

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Blida 1  
Faculté de Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologies

## Polycopié de Cours

### « Techniques d'analyses au laboratoire »

Elaboré par Dr Saida Messgo-Moumene

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



Année Universitaire 2019- 2020

## Préambule

Ce polycopié de Cours « Techniques d'analyses au laboratoire » est destiné à tous les étudiants de Master 1 et 2 et, aux doctorants de Biotechnologie végétale de la Faculté SNV de Blida.

Les objectifs de l'enseignement de ce module permettent à l'étudiant de s'initier au bon choix et , la bonne maîtrise de la méthodologie ainsi qu'une meilleure pratique dans l'utilisation des instruments scientifiques tout en respectant les conditions de leur utilisation pour arriver à des résultats fiables lors de la préparation de son projet de fin d'études de Master 2 ainsi qu'à la réalisation de ses futures activités de Recherches scientifiques. Les techniques et le matériel retenus sont appliqués au végétal, à ses métabolites et au sol. Les connaissances préalables recommandées sont les notions élémentaires de chimie générale, minérale et organique et de physique, chimie analytique qui, aide l'étudiant à appliquer les notions théoriques, en se familiarisant avec les appareillages utilisées dans les :

- Techniques de préparation des solutions et, produits à analyser,
- Techniques de séparation des mélanges,
- Techniques de stérilisation,
- Techniques de caractérisation physico-chimiques,
- Techniques d'analyses spectrométriques et chromatographiques.

Ce cours comprend quatre chapitres appuyés par des travaux pratiques pour une meilleure illustration.



# Sommaire

## Chapitre 1 : Techniques de stérilisation

- 1 Introduction
- 2 Méthodes physiques de stérilisation
  - 2.1 Le bec Bunsen
  - 2.2 Le four pasteur
  - 2.3 L'autoclave
- 3 Autres méthodes de stérilisation
  - 3.1 Stérilisation par pasteurisation
  - 3.2 Stérilisation par tyndallisation
  - 3.3 Stérilisation par filtration
  - 3.4 Stérilisation par radiations
  - 3.5 Stérilisation par les agents chimiques
- 4 Conclusion

## Chapitre 2 : Initiation aux instruments scientifiques et leur bonne utilisation au Laboratoire

- 2.1 Pesage et Balance de Précision
- 2.2 Agitateurs de laboratoire
- 2.3 pH-mètre
- 2.4 Etuves de Laboratoire
- 2.5 Le four à moufle
- 2.6 Le réfractomètre

## Chapitre 3 : Techniques de séparation des mélanges et Centrifugation

- 3.1 Techniques de séparation des mélanges hétérogènes et homogènes
- 3.2 La centrifugation

## Chapitre 4 : Les techniques d'analyses au laboratoire et Méthodes Spectrométrie

- 4.1 Les techniques d'analyses au laboratoire
  - 4.1.1 Introduction
  - 4.1.2 Les méthodes d'analyses
  - 4.1.3 Les techniques d'analyse chimique de laboratoire
  - 4.1.4 Fluorescence
  - 4.1.5 Chromatographie
- 4.2 Méthodes spectroscopiques
  - 4.2.1 Généralités sur les méthodes spectroscopiques
  - 4.2.2 Spectroscopies d'absorption moléculaires
  - 4.2.3 Spectrométrie d'absorption atomique
    - 4.2.3.1 Introduction
    - 4.2.3.2 Principe
    - 4.2.3.3 Instrumentation de base
    - 4.2.3.4 Dosage par absorption atomique
    - 4.2.3.5 Quelques applications



- 4.2.3.6 Avantages
- 4.2.3.7 Inconvénients
- 4.2.4 Spectrométrie UV-VISIBLE
  - 4.2.4.1 Principe du spectrophotomètre et lois générales
  - 4.2.4.2 Détermination des chromophores
  - 4.2.4.3 Dosages ou applications de la loi de Beer-Lambert
- 4.2.5 Spectrométrie IR
- 4.2.6 Spectrofluorométrie
- 4.2.7 Spectrométrie de masse
  - 4.2.7.1 Différents modes d'ionisation
  - 4.2.7.2 Analyse des petites molécules
  - 4.2.7.3 Analyse des protéines
  - 4.2.7.4 Application au séquençage des peptides ou des oligosaccharides
- 4.2.8 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)
  - 4.2.8.1 La RMN et l'analyse structurale
  - 4.2.8.2 La RMN *in vivo*
  - 4.2.8.3 L'imagerie RMN



# Chapitre 1 : Techniques de stérilisation

## 4 Introduction

La destruction des microorganismes ou stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés.

Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés: on utilise essentiellement des méthodes physiques.

Dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques ou chimiques). Il faut opposer la stérilisation qui est la destruction totale des germes, à la désinfection qui est une destruction plus grossière.

La loi de destruction des microorganismes est de type logarithmique. Le nombre d'individus tués est lié à la population et au temps d'exposition. Du fait de la loi de destruction, il est nécessaire de réduire au maximum le nombre de germes présents avant stérilisation par l'emploi de matériel propre et peu pollué, de stériliser pendant un temps relativement long, de vérifier la destruction des germes, d'établir et d'utiliser éventuellement un barème de stérilisation.

## 5 Méthodes physiques de stérilisation

Les méthodes physiques reposent sur l'utilisation de la chaleur. On distingue les appareillages suivants :

### 5.1 Le bec Bunsen

Le flambage est basé sur l'emploi du bec Bunsen. Cette méthode est utilisée pour la stérilisation extemporanée (pour utilisation immédiate) du matériel de manipulation : extrémité de l'öse, extérieur des pipettes Pasteur et pipettes graduées, col des tubes à essai, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers et flacons divers, éta-loirs ...

Il est à noter que le bec Bunsen, réglé avec une flamme bleue, la plus chaude, crée une zone de stérilité d'un diamètre d'environ 20 cm, par ascendance de l'air de cette zone. Toutes les manipulations d'ouverture de tubes et boîtes de culture, d'ensemencement, devront être réalisées dans ce diamètre. Pour que cette zone soit effectivement stérile, les courants d'air et déplacements de personnes sont à proscrire.

### 5.2 Le four pasteur

C'est un four ou étuve à air chaud et sec. Il est utilisé pour la stérilisation de la verrerie vide (tubes à essai, boîtes de Pétri, tubes à culture et bouchons, pipettes Pasteur et récipients divers).

La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage de:

- 30 minutes à 1 heure à 170° - 180°C ou
- 2 heures à 160°C ce qui a pour but d'éviter le brunissement du coton.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières. Pour ces opérations, compte tenu des températures relativement élevées, il est conseillé d'utiliser le plus possible de la verrerie de type "pyrex".

### 5.3 L'autoclave

C'est un appareil très performant qui est indispensable dans une unité de microbiologie. Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie.

Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 100° à 130°C, pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients.

**En milieu saturé d'humidité et sous pression, la stérilisation s'opère à des températures inférieures à celles qui sont nécessaires en milieu sec.**

Le matériel à stériliser est déposé dans les paniers métalliques de l'autoclave dont on aura vérifié le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton (éviter de le prendre avec les doigts - utiliser de préférence une pince) et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage très résistant.

Pour la suite des opérations : mise en chauffe, jet de vapeur, montée de pression, lire attentivement la notice du constructeur.

## 6 Autres méthodes de stérilisation

Certains milieux de culture fragiles (comme les milieux au désoxycholate) ne supportant pas les températures élevées, on procède à une ébullition à 100°C. On distingue:

### 6.1 Stérilisation par pasteurisation

La pasteurisation est toujours suivie d'un refroidissement rapide. Elle peut se faire en bouteilles ou en vrac. Dans le premier cas, utilisé essentiellement pour la bière, le cidre ou les jus de fruits, la boisson est mise en bouteilles ; celles-ci sont capsulées puis soumises à une aspersion d'eau de plus en plus chaude, jusqu'à 65 - 75°C; elles séjournent à cette température pendant 20 à 30 minutes, puis elles sont refroidies par de l'eau de plus en plus froide.

### 6.2 Stérilisation par tyndallisation

John TYNDALL : physicien irlandais (Leighlin-Bridge 1820 - Hinhead, Surrey, 1893). Il a découvert le phénomène de regel de la glace (1871), grâce auquel il a expliqué la marche des glaciers, ainsi que l'effet qui porte son nom.

Il a imaginé cette méthode de stérilisation qui consiste en chauffages discontinus à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas), suivis de refroidissements. On admet qu'au cours de ces périodes de chauffage discontinu, les bactéries perdent leur aptitude à sporuler.

Actuellement, la tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1h. à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration. Dans le cas de son utilisation, il faut veiller à la protection des cotons, car l'humidité excessive entraîne des contaminations.

### 3.3 Stérilisation par filtration

Cette méthode est utilisée pour les milieux sensibles à la chaleur, mais n'est possible que lorsque la viscosité de ces milieux est faible. On utilise alors, suivant le cas, les bougies de porcelaine (type Chamberland), les filtres de verre poreux (le verre fritté N°5 arrête de nombreuses bactéries) ou les membranes filtrantes à usage unique, de type Millipore ou Sartorius.

Ces dernières sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires.

### 4.4 Stérilisation par radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection : le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. Des instruments ou des récipients tels que les boîtes de Pétri peuvent être stérilisés de la sorte.

D'autres radiations (rayons X...), peu utilisées, peuvent cependant servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique : stérilisation par ionisation.

### 4.5 Stérilisation par les agents chimiques

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles et plans de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué, dans nos laboratoires, pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

- **Antiseptiques liquides**

**L'alcool éthylique à 60%** pour la désinfection des paillasse et des instruments. Mais certains germes étant résistants, la désinfection n'est pas toujours évidente.

**L'hypochlorite de sodium (eau de Javel)** est utilisé dilué au 1/4 dans les bacs destinés à recevoir les lames usagées, ou en pissette pour la désinfection des mains, des paillasse et des

sols. Rappelons que l'eau de Javel est toujours largement employée en milieu hospitalier, dans certaines industries et à domicile.

**Les savons et détergents** agissent surtout par leur pouvoir mouillant, ce qui facilite l'élimination des germes.

Dans le commerce, des produits antiseptiques sont très efficaces sur les bactéries et sans danger pour l'homme. On les emploie pour désinfecter le petit matériel, les appareils de fabrication en industrie, mais aussi les paillasses et les mains après manipulations, dans les cabinets médicaux et dentaires, les laboratoires ...

- **Antiseptiques gazeux**

Les vapeurs d'une solution chauffée de formol sont utilisées pour désinfecter les pièces et les étuves. Dans les années 70, les salles de classe étaient désinfectées par ce procédé. Au Centre hospitalier de Haguenau, nous avons observé une enceinte à vapeur de formol et d'ammoniac, servant à la désinfection des couveuses et des respirateurs, le rôle de l'ammoniac étant de diminuer la toxicité des vapeurs.

L'oxyde d'éthylène est utilisé dans l'industrie pour la désinfection de certains matériels en plastique à usage unique. Dans les centres hospitaliers, une enceinte est réservée à ce type de désinfection pour le matériel d'intubation par exemple, qui ne supporte pas l'échauffement. Ce matériel, acheté stérile passe une seule fois dans l'enceinte à oxyde d'éthylène, pour une deuxième utilisation, puis il est détruit.

## 5 Conclusion

On peut noter que les types de stérilisation sont nombreux et que, quel que soit le matériel à traiter, il existe actuellement une méthode adaptée. A notre niveau, dans un laboratoire ou une salle de classe dans laquelle les élèves manipulent des souches bactériennes, il est indispensable de respecter les règles fondamentales de l'asepsie :

- Port d'une blouse en coton, fermée.
- Travail dans la zone de stérilité du bec Bunsen.
- Flambage rapide des orifices des tubes à cultures et du matériel de prélèvement et d'ensemencement.
- Immersion de toutes les lames et petit matériel dans l'eau de Javel.
- Nettoyage rigoureux des mains avant et après la séance.
- Nettoyage des paillasses et du matériel éventuellement contaminé.
- Lavage à ébullition des blouses contaminées.
- Au niveau du laboratoire, les boîtes de Pétri et tubes de culture usagés seront entièrement immergés dans de l'eau de Javel pendant 24 h. Les boîtes en plastique seront ensuite incinérées.

- La verrerie et tout le matériel supportant la chaleur seront soigneusement lavés puis stérilisés dans une étuve à chaleur sèche (180°C pendant 30 à 45 minutes) ou un autoclave (120°C pendant 20 à 30 minutes).

## **Chapitre 2 : Initiation aux instruments scientifiques et leur bonne utilisation au Laboratoire**

### **2.1 Pesage et Balance de Précision**

#### **▪ Introduction**

Le pesage est l'une des tâches les plus fréquentes au laboratoire. Les microbalances, semi-microbalances, balances d'analyse et balances de précision modernes sont de nos jours devenues tellement perfectionnées qu'il est en général possible de ne pas utiliser de chambres de pesée spéciales. Le progrès technologique de l'électronique a permis de simplifier considérablement l'utilisation, de fortement réduire les temps de pesage et de rendre les balances tellement flexibles qu'elles peuvent aujourd'hui être intégrées directement dans un procédé de production. Ce progrès comporte d'ailleurs en lui le risque que les influences perturbatrices de l'environnement ne soient pas suffisamment prises en considération. Il s'agit alors généralement d'effets physiques mesurables par les microbalances, semi-microbalances et balances d'analyse et qui ne doivent pas être supprimés par celles-ci, étant donné qu'il s'agit de variations réelles du poids (p. ex. évaporation lente, absorption d'humidité) ou de forces agissant sur le produit à peser et le plateau (p. ex. magnétisme, électricité statique) et que la balance reconnaît également en tant que variations du poids.

#### **▪ Emplacement de la balance**

L'exactitude et la reproductibilité de résultats de pesée sont étroitement liées à l'emplacement de la balance. Tenez compte des points ci-après afin que votre balance puisse travailler dans les meilleures conditions:

#### **• La table de pesée**

- Solide (table de laboratoire, plan de travail de laboratoire, table en pierre).
- La table de pesée ne doit pas fléchir lors de son utilisation et, si possible, ne pas transmettre de vibrations.
- Amagnétique (pas de plaque en acier).
- Protégée contre l'électricité statique (pas en matière plastique ou en verre).
- Fixation unique : La table de pesée doit soit reposer sur le sol, soit être fixée au mur. Les deux types de fixation simultanément transmettent les vibrations du mur et du sol.
- Réservée uniquement pour le pesage.
- L'emplacement et la table de pesée doivent présenter une stabilité telle que l'affichage de la balance ne varie pas lorsqu'on appuie sur la table ou qu'on se place au poste de pesage. Renoncez aux supports mous, p. ex. les sous-mains. En ce qui concerne le positionnement de la balance, préférez l'emplacement directement au-dessus des pieds de la table car c'est à cet endroit qu'apparaissent les vibrations les plus faibles.

