

Imagerie cellulaire

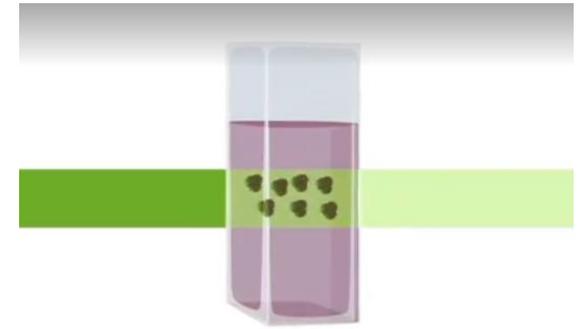
I. Méthodes spectrales : Absorption moléculaire

- Energie des molécules
- Absorption ultra-violette
- Absorption infra-rouge

Spectrophotométrie

Définition

La spectrophotométrie est une technique d'analyse des molécules qui repose sur des **interactions** entre **la matière** et **la lumière** (radiation électromagnétique).



La spectrophotométrie est une méthode qui permet **le dosage de nombreux paramètres** essentiellement sérique ou plasmatique les principaux sont le glucose, urée, créatinine, calcium, phosphore, hémoglobine et albumine.

Elle permet également de :

- ✓ Déterminer la **concentration d'une molécule**.
- ✓ Suivre la cinétique de formation d'un produit au cours d'une **réaction enzymatique**
- ✓ Apprécier le degré de **pureté** d'une molécule purifiée.



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire



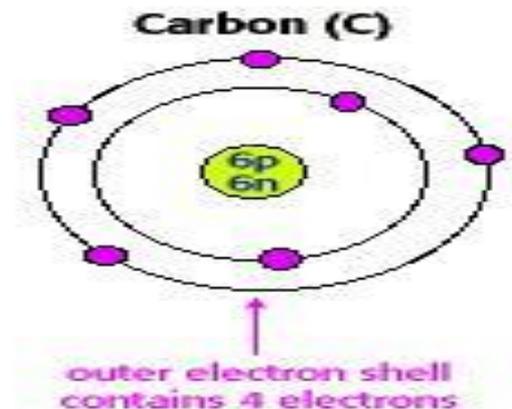
Rappel

Atome

Un atome contient un **noyau** situé en son centre et des **électrons** qui "tournent autour" du noyau.

- ✓ Le noyau contient des **nucléons**, c'est à dire des **protons** et des **neutrons**.
- Les électrons ont une **charge électrique négative**.
- Les protons ont une charge électrique **positive**, de même valeur que celle de l'électron.
- Les neutrons n'ont pas de charge électrique, ils sont **neutres**.

Il y a exactement le **même nombre** d'électrons et de protons dans un atome, un atome est donc **électriquement neutre**.



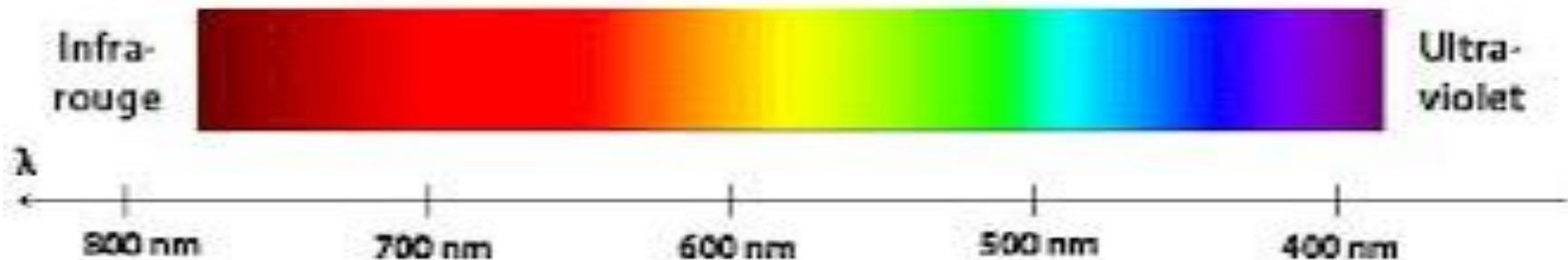


Spectrophotométrie d'absorption moléculaire



Spectre de la lumière

La lumière est un ensemble d'ondes électromagnétiques qui sont caractérisées par leur **longueur d'onde** (symbole lambda) généralement exprimée en **nm**.



