

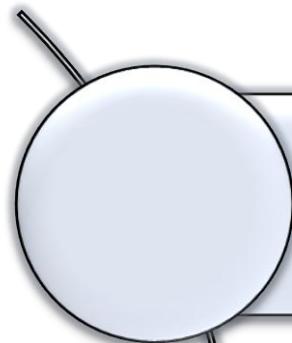
Master: Agroalimentaire et contrôle de qualité
Master: Microbiologie appliquée

UEF4:
Méthodes moléculaires et contrôle de
qualité
« Techniques de contrôle moléculaire »



Dr Alioua S
2019/2020

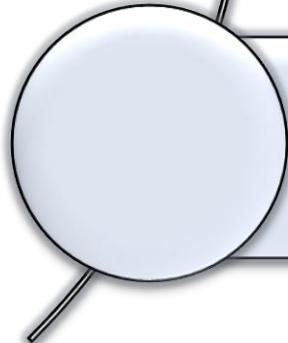
PROGRAMME



Chapitre 1: Rappel sur les différents microorganismes responsables des toxi-infections alimentaires



Chapitre 2: Analyses immunologiques



Chapitres 3: techniques d'hybridation moléculaire et technique PCR



CHAPITRE 02

Analyses
immunologiques



TESTS IMMUNO-ENZYMATIQUES

- Les **méthodes immuno-enzymatiques** utilisent les anticorps pour détecter la présence d'antigènes ou l'inverse en fonction du test réalisé.
- Il existe de **plusieurs types de méthodes EIA** mais toutes utilisent un **anticorps de révélation conjugué avec une enzyme** et l'ajout d'un substrat de cette enzyme permet de visualiser et de quantifier. Ce substrat est un **chromogène**, une molécule incolore qui forme un produit coloré en présence de l'enzyme. Les enzymes les plus utilisés en EIA sont la **phosphatase alcaline** et la **peroxydase de Raifort**

- Dans certaine méthode EIA, le substrat est un **fluorogène**, une molécule non fluorescente que l'enzyme transforme en produit fluorescent.
- La technique **ELISA** (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) est la méthode EIA la plus utilisée.

TEST ELISA:

- La méthode immuno-enzymatique **ELISA**, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », (c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide).
- Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon

- L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps.
- L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme.
- Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un **substrat chromogène** ou **fluorogène**.



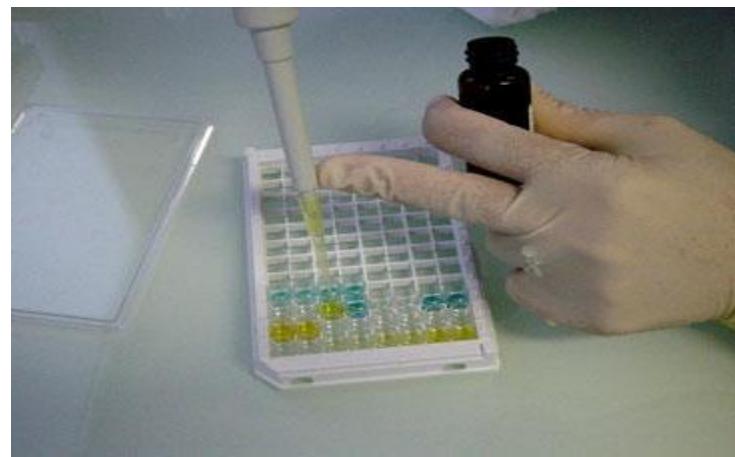
HISTOIRE

- La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par 2 scientifiques suédois, **Peter Perlmann** et **Eva Engvall** à l'Université de Stockholm en **1971**.
- A la fin des années 60, **Stratis Avrameas** et **GB Pierce** mettent au point la technique d'immunoenzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps en utilisant comme marqueur des enzymes.



PRINCIPE

- ELISA est une technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.



ELISA

Indirecte

En Sandwich

Par
compétition

Quantitatif

Qualitatif



ELISA INDIRECT



LE TEST ELISA INDIRECT

- Ce test permet de détecter ou doser des anticorps. il se réalise en 4 étapes:
 1. **"coating" de l'antigène**
- Incubation de la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché dans des puits (à 4 °C overnight, fixation électrostatique).
- Lavage des puits pour éliminer les antigènes en excès (tampon de lavage).



2. fixation d'anticorps à doser

- incubation à 37°C de la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures.
- Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène.
- Les trous sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps en excès.



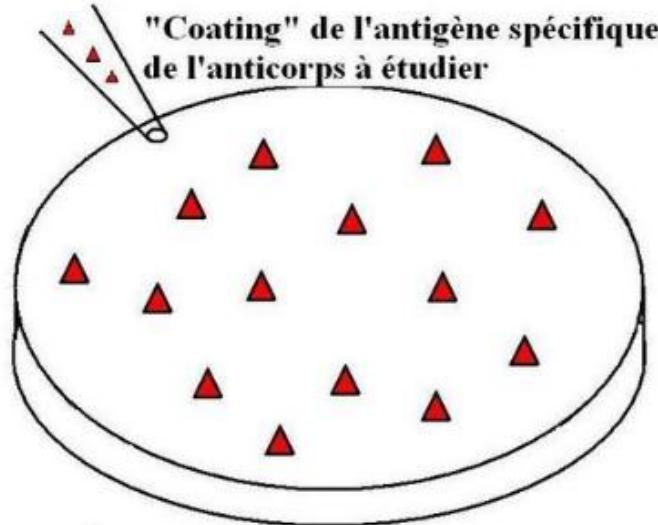
3. fixation d'anticorps de détection:

- incubation à 37°C de la solution d'anticorps de détection pendant environ 30 minutes à 2 heures.
- Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser.
- Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès.
- les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

4. révélation des anticorps fixés

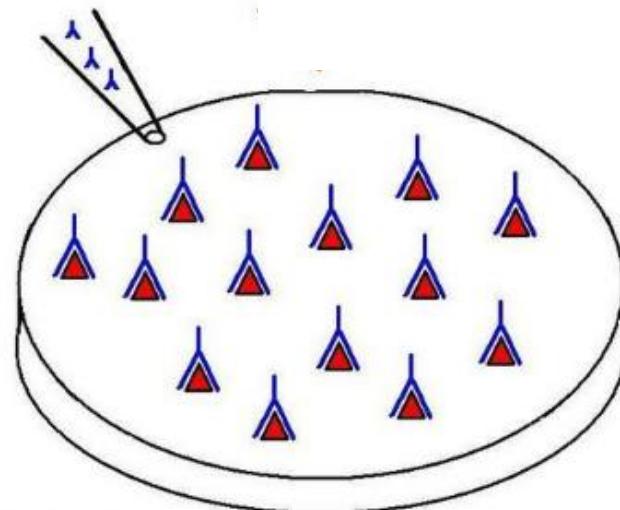
- Incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, d'une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme.
- Apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.



