

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Domaine : Science de la matière

Polycopié de cours

Analyse des échantillons complexes : Préparation et traitement ”

Polycopié destiné aux étudiants de 2^{ème} année chimie analytique

Préparé par :

Mme Souad Hammadou née Mesdour

Maitre de conférences A

Année Universitaire : 2023/2024

Polycopié de cours UEF1:

Analyse d'échantillons complexes : Préparation et traitement

Souad Hammadou née Mesdour, UMBB

Avant-propos

Ce polycopié est un support de cours pour l'unité fondamentale UEF1 : Analyse d'échantillons complexes : Préparation et traitement, destiné aux étudiants master deuxième année de chimie analytique. Il est en conformité avec les nouveaux programmes après l'opération de "l'harmonisation des formations Masters" et approuvés en 2017 par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique en Algérie.

Ce polycopié a été conçu pour aider l'étudiant à développer une compréhension approfondie des méthodes et des techniques de le traitement et préparation des échantillons pour différents techniques, y compris la chromatographie, la spectroscopie et d'autres méthodes analytiques avancées pour les échantillons complexes provenant de matrices biologiques, environnementales ou industrielles.

A l'issue de ce cours, les étudiants seront en mesure de :

- Connaître les méthodes d'extraction, de purification, de séparation et de concentration spécifiquement adaptées à ces types d'échantillons.
- Evaluer et résoudre les problèmes analytiques couramment rencontrés lors de l'analyse des échantillons complexes.
- Acquérir les compétences pratiques en manipulation d'échantillons, ainsi que la capacité de choisir des méthodes de préparation appropriées et en interprétation critique des résultats obtenus.

Table des matières

Chapitre I : Préparation des échantillons

I.1 Introduction.....	1
I.2 Préparation des échantillons : une perspective analytique.....	2
I.3 Méthodes de préparation des échantillons.....	2
I.3.1 Échantillonnage.....	2

I.3.1.1 Etapes d'échantillonnage.....	3
I.3.2 Prétraitement de l'échantillon au laboratoire.....	5
I.3.2.1 Homogénéisation.....	6
I.3.2.2 Séparation des phases solides et liquides.....	6
I.4 Méthodes analytiques d'analyse.....	8
I.5 Validation de la méthode analytique.....	9
I.6 Préparation des échantillons pour analyse des métaux.....	10
I.6.1 Spéciation.....	11

Chapitre II : Principes et techniques d'extraction

II.1. Introduction.....	14
II.2 Généralités sur les techniques d'extraction.....	14
II.2.1 Principe d'extraction Liquide-Liquide.....	16
II.2.1.1 Extraction simple.....	17
II.2.1.2 Extraction répétée.....	20
II.2.1.3 Extraction à contre-courant.....	21
II.2.2 Solvants d'extraction.....	22
II.3 Extraction de produits organiques volatiles à partir des matrices solides et des liquides.....	25
II.3.1 Techniques d'extraction et de concentration.....	26
II.4 Extraction des produits Semi-Volatils (COSV) à partir des liquides et des matrices solides.....	26

Chapitre III : Techniques d'extraction, d'isolement et de la purification des acides nucléiques

III.1 Introduction.....	28
III.2 Généralités sur les acides nucléiques.....	28
III.3 Méthodes d'extraction, d'isolement et de purification des acides nucléiques.....	29
III.3.1 Méthodes d'extraction/purification.....	30
III. 3.1.1 Lyse des cellules.....	30
III. 3.1.2 Extraction/Précipitation.....	32
III.3.1.3 Techniques chromatographiques.....	33
III.3.2 Méthodes de séparation des acides nucléiques.....	34
III.3.2.1 Electrophorèse	34
III.3.2.2 Hybridation moléculaire.....	36
III.3.2.3 Ultracentrifugation	36
III.2.5 Séparation par membrane.....	36
III.3 L'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN).....	37
III.4 Méthodes d'extraction d'ADN.....	38
III.5 Préparation des témoins dans l'analyse d'ADN.....	39
III.6 Préparation des témoins pour l'analyse d'ARN.....	40

Chapitre IV : Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique et spectroscopique des surfaces et des films solides

IV.1 Introduction.....	42
IV.2 Microscope optique.....	43
IV.2.1 La préparation des échantillons en microscopie optique.....	44
IV.3 Microscope à sonde locale.....	46
IV. 4 Microscope électronique.....	47
IV.4.1 préparation des échantillons pour microscopie électronique.....	47
IV.4.2 La microscopie électronique à balayage (MEB).....	48

IV.4.2.1 Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique MEB.....	48
IV.4.3 Microscopie électronique en Transmission (MET).....	50
IV.4.3.1 Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique MET.....	51
IV. 5 Application des RX à la détermination des phases et à l'étude des surfaces et interfaces...	53
IV.5.1 Nature des rayonnements - dualité onde-corpuscule.....	54
IV.5.2 Relations entre énergie et longueur d'onde.....	56
IV.5.3 Production des rayons X.....	57
IV.5.4 Détection des rayons X.....	58
IV.5.4.1 Les écrans fluorescents.....	58
IV.5.4.2 Les films photographiques.....	58
IV.5.5 Spectroscopie de photoémission des rayons X (XPS).....	58
IV.5.5.1 Appareillage.....	60
IV.5.5.2 Préparation des échantillons de test de spectroscopie photoélectronique à rayons X...	63
IV.5.6 Spectroscopies d'absorption des rayons X.....	63
IV.5.7 Spectrométrie par fluorescence des rayons X (XRF).....	64
IV.5.7.1 Préparation des échantillons.....	65
IV.6 Spectroscopie Raman.....	66
IV.6.1 Préparation des échantillons pour analyse Raman.....	67
IV.6.2 Amélioration des surfaces par des techniques de préparation témoin et de substrat en Raman.....	69
IV.6.2.1 La diffusion Raman exaltée de surface (SERS).....	70
IV.6.2.2 Substrats pour Raman.....	71
IV.6.2.2.1 Substrats "SERS-actifs" pour la détection.....	72
IV.6.2.2.2 Nanostructuration de surface.....	72
IV.6.2.2.3 Nanoparticules métalliques en suspension.....	72
IV.6.2.2.4 Nanoparticules métalliques sur des substrats solides.....	73
IV.6.2.2.5 Substrats SERS commercialisés.....	73
IV.7 Spectroscopie infrarouge.....	74
IV.7.1 Préparation d'un échantillon Infrarouge.....	75
IV.7.2 Amélioration des surfaces par des techniques de préparation témoin et de substrat en spectroscopie infrarouge.....	75
IV.7.2.1 Spectroscopie Infrarouge Exaltée de Surface (Surface Enhanced InfraRed Absorption : SEIRA).....	75
IV.7.2.2 Les voies de synthèse des nanoparticules métalliques.....	80
Références Bibliographiques.....	87

Chapitre I : Préparation des échantillons

I.1 Introduction

La chimie analytique joue un rôle crucial dans de nombreux domaines en raison de son importance fondamentale. Elle permet d'identifier et de quantifier les substances chimiques présentes dans un échantillon, qu'il s'agisse d'un médicament, d'un aliment, d'un polluant ou d'un matériau. Grâce à des techniques avancées telles que la spectrométrie de masse, la chromatographie et la spectroscopie, la chimie analytique fournit des informations précieuses sur la composition chimique, la structure moléculaire et les propriétés physiques des substances étudiées. Ces informations sont essentielles dans de nombreux secteurs, tels que la médecine, l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire, l'environnement et la recherche scientifique. La chimie analytique permet de garantir la qualité des produits, de contrôler les procédés de fabrication, d'assurer la sécurité des médicaments et des aliments, de surveiller les niveaux de pollution et de contribuer à l'avancement des connaissances scientifiques. Grâce à son approche précise et rigoureuse, la chimie analytique joue un rôle central dans la résolution de problèmes complexes et dans la prise de décisions éclairées dans de nombreux secteurs d'activité.

L'analyse est donc le référentiel utilisé pour la détermination objective de composition, de la structure et des propriétés des substances et des échantillons. Grâce à des techniques avancées et précises, l'analyse analytique permet de quantifier les éléments et les composés présents, d'identifier les substances inconnues, de détecter les contaminants et les impuretés, et d'évaluer la qualité des matériaux.

Dans le domaine de la recherche scientifique, l'analyse analytique fournit les données nécessaires à la compréhension des mécanismes chimiques, des réactions et des interactions entre les molécules. Elle permet aux chercheurs d'approfondir leur connaissance des phénomènes naturels et de développer de nouvelles substances et technologies.

Dans l'industrie, l'analyse analytique est essentielle pour garantir la qualité des produits fabriqués. Les contrôles analytiques permettent de vérifier la conformité aux normes et aux spécifications, d'assurer la sécurité des produits chimiques, pharmaceutiques, alimentaires, et de répondre aux exigences réglementaires. L'analyse analytique contribue également à l'optimisation des processus de production, en fournissant des données précises pour le suivi et l'amélioration des performances.

En médecine et en pharmacologie, l'analyse analytique joue un rôle crucial dans le diagnostic et le suivi des maladies, la détection de médicaments et de substances toxiques, et la recherche de biomarqueurs. Les analyses analytiques sont utilisées pour évaluer l'efficacité des traitements, contrôler les concentrations de médicaments dans le sang et les tissus, et garantir la sécurité des produits pharmaceutiques.

Enfin, dans le domaine environnemental, l'analyse analytique est indispensable pour évaluer la qualité de l'air, de l'eau et des sols, détecter la présence de polluants et de substances dangereuses, et surveiller les effets des activités humaines sur l'environnement.

I.2 Préparation des échantillons : une perspective analytique

La préparation des échantillons constitue une étape essentielle dans l'analyse analytique, offrant une perspective cruciale pour obtenir des résultats fiables et précis. Elle englobe l'ensemble des techniques et procédures visant à transformer l'échantillon brut en une forme appropriée pour l'analyse. Cette étape permet de réduire les interférences, d'améliorer la sensibilité de la méthode et de garantir la représentativité de l'échantillon.

La préparation des échantillons peut impliquer diverses étapes telles que l'échantillonnage, le prélèvement, la filtration, l'extraction, la purification, la concentration et la digestion. Chacune de ces étapes est réalisée en fonction des caractéristiques spécifiques de l'échantillon et des objectifs analytiques. Donc, elle n'est pas non plus la simple exécution d'un chromatogramme, spectre ou autre pictogramme mais c'est une succession d'étapes : **échantillonnage (programmation et prélèvement) + stockage (conservation des échantillons) + prétraitement des prélèvements (purification, extraction, concentration, ...) + séparation des espèces et mesures (détection, identification, quantification) + études structurales + interprétation des résultats (traitement statistique des données, validation des techniques,...)**.

