

**Matière : TAB**

**Niveau : L3**

**Chapitre III : La dialyse**

### **1.Introduction**

Il se produit souvent qu'une préparation de macromolécules contienne différents produits dont on veut se débarrasser. Ces produits, sels, glucides, détergents ou autres petites molécules, étaient présents dans la préparation initiale ou ont été introduits lors d'une étape de la purification. Une façon simple d'éliminer ces petites molécules est **la dialyse**. 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.

### **2.Définition et principe**

La dialyse est une technique de purification « élimination des sels et petites molécules ».

La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable.

Deux mécanismes entrent en jeu dans ce processus.

- Tout d'abord, les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. Il y aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque espèce chimique en solution subit individuellement ce processus. (Voir figure 1)
- À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre. Si le volume du liquide à l'extérieur du boudin est très grand par rapport à celui de la solution à dialyser, cette égalité des concentrations implique que la majorité des molécules diffusibles, en terme de quantité (poids), est en fait sortie de la solution.
- On peut amplifier cette élimination des molécules diffusibles en répétant ce processus.
  - Les molécules de petites tailles qui traversent la membrane du sac de dialyse sont qualifiées de **diffusibles**, celles qui sont trop grosses sont dites **non diffusibles**.

L'autre mécanisme implique les charges électriques des molécules. En effet, le gradient électrique joue aussi un rôle. Ce gradient électrique résulte de l'ensemble des espèces chargées de part et d'autre de la membrane. Ce dernier facteur est cependant négligeable dans la dialyse et, en pratique, on ne tient compte que du gradient de concentration.

### c. La dialyse est une forme de filtration moléculaire

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semipermeables dont les pores ont une taille inférieure aux macromolécules

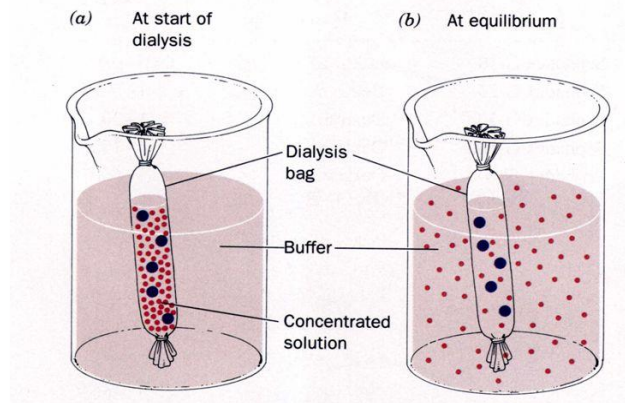


Figure 1

## 3. Méthodologie et appareillage

### Les membranes

La dialyse est réalisée grâce à un boudin de dialyse qui se vend sous forme de rouleau de plastique. Il est initialement conservé en contenant des composés tels que la glycine et les métaux lourds.

Les membranes utilisées sont des membranes en cellulose et dérivés.

### Préparation des membranes de dialyse

La meilleure méthode est le trempage dans de l'eau distillée pour éliminer tous les composants contaminants qui sont sauvegardés lors de la fabrication industrielle comme la glycine et les métaux lourds qu'il faut éliminer au préalable.

- La technique usuelle consiste à placer successivement les membranes :
  - 1h dans un mélange à volume égale d'éthanol et d'eau afin d'éliminer la glycine
  - 1h dans une solution de bicarbonate de sodium 10mM afin d'éliminer les composés sulfurés
  - 1h dans une solution diluée d'EDTA afin d'éliminer les métaux lourds qui est un agent fixant, par chélation, des métaux lourds
  - 2h dans de l'eau distillée

