

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen  
Faculté SNV & STU  
Département de biologie  
Master Biochimie Appliquée  
2020-2021

## **Master 1 Biochimie Appliquée**

### **Semestre 2: Unité Méthodologie**

### **Méthodes d'identification et d'analyse structurale**

**Cours: Dr. Benariba N.**

# Semestre 2: Unité Méthodologie

## Méthodes d'identification et d'analyse structurale

### 2- Semestre 2 :

Unité d'Enseignement	VHS	V.H hebdomadaire				Coeff	Crédits	Mode d'évaluation	
	14-16 sem	C	TD	TP	Autres			Continu	Examen
<b>UE fondamentales</b>						<b>9</b>	<b>18</b>		
<u>UEF1(O/P)</u>									
Biologie cellulaire et signalisation	65h	1h30	1h30	1h30	75h	3	5	x	x
Régulation métabolique et pathologies	60h	1h30	1h30	1h00	65h	2	5	x	x
<u>UEF2(O/P)</u>									
Mécanisme moléculaire et applications des enzymes	65h	1h30	1h30	1h30	75h	2	5	x	x
Pathologies infectieuses	50h	1h30		1h30	55h	2	3	x	x
<b>UE méthodologie</b>						<b>5</b>	<b>9</b>		
<u>UEM1(O/P)</u>									
Méthodes d'identification et d'analyse structurale	45h	1h30		1h30	50h	3	5	x	x
<u>UEM2(O/P)</u>									
Analyse et valorisation des travaux de recherche	45h	1h30		1h30	50h	2	4	x	x
<b>UE découverte</b>						<b>2</b>	<b>2</b>		
<u>UED1(O/P)</u>									
Biodiversité	45h	1h30			3h	2	2		x
<b>UE transversales</b>						<b>1</b>	<b>1</b>		
<u>UET1(O/P)</u>									
Législation	22h30	1h30			5h	1	1		x
<u>UET2(O/P)</u>									
<b>Total Semestre 2</b>	<b>374h30</b>	<b>10h40</b>	<b>4h30</b>	<b>7h30</b>	<b>375h</b>	<b>17,00</b>	<b>30,00</b>		

## **Partie 2: Méthodes d'identification et d'analyse structurale**

### Méthodes d'identification et de détermination de la structure chimique des molécules

#### **1-** Les Méthodes spectroscopiques

**1-1** La Spectroscopie moléculaire UV-Visible: dosage des biomolécules

**1-2** La Spectroscopie moléculaire infrarouge: caractérisation des groupements fonctionnels

**1-3** La cristallographie par diffraction des rayons X : caractérisation de la structure des molécules cristallisées

**1-4** La spectrométrie de masse : caractérisation de la masse des molécules

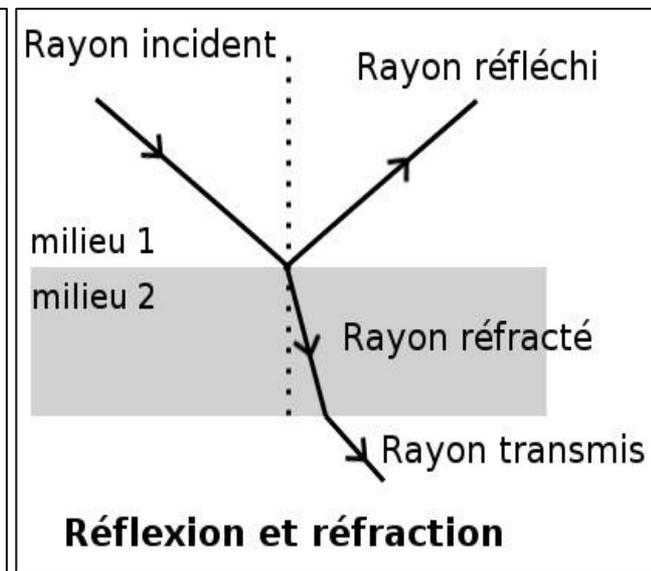
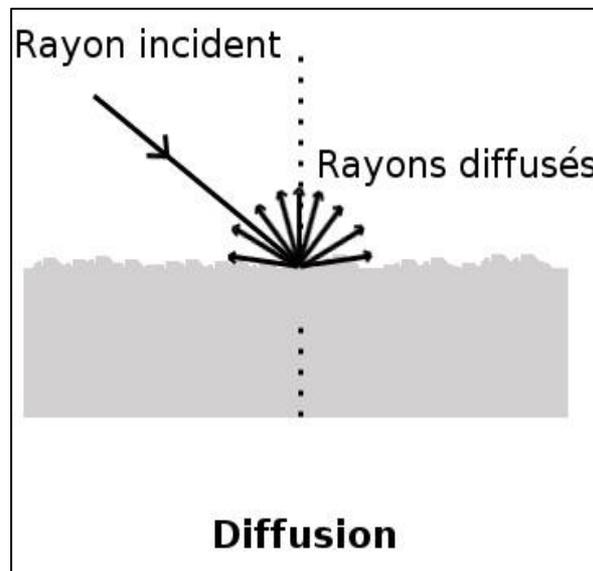
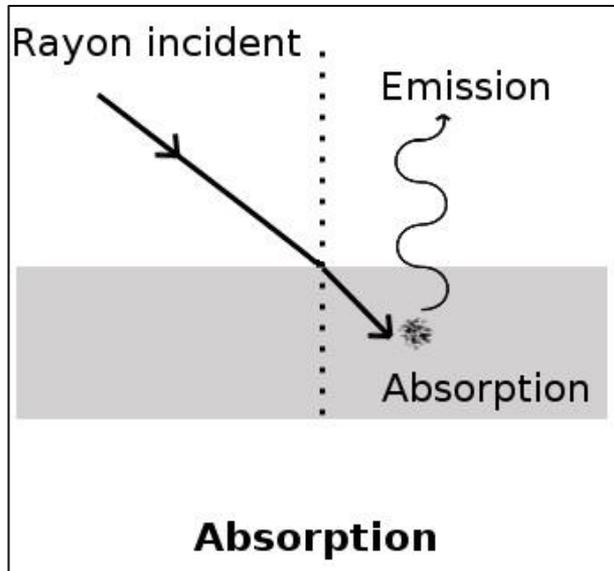
**1-5** La Spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) : caractérisation de la structure des molécules (squelette carbonique) par la RMN du proton H et du carbone-13

# 1- Méthodes spectroscopiques



# 1- Méthodes spectroscopiques

**Définition:** Les méthodes spectroscopiques (spectrométriques ou spectrographiques) sont des méthodes physiques qui étudient les rayonnements (ondes) électromagnétiques absorbés, diffusés ou diffractés (réfractés) par la matière.



# Méthodes d'identification et d'analyse structurale

**1- Méthodes spectroscopiques:** est une analyse instrumentale de la matière (molécule à analyser)

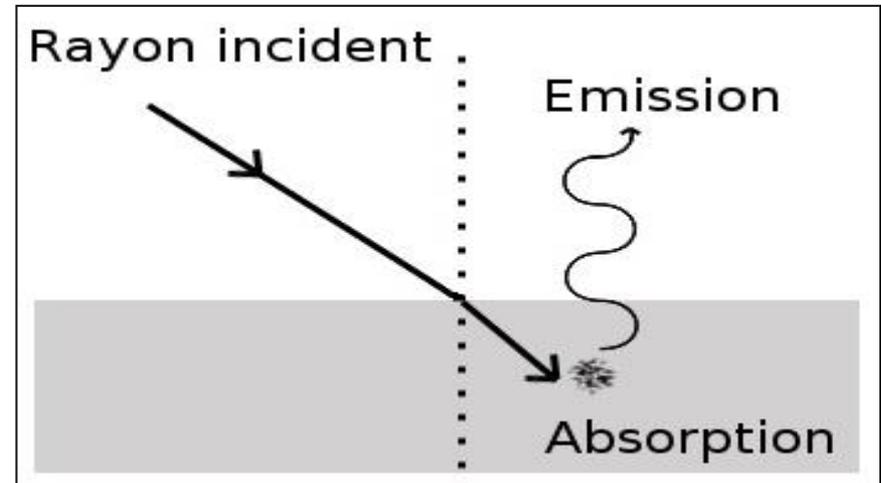
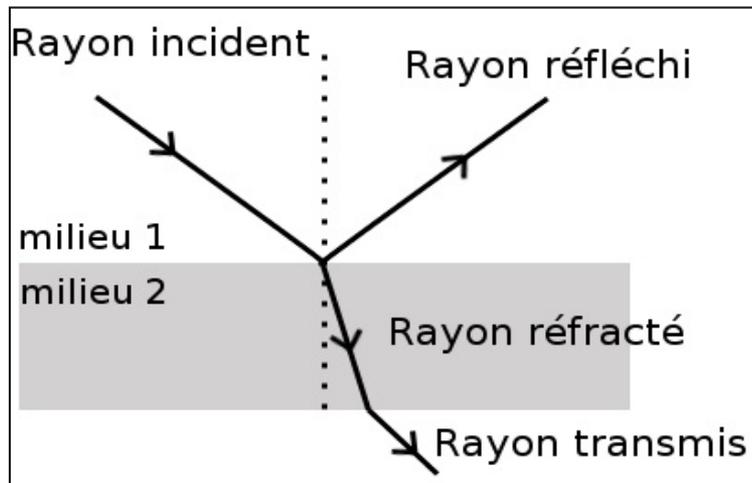
On distingue deux grandes catégories (types) :

- ❖ **La spectrométrie de masse:** utilise l'interaction matière/matière (électrons / matière)
- ❖ **Les spectroscopies radiatives:** utilisent l'interaction rayonnement électromagnétique / matière

# 1- Méthodes spectroscopiques

**Les spectroscopies radiatives:** Selon la nature de l'interaction rayonnement électromagnétique/matière, on distingue deux types de spectroscopies radiatives:

- **Diffraction de rayonnements électromagnétiques:** c'est la cristallographie par diffraction des rayons X, le rayonnement électromagnétique reçu est diffracté.
- **Absorption de rayonnements électromagnétiques**



# 1- Méthodes spectroscopiques

**Absorption de rayonnements électromagnétiques:** Suivant la longueur d'onde de la radiation et l'importance de l'absorption,

On distingue :

- ❖ **La Spectroscopie moléculaire:** Permet de déterminer les groupements fonctionnels, en utilisant le spectre électromagnétique infrarouge, Visible et Ultraviolet.
- ❖ **La Spectroscopie RMN** (résonance magnétique nucléaire): permet de localiser les hydrogènes c'est-à-dire la structure du squelette carboné.

