

POLYCOPIE DE COURS DE TECHNIQUES D'ANALYSE

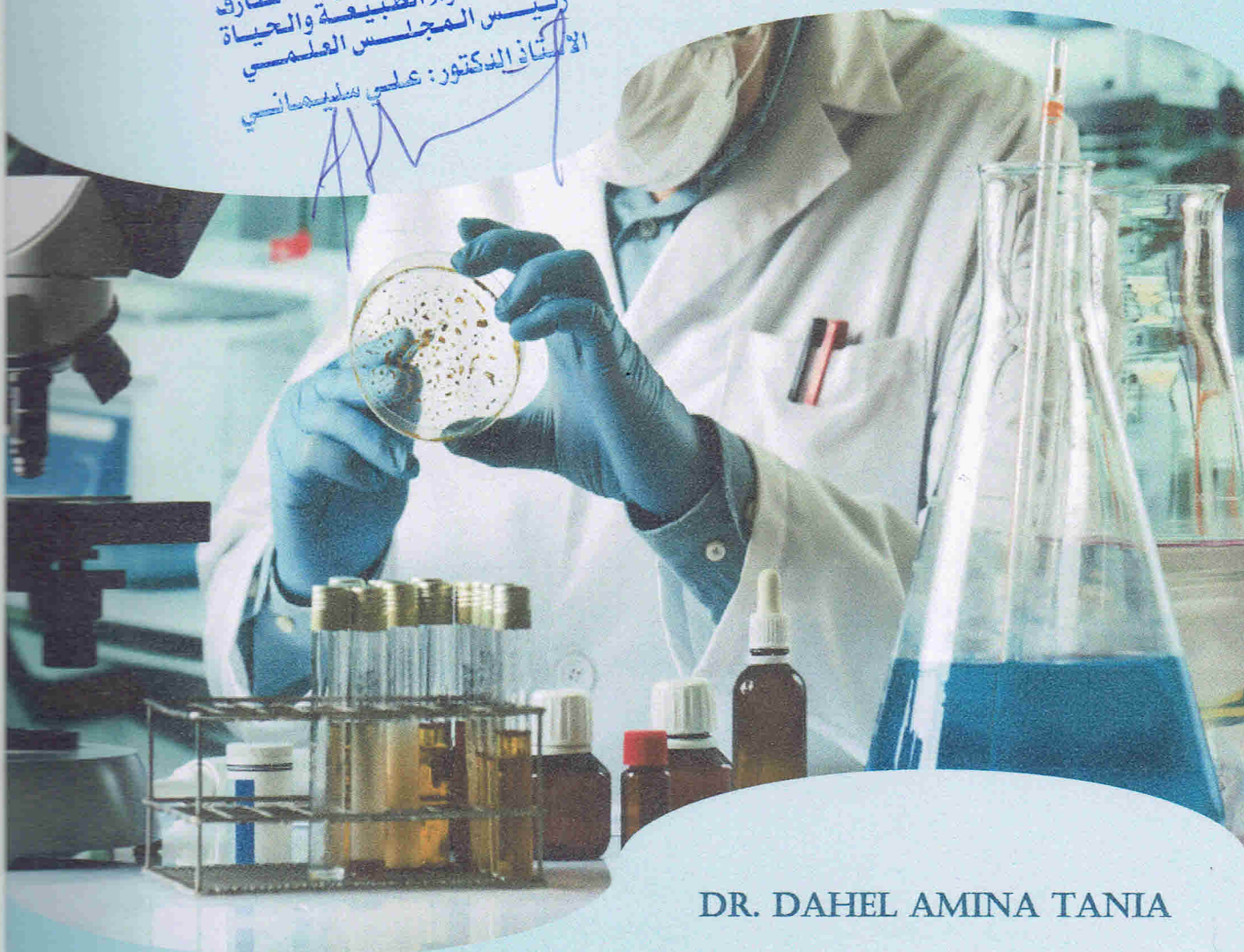


DR. DAHEL AMINA TANIA

3^{ÈME} ANNÉE LICENCE
HALIEUTIQUE
BIOLOGIE ET ECOLOGIE DES MILIEUX AQUATIQUES
AQUACULTURE ET PISCICULTURE

POLYCOPIE DE COURS DE TECHNIQUES D'ANALYSE

جامعة الشاذلي بن جديد - الطارف
كلية علوم الطبيعة والحياة
رئيس المجلس العلمي
الأستاذ الدكتور: عاصمي سليمان نسي



DR. DAHEL AMINA TANIA

3^{ÈME} ANNÉE LICENCE
HALIEUTIQUE
BIOLOGIE ET ECOLOGIE DES MILIEUX AQUATIQUES
AQUACULTURE ET PISCICULTURE

Avant-propos

Ce polycopié de cours s'adresse aux étudiants inscrits en troisième année licence, des trois spécialités, Halieutique; Biologie et Ecologie des Milieux Aquatiques; et Aquaculture et Pisciculture de la filière d'Hydrobiologie Marine et Continentale; du domaine des Sciences de la Nature et de la Vie. Son contenu est conforme aux programmes officiels selon les nouveaux canevas ministériels de 2018-2019. Il est rédigé dans le but de permettre aux étudiants d'avoir un outil de travail et de référence recouvrant les connaissances qui leurs sont demandées.

Le manuscrit commence par quelques définitions avant d'entamer, les cinq parties dans lesquelles les principales méthodes d'analyse sont décrites et étudiées, permettant aux étudiants de maîtriser des techniques d'analyse biologique et de connaître l'application des différents appareils biochimiques.

Dr. DAHEL Amina Tania

TABLE DES MATIERES

Cours 1: Techniques d'analyse		
1.	Définition.	1
2.	Méthodes et moyens d'analyse.	2
3.	Les avantages et les inconvénients des techniques d'analyse.	4
Cours 2: Méthodes chromatographiques		
1.	Définition.	8
2.	Les différentes méthodes chromatographiques.	11
2.1.	La Chromatographie en phase liquide (CPL).	13
2.1.1.	La Chromatographie d'adsorption.	13
2.1.2.	La Chromatographie par perméation sur gel (chromatographie d'exclusion).	15
2.1.3.	La Chromatographie par échange d'ions.	17
2.1.4.	La Chromatographie d'affinité.	20
2.1.5.	La Chromatographie de partage	23
2.2.	La Chromatographie en phase gazeuse (CPG).	31
Cours 3: Méthodes électrophorétiques		
1.	Définition.	36
1.1.	Principe	37
1.2.	Paramètres et conditions de réalisation	38
1.3.	Les supports électrophorèses	39
2.	Différents types d'électrophorèse et leurs applications.	42
2.1.	Electrophorèse de zone	42
2.1.1.	Electrophorèse sur papier.	42
2.1.2.	Electrophorèse sur acétate de cellulose.	43
2.1.3.	Electrophorèse sur gel.	47
2.1.3.1.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE	49
2.1.3.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose.	53
2.1.3.3.	Isoélectrofocalisation	54
2.1.3.4.	Electrophorèse bidimensionnelle	56
2.1.3.5.	Immuno-électrophorèse	58
Cours 4: Méthodes spectrales		
1.	Définition de la spectrophotométrie.	62
1.1.	Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.	64
1.1.1.	Définition.	64
1.1.2.	Types d'appareillages.	65
1.1.3.	Application.	67
1.2.	Spectrophotométrie atomique.	68
1.2.1.	Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).	68
1.2.1.1.	Principe et appareillage.	69
1.2.1.2.	Application.	70
1.2.2.	Spectrophotométrie d'émission atomique (SEA).	71
1.2.2.1.	Principe et appareillage.	71
1.2.2.2.	Application.	73
1.3.	Résonance magnétique nucléaire.	74
1.3.1.	Principe.	74
1.3.2.	Appareillage.	75

1.3.3.	Application.	77
Cours 5: Microscopie électronique		
1.	Le microscope électronique.	78
1.1.	La microscopie électronique à transmission (MET).	80
1.1.1.	Description de l'appareil.	80
1.1.2.	Principe de fonctionnement	82
1.1.3.	Préparation des échantillons.	84
1.2.	La microscopie électronique à balayage (MEB).	86
1.2.1.	Description de l'appareil.	86
1.2.2.	Principe de fonctionnement.	89
1.2.3.	Préparation des échantillons.	91
Cours 6: Méthodes immunologiques		
1.	La radio-immunologie.	95
1.1.	Principe.	95
1.2.	Différents types d'immunodosages.	95
1.3.	Application.	97
2.	L'immun-enzymatique (ELISA).	98
2.1.	Principe.	98
2.2.	Application	100
3.	L'immunofluorescence.	101
3.1.	Principe.	101
3.2.	Différents types d'immunofluorescence	101
3.3.	Application.	102
	Références bibliographiques.	103

LES TECHNIQUES D'ANALYSE

Introduction :

L'identification d'une espèce chimique ou biochimique, ainsi que la détermination de sa quantité ou de sa concentration, peuvent être réalisées soit à l'aide d'instruments analytiques tels que les chromatographes et les spectromètres, soit au moyen de capteurs. Les instruments analytiques se distinguent par leur complexité, leur coût élevé et leur mise en œuvre souvent contraignante. De plus, leur encombrement et leur consommation énergétique importante les rendent peu adaptés aux analyses sur site. Leur temps de réponse est généralement long en raison des étapes préalables nécessaires, telles que la préparation des échantillons, l'étalonnage et l'acquisition des résultats. Toutefois, leur principal atout réside dans leur capacité à fournir une analyse complète et détaillée.

1. Définition.

Ce sont les différentes procédures et méthodes qui permettent la séparation, l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange gazeux, liquides solides... parmi ces techniques, il y a :

La chromatographie,

L'électrophotométrie,

La spectrométrie,

L'immunologie

Et la microscopie électronique.

2. Méthodes et moyens d'analyse.

2.1. Etapes de base des méthodes analytiques.

Les techniques d'analyse, sont relativement nombreuses. A côté des méthodes traditionnelles de culture ou des méthodes basées sur l'observation microscopique, de nouvelles techniques sont apparues. Chacune de ces méthodes possèdent des avantages et des inconvénients, mais toutes passent par les mêmes étapes (fig.1) :

a. Demande analytique:

Expression d'un besoin d'analyse par un professionnel (chercheur, médecin, biologiste, etc.), précisant les objectifs et les paramètres à étudier.

b. Prélèvement:

Collecte de l'échantillon à analyser à partir d'une source spécifique (eau, sol, tissu biologique, etc.), en respectant les conditions de conservation et de transport.

c. Traitement:

Préparation de l'échantillon avant analyse (filtration, dilution, extraction, etc.) afin d'éliminer les interférences et d'optimiser la mesure des composants d'intérêt.

d. Séparation:

Isolement des composants de l'échantillon à l'aide de techniques analytiques (chromatographie, électrophorèse, centrifugation, etc.) pour améliorer la spécificité de l'analyse.

e. Détection:

Identification et quantification des composés par des méthodes adaptées (spectroscopie, fluorescence, conductimétrie, etc.), en fonction des propriétés des substances étudiées.

f. Traitement du signal:

Conversion et amplification des signaux obtenus par les instruments de mesure pour les rendre exploitables et comparables aux valeurs de référence.

g. Traitement des données:

Analyse et interprétation des résultats bruts à l'aide de modèles mathématiques ou statistiques pour assurer leur précision et leur validité.

h. Résultats:

Présentation des données finales sous forme de valeurs quantitatives ou qualitatives, souvent accompagnées d'un rapport d'analyse et d'une interprétation scientifique.

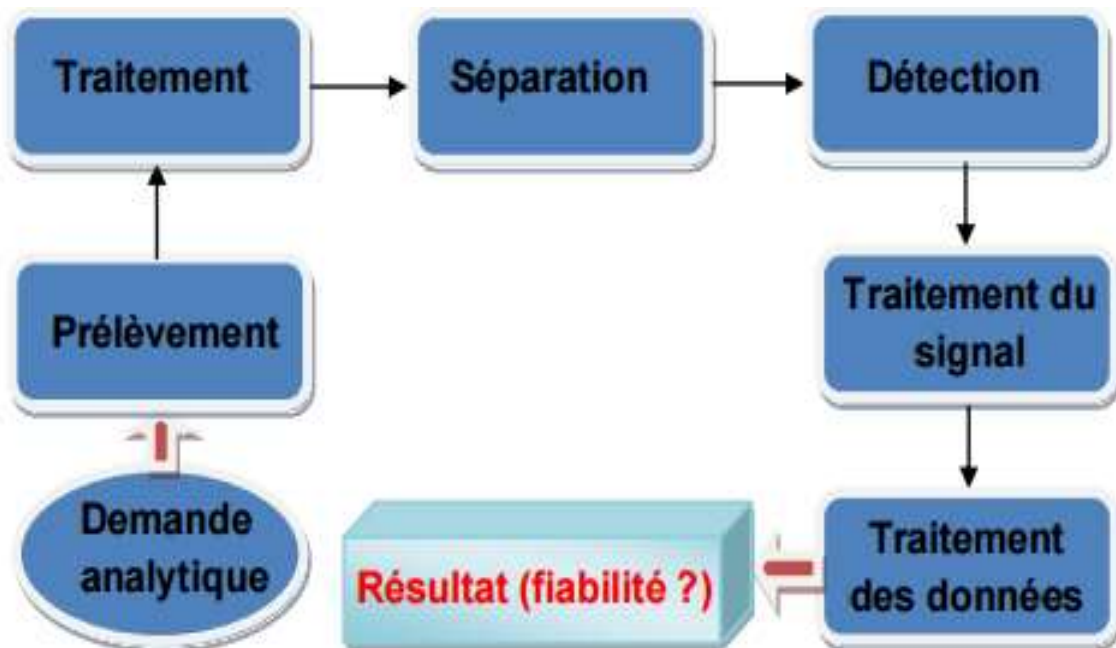


Figure 1 : Etapes d'une méthode analytique.

2.2. Les techniques et méthodes d'analyses.

a. Méthodes chromatographiques :

Servent à séparer les différentes substances colorées présentes dans un mélange.

b. Méthodes électrophorétiques :

Permettent la séparation de particules chargées électriquement sous l'action d'un champ électrique.

c. Méthodes spectrales :

Servent à décrire et à interpréter les signaux dans le domaine des fréquences.

d. Microscopie électronique :

Méthode qui associe les lentilles électromagnétiques et un faisceau d'électrons (alors qu'un microscope optique utilise un faisceau de lumière et des lentilles en verre). Sa résolution ou le grossissement atteint 2 millions de fois, contre 2.000 fois avec un microscope optique.

e. Méthodes immunologiques :

Basés sur la réaction spécifique entre un antigène et un anticorps, c'est les biomolécules impliquées dans le système immunitaire, pour la détection et quantification d'antigènes.

3. Les avantages et les inconvénients des techniques d'analyse.

3.1. Inconvénients.

Ils sont complexes, coûteux, difficiles à mettre en œuvre, volumineux et ont besoins de sources d'énergie importantes, demandent un temps de réponse

très longs (préparation des échantillons, étalonnage, durée de l'analyse, sortie des données...).

3.2. Avantage capital.

La conception de ces instruments d'analyse permet d'obtenir une analyse complète.

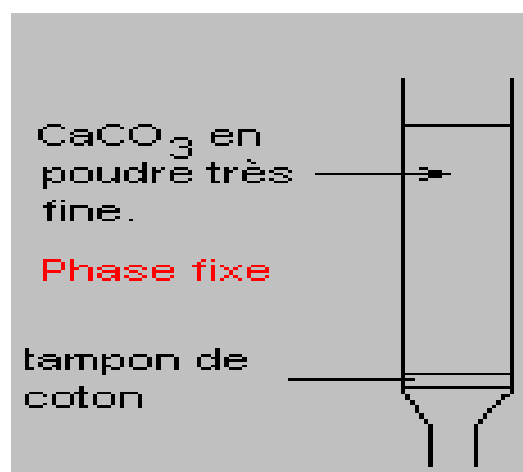
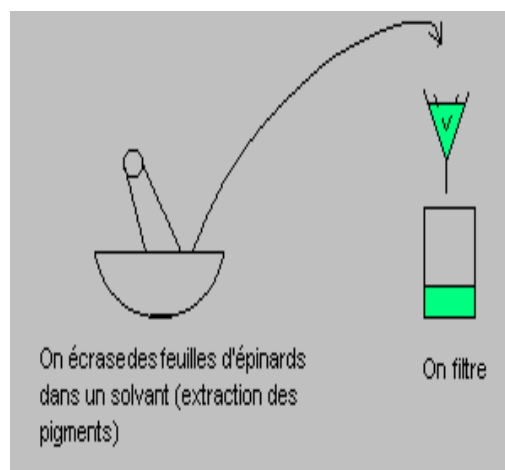
METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Introduction :

La **chromatographie** vient du grec ancien *chrôma* et désigne le mot « couleur ».

✓ Historique :

Le terme de "chromatographie" a été créé par Mikhaïl TSWETT en 1905, pour décrire une technique de séparation de pigments végétaux d'une feuille d'épinard (chlorophylles et caroténoïdes) sur des colonnes remplies d'une substance adsorbante, CaCO_3 carbonate de calcium (phase stationnaire) plus solvant l'éther de pétrole (phase mobile) (Fig.1)



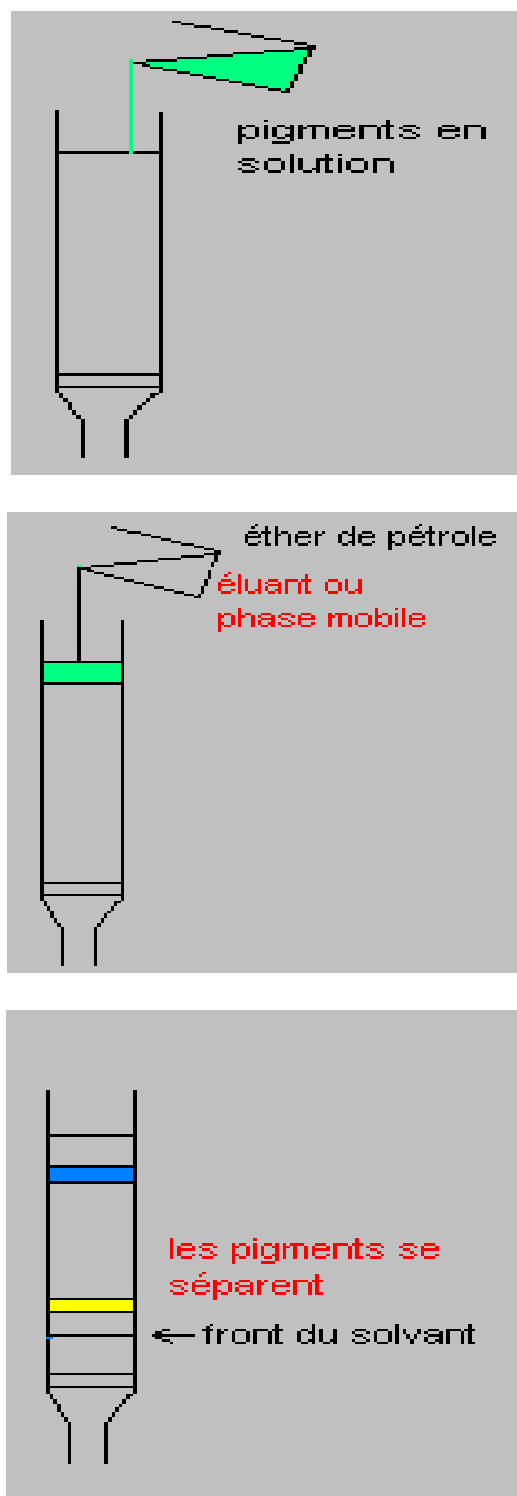


Figure 1 : La chromatographie

(www.w.atechimie.univ-lille.fr)

✓ **Interprétation :**

Les pigments verts sont en fait un mélange de pigments de plusieurs couleurs. En se déplaçant sélectivement sous l'effet du solvant (ou éluant) au travers de la colonne, les différents pigments se séparent.

La poudre, immobile lors de l'expérience, est appelée **phase fixe ou stationnaire**.

Le solvant qui en se déplaçant entraîne le mélange et participe à sa séparation est appelé **phase mobile ou éluant**.

1. Définition :

La chromatographie, méthode qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** le long d'une **phase stationnaire**.

Dans la chromatographie, chaque soluté est donc soumis à **deux** forces : une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

❖ **Quelques définitions :**

- **Elution** est un procédé permettant de mettre en solution, un composé adsorbé à l'aide d'un solvant (l'éluant).
- **Eluant** (phase mobile) solvant permettant d'éluer mélange (soluté).
- **Eluât** (résultat) solution recueillie au bas de la colonne.

1.1. Principe :

La séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules d'un mélange entre deux phases non-miscibles (qui ne

se mélange pas): l'une mobile et l'autre stationnaire. Les molécules d'un mélange se partagent entre les deux phases: l'une phase mobile et l'autre stationnaire.

1.2. Utilité de la chromatographie :

La chromatographie est utilisée au niveau des laboratoires d'analyses, des écoles et des universités

On s'en sert pour:

- Analyser
- Séparer ou purifier
- Doser des produits. L'analyse quantitative.

1. 3. Appareillage: Il existe 2 grands types d'appareillage.

1.3.1. La chromatographie « Classique ».

C'est un appareillage simple constitué de :

- Tube en verre avec plaque en verre fritté à la base ou de tampon de coton
- Les substances descendent le long de **la colonne** selon affinité
- Recueil de l'éluat par petites fractions (fig.2).



Figure 2 : La chromatographie (Classique)

(www.atechimie.univ-lille.fr).

Remarque :

- Le procédé est peu sensible et long
- Peu utilisé

1.3.2. La chromatographie haute performance (HPLC).

- Donne une meilleure efficacité et résolution.
- Très utilisé (fig.3).



Figure 3 : La chromatographie haute performance (HPLC)

(www.waters.com).

2. Les différentes méthodes chromatographiques :

Les deux groupes principaux : basés sur la nature de la phase mobile sont :

2.1. La Chromatographie en Phase Liquide (CPL) quand la phase mobile est un **liquide**.

2.2. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) quand la phase mobile est un **gaz**.

Dans la CPG ou dans la CPL on pourra distinguer des sous-groupes basés sur la nature de la **phase stationnaire** :

a. La Chromatographie d'adsorption sa **phase stationnaire** est **solide** doué de propriétés **adsorbantes** (comme dans l'expérience de Tswett).

b. La Chromatographie de partage sa **phase stationnaire** est **liquide** (non miscible à l'éluant) fixé sur **un solide** qui sert de **support inerte**.

c. La Chromatographie par perméation de gel ou **d'exclusion** sa **phase stationnaire** est un **gel** constituant un **tamis**.

d. La Chromatographie par échange d'ions sa **phase stationnaire** est une **résine échangeuse d'ions**.

2.1. La Chromatographie en phase liquide (CPL).

2.1.1. La chromatographie d'adsorption.

C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par absorption sur la craie (Tswett, 1905).

Elle est basée sur une séparation des solutés au moyen de 2 forces opposées:

a. Adsorption :

C'est la fixation du soluté sur une **surface solide (la phase stationnaire)** grâce à la **force de rétention**. On dit que le soluté est adsorbé.

b. Désorption (élution) :

Consiste à extraire le soluté absorbé à l'aide d'un **solvant éluant (la phase mobile)** grâce à la **force d'entraînement**.

✓ Remarque :

Les principaux adsorbants employés en chromatographie (la phase stationnaire) sont : Gel de silice, Alumine, Papier, Cellulose, Terre, Amidon, Sucres, Talc, Carbonate de sodium, Oxyde de magnésium, Charbon activé.

✓ Principes :

Les différents solutés sont adsorbés sur la phase stationnaire et soluble sur la phase mobile ; Il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant :

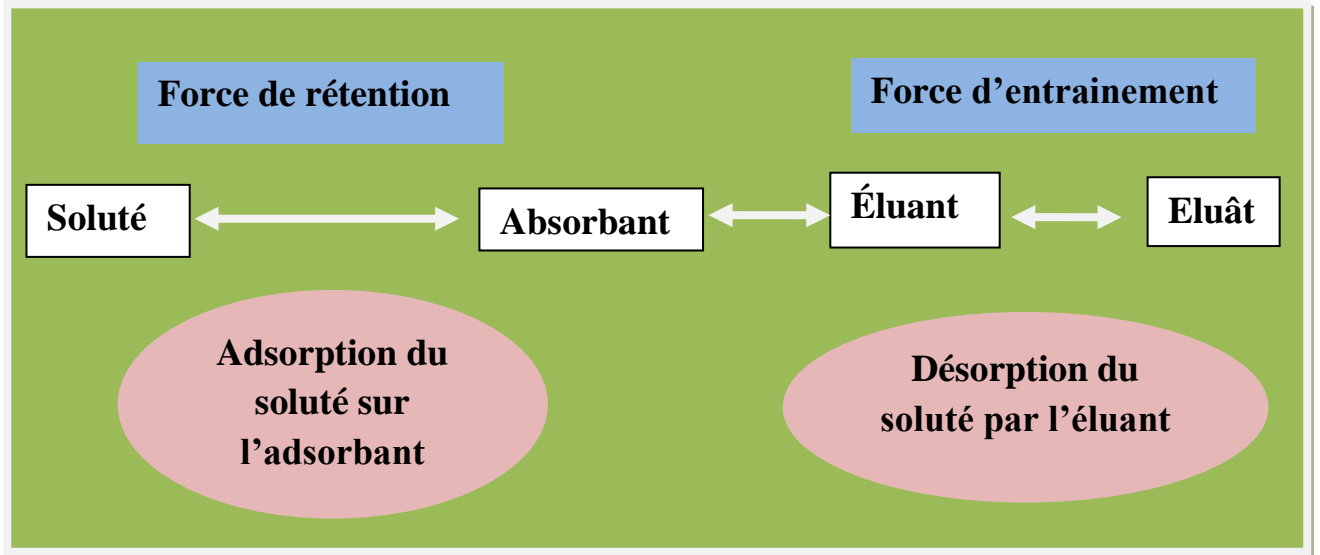


Figure 4 : Schéma du principe de la chromatographie d'adsorption.

