

# BIOCHIMIE

## TRAVAUX PRATIQUES (BIOCH. I. 1, a)

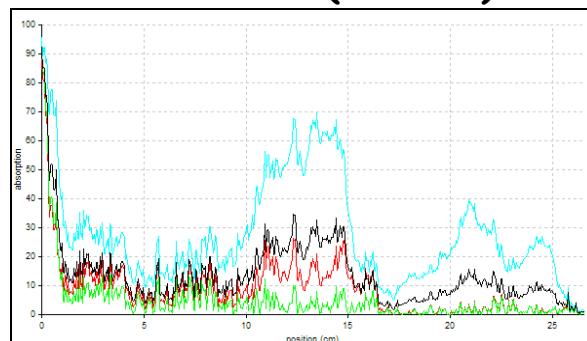


Techniques de chromatographie en phase liquide.

- Chromatographie de partage d'un extrait total de pigments végétaux.



- Expérience Assistée par Ordinateur (EXAO)



Expériences réalisables en T.P. de Biologie  
avec des élèves du 3<sup>ème</sup> degré.

- **Chromatographie de partage d'un extrait total de pigments végétaux.**
- **Expérience Assistée par Ordinateur (EXAO)**

## AVERTISSEMENT

La chromatographie des pigments végétaux nécessite impérativement d'être réalisée sous hotte aspirante vu la toxicité des solvants organiques.

## Sécurité

Les consignes de sécurité d'usage en laboratoire de chimie doivent être appliquées à la lettre.

Le port de gants et de lunettes de protection ainsi que d'une blouse de laboratoire est indispensable.

Protection de l'environnement : Les solvants organiques doivent impérativement être jetés avec les déchets de laboratoire et déposés dans une collecte de produits chimiques.

## Connaissances

**BIOLOGIE** : La structure chimique des pigments végétaux (voir page 2).

**CHIMIE** : techniques de chromatographie en phase liquide (voir pages 3 - 5).

## Matériel

**Pour l'extraction des pigments :**

- √ Du matériel biologique au choix : *feuilles d'épinard, feuilles de carotte, feuilles d'arbre, algues, ....* Dans cet exemple, nous avons choisi des feuilles (fanés) de carotte
- √ Mortier + pilon
- √ Un peu de sable fin propre

**PRODUIT CHIMIQUE POUR L'EXTRACTION :**

- √ **Ethanol dénaturé à 95°**  
( $C_2H_6O$ )  
R 11 et S 7-16



**Pour la filtration simple (lent):**

- √ 1 petite passoire

- √ 1 erlenmeyer
- √ 1 cristalliseur
- √ 1 entonnoir + filtres en papier
- √ 1 spatule ou 1 cuillère en plastique

**Pour la filtration sous vide (rapide) :**

- √ Büchner et fiole à vide reliée à une trompe à eau

**Pour la chromatographie de partage :**

- √ **Cuve de développement** : une éprouvette graduée de 1000 ml équipée d'un bouchon muni d'un crochet. Un cache en papier noir pour recouvrir l'éprouvette.
- √ Bandes de papier Whatman de 30 cm x 3 cm
- √ 1 petite éprouvette graduée
- √ 3 pipettes graduées 10 ml
- √ 3 poires propipettes
- √ 1 petit capillaire pour effectuer les dépôts
- √ Règle en plastique transparent
- √ Crayon à papier ou porte-mine
- √ Papier absorbant

**PRODUITS CHIMIQUES POUR LA CHROMATOGRAPHIE :**

- √ **Ether de pétrole**  
(essence G)  
R11-45-65 et  
S 9-16- 29-53-45



- √ **Acétone**  
(Propanone)  
( $C_3H_6O$ )  
R11-36-66-67  
S9-16-26




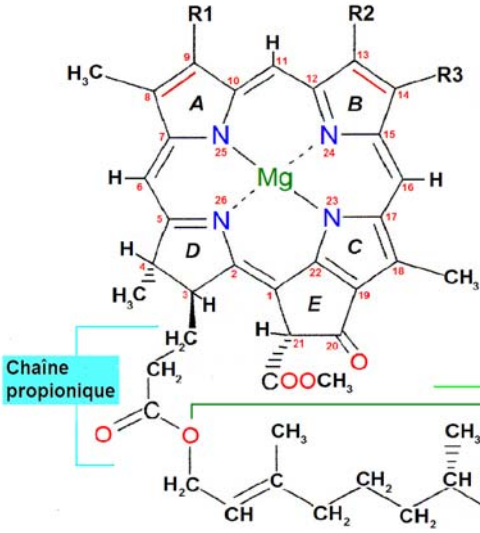


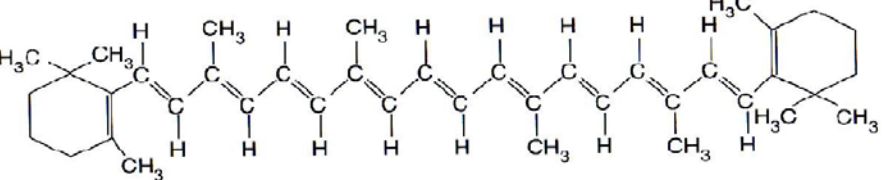
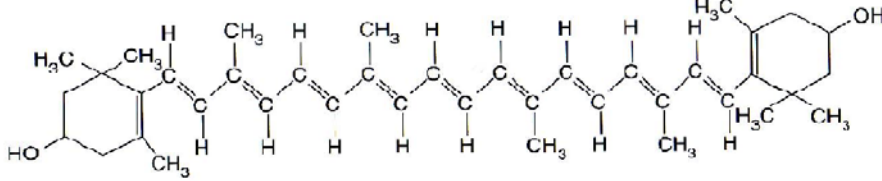

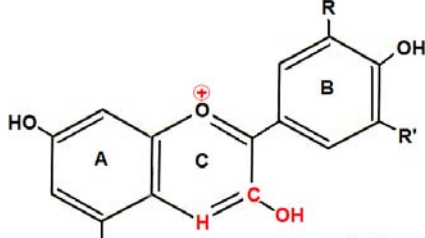
- √ **Cyclohexane**  
( $C_6H_{12}$ )  
R11-38-50/53-65-67  
S9-16-33-60-61-62



**Pour l'EXAO :**

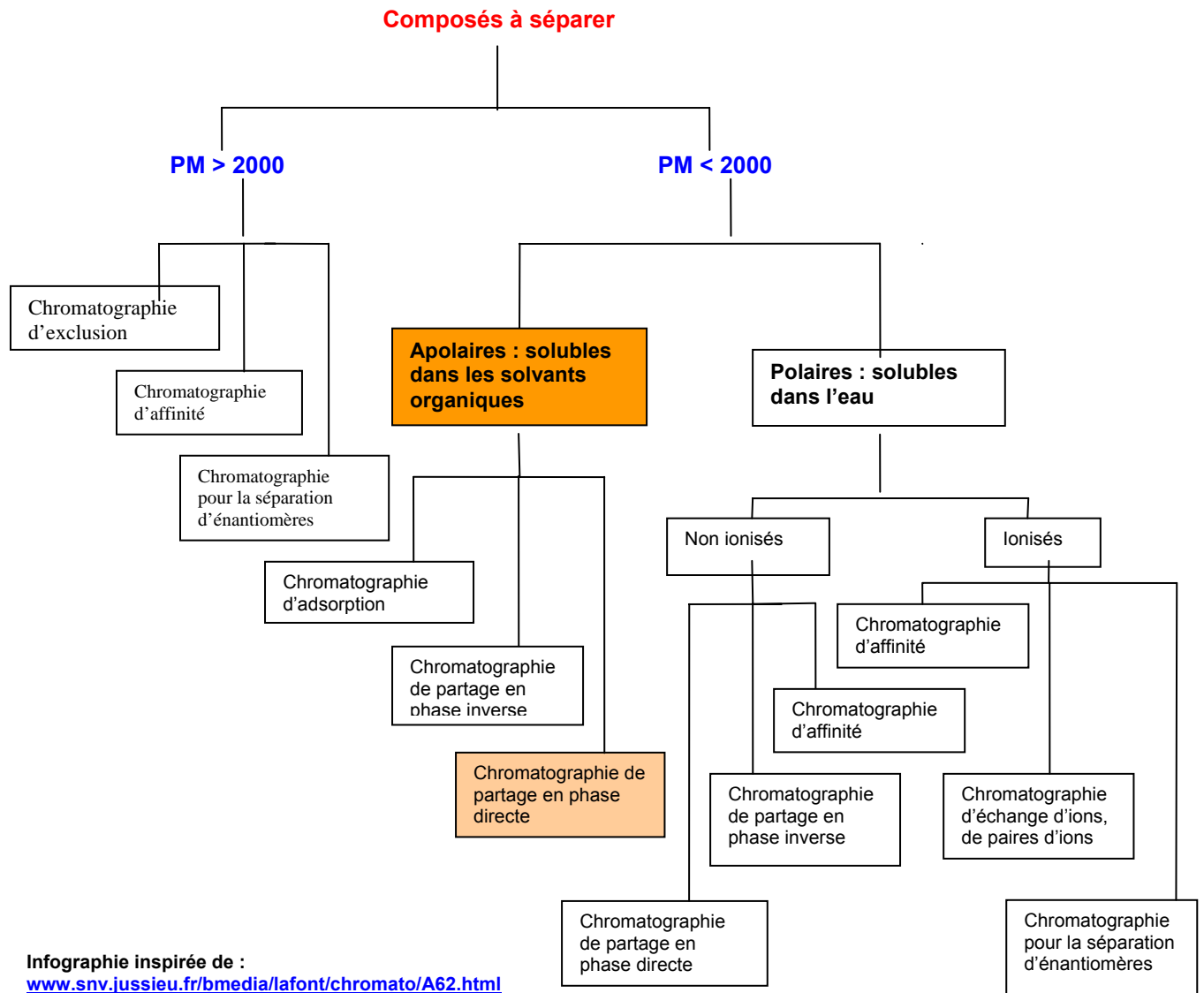
- √ un appareil photo numérique ou un scanner à plat compatible TWAIN (ou les deux)
- √ un ordinateur
- √ le logiciel Mesurim

