

1. Historique

Dans l'antiquité grec, des savants cherchaient d'arracher les secrets de la lumière et parmi eux, Ptolémaïs. En étudiant la diffraction de la lumière et il arrive à la conclusion lorsque un rayon lumineux passe d'un milieu transparent dans un autre de densité différente, il subit une déviation en traversant la surface de séparation des deux milieux. Il formule ainsi les bases d'une optique de la diffraction.

1666 : Newton, en faisant passer la lumière solaire à travers un prisme de verre, montre que la lumière blanche est composée de couleurs élémentaires, chaque couleur étant déviée d'une quantité différente (figure 1). C'est le phénomène de la réfraction.

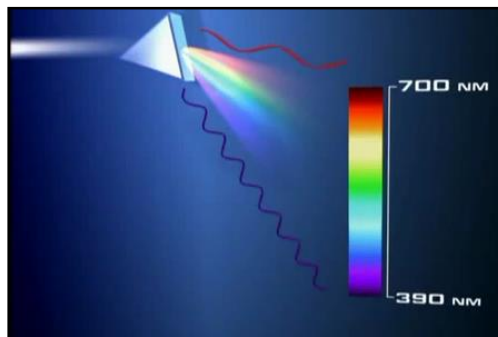


Figure 1. Le phénomène de réfraction.

1800 : Herschel montre l'existence d'un rayonnement au delà du rouge, découvrant ainsi l'existence des infra-rouges.

1801 : Ritter découvre l'existence du rayonnement ultra-violet.

Young met en évidence l'aspect ondulatoire de la lumière et mesure avec précision les longueurs d'onde avec un réseau de diffraction. Chaque couleur pure est caractérisée par sa longueur d'onde propre.

Newton avait toujours été réticent à une interprétation ondulatoire de la lumière, préférant penser en termes de "corpuscules". En vérité, la lumière est un rayonnement électromagnétique qui présente à la fois des caractéristiques d'onde et de particules (sans masse, appelés les photons).

1802 : Wollaston découvre la présence de raies d'absorption dans le spectre solaire.

1814 : Fraunhofer observe, décrit et dessine le spectre du Soleil (figure 2). Il fut le premier à étudier en 1823 le spectre des planètes et des étoiles les plus brillantes. Il constate qu'une raie double dans le spectre du Soleil correspond exactement à celle observée dans le spectre d'une flamme (c'est le Sodium). Plus tard il décrit 350 autres raies dont bon nombre sont dues au Fer.

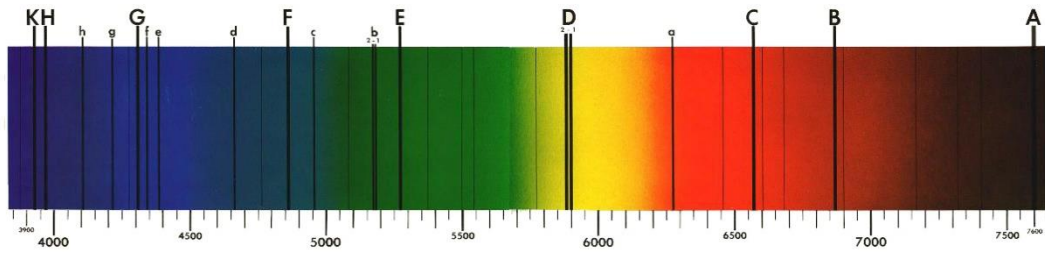


Figure 2. Les raies du spectre du soleil.

Kirchhoff avec l'aide de Bunsen découvre les lois du rayonnement qui portent son nom.

Herschel et Talbot suggèrent pour la première fois d'utiliser la spectroscopie pour l'analyse chimique des substances.

Herschel, Fizeau et Foucault étudient le spectre infrarouge du Soleil.

1842 : Becquerel fut le premier à photographier le spectre solaire.

1868 : un élément chimique inconnu jusqu'alors fut identifié dans le spectre du Soleil par nombreux astronomes lors d'une éclipse de Soleil. Mais Lockyer pu déterminer en 1868 la longueur d'onde exacte de cette raie. Cet élément fut alors nommé "hélium." Ce gaz ne fut identifié sur Terre qu'en 1895.

2. Notions de base

2.1. Spectre électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique se présente sous la forme d'onde électromagnétique qui se propage dans le vide à la même **vitesse** que celle de la lumière c ($2.9979 \cdot 10^8$ m.s⁻¹ dans le vide). Seule une partie de ces ondes est visible sous forme de lumière. L'ensemble de ces ondes, visibles ou non, forme ce qu'on appelle le spectre électromagnétique. Le rayonnement électromagnétique peut être caractérisé par sa **longueur d'onde** λ , par le **nombre d'onde** $\tilde{\nu}$ ou encore par la **fréquence** ν :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = 1/\tilde{\nu}$$

Il est bon de rappeler également que l'**énergie** d'un rayonnement électromagnétique **E** est reliée à sa fréquence par la relation :

$$E = h \nu ; h: \text{constante de Planck.}$$

Le spectre électromagnétique (figure 3) s'étend des radiofréquences de plus basse énergie (ou de plus grande longueur d'onde) au rayonnement Gamma de haute énergie (ou de petite longueur d'onde). Le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV-VIS s'exprime par sa longueur

d'onde λ , en nm. Le domaine UV s'étend de 10 à 390 nm, celui du visible de 390 à 770 nm (du bleu au rouge) et celui de l'infrarouge (IR) du 780 nm à 1mm. Cependant, l'unité spectrale utilisée pour la spectroscopie IR est le nombre d'onde $\tilde{\nu}$, exprimé en cm^{-1} .

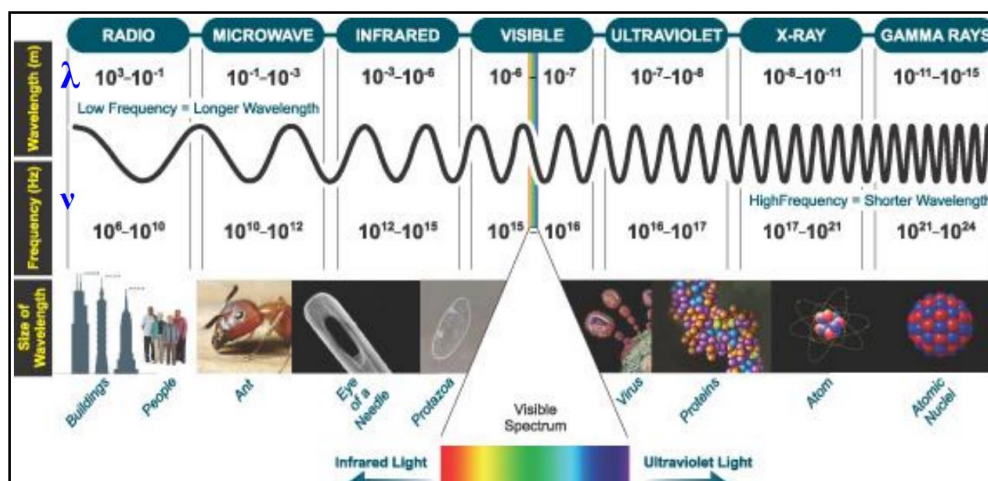


Figure 3. Le spectre électromagnétique.

A chacun des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, ou presque, correspond un type de spectroscopie qui repose sur une interaction particulière de la matière avec ce rayonnement (figure 4). Ainsi pour le domaine :

- Des γ et des RX, le rayonnement est extrêmement énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques de noyau. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie γ et dans la fluorescence X.
- Des UV et du visible, le rayonnement est énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques périphériques et/ou des orbitales moléculaires. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie d'émission atomique (SEA), la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) et la spectroscopie moléculaire (UV-VIS).
- De l'IR, le rayonnement est faiblement énergétique et ne peut affecter principalement que les modes de vibration des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie IR et la spectroscopie Raman.
- Des radio, finalement, le rayonnement est très faiblement énergétique et ne peut affecter que les modes de rotation des molécules, modification d'états de spin électronique (résonance paramagnétique électronique, RPE) et modification d'états de spin nucléaire (résonance magnétique nucléaire, RMN).

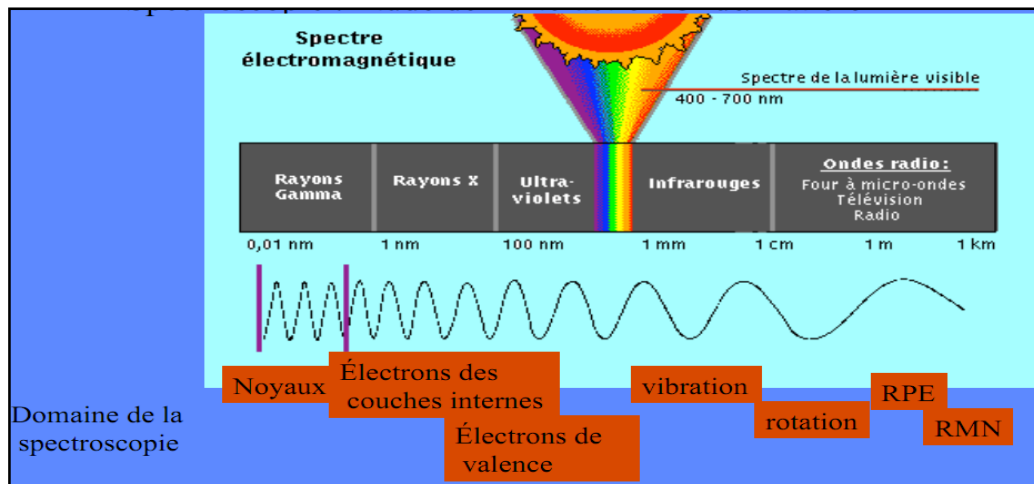


Figure 4. Domaine de la spectroscopie.

2.2. Spectre, spectroscopie et spectrométrie

La spectroscopie est l'étude du spectre électromagnétique d'un phénomène, visuellement (d'où le suffixe -scopie). Depuis un certain temps, l'œil a été remplacé par différents types de détecteurs photoélectriques, et il convient alors de parler de spectrométrie (le suffixe -métrie indiquant que l'on effectue une mesure et non une simple appréciation du phénomène). Il conviendrait de remplacer le terme "spectroscopie", par le terme plus exact de "spectrométrie".

Le spectre est la distribution en énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission, etc. en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. On distingue trois types de spectres :

- Les spectres continus, pour lesquels il existe un "signal" pour chaque longueur d'onde ou fréquence (figure 5a).
- Les spectres discontinus, ou spectres de raies, ou encore spectres discrets, qui ne disposent d'un signal que pour certaines fréquences ou longueurs d'onde spécifiques, caractéristique de la matière irradiante ou irradiée (figure 5b).
- Les spectres combinés qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret (figure 5c).

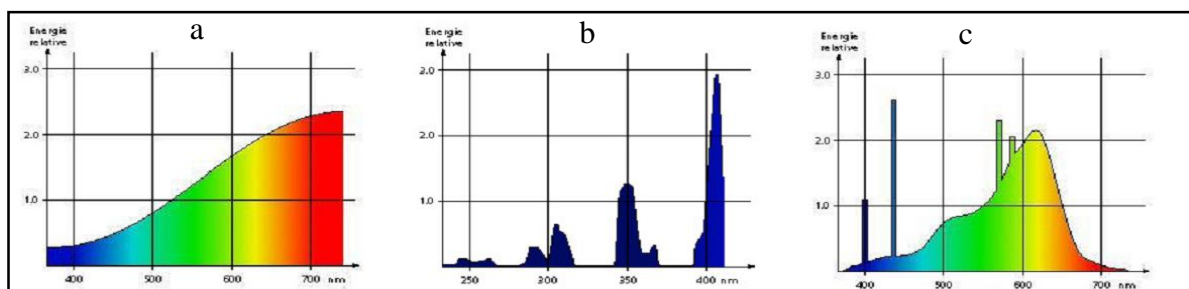


Figure 5. Différents types de spectres. **a** : spectre continu, **b** : spectre discontinus, **c** : spectre combiné.

2.3. Absorption et émission

Les échanges d'énergie entre les atomes et la lumière sont quantifiés: ils se font par paquets d'énergie appelés photons.

2.3.1. Absorption

Un atome initialement au repos au niveau fondamental d'énergie E_f peut passer au niveau excité supérieur d'énergie E_e , en absorbant un et un seul photon d'énergie $\Delta E = h \cdot \nu = E_e - E_f$ (figure 6).

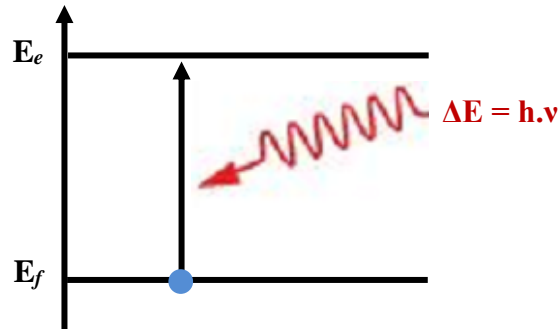


Figure 6. Phénomène d'absorption.

2.3.2. Emission spontanée

Les états électroniques excités ne sont pas stables. Plus ou moins vite, l'atome retombe dans l'état fondamental en émettant un photon. Le photon peut être émis dans n'importe quelle direction. L'énergie $h \nu$ du photon émis est égale à la différence d'énergie $E_e - E_f$ entre les deux niveaux atomiques (e) et (f) (en toute rigueur, il faut tenir compte de l'énergie de recul de l'atome, mais celle-ci est ridiculement petite devant l'écart d'énergie $E_e - E_f$ (figure 7).

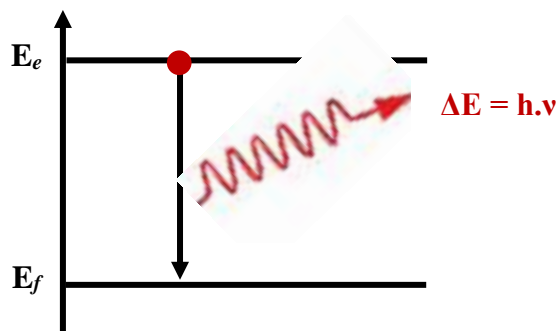


Figure 7. Phénomène d'émission spontanée.

