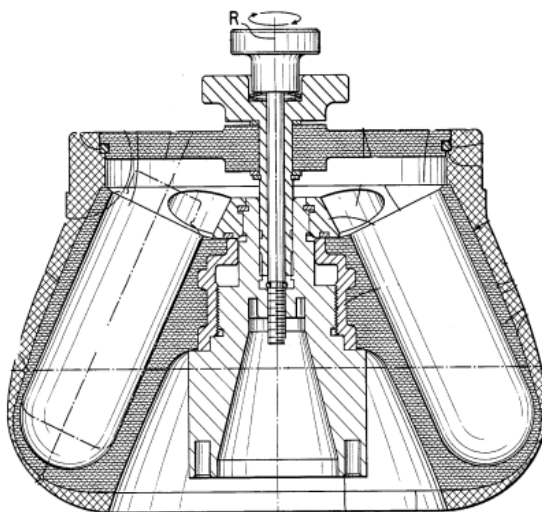


SV3 – Module M18

Techniques chimiques pour la biologie

Cours sur les techniques d'extraction, de fractionnement et de purification



Techniques d'extraction, de fractionnement et de purification

A°/ Techniques d'extraction

Définition :

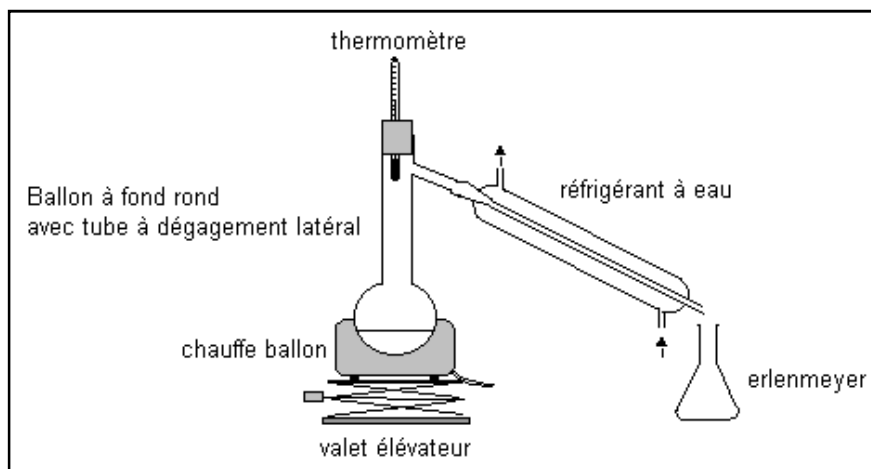
L'extraction d'une espèce chimique donnée peut se faire grâce à un entrainement par vapeur ou par solvant qui permet d'extraire une espèce chimique d'un milieu solide ou liquide par solubilisation dans un solvant. L'espèce chimique passe du mélange du départ vers le solvant dans lequel elle est plus soluble. On distingue des extractions liquide-liquide, solide-liquide et celle faisant intervenir un fluide supercritique.

I°/ Extraction liquide-liquide

1) Extraction par hydro-distillation

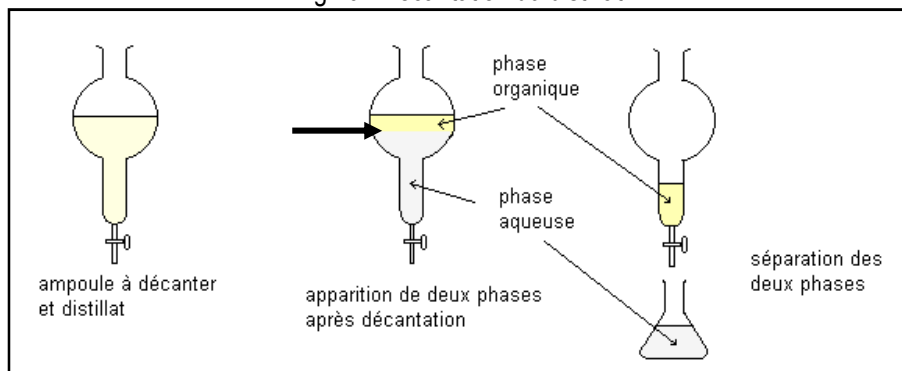
Cette technique, dite aussi extraction par entrainement à la vapeur, est très utilisée dans l'extraction des huiles essentielles des végétaux. Elle consiste à bouillir les substances contenant le produit à extraire dans de l'eau dont la vapeur entraine les huiles essentielles et se condense dans un réfrigérant (Fig 39).

Fig 39 : Principe du fonctionnement de l'hydro-distillation



La phase aqueuse recueillie est additionnée de sel pour rendre les huiles essentielles moins solubles dans l'eau et faciliter leur relargage. Une décantation permet ensuite de récupérer une phase aqueuse, en général plus dense qui se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles qui se situe au dessus (Fig 40). La séparation entre eau et huile essentielle se fait par différence de densité, ce qui permet de récupérer facilement l'huile essentielle.

Fig 40 : Décantation du distillat



Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant. C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau.

2) Extraction par le solvant

L'extraction par solvant consiste à dissoudre le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer la phase organique contenant le composé à extraire de la phase aqueuse. Le composé recherché est d'abord solubilisé dans l'eau par décoction (trempage dans de l'eau bouillante), infusion (dissolution dans un liquide bouillant au départ qu'on laisse refroidir) ou par macération (séjour long d'un corps solide dans un liquide). Le solvant ayant solubilisé le composé recherché est séparé de la phase aqueuse par décantation. Le solvant doit être liquide à la température et à la pression de l'extraction, non miscible avec le milieu initial contenant le composé à extraire et capable d'une bonne solubilisation de ce composé. La densité du solvant est généralement très inférieure à celle de l'eau.

3) Extraction solide-liquide

Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide.

Un exemple de tous les jours est celui de la préparation du café. Les substances aromatiques du café (soluté) sont extraites par solubilisation avec de l'eau (solvant) à partir du café en poudre. Idéalement, on obtient le café buvable (solvant avec substances aromatiques dissoutes) et le café en poudre complètement lavé reste dans le filtre (phase stationnaire).

4) Extraction par un fluide supercritique

Porté au-delà d'une certaine température et d'une certaine pression, un fluide est dans un état dit « supercritique », intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide. Le CO_2 est le plus populaire des fluides supercritiques car ses températures et pression critiques sont relativement basses : 31°C et 74 bars. Dans cet état, il solubilise préférentiellement les composés apolaires (lipophiles). Si la pression baisse, le pouvoir de dissolution baisse, le CO_2 passe à l'état gazeux et les molécules dissoutes précipitent. Elles peuvent alors être récupérées.

Le CO_2 a l'avantage d'être un gaz naturel, non toxique et inodore, largement utilisé dans l'industrie alimentaire. Il peut être recyclé à l'état gazeux en fin de process sans aucune pollution. La dé-caféinisation du café est un exemple d'extraction par le CO_2 supercritique.

5) Extraction solide-liquide

Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide.

B°/ Techniques de décantation, centrifugation et ultracentrifugation

I°/ Décantation

Définition

La décantation est une opération de séparation mécanique, sous l'effet de la pesanteur, de plusieurs phases non-miscibles. Il est ainsi possible de séparer, soit plusieurs liquides non-miscibles de densités différentes, soit des solides insolubles en suspension dans un liquide. Dans le cas de deux liquides qui ne sont pas miscibles (l'huile et l'eau par exemple) et après décantation, le liquide le plus dense se place en dessous du liquide le moins dense (Fig 1).

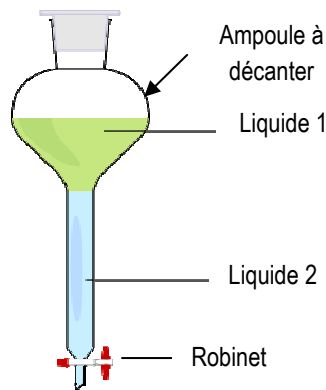


Fig 1 : Principe de la décantation de 2 liquides non miscibles dans une ampoule à décanter.

Dans les laboratoires, ce procédé est utilisé lors des extractions liquide-liquide impliquant une phase aqueuse et une phase organique. Après extraction, ces 2 phases sont séparées par décantation.

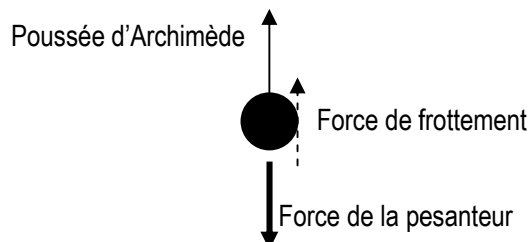
Application de la décantation :

- Traitement des eaux usées
- Dessablage
- Déshuilage ...

1°/ Calcule de la vitesse de sédimentation

Les particules solides en suspension dans un liquide, vont sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède, tomber vers le fond ou remonter à la surface en fonction de leur densité et de leur taille.

Au cours de sa sédimentation, une particule est soumise à :



Son déplacement dépend de la résultante de la poussée d'Archimède, de la force de frottement et de la force de la pesanteur ; la particule va flotter (résultante des force > force de la pesanteur) ou au contraire, elle va décanter avec une vitesse spécifique (résultante des force < force de la pesanteur).

En se déplaçant dans un fluide, une particule subit des forces de frottement. Ces forces sont définies par la loi de Stocks. Si la particule est de forme sphérique avec un rayon r , cette loi est fonction du r (en m), de la viscosité du fluide (η). Sa formule est:

$$\vec{F} = -6\pi\eta r \vec{v}$$

La loi de Stocks est utilisée pour définir la vitesse de sédimentation :

$$V = 2 r^2 \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_f) / 9 \eta$$

où V en m/s

r est en m

g : accélération de la pesanteur (m/s^2)

ρ_p : masse volumique de la particule (kg/m^3)

ρ_f : masse volumique du fluide (kg/m^3)

η : viscosité du fluide ($Pa \cdot s$; le Pa étant une pression équivalente à $1N/m^2$)

Plus la différence des masses volumiques ($\rho_p - \rho_f$) est importante, plus la décantation est envisageable comme procédé de séparation.

* Application :

La vitesse de sédimentation (1,67 m/s) a été utilisée pour déterminer le rayon d'une particule d'une masse volumique de 2000 Kg/m^3 . Cette sédimentation a été effectuée dans un fluide ayant comme viscosité $13,05 \cdot 10^{-4} \text{ Pa/s}$ et comme masse volumique $999,71 \text{ Kg/m}^3$.

Déterminer le rayon de cette particule.

$$V = 2 r^2 \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_f) / 9 \eta \rightarrow r^2 = V \cdot 9 \eta / 2 g \cdot (\rho_p - \rho_f) \rightarrow r = \sqrt{V \cdot 9 \eta / 2 g \cdot (\rho_p - \rho_f)}$$

$$r = \sqrt{1,67 \cdot 9 \cdot 13,05 \cdot 10^{-4} / 2 \cdot 9,81 \cdot (2000 - 999,71)} = 9,99 \cdot 10^{-4} \text{ m} \approx 1 \text{ mm}$$

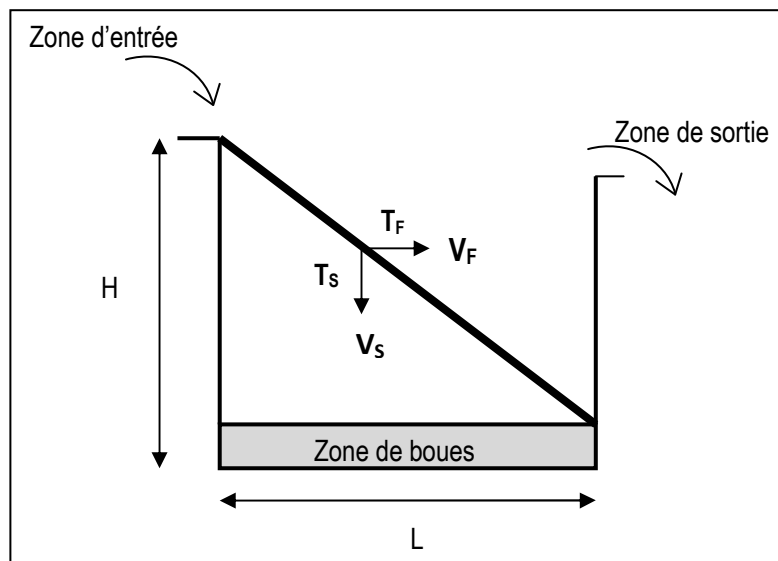
2°/ Exemples de décanteurs

La décantation correspond au cas d'une sédimentation par simple gravité. Dans la majorité des cas, les décanteurs sont alimentés en continu par la suspension qui se décharge de ses particules solides au cours de son passage.

a) Décantation simple

Un décanteur permet de décharger une suspension de ses particules solides grâce à la décantation sous l'effet de la pesanteur. Dans un décanteur à flux horizontal (Fig 2), le débit qui traverse uniformément le décanteur de hauteur (H) et de longueur (L), permet d'obtenir une vitesse horizontale de transfert du fluide (V_L). Les particules en suspension chutent au fond du décanteur avec une vitesse V_s . Pour une bonne décantation, la vitesse de sédimentation de la particule doit être supérieure à la vitesse de transfert du fluide dans le décanteur.