- **Le local de travail**
  - Sans secousses
  - Non exposé aux courants d'air.
  - Placez la table de pesée dans un coin d'un local. C'est à cet endroit qu'un bâtiment présente le moins de vibrations. L'accès au local devrait idéalement s'effectuer par le biais d'une porte coulissante, pour réduire l'influence du mouvement de la porte.
- **La température**
  - Maintenez si possible la température ambiante constante, les résultats de pesée dépendent de la température! (Dérive typique: 1-2 ppm/°C).
  - Ne pesez pas à proximité de radiateurs ou de fenêtres.
- **L'humidité de l'air**
  - L'humidité relative de l'air (% HR) se situe idéalement entre 45 et 60 %.
  - En aucun cas, l'humidité relative de l'air ne devrait se situer hors de la plage de mesure de 20 à 80 % hr.
  - Une surveillance permanente est recommandée pour les microbalances. Si possible, les variations devraient toujours être corrigées.
- **La lumière**
  - Placez la balance si possible contre un mur sans fenêtre. Le rayonnement direct du soleil (chaleur) influence le résultat de pesée.
  - Placez la balance avec un écart suffisant par rapport aux sources de lumière pour éviter le rayonnement thermique. Ceci concerne en particulier les lampes à incandescence. Utilisez les tubes fluorescents.
- **L'air**
  - Ne placez pas la balance dans le flux d'air d'installations de climatisation ou d'appareils dotés de ventilateurs comme les ordinateurs ou les grands appareils de laboratoire.
  - Placez la balance avec un écart suffisant par rapport aux radiateurs. En plus de la dérive possible de la température, de fortes circulations d'air peuvent y apparaître et provoquer des perturbations.
  - Ne placez pas la balance à côté d'une porte.
  - Évitez les lieux très fréquentés par des personnes. Les passants occasionnent généralement un courant d'air sur le lieu de la pesée.
- **Utilisation de la balance**

Les microbalances, semi-microbalances, balances d'analyse et balances de précision sont des instruments de mesure de très grande précision. Si vous suivez les conseils suivants, vous obtiendrez des résultats de pesée fiables.

- **La mise en marche**
  - Ne débranchez pas la balance du réseau d'alimentation et laissez celle-ci toujours en marche. De cette manière, un équilibre thermique peut s'installer dans la balance.
  - Si vous éteignez la balance, utilisez à cet effet la touche d'affichage (sur les anciens modèles, la touche de tarage). La balance est alors en mode veille. L'électronique reste sous tension et un temps d'échauffement n'est plus nécessaire.

- **La mise de niveau ou étalonnage**

Mettez la balance de niveau. Pour ce faire, contrôlez si la bulle d'air se trouve au centre du niveau à bulle. Vous pouvez effectuer des corrections en tournant les pieds réglables. Vous devez ensuite régler la sensibilité de la balance. La procédure exacte est décrite dans le mode d'emploi de la balance.

- **Le réglage**

Régalez régulièrement la sensibilité de la balance, avant tout, lorsque vous mettez la balance pour la première fois en service, après un changement d'emplacement, après la mise de niveau, après d'importantes variations de température, d'humidité ou de pression atmosphérique.

- **La lecture**

Au début de chaque pesée, veillez à ce que l'affichage indique exactement zéro, sinon mettez à zéro pour éviter les erreurs dues au zéro.

Lisez seulement le résultat après disparition du petit cercle en haut à gauche sur l'affichage de la balance. Ce détecteur de stabilité valide le résultat de pesée.

- **Le plateau de pesage**

- Placez toujours le produit à peser au centre du plateau. Vous évitez ainsi les erreurs liées aux charges excentrées.
- Sur les microbalances et semi-microbalances, chargez le plateau, après une pause prolongée (>30 min) tout d'abord brièvement, pour annuler l'effet de la première pesée.

- **Le récipient de pesée**

- Utilisez le plus petit récipient possible.
- Évitez les récipients en matière plastique si l'humidité de l'air est inférieure à 30-40 %. Dans ces conditions, ceux-ci peuvent se charger d'électricité statique. Les matériaux non conducteurs de l'électricité (p. ex. verre et matière plastique) peuvent se charger en électricité statique. Ceci peut entraîner des altérations drastiques du résultat de pesée. Veillez donc à prendre des mesures préventives appropriées.
- Le récipient de pesée et le produit à peser doivent si possible avoir la même température que l'environnement. Des différences de température peuvent conduire à des circulations d'air qui altèrent le résultat de pesée. Après prélèvement dans un four de séchage ou un lave-vaisselle, laissez le récipient de pesée se refroidir, avant de le placer dans la balance.
- Si possible, ne prenez pas le récipient de pesée dans les mains pour le poser dans la chambre de pesée pour ne pas modifier la température et l'humidité de l'air de la chambre de pesée et du récipient de pesée, ce qui a une influence défavorable sur l'opération de pesée.

- **Le pare-brise**

- N'ouvrez les portes du pare-brise que le juste nécessaire. Ainsi le climat dans la chambre de pesée reste constant et le résultat de pesée n'est pas influencé.
- Configurez les balances possédant un pare-brise automatique et configurable comme les instruments de la famille Excellence Plus, pour une ouverture minimale du pare-brise.

- **L'entretien de la balance**

- Veillez à ce que la chambre de pesée et le plateau soient toujours propres.
- Pour le pesage, utilisez exclusivement des récipients de pesée propres.
- Comme produit de nettoyage, les simples produits de nettoyage pour vitres suffisent.
- Pour le nettoyage, utilisez des chiffons non pelucheux.
- Ne balayez pas les impuretés avec un pinceau dans d'éventuelles ouvertures.
- Avant nettoyage, retirez d'abord toutes les pièces amovibles comme le plateau de pesage.

## 2.2 Agitateurs de laboratoire

- **Introduction**

Agitateur ou Laboratory mixer en Anglais sont des équipements de base d'un laboratoire.

Ces instruments se présentent selon plusieurs modèles. Ils ont utilisés dans tous les domaines de la biologie.

- **Application et Utilisation principale**

Un agitateur, quelque soit le type, permet d'homogénéiser une solution ou une suspension (exemple : cellules contenues dans un liquide biologique)

- **Types d'agitateurs**

Il existe plusieurs modèles d'agitateurs, dont le choix est en fonction de l'utilisation recherchée. On distingue :

- **Agitateur magnétique**

Appareil de base pour homogénéiser des solutions ou dissoudre des éléments solides dans un solvant approprié. L'agitation est assurée par un barreau aimanté placé à l'intérieur du récipient contenant le liquide à homogénéiser. L'option principale de ce type d'agitateur est une plaque chauffante : l'élément chauffant permet d'accélérer la dissolution de certains éléments chimiques dans un solvant.

- **Agitateur secoueur de type vortex**

Le mouvement est ici transmis au tube contenant le liquide ou la suspension par pression du tube sur un réceptacle en caoutchouc, solidaire du bloc moteur. Ce mouvement peut s'effectuer soit en continu, soit seulement lorsqu'on applique une pression sur le réceptacle en caoutchouc.

- **Agitateur rotatif à disques ou à tambour**

Cet agitateur permet la rotation lente d'un disque sur lequel peuvent être disposés des tubes de petites dimensions (quelques ml). Il est utilisé le plus souvent pour homogénéiser des liquides biologiques contenant des cellules fragiles.

- **Agitateur de va et vient pour microplaques**

Le mouvement est ici excentré par rapport à l'axe de rotation du moteur. Il permet une homogénéisation des suspensions (latex, agglutinats, ...) contenues dans les puits de microplaques de titration à prévoir.

Les différents types d'agitateur n'ont ni accessoires ni consommables en dehors de l'agitateur magnétique où il est nécessaire d'avoir des barreaux magnétiques enrobés de téflon.

- **Principe de fonctionnement**

Cet appareil, en général de petites dimensions, est constitué, quelque soit le modèle, d'un moteur électrique dont la vitesse de rotation peut varier grâce à un rhéostat. Ce mouvement qui assure l'agitation du liquide est ensuite transmis à un système mécanique spécifique au modèle afin d'homogénéiser un liquide ou une suspension.

## 2.3 pH-mètre

- **Introduction**

Le pH correspond à la concentration en ions  $H_3O^+$  dans la solution. Si le pH est supérieur à 7 la solution est basique, si le pH est égal à 7 la solution est neutre et si le pH est inférieur à 7 la solution est acide.

- **Définition**

Le pH-mètre est un appareil permettant de mesurer le pH d'une solution. Il est constitué de deux éléments : un boîtier électronique qui affiche la valeur du pH et une électrode qui mesure cette valeur.

- **Fonctionnement**

Le fonctionnement du pH-mètre est basé sur le rapport entre la concentration en ions  $H_3O^+$  et la différence de potentiel électrochimique qui s'établit dans l'électrode de verre.

En général cette électrode est une électrode combinée, c'est-à-dire qu'elle est constituée de deux électrodes : une dont le potentiel est connu et constant et l'autre dont le potentiel varie avec le pH. Le potentiel entre ces deux électrodes est nul à  $pH=7$ . On peut alors déterminer la valeur du pH par corrélation car la différence de potentiel entre les deux électrodes évolue proportionnellement au pH.

## ▪ Etalonnage du pH mètre

L'étalonnage du pH mètre est nécessaire avant de relever le pH d'une solution. Il repose sur l'utilisation des solutions tampons.

On utilise deux solutions tampons pour étalonner le pH-mètre : une à pH=7 et une à pH=4. Une solution tampon est une solution qui malgré l'addition d'acide, de base ou d'une dilution, garde approximativement le même pH.

## 2.4 Etuves de Laboratoire

### ▪ Introduction



# SAHLA MAHLA



Étuve ou Incubateur : en Anglais Incubator sont des matériaux de base dans les laboratoires. Une étuve de laboratoire est un appareil de chauffage fonctionnant le plus souvent à la pression atmosphérique et permettant d'effectuer divers traitements thermiques à température régulée.

### ▪ Types d'étuves de laboratoire

Selon la température on distingue différents types d'étuves

Les étuves de chauffage,

Les étuves de séchage et,

Les fours chambre à convection forcée.

Avec leur température de travail maximale de 300 °C et la circulation d'air forcée, les étuves et les séchoirs à chambre obtiennent une excellente homogénéité de température qui se distingue nettement des modèles concurrentiels. Ils peuvent être utilisés pour de nombreuses tâches telles que le séchage, la stérilisation et le maintien de la chaleur.

Les étuves de séchage s'utilisent pour des procédés variés de séchage et de traitements thermiques de charges jusqu'à une température d'application de 260 °C. Une homogénéité de température optimale est obtenue dans l'espace utile du four en raison de la puissance

convection d'air. Ces étuves de séchage peuvent être modifiées aux exigences particulières de procédés grâce une gamme d'accessoires variée.

### ▪ **Utilisation principale des incubateurs ou étuves microbiologiques**

L'étuve de laboratoire est utilisée principalement pour effectuer, à une température donnée, la culture in vitro de microorganismes (bactéries, champignons tels que dermatophytes, moisissures et levures, virus...) et de cellules.

La température la plus fréquemment utilisée se situe aux alentours de 37°C (température pour une croissance optimale des microorganismes) mais l'étuve peut également s'utiliser à d'autres températures pour les applications suivantes :

- à 56 °C en virologie, pour l'inactivation de virus (notamment du VIH),
- entre 30°C et 65 °C pour réaliser, en anatomocytopathologie, des inclusions de tissu dans la paraffine.

### ▪ **Domaines d'application**

✓ Laboratoires de (Microbiologie, Parasitologie, Mycologie, Anatomocytopathologie)

### ▪ **Principe de fonctionnement**

L'étuve de laboratoire se présente comme une armoire isolée thermiquement dont le chauffage est assuré par des résistances électriques commandées par des relais statiques.

Un régulateur de température (de 15° C à 80° C) dont la sensibilité varie en fonction du modèle (ex:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ;  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  ;  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) affiche sur un cadran ou un écran à diodes la température réelle de l'étuve mesurée par une sonde située dans l'enceinte de celle-ci.

Quant à la température de consigne, elle correspond à la température théorique de l'étuve; elle est commandée à l'appareil par l'utilisateur.

Le chauffage se fait par convection; un clapet d'admission d'air extérieur assure le brassage de l'air soit naturellement, soit par une ventilation permettant un transfert thermique rapide et une bonne homogénéité de la température.

La chambre intérieure de l'étuve est équipée de clayettes où l'utilisateur vient déposer les boîtes de culture.

Les clayettes sont en général en acier inoxydable pour une décontamination et un nettoyage facile.

L'étuve comporte habituellement une porte intérieure transparente en verre ou en plastique pour observer les échantillons sans entraîner une baisse de la température dans la chambre.

### ▪ **Modèles des étuves**

• La capacité des étuves est comprise entre 30 et 1000 litres. Le prix dépendant de leur capacité et des accessoires disponibles (régulateur programmable, système de ventilation, éclairage intérieur, minuterie...)

• Il existe également des étuves réfrigérées qui permettent de travailler quand la température ambiante du laboratoire est trop élevée.

Le système de refroidissement est constitué d'un évaporateur, placé dans le flux d'air de ventilation.

- à CO<sub>2</sub> : elles sont utilisées pour la culture des micro-organismes anaérobies et de certaines cultures cellulaires (ex : lymphocytes). Elles fonctionnent, sous une atmosphère additionnée

de CO<sub>2</sub> (la teneur en oxygène diminue avec l'apport de CO<sub>2</sub>) mais peuvent également s'utiliser sous atmosphère normale.

- à porte verrouillable pour assurer une sécurité optimale lorsque lorsqu'on manipule des microorganismes très virulents.

Structures adaptées

#### ▪ **Entretien**

- Toujours débrancher l'appareil de la prise secteur avant d'effectuer le nettoyage.
- Laver l'intérieur de l'appareil avec un chiffon imprégné de produit adapté à l'entretien de l'inox.

#### ▪ **Maintenance**

Niveau de formation requis

- Le personnel intervenant dans la réparation et le suivi de ce type d'appareil doit avoir suivi une formation sur son fonctionnement, sa maintenance et les risques associés.
- Niveau technique peu élevé.

#### **Types de maintenance**

##### • **Maintenance préventive**

- Contrôle journalier de la température intérieure de l'étuve.
- Le joint de porte en silicone doit être talqué tous les 3 mois, afin d'en préserver ses qualités d'adhérence et d'étanchéité.
- Dépoussiérer régulièrement le condenseur du groupe froid pour le modèle réfrigéré.

##### • **Maintenance corrective**

En cas de défaillance, il est possible de remplacer facilement les éléments suivants :

Le personnel utilisateur, biologiste et technicien de laboratoire, doit avoir reçu une formation à l'utilisation de l'appareil dispensée par le constructeur de l'appareil, un organisme habilité ou une personne compétente.

##### ▪ **Précautions d'utilisation**

Ne pas obstruer les prises d'air situées au fond ou sur les cotés de l'appareil.

Les étuves de laboratoire ne sont pas anti-déflagrantes : ne pas y introduire des produits explosifs, inflammables

## 2.5 Le four à moufle



Modèles de fours moufle L, avec porte à battant ou guillotine.

### ■ Caractéristiques

- T<sub>max</sub> 1100 °C ou 1200 °C
- Chauffage par deux côtés ou trois côtés grâce à des plaques chauffantes en céramique  
Plaques de chauffage céramiques avec éléments chauffants intégrées, protégées contre les projections et les échappements gazeux, faciles à changer
- Carcasse en inox à la surface structurée
- Enveloppe à double paroi pour des températures extérieures basses et une grande stabilité
- Au choix avec porte à battant (L) utilisable comme support ou sans supplément avec porte guillotine (LT), la partie chaude étant la plus éloignée de l'opérateur
- Ouverture réglable de l'arrivée d'air dans la porte (voir illustration)
- Cheminée d'évacuation de l'air dans la paroi arrière du four
- Chauffage silencieux fonctionnant avec des relais statiques
- Application définie dans la limite des instructions de fonctionnement

### ■ Précautions d'utilisation du four à moufle

1. Lorsque le four à moufle est utilisé pour la première fois ou après une désactivation prolongée, il doit être séché au four. La durée du four doit être de 200 ° C pendant quatre heures à la température ambiante. 200 ° C à 600 ° C pendant quatre heures. Lors de l'utilisation, la température du four ne doit pas dépasser la température nominale pour éviter de brûler les éléments chauffants. Il est interdit d'infuser dans le four des liquides divers et des métaux facilement solubles. Il est préférable que le four à moufle travaille au-dessous de 50 °

C en dessous de la température maximale, période à laquelle le four a une longue durée de vie.