✓ **Application :**

La chromatographie d'adsorption est utilisée en :

- **Biochimie** : Pour séparer les molécules organiques exemple : les lipides (stéroïdes, stéroïdes, caroténoïdes), les pigments, les médicaments, les oses et les acides aminés et les protéines...
- **Immunologie** : Pour la technique de purification des anticorps.

2.1.2. La Chromatographie par perméation sur gel (chromatographie d'exclusion).

Ce type de chromatographie, également appelé tamisage moléculaire ou filtration sur gel, vise à séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, leur taille et leur forme.

✓ Principes :

Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses (billes de polysaccharide). Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour passer entre les billes progresseront plus rapidement (fig. 5).

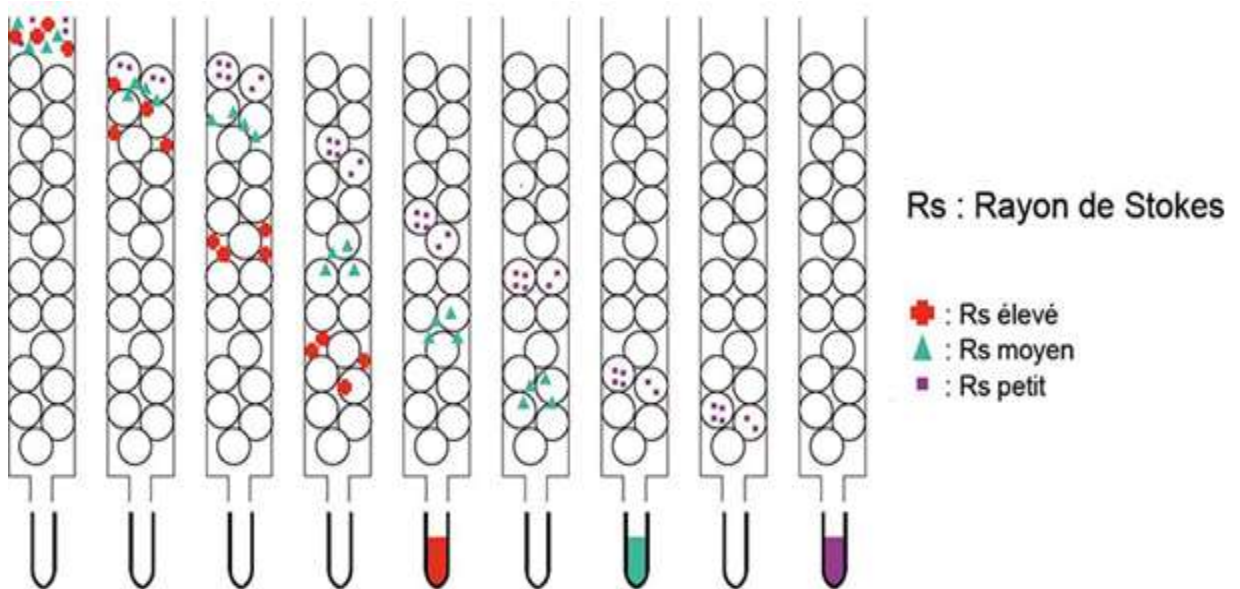


Figure 5 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion

(www.drgpinstitute.in).

- Dans ce type de chromatographie, **la phase stationnaire** est donc un **solide** (les billes de polysaccharide) et **la phase mobile** est un liquide **éluant** (un gel) dont le flux entraîne les molécules du mélange.
- C'est une technique très simple à mettre en œuvre, peu onéreuse, qui est très peu destructrice pour les constituants à séparer.

✓ **Application :**

- **Dessalage.**

On se sert de cette technique pour éliminer des contaminants (sels, détergents, etc.) d'une préparation.

Du côté industriel, on peut produire du lait sans lactose, pour les personnes intolérantes à ce produit, en dessalant du lait. Évidemment, dans ce cas on utilise des colonnes de taille industrielle.

- **Détermination du poids moléculaire.**

Les gels de filtration sur gel sont abondamment utilisés en biochimie pour déterminer le poids moléculaire des protéines.

- **Purification de protéines.**

Comme toutes les chromatographies, la filtration sur gel peut servir comme une étape de la purification d'une protéine

2.1.3. La chromatographie par échange d'ions.

Dans la chromatographie par échange d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est **la charge ionique**. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

Dans ce cas-là, **la phase stationnaire (La résine)** est de charge : positive ou négative

Et **la phase mobile** de charges opposées est liée par des **forces d'attractions électriques** : On parle de chromatographie échangeuse de cations ou d'anions.

Elle passe par 3 étapes :

a. Fixation :

Si on prend l'exemple de « la chromatographie par échange d'anions », la résine étant chargée positivement seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci.

b. Lavage :

Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées (non-fixé) immédiatement.

c. L'éluion (désorption ou libération) des molécules fixées :

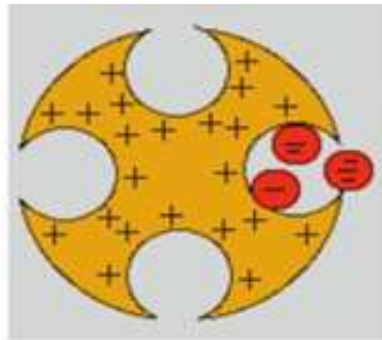
Peut être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'éluion contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine (fig.6).

✓ **Remarque :**

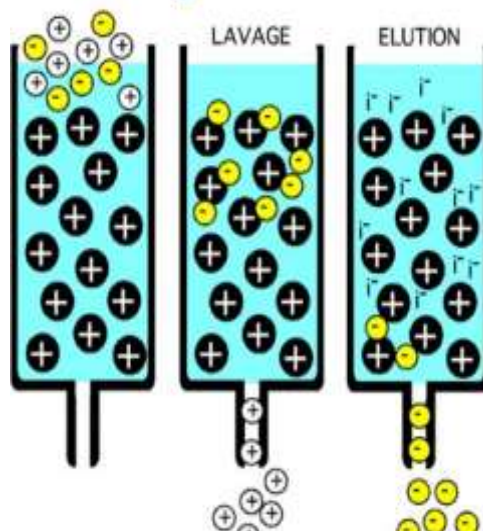
Pour l'élution (désorption ou libération), il existe un autre moyen consiste à modifier la charge des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement).

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

Fixation



**Chromatographie
échangeuse d'ions**



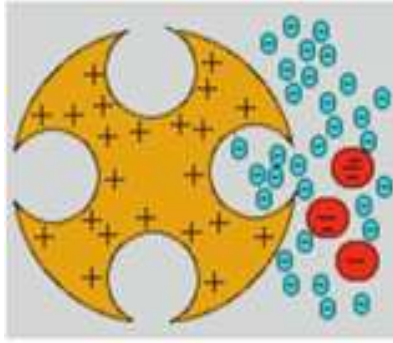
Elution

Figure 6 : schémas du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions

(www.planet-vie.ens.fr).

✓ **Principe :**

La résine (phase fixe ou stationnaire) étant chargée positivement ou négativement, les molécules de charges opposées vont se **fixer**, par des **forces d'attractions électriques** (phase mobile), les autres seront éliminées par **lavage**. Ensuite les molécules fixées vont être libérées ou **éluées** (phase mobile).

✓ **Application :**

Cette technique est utilisée pour séparer des **molécules ionisables**, quels que soit leur domaine et leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

2.1.4. La chromatographie d'affinité.

Dans la chromatographie d'affinité, la séparation des molécules va se faire selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique (récepteur spécifique) fixé sur une résine. La phase stationnaire est le ligand présentant une grande affinité pour certaines molécules bioactives à purifier qui représentent la phase mobile.

Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier grâce à son ligand (fig.7).

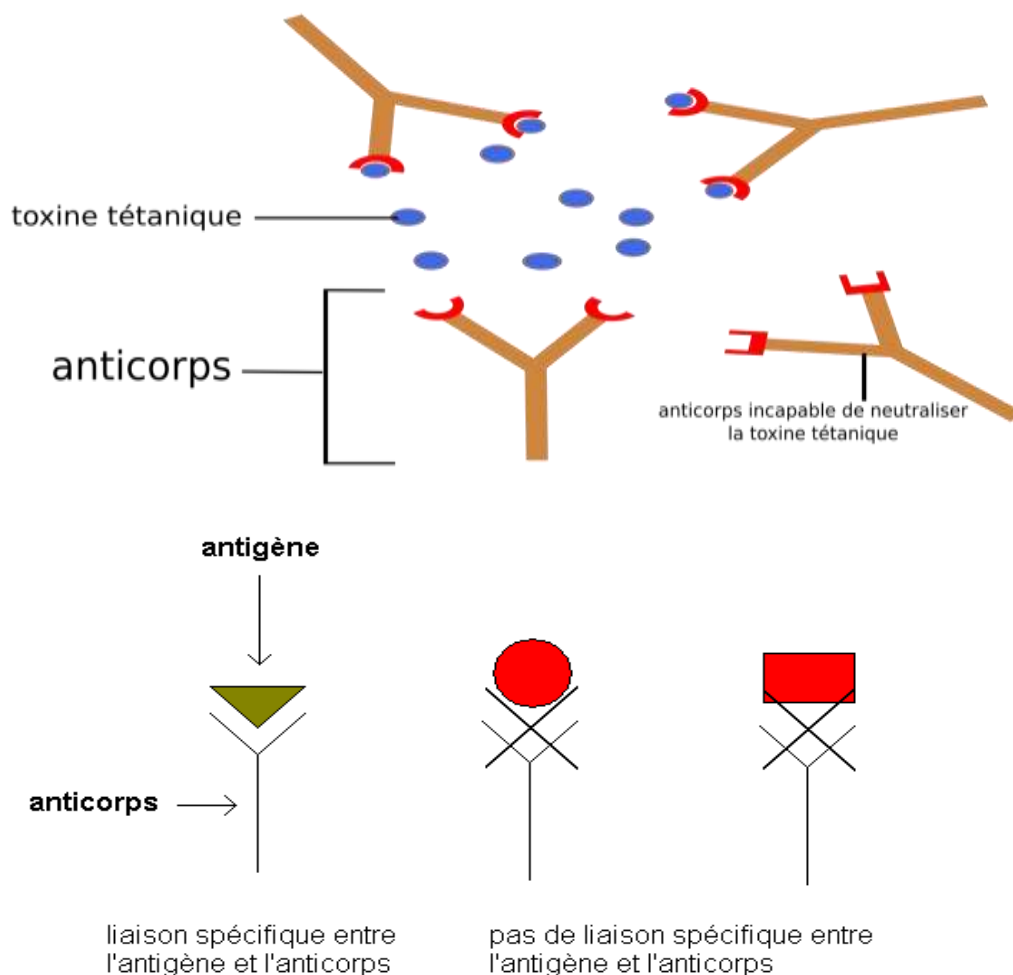


Figure 7 : Deux exemples de liaison spécifique grâce à un ligand

(www.ent2d.ac-bordeaux.fr).

Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine va se lier.

Après avoir éliminé le non-fixé en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée (détachée), par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique (chlorure de potassium ou phosphate salin) ou de pH différent (fig.8).

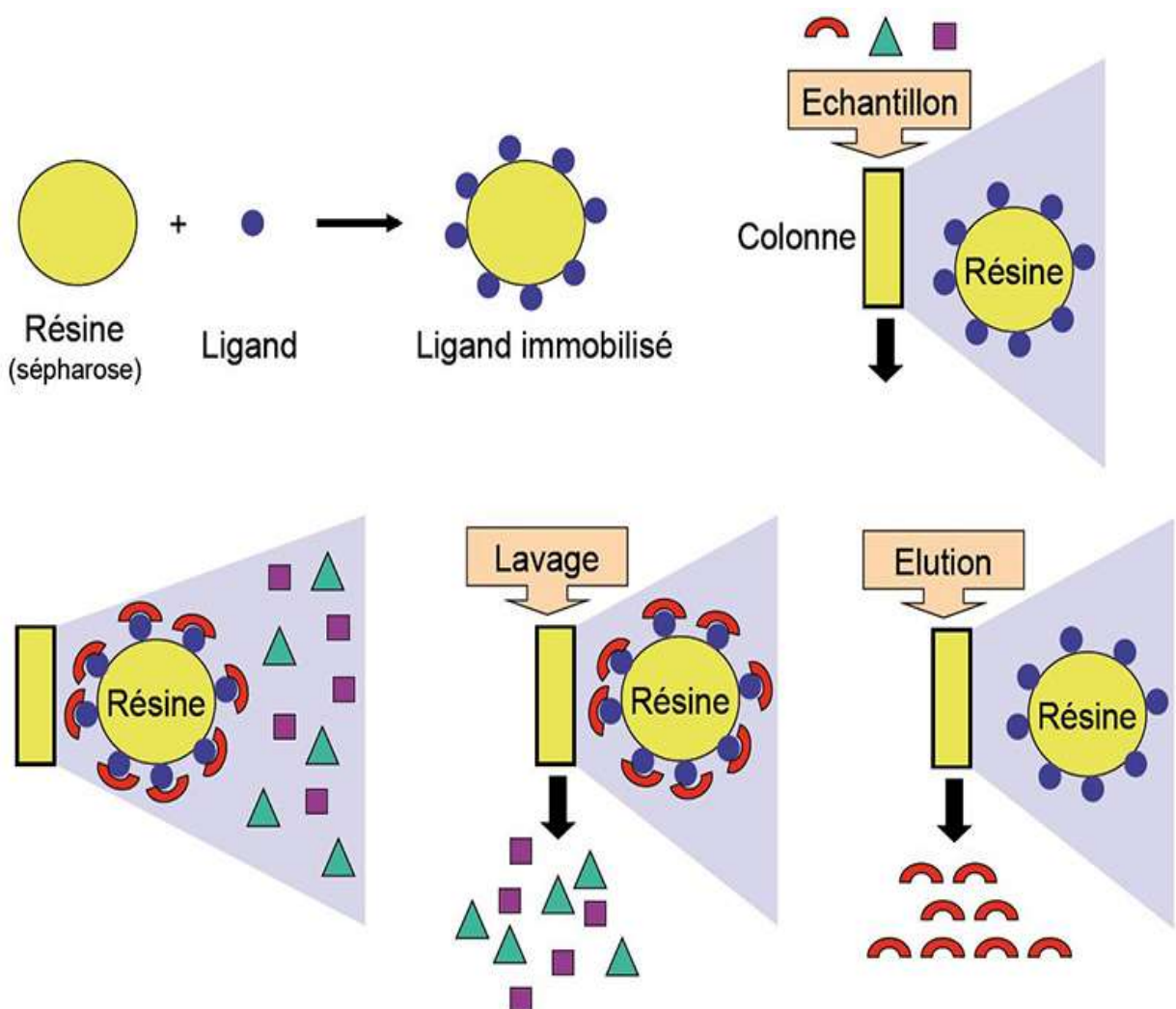


Figure 8: Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité

(www.planet-vie.ens.fr).

✓ **Remarque :**

- **L'avantage** de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.
- **L'inconvénient** de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie.

✓ **Application :**

La chromatographie d'affinité a été utilisée :

- En enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques ;
- En immunologie, pour la purification d'anticorps ;
- En biochimie, pour l'isolement des protéines et des acides nucléiques.

2.1. 5. La chromatographie de partage.

C'est une méthode de séparation de molécules suivant leur migration ou répartition différentielle entre les deux phases liquides. La phase stationnaire est un liquide absorbé par un solide et la phase mobile est liquide, les liquides doivent donc être non miscibles (ne se mélangent pas).

La chromatographie de partage peut se réaliser selon 2 types de polarité de phase:

La polarité de phase normale

La polarité de phase inverse

Dans le cas de la polarité de **phase normale**, la phase stationnaire est hydrophile (aime l'eau) et la phase mobile (l'éluant) est hydrophobe (n'aime pas l'eau).

Dans le cas de la polarité de **phase inverse**, la phase stationnaire est hydrophobe et la phase mobile (l'éluant) est hydrophyle.

✓ **Application :**

Séparation des alcools d'un parfum, séparation des hydrocarbures d'un pétrole, d'une huile...

A. La chromatographie de partage sur papier unidimensionnelle en polarité de phase normale.

Cette technique nécessite l'utilisation de papiers spécifiques car ils possèdent un faible taux d'impuretés exemples : papier Whatman; Schleider; Shüll; Durieux; Arches...

✓ Principe:

La phase stationnaire est constituée par l'eau qui est absorbée par la cellulose du papier de Whatman et **La phase mobile** est un solvant organique et l'eau (fig.9).

L'échantillon est déposé sur des points de repères du papier après mis en solution, l'eau est absorbée en premier ensuite le solvant, qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité.

✓ Réalisation de la chromatographie

- On trace une ligne de dépôt avec numérotation.
- Il faut faire plusieurs dépôts successifs, en séchant bien à chaque fois. Le diamètre des dépôts ne doit pas excéder 3 mm.
- Les dépôts ne doivent pas « baigner » dans l'éluant, lorsque l'éluant se rapproche du haut de la plaque (à environ 10 mm), la sortir rapidement, marquer le front d'un fin trait de crayon et sécher (avec un sèche-cheveux).

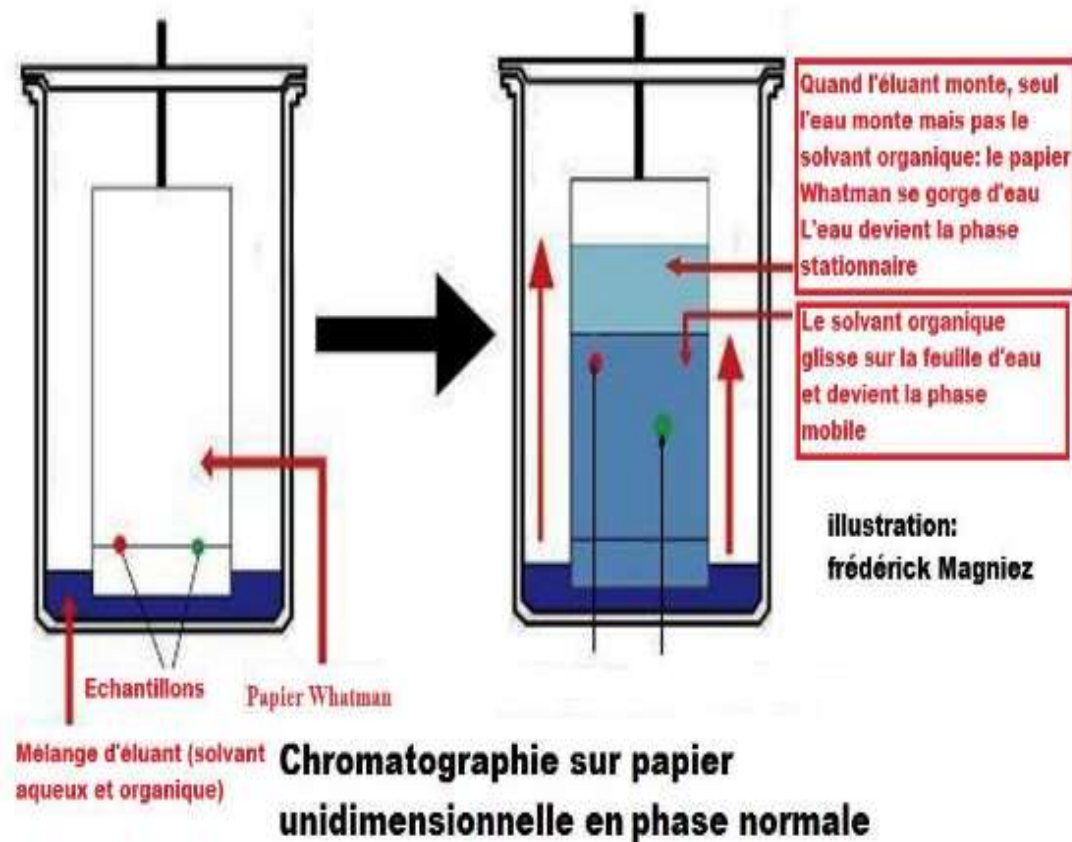


Figure 9 : schéma du principe de la chromatographie de partage sur papier

(www.planet-vie.ens.fr).

✓ **Inconvénients:**

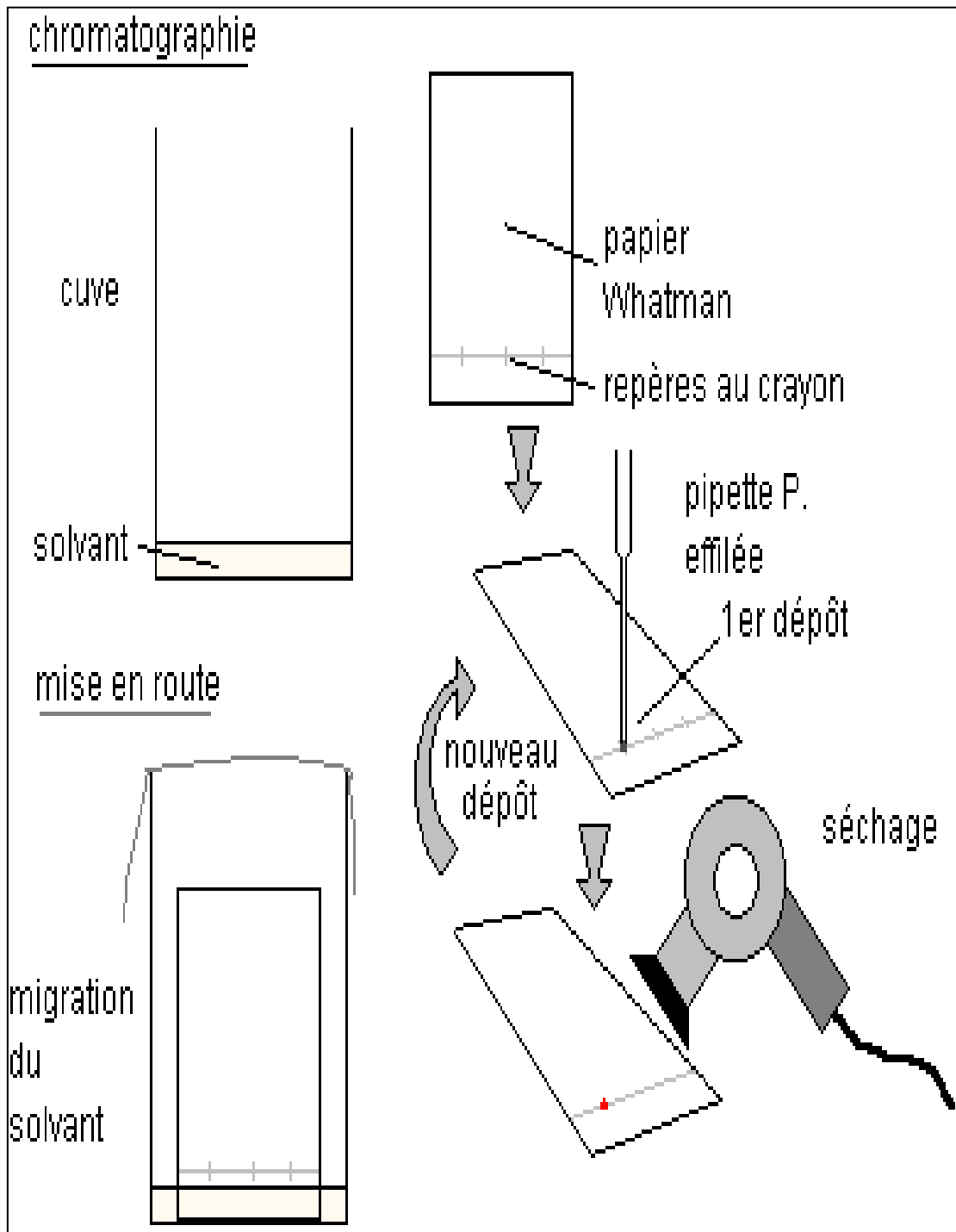
Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont :

- Une durée de développement beaucoup plus longue
- Une séparation généralement moins bonne.

Exemple :

- **Chromatographie de l'acide lactique (partage sur papier) :**

Le but c'est de faire une séparation entre les différents acides.



✓ Montage de l'expérience :

- ▶ 30 mn avant le début de l'expérience, mettre le solvant organique dans la cuve (1 cm) et fermer la cuve avec le papier aluminium afin d'y créer une atmosphère imbibée de vapeurs.

✓ Réalisation des dépôts et mise en route de la chromatographie :

- ▶ A 1.5 cm du bord inférieur du papier Whatman déposer :

- 1 micro-goutte d'acide acétique
- 5 micro-gouttes superposées de petit-lait (lait coagulé à l'acide acétique pur), sécher rapidement entre chaque goutte.
- 5 micro-gouttes superposées de petit lait de yaourt (liquide extrait du yaourt), sécher entre chaque goutte.

- ▶ Déposer le papier dans la cuve, verticalement.
- ▶ Refermer la cuve avec le papier aluminium.
- ▶ Laisser migrer 1 heure environ (le solvant monte jusqu'au sommet du papier) .
- ▶ Enlever le papier de la cuve et le sécher au sèche-cheveux.

✓ Compréhension du résultat :

- ▶ Les acides déposés font virer au jaune, le bleu de bromophénol.
- ▶ Cependant, l'acide acétique utilisé pour produire le petit-lait et yaourt ne peut être confondu avec l'acide lactique car il est volatile (lors du séchage). Les tâches jaunes obtenues caractérisent donc uniquement l'acide lactique.

B. La chromatographie sur couche mince.

Même principe que la **chromatographie de partage sur papier** mais on utilise à la place du papier de Wathman des **Plaques de gel de silice** (fig.10).

