

CHAPITRE I LES MÉTHODES DE SÉPARATION CLASSIQUES

1. Extraction

1.1. Définition

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique, elle utilise un solvant d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ces propriétés chimiques et/ou physiques. Le solvant d'extraction doit être non ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire doit posséder plus d'affinité avec le solvant d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange. Suivant la manière et le moyen utilisé, on a plusieurs techniques.

Tableau 1. Tableau de miscibilité des solvants

TABLE DE MISCIBILITE DES SOLVANTS	
☐	Miscible
■	Non-miscible
acide acétique	acide acétique
acétone	acétone
acétonitrile	acétonitrile
benzène	benzène
n-butanol	n-butanol
chloroforme	chloroforme
cyclohexane	cyclohexane
dichlorométhane	dichlorométhane
DMSO	DMSO
eau	eau
éthanol	éthanol
éthyle acétate	éthyle acétate
éther éthylique	éther éthylique
hexane	hexane
iso-octane	iso-octane
méthanol	méthanol
2-propanol	2-propanol

1.2. Principe

Elle est basée sur la solubilité différentielle d'une même substance dans deux solvants non miscible. Dans le cas où l'un des solvants est constitué par l'eau, le second doit être un liquide de faible constante diélectrique, solvant organique inerte de préférence.

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

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

1.3. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide consiste à faire passer une substance d'un solide vers un solvant dans lequel elle est soluble et dont elle sera facilement isolable.

Le processus nécessite un long contact du solvant avec le solide préalablement broyé avant l'extraction. Il existe deux types d'extraction solide-liquide.

1.3.1. Extraction solide-liquide continue

L'extraction continue est une méthode beaucoup plus longue que l'extraction discontinue, mais plus efficace.

1.3.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle. Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La vapeur va détruire la structure des cellules végétales qui vont libérer leurs huiles essentielles, puis les vapeurs d'eau et d'huile vont s'élever pour atteindre un réfrigérant constitué de deux tubes : le premier dans lequel passe la vapeur pour se liquéfier et le second qui l'entoure et qui dispose d'une entrée et d'une sortie à travers lequel on fait circuler de l'eau à température ambiante en continu pour refroidir. On récupère, par gravité le distillat dans un récipient. La séparation des constituants est d'autant meilleure que le réfrigérant est long (Figure 1).

•La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures, selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en œuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus.

•L'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.

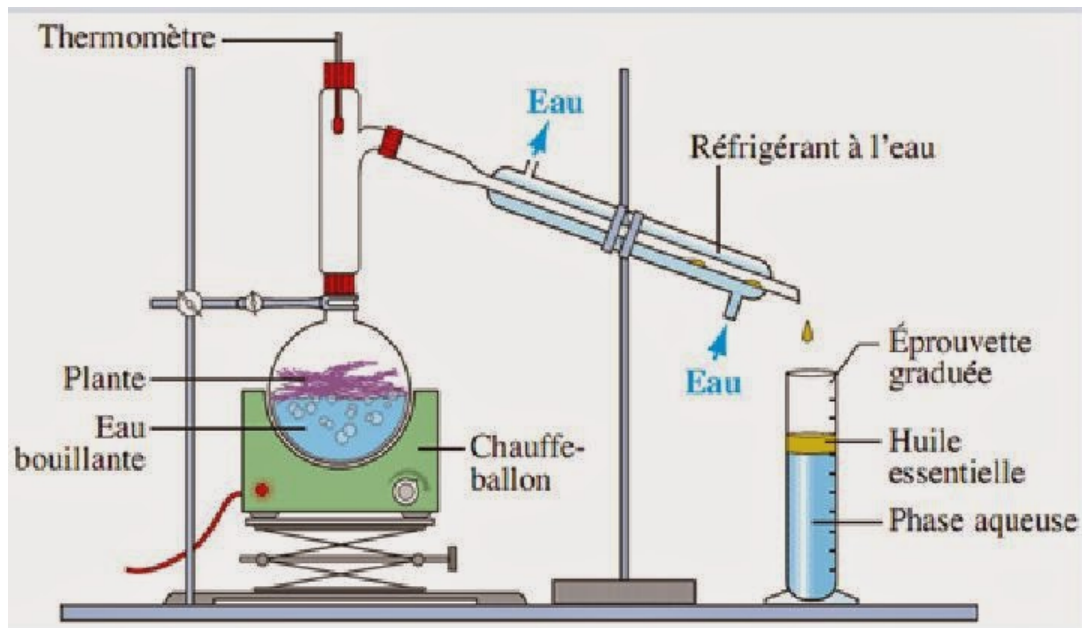


Figure 1. Montage de l'hydrodistillation

1.3.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est une technique très ancienne tout comme l'hydrodistillation. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Elle consiste à récupérer l'huile essentielle contenue dans les cellules végétales au moyen de la vapeur d'eau. La matière première aromatique naturelle est mise dans un alambic dans lequel est injecté de la vapeur d'eau formée par une chaudière ou un générateur. La vapeur d'eau détruit la structure des cellules végétales pour libérer les molécules odorantes. La vapeur chargée d'huile essentielle.

On liquéfiera et récupérera de la même façon que pour l'hydrodistillation (Figure 2).

•L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

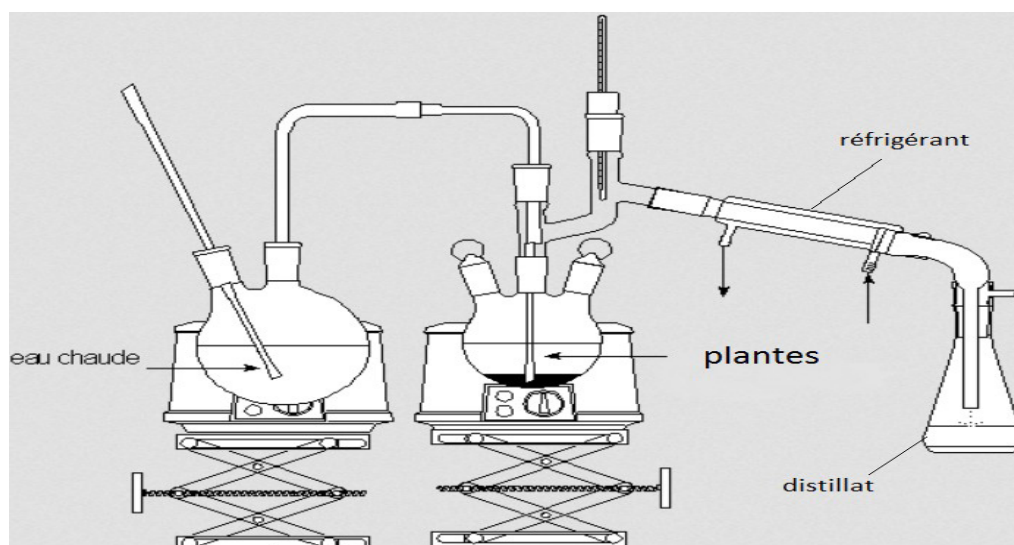


Figure 2. Montage de distillation par entraînement à la vapeur.

