

Chapitre 02 : Les méthodes spectrales.

I- Généralités sur la lumière

I.1-La lumière :

Est un ensemble d'ondes électromagnétiques où chaque onde se propage à la célérité c et sa longueur d'onde λ est :

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Ce phénomène vibratoire est caractérisé par :

- c : la vitesse de propagation (en l'occurrence $c = 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$, constante pour toutes les ondes électromagnétiques dans le vide),
- ν : la fréquence ν (nombre de vibrations par seconde)
- λ : la longueur d'onde (distance parcourue pendant une vibration).

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

$$E = h.\nu$$

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

E : en Joule (J)

I.2- Le spectre du visible :

Le spectre électromagnétique est quasi-totalement invisible par un œil humain, sauf une petite portion dite **spectre visible** qui s'étend du rouge (longueur d'onde de 780 nm) au violet (longueur d'onde de 380 nm) en passant par toutes les couleurs de l'arc-en-ciel (communément divisé en rouge, orange, jaune, vert, bleu, indigo et violet).

A l'intérieur de cet intervalle, la longueur d'onde détermine la couleur perçue.

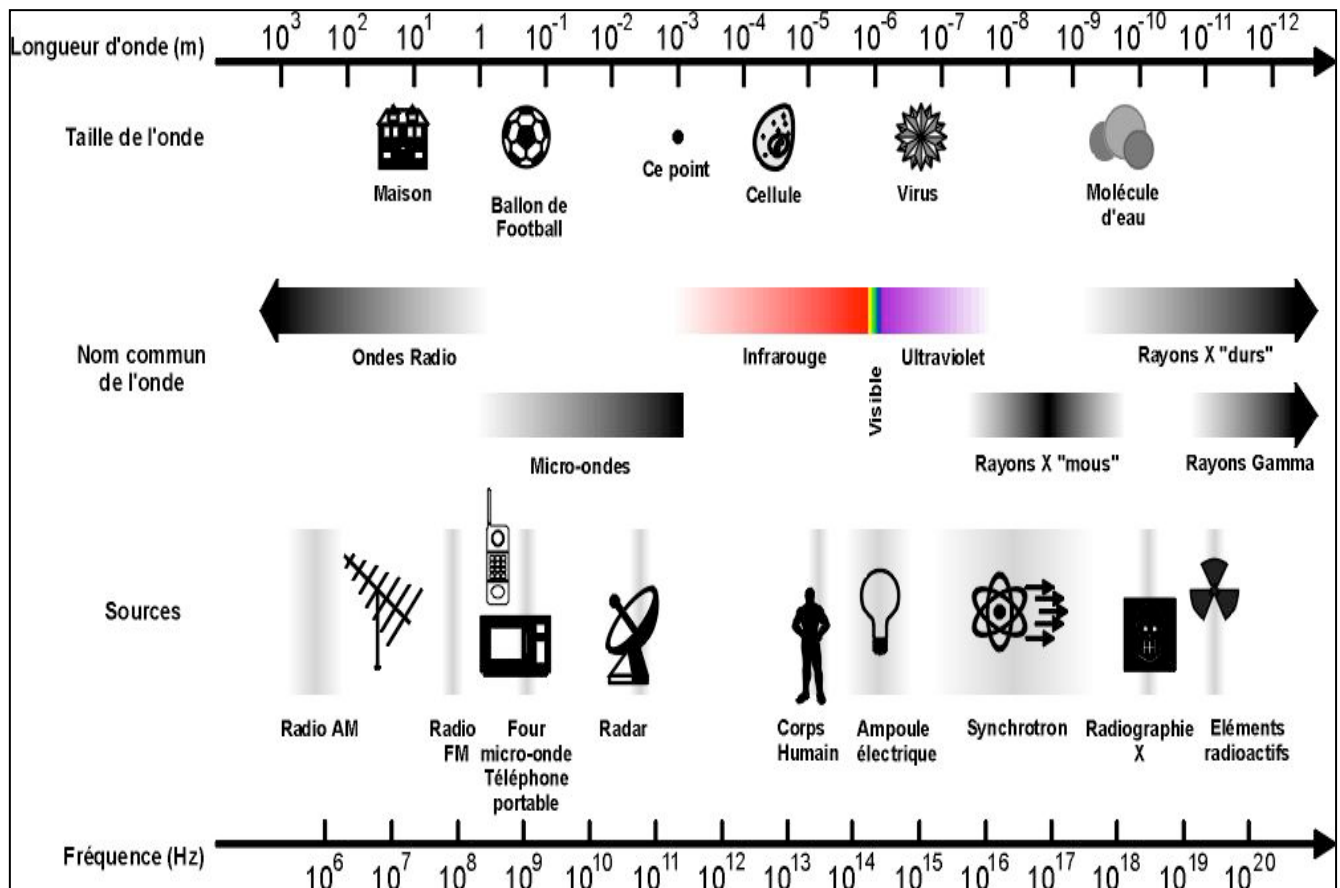


Figure 01 : spectre des radiations électromagnétiques

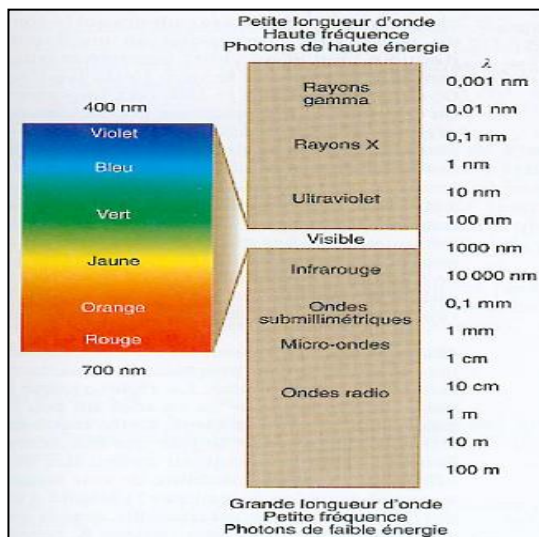


Tableau 8. II. : Couleurs et longueurs d'onde correspondantes

Longueur d'onde (nm)	400	450	500	570	590	610	800
Couleur		violet	bleu	vert	jaune	orangé	rouge

Figure 02 : spectre du visible.

I.3- Relation lumière / matière (Émission et absorption) :

Il peut se produire des *échanges énergétiques* entre la matière et un rayonnement dans deux sens :

- Émission :

La matière peut émettre du rayonnement : les atomes émettent un rayonnement si on les soumet à une excitation. Celle-ci peut être :

- *d'origine thermique* (flamme, plasma d'argon,...) ou *électrique* (atomisation par arc, étincelle,...);
exp : Spectrométrie d'Émission Atomique
- ou avoir pour origine un *bombardement électronique ou électromagnétique de haute énergie* (γ ou X), *exp*: *spectrométrie de Fluorescence X*

- Absorption :

L'énergie d'un rayonnement peut être absorbée par la matière : « *l'intensité d'une onde lumineuse de longueur d'onde λ traversant un échantillon homogène s qui absorbe à cette longueur d'onde, diminuera progressivement pendant toute la durée de son trajet à travers l'échantillon* ».

I.4- Relation domaine / technique :

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

- Des γ et des RX : le rayonnement est extrêmement énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques de cœur. Ces Interactions sont utilisées notamment dans la **spectrométrie γ** et dans la **fluorescence X**.
- Des UV et du visible : le rayonnement est énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques périphériques et/ou des orbitales moléculaires. Ces interactions sont utilisées notamment dans :
 - **La spectrométrie d'émission atomique (SEA),**
 - **La spectrométrie d'absorption atomique (SAA),**
 - **La spectrométrie moléculaire (UV-vis).**
- De l'infra rouge (IR) le rayonnement est faiblement énergétique et ne peut affecter principalement que les modes de vibration des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans **la spectrométrie IR** et **la spectrométrie Raman**.
- Des micro-ondes : finalement, le rayonnement est très faiblement énergétique et ne peut affecter que les modes de rotation des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la **spectrométrie micro-onde**.

On s'intéresse dans ce chapitre à l'étude d'une technique d'absorption « **Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV/VIS** », et d'une d'émission « **Spectrométrie de fluorescence** ».

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV/VIS

I- L'absorbance et la transmittance :

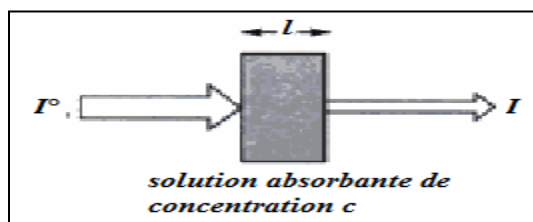
L'**absorbance** mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. On utilise aussi les termes **densité optique**. Cette grandeur est définie par :

$$A = -\log T$$

A : Absorbance, T : Transmittance.

En optique, 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 (I₀) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur. T est exprimée par :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100$$



L'absorbance diffère selon la nature de la substance étudiée, selon la longueur d'onde sous laquelle elle est analysée, et selon la concentration de cette substance dans le milieu traversé. Elle est couramment mesurée par un spectrophotomètre.

I.1- Origine de l'absorption :

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels.

Les molécules absorbantes passent de l'état fondamental à un état excité transitoire en absorbant l'énergie des photons. La relaxation ou le retour vers l'état initial se fait en cédant l'excès d'énergie sous forme de chaleur.

I.2- Groupements chromophores :

Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés, etc.) responsables de l'absorption en UV/VIS sont appelés groupements chromophores :

Tableau 01 : chromophores caractéristiques de quelques groupements azotés.

Nom	Chromophore	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
amine	-NH ₂	195	3 000
oxime	= NOH	190	5 000
nitro	-NO ₂	210	3 000
nitrite	-ONO	230	1 500
nitrate	-ONO ₂	270	12
nitroso	-N=O	300	100

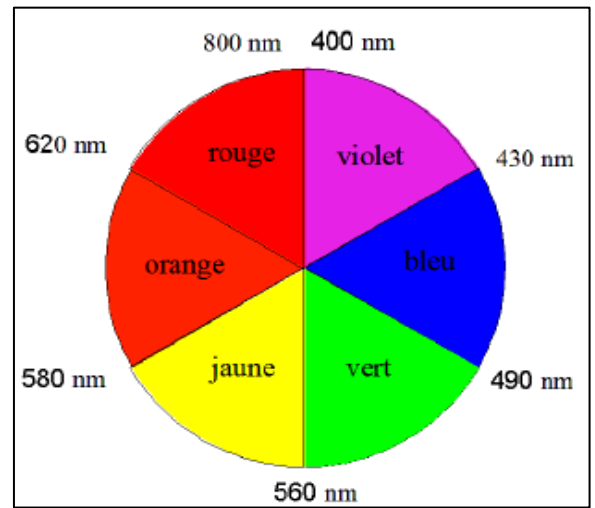
I.3- Absorption de la lumière et couleur

Toute substance transparente traversée par du rayonnement arrête toujours une partie de ce rayonnement: c'est le phénomène d'absorption (l'énergie rayonnante absorbée est convertie en énergie thermique dans la substance).

La lumière transmise est constituée des radiations visibles de la lumière blanche incidente à la quelle manque les radiations absorbées par la substance traversée. La lumière transmise est une lumière colorée. La couleur prise par la substance est la couleur obtenue par recombinaison des radiations transmises, c'est à dire peu absorbées par la substance.

Exemple : une solution de permanganate de potassium a une bande d'absorption dans le jaune vert: elle a donc une couleur rose violacée qui est la couleur complémentaire du jaune-vert par rapport à la source de lumière blanche incidente (la lumière transmise est composée de violet, bleu, orange et rouge).

La couleur d'un composé est le complémentaire de ce qu'il absorbe.



I.4- Le spectre d'absorption:

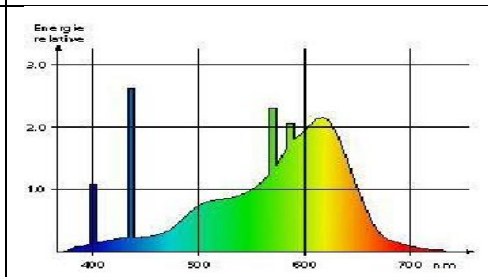
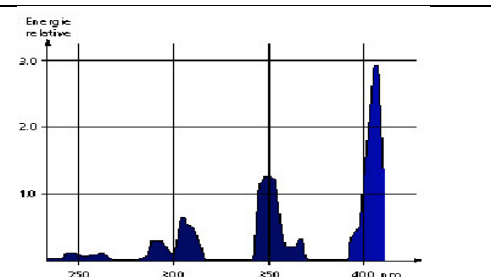
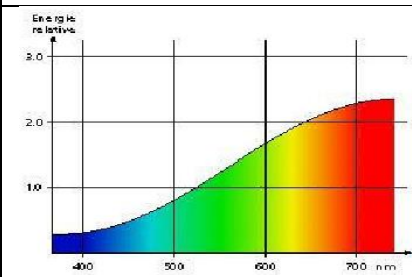
Il s'agit de la distribution en **énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission.....** etc (signal en général) en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence.

C'est un graphique d'une fonction de l'atténuation (absorbance ou transmittance) d'un faisceau de rayonnement en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou du nombre d'onde. On distingue 3 types de spectres :

Les spectres continus : pour lesquels il existe un « signal » pour chaque longueur d'onde (ou fréquence).

Les spectres discontinus : ou *spectres de raies*, ou encore *spectres discrets*, qui ne disposent d'un signal que pour certaines fréquences (longueurs d'onde) spécifiques, caractéristique de la matière irradiante ou irradiée.

Les spectres combinés : qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret.



II- Spectrométrie d'absorption moléculaire dans l'UV-Visible :

Cette méthode très commune dans les laboratoires, est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses dans le domaine spectral de l'UV/VIS qui est divisé en trois plages de longueurs d'onde :

- proche UV (185-400 nm),
- visible (400-700 nm)
- et très proche infrarouge (700-1100 nm).

La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm.

II.1- Le spectrophotomètre

Un spectrophotomètre est un appareil capable de mesurer l'absorbance **A** d'une substance colorée en solution pour une longueur d'onde donnée λ . 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 porte échantillon pouvant contenir (une substance colorée d'étude S ; ou une solution de référence E solution incolore)
- d'un système de mesure de flux lumineux permettant de calculer la valeur de **A**

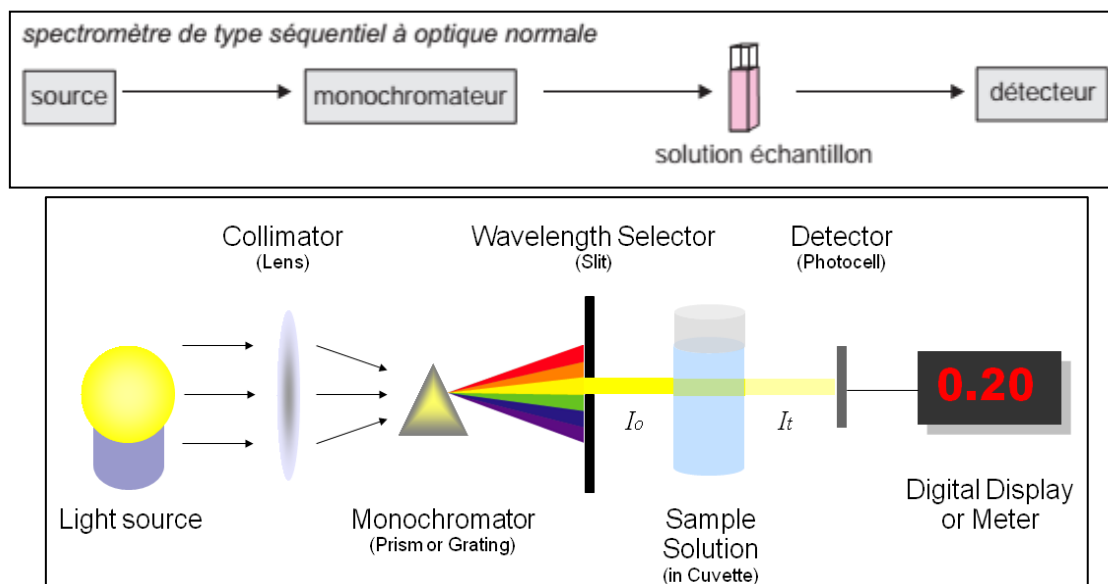


Figure 03 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre

A) Sources lumineuses :

On ne connaît pas de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible. On trouve généralement réunies :

- Une lampe à arc au deutérium sous moyenne pression pour la partie UV (< 350 nm).
- Une lampe à incandescence avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) pour la partie visible du spectre et au-delà (à partir de 350 nm). Cette source est maintenant souvent remplacée par une lampe à arc xénon.

B) Monochromateurs

Ce dispositif permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission : la lumière monochromatique. Ils emploient les éléments constitutifs suivants:

- **Une fente d'entrée s** : pour donner au faisceau une forme et des dimensions bien définies.
- **Un collimateur d'entrée C1**: lentille ou miroir pour produire un faisceau parallèle de radiations.
- **Un disperser D** : réseau ou prisme.
- **Un élément de focalisation C2** : lentille ou miroir qui forme l'image de la fente d'entrée sur une surface plane (plan focal PF).
- **Un plan focal PF**

Tous ces éléments sont centrés sur l'axe optique AO.