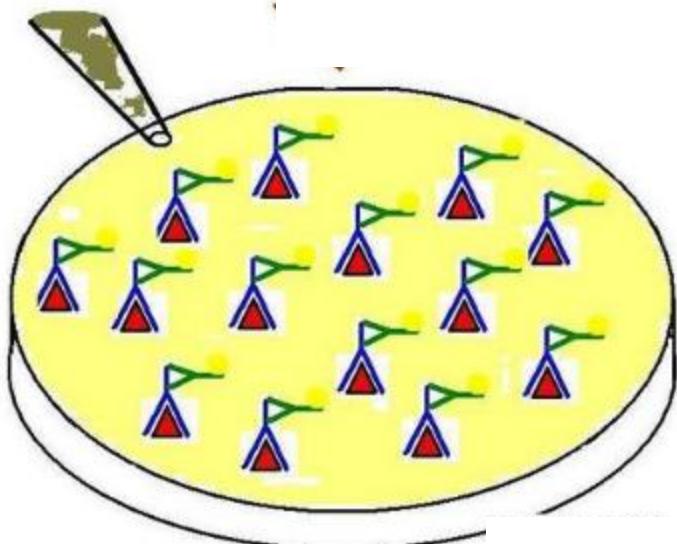


Lavage

incubation de l'anticorps à doser



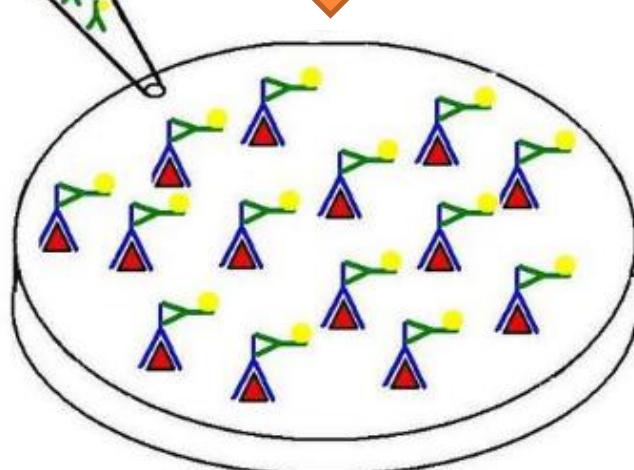
Solution révélatrice



Lavage

Incubation de l'anticorps de détection

Lavage

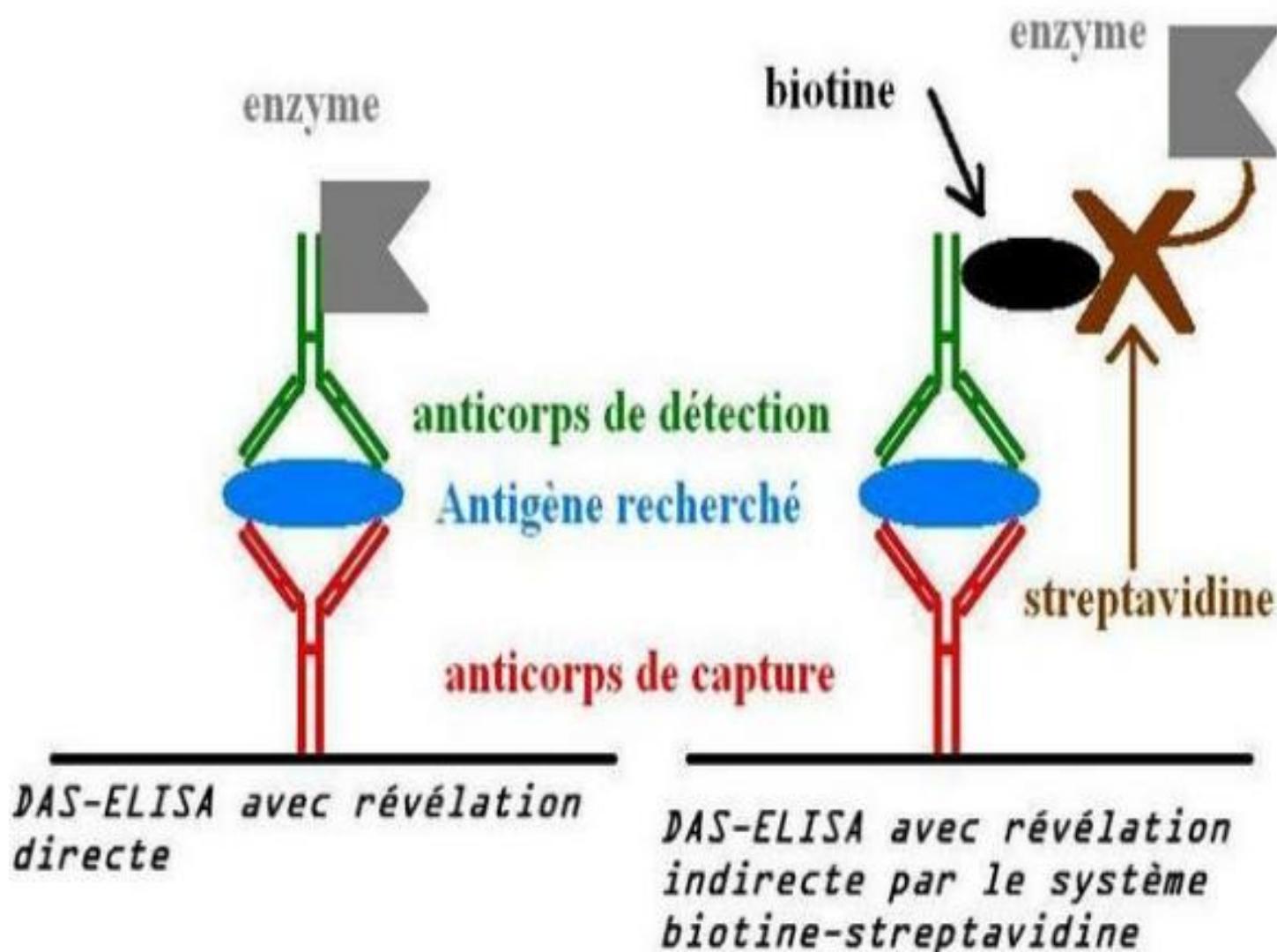


ELISA EN SANDWICH

- L'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. L'utilisation de la DAS ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.
- La première étape consiste à fixer sur le support, **l'anticorps de capture**. On incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage.
- Lors de la deuxième étape, on dépose **l'échantillon possédant l'antigène** à identifier qu'on laisse incuber à 37°C pendant 2 heures puis lavage.
- Dans une troisième étape, on fixe **l'anticorps de détection** marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché à 37°C pendant 2 heures.



- La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.
- La différence entre le DAS ELISA direct et le **DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine** réside au niveau de l'anticorps de détection. Pour le DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine, l'anticorps de détection porte une molécule de biotine qui interagit avec la streptavidine couplé à une enzyme.



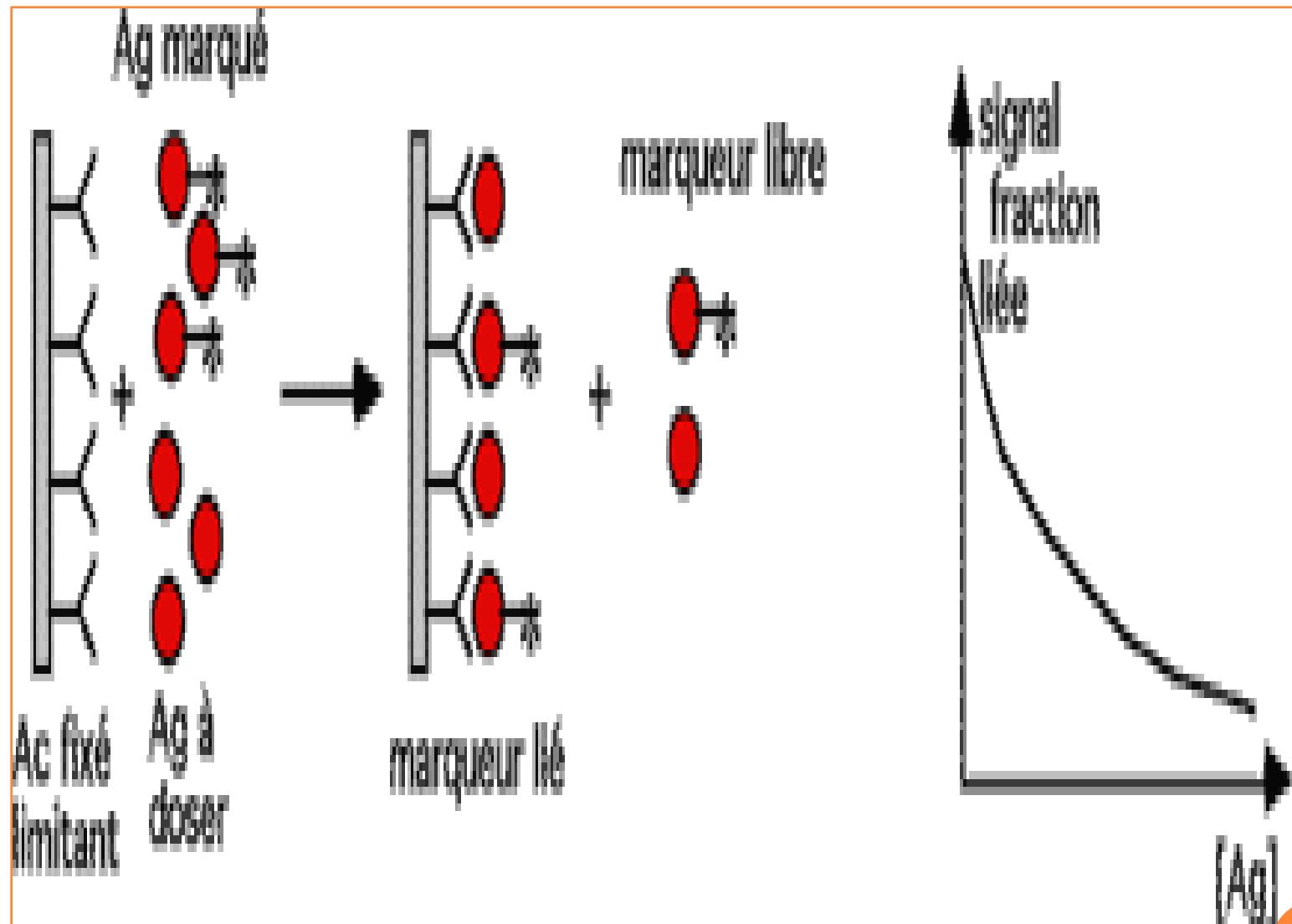
La sensibilité du test DAS-ELISA direct se situe entre 1 et 10 ng/ml. Cette sensibilité peut être augmentée par l'utilisation du système indirect du fait de la forte affinité entre la streptavidine et la biotine.

ELISA COMPÉTITION (DOSAGES AVEC RÉACTIF LIMITANT- MÉTHODES INDIRECTES)

- L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction liée qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser.
- Cette méthode s'applique à tous les antigènes quelle que soit leur taille, y compris les haptènes.