2. Le four à moufle et le contrôleur doivent travailler dans un endroit où l'humidité relative ne dépasse pas 85% et où il n'y a pas de poussière conductrice, de gaz explosif ou corrosif. Lorsqu'un matériau métallique, tel que de la graisse, doit être chauffé, une grande quantité de gaz volatil affectera et corrodera la surface de l'élément chauffant électrique afin de détruire et de raccourcir sa durée de vie. Par conséquent, lors du chauffage, il devrait être évité et scellé de manière opportune ou correctement ouvert pour être éliminé.

3. Le contrôleur de moufle ne doit être utilisé que dans une plage de température ambiante comprise entre 0 et 40 ° C.

4. En fonction des exigences techniques, vérifiez régulièrement si le câblage de chaque fournaise électrique et contrôleur est correct, en cas de blocage du phénomène lorsque l'indicateur se déplace, et utilisez le potentiomètre pour contrôler l'instrument en raison de l'acier magnétique, de la démagnétisation, tréfilage et éclats d'obus. L'augmentation des erreurs causées par la fatigue, les dommages d'équilibre, etc.

5. le thermocouple ne doit pas être retiré à haute température pour éviter que l'enveloppe ne se déchire.

6. Toujours garder le four propre et éliminer les oxydes qu'il contient à temps.

#### ▪ **Objet et domaine d'application**

Détermination des résidus, appelé aussi taux de cendres et de la perte au feu sur des échantillons solides contenant des teneurs en résidus, et en perte au feu, compris entre 0,1% et 99,9%.

#### ▪ **Matériel utilisé**

- Four à moufle.
- Balance micro analytique.
- Creusets de platine

#### ▪ **Principe**

##### • **Minéralisation de l'échantillon**

La teneur en résidus s'effectue en utilisant un creuset en platine, pour obtenir la calcination totale d'un échantillon. L'échantillon étant brûlé à l'aide d'un four à moufle (à une température de 840 °C) environ seize heures. La pesée de la substance de référence est effectuée en même temps que la série des échantillons soumis aux analyses.

La masse du résidu incombustible est calculée par différence avec la pesée initiale (creuset vide) à 0,1mg près.

#### ▪ **Expression du résultat**

- **Résidu**

$$RS (\%) = M/m \times 100$$

m : masse du résidu (en mg).

M : masse de l'échantillon soumis à l'essai (en mg).

- **Perte au feu**

$$PF (\%) = 100 - RS$$

- Incertitudes de mesure

± 0,3 % pour les résultats ≤ 20 %

± 0,7 % pour les résultats > 20 % mais ≤ 40 %

± 1 % pour les résultats > 40 %

## 2.6 Le réfractomètre

### ▪ Introduction

Le terme de réfractomètre est principalement utilisé pour nommer des appareils qui permettent de déterminer l'indice de réfraction d'un liquide, bien qu'il existe également des instruments qui permettent la détermination de l'indice de réfraction d'un solide. Nous allons ici nous restreindre à la détermination de l'indice de réfraction des liquides.

### ▪ Principe théorique du réfractomètre

Les réfractomètres les plus largement répandus d'Abbe et de Pulfrich mesurent l'angle de réfraction  $i_2$  d'un rayon lumineux qui est relié à l'angle d'incidence  $i_1$  selon les lois de Snell-Descartes. Le dioptre considéré ici est l'interface formée par la substance S dont on veut déterminer son indice de réfraction  $n_S$  et le prisme P qui a un indice de réfraction élevé  $n_P$  (voir figure 2).

D'après les lois de Snell - Descartes, l'indice de réfraction de la substance est défini ainsi :  
$$n_S = n_P \cdot (\sin(i_2) / \sin(i_1))$$

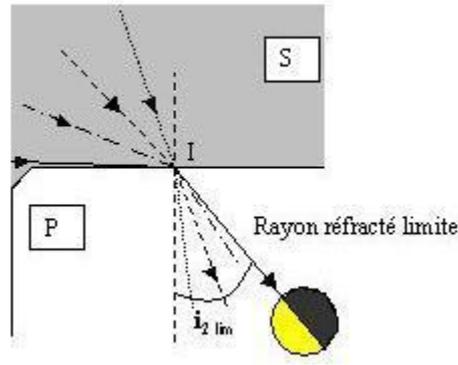
Cependant le problème d'obtenir exactement  $i_2$  et  $i_1$  s'avère considérablement simplifié en prenant un angle d'incidence égal à  $90^\circ$  (incidence rasante), puisque l'indice de réfraction de la substance S est plus faible que celui du prisme. En effet, d'après le paragraphe I.4, nous avons mentionné que lorsque la lumière passe d'un milieu plus réfringent (indice le plus élevé) à un autre moins réfringent, l'angle d'incidence limite est celui qui correspond à un angle de réfraction de  $90^\circ$ . Selon le principe du retour inverse de la lumière, il va de soi que lorsque l'on passe d'un milieu moins réfringent, comme c'est le cas ici ( $n_S$  indice le plus faible) à un autre plus réfringent, l'angle de réfraction limite noté  $i_2 \text{ lim}$  ou parfois appelé l'angle de réfraction critique noté  $i_{2c}$  est celui issu d'un angle d'incidence de  $90^\circ$ .

Sous une incidence rasante (figure 2), il y a donc un rayon réfracté limite tel que  $i_2 \text{ lim} = \arcsin(n_S/n_P)$  qui s'avère particulièrement facile à observer, car plus aucun rayon n'est réfracté dans le prisme P pour des angles plus grands que  $i_2 \text{ lim}$ .

Remarque :

D'après l'expression de l'angle de réfraction limite ( $i_2 \text{ lim} = \arcsin(n_S/n_P)$ ), on voit bien que les réfractomètres ne seront utilisables que pour la détermination d'indices de réfraction  $n_S$  inférieurs à celui du prisme  $n_P$ , soit de l'ordre de 1,7.

**Figure 3. Frontière limite à l'intérieur du prisme du fait de la réfraction.**



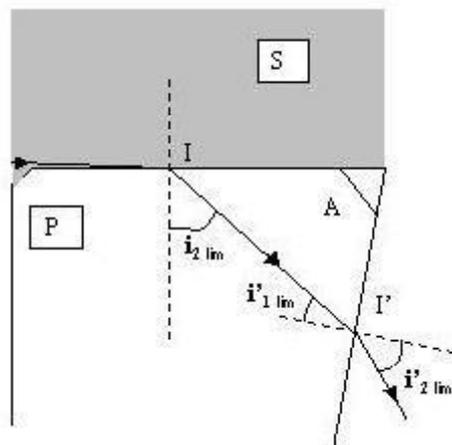
Comme on peut le voir sur la figure 3, tous les rayons incidents entrant dans le prisme au point d'incidence I avec un angle compris entre  $0^\circ$  et  $90^\circ$  par rapport à la normale au point d'incidence I, sont réfractés dans une région angulaire du prisme définie d'une part par la normale et le rayon de réfraction limite défini précédemment. Ainsi l'angle limite de réfraction  $i_{2 \text{ lim}}$  permet de définir une séparation ou frontière entre une zone claire (rayons réfractés) et une zone sombre (aucun rayon réfracté) à l'intérieur du prisme P.

Remarque :

L'angle de réfraction limite  $i_{2 \text{ lim}}$  est parfois appelé angle de réflexion limite ou critique, car un rayon se propageant dans la direction inverse de celle considérée sur la figure 3 et arrivant au point d'incidence I selon un angle légèrement supérieur à l'angle  $i_{2 \text{ lim}}$  serait totalement réfléchi au niveau du dioptre.

En pratique, les conditions représentées sur la figure 3 sont quelque peu modifiées. La valeur de l'angle de réfraction limite  $i_{2 \text{ lim}}$  n'est pas obtenue directement. En effet, pour observer la frontière entre la zone sombre et la zone claire explicitée précédemment, il s'avère indispensable d'utiliser un système optique tel qu'une lunette et un oculaire. Les rayons lumineux doivent donc traverser l'interface prisme - air, induisant ainsi un autre changement de direction des rayons lumineux au niveau de ce nouveau dioptre (voir figure 4 et tableau 2).

**Figure 4. Rayon réfracté limite émergent du prisme.**



**Tableau 2. Angle au sommet du prisme considéré.**

Réfractomètre	Angle A au sommet du prisme
Réfractomètre de Pulfrich	90°
Réfractomètre d'Abbe	61°

Le rayon lumineux qui provient d'un milieu d'indice inconnu  $n_S$ , et qui tombe sur le prisme d'indice  $n_P$  et d'angle au sommet  $A$ , sous une incidence rasante, émerge du prisme au point d'incidence  $I'$  en faisant un angle  $i_2$  lim avec la normale à la face de sortie du prisme.

D'après les lois de Snell-Descartes et les relations géométriques liées au prisme :

$$n_P \cdot \sin(i_1 \text{ lim}) = \sin(i_2 \text{ lim})$$

$$\text{et } i_1 \text{ lim} = A - i_2 \text{ lim}$$

$$\text{Finalement : } \sin(i_2 \text{ lim}) = n_P \cdot \sin(A - \arcsin(n_S / n_P))$$

$$\text{D'où on obtient : } n_S = n_P \cdot \sin(A - \arcsin(\sin(i_2 \text{ lim}) / n_P))$$

Il découle de la relation précédente, que connaissant l'indice de réfraction du prisme considéré, l'angle au sommet de celui-ci, et on peut en déduire l'indice de réfraction  $n_S$  de la substance  $S$  en effectuant une détermination expérimentale de l'angle  $i_2$  lim formé entre la normale à la face de sortie du prisme et le rayon limite émergeant du prisme. Ceci se fait en repérant la limite entre la zone sombre et la zone claire observée à travers un oculaire d'une lunette lorsque l'on éclaire le système étudié sous une incidence rasante d'un faisceau lumineux monochromatique. Ces considérations peuvent s'appliquer et être utilisées pour des lumières ou sources polychromatiques (lumière blanche par exemple) ; elles s'avèrent légèrement modifiées. Cependant des modifications optiques internes au réfractomètre sont alors mises en œuvre pour se ramener au cas simple de la longueur d'onde de référence de la raie D du sodium (589nm).

Ainsi le système optique du réfractomètre est basé sur la mesure de l'angle de réfraction limite à l'interface d'un prisme d'indice de réfraction élevé en général de l'ordre de 1,7 et d'un liquide d'indice de réfraction inconnu  $n$ , inférieur à celui du prisme, que l'on souhaite déterminer expérimentalement.

#### ▪ Description du réfractomètre

L'appareil se compose :

- D'un prisme mobile d'éclairage  $P'$  ;
- D'un prisme réfractométrique  $P$  fixe d'indice élevé  $n_P$  sur lequel on dépose une goutte de liquide dont on veut déterminer l'indice de réfraction  $n_S$  ;
- De deux oculaires  $O$  et  $O'$ , celui du bas ( $O$ ) permet de pointer la ligne de séparation des deux zones claire et obscure, celui du haut ( $O'$ ) permet la lecture de l'échelle des indices. Ces deux oculaires sont munis de système de lentilles dont le réglage permet une vision nette pour chaque utilisateur ;

- D'un dispositif permettant l'éclairage de l'échelle des indices. Il s'agit d'un petit volet circulaire muni d'un miroir obturant la fenêtre d'éclairage latérale ;
- D'un bouton moleté M permettant d'amener la limite de séparation dans le réticule de l'oculaire O. Il se situe à droite du réfractomètre lorsqu'on place son oeil dans l'un des oculaires ;
- D'un bouton moleté M' faisant tourner le système compensateur, série de prismes compensateurs, permettant de déterminer l'indice de réfraction équivalent à la raie D du sodium et de supprimer les colorations que peut présenter la limite de séparation entre la plage sombre et la plage claire. Ce bouton M' se situe à gauche du réfractomètre lorsqu'on place son oeil dans l'un des oculaires.
- D'un thermomètre pour repérer la température lors de la mesure de l'indice de réfraction.
- D'un système de régulation de la température.

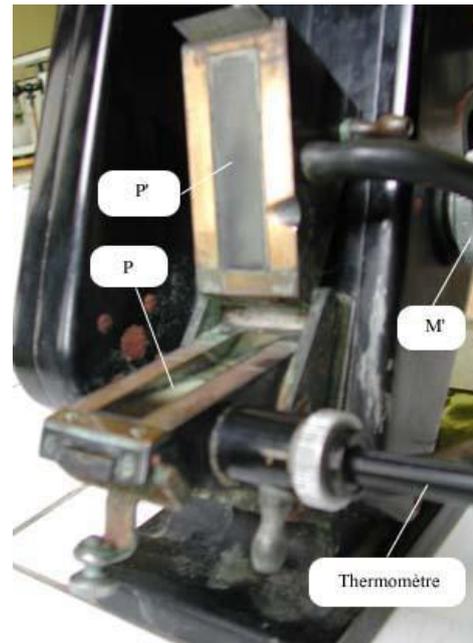


Le réfractomètre vue de face

### Le réfractomètre vue du côté gauche



### Le réfractomètre vue du côté droit



### Les deux prismes P et P'

#### ▪ Protocole expérimental de détermination d'un indice de réfraction

##### • Réglages préliminaires

- Mettre en marche le système de régulation de la température, si toutefois le réfractomètre considéré en possède un.
- Diriger le réfractomètre vers la lumière ou éclairer le système de prismes P-P' à l'aide d'une lampe (monochromatique ou non).
- Ouvrir et orienter convenablement le petit volet obturant la fenêtre d'éclairage de l'échelle des indices.
- Régler le tirage des oculaires pour avoir une vision nette du réticule et de l'échelle de lecture des indices de réfraction.
- Repérer la température à l'aide du thermomètre.
- Relever le prisme P' mobile et nettoyer soigneusement les deux faces apparentes des prismes P et P' à l'aide de papier très doux ou de coton hydrophile imbibé d'alcool.

##### ▪ Mise en place de la substance

Déposer le liquide en quantité suffisante à l'aide d'une pipette sur la face horizontale du prisme réfractométrique P. Attention de ne pas rayer la face du prisme P lors de ce dépôt ! Il est préférable d'utiliser, si c'est possible, une pipette en matière plastique. Sinon, il faut éviter tout contact entre la pipette en verre et le prisme P pour ne pas rayer celui-ci. Par ailleurs, il est important que toute la surface du prisme P soit recouverte de liquide.

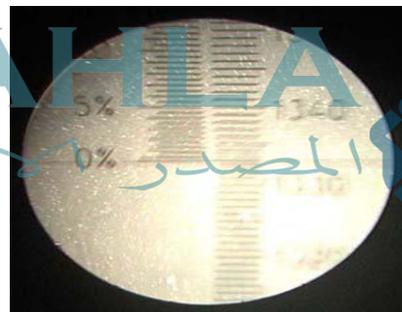
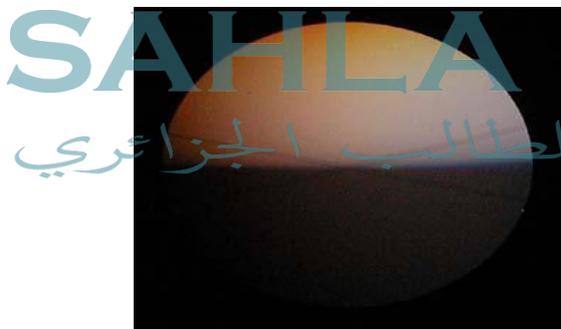
- Rabattre doucement le prisme P' mobile.

