

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Centre Universitaire Nour El-Bachir d'El-Bayadh*  
*Institut de Sciences*  
*Département de sciences de la Nature et de la Vie.*



# *Techniques d'extraction, purification et conservation*

**Préparé par Dr. Mehdi Yamina.**



**Année universitaire 2024-2025**

## **Préface**

Le cours, techniques d'extraction, purification et de conservation s'adresse aux étudiants de la 1<sup>ère</sup> année Master en spécialité de biochimie appliquée. Il se déroule en générale au deuxième semestre. L'objectif principal du module est de faire acquérir les connaissances, théoriques et pratiques, de base sur les techniques d'extraction, purification et de conservation des substances biologiques en vue de préserver leurs activités, ainsi de savoir les bonnes pratiques d'utilisation des solvants d'extraction au laboratoire ce qui permet apporter des compétences scientifiques et techniques spécifiques aux différents techniques entamées.

Ce document est le fruit des enseignements dispensés dans le cadre du module consacré aux technique d'extraction, purification et de conservation pour le niveau M01 en Biochimie Appliquée. Les cours sont présentés de manière simplifiée, accompagné de plusieurs exemples de techniques sous forme de schéma pour favoriser la compréhension de ce module. Le polycopié se compose de quatre chapitres, à savoir :

- **Chapitre I : Solvant chimiques**
- **Chapitre II : Techniques d'extraction**
- **Chapitre III : Techniques de purification**
- **Chapitre IV : Techniques de conservation**

## Chapitre

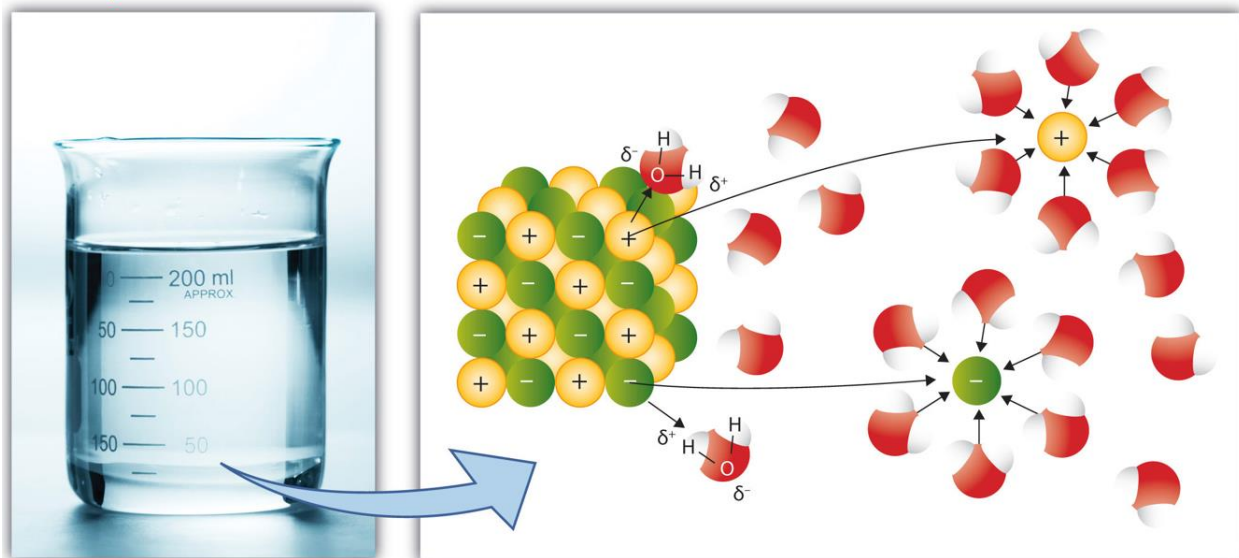
# Solvants chimiques

## 01

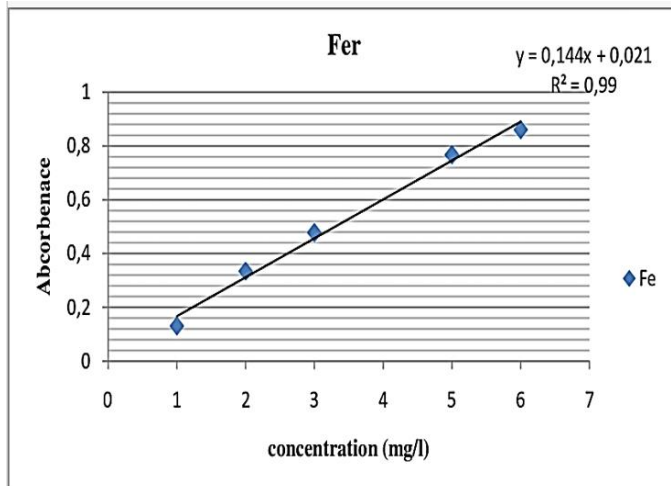
I.1. Définition.....	01
I.2. Classification des solvants.....	03
I.3. Effets sur la santé.....	23
I.4. Domaines d'utilisation des solvants.....	24
I.5. Propriétés physicochimiques des solvants .....	25

### I.1. Définition

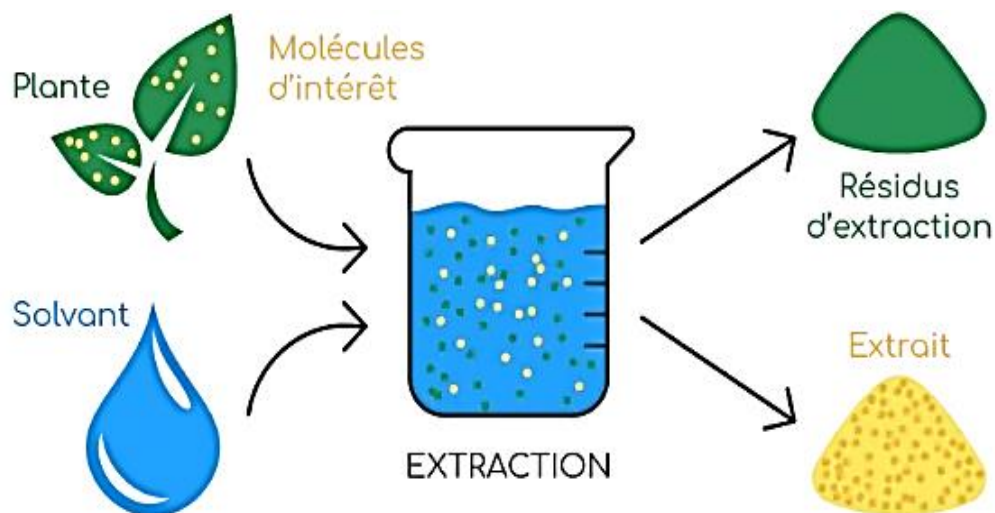
Un solvant est une substance, liquide à sa température d'utilisation, qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans lui-même se modifier.



**Schéma moléculaire de la dissolution du NaCl dans l'eau : le sel est le soluté, l'eau le solvant.**



**Courbe d'étalonnage du fer : plusieurs dilutions du fer dans un solvant acide**



### **Principe général de l'extraction végétale**

L'eau est le solvant le plus courant, la solution étant alors qualifiée de solution aqueuse. En outre, les solvants sont utilisés dans des secteurs très diversifiés tels que le dégraissage, les peintures, les encres, la détergence, la synthèse organique. Le terme « solvant organique » se réfère aux solvants qui sont des composés organiques qui contiennent des atomes de carbone.

### **Quelques caractéristiques des solvants organiques**

- Habituellement, les solvants ont un point de fusion faible et s'évaporent facilement.

- Les solvants permettent de dissoudre les réactifs et d'amener les réactifs en contact.
- Ils ne réagissent pas chimiquement avec le composé dissous : ils sont inertes.
- Les solvants peuvent aussi être utilisés pour extraire les composés solubles d'un mélange, l'exemple le plus commun étant l'infusion de thé dans de l'eau chaude.
- Les solvants sont souvent des liquides transparents avec une odeur caractéristique.
- La concentration d'une solution est la quantité de soluté dans un certain volume de solvant.

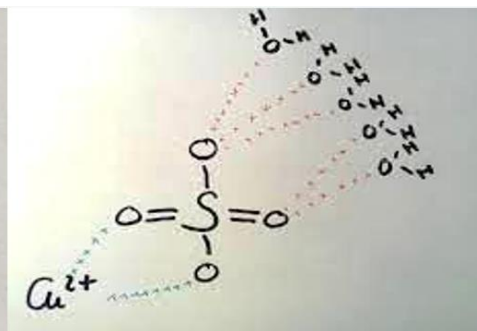
Pour les solutions liquides (phase uniforme liquide contenant plusieurs espèces chimiques), si l'une des espèces est très largement majoritaire (au moins un facteur 100), on l'appelle le « solvant ». C'est le cas de l'eau pour les solutions aqueuses (par exemple une solution aqueuse de sulfate de cuivre : l'eau est le solvant et les ions sulfate et cuivre(II) les solutés).



**Solution aqueuse  
de sulfate de cuivre**



**Poudre de sulfate de cuivre**



**Dissolution dans l'eau**

## **I.2. Classification des solvants**

Il existe de nombreuses classifications des solvants : en fonction de la nature chimique du composé, de sa polarité, de ses propriétés physico-chimiques, de son secteur d'utilisation, de sa toxicité, de son origine (pétrolière ou agrosourcé :

proviennent en majeure partie de la biomasse végétale (pomme de terre, betterave, canne à sucre, tournesol, etc.)).

## A-Classification selon leur polarité

### 1-Les solvants polaires: *protiques et aprotiques*

**a-Les solvants *protiques* polaires** (appelés aussi solvants *protogènes*) possèdent un ou plusieurs atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogène. Exemples : **eau, méthanol, éthanol**.

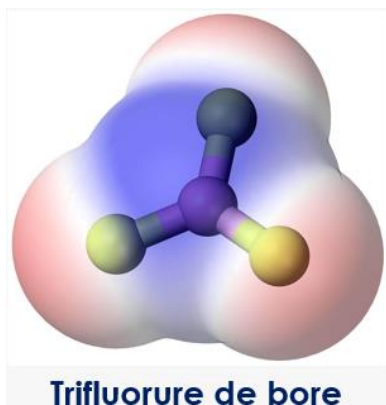
**b-Les solvants *polaires aprotiques*** possèdent un moment dipolaire non nul et sont dénués d'atomes d'hydrogène susceptibles de former des liaisons hydrogène. Exemples: **acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), diméthylsulfoxyde (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ), tétrahydrofurane (THF,  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ).**

### 2-Les solvants apolaires aprotiques

Les solvants *apolaires aprotiques* possèdent un moment dipolaire permanent nul. Par exemple, les hydrocarbures : **benzène, alcanes linéaires, ramifiés ou cycliques, alcènes**.

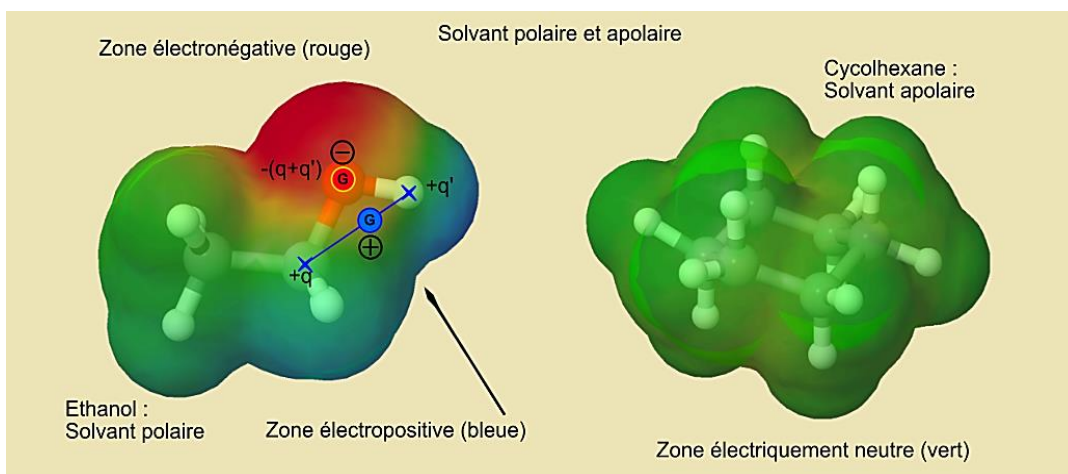
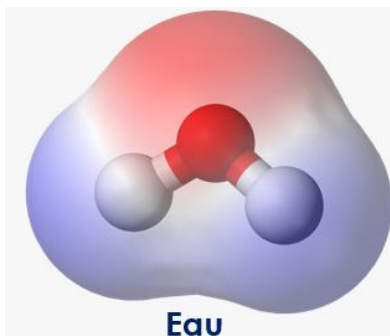
### Notion sur la polarité

► Ce qui est **apolaire** n'a pas de pôle, ou est sans polarité. Les molécules apolaires sont les molécules qui sont produites par l'union d'atomes ayant la même électronégativité, de sorte que les forces avec lesquelles les atomes qui composent la molécule attirent les électrons de la liaison sont égales.

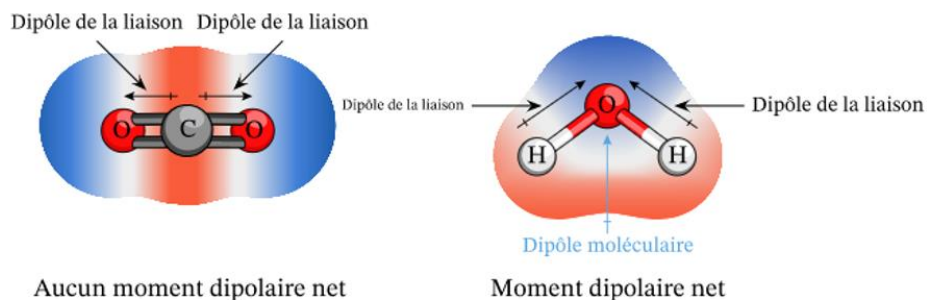
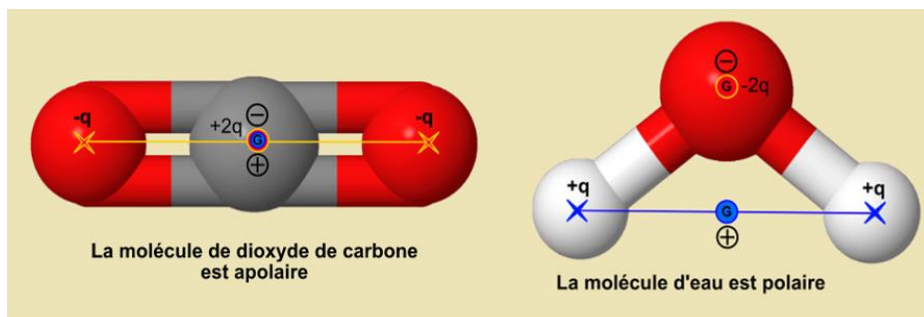


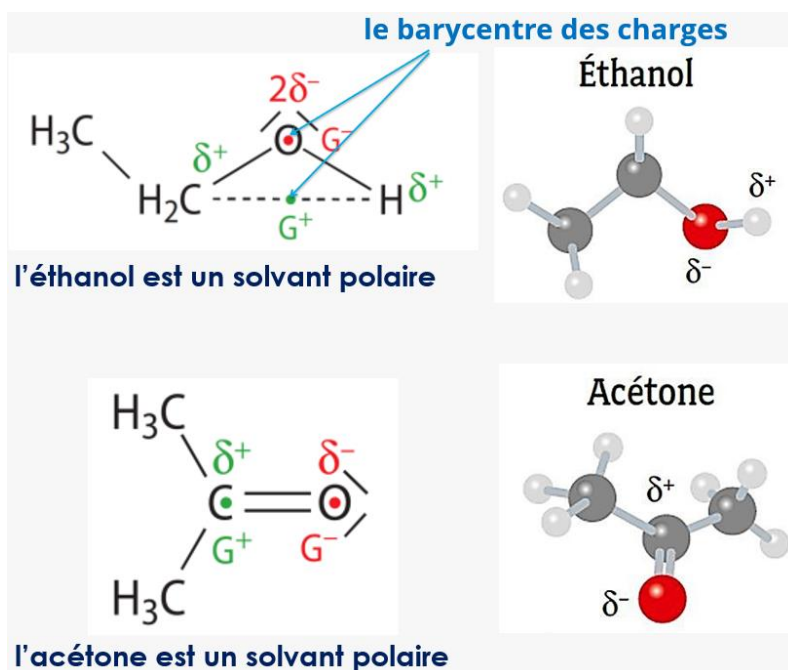


► Une molécule est **polaire** quand l'une de ses extrémités est chargée positivement, et l'autre négativement. Quand une molécule est apolaire, ces charges n'existent pas.



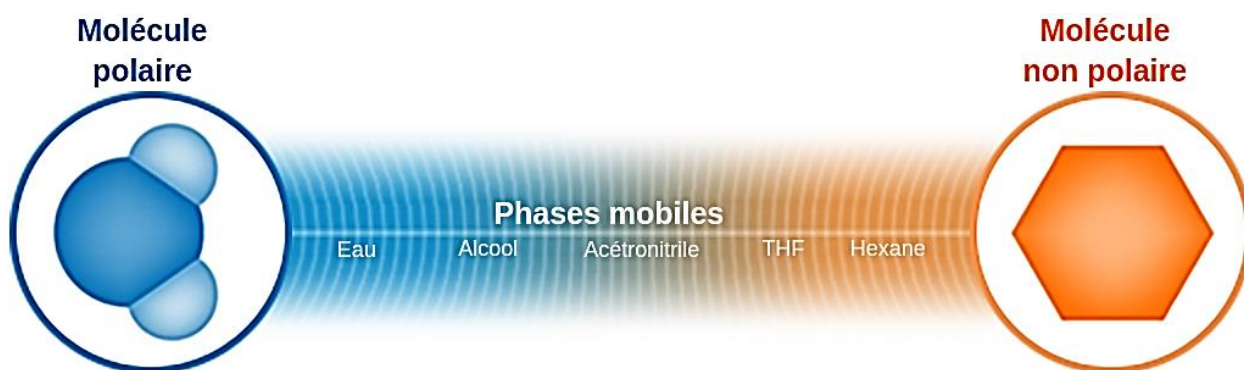
### Solvant polaire et apolaire





Le tableau suivant représente quelques solvants polaires et apolaires :

Solvants non polaires courants	Solvants polaires courants
Pentane	Éthanol
Cyclohexane	Eau
Toluène	Méthanol
Éther diéthylique	Acétone
Cyclopentane	Diméthylformamide (DMF)
Hexane	Dichlorométhane
Benzène	Acide acétique



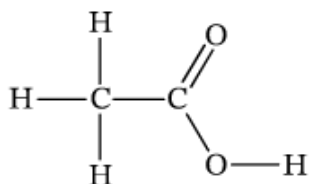
**Échelle de polarité des phases mobiles en HPLC**



**Solvants polaires protiques:** eau, éthanol, méyhanol

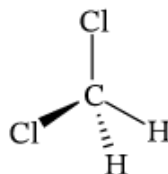
**Solvants polaires aprotiques:** acétonitrile, diméthylsulfoxyde (DMSO), tétrahydrofurane (THF).

Polaire protique



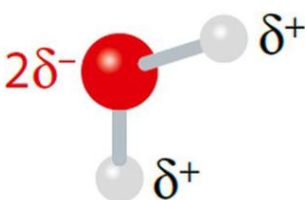
Acide acétique

Polaire aprotique

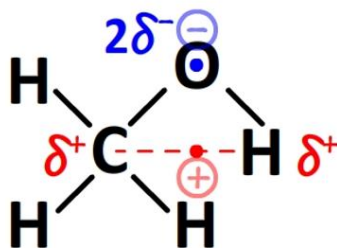


Dichlorométhane

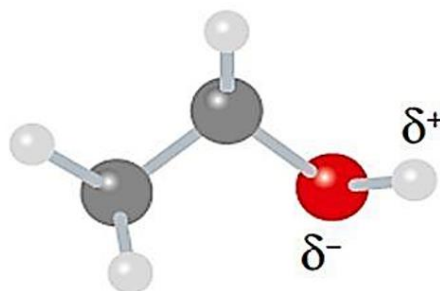
**Solvants polaires protiques:** eau, méthanol, éthanol



Eau



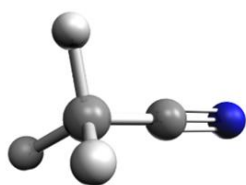
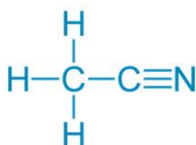
Méthanol



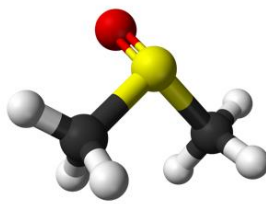
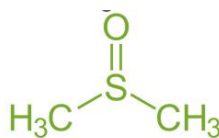
Ethanol

**Solvants polaires aprotiques:** possèdent un moment dipolaire non nul.

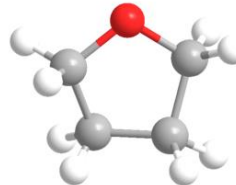
**Exemples:** acétonitrile (CH3CN), diméthylsulfoxyde (DMSO, (CH3)2SO), tétrahydrofurane (THF, C4H8O).



Acétonitrile



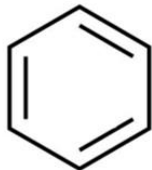
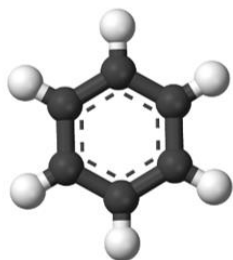
Diméthylsulfoxyde



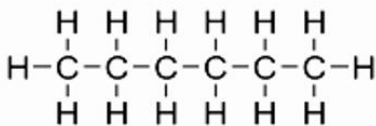
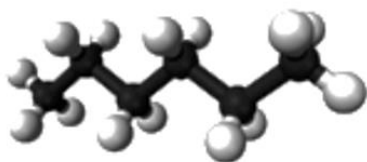
Tétrahydrofurane

**Solvants apolaires aprotiques** possèdent un moment dipolaire nul.

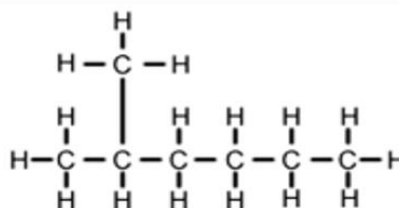
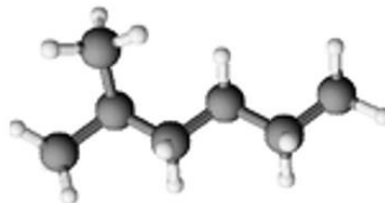
Exemples: les hydrocarbures : **benzène**, **alcane linéaires**, **ramifiés** ou **cycliques**, **alcènes**.



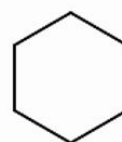
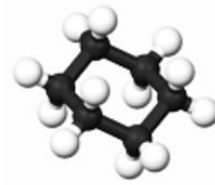
**Benzène**



**Hexane**  
(alcane linéaire)



**2-Méthylhexane**  
(alcane ramifié)



**Cyclohexane**  
(alcane cyclique)

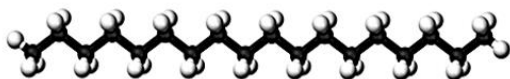
## B-Classification selon la structure chimique

**1-Les solvants hydrocarbures:** aliphatiques (alcane, alcène) et aromatiques (benzène, toluène, xylène) ainsi que les mélanges pétroliers complexes.