- Les méthodes par compétition nécessitent l'emploi d'un **traceur**, qui est un analogue de l'antigène repérable par diverses méthodes : la molécule de traceur peut porter un atome radioactif (tritium iodé), une enzyme, ...
- Ces méthodes ne peuvent être utilisées que lorsqu'on travaille sur des petites molécules, comme par exemple des hormones stéroïdes et elles ne s'appliquent pas à des hormones protéiques.





LES ENZYMES UTILISÉES EN EIA

- Elles doivent être faciles à obtenir et purifier, stables, et mettre en jeu une réaction produisant un composé coloré (cas le plus fréquent).
- L'enzyme (marqueur) est couplée à l'antigène (ou haptène) ou à l'anticorps. Ce couplage doit préserver :
 - le site actif de l'enzyme
 - le site de liaison Ag ou Ac



- La révélation consiste à mesurer l'activité catalytique de l'enzyme : pour cela on mesure la vitesse initiale de la réaction catalysée par l'enzyme, après addition du (des) substrat(s) de l'enzyme, et incubation.
- En général, l'activité enzymatique est mesurée par spectrophotométrie d'absorption moléculaire, fluorimétrie ou luminométrie.
On travaille le plus souvent dans des plaques de microtitration à 96 trous qui permettent de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément

Enzyme	Source
Lysozyme	Blanc d'œuf de poule
Malate déshydrogénase	Mitochondries de cœur de porc
Glucose-6P déshydrogénase	Bactérienne (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
Peroxydase	Raifort
Glucose oxydase	<i>Aspergillus niger</i>
Phosphatase alcaline	<i>Escherichia coli</i>
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>

APPLICATIONS

- **Dosage de protéines à faible concentration** : dosages spécifiques de certaines protéines plasmatiques : ferritine, hormones protéiques : hCG..., marqueurs tumoraux : alpha-foetoprotéine...
- **Recherche et dosage d'anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses** (sérologie) : en parasitologie (toxoplasmose...) en virologie (virus de l'hépatite B, virus du SIDA...), et en bactériologie (*Helicobacter pylori*, ...)

AVANTAGES DE LA TECHNIQUE

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.
- La validité des kits est d'environ 1 an.



INCONVÉNIENTS DE LA TECHNIQUE

- La limite de détection est moins bonne que la technique RIA (radioimmunoassay).
- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.



WESTERN BLOT



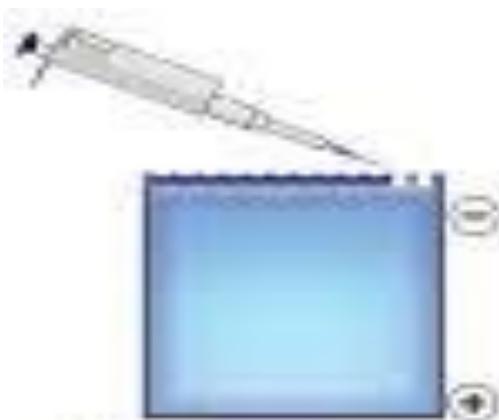
- Le nom du **western blot**, donné à la technique par W. Neal Burnette, est un jeu de mot à partir de la technique du Southern blot ou transfert de Southern, technique de détection d'ADN nommée d'après son inventeur, Edwin Southern. La détection d'ARN est appelée northern blot ou transfert de northern.
- Toutes ces techniques dérivent leur nom de l'étape de transfert sur membrane, comparée à une empreinte sur buvard (*blot* = « tache » en anglais).

- Un western blot, ou immunoblot, est une méthode de biologie moléculaire qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane.
- Le *western blot* (également appelé **transfert de protéines** ou **buvardage de western** ou encore **technique des immunoempreintes**), est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique (sérum ou autre extrait ou homogénat tissulaire) à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter.

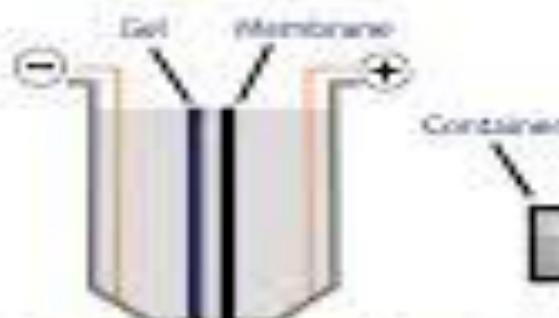
- Le western blot permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe. C'est l'une des techniques analytiques de transfert sur membrane utilisées en biochimie et en biologie moléculaire.
- Elle est parfois utilisée comme un outil de diagnostic complémentaire pour mettre en évidence une protéine particulière (protéine virale, par exemple) dans le sérum d'un patient.

PRINCIPE

- Cette technique, née des progrès de la protéomique, de la biologie moléculaire et de l'Immunofluorescence, utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer des protéines, préalablement dénaturées, selon leur taille.
- Ces protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (typiquement en nitrocellulose), où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.
- Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes, etc.

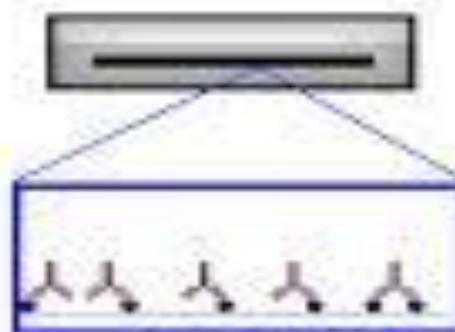


1. Load and separate protein samples on SDS-PAGE gel.

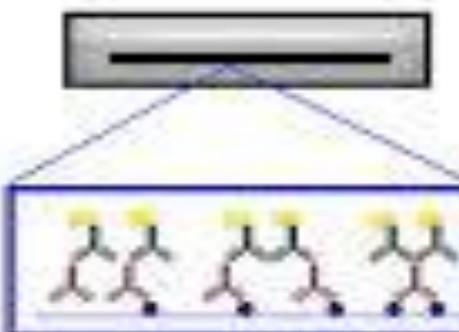


2. Electrophoretically transfer fractionated proteins onto PVDF or nitrocellulose membranes.

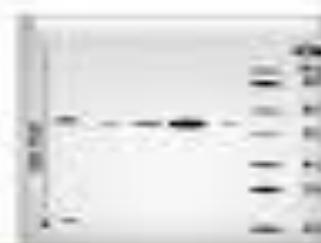
3. Block the membrane with neutral protein (BSA or milk).



4. Incubate the membrane with primary antibody specific to target protein. Wash.

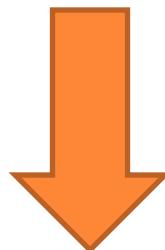


5. Incubate the membrane with HRP-labeled secondary antibody specific to primary antibody. Wash.

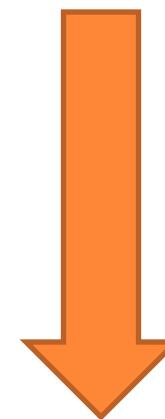


6. Incubate the blot with chemiluminescent HRP substrate and expose to film.

Détection des protéines dans un échantillon



Etape 01:
Séparation des
protéines selon
leur poids
moléculaire



Etape 02:
Révélation
d'anticorps
d'intérêt
grâce aux
anticorps



TECHNIQUE

Extraction

Séparation

Transfert

Révélation

1- PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS: EXTRACTION

- L'ébullition entraîne la lyse cellulaire (éclatement des cellules par choc thermique).
- Afin de séparer les protéines des autres constituants, on utilise un détergent (SDS)
- Le SDS est un agent réducteur, il intervient dans le déploiement des protéines et les transformer en **chaines linéaire d'acides aminés**
- Il leur procure un environnement **riche en charges négatives** afin de les solvater et prévenir la précipitation, et le composant sulfhydryl empêche la régénération des ponts disulfure.

- L'échantillon est ensuite traité de façon à recueillir **un taux constant de protéines** à partir de chaque échantillon différent.
Cela implique un dosage des protéines par la méthode du Biuret ou du bleu de Coomassie (Méthode de Bradford).

DÉTECTEUR

- Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes.
- Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre. Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur.

A- CATHAROMÈTRE

- Le Catharomètre est un appareil simple et robuste, à réponse universelle, mais relativement peu sensible.
- Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté.
- Ces flux de chaleurs sont produits par des thermistances, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée avec précision.