<p>Un rayon lumineux vert (V) pénètre par la fente d'entrée (s) avant d'être redressé en un faisceau parallèle par la lentille de collimation (C1). En passant dans le prisme (D), la lumière est dispersée en ses deux composantes : jaune (J) et bleue (B). Finalement, la lentille de focalisation (C2) « concentre » les rayons dispersés sur le plan de focalisation (PF).</p>	<p>Un rayon lumineux vert (V) pénètre par la fente d'entrée (s) avant d'être redressé en un faisceau parallèle par un miroir concave (C1). En passant sur le réseau à réflexion (D), la lumière est dispersée en ses deux composantes : jaune (J) et bleue (B). Finalement, un deuxième miroir concave (C2) « concentre » les rayons dispersés sur le plan de focalisation (PF).</p>
<p>montage à prisme de Bunsen</p>	<p>montage à réseau de Czerny-Turner</p>

Figure 04 : Deux montages courants de monochromateurs

C) Échantillons :

Le plus fréquemment, il s'agit de *substances en solution*.

Les cuvettes :

En général, on utilise des récipients (cellules) d'épaisseur fixe, calibrée et connue avec précision ($10,00 \pm 0,01$ mm) pour pouvoir déterminer des concentrations via la loi de Beer-Lambert. Des cellules de 0,5 à 50 mm de trajet optique sont d'utilisation courante. On utilise aussi des cellules d'épaisseur variable à vis micrométrique.

Les cellules doivent être faites d'un matériau transparent à la longueur d'onde à utiliser (UV = quartz, visible = verre ou plastic). Leurs faces doivent être optiquement planes.

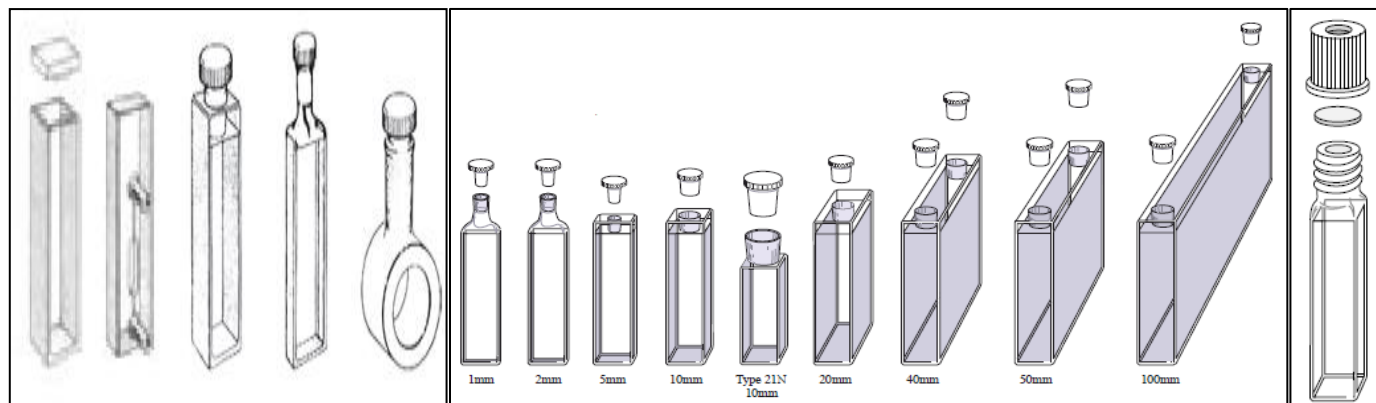


Figure 05 : les cuvettes du spectrophotomètre.

E) Détecteurs :

Le détecteur va convertir en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Il est donc logique que le premier détecteur utilisé ait été l'œil, mais cette méthode, trop subjective a rapidement laissé la place au traitement numérique par les détecteurs électriques :

- Barrettes de diodes
- Capteur à transfert de charge
- Capteur à pixels actifs
- Photomultiplicateur

III- Loi de Beer-Lambert :

L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative. Les mesures reposent sur la loi de **Beer-Lambert** qui relie l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution.

La loi de Beer et Lambert est présentée par:

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l$$

A : désigne l'absorbance mesurée par un spectrophotomètre (sans unité)

l : est l'épaisseur de la solution traversée (en cm),

C : la concentration molaire (mol/l)

ϵ_{λ} : le coefficient d'absorption "ou d'extinction" molaire qui dépend de l'espèce analysée **X** et de la longueur d'onde λ (l/mol.cm). Pour une solution d'une espèce chimique **X** « suffisamment diluée », l'absorbance **A** de cette espèce est proportionnelle à [**X**].

Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- ❖ la lumière utilisée doit être monochromatique "spectre d'absorption, ϵ_{λ} spécifique pour chaque λ ";
 - ❖ les concentrations doivent être faibles (pour garder la linéarité, on utilise une [**X**] < 0.01 M);
 - ❖ 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.
- Éviter la formation des produits avec A différente de celle de X.

III.1- Additivité des absorbances :

Pour toute longueur d'onde, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange (pris à la même concentration) pour cette longueur d'onde.

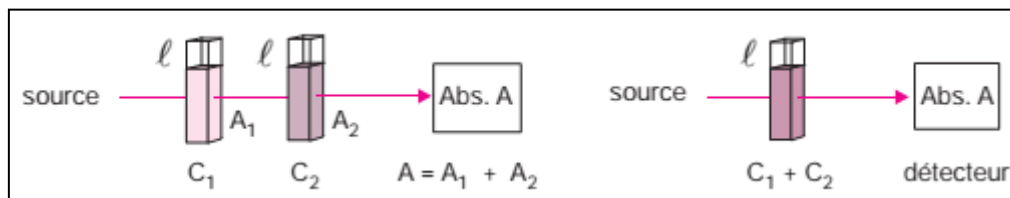


Figure 05: Additivité des absorbances.

La loi de Beer et Lambert est additive : Ceci veut dire que si on mesure l'absorbance A , dans une cuve d'épaisseur l , d'un mélange de deux composés 1 et 2 en solution dans un solvant, on obtiendra la même absorbance totale si la lumière passe successivement à travers deux cuves d'épaisseur l , placées l'une après l'autre, contenant l'une le composé 1 (Abs : A_1) et l'autre le composé 2 (Abs : A_2).

Il faut bien sûr que les concentrations et le solvant soient les mêmes que pour le mélange initial (on donne ici l'indice 1 au composé 1 et l'indice 2 au composé 2) :

$$A = A_1 + A_2 = l(\varepsilon_1 C_1 + \varepsilon_2 C_2)$$

III.2- Colorimétrie :

Quand un composé n'absorbe pas la lumière, il peut néanmoins faire l'objet d'un dosage photométrique si on peut le transformer préalablement à la mesure en un dérivé qui, lui, comporte un chromophore exploitable. Par cet artifice, il devient possible de doser toutes sortes d'espèces chimiques dont l'absorption est initialement soit très faible, soit dans une partie du spectre où coexistent d'autres absorptions qui interfèrent. À cette fin, la mesure d'absorbance est précédée d'une transformation chimique qui doit être à la fois spécifique, totale, rapide, reproductible et conduire à un dérivé stable en solution. C'est le principe des tests colorimétriques.

Le terme de colorimétrie vient de ce que les premiers dosages effectués dans ce domaine, bien avant l'invention des spectrophotomètres, se faisaient avec de la lumière naturelle (lumière blanche) par comparaison visuelle directe de la coloration de l'échantillon dosé avec celle de témoins de concentrations connues.

Les deux situations qui se présentent le plus souvent sont les suivantes :

- Le composé à doser est présent dans une matrice dont certains constituants absorbent dans le même domaine spectral : la mesure directe de l'absorbance due au seul composé est donc impossible (Figure 06 : courbe a). Pour contourner cette difficulté, on transforme de façon spécifique le composé par une réaction totale en un dérivé dont la courbe d'absorption se situe dans une région libre de toute interférence avec la matrice (Figure 06 : courbe b).
- Le composé à doser n'a pas de chromophore exploitable à l'état brut: on fait apparaître, ici encore, un chromophore de remplacement en dérivant l'espèce initiale suivant le même principe (Figure 06 : courbes c et d).

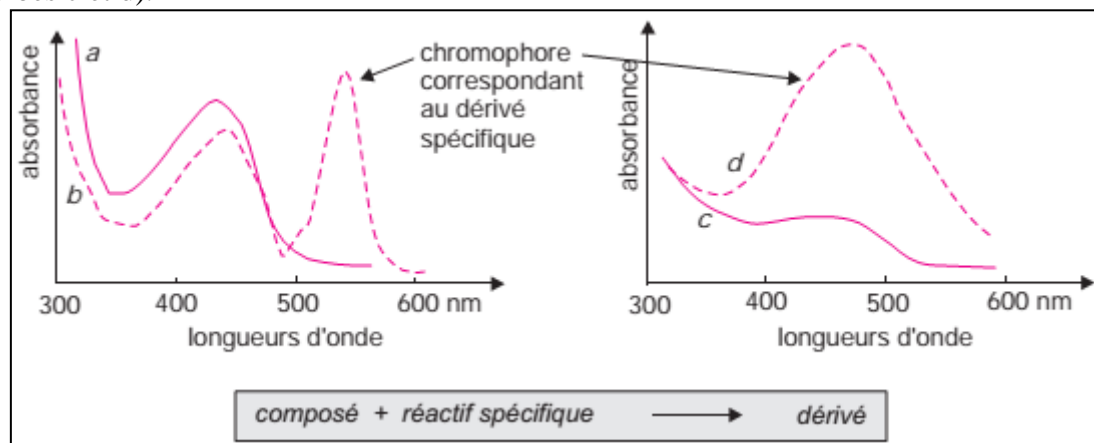


Figure 06: Illustration de deux situations fréquemment rencontrées.

« Un composé masqué dans un mélange ou bien ne présentant pas d'absorption nette peut néanmoins être dosé par colorimétrie en faisant appel à une transformation chimique qui le transforme en un dérivé exempt d'interférences ».

III.3- Protocole général de mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre

Pour mesurer l'absorbance A d'une substance en solution aqueuse pour une longueur d'onde λ :

- on place, dans le spectrophotomètre, une cuve contenant la solution de référence (on règle le zéro du spectrophotomètre $A = 0$ par un « blanc »)
- on place, dans le spectrophotomètre, une cuve contenant la solution de la substance à analyser.
- on lit la valeur de A .

NB: Avant chaque mesure d'absorbance, il est nécessaire de vérifier le zéro. Le blanc utilisé doit contenir la solution à laquelle l'élément étudié a été retiré.

III.3.A- Détermination de λ_{\max} d'absorption :

Dans une étude spectrophotométrique UV-Visible, il est d'usage de tracer le graphe de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ .

La courbe $A = f(\lambda)$ (appelée spectre d'absorption de l'espèce chimique) donne la composition de la lumière absorbée en ses différentes longueurs d'onde ; elle permet de déterminer qualitativement la couleur de la substance.

Par exemple, le graphe de la **Figure 07** représente le spectre d'absorption de l'ion permanganate MnO_4^- : la bande d'absorption est dans la gamme [500 nm ; 580 nm] : donc, le vert et le jaune sont fortement absorbés : on retrouve bien la couleur magenta.

L'analyse d'un tel spectre mène à la détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption λ_{\max} .

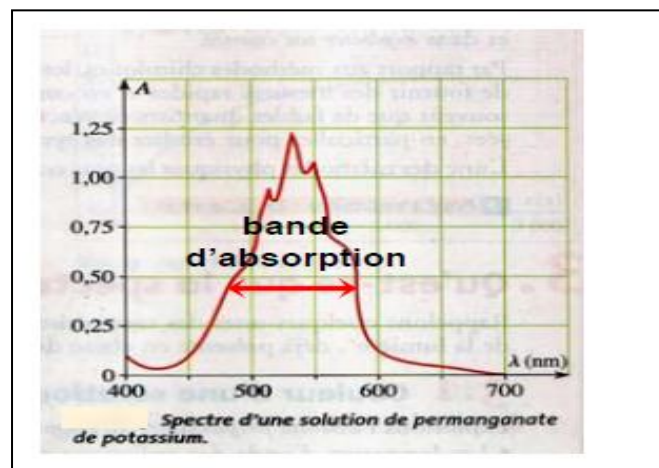


Figure 07 : longueur d'onde d'absorption maximale

III.3.B- Méthodes d'analyse spectrophotométrique :

Il existe plusieurs procédés pour déterminer une concentration par dosage UV-vis, parmi lesquels on cite :

A: Dosage par étalonnage d'une espèce colorée en solution aqueuse :

Un dosage par étalonnage par spectrophotométrie, revient à déterminer la concentration C_0 d'une espèce chimique X en solution aqueuse en utilisant une courbe expérimentale dite courbe d'étalonnage obtenue à partir de mesures d'absorbance :

- ✓ On cherche la longueur d'onde d'absorption maximale λ_{\max} de cet élément, en traçant son spectre d'absorption ($A = f(\lambda)$).
- ✓ à λ_{\max} , on trace la courbe d'étalonnage de l'élément $A = f(C)$:

Pour cela, on prépare des échantillons à des concentrations connues et croissantes de l'élément à doser appelée solutions étalon et on mesure à chaque fois l'absorbance A . Parmi ces 5 échantillons, on prépare le Blanc (un échantillon qui donne $A = 0$ « solvant seul sans l'élément étudié ») et un autre qui donne $A = 100\%$ (élément seul).

- ✓ Finalement, la concentration inconnue C_0 de l'élément peut être déterminée graphiquement de la droite expérimentale $A = f(C)$, en mesurant son absorbance A_0 , puis en reportant cette valeur sur la droite d'étalonnage pour en déduire la concentration.

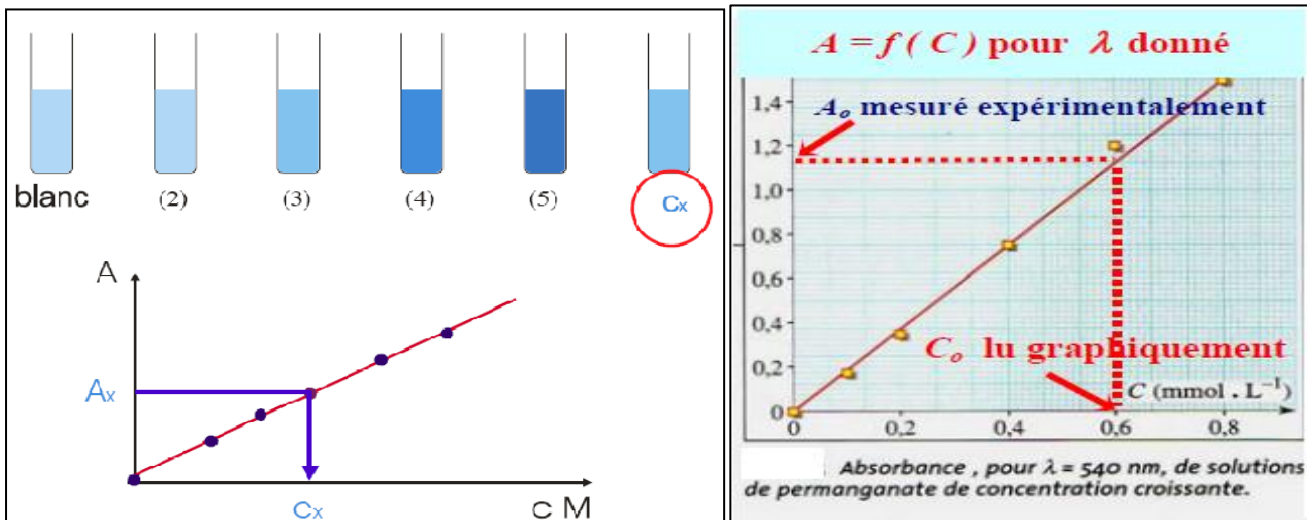


Figure 08 : Illustration de la méthode de la droite d'étalonnage

B: Méthode de l'étalon externe : On compare l'absorbance (A_S) d'une solution de concentration connue (C_S) à l'absorbance (A_X) d'une solution de concentration inconnue (C_X) :

$$A_S = \epsilon l C_S \text{ et } A_X = \epsilon l C_X \text{ d'où } \frac{A_X}{A_S} = \frac{\epsilon l C_X}{\epsilon l C_S} \Leftrightarrow C_X = \frac{A_X C_S}{A_S}$$

IV. Application de la spectrophotométrie UV/VIS :

IV.1- Analyse quantitative

La spectrophotométrie présente de nombreux avantages dans le cadre des dosages :

- Bonne **précision** (de l'ordre de 0,2 à 0,5 % relatif).
- Bonne **sensibilité** (typiquement de 10^{-4} à 10^{-5} M et jusque 10^{-7} M dans les cas les plus favorables).
- Moyenne à grande **sélectivité** (en choisissant judicieusement la longueur d'onde à laquelle on effectue l'analyse).
- **Facilité de mise en œuvre et coût réduit.**
- **Large domaine d'application** : l'utilisation de l'UV-vis comme moyen de dosage représente 95 % des analyses quantitatives dans le domaine de la santé.