• **Percolation** : elle consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance finement pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans la solvant poreux et épais ou une pochette de papier filtre.

1.3.1.3. Extracteur de Soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition, puis condensé avec réfrigérant à boules, ce solvant pur et chaud alimente la cartouche contenant le solide. Lorsque la cartouche est pleine, la solution obtenue (solvant et soluté) se vide automatiquement par siphonage (lixiviation) puis retourne dans le ballon où le solvant est de nouveau porté à l'ébullition. La lixiviation peut également être opérée par passage continu du solvant ou par vidanges manuelles successives (Figure 3).

Les Intérêts de l'extraction au Soxhlet est:

- Son utilisation permet d'utiliser des petites quantités de solvants ce qui est avantageux. Par ailleurs, le solvant qui se condense est toujours pur. La solubilisation de la substance est donc favorisée grâce à des meilleurs coefficients de partage.
- l'extraction d'un composé soluble dans le solvant utilisé : les impuretés (insolubles) restent dans la cartouche, le composé se concentre dans le ballon, dissout dans le solvant. Si la solubilité du composé n'est pas très grande, on pourra même observer sa

recristallisation lors du refroidissement du ballon, après avoir arrêté le fonctionnement de l'appareil.

L'extraction par Soxhlet peut présenter quelques inconvénients :

- La taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable
- L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques

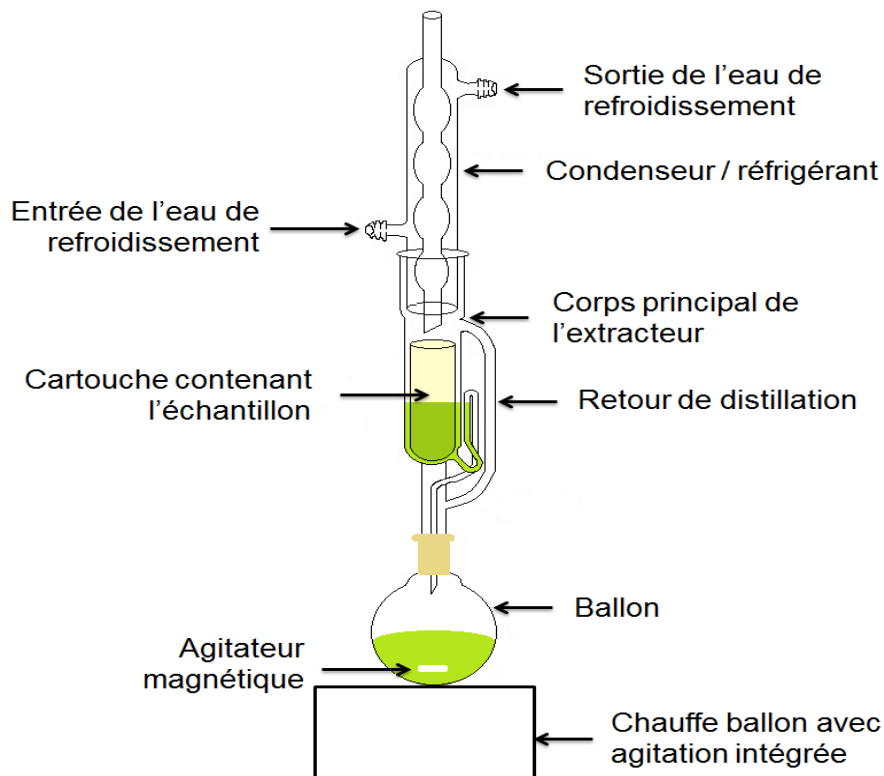


Figure 3. Extracteur de Soxhlet

1.3.2. Extraction solide-liquide discontinue

1.3.2. 1. La macération

Elle consiste à laisser séjourner la matière première végétale dans un solvant (eau, alcool) à température ambiante pour en extraire les constituants solubles (polyphénols). Après filtration, on peut répéter l'opération sur le résidu avec une nouvelle portion de solvant (Figure 4).

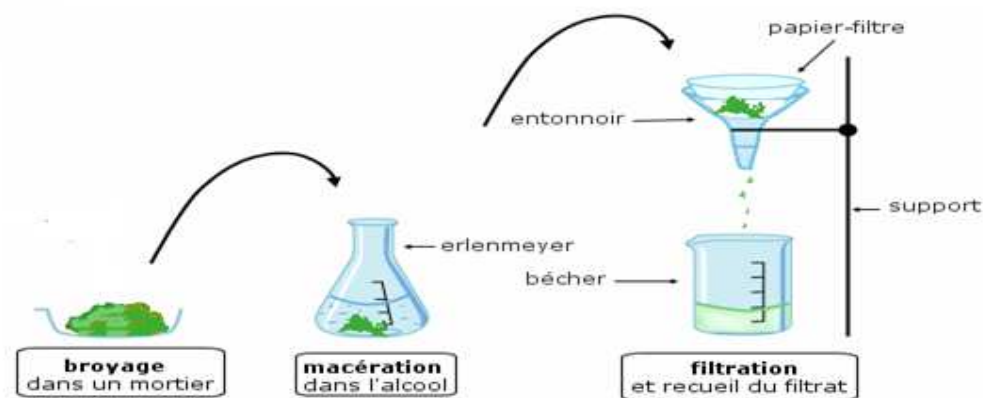


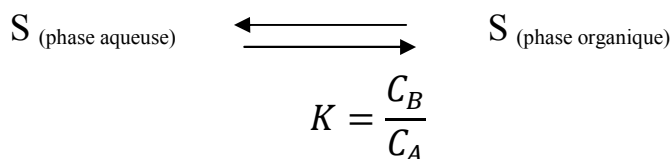
Figure 4. Macération

1.4. Extraction liquide - liquide

Elle consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique ou inversement, en utilisant pour cela deux solvants (l'un aqueux et l'autre organique), non miscibles. Deux paramètres sont importants lors d'une extraction : le coefficient de partage et le taux de distribution.

Le coefficient de partage

La plupart des extractions consistent à extraire un soluté d'un solvant aqueux/hydrophile (noté A par convention) par un solvant organique/hydrophobe (noté B). Le coefficient de partage « K » est le rapport des concentrations de la substance S dans les deux phases, à l'équilibre.



Le taux de distribution

Dans le cas où les solvants ne sont pas parfaitement non miscibles, le coefficient de partage ne peut pas être directement utilisé. Le taux de distribution (ou de répartition) « D » est le rapport entre les concentrations totales de la substance S dans A et B quelque soit l'état dans lequel elle se trouve. On parle de *distribution non régulière* du soluté.

$$D = \frac{\sum C_B}{\sum C_A}$$

$$\text{Avec: } \sum C_A = [\text{forme initiale}]_A + [\text{forme modifiée}]_A$$
$$\sum C_B = [\text{forme initiale}]_B + [\text{forme modifiée}]_B$$

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide.