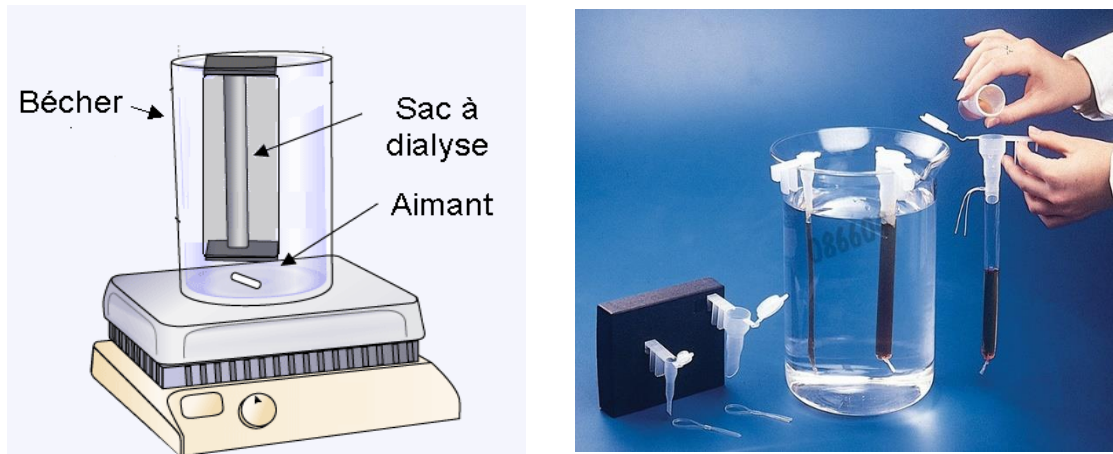
- La membrane ainsi préparée peut être conservée à 4°C pendant 2 à 3 jours dans de l'eau distillée.
- Dépassant ce délai, il est nécessaire 'ajouter des agents antimicrobiens tels que l'azide de sodium afin d'inhiber la croissance microbienne.
- Généralement, les boudins sont de nature cellulosique et ces dérivés : cellophane (acétate de cellulose).
- On place la solution à dialyser dans le sac de dialyse. On referme les deux bout formant ainsi un boudin. On place ce boudin dans la solution contre laquelle on veut faire la dialyse (liquide de contre-dialyse).
- Le boudin doit être immergé dans le liquide de contre dialyse
- Après dialyse : le liquide sortant est défini de **diffusat**  
Le liquide retenu est défini de **retentat**

Les membranes de dialyse sont caractérisées par une limite d'exclusion "**cut-off**" qui sert à donner une idée de la taille des molécules qui ne pourront pas la traverser (de masse supérieure à la limite) et de celles qui pourront (de masse inférieure à la limite). La plupart des membranes disponibles dans le commerce ont généralement une limite de l'ordre de 30 kDa.

### Remarque

Il faut comprendre que cette valeur est approximative car la taille ne varie par linéairement avec la masse, la géométrie de la particule est très importante. D'autre part, les pores des membranes ne sont pas tous identiques, certaines étant plus petits que d'autres. Des molécules de masse proche de la limite d'exclusion diffuseront donc probablement plus lentement.

- Il existe deux types de montage pour faire des dialyses.  
**Le premier type**, le plus courant, est **la dialyse en milieu clos**.
  - On place le boudin contenant la solution à dialyser dans un grand contenant.
  - On laisse aux molécules diffusibles le temps de s'équilibrer de part et d'autre de la membrane.
  - Il est possible d'accélérer ce processus en agitant le liquide de contre-dialyse (e.g. avec un barreau magnétique).



**Figure 2**

Si on veut obtenir une réduction encore plus grande des molécules diffusibles, on peut recourir au **deuxième type de montage: la dialyse en continu.**

- Dans cette technique, on expose le boudin à un courant continu du solvant désiré, en pratique c'est le plus souvent de l'eau. Puisque le courant est continu, les petites molécules ne pourront jamais atteindre une concentration d'équilibre et, diffuseront constamment en dehors du sac à dialyse. On peut ainsi virtuellement atteindre une concentration nulle de ces molécules.

**On doit se rappeler que le solvant de dialyse et les conditions doivent être compatibles avec la stabilité des molécules d'intérêt contenues dans le dialysat.**

- **L'électrodialyse**

L'électrodialyse est un procédé électrochimique qui permet d'extraire les ions contenus dans une solution grâce au passage d'un courant électrique, elle a donc pour but de faire diminuer la concentration d'une solution.