IV.2- Analyse qualitative

1-de substances simples absorbantes (dosage directe) :

- Composés aromatiques dans l'eau (tyrosine, acide benzoïque, etc.)
- Composés polyéniques naturels (vitamine A, carotène, etc.)
- Composés contenant des chromophores conjugués tels que C=O et C=N (chlorophylle, hémoglobine, stérols, etc.)
- Dérivés aromatiques substitués (polluants tels que la dioxine, pesticides tel que DDT, etc.)

2- de substances simples non absorbantes (dosage indirecte) :

- Formation d'un **complexe coloré** (ex. : dosage du Fe^{2+} avec l'orthophénantroline).
- **Réaction** transformant la substance à doser en une substance « colorée » (ex. oxydation de Mn^{2+} en MnO_4^- pour le dosage du manganèse dans le ciment).

3- Analyse quantitative de mélanges : ex. Dosage simultané du chrome et du manganèse dans un alliage.

Spectroscopie atomique

La spectroscopie atomique s'applique à l'analyse qualitative et quantitative d'environ 70 éléments. Sa sensibilité couvre un domaine qui s'étend du ppm au ppb. Sa rapidité, sa simplicité, sa sélectivité exceptionnellement élevée et le coût modéré de son appareillage constituent autant d'atouts supplémentaires de la méthode.

Le dosage spectroscopique d'espèces atomiques ne peut s'effectuer que dans un milieu gazeux pour que les atomes individuels (ou quelques ions monoatomiques tels que Fe^+ , Mg^+ ou Al^+) soient bien séparés les uns des autres. Il s'ensuit que la première étape est *l'atomisation*, un processus par lequel l'échantillon est volatilisé et décomposé de manière à obtenir un gaz atomique. Les échantillons atomisés peuvent donner des spectres d'absorption, d'émission ou de fluorescence.

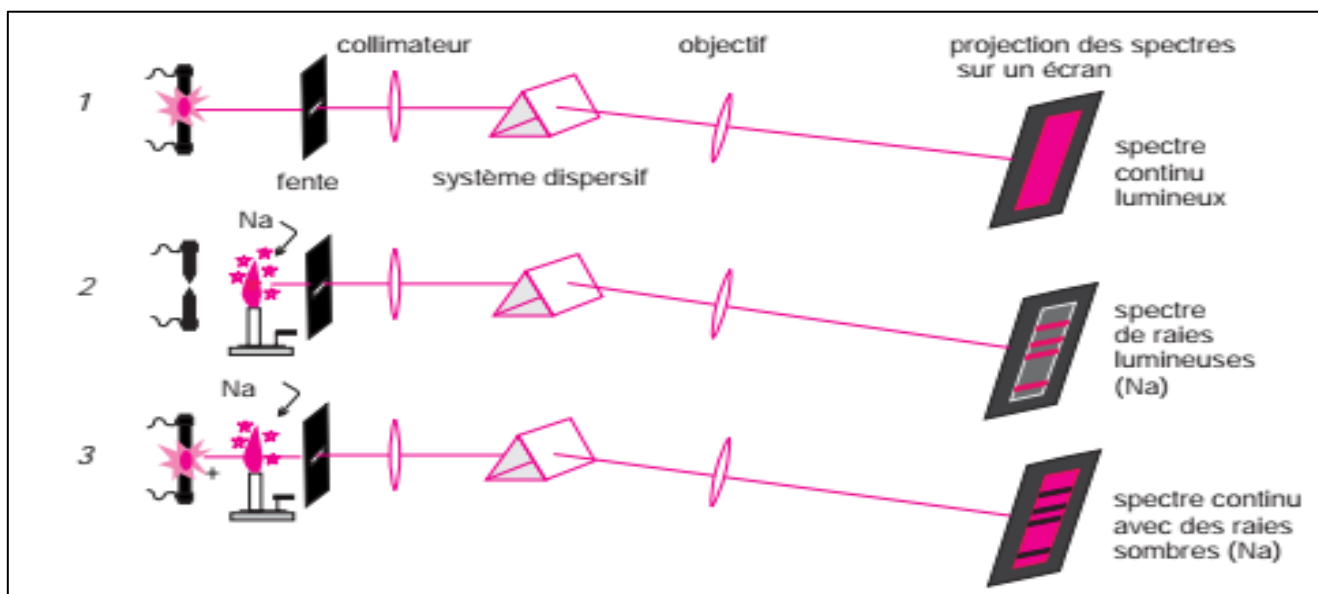
On s'intéresse dans ce chapitre aux techniques d'absorption et d'émission utilisant la manière la plus communément employée pour atomiser les échantillons: l'atomisation de flamme.

Ces deux techniques sont: **la spectroscopie d'absorption atomique (SAA)** et **la spectroscopie d'émission de flamme (SEF)** "photométrie de flamme".

I. Généralités:

I.1. Principe: L'expérience de Kirchhoff:

Elle montre que les gaz incandescents absorbent aux mêmes longueurs d'onde que celles qu'ils peuvent émettre:



On remarque que:

1. Lorsqu'on disperse la lumière d'un arc électrique (source de lumière blanche), avec un prisme, on obtient un spectre continu.
2. Si on substitue à la source précédente un bec Bunsen dans lequel on projette un peu de chlorure de sodium, on obtient le spectre d'émission de cet élément formé de raies dont le doublet jaune bien connu et situé à 589 nm; c'est *l'émission de flamme*.
3. Si on associe sur le même trajet optique l'arc électrique puis la flamme du bec Bunsen, on obtient un spectre contraire à la figure précédente, avec des raies sombres à l'endroit des raies d'émission du sodium.

Ce « renversement des raies » résulte de la présence dans la flamme d'une large proportion d'atomes de sodium restés à l'état fondamental qui absorbent les mêmes fréquences que les atomes de sodium excités émettent. C'est une manifestation de *l'absorption atomique*.

1. L'Absorption atomique: est le phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Il en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (Spectre d'absorption).

2. L'émission atomique: est le phénomène observé lorsqu'un rayonnement électromagnétique est émis par des atomes ou des ions excités qui retournent à l'état fondamental. Il en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (Spectre d'émission).

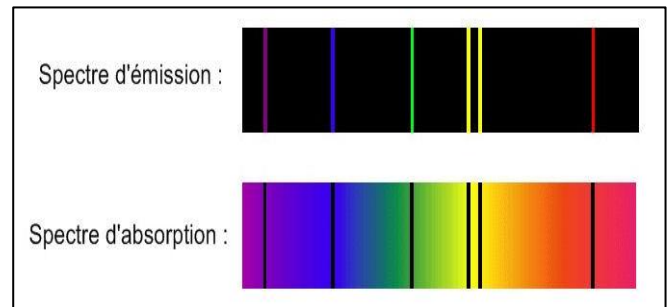
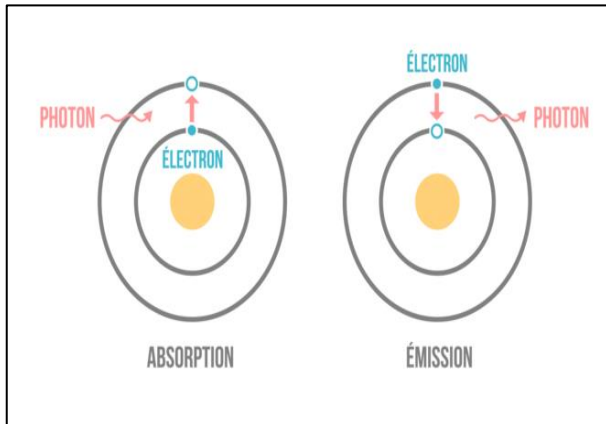


Figure 01: Phénomènes d'absorption et d'émission.

I.2. Les spectres atomiques:

Chaque transition atomique correspond à une émission ou une absorption d'énergie, répartie sur un intervalle très étroit de longueur d'onde, ce qui correspond à la largeur naturelle de la raie. Les spectres d'émission et d'absorption atomique ne peuvent être constitués que d'un nombre limité de pics étroits, ou raies.

a) Spectre d'émission:

Ces raies sont émises lorsqu'on chauffe le sodium gazeux dans une flamme (2000 à 3000°C), ce qui fait passer l'électron périphérique de l'orbitale 3s (état fondamental) aux orbitales 3p, 4p ou 5p (états excités).

La relaxation de l'atome excité vers l'état fondamental libère de l'énergie sous forme d'un photon de rayonnement visible ou ultraviolet. (à 590, 330 ou 285 nm).

Le diagramme partiel des niveaux d'énergie du sodium atomique qui montre d'où proviennent trois de ses raies d'émission les plus importantes.

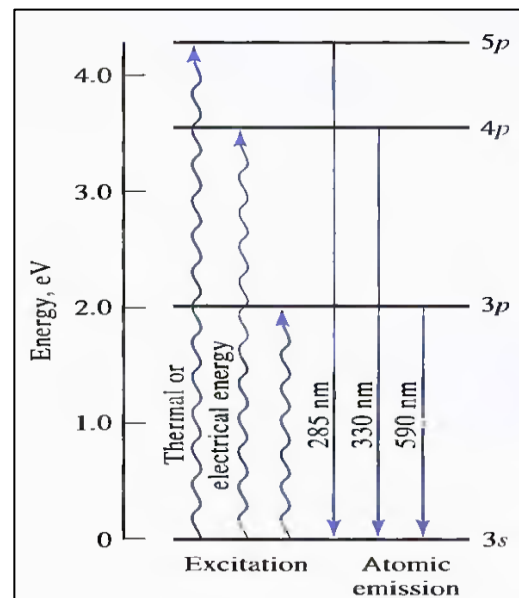


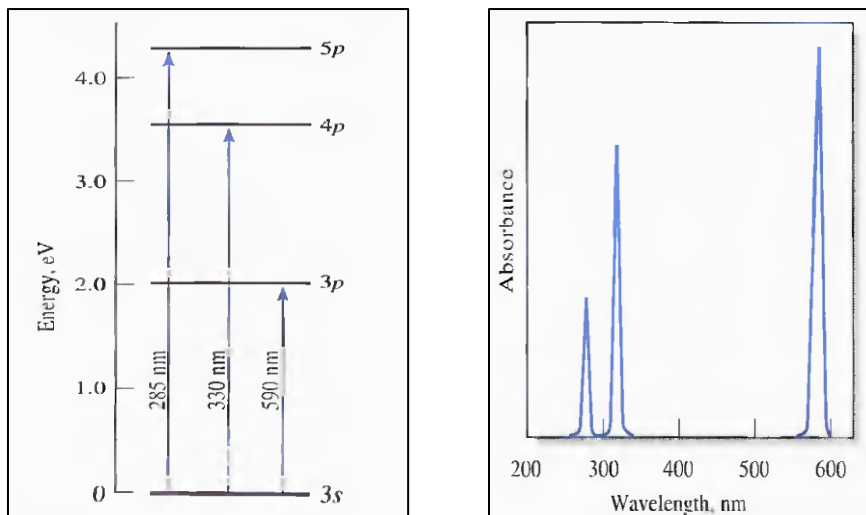
Figure 02: Origine des trois raies d'émission du sodium.

b) Spectre d'absorption:

L'absorption de rayonnement à 285. 331 et 590 nm excite le seul électron périphérique du sodium de son niveau d'énergie fondamental 3s, respectivement vers les orbitales 3p. 4p ou 5p.

La relaxation des atomes excités vers l'état fondamental s'accompagne d'un transfert de leur excès d'énergie à d'autres atomes ou molécules du milieu.

L'origine de ces pics est indiquée sur le diagramme énergétique partiel de la figure 04.



**Figure 03: a) Spectre d'absorption partiel de la vapeur de sodium
b) transitions électroniques responsables des raies de (a).**

Substance introduite dans la flamme	Observation de la flamme à l'œil nu	Observation de la flamme au spectroscope : obtention de spectres d'émission atomique
Sel de sodium Na		
Sel de lithium Li		
Sel de strontium Sr		
Sel de calcium Ca		
Sel de cuivre Cu		

Figure 4 : exemples des couleurs des flammes et spectres d'émission atomique de quelques sels.

I.3. Effet de la température sur un élément:

On conclut d'après l'expérience précédemment décrite, que la flamme provoque les transitions de l'atome de sodium.

La loi de répartition de Maxwell-Boltzmann permet de calculer l'effet de la température sur chaque transition:

$$\frac{N_e}{N_0} = g \cdot \exp \left[-\frac{\Delta E}{kT} \right]$$

N_0 : le nombre d'atomes à l'état fondamental et N_e : celui à l'état excité,

T : température absolue en kelvins

g : rapport des poids statistiques des états e et 0 de l'élément considéré (nombre entier)

ΔE : écart d'énergie (joules) entre les deux populations concernées e et 0 .

k : constante de Boltzmann ($k = R/N = 1,38 \times 10^{-23}$ J/K)

Si ΔE est exprimé en eV et non en joules, la relation devient :

$$\frac{N_e}{N_0} = g \cdot \exp \left[-11\,600 \frac{\Delta E}{T} \right]$$

I.3.a) Les spectres d'émission et d'absorption sont affectés par la température de flamme:

- L'élévation de la température a tendance à augmenter la population d'atomes dans la flamme, et donc la sensibilité.
- Elle détermine également le taux d'atomes excités: La Saa dépend du nombre de N_0 (basse T°) et SEF dépend de N_e (haute T°).

Exp: Dans une flamme acétylène-air, le rapport entre les nombres d'atomes de magnésium excités et non excités est estimé à 10^{-8} , pour devenir 10^{-6} dans une flamme acétylène-oxygène, dont la température est plus élevée de quelque 700°C .

Tableau 01: Rapport N_e/N_0 pour quelques éléments à différentes températures.

Élément	$\lambda(\text{nm})$	$E(\text{eV})$	g	2 000 K	3 000 K	4 000 K
Na	589	2,1	2	$1,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-3}$
Ca	423	2,93	3	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-4}$
Cu	325	3,82	2	$4,8 \times 10^{-10}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-5}$
Zn	214	5,79	3	$7,3 \times 10^{-15}$	$5,7 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-7}$

"Le contrôle de la température est donc très important, surtout en émission".

Rq: La largeur des raies dépend de la température; elle passe de 10^{-5} nm dans les conditions idéales à environ 0,002 nm à 3000 K.

I.3.b) Ionisation dans les flammes:

Tous les éléments peuvent s'ioniser dans une flamme, produisant ainsi un mélange d'atomes, d'ions et d'électrons dans un milieu à très haute température. Un équilibre de mélange s'établit dans le cône interne de la flamme dont la position dépend non seulement de la concentration totale en analyte et des e- produits par tous les éléments présents, mais surtout de la température de la flamme.

Exp: lorsqu'un échantillon contenant du baryum est atomisé: $\text{Ba} \rightleftharpoons \text{Ba}^+ + e^-$

A la température la plus chaude ($>3000\text{K}$), près de la moitié du baryum peut être présente sous forme ionique, sachant que les spectres de Ba et de Ba^+ sont totalement différents l'un de l'autre, d'où la coexistence de deux spectres d'émission. On comprend alors que le contrôle de la température de flamme régit le sens de l'équilibre d'équation.

I.4. L'atomisation:

Ce processus qui convertit un échantillon en vapeur atomique, constitue de loin l'étape la plus critique puisque son efficacité et sa reproductibilité déterminent dans une large mesure la sensibilité, la précision et l'exactitude de la méthode.

En atomisation de flamme, la solution de l'analyte usuellement aqueuse est *nébulisée* (pulvérisée sous forme d'un fin brouillard) en *aérosol*, et amenée dans la flamme dans le flux de carburant ou de comburant gazeux. Les spectres d'émission et d'absorption se forment dans le milieu gazeux très chaud qui constitue la flamme.

Rq: L'aérosol est la suspension de particules liquides finement dispersées dans un gaz.

Lorsqu'un échantillon nébulisé est amené dans la flamme:

- 1- le solvant s'évapore dans la zone de combustion primaire située juste au-dessus du brûleur; il résulte des particules solides finement divisées,
- 2- ces particules sont amenées dans la zone centrale la plus chaude de la flamme appelée *la région interzonale*, où les atomes et les ions monoatomiques se transforment à l'état gazeux à partir des particules solides. C'est également la région de l'excitation induisant l'émission atomique.
- 3- Enfin, les atomes et les ions atteignent la partie externe de la flamme; *zone de combustion secondaire*, où une oxydation peut intervenir avant que les produits d'atomisation ne se dispersent dans l'atmosphère.

