

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Batna 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

POLYCOPIE DE COURS 1

Chapitre 1 : Méthodes spectroscopiques

MODULE

MÉTHODES MODERNE D'ANALYSES ET DE
DOSAGES EN BIOLOGIE
MASTER I (BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE)

Présenté par

Mr. Ghedadba Nabil

Chapitre I Les méthodes spectroscopiques (spectrophotométrie)

Intitulé du Master : Biotechnologie végétale

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UEM1

Intitulé de la matière : Méthodes modernes d'analyses et de dosages en biologie.

Crédits : 4

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Actualiser les connaissances de l'étudiant en matière de nouvelles techniques d'analyse en biologie.

Connaissances préalables recommandées : Biologie.

Contenu de la matière

1. Méthodes spectroscopiques (Spectrophotométrie)
2. Méthodes chromatographiques (chromatographie d'absorption, échange ionique, affinité etc.)
3. Méthodes enzymatiques (dosage d'enzymes, de substrat etc.)
4. Méthodes électro-phorétiques et électrochimiques (réaction antigène anticorps, généralités sur les méthodes immunochimiques courantes, immuno-précipitation etc.)
5. Méthodes cytologiques et ultra structurales.
6. Méthodes cytogénétiques moléculaires (hybridation in situ, FISH, GICH.)

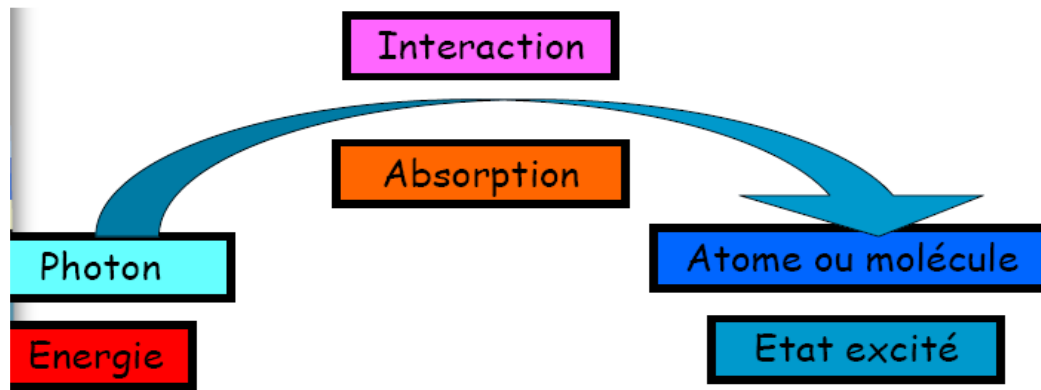
Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

Références : (Livres et photocopiés, sites internet, etc.)

I. Les méthodes spectroscopiques

1- Introduction et principe général

Se sont des techniques **d'analyses** (qualitative, quantitative et structurale), qui consistent à **mesurer l'absorption** d'une solution.