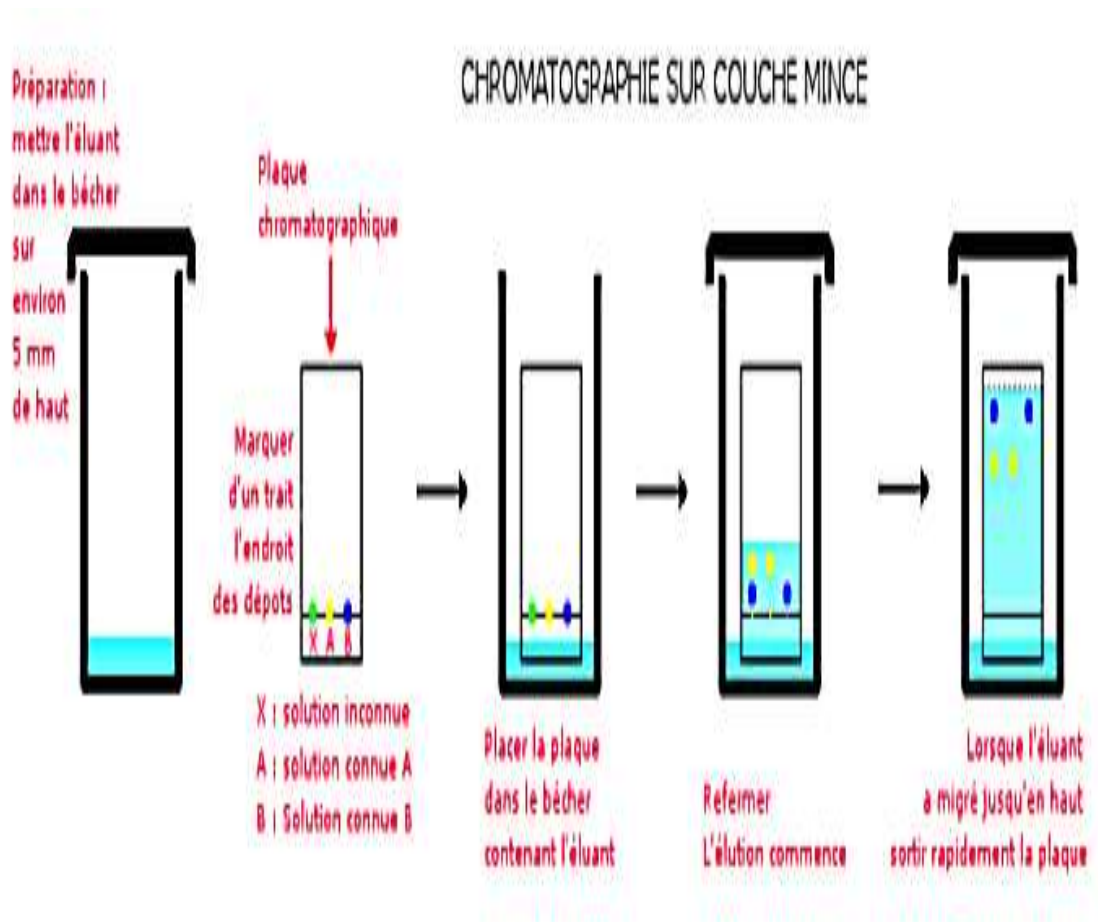


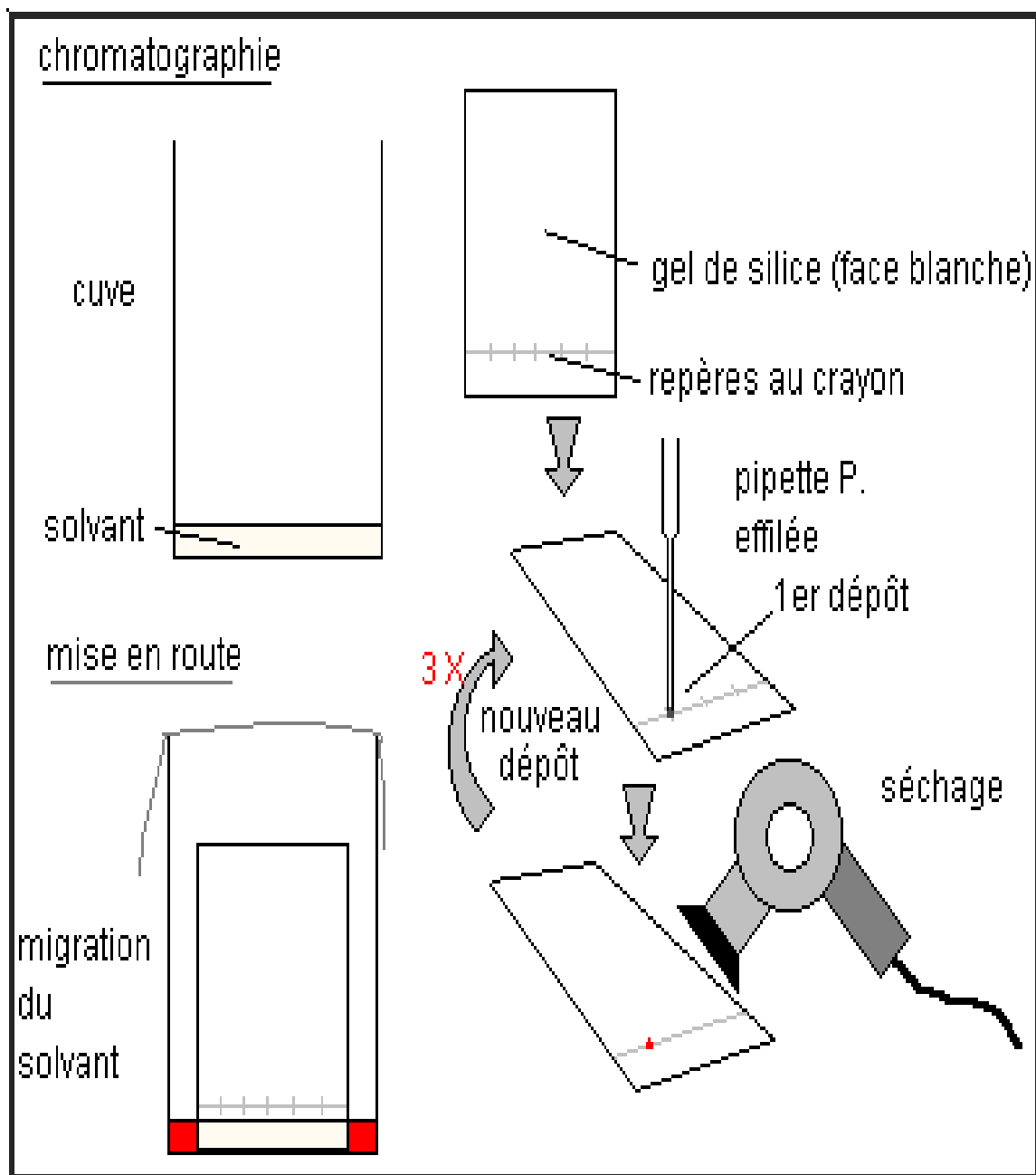
Figure 10: Schéma du principe de la chromatographie sur couche mince

(www.planet-vie.ens.fr).

Exemple :

- **Chromatographie des glucides de courgette (sur couche mince).**

Le but est de séparer les sucres de la sève élaborée extraite d'un végétal (courgette), sur plaque de gel de silice.



- Presser doucement le pédoncule de la courgette très fraîche et simultanément, aspirer à l'aide d'une micropipette le liquide qui en sort : la sève élaborée. *Extraire le liquide au dernier moment.*

✓ **Montage de la chromatographie :**

- ▶ Sur la plaque de gel de silice, tracer un trait au crayon à 1 cm du bord inférieur et placer 5 repères à la même distance.
- ▶ Verser un peu moins d'un cm de solvant au fond du bécher et fermer la cuve à l'aide du film transparent.

✓ **Réalisation des dépôts et mise en route de la chromatographie**

- ▶ Sur les repères tracés précédemment, déposer à la micropipette 3 fois une goutte de sève extraite ça soit suffisamment concentré,
- ▶ Entre chaque dépôt, sécher au sèche-cheveux ou laisser sécher,
- ▶ Mettre la plaque dans la cuve
- ▶ Fermer la cuve à l'aide du film et laisser migrer le solvant pendant 3/4 d'heure, 1 heure,
- ▶ Sortir la plaque, la sécher au sèche-cheveux.

✓ **Compréhension du résultat**

- ▶ Les taches jaunes qui apparaissent correspondent à la réduction du permanganate par les fonctions alcool des sucres.
- ▶ Chaque sucre ayant migré haut sur le gel, il est identifiable par sa position dans le sens vertical.

2.2. La Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

2.2.1. Définition :

C'est une méthode **séparative** dont les principes généraux sont les mêmes que ceux de la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la **séparation** et la **migration** différentielle des constituants du mélange à analyser.

La particularité du procédé est que la **phase mobile** est **gazeuse**, c'est-à-dire agir sur des produits **volatilisés (gaz)**, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable et de travailler en circuit étanche aux gaz.

✓ **Historique :**

La CPG s'est développée à partir de 1952, sous l'impulsion de James et Martin. Elle a pris un essor considérable, entre 1960 et 1970, pour devenir l'une des méthodes de séparation les plus utilisées est concurrencer la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC car :

- Elle associe rapidité et efficacité de séparation.
- Présente un grand choix de phases stationnaires, de températures, et de débit de phase mobile ainsi que sa composition (azote, argon, hélium, hydrogène, ...)

✓ **Intérêt :**

Elle permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé.

2 types:

a. Chromatographie gaz solide CGS:

Chromatographie d'adsorption peu utilisée en raison des traînées dans les pics d'élution, rendant la lecture difficile.

b. Chromatographie gaz liquide CGL:

Chromatographie de partage, basée sur le partage des constituants à séparer, les solutés, entre une **phase gazeuse mobile** inerte appelée **gaz vecteur** et une **phase liquide fixée** sur la surface **d'un support poreux inactif**.

✓ **Principe :**

Les **éléments gazeux** ou **volatils** d'un échantillon sont placés dans un injecteur.

Ils vont ensuite être emportés par un **gaz porteur** (phase mobile) qui va les amener dans un **liquide** (la phase stationnaire) pour qu'ils y soient séparés. Ce liquide est présent dans une colonne, elle-même placée dans un four.

2.2.2. Matériel :

Le schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID ou DIF) est rendu sur la figure suivante :

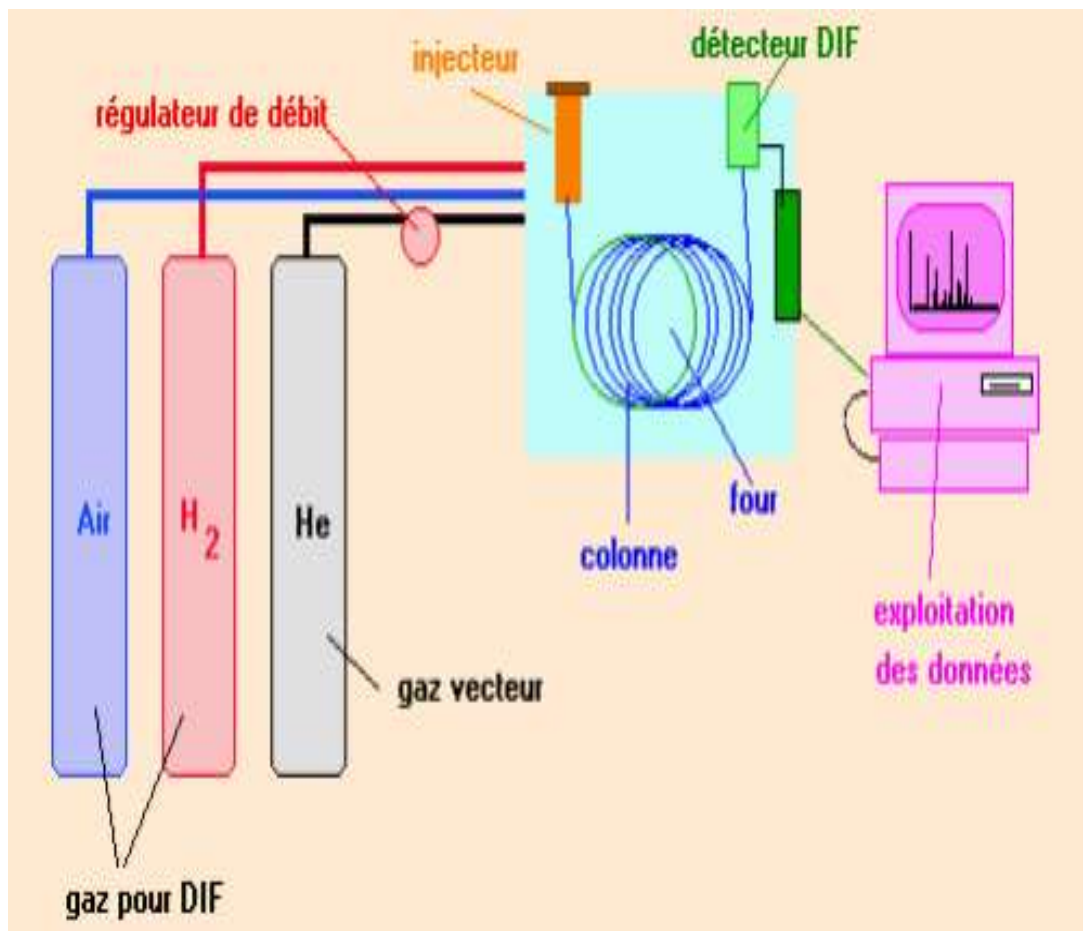


Figure 11 : Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme

(www.ac-nancy-metz.fr).

✓ **Application :**

La chromatographie en phase gazeuse, Intervient dans les analyses des additifs alimentaires, notamment dans les domaines: Huile d'olive, Beurre, sucre Saindoux, Cacao, Chocolat.

Elle permet l'identification des acides gras, les constituants, recherches de falsifications, analyse des substances étrangères, discussion des résultats d'analyse.

Tableau 1 : Classification des techniques chromatographiques selon les phases mobiles et selon les mécanismes de séparation.

Chromatographie en phase liquide		
	type	phase stationnaire
liquide/solide	adsorption	solide poreux
	échange d'ions	solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile.
	D'exclusion (filtration sur gel, perméation de gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille.
Liquide/liquide	partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée).
	Partage phase inversée	Solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires.
Chromatographie en phase gazeuse		
	type	phase stationnaire
gaz/solide	adsorption	solide poreux.
Gaz/liquide	partage (partition)	Dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide.

METHODES ÉLECTROPHORÉTIQUES

Introduction :

L'électrophorèse : Electro : énergie électrique. Phorèse : phoros (Grec) porter, avoir en soi.

L'électrophorèse est avec la chromatographie, la principale des techniques utilisées en **biologie** pour la **séparation** et la **caractérisation** des molécules. Elle a quelques applications **en chimie**, mais est principalement utilisée en **biochimie** ou **biologie moléculaire** pour la séparation des **protéines** ou des **acides nucléiques**.

✓ Historique :

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du serum 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 ainsi obtenir sur le **pôle +** des protéines de charge très **négative** comme l'**albumine** et sur le **pôle -** des protéines de charge plus **positive** comme les **globulines**.

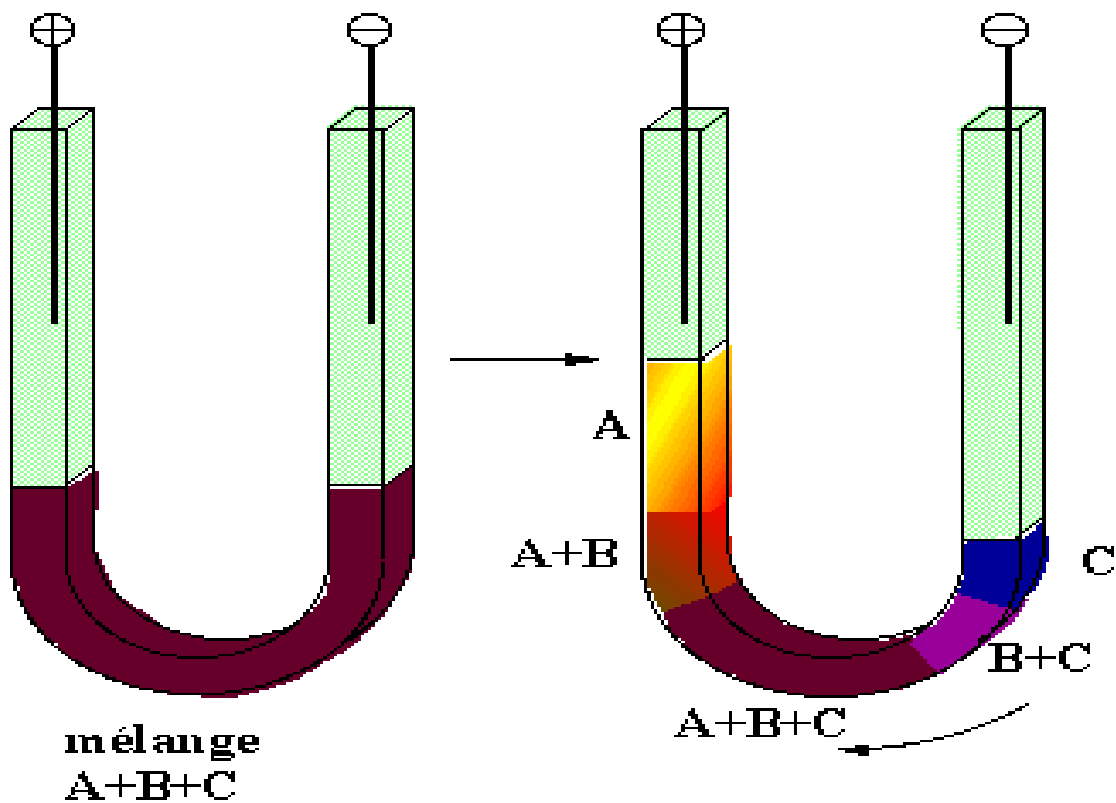


Figure 1 : Electrophorèse libre ou Electrophorèse en veine liquide

(w.w.w.chimieanalytique.com).

1. Définition :

L'électrophorèse est une méthode de **séparation de particules chargées** électriquement par migration différentielle sous l'action d'un **champ électrique**.

Elle est utilisée pour **séparer** et **caractériser** des **molécules** telles que des **protéines** ou des **acides nucléiques** (ADN, ARN, etc.) basée sur le fait que dans un milieu donné soumis à un **champ électrique**, la **migration** et la **séparation** des molécules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille** et de leur **forme**.

1.1. Principe :

L'électrophorèse est une technique permettant de **déplacer des ions** (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un **champ électrique**.

Les anions (chargés positivement) migrent vers **l'anode** (potentiel négatif) et les **cations** (chargés négativement) migrent vers la **cathode** (potentiel positif).

En ce qui concerne les molécules **non chargées**, il n'existe pas de migration.

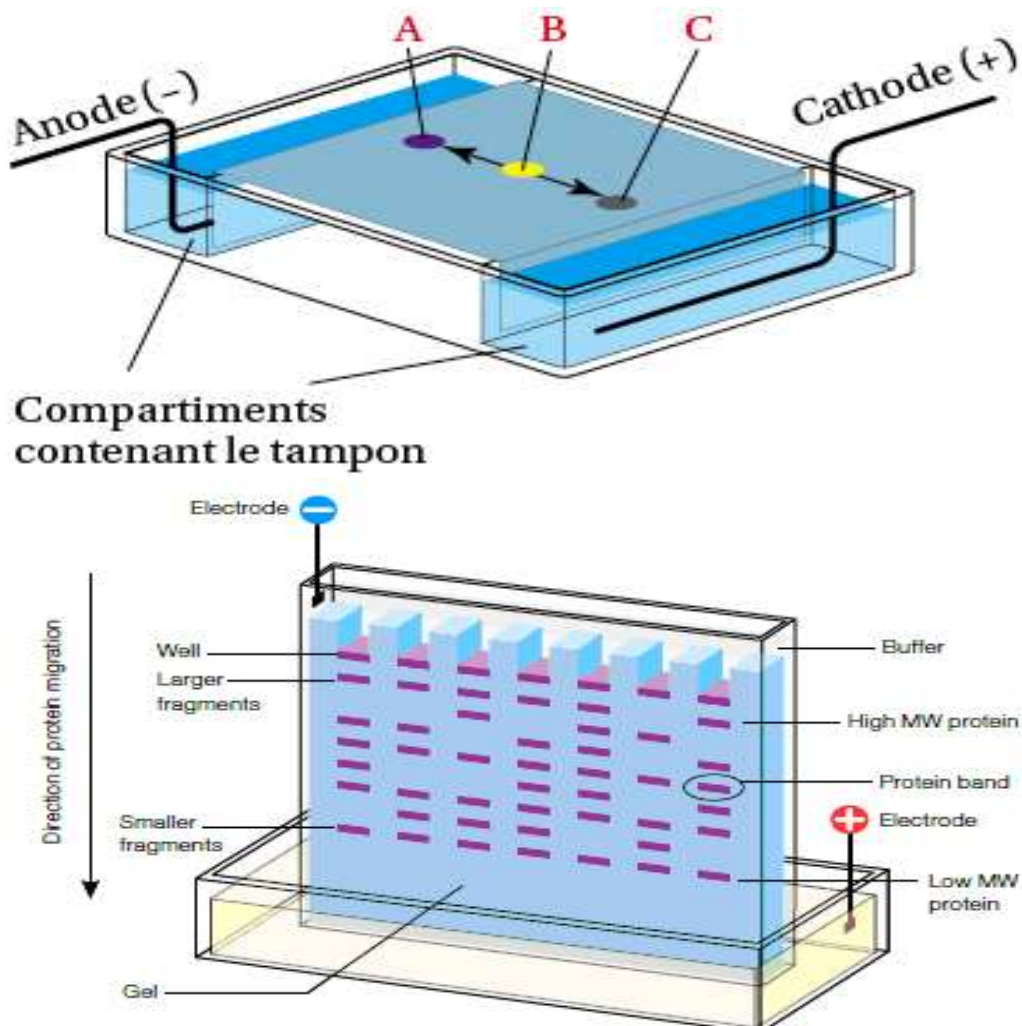


Figure 2 : Principe de l'électrophorèse

(w.w.w.chemlo.wordpress.com)

1.2. Paramètres et conditions de réalisation :

1.2.1. Electrophorèse native ou L'électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Dans l'électrophorèse en conditions **non dénaturantes ou native**, les molécules sont séparées dans leur **état natif**. Il faut donc éviter les conditions dénaturantes :

- ✓ Les pH élevés ou au contraire très bas.
- ✓ Des traitements à des températures élevées.
- ✓ Les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel).
- ✓ Les agents chimiques dénaturants.

Cette technique présente certains **avantages** comme celui de permettre la séparation de molécules entières.

Et certains **inconvénients** comme l'interprétation difficile, il est fréquent que les molécules présentes dans l'échantillon soumis à électrophorèse se collent entre elles, formant de très gros ensembles impossibles à séparer.

1.2.2. Electrophorèse en milieu dissociant ou L'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Comme son nom l'indique, les molécules sont soumises à un traitement **dénaturant** avant leur séparation électrophorétique. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont :

- Les pH élevé ou au contraire très bas.
- Les traitements thermiques (des températures élevées).
- Les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel).
- Et bien sur l'utilisation d'agents dénaturant comme **l'urée** ou le **SDS** (sodium dodécyl sulfate).

1.3. Les supports électrophorèses :

On peut déterminer 2 types d'électrophorèses selon leurs supports:

1.3.1. Support liquide => « Electrophorèse en veine liquide » dite « libre ».

Pour les **TRES grosses** particules (cellules et organites); La migration s'effectue au sein d'un **liquide** soumis à un **champ électrique** de courant continu.

Presque plus utilisée car l'appareillage est coûteux et la mise en œuvre est longue et délicate.

1.3.2. Support poreux => « Electrophorèse de zone ».

Pour séparer les **très grosses molécules** (Protéines ou petits fragments d'Acides Nucléiques); Ce type d'électrophorèse utilise un support **poreux** pour stabiliser la **phase liquide**.

✓ Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- Électrophorèse sur **papier filtre**
- Électrophorèse **sur acétate de cellulose**
- Électrophorèse sur **gel** (amidon, agar, agarose, polyacrylamide, etc.).

2 types de montage peuvent être mis en place dans l'électrophorèse de zone :

- Montage horizontal:

Utilisé pour les supports **en acétate de cellulose** ou **en papier**. Le support se présente sous forme de longues et étroites bandelettes.

Les extrémités du support plongent dans un liquide tampon d'électrode.

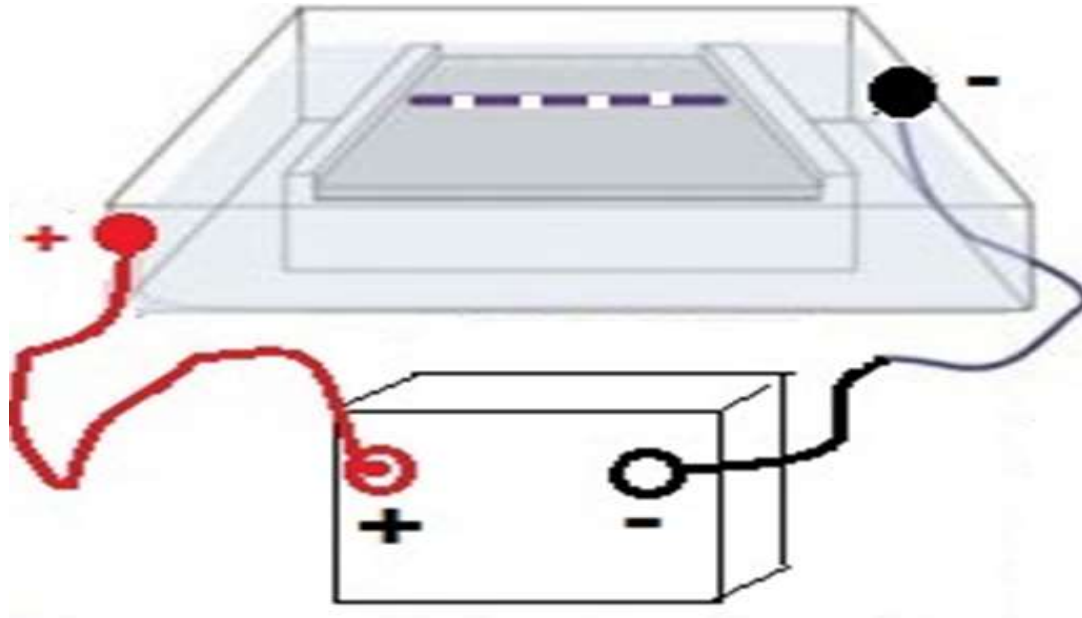


Figure 3 : Electrophorèse horizontale

(w.w.w.takween.com).

- Montage vertical:

Utilisé pour les supports en **gel polyacrylamide** ou, plus rarement en **gel d'agarose**.

Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre.

Durant la gélification on aura pris soin de faire des puits où on déposera les échantillons.

L'extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des

électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.

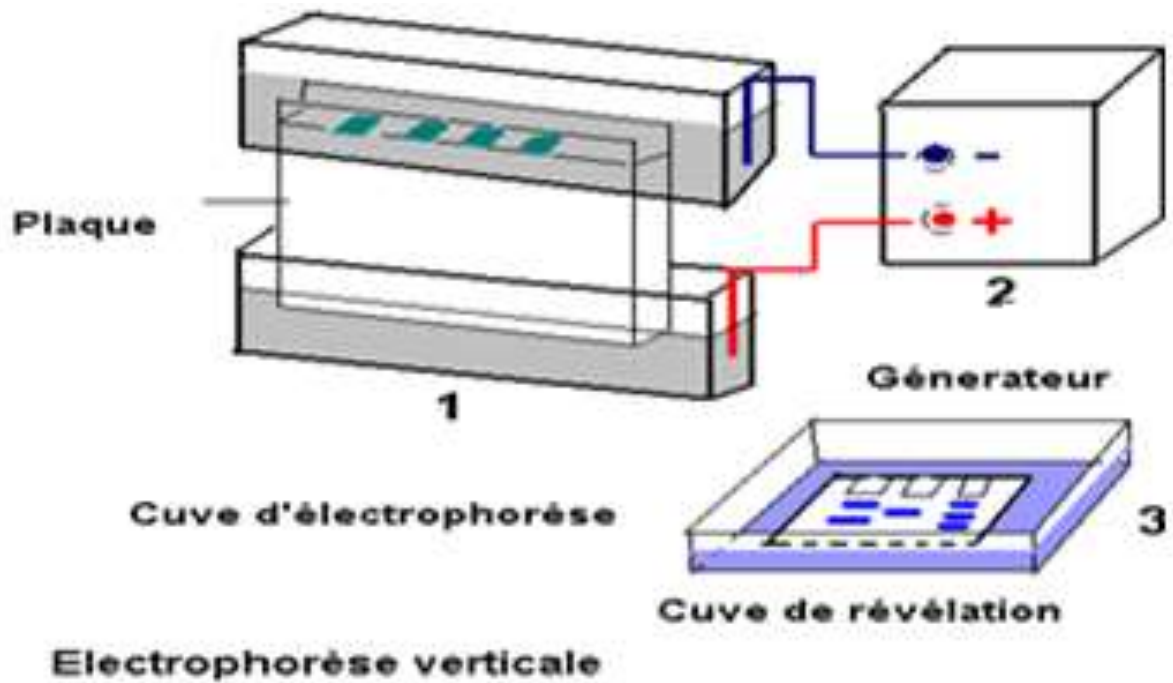


Figure 4 : Electrophorèse verticale

(w.w.w.takween.com).

2. Différents types d'électrophorèse et leurs applications.

2.1. Electrophorèse de zone.

Migration des molécules principalement en fonction de la **charge globale**, et en conditions **non dénaturantes**.

✓ Principe :

- Imprégnation d'une bande par un **électrolyte** (substance conductrice).
- Dépôt d'1 goutte de solution contenant l'espèce ionique à étudier sur la bande de papier ou l'acétate de cellulose.
- Établissement d'une tension électrique entre les 2 extrémités de la bande de papier

L'espèce ionique se déplacera sous l'action du champ électrique avec une vitesse propre à elle.

✓ Remarque :

Un **électrolyte** est une **substance conductrice**, car elle contient des **ions mobiles**.

Par exemple : le sel de table (chlorure de sodium, NaCl) ou le sucre (comme le glucose)

2.1.1. Electrophorèse sur papier.

Sépare les **petites molécules** (acides aminés ou petits peptides).

Permet de déterminer le **point isoélectrique d'un acide aminé** en mesurant sa

mobilité à différents pH.

Peu utilisée de nos jours.

✓ **Remarque :**

-Le **point isoélectrique** (pI ou pKi) ou **potentiel hydrogène isoélectrique** (pHi) est le pH auquel une molécule est sous forme **d'ion mixte** ou sous un **potentiel électrique neutre**.

2.1.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Séparation de molécules de **milieux complexes** (exemple plasma)

Séparation de **petites molécules** migrant à vitesse proportionnelle à leur charge.

✓ **Cas de l'Electrophorèse des hémoglobines A et S sur bande d'acétate de cellulose**

Permet l'identification des phénotypes moléculaires et des génotypes par électrophorèse de l'hémoglobine.

✓ **Protocole.**

- a. Mettre à tremper les bandes d'acétate de cellulose dans le tampon d'électrophorèse (tampon tris-véronal) pendant 10 à 20 minutes.
- b. Essorer l'excès de tampon en plaçant les bandes entre deux feuilles de papier absorbant (essuie-tout).
- c. Placer la bande sur le portoir

- d. Mettre en place le(s) 2 support(s) dans la cuve de tampon d'électrophorèse.
- e. Prélever un échantillon et le déposer sur la bande.
- f. Fermer la cuve et mettre sous tension (environ 1 h de migration à 150 V).
- g. Après migration, placer les bandes dans la solution de rouge ponceau pendant 10 minutes.
- h. Décolorer le fond dans des bains de décoloration d'acide acétique à 5 %.



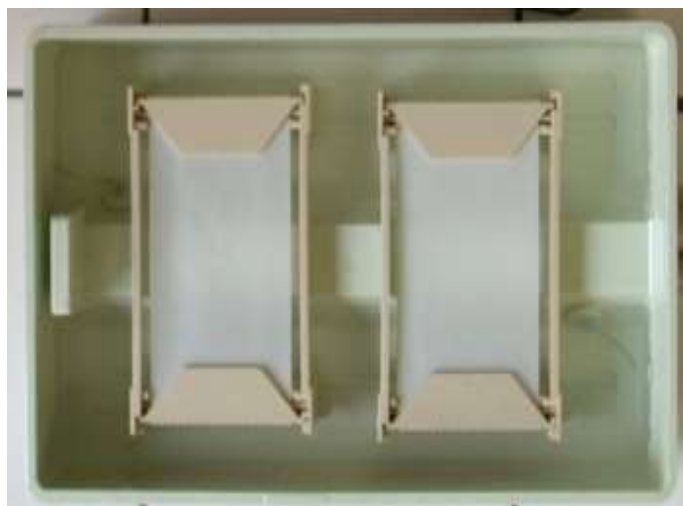
a. Trempage



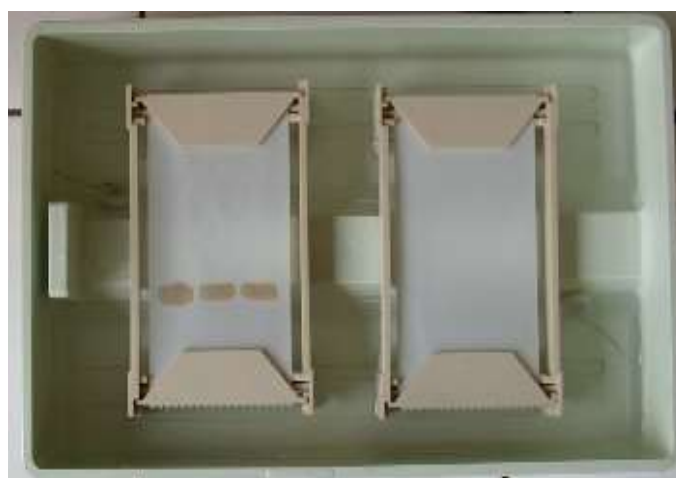
b. Essorage



c. Mise en place de la bande sur le support



d. Bandes en place dans la cuve



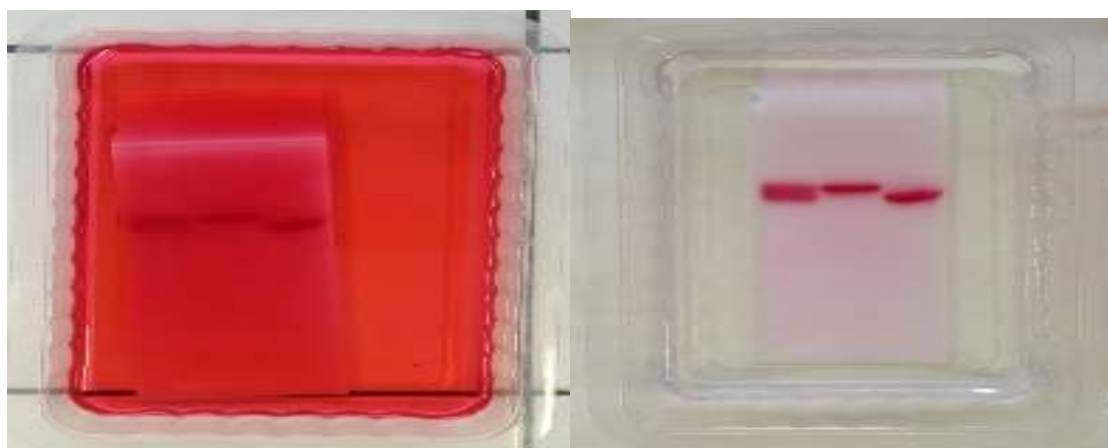
e. Dépôts effectués sur une bande



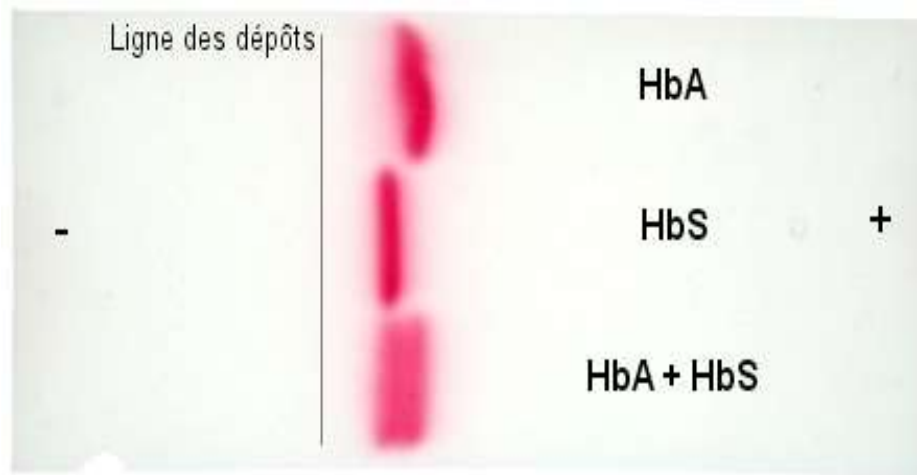
f. Cuve et générateur pendant la migration



g. Coloration



h. Bains de décoloration



i. Electrophorèse des hémoglobines A et S

✓ Résultats.

L'hémoglobine S moins chargée que l'hémoglobine A en raison d'un acide glutamique, migre moins loin et peut ainsi être distinguée sur la bande d'acétate de cellulose (voir figure i).

Cette méthode est de + en + remplacée par les électrophorèses sur gel.

2.1.3. Electrophorèse sur gel.

Il existe 5 différents types **d'électrophorèse sur gel** les plus utilisés sont :

- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)
- Électrophorèse sur gel d'agarose
- Électrophorèse bi-dimensionnelle
- Isoélectrofocalisation.
- Immunoélectrophorèses.

✓ **Remarque :**

Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en **conditions dénaturantes**
(Détergents type **SDS** ou **urée**).

2.1.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis):

Cette technique est très utilisée en **immunologie** et dans l'étude des **protéines** car elle permet, après la **séparation** des différentes protéines, leur **transfert** sur une membrane **afin d'être identifié** par le biais **d'anticorps spécifiques**.

Elle est également utilisée pour le **séquençage** de **l'ADN**.

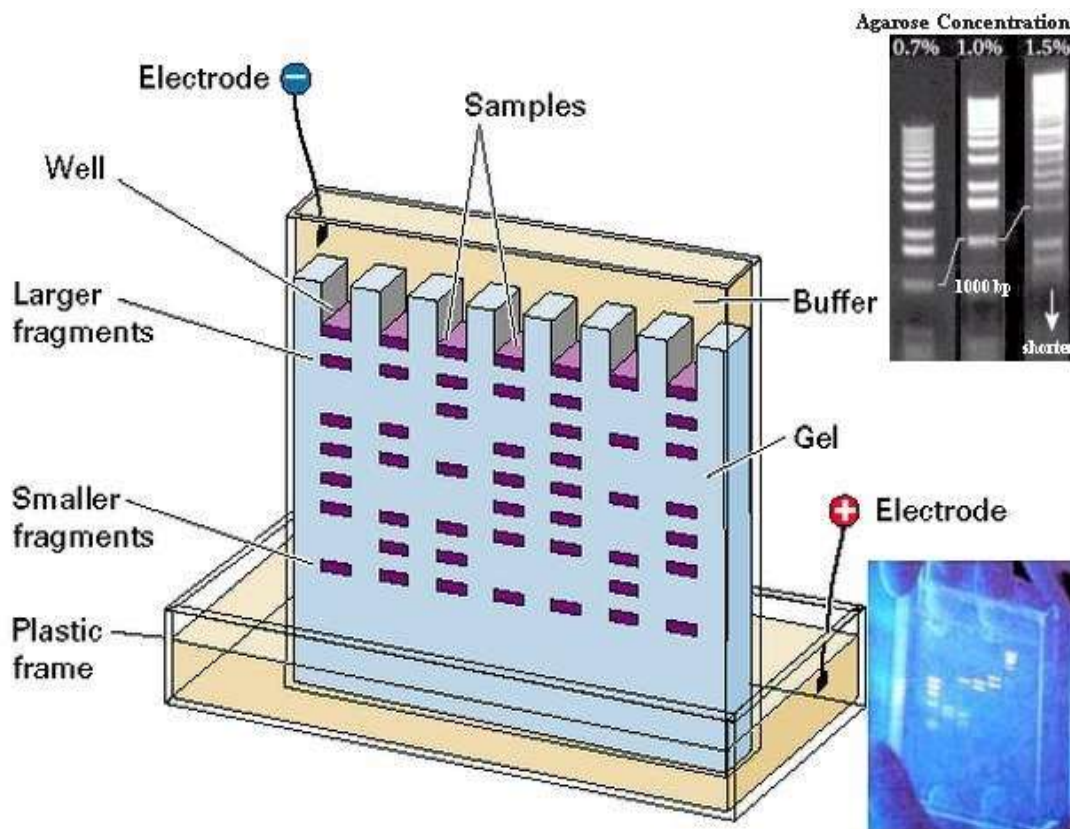


Figure 5: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (montage vertical).

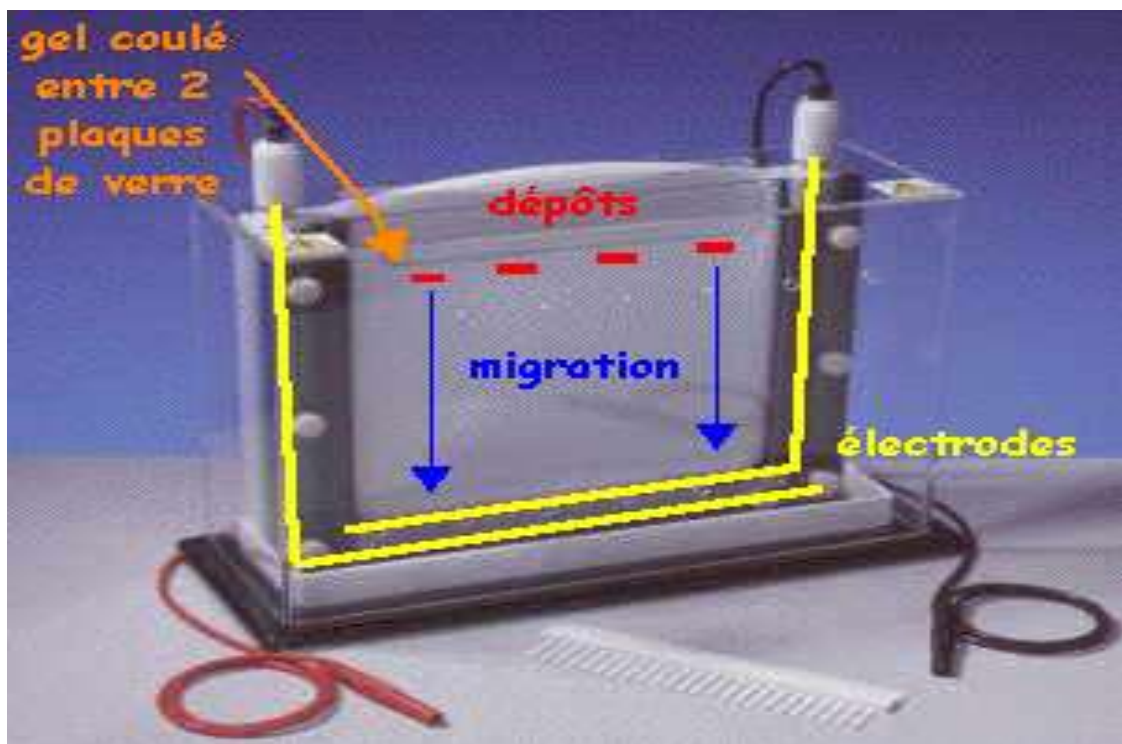


Figure 6 : Le matériel d'électrophorèse

(w.w.w.biochimej.univ-angers.fr).

Le matériel d'électrophorèse se compose:

- Des plaques.
- Des pinces.
- Le joint d'étanchéité.
- Le peigne.
- Les espaceurs.

✓ Principe :

- Deux sorte des gels d'acrylamide ont utilisés, **un gel de séparation** (resolving gel) qui peut être à 6%; 8%; 10%; 12% ou 15%. Plus le gel est dense meilleure sera la séparation et **un gel de concentration** (stacking gel) à 5%.
- La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs: le **TEMED** (tetra-méthyl-éthylènediamine) et l'**ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.
- La migration se fait grâce à une solution tampon (tampon de migration) de Tris 25mM, glycine, d'eau distillée
- Les plaque sont réunies grâce aux pinces entres lesquelles on met des espaceurs, on rajoute les joint d'étanchéité
- Le gel de séparation (resolving gel) est aussitôt coulé entre les 2 plaques à l'aide d'une pipette et ensuite recouverts d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale.
- Retirer l'eau distillée au-dessus du gel de séparation puis remplir le montage jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre, de gel de concentration (stacking gel) et polymérisés grâce au **TEMED** et à l'**ammonium persulfate**. Le peigne est alors mis en place pour former des puits dans le gel de concentration.
- Le peigne est retiré puis les plaques et les cuves de migration sont placées sur le support. Les cuves sont remplies avec le tampon de migration en commençant

par la partie supérieure puis inférieure. Dépôt de 50 microlitres d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue et selon la technique sous-marine.

- Les électrodes de la cuve sont reliées au générateur. La migration se fait à 30 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.

✓ **Révélation :**

Le gel est retiré des plaques puis placé sur un agitateur et coloré pendant 30 minutes dans une solution de coloration de **bleu de coomassie**, puis décoloré 3 fois à 30 minutes avec une solution décolorante composée d'isopropanol, d'acide acétique et d'eau.

✓ **Remarque :**

- Une **solution tampon** est une solution qui maintient approximativement le même **pH** malgré l'addition de petites quantités d'un **acide** ou d'une **base**, ou malgré une dilution.

- **En condition dénaturante :**

Électrophorèse sur gel polyacrylamide-SDS (SDS-page).

Sépare les **protéines** réalisées **en condition dénaturante**, en **présence** de **SDS** Sodium Dodécyl Sulfate ($C_{12}H_{25}SO_4^-$) détergent anionique.

- Les conditions d'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) permettent la suppression des facteurs **forme** et **charge** lors de la migration et Sépare les protéines uniquement en fonction du facteur **taille**.

2.1.3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en **biochimie** et en **biologie moléculaire** pour **séparer** les fragments de **l'ADN** et **l'ARN** ou **des protéines** en fonction de leur **poids et tailles** moléculaire.

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des **acides nucléiques** chargés **négativement** sous l'effet d'un **champ électrique**. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Même principe que l'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide sauf que pour l'Electrophorèses sur gel d'agarose, la révélation des bandes d'ADN se fait par coloration : Bromure d'Ethidium (BET) et l'éclairage sous ultraviolet (voir diapositifs).

✓ **Remarque :**

Cette technique est peu utilisée dans le cas des protéines, car dans ce domaine les gels de polycrylamide donnent toute satisfaction.

2.1.3.3. Isoélectrofocalisation : (IEF de l'anglais isoelectric focusing ou electrofocusing).

Est une technique de séparation des **molécules**, tel que les **protéines**, par des différences dans leur **point isoélectrique**.

Ici, la séparation des molécules de l'échantillon se fait dans un gradient de pH (Force motrice des protons).

Les molécules se déplacent sous l'effet d'un champ électrique jusqu'à l'endroit où le pH égal à leur **pI** (point isoélectrique).

Cette méthode présente l'avantage de lutter contre la diffusion de l'échantillon hors de sa zone de **pI**.

On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration.

Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication. Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle.

✓ Remarque :

- Le **point isoélectrique** (pI ou pKi) ou **potentiel hydrogène isoélectrique** (pHi) est le pH auquel une molécule est sous forme d'ion mixte ou sous un potentiel électrique neutre.

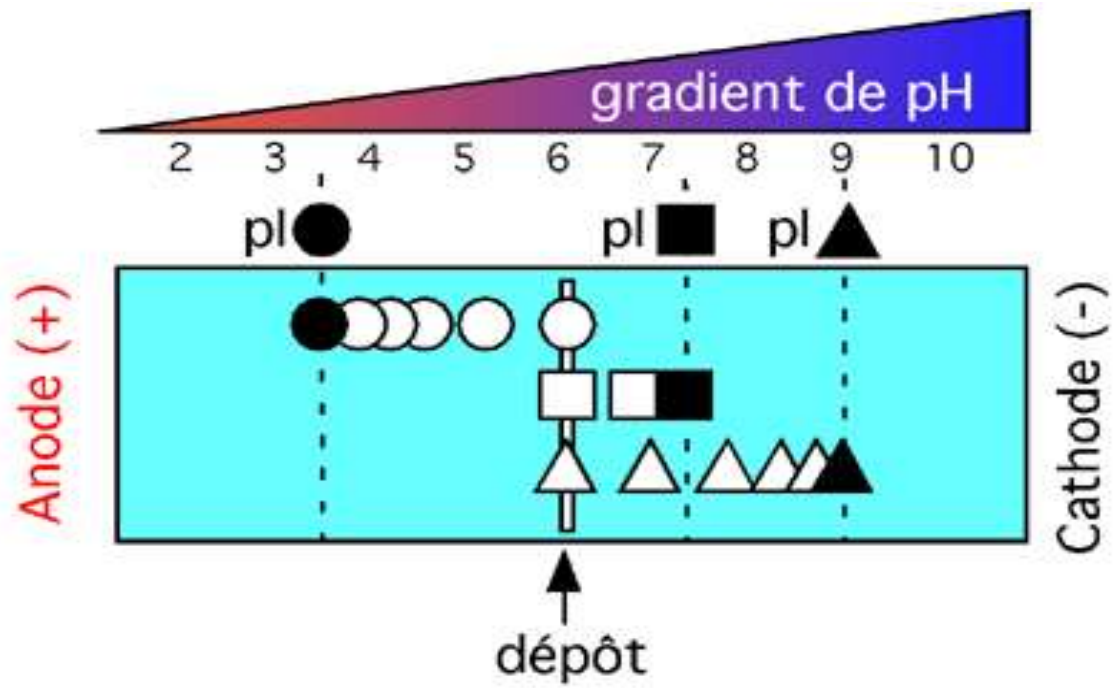


Figure 7 : Isoélectrofocalisation

(w.w.w.biochimiedesproteines).

2.1.3.4. Electrophorèse bidimensionnelle.

C'est un type d'électrophorèse utilisé pour analyser des **bandes protéiques** très proches formant un **chevauchement**. Pour séparer ces bandes, la combinaison de **2 modes de séparation dans 2 dimensions** devient nécessaire.

L'électrophorèse bi-dimensionnelle permet la **résolution >1 000 protéines** différentes alors que le SDS-PAGE (unidimensionnelle) permet uniquement la **résolution <50 protéines**.

Dimension 1 :

Séparation des protéines en fonction de la **charge** par **Focalisation Isoélectrique (FIE)**

On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi. On soumet alors à un fort courant électrique.

Dimension 2 :

Séparation en fonction de la **taille** ou la **masse** des protéines par **SDS-PAGE**

Le gel étroit de protéines séparées par **FIE** est soumis à une **SDS-PAGE** dans une direction **perpendiculaire**.

