

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

~~3^{ème} Année~~ Licence : Biotechnologie végétale et amélioration des plantes

Polycopié de cours

« Analyse instrumentale »

Troisième année Biotechnologie végétale et amélioration des plantes

Dr. BELKHARCHOUCHE Mounira

Année universitaire : 2023-2024

Intitulé de Licence : Biotechnologie végétale et amélioration des plantes

Semestre : 6

Intitulé de l'UE : Méthodologie

Intitulé de la matière : Analyse instrumentale

I. Introduction

II. Méthodes spectrales

II.1. Spectrophotométries d'absorption moléculaire

II.4. Spectrophotométrie d'absorption atomique

III. Méthodes de fractionnement

III.1. Filtration

III.2. Centrifugation

III.3. Méthodes chromatographiques

IV. Microscope électronique

IV.1. Microscopie électronique à balayage

IV.1. Microscopie électronique à transmission

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	i
Liste des tableaux.....	ii
Avant-propos.....	iii
I. Introduction.....	01
Chapitre II : Techniques spectrales.....	02
1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	02
1.1. Spectrométrie d'absorption Uv- visible.....	05
1.2. Spectrométrie d'absorption infrarouge (IR).....	06
2. Spectrophotométrie d'absorption atomique (AA).....	07
2.1. Spectrométrie d'absorption atomique avec flamme.....	08
2.2. Spectrophotométrie d'émission de flamme.....	08
3. Fluorescence.....	09
4. Spectrométrie de masse (MS).....	09
5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	09
Chapitre III : Techniques de séparation (fractionnement).....	11
1. Filtration.....	11
1.1. Intérêt de filtration.....	12
1.2. Procédure de filtration.....	12
1.3. Matériels de filtration.....	13
1.4. Procédés de la filtration au laboratoire.....	15
1.5. Types de filtration en fonction de la taille des particules.....	18
2. Sédimentation et Centrifugation.....	21
2.1. Principe de centrifugation.....	22
2.2. Matériel de centrifugation.....	22
2.3. Type de machines centrifugeuses.....	23
2.4. Les rotors.....	23
2.5. Types de centrifugation.....	25
1. Les gradients discontinus.....	25
2. Les gradients continus.....	27
2.6. Intérêt et applications	29

3. Techniques chromatographiques.....	30
1. Choix de la technique chromatographique.....	30
2. Divers types de chromatographie.....	31
Exemple 1. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	32
Exemple 2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	33
Exemple 3. Chromatographie liquide (LC - HPLC).....	34
Chapitre IV : Microscope électronique.....	36
1. Microscopes électroniques.....	36
1.1. Microscopie électronique à transmission.....	38
1.2. Microscopie électronique à balayage.....	39
Références bibliographiques	41
Glossaire	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Spectrophotomètre	02
Figure 2 : Principe de spectrophotométrie	03
Figure 3 : Spectre d'absorbance	04
Figure 4 : Principe de Spectrométrie Uv- visible.....	05
Figure 5 : Spectrophotomètre UV-visible	06
Figure 6 : Spectrométrie infrarouge (IR).....	07
Figure 7 : Principe de la spectrométrie d'AA	08
Figure 8 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire	10
Figure 9 : Schéma du Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.....	10
Figure 10 : Schéma du spectre RMN.....	10
Figure 11 : Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b).....	15
Figure 12 : Filtration par gravité classique.....	16
Figure 13 : Filtration sous vide	17
Figure 14 : Filtration sous pression.....	18
Figure 15 : Différents types de filtration	20
Figure 16 : Centrifugeuse	22
Figure 17 : Rotor à godet mobile et à angle fixe	23
Figure 18 : Sédimentation des particules dans divers types de rotor	24
Figure 19 : Isolement des organites cellulaires	26
Figure 20 : Préparation de gradient de densité de Saccharose.....	28
Figure 21 : Chromatographie sur couche mince (CCM).....	33
Figure 22 : Détermination le rapport frontal d'une substance.....	33
Figure 23 : Chromatographie CPG.....	34
Figure 24 : Chromatographie HPLC	35
Figure 25 : Microscope électronique à balayage (MEB)	39
Figure 26 : Microscope électronique à transmission (MET).....	40
Figure 27 : Isolement des organites cellulaire par Centrifugation différentielle.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Caractéristiques des Microscope optique et microscope électronique. 37

Avant-propos

Ce support de cours du module « Analyse instrumentales » est destiné aux étudiants de la spécialité : Biotechnologie dont la promotion est 3^{ème} année Licence Biotechnologie végétale et amélioration des plantes.

Ce document réparti sur trois chapitres qui portent les différents types technique d'analyse en laboratoire, et cela, suivant le canevas établi pour ce module. En effet, dans le but de faciliter le parcours de recherche bibliographique aux étudiants de cette spécialité, il a été conçu ce support pédagogique qui porte l'ensemble des analyses instrumentales dont l'étudiant en les a besoin le long de son parcours de licence. Les principaux intérêts de ce module sont : i) améliorer la connaissance des étudiants de ces outils d'analyse en laboratoire, ii) connaître l'importance de chaque analyse et son application et iii) comment choisir la technique qui convient aux objectifs ciblés dans l'étude à réaliser. Enfin, pour avoir des résultats fiables et non douteux il est impérativement savoir maîtriser et manipuler ces techniques avec succès.

I. Introduction

Biotechnologies « Biotechnologie » est un terme relativement récent, son apparition remonte aux années de 1960. IL se compose de bios (« vie » en grec) et de technologie (entré dans la langue française en 1656, au sens d'« étude des outils, machines et matières premières »). Sa définition est un peu plus vague, en effet, l'application de la science et de la technologie aux organismes vivants. Un sens plus restreint du terme « biotechnologie », l'associe aux réalisations des 60 dernières années comprenant toutes les techniques de culture « in vitro » ainsi que les différents aspects de la génétique moléculaire, tels que le clonage de gènes, le séquençage, et aussi la microbiologie, la biochimie, la biophysique, la bio-informatique. La biotechnologie est un domaine clairement multidisciplinaire impliquant la biochimie, la biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie, la microbiologie, la pharmacologie, la fermentation, et l'agriculture (Chaib, 2021).