- Expliquons tout d'abord ce qu'est un ion : un ion est un atome (ce qui constitue la matière) ou une molécule (groupe d'atomes) ayant gagné ou perdu un ou plusieurs électrons. Un ion chargé positivement, qui a donc perdu des électrons, est appelé cation ; un ion chargé négativement, qui a donc gagné des électrons, est appelé anion.

L'eau de mer contient du sel ou chlorure de sodium, de formule  $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ . L'électrodialyse permet donc ici de retirer les ions sodium  $\text{Na}^+$  (des cations) et les ions chlorure  $\text{Cl}^-$  (des anions), d'où la désalinisation de l'eau.

Pour ce faire nous utilisons un électrodialyseur, qui fonctionne de la manière suivante :

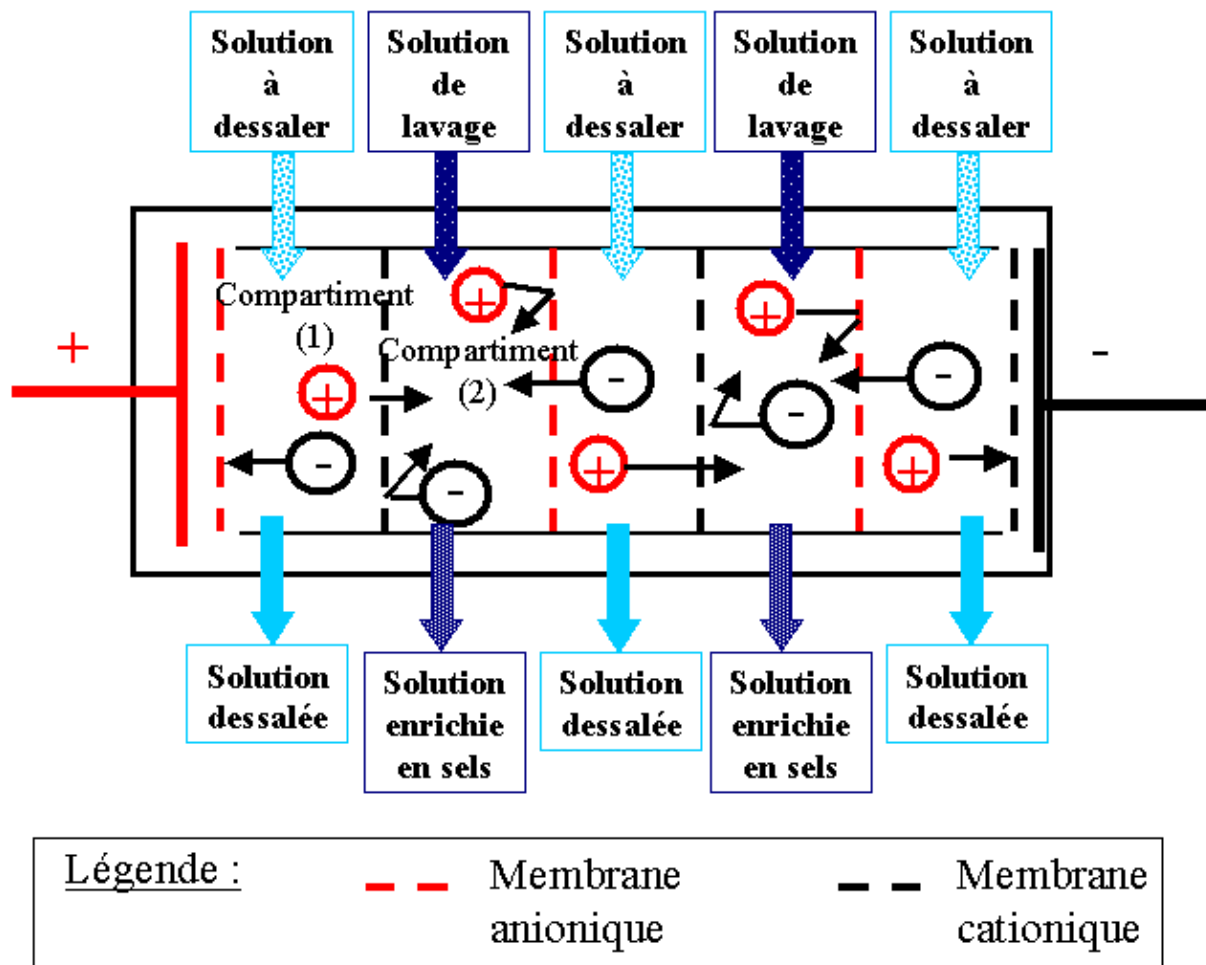


Figure 3

L'eau salée est introduite dans de nombreux compartiments placés à la suite les uns des autres et qui sont séparés chacun par une membrane cationique, qui ne laisse passer que les cations, et une membrane anionique, qui ne laisse passer que les anions. Les membranes cationiques et anioniques sont placées en alternance. Cette suite de compartiments est traversée par un courant

électrique alimenté par un générateur, grâce à des électrodes placées à chaque extrémité de l'appareil.

Ainsi les cations migrent dans le sens du courant électrique (du + vers le -) en ne traversant que la membrane cationique, car les cations chargés positivement sont attirés par la borne négative. Au contraire, les anions, chargés négativement et donc attirés par la borne positive, ne circulent que dans le sens contraire à celui du courant en ne traversant que la membrane anionique.