# Méthodes d'identification et d'analyse structurale

## Classification des méthodes spectroscopiques

### Méthodes spectroscopiques

**Selon la nature du REM**

**Spectrométrie de masse (SM)**

utilise l'interaction matière/matière  
(électrons/matière)

**Spectroscopies radiatives:**

Utilisent l'interaction rayonnement électromagnétique/matière

**Selon l'interaction avec le REM**

**Absorption du REM**

**Selon l'absorption du REM**

**Spectroscopie  
moléculaire**

UV, Visible, IR

**Spectroscopie  
Résonance Magnétique  
Nucléaire (RMN)**

H, C,

**Diffraction du REM**

**Diffraction des rayons  
X ou cristallographie**

# 1- Méthodes spectroscopiques

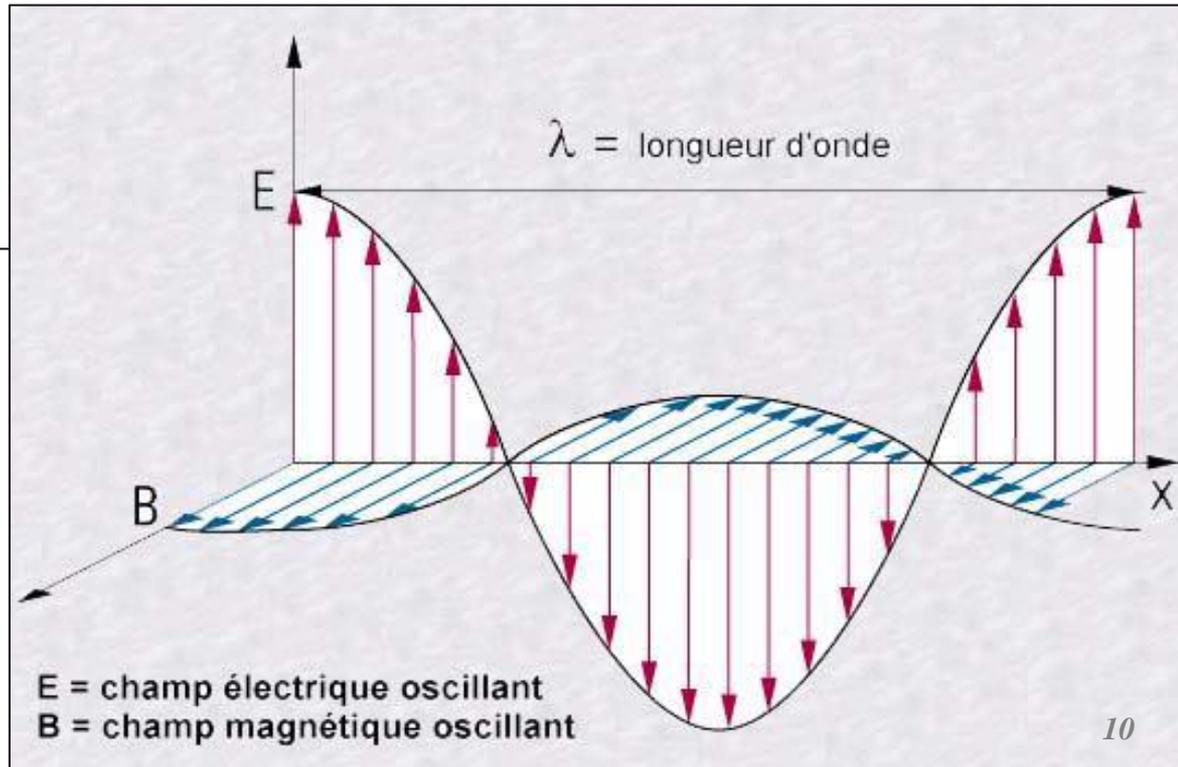
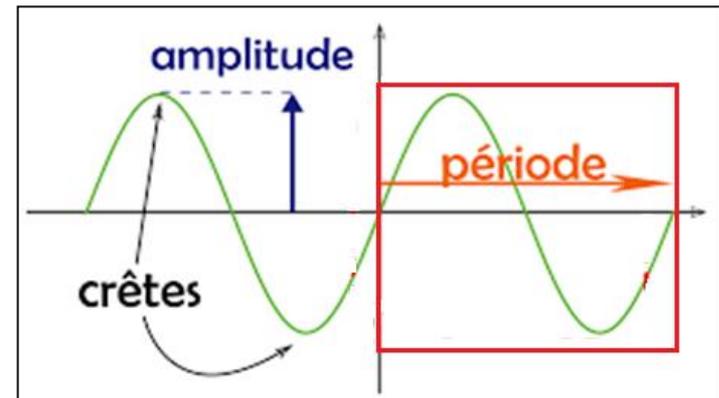
**Rayonnement électromagnétique:** un rayonnement qui se propage dans le vide à la vitesse de la lumière sous forme de champs électrique et magnétique oscillants et qui transporte de l'énergie (photons)

La lumière est une onde électromagnétique qui possède un caractère ondulatoire. Caractérisée par sa fréquence (**f**) et sa longueur d'onde ( **$\lambda$** ), la distance parcourue par l'onde pendant une période définie.

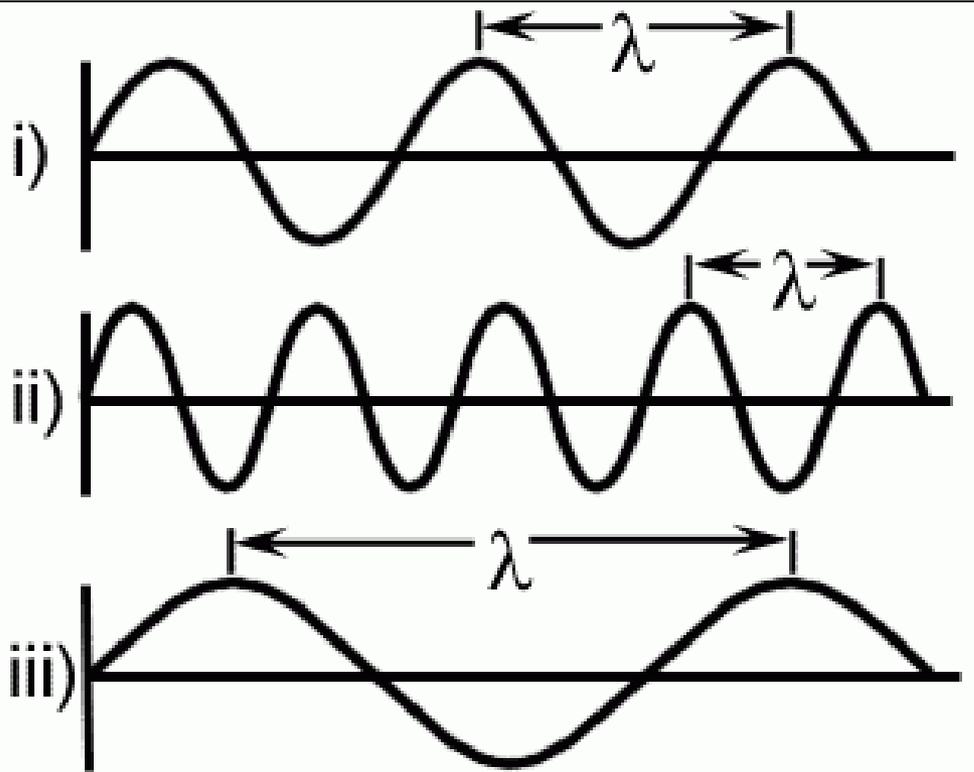
$\lambda$  : longueur d'onde (nm)

c : vitesse de l'onde (m/s)

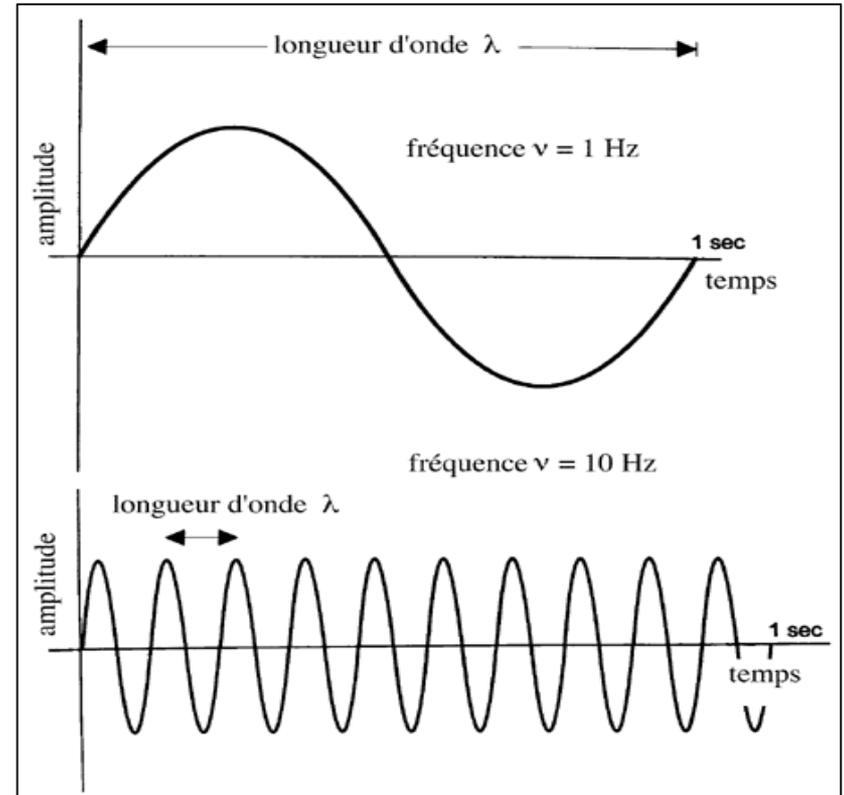
f : fréquence (Hz)