1.4.1 .Extraction liquide-liquide continue

Pour l'extraction continue, la solution à extraire est alimentée par un solvant pur recyclé en continue par distillation. On utilise pour cela un montage qui permet de recycler le solvant d'extraction (Figure 5).

Le montage de la Figure 5(A) est utilisé lorsque le solvant d'extraction est moins dense que la solution à extraire. Les vapeurs de solvant d'extraction émises par le ballon se condensent sur le réfrigérant et le liquide ainsi formé traverse la solution à extraire de bas en haut en se chargeant de soluté au passage. Quand le niveau de liquide dans le ballon d'extraction est atteint le coude, le solvant d'extraction retourne dans le ballon d'ébullition où il est à nouveau vaporisé. Le ballon d'ébullition s'enrichit donc en soluté. Un dispositif analogue existe pour les solvants d'extraction plus denses que la solution à extraire

Figure 5. Principe de l'extraction liquide -liquide continue

1.4.1. Extraction liquide-liquide discontinue

L'extraction liquide-liquide discontinue s'effectue par l'agitation vigoureuse du solvant et de la solution à extraire dans une ampoule à décanter (Figure 6).

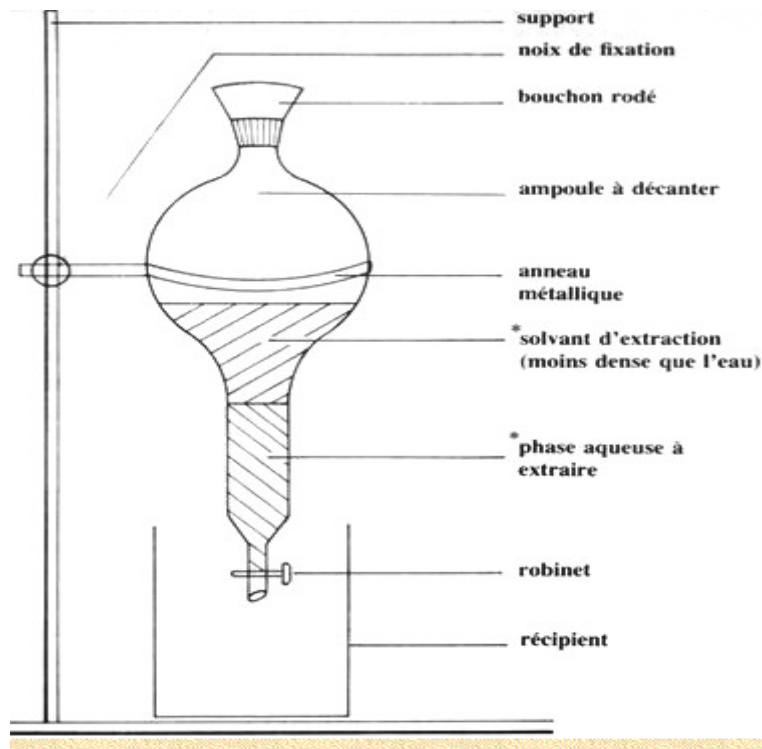


Figure 6. Ampoule à décanter

•Protocole d'extraction (Figure 7)

1- On introduit la solution à extraire et le solvant d'extraction dans l'ampoule à l'aide d'un entonnoir à liquide.

2- Après avoir bouché l'ampoule, on la tient retournée, à deux mains, et on agite énergiquement. Pour extraire le soluté de façon optimale, il faut atteindre l'équilibre de partage précédent. Or si on laisse le contenu de l'ampoule sans agitation, l'interface entre les deux phases est très faible et la diffusion du soluté d'une phase vers l'autre est lente. L'agitation énergique de l'ampoule permet d'augmenter cette interface et d'atteindre l'équilibre plus rapidement.

Il faut prendre soin de dégazer entre chaque agitation pour éviter une surpression dans l'ampoule. En effet, l'équilibre de mélange peut être exothermique et entraîner une légère augmentation de température dans l'ampoule. Cela provoque une vaporisation du solvant le plus volatil qui met l'ampoule sous pression.

3- Il faut déboucher l'ampoule lorsqu'on la repose sur son support, toujours pour éviter une surpression. On doit ensuite laisser décanter les phases.

4- On récupère ensuite les deux phases séparément : la phase aqueuse est en générale plus dense que les phases organiques, à l'exception des solvants chlorés.

On recommence l'extraction de la phase aqueuse avec une nouvelle fraction de phase organique. Une fois l'extraction terminée, on réunit toutes les phases organiques pour le séchage.

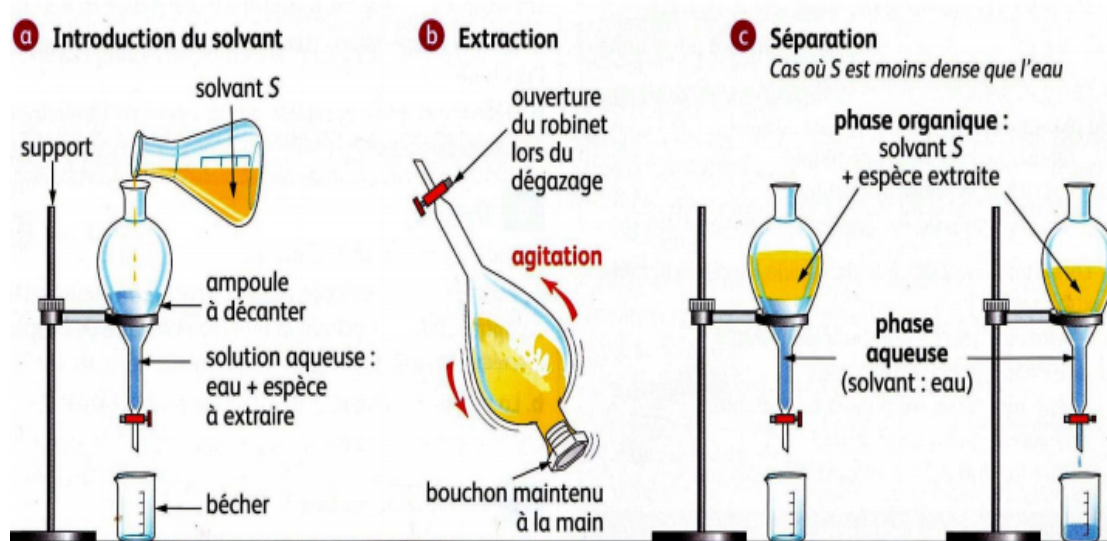


Figure 7. Le processus d'extraction

1.5. Solvant d'extraction

1.5.1. Propriétés des solvants d'extraction

Le solvant d'extraction doit obéir aux critères suivants:

- La solubilité : L'espèce chimique à extraire doit avoir une meilleure solubilité dans ce solvant que dans celui de la solution initial
- La miscibilité: Il ne doit pas être miscible avec le solvant de la solution initial (ils forment 2 phases)
- Le solvant extracteur ne doit pas réagir chimiquement avec l'espèce à extraire. La densité du solvant: Il est nécessaire de connaître ce paramètre car c'est lui qui détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au dessus ou en dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter.