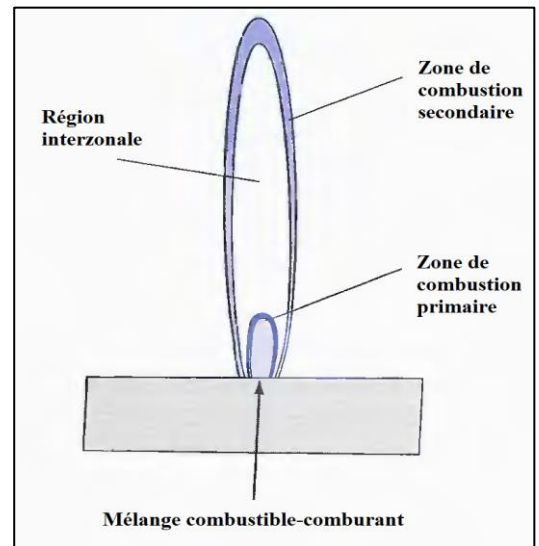


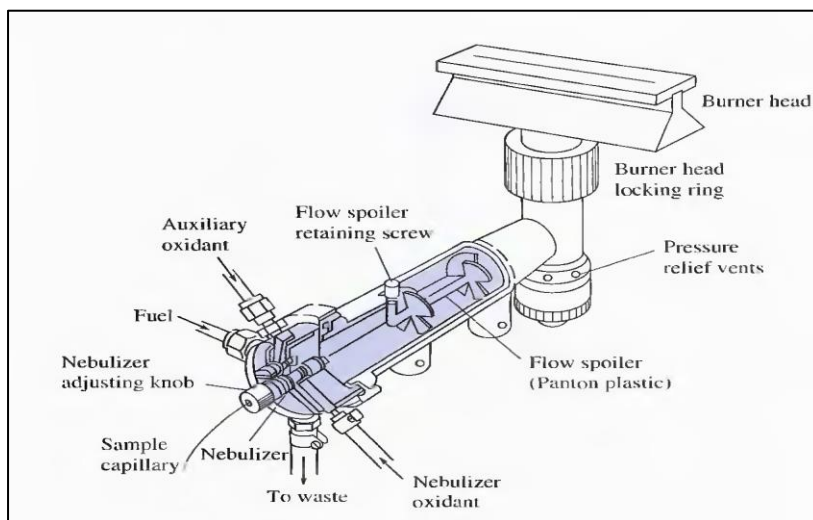
Figure 05: Structure d'une flamme.

I.3.A) Les atomiseurs de flamme:

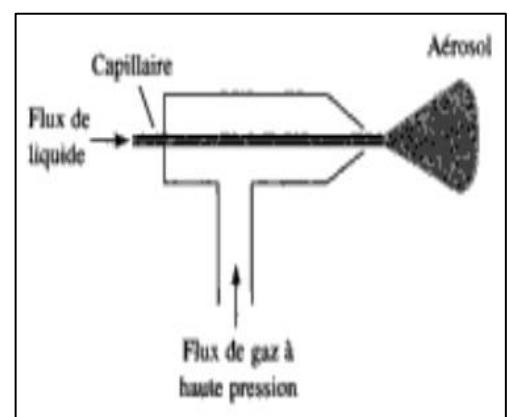
Le type courant de ce nébuliseur pneumatique est à tubes concentriques, dans lequel un courant de gaz (le comburant) à haute pression qui s'écoule à grande vitesse autour de l'orifice du capillaire, aspire l'échantillon liquide et le disperse en fines gouttelettes de diverses tailles qui seront amenées dans la flamme; c'est le transport par aspiration.

On emploie également des nébuliseurs à flux croisés où le gaz à haute pression s'écoule perpendiculairement à l'orifice du capillaire, tandis que le liquide est souvent pompé à travers le capillaire.

Dans la plupart des atomiseurs, l'aérosol est mélangé au comburant avant de se combiner au combustible.



A



B

Figure 05: A) Brûleur à flux laminaire B) nébuliseur à tubes concentriques

I.3.B) Le brûleur à flux laminaire:

L'aérosol est mélangé avec le carburant et traverse une série de chicanes qui ne laissent passer que les gouttelettes les plus fines, alors que l'autre partie de l'échantillon est évacuée. L'aérosol, le comburant et le carburant pénètrent alors dans un brûleur à fente qui donne une flamme large relativement stable de 5 à 10 cm, et un trajet assez long, ce qui améliore la sensibilité et la reproductibilité.

I.3.C) choix du comburant/combustible:

Le tableau ci-dessous donne les combustibles et les comburants courants employés en spectroscopie de flamme et le domaine approximatif de températures obtenu pour chacun de ces mélanges. On choisit les combustibles et les comburants en fonctions des températures correspondant à l'excitation des analytes (les spectres utilisables).

Tableau 02: Types de flammes utilisés en spectroscopie atomique

Combustible et comburant	Temperature, °C
*Gas/Air	1700–1900
*Gas/O ₂	2700–2800
H ₂ /air	2000–2100
H ₂ /O ₂	2500–2700
†C ₂ H ₂ /air	2100–2400
‡C ₂ H ₂ /O ₂	3050–3150
†C ₂ H ₂ /N ₂ O	2600–2800

*Propane or natural gas
†Acetylene

I.5. Dosages par SAA ou par SEF:

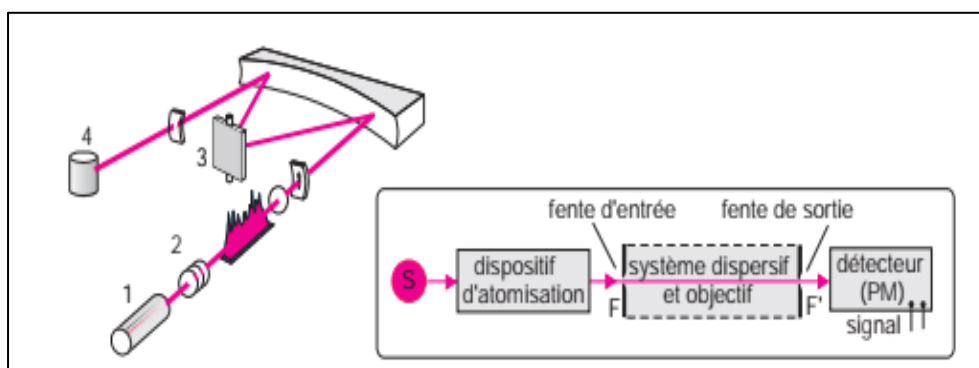
Le dosage des éléments par ces méthodes implique que l'on puisse relier leur concentration à l'intensité de l'absorption ou de l'émission lumineuse correspondante. Les méthodes font appel aux protocoles classiques avec établissement d'une courbe d'étalonnage à partir de solutions synthétiques de concentration croissante en analyte.

II. Spectroscopie d'absorption atomique:

II.1. Instrumentation de base:

Un appareil d'absorption atomique comprend les mêmes composantes de base qu'un appareil d'absorption moléculaire: une source, un réservoir contenant l'échantillon (dans ce cas, une flamme), un sélecteur de longueur d'onde et un dispositif de détection et d'affichage.

Le modèle de base de type monofaisceau comporte quatre parties principales:



- 1: source (lampe spectrale)
- 2: flamme du brûleur
- 3: monochromateur à réseau
- 4: détecteur (photomultiplicateur).

Figure 06: Les diverses parties d'un appareil commercial d'absorption atomique monofaisceau.

II.2. Spécificité de la source:

Contrairement à la source du *spectre continu* de lumière donnant un rapport I/I_0 toujours proche de 1, difficile à déterminer avec précision, car les raies d'absorption sont très fines (1×10^{-3} nm), les sources à *spectres de raies* émettent les seules radiations que l'élément est capable d'absorber, le rapport I/I_0 pourra donc être beaucoup plus petit que 1.

Les plus utilisés sont les lampes à cathode creuse: les raies intenses émises par ces lampes dépendent de l'élément constituant la cathode ayant la même nature que l'élément dosé (pour un élément tel le plomb, la cathode devra contenir du plomb). Il existe près d'une centaine de lampes différentes constituées d'éléments purs mais aussi des lampes multiéléments.

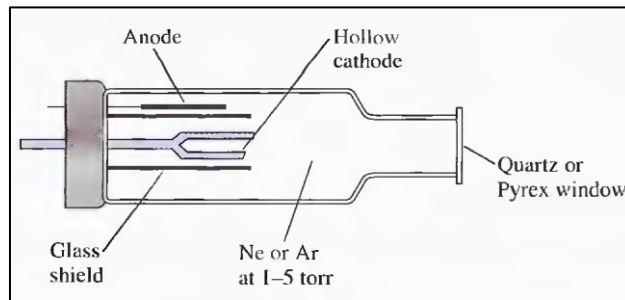


Figure 08: Schéma d'une lampe à cathode creuse.

II.3. Fonctionnement:

1. Pour un dispositif à monofaisceau, le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la flamme (2) dans laquelle l'élément se trouve porté à l'état atomique, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4):

- Si l'élément n'est pas présent dans la flamme, le détecteur reçoit toute l'intensité lumineuse I_0 émise par la source dans l'intervalle de longueur d'onde sélectionné.
- En revanche, si l'élément est présent, l'intensité reçue I est moindre.

2. Pour un dispositif à double faisceau, le rayonnement est dédoublé en deux faisceaux dont l'un traverse la flamme et l'autre la contourne. Après leur recentrement en amont du monochromateur et détecteur, la valeur de l'absorbance est obtenue en calculant le rapport du signal de la référence et de l'échantillon.

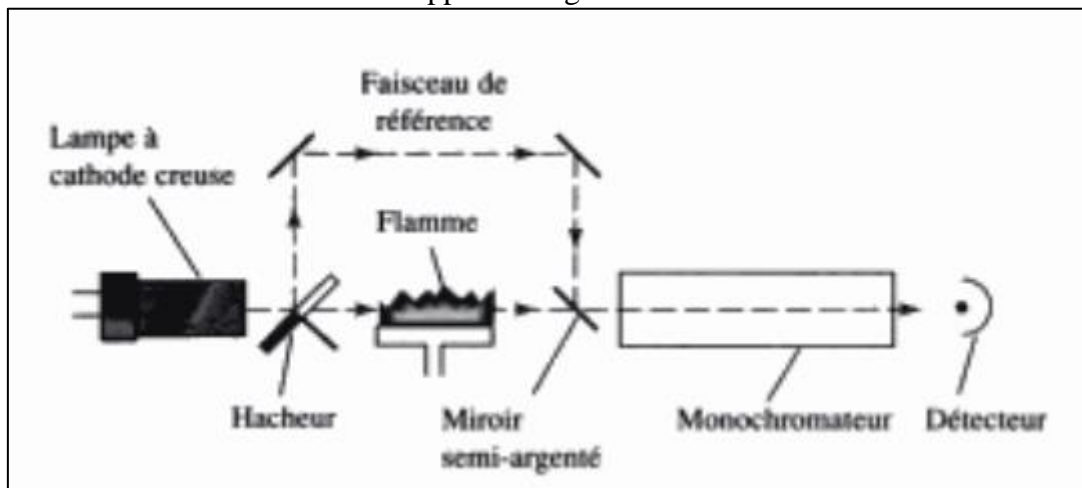


Figure 07: trajets optiques dans un SAA à double faisceau.

II.4. Dosage par SAA:

L'absorbance de l'élément dans la flamme dépend du nombre d'atomes N_0 restés à l'état fondamental sur le trajet optique. L'appareil affiche l'absorbance en faisant le rapport des intensités transmises en l'absence, puis en présence de l'échantillon.

On procède par des mesures comparatives avec des solutions d'étalonnage qui correspondent au mieux à l'échantillon:

$A = k \cdot c$ A , absorbance ; c , concentration de l'élément ; k , coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie.

- La linéarité n'est effective que pour les concentrations faibles (typiquement en dessous de 3 ppm), pour les milieux où l'effet de matrice est négligeable.
- Pour rectifier les écarts de la linéarité, plus fréquents que l'absorption moléculaire, on emploie souvent, deux étalons, avec un étalonnage pour chaque analyse effectuée.

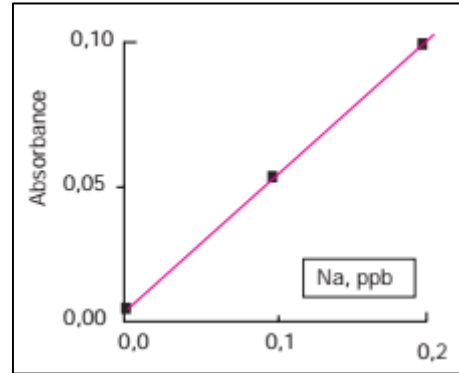


Figure 08: Droite d'étalonnage en absorption atomique. pour le dosage du sodium à des concentrations sub ppb

II.5. Utilisations:

La SAA est une méthode sensible qui permet de doser (Analyse quantitative) plus de 60 éléments, comme elle s'applique bien à des analyses de routine.

Zones de la flamme pour les mesures quantitatives:

La partie de la flamme à utiliser diffère d'un élément à l'autre.

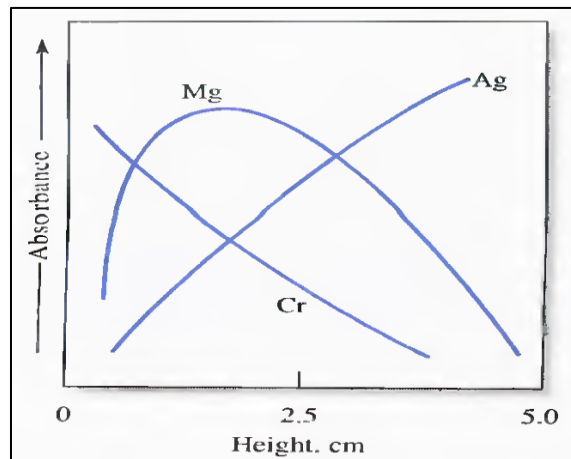


Figure 09: L'absorbance de trois éléments en fonction de la distance comptée à partir de l'orifice du brûleur.

- Pour le magnésium et l'argent, l'augmentation initiale de l'absorbance est due à l'augmentation de la concentration des atomes dans le trajet optique suite à une exposition plus longue à la chaleur.
 - L'absorbance du magnésium atteint son maximum près du centre de la flamme et chute ensuite par suite de la formation d'oxyde de magnésium.
 - Cet effet ne s'observe pas pour l'argent parce que cet élément est beaucoup plus résistant à l'oxydation.
- Pour le chrome, le maximum d'absorbance se situe juste au-dessus de l'orifice du brûleur, et la formation d'oxyde commence dès l'atomisation.

La position de la flamme par rapport au trajet optique est réglée pour obtenir l'absorbance la plus élevée, et doit être exactement conservée de l'étalonnage à l'analyse.

III. spectroscopie d'émission de flamme

III.1. Appareillage et fonctionnement:

La conception des appareils d'émission de flamme est semblable à celle des appareils d'absorption de flamme ; à l'exception de la source de lumière qui n'est pas nécessaire en spectroscopie d'émission. Cependant, dans le cas de l'émission, c'est la flamme qui sert de source de rayonnement, il ne faut donc ni lampe à cathode creuse, ni modulateur de faisceau.

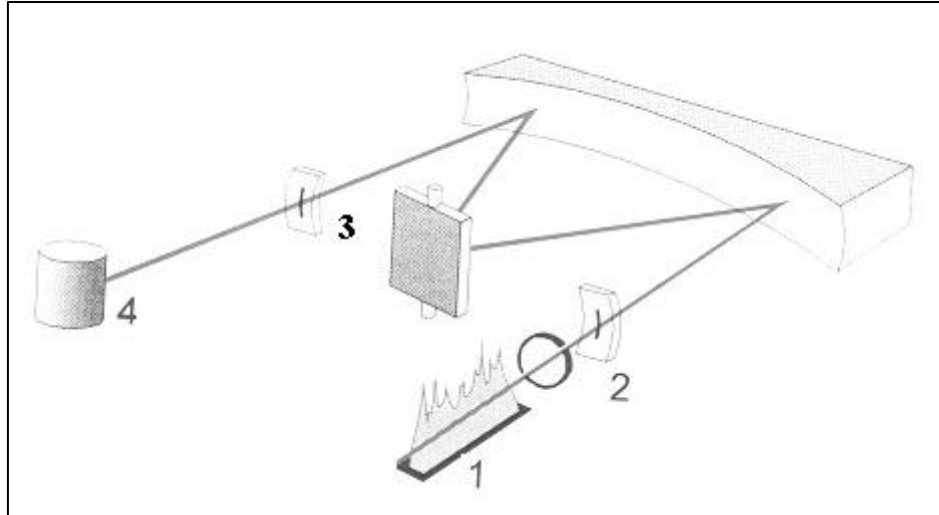


Figure 10: schéma d'un spectro d'émission à flamme.

Les mesures par photométrie de flamme sont effectuées:

- soit à partir des spectromètres d'absorption atomique à brûleur utilisés source éteinte,
- soit à partir d'appareils plus simples propres à l'émission atomique: photomètres de flamme, qui sont capables de faire des mesures sur cinq ou six éléments seulement.