### Définition : Hydrocarbure

Un hydrocarbure est une molécule composée uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène.

#### Hydrocarbures Aliphatiques

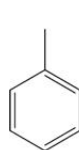


Représentation 3D d'un alcane (octadécane :  $C_{18}H_{38}$ ). Les sphères noires représentent les atomes de carbone, et les sphères blanches les atomes d'hydrogène.

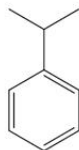


benzène

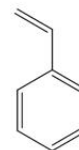
#### Hydrocarbures Aromatiques



toluène



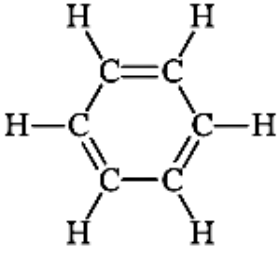
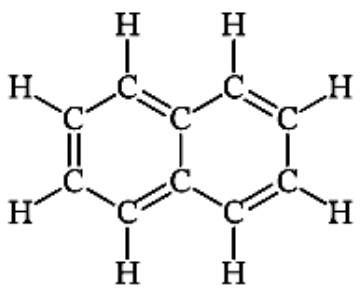
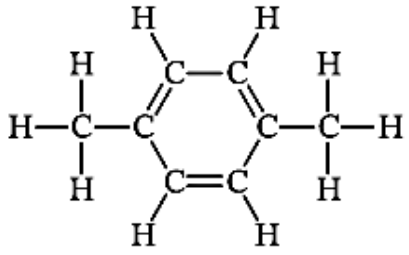
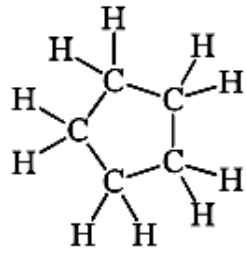
cumène



styrène

#### Mélanges pétroliers complexes



Hydrocarbures aliphatiques	Hydrocarbures aromatiques
<p>Alcane</p> $  \begin{array}{ccccccc}  & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & & \\  &   &   &   &   & & \\  \text{H} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{H} \\  &   &   &   &   & & \\  & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & &   \end{array}  $	
<p>Alcène</p> $  \begin{array}{ccccccc}  & \text{H} & \text{H} & \text{H} & & & \\  &   &   &   & & & \\  & \text{C} & = \text{C} & - \text{C} & - \text{H} \\  &   & &   & & & \\  & \text{H} & & \text{H} & & &   \end{array}  $	
<p>Alcyne</p> $  \begin{array}{ccccccc}  & \text{H} & \text{H} & & \text{H} & \text{H} & \\  &   &   & &   &   & \\  \text{H} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} \equiv \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{H} \\  &   &   & &   &   & \\  & \text{H} & \text{H} & & \text{H} & \text{H} &   \end{array}  $	
<p>Cycloalcane</p> 	

### Mélanges pétroliers complexes

Les raffineries de pétrole, en plus de produire les hydrocarbures simples, fabriquent des mélanges complexes d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou comportant les deux séries à la fois.

#### A-Hydrocarbures aliphatiques (alcane, alcène)

Les hydrocarbures aliphatiques rassemblent :

- **Les alcanes** ou hydrocarbures paraffiniques, saturés, à chaîne droite ou ramifiée;

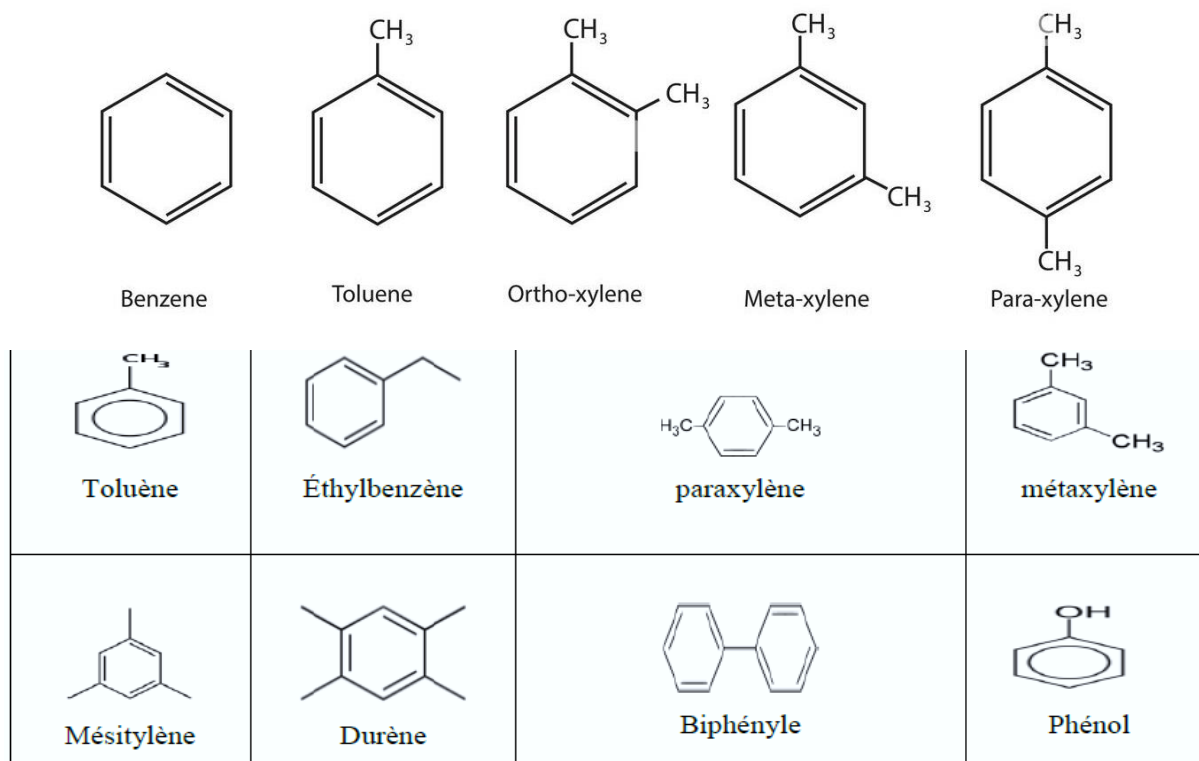
- **Les cycloalcanes** (ou cyclanes) ou hydrocarbures naphténiques, également saturés, mais avec une partie cyclique;
- **Les alcènes** ou composés oléfiniques, et les alcynes, à chaîne droite insaturée.

## B-Hydrocarbures aromatiques (monocycliques, polycycliques)

Les hydrocarbures aromatiques peuvent être:

- Monocycliques (benzène, toluène, xylène, styrène et leurs composés):ils possèdent un cycle insaturé à six atomes de carbone comme le benzène;
- Ou polycycliques: Ce sont des composés comportant plusieurs cycles benzéniques fusionnés (le naphthalène, l'anthracène, le tétracène et le pentacène).

La série aromatique comprend tous les liquides volatils dont la structure moléculaire comporte le noyau benzénique;



### Hydrocarbures aromatiques: dérivés du benzène

## C-Mélanges pétroliers complexes

Sont des mélanges complexes d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou comportant les deux séries à la fois. Ces coupes pétrolières se distinguent par leur gamme de point d'ébullition et leur composition chimique, selon les fractions dont ils sont dérivés et les divers traitements auxquelles elles sont soumises.

**2-Les solvants oxygénés:** alcools, glycols, cétones, esters organiques, éthers, éthers de glycol,

### a-Alcools

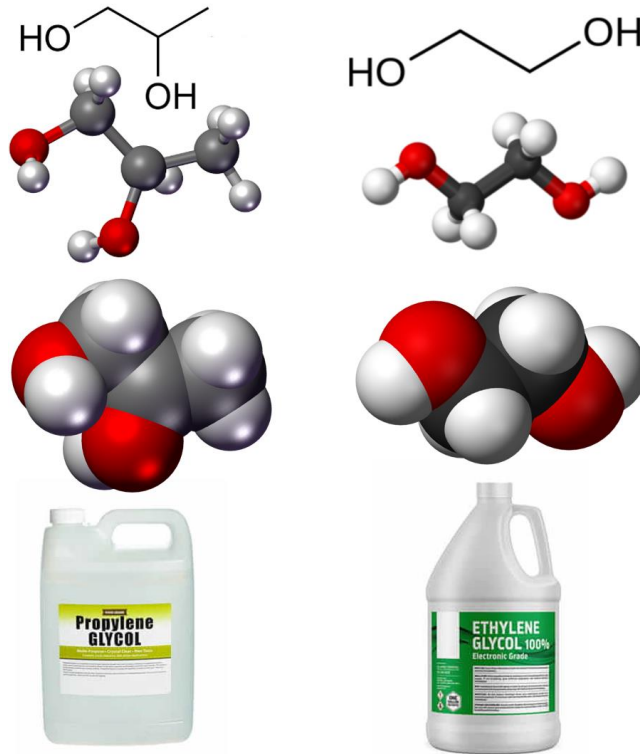
Sont caractérisés par la fonction hydroxyle « OH ». Exp. méthanol, éthanol, isopropanol). Ils résultent de la substitution de l'hydrogène sur un hydrocarbure R-H par la fonction -OH pour donner R-OH (sauf dans le cas d'un hydrogène sur le cycle aromatique qui donne un *phénol*). La fonction hydroxyle produit une élévation importante du point d'ébullition et de la viscosité de l'hydrocarbure correspondant en raison de la présence de *liaisons hydrogène*.

### b-Glycols

Sont appelés aussi polyols ou polyalcools. Ce sont des composés organiques caractérisés par un certain nombre de groupes hydroxyle (au moins deux groupes). Par rapport aux alcools simples, l'augmentation du nombre de groupes hydroxyle entraîne une augmentation très importante de leur point d'ébullition et de leur viscosité ainsi qu'une solubilité accrue dans l'eau. Ils sont aussi peu volatils.

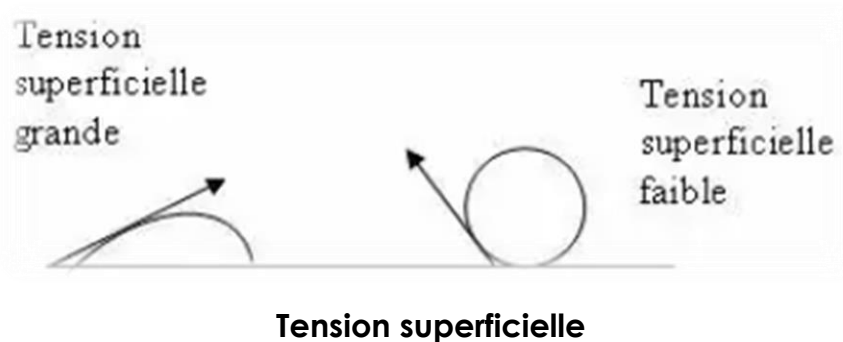
**-L'éthylène glycol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) :** est le plus simple des diols. C'est un liquide incolore, inodore et peu volatil avec une faible viscosité. Il est utilisé notamment comme antigel dans les radiateurs d'automobile et dans les peintures en phase aqueuse.

**-Le propylène glycol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, ou propane-1,2-diol) :** est un diol moins toxique, et employé dans l'industrie alimentaire (E1520) et pharmaceutique. C'est un additif alimentaire qui est autorisé comme support dans les colorants, les émulsifiants, les antioxydants, les enzymes alimentaires, tous les arômes et tous les nutriments.

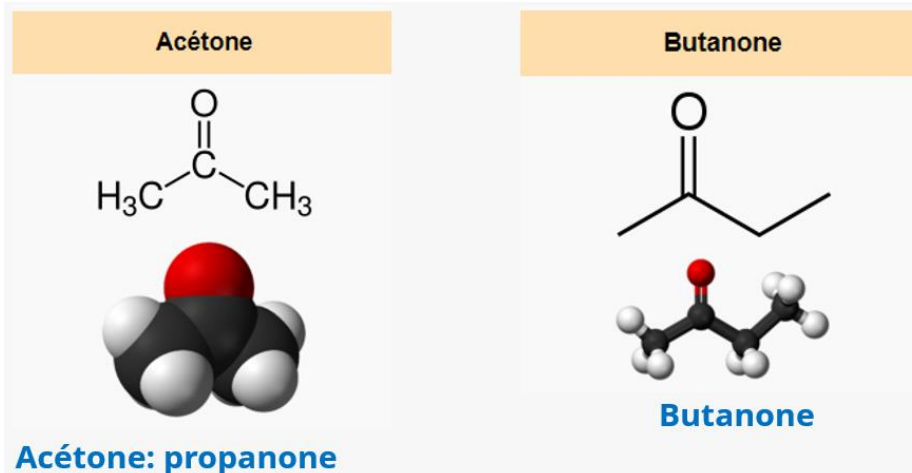


### c-Cétones

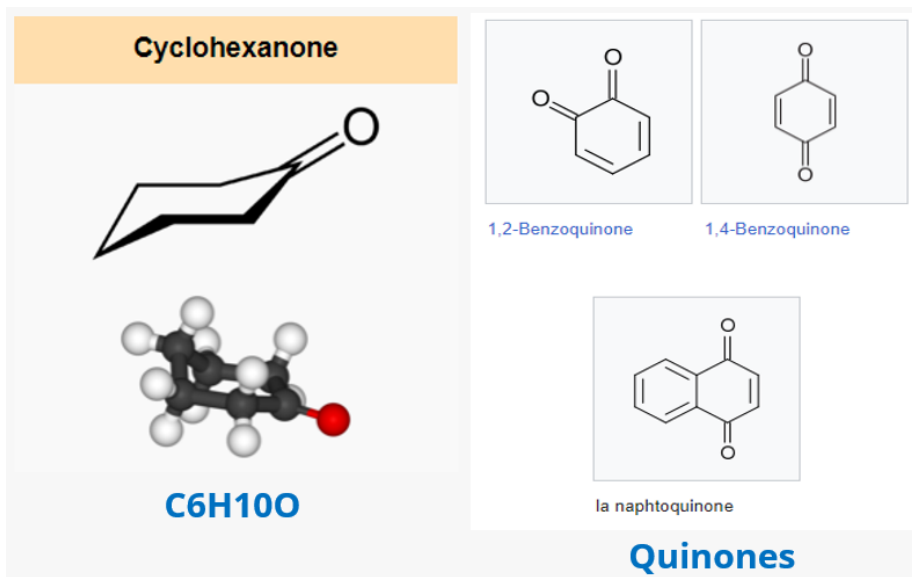
Sont caractérisées par le groupement fonctionnel carbonyle  $\text{-C=O}$ . Les cétones de faibles poids moléculaires sont solubles dans l'eau. A partir de C5, cette solubilité est presque nulle. Ce sont des solvants de haut pouvoir de dissolution, de faibles viscosités et sont miscibles avec les hydrocarbures. Elles ont généralement des densités plus faibles que celles des autres solvants oxygénés. Elles ont aussi de faibles tensions superficielles et offrent une large gamme du taux d'évaporation. Ces solvants sont très volatils et inflammables. Ils sont employés dans les nettoyants et les dégraissants industriels.







### Cétones aromatiques



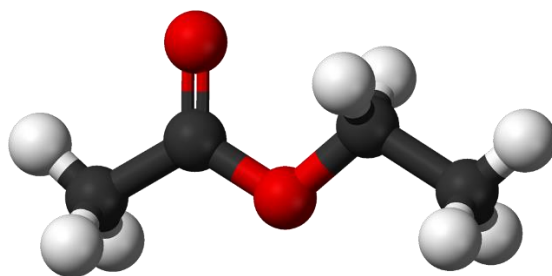
### d-Esters organiques

Sont caractérisés par la présence d'un groupement carboxyle au sein d'une chaîne de carbone et d'hydrogène plus au moins longue. Ils sont obtenus par réaction d'un acide organique avec un alcool. Les esters ont de faibles tensions superficielles et se présentent dans une large gamme de taux d'évaporation. Ce sont des liquides incolores. Ceux de faibles poids moléculaires sont partiellement solubles dans l'eau. Les acétates sont les esters les plus utilisés comme solvant. Ils sont volatils à température ambiante. Il existe également des acétates complexes ou mélange produits à partir de fractions pétrolières. Ils sont

utilisés notamment dans la formulation des peintures, de laques, d'adhésifs et d'encre.

### Acétates

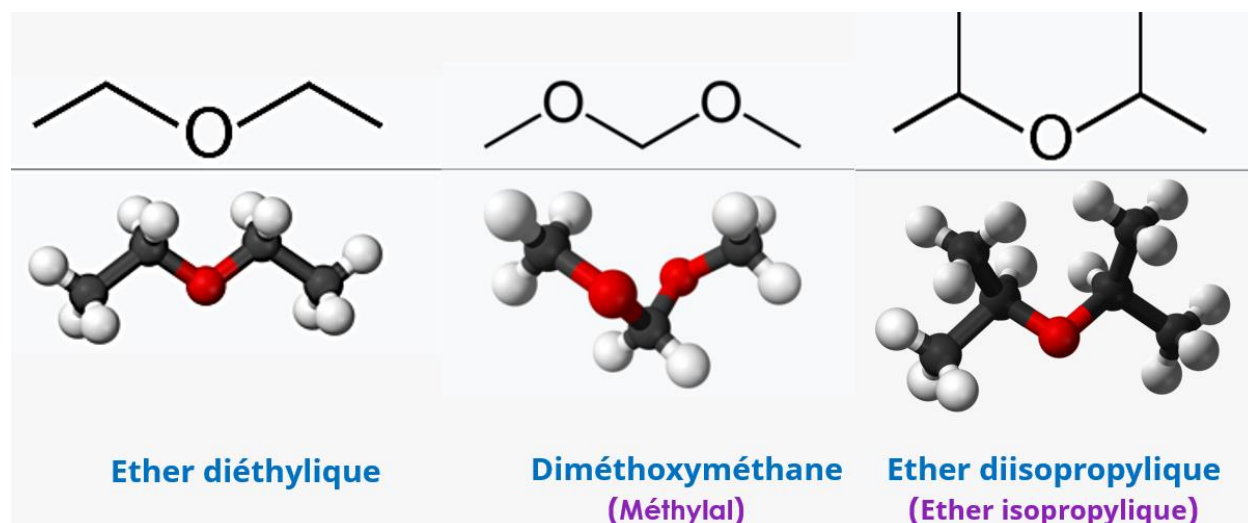
L'acétate d'éthyle est un solvant utilisé dans de nombreuses applications : préparation de vernis, laques, encres, fabrication de films photographiques, arôme synthétique dans l'industrie alimentaire, utilisé aussi dans la fabrication de parfums.

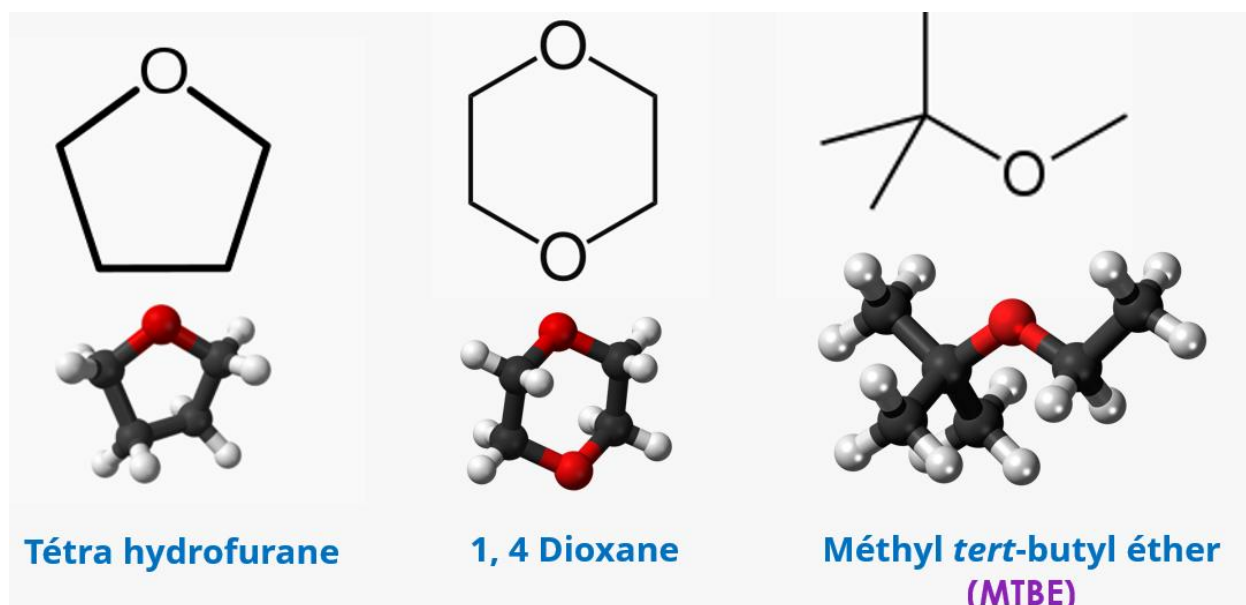


**Acétate d'éthyle**

### e-Ethers

Ils sont caractérisés par la liaison éther, formée d'un atome d'oxygène -O- situé entre deux groupements R et R'. Ils résultent de la déshydratation de deux alcools pour former la liaison R-O-R' où R et R'. Ce sont des chaînes plus ou moins complexes et ramifiées qui peuvent se rejoindre pour former un cycle.





### Quelques éthers

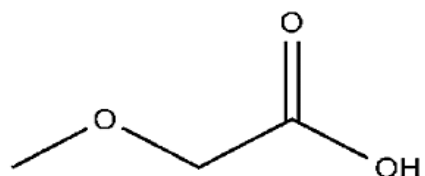
Les éthers aliphatiques sont peu solubles dans l'eau alors que les éthers alicycliques le sont plus. Les éthers utilisés comme solvants sont des liquides volatils à température ambiante. Ils sont incolores et d'odeur caractéristique. Ils sont utilisés comme solvants réactionnels. Les éthers sont plus au moins solubles dans l'eau et dans les hydrocarbures. Ils sont tous inflammables. Les éthers ont tendance à former des peroxydes et des hydroperoxydes qui posent des problèmes de sécurité en raison de leur potentiel explosif.

### **f-Ethers de glycol**

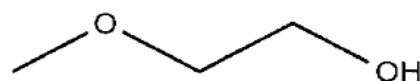
Un groupe dérivé de l'éthylène glycol ou du propylène glycol. Aux conditions normales d'utilisation, sont des liquides incolores à odeur légèrement éthérée, modérément volatils et de viscosité moyenne. Leur large utilisation tient à leur caractère amphiphile qui leur confère une affinité à la fois pour les composés polaires (eau, alcool, cétone) et les composés apolaires (hydrocarbures).

Les éthers de glycol sont donc de bons solvants pour de nombreuses substances et peuvent être utilisés pour rendre miscibles des solvants autrement non-miscibles. On les trouve aussi comme principaux composants dans les colles, les encres, les peintures, les vernis, les diluants, les cosmétiques notamment les

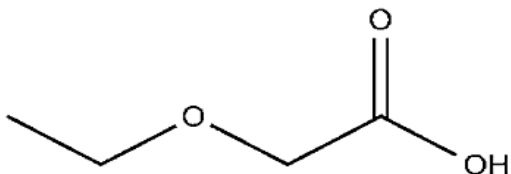
teintures pour cheveux, les produits d'entretien comme les lave vitres, les produits pour la mécanique et la métallurgie (dégraissants).



