

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abbes Laghrour- Khenchela-**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Polycopié**

**Techniques avancées de la Biochimie Appliquée**

**Master II Biochimie Appliquée**

**Réalisé par**

**HABIBATNI. Sofiane**

**Docteur en Biochimie Appliquée- Maître de Conférence B**

**2019-2020**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abbes Laghrour- Khenchela-**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Polycopié**

**Techniques avancées de la Biochimie Appliquée**

**Master II Biochimie Appliquée**

**Réalisé par**

**HABIBATNI. Sofiane**

**Docteur en Biochimie Appliquée- Maître de Conférence B**

**2019-2020**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abbes Laghrour- Khenchela-**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Polycopié**

**Techniques avancées de la Biochimie Appliquée**

**Master II Biochimie Appliquée**

**Réalisé par**

**HABIBATNI. Sofiane**

**Docteur en Biochimie Appliquée- Maître de Conférence B**

**2019-2020**

## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	II
AVANT PROPOS	III
<b>CHAPITRE I : METHODES SPECTRALES</b>	<b>1</b>
Rappels	1
I- Spectrométrie d'absorption et d'émission atomiques	3
I-1 Introduction	3
I-2 Spectrométrie d'absorption atomique	3
I-3 Diagramme d'énergie et transitions spectrales	4
I-4 Applications de la spectroscopie d'émission	5
II- RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	6
II-1 Introduction	6
II -2 Blindage/déblindage	8
II -3 Interprétation d'un spectre RMN	9
II -3-1 Le déplacement chimique	9
II -3-2 Protons équivalents	9
II -3-3 Intégration du signal	10
II -3-4 Multiplicité des signaux	11
II -3-5 Méthode d'analyse d'un spectre de RMN	12
<b>CHAPITRE II : METHODES DE FRACTIONNEMENT</b>	
I Introduction	16
II Méthodes chromatographiques	16
II -1 Chromatographie liquide haute performance	18
II -1-1 Principe	18
II -1-2 Optimisation de la méthode HPLC-DAD	19
II -1-3 Théorie de la chromatographie	19
II -1-4 Paramètres caractérisant la rétention	20
II -1-5 Théorie des plateaux	22
II -1-6 Les application de la chromatographie liquide	23
III- Chromatographie en phase gazeuse	25
III-1 Principe physicochimique	25

III-2 Appareillage	26
III-2-1 Gaz vecteur (phase mobile)	27
III-2-2 le système d'injection	27
III-2-3 La colonne	28
III-2-4 Détecteur	28
III-2-5 Le four	30
III-3 Domaine d'application	30
IV- Méthodes électrophorétiques	31
IV-1 Introduction	31
IV-2 Iso-électrofocalisation	
IV-3 Electrophorèse en milieu dissociant et/ou dénaturant	

### **CHAPITRE III : LES METHODES DE MARQUAGE**

Rappels	39
I- Principaux radio-isotopes utilisés en biochimie	40
II- Les méthodes isotopiques	43
III- Dosages radio-immunologiques	43
IV- Dosages radio-enzymatiques	44
IV-1 Principe	44
IV-2 ELISA indirecte	44
IV- 3 ELISA directe	45
IV- 4 ELISA compétitif	46

### **CHAPITRE IV. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**

I- Historique	47
II- Introduction	49
III- Instrumentation	50
III-1 Description	50
III-1-1 Canon à électrons	51
III-1-2 Le vide	52
III-2 Principe de la microscopie électronique en transmission	54
III-2-1 Interactions électron-matière	54
III-2-2 Aberrations	55
IV- Microscopie électronique à balayage	56
IV-1 Principe de la microscopie électronique	56

## LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Domaines du rayonnement électromagnétique	1
2	Spectre discontinu	2
3	Schéma général d'un spectromètre d'émission atomique	3
4	Diagramme d'énergie de l'atome d'hydrogène	5
5	Spectre RMN de C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	8
6	Spectre RMN de la propanone	10
7	Spectre RMN du méthanoate de méthyle	11
8	Spectre RMN de bromobutane	12
9	HPLC	19
10	Amélioration de la séparation de deux produits	20
11	Chromatogramme du Prozac	20
12	Profil des pics chromatographiques	22
13	Séparation de la benzocaïne et des chlorhydrates de propaïne et de tétracaïne	24
14	Chromatogramme du bénomilate et de ses impuretés éventuelles en solution	24
15	Schéma d'un Chromatographe	27
16	Schéma d'un injecteur	28
17	Cuve d'électrophorèse horizontale	34
18	Cuve d'électrophorèse verticale	34
19	Profil de migration d'un polypeptide	37
20	séparation des protéines sur gel électrophorèse « Western blot »	38
21	Echelle d'émission du rayonnement β « échelle logarithmique »	40
22	Isotopes du Carbone	41
23	Principe ELISA indirect	45
24	ELISA direct	46
25	cdELISA, dosage d'antigènes	46
26	Principe de la lentille	47
27	Lentilles	49
28	Microscope électronique à transmission	53
29	Les différents processus d'interaction électron-matière et leur lien avec les différentes techniques MET	54
30	Microscopie électronique à balayage	56
31	Vue d'en face Microscope électronique à balayage	58

## LISTE DE TABLEAUX

N°	Titre	Page
01	Les valeurs de déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H	14

## **Avant propos**

Le présent cours s'adresse aux étudiants en deuxième année Master 2 Biochimie Appliquée. Ce polycopié de cours s'articule autour de quatre chapitres sur les techniques avancées en Biochimie. Il peut également servir aux étudiants de licence Biochimie. C'est un travail personnel qui émane de ma propre expérience lors de mes activités pédagogiques dans la matière.

L'objectif réel de cet enseignement est de développer une vision intégrée des propriétés structurales et fonctionnelles des macromolécules biologiques. Etudier leurs implications biotechnologiques et/ou thérapeutiques et de maîtriser des méthodes de pointe d'analyse, de caractérisation, de purification et de quantification propres à la biochimie.

De plus, de nouvelles techniques biochimiques permettront d'aller encore plus loin et d'améliorer l'efficacité des principes actifs. Ces innovations devraient trouver de multiples applications contre les maladies de nos jours.

# **CHAPITRE I :**

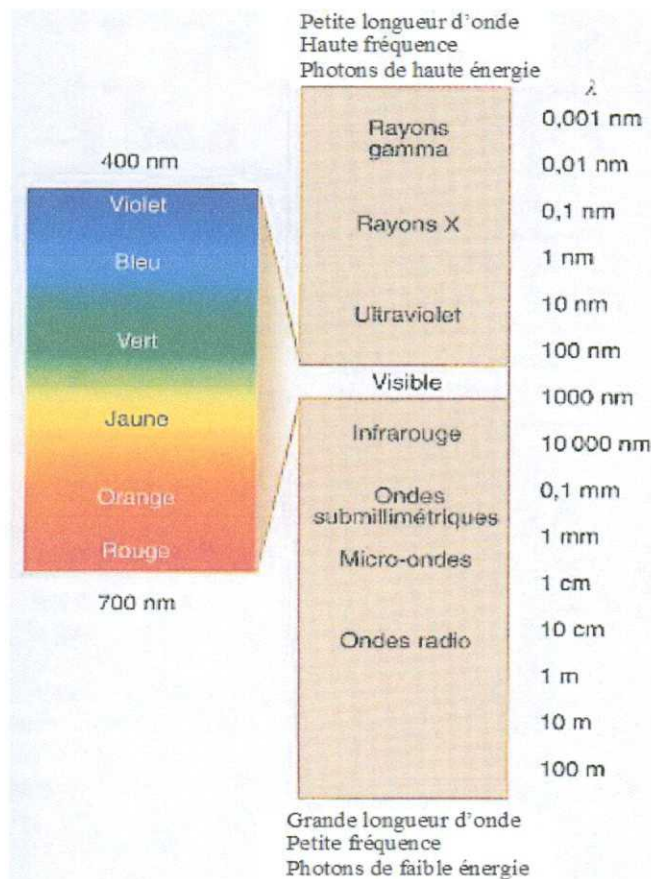
# **METHODES**

# **SPECTRALES**

## Rappels

### Rayonnement électromagnétique

La *lumière* ou *rayonnement électromagnétique*, est une forme d'énergie constituée d'ondes, c'est-à-dire de *phénomènes vibratoires caractérisés par* : une *vitesse de propagation* ( $c = 3.108 \text{ m.s}^{-1}$ , constante pour toutes les ondes électromagnétiques dans le vide), une *fréquence*  $\nu$  (nombre de vibrations / seconde) et une *longueur d'onde*  $\lambda$  (distance parcourue pendant une vibration). Ces 3 longueurs sont *liées par la relation*  $\lambda = c / \nu$ . Bien qu'il y ait une continuité totale dans les valeurs possibles de longueur d'onde (ou de fréquence), on distingue (arbitrairement) sur cette base des *domaines particuliers du rayonnement électromagnétique*, comme indiqué sur la figure 1.



**Figure 1.** Domaines du rayonnement électromagnétique (le domaine du visible, le seul auquel notre œil est sensible, est extrêmement étroit et est limité entre 400 et 700 nm. A l'intérieur de cet intervalle, la longueur d'onde détermine la couleur perçue).

### Spectre électromagnétique

Un *spectre électromagnétique* est la *décomposition du rayonnement électromagnétique selon ses différentes composantes en* terme de *fréquence*  $\nu$  (ou longueur d'onde  $\lambda$ ) *ou d'énergie* des photons  $E$ , les deux grandeurs étant *liées par la constante de Planck*  $h$  :

$$E = h.\nu.$$

Un rayonnement *peut comporter toutes les fréquences* (ou toutes les longueurs d'ondes) *dans un intervalle donné*. On dit alors qu'il présente un *spectre continu*. Ainsi, la lumière solaire présente un spectre continu, de l'ultraviolet à l'infrarouge en passant par le visible. *D'autres sources*, par contre, *émettent un rayonnement à spectre discontinu* (figure 2). C'est le cas, par exemple, de la lumière émise par une décharge électrique dans un gaz.

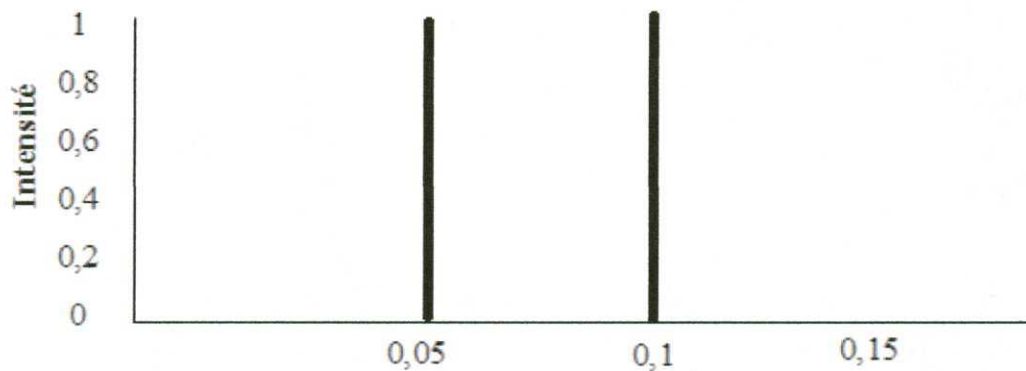


Figure 2 : Spectre discontinu

## I- Spectrophotométrie d'absorption et d'émission atomiques

### I-1. Introduction

La spectroscopie est une technique d'analyse de la matière basée sur l'étude des interactions de la matière avec des radiations électromagnétiques. Selon les énergies des radiations mises en jeu, la spectroscopie fournit des informations concernant

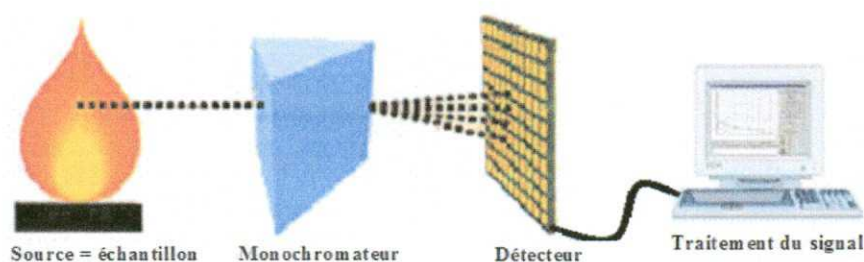
- ▶ Les électrons formant les liaisons chimiques (spectroscopie U.V.- visible)
- ▶ Les atomes impliqués dans les liaisons (spectroscopie infrarouge)
- ▶ Les noyaux atomiques (spectroscopie de résonance magnétique nucléaire)

La spectrométrie d'absorption et d'émission atomiques constituent deux méthodes d'analyse **élémentaire** quantitative aux nombreuses applications notamment en **Sciences de l'environnement**. Elles permettent de doser environ 70 éléments (métaux et non métaux : **Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Co, Zn, As, ...**) à des concentrations souvent inférieures au  $\mu\text{g/L}$  (ppb) dans divers types de substrats : végétaux, sols, sédiments, roches, aliments, déchets solides, effluents liquides, eaux souterraines et de surface, eaux usées etc.

### I-2. La spectrophotométrie d'absorption atomique

La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) technique décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois par **Walsh (1955)**. AAS étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. Une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques à l'état de traces (quelques mg/litre). L'analyse se base sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental, et on utilise à cet effet en général des solutions.

L'absorption atomique ainsi que l'émission de flamme concernent des mesures sur un échantillon transformé en gaz atomique. Une température de 2000° à 3000° permet cette transformation.



**Figure 3. : Schéma général d'un spectromètre d'émission atomique** : Une source-échantillon (ici, une flamme), un monochromateur (un prisme), un détecteur (un CCD) et un système de traitement du signal (un ordinateur).

La technique est simple si on sait préparer les solutions initiales. Une préparation est donc souvent nécessaire : dissolution d'un alliage par exemple. La méthode est soit :

- ▶ Quantitative
- ▶ Relative : il faut donc faire une courbe d'étalonnage.

La spectrométrie d'absorption atomique présente de nombreux avantages :

- ▶ Elle est très sélective, il n'y a pas d'interférences spectrales ou alors elles sont connues.
- ▶ Elle est très documentée : tous les pièges sont connus et répertoriés dans le **COOK BOOK** livré avec l'appareil...

### **Restrictions de la technique**

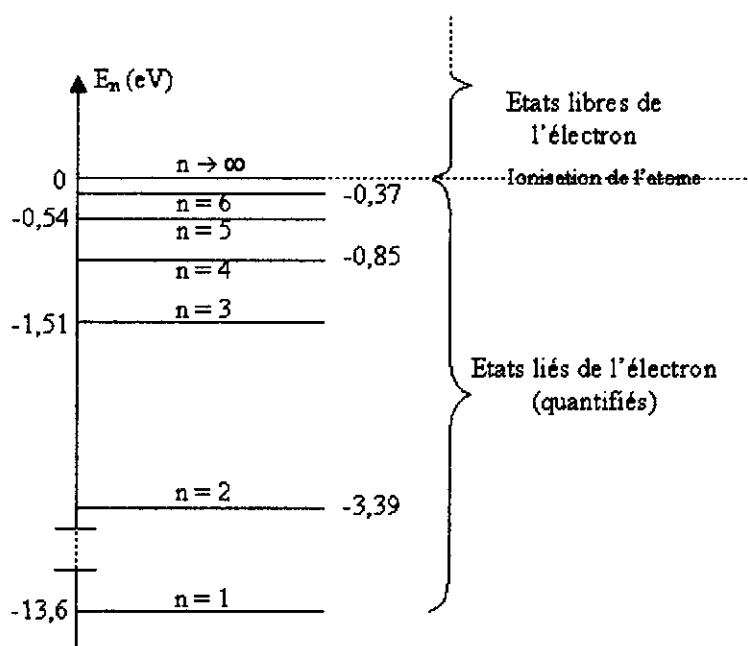
- ▶ Pour des raisons technologiques et non de principes, certains éléments, comme les gaz rares, les halogènes... ne peuvent être analysés par spectrométrie, leur énergie d'absorption n'étant pas comprise entre 180 et 1000 nm).
- ▶ Les concentrations doivent être à l'échelle de traces afin de rester dans le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert, car sa dynamique est limitée.
- ▶ L'existence d'interférences chimiques sévères complique parfois tel que calcium/phosphore).

Chaque élément, à doser, a un nombre spécifique d'électrons associés à son noyau. La configuration orbitale normale et la plus stable des électrons est appelée état de base. Lorsque qu'une énergie est fournie à un atome, ce dernier l'absorbe et adopte une configuration électronique appelée état d'excitation. Cet état est instable et l'atome retourne immédiatement à son état de base libérant ainsi une énergie lumineuse.

