

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 20 Août 1955 Skikda
Faculté des Sciences
Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Agronomiques
Filière Sciences Agronomiques
Parcours production végétale



Polycopié pédagogique du cours de la matière

« Analyse Instrumentale »

Destiné aux étudiants de la 3^{ème} Année Licence LMD

Production végétale (semestre 06)

Elaboré par : **Dr. BECHIRI Loubna**

Maître de conférences- B-

Année universitaire: 2022- 2023

Préface

Le mot analyse comporte le suffixe « lyse » qui signifie « décomposer », c'est-à-dire les produits dont sont composés tous les corps. Il a fallu donc de trouver des méthodes pour diviser les corps complexes, puis caractériser les corps élémentaires issus de cette composition par les différents instruments analytiques.

Les scientifiques possèdent une panoplie de moyens puissants et élégants leur permettant de rassembler des informations qualitatives et quantitatives concernant la composition et la structure de la matière.

Le choix judicieux d'une technique d'analyse et l'utilisation efficace de l'instrumentation moderne d'analyse exigent toutefois la compréhension préalable des principes fondamentaux à la base de la technique et du fonctionnement des appareils.

Ce cours pédagogique traite de toutes les grandes techniques d'analyse actuelles et sur le sol tant d'un point de vue théorique que pratique constitue un guide indispensable pour les étudiants du 3^{ème} cycle Licence en Sciences Agronomiques.

Pourquoi on s'intéresse à l'analyse instrumentale dans les Sciences Agronomiques ?

C'est pour détecter les métaux lourds qui sont des polluants engendrés par l'activité humaine qui ont un fort impact toxicologique. Les métaux toxiques sont nombreux mais on peut citer surtout : l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure. Ils ont des impacts sur les végétaux, produits de consommation et l'homme.

Quelques impacts des métaux lourds sur la santé humaine :

Plomb : troubles du système nerveux, affection du foie et des reins ;

Cadmium : affection respiratoire, troubles rénaux ;

Mercure : troubles du système nerveux ;

Nickel : maladies respiratoires, asthme, cancer ;

Chrome : cancers, troubles dermatologiques, anémie.

Il est donc nécessaire de vérifier les teneurs en métaux lourds et les autres polluants des eaux destinées à la consommation et d'autres activités liées à l'Agriculture (tel que : l'irrigation). Les origines des polluants sont diverses, on peut citer notamment l'industrie de traitement des surfaces (peintures), les eaux usées...etc.

Les chapitres présentés dans ce cours aideront les futurs scientifiques à, d'une part, choisir les moyens de résoudre un problème d'analyse et, d'autre part, exploiter au mieux les résultats obtenus. Ils prendront également conscience des pièges qui accompagnent toute mesure physique et se familiariseront avec les indispensables notions de limites de sensibilité, de précision et d'exactitude des techniques.

L'objectif de ce document pédagogique est de permettre aux étudiants de la troisième année licence LMD en Production végétale d'acquérir certaines notions fondamentales en analyse instrumentale et leur application au niveau du laboratoire. D'une part fournir les bases pratiques aidant à la compréhension des notions théoriques et d'autre part d'apprendre à l'étudiant la démarche à adopter face à un instrument d'analyse.

- Il vise à permettre de comprendre les bases théoriques des différentes techniques d'analyse et leurs application ;
- Acquérir leurs principes théoriques ;
- Se familiariser avec la construction de l'appareillage utilisé dans les différentes techniques ;
- Connaitre les différents instruments utilisés en Agronomie et savoir les manipuler ;
- Connaître les applications et les limitations des techniques analytiques instrumentales ;
- Etre en mesure de choisir la technique la plus appropriée aux divers problèmes analytiques ;
- Permettre aux étudiants qui préparent leur mémoire de fin de cycle de maîtriser les principales techniques d'analyse au niveau du végétal et du sol, prendre connaissance des instruments et leur manipulation.

L'étudiant au terme de l'activité sera capable:

- De comprendre le fonctionnement et la procédure d'utilisation d'électrodes indicatrices telles que le pH mètre, conductimètre...
- D'utiliser, en suivant des procédures écrites, des appareils d'analyse instrumentale ;
- De construire et utiliser une courbe d'étalonnage et une droite de calibration pour les différentes techniques instrumentales ;
- Interpréter les résultats d'analyses instrumentales.

Ce polycopié est réparti en cinq chapitres.

- 1- INTRODUCTION
- 2- METHODES SPECTROMETRIQUES
- 3- METHODES ELECTROCHIMIQUES
- 4- METHODES ENZYMATIQUES
- 5- CHAMBRE A PRESSION ; POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE

Je tiens à remercier énormément les chers collègues qui ont bien voulu juger le manuscrit
du cours pédagogique et m'aider à l'améliorer encore une fois.

Il est possible que cette première version comporte quelques imperfections, je serais
reconnaissante à tous ceux qui me feront part de leurs corrections, remarques et
suggestions. Merci beaucoup.

Sommaire

CHAPITRE 01 : INTRODUCTION.....	01
I- CLASSIFICATION DES METHODES ANALYTIQUES.....	01
1- Méthodes classiques.....	01
2- Méthodes instrumentales.....	01
II-PRINCIPES D'ANALYSE INSTRUMENTALE.....	02
III- CARACTERISTIQUES DES METHODES INSTRUMENTALES.....	02
CHAPITRE 02 : METHODES SPECTROMETRIQUES.....	04
INTRODUCTION.....	04
I- INTERACTION MATIERE- RAYONNEMENT.....	05
II-SPECTROGRAPHE.....	06
SPECTROMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE.....	10
INTRODUCTION.....	10
1- Spectre électromagnétique.....	10
2- Radiations électromagnétiques.....	10
3- Théorie de la spectrophotométrie	11
I-SPECTROMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE.....	12
1- Définitions.....	13
2- Principe.....	13
II-DOMAINE D'ULTRAVIOLET ET DU VISIBLE.....	16
III-APPAREILS.....	17
1- Photométries « colorimétrie ».....	17
2- Spectrophotomètre.....	17
3- Spectroscopie UV- visible.....	18
IV- ELEMENTS CONSTITUANT UN SPECTROPHOTOMETRE UV-	
 VISIBLE.....	20
1- Source lumineuse.....	20
2- Monochromateur.....	20
3- Cuve.....	21
4- Cellule photoélectrique.....	21
5- Amplificateur.....	21
6- Détecteur électronique.....	21
V-Dosages APPLICATIONS DE LA LOI DE BEER- LAMBERT).....	21

1- Méthodes directes.....	21
2- Méthodes indirectes.....	21
VI- AVANTAGES.....	22
VII- LIMITES.....	22
VIII- APPLICATIONS.....	23
SPECTROMETRIE D’EMISSION ATOMIQUE.....	24
I- PRINCIPE.....	24
II-ELEMENTS D’UN PHOTOMETRE D’EMISSION ATOMIQUE.....	24
1- Nébuliser pour atomiser la solution à analyser.....	25
2- Brûleur et flamme.....	25
2-1- Vaporisation du solvant.....	26
2-2- Fusion et vaporisation des composés métalliques.....	26
2-3- Dissociation moléculaire.....	26
2-4- Excitation ou ionisation des atomes.....	26
2-5- Emission de radiation par les atomes excités.....	26
3- Monochromateur.....	26
4- Photomultiplicateur.....	27
5- Amplificateur, enregistreur.....	27
III- APPLICATIONS.....	27
IV- DOMAINES D’APPLICATION DE LA PHOTOMETRIE DE FLAMME.....	27
SPECTROMETRIE D’ABSORPTION ATOMIQUE.....	28
INTRODUCTION.....	28
I- PRINCIPE.....	28
II-LOI D’ABSORPTION EN ABSORPTION ATOMIQUE.....	29
III-APPAREILLAGE.....	29
1- Source de radiation.....	29
2- Production de la vapeur atomique.....	29
3- Monochromateur.....	30
4- Détecteur.....	30
IV-QUELQUES APPLICATIONS.....	30
CHAPITRE 03 : METHODES ELECTROCHIMIQUES.....	31
I- DESCRIPTION.....	31
II- GRANDS DOMAINES D’APPLICATION.....	31

1- Electro synthèse.....	31
2- Traitement de surface et corrosion.....	32
3- Stockage et conversion de l'énergie.....	32
4- Méthodes d'analyse et de mesure.....	32
5- Environnement et biologie.....	33
MESURE DU PH.....	34
I- QU'EST-CE QUE LE pH ?.....	34
II- ACIDE OU BASIQUE ?.....	34
III- ACIDITE DU SOL (STATUT ACIDO- BASIQUE).....	35
1- Mesure et interprétation.....	36
2- Pouvoir tampon du sol.....	37
3- pH et calcium.....	38
IV-COMMENT MESURER LE pH ?.....	38
V- pH-METRE.....	38
1- Fonctionnement.....	39
2- Etalonnage.....	40
3- Entretien des sondes.....	40
4- Types de pH-mètre.....	41
4-1- pH-mètre de poche.....	41
4-2- pH-mètre avec sonde renouvelable.....	41
4-3- pH- mètres régulateurs.....	42
4-4- pH-mètre de laboratoire.....	42
VI- INFLUENCE DU pH SUR L'ASSIMILATION DES NUTRIMENTS....	43
VII- DIFFERENTS TYPES DES PLANTES.....	43
VIII-MODIFICATION DU pH DU SOL, LE ROLE DES	
AMENDEMENTS.....	44
MESURE DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE.....	46
I- DEFINITION DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE.....	46
1- Extrait de pâte saturée.....	46
2- Echelle de salinité.....	46
II-PRINCIPE.....	47
III- UNITE.....	47
IV- UTILISATION COURANTE.....	47
V- RISQUE DE SALINITE.....	48

VI- CONDUCTIMETRIE.....	49
VII- CONDUCTIMETRE.....	51
1- Définition.....	51
2- Fonction et description.....	51
3- Etalonnage du conductimètre.....	52
4- Mesure.....	52
CHAPITRE 04 : METHODES ENZYMATIQUES.....	53
INTRODUCTION.....	53
I-DEFINITION DE L'ENZYME.....	53
II-CONDITIOND DU DOSAGE.....	53
1- Dosage en point final.....	53
2- Dosage par mesure de la vitesse initiale.....	53
NITRATE REDUCTASE.....	54
I- PRINCIPE.....	54
II-TECHNIQUE.....	57
III- LECTURE.....	57
TEST ELISA.....	59
I-PRINCIPE THEORIQUE.....	59
II-APPLICATIONS.....	62
1- Essais quantitatifs (dosages).....	62
2- Essais qualitatifs : le test VIH par ELISA.....	62
3- ELISA en sandwich.....	63
4- ELISA par compétition.....	64
CHAPITRE 06 : LA CHAMBRE A PRESSION ; LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE.....	65
I- ESTIMATION DE L'ETAT HYDRIQUE DE L'ARBRE.....	65
II-QU'EST-CE-QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE ?.....	65
III- QU'EST- CE QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE DE BASE ?.....	66
IV- QU'EST- CE QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE DE TIGE?.....	66
V- PRINCIPE DE LA MESURE DU POTENTIEL HYDRIQUE.....	67
VI- CHAMBRE A PRSSION.....	68

VII- CHAMBRE A PRESSION ET POTENTIEL TIGE.....	68
1- Description et fonctionnement de la chambre à pression.....	68
2- Techniques de mesure.....	69
3- Détection plus précoce des déficits hydriques modérés par le Tmin.....	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71

Liste des tableaux

Tableau 01: Propriétés chimiques et physiques utilisées en analyse instrumentale.....	03
Tableau 02: Domaine d'étude en physicochimie et applications.....	08
Tableau 03: Spectre des radiations électromagnétiques.....	11
Tableau 04 : Transmission et densité optique suivant la nature du milieu.....	16
Tableau 05 : Correspondance entre couleurs et longueurs d'ondes dans le visible.....	17
Tableau 06 : Longueurs d'ondes se répartissent en trois domaines.....	18
Tableau 07 : Quelques ions (cations/anions) du sol.....	48
Tableau 08 : Récapitulatif de la lecture du test de la Nitrate Réductase.....	58
Tableau 09: Etapes du test ELISA.....	61

Liste des figures

Figure 01 : Spectre des radiations électromagnétiques.....	06
Figure 02 : Spectre électromagnétique.....	10
Figure 03 : Spectrophotomètre.....	12
Figure 04 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV- visible mono faisceau.....	18
Figure 05 : Schéma du principe d'un photomètre d'émission à flamme.....	25
Figure 06 : Devenir du nébulisât dans la flamme.....	25
Figure 07 : Potentiel Hydrogène (pH).....	34
Figure 08 : pH-mètre.....	38
Figure 09 : Sonde.....	40
Figure 10 : pH-mètre de poche.....	41
Figure 11 : pH-mètre avec sonde renouvelable.....	41
Figure 12 : pH-mètre régulateur.....	42
Figure 13 : pH-mètres de laboratoire.....	42
Figure 14 : Types de plantes selon le pH du sol.....	44
Figure 15 : Changement coloration de la plante Hortensia selon le pH du sol.....	45
Figure 16 : Types de conductimètres.....	51
Figure 17 : Résultats possible du test de la Nitrate Réductase.....	56
Figure 18 : Plaque de microtitrage à 96 puits, couramment utilisée pour les tests- ELISA.....	60
Figure 19 : Microbiologiste utilisant un test ELISA pour dépistage du VIH-.....	62
Figure 20 : ELISA en sandwich.....	63
Figure 21 : Mesure du potentiel hydrique foliaire.....	65
Figure 22 : Chambre à pression.....	68

CHAPITRE 01 : INTRODUCTION

La chimie analytique englobe l'ensemble des méthodes utilisées pour déterminer la composition chimique d'échantillons de matière.

Les méthodes qualitatives fournissent des informations relatives à la nature des espèces atomiques ou moléculaires ou encore les groupes fonctionnels dans l'échantillon. Les méthodes quantitatives, quant à elles, fournissent des informations numériques telles que la quantité relative d'un ou de plusieurs composants.

I- CLASSIFICATION DES METHODES ANALYTIQUES

Les méthodes analytiques sont souvent classées en deux catégories: les méthodes classiques et les méthodes instrumentales. Cette classification est essentiellement d'origine historique, les méthodes classiques parfois appelées méthodes chimiques par voie humide, précédant les méthodes instrumentales d'un siècle sinon plus.

1- Méthodes classiques

Au début de la chimie, la plupart des analyses étaient effectuées en séparant les composants de l'échantillon auxquels on s'intéressait (les analytes) par précipitation, extraction ou distillation. Dans le cas d'une analyse qualitative, les composants séparés étaient traités par des réactifs conduisant à des produits aisément reconnaissables à leur couleur, à leur température d'ébullition ou de fusion, à leur odeur, à leur activité optique ou encore à leur indice de réfraction. Dans le cas d'une analyse quantitative, la quantité d'analyte était obtenue à partir des pesées ou titrages.

Les méthodes classiques d'analyse sont encore largement utilisées dans de nombreux laboratoires. Néanmoins, leur emploi diminue en raison de leur remplacement progressif par les méthodes instrumentales.