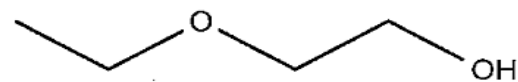
Methoxyacetic acid (MAA)



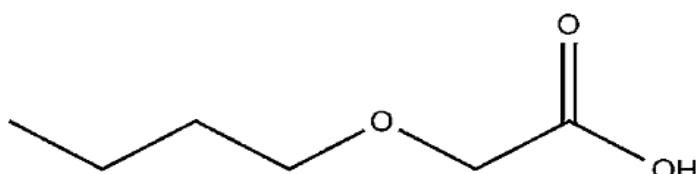
Ethylene glycol methyl ether (EGME)



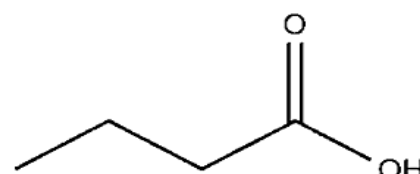
Ethoxyacetic acid (EAA)



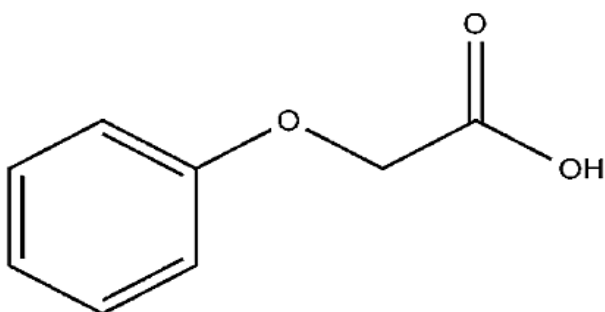
Ethylene glycol ethyl ether (EGEE)



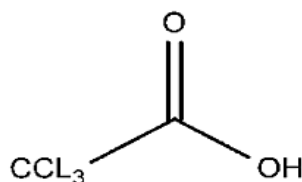
Butoxyacetic acid (BAA)



Butyric acid (BuA)



Phenoxyacetic acid (PAA)



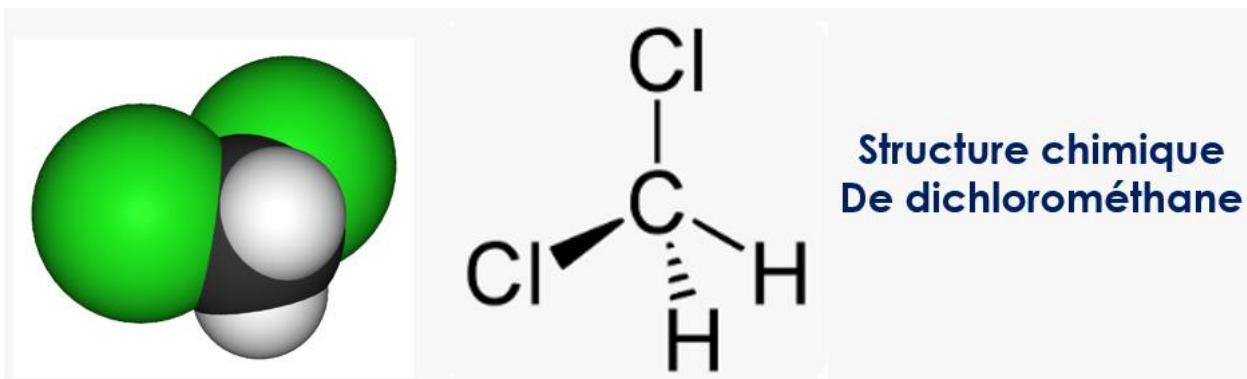
Trichloroacetic acid (TCAA)

### Quelques éthers de glycol

**3-Les solvants halogénés:** sont des hydrocarbures où l'on a remplacé un ou plusieurs atomes d'hydrogène par des atomes d'halogènes (brome, chlore, fluor, iode).

► Les solvants halogénés sont des hydrocarbures dont un ou plusieurs atomes d'hydrogènes ont été substitués par des halogènes (fluor, chlore, brome, iode).

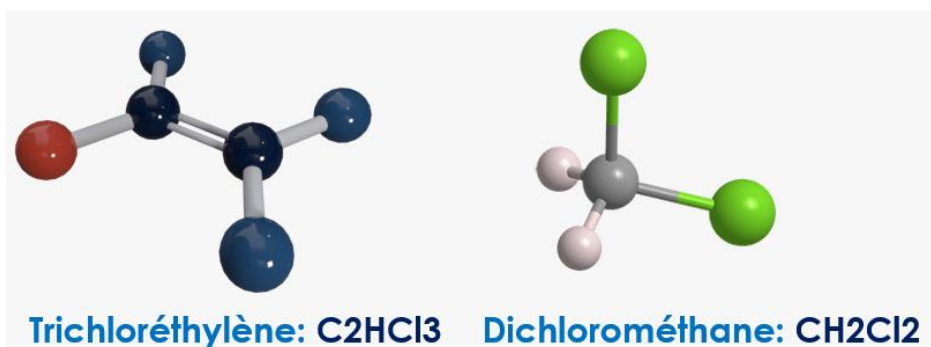
► Les solvants chlorés sont les plus répandus suivis des fluorés. La plus grande partie des solvants halogénés est issue des hydrocarbures aliphatiques.



- A part les plus petites molécules qui sont gazeuses (chlorométhane, dichlorométhane, chloroéthane, chloroéthylène, bromométhane), tous les dérivés halogénés couramment utilisés sont des liquides incolores.
- Les solvants chlorés ne sont pas ou peu inflammables, de même que les dérivés fluorés.
- Ils ont tous des points d'ébullition et des densités plus élevés que ceux des hydrocarbures correspondants.
- Ils sont moins volatils et insolubles dans l'eau mais sont d'excellents solvants pour de nombreux polymères synthétiques, huiles et graisses minérales.

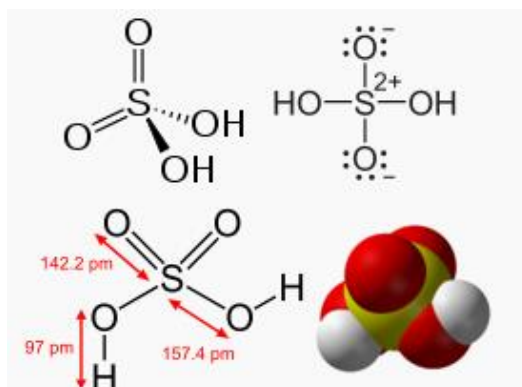
Les solvants halogénés sont largement utilisés dans le dégraissage à la vapeur de surfaces métalliques (trichloréthylène). D'autres applications incluent le décapage de peinture (dichlorométhane) et le nettoyage à sec (perchloréthylène).





#### 4-Solvants inorganiques

Les solvants *inorganiques* ne contiennent pas d'atomes de carbone. L'eau, les solutions aqueuses contenant des additifs (tensioactifs, solution tampon...), l'acide sulfurique concentré, l'ammoniaque sont des solvants inorganiques classiques.



**Structure de l'acide sulfurique**

#### C-Classification selon la charge

On distingue les espèces ioniques et non ioniques :

**-Espèces non ioniques** : la majorité des solvants actuels sont des espèces non ioniques.

**-Espèces ioniques** : tandis que la plupart des solvants sont de nature moléculaire (formés d'une seule espèce neutre), il existe une nouvelle classe de solvants, appelés *liquides ioniques*, constitués d'anions et de cations.

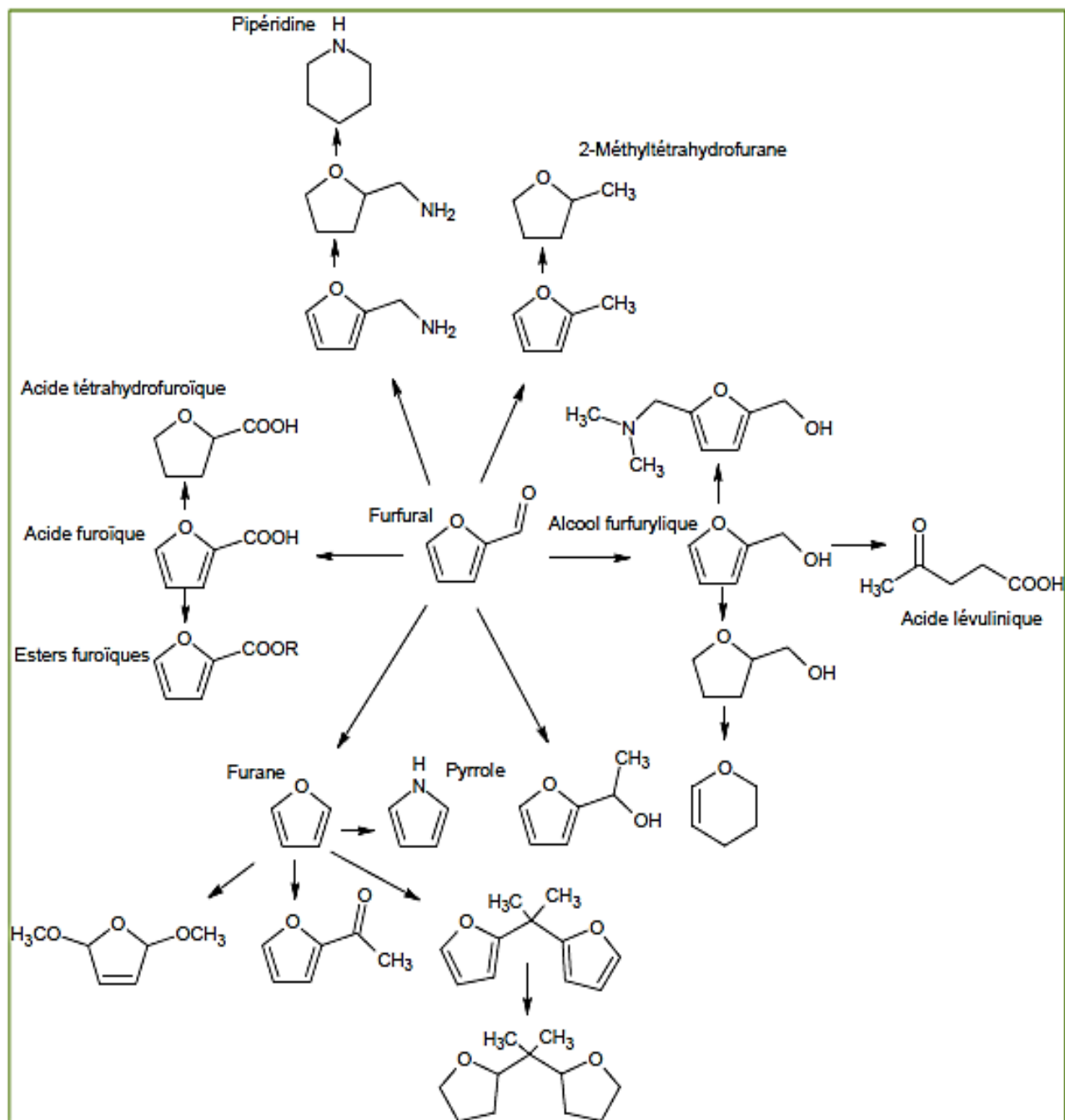


Les propriétés physiques conduisent à une première distinction entre solvants moléculaires et solvants ionisés. Les composés organiques constituent, comme l'eau, des *solvants moléculaires* : ils sont constitués de molécules électriquement neutres et présentent, à l'état pur, une conductivité faible. Les *solvants ionisés* sont formés principalement d'anions et de cations reliés par des attractions électrostatiques et sont bons conducteurs : c'est le cas des sels fondus.

Les liquides ioniques sont des sels fondus possédant un point de fusion inférieur à 100 °C et une tension de vapeur quasiment nulle (ils sont non-volatils). Ils constituent une alternative de plus en plus sérieuse aux solvants moléculaires classiques et sont désormais très utilisés en électrochimie. De nombreuses recherches actuelles s'intéressent à leur utilisation pour la séparation des métaux radioactifs et pourraient aboutir à des solutions particulièrement écologiques pour le retraitement des déchets radioactifs.

#### **D-Classification selon l'origine**

Il est important de préciser que l'origine du solvant n'a pas de conséquence sur sa toxicité ; un solvant agrosourcé peut être néfaste pour l'homme ou l'environnement (cas du furfural). Les solvants *pétrochimiques* proviennent du pétrole et donc de la pétrochimie. La plupart des solvants actuellement utilisés sont d'origine pétrochimique (hexane, benzène, acétate d'éthyle, dichlorométhane). Les solvants *agrosourcés* (appelés aussi *biosolvants*) proviennent de la valorisation de la biomasse végétale (bois, sucre, huiles végétales, huiles essentielles). Les exemples les plus connus sont les alcools (méthanol, éthanol, etc.), le furfural, le glycérol ou encore des esters comme le lactate d'éthyle.



Familles	Exemples	Production	Applications	Référence commerciale
Esters d'acides organiques fermentaires	Lactate d'éthyle	Fermentation du maïs, estérification de l'acide lactique	Produits de nettoyage, dégraissage, dissolvants vernis à ongles, (nettoyage des nettoyeurs de disjoncteurs haute tension)	Vertec Bio graffitis)
	Diesters aliphatiques (dibasic esters DBE)	Mélange d'esters d'acides adipique, glutarique et succinique, obtenus par estérification	Nettoyage, dissolvants peintures	
	$\gamma$ -Valerolactone	Cyclisation de l'acide lévulinique puis hydrogénation	Milieu réactionnel de biocatalyse	
Esters d'acide gras	Ester méthylique d'huile végétale (EMHV)	Transestérification ou estérification d'acides gras	Nettoyage, dégraissage, fluxants bitumineux, agents de formulation phytosanitaire, dissolvants de cosmétique, nettoyage après naufrage de l'Erika en 1999	- Oléoflux 18 : fluxant pour bitumes - Toyal Europe : remplacement du white spirit

### Exemples de biosolvants et applications

## E-Classification selon la toxicité

### Définition de la toxicité

La toxicité) du grec τοξικότητα/*toxikótêta*) est la mesure de la capacité d'une substance chimique, radionucléide, molécule organique, etc. à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale et humaine, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex. : foie, rein, poumon, cœur, chez l'animal).

### Solvants toxiques et non toxiques

Les solvants organiques peuvent être classés selon leur toxicité en fonction de différents critères tels que:

la dose létale 50 (DL50), la dose journalière admissible (DJA) ou encore leur classification selon le règlement européen CLP (*Classification, Labelling and Packaging*) qui évalue les risques pour la santé humaine et l'environnement.

Il est important de noter que la toxicité des solvants organiques peut varier en fonction de leur utilisation, de leur concentration, de leur mode d'application et de la durée d'exposition. Il est donc essentiel de prendre en compte ces différents facteurs pour évaluer correctement les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation de ces produits.

### **Exemple de classification des solvants organiques selon leur degré de toxicité :**

**a-Solvants peu toxiques:** l'éthanol, l'acétone, le méthanol, le tétrahydrofurane (THF), l'acide acétique, le diméthylsulfoxyde (DMSO);

**b-Solvants moyennement toxiques:** le dichlorométhane, le toluène, l'éther de pétrole, le chloroforme, le benzène;

**c-Solvants très toxiques:** le tétrachlorure de carbone, le trichloréthylène, l'hexane, le perchloroéthylène.

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

### *Exemple de toxicité des solvants :*

-plusieurs types d'éthers de glycol ont été ainsi mis en cause dans des cas de cancers graves ; neuf ont été classés reprotoxiques (dangereux pour les fœtus des femmes enceintes).

- Le benzène est un produit toxique pouvant induire des intoxications par voies respiratoires ou cutanées. Les intoxications aiguës se traduisent par un effet narcotique sur le système nerveux qui peut entraîner un arrêt respiratoire. Par ailleurs, le benzène est cancérigène et peut causer des altérations génétiques héréditaires.

### **I.3. Effets sur la santé**

**a-Système nerveux central** : altération de la couche lipidique de la membrane de la cellule nerveuse et de la myéline (action démyélinisante sur le tissu nerveux). A faible concentration, ils provoquent des troubles du comportement et des perturbations psychomotrices.

**b-Système nerveux périphérique**: l'exposition chronique à certains solvants (n-hexane, méthylbutylcétone, mélange de solvants) pourrait favoriser le développement d'une neuropathie périphérique qui se manifestent par des symptômes de crampes musculaires, de faiblesse et de douleur.

**c-Peau**: les propriétés lipophiles de la plupart des solvants exercent une action dégraissante, d'où sécheresse, déchirure et irritation de la peau ; processus allergiques conduisant à l'installation de véritables eczémas.

**d-Voies respiratoires** : les symptômes d'irritation des voies respiratoires chez les travailleurs exposés aux odeurs des solvants ne sont pas exceptionnels.

**e-Foie**: l'exposition aiguë à certains solvants comme le tétrachlorure de carbone, le 1,2-dichloroéthane, le diméthylformamide peut engendrer une hépatite aiguë cytolytique.

### **Comment prévenir la toxicité des solvants organiques?**

Peinture, nettoyage des métaux ou des textiles, décapage, fabrication des parfums... de nombreux travailleurs sont en contact, parfois sans le savoir, avec des solvants. Une exposition régulière, même à faible dose, peut entraîner à plus

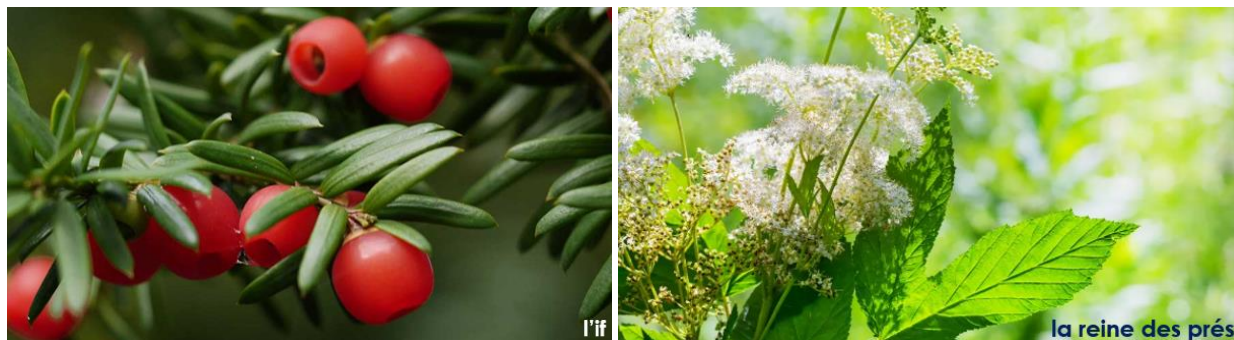
ou moins long terme des atteintes à la santé, dont certaines sont irréversibles. Priorité doit être donnée à la substitution des solvants dangereux.

### **Moyens de protection de toxicité des solvants organiques**

- Une bonne connaissance des caractéristiques physicochimiques des solvants chimiques.
- limiter la durée d'exposition aux solvants chimiques.
- Une bonne manipulation des solvants chimiques.
- Conservation et transport correcte des solvants chimiques.

### **I.4. Domaines d'utilisation des solvants**

**Domaine médical et pharmaceutique :** au 19<sup>e</sup> siècle, l'industrie a développé de nouveaux solvants. Avec eux, les chercheurs ont isolé des espèces chimiques de certaines plantes pour en faire le principe actif de médicaments (un anti-inflammatoire venant de la reine des prés, un anticancéreux venant de l'if,...).



**Autres domaines d'utilisation des solvants :** les solvants sont utilisés dans des secteurs très diversifiés tels que le dégraissage (dégraissants), les peintures (adjuvants, diluants et décapants), les encres, la détergence (détergents), la synthèse organique, industrie pharmaceutique (purifiants), fabrication des parfums.

En outre, les solvants servent comme milieux réactionnels, agents de nettoyage pour dissoudre des salissures, ou comme dissolvant, disperseur, correcteur de



viscosité, correcteur de tension superficielle, plastifiant ou agent protecteur, adjuvants et diluants (peinture, vernis, encres, colles, pesticides), dégraissants (le perchloroéthylène qui est utilisé pour le nettoyage à sec), purifiants (parfums, médicaments), décapants (élimination des peintures, vernis, colles), support pour le conditionnement, le transport et la mise en œuvre de cosmétiques, peintures et encres.

### **I.5. Propriétés physicochimiques des solvants**

Les solvants sont souvent des liquides transparents avec une odeur caractéristique. Certains solvants organiques se dissolvent dans l'eau. D'autres ne se mélangent pas, mais plutôt qu'ils forment une couche séparée avec une limite visible entre eux. Les solvants les plus couramment utilisés peuvent être caractérisés par les propriétés physiques suivantes : point de fusion, point d'ébullition, solubilité dans l'eau, miscibilité avec d'autres solvants, densité, viscosité, constante diélectrique, pression de vapeur saturante, pouvoir solvant (indice kauri-butanol et point d'aniline), paramètres de solubilité d'Hansen.

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

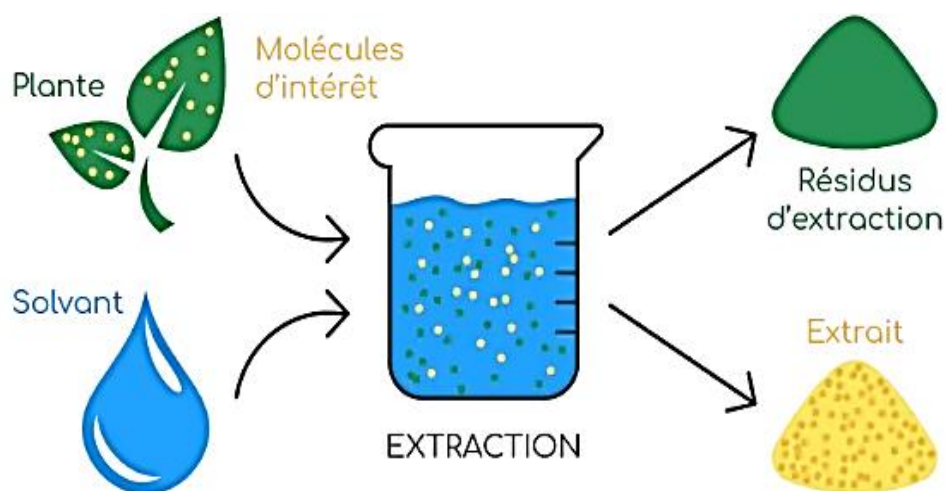
Solvant	Formule chimique	Température d'ébullition	Constante diélectrique	Masse volumique
<b>Solvants aprotiques apolaires</b>				
Cyclohexane	$C_6H_{12}$	80,75 °C	1,9	0,7786 g·ml <sup>-1</sup>
Hexane	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	69 °C	2,0	0,655 g·ml <sup>-1</sup>
Benzène	$C_6H_6$	80 °C	2,3	0,879 g·ml <sup>-1</sup>
Toluène	$C_6H_5-CH_3$	111 °C	2,4	0,867 g·ml <sup>-1</sup>
Éther diéthylique	$CH_3CH_2-O-CH_2-CH_3$	35 °C	4,3	0,713 g·ml <sup>-1</sup>
Chloroforme	$CHCl_3$	61 °C	4,8	<b>1,498 g·ml<sup>-1</sup></b>
Acétate d'éthyle	$CH_3-C(=O)-O-CH_2-CH_3$	77 °C	6,0	0,894 g·ml <sup>-1</sup>
<b>Solvants aprotiques polaires</b>				
1,4-Dioxane	$/-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-\backslash$	101 °C	2,3	<b>1,033 g·ml<sup>-1</sup></b>
Tétrahydrofurane (THF)	$/-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-\backslash$	66 °C	7,5	0,886 g·ml <sup>-1</sup>
Dichlorométhane (DCM)	$CH_2Cl_2$	40 °C	9,1	<b>1,326 g·ml<sup>-1</sup></b>
Acétone	$CH_3-C(=O)-CH_3$	56 °C	21	0,786 g·ml <sup>-1</sup>
Acétonitrile (MeCN)	$CH_3-C\equiv N$	82 °C	37	0,786 g·ml <sup>-1</sup>
Diméthylformamide (DMF)	$H-C(=O)N(CH_3)_2$	153 °C	38	0,944 g·ml <sup>-1</sup>
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	$CH_3-S(=O)-CH_3$	189 °C	47	<b>1,092 g·ml<sup>-1</sup></b>

Solvants protiques polaires				
Acide acétique	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6,2	<b>1,049 g·ml<sup>-1</sup></b>
<i>n</i> -Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0,810 g·ml <sup>-1</sup>
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(-OH)-CH}_3$	82 °C	18	0,785 g·ml <sup>-1</sup>
Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0,803 g·ml <sup>-1</sup>
Ammoniac	$\text{NH}_3$	-33,35 °C	22	0,7 g·ml <sup>-1</sup> à -33 °C
Éthanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	24	0,789 g·ml <sup>-1</sup>
Méthanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0,791 g·ml <sup>-1</sup>
Acide formique	$\text{H-C(=O)OH}$	101 °C	58	<b>1,21 g·ml<sup>-1</sup></b>
Eau	$\text{H-O-H}$	100 °C	80	1,000 g·ml <sup>-1</sup>

II.1. Définition.....	28
II.2. Extraction traditionnelle.....	29
II.3. Extraction par solvant.....	34
II.4. Extraction par hydro-distillation.....	39
II.5. Extraction des protéines.....	43
II.6. Extraction des acides nucléiques.....	48

### II.1. Définition

L'extraction est parmi les méthodes les plus utilisées en analyse pour séparer les mélanges. Cette technique utilise un moyen pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques. Le solvant d'extraction n'est pas ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire possède plus d'affinité avec le solvant d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange.