En résumé, la préparation des échantillons est une étape essentielle pour obtenir des résultats analytiques précis et fiables. Elle permet de traiter les échantillons bruts afin de les rendre appropriés pour l'analyse. Une approche soigneuse et rigoureuse de la préparation des échantillons est cruciale pour garantir la validité des résultats analytiques et pour fournir des informations précieuses dans divers domaines tels que la recherche, l'industrie, la médecine et l'environnement.

I.3 Méthodes de préparation des échantillons

I.3.1 Échantillonnage

Les méthodes d'échantillonnage jouent un rôle essentiel en chimie analytique, car elles déterminent la représentativité et la fiabilité des résultats obtenus. Différentes méthodes d'échantillonnage sont utilisées en fonction de la nature de l'échantillon et de l'objectif de l'analyse.

- ❖ **L'échantillonnage aléatoire** est l'une des méthodes les plus courantes, où les échantillons sont prélevés au hasard dans la population ou le lot à analyser. Cela garantit une représentation équitable et évite les biais potentiels.
- ❖ **L'échantillonnage systématique**, quant à lui, implique la sélection régulière d'échantillons à des intervalles prédéterminés, ce qui permet de couvrir uniformément toute la population.
- ❖ **L'échantillonnage stratifié** consiste à diviser une population en sous-groupes homogènes appelés strates, puis à prélever des échantillons de chaque strate. Cette méthode est utilisée lorsque la population présente une hétérogénéité interne significative.
- ❖ **L'échantillonnage en grappe** consiste à regrouper les éléments de la population en clusters ou en grappes, puis à prélever des échantillons de certains ou de tous les clusters. Cette approche est utile lorsque la population est dispersée géographiquement ou présente une certaine structure.
- ❖ **L'échantillonnage séquentiel** est utilisé lorsque les échantillons sont prélevés dans le temps de manière progressive. Cela permet de suivre l'évolution d'un processus ou d'une réaction chimique au fil du temps.
- ❖ **L'échantillonnage composite** est réalisé en prélevant plusieurs échantillons individuels à différents moments, puis en les combinant pour former un seul échantillon représentatif.

Cette méthode est utilisée lorsque les analytes sont présents à de faibles concentrations et nécessitent une accumulation pour une détection précise.

- ❖ **Échantillonnage par quotas** : Les échantillons sont prélevés en respectant des quotas prédéfinis, tels que le nombre d'individus de chaque catégorie.
- ❖ **Échantillonnage par sondage** : Un petit nombre d'échantillons est prélevé à partir d'une population plus large, en utilisant des techniques statistiques pour extrapoler les résultats.
- ❖ **Échantillonnage en cascade** : Les échantillons sont prélevés en série, où chaque échantillon est divisé en sous-échantillons successifs pour des analyses spécifiques.
- ❖ **Échantillonnage sélectif** : Les échantillons sont prélevés sélectivement en fonction de caractéristiques spécifiques, telles que la taille, la couleur, la concentration, etc.

Chaque méthode d'échantillonnage présente ses avantages et ses limites, et le choix de la méthode appropriée dépendra du contexte analytique spécifique. Une bonne sélection et mise en œuvre des méthodes d'échantillonnage garantissent l'obtention d'échantillons représentatifs, ce qui est essentiel pour des analyses précises et fiables en chimie analytique. La connaissance de certaines caractéristiques physico-chimiques des composés à analyser peut aider au choix d'une méthode appropriée.

1.3.1.1 Etapes d'échantillonnage

Les étapes d'échantillonnage peuvent varier en fonction de la méthodologie et des objectifs spécifiques de l'étude, mais voici les étapes générales impliquées dans le processus d'échantillonnage :

- **Définir l'objectif de l'échantillonnage** : Déterminez clairement ce que vous souhaitez étudier ou analyser dans la population.
- **Déterminer la population cible** : Identifiez la population totale à partir de laquelle vous allez prélever les échantillons.
- **Choisir la méthode d'échantillonnage** : Sélectionnez la méthode d'échantillonnage appropriée en fonction de vos objectifs, de la nature de la population et des contraintes logistiques.
- **Déterminer la taille de l'échantillon** : Calculez la taille de l'échantillon nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Cela peut être fait en utilisant des formules statistiques ou en se basant sur des recommandations spécifiques.
- **Sélectionner les échantillons** : Utilisez la méthode d'échantillonnage choisie pour sélectionner les individus, les unités ou les éléments qui constitueront l'échantillon. Assurez-vous de suivre rigoureusement la procédure d'échantillonnage pour garantir la représentativité de l'échantillon.
- **Prélever les échantillons** : Collectez les échantillons conformément aux protocoles et aux procédures établis. Assurez-vous d'utiliser des techniques appropriées pour prévenir la contamination ou les altérations des échantillons.
- **Étiqueter les échantillons** : Enregistrez toutes les informations pertinentes sur chaque échantillon prélevé, telles que la date, l'heure, l'emplacement, les conditions de prélèvement, etc. Étiquetez correctement les échantillons pour une identification précise ultérieure.
- **Stocker et transporter les échantillons** : Conservez les échantillons dans des conditions appropriées pour préserver leur intégrité jusqu'à leur analyse. Assurez-

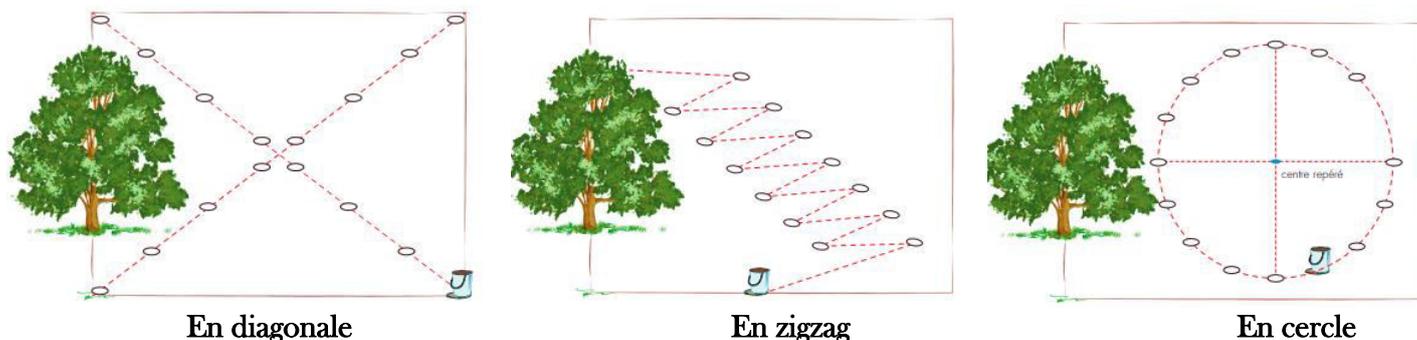
vous de respecter les exigences de stockage et de transport spécifiques à chaque type d'échantillon.

- **Analyser les échantillons** : Effectuez les analyses ou les tests requis sur les échantillons prélevés en utilisant les méthodes appropriées.
- **Interpréter les résultats** : Analysez les résultats obtenus à partir des échantillons et tirez des conclusions en les reliant à la population d'origine.
- **Rapporter les résultats** : Présentez les résultats de manière claire et concise, en incluant les limitations de l'échantillonnage et les recommandations éventuelles pour des études futures.

Remarque : Il est important de noter que la rigueur et l'exactitude dans chaque étape de l'échantillonnage sont essentielles pour garantir la validité des résultats et la représentativité de l'échantillon par rapport à la population cible.

Exemple 1:

Pour le prélèvement du sol, il est conseillé de réaliser au moins 15 prélèvements élémentaires par hectare en sol homogène soit en diagonale, soit en zigzag, ou en cercle.



Procédure d'échantillonnage :

- **Équipement requis** :
 - Une tarière manuelle ou une pelle pour prélever les échantillons.
 - Des sacs d'échantillonnage propres pour stocker les échantillons.
 - Un GPS ou un appareil de localisation pour enregistrer les emplacements d'échantillonnage.
- **Planification** :
 - Déterminez la zone d'échantillonnage en fonction de vos besoins spécifiques. Par exemple, si vous voulez évaluer la fertilité du sol d'une parcelle agricole, divisez-la en sections homogènes en fonction des caractéristiques du sol, comme le type de sol, le drainage, l'historique de culture, etc.
 - Définissez le nombre d'échantillons à collecter en fonction de la taille de la zone d'échantillonnage et de la variabilité attendue du sol.
- **Collecte des échantillons** :
 - Marchez en zigzag à travers la zone d'échantillonnage et prélevez des échantillons à l'aide d'une tarière ou une pelle à intervalles réguliers jusqu'à une profondeur de 15 à 30 cm.

- Assurez-vous de nettoyer l'outil entre chaque prélèvement pour éviter la contamination.
- **Stockage des échantillons :**
 - Placez chaque échantillon prélevé dans un sac d'échantillonnage propre et étiquetez-le avec des informations telles que la date, le lieu et la profondeur de prélèvement.

Exemple 2 :

Pour l'échantillonnage de l'air, la procédure utilisée pour collecter des échantillons représentatifs de gaz à des fins d'analyse.

- **Équipement requis :**
 - Des bouteilles d'échantillonnage appropriées, souvent en acier inoxydable ou en verre, avec des vannes et des joints d'étanchéité.
 - Des tubes d'échantillonnage spécifiques pour certains types de gaz, tels que des tubes de détection de gaz à coloration, des tubes à réaction chimique, etc.
 - Des dispositifs de prélèvement, tels que des pompes, des échantillonneurs automatiques, ou des sacs en plastique pour les échantillons de gaz en vrac.
 - Des dispositifs de protection individuelle appropriés, tels que des gants, des lunettes de sécurité et des masques respiratoires, si nécessaire.
- **Collecte des échantillons :**
 - On peut utiliser une pompe pour collecter des échantillons d'air ambiant pendant une période suffisante pour obtenir un échantillon représentatif, puis on transfère les échantillons collectés dans des bouteilles d'échantillonnage appropriées.
 - Étiquetez chaque bouteille avec des informations telles que la date, l'emplacement de l'échantillonnage, les conditions de collecte, etc.