# Rayonnements (ondes) électromagnétiques



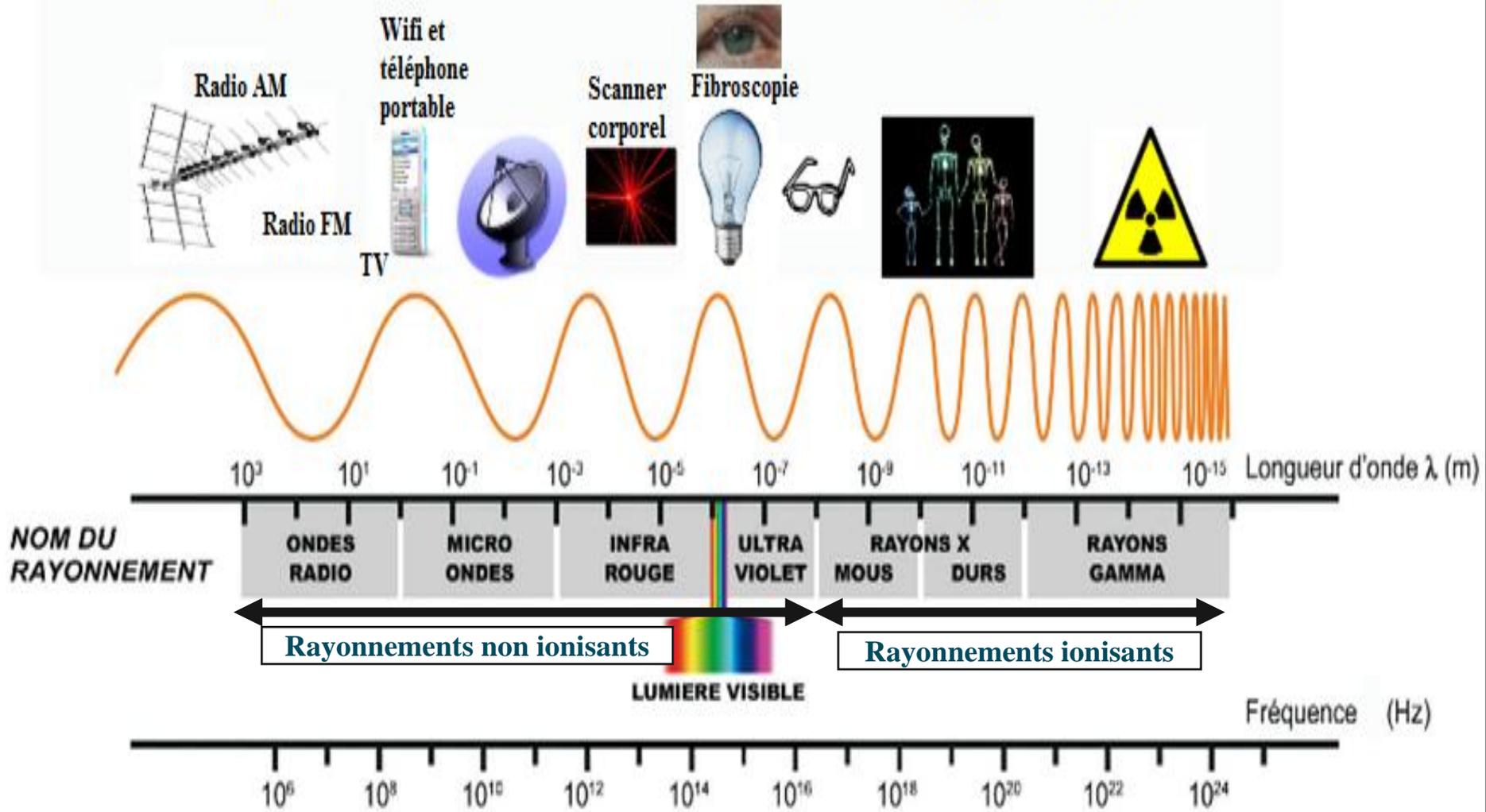
**La longueur d'onde ( $\lambda$ ) représente la distance parcourue par l'onde pendant une période d'oscillation**



**La fréquence (f) en hertz est le nombre de période d'oscillation par seconde.**

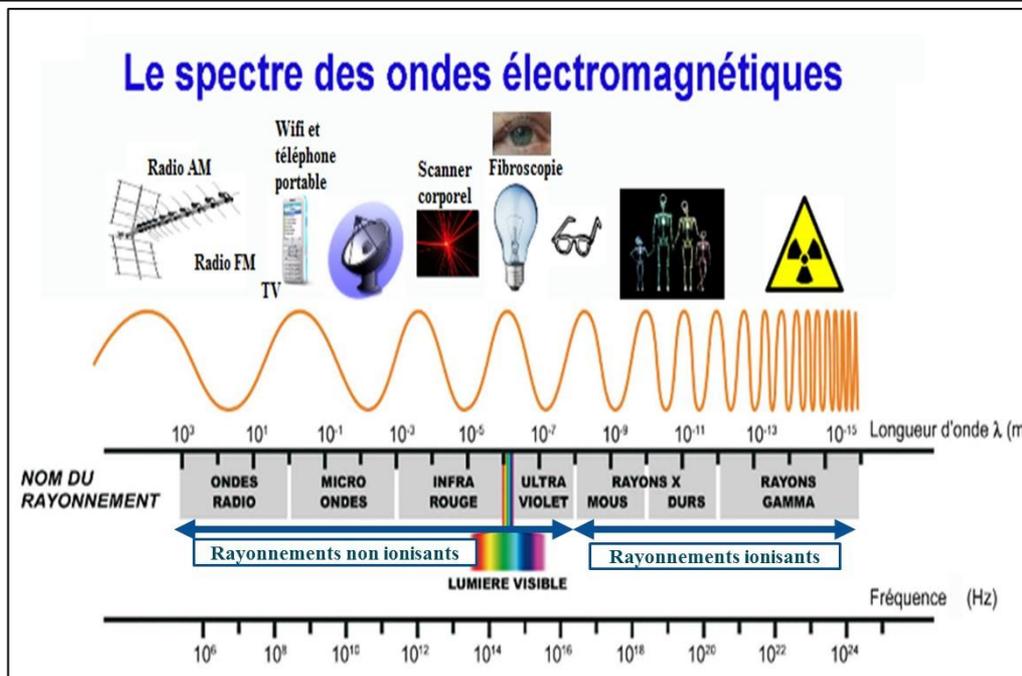
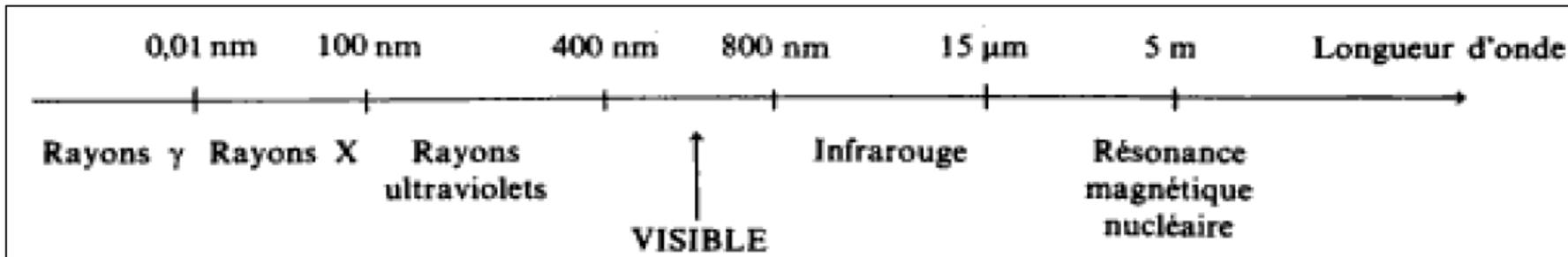
# Rayonnements (ondes) électromagnétiques

## Le spectre des ondes électromagnétiques



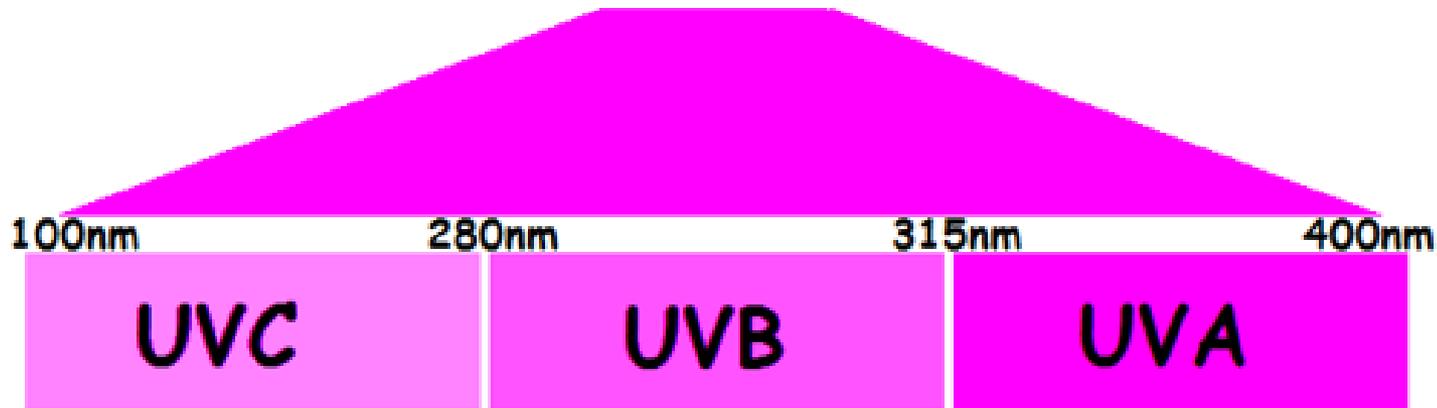
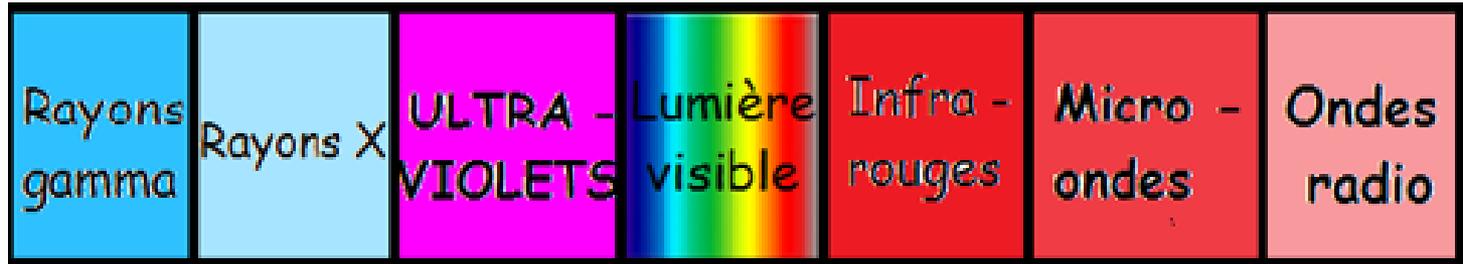
# Spectres des ondes électromagnétiques