Principe général de l'extraction végétale

C'est au cours du 18<sup>ème</sup> siècle que commence l'utilisation de solvant organique pour l'extraction des matières naturelles. L'évolution des techniques d'extraction est motivée par la diversité des matières premières et par l'optimisation des conditions d'échange entre phases d'extraction tout en cherchant à minimiser la consommation de solvant.

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums. Les solvants utilisés dans ces procédés de séparation des produits végétaux sont généralement l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc.

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

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

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

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme.

Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament.

## **II.2. Extraction traditionnelle**

L'extraction est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, en se basant sur les propriétés physicochimiques. L'homme utilise des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité, par différentes techniques.

## LES DIFFÉRENTS TYPES D'EXTRACTION

SOLIDE / LIQUIDE



MACÉRATION



DÉCOCTION



INFUSION



PERCOLATION



**a-Infusion** : l'infusion en est un autre exemple très parlant ; On verse de l'eau bouillante sur les feuilles ou les fleurs finement hachées puis on les laisse tremper pour dissoudre les principes actifs. Le thé en est un exemple. Au fil du temps, les méthodes d'extraction se sont développées et perfectionnées.

**b-Pressage**: il s'agit d'exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus, ou d'écraser des fleurs pour extraire les arômes comme le faisaient les égyptiens.

**c-Décoction** : cette méthode est très ancienne. Elle consiste à placer la racine ou l'écorce d'une plante dans de l'eau froide ; le tout est porté à ébullition et les constituants se dissolvent dans l'eau.

**d-Enfleurage** : les fleurs fragiles (violette ou jasmin) sont posées sur des châssis enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact (forme d'extraction utilisée en parfumerie); en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes que l'on extrait avec de l'alcool. Cette technique repose sur le pouvoir d'absorption d'une huile essentielle par les corps gras.





### Technique d'enfleurage

**e-Macération** : Une substance séjourne à froid dans un solvant organique pour en extraire les constituants solubles dans ce solvant. Ex : la présence de fruits dans l'alcool.

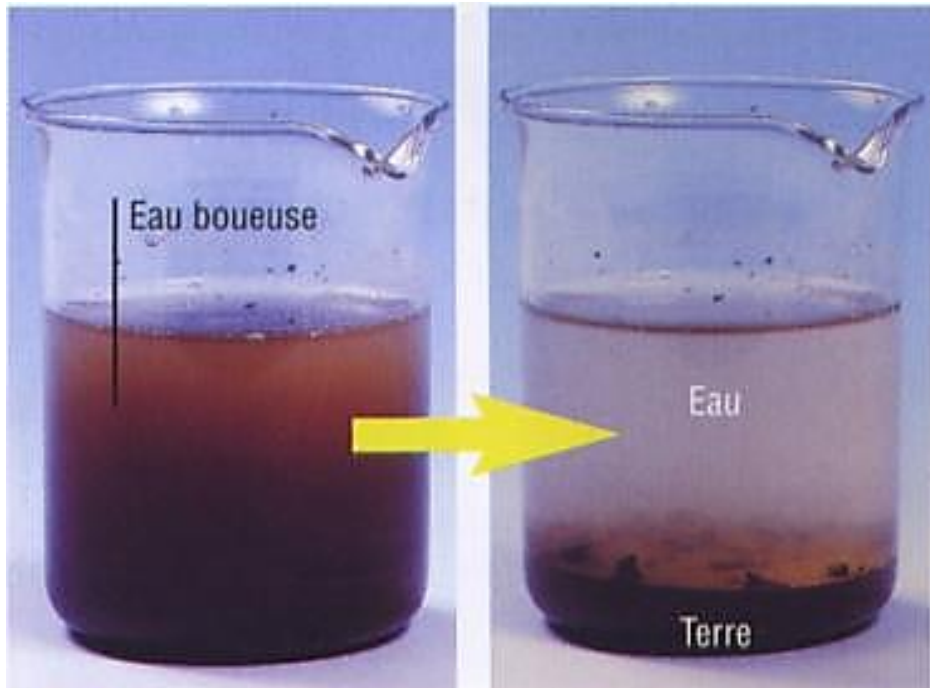
**f-Hydrodistillation** : l'hydrodistillation ou entraînement à la vapeur. Dans cette méthode, les parfums de la plante (huiles parfumées ou huiles essentielles) sont entraînés par de la vapeur d'eau. Cette technique date de l'Egypte ancienne.

**g-Filtration** : cette technique date de la préhistoire. Elle permet de séparer les particules solides en suspension du reste du liquide d'un mélange hétérogène qui a été décanté avant par exemple, elle permet au travers d'un lit de sable de rendre une eau boueuse limpide. Le Liquide recueilli est donc homogène, il porte le nom de (filtrat).

**h-Centrifugation** : La sédimentation est une technique permettant de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur lorsque la dispersion est formée d'une substance plus dense que le liquide (décantation).

**i-Décantation** : Une décantation permet de séparer les constituants les plus denses du reste d'un mélange hétérogène.

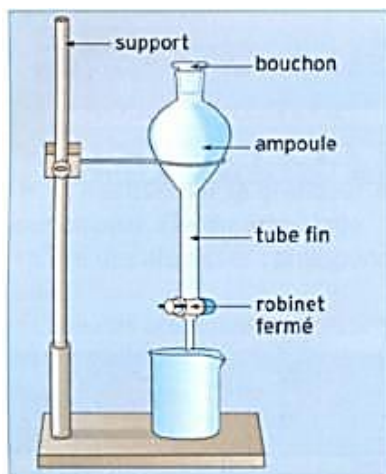
**a-Décantation « solide-liquide »**



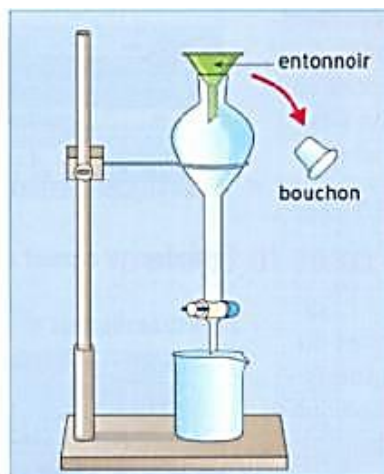
**Décantation d'une eau boueuse**

**b- Décantation « liquide-liquide » : l'ampoule à décanter**

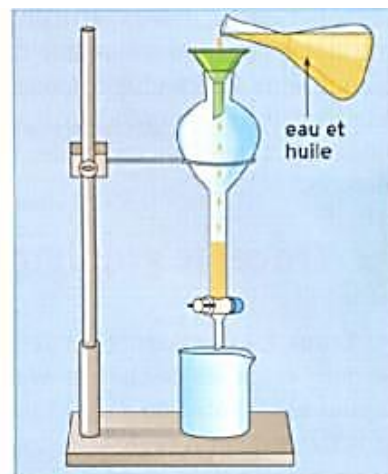
Une ampoule à décanter s'utilise pour séparer des liquides non miscibles.



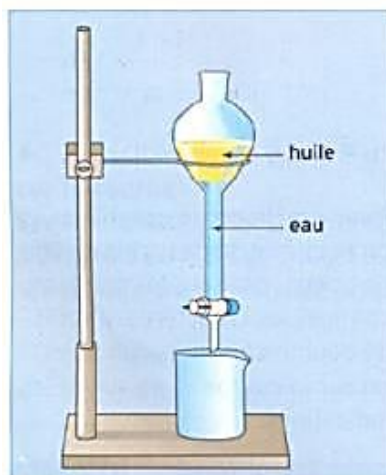
▲ **1. Placer l'ampoule à décanter** sur un support en anneau et placer sous le robinet un récipient, bêcher ou erlenmeyer.



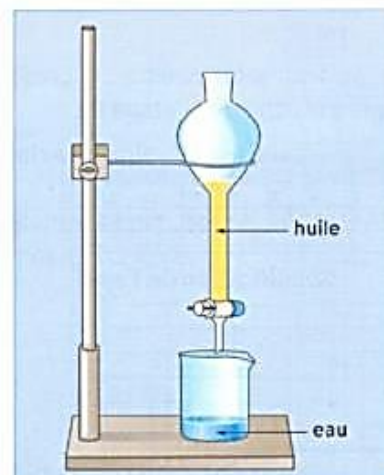
▲ **2. Fermer le robinet** qui doit alors être perpendiculaire au tube inférieur. **Enlever le bouchon rodé** et placer un entonnoir sur l'ouverture.



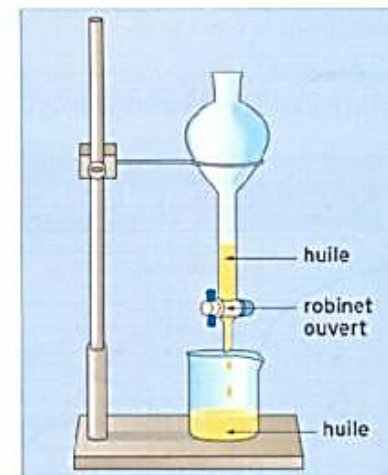
▲ **3. Verser avec précaution le mélange** dans l'ampoule, ici un mélange d'eau et d'huile.



▲ **4. Laisser reposer** le mélange jusqu'à ce que les liquides soient bien séparés, c'est-à-dire forment **deux phases bien distinctes**. L'eau constitue la phase inférieure et l'huile, la phase supérieure.



▲ **5. Ouvrir le robinet** qui est alors parallèle au tube fin. **Laisser couler la phase inférieure**, ici l'eau, dans un récipient et **refermer le robinet**. Le tube fin permet de bien distinguer la séparation entre les deux phases.



▲ **6. Placer un deuxième récipient** sous l'ampoule, ouvrir à nouveau le robinet et récupérer la **phase supérieure**, l'huile.

### II.3. Extraction par solvant

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

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

#### **Extraction par solvant**

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

**a-Mise en contact:** solvant avec la substance contenant le composé à extraire soit directement par le solvant d'extraction ou en faisant intervenir d'abord l'eau. On fait alors agir le solvant sur une décoction, une infusion ou une macération.

**b-Décantation:** est réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter. En fonction de la nature du solvant utilisé et en particulier de sa densité par rapport à celle de l'eau (1,00), la phase organique à récupérer se situera au-dessus ou en dessous.

**c-Séchage et filtration:** afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau.

## Choix du solvant

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

- **L'état physique du solvant:** Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction.

- **La miscibilité du solvant:** Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.

- **La solubilité:** Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à-dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).

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

- **Facilement éliminés après extraction** et donc avoir un **point d'ébullition bas**. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire.

- **Inertes chimiquement** vis-à-vis de la solution à extraire.

- **Peu toxiques** que possible.

### Avantages et inconvénients de quelques solvants d'extraction

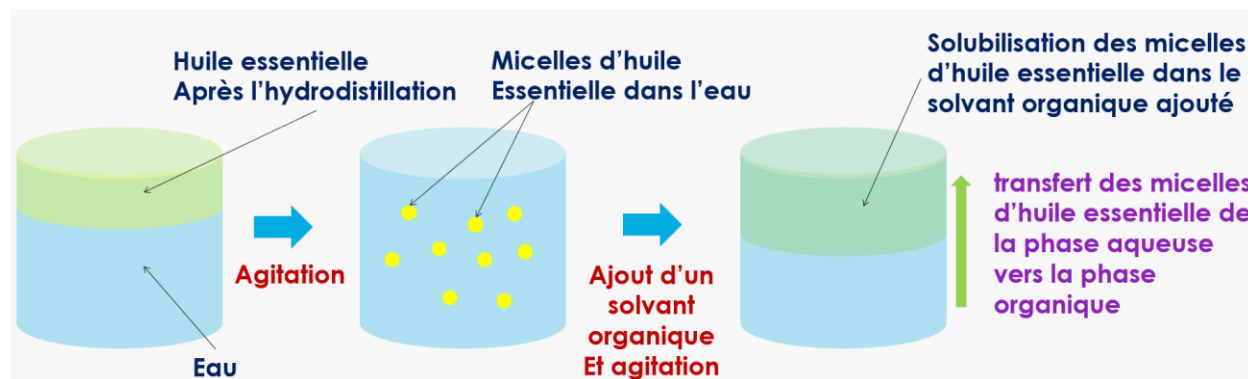
Solvants	Température d'ébullition (°C)	Densité	Avantages	Inconvénients
Cyclohexane	81	0,78	Peu toxique	Facilement inflammable
Dichloro-1,2-éthane	83	1,26	Peu inflammable	Modérément toxique, vapeurs irritantes
Dichlorométhane	40	1,34	Facile à éliminer	Forme des émulsions, nocif
Ether éthylique	35	0,71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

### Types d'extraction par solvant

**a-Extraction directe :** l'espèce chimique est extraite d'un produit naturel par macération (à froid) puis filtration (par exemple l'extraction des arômes des zestes d'orange).

**b-Extraction liquide-liquide :** c'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles. L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge. Du fait que l'eau ne s'évapore pas facilement, l'espèce chimique est difficilement récupérable si elle est en solution dans l'eau. Dans ce cas, il faut utiliser un solvant organique dans lequel la substance est très soluble (beaucoup plus que dans l'eau), celle-ci va passer de l'eau au solvant organique. Il faut que l'eau et le solvant organique ne soient pas miscibles.

L'extraction liquide-liquide consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique ou inversement, en utilisant pour cela deux solvants (l'un aqueux et l'autre organique), non miscibles, mis en contact intime.

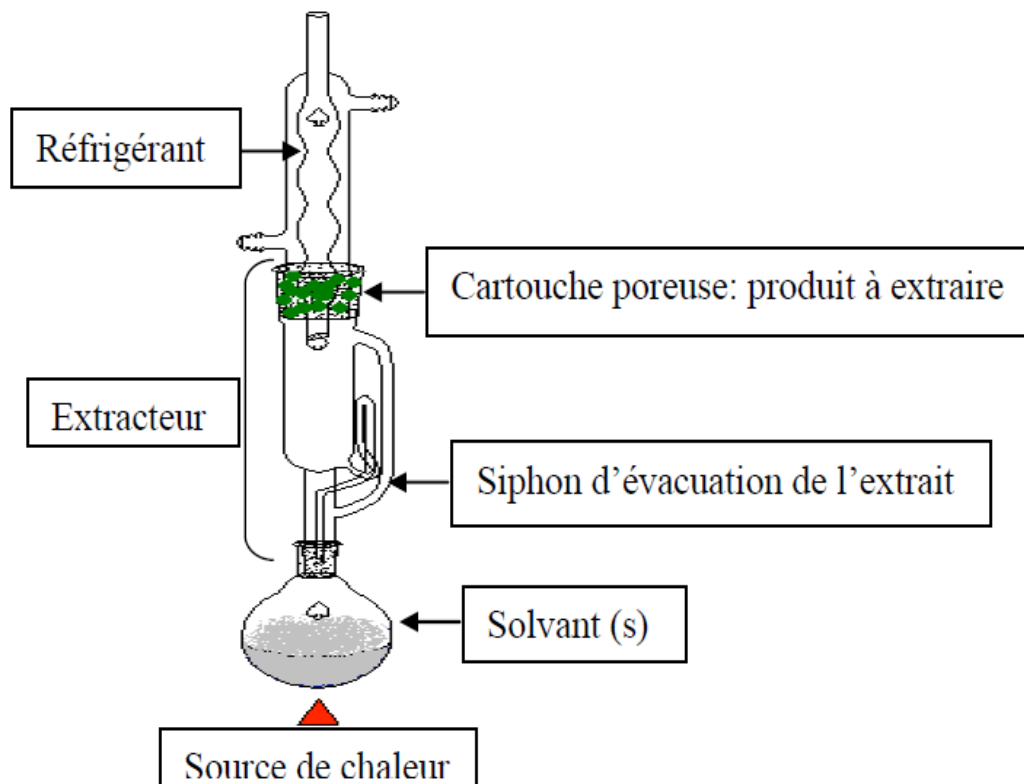


### c-Extraction solide-liquide

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

**A. Extracteur de Soxhlet :** est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur: Franz Von Soxhlet.





**Schéma d'un appareil de Soxhlet**

**B. Extracteurs de Kumagawa :** très proche de l'extracteur de Soxhlet, le Kumagawa a l'avantage de pouvoir être utilisé à des températures bien supérieures et d'être moins encombrant grâce à la cartouche incorporée dans le porte-ballon.



**Extracteurs de Kumagawa**

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

L'extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau) consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. C'est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résisteront pas au chauffage. La vapeur d'eau produite va entraîner avec elle un composé donné selon un phénomène physique particulier : la création d'un azéotrope (mélange de deux liquides qui bout à température fixe et ne se distille pas en bouillant). Il s'agit en fait d'un mélange de composés, non miscibles, (l'eau et une molécule odorante). La vapeur d'eau chargée en molécules organiques est condensée puis récupérée. Le liquide obtenu est appelé distillat. Il y a donc séparation de deux phases : l'une aqueuse et l'autre organique, cette dernière contenant le composé à extraire. Pour récupérer l'huile essentielle, il faut procéder à une extraction liquide-liquide.

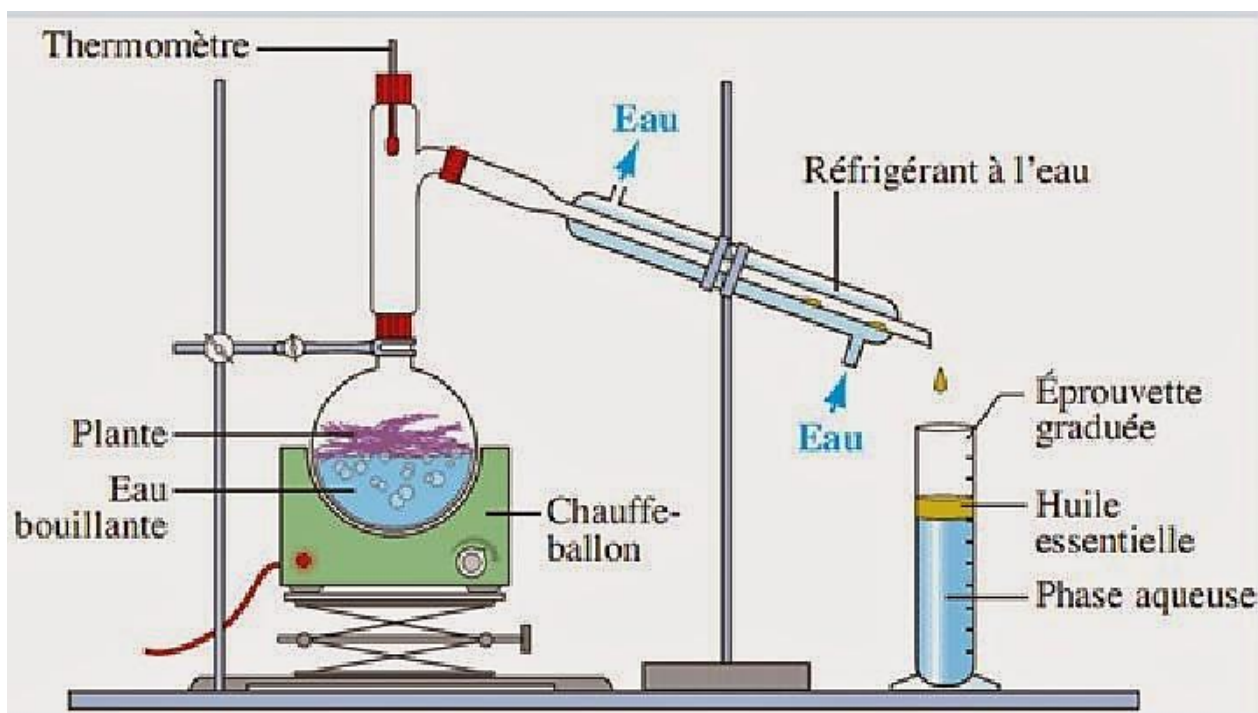
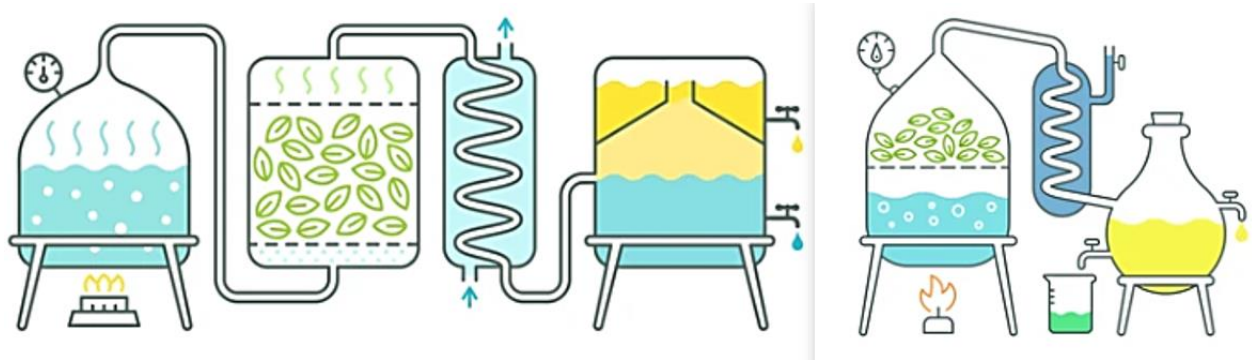


Schéma d'une hydro-distillation

C'est la distillation d'un mélange d'eau et d'un produit naturel. Lorsque l'on chauffe ce mélange, les arômes et les odeurs du produit (huile essentielle) naturel sont entraînés par la vapeur d'eau. Il suffit alors de condenser les vapeurs qui se dégagent par un réfrigérant afin de récupérer les arômes.



