

Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

Techniques chimiques pour la biologie

INTRODUCTION/TERMINOLOGIE

***Technique/technologie** : c'est l'utilisation de la connaissance fondamentale dans le but d'une application pratique

***Chimie** : Science qui étudie les divers constituants de la matière, leurs propriétés, transformations et interactions.

***Tech. Chimique** : utilisation des connaissances fondamentales de la physico-chimie d'un système, pour développer (mettre au point) un procédé (méthode) afin d'**explorer** ou **exploiter** le système.

Ces techniques sont mises au point par des chimistes, physiciens ou biologistes ou autres

-**Explorer** = **Analyser** : déterminer la nature (**qualité**) et/ou la **quantité** d'un (ou des) composants du système.

= technique **analytique qualitative** ou **quantitative**.

-**Exploiter** = **utiliser le système**, ou **extraire** (isoler, préparer) en quantité un (ou plusieurs) composant du système pour son utilisation ultérieure.

= technique **préparative** .

Remarques :

-Souvent, une même technique (basée sur les mêmes propriétés physico-chimique d'un composé) peut être utilisée en analytique ou en préparative ; la différence fondamentale est d'échelle, en particulier la quantité de matière (système) initiale (source du composé d'intérêt) manipulée et, forcément, la taille (la capacité) des (dispositifs) équipements utilisables.

Nous nous intéresserons aux techniques analytiques.

-les propriétés physicochimiques exploitées pour analyser (ou préparer) les biomolécules sont :

*les **propriétés physiques**, c'est-à-dire des propriétés qui peuvent être observées ou mesurées sans modifier la nature chimique de la biomolécule .Ce*

sont par exemple la masse, la forme, l'interaction avec la lumière (absorption, fluorescence, indice de réfraction), la densité, la charge électrique, la température d'ébullition ou d'évaporation ... Ces propriétés servent souvent à identifier les biomolécules (**propriété intensive** comme la densité) mais peuvent aussi servir à sa quantification lorsque la propriété en question est dite **extensive** (proportionnelle à la masse, comme l'absorption de la lumière). Ces propriétés sont souvent mises en évidence grâce à des dispositifs (instruments, appareils) électroniques et informatiques.

Les propriétés chimiques, c'est-à-dire impliquant la réactivité chimique de la biomolécule et donc l'altération de sa nature chimique. Ces propriétés sont exploitées pour développer des tests qualitatifs pour mettre en évidence la présence d'une molécule particulière dans un milieu (exemple : test antidopage des sportifs), ou alors pour quantifier une molécule grâce à la stœchiométrie de la réaction (dosage du produit de réaction).

-Une technique analytique peut être basée sur les propriétés chimiques, physiques ou combiner les deux types de propriétés, sachant que les deux types de propriétés sont intimement reliées.

***Biologie** : c'est la science naturelle qui étudie la vie et les organismes vivants, leurs structures physiques, processus chimiques, interactions moléculaires, mécanismes physiologiques, développement et évolution

-Un **organisme** vivant est un **système physico-chimique** individualisé, mais ouvert (thermodynamiquement) sur son environnement (milieu extérieur). Il est constitué par des molécules et éléments chimiques en perpétuelles interactions entre eux, produisant des **structures** et générant des **processus** et mécanismes assurant les échanges de matière et d'énergie avec le milieu extérieur, et ainsi le développement et l'évolution de l'organisme.

-**Biosystème** : nous appellerons biosystème tout système (physico-chimique) moléculaire, constitué par des **biomolécules** (des molécules produites par un organisme vivant ou intégrées activement dans sa composition). Ces biomolécules peuvent être soit organisées en un individu unicellulaire ou multicellulaire ou alors simplement dissoutes ou incorporées dans un environnement solide (ou semi solide), liquide ou gazeux.

Dans un biosystème (le système entier) la (les) biomolécule d'intérêt (sujet de l'étude analytique ou préparative) est appelée (s) **analyte**, le reste du biosystème est appelé **matrice**.

*Les biomolécules (analytes) sont en majorité des molécules organiques (macroéléments) mais un organisme vivant contient aussi, en faibles quantités (microéléments), des composés inorganiques tels que des métaux de transition comme le fer, le cobalt le cuivre le magnésium...

Nous nous intéresserons essentiellement aux macroéléments.

*Il existe différentes manières de **classer les biomolécules**, la plus simple consiste à les distinguer en fonction de leur taille : **petite = micromolécule**, ou **grande = macromolécule**. Les macromolécules constituent de fait l'essentiel du poids sec d'une cellule...

Une autre classification basée sur la taille consiste à distinguer :

-Les **petites molécules** : comprenant des molécules diverses, servant de source d'énergie ou intervenant dans la communication intra ou intercellulaire, ou inter organes ou alors inter organismes dans un écosystème ; Ce sont des lipides et leurs dérivés, des sucres simples, des vitamines, des neurotransmetteurs, des hormones, des toxines (antibiotiques..), des pigments, des aromates ...

-Les **monomères** : ce sont des petites molécules servant de bloc (unité) de construction de macromolécules appelées polymères ; les monomères comprennent les acides aminés, les nucléotides et les monosaccharides.

-Les **polymères** : construits par liaisons covalentes successives (condensation) entre des monomères , ils comprennent les peptides/oligopeptides /protéines, les acides nucléiques et les oligosaccharides/polysaccharides. Ces polymères participent à la structure et/ou au stockage /transfert/expression de l'information biologique.

Une autre classification consiste à regrouper les biomolécules en **familles (bio) chimiques** (majeures) ; On distinguera alors :

-Les **protides** : regroupant les acides aminés et leur produits de condensation, i.e., peptides polypeptides et protéines.

-Les **acides nucléiques** et leurs bases azotées/nucléotides constitutifs.

- dans un biosystème les (biomolécules) analytes sont généralement présents à de faibles concentrations et leur stabilité physico chimique (en particulier celle des macromolécules) n'est optimale que dans des conditions relativement douces de pH, température, pression, force ionique...

-Au sein d'un organisme vivant (in vivo), les inter conversions entre biomolécules (= **métabolisme**) sont permanentes (dynamiques) et, surtout, sensibles aux perturbations (signaux) internes (stress de différentes natures) ou environnementales (agression...); Cela implique une **variabilité spatiale et temporelle** de la composition quantitative et qualitative du biosystème. Cette variabilité potentielle est, par ailleurs, aussi observée (in vitro) dans les extraits acellulaires d'organismes ou dans leur milieu extérieur.

La technique d'étude doit donc préserver au maximum les propriétés qualitatives et quantitatives du biosystème (et sa stabilité spatio-temporelle), et être assez discriminative et sensible pour explorer de façon différentielle, les différents composants du biosystème.

***Biosystème « parent » ou « entier » ou « initial », versus « échantillon » :**

Un **biosystème « parent »** à analyser peut avoir différentes dimensions : si je veux analyser la glycémie (le taux de glucose dans le sang) d'une personne, le biosystème « parent » est tout le sang circulant chez la personne (environ 5 litres chez un homme adulte), si je veux analyser la contamination d'un lac par un xénobiotique, le biosystème « parent » est tout le lac, si je veux déterminer la concentration de phosphate dans le sol d'un jardin, le biosystème parent est toute la terre du jardin... Il apparaît donc évident que je ne peux pas extraire tout le sang d'une personne pour doser sa glycémie, ni transporter tout le lac au laboratoire pour doser le xénobiotique qui le contamine ; L'analyse doit donc être réalisée sur **une portion** du biosystème parent, sur **un échantillon**.

Il va de soi que pour que l'analyse soit fiable, et permette des conclusions valables, que la composition qualitative et quantitative de l'échantillon soit le reflet fidèle de celle du biosystème parent ; **L'échantillon doit être représentatif du biosystème d'origine.**

Ainsi, et en fonction de **la question scientifique posée** (le but de l'étude), certaines techniques analytiques doivent pouvoir être appliquées à l'organisme à l'état (actif) vivant (**in vivo**). Dans ce cas, l'analyte est directement ciblé et prélevé (extrait) de façon relativement spécifique au moment et à l'endroit adéquat, sur (à partir de) l'organisme actif, grâce à des micro dispositifs (micro appareillage), puis directement analysé à l'aide (généralement) d'instruments sophistiqués exploitant les propriétés physico-chimiques caractéristiques (spécifiques, différentielles) de l'analyte . De la même façon, dans certaines études environnementales par exemple, et pour ne pas perturber le biosystème, le prélèvement ciblé d'un composant est effectuée sur place ou **in situ** .

D'autres techniques sont applicables **in vitro**, ou **ex vivo**, sur un produit dérivé de l'organisme actif ou en **post mortem** (organe, tissu, cellules, extrait acellulaire, sécrétions...). Dans ce cas, un échantillon est prélevé puis, éventuellement, transporté au laboratoire où il est préparé (traité) avant l'analyse.

Dans tous les cas, le technicien est confronté à une question scientifique (une problématique) particulière, émanant d'un donneur d'ordre (client) particulier (biologiste fondamentaliste, clinicien, environnementaliste, industriel...). Dans chacun des cas , il devra avant de pouvoir proposer une (ou des) technique (analytique ou préparative) pour aborder le problème, acquérir un maximum d'information sur la nature (et l'accessibilité) du biosystème parent (matrice+ analyte) et tenir compte des prérogatives du client ,notamment en ce qui concerne la nature de la technique (qualitative ou quantitative) ses performances (précision, rendement...) son cout ...Il pourra ensuite établir **une stratégie** , c'est-à-dire un protocole (une méthode , un procédé) comprenant un certain nombre d'opérations de laboratoire, successives et coordonnées, susceptibles à la fin de lui fournir la réponse qualitative ou quantitative à la question scientifique posée.

Strategie Générale

Une stratégie et une série (succession) d'actions coordonnées exécutées de façon à atteindre un but précis.

Une stratégie analytique (chimique dans notre cas) a pour but d'identifier et/ou de quantifier un (ou des) analyte dans un biosystème (matrice) ; Cette stratégie peut comporter un certain nombre d'étapes , elles même constituées par une ou plusieurs techniques . La spécificité de chaque stratégie est déterminée par la

nature de l'analyte et de la matrice ainsi que de la question scientifique posée, mais toutes les stratégies s'inscrivent dans (répondent à) un schéma général qui peut être résumé en 6 étapes majeures :

- 1- Définition du problème et choix d'une technique (méthode).
- 2- Obtention d'un échantillon représentatif du biosystème parent.
- 3- Préparation de l'échantillon.
- 4- Analyse de l'échantillon.
- 5- Obtention et analyse des résultats.
- 6- Report des résultats et prise de décision.

Les résultats obtenus peuvent être satisfaisant ou alors suggérer une nouvelle problématique et un retour en (1)...

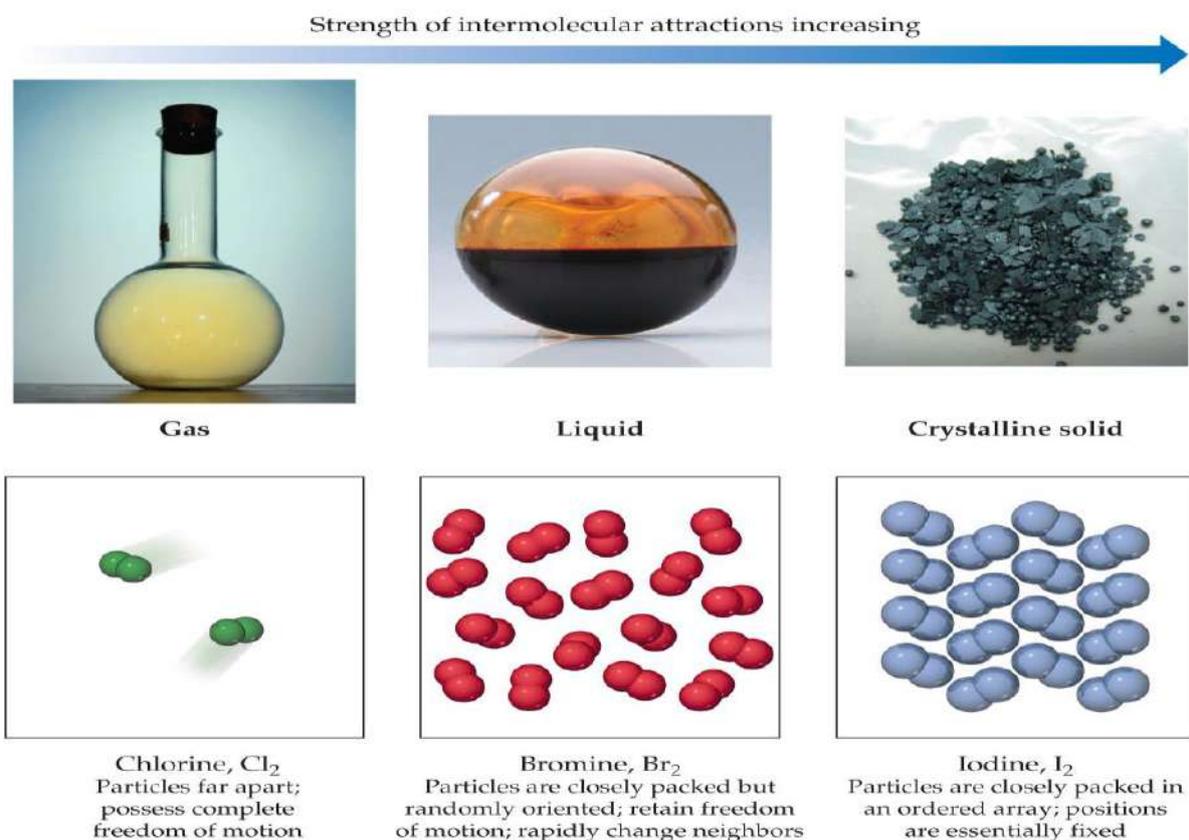
LES ETATS DE LA MATIERE

Les **états** (ou **phases**) de la matière représentent les différentes formes sous lesquelles une substance peut exister dans la nature.

Les trois états de la matière les plus connus sont les états **gazeux**, **solide** et **liquide**. Il existe d'autres états comme le **plasma**, mais ceux-ci sont plutôt rares et doivent normalement être produits en laboratoire, dans des conditions de température et de pression précises. Une substance peut se présenter sous différentes formes physiques, selon **ses propriétés** (sa nature chimique), la **température** et la **pression**

A une température et une pression données l'état de la matière dépendra de deux forces ou grandeurs physiques antagonistes, qui se manifestent en son sein :

- **L'énergie cinétique** des particules qui la constitue (atomes, ions, molécules .. .)
- Les **forces d'attraction** entre ces particules



© 2012 Pearson Education, Inc.

FIGURE 1

GAZ : Les gazs sont hautement compressibles et assument/epousent la forme est le volume de leur conteneur. Les atomes/molécules d'un gaz sont éloignés les uns des autres et n'interagissent pratiquement pas entre eux.

LIQUIDE : Les liquides sont peu à pas compressibles et assument la forme mais pas le volume de leur conteneur. Les molécules d'un liquide sont maintenues les unes plus proches des autres que dans le cas d'un gaz , mais pas de façon rigide , de telle sorte qu'elles sont capables de se mouvoir /bouger les unes par rapport aux autres ,changer leur position individuelle sans modifier l'état liquide.

SOLIDE : Les solides sont incompressibles et possèdent une forme et un volume définis. Les molécules d'un solide sont intimement empaquetées, très proches les unes aux autres, beaucoup plus que dans les liquides. Elles peuvent vibrer autour, mais sans quitter leur position d'origine ni changer son voisinage immédiat.

Dans un gaz les particules constitutives (atomes, molécules) ont une liberté complète de mouvement car il n'existe pratiquement pas de forces attractives entre elles.

Dans les liquides ces particules sont maintenues proches les unes des autres, en réseau, par des forces d'attractions intermoléculaires relativement fortes. Ces forces sont cependant assez souples (faibles, se rompent et se rétablissent aisément et rapidement) pour permettre un mouvement limité des particules les unes par rapport aux autres, et une parfaite fluidité/plasticité du réseau ainsi formé.

Dans les solides les forces d'attractions intermoléculaires sont si fortes que les molécules sont pratiquement figées dans leur position et le réseau formé et complètement rigide.

Les **forces intermoléculaires** déterminent donc l'état et les propriétés physiques de la matière, elles sont responsables de l'existence de l'état

condensé de la matière (solide et liquide). Ces forces/interactions intermoléculaires sont de faible énergie, et de nature électrostatique ; Elles vont se manifester chaque fois que les propriétés chimiques de la matière, mais aussi la température et la pression le permettent.

La température et la pression affectent l'énergie cinétique (le mouvement) des particules de matière et gouvernent/déterminent la transition /changement entre les phases (états) dans lesquelles se trouve la matière :

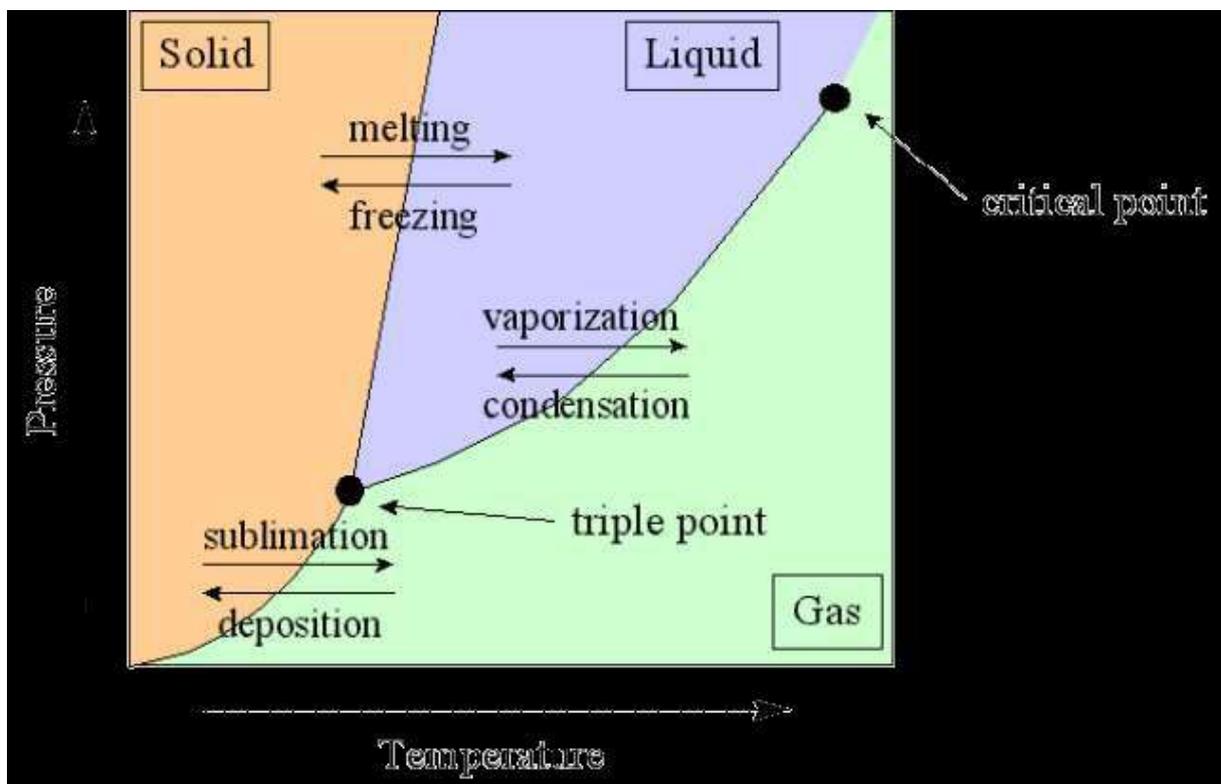
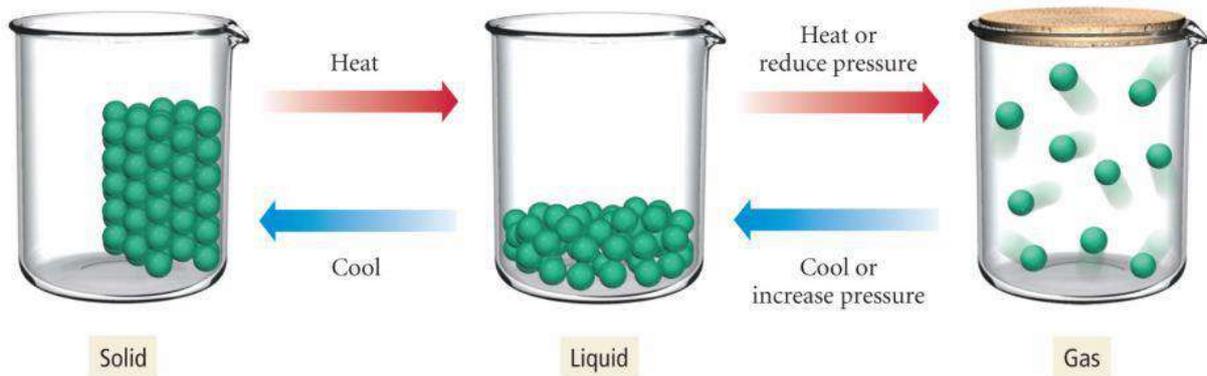


Diagramme des phases

FIGURE 2

A pression atmosphérique (1 atmosphère), nous sommes tous habitués à la transition de l'eau entre ses différentes phases, glace (solide)/liquide/vapeur, sous l'effet de l'augmentation de la température (et donc l'augmentation de l'énergie cinétique des molécules, c.à.d. l'agitation thermique). Cette agitation thermique qui tend à disperser les molécules d'une matière condensée (solide ou liquide) est contrecarrée / antagonisée par des forces d'attraction intermoléculaires, dont la nature et l'intensité sont déterminées par la nature chimique des molécules.