III.1.1. La flamme:

L'émission atomique nécessite un moyen de convertir un analyte sous forme solide, liquide ou en solution en un atome gazeux libre. La même source d'énergie thermique sert généralement de source d'excitation.

III.1.2. Monochromateur:

En SEF, on utilise souvent un simple filtre coloré interchangeable (ou monochromateur), qui balaye les différentes lignes d'émission en séquence:

- Habituellement, les longueurs d'onde à utiliser sont définies par l'utilisateur dans un programme informatique, et le monochromateur oscille rapidement d'une longueur d'onde à la suivante, en isolant une seule à la fois sur une seule fente de sortie.
- Alternativement, les monochromateurs peuvent balayer une gamme de longueurs d'onde.

III.1.3. Détecteur:

Le rayonnement isolé est converti en signaux électriques par un seul transducteur, plusieurs transducteurs ou un détecteur matriciel. Les signaux électriques sont ensuite traités et fournis en entrée au système informatique.

III.1.4. Systèmes informatiques et logiciels

Les spectromètres commerciaux sont désormais livrés avec des ordinateurs et des logiciels puissants, qui peuvent aider à la sélection de la longueur d'onde et à l'étalonnage.

III.2. Fonctionnement:

III.2.1. La préparation de l'échantillon:

La flamme convient le mieux à l'analyse d'échantillons sous forme de solution et de liquide. Les solides sont d'abord mis en solution, bien que leur analyse par insertion directe dans la flamme soit possible.

III.2.2. Sélection de la longueur d'onde et de la largeur de la fente:

Le choix de la longueur d'onde est dicté par le besoin de sensibilité et l'absence d'interférence due aux raies d'émission des autres constituants de l'échantillon. Des largeurs de fente plus étroites offrent une meilleure résolution:

Exp: une analyse de Ni utilisant la raie d'émission atomique à 349,30 nm est compliquée par la raie d'émission atomique de Fe à 349,06 nm.

III.2.3. excitation:

On utilise une flamme pour l'excitation, les spectres ainsi formés sont simples au point que l'on peut facilement isoler la raie d'émission choisie.

Certains modèles perfectionnés disposent de deux cellules de mesure, ce qui permet de comparer l'intensité lumineuse émise avec celle d'une solution de référence, facilitant de ce fait le calcul des concentrations.

III.3. Dosage:

Pour une population de N^* atomes excités, l'émission lumineuse I_e est:

$$I = kN^*$$

Comme N^* est proportionnel à la concentration de l'élément dans la partie chaude de l'appareil (Si la source d'émission est en équilibre thermique), l'intensité lumineuse émise I_e , est elle-même proportionnelle à la concentration C "la population totale d'atomes d'analyte, N , à travers la distribution de Boltzmann" :

$$I_e = K \cdot c$$

Cette formule n'est valable ici encore que pour les faibles concentrations et en l'absence d'auto-absorption ou d'ionisation.

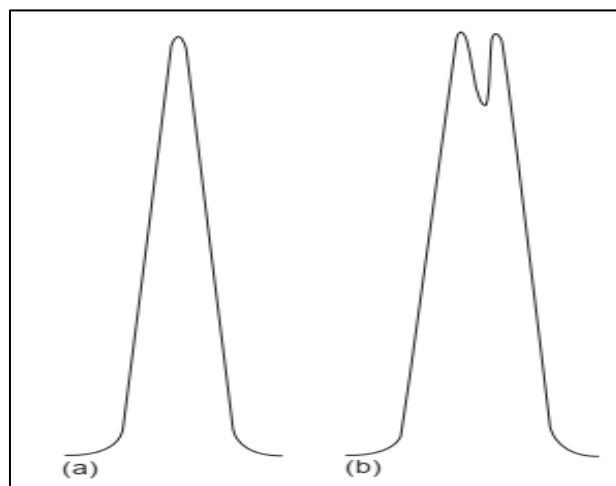


Figure 11: Ligne d'émission atomique à (a) une faible concentration d'analyte et (b) une concentration élevée d'analyte montrant l'effet de l'auto-absorption.

Comme précédemment, la mise au point d'un dosage par émission de flamme exige un étalonnage de l'appareil avec une gamme de standards.

La limite de linéarité de la réponse est vite atteinte, ce qui impose de travailler avec des solutions faiblement concentrées (10 à 100 ppm).

III.4. Applications :

La spectroscopie atomique incluant la SEF, est à la fois qualitative et quantitative. Elle est largement utilisée pour:

- les dosages de routine des métaux alcalins et alcalino-terreux (ex. calcium dans le lait...).
- déterminer les traces de métaux dans les échantillons environnementaux, tels que l'eau potable, les eaux usées et les nappes phréatiques.
- déterminer les traces de métaux dans les denrées alimentaires, dans les matériaux biologiques et dans le contrôle de qualité industriel.
- dans certains laboratoires cliniques pour déterminer le Na et le K.
- en *Analyse multi-élémentaire*, il est possible d'analyser trois ou quatre analytes par minute (très utile dans l'identification des sources de pollution).

La SEF plus particulièrement, a trouvé de nombreuses applications en analyse élémentaire, et est principalement utilisée pour le dosage du sodium, du potassium, du lithium et du calcium, notamment dans les fluides et les tissus biologiques.

La méthode est également utilisée en analyse qualitative ; l'identification des éléments présents est basée sur la mesure des longueurs d'onde des pics, qui sont spécifiques à chaque élément.

IV. Comparaison entre SAA et SEF



A



B

Figure 10: A) spectrophotomètre d'absorption atomique "SAA", B) spectrophotomètre à flamme "SEF".

Tableau 03: Comparaison des limites de détection pour divers éléments par les méthodes d'absorption atomique de flamme et d'émission atomique de flamme *

Émission de flamme plus sensible	Sensibilité similaire	Absorption de flamme plus sensible
Al, Ba, Ca, Eu, Ga, Ho, In, K, La, Li, Lu, Na, Nd, Pr, Rb, Re, Ru, Sm, Sr, Tb, Tl, Tm, W, Yb	Cr, Cu, Dy, Er, Gd, Ge, Mn, Mo, Nb, Pd, Rh, Sc, Ta, Ti, V, Y, Zr	Ag, As, Au, B, Be, Bi, Cd, Co, Fe, Hg, Ir, Mg, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Si, Sn, Te, Zn

Tableau 04: Limites de détection (ng/mL ou ppb) pour certains éléments par SAAF et SEF *

Element	Flame AA	Flame Emission
Ag	3	20
Al	30	5
Ba	20	2
Ca	1	0.1
Cd	1	2000
Cr	4	5
Cu	2	10
Fe	6	50
K	2	3
Mg	0.2	5
Mn	2	15
Mo	5	100
Na	0.2	0.1
Ni	3	600
Pb	5	200
Sn	15	300
V	25	200
Zn	1	200

Le pH-mètre

Les méthodes analytiques qui sont basées sur des mesure de potentiel sont appelées méthodes potentiométriques ou potentiométrie.

Le pH- mètre est un potentiomètre qui comporte : une électrode de référence, une électrode indicatrice et un appareil de mesure du potentiel.

Principe :

Le pH est déterminé par la mesure du potentiel d'une électrode indicatrice, rapporté à une électrode de référence.

1. L'électrode de référence :

Est une demi-cellule dont le potentiel est connu et reste constant, indépendamment de la composition de la solution d'analyte.

Une électrode de référence idéale possède un potentiel (rapporté à l'électrode à l'hydrogène) constant, connu avec exactitude et absolument indépendant de la composition de la solution d'analyte. De plus, elle doit être d'un emploi et d'un entretien commodes, et son potentiel doit rester constant même s'il y passe de faibles courants.

1-1. L'électrode au calomel :

Elle est constituée de mercure en contact avec une solution de concentration connue de chlorure de potassium saturée en chlorure de mercure (I) ou calomel. Elle est schématisée par :



Où x représente la concentration molaire du chlorure de potassium présent dans la solution

La réaction de cette électrode est :



Rq : Le calomel est le chlorure mercureux Hg_2Cl_2 , dont la solubilité dans l'eau est très faible.

1-2. L'électrode argent/ chlorure d'argent :

L'électrode de référence la plus courante sur le marché est celle constituée par une électrode d'argent dans une solution à la fois saturée en chlorure de potassium et en chlorure d'argent :



La demi-réaction est :



Les modèles commerciaux ressemblent extérieurement aux électrodes au calomel, néanmoins le tube intérieur est remplacé par un fil d'argent recouvert d'une couche de chlorure d'argent plongeant dans une solution de KCl saturée en AgCl.

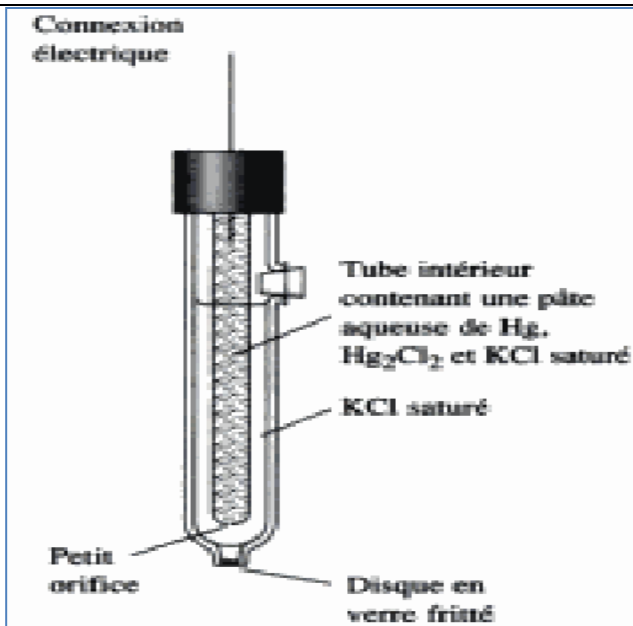


Figure 01 : schéma d'une électrode commerciale au calomel saturé.

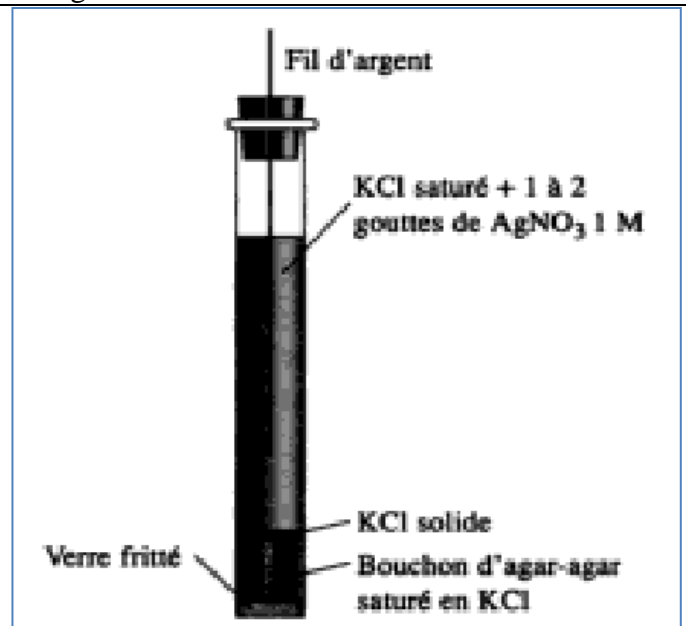


Figure 02 : schéma d'une électrode argent/chlorure d'argent

2. L'électrode indicatrice « l'électrode du verre indicatrice du pH »:

Une électrode indicatrice ou de travail est une demi-cellule dont le potentiel varie de manière connue en fonction de la concentration d'analyte. Pour être considérée comme idéale, elle doit répondre rapidement et de manière reproductible aux variations de concentration de l'analyte.

L'électrode indicatrice du pH-mètre appelée **électrode du verre indicatrice du pH** appartient au groupe *des électrodes à membrane*. Elle présente la méthode la plus commode et la plus commune pour déterminer le pH puisqu'elle consiste à mesurer le potentiel qui se développe à travers une membrane de verre mince qui sépare deux solutions d'acidité différente : la solution inconnue et la solution de pH connu.

Les membranes de ce type d'électrodes sont caractérisées par :

- Une très faible solubilité dans la solution de l'analyte.
- Une conductivité électrique résultante du déplacement des ions monovalents.
- Réactivité sélective par rapport à l'analyte (H^+).

3. Dispositif général :

3-1. Description :

La figure 03 représente la cellule mise en œuvre : elle est constituée d'une électrode indicatrice de verre et d'une électrode de référence au calomel saturé, plongeant toutes deux dans une solution de pH inconnu.

L' E_{ind} est constituée d'une membrane en verre mince répondant aux ions H^+ , qui est soudée à l'extrémité d'un tube en verre à paroi épaisse ou d'un tube en plastique. Ce tube contient un petit volume d' HCl dilué, saturé en chlorure d'argent. Un fil d'argent plongeant dans cette solution forme une électrode de référence argent/chlorure d'argent qui est connectée à la borne positive d'un voltmètre. L'électrode au calomel est connectée à l'autre borne.

La figure montre ainsi que l'électrode de verre contient deux électrodes de référence :

- Une électrode externe au calomel
- Une électrode interne $Ag/AgCl$. Bien que celle-ci fasse partie de l'électrode de verre, elle ne constitue pas la partie sensible de l'électrode. En fait, c'est uniquement la mince membrane de verre à l'extrémité de l'électrode qui répond aux ions H^+ .

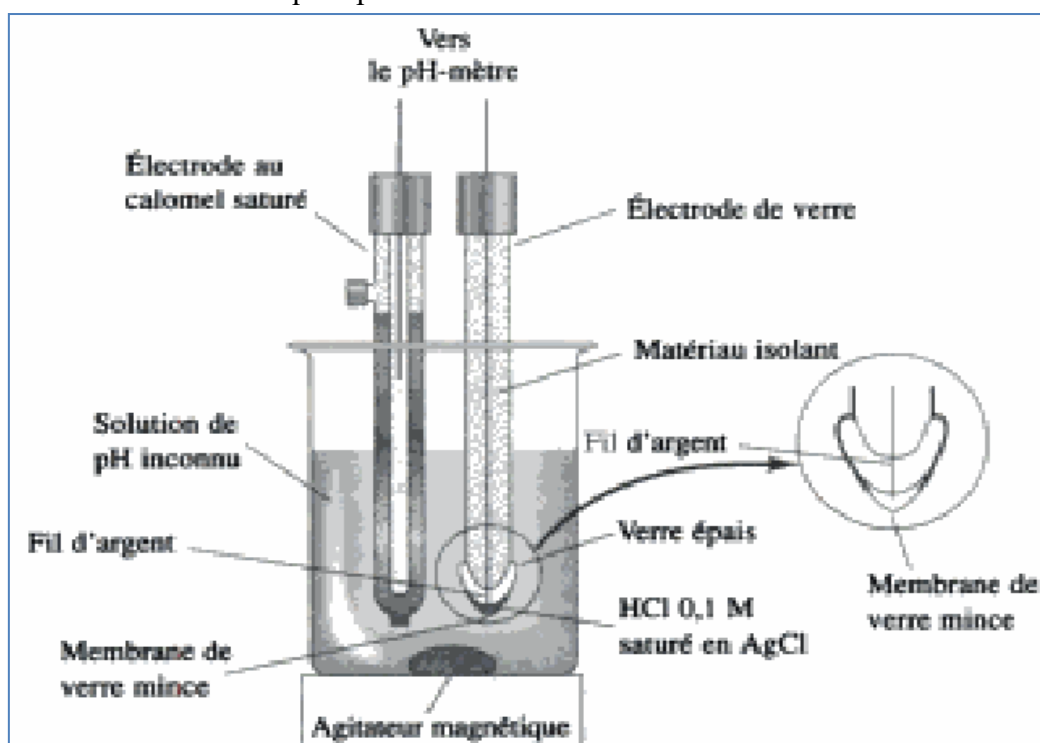


Figure 03 : systèmes d'électrodes pour la mesure du pH.

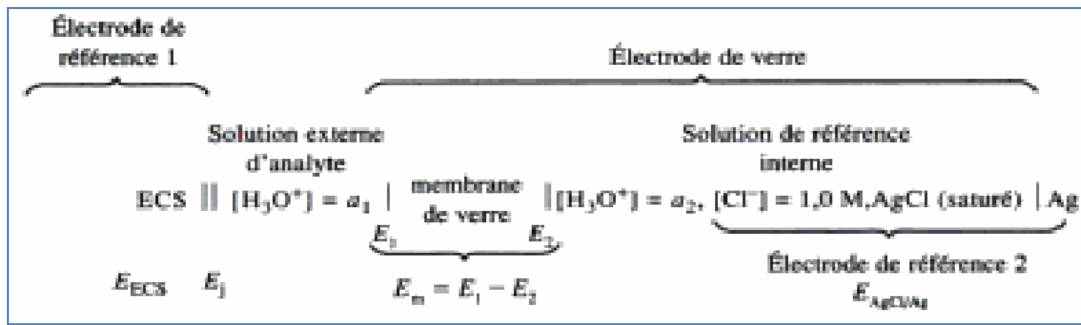


Figure 04 : Schéma d'ensemble d'une cellule de pH-métrie.

