

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Ecologie, Environnement et Biotechnologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Polycopié de cours
« Techniques d'analyse biologiques II »
(TAB II)

Première Année Master : Biotechnologie microbienne

Dr. BELKHAROUCHE Mounira

Année universitaire : 2023-2024

Intitulé du Master : Biotechnologie microbienne

Semestre : 1

Intitulé de l'UE : Méthodologie

Intitulé de la matière : Techniques d'analyse 2

Crédits : 05

Coefficients : 02,5

Objectifs de l'enseignement : étude des procédés d'analyses physicochimiques et de caractérisations (RX, FTIR).

Connaissances préalables recommandées : quelques notions en physique et chimie.

Contenu de la matière :

I. Introduction : synthèse chimique et biologique des macromolécules et leur purification

Rappel sur la chimie organique et la structure moléculaire

II. Méthodes spectrales

II.1. Spectrophotométries d'absorption moléculaire

II.2. Fluorimétrie

II.3. Photométrie d'émission atomique (microscope électronique)

II.4. Spectrophotométrie d'absorption atomique

II.5. Résonance magnétique nucléaire

III. Méthodes de fractionnement

III.1. Filtration

III.2. Sédimentation et centrifugation

III.3. Dialyse et électrodialyse

III.4. Méthodes chromatographiques

III.5. Méthodes électrophorétiques

III.6. Différents type électrophorèse et leurs applications

VI. Méthodes de marquage

VI.1. Méthodes isotopiques

VI.2. Dosage radio immunologique

VI.3. Dosage radio enzymatique

V. Microscope électronique

V.1. Microscopie électronique à transmission

V.2. Microscopie électronique à balayage

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Avant-propos	
I. Introduction.....	01
Chapitre I : Techniques de séparation (fractionnement).....	02
1. Les méthodes de séparation.....	02
1.1. Filtration.....	02
1.2. Intérêt de filtration.....	03
1.3. Procédure de filtration.....	03
1.4. Matériels de filtration.....	04
1.4.1. Les filtres.....	04
1.4.1.1. Procédés de la filtration au laboratoire.....	05
1.4.1.2. Types de filtration en fonction de la taille des particules.....	07
1.4.2. Entonnoirs.....	09
1.2. Sédimentation et Centrifugation.....	09
1.2.1. Principe de centrifugation.....	10
1.2.2. Matériel de centrifugation.....	10
1.2.3. Type de machines centrifugeuses.....	11
1.2.4. Les rotors.....	11
1.2.5. Types de centrifugation.....	12
1. Les gradients discontinus.....	14
2. Les gradients continus.....	15
1.2.6. Intérêt.....	16
3. Dialyse et électrodialyse.....	18
1. Dialyse.....	18
1.1. Principe.....	18
1.2. Matériel de dialyse.....	19
1.2.1. Membranes.....	19
1.2.2. Appareillage.....	20
1.3. Facteurs influençant la dialyse.....	20
2. Électrodialyse.....	21
4. Techniques électrophorétiques.....	22
1. Électrophorèse de zones ou sur support.....	23
2. Électrophorèse capillaire.....	23

3. IsoElectrofocalisation.....	24
4. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	25
5. Électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturante SDS-PAGE.....	27
6. Électrophorèse bidimensionnelle.....	29
7. Immunoélectrophorèse.....	30
5. Techniques chromatographiques.....	33
1. Choix de la technique chromatographique.....	34
2. Divers types de chromatographie.....	34
1. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	35
2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	36
3. Chromatographie liquide (LC - HPLC).....	37
Chapitre II : Techniques spectrales.....	39
1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	41
1.1. Spectrométrie d'absorption Uv- visible.....	41
1.2. Spectrométrie d'absorption infrarouge (IR).....	42
2. Spectrophotométrie d'absorption atomique (AA).....	44
2.1. Spectrométrie d'absorption atomique avec flamme.....	44
2.2. Spectrophotométrie d'émission de flamme.....	45
3. Fluorescence.....	45
4. Spectrométrie de masse (MS).....	45
5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	46
Chapitre III : Méthodes de marquage.....	48
1. Dosage radio immunologique.....	49
2. Dosage radio enzymatique (Les techniques Immuno-enzymatiques).....	53
1. Techniques quantitatives.....	54
2. Techniques qualitatives.....	57
Chapitre IV : Microscope électronique.....	60
1. Microscopes électroniques.....	62
1.1. Microscopie électronique à transmission.....	62
1.2. Microscopie électronique à balayage.....	63
Références bibliographiques.....	65
Glossaire	67

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Filtration par gravité classique.....	05
Figure 02 : Filtration sous vide.....	06
Figure 03 : Filtration sous pression.....	06
Figure 04 : Différents types de filtration.....	08
Figure 05 : Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b).....	09
Figure 06 : Centrifugeuse.....	11
Figure 07 : Rotor à godet mobile et à angle fixe.....	12
Figure 08 : Sédimentation des particules dans divers types de rotor.....	12
Figure 09 : Isolement des organites cellulaires.....	13
Figure 10 : Centrifugation différentielle.....	14
Figure 11 : Préparation de gradient de densité de Saccharose.....	16
Figure 12 : Processus de dialyse.....	19
Figure 13 : La membrane semi-perméable.....	20
Figure 14 : La dialyse dans le dialyseur.....	20
Figure 15 : Échangeuses d'ions.....	22
Figure 16 : Membranes électrodialyse.....	22
Figure 17 : Électrophorèse de zones ou sur support: papier.....	23
Figure 18 : Dispositif d'électrophorèse (Verticale et horizontale).....	30
Figure 19 : Chromatographie sur couche mince (CCM).....	36
Figure 20 : Détermination le rapport frontal d'une substance.....	36
Figure 21 : Chromatographie HPLC.....	38
Figure 22 : Principe de la spectrophotométrie.....	40
Figure 23 : Spectre d'absorbance.....	40
Figure 24 : Principe du Spectrométrie Uv- visible.....	41
Figure 25 : Spectrométrie infrarouge (IR).....	43
Figure 26 : Principe de la spectrométrie d'AA.....	45
Figure 27 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.....	47
Figure 28 : Schéma du Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.....	47
Figure 29 : Schéma du spectre RMN.....	47
Figure 30 : Réactions Antigène-Anticorps avec marquage.....	49
Figure 31 : Immuno-précipitation en milieu liquide (Test de Farr).....	51
Figure 32 : Les variantes méthodologiques des techniques ELISA.....	54
Figure 33 : La DO est directement proportionnelle à la quantité d'Ac mesuré.....	55
Figure 34 : La DO est directement proportionnelle à la quantité d'Ac mesuré.....	56
Figure 35 : La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré.....	56
Figure 36 : La DO est indirectement proportionnel à la quantité d'Ag mesuré.....	56

Figure 37 : Microscope électronique à balayage63
Figure 38 : Microscope électronique à transmission64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Caractéristiques des Microscope optique et microscope électronique. 04

Avant-propos

Ce document soit support de cours pour le module de « Techniques d'analyse biologiques » est destiné aux étudiants de la spécialité : Biotechnologie dont la promotion est 1^{ère} année Master Biotechnologie microbienne.

Il a été conçu, non sans efforts, à partir d'une compilation de données publiées sur divers sites d'internet mais aussi dans la littérature grise. En tant qu'enseignante chercheuse, l'idée de mettre ce document pédagogique à la disposition de nos étudiants est d'un devoir envers eux pour qu'ils sachent i) l'importance de ces techniques, ii) améliorer leurs connaissances techniques lors de réalisation leurs travaux de recherche ou bien lors de leurs parcours académiques, iii) comprendre les termes et les appareils utilisés fréquemment en Biotechnologie.

Ce support comporte l'ensemble de techniques d'analyses biologiques suivant le canevas établie pour ce cycle. Certainement, il va raccourcir le temps de recherche sur les ouvrages numériques ainsi que ceux qui sont classiques.

I. Introduction

Les démarches de procéder aux analyses biologiques en laboratoire sont divers. Il s'agit de mettre en évidence les substances ou les solutions à étudier. Ce type d'analyse fait appel à plusieurs techniques ou manipulations au sein d'un laboratoire en utilisant des appareils et des outils conviennent aux objectifs préétablis par l'étude à réaliser.

Dans cette optique, le bon déroulement de différents analyses biologiques nécessitent principalement des outils qui sont à leur tour doivent être utiliser selon des protocoles bien déterminés, selon le but ou les résultats visés. Dans ce cours, plusieurs techniques seront bien détaillées allant de les identifier, présenter, déterminer le mode opératoire et leur application ainsi que dans quels domaines sont-elles utilisées.

Cependant, avant d'entamer à apprendre ce module, il fallait avoir des connaissances préalables en physique, chimie, biologie moléculaire et biochimie. L'utilisation dans le domaine de recherche des appareillages et des techniques nouvelles va contribuer certainement dans l'accélération des travaux de recherche, d'économiser les longues périodes de temps pour avoir les résultats attendus, ainsi que l'obtention des résultats fiables et démonstratifs.

Chapitre I : Techniques de séparation (fractionnement)

Définition de la séparation

La séparation est l'isolement des substances ou des micro/macromolécules des solutions ou des mélanges dans le but de les purifier.

1. Les méthodes de séparation

Les méthodes de séparation utilisées dépendent de l'état de départ de l'échantillon, qui peut être une solution homogène ou hétérogène.

1er cas : Séparation des constituants d'un mélange hétérogène.

- Si le mélange présente une phase solide et une phase liquide, deux moyens de séparation sont possibles : **la filtration et la centrifugation.**
- Si l'échantillon est un mélange de deux liquides non miscibles : on utilise la **décantation (et centrifugation).**

2ème cas : Séparation des constituants d'un milieu homogène.

Il existe plusieurs techniques de séparation qui sont couramment employées en sciences biologiques, ici on peut donner quelques définitions de cette technique :

1.1. Filtration

- a. L'amélioration de qualité des produits (alimentaires, chimiques, productions etc....) nécessite des procédés de filtration. Par laquelle les particules seront éliminées des ces produits. De ce fait, la filtration permet d'extraire les particules de ces produits par des systèmes conçus en fonction de l'utilité de produit à traiter (Anonyme, 2024).¹
- b. La filtration est une méthode de séparation qui permet de séparer des constituants ou particules en suspension dans un mélange / fluide dont elle est basée sur la différence de pression et de taille à travers une membrane appelée des « filtres ». Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu.
- c. Cette technique consiste à retenir des particules solides en suspension dans un liquide ou un gaz au travers un filtre, une substance filtrante ou un réseau poreux.

¹ <https://agriculture.canada.ca/fr/production-agricole/leau/etangs-etangs-reservoirs/gestion-leau-surface-zone-rurale/comment-fonctionne-filtration>

- d. Consiste à séparer les particules solides les plus denses d'un mélange hétérogène (jus de fruit, infusion,) par décantation. Les fines particules qui restent sont filtrées par des matériaux poreux dont les mailles doivent être plus fines pour capter ces particules. Le résultat est la récupération d'un « résidu » solide dans le filtre et un mélange homogène appelé « filtrat ». La filtration ne peut être utilisée pour séparer les composants d'un mélange homogène.
- e. La filtration est une technique séparative consistant à séparer grâce à un milieu poreux les différents constituants d'un mélange possédant une phase liquide et une phase solide.

1.2. Intérêt de filtration

La filtration permet de purifier les solutions en éliminant toutes les particules solides. Elle est également utilisée pour retenir toutes les particules en suspension dans l'air.

Le but de la filtration est d'arrêter les contaminants d'une taille donnée, d'une façon constante et définitive dans les conditions d'utilisation des filtres.

La filtration est fréquemment employée en biochimie pour un grand nombre d'applications : stérilisation, décontamination, récupération des précipités, élimination de sels de solutions, concentration de macromolécules...etc.

1.3. Procédure de filtration

Lors de filtration, la rétention des particules résulte de deux phénomènes : le colmatage et l'adsorption.

- Le colmatage (Le criblage)

C'est un phénomène mécanique, qui consiste à retenir, sur le réseau poreux, les particules dont la taille est supérieure à celle des pores filtrants.

- L'adsorption

C'est un phénomène physique, qui consiste à retenir, à l'intérieur des canaux du réseau poreux, des particules solides, de taille inférieure au diamètre des pores. Cette rétention entraîne des actions électrostatiques, c'est-à-dire, lors de la filtration, les particules solides qui se sont engagées dans les canalicules du réseau, vont provoquer une orientation des ions de la solution à l'interface du solide adsorbé, et du liquide qui s'écoule. Cette orientation entraîne la formation d'une charge continue, responsable d'un effet de répulsion, sur les molécules de la phase liquide, ce qui facilite l'écoulement. En effet, la phase liquide, les ions négatifs de la

solution sont repoussés par les particules négatives déjà plaquées sur les parois des canalicules. Les ions positifs de la solution sont repoussés par les charges positives de même signe de la paroi.

1.4. Matériels de filtration

Le matériel utilisé généralement pour procéder la filtration est le filtre dont plusieurs types sont disponibles en fonction de l'intérêt de séparation.

14.1. Les filtres

Pour que les filtres soient efficaces il est important de déterminer son pouvoir de séparation qui définit la performance de filtre. La rétention des particules peut être définitive dans la mesure où la structure de filtre est stable.

En effet, on peut distinguer deux types de filtre selon la substance filtrante utilisée à savoir :

- + Filtres rigides
- + Filtres non rigides

a. Fibres de cellulose (filtres non rigides)

Ce sont les plus utilisées, les fibres de cellulose peuvent former un feutrage plus en moins serrés de présentation diverses :

- Fibre de coton, tissu de coton
- Plaque et disque de papier filtrant de différentes formes et épaisseurs, ces filtres sont stérilisables par la vapeur d'eau.

b. Filtres de matières plastiques (ne sont pas stérilisables)

- Elles sont peu utilisées, elles sont très résistantes, faciles à confectionner.
- Les matières plastiques filables et tissables sont utilisées pour la confection des filtres : polyamides, polyméthane, polyesters...
- Les tissus obtenus sont très résistants et cèdent peu de fibres.

c. Membranes organiques

Ce sont des membranes d'esters de cellulose très utilisées dans la filtration du fait que ces filtres offrent des pores de diamètre très bien défini jusqu'au 1/100^{ème} du μm .

- Ils peuvent être stérilisés dans l'autoclave par la chaleur humide à 120° C.

d. Le verre fritté (filtre rigide)

- Le verre fritté est très utilisé dans la filtration du fait de son inertie chimique.
- Il est composé d'un réseau rigide poreux de charge électrique négative, constitué par soudure entre elles de particules de verre dont le calibre conditionne la porosité.

e. Substances absorbantes agglomérées

Auparavant, le matériau absorbant le plus employé en pharmacie était l'amiante ou asbeste (silicate de magnésium qui existe à l'état naturel sous forme de fibres). Lorsqu'il est associé aux fibres de cellulose, on a formation de plaques de filtration très efficaces destinées, selon la porosité du réseau, à la filtration clarifiante ou à la filtration stérilisante. Néanmoins, ces fibres présentent des inconvénients à savoir :

- Sont cancérigènes ;
- Ont une charge électrique négative, elles peuvent donc retenir des cations de la solution à filtrer ;
- Ne sont pas inertes chimiquement : elles peuvent céder au filtrat des ions alcalins et des traces de fer néfastes pour certains principes actifs ;
- Cèdent des fibres, dans le cas des solutions injectables, il faudra placer en aval, un autre filtre en verre fritté ou en ester de cellulose.

Pour remplacer ces filtres, on a eu recours à l'utilisation d'associations de fibres de cellulose et fibres de verre qui forment des réseaux très cohérents. Ces filtres se présentent en plaques ou en cartouches.

14.1.1. Procédés de la filtration au laboratoire

On distingue différents procédés de filtration :

- a. Filtration par gravité :** La filtration par gravité est utilisée pour récupérer le liquide (filtrat). Il s'écoule librement à travers le filtre. Ce dernier, placé sur un entonnoir, est soit conique, soit plissé (filtration accélérée). La filtration peut également être réalisée sur un tampon de coton de verre.

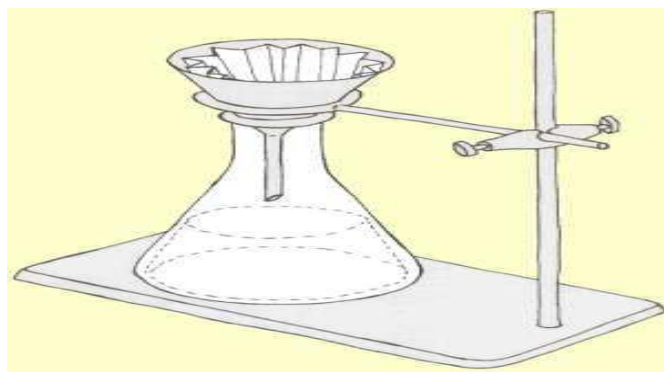


Figure 1 : Filtration par gravité classique

- b. Filtration sous vide :** La filtration sous vide est utilisée pour isoler un solide. Elle est plus rapide que la filtration par gravité car une dépression est créée par un dispositif d'aspiration avec une trompe à eau. Protocole opératoire ▫ Fixer la fiole à vide. ▫

Utiliser un filtre papier de diamètre adapté au Büchner. ▫ Mouiller le filtre avec un peu de solvant pour obtenir une bonne adhérence sur le Büchner. ▫ Ne pas exercer immédiatement une forte aspiration car de fines particules vont obturer les pores du filtre, ce qui diminue la vitesse de filtration. ▫ Laver le solide avec le solvant froid en arrêtant l'aspiration. ▫ Essorer le solide en le pressant avec un tapon en maintenant le vide.

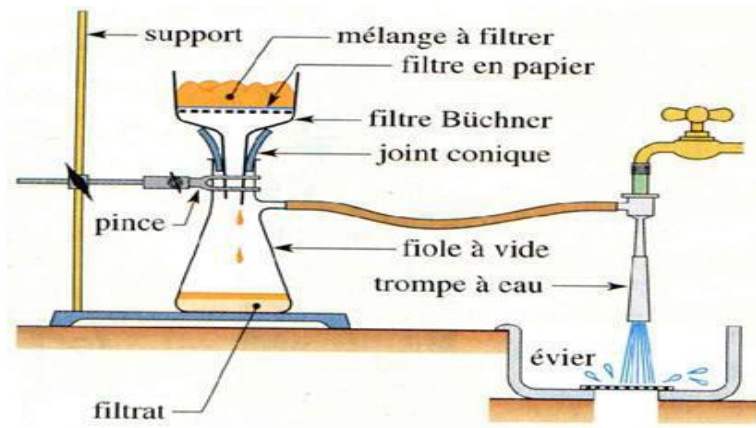


Figure 2 : Filtration sous vide.

c. Filtration sous pression

On augmente la vitesse de filtration en exerçant une pression sur le liquide à filtrer en amont du matériel filtrant représenté par une membrane filtrante. Ce système de filtration sous pression 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.



Figure 3 : Filtration sous pression.

1.4.1.2. Types de filtration en fonction de la taille des particules

On peut distinguer plusieurs types de filtration en fonction de la taille des particules :

- **La filtration clarifiante** : permet d'arrêter des contaminants de 10 à 450 μm .
- **La microfiltration**

Permet d'arrêter des contaminants de 0,01 μm à 10 μm . Elle consiste à faire passer un mélange solide liquide à travers un milieu poreux qui retient les particules de taille supérieure à la taille des pores en surface. Elle est basée sur la différence de pression comme force motrice.