2- Méthodes instrumentales

Tout au début vingtième siècle, les chimistes ont commencé à tirer parti de certains phénomènes autres que ceux auxquels recouvrent les méthodes classiques pour résoudre les problèmes analytiques. Ainsi, ils ont commencé à exploiter les propriétés physiques des analytes, la conductivité, le potentiel d'électrode, l'absorption ou l'émission de lumière, le rapport entre la masse et la charge, ou encore la fluorescence pour analyser quantitativement des composés inorganiques, organiques ou biochimiques, de plus les techniques extrêmement efficaces de chromatographie et d'électrophorèse ont remplacé progressivement les méthodes de distillation d'extraction ou de précipitation utilisées

jusque là dans la séparation des composants d'un mélange complexe avant leur analyse qualitative et quantitative. Ces méthodes plus récentes de séparation et de dosage des espèces chimiques sont regroupées sous le nom de méthodes instrumentales d'analyse. Ces dernières sont basées sur des phénomènes connus depuis un siècle sinon plus, leur utilisation par les chimistes a cependant été retardée en raison de l'absence d'une instrumentation simple et fiable. En réalité le développement des méthodes instrumentales modernes d'analyse a crû de manière parallèle à celui de l'électronique et de l'informatique.

II-PRINCIPES D'ANALYSE INSTRUMENTALE

Les techniques d'analyse permettant aux scientifiques de rassembler des informations quantitatives et qualitatives quant à la composition et la matière ne manquent pas. Encore faut-il face à un problème concret, choisir judicieusement la stratégie et exploiter au maximum les ressources qu'offre chacune de ces techniques.

L'utilisation efficace de l'instrumentation moderne d'analyse exige la compréhension préalable des principes fondamentaux à la base de la technique et du fonctionnement des appareils.

III- CARACTERISTIQUES DES METHODES INSTRUMENTALES

En guise d'introduction, examinons les propriétés chimiques et physiques qui jouent un rôle en analyse qualitative et quantitatives. Le tableau 01 énumère la plupart des propriétés caractéristiques que l'on utilise couramment en analyse instrumentale. La majorité de propriétés énumérées dans ce tableau nécessitent l'utilisation d'une source d'énergie afin de provoquer une réponse mesurable de l'analyte. Par exemple, en spectroscopie d'émission atomique, il est indispensable d'élever la température de l'analyte afin de l'amener sous forme d'atomes gazeux et de les exciter à des états d'énergies supérieures. Les atomes excités émettent alors un rayonnement électromagnétique caractéristique que l'on mesure à l'aide d'un appareil adéquat.

L'excitation énergétique peut être obtenue soit par l'action d'un rayonnement électromagnétique, soit par l'application d'une excitation électrique, tension, courant ou charge, soit par une forme subtile d'énergie particulière émise par l'analyte, comme c'est le cas par exemple en présence de phénomènes nucléaires.

Tableau 01: Propriétés chimiques et physiques utilisées en analyse instrumentale

Propriétés caractéristiques	Méthodes instrumentales
- Emission de rayonnement	- Spectroscopie d'émission (Rayons X, UV et visibles), fluorescence, phosphorescence et luminescentes (rayons X, UV et visibles)
- Absorption de rayonnement	- Spectrophotométrie et photométrie (rayons X, UV, visibles, IR), RMN (résonance magnétique nucléaire), spectroscopie
- Diffusion de rayonnement	- Turbidimétrie, néphélométrie, spectroscopie Raman
- Réfraction de rayonnement	- Réfractométrie, interférométrie
- Diffraction de rayonnement	- Diffraction des rayons X et des électrons
- Rotation du plan de polarisation du rayonnement	- Polarimétrie : dispersion de la notation optique
- Potentiel électrique	- Potentiométrie
- Charge électrique	- Coulométrie
- Courant électrique	- Ampérométrie
- Résistance électrique	- Conductivité
- Masse	- Gravimétrie
- Rapport masse/ charge	- Spectrométrie de masse
- Vitesse de réaction	- Méthodes cinétiques
- Propriétés thermiques	- Thermogravimétrie, colorimétrie à balayage différentiel, analyses thermique différentielles, méthodes conductométriques thermiques
- Radioactivité	- Méthodes de dilution isotopique et d'activation

CHAPITRE 02: METHODES SPECTROMETRIQUES

INTRODUCTION

Les méthodes spectrométriques se décomposent globalement en deux grandes catégories :

- La spectrométrie des rayonnements : qui elle-même regroupe la spectrométrie d'absorption, la spectrométrie d'émission, la spectrométrie de diffusion Raman et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.
- La spectrométrie de masse.

Les techniques optiques d'analyse connaissent actuellement un très grand essor, le principe général de ces techniques consiste en l'exploitation quantitative, dans des conditions expérimentales très strictes, des phénomènes d'interaction entre la matière (atomes, molécules, ions) et les rayonnements.

La spectroscopie et la spectrométrie des rayonnements regroupent un ensemble de méthodes d'analyse permettant d'accéder à la composition et à la structure de la matière fondées sur l'étude des spectres fournis par l'interaction des atomes et des molécules avec divers rayonnements électromagnétiques qu'ils émettent, absorbent ou diffusent. Selon leur énergie, les photons interagissent sélectivement avec les différents niveaux électroniques qui composent la structure électronique atomique ou moléculaire. Ce sont les électrons de cœur (proche du noyau atomique) pour les rayons X, les électrons périphériques (éloignés des noyaux et impliqués dans les liaisons chimiques) pour la lumière absorbée ou émise dans le proche ultraviolet et dans le visible. Dans le domaine des rayonnements infrarouge, c'est le saut entre niveaux de vibration moléculaire qui intervient, le saut entre niveau de rotation des molécules pour les micro-ondes et le spin du noyau atomique pour la RMN.

Les éléments qui constituent la molécule sont les atomes, dont les électrons et les noyaux sont caractérisés par les nombres quantiques spécifiques. Il en résulte que la molécule en passant d'un état énergétique à un autre ($\Delta E = E_1 - E_2$) peut émettre ou absorber un photon d'énergie selon la relation : $E_1 - E_2 = h\nu$ (Joules).

Les spectroscopies s'intéressent à l'ensemble des sauts d'énergie possibles que permettent de prévoir nos connaissances sur la quantification des énergies atomiques et moléculaires. Ces sauts d'énergie couvrent une très grande gamme d'énergie qui peut

s'étendre de fréquences de l'ordre de 10^{18} hertz avec des énergies de l'ordre de 10^5 KJ par mole (rayons X) ou des fréquences de l'ordre de 10^4 hertz et des énergies de l'ordre 10^{-9} KJ par mole (fréquence radio).

I- INTERACTION MATIERE- RAYONNEMENT

De nombreuses expériences ont permis d'interpréter la lumière comme étant une vibration se propageant de façon extrêmement rapide dans un certain nombre de milieux transparents. La propagation de cette vibration crée une onde progressive caractérisée par sa fréquence ν et sa longueur d'onde λ , grandeurs liées par la relation :

$$\lambda = c / \nu = 10^4 / \sigma \quad c : \text{vitesse de la lumière } 2,998.10^8 \text{ m.s}^{-1}$$

λ : longueur d'onde exprimée en μm ou nm

σ : nombre d'onde exprimé en cm^{-1} ou Kayser

La lumière est assimilée à un pinceau de particules appelées photons dont la masse est nulle, la vitesse égale et l'énergie donnée par la relation :

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

h : constante de Planck ; $6,62.10^{-34}$ J.s

ν : est la fréquence (du rayonnement considéré proportionnelle à l'énergie)

L'énergie d'un photon est donc inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Autrement dit, plus la radiation est énergétique (λ petite) plus cette radiation risque d'être dangereuse pour la matière vivante (l'énergie croît avec la fréquence et le nombre d'onde).

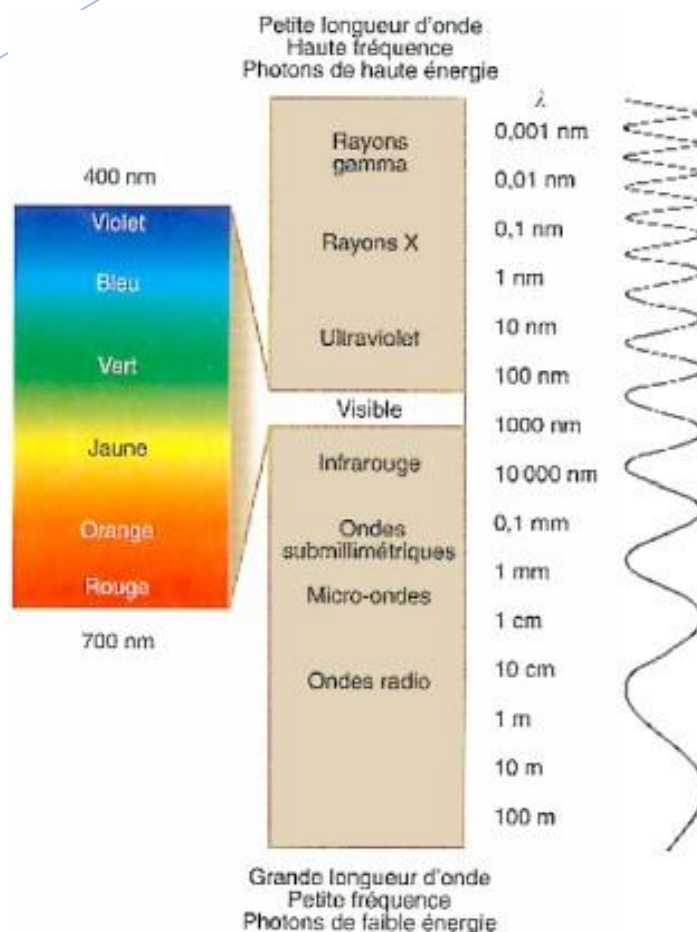


Fig. 01: Spectre des radiations électromagnétiques

II- SPECTROGRAPHE

Appareil de mesure enregistre la courbe $T = f(\lambda)$, c'est le spectre moléculaire d'absorption. L'aspect du spectre est lié à la structure du composé et au caractère de ses liaisons (spécifique). Son interprétation consiste à attribuer chaque absorption à la présence de caractéristiques structurales dans la molécule qui peut subir plusieurs types d'excitations. Chaque mode d'excitation nécessite une quantité bien définie d'énergie, les absorptions correspondantes apparaîtront dans des régions différentes du spectre électronique.

Le spectre d'une molécule est théoriquement un spectre de raies, mais dans les conditions expérimentales, les longueurs de ces raies conduisent parfois à l'observation d'une apparente continuité sur les spectres.

On rencontre différents types de spectroscopies, avant tout basées sur le mode d'interaction lumière (ou onde)/ matière, avec un échange d'énergie entre la molécule ou l'atome (niveau quantifié) et une onde électromagnétique de la fréquence ν et d'énergie $E = h\nu$ qui correspond à la transition moléculaire observé.

On observe :

**Absorption : les spectroscopies d'absorption reposent sur une excitation après absorption d'un quanta d'énergie.

**Emission : inversement les spectroscopies d'émission s'inscrivent dans un processus de retour à l'état fondamental (relaxation) avec émission d'un photon.

On peut faire un inventaire des différentes spectroscopies par énergie décroissante :

- **Spectroscopies photo électroniques : PES ;**
- **Spectroscopies électroniques : UV et Visible ;**
- **Spectroscopies vibrationnelles : IR ;**
- **Spectroscopies rotationnelles : micro- ondes ;**
- **Spectroscopies magnétiques ou spin : RMN.**

Nous allons balayer rapidement (avant l'en développer certaines) les grandes catégories de spectroscopies, des hautes énergies vers les plus faibles.

Tableau 02: Domaine d'étude en physicochimie et applications

	Longueur d'onde	Application (type d'excitation)
Rayons X et γ	0.1 10^{-3} nm à 50 nm	Diffraction de rayons X
UV lointain	50 nm à 150 nm	Spectrophotométrie UV- visible : Spectre UV (spectre électronique) (excitation électronique)
Proche UV	150 nm à 400 nm	
Visible	400 nm à 800 nm	
Proche IR	0.8 μm à 20 μm (2 10^{-3} cm) 20 μm à 0.1 cm	Spectrophotométrie IR
IR lointain		Spectre IR (excitation vibrationnelle et rotationnelle)
Micro onde	0.1 cm à 10 cm	Spectrophotométrie de la RMN : IR (micro onde)
Onde radio	10 cm à 1 m	RMN (spin électronique et nucléaire)

- **Rayons X et γ**

Les rayons X et γ , très énergétiques brisent les molécules organiques, arrachent les électrons profonds des atomes, qui en gagnent leur niveau fondamental (état d'énergie initial) émettent un spectre caractéristique de l'élément auquel ils appartiennent. Ils renseignent sur la disposition des plans des atomes dans un réseau cristallins. Les énergies impliquées sont $> 1250\text{KJ/mole}$

- **Rayons UV**

Les rayons UV moins énergétiques, ne peuvent que promouvoir à un niveau plus élevé (état excité) les électrons les moins liés à l'édifice moléculaire (molécules possédant

des liaisons multiples, noyau aromatique). Pour ce type de radiation, les énergies impliquées varient entre 170 et 1250 KJ/mole.

- **Rayons IR**

Les rayons IR ont des fréquences dont l'ordre de grandeur est celui des vibrations entre atomes dans les molécules organiques. Ils augmentent donc l'amplitude de ces vibrations et leur absorption à une fréquence spécifique trahit la présence dans la matière de différents enchaînements d'atomes. ΔE varie entre 8 et 150 KJ/mole pour le proche IR (transitions vibrationnelles) et entre 0.4 et 8 KJ/mole pour l'IR lointain (transitions rotationnelles).

- **Micro onde**

Pour les micro-ondes, les quanta correspondant effectuent des rotations autour des liaisons associées à des énergies de l'ordre $\Delta E = \sim 4 \cdot 10^{-4}$ KJ/mole.

- **Ondes radio**

Enfin, les ondes radio sont capables de produire des transitions au sein d'un noyau atomique, les énergies échangées sont de l'ordre de $\sim 4 \cdot 10^{-6}$ KJ/mole et jusqu'à 10^{-9} KJ/mole. Ce phénomène est à la base de la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN).

SPECTROMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE

INTRODUCTION

1-Spectre électromagnétique

Ensemble contenu des ondes électromagnétiques connues, classées dans l'ordre de leurs longueurs d'ondes, de leurs fréquences, de leurs énergies.