FORCES INTRAMOLECULAIRES ET FORCES INTERMOLECULAIRES

Les forces intramoléculaires opèrent à l'intérieure de chaque molécule pour lier les atomes constitutifs entre eux, il en résulte des **liaisons chimiques**, et elles contribuent aux propriétés chimiques des molécules.

Ces forces sont d'énergie élevée et sont dues à l'interaction (attraction) électrostatique entre **charges électriques formelles** situées à de courtes distances entre elles, et mettant en jeu des :

- ions de charges électriques (formelle/totale) opposées : liaison ionique
- noyaux (protons) et électrons de deux atomes : liaison covalente
- Cations métalliques et électrons de valence délocalisés : liaison métallique

Les forces intermoléculaires opèrent entre des molécules (ou atomes) séparées (qui peuvent être de natures différentes), et influencent les propriétés physiques de la matière (point de fusion et d'ébullition, viscosité, solubilité....)

Ces forces sont de faible énergie et résultent de l'interaction électrostatique entre **charges électriques partielles**, ou entre un ion (charge formelle) et une charge partielle. Elles interviennent à des distances plus longues que celles rencontrées dans les interactions intramoléculaires.

Les charges électriques partielles apparaissent sur les **molécules polaires** ou **polarisables**

MOLECULES POLAIRES ET POLARITE

La polarité d'une molécule est déterminée par les propriétés des liaisons covalentes qui la constituent et par sa géométrie.

Liaison polaire

Une **liaison covalente** est une **liaison chimique** dans laquelle deux atomes se partagent deux électrons (un électron chacun ou deux électrons venant du même atome) d'une de leurs couches externes afin de former un doublet d'électrons liant les deux atomes.

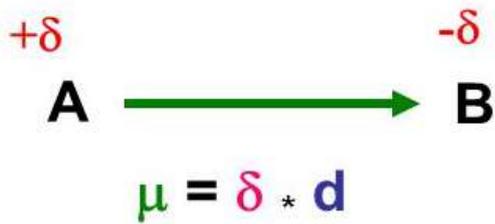
Lors de ce partage d'électrons, et hormis le cas où les deux atomes sont identiques, l'un des atomes partenaires peut présenter plus **d'affinité pour les électrons**, auquel cas il est dit plus **électronégatif**, c'est-à-dire que son noyau a plus d'aptitude à attirer vers lui les électrons partagés, et l'atome en question se retrouve avec un **excès de charges** négatives et porteur d'une **charge électrique partielle** négative notée δ^- (**pole négatif**), l'autre atome partenaire se trouve appauvri en électrons et porteur d'une charge électrique partielle de **même valeur**, mais positive notée δ^+ (**pole positif**) ; La liaison covalente en question est dite **polaire** et la **molécule** diatomique obtenue est **polarisée** et constitue alors un **dipôle électrique**



FIGURE 3

La molécule polaire est caractérisée par son **moment dipolaire**, qui est un **vecteur** $\vec{\mu}$ orienté, **par convention**, depuis le pole positif vers le pole négatif (on peut rencontrer **l'orientation inverse**) et dont le module est égal au produit

de de la charge électrique partielle par la distance séparant les deux charges positive et négative



La polarité d'une liaison covalente (et le moment dipolaire d'une molécule diatomique) est déterminée par la différence dans l'électronégativité des atomes (partenaires) qui la contractent, l'électronégativité étant définie comme étant l'aptitude (la capacité) relative d'un atome à attirer les électrons partagés dans la liaison.

L'électronégativité des éléments chimiques est donnée ci-après :

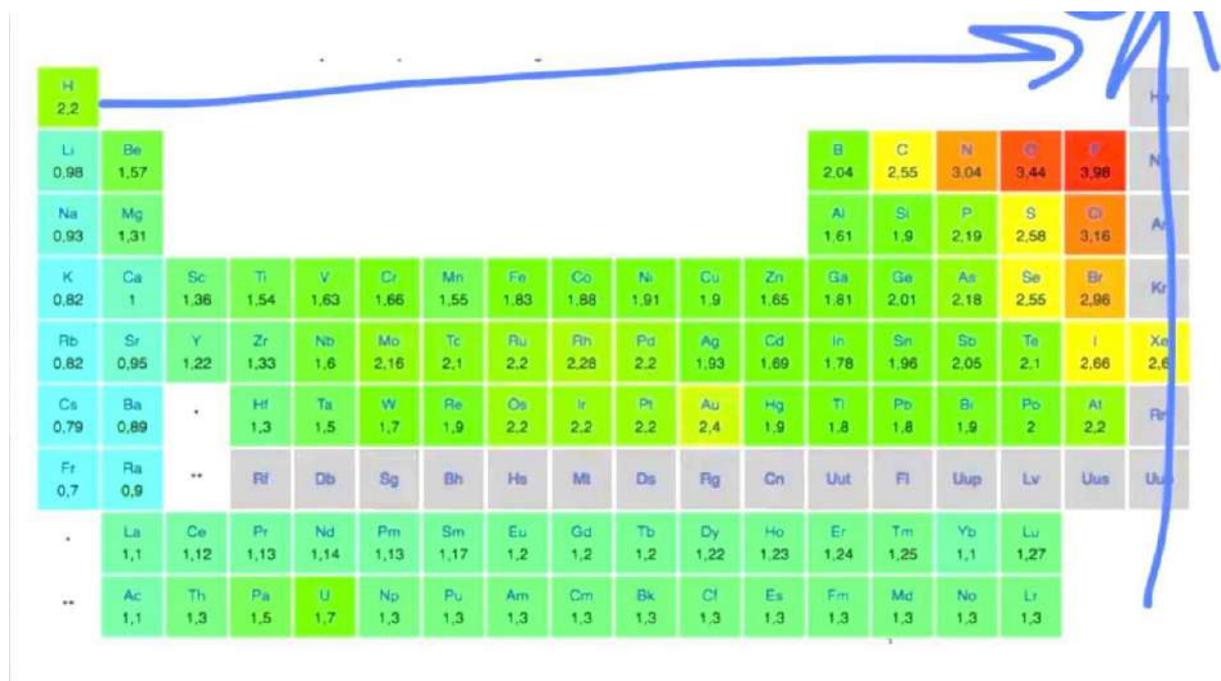


FIGURE 4

A noter que l'électronégativité augmente de gauche à droite et de bas en haut dans le tableau périodique, le Fluor étant le plus électro-négative (valeur 4) et le Francium le moins électro-négative (valeur 0,7).

Pour qu'une liaison soit polarisée il faut que la différence d'électronégativité entre les deux atomes partenaires soit supérieure à 0,5.

Ainsi , lorsque :

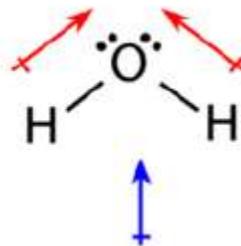
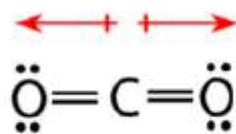
$\Delta E < 0,5$ Liaison covalente non polaire

$0,5 < \Delta E < 1,7$ Liaison covalente polaire

$\Delta E > 1,7$ Liaison ionique

Une molécule diatomique polaire comporte donc une liaison covalente polaire et est caractérisée par son vecteur moment dipolaire ; De la même façon, dans une molécule pluri atomique comportant plusieurs liaisons covalentes polaires, chacune de ses liaisons est caractérisée par son vecteur moment dipolaire élémentaire et la molécule entière se trouve caractérisée par un vecteur moment dipolaire résultant, correspondant à **la somme vectorielle** des moments dipolaires élémentaires

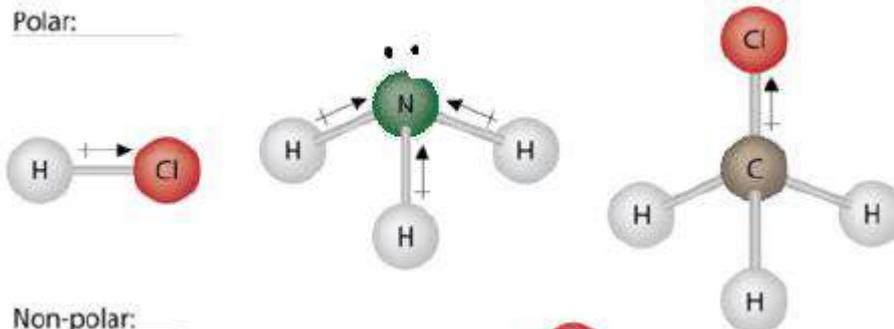
Dipoles:



Overall Dipole:

(none)

Polar:



Non-polar:

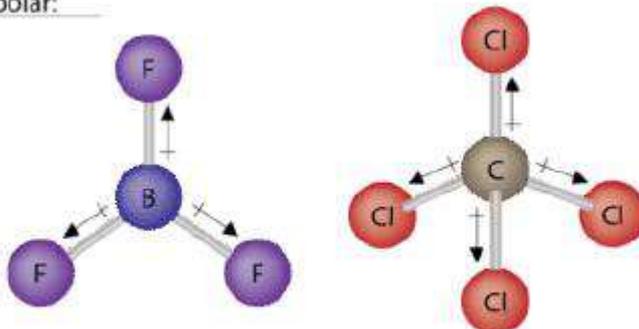


FIGURE 5

Nous n'entrerons pas dans plus de détails, mais retenons que du fait de la **nature vectorielle du moment dipolaire**, la valeur du moment dipolaire résultant est affecté par la géométrie de la molécule et toute symétrie de la molécule conduit à un moment résultant nul.

CONSEQUENCES : lorsque une molécule comporte des **liaisons polaires** et un **moment dipolaire résultant non nul**, la molécule est **polaire** et porteuse de **charge électriques partielles** formant un **dipôle**.

Un dipôle peut interagir électrostatiquement avec un autre dipôle ou avec un ion comme il peut induire l'apparition d'un dipôle (induit) sur une molécule initialement non polaire (mais polarisable). Ces **interactions électrostatiques intermoléculaires** sont de nature **attractive** et **répulsive**, avec bien évidemment une prédominance des composantes attractives pour assurer la cohésion des molécules d'une matière condensée (solide ou liquide).

INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES (IIM)

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les IIM sont des forces (non liantes) de natures électrostatiques entre molécules (et ions), agissant à des distances supérieures à celles mises en jeu dans les interactions intramoléculaires (liantes), et sont donc de faible énergie et disparaissent rapidement lorsque les molécules s'éloignent les unes des autres, comme c'est le cas lorsque la température augmente et/ou la pression diminue.

Ces interactions sont à dominante (en très large majorité) attractives et déterminent la cohésion (la stabilité) des mélanges moléculaires condensés (liquide et solide) et leur propriétés physiques, tels que les points de fusion et d'ébullition, la viscosité, la tension superficielle la solubilité...

Les tables 1 et 2 décrivent les différents types d'IIM en comparaisons aux interactions intramoléculaires.

Remarques :

- les **liaisons ou interactions hydrogène** opèrent non seulement entre molécules séparées (intermoléculaire) mais aussi à **l'intérieur** (en **intramoléculaire**), par exemple, entre différentes régions d'une même macromolécule protéique.

-**Les interactions ion/ion** sont des forces attractives entre ions (atomes ou molécules) de charges électriques opposées, ou répulsives entre ions de charges de même signe. Elles sont aussi dites liaisons ioniques (lorsqu'elles sont attractives). Ce sont des forces de COULOMB qui opèrent sur de longues distances, même dans les gaz.

$$F = k \cdot (Z^+ \cdot Z^-) / d^2$$

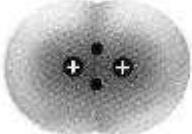
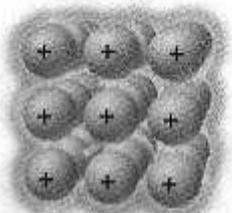
ou k est une constant qui depend du milieu dans lequel se déroule l'interaction ($k = 1/4\pi\xi$) ou ξ est la constante diélectrique, ou la permittivité, du milieu). Ces forces sont de d'énergie élevée, et interviennent dans la formation de cristaux solides, comme le NaCl, et dans les processus de précipitation.

-Les IIM qui nous interessent sont consignées dans la table 1

TABLE 1- Interactions non liantes

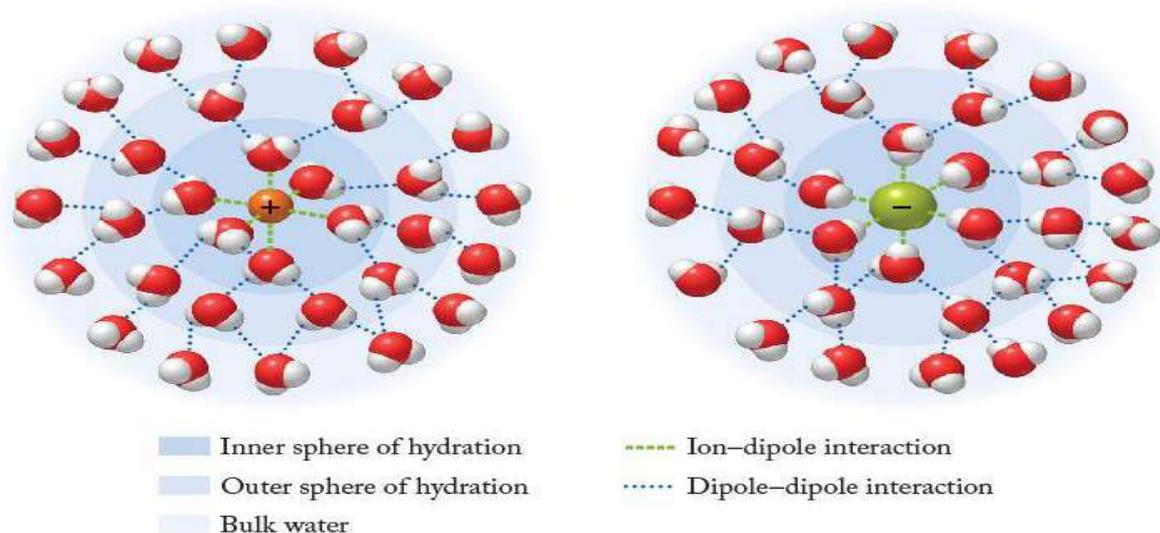
Nonbonding (Intermolecular)				
Ion-dipole		Ion charge– dipole charge	40–600	$\text{Na}^+ \cdots \text{O} \begin{array}{l} \text{H} \\ \text{H} \end{array}$
H bond	$\delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^-$ –A–H·····:B–	Polar bond to H– dipole charge (high EN of N, O, F)	10–40	$\begin{array}{c} \text{:}\ddot{\text{O}}\text{--H} \\ \\ \text{H} \end{array} \cdots \begin{array}{c} \text{:}\ddot{\text{O}}\text{--H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Dipole-dipole		Dipole charges	5–25	$\text{I--Cl} \cdots \text{I--Cl}$
Ion-induced dipole		Ion charge– polarizable e^- cloud	3–15	$\text{Fe}^{2+} \cdots \text{O}_2$
Dipole-induced dipole		Dipole charge– polarizable e^- cloud	2–10	$\text{H--Cl} \cdots \text{Cl--Cl}$
Dispersion (London)		Polarizable e^- clouds	0.05–40	$\text{F--F} \cdots \text{F--F}$

TABLE 2 - Interactions liantes

Table 12.2 Comparison of Bonding and Nonbonding (Intermolecular) Forces				
Force	Model	Basis of Attraction	Energy (kJ/mol)	Example
Bonding				
Ionic		Cation–anion	400–4000	NaCl
Covalent		Nuclei–shared e^- pair	150–1100	H–H
Metallic		Cations–delocalized electrons	75–1000	Fe

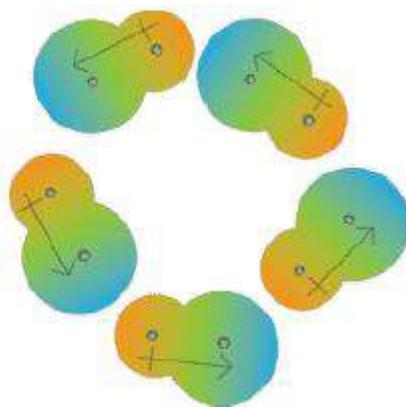
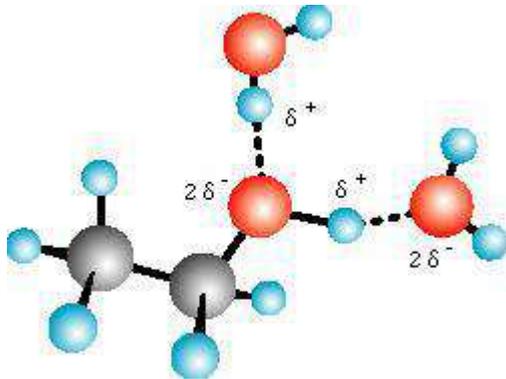
Interaction Ion/Dipole

Un ion interagit électrostatiquement avec la charge électrique partielle de signe opposé, portée un dipôle situé à proximité. C'est ainsi qu'un cristal de NaCl est solubilisé en présence de molécules d'H₂O car les interactions avec le dipôle H₂O se substituent efficacement (et annulent) les attractions entre les ions Na⁺ et Cl⁻



Interactions Dipôle/Dipôle

Les molécules dipolaires tendent à s'orienter les unes par rapport aux autres de façon à optimiser les interactions attractives entre leurs pôles (charges électriques partielles) de signes opposés



Plus le moment dipolaire des molécules est grand plus l'interaction dipole/dipole est forte et plus la température d'ébullition est élevée



Propane
CH₃CH₂CH₃
MW = 44 amu
 μ = 0.1 D
bp = 231 K



Dimethyl ether
CH₃OCH₃
MW = 46 amu
 μ = 1.3 D
bp = 248 K



Acetaldehyde
CH₃CHO
MW = 44 amu
 μ = 2.7 D
bp = 294 K



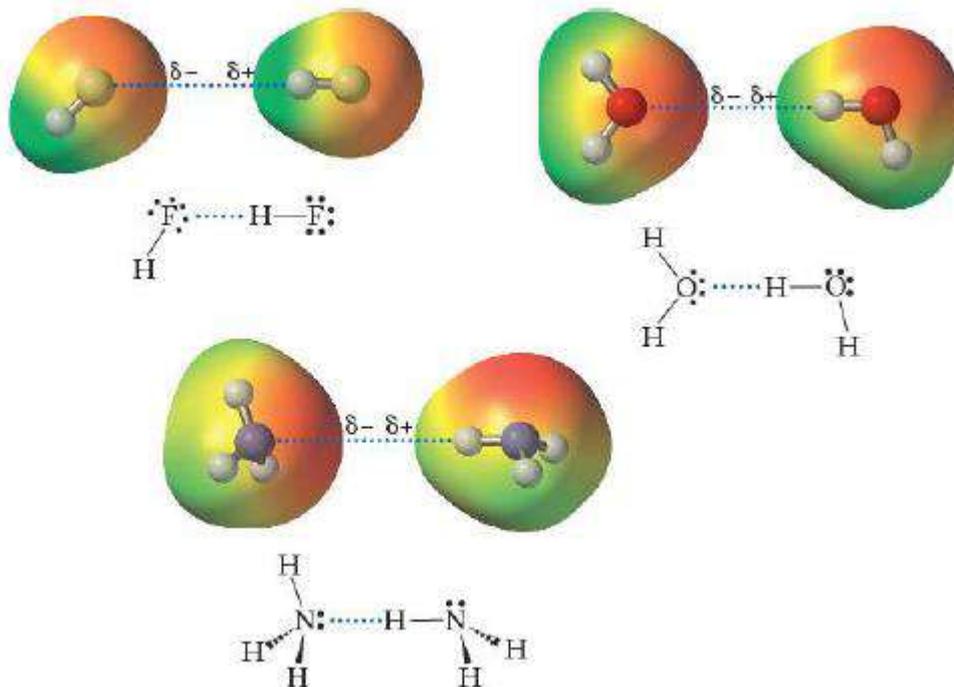
Acetonitrile
CH₃CN
MW = 41 amu
 μ = 3.9 D
bp = 355 K

Increasing polarity
Increasing strength of dipole-dipole forces

La liaison Hydrogene

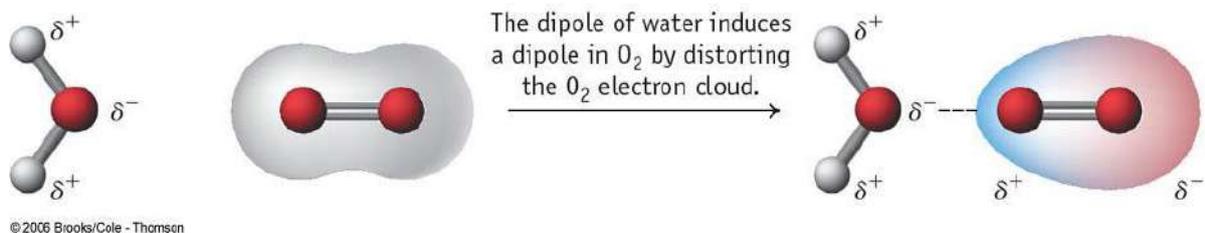
La liaison Hydrogene est un cas particulier d'interaction dipole/dipole ; C'est une interaction d'énergie plus forte que celle d'une interaction dipole/dipole classique, et elle se réalise lorsque un atome d'hydrogene qui est lié (attaché) covalentielllement à un petit atome très electronegatif, se trouve attiré par la paire d'electron libre d'un atome d'une molecule voisine.

