



**Université d'Ain Témouchent –Belhadj Bouchaib**

**Faculté des Sciences et Technologies**

**Département d'Agroalimentaire**

**Polycopié pédagogique**

# **Méthodes d'analyse Avancées de Contrôle de Qualité**

*Cours destinés aux étudiants de 1ère année Master « Agro-Alimentaire et  
Contrôle de Qualité » (AACQ)*

*Présenté par : Dr ZITOUNI- YAHIAOUI Amel  
Maitre de conférences, département d'Agroalimentaire*

**Année universitaire : 2024 - 2025**

## **Avant-propos**

Le présent polycopié est destiné aux étudiants de Master « Agro-Alimentaire et Contrôle de Qualité » (AACQ). Il peut également servir aux étudiants de Master Biochimie.

Cette matière occupe une place importante dans le programme. Par ailleurs, elle est classée dans l'unité fondamentale des enseignements.

Son programme regroupe les méthodes spectroscopiques d'analyse les plus utilisées pour caractériser les produits ou molécules naturels organiques ou les produits de synthèse.

Les cours sont présentés d'une façon simplifiée, illustrés par des exemples d'interprétation des données spectrales, pour faciliter la compréhension aux étudiants.

Le polycopié est composé de huit chapitres.

## **Introduction**

Les méthodes d'analyse avancées jouent un rôle central dans l'analyse numérique en raison de leur précision et de leur efficacité supérieures dans la caractérisation des molécules naturelles ou synthétiques. Différents types de méthodes d'analyse peuvent être distingués, en fonction de l'objectif analytique poursuivi (mise en évidence / quantification, caractérisation ...)

### **Objectif du module : Apprentissage visé**

« Méthodes d'Analyses avancées de contrôle de qualité » vise à développer aux étudiants les concepts des méthodes instrumentalisées impliquées dans le contrôle de qualité, ainsi, cet enseignement repose sur les aspects suivants :

- Décrire les phénomènes fondamentaux à la base de chaque technique, ainsi que l'appareillage dont on a inspiré à partir de ces phénomènes.
- Apprendre la méthodologie à mettre en œuvre pour analyser et interpréter des données spectrales.
- Citer les principaux domaines d'application pour chaque technique.

L'étudiant sera capable de faire le choix raisonné d'une technique pour la résolution d'un problème donné et de mettre en œuvre les techniques d'analyses courantes et récentes en s'adaptant à l'évolution des métiers dans le domaine des analyses.

## Sommaire

<b>Chapitre 1 : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 2 : Spectrométrie d'absorption et d'émission atomique.....</b>	<b>12</b>
<b>Chapitre 3 : Spectrométrie infrarouge .....</b>	<b>22</b>
<b>Chapitre 5 : Spectrométrie par luminescence .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapitre 4 : Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire .....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 6 : Spectrométrie de masse .....</b>	<b>44</b>
<b>Chapitre 7 : Diffraction des rayons X (DRX).....</b>	<b>51</b>
<b>Chapitre 8 : Microscopie électronique .....</b>	<b>58</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>71</b>

# **Chapitre 1 : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire**

**Introduction (généralités)**

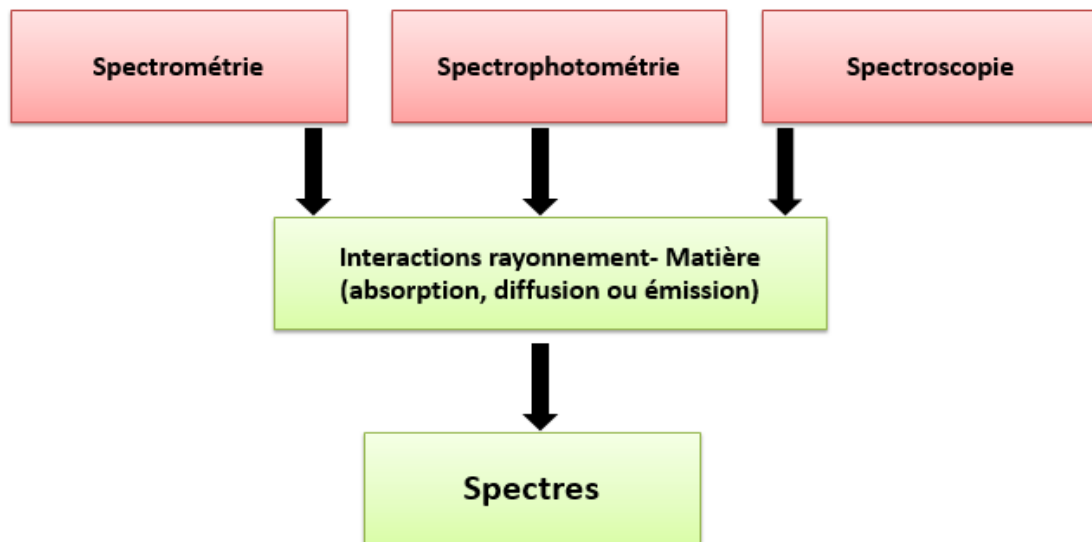
La **spectrophotométrie** est la technique analytique qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétiques dans le domaine de la lumière visible. La spectrométrie, ou spectroscopie, est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une espèce ou substance chimique donnée, généralement en solution..

l'instrument qui permet la mesure dans ce cas est : le spectromètre ou spectroscopie.

Le suffixe « -scopie » fait référence à l'observation visuelle, par exemple la projection sur un écran ou bien l'utilisation des lunettes d'observation.

Le suffixe « -métrie » est fortement lié à l'enregistrement d'un signal par un appareil (table traçante, enregistrement électronique, etc.).

Le terme photométrie signifie la mesure d'une densité de photons.



**Figure 1.1.** Principe général de différentes techniques spectrales

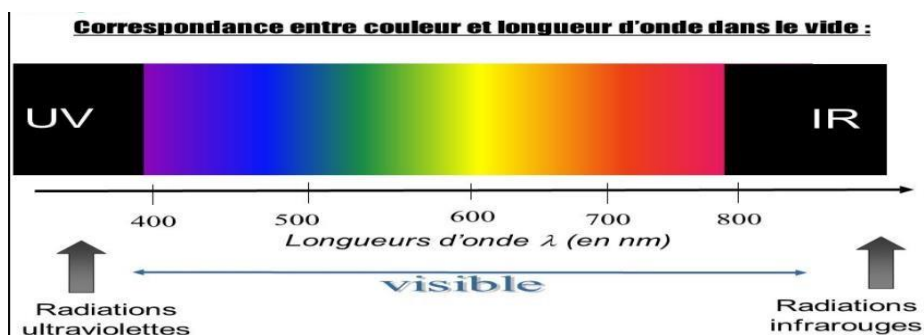
**1. Définition de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire**

Une technique utilisée pour l'analyse qualitative et à l'analyse quantitative, rapide et non destructive qui permet la mesure de la concentration d'un composé dissous dans une solution. Le terme photométrie signifie que l'on mesure une densité optique de photons (absorbance).

## 2. Domaine spectrale

Elle s'effectue pour des éclaircissements dans le domaine du proche UV, du visible, et du proche infrarouge, ce qui correspond à l'intervalle 180 - 1000 nm en longueur d'onde.

- visible : 400 nm (violet) - 800 nm (rouge)
- proche-UV : 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm

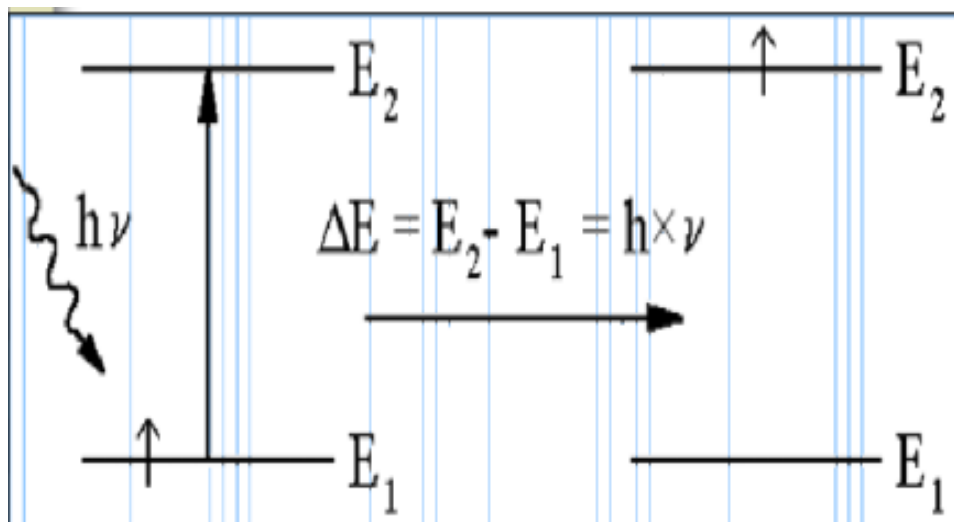


## 3. Principe

Cette méthode consiste à étudier une interaction entre une molécule (un échantillon) et un rayonnement UV- visible. On considère deux niveaux d'énergie **E1** et **E2** pour cette molécule. Les électrons sont dans un état fondamental ou bien, en un niveau E1 de plus basse énergie. Un rayonnement d'énergie  $E = h\nu$  vient exciter cette molécule.

Pour une longueur d'onde donnée  $\lambda_{1-2}$  correspondant à une fréquence  $\nu_{1-2}$ . L'énergie envoyée sur cette molécule correspond à la différence  $\Delta E = E_2 - E_1$ . L'électron passera alors du niveau E1 (fondamental) au niveau E2 (excité) par **absorption** d'un photon : c'est une **transition électronique**, avec :

$$\Delta E = h\nu_{1-2} \text{ soit } \lambda_{1-2} = h.c/\Delta E$$

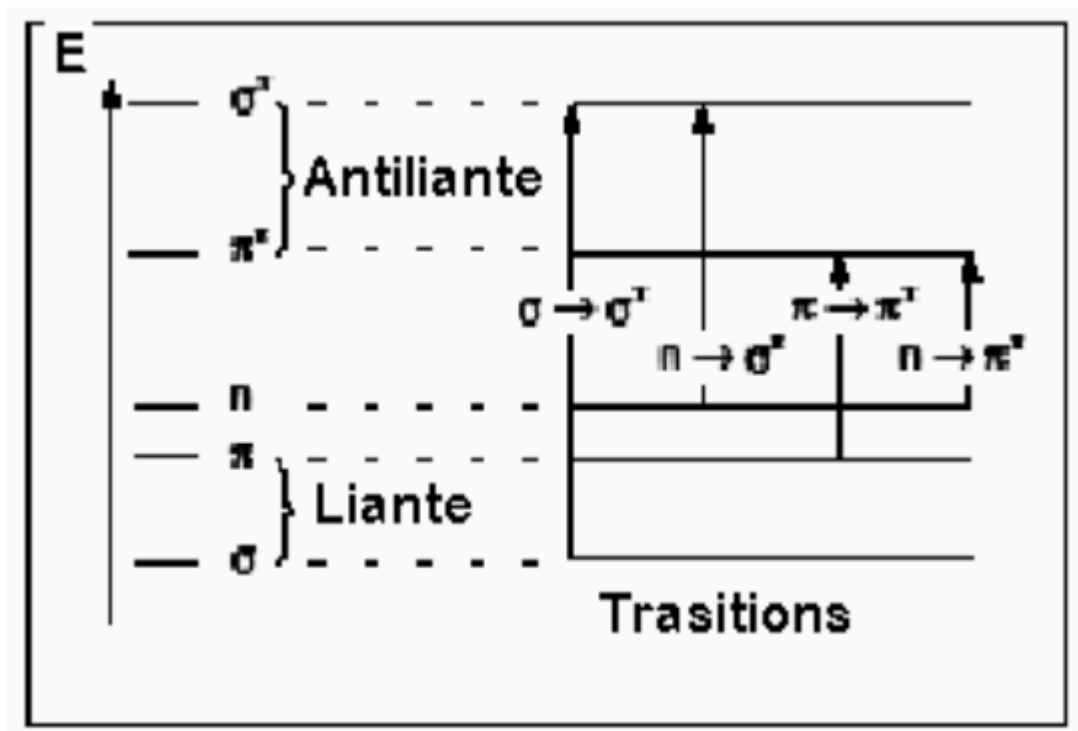


**Figure 1.2.** Principe et loi de l'absorption moléculaire (Biémont, 2008).

#### 4. Différentes Transitions électroniques

On définit la transition électronique comme étant le passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires anti liantes non remplies. Ce sont les électrons des liaisons  $\sigma$  ou  $\pi$  et les doublets nonliants  $n$  des atomes tels que H, C, N, O qui sont à l'origine de transitions électroniques.

On peut indiquer pour toute bande d'absorption sa nature en relation avec les orbitales moléculaires (OM) concernées et le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  ( $\text{l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) calculé au maximum de la bande d'absorption. Dans la figure suivante, on schématise les différentes transitions électroniques.



**Figure 1.3.** Les transitions électroniques (Biémont, 2008).

#### 4.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Elle se situe dans le lointain UV car le saut d'un électron d'une OM liante  $\sigma$  dans une OM antiliante  $\sigma^*$  demande beaucoup d'énergie, la bande d'absorption est intense.

#### 4.2. Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Elle peut apparaître vers 180 nm pour les alcools, vers 190 nm pour les éthers ou les dérivés halogénés et vers 220 nm pour les amines.

Le saut d'un électron d'un doublet  $n$  des atomes O, N, S, Cl..... dans une OM  $\sigma^*$  conduit à une transition d'intensité moyenne

#### 4.3. Transition $n \rightarrow \pi^*$

Elle est à l'origine du passage d'un électron d'une OM non liante de type  $n$  à une OM antiliante  $\pi^*$ . On la rencontre pour les molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé. Cette transition est peu intense. Se situe généralement entre 270 et 295nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible.

#### 4.4. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm, dont la position dépend de la présence de

substituant hétéroatomiques. Il y a passage d'un électron d'une OM  $\pi$  vers une OM  $\pi^*$ .

#### 4.5. Transition $d \rightarrow d$

Sous l'effet du champ cristallin, il peut y avoir levée de dégénérescence des orbitales d. Ainsi plusieurs sels inorganiques, comportant des électrons engagés dans des orbitales moléculaires  $d$  (les métaux de transition), conduisant à des transitions de faible absorptivité. Ces types de transitions apparaissent dans le domaine visible.

### 5. Principe d'absorption en spectrophotométrie

#### 5.1. Loi de Beer-Lambert

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire consiste généralement un dosage quantitatif des substances en solution par la mesure de leur **densité optique** ou **absorbance**.

On sélectionne généralement des photons absorbables par la molécule étudiée. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité  $I_0$  traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une intensité  $I$  inférieure à  $I_0$ .

La loi qui modélise le lien entre les différentes données « Absorbance, transmission et concentration » est **la loi de Beer-Lambert**.

Si on considère une cuve de **longueur  $l$** , traversée par un rayonnement de longueur d'onde  $\lambda$  et d'intensité  $I_0$ . On introduit dans cette cuve un composé en solution de **concentration  $C$** .

Après absorption et / ou transmission, le rayon sortira avec une intensité  **$I$  ( $I < I_0$ )**.

\*  $I_0$  est l'intensité de la lumière incidente

\*  $I$  est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)

\*  $l$  est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

\*  $C$  est la concentration des espèces absorbantes

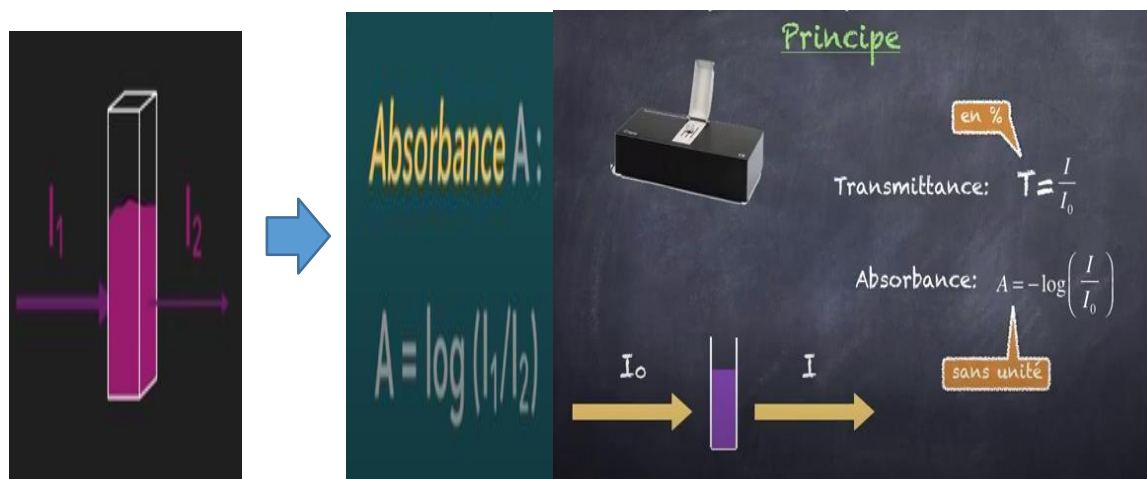


Figure 1.4. Principe de la loi de Beer-Lambert

Cette équation s'écrit  $\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = \epsilon l C$ .

\* **k** est une constante caractéristique de l'échantillon.

\*  $\log(I_0/I)$  est appelé **absorbance (A)**

\*  $I/I_0 = T$  est la **transmission**

\* **% T** est la **transmittance**

\*  $\epsilon$  est le **coefficient d'extinction ou d'absorption molaire** (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ); c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée.

On obtient donc, la relation appelée **loi de Beer-Lambert** :  $A = - \log T = \epsilon l C$

### 5.2. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert n'est valable que dans certaines conditions, à savoir :

- Des solutions suffisamment diluées, transparentes, qui contiennent des molécules non fluorescentes.
- Des solutions stables de point de vue photo chimique.
- Des solutions qui ne réagissent pas avec des solvants (phénomène de Quenching).
- $\epsilon$  et **l** sont stables.

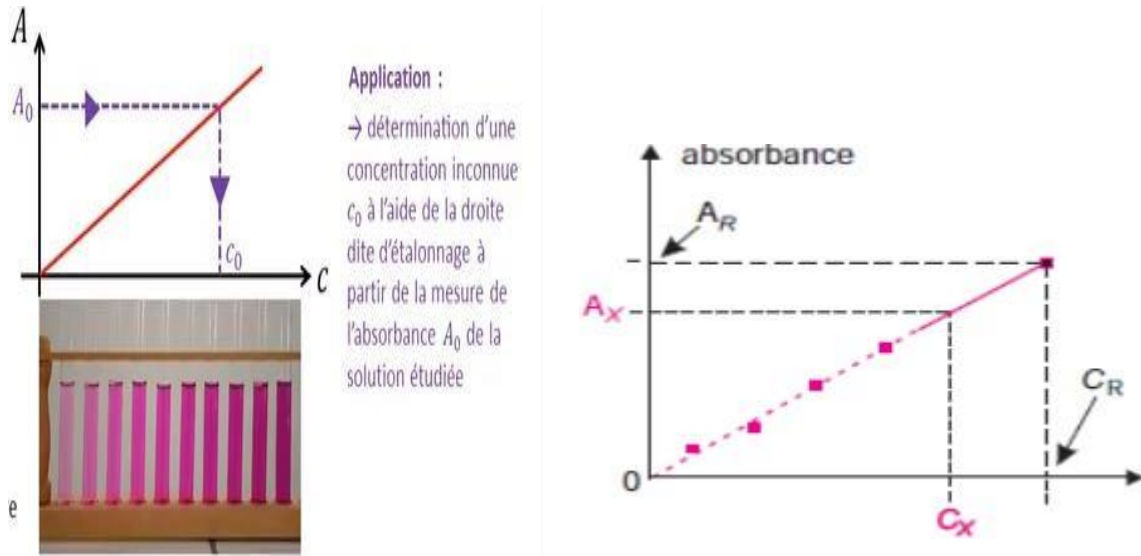
### 5.3. Détermination de la concentration d'une solution par étalonnage

Il est possible de déterminer la concentration inconnue d'une espèce en solution par mesure de son absorbance et application de la loi de Beer-Lambert. Ainsi, Le graphique représentant l'absorbance en fonction de la concentration, appelé courbe ou droite **d'étalonnage**, a le rôle de déterminer la concentration inconnue d'une solution à partir de la mesure de l'absorbance de solutions de concentrations connues ou sélectionnées.

Les étapes suivantes permettent de la réussir :

- ❖ On sélectionne la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption  $\lambda_{max}$ .
- ❖ On prépare une gamme de solutions à différentes concentrations  $C_i$ .
- ❖ l'absorbance de chacune de ces solutions à  $\lambda_{max}$  est mesurée par la suite.
- ❖ On trace la courbe d'étalonnage  $A_i = f(C_i)$  (figures suivantes).
- ❖ On mesure l'absorbance  $A_x$  de notre échantillon ou solution de concentration inconnue  $C_x$  à  $\lambda_{max}$ .

❖ A partir de la courbe on peut lire la concentration inconnue  $C_x$  de notre solution d'absorbance  $A_x$  par projection sur l'axe des x.