Exemple d'une fiche d'identification de l'échantillon

Dans tous les cas, l'échantillon moyen mis en sac plastique et amené au laboratoire doit porter la fiche d'identification suivante :

- date de prélèvement ;
- nom de l'exploitant et du responsable du prélèvement (dans le cas d'une structure professionnelle ou d'un institut) ;
- repérage géographique (lieu ou coordonnées sur carte ou par GPS) ;
- type de sol ;
- culture (avant, en place, ou après) ;
- tout renseignement complémentaire permettant de ne pas confondre l'échantillon avec un autre prélevé dans des conditions similaires (cas de plusieurs échantillons moyens prélevés sur la même parcelle, du fait d'accidents de culture ou d'une parcelle hétérogène).

I.3.2 Prétraitement de l'échantillon au laboratoire

Le prétraitement des échantillons est une étape essentielle dans les analyses en laboratoire, visant à préparer les échantillons avant l'analyse proprement dite. Cette étape vise à éliminer les interférences, à concentrer les analytes d'intérêt et à rendre les échantillons compatibles avec les méthodes d'analyse. Différentes méthodes de prétraitement sont utilisées en fonction de la nature de l'échantillon et des analytes recherchés. La plupart des instruments de mesure requièrent un

traitement préalable de l'échantillon : homogénéisation, minéralisation, concentration, séparation...etc.

I.3.2.1 Homogénéisation

L'homogénéisation des échantillons est une étape clé du prétraitement, visant à obtenir une répartition uniforme des composants dans l'échantillon. Cette étape est essentielle pour assurer une représentativité des échantillons prélevés et pour minimiser les variations de composition à l'intérieur de l'échantillon. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour homogénéiser les échantillons, en fonction de leur nature physique et de leur taille. L'une des méthodes les plus courantes est l'**agitation mécanique**, où l'échantillon est placé dans un récipient approprié et agité à l'aide d'un dispositif tel qu'un agitateur magnétique, un vortex ou une sonde d'ultrasons. Cette agitation mécanique permet de mélanger les composants de l'échantillon de manière efficace et homogène.

Pour les échantillons solides, des méthodes telles que le **broyage**, le **concassage** ou le **pilonnage** peuvent être utilisées pour obtenir une taille de particules uniforme. Dans certains cas, l'utilisation de techniques de **micronisation** ou de **pulvérisation** peut être nécessaire pour obtenir une répartition homogène des particules.

Pour les échantillons liquides, une agitation vigoureuse ou une agitation magnétique peut suffire à homogénéiser l'échantillon. Dans certains cas, une **sonication** peut être utilisée pour disperser les particules fines ou pour faciliter la dissolution des solides dans le liquide.

Il est important de noter que l'homogénéisation des échantillons doit être effectuée de manière à éviter toute contamination croisée ou altération des composants de l'échantillon. Des précautions doivent être prises pour nettoyer et stériliser les équipements de traitement entre chaque échantillon afin de garantir l'intégrité des résultats d'analyse.

I.3.2.2 Séparation des phases solides et liquides

La séparation des phases liquide et solide est une étape importante du prétraitement des échantillons, particulièrement lorsque l'échantillon contient des composants solides en suspension ou des particules indésirables. Cette étape vise à isoler la phase liquide, qui contient généralement les analytes d'intérêt, en éliminant les particules solides.

Plusieurs techniques de séparation des phases liquide et solide sont couramment utilisées. On peut citer :

- ❖ **Lavage** : Le lavage préalable est une étape importante du prétraitement des échantillons qui vise à éliminer les contaminants et les interférences présents à la surface de l'échantillon. Cette étape est particulièrement importante lorsque l'échantillon provient d'une source externe et peut être soumis à des polluants ou à des substances indésirables. Le lavage préalable peut être effectué de différentes manières en fonction de la nature de l'échantillon et des contaminants ciblés. Pour les échantillons solides, le lavage peut impliquer l'utilisation de solvants appropriés pour dissoudre ou éliminer les impuretés présentes à la surface. Par exemple, des solvants tels que l'eau, l'éthanol ou l'acétone peuvent être utilisés pour le lavage des particules solides. Dans le cas des échantillons liquides, le lavage préalable peut consister à traiter l'échantillon avec des agents de déprotéinisation, des agents chélateurs ou des réactifs spécifiques qui ciblent les composants indésirables. Ces agents peuvent aider à éliminer les protéines, les métaux lourds ou d'autres substances présentes dans l'échantillon.

- ❖ **Filtration** : une des méthodes les plus simples, où l'échantillon est passé à travers un filtre poreux qui retient les particules solides tout en permettant le passage du liquide. Des filtres de différentes tailles de pores peuvent être utilisés en fonction de la taille des particules à éliminer.
- ❖ **Centrifugation** : Une autre méthode de séparation largement où l'échantillon est placé dans des tubes centrifuges et soumis à une force centrifuge élevée, ce qui permet la séparation des phases en fonction de leur densité. Les particules solides plus lourdes se déposent au fond du tube, formant un sédiment, tandis que le liquide clair se trouve au-dessus. Le sédiment peut ensuite être éliminé par décantation ou par aspiration, permettant d'obtenir la phase liquide purifiée.
- ❖ **Dissolution de la matrice** : La plupart des systèmes de mesure d'éléments nécessitent de disposer d'un échantillon sous forme liquide ou gazeuse. Il est donc souvent nécessaire de procéder à la mise en solution des éléments à analyser. Dans la majorité des cas, il s'agit de convertir les composants de la matrice en formes chimiques simples. Plusieurs voies sont possibles et leur choix est conditionné par la nature de la matrice, les éléments à analyser, la technique d'analyse qui sera utilisée ultérieurement. Cette opération nécessite l'ajout d'un réactif chimique (par exemple un acide), un apport d'énergie ou une combinaison des deux. Pour les échantillons liquides, la dissolution peut être plus simple, souvent réalisée en diluant l'échantillon avec un solvant approprié. Cela peut être nécessaire pour ajuster la concentration ou pour éliminer les interférences présentes dans l'échantillon d'origine.
- ❖ **Calcination** : consiste à chauffer le matériau à des températures élevées dans un environnement contrôlé, généralement en présence d'air ou d'un autre gaz réactif. Cette technique est largement utilisée pour la conversion thermique des échantillons solides, notamment des composés organiques, en résidus inorganiques. Pendant le processus de calcination, les échantillons subissent des changements chimiques et physiques. Les composés organiques sont décomposés en gaz, en vapeur ou en résidus carbonés, tandis que les minéraux inorganiques subissent des réactions de déshydratation, d'oxydation, de réduction ou de décomposition. La calcination permet ainsi d'éliminer les impuretés organiques, de convertir les phases cristallines, de favoriser la formation de produits réactionnels spécifiques et de préparer les échantillons pour des analyses ultérieures.
- ❖ **Minéralisation** : La minéralisation est une méthode de prétraitement des échantillons utilisée principalement pour les échantillons contenant des éléments minéraux. Elle vise à convertir la matière organique et inorganique de l'échantillon en une forme minérale soluble dans l'acide, permettant ainsi l'analyse ultérieure des éléments présents. La minéralisation peut être réalisée à l'aide de différentes techniques, telles que la digestion acide, la digestion en fusion et la minéralisation assistée par micro-ondes. **La digestion acide** est la méthode la plus couramment utilisée, dans laquelle l'échantillon est chauffé avec des acides forts, tels que l'acide nitrique et l'acide chlorhydrique, pour dissoudre les composants minéraux. **La digestion en fusion** est une méthode plus agressive dans laquelle l'échantillon est chauffé à haute température en présence d'un agent de fusion, tel que le carbonate de sodium ou le peroxyde de sodium. Cette technique est souvent utilisée pour les échantillons contenant des éléments réfractaires ou des minéraux résistants à la digestion acide. **La minéralisation assistée par micro-ondes** est une méthode plus rapide et plus efficace, dans laquelle les

échantillons sont exposés à des micro-ondes qui génèrent de la chaleur à l'intérieur de l'échantillon, accélérant ainsi le processus de digestion.

- ❖ **Concentration** : La concentration de l'échantillon est une étape essentielle du prétraitement des échantillons en laboratoire. Cette étape vise à réduire le volume de l'échantillon tout en concentrant les analytes d'intérêt. La concentration peut être réalisée de différentes manières, selon la nature de l'échantillon et l'objectif de l'analyse. Une méthode couramment utilisée pour la concentration de l'échantillon est l'**évaporation**. L'échantillon est chauffé à une température appropriée, généralement sous vide, afin d'éliminer le solvant ou le liquide présent dans l'échantillon. Ce processus permet de réduire le volume de l'échantillon, ce qui le rend plus concentré en analytes. L'évaporation peut être réalisée à l'aide de différents équipements tels que des évaporateurs rotatifs ou des évaporateurs sous vide. La concentration de l'échantillon peut être effectuée par extraction ou par chromatographie en phase solide (SPE). Il est important de mentionner que la concentration de l'échantillon doit être réalisée avec précaution afin de minimiser toute perte ou altération des analytes. Des conditions appropriées de température, de pression et de manipulation doivent être respectées pour garantir une concentration efficace et précise.
- ❖ **Fusion alcaline** : consiste à dissoudre les composés solides en les faisant réagir avec des agents de fusion alcalins tels que les carbonates, les hydroxydes ou les peroxydes alcalins. Cette méthode est principalement utilisée pour la préparation des échantillons d'origine minérale ou métallique, où les composés solides sont difficiles à dissoudre par des méthodes conventionnelles. Lors du processus de fusion alcaline, l'échantillon est mélangé avec un agent de fusion alcalin dans des conditions de haute température (300 à 1000°C). Cette température élevée permet de décomposer les composés solides et de favoriser leur solubilisation. Les agents de fusion alcalins réagissent avec les composés présents dans l'échantillon, formant des sels solubles ou des complexes qui peuvent être facilement dissous. Après la fusion, l'échantillon est refroidi et la solution obtenue est généralement diluée avec de l'eau ou un autre solvant approprié. Cette dilution permet de réduire la concentration des agents de fusion et de préparer la solution pour l'analyse ultérieure.
- ❖ **Séparation** : Dans certains cas, des méthodes de séparation plus avancées peuvent être utilisées, telles que l'extraction liquide-liquide ou l'extraction par solvant. Ces méthodes exploitent les différences de solubilité des composants entre deux phases liquides immiscibles pour les séparer sélectivement. Par exemple, des solvants organiques peuvent être utilisés pour extraire des analytes spécifiques de la phase aqueuse, permettant ainsi leur concentration et leur purification. La séparation des phases liquide et solide est essentielle pour éliminer les interférences potentielles et pour concentrer les analytes d'intérêt dans la phase liquide. Elle permet également de faciliter les analyses ultérieures en éliminant les particules qui pourraient obstruer les instruments d'analyse ou perturber les mesures. La méthode de séparation choisie dépendra de la nature de l'échantillon et des objectifs de l'analyse.