La **microfiltration** élimine donc les **microparticules**, les **macromolécules** comme les **polymères**, les **micro-organismes en suspension** (bactéries) et certains virus. Elle est utilisée dans les domaines suivants :

- ✓ Stérilisation à froid des boissons et produits pharmaceutiques
- ✓ Clarification des jus de fruit, vins et bières
- ✓ Séparation des bactéries de l'eau, par exemple dans le traitement des eaux usées biologiques
- ✓ Traitement des effluents
- ✓ Séparation des émulsions huile/eau
- ✓ Pré-traitement de l'eau
- ✓ Séparation solide-liquide dans les industries alimentaires et pharmaceutiques

- **L'ultrafiltration**

- Elle permet d'arrêter des contaminations de 0.001 μm à 0.01 μm (10 à 100 \AA °).

Est une filtration d'un liquide à travers une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression, dont la rétention des particules de grand poids moléculaire et le passage des petites molécules. Dans le cas des particules virales, l'élimination de la totalité des virus fait recours à une **ultrafiltration**, qui permet d'éliminer des fluides traités les particules dissoutes de 0.001 à 0.1 μm (soit 1 à 100 nm). Elle bloque donc les bactéries, les levures et la plupart des virus. Ce procédé est utilisé dans les domaines de : l'industrie laitière, l'industrie alimentaire, l'industrie textile et l'industrie du métal, par exemple la séparations d'émulsion huile/eau.

L'ultrafiltration peut aussi être mise en place comme prétraitement de l'eau (dessalement des eaux de surfaces) avant une **nanofiltration** ou une étape d'osmose inverse. Elle est utilisée également en recherche fondamentale, pour la séparation et la purification et la concentration

des protéines. Lorsque les pores du filtre sont encore plus étroits, on parlera de nanofiltration puis d'osmose inverse.

- **La nanofiltration**

Ce procédé membranaire est placé entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration sur la base de taille. Permettant la rétention des sels minéraux avec une pression plus faible (« 20 bars). Il est plus économique que l'osmose inverse dont elle effectue le dessalement partiel.

- **L'osmose inverse :**

Permettant d'arrêter des contaminants de 0,0001 um à 0,001 um (1 A° à 10 A°). Est un procédé membranaire utilisé pour le passage de l'eau du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré sous l'effet d'un gradient de pression. Les stations d'osmose inverse sont destinées pour la déminéralisation des eaux.

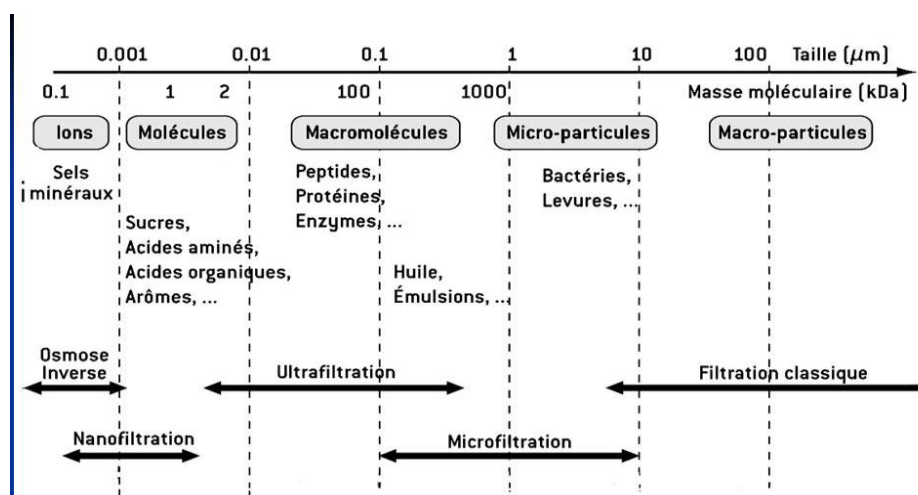
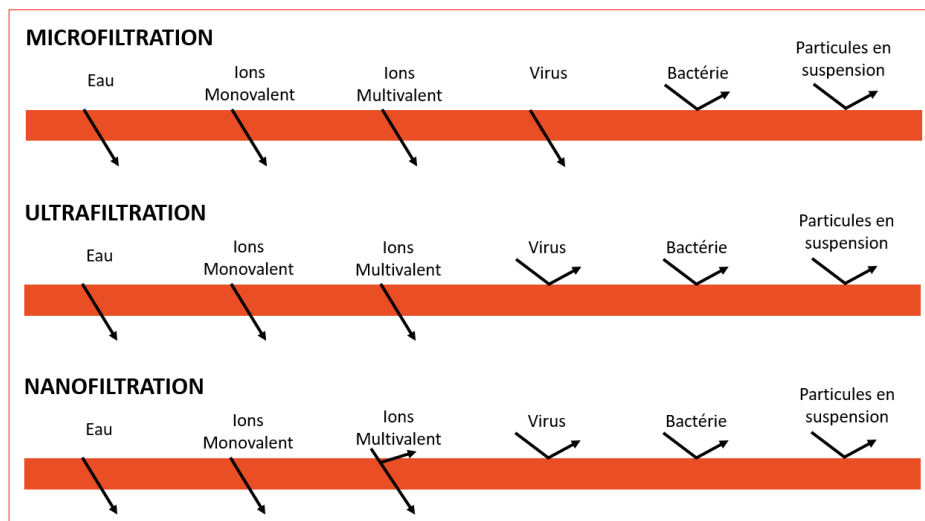


Figure 4 : Différents types de filtration

1.4.2. Entonnoirs

Un entonnoir est un instrument en forme conique, terminé par un tube et servant à verser un liquide, une poudre, un granulé ou une pâte dans un récipient de petite ouverture. Ils sont généralement en verre, plastique ou métal, mais parfois en papier ciré lorsqu'ils sont destinés à un usage unique. On distingue deux types d'entonnoirs :

-Les entonnoirs ordinaires : constitués de verre, porcelaine ou de polycarbonate.

-Les entonnoirs spéciaux : peuvent être en verre ou porcelaine et contiennent une partie plate perforée sur laquelle une rondelle de papier filtre est déposée. Il existe deux types d'entonnoirs spéciaux (Figure).

*BUCHNER: utilisé lors que la quantité assez importantes dans le liquide;

*HIRSCH: utilisé lors que la quantité faible dans le liquide

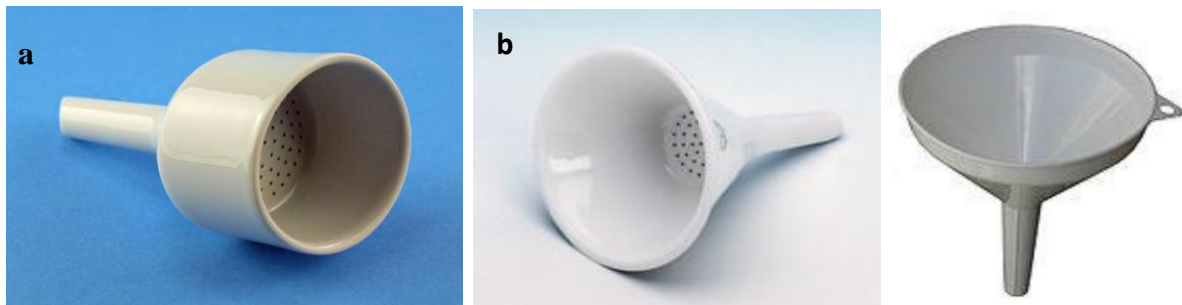


Figure 5 : Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b)

1.2. Sédimentation et Centrifugation

Introduction

De nombreuses expériences de différents domaines exigent une ou plusieurs étapes de centrifugation. Cette technique permet d'exposer des échantillons à de fortes accélérations qui permettent la séparation des constituants. Il est possible ainsi de fractionner une préparation en un sédiment (culot), constitué de matériel plus ou moins solidement entassé dans le fond du tube à centrifuger, et en un surnageant qui sera le liquide résiduel au-dessus du sédiment. Parmi les procédés mis en œuvre pour le traitement mécanique des liquides, la sédimentation et la centrifugation qui sont basées sur la différence de densité des phases. Les phénomènes physiques utilisés et les forces qui en résultent caractérisent ces deux procédés.

- La sédimentation utilise le champ de l'accélération terrestre
- La centrifugation utilise le champ de l'accélération centrifuge

Définitions**a. Sédimentation**

La sédimentation est une technique d'analyse permettant de séparer un solide au sein d'un liquide ou un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densités différentes. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur.

➤ Lorsque la préparation est formée d'une substance beaucoup plus dense que le liquide : on parle de Décantation

➤ Lorsque la densité de la substance est plus faible, la sédimentation en est gênée. Il faut avoir recours à des champs de force plus intense (centrifugation).

b. Centrifugation

La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de **leur densité** sous l'effet d'**une force centrifuge**. Le mélange à séparer peut être composé soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. C'est une technique de séparation qui permet de récupérer un **précipité (culot) et un surnageant**.

1.2.1. Principe de centrifugation

La centrifugation permet de séparer des **constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide**, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières. Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à la gravité, force qui s'exerce du haut vers le bas, et à la poussée d'Archimède, force qui s'exerce du bas vers le haut.

1.2.2. Matériel de centrifugation

L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée **centrifugeuse**. La centrifugeuse est équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte. Excepté pour les centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps typique d'utilisation sont relativement limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, l'enceinte est réfrigérée et souvent soumise à un vide poussé pour éviter les frottements. La mise en place des échantillons doit être équilibrée. Il faut mettre les tubes deux à deux, chaque couple de tubes doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation (Figure 6).



Figure 6 : Centrifugeuse

Pour la séparation d'une particule au sein d'une suspension, il faut travailler avec de grandes accélérations par les centrifugeuses. Ces appareils comportent les éléments suivants :

- Un moteur capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers tours par minute
- Un rotor capable de supporter des rotations aussi rapides (en titane), en général conçu pour les rotors des ultracentrifugeuses résistant à de fortes températures
- Une enceinte dans laquelle est disposé le rotor qui est réfrigérée et sous vide (ultracentrifugeuse). Les centrifugeuses de paillasse ne sont pas réfrigérées. En effet, pour des vitesses de rotation importantes, le déplacement du rotor entraînerait un échauffement de l'appareil.
- Cette enceinte est plus blindée pour éviter des accidents en cas d'explosion du rotor.
- La principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor est la force du moteur qui le fait tourner. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand.

1.2.3. Type de machines centrifugeuses

Selon l'axe de rotation, il existe trois catégories de machines à centrifuger : Les centrifugeuses à axe horizontal, les centrifugeuses à axe vertical et les centrifugeuses à axe oblique.

1.2.4. Les rotors

La dimension du rotor : pour maximiser la vitesse de rotation, il faut minimiser le rayon du rotor donc la taille. Il existe trois types de rotors

- Les rotors à angles fixes
- Les rotors à godets oscillants
- Les rotors verticaux



Figure 7 : Rotor à godet mobile et à angle fixe

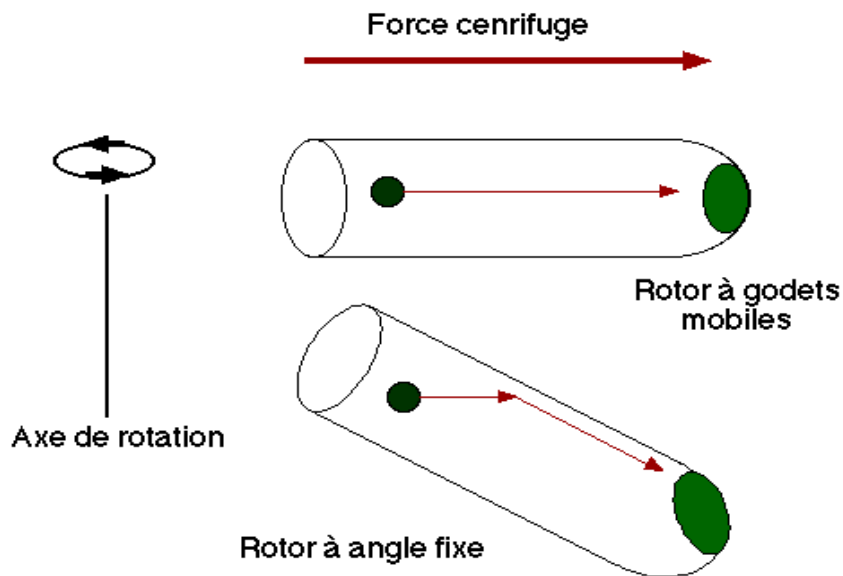


Figure 8 : Sédimentation des particules dans divers types de rotor

1.2.5. Types de centrifugation

Il existe deux principaux types de centrifugation :

a. Centrifugation différentielle

Elle est basée sur **des différences de vitesse de sédimentation** de particules de tailles et de densités variables. Les particules de même masse mais de densités différentes, celles qui présentent la densité la plus élevée se sédimentent plus rapidement.

Dans cette technique, le matériel de départ (homogénat) est fractionné en augmentant la vitesse de centrifugation. On utilise très fréquemment **des rotors à angle fixe** caractérisés par des tubes inclinés de 14 à 40°.

Principe : L'homogénat est d'abord soumis à une centrifugation à basse vitesse pour sédimenter les particules les plus grosses (ou les plus denses) présentes. Après cela, le matériau non sédimenté (surnageant) est transféré dans un autre tube et centrifugé à une vitesse plus élevée (et généralement également une période plus longue) pour sédimenter des particules de taille un peu plus petite (et / ou de densité plus faible) et à chaque étape, on améliore le rendement avec une seconde centrifugation dans les mêmes conditions à partir du culot précédent.

On peut utiliser cette méthode pour récupérer les éléments figurés du sang (GR, GB, plaquettes,,,) qui sédimenter par des accélérations très faibles. En outre, on peut relancer un deuxième cycle de centrifugation en utilisant le surnageant précédent, mais avec une accélération plus élevée. Exemple : Isolement des organites cellulaires (Figure 9 et 10).

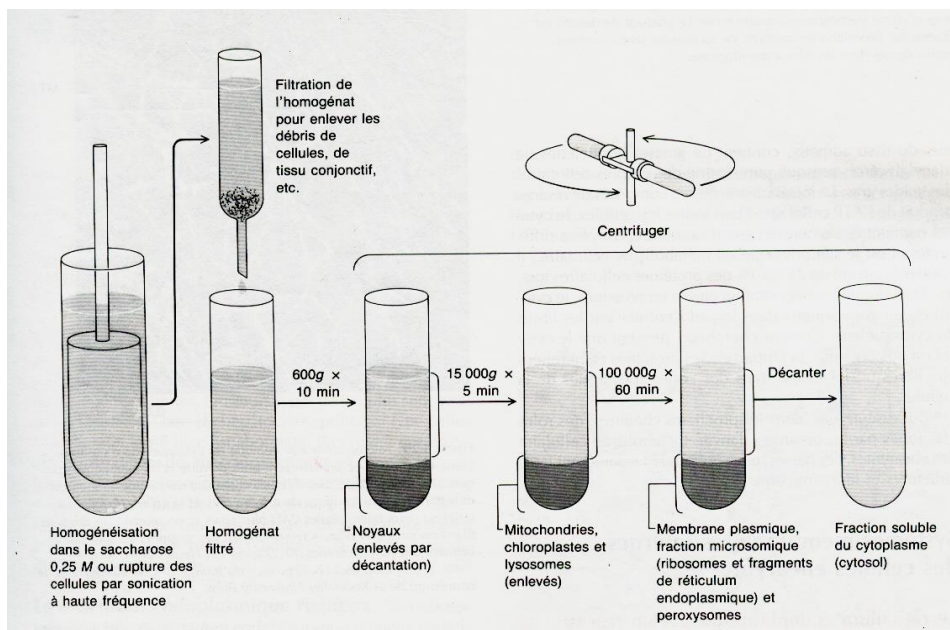


Figure 9 : Isolement des organites cellulaires

Centrifugation différentielle

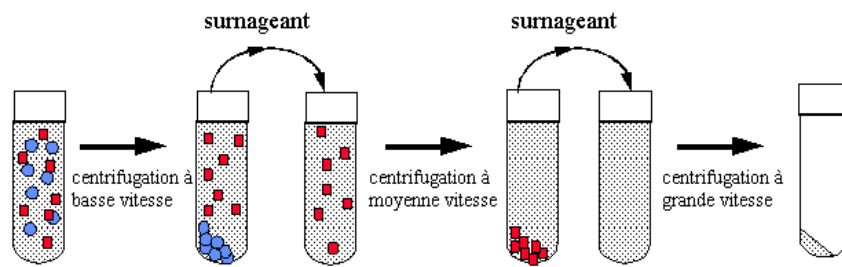


Figure 10 : Centrifugation différentielle

b. Centrifugation en gradient de densité

Ce type de centrifugation est utilisé pour accentuer les méthodes de séparation. En effet, un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant.

- ✓ Les particules sédimentent dans le cas où la densité est plus grande que celle du milieu. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide. S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- ✓ Les particules les moins denses que celle du milieu, peuvent atteindre le niveau de densité qui est égal à celle du milieu ou peuvent flotter à la surface.
- ✓ Donc, pour obtenir des solutions de densités différentes, la méthode la plus classique est d'utiliser des solutions de concentration croissante en saccharose, mais aussi du chlorure de césium.

Il existe deux types de gradients :

1. Les gradients discontinus

Ils sont constitués d'un empilement de solutions de moins en moins dense. Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes. Au-dessus, leur densité étant plus élevée ils migrent vers le bas, et au-dessous leur densité étant plus faible ils migrent vers le haut.

2. Les gradients continus

Ce sont des gradients pour lesquels la variation de densité est continue. Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes parfois visibles à l'œil nu.

Les gradients les plus utilisés sont :

A) Le saccharose (sucrose)

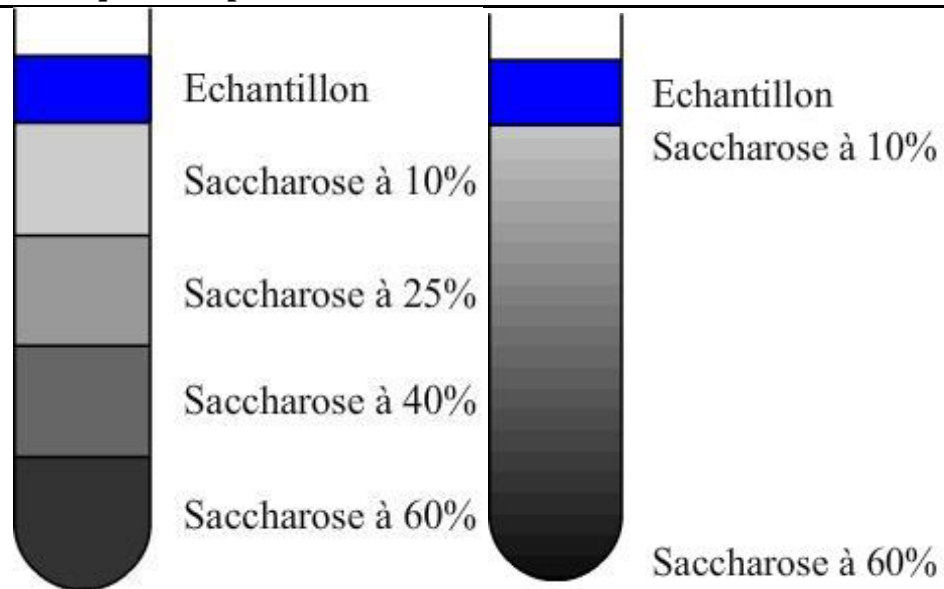
Il est très souvent employé. Il permet d'atteindre des densités assez élevées. Ce produit a l'avantage d'être peu coûteux, électriquement neutre et plutôt inerte pour la plupart des fractions cellulaires.