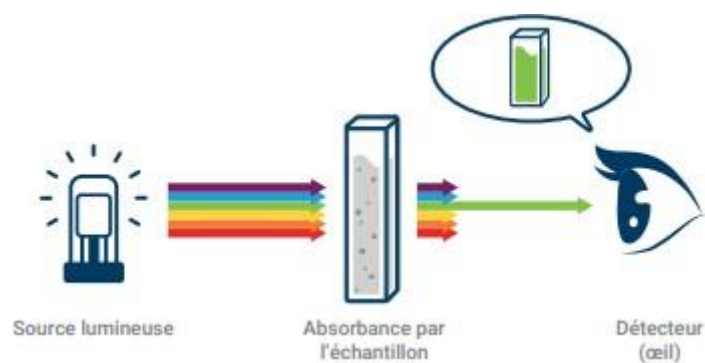


**Figure 1.5.** La courbe d'étalonnage (Biémont, 2008).

## 6. Lien entre couleur d'une solution et son absorption

### 6.1. Notion de perception des couleurs

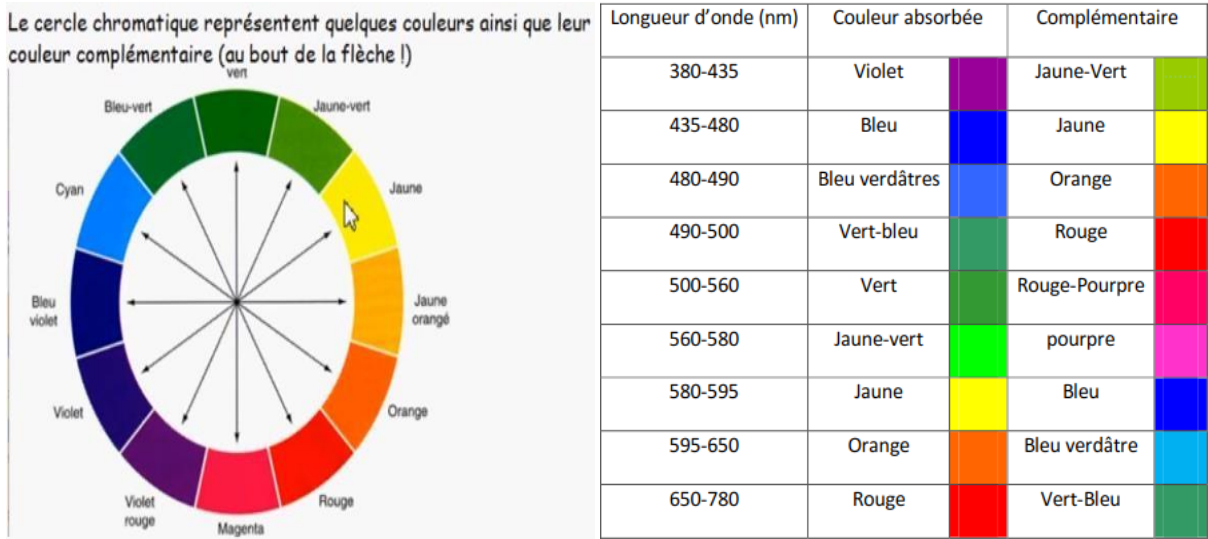
Supposant une solution colorée dans une cuve sur laquelle on va projeter des radiations, une partie seulement de ces radiations va traverser cette solution, ce sont les radiations transmises mais non absorbées. On intercale un prisme ou réseau, on obtient un spectre d'absorption qui contient toutes les radiations transmises, et la couleur perçue de cette solution est le mélange de ces radiations (voir figure ci-dessous).



**Figure 1.6.** Notion de perception des couleurs : transmission et couleur (Agilent Technologies, 2021)

**6.2. Cercle chromatique**

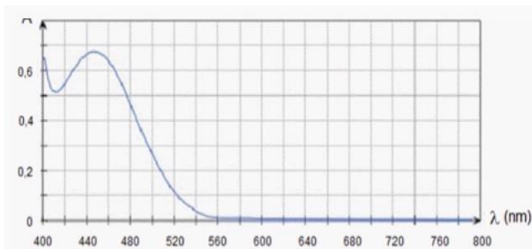
Le **cercle chromatique** permet de retrouver facilement la couleur complémentaire d'une couleur : elles sont diamétralement opposées. Exemple : La couleur complémentaire du rouge est le bleu-vert.



**Figure 1.7.** Le cercle chromatique (Agilent Technologies, 2021)

Voici quelques exemples :

**Exemple:** le spectre d'absorption du dichromate de potassium (compris entre 400 et 600 nm) est le suivant:

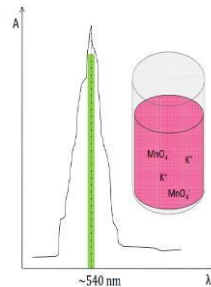


Il absorbe les radiations violettes, bleues et une partie des radiations vertes. Sa couleur est donc la somme des couleurs complémentaires qui sont (d'après le cercle chromatique) le jaune orangé, l'orange et le magenta. La solution a en effet une couleur orangée. Solution de dichromate de potassium ( $2K_2Cr_2O_7$ ):



**Exemple 2**

Prenant l'exemple du permanganate de potassium  $KMnO_4$ . Une solution du permanganate de potassium ( $K^+$ ,  $MnO_4^-$ ) nous apparaît violette comme représenté dans le tableau précédent. Mais cette solution présente une absorption maximale à une longueur d'onde d'environ 540 nm (absorbe dans le vert). Alors que la couleur aperçue par l'œil est le complémentaire de ce qui est absorbé (Rouge-Pourpre) (voir tableau).



Spectre d'absorption typique d'une solution de ( $K^+$ ,  $MnO_4^-$ ).

### 6.3. Paramètres intervenant dans l'absorption de la lumière par une solution

Plusieurs paramètres qui interviennent :

- **la longueur d'onde** : toutes les radiations ne sont pas absorbées de la même façon.
- **La nature de l'espèce chimique** : une solution ne contient pas les mêmes espèces chimiques.
- **l'épaisseur de la solution** : plus la solution est épaisse, plus les radiations absorbées sont nombreuses.
- **La concentration** : plus la solution est dense ou concentrée de point de vue colorimétrique, plus on aura beaucoup de radiations absorbées.

### 7. Appareillage : Fonctionnement du spectrophotomètre

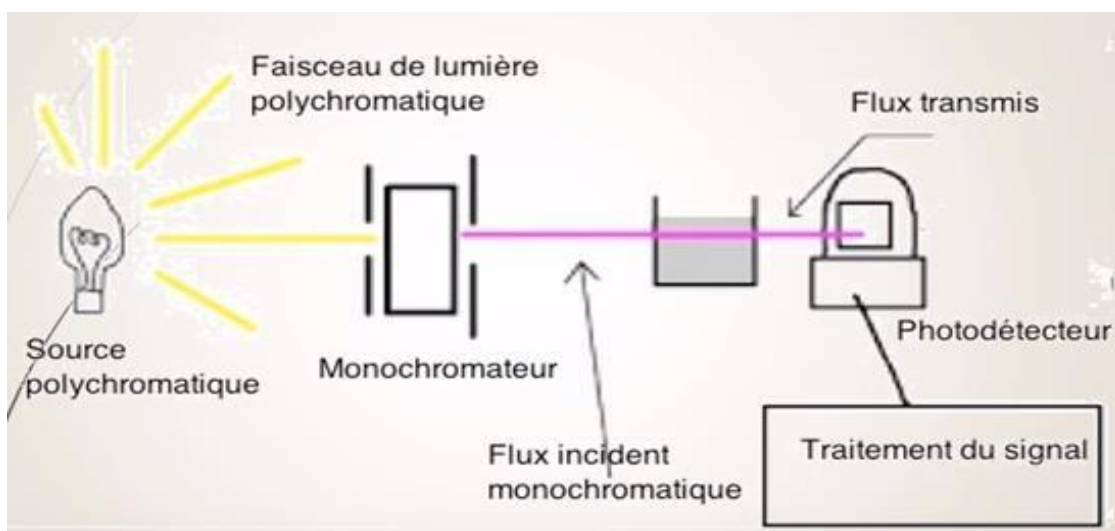
L'absorbance des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre précédemment étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à analyser.

Les radiations lumineuses passent par un monochromateur dont son rôle est de sélectionner une longueur d'onde (monochromatique).

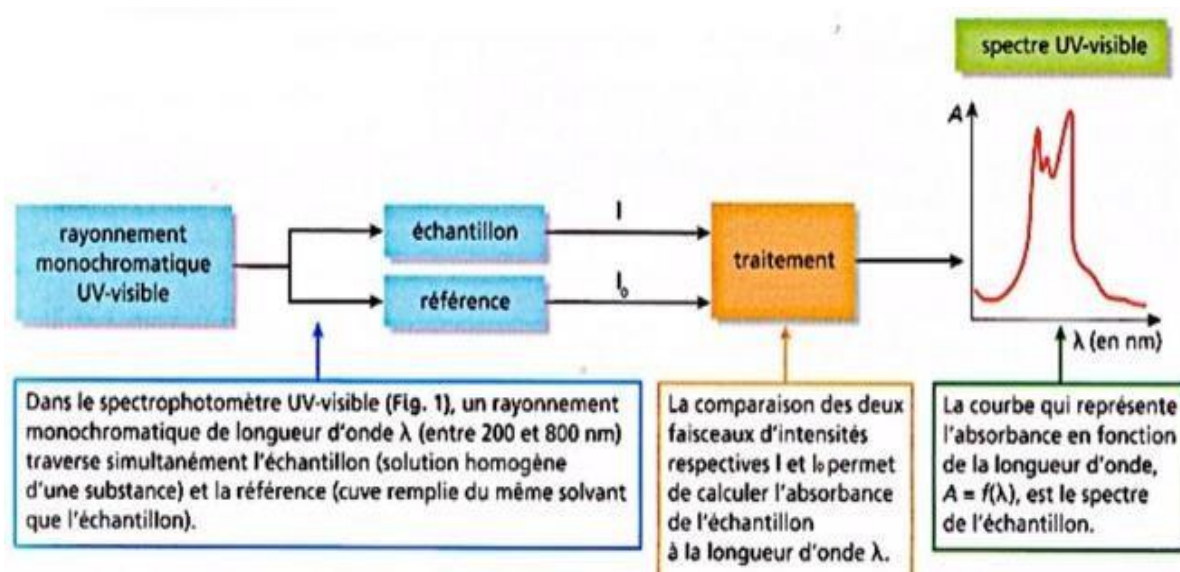
Ce faisceau monochromatique va traverser, par la suite la cuve de la solution qui contient l'échantillon à étudier, et qui va absorber les photons (absorption).

Le résultat apparaît soit sous forme d'une valeur qu'on appelle absorbance ou densité optique (DO) ou bien un **spectre tracé** sur un écran.

**Les figures suivantes** résument les principaux composants d'un simple spectrophotomètre, ainsi que son fonctionnement



**Figure 1.8.** Les principaux composants d'un simple spectrophotomètre.



**Figure 1.9.** Fonctionnement d'un spectrophotomètre simple

### 8. Domaines d'application (Quelques exemples)

La spectrophotométrie est largement utilisée dans beaucoup de domaines : agroalimentaire, biologie, chimie, pharmacie, environnement, etc., aussi bien au laboratoire que sur site industriel. Ainsi, la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) reste une technique très présente dans les laboratoires de recherche scientifique et de l'industrie.

Dans l'industrie pharmaceutique et l'industrie agroalimentaire, de nombreux tests de dissolution de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS.

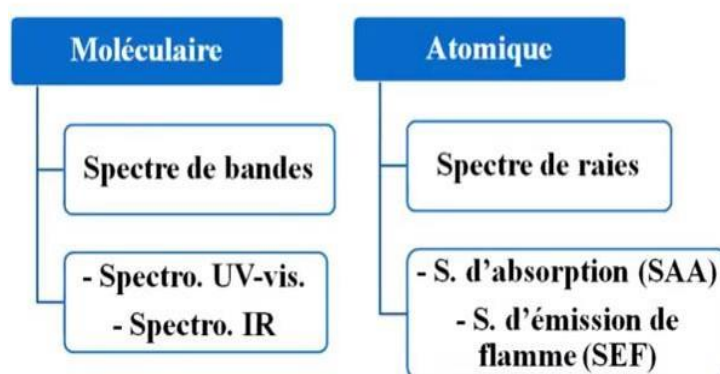
Cette technique d'analyse a bénéficié de nombreuses améliorations technologiques ces dernières années car les possibilités apportées par l'analyse multivariable permettant l'analyse de plusieurs constituants, en limitant les phénomènes d'interférences physico-chimiques, ont ouvert de nouvelles utilisations, notamment pour l'analyse industrielle.

# **Chapitre 2 : Spectrométrie d'absorption et d'émission atomique**

### **Introduction**

Les méthodes spectrales sont réparties en méthodes moléculaires et méthodes atomiques.

Les méthodes moléculaires s'intéressent à l'analyse de la molécule entière et leurs données sont illustrées par des spectres de bandes (la spectrométrie UV-Visible et la spectrométrie infra-Rouge). Quand il s'agit des méthodes atomiques, elles consistent l'analyse atomique, et sont représentées par des spectres de raies (la spectrométrie d'émission atomique et la spectrométrie d'absorption atomique).



**Figure 2.1.** Les différents types de spectres selon les techniques (moléculaire ou atomique)

#### **1. Définition**

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et la spectrométrie d'émission atomique (SEA) sont deux techniques d'analyse qualitatives et quantitatives très précises et particulièrement sensibles, largement utilisées pour la caractérisation ou la mesure de la concentration des minéraux (métaux ou non métaux) en solution d'environ 70 éléments, parfois à l'état de traces ( $c \leq \text{mg/l}$ ).

**Le tableau** suivant regroupe des éléments qu'on peut doser par SAA et SEA

IA																	VIIIA				
H																	He				
Li	Be															B	C	N	O	F	Ne
3	4															5	6	7	8	9	10
Na	Mg	III B	IV B	V B	VII B	VIII B	VIII						IB	II B	Al	Si	P	S	Cl	Ar	
11	12														13	14	15	16	17	18	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr				
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe				
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54				
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn				
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86				
Fr	Ra	Ac																			
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu					
			58	59	60		62	63	64	65	66	67	68	69	70	71					
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw					
			90	91	92																

élément — M — flamme air/acétylène

numéro atomique — XX —

élément — M — flamme N<sub>2</sub>O/acétylène

numéro atomique — XX —

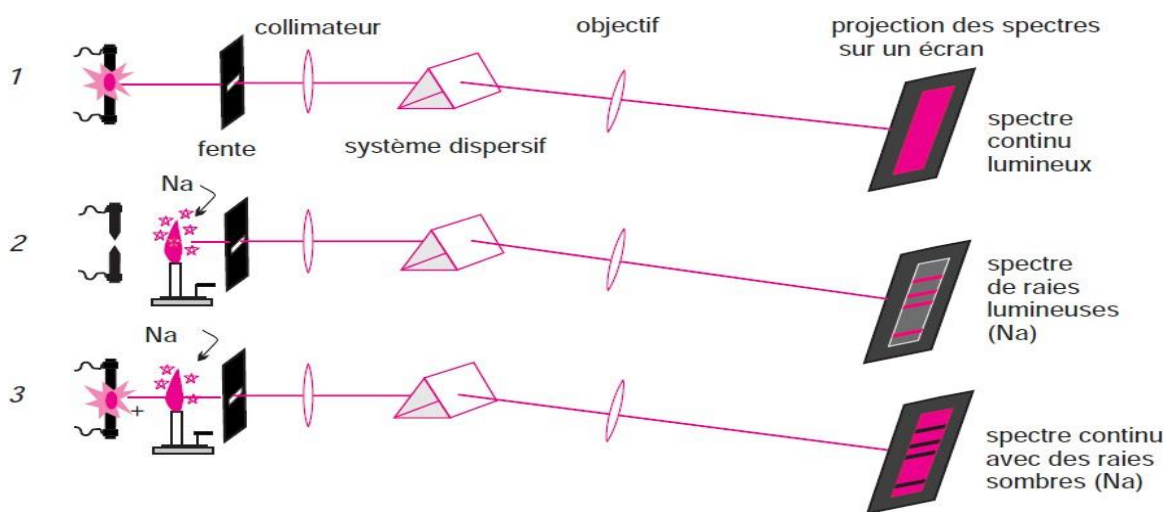
**Figure 2.2.** Eléments dosés par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Tableau périodique) ;

Les éléments qui apparaissent en rose : on ne pas les caractériser par SAA- SEA, les éléments en blanc et en gris : on peut les doser, la différence entre ces éléments est le mélange combustible- carburant)

## 2. Absorption atomique et émission atomique : Principes de phénomènes fondamentaux

### 2.1. Expérience du renversement des raies de Kirchhoff

La figure 2.3 décrit l'expérience du renversement des raies de Kirchhoff.



**Figure 2.3.** Expérience du renversement des raies de Kirchhoff (Dunod et al., 2004)

### **Expérience 1**

Source de lumière d'un arc électrique dont le rayonnement est dispersée avec un prisme

=> On obtient un spectre continu lumineux. Une lumière émise par une source polychromatique, telle qu'une lampe peut être à l'origine d'un spectre continu après avoir été dispersée par un prisme.

### **Expérience 2**

La lampe est substituée par un bec Bunsen dans lequel on projette du  $\text{NaCl}_2$ , on obtient un spectre de raies qui correspond aux quelques atomes de sodium passés dans un état excité et qui émettent de la lumière lors de leur retour vers l'état fondamental.

### **Expérience 3**

Sur le trajet de la lumière polychromatique, une source de chauffage (bec bensen) est mise. Les atomes restés à l'état fondamental dans la flamme, après excitation absorbent la lumière à des longueurs d'ondes déterminées. Le résultat est donc un spectre avec des raies sombres sur un fond noir. Ces raies sombres se situent à l'endroit des raies d'émission du sodium.

## **2.2. Absorption atomique et émission atomique**

-L'absorption atomique correspond au phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe ainsi à un état excité. Le résultat sera un spectre d'absorption.

-L'émission atomique est le phénomène physique qui peut avoir lieu lorsqu'un rayonnement électromagnétique est émis par des atomes excités lors de leur à l'état fondamental. Il en résulte ainsi un spectre d'émission.

## **3. Lois et grandeurs appliquées**

### **3.1. Loi de Beer-Lambert**

**En spectrométrie d'absorption atomique, on mesure l'absorbance :  $A = K.C$**

A : Absorbance (sans unité)

C : Concentration de l'élément

K : Coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie

**En spectrométrie d'émission atomique, on mesure l'intensité du rayonnement émis :**

$$I_e = K.C$$

**I<sub>e</sub>**: Intensité de rayonnement émis

**K** : Coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie.

**C** : Concentration de l'échantillon

### 3.2. Loi de Boltzmann

En SEA, l'intensité de l'émission est proportionnelle au nombre d'atomes retournés à l'état fondamental. La lumière émise est, par conséquent proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

**La loi de Maxwell - Boltzmann** repose sur la détermination des rapports des populations dans un état fondamental et un état excité en fonction de la température.

$$N_1/N_0 = g_1 \cdot e^{-\Delta E/kT}$$

Avec : **g** le rapport statistiques des état 1 et 0

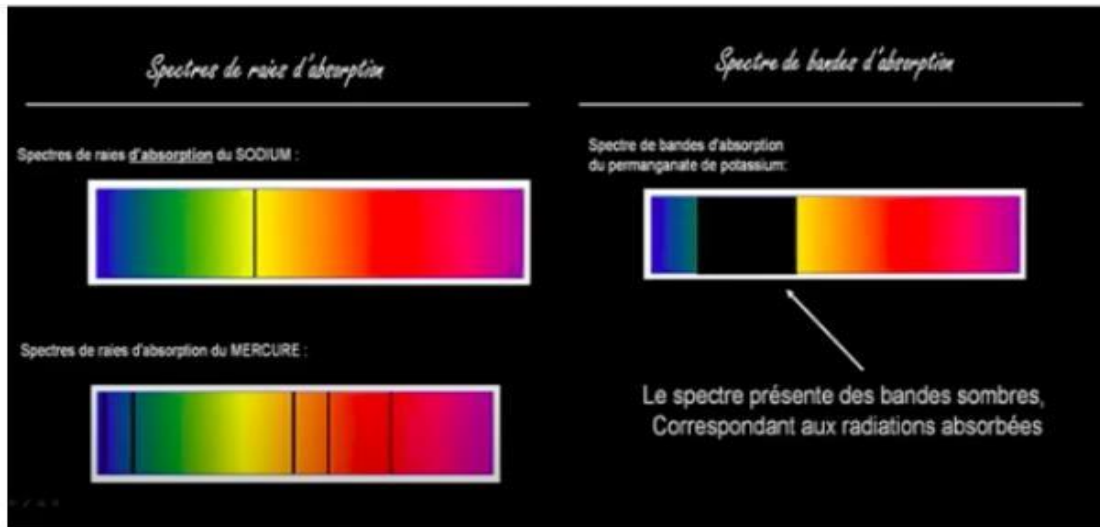
**k** constante des Boltzmann =  $1.38 \times 10^{-23} \text{J/K}$

**ΔE**: écart énergétique (j)

**T**: la température

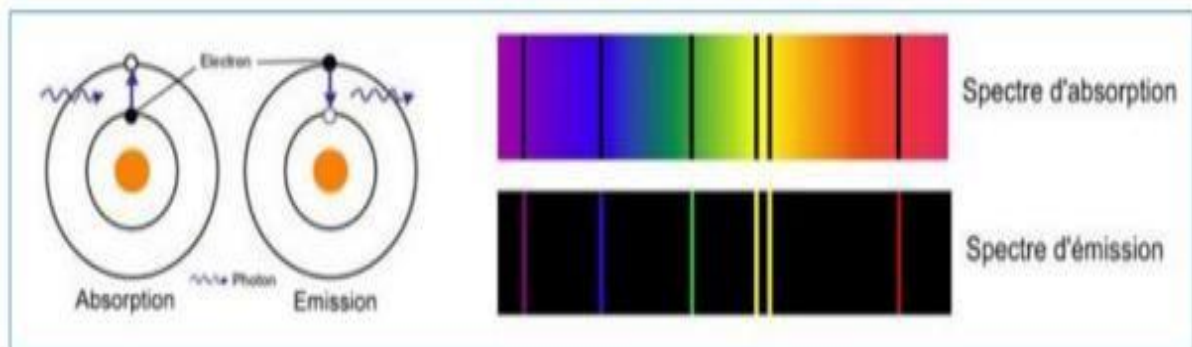
### 4. Analyse spectrale

A la différence de la spectrométrie d'absorption moléculaire qui s'intéresse à l'analyse de la molécule entière et donne un spectre de bande (exemple de spectre de bande d'absorption du Permanganate de Potassium dans la figure suivante), la spectrométrie d'absorption et d'émission atomique nous donne des spectres de raies (exemple de spectre de raie d'absorption du Sodium et du Mercure en figure suivante)



**Figure 2.3.** Spectres de raie d'absorption du Sodium et du Mercure

La figure ci-dessous montre la différence entre un spectre de raie d'absorption et un spectre de raie d'émission.