La liaison hydrogene s'établit lorsque l'Hydrogene est lié covalentielllement à l'Oxygene , le Fluor ou l'Azote



Interaction Dipole/Dipole induit

Lorsque une molécule polaire (**dipôle permanent**) se trouve à proximité d'une molécule apolaire, le champs électrique crée par le dipôle permanent peut repousser les electrons de la molécule apolaire et faire apparaitre au niveau de celle-ci un **dipôle induit** ; L'interaction peut alors avoir lieu entre les deux.



Interactions Dipole induit/Dipole induit

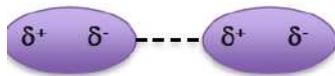
Aussi appelées forces de dispersion de LONDON, elle sont dues au fait que dans une molécule, le mouvement aléatoire des électrons peut à tout moment conduire à une distribution asymétrique des charges électriques autour de la molécule et faire ainsi apparaître un **dipole instantané** qui peut induire un autre dipole dans les molécules voisines et ainsi de suite



1) Two nonpolar molecules with no attractive forces between them.



2) As electrons shift within one of the molecules, a temporary dipole may appear.



3) An adjacent molecule will be attracted to the molecule with the temporary dipole and a new dipole within the second molecule will be induced. This creates the London dispersion force.



4) The electrons move back and the temporary dipoles disappear. This makes the LDF a weak force, it is only temporary.

1) Définir le problème et prévoir une méthode

-Définir le problème

Quelle est l'information recherchée, **qualitative ou quantitative**, quel en sera l'usage et par qui (**client**), quelle est la **précision** requise, quel est le **budget** alloué, quelle est la **nature** est **comment** obtenir un **échantillon représentatif**,
Le client peut être

- un biologiste intéressé par analyser la libération d'une molécule particulière par un organisme (ou une cellule) après stimulation,
- un agent de l'agence de protection de l'environnement qui explore la contamination d'un cours d'eau par les pesticides utilisées dans les fermes des alentours
- un médecin qui recherche un bio marqueur dans le sang d'un patient pour établir un diagnostic
- un agent de l'agence de sécurité alimentaire qui vérifie l'innocuité d'un aliment à mettre sur le marché
- un douanier qui veut rechercher la présence de substances illicites dans une préparation

each of which will have different criteria or needs, and each having their own understanding of what a chemical analysis involves or means.

-Prévoir une méthode

*Quelles sont les caractéristiques de l'échantillon, sa nature (liquide solide gaz), sa taille, sa complexité (présence d'interférents), sa teneur en analyte.

*Sélectionner une méthode en fonction de la nature (les propriétés, les caractéristiques) de l'analyte et de la matrice, de la sensibilité (fonction de la teneur/concentration de l'échantillon en analyte), de la sélectivité (fonction de la présence d'interférents) et la précision requises, des moyens techniques disponibles (instruments, expertise), ainsi que d'autres paramètres comme la rapidité d'exécution, le cout, la possibilité d'automatisation... Tout cela bien sûr dans le respect des normes (de sécurité/innocuité) et régulations éventuelles édictées par les sociétés savantes (les autorités). Exple : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments -ONSSA - Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires.

2) Obtenir un échantillon représentatif

Le biosystème parent à échantillonner peut être solide liquide ou gazeux. Il peut être de composition **homogène** ou **hétérogène**. Dans le premier cas, un échantillon pris **au hasard** au sein du biosystème parent devrait suffire pour l'analyse (c'est généralement le cas pour les biosystèmes liquides ou gazeux tels que les fluides biologiques), dans le deuxième cas on pourrait être intéressé par la variation de l'analyte à travers tout le biosystème, auquel cas plusieurs échantillons sont prélevés dans différentes parties du biosystème.

En fait, il n'existe pas de traitement général de la théorie de l'échantillonnage, et les techniques d'échantillonnage dépendent de la nature de l'analyte et du demandeur de l'analyse (client, donneur d'ordre).

Ainsi, les méthodes d'échantillonnage des matériaux (biosystèmes) les plus importants sont **édictees et standardisées** par ce qu'on appellera des « **sociétés savantes** », c'est-à-dire des communautés scientifiques ou autorités (agences nationales) spécialisées dans la santé publique, la protection de l'environnement... Cela n'empêche pas cependant de développer des méthodes « in-house » adaptées à une problématique « locale » particulière.

Dans tous les cas, l'étape d'échantillonnage consiste à décider **où** (dans quelle partie du biosystème parent) obtenir l'échantillon représentatif de la problématique posée (biopsie, fluide biologique, racine, feuille...) dans quelles **conditions** (in vivo, post mortem, à jeun, après manger, la nuit, conditions climatiques...) **comment** (par quelle méthode et quels instruments) et en quelle **quantité**.

Certaines **précautions** doivent être prises lors de la **manipulation** (prélèvement, transport) et du **stockage** de l'échantillon afin d'éviter ou minimiser la contamination, la perte (volatilisation, adsorption), la décomposition ou l'altération de l'analyte ou de la matrice (oxydation, photo oxydation, action microbienne ou enzymatique). En général ces effets indésirables peuvent provenir des outils utilisés pour le prélèvement (seringues, pinces...), du conteneur utilisé pour le transport et/ou stockage, de l'atmosphère, de l'action de la lumière et de la température..

Dans tous les cas, l'échantillon doit être maintenu :

- à la température la plus basse possible (+4....-196°C) afin d'optimiser sa stabilité physique, chimique et biologique
- dans un conteneur en matériau adéquat (verre, éventuellement ambré, plastique special, inox), taille adaptée et fermeture étanche
- Le moins de temps possible

Pour certains analytes et matrices, on peut également être amené à stabiliser l'échantillon dès que prélevé, par ajout de certains additifs

Nous reviendrons ultérieurement sur ces paramètres de stabilisation de l'échantillon

3) Préparation de l'échantillon

Hormis les situations où l'analyte est ciblé **in situ** puis directement soumis à l'analyse instrumentale (**on-line analysis, direct injection analysis**) , l'échantillon prélevé et généralement soumis à un prétraitement (préparation) plus ou moins laborieux (en fonction de sa nature) ,avant toute analyse.

a)Préparation préliminaire ou « sommaire » :

L'échantillon doit être « propre », non souillé par du matériel étranger et donc en être débarrassé.

Les échantillons **liquides ou gazeux** peuvent par exemples contenir des matières en suspension, celles-ci sont éliminées par **filtration** (liquide,gaz), **décantation** (liquide)ou **centrifugation** (liquide), le but étant de recueillir un fluide **homogène** (une seule phase) limpide et allégé, **acceptable** par les instruments d'analyse.

Les échantillons **solides** sont **lavés et nettoyés** pour, par exemples débarrasser un végétal des poussières déposées a sa surface, des restes de sol adhérentes aux racine ou tubercule...Un échantillon de foie ou de rein peut être débarrassé de l'excès de graisses associées et des vaisseaux sanguin...

b) préparation « avancée »

Le but de l'étape de préparation est l'obtention de l'échantillon sous une forme, généralement liquide, compatible avec (acceptable par) l'analyse instrumentale ;

Les échantillons **solides** nécessitent donc, en premier lieu, d'être **homogénéisés** (désintégrés) et **transformés en échantillons liquides**, cela permet de **libérer l'analyte** de ses ancrages intra tissulaires (intracellulaire) et de le rendre accessible aux manipulations ultérieures (analyse instrumentale ou à l'extraction et la purification).

Une fois l'échantillon liquide obtenu, **d'autres opérations** pré analytiques (de préparation) peuvent être entreprises dans le but **d'enrichir l'échantillon** en analyte d'intérêt, tout en réduisant ou en **éliminant les interférences** potentielles par d'autres composants de la matrice.

Les opérations de préparation (de l'échantillon), dépendent de la nature de l'analyte et celle de la matrice ; Les plus courantes sont :

- **La concentration ou la dilution** de l'échantillon afin d'avoir l'analyte à une concentration adéquate pour les manipulations ultérieures, cela se fera par :
 - *ajout de solvant pur (dilution)
 - *filtration /ultrafiltration (concentration des solutions de macromolécules)
 - *Dialyse (pour éliminer les petites molécules et ions)

-L' extraction de l'analyte par un liquide solvant ou par un solide adsorbant.

L'extraction par le solvant peut être réalisée sur un échantillon solide, de manière concomitante avec le processus d'homogénéisation (extraction solide/liquide**), ou alors sur l'échantillon liquide obtenu après homogénéisation (**extraction liquide/liquide**) ; on peut aussi avoir une **extraction gaz/liquide**.*

L'extraction par un solide (extraction en phase solide) est réalisée à partir d'un échantillon liquide (extraction liquide/solide**) ou gazeux (**extraction gaz/solide**).*

- **Précipitation des protéines** : peut avoir deux objectifs différents,

- 1) **éliminer les protéines** de la matrice pour alléger l'échantillon et éviter les interférences avec l'analyse (chimique ou instrumentale), c'est souvent le cas lorsque l'analyte d'intérêt est une petite molécule,
- 2) **isoler les protéines** pour leur manipulation ultérieure, dans ce cas la protéine est l'analyte.

D'autres procédés sont utilisables pour une bonne préparation de l'échantillon, ils dépendent tous de la nature de l'analyte et de la matrice, mais d'autres paramètres peuvent aussi influencer le choix du procédé, notamment la taille de l'échantillon, le coût de l'opération....

Nous nous limiterons aux trois procédés cités précédemment

A- HOMOGENEISATION

= obtention d'un échantillon (biosystème) **homogène**, formé d'une seule phase, liquide dans laquelle la concentration de l'analyte est uniforme.

Les échantillons solides sont donc désintégrés, finement divisés (pulvérisés), afin d'augmenter la surface d'échange de la matrice (de l'échantillon) avec le milieu extérieur ; L'analyte, comme un certain nombre de composants de la matrice, est ensuite transféré depuis la matrice solide vers un solvant (liquide) récepteur, que l'on a ajouté à l'échantillon solide pendant, ou alors après l'opération de désintégration. L'échantillon finement divisé en suspension dans le solvant est appelé **homogénat**.

La désintégration (le broyage, la pulvérisation) des structures tissulaire et cellulaire peut être achevée par différents moyens et dans différentes conditions physico-chimiques ; Les caractéristiques (propriétés) de l'analyte et de la matrice déterminent le choix de la méthode (technique).

Par exemple,

*si des fragments (morceaux) intacts de membrane, ou alors des organites cellulaires sont (à isoler) recherchés pour analyse ultérieure, la méthode choisie ne doit pas détruire ces composants (organites) subcellulaires.

*si une protéine active est recherchée, les méthodes qui génèrent (dégagent) de la chaleur ou de la mousse seront à éviter (dénaturation)

*si l'on s'intéresse à un analyte de faible poids moléculaire (métabolite), sa libération complète de ses ancrages intracellulaires est nécessaire, et elle n'est achevée que par la désintégration complète des structures cellulaires...

Donc, dans le cas de l'homogénéisation la fin justifie les moyens, et chaque méthode possède ses avantages et ses inconvénients.

Les méthodes d'homogénéisation sont de deux types : **mécaniques** (physiques) ou **chimiques** (biochimiques), les deux pouvant aussi être combinées en tandem ou en simultané.

Les méthodes (bio) chimiques sont globalement plus « douces » que les méthodes mécaniques et elles leur sont souvent préférables, les méthodes mécaniques étant plus énergiques et génératrice de stress thermique et mécanique .

1-METHODES MECANIQUES/PHYSIQUES

Les méthodes mécaniques utilisées pour désintégrer l'échantillon incluent le **broyage**, le **cisaillement**, le **bombardement** et le traitement par **les ultrasons** ;

Il demeure cependant difficile d'identifier/différencier dans chacun des cas le type de forces en présence.

Remarques :

*-Il existe un grand nombre de dispositifs (appareillage) utilisables pour l'homogénéisation mécanique, nous n'en voyons que quelques exemples. Tous ne sont pas toujours utilisables avec n'importe quel échantillon, car non seulement la qualité mais aussi la **quantité** d'échantillon détermine le type de dispositif, de même que d'autres paramètres tels que l'efficacité, la facilité, la rapidité, le débit (nombres d'échantillons traitables en même temps), le cout....*

-Les méthodes mécaniques génèrent toutes, à des degrés différents, de la chaleur; Il convient donc de maintenir l'échantillon à froid, ce qui est dans certains cas automatiquement assuré par un appareillage réfrigéré, sinon le dispositif (échantillon et appareil) et pré-refroidit ou maintenu sur un bac de glace durant la manipulation.

*-L'homogénéisation est le plus souvent réalisée en présence d'une phase liquide que l'on appellera **solvant** ou **tampon**, et dont le rôle est de capter/recevoir/solubiliser l'analyte et autres composants de la matrice (**solutés**) dans des conditions de stabilité optimale ; Le solvant/tampon doit donc avoir les caractéristiques physico chimiques (et biochimiques) compatibles avec cet objectif.*

*-Dans certain cas, le tampon participe lui-même au processus de désintégration de l'échantillon (**lyse chimique**), de manière concomitante à la désintégration mécanique.*

Par ailleurs, et bien qu'une opération idéale d'homogénéisation ne doive comporter qu'une seule étape (une seule méthode), le praticien utilise assez souvent plus d'une méthode, en tandem (successivement), pour obtenir le résultat désiré.

***Le mortier (Broyage /mouture/pulvérisation)**

Le mortier et son piston et l'outil le plus populaire pour broyer/moudre/pulvériser un échantillon, mais d'autres dispositifs/outils sont utilisables, comme les moulins à grain, à café et d'autres appareils de laboratoire comme les homogénéiseurs en verre.



Dans un mortier, le broyage est achevé en écrasant l'échantillon, préalablement émincé, entre deux surfaces abrasives qui glissent l'une sur l'autre. L'échantillon est soumis à des forces verticales (d'écrasement) et tangentielles (d'étirement) par le mouvement du piston, de bas en haut et de rotation. Le broyage est éventuellement facilité par l'adjonction à l'échantillon, de particule fine de sable, de verre, d'alumine ou autre matériel inerte, pour augmenter le pouvoir abrasif du dispositif.

Les échantillons traités dans un mortier peuvent être frais, secs ou congelés. Ils peuvent être mous (tissus animaux, parties molles de plantes..) ou durs. L'opération de broyage est souvent réalisée en présence d'une phase liquide (tampon/solvant) aqueuse ou organique, qui permet de récupérer les biomolécules libérées de la matrice.

L'échantillon peut aussi être pulvérisé a sec, sans ajout de phase liquide ; Dans ce cas l'échantillon est imbibé d'azote liquide ($-196^{\circ}\text{C}^{\circ}$), ce qui le rend friable et facile à désintégrer. Au fur et à mesure de l'opération de broyage, l'azote liquide s'évapore et on obtient à la fin un échantillon sous forme de poudre fine (cryo pulvérisation) que l'on peut resuspendre dans un solvant (liquide).

***Le Potter-Elvehjem (P-E), L'homogénéiseur de Dounce , homogénéiseur à couteaux**

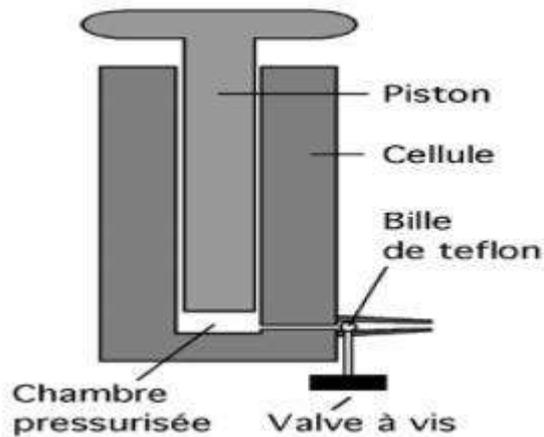
Le P-E est un tube en verre dans lequel plonge, de façon très ajustée, un pilon (piston) en verre ou en PTFE ; L'échantillon (tissu mou) préalablement découpé en petits morceaux et additionné d'un solvant adéquat, est soumis à des forces tangentielles de cisaillement entre la paroi abrasive du Potter et le piston, ce dernier effectue des mouvements verticaux et de rotation, entraîné manuellement ou à l'aide d'un moteur



L'homogénéiseur à couteaux, utile pour les échantillons mous fonctionne comme les appareils domestiques utilisés pour préparer les jus de fruits ou de la viande hachée....

***La presse de French**

Très utilisée pour suspension de microorganisme, la presse consiste en un cylindre creux (cellule), en acier dans lequel plonge un piston (en acier) ajusté ; Le cylindre est muni du côté opposé d'une ouverture très étroite , par laquelle sont expulsées les cellules microbiennes sous la pression élevée du piston.

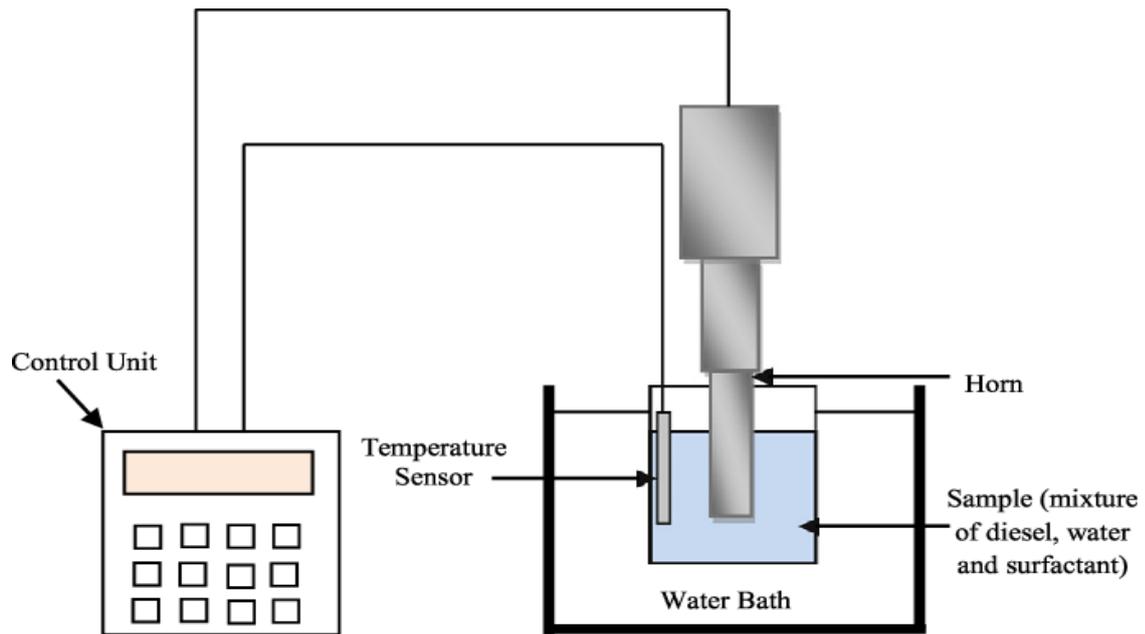


***Les homogénéiseurs à billes (bombardement)**

Il en existe de différents formats. Dans ce cas, l'échantillon (un tissu sec ou mou, ou alors une suspension microbienne), et mis dans un récipient adapté (tube ou flacon bien fermé) en présence de billes de verre, d'acier ou d'oxyde de zirconium ; l'ensemble est soumis à un mouvement énergétique (motorisé) de va et vient qui engendre des collisions (bombardement) entre l'échantillon et les billes, ce qui provoque sa désintégration.