Un document utile : la structure chimique des pigments végétaux :

<p><b>La famille des chlorophylles</b></p> 	<p><b>Structure des chlorophylles a, b et d.</b> (Numérotation selon IUPAC-IUB 1987)</p>  <table border="1" data-bbox="1037 286 1436 481"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chl.a</td> <td>-CH=CH<sub>2</sub></td> <td>-CH<sub>3</sub></td> <td>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>Chl.b</td> <td>-CH=CH<sub>2</sub></td> <td>-C(=O)-H</td> <td>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>Chl.d</td> <td>-C(=O)-H</td> <td>-CH<sub>3</sub></td> <td>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></td> </tr> </tbody> </table> <p>Phorbine hydrophile constituée d'un noyau chlorine centré sur un atome de Mg et de la présence d'un anneau cyclopentanoïque sur le cycle C</p> <p>Phytol hydrophobe: alcool estérifiant à longue chaîne</p> <p>© Infographie: B. Lourtie</p>		R1	R2	R3	Chl.a	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Chl.b	-CH=CH <sub>2</sub>	-C(=O)-H	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Chl.d	-C(=O)-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
	R1	R2	R3														
Chl.a	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>														
Chl.b	-CH=CH <sub>2</sub>	-C(=O)-H	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>														
Chl.d	-C(=O)-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>														
<p><b>La famille des caroténoïdes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les carotènes</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les xanthophylles</li> </ul> 	 <p>β-Carotène</p>  <p>Zeaxanthine</p> <p>Forme oxydée du β-Carotène</p>																
<p><b>La famille des flavonoïdes</b></p> 	 <p>Anthocyanidines</p> <table data-bbox="1029 1787 1388 1937"> <tr> <td>pelargonidine</td> <td>R = R' = H</td> </tr> <tr> <td>cyanidine</td> <td>R = OH, R' = H</td> </tr> <tr> <td>péonidine</td> <td>R = OCH<sub>3</sub>, R' = H</td> </tr> <tr> <td>delphinidine</td> <td>R = R' = OH</td> </tr> <tr> <td>pétunidine</td> <td>R = OCH<sub>3</sub>, R' = OH</td> </tr> <tr> <td>malvidine</td> <td>R = R' = OCH<sub>3</sub></td> </tr> </table>	pelargonidine	R = R' = H	cyanidine	R = OH, R' = H	péonidine	R = OCH <sub>3</sub> , R' = H	delphinidine	R = R' = OH	pétunidine	R = OCH <sub>3</sub> , R' = OH	malvidine	R = R' = OCH <sub>3</sub>				
pelargonidine	R = R' = H																
cyanidine	R = OH, R' = H																
péonidine	R = OCH <sub>3</sub> , R' = H																
delphinidine	R = R' = OH																
pétunidine	R = OCH <sub>3</sub> , R' = OH																
malvidine	R = R' = OCH <sub>3</sub>																

## Ce qu'il faut savoir faire:

Choisir le type de chromatographie en fonction des composés à séparer.



**Facteurs intervenant dans le partage des molécules en fonction des mécanismes de séparation :**

- **la solubilité dans un solvant liquide** : chromatographie de partage
- **la taille, la forme des molécules** : chromatographie d'exclusion
- **la polarité** : chromatographie d'adsorption, chromatographie d'adsorption en phase inversée
- **la charge électrique** : chromatographie par échange d'ions
- **la présence de groupe d'atomes formant des sites particuliers** : chromatographie d'affinité

La classification des différents types de chromatographie repose sur le fait que l'on a privilégié l'effet de l'un des facteurs ci-dessus, cependant aucune méthode ne repose exclusivement sur un seul de ces facteurs.

## Ce qu'il faut comprendre :

**La chromatographie de partage**, sur papier Whatman ou sur colonne (CLC), fait partie des différents modes de chromatographie en phase liquide.

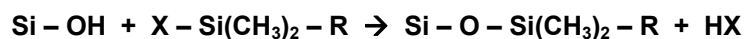
## 1. La méthode :

- **chromatographie liquide/liquide.**
- **La phase mobile**, l'éluant, est liquide.
- **La phase stationnaire** est liquide.
- **Le facteur intervenant dans le mécanisme de séparation : la différence de solubilité des espèces dans les 2 solvants.**  
(Revoir en chimie les chapitres sur l'équilibre chimique, le déplacement de l'équilibre chimique, la solubilité)

Le mécanisme mis en jeu dans ce type de chromatographie est le **partage des solutés du mélange** entre les **2 solvants non miscibles** qui constituent d'une part la phase stationnaire et d'autre part la phase mobile.

**La phase stationnaire peut être constituée par :**

- **un film liquide imprégné** sur un support rigide (silice, cellulose,...)
- **un film liquide fixé par liaison covalente** (phases greffées sur silice), le greffage est réalisé par des ponts siloxane :



## 2. La chromatographie sur papier

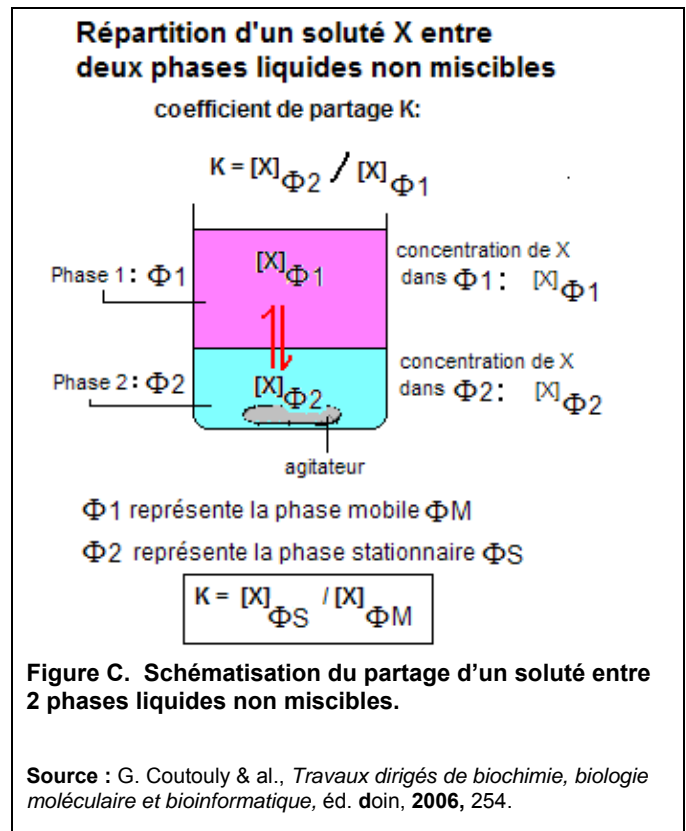
**La chromatographie sur papier est une chromatographie de partage**

- **La phase fixe** est formée par l'**eau adsorbée** par la cellulose du papier qui constitue le support rigide. Les molécules d'eau **liées à la cellulose** représentent le **premier solvant**.
- **La phase mobile** est constituée par l'**éluant** qui représente le **second solvant (ou mélange de solvants)**.

**Les facteurs qui interviennent dans cette méthode et qui influencent la vitesse et donc la hauteur de migration des espèces sont multiples :**

- **La solubilité des espèces dans chacun des 2 solvants :** une espèce plus soluble dans la phase mobile (l'éluant) se déplace plus rapidement qu'une espèce qui l'est moins.  
Le **coefficient de partage K** d'une espèce X entre 2 solvants S1 et S2 :

$$K = [X]_{S1} / [X]_{S2}$$







## Protocole

### A. Extraction d'une solution totale de pigments :

1. Rincer à l'eau déminéralisée quelques feuilles du végétal choisi : ici, des feuilles de carotte (*Daucus carota*)
2. Sécher convenablement avec du papier absorbant, sans trop malmener les feuilles.



Photo 1.

3. Découper les feuilles en petits morceaux dans le mortier, ajouter une petite pincée de sable et broyer en additionnant **6 ml d'éthanol**.



Photo 2.

4. Lorsque les feuilles sont bien broyées, filtrer grossièrement dans un cristallisoir à l'aide de la petite passoire. Presser sur le broyat à l'aide du pilon.



Photo 3.

5. Récupérer le dépôt accumulé dans la passoire avec une spatule ou une cuillère en plastique, le placer dans le mortier et broyer à nouveau en rajoutant **2 ml d'éthanol**.
6. Répéter la filtration grossière comme expliquée au point 4.
7. **Filtrer le contenu du cristallisoir** dans l'erenmeyer à l'aide de l'entonnoir et du filtre en papier. Rien ne doit déborder du filtre ! Presser délicatement le dépôt contre le filtre avec une cuillère en plastique afin d'extraire un maximum de solution de pigments. Il faut veiller à ne pas endommager le filtre !