**Figure 2.4.** Spectre d'absorption atomique et spectre d'émission atomique

\*L'absorption atomique en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (**Spectre d'absorption**).

\*L'émission atomique en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (**Spectre d'émission**).

## 5. Appareillage et principes

### 5. 1. Spectromètre d'absorption atomique

#### 5.1.1. Appareillage SAA

Un spectrophotomètre d'absorption atomique est composé généralement d'une source lumineuse, un monochromateur, un atomiseur (générateur d'atomes), un détecteur et un afficheur ou enregistreur de données.

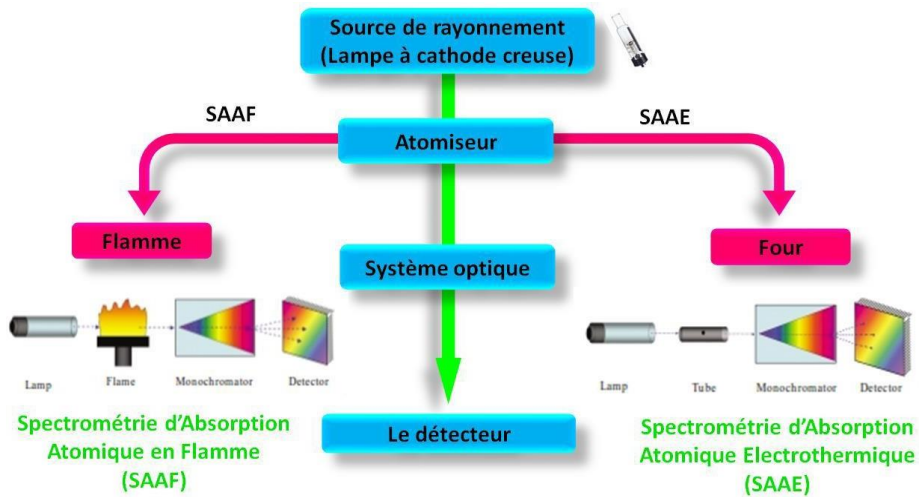
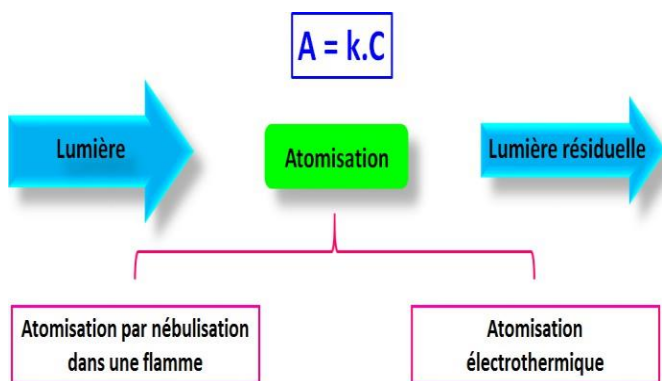


Figure 2.5. Spectromètre d'absorption atomique

### 5.1.2. Principe SAA



L'échantillon est transformé en vapeur atomique.

Les atomes qui sont en état fondamental absorbent un rayonnement bien déterminé.

L'absorbance est proportionnelle à la quantité d'atomes de l'élément à analyser.

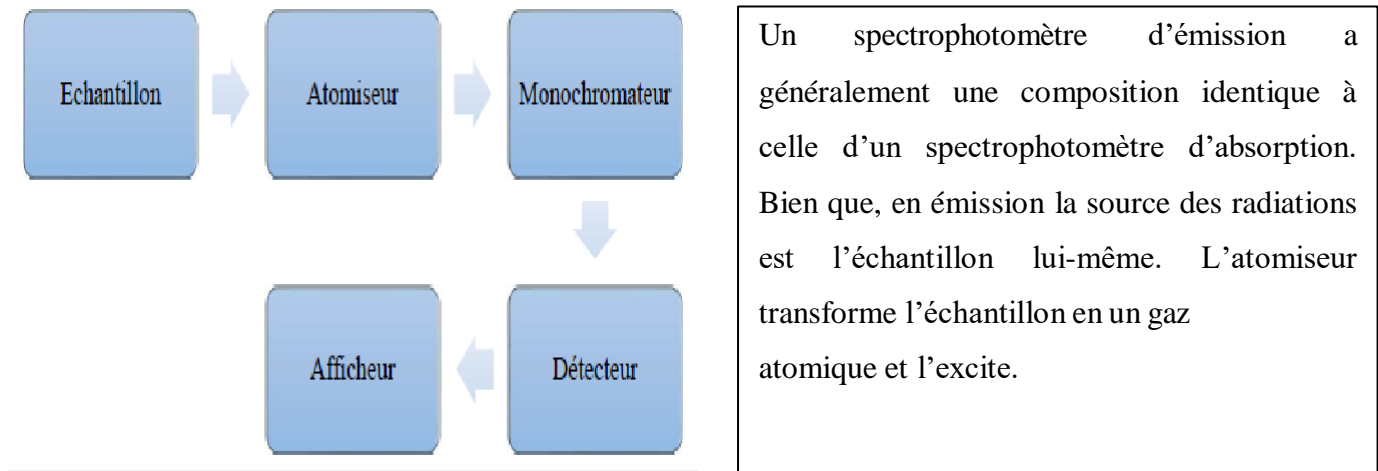
En SAA, la création des vapeurs atomiques est soit par :

- Atomisation par nébulisation dans une flamme
- Atomisation électrothermique

Figure 2.6 : Principe de fonctionnement en spectrométrie d'absorption atomique

### 5.2. La spectrométrie d'émission atomique (SEA)

5.2.1. Appareillage SEA



La figure suivante montre la composition d'un Spectromètre d'émission atomique (les deux types d'atomisation)

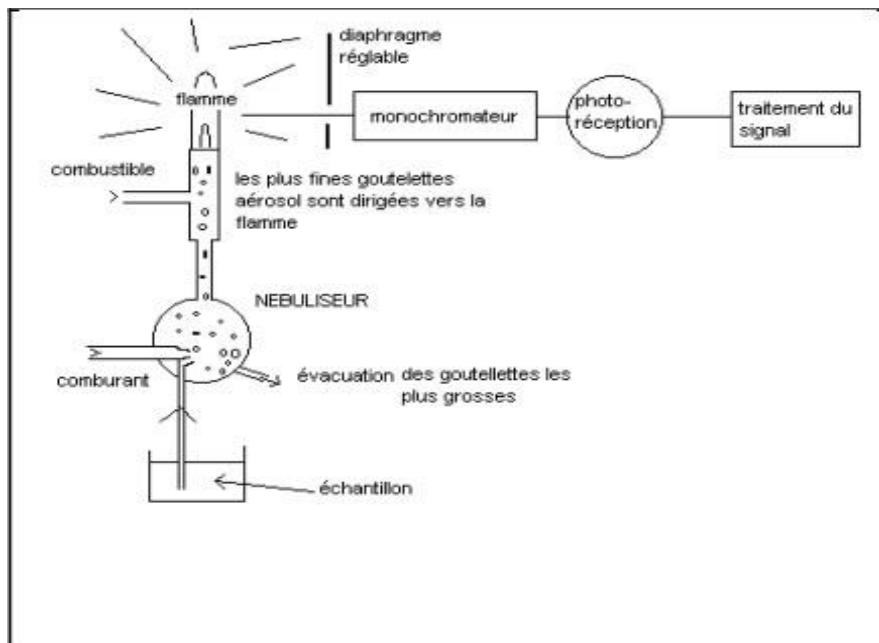
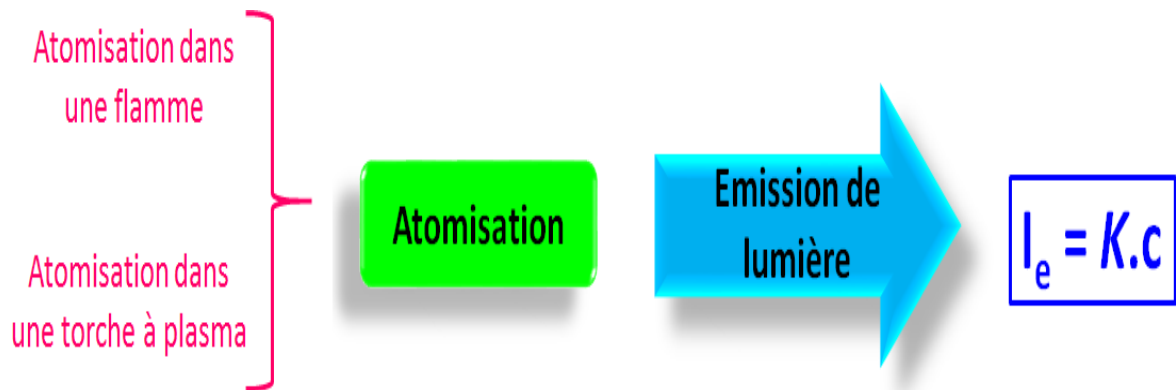


Figure 2.7. Spectromètre d'émission atomique (Perrin, 2006)

### 5.2.2. Principe SEA



Pour manipuler la SEA, il faut savoir les informations suivantes :

L'atomiseur est la partie de cet appareil dans laquelle on introduit notre échantillon.

L'atomiseur a donc un double rôle :

- Production de vapeurs atomiques.
- Excitation des atomes.

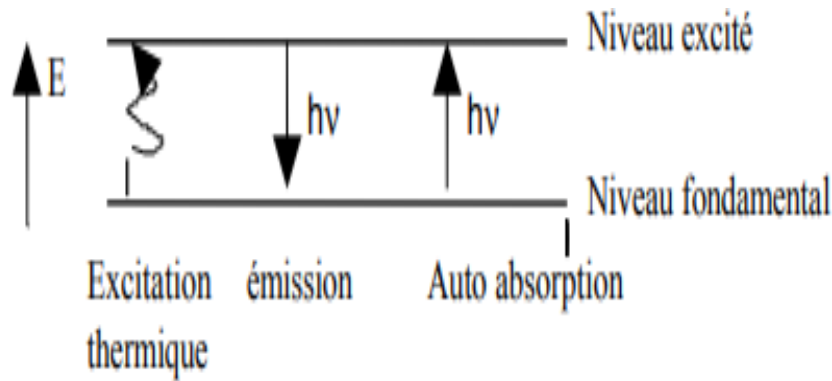
Le retour à l'état fondamental est accompagné d'émission de rayonnements spécifiques de l'élément ou des éléments à analyser, et ceci après excitation.

L'intensité du rayonnement émis est proportionnelle à la concentration de l'élément analysé considéré.

Deux types d'atomiseurs caractérisent la SEA :

La flamme (**Photométrie d'émission de flamme**).

La torche à plasma (**Spectrométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif = Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry ICP-OES**).



**Figure 2.8.** Transitions énergétiques pendant l'émission atomique (Perrin, 2006)

### 6. Domaines d'application

Les applications sont très nombreuses étant donné qu'on atteint pour certains éléments des concentrations inférieures au  $\mu\text{g/L}$ . Voici quelques exemples :

- Analyse des échantillons pharmaceutiques ou thérapeutiques pour doser les éléments Na, K, Mg, Ca, Al et chlore) : Identification et dosage des substances actives ou des principes actifs lors du contrôle des matières premières ou des produits finis pharmaceutiques à base de minéraux (tonifiants, fortifiants, anti-stress ...).
- Détection du plomb, chrome, cadmium et mercure dans les polymères
- Détermination de la présence de métaux lourds, et leur concentration dans des échantillons d'eau, sol ou plantes.
- Contrôle de qualité des denrées alimentaires par la détermination de :  
Métaux dans le poisson, céréales.....
- Médecine : Métaux lourds dans les cheveux, les ongles ...
- Application de la SAE en médecine légale : le laser est un élément qui peut être utilisé comme atomiseur pour la détection de traces d'éléments dans des organes, tissus, dents...  
etc,

# **Chapitre 3 : Spectrométrie Infrarouge**

### 1. Définition

La spectrométrie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation rapide et sensible (analyse qualitative et quantitative) des molécules organiques.

### 2. Description et principe

La spectrométrie infrarouge est une technique analytique qui repose sur l'absorption des rayonnements (infrarouges) par la matière organique (l'échantillon). Cette absorption est en relation avec la composition chimique des échantillons.

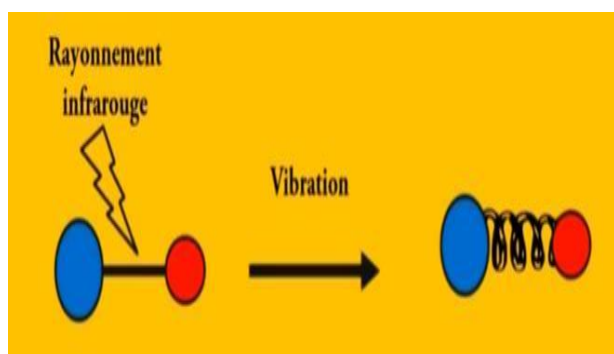
On peut estimer cette dernière par la simple mesure de l'absorption de lumière par l'échantillon.

Le principe d'une spectroscopie IR est d'envoyer des radiations IR sur un échantillon à analyser. Sachant que certaines longueurs d'onde sont alors absorbées par les liaisons chimiques des molécules se trouvant dans l'échantillon.

On déduit alors, et on peut déterminer les différentes liaisons chimiques à partir d'un spectre IR généré.

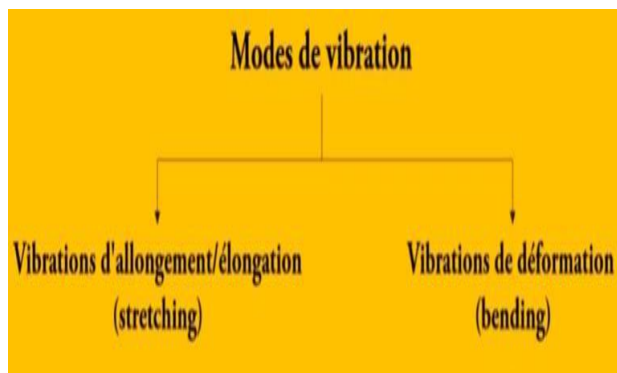
Une spectrométrie infrarouge peut ainsi avoir différentes finalités :

- Identifier et caractériser une molécule inconnue, en référençant ses liaisons.
- Tester la mise en évidence d'une molécule dans un échantillon.
- Procéder à un dosage d'une espèce chimique, dans certains cas.



En spectroscopie infrarouge, l'énergie est fortement liée à la vibration des liaisons chimiques. Donc, on n'observe pas la transition des électrons contrairement à la spectrophotométrie d'absorption moléculaire ou on peut le faire.

**Fig 3.1.** Modèle diatomique



Lors de la soumission d'une molécule à une radiation infrarouge, effectivement, la structure moléculaire se met à vibrer.

Ceci est responsable de modifier :

- les distances interatomiques : vibrations de valence ou d'élongation
- les angles de valence : vibrations de déformation

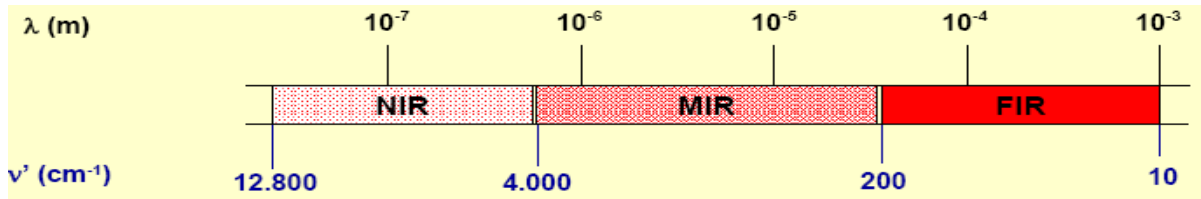
Les différentes possibilités de vibrations sont illustrées dans **la figure suivante**

Vibration d'élongation (de valence)	
 symétrique	 asymétrique
Vibration de déformation	
Dans le plan	Hors du plan
 asymétrique (rotation plane)	 asymétrique (balancement)
 symétrique (cisaillement)	 symétrique (torsion)

**Fig 3.2.** Modèle polyatomique (Silverstein, 2016)

### 3. Domaine spectrale IR et grandeurs

Le domaine de l'infrarouge correspond à des longueurs d'onde comprises entre  $0,78 \cdot 10^{-6}$  m et  $10^{-3}$  m, que l'on peut diviser en trois régions.



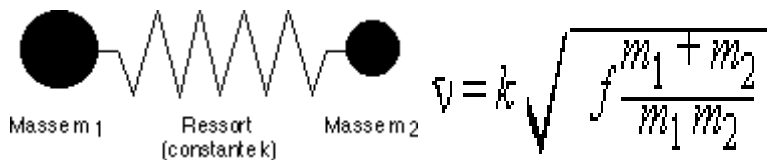
Région		Longueur d'onde $\lambda$ (m)	Nombre d'onde $\bar{\nu}$
IR proche	Near IR (NIR)	$0.78 \cdot 10^{-7} - 2.5 \cdot 10^{-6}$	13300-4000 $\text{cm}^{-1}$
IR moyen	Mid IR (MIR)	$2.5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$	4000-400 $\text{cm}^{-1}$
IR lointain	Far IR (FIR)	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	400-10 $\text{cm}^{-1}$

Un rayonnement infrarouge est caractérisé par le **nombre d'onde** en  $\text{cm}^{-1}$  (et non par sa longueur d'onde).

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

Avec : **Nombre d'ondes** = 1 / Longueurs d'onde

On peut montrer que la fréquence de vibration entre deux atomes dépend de la force de la liaison qui les unit et de leur masse atomique respective ( $m_1$  et  $m_2$ ) selon la **loi de Hooke** (qui décrit les mouvements d'un ressort) :



- $\nu$  = fréquence vibrationnelle en nombres d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ )
- $k$  = constante
- $f$  = constante de force indiquant la force de la liaison entre les atomes.
- Chaque type de liaison possède une fréquence de vibration qui lui est propre. Le spectre infrarouge est donc extrêmement important pour l'**identification de groupements chimiques**.

**4. Appareillage** (fonctionnement d'un spectrophotomètre IR)

Le principe du spectrophotomètre IR repose sur le fait que l'appareil envoie des radiations de fréquences bien déterminées modifiées progressivement : balayage en fréquence dans le domaine du proche infrarouge. Ce dernier est le même que celui utilisé en UV-visible

- Ces dernières années, les spectrophotomètres infrarouge à transformée de Fourier sont les plus fréquemment utilisés, ce qui rend facile l'obtention de toutes les fréquences en même temps sans effectuer un balayage. L'avantage est d'obtenir les spectres rapidement.

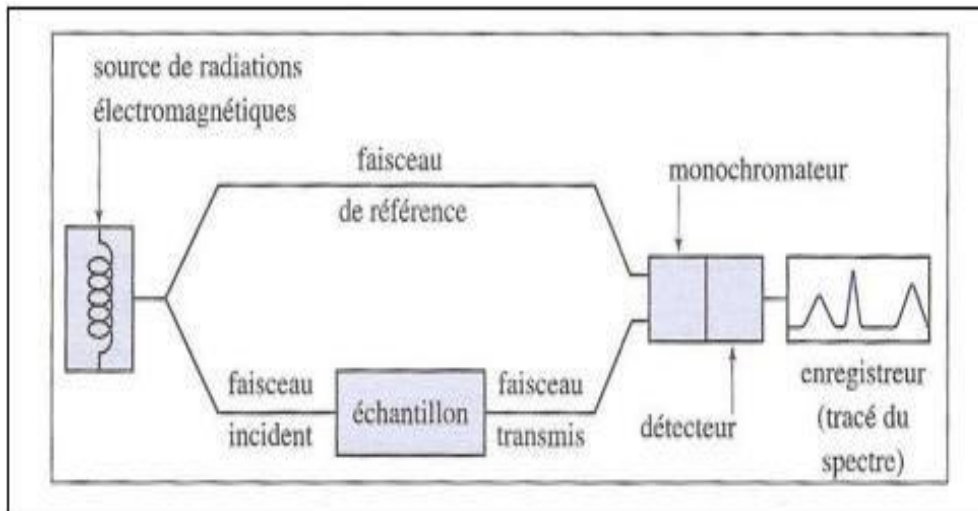
Le résultat sera donc des spectres qui mesurent la transmittance en fonction du nombre d'onde et non pas l'absorbance (d'où l'allure des spectres inversés) :

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

I : intensité du faisceau transmis (après passage dans l'échantillon)

$I_0$  : intensité du faisceau incident (faisceau de référence).