- La volatilité élevée : Facilement éliminés après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire.
- Inertes chimiquement vis-à-vis de la solution à extraire.
- Peu toxiques que possible.

Avant d'utiliser un solvant, il faut étudier son étiquette pour prendre les précautions nécessaires et le manipuler en toute sécurité.

- L'extraction par solvant fait intervenir quatre étapes:

1. Relargage

Le relargage est une méthode destinée à améliorer la séparation entre une phase aqueuse et une phase organique lorsque la solubilité du produit organique dans l'eau n'est pas négligeable. Elle consiste à saturer la phase aqueuse avec un électrolyte indifférent (très souvent le chlorure de sodium). Cette addition augmente le pouvoir ionique de la phase aqueuse et diminue d'autant la solubilité des composés organiques dans celle-ci.

2. La décantation

Est réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter. En fonction de la nature du solvant utilisé et en particulier de sa densité par rapport à celle de l'eau, la phase organique à récupérer se situera au dessus ou en dessous.

3. Séchage de la phase organique

Le séchage d'un composé organique liquide sert à éliminer les traces d'eau que contient le produit après la synthèse.

Les desséchants chimiques sont des solides inorganiques qui fixent l'eau lorsqu'ils sont ajoutés au milieu humide. Ils sont choisis parmi des **sels anhydres** susceptibles de s'hydrater: **MgSO₄** (le plus efficace), **Na₂SO₄**, **CaCl₂** (pour les hydrocarbures et les dérivés halogénés).

4. Évaporation du solvant d'extraction

C'est un procédé physique de séparation des solutions par vaporisation du solvant. Les appareils permettant d'effectuer ce procédé sont appelés évaporateurs.

Le principe de fonctionnement de l'évaporation rotatif repose sur l'évaporation et la condensation du solvant à l'aide d'un ballon d'évaporation rotatif. Pour chasser le solvant plus rapidement, il est possible de travailler sous pression réduite.

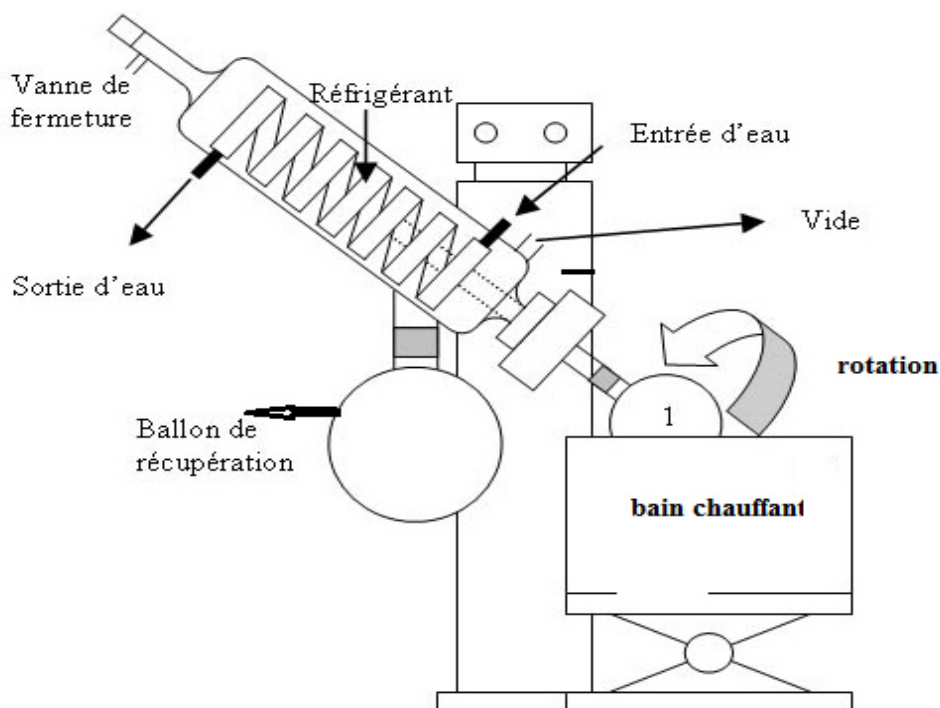


Figure 8. Évaporateur rotatif

1.5.2. Quelques solvants d'extraction

Le Tableau 2 regroupe Les avantages et les inconvénients des solvants usuels lors des extractions

Tableau 2. Les avantages et les inconvénients de quelques solvants d'extraction

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

2. La distillation

2.1. Principe

La distillation est une technique de séparation des constituants d'un mélange Liquide. Elle consiste à porter le mélange à ébullition et à recueillir, après une succession de vaporisation et de condensation, une fraction dite légère appelée le distillat. Celui-ci correspond au produit le plus volatil qui a le point d'ébullition le plus bas et qui distillat en premier .Dans le ballon, il reste la fraction dite lourde appelée le résidu. La conception de l'appareil dépend de la nature du mélange à séparer.

Le principe des différentes techniques de distillation fait appel aux lois qui régissent l'équilibre liquide-vapeur des corps purs et des mélanges.

Les applications usuelles de la distillation sont:

- L'élimination d'un produit en cours de réaction chimique ou d'un solvant
- L'isolement d'un composé naturel ou plusieurs composés, obtenus après une réaction chimique
- La purification d'un composé

2.2. Les techniques de distillation

2.2.1. Distillation simple

Une distillation est dite simple lorsque l'appareillage est monté sans colonne à distiller et sans analyseur pour réguler le prélèvement du reflux. Le distillat est le produit d'une seule opération d'ébullition et de condensation.