***Ultrasonication**

Dans ce cas l'échantillon est désintégré par la pression exercés par des ondes sonores de hautes frequences (10 à 40 MHZ,ultrasons).



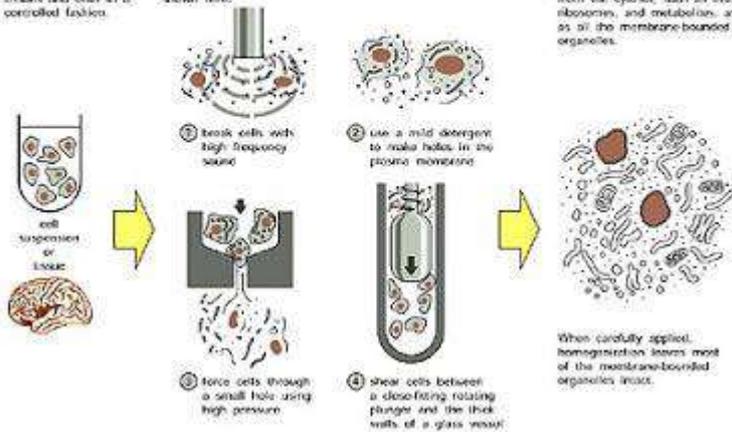
Dans ce cas un module de contrôle envoie un signal de haute fréquence à un transducteur, qui convertit le signal en énergie mécanique sous forme de vibrations, qui sont transmises au bout d'une sonde qui plonge dans l'échantillon (solide+tampon) ; Les vibrations créent des variations de pression (cavitation) qui désintègrent l'échantillon.

BREAKING CELLS AND TISSUES

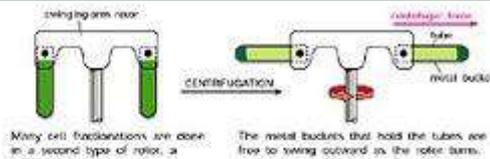
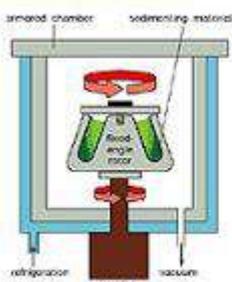
The first step in the purification of most proteins is to disrupt tissues and cells in a controlled fashion.

Using gentle mechanical procedures, called homogenization, the plasma membranes of cells can be ruptured so that the cell contents are released. Four commonly used procedures are shown here.

The resulting thick soup (called a homogenate or an extract) contains large and small molecules from the cytosol, such as enzymes, ribosomes, and metabolites, as well as all the membrane-bounded organelles.



THE CENTRIFUGE



Many cell fractionations are done in a second type of rotor, a swinging arm rotor.

The metal buckets that hold the tubes are free to swing outward as the rotor turns.



Centrifugation is the most widely used procedure to separate the homogenate into different parts, or fractions. The homogenate is placed in test tubes and rotated at high speed in a centrifuge (sometimes called an ultracentrifuge). Present-day ultracentrifuges rotate at speeds up to 100,000 revolutions per minute and produce enormous forces, as high as 600,000

times gravity.

At such speeds, centrifuge chambers must be refrigerated and evacuated so that friction does not heat up the homogenate. The centrifuge is surrounded by thick armor plating, since an unbalanced rotor can shatter with an explosive release of energy. A fixed-angle rotor can hold

Précipitation/solubilité des protéines = F(pH, force ionique)

-Les réponses ci-après sont un exemple de réponses. Chaque étudiant pourrait apporter ses propres réponses (plus ou moins enrichies) en fonction de ses lectures et sa culture générale sur le thème. Le problème de la solubilité des protéines est fondamental, ancien, mais compliqué et toujours (actuellement) débattu les scientifiques de différents domaines ; A notre niveau, nous en avons fait une description seulement superficielle

- Les phrases en rouge italique décrivent les étapes de la stratégie générale pour résoudre l'exercice

Commenter des graphiques :

1- Schéma 1



**On commence par donner un titre au schéma :*

-la figure représente la solubilité de deux protéines A et B en fonction du pH.

**On passe à la description des profils (observation globale) :*

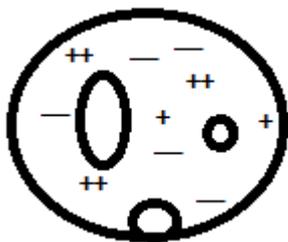
-La solubilité des protéines varie en fonction du pH, le profil de variation est similaire pour les deux protéines

-Pour chacune des deux protéines la solubilité présente un minimum pour une valeur particulière du pH. La solubilité des deux protéines augmente de part et d'autre de cette valeur du pH.

**On passe à l'interprétation (explication) du phénomène observé :*

- La solubilité des protéines dans un solvant dépend des interactions : entre molécules de protéines, entre molécules de protéines et molécules de solvant. Ces interactions sont influencées par l'agitation thermique et par la présence de co-soluté (autres molécules en présence).

- En solution aqueuse (*ce qui est le cas car nous parlons de pH, donc d'ions et d'ionisation*), les interactions intermoléculaires mises en jeu sont de nature électrostatique et se manifestent entre charges électriques partielles ou entière (formelles) portées par deux molécules
- la structure primaire d'une protéine comporte des séquences d'aminoacyles à chaîne latérale polaire ou ionique et des séquences d'aminoacyles à chaîne latérale apolaire.
- La chaîne polypeptidique ainsi constituée est thermodynamiquement instable en solution aqueuse, si bien qu'elle a tendance à se replier sur elle-même, à la recherche d'une conformation globulaire (structure tridimensionnelle) d'énergie minimale, avec, à sa surface, un maximum de séquences polaires à côté de quelques séquences apolaires.
- En solution aqueuse, la surface d'une protéine globulaire se présente comme une mosaïque de zones (plages) polaires (éventuellement ioniques) et zones apolaires (éventuellement polarisables), avec, **pour que la protéine soit soluble en milieu aqueux**, dominance des zones polaires.



- En solution aqueuse, les protéines sont des poly électrolytes caractérisés par une charge électrique (globale) nette dont le signe et l'amplitude dépendra du pH de la solution. Cette charge électrique formelle est due à la contribution des groupements ioniques (en fonction de leur pK) des chaînes latérales des aminoacyles constitutifs qui se trouvent à la surface de la protéine.
- Les protéines (P) sont donc des molécules amphotères, se comportant en acide (P⁺) ou en base (P⁻) en fonction du pH du milieu :



L'espèce P⁰, électriquement neutre (c'est-à-dire porteuse d'autant de charges positives que de charges négatives) est dominante lorsque la

solution est électriquement neutre, c'est-à-dire lorsque (dans la solution) la somme des charges électriques en positives est égale à la somme des charges négatives ou : $\sum C_i Z_i^+ = \sum C_i Z_i^-$

Cette situation est réalisée lorsque le pH de la solution est égal au pH isoélectrique (pHi) de la protéine ; Dans ces conditions les forces électrostatiques répulsives entre molécules de protéines sont minimisées, ce qui favorise leur agrégation et diminue la solubilité.

De part et d'autre du pHi de la protéine, ce sont les espèces P^+ ou P^- qui prédominent, avec dans chacun des cas une augmentation des interactions répulsives entre protéines de même signe et augmentation de la solubilité.

****L' interprétation ci-dessus est valable pour tout profil Solubilité= f(pH)***

**Pour les profils des protéines A et B , complément d'interprétation :*

- Les protéines A et B présentent des profils de solubilité aqueuse analogue et typique d'une protéine globulaire mais avec des minima et donc des pHi assez (suffisamment)différents. Dans ces conditions, les deux protéines peuvent être précipitées différentiellement à partir d'une même solution, par augmentation progressive du pH du milieu (précipitation isoélectrique).

*Schéma 2

**Titre*

-Représente la variation de la solubilité d'une protéine en fonction du pH(abscisse principale) et de la force ionique(concentration en sel) du milieu (abscisse secondaire)

**observation*

Nous avons déjà commenté la variation de la solubilité en fonction du pH(voir ci-dessus), il reste à compléter le commentaire par l'effet de la force ionique :

- Quelle que soit le pH du milieu, l'augmentation de la force ionique améliore la solubilité (les courbes solubilité =F(pH) sont quasi parallèles).
- Nous pouvons dériver (construire) la fig.2b à partir de la fig.2a

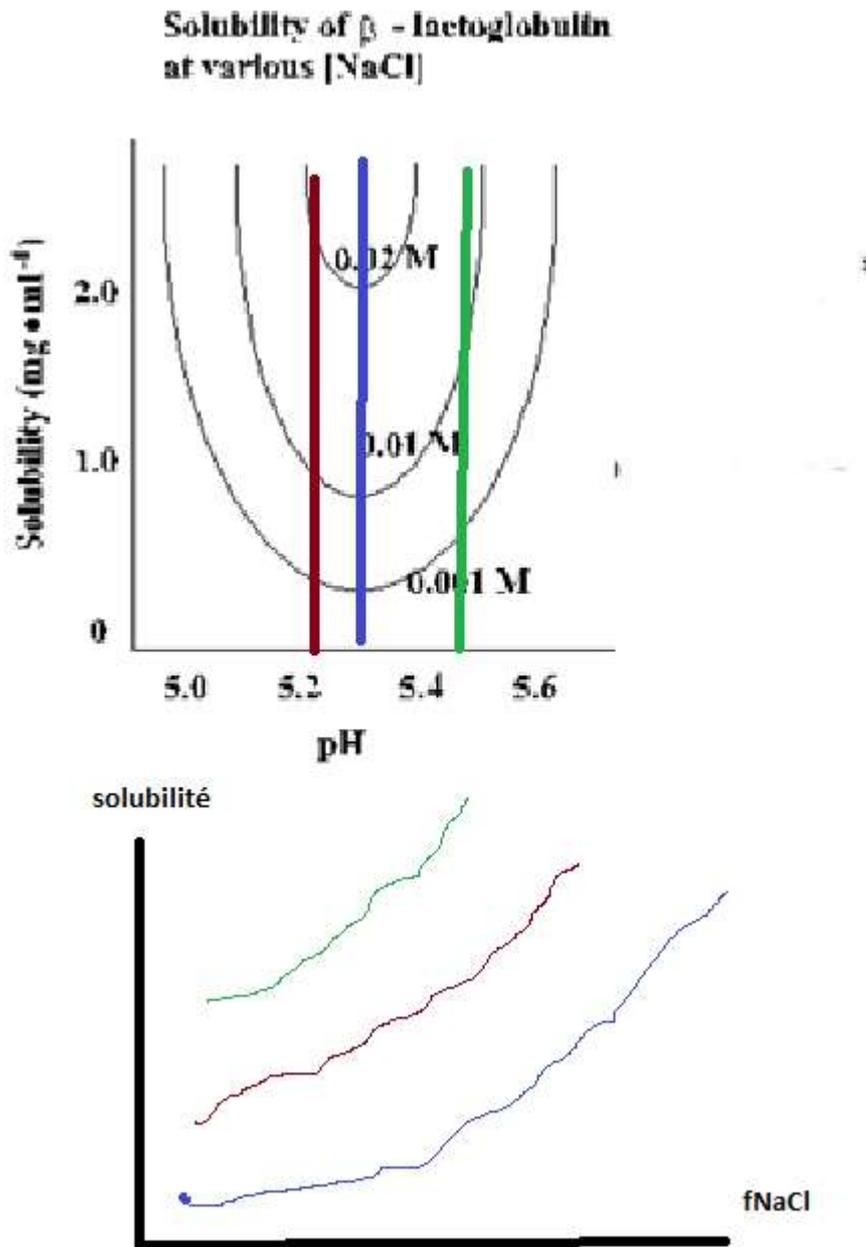


Fig 2.a solubilité = F (pH) à [NaCl] constante

Fig.2b solubilité=F ([NaCl]) à pH constant

**Interprétation*

- quelle que soit l'état d'ionisation de la protéine (c.à.d. quel que soit le pH), l'adjonction d'ions salins dans le milieu favorise la solvataion (l'hydratation, la fixation de molécules d'eau) de la protéine et donc sa solubilité.

-La fig .2b montre un effet de salting in du NaCl sur la protéine, c.à.d. que les ions salins **aux concentrations utilisées dans la fig.** se fixent à la surface de la protéine, forment des ponts salins entre molécules de protéine et molécules d'eau, et favorisent la formation d'une coque (d'une couche) d'hydratation autour de la protéine. Cette coque d'hydratation constitue un écran entre les molécules de protéines et diminue les forces attractives entre elles (en particulier à leur pHi) ce qui augmente leur solubilité

HOMOGENEISATION (SUITE)

Rappel :

Obtention d'un échantillon de composition homogène, avec une concentration en analyte uniforme à travers tout l'échantillon ; c'est le cas pour les échantillons fluides (liquide ou gazeuse) homogènes (constitués d'une seule phase)

Pour les échantillons solides, l'homogénéisation consiste à avoir un échantillon **finement divisé** (pulvérisé), avec une **apparence homogène**, que l'on va suspendre dans une phase liquide organique (**solvant**) ou aqueuse (**tampon**) pour obtenir un **homogénat** (phase solide+ phase liquide).

Au sein de l'homogénat s'effectue un **transfert** de molécules (**solutés**) depuis la phase solide (matrice) vers la phase liquide (solvant/tampon) ; Parmi les solutés transférés doit se trouver l'analyte d'intérêt mais aussi, le plus souvent, d'autres composants (**interférents**) de la matrice.

A la fin de l'opération d'homogénéisation, l'homogénat est **clarifié** et la phase liquide (contenant l'analyte) est récupérée est soumise à la suite du protocole (stratégie) d'analyse.

Lors du développement d'une méthode d'homogénéisation, il est nécessaire de considérer les caractéristiques finales de l'homogénat (et de l'analyte) avant de décider des outils et des conditions physiques et chimique à utiliser pour son obtention ; LA FIN JUSTIFIE LES MOYENS !

Nous en avons déjà parlé.

Nous avons vu durant la séance précédente, que les méthodes utilisées pour désintégrer/homogénéiser les échantillons pouvaient être mécaniques/physiques ou chimiques/biochimiques ; Nous avons aussi vu que cette dichotomie était relativement artificielle et que très souvent le processus d'homogénéisation comportait une combinaison d'actions mécaniques (appareillages) en présence d'actions (bio)chimiques (tampon/solvant).

Le schéma ci-après résume les méthodes d'homogénéisation :

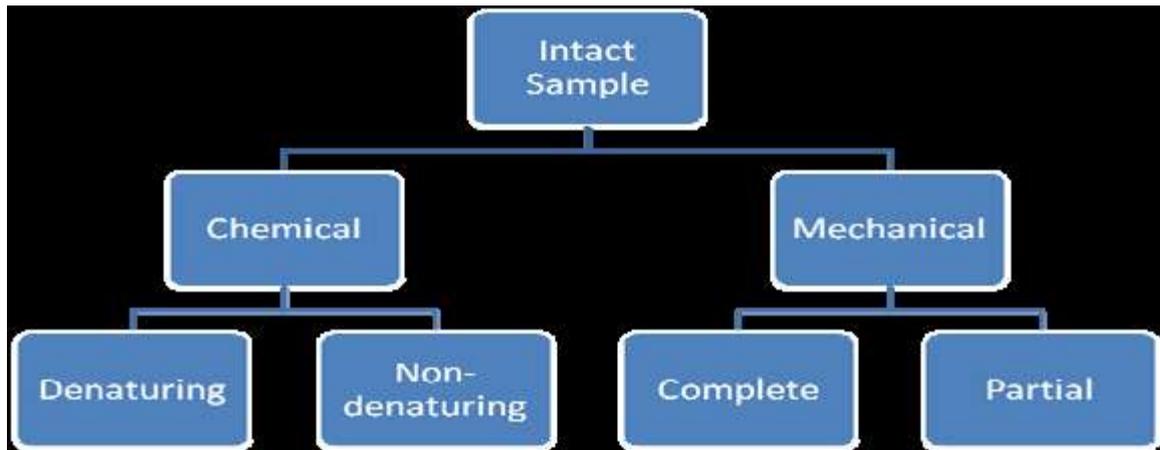


Figure 1. Simple schematic of sample disruption options. This simplified scheme does not consider that methods are normally combined during sample disruption. Mechanical homogenization normally makes use of buffers or lysis solutions just as chemical lysis normally requires that the sample contains small particles, which is normally created using a homogenizer

A-2 – METHODES CHIMIQUES/BIOCHIMIQUES

Les méthodes chimiques ou biochimiques utilisent un tampon (ou un solvant) de lyse pour accomplir l'homogénéisation /désintégration de l'échantillon ; Cette lyse /désintégration (bio)chimique peut être assistée(aidée) par une désintégration mécanique , mais un tampon (solvant) de lyse adéquat, peut à lui seul rompre /désintégrer les parois et membranes cellulaires et solubiliser/capter de façon efficace l'analyte d'intérêt (et autres composants de la matrice).

Un tampon adéquat doit par ailleurs posséder des propriétés/caractéristiques physico (bio) chimiques (température, pH, force ionique, constante diélectrique, viscosité...) compatibles avec une stabilité optimale de l'analyte.

C'est en fonction du résultat escompté (qualité de l'analyte), et de la nature de l'échantillon de départ que la lyse (bio) chimique utilise différentes combinaisons des paramètres du tampon, dont les principaux sont : le pH, la présence de détergents (surfactants), de chaotropes ou d'enzymes ; D'autres additifs sont souvent inclus dans le tampon de lyse afin d'optimiser la stabilité de l'analyte.

a-pH, Lyse alcaline

Lors de la lyse alcaline (pH basique), l'agent actif (lysant) est l'ion OH^- . Le tampon de lyse contient de l'Hydroxyde de Sodium (NaOH) et les ions OH^- réagissent avec la membrane plasmique en rompant les liaisons ester des acylglycerol (phospholipides) de la membrane ce qui la perméabilise et la désintègre ; Très souvent le tampon alcalin est additionné d'un détergent comme le SDS (Sodium DodecylSulfate) qui s'insère dans la membrane fragilisée par les ions OH^- et solubilise (détache) les protéines membranaires, participant ainsi à la désintégration totale de la membrane.

Le pH utilisé est compris entre 11,5 et 12,5 et par conséquent l'analyte en question doit être stable dans ces conditions ; Cette méthode est très utilisée pour extraire les acides nucléiques microbiens mais ne permet pas l'obtention de protéines natives (fonctionnelles)

b- Détergents

Les détergents ou surfactants sont des composés organiques (de synthèse ou naturels) qui ont la propriété de rompre les interactions entre les interfaces hydrophobes et hydrophiles. Puisque la membrane plasmique est une bicouche lipidique constituée par l'association (non covalente) de molécules hydrophobes et de molécules hydrophiles, les détergents s'insèrent dans cette structure et la désintègrent ; Les détergents sont capables de rompre les interactions lipide-lipide, lipide-protéine et protéine-protéine, ils sont aussi capables de dénaturer les protéines cytosoliques et former des micelles avec ces protéines.

Le SDS (sodiumdodecylsulfate) est un détergent anionique comportant une « tête » Sulfate hydrophile et une « queue » hydrophobe formée de 12 atomes de carbone (dodecyl ou lauryl) ; IL est utilisé non seulement dans les laboratoires (en particulier pour isoler les protéines membranaires) mais aussi dans les détergents domestiques.