I.4 Méthodes analytiques d'analyse

Les méthodes d'analyse analytique sont des techniques utilisées pour déterminer la composition chimique, les propriétés physiques ou d'autres caractéristiques des échantillons. Il existe plusieurs méthodes d'analyse analytique, qui peuvent être classées en fonction de leur principe de

fonctionnement. Voici quelques-unes des méthodes d'analyse analytique les plus couramment utilisées :

- ❖ **Spectroscopie** : La spectroscopie comprend plusieurs techniques telles que la spectroscopie ultraviolette-visible (UV-Vis), la spectroscopie infrarouge (IR), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie de fluorescence, la spectroscopie de masse, etc. Ces techniques sont utilisées pour étudier l'interaction de la matière avec différentes gammes de rayonnement électromagnétique, ce qui permet d'identifier et de quantifier les composants présents dans un échantillon.
- ❖ **Chromatographie** : La chromatographie est une méthode de séparation des composants d'un mélange en utilisant des différences d'affinité entre les composés et une phase stationnaire. Il existe différentes techniques de chromatographie, telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase liquide (HPLC), la chromatographie sur couche mince (CCM), etc. Ces techniques sont utilisées pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un échantillon.
- ❖ **Méthodes électrochimiques** : Les méthodes électrochimiques comprennent la voltamétrie, l'électrolyse, la polarographie, la conductimétrie, etc. Elles exploitent les propriétés électrochimiques des substances pour analyser les échantillons. Ces techniques sont couramment utilisées dans l'analyse des métaux, des ions et d'autres espèces chimiques.
- ❖ **Méthodes spectroscopiques atomiques** : Les méthodes spectroscopiques atomiques, telles que la spectrométrie d'émission atomique (ICP-OES), la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) et la spectrométrie de plasma couplée à la masse (ICP-MS), sont utilisées pour déterminer la concentration des éléments dans les échantillons. Elles sont particulièrement utilisées dans l'analyse des éléments traces et des métaux.
- ❖ **Mesure des propriétés physico-chimiques** : La mesure des propriétés physico-chimiques fait partie intégrante de l'analyse analytique. Ces mesures permettent de caractériser les propriétés physiques et chimiques des échantillons, ce qui peut fournir des informations précieuses sur leur composition, leur structure et leurs interactions. On cite :
 - **Méthodes potentiométriques** : Ces méthodes mettent en œuvre le plus souvent des électrodes spécifiques qui sont utilisées par immersion dans l'eau ; elles permettent de mesurer : pH, potentiel d'oxydo-réduction, oxygène, turbidité, résistivité, fluorures, cyanures...
 - **Méthodes colorimétriques** : Ces méthodes mettent en jeu des "réactions colorées" dont l'intensité de la couleur obtenue est évaluée au moyen de comparateurs possédant des disques, plaquettes ou bandes colorées servant d'étalons.
 - **Méthodes volumétriques** : De nombreux paramètres sont déterminés par volumétrie (alcalinité, dureté totale, dureté calcique, chlorures...). Des malles contenant de la verrerie classique de laboratoire permettent ces déterminations (burettes, erlenmeyer, éprouvettes graduées, fioles...).

I.5 Validation de la méthode analytique

La validation d'une méthode analytique d'analyse comprend plusieurs étapes essentielles. Voici les étapes couramment suivies lors de la validation d'une méthode :

1. **Sélection des paramètres de validation** : Déterminez les paramètres de performance critiques de la méthode analytique, tels que la sélectivité, la sensibilité, la linéarité, la précision, l'exactitude, la robustesse et la stabilité.
2. **Préparation des échantillons** : Préparez les échantillons nécessaires à la validation de la méthode en suivant les procédures appropriées.
3. **Sélectivité** : Évaluez la sélectivité de la méthode en mesurant les signaux de bruit de fond et en vérifiant l'absence d'interférences provenant d'autres composés présents dans l'échantillon.
4. **Sensibilité** : Déterminez la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) de la méthode en utilisant des échantillons à faible concentration et en mesurant les signaux obtenus.
5. **Linéarité** : Construisez une courbe d'étalonnage en mesurant les signaux pour des échantillons de concentrations connues et vérifiez que la méthode présente une réponse linéaire dans la plage de concentration d'intérêt.
6. **Précision** : Évaluez la précision de la méthode en effectuant des répétitions de mesures sur des échantillons identiques et en calculant la variabilité des résultats obtenus.
7. **Exactitude** : Comparez les résultats de la méthode avec une méthode de référence ou utilisez des échantillons de référence certifiés pour évaluer l'exactitude de la méthode.
8. **Robustesse** : Testez la robustesse de la méthode en introduisant de légères variations dans les conditions expérimentales, telles que le temps d'incubation, la température, le pH, etc., et évaluez l'impact sur les résultats.
9. **Stabilité** : Évaluez la stabilité de la méthode en mesurant la variabilité des résultats sur une période de temps définie et en tenant compte des conditions de stockage des échantillons et des solutions étalons.
10. **Documentation** : Rassemblez tous les résultats, les protocoles expérimentaux, les conditions de mesure et les calculs associés dans un rapport de validation complet.

Remarque :

Il est important de noter que la validation d'une méthode analytique doit être effectuée conformément aux réglementations et normes appropriées, telles que les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) ou les directives spécifiques à l'industrie ou encore aux normes en vigueur.

I.7 Préparation des échantillons pour analyse des métaux

La préparation des échantillons pour le dosage des métaux est une étape essentielle afin d'obtenir des résultats précis et fiables. Les étapes incluront :

- **Prélèvement de l'échantillon** : L'échantillon doit être prélevé de manière représentative en suivant des protocoles appropriés. Il est important de minimiser toute contamination externe lors de la manipulation de l'échantillon.
- **Séchage** : Certains échantillons peuvent contenir de l'humidité, ce qui peut interférer avec le dosage des métaux. Il est donc nécessaire de sécher l'échantillon avant de procéder à l'analyse. Cela peut être réalisé en utilisant un four ou un dispositif de séchage adapté.
- **Réduction de la taille** : Si l'échantillon est trop volumineux, il peut être nécessaire de le réduire en taille. Cela peut être effectué en utilisant des outils tels que des broyeurs, des mortiers ou des broyeurs à billes. Cette étape facilite le processus d'analyse ultérieur.

- **Digestion** : La digestion de l'échantillon est une étape cruciale pour libérer les métaux présents dans la matrice de l'échantillon. Des acides forts, tels que l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique, sont généralement utilisés pour dissoudre l'échantillon solide. Cette étape permet de convertir les métaux en une forme soluble pour faciliter leur dosage ultérieur.
- **Filtration** : Après la digestion, il est souvent nécessaire de filtrer la solution pour éliminer les particules solides non dissoutes. Cela permet d'obtenir une solution claire et débarrassée de toute interférence solide.
- **Dilution** : Dans certains cas, la concentration des métaux dans la solution peut être trop élevée pour une analyse précise. Dans ce cas, une dilution appropriée peut être réalisée pour obtenir une concentration adaptée pour le dosage.
- **Calibration de la méthode** : Avant de procéder au dosage, il est important de calibrer la méthode d'analyse. Cela implique la préparation d'une série de solutions étalons contenant des concentrations connues des métaux cibles. Les solutions étalons sont ensuite analysées pour établir une courbe de calibration, qui permettra de corréler la concentration des métaux avec la réponse analytique.
- **Dosage des métaux** : Une fois la méthode calibrée, l'échantillon préparé est analysé à l'aide de la technique choisie, telle que la spectrométrie d'absorption atomique, la spectrométrie d'émission atomique ou la voltamétrie. La concentration des métaux dans l'échantillon est déterminée en comparant la réponse analytique avec la courbe de calibration établie précédemment.
- **Validation des résultats** : Pour assurer la fiabilité des résultats, il est important de valider la méthode de dosage. Cela peut impliquer des tests de précision, de justesse et de sensibilité, ainsi que la vérification des limites de détection et de quantification. Les résultats peuvent également être comparés à des méthodes de référence ou à des échantillons de contrôle pour confirmer leur précision.

I.5.1 Spéciation

La spéciation des métaux fait référence à l'analyse des différentes formes chimiques ou espèces dans lesquelles un métal peut se trouver dans un échantillon (Voir Tableau I.1).