3-2. Structure de la membrane :

Le verre dont il est question ici, ne désigne pas le matériau du corps de l'électrode, mais la membrane qui assure le contact avec la solution (**Figure 3**). Il s'agit d'une mince paroi d'un verre spécial à forte teneur en sodium (25 %), dont la surface s'hydrate en présence d'eau et devient comparable à un gel, alors que le reste correspond à un électrolyte solide.

Un verre de silicate se présente à l'échelle microscopique comme un réseau tridimensionnel issu d'un orthosilicate (sel de l'acide orthosilicique $\text{Si}(\text{OH})_4$) dont la structure lacunaire contient des cations sodium qui permettent le déplacement des charges d'une face à l'autre de la membrane. Celle-ci est en contact, à l'extérieur, avec la solution à analyser et, à l'intérieur, avec l'électrolyte dont l'acidité est constante.

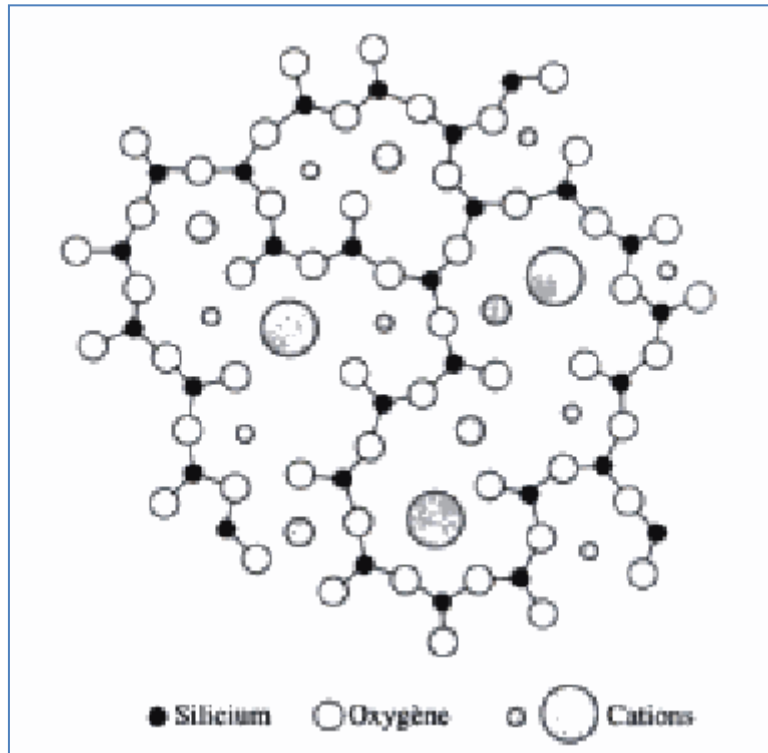
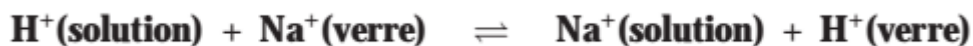


Figure 05: vue en coupe de la structure d'un verre au silicate.

3-3. mécanisme de fonctionnement :

Le potentiel de l'électrode de verre exprime la différence du potentiel « ddp » qui se développe entre les deux surfaces de la membrane suite au mouvement des ions Na^+ (porteurs de charge dans la partie interne anhydre) et H^+ (mobiles dans la couche de gel).

Les deux parois (l'interface entre l'extérieur du verre et la solution d'analyte, et l'interface entre la solution interne et l'intérieur du verre) sont le siège d'échanges entre cations Na^+ et H^+ :



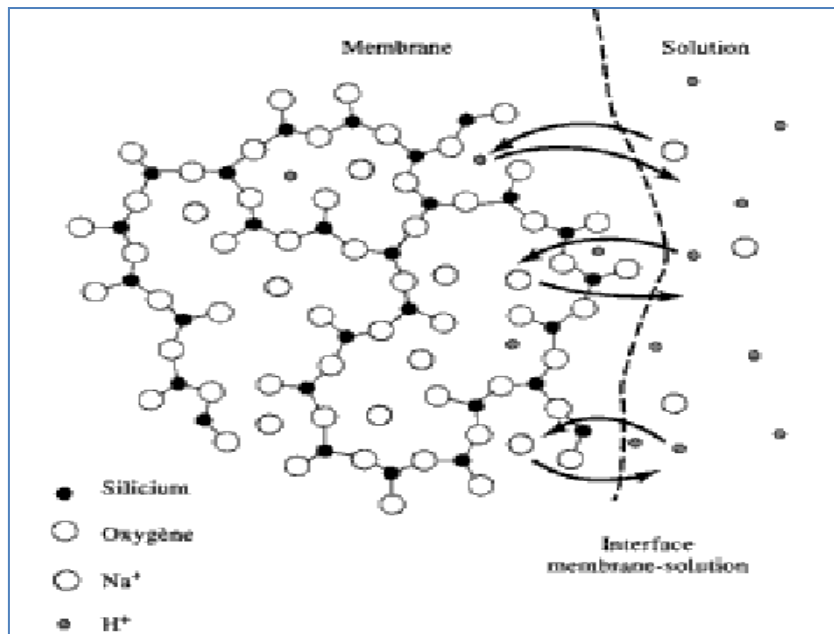


Figure 06: Echange ionique entre les H⁺ et Na⁺ à l'interface membrane-solution

Si la concentration en H⁺ est différente sur les deux parois, une ddp de liaison apparaîtra entre elles, dont la valeur va être indicatrice de l'activité en ion H⁺ de la solution, donc de son pH. Celui-ci est déterminé avec un millivoltmètre électronique, le pH-mètre, en mesurant la ddp entre l'électrode de verre et une électrode extérieure de référence au calomel (ou Ag/AgCl).

L'appareil, après avoir été étalonné, fournit directement le pH de la solution. On trouve souvent ces électrodes sous forme combinées de manière concentrique.

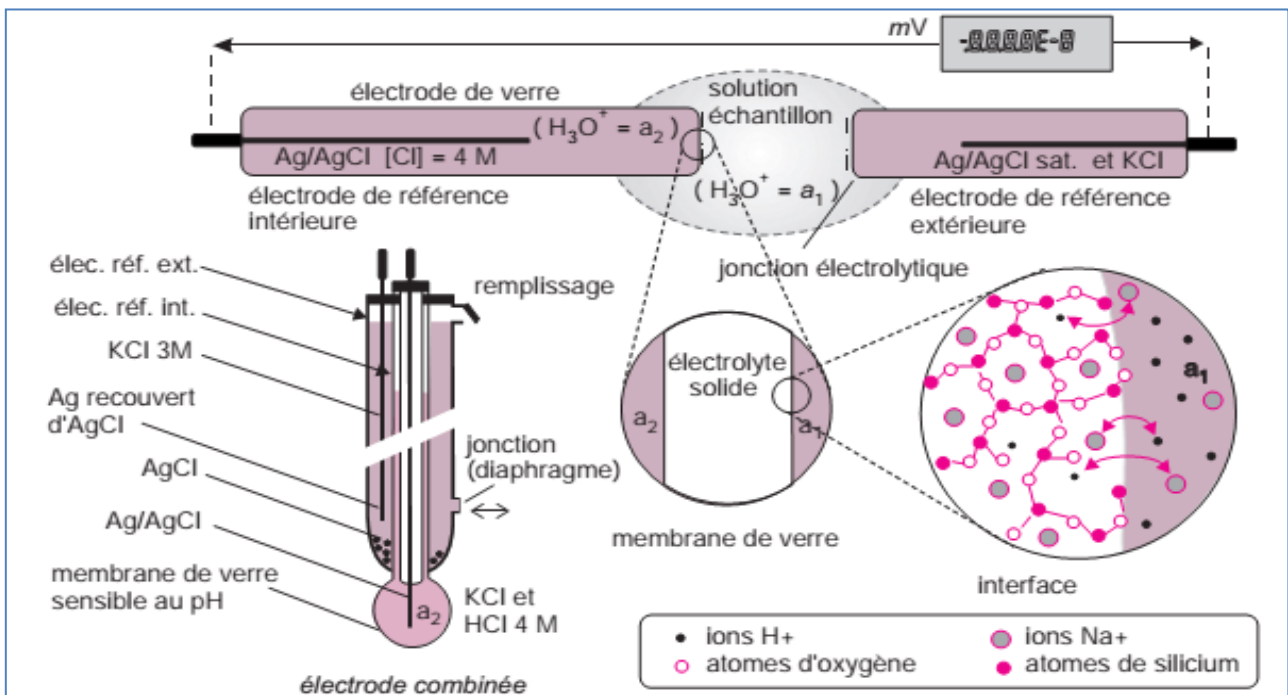


Figure 19.2 Electrode de verre pour la mesure du pH.

La concentration en ions H⁺ est accessible à partir de la différence de potentiel qui apparaît entre une électrode de verre et une électrode de référence (ici une électrode Ag/AgCl). Détail de la membrane, vue en coupe, perméable aux ions H⁺. Quand un ion H⁺ forme une liaison silanol, un ion sodium part en solution pour conserver l'électroneutralité de la membrane. Une électrode combinée de présentation classique, l'électrode de référence entourant l'électrode de verre, sauf à son extrémité. La jonction permet la migration des ions sans que les liquides de part et d'autre ne se mélangent.

Figure 07 : Electrode de verre pour mesure du pH

La conductimétrie

De par sa grande fiabilité, sa sensibilité et son faible coût, la conductivité est une technique potentielle de premier ordre pour toute application de surveillance de la pureté des eaux, du contrôle des eaux potables et des eaux utilisées dans la fabrication de produits. Au-delà, la conductivité est une méthode extrêmement répandue et très utile en estimation du nombre total d'ions dans une solution ou encore dans la mesure directe des composants.

1. Conductivité :

La conductivité est la capacité d'une solution ou d'un métal à faire passer un courant électrique. Dans une solution, ce sont les ions qui transportent le courant alors que dans un métal ce sont les électrons. En solution, cette caractéristique dépend de la nature des ions présents ; de leurs concentrations ; de la mobilité des ions et de leur valence ainsi que de la température.

La conductivité se mesure en appliquant un courant électrique alternatif (I) à deux électrodes immergées dans une solution et en mesurant la tension (U) qui en résulte. Lors de cette expérience, les cations migrent en direction de l'électrode négative, les anions se dirigent vers l'électrode positive et la solution se comporte comme un conducteur électrique.

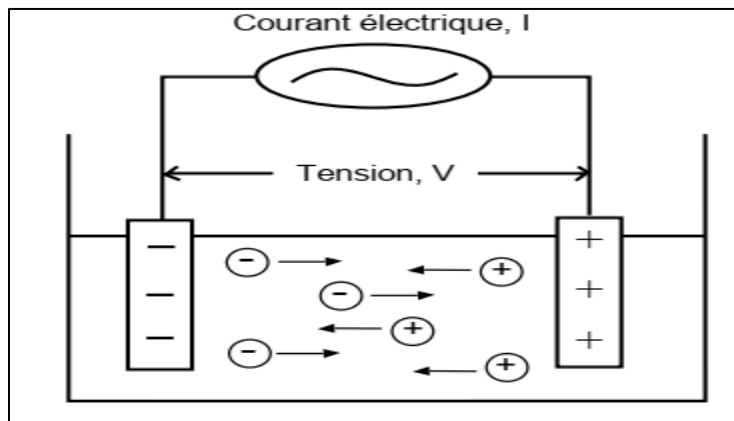


Figure 1 : Schéma d'un conductimètre

2. Solution électrolytique :

La conductivité est typiquement mesurée dans des solutions aqueuses d'électrolytes. Les électrolytes sont des substances qui contiennent des ions, c'est-à-dire des solutions de sels ioniques ou de composés qui s'ionisent en solution. Ce sont les ions formés dans la solution qui vont transporter le courant électrique : les cations se déplacent dans le sens conventionnel du courant et les anions dans le sens inverse.

Les électrolytes peuvent être soit forts soit faibles ; les électrolytes forts sont des substances qui sont entièrement ionisées en solution (exp : NaCl, HCl), contrairement aux électrolytes faibles dont la dissociation ionique n'est que partielle (exp : acide acétique). Les solutions les plus conductrices sont les solutions aqueuses puisque l'eau a la capacité de stabiliser les ions formés par un procédé appelé solvation.

3. Définition des termes utilisés :

3.1. Résistance :

La résistance est l'aptitude d'un matériau conducteur à s'opposer au passage d'un courant électrique sous une tension électrique donnée. Pour une solution, la résistance R se calcule à partir de la loi d'Ohm

$$R = U/I \text{ (Ohms } \Omega \text{)}$$

avec : U = tension (volts), I = intensité du courant (ampères), R = résistance de la solution (ohms Ω)

3.2. Conductance :

La conductance G est définie comme étant l'inverse de la résistance électrique R d'une solution entre deux électrodes. Elle exprime la capacité d'un corps, soumis à une différence de potentiel, à laisser passer une certaine quantité de courant électrique. Plus G est élevée, plus la solution électrolytique conduit le courant électrique.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad \text{en Siemens (S)}$$

3.3. Conductivité

La conductance G dépendante de la cellule de mesure peut être transformée en conductivité normalisée σ , qui est indépendante de la configuration de cette cellule. Cela s'obtient en multipliant la conductance par la constante de cellule.

$$G = \sigma \cdot \frac{S}{L} \rightarrow \sigma = G \cdot \frac{L}{S} \quad (\text{S/m})$$

Avec :

σ = conductivité en S.m-1

K = constante de cellule (m^{-1}) : $K = L/S$

C'est le rapport de la distance (L) entre les électrodes sur la surface de ces électrodes (S).

S = surface réelle des électrodes (m^2)

L = distance entre les électrodes (m)

On peut écrire :

$$\sigma = G \cdot K$$

Dans la pratique, les conductimètres mesurent la conductance et affichent la conductivité après avoir effectué les opérations de conversion.

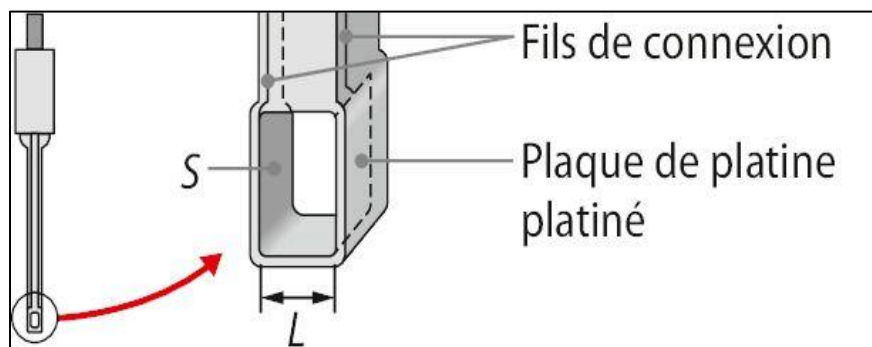


Figure 2 : la géométrie de cellule de mesure

4. Le conductimètre :

Le conductimètre est une cellule de mesure de conductivité constituée d'une paire d'électrodes de charge opposée, appelées pôles ou électrodes, à laquelle une tension alternative de faible amplitude (100-1000Hz) est appliquée. Le conductimètre mesure le courant circulant et calcule la conductivité.

Le courant alternatif est utilisé à la place du courant continu pour éviter l'accumulation d'ions à proximité de la surface de l'électrode « polarisation des électrodes » et les réactions d'électrolyse indésirables, qui influent sur la composition de la solution et par conséquent aussi sur la conductivité.

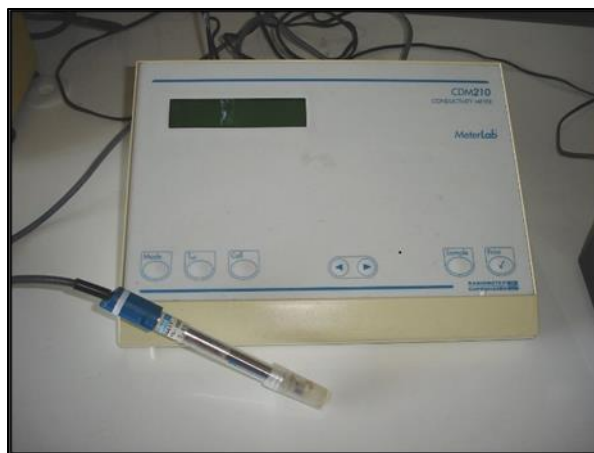


Figure 3 : Photo d'un conductimètre

4.1. Etalonnage :

L'étalonnage est une étape importante puisqu'il permet de déterminer la valeur correcte de la constante de cellule K dans les conditions de travail. La constante de cellule change dans le temps suite aux modifications qui apparaissent lors d'une contamination ou à cause de modifications physico-chimiques. Théoriquement, ce facteur est déterminé par la géométrie de la cellule mais pratiquement, on utilise des étalons dont la conductivité est connue, par exemple une solution de KCl 0,01D.