Fig 2 : Schéma d'un décanteur à flux horizontal



Soit : T_S : le temps en heure nécessaire pour que la particule atteigne le fond, V_S : vitesse de sédimentation en m/heure et H : la hauteur en m du décanteur
 $V_S = H/T_S \rightarrow T_S = H/V_S$

T_F : le temps en heure, nécessaire pour que la particule sorte du décanteur (temps du transfert du fluide), V_F : vitesse de transfert du fluide en m/heure et L : longueur du décanteur en m
 $V_F = L/T_F \rightarrow T_F = L/V_F$

Soit Q , le débit du fluide entrant en m^3/H ; $Q = L \times l \times H/T$ (Q en m^3/H)
 $Q = V_F \times l \times H \rightarrow V_F = Q/l \times H$ (l étant la largeur du décanteur en m)

Pour une bonne décantation, le temps de sédimentation de la particule doit être inférieur au temps de transfert du fluide dans le décanteur :

$T_S < T_F$ c-à-d $H/V_S < L/V_F$ ou encore : $H/V_S < L \times l \times H/Q$
Donc : $Q/V_S < L \times l$; $Q/V_S < S \leftrightarrow V_S > Q/S$
 (S : surface du fond du décanteur en m^2)

Q/S est appelée charge hydraulique ou vitesse de Harezen

* Application :

Quelle est la valeur du débit entrant au dessous de laquelle on peut réaliser une décantation dans un décanteur cubique de 15 m de côté sachant que la vitesse de sédimentation y est de 6m/H ?

$V_S > Q/S \rightarrow Q < V_S \times S$; $Q < 6 \times 15 \times 15 = 1350 m^3/H \rightarrow Q < 1350 m^3/H$

II° Centrifugation

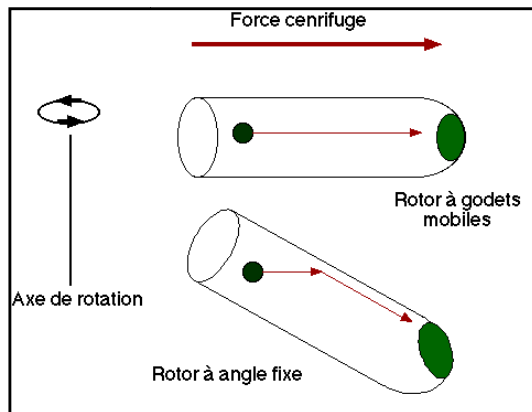
A cause de leur très petite masse, les macromolécules contenues dans une solution ne peuvent sédimenter par la seule force de gravité. Leur sédimentation dans un temps raisonnable nécessite leur accélération grâce à une force centrifuge.

Définitions

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge par accélération autour d'un axe. L'appareil de centrifugation est appelée centrifugeuse. Une centrifugeuse est une machine équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte et actionné par un moteur. L'échauffement dû à la rotation peut être évité par un système de réfrigération alors que le frottement avec les particules d'air dans la chambre du rotor est réduit grâce à un système de création de vide (pompe à vide).

Les tubes à centrifuger sont mis dans des rotors et il existe deux types de rotors, les rotors libres et les rotors à angle fixe (Fig 3).

Fig 3 : Rotor libre et à angle fixe



- Rotors libres

Dans ces rotors, les tubes ont une position verticale quant la centrifugeuse est à l'arrêt et adoptent une orientation perpendiculaire à l'axe de rotation lors de la centrifugation (Fig 4 et 5). Ils sont adaptés à une vitesse de rotation relativement réduite et supportent des volumes importants.

Fig 4 : Mouvement des tubes dans une centrifugation à rotor libre

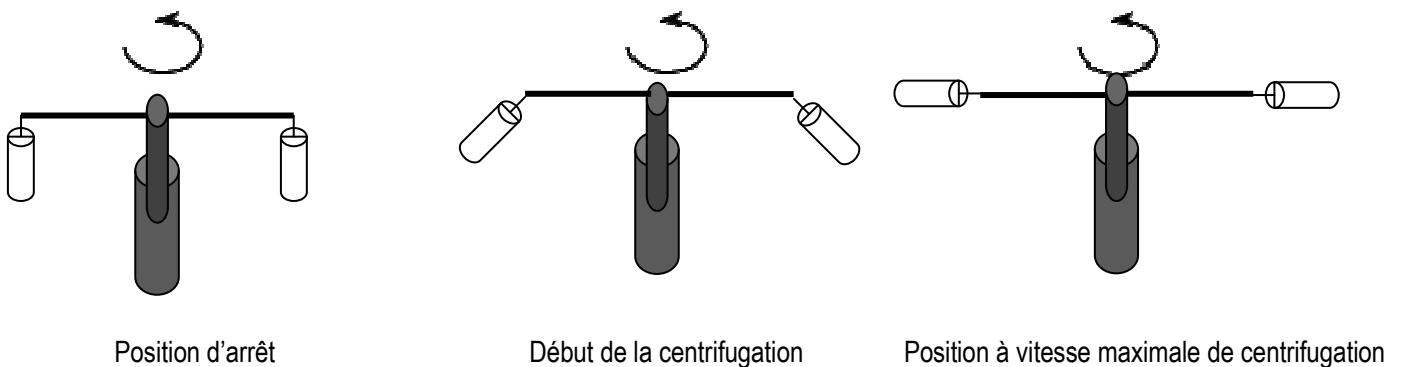


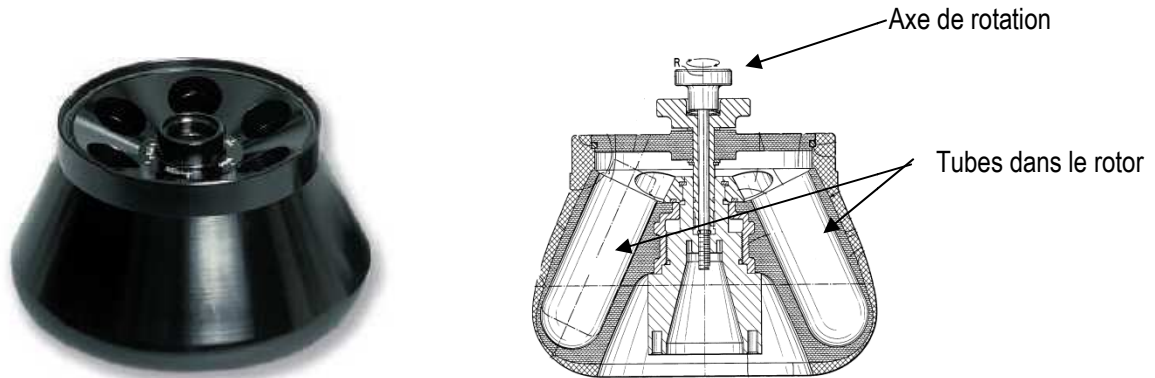
Fig 5 : Exemple de rotor libre



- Rotors à angle fixe

Dans ces rotors, les tubes ont une position oblique fixe. Ils sont adaptés à une vitesse de rotation élevée et à des volumes réduits (Fig 6).

Fig 6 : Image et coupe schématique d'un rotor fixe

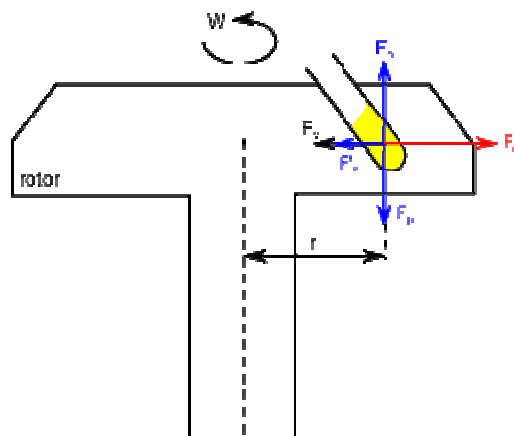


A haute vitesse, une centrifugeuse devient dangereuse. Sa manipulation doit se faire dans les normes. Les tubes doivent être entreposés d'une manière symétrique dans le rotor et doivent être de la même forme et parfaitement équilibrés ; la masse en chaque point doit être idéalement identique à celle du point symétrique par rapport à l'axe de rotation. Les tubes doivent être équilibrés deux à deux et chaque couple de tubes est à placer symétriquement par rapport à l'axe de rotation. Chaque rotor possède sa propre vitesse maximale de rotation. Un déséquilibre dans le chargement du rotor peut avoir des conséquences dramatiques : rupture de l'axe et expulsion du rotor car il est soumis à des vitesses énormes, d'où le risque de dommages dans le laboratoire et de blessures du personnel.

Le coefficient de sédimentation qui renseigne sur la vitesse de sédimentation d'une particule est exprimé en Svedberg qui correspond à 10^{-13} s. Ce coefficient lié à la force centrifuge dépend aussi de la masse de la particule, de la densité du solvant (poussée d'Archimède) et des forces de frottement générées par le déplacement de la particule dans la solution. Ces forces dépendent de la taille et de la forme de la particule.

1°/ Force centrifuge

Dans un rotor en mouvement, une particule est en réalité soumise à plusieurs forces :



- La force de pesanteur descendante F_p
- La poussée d'Archimède ascendante F_a

- Une force de friction F_v
- La force centripète F'_c
- La force centrifuge F_c

Dans un mouvement circulaire, la force centrifuge est équivalente à l'accélération que multiplie la masse :

$$F_c = a \cdot m \quad F_c \text{ en N (Newton)}$$

L'accélération est fonction de la vitesse de rotation angulaire (ω) et du rayon (r) selon la formule :

$$a = \omega^2 \cdot r$$

a en m/s^2
 ω en radian/s
 r en m

La vitesse de rotation angulaire peut être exprimée en fonction du nombre de tours par seconde (n) selon la formule :

$$\omega = 2 \pi \cdot n \quad (\pi \text{ étant le rapport de la circonférence d'un cercle par son diamètre, soit } 3,14)$$

L'amplification de l'accélération en nombre de g (gravité = $9,81 \text{ m.s}^{-2}$) est définie comme étant le rapport :

$$Z = a/g \text{ c-à-d } Z = \omega^2 \cdot r / g = (2 \pi \cdot n)^2 \cdot r / g = 4 \pi^2 \cdot n^2 \cdot r / g$$

$$\text{D'où : } n = \sqrt{Z \cdot g / 4 \pi^2 \cdot r} \quad \text{rotation/s}$$

$$\text{ou bien } n = 60 \cdot \sqrt{Z \cdot g / 4 \pi^2 \cdot r} \quad \text{rotation/min (rpm)}$$

Le nombre de g est identique d'une centrifugeuse à l'autre alors que le nombre de rotation / minutes dépend du rayon de la centrifugeuse.