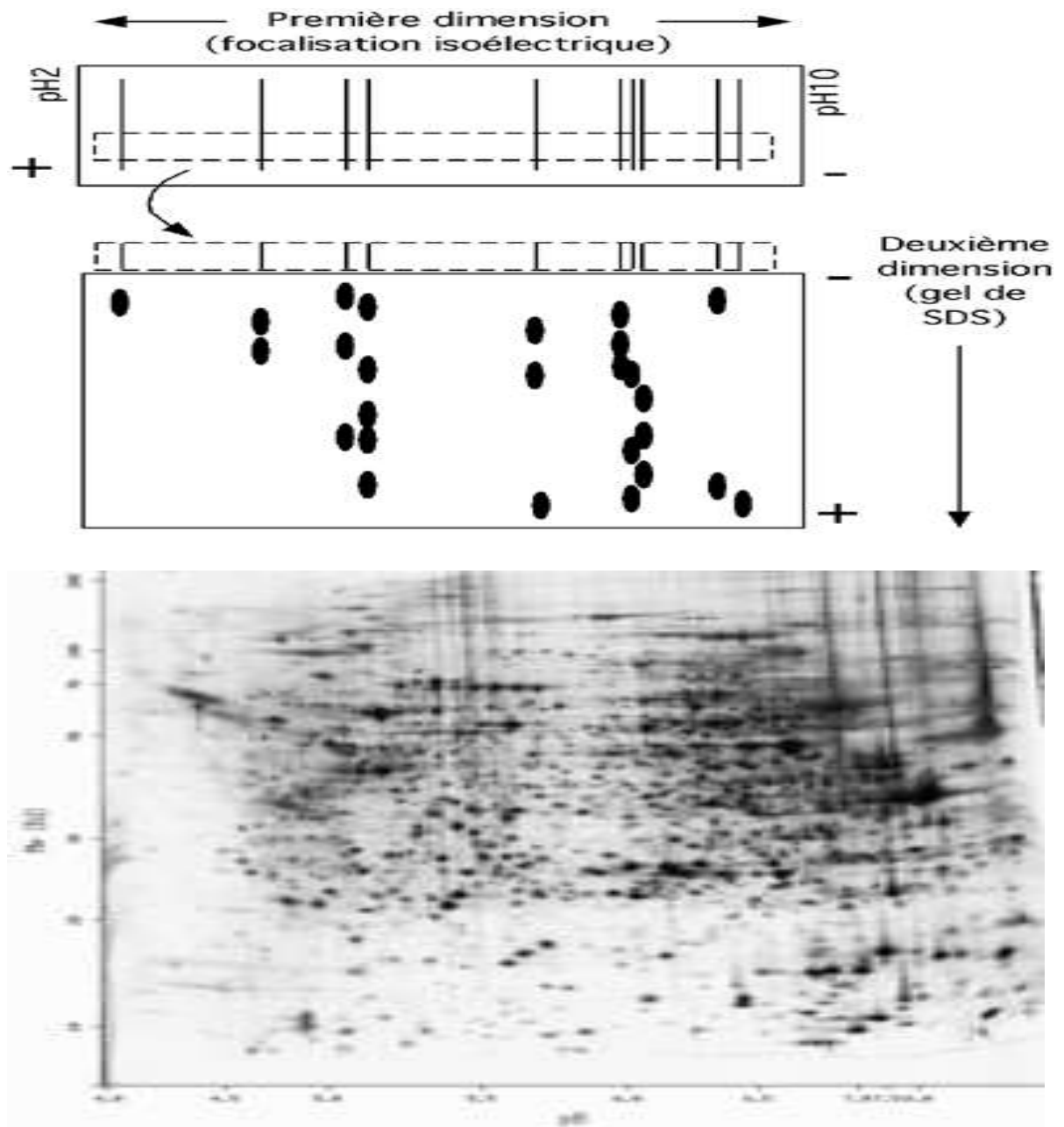


Figure 8 : Electrophorèse bidimensionnelle

(w.w.w.biochimiedesproteines).

2.1.3.5. Immuno-électrophorèse.

La révélation est basée sur une réaction « antigène-anticorps ».

C'est une méthode de séparation des **protéines sériques** présentes dans le **sérum de sang** ou l'**urine**, associant la migration dans un champ électrique (électrophorèse) et la précipitation des protéines à l'aide d'immun sérum c-à-d que les anticorps forment un précipité avec les antigènes dont ils sont spécifiques (**immunodiffusion**).

✓ Principe :

- Dans un premier temps, les protéines sériques sont séparées par électrophorèse.
- Ensuite les fractions obtenues sont étudiées avec des anticorps spécifiques des protéines sériques par la méthode de la double diffusion, appelée **immunodiffusion**.

a. Electrophorèse.

- Dépôt des sérums dans les puits marqués.
- Tension électrique est appliquée pendant 45 mn
- Les protéines chargées électriquement sont séparées.

✓ Résultats.

Les fractions de protéines (albumine, α_1 , α_2 , β et γ globulines) sont séparées comme dans une électrophorèse de zone classique mais ici on ne les visualise pas par coloration.

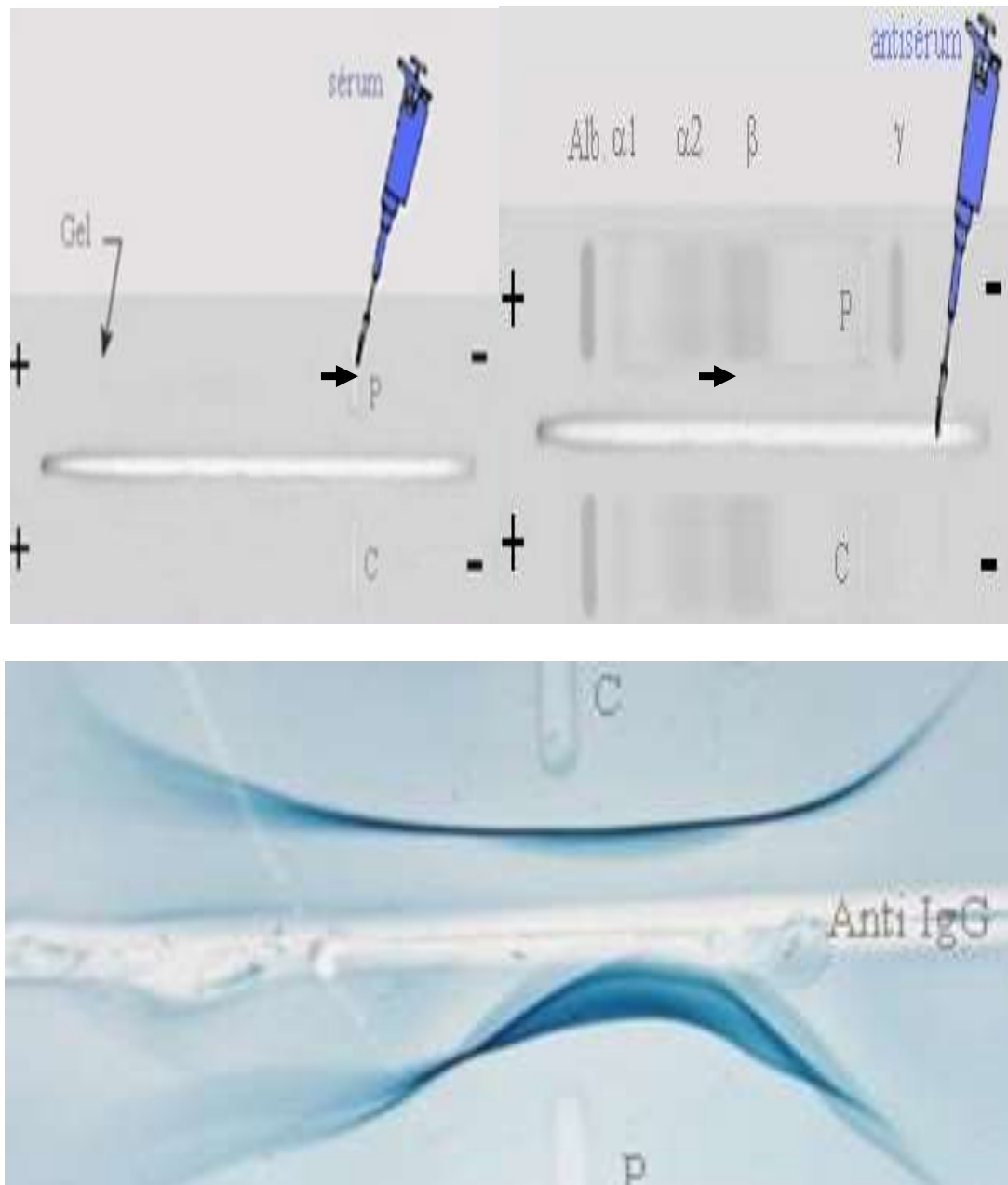


Figure 9 : L'immuno-électrophorèse

(www.snv.jussieu.fr).

b. Immunodiffusion.

- Une couche de gel est percée de trous (ou "puits"). L'échantillon à étudier

est placé dans un puits et un sérum ou des anticorps purifiés sont placés dans un puits adjacent. On les laisse se développer pendant 48 heures.

- Pendant ce temps, les deux échantillons vont se diffuser autour de leurs puits respectifs. Si les antigènes reconnaissent un des anticorps de l'échantillon, ils s'y lieront et formeront un complexe immun (complexe antigène-anticorps). Le complexe immun créera un précipité blanc en forme de ligne ou d'arc, ce qui est une signature visuelle de la reconnaissance d'un antigène.

- Un lavage et une coloration seront nécessaires : Élimination par lavage-absorption (NaCl 0,85%) des protéines restées libres puis séchage des plaques et coloration à l'aide d'un colorant bleu pour protéines.

- Décoloration puis séchage : Seuls les arcs de précipitation apparaissent colorés.

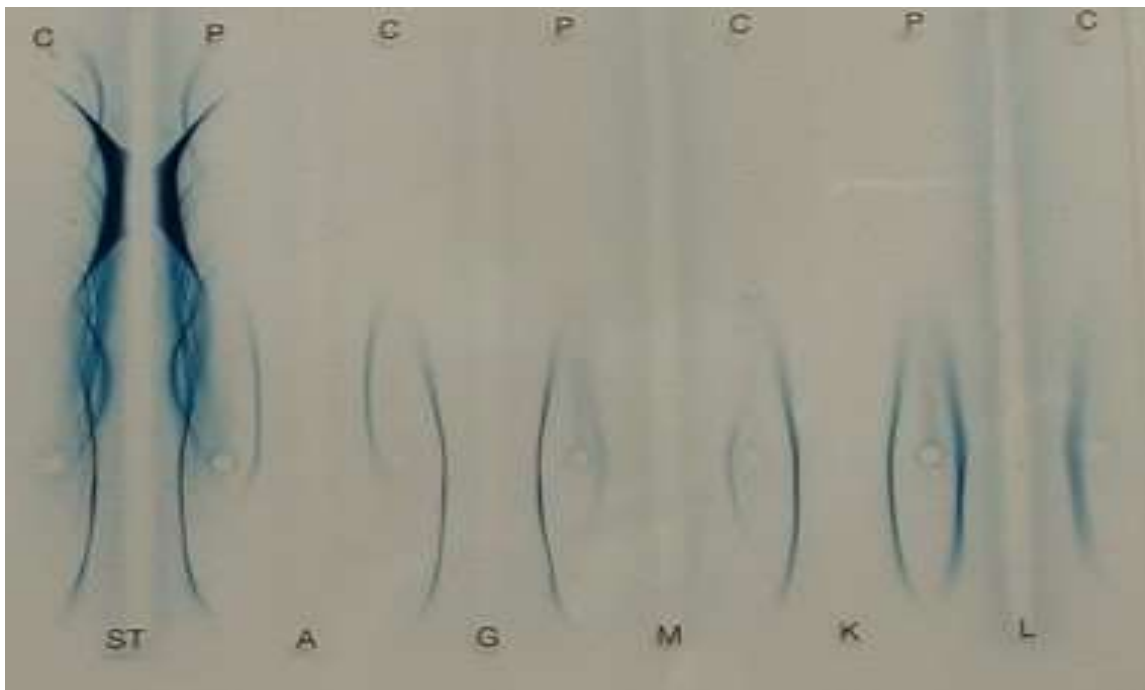


Figure 11 : Les arcs de précipitation colorés

(Un Immunoélectrophorégramme)

(www.snv.jussieu.fr)

METHODES SPECTRALES.

Introduction :

Spectrophotométrie= spectro+photo+métrie

Spectro=rayon électromagnétique photo=lumière métrie=mesurer

Qui dit spectrophotométrie dit spectre électromagnétique. Le spectre électromagnétique est constitué d'ondes de différentes longueurs, des plus petites aux plus grandes et qui sont les rayons gamma, rayon x, ultraviolet, visible, infrarouge microonde, les ondes radio.

La lumière visible ne représente qu'une minuscule partie du spectre électromagnétisme; mais étant détectable par l'œil humain, elle fut donc un des premiers moyens de caractérisation des composés chimiques.

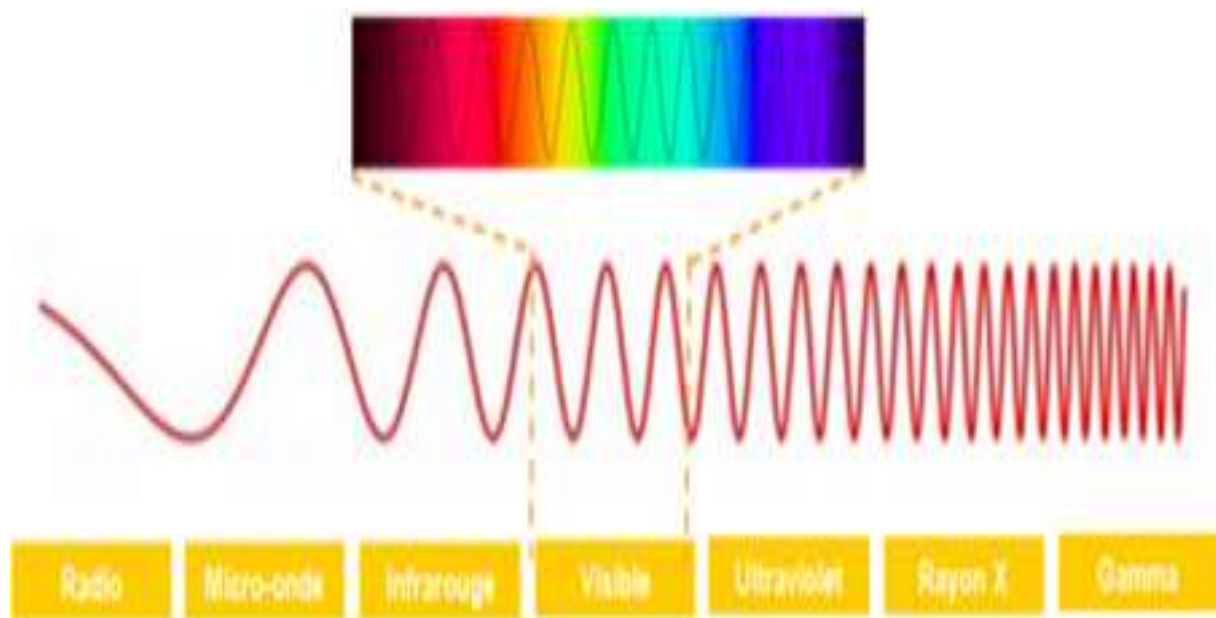


Figure 1 : Le spectre électromagnétique

(w.w.w.cours.univ-paris1.fr).

✓ Historique :

C'est **Issac Newton** (1642-1726) qui a été le fondateur de la spectroscopie, il a été le premier à comprendre que l'étalement des couleurs par le prisme est lié à la nature intrinsèque de la lumière, non pas au prisme lui-même.

1. Définition de la spectrophotométrie :

La spectrophotométrie est l'étude quantitative des interactions entre la lumière et la matière. Lorsque la lumière traverse une substance, elle est en partie transmise et en partie absorbée.

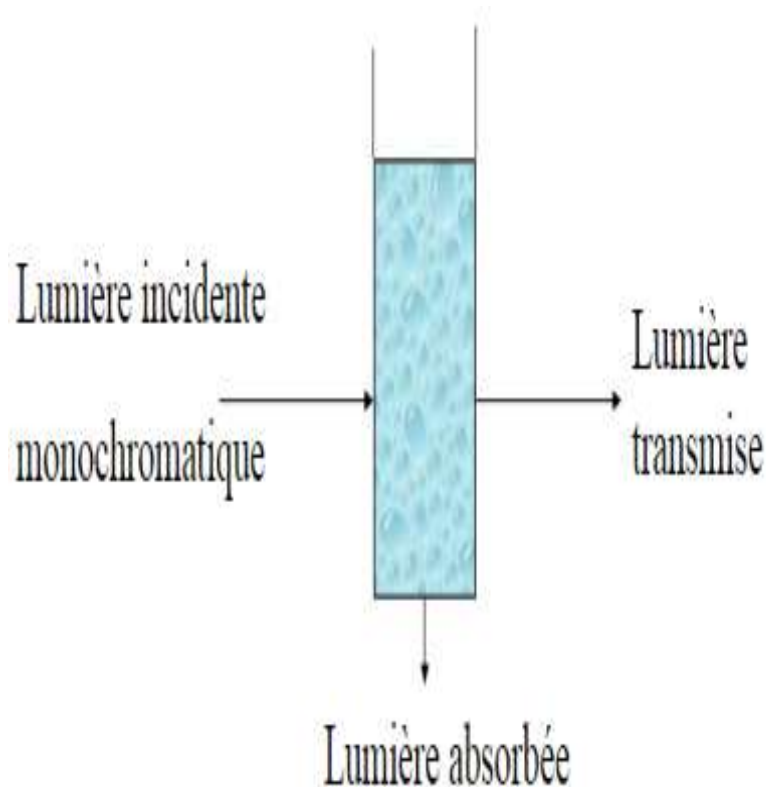


Figure 2 : Interaction de la substance avec la lumière

(Google, 2021).

Il existe trois grandes familles de spectroscopie :

- a.** Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.
- b.** Spectrophotométrie atomique qui peut être : à absorption atomique ou à émission atomique
- c.** Spectrophotométrie de résonance magnétique nucléaire.

1.1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

1.1.1. Définition :

Technique de laboratoire permettant de doser une substance chimique en solution (hémoglobine, calcium sanguin) en faisant traverser à cette solution étudiée (provenant d'un prélèvement effectué sur un malade, par exemple) un rayon d'une lumière artificielle (rayonnement électromagnétique).

On **mesure** par la suite l'intensité du rayonnement électromagnétique qu'elle **absorbe** à des longueurs d'onde différentes, allant de l'ultraviolet jusqu'aux ondes radio. Ce rayonnement qu'elle absorbe, est appelé le **spectre d'absorption**.

A. Principe :

La **spectrophotométrie d'absorption** : mesure que l'**absorbance** ou la densité optique de la substance chimique (généralement en solution).

En effet, selon la **loi de Beer-Lambert**, l'intensité de la lumière transmise après passage de la solution à doser est fonction de la concentration de cette substance. Plus la concentration **C** augmente, plus la solution est sombre, plus elle absorbe la lumière et donc plus l'absorbance **A** est élevée : (**$A = kCL$**).

Où

C = C'est la concentration des espèces absorbantes.

k = Constante caractéristique de l'échantillon.

A = Absorbance de la lumière.

L = Longueur de la cuve que traverse la lumière = 1 cm

B. Le spectre d'absorption :

C'est la quantité de lumière absorbée par un composé, en fonction de la longueur d'onde

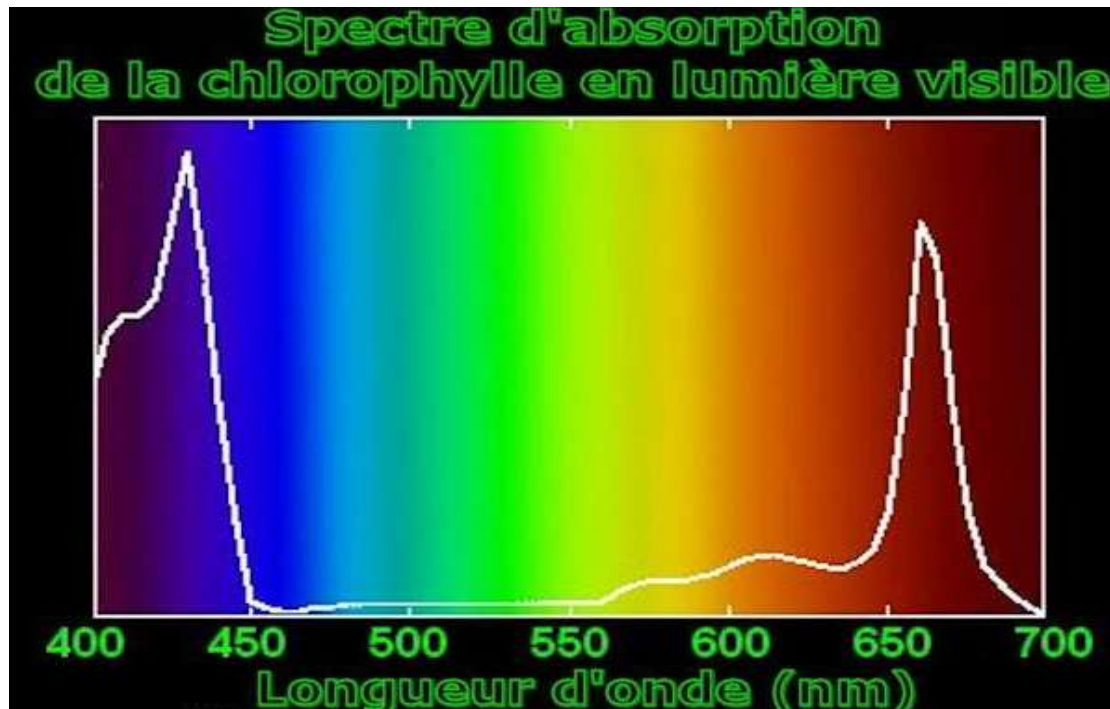


Figure 3 : le spectre d'absorption

(w.w.w.cours.univ-paris1.fr)

Exemple :

Le spectre d'absorption de la chlorophylle en lumière visible dispose de deux pics, un dans le bleu et un second dans le rouge le vert n'est pas absorbé, il est transmis, ce qui nous permet de le voir en vert (diapo).

1.1.2. Types d'appareillages.

C'est le **spectrophotomètre** qui mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée.

Un **monochromateur** est un dispositif utilisé en **optique** pour

sélectionner une gamme la plus étroite possible de **longueurs d'onde** à partir d'un **faisceau lumineux** de gamme de **longueurs d'onde** plus large.

La **lumière** monochromatique, traverse une **cuve** contenant la solution étudiée, et l'appareil **photodétecteur** mesure l'intensité de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

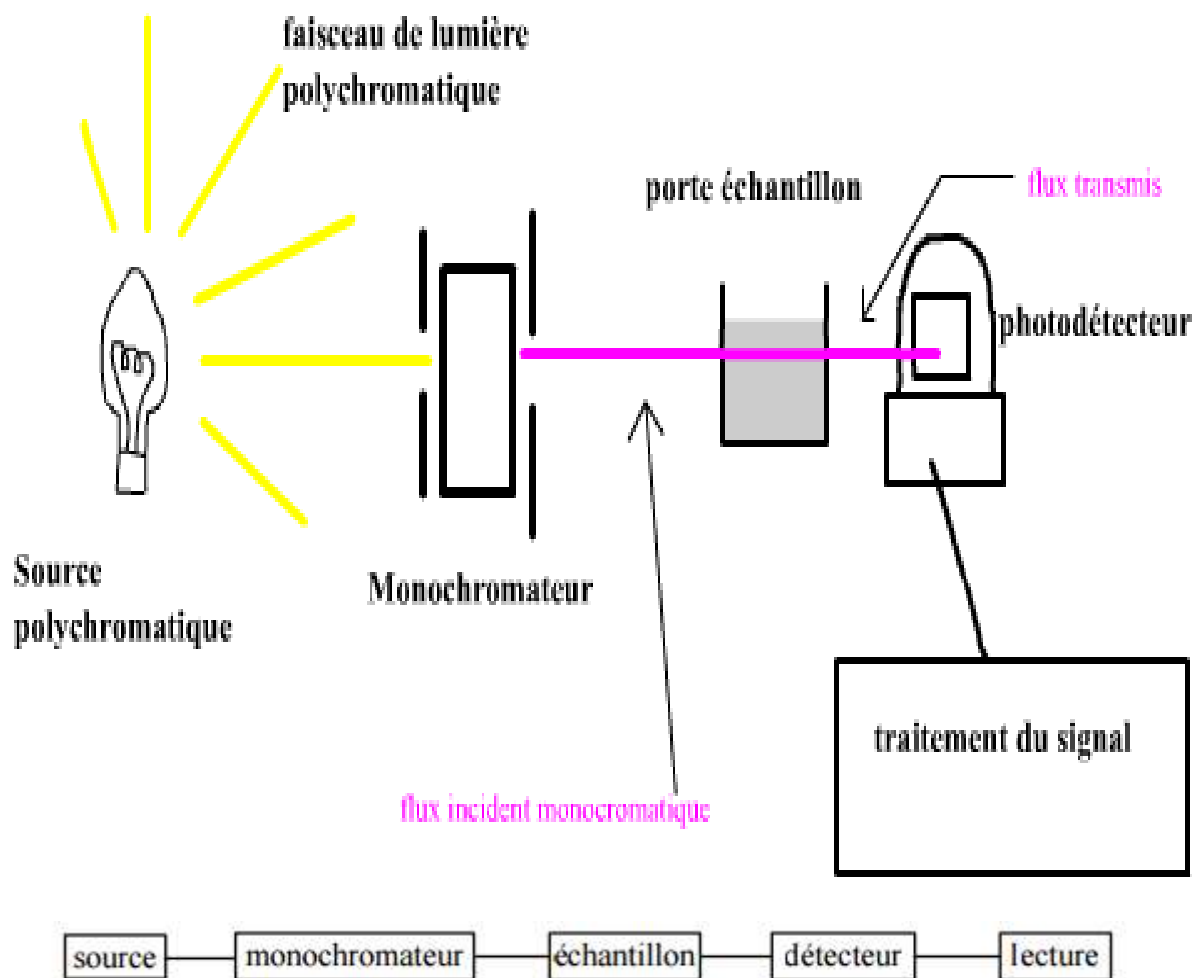


Figure 4 : Fonctionnement du spectrophotomètre

(www.perrin33.com).

Il existe plusieurs spectromètres parmi eux, le spectromètre Raman ou infrarouge, le spectromètre micro-onde ou à hyperfréquence et enfin le plus utilisé, le spectromètre UV/Visible ; c'est une technique de spectroscopie qui met en jeu les ondes dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm - 1 400 nm). L'échantillon sera soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde.



Figure 4 : Spectromètre UV/Visible

(Google, 2021).

1.1.3. Application :

Utilisé dans les analyses **chimiques** et pour déterminer le pourcentage d'oxygénation du sang (**oxymétrie**).

1.2. Spectrophotométrie atomique.

Les sources de rayonnement UV/Visible, utilisées en spectrométrie moléculaires ne conviennent pas pour la spectrométrie atomique, il a fallu mettre au point des sources spécifiques dont les plus utilisées sont **la lampe à cathode creuse et la torche plasma**. C'est une méthode donc qui analyse **quantitativement** ou **qualitativement** environ **70** éléments à l'état de traces (métaux, métalloïdes et non-métaux).

La spectrophotométrie atomique se présente sous deux formes:

- a. Spectrophotométrie d'absorption atomique(SAA).
- b. Spectrophotométrie d'émission atomique (SEA).