## ▪ Mesure

Dans un premier temps, on effectue ces différentes opérations en regardant dans l'oculaire O (celui du bas) :

- En agissant sur le bouton moleté de droite, amener dans le champ de vision la limite de séparation des deux zones claire et obscure. Cette ligne de séparation est plus ou moins nette : Des irisations sont observées lorsque l'on travaille en lumière non monochromatique ;
- En agissant sur le bouton moleté de gauche qui commande la rotation du système compensateur (série de prismes compensateurs), obtenir un maximum de contraste entre les deux plages et une ligne de séparation aussi nette que possible, par suppression des irisations. Ce réglage n'est pas à effectuer en lumière monochromatique.
- Enfin, ajuster cette ligne de séparation à l'intersection du réticule, en agissant à nouveau sur le bouton moleté de droite.
- Une fois ces opérations effectuées, il suffit de regarder dans l'oculaire O'(celui du haut) et de lire la valeur de l'indice de réfraction sur l'échelle supérieure. En effet, deux échelles sont visibles : l'échelle supérieure ou à droite indique la valeur de l'indice de réfraction et l'échelle inférieure ou située à gauche, graduée de 0 à 85, donne en pourcentage la teneur en matières sèches des jus sucrés.

Aspect du champ de vision observable dans l'oculaire O. Échelles observables dans l'oculaire O'.



Il est important de relever la température correspondant à cette mesure. Si le réfractomètre utilisé a un circuit de régulation de température des prismes et du thermomètre, la valeur de cette mesure est normalement identique à celle effectuée au cours des réglages préliminaires.

La précision de la mesure de l'indice de réfraction est de l'ordre de  $10^{-3}$ , voire  $10^{-4}$  selon le type d'appareil utilisé.

## ▪ Nettoyage de l'appareil

Une fois la mesure effectuée, soulever le prisme mobile et essuyer une première fois, délicatement, les deux prismes avec du papier propre très doux (papier Joseph) ou du coton hydrophile propre imbibé d'alcool ou d'éther de pétrole selon la nature de l'échantillon, puis sécher avec un papier propre très doux et sec.

Une fois ceci effectué, rabattre doucement le prisme P' mobile. Il peut même être souhaitable d'interposer un morceau de papier Joseph sec entre les deux faces.

## Chapitre 3 : Techniques de séparation des mélanges et Centrifugation

### 3.1 Techniques de séparation des mélanges hétérogènes et homogènes

#### ▪ Introduction

- Un mélange hétérogène est formé de plusieurs corps visibles les uns par rapport aux autres ( cola, orangina... )
- Un mélange homogène est formé de plusieurs corps que l'on ne peut distinguer ( sirop à l'eau, café...)

#### ▪ Principales techniques de séparation des mélanges

##### • Le dégrillage

Technique consistant à séparer grossièrement les gros déchets solides d'un liquide en faisant passer le mélange à travers des grilles plus ou moins larges. Cette technique est essentiellement utilisée dans les centrales d'épuration ou de traitement des eaux. On pourra se documenter sur ces différents traitements sur le site : [cieau.com](http://cieau.com)

##### • La décantation

Cette technique permet de séparer dans un même récipient les corps les plus lourds des autres en laissant reposer le mélange. Les corps les plus lourds vont alors se déposer dans le fond du récipient. Cette technique est utilisée pour traiter des mélanges de volume important comme dans les usines de traitements des eaux.

##### • La centrifugation

C'est le principe de "l'essoreuse à salade" que vous avez à la maison. Le mélange est versé dans des récipients que l'on met en rotation autour d'un axe fixe : sous l'effet de la force centrifuge, les particules les plus lourdes sont expulsées dans le fond du récipient. Cette technique est utilisée lorsque le mélange contient des particules solides si petites qu'une décantation est impossible ou trop longue (comme dans l'industrie laitière ou les laboratoires).

##### • La filtration

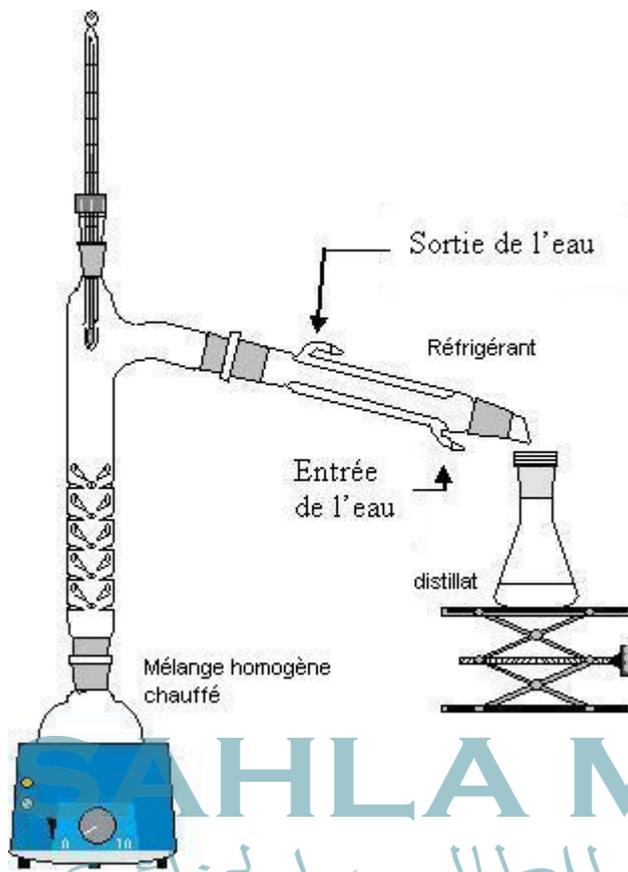
Après une décantation ou une centrifugation, les corps solides et liquides sont séparés mais dans un même récipient. La filtration va permettre de séparer physiquement le solide d'un liquide en faisant passer le mélange dans un filtre plus ou moins gros. Les corps solides (que l'on nomme résidus) sont piégés dans le filtre et le liquide (filtrat) est récupéré dans un récipient.

Remarque : avant une filtration, on procède souvent à une décantation ou à une centrifugation ce qui permet de ne pas boucher trop vite le filtre sur lequel se déposent les particules solides.

##### • La distillation

La distillation permet de séparer les constituants d'un mélange homogène formé de liquides dont les températures de vaporisation sont éloignées de plusieurs degrés Celsius. Le corps le

plus volatile (qui a la température de vaporisation la plus faible) se vaporise en premier, monte le long de la colonne puis est condensé en passant à l'intérieur du réfrigérant grâce à un circuit externe dans lequel circule en permanence de l'eau fraîche.



En contrôlant la température avec un thermomètre en haut de la colonne, on sélectionne les corps que l'on souhaite récupérer dans la fiole placée à la sortie du réfrigérant.

- **La chromatographie.**

La chromatographie permet de séparer un mélange solide coloré afin d'en déterminer sa composition. Une chromatographie se réalise sur une très petite partie du mélange. On dépose une trace du mélange solide dilué dans un peu d'eau à un centimètre du bas d'une feuille à chromatographie (qui ressemble à une feuille de papier buvard) préalablement placée dans une cuve dans laquelle on a versé un fond de liquide incolore volatile (mélange d'éther de pétrole et d'acétone). Par capillarité, le liquide remonte doucement le long de la feuille en entraînant de façon inégale les différents corps colorés qui composent le mélange.

*Exemple:* un pigment de couleur vert est composé par à partir de pigments bleus et jaunes : une chromatographie permet de le vérifier.

## 3.2 La centrifugation

### ▪ Introduction

Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces : son poids, dirigé vers le bas, et la poussée d'Archimède dirigée vers le haut. Selon sa densité, supérieure ou inférieure à celle du milieu, la force résultante sera dirigée vers le bas ou vers le haut, le corps descendra ou remontera dans le liquide. Ce phénomène est la sédimentation. Les macromolécules biologiques n'échappent pas à cette règle. Un exemple simple est fourni par les globules rouges qui tombent au fond du tube quand on laisse reposer un prélèvement de sang, les globules blancs moins denses formant une fine couche juste au dessus. En attendant assez longtemps, les molécules se répartiront en trois groupes, celle qui sont descendues au fond, celles qui sont remontées à la surface et celles qui sont encore en solution. En modulant correctement la densité du milieu on peut donc purifier une molécule.

Ce phénomène est long, il prend près d'une heure dans le cas du sang, et pourtant il s'agit de cellules, donc de quelque chose d'assez gros. La plupart des molécules biologiques sont beaucoup plus petites et la sédimentation naturelle prend plus de temps : plusieurs semaines, plusieurs années voire plusieurs siècles. Surtout dans le dernier cas, un biologiste ne peut pas attendre aussi longtemps.

### ▪ Principes de la centrifugation

Si l'accélération de la pesanteur était plus élevée, mettront 100 G les choses seraient différentes : les deux forces seraient plus intenses, leur résultante le serait aussi, la molécule sédimenterait aussi plus vite, à 100 G ce serait 100 fois plus vite qu'à 1. A 1000 ou 10000 G ça irait encore plus vite. Toutefois, on ne sait pas agir sur l'accélération de la pesanteur. Sur terre, on reste désespérément à 1 G. Il faut utiliser une autre accélération.

Tout le monde a un jour fait tourner un mobile fixé à une ficelle et a pu se rendre compte qu'à partir d'une certaine vitesse la force dominante n'est plus celle de la pesanteur, mais la force centrifuge. C'est cette force qui est exploitée en biologie. Un appareil spécial appelé centrifugeuse entraîne les préparations biologiques à des vitesses de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de milliers de tours par seconde, produisant des accélérations de plus millions de G sur la molécule à purifier. La sédimentation se produit alors en quelques heures au lieu de plusieurs années. De part ses variations, la centrifugation est une technique de purification très puissante. Aujourd'hui les petites centrifugeuses (ou centrifugeuses de paillasse) sont aussi courantes dans les laboratoires que les réfrigérateurs dans une maison. Les plus grosses et les plus rapides, appelées ultracentrifugeuses, font parties du matériel lourd et sont achetées et exploitées en communs par plusieurs laboratoires.

## ▪ Description de la centrifugeuse

Une centrifugeuse est constituée d'un axe portant un rotor spécial, l'ensemble étant entraîné par un moteur puissant. Le rotor porte des emplacements, situés symétriquement de part et d'autre de l'axe, qui peuvent recevoir des tubes contenant les préparations biologiques. L'ensemble est enfermé dans une cuve, scellée pendant la rotation, pour des raisons de sécurité.

## ▪ Risques et Précautions d'utilisation de la centrifugeuse

Deux problèmes se posent dans l'utilisation d'une centrifugeuse, surtout pour les ultracentrifugeuses :

- Le déséquilibre du rotor et le dégagement de chaleur.  
Le premier d'entre eux, le déséquilibre est la bête noire des biologistes. Un déséquilibre de g de part et d'autre du rotor se traduit par un équivalent de 100 kg sur l'axe à 100000 G. Une telle contrainte aboutit à la rupture de l'axe et le rotor s'envole tel un fresson. À une telle vitesse, le rotor n'est pas particulièrement gêné par le mur de béton de la pièce, encore moins par le technicien se trouvant sur son trajet. Tous les vieux biologistes ont un jour entendu parler d'accidents de ce genre qui se sont terminés en drames. Aujourd'hui le problème est moins critique car les matériaux sont de meilleure qualité qu'autrefois et les systèmes de sécurité empêchent la centrifugeuse d'accélérer si un déséquilibre est détecté. Mais la meilleure protection est quand même de préparer ses tubes avec soin. Les balances modernes permettent d'ajuster le poids d'un tube au mg près, ce qui assure une marge de sécurité suffisante.
- Le second problème est plus gênant. À la vitesse des centrifugeuses, le frottement de l'air sur le rotor produit de fortes quantités de chaleur. Or les molécules biologiques sont sensibles à la chaleur. Une première approche consiste à refroidir le rotor, toutes les centrifugeuses sont équipées de ce système. Mais à 50000 ou 100000 tours par minutes ça ne suffit plus. La solution consiste donc à supprimer les frottements en faisant tourner le rotor dans le vide. Les ultracentrifugeuses sont donc équipées de pompes à vides extrêmement performantes parmi les meilleures que l'homme sache produire.
- Un des attraits de la centrifugation est qu'il s'agit d'une des rares techniques utilisables sur de grosses quantités de matériel. Elle peut ainsi être utilisée au niveau industriel. L'exemple le plus connu est la stérilisation du lait : une centrifugation modérée sédimente les bactéries, les substances du lait plus légères ne sont que peu touchées.

## ▪ Variantes de la centrifugation

Au début de la centrifugation, le mélange contenant la substance à isoler est déposée à la surface du liquide. Au cours de la centrifugation, la molécule descend en fonction de sa densité. La vitesse de sédimentation est exprimée dans une unité indépendante des densités du milieu et de l'accélération : le Svedberg (S). Plus la valeur en Svedberg est élevée, plus elle arrivera vite au fond du tube. À la fin de la centrifugation, le tube contient deux phases distinctes : un dépôt plus ou moins solide au fond du tube qui correspond aux molécules ayant

reussi à sédimenter jusqu'au bout et appelé culot, un phase liquide qui contient toute les molécules n'ayant pas atteint le fond du tube, le surnageant. Selon les cas, la molécules désirée est dans le culot, le surnageant ou répartie entre les deux (dans ce dernier cas, cela signifie que les paramètres de centrifugation ont été mal choisis).

A partir de cette base simple, les biologistes ont développée plusieurs variantes de la centrifugation. La molécule à purifier n'est pas forcément la plus dense ou la moins dense. On peut aussi vouloir obtenir un profil de sédimentation, c'est à dire étudier la concentration en molécule en fonction du coefficient de sédimentation. Les biologistes ont donc réussis à imaginer et à fabriquer des milieux de densités variables en fonction de la profondeur dans le tube.

- **La centrifugation en double densité.**

Dans ce genre de centrifugation, le milieu est consisté de deux solution de densités différentes. La partie inférieure du tube contient un milieu a densité élevée, la partie supérieure contient un milieu de plus faible densité. En fin de centrifugatin, les molécules sont réparties en trois points : les molécules légères à la surface, les plus lourdes au fond, et à l'interface entre les deux milieux les molécules plus denses que le premier milieu mais moins denses que le second. En choisissant bien la densité des liquides, la molécule purifier se retrouve à l'interface et est isolée de la plupart des molécules plus denses et moins denses. Cette technique est donc plus performante que la centrifugation avec un milieu de densité unique, mais il faut avoir une idée du coefficient de sédimentation de la molécule à purifier pour que la fourchette entre les deux densité soit le plus proche afin d'éliminer un maximum des autres molécules.

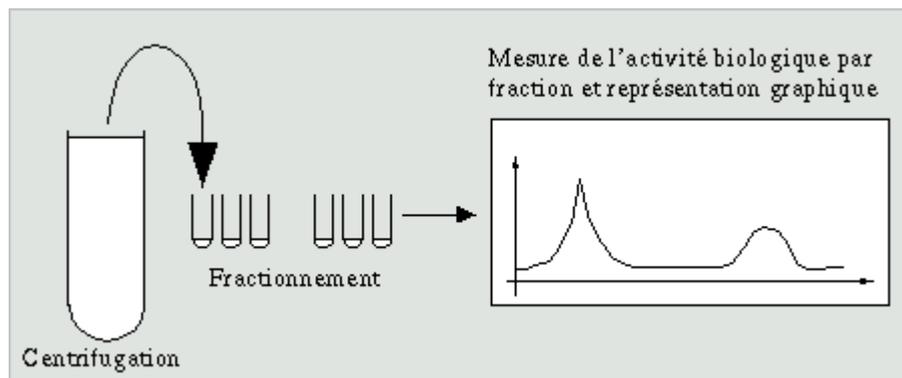
On peut signaler que l'on est pas obligé de se limiter à seulement deux densité, mais qu'on en peut avoir plus. La condition étant que les milieux légers soient au dessus des milieu denses. Pour des raisons techniques il est difficile d'aller au dela de 4. Par ailleurs, la position des molécules dépend peu des conditions de centrifugation, il suffit que celles ci soient suffisamment énergique pour que le phénomène se produise jusqu'au bout (mais sans aller jusqu'à detruire la molécule).