Photo 4.

9. Verser le filtrat obtenu dans un petit récipient en verre d'une contenance proche de 5 ml (afin de le remplir complètement avec le filtrat et d'éviter l'oxydation des pigments) et fermer avec un bouchon.



Photo 5.

## B. Chromatographie de partage

### 1. Préparation de la bande de papier :

**Attention !!!** Les bandes de papier Whatman doivent être manipulées avec beaucoup de soins.

Elles ne doivent pas être touchées à mains nues mais seulement avec des gants de protection.

A défaut de papier pour chromatographie, le papier buvard blanc peut faire l'affaire (voir photo 6).

1. 1 A 0,5 mm du bord supérieur de la bande de papier, au milieu, percer un petit trou pour pouvoir accrocher la bande au crochet du bouchon de l'éprouvette.

1. 2 Avec la règle, tracer un petit trait tous les cm le long de l'un des grands côtés du papier. A 2 cm du bord inférieur du papier, tracer très délicatement, en appuyant à peine, une ligne en travers du papier. **Cette ligne sera la ligne de dépôt.**

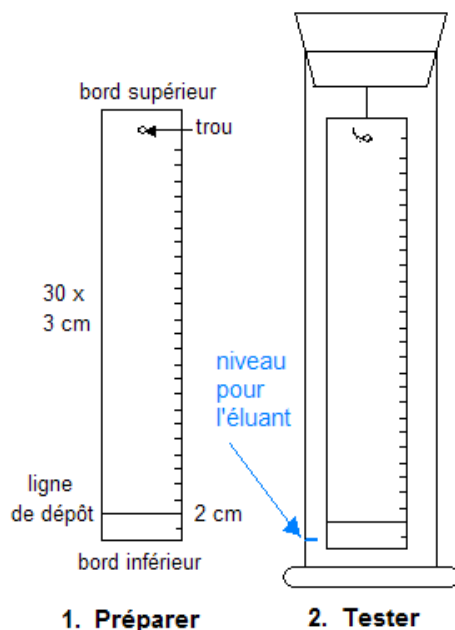


Figure 1 : préparation d'une bande de papier pour la chromatographie de partage et test à vide.

### 2. Faire un test à vide du dispositif :

2. 1 Accrocher la bande sur le crochet du bouchon et placer le bouchon sur l'éprouvette 1000 ml **vide** (sans l'éluant).

2. 2 Vérifier, lorsque le système est fermé, que le bord inférieur du papier ne touche pas le fond de l'éprouvette. Le cas échéant, raccourcir la bande de papier et faire un nouvel essai.

La bande de papier ne devra toucher ni le fond ni les côtés de l'éprouvette.

2. 3 Evaluer la hauteur que devra atteindre l'éluant dans l'éprouvette. Le bord inférieur du papier devra plonger dans l'éluant mais le niveau de l'éluant devra rester en dessous de la tache de dépôt. Indiquer la hauteur par un trait au marqueur.

2. 4 Fabriquer un cache en papier noir qui sera placé sur l'éprouvette pendant la séparation des pigments

### 3. Préparation de l'éluant :

3. 1 Prélever chaque solvant avec une pipette munie d'une propipette. **Utiliser une pipette par solvant !**

Composer le mélange de solvants dans la petite éprouvette graduée.

Ether de pétrole (85 %), acétone (10 %), cyclohexane (5%).

3. 2 **Retirer le papier du bouchon de l'éprouvette !** Verser l'éluant dans l'éprouvette jusqu'à la hauteur repérée (voir 2. 3).

3. 3 Fermer l'éprouvette avec le bouchon et mouiller les parois de l'éprouvette en lui imprimant doucement une rotation. Laisser saturer pendant 20 à 30 min le temps d'effectuer les dépôts.

### 4. Effectuer le dépôt de l'extrait total :

4. 1 Avec le capillaire, prélever une petite quantité d'extrait de pigments et déposer une goutte sur la ligne de dépôt.

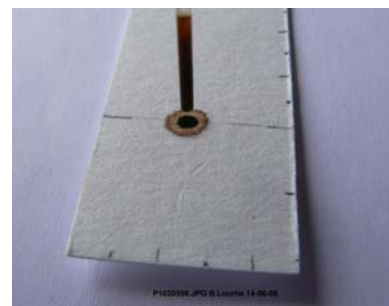


Photo 6.

4. 2 Laisser complètement sécher avant d'effectuer un nouveau dépôt. Pour accélérer l'évaporation, il est d'usage d'utiliser un sèche-cheveux.

4. 3 **Effectuer une dizaine de dépôts successifs en laissant toujours sécher entre chaque dépôt.**

La tache ne devrait pas avoir plus de 5 mm de diamètre. Plus l'extrait est dilué dans l'éthanol plus la tache sera étendue. Si nécessaire, laisser s'évaporer l'éthanol pour concentrer l'extrait.



### 5. Séparation des pigments :

5.1 **Accrocher la bande de papier** au crochet du bouchon et placer la bande dans l'éprouvette. Fermer avec le bouchon.

5.2 Placer le cache en papier sur l'éprouvette et laisser migrer l'éluant presque jusqu'en haut ( $\pm 28$  cm). Cela prend environ 50 min.

**Il ne faut, en aucun cas, déplacer le dispositif pendant l'expérience.**

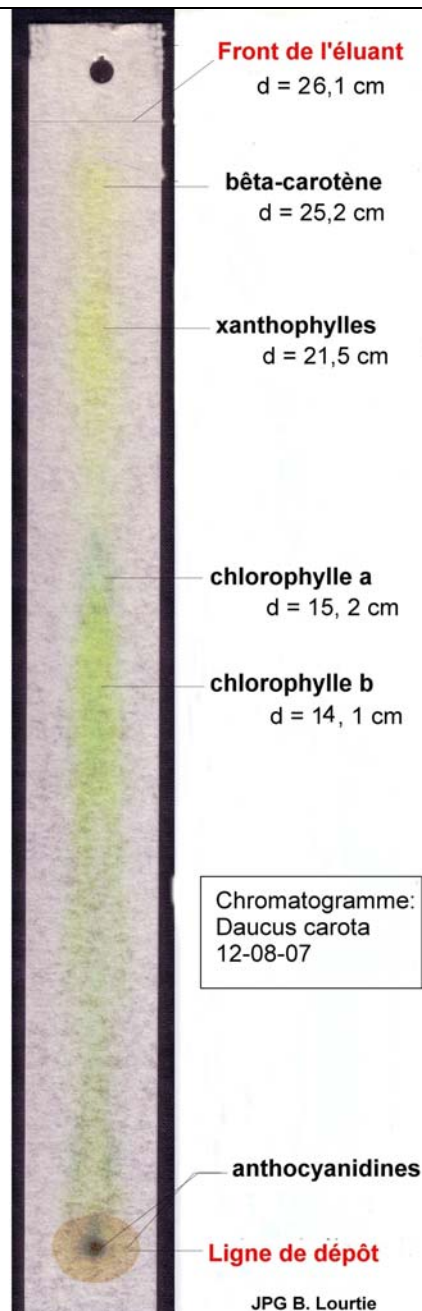
5.3 Lorsque la chromatographie est terminée, sortir la bande de l'éprouvette et la photographier immédiatement avec un appareil photo numérique (facultatif). Ensuite, avec un crayon, marquer le front de l'éluant ainsi que le centre des taches laissées par les pigments séparés.

**Attention ! La couleur des pigments disparaît au fur et à mesure que la bande sèche.**

Ce qu'il faut obtenir :



**Photo 7.** Dispositif pour la chromatographie de partage des pigments végétaux.



**Photo 8.** Chromatogramme obtenu à partir d'un extrait total de *Daucus carota* (carotte).

Que s'est-il passé ?

**Chromatographie sur papier des pigments végétaux (avec un éluant composé de 85% d'éther de pétrole, 10% d'acétone et 5% de cyclohexane)**

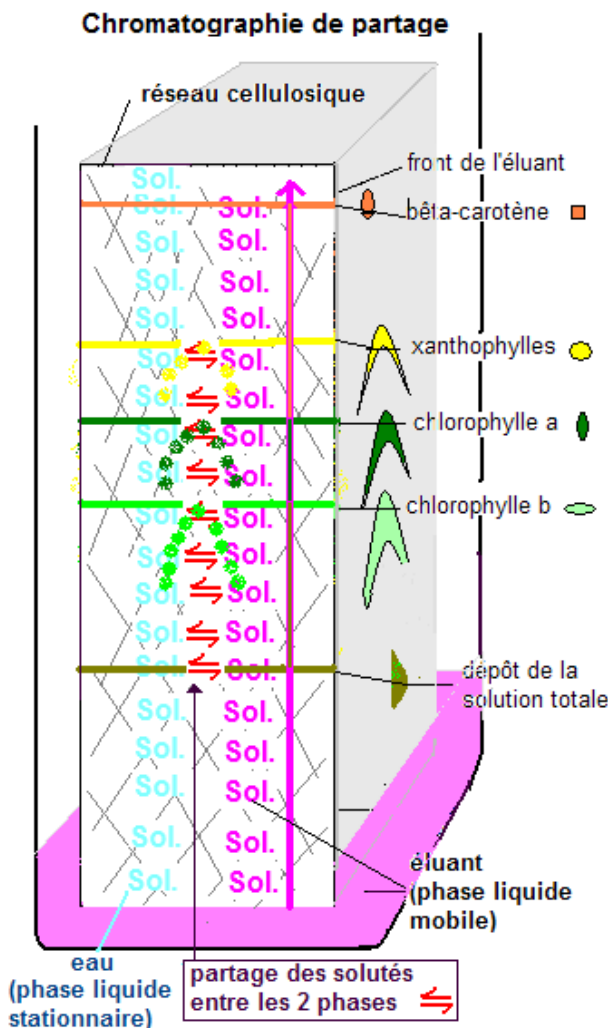


Figure A. Schématisation d'une chromatographie sur papier.