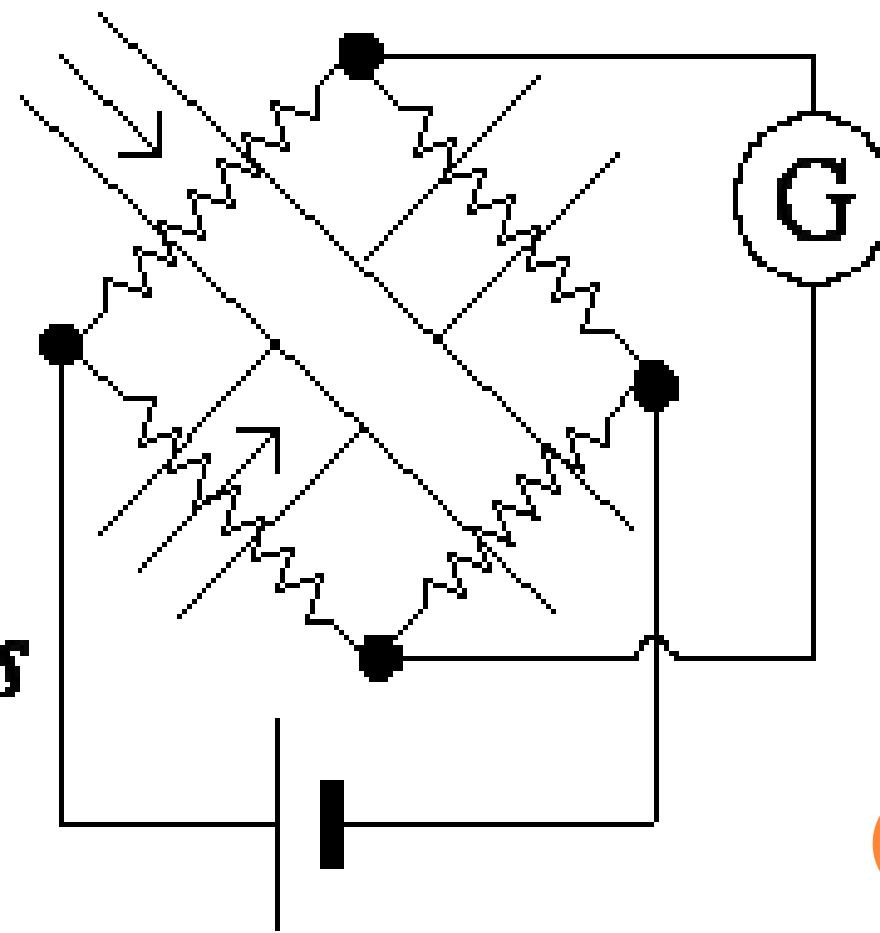
- En faisant passer le gaz vecteur contenant les constituants séparés sur la cellule du détecteur
- nous obtiendrons un signal chaque fois que l'un des constituants se présentera dans la cellule car la conductibilité thermique du gaz vecteur (qui traverse le détecteur) varie quand le constituant X traverse le détecteur.



gaz vecteur

pur

*gaz vecteur
contenant les
solutés*

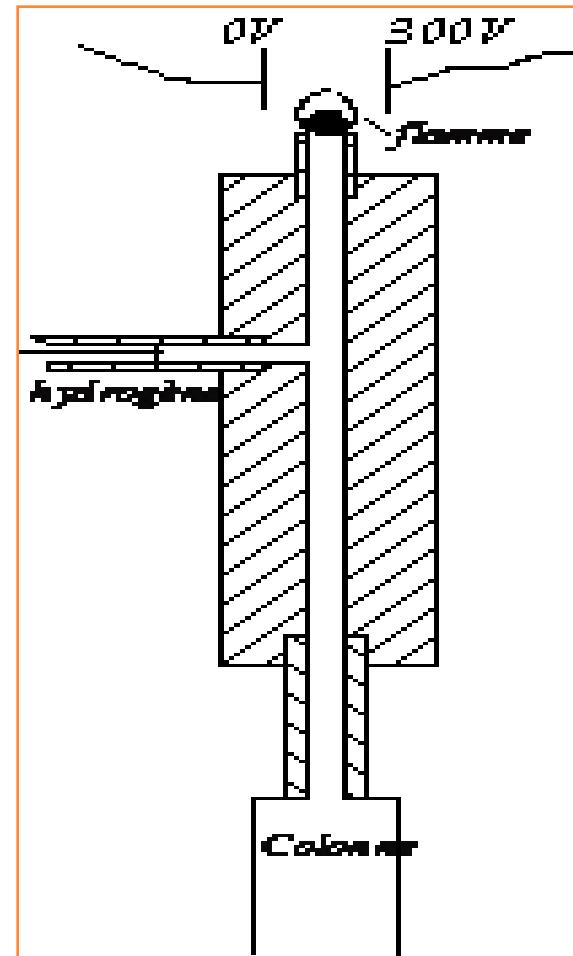


B- DÉTECTEUR À IONISATION DE FLAMME

- C'est un détecteur beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais moins universel, car il ne donne de réponse qu'aux composés organiques
- Il a aussi l'inconvénient, contrairement au catharomètre, de détruire le soluté qui le traverse, car son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène, l'effluent apporté par de l'azote (gaz vecteur).
- Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des ions carbone de charge positive qui sont précipités sur une électrode où ils créent un courant d'ionisation que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur. Sur un enregistreur, on obtient par conséquent un signal proportionnel au débit-masse du soluté dans le détecteur

Le détecteur FID est :

- Non Universel
- sélectif
- Destructif
- Linéaire



C- DÉTECTEUR À CAPTURE D'ÉLECTRONS

- Une source telle que le tritium (${}^3\text{H}$) envoie des électrons libres dans le détecteur.
- Quand ce détecteur est traversé par des substances ayant une affinité pour les électrons libres, il se produit des ions qui, comme pour le détecteur à ionisation de flamme, dans le champ électrostatique existant, sont recueillis par une électrode et forment un courant d'ionisation à amplifier convenablement.

PERFORMANCES DES DÉTECTEURS

Catharomètre	Détecteur à ionisation de flamme	Détecteur à capture d'électrons
Tous composés	Composés organiques	Composés halogénés



COLONNE

- C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre.
- Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte (ex : brique pilée, alumine etc... soigneusement calibrée)
- On distingue les colonnes à remplissage proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur.

PERFORMANCES DES COLONNES

- *Une colonne à remplissage bien préparée peut atteindre une efficacité de l'ordre de 1 500 plateaux théoriques par mètre
- *Les colonnes capillaires atteignent facilement 2 000 à 10000 plateaux théoriques par mètre. On ne doit jamais effectuer d'analyse CPG sans avoir stabilisé l'ensemble de l'appareil en débit de gaz vecteur et en température pendant au moins deux heures.
- *En dehors des périodes d'utilisation, les colonnes doivent être bouchées pour éviter l'humidité pouvant se solubiliser dans la phase stationnaire, ainsi que l'oxydation de celle-ci.



CHOIX DE LA PS

- Le choix de la phase stationnaire conditionne la bonne séparation des constituants.



LE GAZ

- Le gaz employé (phase mobile) est un gaz inerte (hélium ou azote). Le gaz utilisé est l'hélium.
- Ce gaz vecteur ou gaz porteur pousse les constituants à travers la colonne. En chaque point de cette dernière,
- il se produit un équilibre entre la fraction du constituant en phase stationnaire et en phase mobile.
- Il s'agit de chromatographie de partage.



PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

- L'échantillon (un liquide volatil) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une micro seringue qui va traverser une pastille souple, appelée *septum*, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée *injecteur*.
- L'injecteur est traversé par le *gaz porteur* et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0,2 à 5,0 µl.



- Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz porteur* (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la *phase stationnaire*.
- La phase stationnaire peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de **rétention chromatographique** avec les différents composés (appelés **solutés**).
- Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne.

- La grandeur expérimentale brute est appelée ***temps de rétention***. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur.
- Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (***élution***), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être légèrement supérieure à la température d'ébullition des composés (de manière que les composés ne sortent pas trop tôt, ce qui aurait pour conséquence d'avoir leurs pics confondus avec celui du temps mort).
- On peut travailler en isotherme, c'est-à-dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie.

- À la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est appelé *détecteur*. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux.
- Le détecteur envoie un signal électrique vers un enregistreur de données qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne).
- L'ensemble des pics est appelé *chromatogramme*. Actuellement et de plus en plus, les logiciels remplacent avantageusement les enregistreurs papiers pour l'interprétation des signaux envoyés par les détecteurs.

ANALYSE QUALITATIVE EN CPG

- Si on injecte un mélange de plusieurs liquides dans la colonne par l'intermédiaire de l'injecteur, ces liquides sont transformés en gaz, lesquels sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur.
- La phase stationnaire selon sa constitution, va plus ou moins retenir sélectivement chacun des produits



COEFFICIENT DE PARTAGE K

- On appelle coefficient de partage K pour un constituant X :
- $K = \text{Masse de constituant X par unité de volume de phase stationnaire} / \text{Masse de constituant X par unité de volume de phase mobile}$
- Ce coefficient de partage est un des paramètres qui conditionne la durée de parcours de la colonne par le constituant.
- Si les autres paramètres (température, débit gazeux) sont constants, alors pour un mélange à analyser, la durée de parcours sera différente pour chaque constituant si leurs coefficients de partage sont différents.
- Cette durée est appelée temps de rétention. Moyennant un étalonnage préalable avec des produits purs, la CPG permet donc l'analyse qualitative des constituants d'un mélange.



ALLURE DU CHROMATOGRAMME

- Un chromatogramme correct est composé de pics de forme symétrique, pas trop larges et bien séparés.
- C'est en jouant sur les conditions opératoires que l'on arrive à un tel chromatogramme.
- Les facteurs favorables à une bonne séparation sont :
 - ✓ des temps de rétention suffisamment différents (choix de la colonne)
 - ✓ des pics peu élargis.