### **I-3. Diagramme d'énergie et transitions spectrales**

En l'absence d'une excitation extérieure, un électron se trouve en permanence sur le niveau d'énergie le plus bas possible. *Si tous les électrons d'un atome sont à leur plus bas niveau d'énergie possible, l'atome est dans l'état fondamental, sinon il est dans un état excité.*

Ce modèle rend effectivement compte des observations qui peuvent être faites à propos des spectres d'émission atomique.



**Figure 4 : Diagramme d'énergie de l'atome d'hydrogène**

Puisque les électrons sont normalement au niveau d'énergie le plus bas possible, ils ne peuvent pas perdre d'énergie. L'émission d'un rayonnement ne peut donc avoir lieu que si une excitation (apport d'énergie) les porte d'abord à un niveau supérieur (ex ;  $n_5$ ), d'où ils pourront ensuite redescendre sur un niveau inférieur (ex ;  $n_3$ ), en émettant un photon.

L'existence de niveaux d'énergie bien définis, et celle de la condition  $\Delta E = h\nu$ , justifient les spectres de raies : seul un rayonnement dont la fréquence satisfait à cette condition pour l'une des transitions possibles peut échanger de l'énergie avec l'atome, à l'émission comme à l'absorption.

Les différents niveaux d'énergie (ou les termes spectraux correspondants) d'un atome et les transitions correspondantes sont représentés sous forme d'un diagramme d'énergie. On porte en ordonnée les valeurs de l'énergie et on trace une droite horizontale pour chacun des niveaux énergétiques possibles de l'atome considéré. Les transitions sont schématisées par des flèches verticales joignant deux niveaux.

### 1-4. Applications de la spectroscopie d'émission

On citera simplement quelques exemples d'applications (les valeurs numériques données dans ces exemples correspondent à l'utilisation d'un ICP-OES) :

► Détection de la présence de métaux lourds, et leur quantification, dans des échantillons d'eau. On peut typiquement détecter une trentaine d'éléments et les quantifier à des concentrations de l'ordre de 0,01 à 5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

► Détection d'éléments traces dans des métaux tels que l'or, le cobalt, le nickel ou le palladium (de l'ordre du  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

► Détermination de la présence de plomb, chrome, cadmium et mercure dans des polymères.

► Analyse d'échantillons cliniques ou pharmaceutiques pour déterminer, par exemple, la quantité de sodium, potassium, magnésium, calcium, aluminium et chlore qu'ils contiennent.

Cependant, la **spectroscopie d'émission** convient également à l'analyse d'échantillons hautement radioactifs, car aucune radioactivité perturbatrice n'est introduite dans aucune partie de l'analyseur.

### Application

L'énergie du niveau  $n$  de l'atome d' $\text{H}_2$  est donné par la relation suivante :  $E_n = -E_0 / n^2$  avec  $E_0 = 13,6\text{eV}$ .

1- Quelle est l'énergie correspondante :

a- à l'état fondamental de l'atome d'  $\text{H}_2$  ?

b- Au premier état excité de l'atome d'  $\text{H}_2$  ?

2- définir la transition ?

3- Une transition du niveau 4 au niveau 2, cette transition est elle une absorption ou une émission ? Justifier ?

Quelle est la longueur d'onde  $\lambda_1$  de l'onde associée à cette transition ?

4- Une transition du niveau 2 au niveau 5, cette transition est elle une absorption ou une émission ? Justifier ? Quelle est la longueur d'onde  $\lambda_2$  de l'onde associée à cette transition ?

## II- Résonance magnétique nucléaire

### II-1 Introduction

Le phénomène physique sur lequel repose la résonance magnétique nucléaire (RMN) a été étudié en 1946 par des groupes de physiciens dirigés par E. M. Purcell (Université de Harvard) et F. Bloch (Université de Stanford).

Depuis cette date, la technique a connu un développement spectaculaire dans différents domaines. La **RMN** apporte des renseignements extrêmement intéressants sur la structure des molécules aussi bien en phase liquide qu'en phase solide. **Richard Ernst** a obtenu le prix Nobel de chimie en 1991 pour la mise au point de la spectroscopie de **RMN** impulsionnelle.

Parmi les outils d'analyse disponibles à l'heure actuelle, la RMN est sans doute l'un des plus précieux. Elle a non seulement permis aux chimistes d'identifier beaucoup plus facilement qu'auparavant leurs molécules, ou de caractériser celles extraites de la nature afin d'élaborer de nouveaux médicaments, mais aussi d'obtenir une méthode non-invasive et non-ionisante d'étude du corps humain (**Imagerie par Résonance Magnétique, IRM**).

Le carbone possède deux isotopes stables : le  $^{12}\text{C}$  dont l'abondance isotopique est d'environ 98,9% et le  $^{13}\text{C}$  qui ne représente que 1,1%. Seul le  $^{13}\text{C}$  est doté d'un spin non nul ( $I = \frac{1}{2}$ ) et peut donc être utilisé en RMN.

L'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  réduit d'un facteur 100 la sensibilité de la RMN carbone par rapport à celle du proton. Il est donc beaucoup plus difficile d'obtenir un bon rapport signal sur bruit avec ce type de noyau et cela a conduit à la proposition de nombreuses techniques multi-impulsionnelles visant à contourner cet inconvénient.

En RMN, l'interaction entre le noyau atomique et le champ magnétique est quantifiée et seule une fréquence particulière (appelée **fréquence de Larmor**) permet cette interaction. Cette fréquence dépend du type de noyau observé (proton, carbone, azote, etc.), mais aussi de l'environnement chimique de ce noyau, c'est-à-dire des autres noyaux présents autour, et des électrons impliqués dans la liaison chimique, ce qui signifie par exemple qu'un proton porté par un groupement méthyle ne résonnera pas à la même fréquence qu'un proton d'aldéhyde. La fréquence de résonance permet donc de remonter à la structure de la molécule.

Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation.

La RMN est surtout connue comme un outil privilégié pour la détermination structurale sur un produit purifié ; mais cette technique peut également permettre d'obtenir des informations précieuses pour l'analyse de mélanges.

Le présent polycopié sera ici limité à la RMN du noyau de l'atome d'hydrogène ou RMN du proton.

### Exemple de spectre RMN

La fréquence de résonance dépend du champ magnétique produit par le spectromètre. Afin que les spectres tracés soient indépendants du spectromètre utilisé, on convertit cette fréquence en une grandeur appelée *déplacement chimique*, qui ne dépend pas du champ magnétique du spectromètre.

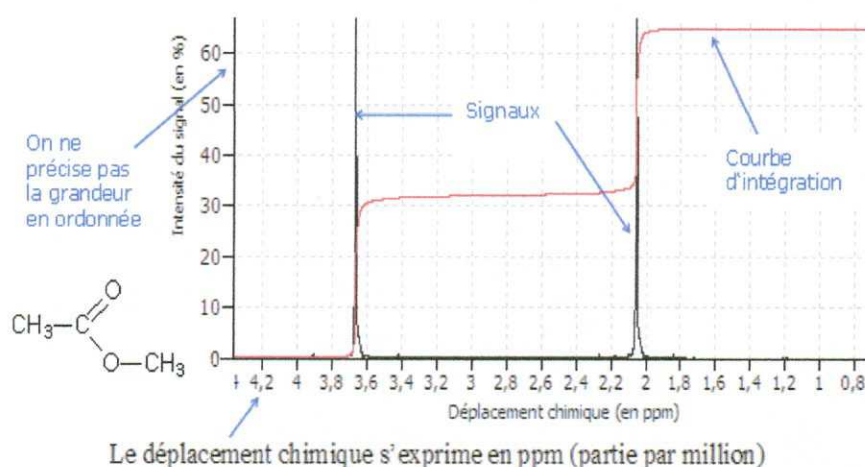


Figure 5 : Spectre RMN de  $C_3H_6O_2$

### II-2 Blindage/déblindage:

La fréquence de résonance de l'atome d'hydrogène dépend de son voisinage. Plus l'atome d'hydrogène est à proximité d'un substituant très électronégatif (oxygène, halogènes, ...), plus il sera déblindé.

Si un proton est déblindé, son déplacement va être bien plus élevé par rapport à un proton placé à côté d'un groupement alkyl de type  $-CH_2$  ou  $-CH_3$ .

Par exemple, dans la molécule  $CH_3-CH_2-Br$

Les protons en  $CH_2$  sont dits déblindés car proches de l'atome de Brome plus électronégatif. Ils ont le déplacement chimique le plus élevé.

Les protons en  $CH_3$  sont dits blindés car aucun atome particulièrement électronégatif ne se trouve dans leur voisinage.

### II-3 Interprétation d'un spectre RMN

#### II-3-1 Le déplacement chimique

Le déplacement chimique, noté  $\delta$ , est la grandeur en abscisse du spectre RMN. Il s'exprime usuellement en partie par million notée **ppm**.

**Remarque:** Les électrons proches d'un noyau d'hydrogène génèrent un champ magnétique de faible valeur, qui modifie localement le champ magnétique que créé par le spectromètre. Le champ magnétique subi par le proton dépend donc de l'environnement chimique dû aux autres atomes de la molécule. Par conséquent, la fréquence de résonance, et donc le déplacement chimique de chaque proton, dépendent des autres atomes de la molécule. Par exemple, plus un noyau est proche d'atomes électronégatifs, Plus son déplacement chimique est grand.

**Exemple:** Sur le spectre de RMN du proton de l'éthanoate de méthyle ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$ ), on observe un signal à 2,06ppm qui correspond aux protons du premier groupe  $\text{CH}_3$  et un second signal à 3,66 ppm qui correspond aux protons du second groupe  $\text{CH}_3$ . Ceux-ci ont donc un déplacement chimique supérieur à cause de la proximité de l'atome d'oxygène du groupe ester plus électronégatif que les atomes de carbone et d'hydrogène.

#### II-3-2 Protons équivalents

Dans une molécule, les noyaux des atomes d'hydrogène sont équivalents s'ils ont le même environnement chimique. Des protons équivalents sont représentés par le même signal sur le spectre. Par conséquent le nombre de signaux dans un spectre de RMN est égal au nombre de groupes de protons équivalents dans la molécule étudiée.

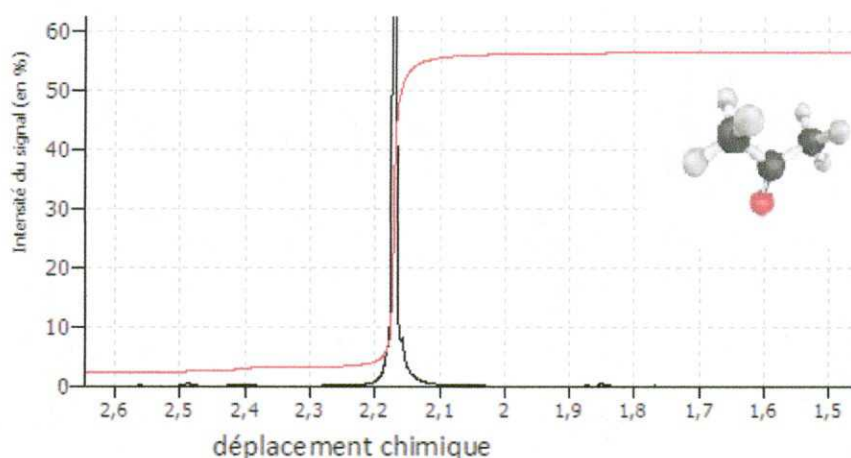
**Règle:** En première approximation, on pourra considérer que des atomes d'hydrogène sont équivalents si:

- ▶ Ils sont liés à un même atome de carbone engagé uniquement dans des liaisons simples.
- ▶ Ils sont liés à des atomes différents mais il existe entre eux une relation de symétrie simple.

#### Application:

Quel est le nombre de signaux que devrait comporter le spectre de RMN du proton de la propanone ?

**Réponse:** Les trois atomes d'hydrogène d'un groupe méthyle sont liés à un même atome de carbone engagé dans des liaisons simples: ils sont donc équivalents.



**Figure 6 : Spectre RMN de la propanone**

Les deux groupes méthyle sont symétriques par rapport à un plan contenant le groupe carbonyle: les six protons sont donc équivalents. Le spectre de RMN du proton de la propanone ne comportera donc qu'un seul signal.

### II-3-3 Intégration du signal

L'aire sous la courbe d'un signal de RMN est proportionnelle au nombre de protons responsables de ce signal. La courbe d'intégration du spectre est constituée de paliers.

La hauteur de chaque saut vertical de la courbe d'intégration est proportionnelle au nombre de protons équivalents responsables du signal correspondant. On peut ensuite retrouver le nombre de protons associés à chaque signal en analysant la structure de la molécule.

**Ex:** Le spectre du méthanoate de méthyle présente deux signaux.

Le saut de la courbe d'intégration correspondant au signal à 3,8 ppm est trois fois plus grand que le saut correspondant au signal à 8,1 ppm. Dans la molécule étudiée, il y a donc trois fois plus de protons en résonance à 3,8 ppm qu'à 8,1 ppm.

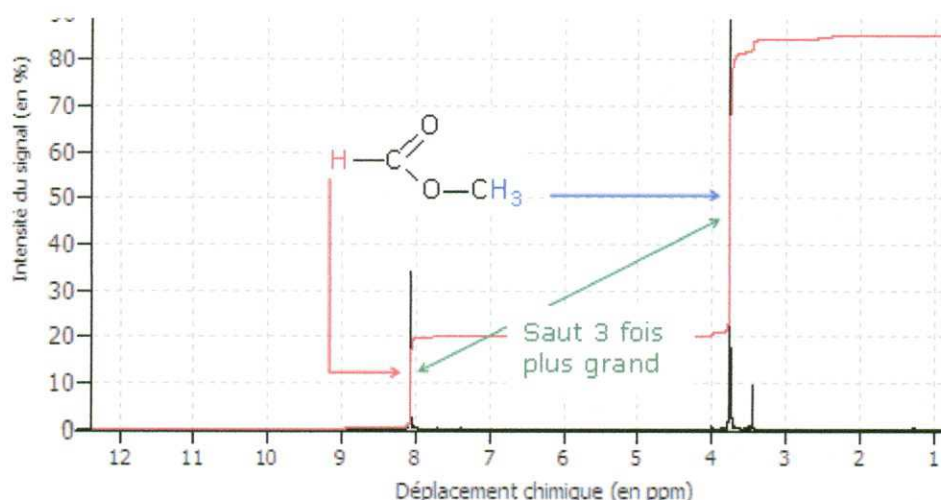
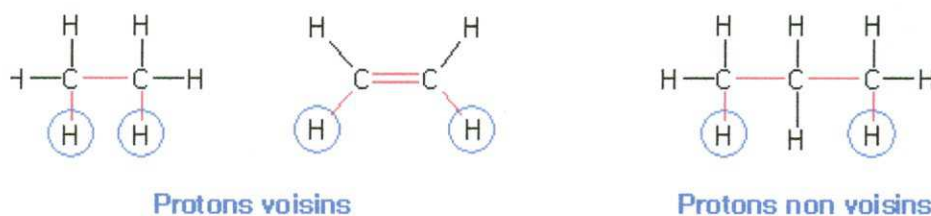


Figure 7 : Spectre RMN du méthanoate de méthyle

### II-3-4 Multiplicité des signaux

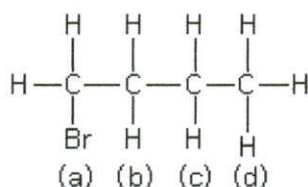
Le signal de résonance peut comporter plusieurs pics et est alors appelé multiplet. Cette démultiplication des signaux est due aux interactions entre des protons voisins non équivalents. Deux protons sont dits voisins s'ils sont séparés par trois liaisons, simples ou multiples.



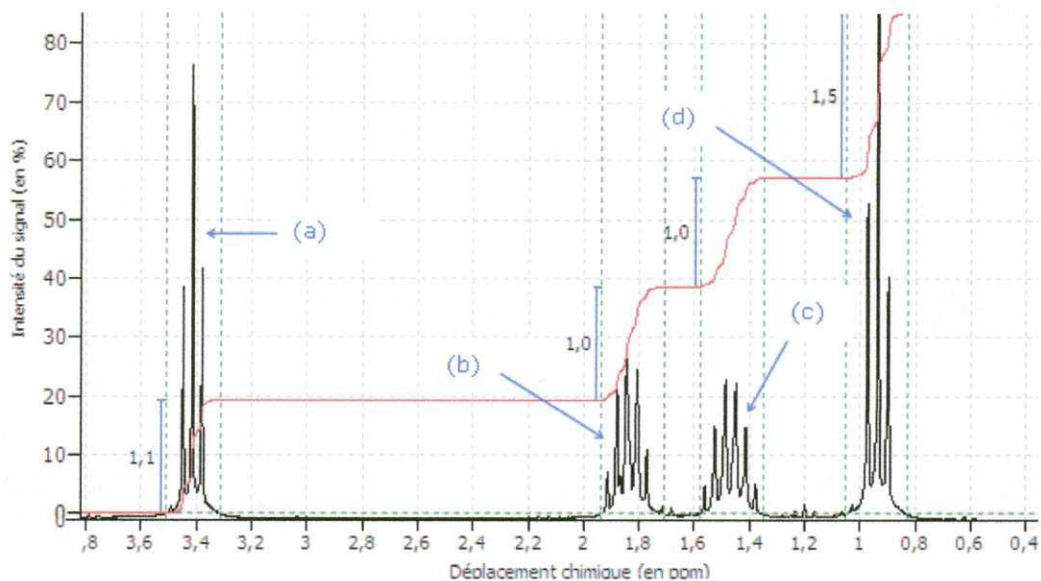
### Règle des (n + 1)-uplets

Un groupe de protons équivalents (a) ayant pour voisins n protons (b) non équivalents à (a) présente un signal de résonance sous forme d'un multiplet de (n+1) pics.