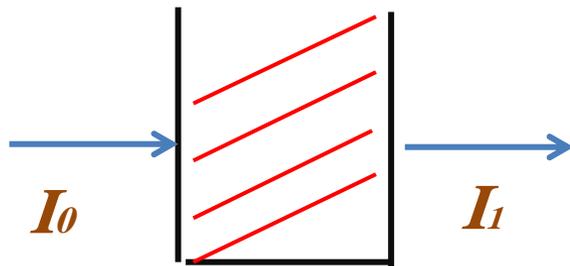
$400 \text{ nm} < \text{lumière visible} < 800 \text{ nm}$
 $< 400 \text{ nm} : \text{radiations UV}$
 $> 800 \text{ nm} : \text{radiations IR}$

- UV lointain : 10 – 200 nm
- UV proche : 200 - 400 nm

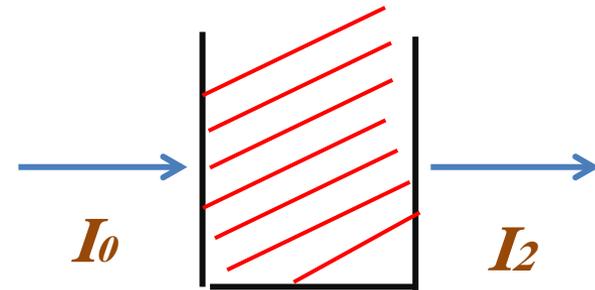
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Expérience

$$I_1 > I_2 > I_3$$

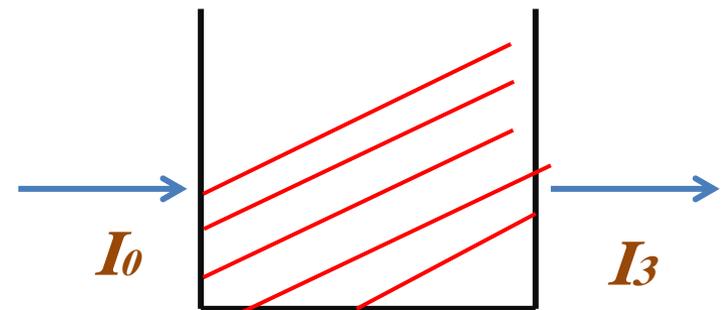


1 Concentration faible



2 Concentration élevé

$$\frac{I_3}{I_0} < \frac{I_2}{I_0} < \frac{I_1}{I_0}$$



$$T_3 < T_2 < T_1$$

3

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Transmittance

la transmittance T est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur. T est exprimé par un nombre fractionnaire ou sous forme de pourcentage :

TRANSMITTANCE ou TRANSMISSION

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

$$A = -\log T$$

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

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

$$A = \log (1/T)$$

(E)

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Phénomène d'absorption :

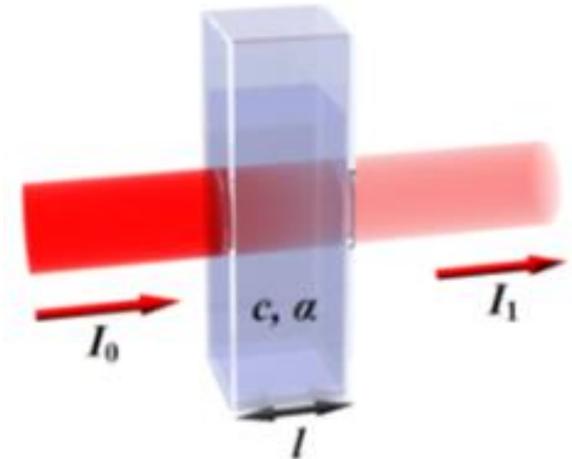
Lorsqu'un faisceau lumineux traverse une solution contenant des solutés, une partie des ondes sera absorbée par les corps dissous. Ainsi, lorsqu'un faisceau lumineux de flux d'intensité I_0 , traverse une substance et qu'on observe le flux d'intensité transmis I_1 :

Si $I_1 = 0$: le faisceau est totalement absorbé.