* Application :

A quelle vitesse en rpm faudrait-il programmer une centrifugeuse ayant un rayon de 12 cm pour atteindre une accélération de 120 000 g ?

$$N = 60 \cdot \sqrt{Z \cdot g / 4 \pi^2 \cdot r} = 60 \cdot \sqrt{120\,000 \cdot 9,81 / 4 \cdot (3,14)^2 \cdot 0,12} = 29924 \text{ rpm}$$

2°/ Différents types de centrifugation

a) Centrifugation simple

La centrifugation simple d'une solution conduit à un culot au fond du tube et à un surnageant (Fig 7) ou à des phases liquides séparées (Fig. 8). Si les particules à centrifuger ont une masse très petite, il convient d'augmenter leur masse en les précipitant (formation d'agrégats moléculaires).

Fig 7 : Exemple de centrifugation simple

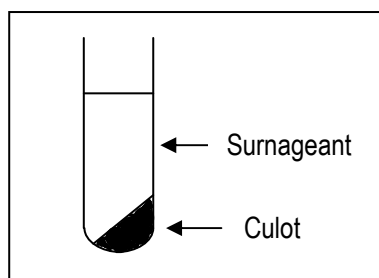
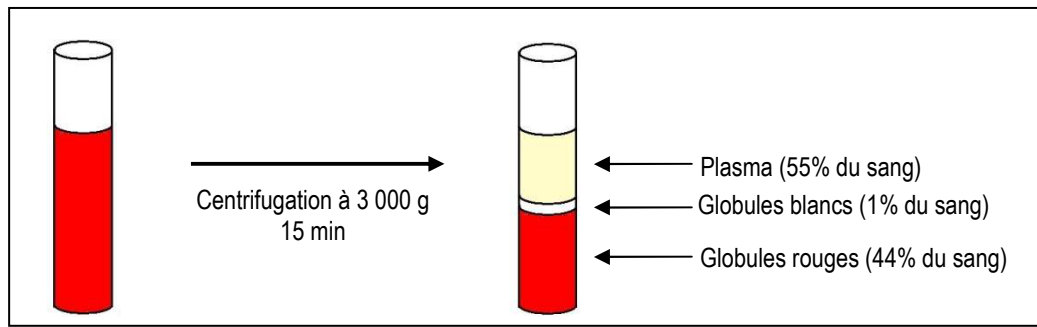


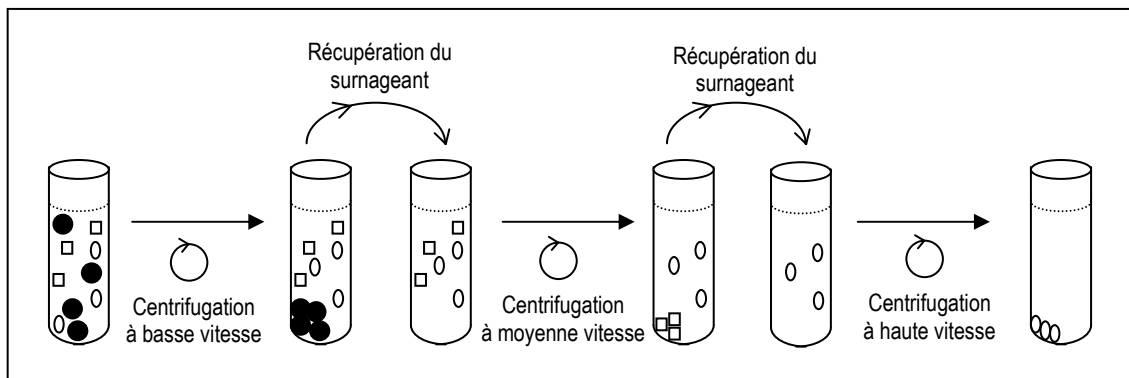
Fig 8 : Exemple de centrifugation du sang



b) Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle consiste en plusieurs cycles de centrifugation à vitesses croissantes. Dans un premier temps, les particules les plus massives vont sédimenter les premières sous la forme d'un culot alors que les autres vont rester au niveau du surnageant. Ce dernier sera récupéré pour subir une deuxième centrifugation avec une vitesse et un temps plus importants pour sédimenter les particules moyennes. Enfin, les plus petites particules peuvent être séparées du 2^{ème} surnageant grâce une autre centrifugation à haute vitesse (Fig 9).

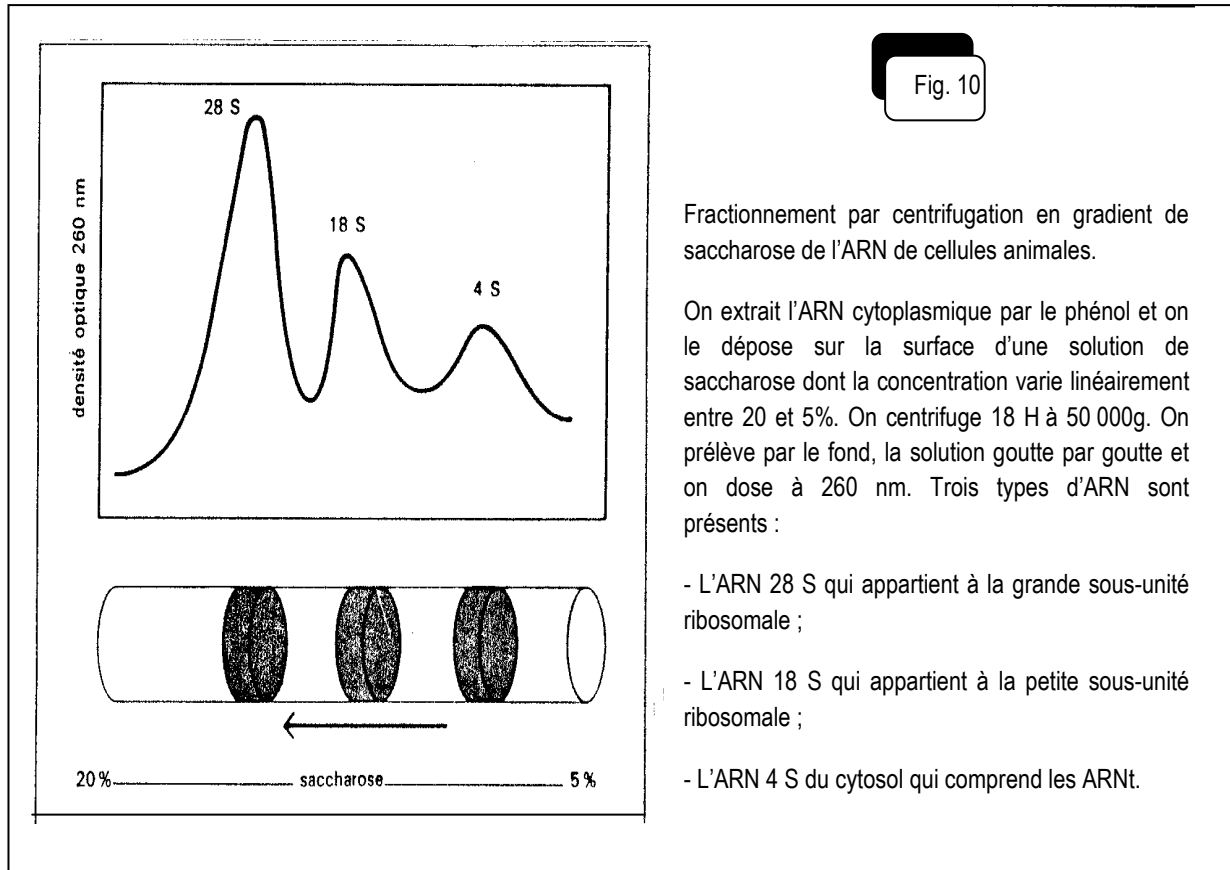
Fig 9: Principe de la centrifugation différentielle



c) Centrifugation à l'équilibre

Dans la centrifugation à l'équilibre, les particules soumises à la force centrifuge, vont migrer dans le milieu jusqu'à une zone où la densité est égale à leur propre densité et s'arrêtent : la force de leur gravitation est égale à la poussée d'Archimède. Chaque groupe de particules identiques va se trouver localisé à une zone précise du tube avec des densités croissantes du haut vers le bas. On parle de gradient de concentrations ou de densités. Il existe des gradients continus et discontinus qui correspondent respectivement à des valeurs dont l'augmentation est continue et à des valeurs dont l'augmentation se fait par tranches (empilement de solutions de plus en plus denses). Ces gradients sont souvent préparés avec du saccharose (on parle de coussin de saccharose) ou de chlorure de césium ayant une très forte densité. Le temps de la centrifugation à l'équilibre est long et les particules sont récupérées sous la forme de fractions en perforant le bas du tube ou on utilisant un pompage à partir du fond du tube. La centrifugation à l'équilibre est appliquée à la séparation d'un mélange de particules dont les masses et les formes sont proches.

L'ultracentrifugation pendant un temps long (plusieurs heures) sur un gradient continu permet de séparer les macromolécules en fonction de leur constante de sédimentation sous forme de bandes qui délimitent des zones réparties dans le gradient. C'est l'ultracentrifugation de zone (ex: Fig 10).



III°/ Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une centrifugation à très haute vitesse pouvant atteindre les 2 000 000 G (l'équivalent de 19 600 Km/s²). Il existe des ultracentrifugeuses préparatoires et analytiques. Les premières permettent d'obtenir des macromolécules pures alors que les secondes rendent possibles le suivi à temps réel la sédimentation d'une macromolécule grâce à un système optique pour déterminer par exemple la vitesse de sédimentation ou la masse molaire des macromolécules. Les ultracentrifugeuses sont dotées obligatoirement d'un système de refroidissement et d'un système de création de vide.

IV°/ La centrifugation et ses applications

- Dans le quotidien : essorage de la salade, essorage du linge, extraction du jus des fruits et légumes ;
- Dans l'industrie alimentaire: séparation de la crème du lait (écrémage), élimination des particules de la bière ou du vin (clarification), extraction des huiles et des matières grasses (extraction de l'huile d'olive), extraction du miel ;
- Dans les laboratoires : pour récupérer un précipité, pour séparer les composés cellulaires et les macromolécules.

V°/ Exemples de centrifugeuse et de ses accessoires



Centrifugeuse réfrigérée



Rotor à angle fixe pour tubes Eppendorf



Rotor libre



Gobelets



Tube conique en plastique



Tube à hémolyse



Tube Eppendorf

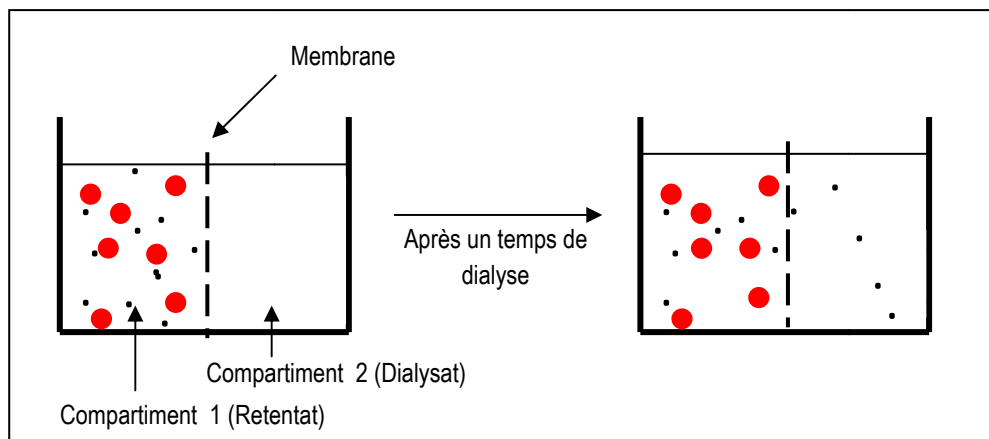
C°/ Technique de Dialyse

I° Définition et domaines d'application de la dialyse

Le principe de la dialyse consiste à séparer deux solutions par une membrane qui ne laisse passer d'une manière sélective que les molécules dont le diamètre est inférieur au diamètre des pores de la membrane. Ces membranes qui permettent un échange entre des 2 solutions peuvent être des membranes hémiperméables qui ne laissent passer que le solvant ou des membranes dialysantes dont le diamètre des pores est fixe (Fig 11).