De cette façon, certains compartiments appelés compartiments de dilution (1) seront appauvris en sel dissous, étant donné que les ions seront de moins en moins nombreux, et d'autres appelés compartiments de concentration (2) en seront enrichis, étant donné qu'ils récupèrent les ions des compartiments de dilution. Comme les membranes, les compartiments de dilution et de concentration se succèdent en alternance.

Nous obtenons donc au final de l'eau dessalée en récupérant celle issue des compartiments en dilution.

La dialyse est un procédé de séparation par membrane des molécules ou des ions en solution au même titre que l'osmose inverse, l'ultrafiltration et l'électrodialyse. Ces techniques diffèrent par la force utilisée pour que les espèces chimiques ou les ions puissent traverser la membrane semi-perméable, c'est-à-dire la barrière relativement mince séparant deux milieux liquides. Ces forces sont :

- un gradient de pression dans l'osmose inverse, l'ultrafiltration ou encore un gradient de pression partielle lors de la diffusion des gaz à travers une membrane poreuse ;
- un gradient de potentiel électrique dans l'électrodialyse ;
- et enfin un gradient de concentration dans la dialyse.

L'avantage de cette dernière réside dans le fait que les séparations se font dans la majeure partie des cas à température ambiante, respectant ainsi les substances thermolabiles, sans changement de phase liquide (avantageux sur le plan énergétique) et, enfin, sans accumulation de constituants dans la membrane, ce qui permet d'envisager un fonctionnement en continu donc sans cycle de régénération. En revanche, la méthode est lente.

La distinction entre dialyse, ultrafiltration et osmose inverse, qui toutes les trois reposent sur l'utilisation d'une membrane et conduisent à la séparation des petites molécules d'avec les grosses molécules, peut être représentée par la figure 1.