Le CTAB (CetylTrimethylAmmoniumBromide) est un détergent cationique utilisé lors de l'extraction de l'ADN des plantes

Les détergents zwitterioniques possèdent , en même temps, des groupes anioniques et des groupes cationique et leur charge électrique nette est neutre.

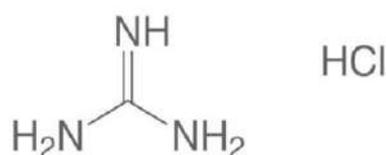
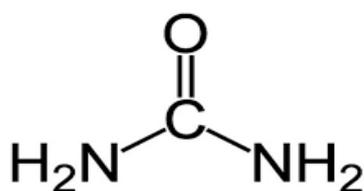
Le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) est un détergent zwitterionique très utilisé pour isoler des protéines à l'état natif (non dénaturées)

Les détergents non ioniques ont une « tête » polaire mais non ionisée, comme un glycoside (sucre) . Ils ont tendance à être moins « énergiques » (moins puissants) et ne dénaturent pas les protéines bien que toujours capables de désintégrer la membrane ; Ils agissent en dispersant les molécules faiblement associées. Parmi ces détergents on trouve le Triton , le Brij et d'autres.

c- Les Chaotropes

Les chaotropes sont des molécules capables de rompre les interactions faibles **intermoléculaires**, comme les liaisons hydrogènes entre molécules d'eau ou alors les interactions hydrophobes entre les protéines. Les chaotropes rompent aussi les interactions faibles **intramoléculaires** et dénaturent les protéines et sont souvent utilisés pour cela lors de l'extraction des Acides nucléiques (l'ARN en particulier).

Les chaotropes les plus utilisés sont l'urée et les sels de guanidine ; Ces composés sont utilisés à forte concentration (6 à 9 molaire)



d- Les Enzymes

La lyse par les enzymes est une lyse biochimique. Des enzymes comme le lysozyme, la lysostaphine, la zymolase, cellulase, protéase, pectinase et glycanase sont toutes des enzymes commerciales et peuvent être utilisées dans différentes instances.

L'avantage de la lyse enzymatique réside dans sa spécificité ; Le lysozyme est par exemple utilisé pour la lyse bactérienne, la chitinase pour les levures et les pectinases et cellulase pour les cellules végétales

La paroi cellulaire de levures, de champignons ou de végétaux contient généralement un mélange de polysaccharides différents, et sa lyse/dégradation/perméabilisation nécessite un mix (cocktail/mélange) d'enzymes de spécificité différentes.

Les enzymes peuvent en particulier être utilisées comme première étape de traitement des cellules pour éliminer les composants de la paroi cellulaire avant de désintégrer la membrane plasmique ; les cellules dépourvues de leur paroi sont appelées protoplastes ou spheroplastes, et sont utilisables dans les expériences de transformation génétique et peuvent être facilement lysées par le lysozyme ou autre méthode chimique.

e- Autres additifs (au tampon de lyse)

Tout tampon ou solvant de lyse, doit non seulement permettre la libération effective de l'analyte d'intérêt de ses attaches intracellulaire, mais doit aussi garantir une stabilité optimale à cet analyte une fois solubilisé dans le tampon.

La stabilité de l'analyte dépend de sa nature chimique et est en particulier critique pour les composés macromoléculaires tels que les protéines.

Le cytosol contient de grandes concentrations de solutés dans un environnement réducteur. Lorsque les cellules sont rompues, les solutés se trouvent rapidement dilués ce qui favorise leur diffusion, en particulier les sous-unités d'une même protéine peuvent se dissocier alors que d'autres perdent

leur cofacteurs ; Des stabilisateurs osmotique comme le sucrose ou le sorbitol peuvent être ajouté au tampon de lyse pour éviter la dissociation et la diffusion des solutés faiblement associés.

Différentes méthodes d'homogénéisation entraînent l'introduction d'air dans les homogénats, l'oxygène apporté change le statut redox du milieu et peut provoquer l'oxydation des solutés (normalement à l'état réduit). Des composés antioxydants comme le glutathion, le dithiothreitol ou le beta-mercapthoethanol sont souvent ajoutés pour contrer l'effet néfaste des oxydants

Lors de la preparation de protéines, il est important d'ajouter des inhibiteur de proteases au tampon d'homogeneisation. En effet, la rupture des cellules libere les proteases (et autres hydrolases) contenues dans les lysosomes des cellules animales ou les vacuoles de cellules vegetales ou espace periplasmique microbien.

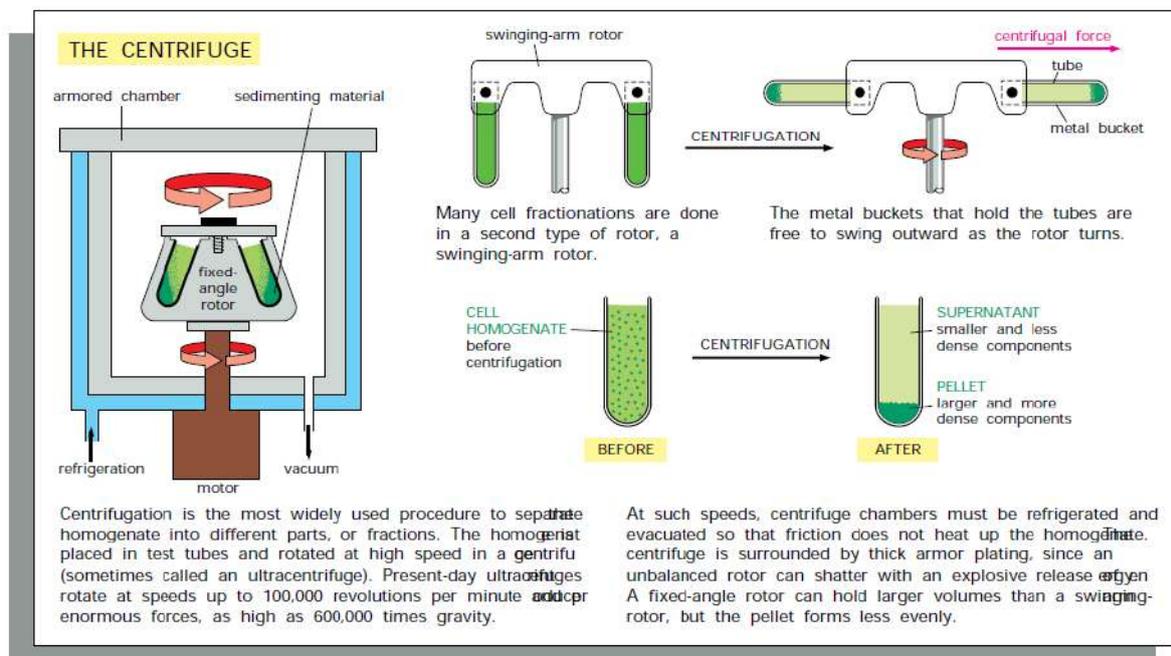
Table 4.6 A summary of extraction methods which are best used with different tissue.

Method	Animal tissue	Animal cell culture	Plant tissue	Plant cell cultures	Bacteria	Yeast	Fungi (filamentous)
Osmotic shock		π					
Grind in liquid N ₂	π	π	π	π	π	π	π
Grind with acid washed sand	π	π	π	π	π		
Homogeniser, e.g., Dounce	π	π	π	π			
Ultra sonicator		π		π	π	π	
Blenders	π	π	π	π			
Blenders with beads	π	π	π	π	π	π	π
Polytron	π	π	π	π			
Ballotini beads		π		π	π	π	π
Compression/Expansion		π		π	π		
Freezing/Thawing		π		π	π	π	
Enzyme treatment, e.g., lysozyme or lysozyme + detergents					π		
Enzyme treatment, e.g., Lyticase						π	

3- Clarification de l'homogénat (lysate)

Après désintégration de l'échantillon, l'homogénat acellulaire contient des fragments de membranes, éventuellement des organites cellulaires et bien sûr des molécules solubles, dont l'analyte d'intérêt. Les composants insolubles doivent donc être éliminés de l'homogénat et laisser place à un **extrait acellulaire** liquide, **clair et homogène**, ne contenant que les composés solubles. Cette opération, appelée **clarification**, est généralement réalisée grâce à la **décantation/sédimentation** assistée/accélérée par la **centrifugation**. Certains homogénat de tissus végétaux ou animaux contiennent souvent de gros débris cellulaires ; Ceux-ci sont d'abord éliminés par **filtration** sur un morceau de tissu (mousseline/gaze/pansement) avant de soumettre l'homogénat ainsi allégé à la centrifugation. Le surnageant (liquide) de centrifugation est récupéré, il constitue l'extrait acellulaire (contenant l'analyte d'intérêt) qui va subir la suite des opérations constitutive de la stratégie d'analyse.

L'extrait acellulaire peut être soumis à une filtration de préférence stérilisante (filtre de faible porosité : 45 ou 22 micron), et éventuellement additionné d'agents stabilisants/conservateurs puis stocké (le moins longtemps possible) à faible température (4° à -80°C selon l'analyte)



B- EXTRACTION

L'extraction effective (satisfaisante) d'un analyte à partir de sa matrice (à partir de l'échantillon), consiste à « forcer » son transfert depuis la matrice qui le contient (phase donatrice de l'analyte) , vers une nouvelle phase (phase réceptrice de l'analyte) **non miscible** (ne se mélange pas) à la première ; ce transfert se réalise jusqu'à ce que la **répartition/distribution** de l'analyte entre les deux phases atteigne un équilibre. Le transfert n'est possible que si l'analyte en question possède une **affinité** physicochimique pour la phase réceptrice, supérieure à celle qu'il possède pour la phase donatrice (en d'autres termes, l'analyte est plus stable thermodynamiquement dans la phase réceptrice).

Le transfert d'analyte peut, en principe, se réaliser **directement** entre les phases non miscibles suivantes :

Depuis un solide vers un liquide, depuis un solide vers un gaz, depuis un liquide vers un liquide, depuis un liquide vers un solide, depuis un liquide vers un gaz, depuis un gaz vers un liquide ou depuis un gaz vers un solide.

Lorsque le transfert de l'analyte se fait vers une phase liquide, on parle **d'extraction par le solvant**, et lorsque ce transfert s'effectue vers une phase solide, on parle **d'extraction en phase solide**.

Signalons au passage que l'opération d'homogénéisation d'un échantillon solide (mécaniquement ou (bio) chimiquement) en présence d'une phase liquide (solvant ou tampon) constitue ,en même temps, une opération de transfert d'analyte (et autres solutés) depuis un solide vers un liquide ou **extraction solide/liquide** , et que la libération passive de parfum par une rose constitue une opération de transfert de molécules odorantes depuis un solide (la rose) vers un gaz (l'air environnant) réalisant ainsi une opération **d'extraction solide/ gaz ...**

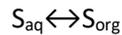
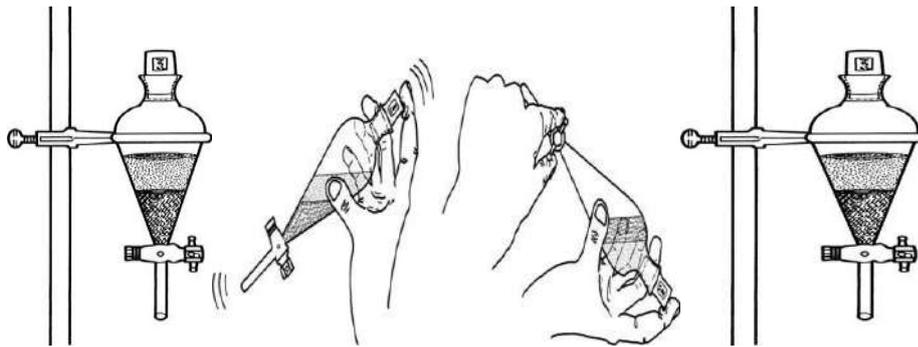
Dans la mesure où le premier objectif de notre stratégie d'analyse consistait en l'obtention de l'analyte dans un échantillon liquide (acceptable par les instruments d'analyse), nous nous intéresserons à extraire cet analyte **directement** par un solvant, ou alors ,par un solide dans un **premier temps** , avant de le récupérer dans un solvant.

Remarque : Nous ne traiterons pas la distillation et l'hydrodistillation.

B-I- L'EXTRACTION PAR LE SOLVANT

Pour illustrer l'extraction par le solvant, nous exposerons la théorie de l'extraction à partir d'une phase liquide (extraction liquide/liquide), sachant que l'extraction à partir d'un solide (extraction solide/liquide) obéit au même principe de l'existence d'une différence d'affinité physico chimique de l'analyte vis-à-vis des deux phases (non miscibles) en présence.

Lors d'une opération d'extraction liquide/liquide, un soluté est mis dans une ampoule à décanter (ou autre récipient adéquat) en présence de deux liquide non miscibles, généralement une phase aqueuse et une phase organique ; Le système est mélangé/secoué (pour former transitoirement une émulsion) puis laissé atteindre l'équilibre (séparation des phases) va se répartir/se distribuer entre les deux phase.



A l'équilibre le soluté (ou les solutés) se trouve(nt) réparti/distribué entre les deux phases dans des proportions déterminées par une **loi de partition** (ou repartition) ou **distribution de NERNST** qui stipule, qu'à température et pression constante, un soluté S va **toujours** se répartir (partitionner/se distribuer) dans les **mêmes proportions** entre un **couple donné** de deux liquides non miscibles ; Le rapport des concentrations de soluté dans chacune des phases (chacun des deux liquides) à l'équilibre définit un **coefficient de partition** (ou de distribution) K_D ,

$$K_D = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq}}$$

$[S]_{org}$ et $[S]_{aq}$ sont les concentrations de soluté dans la phase organique et aqueuse respectivement (plus généralement phase supérieure et phase inférieure ou phase extractante et phase d'origine), K_D est indépendant de la **concentration totale** de soluté dans les deux phases. En pratique, un soluté existe souvent sous différentes formes (espèces) chimiques en solution produites par dissociation(ionisation), protonation, complexation ou polymérisation, dans ce cas on définit la constante **D**, appelée **taux de partition** ou de **distribution** avec

$$D = \frac{(C_S)_{org}}{(C_S)_{aq}}$$

Ou $(C_S)_{org}$ et $(C_S)_{aq}$ sont les sommes des concentrations de toutes les espèces chimiques de soluté dans chacune des phases respectives ; par exemple si le soluté SH s'ionise dans la phase aqueuse et pas dans la phase organique, on aura $SH_{aq} \leftrightarrow S_{aq}^- + H_{aq}^+$ dans la phase aqueuse, et uniquement SH_{org} dans la phase organique (car S^- qui est chargé électriquement n'est normalement pas soluble dans la phase organique et n'y est pas transféré), l'expression de D sera :

$$D = \frac{[SH]}{[SH] + [S^-]}$$

Donc le paramètre D dépend des conditions expérimentales, c'est à dire de la réactivité du soluté dans les deux phases (réactivité que l'on peut contrôler en modifiant les caractéristiques physicochimiques des phases), mais si cette réactivité est absente les paramètres D et K_D sont identiques.

Dans la suite du cours on considèrera uniquement la situation où $K_D = D$

D'après l'expression de K_d , on voit que plus sa valeur est élevée plus le soluté est quantitativement extrait/capté/récupéré dans la phase organique (supérieure, extractante).

Une expression plus utile pour exprimer l'efficacité de l'extraction par le solvant est le **taux d'extraction E** défini comme suit :

$E = \frac{C_{org}V_{org}}{C_{org}V_{org} + C_{aq}V_{aq}}$ où $C_{org} = [S]_{org}$, $C_{aq} = [S]_{aq}$ et V_{org} et V_{aq} sont les volumes respectifs de la phase organique et aqueuse

Après division par C_oV_o et utilisant la définition de K_D on obtient

$E = \frac{K_D V}{1 + K_D V}$ où $V = V_{aq}/V_{org}$ le rapport des volumes de phase organique et phase aqueuse.

Pour une extraction en une seule étape, K_D doit être grand, c.à.d ≥ 10 , pour une récupération quantitative ($\geq 99\%$) du soluté dans la phase organique. Ceci est la conséquence du rapport des phases V , qui doit être maintenu dans un intervalle pratique de $0,1 < V < 10$.

B-EXTRACTION (SUITE)

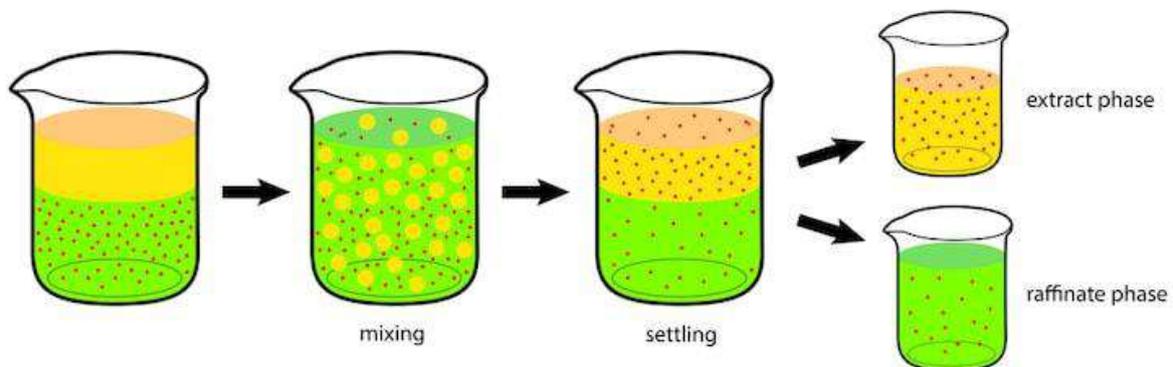
B-1- Extraction par le solvant

B-1-1- Extraction Liquide/Liquide (ELL)

B-1-1-a Extraction simple/unitaire

Rappel :

Lors d'une opération d'extraction par le solvant de type ELL, un soluté présent dans une phase liquide de départ (**phase extraite**) est mis en présence d'une deuxième phase liquide (**phase extractante**), non miscible à la première. Les deux phases sont énergiquement mélangées (formation de micelles), pour permettre un échange (une redistribution ou répartition) du soluté entre les deux phases puis le système est laissé retourner à l'équilibre (reformation de deux phases séparées). A la fin de l'opération, la phase extractante (généralement organique) enrichi en soluté est récupérée et éventuellement concentrée par évaporation.



shutterstock.com • 510367069

A l'équilibre le soluté se trouve reparti (distribué) entre les deux phases conformément à son coefficient de partage $K_d = ([S]_{sup}/[S]_{inf})$ ou sup et inf désignent, respectivement, la phase supérieure (généralement organique, notée **o**) et la phase inférieure (généralement aqueuse, notée **a**).

A une température donnée, K_d est indépendant de la quantité totale de soluté en présence, et quelle que soit cette quantité elle se répartira toujours dans les mêmes proportions (pourcentages) entre les deux phases.

La **fraction** de soluté **extraite** par le solvant (**sup** ou **o**)

$$E = \frac{\text{quantité totale de soluté extraite dans la phase organique}}{\text{quantité totale de soluté dans les deux phases}}$$

$$E = \frac{C_o V_o}{C_o V_o + C_a V_a} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_d} \cdot \frac{V_a}{V_o}}$$

(Le **taux d'extraction** = $E \times 100$)

De la même façon la **fraction** de soluté **restante** dans la phase aqueuse après extraction est

$$E' = \frac{C_a V_a}{C_o V_o + C_a V_a} = \frac{1}{1 + K_d \cdot \frac{V_o}{V_a}}$$

Plus le K_d et /ou V_o sont élevés, plus l'extraction est efficace. Cependant, si le K_d est faible il serait nécessaire d'augmenter V_o pour avoir une extraction satisfaisante, action qui présente un certain nombre d'inconvénients (manipulation peu pratique de grands volumes de solvant organique, aussi bien lors de son utilisation que lors de son recyclage, coût économique et environnemental, sécurité...).

Une autre alternative pour améliorer le taux d'extraction d'un soluté de faible K_d est la réalisation de plusieurs extractions successives, à partir de la même phase de départ (phase aqueuse), par des petites portions de phase extractante (phase organique) ; Les portions de phase organique utilisées sont ensuite réunies pour utilisation ultérieure : c'est **l'extraction multiple discontinue**.