Le transfert des solutés par diffusion au travers de la membrane de dialyse relève d'un mouvement des molécules contenues dans la solution (agitation moléculaire). Si la molécule rencontre un pore dont la taille est supérieure à la sienne, elle traversera la membrane. C'est le gradient de concentration du soluté de part et d'autre de la membrane qui gouverne la diffusion des molécules : plus la solution a une concentration élevée plus les molécules traversent la membrane en direction de la solution dont la concentration en solutés est la plus faible. La capacité de diffusion d'un soluté dépend de sa forme moléculaire, de son degré d'hydratation, de sa charge ionique et de sa polarité.

Fig 11: Principe de la dialyse



Domaines d'applications de la dialyse

- Purification macromoléculaire
- Concentration protéiques
- Séparation de solutés
- Décontamination
- Changement de pH
- Dessalage
- Echanges d'ions

II°/ Expression du coefficient de dialyse

Par diffusion passive, les molécules de soluté ayant un diamètre inférieur au diamètre des pores de la membrane diffusent du compartiment 1 (compartiment le plus concentré) vers le compartiment 2 (compartiment le moins concentré). La cinétique de cette réaction est d'ordre 1, la vitesse de dialyse est proportionnelle à la concentration en soluté C. Si l'on observe la concentration dans le compartiment (1) en fonction du temps, on peut écrire :

$$dC/dt = -\delta C \quad \text{où } \delta \text{ est le coefficient de dialyse exprimé en min}^{-1}$$

En intégrant cette équation en fonction du temps, on exprime l'évolution de la concentration dans le compartiment (1) au cours du temps :

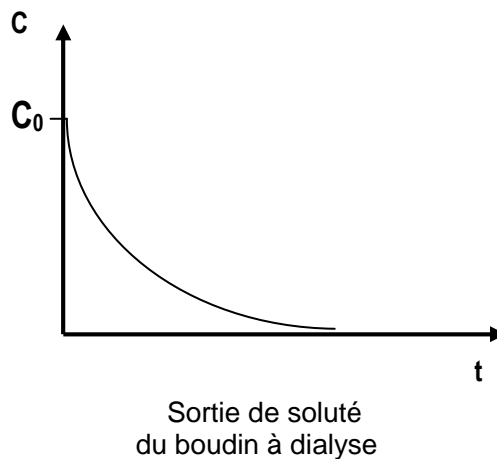
$$dC/dt = -\delta C \rightarrow dC = -\delta C dt \rightarrow dC/C = -\delta dt \rightarrow \ln C_t = -\delta t + K \rightarrow C_t = e^{-\delta t} \cdot e^K$$

Au temps t_0 , $C = C_0$, donc :

$$C_t = C_0 e^{-\delta t}$$

C_t : concentration au temps t en min

C_0 : concentration au temps 0

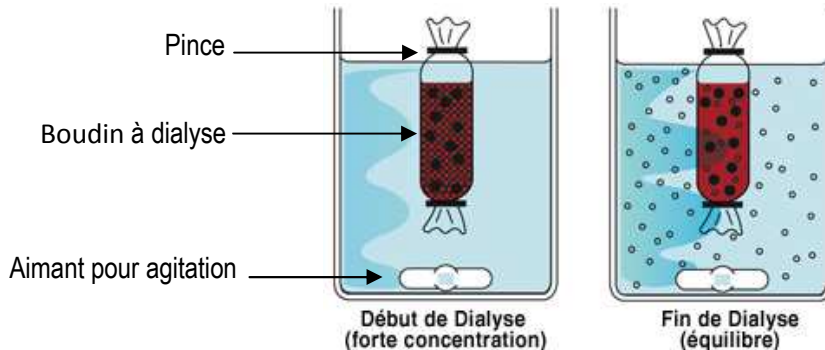
Représentation graphique :**III°/ Boudin à dialyse**

Les membranes de dialyse couramment utilisées sont des membranes de cellulose traitées qui ne portent pas de charges fixes et n'adsorbent pas la plupart des solutés. La perméabilité de la membrane de dialyse est caractérisée par une valeur seuil de poids moléculaire. Les molécules de poids moléculaire inférieur à cette valeur passent par les pores de la membrane. La taille réelle d'un soluté et le passage à travers la membrane sont susceptibles de varier avec le pH et la force ionique. Le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la racine carrée du poids moléculaire.

La dialyse se réalise en introduisant la substance dans un sac (le boudin à dialyse, Fig 12) et en plongeant le boudin dans un récipient contenant un grand volume d'une solution tampon à très faible force ionique. Comme le volume du compartiment extérieur est très grand et quand l'équilibre sera atteint, la majorité des molécules diffusibles sera sortie du

boudin. On peut amplifier la séparation des molécules diffusibles en répétant l'opération (en changeant le tampon du compartiment extérieur). Une autre façon d'opérer la dialyse consiste à changer continuellement la solution extérieure (dialyse en continu).

Fig 12 : Principe de l'utilisation du boudin à dialyse



La dialyse s'arrête lorsque les concentrations en soluté diffusible sont égales dans les deux compartiments. On appelle t_{eq} le temps au bout duquel le système est à l'équilibre ou, autrement dit, lorsque les concentrations en soluté sont égales de part et d'autre de la membrane.

L'utilisation de membranes semi-perméables qui autorisent la diffusion des petites molécules (ions minéraux, oses, diholosides, aminoacides ...) et pas celle des macromolécules comme les protéines, permet de réaliser simplement des dessalages de solutions protéiques. Les molécules de petite taille qui traversent la membrane du sac à dialyse sont qualifiées de diffusibles. Celles qui sont trop grosses sont dites non-diffusibles. Lors de la dialyse, il se forme un gradient électrique qui résulte de l'ensemble des espèces chargées de part et d'autre de la membrane. Il est cependant négligeable dans la dialyse et, en pratique, on ne tient compte que du gradient de concentration.

Un autre phénomène se produisant de façon concomitante avec le mouvement des petites molécules est l'osmose. En effet, puisque le contenu du sac à dialyse, au début du processus, est souvent plus concentré que le liquide de contre-dialyse, l'eau, par osmose, entrera dans le sac. Cependant, au fur et à mesure que les particules diffuseront hors du sac, la concentration de part et d'autre de la membrane s'équilibrera et l'osmose ne sera plus un facteur dans les concentrations à l'intérieur ou à l'extérieur du sac.

IV°/ Ultrafiltration

L'ultrafiltration est le transfert actif de soluté et de solvant selon un gradient de pression hydrostatique de chaque côté de la membrane (Fig 13). Elle est pratiquée dans l'hémofiltration (épuration extra-rénale) avec une pression positive dans le compartiment sanguin (chez le patient) et une pression négative dans le compartiment du dialysat. C'est ce phénomène qui va permettre de corriger l'excès de liquide dans le sang du malade. On exerce une pression sur le compartiment sanguin, l'eau qu'elle contient en excès traverse la membrane et rejoint le dialysat.

Fig 13. Principe de l'ultrafiltration



L'ultrafiltration est dépendante du :

- Débit de filtration.
- La taille des pores de la membrane : degré de porosité de la membrane (la taille des pores de la membrane va limiter le transfert).

V°/ Nanofiltration

Dans la nanofiltration, on utilise des membranes semi-perméables dont le diamètre des pores varie entre 0,001 et 0,01 micromètre pour éliminer les agents colorants, les ions polyvalents (métaux lourds), les micropolluants organiques tels que les pesticides et les nitrates. La nanofiltration fait partie des procédés de dépollution, de l'adoucissement et de décoloration de l'eau.

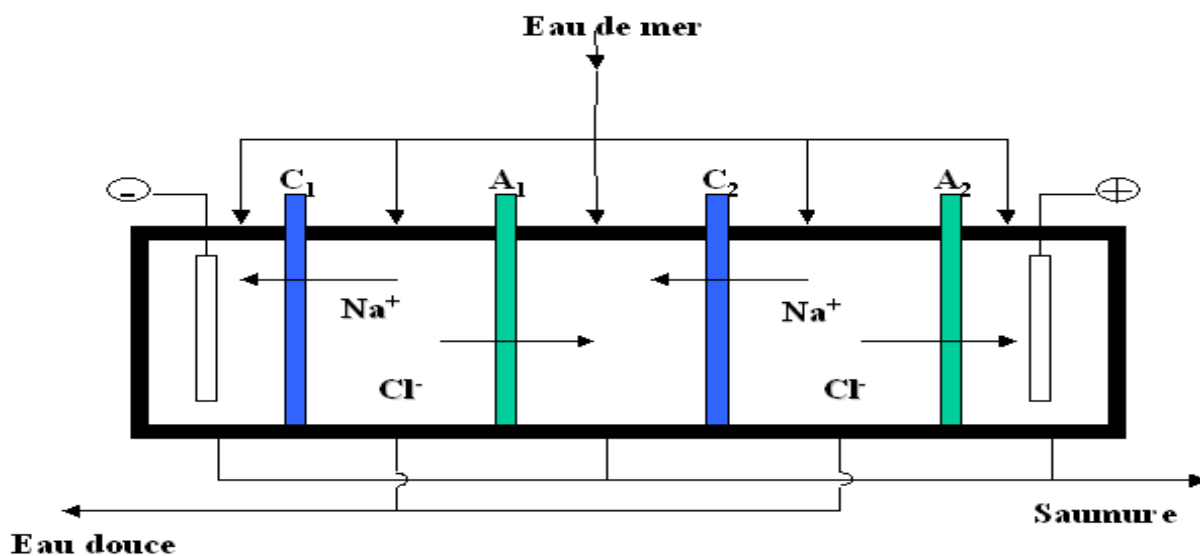
VI°/ Électrodialyse

L'électrodialyse est un procédé électrochimique qui permet d'extraire les ions contenus dans une solution. L'extraction des ions se fait par migration des ions à travers des membranes sélectives (anioniques ou cationiques) sous l'action d'un champ électrique. Ainsi seuls les anions peuvent traverser une membrane anionique et seuls les cations peuvent traverser une membrane cationique. En plaçant plusieurs membranes en parallèle laissant passer alternativement les ions positifs et les ions négatifs, on peut éliminer certains ions de l'eau. Dans certains compartiments, il y a concentration des ions et dans d'autres les ions sont éliminés. Les particules qui ne portent pas de charge électrique ne sont pas éliminées.

* Application au dessalement

L'électrodialyse est utilisée pour le dessalement d'eau de mer et on récupère en fin de chaîne de traitement, à la fois de l'eau douce et de la saumure. Sous l'effet d'un courant, les ions Na^+ sont attirés vers l'électrode négative et les ions Cl^- vers l'électrode positive. En raison de la sélectivité des membranes, les ions Na^+ peuvent uniquement traverser les membranes cationiques et les ions Cl^- les membranes anioniques, on obtient de l'eau douce dans deux des quatre compartiments (Fig 14).

Fig 14 : Principe de l'électrodialyse de l'eau de mer



A1 et A2 : membranes anioniques C1 et C2 : membranes cationiques

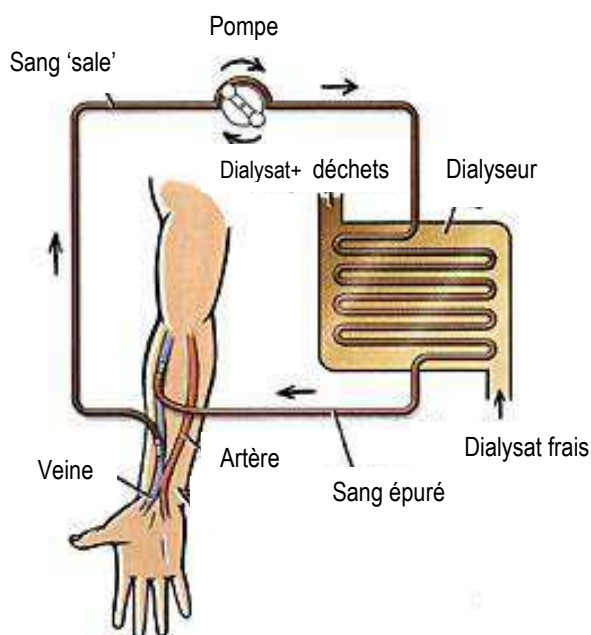
Les membranes cationiques sont constituées de polystyrène sulfonaté, tandis que les membranes anioniques sont constituées de polystyrène avec des ammoniums quaternaires.