- **La centrifugation en gradient de densité.**

Ici la densité du milieu varie de façon continue depuis un maximum au fond du tube à une minimum à la surface. A la fin de la centrifugation, les molécules seront réparties dans le tube en fonction de leur densité. Cela peut sembler être une extrapolation de la technique précédente, mais en réalité sa finalité est très différente. Elle ne sert pas à purifier une molécule que l'on veut étudier mais a créer un profil de densité des molécules d'une solution.

Un exemple est la répartition des différentes variantes de la cholinestérase au niveau de la plaque motrice. Toutes ces molécules ont le même substrat (l'acétylcholine) et sont détectées et dosées par la même technique. Le dosage par les moyens traditionnels ne donne qu'une

activité globale sans aucune indication de leur répartition. La centrifugation en gradient de densité permet de les séparer. Le contenu du tube est ensuite reparti par un collecteur de fraction dans plusieurs tubes qui ne contiennent qu'une seule forme de la molécule, puis la molécule est dosée dans chaque tube. Le coefficient de sédimentation de chaque molécule et donc le tube où elle doit se trouver, étant connu, on peut tracer un profil de densité comme indiqué sur la figure ci contre. Ce profil représente la quantité de la molécule en fonction de la fraction (donc de la densité). Chaque enzyme, représentée par un pic, peut être ainsi mesurée séparément et on peut obtenir la proportion de chacune dans la totalité.



## ▪ Décantation et Centrifugation

### • La décantation

Dans un mélange hétérogène, certains constituants peuvent être visible à l'œil nu. Considérons un mélange hétérogène solide-liquide comme une eau de rivière.

Dans ce type de mélange, les particules solides « nagent » en suspension dans le liquide. Si ce mélange reste au repos quelques heures, la gravité fait son travail et entraîne les particules lourdes au fond du récipient contenant le mélange. Les particules les plus légères restent en surface. Nous appelons cette technique de séparation **la décantation**. C'est la première étape du nettoyage de l'eau dans les stations de captage placées au bord des rivières.



Mélange de départ avec les particules solides en suspension dans l'eau



Après décantation, un liquide plus clair se trouve en haut du récipient alors que les particules lourdes sont tombées au fond.

### • La centrifugation

La centrifugation constitue **un procédé de décantation perfectionnée** qui permet de gagner du temps, notamment dans les laboratoires d'analyse. En effet, il faut attendre quelques minutes, voire quelques heures pour que les particules les plus denses tombent au fond du récipient.

Dans les laboratoires, la centrifugeuse est un appareil qui reçoit des tubes à essais. Les tubes sont placés à l'intérieur. Une fois mise en route, la centrifugeuse tourne à des milliers de tours/minutes. Les particules solides présentes dans les mélanges sont alors plaquées au fond des tubes à essais. En haut du tube, un liquide clair apparaît.

### ▪ Principes de base

Une particule soumise à **un champ gravitationnel** tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement. Ce principe fondamental de physique est très utilisé en biochimie pour séparer des précipités, des cellules, des organites et même des macromolécules. En mettant une préparation biochimique dans le rotor d'une centrifugeuse et en faisant tourner celui-ci, on génère une accélération qui va pousser les particules qui la composent vers l'extérieur du rotor, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger. La vitesse avec laquelle se déplaceront ces particules est proportionnelle à

- la force gravitationnelle à laquelle la particule est soumise

- la masse de la particule

- la différence entre la densité de la particule et celle du solvant,

et inversement proportionnelle à

- la friction avec le milieu, en fonction de la taille et à la géométrie des particules.

Une particule donnée (e.g. une sous-unité d'un ribosome) a donc une vitesse spécifique de sédimentation lors d'une centrifugation parce qu'elle a une combinaison donnée de masse, de densité et de morphologie. On exprime souvent cette caractéristique en **coefficient de sédimentation**, généralement exprimée en unités **Svedberg (S)**. Plus une particule est massive ou dense ou ne génère qu'une faible friction (due à sa forme), plus son S sera élevé. Cette unité de "taille" est particulièrement employée pour caractériser **les particules ribosomiques**. **C'est pourquoi on parle encore de ribosomes 70 S chez les procaryotes et 90 S chez les eucaryotes.**

On peut facilement générer une force centrifuge (résistance au changement de direction imposé par une **force centripète**. C'est une résistance par inertie et non une force active) en faisant tourner à haute vitesse un rotor pouvant contenir des tubes à centrifuger. Une force gravitationnelle se forme alors perpendiculairement à l'axe de rotation du rotor.

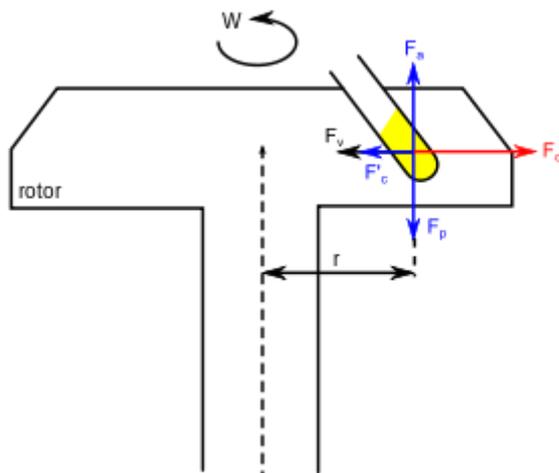


Schéma des différentes forces s'appliquant sur le composé à centrifuger

Au cours de la centrifugation, les composés dans le fluide situés à une distance  $r$  de l'axe de rotation sont soumis à différentes 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  $F_c$

Cette force centrifuge, exprimée en newtons, est donnée par la relation

$$F_c = m\gamma_c$$

المصدر الأول للطالب الجزائري

avec  $\gamma_c = \omega^2 r$  en  $m/s^2$

dont :

- La masse  $m$  du composé à séparer
- La distance  $r$  du tube à l'axe de rotation de la centrifugeuse
- La vitesse angulaire  $\omega$  exprimée en radians par seconde ou en tour par minute.

### ▪ Fonctions

La **centrifugation** permet de séparer :

- deux phases liquides ;
- une phase solide en suspension dans une phase liquide ;
- deux phases liquides contenant une troisième phase solide.

## ▪ Types de centrifugeuses

Il existe deux catégories principales de centrifugeuses :

- les **centrifugeuses à axe vertical**, appelées communément **clarificateurs** ou **séparateurs centrifuges** (avec un bol à assiettes ou à chambres qui tourne sur un axe vertical) ;



SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



- les **centrifugeuses à axe horizontal**, appelées communément **décanteurs centrifuges** (avec un bol cylindroconique qui tourne sur un axe horizontal et une vis disposée à l'intérieur du bol permettant l'évacuation des sédiments).



#### ▪ L'ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une méthode de centrifugation dont le but est de séparer des particules très fines dispersées dans un liquide de densité pratiquement égale. Pour que cette séparation ait lieu la vitesse de rotation de la centrifugeuse doit dépasser **les 15 000 tours par minute**.

La centrifugeuse utilisée est appelée ultracentrifugeuse. Le rotor de cet appareil se déplace dans un vide, de sorte qu'aucune résistance de l'air ne se produise.

L'ultracentrifugation a été développée au milieu des années 1923 par **Theodor Svedberg** (Il montra son utilité pour la séparation de protéines, ce qui lui valut la Médaille Franklin en 1949. Il obtint le prix Nobel de chimie en 1926). L'ultracentrifugation peut être utilisée pour des fins **analytiques ou préparatives**.

### **Chapitre 4 : Les techniques d'analyses au laboratoire et Méthodes Spectrométrie**

#### **4.2 Les techniques d'analyses au laboratoire**

##### **4.1.1 Introduction**

La détection d'une espèce chimique ou biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité —ou de sa concentration peuvent être faites soit à l'aide d'instruments d'analyse tels que les chromatographes ou les divers spectromètres, soit à l'aide de capteurs.

On peut dire des instruments d'analyse qu'ils sont généralement complexes, coûteux et souvent difficiles à mettre en œuvre. Ils sont aussi le plus souvent volumineux et tributaires de sources d'énergie relativement importantes, donc peu adaptés à l'analyse sur site. Ils sont enfin affligés de temps de réponse souvent très longs (préparation des échantillons, étalonnage, durée de l'analyse proprement dite, sortie des don

nées...). En revanche, avantage capital : la conception de ces instruments d'analyse permet d'obtenir une analyse complète du milieu [1].

Les techniques d'analyses physicochimiques regroupent les deux types de méthodes :

Une méthode officielle ou méthode analytique acceptée et recommandée par les organismes internationaux qui en ont évalué les caractéristiques de performance (précision, exactitude, etc ...) par des études collaboratives impliquant plusieurs laboratoires à travers le monde.

Une méthode de référence ou méthode officielle reconnue par les organismes internationaux comme étant la méthode qui donne le résultat le plus exact, c'est-à-dire le plus près de la valeur réelle de la concentration d'un constituant sous analyse. La méthode de référence donne habituellement les résultats les plus précis, par comparaison avec les autres méthodes d'analyse du constituant

#### 4.1.6 Les méthodes d'analyses

- **Méthodes potentiométriques**

Ces méthodes mettent en œuvre le plus souvent des électrodes spécifiques qui sont utilisées par immersion dans l'eau; elles permettent de mesurer: pH, potentiel d'oxydo-réduction, oxygène, turbidité, résistivité, fluorures, cyanures... Le couplage de ces sondes à une unité centrale de saisie de données (microprocesseur ou 337 micros ordinateurs) permet de suivre sur le site l'évolution de la qualité de l'eau dans le temps.

- **Méthodes colorimétriques**

Ces méthodes mettent en jeu des "réactions colorées" dont l'intensité de la couleur obtenue est évaluée au moyen de comparateurs possédant des disques, plaquettes ou bandes colorées servant d'étalons.

- **Méthodes volumétriques**

De nombreux paramètres sont déterminés par volumétrie (alcalinité, dureté totale, dureté calcique, chlorures...). Des malles contenant de la verrerie classique de laboratoire permettent ces déterminations (burettes, erlenmeyer, éprouvettes graduées, fioles...)[3].

#### 4.1.7 Les techniques d'analyse chimique de laboratoire

- **Spectrophotométrie**

- ❖ **Spectrophotométrie d'absorption moléculaire**

C'est la méthode analytique la plus utilisée en analyse d'eau. Elle nécessite la mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de (élément recherché. Elle s'appuie sur le fait que toute solution colorée traversée par un faisceau de lumière laisse passer une fraction de la lumière incidente; la quantité de lumière absorbée est proportionnelle à la concentration du composé coloré recherché (loi de Beer-Lambert). Cette technique a permis le développement de chaînes analytiques de laboratoire à flux continu, l'utilisation industrielle de photocalorimètres pour la mesure "séquentielle-en continu" de nombreux paramètres (silice, ammonium, etc.).

### ❖ Spectrophotométrie d'absorption UV et IR

Dans le domaine de l'eau, ces techniques sont surtout utilisées pour quantifier des familles de matière organique (MO).

La mesure de l'absorption UV à 254 nm est un indice caractéristique des substances possédant une ou plusieurs doubles liaisons.

La même mesure à d'autres longueurs d'onde complète l'examen (par exemple, acides humiques).

La mesure du COT (Carbone organique total)

fait intervenir une minéralisation du carbone organique par oxydation chimique et UV ou par combustion et une détection du CO<sub>2</sub> par IR.

La limite de détection de la méthode est de 0,2 mg.l<sup>-1</sup> et la précision est de 10 % (figure(II-4)).

L'indice CH<sub>2</sub> permet de mesurer les pollutions par les hydrocarbures, on fait en général appel à une technique fondée sur l'absorption des liaisons -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, dans le domaine infrarouge compris entre les nombres d'ondes 2 800 et 3000 cm. Plusieurs méthodes opératoires existent dont les champs d'application peuvent être incertains et l'interprétation difficile[3].

### ❖ La spectrophotométrie d'absorption atomique (AA)

#### Principe général

Cette méthode d'analyse dite élémentaire permet de doser des éléments chimiques à l'état de traces (en très faible quantité : quelques ppm) contenus dans une solution. Ainsi est on capable à partir d'un échantillon de connaître les concentrations des espèces présentes.

Cette méthode est quantitative notamment dans le domaine UV -visible.

La spectrométrie d'absorption est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie des atomes.

En effet un atome qui passe de son état (d'énergie) fondamental à un état excité quelconque absorbe un ou plusieurs photons. La fréquence  $\nu$  du photon dépend de l'énergie

$\Delta E$  acquise par l'atome par la relation :

$$\Delta E = h\nu$$

Où  $h$  est la constante de Planck.

On associe au phénomène d'absorption un spectre d'absorption.

Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments que l'on a décidé de doser.

Mise en œuvre

L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer-Lambert :

$$ABS = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Avec :

$\epsilon$  : constante qui dépend de l'atome absorbant.

$l$  : longueur de la flamme.

$c$  : concentration de la solution en élément absorbant.

Il existe donc une relation entre l'absorbance et la concentration de l'élément absorbant. Pour une longueur d'onde correspondant à un élément absorbant de l'échantillon, on peut mesurer l'absorbance associée traduisant le nombre de photons absorbés et ainsi à partir de la loi de Beer-Lambert est-on capable de connaître la quantité de l'absorbant considéré.

**La manipulation est la suivante :**

On mesure d'abord le profil ou la bande d'absorption pour le déterminer ou les maxima d' $\epsilon_{\lambda}$  (avec une solution de concentration donnée permettant une absorption suffisante). Dans le domaine infrarouge, on est plus en mesure de distinguer des maximums et donc de rendre la méthode plus qualitative.

on choisit alors la longueur d'onde  $\lambda$  pour laquelle  $\epsilon_{\lambda}$  est maximum c'est-à-dire la longueur d'onde associée à un élément de l'échantillon.

on mesure l'absorbance pour cette longueur d'onde comme pour toutes les méthodes quantitatives, on établit une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration connue des solutions étalons.

On doit obtenir une droite  $ABS=f(c)$  passant par l'origine

enfin à partir de l'absorbance de l'échantillon pour la longueur d'onde associée à un élément absorbant et la courbe d'étalonnage

, on calcule sa concentration.

On réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

**Avantages et limites de la méthode**

Cette méthode est peu chère car elle ne demande pas une technique complexe. Cependant elle reste très quantitative et ne permet pas toujours de connaître les éléments contenus dans l'échantillon. De plus elle nécessite un étalonnage à chaque nouvelle manipulation et demande ainsi beaucoup de temps [6].

Dans l'absorption atomique avec flamme (air/acétylène ou protoxyde d'azote/acétylène), (échantillon d'eau qui

contient les éléments métalliques recherchés, est dispersé en nuage de fines gouttelettes dans la flamme. Les métaux ainsi libérés forment un plasma d'atomes libres (figure (II-6)).

Dans le cas de l'atomisation sans flamme, obtenue par voie électrique, les volumes utilisés sont plus faibles. Le dispositif d'atomisation est constitué d'un tube de graphite que l'on chauffe à une température comprise entre 1500 et 2 800 °C. Il a pour objectif de produire une vapeur atomique à partir de l'échantillon d'eau[3].

La spectrophotométrie d'émission de flamme

La pulvérisation d'une solution d'eau contenant des métaux dans une flamme se caractérise par une décomposition et une dissociation à l'état atomique des traces métalliques. Les atomes des métaux sont ainsi excités thermiquement par la flamme, et leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'une radiation dont la longueur d'onde est spécifique de l'élément recherché et dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration. Cette technique est appropriée pour le dosage direct des éléments alcalins: Na, K, Li

#### ❖ Spectrophotométrie de plasma à couplage inductif (ICP)

La spectroscopie de plasma à couplage inductif est une technique qui fait appel aux phénomènes d'émission atomique dont la source d'atomes est un plasma d'argon. A haute température, il se forme au sein de l'argon un mélange d'atomes et de particules chargés suivant un équilibre.