B-1-1-b- Extraction multiple

Le processus d'extraction multiple se déroule comme suit :

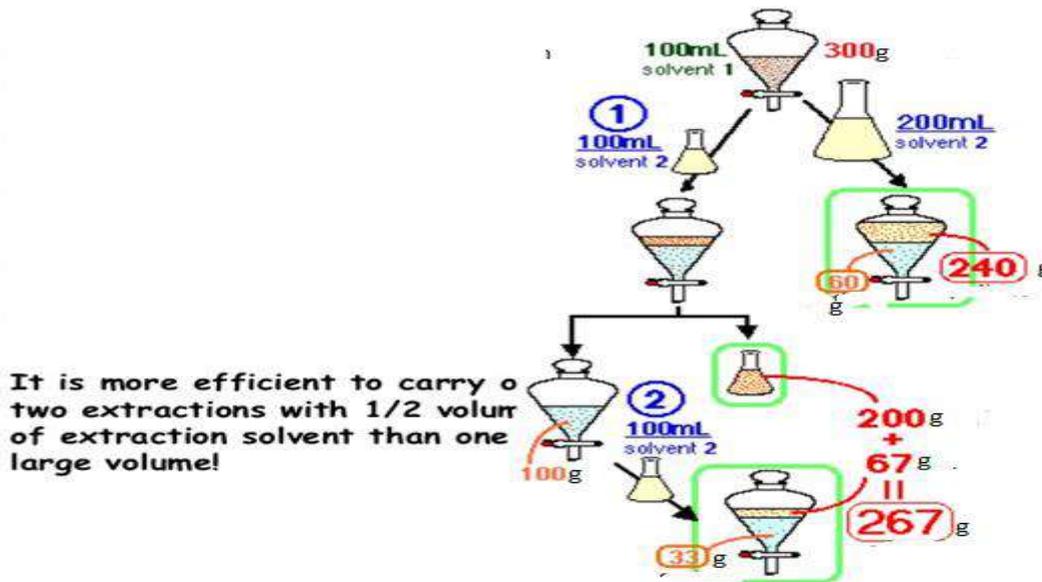
Considérons un soluté X de coefficient de partage $K_d = 2$, et présent à raison de $Q_t = 300$ g dans 100ml de phase aqueuse (inférieure), à extraire en une seule opération par 100 ml de phase organique (supérieure)

Après mélange des phases et atteinte de l'équilibre le soluté se répartit entre les deux phases à raison de (Q_a g) dans la phase aqueuse et $Q_o = Q_t - Q_a$

$$K_d = 2 = \frac{\frac{Q_t - Q_a}{V_o}}{\frac{Q_a}{V_a}} = \frac{300 - Q_a}{\frac{100}{Q_a}} \quad \text{on déduit } Q_a = 100 \text{ g et } Q_o = 200 \text{ g}$$

Si $V_a=100$ ml et $V_o= 200$ ml, on peut calculer $Q_a=60$ g et $Q_o= 240$ g (V_o augmente, Q_o augmente).

Maintenant, si au lieu d'utiliser $V_o =200$ ml en une seule fois nous la partageons en deux portions de 100 ml chacune , et réalisons deux extractions successives selon le schéma ci-après, la quantité totale de soluté extraite après les deux opérations se trouve augmentée (267g au lieu de 240g) :



Donc l'augmentation du nombre d'extractions permet d'augmenter le taux d'extraction , tout en utilisant moins de solvant.

Dans le **cas général**, considérons Q_t grammes d'un soluté, présente initialement dans V_a ml de solvant aqueux, à extraire par des portions successives et égales (pour simplifier) V_o de solvant organique, nous avons :

$$K_d = C_o/C_a ; Q_t = Q_a + Q_o ; Q_a = C_a V_a ; Q_o = C_o V_o$$

Après le premier équilibre (la première extraction)

La fraction ,notée E' , de soluté restante dans la phase aqueuse :

$$E' = \frac{Q_{a1}}{Q_t} = \frac{C_{a1} V_a}{C_{a1} V_a + C_{o1} V_o} = \frac{V_a}{V_a + V_o \frac{C_{o1}}{C_{a1}}} = \frac{V_a}{V_a + K_d V_o}$$

$$\text{Et } Q_{a,1} = Q_t \left(\frac{V_a}{V_a + K_d V_o} \right)$$

La deuxième extraction est identique à la première, sauf que Q_t , qui est la quantité initiale de soluté, est remplacée par $Q_{a,1}$, la quantité restante dans la phase aqueuse après la première extraction ; Alors, par analogie (en répétant le même raisonnement que précédemment) on a :

$$Q_{a,2} = Q_{a,1} \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right) = Q_t \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right)^2$$

De la même façon, après **n extraction** :

$$Q_{a,n} = Q_t \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right)^n, \quad Q_t \text{ étant la quantité initiale de soluté en présence,}$$

$$Q_t = Q_{a,n} + \sum_{i=1}^n Q_{o,i}$$

$$\sum_{i=1}^n Q_{o,i} = Q_{o,1} + Q_{o,2} + Q_{o,3} + \dots + Q_{o,n}$$

La quantité de soluté extraite par le solvant organique après **n** extractions est

$$\sum_{i=1}^n Q_{o,i} = Q_t - Q_{a,n} = Q_t - Q_t \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right)^n = Q_t \left(1 - \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right)^n \right) \quad \text{et la fraction}$$

de soluté extraite est :

$$E = \left(1 - \left(\frac{V_a}{V_a + K_d \cdot V_o} \right)^n \right)$$

Plus le nombre d'extraction augmente plus la quantité (ou la fraction) de soluté extraite augmente (de façon exponentielle) ; Normalement, quelques cinq extractions doivent être suffisantes, sinon il faudrait utiliser un solvant plus favorable (permettant un K_d supérieur).

B-1-1-c- Pratique de la LLE

La sélectivité et l'efficacité de la LLE est fortement influencée par le choix des deux phases non miscibles. Le solvant organique (extracteur) doit répondre à certains critères, tels que :

- faible solubilité dans la phase aqueuse (typiquement < 10%)
- Volatilité élevée afin de faciliter son évaporation et la concentration de l'échantillon

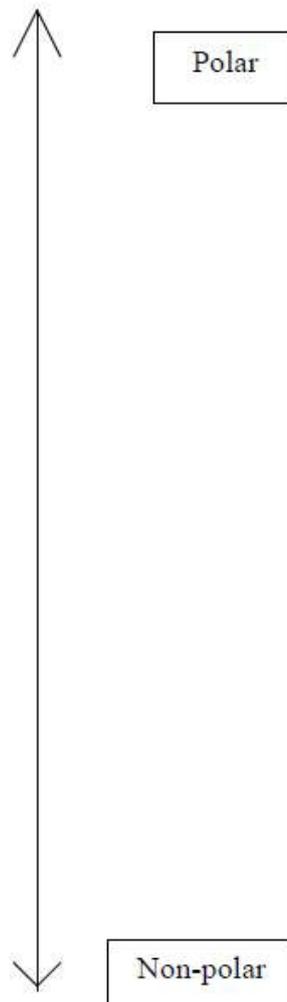
-haut degre de pureté (pour eviter la concentration des impuretés lors de l'évaporation)

-Compatibilité avec les techniques d'analyses prévues (en particulier les méthodes de detection)

-Polarité relative et capacité de former des liaisons Hydrogene, ce qui permet une meilleur extraction (augmentation du Kd)

D'autre part, le kd peut être influencé par d'autres facteurs affectant la reactivité du soluté d'interet dans l'une ou l'autre des deux phases (rappelez vous le taux de distribution D), tels que le pH, la complexation, la formation de paires d'ions....

Water
Acetic Acid
Ethyleneglycol
Methanol
Ethanol
Isopropanol
Pyridine
Acetonitrile
Nitromethane
Diehylamine
Aniline
Dimethylsulfoxide
Ethylacetate
Dioxane
Acetone
Dicholoroethane
Tetrahydrofuran
Dicholoromethane
Chloroform
Diethylether
Benzene
Toluene
Xylene
Carbontetrachloride
Cyclohexane
Petroleum ether
Hexane
Pentane



Deux approches distinctes sont possible pour une LLE, le mode **dicontinu**, durant lequel un equilibre est atteint entre les deux phases, et le **mode continu** durant lequel l'équilibre pourrait ne pas être atteint.

La **LLE discontinue** est celle réalisée dans une **fiolle à decanter** (voir plus haut) ; En fonction du K_d (normalement suffisamment grand), l'extraction est **unitaire** ou alors **multiple**.

Dans certain cas la cinétique de distribution du soluté entre les deux phases est lente (K_d faible) et le choix d'une **LLE continue** s'impose ; Dans ce cas deux dispositifs differents sont utilisables selon que le **solvant extracteur** (normalement organique) est plus dense ou moins dense que la phase à extraire.

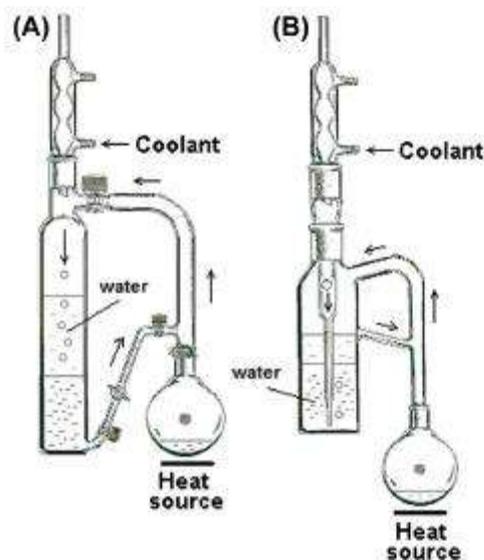


FIGURE 6.1.6 Two continuous liquid-liquid extractors, 10035 one for a solvent heavier than water (A) and the other for a solvent lighter than water (B).

Cette approche est utilisée pour extraire de larges volumes de phase aqueuse. Dans ce cas du solvant organique frais est chauffer à ebullition, condensé puis forcer à percoler de façon repetitive à travers la colonne de phase aqueuse contenant le soluté. Le processus dure normalement plusieurs heures (6 à 24h) et permet des concentration appreciables de l'échantillon en soluté, après quoi le ballon a solvant et recuperé et le solvant évaporé.

B-1-2- Extraction Solide/Liquide (SLE)

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'homogenisation d'un échantillon solide en présence d'une phase liquide constitue une operation

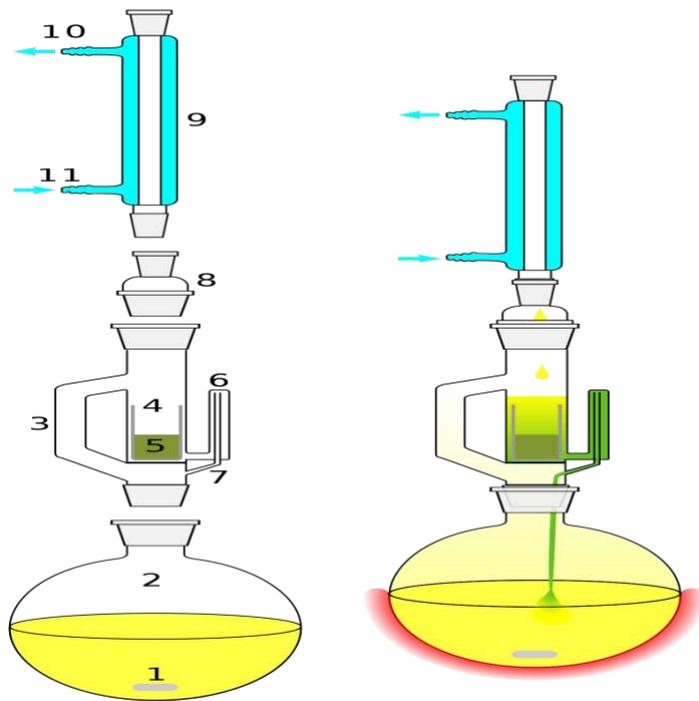
d'extraction solide liquide, la phase liquide pouvant être aqueuse ou organique ; Dans ce cas aussi les deux phases (solide et liquide) ne sont pas miscibles et les solutés se répartissent (partitionnent/ se distribuent) entre les deux phases conformément à leur coefficient de partage K_d ; la théorie du partage demeure la même que dans la LLE.

La SLE peut aussi être réalisée en mode **unitaire** ou **multiple**, de façon **discontinue** ou **continue**.

L'homogénéisation en présence d'une phase liquide constitue un exemple classique de **SLE discontinue (unitaire ou multiple)**, nous nous contenterons de considérer l'exemple comme acquis.

La SLE continue est souvent utilisée pour extraire les **solutés thermostables** à partir de divers échantillon solides à l'aide d'un dispositif appelé SOXHLET.

Lors de d'un SLE dans un soxhlet (voir schéma ci après), un échantillon solide finement divisé est placé dans une cartouche filtrante (numéro 4). Un dispositif ingénieux permet l'évaporation (ballon 1) puis la condensation (3 et 9) du solvant extracteur (faible point d'ébullition) qui est ensuite amené à percoler (de façon répétitive) à travers l'échantillon (4) en emportant le soluté avec lui avant de revenir (6 et 7) dans le ballon (1) à solvant. Plusieurs cycles d'évaporation/ condensation/ extraction sont réalisés sur une durée de 6 à 24h (voir vidéo).



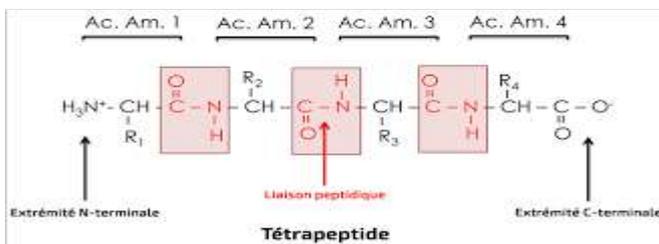
Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet : 1 Agitateur magnétique 2 Ballon à col rodé 3 Retour de distillation (tube d'adduction) 4 Corps en verre 5 Filtre 6 Haut du siphon 7 Sortie du siphon 8 Adaptateur d'expansion 9 Condenseur 10 Sortie de l'eau de refroidissement 11 Entrée de l'eau de refroidissement

D-PRECIPITATION DES PROTEINES

D1-Les proteines

Les protéines sont des macromolécules biologiques. Ce sont des molécules organiques les plus abondantes dans les cellules, elles en constituent souvent plus de 50% du poids sec. Elles jouent un rôle primordial dans la structure et la fonction cellulaire et constituent le mode d'expression majeur de l'information génétique portée par l'ADN (acide désoxyribonucléique).

Les Protéines sont des biopolymères, molécules formées par la condensations (par liaison covalente = liaison amide= liaison peptidique) en nombre et nature variable d'une vingtaine d'acides aminés de la série L ; Cette condensation est « programmée » par l'information codée dans l'ADN (gène) et produit une chaîne polypeptidique dont la séquence (nombre, nature et ordre d'enchaînement) d'acides aminés est spécifique (structure primaire) et répond à la règle fondamentale de la biologie moléculaire : un gène /une chaîne polypeptidique.



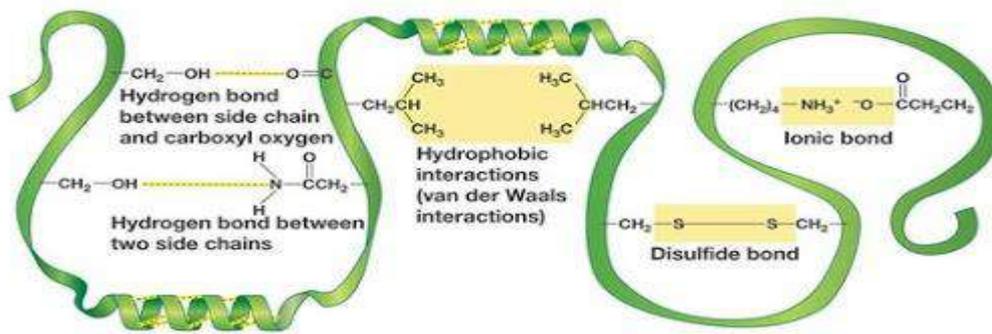
Une protéine peut être constituée par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes. Dans tous les cas, la ou les chaînes polypeptidiques, caractérisées chacune par sa structure primaire, ne sont pas stables en solution aqueuse (milieu naturel des protéines) dans leur état d'extension maximale, ce qui provoque leur repliement ou réorganisation spatiale en vue d'atteindre un état thermodynamique stable (d'énergie minimale), correspondant le plus souvent à leur état, ou conformation, dite native et fonctionnelle.

Le processus de repliement des chaînes polypeptidiques, comme leur éventuelle association, est un processus hiérarchisé qui obéit à un déterminisme double : génétique (la structure primaire) et physicochimique (interactions avec le milieu environnant).

Ainsi, une chaîne polypeptidique, en fonction de sa structure primaire (définie par le gène correspondant), des contraintes (physiques) aux rotations imposées par la liaison peptidique et par l'existence de possibilités (chimiques) de formation de ponts (liaisons) hydrogène entre les substituants des liaisons peptidiques voisines, cette chaîne polypeptidique adopte une réorganisation spatiale « locale » en hélice α ou en feuillet β , appelée structure secondaire. Une chaîne polypeptidique peut comporter une ou plusieurs structures secondaires du même type ou de différents types ; Ces structures secondaires peuvent se réorganiser en structures tertiaires grâce à l'interaction (liaison H, Van der Waals, ioniques...) entre différentes parties de la chaîne polypeptidique.

Plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes, ayant acquis une structure tertiaire, peuvent s'associer en une protéine multi (ou oligo)mérique caractérisée par sa structure quaternaire.

Une protéine est normalement active avec le niveau structural tertiaire ou quaternaire.

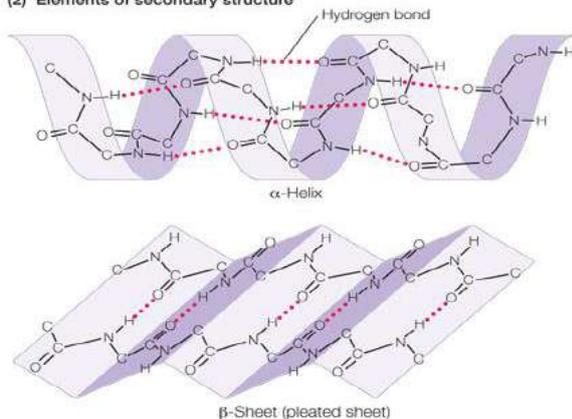


A noter que le seul type de liaison covalente participant à la stabilisation de la structure tridimensionnelle (3D) des protéines est le **pont (liaison) disulfure**, ce dernier est normalement spécifié dans ce qu'on appelle la **structure covalente** d'une chaîne polypeptidique, à la différence de la **structure primaire** qui ne tient compte que des liaisons peptidiques. La structure 3D des protéines, ou **conformation native** (fonctionnelle), est donc essentiellement stabilisée par des interactions (électrostatiques) faibles **intramoléculaires**, identiques à celles existantes entre molécules d'un état condensé de la matière.

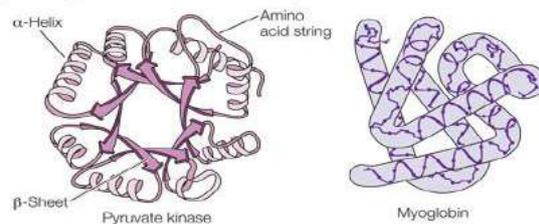
(1) Primary structure



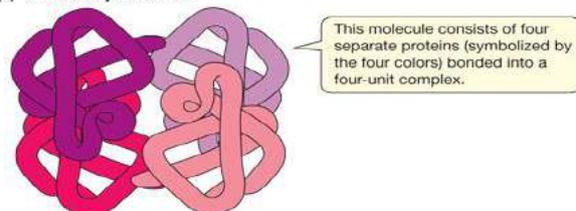
(2) Elements of secondary structure



(3) Tertiary structure drawn in two ways



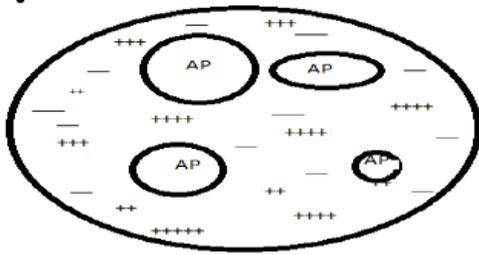
(4) Quaternary structure



This molecule consists of four separate proteins (symbolized by the four colors) bonded into a four-unit complex.