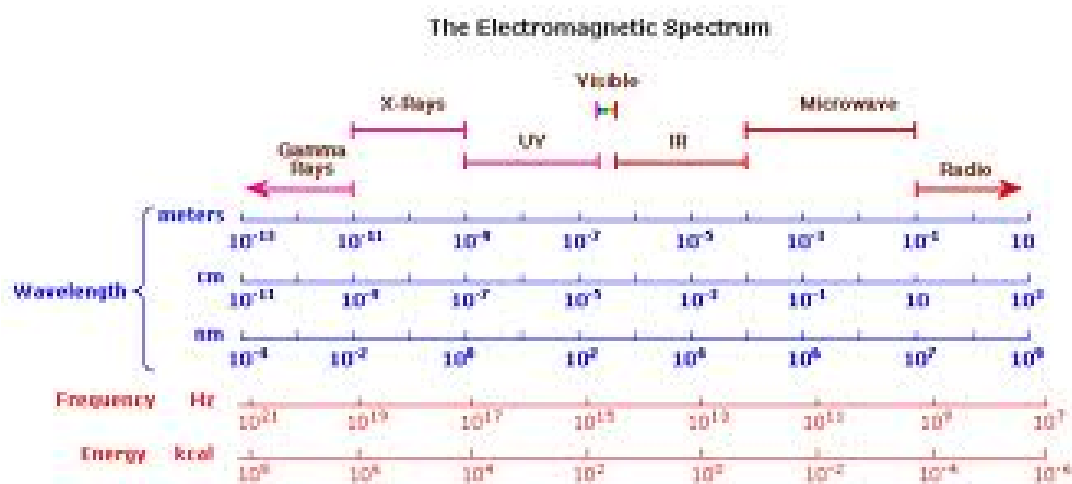


Fig. 02 : Spectre électromagnétique

2-Radiations électromagnétiques

La lumière visible est constituée de radiations électromagnétiques sensibles à l'œil humain. Ces ondes sont perçues comme étant colorées, tandis que la superposition de différentes longueurs d'ondes couvrant tout le domaine du spectre visible constitue une lumière blanche. Les ondes électromagnétiques sont généralement caractérisées par les grandeurs suivantes :

- **Longueur d'onde λ (lambda) :** unité de longueur (distance) qui sépare deux pics d'onde (exprimé généralement en nm).
- **Nombre d'onde σ (sigma) :** nombre d'onde par unité de longueur (exprimé généralement en cm^{-1}).
- **Fréquence ν (nu) :** nombre d'onde par seconde (exprimé en Hz). Ces grandeurs sont reliées par la relation suivante :

$$\sigma = 1/\lambda = \nu/C$$

Où : C : la vitesse de lumière ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)

3-Théorie de la spectrophotométrie

L'absorption d'un photon correspondant au domaine de longueur d'onde de l'UV et du visible, provoque une augmentation de l'énergie de la molécule de l'ordre de 400 000 J.mol⁻¹, conduisant à un changement de l'état électronique, vibrationnel et rotationnel de la molécule.

$$h\nu = (\Delta E)_{\text{électronique}} + (\Delta E)_{\text{vibrationnel}} + (\Delta E)_{\text{rotationnel}}$$

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels. Il y a alors modification de son énergie électronique ($E_{\text{élec.}}$), l'une des trois composantes avec l'énergie de rotation ($E_{\text{rot.}}$) et l'énergie de vibration (E_{vib}) de l'énergie mécanique totale de la molécule. Sachant que la modification de $E_{\text{élec.}}$ entraîne des perturbations de $E_{\text{rot.}}$ et E_{vib} . correspondants, on obtient dans tous les cas un vaste ensemble de transitions possibles.

$$\Delta E_{\text{tot.}} = \Delta E_{\text{rot.}} + \Delta E_{\text{vib.}} + \Delta E_{\text{élec.}}$$

(Avec $\Delta E_{\text{élec.}} > \Delta E_{\text{vib.}} > \Delta E_{\text{rot.}}$)

Tableau 03: Spectre des radiations électromagnétiques

Domaine spectral	Micro-ondes	Infrarouge Lointain moyen proche	visible	Ultraviolet Proche lointain	R.X mous durs
Mode d'absorption	Rotation des molécules	Rotation et vibrations des molécules		Transition des électrons périphériques	Transition des électrons profonds
Type de spectres	Rotation pure	Rotation- vibration		Transitions électroniques	

I- SPECTROMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE



Fig. 03: Spectrophotomètre

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

La spectrométrie d'absorption moléculaire est très utilisée dans le domaine industriel pour résoudre les problèmes d'analyse chimique, de dosage, d'identification. Les techniques utilisées sont très variables, allant de la colorimétrie où de simples filtres suffisent, aux spectromètres de haute résolution qui nécessitent des appareils volumineux. Comme pour d'autres techniques, les perfectionnements dans le domaine de l'acquisition ou de l'exploitation des données ont contribué à une plus grande automatisation des équipements et à une exploitation des résultats à la fois plus complète et plus rapide.

1-Définitions

La spectrométrie d'absorption moléculaire permet la mesure de la concentration d'un composé dissous dans une solution, s'effectue dans le domaine proche ultraviolet (U.V), visible et proche infrarouge (I.R), ce qui correspond à l'intervalle des longueurs d'ondes comprises entre environ 180 et 1000 nm. Lorsqu'un faisceau de radiations monochromatiques parallèles traverse sous incidence normale un milieu absorbant homogène et constitué d'une solution de n composés dissous ne réagissant pas les uns sur les autres, l'absorbance de l'ensemble est égale à la somme des absorbances spécifiques. Pour une transition électronique, il existe de nombreuses possibilités différentes pour des transitions vibrationnelles et rotationnelles. Lorsque la lumière arrive sur un milieu homogène, une partie de cette lumière incidente est réfléchi, une partie est absorbée par le milieu et le reste est transmis.

Si : * I_0 : est l'intensité de lumière incidente ;

* I_r : celle de la lumière réfléchi ;

* I_a : celle de la lumière absorbée ;

* I_t : celle de la lumière transmise.

On peut écrire la relation suivante : $I_0 = I_r + I_a + I_t$

2- Principe

La spectrophotométrie est fondée sur la loi de Beer- Lambert

- **Loi de Bouguer- Lambert**

Lorsqu'une lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse un milieu homogène, l'intensité de la lumière émergente I décroît exponentiellement lorsque l'épaisseur L du milieu absorbant augmente.

$$I = I_0 e^{-aL}$$

a : Est une constante appelée : coefficient d'absorption, caractéristique du milieu et de la longueur d'onde considérés.

- **Loi de Beer**

En analyse quantitative, on étudie principalement des solutions, Dans ce cas, la loi de Beer fait intervenir les concentrations. Elle s'exprime sous une forme tout à fait semblable à la précédente :

$$I = I_0 10^{-\zeta L c}$$

Où : * ζ : Est le coefficient d'absorption caractéristique de la substance appelée : coefficient d'extinction.

*L : Est l'épaisseur de la cuve.

*c : La concentration de la solution.

- **Loi de Beer- Lambert**

Finalement la relation fondamentale utilisée en spectrophotométrie est présentée sous la forme :

$$\text{Log}_{10} I_0 / I = \zeta c L$$

La relation de Beer- Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration, et à longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

- **Facteur de transmission ou transmittance « T »**

C'est le rapport du flux énergétique ou lumineux transmis au flux incident.

La transmission T d'une lumière d'intensité I_0 (lumière incidente) à travers un liquide est représentée par la relation :

$$T = I / I_0$$

Ou, en pourcentage de transmission : $T\% = (I / I_0) \cdot 100$

- **Densité optique**

On désigne par le terme densité optique le logarithme décimal de l'inverse du facteur de transmission. L'absorbance est au sens strict du terme la fraction de la densité optique interne d'une solution due à certains de ses constituants. Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log (I_0/I) \quad T = I / I_0 \quad \text{C'est-à-dire que : } A = - \log T$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

Expérimentalement, si l'épaisseur traversée augmente linéairement, l'intensité transmise diminue de manière logarithmique, cette diminution est notée E (extinction) ou A (absorbance) ou DO (densité optique) ou OD (Optical density) et s'écrit :

$$E = A = DO = OD = - \log I/I_0 = \zeta c L$$

E : sans unité

ζ : mol⁻¹.l.cm⁻¹ ou g⁻¹.l.cm⁻¹

c : mol/l ou g/l

L : cm

Où :

C : La concentration molaire de la substance (concentration du soluté) (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction) en mol/l ou g/l.

L : La longueur de solution traversée par le faisceau définit : le trajet optique de la solution absorbante « longueur de trajet optique » en cm.

ζ : Coefficient d'absorption moléculaire (coefficient d'extinction qui dépend de la longueur d'onde).

Si la concentration du soluté est exprimé en g/l (g.l⁻¹), ζ est en g⁻¹.l.cm⁻¹ et on l'appelle : coefficient d'extinction spécifique.

Si la concentration du soluté est exprimé en mol/l (mol.l⁻¹), ζ est en mol⁻¹.l.cm⁻¹ et appelé : coefficient d'extinction molaire.

L'absorbance à une longueur d'onde λ

$$A_\lambda = \zeta_\lambda L c$$

Selon la loi de Beer- Lambert, l'absorbance est additive (mais non la transmittance). Ainsi, pour une solution contenant plusieurs substances absorbantes, l'absorbance de la solution est la somme de leurs absorbances. Pour n substances absorbantes :

$$A = \sum_{i=1}^n A_i (\zeta_{\lambda, i}, l = 1 \text{ cm}, c_i) = (\zeta_{\lambda, 1} c_1 + \zeta_{\lambda, 2} c_2 + \zeta_{\lambda, 3} c_3 + \dots + \zeta_{\lambda, n} c_n)$$

Remarque

- Si $I_0 = I$ le milieu est transparent, dans ce cas le rapport $I / I_0 = 1$ la transmission est donc de 100% par contre $DO = 0$.
- Inversement, si le milieu est opaque, I tend vers 0 donc la transmission (I / I_0) tend vers 0, alors que la DO doit ∞ (infinie).

Tableau 04 : Transmission et densité optique suivant la nature du milieu

	Milieu	
	Transparent	Opaque
I	Egale à I_0	Très petit, proche de 0
Transmission = I/I_0	100%	0%
DO = $\log I_0/I$	0%	Infini ∞

La notation DO est de plus en plus utilisée car elle est directement proportionnelle à la concentration (en effet $DO = \zeta c L$), alors que la transmission est encore une fonction logarithmique de la concentration du produit.

II-DOMAINES D'ULTRAVIOLET ET DU VISIBLE

Le domaine du spectre UV utilisable en analyse s'étend environ de 190 à 400 nm, le domaine du spectre visible s'étend environ de 400 à 800 nm. Un soluté coloré absorbe de la lumière visible. On parle de spectrophotocolorimétrie ou simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet, on parle de spectrophotométrie UV. Les infrarouges ne sont pas utilisés en spectrophotométrie car ils dépendent surtout de la température de la solution et non de sa concentration, ils sont plutôt couverts par la spectroscopie en infrarouge. La spectrophotométrie est fondée sur l'étude du changement d'absorption de la lumière par un milieu, en fonction de la variation de la concentration d'un constituant. On détermine la concentration d'une substance en mesurant l'absorption relative de la lumière.

III- APPAREILS

On peut les classer en deux catégories: les photomètres et spectrophotomètres :

1- Photométries « colorimétrie »

Est un cas particulier de la spectrophotométrie dans le domaine visible. On utilise une source de lumière blanche (est habituellement des lampes de tungstène ne fournissant qu'une lumière dans le visible) et les déterminations sont faites à l'aide d'un instrument simple appelé colorimétrie. Une cellule photoélectrique permet d'apprécier l'intensité de coloration. On utilise une lumière dont les longueurs d'ondes se situent dans un domaine spectral relativement étroit grâce à des filtres qui ne transmettent que les longueurs d'ondes d'une petite région du spectre.

Remarque

L'énergie de radiation augmente lorsque la longueur d'onde diminue.

Tableau 05 : Correspondance entre couleurs et longueurs d'ondes dans le visible

Couleurs	Intervalle de longueur d'onde (nm)
Violet	400- 450
Bleu	450- 500
Vert	500- 570
Jaune	570- 590
Orange	590- 620
Rouge	620- 670

2- Spectrophotomètre

Le monochromateur est un prisme ou un réseau, ce qui permet d'utiliser toute la gamme du visible et éventuellement de l'UV.

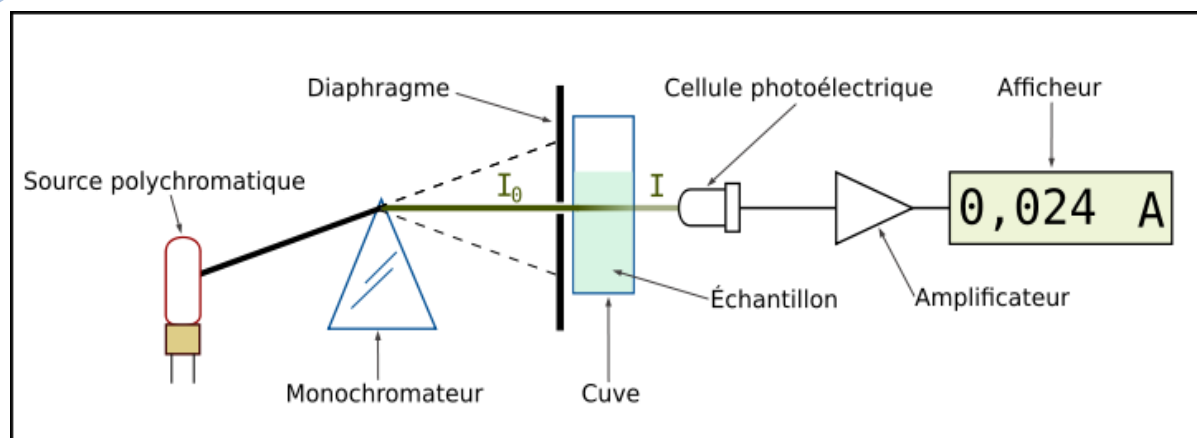


Fig. 04 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV- visible mono faisceau

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

3- Spectroscopie UV- visible

C'est la plus ancienne spectroscopie d'absorption utilisée, les spectres dans l'UV sont parfois appelés spectres électroniques car la transition responsable de l'absorption d'énergie correspond à une modification dans la répartition des électrons. Elle informe sur la présence de composés possédant des liaisons multiples. La spectroscopie UV est donc surtout intéressante pour étudier les systèmes conjugués et aromatiques, et vérifier par exemple la présence de tel ou tel substituant sur un noyau aromatique.

Tableau 06 : Longueurs d'ondes se répartissent en trois domaines

Domaines	Longueur d'onde	Energie mise en jeu ΔE
UV lointain	50 nm à 150 nm	Elles varient entre 170 et 1250 KJ/mol
Proche UV	150 nm à 400 nm	
Visible	400 nm à 800 nm	

En UV, les spectres d'absorption sont enregistrés par un spectrophotomètre qui compare pour chaque longueur d'onde l'énergie transmise et l'énergie incidente. Quand il y a absorption d'énergie électromagnétique, à une fréquence ν correspondant à une radiation ultraviolette un électron au moins passe d'un état stable à un état d'énergie plus élevé dit excité, son état décrit initialement par une orbitale ψ , l'est alors par une autre orbite ψ^* . Le passage de l'état E_1 fondamental à E_2 excité absorbe une énergie E . Ainsi une lumière de courte longueur d'onde est plus énergétique qu'une lumière de grande longueur d'onde. Les énergies mises en jeu par l'UV sont élevées, elles ne sont dépassées que par celles des rayons γ et des rayons X.

Elles varient entre 170 et 1250 KJ/mol. Par absorption d'énergie, les électrons de liaisons α , π , η peuvent être portés vers des états excités qui sont des états anti liants α^* , π^* , η^* . La liaison α étant forte, la séparation et l'énergie nécessaire pour passer de α à α^* est très élevée. Il en résulte que les molécules qui n'ont que des liaisons de type α ne présenteront pas de bande d'absorption dans l'UV proche $\lambda > 150$ nm. C'est le cas des hydrocarbures saturés (méthane, propane...) qui ne présentent de bandes d'absorption qu'au dessous de 140 nm. Les transitions les plus étudiées sont reliées aux électrons π et aux électrons non liants η des molécules organiques. Elles mettent en jeu des énergies plus faibles. L'intensité de la lumière diminue exponentiellement au fur et à mesure qu'elle traverse l'échantillon. La mesure de l'intensité de lumière émergente (bande d'absorption) à une longueur d'onde particulière est exprimée par le coefficient d'extinction.

- S'il est $\zeta < 200$ correspond à une transition de faible probabilité.
- S'il est $\zeta > 1000$ implique une transition de probabilité plus grande.

La transition de longueur d'onde la plus élevée est de plus faible énergie.

- **Groupe chromophore** : les groupes d'atomes qui apportent des électrons propres à subir des transitions, sont appelées chromophores (groupe chromophore : groupe insaturé covalent responsable de l'absorption) les groupes de nature à présenter cette propriété sont tous ceux qui présentent des insaturations tels que : $C = C$, $C = O$, $C = N$, C_6H_6 , $C \equiv C$...