Le domaine des biotechnologies végétales est un domaine qui est basé sur l'utilisation des technologies en laboratoire sur les cellules, les tissus, les organes ou l'ADN des végétaux. Son importance apparaît essentiellement pour i) accélérer la production, ii) améliorer ses caractéristiques, au service de la recherche, de l'agriculture ou de productions industrielles et iii) la protection de ces produits végétaux.

En effet, la biotechnologie utilise principalement les microorganismes ainsi que les cellules végétales, animales ou humaines pour la production de certaines substances à l'échelle agroalimentaire et industrielle. La biotechnologie végétale étudie les plantes et les cultures de tissus végétaux, vu leur importance en production d'aliments, de matière première et de médicaments. Pour garantir la faisabilité, il est nécessaire de faire appel à plusieurs techniques sophistiquées mais aussi la disponibilité de différents produits.

Dans ce contexte, ce cours est considéré comme une de route au profit de l'étudiant ou autres, dont diverses analyses ont été démontrées et l'appareillage a aussi été représenté.

II. Méthodes spectrales

Introduction

La spectrophotométrie est une méthode d'analyse qui permet de déterminer l'absorbance d'une substance chimique en solution, c'est-à-dire sa capacité à absorber la lumière qui la traverse. L'absorbance d'une substance chimique dépend de la nature et de la concentration de cette substance ainsi que de la longueur d'onde à laquelle on l'étudie

Principe

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Dans la pratique, 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), l'appareil donne l'absorbance (A) selon la formule suivante :

$$A = \text{LOG}(I_0/I)$$



Figure 1 : Spectrophotomètre

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.

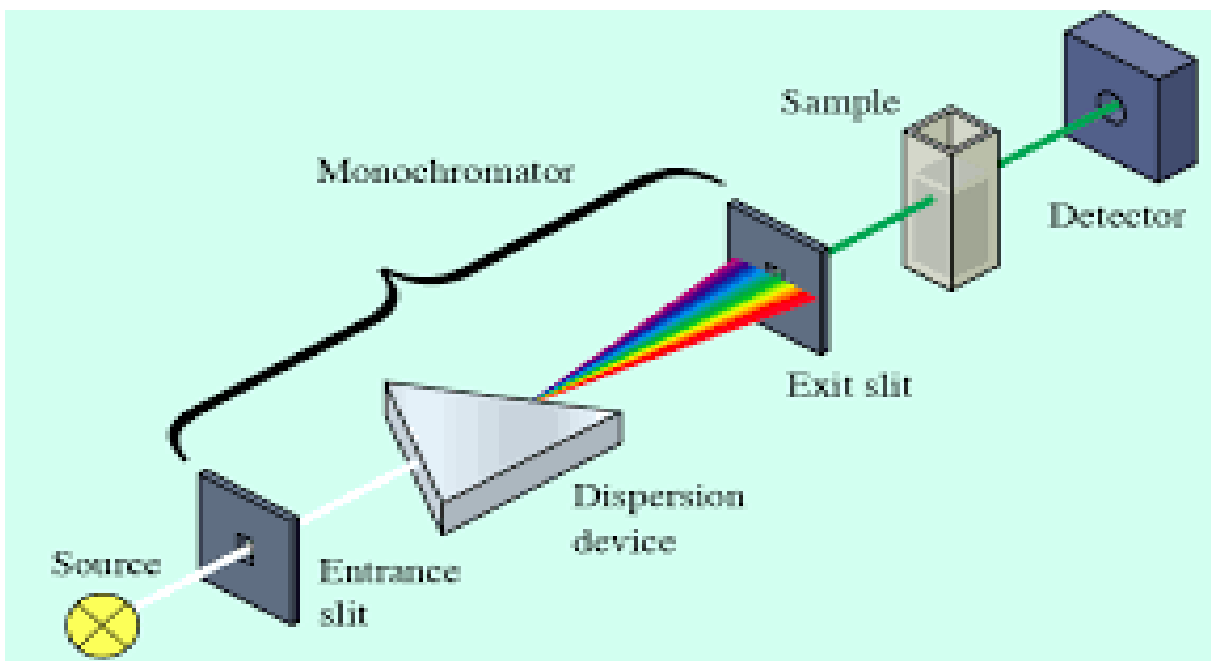


Figure 2 : Principe de spectrophotométrie

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

Chapitre II. Méthodes spectrales

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 $A = f(\lambda)$

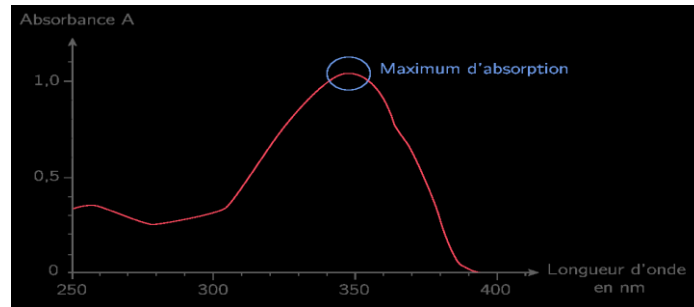


Figure 3 : Spectre d'absorbance.

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.

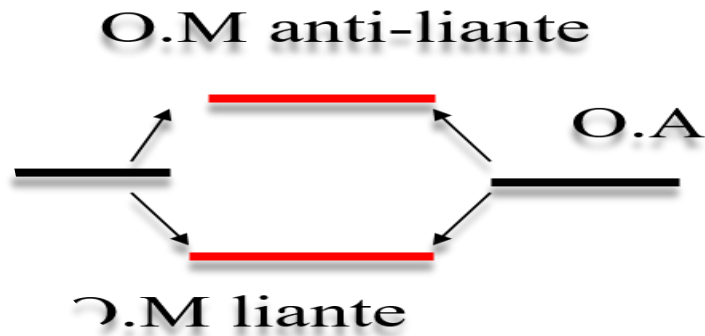
1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

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).