Tableau I.1 : Quelques métaux et leurs formes

Métal	Forme chimique
Mercure (Hg)	Méthylmercure (CH_3Hg), Mercure inorganique (Hg^{2+}), Mercure élémentaire (Hg^0)
Plomb (Pb)	Plomb inorganique (Pb^{2+}), Plomb organique (par exemple, tétraméthylplomb)
Cadmium (Cd)	Cadmium inorganique (Cd^{2+}), Cadmium organique (par exemple, cadmium-EDTA)
Arsenic (As)	Arsenic inorganique (As^{3+} , As^{5+}), Méthylarséniate (CH_3AsO_3), Acide arsénic (H_3AsO_3)
Cuivre (Cu)	Cuivre inorganique (Cu^{2+}), Cuivre organique (par exemple, complexes de cuivre avec des ligands organiques)
Fer (Fe)	Fer ferreux (Fe^{2+}), Fer ferrique (Fe^{3+})
Zinc (Zn)	Zinc inorganique (Zn^{2+}), Zinc organique (par exemple, complexes de zinc avec des ligands organiques)

Nickel (Ni)	Nickel inorganique (Ni^{2+}), Nickel organique (par exemple, complexes de nickel avec des ligands organiques)
Chrome (Cr)	Chrome trivalent (Cr^{3+}), Chrome hexavalent (Cr^{6+})
Manganèse (Mn)	Manganèse divalent (Mn^{2+}), Manganèse tétravalent (Mn^{4+}), Manganèse hexavalent (Mn^{6+})

Voici les étapes générales impliquées dans l'analyse de la spéciation des métaux :

- **Préparation des échantillons** : Cette étape implique la collecte et la préparation des échantillons en fonction de la matrice à analyser. Il peut s'agir d'une extraction ou d'une séparation des différentes phases de l'échantillon, telles que l'extraction liquide-liquide ou solide-liquide.
- **Fractionnement** : Le fractionnement est une étape cruciale dans l'analyse de la spéciation des métaux. Il vise à séparer les différentes formes chimiques du métal dans l'échantillon. Des techniques telles que l'ultrafiltration, l'échange d'ions, la chromatographie en phase liquide (HPLC) ou la chromatographie en phase gazeuse (GC) peuvent être utilisées pour séparer les espèces métalliques.
- **Extraction par précipitation** : Cette méthode consiste à former des précipités insolubles avec les métaux d'intérêt. Les précipités peuvent être obtenus en ajustant le pH de la solution, en ajoutant des réactifs précipitants spécifiques ou en utilisant des agents complexants pour former des complexes insolubles. Les précipités sont ensuite filtrés, lavés et dissous dans un solvant approprié pour l'analyse.
- **Détection et quantification** : Une fois que les différentes formes chimiques du métal sont séparées, elles doivent être détectées et quantifiées. Cela peut être réalisé en utilisant des techniques analytiques spécifiques, telles que la spectrométrie d'absorption atomique (AA), la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS), la voltamétrie ou la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).
- **Analyse des données** : Après avoir obtenu les résultats analytiques, il est nécessaire d'analyser et d'interpréter les données. Cela peut impliquer la comparaison des différentes espèces métalliques présentes dans l'échantillon, l'évaluation de leur concentration respective et l'identification des relations entre les différentes formes chimiques du métal.
- **Validation de la méthode** : Comme pour toute analyse, il est important de valider la méthode de spéciation utilisée. Cela implique de démontrer la précision, la sensibilité, la sélectivité et la reproductibilité de la méthode, ainsi que la conformité aux normes et réglementations applicables.

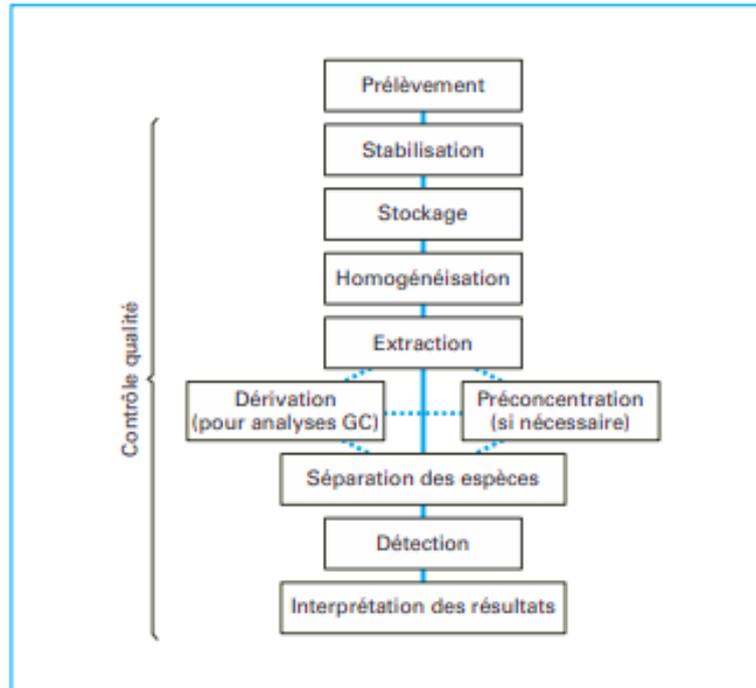


Figure 1. Étapes constitutives des analyses de spéciation.

Exemple 1:

Supposons que nous ayons un échantillon d'eau de rivière contenant du mercure (Hg) et que nous souhaitons analyser les différentes formes chimiques du mercure présentes dans l'échantillon. Pour y faire, nous procédons à :

- **Préparation de l'échantillon** : Collecter un échantillon d'eau de rivière et le filtrer pour éliminer les particules solides.
- **Fractionnement** : Utiliser une technique d'extraction liquide-liquide pour séparer les différentes formes de mercure. Par exemple, une extraction au chlorure stannique (SnCl_2) peut être utilisée pour convertir le mercure inorganique (Hg^{2+}) en mercure organique (méthylmercure, CH_3Hg^+). Cette réaction permet de séparer les deux espèces de mercure.
- **Détection et quantification** : Utiliser une technique analytique telle que la spectrométrie d'absorption atomique (AA) pour détecter et quantifier les concentrations de mercure inorganique et de méthylmercure dans les fractions séparées. La spectrométrie d'absorption atomique est capable de mesurer les concentrations de métaux à des niveaux de trace.

I.5.2 Méthodes d'analyse des métaux

Il existe différentes méthodes de dosage des métaux, adaptées en fonction des caractéristiques des échantillons et des métaux à analyser. Voici quelques-unes des méthodes couramment utilisées (voir Figure I.1):

- **Spectrométrie d'absorption atomique (AA)** : Cette méthode repose sur l'absorption de la lumière par les atomes du métal à analyser. Elle permet de mesurer la concentration des métaux dans un échantillon en fonction de l'absorption de la lumière à une longueur d'onde spécifique.
- **Spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES)** : Cette méthode utilise la spectroscopie d'émission pour détecter les métaux. L'échantillon est atomisé et excité par une source

d'énergie, puis les émissions de lumière spécifiques des métaux sont mesurées pour déterminer leur concentration.

- **Spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS)** : Cette méthode combine la spectrométrie de masse avec un plasma à couplage inductif pour permettre une détection et une quantification précises des métaux présents dans l'échantillon.
- **Voltamétrie** : Cette méthode est basée sur la mesure du courant électrique généré par l'oxydation ou la réduction des métaux à une électrode. Elle est utilisée pour déterminer les concentrations de métaux dans les solutions.
- **Méthodes colorimétriques** : Certaines métaux peuvent former des complexes colorés avec des réactifs spécifiques. Ces complexes sont alors mesurés colorimétriquement pour estimer la concentration des métaux.
- **Méthodes électrochimiques** : Les méthodes électrochimiques, telles que la polarographie et la voltampérométrie, utilisent des mesures de courant ou de potentiel pour quantifier les métaux présents dans les échantillons.

Chapitre II : Principes et techniques d'extraction

II.1. Introduction

L'extraction est une technique fondamentale utilisée en chimie analytique pour isoler et concentrer des substances d'intérêt à partir de mélanges complexes. Elle permet de séparer les composants d'un échantillon en exploitant leurs différences de solubilité, de polarité ou d'autres propriétés physico-chimiques. L'extraction est largement utilisée dans de nombreux domaines, tels que l'analyse environnementale, l'analyse alimentaire, la pharmacologie et la recherche biomédicale. Différentes méthodes d'extraction sont disponibles, chacune adaptée à des types spécifiques d'analytes et de matrices. Parmi les techniques couramment utilisées, on trouve l'extraction liquide-liquide, l'extraction en phase solide, l'extraction assistée par micro-ondes et bien d'autres. Chaque méthode présente ses avantages et ses limitations, et le choix de la technique appropriée dépend des caractéristiques de l'échantillon et des objectifs analytiques.

Dans ce chapitre, nous explorerons les différentes méthodes d'extraction utilisées en chimie analytique, leurs principes de fonctionnement, leurs applications et les considérations importantes lors de la sélection de la méthode appropriée. Nous mettrons également en évidence les avantages de l'extraction dans la préparation des échantillons et son rôle crucial dans la réalisation d'analyses précises et significatives.

II.2 Généralités sur les techniques d'extraction

Historiquement, plusieurs méthodes d'extraction ont été adoptées pour isoler et purifier des composés à partir de matrices complexes, à savoir :

1. **Extraction par solvant** : C'est l'une des méthodes d'extraction les plus anciennes et les plus simples. Elle consiste à utiliser un solvant approprié pour dissoudre les composés d'intérêt

présents dans la matrice. Cette méthode est largement utilisée pour extraire des composés organiques à partir de matrices solides, liquides ou gazeuses.

2. **Extraction par distillation** : Cette méthode est basée sur les différences de volatilité des composés à extraire. Elle implique l'évaporation du mélange à une température appropriée, suivie de la condensation et de la récupération du composé volatil.
3. **Extraction par pression** : Cette méthode est utilisée pour extraire des liquides ou des solides à partir de matrices solides. Elle consiste à appliquer une pression sur la matrice pour séparer le liquide ou le solide d'intérêt.
4. **Extraction par infusion** : Cette méthode est couramment utilisée pour extraire des composés à partir de matières végétales. Elle implique le trempage des matières premières dans un solvant approprié pendant une période de temps déterminée, permettant aux composés d'intérêt de se dissoudre dans le solvant.
5. L'extraction par enfleurage est une méthode traditionnelle utilisée spécifiquement pour extraire les composés odorants des fleurs, notamment les huiles essentielles. Cette technique est principalement utilisée dans l'industrie parfumerie et cosmétique.
6. **L'extraction par enfleurage** : consiste à placer les fleurs fraîchement cueillies sur une couche de graisse animale ou végétale, telle que la graisse de porc ou l'huile végétale. Au fil du temps, les composés volatils contenus dans les fleurs sont diffusés dans la graisse, créant ainsi une infusion parfumée. Cette méthode nécessite souvent plusieurs jours ou semaines d'infusion pour permettre aux composés volatils de se dissoudre complètement dans la graisse. Une fois l'infusion terminée, la graisse est collectée et traitée pour extraire les composés odorants, généralement par une méthode de solvant ou de distillation. L'extraction par enfleurage est une méthode délicate et coûteuse, car elle nécessite une grande quantité de fleurs pour produire une petite quantité d'huile essentielle. Cependant, cette technique est appréciée pour sa capacité à capturer les arômes délicats et subtils des fleurs, ce qui en fait un choix privilégié pour certaines fleurs rares et précieuses utilisées dans la parfumerie haut de gamme.
7. **L'extraction par décoction** : une méthode traditionnelle d'extraction utilisée depuis longtemps dans diverses cultures pour extraire les composés solubles dans l'eau, tels que les principes actifs des plantes médicinales. Elle consiste à faire bouillir les matières végétales, comme les racines, les écorces, les feuilles ou les graines, dans de l'eau pendant une période prolongée. La chaleur favorise la libération des composés solubles dans l'eau, qui sont ensuite transférés de la plante à l'eau. La décoction peut être réalisée en plaçant les matières végétales dans l'eau froide et en les portant à ébullition, ou en ajoutant les matières végétales à l'eau déjà bouillante. Une fois l'ébullition atteinte, la préparation est maintenue à feu doux pendant un certain temps pour permettre aux principes actifs de se dissoudre dans l'eau. Après la décoction, le liquide est filtré pour éliminer les résidus solides et obtenir une solution contenant les composés extraits. Cette solution peut être utilisée directement ou subir d'autres étapes de purification ou de concentration, selon l'application spécifique. Il convient de noter que certains composés peuvent être dégradés ou perdus lors de la décoction en raison de la chaleur prolongée, ce qui peut limiter son utilisation pour certains composés sensibles.
8. **L'extraction par percolation** : utilisée pour extraire des composés solubles d'une substance solide en faisant passer un solvant à travers celle-ci. Cette technique est couramment utilisée