- **Grouperment auxochrome** : Grouperment saturés qui quand il est lié à un chromophore modifie à la longueur d'onde et augmente l'intensité de l'absorption maximale.
- **Effet bathochromique** : déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes. Le phénomène de la conjugaison se traduit par la diminution de la différence d'énergie entre ψ et ψ^* et par suite par une diminution de la fréquence et une augmentation de la longueur d'onde, on dit qu'il y a un effet bathochrome, si la conjugaison est très importante λ_{\max} augmentant, fini par atteindre le domaine de visible et la substance est alors colorée.
- **Effet hypsochromique** : \neq Effet bathochromique : à l'inverse, une augmentation de la différence d'énergie qui entraîne une augmentation de fréquence et une diminution de la longueur d'onde impliquera un effet hypsochrome.
- **Effet hyperchromique** : **Augmentation** de l'intensité d'absorption (\neq hypochromique).

IV- ELEMENTS CONSTITUANT UN SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE

1- Source lumineuse

Elle est constituée par :

- Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm avec un maximum d'émission à 652 nm.
- Une lampe à filament de tungstène pour la région allant de 350 à 800 nm (lumière blanche).
- Une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique.

2- Monochromateur

L'élément de base est un prisme, un réseau ou un filtre coloré, le rôle du monochromateur est d'isoler le rayonnement sur lequel on fait la mesure (permettant de sélectionner une longueur d'onde à partir de la lumière utilisée). Il est composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie.

3- Cuve

Elle contient soit l'échantillon soit la référence, la longueur de la cuve est définie (1, 2, 4, ou 5 cm de trajet optique). Elle doit être transparente aux radiations d'étude.

- **Précautions d'usage**

Choisir le type de cuve adapté à la longueur d'onde :

- Quartz pour les UV (190- 400 nm).
- Verre ou polystyrène pour le visible (400- 800 nm).
- Ne jamais mettre les doigts sur les faces dépolies des cuves.
- Bien orienter la cuve par rapport à l'axe du faisceau lumineux.
- Supprimer toutes les bulles d'air.

4- Cellule photoélectrique : « tube photomultiplicateur d'électrons »

Qui fournit un courant électrique proportionnel au nombre de photon qu'elle reçoit.

5- Amplificateur

Le courant fourni par une cellule photoélectrique doit être amplifié.

6- Détecteur électronique

Dont la réponse est proportionnelle à ce courant électrique et permet une mesure relative de l'intensité lumineuse.

V- DOSAGES (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.

1- Méthode directe

- Elle consiste à mesurer A et à calculer C .
- Elle nécessite de connaître le ζ de la substance à doser à la longueur d'onde choisie. Et de bien caler le monochromateur, car ζ varie avec λ .

2- Méthode indirecte

- Elle ne nécessite pas de connaître ζ .
- Méthode par comparaison avec un étalon unique : elle consiste à mesurer dans les mêmes conditions l'absorbance A_d de la solution à doser 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 .

- 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 ses solutions étalons « filles », puis 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.

VI- AVANTAGES

Spectrophotométrie UV- visible présente les avantages suivants :

- Molécules biologiques en solution ;
- Méthode facile à mettre en œuvre ;
- Simplicité des mesures ;
- Permet de déterminer la concentration des molécules ;
- Permet de tester l'effet de divers paramètres (pH, température...).

VII- LIMITES

Plusieurs facteurs peuvent dégrader la loi de Beer-Lambert et limiter la validité de la spectrophotométrie :

- Le domaine de mesure idéal est pour les valeurs de T situées entre 20 et 60% ;
- Plusieurs aberrations optiques liés à la diffusion, la réflexion et la diffraction de la lumière peuvent fausser la mesure ;
- Les phénomènes de fluorescence ainsi que d'autres particularités chimiques liées aux substances absorbantes peuvent interférer ;
- Plus la densité du soluté est importante, plus le faisceau de lumière incident sera réfracté avec une valeur donnée. Cette tendance est normalement infime mais devient plus prononcée avec les hautes concentrations. Ainsi, la réfraction réduit l'intensité de la lumière transmise et l'instrument indique faussement une absorbance plus élevée. Généralement, ce phénomène peut être évité en travaillant avec des concentrations inférieures à $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$.

VIII- APPLICATIONS

- Déterminer la concentration d'une molécule (analyse qualitative et quantitative) ;
- Suivre la cinétique de formation d'un produit au cours d'une réaction enzymatique ;
- Mesurer l'absorbance d'un éluat au cours d'une chromatographie pour tracer le profil d'éluion ;
- Apprécier le degré de pureté d'une molécule purifiée.
- En biologie ; application aux protéines qui possèdent des acides aminés aromatiques et aux oligonucléotides ARN et ADN par mesure de la concentration d'un échantillon, étude de l'environnement sur les propriétés des biomolécules comme la dénaturation d'un brin d'ADN ou d'ARN qui peut être suivi par UV-visible.

SPECTROMETRIE D'EMISSION ATOMIQUE

I- PRINCIPE

Lorsqu'une solution saline chauffée dans une flamme (chauffage d'un métal dans une flamme), elle subit plusieurs modifications :

- Evaporation du solvant « de la couche d'eau ».
- Evaporation des particules du métal en molécules salines, puis en atomes (atomisation).

Apparition de molécules non dissociées, puis dissociées, d'atomes neutres à l'état fondamental puis excités (saut des électrons d'une couche à une autre), d'ions non excités puis excités,...

Lorsque du retour à l'état fondamental, l'énergie absorbée est restituée et émise sous forme de lumière (énergie lumineuse) avec une longueur d'onde caractéristique du métal à doser et dont l'intensité est proportionnelle à sa concentration.

Exemple :

- $\lambda_{\text{Na}} = 589 \text{ nm}$
- $\lambda_{\text{K}} = 766 \text{ nm}$

II- ELEMENTS D'UN PHOTOMETRE D'EMISSION ATOMIQUE

« PHOTOMETRE DE FLAMME D'EMISSION ATOMIQUE »

L'échantillon dilué comportant éventuellement l'étalon interne est transformé en aérosol et brûle dans la flamme. La lumière émise est détectée et le signal obtenu amplifié et traité.

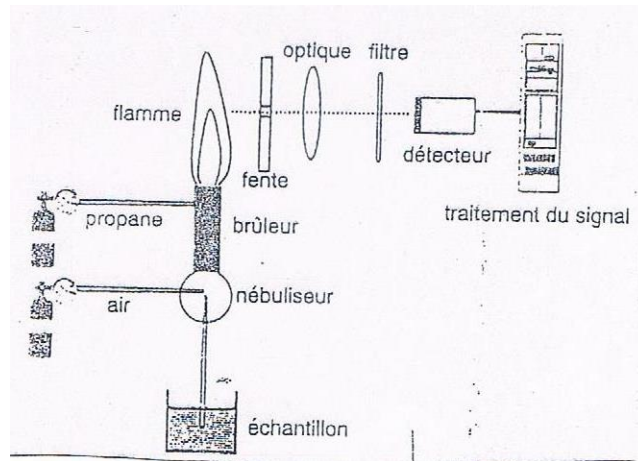


Fig. 05 : Schéma du principe d'un photomètre d'émission à flamme

1- Nébuliser pour atomiser la solution à analyser

Le nébuliseur pulvérise en très fine gouttelettes la solution contenant l'élément à doser grâce au gaz comburant qui les véhicule vers le brûleur.

2- Brûleur et flamme

Pour les photomètres d'émission utilisés en routine (dosage Na, K, Li), la flamme est obtenue par un mélange air/propane, air/butane dans lequel l'aérosol d'échantillon est injecté. Le mélange traverse le tube de brûleur et parvient dans la flamme. La combustion du propane fournit suffisamment d'énergie (ils permettent d'obtenir une température de flamme) de l'ordre de 1900- 1925 °K pour réaliser l'activation des atomes.

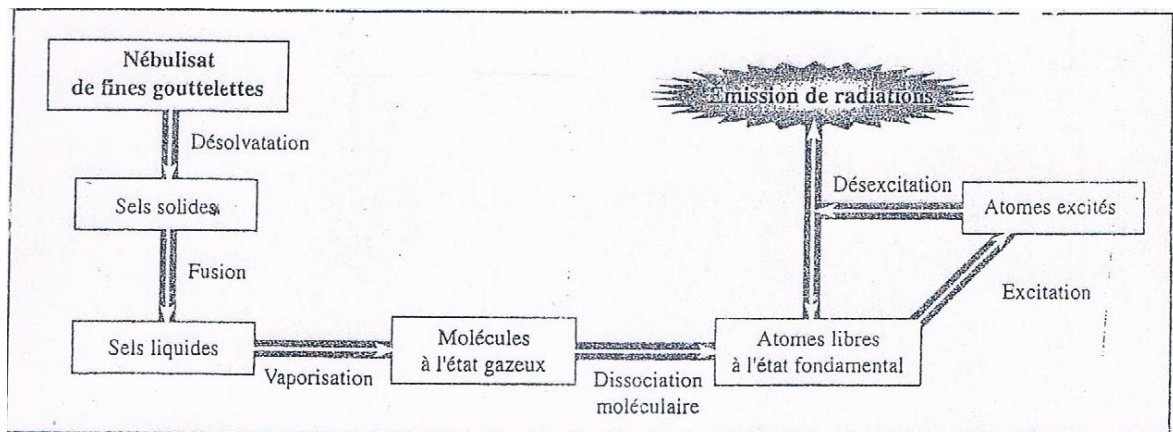


Fig. 06 : Devenir du nébulisat dans la flamme

2-1- Vaporisation du solvant

La durée de ce phénomène dépend beaucoup de la taille de gouttelettes du nébulisât.

2-2- Fusion et vaporisation des composés métalliques

Certains sels ou oxydes métalliques pourront ensuite passer à l'état liquide puis gazeux, c'est le cas par exemple du chlorure de sodium dont le point de fusion est de 830°C et la température d'ébullition 1480°C. D'autres oxydes, au contraire, resteront à l'état solide dans la flamme air/butane (ou propane). On dit qu'ils sont réfractaires à cette température. Citons l'oxyde de calcium dont la température de fusion est de 2580°C.

2-3- Dissociation moléculaire

Sous l'action des chocs importants à ces températures élevées. Certaines molécules de sels à l'état de vapeur vont se dissocier en atomes libres. Comme la température de la flamme n'est pas suffisante pour dissocier tous les sels, la photométrie de flamme air/butane (ou propane) sera limitée au dosage des alcalins et de quelques alcalinoterreux.

2-4- Excitation ou ionisation des atomes

Les chocs interatomiques causés par l'agitation thermique ont pour effet de provoquer des transitions électroniques dans ces atomes libres, transition qui peuvent parfois aller jusqu'à la perte de l'électron. Cette ionisation est cependant un phénomène rare aux températures utilisées en photométrie de flamme, sauf pour les alcalins qui ont une faible énergie d'ionisation.

2-5- Emission de radiation par les atomes excités

Les atomes excités perdent leur énergie par émission de photons de longueurs d'onde spécifiques. L'intensité de ces raies émises est proportionnelle au nombre d'atomes à l'état excité dans la flamme, nombre qui est lui-même proportionnel à la concentration de l'élément à doser dans la solution qu'on pulvérise.

3- Monochromateur « filtres interférentiels »

Isolement de la longueur d'onde de l'élément à doser.

4- Photomultiplicateur

Mesure de l'intensité du flux émis.

5- Amplificateur, enregistreur

Affichage de la valeur de l'émission.

III- APPLICATIONS

- Elle peut être utilisée à la fois pour l'analyse qualitative et quantitative ;
- La photométrie de flamme air/ butane (ou propane) convient très bien pour les alcalins : Na, K, Li dans les fluides (sang, urine) et tissus biologiques et alcalinoterreux : calcium, baryum.

IV- DOMAINES D'APPLICATION DE LA PHOTOMETRIE DE FLAMME

- Laboratoires médicaux et pharmaceutiques : les dosages du sodium et du potassium... sont couramment demandés en analyse médicale ;
- Laboratoires des industries alimentaires : dosage Na, K dans l'eau, les boissons, le lait et ses dérivés...
- Laboratoires d'analyses des eaux : analyse des eaux potables, minérales, polluées...

SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

INTRODUCTION

La spectrométrie atomique étudie les émissions aux 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 ces électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Ce sera le cas si l'énergie mises en jeu sont modérées. Les principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique utilisée en analyse chimiques sont:

- L'émission d'arc ou d'étincelle (analyse qualitative préalable).
- L'émission de flamme et l'absorption atomique (analyse quantitative des éléments à faibles teneurs).

I- PRINCIPE

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'onde (cette méthode consiste en la mesure de l'absorption de radiations photoniques spécifiques par les atomes en phase vapeur), l'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe sa longueur d'onde.

L'absorption des radiations électromagnétiques des régions visibles et UV du spectre par les atomes libres résulte d'un changement dans la structure électronique (l'absorption d'une énergie lumineuse par un atome métallique à l'état fondamentale le fait passer à un état excité). On observe lorsque la radiation caractéristique (de résonance en général) d'un élément passe dans un nuage de vapeur atomique de l'échantillon. L'échantillon est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme ou par évaporation d'une surface chauffée électriquement.

La détermination spectroscopique d'espèces atomiques peut seulement être réalisée à partir d'un échantillon à l'état gazeux, dans lequel les atomes individuels comme l'Ag, l'Al, le Fe et le Mg sont nettement séparés les uns des autres.

II-LOI D'ABSORPTION EN ABSORPTION ATOMIQUE

L'intensité de l'absorbance dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de BEER LAMBERT selon laquelle l'absorbance A:

$$A = K c l \quad \text{ou} \quad A = \log I_0/I$$

K : Coefficient d'absorption spécifique (constant) ;

c : La concentration en atomes ;

l : Longueur du domaine absorbant (trajet optique) ;

I_0 : Intensité initiale de la source de lumière

I : Intensité après absorption par les atomes.

La gamme de dosage (domaine dans lequel la droite d'étalonnage est pratiquement une droite) est généralement donnée par le constructeur. Elle dépend de la raie de dosage utilisée.

III- APPAREILLAGE

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose :

1- Source de radiation: « la lampe à cathode creuse »

Elle consiste en une anode de tungstène et une cathode cylindrique sise dans un tube de verre contenant un gaz inerte (gaz rare) comme l'argon. La cathode est composée de l'élément à analyser.

2- Production de la vapeur atomique: « un brûleur et un nébuliseur »

Il faut de la chaleur pour faire passer l'échantillon à l'état gazeux, la chaleur est générée par une flamme ou un four de graphite.

Source :

- D'atomisation à flamme (SAA en flamme).

- D'atomisation sans flamme (SAA par électrothermie).

La SAA de flamme analyse seulement les solutions, tandis que la SAA de four de graphite analyse les solutions, les boues liquides et les échantillons à l'état solide.

- Atomiseur de flamme consiste en un nébuliseur qui convertit l'échantillon en un aérosol, qui est alimenté dans un brûleur, la solution à doser est nébulisée puis atomisée dans une flamme (généralement une flamme air/ acétylène, acétylène/ protoxyde d'azote).
- Atomiseur électrothermique fournit une grande sensibilité parce qu'il atomise l'échantillon rapidement.

3- Monochromateur

Pour isoler une bande étroite de longueurs d'ondes on utilise un monochromateur.

4- Détecteur : Système de lecture relié à un amplificateur

Après passage par un monochromateur, le flux lumineux vient frapper un photomultiplicateur qui transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique (convertir la lumière en signaux électriques).

IV- QUELQUES APPLICATIONS

La SAA est une méthode basée sur un élément unique, utilisée pour reconstituer l'analyse des métaux d'échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques et atmosphériques.