2.3.3. Emission induite

La présence d'un rayonnement incident peut induire un atome excité à émettre un photon ayant les mêmes caractéristiques que les photons incidents. Cela à condition que l'énergie de ces photons soit "résonnante", c'est-à-dire que $h \nu$ soit égale à l'écart d'énergie entre le niveau supérieur et le niveau inférieur. Dans cette émission induite (figure 8), le photon créé par l'atome

en se désexcitant à même fréquence et même direction de propagation que le rayonnement incident. Ce processus, qui permet d'amplifier une onde lumineuse, est à la base du fonctionnement des lasers.

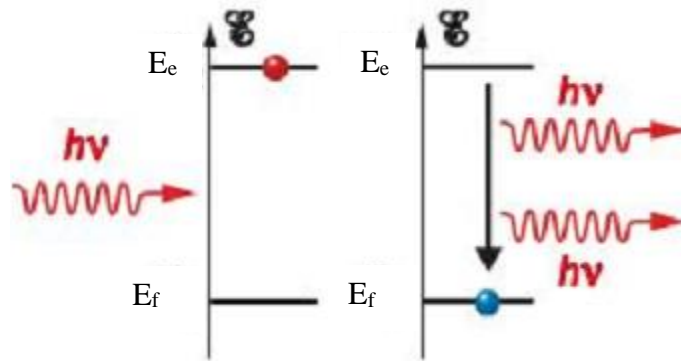


Figure 8. Phénomène d'émission induite.

L'émission spontanée et l'émission stimulée sont deux modes de désexcitation des atomes qui sont en concurrence.

Lorsqu'un atome est dans son état fondamental, il y reste jusqu'à ce qu'un photon, une décharge électrique, ... lui apporte l'énergie nécessaire pour passer dans un état excité. Au contraire, lorsqu'un atome est dans un état excité, il se désexcite spontanément et quasi instantanément pour revenir à son état fondamental.

Dans une population d'atomes, il y a donc beaucoup plus d'atomes dans l'état fondamental que dans un état excité. L'émission stimulée est un phénomène très peu probable par rapport à l'émission spontanée. Si peu probable qu'elle n'a été observée qu'en 1928 alors qu'Einstein avait prévu son existence dès 1917.

1. Spectrométrie UV-VIS

La spectrophotométrie UV-VIS repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche IR (proche UV : 185-400, VIS : 400-800 et très proche IR 800-1100 nm). Cette partie du spectre est relativement pauvre en informations sur la structure des composés moléculaires. En revanche, l'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. La méthode s'applique non seulement aux composés qui présentent une absorption dans le visible mais également aux composés dont un dérivé obtenu par une réaction chimique présente une telle absorption.

1.1. Principe

Ce type de spectrométrie repose principalement sur des interactions entre les rayonnements électromagnétiques et les électrons des orbitales moléculaires. L'absorption des rayonnements par les molécules est due au passage d'un électron d'un niveau électronique à un autre niveau électronique d'énergie supérieure. Le document de base fourni par les spectrophotomètres, appelé spectre, correspond au tracé des variations de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde des photons incidents.

Dans la majeure partie des cas, les spectres UV-VIS sont continus et constitués de bandes larges qui correspondent à la superposition de transitions électroniques (fortement énergétiques), vibrationnelles (faiblement énergétiques) et de transitions rotationnelles (très faiblement énergétiques). Ces spectres présentent un ou plusieurs maximum(s) d'absorbance, auquel correspond une longueur d'onde notée λ_{\max} .

1.2. Spectres dans l'UV-VIS et loi de Beer-Lambert

Les spectres dans l'UV- VIS donnent la transmittance ou l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement. La **transmittance**, notée **T**, est donnée par :

$$T = I/I_0$$

où I_0 est l'intensité incidente et I , l'intensité transmise.

L'**absorbance A** est définie par : $A = -\log T$

Cette dernière grandeur est très utile en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert que nous verrons plus loin. Plus un composé est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée.

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l (figure 1).

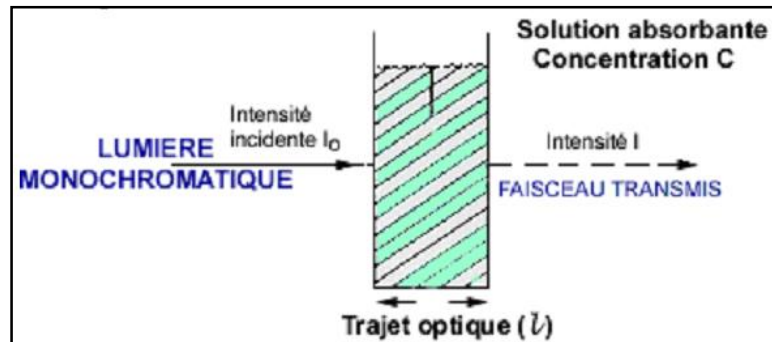


Figure 1. Absorbance d'une lumière monochromatique par une solution.

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-k l C}$$

Où :

l : la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

C : la concentration des espèces absorbantes

k : une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = \epsilon l C$.

ϵ est le coefficient d'extinction molaire ; c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log T = \epsilon l c$$

1.3. Origine d'absorption

Les rayonnements provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Transitions électroniques généralement observées en spectrophotométrie : $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$.

Le diagramme suivant illustre ceci pour des orbitales de type σ , π et n (figure 2):

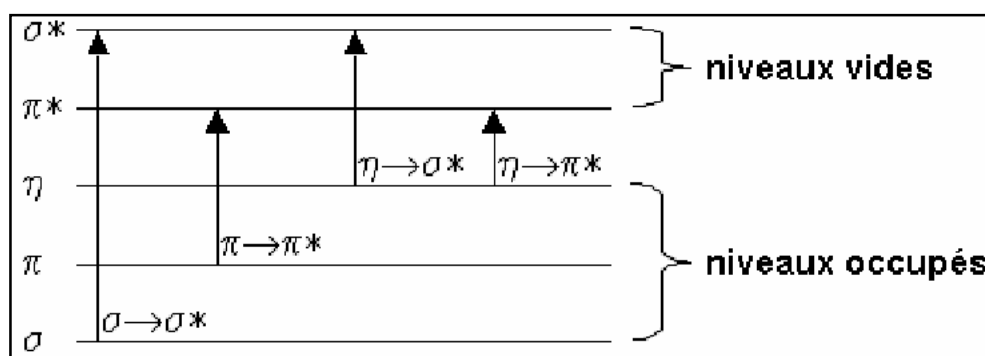


Figure 2. Diagramme illustre des transitions électromagnétiques.

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-VIS peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés **chromophores** ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C\equiv C$, $C\equiv N$,...).

N.B.

- Groupement chromophore : groupement insaturé covalent responsable de l'absorption ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C\equiv C$, $C\equiv N$, $C=S$, $N=N$...).
- Groupement auxochrome : groupement saturé lié à un chromophore et qui modifie la longueur d'onde et l'intensité de l'absorption maximale. E.g. : OH , NH_2 , Cl ,...
- Effet bathochrome : déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.
- Effet hypsochrome : déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.
- Effet hyperchrome : augmentation de l'intensité d'absorption.
- Effet hypochrome : diminution de l'intensité d'absorption (figure 3).

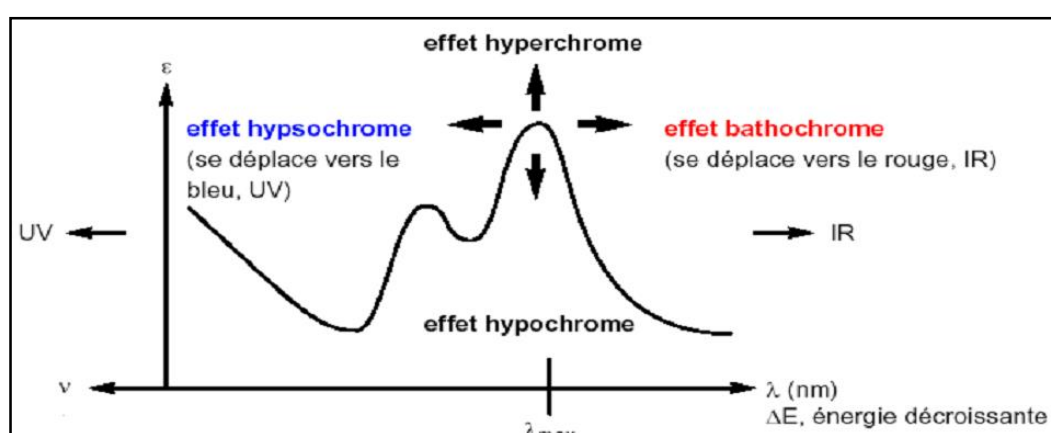


Figure 3. Différents effets des auxochromes.

1.4. Matériels

1.4.1. Source lumineuse

Les sources les plus utilisées sont :

- **La lampe à filament de tungstène** dans une atmosphère halogène (lampe à iode). Elle (figure 4) fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 350 et 700 nm (visible).



Figure 4. Lampe à filament de tungstène dans une atmosphère halogène.

- **La lampe à arc dans une atmosphère d'hydrogène ou de deutérium** (figure 5), dite lampe à hydrogène ou deutérium. Elle fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 200 et 360 nm (le spectre dans le visible est chaotique). Ainsi de nombreux spectrophotomètres combinent lampe à deutérium et lampe à iode pour couvrir le VIS et l'UV.



Figure 5. Lampe à arc dans une atmosphère de deutérium.

- **La lampe à arc en atmosphère de xénon** (figure 6). Elle fournit un spectre de lampe continu utilisable entre 260 et 800 nm. C'est une lampe actuellement très populaire. En raison de leur large spectre (couvrant le domaine UV et visible) et leur longue durée de vie. Cependant, leur utilisation a été centrée sur des instruments de précision inférieure.



Figure 6. Lampe à arc en atmosphère de xénon.

- **La lampe à vapeur de mercure** (figure 7). Elle donne le spectre d'émission de raies du mercure, c'est à dire un spectre de raies discontinues mais de bandes passantes très étroites. Par exemple : 546 nm, puis 435 nm, puis 404 nm, puis 366 nm, puis 313 nm, ...

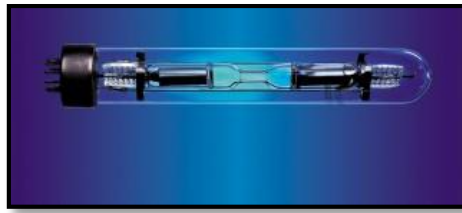


Figure 7. Lampe à vapeur de mercure.

1.4.2. Les monochromateurs

La sélection de la longueur d'onde est réalisée grâce au monochromateur (voir vidéo). Il comprend classiquement :

- Une fente d'entrée permettant l'atteinte par un fin faisceau polychromatique.
- Un système dispersif de type réseau.
- Une fente de sortie, qui, par la motorisation précise, permettra de sélectionner une longueur d'onde précise (en fait une bande passante étroite) dispersée et de la diriger vers le porte échantillon. Les spectrophotomètres à éclairage polychromatique et système dispersif placé après l'échantillon puis capteur à barrette de diodes ne nécessitent pas de motorisation.

1.4.3. Système porte échantillon

Classiquement on utilise des "cuvettes" à face optique parallèles, transparentes et déterminant un trajet optique de 1 cm. Le matériau de la cuve renfermant l'échantillon est fondamental :

- Les cuves à usage unique en polystyrène ne sont utilisables que dans le visible (figure 8a).
- Certains plastiques permettent la réalisation de cuves à usage unique utilisables dans l'UV plus ou moins lointain.
- Les cuves en verre, à nettoyer après usage, ne sont utilisables que dans le visible et sont généralement abandonnées au profit des cuves plastiques à usage unique. Mais il faut noter que le plastique est parfois incompatible avec certains solvants (figure 8b).
- Les cuves en quartz (coût élevé) permettent les mesures dans l'UV jusqu'à 200 nm et aussi le visible (figure 8c).

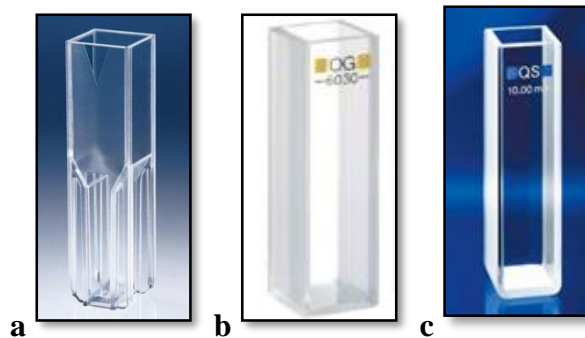


Figure 8. Différentes cuvettes. **a** : cuvette en polystyrène, **b** : cuvette en verre, **c** : cuvette en quartz.

1.4.4. Détecteurs

Le principe de base du détecteur est de transformer en courant électrique ou en tension le signal optique reçu. Il s'agit donc de compter les photons reçus par longueur d'onde en utilisant l'effet photoélectrique. On peut réaliser un compteur de photons avec des diodes.

1.4.4.1. Photodiodes

Une photodiode est une diode sensible à la lumière. Un montage électrique adéquat permettra d'obtenir un signal en tension électrique proportionnelle à l'éclairement (voir vidéo).

1.4.4.2. Barrette de diodes

Une barrette de (photo)diodes "miniatures" recevant une lumière d'origine polychromatique mais décomposée par un élément de type réseau se comporte en capteur d'éclairement multilongueurs d'onde et en simultané pour chaque longueur d'onde. Chaque diode unitaire reçoit une bande passante donnée de longueurs d'ondes. Si l'élément dispersif est de qualité et si la dimension de chaque diode unitaire est convenable, chaque bande passante mesurée sera étroite et tout le spectre sera mesuré en simultané.