## Les ondes utilisées en spectrométrie

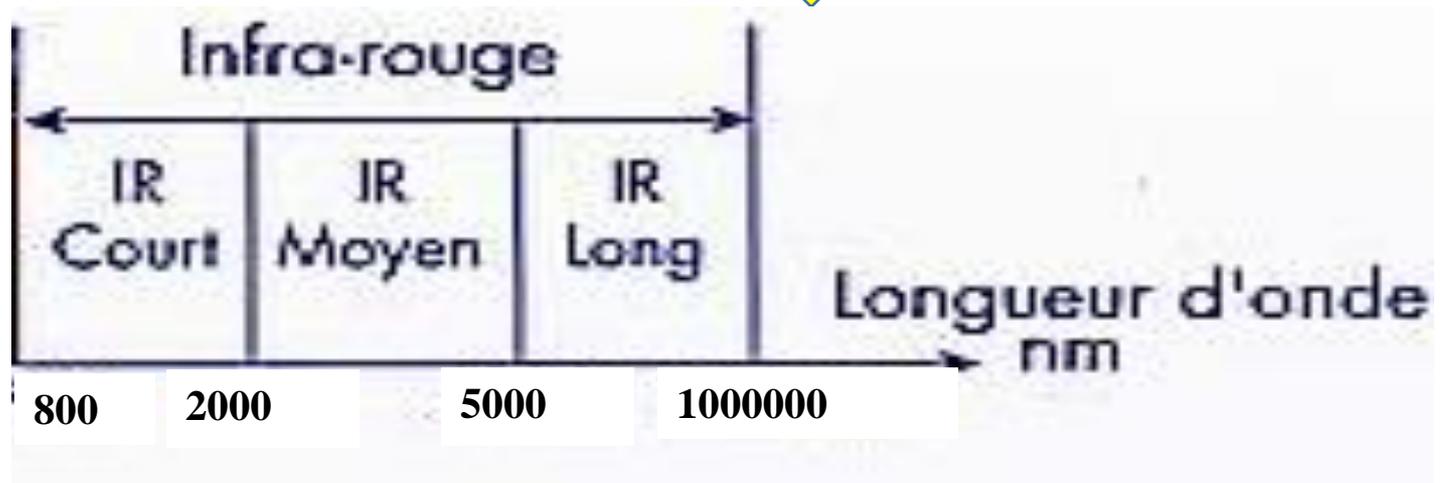
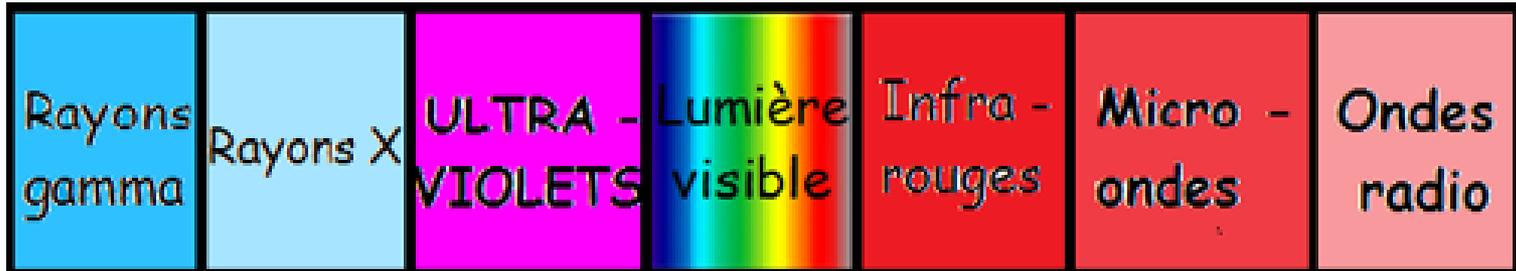


L'œil humain est un récepteur de lumière visible (onde électromagnétique) dont la fréquence appartient à un domaine très restreint, compris entre celui des infrarouges et celui des UV.

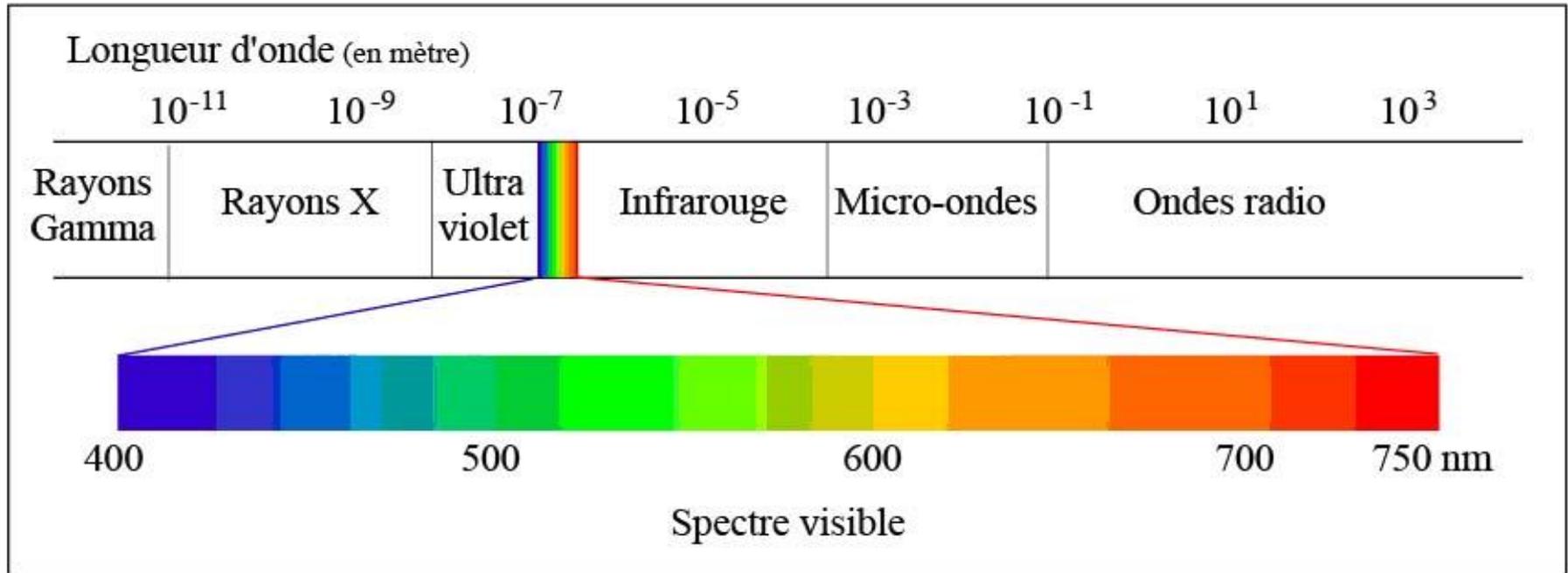
# Spectres des ondes électromagnétiques: la lumière ultraviolet (UV)



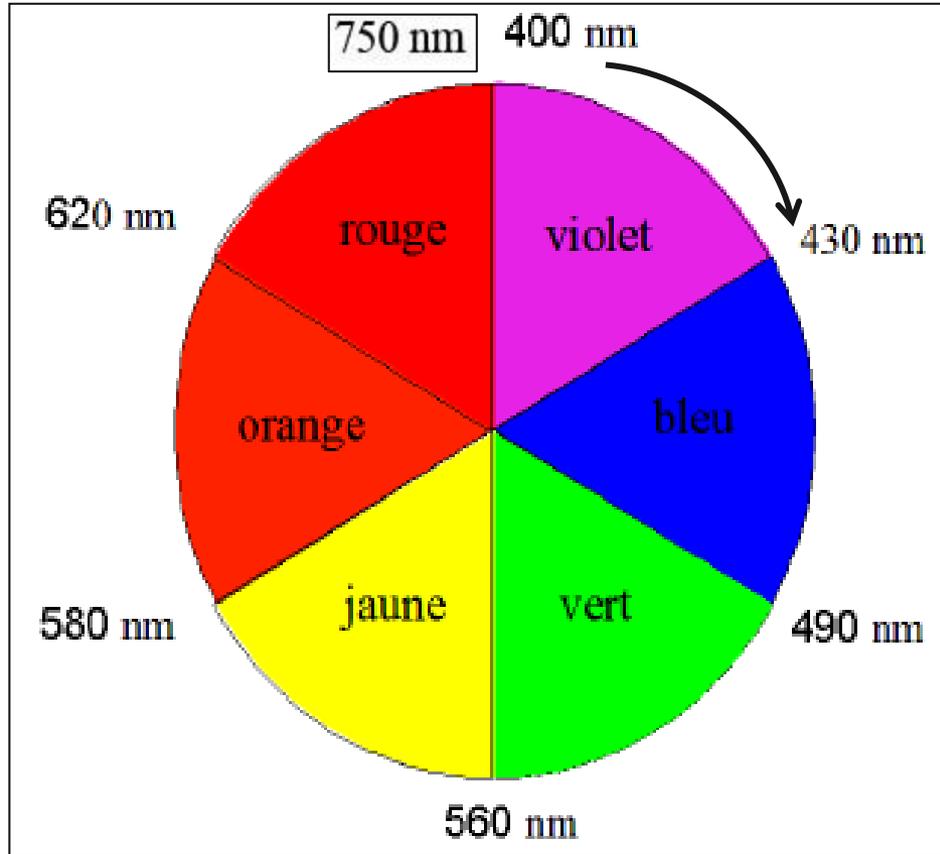
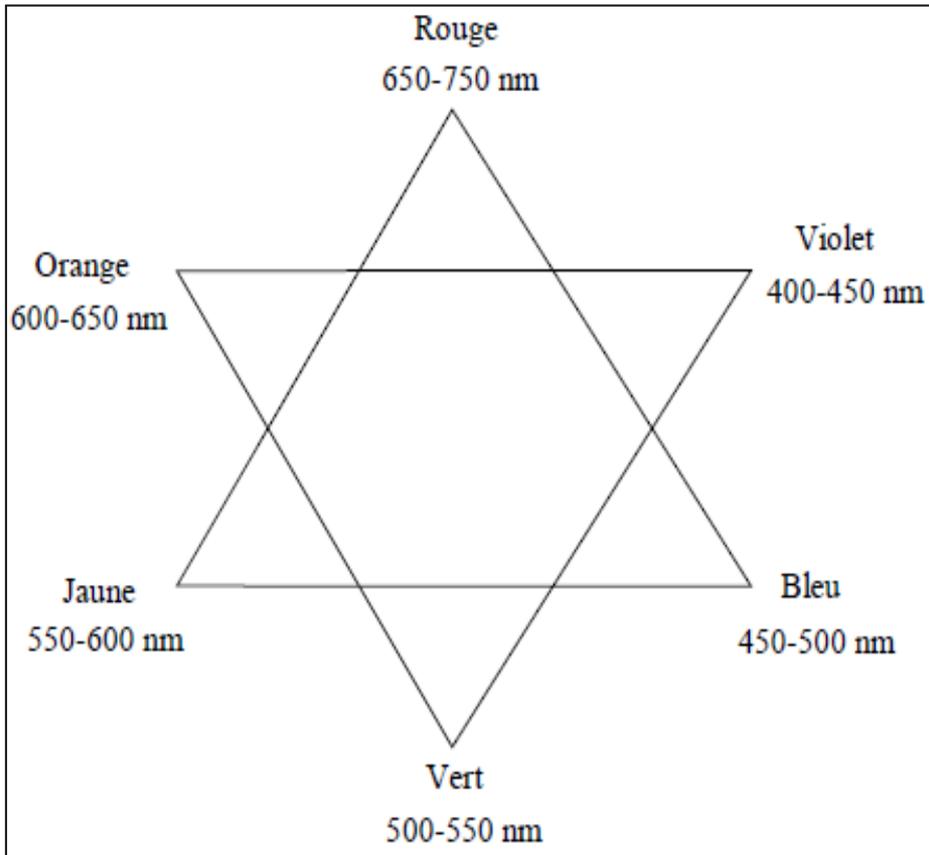
# Spectres des ondes électromagnétiques: la lumière infra rouge (IR)