**Exemple:** molécule de bromobutane



Protons équivalents	Nombre de protons	Protons voisins	Nombre de pics du signal	Hauteur d'intégration
Protons du groupe <b>a</b>	2	2	3	2
Protons du groupe <b>b</b>	2	4	5	2
Protons du groupe <b>c</b>	2	5	6	2
Protons du groupe <b>d</b>	3	2	3	3



**Figure 8 : Spectre RMN de bromobutane**

### II-3-5 Méthode d'analyse d'un spectre de RMN

Pour attribuer son spectre de RMN à une molécule, il faut :

- a-** Compter le nombre de signaux pour déterminer le nombre de groupes de protons équivalents « le nombre de groupes de protons équivalents est égale au nombre de signaux ».
- b-** Utiliser la courbe d'intégration pour déterminer la proportion de protons associée à chaque signal.
- c-** Analyser la multiplicité d'un signal pour dénombrer les protons équivalents voisins des protons responsables d'un signal.
- d-** déterminer les protons qui sont couplés et en déduire la forme des signaux en appliquant la règle des  $(n+1)$  uplet.
- e-** attribuer le déplacement chimique à chaque groupe de protons de la molécule,

**f-** Utiliser une table de valeurs de déplacement chimique pour vérifier la formule de la molécule obtenue à l'issue des étapes précédentes ou pour identifier la formule de la molécule s'il reste des ambiguïtés.

**g-** vérifier à l'aide de la table de données que les déplacements chimiques correspondent bien aux groupes caractéristiques.

Lorsque des protons sont proches d'un groupe électronégatif (C=O, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -OH, -O-), leur déplacement chimique peut-être supérieur à celui indiqué dans les tables de données.

Tableau 1: de valeurs de déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (voir page 14)

Déplacements chimiques moyens de quelques types de protons  
( $\delta$  est exprimé en ppm par rapport au TMS pris comme référence)  
R est un groupe aliphatique saturé ; Ar est un groupe aromatique.

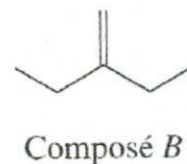
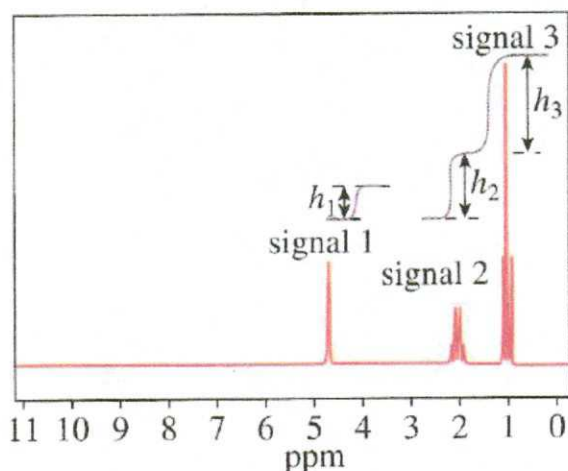
## CHAPITRE I : Méthodes Spectrales

Protons CH <sub>3</sub>	δ	Protons CH <sub>2</sub>	δ	Protons CH	δ
Lié à un C AX <sub>3</sub> :		Lié à un C AX <sub>3</sub> :		Lié à un C AX <sub>3</sub> :	
CH <sub>3</sub> -C	0,9	CH <sub>2</sub> -C	1,3	CH-C	1,5
CH <sub>3</sub> -C-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	1,15	CH <sub>2</sub> -C-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	1,3	CH-C-OH(ou OR)	1,6-2
CH <sub>3</sub> -C-Ar	1,25	CH <sub>2</sub> -C-Ar	1,6	CH-C-Cl	1,6
CH <sub>3</sub> -C-OH(ou OR)	1,15-1,3	CH <sub>2</sub> -C-OH(ou OR)	1,8		
En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:		En α d'une insaturation:	
CH <sub>3</sub> -C=C	1,6	CH <sub>2</sub> -C=C	2,1-2,3	CH-C=C	2,5
CH <sub>3</sub> -CO-OR	2,0	CH <sub>2</sub> -C≡C	2,6	CH-C≡N	2,7
CH <sub>3</sub> -CO-OH	2,1	CH <sub>2</sub> -CO-OR	2,2	CH-CO-OH	2,6
CH <sub>3</sub> -CO-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2-2,1	CH <sub>2</sub> -CO-OH	2,35	CH-CO-R	2,5-2,7
CH <sub>3</sub> -C=C-C=O		CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,1-2,2	CH-Ar	3,0
CH <sub>3</sub> -CO-R	2,0	CH <sub>2</sub> -C=C-C=O		CH-CO-Ar	3,3
CH <sub>3</sub> -Ar	2,1-2,2	CH <sub>2</sub> -CO-R	2,4		
CH <sub>3</sub> -CO-Ar	2,3-2,4	CH <sub>2</sub> -Ar	2,4		
	2,6	CH <sub>2</sub> -CO-Ar	2,7		
			2,9		
Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome		Lié à un hétéroatome	
CH <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,1-2,3	CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,5	CH-NH <sub>2</sub> (ou NR <sub>2</sub> )	2,9
CH <sub>3</sub> -NH-COR	2,8-2,9	CH <sub>2</sub> -NH-COR	3,3	CH-NH-COR	3,8-4,1
CH <sub>3</sub> -OR	3,3	CH <sub>2</sub> -OR	3,4	CH-OR	3,7
CH <sub>3</sub> -OH	3,4	CH <sub>2</sub> -OH	3,6	CH-OH	3,9
CH <sub>3</sub> -OCOR	3,7	CH <sub>2</sub> -OCOR	4,2	CH-OCOR	4,8-5,1
CH <sub>3</sub> -OAr	3,8	CH <sub>2</sub> -OAr	4,0	CH-OAr	4,0
CH <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	4,3	CH <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub>	4,4	CH-NO <sub>2</sub>	4,5-4,7
Protons liés à un C insaturé:	δ	Protons portés par un hétéroatome. Leur position dépend considérablement du solvant et de la concentration.			
-C≡CH	1,8-3,1	<b>OH</b>		<b>NH</b>	
-C=CH-	4,5-6,0	Alcool (ROH) : 0,7-5,5		Amine aliphatique (RNH <sub>2</sub> , RNH-) : 0,6-5,0	
ArH	6,5-8,2	Phénol (ArOH) : 4,5-7,1		Amine aromatique (ArNH <sub>2</sub> , ArNH-) : 2,9-4,7	
	(benzène : 7,27)	Amides (-CO-NH <sub>2</sub> , CO-NH-) : 6,0-8,5			
RCH=O	9,5-10,0	Acide (R-CO-OH) : 10,5-12,5			
ArCH=O	9,7-10,5				

## CHAPITRE I : Méthodes Spectrales

### Application :

On donne le spectre RMN de la molécule B représentée ci-dessous en formule topologique. On se propose de vérifier la cohérence entre le spectre et la structure de B.



1. Pour chaque signal du spectre, remplir le tableau ci-dessous :

numéro du signal	Déplacement chimique	profil	Intégration
1			
2			
3			

2. En déduire, pour chaque signal, le nombre de voisins des protons considérés.

3. Écrire la formule semi développée de B.

4. Montrer que la molécule B ne contient que trois types de protons différents : les repérer en couleur sur la formule.

5. Attribuer à chaque type de proton un signal.

**CHAPITRE II :**  
**METHODES DE**  
**FRACTIONNEMENT**

### I- Introduction

La complexité des extraits de plantes nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt. Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des produits naturels telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), la chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography), la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography), la chromatographie à contre courant (CCC, CounterCurrent Chromatography), la chromatographie en fluide supercritique (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) ou l'électrophorèse capillaire (CE, capillary electrophoresis).

### II. Méthodes chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être classées selon le type de phase stationnaire et mobile. Que la phase mobile soit gazeuse, liquide, la phase stationnaire est située dans une colonne, traversée par la phase mobile sous l'effet d'une pression extérieure. C'est la chromatographie sur colonne. La chromatographie liquide moderne utilise beaucoup d'oxydes inorganiques avec groupements fonctionnels organiques chimiquement liés ainsi que des polymères poreux.

Quand la phase stationnaire est étalée en fine couche sur une surface plane telle une plaque de verre (auparavant du papier) et que la phase mobile se déplace sur cette couche sous l'effet de forces de capillarité, la technique est appelée, chromatographie planaire ou sur couche mince (TLC).

Les séparations chromatographiques sont classées en 5 principaux types:

- a. Chromatographie de partage en phase normale ou inversée
- b. Chromatographie d'adsorption : la phase stationnaire est un solide finement divisé sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption.
- c. Chromatographie d'exclusion stérique : dans laquelle la phase stationnaire est constituée d'un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. Ces matériaux sont souvent des gels qui se comportent comme de véritables tamis vis-à-vis des molécules ayant des poids et des structures différents. Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion.

**d.** Chromatographie sur échangeur d'ions : la phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

**e.** Chromatographie d'affinité : dans cette technique, un ligand, qui lie spécifiquement la protéine d'intérêt, est fixé de manière covalente à une matrice poreuse et inerte on peut alors récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand en ajoutant un excès de ligand libre dans la colonne ( celui-ci entre en compétition pour la liaison de la protéine) ou en changeant le pH, la force ionique et/ou la température. Cette approche possède le grand avantage d'exploiter les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt, au lieu d'utiliser des propriétés physico-chimiques qui sont aussi partagées par d'autres protéines, et possède aussi l'avantage de pouvoir purifier la protéine d'intérêt à un très haut degré de pureté en une seule étape.

En résumé, la chromatographie est une méthode de séparation non destructrice d'un mélange liquide ou gazeux en ses différents constituants. C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène.

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact :

- **La phase stationnaire** peut-être soit un solide finement pulvérisé, soit un liquide immobilisé sur une phase fixe. Elle est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support
- **La phase mobile** est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux. Elle se déplace au contact de la phase stationnaire.

Leur combinaison permet de distinguer quatre types de chromatographie :

- la chromatographie liquide-liquide
- la chromatographie liquide-solide
- la chromatographie gaz-liquide
- la chromatographie gaz-solide

Il existe 5 types de chromatographie en phase liquide et trois en phase gazeuse

L'entraînement à des vitesses différentes des produits présents dans la colonne par la phase mobile conduit à leur séparation. Les produits traversent la colonne avec des temps qui dépendent de leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou de leur affinité avec la phase

stationnaire (polarité...). A leur sortie de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

L'efficacité d'une colonne augmente quand la taille des particules de support diminue et donc que la hauteur équivalente à un plateau théorique diminue. Pour obtenir un débit convenable avec des microparticules de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, il faut exercer une forte pression sur la phase mobile.

### **II-1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)**

L'HPLC fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, elle demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet-visible (UV-vis, réalisée par un détecteur à barrette de diodes DAD, Diode Array Detector), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire (RMN).

#### **II-1-1 Principe :**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

### II-1-2 Optimisation de la méthode HPLC-DAD

Les composés phénoliques sont séparés par HPLC-DAD. Les phases stationnaires habituellement employées pour la séparation de composés phénoliques sont les colonnes de silice greffées avec des chaînes  $C_{18}$ . La séparation peut être réalisée en mode isocratique ou en mode gradient d'élution, toutefois la vaste gamme de polarité de ces molécules nécessitent souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés.

Les systèmes de solvant sont alors composés d'eau ( $H_2O$ ) et d'un modificateur organique le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). La phase mobile est souvent acidifiée à un pH situé entre 2 et 4, afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité.



Figure 9 : HPLC

### II-2-3 Théorie de la chromatographie

On obtient une série de pics symétriques que l'on appelle chromatogramme qui est utilisé en analyse qualitative (temps de rétention) et en analyse quantitative (aire des pics). Les positions des pics sur l'axe des temps permettent d'identifier les constituants de l'échantillon tandis que les aires sous les pics mesurent leur quantité. Si les pics se chevauchent, une amélioration de séparation entre ces derniers s'impose (Figure 10) ;

- A largeur de pic constante, on peut augmenter la différence de temps de rétention entre les 2 pics de deux solutés **A** et **B**, comme le chromatogramme ci-dessous :
- A temps de rétention constant, on peut diminuer la largeur des pics

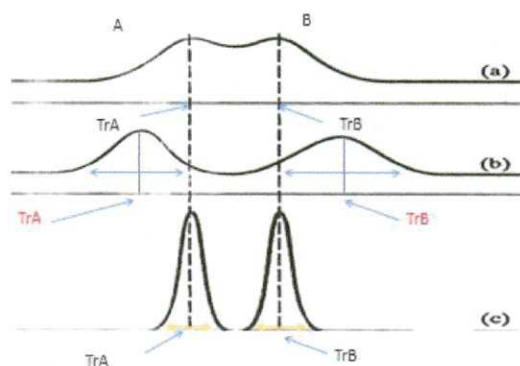


Figure 10 : Amélioration de la séparation de deux produits.

En conclusion, la rétention et la forme des pics s'avèrent primordiaux pour améliorer une séparation.

### Application :

Le chromatogramme du Prozac (antidépresseur) a été enregistré dans les conditions suivantes: HPLC. Colonne  $C_{18}$ :  $L=15\text{cm} \times 4.6\text{mm}$ . Phase mobile: acetonitrile /  $25\text{mM KH}_2\text{PO}_4$  à pH 7.0 (40:60). Débit:  $2\text{mL}/\text{min}$ . Température:  $30^\circ\text{C}$ . Détecteur UV :  $254\text{ nm}$ . Injection:  $1\mu\text{L}$ .

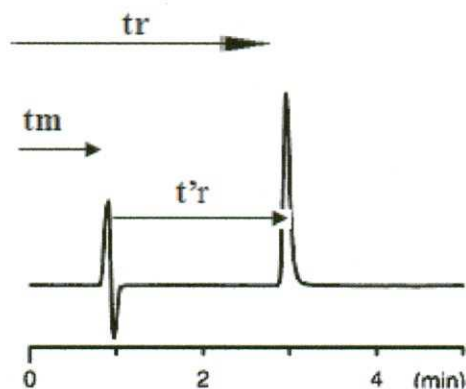


Figure 11 : Chromatogramme du Prozac

### Paramètres caractérisant la rétention :

#### a- Le temps de rétention

Le temps de rétention  $tr$  d'un produit A est le temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie du produit. ( $tr = 3\text{mn}$ ).

$tr$  dépend du produit A et des conditions expérimentales (colonne, température, débit de phase mobile... etc).

### b- Le volume de rétention

Le volume de rétention  $V_r$  correspond au volume de la phase mobile nécessaire pour éluer le produit A. Si  $D$  est le débit de la phase mobile ( $D$  supposé constant) :

$$V_r = t_r * D. (V_r = 3 * 2 = 6 \text{ ml})$$

### c- Le temps mort

Le temps mort  $t_m$  est le temps que met la phase mobile pour traverser la colonne. ( $t_m = 1 \text{ mn}$ ). La phase mobile est caractérisée par sa vitesse linéaire  $u$  de déplacement dans la colonne de longueur  $L$ , on a :

$$u = L / t_m (u = 15 \text{ cm/mn})$$

**d- Le volume mort** On appelle volume mort  $V_m$  le volume de la phase mobile qui passe à travers la colonne pour aller d'une extrémité à l'autre de la colonne (pendant le temps  $t_m$ ). Autrement dit,  $V_m$  est le volume occupé par la phase mobile dans une colonne.

$$V_m = t_m * D. (V_m = 1 * 2 = 2 \text{ ml})$$

$V_m$  ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne.

### e- Volume et temps de rétention réduits

On appelle volume de rétention réduit  $V'_r$ , la différence entre les termes  $V_r$  et  $V_m$ .

$$V'_r = V_r - V_m (V'_r = 4 \text{ ml})$$

Le volume de rétention réduit correspondant au produit A est le volume de phase mobile qui doit passer à travers la colonne pour éluer le composé A.