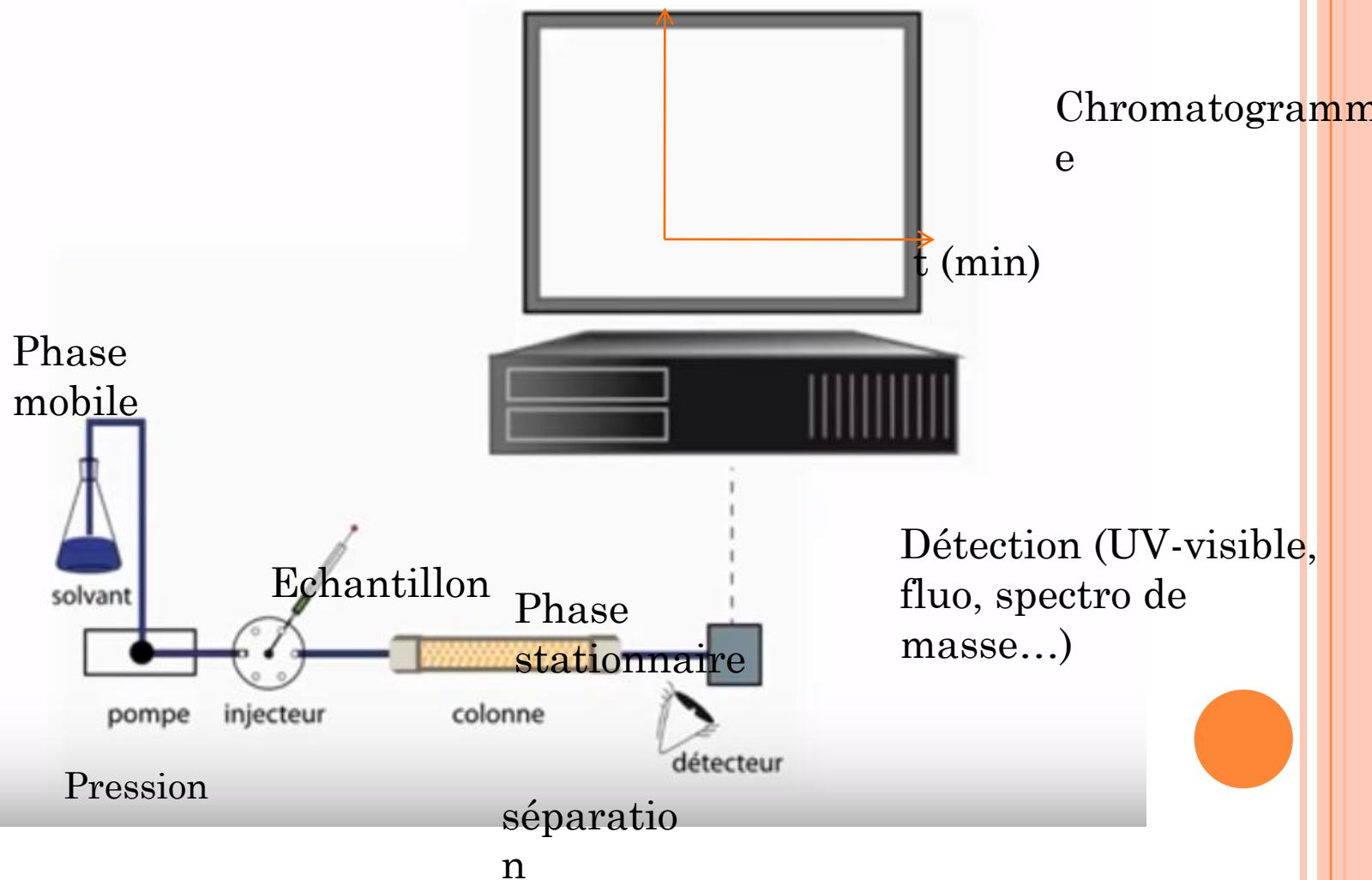
PRINCIPALES APPLICATIONS

- La chromatographie en phase gazeuse sert surtout pour l'analyse de liquide thermiquement stables et assez volatils et pour séparer les petites molécules avec des quantités de l'ordre de quelque picogrammes.

- analyse pétrochimique
- industrie des arômes ,des parfums
- environnement
- indus pharmaceutique



CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)



- ✓ **Chromatographie**: séparation et quantification
- ✓ **Liquide**: travail en solution
- ✓ **Haute performance**: Grande efficacité de la séparation



Comparaison CPG-CLHP

- CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse :
 - composés volatils,
 - faibles masses molaires
- CLHP:
 - toutes molécules trouvent un solvant pour y être dissoutes :**méthode universelle**



OBJECTIFS

- Séparation individuelle de constituants dans un mélange complexe
- Mise en solution dans un solvant ou un mélange de solvant (éluant)
- Analyse qualitative
- Analyse quantitative



INTÉRÊT

- Technique non destructive: permet d'isoler, de purifier des produits.
- Analyse de composés:
 - fortement polaires
 - P.M. élevé
 - système souvent facilement automatisable



ORIGINE DE LA HPLC

- La HPLC, constitue une technique analytique très générale d'emploi.
- Elle dérive de la forme la plus ancienne de la **chromatographie liquide sur colonne** dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

- Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne.
- Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable.
- La migration forcée d'une phase liquide au contact d'une phase stationnaire se retrouve dans plusieurs techniques chromatographiques. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des **mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire** basés sur les **coefficients d'adsorption ou de partage**.



PRINCIPE

Principe d'une séparation

- **Temps d'analyse:** minimal
- **Performance:** maximale



Processus chromatographique



Phénomène
d'adsorption et de
désorption répétés



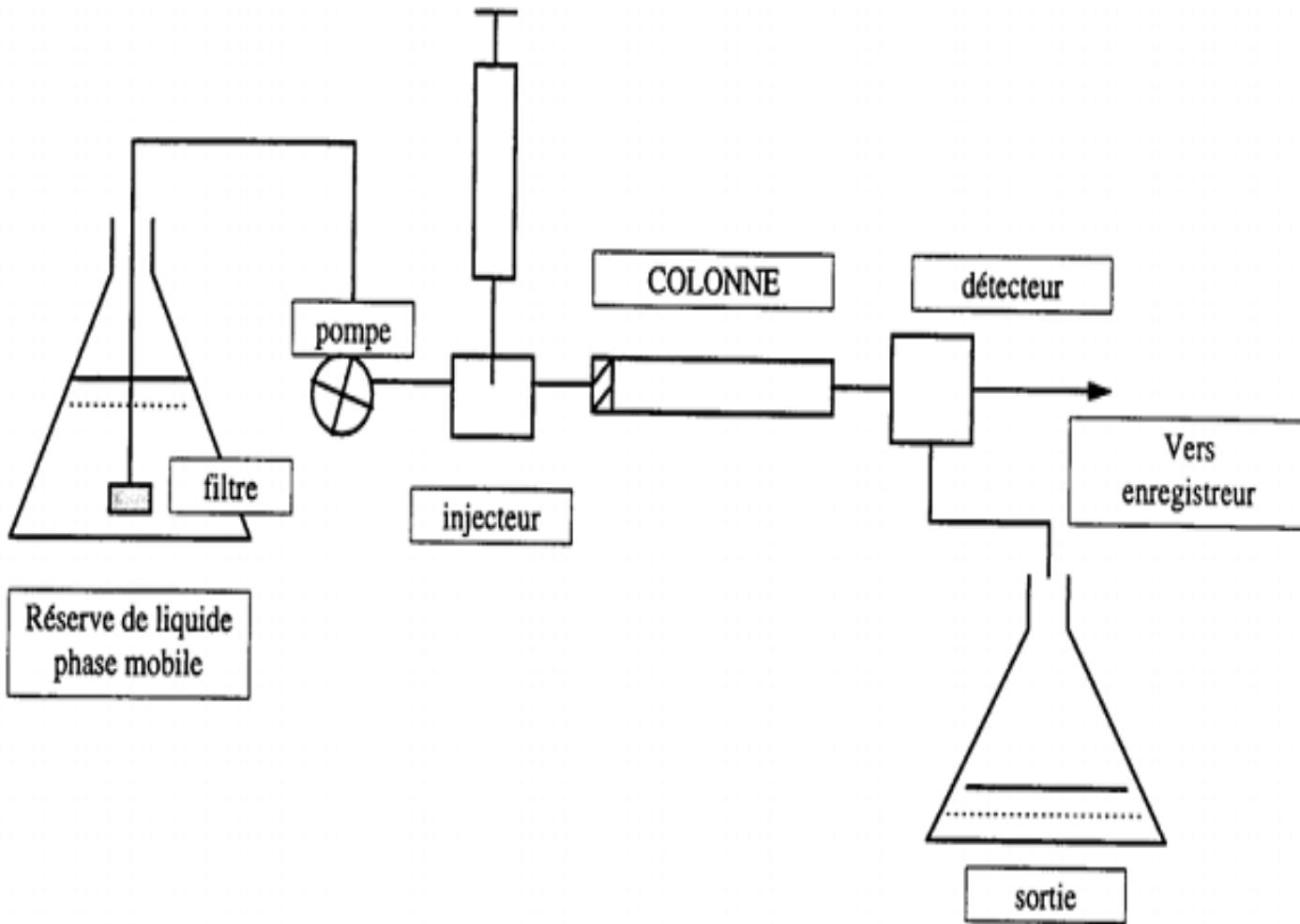


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC

LES ORGANES

a) Un réservoir de solvant (éluant)