B) Le chlorure de césium (CsCl)

Il est utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques. Ce sel peut atteindre une densité très élevée. Son principal avantage est la possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse. Son coût et sa nature comme un sel c-à-d de molécules chargées, réduisent son champ d'application. D'autres sels de césium peuvent aussi être employés comme le sulfate de césium (CsSO₄).

❖ Rôles de rotors horizontaux, mobiles ou à godets oscillants

- Ils se réorientent lors de la centrifugation.
- Les godets sont disposés sur des crochets, lors de la centrifugation, grâce à la force centrifuge, ils passent en position horizontale. Les particules se sédimentent directement dans le fond du tube à centrifuger.
- Ils sont généralement utilisés dans les centrifugations en gradient continu ou discontinu (séparations plus fines) car la force centrifuge s'exerce dans le sens de la longueur du godet. Les particules sont alors séparées en fonction de leur densité.
- Un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant. On peut donc moduler cette vitesse en faisant varier de façon continue ou discontinue cette différence de densité en créant un gradient de concentration. (Figure 11).
- Inconvénient : Ils ne peuvent pas atteindre des vitesses très élevées parce que les godets en position horizontale allongent le rayon du rotor, ce qui est plus difficile de lui conférer des vitesses élevées.



Exemple de gradient discontinu

Exemple de gradient continu

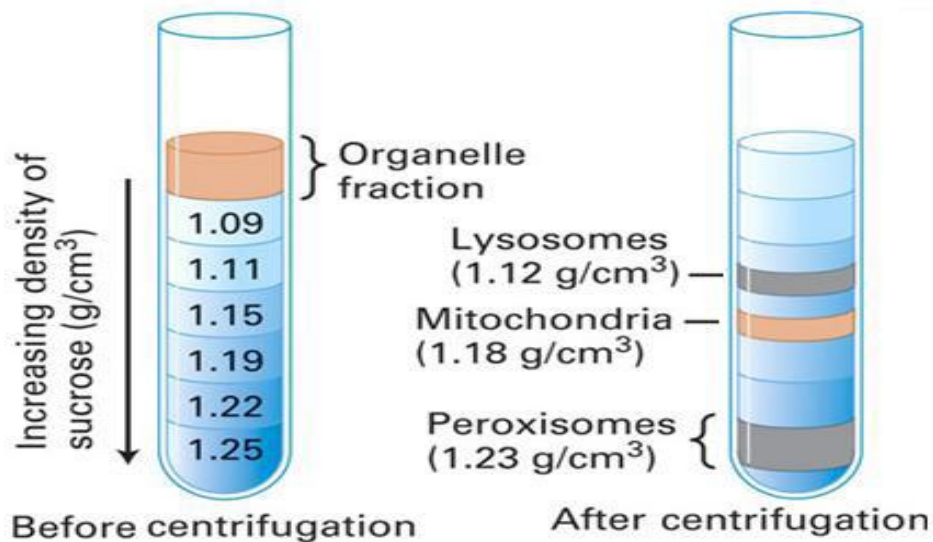


Figure 11 : Préparation de gradient de densité de Saccharose

1.3. Intérêt

Applications de la centrifugation

- ✓ Détermination du poids moléculaire : notamment pour les acides nucléiques et les protéines;
- ✓ Détermination des constantes de sédimentations : les acides nucléiques, les sous-unités des ribosomes et des ARN ribosomiaux. Certains organites ont les mêmes constantes que les acides nucléiques ;

- ✓ Séparation d'un mélange : deux molécules de masse molaires différentes sédimentent séparément ;
- ✓ Vérification de la pureté d'un mélange de macromolécule : l'obtention d'un seul pic symétrique par l'ultracentrifugation indique une molécule pure ;
- ✓ Analyse quantitative : la surface du pic correspond au pourcentage du composé.

3. Dialyse et électrodialyse

1. Dialyse

La dialyse est une méthode de séparation par diffusion. Elle est utilisée pour séparer et éliminer des petites molécules (contaminant) et des ions d'une solution macromoléculaire par une membrane. L'utilisation d'une membrane dialysante empêche le passage des macromolécules contrairement aux petites molécules qui peuvent la traverser

1.1. Principe

Ce processus est basé principalement sur le phénomène de diffusion à travers une membrane semi-perméable qui joue le rôle d'un tamis. Ce processus comporte deux mécanismes :

- ✓ Le passage des molécules à travers la membrane est effectué selon le gradient de densité, dont le sens de déplacement est du côté plus concentré vers le côté moins concentré.
- ✓ Après un certain temps de dialyse, un état d'équilibre des molécules diffusibles a lieu, cela signifie que les molécules diffusibles dans les deux côtés de la membrane ont la même concentration.
- Cette méthode est utilisée aussi :
 - Comme méthode de concentration (surtout pour les solutions protéiques),
 - Pour équilibrer les échantillons avec le tampon (électrophorèse).
- La concentration dans le liquide de contre dialyse doit être maintenue nulle, et ceci soit on utilisant un grand volume de ce liquide soit on le renouvelant constamment.
- Dans la figure ci-dessous, la solution A contient de grosses molécules + petites molécules + ions. Les ions et les petites molécules traversent la membrane vers B, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le passage continu jusqu'à l'élimination totale des petites molécules et des ions, à condition que le volume de B soit très élevé par rapport à A ou que le milieu B soit changé continuellement.

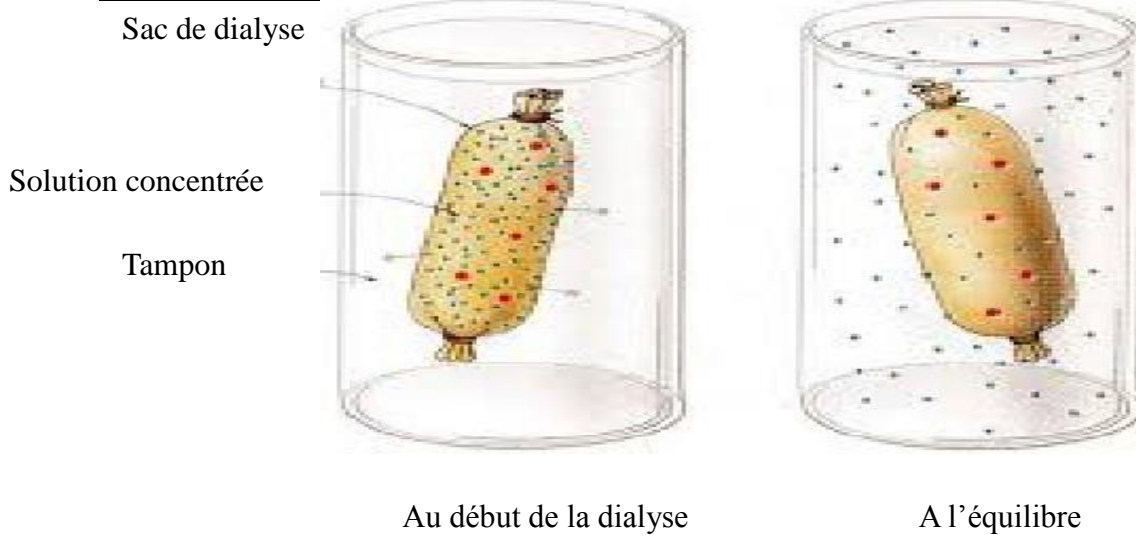


Figure 12 : Processus de dialyse

1.2. Matériel de dialyse

1.2.1. Membranes

- Les membranes à dialyse sont caractérisées par :
 - Une limite d'exclusion ("cut-off") qui donne l'information sur la taille des molécules qui ne pourront pas la traverser (de masse supérieure à la limite) et de celles qui pourront la traverser (de masse inférieure à la limite).
 - Elles peuvent être fabriquées par des matériaux comme les esters de cellulose et les dérivés cellulosiques.
 - Dans la pratique, les membranes sont constituées de cellophane (Diamètre des pores 25 nm, épaisseur 20 μm) ainsi que d'autres commercialisées à pores calibrées de 5 à 200 nm, appelées **membrane d'ultrafiltration**.
- La diffusion à travers la membrane semi-perméable peut être accompagnée par les phénomènes suivants :
 - La diffusion de grosses molécules est lente ou nulle ;
 - Les frottements de petites molécules sur la paroi peuvent freiner la vitesse de ces molécules
 - L'adsorption de certains solutés sur la membrane entraînant des modifications locales de concentration

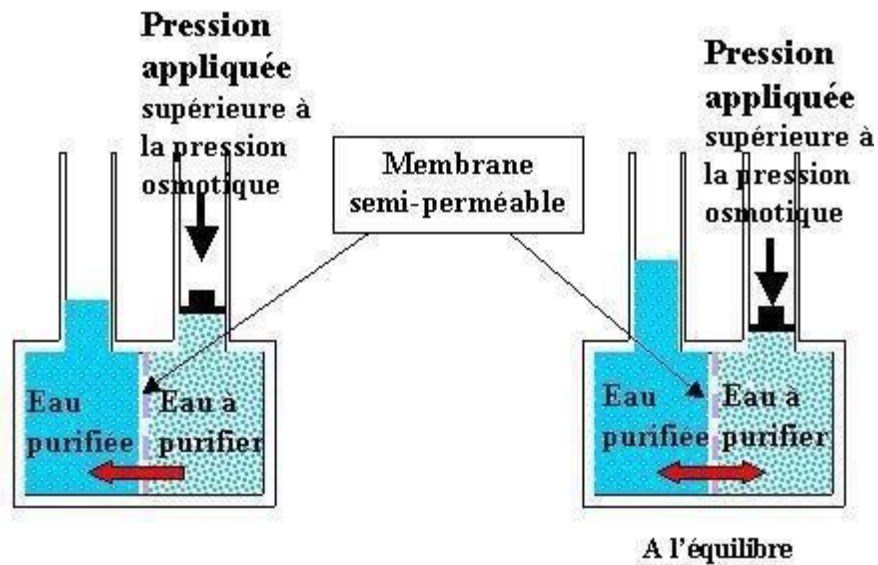


Figure 13 : La membrane semi-perméable

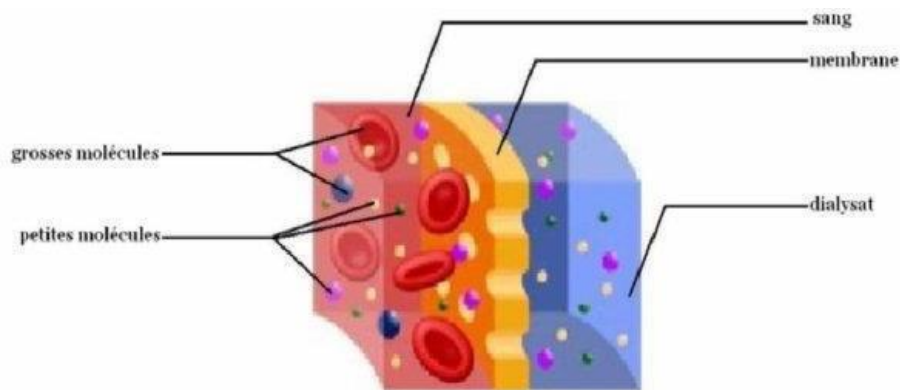


Figure 14 : La dialyse dans le dialyseur

1.2.2. Appareillage

L'appareil de dialyse est un dialyseur.

1.3. Facteurs influençant la dialyse

Le bon déroulement de la dialyse peut être influencé par plusieurs facteurs qui touchent la membrane de dialyse, la solution de contre dialyse ou la solution à dialyser :

1. Température : l'augmentation de la température augmente la vitesse d'agitation des molécules et par conséquent l'élévation de la vitesse de diffusion des substances. De même, la température élevée peut modifier la structure des molécules (dénaturation des protéines par exemple).

2. Rapport entre la surface de la membrane de dialyse et le volume de la solution à dialyser : en utilisant un volume à dialyser précis, plus que la surface de la membrane est élevée, plus que la vitesse de diffusion est augmentée.

3. Charge électrique de la membrane : l'utilisation des membranes chargées électriquement est déconseillée afin d'éviter l'apparition du phénomène de répulsion des molécules qui ont la même charge électrique ou leur adsorption sur la membrane.

4. Présence de quelques substances chimiques qui modifient la vitesse de diffusion en l'inhibant ou en l'augmentant : l'existence de certaines substances ensemble peut inhiber ou augmenter la vitesse de diffusion, telles que l'adrénocorticotrophine (hormone de l'hypophyse, molécule à dialyser) et le sulfate d'ammonium ou l'urée (comme solution de contre dialyse). Au fait, l'hormone est dialysée contre l'eau distillée, la substitution de l'eau avec le sulfate d'ammonium provoque l'apparition des agrégats non dialysables, par contre l'urée élève la vitesse de diffusion à travers la membrane.

2. Électrodialyse

Définition

C'est une élimination plus rapide et plus complète des ions dont les mouvements ioniques sont accélérés par un champ électrique. Elle est assurée par des membranes anioniques (perméables aux anions) et d'autres cationiques (perméables aux cations). Lors de l'électrodialyse, deux paramètres doivent être surveillés : la variation de pH et l'augmentation de la température.

Applications de la dialyse

1. Élimination de toutes molécules diffusibles contaminantes, tels que les acides, les alkyles, les sucres, les lipides, ... ;
2. Élimination des sels existant dans les solutions de macromolécules (sulfate d'ammonium après une précipitation protéique) ;
3. Concentration des macromolécules d'intérêt ;
4. Hémodialyse, c'est-à-dire purification du sang.

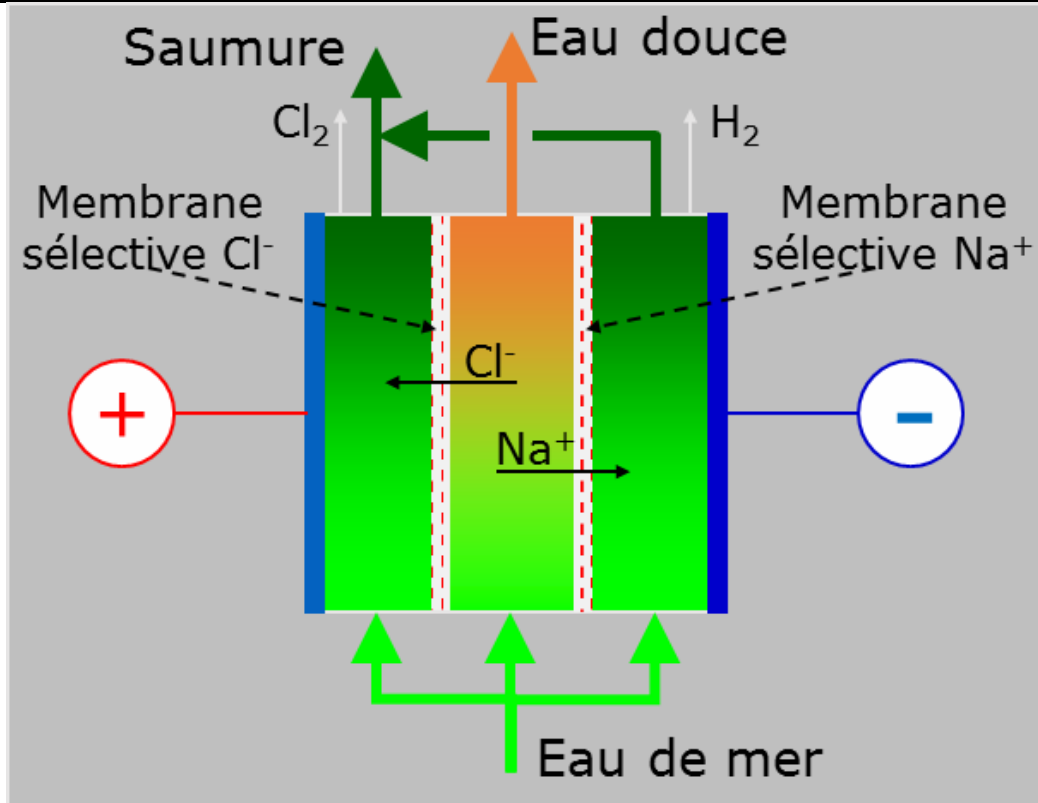


Figure 15 : Échangeuses d'ions

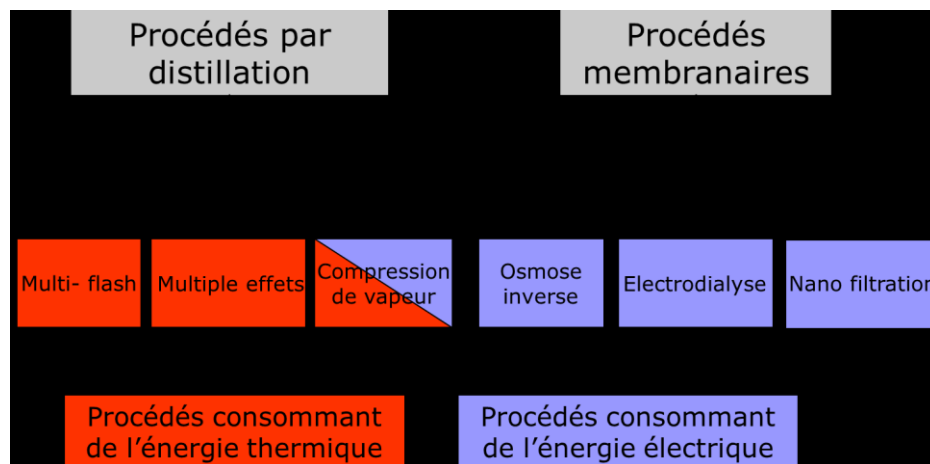


Figure 16 : Membranes électrodialyse

4. Techniques électrophorétiques

Définition

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Pour les charges électriques identiques la séparation est en fonction de leur taille.