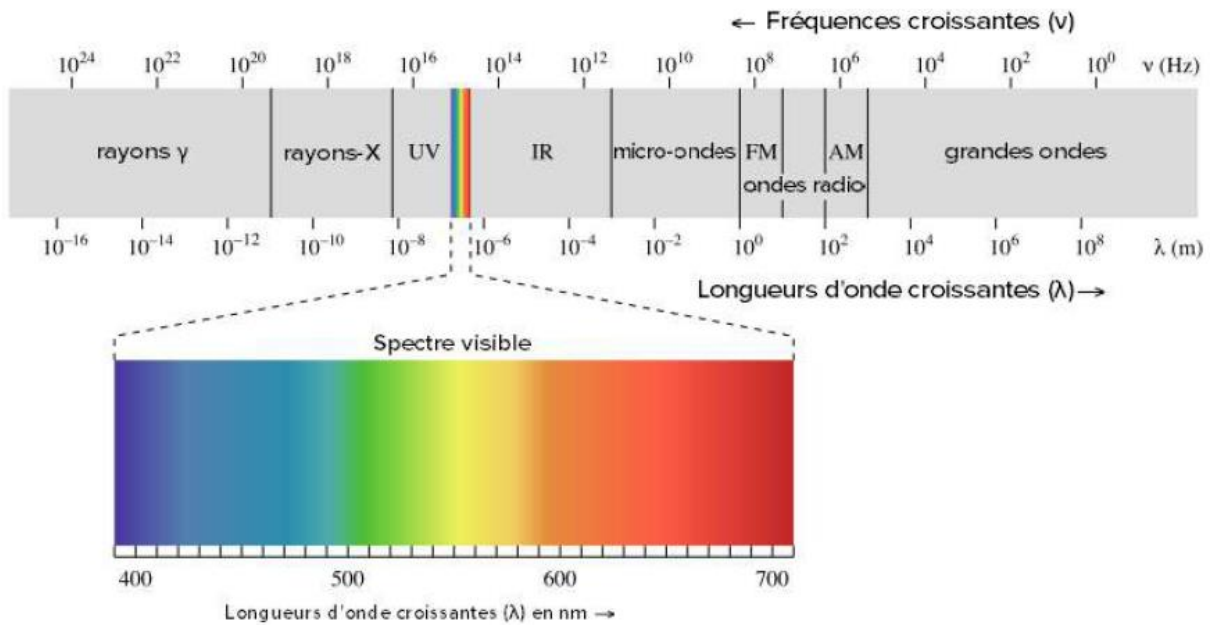


On fonction de spectre utilisé, et la nature de la substance à analyser on a plusieurs techniques :

- a- **Spectroscopie UV-visible = spectrophotométrie** = spectroscopie d'absorption moléculaire
- b- **Spectroscopie d'absorption atomique (SAA)** : La spectrométrie atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, c'est à dire lorsque celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Ce sera le cas si les énergies mises en jeu sont modérées.
- c- **Spectroscopie Infrarouge (IR)** : dans cette technique on peut exciter les modes de vibration (élongation et déformation des liaisons).
- d- **Spectroscopie de masse (SM)** : généralement couplé avec la chromatographie en phase gazeuse (CG/SM), appliquée surtout pour l'analyse et la détermination de la structure des huiles essentielles.
- e- **Résonance Magnétique nucléaire (RMN)** : très utilisée pour la détermination de la structure des molécules d'origine végétales (flavonoïdes, alcaloïdes, ...etc.)

2- Le spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont classées et réparties en fonction de leur longueur d'onde ou de leur fréquence ; cette répartition est appelée spectre électromagnétique. Ce spectre est représenté sur la figure suivante, qui consiste en une bande contenant tous les types de rayonnement électromagnétique qui existent dans l'univers.

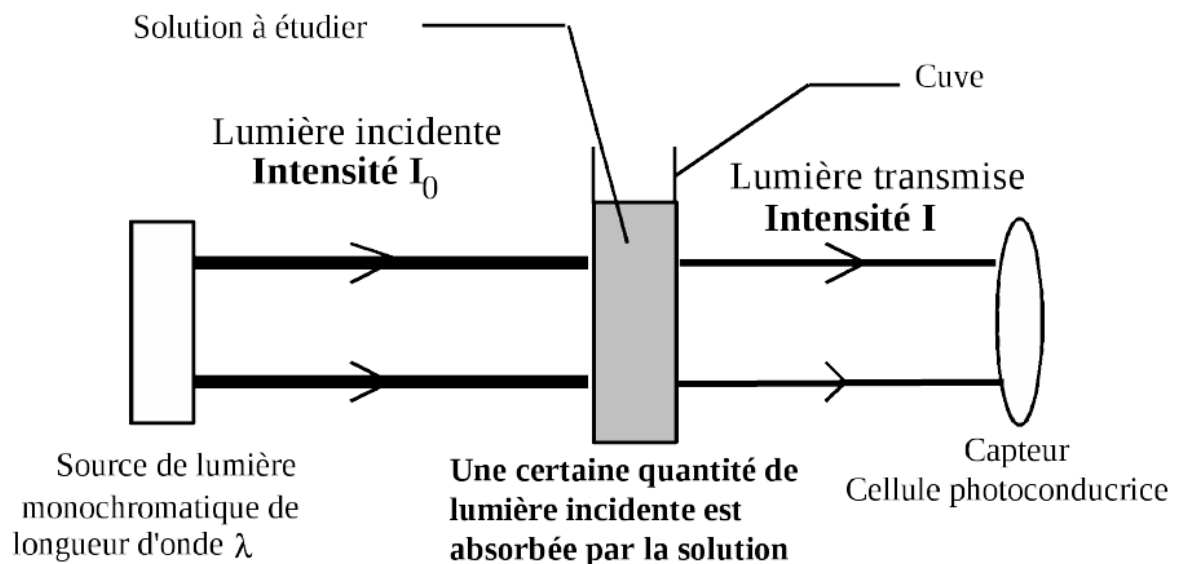


Dans ce cours nous allons aborder une technique spectrale d'analyse et de dosage :