De la même façon, on définit un temps de rétention réduit  $t'_r$ .

$$t'_r = t_r - t_m (t'_r = 2 \text{ mn})$$

Les volumes et temps de rétention réduits sont indépendantes des volumes et temps morts, elles dépendent donc moins de l'instrumentation (de la colonne).

### f- Le facteur de rétention (ou de capacité)

Le facteur de rétention  $k'$  pour un produit donné est défini comme suit :

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V'_r}{V_m} \quad \text{ou également} \quad k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m}$$

Les facteurs de rétention sont des grandeurs sans dimension donc plus générales d'un produit donné que les temps ou les volumes de rétention réduits ( $k' = 2$ ).

Le facteur de rétention: c'est le rapport du temps passé par le soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

#### II-2-4 Théorie des plateaux

a- L'efficacité d'une colonne de chromatographie peut s'exprimer par le nombre  $N$  de plateaux théoriques qu'elle possède. Plus le nombre de plateau est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également la hauteur équivalente de plateaux théoriques (HEPT) :

$$H=L / N$$

Avec  $L$  : longueur de la colonne. Plus la hauteur de plateau  $H$  est faible, plus la colonne est efficace. Plusieurs relations dans le cas de pics symétriques (gaussien) permettent de calculer le nombre de plateaux théoriques en fonction des grandeurs de rétention utilisées :

$$N= (t_R/\sigma)^2 = 16(t_R/\omega)^2 = 5.54 (t_R/\delta)^2$$

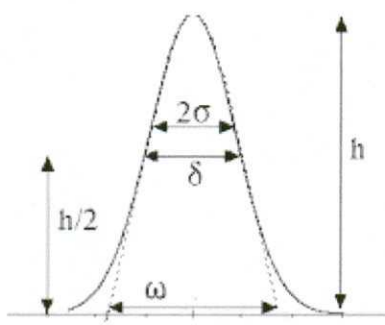


Figure 12 : Profil des pics chromatographiques

#### b- Facteur de séparation ou de rétention

Il définit la position relative de 2 pics, le pic du soluté "a" sortant avant le pic du soluté "b": Il est égal à  $a = t'R(b)/t'R(a) = \omega_b/\omega_a$ . Il faut pour que les pics soit séparé une valeur de  $a$  différente de 1. Cependant une séparation correcte nécessite un retour à la ligne de base du composé "a" avant l'apparition du second pic. Ce coefficient à lui seul ne garantit pas une bonne résolution.

#### c- Facteur de résolution de la colonne

Il définit la plus ou moins bonne séparation de 2 solutés :

$$R= 2(tR(a)-tR(b))/(\omega_a+ \omega_b)$$

La relation peut également s'écrire :

Pour des valeurs de R supérieures à 1,5 les pics sont correctement séparés. Pour une valeur comprise en 0,6 et 1,5, les pics sont séparés mais sans retour à la ligne de base entre les pics.

### d- Le facteur de sélectivité $\alpha$

Pour calculer ce facteur, on introduit tout d'abord un premier paramètre, le facteur de capacité  $k'$  :

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

**Remarque ;**

$k'$  est facile à relier au  $R_f$  obtenu en couche mince, et l'on peut démontrer que :

$$k' = (1/R_f) - 1$$

Ceci permet de transposer les résultats de la CCM à la HPLC. Le facteur de sélectivité qui mesure l'aptitude de la colonne à séparer les composés est égale :

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

Ce facteur de sélectivité ou de séparation, sans dimension, est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il est en général compris entre 1,05 et 2. Si la colonne est efficace (N élevé), des valeurs supérieures ne sont pas nécessaires.

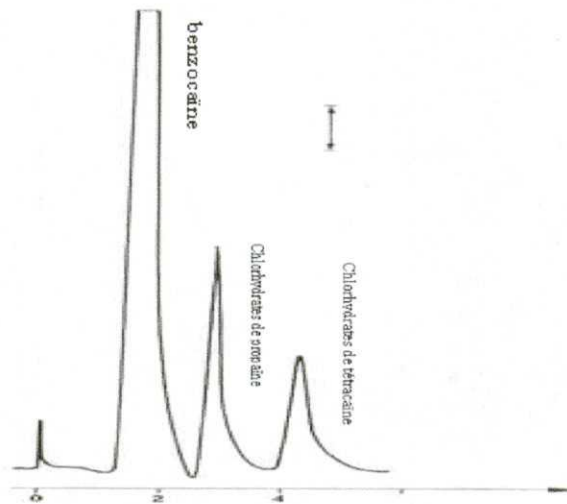
### II-2-5 les applications de la chromatographie sur colonne

Les catécholamines telles que l'adrénaline et la dopamine sont hautement importantes pour beaucoup de rôles biologiques. Analyser leurs précurseurs et métabolites peut fournir le diagnostic des maladies telles que la maladie de Parkinson, la cardiopathie, et la dystrophie musculaire.

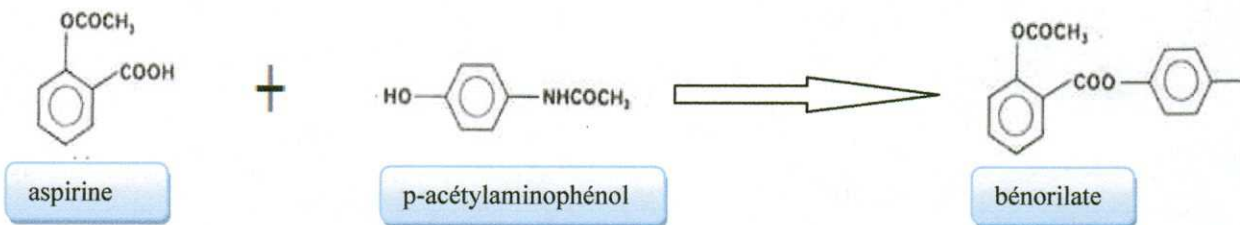
Parmi les applications de la chromatographie liquide, prenons l'exemple celui d'adsorption ; Les médicaments sont souvent associés à des différentes substances dont les effets se veulent complémentaires, leur contrôle nécessite des méthodes rapides et fiables permettant de doser les différents constituants des préparations médicamenteuses. Pour ce faire, la chromatographie liquide s'impose.

**Ex ; Séparation de la benzocaïne et des chlorhydrates de propaïne et de tétracaïne, ces trois substances se trouvent ensemble dans un anesthésique dentaire.**

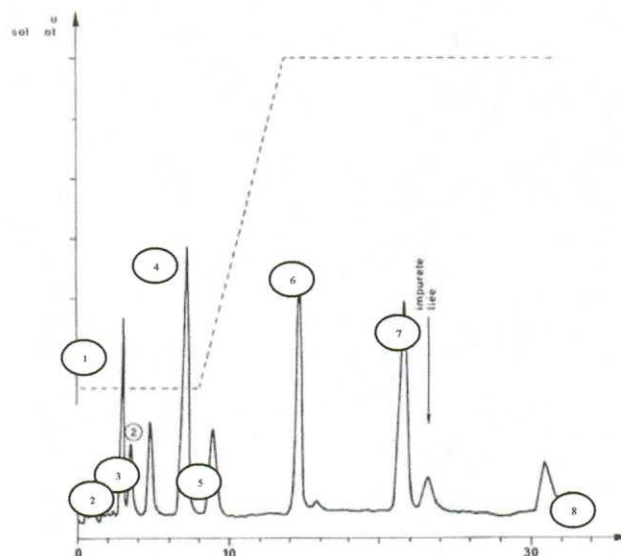
Colonne de longueur 15 cm, diamètre intérieur 0,48 cm. Phase mobile ; acétate d'éthyle-méthanol-éthylamine en solution aqueuse à 50% (p/v) (93 :6,86 ; 0,14). Teneur en eau : 0,13%. Débit : 80 ml.h<sup>-1</sup>. Injection de 10 $\mu$ l d'une solution contenant 0,5 g de chlorhydrate de tétracaïne dans 100 ml de phase mobile. Détection UV à 254 nm,  $\Delta P$  : 30 bars.



**Figure 13:** Séparation de la benzocaïne et des chlorhydrates de propaïne et de tétracaïne  
Le bénomilate provient de la réaction d'estérification de l'acide acétylsalicylique « aspirine » par le p-acétylaminophénol selon la réaction :



La chromatographie de partage permet l'identification et le dosage des impuretés du bénomilate.



**Figure 14 :** Chromatogramme du bénomilate et de ses impuretés éventuelles en solution dans le chlorure de méthylène

## CHAPITRE II : Méthodes de fractionnement

---

- 1- anhydride acétylsalicylique ( $1\text{mg.ml}^{-1}$ );
- 2- aspirine (0,5);
- 3- acide acétylsalicylique ( $1,5\text{ mg.ml}^{-1}$ );
- 4- salophène ( $0,5\text{ mg.ml}^{-1}$ );

- 5- acétoxy 2 benzoate d'ammino 4 phényl ( $1\text{ mg.ml}^{-1}$ );
- 6- bénomilate ( $0,5\text{ mg.ml}^{-1}$ );
- 7- paracétamol ( $0,5\text{ mg.ml}^{-1}$ );
- 8- p-aminophénol ( $1,5\text{ mg.ml}^{-1}$ )

Colonne : longueur 25 cm ; diamètre int 2,1 mm. Phase stationnaire : Micropak CN  $10\mu\text{m}$ .

Phase mobile : solvant A : hexane-chlorure de méthylène-acide acétique (94,8 : 5 : 0,2) (v/v).

solvant B : hexane-chlorure de méthylène-méthanol- acide acétique (89,8 : 5 : 5 : 0,2) (v/v).

débit ;  $60\text{ ml.h}^{-1}$ .  $\Delta P$  : 70 bars. Quantité injectée :  $3\mu\text{l}$ .

### III- Chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography)

La GC a été employé pour l'analyse et l'identification des composés volatils des fruits et des feuilles, elle est utilisée également dans d'autres domaines, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques. C'est une technique développée par A.J.P MARTIN et R.L.M. SYNGE, bénéficiaires du Prix Nobel de chimie 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage.

Outre les composés volatils, la GC est particulièrement adaptée à l'analyse de molécules de faible poids moléculaire et/ou à caractère hydrophobe facilement volatilisables, après une étape de dérivation. Ainsi cette technique couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID, Flame Ionisation Detector) ou à un détecteur de spectrométrie de masse a également été utilisée, après une étape d'estérification, pour la détermination du contenu en acides gras.

#### III-1 Principe physico-chimique

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile.

Plus la molécule a d'affinité pour la phase stationnaire, moins elle est entraînée par le gaz vecteur et donc plus elle est retenue sur la colonne. Ainsi, sur colonne polaire, les analytes apolaires sortent en premier, alors que sur colonne apolaire, les analytes polaires sortent en premier.

Par ailleurs, plus la température est haute, plus on déplace l'équilibre de partage vers  $A_{(phase\ mobile)}$ , et donc plus l'analyte  $A$  est entraîné par le gaz vecteur.

Si les analytes d'un échantillon ont des coefficients de partage différents, alors, tous les autres paramètres étant identiques (débit du gaz vecteur, température), leurs durées de parcours dans la colonne seront différentes. Ainsi, les analytes se séparent puis sortent de la colonne les uns après les autres. La durée entre la date d'injection et celle de sortie de colonne d'un analyte  $A$  est son « temps de rétention ».

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile.

Le partage est un équilibre dynamique entre l'analyte  $A$  dans la phase stationnaire  $A_{(phase\ stationnaire)}$  et le même analyte dans la phase mobile  $A_{(phase\ mobile)}$ :  $A_{(phase\ stationnaire)} \rightleftharpoons A_{(phase\ mobile)}$ .

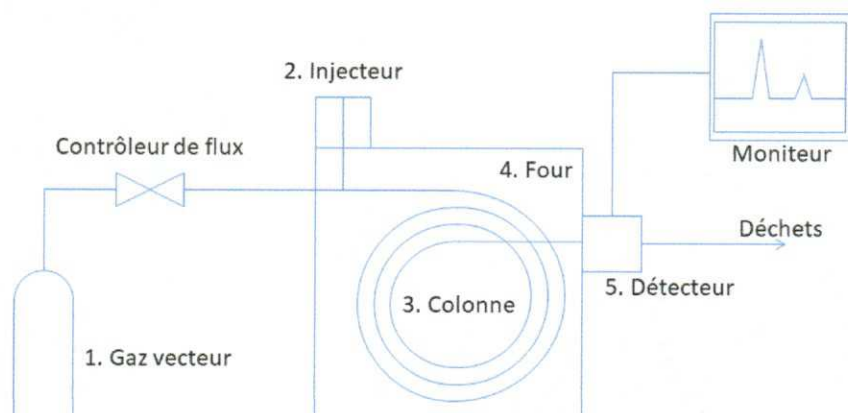
Le coefficient de partage  $K$  est la constante d'équilibre associée à cet équilibre.

Plus la molécule a d'affinité pour la phase stationnaire, moins elle est entraînée par le gaz vecteur et donc plus elle est retenue sur la colonne. Ainsi, sur colonne polaire, les analytes apolaires sortent en premier, alors que sur colonne apolaire, les analytes polaires sortent en premier.

Par ailleurs, plus la température est haute, plus on déplace l'équilibre de partage vers  $A_{(phase\ mobile)}$ , et donc plus l'analyte  $A$  est entraîné par le gaz vecteur.

### III-2 Appareillage

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Il comporte plusieurs éléments, comme indiqué sur le schéma ci-dessous :



**Figure 15** : Schéma d'un chromatographe

### III-2-1 Le gaz vecteur (phase mobile)

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Selon la nature du détecteur utilisé le gaz vecteur peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

Le débit du gaz vecteur influe sur le pouvoir de résolution du chromatographe. Deux phénomènes, la diffusion longitudinale et la résistance au transfert de masse entre les phases mobile et stationnaire, ont des effets opposés sur le pouvoir de résolution de la colonne. L'opérateur choisit donc une valeur du débit afin d'optimiser le pouvoir de résolution du chromatographe.

### III-2-2 Le système d'injection

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil.

L'introduction se fait à l'aide d'une microsiringue (le volume à injecter est généralement voisin de 1  $\mu\text{L}$ ) à travers un septum (qui assure l'étanchéité) dans un *liner* (typiquement un tube de verre rempli d'un petit morceau de coton).

Si l'échantillon contient des espèces non-volatiles, celles-ci sont retenues sur le coton et donc non-injectées dans la colonne, ce qui permet de la protéger. Les espèces volatiles sont vaporisées et entraînées par le gaz vecteur vers la tête de la colonne.

- ▶ Détecteur à conductibilité thermique – catharomètre.
- ▶ Détecteur à ionisation de flamme.
- ▶ Détection par spectroscopie infrarouge
- ▶ Détection par spectrométrie de masse
- ▶ Détecteur à capture d'électrons.

### III-2-5 Colonne

Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte ( ex : brique pilée, alumine etc. Soigneusement calibrée) On distingue les colonnes à remplissage proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Le support remplissant la colonne est constitué de grains dont les dimensions varient de 60 à 70  $\mu\text{m}$ ; ils sont à base soit de matériau réfractaire soit de silice. La phase stationnaire est un liquide peu volatil, formant environ 10% de la masse du support non imprégné.

La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend dans une large mesure du choix de la phase stationnaire. On distingue les phases apolaires et les phases polaires. Les premières sont à base d'hydrocarbures aliphatiques saturés ou de silicones (squalane, apiezon,...). Les secondes sont des polymères possédant des fonctions polaires: polyols, polyesters, polyamides. En général, les phases polaires retiennent plus les composés polaires, alors que ceux-ci sortent plus rapidement des colonnes apolaires que les composés du même nom.

#### Consignes ;

On ne doit jamais effectuer d'analyse CPG sans avoir stabilisé l'ensemble de l'appareil en débit de gaz vecteur et en température pendant au moins deux heures. En dehors des périodes d'utilisation, les colonnes doivent être bouchées pour éviter l'humidité pouvant se solubiliser dans la phase stationnaire, ainsi que l'oxydation de celle-ci.

La température de la colonne est en général inférieure de 20°C à celle du point d'ébullition du soluté le plus volatil. Plus la température de colonne est basse, meilleure est la séparation, mais cela risque d'allonger le temps d'analyse. Le choix de la phase stationnaire conditionne la bonne séparation des constituants. Il faudra la choisir polaire ou apolaire en fonction de la

nature des substances à séparer. Le gaz employé (phase mobile) est un gaz inerte (hélium ou azote). Le gaz utilisé par notre installation est l'hélium. Ce gaz vecteur ou gaz porteur pousse les constituants à travers la colonne. En chaque point de cette dernière, il se produit un équilibre entre la fraction du constituant en phase stationnaire et en phase mobile. Il s'agit de chromatographie de partage. L'ensemble des organes décrits ci-dessus est placé dans des enceintes thermo statées à des températures programmées selon la disposition des organes et la nature de l'échantillon à analyser.