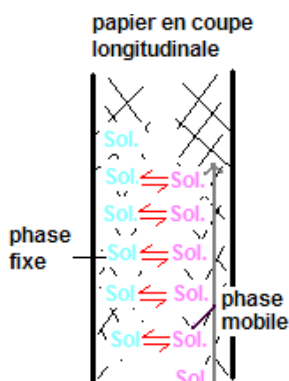


Figure B. Schéma du partage d'un soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire (papier en coupe longitudinale vu de profil)

FIGURE A.

- **Le  $\beta$ -carotène** est élué en premier et migre avec le front de l'éluant. Le  $\beta$ -carotène est un pigment apolaire, liposoluble (il s'agit d'un hydrocarbure en  $C_{40}$  appartenant à la famille des terpénoïdes). Le  $\beta$ -carotène est insoluble dans l'eau de la phase fixe et soluble dans l'éluant composé de solvants organiques. Le partage du  $\beta$ -carotène entre le solvant de la phase liquide stationnaire et le solvant de la phase liquide mobile n'a pas lieu.
  - **Les xanthophylles** sont des carotènes oxydés. Plus polaires que les carotènes, ils sont moins solubles dans l'éluant et un peu plus solubles dans l'eau que ces derniers. Ils se partagent donc entre ces 2 solvants au cours de l'éluion et, par conséquent, ils migrent moins vite que le  $\beta$ -carotène. La lutéine est la forme oxydée de l' $\alpha$ -carotène et la zéaxanthine est la forme oxydée du  $\beta$ -carotène.
  - **Les chlorophylles** sont des molécules **amphiphiles** constituées d'un anneau porphyrrique hydrophile et d'une chaîne hydrocarbonée en  $C_{20}$  hydrophobe (insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques). Les chlorophylles se partagent entre les 2 solvants et migrent moins vite que les xanthophylles car elles sont moins solubles dans l'éluant que ces derniers.
- Ce sont les molécules qui présentent la plus grande taille dans le mélange de pigments (Chloro. a :  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  ; Chloro. b :  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ).
- **La chlorophylle b** se différencie de la chlorophylle a par la présence d'un groupe formyle ( $R_2 = CHO$ ) à la place d'un groupe méthyle ( $R_2 = CH_3$ ) en position C(13). La chlorophylle b est donc plus polaire et moins soluble dans l'éluant que la chlorophylle a.

- **Les pigments hydrosolubles** tels que les **anthocyanidines** ne migrent pas et restent au niveau de la tache de dépôt

FIGURE A et B.

**Dans la chromatographie de partage**, il faut imaginer une phase mobile  $\Phi_M$  se déplaçant lentement devant une phase stationnaire (fixe) liquide immobile  $\Phi_S$  avec la réalisation de N équilibres jusqu'à épuisement de la concentration du soluté X dans la phase mobile.

## Mesurer et calculer :

### 1. Calculer le rapport frontal (Rf) pour chaque pigment séparé

- **Mesurer** la hauteur de migration de l'éluant (distance entre la ligne de dépôt et le front de l'éluant).
- **Mesurer** la distance (d) parcourue par chaque pigment (distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache).
- **Calculer**, pour chaque pigment, le rapport frontal (Rf) :

$$Rf = \text{distance parcourue par le pigment} / \text{distance parcourue par l'éluant}$$

Pour un éluant donné et une espèce chimique donnée le Rf est caractéristique de l'espèce.

### Remarque :

L'éluant le plus souvent utilisé pour la chromatographie des pigments végétaux sur papier est celui qui est utilisé dans cet exemple : éther de pétrole 85 %, acétone 10 %, cyclohexane 5 %. Il peut être intéressant de faire des essais avec des éluants de composition différente.

**Les phéophytines** ne sont pas visibles, dans les conditions de l'expérience ! La chromatographie sur couche mince (CCM) permet de séparer les phéophytines (voir : conclusions page 13). Il s'agit d'adopter un regard critique en ce qui concerne l'expérience décrite aux pages 122 et 123 de l'ouvrage suivant : R. Perrier & col., *Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques*, Collection Biosciences et techniques, éditeur doin, 1997, 122-123.

### 2. La technique peut être rendue quantitative (avec une erreur de $\pm 10$ %) de deux façons :

- **par les observations sur le papier** : la surface du spot est proportionnelle au log. de la concentration, mesurer l'absorption à travers le papier après révélation. [4]
- **par les techniques d'éluion** : découper la région du papier qui contient l'espèce, éluer cette région et doser l'espèce dans l'éluat). [4]

## EXAO : utiliser un logiciel de mesure sur l'image

### Matériel :

- ✓ Un appareil photo numérique ou un scanner à plat (ou les deux).
- ✓ Un ordinateur

**Les outils de mesure sur l'image du logiciel MESURIM PRO (auteur : J-F. Madre, Académie d'Amiens, France)** permettent d'aborder des mesures de photométrie classique à partir d'objets photographiés ou scannés.

Ces outils travaillent sur les images telles qu'elles sont représentées dans la mémoire de l'ordinateur, les résultats dépendent de la qualité de la numérisation et d'indications correctes d'échelle. **Ces outils demandent d'être utilisés avec circonspection (voir avertissement de l'auteur concernant l'interprétation des résultats).**

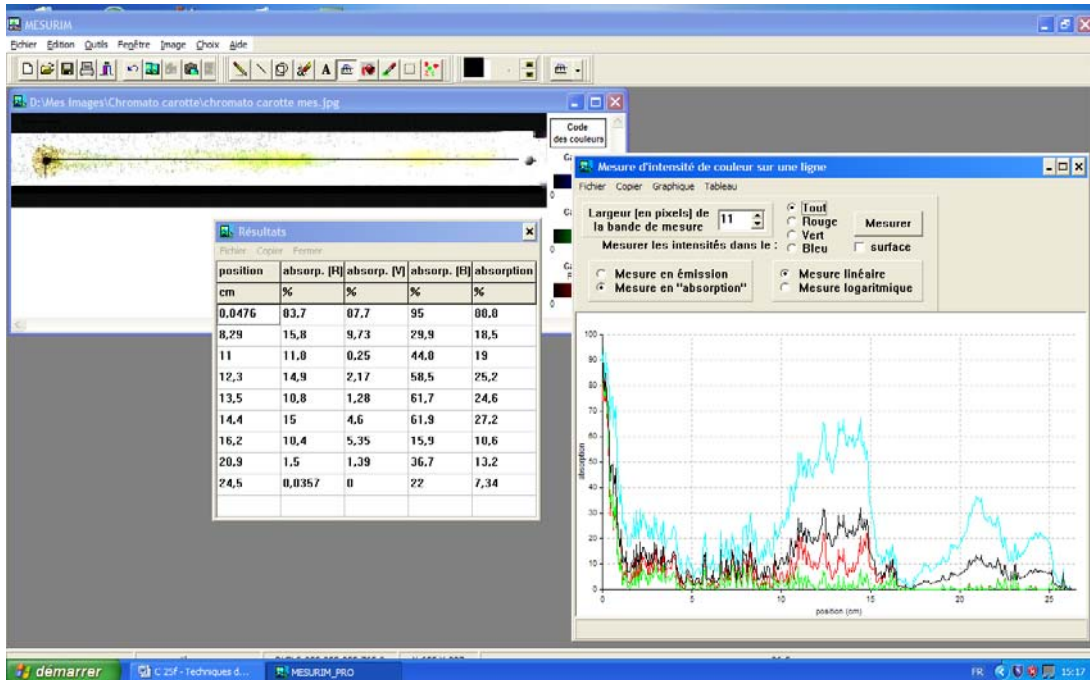
**Annuaire des logiciels de SVT gratuits et disponibles sur internet en téléchargement.**

- SVT-Edu.net (<http://perso.wanadoo.fr/joudan.eric/logiciel.htm>)
- Académie Nantes (<http://www.ac.nantes.fr:8080/peda/disc/svt/tice.htm>)

**Après téléchargement du logiciel, on peut utilement se constituer un mode d'emploi à partir des explications proposées dans le « Sommaire » et les exemples d'utilisation.**