# Spectres des ondes électromagnétiques: la lumière visible

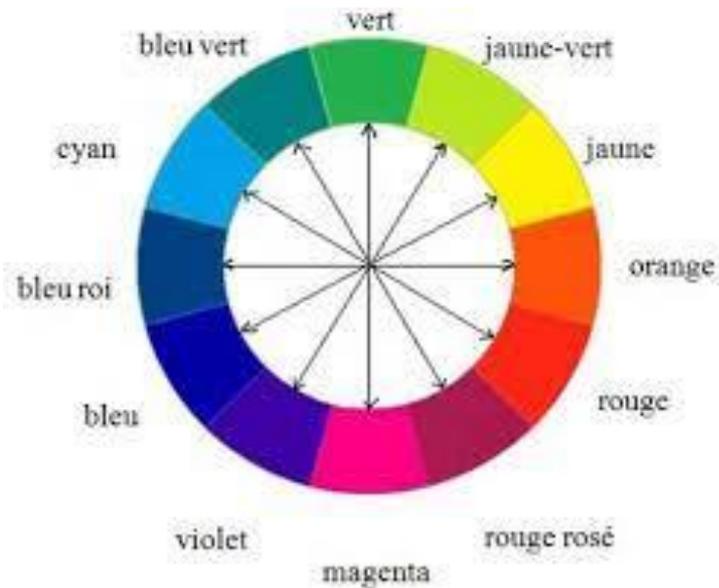


# Spectres des ondes électromagnétiques: la lumière visible



## Cercle (étoile) chromatique de la lumière visible

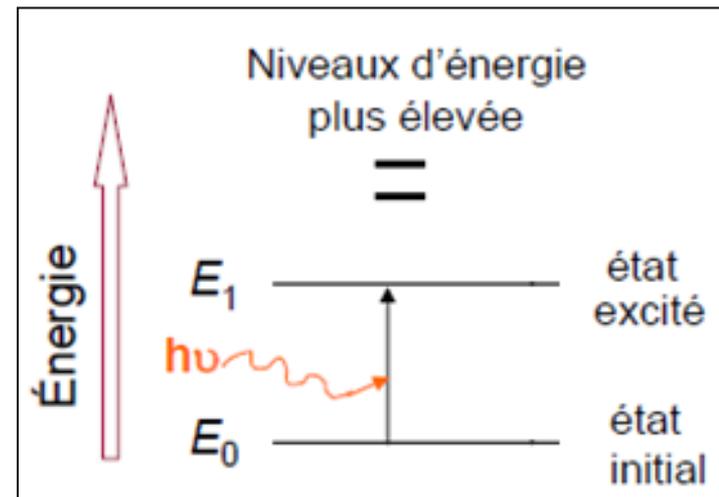
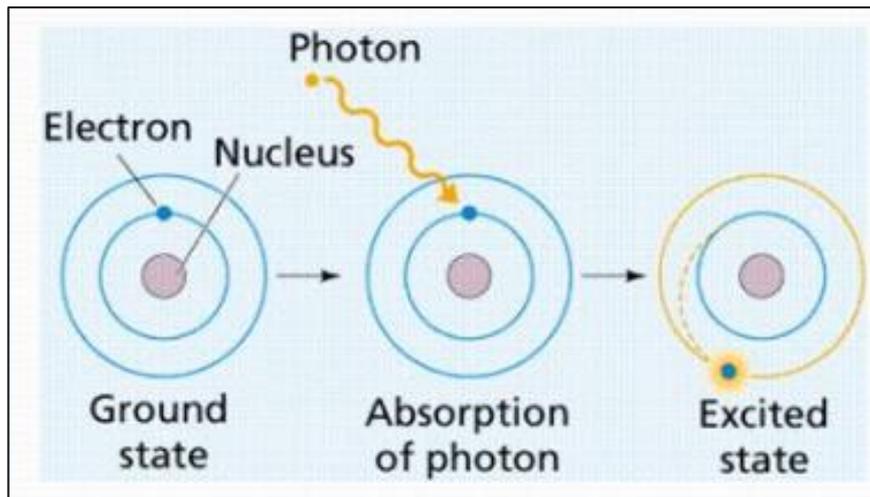
## 2- La spectroscopie d'absorption UV-Visible



## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

**Principe:** La spectroscopie UV-Visible concerne l'absorption des ondes électromagnétiques à une longueur d'onde  $\lambda$  dans le visible et l'ultraviolet par des entités chimiques (molécules) en solution. Cette absorption ( $A$ ) qui correspond à un état de transition énergétique des électrons, traduit le rapport entre l'intensité de radiation incidente  $I_0$  et l'intensité de de la radiation transmise  $I_t$ .

**L'état de transition énergétique des électrons:** L'énergie du photon est absorbée par une molécule (ou un atome) se trouvant dans son état fondamental  $E_0$  (niveau d'énergie le plus faible) et passe alors à un état excité  $E_1$  (niveau d'énergie plus élevée).

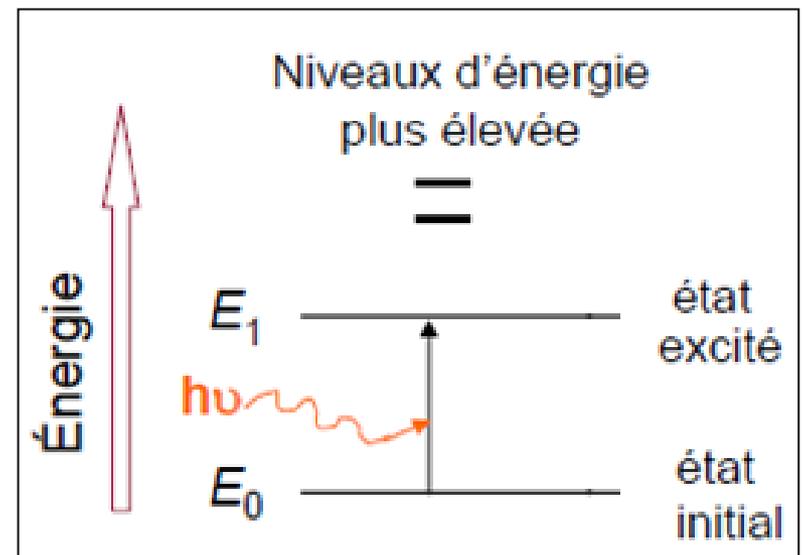
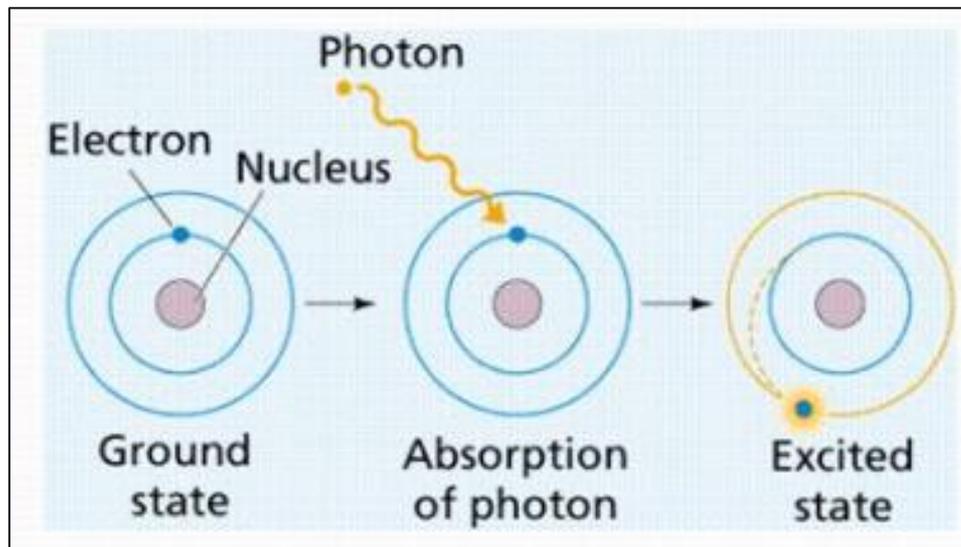


### Etat de transition énergétique des électrons

## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible concerne l'absorption (**A**) des ondes électromagnétiques à une longueur d'onde  $\lambda$  dans le visible et l'ultraviolet par des entités chimiques (molécules) en solution. Cette absorption (**A**) qui correspond à des transitions énergétiques des électrons, traduit le rapport entre l'intensité de radiation incidente  $I_0$  et l'intensité de la radiation transmise  $I_t$ .

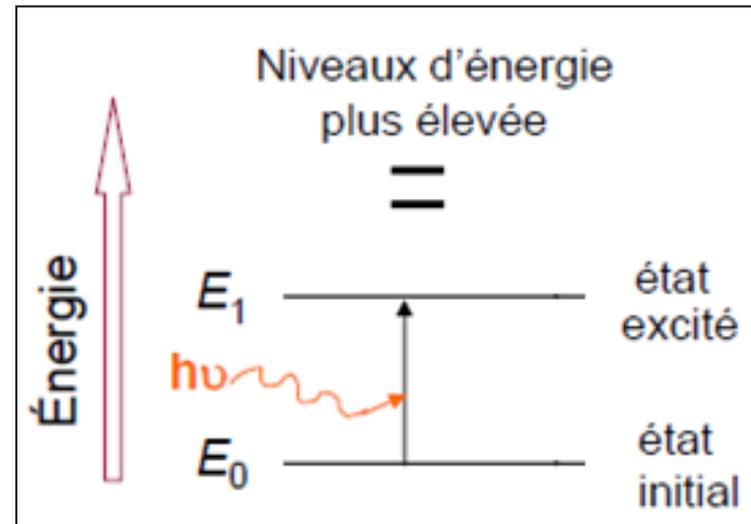
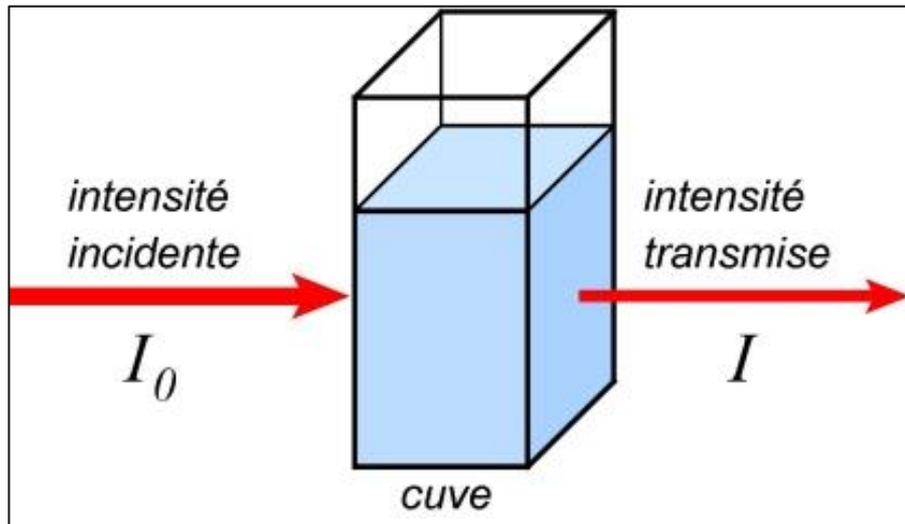
L'énergie du photon est absorbée par une molécule (ou un atome) se trouvant dans son état fondamental  $E_0$  (niveau d'énergie le plus bas) et passe alors à un état excité d'énergie plus élevée  $E_1$ .



## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible concerne l'absorption (**A**) des ondes électromagnétiques à une longueur d'onde  $\lambda$  dans le visible et l'ultraviolet par des entités chimiques (molécules) en solution. Cette absorption (**A**) qui correspond à des transitions énergétiques des électrons, traduit le rapport entre l'intensité de radiation incidente  $I_0$  et l'intensité de de la radiation

L'énergie du photon est absorbée par une molécule (ou un atome) se trouvant dans son état fondamental  $E_0$  (niveau d'énergie le plus bas) et passe alors à un état excité d'énergie plus élevée  $E_1$ .

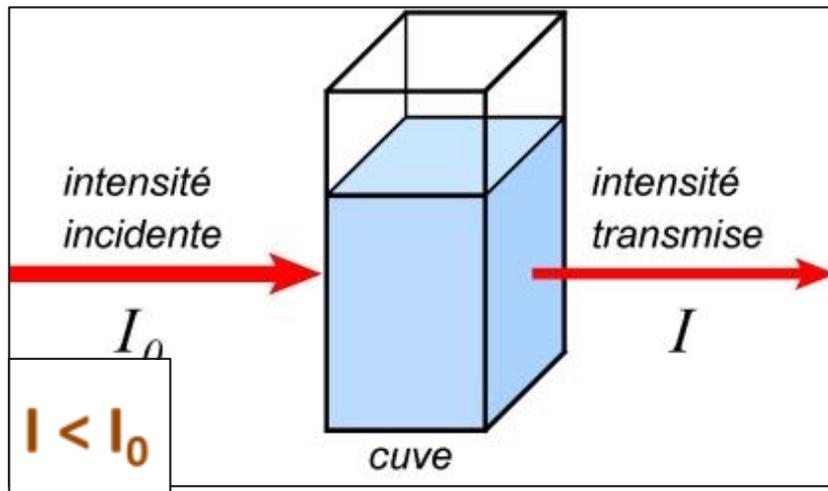


Etat de transition énergétique des électrons au cours de l'absorption dans l'UV-Visible

# La spectroscopie d'absorption UV-Visible

## Absorbance (A) et transmittance (T%)

L'absorbance de la lumière (**A**) est liée au nombre de molécules présent dans la solution (concentration de la solution). La transmittance (**T%**) est la lumière transmise et non absorbée par les molécules de la solution.



$$\text{Absorbance (A)} = \log \frac{I_0}{I}$$

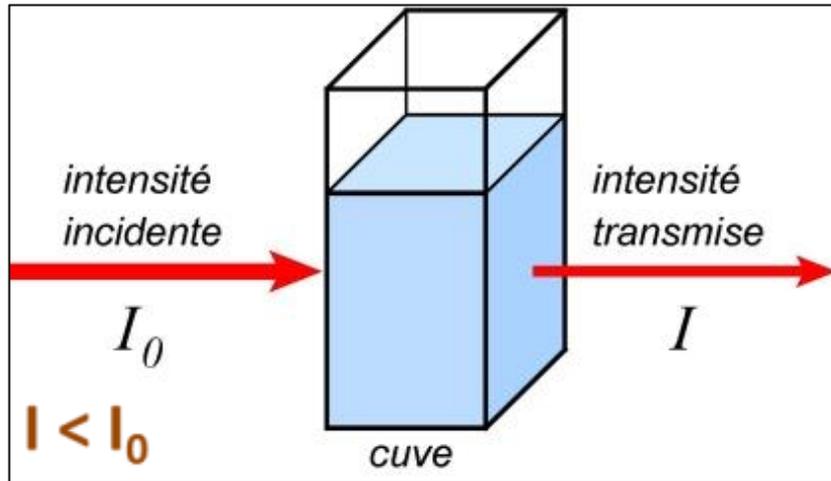
$$\% \text{Transmission (T)} = \left[ \frac{I}{I_0} \right] \times 100$$

$I_0$  est l'intensité incidente de la lumière sur l'échantillon

$I$  est l'intensité sortante de l'échantillon

# La spectroscopie d'absorption UV-Visible

## Absorbance (A) et transmittance (T%)



$$\text{Absorbance (A)} = \log \frac{I_0}{I}$$

$$\% \text{Transmission (T)} = \left[ \frac{I}{I_0} \right] \times 100$$

### Variations de I, T et A

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

- Pour mesurer l'absorbance d'une solution on utilise un spectrophotomètre
- Le résultat obtenu est un spectre d'absorption de la solution: qui est une courbe représentant son absorbance en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$ .

# La spectroscopie d'absorption UV-Visible

## Schéma du spectrophotomètre

Source de lumière monochromatique variable

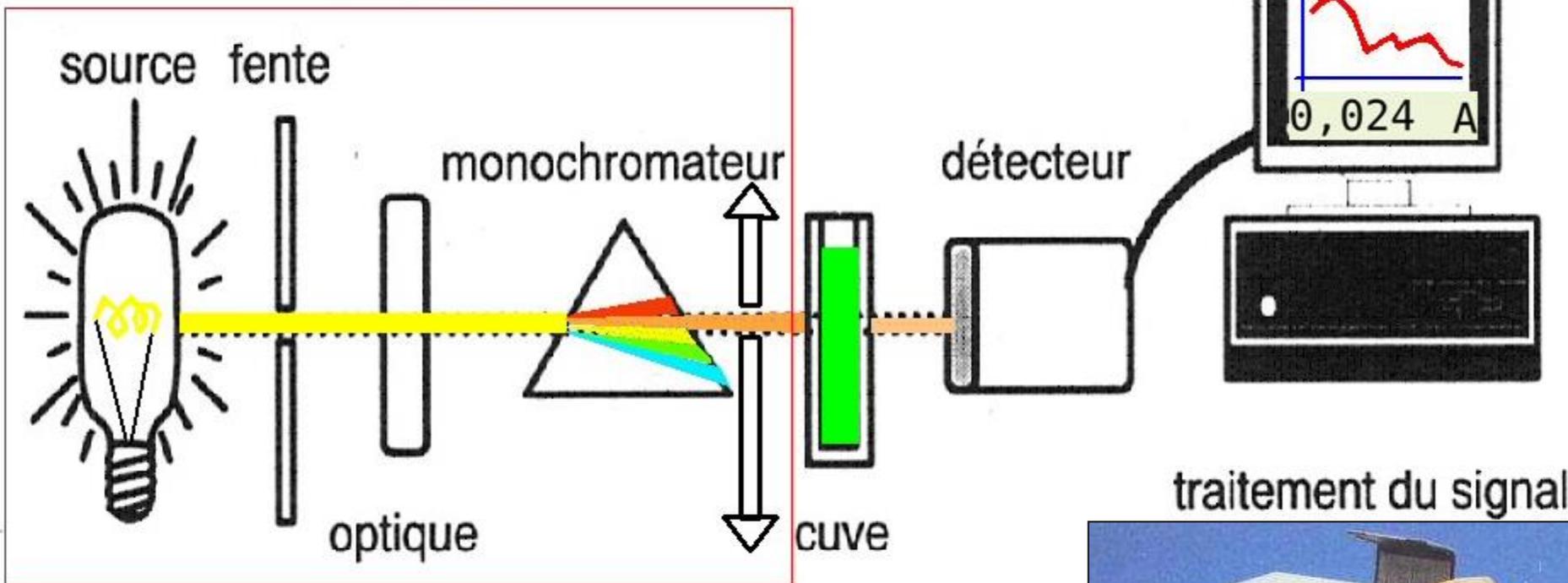


schéma fonctionnel d'un spectrophotomètre



## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

Un spectrophotomètre est un appareil capable de mesurer l'absorbance ( $A$ ) d'une substance colorée ou transparente en solution pour une longueur d'onde donnée  $\lambda$  : Il est constitué :

- ❖ d'une source de lumière blanche ;
- ❖ d'un système dispersif ( réseau ou prisme ) muni d'une fente capable de sélectionner une lumière monochromatique incidente tombant sur une cuve qui porte l'échantillon, c'est le monochromateur.
- ❖ d'un système optoélectronique permettant de calculer la valeur de  $A$  à l'aide de mesures de puissances lumineuses.

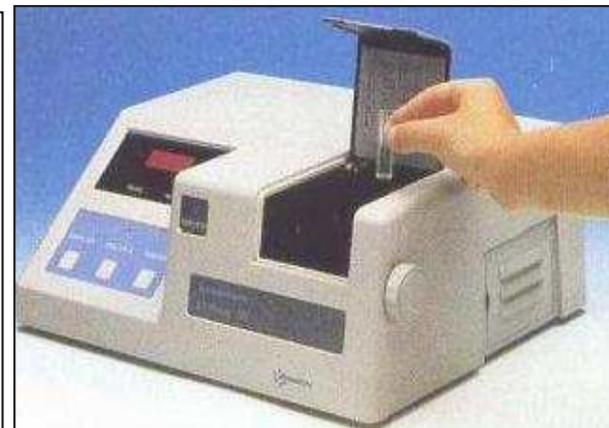
# La spectroscopie d'absorption UV-Visible: Modèles du spectrophotomètre



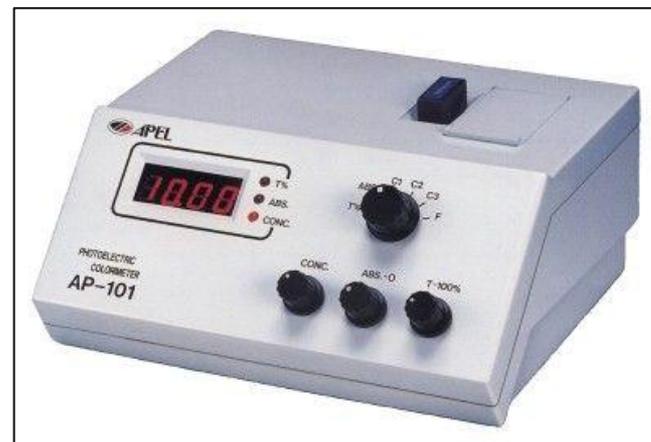
**Spectrophotomètre UV-Visible  
lecteur de plaque**