### III-2-5 Le four

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

Si la température est gardée constante tout au long de l'analyse, elle est appelée « isotherme ». A l'inverse, on peut augmenter la température du four graduellement au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « gradient ».

### III-3 Domaines d'applications

- ▶ Industrie chimique : production, contrôle...
- ▶ Industrie alimentaire : corps gras, vins et spiritueux, bière, arôme...
- ▶ Industrie cosmétique et parfums
- ▶ Industrie pharmaceutique Domaines d'applications
- ▶ Energie : raffinerie de pétrole, gaz naturel, biomasse...
- ▶ Contrôle pollution : eaux, sols, atmosphère
- ▶ Exploration spatiale
- ▶ Police scientifique
- ▶ Recherche scientifique

### IV- Méthodes électrophorétiques

#### IV -1 Introduction

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique. Les composés qui peuvent être transformés en particules chargées par formation de complexes, sont de même sujets à une migration sous l'effet du champ électrique.

#### 3-2 Isoélectrofocalisation

Au point Isoélectrique, la protéine ne possède aucune charge nette, le nombre de charges positives étant égal à celui de charges négatives. Donc à un pH égal au pI, les protéines ne peuvent pas se déplacer dans le champ électrique. Les protéines ont une charge qui leur permet de migrer dans un champ électrique. La vitesse de cette migration est proportionnelle à la charge qui elle-même est proportionnelle à la différence entre le pH du milieu et le pI de la protéine.

Le principe de base de la focalisation isoélectrique (**FIE**) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur pI.

Un tel gradient de pH est créé avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes positivement ou négativement ionisables (amines, carboxyles, sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de pI. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pI. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pI couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pI.

## CHAPITRE II : METHODES DE FRACTIONNEMENT

---

Il est à noter que c'est le gel de polyacrilamide qui est le plus souvent utilisé de nos jours et que la focalisation isoélectrique est souvent couplée à l'électrophorèse sur gel 2D qui permet une meilleure séparation en fonction du poids de la molécule.

Après avoir fini la séparation des protéines par leur pI, il est important de pouvoir observer les bandes qui ont été formées. Pour ce faire, il existe quelques méthodes qui permettent de les voir. La première est la coloration avec divers colorants comme le bleu de Coomassie où l'on doit fixer le gel avec 20% d'acide trichloroacétique, ensuite colorer le gel avec le bleu de Coomassie dissout dans 40% de méthanol et 10% d'acide acétique puis faire une décoloration avec 25 % de méthanol et 10 % d'acide acétique.

Le colorant vert solide FCF est un colorant qui n'interfère pas avec les ampholytes que l'on retrouve dans le gel de focalisation isoélectrique, et il fournit une meilleure plage de détection que le bleu de Coomassie. On peut également utiliser un colorant fluorescent, comme le fluorescamine, qui va se lier avec les groupements amines primaires des peptides et former des composés très fluorescents.

La focalisation isoélectrique peut être combinée à l'immunoélectrophorèse. Cette combinaison est surtout utilisée en immunologie et consiste à prendre une bande du gel obtenue avec la focalisation isoélectrique et à la placer dans un gel qui contient une solution d'anticorps spécifiques, ce qui va faire migrer les protéines selon l'affinité des antigènes avec ces anticorps. Cette technique a été utilisée pour l'analyse de protéines urinaires, des amylases salivaires et des protéines sériques humaine.

La focalisation isoélectrique est **utilisée pour des analyses en clinique** par exemple afin de déterminer la sévérité du diabète chez une personne en déterminant la variation des charges de l'hémoglobine due à des modifications aux groupements amines. Elle permet aussi l'analyse de nourriture ou de graines. Elle est surtout utilisée pour les applications suivantes : la séparation des protéines en fonction de leur pI, le contrôle alimentaire, soit savoir s'il y a des traces animales, permet de faire la différenciation de caséines, des protéines que l'on retrouve dans les produits laitiers, la caractérisation de certaines espèces de plantes comme le blé et finalement, elle est utilisée pour des analyses de routine en clinique entre autres pour l' $\alpha$ -amylase ou pour l'identification des différentes isoenzymes de l'alcool déshydrogénase.

Une protéine en solution portée à un pH inférieur à son  $P_I$ , se comporte comme une base et capte des protons  $H^+$ . Elle devient chargée positivement.

Une protéine mise à un pH supérieur à son  $P_I$ , se comporte comme un acide et cède des protons. Elle sera chargée négativement. Prenons le cas d'un acide aminé A, ses charges seront:

Milieu acide Milieu basique



### Il existe 2 types d'électrophorèses

- ▶ L'électrophorèse dite "libre" en veine liquide (mise au point par Tisélius en 1937).
- ▶ L'électrophorèse de zone sur support.
- ▶ L'électrophorèse en veine liquide, la migration dans ce type d'électrophorèse s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu. Cette technique permet une bonne détermination des mobilités électrophorétiques **mais** couteuse et les particules ne se séparent pas complètement mais il se forme des frontières mise en évidence par des méthodes optiques telles que l'absorption Ultra-violette pour les protéines.

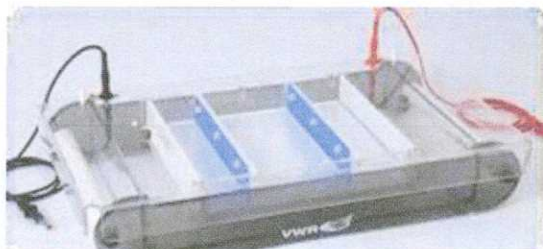
L'électrophorèse de zone, ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Différents types de support peuvent être utilisés:

- ✓ Support en papier ou acétate, la migration des mélanges s'effectue à la surface de celui-ci.
- ✓ Support en polyacrylamide ou agarose (la migration des mélanges s'effectue à l'intérieur même du support). Les fractions séparées migrent comme des "zones" individuelles. La taille des mailles ("pores") pour les supports en gel peut influencer la vitesse de migration (ralentir le déplacement des grosses molécules).

### Deux types de montage peuvent être mis en place :

#### Montage horizontal

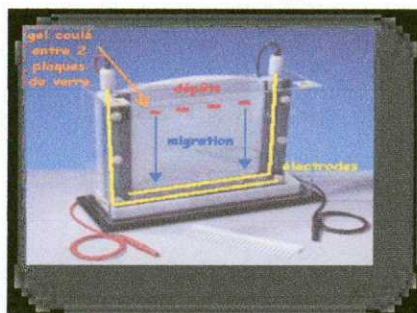
Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande. Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface.



**Figure 17:** Cuve d'électrophorèse horizontale.

### Montage vertical

Utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou, plus rarement 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. Chaque extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.



**Figure 18 :** Cuve d'électrophorèse verticale.

Les supports utilisés en électrophorèse sont nombreux, avec des degrés de résolution variables. Leurs types ont permis de distinguer plusieurs appellations en électrophorèse, comme : - Electrophorèse en veine liquide- Electrophorèse sur papier- Electrophorèse sur gels (agarose, amidon, polyacrylamide...).

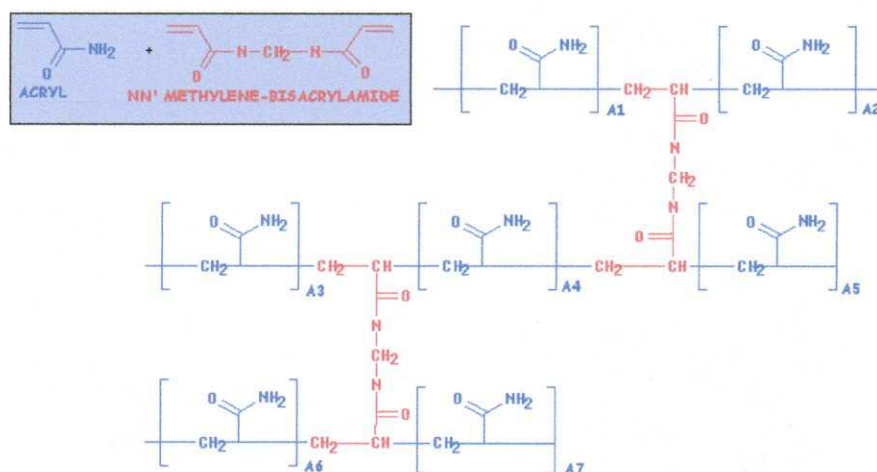
**Ex : Gels de polyacrylamide**, cette matrice est constitué d'**acrylamide** (extrêmement neurotoxique par ingestion ou au contact avec la peau) qui est l'unité de base et de **bisacrylamide** qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

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 de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène afin d'être identifier par le biais d'anticorps

## CHAPITRE II : METHODES DE FRACTIONNEMENT

spécifiques. Également utilisée pour le séquençage de l'ADN (les méthodes traditionnelles de Maxam et Gilbert ou de Sanger permettent de séquencer à la paire de bases près).

La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs : le **TEMED** (N,N,N',N' tétra-méthyl-éthylènediamine) et l'**ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.



La densité d'un **gel de concentration** (stacking gel) est à 5%. Ce gel est coulé en haut du gel de séparation. Il permet à l'échantillon une entrée homogène dans le gel de séparation. On utilise un "peigne" afin de créer des "puits" individuels pouvant accueillir chaque échantillon.

### 3-3 Electrophorèse en milieu dissociant et/ou dénaturant

#### Le SDS-PAGE

Une variante de cette technique consiste à utiliser du **SDS (Sodium Dodécylsulfate)** qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native. Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le **β mercaptoéthanol** qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique.




Sous l'action de la température élevée (100°C classiquement) et du SDS (un détergent anionique), en présence d'un agent réducteur (2-mercaptoéthanol ou dithiothréitol), toutes les sous unités polypeptidiques des protéines perdent leurs ponts disulfures éventuels (séparées) sont dénaturées et il y a formation d'associations :

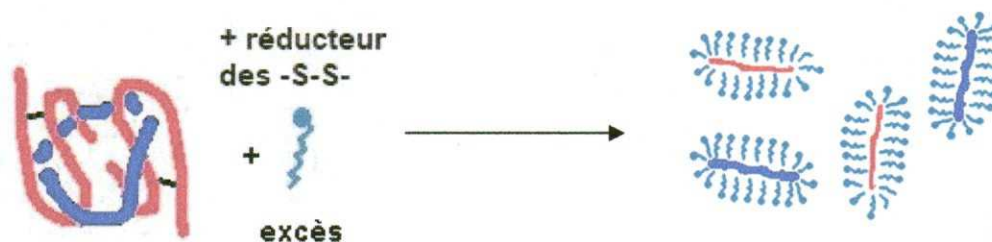
### SDS - sous unité polypeptidiques.

Dans le cas de protéines globulaires hydrosolubles, quel que soit le polypeptide, toutes les associations **SDS - unité polypeptidique** présentent un ratio SDS/polypeptide presque identique vers 1,4 g/g et finalement la même densité de charge (le rapport la charge  $q$  au rayon hydrodynamique  $r$ ) et donc la même mobilité en veine liquide.

Le 2-mercaptoéthanol ( $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-SH} = \text{RSH}$ ) ou le dithiothréitol ( $\text{HS-CH}_2\text{-CHOH-CHOH-CH}_2\text{-SH}$ , moins toxique) se comportent en réducteur des ponts disulfures éventuels: ( $2 \text{ R-SH}$  « en excès » +  $\text{X-S-S-X} \rightarrow \text{R-S-S-R} + \text{X-SH HS-X}$ ). Ceci permet de séparer d'éventuelles sous-unités liées par ponts disulfures et d'assurer le "dépliage" complet des polypeptides comportant des ponts disulfures (intrachaine).

Soit une protéine formée par l'assemblage de 4 s/u polypeptidiques, 2 unités symbolisées

 et deux unités symbolisées par  la chaîne rouge possède des ponts disulfures symbolisées par des traits noirs. Soit  symbolisant le SDS



Ce sont les associations SDS-unités ainsi obtenues qui vont être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Comme toutes ces associations ont la même densité de charge et donc la même mobilité potentielle en veine liquide, c'est l'effet de tamisage moléculaire par le support gel qui sera mis en œuvre pour exercer l'effet séparatif différentiel. Ce qui suppose donc de travailler avec un gel de porosité adaptée et parfaitement contrôlée ou avec un gel présentant un gradient de porosité.

Le sodium dodécylsulfate est un détergent qui comprend une tête polaire sulfate hydrophile chargée négativement et une chaîne hydrophobe apolaire de 12 carbones.

### Séparation électrophorétique

Dans la partie séparative du gel d'électrophorèse (separating gel), les grosses associations sont plus freinées et/ou arrêtées par le maillage du gel que les petites. D'où un profil de migration du type :

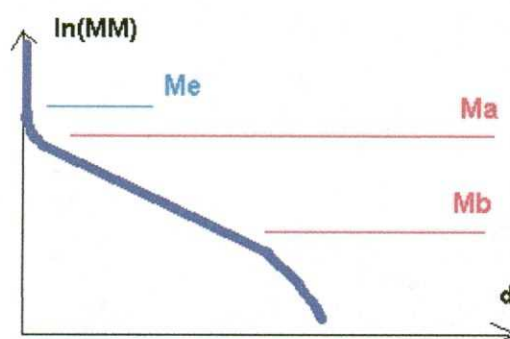


Figure 19 : profil de migration d'un polypeptidique

- $\ln(MM)$  :  $\ln$  de la **masse moléculaire** d'une unité polypeptidique (non glycosylée).
- ▶  $d$  : distance parcourue dans le gel d'électrophorèse (parfois on travaille relativement avec un colorant de densité de charge très élevée utilisé comme marqueur).
- ▶  $Me$  : au dessus de cette masse moléculaire d'unité polypeptidique, les micelles sont arrêtées par le maillage du gel.
- ▶  $Ma$  et  $Mb$  : dans cet intervalle de masses moléculaires, la migration est une fonction linéaire du logarithme de la masse moléculaire :  $d = a * \ln(MM) + b$ .

### Révélations des SDS-page

On peut révéler toutes les protéines du gel sans distinction. On fixe (précipitation in situ, en général par une acidification) et on colore avec un colorant des protéines : bleu de Coomassie, méthodes aux sels de cuivre, au nitrate d'argent ... On révèle ainsi toutes les bandes protéiques séparées (avec une détectabilité plus ou moins élevée selon les techniques).

On peut ne vouloir révéler que certaines protéines grâce à des anticorps marqués contre des motifs d'intérêt. Dans ce cas, on met en œuvre la technique dite de Western-blot qui permet, après transfert sur une membrane, d'utiliser une révélation par anticorps marqués.

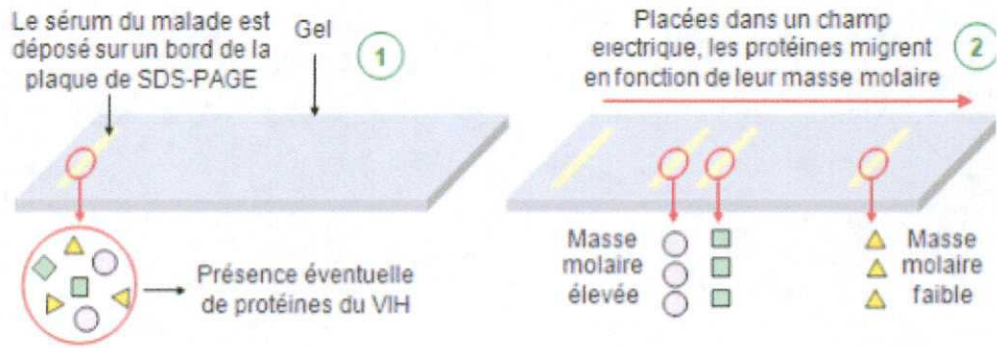


Figure 20 : séparation des protéines sur gel électrophorèse « Western blot »

# **CHAPITRE III : LES METHODES DE MARQUAGE**

### Rappels

#### Atomes, isotopes stables et radioisotopes

Le noyau de certains isotopes de certains atomes n'est pas stable. Il se décompose en émettant certaines particules. Les éléments de poids atomique très élevé peuvent émettre des particules  $\alpha$ , un noyau d'He. Ces éléments sont généralement peu employés en biochimie.

D'autres émettent une particule  $\beta$ , électron (quelquefois appelé négaton) ou **positron**, accompagnée d'un neutrino. La plupart des radio-isotopes employés en biochimie sont de ce type:  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  (tritium),  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , etc. D'autres radio-isotopes émettent du rayonnement  $\gamma$ . Généralement cette émission résulte d'un processus complexe où plusieurs décompositions se produisent en série et s'accompagnent également de la production de particules  $\beta$ . Un isotope de type  $\gamma$  est utilisé en biochimie:  $^{125}\text{I}$ .