- Spectroscopie Ultraviolet-visible

3- Principe de Spectroscopie ultraviolette et visible

Soit une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon d'épaisseur l , l'absorbance vérifie la loi de Beer-Lambert soit :



Le spectre UV-Visible est le tracé de A (absorbance) en fonction de λ (en nm) Bande d'absorption caractérisée par : sa position λ_{\max} (nm) et son intensité ϵ_{\max} ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) ou coefficient d'absorption molaire

Chapitre I Les méthodes spectroscopiques (spectrophotométrie)

A une longueur d'onde donnée, pour une solution donnée, pour une épaisseur e de solution traversée par la lumière, l'absorbance A est proportionnelle à la concentration C de la solution étudiée.

Loi de Beer-Lambert :

The diagram shows the equation $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ enclosed in a rectangular box. Three arrows point from text labels to the terms in the equation: one from 'absorbance (sans unité)' to 'A', one from 'trajet optique (cm)' to 'l', and one from 'concentration de la substance dans la solution (mol/l)' to 'c'. Below the box, a label 'coefficient d'absorption moléculaire ou coefficient d'extinction molaire (l.mol⁻¹.cm⁻¹ ou cm².mol⁻¹)' points to the Greek letter epsilon.

absorbance (sans unité)

trajet optique (cm)

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$

coefficient d'absorption moléculaire
ou coefficient d'extinction molaire
(l.mol⁻¹.cm⁻¹ ou cm².mol⁻¹)

concentration de la substance
dans la solution (mol/l)

La transmission $T = I/I_0$

Absorbance (A) = $-\log T$, $A = 1/T$,

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

L'absorbance est une grandeur additive.

❖ Conditions de validité de la loi de Beer Lambert :

La loi de Beer Lambert est valable dans des conditions très précises :

- La solution doit être **homogène** dans les solutions hétérogènes, il existe des phénomènes de diffusion qui entraînent une baisse accélérée de l'intensité résultante.
- La solution doit être **diluée** si la concentration est très importante, la relation $A = f(C)$ n'est plus linéaire, il faut un **monochromatisme** très poussé pour éviter des interférences de certaines substances, enfin pour deux substances en solution absorbant les photons à la même longueur d'onde, l'absorbance sera égale à la somme des absorbances, de chacune des substances il y a une additivité de $A (S1 + S2) = A (S1) + A (S2)$.

En résumé :

Cette relation, n'est valide que dans certaines conditions,

- la lumière incidente doit être monochromatique
- la solution doit être suffisamment diluée
- la solution doit être homogène (pas de précipité, ni de gaz)
- le soluté ne doit pas donner de réaction sous l'effet de la lumière

❖ Applications de la loi de Beer-Lambert

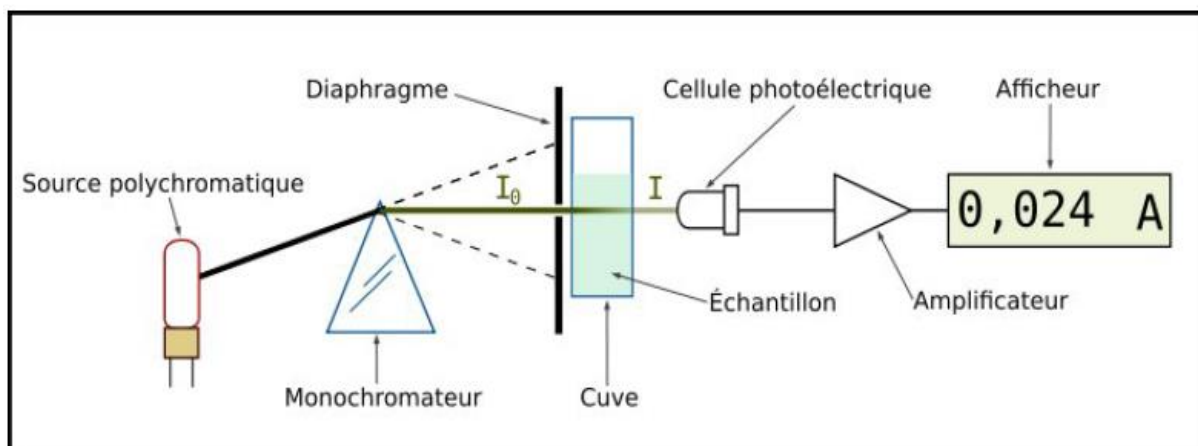
Cette loi est utilisée pour de nombreux dosages d'espèces chimiques colorés. Pour des composés incolores, il est parfois possible de fabriquer des complexes colorés. Cette loi n'est valable que pour les faibles concentrations est en général pour des absorbances inférieures à 1. La loi de Beer-Lambert est également utilisée dans certains détecteurs comme ceux utilisés en HPLC.