- Il faut noter aussi que la loi de Beer-Lambert est aussi valable en spectroscopie IR.



**Fig. 3.3.** Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR (Volhardt et al., 2015)

### 5. Spectre infrarouge : données et interprétation

Les nombres d'onde d'absorption en IR permettent simplement de connaître certaines liaisons ou groupes caractéristiques, puis certaines fonctions chimiques des éléments à tester. Ceci est dû au fait que les fréquences de vibration de la plupart des groupes d'atomes caractéristiques des molécules ne dépendent que dans certains cas de la molécule.

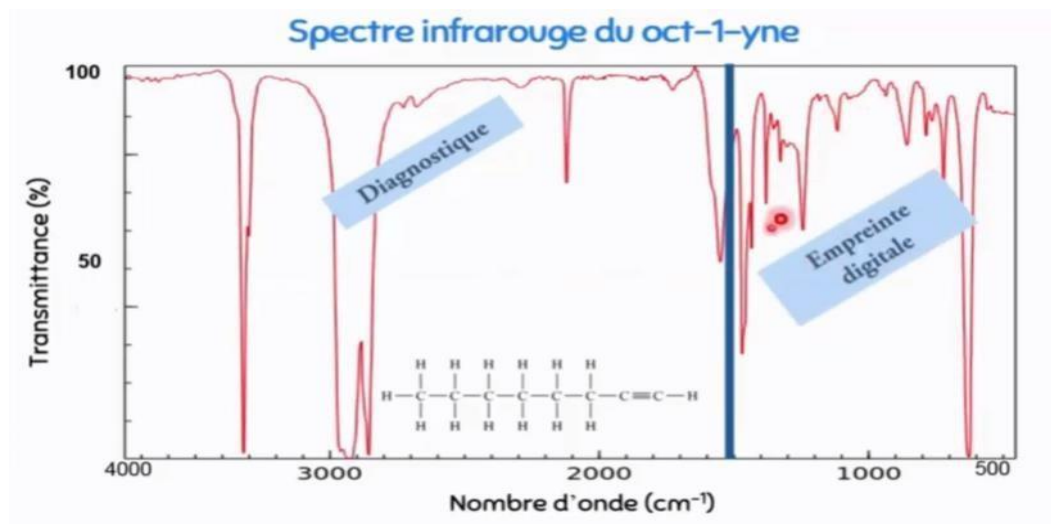
- Les spectres infrarouge sont généralement complexes à cause de l'apparition de bandes supplémentaires dues à des harmoniques des fréquences fondamentales d'absorption ou à des combinaisons de certaines fréquences. Par conséquent, on ne peut pas attribuer ou analyser toutes les bandes apparaissant sur un spectre pour en extraire les informations nécessaires à l'identification ou la caractérisation.

- Pour cela, on utilise les bandes principales, tant par leur présence que par leur absence.

L'étude d'un spectre I.R permet :

-De caractériser un composé inconnu ou, ses groupes fonctionnels, de vérifier la pureté d'une molécule connue, par l'absence de bande signalant la présence de composé étrangers, et de suivre un processus réactionnel en analysant l'apparition ou la disparition des bandes caractéristiques de certains groupes fonctionnels.

La figure ci-après présente des données spectrales Infrarouge d'une molécule du Oct-1-yne.

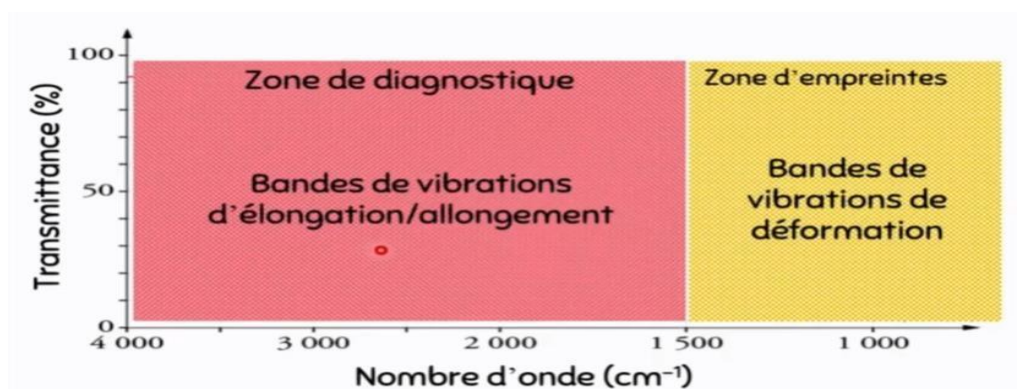


**Fig 3.4.** Données spectrales Infrarouge d'une molécule du Oct-1-yne (Spectral Database for Organic Compounds)

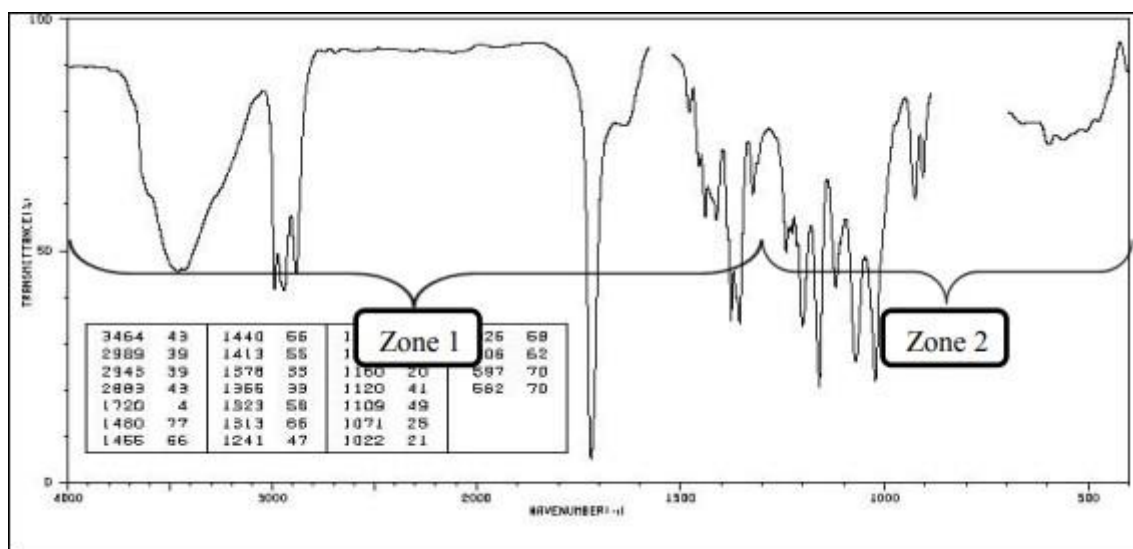
- L'axe des abscisses représente le nombre d'onde, l'axe est orienté de la droite vers la gauche
- L'axe des ordonnées est orienté vers le haut et représente la transmittance en %

**Zones d'absorption :** Il existe deux zones à analyser différemment au sein d'un spectre d'absorption infrarouge.

- **Zone 1 :** on y trouve la plupart des bandes de vibration d'élongation
- **Zone 2 :** on y trouve la plupart des bandes de vibration de déformation (zone souvent difficile à analyser, appelée zone des empreintes digitales)



Voici un autre exemple d'un spectre d'absorption infrarouge de la 5-hydroxypentan-2-one :



**Fig 3.5.** Spectre d'absorption infrarouge de la 5-hydroxypentan-2-one (Spectral Database for Organic Compounds)

D'après la littérature, le tableau suivant nous montre les différents types de liaisons et leurs caractéristiques en données spectrales.

**Tableau 4.1.** Bandes d'absorption multiples en Spectrométrie Infrarouge

Liaison	Nature de la vibration	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensité
C(tétraédrique) – H	élongation	2800 – 3000	Forte, multiple (correspondant à différents modes de vibration, symétriques et antisymétriques des groupes $\text{CH}_2$ et $\text{CH}_3$ )
C(tétraédrique) – H	déformation	1425 – 1470	Forte
C(tétraédrique) – H ( $\text{CH}_3$ )	déformation	1365 – 1385	Forte, 2 bandes
C – C	élongation	1000 – 1250	Forte

(Silverstein, 2016)

### 6. Domaines d'application

Méthode d'analyse rapide dans les industries agroalimentaires, au sein desquelles occupe une place de premier ordre spectroscopique, elle se révèle un outil précieux pour la formulation.

Elle peut avoir des applications à diverses industries agroalimentaires (céréales, jus de canne à sucre, alimentation animale, lait et produits laitiers, produits carnés) :

-La spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) est une technique analytique qui a connu un développement important dans le domaine de l'alimentation animale. Rapide et peu coûteuse, elle trouve sa place dans un contexte de besoin croissant de contrôle qualité et de traçabilité.

Grace à la SPIR, on peut mesurer la composition chimique d'une molécule (humidité, protéines, lipides, etc.), ainsi qu'estimer la valeur nutritive. Au cours de la fabrication comme sur les produits finis, la SPIR permet aussi d'analyser les aliments composés et de vérifier leur conformité aux formules théoriques.

La spectroscopie IR est une technique probante en chimie organique et en chimie inorganique. En effet, elle permet l'analyse de surface dans l'industrie de la micro-électronique pour des semi-conducteurs comme le silicium, le nitrure de silicium, l'arséniure de gallium, le séléniure de zinc, le silicium amorphe, *etc.*

Elle peut être même utilisée en médecine légale pour les cas civils criminels ou pour la caractérisation de la dégradation polymérique.

# **Chapitre 4 : Spectrométrie par luminescence**

### *1. Définition et principe*

La spectroscopie de fluorescence, ou encore fluorométrie ou spectrofluorométrie, est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon. C'est une méthode à la fois sélective et très sensible permettant de très nombreux dosages. L'intensité de fluorescence étant en rapport avec la concentration de l'échantillon à analyser, les dosages sont faits à l'aide de fluorimètres ou de spectrofluorimètres. L'extinction extrêmement rapide de l'intensité lumineuse lorsque l'excitation s'arrête, fait également l'objet de mesures à des fins analytiques.

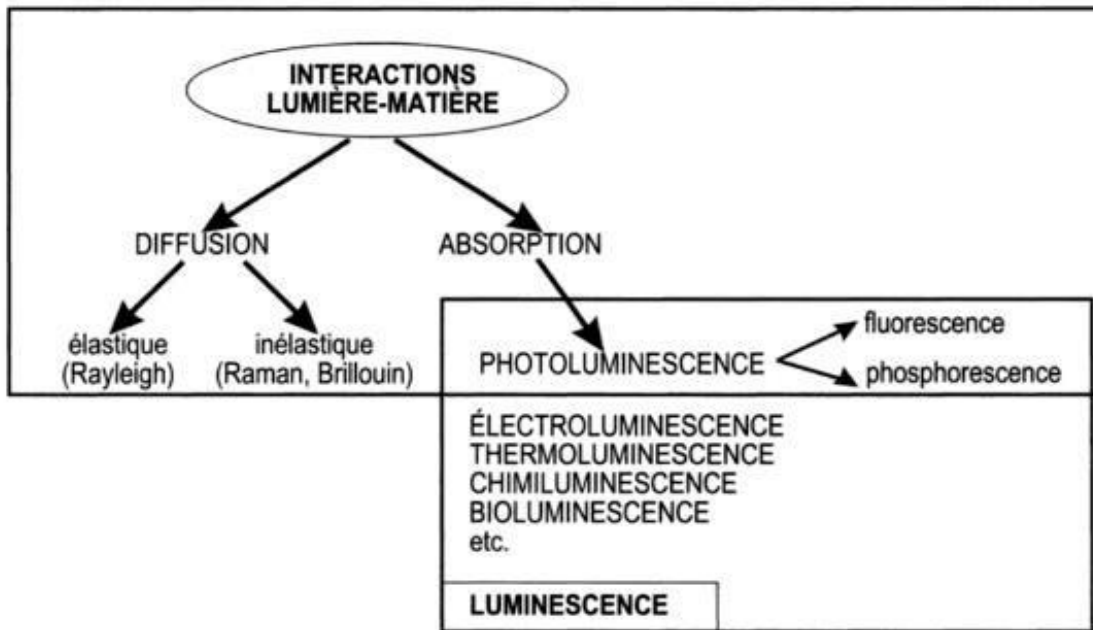
Cette technique repose sur l'utilisation d'un faisceau de lumière (habituellement dans l'ultraviolet) qui va exciter les électrons des molécules de certains composés afin qu'ils émettent de la lumière de plus basse énergie, typiquement de la lumière visible, mais pas nécessairement.

La spectroscopie de fluorescence peut être une spectroscopie atomique ou une spectroscopie moléculaire. Les outils qui servent à la mesure de la fluorescence sont appelés fluoromètres ou fluorimètres.

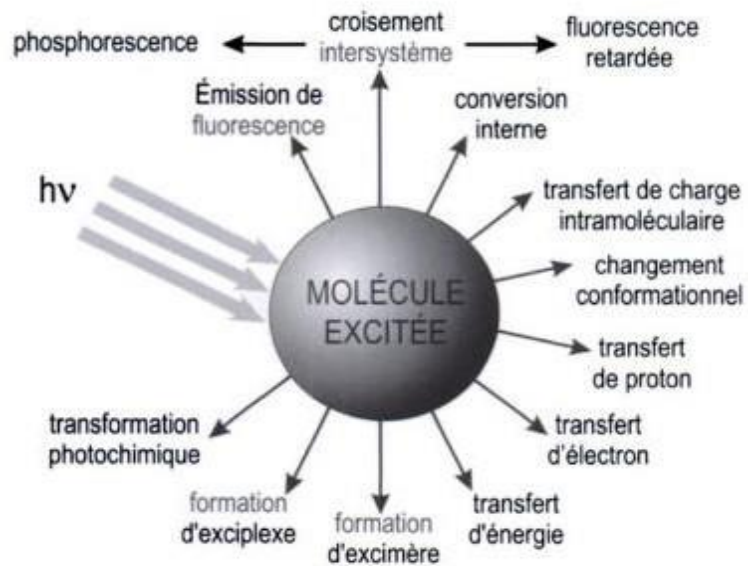
### *2. Phénomène de la fluorescence*

Le phénomène de fluorescence est un processus dans lequel un atome absorbe de l'énergie, généralement de la lumière à une certaine longueur d'onde, et réémet immédiatement (ou dans un intervalle de quelques nanosecondes) de la lumière à une autre longueur d'onde.

La fluorescence représente une autre forme de photoluminescence que la phosphorescence.



**Fig 4.1.** Principe de phénomène de fluorescence (Bernard, 2004)



**Fig 4. 2.** Différents processus de fluorescences suite à l'excitation d'une molécule (Bernard, 2004)

### 3. Caractéristiques des molécules fluorescentes

La plupart des molécules qui fluorescent sont cycliques et rigides. On les nomme « des fluorophores » ou « fluorochromes ». Ceux-ci sont caractérisés par plusieurs critères tels :

- les longueurs d'onde de leurs pics d'excitation et d'émission ;
- leur fluorescence est efficace (autrement dit ; le nombre de photons émis rapporté au nombre de photons absorbés.
- la durée de vie de leur état excité est bien déterminée d'une molécule à une autre.

### 4. Description du principe (diagramme de Jablonski)

La spectroscopie de fluorescence s'appuie sur le phénomène de luminescence, à savoir, le rayonnement émis par des molécules qui, après avoir été excitées par une onde électromagnétique, retournent à leur niveau d'énergie inférieur. Deux formes de la luminescence selon la nature de l'état excité peuvent être citer : la fluorescence et la phosphorescence.

Le **diagramme de Jablonski** permet ainsi de visualiser ces phénomènes.

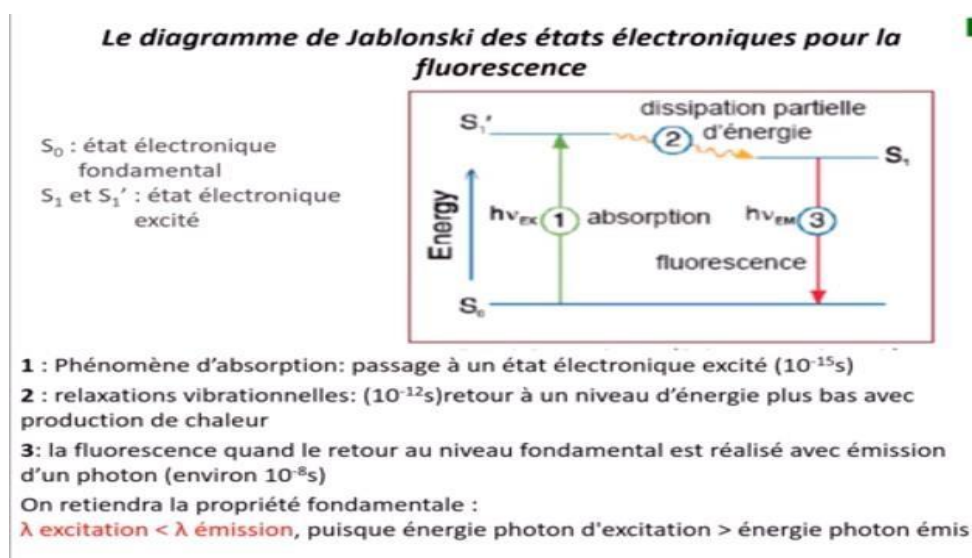
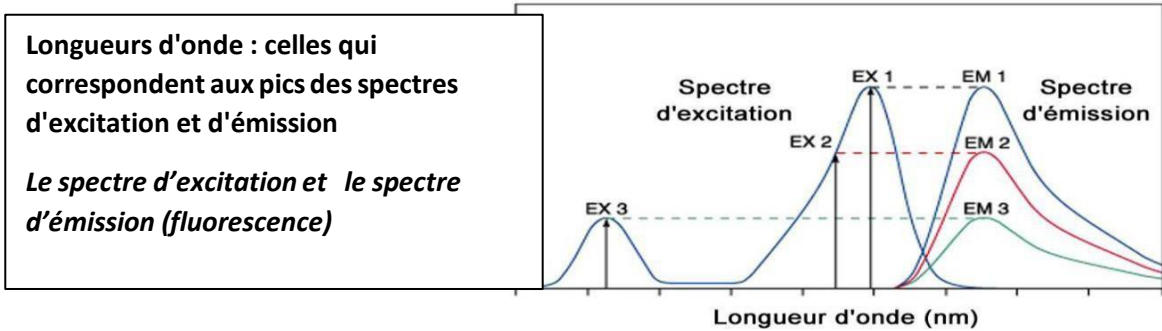


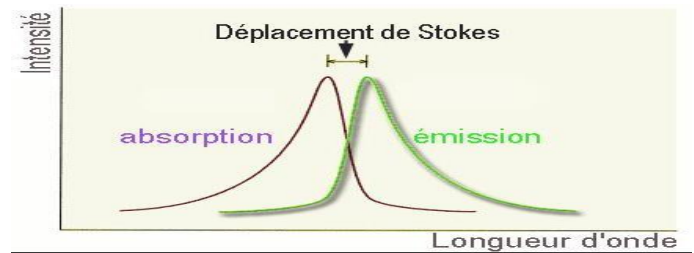
Fig 4. 3. Diagramme de JABLONSKI (Bernard, 2004)

**5. Comparaison de spectres d'émission et d'excitation**



- **Déplacement de Stokes**

Se définit par la différence entre le maximum d'excitation et d'émission est appelée le déplacement de Stokes.



**6. Rendement quantique**

Le rendement quantique de fluorescence est le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité absorbée (ou le rapport entre les photons émis et les photons absorbés).

Soit:

$\Phi_f$ : le rendement quantique de fluorescence

$I_f$ : l'intensité de fluorescence

$I_a$ : intensité absorbée

$I_0$ : l'intensité incidente

$I$ : l'intensité transmise

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

**7. Instrumentation**

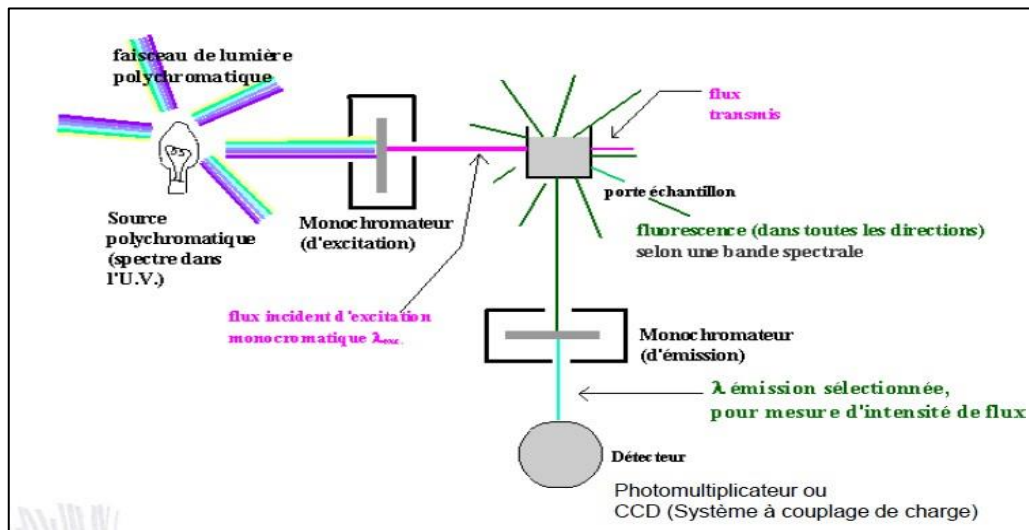
Le composé fluorescent ou l'analyte se comporte comme une source qui irradie dans toutes les directions. Effectivement, l'appareil recueille généralement la lumière émise suivant un axe qui est perpendiculaire au faisceau de la lumière en provenance de la source

excitatrice.