Principe

Le rapprochement des atomes entraîne le recouvrement des O.A, on a formation d'orbitales **moléculaires** (O.M). Pour que le recouvrement des O.A puisse se faire il faut que ces O.A aient des niveaux d'énergie voisins et il faut une orientation correcte des orbitales dans l'espace. Lorsque deux O.A se combinent, elles donnent 2 O.M:

-une liante : d'énergie inférieure à celle des O.A



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 spectromètres 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.

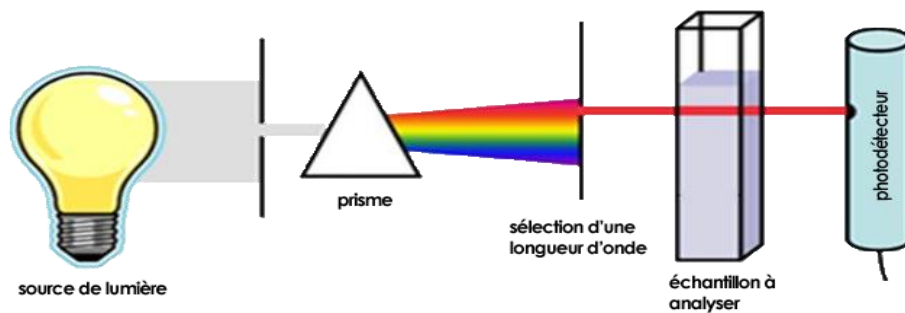


Figure 4 : Principe du Spectrométrie Uv- visible

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 $h = 6,626.10^{-34}J/s$

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

λ : longueur d'onde

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



Figure 5 : Spectrophotomètre UV-visible

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.

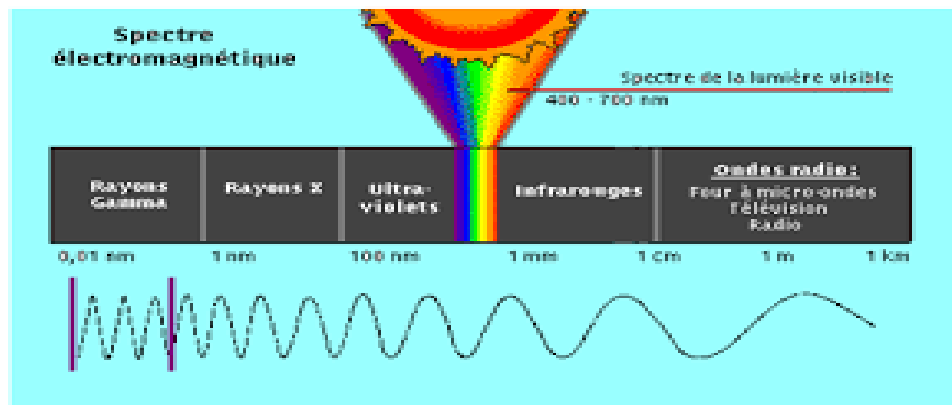


Figure 6 : Spectrométrie infrarouge (IR)

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.

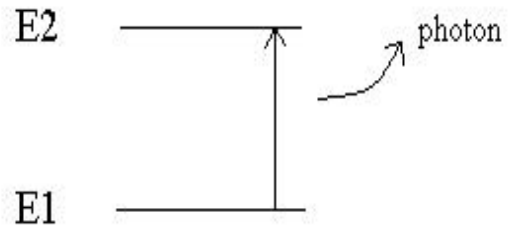


Schéma d'une transition électronique

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 7).

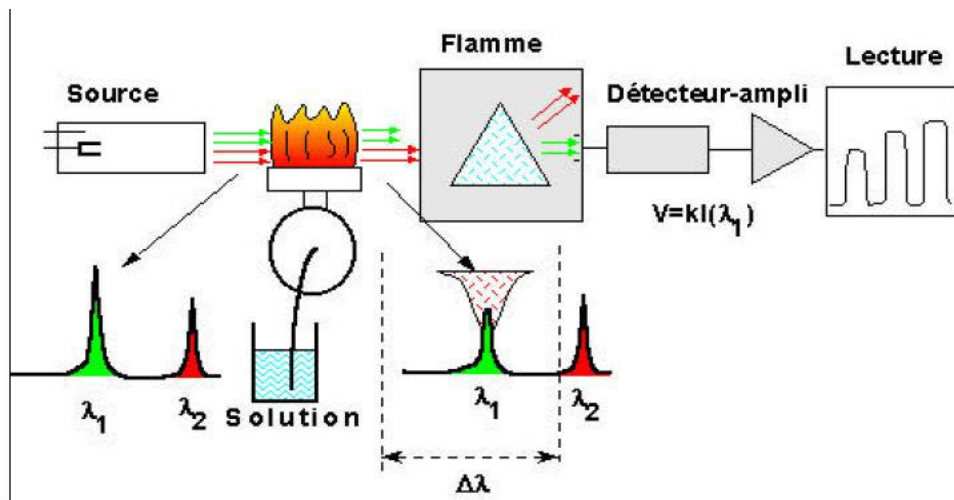


Figure 7 : Principe de la spectrométrie d'AA.

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).