Le plasma est produit par voie inductive par une génératrice haute fréquence.

Sa température varie entre 6 000 et 8 000°C. Les éléments recherchés sont introduits dans le plasma et transformés en vapeur atomique et éventuellement ionique par excitation lors de leur collision avec les éléments constitutifs du plasma.

Cette technique a un champ d'application plus large que l'absorption atomique sans flamme mais son pouvoir de détection est plus faible. La haute température du plasma permet de limiter les interférences de matrices et de ce fait l'ICP peut être très largement employée pour la recherche des métaux lourds.

Tous les spectrophotomètres comportent un système de dispersion de la lumière pour le choix de la longueur d'onde appropriée ainsi qu'un photomultiplicateur pour la mesure de l'intensité reçue.

#### 4.1.8 Fluorescence

La fluorescence est un phénomène de luminescence: des molécules émettent un rayonnement dans toutes les directions grâce à l'énergie reçue d'une lumière incidente. Elle est la propriété des composés cycliques aromatiques.

Sa mesure s'effectue à partir de spectrofluorimètres avec lumière incidente UV et lecture à 90° en lumières UV et visible.

#### 4.1.9 Chromatographie

Pour l'identification et le dosage des MO, on a, en général, recours à des techniques chromatographiques.

**En chromatographie en phase gazeuse (CG)**, la technique en colonne capillaire est utilisée en raison de son pouvoir de résolution inégalé, de la disponibilité de détecteurs universels et de son couplage aisé à la spectrométrie de masse (SM).

Un chromatographe en phase gazeuse ou liquide comporte trois parties: un injecteur, une colonne de séparation et un détecteur.

Après avoir introduit l'échantillon au moyen d'une microsiringue par l'injecteur, la séparation des molécules s'effectue dans la colonne en fonction d'un gradient de température.

A leur sortie de la colonne chromatographique, les composés séparés passent individuellement dans un détecteur dont la fonction

est de donner un signal (sous forme de pic) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composé injecté, ce qui permet d'assurer, par le biais d'un étalonnage, une analyse quantitative.

Les détecteurs universels présentent une sensibilité moyenne pour la plupart des composés organiques, alors que les détecteurs "spécifiques" donnent une réponse beaucoup plus intense pour certaines familles chimiques.

Le détecteur universel par excellence est celui à ionisation de flamme (FID). Des détecteurs spécifiques sont le détecteur à capture d'électrons (ECD) sensible aux composés halogénés, le détecteur thermo-ionique pour des composés azotés et phosphorés, le détecteur à photoionisation (PID) pour des composés aromatiques.

**La chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC)** utilise normalement pour phase mobile des solvants aqueux ou organiques.

Les techniques de mise en œuvre sont plus diversifiées qu'en phase gazeuse. La chromatographie en phase inverse qui utilise une phase liquide polaire pour éluer une colonne contenant une phase apolaire permet de déterminer les HPA.

**La chromatographie ionique (par échange d'ions)** permet de séparer un grand nombre de cations et d'anions.

**La chromatographie d'exclusion** sépare sur gel poreux des composés en fonction de leur taille, et permet de déterminer leur poids molaire apparent; des fractions de poids molaires différents sont ainsi disponibles pour des analyses complémentaires.

## 4.2 Méthodes spectroscopiques

### 4.2.1 Généralités sur les méthodes spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques permettent de déterminer les caractéristiques géométriques et énergétiques des molécules. Elles sont essentiellement utilisées pour déterminer les structures moléculaires.

La spectroscopie résulte de l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et une molécule. L'énergie d'une molécule résulte de quatre contributions : L'énergie des électrons ( $E_e$ ), l'énergie de translation ( $E_t$ ), l'énergie de vibration ( $E_v$ ) et l'énergie de rotation ( $E_r$ ). Ces énergies sont quantifiées. L'absorption d'une radiation électromagnétique de fréquence induit une variation d'énergie de la molécule, sans action  $E_t$  :

$$E = E_e + E_t + E_v + E_r$$

$$E = h\nu = E_e + E_v + E_r$$

Ordres de grandeur :

- $E_e$  de l'ordre de l'eV : transition dans l'UV-visible.
- $E_v$  de l'ordre du 1/10 d'eV : transition dans l'IR.
- $E_r$  de l'ordre du 1/1000 d'eV : transition dans les micro-ondes.

### 4.2.2 Spectroscopies d'absorption moléculaires

Spectroscopie micro-onde : spectroscopie de rotation. Informations sur les longueurs de liaison de molécules polaires diatomiques.

Spectroscopie IR : spectroscopie de vibration - rotation. Informations sur les déformations et élongations de liaisons : grande importance en chimie organique.

Spectroscopie UV-visible : spectres de transitions électroniques.

Spectroscopie photoélectronique. Utilisation de photons X pour ioniser l'atome ou la molécule :

$$h\nu = \frac{1}{2}mv^2 + EI. \text{ Information sur EI et sur l'énergie des niveaux électroniques.}$$

### 4.2.3 Spectrométrie d'absorption atomique

#### 4.2.3.1 Introduction

La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) est une technique décrite pour la 1ère fois par

Walsh (1955). AAS étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. C'est une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques (métaux et non-métaux). Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

#### 4.2.3.2 Principe

L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant selon la loi de distribution de Boltzmann, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser. L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer-Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

#### 4.2.3.3 Instrumentation de base

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, la lampe à cathode creuse, d'un brûleur et un nébuliseur, d'un monochromateur et d'un détecteur relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.

- **La lampe à cathode creuse** La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm de Hg. Lorsqu'on applique une différence de potentiel de quelques centaines de volts entre les deux électrodes, une décharge s'établit. Le gaz rare est alors ionisé et ces ions bombardent alors la cathode, arrachant des atomes à celle-ci. Ces atomes sont donc libres et sont excités par chocs : il y a émission atomique de l'élément constituant la cathode creuse. La particularité du rayonnement ainsi émis est qu'il est constitué de raies très intenses et très fines.
- **Le nébuliseur** L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur.

- **La flamme – atomisation**

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. La flamme air acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de 2500°C environ. A la place d'une flamme, on peut également utiliser un four cylindrique en graphite pour atomiser l'échantillon. La lumière qui quitte la source n'est pas monochromatique. On obtient un spectre de raies contenant :

- les raies de l'élément à doser,
- les raies du gaz de remplissage dans la source,

- les raies d'éventuelles impuretés,
- les raies de l'atomiseur (flamme).

Le rôle du monochromateur consiste à éliminer toute la lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille.

- **Le détecteur**

Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur. Ce dernier mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances. Il est relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.

On détermine :

**Absorbance spécifique = Absorbance totale – Absorbance non spécifique**

- L'absorption spécifique est due à l'élément à doser (sur une raie).
- L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice. Des mesures permettent la correction des absorptions non spécifiques.

#### 4.2.3.4 Dosage par absorption atomique

La courbe d'étalonnage est déterminée de deux manières différentes :

- **Étalonnage direct** → matrice simple (un seul élément à doser).
- **Méthode des ajouts dosés** → matrice complexe ou inconnue

#### Remarques

- S'assurer de la similitude de composition (solvant, concentration en acide, teneur en sels...) entre les solutions d'étalonnage et d'échantillons.
- Ne pas comparer des échantillons en solution organique à des étalons aqueux.

#### 4.2.3.5 Quelques applications

La spectrophotométrie d'absorption atomique est essentiellement une méthode d'analyse quantitative qui convient beaucoup mieux à la détermination des traces qu'à celle des composants majeurs. La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques (roches et minerais, métaux et alliages...). Elle est donc très adaptée à l'étude du matériel archéologique. Elle permet aussi de quantifier les éléments métalliques en solutions (Gestion des déchets). Citons quelques exemples :

- Analyse des constituants majeurs et mineurs de céramiques archéologiques
- dosage du Ca, Sr, Zn dans les os
- Analyse des éléments traces pour identification des pierres
- dégradation des verres
- dosage des particules métalliques (Cu, Fe...) dans le papier
- Analyse des eaux
- Analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques
- Analyse des aliments et boissons,
- Analyse des sols, engrais et sédiments
- Analyse des produits industriels

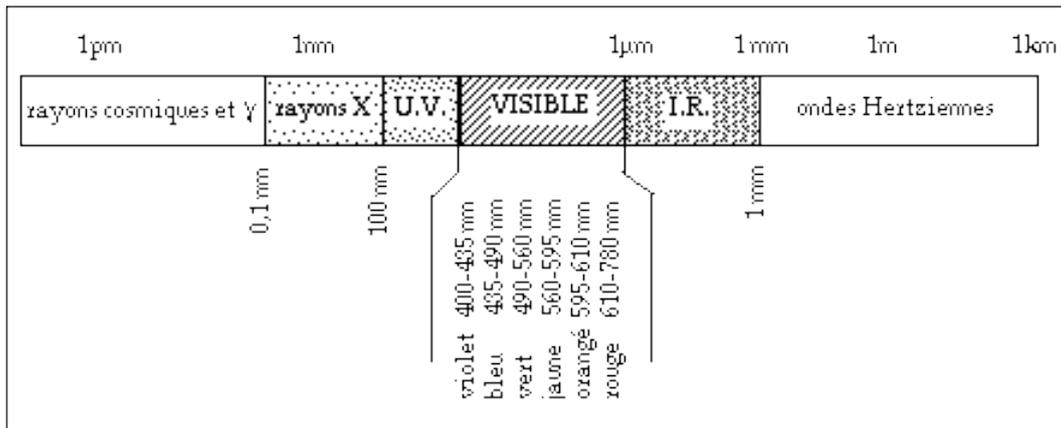
#### 4.2.3.6 Avantages

haute sensibilité, grande spécificité, rapidité, faible quantité de substance nécessaire (1 mL de la solution peut suffire) et facilité de préparation des solutions étalons.

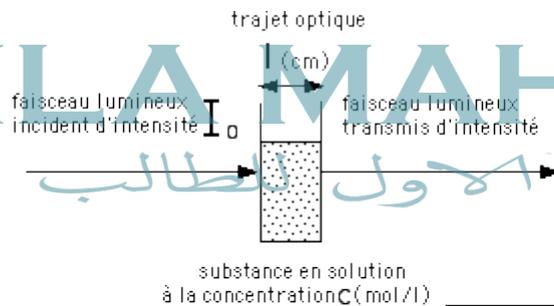
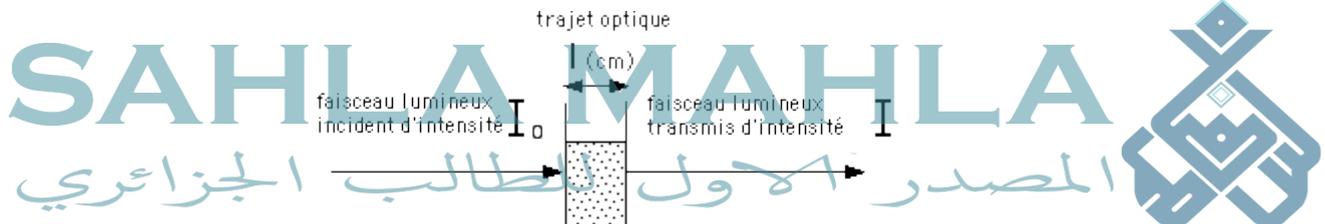
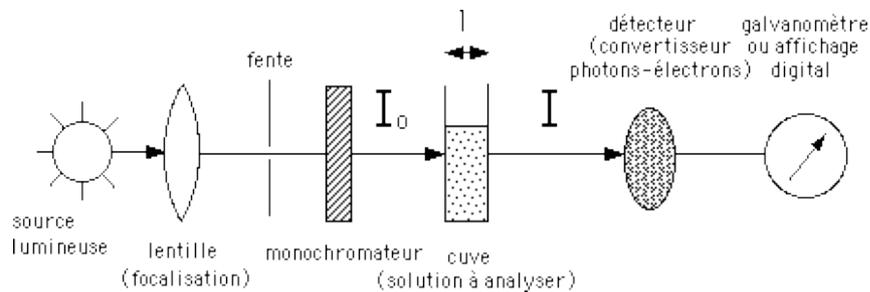
#### 4.2.3.7 Inconvénients

nécessité d'utiliser pour chaque élément à doser une source caractéristique, technique d'analyse destructrice, domaine d'application limité presque exclusivement aux métaux (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc...), nécessité d'avoir des concentrations assez faibles.

## 4.2.4 Spectrométrie UV-VISIBLE



### 4.2.4.1 Principe du spectrophotomètre et lois générales



TRANSMITTANCE ou TRANSMISSION

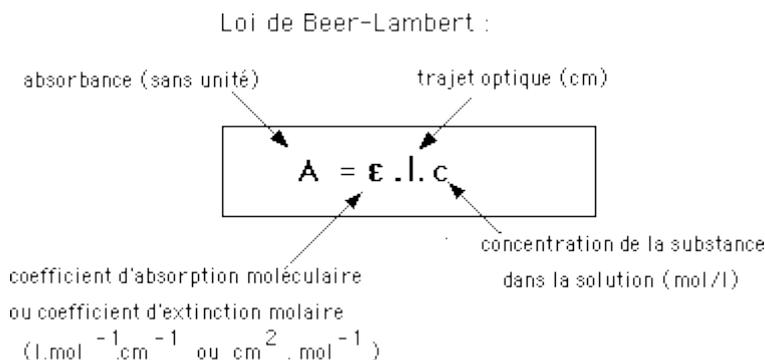
$$T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

ABSORBANCE ou DENSITE OPTIQUE (D.O.) ou EXTINCTION (E)

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

#### Variations de I, T et A

	I	T	A
Milieu transparent	$I_0$	100%	0
milieu opaque	0	0%	infinie



#### 4.2.4.2 Détermination des chromophores

Il existe un certain nombre de chromophores "élémentaires" qui absorbent l'UV à des longueurs d'ondes variées.

Chromophores élémentaires	$\lambda$ max (nm)	$\epsilon$ max (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
> C = C < (alcène)	173*	10000
- C ≡ C - (alcyne)	178*	2000
> C = O (cétone)	290	16
- CH = O (aldéhyde)	279	15
- COOH (acide)	208	32
- COCl (chlorure d'acide)	220	100
- CONH <sub>2</sub> (amide)	220	63
- COOR (ester)	211	57
- NO <sub>2</sub> (nitro)	214	17
- N = N - (azométhane)	338	4

\* spectre dans le n-heptane

La présence dans une même molécule de plusieurs de ces chromophores peut se traduire selon les deux cas suivants :

- par une simple additivité si ces chromophores sont indépendants,
- par des effets **bathochromes** (déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde en UV ou vers le visible) et **hyperchromes** (augmentation du coefficient d'absorption moléculaire) lorsque ces chromophores sont conjugués. C'est le cas des systèmes diéniques, polyéniques, aromatiques (plusieurs liaisons >C=C<) ou résultant de la conjugaison de chromophores différents. Ces interactions obéissent à des règles qui permettent de prédire la zone d'absorption maximale. Les spectres dépendent également des interactions avec le solvant. Bien évidemment, dans l'eau, les spectres sont très souvent sensibles au pH qui modifie l'ionisation de certaines fonctions chimiques.