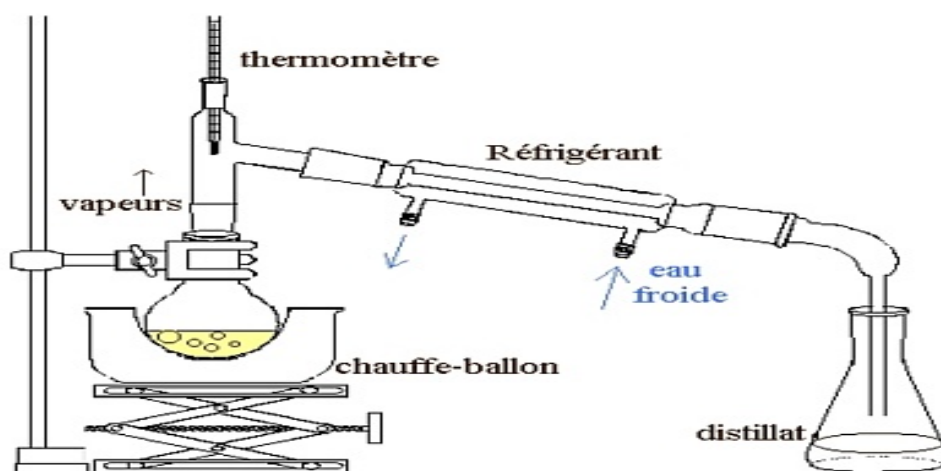


Figure 9. Montage de distillation simple

2.2.2. Distillation fractionnée (à pression atmosphérique)

Le principe de la distillation fractionnée est de séparer des liquides miscibles ; son principe repose sur la différence des températures d'ébullition de ces composés. Plus cette différence est grande, plus il sera facile de les séparer.

Par rapport au montage d'hydrodistillation, **on ajoute une colonne de Vigreux** entre le ballon et la tête de distillation. La colonne de Vigreux possède des pics qui convergent vers l'intérieur, obligeant les vapeurs à parcourir une distance plus longue, ce qui permet une meilleure séparation entre les composés.

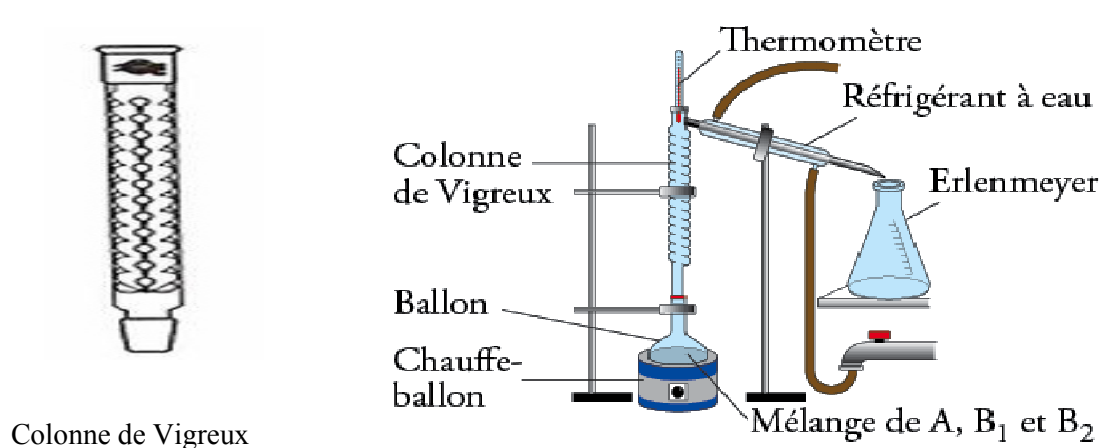


Figure 10. Montage de distillation fractionnée

2.2.3. Distillation sous pression réduite

Une distillation sous pression réduite permet de distiller :

- des composés dont le point d'ébullition sous pression atmosphérique est élevé et impossible à atteindre avec les moyens de chauffage « classiques »
- des composés « fragiles » qui se dégradent thermiquement ou qui s'oxydent à l'air

En pratique, les composés dont la température d'ébullition est supérieure à 150 °C sont généralement distillés sous pression réduite.

Le montage est essentiellement le même que celui de la distillation simple, à l'exception de l'allonge coudée qui est étanche aux deux bouts, et munie d'une prise pour une pompe à vide. On installe normalement un erlenmeyer à joint rodé ou un ballon au bout de l'allonge pour recueillir le liquide distillé. L'abaissement de la pression s'effectue soit à l'aide d'une pompe ou avec un trompe à eau.

Il existe deux types de séparateur de fractions :

- le séparateur rotatif (type de pis de vache) pour une manipulation simple.
- à robinet: séparateur de parkin ou de bertrand.

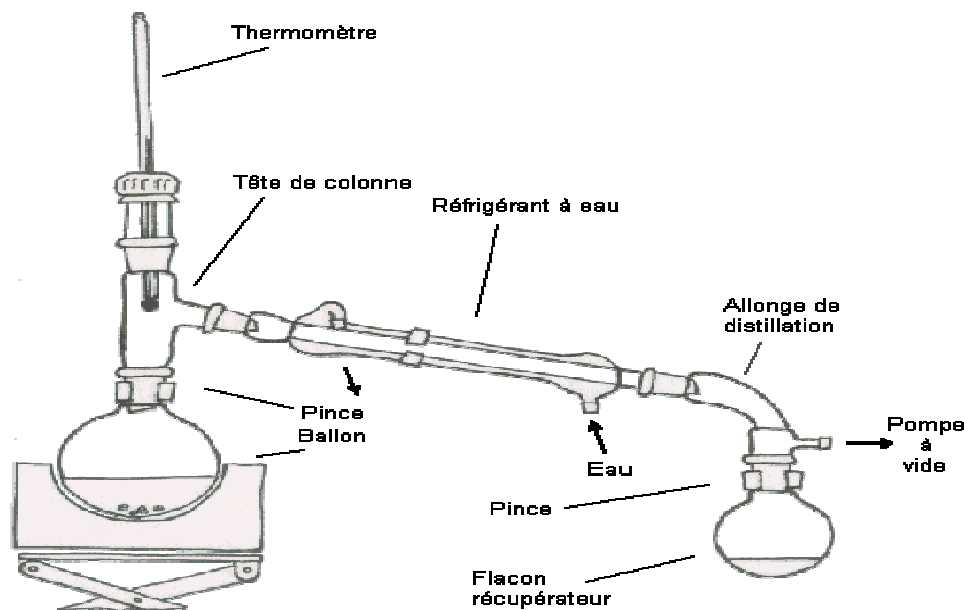


Figure 11. Montage de distillation sous pression réduite

2.2.4. Montage de Dean - Stark

On utilise le montage hétéroazéotropique de Dean Stark pour extraire l'eau du milieu réactionnel. L'appareil de Dean Stark en laboratoire se compose généralement d'un élément de verrerie cylindrique et vertical, étant généralement gradué sur toute sa longueur et se terminant par un robinet, tout comme une burette. Le haut du cylindre est ajusté au bas du condenseur à reflux, mais possède aussi un bras qui est ajusté au ballon ou réacteur contenant le milieu réactionnel.