Les facteurs influençant la technique :

- ✚ Temps de migration
- ✚ Force ionique des tampons
- ✚ Température
- ✚ Courant électrique continu
- ✚ Force de freinage
- ✚ PH du tampon (notamment pour les substances amphotères)

Il existe plusieurs types de ce procédé, on peut citer les suivants :

1. Électrophorèse de zones ou sur support

- 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.
- Différents supports : le support doit être homogène, poreux et inerte (cette dernière condition n'est jamais totalement réalisée) à savoir : papier (bande), acétate de cellulose (bandes), semi-solide : gel d'agarose, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, de silice,,,,

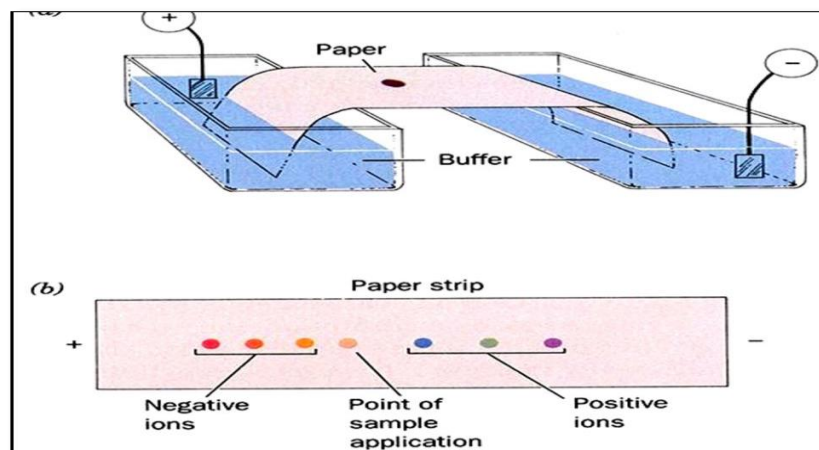
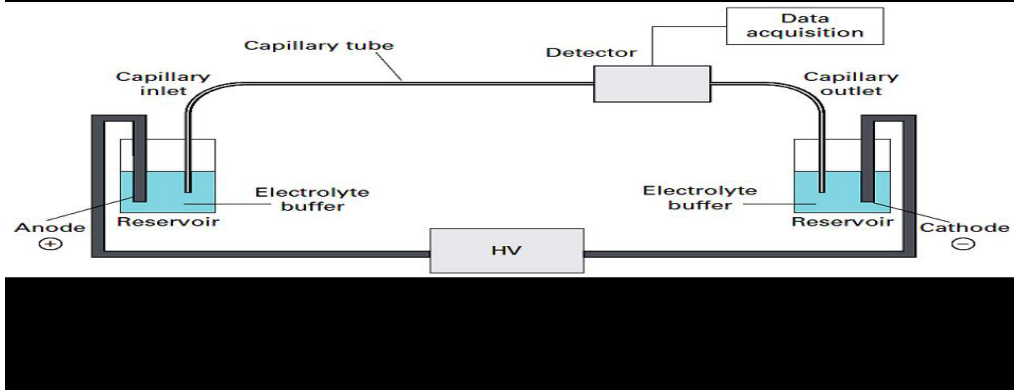


Figure 17 : Électrophorèse de zones ou sur support : papier

2. Électrophorèse capillaire

Séparation de molécules ioniques dans un tube capillaire (10-100 μm) rempli d'un électrolyte conduisant le courant à l'intérieur du capillaire : voltage élevée (15- 30 Kv) conduit à une migration rapide dans le capillaire.

C'est une technique très rapide et à haute résolution, sensible et automatisable avec un temps d'analyse très court.



3. IsoElectrofocalisation

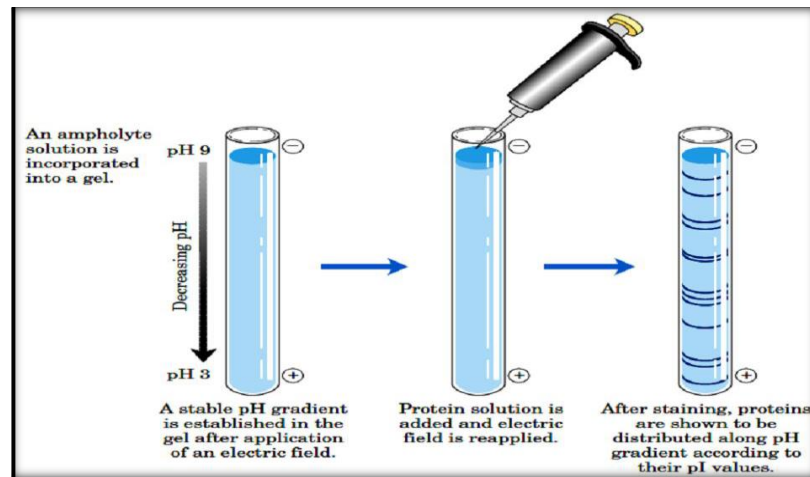
Les protéines avec leur charge peuvent migrer dans un champ électrique. La vitesse de cette migration est proportionnelle à la charge qui elle-même est proportionnelle à la différence entre le pH du milieu et le pHi de la protéine. Au pHi, la protéine ne possède aucune charge nette (charge+ = charges -). Donc à un pH égal au pHi, les protéines ne peuvent pas se déplacer dans le champ électrique.

Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dont les protéines peuvent se déplacer sous un champ électrique. La migration est effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH = son pHi dont les protéines restent immobiles en raison de leur charge nulle. Donc, on peut séparer les protéines d'une préparation en fonction de leur pHi.

Pratiquement, Le gradient de pH est généré par des ampholytes (amines, Carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon : on utilise un mélange de molécules ionisables (+/-) possédant des pHi dans une gamme large : 3-9, ou plus ou moins étroite : 4-5 ou 5, 5-6). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle.

Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils vont migrer et se distribuer par ordre de pHi. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pHi va créer donc un gradient continu de pH.

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



4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur masse moléculaire. La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migrent plus loin que les molécules de grande taille.

Facteurs affectant la migration

- ✓ Le facteur le plus important est la longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction de la masse moléculaire et donc de la taille de l'ADN.
- ✓ Toutefois la conformation de l'ADN est aussi un facteur important. Ainsi pour éviter les problèmes liés à cette conformation, n'est séparé sur gel d'agarose uniquement que de l'ADN linéaire (fragment d'ADN issu d'une digestion, ADN amplifié par PCR ou encore de l'ADNc).
- ✓ L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.
- ✓ Plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité, effectivement un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel.
- ✓ La conformation d'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire;,,

✚ **Produit utilisés**

***Gel d'agarose**

On utilise généralement un gel 1 % m/V (0,8/1 g d'agarose pour 100 ml de volume final) en électrophorèse. Plus on veut un gel discriminant, plus on augmentera le pourcentage d'agarose. L'agarose est un polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles auprès des fournisseurs.

***Tampons**

Il existe divers types de tampons. Les plus souvent utilisés sont le Tris/Acétate/EDTA (TAE), le Tris/Borate/EDTA (TBE) et le sodium borate (SB). *Le TAE possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille.

*Le **SB** est relativement nouveau et inefficace pour la séparation de fragments d'ADN d'une taille supérieure à 5000 paires de bases (5 kb). Cependant sa faible conductivité permet l'utilisation d'un plus fort voltage (jusqu'à 35V/cm), ceci réduisant considérablement le temps de migration. Des fragments d'ADN avec seulement quelques paires de bases de différences sont séparés en utilisant un gel d'agarose à 3 % et avec un tampon SB de très faible conductivité.

✚ **Révélation de l'ADN**

Afin de visualiser la migration de l'électrophorèse, il faut préalablement ajouter un colorant dans le gel à une concentration prescrit par le fabricant de l'agent intercalant **ou** bien faire la révélation après la migration. La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au bromure d'éthidium ou BET. Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Cependant, le bromure d'éthidium est toxique et hautement mutagène et doit être manipulé avec grande précaution.

D'autres agents intercalants plus sécuritaires comme le GelRed, le SYBR Safe, le violet de gentiane et le bleu de méthylène peuvent être aussi utilisés.

○ **GelRed**

Le GelRed est un colorant fluorescent utilisé pour la révélation sur gels d'agarose ou de polyacrylamide d'ADNdb, d'ADNsb ou d'ARN. Il possède pour caractéristiques d'être hautement spécifique, très stable et de respecter l'environnement. De plus, sa sensibilité est supérieure au bromure d'éthidium et il ne requiert pas d'étapes de décoloration.

- **SYBR Safe**

Le SYBR Safe est un colorant à gel d'agarose ou de polyacrylamide possédant une haute sensibilité. Il agit comme agent intercalant pour l'ADN ainsi que l'ARN. Le produit est commandé à une concentration déjà prête pour l'usage. La visualisation de la migration s'effectue par l'exposition aux rayons UV ou avec de la lumière bleue.

- **Violet de gentiane**

Il est aussi comme agent de visualisation pour une électrophorèse sur gel d'agarose. Il est nécessaire d'avoir une grande concentration d'ADN (100 ng et plus) à faire migrer en raison de la faible sensibilité de cette méthode.

- **Bleu de méthylène**

Le Bleu de méthylène peut être utilisé comme révélateur à la fin de la migration sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Cette méthode nécessite un temps de coloration pouvant aller jusqu'à 15 heures étant donné sa faible sensibilité. Son avantage est simplement qu'il permet de ne pas utiliser le bromure d'éthidium et que sa décoloration nécessite seulement de l'eau distillé. Toutefois, l'utilisation de ce colorant induit une coloration de fond difficile à éliminer et cela rend la visualisation des bandes plus difficile.

Alternativement, le gel peut être incubé dans un bain contenant du SYBR Green I (pour les acides nucléiques doubles brins) ou du SYBR Green II (pour détecter aussi les acides nucléiques simples brins). Le SYBR Green présente l'avantage d'une moindre toxicité et d'une sensibilité plus élevée permettant de détecter des quantités plus faibles d'acides nucléiques.

5. Électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturante SDS-PAGE

Principe

L'électrophorèse dénaturante « SDS-PAGE » est la méthode la plus utilisée pour :

- L'analyse qualitative d'un mélange de protéines
- La séparation des protéines selon le poids moléculaire
- La détermination du poids moléculaire.
- L'estimation du nombre de sous unité protéiques

Le gel de polyacrylamide est le support le plus utilisé, il est formé par la polymérisation des monomères d'acrylamides. L'électrophorèse PAGE remplace celle sur acétate de cellulose.

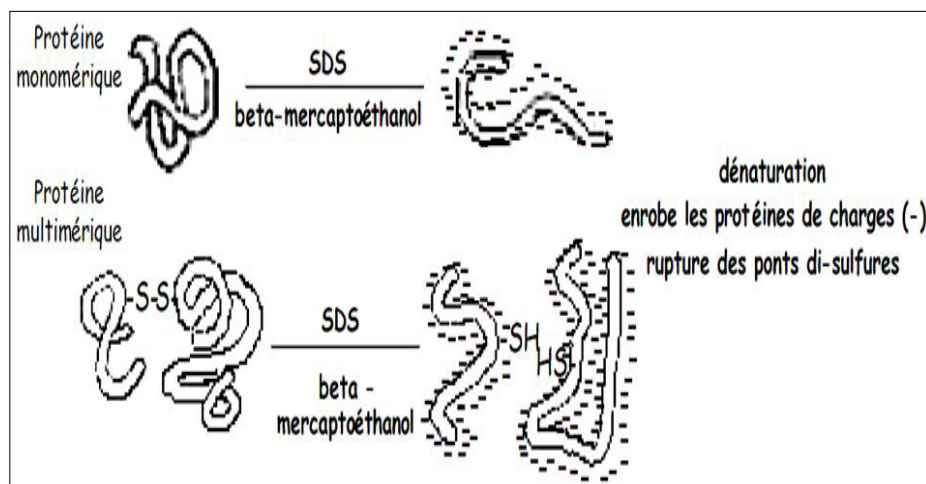
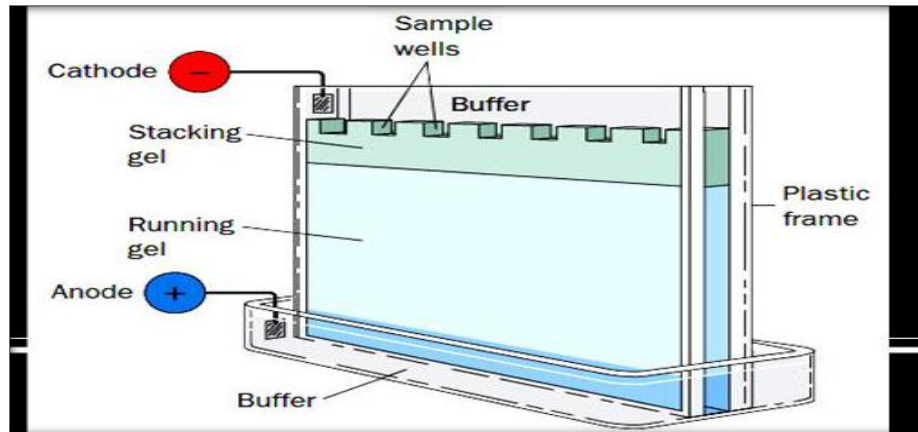
Pour séparer les protéines, on utilise souvent l'électrophorèse particulier (condition dénaturante): SDS-PAGE

Le gel de séparation ou de résolution est polyacrylamide (6- 15 %) contenant du Sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique qui change la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules deviennent avec la même charge (suppression facteurs forme et charge), et la séparation devient baser seulement sur la masse molaire (taille):

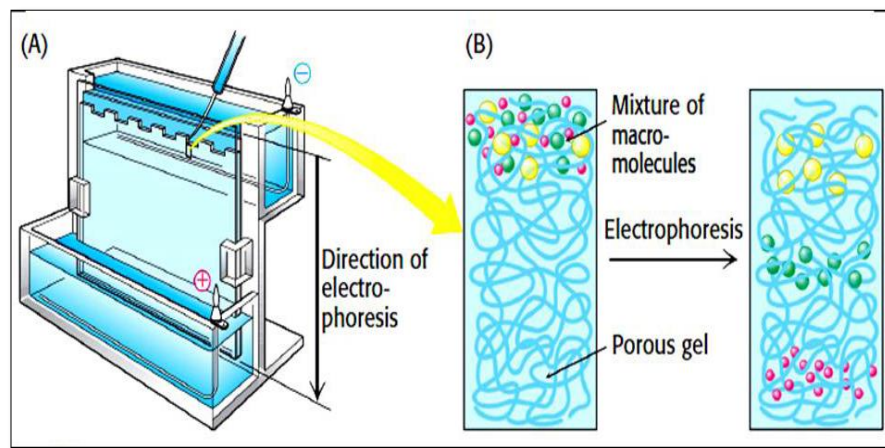
(SDS : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^-$, Na^+)

(12 carbone, le Na^+ se détache dans le milieu aqueux)

- Gel concentrateur (stacking gel: 3-5 %) est coulé en haut du gel de séparation.



- Les extraits protéiques mis à bouillir en présence d'un détergent et d'un agent réducteur
- Perte de la charge nette et de la structure tertiaire ou quaternaire.
- Évaluation des masses moléculaires (M)des protéines séparées
- Les protéines séparées dans le gel sont révélées par la coloration de Bleu de Coomassie, nitrate d'argent (+ sensible), ou colorants fluorescents.



6. Électrophorèse bidimensionnelle

Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines dénaturées (EBD) est une association de deux électrophorèses. La première, une **isoélectrofocalisation (IEF)**, fait se déplacer les protéines jusqu'à atteindre son point isoélectrique (pHi). La deuxième, une **électrophorèse en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS)** dont la migration est en fonction de sa masse moléculaire (MM). Ces deux électrophorèses combinent deux critères indépendants, c'est ce qui rend cette technique particulièrement résolutive : plusieurs centaines des constituants d'un mélange de polypeptides peuvent être individualisés sous forme de spots sur un gel.

Applications :

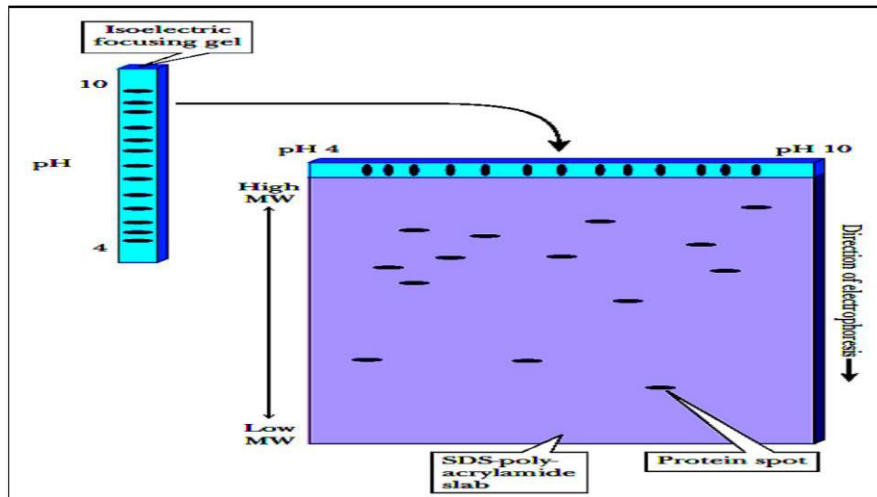
Les applications sont multiples à savoir : La vérification de la pureté d'un échantillon, les études de variabilité génétique, en passant par le suivi des variations d'expression en fonction de différents facteurs : développement, différenciation, traitements (drogues, stress, hormones).

Lorsqu'il existe des bandes protéiques très proches soit en chevauchement donc la séparation électrophorèse par SDS-PAGE unidimensionnelle avec résolution < 50 protéines.

- Pour séparer plus les bandes, on utilise l'électrophorèse bidimensionnelle avec résolution > 1000 protéines différentes.
 - ✓ **Dimension 1** : séparation des protéines selon leur charge par focalisation isoélectrique (FIE)
- On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel de polyacrylamide où un gradient de pH est établi avec des pHi spécifiques des protéines.
 - ✓ **Dimension 2** : séparation des protéines selon la taille SDS-PAGE.

✚ Révélation

Toutes les méthodes de révélation non spécifique des protéines sur gel de polyacrylamide peuvent être employées. Comme les concentrations en protéines dans les extraits sont souvent faibles, les méthodes de coloration au nitrate d'argent sont souvent utilisées, bien que leur reproductibilité soit difficile à contrôler.



Électrophorèse bidimensionnelle



Figure 18 : Dispositif d'électrophorèse (Verticale et horizontale)

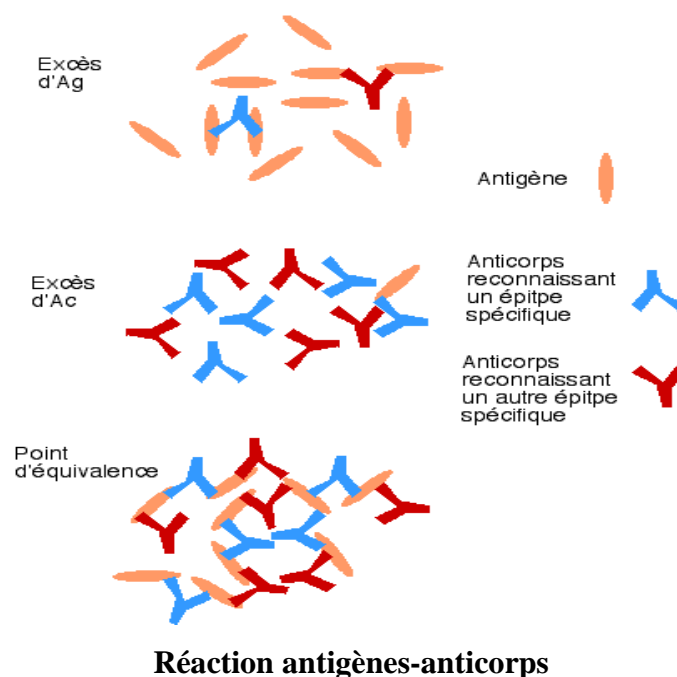
7. Immunoélectrophorèse

Principe

Les antigènes ou les anticorps contenus sous forme ponctuelle dans le gel pourront alors diffuser de façon radiale, autour de leur point d'application. En effet les pores d'un gel d'agarose

sont suffisamment grands. Au cours de cette migration, des antigènes et des anticorps se terminent par un contact les uns avec les autres et forment des complexes antigènes-anticorps stables.