Cependant, le signal de sortie restant très faible, il nécessite une amplification d'un facteur 10 au moins pour être lisible. Du fait de cette limitation, on est vite passé à un système d'amplification interne, il s'agit des photomultiplicateurs.

Dans un photomultiplicateur, les "photoélectrons", ceux issus de l'absorption des photons incidents, sont accélérés à travers des électrodes, dites dynodes, qui sont maintenues à des potentiels croissants. En frappant la surface d'une électrode, chaque électron provoque l'émission de plusieurs électrons secondaires qui sont à leurs tours accélérés vers la dynode suivante pour y être dupliqués.

1.4.5. Les spectrophotomètres à mono-faisceau

Il y a deux possibilités selon que l'on travaille en faisceau monochromatique ou non (figure 9).

Source lumineuse ==> Echantillon ==> Polychromateur ==> détecteur polychromatique

Source lumineuse ==> Monochromateur ==> Echantillon ==> détecteur

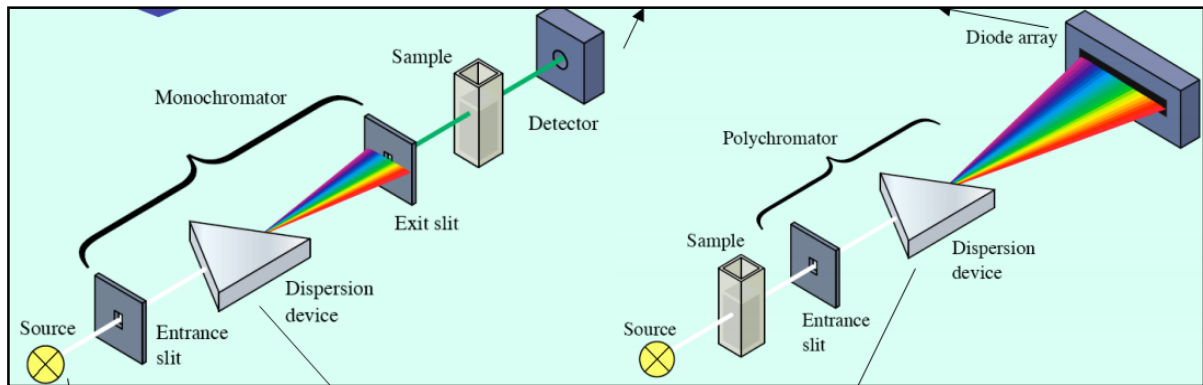


Figure 9. Spectrophotomètre à mono-faisceau. A droite : avec faisceau polychromatique, à gauche : avec faisceau monochromatique.

Notion de blanc

Lorsqu'une espèce chimique est solubilisée dans un solvant et placée dans une cellule de mesure, l'absorption mesurée correspond à trois absorptions différentes :

- l'absorption due à la cellule qui peut être en verre, en quartz ou en polymère ;
- l'absorption due au solvant ;
- l'absorption due à l'espèce chimique dissoute.

Les deux premières absorptions ne sont pas dues à l'espèce analysée. Il faut donc les retrancher. Pour ce faire, on mesure l'absorbance de la cellule avec du solvant et on soustrait l'absorbance ainsi obtenue (le blanc) à l'absorbance mesurée avec l'espèce que l'on veut étudier. Ceci est rendu possible par l'additivité des absorbance.

Il est nécessaire de faire un blanc lorsqu'on utilise un appareil monofaisceau.

1.4.6. Les spectrophotomètres à double faisceau

Avec lesquels il n'est pas nécessaire de faire des blancs ou des lignes de bases. Un faisceau traverse le compartiment échantillon et le second le compartiment référence. La soustraction du blanc est faite automatiquement par le logiciel de traitement (figure 10).

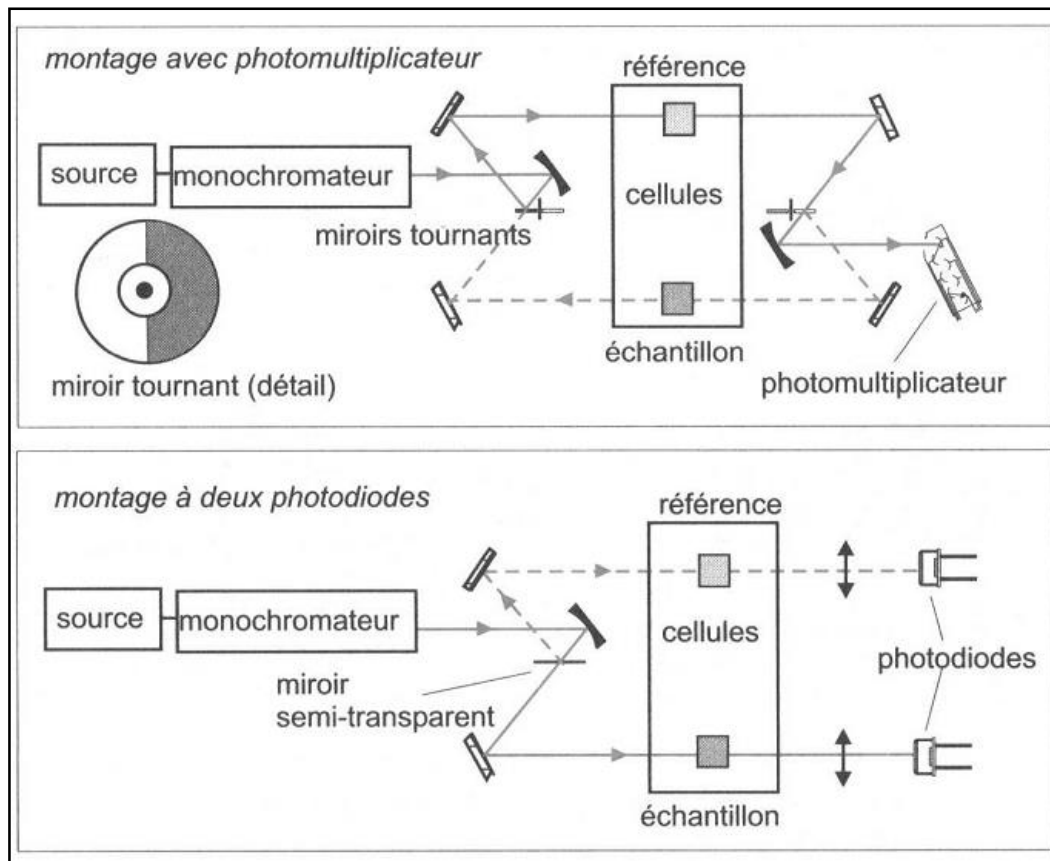


Figure 10. Spectrophotomètres à double faisceau.

1.5. Applications de la spectrométrie UV-VIS

1.5.1. Application chimique

1.5.1.1. Analyse quantitative (Identification de la concentration d'une substance inconnue)

La spectrophotométrie UV-VIS est utilisée pour mesurer la concentration d'un échantillon inconnu. Pour cela, il faut d'abord choisir sa propre bande d'absorption. L'exemple de spectre d'absorption de l'échantillon peut être disponible dans la littérature s'il a déjà été étudié.

Si non, une spectrophotométrie à double faisceau doit être effectuée pour savoir où sa bande d'absorption se situera. Une bande d'absorption appropriée est sélectionnée. En général, tous les composés organiques absorbent dans la plage du spectre UV-VIS et donc un certain nombre de composés biologiques peuvent être mesurés en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS. Concentration inconnue d'acide nucléique et des protéines sont un bon exemple. Les acides nucléiques absorbent à 254 nm (ou 260 nm) et les protéines à 280 nm. L'absorption des acides nucléiques dépend des noyaux aromatiques des purines et des pyrimidines tandis que celle des protéines dépend du nombre d'acides aminés - contenu en tyrosine et le tryptophane et une partie de cette absorption est due au contenu en phénylalanine.

Comme l'absorbance est proportionnelle à la concentration, plusieurs spectres à longueur d'onde fixée (λ_{\max}) peuvent être utilisés pour un dosage.

Deux techniques de dosages sont utilisées en spectrophotométrie :

- la méthode de la gamme d'étalonnage ;
- la méthode des ajouts dosés.

La méthode de la gamme d'étalonnage consiste à préparer des solutions dont la concentration encadre la solution de concentration inconnue. L'absorbance mesurée pour chacune de ces solutions permet d'établir un graphe où l'on trace $A = f(C)$. Il ne reste plus qu'à placer l'absorbance de la solution inconnue et l'on obtient la concentration inconnue.

La méthode des ajouts dosés consiste à ajouter plusieurs fois un même volume d'une solution de concentration connue à un volume donné de concentration inconnue. Un travail graphique ou mathématique se basant aussi sur la proportionnalité entre A et C permet de trouver la concentration inconnue.

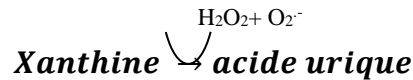
1.5.1.2. Analyse quantitative (identification d'une substance inconnue)

La spectrophotométrie UV-VIS peut être utilisée pour identifier les diverses classes de composés à la fois dans l'état pur et ainsi que dans des préparations biologiques. Ceci est fait en traçant les courbes du spectre d'absorption. Ces courbes représentent une classe spécifique de composés et la connaissance de ces courbes aideront dans l'identification de toute substance. Par exemple, les substances qui n'absorbent pas dans la gamme 220-280nm sont généralement des hydrocarbures aliphatiques ou de leurs dérivés. En outre, les systèmes complexes vont donner lieu à des courbes d'absorption avec plusieurs maxima et chacune d'entre elles auront une forme caractéristique et la gamme indiquant la présence d'un groupe fonctionnel particulier.

1.5.1.3. Essais enzymatiques

L'activité enzymatique peut être, facilement et rapidement, calculé lorsque le substrat ou le produit est coloré ou absorbe la lumière dans la gamme des UV. Dans ces cas, le taux d'apparition ou de la disparition d'un produit ou d'un substrat absorbant la lumière peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Exemple 1. Nous prendrons l'exemple de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) pour comprendre comment est effectué un essai enzymatique ou comment l'activité enzymatique est mesurée. La XOR est une enzyme impliquée dans la dégradation de l'hypoxanthine et la xanthine en acide urique. La réaction est illustrée comme suit :



Les produits sont l'acide urique, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et superoxyde (O₂⁻). L'un des produits, l'acide urique absorbe dans le domaine de l'UV à 295 nm. De même, ni le substrat, ni les autres produits n'absorbent à 295 nm. Par conséquent, la progression de la réaction peut être suivie en mesurant l'augmentation de l'absorption à 295 nm dans un spectrophotomètre.

Exemple 2. Lactate déshydrogénase est une enzyme impliquée dans le transfert d'électrons à de lactate vers NAD⁺. La réaction est illustrée comme suit :



Les produits sont pyruvate, NADH et un H⁺. L'un des produits, le NADH absorbe dans le domaine de l'ultraviolet à 340 nm tandis que le reste n'absorbe pas. Ainsi, la progression de la réaction peut être suivie en mesurant l'augmentation de l'absorption à 340 nm dans un spectrophotomètre.

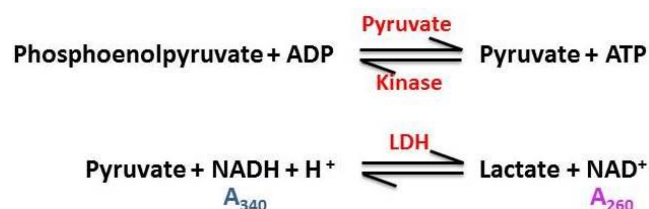
Exemple 3. Essai couplé

Certaines réactions sont couplées à une autre réaction enzymatique qui peut être facilement mesurée optiquement. Une telle réaction est celle de phosphoenolpyruvate et ADP réagissant pour donner pyruvate et de l'ATP catalysée par la pyruvate kinase.



Etant donné que ni l'un des substrats ou les produits absorbent à 340 nm, cette réaction peut être couplée à une autre réaction (cité dans le deuxième exemple).

Si la lactate déshydrogénase et NADH sont ajoutés en excès, le système sera un peu manipulé et nous prendrons la réaction couplée comme suit:



Comme nous avons ajouté un excès de NADH dans la réaction, le système va maintenant absorber à 340 nm. Ainsi, pour chaque molécule de pyruvate formé dans la première réaction, une molécule de NADH est oxydée en NAD⁺ dans la deuxième réaction où le pyruvate est converti en lactate. Comme mentionné précédemment, le NAD n'absorbe pas à 340 nm, l'absorbance diminue tant que la conversion du pyruvate en lactate se poursuit.

1.5.2. Application structurale

1.5.2.1. Contrôle de purification

Il s'agit l'une des applications les plus importantes de spectrophotométrie UV-VIS. Les impuretés peuvent être détectées très facilement en testant si le composé ne montre pas son spectre d'absorption caractéristique. Exemple: Benzène impurifié dans l'alcool absolu peut être détectée par cette méthode. Ceci peut être détecté en mesurant l'absorbance à 280 nm. Comme à 280 nm, le benzène va absorber, alors que l'alcool (210 nm) ne sera pas absorber.

1.5.2.2. Détermination du poids moléculaire

Supposant un composé formant un dérivé avec un réactif qui présente une bande d'absorption caractéristique. Le composé présente donc la bande d'absorption d'une forte intensité à une longueur d'onde où il n'absorbe pas, alors le coefficient d'extinction du dérivé est habituellement le même que celle du réactif. Bien que le coefficient d'extinction reste identique pour chaque un des dérivés formé, l'absorbance est différente pour les composés de poids moléculaire différent. Le poids moléculaire du composé peut alors être calculé facilement en basant sur des données d'absorption : $PM = \epsilon l m / A$

1.5.2.3. Turbidimétrie

Toute particule ou même les bactéries rend la solution trouble. Cela est dû à l'effet Tyndall, qui est dû à la diffusion de la lumière par des particules colloïdales. Les particules de cette solution absorbent à une longueur d'onde particulière et ces particules dispersent la lumière incidente. Si cela se produit, alors le rayonnement d'une longueur d'onde qui n'est pas absorbée par la solution est amené à passer à travers la suspension et l'absorption apparente sera uniquement en raison de la dispersion par les particules. Ainsi, la lumière transmise aura une intensité plus faible par rapport à celle de la lumière incidente. En conséquence, si l'intensité de la lumière transmise est mesurée, elle donnera une idée du nombre de particules dans la suspension. Cette technique est turbidimétrie. En utilisant cette technique, nous pouvons trouver un nombre approximatif de particules en suspension donnée.