**Spectrophotomètre UV-Visible lecteur de cuve**



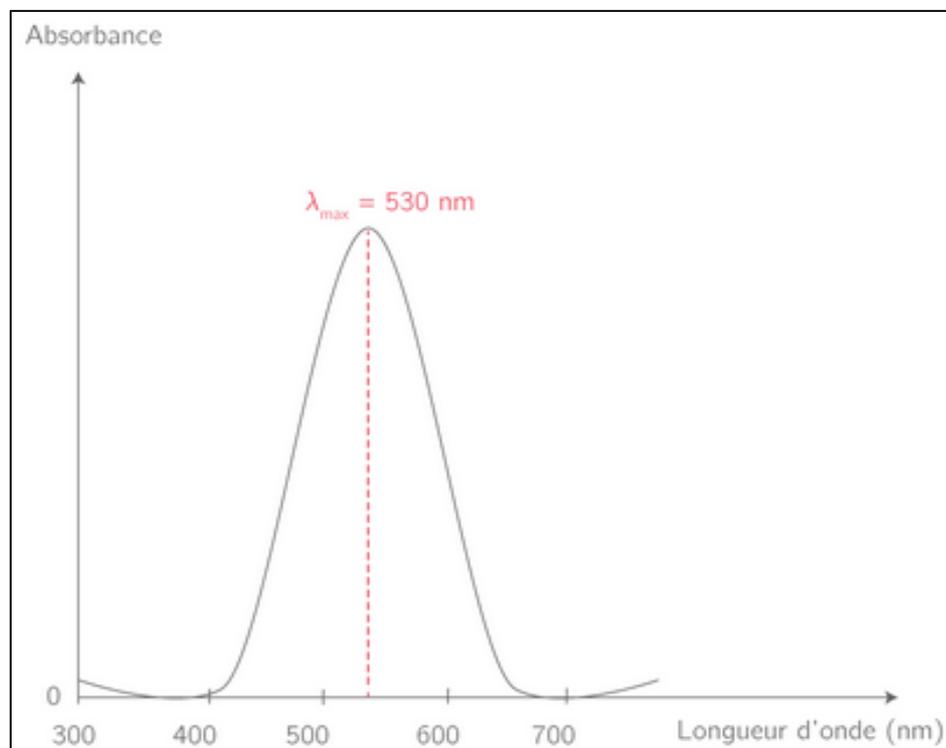
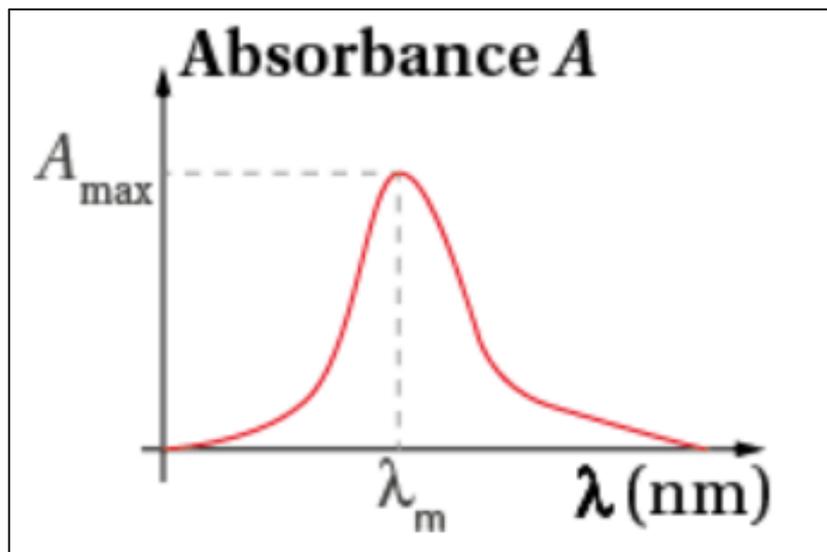
**Cuves du spectrophotomètre**



**Colorimètre (Visible)**

## La Spectroscopie moléculaire: Spectrophotométrie UV-Visible

Le spectre d'absorption d'une solution est la courbe représentant son absorbance en fonction de la longueur d'onde. Le spectre d'absorption représente les bandes d'absorption caractérisées par leurs longueurs d'onde maximales  $\lambda_{\max}$

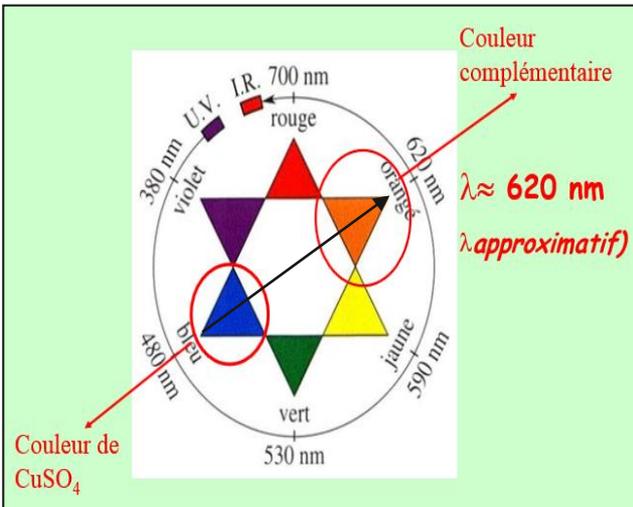
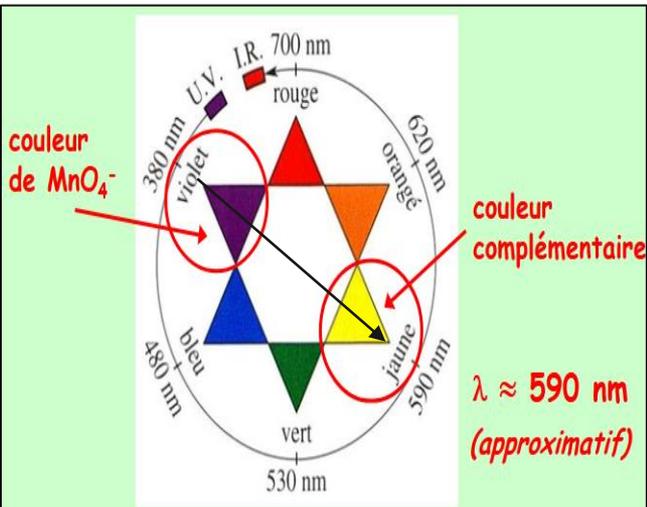
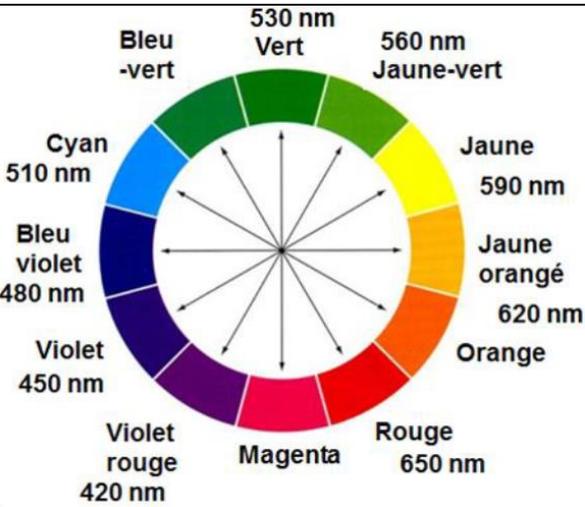


**Spectre d'absorption UV-Visible d'une solution des ions de permanganate**

# La spectroscopie moléculaire: Spectrophotométrie d'absorption dans UV-Visible

La mesure de l'absorbance doit être réalisée à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. Cette longueur d'onde peut être déterminée à partir de la couleur de la solution en prenant la couleur de la longueur d'onde (lumière) diamétralement opposée sur le cercle chromatique. C'est la longueur d'onde qui donne la plus grande valeur d'absorption.

**Exemple:** une solution de permanganate de potassium est violet, à l'aide du cercle chromatique on détermine la couleur de la lumière qu'elle absorbe majoritairement. Il s'agit de la couleur diamétralement opposée au magenta, c'est la couleur jaune de longueur d'onde  $\lambda_{\max}$  590 nm.



**Cercle (étoile) chromatique de la lumière visible**

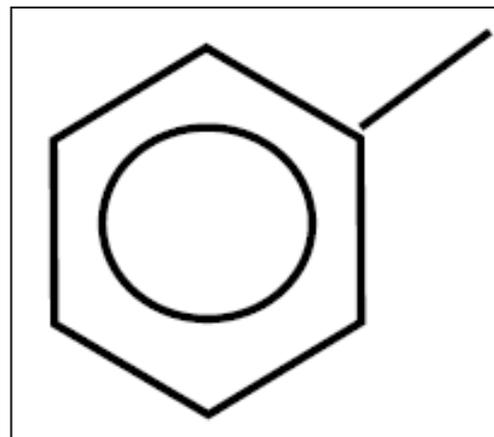
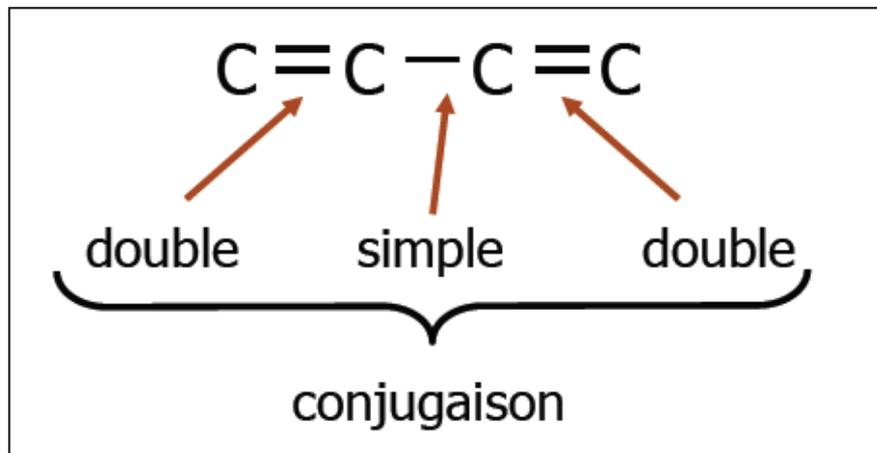
## **Chromophores et absorption dans le spectre UV-Visible**

L'absorbance d'une solution dans la lumière UV-visible est assurée par la présence d'un chromophore, qui est responsable de l'absorption maximale de la lumière complémentaire.

**Un chromophore** est un groupe d'atomes comportant une ou plusieurs doubles liaisons et formant avec le reste de la molécule une séquence de doubles liaisons conjuguées (alternance de doubles et simples liaisons), et qui sont responsables de pics d'absorption dans l'ultraviolet.

- Dans le visible (400-800 nm) le chromophore (chromogène) développe une coloration de la solution, cette couleur détermine la couleur complémentaire de la lumière absorbée.
- Dans l'UV (100-400 nm) la solution est incolore, le chromophore est responsable de l'absorbance de la lumière.