VI°/ Hémodialyse

Les patients atteints de l'insuffisance rénale ont des reins qui n'assurent plus leur fonction d'épuration du sang et subissent la dialyse comme traitement pour éliminer les impuretés du sang et l'eau en excès dans le corps. L'hémodialyse consiste à mettre le sang du patient en contact avec un liquide artificiel appelé dialysat, par l'intermédiaire d'une membrane qui ne laisse passer que l'eau et les substances de très petite taille. Les substances présentes en excès quittent le sang et

traversent la membrane vers le dialysat. Le dialysat contient des sels tels que le Na^+ , le Ca^{++} et d'autres molécules qui ne devraient pas sortir du sang. L'hémodialyse fait appel à l'ultrafiltration (Fig 15).

Fig 15 : Schéma simplifié de fonctionnement d'un rein artificiel



D°/ Techniques de chromatographie

Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases ; phase stationnaire et phase mobile. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide de différentes interactions. L'échantillon est adsorbé puis désorbé sur la phase stationnaire. Il est plus ou moins soluble dans la phase mobile.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues dans l'échantillon ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution-étalon. Ces substances servent de références et permettent d'identifier ou de doser chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation.

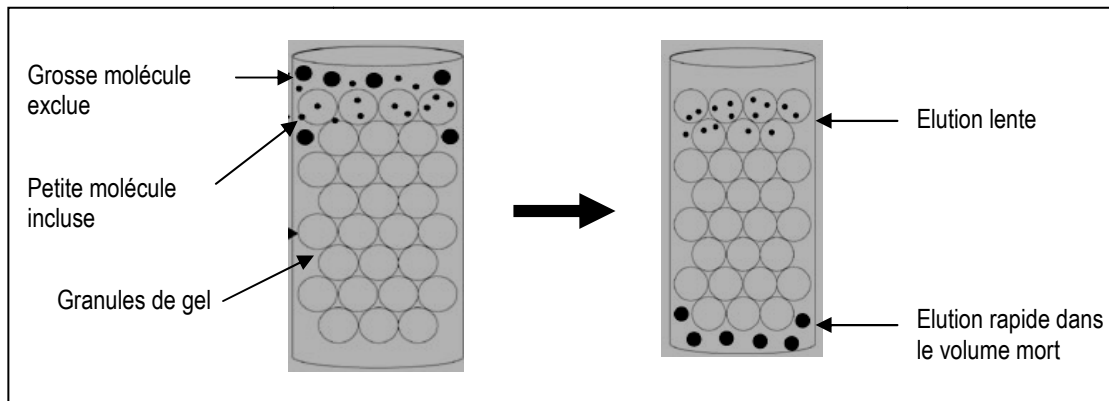
La chromatographie est réalisée dans le but d'analyser, de séparer, de purifier ou de doser des composés chimiques.

Il existe différents types de chromatographies.

I°/ Chromatographie d'inclusion-exclusion

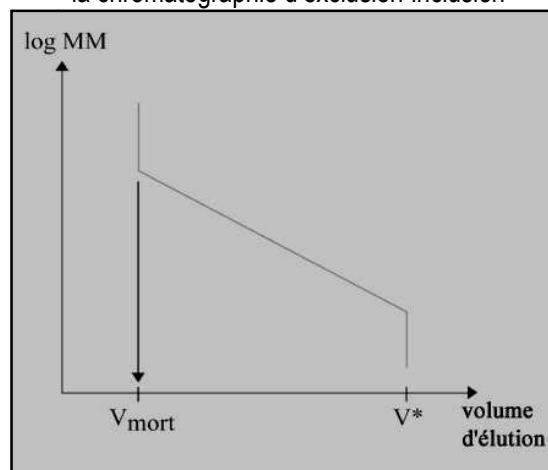
Elle est encore appelée gel filtration ou tamisage moléculaire. C'est une sorte de filtration sur un tamis formé de granules poreux. En fonction de leur taille, les molécules à séparer vont être au bien exclues des pores des granules et vont être facilement entraînées par l'éluant, au bien retenues dans les pores des granules et vont être retardées (Fig 16). Les granules couramment utilisées sont le Séphadex™ et le shépharose™.

Fig 16 : Principe de la chromatographie d'inclusion/exclusion



Dans ce type de chromatographie, Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire (Fig 17).

Fig 17 : Expression du log de la masse molaire en fonction du volume d'élution dans la chromatographie d'exclusion-inclusion

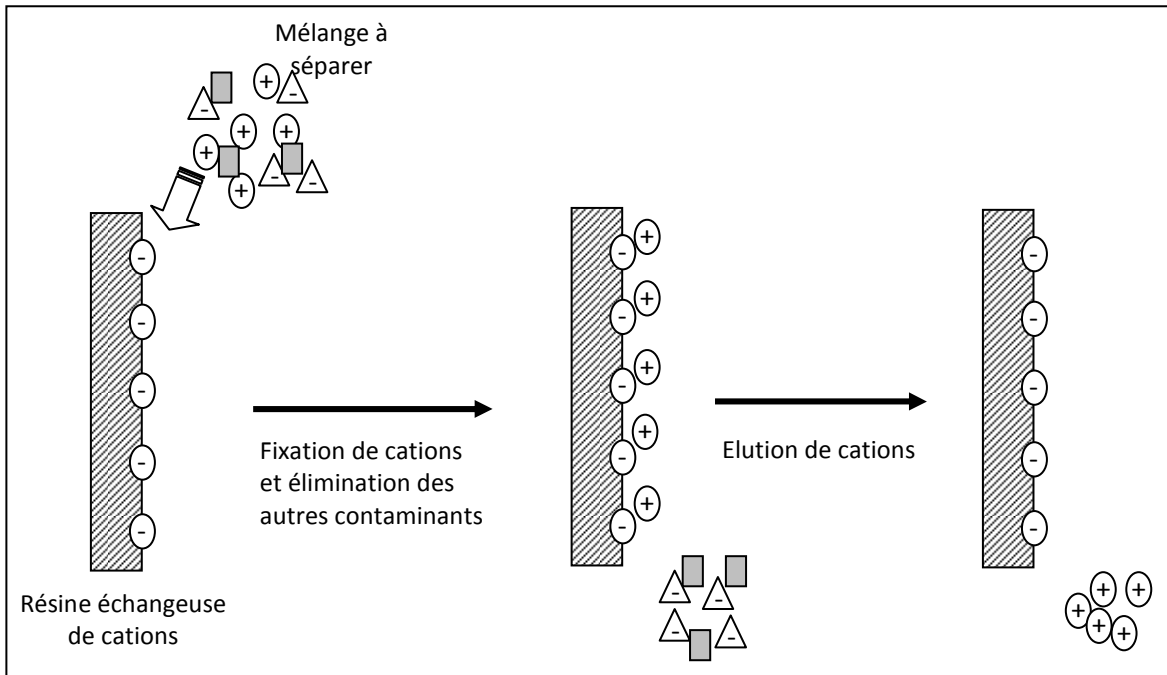


II°/ Chromatographie échangeuse d'ions

Utilise une phase stationnaire à sites ioniques capables d'échanger des ions avec ceux de la phase mobile (Fig 18). La phase stationnaire qui se comporte comme un échangeur d'ions, a la propriété de pouvoir échanger ses ions avec ceux d'une solution. C'est un support sur lequel sont greffés des radicaux ionisables ou ionisés, dites soit cationiques lorsque elles peuvent échanger leurs cations (tels que H^+), soit anioniques lorsqu'elles peuvent échanger leurs anions (tels que OH^- ou Cl^-).

Lorsque l'on veut séparer les constituants d'un mélange, on choisit les conditions opératoires de telle sorte qu'un des constituants du mélange ne soit pas retenu par la phase stationnaire (résine), et que l'autre constituant le soit. On modifie ensuite les conditions opératoires en faisant couler sur la résine un solvant approprié, appelé éluant, de tel sorte que le constituant fixé sur la résine soit entraîné par l'éluant.

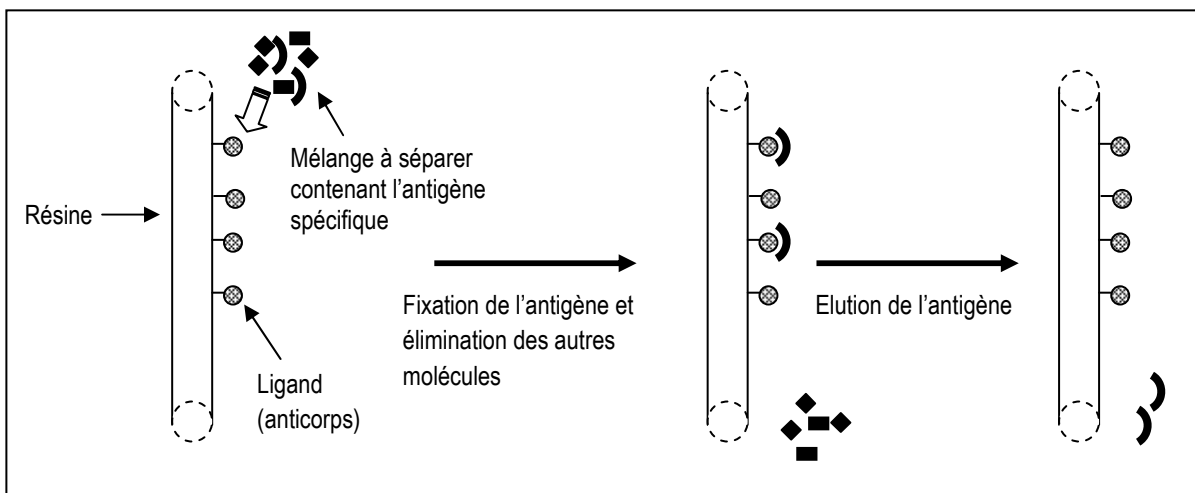
Fig 18: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions (cations)



III°/ Chromatographie d'affinité

Basée sur l'affinité entre un ligand et la molécule à séparer. Le ligand est d'abord fixé sur la résine de la colonne puis reçoit le mélange dont il va accrocher la molécule qui lui est spécifique (Fig 19). A titre d'exemple, le ligand peut être un anticorps spécifique d'un antigène à purifier. L'antigène est retenu par l'anticorps alors que les autres molécules sont éliminées. Ensuite, le décrochage de l'antigène se fait par élution. L'éluant peut être un tampon de haute force ionique, de pH différent ou qui comporte une forte concentration d'une molécule possédant également de l'affinité pour le ligand et qui va déloger l'antigène par compétition pour les sites de fixation.

Fig 19: Principe de la chromatographie d'affinité



IV°/ Chromatographie d'adsorption

Elle est basée sur un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase fixe solide et un mécanisme d'élution (désorption) par la phase mobile liquide ou gazeuse (éluant). L'adsorption est la fixation plus ou moins forte du soluté sur la phase fixe

(liaisons de faible énergie) alors que l'élution revient à l'extraction du soluté adsorbé à l'aide de l'éluant. Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase fixe et seront plus ou moins entraînés par la phase mobile ce qui donne une migration différentielle des solutés en fonction de la résultante des forces d'adsorption sur la phase fixe et d'entraînement par la phase mobile et conduit à leur séparation.