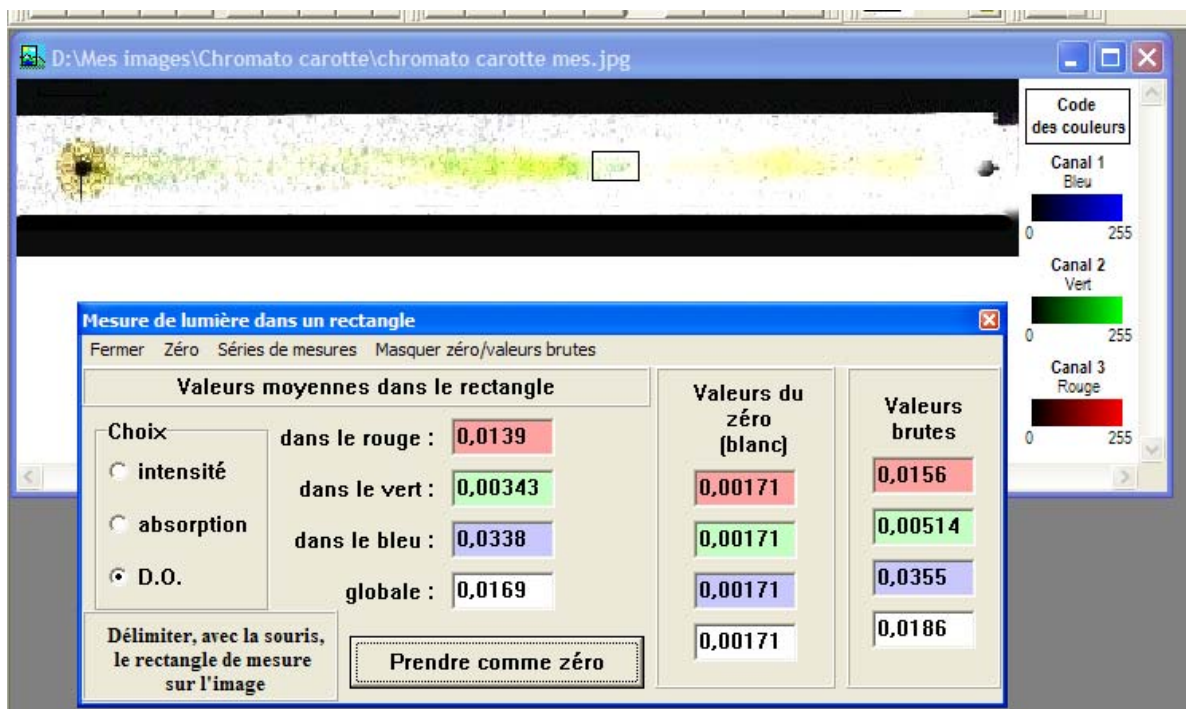
**Exemple 1: mesure d'intensité de lumière avec le logiciel MESURIM PRO.**

On peut mesurer la variation d'intensité de couleur dans un canal de couleur ou dans l'ensemble des canaux, le long d'un segment, suivant une bande plus ou moins large. Les résultats sont donnés sous la forme d'une courbe qui peut être donnée « en émission » (intensité), « en absorption » (opposé de l'intensité si la mesure est linéaire) ou « en D.O. estimée » (si la mesure est logarithmique).



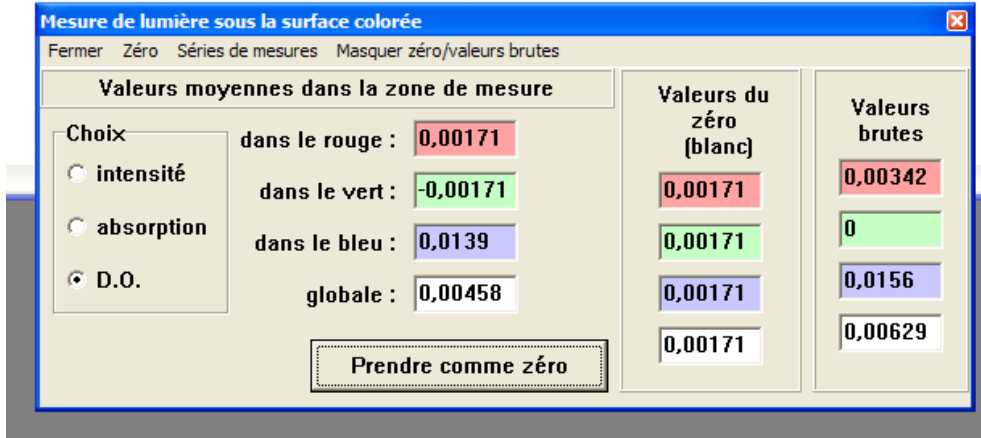
**Exemple 2 : mesure de lumière dans un rectangle et mesure de lumière sous la surface colorée.**

**2. 1 Mesure de la densité optique (D.O.) dans le rectangle du spot de la chlorophylle a**



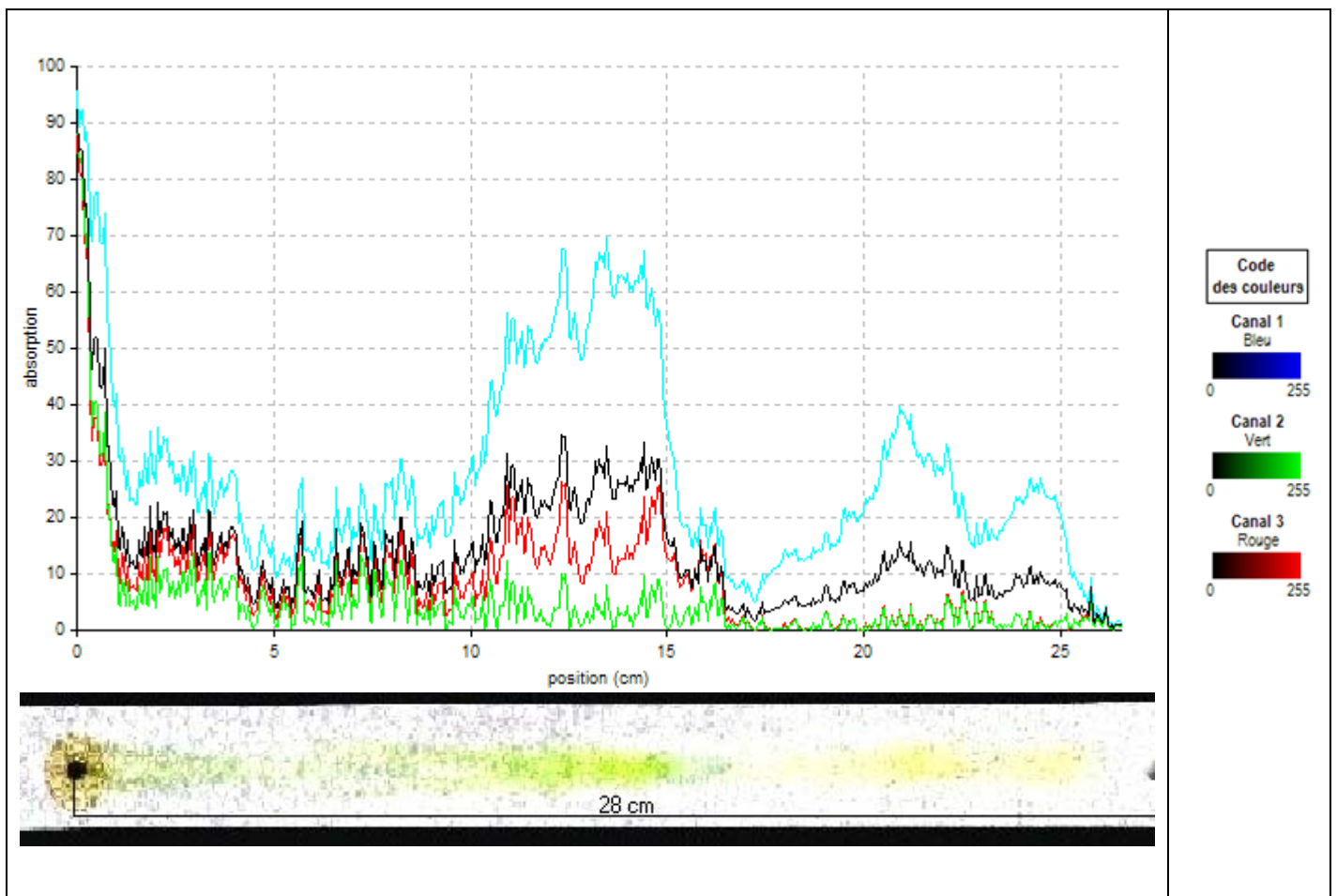


2. 2 Mesure de la D.O. sous la surface colorée dans le rectangle



Application :

1.1 Mesures de photométrie classique sur l'image du chromatogramme de *Daucus carota* obtenue avec un scanner à plat CIS (CanoScan Lide 30).



**Graphique 1.** Mesure d'intensité de couleur sur une ligne (mesure linéaire en absorption) dans l'ensemble des 3 canaux RVB (courbe noire), dans le canal bleu (courbe bleue), dans le canal rouge (courbe rouge) et dans le canal vert (courbe verte).