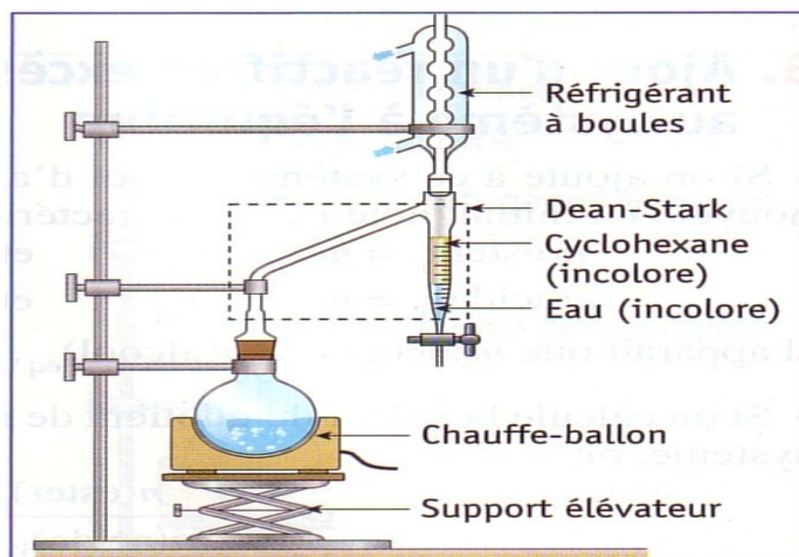


Figure 12. Montage de Dean - Stark

3. La filtration

3.1. Définition

La filtration est une technique de séparation. Elle consiste à faire passer une suspension à travers un milieu poreux pour y retenir les particules solides tout en laissant passer la fraction liquide. La filtration s'effectue sous pression atmosphérique, sous pression réduite, à chaud ou à froid.

Il existe deux types de filtrations :

- Filtration par gravité
- Filtration sous pression réduite

3.2. Filtration par gravité

Le mélange est soumis uniquement à la pression atmosphérique. Le liquide passe à travers le support filtrant, tandis que le solide est récupéré sur le support filtrant.

Le filtre utilisé est en papier dont la porosité devra être choisie en fonction de la granulométrie du solide à filtrer. Le papier filtre est placé dans un entonnoir. Il existe différents types de papier caractérisés par la taille des pores, par sa rétention de liquide et sa vitesse de filtration.

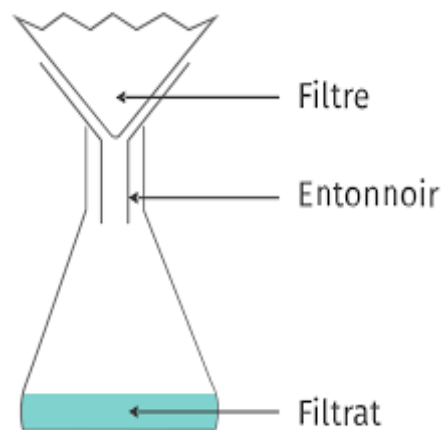


Figure 13. La filtration par gravité.

3.3. Filtration sous pression réduite

La filtration sous pression réduite permet de diminuer significativement le temps de filtration. La réduction de la pression peut être effectuée à l'aide d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide.

3.3.1. Filtration sur Büchner

On utilise un entonnoir Büchner. Cet entonnoir généralement en porcelaine, présente un fond plat et percé. Le papier filtre est déposé sur le fond plat et humecté avec du solvant afin qu'il épouse bien la forme de l'entonnoir. Celui-ci est ensuite placé sur une fiole à vide (erlenmeyer en verre épais muni d'une sortie pour pouvoir effectuer le vide). Un adaptateur de forme conique en caoutchouc permet de faire l'étanchéité.

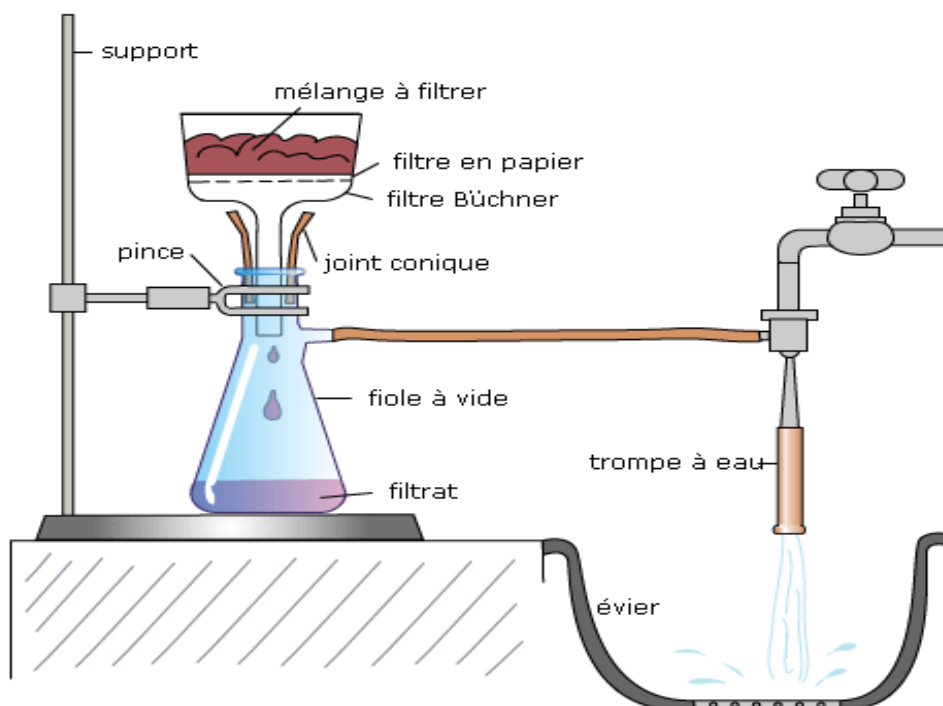


Figure 14. La filtration sur Büchner.

3.3.2. Filtration sur verre fritté

Les entonnoirs munis de verre frittés sont très pratiques mais bien que plus coûteux à l'achat. La porosité du verre fritté est indiquée par un numéro de 0 à 5 pour des pores de plus en plus petits. Comme pour le Büchner, l'entonnoir est placé sur une fiole à vide à l'aide d'un cône en caoutchouc qui permet de faire l'étanchéité.



Figure 15. Entonnoir de Filtration sur verre fritté

Tableau 3. Taille des pores en fonction de la porosité du verre fritté

Porosité	Taille des pores (μm)	Domaine d'application
0	160 à 250	gros précipités
1	100 à 160	précipités gélatineux
2	40 à 100	précipités cristallins
3	16 à 40	précipités mi-fins
4	10 à 16	précipités très fins
5	1 à 16	filtration bactérienne

3.4. Ultrafiltration (UF)

L'ultrafiltration utilise des membranes microporeuses dont les diamètres de pores sont compris entre 1 et 100 nm. De telles membranes laissent passer les petites molécules (eau, sels) et arrêtent les molécules de masse molaire élevée (polymères, protéines, colloïdes). Pour cette raison, cette technique est utilisée pour l'élimination de macro solutés, présents dans les effluents ou dans l'eau à usage domestique, industriel (électronique) ou médical. Les membranes d'ultrafiltration sont caractérisées par leur perméabilité et par leur seuil de coupure qui remplace la taille des pores lorsque les membranes sont classées par la sélectivité.