4- Appareillage

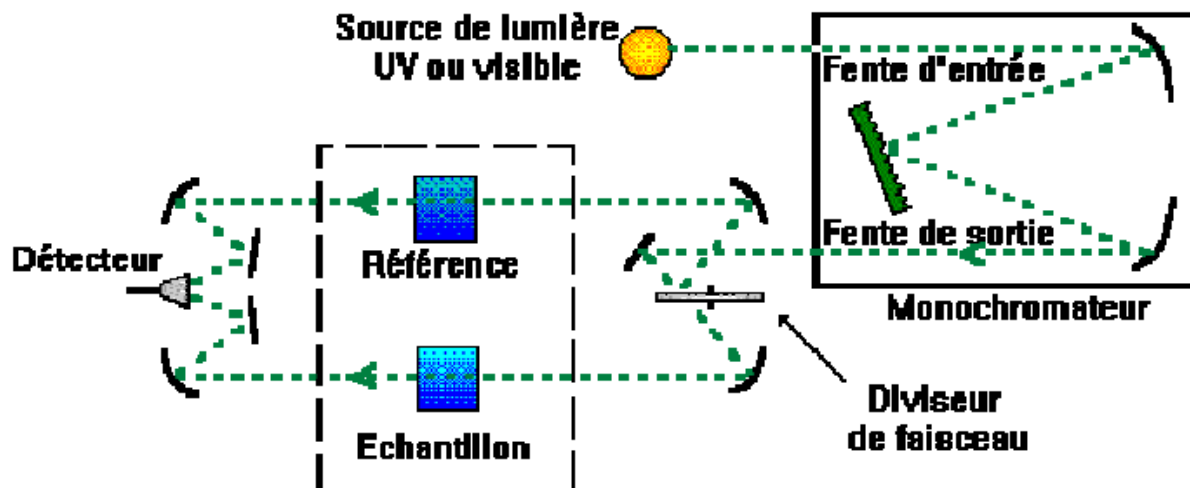
- Description de l'appareil

Le spectrophotomètre permet la comparaison d'un faisceau lumineux avant et après passage dans un échantillon. Un spectrophotomètre comporte : (Figure)

- **Une source de lumière blanche**
- **Un monochromateur** composé d'un réseau et d'une fente qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde autour d'une valeur choisie
- **Une cuve** qui contient l'échantillon à étudier
- **Un détecteur** qui mesure l'intensité lumineuse après la traversée de la cuve



Il existe des spectrophotomètres monofaisceaux (ci-dessus) et double-faisceaux (ci-dessous) ; les premiers nécessitent de travailler avec une solution de référence afin de « faire le zéro ».



5- Application de la méthode :

✓ *En biochimie clinique*

Cette méthode permet en biochimie clinique de doser de nombreux paramètres essentiellement sérique ou plasmique (sérum ou plasma) les principaux sont le glucose, cholestérol, triglycérides, protéines (hémoglobine, albumine, ...), urée, créatinine et calcium, bilirubine conjuguée et non conjuguée,

✓ *Dans le domaine végétal*

- Dosage des polyphénols (méthode de Folin Ciocalteu)
- Dosage des flavonoïdes (méthode d' AlCl_3)
- Dosage des tannins (méthode de la catéchine)
- Dosage des caroténoïdes, de la vitamine C, des alcaloïdes,

En enzymologie

Les activités enzymatiques :

Transaminase (ALAT : Alanine Amino-transférase et ASAT : Aspartate Amino-transférase), amylase, phosphatase alcaline, LDH (lactate déshydrogénase), ...