**Différents montage d'hydro-distillation**

Données concernant le principe actif de l'huile essentielle de quelques végétaux odorants :

Principe actif de quelques huiles essentielles	Densité ( d )	Température d'ébullition (°C)	Solubilité (g pour 100 mL)	
			Eau	Cyclohexane
Aldéhyde salicylique	1,167	196,5	ps	∞
Cinnamaldéhyde	1,112	251	tps	∞
Cuminaldéhyde.	0,978	235	i	s
Anéthole	0,994	235,3	tps	s
Estragol	0,964	215	i	s
Eucalyptol	0,924	176-7	tps	∞
Acétate de linalile	0,895	220	tps	∞
Limonène	0,842	177	i	∞

## Étapes d'hydro-distillation

**a-L'entraînement à la vapeur :** consiste à bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Par la suite, ces vapeurs sont condensées à l'aide d'un réfrigérant.

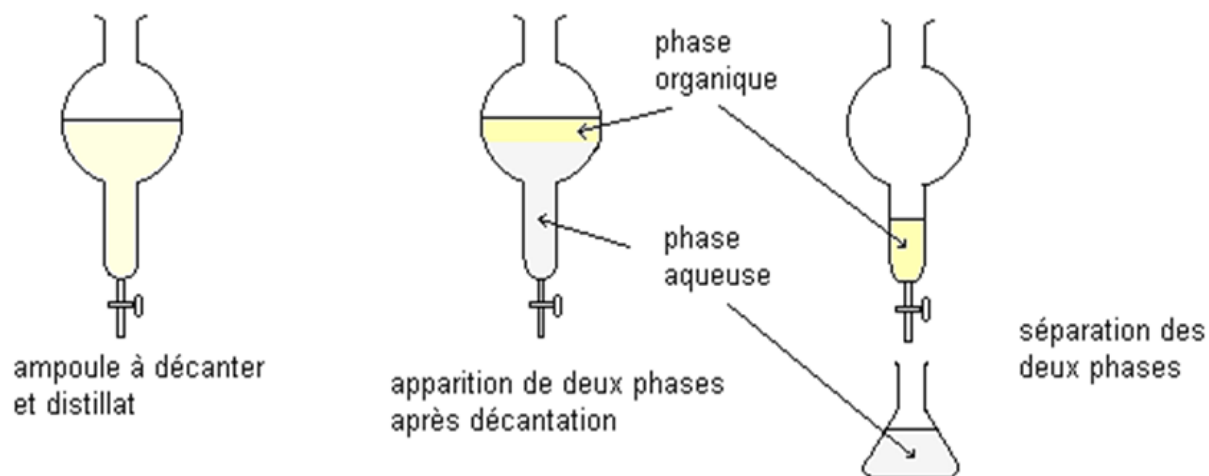
**b-Le relargage :** consiste à rendre les huiles essentielles, qui sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau, moins solubles par l'ajout du chlorure de sodium. De cette manière, il sera plus facile de récupérer ces huiles essentielles.

**c-La décantation:** est réalisée dans une ampoule à décanter, dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles se situe au-dessus.

**d-Le séchage et la filtration :** Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, il est important de faire agir un déshydratant

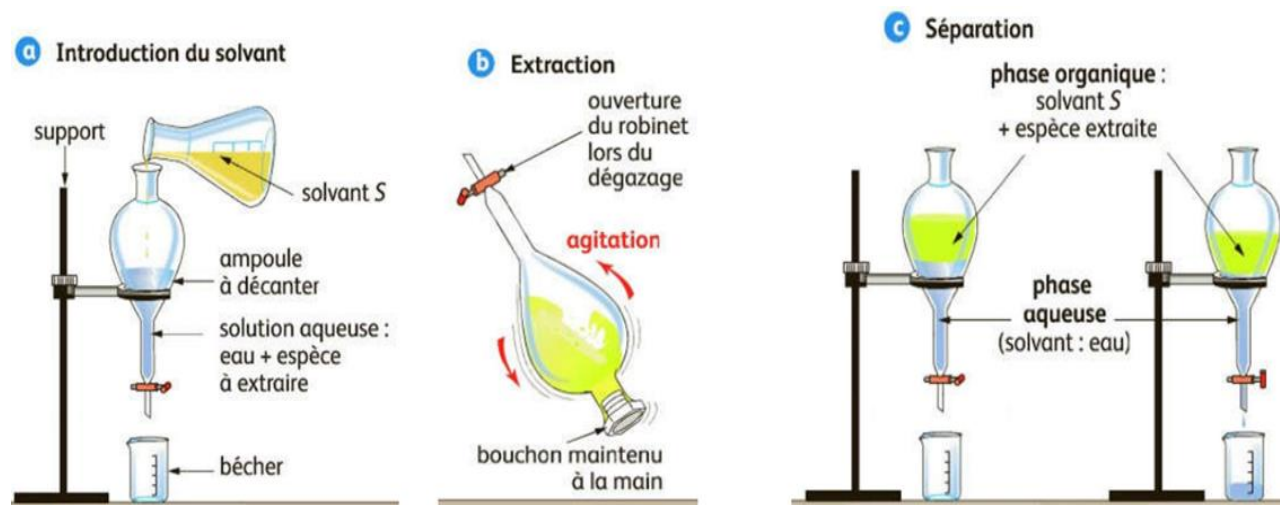
(grains de sulfate de magnésium anhydre (poudre) (C'est le séchage). Pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau il faut réaliser une filtration.

### Processus de la décantation après hydro-distillation



On distingue entre les phases par la densité. La phase organique est moins dense que l'eau donc elle se place au-dessus et la phase aqueuse au-dessous.

### Processus de la décantation après l'ajout du solvant suite à l'hydro-distillation



On bouche l'ampoule à decanter puis on agite en ouvrant régulièrement le robinet de l'ampoule pour laisser s'échapper les gaz qui peuvent se former au

cours de l'opération puis on laisse reposer. On sépare la phase organique (huile essentiel+cyclohexane) de la phase aqueuse (l'eau+sel).

L'hydro-distillation est une technique d'extraction qui présente certains Inconvénient :

- Nécessité de surveiller en permanence le niveau d'eau et d'arrêter la distillation lorsque l'on remet de l'eau.
- Grande quantité d'eau à chauffer et perte de temps au chargement et au déchargement de l'alambic + remplissage en eau, nettoyage, etc.
- Risque de détérioration des huiles.

## **II.5. Extraction des protéines**

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

### **A-Techniques mécaniques**

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

#### **Ⓐ-l'homogénéisateur de type Dounce**



### **Homogénéisateur de type Dounce**

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

### **Ⓑ- l'homogénéisateur de type Potter-Elvehjem**

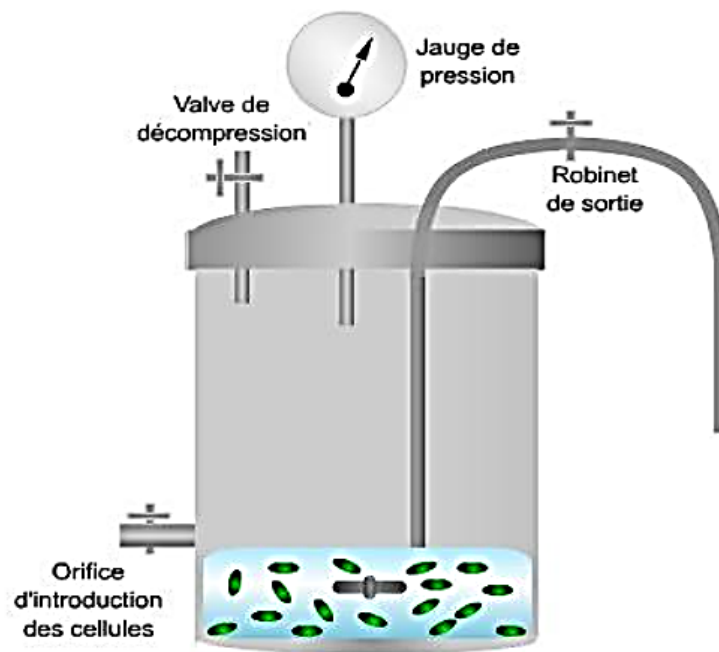


### **Homogénéisateur en verre de type Potter-Elvehjem (Broyeur de tissus Potter-Elvehjem)**

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

**-La bombe à disruption :** Cette technique consiste à traiter l'échantillon avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides.

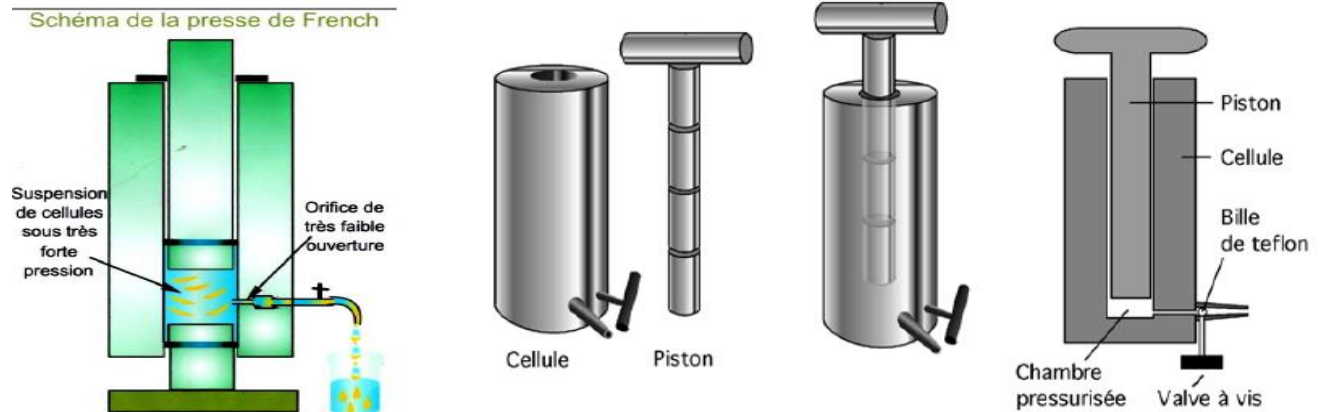
Par la suite, la pression est libérée tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclater.



### Homogénéisateurs à gaz ou la bombe à disruption

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





### Presse de French

L'appareil vise lui aussi à forcer les cellules à passer dans un espace plus petit qu'elles, ce qui déchire leur membrane (et réduit la plupart de leurs structures en marmelade). Il consiste en un cylindre creux en métal, cylindre dans lequel s'enfonce un piston de métal nanti de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide. À la base du cylindre, une petite valve est installée; celle-ci peut être obstruée par une petite bille en teflon.

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



### Bain à ultrason

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

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

**B-Techniques chimiques:** les techniques chimiques regroupent :

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

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

### **C-Techniques enzymatiques**

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

## II.6. Extraction des acides nucléiques

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

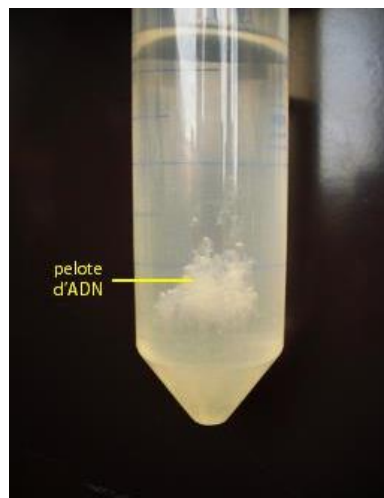
1-La lyse cellulaire par des méthodes physiques ou chimiques permet d'accéder à l'ADN.

2-L'élimination ou la séparation des lipides membranaires et des débris cellulaires se fait généralement à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate et par centrifugation.

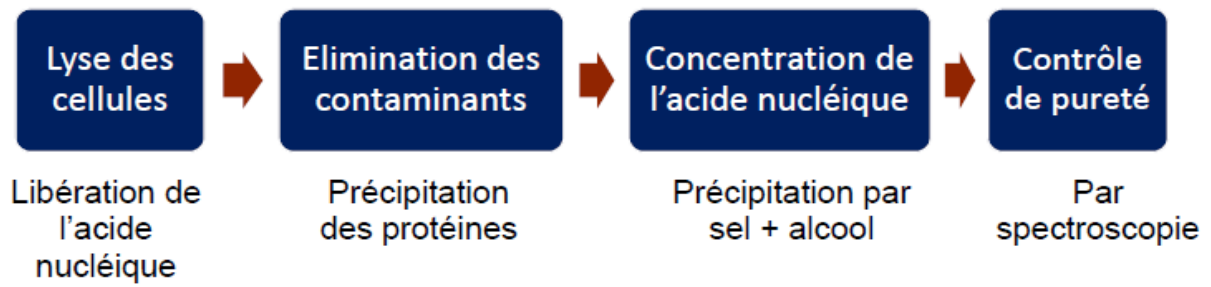
3-L'élimination ou la dénaturation des protéines de l'extrait cellulaire est effectuée à l'aide d'une protéase.

4-L'élimination de l'ARN est effectuée par addition de RNase qui dégrade rapidement l'ARN en ribonucléotides.

5-La précipitation /agrégation/ élution de l'ADN.



**Agrégation d'ADN**



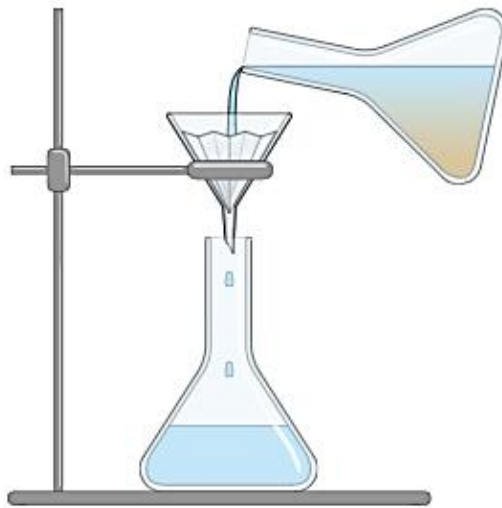
### **Les principales étapes de l'extraction des acides nucléiques**

<b>III.1. Filtration.....</b>	<b>50</b>
<b>III.2. Centrifugation.....</b>	<b>58</b>
<b>III.3. Chromatographie.....</b>	<b>62</b>
<b>III.4. Électrophorèse.....</b>	<b>70</b>

En chimie et biochimie, la purification désigne le processus qui consiste à séparer des substances chimiques ou des biomolécules dans le but d'éliminer les impuretés ou d'extraire des biomolécules spécifiques. Différentes méthodes de purification peuvent être utilisées en fonction des besoins :

### **III.1. Filtration**

C'est une méthode mécanique utilisée pour séparer un solide d'un liquide ou d'un gaz en faisant passer le mélange par une membrane ou un chiffon fin, par l'aide d'un entonnoir. C'est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie.



### **Filtration par gravité**

L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu (aussi communément appelé "gâteau" ou rétentat). Exemples :

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

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

### **Principe**

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

### **Applications**

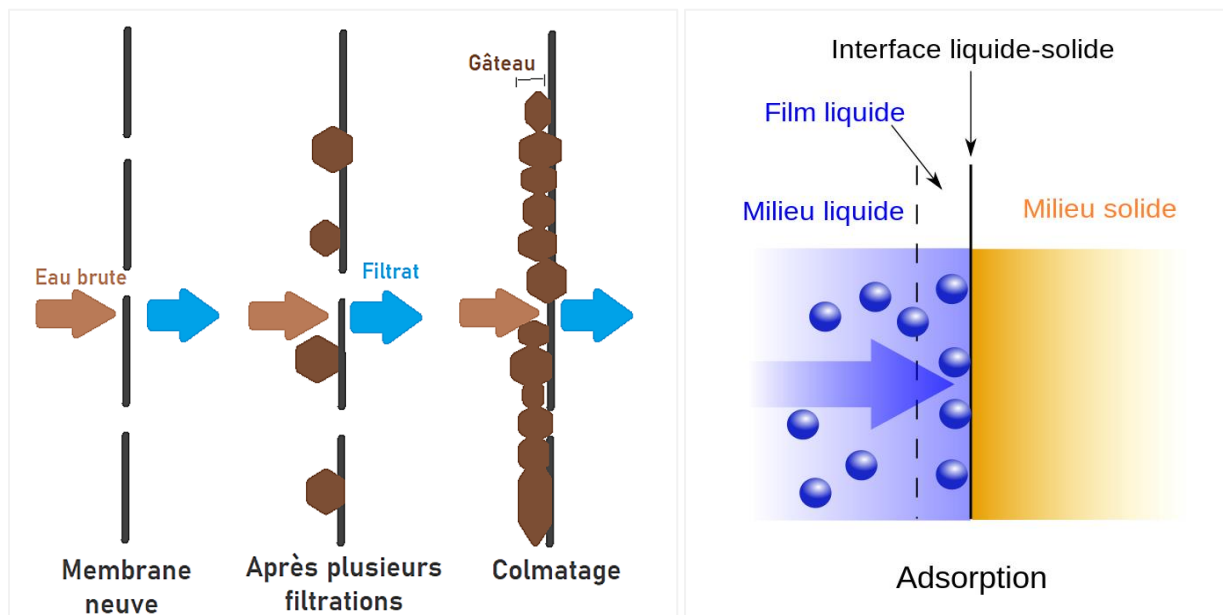
Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir :

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

### Deux phénomènes accompagnent souvent la filtration:

**a-Le premier phénomène est le colmatage :** la pénétration des particules dans les interstices [petits espaces vides entre les parties du filtre] de la matière filtrante provoque le phénomène du colmatage. Ceci modifie la porosité et ralentie la filtration.

**b-Le deuxième phénomène est l'adsorption :** il résulte de la charge électrique qui possède la matière filtrante. Ceci induit la rétention de certains produits par le filtre malgré que leurs dimensions permettent leur passage à travers les pores du filtre.



### Phénomènes accompagnent la filtration



### Les entonnoirs:

#### **A-Entonnoirs ordinaires:**

-en verre,...etc.

#### **B-Entonnoirs spéciaux:**

-Entonnoirs de BUCHNER.  
-Entonnoirs de HIRSCH.

### Les filtres:

#### **A-filtres d'épaisseur:**

(épais ou en profondeur)

#### **B-filtres membranes.**

(écrans ou de surface)

## **Matériel de filtration**

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

### **a. Filtration gravimétrique (filtration par gravité)**

Dans cette méthode, l'entonnoir de laboratoire équipé d'un papier filtre est utilisé où la différence de pression est créée par la hauteur du liquide sur le filtre. Elle présente les inconvénients suivants :

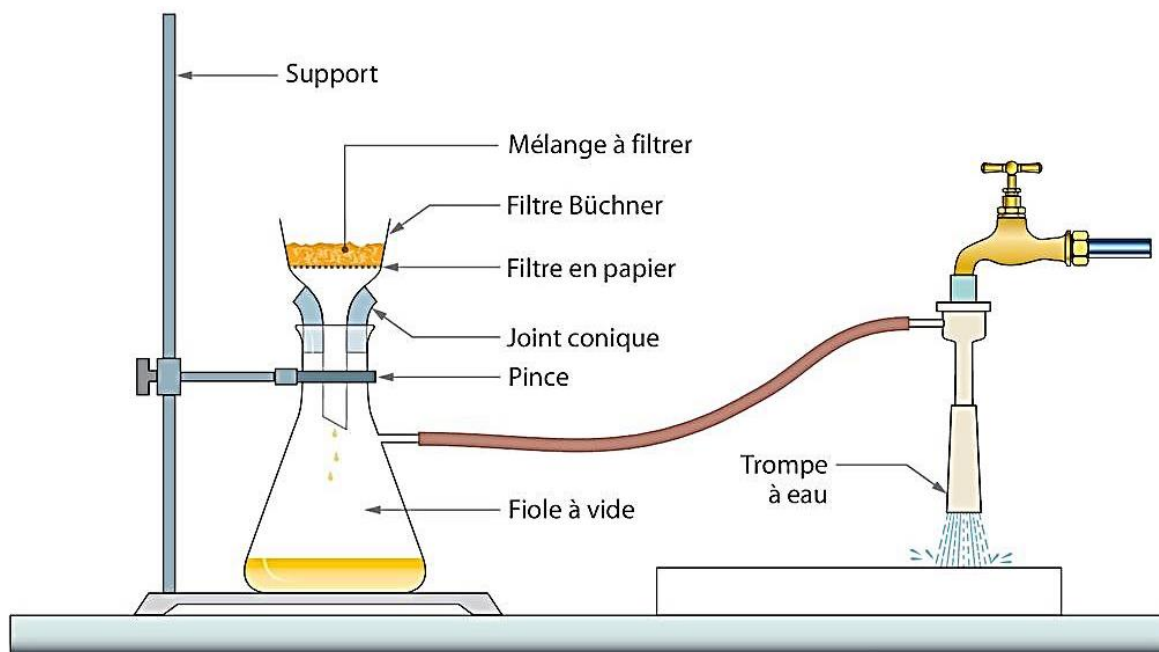
- La filtration est lente.
- La difficulté de récupération de la phase solide isolée, surtout lorsqu'elle est peu abondante.
- La séparation est incomplète : le solide retient une quantité non négligeable de liquide.

### **b. Filtration sous vide**

C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs spéciaux adaptés sur une fiole à vide,



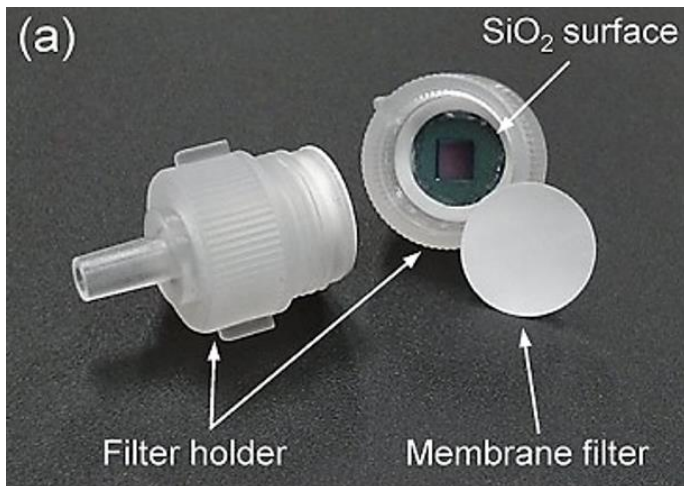
dans laquelle on crée une dépression, sont utilisés. La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant.



**Filtration sous vide**

### **c. Filtration sous pression**

La vitesse de filtration est augmentée en exerçant une pression sur le liquide à filtrer (membrane filtrante). Ce type de filtration évite le moussage et l'évaporation du solvant ; Ce système de filtration avec membranes filtrantes existe également sous forme de cartouches filtrantes (millipore) adaptable sur une seringue pratique pour la filtration des petits volumes de solution à filtrer.