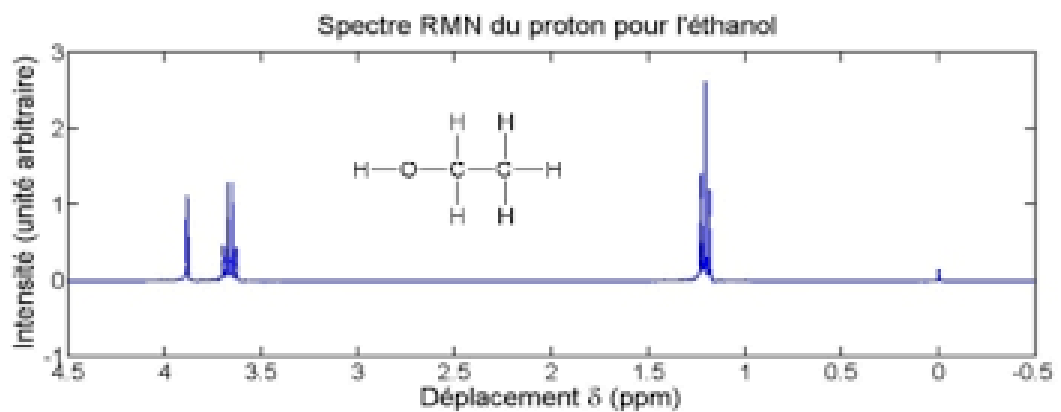
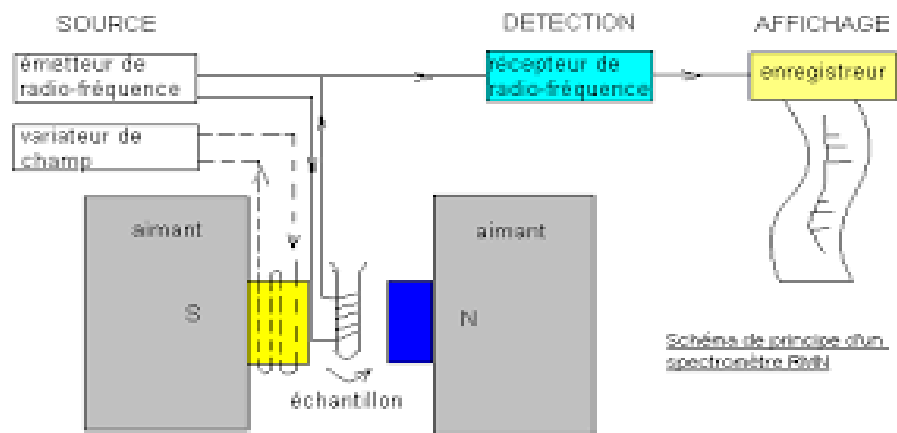


Figure 8 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Figure 9 : Schéma du Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Figure 10 : Schéma du spectre RMN

III. Méthodes de 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. 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.

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

- 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.
- 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 fins 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.

1.1. 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.

1.2. 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

Chapitre III. Méthodes de fractionnement

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.

1.3. 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.

a. 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

b. 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.

c. 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.

d. 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.

e. 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.

f. 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.

c. 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 :

Chapitre III. Méthodes de fractionnement

-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.

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

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

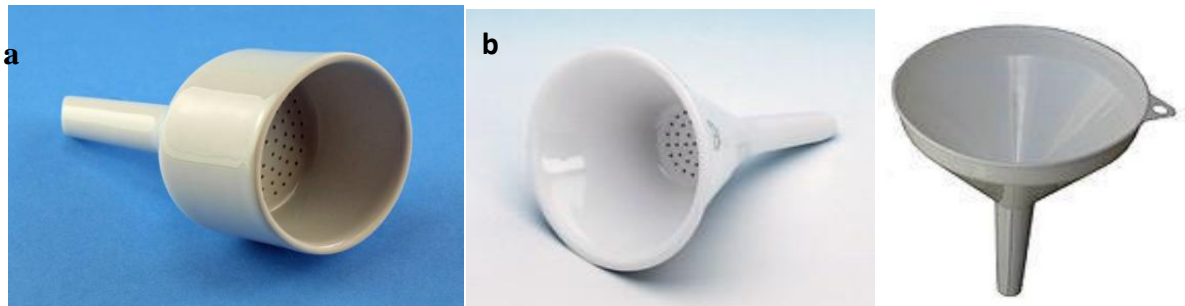


Figure 11 : Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b)

1.4. 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.

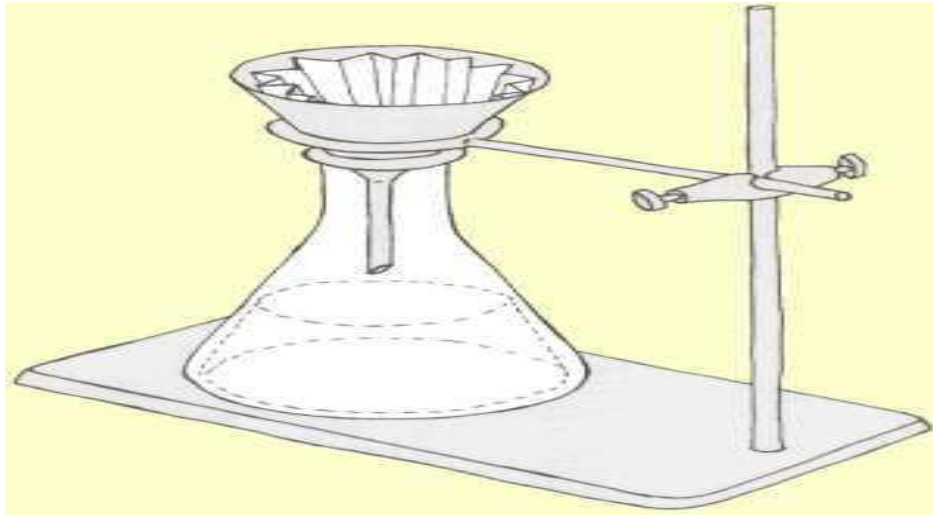


Figure 12 : Filtration par gravité classique

- 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.

