluent à traiter, et/ou des objectifs à atteindre : la filtration tangentielle ou la filtration frontale.

Lors de filtrations menées en mode tangentiel (Figure V.5.a), le fluide circule parallèlement à la membrane entraînant ainsi un cisaillement qui permet de limiter l'accumulation de matière.

En mode frontal (Figure V.5.b), la filtration s'effectue perpendiculairement à la surface de la membrane ; ainsi, toute la matière entrant dans le module de filtration et retenue par la membrane s'accumule à sa surface.

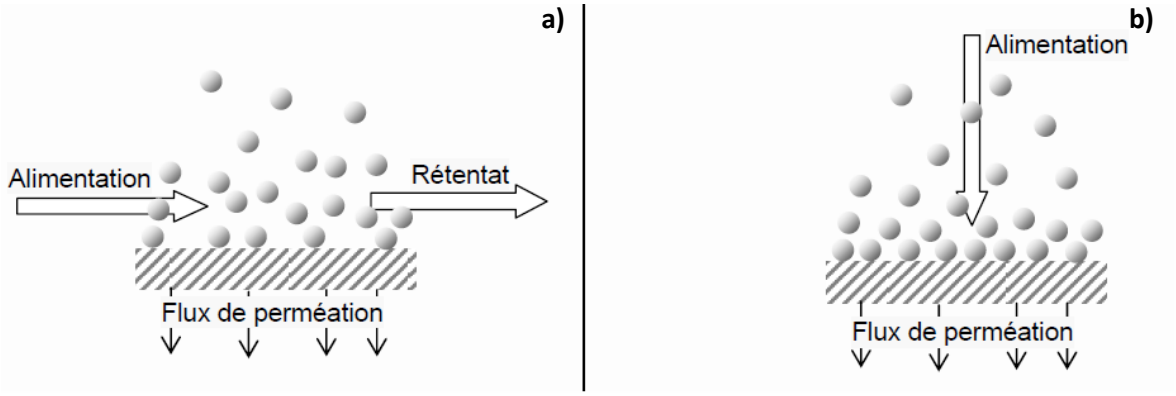


Figure V.5. Filtration tangentielle (a) et filtration frontale (b)

Références bibliographiques

1- *Herrnanns, J. J.; Ende, H. H. In Newer Methods of Polymer Characterisation (B. Ke, Ed.) Interscience, London and New York. 1964, p. 525.*

2- Jean-Pierre SINE, Séparation et analyse des biomolécules, Méthodes physicochimiques, cours et exercices, Elipses édition Marteking S, A, 2003.

3- Michel Jaffrin, Procédés de filtration membranaires, Ebook at Bookboon, 1ère édition 2014.

4- Akira Kotera, Fractionnal Precipitataion, Chapter B.1. Departement of chemistry, Japan.

5- Gilles Camus, L'électrophorèse, Planet-Vie, 20 janvier 2019, https://planetvie.ens.fr/article/1500/electrophorese,

6- Schwartz D-C., Cantor C-R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984, 37: 67-75.

7- Guastalla, Jean Salvinien, Jean Moretti, « ÉLECTROPHORÈSE», Encyclopædia Universalis, consulté le 20 février 2018.

8- 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.

9- DESCLAUX Sandrine., 2003 - Techniques séparatives à membranes. Technique de l'ingénieur, 2003 volume J 3, n° J2731. P 8.