4. La recristallisation

4.1. Introduction

La recristallisation est une méthode de purification. Cette technique consiste à isoler un produit voulu à partir d'un mélange. En effet, quand des composés organiques sont isolés à la fin d'une réaction, ils sont rarement purs. Généralement, ils sont contaminés par des quantités plus ou moins importantes d'autres composés qui peuvent contenir : du produit de départ n'ayant pas réagi, un ou plusieurs produits secondaires qui sont souvent qualifiés d'impuretés. Pour cela, on joue sur les différences de solubilité des différents constituants du mélange. Le but est d'obtenir une solution sursaturée par dissolution des produits et des impuretés dans un ou plusieurs solvants. La quantité de produit qui cristallise correspond à la sursaturation. Pour obtenir la sursaturation, il faut dissoudre les produits dans un minimum de solvant.

4.2. Principe

La recristallisation est une technique de purification des solides qui repose sur la différence de solubilité, dans le solvant choisi, entre le composé à purifier et les impuretés, chaud et à froid. La purification est d'autant plus aisée que le taux initial d'impuretés est faible.

4.3. Étapes de la recristallisation

1. Dissolution de la substance à purifier

Le mélange (solide brut + solvant) est porté à ébullition tout en agitant. La dissolution doit être complète sans dépasser la quantité minimale de solvant nécessaire.

2. Filtration à chaud

La filtration permet d'éliminer les impuretés insolubles. Celle-ci, de même que le rinçage, sont effectués à chaud pour éviter un refroidissement brutal du solvant et une cristallisation trop rapide. Suivant les produits à purifier et le solvant de recristallisation, il est possible d'utiliser à cette étape du charbon activé. Le charbon a deux caractéristiques principales : il capte les particules en suspension et possède une forte affinité pour les molécules colorées. Du fait de sa grande surface spécifique une pointe de spatule est généralement suffisante pour traiter de grandes quantités (grammes) de produit. Toutefois, la filtration est plus délicate : l'utilisation de deux papiers filtres enchâssés est conseillée.

3. Refroidissement

La qualité des cristaux dépend de la vitesse de refroidissement de la solution : un refroidissement lent au contact de l'air ambiant, ensuite on immerge le récipient dans un bain d'eau puis dans un bain d'eau glacé.

4. Filtration sous pression réduite et lavage des cristaux

La deuxième filtration se fait toujours par aspiration en utilisant un filtre Büchner. Le produit doit être lavé avec le moins possible de solvant de recristallisation bien froid.

5. Séchage des cristaux

Le séchage à l'air libre est une méthode simple qui évite les problèmes liés au chauffage des cristaux : sublimation, fusion, décomposition, oxydation. Par contre, elle est lente. On peut diminuer sa durée en pressant les cristaux entre deux feuilles de papier filtre. L'utilisation d'une étuve permet de diminuer le temps de séchage : la température doit être choisie pour que le séchage soit le plus rapide possible tout en préservant la qualité du produit.

4.4. Choix du solvant

Le solvant de recristallisation doit répondre aux critères suivants :

-Le solvant choisi ne doit réagir ni avec le produit à recristalliser ni avec les impuretés présentes.

-La solubilité du produit doit être élevée dans le solvant chaud et très faible dans le solvant froid. En revanche, les impuretés doivent être solubles dans le solvant froid ou pouvoir être éliminées à chaud.

-La température d'ébullition du solvant doit être inférieure à la température de fusion du solide à recristalliser, sinon il apparaît une huile constituée du produit sous forme liquide et la cristallisation n'est pas possible.

- Le solvant est le moins toxique et le moins inflammable possible.

4.5. Recristallisation à chaud à deux solvants

La technique de recristallisation à chaud à deux solvants fait appel à un bon solvant : celui où le produit peut se dissoudre à chaud et un second solvant dans lequel il n'est pas soluble et que l'on appelle mauvais solvant.

- Dissolution à chaud dans le meilleur solvant.
- Addition graduelle de l'autre solvant jusqu'à l'apparition d'un trouble.
- Élimination du trouble par une nouvelle addition de quelques gouttes du premier solvant.

5. La centrifugation

5. 1. Introduction

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. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. Elle est techniques les plus importantes et les plus utilisées dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire et de la médecine.

Une centrifugeuse utilise la force centrifuge (force g) pour isoler les particules suspendues de leur milieu environnant. Les applications de centrifugation sont nombreuses et peuvent comprendre la sédimentation de cellules et de virus, la séparation d'organelles subcellulaires et l'isolation de macromolécules comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides.

5. 2. Principe

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières. Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à la gravité, force qui s'exerce du haut vers le bas, et à la poussée d'Archimède, force qui s'exerce du bas vers le haut. En dehors du cas particulier dans lequel ces deux forces sont parfaitement équilibrées. Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en x.g (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:

$$g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$$

g: la force relative de centrifugation.

r : le rayon de rotation du rotor (en cm)

N : la vitesse de rotation (rotations par minute: rpm) .

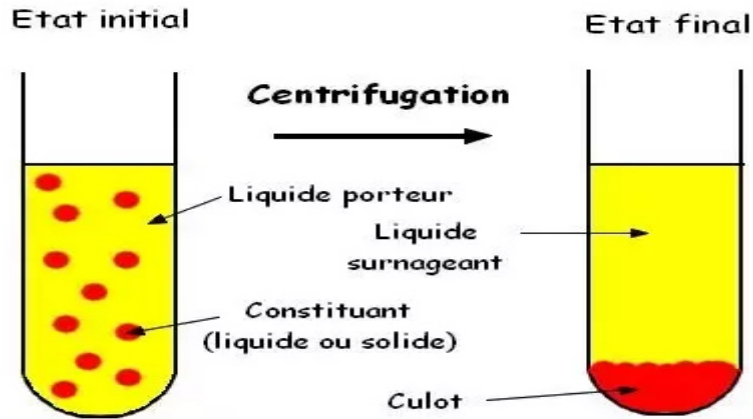


Figure 16 : Schéma de principe de la centrifugation

5. 3. La centrifugeuse

Une centrifugeuse est une machine équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte. Sur l'axe vertical il se pose un rotor qui est choisi en fonction du volume de liquide à centrifuger et selon une position basculante dans le cas d'une centrifugation horizontale ou une position fixe dans le cas d'une centrifugation oblique. Les tubes à centrifuger contenant la solution ou la suspension seront soumis à une force centrifuge beaucoup plus élevée que celle due à la pesanteur g ; si bien que les particules atteignent une vitesse limite relativement élevée dans un laps de temps très court.