Le R_f (rapport frontal ou rétention frontale) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée.

$$R_f = \text{Hauteur de migration du soluté} / \text{Hauteur du front de migration}$$

- Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant → Choix d'un éluant peu polaire
- Plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant → Choix d'un éluant polaire

Par ordre de polarité décroissante, les solvants couramment utilisés sont :

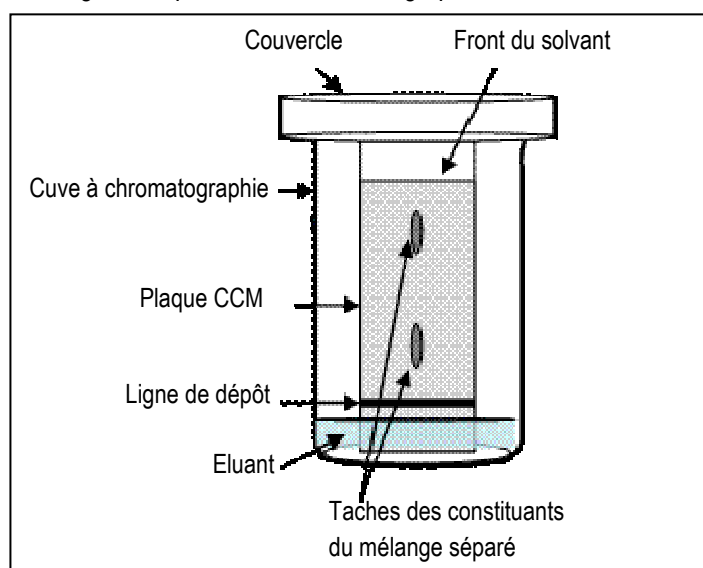
Acide acétique (CH_3COOH) > Eau > Méthanol (CH_2OH) > Ethanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) > Acétate d'éthyle ($\text{CH}_3\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$) > Dichlorométhane (C_2Cl_2) > Ether diéthylique ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$) > Benzène (C_6H_6) ; Toluène ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$) > Tétrachlorométhane (CCl_4) > Hexane (C_6H_{14}).

La chromatographie d'adsorption peut se réaliser en couche mince ou sur colonne.

1) La chromatographie en couche mince

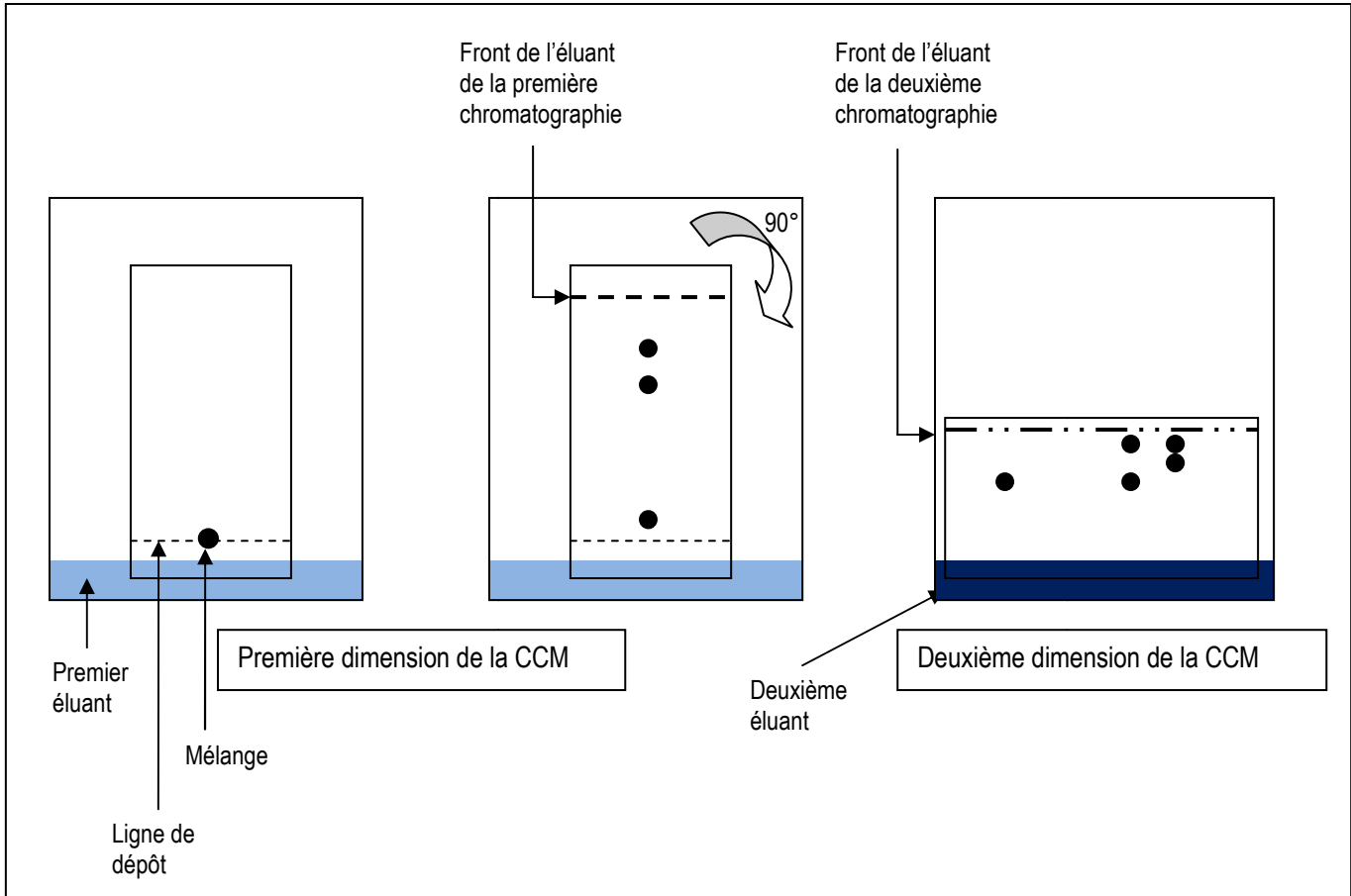
Dans la chromatographie en couche mince ou CCM, l'échantillon est déposé sur une plaque de silice ou d'alumine et l'ensemble est placé dans une cuve couverte, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité et chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Sa vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption ; les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires. Après élution, la révélation se fait à l'œil nu si le produit est coloré, sous UV ou après coloration spécifique par un révélateur chimique (iode, vanilline, ninhydrine ...). On obtient un chromatogramme. La CCM est utilisée pour des fins analytiques (Fig 20).

Fig 20: Dispositif de la chromatographie sur couche mince



La chromatographie en couche mince peut être bidimensionnelle. La première chromatographie s'effectue verticalement et sera suivie par une deuxième chromatographie après rotation du support d'un angle de 90° comme le montre la Fig 21.

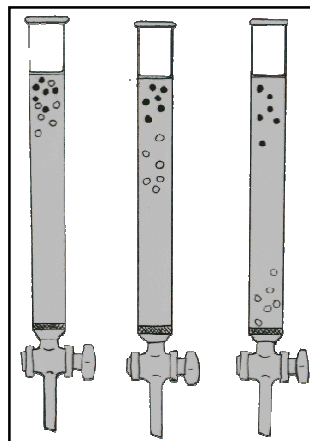
Fig 21: Principe de la chromatographie en couche mince bidimensionnelle



2) La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe et s'emploie pour préparer une bonne quantité d'un soluté donné (Fig 22).

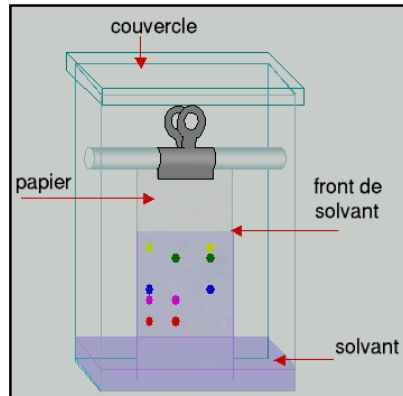
Fig 22: Principe de la chromatographie sur colonne.



V7 Chromatographie de partage

Basée sur la répartition différente (partage différent) d'un soluté dans deux phases. Si le soluté est plus soluble dans la phase mobile, il se déplacera plus facilement que celui qui l'est moins. Dans la chromatographie sur papier, la phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle (Fig 23). La chromatographie sur papier est réalisée dans un but analytique.

Fig 23: Principe de la chromatographie sur papier



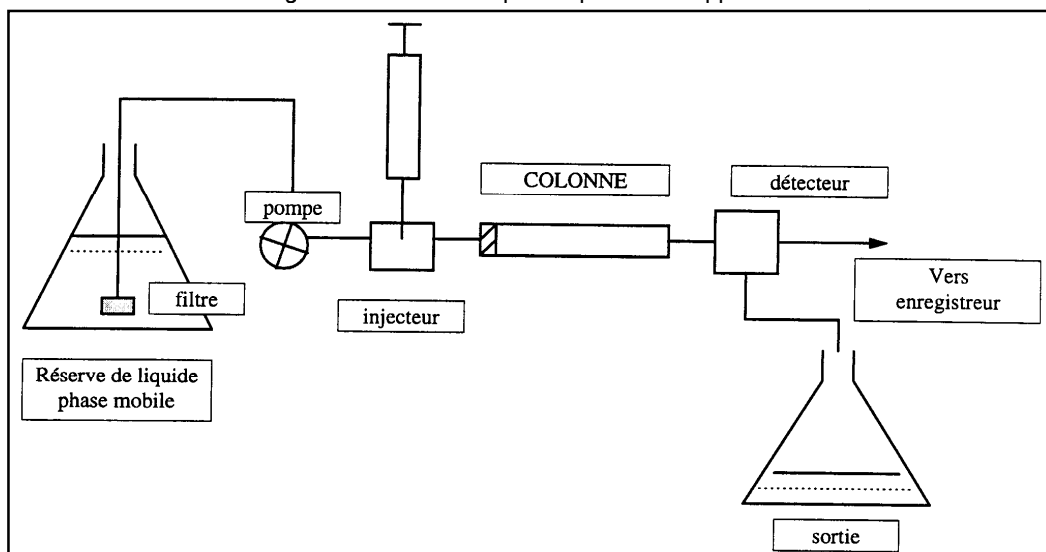
La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est également une chromatographie de partage. Elle nécessite de vaporiser l'échantillon par chauffage sans le dégrader et utilise des gaz neutres tels que l'hélium ou l'hydrogène.

La chromatographie liquide de haute performance (*High Performance Liquid Chromatography* ou HPLC) est la chromatographie la plus utilisée. Elle est à la fois analytique et préparative. La phase mobile est formée d'un liquide alors qu'il faut distinguer deux cas pour la phase stationnaire :

- Si la phase stationnaire est polaire, on parle d'une HPLC en phase normale ;
- Si la phase stationnaire est apolaire, on parle d'une HPLC en phase inverse.

L'HPLC est entièrement automatisée par l'introduction de microprocesseurs et de micro-ordinateurs capables de piloter les opérations. Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur permettant l'injection de l'échantillon, une colonne (phase stationnaire), un détecteur, un système de sortie pour la collecte de fractions et un système d'acquisition de données (Fig 24).

Fig 24 : Les modules qui composent un appareil HPLC



En sortie de colonne, un détecteur mesure en continu l'absorbance du liquide à une longueur d'onde choisie en fonction de la molécule recherchée. On obtient un tracé correspondant à la variation de l'absorbance en fonction du temps (Fig 25). Chaque pic correspond en principe à une espèce moléculaire. Le temps qui s'écoule entre l'injection du mélange dans la colonne et le sommet d'un pic correspond au temps de rétention de la molécule (Fig 26). Ce temps est caractéristique d'une molécule dans des conditions données.

Fig 25 : Exemple d'enregistrement d'HPLC

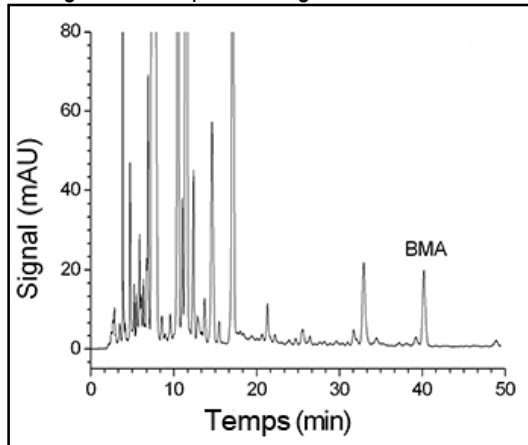
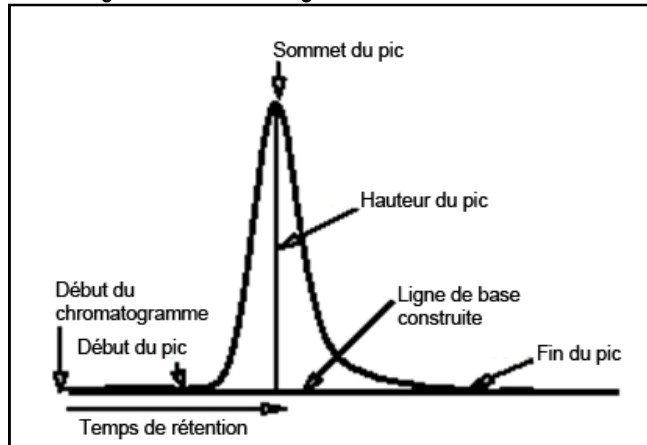


Fig 26 : Pic de l'enregistrement d'HPLC



E°/ Techniques électrophorétiques

Définition

L'électrophorèse est une technique de séparation et d'analyse de macromolécules. Elle désigne le déplacement en fonction de la charge électrique et de la taille de ces macromolécules dans un support sous l'effet d'un champ électrique.