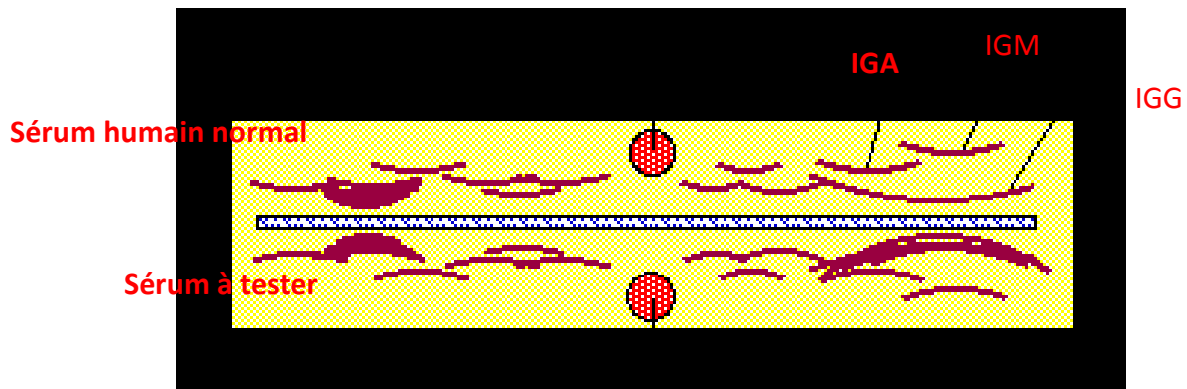
Au point d'équivalence, des complexes massifs (contenant des milliers d'antigènes et d'anticorps reliés ensemble) se forment et restent emprisonnés dans le gel à cause de leur taille et ne peuvent plus diffuser. Après avoir éliminé toutes les protéines n'ayant pas réagi, par trempage dans un solvant aqueux (ex: salin), on peut alors colorer les complexes antigènes anticorps. Le point d'équivalence est le rapport optimal du nombre d'antigènes et d'anticorps polyclonaux où se forment de très longues chaînes d'antigènes liés à des anticorps. Lorsqu'il y a beaucoup trop d'antigènes par rapport aux anticorps, il ne se forme que des complexes antigène:anticorps 2:1 (s'il s'agit d'une IgG) avec un résidu d'excès d'antigènes non liés. Contrairement s'il y a beaucoup d'anticorps par rapport aux antigènes, il se forme des complexes antigènes:anticorps ou un antigène sera attaché à quelques anticorps avec un excédent d'anticorps libres. Les complexes antigènes:anticorps 1:1 ou 2:1 sont relativement petits et peuvent diffuser dans les pores d'un gel d'agarose, tout comme les anticorps et les antigènes libres. Au fur et à mesure que les anticorps et les antigènes migrent un vers l'autre, le rapport antigène:anticorps devient optimal, des complexes de plus en plus gros se forment jusqu'à contenir des milliers de molécules associées en de gigantesques complexes insolubles et immobilisés dans le gel. Ces complexes sont appelés précipitines.



Il existe en fait tout un ensemble de techniques qui utilisent des anticorps associés à des séparations électrophorétiques. On peut distinguer les techniques suivantes :

1* Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

Les protéines migrent dans un gel d'agarose, dont on les révèle par une technique de double diffusion des antigènes et des anticorps, donnant ainsi des arcs de précipitation. Avec un antisérum total, on peut par exemple distinguer 30-40 protéines dans le sérum humain. On peut l'utiliser aussi avec un antisérum spécifique.

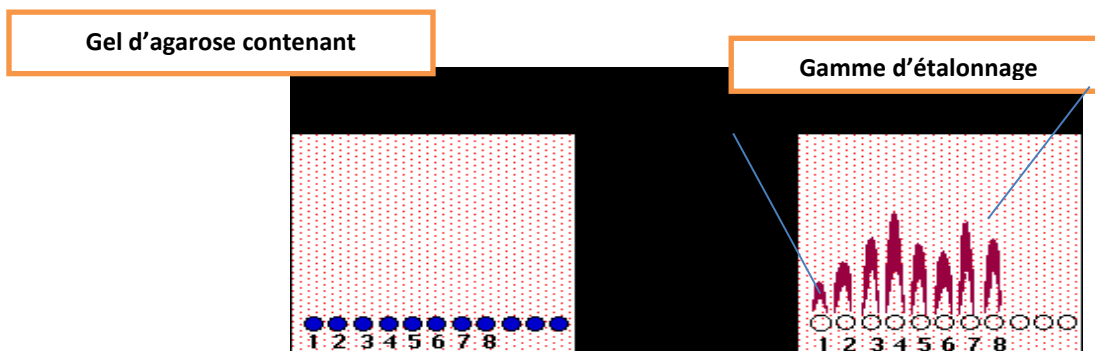


2* Electro-immunodiffusion double (= électrosynérèse)

Cette méthode dérive de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony. Elle consiste à accélérer la diffusion par un champ électrique. Les conditions électrophorétiques sont choisies de façon à ce que les antigènes et les anticorps migrent en sens inverse (ceci est possible car le pHi des Immunoglobulines est supérieur à celui de beaucoup de protéines).

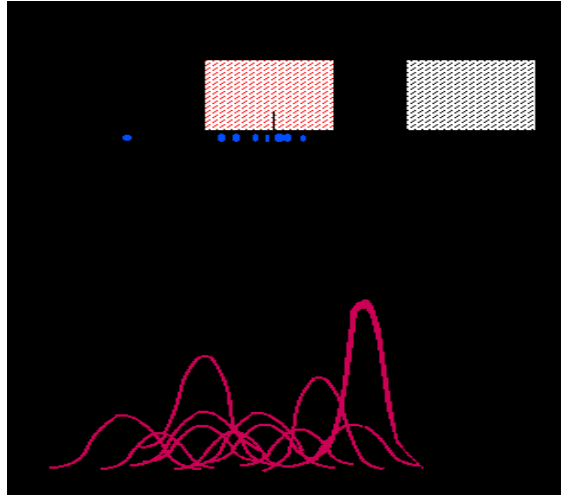
3* Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell)

Les protéines sont déposées sur des gels contenant l'antisérum. On se place à pH où les Ig migrent peu. Les protéines se déplacent et rencontrent les anticorps qui forment alors des précipités en forme de fusée appelés "rockets" dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en protéine. On utilise une partie des puits pour faire un étalonnage.



4* Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell)

On sépare les protéines dans une première dimension en gel d'agarose. On coule ensuite un gel contenant l'immunsérum polyspécifique, puis on réalise la seconde dimension.



5. Techniques chromatographiques

Définitions

Définition 1

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants des mélanges variés. Elle sert pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers.

Le principe de base: repose sur les équilibres de concentration présence de deux phases non miscibles, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure,...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité,...).

Définition 2

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, utilisée pour la séparation des constituants d'un mélange (les solutés), l'identification et le dosage des MO par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne.

1. Choix de la technique chromatographique

Le choix de l'une des techniques dépend :

De la nature du soluté : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...

Objectif de l'analyse : identification de composants d'un mélange, nécessite ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (CPG/SM ou GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification)...

2. Divers types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon 3 modalités:

a. Classification selon la nature des phases :

- La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz.
- La phase stationnaire soit un solide, soit un liquide: la combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide-solide (LSC)
- chromatographie liquide-liquide (LLC)
- chromatographie gaz-solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC)

b. Classification selon le phénomène chromatographique :

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée:

- La chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un composé.
- La chromatographie de partage (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- La chromatographie d'échange d'ions (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- La chromatographie d'exclusion (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

Selon le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), séparer ou purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de la phase stationnaire que l'on utilise.

c. Classifications selon les procédés utilisés

- Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :
 - la chromatographie sur colonne : (adsorption, de partage, d'exclusion, échangeuse d'ions, d'affinité)
 - la chromatographie de surface : Chr. sur papier et la chromatographie sur couche mince.
- Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distingue :
 - *La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
 - *La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

✚ Chromatographie sur couches minces (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse plus simple et plus fiable et ne nécessite pas un appareillage sophistiqué et peu coûteuse elle offre la possibilité de traiter un grand nombre d'échantillons. Elle a remplacé la chromatographie sur papier en raison de sa grande performance. La méthode est basée sur l'utilisation de deux phases :- *Phase stationnaire* : les supports utilisés sont variés (silice, cellulose, support imprégné ou greffé (phase inverse), échangeurs d'ions. Et - *Phase mobile* : tampon (Figure 19).

La CCM est une technique qualitative et quantitative, la révélation des spots se fait soit par une réaction colorée, soit par fluorescence. L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le rapport au front (R_f) de chaque soluté, ou encore le rapport à un témoin (R_t) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque (Figure 20).

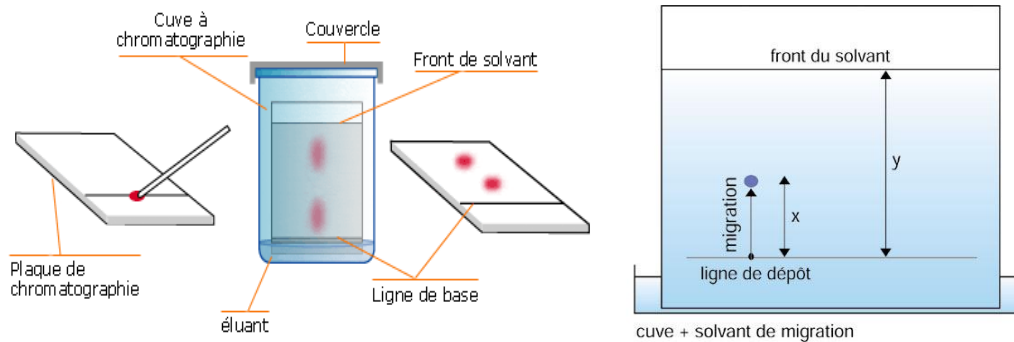


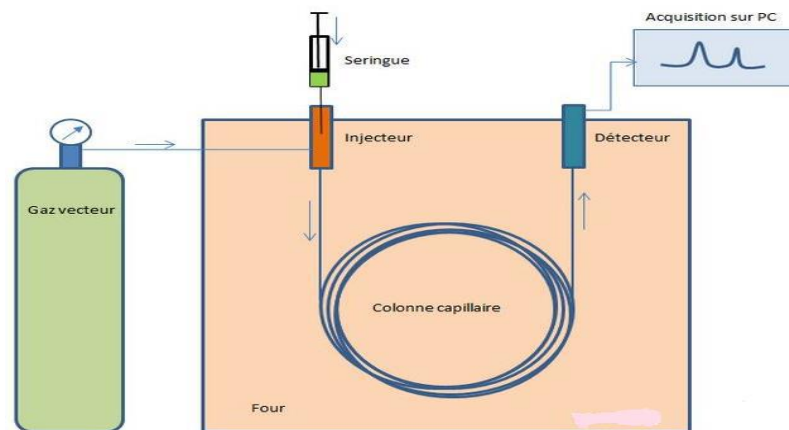
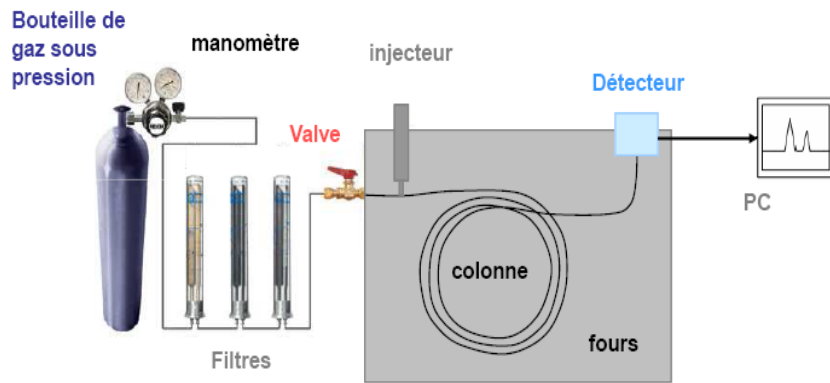
Figure 19 : Chromatographie sur couche mince (CCM)

Figure 20 : Détermination le rapport frontal d'une substance.

🚦 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette méthode permet de séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre deux phases :

- une phase stationnaire qui peut être soit liquide (chromatographie de partage ; GLC), soit solide (chromatographie d'adsorption ; GSC)
- une phase mobile : un gaz ou mélange de gaz
- La méthode s'adresse à des **molécules volatiles** naturellement ou des **molécules rendues volatiles** par des réactions de **dérivatisation** (à des températures ne provoquant pas leur décomposition). Les différents composants du chromatographe sont indiqués dans la figure ci-dessous. Les détecteurs peuvent être :
- Non spécifiques : cathétomètre, détecteur à ionisation de flamme, photomètre de flamme
- Spécifiques : détecteur thermo ionique, par capture d'électrons, spectromètre de masse



Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

✚ Chromatographie liquide (LC - HPLC)

Il existe deux types de chromatographie liquide à savoir :

La chromatographie liquide à basse pression « LC »: elle ne nécessite pas un appareillage sophistiqué c'est une colonne de verre remplie de particules de phase stationnaire, le solvant migre sous l'effet de la pesanteur. Bien que la résolution obtenue soit relativement faible, cette technique est couramment utilisée à raison de son faible coût.

- La chromatographie liquide à haute performance/pression « HPLC »: utilise pour phase mobile des solvants aqueux ou organiques. C'est une méthode de séparation chromatographique très développée à raison de l'utilisation des granules homogènes de très petites tailles permettant de réaliser des colonnes résistantes au passage de solvant, ce qui implique la nécessité d'employer des pompes à haute pression pour pousser les solvants (et des tubes résistants pour y mettre les phases stationnaires) (Figure 21).

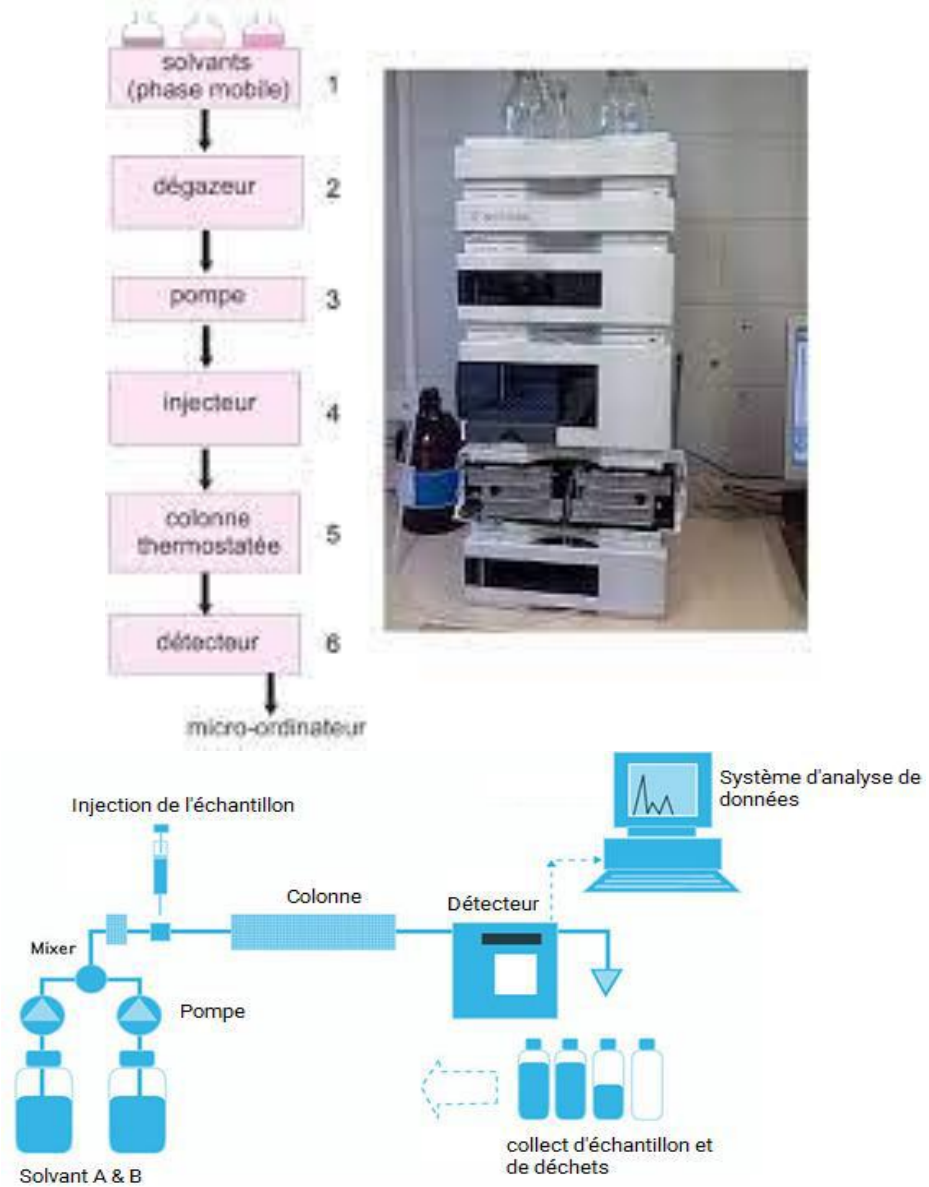


Figure 21 : Chromatographie HPLC

II. Techniques spectrales

Introduction

Spectrométrie et spectrophotométrie sont des techniques d'analyse utilisées à déterminer le taux d'absorbance d'une substance chimique, c'est-à-dire sa capacité d'absorption de la lumière. L'appareil spécial utilisé est le spectrophotomètre qui est capable d'évaluer le spectre d'absorbance d'une solution.

Le principe de la spectrophotométrie est simple : l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière qu'il reçoit, une fois celle-ci passée à travers un récipient transparent (cuvette dont la matière doit être adaptée à la longueur d'onde), contenant la solution à étudier. À partir de l'intensité de la lumière qui est émise (notée I_0) et d'après la mesure de l'intensité de la lumière transmise (I), l'appareil calcule l'absorbance (A). La formule algébrique de cette opération est : $A = \log(I_0/I)$.

La loi de Beer-Lambert précise que l'absorbance A dépend de façon proportionnelle à la concentration d'une solution, dans la mesure où celle-ci est située en deçà de $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$. De fait, il devient possible, en mesurant l'absorbance, de calculer la concentration d'une solution et même d'observer la cinétique d'une réaction chimique (une réaction enzymatique).

La technique de spectrophotométrie est très fréquemment utilisée en raison de ses nombreux avantages : *elle est facile à mettre en œuvre, *elle permet d'étudier des molécules biologiques en solution et de déterminer leur concentration, *elle ne nécessite que des mesures simples et *elle peut également permettre de tester un ensemble de paramètres annexes, tels que la température, le pH, etc.

On utilise une spectrophotométrie UV, laquelle permet aussi de mesurer l'absorbance de gaz ou de solides bien que cela soit plus rare que des solutions. Toutefois, l'absorption UV-visible n'est pas un test spécifique pour tout composé, car il peut être perturbé par divers éléments, comme la nature du solvant, le pH de la solution, sa température, la présence d'impuretés.

Principe de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode d'analyse qui permet de déterminer le taux d'absorbance d'une substance ayant des propriétés spectrales. Cette absorbance ou "D.O "

dépend de la nature, la concentration de cette substance ainsi de la longueur d'onde à laquelle on l'étudie.

L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre ; l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière après son passage au travers d'une cuve contenant la solution à étudier. L'intensité de la lumière monochromatique émise (I_0) est connue ; à partir de la mesure de l'intensité de la lumière transmise (I), le spectrophotomètre donne l'absorbance.