- En biologie clinique : la technique est utilisée pour le dosage sérique des métaux et alcalinoterreux : calcium, magnésium, fer, cuivre, zinc, sélénium, aluminium...
- En toxicologie et pharmacologie : la technique est utilisée pour le dosage de divers métaux : mercure, plomb, nickel, manganèse, cadmium.
- Le dosage du Ca, Zn.....dans les os.

Remarque

Les derniers appareils commercialisés permettent un dosage simultané de plusieurs éléments en mettant en jeu simultanément plusieurs sources de radiations différentes.

CHAPITRE 03 : METHODES ELECTROCHIMIQUES

L'électrochimie est la discipline scientifique qui s'intéresse aux relations entre la chimie et l'électricité. Elle décrit les phénomènes chimiques couplés à des échanges réciproques d'énergie électrique. L'électrochimie comprend toutes technologies et techniques issues de ses travaux scientifiques (électrolyse, corrosion, piles, batteries, électrodéposition...). De plus, l'électrochimie s'intéresse à des systèmes hétérogènes comportant aux deux extrémités des matériaux conducteurs électroniques (métal, carbone...) et, entre ces deux conducteurs, au moins un matériau conducteur ionique (électrolyte liquide ou gélifié, sel fondu...).

I-DESCRIPTION

Les réactions électrochimiques sont les phénomènes qui ont lieu à l'interface de deux systèmes conducteurs (électronique et ionique) lors du transfert de charge composé de un ou plusieurs électrons. Ces transferts de charges s'accompagnent de modification des états d'oxydation des matériaux (oxydation ou réduction) et donc de leur nature physico-chimique (dépôt métallique, évolution de gaz, formation d'espèces radicalaires, réactions chimiques couplées...). L'ensemble des réactions élémentaires peut ainsi atteindre un haut niveau de complexité. L'électrochimie permet de mieux appréhender les phénomènes d'oxydo- réduction et de corrosion.

II-GRANDS DOMAINES D'APPLICATION

On classe généralement les applications industrielles de l'électrochimie dans 5 grandes catégories :

1- Electro synthèse

L'électro synthèse est parfois utilisée dans l'industrie chimique lourde au détriment d'une synthèse par voie thermique. Les principales matières premières produites par électro synthèse sont : l'aluminium (env. 24 Mtonnes/an), le di chlore et la soude (env. 40 Mtonnes/an). On produit également en quantité moindre du di fluor, du lithium, du sodium, du magnésium et du dihydrogène. On rangera dans la même catégorie la purification de certains métaux par électro affinage (notamment le cuivre, le zinc et l'aluminium).

2- Traitement de surface et corrosion

Les traitements de surface par voie électrochimique sont nombreux car l'électrochimie permet de bien contrôler la nature et la qualité du dépôt. Ce dépôt de métal (nickel, zinc, or...) de quelques micromètres d'épaisseur (1 à 10 micromètres) joue un rôle esthétique ou de protection contre la corrosion.

3- Stockage et conversion de l'énergie

Les piles et accumulateur électrique sont des générateurs électrochimiques. Les accumulateurs se distinguent des piles par le fait qu'ils sont électriquement rechargeables.

- Dans des applications de type « grand public » comme les batteries pour téléphones portables.
- Dans les applications professionnelles, les plus courantes sont les batteries au plomb, elles assurent le rôle de source d'énergie auxiliaire des véhicules automobiles permettant entre autres, leur mise en route.
- D'autres types d'accumulateurs, plus sophistiquées, commencent à jouer un grand rôle dans les véhicules hybrides; ils stockent l'énergie récupérée par l'intermédiaire de générateurs lors des freinages et, la restituent avec des moteurs électriques lors des phases d'accélération: exemple, certains modèles Toyota.
- D'autre part, de nombreuses recherches sont aujourd'hui effectuées dans le domaine des piles à combustible afin d'équiper ces mêmes véhicules. Ceci bien que la ressource en hydrogène propre soit encore hypothétique.
- Les super condensateurs sont des condensateurs (capacités) aptes à accumuler rapidement une grande quantité d'énergie électrique puis de servir de générateurs.

4- Méthodes d'analyse et de mesure

Du fait de leur faible coût, on utilise de plus en plus de capteurs électrochimiques. Le plus simple d'entre eux est l'électrode à pH. Le plus utilisé est le capteur à dioxygène, notamment pour l'analyse des gaz de combustion. Les capteurs électrochimiques ont aussi de nombreuses applications dans le domaine biomédical ou pour l'analyse de la pollution. L'appareil de mesure le plus utile à l'électrochimie s'appelle le potentiostat ou galvanostat. La cellule électrochimique la plus courante est la cellule à trois électrodes: L'électrode de travail et la contre électrode entre lesquelles passe le courant. L'électrode de référence (ou

impolarisable) qui permet d'évaluer la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrolyte.

5 -Environnement et biologie

Dans ce domaine en forte expansion, les techniques électrochimiques permettent la séparation (électrodialyse), la récupération, la concentration ou la destruction de certains éléments. Un exemple type d'application est le dessalement des eaux saumâtres par électrodialyse.

MESURE DU pH

I- QU'EST-CE QUE LE pH ?

Le pH, qui est l'abréviation du **potentiel hydrogène**, est un paramètre servant à définir si un milieu est acide ou basique. Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1909 par le chimiste danois Peder Lauritz, alors qu'il travaillait sur les ions hydrogènes.

Le pH 7, aussi appelé "**pH neutre**", caractérise un milieu neutre (ni acide ni basique). Il correspond au potentiel hydrogène de l'eau pure à 25°C. Les solutions dont le pH est inférieur à 7 sont acides. Celles dont le pH est supérieur à 7 sont basiques. A noter : le pH des solutions physiologiques est de 7,41.



Fig. 07 : Potentiel Hydrogène (pH)

II-ACIDE OU BASIQUE ?

La valeur du pH d'une solution est directement liée à sa concentration en ions oxonium H_3O^+ qui proviennent de la fixation d'un proton H^+ sur une molécule d'eau. Un milieu acide (correspondant à un pH faible) présente une forte concentration en ions oxonium. Une solution aqueuse est considérée comme acide quand elle contient plus d'ions H_3O^+ que l'eau pure. Inversement, un milieu basique (correspondant à un pH élevé)

se caractérise par la présence d'ions hydroxydes OH^- qui proviennent de la perte d'un proton H^+ par une molécule d'eau.

Une solution aqueuse est considérée basique quand elle contient plus d'ions OH^- que l'eau pure. En règle générale, l'ajout d'un acide diminue le pH d'une solution neutre ou basique ; inversement, l'ajout d'une base augmente le pH d'une solution acide ou neutre. A noter: le pH est un facteur logarithmique: il diminue d'une unité quand une solution devient dix fois plus acide, de deux unités quand elle devient 100 fois plus acide, de trois unités quand elle devient 1000 fois plus acide et ainsi de suite...

III- ACIDITE DU SOL (STATUT ACIDO- BASIQUE)

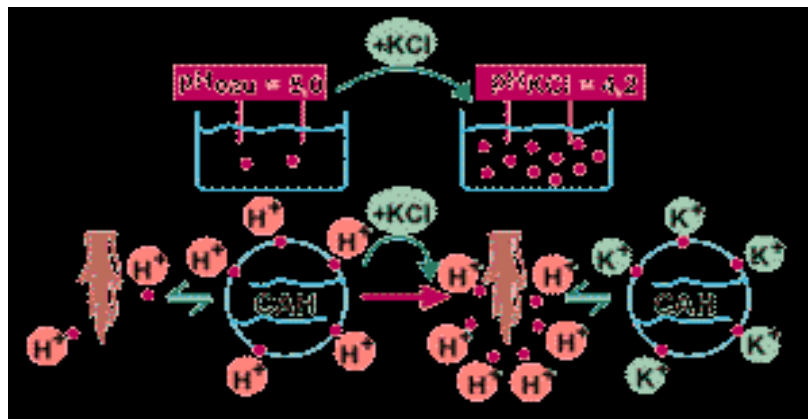
L'acidité du sol exprimée par le pH, le pH d'un sol est la mesure de la quantité d'ions H^+ libres dans sa solution. Seuls les ions H^+ libres dans la solution du sol peuvent agir sur le pH. L'acidité du sol est régie par la quantité de cations hydrogène (H^+) qui sont fixés sur le complexe argilo-humique ou en mouvement dans la solution du sol. Elle influence directement l'assimilabilité des éléments nutritifs par le couvert végétal et joue à ce titre un rôle fondamental dans la rentabilité de la culture.

Les sols ont une tendance naturelle à l'acidification, c'est-à-dire au remplacement sur le complexe des cations minéraux par des ions H^+ . Or ce phénomène est accentué par l'action de certains engrais (phosphate, nitrate, ammoniacque). Ainsi pour éviter d'atteindre des niveaux d'acidité trop importants, il convient de corriger régulièrement le pH du sol par des amendements calciques et magnésiens ou par un chaulage.

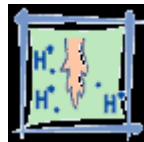
Bien que le pH idéal varie selon la nature du sol et la culture, on cherche en règle générale à obtenir une légère acidité (en dessous de la neutralité) qui est alors favorable à l'assimilation.

1- Mesure et interprétation

Le pH eau mesure l'acidité de la solution du sol. Le pH KCl mesure l'acidité en réserve sur le complexe argilo-humique (les ions H^+ du complexe sont remplacés par des ions potassium K^+). Le pH KCl est donc toujours inférieur au pH eau. La différence ($pH \text{ eau} - pH \text{ KCl}$) varie de 0,5 à 1,5. Elle est évidemment proportionnelle à l'acidité de réserve du CAH.



- pH eau



Le pH eau (potentiel Hydrogène) correspond à la concentration en hydrogène $[H^+]$ de la solution du sol. Il est appelé ainsi car il est mesuré dans un mélange terre / eau. Le pH eau permet de distinguer 3 grands types de sol :

pH eau < 7: sol acide

pH eau = 7: sol neutre

pH eau > 7 : sol alcalin

Le pH eau correspond à l'acidité active ou acidité réelle du sol.

$$pH = - \log [H^+]$$

L'échelle du pH s'étend de 0 à 14.

- **pH KCl**



Le pH KCl correspond à la concentration en hydrogène $[H^+]$ du sol obtenu après ajout de KCl. Le KCl a pour effet de chasser les H^+ fixés sur le Complexe Argilo-Humique (C-A-H), ce qui permet de déterminer l'acidité totale ou acidité de réserve du sol. Le pH KCl est donc un pH théorique « théorique » qui permet de connaître l'acidité potentielle du sol.

Ecart $< 0,5$ l'acidité de réserve faible ;

Ecart < 1 acidité de réserve moyenne ;

Ecart > 1 acidité de réserve élevée. Le pH KCl n'est mesuré qu'en sols non calcaires.

La première version du Référentiel pédologique français propose les types de sols suivants :

- pH inférieur à 3,5 hyper-acide ;
- pH entre 3,5 et 5,0 très acide ;
- pH entre 5,0 et 6,5 acide ;
- pH entre 6,5 et 7,5 neutre ;
- pH entre 7,5 et 8,7 basique ;
- pH supérieur à 8,7 très basique.

2- Pouvoir tampon du sol : le pouvoir tampon du sol représente sa capacité à résister aux variations de son pH. Plus un sol est riche en colloïdes argilo-humiques, plus le nombre d'ions en réserve sur le complexe est élevé et donc plus son pouvoir tampon est important. Il est ainsi plus difficile de corriger le pH d'un sol fortement tamponné (type argileux) par rapport à un sol peu tamponné (type sableux).

3- pH et calcium: le calcium est le cation minéral le plus représenté sur le complexe argilo-humique. Lorsque le sol se décalcifie (prélèvement du couvert, lessivage), le départ d'ions Ca^{2+} du complexe laisse la place à un nombre supplémentaire d'ions H^+ ce qui provoque à plus ou moins long terme une acidification.

IV- COMMENT MESURER LE pH ?

Il existe de nombreuses façons de mesurer le pH d'une solution aqueuse. On peut tout d'abord le mesurer par électrochimie à l'aide d'un appareil appelé pH-mètre. On peut aussi utiliser des indicateurs colorés acido- basique : il s'agit de substances qui ont la propriété de changer de couleur en fonction de l'acidité du milieu environnant. Le papier pH, très utilisé pour mesurer l'acidité, est en fait un papier imbibé d'un indicateur universel. Quand on le trempe dans une solution, il prend instantanément la couleur correspondant à un certain pH.

V- pH-METRE

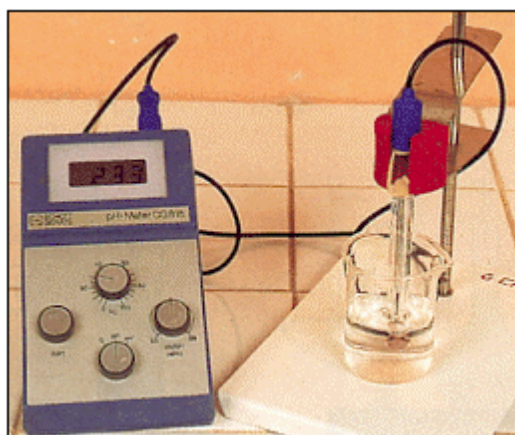
Un pH-mètre est un appareil, souvent électronique, permettant la mesure avec précision du pH d'une solution.



Fig. 08 : pH-mètre

1- Fonctionnement

Le pH-mètre est généralement constitué d'un boîtier électronique permettant l'affichage de la valeur numérique du pH et d'une sonde de pH constituée d'une électrode de verre permettant la mesure et d'une électrode de référence. Son fonctionnement est basé sur le rapport qui existe entre la concentration en ions H_3O^+ (définition du pH) et la différence de potentiel électrochimique qui s'établit dans le pH-mètre une fois plongé dans la solution étudiée. Celui-ci est constitué de deux électrodes, l'une standard dont le potentiel est constant et connu (appelée électrode de référence), l'autre à potentiel variable (fonction du pH, appelée électrode de verre). Ces deux électrodes peuvent être combinées ou séparées.



Lorsque l'électrode en verre est immergée dans une solution de pH inconnu, il s'établit entre les parois externe et interne du verre une différence de potentiel. Celle-ci est fonction de la différence de pH entre la solution de remplissage de l'électrode et la solution de pH inconnu. Cette différence de potentiel provient des échanges de cations à travers la membrane de verre. Ces échanges, très limités, n'affectent pas la composition des solutions.

2- Etalonnage

Une fois l'appareil étalonné à l'aide de deux solutions tampon (souvent de pH 4, 7 et 10), on peut déterminer la valeur du pH par simple corrélation, la différence de potentiel évoluant proportionnellement à la valeur du pH selon la formule :

$$\Delta E = a(pH_a - pH_b) + b$$

- ΔE est la différence de potentiel entre les deux électrodes
- pH_a est le pH de la solution à mesurer
- pH_b est le pH de la solution de référence
- a et b coefficients positifs dépendent de l'appareil, ils sont révélés lors de l'étalonnage du pH-mètre.

3- Entretien des sondes

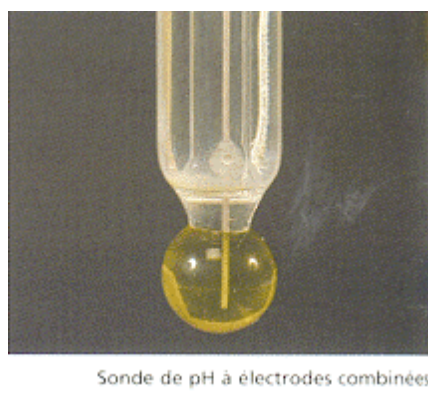


Fig. 09 : Sonde

La durée de vie d'une électrode est bien souvent fonction du soin que l'on accorde à son entretien. Toutes les électrodes sont livrées d'un capuchon qui protège le bulbe et la jonction de la sonde. Une solution dite de conservation appelée chlorures de potassium (KCl) garde l'électrode toujours humide.