Si $I_1 = I_0$, le faisceau n'est pas du tout absorbé.

Si $I_1 < I_0$: la substance a absorbé certaines radiations du faisceau. La substance présente la couleur complémentaire de celle absorbée.

Cette propriété peut être mise à profit pour doser des substances en milieu aqueux.



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Absorbance :

Absorbance (A) ou la densité optique (DO) est la valeur du logarithme décimale de l'inverse de transmittance (T).

$$A = DO = \log (1/T) = \log (I_0/I)$$

DO : est un nombre sans dimension, toujours positif.

Pour DO= 0, le milieu est parfaitement transparent.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Variations de I, A et T :

	I	A	T
Milieu transparent	$I_1 = I_0$	0	100%
Milieu opaque	$I_1 = 0$	infinie	0%



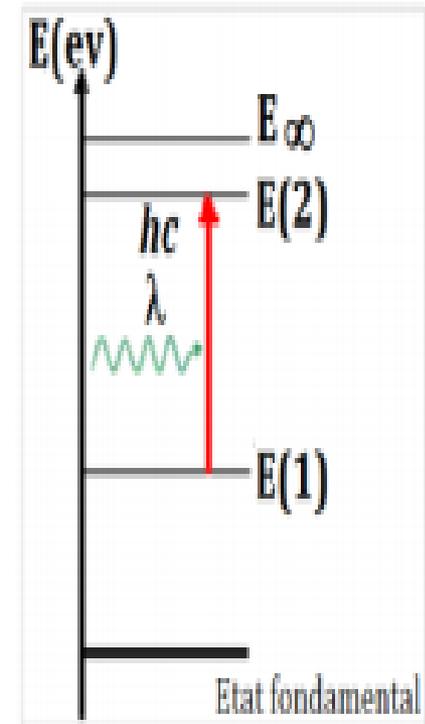
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire



Absorption :

Sous l'action d'une onde électromagnétique, l'atome, initialement dans un état d'énergie électronique $E(1)$, passe alors en un état électronique d'énergie supérieure $E(2)$:

$$E(2) > E(1).$$



Energie des molécules

L'énergie d'une molécule correspond à la somme de quatre types d'énergie: énergie électronique , énergie de translation , énergie de vibration et énergie de rotation

Niveaux d'excitation électroniques

- ✓ Les électrons sont situés sur des orbitales moléculaires.
- ✓ L'absorption d'un photon d'énergie appropriée (domaine UV-Visible) fait passer une molécule de l'état fondamental à un état électronique excité. Une telle transition correspond au passage d'un électron dans une orbitale inoccupée d'énergie supérieure.
- ✓ Un électron pourra passer sur une orbitale vide, il y a donc une série de niveaux.
 - Energie électronique (E_e): énergie associée aux électrons qui sont dans des niveaux d'énergie **quantifiés**.

Niveaux de vibration

- ✓ Les liaisons entre atomes ne sont pas rigides, les atomes vibrent naturellement les uns par rapport aux autres.
- ✓ En cas d'apport d'énergie extérieure le phénomène de vibration augmente : augmentation de l'énergie de vibration.
- ✓ On appelle E_{vib} l'énergie absorbée de cette manière.
- ✓ L'énergie vibrationnelle présente **2 caractéristiques** :

$$E_{\text{v}} \ll E_{\text{e}}$$

E_{v} est **quantifiée**.

- Energie de vibration (E_{v}): énergie associée aux mouvements des atomes autour de leur position d'équilibre.

Niveaux de rotation

- ✓ Si la molécule est libre de ses mouvements elle peut tourner autour de son centre de gravité.
- ✓ Ce phénomène existe dans les gaz et les vapeurs mais est négligeable dans les liquides et les solides.

$$E_r \ll E_v \ll E_e$$

- Energie de rotation (E_r): énergie associée aux mouvements de rotation des atomes autour d'un axe passant par le centre d'inertie.