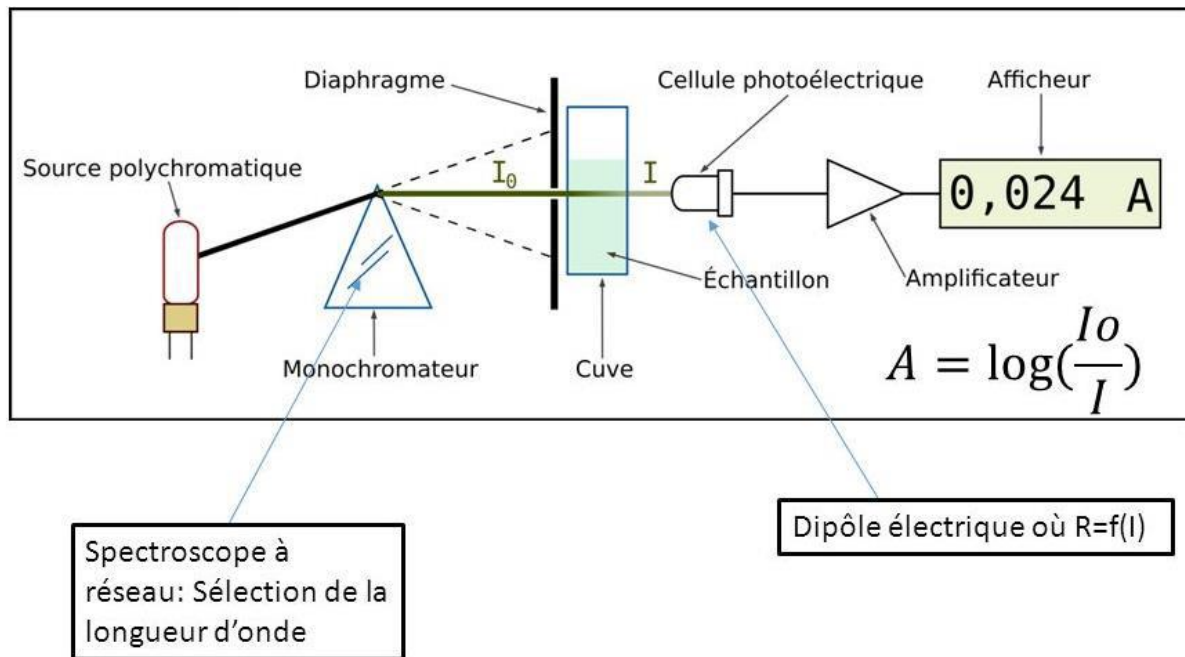


Figure 22 : Principe de la spectrophotométrie

La loi de Beer Lambert précise que l'absorbance dépend de façon proportionnelle à la concentration de la solution. Cette loi est vérifiée que pour les concentrations faibles

Pour déterminer la concentration d'une solution inconnue à partir de l'absorbance, on cherche d'abord maximale de la solution contenant l'espèce à doser en établissant le spectre $A=f(\lambda)$

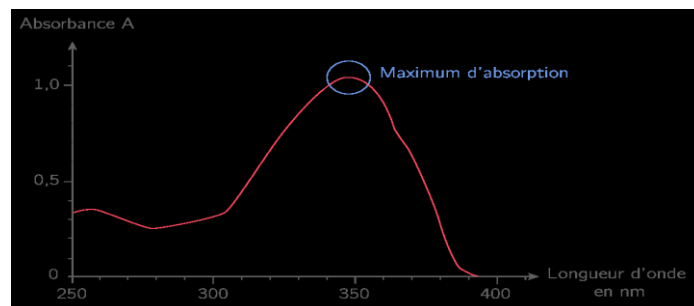


Figure 23 : spectre d'absorbance.

A_{MAX} correspond à une longueur d'onde maximale λ_{max} . Le spectromètre sera réglé à cette longueur d'onde maximale λ_{max} .

A partir d'une solution contient l'espèce à doser de titre connue (calibrateur), on mesure l'absorbance et on établit la droite de calibration.

La concentration peut alors être déterminée graphiquement : l'absorbance de la solution de concentration inconnue est reportée en ordonnée et le point de la droite possédant cette ordonnée possède une abscisse ayant pour valeur cette concentration.

1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

C'est la méthode analytique la plus utilisée en analyse d'eau. Elle nécessite la mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de (élément recherché). Elle s'appuie sur le fait que toute solution colorée traversée par un faisceau de lumière laisse passer une fraction de la lumière incidente ; la quantité de lumière absorbée est proportionnelle à la concentration du composé coloré recherché (loi de Beer-Lambert).

1.1. Spectrométrie d'absorption Uv- visible

La technique est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption. Le domaine UV s'étale entre 10 et 400 nm mais la plupart des spectroscopes ont comme limites 190 à 400 nm. De plus, ces appareils permettent aussi d'accéder aux longueurs d'ondes visibles, entre 400 et 750 nm.

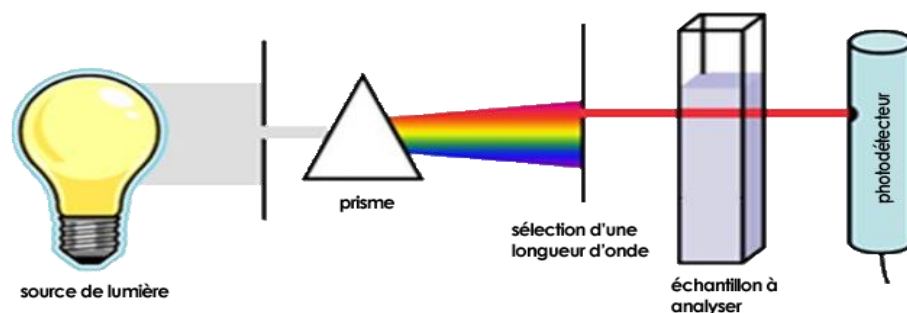


Figure 24 : Principe du Spectrométrie Uv- visible

Principe : est basée sur l'absorption des radiations lumineuses par l'usage de la lumière pour mesurer une concentration qui est proportionnelle à l'absorption de la lumière. Cette

lumière comprend des particules d'énergie discrète : le photon (modèle de Bohr) : quand un électron saute d'une orbite de plus haute énergie à une de plus basse énergie. L'énergie de ce photon est un multiple entier (quantification) de la valeur $h\nu$, ou $\nu=c/\lambda E$:

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

E: énergie de la radiation

h: constante de Planck $h = 6,626.10^{-34} \text{J/s}$

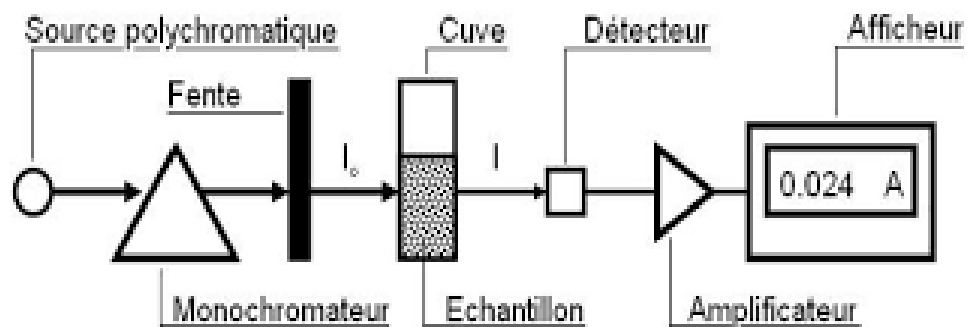
c: vitesse de la lumière $c = 2,998. 10^8 \text{m/s}$,

λ: longueur d'onde

NB: plus la fréquence, ν , est élevée, plus son énergie est importante et plus la couleur tend vers le bleu.



Schéma de principe du spectrophotomètre



1.2. Spectrométrie d'absorption infrarouge (IR)

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou pour tester la pureté d'une substance. Les différentes fonctions chimiques présentes sur une molécule donnée sont responsables de bandes d'absorption caractéristiques. Les spectres d'absorption IR sont caractérisés par de faibles coefficients d'absorption molaire (compris entre 10 et 1500) donc la méthode est peu sensible.

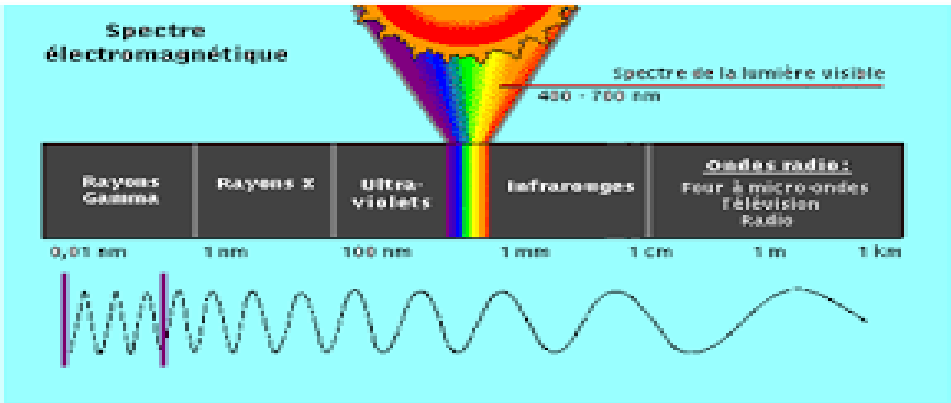


Figure 25 : Spectrométrie infrarouge (IR)

2. Spectrophotométrie d'absorption atomique (AA)

Principe : Cette méthode d'analyse dite élémentaire permet de :

- Doser des éléments chimiques à l'état de traces (en très faible quantité : quelques ppm) contenus dans une solution.
- Connaître les concentrations des espèces présentes.

Cette méthode est quantitative notamment dans le domaine UV-visible. La spectrométrie d'absorption est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie des atomes. En effet un atome qui passe de son état (d'énergie) fondamental à un état excité quelconque absorbe un ou plusieurs photons.

Le phénomène d'absorption est associé à un spectre d'absorption. Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments que l'on a décidé de doser.

En effet un atome qui passe de son état (d'énergie) fondamental à un état excité quelconque absorbe un ou plusieurs photons. La fréquence ν du photon dépend de l'énergie ΔE acquise par l'atome par la relation : $\Delta E = h\nu$

h est la constante de Planck.

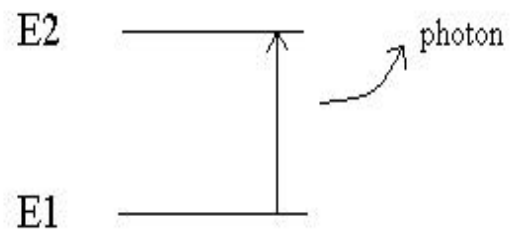


Schéma d'une transition électronique

2.1. Spectrométrie d'absorption atomique avec flamme

L'échantillon d'eau qui contient les éléments métalliques recherchés, est dispersé en nuage de fines gouttelettes dans la flamme. Les métaux ainsi libérés forment un plasma d'atomes libres (Figure 26).

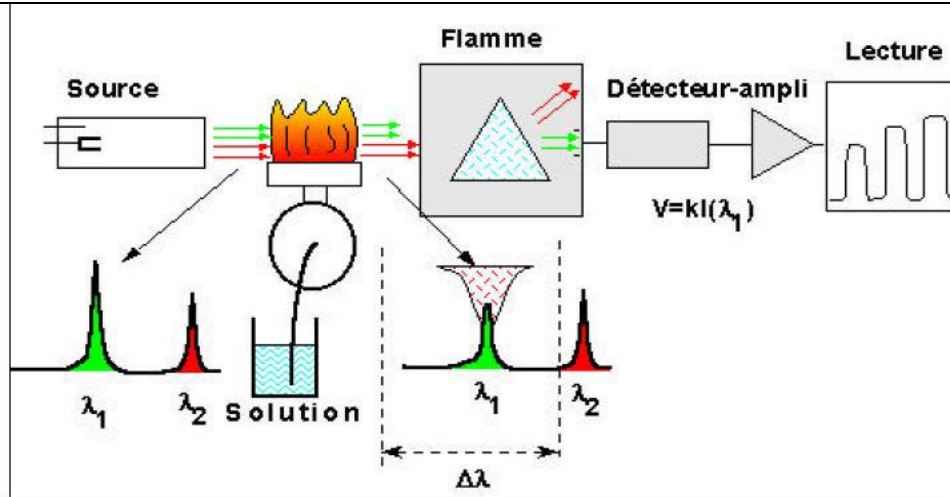


Figure 26 : Principe de la spectrométrie d'AA.

2.2. Spectrophotométrie d'émission de flamme

La pulvérisation d'une solution d'eau contenant des métaux dans une flamme se caractérise par une décomposition et une dissociation à l'état atomique des traces métalliques. Les atomes des métaux sont ainsi excités thermiquement par la flamme, et leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'une radiation dont la longueur d'onde est spécifique de l'élément recherché et dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration. Cette technique est appropriée pour le dosage direct des éléments alcalins : Na, K, Li.

3. Fluorescence

La fluorescence est un phénomène de luminescence : des molécules émettent un rayonnement dans toutes les directions grâce à l'énergie reçue d'une lumière incidente. Elle est la propriété des composés cycliques aromatiques. Sa mesure s'effectue à partir de Spectrofluorimétrie avec lumière incidente UV et lecture à 90° en lumières UV et visible.

4. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales : la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge (m/z) et l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser (qualitativement et quantitativement).

5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Elle est basée sur l'utilisation des propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique, est particulièrement puissante.

Principe : elle est basée sur l'utilisation d'un champ magnétique pour orienter les spins nucléaires des atomes, l'excitation des spins par une onde radio à la fréquence de résonance permet de basculer certains spins, ces spins excités reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des protons + neutrons (= nucléons) d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique I. La RMN concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin = 1/2 (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton (^1H -RMN), celle du carbone (^{13}C -RMN) ou celle du phosphore (^{31}P -RMN).



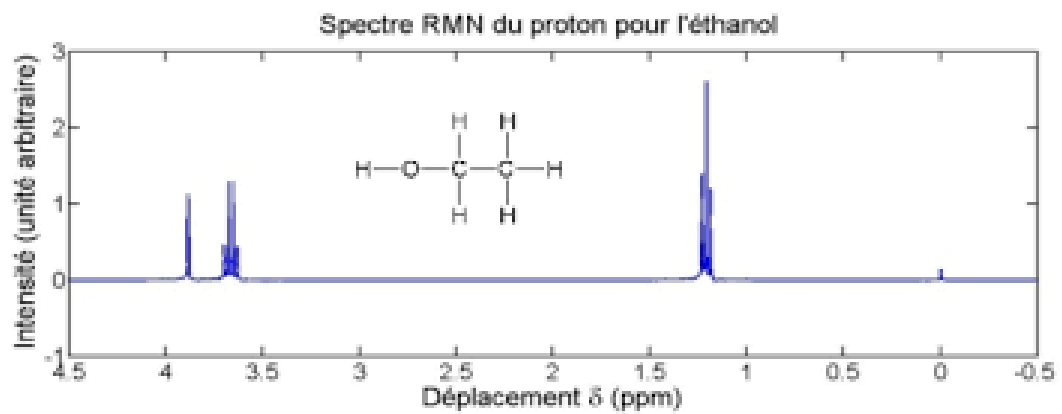
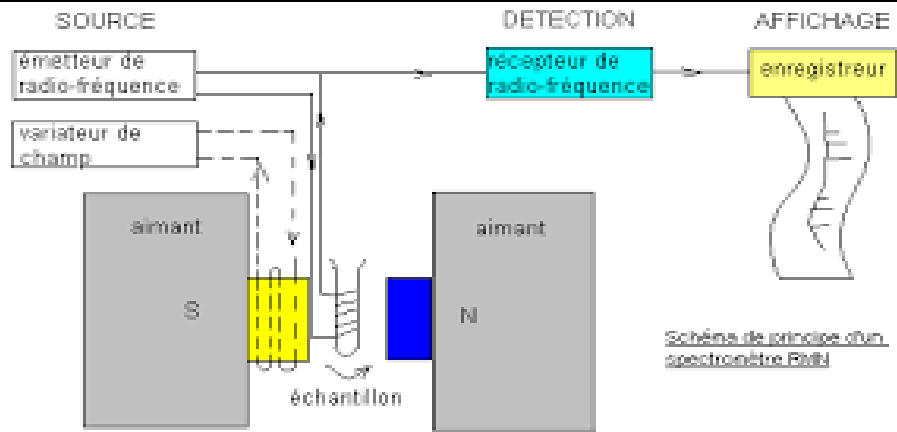


Figure 27 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Figure 28 : Schéma du Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Figure 29 : Schéma du spectre RMN

III. Méthodes de marquage

1. Introduction

Les techniques immunologiques reposent sur une réaction **Antigène-Anticorps**. Sont généralement utilisées pour détecter ou identifier les antigènes ou les anticorps dont l'utilisation des anticorps spécifiques doit correspondre aux antigènes recherchés. Il existe plusieurs types d'anticorps tels que : sérums polyclonaux, immunoglobulines purifiées ou anticorps monoclonaux.

Comme définition : un anticorps est un composant de nature glycoprotéine complexe, est indispensable au système immunitaire pour déterminer et neutraliser les agents pathogènes spécifiquement. Sont synthétisés par les lymphocyte B soit les plasmocytes.

La réaction Ag-Ac est une réaction exothermique, réversible **et** spécifique.

1- La spécificité : C'est l'aptitude de l'Ac à ne réagir qu'avec l'Ag et rien qu'avec cet Ag.

2- L'affinité : C'est la tendance avec laquelle un épitope réagit avec un anticorps

3- La réversibilité : Les forces de liaison faible rendent compte de la réversibilité de la réaction. Un maximum de liaison Ag –Ac n'est obtenu qu'après un temps d'incubation.

Applications : Elles sont très utilisées en :

-Recherche fondamentale et appliquée.

-Analyse médicale, pour le dosage de nombreuses substances (Ag, Ac, hormones, marqueurs tumoraux, médicaments...) dans les différents liquides biologiques.

➤ **Identification et/ou dosage d'un Antigène (Ag)**

- Cellules
- Agents infectieux
- Protéines
- Hormones
- Médicaments

➤ **Mise en évidence et/ou titrage d'un Anticorps (Ac)**

- Sérologies infectieuses
- Maladies auto-immunes
- Allergies
- Transplantation

2. Types de techniques immunologiques avec marquage

1. Radio-immunologique

2. Immunofluorescence
3. Immuno-enzymatiques
4. Chimiluminescence

Soit :

•Réactions Antigène-Anticorps utilisant un réactif « Antigène*ou Anticorps *» associé à un Marqueur (Traceur) détectable permettant de révéler la liaison antigène–anticorps spécifique

•Le marquage ne doit pas modifier la spécificité de la réaction Ag-Ac (le marquage se fait en dehors des régions de complémentarité)

•Les marqueurs augmentent la sensibilité d'une immuno-analyse et permettent de déceler des quantités plus faibles de cible que les méthodes qui ne les utilisent pas.

•Quatre grands types de marqueurs sont utilisables, des enzymes, des fluorochromes, des composés chimiluminescents et des radio-isotopes (Figure 30).