La source excitatrice est souvent constituée par une lampe à arc xénon de 150 à 800 watts. La mesure de l'intensité lumineuse est faite par un photomultiplicateur ou une photodiode. Le solvant, la température, le pH et la concentration sont autant de paramètres qui interviennent sur les intensités de fluorescence. Certains gaz à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre sont dosés à partir de leur fluorescence rétrodiffusée, induite par excitation d'une très courte impulsion (1 ms) d'un puissant laser monochromatique qu'il est possible d'accorder sur une longueur d'onde spécifique du composé recherché (dispositif appelé lidar).

Deux types d'appareils en fluorescence sont proposés par les constructeurs :

- les fluorimètres à rapport de fluorescence,
- les spectrofluorimètres.



**Fig 4.5.** Appareillage simple en spectrométrie de fluorescence

## 8. Domaines d'application

L'utilisation de la fluorescence s'est accrue de façon exponentielle ces dernières années grâce à sa grande sensibilité, en particulier en biologie. Ses applications sont nombreuses comme :

- Mise en évidence directe d'espèces intrinsèquement fluorescentes.

#### Chapitre 4. Spectrométrie par luminescence

- Caractérisation et quantification à l'aide de sondes fluorescentes (molécules neutres, cytofluorimétrie, sondes à ADN, contrôle sang, urine...), exploration de la matière telle que l'information sur polarité, viscosité, pH.

-d'autres applications pratiques telles que capteurs optiques, chimiques, biocapteurs, marquage des billets de banque, lasers à colorants, peintures anti-collision (des avions) ...

Les applications en chimie analytique concernent surtout les domaines où il est important d'avoir une empreinte pour comprendre un phénomène ou un processus (chauffage....) tels que les aliments comme des huiles végétales par exemple. indéniablement, la fluorescence est prometteuse pour définir des marqueurs de la qualité nutritionnelle des aliments.

# **Chapitre 5 : Spectrométrie RMN**

### 1. Définition de la Spectroscopie RMN

La RMN est une technique d'analyse qui permet de lever le voile sur toute la molécule organique en déterminant sa structure. Différentes spectroscopie RMN selon l'atome étudié peuvent être distinguées. La plus fréquemment étudiée est celle de l'atome d'hydrogène.

- **Phénomène d'RMN**

RMN signifie Résonance magnétique nucléaire RMN est un paramètre qui concerne certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire, et placés dans un champ magnétique.

Le phénomène de résonance magnétique du proton correspond **au transfert de proton** d'un niveau d'énergie à un autre sous l'effet d'un champ magnétique.

Il existe plusieurs types de RMN. La plus fréquemment étudiée est la RMN du proton, qui se limite à l'étude des noyaux d'atomes d'hydrogène qui sont désignés sous terme de "proton" car ils sont constitués d'un seul et unique proton. Elle est particulièrement intéressante en raison de l'abondance d'atomes d'hydrogène dans les molécules organiques.

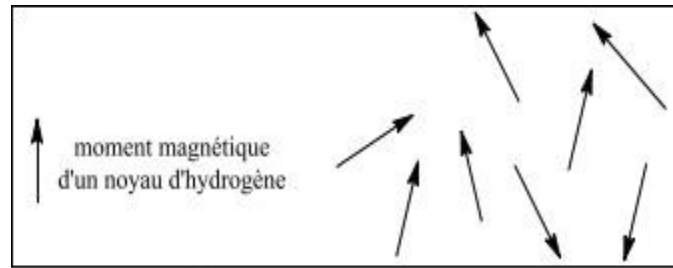
Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des protons + neutrons (= nucléons) d'un atome. La RMN concerne généralement les noyaux avec un nombre de spin = 1/2 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Il est possible d'utiliser la RMN du proton ( $^1\text{H}$ -RMN), celle du carbone ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou celle du phosphore ( $^{31}\text{P}$ -RMN).

Isotope	Spin
$^1\text{H}$	1/2
$^2\text{H}$	1
$^3\text{H}$	1/2
$^3\text{He}$	1/2
$^6\text{Li}$	1
$^7\text{Li}$	3/2
$^9\text{Be}$	3/2
$^{10}\text{B}$	3
$^{11}\text{B}$	3/2
$^{13}\text{C}$	1/2
( $^{14}\text{N}$ )	1
$^{15}\text{N}$	1/2
$^{17}\text{O}$	5/2
$^{19}\text{F}$	1/2
$^{21}\text{Ne}$	3/2
$^{23}\text{Na}$	3/2
$^{25}\text{Mg}$	5/2
$^{27}\text{Al}$	5/2
$^{29}\text{Si}$	1/2
$^{31}\text{P}$	1/2
$^{33}\text{S}$	3/2
$^{35}\text{Cl}$	3/2
$^{37}\text{Cl}$	3/2

### 2. Principe de spectroscopie RMN

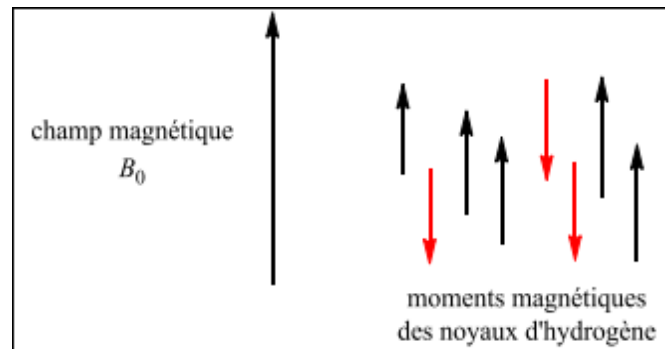
Le principe de la RMN consiste à soumettre une molécule à un champ magnétique, qui se comporte comme un aimant. Ce dernier à le rôle de faire résonner les atomes d'hydrogène de la molécule. Les différentes fréquences de résonance des atomes d'hydrogène sont consignées dans un graphique permettant de déterminer la structure de la molécule.

Un aimant possède un moment magnétique que l'on peut symboliser par un vecteur. En l'absence de champ magnétique les moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire (figure 5.1).



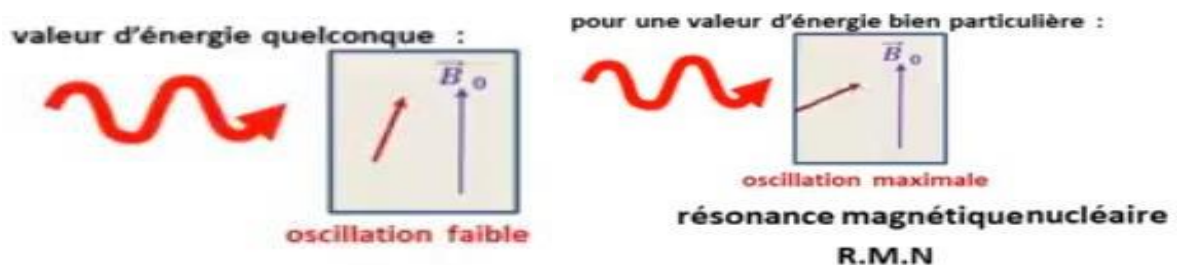
**Fig 5.1.** Moments magnétiques orientés aléatoirement (Rouessac et al., 2004).

Les moments magnétiques des noyaux s'orientent lors de leur soumission à un champ magnétique. Deux orientations sont possibles : parallèlement au champ magnétique ou anti-parallèlement (Figure 5.2).



**Fig 5.2.** En présence d'un champ magnétique extérieur (Rouessac et al., 2004).

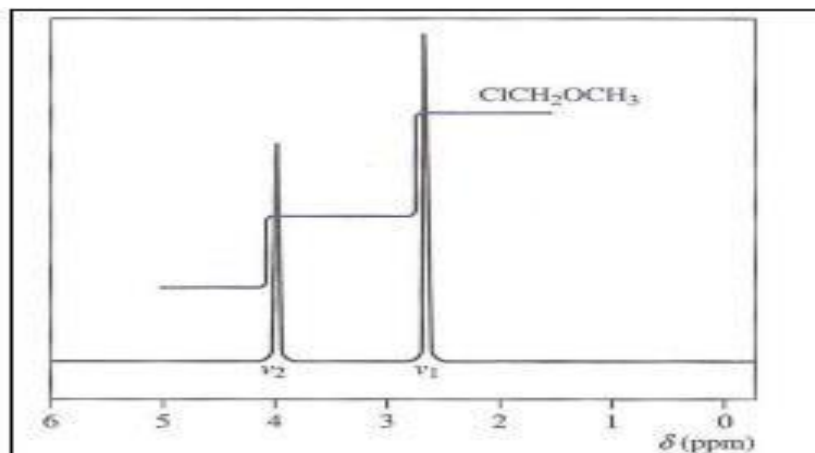
Cette fréquence dépend du champ magnétique appliqué. Selon les spectromètres RMN utilisés la fréquence de résonance du proton ne sera donc pas la même. L'ordre de grandeur reste pourtant le même : celui des fréquences des ondes radio (figure ci-après).



**Fig 5.3.** Chaque orientation possède sa propre énergie (Rouessac et al., 2004).

### 3. Allure générale d'un spectre RMN

Voici un exemple de spectre RMN :



**Fig 5.4** : exemple de spectre RMN (Rouessac et al., 2004)

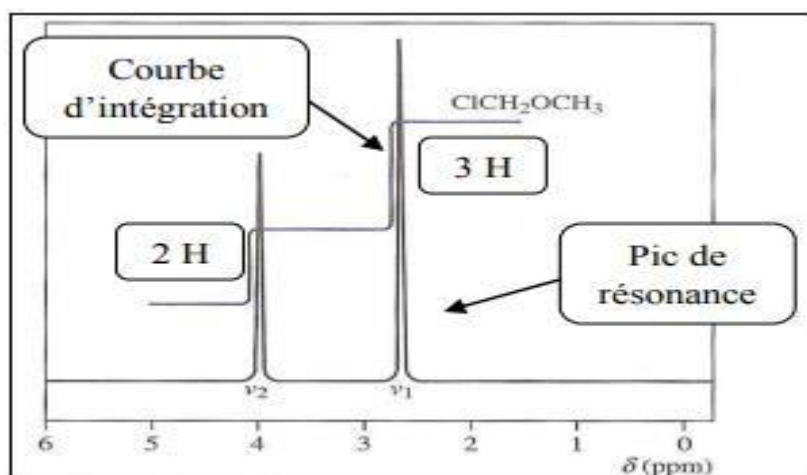
L'axe des ordonnées est représenté par l'intensité du signal RMN en unités arbitraire, l'axe des abscisses représente le déplacement chimique, en partie par million (ppm) et qui est une grandeur liée à la fréquence de résonance des protons.

**3.1. Déplacement chimique** : Les spectres ne sont pas gradués en fonction de la fréquence de résonance car la fréquence de résonance de chaque proton dépend du champ magnétique appliqué, qui dépend de l'appareil utilisé. Pour avoir des spectres universels il faut une grandeur qui ne dépend pas de ça. Cette grandeur est le déplacement chimique.

**3.2. Courbe d'intégration** : on peut trouver une courbe appelée courbe d'intégration associée à la plupart des spectres. la hauteur de cette courbe est proportionnelle à l'aire se trouvant sous les pics du spectre. Elle est importante car elle permet de savoir le nombre d'hydrogène résonant à chaque fréquence, puisque l'aire sous un pic est proportionnelle aux nombres de protons résonants.

#### **Méthode :**

- on mesure la hauteur de chaque pic de la courbe d'intégration.
- en connaissant le nombre total d'atomes d'hydrogène au sein de la molécule, on remonte au nombre d'atomes d'hydrogène correspondant à chaque pic (figure 5.5).



**Fig 5.5.** Courbe d'intégration (Rouessac et al., 2004)

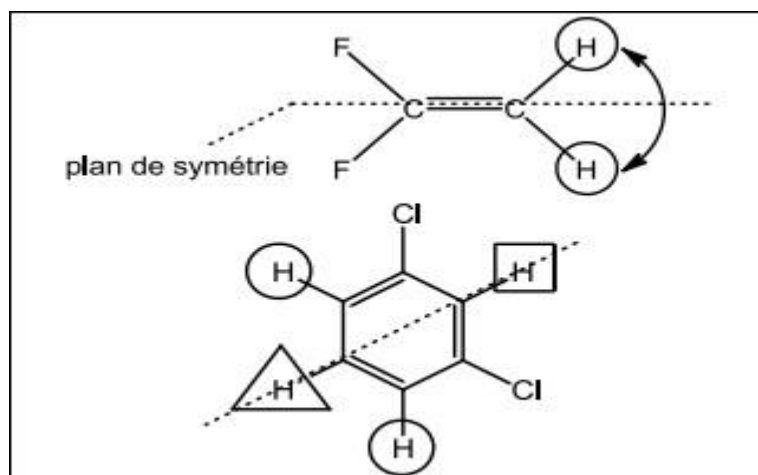
### 3.3. Notion de H équivalents

**Equivalence magnétique** : Deux hydrogènes sont dits magnétiquement équivalents s'ils résonnent rigoureusement à la même fréquence (même déplacement chimique)

**Comment reconnaître des atomes d'hydrogène magnétiquement équivalents en regardant la structure moléculaire ?**

Ils doivent être chimiquement équivalents (condition nécessaire mais pas suffisante en réalité).

**Equivalence chimique** : Deux atomes d'hydrogène sont chimiquement équivalents s'ils ont le même environnement chimique. Il faut qu'il existe une opération de symétrie qui permet de les échanger. On pourra travailler avec les modèles moléculaires pour que les élèves identifient les atomes équivalents (figure 5.6).



**Fig 5.6 :** exemple d'atomes d'hydrogène équivalent chimiquement (Rouessac et al., 2004).

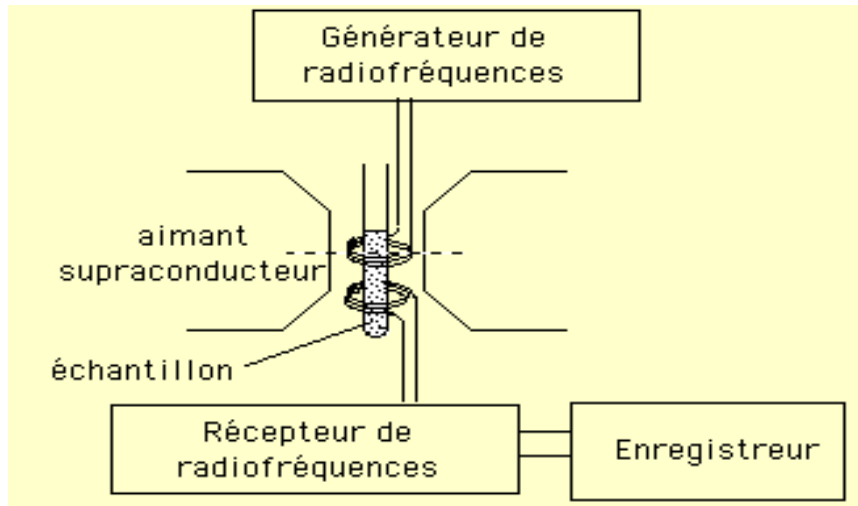
#### 4. Appareillage

Un spectromètre de RMN est composé généralement d'un électro-aimant à l'origine de  $B_0$ . L'élévation de température nécessite la mise en place d'un circuit de refroidissement de l'aimant. Pour des champs importants (2 tesla et plus), on a recours à des cryoaimants utilisant des bobines supraconductrices refroidies à l'hélium liquide (**Fig 5.7.**).

Actuellement, les appareils en majorité utilisent des électro-aimants dont les champs magnétiques valent 1,409 ; 2,115 ; 5,872 et 11,743 correspondant respectivement à 60, 90, 250 et 500 MHz, pour la résonance du proton. D'ailleurs, on utilise très souvent cette grandeur, la fréquence, pour caractériser l'appareil. Dans ces appareils à onde continue, la fréquence est fixée par l'émetteur et on fait un balayage en faisant varier très légèrement le champ  $B_0$  à l'aide d'un variateur de champ pour obtenir la résonance.

En outre, un besoin de sensibilité et de résolution plus élevées ont conduit à la production d'appareils de fréquence allant de 200 à 500 et même 600 MHz. Pour tous les appareils de fréquence supérieure à 100 MHz, on utilise des cryoaimants. Le spectromètre est aussi équipé d'un émetteur-récepteur de radiofréquence : ceci est une bobine alimentée par un courant alternatif. Le tube contenant l'échantillon est placé dans une

sonde, qui contient les bobines d'émission et de réception, et sur un support spécial « spinner » qui permet de faire tourner l'échantillon autour de son axe vertical dans le but d'améliorer l'homogénéité du champ.



**Fig 5.7.** Composition d'un spectromètre RMN.

### 5. *Quelques applications en Biologie*

#### **Application médicale : l'IRM**

Le principe de la RMN est également exploité en domaine médicale. Cette technique est plus connue sous le nom d'Imagerie par **R**ésonance **M**agnétique.

De la même manière que la molécule en RMN, le patient est placé au sein d'une grande bobine produisant un fort champ électromagnétique (du même ordre que pour la RMN sur les molécules) et les protons contenus par le corps humain sont excités. Cela permet d'obtenir une image ressemblant à une radiographie (rayons X), avec des zones sombres et d'autres plus claires selon la forme des tissus humains étudiés. Il est possible de caractériser par cette méthode diverses pathologies (inflammations, œdèmes, tissus cancéreux etc.).

#### **La RMN in vivo**

C'est une méthode non invasive et non traumatique qui donne accès à un certain nombre de paramètres : elle permet par exemple la mesure du pH intracellulaire, l'identification de composés organiques et la mesure de leurs concentrations, l'étude cinétique de leur métabolisme ... Elle permet des études sur des tissus, voire sur l'animal entier (souris, rat) placé dans un système de contention adéquat. Diverses molécules sont ainsi accessibles, comme par exemple

## **Chapitre 5. Spectrométrie de Résonance magnétique nucléaire**

: les composés phosphorés (nucléotides -, phospholipides - phosphatidyl-choline, phosphatidyl-éthanolamine -, acides aminés, neuromédiateurs - GABA, ...

# **Chapitre 6 : Spectrométrie de masse**

### **1. Définition et objectifs de la spectrométrie de masse**

Il s'agit d'une technique d'analyse qualitative et quantitative permettant la détermination de la masse moléculaire des molécules organiques, la caractérisation de leurs structures, ainsi que le quantification (dosage), en se basant sur une séparation des atomes ou des molécules sous forme d'ions suivant leur masse.

Un spectromètre de masse est un détecteur universel très sensible. Sa gamme linéaire va de 3 à 7 ordres de grandeur, d'où la possibilité d'obtenir une quantification fiable sur un domaine large.

C'est un appareil de très grande sensibilité et sélectivité qui permet l'analyse des échantillons minéraux, organiques, bioorganiques, quelque soit leur état physique : gazeux, liquide ou solide.

La caractérisation peut être réalisée en comparant le spectre de masse d'une molécule avec des banques des spectres, ainsi, il est possible d'identifier la molécule.

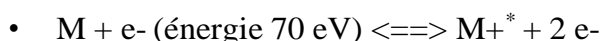
Lors de l'utilisation d'un analyseur haute résolution, la spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Les ions peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse (dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision). L'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des ions.

### **2. Principe de la technique**

Le processus d'ionisation est la clé de cette technique d'identification. Ainsi, une petite partie de l'échantillon est transformée en ions.

-Un électron est arraché aux molécules et on obtient une espèce qui est à la fois un cation (ion positif) et un radical libre que l'on appelle ion moléculaire,  $M+^*$  :



-L'énergie du faisceau ionisant fragmente l'ion moléculaire par rupture des liaisons, et donne ainsi naissance à des ions positifs de masse plus faible.

-Les ions ainsi résultants sont ensuite accélérés dans un champ électrique et/ou magnétique,

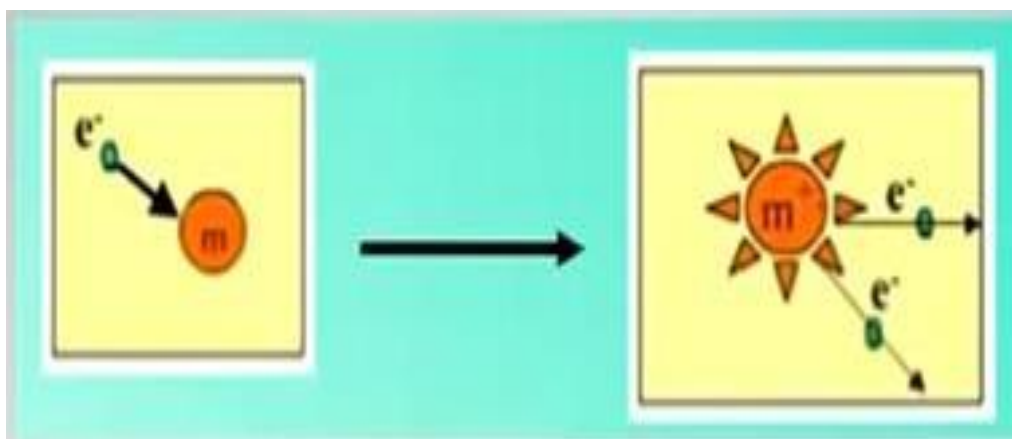
soumis ensuite à des champs électriques et éventuellement magnétiques et leur trajectoire dépendra du rapport  $m/z$  dirigés entre les pôles d'un aimant selon une trajectoire circulaire qui dépend de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

### 3. Description du principe (types d'ionisation)

On peut distinguer plusieurs types d'ionisation suivant la technique utilisée :

#### a) Ionisation par impact électronique IE

C'est la technique la plus anciennement utilisée. Le principe repose sur le fait qu'un faisceau d'électrons très énergétique (70 eV) percute les molécules de l'échantillon en phase vapeur, ils cèdent un électron d'une molécule de l'analyte en créant ainsi un radical cation (ion moléculaire). On peut estimer l'énergie d'ionisation des composés organiques < 15 eV, l'excédent d'énergie reçue par la molécule (50 – 15) eV est dissipé par rupture de liaisons covalentes ( $E = 3$  à 10 eV) : et c'est la fragmentation.