Il existe deux types de dosage :

- **Dosage directe** : lorsque, ξ est connue, λ_{\max} connue et spécifique dans un milieu donnée. Application directe de la loi de Beer Lambert.
- **Dosage indirecte** : dans le cas ou, λ_{\max} inconnue ou ξ inconnu

Lorsque λ_{\max} inconnue : Utilisation des réactions colorées

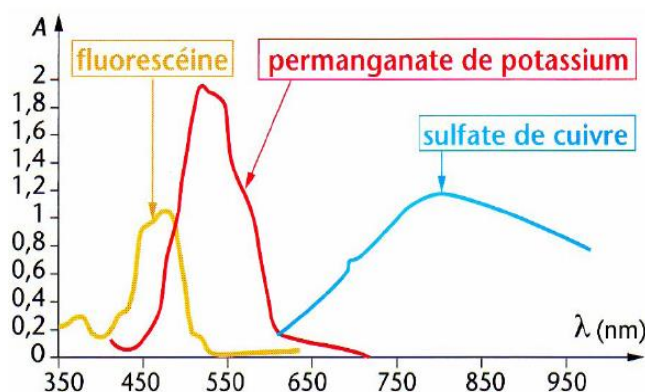
Substance (S) λ_{\max} ? + réactif \longrightarrow Produit (complexe coloré) à λ_{\max}

Chapitre I Les méthodes spectroscopiques (spectrophotométrie)

Lorsque ξ inconnu, λ_{\max} connu : méthode d'étalonnage (voir dosage spectrophotométrique)

5- Effets de différences facteurs sur l'absorbance

5-1- Nature de la solution et longueur d'onde d'étude



L'absorbance dépend de la nature de la solution et de la longueur d'onde de la lumière incidente.

5-2- Epaisseur de la solution traversée

Travaillons avec une solution de permanganate, à longueur d'onde fixe, et faisons varier l'épaisseur l de la solution traversée par la lumière d'analyse, en utilisant un, deux, trois ou quatre cuves accolées (en refaisant à chaque fois le blanc avec le même nombre de cuves contenant de l'eau).

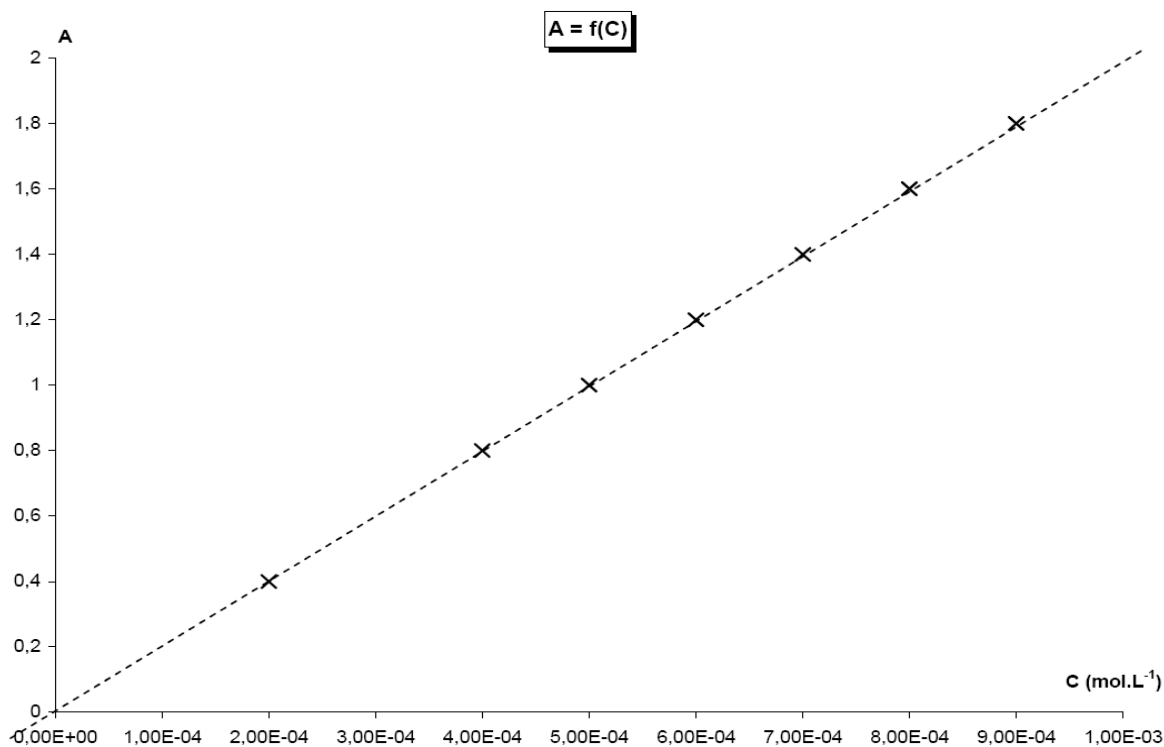
l (cm)	1	2	3	4
A	0,208	0,418	0,618	0,839
A/l (cm^{-1})	0,208	0,209	0,206	0,210

L'absorbance A est proportionnelle à l'épaisseur de la solution traversée par la lumière.