- qui contient la phase mobile en quantité suffisante.
- Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

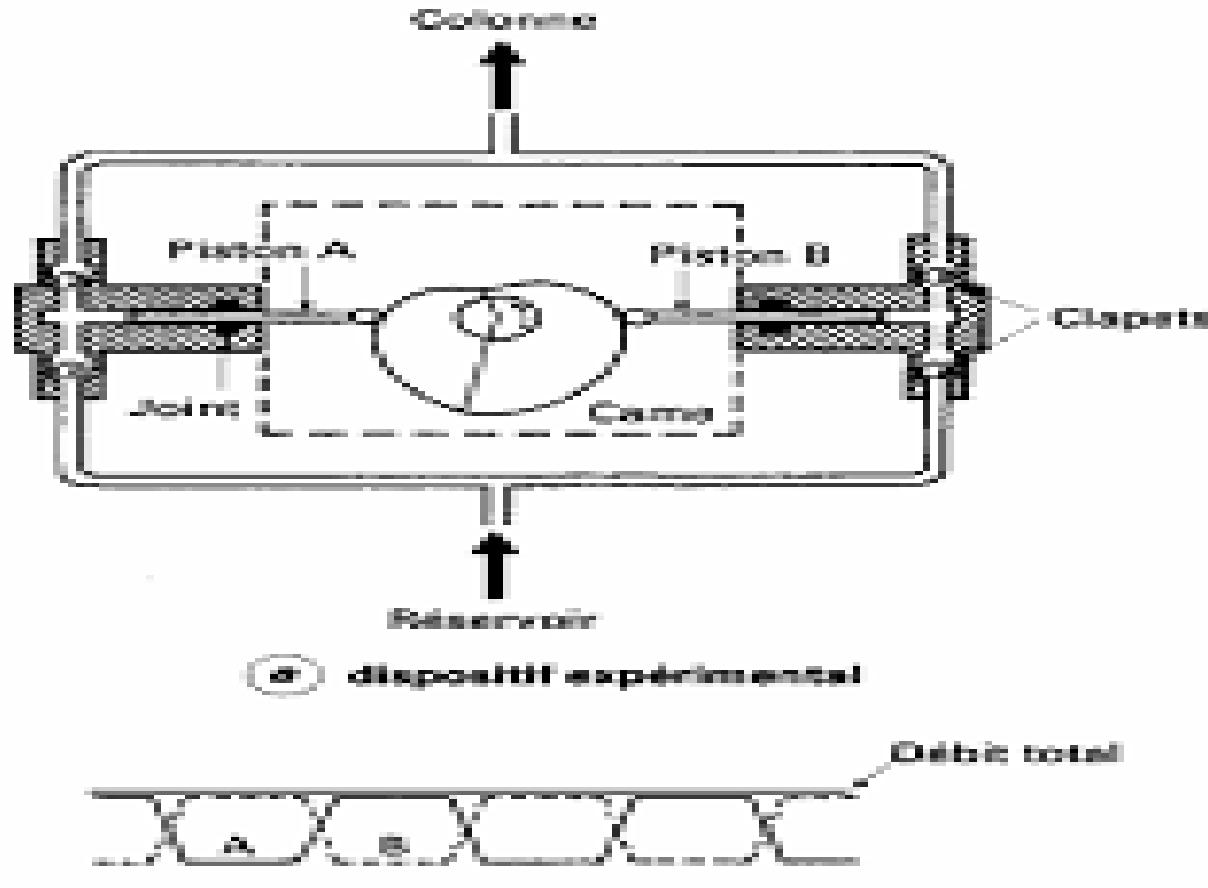


b) La pompe :

- elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:
 - en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
 - en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.
- Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μ l à plusieurs ml/min.



- Délivrer un **débit** constant sous une **pression** élevée, constante



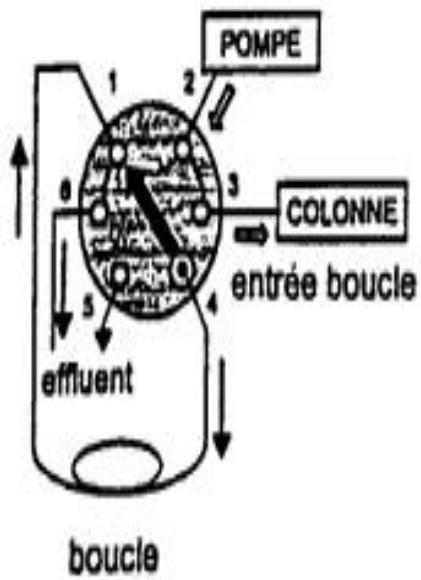
dispositif expérimental

profils du débit délivré par chacun des deux pistons A et B
et du débit total

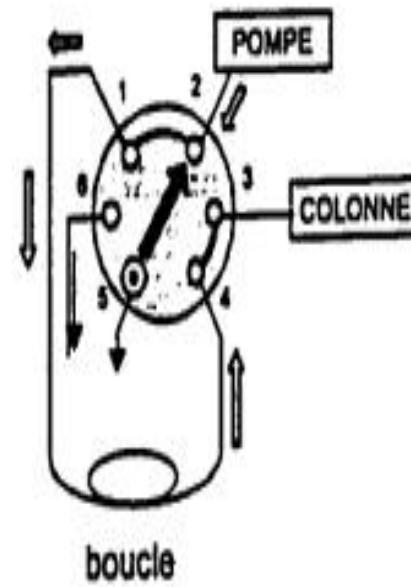
c) Vanne d'injection :

- c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes.
- Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.
- Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.



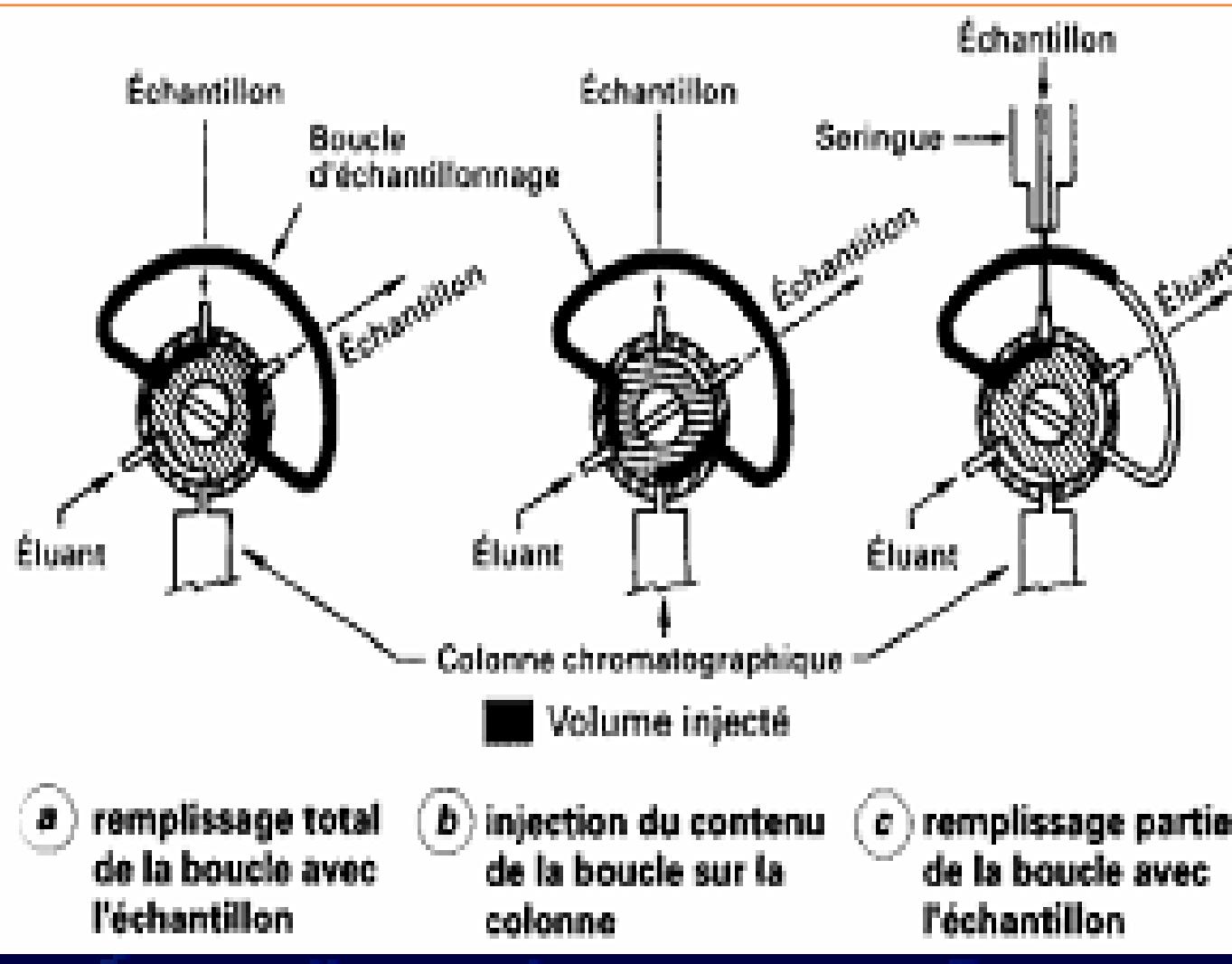


a) chargement



b) injection

Figure 4 : les deux phases de l'injection avec une boucle



Boucles d'injection

d) La colonne



- Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre.
- Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm.
- Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

e) La phase stationnaire

La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice.