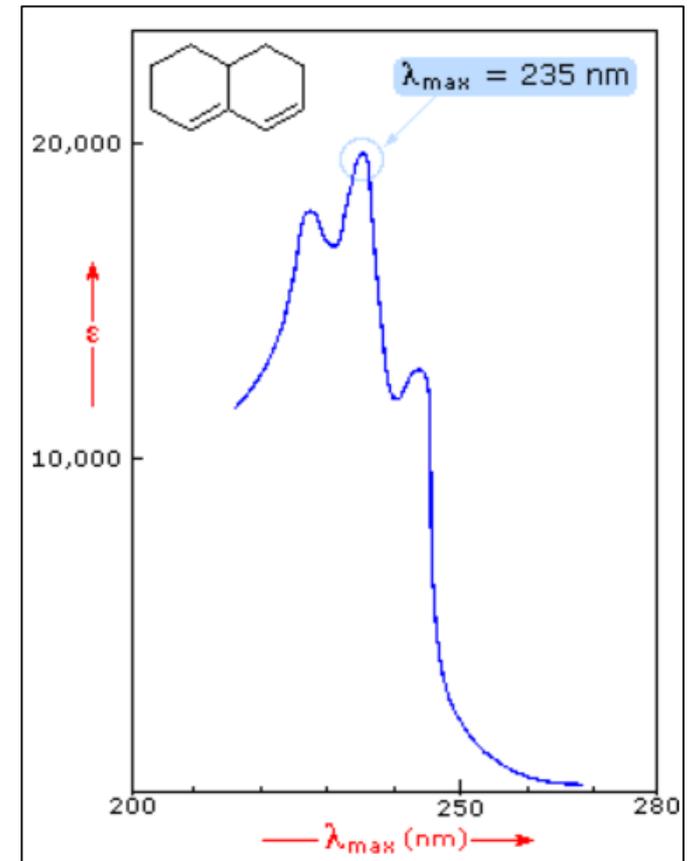
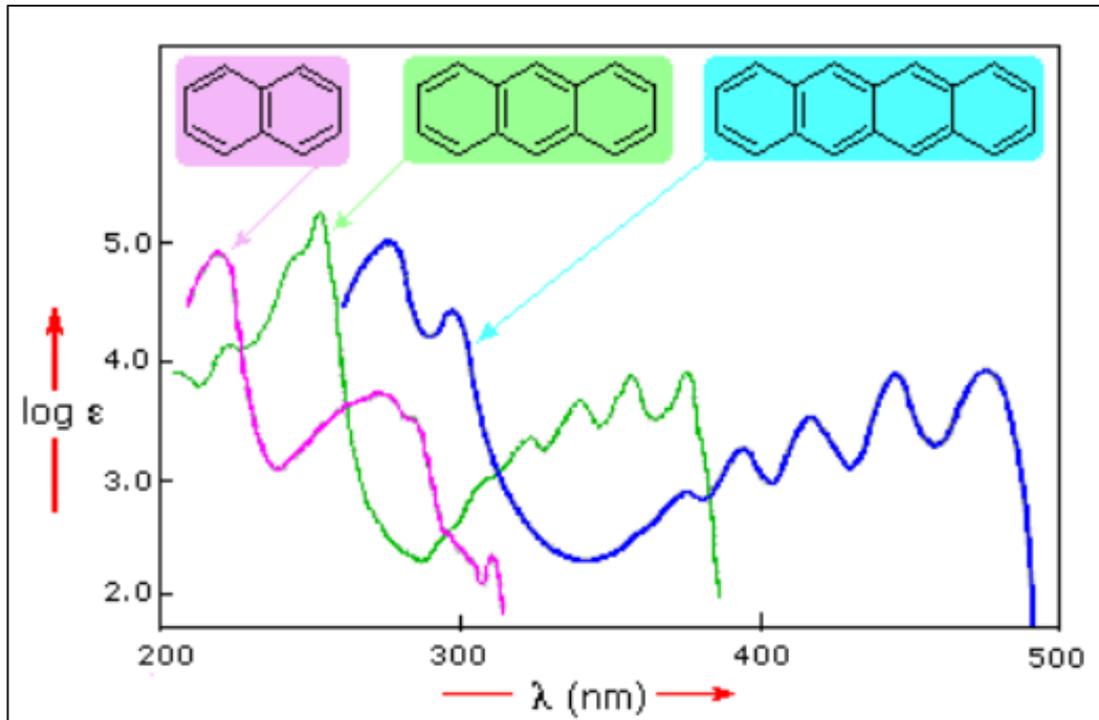
**Chromophores et absorption dans le spectre UV-Visible:** Un chromophore est un groupe d'atomes comportant une ou plusieurs doubles liaisons et formant avec le reste de la molécule une séquence de doubles liaisons conjuguées (alternance de doubles et simples liaisons), et qui sont responsables de pics d'absorption dans l'ultraviolet.



Noyau aromatique

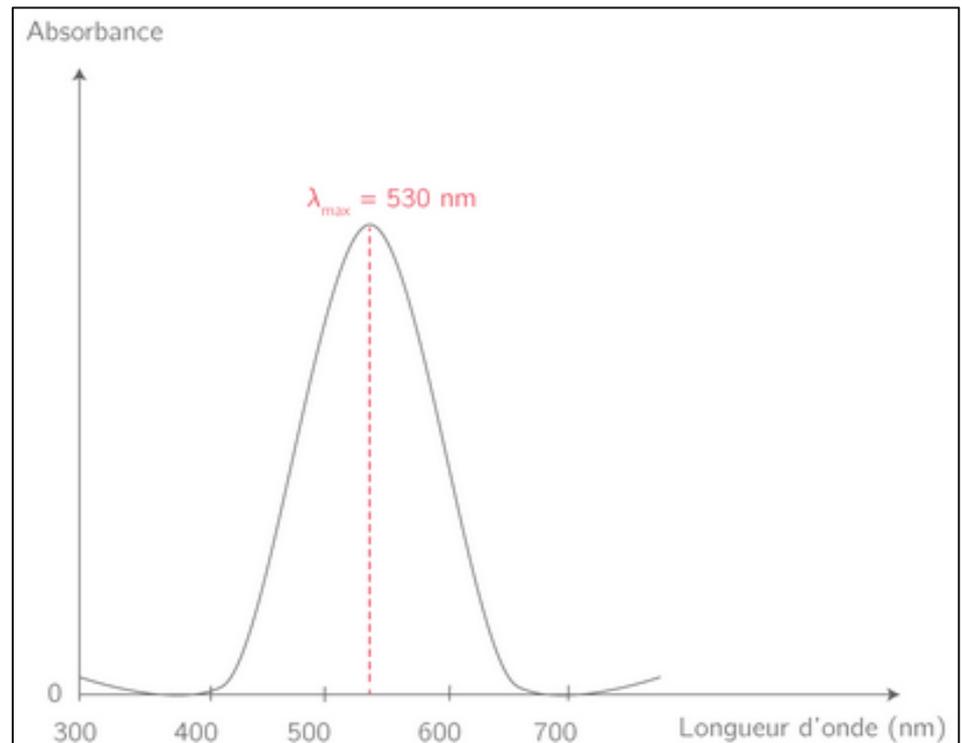
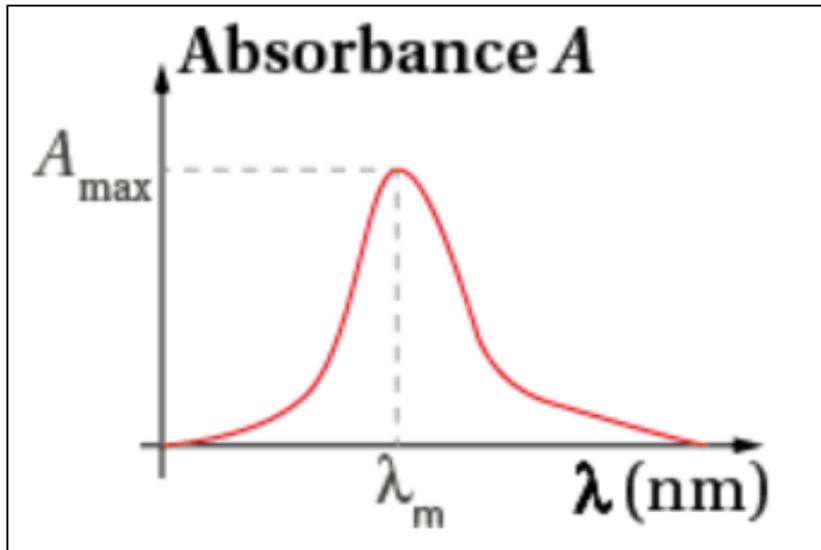
# La spectroscopie moléculaire: Spectrophotométrie d'absorption dans *UV-Visible*

**Chromophores** : quand le nombre de doubles liaisons conjuguées (alternance de doubles et simples liaisons) augmente dans la solution la longueur d'onde d'absorption augmente ( elle se rapproche du visible).



## La Spectroscopie moléculaire: Spectrophotométrie UV-Visible

Le spectre d'absorption d'une solution est la courbe représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Le spectre d'absorption représente les bandes d'absorption caractérisées par leurs longueurs d'onde maximales  $\lambda_{\max}$



**Spectre d'absorption UV-Visible d'une solution des ions de permanganate**

## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

### La relation entre l'absorbance (A) et la concentration

**La loi de Beer-Lambert** : traduit la relation entre l'absorbance, la concentration et la longueur de solution traversée par la lumière dans la cuve de mesure

Loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda).L.C$$

$$C = A(\lambda) / [ \varepsilon(\lambda).L ]$$

**A** = absorbance (ou D.O.)

**c** = concentration (mol.litre<sup>-1</sup>)

**l** = longueur de solution traversée (cm)

**ε** = absorptivité molaire (mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.litre).

(souvent appelé : "coefficient d'absorption")

les valeurs expérimentales de ε vont de 0 à 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

## La spectroscopie d'absorption UV-Visible

### La relation entre l'absorbance (A) et la concentration

La loi de Beer-Lambert est appliquée dans le dosage des substances (détermination de la concentration). Deux méthodes sont utilisées:

- **Méthode directe:** Consiste à connaître le  $\epsilon$  de la substance à doser et à mesurer l'absorbance pour déterminer la concentration de la substance à doser.
- **Méthode indirecte:** Ne consiste pas à connaître le  $\epsilon$  de la substance à doser, la détermination de la concentration de la substance peut se faire par;
  - **Comparaison de l'absorbance de la substance à doser avec l'absorbance d'un étalon unique** (un tube étalon) de concentration connue, puis la concentration de la substance est déterminée (par règle de trois).
  - **Comparaison de l'absorbance de la substance à doser avec l'absorbance d'une gamme d'étalonnage** (une série des tubes étalon) de concentration connue, puis la concentration de la substance à partir de la courbe étalon.

Loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda).L.C$$

$$C = A(\lambda) / [ \epsilon(\lambda).L ]$$

# La Spectroscopie moléculaire: Spectrophotométrie UV-Visible

## La relation entre l'absorbance (A) et la concentration

Loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda).L.C$$

$$C = A(\lambda) / [\varepsilon(\lambda).L]$$

Courbe d'étalonnage