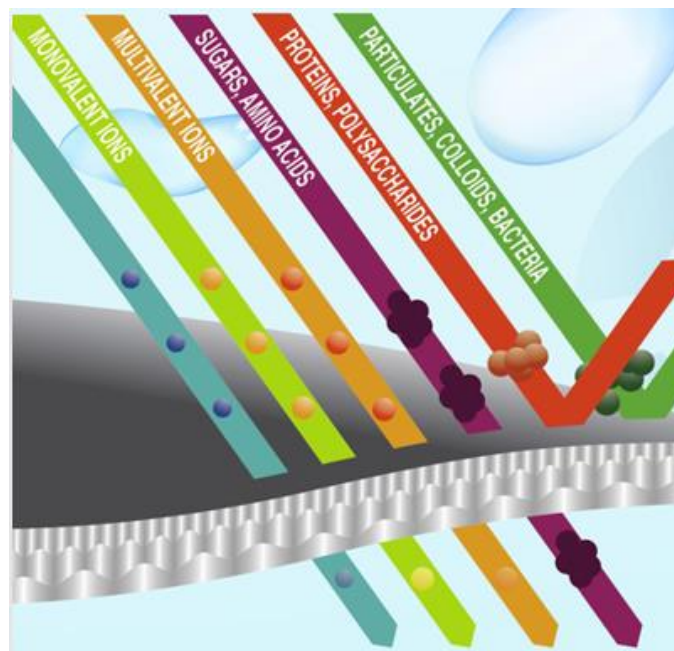


## Techniques de filtration sous vide

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

#### **d. Ultrafiltration et microfiltration**

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



#### **Principe d'ultrafiltration**

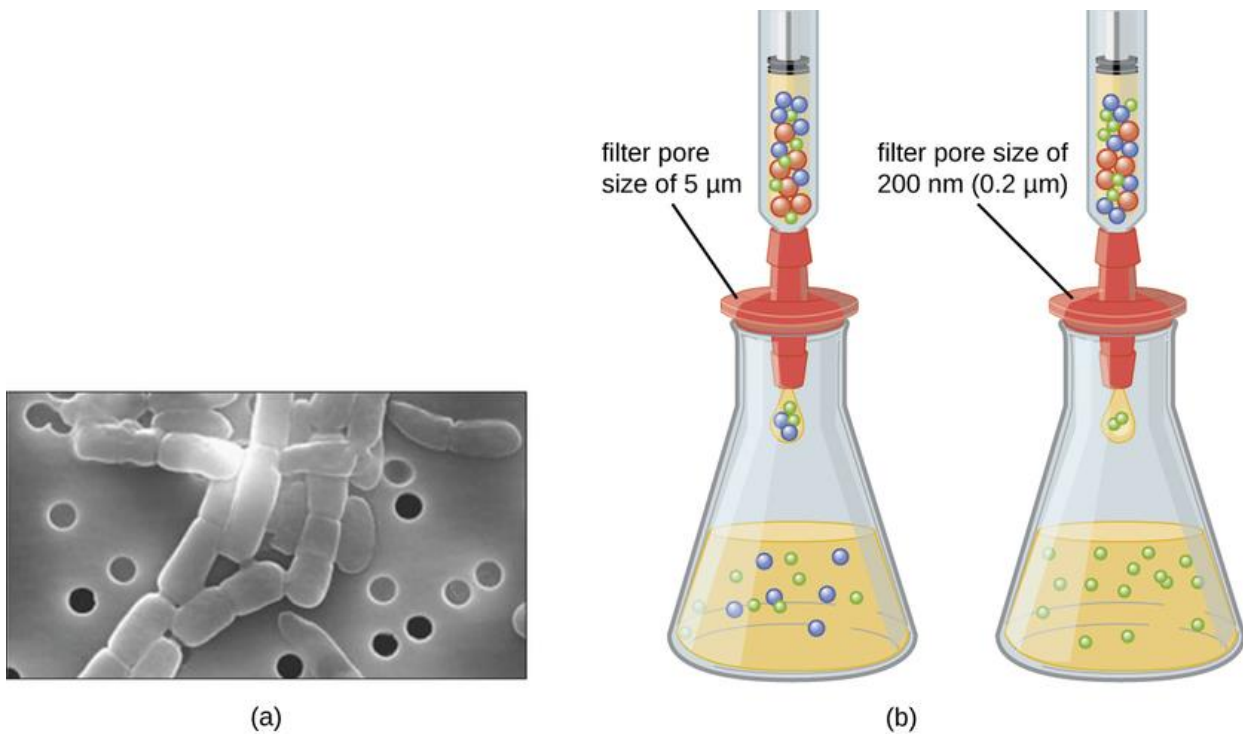
Les applications de l'ultrafiltration et de la microfiltration sont plus analytiques, outre la clarification et les filtrations stériles, on cite également :

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

Les filtres à membrane peuvent être utilisés pour éliminer les cellules ou les virus d'une solution :

(a) Cette micrographie électronique à balayage montre des cellules bactériennes en forme de bâtonnets capturées à la surface d'un filtre à membrane. Notez les différences dans la taille comparative des pores de la membrane et des bactéries. Les virus passeront par ce filtre.

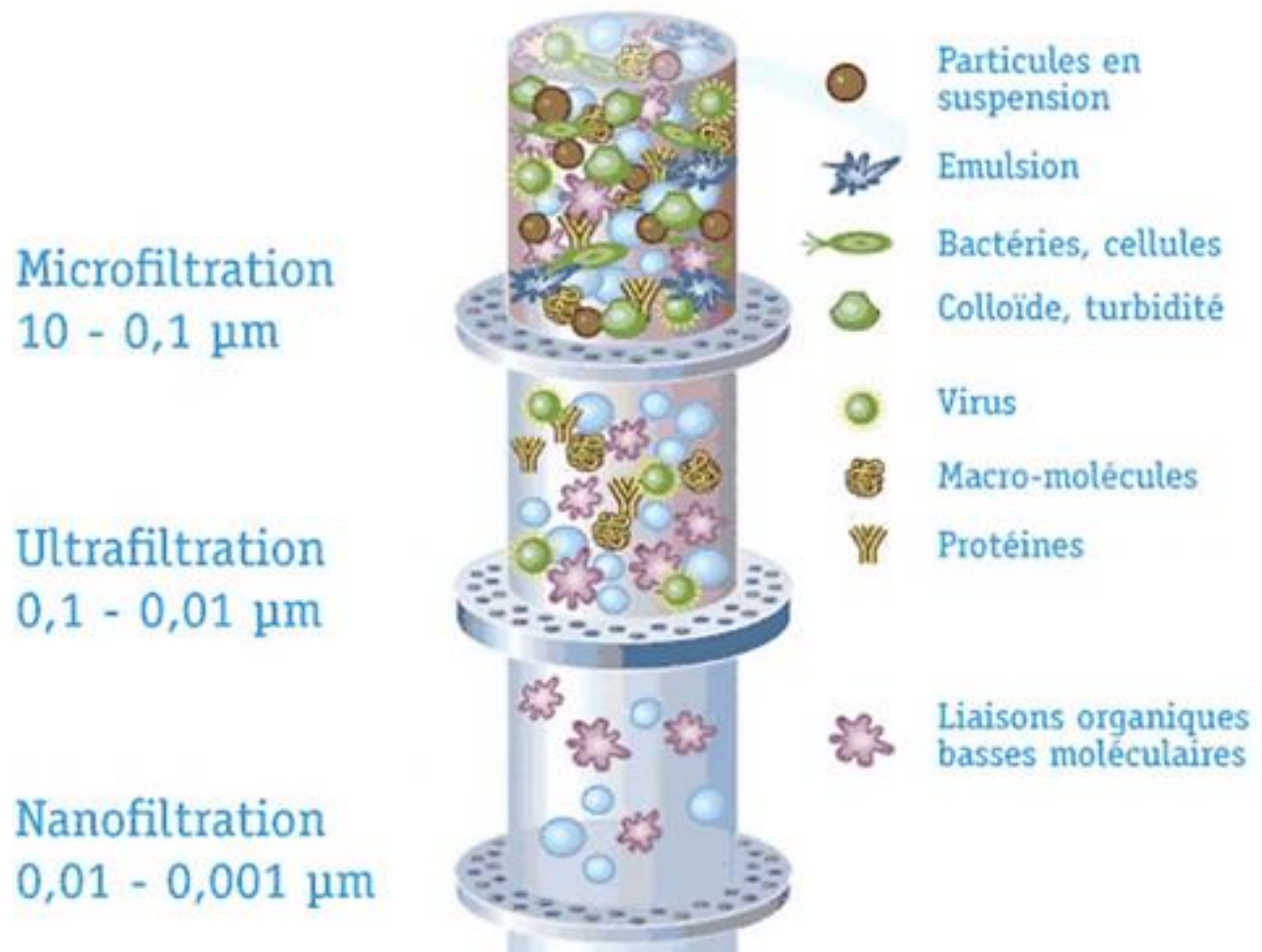
(b) La taille des pores du filtre détermine ce qui est capturé à la surface du filtre (animal [rouge] et bactéries [bleu]) et éliminé du liquide qui le traverse. Notez que les virus (vert) passent à travers le filtre le plus fin. (crédit a : modification des travaux du ministère américain de l'Énergie).



### Technique d'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de séparation membranaire des particules (macro-molécules, protéines, virus,...) en solution ou en suspension d'un mélange liquide (plasma, lait,...).

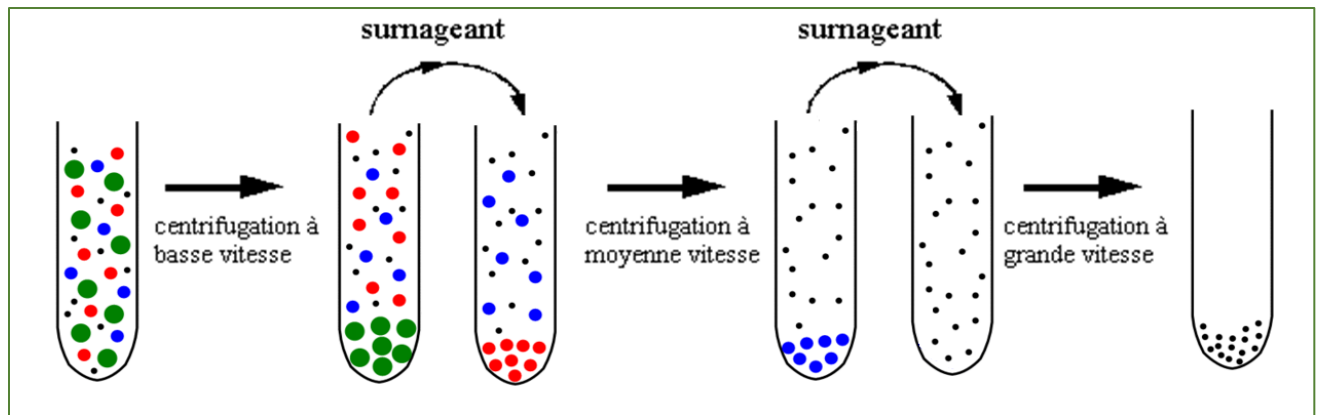




### Techniques de filtration fines

#### III.2. Centrifugation

La centrifugation (ou sédimentation) est un procédé dans lequel on sépare les molécules grâce aux différences de masse, en faisant tourner la solution à haute vitesse dans une centrifugeuse.



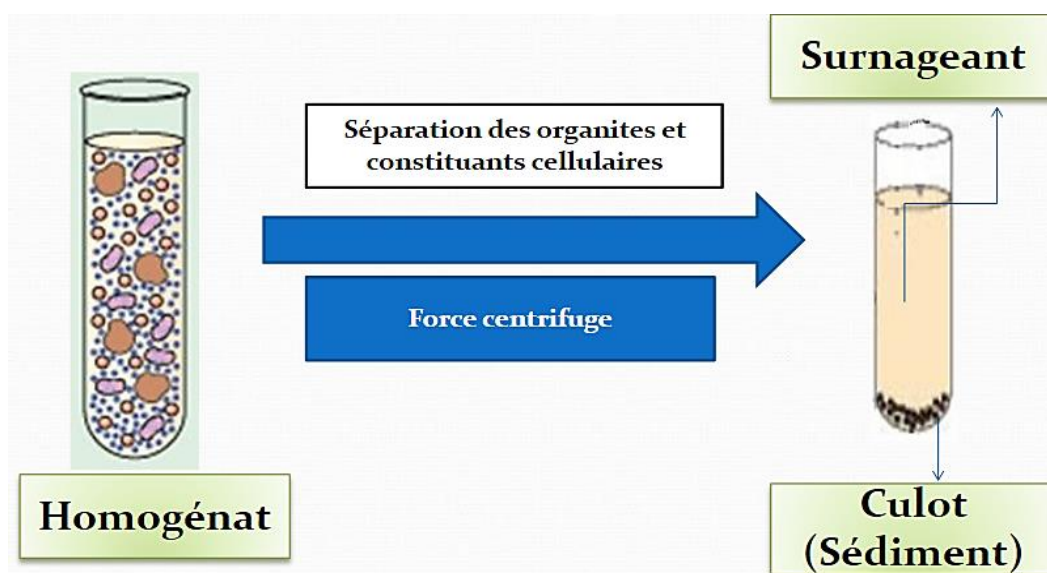
### Rotor à angle fixe

La centrifugation est une technique de séparation de phases (phases liquides non miscibles ou phase solide suspendue dans une phase liquide) soumises à la force centrifuge, en fonction de leur densité.

-La force centrifuge est créée par la rotation rapide d'un rotor, entraîné par un moteur électrique.

-La vitesse de rotation peut aller de 100 à 100 000 rpm (Revolutions Per Minute).

-La taille de la centrifugeuse dépend de la taille et/ou du nombre des échantillons.



### Principe de centrifugation

## Centrifugation différentielle

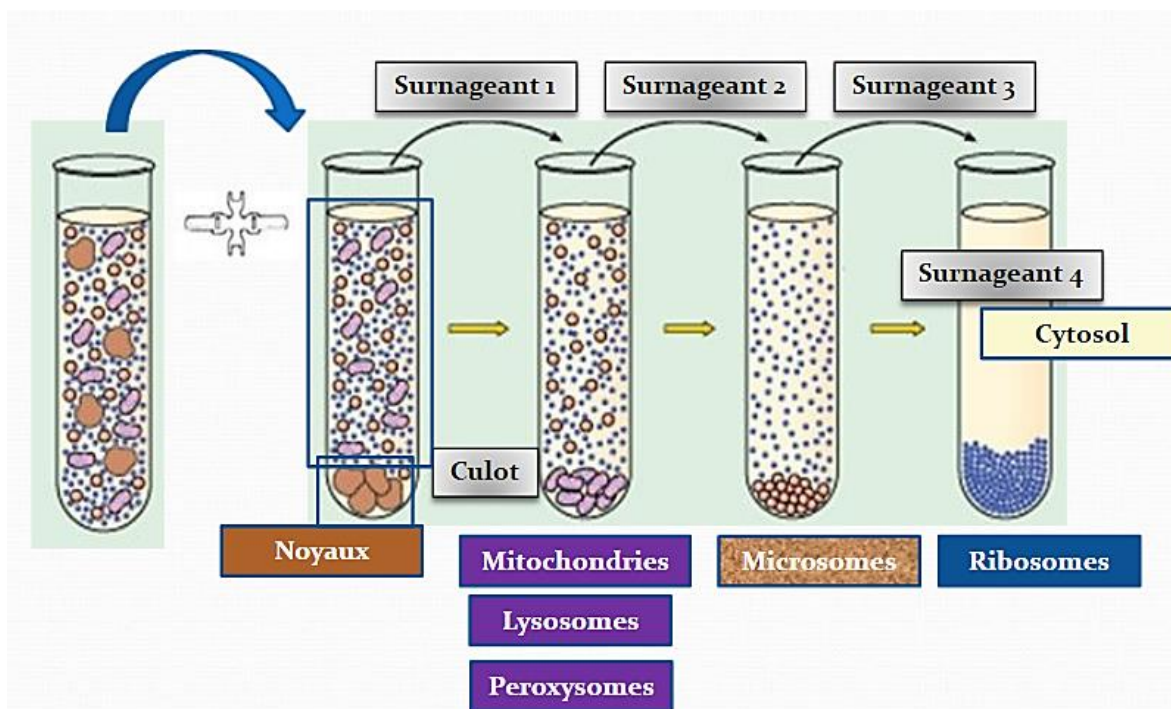


- Dépend de la taille et le poids des particule cellulaires
- Utilise des forces de centrifugation différentes et croissantes (des centrifugations consécutives)

## Centrifugation en gradient de densité



- Utilise des solutions, qui créent des gradient de densité
- Permet l'obtention de plusieurs bandes de séparation (chaque bande est occupée par un constituant cellulaire)

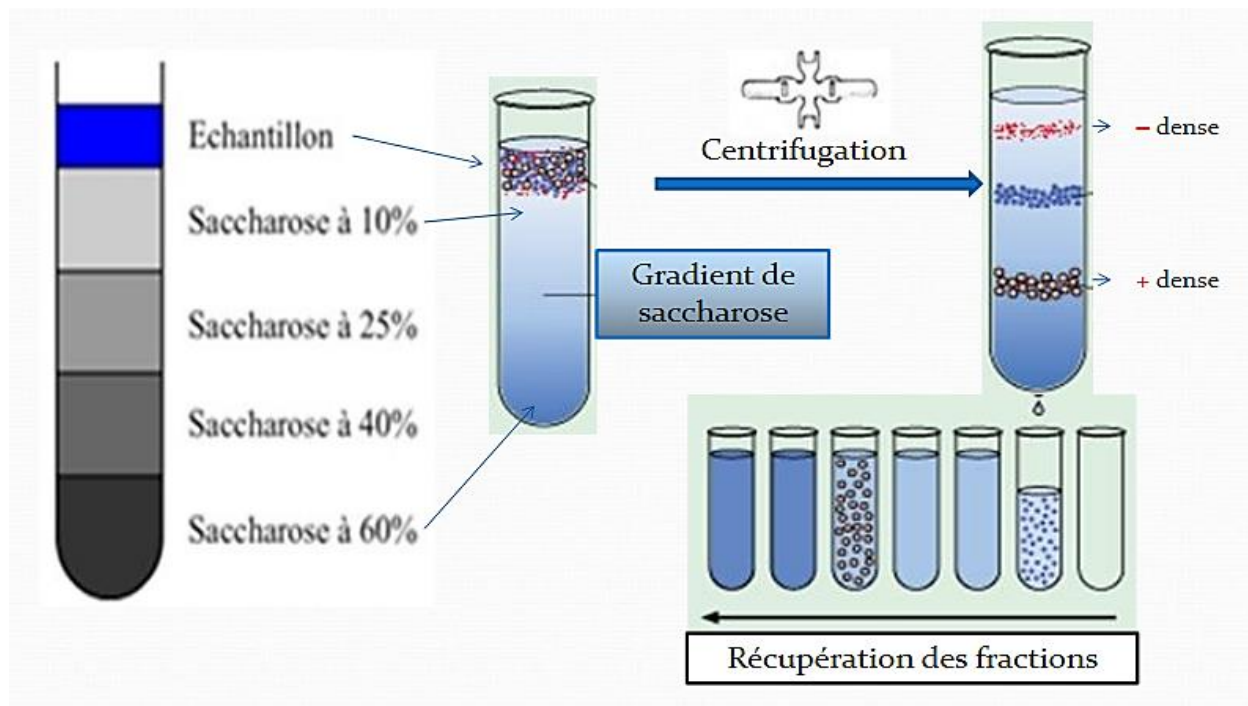
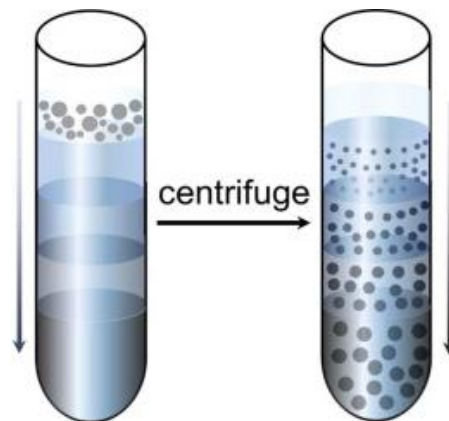


### a-Centrifugation différentielle

### b-Centrifugation en gradient de densité (centrifugation à l'équilibre ou zonale)

Dans une centrifugation *zonale*, l'échantillon est déposé en une mince bande au sommet d'un tube contenant un tampon présentant un gradient de densité. Les protéines s'enfoncent et se séparent dans le gradient en fonction de leur

coefficient de sédimentation (les plus lourdes et denses coulent plus vite). Comme toutes les protéines finiront par arriver au fond du tube, il faut arrêter la centrifugation avant, puis séparer chaque "étage" du tube (on fractionne le contenu du tube en en retirant des volumes égaux à partir du sommet).