Chromophores	$\lambda$ max	$\epsilon$ max	Remarques
Chromophores conjugués			
>C=C-C=C< (linéaire)	220	30000	
>C=C-C=O (dans un cycle)	244	10000	
<b>Acides nucléiques</b>			
Adénosine	260	15000	
Guanosine	255	14000	

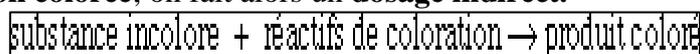
Thymidine	265	10000	
Cytidine	270	9000	sensible au pH
ADN double brin	260		1U.D.O.=50 µg/ml
ADN simple brin	260		1U.D.O.= 33 µg/ml
ARN	260		1U.D.O.= 40 µg/ml
<b>Protéines</b>			
Liaison peptidique	190	4-8000	sensible à la conformation
Pont disulfure	250	300	
Phénylalanine	257	200	
Tyrosine	275	1400	sensible au pH
Tryptophane	280	5600	
<b>Coenzymes, hèmes...</b>			
Flavine (FMN,FAD)	450	12700	déshydrogénases
NADH, NADPH	338	6400	déshydrogénases
Pyridoxal	390-500	6000	transaminases, décarboxylases
Hème II bande $\alpha$	550	27700	
Hème II bande Soret	400	120000	(--> couleur rouge)
Cis-rétinal	498	4200	rhodopsine
Chlorophylle A	660-680	10000	(--> couleur verte)

Les données de ces tableaux sont tirées de la référence suivante : Joel Janin, Méthodes biophysiques pour l'étude des biomolécules. Hermann, Paris 1985 (page 131).

#### 4.2.4.3 Dosages ou applications de la loi de Beer-Lambert

Deux cas sont possibles :

- La **substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique** dans le visible (substance colorée) ou dans l'UV; on fait alors un **dosage direct**.
- La **substance à doser ne possède pas de pic d'absorption caractéristique**; il faut alors effectuer une **réaction colorée**; on fait alors un **dosage indirect**.



Les conditions d'une bonne méthode de dosage sont les suivantes :

- spécificité** : la réaction colorée doit être spécifique de la substance à doser (qui doit être seule à réagir avec les réactifs de coloration)
- solubilité** : le produit coloré obtenu doit être soluble; la solution doit être limpide pour permettre une lecture en spectrophotométrie d'absorption.
- stabilité** : la coloration doit être stable pendant un certain temps, pour permettre d'effectuer les lectures sans que la coloration n'évolue; généralement il faut une certaine durée de développement de la coloration pour qu'elle soit stable.
- proportionnalité** : l'intensité de la coloration obtenue (son absorbance) doit être proportionnelle à la quantité de substance à doser présente; cela nécessite de mettre les réactifs de coloration en excès (pour que la réaction colorée soit totale), et éventuellement de

diluer la solution à doser (pour être dans les conditions de validité de la loi de Beer-Lambert).  
 -**sensibilité** : la réaction colorée doit être sensible, pour permettre de doser des solutions de faibles concentrations.

▪ **Méthode directe**

- elle consiste à **mesurer A** et à **calculer c** .
- elle nécessite de **connaître le  $\epsilon$**  de la substance à doser à la longueur d'onde choisie, et de bien caler le monochromateur, car  $\epsilon$  varie avec  $\lambda$ .

▪ **Méthodes indirectes : elles ne nécessitent pas de connaître  $\epsilon$ . On distingue :**

• **Méthode par comparaison avec un étalon unique:**

- elle consiste à mesurer dans les mêmes conditions l'absorbance  $A_d$  de la solution à doser et l'absorbance  $A_{et}$  d'une solution "étalon" ou "standard" de concentration connue  $c_{et}$ , puis à calculer la concentration de la solution à doser  $c_d$ .

- elle suppose mais **ne vérifie pas la linéarité**.

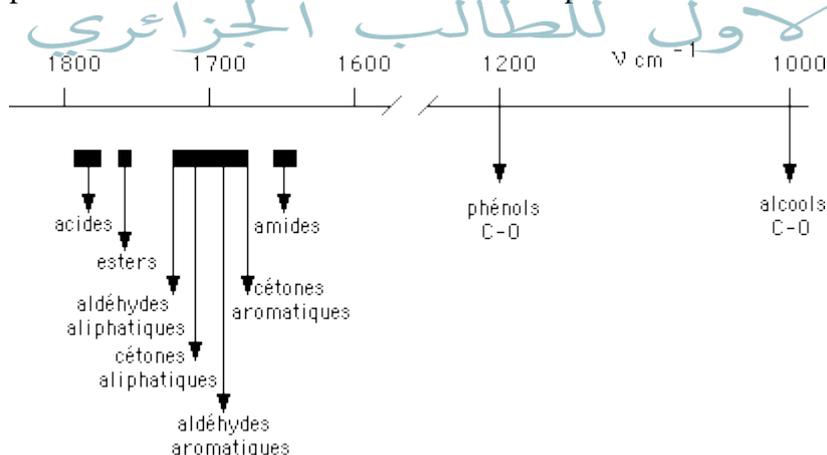
• **Méthode avec une gamme d'étalonnage**

Elle consiste à préparer une **gamme de dilutions** d'une solution étalon "mère", à mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons "filles", puis à tracer la **courbe d'étalonnage**  $A = f(c)$ . L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage; on fait ainsi une **détermination graphique** de la concentration de la solution à doser (la gamme doit encadrer la valeur probable de la solution à doser) ;

- elle permet de **vérifier la linéarité**, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation (tracé d'une droite statistique).

#### 4.2.5 Spectrométrie IR

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou pour tester la pureté d'une substance. Les différentes fonctions chimiques présentes sur une molécule donnée sont responsables de bandes d'absorption caractéristiques.



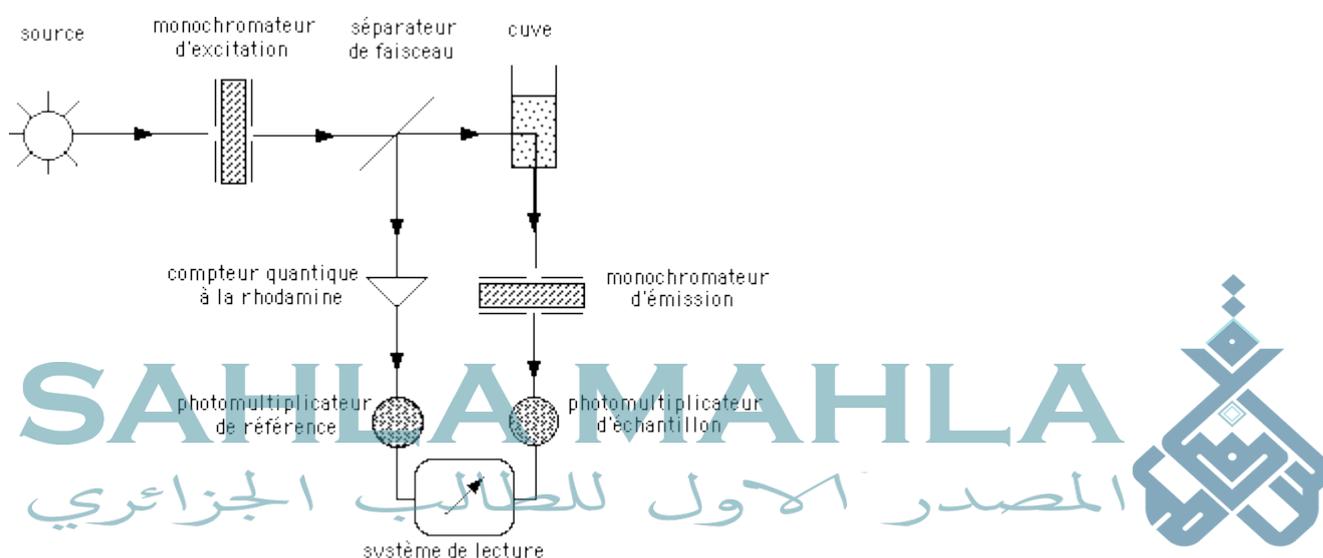
Exemples de valeurs des vibrations de valence ( $\nu$  C=O ou C-O) de carbonyles, carboxyles et dérivés divers ( $\nu$  = nombre d'onde =  $1/\lambda$ ).

Les spectres d'absorption IR sont caractérisés par de faibles coefficients d'absorption molaire (compris entre 10 et 1500) : la méthode est donc peu sensible mais il existe maintenant des appareils dits "à transformée de Fourier" qui permettent l'accumulation et le moyennage de spectres successifs d'un même échantillon. En augmentant le temps d'accumulation, on arrive

alors à obtenir des spectres avec de très faibles quantités de substance. Les spectres sont obtenus à partir de molécules à l'état gazeux, liquide (à l'état pur ou en solution dans des solvants "transparents" - CCl<sub>4</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CS<sub>2</sub> ou huile de paraffine Nujol®), ou solide (pastillage dans du KBr).

#### 4.2.6 Spectrofluorométrie

Les substances absorbant de l'énergie se trouvent alors "excitées" et elles doivent ensuite reperdre cette énergie. Ceci se fait le plus souvent sous forme de chaleur mais, dans certains cas, ce retour à l'état initial est lent et la substance peut alors émettre à son tour un photon (de plus basse énergie, donc de longueur d'onde plus élevée que celle de la lumière excitatrice). Ceci se manifeste plus particulièrement avec les substances possédant des cycles polyinsaturés. Les polycycles aromatiques (naphtalène, anthracène,...) et certains hétérocycles (coumarines, indoles,...) sont parmi les composés les plus fluorescents.



Quand on excite la substance à une longueur d'onde égale à son maximum d'absorption, celle-ci réémet une lumière que l'on peut mesurer, et dont l'intensité  $I_z$  est définie par :

$$I_z = k \cdot I_0 \cdot Q_z \cdot \epsilon \cdot c \cdot l$$

où l'on voit que  $I_z$  est proportionnelle ( $k$ ) au coefficient d'absorption moléculaire ( $\epsilon$ ), à l'intensité de la lumière incidente ( $I_0$ ), au rendement quantique ( $Q_z$ ), à la concentration ( $c$ ) et à la longueur du chemin optique ( $l$ ). Cette loi n'est vérifiée que pour des solutions diluées (absorption inférieure à 0,05 Unités de D.O.).

Le rendement quantique  $Q_z$  est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons **absorbés**. Il varie entre 0 et 1 et n'a pas de dimension. Il est caractéristique d'une substance donnée à une température donnée et dans un solvant donné. Il diminue (d'environ 1% par °C quand la température augmente), est indépendant de la longueur d'onde (car seul les photons absorbés sont pris en compte) et varie considérablement avec le solvant (d'un facteur 10 à 100).

Les appareils permettent (1) soit de déterminer les spectres de fluorescence (excitation/émission), (2) soit de réaliser des dosages quantitatifs et très sensibles (entre 1000 et 10000 fois plus sensibles qu'en UV-VIS). Il existe diverses réactions chimiques  $\pm$  spécifiques permettant de rendre fluorescents des composés qui ne le sont pas naturellement.

#### 4.2.7 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales : la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge ( $m/z$ ) et l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser (qualitativement et quantitativement).

La spectrométrie de masse a récemment élargi son champ d'application, qui était classiquement limité à l'étude des petites molécules organiques ( $PM < 2.000$ ), pour permettre actuellement d'étudier des macromolécules ( $PM \dots > 100.000$ ), dont il est possible de déterminer le PM à une unité près !

Les appareils peuvent être utilisés soit avec un système d'introduction directe (analyse de substances pures), soit couplés avec un système de chromatographie (TLC, GLC, HPLC, SFC). Certains appareils plus sophistiqués (MS-MS) permettent d'analyser des mélanges sans chromatographie préalable. Le premier étage de MS sert à sélectionner un ion, et le second analysera les ions issus de la fragmentation de celui-ci.

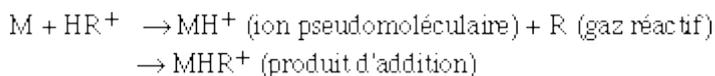
##### 4.2.7.1 Différents modes d'ionisation

###### ▪ EI-MS : Impact électronique

L'ionisation est réalisée dans une chambre d'ionisation où règne un vide de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  Torr. Un faisceau d'électrons est utilisé pour l'ionisation, et la collision soit éjecte un électron de la molécule, donnant une espèce  $M^+$ , soit la casse en fragments caractéristiques. Selon l'énergie utilisée pour accélérer les électrons, il y aura plus ou moins de fragmentation.

###### ▪ CI-MS : Ionisation chimique

Cette méthode utilise un gaz réactif (à la pression d'environ 1 mm Hg) qui est ionisé par un faisceau d'électrons et donne une série d'ions qui à leur tour réagissent avec les substances à analyser. On peut utiliser divers gaz, parmi lesquels l'ammoniac, le méthane et l'isobutane. La réaction d'ionisation est la suivante :



Il s'agit d'une méthode "douce", qui casse beaucoup moins les molécules que la précédente.

- **FD-MS** : Désorption de champ

Cette méthode convient bien aux molécules non volatiles et instables à la température. L'ionisation est réalisée dans un champ électrostatique intense (107-108 V.cm-1) : ces conditions amènent les molécules à perdre un électron ( $\rightarrow M^+$ ) sans les chauffer, et l'on n'observe pratiquement pas de fragmentation.

- **FAB-MS** : Bombardement par des atomes rapides

Cette méthode utilise un faisceau d'atomes neutres (Argon) de grande énergie cinétique pour l'ionisation de substances non volatiles, ionisées ou non, présentes soit à l'état solide, soit sous forme de solution dans une matrice de glycérol. L'ionisation s'effectue à température ambiante et fournit en abondance des ions pseudo-moléculaires ( $[M+H]^+$  en mode positif ou  $[M-H]^-$  en mode négatif).

- **Autres méthodes d'ionisation**

La désorption par plasma : le faisceau d'atomes rapides est remplacés par des produits de fissions d'atomes de californium ( $^{252}\text{Cf}$ ), qui produisent un chauffage rapide et l'ionisation des molécules en ions pseudo-moléculaires. La désorption par laser : dans ce cas les photons d'un faisceau laser provoquent une ionisation douce des molécules organiques et des ions pseudo-moléculaires sont alors formés.

#### 4.2.7.2 Analyse des petites molécules

Toutes les méthodes ci-dessus sont utilisables pour l'analyse des petites molécules. Selon leur volatilité et leur fragilité, on est amené à utiliser des méthodes d'ionisation plus ou moins "douces". Lorsque les substances organiques sont des ions (ex. esters phosphate), seul le FAB ( $\text{FAB}^+$  ou  $\text{FAB}^-$ ) permet d'observer des ions "moléculaires". La spectrométrie de masse permet donc de déterminer le poids moléculaire d'une substance, et les diverses fragmentations renseignent sur sa structure : les cassures s'effectuent en des sites privilégiés, par exemple au niveau des liaisons peptidiques ou osidiques pour les peptides et les polyosides respectivement.

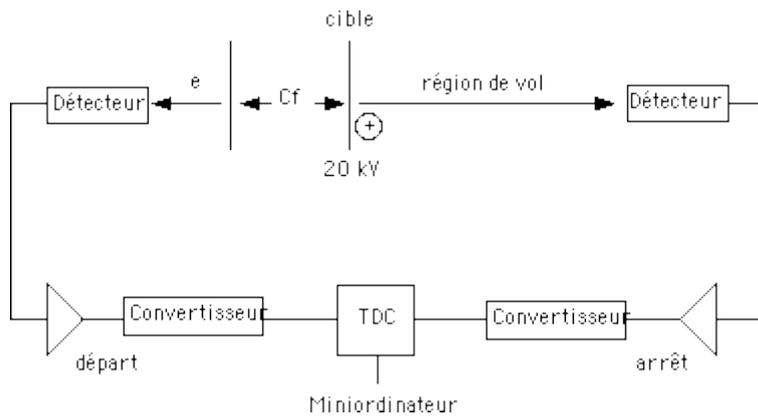
#### 4.2.7.3 Analyse des protéines

##### - détermination de leur P.M.

Il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer la masse moléculaire des protéines, parmi lesquelles :

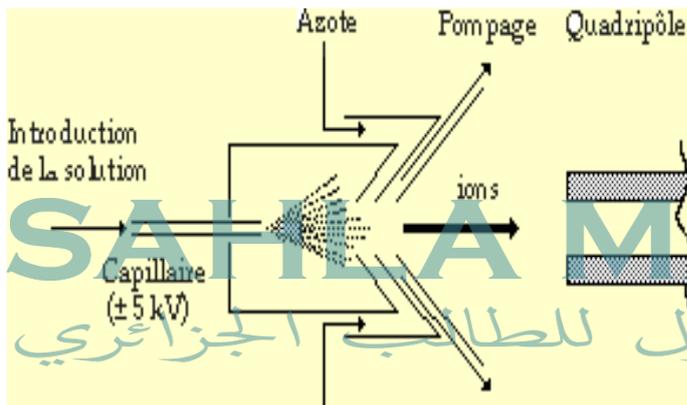
##### - la mesure de "temps de vol" (time-of-flight).