Tableau des résultats pour des valeurs choisies (pics)						Code des couleurs	
Position cm	absorp. (R) %	absorp. (V) %	absorp. (B) %	absorption %		Rf	
0	88	91,7	95,7	91,8	extrait total		Canal 1 Bleu 0 255
10,9	25,6	12,3	56,3	31,4			Canal 2 Vert 0 255
11	15,7	1,93	47,2	21,6			Canal 3 Rouge 0 255
12,4	25,7	9,13	67,8	34,2	chloro. b	12,4 / 26,5	
13,5	20,9	7,99	69,6	32,8			
14,4	23,5	9,55	67,4	33,5			
15,6	7,13	1,11	15,1	7,77			
15,8	15,9	7,56	21,8	15,1	chloro a	15,8 / 26,5	
20,9	3,6	3,42	39,5	15,5	xanthophylles	20,9 / 26,5	
22,1	6,49	5,85	32,8	15,1			
24,2	3,39	3,24	27,1	11,3	$\beta$ -carotène	24,2 / 26,5	
24,5	2,25	1,71	26,8	10,3			
26,5	0,784	0,784	1,57	1,05			

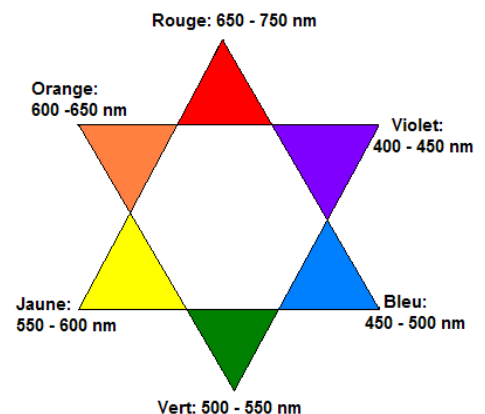
### Interprétation des résultats :

#### Le graphique montre :

- **Une forte absorption dans les 3 canaux pour la tache de l'extrait total.**
  - La tache rouge brunâtre sur la ligne de dépôt est due aux pigments hydrosolubles qui n'ont pas été élués
  - La forte absorption dans le vert s'explique par la présence de pigments rouges, les anthocyanidines.
- **La chlorophylle b**, pigment photosynthétique vert, absorbe principalement dans le rouge et dans le bleu et en moindre mesure dans le vert. Ceci est à mettre en rapport avec la couleur vert jaunâtre de la chlorophylle b.
- **Une forte absorption dans le bleu au niveau du spot de la chlorophylle b.**  
Il y a peut-être une superposition d'un pigment jaune (xanthophylle) et de la chlorophylle b. Ceci expliquerait la couleur jaune visible sur le chromatogramme à cet endroit.  
Une chromatographie bidimensionnelle pourrait apporter une réponse mais la coloration des pigments disparaît dès que le chromatogramme sèche.
- **La chlorophylle a**, pigment photosynthétique vert - bleuâtre, absorbe dans le rouge et dans le bleu et en moindre mesure dans le vert.
- **Les caroténoïdes (xanthophylles et carotènes)** sont des pigments jaunes à orange et absorbent essentiellement dans le bleu.

**La couleur des corps opaques est déterminée par les rayons réfléchis par ces corps ; en d'autres mots, par les rayons qu'ils n'absorbent pas.**

Pour un composé qui absorbe la lumière à une longueur d'onde déterminée, la coloration résultante est celle obtenue par l'addition de toutes les autres couleurs sauf celle qui est absorbée.  
L'œil perçoit cette coloration comme étant la complémentaire c'est-à-dire celle qui est opposée dans le triangle des couleurs.



## Question remue-méninges:

Peut-on mettre en relation les résultats obtenus en mesure de photométrie classique à partir d'objets photographiés ou scannés et les spectres d'absorption des pigments végétaux obtenus par spectrophotométrie?

## Eléments de réponse

### 1. Spectrophotométrie

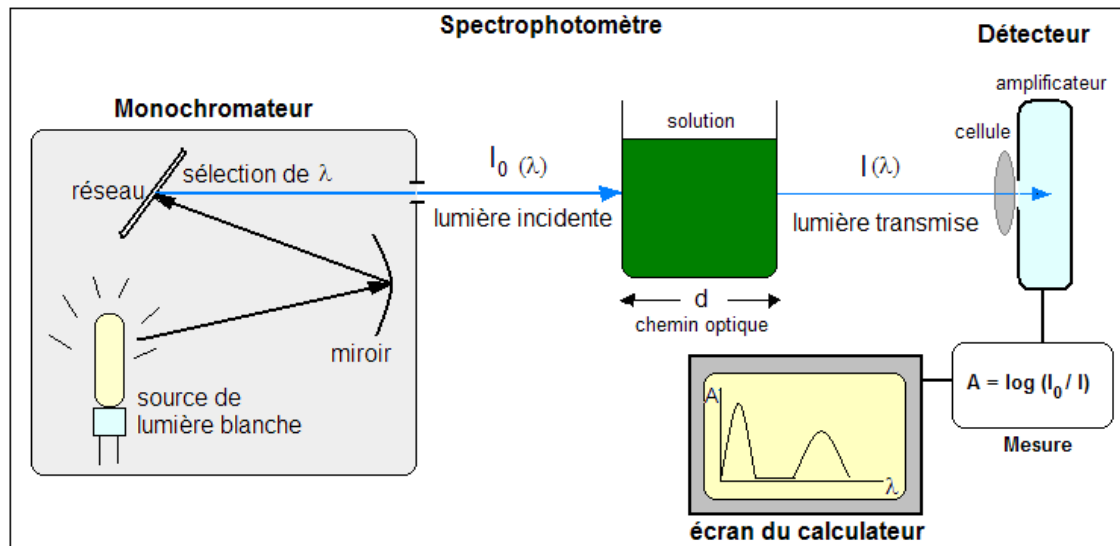
#### 1.1 La méthode :

La **spectrophotométrie** est une méthode d'analyse physico-chimique qui permet d'identifier et de doser des particules (ions, molécules) présentes dans une solution sans l'altérer.

**Utilisée en biochimie**, cette méthode est basée sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission d'un rayonnement électromagnétique par les particules à doser.

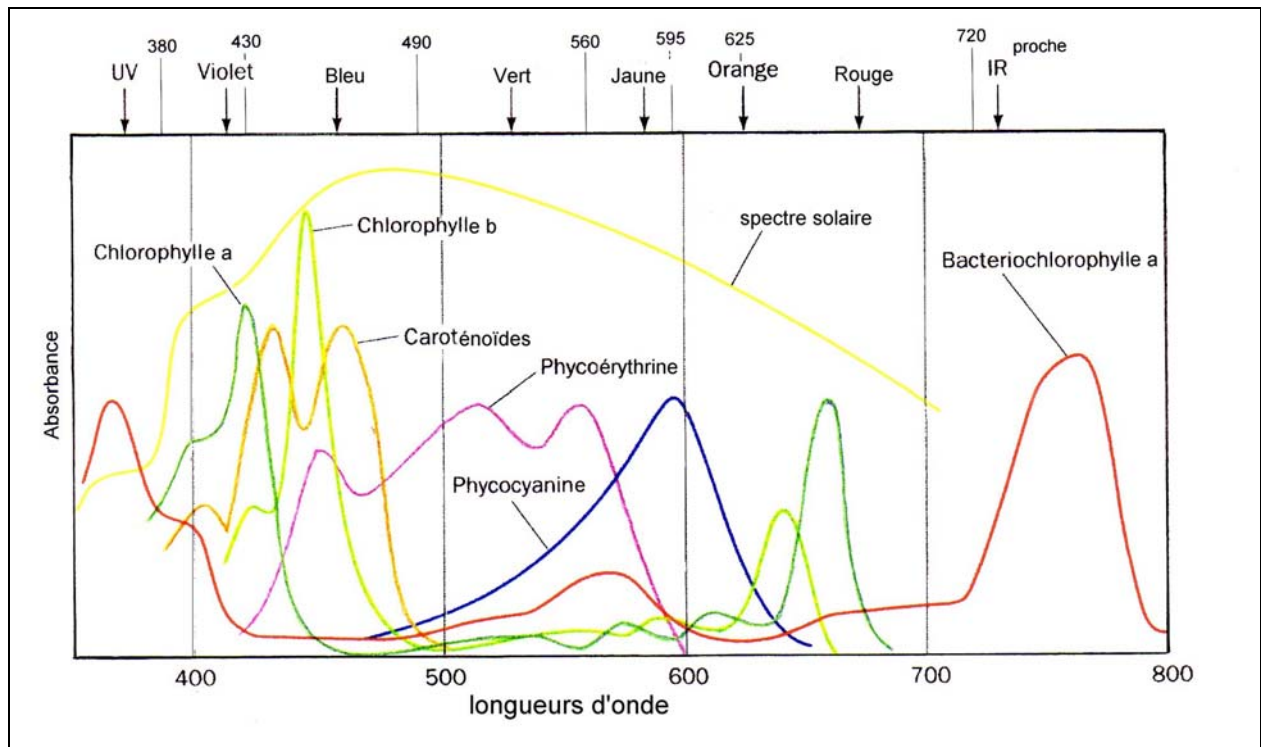
**Les rayonnements le plus souvent utilisés** sont l'UV (< 400 nm), la lumière visible (400 nm – 800 nm) et l'IR (> 800 nm).