La fréquence d'étalonnage va dépendre de l'application, des échantillons et des conditions de travail, mais globalement, il est recommandé d'étalonner la cellule au moins une fois par semaine.

Rq :

La démalité d'une solution correspond au poids de KCl / 1000 g de solution :

Solution type (en démal)	Masse KCl 1000g solution	Conductivité à 25°C
1D	71.1352	111.3 mS/cm
0.1D	7.4191	12.85 mS/cm
0.01D	0.7452	1408 µS/cm

4.2. Effets de la température :

Les mesures de conductivité sont fortement dépendantes de la température. Au fur et à mesure que la température d'un échantillon augmente, sa viscosité diminue, d'où un accroissement de la mobilité des ions.

La température doit être indiquée pour chaque résultat de conductivité. Par exemple ; la conductivité du chlorure de potassium 0,01 M à 20 °C est de 1278 µS/cm, mais à 25 °C, elle est de 1413 µS/cm. Pour cette raison, les mesures se réfèrent à une température de référence « 25 °C, parfois de 20 °C » afin de rendre possible la comparaison de résultats.

Dans la pratique, le conductimètre mesure la conductivité à la température réelle (par ex., 27 °C) et convertit la valeur mesurée à la température de référence souhaitée en utilisant des algorithmes de correction de température choisis par l'utilisateur.

4.3. Procédé de mesure :

Avant d'effectuer une mesure de conductivité, l'emploi d'un étalonnage permet de connaître la constante de cellule, dont la valeur sera mémorisée automatiquement ou saisie manuellement dans le conductimètre.

- Rincez soigneusement le capteur et le récipient qui contiendra la solution d'échantillon à plusieurs reprises à l'eau désionisée afin d'éliminer toute contamination, puis secouez pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
- Rincez le capteur et le récipient avec l'échantillon deux ou trois fois et jetez l'échantillon utilisé.
- Remplissez le récipient avec la solution d'échantillon fraîchement préparée.
- Immergez le capteur dans l'échantillon. La cellule de mesure et les orifices d'aération présents sur le côté de certaines électrodes doivent être complètement recouverts.
- Éliminez toutes les bulles d'air de cette région en tapotant sur l'électrode ou en l'agitant.
- Effectuez une mesure de la conductivité en suivant les instructions données dans le manuel d'utilisation. L'agitation peut faciliter l'obtention plus rapide du résultat, mais ne doit pas produire de bulles.
- Si un mode de compensation de température est activé, la mesure de conductivité sera directement corrigée à la température de référence prééglée.

5. Loi de Kohlrausch :

Pour une température donnée, la conductivité d'une solution est la somme des contributions apportées par les ions présents :

$$\sigma = \sum_i \lambda_i \cdot [X_i]$$

Avec : σ : conductivité en $S \cdot m^{-1}$

$[X_i]$: concentration de l'ion X_i en $mol \cdot m^{-3}$

λ_i : conductivité molaire ionique de l'ion X_i en $S \cdot m^2 \cdot mol^{-1}$, une grandeur caractéristique de l'ion reflétant son apport à la conductivité électrique de la solution (dépendante de C , T° , sa charge sa taille).

Exemple :

Solution aqueuse de chlorure de potassium KCl de concentration C :

$$\sigma = \sigma_{K^+} + \sigma_{Cl^-} = \lambda_{K^+} \cdot [K^+] + \lambda_{Cl^-} \cdot [Cl^-] = (\lambda_{K^+} + \lambda_{Cl^-}) \cdot C$$

Pour une solution suffisamment diluée ($c \leq 10^{-2} mol/L$), la conductivité d'un électrolyte est proportionnelle à sa concentration.

6. Applications :

6.1. Mesure de la concentration d'ion :

La conductivité d'une solution est fortement proportionnelle à sa concentration en ions. Puisque la conductivité n'est pas une technique spécifique, le calcul de concentration réalisé à partir de mesures de conductivité n'est donc valable que pour des échantillons contenant une seule espèce.

6.2. Solides dissous totaux (Total Dissolved Solids) « TDS » :

Le TDS correspond à la mesure de la concentration totale des espèces ioniques présente dans un échantillon. Ce facteur fournit également une information sur la composition qualitative des ions de l'échantillon d'eau :

- Pour une eau normale, la valeur du facteur TDS doit être comprise entre 0,50 et 0,70.
- Un TDS < 0,55 indique que l'échantillon contient probablement et en quantité non négligeable de l'ammoniaque ou des nitrites.
- Un TDS > 0,8 peut indiquer la présence en quantités importantes d'ions sulfate ou calcium peu dissociés.

6.3. Mesure de salinité :

La salinité est une mesure sans unité qui exprime la masse de sels dissous que contient une eau de mer.

6.4. Dosages :

Pour déterminer la concentration d'un soluté dans une solution, on peut réaliser :

6.4.1. Dosage par étalonnage (non destructif) :

Il permet la détermination d'une concentration C_x d'un soluté ionique en solution aqueuse S_x à partir d'une droite d'étalonnage. On mesure, à l'aide d'un conductimètre, la conductivité σ_i de plusieurs solutions S_i contenant ce même soluté de concentrations C_i puis on trace la courbe $\sigma_i = f(C_i)$.

On mesure la valeur de la conductivité de la solution d'échantillon σ_x , puis on la reporte sur la courbe d'étalonnage.

Pour que la mesure soit efficace, les solutions étalons utilisées doivent être diluées ($c \leq 10^{-2}$ mol/L) afin d'obtenir une fonction linéaire, et la concentration de la solution inconnue doit appartenir à la gamme d'étalonnage. Si ce n'est pas le cas, elle devra être diluée avant la mesure.

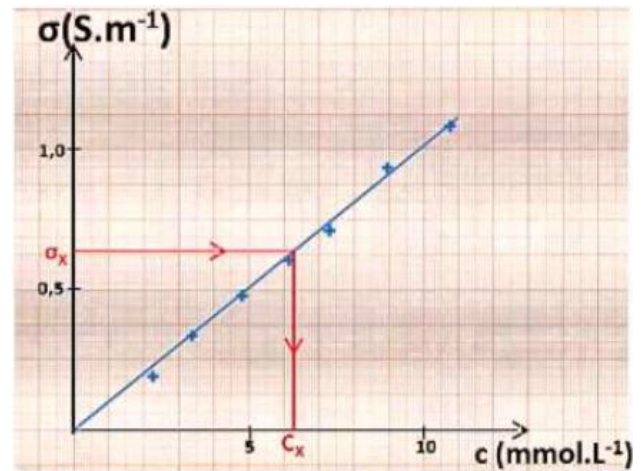


Figure 4 : Courbe d'étalonnage $\sigma = f(C)$.

6.4.2. Dosage par titrage (destructif) :

L'objectif est de déterminer avec précision la quantité de matière ou la concentration d'une espèce chimique. On mesure la conductivité de la solution σ pour chaque volume V de solution titrante versée, puis on trace la courbe de dosage $\sigma = f(V)$.

Le point d'intersection des deux droites est le point équivalent E et sa projection sur l'abscisse donne le volume équivalent V_E permettant de calculer la concentration C_i .

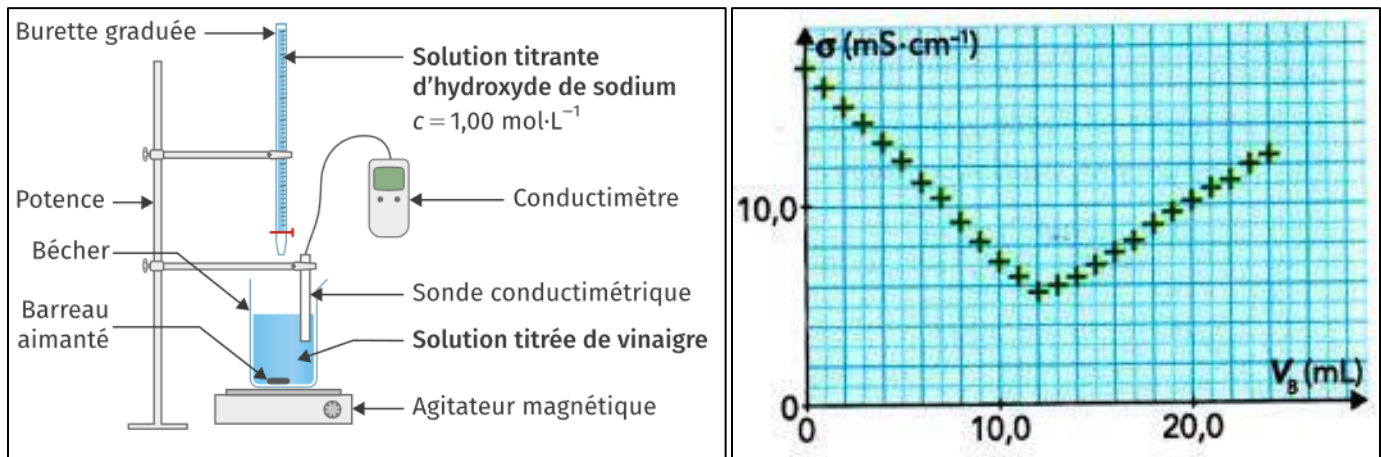


Figure 5 : Titrage conductimétrique et courbe $\sigma = f(V)$.

Chapitre IV : La chambre à pression : Le potentiel hydrique foliaire

Le potentiel hydrique (Ψ) définit le flux d'eau entre deux points. Il s'agit d'une pression mesurée en Mégapascal (MPa). Chez les plantes, la transpiration au niveau des feuilles contrôle le flux d'eau dans le continuum sol-plante-atmosphère. Il a des conséquences importantes pour les plantes (turgescence, montée de la sève)

Le sens du flux d'eau est toujours d'un potentiel hydrique élevé à un potentiel hydrique faible : on observe donc $\Psi_{\text{sol}} > \Psi_{\text{plante}} > \Psi_{\text{atmosphère}}$. Le potentiel hydrique dans le xylème est toujours négatif, de ce fait ; la colonne d'eau dans la plante est alors en tension (pression) négative.

IV.1. Mesure du potentiel hydrique foliaire

Une bombe à pression ou chambre à pression ou bombe Scholander est un instrument qui permet de mesurer le potentiel hydrique approximatif des tissus végétaux.

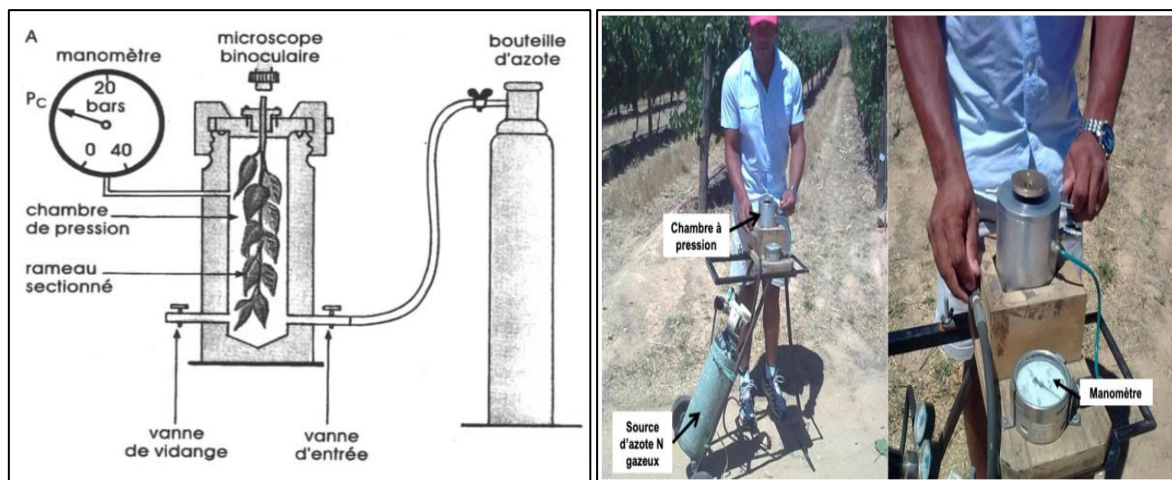


Figure 50 : La bombe de Scholander

IV.2. Principe de fonctionnement

Lorsqu'une coupe nette est effectuée au niveau du pétiole, il peut être observé à la loupe binoculaire un ménisque air-sève dont la base est tournée vers l'intérieur. Lorsque la pression appliquée sur la feuille augmente, le ménisque monte. Lorsque cette même pression est égale au potentiel hydrique de la sève, le ménisque apparaît plat au niveau de la coupe, comme à l'équilibre.

Dans le cas de la bombe de Scholander, la pression exercée sur la feuille est celle dans la chambre à pression (P_c). Il est possible de l'augmenter progressivement jusqu'à atteindre l'équilibre, c'est-à-dire lorsque $P_c = \Psi$. Dès ce moment, le ménisque apparaît plat au niveau de la coupe et il est observé une goutte de sève. La valeur donnée est en bar (10 bars = 1 MPa).

Lorsque la plante étudiée est en stress hydrique marqué, une pression élevée est requise pour atteindre l'équilibre. Dans ces conditions, la tension exercée sur l'eau de la feuille est forte.

Le temps nécessaire pour arriver au potentiel hydrique dépend du stress hydrique subi par la plante. Il faut compter plus ou moins 2 minutes pour arriver au potentiel hydrique d'une plante non stressée et environ 10 minutes pour obtenir celui d'une plante stressée. Dans tous les cas, cette méthode n'est pas très longue mais nécessite un suivi constant.

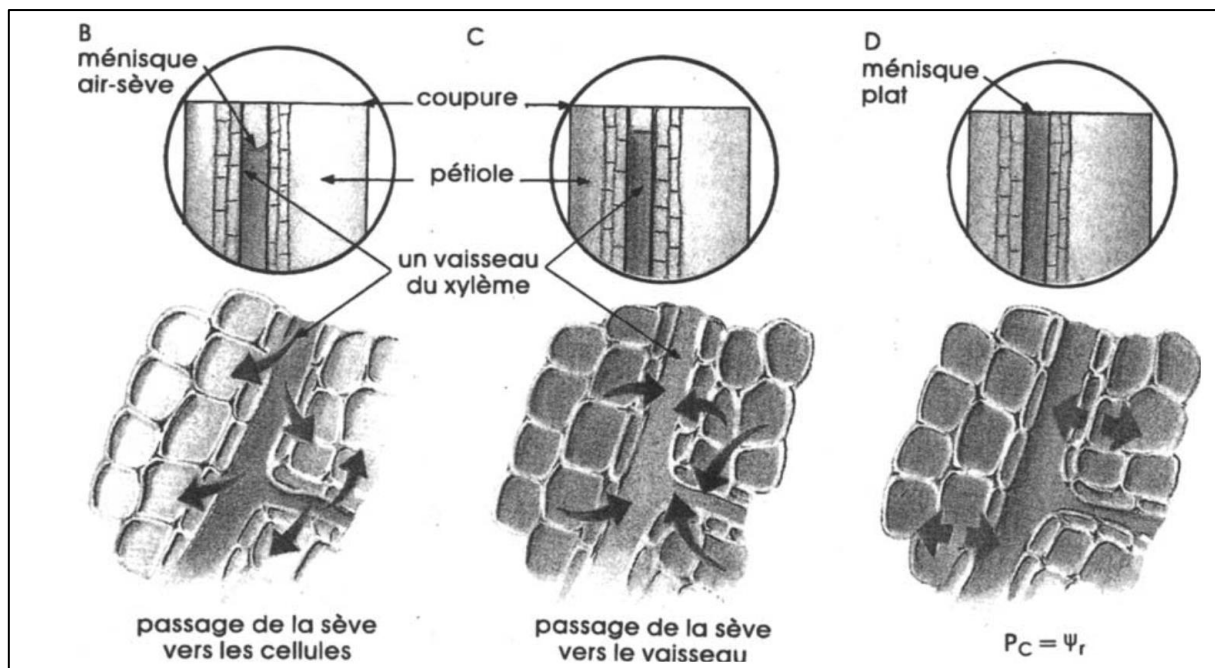


Figure 51: principe de la mesure de la tension de la sève par la méthode de la chambre à pression

IV.3. Manipulation

Plusieurs variables de potentiel hydrique peuvent être déterminées à l'aide de l'analyse de la bombe à pression. Le plus courant est le potentiel hydrique des feuilles avant l'aube.

Effectuée une à deux heures avant l'aube, cette mesure est considérée comme une bonne représentation de l'état hydrique total de la plante. Comme aucune transpiration par les stomates ne doit se produire la nuit (indépendance des conditions climatiques), les potentiels hydriques de la plante doivent être en équilibre sur toute la plante et être similaires au potentiel hydrique du sol autour des racines :

- Un segment de feuille et de pétiole ou de tige est placé à l'intérieur d'une chambre scellée.
- Du gaz sous pression (normalement de l'azote comprimé) est lentement ajouté à la chambre.
- Au fur et à mesure que la pression augmente à un moment donné, le contenu liquide de l'échantillon sera expulsé du xylème et sera visible à l'extrémité coupée de la tige ou du pétiole.
- La pression requise pour ce faire est égale et opposée au potentiel hydrique de l'échantillon (Ψ_{feuille} ou Ψ_{total}).