**Fig 6.1.** L'impact électronique

#### b) Ionisation chimique CI

C'est une technique qui ressemble à l'impact électronique. La différence entre les deux techniques repose sur le fait d'introduire un gaz réactif qui sera soit l'ammoniac, le méthane ou l'isobutane, en général. Ce gaz est ionisé par la suite dans la source. Les molécules de l'analyte entrent en collision avec les molécules ionisées du gaz ( $\text{CH}_4^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9^+$ ,...), ce qui peut conduire à une ionisation secondaire par transfert de proton en créant ainsi un ion  $[\text{M}+1]^+$  :  $\text{M} + \text{H}^+ \rightarrow [\text{M}+1]^+$

L'excédent d'énergie est en général < 5 eV, trop faible pour produire la fragmentation.

Ceci implique une forte abondance d'ions moléculaires qui sont ainsi facilement détectés.

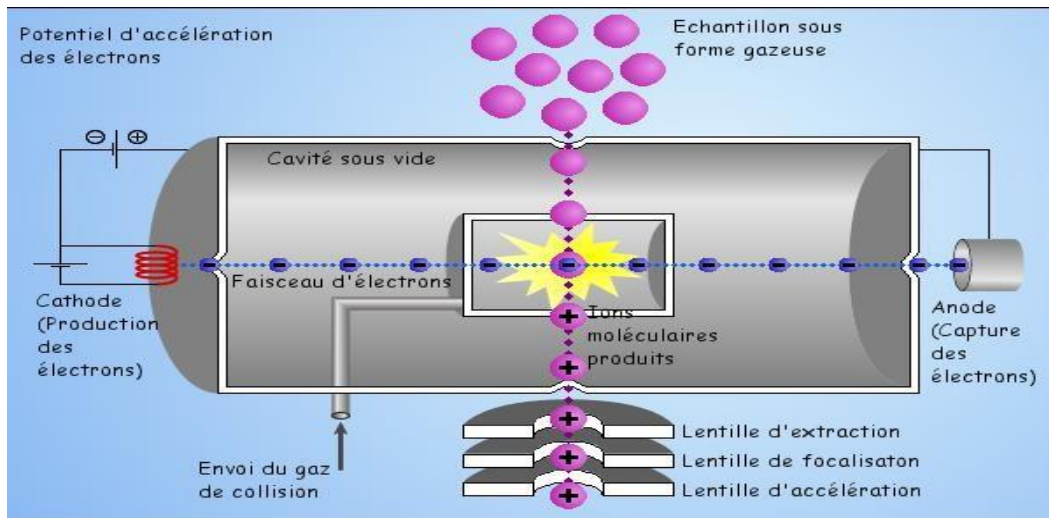
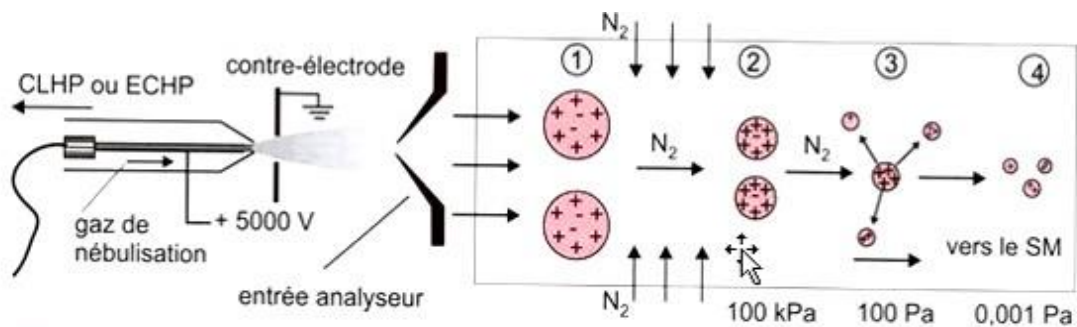


Fig 6.2. L'ionisation chimique

**C) Ionisation par l'intermédiaire d'un spray**

Cette technique se base sur le fait que la phase liquide est transformée en un fin brouillard. Les molécules du brouillard sont ensuite ionisées par un champ électrique (capillaire métallisé portée à un potentiel élevé), par des photons (10 eV) ou par ionisation chimique (par des molécules ionisées par décharges corona avec une pointe portée à haute tension). L'avantage de cette méthode est la capacité d'obtenir des ions multichargés ( $z$  peut dépasser 30). L'accès à des ions de grande masse est assuré puisque c'est le rapport  $m/z$  qui est important.

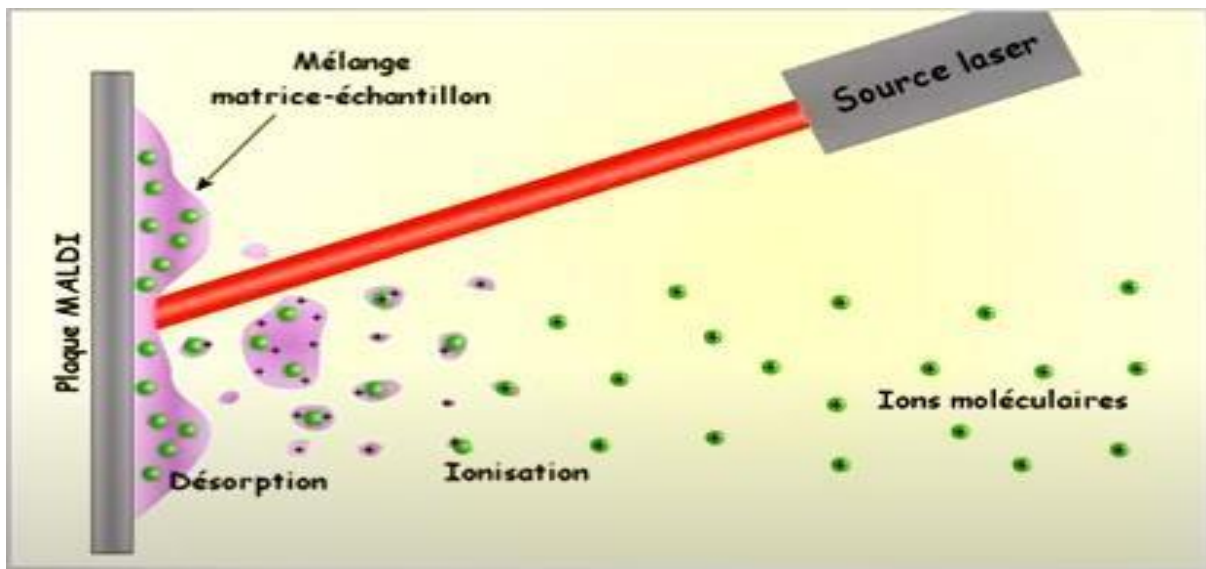


**Figure 16.22** Ionisation à pression atmosphérique par electrospray (« ionspray »). Le capillaire de sortie portée à un potentiel élevé, conduit à un brouillard chargé (1). Les gouttelettes, en s'évaporant, provoquent une augmentation de la densité de charges électriques (2) au point qu'elles explosent en expulsant des molécules de l'analyte porteuses de plusieurs charges (3). Le diazote améliore le processus de concentration (4).

Fig 6.3. Ionisation par l'intermédiaire d'un spray

**d) Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)**

Le principe de cette technique porte sur le fait qu'une partie importante des ions produits ne sont pas fragmentés. En effet, afin d'ioniser un mélange matrice/échantillon sur une surface métallique, un faisceau laser est mis en place. Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser, s'excitent et s'ionisent. Ceci peut conduire à la dissociation et le passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon. Elle conduit à la formation d'ions monochargés et multichargés.



**Fig 6.4.** Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

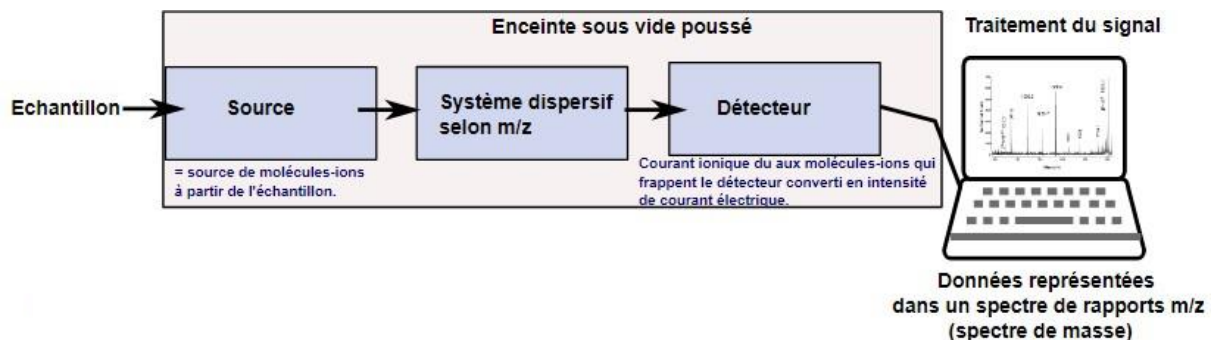
**4. Couplage Chromatographie- SM**

Récemment, la spectrométrie de masse est facilement couplée aux méthodes séparatives telles les chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide. Le comportement chromatographique des molécules, par l'intermédiaire des indices de rétention chromatographique en phase gazeuse par exemple, apporte une dimension supplémentaire pour l'identification de la molécule étudiée. Ces couplages permettent aussi de purifier et concentrer les molécules d'intérêt avant leur arrivée dans la source d'ions et facilitent ainsi leur détection et leur quantification.

### 5. Appareillage

L'objectif de la spectrométrie de masse est la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'analyte. Afin d'atteindre ce résultat, la première étape est de transformer une très petite quantité de l'échantillon à analyser en ions par une des techniques d'ionisation (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Les ions qui en résultent sont soumis ensuite, sous vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur *rapport masse /charge*, donc généralement leur nature (**figure.5.1**). La succession d'étapes dans ce qui suit explique la technique :

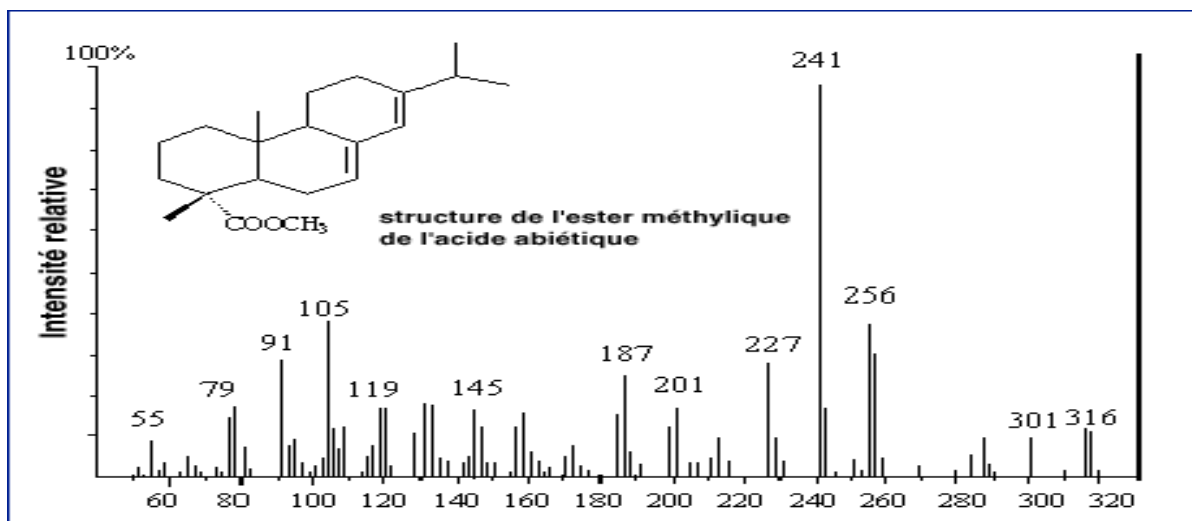
- *Ionisation* : l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est ionisé dans la *source* de l'appareil. De nombreux procédés sont mis en place pour cette première étape. À cet effet, tout composé formé de molécules peut conduire à un mélange statistique d'ions de fragmentation.
- *Accélération* : Afin d'augmenter leur énergie cinétique, les ions formés sont extraits de cette partie de l'appareil, ensuite focalisé et accélérés *par* des lentilles électroniques,
- *Séparation* : A ce stade, les ions sont filtrés en fonction de leur rapport masse/charge par l'*analyseur*, certains appareils combinant plusieurs types d'analyseurs en série.
- *Détection* : les ions terminent leur course après leur séparation, en frappant le capteur d'un *détecteur* dont le signal est relative aux charges des ions reçus.
- *Affichage du spectre de masse* issu du traitement du signal envoyé par le détecteur.



**Fig 6.5.** Spectromètre de masse (Perrin, 2022)

**6. Interprétation des données spectrales**

La représentation sous forme graphique de l'abondance des ions, sur la base leur rapport masse/charge (l'axe des abscisses) constitue le spectre de masse. Celui-ci traduit la fragmentation, à l'échelle statistique, du très grand nombre d'espèces individuelles qui composent tout échantillon soumis à cette analyse.



**Fig 6.6.** Spectre de l'ester méthylique de l'acide abiétique

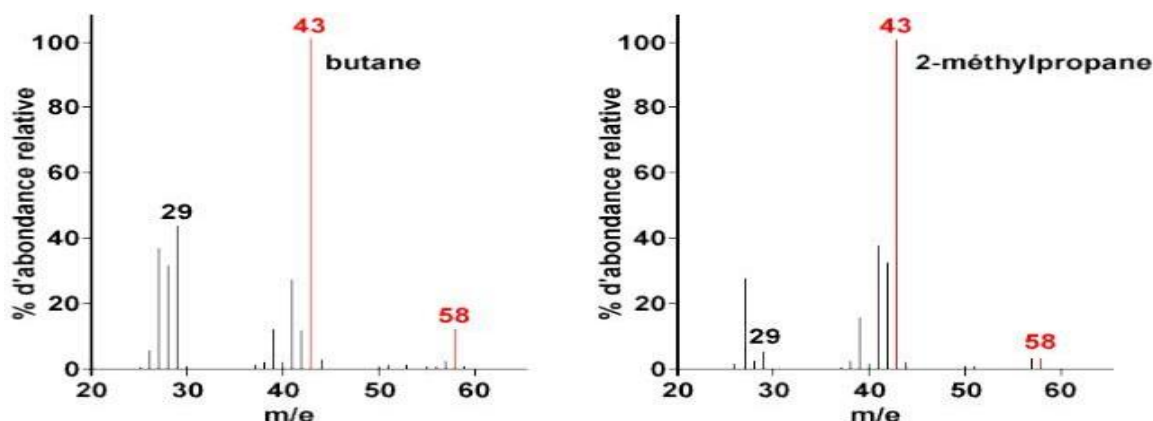
**Pic de base :** le plus intense, correspond à l'ion le plus abondant.

**Pic moléculaire (pic parent) :** correspond à l'ion de nombre de masse = masse molaire de la molécule.

(Dans cet exemple, la masse molaire = 316 g/mol, puisque  $z = 1$ )

**Pics fragments :** les différents pics correspondant aux différents ions fragmentés

**Autres exemples**



**Figure 10.** Spectres de masse du butane  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  et du 2-méthylpropane  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ , des isomères dont les masses molaires = 58 g/mol.

**Fig 6.7.** Quelques exemples de spectres de masse.

# **Chapitre 7 : Diffraction des rayons x**

### **1. Définition et objectif de la technique**

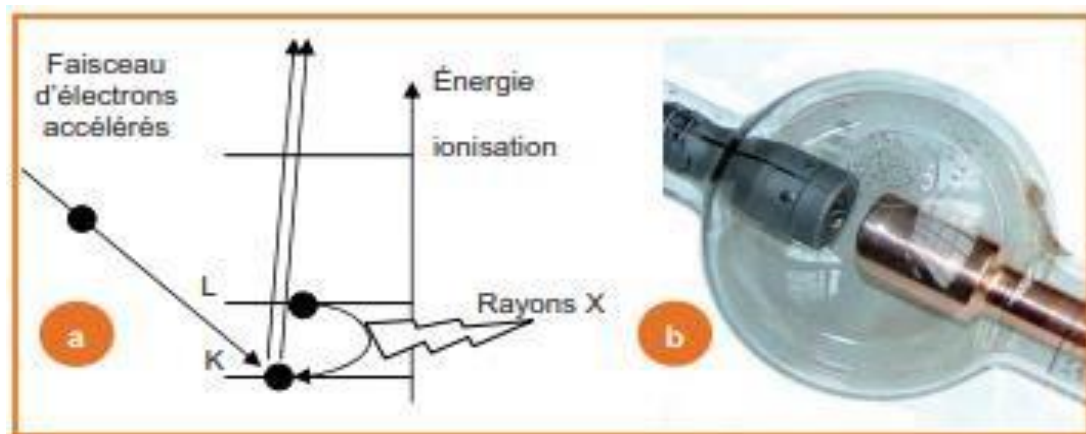
Les rayons X sont considérés comme pilier principal de différentes techniques d'analyse comme la radiographie, la spectroscopie et la diffractométrie. Ces radiations électromagnétiques se situent dans une gamme spectrale dont les longueurs d'ondes sont de l'ordre de l'angström (Å).

La diffraction des rayons X est une méthode d'analyse non destructive pour la caractérisation et la détermination quantitative des différentes formes cristallines présentes dans un solide. Elle est la méthode généralement utilisée pour identifier la nature et la structure des produits cristallisés. En outre, cette technique ne s'applique qu'à des milieux cristallins (roches, cristaux, minéraux, pigments, argiles...) présentant les caractéristiques de l'état cristallin, autrement dit un arrangement périodique, ordonné et dans des plans réticulaires tridimensionnels des atomes constitutifs. Les atomes s'organisent donc en plans réticulaires plus ou moins denses qui sont désignés par leurs coordonnées (h, k, l) dans un système de repérage de l'espace.

### **2. Principe**

#### **2.1. Production des rayons X pour la diffraction**

La production des rayons X est un processus identique à celui de l'imagerie médicale. Des électrons arrachés à un filament de tungstène chauffé électriquement sont accélérés sous l'effet d'un champ électrique intense (50 kV) pour percuter une anticathode (ou anode) qui peut être de nature différente selon les applications visées (figure 7.1).



**Fig 7.1 . (a) Phénomènes mis en jeu lors de la production des rayons X dans un tube (b) (Aronica, 2010)**

## **2.2. Principe de la diffraction des rayons X**

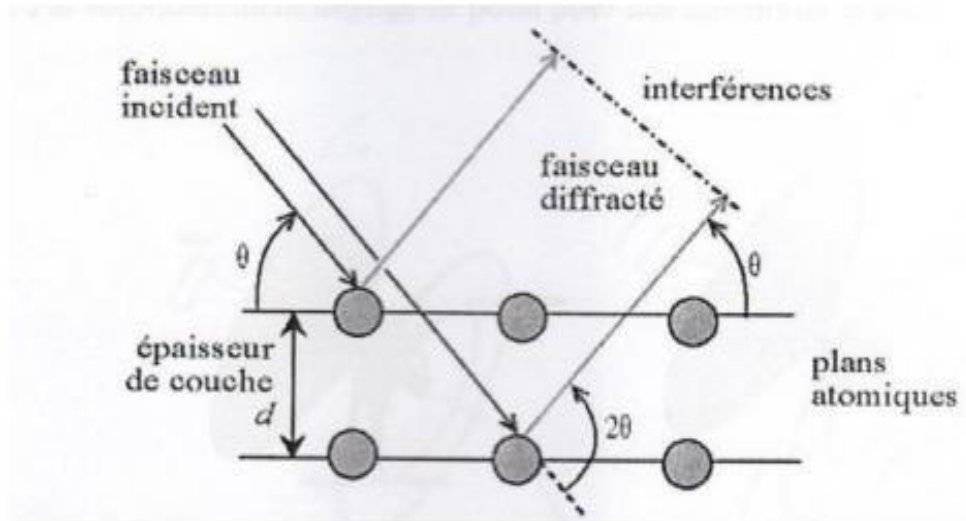
La diffraction des rayons X permet de mesurer l'intensité des rayons X diffractés par un matériau. La technique de diffraction des rayons X repose sur le fait qu'un réseau cristallin est composé d'un empilement de familles de plans réticulaires parallèles et équidistants. Le faisceau de rayons X incident est réfléchi d'une façon partielle par le premier plan. Le faisceau non réfléchi tombe sur le deuxième plan pour être à nouveau partiellement réfléchi. Et ainsi de suite. Pour que les ondes diffusées par les différents plans soient en phase et que l'intensité totale de l'onde diffusée soit importante, il faut :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (\text{relation de Bragg})$$

où  $d$  est la distance des plans réticulaires,  $\lambda$  la longueur d'onde et  $n$  l'ordre de la réflexion. Cette relation, montre qu'il suffit de mesurer les angles de Bragg ( $\theta$ ) pour déterminer les dimensions et la forme de la maille élémentaire du cristal. Les amplitudes des ondes réfléchies permettent de déterminer la structure atomique du motif

## **2.3. Loi de Bragg**

Si l'on calcule les directions dans lesquelles on a du signal, on s'aperçoit que l'on obtient une loi très simple: si l'on trace des plans imaginaires parallèles passant par les atomes, et si l'on appelle  $d$  la distance entre ces plans (ou « distance interréticulaire »), alors les interférences sont constructives si  $2 d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl} = n \cdot \lambda$  (II.1) Où  $d_{hkl}$  est la moitié de la déviation,  $n$  est un nombre entier appelé « ordre de diffraction », et  $\lambda$  est la longueur d'onde des rayons X (souvenez- vous que l'on travaille en monochromatique). C'est **la loi de bragg**.