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire



- ❖ **Phénomène:** Absorption
- ❖ **Source d'excitation :** lumière
- ❖ **Domaine spectrale :** UV, Visible, proche IR,
- ❖ **Le niveau d'excitation :** molécules

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Loi de Beer - Lambert

L'absorbance est en fonction de la concentration du soluté comme le montre la loi de Beer - Lambert :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A = absorbance sans unité

I₀ = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté)

I = intensité lumineuse transmise

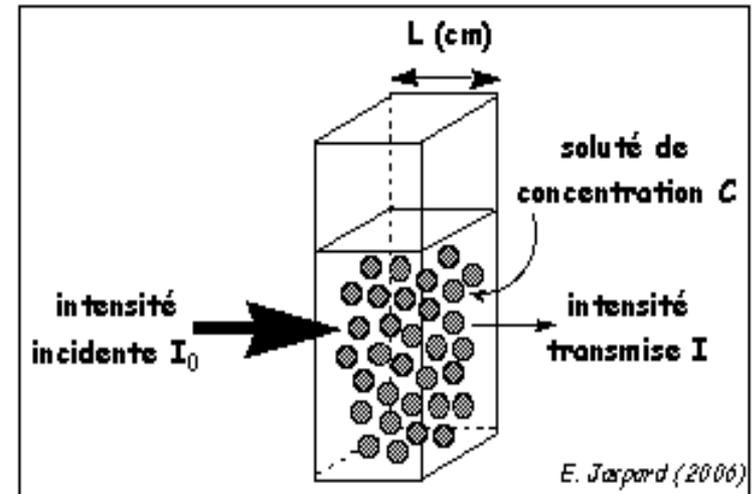
ε = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde) :

Si la concentration du soluté est en M (ou mol.L⁻¹), ε est en M⁻¹.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction molaire : ε_M

Si la concentration du soluté est en % (masse/volume), ε est en g⁻¹.L.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction pondéral : ε_{1%}

l = longueur du trajet optique (en cm)

C = concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction)



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Des paramètres peuvent influencer l'absorbance

Temps: Pour de nombreux composés colorés, l'absorbance évolue en fonction du temps. Il est nécessaire lorsque l'on met au point un dosage, d'étudier les variations d'absorbances à partir du moment où la coloration est formée.

Température: Les étalonnages sont valables qu'à une température donnée et les variations d'absorbance sont parfois considérables en fonction de la température.

pH: Le pH du milieu dans lequel est dissous le soluté peut avoir un effet important sur le spectre

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Des paramètres peuvent influencer l'absorbance

Solvants: Le choix est vaste (eau , hexane, éthanol,.....) seuls la résistance des cuves et le spectre du solvant lui- même peuvent être les facteurs limitants de ce choix.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert n'est vérifiée que si les conditions suivantes sont respectées :

- ✓ La lumière utilisée doit être monochromatique.
- ✓ Les concentrations doivent être faibles.
- ✓ La solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène.
- ✓ Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques.
- ✓ Le Soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Appareille

Source
lumineuse

Monochromateur



Détecteur

Enregistreur

Un spectrophotomètre est composé de cinq éléments principaux :

1. Source lumineuse: Une source de rayonnements d'émission constante et d'intensité stable; filament à incandescence pour l'IR, lampe à filament de tungstène pour le visible et lampe à hydrogène pour l'UV.

2. Un Monochromateur : permettant de sélectionner la longueur d'onde de mesure le plus précisément possible

3. Cuves: Un système permettant de contenir dans le faisceau lumineux;

4. Détecteur : Un récepteur sensible aux rayons reçus et transformant l'énergie lumineuse en signal électrique;

5. Enregistreur : Un système de traitement du signal permet d'affichage ou l'enregistrement des résultats obtenus.

Références:

Azzi, Rachid. *Méthodes spectrales* : méthodes physico-chimiques d'analyses biologiques. -Saint-Denis : Édilivre, DL 2015 (59-Roubaix : Impr. Sobook). - 1 vol. (46 p.)