4- Types de pH-mètre

4-1- pH-mètre de poche

D'une simplicité d'utilisation avec une précision qui reste largement suffisante pour une utilisation en aquarium, son entretien est simple, sa taille réduite facilite son transport, son inconvénient c'est que la sonde ne se remplace pas, c'est l'appareil entier qu'il faut renouveler.



Fig. 10 : pH-mètre de poche

4-2- pH-mètre avec sonde renouvelable

D'une précision plus élevée, ils sont plutôt réservés aux professionnelles effectuant des mesures en série. Les sondes doivent être renouvelées de un (sondes type standard) à deux ans (sondes type labo).



Fig. 11 : pH-mètre avec sonde renouvelable

4-3- pH- mètres régulateurs

Ces appareils ont la particularité de pouvoir réguler le pH, qu'ils soient pour un milieu acide ou alcalin, l'appareil agira d'une électrovalve qui injectera du CO₂ :

- Pour un milieu acide, le CO₂ fera par l'intermédiaire d'un réacteur baisser le pH ;
- Pour un milieu alcalin, le CO₂ fera par l'intermédiaire d'un réacteur augmenter le pH ;



Fig. 12 : pH-mètre régulateur

4-4- pH-mètres de laboratoire

D'une extrême précision, ces appareils sont réservés exclusivement aux professionnelles et aux aquariums publics.



Fig. 13 : pH-mètres de laboratoire

VI- INFLUENCE DU pH SUR L'ASSIMILATION DES NUTRIMENTS

Le pH des sols de jardin se situe presque toujours entre 4 et 8. Un sol ayant un pH inférieur à 7, un sol ayant un pH supérieur à 7 est basique. Le degré d'acidité ou de basicité du sol joue un rôle très important sur l'assimilation des éléments nutritifs par la plante.

Dans un milieu acide, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le molybdène sont moins facilement assimilable par la plante, tandis que le fer, la manganèse, le bore, le cuivre et le zinc les ont moins dans un milieu basique. Lorsque le pH du sol est inférieur à 6, certains nutriments ne sont plus assimilés par la plante et il en est de même pour un pH supérieur à 7.

La plupart des plantes ont donc une croissance optimale lorsque le pH du sol est compris entre 6 et 7 car la majorité des éléments nutritifs sont assimilables dans cette zone.

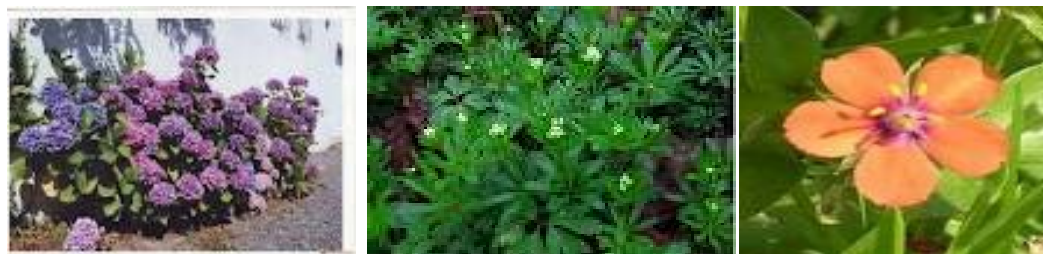
VII- DIFFERENTS TYPES DES PLANTES

Les plantes peuvent être répartir en trois catégories en fonction du pH du sol sur lequel elles poussent :

- Les plantes acidophiles : le pH du sol est compris entre 4,0 et 6,5 ;
- Les plantes neutrophiles : le pH du sol est compris entre 6,5 et 7,5 ;
- Les plantes basophiles : le pH du sol est compris entre 7,5 et 9,0.

Les plantes acidophiles croissent de manière optimale sur un sol acide, à ces valeurs de pH, certains champignons et certaines bactéries nuisibles à la croissance de ces plantes ne peuvent croître et les mauvaises herbes ne peuvent s'installer en milieu acide, ce qui laisse toute la place aux plantes acidophiles, de plus, les plantes ont besoin d'une quantité importante de certains éléments nutritifs comme le manganèse, l'aluminium et le fer qui sont fortement absorbés pour de faibles valeurs de pH.

A l'inverse, les plantes basophiles consomment une quantité importante d'éléments nutritifs comme le calcium et le magnésium qui sont fortement absorbés à des valeurs de pH plus élevées et supérieures à 7.



Plante acidophile

[Hortensia]

Plante neutrophile

[Aspérule odorante]

Plante basophile

[Mouron rouge]

Fig. 14 : Types de plantes selon le pH du sol

VIII- MODIFICATION DU pH DU SOL, LE ROLE DES AMENDEMENTS

Le pH optimal du sol varie selon l'espèce cultivée. Il convient donc de mesurer le pH du sol avant de procurer les plantes. Si le sol est trop acide, le pH peut être augmenté à l'aide d'amendements à base de chaux ou de magnésium. Ces amendements s'utilisent de préférence de la fin de l'automne jusqu'au début du printemps. Par contre, si le sol est trop basique, le pH peut être diminué en ajoutant à la terre de la tourbe ou de l'humus. Ces amendements peuvent se pratiquer toute l'année avec une préférence pour la période estivale.

Pourquoi certaines fleurs changent-elles de couleur ?

Certaines molécules responsables de la coloration des plantes, des légumes ou des fruits (autres que la chlorophylle) sont sensibles à leur environnement chimique et notamment pH du sol; c'est le cas des anthocyanes, famille de colorants naturels dont la couleur varie en fonction de l'acidité ou de la basicité d'une solution. Citons comme exemple les Hortensias dont les fleurs sont bleues lorsque le pH est inférieur à 6 et roses lorsque le pH est compris entre 6 et 7.



pH du sol < 6
Hortensia bleue



pH du sol
Hortensia rose

Fig. 15 : Changement coloration de la plante Hortensia selon le pH du sol

MESURE DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE

La conductivité électrique est l'aptitude d'un matériau ou d'une solution à laisser les charges électriques se déplacer librement, autrement dit à permettre le passage du courant électrique.

I- DEFINITION DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE

La conductivité électrique traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique. Cette notion est inversement proportionnelle à celle de résistivité électrique. La mesure de la conductivité électrique permet d'obtenir rapidement une estimation de la teneur globale en sels dissous.

1- Extrait de pâte saturée

La confection de la pâte nécessite au moins 300g de terre afin d'obtenir 50 cm³ de solution d'extraction. Le mélange sol/eau (c'est la méthode la plus rapide) aux rapports $1/1$, $1/2$, $1/2,5$, on crée ainsi un rapport terre/eau variable selon la texture (par exemple $1/2$ pour une texture argileuse et $1/5$ pour un échantillon sableux).

La salinité ou conductivité électrique s'exprime généralement en une unité de mesure communément utilisée est le Siemens (S/cm) exprimé souvent en micro siemens/cm ($\mu\text{S/cm}$) ou milli siemens (mS/cm) ou en déci siemens (dS/m). La conductivité est directement proportionnelle à la quantité de solides (les sels minéraux) dissous dans l'eau. Ainsi, plus la concentration en solide dissous sera importante, plus la conductivité sera élevée.

2- Echelle de salinité

L'échelle agronomique mise au point par le laboratoire de la salinité est graduée selon les valeurs de la conductivité électrique de 0 à 16 dS/m. Au-delà de 8 dS/m, la plupart des plantes cultivées voient leurs rendements nettement affectés par la salinité.

II-PRINCIPE

La conductivité électrique est l'inverse de la résistivité. Elle correspond à la conductance d'une portion de matériau de 1 m de longueur et de 1 m² de section. Parmi les meilleurs conducteurs, il y a les métaux (comme le cuivre ou l'aluminium) pour lesquels les porteurs de charge sont les « électrons libres » et, les solutions d'électrolytes (ayant des ions en solution). Pour ces dernières, la valeur de la conductivité dépend de la nature des ions présents dans la solution et de leurs concentrations. La conductivité d'une solution peut être mesurée à l'aide d'un conductimètre.

III- UNITE

S.m⁻¹ (siemens par mètre). Le plus souvent la mesure avec un conductimètre donne le résultat en mS.cm⁻¹ (milli siemens par centimètre).

Attention : 1 mS.cm⁻¹ = 0,1 S.m⁻¹

IV- UTILISATION COURANTE

Largement utilisée en chimie, c'est le rapport de la densité de courant par l'intensité du champ électrique. C'est l'inverse de celle de la résistivité. Le symbole généralement utilisé pour désigner la conductivité est la lettre grecque *sigma* : σ . Selon les matériaux, σ varie de 10⁸ S.m⁻¹ à 10⁻²² S.m⁻¹.

La conductivité va déterminer l'ensemble des minéraux présents dans une solution : Une eau douce accusera généralement une conductivité basse et bien au contraire une eau dite dure affichera une conductivité élevée. Cette mesure détermine la quantité des ions liés contenue dans cette solution qui sont réparties en deux groupes.

Tableau 07 : Quelques ions (cations/anions) du sol

Cations	Anions
Calcium	Bicarbonates
Magnésium	Chlorures
Potassium	Sulfates
Sodium	Nitrates
/	Phosphates

Et bien d'autres. Ce sont tous ses sels dissous que la conductivité va déterminer et nous donner une indication sur la qualité de l'eau que nous employons.

V- RISQUE DE SALINITE

La teneur en sel dans l'eau d'irrigation. L'excès de teneur en sel est l'un des soucis principaux avec l'eau utilisée pour l'irrigation. Une concentration élevée en sel dans l'eau ou dans les sols affectera négativement le rendement des récoltes, provoquera une dégradation des sols et une pollution des eaux souterraines.

L'utilisation d'une eau salée pour l'irrigation dépendra de plusieurs facteurs:

- La tolérance en sel de la récolte
- Les caractéristiques du sol sous l'irrigation
- Les conditions climatiques. La qualité de l'eau d'irrigation joue un rôle essentiel dans les secteurs arides affectés par des taux d'évaporation élevés entraînant une accumulation importante de sel dans les sols.

Les procédures de gestion des sols et de l'eau. En général, l'eau réutilisée pour l'irrigation doit avoir un degré faible ou moyen de salinité (conductivité électrique de 0,6 à 1,7 dS/m).

Une grande attention doit être prise pour les zones côtières où l'infiltration d'eau de mer pose un risque important de salinité de l'eau d'irrigation qui est alors pompée depuis

Des puits. Par exemple en Espagne, la surexploitation des ressources souterraines pour l'agriculture a provoqué une baisse des niveaux d'eau et, par conséquent a provoqué l'intrusion d'eau de mer dans le littoral.

VI- CONDUCTIMETRIE

Une solution ionique, aussi appelée électrolyte, est conductrice de l'électricité. La présence d'ions, chargés électriquement, assure le caractère conducteur de la solution. La conductimétrie est une méthode d'électro analyse qui permet de mesurer les propriétés conductrices d'une telle solution.

En pratique, on détermine la conductance G d'un volume d'une solution à l'aide d'une cellule de mesure constituée de deux plaques parallèles de surface immergée S et séparées d'une distance l . La conductance mesure la facilité qu'a une solution à laisser passer le courant. Conductivité d'une solution ionique

La valeur de la conductance G d'une solution ionique dépend de la nature de la solution, ainsi que de la géométrie de la cellule de mesure mais aussi du type d'anions et de cations contenus dans la solution. Elle peut être déterminée par la relation :

$$G = \frac{\sigma \cdot S}{l}$$

Avec G en siemens (S), S en mètre carré (m^2), l en mètre (m) et σ en siemens par mètre (S/m).

Cette conductance est :

- Proportionnelle à la surface S des électrodes de la cellule de mesure (également appelée cellule de conductimétrie) ;
- Inversement proportionnelle à la distance l entre les deux électrodes.

Par ailleurs, la conductance est l'inverse de la résistance : $G = \frac{1}{R}$ avec G en siemens (S) et R en ohms (Ω).

On peut donc à l'aide d'une simple cellule, d'un générateur de tension U et d'un ampèremètre branché en série, déduire la conductance à l'aide de la loi d'Ohm :

$$U = R \cdot I = \frac{I}{G} \text{ avec } U \text{ en volts (V), } R \text{ en ohms } (\Omega), I \text{ en ampères (A) et } G \text{ en siemens}$$

(S). On peut aussi écrire : $G = \frac{I}{U}$.

On appelle σ (sigma) la conductivité de la solution. Cette grandeur est caractéristique de la solution. Elle dépend :

- de la concentration des ions ;
- de la nature de la solution ionique ;
- de la température de la solution. Un conductimètre, préalablement étalonné, permet d'afficher directement la valeur de la conductivité σ de la solution.

En effet on a l'égalité suivante: $G = k \cdot \sigma$ ou $\sigma = \frac{G \cdot l}{S}$, avec :

- σ la conductivité de l'électrolyte (en S/m) ;
- k la constante de cellule (homogène à une longueur et donc exprimée en m) ;
- G la conductance (en S) ;
- l la distance entre les deux plaques du conductimètre immergées dans la solution (en m) ;
- S l'aire de ces plaques (en m²).

VII- CONDUCTIMETRE

1- Définition

Un conductimètre, ou conductivimètre, est un appareil permettant de mesurer une propriété de conductivité, il est constitué par deux électrodes en cuivre rectangulaire plongeant dans la solution à étudier, l'ensemble soumis à une tension de valeur efficace mesuré par un voltmètre et une intensité efficace mesuré par un ampèremètre. Il existe des conductivimètres spécifiques à certaines applications :

- Mesure de la conductivité électrique d'une solution. Cet appareil est composé d'un générateur basse fréquence (courant alternatif), d'un ampèremètre et d'un voltmètre. Cette technique a été développée par Friedrich Kohlrausch en 1874 (Loi de Kohlrausch).
- Mesure de la conductivité thermique.



Fig. 16 : Types de conductimètres

2- Fonction et description

Le conductimètre est constitué :

- D'une sonde de conductimétrie (deux plaques conductrices en vis-à-vis, alimentées par une tension alternative) ;

- Un boîtier qui sert d'alimentation pour la sonde, ce boîtier dispose en outre une zone de lecture, d'un bouton de réglage de la température et d'un bouton d'étalonnage. Un troisième bouton permet en général de sélectionner le calibre.

Attention : la plupart des conductimètres nécessitent d'être plongés dans l'eau distillée (pendant au moins deux heures) avant leur utilisation.

3- Etalonnage du conductimètre

- Régler le bouton de température du conductimètre sur la température de la pièce ;
- Rincer (avec de l'eau distillée) et essuyer délicatement (avec du papier Joseph) la sonde ;
- Plonger la sonde dans une solution d'étalonnage (solution dans la valeur de conductivité pour des températures entre 15 et 30°C est donnée par le fabricant).
- Régler le bouton d'étalonnage du conductimètre pour que la valeur affichée coïncide avec la valeur donnée par le fabricant de la solution d'étalonnage (à la température de la pièce)
- Sortir la sonde de la solution d'étalonnage, la rincer, la replacer dans l'eau distillée.

Attention : Pour certains conductimètres, il n'est possible de changer de calibre sans refaire l'étalonnage.