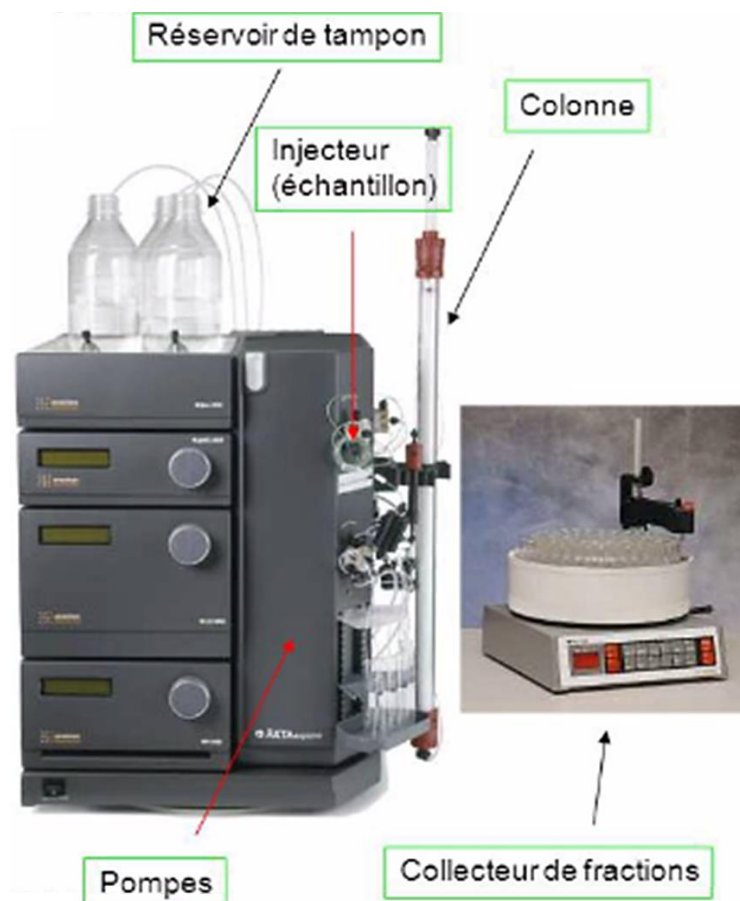
**b-Centrifugation en gradient de densité**



### III.3. Chromatographie

Elle est utilisée pour séparer et purifier les molécules comme les AA, les protéines, AG, polyphénols,...etc.; c'est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité de substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Cette technique se caractérise par :

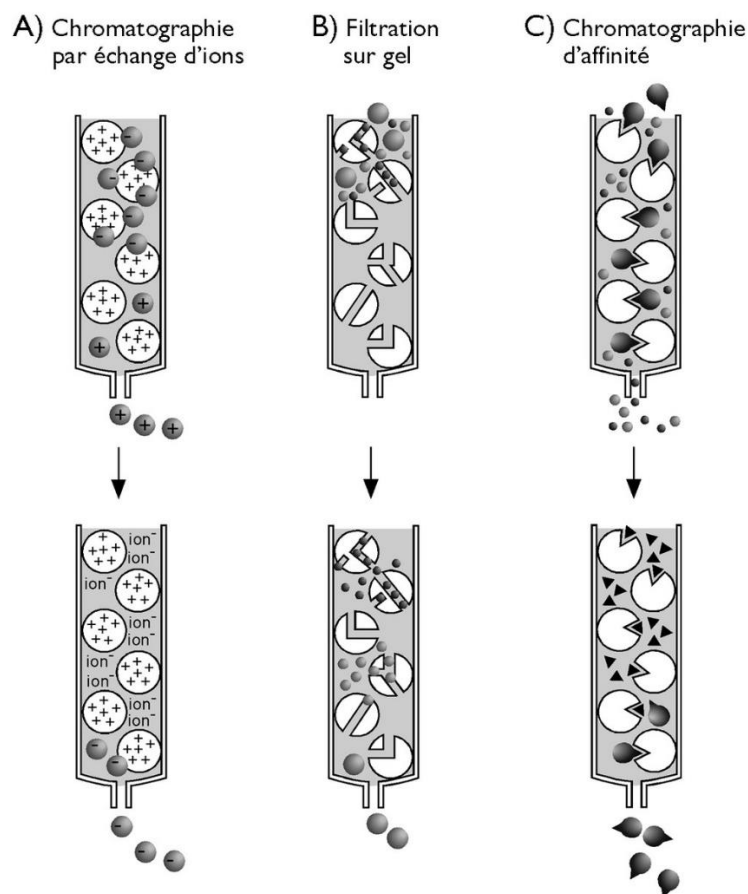
- Excellente sélectivité
- Grande pureté 80 – 90%
- Purifications en 1 ou 2 étapes
- Concentration des protéines
- Rapidité
- Non dénaturante



**Composantes de la chromatographie**

## Etapes générales d'une chromatographie :

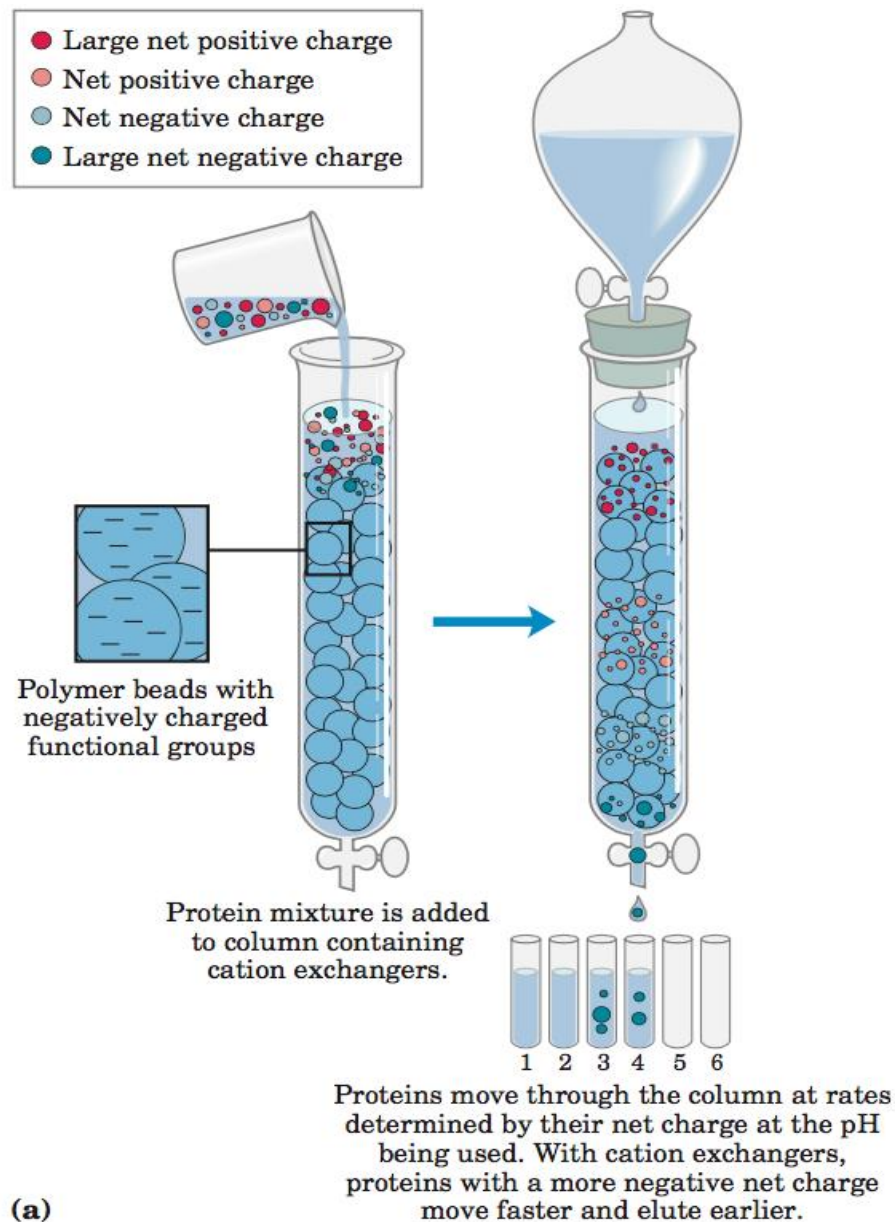
- **Equilibration:** la solution tampon sans protéines passe au travers de la phase stationnaire.
- **Injection:** la solution contenant la protéine d'intérêt passe au travers de la phase stationnaire.
- **Lavage:** différents tampons passent au travers de la phase stationnaire. Ces trois premières phases utilisent des principes communs aux différentes techniques de chromatographie.
- **Elution ou décrochage:** on libère les protéines d'intérêt fixées sur la phase stationnaire. Cette dernière phase utilise un principe pouvant adopter différentes variations selon la chromatographie utilisée.








Etapes générales d'une chromatographie

## **$\alpha$ -Chromatographie par échange d'ions**

Elle exploite la charge des protéines. Elle nécessite une matrice chargée, qui retiendra plus longtemps les protéines de charge opposée que les autres protéines. La protéine est éluée soit grâce à un autre ion, qui entre en compétition avec la protéine pour se lier à la matrice, soit en modifiant le pH, qui déstabilise les interactions ioniques.



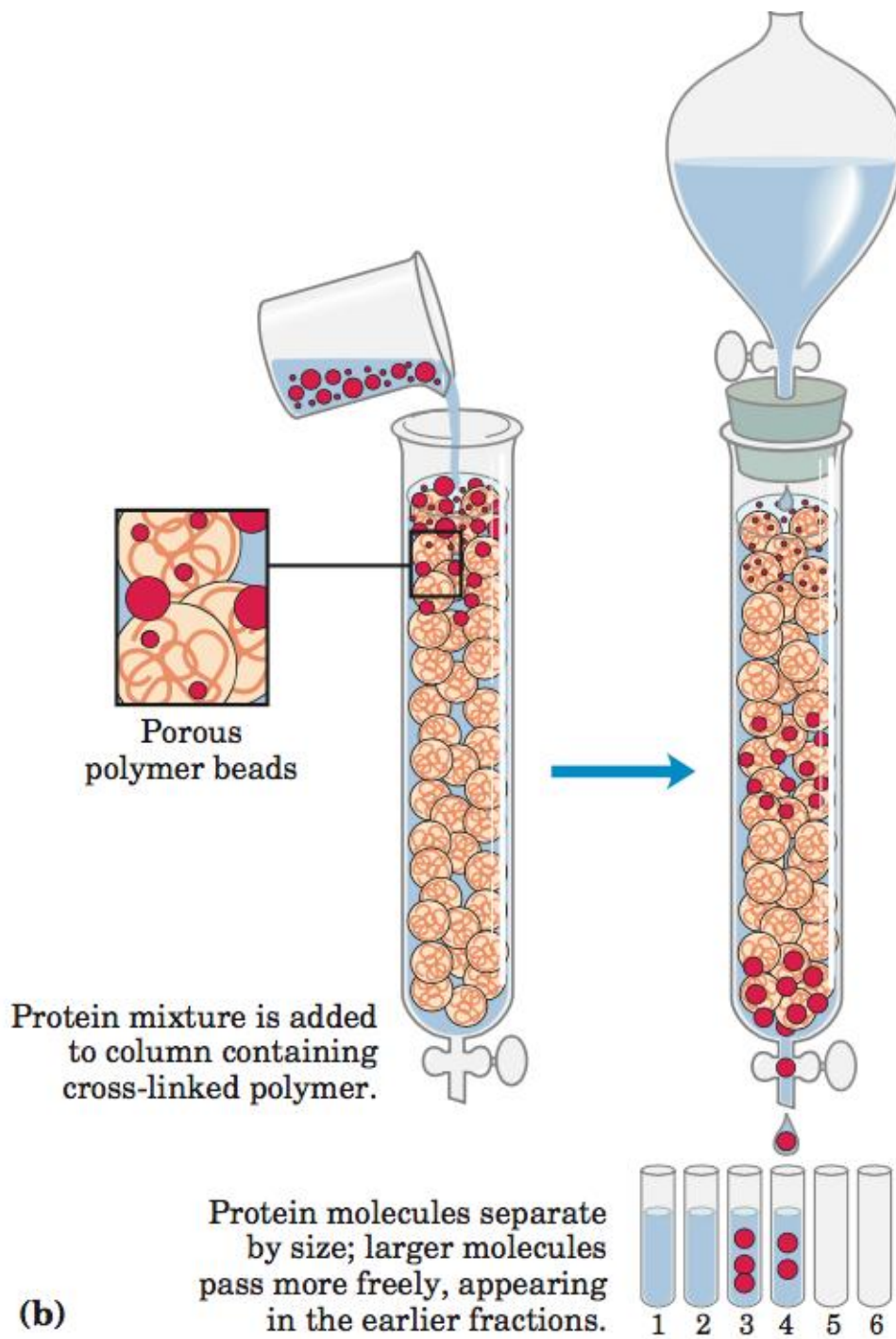
## **Chromatographie par échange d'ions**

 <p>DEAE (diethyl aminoethyl-)</p>	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $\text{H}$	Échangeur d'anions
 <p>QAE (quaternary aminoethyl-)</p>	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $\text{CH}_2$ $\text{CHOH}$ $\text{CH}_3$	Échangeur d'anions
 <p>CM (carboxymethyl-)</p>	$\text{O}$ $\text{O}^-$	Échangeur de cations
 <p>Phospho-</p>	$\text{O}$ $\text{O}^-$ $\text{O}^-$	Échangeur de cations
 <p>-S (monoS, p.e.)</p>	$\text{O}$ $\text{O}^-$ $\text{O}$	Échangeur de cations

### Différents échangeurs utilisés en chromatographie d'échange d'ions

#### b-Chromatographie par filtration sur gel

La chromatographie d'exclusion (ou par filtration sur gel) exploite la taille des protéines. Les plus petites protéines sont retenues plus longtemps par les pores de la matrice que les grosses, qui traversent rapidement la colonne.



Chromatographie par filtration sur gel

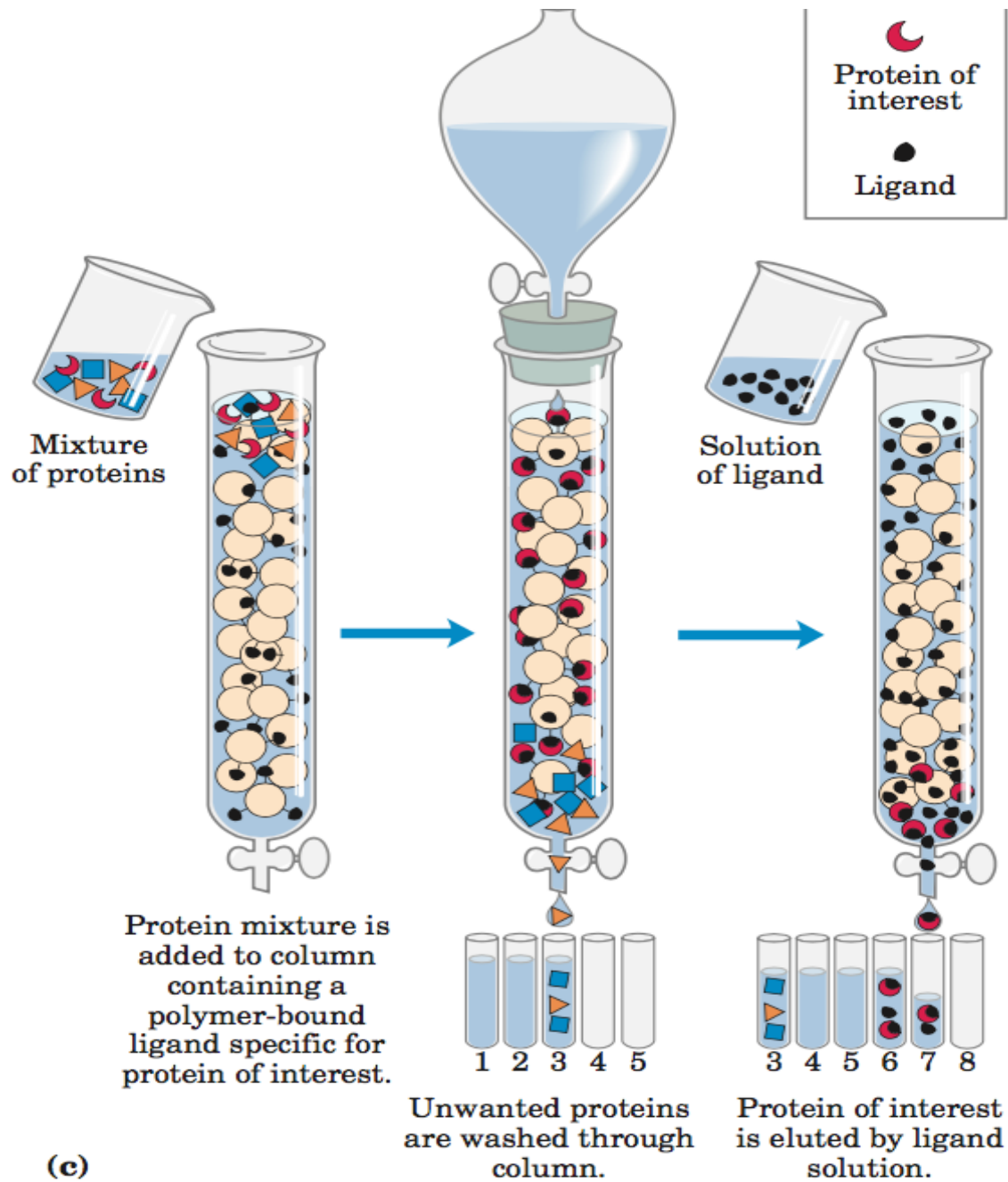
Nom de la résine	Capacité de fractionnement (en Da)
<i>type dextran</i>	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1 000- 5 000
Sephadex G-75	3 000- 70 000
Sephadex G-200	5 000- 800 000
<i>type polyacrylamide</i>	
Bio-gel P2	200- 2 000
Bio-gel P6	1 000- 6 000
Bio-gel P-150	15 000- 150 000
Bio-gel P-300	60 000- 400 000
<i>type agarose</i>	
Sepharose 2B	2 000 000- 25 000 000
Sepharose 4B	300 000- 3 000 000
Bio-gel A-0,5M	30 000- 500 000
Bio-gel A-15M	30 000- 15 000 000
Bio-gel A-150M	5 000 000- 150 000 000

#### Porosité de gel utilisé en chromatographie d'exclusion

#### c-Chromatographie d'affinité

Elle exploite une interaction forte des protéines avec une autre molécule retenue dans une colonne ; un substrat peut être lié à la matrice pour retenir son enzyme

correspondante. La protéine d'intérêt est généralement éluée avec une molécule compétitrice ayant de l'affinité pour la matrice.



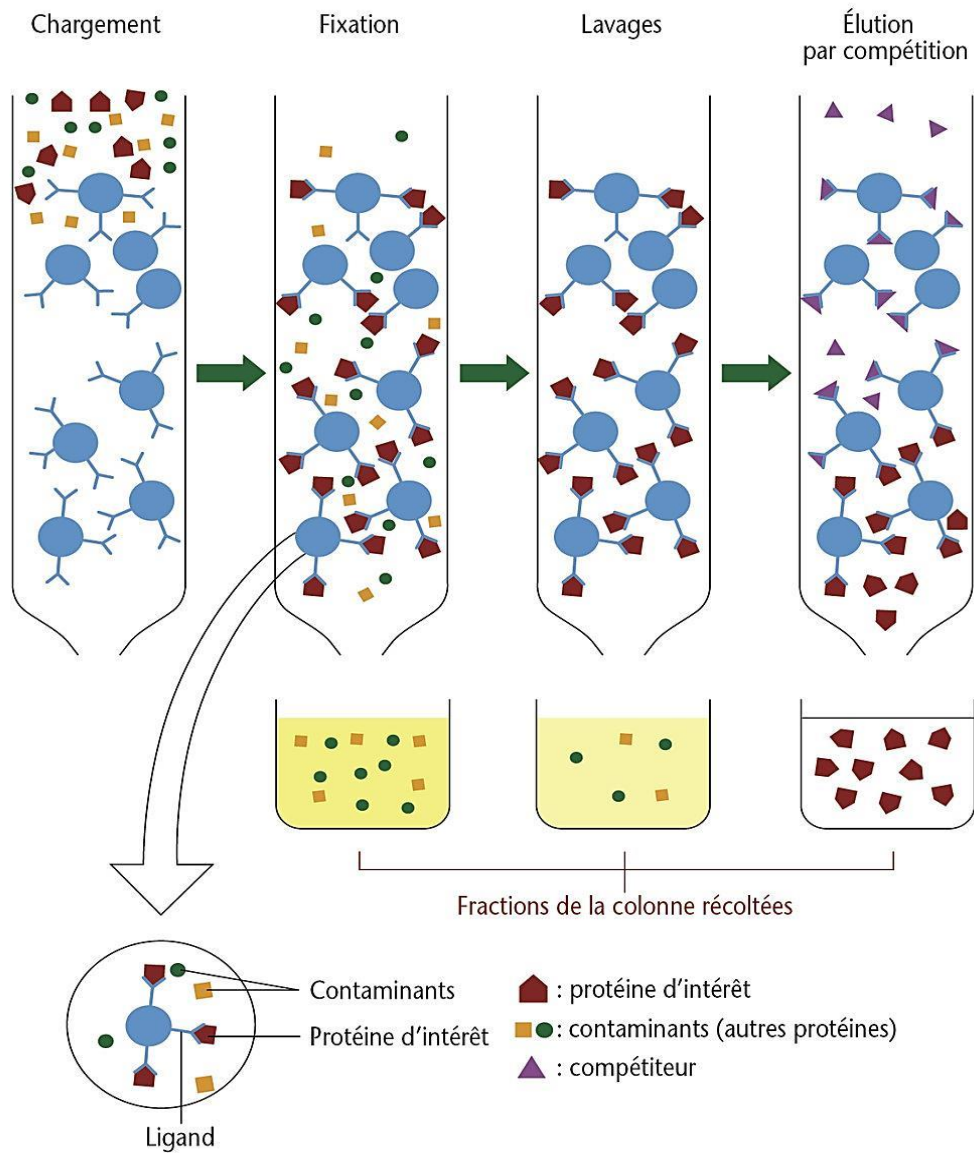
### Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité dans une colonne contenant des ligands fixés sur la phase solide, afin de purifier une biomolécule : protéine d'intérêt.



Trois types d'affinités sont utilisés :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité anticorps-antigène

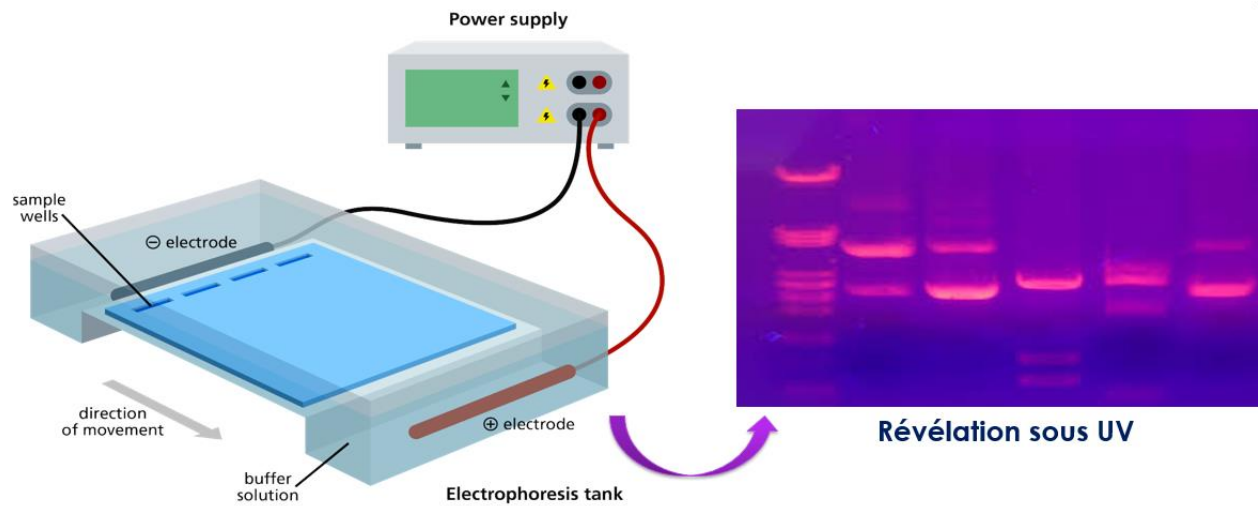


### Chromatographie d'affinité ligand-récepteur

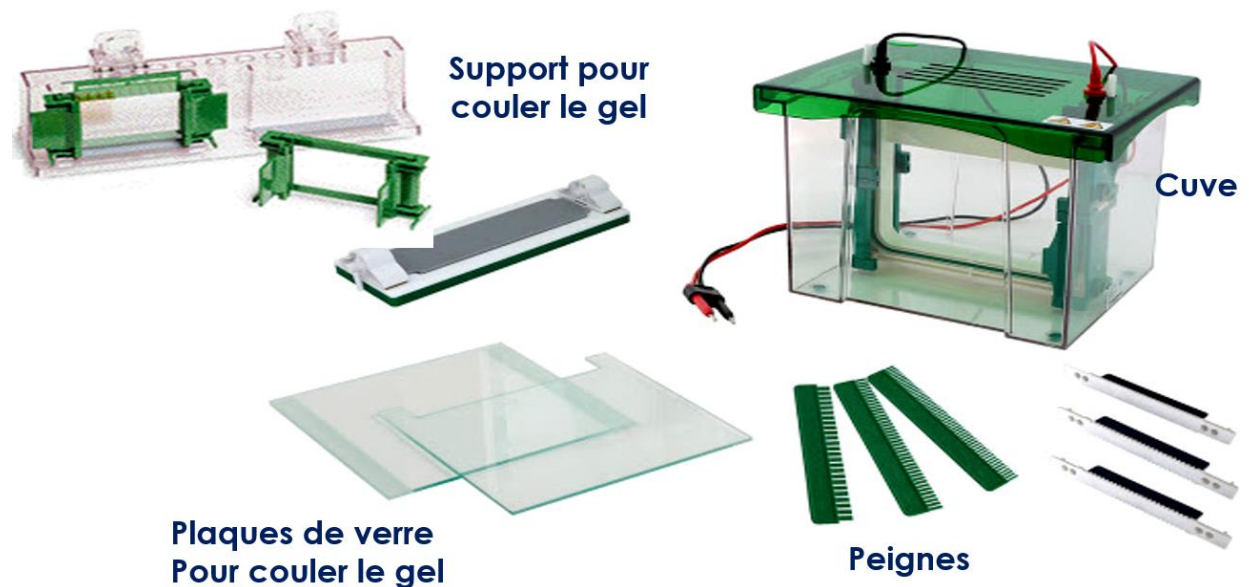


### III.4. Électrophorèse

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



#### Technique d'électrophorèse



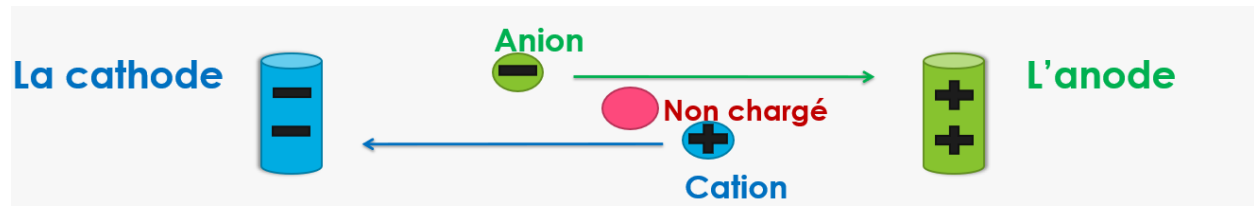
#### Composantes d'appareil électrophorèse vertical

L'électrophorèse permet de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique.