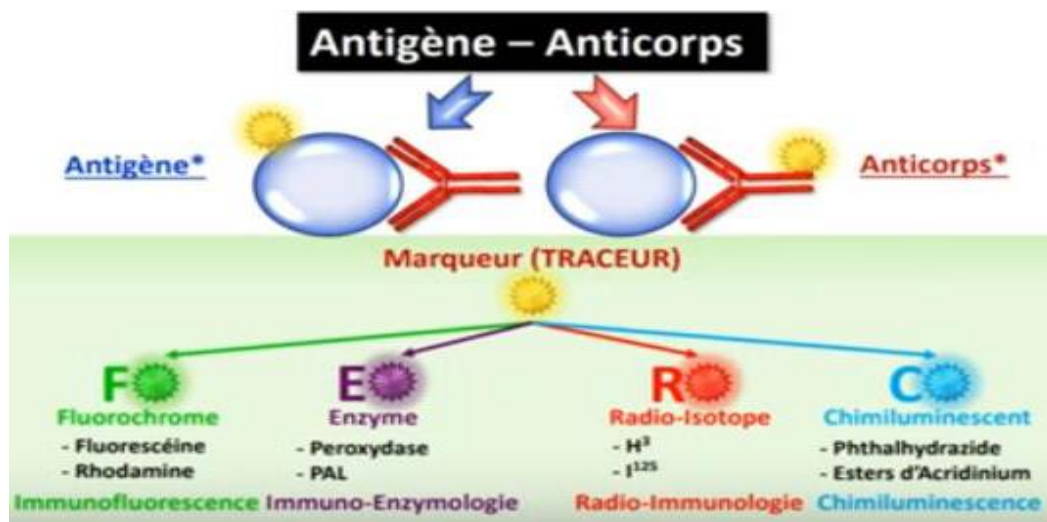


Figure 30 : Réactions Antigène-Anticorps avec marquage

1. Dosage radio immunologique

Introduction

Le premier immunodosage décrit est celui de l'insuline en 1959 par YALOW et BERSON. Ils regroupent l'ensemble de méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène (AG) – anticorps (AC). Les plus nombreux utilisent actuellement un troisième élément (le traceur ou marqueur). Ce marqueur peut être soit un noyau radioactif, soit une enzyme ou bien une molécule fluorescente.²

² Khaled .H (sd). Les techniques immunologiques avec marquage. **Université de Constantine 3**

Principe

-Méthode de dosage et d'analyse quantitative

- Réaction antigène-anticorps associée à un marqueur radioactifs (un radio-isotope).
- Caractérisée par sa grande sensibilité et sa grande spécificité.

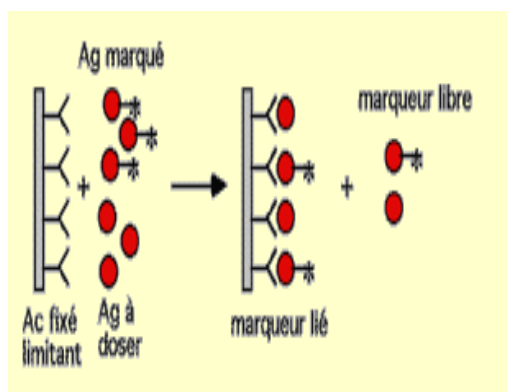
Les marqueurs radioactifs : émettent un signal physique direct, il est détecté par la mesure de la radioactivité dont l'amplitude est proportionnelle (directement ou inversement) à la quantité du marqueur radioactif.

Les isotopes radioactifs utilisés :

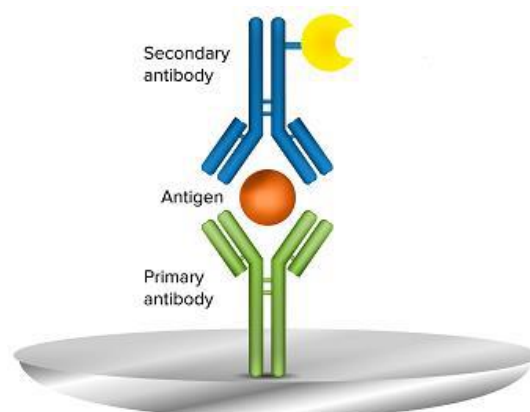
- ^{125}I : émetteur γ , $E = 35 \text{ KeV}$, $T = 60 \text{ j}$ (c'est le plus utilisé)
- ^3H (Tritium) : émetteur β , $E = 19 \text{ KeV}$, $T = 12,3 \text{ ans}$

Méthodes

Par compétition



Sandwich



- Le test de Farr est une technique de dosage radio-immunologique: utilisée pour la détection des Ac anti-ADN , elle utilise de l'ADN double brin marqué par un radio-isotope.

- Elle se déroule en 4 étapes:-Incubation du sérum du patient avec l'ADN double brin marqué-Séparation des complexes immuns par précipitation et centrifugation-Elimination de l'ADN double brin marqué non lié à un anticorps-Mesure de la radioactivité (proportionnalité entre la radioactivité mesurée et la quantité d'anticorps présents dans le sérum).

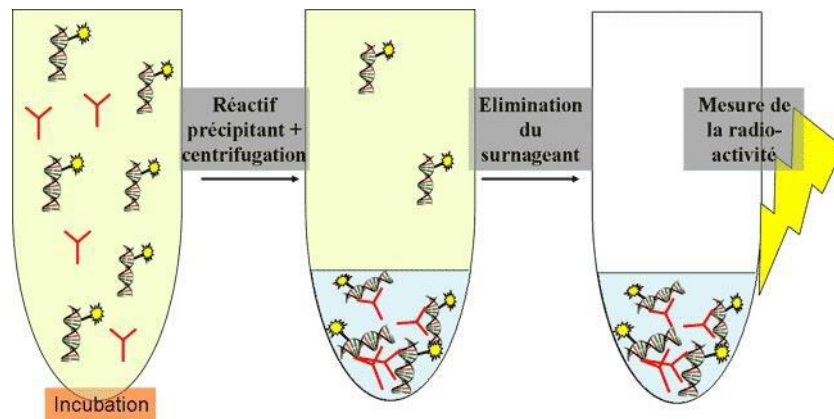


Figure 31 : Immuno-précipitation en milieu liquide (Test de Farr)

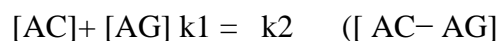
Ces techniques ont été progressivement supplanté par l'emploi de marqueurs non isotopiques (enzymatiques et luminescents) offrant une plus grande facilité d'emploi sans les restrictions réglementaires liées à la manipulation des produits radioactifs.

Les anticorps : Lorsqu'on injecte à un animal un antigène, la réponse immunitaire se traduit entre autres par une sécrétion d'anticorps. Ces anticorps sont des immunoglobulines. Il s'agit de glycoprotéines produites par les lymphocytes B activés en plasmocytes. Elles portent des sites capables de reconnaître spécifiquement certains déterminants antigéniques appelés épitopes.³

Les antigènes : Les antigènes (AG) correspondent aux molécules à doser. La liaison antigène anticorps dépend de l'avidité de cet anticorps pour cet antigène.

Réaction antigène-anticorps :

La réaction antigène-anticorps est la base de tous les immundosage dosages et un AG réagit avec un AC.



K1 et k2 représentent les vitesses respectives d'association et de dissociation. Cette réaction est réversible et on obtient un équilibre lorsque la quantité [AC-AG] formée par unité de temps est égale à la quantité de ce même composé dissocié par unité de temps.

³ MANSOURI FAROUK. 2022. dosages-radioimmunologiques. PDF (faced.med.univ-constantine3.dz). Université Constantine 3. Faculté de médecine. Département de pharmacie. 2ème année pharmacie ;

Influence des conditions physico-chimiques sur la réaction AC-AG

La constante d'affinité dépend du milieu. Les facteurs essentiels sont :

- Ph si Ph diminue, l'intensité de la réaction diminue.
- La température joue un rôle à la fois sur la constante d'affinité et sur la vitesse de la réaction AC-AG.

Principes généraux des radioimmunosages

Ces méthodes combinent deux procédés :

- ✓ La réaction AC et AG
- ✓ La détection du signal radioactif

1. Les méthodes par compétition : Aussi appelées par défaut d'anticorps ou Radio Immuno Assay (R.I.A)

Principe

La concentration des AC doit être inférieure à la concentration totale des AG. Donc il y'a une compétition vis à vis des sites AC avec formation simultanée des complexes [AC- AG*] et [AC-AG]

- En maintenant fixe la concentration en AC et en molécules marquées (AG*), l'augmentation de la concentration en AG entraîne une augmentation des complexes [AC-AG] au détriment du complexe [AC- AG*].
- Si on dispose d'une méthode qui permet de séparer les composés libres, les complexes [AC-AG] et [AC- AG*] sans modifier l'équilibre de la réaction, on peut facilement déterminer grâce au signal délivré par le marqueur radioactif la concentration de AG* [F*] et des complexes [AC - AG*] ou [B*] pour chaque concentration d'Ag.
- A l'équilibre : Les rapports $[F] / B = [F*] [B*]$

Avantages et inconvénients

- ✓ S'appliquent à tous les AG quelques soit leurs tailles
- ✓ Nécessite une constante d'affinité élevée
- ✓ Nécessite un nombre constant d'AC dans chaque tube.
- ✓ Un seul épitope étant nécessaire à l'AG, mais les fragments et les métabolites de l'AG porteur de l'épitope peuvent être reconnus comme la molécule mère, donc des résultats par excès.

Les méthodes radioimmunométriques : Aussi appelées par excès d'anticorps ou méthodes sandwich ou IRMA.

Récemment développées, ces méthodes ont pris une véritable extension depuis l'utilisation des anticorps monoclonaux et tentent de remplacer les méthodes par compétition.

Principe

Elles se distinguent des méthodes par compétition par :

- Présence d'excès d'AC
- L'utilisation d'un deuxième AC2* qui est marqué. Ce dernier est utilisé comme révélateur de la réaction entre l'AG et le premier AC1 qui est fixé sur le support solide. La quantité fixée doit être de telle sorte que le nombre de sites de liaisons disponibles doit être supérieur au nombre de molécules AG présent dans la solution.
- AG va se fixer sur les sites spécifiques.
- L'addition de l'AC2* est suivie de sa fixation sur Ag préalablement fixé sur l'AC1. L'AG se trouve ainsi pris en sandwich entre deux anticorps (AC1 et AC2*).
- Un simple lavage permet de séparer les complexes (AC1-AG- AC2*) = B* et AC2*(F*).
- L'AC2* doit réagir contre un épitope différent de l'AG

Avantages et inconvénients : Sont liés à l'utilisation AC monoclonaux et au principe même de la méthode :

- L'utilisation de deux AC monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de l'AG donc amélioration de la reconnaissance spécifique de ce dernier.
- La limite de détection est abaissée par rapport aux méthodes par compétition.
- La gamme de mesure est plus étendue.
- Augmentation de la précision des mesures.
- L'AG doit avoir deux épitopes (utilisation impossible pour les petites molécules).
- Le phénomène du crochet qui apparaît pour les concentrations élevées d'Ag où on observe une diminution de la valeur du signal passant au-dessous de celle obtenue par le dernier point de la gamme.

1. Dosage radio enzymatique (Les techniques Immuno-enzymatiques)

Définition et principe

Ce sont des techniques immunologiques dans lesquelles un des constituants (Ag ou Ac) est **marqué par une enzyme**.

- Les enzymes communément utilisées : **phosphatase alcaline, peroxydase, β -galactosidase**.

- Le marquage par ces enzymes ne doit pas affecter ni la spécificité ni l'affinité des Ac ni la structure de l'Ag.

- Pour chaque enzyme utilisée, il faut ajouter dans le milieu **un substrat chromogène** qui, lorsqu'il est dégradé par l'enzyme donne **un produit de couleur différente et absorbant de la lumière à une certaine longueur d'onde**.

- Technique **qualitative** (lecture à l'œil nu) ou **quantitative** (mesure de la densité optique grâce à la spectrophotométrie)

+ Méthodes

1. Techniques quantitatives

a. Techniques ELISA

- Techniques largement utilisées
- Bonne sensibilité, spécificité
- Réalisées dans des plaques de microtitration dont le matériau permet la fixation des protéines (Ag ou Ac)
- Plusieurs variantes méthodologiques : par compétition, indirecte, type sandwich.
- La révélation de la réaction Ag-Ac repose sur la mesure de la densité optique du produit généré à l'aide d'un spectrophotomètre (lecteur de plaques ELISA)
- La détermination de concentration est assurée par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage.

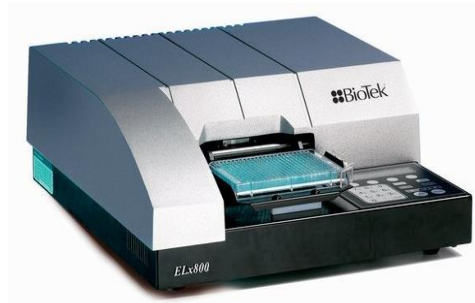
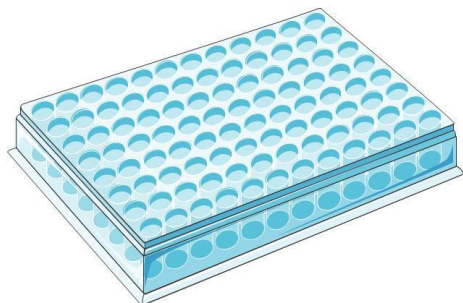
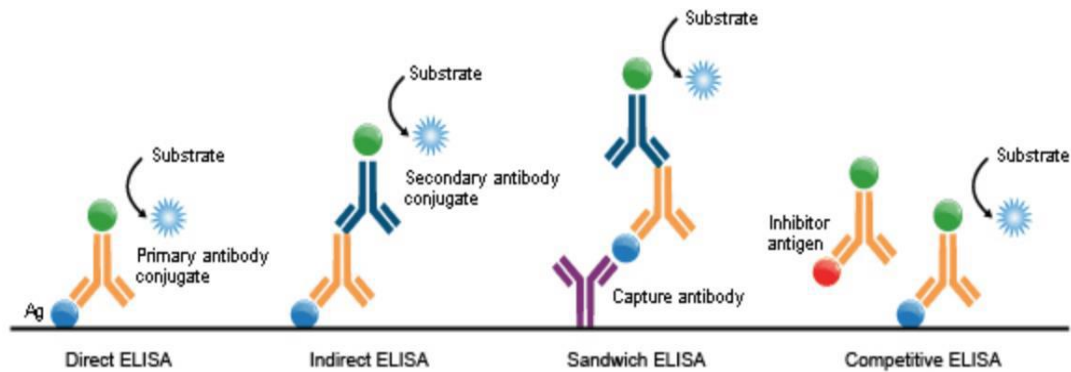


Figure 32 : Appareillages utilisés dans les techniques ELISA

a.1. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA



a.1.1. ELISA indirecte.

- Utilisée pour la recherche des **Ac**.
- Peut être quantitative ou qualitative.
- L'Ac recherché est fixé à la plaque grâce à l'interaction des Fab avec l'Ag présent dans la plaque.
- L'ajout d'un autre **Ac marqué** dirigé contre le Fc de l'Ac recherché permet de visualiser la réaction.

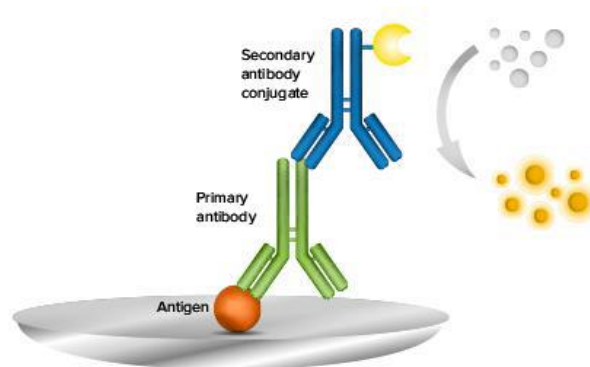


Figure 33 : La DO est directement proportionnelle à la quantité d'Ac mesuré

a.1.2. ELISA Sandwich

- Ac1 reconnaît épitope1 sur l'Ag
- Ac2 reconnaît épitope2 sur l'Ag

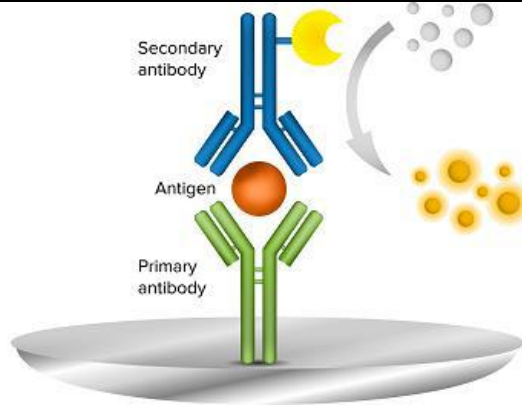


Figure 34 : La DO est directement proportionnelle à la quantité d'Ac mesuré

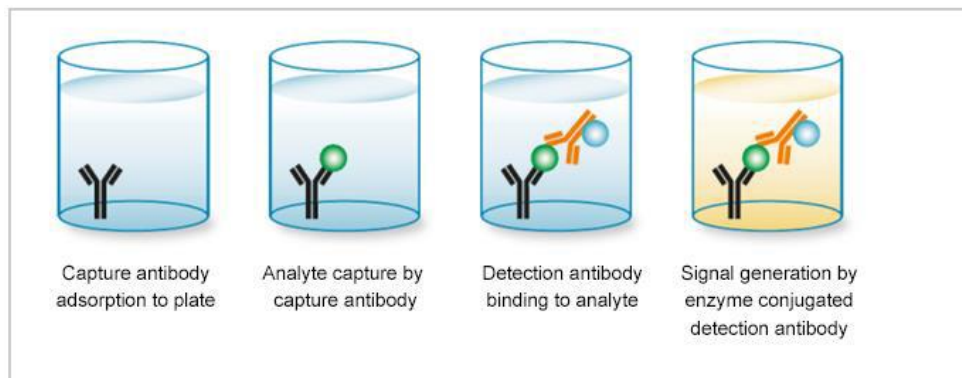


Figure 35 : La DO est directement proportionnelle à la quantité d'Ac mesuré

a.1.3. ELISA par compétition

Principe : basé sur une compétition entre Ag marqué et l'Ag non marqué vis-à-vis de sites limités d'Ac.