Lors du processus de repliement d'une protéine en milieu aqueux, l'interaction des chaînes latérales des résidus aminoacyles constitutifs entre eux et avec les molécules d'eau, fait que la majorité des chaînes latérales hydrophobes se trouvent confinées à l'intérieur du globule protéique, en l'absence de molécules d'eau et en interaction entre elles par des forces de LONDON (Van Der Waals), alors que les chaînes latérales hydrophiles se trouvent rejetés (en majorité) à la surface du globule protéique au contact des molécules d'eau et autre co-solutés polaires. Certaines contraintes (physiques) stériques compliquent cependant cette situation idéale, si bien que la surface du globule protéique obtenu se présente en réalité sous forme d'une mosaïque constituée de pages

polaires(hydrophiles) et de plages apolaires (hydrophobes) ; L'abondance relative de ces plages polaires et apolaires dépend de la localisation cellulaire de la protéine et de sa fonction.



La structure « électrique » de la surface protéique, i.e la nature des chaînes latérales des résidus aminoacyl de surface, conditionne en grande partie la charge électrique nette de la protéine et sa polarité et par conséquent sa solubilité dans son milieu environnant aqueux et sa fonctionnalité

D-2-SOLUBILITE DES PROTEINES

La solubilité des protéines dépend de la taille de la protéine et de sa structure , de sa polarité et des paramètres physicochimiques du solvant. La solubilité d'une protéine peut donc être modulée en modifiant les propriétés électriques de la protéine par modification des paramètres physicochimiques du solvant.

Si l'on se limite à un solvant aqueux, la solubilité d'une protéine sera fonction de :

- interactions polaires avec le solvant aqueux
- interactions ioniques avec les ions (sels) en solution
- interactions électrostatiques (attractives et répulsives) entre molécules de protéines

Toutes ces interactions vont dépendre de la température (agitation thermique dispersive),le pH du milieu (ionisation des groupement acidobasique sur la protéine), de sa force ionique (sels) et de sa constante diélectrique (pouvoir de d'amortissement des forces attractives entre charges de signes opposés).

La maîtrise, la compréhension et la modulation de la solubilité d'une protéine peut servir plusieurs objectifs :

- biochimiques : formulation de médicaments à base de protéines hautement concentrées
- médicaux : compréhension (pour éventuelle modulation) de la pathogénicité de certaines maladies telles que l'Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob ou Parkinson
- biotechnologiques : la production et purification de protéines recombinantes
- analytiques : préparation d'échantillon biologiques déprotéinisés lors de la purification et/ou le dosage d'autres molécules (acides nucléiques , métabolites.....).

Dans les deux premiers cas , c'est l'augmentation de la solubilité qui est recherchée alors que dans les deux derniers cas c'est la diminution de la solubilité ,donc la précipitation, qui est recherchée.

D-3-PRECIPITATION DES PROTEINES

Comme indiqué plus haut, la précipitation des protéines peut avoir deux objectifs opposés : éliminer les protéines d'un échantillon ou alors récupérer les protéines et éliminer le reste des composants de la matrice.

Dans le premier cas, les protéines sont traitées par des conditions physicochimiques extrêmes, qui provoquent une perte irréversible de la structure tridimensionnelle (native et active) de la protéine, c'est la dénaturation des protéines, ce qui permet d'obtenir un agrégat solide (un précipitât) de protéine (sous forme de ce qu'on appelle pelote statistique) inactive ; Le précipitât est ensuite éliminé (écarté) par centrifugation ou filtration.

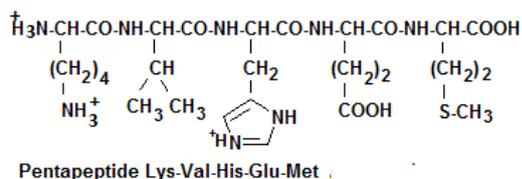
Dans le deuxième cas, l'objectif pourrait être d'obtenir des protéines inactives pour, entre d'autres objectifs, quantifier (doser) les protéines totales dans un échantillon, pour déterminer leur structure primaire ou leur poids moléculaire ; Ces déterminations ne nécessitent pas d'avoir une protéine biologiquement active et peuvent être effectuées après un traitement drastique (dénaturant) des dites protéines. Cela n'est pas le cas si le but de la précipitation est d'avoir une protéine active, et le procédé utilisé pour précipiter la protéine doit être réversible, c'est-à-dire que la protéine précipitée doit garder sa structure 3D native ou du moins que sa dénaturation partielle soit réversible (renaturation) moyennant une modification des conditions du milieu.

Remarque : Dans tous les cas la précipitation d'une protéine à partir d'une solution, tout comme l'extraction par le solvant ou en phase solide, correspond à une opération de transfert d'un soluté (dans ce cas une protéine) à partir d'une phase initiale liquide vers une phase non miscible, dans ce cas solide (= précipitât), avec la particularité que à la différence de l'extraction par le solvant ou la SPE, la phase solide réceptrice (le précipitât) est, au départ, virtuelle est apparaît au fur et à mesure de l'opération.

3-1-Précipitation isoélectrique des protéines

Les protéines sont des polyacides amphotères, les chaînes latérales des résidus aminoacyles ionisables (Glu, Asp, Lys, Arg, His) contribuent aux caractères acidobasiques de la protéine et à sa charge électrique nette à un pH expérimental donné ; Ces paramètres déterminent la solubilité de la protéine en fonction du pH.

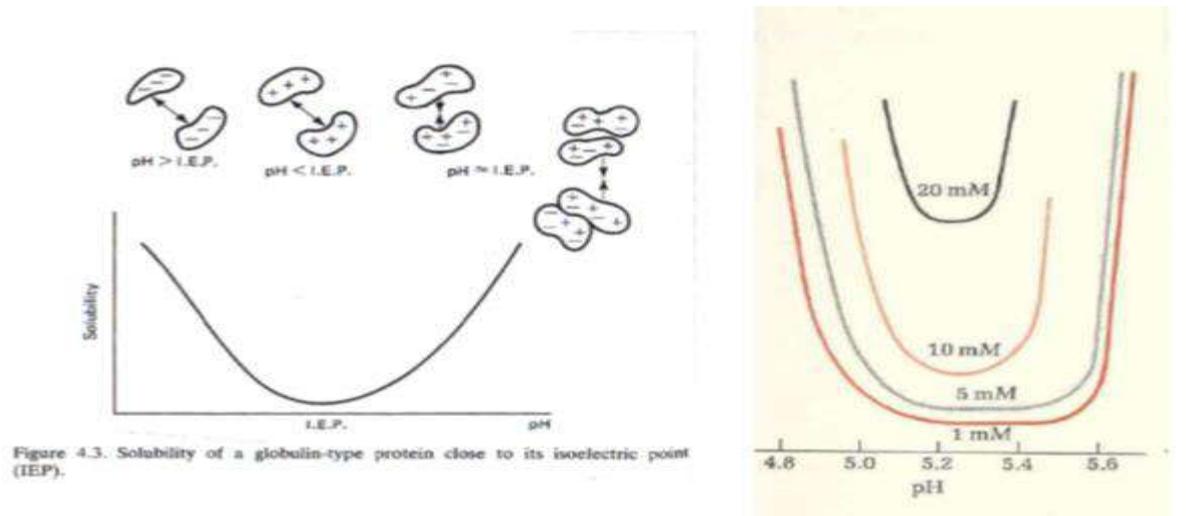
Exemple : Si on considère un peptide comme exemple de polyacide



A pH acide les bases faibles NH₂ sont protonisées en NH₃ et les acides faibles COOH sont aussi protonisés. Au fur et à mesure que le pH augmente ces groupements libèrent leur proton ; Donc au départ le peptide est sous forme P³⁺

$P^{3+} \leftrightarrow P^{2+} \leftrightarrow P^{1+} \leftrightarrow P^0 \leftrightarrow P^{1-}$ les peptides P^{2+} , P^{1+} , P^0 et P^{1-} sont amphotères et peuvent se comporter en acide ou en base.

Le profil de solubilité en fonction du pH varie en fonction de la protéine et se présente généralement comme suit :



Comme signalé plus haut, une protéine possède plusieurs groupements ionisables qui, en fonction de leur pK respectifs et du pH du milieu, seront porteurs de charges électriques positives ou négatives ; Pour chaque protéine, il existe une valeur du pH expérimental pour laquelle la protéine est porteuse d'autant de charges positives que négatives, c'est le **pH isoélectrique** de la protéine (pI ou pHi). En deçà du pHi (gauche du schéma) la majorité de ces groupements est protonisée (captent un proton) et seront de charge neutre ou positive et la protéine est globalement de charge positive. Au-delà du pHi la majorité des groupements est déprotonisée (libération de proton) et ces groupements seront électriquement neutres ou porteur d'une charge négative, la protéine sera globalement chargée négativement.

La variation de la solubilité en fonction du pH expérimental reflète donc la prépondérance, de part et d'autre du pHi , des forces de répulsions électrostatiques entre molécules de protéines de charge électrique de même signe, ce qui augmente la solubilité ; Ces interactions répulsives sont minimales au niveau du pHi et la solubilité diminue. Ce phénomène est appelé précipitation isoélectrique et permet, à priori, de purifier une protéine en amenant le pH expérimental au pHi de la protéine, cependant, dans un mélange de protéines, des interactions hétérogènes perturbent la spécificité de la précipitation et des agrégats hétérogènes de protéines sont formés par précipitation

(Rem. Struct.I, 3D, charg.elec)

La précipitation isoélectrique peut être améliorée par ajout modéré de sels dans le milieu. (Schéma)

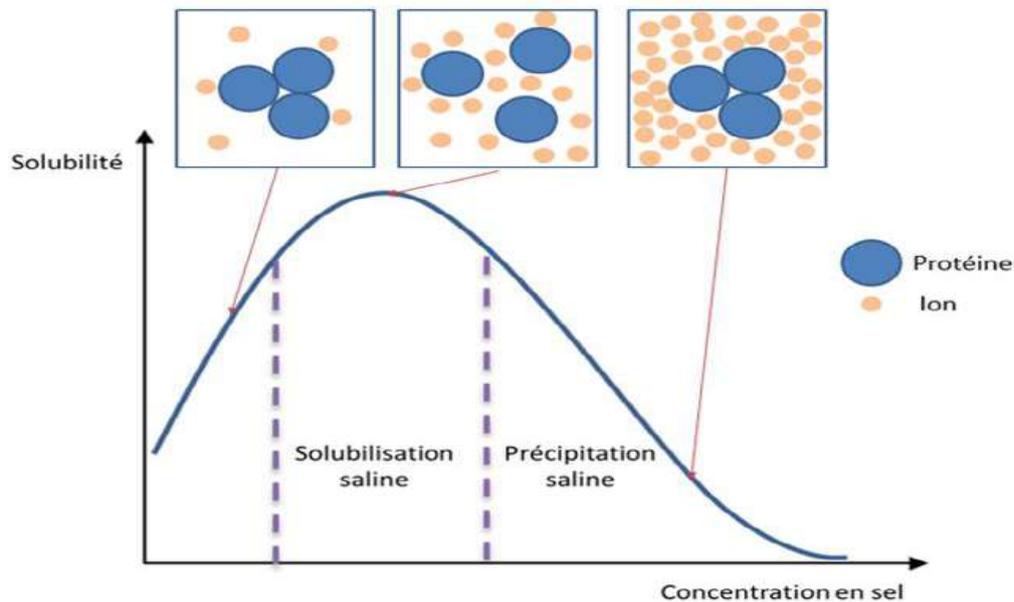
3-2-Précipitation par les sels

La solubilité d'une protéine en solution aqueuse dépend de la concentration en sels dissous, c'est-à-dire de la force ionique

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2$$

Où C_i représente la concentration de chaque ion i et Z_i^2 correspond à la charge électrique de l'ion i .

La solubilité des protéines varie en fonction de la nature des ions en solution, de leur concentration et de leur charge électrique ; En général le profil de solubilité se présente comme suit



a-Salting in

Dans l'intervalle de concentration en sels allant de 0 à 0,5 M, la solubilité de la protéine augmente avec la force ionique (concentration en sels) : c'est le Salting in (solubilisation) ; Dans ces conditions les ions salins (en quantité modérée) se lient avec les charges électriques de signe opposé sur la surface protéique, ce qui favorise l'hydratation (l'adsorption de molécules d'eau, formation d'une coque d'hydratation) de la protéine et diminue les interactions attractives entre molécules de protéines.

Signalons (voir schéma) que la solubilité de la protéine diminue à faibles concentrations en sels, cela se produit lorsque le milieu aqueux est dilué ou lorsque la solution protéique est dialysée contre un tampon hypotonique. Cela pourrait être intéressant pour précipiter notre protéine d'intérêt ou alors des protéines interférentes au cours d'un processus de purification.

b-Salting out ou relargage

L'augmentation excessive de la force ionique provoque une diminution de la solubilité et la précipitation des protéines ; Ce phénomène est appelé **salting out** ou **relargage** et consiste en fait en une **exclusion** des protéines de leur environnement aqueux.

C'est un procédé facile, peu coûteux et très utilisé, tout à fait au début des protocoles de purification des protéines ; Il permet non seulement l'élimination éventuelle d'interférents de toutes sortes (protéines et autres molécules) mais aussi d'éliminer l'excès de solvant et d'obtenir la protéine à l'état concentré.

Le salting out résulte lorsque les ions salins en excès séquestrent la majorité des molécules d'eau, privant ainsi la protéine de sa coque d'hydratation ; Cela conduit au démasquage des plages apolaires à la surface des molécules de protéines, plages qui vont avoir tendance à s'associer entre elles par des interactions hydrophobes (LONDON) conduisant à l'agglutination des protéines.

Le salting out est donc largement dépendant de la richesse de la surface protéique en plages Hydrophobes, richesse qui augmente généralement avec la taille de la protéine.

Le sel le plus utilisé pour le salting out des protéines est le sulfate d'ammonium, car il est un précipitant assez fort, très soluble dans l'eau, peu cher et ne dénature pas les protéines ; les protéines précipitées par le sulfate d'ammonium peuvent être re-solubilisées dans un tampon adéquat et retrouvent leur conformation native

3-3-Précipitation par les solvants organiques

L'addition d'un solvant organique miscible avec l'eau , comme l'éthanol ou l'acétone, diminue la solubilité des protéines ; Cela est dû à la diminution de la constante diélectrique du milieu et donc de son pouvoir de s'opposer au forces attractives(F) entre charges électriques de signes opposés portées par les molécules de protéines.

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q \cdot q'}{r^2}$$

Où ϵ est la constante diélectrique du milieu (elle est à 25°C de 78,5 pour H₂O, 24,3 pour l'éthanol, 33 pour le méthanol)

Par ailleurs la miscibilité du solvant organique avec l'eau est due à la formation d'interactions polaires entre les molécules de solvant organique (polaire) et molécules d'eau, ce qui conduit à un appauvrissement de la coque d'hydratation de la protéine d'où son exclusion/relargage du milieu aqueux, et donc sa précipitation.

Comme pour le relargage par les sels , la précipitation ou l'exclusion des protéines par ajout de solvant organique est d'autant plus facile que la taille de la protéine augmente

3-4-Precipitation par les polymers inertes

Les polymères hygroscopiques tels que le polyethylene glycol (PEG, HOCH₂(CH₂OCH₂)_nCH₂OH) sont des composés très hydrophiles , qui lorsqu'ils sont ajoutés à une solution protéique provoque l'exclusion et la précipitation des protéines par un mécanisme analogue à celui d'un excès de sels.

C- L'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)

L'extraction en phase solide (SPE) est une technique de préparation de l'échantillon, plus récente que la LLE, mais très populaire et de première importance pour isoler, enrichir ou éliminer un composé présent dans une matrice complexe.

Comme dans le cas de la LLE, la SPE consiste en un transfert plus ou moins sélectif d'un soluté, depuis une phase liquide ou gazeuse (**Extraction liquide/solide ou extraction gaz/solide**) vers une phase solide. Le transfert est une opération de distribution/partition du soluté entre deux phases non miscibles (une fluide et une solide) en fonction de l'affinité relative du soluté pour chacune des deux phases ; Cette distribution est gouvernée, comme pour la LLE, par une constante ou **coefficient de partage K_d**

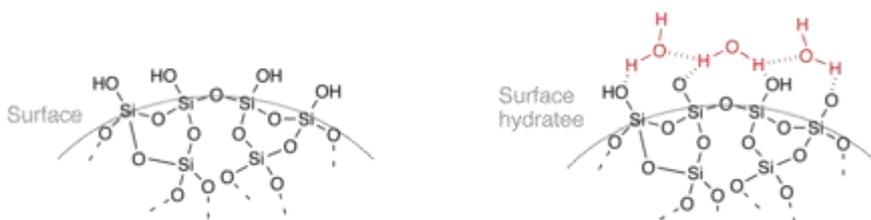
$K_d = [S]_s / [S]_f$ ou $[S]$ est la concentration de soluté à la surface de la phase solide (s) ou dans la phase fluide (f, liquide ou gaz).

L'affinité relative du soluté vis-à-vis des deux phases est déterminée par sa polarité relative, et par la nature et les capacités absorbantes de la phase solide ; Le soluté interagit avec la surface de la phase solide par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, interactions dipolaires, forces de London ou interactions ioniques.

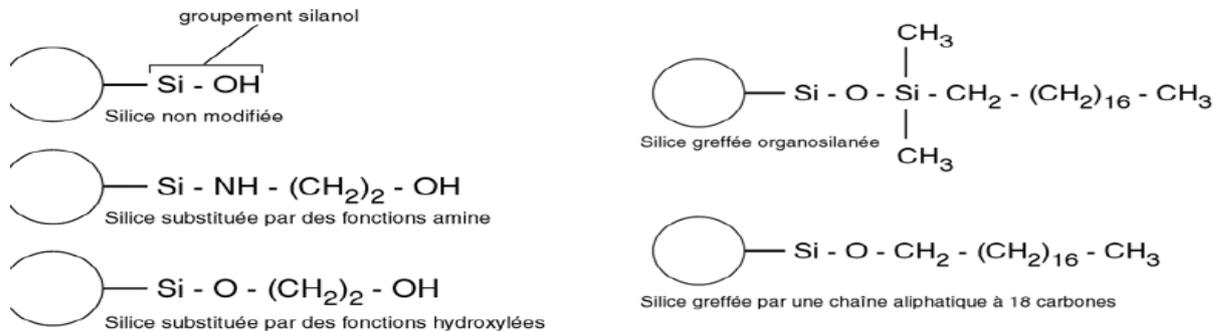
En général les phases solides (ou adsorbants) utilisés en SPE peuvent être groupés en trois classes :

- Les phases **normales**
- Les phases **inverses**
- Les phases **échangeuses d'ions**

La majorité des phases solides sont basées sur des particules de silice (particules de formes irrégulières et de diamètre allant de 30 à 60 micron) porteuses de groupements silanol ($-\text{Si}-\text{OH}$) à leur surface.



Ces groupements silanol peuvent être substitués (liés à, greffés par) d'autres groupements fonctionnels modifiant ainsi leurs propriétés absorbantes (de rétention) :



Remarque : en plus des adsorbants basés sur la silice , certains sont à base d'alumine (Al₂O₃) , florisil (oxyde de magnésium et silicium) ou autres polymères macro réticulés

La nature des groupements fonctionnels définissent la classification de la phase solide (voir quelques exemples dans le tableau ci-après) :

-Les adsorbants en **phase normale** : ont des groupes fonctionnels polaires de type cyano,amino, alcool (ou diol) ; Ces groupes retiendront/adsorberont les molécules polaires .

-Les adsorbants en **phase inverse** : ont des groupes fonctionnels apolaires de type octadécyl (C₁₈), octyl (C₈) et méthyl (CH₃) ; Ces groupes sont apolaires et retiendront les molécules apolaires.

-Les adsorbants **échangeurs d'ions** : ont des groupes fonctionnels porteurs d'une charge électrique nette (entière) positive ou négative de type acide sulfonique (SO₃⁻) ou ammonium (N⁺) ; Ces groupes retiendront les molécules ions de signe opposé.