#### Notion de Demi-vie

La demi-vie, ou période, est le temps requis pour que la moitié des isotopes se soit désintégrée. Ainsi, après une demi-vie, il ne reste plus que 50% de la radioactivité initialement présente. Après deux demi-vies, il n'en reste que 25%. Pour que la quantité baisse à moins de 1% de la quantité initiale, il faut presque 7 demi-vies. On peut facilement compter la fraction de radioactivité restante après un certain temps par la formule:

$$\% \text{ résiduel} = 100 \times e^{-0.6931(t/h)}$$

où  $t$  = temps écoulé,  $h$  = demi-vie.

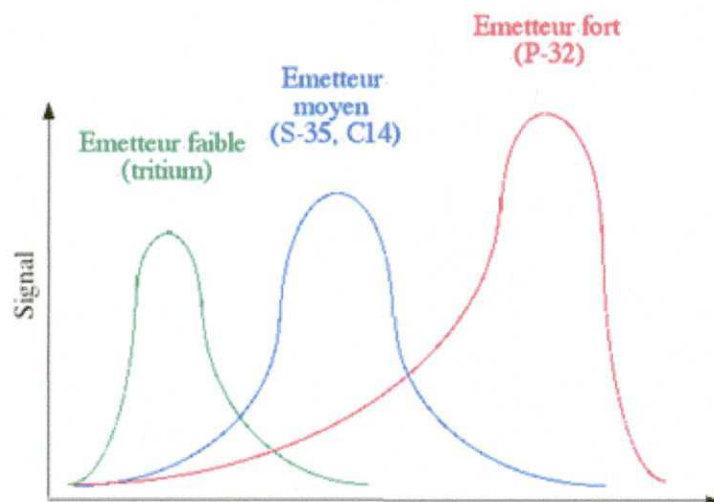
La demi-vie est très importante pour l'expérimentation en laboratoire. Un isotope à demi-vie courte (jours) devra être utilisé et mesuré rapidement. Les isotopes très instables sont pratiquement inutilisables dans un laboratoire ordinaire, ils ne peuvent être employés qu'au moment même de leur production.

En termes de facilité d'emploi, les isotopes à longue demi-vie sont plus pratiques. Cependant ils persistent longtemps dans l'environnement et leur élimination peut devenir problématique. Les solutions ou le matériel contaminé avec de tels radio-isotopes nécessitent des méthodes coûteuses d'entreposage à long terme.

#### Énergie émise

L'énergie libérée par une désintégration varie selon les isotopes. Chaque isotope émet à un niveau d'énergie donné, généralement exprimée en MeV. Ainsi le  $^3\text{H}$  émet à 0.018 MeV. De tels isotopes sont souvent qualifiés de "faibles" ou de "mous". D'autres, au contraire, émettent des particules hautement énergétiques. Par exemple, le  $^{32}\text{P}$  produit 1.71 MeV. On les qualifie

souvent de forts ou "durs". Entre ces deux extrêmes, on retrouve des émetteurs moyens comme le  $^{14}\text{C}$  (0.156 MeV) ou le  $^{35}\text{S}$  (0.169 MeV). Cette caractéristique influe évidemment sur le danger d'irradiation de chaque isotope ainsi que sur la facilité avec laquelle on peut le détecter.



**Figure 21 :** Echelle d'émission du rayonnement  $\beta$  « échelle logarithmique »

### Unités de radioactivité

L'unité officielle de radioactivité du SI est le becquerel (Bq). Cette unité représente le nombre de désintégrations par seconde. Même s'il s'agit de l'unité recommandée, son usage est encore restreint. Comme c'est une unité qui correspond à une quantité minuscule de radioactivité, on utilise surtout les grandes dénominations comme le kBq ou le MBq.

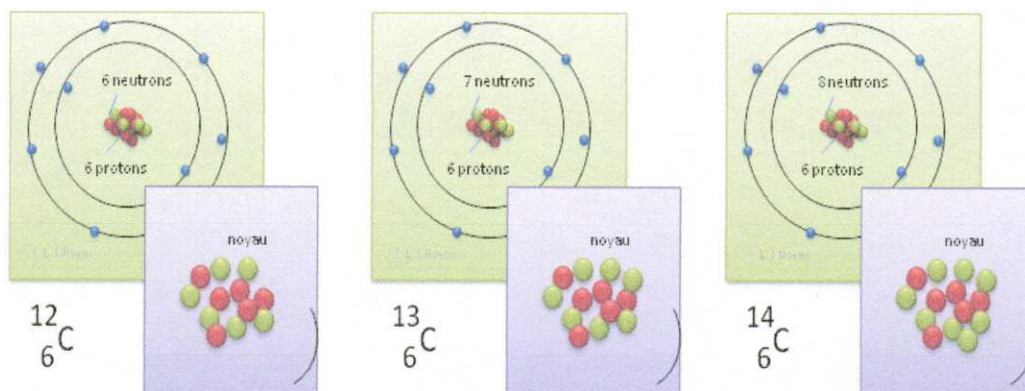
L'unité de mesure de la quantité de radioactivité la plus utilisée est sûrement le curie (Ci). Elle représente le nombre de décompositions radioactives dans un 1 g de radium, c'est-à-dire  $2.22 \times 10^{12}$  décompositions par minute (DPM). Les dimensions les plus fréquentes en biochimie sont le  $\mu\text{Ci}$  ( $2.22 \times 10^6$  DPM) ou le mCi ( $2.22 \times 10^9$  DPM).

On exprime quelquefois la quantité de radioactivité en décomposition par minute (DPM). L'activité spécifique est la quantité de radioactivité par unité de masse d'une molécule contenant le radio-isotope. Elle est normalement exprimée en mCi/mmol ou en mCi/mmol.

### I- Principaux radio-isotopes utilisés en biochimie

Les isotopes sont en effet des éléments chimiques qui se retrouvent dans la même case que d'autres dans le tableau périodique, car ils possèdent les mêmes propriétés chimiques que l'élément qui le représente. La seule différence entre les isotopes d'un même élément se

trouve au niveau nombre de nucléons composant leur noyau. C'est le nombre de neutrons, particules neutres qui varie selon les isotopes.



**Figure 22** : Isotopes du Carbone

**Carbone-14:** Cet isotope très stable, demi-vie de plus de 5000 ans, est fréquemment utilisé pour marquer des petites molécules: glucose et autres glucides, acides aminés, etc. Il émet des particules  $\beta$  moyennement énergétiques, ce qui le rend utile aussi bien pour les expériences de comptage ou d'autoradiographie. Cette stabilité est un avantage puisqu'on peut le conserver assez longtemps, mais il faut faire attention à l'autoradiolyse. L'inconvénient de cette stabilité est sa très longue persistance dans l'environnement.

**Tritium:** Cet émetteur  $\beta$  assez stable, ayant une demi-vie de plus de 12 ans, est utilisé pour marquer de petites molécules ou des macromolécules. Les réactions de conjugaison pour marquer des molécules d'intérêt sont bien connues et sont relativement faciles à faire. Il émet cependant des particules  $\beta$  assez faibles, ce qui le rend plus difficile à détecter.

**Phosphore-32:** Cet émetteur  $\beta$  relativement peu stable (demi-vie de 14,3 jours) est souvent utilisé pour étudier les acides nucléiques ou la phosphorylation des protéines. Sa forte émission de particules  $\beta$  très énergétiques permet des autoradiographies très rapides. Cependant, il faut redoubler de prudence à cause du danger que ses radiations puissantes représentent.

**Souffre-35:** Cet émetteur  $\beta$  moyennement stable (demi-vie de 88 jours) est principalement utilisé dans le marquage métabolique des protéines. En effet on peut obtenir facilement de la [ $^{35}\text{S}$ ]-méthionine et de la [ $^{35}\text{S}$ ]-cystéine avec des activités spécifiques extrêmement élevées, ce

qui facilite l'expérimentation où on étudie les changements rapides de la synthèse des protéines.

**Iode-125:** Cet émetteur de rayonnement  $\gamma$  est souvent utilisé pour marquer des protéines par conjugaison d'iodure, dérivé de l'iode moléculaire) sur la tyrosine. De nombreuses applications de RIA utilisent des anticorps secondaires marqués à l' $^{125}\text{I}$ . Son rayonnement est particulièrement puissant. Si on travaille avec de l'iode non conjugué à une protéine, les risques sont encore accrus à cause de la volatilité de l'iode moléculaire utilisé pour faire cette conjugaison. L'inspiration des vapeurs est un danger réel contre lequel il faut se prévenir par des dispositifs spéciaux de sécurité. Conjugué ou non cependant, l'iode-125 est un puissant émetteur gamma qu'il convient de manipuler avec soin.

Dans le diagnostic in-vivo, on injecte à un patient une quantité soigneusement déterminée d'un radio-isotope choisi pour ses propriétés de solubilité, répartition dans l'organisme, etc. Ce radio-isotope doit avoir une demie-vie très courte, souvent de l'ordre de l'heure, pour ne pas créer de dommages chez le patient, et doit être facilement repérable par des détecteurs spécifiques au type d'analyse. Ce traceur atteint un tissu spécifique dont il permet de mesurer certains paramètres physiques ou physiologiques.

La façon classique d'étudier les transformations que subissent des molécules dans un système vivant, leur accumulation ou leur élimination est le marquage métabolique. Il s'agit simplement de mettre en présence un précurseur marqué et d'identifier ou de quantifier les molécules dans lesquelles se retrouvera le radio-isotope.

La première application des radio-isotopes à l'expérimentation en biochimie a été l'élucidation des voies métaboliques. Pratiquement toutes les voies ont été révélées de cette façon. L'approche est simple, on met le précurseur contenant un isotope dans un extrait cellulaire et on prend des échantillons à certains intervalles de temps pour déterminer dans quelles molécules le radio-isotope se retrouvera. Comme les chaînes réactionnelles du métabolisme sont normalement très rapides, il est essentiel d'échantillonner sur des intervalles de temps très courts et d'inactiver totalement les enzymes immédiatement lors de la prise d'échantillon.

On peut ensuite identifier les molécules qui apparaissent en fonction du temps par diverses techniques comme la chromatographie, l'électrophorèse, etc. Ensuite on peut utiliser la séquence d'apparitions des divers métabolites pour déduire l'enchaînement des réactions. Des travaux classiques utilisant cette approche sont ceux de Embden et Meyeroff (glycolyse),

Krebs (cycle de l'acide citrique), Calvin et Benson (fixation du CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse), etc..

### II- Les méthodes isotopiques

Les méthodes d'analyse radiochimiques et isotopiques s'appuient sur des mesures des propriétés du noyau de l'atome. Elles servent à déterminer de la matière en très faibles quantités dans le domaine des microgrammes aux fractions de picogramme.

Les méthodes radiochimiques et nucléaires conservent leur raison d'être car elles sont souvent plus simples et plus aisées à mettre en œuvre.

Elles ont l'avantage de nécessiter un appareillage moins onéreux que celui de techniques concurrentes, non radioactives, et les résultats obtenus sont moins sujets à l'erreur. De plus, les radioactivités à manipuler pour ces techniques sont fiables et parfaitement contrôlées.

### III. Dosages radio-immunologiques

Le **dosage radio-immunologique** est un dosage *in-vitro* destiné à évaluer la présence d'un antigène de manière extrêmement précise. Fondamentalement, toute substance biologique associée à un anticorps spécifique peut être mesurée, même en concentration infime. Le dosage radio-immunologique a été la première technique d'immuno-dosage développée pour analyser les concentrations nanomolaires et picomolaires d'hormones dans les liquides biologiques.

L'antigène cible est marqué de manière radioactive et lié à ses anticorps spécifiques (il convient d'ajouter une quantité limitée et connue de l'anticorps spécifique). Un échantillon, de sérum sanguin par exemple, est ensuite ajouté pour déclencher une réaction de compétition entre les antigènes marqués de la préparation et les antigènes non marqués de l'échantillon sérique, contenant les anticorps spécifiques. La compétition des anticorps libère une certaine quantité d'antigènes marqués. Cette quantité est proportionnelle au rapport antigènes marqués/antigènes non marqués. Une courbe de liaison peut alors être générée afin de déterminer la quantité d'antigènes dans le sérum du patient.

Cela signifie que puisque la concentration d'antigène non marqué est accrue, davantage d'antigènes se lient à l'anticorps, déplaçant alors le variant non marqué. Les antigènes liés sont ensuite séparés des antigènes non liés, et la radioactivité des antigènes libres restant dans le surnageant est mesurée. Une courbe de liaison peut être générée au moyen d'un étalon connu afin de déterminer la quantité d'antigènes dans le sérum du patient.

Le dosage radio-immunologique est une ancienne technique de dosage qui continue d'être largement utilisée et d'offrir divers avantages en termes de simplicité et de sensibilité.

### **IV- Dosages radio-enzymatiques**

La méthode immuno-enzymatique ELISA (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide) est un examen de laboratoire. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

#### **IV-1 Principe**

Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (enzyme immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, par opposition aux RIA (radio immunoassays) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par secondes.

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. La densité optique (DO) est proportionnelle à la quantité de substrat ayant réagi.

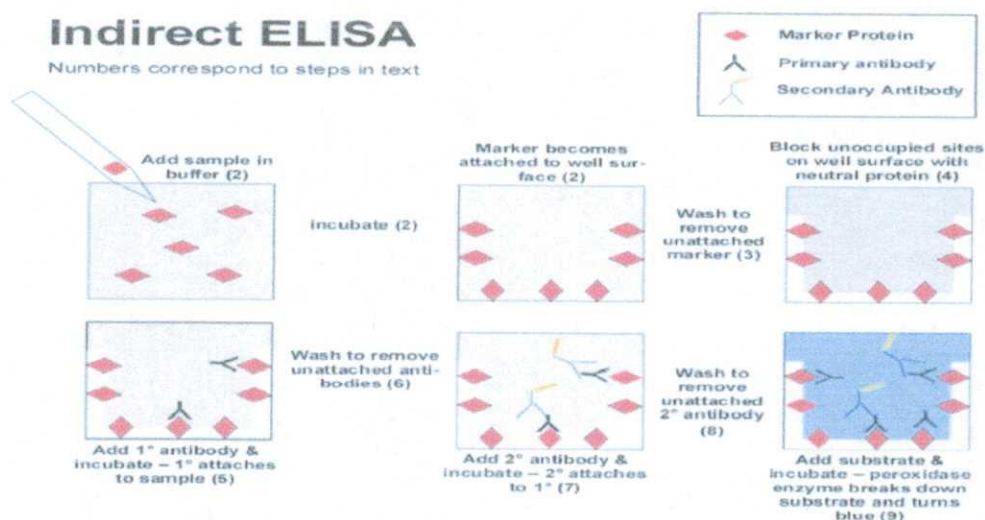
#### **IV-1-2 ELISA indirecte**

Les étapes de l'ELISA dite indirecte, la plus couramment utilisée, pour déterminer la concentration en anticorps du sérum sont:

- a. l'application d'un échantillon d'un antigène connu sur une surface, le plus souvent celle d'un puits d'une plaque de microtitration. L'antigène est fixé à la surface, de façon à le rendre immobile.
- b. le recouvrement des puits (ou toute autre surface) par les échantillons de sérum à tester (ou tout autre solution à tester), dont la concentration en anticorps est, par définition, inconnue, et habituellement diluée dans le sérum d'une autre espèce. L'utilisation de sérum non-humain empêche la liaison à l'antigène par des anticorps non-spécifiques contenus dans le sang du patient.

- c. le rinçage de la plaque, de façon à retirer les anticorps non liés. Après rinçage, seuls les complexes antigène-anticorps demeurent attachés à la surface du puits.
- d. l'ajout aux puits des anticorps secondaires qui se lieront à l'anticorps primaire, (il s'agit dans ce cas d'une antiglobuline). Ces anticorps secondaires sont couplés à l'enzyme modificateur de substrat qui permet de suivre l'évolution de la réaction.
- e. le second rinçage de la plaque, de sorte à éliminer les anticorps non liés.
- f. l'application d'un substrat qui, s'il est converti par l'enzyme, émet un signal chromogénique ou fluorescent.
- g. la quantification du résultat, à la vue ou, le plus souvent, par spectrophotométrie ou tout autre appareil d'optique.

L'enzyme agit comme amplificateur: quand bien même peu d'anticorps conjugués à l'enzyme seraient attachés, l'enzyme catalyserait la formation de nombreux signaux, ce qui rend ce test très sensible, mais augmente également le nombre de faux positifs. Il faut donc, comme d'habitude, prévoir des puits « contrôle ».