2. Spectrométrie IR

Le domaine de l'infrarouge (figure 1) correspond à des longueurs d'onde comprises entre 770nm et 1mm, que l'on peut diviser en trois régions.

Région		Longueur d'onde λ (m)/ nombre d'onde (cm^{-1})
IR proche	Near IR (NIR)	$0.78 \cdot 10^{-7}$ - $2.5 \cdot 10^{-6}$ / 12800-4000
IR moyen	Mid IR (MIR)	$2.5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ / 4000-200
IR lointain	Far IR (FIR)	$5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-3} / 200-10

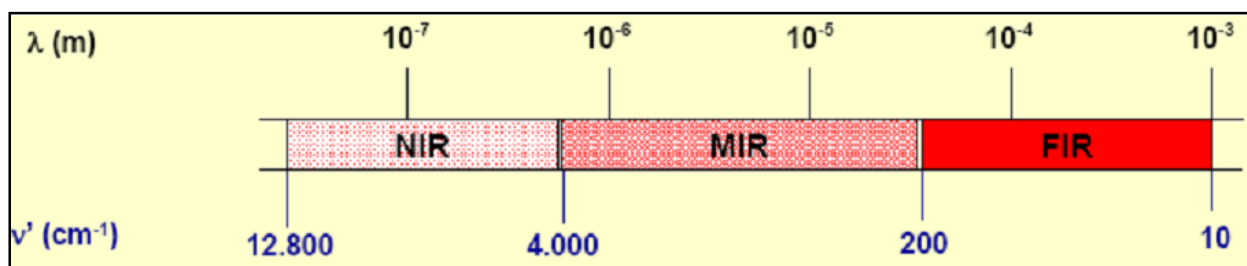


Figure 1. Le domaine d'infrarouge.

Comment s'assurer que le produit obtenu lors d'une réaction est bien celui attendu ? La spectrométrie IR est idéale pour confirmer la présence de groupements fonctionnels. Il s'agit d'une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes.

2.1. Principe

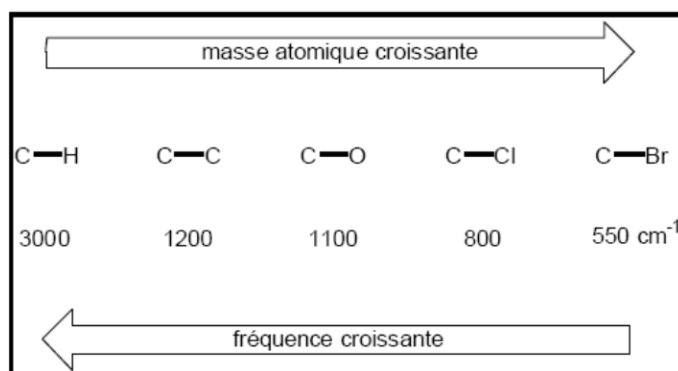
2.1.1. Vibration moléculaire

La molécule, assemblage non rigide d'atomes, ressemble à un système de balles (les atomes), liées les unes aux autres par des ressorts de constante de raideur plus ou moins grande (les liaisons) dont les vibrations apparaissent à des fréquences déterminées.

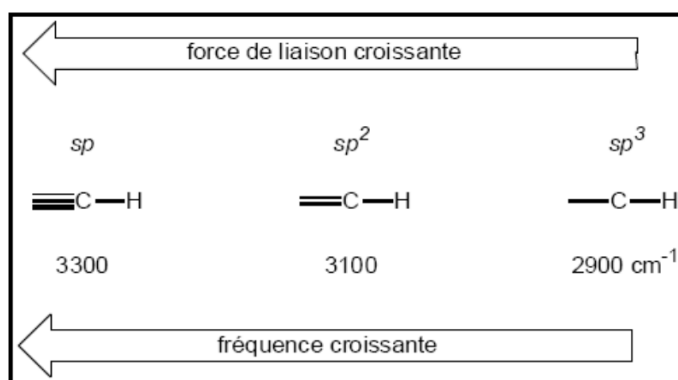
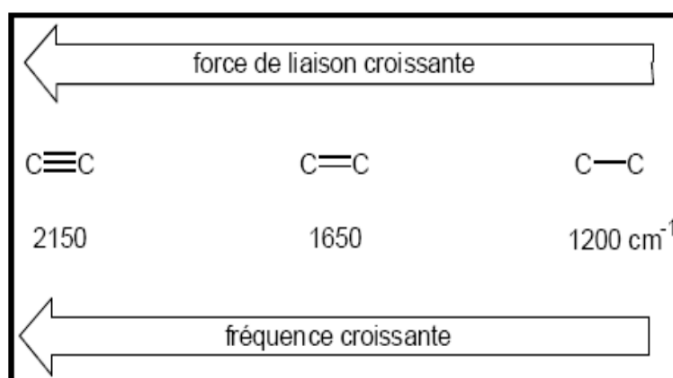
L'énergie du rayonnement IR est suffisante pour produire des changements dans l'énergie de vibration des molécules, mais elle ne peut provoquer des transitions électroniques. En effet, les atomes situés aux deux extrémités d'une liaison sont animés d'un mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre et que s'ils sont différents, ils forment un dipôle électrique oscillant à cette même fréquence. Si on irradie une telle liaison non symétrique par une source lumineuse monochromatique dont la fréquence est la même que la fréquence de vibration, il va naître une interaction avec le dipôle électrique de la liaison. Autrement dit la composante électrique de l'onde pourra transmettre son énergie à la liaison à condition qu'il y ait accord entre sa fréquence mécanique de vibration et la fréquence électromagnétique de la radiation. Cette approche

simplifiée explique qu'en l'absence de dipôle permanent, ce qui est le cas des molécules tel les O₂, N₂, Cl₂, aux liaisons non polaires, il n'y ait pas couplage avec l'onde électromagnétique et qu'aucune absorption d'énergie ne se produise.

2.1.2. Effet de la masse des atomes



2.1.3. Effet de la force du lien



2.1.4. Modes de vibrations

Lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie sous la forme d'un rayonnement IR, l'amplitude des vibrations des liaisons moléculaires augmente, le retour à l'état normal libère de la chaleur.

Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donné. A chacun correspond une fréquence caractéristique.

Ces modes fondamentaux sont responsables des principales bandes d'absorption.

L'absorption du rayonnement IR par les composés organiques correspond à deux types principaux de vibrations :

2.1.4.1. Vibration de valence ou d'élongation

Vibrations entre deux atomes donnés au cours desquelles la distance interatomique varie selon l'axe de la liaison (figure 2).

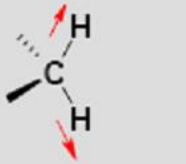
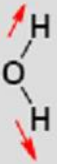
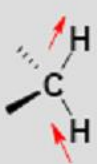
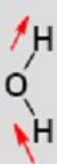
Vibrations de valence (stretching)			
Symétrique (ν_s)		Asymétrique (ν_{as})	
			
$\nu_s = 2850 \text{ cm}^{-1}$	$\nu_s = 3652 \text{ cm}^{-1}$	$\nu_{as} = 2930 \text{ cm}^{-1}$	$\nu_{as} = 3756 \text{ cm}^{-1}$

Figure 2. Vibration de valence ou d'élongation. Dans la vibration symétrique, les deux atomes d'hydrogène se rapprochent et s'éloignent de l'atome central en concordance de phase. Dans la vibration asymétrique, les deux atomes d'hydrogène se rapprochent et s'éloignent de l'atome central en discordance de phase.

2.1.4.2. Les vibrations de déformation angulaire

Vibrations au cours desquelles l'angle formé par deux liaisons contiguës varie. Lors de ce mouvement, la distance interatomique reste constante (figure 3).

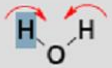
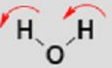
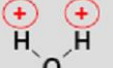
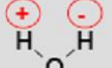
Vibrations de déformation (bending)			
Dans le plan		Perpendiculaire au plan	
Cisaillement (δ) (scissoring)	Rotation plane (ρ) (rocking)	Balancement (ϖ) (wagging)	Torsion (τ) (twisting)
			
$\delta = 1596 \text{ cm}^{-1}$	$\rho = \text{variable}$	$\varpi = \text{variable}$	$\tau = 3756 \text{ cm}^{-1}$

Figure 3. Vibration de déformation. **Cisaillement** : modification de l'angle de liaison, **rotation plan** : pas de modification de l'angle de liaison, **balancement** : déplacement simultané des deux atomes hors du plan, **torsion** : déplacement simultané des deux atomes de chaque côté du plan.

2.2. Allure d'un spectre IR

En abscisse, on porte le nombre d'onde exprimé en cm^{-1} . La fenêtre spectrale utilisée par les appareils du commerce s'étend de 400 à 4000cm^{-1} .

En ordonnée, on porte généralement la transmittance T, parfois l'absorbance A. L'infrarouge est rarement utilisé de façon quantitative (figure 4).

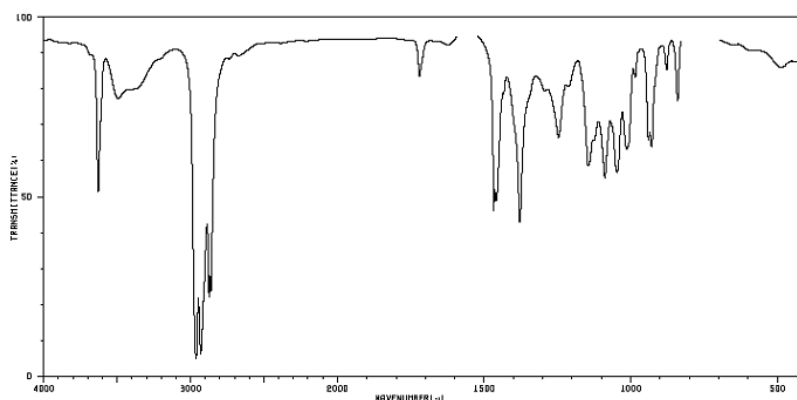


Figure 4. Spectre IR de l'hexan-2-ol (en solution dans CCl_4).

2.3. Instrumentation

2.3.1. Source

Dans le **moyen IR**, les sources les plus utilisées sont :

- ✓ Filament de Globar : c'est une baguette de carbure de silicium SiC , diamètre de 5 à 7 mm, longueur de 4 à 7 cm. Il fonctionne à des températures de l'ordre de $1300\text{ }^\circ\text{C}$ et rayonne un spectre continu entre 10000 et 250 cm^{-1} avec une émission maximale à 5300 cm^{-1} .
- ✓ Filament de Nichrome : c'est un fil résistant bobiné sur une plaque réfractaire et isolante dont l'émission infrarouge entre 2 et $15\text{ }\mu\text{m}$ est suffisante pour les spectromètres de routine. Enroulé en spirale et chauffé électriquement, il fournit une source de vie plus longue qu'un Globar ou un filament de Nernst, mais aussi d'énergie radiante plus faible.

Dans le **domaine du proche IR**, les lampes les plus utilisées sont en quartz-tungstène-halogène (QTH) (gamme spectrale : $250\text{-}2500\text{ nm}$, soit $40000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$).

Dans le **domaine du lointain IR**, classiquement, la source est une lampe à vapeur de mercure (limite : 10 cm^{-1}). La limite de 10 cm^{-1} pour un spectromètre à source classique n'est réalisable qu'avec des échantillons de l'ordre de 1 cm^2 de surface.

Des brillances bien plus importantes que pour la lampe à vapeur de mercure peuvent être obtenues avec une source synchrotron : on n'améliore que légèrement la limite basse fréquence de l'instrument, mais la brillance permet de travailler sur de très petits échantillons.

2.3.2. Analyseurs

Destinés à extraire l'information $A = f(\nu)$

2.3.2.1. Système dispersif (monochromateur)

Un monochromateur est constitué d'une fente d'entrée, suivi d'un miroir afin d'assurer que la lumière est parallèle, un réseau de diffraction, un miroir de focalisation, qui dirige le rayonnement dispersé à la fente de sortie, et sur un détecteur.

2.3.2.2. Interféromètres de Michelson

Elles (figure 5) constituent de :

- ✓ Séparatrice : formée d'un film Ge déposé sur une lame de KBr, réfléchit et transmet 50% du flux incident.
- ✓ Deux miroirs plans perpendiculaires, un mobile et un fixe.

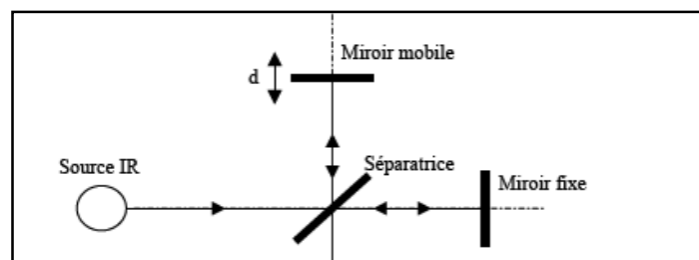


Figure 5. Interféromètres de Michelson.

2.3.3. Détecteur

Les spectromètres IR utilisent des détecteurs à élément unique, que ce soit thermique ou quantique.

2.3.3.1. Détecteur thermique

Tel que DTGS (Deuterated TriGlycide Sulfate) ou DLaTGS, parfois appelés DLTGS, (deuterated L-alanine-doped triglycine sulfate) ou le moins sensible tantalate de lithium (LiTiO_3), détecteur relativement peu coûteux.