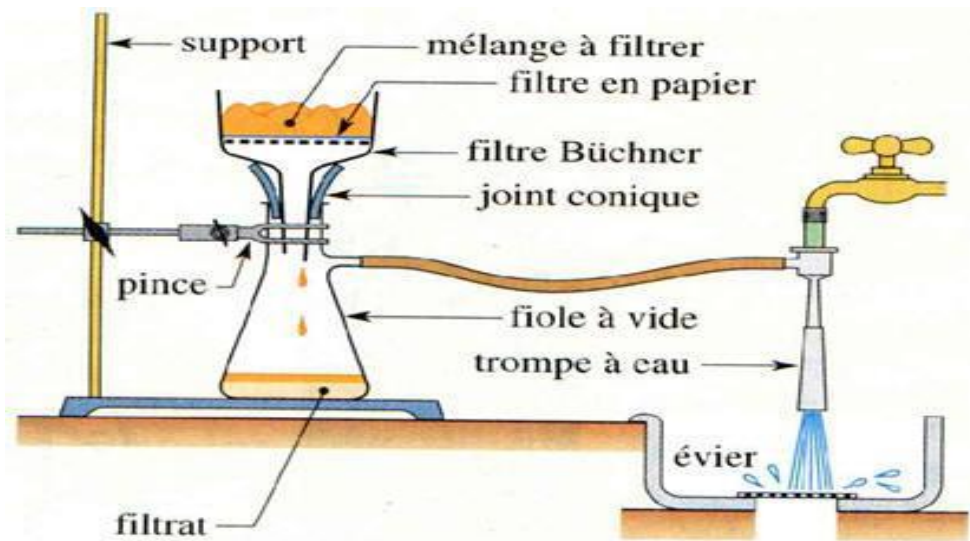


Figure 13 : Filtration sous vide.

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 14 : Filtration sous pression

1.5. 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 (\ll 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 μm à 0,001 μm (1 \AA à 10 \AA). 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.

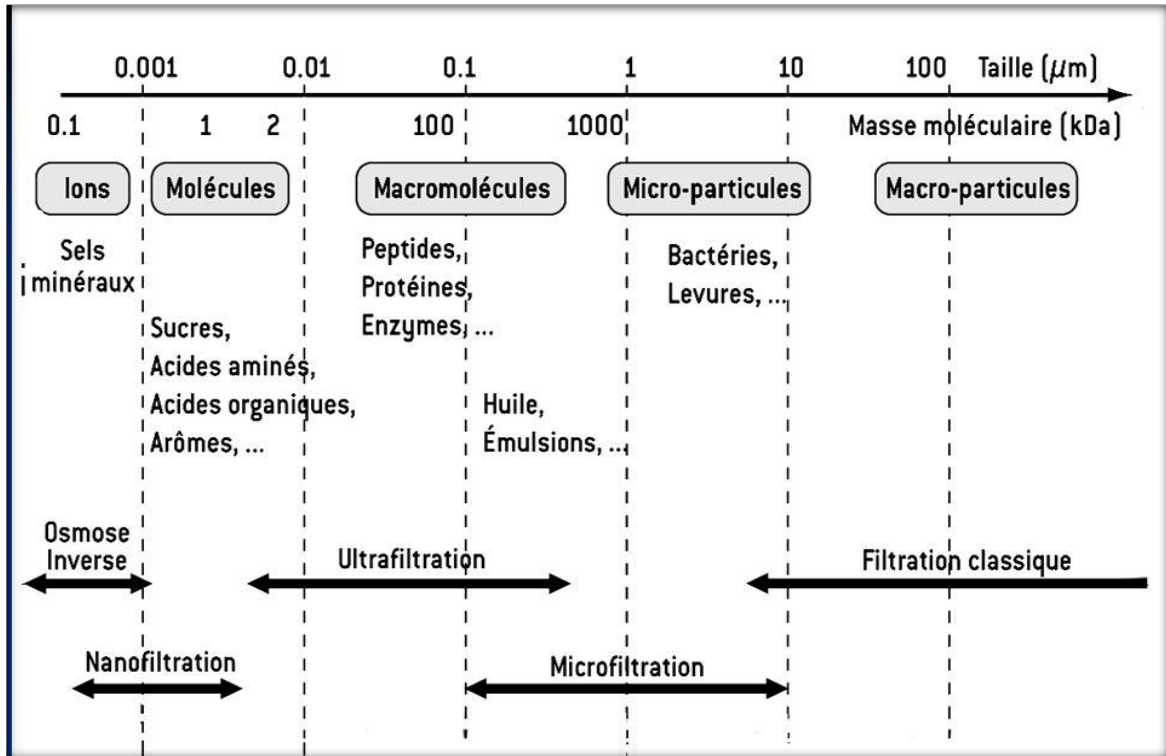


Figure 15 : Différents types de filtration

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**.

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.

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.

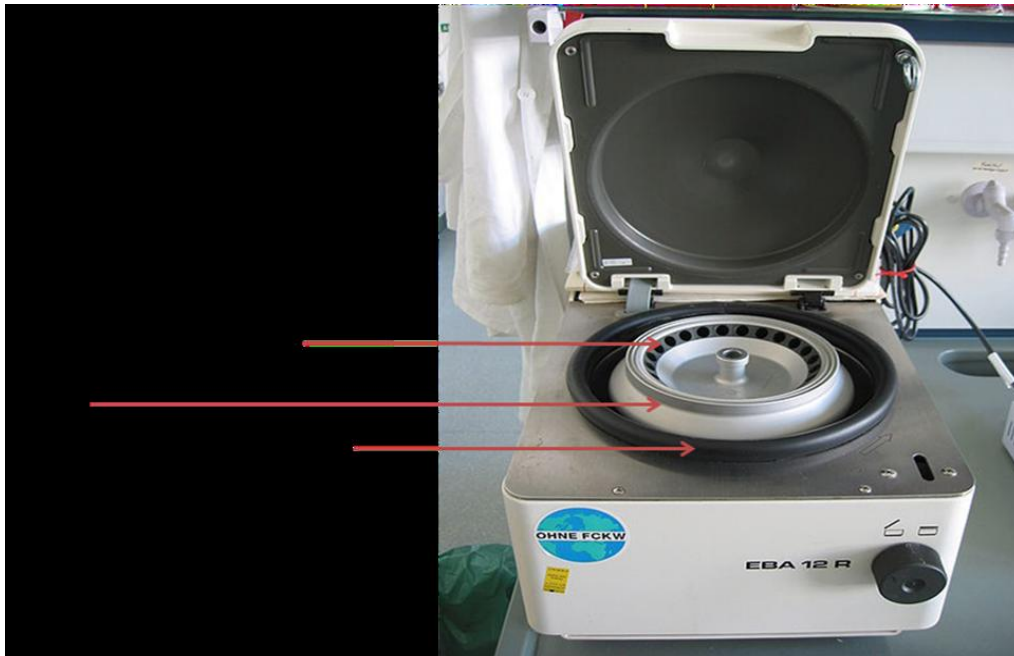


Figure 16 : Centrifugeuse

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 entrainerait 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.