en chimie, en pharmacie et en industrie alimentaire pour extraire des substances actives, des arômes, des colorants ou d'autres composés souhaités à partir de matières premières végétales ou animales. Le processus d'extraction par percolation implique généralement l'utilisation d'une colonne remplie du matériau solide à extraire, parfois appelé matrice. Le solvant est introduit dans la colonne et s'écoule lentement à travers le matériau, dissolvant les composés ciblés au fur et à mesure de son passage. Le solvant chargé en substances extraites, appelé percolat, est recueilli à la sortie de la colonne. Une fois l'extraction terminée, le percolat peut subir des étapes de purification, telles que la filtration, la décantation ou l'évaporation, pour isoler et concentrer les composés d'intérêt. Le solvant peut également être récupéré pour une utilisation ultérieure, tandis que le matériau solide restant peut être retraité ou éliminé de manière appropriée.

9. **L'extraction par macération** : largement utilisée en chimie, en pharmacie et en cosmétique pour extraire les composés actifs des plantes, des herbes, des épices ou d'autres substances végétales. C'est une technique simple et traditionnelle qui consiste à laisser reposer un solvant sur le matériau végétal à température ambiante pendant un certain temps, généralement plusieurs heures à plusieurs jours. L'extraction par macération est basée sur la solubilité des composés ciblés dans le solvant utilisé, tel que l'eau, l'alcool ou un mélange de solvants sous agitation. Une fois le temps d'extraction écoulé, la solution est filtrée pour séparer les résidus solides du liquide extrait, appelé macérat.
10. **L'extraction par lixiviation**, également appelée lessivage, utilisée pour extraire des substances solubles d'un matériau solide à l'aide d'un solvant approprié. Cette méthode est largement utilisée dans différentes industries, notamment l'industrie minière, l'industrie agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique. Le processus de lixiviation implique le contact intime du matériau solide avec le solvant, permettant ainsi la dissolution des substances ciblées. Le solvant peut être de l'eau, des solutions acides, des solvants organiques ou une combinaison de ceux-ci, en fonction de la nature des substances à extraire. Elle peut être réalisée de différentes manières, selon les caractéristiques du matériau et du solvant. Parmi les techniques couramment utilisées, on trouve la lixiviation en tas, où le matériau solide est empilé en tas et le solvant est pulvérisé sur le tas, permettant la percolation à travers le matériau et la collecte de la solution extraite en dessous. Une autre méthode est la lixiviation en colonne, où le matériau solide est placé dans une colonne et le solvant est introduit par le haut de la colonne, s'écoulant à travers le matériau et collectant la solution extraite à la sortie de la colonne. Une fois la lixiviation terminée, la solution extraite, appelée lixiviat, est séparée du matériau solide par filtration ou décantation. Ensuite, des étapes de purification ou de concentration peuvent être effectuées sur le lixiviat pour obtenir les substances souhaitées sous une forme plus pure ou plus concentrée.
11. **L'extraction par entraînement à la vapeur** utilisée pour extraire les composés volatils et aromatiques des plantes, des fleurs et des herbes. Les plantes ou les parties de plantes sont placées dans un appareil d'extraction appelé alambic, qui se compose généralement d'une chambre de distillation et d'un système de condensation. L'eau est chauffée dans la chambre de distillation, produisant de la vapeur d'eau. La vapeur traverse ensuite le matériau végétal, entraînant les composés volatils présents dans les cellules végétales. Ces composés volatils se mélangent avec la vapeur d'eau et sont entraînés avec elle vers le système de condensation.

Dans le système de condensation, la vapeur d'eau chargée des composés volatils est refroidie, ce qui permet la condensation de la vapeur et la séparation des composés volatils de l'eau. Les composés volatils, qui sont généralement moins solubles dans l'eau, se séparent sous forme de gouttelettes d'huile essentielle ou de liquide aromatique. Une fois la condensation terminée, la phase d'huile essentielle ou de liquide aromatique est recueillie séparément de l'eau condensée. Cette phase est souvent plus légère que l'eau et flotte à sa surface. Elle peut ensuite être séparée de l'eau par décantation ou par l'utilisation d'agents de séparation appropriés.

12. **Extraction par chromatographie** : Cette méthode est utilisée pour séparer et isoler des composés individuels à partir d'un mélange complexe. Elle est basée sur les différences d'interaction entre les composés et une phase stationnaire, qui peut être solide, liquide ou gazeuse.

II.2.1 Principe d'extraction Liquide-Liquide

Cette technique est largement utilisée en chimie analytique et en chimie préparative pour isoler et purifier des substances cibles d'un mélange complexe. Le processus d'extraction liquide-liquide se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, le mélange contenant la substance cible est préparé. Ensuite, une phase organique appropriée est choisie pour extraire la substance cible. La phase organique est généralement choisie en fonction de sa solubilité sélective vis-à-vis de la substance cible. Les deux phases, aqueuse et organique, sont ensuite mélangées de manière intensive pour favoriser la distribution des composés entre les deux phases. Ce mélange est appelé "agitation" ou "extraction". Pendant cette étape, la substance cible se dissout dans la phase organique, tandis que les autres composés restent principalement dans la phase aqueuse. Après l'agitation, les deux phases sont séparées en utilisant des techniques telles que la décantation ou la centrifugation. La phase organique, qui contient la substance cible, est récupérée. Si nécessaire, le processus d'extraction peut être répété plusieurs fois pour augmenter le rendement de l'extraction. Une fois l'extraction terminée, la phase organique contenant la substance cible peut être traitée pour éliminer les impuretés ou concentrer davantage la substance cible. Des techniques telles que l'évaporation, la distillation ou la chromatographie peuvent être utilisées à cette fin. Il est important de noter que le choix approprié de la phase organique, des conditions d'extraction (temps, agitation, température) et des techniques de séparation sont essentiels pour obtenir une extraction efficace et sélective. La solubilité relative de la substance cible dans les deux phases est un facteur clé à prendre en compte. Le schéma suivant (Figure II.1) récapitule les étapes de l'opération d'extraction :

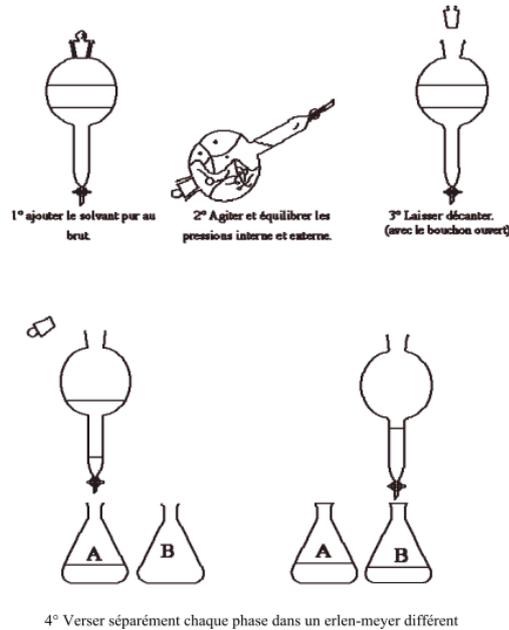
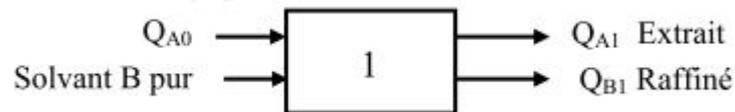


Figure II.1 : Etapes de l'extraction par décantation

II.2.1.1 Extraction simple

Pour évaluer le degré d'extraction d'une espèce pour un système d'extraction donné, on fait appel au coefficient de partition " P " ou de distribution " D ".



Calcul de Q_{B1} , Q_{A1} et ρ

$$\text{Equation de partage : } \lambda = \frac{C_{B1}}{C_{A1}} \quad \text{et} \quad \alpha = \frac{Q_{B1}}{Q_{A1}} = \lambda \frac{V_B}{V_A}$$

$$\text{Equation de conservation de la matière : } Q_{A0} = Q_{A1} + Q_{B1}$$

A partir des deux équations :

$$Q_{B1} = \left(\frac{\alpha}{\alpha+1} \right) Q_{A0} \quad \text{et} \quad Q_{A1} = \left(\frac{1}{\alpha+1} \right) Q_{A0}$$

$$\text{Et le rendement : } \rho = \frac{Q_{B1}}{Q_{A0}} = \frac{\alpha}{\alpha+1} \Rightarrow \rho = 1 - \frac{1}{\alpha+1}$$

D'après l'expression du rendement, on se rend que celui-ci ne peut atteindre les 100%. On peut augmenter le rendement en augmentant le rapport V_B/V_A , une amélioration significative du rendement n'est alors obtenue qu'au prix d'une dépense plus grande de solvant extractif.

Le partage d'une espèce M entre deux phases liquides non miscibles, mises en contact par agitation, implique l'égalité des potentiels chimiques μ de M entre les deux phases :

$$\mu_{M, aq} = \mu_{M, org}$$

Les indices aq et org désignent respectivement les phases aqueuse et organique, par définition :

$$\mu_{M, aq} = \mu_{M, aq}^0 + RT \ln a_{M, aq}$$

$$\mu_{M, org} = \mu_{M, org}^0 + RT \ln a_{M, org}$$

a et μ sont respectivement l'activité et le potentiel chimique standard de M dans les phases aqueuse et organique. A l'équilibre d'extraction :

$$\mu_{M, aq}^0 + RT \ln a_{M, aq} = \mu_{M, org}^0 + RT \ln a_{M, org}$$

$$\frac{a_{M, org}}{a_{M, aq}} = e^{-\left(\frac{\Delta\mu^0}{RT}\right)} = P_M = Cte$$

Avec ;

R : Constante des gaz parfaits 8,314 (J.K⁻¹ .mol⁻¹)

T : Température absolue (Kelvin)

$\Delta\mu^0$: Enthalpie libre standard de transfert d'une mole d'une phase à l'autre (J.mol⁻¹).