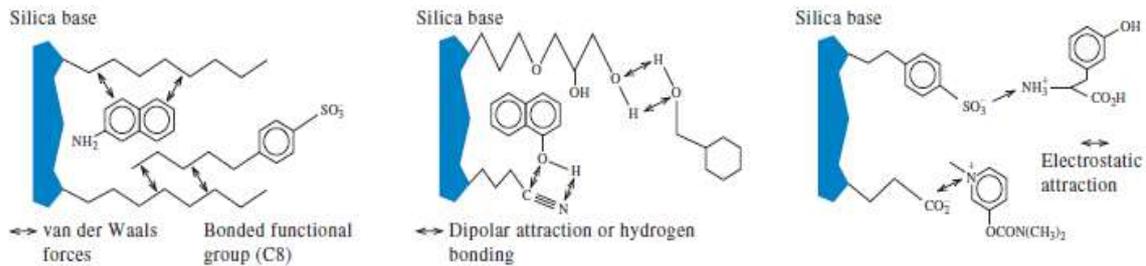


Fig. 18.4. Solid-phase extractants utilizing nonpolar, polar, and electrostatic interactions.
 (Adapted from N. Simpson, *Am. Lab.*, August, 1992, p. 37. Reproduced by permission of American Laboratory, Inc.)

Table 2. Typical SPE sorbents and interaction mechanisms

Sorbent	Polarity	Interaction mechanisms
Silica SiO ₂	Polar	Adsorption; H-bonding
Florisil, alumina MgSiO ₃ Al ₂ O ₃	Polar Polar	H-bonding H-bonding
Bonded phases (modified silica)		
-C ₁₈ H ₃₇ (C18 or ODS)	Nonpolar	Van der Waals interactions
-C ₈ H ₁₇ (C8 or octyl)	Nonpolar	Van der Waals interactions
-C ₆ H ₅ (phenyl)	Nonpolar	Van der Waals interactions and π-π interactions
-(CH ₂) ₃ CN (cyanopropyl)	Polar	Polar interactions; H-bonding
-(CH ₂) ₃ NH ₂ (aminopropyl)	Polar	H-bonding
-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ H	Ionic	Cation exchange
-(CH ₂) ₃ N(CH ₂) ₃ Cl	Ionic	Anion exchange

PRATIQUE DE LA SPE :

Un dispositif de SPE peut avoir différents formats, chacun avec ses avantages et avec ses limitations, en fonction du nombre d'échantillons à traiter, de la nature de l'échantillon et de son volume.

Le dispositif le plus courant est un **conteneur** (un barillet) en plastique (polypropylène) de type **seringue** (voir schéma ci-dessous) dans lequel le matériel adsorbant (la phase solide, 50mg à 10g) est tassé (empaqueté) sous forme d'une **cartouche** de quelques centimètres de hauteur, la taille de la seringue est choisie de façon à ce que un espace vide suffisant est laissé au-dessus du lit d'adsorbant, espace qui va recevoir l'échantillon liquide contenant le soluté ainsi que les différents solvants utilisés dans la suite des opérations.

D'autres dispositifs sont disponibles pour accommoder des échantillons de volumes variables, voir des micro volumes ou des échantillons gazeux (voir ci-après)

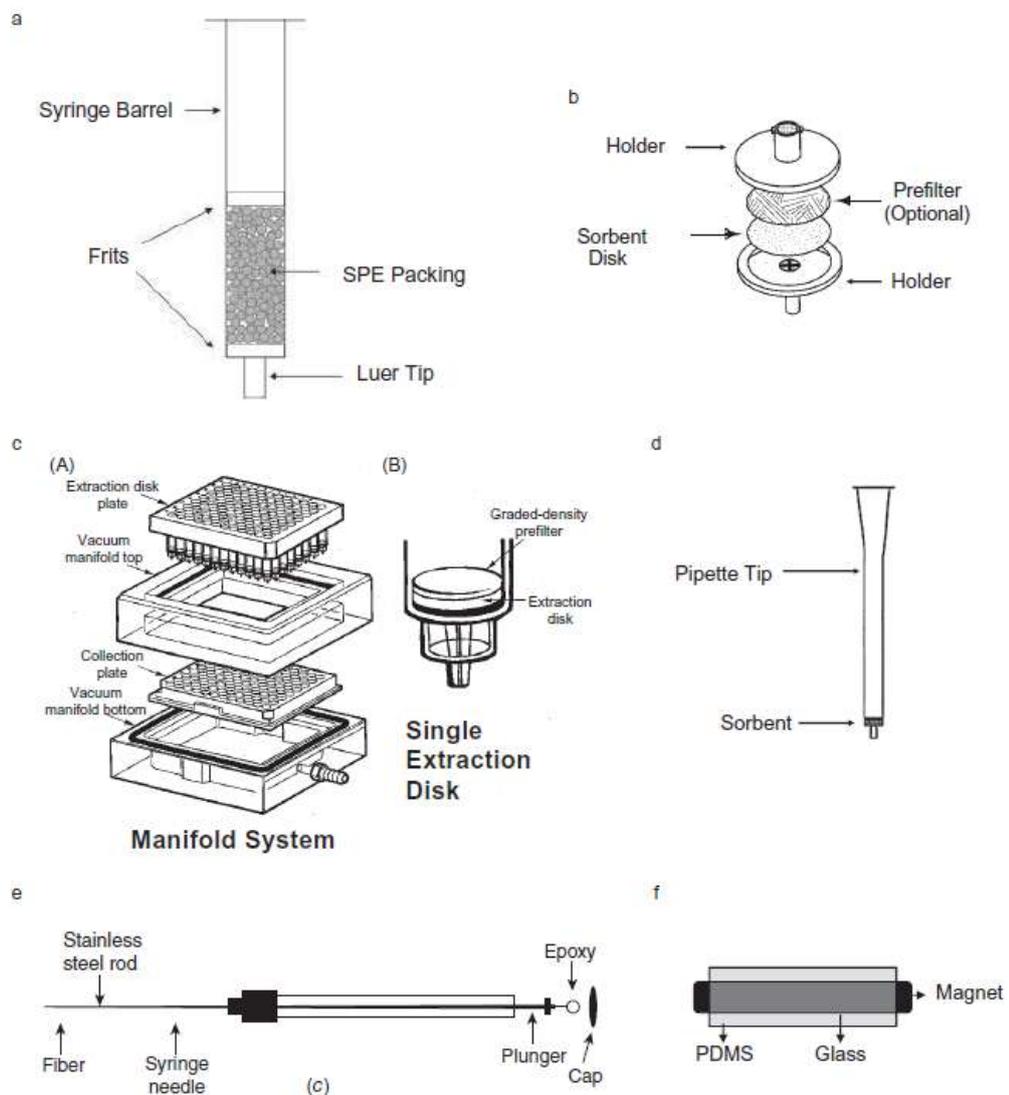


Figure 4.1. SPE devices. (a) Typical syringe barrel cartridge design. (b) Typical SPE disk configuration. (c) Schematic diagram of a 96-well SPE extraction plate system (3M Corp.). (d) SPE pipette tip. (e) SPME syringe assembly. (f) Coated stir bar.

Quel que soit le dispositif utilisé, l'échantillon liquide (et les différents solvants utilisés dans le protocole opératoire, *voir plus loin*) est forcé à percoler à travers le lit de phase solide par pression positive à l'aide d'un

piston ou alors par pression négative/succion grâce à une pompe à vide , les solutés, dont celui d'intérêt sont alors retenus par la phase solide , d'où ils pourront être détachés plus ou moins sélectivement (voir plus loin).

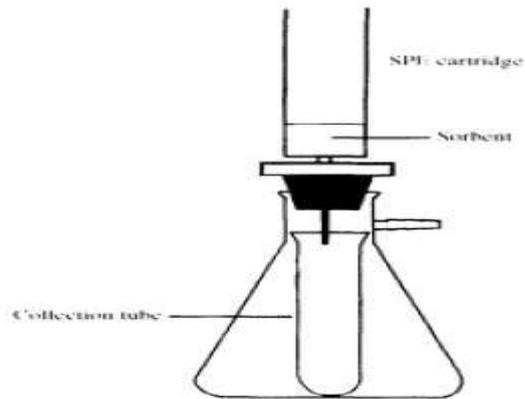


Figure 4.1
Solid phase extraction using a cartridge and a single side-arm flask apparatus

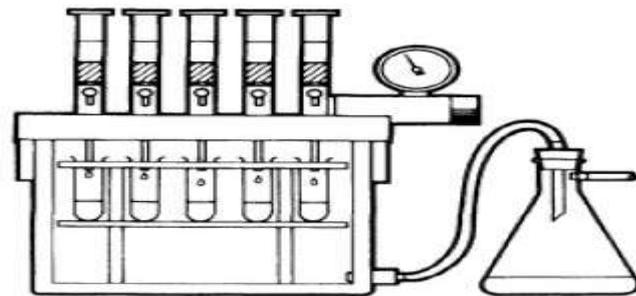


Figure 4.2
Vacuum manifold for solid phase extraction of multiple cartridges. Reproduced by permission of International Sorbent Technology Ltd

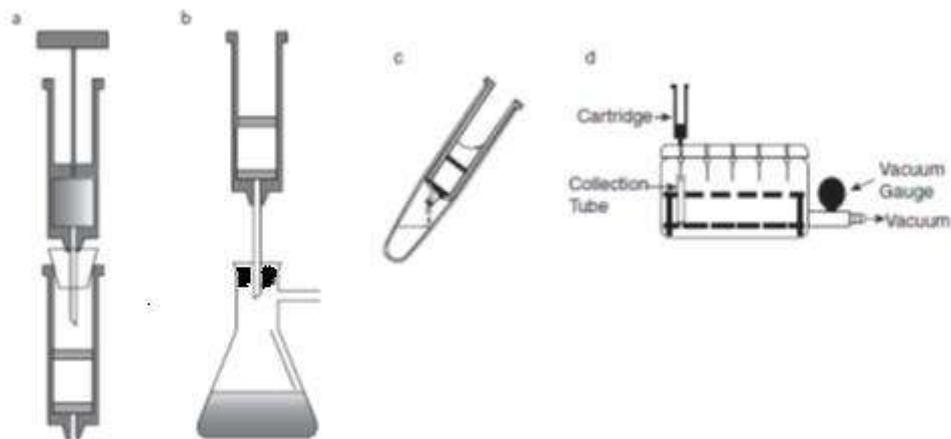


Figure 4.2. SPE apparatus: (a) pressurization, (b) vacuum, (c) centrifugation, and (d) vacuum manifold.

ETAPES D'UNE SPE

Indépendamment du format (cartouche, filtre, pipette..) et du type (phase normale, inverse ou échange d'ions) de SPE, il existe deux types de stratégies générales pour enrichir un échantillon en un composé d'intérêt :

-adsorber /retenir sur la phase solide les composés interférents alors que le soluté d'intérêt est non retenu et passe librement à travers le dispositif.

-adsorber/retenir le soluté d'intérêt sur la phase solide alors que les composés interférents ne sont pas retenus et passent librement à travers la phase solide.

La première stratégie est choisie lorsque le soluté d'intérêt est présent à forte concentration dans l'échantillon. Lorsque le soluté d'intérêt est présent à faible concentration, ou alors lorsque plusieurs solutés de polarités différentes sont à isoler c'est la seconde stratégie qui est privilégiée

Une fois la stratégie choisie, le mode opératoire comporte cinq étapes, que nous allons décrire pour la deuxième stratégie ; Chaque étape est caractérisée par la nature et le type de solvant utilisé qui, en retour, dépend des caractéristiques de la phase solide et celles de l'échantillon.

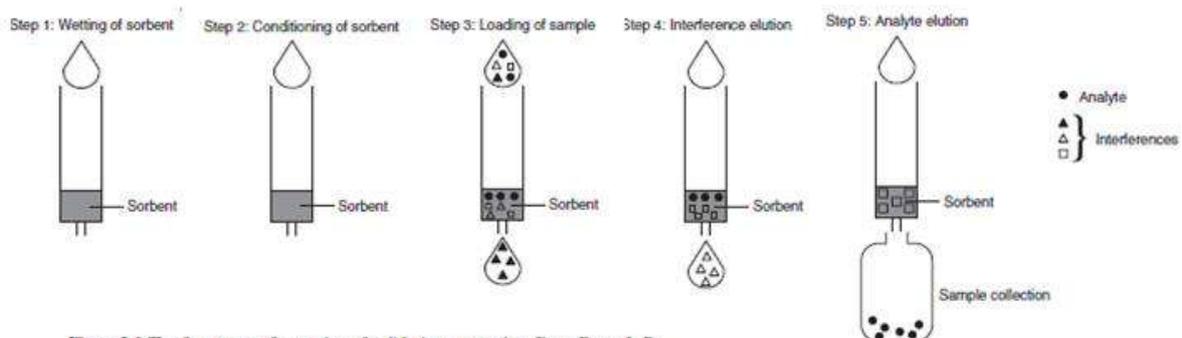


Figure 3.4 The five stages of operation of solid phase extraction. From Dean, J. R., *Extraction Methods for Environmental Analysis*, Copyright 1998. © John Wiley & Sons, Limited. Reproduced with permission.

Etape 1 : **Imbibition/solvatation** (*wetting*) de l'adsorbant, étape qui permet d'exposer les groupes fonctionnels à la surface de l'adsorbant et assurer un contact optimum avec l'échantillon, ainsi que l'élimination d'éventuelles bulles d'air qui pourraient être emprisonnées par la phase solide.

Etape 2 : **Conditionnement/équilibre** (*conditioning*) de l'adsorbant, étape durant laquelle un solvant ou un tampon (volume généralement 5 à 10 le volume de l'adsorbant), de composition similaire à la phase liquide à extraire, est percolé à travers l'adsorbant ; Cela permet de saturer la phase solide en

molécules de solvant et accélérer l'atteinte de l'équilibre de distribution des solutés entre les deux phases

Etape 3 : **Chargement /adsorption** (*loading*) de l'échantillon, étape au cours de laquelle l'échantillon (liquide) est forcé à percoler à travers la phase solide grâce à une pression positive par un piston ou alors par pression négative par succion à l'aide d'une pompe.

Remarque : Au cours de cette étape, et comme nous avons choisi d'illustrer la deuxième stratégie (voir plus haut), le soluté devrait être **sélectivement** retenu par l'adsorbant, **préférentiellement** à d'autres composant de la matrice ; cependant cette situation idéale est rarement réalisée car des molécules (interférents) de propriétés similaires à celles du soluté d'intérêt sont souvent présentes et peuvent aussi être retenues.

Etape 4 : **Lavage** (*washing*) des interférents en percolant à travers la phase solide, plusieurs volume d'un solvant /tampon (force supérieure à celle du solvant d'équilibration) capable de détacher/désorbéir et entraîner les interfèrent adsorbés à la phase solide mais sans affecter l'adsorption du soluté d'intérêt. Cette étape est fondamentale et sa réussite dépend de l'affinité relative (différentielle) du soluté d'intérêt et des molécules interférentes pour la phase solide et du choix du solvant/tampon de lavage.

Etape 5 : **Elution/désorption** du soluté d'intérêt, étape au cours de laquelle le soluté d'intérêt toujours adsorbé à la phase solide, est désorbé/détaché de la surface de celle-ci par un solvant/tampon adéquat, notamment de force supérieure à celle du solvant utilisé lors de l'étape de lavage ; Le volume de solvant utilisé pour l'élution doit être minimisé afin d'achever une meilleure concentration du soluté d'intérêt.

Choix du solvant

Le choix du solvant influence directement la rétention / adsorption du soluté par la phase solide et son élution subséquente, et c'est la polarité du solvant qui détermine sa force (c'est-à-dire sa capacité à éluer/désorber /détacher un soluté à partir de la phase solide dans un volume minimal). La force relative de certains solvants utilisés en SPE en phase normale ou phase inverse est donnée dans le tableau suivant :

Table 3.2 Solvent strengths for normal and reversed phase sorbents. From Dean, J. R., *Extraction Methods for Environmental Analysis*, Copyright 1998. © John Wiley & Sons, Limited. Reproduced with permission

Solvent strength for normal phase sorbents		Solvent strength for reversed phase sorbents
Weakest	Hexane	Strongest
	Iso-octane	
	Toluene	
	Chloroform	
	Dichloromethane	
	Tetrahydrofuran	
	Ethyl ether	
	Ethyl acetate	
	Acetone	
	Acetonitrile	
	Isopropyl alcohol	
Strongest	Methanol	
	Water	Weakest

Bien évidemment, cette classification correspond à une situation idéale car, en pratique, on a souvent recours à un mélange de solvant pour achever un enrichissement adéquat de l'échantillon en soluté d'intérêt.

En ce qui concerne la SPE par échange d'ions, la « force » du solvant, qui dans ce cas est un tampon aqueux, est en fait déterminée par son pH et/ou sa force ionique (concentration en ions) par rapport au pK du soluté d'intérêt (son état d'ionisation) est sa densité de charge (sa capacité à concurrencer avec les contre-ions du tampon vis-à-vis des groupes fonctionnels de la phase solide). Nous reviendrons sur cet aspect lors du cours sur la **chromatographie**.

Autres facteurs affectant la SPE

Le choix de l'adsorbant pour SPE dépend en premier lieu des caractéristiques du soluté d'intérêt, mais d'autres facteurs peuvent affecter les résultats de l'opération :

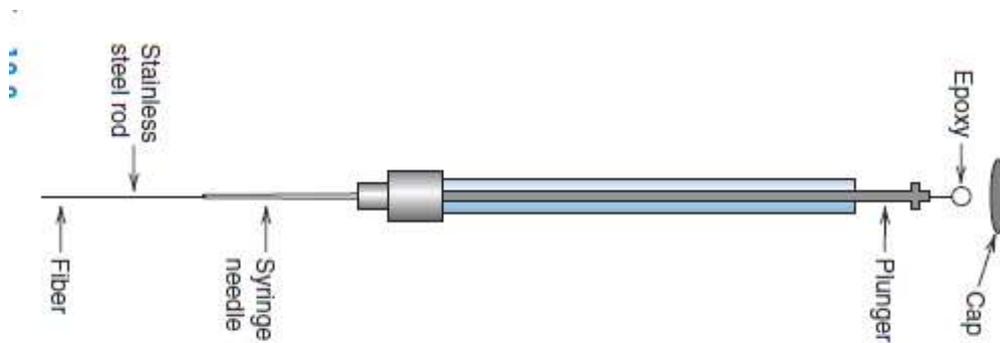
- Le nombre de sites actifs (groupes fonctionnels) doit être en excès, suffisant pour accepter toutes les molécules de soluté, sinon la phase solide est saturée. Il faut donc tester la capacité de l'adsorbant avant son utilisation.
- Le flux de l'échantillon liquide à travers la phase solide doit être ajusté afin d'optimiser le temps d'interaction entre les solutés et l'adsorbant. Des

flux de 3 à 10ml par minutes sont souvent utilisés avec des dispositifs en cartouche

- Le solvant d'élution (comme pour le solvant d'extraction en LLE) doit être compatible avec les techniques d'analyse ultérieure de l'échantillon.

La MICROEXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPME)

SPME est une technique de SPE qui n'utilise pas de solvant ; Elle typiquement utilisée pour collecter directement des soluté/analyte à partir d'une phase fluide(liquide ou gaz) pour être analysé instrumentalement par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou chromatographie liquide de haute performance (HPLC). La figure suivante illustre un dispositif pour SPME



Le composant principal de ce dispositif est une fibre d'extraction, protégée à l'intérieur d'une aiguille en acier inox attachée à une seringue. La fibre à SPME est constituée par une fibre de silice enveloppée/recouverte par une fine couche (7 à 100 micron d'épaisseur) d'un matériel adsorbant (phase solide). Dans un échantillon liquide ou dans « l'espace de tête » (head space, atmosphere entourant un échantillon liquide ou un organisme) les analytes sont exposés à la fibre adsorbante (pendant un temps suffisant) et se distribuent entre la matrice de l'échantillon et la fibre.

Après (équilibre) extraction la fibre est retranchée/retournée dans l'aiguille de la seringue puis :

-directement transférée pour injection dans un appareil de GC au niveau duquel l'analyte est désorbé par augmentation de température avant de continuer son chemin à travers le dispositif d'analyse ou alors

-La fibre est introduite dans un solvant adéquat qui permet de désorber l'analyte avant de le récupérer pour analyse HPLC ; Certains appareils pour HPLC sont

pourvu d'un compartiment special, integré à l'appareil, pour la desorption et l'injection automatique de l'échantillon liquide dans la suite du dispositif d'analyse.

La SPME est particulierement pratique pour l'échantillonnage ciblé, in vivo ou in situ pour le travail sur le terrain.

La SPME sera illustrée par des videos.

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