- ✓ Sensibles à la chaleur dégagée par l'absorption de photons sur une cible noircie.
- ✓ Pyroélectrique.
- ✓ Température ambiante.

- ✓ Modérément sensible et rapide.

2.3.3.2. Détecteur quantique

Tel que MCT (Mercury Cadmium Telluride) ou In-Sb (indium antimonide)

- ✓ Sensibles directement aux photons.
- ✓ Effet photovoltaïque.
- ✓ Température de l'azote liquide.
- ✓ Très rapide.

2.3.4. Préparation des échantillons

On peut enregistrer le spectre d'un corps à l'état gazeux, liquide, solide ou en solution.

- ✓ Si le corps est à l'état gazeux, on utilise des cellules spéciales, jamais en verre car le verre est opaque aux radiations IR.
- ✓ Si le corps est à l'état liquide, un film est déposé entre deux pastilles de KBr ou de NaCl.
- ✓ Si le corps est solide, il est broyé avec du bromure de potassium KBr et comprimé en pastille par une presse hydraulique. Il peut aussi être étudié en suspension dans le nujol (mélange d'hydrocarbures paraffiniques de grandes masses molaires).
- ✓ Les solvants utilisés pour les solutions doivent très peu absorber dans l'IR. On utilise en général : CCl_4 , CH_2Cl_2 , CHCl_3 .

Les deux catégories majeures de spectromètre IR utilisés aujourd'hui sont ceux basés sur des spectromètres dispersifs ou la transformée de Fourier(FT). Leurs différences résident essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'onde.

• Spectromètre IR à balayage (double faisceaux)

Dans ce montage (figure 6), la radiation de la source est divisée en deux faisceaux par un miroir ; les faisceaux de référence et échantillon.

Les faisceaux sont dirigés dans le compartiment à échantillon où ils passent respectivement à travers les cellules de référence et échantillon.

A la sortie du compartiment, un obturateur permet de bloquer alternativement un et l'autre des faisceaux. On obtient un seul faisceau composé de segments alternants des faisceaux de référence et échantillon.

Le faisceau combiné passe à travers le monochromateur pour produire un balayage de la bande de fréquences au détecteur.

Le détecteur (type thermique) compare l'intensité des segments de référence et échantillon pour chaque fréquence et produit un spectre de la transmittance ou de l'absorbance en fonction de la fréquence ou de la longueur d'onde.

- **Spectrométrie à transformée de Fourier (FT-IR)**

Dans ce montage (figure 7), la radiation de la source est divisée en deux faisceaux par un séparateur de faisceaux.

Un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable à cause d'un miroir mobile, avant d'être recombinaés, de traverser l'échantillon et de frapper le détecteur.

Quand la différence de chemin optique entre les faisceaux correspond à un multiple entier de la longueur d'onde d'une bande, on obtient une interférence constructive. Une interférence négative est obtenue lorsque la différence correspond à un multiple entier impair du quart de la longueur d'onde. L'ensemble des interférences positives et négatives produit un interférogramme. Celui-ci contient toutes les informations requises pour produire un spectre suite à une opération mathématique appelée transformée de Fourier.

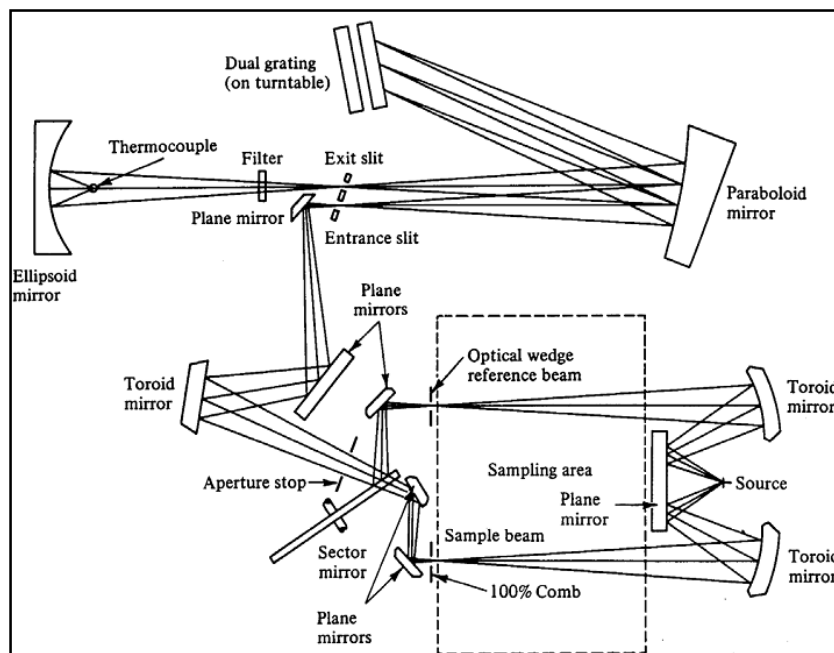


Figure 6. Spectromètre IR à balayage (double faisceaux).

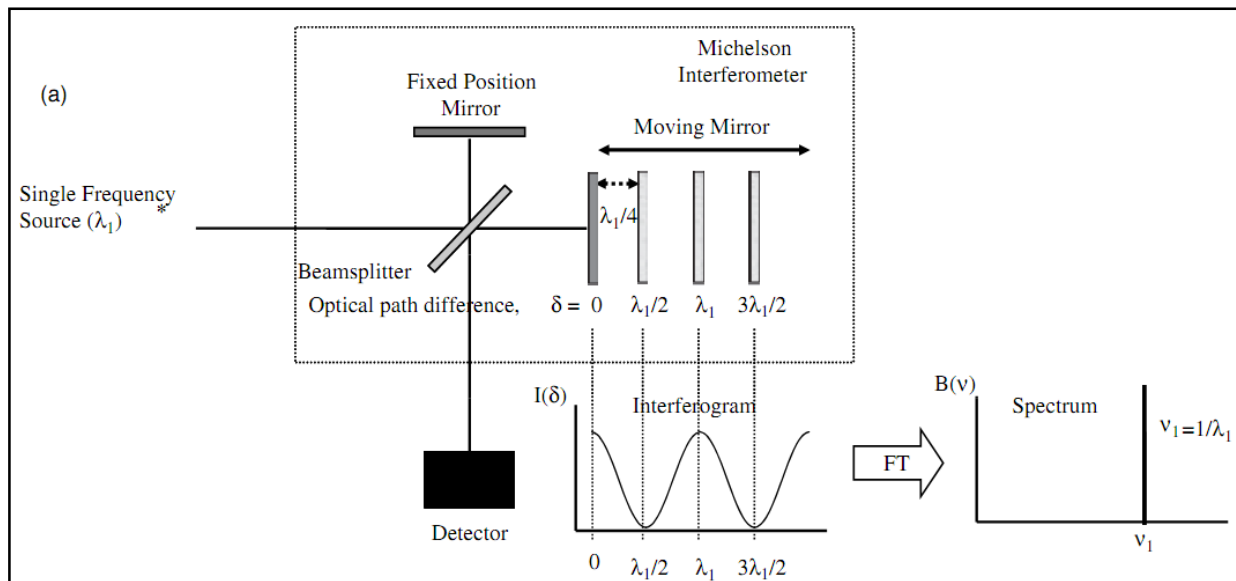


Figure 7. Spectrométrie à transformée de Fourier (FT-IR).

2.4. Applications

L'utilisation de cette technique s'est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses :

- ✓ industrie agro-alimentaire ;
- ✓ industrie pharmaceutique ;
- ✓ domaines des matériaux (polymères,...) ;
- ✓ industrie pétrolière, industrie textile,...

3. Spectrofluorimétrie

Introduction

La fluorescence est définie comme l'émission de lumière par des molécules sans dégagement de chaleur.

A ce phénomène s'associe toute une terminologie caractérisant l'émission (fluorescence, phosphorescence) ou l'excitation (chimiluminescence, bioluminescence, radioluminescence, cathodo-luminescence, photoluminescence, thermoluminescence).

Les fluorochromes ou fluorophores sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

La fluorimétrie étudie l'émission de lumière par des molécules en solution ou à l'état solide après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou de l'UV selon la nature du fluorophore.

3.1. Principe (aspect qualitatif)

Pour bien comprendre le phénomène de fluorescence, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski (figure 1). C'est un diagramme énergétique comparant les phénomènes de retour à l'équilibre par fluorescence et phosphorescence.

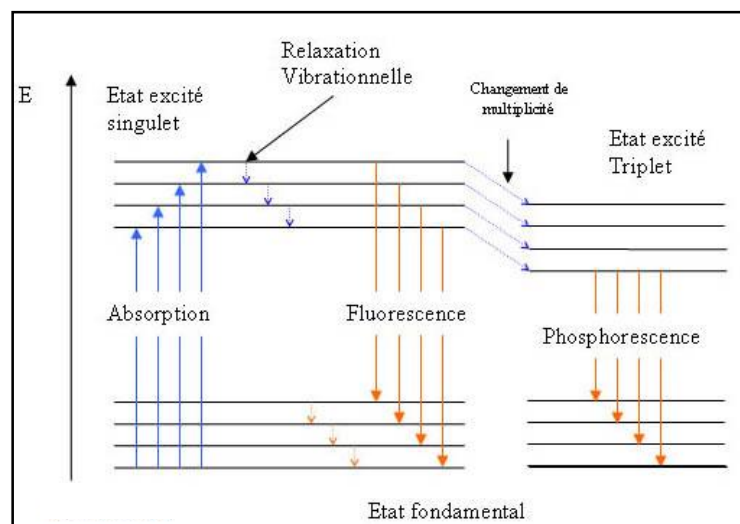


Figure 1. Le diagramme de Jablonski.

Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de 10^{-12} seconde.

La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne (retour direct à l'état fondamental) ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence.

En effet, L'énergie émise est en général inférieure à l'énergie d'excitation. Cela provient du fait que le centre retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. Cette différence est appelée déplacement de Stokes.

Le spectre d'émission (intensité d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du photon émis) dépend de la nature de la molécule fluorescente et des interactions mises en jeu entre cette molécule et son voisinage.

N.B.: La phosphorescence passe par une étape supplémentaire l'état triplet ou 'il y a retournement de spin. L'émission lumineuse dure donc beaucoup plus longtemps.

3.2. Aspect quantitatif

La fluorimétrie est une méthode de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescente. On mesure la fluorescence qui est proportionnelle à la concentration.

3.2.1. Rendement quantitatif de fluorescence

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité absorbée.

Soit :

Φ_f : le rendement quantique de fluorescence (sans unité)

I_f : l'intensité de fluorescence

I_a : intensité absorbée

I_0 : l'intensité incidente

I : l'intensité transmise

$$\Phi_f = I_f / I_a = I_f / (I_0 - I) = I_f \cdot I_0 \cdot (1 - I / I_0)$$

Φ_f est compris entre 0 (absence de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale).

Φ_f dépend de la molécule, du solvant, du pH et de la T° . Il ne dépend pas de l'intensité de la source lumineuse et de la longueur d'onde d'excitation (seuls les photons absorbés sont pris en compte).

3.2.2. Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence, à longueur d'onde λ , est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence.

$$I_f = \Phi_f \cdot I_a = \Phi_f \cdot (I - I_0)$$

L'intensité absorbée, I_a , est donnée, par la loi de Beer Lambert, l'intensité de fluorescence devient alors :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)$$

Or l'appareil ne capte qu'une partie de la fluorescence, on a donc:

$$I_f' = k (\Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)) = K \cdot c$$

k = constant de l'appareillage

L'intensité est exprimée en Einstein par seconde (1 einstein = 6.10^{23} photons). Elle dépend de la T° , I_0 de la source, de la concentration en solution fluorescente, de l'appareillage, la λ d'excitation et la nature du solvant et du pH.

3.2.3. Expression des spectres

Le spectre d'excitation d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde fixe et en laissant varier la longueur d'onde d'excitation.

Le spectre d'émission d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise aux différentes longueurs d'onde d'émission en excitant avec une longueur d'onde fixe.

3.4. Molécules concernées

Pour que la fluorescence se manifeste, plusieurs caractéristiques sont nécessaires:

- Absorption dans l'UV et le visible.
- Forte probabilité maximale d'absorption (ϵ_{\max}).
- Faible énergie de transition électronique.
- Absence d'atomes ou de groupements favorisant les phénomènes non radiatifs dans la molécule.

3.5. Appareillage

3.5.1. Une source lumineuse

- Lampes à arc au xénon : émission continue entre 220 et 700 nm. Leur énergie varie en fonction de la longueur d'onde. Ce sont les plus performantes.

- Les lampes à vapeur de mercure: n'émettent qu'un spectre discontinu (raies entre 254 et 366 nm).
- Les sources lasers: apparition récente, encore peu utilisées.

3.5.2. Un monochromateur d'excitation (prisme ou réseau)

3.5.3. Une cuve en quartz

3.5.4. Un monochromateur d'émission: permet la sélection d'une bande étroite de longueur d'onde d'émission (car après excitation l'échantillon émet dans toutes les directions)

3.5.5. Un photomultiplicateur: transforme la lumière émise en courant électrique.

3.5.6. Un système de lecture du signal

3.6. Applications

3.6.1. Applications qualitatives

- Méthode sensible (identification de traces) et spécifique.
- Détermination du spectre d'absorption d'une substance dans les conditions où la spectrométrie UV-VIS est inadaptée.
- Permet de tracer le spectre d'excitation d'une molécule à très faible concentration ou en présence de substances absorbantes interférentes.

3.6.2. Application quantitatives

- Analyse des médicaments ou de substances naturelles à concentration souvent faible dans les milieux biologiques.
- Analyse après excitation à une longueur d'onde déterminée.
- Analyse directe de substances naturellement fluorescentes (ex: quinine et quinidine).
- Les molécules peu fluorescentes sont amplifiées par hétérocyclisation.
- Les molécules non fluorescentes peuvent être rendues fluorescentes par dérivation de fluorescence. Parmi ces composés de dérivation, la fluorescamine et la bromométhoxy-coumarine.
- La fluorimétrie est également utilisable dans le cadre des méthodes immunologiques en phase homogène ou hétérogène, le traceur étant constitué par la molécule à doser marquée par un fluochrome.