- Ce matériau est **très polaire**. Il faut donc utiliser un **éluant apolaire**.
- Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.
- L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.



La phase inverse :

- La phase inverse est majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18).
- Cette phase est **apolaire** et nécessite donc un **éluant polaire**.
- Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.
Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

- **La phase mobile :**
- L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.



- Rôle actif dans le mécanisme de séparation
son choix dépend :
 - du type de chromatographie
 - de la polarité des composés étudiés
 - du type de détecteur utilisé
 - constituée par un ou plusieurs éléments



- La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :
 - - si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
 - - si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

- En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention des composés.
- Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales.
- Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus.
- On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution).



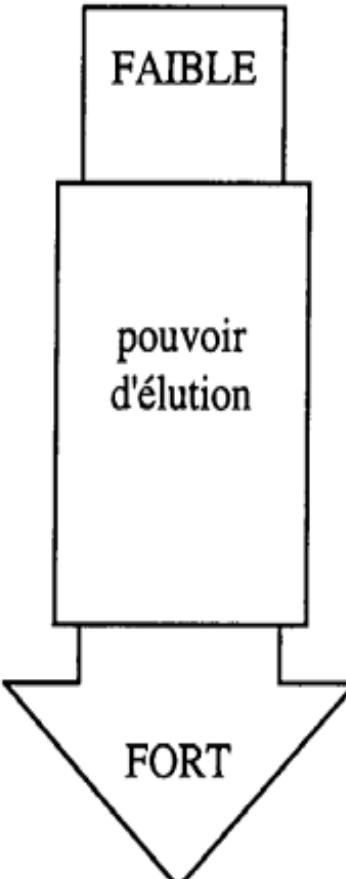
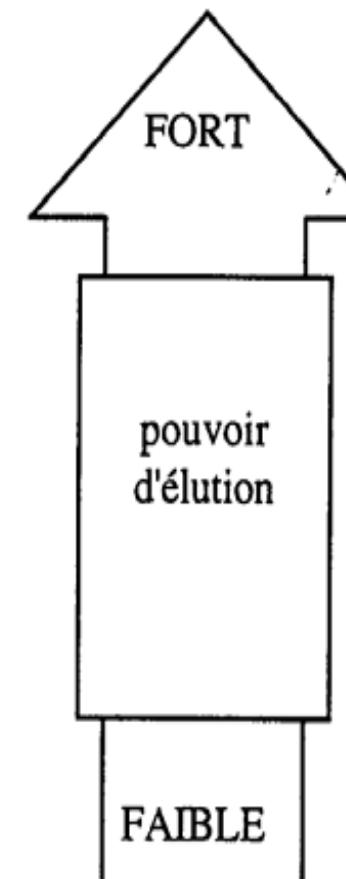
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
 <p>FAIBLE</p> <p>pouvoir d'élution</p> <p>FORT</p>	<p>hexane</p> <p>toluène</p> <p>trichlorométhane</p> <p>dichlorométhane</p> <p>éther</p> <p>acétate d'éthyle</p> <p>acétonitrile</p> <p>méthanol</p> <p>eau</p>	 <p>FORT</p> <p>pouvoir d'élution</p> <p>FAIBLE</p>

tableau 1 : pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

f) DéTECTEURS

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés

- **détecteur UV-visible** : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.
 - La lampe Deuterium est utilisé pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé à la longueur d'onde non variable de 254 nm.
 - Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :
 - le produit à détecter吸光 la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption ϵ soit suffisamment grand ;
 - la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

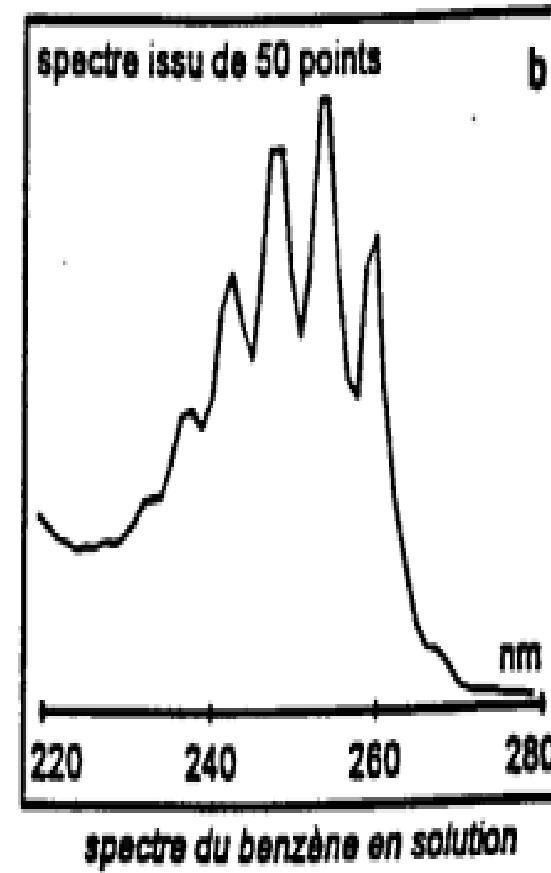
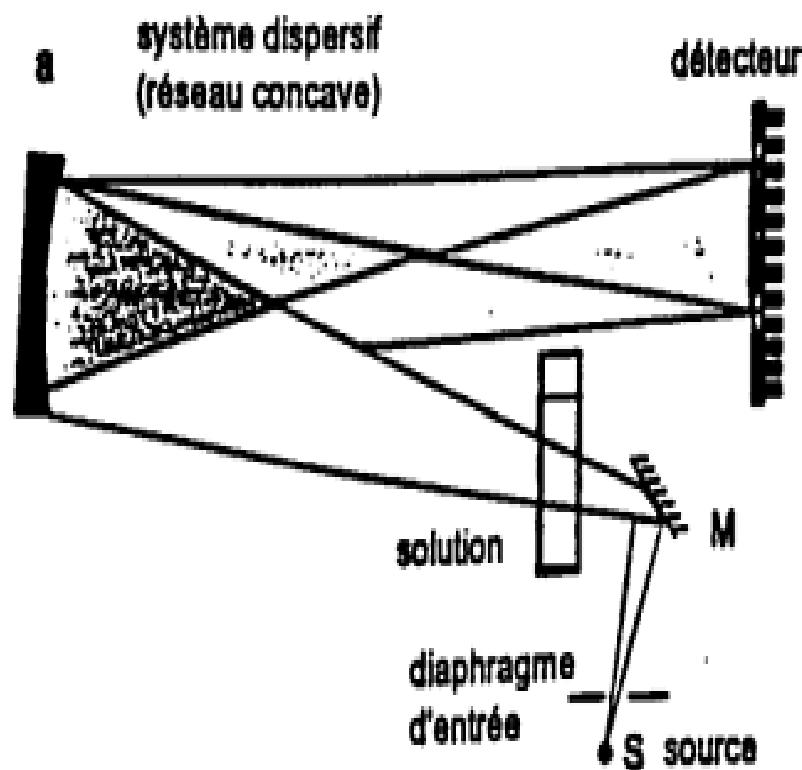


Figure 5: Principe du détecteur UV

○ Réfractomètre :

- il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne.
- Cette mesure, extrêmement précise, dépend de la température du liquide.
- On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice.
- Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.
- Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une -station d'acquisition.