Le système utilise la désintégration d'atomes de  $^{252}\text{Cf}$ , qui peuvent dans 3% des cas se désintégrer en deux particules (Tc et Ba) émises simultanément et dans deux directions opposées. L'une des deux est immédiatement détectée et donne un signal de départ, tandis que l'autre frappe une "cible" sur laquelle est déposé l'échantillon. Celui-ci va alors émettre de 1 à 10 ions secondaires, qui vont se déplacer à une vitesse inversement proportionnelle à la racine carrée de leur masse. Le temps qu'ils mettent pour atteindre le détecteur (= leur temps de vol) permet donc de déterminer la masse des ions.

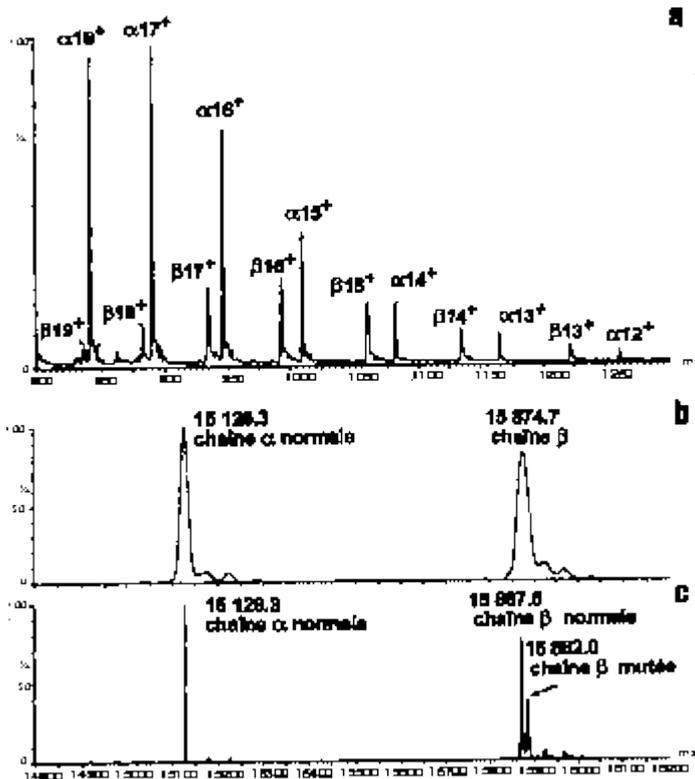


### - l'électrospray (ou ion-spray)

La solution contenant les protéines est vaporisée dans une chambre en présence d'un potentiel élevé qui va provoquer une grande ionisation des macromolécules (en moyenne une charge + pour 1000 Da, qui correspond à la fréquence moyenne de 10% des aminoacides basiques dans les protéines). Le système permet l'évaporation du solvant et les ions vont alors pénétrer dans l'analyseur quadripolaire. On obtient un ensemble de pics correspondant à des  $m/z$  différant successivement de une unité au dénominateur, ce qui fournit un ensemble d'équations à partir desquelles on peut déduire la masse de la protéine.



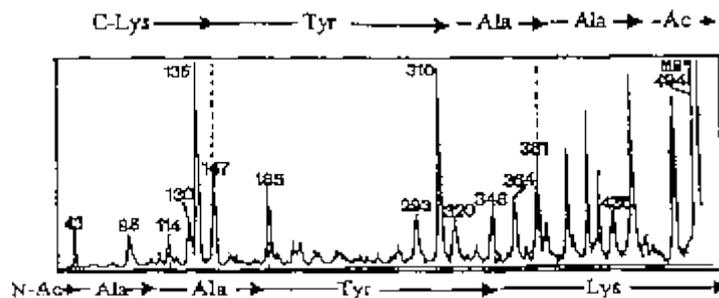
Le spectre d'une protéine contient plusieurs pics (dans la région autour de  $m/z = 1000$ ), qui correspondent à des espèces multiprotonées de la même molécule, et donc pas du tout à des fragmentations successives de celle-ci. Ceci permet de calculer la masse moléculaire de la protéine  $\pm 1$  Da. C'est très important, en particulier pour (1) tester la compatibilité avec l'analyse de la composition en acides aminés et (2) pour déceler diverses variations des modifications post-traductionnelles ou (3) identifier la nature d'éventuels groupements N-bloquants, qui empêchent par ailleurs le séquençage selon les méthodes classiques



L'analyse de l'hémoglobine humaine montre en (a) deux séries d'ions multichargés qui correspondent respectivement aux deux chaînes a et b. Une analyse plus approfondie montre dans ce cas particulier que la chaîne  $\beta$  est en fait un mélange entre la forme normale et un variant de masse très proche (s).  
 Source : Technoscope de Biofutur n°164 (1997).

#### 4.2.7.4 Application au séquençage des peptides ou des oligosaccharides

La spectrométrie de masse permet de réaliser un séquençage direct des peptides même lorsque l'extrémité terminale du peptide est bloquée et même si le peptide n'est pas pur. Ceci est effectué par MS-MS. Le premier étage sélectionne un ion correspondant au peptide considéré, et le second étage permet de suivre sa fragmentation. Celle-ci se réalise par coupure au niveau des liaisons peptidiques principalement (et ce à partir des deux extrémités). Il est alors possible de déduire de l'ensemble des ions obtenus la séquence peptidique lue simultanément dans les deux sens.

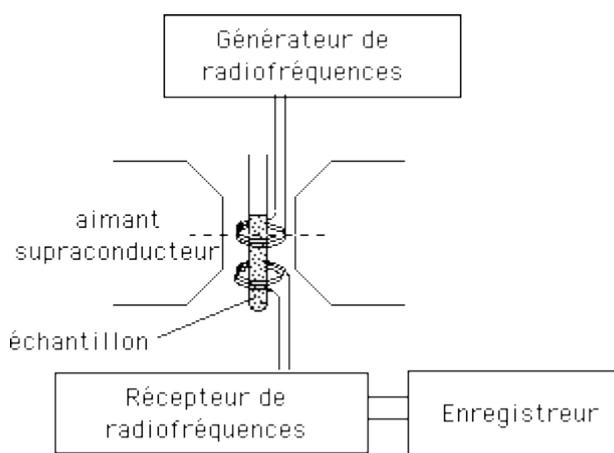


de déglycosylation des protéines N- ou O-glycosylées, qui laissent intacts les résidus oligosaccharidiques. La MS permet d'obtenir la masse moléculaire des oligosaccharides, et l'analyse des fragmentations renseigne sur la nature des sucres présents. Il est toutefois nécessaire d'utiliser simultanément d'autres techniques complémentaires (clivages enzymatiques, RMN,...).

## 4.2.8 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

### 4.2.8.1 La RMN et l'analyse structurale

Cette technique, qui utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique, est particulièrement puissante.

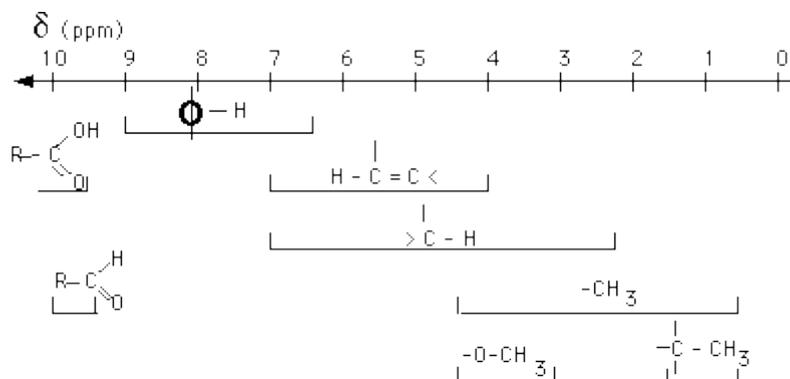


Le principe consiste à (1) utiliser un champ magnétique pour orienter les "spins" nucléaires des atomes, (2) à exciter ces spins par une onde radio à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins, (3) après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané : cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des protons + neutrons (= nucléons) d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique I. La RMN concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin = 1/2 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton (1H-RMN), celle du carbone ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou celle du phosphore ( $^{31}\text{P}$ -RMN). La faible abondance du  $^{13}\text{C}$  dans la nature (1% environ) fait que la RMN du carbone est peu sensible.

La RMN du proton analyse les composés dissous dans un solvant deutérié (afin que les signaux du solvant n'interfèrent pas avec ceux de la molécule à étudier). Le composé doit être d'abord lyophilisé dans un solvant deutérié ( $\text{D}_2\text{O}$ ) afin d'éliminer tout résidu de solvants de HPLC, puis est analysé dans l'appareil pendant une période allant de quelques heures à quelques jours. L'appareil fonctionne par accumulation successive de spectres individuels qui sont ensuite moyennés afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Ceci permet d'obtenir des spectres valables avec de faibles quantités d'échantillon. Le spectre contient un certain nombre de signaux correspondant aux différents protons de la molécule et il convient alors de l'interpréter. Dans un champ magnétique de 10000 Gauss (Bo), les protons résonent à une

fréquence très proche de 42,6 MHz. Selon leur environnement, les protons diffèrent et ils résonneront à cette fréquence pour un champ magnétique (B) légèrement inférieur. On exprimera cette différence (très faible) en ppm du champ  $B_0$ , selon la relation :

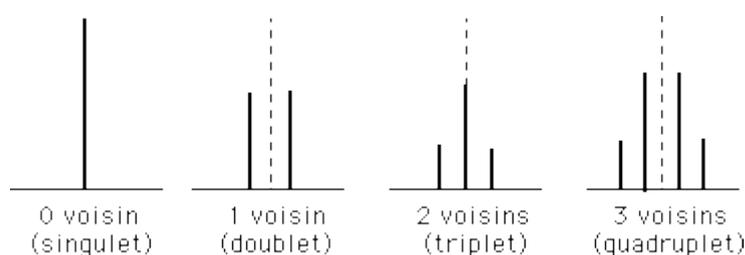
$$\delta = (B_0 - B) / B_0 \cdot 10^6 = \text{déplacement chimique (ppm)}$$



Quelques exemples de déplacements chimiques en RMN du proton

(0 = référence TMS)

Le signal d'un proton est donc caractérisé par son **déplacement chimique**  $\delta$  (exprimé en ppm de la valeur du champ magnétique), qui dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) et des autres substituants portés par ce dernier et les atomes adjacents : la présence de substituants comme des -OH, =O, ou celle de liaisons insaturées (C=C) affectent de façon caractéristique la valeur du déplacement chimique. Par ailleurs, les protons portés par un même carbone ou des atomes adjacents vont présenter des couplages, qui vont se traduire par une **multiplicité du signal** : le couplage avec un autre proton se traduit par la formation d'un doublet (avec deux protons d'un triplet etc.) et la largeur de ce doublet (exprimée en Hertz) dépend de la valeur des angles dièdres entre les liaisons C-H. La mesure des constantes de couplage permet de définir à la fois le nombre des voisins et la stéréochimie de la molécule.



L'application classique de la RMN concerne la **détermination des structures moléculaires**, qui seront décrites avec la **stéréochimie** exacte (ex. stéroïdes, oses, oligosaccharides,...).

L'utilisation de techniques de RMN à deux dimensions ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ ) permet d'"éclater" le spectre et facilite grandement l'identification des protons ou des carbones couplés.

L'analyse en couplage  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  permet d'établir la correspondance entre les protons et les atomes de carbone. Ces approches nécessitent toutefois des temps d'accumulation nettement plus longs, mais les progrès réalisés au cours des dernières années ont largement abaissé le seuil des analyses (ex.  $10\ \mu\text{g}$  pour un stéroïde)

L'analyse de petites molécules (poids moléculaire  $< 10^3$ ) est relativement aisée. Il n'en va pas de même avec des molécules plus grosses, bien que ceci devienne depuis peu possible. Les outils actuels (appareils à haut champ dotés de moyens informatiques puissants pour le traitement des signaux) permettent de s'attaquer à la structure tridimensionnelle de protéines en solution (un grand avantage par rapport à la cristallographie aux rayons X) pour des poids moléculaires allant jusqu'à 30 kDa. Les structures en  $\alpha$ -hélice ou en feuillet- $\beta$  se traduisent par des relations de proximité (= par des couplages) entre protons qui sont caractéristiques de chacun de ces états. Il est possible également d'analyser des interactions entre deux molécules (ligand-récepteur, métal-acide nucléique,...). La RMN permet donc actuellement des **études conformationnelles** des macromolécules biologiques.

#### 4.2.8.2 La RMN *in vivo*

C'est une méthode non invasive et non traumatique qui donne accès à un certain nombre de paramètres : elle permet par exemple la **mesure du pH intracellulaire** (mesure du déplacement chimique des ions phosphate), l'identification de composés organiques et la mesure de leurs concentration, l'étude cinétique de leur métabolisme ... Elle permet des études sur des tissus, voire sur l'animal entier (souris, rat) placé dans un système de contention adéquat. Diverses molécules sont ainsi accessibles, comme par exemple : les **composés phosphorés** (nucléotides - ADP, ATP, UDPG -, ions phosphate, esters phosphates - composés de la glycolyse, créatine-P -, phospholipides - phosphatidyl-choline, phosphatidyl-éthanolamine -, acides aminés - alanine, glutamine -, neuromédiateurs - GABA, ...

#### 4.2.8.3 L'imagerie RMN

Cette méthode utilise en pratique la RMN de l'eau, constituant de loin le plus abondant de la matière vivante. Les caractéristiques des protons de l'eau (en termes de temps de relaxation) varient selon les tissus et leur état hydrique. La méthode repose donc sur les différences d'état hydrique des tissus qui donnent des signaux différents. Ces signaux sont enregistrés selon des "plans de coupe" et les différences de temps de relaxation apparaissent comme des différences de contraste de l'image, très précises. On peut régler les appareils pour visualiser les tissus mous ou au contraire les systèmes ostéo-articulaires. Il est possible de caractériser par cette méthode diverses pathologies (inflammations, oedèmes, tissus cancéreux etc.).

#### ▪ Références

- [www.mt.com/GWP](http://www.mt.com/GWP)
- [www.humatem.org](http://www.humatem.org)
- [www.biologiesansfrontieres.org](http://www.biologiesansfrontieres.org)
- [www.biologiesansfrontieres.org](http://www.biologiesansfrontieres.org)
- M. Chavanne. G. J. Beaudouin. A. Jullien. F. Flammand. **Chimie organique expérimentale**. Ed. Modulo. 1991.

- Shoemaker. Garland. **Experiments in physical chemistry**. International Student edition, second edition. 1962.
- Weissberger. **Physical methods of Organic Chemistry**. volume I, Interscience Publisher. 1945.
- J.-M. Brébec. P. Denève. T. Desmarais. M. Ménétrier. B. Noël. C. Orsini. **Hprépa Optique 1ère année MPSI - PCSI - PTSI**. Hachette supérieur. 1999. Notice d'utilisation du réfractomètre de la société optique et précision de Levallois.
- La distillation
- Les techniques pour la séparation des mélanges