4. Spectrométrie de masse

Généralité

Les molécules biologiques sont composées essentiellement de carbone C, hydrogène H, oxygène O, azote N, phosphore P, et soufre S. A chacun de ces atomes correspond une masse atomique. Connaissant la formule brute d'une molécule, on peut donc calculer une masse chimique.

L'unité de masse (μ) est appelée dalton (Da) pour une masse chimique. Elle est définie comme 1/12 de la masse d'un atome de carbone 12 :

$$1\mu = 1 Da = 1.660540 \cdot 10^{-27} Kg$$

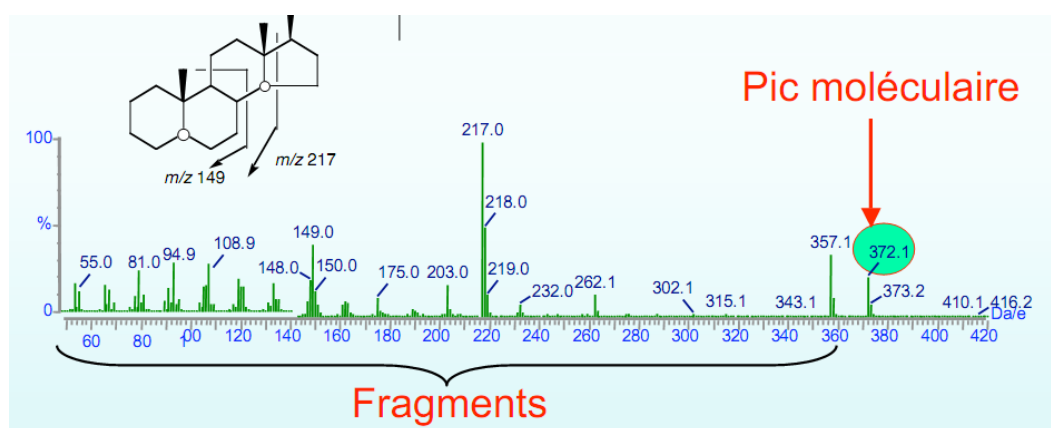
La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse.

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant.

La spectrométrie de masse peut apporter donc les informations suivantes :

- La valeur m/z du pic moléculaire permet de calculer la masse moléculaire.
- Les pics de fragmentation permettent de reconstituer une partie de la structure.
- L'intensité des pics permet de faire de l'analyse quantitative.

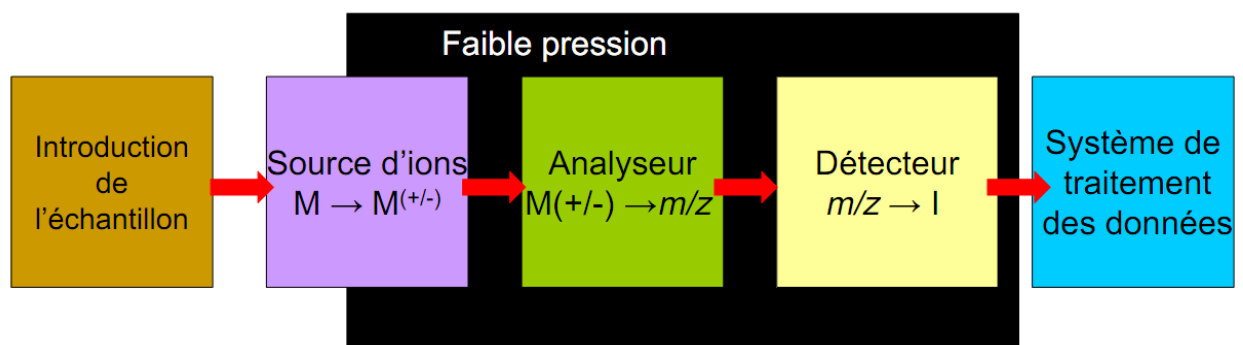


4.1. Appareillage

Un spectromètre de masse mesure la masse de molécules isolées ionisées. Pour cela, le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes:

- **Volatiliser** : séparer les molécules les unes des autres dont on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux.
- **Ioniser** : transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques.
- **Mesurer les rapports m/z** : la masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m)/nb de charges (z).

Un spectromètre de masse est donc constitué de :



4.1.1. Système d'introduction de l'échantillon

Les échantillons peuvent être introduits de deux manières :

- directement dans la source d'ionisation : sous forme gazeuse, liquide (infusion), ou solide ;
- par l'association à une méthode séparative : électrophorèse capillaire, chromatographie en phase gazeuse ou liquide.

Le système d'introduction de l'échantillon dépend de sa nature :

- **Gaz et liquides volatils** : à partir d'un ballon chauffé mis en communication avec source.
- **Solides** : tube avec filament et l'échantillon dissous dans un solvant organique et chauffé pour être vaporisé.

4.1.2. Source d'ions

Il existe de nombreux types de sources d'ions et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent.

Le principe physique qui permet de volatiliser et l'ioniser un type de composé est choisi par l'opérateur en fonction des caractéristiques de la molécule à analyser.

Les étapes de volatilisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source.

Les critères de choix principaux sont:

- la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser ;
- sa labilité chimique ;
- les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation ;
- la taille des molécules ;
- les quantités de produit disponibles ;
- et le type d'introduction souhaitée (directe ou en couplage chromatographique).

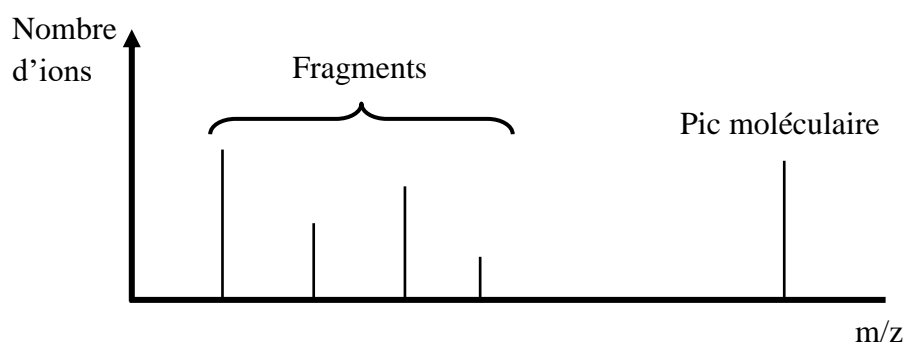
Les sources d'ions se classent en sources dures et en sources douces :

4.1.2.1. Sources dures

Les ionisations dures génèrent souvent des ions moléculaires, à nombre impair d'électrons, qui se fragmentent beaucoup et parfois même totalement avant d'avoir eu le temps de sortir de la source. Lorsque leur durée de vie est assez longue pour qu'il sortent de la source intacts, mais qu'ils se décomposent avant d'avoir complètement traversé l'analyseur et d'arriver au détecteur, on les appelle ions métastables. Leurs fragments peuvent être analysés et donnent des informations de structures.

Cette source peut apporter les informations suivantes :

- La masse moléculaire d'un composé.
- La masse des fragments de ce composé.
- Une mesure de la quantité.



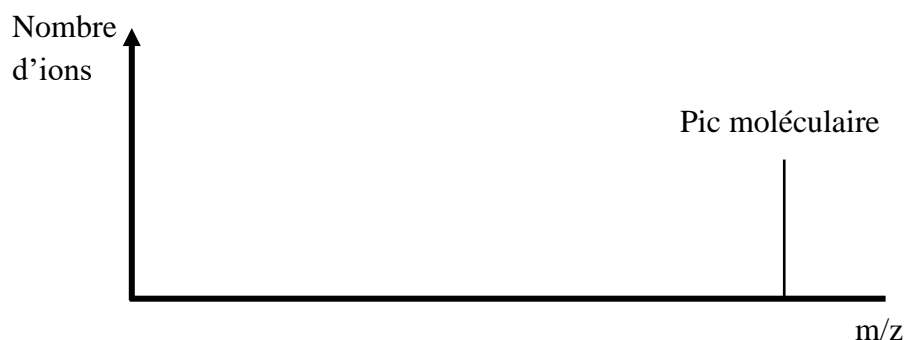
4.1.2.2. Sources douces

Les ionisations douces génèrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons, qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au détecteur, et donc être mesurés.

Cette source peut apporter les informations suivantes :

- La masse moléculaire d'un composé.
- Pas de fragmentation.

- Une mesure de la quantité.



Les sources d'ions les plus courantes sont :

La source à plasma induit couplé (Induced coupled plasmas: ICP-MS)	Très dure
La source à impact électronique (EI)	Dure
La source à ionisation chimique (CI)	Assez douce
La source à ionisation chimique par désorption (DCI)	Assez douce
L'ionisation par thermospray (TSP)	Assez douce
La désorption de champs (FD)	Assez douce
L'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS, FAB)	Assez douce
La désorption par plasma (PD)	Assez douce
La désorption laser (LD)	Assez douce
L'ionisation chimique à pression atmosphérique (API ou APCI)	Assez douce
La photoionisation (APPI)	Assez douce
L'ionisation laser assistée par matrice (MALDI) : Utilisées en protéomique	Douce
L'électronébulisation (electrospray: ES ou ESI) : Utilisées en protéomique	Douce

4.1.3. Analyseur

Il existe différents types d'analyseurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent des valeurs m/z . C'est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur.

B: Déflexion par un champ magnétique (c'est l'analyseur le plus ancien)

Q: Déflexion par un champ quadropolaire

IT: Confinement dans un piège à ion (Ion Trap)

TOF: Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight)

FT-ICR: Résonance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourier

Les ions formés dans la source sont dirigés (extraction et focalisation) vers l'analyseur par des champs électrostatiques qui peuvent être de quelques volts (Q, IT, FT-ICR) ou de plusieurs dizaines de kilovolts (TOF, B). La vitesse de déplacement des ions dans l'analyseur dépend de l'intensité du champ d'extraction.

On peut coupler plusieurs analyseurs (MS-MS et MSⁿ) pour faire de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions en utilisant successivement le pouvoir séparateur de chaque analyseurs. Ceux-ci peuvent être identiques ou différents.

Les caractéristiques principales d'un analyseur sont :

- La résolution R.
- La gamme m/z qu'il peut analyser.
- La rapidité de balayage en m/z.
- La sensibilité.
- La vitesse avec laquelle les ions le traversent.

Souvent, avec un même analyseur, on peut augmenter l'une de ces caractéristiques aux dépends des autres, mais seulement dans certaines limites.

Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle (Q)	2 000	8 000
Trappe ionique (IT)	5 000	6 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	1 000 000	4 000

4.1.4. Détecteur

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal électrique utilisable. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Cette détection fait appel à la charge, à la masse et à la vitesse des ions. Il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable.

La plaque photographique et le cylindre de Faraday permettaient une mesure directe des charges arrivant au détecteur, tandis que les détecteurs multiplicateurs d'électrons ou de photons permettent l'amplification de l'intensité du signal détecté. Les détecteurs à induction et les détecteurs cryogéniques sont actuellement en cours de développement. Ils sont basés sur des principes physiques différents de ceux utilisés pour les détecteurs communément utilisés et présentent une efficacité indépendante de la masse et de la vitesse des ions détectés.

4.1.5. Système de traitement des données

Les spectromètres de masse sont pilotés par un ordinateur. Les opérations assurées par ce système sont :

- Réglage et calibrage du spectromètre.
- Acquisition et stockage des données.
- Traitement des données et recherche dans les banques de spectres.

4.2. Applications

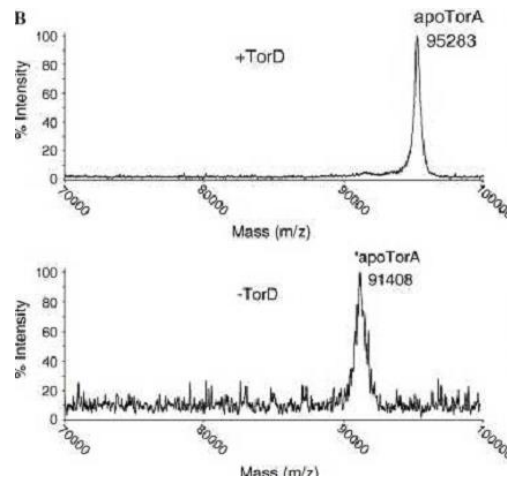
La spectrométrie de masse présente un spectre très vaste d'applications, qui s'étend de la recherche fondamentale au contrôle des processus industriels. On s'intéresse aux applications aux peptides, aux protéines et au protéome.

4.2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale

4.2.1.1. Contrôle de l'intégrité de protéine

Exemple : TorA (95 kDa) est une protéine périplasmique d'*Escherichia coli*. TorD (22 kDa) est la chaperone stricte de TorA. On mesure la masse de TorA produite par deux souches de bactéries *E. Coli*.

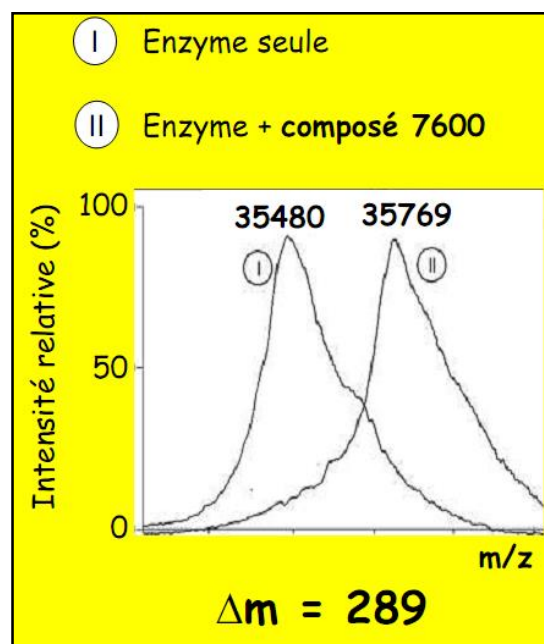




En absence de sa protéine chaperone, TorA subit une dégradation, perte de 2875 Da

4.2.1.2. Interactions protéine-ligand

Exemple : AFEST est une carboxylester hydrolase de l'*Archaeoglobus fulgidus*. Le composé 7600 (284 Da) est un puissant inhibiteur de plusieurs sérine carboxylester hydrolases.