Les échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux. Chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

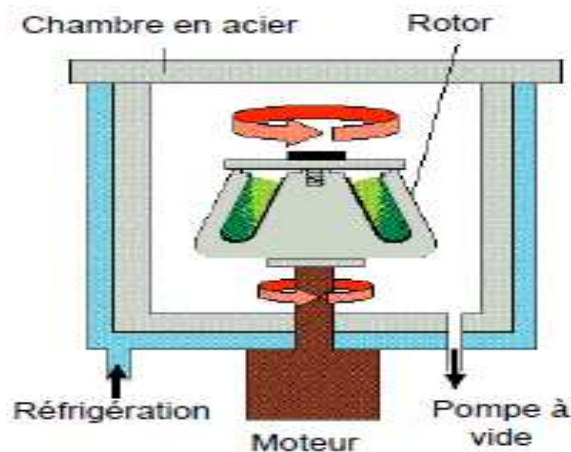


Figure 17 : Centrifugeuse

5. 4. Types de centrifugation

Il existe deux principaux types de centrifugation.

5. 4. 1. La centrifugation différentielle

La sédimentation se fait par la différence de vitesse de sédimentation entre les particules qui diffèrent selon la densité et les dimensions.

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat cellulaire en fonction de la taille et de la densité de ses constituants. L'homogénat est placé dans une centrifugeuse ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot, qui sera prélevé : A 1000 g, pendant 10 minutes, on observe la sédimentation du noyau et du cytosquelette. A 15 000 g, pendant 5 minutes, on observe la sédimentation des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes. A 100 000 g (ultracentrifugation), pendant 60 minutes on observe la sédimentation de la membrane plasmique, des microsomes et des grands polysomes. A 300 000 g, pendant 2 heures on observe la sédimentation des ribosomes et des petits polysomes. Ce qui reste à la fin c'est la fraction hydrosoluble du cytosol.

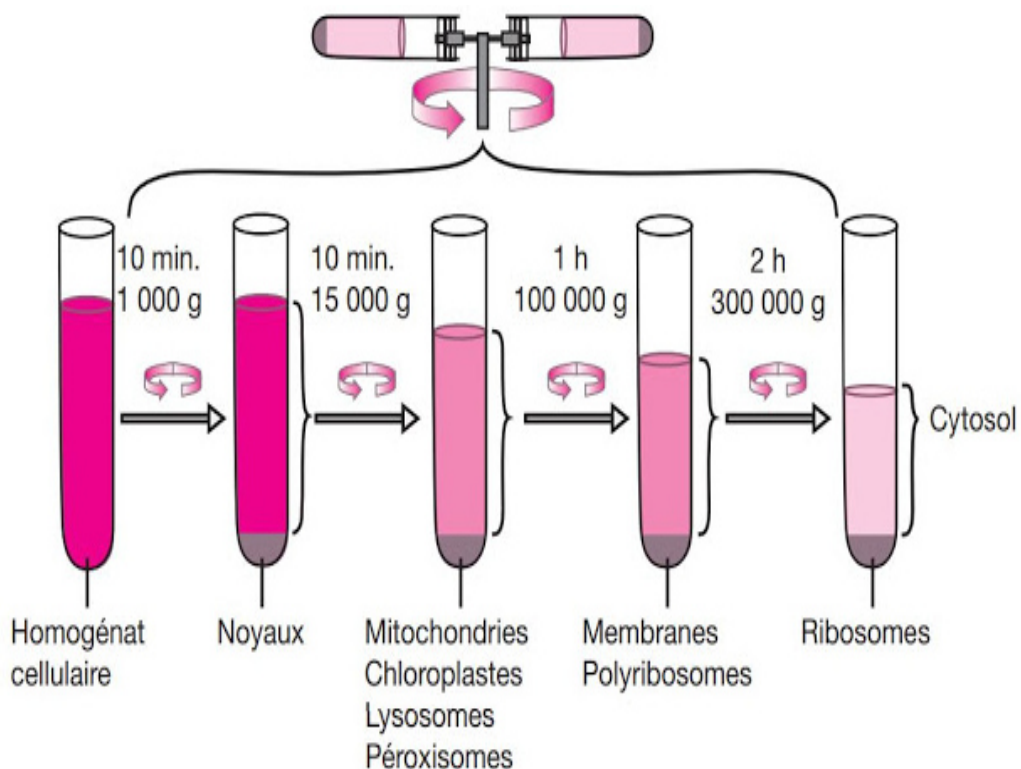


Figure 18. Principe de la centrifugation différentielle

5. 4. 2. Centrifugation en gradient de densité

La sédimentation se fait par un gradient de densité ainsi la différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs influençant la vitesse de sédimentation. Pour obtenir des solutions de densités différentes, deux gradients peuvent être utilisés, un gradient de saccharose formé préalablement à la centrifugation, et un gradient de chlorure de césium (CsCl).

Plus la vitesse de densité est grande, plus la sédimentation est rapide.

On distingue trois cas :

- Si la particule est moins dense que le milieu, elle s'élève et flotte à la surface
- Si la particule est plus dense que le milieu, elle se sédimente au fond de tube
- Si la particule et le milieu ont la même densité, aucune sédimentation n'est observée quel que soit la vitesse de rotation.

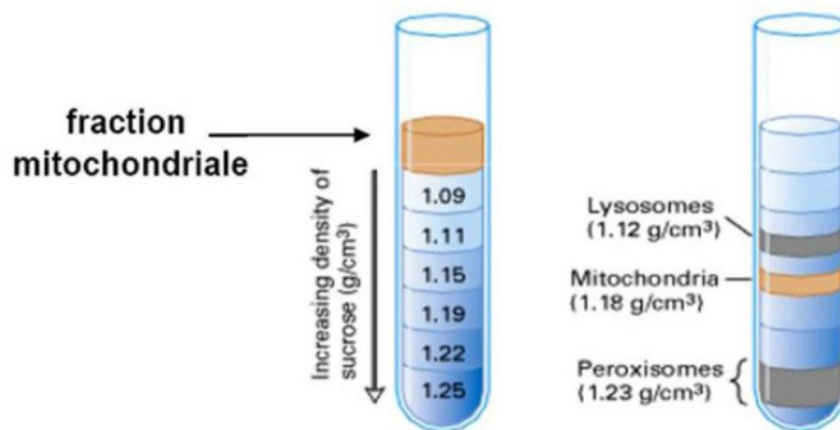


Figure 19 : principe de la centrifugation en gradient de densité

Il existe deux types de gradients : discontinus et continus. Dans les deux cas la vitesse de sédimentation ne doit pas intervenir. Il est donc nécessaire de laisser le temps aux particules d'atteindre leur position d'équilibre, ce qui implique des temps de centrifugation assez longs. Bien entendu, les particules les moins denses peuvent se retrouver au sommet du tube (particules moins denses que la solution la plus haute) et les particules les plus denses peuvent former un culot (particules plus denses que la solution la plus basse).