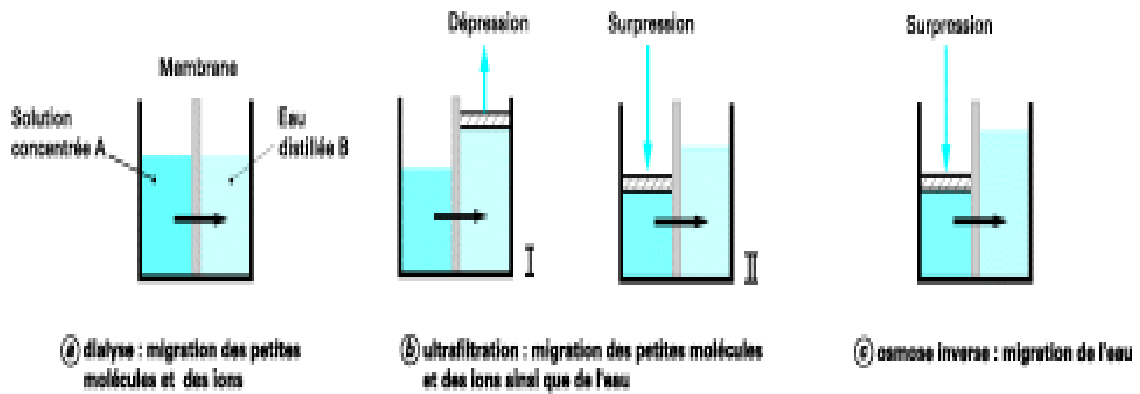


Figure 4

- **Dialyse** : sur la figure *a*, la solution concentrée A contient des molécules de masses moléculaires élevées, des ions minéraux et des petites molécules. Les ions et les petites molécules traversent la membrane et passent dans le compartiment B jusqu'à ce que leur concentration soit égale de part et d'autre de la membrane, si l'on ne change pas l'eau en B (dialyse à l'équilibre), ou jusqu'à élimination totale si l'on renouvelle périodiquement ou en continu l'eau distillée du compartiment B. Les grosses molécules restent en A.
- **Ultrafiltration** : bien que le terme ultrafiltration comprenne le mot filtration, cette technique ne s'adresse pas à la séparation d'un mélange hétérogène solide + liquide, mais au même type de mélange que dans le cas de la dialyse.

Sur la figure *b I*, on exerce une dépression au-dessus du compartiment B, la séparation des molécules est du même type que dans la dialyse, mais l'eau traverse aussi la membrane dans le sens A vers B, conduisant ainsi à la séparation des grosses molécules des autres espèces chimiques ou ions minéraux, mais aussi à la concentration des grosses molécules au sein de la phase aqueuse. Cette technique est principalement utilisée pour la concentration des solutions protéiques.

Sur la figure *b II*, on exerce une pression au-dessus du compartiment A ; les petites molécules et les ions traversent la membrane ainsi que l'eau. Le

phénomène est identique au précédent, mais il est possible d'exercer une pression supérieure à la dépression qui s'exerce en I (dans ce dernier cas, elle pourrait au maximum être égale à la pression atmosphérique).

- **Osmose inverse** : (figure c) : on exerce, au-dessus du compartiment renfermant la solution concentrée, une pression supérieure à la pression osmotique de celle-ci. L'eau traverse la membrane semi-perméable asymétrique.

Dans le cas de l'ultrafiltration et de l'osmose inverse, il est indispensable que la membrane repose sur un support mécanique poreux pour résister à l'effet de la pression qui risquerait de provoquer déformation ou rupture de la membrane.

#### 4. Calculs

Le but de la dialyse est de réduire la concentration des petites molécules d'un mélange à un niveau très faible.

Les molécules diffusibles vont traverser la membrane sans obstacle du dialysat dans le liquide de contre dialyse. A l'équilibre, leurs concentrations vont être égales de part et d'autre de la membrane. Pour ces molécules, il s'agit donc en fait d'une "dilution" où on mettrait un petit volume d'une solution dans un grand volume d'une autre. Pour ces petites molécules, les calculs se font donc de la même manière que si on calculait une dilution simple!

$$C_f = \frac{C_i \cdot V_i + CLCD \cdot VLCD}{V_i + VLCD}$$

Tel que :

C<sub>f</sub> : Concentration finale d'un soluté dans le boudin de dialyse à la fin de la dialyse

C<sub>i</sub> : Concentration initiale d'un soluté dans le boudin de dialyse au début de la dialyse

V<sub>i</sub> : Volume initiale du liquide à dialyser

CLCD : Concentration du liquide de contre dialyse

VLCD : Volume du liquide de contre dialyse

Si on fait des dialyses successives, il faut évidemment recalculer chaque "dilution" une après l'autre pour connaître la concentration finale des molécules diffusibles.