1.2.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres de l'échantillon peuvent **absorber** les rayonnements d'une certaine **longueur d'ondes** de **la lampe à cathode creuse**.

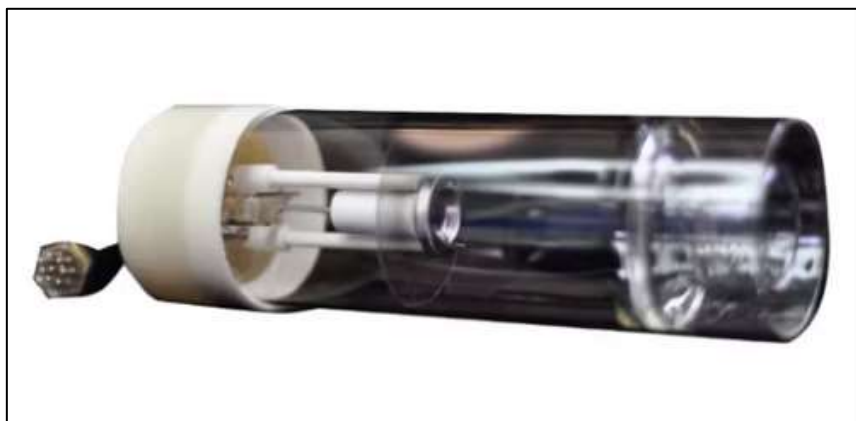


Figure 5 : Photographie d'une lampe à cathode creuse pour spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) (Google, 2021).

1.2.1.1. Principe et appareillage :

La lumière est remplacée par une source atomique qui provient de la lampe à cathode creuse.

Le rayonnement traverse la flamme du four graphique (atomisation), le monochromateur et il est ensuite en partie absorbé par l'échantillon.

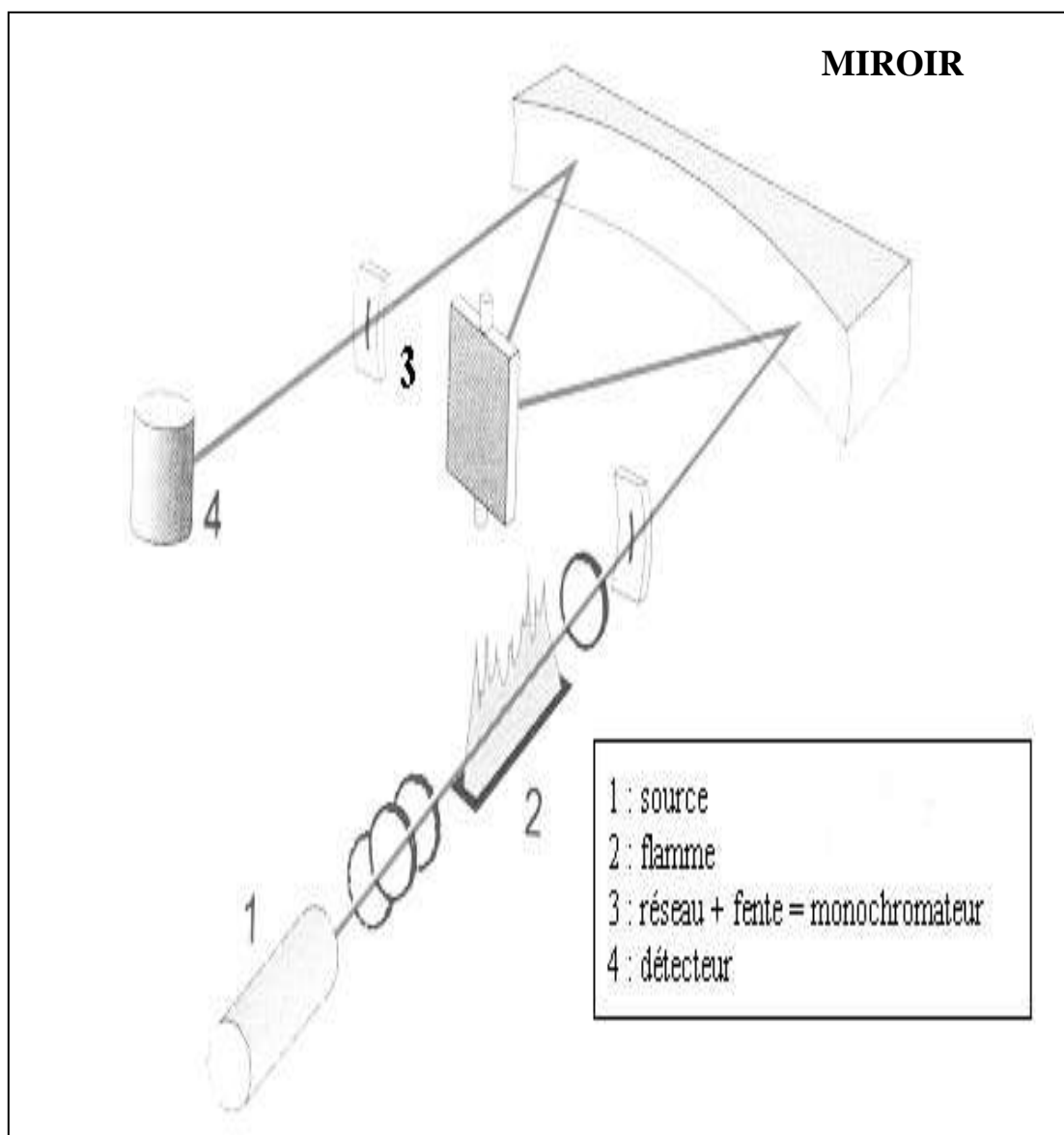


Figure 6 : Principe de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) (www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie).



Figure 7 : Spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA)

(Google, 2021).

1.2.1.2. Application :

La SAA est une méthode basée sur l'analyse des **métaux** d'échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques et atmosphériques par exemple.

1.2.2. Spectrophotométrie d'émission atomique (SEA).

La spectroscopie d'émission atomique (SEA) mesure **l'émission** optique provenant des molécules de l'échantillon, atomisées et stimulées par une flamme à haute température (source d'énergie) **de torche plasma**, pour déterminer sa concentration.

Les atomes ou **molécules** de l'échantillon qui sont atomisés et stimulés par la source d'énergie à haute température, peuvent se désintégrer en émettant des radiations appelées **émissions atomiques** (spectroscopie d'émission atomique).



Figure 8 : Torche plasma pour spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) (Google, 2021).

1.2.2.1. Principe et appareillage:

La solution est pulvérisée dans une flamme où elle est transformée en vapeurs atomiques.

On envoie sur ces vapeurs une source d'énergie à haute température caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde) produite par la source qui est généralement la torche plasma, qui va les atomiser et stimuler en émettant des radiations appelées **émissions atomiques**.

La radiation est absorbée par un capteur optoélectronique (photodiode).

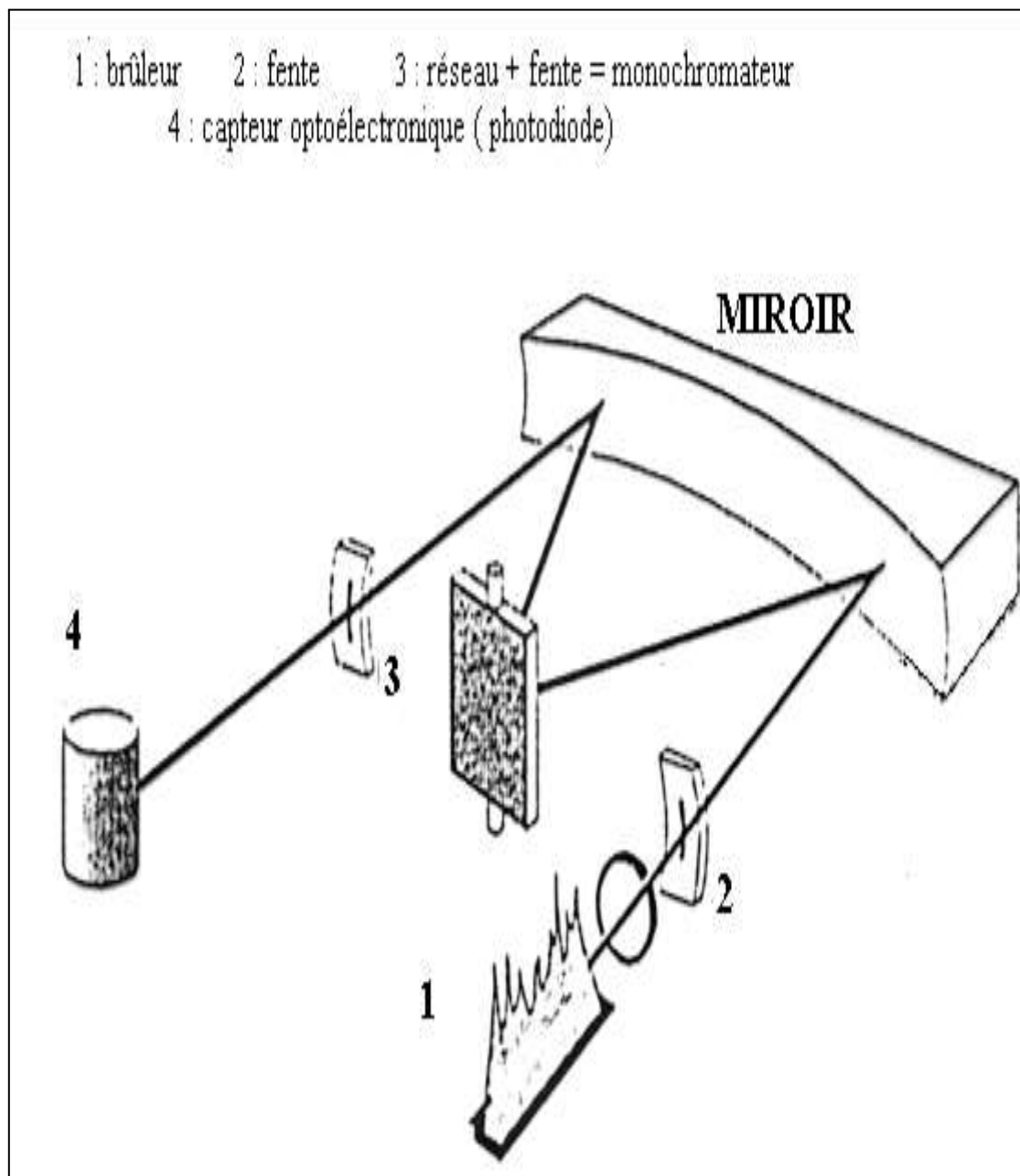


Figure 9 : Principe de la spectrophotométrie d'émission atomique (SEA) (www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie).



Figure 10 : Spectromètre par torche à plasma à couplage inductif (ICP) (Google, 2021).

1.2.2.2. Application :

Ses usages les plus importants portent sur la détermination du **sodium**, du **potassium**, du **lithium** et du **calcium** dans les fluides et tissus biologiques.

1.3. Résonance magnétique nucléaire.

Méthode spectrométrique récente (1950-1960) dont le développement et les performances s'accroît de façon spectaculaire.

Cette technique permet de connaître la structure des molécules, en mesurant **l'absorption** d'une radiation par le noyau atomique possédant un **spin** nucléaire, de la substance ou matière analysée, placés dans un champ magnétique fort, tel que le domaine des **fréquences radio** appelées **fréquences de résonances**.

1.3.1. Principe:

Le **noyau atomique** désigne la région située au centre d'un **atome** constituée de **protons** (charge positive) et de **neutrons** (charge neutre) formant ensemble les **nucléons**.

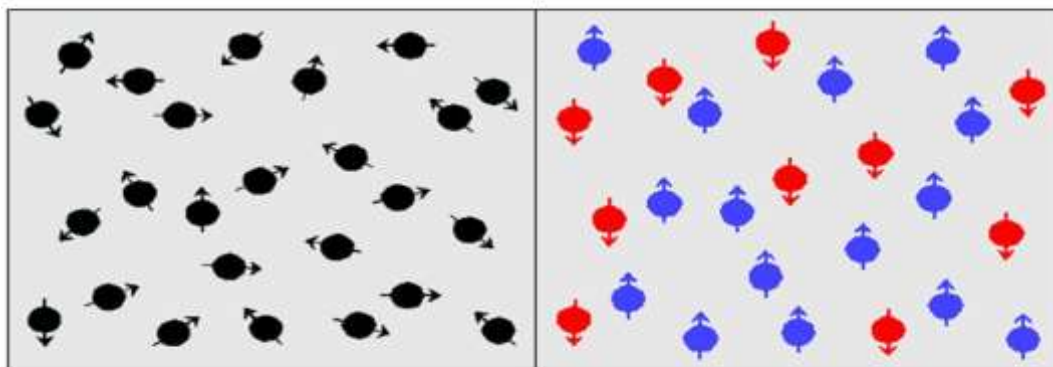
Le **spin** correspond à la masse ou à la charge du noyau.

-Les noyaux peuvent être divisés en **deux catégories** : d'une part ceux qui possèdent un **spin** et d'autre part ceux qui n'en possèdent pas.

Pour les noyaux qui possèdent un spin :

- En l'absence du champ magnétique, les protons du noyau sont orientés au hasard
- Et en présence du champ magnétique, en fréquence radio, les protons qui possèdent un moment angulaire de **spin**, optent pour 2 orientations, une orientée parallèlement au sens du champ magnétique et l'autre antiparallèlement au sens du champ magnétique, le noyau est dit en **résonance**.

Principe de la RMN



À gauche, orientation des protons en l'absence de champ.

À droite, en présence d'un champ magnétique. En bleu, les protons orientés dans le sens du champ et en rouge, les protons orientés dans le sens contraire au champ.

1.3.2. Appareillage:

L'espèce à étudier est introduite dans un tube contenant un solvant bien choisi, en faisant varier les **fréquences des ondes radio** traversant la solution, on peut enregistrer les **fréquences de résonance** de l'ensemble des protons de la molécule étudiée.

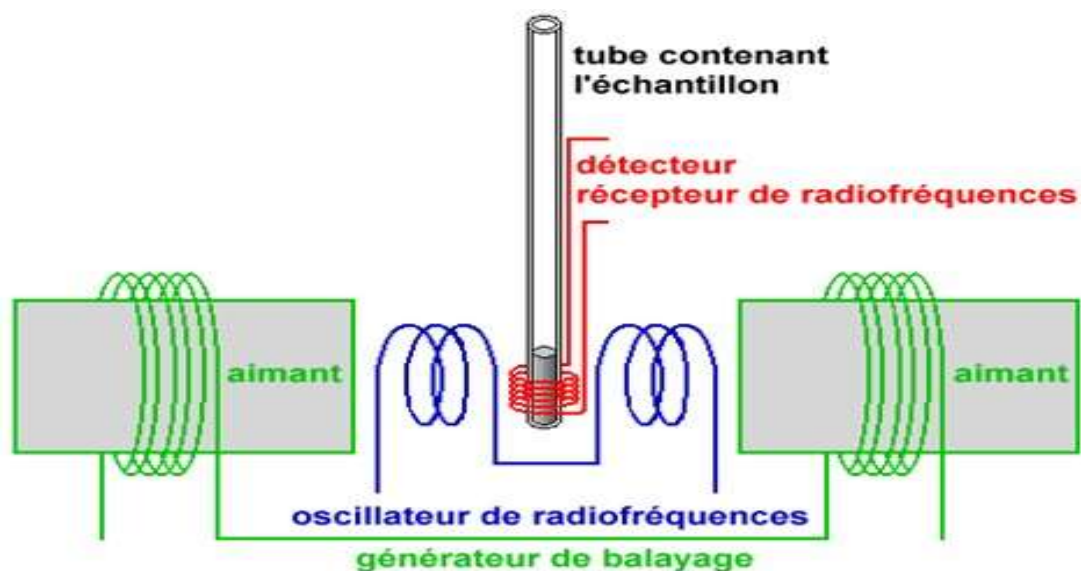


Figure 11 : Principe du fonctionnement du spectromètre à résonance magnétique nucléaire (Google, 2021).



Figure 12 : fréquence de résonance.



Figure 13 : spectromètre à résonance magnétique nucléaire.

(www.usherbrooke.ca).

1.3.3. Application:

- **Dans l'industrie** : recherche les défauts de fabrication.
- **En biologie** : analyse de la structure des macromolécules (protéines, acides nucléiques polysaccharides...).
- **En pharmaceutique** : vérifie la pureté des médicaments.
- **En médecine** : diagnostic facilité grâce à l'imagerie par RMN, appelée l'IRM, technique d'imagerie médicale permet d'obtenir des Images en 2D ou 3D de l'intérieur du corps.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Introduction :

Contrairement à un microscope optique (photonique), un microscope électronique n'est pas sensible à la lumière qui émane de l'échantillon à analyser, mais aux électrons qu'il renvoie.

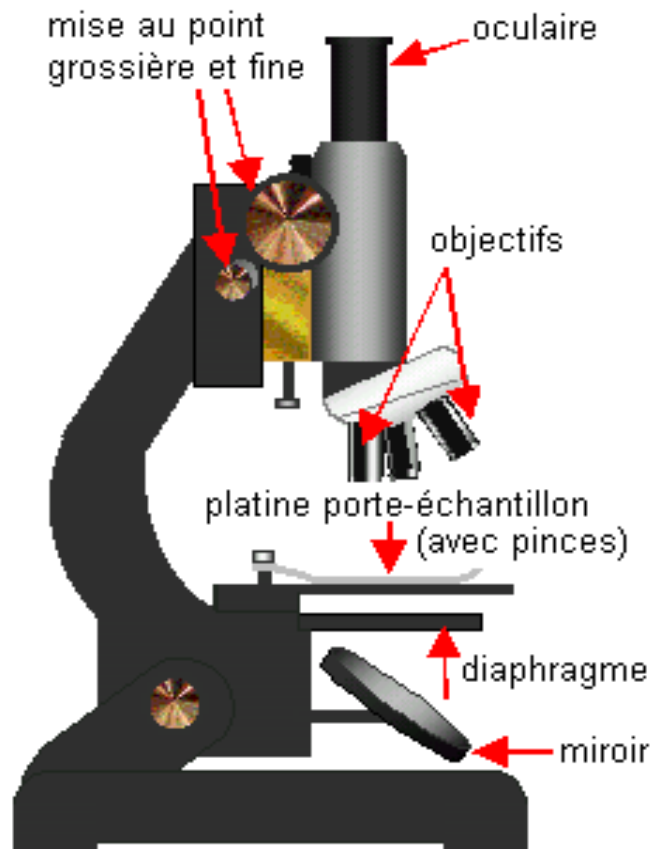


Figure 1 : Microscope optique (photonique)

(www.fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_optique).

Le microscope électronique utilise le même principe de **lentilles** et de **faisceaux** qu'un microscope optique (photonique) classique.

Ce qui varie, c'est que le microscope électronique est doté de **lentilles électromagnétiques** et **d'un faisceau d'électrons**, alors qu'un microscope optique utilise **des lentilles en verre** et **un faisceau de lumière** (photon).

La résolution des microscopes électroniques est beaucoup plus grande (le grossissement atteint 2 millions de fois, contre 2.000 fois avec un microscope optique).

Tableau 1: Analogie entre le microscope optique et le microscope électronique.

Microscope optique	Microscope électronique
1. Faisceau de lumière (photon).	1. Faisceau d'électrons.
2. Lentilles en verre.	2. Lentilles électromagnétiques.
3. Le grossissement atteint 2.000 fois.	3. Le grossissement atteint 2 millions de fois.
4. L'image obtenue se forme directement sur la rétine de l'observateur.	4. L'image obtenue se forme directement sur l'écran fluorescent.

1. Le microscope électronique.

C'est un type de microscope qui utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et des lentilles électromagnétiques pour créer des images très agrandie. La résolution des microscopes électroniques atteint un grossissement de 2 millions de fois, l'image obtenue se forme directement sur l'écran fluorescent.

Il existe plusieurs sortes de microscope électronique. Les plus connus sont :

- a. Le microscope électronique en transmission.
- b. Le microscope électronique à balayage.

1.1. La microscopie électronique à transmission (MET).

La microscopie électronique à transmission (MET, en anglais TEM pour *Transmission Electron Microscopy*) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « **transmis** » à travers un échantillon très mince, il permet de visualiser des objets bien **plus petits** que des cellules.

Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une **image**, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

1.1.1. Description de l'appareil.

Un microscope électronique en transmission est composé des principaux éléments suivants :

- Un canon à électrons, qui fournit le faisceau électronique ;
- Des lentilles magnétiques ;

- Un système de détecteurs d'électrons.

Ces éléments sont placés dans un système de **vide**, autour duquel se situe un réservoir d'azote liquide, qui sert à refroidir les zones près de l'échantillon

Le faisceau d'électrons est produit au moyen d'un canon à électrons, ils se déplacent dans le vide généré par des pompes (pompes à palettes, pompes à diffusion et pompes sèche). Ces dernières nécessitent d'être refroidies par un circuit liquide.

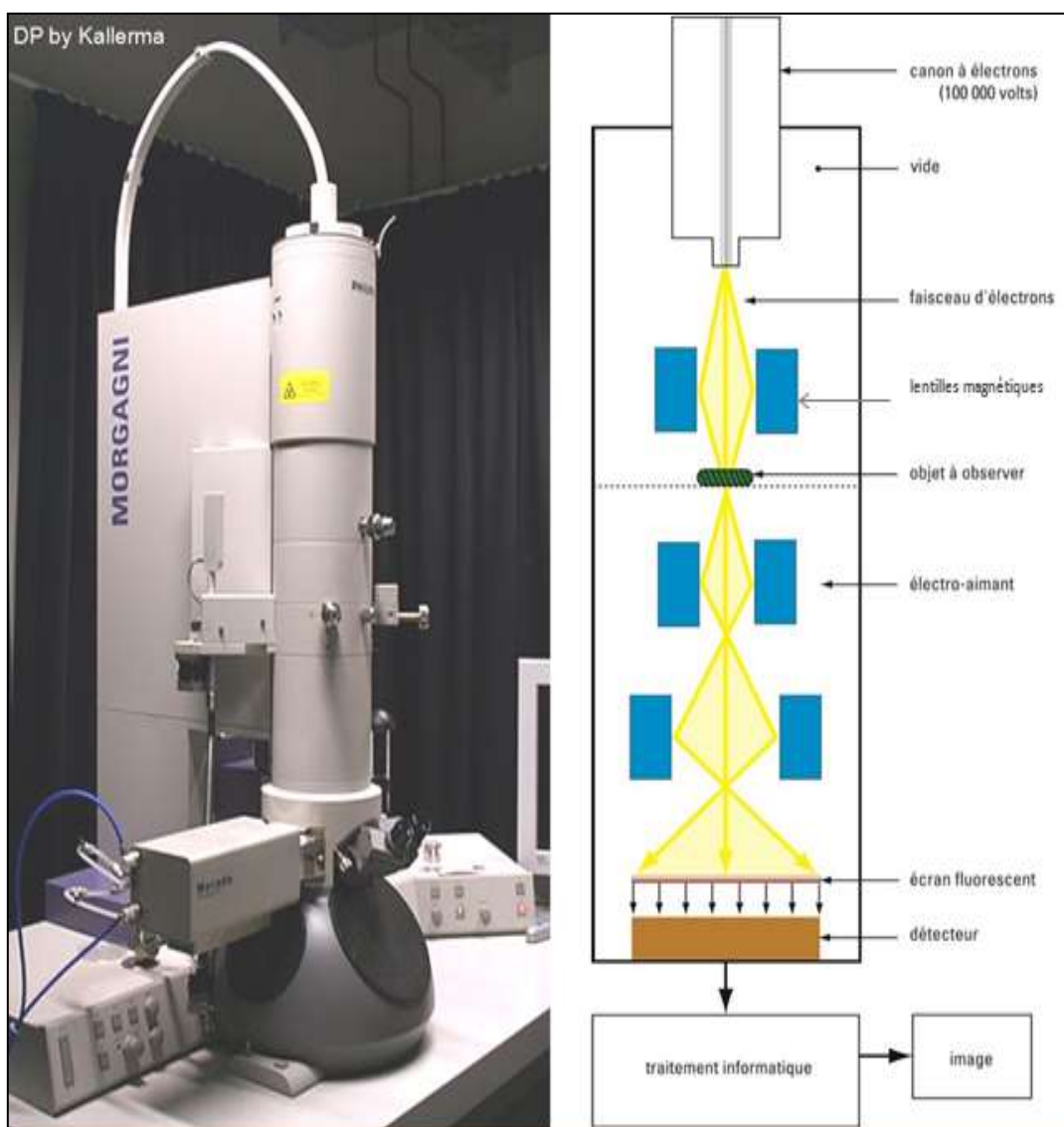


Figure 2 : Microscope électronique à transmission (MET).

(w.w.w.crdp-aquitaine.fr)

1.1.2. Principe de fonctionnement.

Le canon émet des électrons en chauffant un filament de Tungstène (ou cristal d'hexaborure de lanthane). Ces électrons sont ensuite accélérés à l'aide d'une tension comprise entre 200 et 1000 kV.

Les faisceaux d'électrons passent au travers de échantillon d'environ 3 mm de diamètre et d'épaisseur inférieure à 20 nano-mètres Puis se focalisent à l'aide de lentilles magnétiques vers l'écran fluorescent (ou une caméra numérique) sous lequel se trouve un détecteur et donnent ainsi une image.

Le microscope électronique à transmission a deux principaux modes de fonctionnement :

- a. Le mode image,
- b. Le mode diffraction.

a. En mode image:

Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon. Suivant son épaisseur, sa densité et sa nature chimique, les électrons sont plus ou moins absorbés.

A l'aide d'un détecteur, on peut, par transparence, observer une image de la zone irradiée. Ce principe est utilisé notamment en biologie, pour observer des cellules ou des coupes minces d'organes.

b. En mode diffraction:

On utilise le comportement ondulatoire des électrons. Lorsqu'ils rencontrent de la matière organisée (des cristaux), ils sont diffractés, c'est-à-dire déviés dans certaines directions, dépendant de l'organisation des atomes.

Le faisceau est diffracté en plusieurs petits faisceaux. Suivant leur direction, ceux-ci permettent d'en savoir plus sur la structure du cristal étudié.