#### 1.2 Le spectrophotomètre :



- Une source de lumière blanche (lumière visible) émet un rayonnement vers un réseau par l'intermédiaire d'un miroir.
- Le réseau disperse la lumière blanche en ses lumières monochromatiques (violet, bleu, vert, jaune, orange et rouge).
- Le monochromateur sélectionne une longueur d'onde ( $\lambda$ ) à l'aide d'une fente.
- La lumière de longueur d'onde sélectionnée ( $I_0$  = lumière incidente) traverse une cuve rectangulaire en quartz de dimension connue ( $d$  = trajet optique) et contenant la solution de l'espèce chimique colorée à analyser.
- Une cellule photoélectrique traduit en courant électrique le nombre de photons qu'elle reçoit ( $I$  = lumière transmise). Cette dernière, couplée à un amplificateur électronique, constitue le détecteur qui permet de mesurer l'intensité lumineuse transmise  $I$  et l'intensité lumineuse incidente  $I_0$ .
- L'appareil affiche la valeur de l'absorbance  $A = \log(I_0 / I)$  (sans unité). Cette valeur est comprise entre 0 et 2.
- **Pour réaliser une mesure**, il faut effectuer un **réglage du zéro** avec une solution appelée le **blanc**.
- Un ordinateur traduit les mesures sous forme du graphique d'une fonction  $A$  (Absorbance) =  $f(\lambda)$ .

### 1. 3 Les spectres d'absorption des principaux pigments photosynthétiques.



Un **spectre d'absorption** présente la variation de l'absorption, par une particule (atome, molécule), en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. **Chaque particule**, est caractérisée par la forme générale de son spectre d'absorption (hauteurs relatives des pics et leur position en longueur d'onde).

En **analyse qualitative**, le spectre d'absorption permet de déterminer la nature d'une substance chimique.

En **analyse quantitative**, l'intensité d'absorption est fonction de la concentration de la particule qui absorbe la lumière.

A chaque longueur d'onde, l'absorption de la lumière par une particule en solution dépend de la nature de la particule, de sa concentration ( $c$  en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), du chemin optique ( $d$  en  $\text{cm}$ ) parcouru par la lumière à l'intérieur de la solution et d'un coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance pour un solvant donné ( $\epsilon_\lambda$  en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### Loi de Beer-Lambert :

Lorsqu'une **lumière monochromatique** d'intensité «  $I_0$  » traverse un milieu homogène, l'intensité de la lumière transmise «  $I$  » décroît selon une fonction exponentielle lorsque le chemin optique «  $d$  » et la concentration «  $c$  » augmentent.

$$A_\lambda = \log I_0 / I = \epsilon_\lambda c d = \text{D.O (sans unité)} \quad \text{et} \quad c = A_\lambda / \epsilon_\lambda \cdot d$$

A: absorbance ou densité optique (sans unité) ;

$\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire, constante caractéristique de l'espèce moléculaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

$c$  : concentration ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

$d$  : chemin optique ( $\text{cm}$ ).

$\lambda$  : longueur d'onde ( $\text{nm}$ ).

## 2. Les mesures de photométrie classique à partir d'objets photographiés ou scannés.

### 2.1 Acquisition d'images à partir d'un appareil photo numérique.

Comme pour tout appareil photographique, l'image passe d'abord par une série de lentilles optiques. Ensuite, une **cellule photosensible** (CCD : Charged Coupled Device = Capteur à transfert de charges) convertit la lumière en charges électriques. Le CCD ne voit que des nuances de gris : le noir correspond à une charge nulle et le blanc correspond à une charge maximum.

On obtient des couleurs en filtrant suivant 4 nuances de couleurs (rouge, bleu et 2 nuances de vert) : 1 filtre rouge (R) avec 256 nuances de rouge, 1 filtre bleu (B) avec 256 nuances de bleu et 2 filtres verts avec 256 nuances de vert chacun. Cela correspond à 16 777 216 couleurs différentes.

### 2.2 Acquisition d'images à partir d'un scanner à plat compatible TWAIN.

- **Caractéristiques :**

- **le pilote** : il s'agit d'un programme compatible TWAIN qui sert d'interface entre les logiciels de traitement d'images et le scanner pour l'acquisition ;
- **la résolution** : correspond au nombre de pixels par pouce qu'un scanner peut acquérir. L'unité d'acquisition est le **dpi ou ppp** (dot per inch = points par pouce) qui peut être différente en largeur et en longueur ;
- **la palette des couleurs** : caractérise chaque scanner et est exprimée en bits.

- **Fonctionnement d'un scanner à plat :**

Le principe général de fonctionnement d'un scanner consiste en une source lumineuse qui se déplace près de la surface d'un document. La lumière émise est réfléchiée et captée par un capteur photosensible qui convertit la lumière (valeurs arithmétiques) en charges électriques (valeurs analogiques) qui sont converties, à leur tour, en signal digital (valeurs numériques) par un convertisseur analogique-numérique. Un microcontrôleur met l'image en forme (format JPEG) avant son transfert vers l'ordinateur.

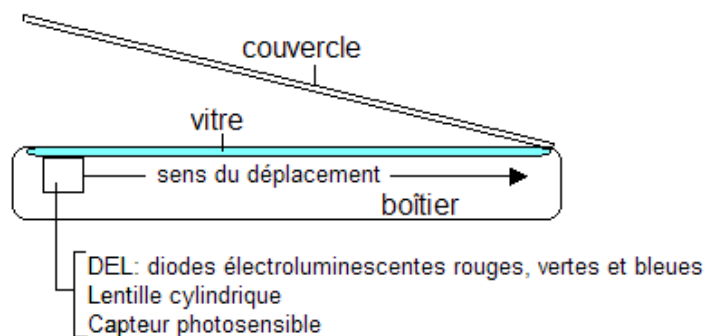
Il existe deux technologies différentes : la technologie CCD (voir appareil photo numérique) et la technologie CIS (Contact Image Sensor = capteur d'images par contacts).

- **Description d'un scanner CIS :**

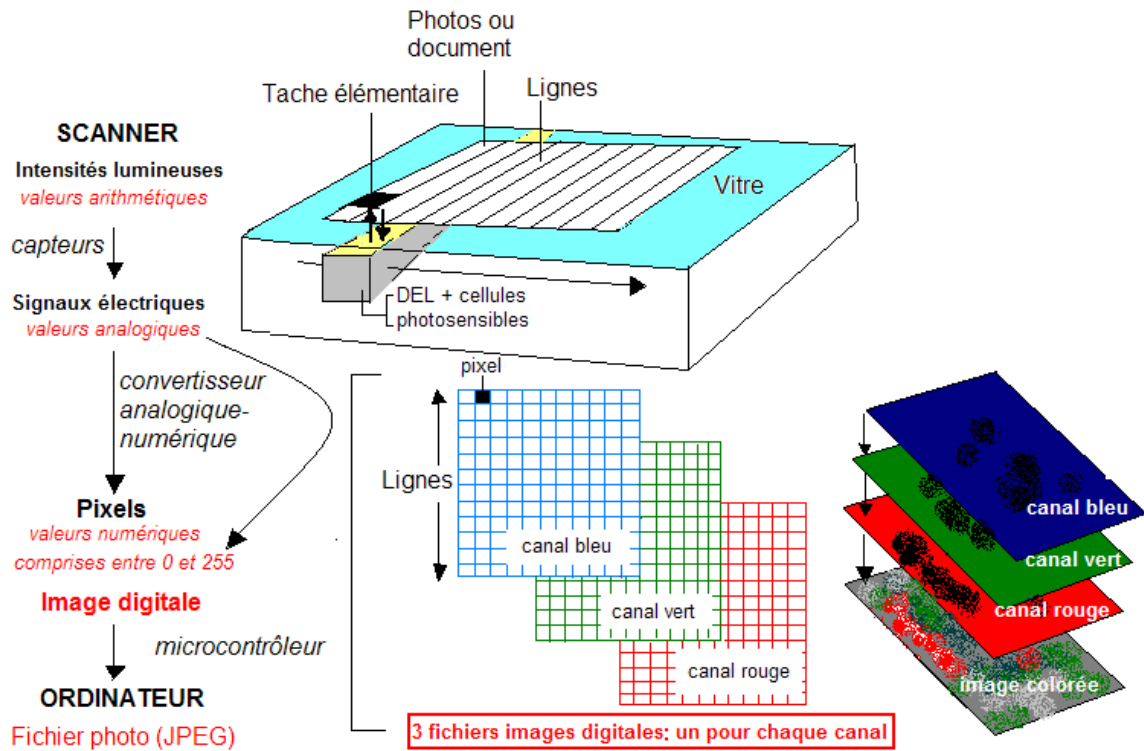
Dans ce système, un **dispositif unique** est directement en contact au travers de la vitre avec le document à numériser. Ce dispositif unique regroupe **la source lumineuse, la lentille et le capteur**. La lentille cylindrique fait converger vers le capteur la lumière émise par des **diodes électroluminescentes** (DEL) de couleurs **rouge, bleue et verte**. Les capteurs CMOS (Complementary Metal Oxyd Semi-conductor) utilise une rampe de DEL et requiert une distance très étroite entre les capteurs et le document.

Les DELs de couleurs émettent dans les longueurs d'onde suivantes : Bleu (450 nm – 500 nm), Vert (500 nm – 570 nm) et Rouge (610 nm – 760 nm).