**Fig 7.2.** Loi de Bragg donnant les directions où les interférences sont constructrices (Jeffrey, 2000)

#### **4. Traitement des spectres**

Un diagramme de diffraction est caractéristique d'un composé. La position angulaire  $\theta_{hkl}$  des raies de diffraction obéit à la relation de Bragg. Comme on connaît des angles, on déduit ainsi les distances inter-réticulaires  $d_{hkl}$  et on peut réaliser une analyse qualitative des phases en présence en les comparant des distances interréticulaires calculées avec celles stockées dans les bases de données, si le composé est déjà connu et répertorié.

A partir du diffractogramme, on peut avoir directement les valeurs de l'intensité diffusée en fonction de  $2\theta$ . Le temps d'acquisition d'un diffractogramme est d'environ  $4h/\text{échantillon}$ . Dans ces diffractogrammes, nous pouvons extraire la distance  $d_{001}$  à partir de la position de premier pic, en utilisant la loi de Bragg :  $n\lambda = 2d \sin\theta$  avec longueur d'onde  $\lambda=1,5418\text{Å}$ .

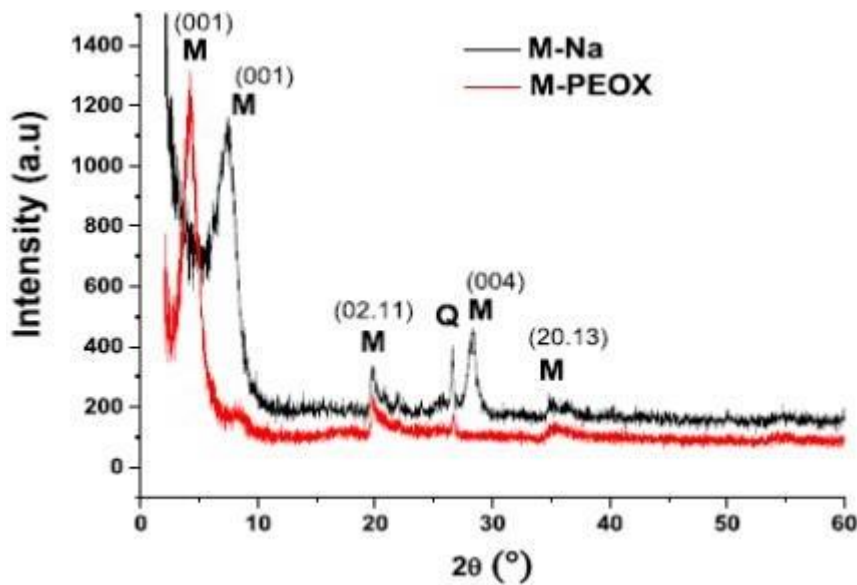
#### **Exemple d'application :**

Ci-dessus, des exemples sur l'application de l'analyse DRX sur l'étude des matériaux

#### **Spectre DRX d'une argile sodique (M-Na) et d'une argile intercalée par un polymère (M-PEOX) :**

Dans la figure 7.3, le spectre DRX montre les différents plans et les pics de montmorillonites (M) existant dans les échantillons. On constate aussi dans le spectre, que le premier pic qui

correspond au plan (001) de M-PEOX se décale vers les petits angles par rapport au M-Na. Cela confirme le processus d'intercalation

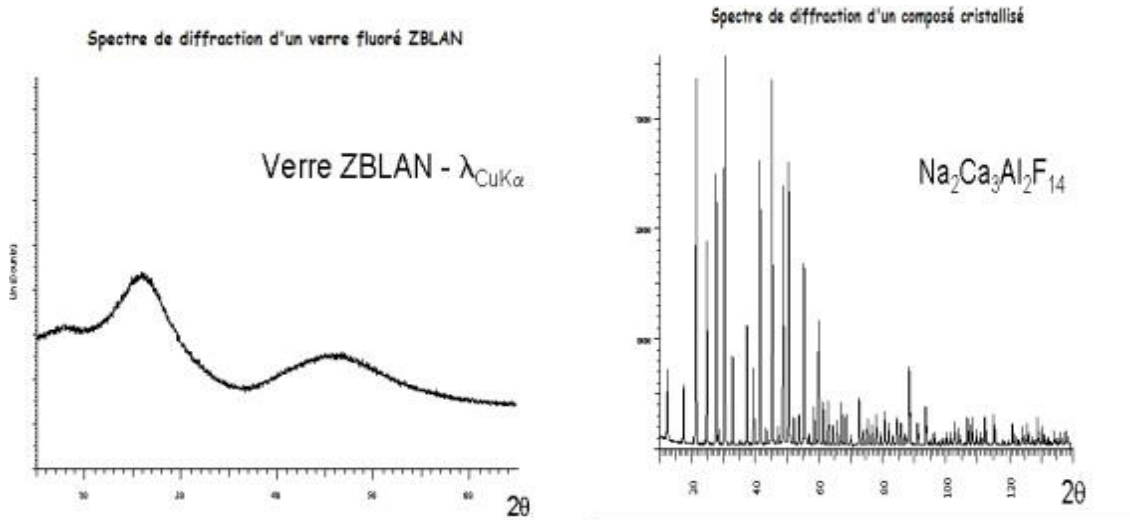


**Fig 7.3.** Spectre DRX d'une argile sodique et argile intercalée par un polymère PEOX.

### Spectres de diffraction d'un composé cristallisé et amorphe

**La figure 7.4** illustre un spectre DRX d'un verre fluoré et d'un composé cristallisé.

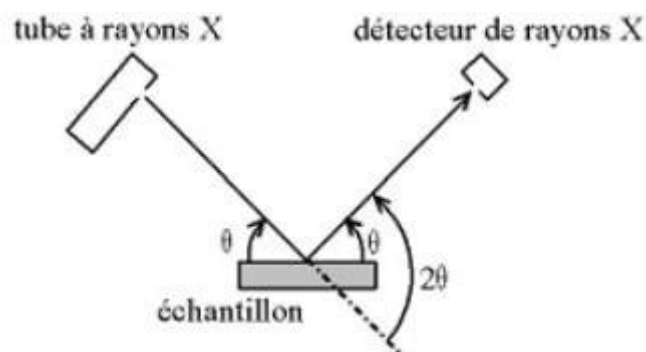
On constate l'absence de raies discrètes de diffraction sur le spectre du verre (les larges bosses visibles sont créés par des distributions de raies liées au désordre dans le solide). Cette dernière situation est évidemment très différente de celle rencontrée dans un solide périodique comme  $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{F}_{14}$  dont le spectre de diffraction est particulièrement fourni en raies discrètes et fines.



**Fig 7.4.** Spectre DRX de verre ZBLAN et Na<sub>2</sub>Ca<sub>3</sub>Al<sub>2</sub>F<sub>14</sub>.

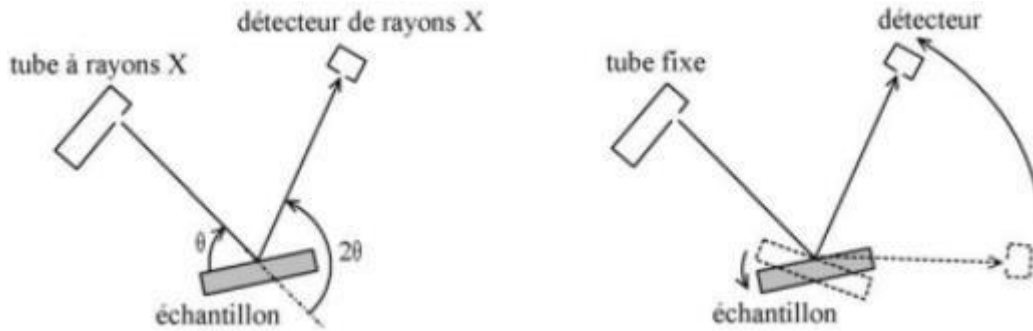
### 5. Instrumentation : Diffractomètre Bragg- Brentano

C'est le montage le plus fréquemment utilisé. L'échantillon se présente comme une plaquette ; en effet, cela peut être une plaquette solide, ou bien une coupelle rempli de poudre avec un niveau bien plan. Dans la configuration dite « », l'échantillon est horizontal et immobile, le tube et détecteur de rayons X bougent symétriquement. Si  $2\theta_{hkl}$  est la déviation du faisceau, l'angle entre l'horizontale et le tube vaut donc  $\theta_{hkl}$  de même que l'angle entre l'horizontale et le détecteur, d'où le nom du montage.



**Fig 7.5.** Définition des angles dans le montage de Bragg-Brentano (Klug et Alexander, 1974).

Le tube à rayon X est la partie la plus lourde, pour cela, il est préférable souvent de garder le tube fixe et faire bouger l'échantillon et le détecteur. On a donc le montage dit ( $\theta$ hkl,  $2\theta$ hkl ), puisque le plan de l'échantillon fait un angle  $\theta$  avec le faisceau incident, et le détecteur fait un angle  $2\theta$ hkl avec le même faisceau.



**Fig 7.6.** Montage de  $\theta$ hkl et  $2\theta$ hkl (Klug et Alexander, 1974).

Le montage de Bragg- Brentano à le rôle de capter plus d'intensité ; en effet, le faisceau sort divergent du tube, et du fait de la géométrie, il reconverge sur le détecteur. Effectivement, la convergence n'est pas complète (il faut un échantillon courbe et non pas plan), on parle donc de focalisation approchée (parafocussing). Il y a au moins deux moteurs, un pour positionner le détecteur, et l'autre pour le porte échantillon ( $\theta$ hkl,  $2\theta$ hkl )ou pour le tube de rayons X( $\theta$ hkl,  $2\theta$ hkl ).ce dispositif s'appelle un« goniomètre», puisqu'il sert à régler les angles d'incidence et de diffraction.

# **Chapitre 8 : Microscopie électronique**

### ***Introduction***

La microscopie représente l'observation d'un échantillon placé préalablement dans une préparation microscopique de forme plate et de faible épaisseur à travers le microscope. La microscopie rend visibles des éléments qui étaient invisibles à l'œil nu, soit par leur taille, soit par leurs couleurs.

La microscopie est divisée en deux grands types :

- \* La microscopie optique
- \* La microscopie électronique.

### ***1. Définition et principe***

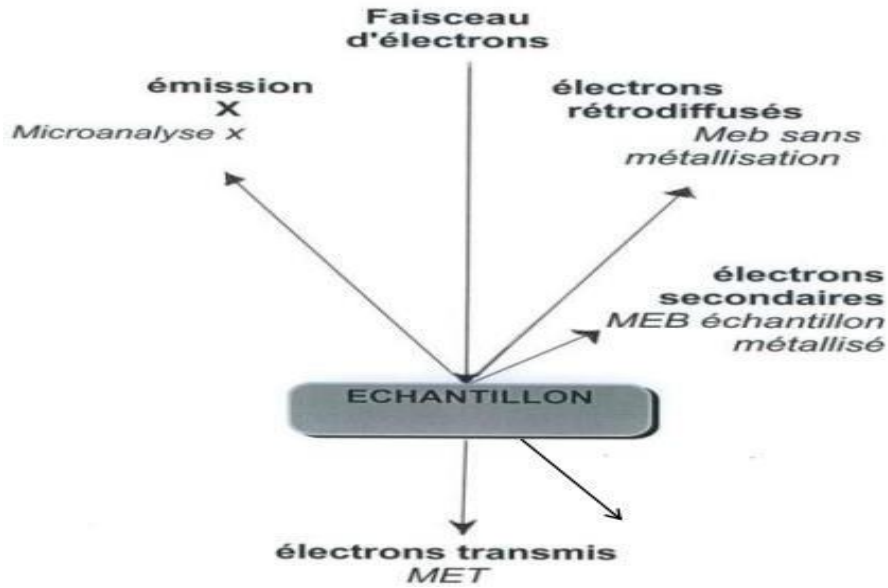
Un microscope électronique (ME) est un type de microscope qui repose sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et produire ainsi une image très agrandie.

Le microscope électronique est doté de lentilles électromagnétiques et d'un faisceau d'électrons, alors qu'un microscope optique utilise un faisceau de lumière et des lentilles en verre.

Le **principe** s'appuie sur le fait qu'un faisceau d'électrons est utilisé pour produire une image. L'objet est percuté par ce faisceau d'électrons. Le microscope électronique utilise des lentilles électrostatiques et des lentilles magnétiques pour former l'image.

Les microscopes électroniques ont un pouvoir de résolution supérieur aux microscopes optiques qui utilisent des rayonnements électromagnétiques visibles.

Le ME permet une observation de très haute résolution de l'ultrastructure des cellules eucaryotes et de la structure procaryote. La longueur d'onde d'un faisceau d'électrons est plus courte que celle de la lumière résultant en une meilleure résolution, allant jusqu'à 2 millions de fois.



**Fig 8.1.** Principe du microscope électronique ; interaction électron- matière (**plate-forme imagerie, univ de poitiers**).

## **2. Les différents microscopes électroniques**

- Il existe plusieurs sortes de microscope électronique. Les plus connus sont :
- le microscope électronique en transmission ;
- le microscope électronique à balayage.

### **2.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

#### **2.1.1. Définition**

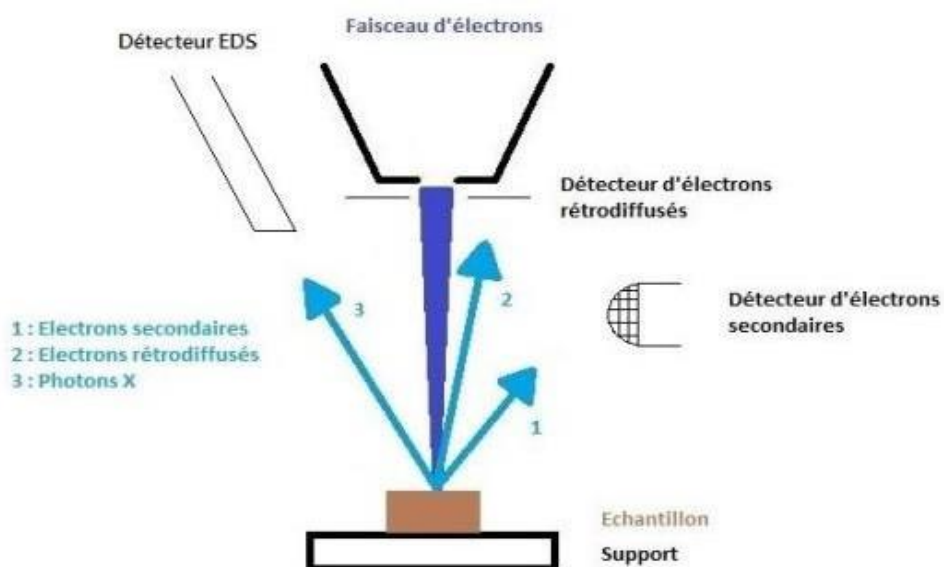
La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de caractérisation capable de créer des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en se basant sur le principe des interactions électrons-matière.



**Fig 8.2.** Photo d'un microscope électronique à balayage (Sephan, 2017)

### 2.1.2. Principe

- Dans une première étape, l'échantillon à analyser est projeté à un faisceau d'électrons.
- plusieurs types d'émissions, peuvent être générés suite à l'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon.
- Les électrons secondaires de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique.
- Il est possible maintenant d'obtenir une cartographie de la zone balayée. en balayant le faisceau sur l'échantillon.
- Les électrons rétrodiffusés donnent une image avec un contraste chimique sur une surface plane.

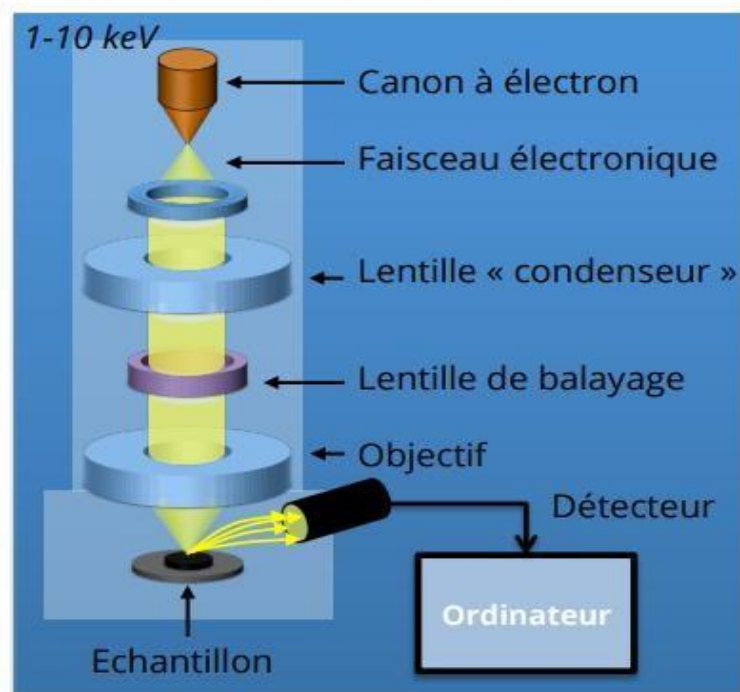


**Fig 8.3.** Principe d'un microscope électronique à balayage (Reimer, 1997).

### 2.1.3. Composition (appareillage)

Un microscope électronique à balayage est constitué principalement par :

- □ une colonne maintenue sous un vide secondaire
- □ une source d'électrons appelée canon et d'un dispositif de haute tension, accélérateur des électrons.
- □ un ensemble de lentilles électromagnétiques appelés condenseurs destiné à former un pinceau fin et intense
- □ une lentille électromagnétique finale appelée « objectif » qui permet de focaliser le faisceau sur la surface à examiner.
- □  $f$  un diaphragme objectif
- □  $f$  un dispositif de déflexion piloté par un générateur de balayage
- □  $f$  une platine porte-objet mobile
- □ des détecteurs
- □  $f$  un système de visualisation d'image couplé de manière synchrone au même générateur de balayage



**Fig 8.4.** Composition d'un microscope électronique à balayage (Sephane, 2017)

#### 2.1.4. Caractéristiques

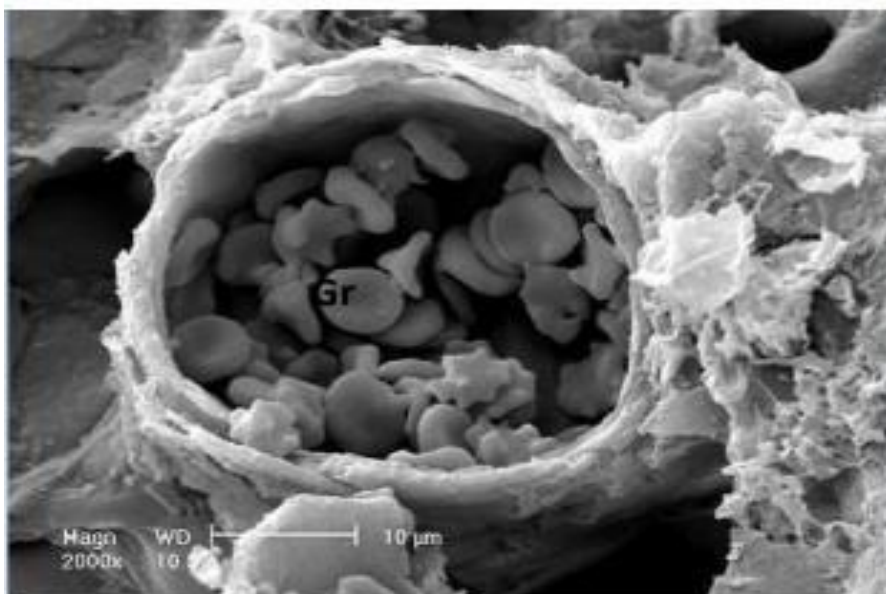
Les principales caractéristiques de MEB sont :

- ❖ une grande résolution spatiale (de l'ordre du 1 nm)
- ❖ une grande richesse d'information en imagerie
- ❖ la possibilité d'analyse chimique élémentaire
- ❖ *f* des possibilités de grossissements continus, de x10 à x100 000 et plus une très, grande profondeur de champ : spectaculaire "effet de relief"
- ❖ *f* peu ou pas de préparation d'échantillon mais l'échantillon est sous vide et soumis à un bombardement électronique ce qui peut poser un problème pour les échantillons fragiles ou isolants
- ❖ *f* une simplicité d'utilisation
- ❖ *f* un vaste domaine d'utilisation (de la métallurgie à la biologie)