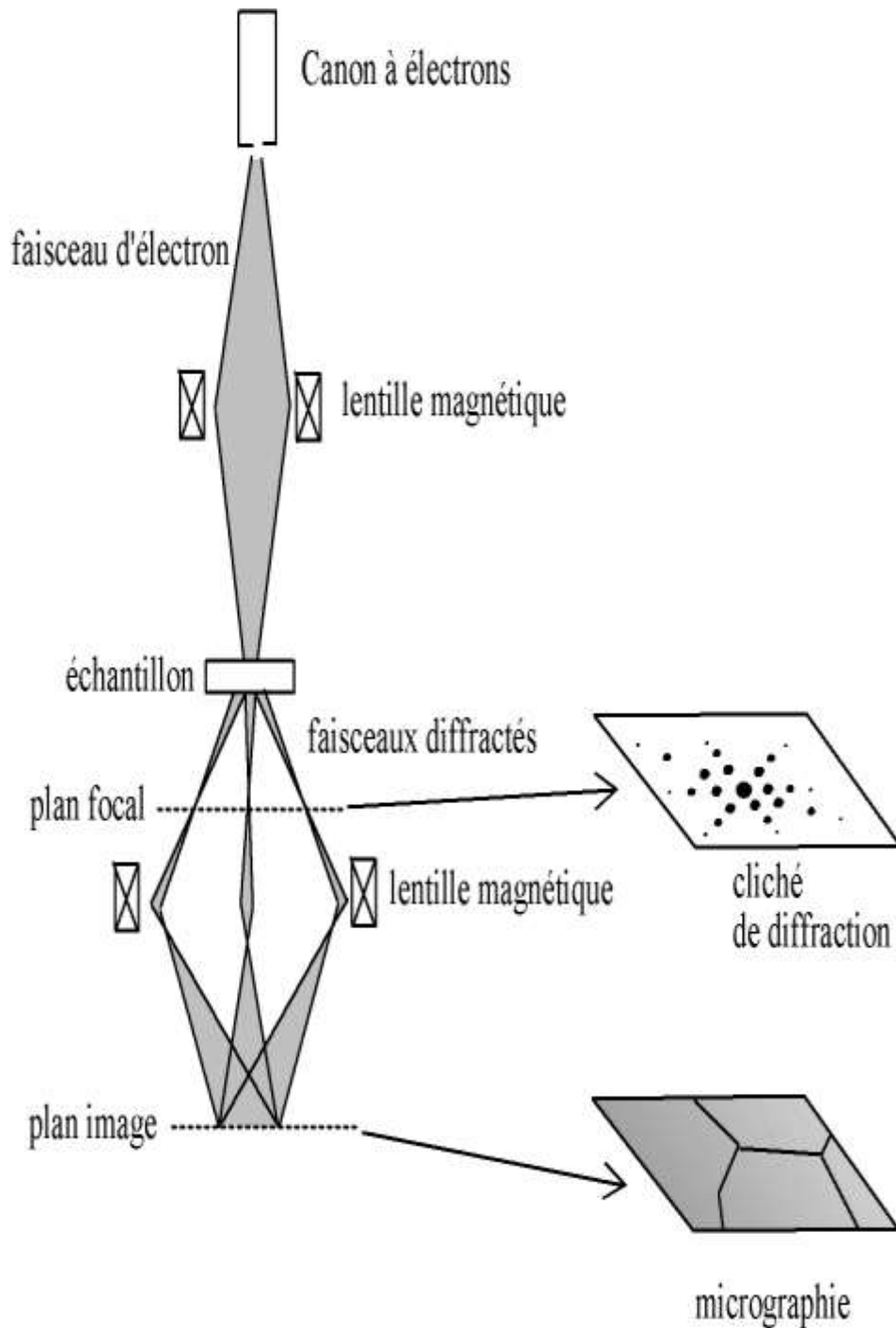


Figure 3 : Schéma de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET) (w.w.w.crdp-aquitaine.fr).

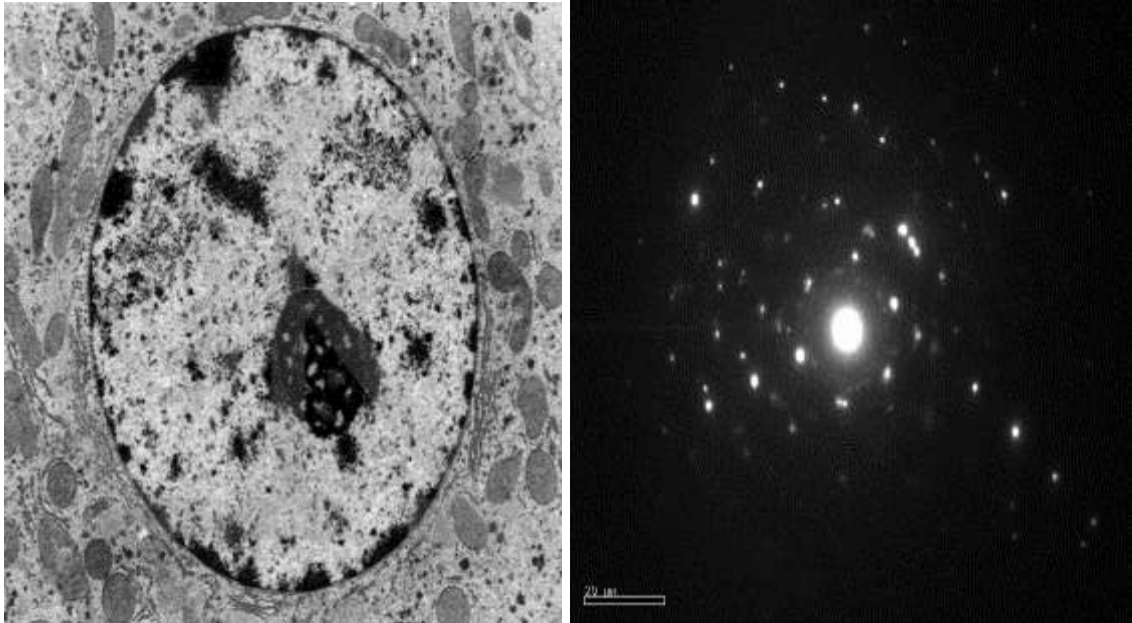


Figure 4 : Micrographie en champ clair et Cliché de diffraction prise avec le microscope électronique à transmission (MET)

(Google, 2021).

1.1.3. Préparation des échantillons.

La qualité des résultats obtenus dépende de la finesse des échantillons traversés par le faisceau d'électrons. Leur épaisseur doit être de l'ordre de 10 à 100 nanomètres maximum.

En général, on fait un trou à bords minces dans l'échantillon, et on observe les bords du trou.

On peut faire ce trou :

- Par abrasion mécanique, avec une cuvetteuse ;
- Par dissolution électrochimique (principe de l'attaque acide) ;
- Par amincissement ionique (on bombarde l'échantillon avec un jet d'ions sous vide).

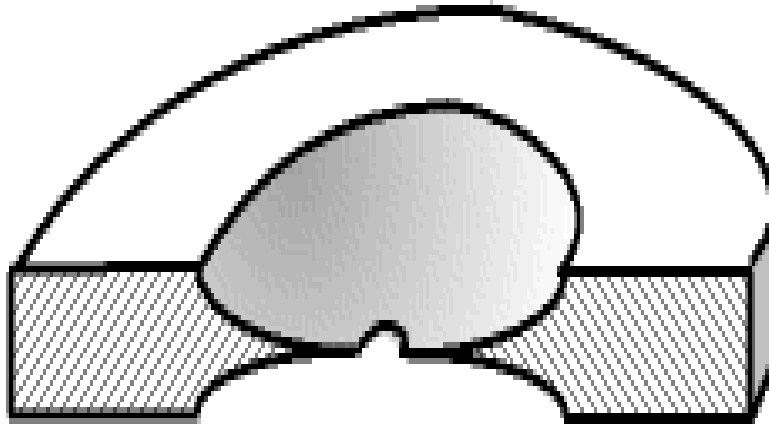


Figure 5 : Échantillon métallique

(Google, 2021).

En biologie, on se sert du contraste d'absorption ; il suffit de faire des lames minces, les électrons traversent facilement la matière organique.

1.2. La microscopie électronique à balayage (MEB).

Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour *scanning electron microscopy*)

C'est une technique de **microscopie électronique** capable de produire des images en relief (haute résolution) de la surface d'un échantillon en utilisant, **le principe des interactions électrons-matière** grâce un balayage du microscope.

1.2.1. Description de l'appareil.

Un microscope électronique à balayage se compose de:

- Un canon à électrons, qui fournit le faisceau électronique
- Des lentilles magnétiques
- Un circuit de pompage pour l'obtention d'un vide secondaire
- Un système de détecteurs d'électrons
- Un générateur de balayage
- Un amplificateur de signal
- Une bobine de déflexion

L'interaction entre les électrons et l'échantillon, provoque la formation de nouveaux **électrons** de plus faible **énergie** (secondaires, rétrodiffuse...). Ils sont amplifiés par un amplificateur de signal puis détectés par un système de détecteurs d'électrons et convertis en un **signal électrique**.

Le contrôle du balayage de la surface de l'échantillon est assuré par la bobine de déflexion.

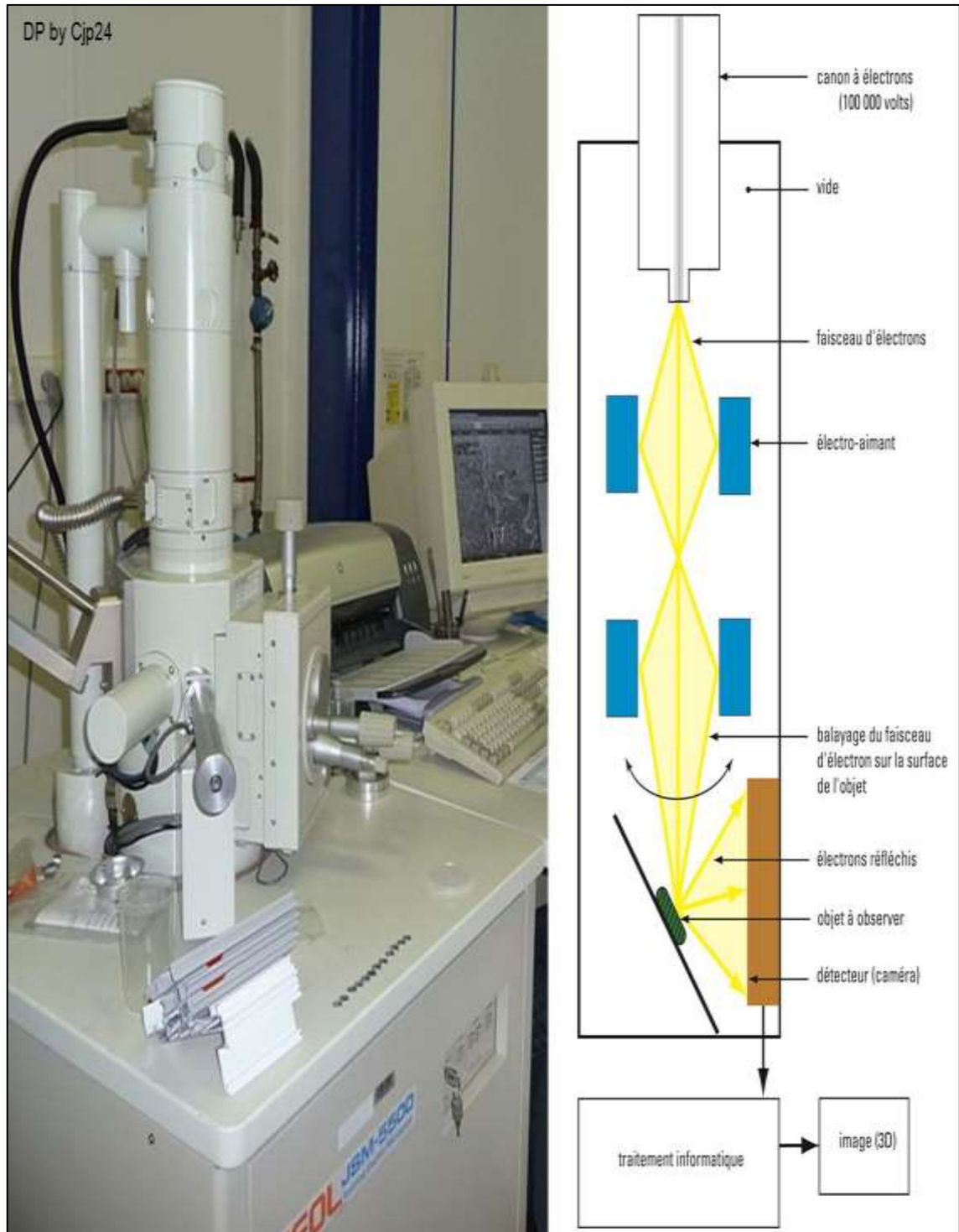


Figure 6 : Microscope électronique à balayage (MEB)

(w.w.w.crdp-aquitaine.fr).

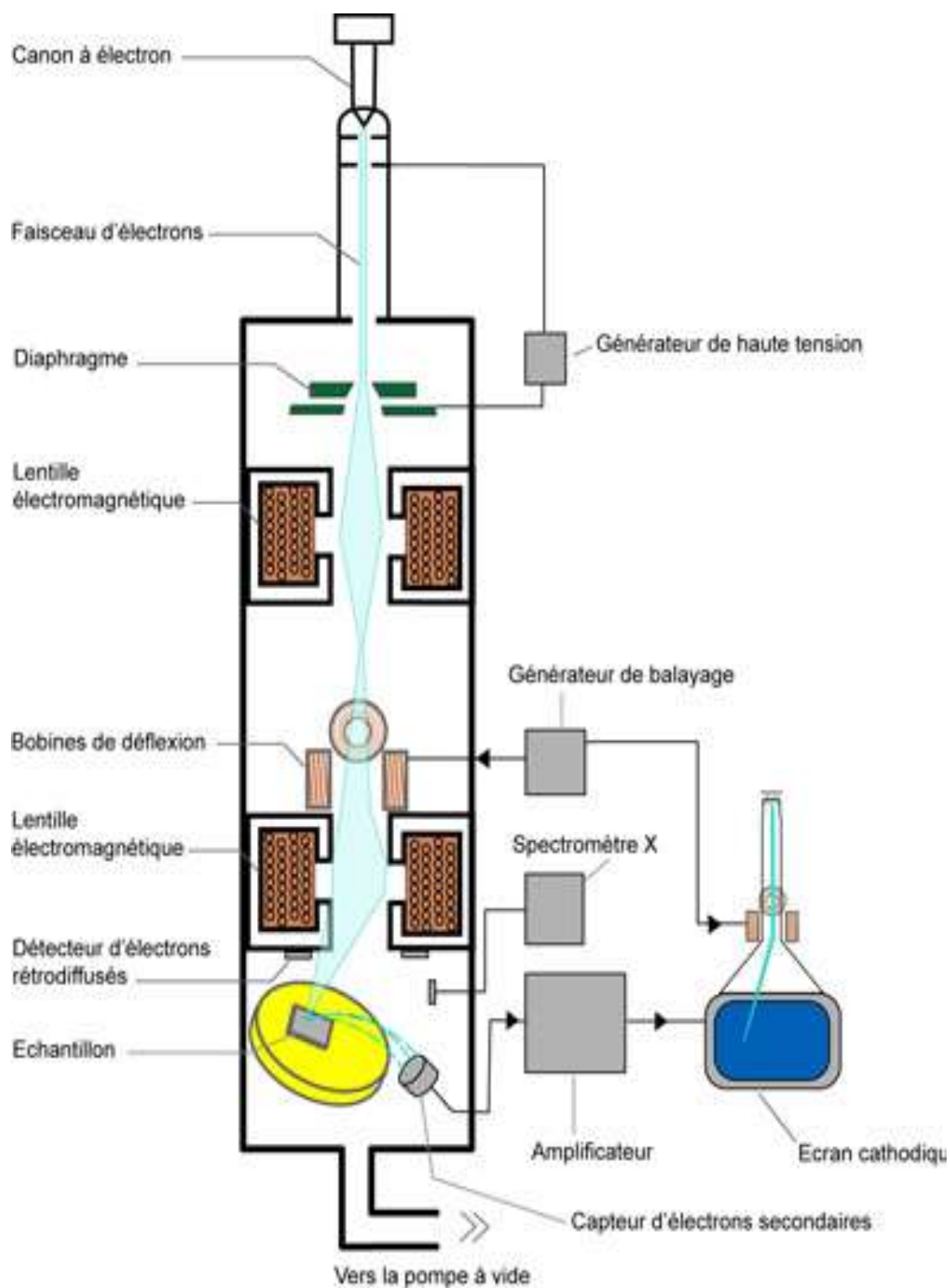


Figure 7 : Description du microscope électronique à balayage (MEB)

(www.crdp-aquitaine.fr).

1.2.2. Principe de fonctionnement.

Le canon produit un faisceau d'électrons grâce à un filament de tungstène chauffé par un courant. Ce faisceau est accéléré par un générateur de haute tension (jusqu'à 30 KV).

Il est ensuite focalisé sur l'échantillon par une série de 3 lentilles électromagnétiques en une sonde de moins de 4 nm.

Le faisceau en touchant la surface de l'échantillon produit des **interactions** dont les suivantes:

- Des électrons **secondaires**,
- Des électrons **rétrodiffusés**,
- Des électrons **auger**,
- Des **rayons X**.

Ces interactions sont amplifiées et collectées par un détecteur adéquat pour être ensuite converties en un **signal électrique**. Ce processus est réalisé en **chaque point de l'échantillon** par un **balayage** du microscope, a fin de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief.

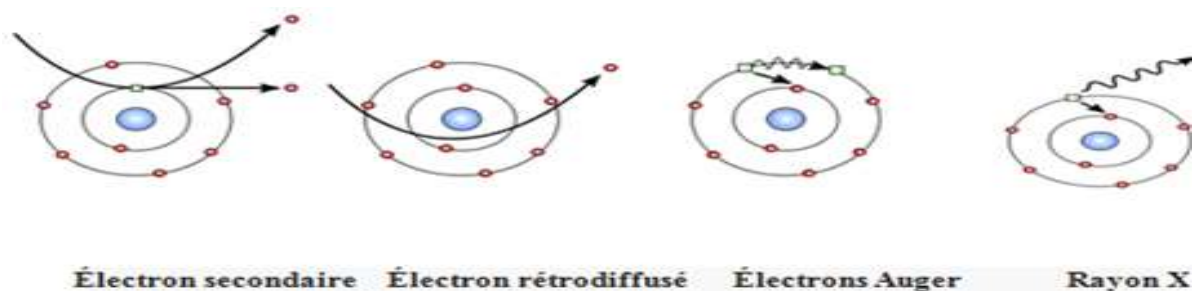


Figure 7 : Interaction entre la matière et les électrons

(Google, 2021).

a. Électrons secondaires :

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Quand il interagit avec les électrons d'un atome, il ressort avec perte d'énergie. Un électron secondaire est émis, l'atome est ionisé. La détection de ces électrons fournit une information sur la topographie de l'échantillon sur une profondeur de 10 nm. L'analyse de ces électrons permet d'obtenir une image caractéristique de la surface. Ces électrons représentent un bon outil pour l'observation des contours, de la morphologie de l'échantillon.

b. Électrons rétrodiffusés :

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Il ressort sans perte d'énergie, en gardant son énergie cinétique et sa quantité de mouvement. Il n'a pas échangé d'énergie avec les atomes de l'échantillon. L'électron incident est rétrodiffusé élastiquement. "Les centres diffuseurs qui induisent dans leur environnement un champ électrique très intense peuvent faire subir à l'électron un changement de direction allant jusqu'à 180°.

c. Électrons Auger :

Ils sont émis à la suite de désexcitation des atomes de l'échantillon (couches externes). Ils possèdent une faible énergie et ils sont caractéristiques de l'atome qui les a émis. Par conséquent, ils permettent d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon, plus particulièrement de sa superficie.

d. Emission d'un photon X :

Un électron primaire du faisceau incident entre en collision avec l'échantillon. Un électron d'une couche interne est éjecté. Il est remplacé par un électron d'une couche supérieure. Un photon d'énergie égale à la différence entre les deux niveaux d'énergie électronique est émis. Le vide

de la couche supérieure est comblé par un autre électron d'une couche encore supérieure avec émission d'un photon. Une cascade est ainsi créée. L'étude des photons X permet une analyse quantitative de la composition chimique de l'échantillon.

1.2.3. Préparation des échantillons.

La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, plat, de dimensions de l'ordre de 1 à 2 centimètres et doit conduire l'électricité afin de pouvoir évacuer les électrons.

Les échantillons métalliques nécessitent peu de préparation à l'exception du nettoyage et du montage.

Par nature, les échantillons biologiques contiennent de l'eau et sont plus ou moins mous. Ils doivent être déshydratés puis subir un traitement pour devenir conducteur (fixation des tissus, nettoyage et métallisation).

La déshydratation : L'échantillon passe de l'eau à l'éthanol puis au CO_2 liquide, pour qu'il soit sec.

La métallisation : On passe une couche métallique sur l'échantillon biologique pour qu'il devienne conducteur.

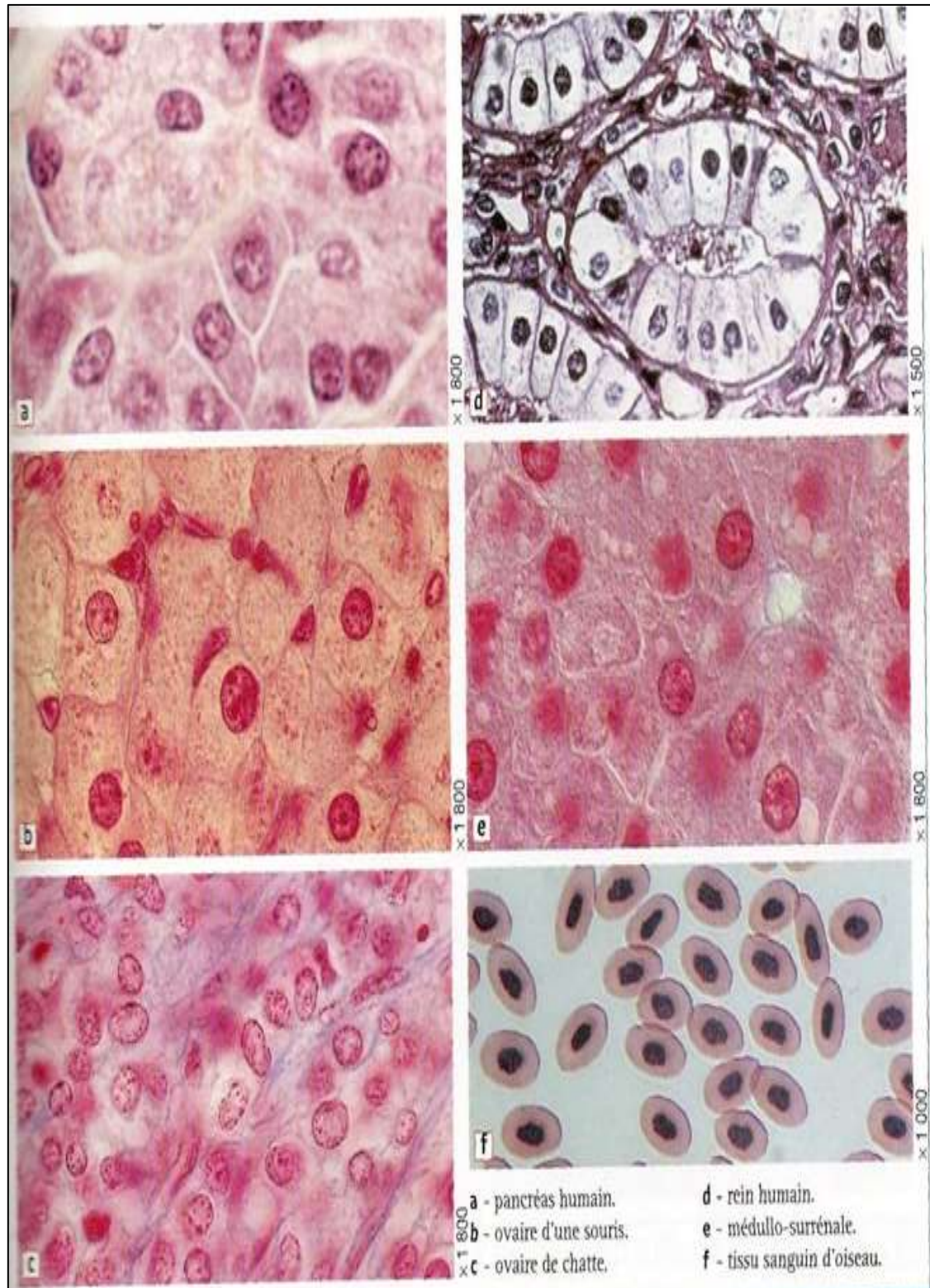


Figure 8 : Images prises par microscope électronique optique

(Google, 2021).