5-3- Concentration de la solution

On se prépare une gamme de solutions de permanganate de potassium par dilution à partir d'une solution mère de concentration $C_0 = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (pipette graduée de 10 mL et fiole jaugée de 10,0 mL).

N°	1	2	3	4	5	6	7
V_0 (mL)	2	4	5	6	7	8	9
C (mol.L^{-1})	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$
A	0,4	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8



L'absorbance A est proportionnelle à la concentration C de l'espèce absorbant la lumière dans la solution.

6- Dosage spectrophotométrique :

Définition: Doser ou titrer une espèce chimique en solution consiste à déterminer la **concentration molaire** de cette espèce dans la solution. Ex : On trace la droite d'étalonnage à partir d'une gamme étalon de l'espèce à doser.

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance étant proportionnelle à la concentration, cette courbe est une droite passant par l'origine.

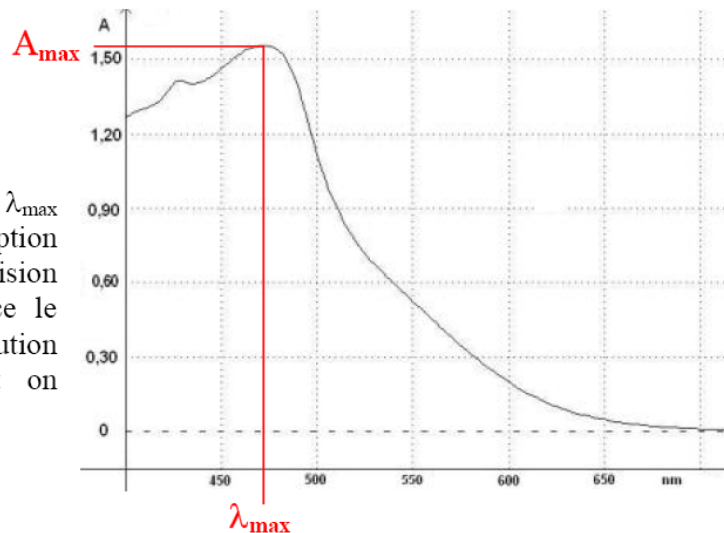
Pour doser une solution par spectrophotométrie, il est nécessaire de connaître un ordre de grandeur de la concentration à déterminer

6-1- Choix de la longueur d'onde de travail (Recherche du maximum d'absorption)

Le spectrophotomètre doit être réglé à une longueur d'onde fixe pour le dosage. Il est intéressant de choisir une longueur d'onde λ pour laquelle le coefficient d'absorption molaire ξ de l'espèce à doser est le plus élevé possible donc l'absorbance A la plus grande possible.

Il devient alors possible de doser l'espèce à de faibles concentrations. Il faut également choisir la longueur d'onde et la concentration de travail de telle sorte que les valeurs d'absorbance ne soient ni trop faibles afin de minimiser l'incertitude liée au bruit de fond, ni trop élevées pour que la loi de Beer-Lambert reste applicable. Ces limites inférieures et supérieures dépendent de l'appareillage utilisé.

On se place à la longueur d'onde λ_{\max} correspondant au maximum d'absorption afin d'obtenir la plus grande précision pour le dosage. Pour cela, on trace le spectre d'absorption d'une solution contenant le soluté à étudier et on détermine graphiquement λ_{\max} .



6-2- Droite d'étalonnage

On prépare ensuite une série de solutions (contenant le soluté à étudier) à différentes concentrations c . En se plaçant à λ_{\max} , on fait le zéro et on relève l'absorbance mesurée pour chaque solution.

On trace le graphique représentant A en fonction de C .

6-3- Concentration de la solution à doser

On mesure l'absorbance A_S de la solution S à la longueur d'onde λ_{\max} .

A l'aide de la droite d'étalonnage, on peut déterminer graphiquement la concentration C_S de la solution S . Prenons l'exemple du dosage d'une solution de permanganate de potassium.