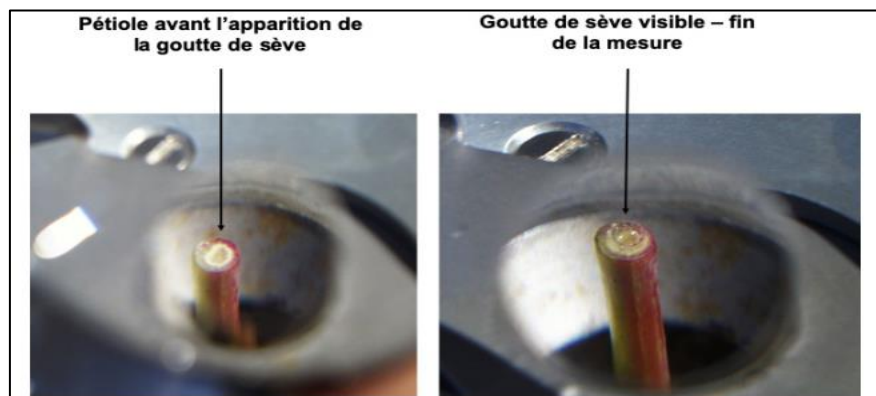


Figure 52: Apparition de la goutte de sève durant la mesure du potentiel hydrique foliaire.

Les bombes à pression sont portables sur le terrain et mécaniquement simples, ce qui en fait la méthode prédominante pour les mesures du potentiel hydrique dans les domaines de la physiologie et de l'écophysiologie des plantes.

IV.4. Importance

Le potentiel hydrique foliaire est utilisé en routine dans plusieurs pays pour le pilotage de l'irrigation et son adaptation à un cépage donné. Ils constituent un outil de choix pour l'irrigation de précision visant à économiser l'eau.

Tableau 8 : Potentiel hydrique foliaire de base et état hydrique de la vigne (1 bar = 0,1 MPa = 100 KPa).

Classes	Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{phfb} , MPa)	Niveau de contrainte ou de stress hydrique
1	$0 \text{ MPa} \geq \Psi_{\text{phfb}} \geq -0,3 \text{ MPa}$	Pas de déficit hydrique
2	$-0,3 \text{ MPa} > \Psi_{\text{phfb}} \geq -0,5 \text{ MPa}$	Déficit hydrique faible à modéré
3	$-0,5 \text{ MPa} > \Psi_{\text{phfb}} \geq -0,8 \text{ MPa}$	Déficit hydrique modéré à sévère
4	$< -0,8 \text{ MPa}$	Déficit hydrique sévère à élevé (=stress)

*Les réponses physiologique et biochimique de la vigne à ces seuils dépendent du cépage, du stade phénologique et de la durée du déficit hydrique.

Tableau 9 : Valeurs seuils des potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{phfb} , MPa) et conséquences possibles sur le fonctionnement de la vigne

Ψ_{phfb} (MPa)	Croissance végétative	Photosynthèse	Croissance de la baie	Maturation du raisin
0 à -0,3	normale	normale	normale	normale
-0,3 à -0,5	réduite	normale à réduite	normale à réduite	normale ou stimulée
-0,5 à -0,8	réduite à inhibée	réduite à inhibée	réduite à inhibée	réduite à inhibée
< -0,8	inhibée	inhibée	inhibée	réduite à inhibée

* Les valeurs seuils peuvent varier d'un cépage à l'autre.

Chapitre III : Les méthodes enzymatiques

III.1. La technique d'immunoabsorption par enzyme liée

La méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), est une technique immuno-enzymatique sur support solide principalement utilisée pour **détecter et/ou doser la présence d'anticorps ou d'antigènes** dans un échantillon. La reconnaissance de l'antigène étudié par un anticorps spécifique (ou inversement) est suivie grâce à l'utilisation d'un substrat chromogène ou fluorogène par l'enzyme liée à l'anticorps qui émet un signal coloré ou fluorescent dosé par spectroscopie.

III.1.1. Types d'ELISA

III.1.1.1. ELISA direct

Dans la forme la plus simple d'un ELISA :

- Les antigènes de l'échantillon à tester sont fixés à une surface.
- Ensuite, un anticorps correspondant et lié à une enzyme est appliqué sur la surface afin qu'il puisse se lier à l'antigène.
- Tous les anticorps non liés sont éliminés.
- Dans la dernière étape, une substance contenant le substrat de l'enzyme est ajoutée.
- S'il y avait liaison, la réaction subséquente produit un signal détectable, le plus souvent un changement de couleur proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon. Puisqu'un seul anticorps est utilisé dans un ELISA direct, ils sont moins spécifiques qu'un ELISA sandwich.

Elle est utilisée pour évaluer l'affinité et la spécificité des anticorps. Enquêter sur les interactions bloquantes/inhibitrices. Cette forme d'ELISA est simple et rapide mais moins spécifique puisque n'utilise qu'un seul anticorps.

III.1.1.2. ELISA indirect

Un ELISA indirect est similaire à un ELISA direct en ce qu'un antigène est immobilisé sur une plaque, mais il comprend une étape d'amplification de détection. Pour améliorer la sensibilité de la détection de l'antigène, l'anticorps qui reconnaît l'antigène recherché n'est pas couplé à une enzyme, mais il est reconnu spécifiquement par un second anticorps qui sera, lui, couplé à une enzyme.

- Tout d'abord, un anticorps de détection primaire non conjugué est ajouté et se lie à l'antigène spécifique.
- Un anticorps secondaire conjugué dirigé contre l'espèce hôte de l'anticorps primaire est ensuite ajouté.
- Le substrat produit alors un signal proportionnel à la quantité d'antigène lié dans le puits.

On l'utilise pour la mesure des anticorps endogènes. Son avantage est la sensibilité élevée, alors que son inconvénient est le potentiel de réactivité croisée causée par l'anticorps secondaire, ce qui augmente également le nombre de faux positifs. Il faut donc logiquement prévoir des puits de contrôle.

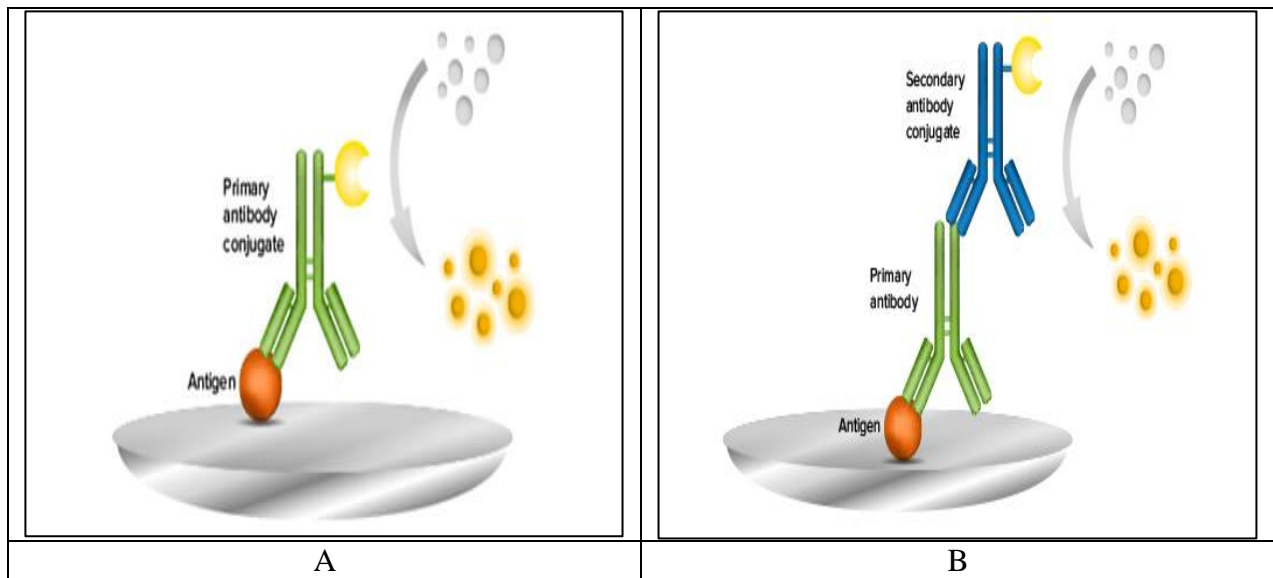


Figure 46: ELISA directe (A) et indirect (B)

III.1.1.3. Sandwich ELISA

Les ELISA en sandwich sont le type d'ELISA le plus courant. Deux anticorps spécifiques sont utilisés pour prendre en sandwich l'antigène, communément appelés paires d'anticorps appariés :

- L'anticorps de capture est enduit sur une microplaque, l'échantillon est ajouté et la protéine d'intérêt se lie et est immobilisée sur la plaque.
- Un anticorps de détection conjugué est ensuite ajouté et se lie à un épitope supplémentaire sur la protéine cible.
- Le substrat est ajouté et produit un signal proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. Les ELISA sandwich sont hautement spécifiques, car deux anticorps sont nécessaires pour se lier à la protéine d'intérêt.

L'ELISA en sandwich est une variante moins commune en clinique, mais elle est par contre d'un usage très courant en recherche. Sa spécificité et sa sensibilité sont maximales, comme elle est compatible avec les matrices d'échantillons complexes. Cependant, son protocole, plus long que les autres types, présente un défi à développer.

III.1.1.4. ELISA compétitif

Cette variante permet le dosage d'un antigène en utilisant le principe de compétition de liaison. Elle est couramment utilisée pour les petites molécules, lorsque la protéine d'intérêt est trop petite pour prendre efficacement en sandwich deux anticorps. Le protocole consiste à :

- Fixer des anticorps sur une plaque.
- Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque
- La plaque est par la suite rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.
- La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut.
- Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

Cette méthode est avantageuse en quantification de petites molécules et d'hormones. En contrepartie, l'utilisation d'un seul anticorps limite sa spécificité.

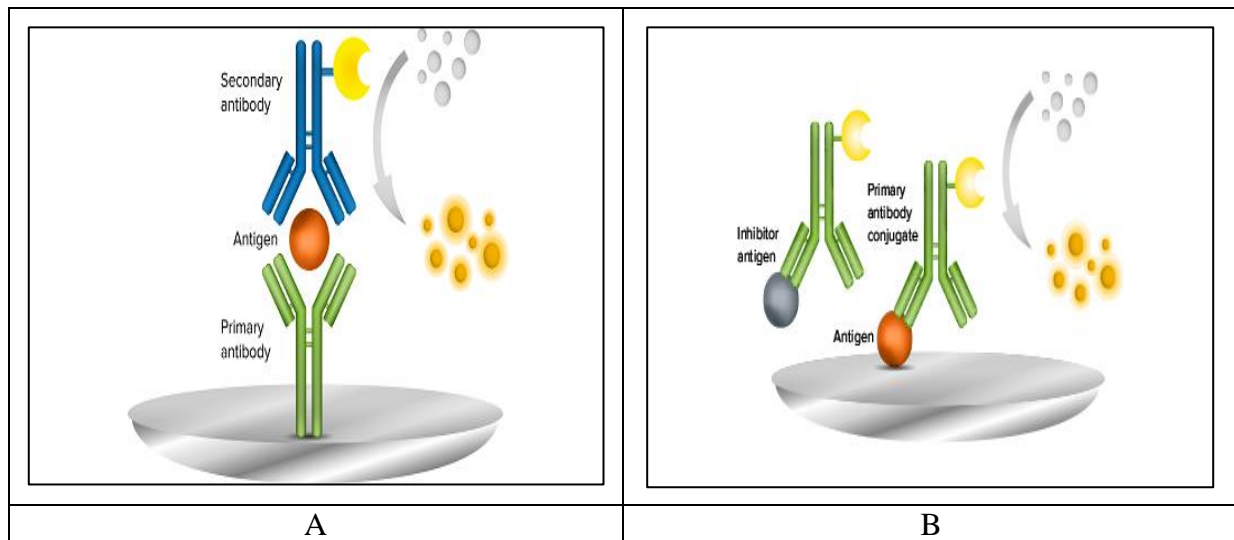


Figure 47: ELISA en sandwich (A) et ELISA compétitif.

III.1.2. Applications de l'ELISA

L'ELISA peut être réalisé à visée quantitative ou qualitative. Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, le test ELISA est utilisé pour la détection de plusieurs virus végétaux ainsi que pour l'identification du pathovar ou de la sous-espèce de bactéries phytopathogènes.

III.2. Mesure de l'activité nitratre réductase in vitro

III.2.1. Le nitratre réductase

Le nitratre réductase (NR) nomme autrement une flavoprotéine soluble contenant du molybdène. Cette enzyme est essentielle pour la réduction du nitratre en NH_2 dans les plantes, étape essentielle de la production des protéines.

Cette enzyme catalyse précisément la première étape de la voie d'assimilation du nitratre (NO_3^-) ; sa réduction en nitrite (NO_2^-), qui est principale pour l'acquisition de l'azote par les plantes cultivées et pour gérer son rôle de signalisation dans différents processus végétaux.

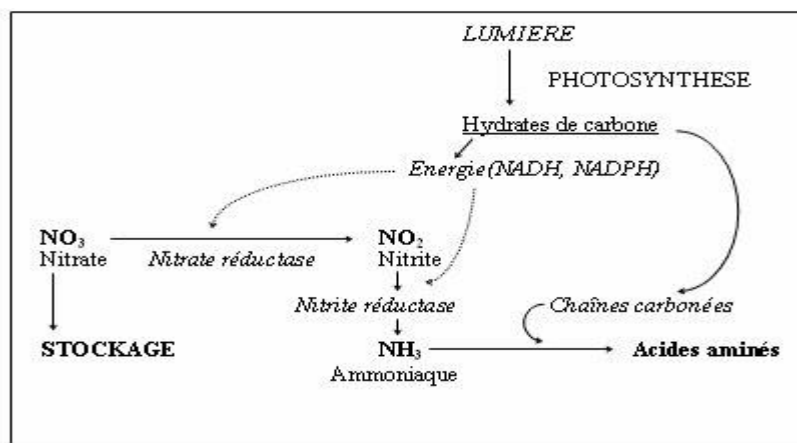


Figure 48: Etapes de réduction des nitrates en ammoniacque et devenir de l'ammoniacque dans la plante.

III.2.2. Principe de la mesure in vitro de l'activité nitratre réductase

Une activité enzymatique s'exprime toujours en quantité de produit apparu ou de substrat consommé par unité de temps et par unité de matière. Dans le cas de l'activité nitratre réductase, l'activité sera rapportée en nmoles de nitrites apparus par heure et par g de feuille.

Après addition d'un réactif, les nitrites apparus donnent lieu à un composé coloré dont l'absorbance est mesurée à 540 nm. En réalité, deux réactifs seront utilisés : le sulfanilamide et le N-1-naphtylènediamine (NED). En milieu acide, le sulfanilamide donne du sulfanilate de sodium et un ion ammonium. Les ions nitrites réagissent avec le sulfanilate de sodium en donnant un ion diazoniium qui en présence de NED donne un composé de couleur rose qui absorbe à 540 nm.

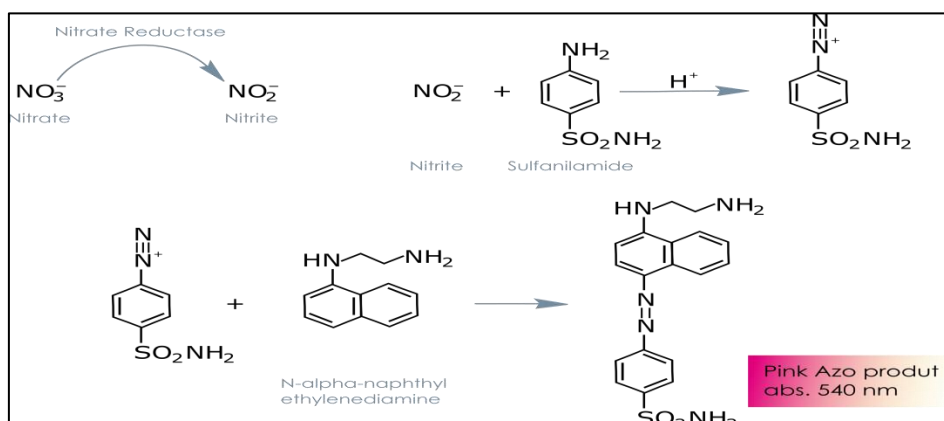


Figure 49 : Principe de dosage de l'activité nitrate réductase.

Pour chaque temps, on convertit l'absorbance en nanomoles de nitrites, à l'aide de la gamme étalon. La variation de la quantité de nitrites apparus en fonction du temps est tracée sur une feuille de papier millimétré et la vitesse initiale de la réaction est mesurée et calculée pour une heure.

Connaissant la masse de la feuille, le volume d'extrait et la quantité d'extrait introduit dans le milieu réactionnel, on peut alors calculer l'activité enzymatique en $\mu\text{moles de nitrites formés} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ feuilles.