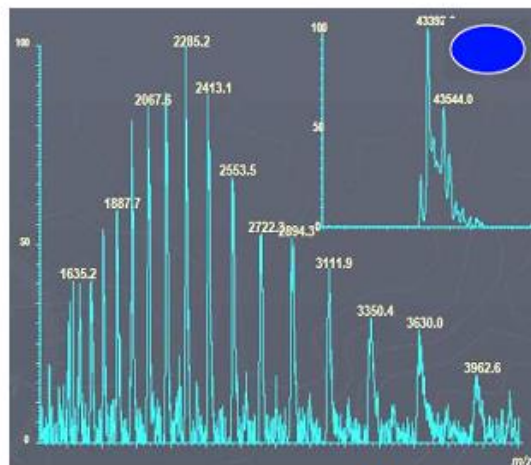
4.2.1.3. Modifications post-traductionnelles

Tout incrément de masse Δm (modification chimique ou mutation d'AA) peut être mesuré par spectrométrie de masse.

Phosphorylation	
pTyr	+80
pSer, pThr	+80
Acetylation	+42
Methylation	+14
Acylation, fatty acid modification	
Farnesyl	+204
Myristoyl	+210
Palmitoyl	+238
etc.	
Glycosylation	
N-linked	>800
O-linked	203, >800
GPI anchor	>1,000
Hydroxyproline	+16
Sulfation (sTyr)	+80
Disulfide bond formation	-2
Deamidation	+1
Pyroglutamic acid	-17
Ubiquitination	>1,000
Nitration of tyrosine	+45

4.2.1.4. Interactions protéine-protéine: oligomérisation /stoechiométrie

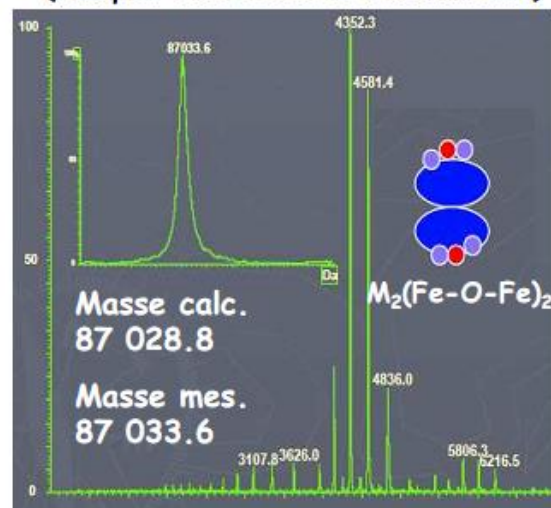
en conditions dénaturantes
(H₂O/MeOH/AcAcétique) :



Monomère inactif

Masse calc.
43 386
Masse mes.
43 392

en conditions non dénaturantes
(tampon bicarbonate d'ammonium) :



Dimère actif avec cluster « Fe-O-Fe » non covalent sur chaque monomère

Masse calc.
87 028.8
Masse mes.
87 033.6

$M_2(\text{Fe-O-Fe})_2$

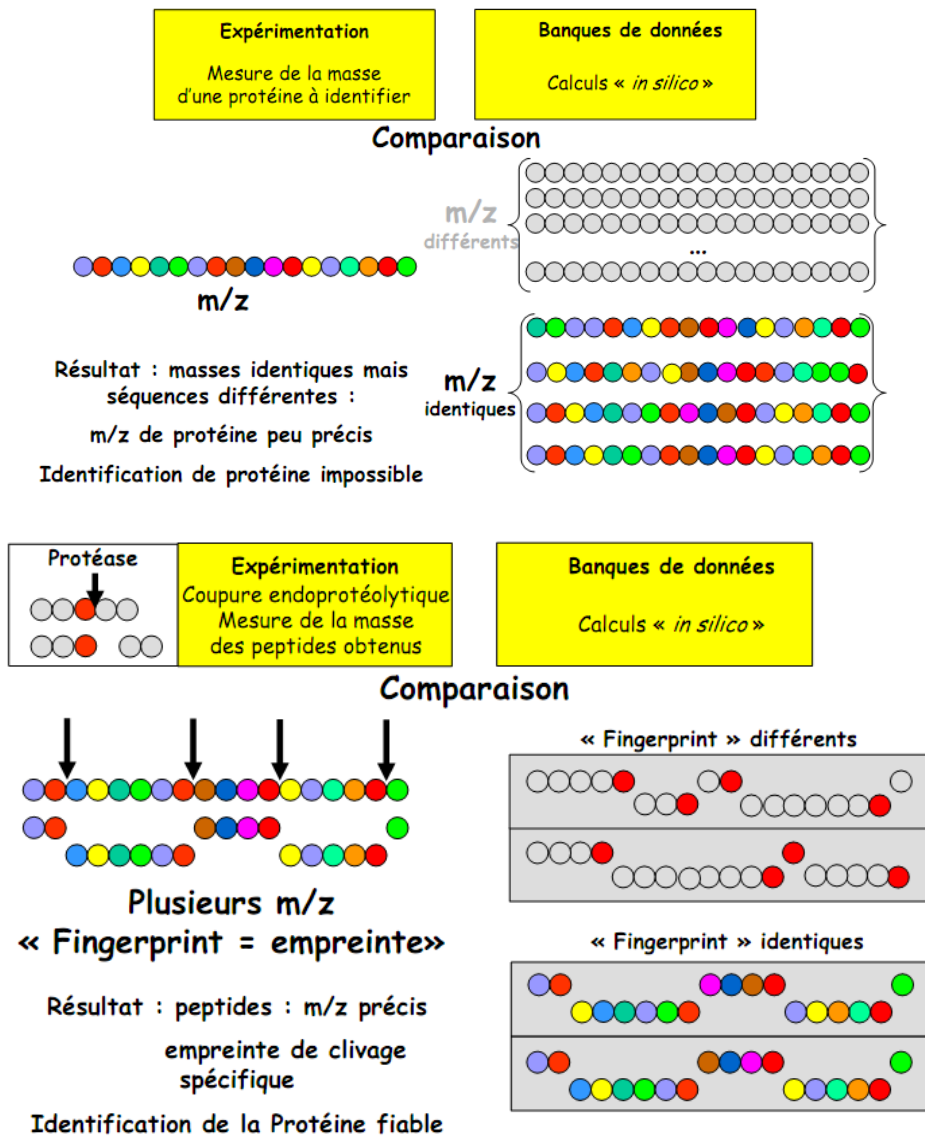
4.2.2. Identification de protéines (protéomique descriptive)

Protéome : ensemble des protéines exprimées par le génome ou par un type cellulaire ou une cellule.

Protéomique descriptive : identification et caractérisation des protéines d'une cellule dans un environnement donné.


L'analyse "rapide" et à grande échelle des protéomes est devenue possible grâce à: la connaissance des Génomes, méthodes de séparation des protéines, la spectrométrie de masse et la bioinformatique.

Identifier une protéine, connaissant son origine (génom), revient à lui attribuer une séquence en acides aminés.



881.222849
943.514963
1068.6416
1116.57621
1132.58301
1212.7018
1244.65546
1322.70696
1340.71526
1356.71383
1367.72379
1384.74483
1396.7146
1402.74509
1516.82759
1544.81102
1593.82601
1632.89477
1638.76448
1654.8601
1660.72389
1671.84132
1765.71536
1801.90996
1814.97956
1828.95939
1842.99485
1872.97703
1942.01866
1999.04159
2030.06445
2102.09095
2131.14332
2208.05736
2238.08617
2391.09731
2675.38176
2692.38245
2757.38469
2870.37949
3062.43458

**Compare
± Tolérance de Masse**



**Moteurs informatiques de recherche :
Algorithmes de calculs de scores basés
sur des probabilités**

641.376731
842.5
901.4
930.
945.5
1008.
1215.
1282.
1316.
1349.
1366.
1410.
1538.
1635.
1643.
1685.
1807.
2246.
2374.
2470.
2898.
3312.
641.376731
842.5
901.4
930.
945.5
1008.
1215.
1282.
1316.
1349.
1366.
1410.
1538.
1635.
1643.
1685.
1807.
2246.
2374.
2470.
2898.
3312.
641.376731
842.5
901.4
930.
945.5
1008.
1215.
1282.
1316.
1349.
1366.
1410.
1538.
1635.
1643.
1685.
1807.
2246.
2374.
2470.
2898.
3312.

Masses Expérimentales

Masses Théoriques

4.2.3. Quantification de protéines (protéomique quantitative)

Elle vise à comparer et quantifier des variations d'expression de protéines dans des situations biologiques variées : conditions de contrôle vs conditions de stress, pathologiques, avec stimuli chimiques...

4.2.3.1. Quantification relative après marquage

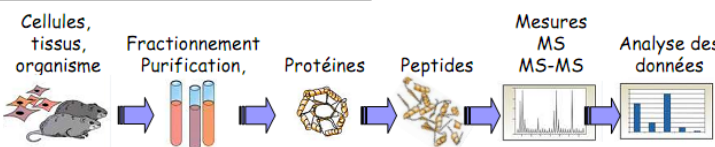
Pour comparer deux situations expérimentales

Introduction d'un marquage des protéines, dans l'une des deux conditions à comparer

Condition 1 } Comparaison du protéome

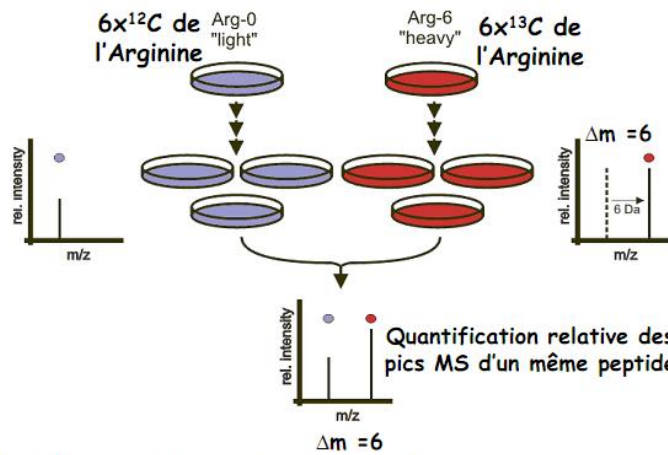
Condition 2 }

Cellules, tissu, organisme → Fractionnement (Purification) → Protéines → Peptides → Mesures MS (MS-MS) → Analyse des données



Marquage métabolique	1	1 et 2	1 et 2	1 et 2	1 et 2	1 et 2
	2	1 et 2	1 et 2	1 et 2	1 et 2	1 et 2
Marquage chimique	1	1	1	1 et 2	1 et 2	1 et 2
	2	2	2	1 et 2	1 et 2	1 et 2
	1	1	1	1	1 et 2	1 et 2
	2	2	2	2	1 et 2	1 et 2

*SILAC: Marquage d'acides aminés par incorporation d'isotopes stables lourds (¹³C ou ¹⁵N) en culture de cellules



*SILAC: Stable Isotope Labeling by Aminoacids in cell Culture

4.2.3.2. Quantification absolue

Dosage d'une protéine connue

Synthèse d'un peptide marqué (¹³C, ¹⁵N), correspondant à une portion de cette protéine



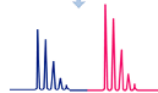
Caractérisation de ce peptide par spectrométrie de masse



Ajout d'une quantité connue de ce peptide de synthèse dans l'échantillon biologique



Digestion protéolytique



Analyse en Spectrométrie de Masse
Comparaison des intensités peptide marqué/non marqué
Quantification absolue

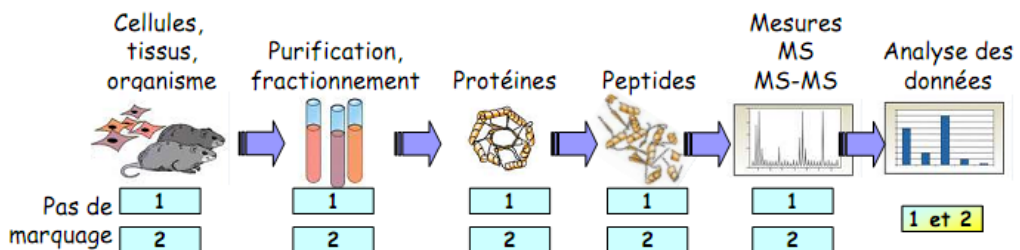
4.2.3.4. Quantification "label free"

Pour comparer deux situations expérimentales (ou plus!)

Condition 1

Condition 2

Comparaison du protéome



Nécessité de répéter chaque situation : expériences biologiques et techniques (n=3 à 10) et rassembler les données : Go-To !
Et exploitation avec divers outils bioinformatiques ...travail de longue haleine!

5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Introduction

La RMN est une technique spectroscopique qui repose sur le magnétisme du noyau. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption d'une radiation dans le domaine des fréquences radio par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Elle constitue l'une des plus puissantes méthodes de détermination de la structure des espèces aussi bien organique qu'inorganique.

5.1. Théorie

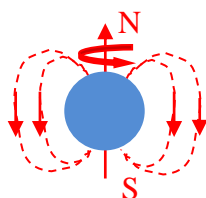
5.1.1. Notion de spin nucléaire

Un noyau est observable par RMN s'il présente des propriétés magnétiques caractérisées par l'existence d'un moment cinétique I non nul appelée spin.

Le spin est associé à un moment cinétique \vec{I} qui est analogue à celui qui résulterait de la rotation sur elle-même d'une particule (électron, proton, neutron) de dimension nulle.