Les anions (-) migrent vers l'anode (+) et les cations (+) se déplacent vers la cathode (-). La charge des macromolécules dépend du pH du milieu et en général, les acides nucléiques chargés négativement grâce aux groupements phosphate, migrent vers le pôle positif alors que la charge d'une protéine reste liée à la nature des acides aminés qui la composent. L'électrophorèse est réalisée sur un support horizontal (Fig 27) ou vertical (Fig 28).

Fig 27 : Principe de l'électrophorèse horizontale

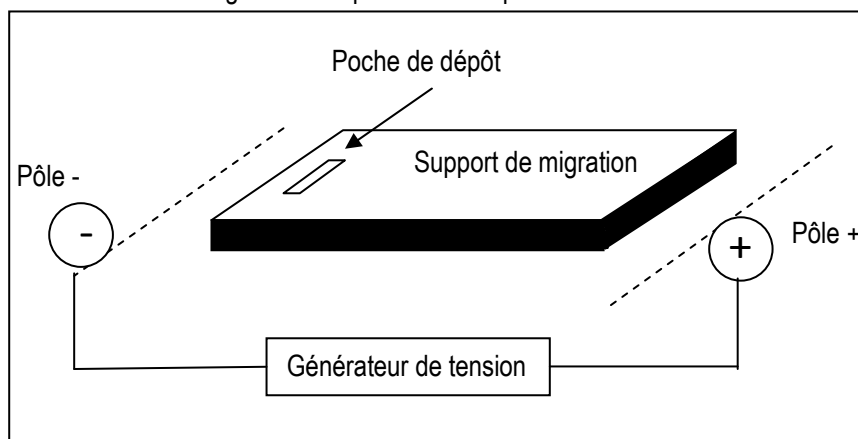
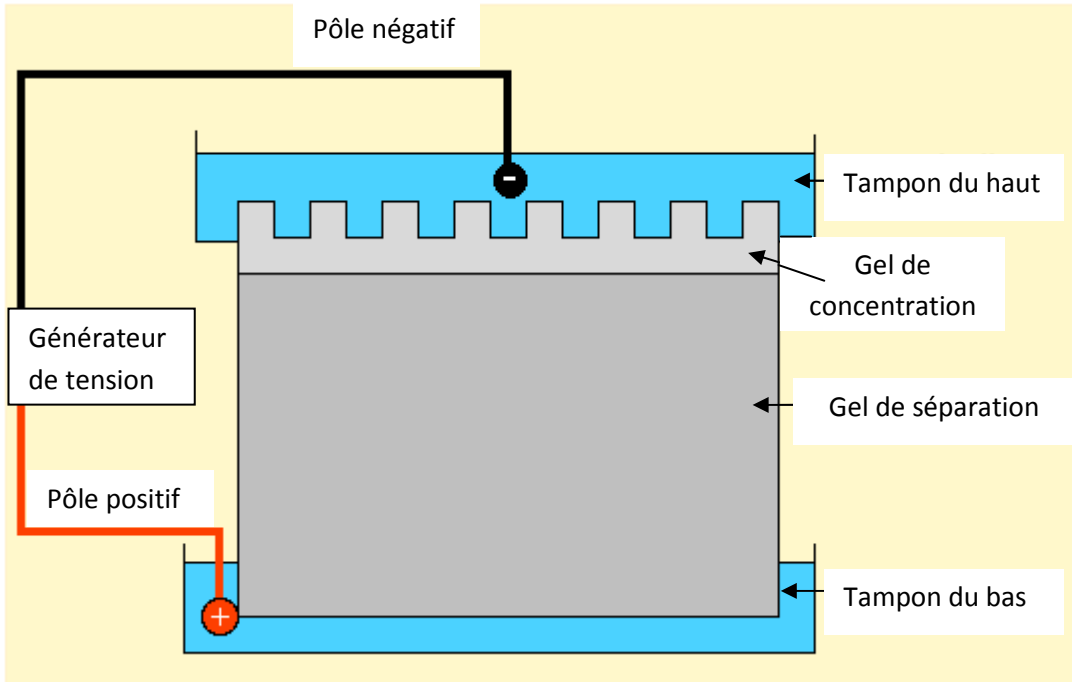


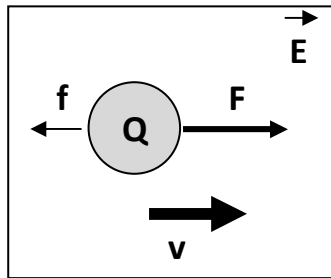
Fig 28 : Principe de l'électrophorèse verticale



Les macromolécules sont déposées sur un support de migration au niveau d'une poche de dépôt (agarose, polyacrylamide, milieu liquide – veine liquide, amidon, silice ...) qui baigne dans un tampon. Elles sont mobilisées grâce à une tension électrique générée par un générateur de tension et caractérisée par deux pôles, l'un positif et l'autre négatif.

I°/ Calcul de la mobilité électrophorétique

Si on place une particule de charge électrique Q dans un champ E , elle sera soumise à une force qui la mobilise vers l'électrode ayant un sens opposé à sa charge :



$$F = Q \cdot E \quad (E \text{ en Volt/m ; } Q \text{ en A/s})$$

La charge Q dépend du pH du milieu. En effet, il faut distinguer 3 cas de figure en rapport avec le pH isoélectrique de la particule (pH_i) :

Si $pH > pH_i$	Charge nette négative (anion)	Migration vers le pôle +
Si $pH < pH_i$	Charge nette positive (cation)	Migration vers le pôle -
Si $pH = pH_i$	Charge nette nulle	Pas de migration

Cette mobilité sera retardée par la force de frottement f qui dépend elle-même de la viscosité du milieu (η), du rayon de la particule (r) et de sa vitesse de migration (v) selon la formule :

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (\eta \text{ en Pa} \cdot \text{s} ; r \text{ en m et } v \text{ en m/s})$$

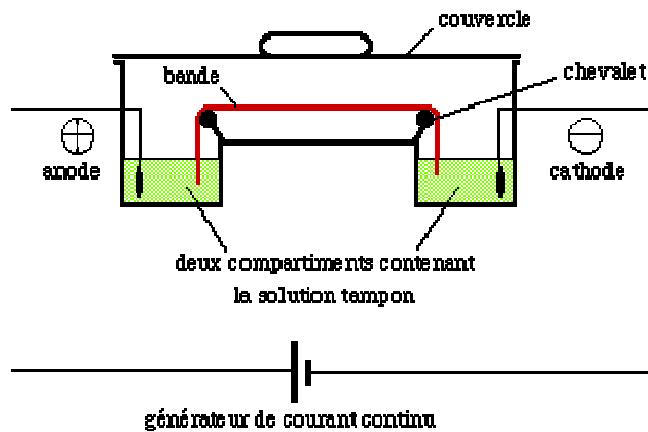
Entre ces 2 forces s'établit un équilibre donnant une vitesse constante du déplacement de la particule et on peut alors écrire :

$$Q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{soit} \quad \boxed{V = Q \cdot E / 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

La mobilité électrophorétique est également influencée par le courant d'électro-endosmose (formation de couche de charges négatives au niveau du support et de couche de charges positives au niveau du solvant, ce qui entraîne la phase liquide vers le pôle négatif) et par les courants d'évaporation dus au réchauffement du support de la migration par effet Joule. Ce réchauffement est maximal au milieu du support ce qui entraîne un courant liquidien vers ce point. La couverture du support de migration diminue ce courant liquidien.

III°/ Electrophorèse sur un support flexible

La phase liquide peut être stabilisée grâce à un support poreux et inerte (papier, acétate de cellulose) comme indiqué dans le schéma suivant :



IV°/ Electrophorèse de protéines en SDS-PAGE

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*" ou *SDS-PAGE*) a été décrite par Laemmli en 1970. Elle se déroule en conditions dénaturantes pour désorganiser la structure tridimensionnelle native des protéines et les avoir sous une forme monomérique dénaturée. Cette dénaturation repose sur un chauffage, sur l'utilisation d'un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts bisulfure (migration sous la forme monomérique) et sur l'emploi du SDS (dodécylsulfate de sodium). Ce dernier est un détergent qui habille les chaînes polypeptidiques des protéines d'une charge négative et permet leur déploiement sous forme d'une structure primaire (Fig 29 et 30).

Fig 29 : Habillement d'une protéine par les charges négatives du SDS

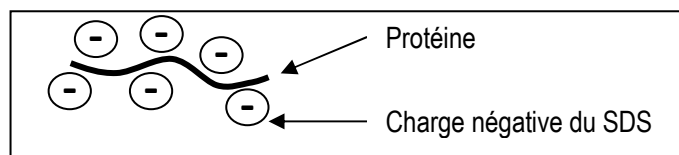
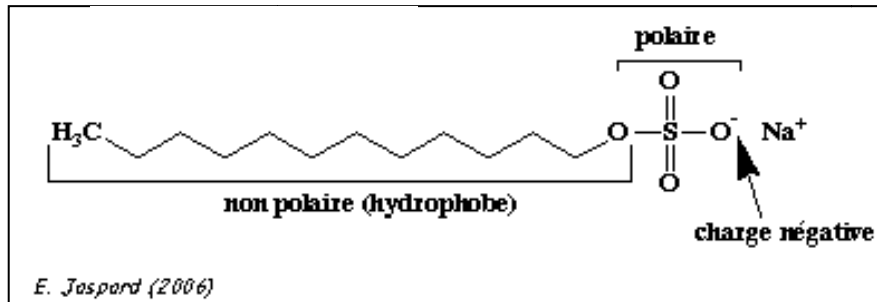


Fig 30 : Structure du DodécylSulfate de Sodium (SDS)



L'électrophorèse des protéines se déroule sur un support formé par un gel de polyacrylamide qui s'obtient par polymérisation de l'acrylamide et du bis acrylamide en présence de catalyseurs. Plus le gel est concentré en acrylamide et bis-acrylamide, plus le diamètre des mailles est réduit et plus la taille des macromolécules à séparer est petite et vice versa (Fig 31).

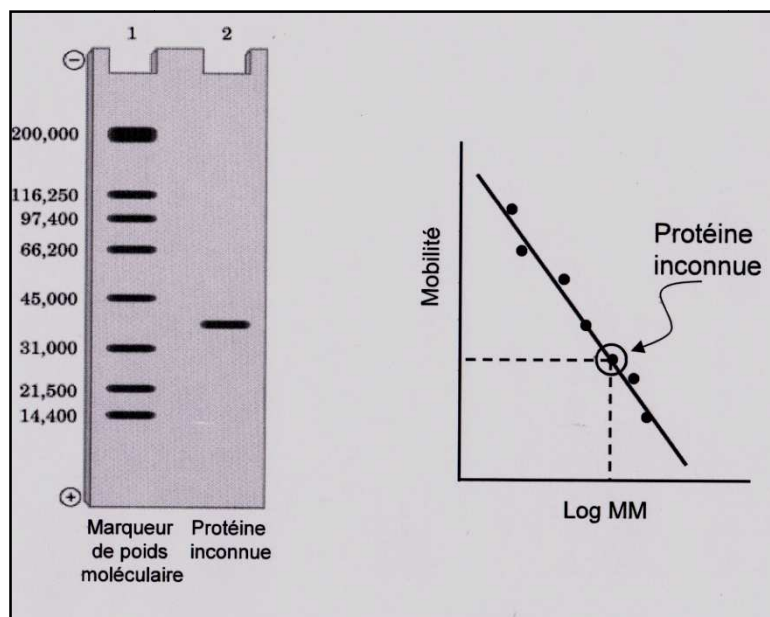
Fig 31 : Gamme de tailles de protéines à séparer en fonction du pourcentage du gel d'acrylamide

% en acrylamide	PM des protéines (KD)
7,5%	45 - 400
10%	22 - 300
12%	13 - 200
15%	2,5 - 100

Comme les macromolécules à séparer sont incolores, le suivi de leur migration se fait grâce à des indicateurs de migration tel que le bleu de bromophénol (couleur bleue) ou le xylène cyanol (couleur bleue verte). Ces indicateurs qui ont une taille plus petite que les protéines migrent en premier avec la vitesse la plus rapide. Leur arrivée en bas du gel marque la fin de la migration. Après migration, la révélation des bandes dans le gel se fait généralement par coloration au bleu de coomassie qui colore les protéines en bleu ou par marquage fluorescent ou radioactif.