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.

2.3.1. 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 17 : Rotor à godet mobile et à angle fixe

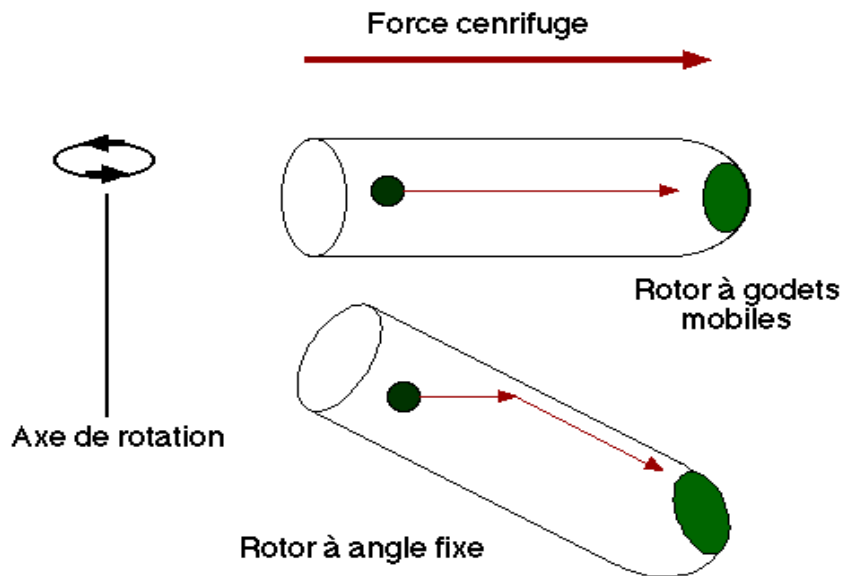


Figure 18 : Sédimentation des particules dans divers types de rotor

2.3.2. 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 sédimentent 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.

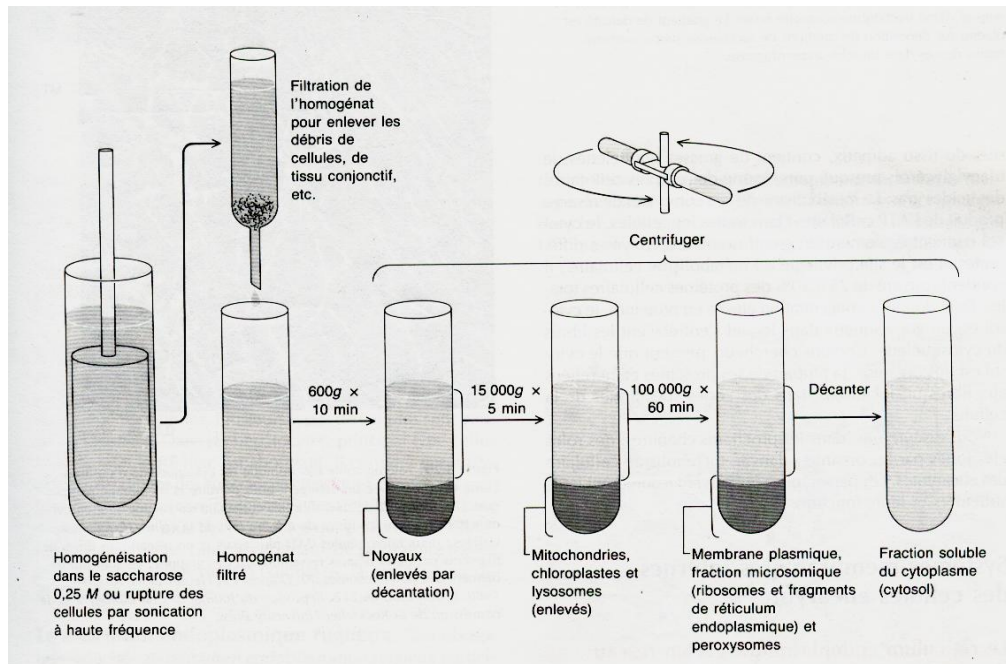


Figure 19 : Isolement des organites cellulaires

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)

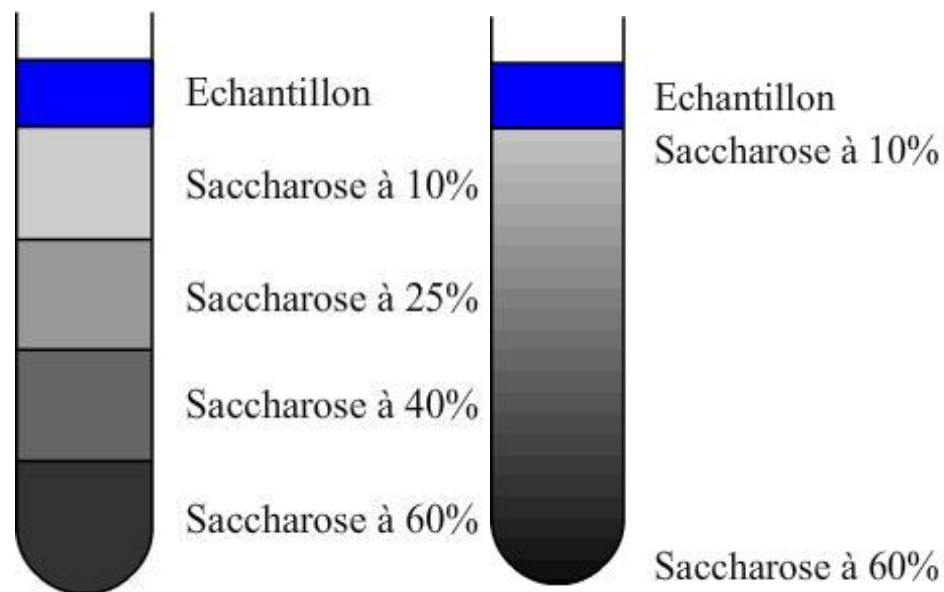
Il est utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques. Ce sel peut atteindre une densité très élevée. Son principal avantage est la possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse. Son coût et sa nature comme un sel c-à-d de molécules chargées, réduisent son champ 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.