Cette dernière loi est dite loi de distribution implique qu'à température et pression constante, le rapport $a_{M, org}/a_{M, aq}$ soit constant à l'équilibre :

$$P_M = \frac{a_{M, org}}{a_{M, aq}}$$

P_M : est la constante de distribution. L'activité a_M dans chaque phase est liée à la concentration C_M par la loi de Berthollet Nernst :

$$a_M = \gamma_M C_M$$

Avec γ_M est le coefficient d'activité.

On aura :

$$P_M = \frac{\gamma_{M, org} \cdot C_{M, org}}{\gamma_{M, aq} \cdot C_{M, aq}} = e^{-\left(\frac{\Delta\mu^0}{RT}\right)}$$

Si on travaille avec des solutions très diluées (concentrations très inférieures à 1 mol. L⁻¹), on peut alors supposer que les activités sont égales aux concentrations. En effet, les coefficients d'activité tendent alors vers la valeur 1. La constante de distribution s'écrit :

$$P_M = C_{M, org} / C_{M, aq}$$

Ces relations ne sont pas valables que si l'espèce métallique se trouve sous la même forme chimique dans les deux phases. Comme cela est rarement le cas, un nouveau paramètre D plus utile est alors utilisé ; le coefficient de distribution D_M . En pratique, pour caractériser un équilibre de partage et évaluer le degré d'extraction on utilise le coefficient de distribution D, qui ne tient compte que de la concentration globale de l'élément M dans chaque phase, son expression est la suivante :

$$D_M = \Sigma C_{M, org} / \Sigma C_{M, aq}$$

Le K_D coefficient de partage thermodynamique est le rapport des fractions molaires N_A et N_B du soluté dans les deux phases à l'équilibre dans des conditions données de température, de pression et de pH. Il s'exprime par l'équation suivante :

$$K_D = N_B/N_A.$$

K_D varie selon les solutés à répartir et selon le couple de solvants. La valeur des fractions molaires n'étant pas facilement accessible, on utilise plus classiquement le coefficient de partage λ ou K qui est le rapport des concentrations de la substance S dans les deux phases à l'équilibre :

$$\lambda = C_B/C_A.$$

Une extraction dite faible, est un équilibre thermodynamique pour lequel le coefficient de distribution est inférieur à 1 ($D < 1$). Une forte extraction correspond, quant à elle, à un fort coefficient de distribution ($D \gg 1$). Cette grandeur mesure l'affinité du soluté pour les deux phases et dépend généralement de nombreux facteurs : nature et concentration du soluté, température, pH et composition du solvant.

Rendement d'extraction ou efficacité d'extraction

L'extraction liquide-liquide d'une espèce peut être exprimée par son efficacité ou le taux de cette espèce extraite en phase organique et s'exprime en pourcentage (%). Le rendement d'une extraction " E " est la fraction de la quantité totale d'un élément, initialement dans un volume (V_{aq}) de solution aqueuse, qui est passée dans un volume (V_{org}) de solution organique

$$E = 100 C_{M,org} \cdot V_{M,org} / (C_{M,org} \cdot V_{M,org} + C_{M,aq} \cdot V_{M,aq})$$

$$E = 100 D_M / [D_M + (V_{M,aq} / V_{M,org})]$$

Dans le cas où les volumes des deux phases sont égaux ($V_{aq}/V_{org} = 1$), l'expression du rendement d'extraction " E " devient comme suit :

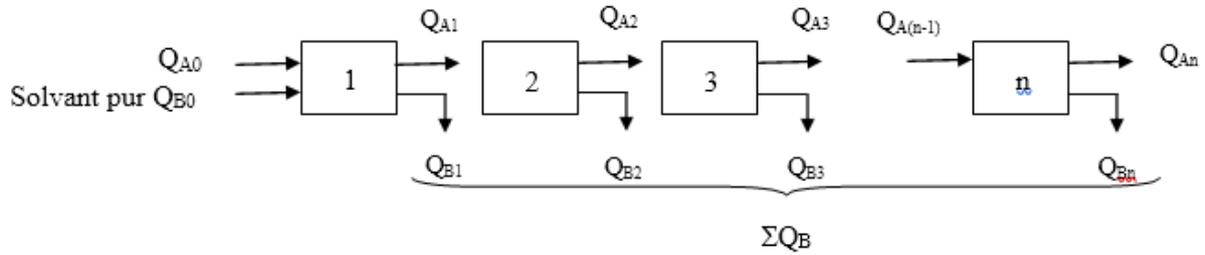
$$E = 100 D_M / (D_M + 1)$$

II.2.1.2 Extraction répétée

On effectue comme précédemment, une première extraction d'un volume V_A de phase à extraire avec un volume V_B de solvant extractif, cette extraction constitue le 1^{er} étage. Par la suite, on effectue une 2^{ème}, 3^{ème}, ..., n^{ème} extraction sur le raffiné provenant de l'étage précédent (n - 1).

Les différents extraits sont mélangés et concentrés pour isoler la substance. Chaque extraction correspond à un étage, d'où le nom d'extraction à plusieurs étages ou à n étages.

Pour généraliser, lorsque l'on procède à une extraction, un des buts à atteindre est de récupérer la plus grande quantité possible de substance S à l'aide d'un volume donné de solvant extractif. Pour étudier le rendement d'extraction, il faut connaître la quantité extraite par le solvant B (Q_B) à partir de la quantité initiale présente dans le solvant A (Q_A).



Le rendement d'extraction ρ (ou E) s'exprime de la manière suivante :

$\rho = Q_B/Q_{A0}$ dans le cas d'une extraction simple

ou $\rho = \Sigma Q_B/Q_{A0}$ dans le cas d'une extraction multiple.

➤ Equation de partage

Relative aux concentrations : $\lambda = \frac{c_{B1}}{c_{A1}} = \frac{c_{B2}}{c_{A2}} = \dots = \frac{c_{Bn}}{c_{An}}$

Relative aux quantités : $\alpha = \frac{Q_{B1}}{Q_{A1}} = \frac{Q_{B2}}{Q_{A2}} = \dots = \frac{Q_{Bn}}{Q_{An}}$

➤ Equation de la conservation de la matière

Pour le 1^{er} étage : $Q_{A0} = Q_{A1} + Q_{B1}$ Pour le

2^{ème} étage : $Q_{A1} = Q_{A2} + Q_{B2}$ Pour le 3^{ème}

étage : $Q_{A2} = Q_{A3} + Q_{B3}$

Pour le n^{ème} étage : $Q_{A(n-1)} = Q_{An} + Q_{Bn}$

En faisant la somme de tous ces termes, on obtient : $Q_{A0} = \Sigma Q_B + Q_{An}$

Pour le 1^{er} étage : $Q_{A0} = Q_{A1} + Q_{B1}$ $Q_{B1} = \alpha Q_{A1}$

Pour le 2^e étage : $Q_{A1} = Q_{A2} + Q_{B2}$ $Q_{B2} = \alpha Q_{A2}$

Pour le 3^e étage : $Q_{A2} = Q_{A3} + Q_{B3}$ $Q_{B3} = \alpha Q_{A3}$

On cherche à calculer Q_{An} , ΣQ_B et le rendement en fonction de α .

$$\text{On obtient : } Q_{An} = Q_{A0} \frac{1}{(\alpha+1)^n} \quad \text{et} \quad \Sigma Q_B = Q_{A0} \left[1 - \frac{1}{(\alpha+1)^n} \right]$$

$$\text{Et le rendement : } \rho = 1 - \frac{1}{(\alpha+1)^n}$$

L'équation permettant de calculer le rendement montre que ce dernier augmente avec le nombre n d'extraction : $\rho \rightarrow 1 \Rightarrow n \rightarrow +\infty$

Il apparaît ainsi que si l'on se propose d'extraire une substance par un volume de solvant extractif total \hat{v}_B , il y'a intérêt pour augmenter le rendement, de fractionner ce volume en n portions et à pratiquer n extractions successives avec chacune de ces portions.

Pour des conditions optimales

$$\rho = 1 - \frac{1}{(\alpha+1)^n} \Rightarrow 1 - \rho = \frac{1}{(\alpha+1)^n} \Rightarrow \log(1 - \rho) = -n \log\left(\lambda \frac{V_B}{V_A} + 1\right)$$

On a alors :

1^{er} cas : n constant $\Rightarrow (1 - \rho) = f(V_B)$

2^e cas : V_B constant $\Rightarrow \text{Log}(1 - \rho) = f(n)$

Plus Q_B sera proche de Q_{A0} , meilleur sera le rendement d'extraction. Le rendement d'extraction dépend du solvant et du soluté et par conséquent de la constante de distribution, du volume de solvant d'extraction et du nombre d'opérations effectuées. En effet, lorsque l'on exprime le rendement d'extraction de la manière suivante,

$$\rho = Q_B/Q_{A0} = \frac{C_B \times V_B}{C_B V_B + C_A V_A} \quad \text{et } D = C_B/C_A$$

$$\text{et } Q_B = Q_{A0} - Q_A.$$

On peut alors écrire :

$$\rho = 1 - \frac{1}{\left[1 + D \frac{V_B}{V_A}\right]^n}$$

avec V_A = volume de solution aqueuse (à extraire)

V_B = volume de solvant organique

C_B = concentration de l'analyte dans la phase

C_A = concentration de l'analyte dans la phase aqueuse

D = constante de distribution

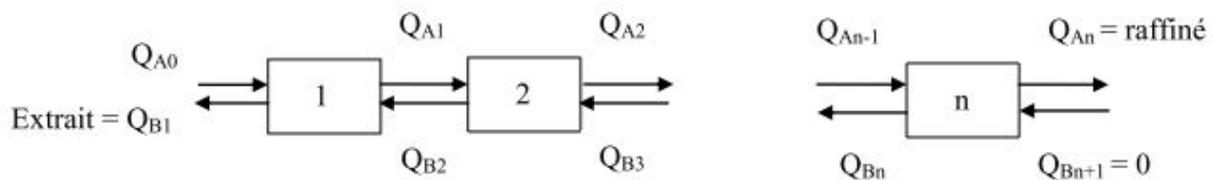
n = nombre d'opérations (à V_B constant).