En se référant à des macromolécules de PM connus, on peut estimer le PM inconnu d'une macromolécule grâce à l'électrophorèse en exprimant le Log PM en fonction de la distance parcourue en présence d'une échelle de taille (Fig 32)

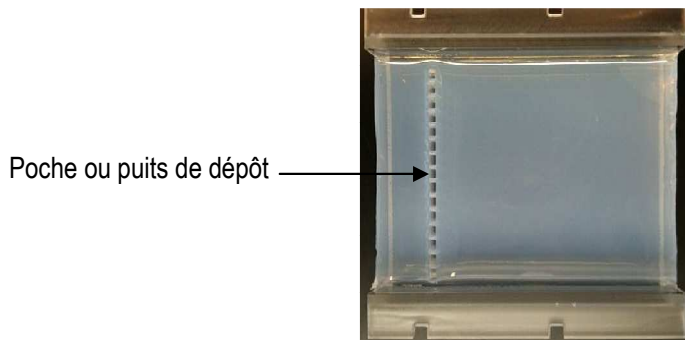
Fig 32 : Principe de détermination du PM d'une protéine après électrophorèse en présence d'un marqueur de poids moléculaire.



V°/ Gel d'agarose :

Le gel d'agarose est couramment utilisé dans les laboratoires pour séparer et analyser l'ADN ou l'ARN sous la forme d'un gel horizontal. L'agarose est un polysaccharide extrait d'algues capable de former un support semi-solide (gel) après fusion/solidification. La poudre d'agarose est dissoute dans un tampon puis chauffée jusqu'à sa fusion totale avant d'être coulée dans la plaque d'électrophorèse. Le refroidissement de la solution conduit à la solidification du gel (Fig 33). Après migration qui s'effectue du pôle négatif vers le pôle positif du fait que les acides nucléiques sont des polyanions, la révélation des acides nucléiques peut se faire grâce au bromure d'éthidium sous les rayons ultraviolets. La séparation des fragments d'acides nucléiques se fait en fonction de leur taille. Des logiciels informatiques impliquant le densitométrage permettent d'améliorer le visionnement des bandes dans le gel.

Fig 33: Photo d'un gel d'agarose



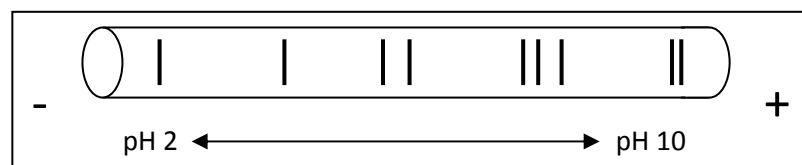
VI°/ Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est la combinaison d'une focalisation isoélectrique qui sépare les protéines en fonction de leur pI (première dimension), suivie d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (deuxième dimension) qui les sépare dans une deuxième étape, en fonction de leur poids moléculaire.

1) Focalisation isoélectrique ou isofocalisation

Permet de séparer les protéines en fonction de leurs pI isoélectriques. Ces protéines sont soumises à une migration sur un gel en tube dans lequel le pH est réparti selon des valeurs croissantes (gradient de pH obtenu grâce à des ampholytes). En fonction du champ électrique, une protéine donnée migre jusqu'à une zone où le pH est équivalent à son pI isoélectrique (charge globale nulle) puis s'immobilise (Fig 34).

Fig 34: Exemple de focalisation isoélectrique montrant la migration sur un gel en tube à gradient de pH

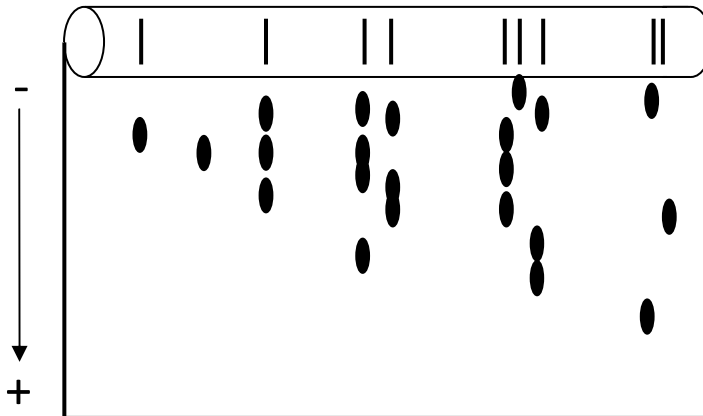


2) Electrophorèse en conditions dénaturantes

Il s'agit de la deuxième phase qui s'effectue après la focalisation isoélectrique. Le gel en tube est récupéré puis déposé au-dessus d'un gel vertical en plaque pour une migration en conditions dénaturantes. Les bandes de protéines

séparées de manière horizontale vont migrer verticalement, du haut vers le bas, pour donner des protéines isolées sous forme de spots (Fig 35).

Fig 35: Résultat de la migration verticale sur gel dénaturant



L'électrophorèse est une technique qui permet, entre autres, pour les protéines de :

- déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective
- d'évaluer le degré de purification d'une protéine
- de séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps)
- de séparer des protéines sur des gels bi-dimensionnels, selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation) puis masse molaire
- ...

Pour les acides nucléiques, elle permet de :

- déterminer la taille de fragments d'ADN
- déterminer la séquence de l'ADN
- séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique du Northern blot (ARN) ou du Southern blot (ADN)
- d'établir le profil de restriction (hydrolyse par des enzymes de restriction) de fragments d'ADN
- ...

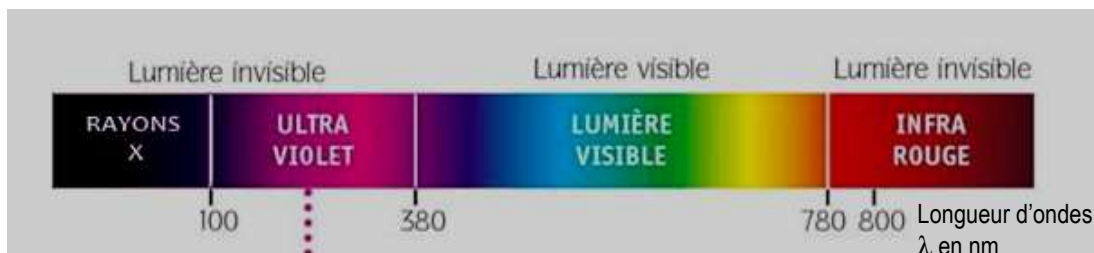
Récemment, on s'achemine vers des systèmes d'électrophorèse sur micro-puce qui sont plus rapide et qui s'apprêtent mieux aux traitements informatisés.

F°/ Méthodes Optique

Introduction :

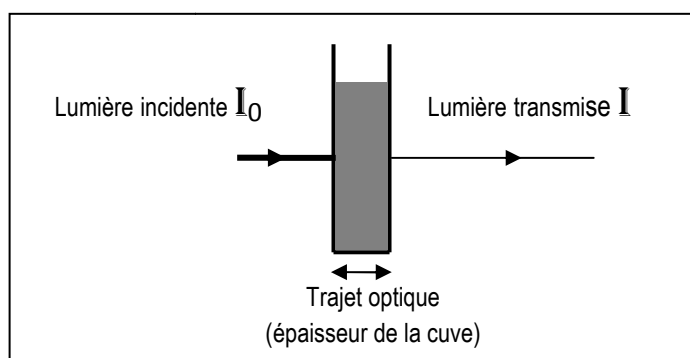
Les molécules sont capables d'absorber la lumière et cette absorbance est utilisée, dans beaucoup de cas, pour les étudier et pour déterminer leur concentration. L'absorbance d'une molécule est maximale à une longueur d'ondes précise ; les molécules qui absorbent dans le visible (400 – 800 nm, Fig :) sont suivies par colorimétrie grâce à un appareil appelé colorimètre ; celles qui absorbent dans l'ultra-violet (100-380 nm) sont suivies par spectrophotométrie (appareil = spectrophotomètre) alors que l'absorption dans l'infrarouge (> 780 nm) est suivie par spectroscopie (appareil = spectromètre infrarouge). Le spectre de la lumière est présenté dans la Fig 36.

Fig 36 : Spectre de la lumière



I°/ Spectrophotométrie UV-Visible

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s).



L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance (A) ou densité optique (DO) de la solution comme :

$$A = DO = \log (I_0 / I)$$

Cette absorbance peut être exprimée en fonction de la concentration par la loi de Beer-Lambert :

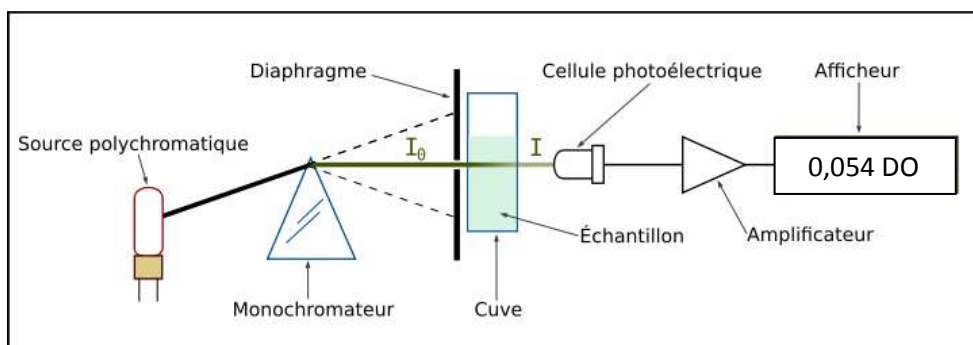
$$DO_\lambda = \epsilon_\lambda \times L \times C$$

- DO est la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ ;
- C est la concentration de la substance absorbante (en mol./L);
- L est la longueur du trajet optique (en cm);
- ϵ_λ est le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution (en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Pour mesurer correctement la DO, il faut opérer avec des solutions moins concentrées pour lesquelles la valeur de la DO ne dépasse pas en général la valeur de 1.

La mesure de la DO se fait dans un spectrophotomètre UV/Visible dont le principe est schématisé dans la Fig 37.

Fig 37 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV/Visible



A partir du faisceau lumineux, le monochromateur permet de réduire la lumière à la longueur d'ondes choisie. L'étendue du rayon lumineux est contrôlée par un diaphragme avant de traverser la solution contenue dont les molécules dissoutes vont absorber une partie de l'énergie lumineuse et passer à un état excité. Une cellule photoélectrique permet de capter la lumière transmise et de la transmettre, via un amplificateur, à un système capable de la transformer en valeur de DO qui apparaît au niveau de l'afficheur.

Les spectrophotomètres UV/visible peuvent être à un seul faisceau (lecture d'une cuve à la fois ; Fig 38) ou à faisceaux multiples (capable d'effectuer plusieurs lectures à la fois). Les solutions à doser sont mises dans des cuves en quartz pour les mesures en UV (le quartz n'absorbe pas en UV) ou en verre ou en plastique pour les mesures en lumière visible. Les mesures sont effectuées par référence à un essai blanc c-à-d une solution identique à celle de l'essai mais sans la molécule à doser et qui permet de soustraire la valeur du bruit de fond.

Fig 38 : Photo d'un spectrophotomètre