Chapitre III. Méthodes de fractionnement

- 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.
- 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

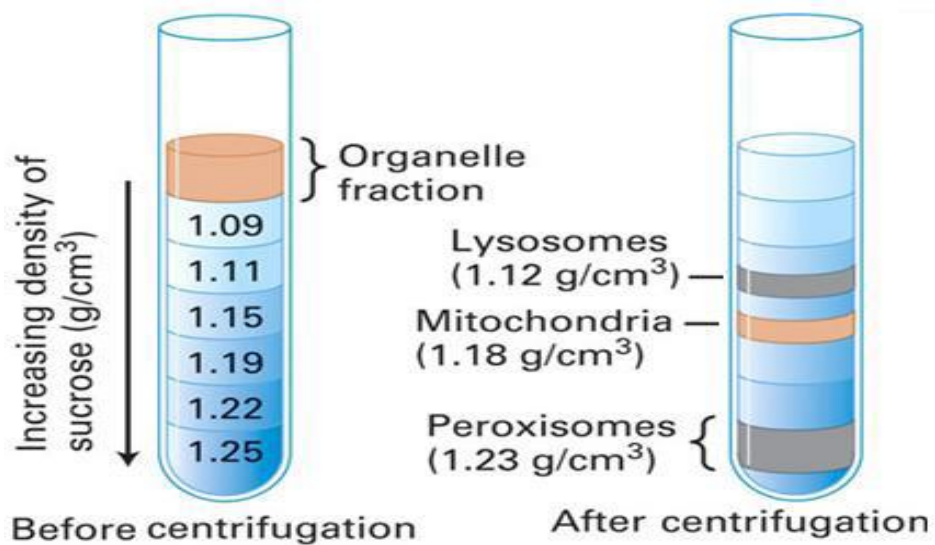


Figure 20 : Préparation de gradient de densité de Saccharose

2.4. 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 différente 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 le pourcentage du composé.

3. Méthodes 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

Chapitre III. Méthodes de fractionnement

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.

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 (Rf) de chaque soluté, ou encore le rapport à un témoin (Rt) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque.

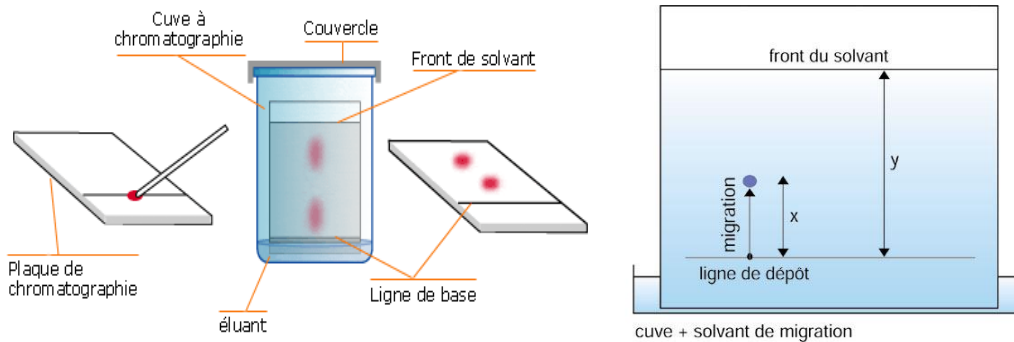


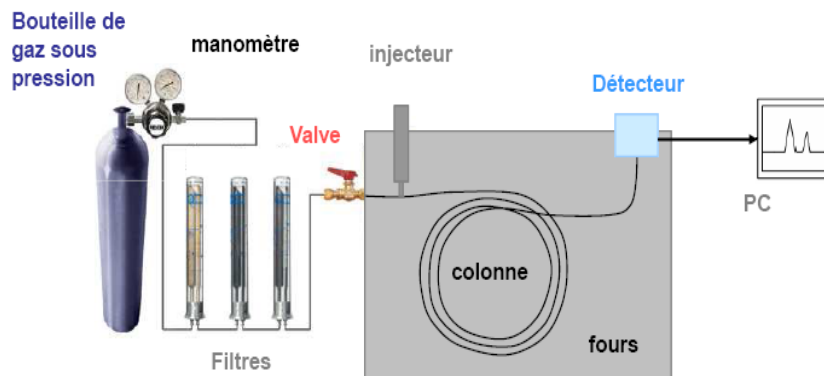
Figure 21 : Chromatographie sur couche mince (CCM)