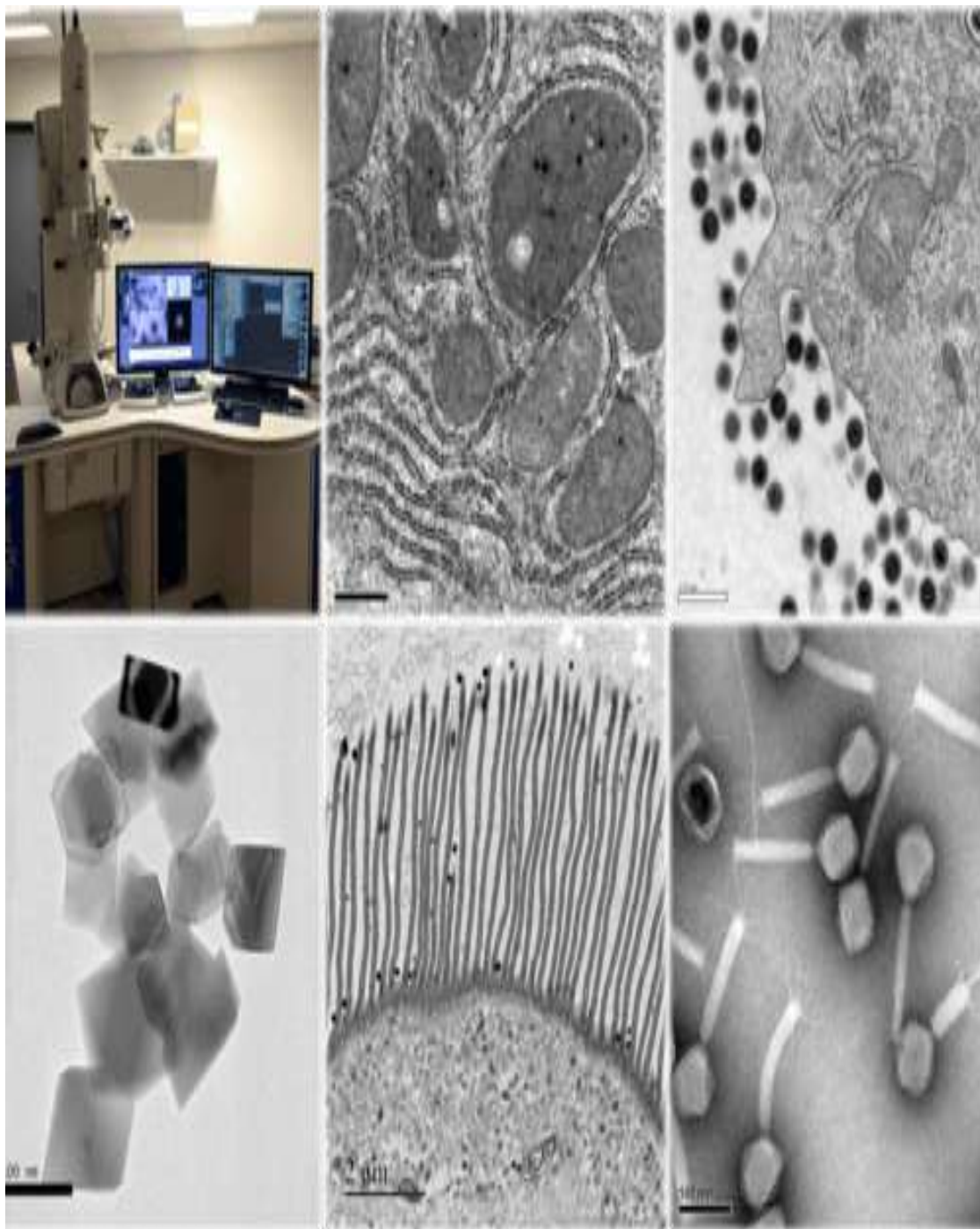


Figure 9 : Images prises par microscope électronique à transmission (MET)

(<https://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/conference>)

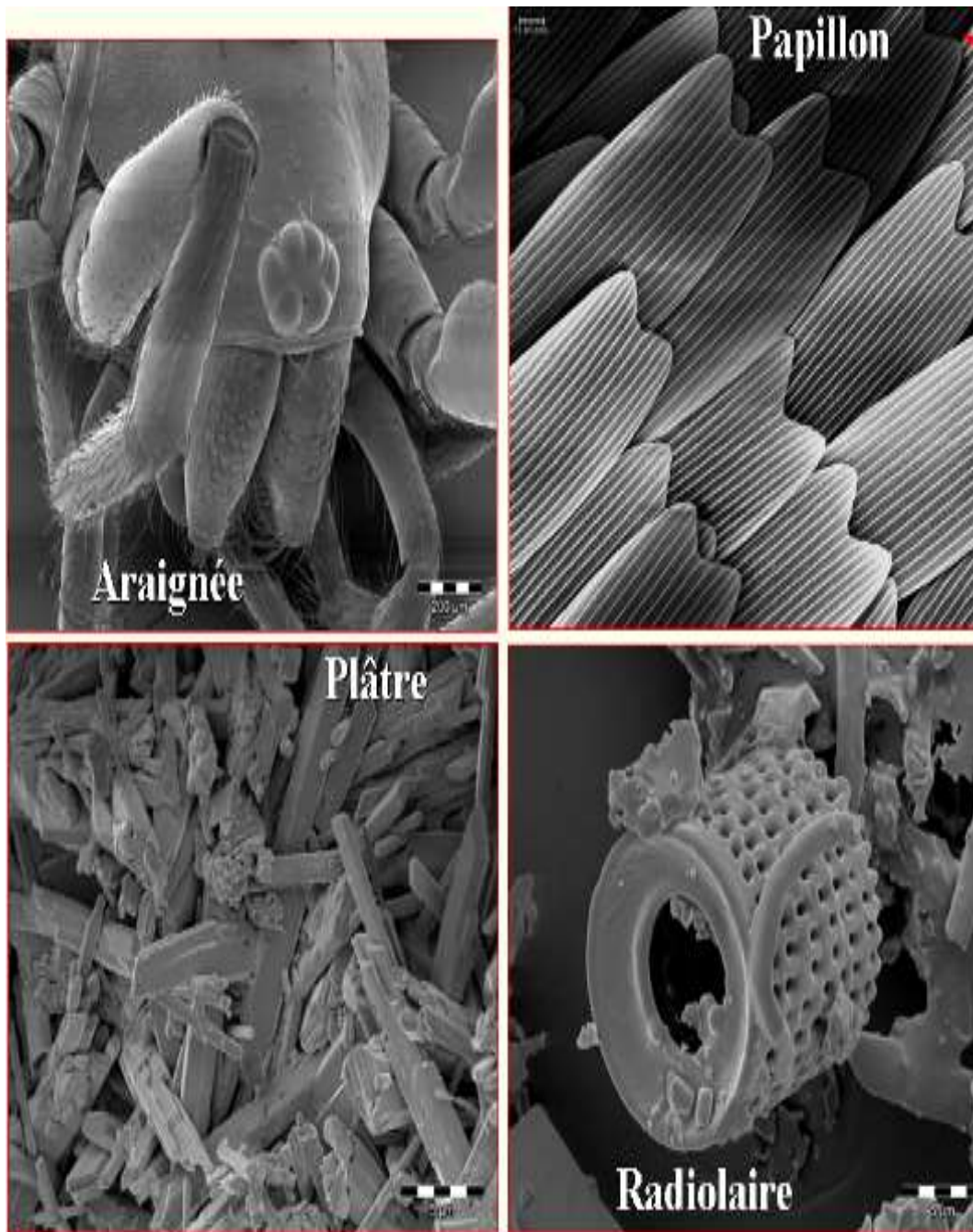


Figure 10 : Images prises par microscope électronique à balayage (MEB)

(<https://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/conference>)

METHODES IMMUNOLOGIQUES.

1. La radio-immunologie.

C'est une technique de dosage qui fait appel à la physique nucléaire (radioactivité) et à la l'immunologie. Elle utilise des composés radioactifs associés à des molécules immunologiques (anticorps- antigènes).

1.1. Principe :

La technique consiste à marquer des molécules immunologiques (anticorps- antigènes) avec un radionucléide, qui est généralement de l'iode 131 ou 125 et à détecter les réactions antigène-anticorps qui en résultent.

Soit *in vivo* (injecter antigène directement dans le corps) on obtient alors une reaction local exemple le test d'allergie.

Soit *in vitro* en plaçant le sérum du sujet en présence de l'antigène radioactif correspondant dans des conditions techniques optimales et de disposer d'un moyen pour observer quantitativement la réaction antigène-anticorps.

1.2. Différents types d'immunodosages.

On distingue deux grands types d'immunodosage utilisant un marqueur, selon que le réactif est limitant ou en excès par rapport à l'antigène à doser.

1.2.1. Dosage avec un excès de réactif : méthodes immunométriques ou méthodes directes.

La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixé, ces antigènes sont

ensuite révélés par des anticorps marqués.

Le dosage consiste à mesurer la fraction liée (Ag à dosé + Ac marqué) qui augmente linéairement avec la concentration en antigène à doser.

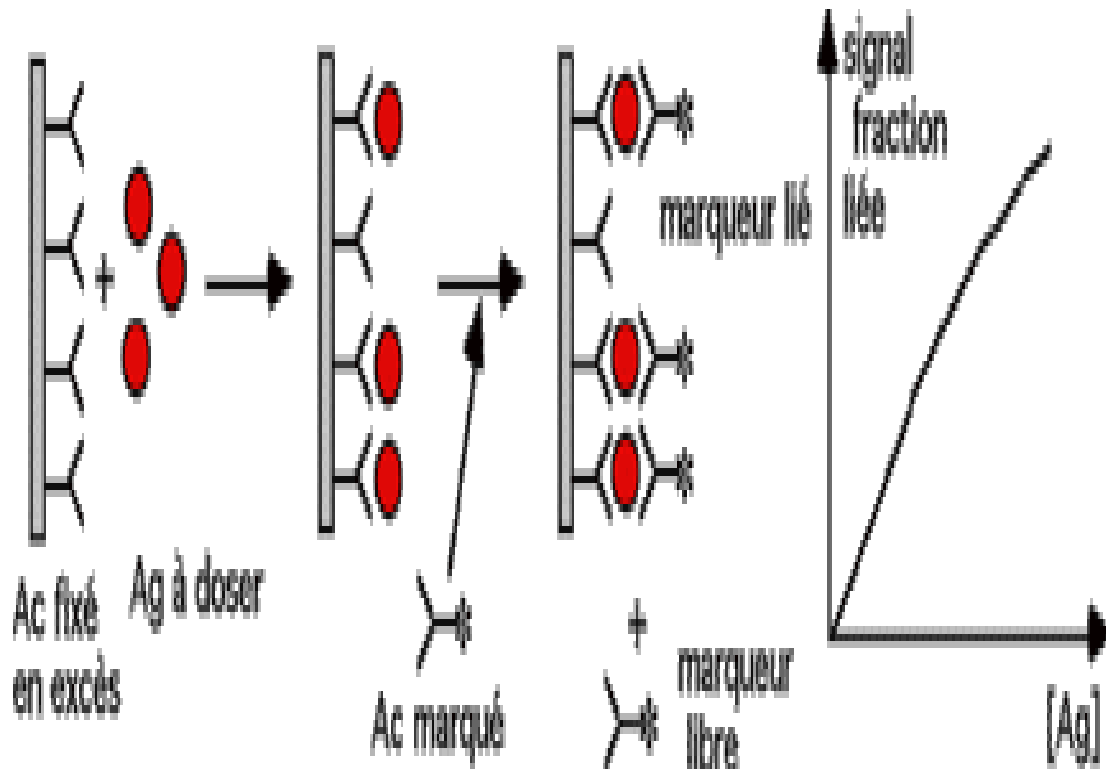


Figure 1: Dosage avec un excès de réactif : méthodes directes

(www.snv.jussieu.fr).

1.2.2. Dosage avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes.

L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée.

Le dosage consiste à mesurer la fraction liée (Ac fixé + Ag marqué) qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser.

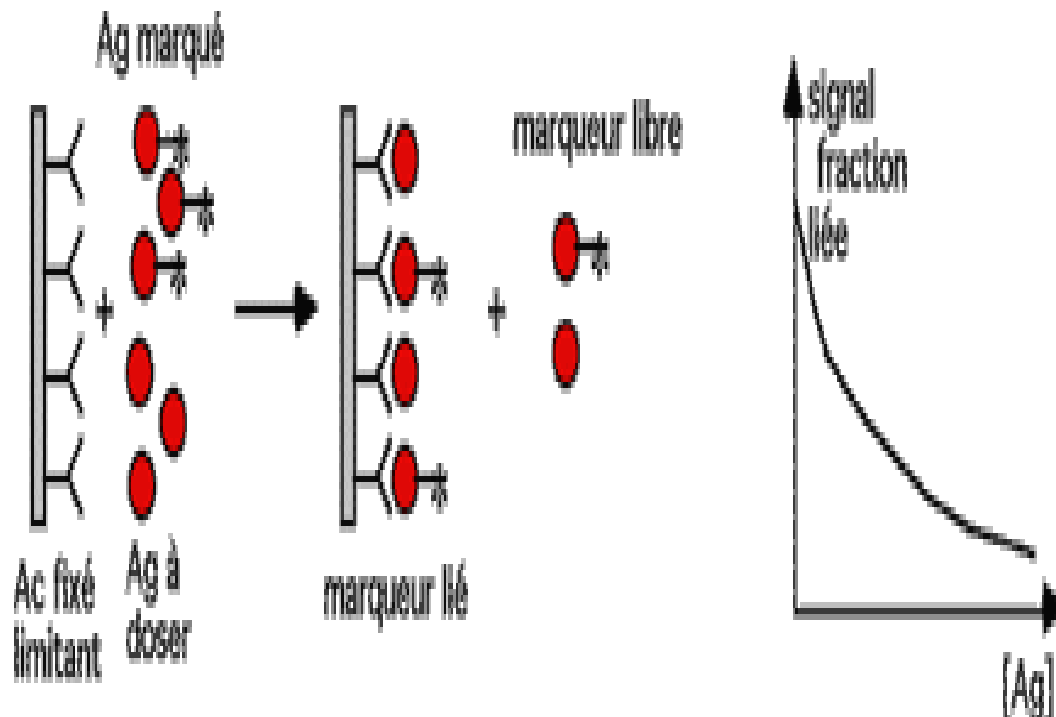


Figure 2: Dosage avec réactif limitant : méthodes indirectes

(www.snv.jussieu.fr).

1.3. Application:

En médecine nucléaire elle sert à doser de manière très précise des substances biologiques telles que, les hormones, les enzymes, ou les stéroïdes qui sont contenues dans le sang et les urines.

De nos jours, la méthode immuno-enzymatique ELISA a largement dépassé la radio-immunologie.

2. L'Immuno-enzymatique (ELISA).

Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (en anglais Enzyme-Linked Immuno Assay) ou ELISA permet de voir une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par un substrat d'une enzyme fixée à l'anticorps secondaire.

2.1. Principe :

Avant de parler de principe, il faut différencier entre une technique dite directe ou indirecte dans les techniques immunologiques :

- **Une technique directe** : l'élément recherché est l'agent responsable (bactérie ou virus) lui-même ou une partie de lui (recherche de l'agent causal).
- **Une technique indirecte** : on recherche les éléments élaborés par l'organisme contre l'agent causal (les anticorps).

Il existe plusieurs types de tests ELISA mais le plus couramment utilisé et celui-ci, le test ELISA indirect.

Test ELISA indirect:

Le principe de l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

- D'un antigène spécifique à l'anticorps recherché
- D'un échantillon à analyser

- D'un anticorps secondaire anti IgG couplé à une enzyme peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps IgG)
- Du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB.

Le test comporte quatre étapes principales :

a. Fixation de l'antigène :

L'antigène spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.

b. Fixation de l'anticorps à doser :

On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps) sur les plaques précédentes. Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.

c. Fixation de l'anticorps de détection :

On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.

d. Révélation :

On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

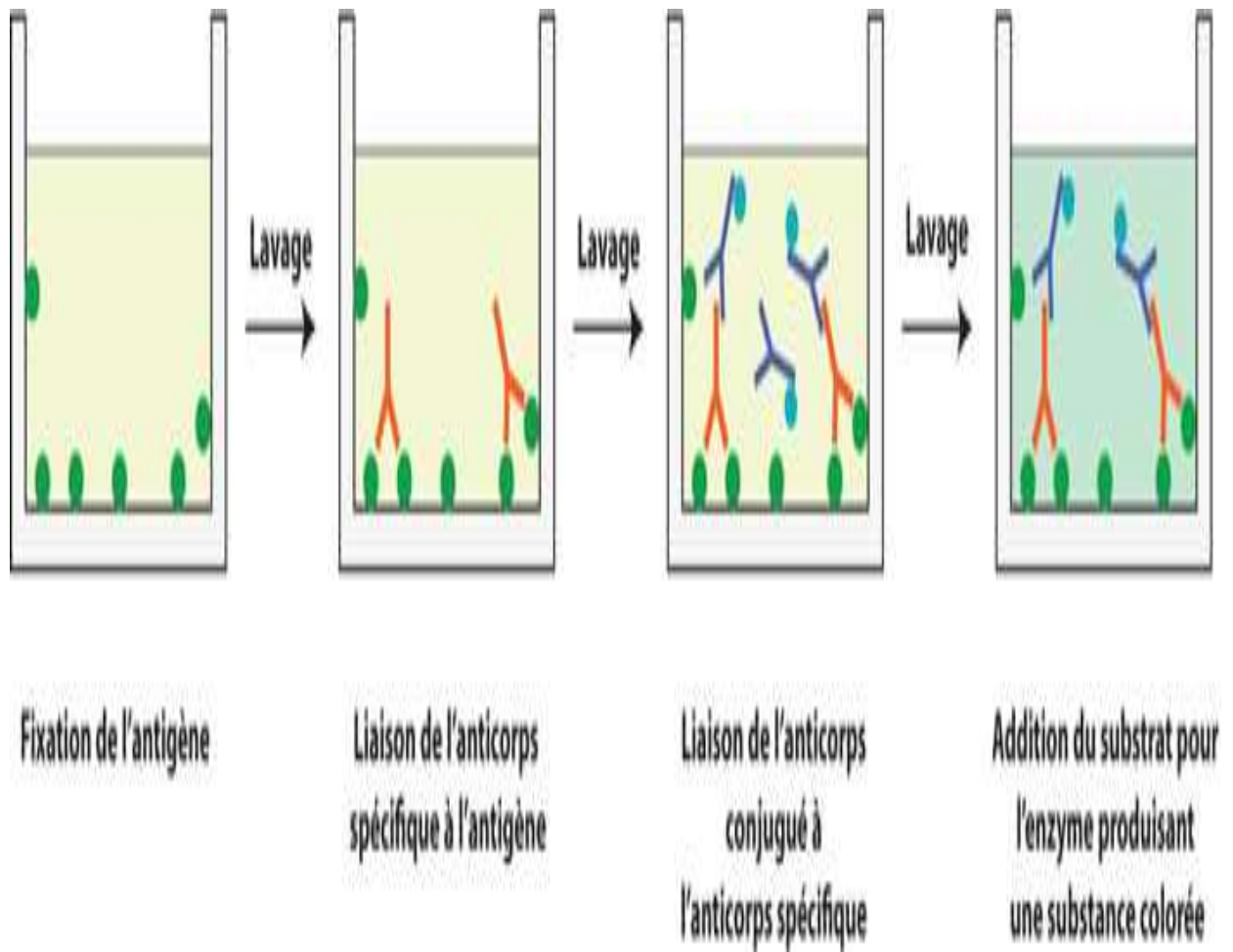


Figure 3: Tests ELISA indirect

(w.w.w. microbiologie-clinique.com).

2.2. Application :

ELISA est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes, dans un échantillon.

Elle est notamment utilisée pour le dépistage du HIV, et permet de déterminer la concentration sérique d'anticorps dirigés contre le virus.

3. L'Immunofluorescence.

L'**immunofluorescence** est une technique d'immunomarquage, qui utilise des anticorps ainsi que des fluorochromes (**coloration fluorescente**). Elle permet de repérer la présence de diverses substances grâce à des **anticorps**, rendus **fluorescents**, qui vont se fixer dessus.

3.1. Principe :

En colorant des anticorps puis en les observant exposés à une lumière spéciale, il devient simple de les détecter et de repérer les substances sur lesquelles ils se fixent.

3.2. Différents types d'immunofluorescence.

Il existe deux types de fluorescence, conférée par un fluorochrome, substance chimique qui émet de la lumière si elle est excitée à une certaine longueur d'onde.

a. Immunofluorescence direct.

Lors de ce marquage, on utilise un anticorps dirigé contre la molécule recherchée, appelée antigène. Cet anticorps est couplé à un fluorochrome. Ensuite pour révéler la préparation, on peut utiliser un microscope à épifluorescence. Cette technique reste une des plus utilisées dans la recherche scientifique.

b. L'immunofluorescence indirecte.

Elle est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième

anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire.

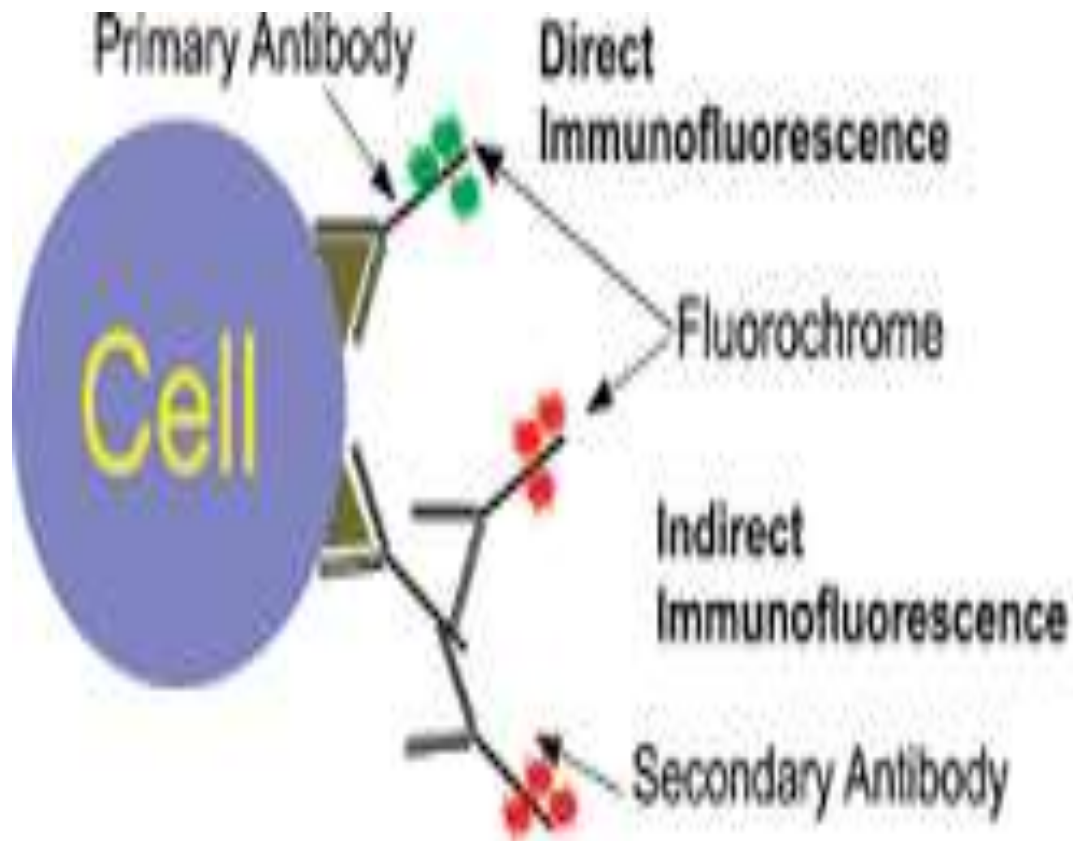


Figure 4: L'immunofluorescence direct et indirect

(w.w.w. microbiologie-clinique.com).

3.3. Application :

Cette méthode est utilisée pour rechercher des bactéries ou des anticorps dans des prélèvements biologiques. L'immunofluorescence est aussi employée pour le diagnostic de maladies auto-immunes : diabète de type 1, de la sclérose en plaques ou encore de la polyarthrite rhumatoïde.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Fisher, J.; Arnold, J.R.P., 2001. L'essentiel en Chimie pour Biologistes. Berti Editions, Paris.

Jaussaud, P., 1996. L'exploration des molécules. Nathan Université, Paris.

Kamoun, P., 1997. Appareils et Méthodes en Biologie Moléculaire. Médecine-Sciences/ Flammarion, Paris. 1 vol. (VIII-418 p).

Mahuzier, G. ; Hamon, M., 1986. Abrégé de Chimie Analytique. Tome 2. Méthodes de séparation. Masson, Paris.

Odell, I.D.; Cook, D., 2013. Immunofluorescence techniques. *J Invest Derm.* 133 (1),4.

René L., 2005. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules Université de pierre et marie curie. Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>

Rouessac, F.A. ; Rouessac, A., 2004. Analyse Chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition (Dunod)

Schwedt, G., 1993. Atlas de poche des Méthodes d'Analyse, Médecine-Sciences / Flammarion, Paris.

Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J.; West, D. M., 1997. Chimie Analytique; De Boeck: Bruxelles, Belgique,

Sites internet:

Chromatographie :

<http://w.w.w.atechimie.univ-lille.fr/Chromatographie-Theorie/Introduction/>

<https://www.drgpinstitute.in/gel-permeation-chromatography>

<https://www.planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-chromatographie>

<https://www.ent2d.ac-bordeaux.fr/disciplines/svt/principe-de-la-specificite-antigene-anticorps/>

https://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/CPG/chromato_gaz.htm

<https://www.chemphys.fr/mpb/teach/chromato1/chromato1.pdf>

[https://www.licence3-chimie.u-bourgogne.fr/courssupports/CM_Denat_2010_Chromatographie .pdf](https://www.licence3-chimie.u-bourgogne.fr/courssupports/CM_Denat_2010_Chromatographie.pdf)

Électrophorimétrie :

<https://www.chemlo.wordpress.com/geine-chimique/expose/>

<http://www.biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophorese/1 Electrophorese.htm>

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>

<https://www.chimieanalytique.com/electrophorese/>

<http://www.takween.com/techniques/electrophorese.html>

Spectrophotométrie :

Le spectre électromagnétique : <https://e-cours.univ-paris1.fr/modules/uved/envcal/html/rayonnement/1-rayonnement-electromagnetique/1-4-spectre-electromagnetique.html>

Les spectrophotomètres pour mesures de l'absorption moléculaire : http://www.perrin33.com/biochanalys/photons/spectros_2.php

Techniques Spectroscopiques : [http://www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie/El%20hajji/chap %20IV%20S4.pdf](http://www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie/El%20hajji/chap%20IV%20S4.pdf)

Microscopie électronique :

<https://www.usherbrooke.ca/chimie/services/rmn>

<https://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/conference>

[https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/met- microscope-electronique-a-transmission/](https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/met-microscope-electronique-a-transmission/)

https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_optique

Méthodes immunologies :

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) : <https://microbiologie-clinique.com/Elisa.html>

Biochimie des protéines: <https://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5b1.html>

Des analyses biopharmaceutiques de routine plus rapides : <https://www.waters.com>

<https://sites.google.com/site/rmnetcancers/articles/presentation-rmn>