- Ac: quantité limitée.
- Ag-Enzyme : quantité constante limitée

Exemple : dosage d'un Ag

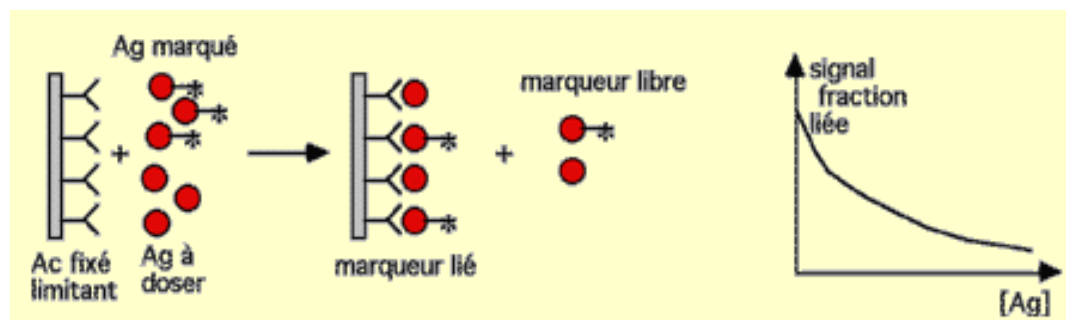
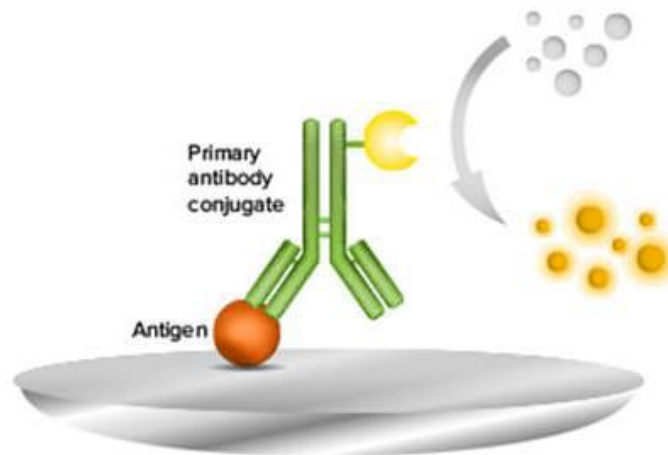


Figure 36 : La DO est indirectement proportionnelle à la quantité d'Ag mesuré

2. Techniques qualitatives

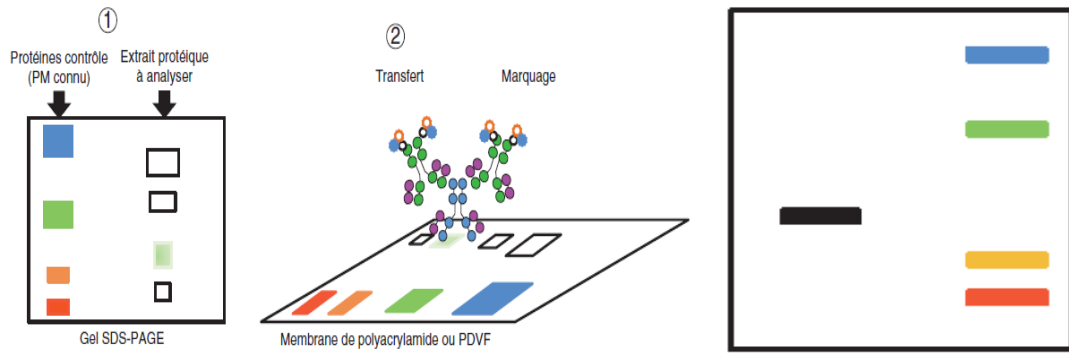
a. ELISA Directe

- Utilisée en immunohistochimie.
- Recherche d'Ag présent dans un tissu à l'aide d'un anticorps spécifique conjugué à une enzyme.
- Lecture au microscope optique.

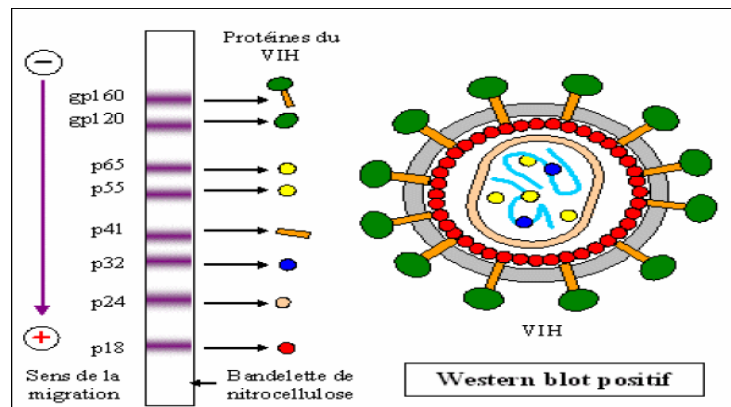


b. Western Blot (Immuno empreinte) : Technique immunoenzymatique réalisée sur des membranes de nitrocellulose.

- La préparation des membranes passe par deux étapes:
 - Séparation électrophorétique par SDS-PAGE (Haute résolution)
 - Transfert des bandes d'Ag sur la membrane de nitrocellulose (blotting)
- La détection de la protéine d'intérêt est ensuite réalisée sur la membrane, de manière directe grâce à des anticorps spécifiques couplés à un traceur ou de manière indirecte en utilisant alors un anticorps spécifique et un anticorps secondaire couplé à un traceur enzymatique (permettant la production d'un précipité coloré).
- Cette technique est **qualitative**, voire **semi-quantitative**.



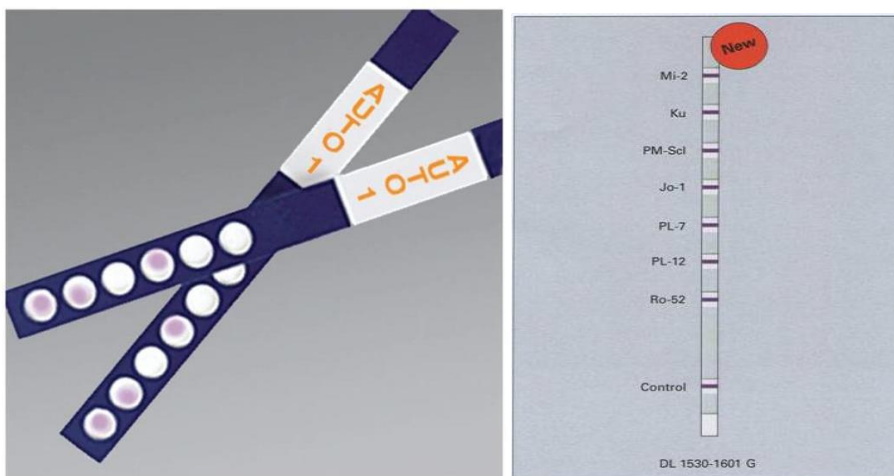
• **En clinique** : la confirmation d'un diagnostic sérologique positif d'infection par le VIH nécessite un western-blot.



c. Immunodot

L'immunodot(*dot-blot*), est une technique dérivée du western-blot dans laquelle **les antigènes**, sont directement déposés sur des bandelettes de nitrocellulose. (Il n'y a pas de séparation préalable des protéines sur gel).

- Il s'agit d'une technique immunoenzymatique de type indirect.
- Utilisée pour la détection d'Ac.
- Un résultat positif se présente sous forme d'un cercle ou trait coloré.



d. Elispot

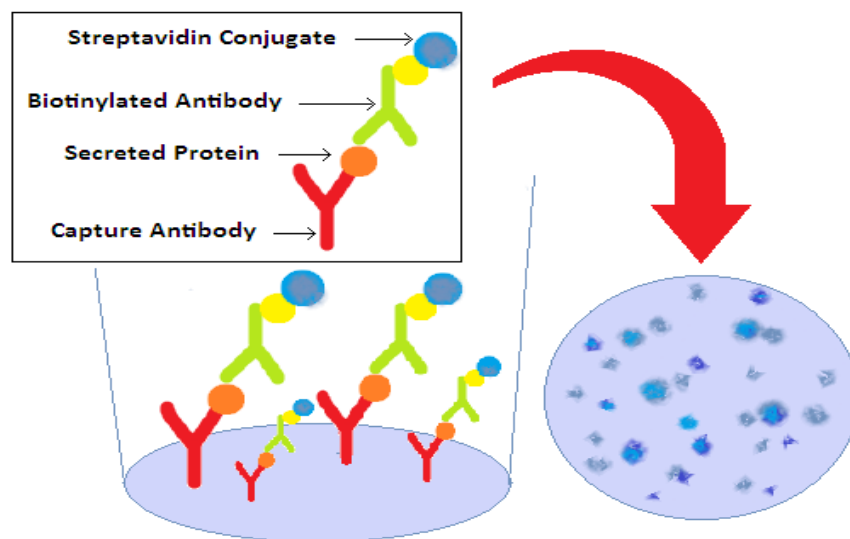
Variante de la technique Elisa utilisée pour la détection des cellules productrices de cytokines.

- Le puits de la plaque est couvert d'Acanti-cytokine recherchée dans lequel sont cultivées les cellules du patient.

- Les cytokines produites seront captées par les Acprésents dans le puits dans l'endroit de leur production.

- On continue les étapes de l'ELISA sandwich habituelle.

- Le résultat positif se traduit par l'apparition de spots colorés dont chacun correspond à une cellule productrice.



IV. Microscope électronique

Introduction :

Les microscopes électroniques sont des instruments beaucoup plus volumineux. Ils utilisent eux aussi un système de lentilles qui sont organisées dans une colonne électronique. Le microscope électronique à balayage permet typiquement d'accéder à des pouvoirs de résolution de l'ordre de 10 nm. Le microscope électronique en transmission, plus volumineux encore que le microscope électronique à balayage, avec un système de lentilles plus complexe. Il permet d'accéder à des résolutions de l'ordre de 0,1nm et donc de voir directement les atomes. **Le principe** est d'utiliser un système optique. Il y a évidemment une source d'électrons qui émet un faisceau d'électrons. Dont l'utilisation d'un système de lentilles pour focaliser, éclairer un échantillon. Ça c'est le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage. L'échantillon est massif et il va réfléchir ce faisceau d'électrons. On va détecter les faisceaux réfléchis dans un détecteur et l'image est formée en balayant ce faisceau d'électrons sur la surface de l'échantillon. On obtient ainsi une image qui est fabriquée de manière séquentielle comme sur un écran cathodique de télévision, grâce à l'utilisation d'un écran d'ordinateur. Dans le cas d'un microscope électronique en transmission, la géométrie est différente dont le passage se fait à travers l'échantillon. Donc on a un échantillon mince. Le système de lentilles est disposé de part et d'autre de l'échantillon le long de la colonne. Où il y a les mêmes éléments. Un système condenseur, une lentille objective qui permet de fabriquer l'image et un système projecteur qui va permettre d'agrandir l'image sur un écran.

Cependant, pour comprendre complètement le mécanisme de formation de l'image en microscopie électronique, il faut aussi s'intéresser aux mécanismes d'interactions entre le faisceau d'électrons et l'échantillon. Dans le cas du microscope électronique à balayage, le faisceau est envoyé puis focalisé à la surface, en s'intéressant ici essentiellement à deux processus. **Un processus** au cours duquel le faisceau d'électron incident est réfléchi par l'échantillon, ce sont les électrons rétrodiffusés. Ces électrons vont être sensibles au numéro atomique des atomes. Donc si les atomes sont lourds, ils vont plus facilement réfléchir. Et donc on va former des images avec un contraste chimique. **Puis les électrons secondaires**, qui sont des électrons qui sont émis par l'échantillon. Ces électrons vont fournir l'information sur la

Chapitre IV : Microscope électronique

topographie de la surface ⁴. La différence qui existe entre le microscope optique et le microscope électronique est illustrée dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des Microscope optique et microscope électronique

Microscope optique	Microscope électronique
Faisceau lumineux	Faisceau d'électrons
Lentilles en verre	Lentilles électrostatiques et magnétiques
Grossissement x 2 000 fois	Grossissement x 2 000 000 fois
Résolution limite	Résolution bonne Technique simple
Technique simple	Technique complexe
Source d'énergie : Lampe électrique	Filament de tungstène porté à incandescence
Rayonnements : photons	Électrons libres accélérés dans le vide pour traverser ensuite l'échantillon.
Pouvoir séparateur : 0.2 μm	0.2 nm (2Å)
Épaisseur de l'échantillon : 2 à 10 μm	300-800 Å

Contrairement au MET et au microscope optique, l'image n'est pas formée par une lentille objectif. L'image est formée de manière séquentielle en balayant la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons. Le MEB fournit des images de la surface en relation avec le mode de diffusion des électrons par l'échantillon.⁵

Trois principales contraintes se posent avant l'observation d'un échantillon au microscope électronique :

- Les électrons se déplacent à l'intérieur d'une enceinte où règne un vide poussé (de l'ordre de 10⁻⁵ mm de mercure). Sous cette pression, seules les substances non volatiles peuvent être observées. Les cellules sont riches en eau (un composé volatil), une étape de déshydratation est donc nécessaire. Comme pour la microscopie optique la déshydratation est nécessairement précédée d'une étape de fixation pour ne pas endommager l'échantillon.

- Les échantillons sont soumis à un bombardement d'électrons ce qui induit une augmentation de la température. Il faut donc que l'échantillon supporte de fortes températures sous vide.

- Le pouvoir de pénétration des électrons est très faible, par conséquent l'échantillon doit être ultrafin, pas plus de 0,1 μm . L'observation par microscope électronique à transmission

⁴ Odile Stephan. MOOC : Comprendre les nanosciences 2017, MOOC Nano, COMUE Université Paris Saclay & Université Paris-Sud

⁵ Marie-Paule Bassez ; Julien Bortoluzzi ; Benjamin Malatrait ; Ludovic Ribstein 2012. Les microscopes électroniques <http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/coursenligne.html>. Université de Strasbourg.

Chapitre IV : Microscope électronique

nécessite l'augmentation du contraste des objets observés grâce à l'utilisation d'éléments de numéro atomique élevé qui diffusent fortement les électrons ⁶.

1. Microscopes électroniques

Principe

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que:

- ✓ Les photons sont remplacés par des électrons.
- ✓ Les lentilles de verre sont remplacées par des lentilles électromagnétiques.
- ✓ La limite de résolution du ME est plus élevée à celle du MO. Elle est de 2 nm (c'est-à-dire 1000 fois plus élevée que le MO). L'agrandissement du ME peut atteindre jusqu'à 500.000 contre 2000 pour un MO.

1.1. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission (MET ou TEM en anglais pour Transmission Electron Microscopy) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre. C'est la technique de microscopie la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse. Les électrons sont plus ou moins absorbés et l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent. Le grossissement est beaucoup plus fort qu'en microscopie optique.

La qualité des observations et des analyses en MET est conditionnée par la qualité des échantillons.

Microscope électronique de transmission (TEM) : dans ce cas, un objet est irradié par des électrons. Les microscopes TEM (microscopes électroniques de transmission) sont comme les microscopes de lumière transmise, où l'absorption joue un rôle important. Actuellement la résolution obtenue est d'environ 0,05 nm.

Microscope électronique à transmission (MET), les électrons traversent l'échantillon traité par des métaux lourds. Sur l'écran du MET apparaît une image claire et agrandie. L'image est due

⁶ Extrait PDF (www.editions-ellipses.fr): Chapitre 1- Les méthodes d'étude en biologie cellulaire

Chapitre IV : Microscope électronique

à l'absorption différentielle des électrons par les différentes structures de l'échantillon. Le MET se compose essentiellement de :

- Une source des électrons (fil métallique chauffé à un degré très élevé sous vide).
- Sous vide, les électrons vont être accélérés en appliquant une différence de potentiel de 10 à 100 kV
- Espace tubulaire sous vide.
- Des lentilles électromagnétiques (Bobines) permettent la diffraction du trajet des électrons ⁷.



Figure 37 : Microscope électronique à balayage (MEB)

1.2. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. La résolution est plus faible que le microscope électronique à transmission, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en 3D. Lorsque le faisceau d'électron bombarde la préparation, une partie des électrons la traverse, le reste est ré-

⁷ ZOUAGHI Youcef. 2021. Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule TD N°1 : Méthodes de microscopie optique et électronique Université Frères Mentouri Constantine 1. 1ère année LMD/TC/SNV. Cours de Biologie Cellulaire

Chapitre IV : Microscope électronique

émis. Ce sont eux qui serviront à construire l'image. Le résultat est une représentation de la surface de l'objet observée. ⁸

Le MEB permet d'observer l'objet en trois dimensions. Il est utilisé dans l'étude des surfaces des objets massifs après leur traitement par des substances métalliques réfléchissantes telles que le platine, l'argent et l'or. Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image.



Figure 38 : Microscope électronique à transmission (MET)

⁸ Naciri M. 2011. Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies optique et électronique. Techniques histologiques PDF (www.fsr.ac.ma). Université Mohammed V-Agdal. Faculté des Sciences de Rabat. Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale

Références bibliographiques

- R. Denine, Cours de pharmacie galénique, Office des Publications Universitaires.2008
- Y. Rossetto, Pharmacotechnie Industrielle φ41,I.M.T, 1998
 - A. Le Hir, J-C. Chaumeil, and D.Brossard,Pharmacie Galénique. 2009, Edition Masson
 - P. Wherlé, Pharmacie galénique. 2007,Edition Maloine
 - Juliane Flourey, Enseignant chercheur en génie des procédés, Agrocampus Ouest.
Romain Jeantet, Enseignant chercheur en génie des procédés et technologie laitière,
Agrocampus Ouest. Scénarisation : Equipe des auteurs du module, Equipe d'Ingénierie
du CIRM-Université de Rennes 1. Production : Equipe de production du CIRM –
Université de Rennes 1.
 - Zouaghi Youcef. 2021. Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule TD N°1 : Méthodes
de microscopie optique et électronique Université Frères Mentouri Constantine 1. 1ère
année LMD/TC/SNV. Cours de Biologie Cellulaire
 - Naciri M. 2011. Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies
optique et électronique. Techniques histologiques PDF (www.fsr.ac.ma). Université
Mohammed V-Agdal. Faculté des Sciences de Rabat. Laboratoire de Zoologie et de
Biologie générale
 - Khaled .H (sd). Les techniques immunologiques avec marquage. Université de
Constantine 3
 - Mansouri Farouk. 2022. dosages-radioimmunologiques. PDF ([facmed.univ-
Constantine3.dz](http://facmed.univ-Constantine3.dz)). Université Constantine 3. Faculté de médecine. Département de
pharmacie. 2ème année pharmacie ;
 - **Microfiltration, ultrafiltration et filtration stérilisante : quelles différences ?**16
janvier 2020. [https://blog.sofise-filtration.com/industries/toutes-
industries/microfiltration-ultrafiltration-et-filtration-sterilisante-quelles-differences](https://blog.sofise-filtration.com/industries/toutes-industries/microfiltration-ultrafiltration-et-filtration-sterilisante-quelles-differences)
 - [https://agriculture.canada.ca/fr/production-agricole/leau/etangs-etangs-
reservoirs/gestion-leau-surface-zone-rurale/comment-fonctionne-filtration](https://agriculture.canada.ca/fr/production-agricole/leau/etangs-etangs-reservoirs/gestion-leau-surface-zone-rurale/comment-fonctionne-filtration)
 - **Ouvrages et polycopiés de cours publiés sur internet.**

Glossaire

- 1- **Biotechnologie** : est l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services. Biotechnologie ou « technologie de bioconservation » est une combinaison entre la science des êtres vivants (la biologie) et un ensemble de techniques nouvelles issues d'autres disciplines telles que la microbiologie, la biochimie, la biophysique et l'informatique.....
- 2- **PCR : PolymeraseChain Reaction** : une méthode de biologie moléculaire d'amplification d'ADN in vitro afin d'étudier un fragment d'ADN particulier dont la séquence est au moins partiellement connue. Il est nécessaire d'effectuer une répliquenzymatique de ce fragment pour caractériser une quantité manipulable d'ADN. Les applications de la PCR est multiples dans plusieurs domaines à savoir : génétique, oncologie et microbiologie
- 3- **Pouvoir de résolution** : ou pouvoir de séparation est la distance minimale qui doit exister entre deux points contigus pour qu'ils soient correctement discernés au travers d'un système optique tel qu'un microscope optique ou télescope.
- 4- **PH** : le potentiel hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H⁺ (protons) en solution. Le PH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Ainsi dans un milieu aqueux à 25° C une solution avec un PH : inférieur à 7 est acide, supérieur à 7 est basique, égal à 7 est neutre.

(Pr. Darbouche Abdelhak, 2011)

Préparation d'une suspension riche en mitochondries

Pour étudier le rôle des mitochondries, il est nécessaire de les isoler. Pour cela, on utilise des cellules particulièrement riches en mitochondries, par exemple des cellules du foie.

Les cellules subissent d'abord un broyage mécanique modéré afin de libérer les constituants sans trop les léser. Le broyat est ensuite centrifugé : la rotation à grande vitesse des tubes contenant les extraits cellulaires permet de séparer les constituants cellulaires et d'obtenir une fraction riche en mitochondries. L'isolement réel des mitochondries nécessite cependant une centrifugation à très grande vitesse (imparfaitement réalisée avec une centrifugeuse de lycée).