Ceux-ci migrent vers leur électrode respective :

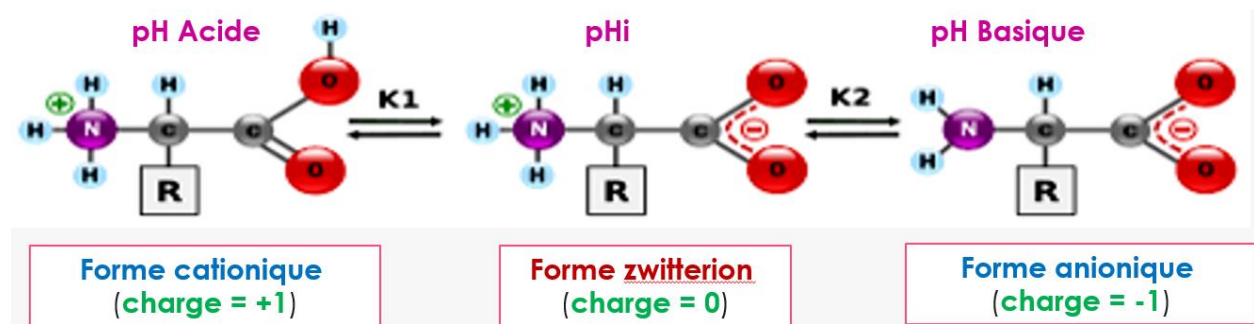
- Les **anions** (chargés négativement) migrent vers l'**anode** (potentiel positif);
- Les **cations** (chargés positivement) migrent vers la **cathode** (potentiel négatif).

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



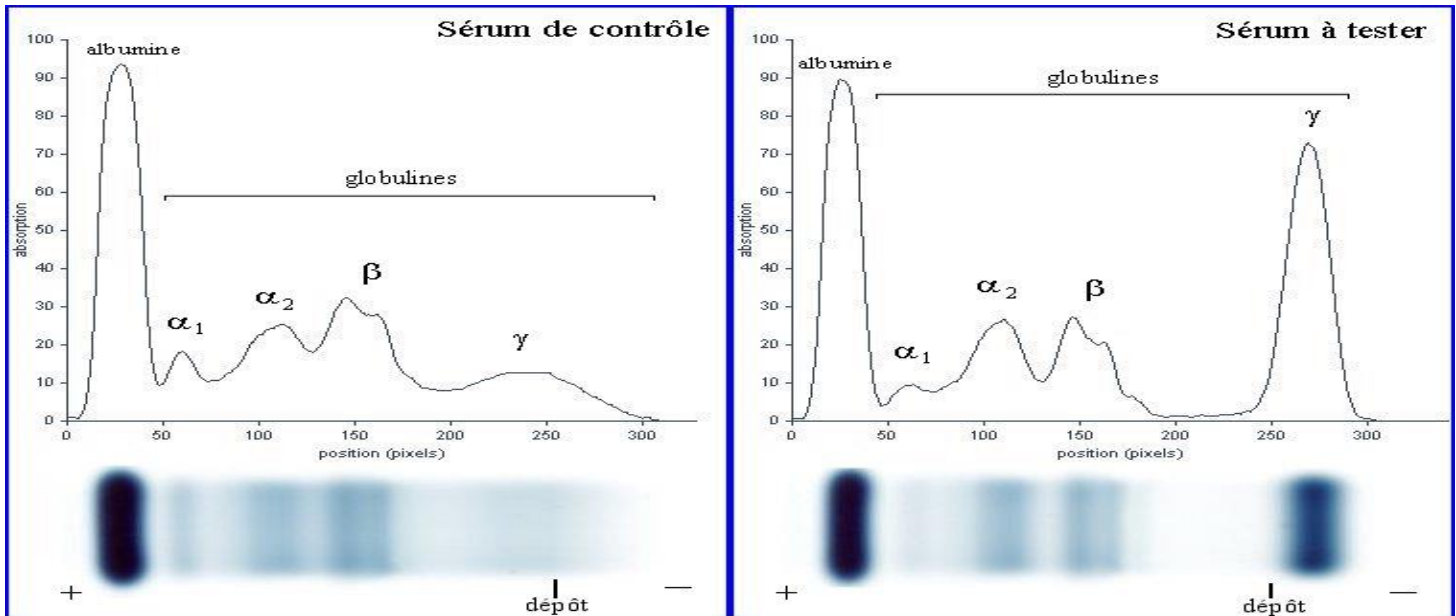
### Principe d'électrophorèse

La charge d'une particule est fonction du pH isoélectrique de cette dernière et de pH du solvant ; on appelle  $pH_i$  d'une particule le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique (forme zwitterion : charge = 0).



Par conséquent, la différence  $pH-pH_i$  détermine le signe de la charge d'une particule, plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante :

- Si  $pH < pH_i \rightarrow$  charge nette positive (**cation**) donc migration vers la **cathode**;
- Si  $pH > pH_i \rightarrow$  charge nette négative (**anion**) donc migration vers l'**anode**;
- Si  $pH = pH_i \rightarrow$  charge nette nulle (**zwitterion**) donc **pas de migration**

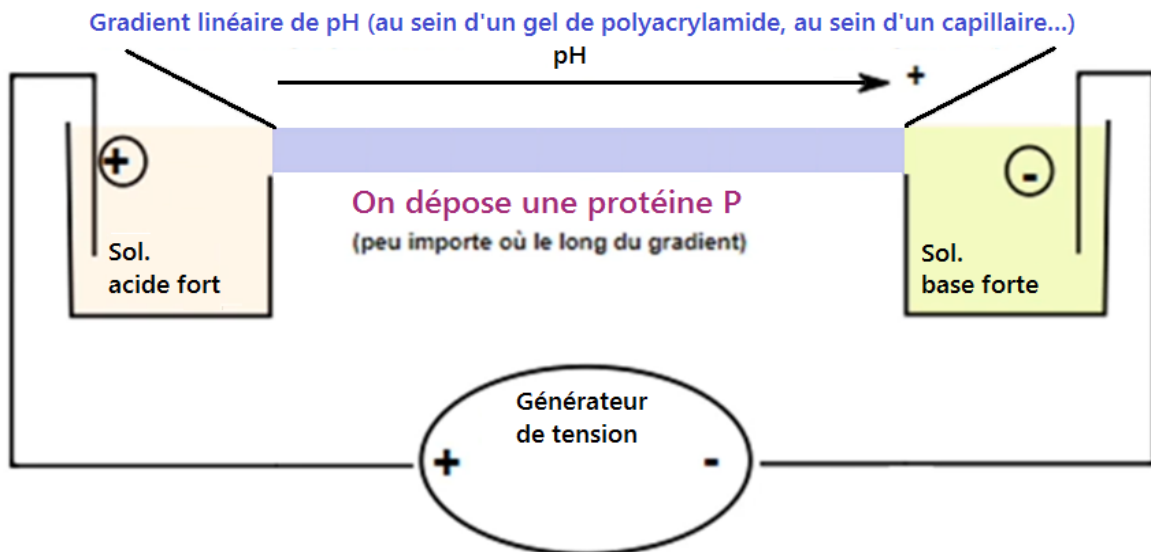


## Une gammopathie monoclonale révélée par une électrophorèse

### Différents types d'électrophorèse

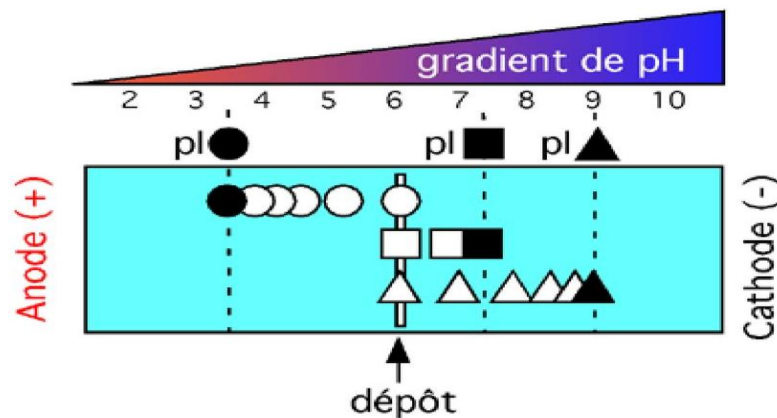
❶ **Isoélectrofocalisation** (au sein d'un gel de forte porosité: polyacrylamide ou agarose, ou au sein d'un capillaire)

L'isoélectrofocalisation ou focalisation isoélectrique est une technique qui sépare les protéines les unes des autres en fonction de leur point isoélectrique (pHi).



### Principe d'isoélectrofocalisation

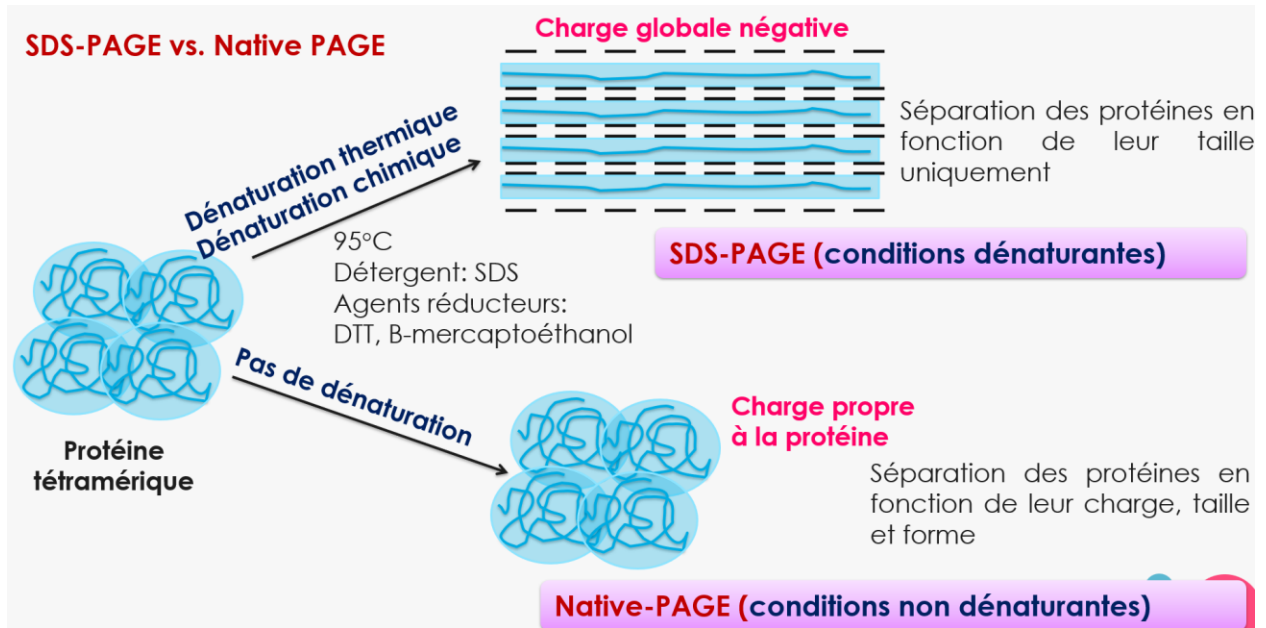
Elle consiste en une migration, induite par un courant électrique, des protéines dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur  $pI$  -moment auquel elles cessent de migrer, puisque leur charge nette est nulle. On génère le gradient en soumettant un mélange d'ampholytes à un courant électrique. Ces sont de petites molécules à caractère amphotère



### Modes de migration moléculaire en isoélectrofocalisation

#### ⌚ Électrophorèse en conditions natives (non dénaturantes) et en conditions dénaturantes

L'électrophorèse peut se faire en conditions natives ou en conditions dénaturantes. Les conditions natives respectent la structure de la molécule alors que les conditions dénaturantes dénaturent les molécules grâce à l'ajout d'un agent dénaturant dans le tampon.



### **α-Electrophorèse en conditions non dénaturantes (natives)**

Dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes (natives), les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif.

Il faut donc éviter:

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

La séparation se fait en fonction de nombreux critères. Pour un support et un voltage donné, la vitesse de migration dépendra de :

- 1. La charge native de la molécule:** plus la charge est importante, plus la vitesse de migration sera importante ;
- 2. La masse moléculaire:** plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible ;

Comme son nom l'indique, dans cette variante, les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native.

### **b-Électrophorèse en conditions dénaturantes**

Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont:

- ▶ Les traitements thermiques (températures élevées);
- ▶ Les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques);
- ▶ L'utilisation d'agents dénaturant comme l'urée ou le SDS (Sodium dodécylsulfate). Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes.

Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire.

- La charge n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées);
- La charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses);
- L'interprétation des résultats sera plus simple que celle d'une électrophorèse en conditions natives.

### **Ⓢ Électrophorèse sur support ou l'électrophorèse de zones:**

L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné. Les espèces ioniques migrent soit vers la cathode (-) soit vers l'anode (+) suivant leur charge.

- Le terme « électrophorèse de zone » est utilisé lorsque les mobilités sont examinées sur des bandes de papier, d'acétate de cellulose ou d'acrylamide. Ces dispositifs ont été largement utilisés surtout pour la séparation de protéines.
- Pour l'électrophorèse sur gel, deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide.

### **A-Électrophorèse sur gel d'agarose;**

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur charge, leur taille (poids moléculaire) ou les deux à la fois. L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (m/v) et permet de séparer des molécules de très grande taille (supérieure à 200 kD), principalement de l'ADN ou de l'ARN. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI) avant de visualisation en lumière UV.

### **B- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE);**

Le polyacrylamide est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (m/v) et permet de séparer des molécules plus petites : protéines, peptides et des fragments d'acides nucléiques. On peut aussi faire varier sa réticulation.

### **C-Électrophorèse capillaire (support poreux stabilisant la phase liquide).**

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection (on injecte seulement quelques nanolitres de l'échantillon). L'électrophorèse capillaire est une méthode de séparation analytique par laquelle les composants d'un mélange sont séparés en fonction de leur mobilité électrophorétique. La méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse,... Dans les premières expériences, un tube en verre U rempli de gels ou de solutions était utilisé. Les capillaires ont été utilisés après les années 1960.

#### ④ Électrophorèse bidimensionnelle (couple l'isoélectrofocalisation et le SDS-PAGE)

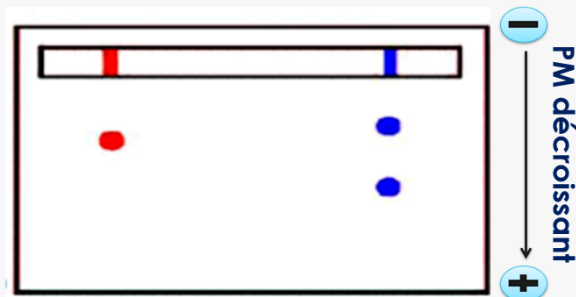
L'électrophorèse bidimensionnelle; couple une isoélectrofocalisation à une migration en fonction de la taille (SDS-PAGE); on sépare:

① Selon le **pHi** dans la 1<sup>ère</sup> dimension (**IEF**);



1<sup>ère</sup> dimension: séparation en fonction du pHi  
**Électrophorèse sur gradient pH (Empholytes)**

② Selon la **masse** molaire dans la 2<sup>ème</sup> dimension (**PAGE-SDS**).



2<sup>ème</sup> dimension: séparation en fonction du PM  
**Électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

#### ⑤ Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse (IEP) est en général mise en œuvre après qu'une électrophorèse classique d'un sérum a révélé la présence d'une immunoglobuline monoclonale. Elle permet normalement le typage de cette Ig.

**Étape 01:** migration d'un mélange de protéines dans un gel d'agarose pour les séparer;



**Premier temps:**  
**Électrophorèse classique**



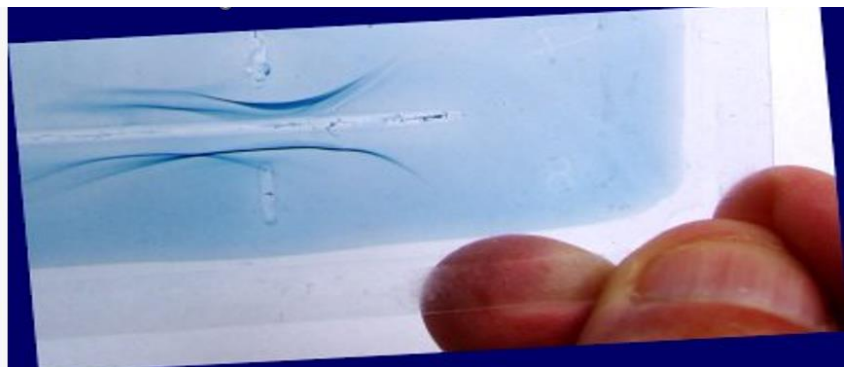
**Étape 02:** diffusion passive d'un antisérum déposé dans une tranchée creusée dans le gel parallèlement à la direction de migration et apparition des arcs de précipitation formés au point de rencontre (Ag-Ac);

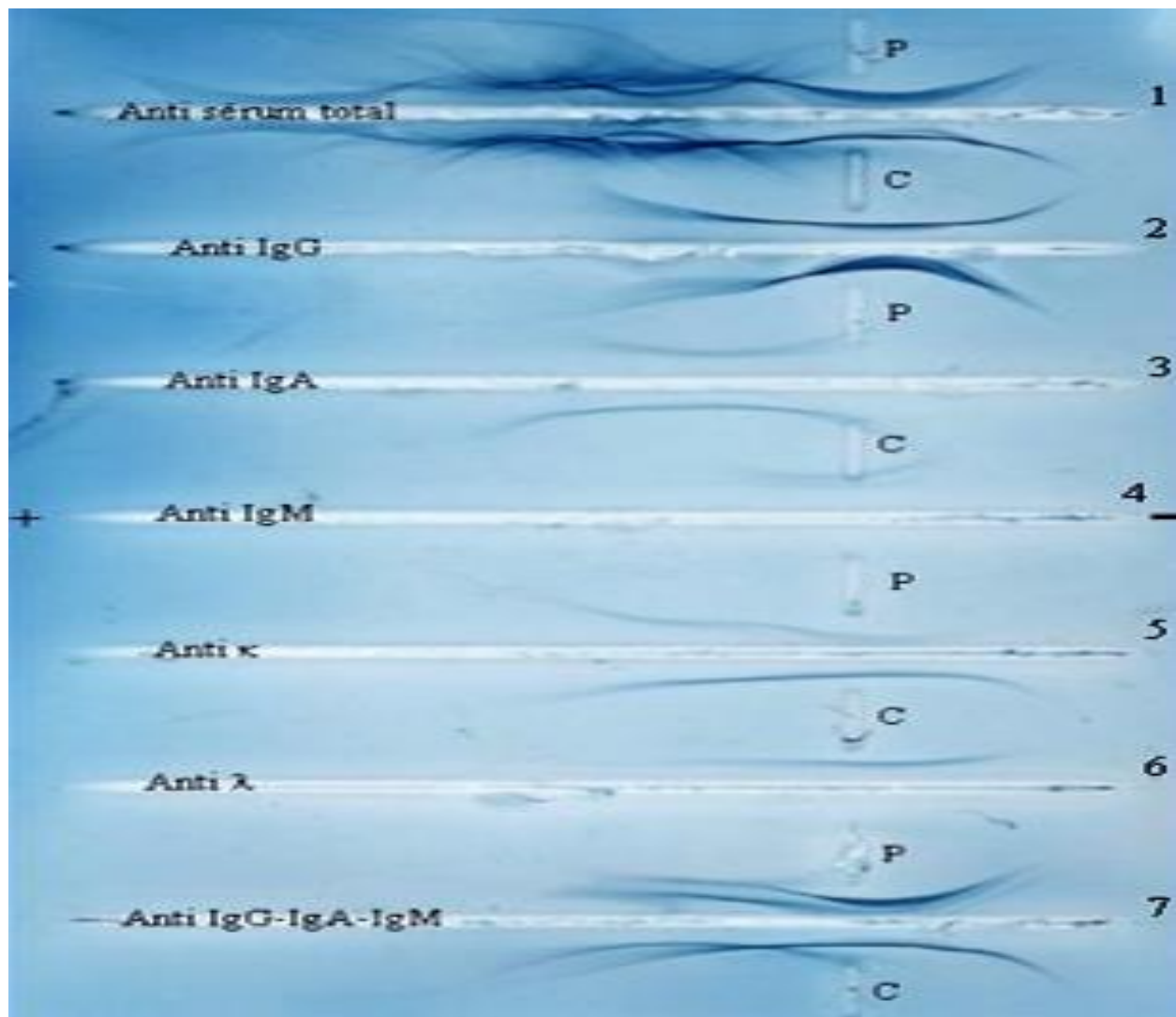
**Deuxième temps:**  
**Immunodiffusion**



**Étape 03:** visualisation des arcs de précipitation après coloration par le bleu de Coomassie.

**Troisième temps:**  
**Révélation-Coloration**





Résultats d'immunoélectrophorèse

## Références

- Martin Levey, «Babylonian Chemistry: A Study of Arabic and Second Millennium B.C. Perfumery», Osiris, vol. 12, 1956, p. 376-389.
- D. F. Othmer (dir.), A Century of Chemical Engineering, 1982, « Distillation - Some Steps in its Development».
- Extrait de « Techniques expérimentales en chimie », Bernard A.S., Clède S., Emond M., Monin-Soyer H., Quérard J., Dunod, 2014.
- Drugeon S (2002); Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique ; Ingénieur du Génie Sanitaire ; 24 septembre 2002.
- Arakawa, T., Timasheff, S.N. Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. Biochemistry. 23, 5912-5923 (1984).
- D. Skoog, D. West, J. Holler, « Chimie analytique », 7ème éd. 1997. De Boeck Université.
- B. Fosset, C. Lefrou, A. Masson, C. Mingotaud, «Chimie physique expérimentale», 2000, Hermann.
- RF Boyer (1986) Modern experimental biochemistry, Addison-Wesley Publishing Co, Reading (Mass., USA) p. 248-50.
- J.-P. Bayle, «400 manipulations commentées de chimie organique volume 1», 2006, Ellipses.
- J. Drouin, «Manipulations commentées de chimie organique», De Boeck Université, 1999, De Boeck.
- Leybros, J. and P. Frémeaux (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06
- Groubert, A. (1984). Techniques d'extraction végétale. Montpellier, pharmacie.
- Braithwaite and Smith 1985 - Chromatographic Methods - 4ème éd., Chapman and Hall.
- Savidan 1963 - La chromatographie - Dunod.
- Bounias 1983 - L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince - Masson.
- Levine S.G. 1990 - Identification of Unknowns by Melting Point and Thin-Layer Chromatography in Combination - J. Chem. Ed., 67, p. 972.