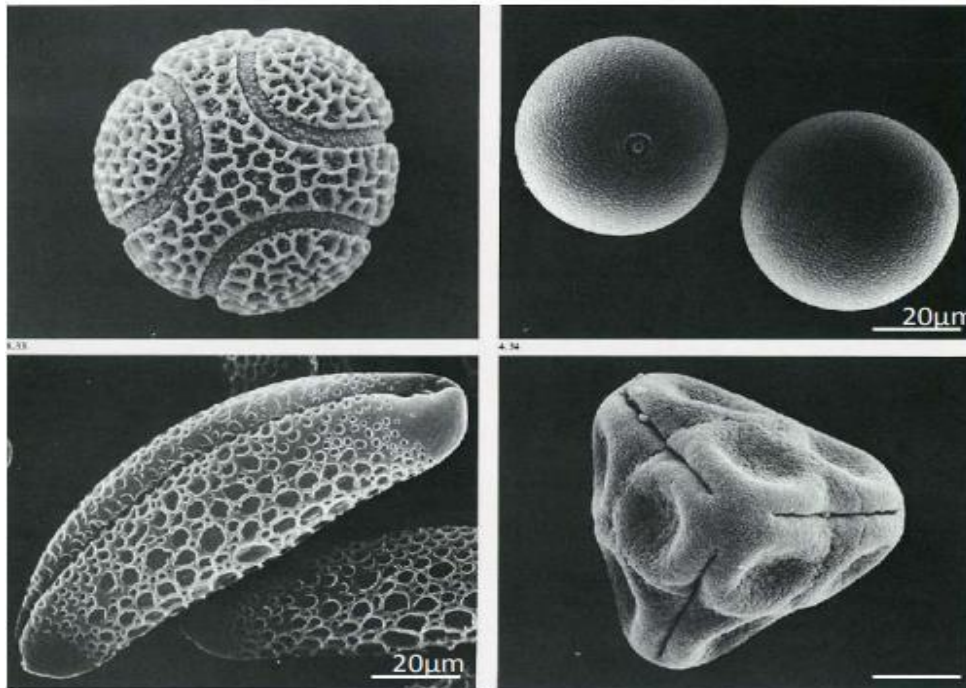
#### 2.1.5. Quelques applications

- Image de surface cellulaire ou de matériau
- Immunomarquage des protéines de surface par billes d'or
- Imagerie en mode électrons rétrodiffusés
- Spectrométrie X

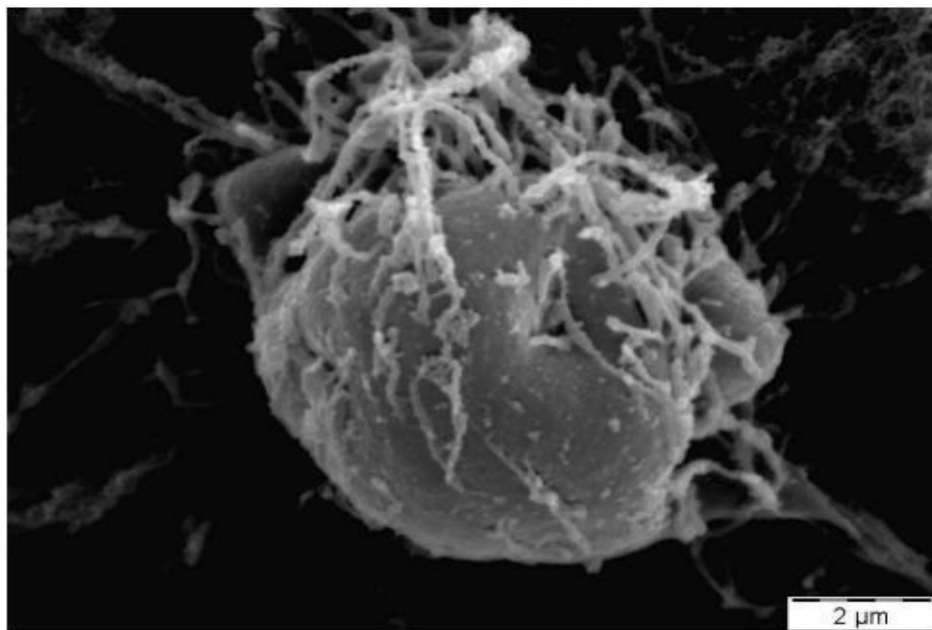
Les images suivantes présentent quelques exemples d'application de MEB (**source : plateforme imagerie, université de poitiers**)



**Vaisseaux sanguins**



**Les différents types de grain de pollen**



**Cellule sanguine de Wolbachia**

## **2.2. Microscopie Electronique en transmission (MET)**

### **2.2.1. Définition**

La microscopie électronique en transmission est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.



**Fig 8.5.** Photo d'un microscope électronique en transmission ((plate-forme imagerie, univ de poitiers).

### **2.2.2. Principe**

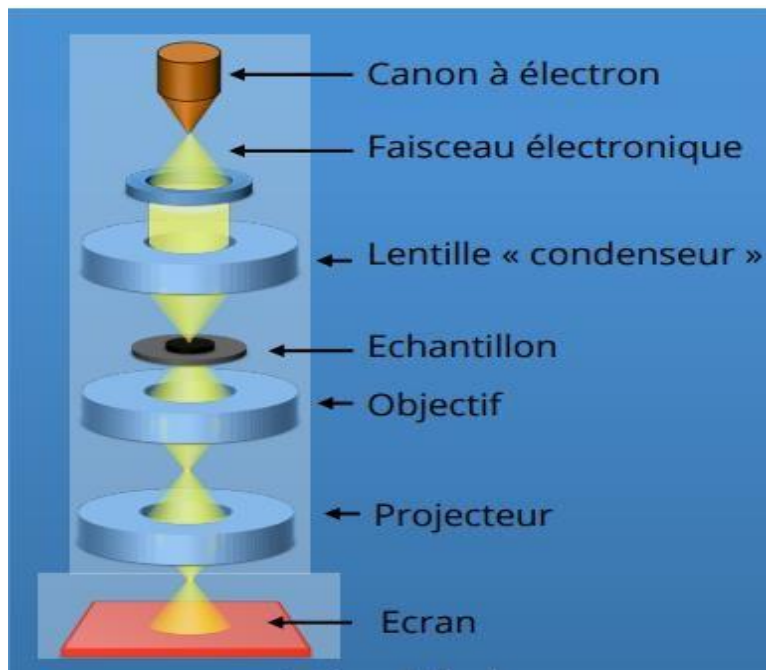
- des électrons sont émises en chauffant un filament de Tungstène (ou cristal d'hexaborure de lanthane).
- Les mêmes électrons sont par la suite accélérés à l'aide d'une tension comprise entre 200 et 1000 kV.
- Au moment où le vide est créé dans la cellule, le faisceau d'électrons doit être passé au travers d'un échantillon,
- Finalement, ce faisceau est focalisé à l'aide de lentilles magnétiques vers l'écran ou la plaque photographique.

### **2.2.3. Composition (appareillage)**

Un microscope électronique en transmission est composé de :

- un système de pompes à vide ;
- un système de refroidissement à azote ;
- un canon à électron composé d'une source d'électrons, un système de focalisation et 'un accélérateur d'électrons ;
- une colonne optique électronique contenant les lentilles magnétiques et les diaphragmes ;
- un porte échantillon ;

- un détecteur d'électrons ;
- Éventuellement d'autres éléments électroniques de mesure.



**Fig 8.1.** Différents composants d'un microscope électronique en transmission (Sephan, 2017).

#### **2.2.4. Caractéristiques**

- Excellente résolution (atomique)

Large gamme de grandissement (2000 à 1.5M)

Origine du contraste : contraste de diffraction

Préparation des objets longue et complexe (épaisseur < 300nm)

Petits volumes sondés (quelques mm<sup>2</sup> épaisseur)

Technique destructive.

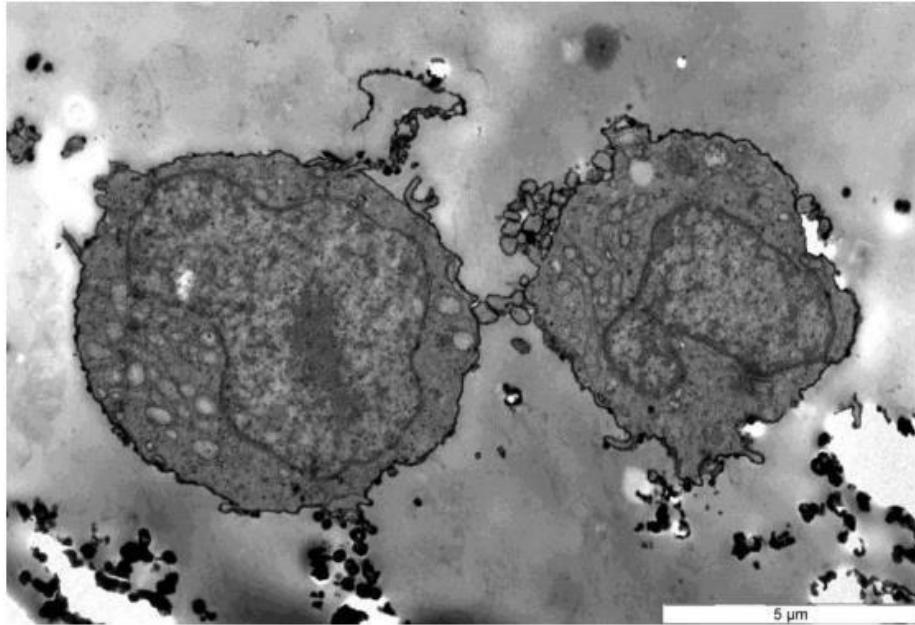
#### **2.1.5. Quelques applications**

- Ultrastructure sur coupe de tissu vivant ou matériaux

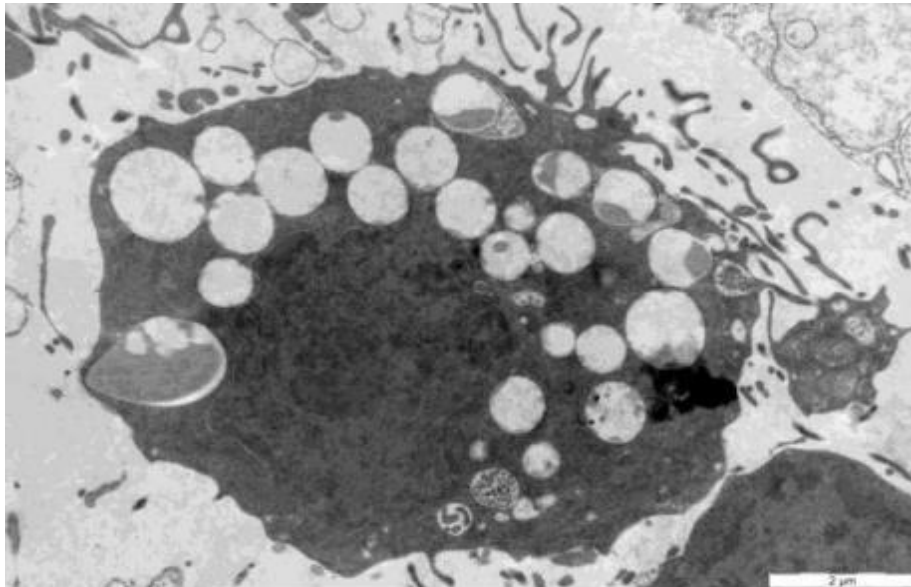
- Immun marquage des protéines par billes d'or

- Diffraction électronique.

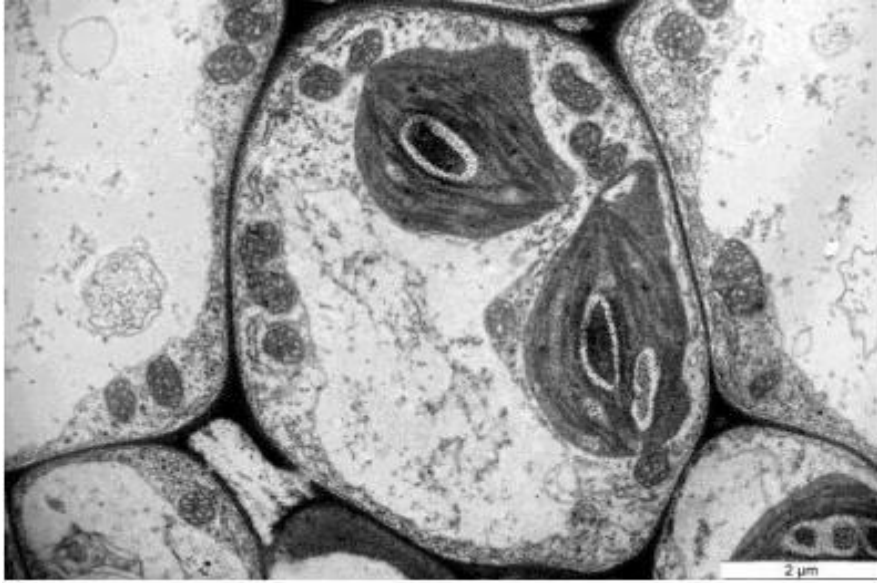
Les images suivantes présentent quelques exemples d'application de MEB (source : plateforme imagerie, université de poitiers)



**Effet de peptide microbien sur cellules cancéreuse**



**Phagocytose**



**Coupe MET dans une feuille d'arabidopsis**

## Références bibliographiques

**Agilent Technologies, Inc.** (2021). *Publié aux États-Unis, 5980-1397FR.*

**Aronica, C.** (2010) La diffraction des rayons X : Principes et applications d'une méthode de caractérisation des arrangements atomiques dans les solides cristallisés. *L'actualité chimique* - n° 346.

**Base de données IR par fréquence :**  
[http://www.unice.fr/cdiac/animations/spectroscopie/infra\\_rouge/infra\\_rouge.htm](http://www.unice.fr/cdiac/animations/spectroscopie/infra_rouge/infra_rouge.htm).

**Bernard, V.** (2004). Initiation à la fluorescence moléculaire. *Edition de Boeck et Larcier. s.a, 1<sup>ère</sup> édition. ISBN : 2-8141-4597-2.*

**Bibliothèque de spectres IR et RMN :** - Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) :  
[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) - *Catalogue Sigma Aldrich®*  
: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>

**Biémont, É.** (2008). Spectroscopie moléculaire Structures moléculaires et analyse spectrale. *Éditeur : De Boeck Supérieur. 428 pages.*

**Hesse, M., Meier, H et Zeeh, B.** (1997). Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, *Masson, 2-225-83050-9.*

**Jeffry J. W.** (2000). *Method In X-R Cristallography Et Radiographie,*

**Klug, H.P., Alexander L.E.** (1974). *X-ray diffraction procedures 2nd ed., éd. J. Wiley & Sons Inc. (New-York).*

**Perrin, J.F** (2022). *Photométrie d'émission atomique. "Biotechnologies et Bioanalyses". ,*

**Plate- forme de l'imagerie,** université de poitiers.

**Reimer, L.** (1997). *Transmission Electron Microscopy: physics and Image Formation and Microanalysis, 4<sup>ème</sup> édition, Springer series in Optical Science, Berlin.*

**Rouessac, F ., Rouessac, A., Cruché, D., Martel, A.** (2004). ANALYSE CHIMIQUE : Méthodes et techniques instrumentales modernes, *9e édition EAN EBOOK*. 592 PAGES.

**Silverstein, R.M., Webster, F., Kiemle, D.** (2016). Identification spectrométrique de composés organiques. *Traducteur : Vincent Lafond. 3e Édition*. 480 pages.

**Simulateur de spectres RMN** : - <http://www.nmrdb.org/predictor>.

**Odile, S.** (2017). La microscopie électronique. *Université Paris-Sud / CNRS*.

**Vollhardt, P., Schore,N., Depovere, P.** (2015). Traité de chimie organique. *6E ÉDITION Boeck Supérieur - DBS*. 1418 pages.

# Table des matières

**Avant-propos**

**Introduction**

**Sommaire**

<b>Chapitre 1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire</b> .....	<b>1</b>
Introduction (généralités) .....	2
1. Définition de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	2
2. Domaine spectrale .....	3
3. Principe .....	3
3. Différentes Transitions électroniques .....	4
4.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ .....	4
4.2. Transition $n \rightarrow \sigma^*$ .....	4
4.3. Transition $n \rightarrow \pi^*$ .....	4
4.4. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$ .....	4
4.5. Transition $d \rightarrow d$ .....	5
4. Principe d'absorption en spectrophotométrie.....	5
4.1. Loi de Beer-Lambert .....	6
5.2. Validité de la loi de Beer-Lambert.....	7
5.3. Détermination de la concentration d'une solution par étalonnage .....	8
6. Lien entre couleur d'une solution et absorption.....	8
6.1. Notion de perception des couleurs.....	8
6.2. Cercle chromatique.....	9
6.3. Paramètres intervenant dans l'absorption de la lumière par une solution .....	9
7. Appareillage : Fonctionnement du spectrophotomètre .....	10
8. Domaines d'application ( <u>Quelques exemples</u> ).....	11
<b>Chapitre 2. Spectrométrie d'absorption et d'émission atomique</b> .....	<b>12</b>
Introduction.....	13
1. Définition.....	13
2. Absorption atomique et émission atomique : Principes de phénomènes fondamentaux.....	13
2.1. Expérience du renversement des raies de Kirchhoff.....	14
2.2. Absorption atomique et émission atomique.....	14

3. Lois et grandeurs appliquées.....	15
3.1. Loi de Beer-Lambert.....	15
3.2. Loi de Boltzman.....	16
4. Analyse spectrale.....	16
5. Appareillage et principes.....	17
5. 1. Spectromètre d'absorption atomique.....	18
5.1.1. Appareillage SAA.....	18
5.1.2. Principe SAA.....	18
5.2. La spectrométrie d'émission atomique (SEA).....	19
5.2.1. Appareillage SAA.....	19
5.2.2. Principe SAA.....	20
6. Domaines d'application.....	21

**Chapitre 3. Spectrométrie Infrarouge ..... 22**

1. Définition.....	23
2. Description et principe.....	23
3. Domaine spectrale IR et grandeurs.....	24
4. Appareillage (fonctionnement d'un spectrophotomètre IR).....	26
5. Spectre infrarouge : données et interprétation.....	27
6. Domaines d'application.....	29

**Chapitre 4 : Spectrométrie par luminescence .....30**

1. Définition et principe.....	31
2. Phénomène de la fluorescence.....	31
3. Caractéristiques des molécules fluorescentes.....	32
4. Description du principe (diagramme de Jablonski).....	33
5. Comparaison de spectres d'émission et d'excitation.....	34
6. Rendement quantique.....	35
7. Instrumentation.....	36
8. Domaines d'application.....	36

**Chapitre 5 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire ..... 37**

1. Définition de la Spectroscopie RMN.....	38
--	----

<i>Phénomène d'RMN</i> .....	38
2. <i>Principe de spectroscopie RMN</i> .....	39
3. <i>Allure générale d'un spectre RMN</i> .....	40
3.1. <i>Déplacement chimique</i> .....	41
3.2. <i>Courbe d'intégration</i> .....	41
3.3. <i>Notion de H équivalents</i> .....	42
4. <i>Appareillage</i> .....	43
5. <i>Quelques applications en Biologie</i> .....	43
<b>Chapitre 6. Spectrométrie de masse</b> .....	<b>44</b>
1. <i>Définition et objectifs de la spectrométrie de masse</i> .....	45
2. <i>Principe de la technique</i> .....	45
3. <i>Description du principe (types d'ionisation)</i> .....	46
1.1. <i>Ionisation par impact électronique IE</i> .....	46
1.2. <i>Ionisation chimique CI</i> .....	46
1.3. <i>Ionisation par l'intermédiaire d'un spray</i> .....	47
1.4. <i>Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)</i> .....	47
4. <i>Couplage Chromatographie- SM</i> .....	48
5. <i>Appareillage</i> .....	49
6. <i>Interprétation des données spectrales</i> .....	50
<b>Chapitre 7. Diffraction de rayons X</b> .....	<b>51</b>
1. <i>Définition et objectif de la technique</i> .....	52
2. <i>Principe</i> .....	52
2.1. <i>Production des rayons X pour la diffraction</i> .....	53
2.2. <i>Principe de la diffraction des rayons X</i> .....	53
2.3. <i>Loi de Bragg</i> .....	54
4. <i>Traitement des spectres</i> .....	55
5. <i>Instrumentation : Diffractomètre Bragg- Brentano</i> .....	56
<b>Chapitre 8. La microscopie électronique</b> .....	<b>58</b>
<i>Introduction</i> .....	59
1. <i>Définition et principe</i> .....	59
2. <i>Les différents microscopes électroniques</i> .....	61

2.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	61
2.1.1. Définition.....	61
2.1.2. Principe.....	61
2.1.3. Composition (appareillage).....	62
2.1.4. Caractéristiques.....	63
2.1.5. Quelques applications.....	63
2.2. Microscopie Electronique en transmission (MET).....	65
2.2.1. Définition.....	65
2.2.2. Principe.....	66
2.2.3. Composition (appareillage).....	66
2.2.4. Caractéristiques.....	67
2.1.5. Quelques applications.....	68
 <b>Références bibliographiques.....</b>	 <b>70</b>