**Figure 23** : Principe ELISA indirect

#### IV-1-3 ELISA direct (dELISA)

Dans un premier temps, l'antigène à déposer est déposé sur un support solide (généralement une plaque de microtitration). L'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme. Les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage (Figure 12). L'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide.

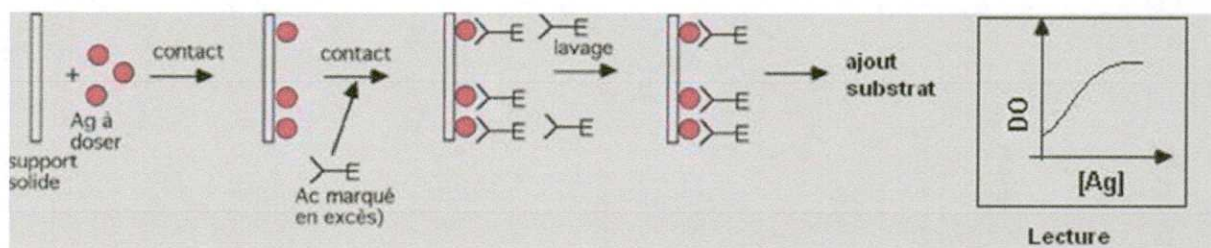


Figure 24 : ELISA direct.

#### IV-1-4 ELISA compétitif

Les anticorps sont fixés sur le support solide. L'antigène à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'antigène marqué. Plus la quantité d'antigène à doser sera forte, plus l'activité enzymatique sera faible et la DO mesurée sera faible. Elle sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser ;

1. Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
  2. Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
  3. La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.
- La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

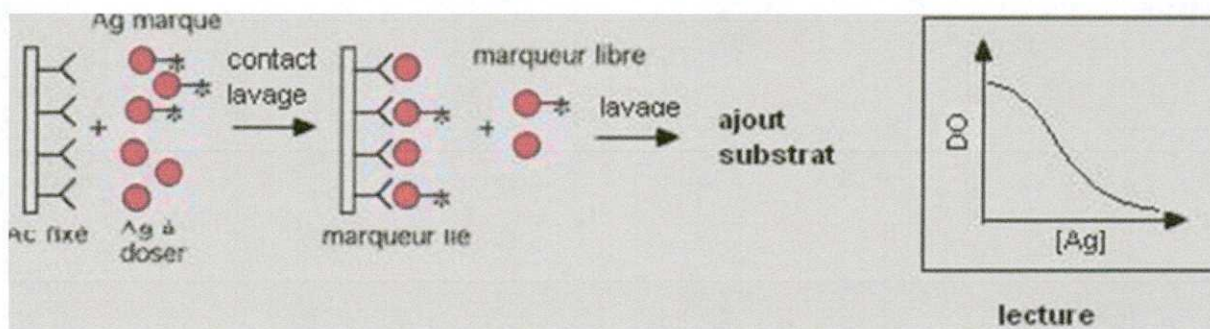


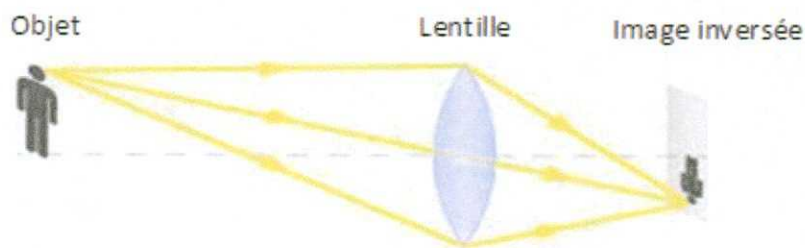
Figure 25: cdELISA, dosage d'antigènes

**CHAPITRE IV.  
MICROSCOPIE  
ELECTRONIQUE**

### 1- Historique

Les systèmes optiques développés par la nature, dont nos yeux, ne sont pas parfaits, et ils vieillissent mal. L'histoire des microscopes optiques débute par à imaginer que certains de nos ancêtres des cavernes avaient déjà du mal à voir les dessins de leurs artistes sur les murs des grottes, et très tôt le besoin de mieux voir a conduit les hommes à trouver des palliatifs, c'est à dire des lentilles de correction.

Avant, la naissance de la microscopie électronique, y'a eu d'abord celle de la microscopie optique dont le principe repose sur l'utilisation des lentilles qui sont des objets, en verre le plus souvent, qui dévient la lumière (plus ou moins selon la couleur de la lumière) et qui, tels la loupe, permettent de former une image agrandie d'un objet que l'on ne pourrait pas voir à l'œil nu (figures 24).



**Figure 26** : Principe de la lentille

En 1850, une lentille a été découverte à Nimrud, en Irak, par l'archéologue Austen Layard (qui était français malgré ce nom bien anglais!) Elle semble être âgée de 3000 ans environ (elle aurait été fabriquée entre le Ier millénaire av. J.-C. et le VIIe siècle av. J.-C.) et est exposée au British Museum de Londres. Il s'agit d'un disque en Crystal de roche, qui pouvait peut-être servir de loupe, mais son polissage était très grossier, et au final, on ne sait pas trop bien de quoi il s'agit.

Il y a ensuite d'autres vestiges, telle cette lentille datant à peu près du V<sup>e</sup> siècle avant JC, qui fut découverte en Crète, dans une grotte dans le mont Ida. Elle semble être de meilleure qualité que celle de Nimrud.

## CHAPITRE IV. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

---

Les auteurs romains Pline et Sénèque mentionnent dans leurs écrits un graveur à Pompéi qui utilisait une lentille. On peut trouver aussi des écrits romains mentionnant des moyens grossissants tels que des boules de verre remplies d'eau ou bien des émeraudes taillées en lentille concave.

Toutefois, on peut dire que l'histoire des sciences optiques en tant que telles commence probablement à Alexandrie, vers 300 ans avant JC

Au XIII<sup>e</sup> siècle, Roger Bacon a utilisé, et cette fois-ci on le sait de façon plus documentée, des lentilles de verre en tant que loupe.

Il faut attendre jusqu'au XVI<sup>e</sup> siècle pour voir poindre la première application scientifique concrète des lentilles. Jusqu'à cette période, il s'agissait de verres correcteurs pour nos yeux déficients.

Vers 1590, le hollandais **Zacharias Janssen** profite de ses compétences de fabricant de lentilles pour inventer un nouvel outil : le microscope optique. Il est alors formé par deux lentilles convexes, dans un ensemble de tubes coulissants. Zacharias aurait découvert les vertus de l'association de ces lentilles, il avait un grossissement de 10X.

Au XVII<sup>e</sup>, les recherches scientifiques convergent vers le développement de la microscopie. Toutefois, le plus célèbre est sans conteste celui d'Antoni Leewenhoek, que l'on considère comme le père de la bactériologie en tant que science. 20 ans plus tard donc qu'il présente son premier microscope. Ainsi donc, il était très curieux et il s'est mis à regarder tout et n'importe quoi avec son microscope. Il est parvenu au fait qu'il pouvait grossir les objets 300 fois. Le microscope que Leeuwenhoek utilise permet une résolution de 1,4 micromètres (soit 300 X). Soit 1/35<sup>e</sup> de la largeur d'un cheveu!

En parallèle, un autre scientifique développa une variante du microscope optique. Il s'agit de **Robert Hooke**. Le pouvoir grossissant de son microscope est lié à l'utilisation de plusieurs lentilles convexes (Figure 25). Mais comme les lentilles employées à la réalisation de ces microscopes présentaient toutes des défauts d'aberration chromatique entourant les bords de l'image, la plupart des scientifiques rejetèrent le microscope composé et réutilisèrent le microscope à lentille simple, comme celui de Leewenhoek. Ce microscope offrait des grossissements moins importants, mais possédaient une qualité d'image plus nette.



Figure 27 : Lentilles

### 2- Introduction

Avant d'aborder la microscopie électronique, il est nécessaire de citer les différentes techniques d'observation microscopiques :

a- Microscopie optique ou photonique, la préparation de l'échantillon à observer est éclairée par une lampe et les objets vont interagir avec la lumière. Pour cela on distingue :

- ▶ Microscopie en lumière directe
- ▶ Microscopie en contraste de phase
- ▶ Microscopie confocale
- ▶ Microscopie à fluorescence

L'arrivée de l'ordinateur a révolutionné la microscopie, il a permis la mise au point de nouvelles techniques d'observation, repoussant les limites actuelles de la microscopie classique. Parmi ces techniques, la microscopie confocale, la microscopie à champ proche et la tomographie numérique sont en plein essor.

Le microscope optique utilise deux composants bien familiers :

a) les lentilles, qui permettent, de grossir des objets que l'on ne peut pas voir à l'œil nu. Ceci en déviant les rayons de lumière.

b) la lumière, ce rayonnement de particules dont l'exemple le plus connu est bien sûr le soleil qui nous envoie tous les jours son lot de rayons. Ces particules sont appelées des photons. Chaque photon transporte de l'énergie, et selon la couleur de la lumière, la quantité d'énergie est différente. Et selon la couleur, le rayon de lumière va être dévié différemment par la lentille.

La principale limitation de la microscopie optique est sa résolution. La loi de Raleyght énonce que les détails les plus petits que l'on peut observer correspondent à la demi longueur d'onde d'éclairage. Il n'est pas donc utile d'augmenter le grossissement au-delà de cette limite car ceci n'aboutit qu'à diminuer la netteté de l'image. Le microscope optique, même avec des lentilles optiques parfaites et une illumination idéale, ne pourra jamais distinguer des

objets plus petits que la moitié d'une longueur d'onde de lumière. La lumière blanche a une longueur  $\lambda$  de  $0.55 \mu\text{m}$ .  $\lambda/2$  est de  $0.275$ . Donc si l'on regarde 2 lignes qui sont plus proches que  $0.275 \mu\text{m}$ , on en verra qu'une. Un point plus petit que  $0.275 \mu\text{m}$  peut être discerné comme un petit nuage tout au mieux. Donc, la seule solution pour augmenter la résolution du microscope, c'est d'utiliser une source d'illumination ayant une longueur d'onde plus courte.

En microscopie optique, en utilisant des longueurs d'ondes les plus courtes possibles (UV) la limite d'observation est d'environ  $25 \mu\text{m}$ , l'architecture cellulaire fine ne peut donc être observée à l'aide de photons UV.

Puisque le photon ne permet pas d'obtenir une meilleure résolution, si on veut observer des détails plus fins au sein d'un objet, il faut donc recourir à l'utilisation d'une autre onde électromagnétique possédant une longueur d'onde plus faible que les photons. Or les électrons possèdent une longueur d'onde  $\lambda$  inférieure à l'Angstrom, proportionnelle à la tension d'accélération  $V$  qui leur est appliqué.

### 3-1 Instrumentation

#### 3-1-1 Description

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

- ▶ d'un canon à électrons, qui fournit le faisceau électronique ;
- ▶ de lentilles magnétiques ;
- ▶ d'un système de détecteurs d'électrons.

Ces éléments sont placés dans un vide variant de  $10^{-7}$  mbar pour le détecteur CCD à  $10^{-10}$  mbar pour la source d'électrons. Le microscope peut être équipé d'un détecteur de rayons X pour effectuer des analyses dispersives en énergie (EDXS, pour *energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

Dans un MET couramment utilisé en biologie, les tensions d'accélération varient entre 100 et 300 kV ce qui produit des électrons possédant une longueur d'onde comprise entre  $3,7 \cdot 10^{-3} \times \text{nm}$  et  $1,97 \cdot 10^{-3} \times \text{nm}$ . Par exemple, pour une tension d'accélération de 100 kV, le plus petit détail théorique que l'on pourrait observer est de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-3} \times \text{nm}$ .

Par analogie avec le microscope optique, Le MET est constitué d'un système de lentilles dans ce cas électromagnétiques qui permettent de condenser et focaliser les électrons émis par la source. La source peut être un simple filament de tungstène ou un cristal d'hexaborure de lanthane chauffé à très haute température (respectivement 3000°C et 1500°C).

Plus récemment, des sources à émission de champ ont été développées. Ce type de source consiste à soumettre une pointe de tungstène (recouverte d'oxyde de zirconium) à une forte différence de potentiel électrique ce qui entraîne l'émission d'électrons par effet tunnel et délivre un faisceau d'électrons de meilleure qualité, plus brillant et plus cohérent que pour les deux premières sources.

Par la suite, le faisceau produit par la source est accéléré et se propage dans la colonne du MET pour atteindre l'échantillon présent au milieu de la lentille objectif (Figure 28). Le libre parcours des électrons dans l'air étant très faible, un vide poussé, d'au moins  $9 \times 10^{-7}$  atmosphère, est maintenu au sein de la colonne. Le faisceau va tout d'abord être condensé par la lentille « condenseur » puis focalisé par la lentille « objectif » pour enfin être projeté sur un écran ou un film photographique par la lentille « projecteur » (Figure 28). L'image de l'échantillon peut être observée sur l'écran phosphorescent ou directement sur un film photographique après développement.

Dans un MET, l'image est une projection 2D d'un objet en 3D qui est l'échantillon. L'image obtenue n'est pas parfaite. Un MET est un système optique qui possède de nombreux défauts ce qui entraînent des déformations importantes dans l'image. Le contraste dans l'image ainsi qu'une partie de ces distorsions sont modélisés mathématiquement par la Fonction de Transfert de Contraste ou CTF (Contrast Transfer Function).

### 3-1-2 Canon à électron

Un canon à émission de champ (en anglais *Field Emission Gun* ou *FEG*) est constitué d'une pointe de tungstène cristallin d'environ 100 nm pour les cold FEG et de 0,5  $\mu\text{m}$  pour les FEG Schottky. L'extraction des électrons ne s'effectue pas par chauffage, mais en appliquant un champ électrique intense ( $\approx 10^7$  V/cm et  $\approx 4$  kV). Cette source est caractérisée par une faible variabilité énergétique, et une bonne cohérence. Cependant elle nécessite un vide extrêmement poussé (de l'ordre de  $10^{-10}$  mbar). Dans le cas contraire, la pointe du canon s'oxyde et l'effet d'émission chute drastiquement. Cette exigence en fait des machines très coûteuses et délicates. À signaler que les pointes sont recouvertes d'une couche de  $\text{ZrO}_2$  qui "mouille" la pointe et permet de diminuer le travail de sortie des électrons.

### 3-1-3 Le vide

Les électrons se déplacent, ici, dans le vide. Pour permettre cela, le microscope est donc équipé d'un système de vide (Pompe à vide, jauges, électrovannes). Le vide créé est un vide de l'ordre de  $10^{-6}$  mbars pour les filaments de tungstène et peut atteindre jusqu'à  $10^{-10}$  mbars dans les canons FEG. Pour générer ces vides on utilise :

- ▶ une pompe primaire (palette, scroll...);
- ▶ une pompe secondaire (diffusion d'huile pendant longtemps, mais on utilise de plus en plus des pompes turbomoléculaires);
- ▶ des pompes ioniques pour les FEG et parfois pour les LaB6.

Les pompes à palettes et les pompes à diffusion utilisent de l'huile et présentent le défaut de contaminer l'échantillon et parfois le microscope avec des hydrocarbures. C'est pourquoi on leur préfère de plus en plus les pompes sèches (scroll et pompes turbomoléculaires) même si celles-ci sont plus exigeantes et plus chères en maintenance.

Ces pompes nécessitent d'être refroidies (toujours pour les pompes à diffusion, parfois pour les pompes turbomoléculaires) par un circuit d'eau.

Autour du microscope se situe un réservoir d'azote liquide, qui sert à refroidir une certaine zone près de l'échantillon. De cette manière, les impuretés présentes dans le vide se condensent dans cette zone, et ne contaminent pas l'échantillon. Un second réservoir sert à refroidir le détecteur de rayons X, si le microscope en est équipé.

La résolution d'un microscope est limitée par la diffraction à des distances de l'ordre de la longueur d'onde donc de l'ordre de la centaine de nanomètres pour le rayonnement optique. Dans les années 1920, Ruska eut l'idée d'utiliser les électrons rapides comme source de rayonnement, leur longueur d'onde étant bien plus faible (de l'ordre de quelques picomètres pour des vitesses de l'ordre de la moitié de la vitesse de la lumière). Bien que la résolution soit limitée dans un microscope électronique en transmission (MET ou TEM en anglais) par les aberrations de ses lentilles, la résolution des MET est passée en 80 ans de la centaine de nanomètres à la centaine de picomètres.