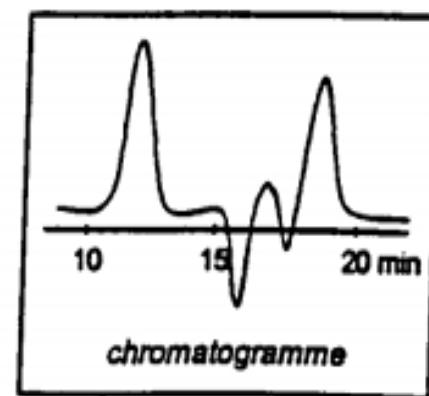
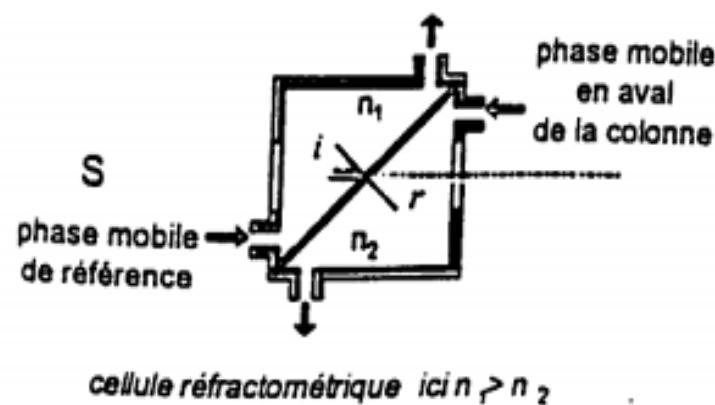
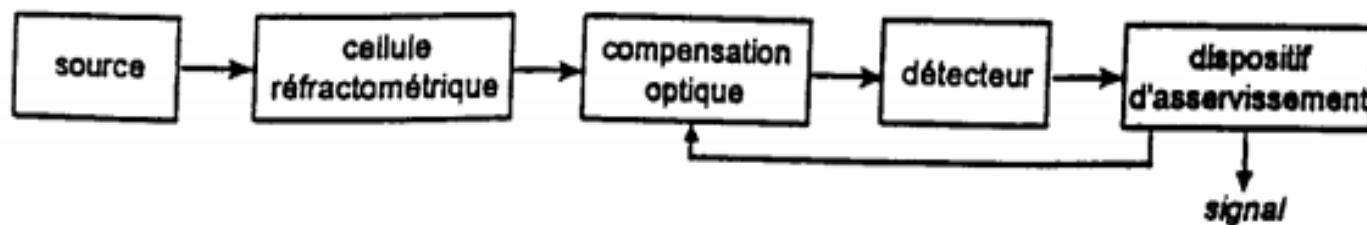


Figure 6 : Trajet optique du détecteur RI

COUPLAGES

Identifier les produits sortants par :

-
- Spectrométrie de masse
-
- Résonance magnétique nucléaire
-
- Spectroscopie Infra-Rouge



FACTEURS D'OPTIMISATION

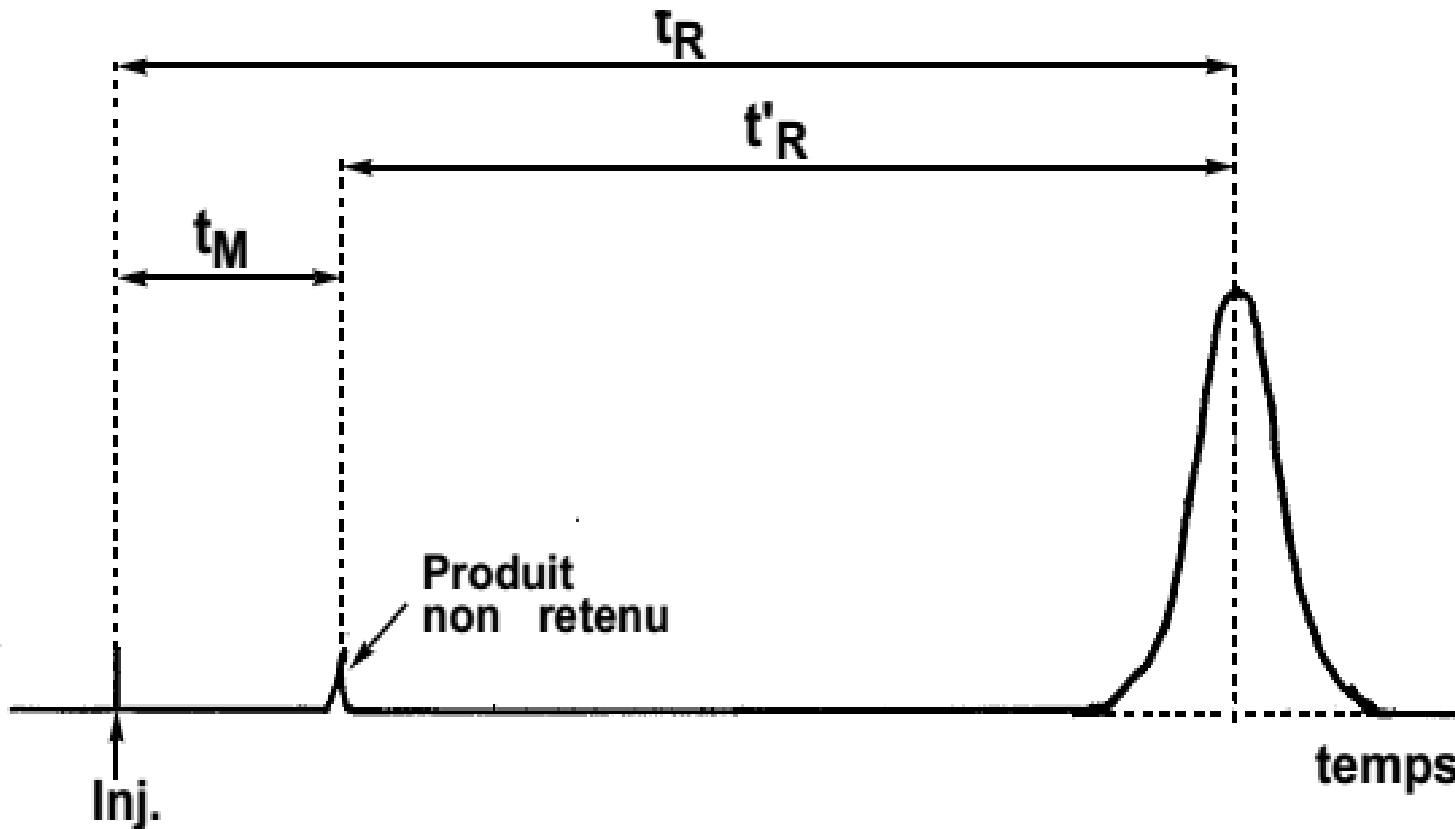
- Colonne (longueur, diamètre, particules...)
- Débit – Pression
- Eluant (%polaire apolaire, pH)
- Température



NOTIONS FONDAMENTALES

○ A-) TEMPS DE RETENTION (T.R.)

- Séparation des composés en fonction du temps



- Le t.R. peut-être divise en deux termes t_M ET $t'R$.

$$t'R = t_R - t_M$$

$t'R$ = t.R. réduit = temps de séjour d'un composé dans la phase stationnaire.

tM = temps de séjour dans la phase mobile



- **B - FACTEUR DE CAPACITE**
- Permet d'exprimer le temps de “fixation” “d’adsorption”, sur la phase stationnaire, des différents composés d'un mélange.

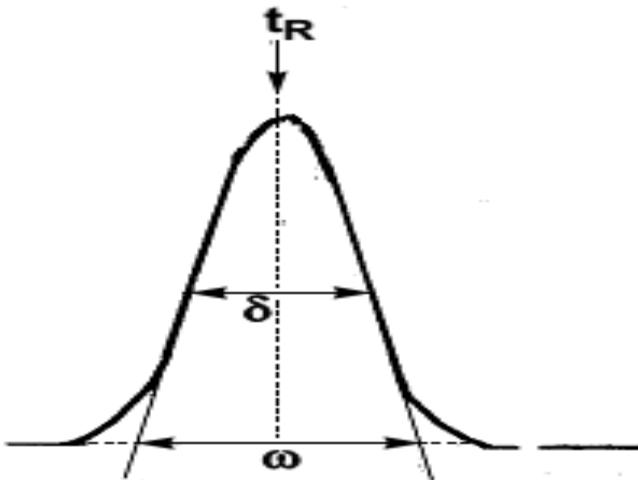
$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

EN PRATIQUE :

$$1 < k' < 10$$



C - CARACTERISTIQUES D'UN PIC -NOTION DE PLATEAUX THEORIQUES -



ω : LARGEUR DU PIC A LA BASE

δ : LARGEUR DU PIC A MI-HAUTEUR

° **NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES :**

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad \text{OU} \quad n = 5,545 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

CHROMATOGRAPHIE À FLUX LATÉRAL IMMUNO-CHROMATOGRAPHIE

Anticorps/ antigène complexe

Technique de séparation

Test de diagnostic ou de dépistage rapide (quelques minutes) sur bandelettes qui font apparaître une coloration particulière permettant d'interpréter immédiatement le résultat.

Technique simple, rapide et peu coûteuse.



- La 1^{er} zone: **zone de réaction**: Les anticorps munie d'enzyme s'accroche au hCG
- Ensuite l'urine attrape toutes les enzymes AB1 et les amène à la 2^{ème} zone : **zone de test** ou le résultat apparait, à l'abri dans cette zone y a d'autre anticorps qui resteront collé au hCG
- C'est un essai en sandwich: si hCG est présente elle sera prise entre les enzyme AB1 et AB2 et maintenu dans la zone. Permettant aux enzymes libérant du colorant de faire leur travail pour faire apparaître un motif
- S'il n ya pas d'hCG, la vague d'urine et d'enzyme continu son chemin
- En fin il y a un dernier arrêt la 3^{ème} zone: **zone de contrôle**, comme dans toute bonne expérience cette étape confirme que le test fonctionne correctement. Même si les enzymes AB1 ne décèlent pas d'hCG, ou qu'elles sont en surplus car elles ont surchargé la zone 1, toutes les enzymes AB1 ramassé en zone 1 devraient arrivé ici et activé d'avantage de colorant
- Si aucun motif n'apparait cela indique que le test est défectueux