Figure 22 : 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



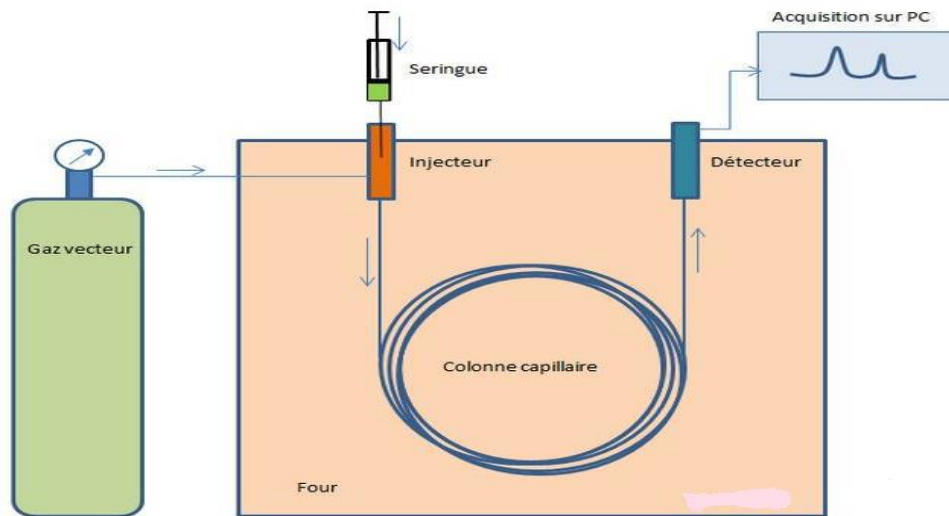


Figure 23 : Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

⚡ 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).

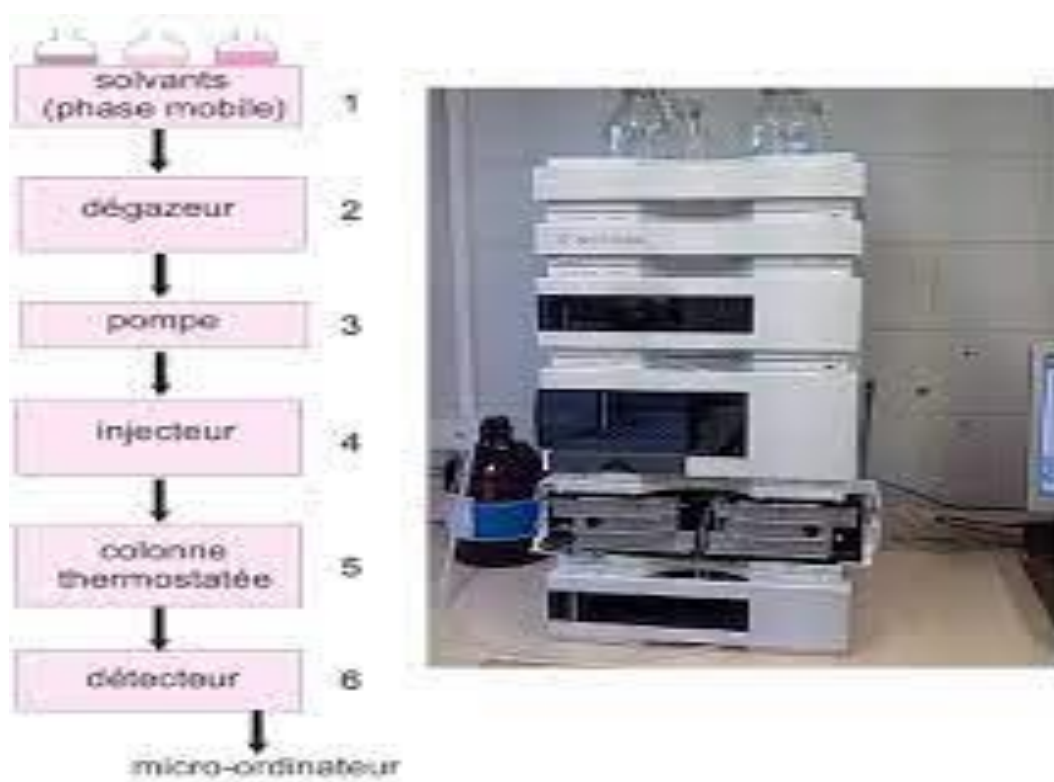


Figure 24 : Chromatographie HPLC

VI. 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 un 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

Chapitre IV. Microscope électronique

l'échantillon. Ces électrons vont fournir l'information sur la topographie de la surface ². 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.³

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.

² Odile Stephan. MOOC : Comprendre les nanosciences 2017, MOOC Nano, COMUE Université Paris Saclay & Université Paris-Sud

³ 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.

- 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 nécessite l'augmentation du contraste des objets observés grâce à l'utilisation d'éléments de numéro atomique élevé qui diffusent fortement les électrons ⁴.

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.

⁴ Extrait PDF (www.editions-ellipses.fr): Chapitre 1- Les méthodes d'étude en biologie cellulaire

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 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 ⁵.



Figure 25 : Microscope électronique à balayage (MEB)

2.2. 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,

⁵ 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

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-émis. Ce sont eux qui serviront à construire l'image. Le résultat est une représentation de la surface de l'objet observée. ⁶

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 26 : Microscope électronique à transmission (MET)

⁶ 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

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

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.

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

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

Chaïb G. 2021. Cours de Biotechnologies L3 BPV . Facultés de SNV.Département de biologie. Université Frères Mentouri 1. Constantine.

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

Glossaire

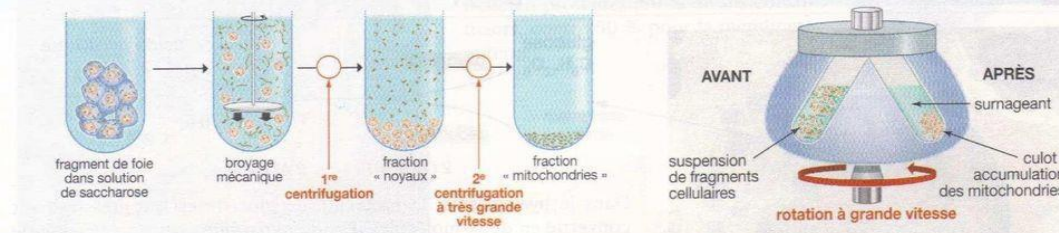
- 1- **Biotechnologie** : est l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services. Biotechnologie ou « technologie de bioconservation » est une combinaison entre la science des êtres vivants (la biologie) 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.

(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).



10

Figure 27 : Isolement des organites cellulaire par Centrifugation différentielle