4- Mesure

- Rincer la sonde du conductimètre (si possible avec la solution dont on veut mesurer la conductivité). L'essuyer délicatement avec du papier Joseph ;
- Plonger la sonde dans la solution dont on veut mesurer la conductivité ;
- Attendre la stabilité (quelques secondes) ;
- Lorsque la lecture est terminée, rincer la sonde et la plonger dans la solution d'eau.

Le conductimètre est composé d'une cellule de conductimétrie à électrode de graphite, reliée à un boîtier de mesure, ce boîtier mesure l'intensité et la tension du courant traversant la solution, et calcule automatiquement sa conductivité en S/cm, contrairement à ce qu'indique le boîtier. De plus, une correction est appliquée de façon à obtenir la conductivité à 25°C, quelle que soit la température de la solution.

Allumer/Eteindre : à bouton POWER (peut rester allumé sans dégâts à sec).

CHAPITRE 04 : METHODES ENZYMATIQUES

INTRODUCTION

Les méthodes enzymatiques font souvent appel à l'utilisation conjointe de plusieurs enzymes. Un grand nombre de dosages en particulier les analyses biologiques médicales ou agroalimentaires, font appel à l'utilisation d'enzymes. En effet, les enzymes par leur grande spécificité et leur efficacité remarquable sont des outils de choix.

I- DEFINITION DE L'ENZYME

Une enzyme (ou un enzyme) est une molécule protéique permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction : ce sont des catalyseurs biologiques (ou biocatalyseurs). Une enzyme, comme toute protéine, est synthétisée à partir des informations codées dans l'ADN ou dans l'ARN dans le cas de certains virus. Il existe plus de 3500 enzymes différentes répertoriées. Les premières enzymes isolées furent d'abord nommées ferments et par la suite diastases. Il existe deux grandes catégories d'enzymes :

- Les enzymes purement protéiques (qui ne sont constituées que d'acides aminés)
- Les enzymes qui sont en deux parties :
 - Une partie protéique : « l'apoenzyme »;
 - Une partie non-protéique : « le coenzyme »;

L'association de la partie protéique (apoenzyme) et de la partie non-protéique (coenzyme) constitue « l'holoenzyme ». Sans le coenzyme, la catalyse de la réaction ne peut avoir lieu.

II- CONDITIONS DU DOSAGE

Deux types de conditions de dosage sont utilisés :

1- Dosage en point final

Pour être applicable, la méthode implique une réaction totale de transformation du substrat en produit. Lorsque le substrat de l'enzyme est transformé complètement et rapidement en produit. La méthode consiste à transformer totalement le substrat en produit en présence d'enzyme(s) appropriée (s).

2- Dosage par mesure de la vitesse initiale

Pour être applicable, la réaction doit fonctionner dans des conditions d'ordre 1 par rapport au substrat (la concentration du substrat est inférieure).

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

La respiration des bactéries ne s'effectue pas exclusivement sur l'oxygène. Les nitrates (NO_3^-) peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour former des nitrites (NO_2^-). Parfois la réduction peut être poursuivie jusqu'au stade N_2 . L'utilisation des nitrates comme accepteurs d'électrons nécessite la présence d'une enzyme : la Nitrate Réductase (NR): est une enzyme impliquée dans la respiration anaérobie. Elle est mise en évidence par la présence de nitrites ou l'absence de nitrates après incubation de la bactérie sur un milieu nitraté.

I- PRINCIPE

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



Cette enzyme est recherchée en bactériologie systématique, il existe plusieurs type de nitrate réductase :

- La nitrate réductase capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites selon $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$
- la nitrate réductase capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon $NO_3^- + 6H^+ + 5e^- \longrightarrow 1/2N_2 + 3H_2O$

Réactifs utilisés

- Réactif de Griess : acide sulfanilique et α - naphtylamine (réagit avec les nitrites en donnant une coloration rouge) ;
 - Epreuve de Zo-Bell : poudre de zinc (réduit les nitrates en nitrites) ;
 - Un milieu contenant des nitrates (Mannitol-mobilité-nitrate ou bouillon nitraté par exemple).
- Le réactif de Griess prend une teinte rouge en présence d'ions nitrites. L'apparition de cette teinte dans le milieu signe la présence d'ions nitrites. Cela signifie que la bactérie possède une nitrate réductase et que cette dernière est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites : c'est le cas pour les Entérobactéries.
 - En revanche, l'absence de coloration rouge ne signifie pas que la bactérie étudiée ne possède pas de nitrate réductase. En effet, on a vu qu'il était possible qu'une bactérie possède une nitrate réductase très active et capable de réduire les nitrates jusqu'au stade di azote. Une bactérie possédant une tel enzyme consommera la totalité des nitrates du milieu. Nous devons vérifier s'il reste des ions nitrates dans le milieu ou non.
 - Pour ce faire, il faut utiliser un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites comme la poudre de zinc. Cette dernière est alors ajoutée au milieu après l'ajout du réactif de Greiss. Après quelques minutes, si l'on observe l'apparition d'une teinte rouge c'est qu'il y a eu formation d'ions nitrites par l'action du zinc. Il restait donc des ions nitrates dans le milieu, la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. A l'inverse, si l'on n'observe pas de coloration rouge, c'est qu'il n'y avait plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc. La bactérie, avec sa nitrate réductase très active a consommé tous les ions nitrates.

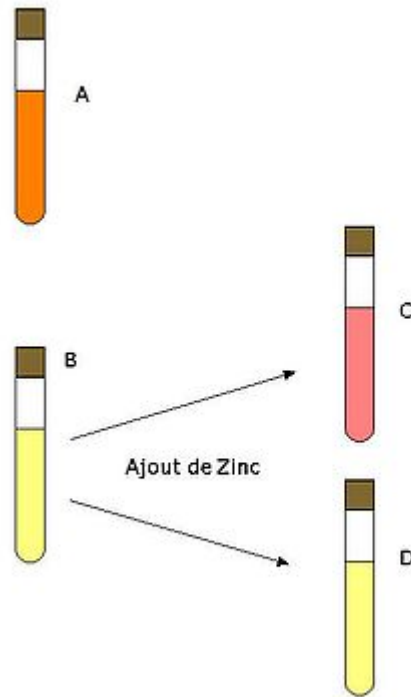
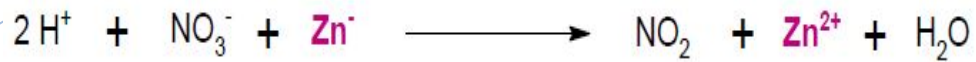


Fig. 17 : Résultats possible du test de la Nitrate Réductase

- **A** Milieu rouge orangé : la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase au stade NO_2^-
- **B** Milieu jaune \Rightarrow ajout de la poudre de zinc
 - **C** Milieu rouge : présence de nitrate dans le milieu \rightarrow la bactérie ne possède pas l'enzyme.
 - **D** Coloration jaune : pas de nitrate dans le milieu \rightarrow la bactérie possède l'enzyme au stade N_2 .

II-TECHNIQUE

La recherche va s'effectuer :

- Soit à partir de milieu gélosé nitraté ;
- Soit à partir de bouillon nitraté à 10 g.dm^{-3} ;
- Soit à partir du milieu mannitol mobilité ;

Après lecture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine.




Mélanger, observer.

III- LECTURE

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat NR+
- Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates.
- Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat NR-.
- Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR +

Causes d'erreurs : utilisation d'un milieu ne contenant pas de nitrates, réalisation du test à partir d'un milieu glucidique, un glucide ayant été attaqué, une fermentation peut cacher une respiration nitrate (cas API 20E), culture insuffisante, réactifs périmés.

Tableau 08 : Récapitulatif de la lecture du test de la Nitrate Réductase

		
<p>Après ajout de 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine. Le milieu devient rouge: présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat NR+</p>	<p>Après ajout de la poudre de zinc, pas de coloration: les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR+</p>	<p>Après ajout de la poudre de zinc, coloration rouge: on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat NR-</p>

TEST ELISA

ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire appelé (en anglais) enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide.

Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (enzyme immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, par opposition aux RIA (radio immunoassays) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par secondes.

L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie, mais pas uniquement, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV), que pour détecter la présence d'un antigène. Il a également trouvé des applications dans l'industrie de l'alimentation, afin de détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux. Il est limité par la disponibilité en anticorps spécifique.

I-PRINCIPE THEORIQUE

Le test ELISA est utilisé pour la détection et le dosage d'antigène ou d'anticorps. Dans le cas de la détection d'un anticorps, cet anticorps va être fixé spécifiquement sur des antigènes tapissant un support et révélé par un second anticorps, dit de détection, couplé à une enzyme qui va induire la coloration d'un substrat, par exemple, pour la recherche d'anticorps anti BSA, on utilisera :

- Antigène : BSA (Bovine Sérum Albumine) ;
- Anticorps recherché : Sérum de lapin anti BSA ;
- Anticorps de détection + Enzyme : anticorps anti-Ig de lapin conjugué à la peroxydase.
- Substrat de la peroxydase : YMB (Tétra Méthyle Benzidine).

Le test comporte quatre (04) étapes :

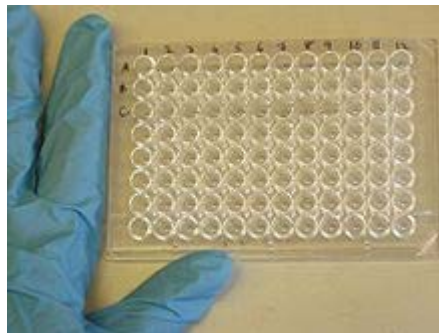
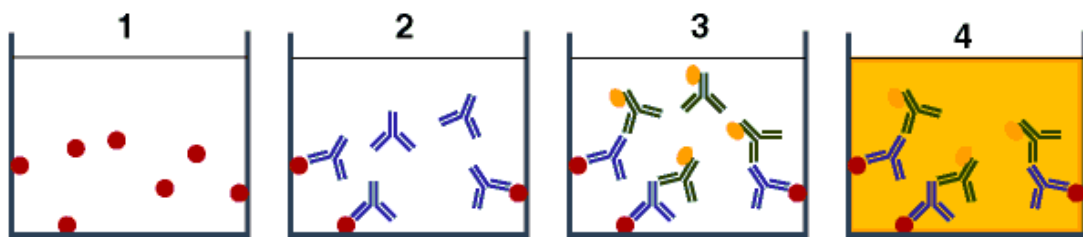


Fig. 18: Plaque de microtitrage à 96 puits, couramment utilisée pour les tests ELISA-

Tableau 09 : Etapes du test ELISA

ETAPE 01	« Fixation de l'antigène »	On incube dans les puits la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. L'antigène va se fixer électro statiquement au fond des puits de plaques de microtitration immunologique. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer l'antigène en excès.
ETAPE 02	« Fixation de l'anticorps à doser »	On incube dans les puits la solution d'anticorps. Ils se fixent spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour enlever les anticorps non fixés.
ETAPE 03	« Fixation de l'anticorps de détection »	On incube dans les puits l'anticorps de détection couplé à une enzyme. Il va se fixer sur l'anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour enlever les anticorps de détection en excès non fixés.
ETAPE 04	« Révélation des anticorps fixés »	On incube une solution révélatrice, contenant un substrat de l'enzyme si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), le substrat est dégradé et une coloration apparaît. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente donc à la concentration d'anticorps recherchés.

II-APPLICATIONS

1- Essais quantitatifs (dosages)

On utilise l'ELISA indirect pour le dosage de protéines variées. Quelques exemples tirés d'application en pharmacologie médicale : hormones thyroïdiennes, concentration en médicaments (pour évaluer l'observance et/ou adapter la posologie), etc. Dans le domaine de la recherche, les tests ne sont limités que par l'imagination du chercheur.

2- Essais qualitatifs : le test VIH par ELISA

L'application la plus connue du grand public est le dépistage en première ligne du VIH. La technique ELISA permet la détection d'anticorps anti-VIH dans le sérum sanguin (d'où le terme de séropositivité ou de séronégativité). La technique présente comme indiqué une grande sensibilité (c'est-à-dire que la plupart des cas sont détectés, et que les « faux négatifs » - les tests négatifs alors que le patient est en réalité séropositif - sont quasi à exclure, du moins si le test est réalisé dans un délai de trois mois après le contact infectant) et une spécificité acceptable (c'est-à-dire un taux assez faible de « faux positifs » - Le test est positif parce que l'anticorps a réagi à un antigène non spécifique). Toutefois, en cas de sérologie anti-VIH positive, les échantillons doivent être soumis à des tests de confirmation, comme le western blot, qui utilise une technique basée sur l'électrophorèse et dont le taux d'erreur est extrêmement faible.



Fig. 19 : Microbiologiste utilisant un test ELISA pour dépistage du VIH-

3- ELISA en sandwich

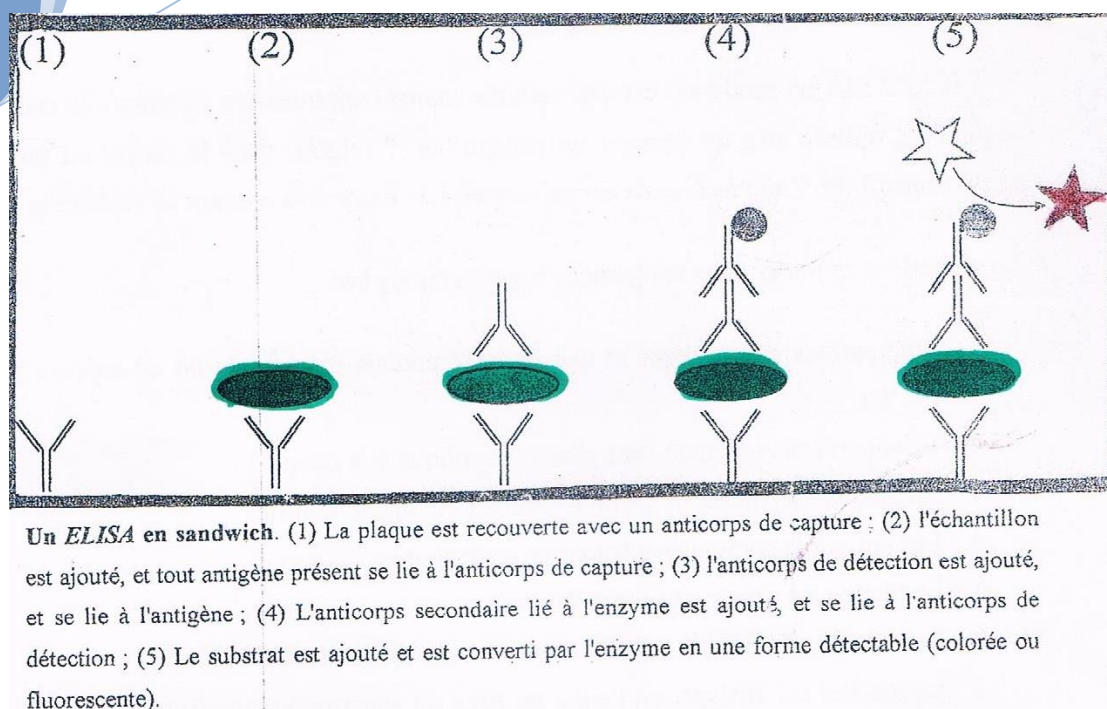


Fig. 20 : ELISA en sandwich

L'ELISA en sandwich est une variante moins commune (en clinique) de cette technique, utilisée afin de détecter un échantillon d'antigène dans le sérum ou tout autre échantillon. Cette technique est par contre d'un usage très courant en recherche.

Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit :

1. Une surface est préparée et une quantité connue d'anticorps dit de capture y est liée.
2. L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque.
3. La plaque est rincée, de façon à éliminer l'antigène non-lié.
4. Les anticorps conjugués à l'enzyme sont ajoutés.
5. La plaque est rincée une seconde fois.
6. Le substrat convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté.
7. Le résultat est analysé « à l'œil » ou dans un spectrophotomètre spécialement conçu pour accepter directement les plaques de 96 puits.

Toutefois, ainsi qu'illustré, il existe le plus souvent une étape supplémentaire, l'addition d'anticorps de détection, afin d'éviter de créer des anticorps conjugués à l'enzyme pour chaque antigène. L'utilisation d'une enzyme couplée reconnaissant la fraction Fc des autres anticorps permet de l'utiliser dans une variété de situations et de réduire le coût de la procédure.

4- ELISA par compétition

Une troisième utilisation de l'ELISA se fait par compétition de liaison. Elle permet le dosage d'un antigène :

1. Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
2. Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
3. La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal est fort.

CHAPITRE 06 : LA CHAMBRE A PRESSION: LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE

La chambre à pression permet une détermination rapide et facile de l'état hydrique des végétaux en plein champ. Trois applications de la chambre à pression sont recensées: le potentiel foliaire de base (Ψ_B), le potentiel foliaire (Ψ_F) et le potentiel tige (Ψ_T). Seules les deux premières (Ψ_B et Ψ_F) ont été largement utilisées sur la vigne. En effet, parmi les 3 applications de la chambre à pression, le Ψ_T est le seul à refléter l'état hydrique global de la vigne au cours de la journée, sa valeur représente l'effet de la différence entre l'absorption d'eau par le système racinaire et la transpiration du feuillage de la vigne.

I- ESTIMATION DE L'ETAT HYDRIQUE DE L'ARBRE

Trois grandeurs principales permettent de caractériser l'état hydrique d'un végétal: (1) l'humidité pondérale qui correspond au rapport de la masse d'eau d'un échantillon sur sa masse sèche, (2) la teneur en eau relative, qui est le rapport entre la masse d'eau contenu dans un échantillon à un instant donné et la masse d'eau maximale lorsqu'il est à pleine turgescence, (3) et le potentiel hydrique, grandeur thermodynamique qui permet d'estimer l'état de liaison des molécules d'eau. La teneur en eau relative et l'humidité pondérale dépendent de la quantité d'eau que contient un organe, le potentiel hydrique est une grandeur qui conditionne les transferts d'eau entre deux points. Ainsi, le potentiel hydrique permet de caractériser l'état hydrique de l'arbre.

II-QU'EST-CE-QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE ?



Fig. 21 : Mesure du potentiel hydrique foliaire

Il s'agit incontestablement de la mesure de référence pour mesurer l'état hydrique de la vigne. Elle se réalise à l'aide d'une chambre à pression dite de Scholander. Il s'agit d'estimer, à l'aide de la pression d'un gaz neutre appliqué sur une feuille, la capacité des cellules à retenir l'eau. Moins il y aura d'eau libre dans la plante, plus la pression nécessaire pour la faire sortir sera forte. Le résultat, la pression nécessaire pour extraire la sève de la feuille, est exprimé en Bar ou en Mpa, toujours en valeur négative. Ce potentiel représente l'état hydrique de la plante à un instant donné et peut être mesuré sur toute feuille et à toute heure selon ses objectifs. Il peut permettre notamment de suivre l'évolution de la contrainte au cours de la journée. Il existe une forte variabilité entre feuilles et son interprétation peut s'avérer problématique. On préférera plutôt le potentiel hydrique foliaire de base et de tige.

III- QU'EST- CE QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE DE BASE ?

Ce potentiel (phfb) s'adresse à une plante dont tous les stomates sont fermés et représente les disponibilités en eau du milieu. La mesure se réalise en fin de nuit, avant le lever du soleil. Il s'agit d'un indicateur robuste qui a permis d'obtenir de solides seuils de référence, validés à l'échelle internationale (Carbonneau, 1998). Ces seuils peuvent varier suivant les cépages.

- 0,2 MPa < phfb contrainte hydrique absente
- 0,3 MPa < phfb < - 0,2 MPa contrainte hydrique faible
- 0,5 MPa < phfb < -0,3 MPa contrainte hydrique faible à modérée
- 0,8 MPa < phfb < -0,5 MPa contrainte hydrique modérée à sévère
- phfb < -0,8 MPa contrainte hydrique sévère

IV- QU'EST- CE QUE LE POTENTIEL HYDRIQUE FOLIAIRE DE TIGE ?

Ce potentiel est mesuré sur une feuille préalablement ensachée pendant une heure au midi solaire (à 14h00). Il représente l'état de tension de l'eau dans la plante. Cette méthode de mise en œuvre plus lourde est sensible aux faibles contraintes et permet d'obtenir plus de discrimination dans les vignobles à contrainte modérée, comme les vignobles de type océanique.

Voici quelques seuils.

- 0,6 MPa < phfb contrainte hydrique absente
- 0,9 MPa < phfb < - 0,6 MPa contrainte hydrique faible
- 1,1 MPa < phfb < -0,9 MPa contrainte hydrique faible à modérée
- 1,4 MPa < phfb < -1,1 MPa contrainte hydrique modérée à sévère
- phfb < -1,4 MPa contrainte hydrique sévère

V- PRINCIPE DE LA MESURE DU POTENTIEL HYDRIQUE

La mesure de potentiel hydrique foliaire est effectuée à l'aide d'une chambre à pression mise au point par Scholander. La pression (MPa) appliquée à la feuille au moment où apparaît un ménisque de sève au niveau de la coupure du pétiole correspond à l'inverse de la valeur de potentiel hydrique.

Le potentiel hydrique foliaire définit l'état hydrique de la plante est essentiellement la résultante des forces d'origine osmotique et de turgescence (élasticité pariétale) qui lient l'eau au tissu végétal. Lorsque la plante ne transpire pas (nuit, pluie, ...) son potentiel hydrique s'équilibre lentement avec le sol, on définit alors le potentiel hydrique foliaire de base mesuré en fin de nuit. Cette valeur de potentiel hydrique caractérise le potentiel hydrique de la zone de sol où les racines prélèvent l'eau.

Dès que les mécanismes transpiratoires se développent avec le lever du jour et l'augmentation de la demande évaporative, la valeur du potentiel hydrique va devenir de plus en plus négative jusqu'à un minimum à midi appelé potentiel hydrique foliaire minimum. Un gradient de potentiel de plus en plus négatif va s'établir tout au long de la plante, des racines jusqu'aux feuilles, siège des phénomènes transpiratoires. Pour déterminer le potentiel hydrique des éléments du xylème des tiges, la méthode consiste à mesurer le potentiel hydrique d'une feuille couverte, attachée au point où l'on veut effectuer la mesure. La feuille couverte ne transpirant pas, la différence de potentiel hydrique entre la feuille et son point d'attache est nulle. Cette méthode est également utilisable pour mesurer le potentiel hydrique de racines en emballant des drageons ou des rejets de souches par exemple.

VI- CHAMBRE A PRESSION

La chambre à pression est l'outil le plus connu pour mesurer le potentiel hydrique de la vigne. Méthode de référence et ne permet pas des mesures en continu. De plus, les conditions de réalisation diffèrent suivant le type de potentiel que l'on souhaite mesurer : potentiel hydrique foliaire, potentiel hydrique foliaire de base ou potentiel hydrique tige. La méthode est la même: seul le pétiole d'une feuille sort de la chambre à pression, laquelle est soumise à une pression croissante d'azote jusqu'à ce que de la sève s'écoule du pétiole. Plus la pression nécessaire est grande, plus le déficit hydrique de la plante est important.



Fig. 22 : Chambre à pression

VII- CHAMBRE A PRESSION ET POTENTIEL TIGE

1- Description et fonctionnement de la chambre à pression

La première chambre à pression a été construite par SCHOLANDER (1965). La chambre à pression est une enceinte fermée permettant d'exercer une pression sur un organe végétal, afin de connaître la pression de la sève dans les vaisseaux du xylème de cet organe. Une chambre à pression est composée d'un cylindre permettant d'enfermer une feuille dont le pétiole dépasse par le couvercle. Le couvercle de la chambre comprend un joint torique. Celui-ci, serré autour du pétiole, permet d'enfermer avec étanchéité la feuille dans la chambre (photos 1, 2 et 3). Cette feuille a été prélevée quelques dizaines de secondes avant d'être enfermée dans l'enceinte. La chambre à pression est reliée à une source d'azote.

Deux vannes permettent de contrôler le débit de gaz entrant dans la chambre fermée. Le manomètre indique l'évolution de la pression dans la chambre (photo 2). Quand la pression du gaz dans la chambre équilibre la pression de la sève dans la feuille, la section du pétiole dépassant du couvercle s'humecte de sève. L'apparition de la sève sur le croissant de faisceaux libéro-ligneux de la section du pétiole correspond à l'équilibre légèrement dépassé. Par conséquent, il est très important de régler finement la montée en pression du gaz dans la chambre. Si ce n'est pas le cas, on risque de dépasser l'équilibre avant l'apparition de la sève.

2- Techniques de mesure

La chambre à pression permet de mesurer, à partir d'une feuille, trois potentiels hydriques différents :

- Le potentiel foliaire de base (Ψ_B) est mesuré à la fin de la nuit sur des feuilles non ensachées. Cette mesure représente l'état hydrique de l'ensemble de la vigne en fin de nuit.
- Le potentiel foliaire (Ψ_F) est mesuré au cours de la journée sur des feuilles exposées ou non au soleil. Cette mesure indique l'état hydrique d'une feuille. Elle dépend beaucoup du microclimat de la feuille considérée.
- Le potentiel tige (Ψ_T) est mesuré sur des feuilles ensachées (dans une feuille plastique doublée d'une feuille d'aluminium) au moins une heure avant la mesure. L'ensachage imperméable et opaque entraîne la fermeture des stomates: la feuille ainsi couverte ne transpire plus. Par conséquent, le potentiel hydrique de cette feuille s'équilibre avec le potentiel hydrique du potentiel tige. Cette mesure indique l'état hydrique global de la vigne. Elle intègre l'état hydrique du sol et le niveau de transpiration du feuillage.

La mesure du potentiel tige a été utilisée pour la première fois sur des plants de tabac. De façon surprenante, il n'a pratiquement pas été utilisé sur vigne jusqu'en 1998, contrairement au potentiel de base, qui était alors la référence. Sur une période de 24 heures, l'état hydrique de la vigne passe par un maximum et par un minimum, lié à la transpiration du feuillage. Pendant la journée, les pertes en eau par transpiration du feuillage dépassent les capacités d'absorption du système racinaire. Ainsi, l'état hydrique

de la vigne diminue pour atteindre un minimum à la mi-journée. Les stomates se ferment pendant la nuit. Ainsi, les feuilles ne transpirent plus et la vigne peut compenser les pertes de la journée par l'absorption d'eau racinaire.

Le Ψ_B représente un équilibre en fin de nuit entre l'état hydrique du sol et l'état hydrique de la vigne. Le Ψ_T est plus faible (Ψ_{Tmin}) parce qu'il indique l'état hydrique de la vigne pendant la transpiration du feuillage en milieu de journée qui correspond à la période où la demande évaporatoire est la plus forte de la journée.

3- Détection plus précoce des déficits hydriques modérés par le T_{min}

Le Ψ_{Tmin} est plus performant que le Ψ_B pour détecter les déficits hydriques modérés, il intègre la transpiration globale du feuillage et les capacités d'absorption racinaire de la vigne. En effet, ceux-ci n'apparaissent d'abord qu'en milieu de journée pendant quelques heures, quand la demande évaporatoire et la transpiration du feuillage excèdent les capacités d'absorption d'eau du système racinaire. Quand les déficits hydriques s'accroissent, ils peuvent alors persister en fin de nuit. Selon le type de sol, les déficits hydriques modérés sont observés en milieu de journée avec le Ψ_{Tmin} , 2 à 4 semaines avant d'être détectés en fin de nuit avec le Ψ_B .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Baize .D. 2018** Guide des analyses courantes en pédologie. Editions INRA.
- 2- **Carbonneau A. 1998.** Qualitative aspects, 258 – 276. In. Proc. XXVIIth World Congress of Vine and Wine, Bratislava. Traité d'irrigation, Tiercelin J.R., Lavoisier Tec et Doc ed., 1011 p.
- 3- **Choné X., van Leeuwen C., Dubourdiou D. &, Gaudillère J.P. 2001.** Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Annals of Botany*, 87 (4), 477-483.
- 4- **Deloire A., Ojeda H., Zebic O., Bernard N., Hunter J.J, Carbonneau A., 2005.** Influence of grapevine water status on the wine style, *Le Progrès Agricole et Viticole*, 2005, N° 21, 455 – 462.
- 5- **Deloire A., Heyns D., 2011.** The Leaf Water Potentials: Principles, Method and Thresholds *Wineland*, 119-121, September 2011.
- 6- **Engvall E. et Perlman P. 1971.** « Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G », *Immunochemistry*, vol. 8, pages 871-874, [PMID 5135623](#)
- 7- **Goldsby R. A. et Kindt T. J., Osborne B. A. et Kuby J. 2003.** « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », in *Immunology*, 5^e édition, pages 148-150, W. H. Freeman, New York.
- 8- **Hammel H. T., Brandstreet E. T. & Hemmingsen E. 1965.** Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-346
- 9- **Holthoff E. L. Stratis-Cullum D.N. et Hankus M. E. 2011.** A nanosensor for TNT detection based on molecularly imprinted polymers and surface enhanced Raman scattering. *Sensors*, 11 (3), 2700-2714.
- 10- **Lajunen L.H.J. 2004.** Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission, Cambridge, UK: Royal society.
- 11- **Linden G. 1981.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Volume 2. Principes des techniques d'analyse. Collection Sciences et Techniques agro-alimentaires. Tec et Doc, Paris, France, p 1-435.

- 12- **Lopes L.** « Méthode de la réaction prépondérante : proposition d'une approche quantitative systématisée ». Bulletin de l'union des physiciens, vol. 102, n° 904, mai 2008, p. 707-726 [PDF].
- 13- **Mc Quarrie D.A. R. 2011.** Physico-chimie inorganique LEHN J.-M. La chimie supramoléculaire. Concepts et perspectives Mc QUARRIE DA, Rock.
- 14- **Nordstom D.K., Alpers C.N., Ptacek C.J. et Blowes D.W. 2000.** Environment Science and Technology, vol. 13, n° 5, p. 254-258.
- 15- **Retcofsky H. L. 2003.** « Spectrum Analysis Discoverer? », *Journal of Chemical Education*, vol. 80, n° 9, p. 1003 ([DOI 10.1021/ed080p1003.1](https://doi.org/10.1021/ed080p1003.1), [Bibcode 2003JChEd..80.1003R](#)).
- 16- **Richard T., Loïc V. et Pascal F. 2013.** Dictionnaire de physique, Bruxelles, p. 133 « conductivité »
- 17- **Rienth M., Scholasch T., 2019.** State-of-the-art of tools and methods to assess vine water status, *OENO One*, 4, 619-637.
- 18- **Van Leeuwen C. & Seguin G. 1994.** Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabernet franc, Saint-Emilion, 1990). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 28, (2), 81-110.

WEBOGRAPHIE

- 19- <https://www.agrireseau.net/lab/documents/test%20ELISA.pdf> Consulté le 10 juillet 2020.
- 20- https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_de_la_nitrate_r%C3%A9ductase Consulté le 15 juillet 2020.
- 21- www.vignevin-occitanie.com/fiches-pratiques/estimation-de-letat-hydrique-de-la-vigne/. Consulté le 10 août 2020.