Scanner à plat: technologie CIS (capteur d'image par contacts)



• **Fonctionnement d'un scanner CIS :**



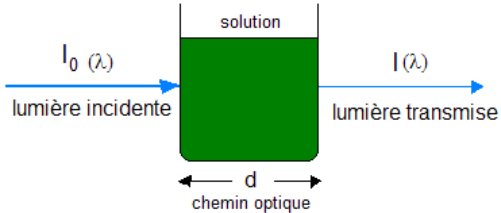
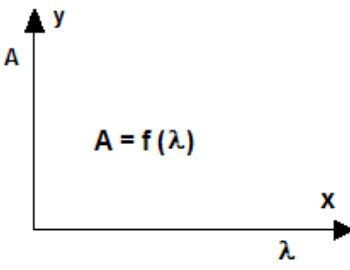
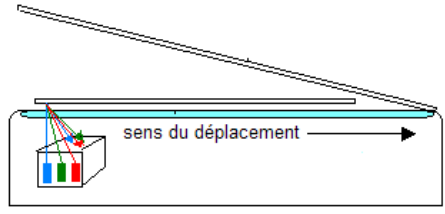
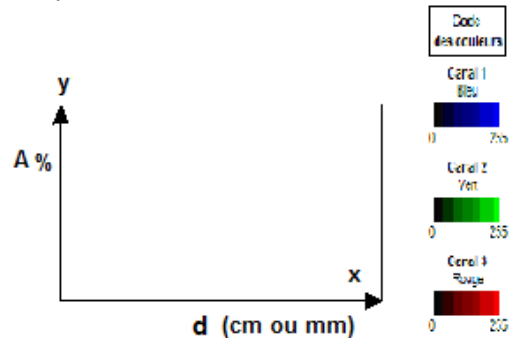
- le scanner parcourt le document ligne par ligne ;
- chaque ligne est décomposée en « taches élémentaires » correspondant à des **pixels** ;
- le capteur analyse la couleur de chaque pixel ;
- **la couleur de chaque pixel** est décomposée en 3 composantes (rouge, vert et bleu) ;
- chacune des composantes de couleur est mesurée et représentée par une valeur numérique.
- La numérisation s'effectue en codage binaire (0 ou 1), l'unité élémentaire de stockage (une case mémoire de l'ordinateur) est appelée « bit » (binary information). L'unité de travail est l'octet, ensemble constitué de 8 bits ;
- en calcul binaire,  $1 + 1 = 10$  (qui ne se lit pas dix mais un, zéro). Dans un octet, on peut stocker des valeurs numériques comprises entre 0 et 255 :

Zéro	00000000
1	00000001
2	00000010
3	00000011
4	00000100
5	00000101
...	.....
...	.....
255	11111111

- **le pixel qui reçoit la valeur 255** est celui qui correspond à la valeur arithmétique de l'intensité lumineuse la plus élevée ;
- **la numérisation** conduit à la création de **3 fichiers images digitales** : un pour chaque canal de couleur (R, V et B) ;
- **chaque canal de couleur (R, V et B) varie entre les valeurs comprises entre 0 et 255 bits** ;
- **une image en couleur** est constituée par la superposition de 3 images monochromes (R, V et B) obtenues à partir des 3 fichiers images (R, V et B).



Conclusions :

<p><b>Spectrophotométrie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>A partir d'un faisceau incident <math>I_0</math> monochromatique, l'appareil mesure l'intensité de la lumière transmise à travers une solution de pigment.</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Le spectre d'adsorption représente graphiquement :  <math>A \text{ (sans unité)} = f(\lambda \text{ en nm})</math></li> </ul> 	<p><b>Photométrie classique avec Mesurim</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>A partir d'un faisceau incident <math>I_0</math> polychromatique (RVB) sur une tache de pigment, le logiciel mesure l'intensité de la lumière réfléchie</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Le graphique d'intensité de couleur sur une ligne, en absorption et mesure linéaire, représente :  <math>A (\%) = f(d \text{ en cm ou mm})</math>  <i>avec d : distance de migration</i></li> <li>Le graphique d'intensité de couleur sur une ligne, en absorption et mesure logarithmique, représente :  <math>D.O. \text{ (sans unité)} = f(d \text{ en cm ou mm})</math></li> <li>Les 3 canaux de couleurs se superposent pour chaque valeur de « d »</li> </ul> 
---	--

Commentaires

La chromatographie des pigments végétaux, sur papier, peut paraître désuète en comparaison des chromatogrammes obtenus en chromatographie d'adsorption sur couche mince (CCM).

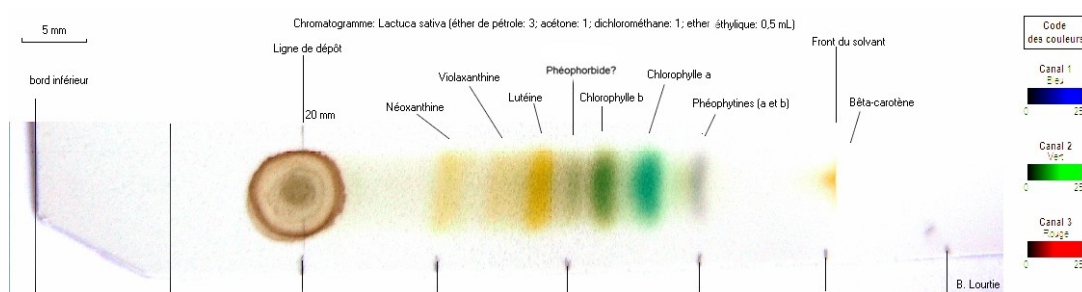


Illustration : B. Lourtie  
**Chromatogramme (CCM) *Lactuca sativa*.**

Cependant, les deux méthodes doivent être maîtrisées par des élèves se destinant à poursuivre des études scientifiques. D'autre part, la comparaison des chromatogrammes obtenus par chacune des deux méthodes peut être source de questions intéressantes.

## Sources :

## Bibliographie:

- [1] G. Coutouly & col. *Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique*, 3<sup>ème</sup> édition, Collection Biosciences et techniques, éditeur doin, **2006**, méthodes chromatographiques, 254-284.
- [2] G. Coutouly & col. *Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique*, 3<sup>ème</sup> édition, Collection Biosciences et techniques, éditeur doin, **2006**, méthodes spectrophotométriques, 302-304.
- [3] D. Voet, J.G. Voet, *Biochimie*, traduction française de la 3<sup>ème</sup> édition américaine, De Boeck Université, **2005**, 143.
- [4] A. L. Lehninger, *Biochimie*, traduction de la 2<sup>ème</sup> édition, Flammarion Médecine – Sciences, **1977**, 105-106.
- [5] M. Vanbelle, *Biochimie descriptive 1<sup>ère</sup> partie, Introduction à la biochimie moderne pour agronomes*, Faculté des Sciences Agronomiques de l'UCL, **1970**, 2, 34-35.
- [6] B. Julia, B. Proust & col. *Physique-Chimie 2de*, la chimie au quotidien, Magnard, **2004**, 11, 173-184
- [7] V. Audebert & col. *Sciences de la Vie et de la Terre*, Terminale S, enseignement de spécialité, édition Bordas, Collection Tavernier-Lizeaux, **2002**, 1, 196
- [8] J. B. Baudin & col. *Chimie*, Terminale S, enseignement obligatoire, édition Nathan, Collection Sirius, **2002**, 2, 42-58.

## Sites Web :

- **Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules** : Techniques chromatographiques : la chromatographie liquide / mécanismes et modalités.  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html>
- **Biologie et Recherche** : les différentes techniques de chromatographie.  
<http://www.123bio.net/cours/chromato/introchromato.html>
- **Colorants alimentaires dans un sirop** : fiche du professeur  
<http://www4b.ac-lille.fr/~physiquechimie/lycee/seconde/pci/chimie/obligatoire/synthe.....>
- **Spectrophotométrie, colorimétrie** : dosage de l'acide phosphorique dans le coca-cola  
[http://www.unige.ch/sciences/chiam/williams/tp/Pharmacie/09\\_Colorimetrie.pdf](http://www.unige.ch/sciences/chiam/williams/tp/Pharmacie/09_Colorimetrie.pdf)
- **Spectrophotométrie d'absorption, document de travaux pratiques : Principe de l'absorptiométrie d'espèces chimiques en solution**  
[http://formation.etud.u-psud.fr/chimie/experiences/tp-101a/documents\\_TP/c3absorption....](http://formation.etud.u-psud.fr/chimie/experiences/tp-101a/documents_TP/c3absorption....)
- **YBET, le cours informatique : PC et périphériques**, 18. Acquisition image : appareil photo numérique et scanner  
[http://www.ybet.be/hard1ch18/hard1\\_ch18.htm](http://www.ybet.be/hard1ch18/hard1_ch18.htm)
- **LMPC Informatique- Monthey : le scanner**  
<http://www.lmpc.ch>
- **Numériseur de document**  
[http://fr.wikipedia.org/wiki/Num%C3%A9riseur\\_de\\_document](http://fr.wikipedia.org/wiki/Num%C3%A9riseur_de_document)
- **Cnam : ELE 101 Composants électroniques : dispositifs optoélectroniques**  
[http://www.cnam.fr/elau/publi/algani/images/ELE101\\_CNAM\\_7\\_2008.pdf](http://www.cnam.fr/elau/publi/algani/images/ELE101_CNAM_7_2008.pdf)
- **Diodes électroluminescentes**  
[http://www.rqmp.ca/medias/Projets%20de%20recherche/Projet\\_aimez\\_LEDS\\_fr.pdf](http://www.rqmp.ca/medias/Projets%20de%20recherche/Projet_aimez_LEDS_fr.pdf)
- **Diodes électroluminescentes**  
[http://fr.wikipedia.org/wiki/Diode\\_%C3%A9lectroluminescente](http://fr.wikipedia.org/wiki/Diode_%C3%A9lectroluminescente)