Au début des années 30, en Allemagne que débutent les premiers travaux autour de la conception d'un appareil optique électronique. **Max Knoll** développe un analyseur à faisceau d'électrons, qu'il intègre dans ce que fût le premier Microscope Electronique en Transmission. Quelques années plus tard, le scientifique **Manfred Von Ardenne** complète

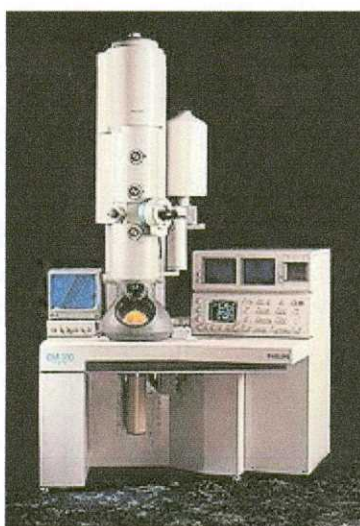
ces travaux en y ajoutant des bobines de balayage : en 1938, il construit le premier Microscope Electronique à Balayage.

C'est à l'Université de Cambridge (Angleterre) que l'histoire du MEB se poursuit. **Charles Oatley** et **Dennis Mc Mullan** parviennent à la fin des années 40 à obtenir une image en relief, particularité des MEB « modernes ». Cette avancée est complétée par les travaux de **T.E. Everhart** et **R.F.M Thornley** aboutissant à un nouveau détecteur permettant de détecter les électrons secondaires.

La MET est la technique la plus performante en terme de résolution. Elle donne des images ressemblant à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électrons est émis par un canon à électrons focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétique et la traverse. Les électrons sont plus ou moins absorbés (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons) sur un écran fluorescent0 cependant, le grossissement est beaucoup plus important qu'en microscopie optique et permet de visualiser les structures internes des organismes cellulaires observées.

La microscopie électronique en transmission (MET) et les techniques associées ont des applications principalement en science de matériaux (de la métallurgie aux nanotechnologies) et en biologie.

Un MET fonctionne essentiellement comme un microscope optique, le rôle dévolu aux photons dans ce dernier étant assumé par les électrons dans le premier. Il existe conceptuellement sous deux formes : les TEM, pour lesquels le faisceau incident sur l'échantillon est une onde plane, comme dans le cas d'un microscope de paillasse, et les STEM (pour Scanning Transmission Electron Microscope), qui se rapprochent des microscopes optiques confocaux.



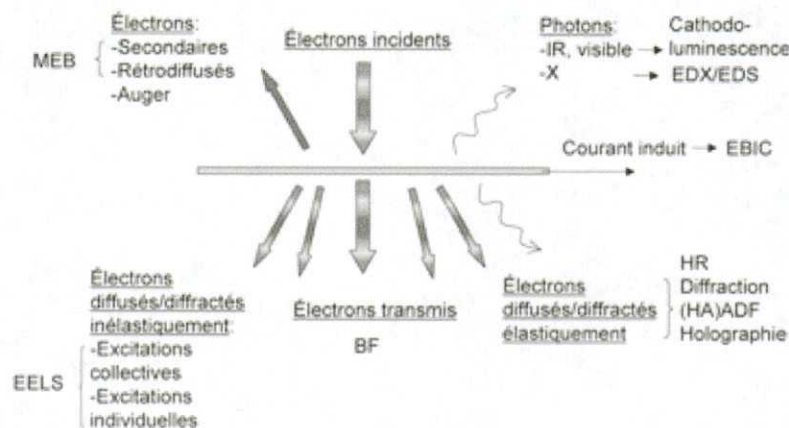
**Figure 28:** Microscope électronique à transmission

### 3-2 Principe de la Microscopie Electronique en transmission

Le principe de fonctionnement d'un MET s'apparente à celui d'un microscope optique. Les électrons remplacent les photons. Le rayonnement traverse l'échantillon et une image se forme sur un écran phosphorescent au lieu de se former sur la rétine de l'observateur (Figure 13). Puisque le fonctionnement de ces deux microscopes est très similaire, pourquoi utilise-t-on les électrons comme source de lumière à la place des photons ?

#### 3-2-1 Interaction électrons-matière

Lors d'une expérience de microscopie électronique en transmission, des électrons rapides, typiquement de l'ordre de 100 à 200 keV, c'est-à-dire environ la moitié de la vitesse de la lumière, sont envoyés sur l'échantillon d'intérêt. Après interaction, les caractéristiques des électrons vont être modifiées, et un certain nombre de particules et de rayonnements vont être produit. Les signaux ainsi obtenus donneront accès à des informations sur les propriétés structurales, électroniques et optiques, entre autres, du matériau, et seront ainsi utilisés en MET. Les différents processus d'interaction sont résumés dans la Figure



**Figure 29 :** Les différents processus d'interaction électron-matière et leur lien avec les différentes techniques MET.

Les particules les plus utiles sont bien sûr les électrons eux-mêmes. Ainsi, la majorité (typiquement 80%) des électrons n'interagissent pas inélastiquement avec l'échantillon, et seront soit directement transmis, soit diffractés et/ou diffusés élastiquement. Les contrastes obtenus en imagerie conventionnelle, imagerie haute-résolution, diffraction, holographie et imagerie de fond noir proviennent tous d'une utilisation différente de ces électrons. Les 20%

restants ont donc perdu de l'énergie par interaction avec l'échantillon en créant plasmons, transitions inter-bandes et transitions des états de cœur vers les bandes inoccupées du solide.

Lors de la désexcitation, des électrons secondaires peuvent être émis. De plus, des électrons incidents peuvent être rétrodiffusés. Bien que pratiquement inutilisés en MET, ces deux types d'électrons sont à la base de la formation du contraste des images de Microscopie Electronique à Balayage.

Finalement, des paires électrons-trous peuvent être créés, et produire un courant mesurable sur une jonction convenablement polarisée, donnant naissance à un signal dit EBIC (Electron Beam Induced Current), utilisé de manière anecdotique dans la caractérisation des jonctions

En biologie, trois principaux types de microscope électronique sont couramment utilisés : le microscope électronique en transmission ou MET, le microscope électronique à balayage ou MEB et le microscope électronique à balayage en transmission ou MEBT. Le plus utilisé en biologie est le MET. Ce microscope génère un faisceau fixe d'électrons et permet de réaliser des études structurales à haute résolution sur des virus ou des complexes protéiques isolés. Il permet aussi d'étudier des coupes fines de cellules. Dans le cas du MEB, le faisceau d'électrons est une sonde mobile qui permet de balayer la surface d'un échantillon afin d'en obtenir une image ou de réaliser des mesures quantitatives sur la composition chimique de l'échantillon. Le MEBT quant à lui est une combinaison des deux premiers types de ME. Il permet d'obtenir une image classique en transmission ainsi qu'une détermination précise de la masse de l'objet observé sous le faisceau d'électrons. Il est possible, grâce à ce type de microscope et après traitement informatique des images, d'obtenir un modèle 3D d'objets biologiques comme la capsid de l'adénovirus ou la structure de la protéine TET1.

### **3-2-2 Aberrations**

La tension d'accélération des électrons peut aussi fluctuer dans le temps. De plus, lorsque le faisceau traverse l'échantillon, il se produit des diffusions inélastiques dans l'échantillon, ce qui peut produire des pertes de plusieurs centaines d'électrons-volt.

À la différence de l'optique photonique, il se produit des interactions entre les électrons dans le faisceau, dus à l'interaction coulombienne. Si le faisceau est très intense, cela produira des aberrations de charge d'espace qui ne concernent généralement pas les MET.

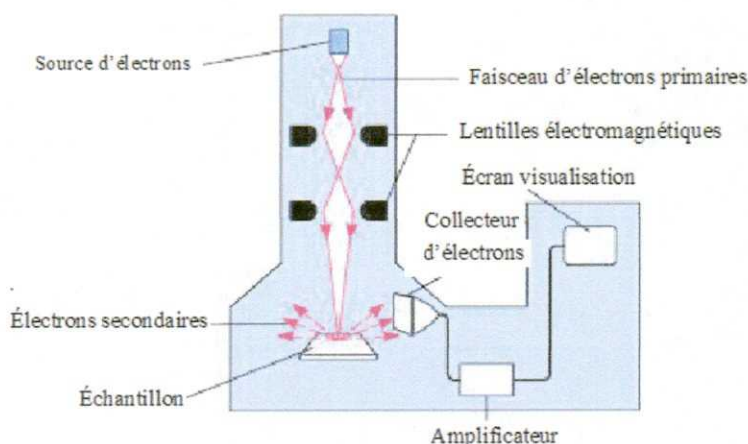
De plus, il faut que le vide dans la colonne soit très bon, sinon, il se produit des interactions entre le faisceau électronique et les molécules résiduelles du vide. Cela a pour conséquence de modifier l'énergie des électrons et donc d'augmenter l'aberration chromatique et de perturber la trajectoire concernée. Ceci nécessite pour les MET un vide meilleur que  $10^{-8}$  Torr.

#### 4- Microscopie électronique à balayage

Le Microscope Electronique à Balayage (MEB ou SEM en anglais pour *Scanning Electron Microscopy*) est une technique de caractérisation permettant d'obtenir des images de la surface d'un échantillon en haute résolution. Utilisant le principe des interactions électron-matière, le MEB offre bien une meilleure résolution que les microscopes optiques traditionnels, limités par la longueur d'ondes de la lumière visible ainsi que par la qualité des lentilles optiques.

L'image obtenue dans un MEB est engendrée par un faisceau d'électrons qui vient frapper la surface d'un échantillon massif, ce qui différencie ce type d'équipement du microscope électronique à transmission (MET) où le faisceau d'électrons traverse une section mince.

Un MEB est composé d'une colonne électronique, d'un canon à électrons (un canon à électrons permettant de frapper la surface de l'échantillon), de détecteurs et d'une platine permettant de déplacer l'objet à analyser.



**Figure 31 :** Microscopie électronique à balayage

##### 4-1 Principes de la microscopie électronique à balayage

Cet appareil est aujourd'hui utilisé dans de nombreux domaines industriels pour analyser les propriétés de surface d'un matériau ou pour caractériser une défaillance ou pollution (particule, dépôt, fissure...).

Ce type technique donne des images spectaculaires proches d'une image en trois dimensions. Lorsque le faisceau d'électrons bombarde la préparation, il pénètre dans l'échantillon et interagit avec la matière. De cette interaction deux types d'émissions électroniques sont collectées :

- ▶ les électrons secondaires
- ▶ les électrons rétrodiffusés

**les électrons secondaires**, de plus faible énergie, sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique qui serviront à construire l'image tandis que **les électrons rétrodiffusés** permettent d'obtenir différents niveaux de gris en fonction de la densité atomique des éléments constitutifs de l'échantillon. Par cette méthode il est possible de différencier les matières minérales des matières organiques.

Un autre aspect de la microscopie électronique à balayage est une mise en évidence facile des cristaux. Une structure cristalline peut être visualisée sous la forme d'une figure de diffraction facilement reconnaissable. L'étude de cette figure permet de en outre de déterminer l'arrangement des atomes dans l'espace et en déduire sa nature.

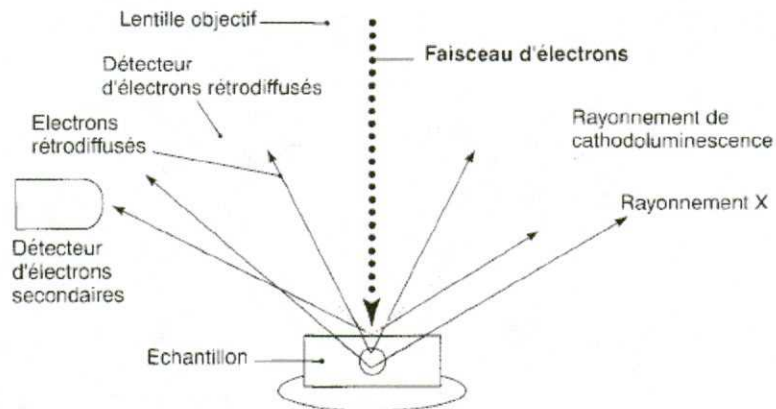
Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour *scanning electron microscopy*) utilise un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon.

L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires. Ils sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief. La préparation des échantillons est contraignante. Ils doivent être déshydratés puis subir un traitement pour devenir conducteur (fixation des tissus, nettoyage). L'échantillon est ensuite placé sur le porte-objet.

Lorsque le faisceau primaire pénètre dans l'échantillon, il intéresse un volume qui a grossièrement la forme d'une poire. Au point d'impact, les électrons primaires extraient divers rayonnements : ~- des électrons secondaires qui, recueillis par le SED (Secondary Electron Detector), vont pouvoir former une image. Ces électrons secondaires de faible énergie sont issus de la surface de l'échantillon ; ^ des électrons rétrodiffusés, plus énergétiques, qui sont issus d'une partie plus profonde de l'échantillon. Ils contribuent à la formation de l'image mais, recueillis par un détecteur spécifique, ils donnent des informations intéressantes en différenciant le numéro atomique des éléments présents au point d'extraction ; >- un rayonnement X , issu d'une zone encore plus interne que les électrons rétro-diffusés, et qui permet une analyse semi-quantitative de la partie balayée par le faisceau primaire ; ^ des électrons Auger, ainsi qu'un rayonnement de cathodoluminescence, complètent les informations pouvant être obtenues.

## CHAPITRE IV. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Dans la microscopie à transmission et à balayage, un faisceau d'électrons est envoyé sur l'échantillon pour le sonder, mais les deux techniques diffèrent quant à l'information qui est perçue par le microscope et l'usage qui peut être par le microscope.



**Figure 32 :** Interactions entre électrons et matière.

Grâce au microscope électronique à balayage, il est possible de voir la surface d'objets, de bactéries, de matériaux... La grande profondeur de champ est un atout de ce microscope. La résolution (1 nanomètre) est en revanche moins bonne que celle du microscope électronique en transmission (0,1 nanomètre).



**Figure 33 :** Vue d'en face Microscope électronique à balayage

## CHAPITRE II : Méthodes de fractionnement

---

d. Chromatographie sur échangeur d'ions : la phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

e. Chromatographie d'affinité : dans cette technique, un ligand, qui lie spécifiquement la protéine d'intérêt, est fixé de manière covalente à une matrice poreuse et inerte on peut alors récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand en ajoutant un excès de ligand libre dans la colonne ( celui-ci entre en compétition pour la liaison de la protéine) ou en changeant le pH, la force ionique et/ou la température. Cette approche possède le grand avantage d'exploiter les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt, au lieu d'utiliser des propriétés physico-chimiques qui sont aussi partagées par d'autres protéines, et possède aussi l'avantage de pouvoir purifier la protéine d'intérêt à un très haut degré de pureté en une seule étape.

En résumé, la chromatographie est une méthode de séparation non destructrice d'un mélange liquide ou gazeux en ses différents constituants. C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène.

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact :

- **La phase stationnaire** peut-être soit un solide finement pulvérisé, soit un liquide immobilisé sur une phase fixe. Elle est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support
- **La phase mobile** est un fluide qui peut être soit liquide soit gazeux. Elle se déplace au contact de la phase stationnaire.

Leur combinaison permet de distinguer quatre types de chromatographie :

- la chromatographie liquide-liquide
- la chromatographie liquide-solide
- la chromatographie gaz-liquide
- la chromatographie gaz-solide

Il existe 5 types de chromatographie en phase liquide et trois en phase gazeuse

L'entraînement à des vitesses différentes des produits présents dans la colonne par la phase mobile conduit à leur séparation. Les produits traversent la colonne avec des temps qui dépendent de leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou de leur affinité avec la phase

## Références bibliographiques

- 1- De Ducauze Christian. **2014**. Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie. Page 148.
- 2- Edward M. Purcell. **1952**. Research in Nuclear Magnetism , The Nobel Prize in Chemistry.
- 3- R. J. Abraham, J. Fisher, P. Loftus. **1988**. Introduction to NMR Spectroscopy.
- 4- Richard R. Ernst, Geoffrey B, Alexander W. Clarendon P, **1987**. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. 610 pages.
- 5- Gwenola Burgot et Jean L Burgot. **2002**. Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique, Tec et Doc. Ed. médicales internationales.
- 6- Douglas A. SKOOG, F. James HOLLER, Timothy A. NIEMAN. **2003**. Principes d'Analyse Instrumentales, De Boeck.
- 7- De BOUCHONNET Stéphane. **2009**. La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Eds TEC & Doc. Lavoisier
- 8- De Donald Voet, Judith G. Voet. 2016. Biochimie. 3<sup>ème</sup> édition. Deboeck.
- 9- De Paul Popescu, Hélène Hayes, Bernard Dutrillaux. 1998. Techniques de cytogénétique animale.
- 10- De Thierry Lefevre, Michel Raymond, Frédéric Thomas. **2016**. 2<sup>ème</sup> édition. Deboeck. Biologie évolutive.
- 11- François Brisset. **2012**. Microscopie Electronique à Balayage et de microanalyse. EDP Sciences. Pages 984.