Le spin associé à la rotation du proton un moment magnétique $\vec{\mu}$.

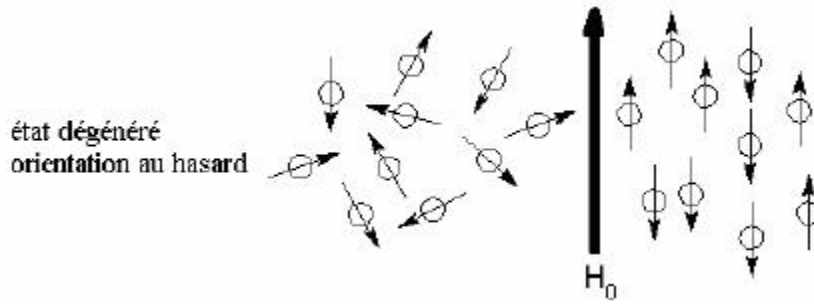


Les moments cinétiques et les moments magnétiques sont deux vecteurs colinéaires liés entre eux par le rapport gyromagnétique de spin nucléaire γ : $\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I}$

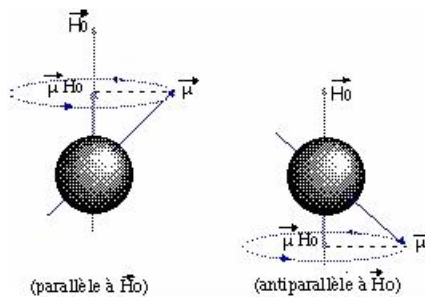
Il existe pour le proton deux états magnétiques distincts $m = +1/2$ et $m = -1/2$ ce qui signifie que pour un proton les états de spin sont quantifiés.

5.1.2. Interaction spin nucléaire-champ magnétique

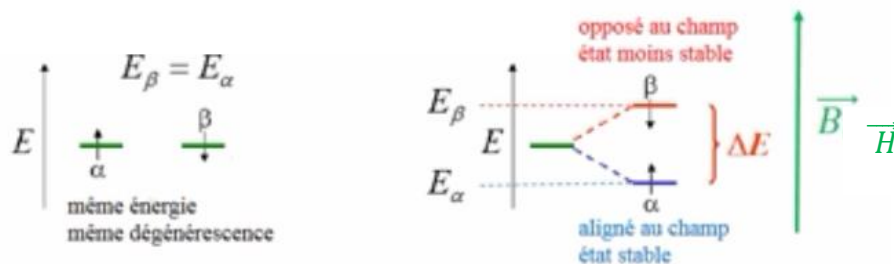
En l'absence de champ magnétique externe, les moments magnétiques de spin sont orientés au hasard. Par contre, sous l'action d'un champ magnétique statique H_0 , ces moments vont s'aligner selon le sens du champ imposé.



Selon les lois de la mécanique quantique, seules certaines orientations discrètes de ces vecteurs sont autorisées. Dans le cas du proton, deux orientations sont permises : parallèle et antiparallèle.

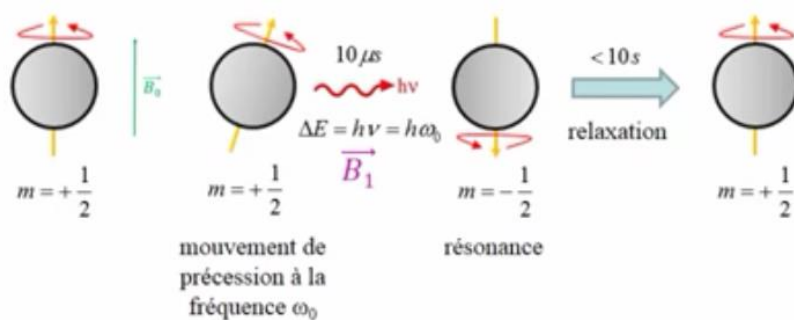


La différence d'énergie, ΔE , entre les deux états (α et β) dépendra directement de la force du champ magnétique H_0 selon :



5.1.3. Condition de résonance

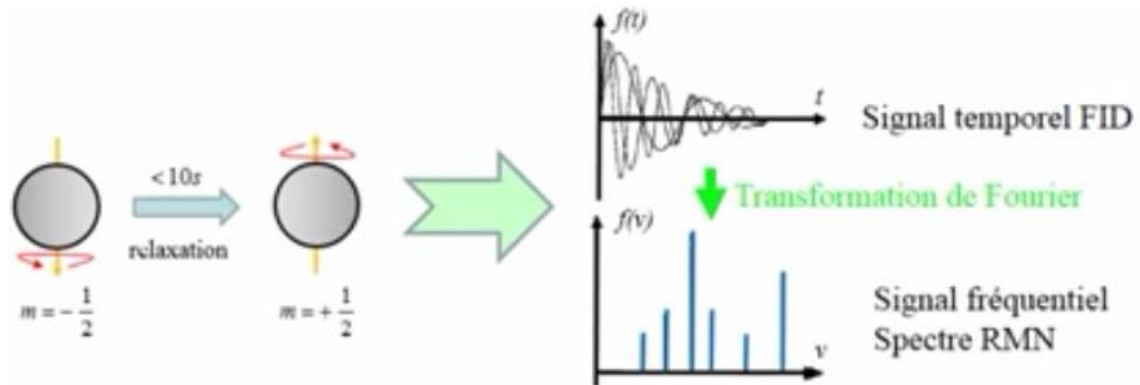
La fréquence du mouvement du proton en rotation est appelée fréquence de Larmor. Il sera possible d'effectuer une transition entre les deux niveaux d'énergie en fournissant au noyau l'énergie électromagnétique $h\nu = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot H_0$ correspondant à la fréquence de Larmor. Lorsque la transition a lieu, on dit qu'il y a résonance du noyau.



5.2. Principe de la RMN

Le principe de la RMN du proton (RMN¹H) consiste à :

- ✓ utiliser un champ magnétique H_0 pour orienter les "spins" nucléaires des atomes ;
- ✓ exciter ces spins par une onde radio à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins ;
- ✓ après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial (relaxation).



5.3. Appareillage

Il existe deux types de spectromètres, le spectromètre à balayage ou à onde continue, et le spectromètre par transformée de Fourier (FT-NMR).

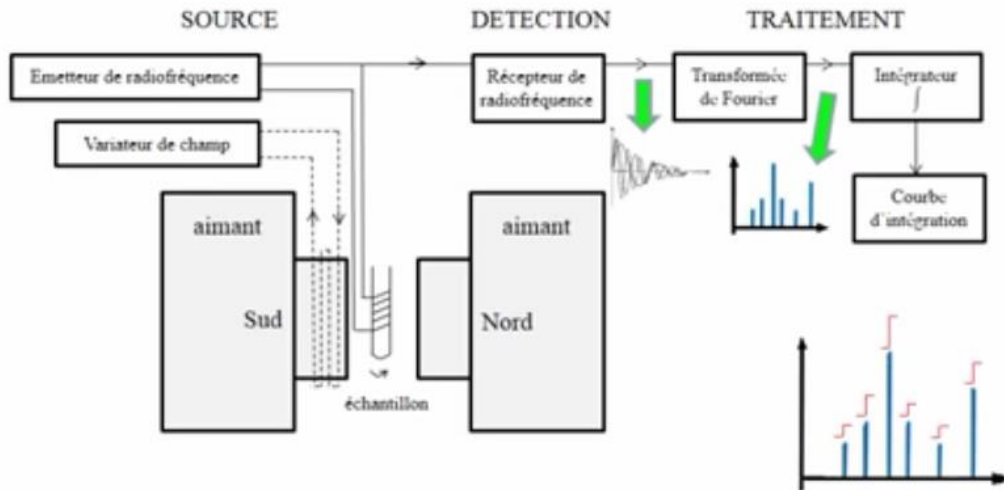
Les éléments suivants sont indispensables pour constituer un spectromètre :

- ✓ **Un aimant** pour produire le champ statique H_0 .
- ✓ **Une source** de radiations électromagnétiques de fréquence appropriée (générateur).
- ✓ **Une unité de balayage de fréquence** dans tout le domaine des absorptions.
- ✓ **Une cellule** contenant l'échantillon. Pour l'étude en solution, l'échantillon est dissous dans un solvant. La quantité de produit nécessaire pour la RMN du proton est de 10 à 50 mg. L'échantillon est placé dans un tube en verre mis en rotation au centre d'une bobine magnétique.

Le solvant choisi doit être dépourvu d'hydrogènes. En effet, les protons du solvant ne doivent pas masquer les protons de l'échantillon examiné.

Solvants employés : CCl_4 ; $CDCl_3$; CD_3COCD_3 ; CD_3OD_3 ; C_5D_5N ; D_2O ; $DMSO-d_6$...

- ✓ **Un détecteur** (récepteur de radiofréquence) qui mesure la quantité de radiation absorbée par la cellule.
- ✓ **Un enregistreur** qui trace l'énergie absorbée en fonction de la fréquence.



5.4. Principales caractéristiques du signal RMN

5.4.1. Le déplacement chimique

La position des différentes raies du spectre RMN est déterminée par rapport à une référence. Dans le cas du proton, on utilise le tétraméthylsilane $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS). Par commodité, on utilise une échelle de notation : le déplacement chimique δ_i , exprimé en partie par million (ppm).

$$\delta_{ppm} = \frac{(v_i - v_{ref})}{v_0} \cdot 10^6$$

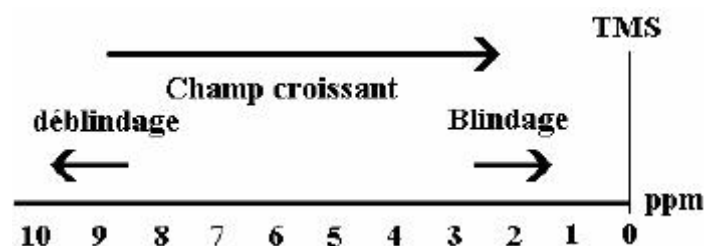
v_i : fréquence de résonance du noyau i

v_{ref} : fréquence de résonance de la référence (TMS)

v_0 : fréquence du champ statique H_0

δ est caractéristique de l'environnement du proton. Les protons de même environnement sont dits **magnétiquement équivalents** et ont le même δ . Les noyaux ayant des environnements différents sont dits **magnétiquement différents**.

Si un signal sort à un champ voisin de celui de la référence (TMS), on dit qu'il sort à champ fort : il est **blindé**. Inversement, si un signal sort à un déplacement chimique élevé, on dit qu'il sort à champ faible : le signal est **déblindé**.



Le déplacement chimique d'un proton dépend :

- ✓ essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) ;
- ✓ des substituants portés par cet atome ;
- ✓ de la nature des atomes adjacents et des substituants portés par ces derniers (OH, Cl,...) ;

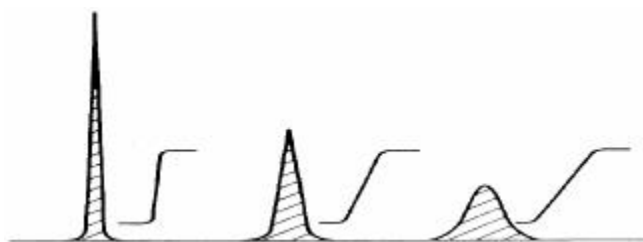
Les **effets attracteurs** (inductif ou mésomère) s'exerçant sur un carbone portant H induisent un **déblindage**. Un **effet donneur** induira au contraire un **blindage**.

Un deuxième effet important est la présence d'électrons π au voisinage du proton étudié (cycle aromatique ou liaison multiple).

Les déplacements chimiques nous donnent donc des indications sur l'environnement chimique du groupe auquel appartient le proton considéré. On pourra ainsi identifier des groupes de protons à partir de la valeur de δ . Des tables donnent les plages de ces déplacements en fonction de divers environnements.

5.4.2. Courbe d'intégration

Dans un spectre RMN, l'intensité d'un signal est mesurée par sa surface. L'intégration des surfaces des signaux se présente sous la forme d'une série de paliers.



La hauteur de chaque palier est proportionnelle au nombre de H correspondants.

5.4.3. Couplage spin-spin

Les protons portés par un même carbone ou des atomes adjacents vont présenter des couplages spin-spin. Le couplage ne peut avoir lieu qu'entre protons magnétiquement différents.

Le couplage avec un autre proton se traduit par la formation d'un doublet, avec deux protons par un triplet, etc. Lorsqu'un hydrogène possède n hydrogènes voisins équivalents entre eux, son signal apparaît sous la forme d'un multiplet à $(n+1)$ pics :

Si, pour des protons, il y a couplage avec deux groupes voisins de n_1 et n_2 protons, la multiplicité est donnée par : $(n_1+1)(n_2+1)$.

Exemple : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CHCl}_2$

La multiplicité du signal du CH_2 est égale à : $(n_1+1)(n_2+1) = (3+1)(1+1) = 8$.

Les rapports d'intensité des composantes suivent la règle du triangle de Pascal

nombre de voisins	nombre de pics et intensité relative	Nom du signal
0	1	singulet
1	1-1	doublet
2	1-2-1	triplet
3	1-3-3-1	quadruplet
4	1-4-6-4-1	quintuplet
5	1 - 5 - 10 - 10 - 5 - 1	sextuplet
6	1 - 6 - 15 - 20 - 15 - 6 - 1	septuplet

Les pics d'un multiplet sont espacés d'une quantité notée J appelée constante de couplage et exprimée en hertz. La valeur de la constante de couplage dépend de plusieurs facteurs tels que les distances et les angles.

5.5. Applications

- la spectrométrie RMN permet une analyse complémentaire de celle issue d'une spectrométrie infrarouge, notamment sur les groupes portant de l'hydrogène.
- Permet d'obtenir l'environnement des atomes d'hydrogène, et par là même la structure de la molécule.
- Les principales applications se situent au niveau de l'élaboration des structures chimiques et de l'imagerie médicale (IRM).