II.2.1.3 Extraction à contre-courant

La technique consiste à faire circuler dans une colonne la phase à extraire et le solvant extractif en sens inverse dans un dispositif qui assure une grande surface de contact entre les deux phases. Il y a ainsi un brassage continu et prolongé entre les deux phases ce qui améliore les performances de l'extraction.

Bien que le phénomène soit continu, on le compare à une suite discontinue d'opérations, la colonne est assimilée à un ensemble d'étages, de nombre « n », dans lesquels sont pratiquées des extractions répétées. Q_{A1} , Q_{A2} ... ne sont pas au contact avec le solvant neuf mais avec un solvant ayant déjà dissous une certaine quantité de soluté. L'extraction à contre courant est réalisée dans des colonnes définies par leur longueur. L'efficacité d'une colonne est exprimée par la hauteur équivalente à un plateau théorique (H ou HEET) :

$$HEET = \frac{L}{n}$$



Equation de partage :

$$\text{Relative aux concentrations : } \lambda = \frac{C_{B1}}{C_{A1}} = \frac{C_{B2}}{C_{A2}} = \dots = \frac{C_{Bn}}{C_{An}}$$

$$\text{Relative aux quantités : } \alpha = \frac{Q_{B1}}{Q_{A1}} = \frac{Q_{B2}}{Q_{A2}} = \dots = \frac{Q_{Bn}}{Q_{An}}$$

Equation de la conservation de la matière:

Pour le 1^{er} étage : $Q_{A0} + Q_{B2} = Q_{A1} + Q_{B1}$

Pour le 2^e étage : $Q_{A1} + Q_{B3} = Q_{A2} + Q_{B2}$

Pour le n^e étage : $Q_{An-1} + Q_{Bn+1} = Q_{An} + Q_{Bn}$

En faisant la somme de tous ces termes, on obtient : $Q_{A0} = Q_{An} + Q_{B1}$

On cherche à calculer Q_{An} , Q_{B1} et le rendement en fonction de α .

$$\begin{aligned} \text{Pour le 1}^{\text{er}} \text{ étage : } Q_{A0} - Q_{A1} &= Q_{B1} - Q_{B2} & Q_{B1} &= \alpha Q_{A1} \text{ et } Q_{A1} = \frac{Q_{B1}}{\alpha} \\ \Rightarrow Q_{A0} - \frac{Q_{B1}}{\alpha} &= \alpha Q_{A1} - Q_{B2} & \Rightarrow Q_{A0} - \frac{Q_{B1}}{\alpha} &= \alpha (Q_{A1} - \frac{Q_{B2}}{\alpha}) \longrightarrow (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pour le 2}^{\text{e}} \text{ étage : } Q_{A1} - Q_{A2} &= Q_{B2} - Q_{B3} & Q_{B2} &= \alpha Q_{A2} \text{ et } Q_{A2} = \frac{Q_{B2}}{\alpha} \\ \Rightarrow Q_{A1} - \frac{Q_{B2}}{\alpha} &= \alpha (Q_{A2} - \frac{Q_{B3}}{\alpha}) \longrightarrow (2) \end{aligned}$$

$$\text{De (1) et (2), on a : } Q_{A0} - \frac{Q_{B1}}{\alpha} = \alpha^2 (Q_{A2} - \frac{Q_{B3}}{\alpha})$$

$$\text{Pour n étages : } Q_{A0} - \frac{Q_{B1}}{\alpha} = \alpha^n (Q_{An} - \frac{Q_{Bn+1}}{\alpha}) \quad \text{sachant que : } Q_{Bn+1} = 0$$

$$\Rightarrow Q_{A0} - \frac{Q_{B1}}{\alpha} = \alpha^n Q_{An} \longrightarrow (3) \quad \text{et} \quad Q_{A0} = Q_{An} + Q_{B1}$$

On obtient :

$$Q_{An} = \frac{\alpha - 1}{\alpha^{n+1} - 1} Q_{A0} \quad \text{et} \quad Q_{B1} = Q_{A0} \left(1 - \frac{\alpha - 1}{\alpha^{n+1} - 1} \right)$$

$$\rho = 1 - \frac{\alpha - 1}{\alpha^{n+1} - 1}$$

A partir de la formule du rendement, on détermine le nombre d'étages théorique :

$$n = \frac{\log(\alpha - \rho) - \log(1 - \rho)}{\log \alpha} - 1 \quad \text{et} \quad HEET = \frac{L}{n}$$

II.2.2 Solvants d'extraction

Les solvants d'extraction sont des substances utilisées pour extraire les composés cibles d'un échantillon ou d'une matrice. Ils doivent avoir des propriétés appropriées pour permettre une extraction efficace et sélective. Les solvants couramment utilisés pour l'extraction sont (Voir Figure II.2):

- ❖ **Solvants organiques** : Les solvants organiques tels que l'éther diéthylique, le chloroforme, le dichlorométhane et l'hexane sont largement utilisés en extraction liquide-liquide. Ils sont souvent choisis en fonction de leur polarité, de leur miscibilité avec l'eau et de leur capacité à dissoudre les composés cibles. Certains solvants organiques, comme l'éthanol et l'acétone, sont également utilisés dans des extractions plus spécifiques.
- ❖ **Solvants aqueux** : L'eau est souvent utilisée comme solvant d'extraction, en particulier pour les composés hydrophiles. Dans certains cas, l'ajout de sels ou d'acides peut améliorer l'efficacité de l'extraction en modifiant les propriétés de solubilité.
- ❖ **Mélanges de solvants** : Des mélanges de solvants peuvent être utilisés pour améliorer la sélectivité et l'efficacité de l'extraction. Par exemple, le mélange éther diéthylique/méthanol est couramment utilisé dans l'extraction de composés phénoliques.

- ❖ **Solvants supercritiques** : Les solvants supercritiques, tels que le dioxyde de carbone supercritique, sont utilisés dans l'extraction à haute pression et à température critique. Ils présentent des propriétés uniques qui permettent une extraction sélective et respectueuse de l'environnement.

Le choix du solvant d'extraction dépend du type de composés cibles, de leur solubilité, de leurs propriétés chimiques et physiques, ainsi que des exigences de l'analyse ultérieure. Il est essentiel de choisir un solvant compatible avec les échantillons, de veiller à sa pureté et de prendre en compte les aspects de sécurité lors de l'utilisation des solvants.

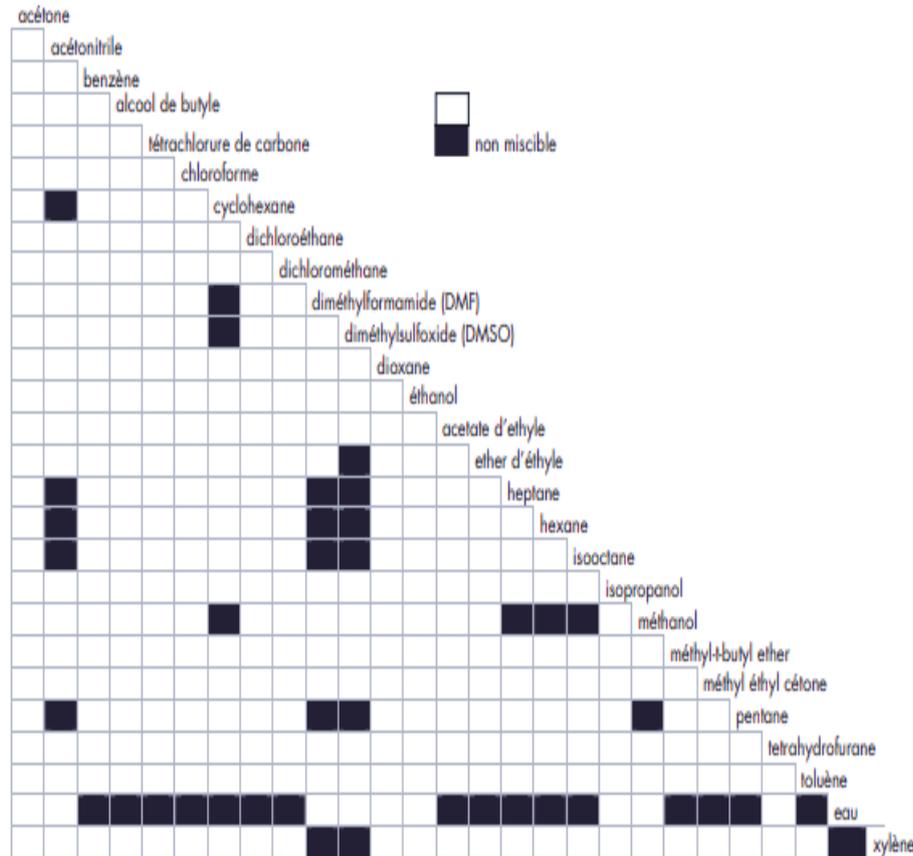


Figure II.2 : miscibilité des solvants.

Exemple 1 :

Dans une extraction simple, 40mL d'acide benzoïque sont mélangés avec 10mL de dichlorométhane ($d=1,33$). Après séparation dans une ampoule à décanter, on recueille 20mL de la phase aqueuse. Cette phase aqueuse est ensuite dosée avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration 0,002 mol/L.

1. Comment choisir un solvant extracteur vis-à-vis du soluté à extraire ?
2. Pourquoi un soluté est-il soluble dans un solvant ?
3. Indiquez la position respective des deux phases dans l'ampoule à décanter.
4. Étant donné que le volume de soude versé à l'équivalence est de 18,1mL, calculez la quantité d'acide benzoïque restant dans la phase aqueuse. En déduisez la quantité d'acide benzoïque extraite par le solvant si 20mL d'acide benzoïque ont réagi initialement avec 22,8mL de solution d'hydroxyde de sodium de concentration 0,002 mol/L.
5. Calculez le coefficient de partage et le rendement de l'extraction.

B) Dans une seconde extraction, 40mL d'acide benzoïque sont extraits avec 5mL de dichlorométhane. La phase aqueuse est ensuite récupérée et soumise à une deuxième extraction avec le même volume de dichlorométhane.

1. Calculez la quantité d'acide benzoïque restant dans les 20mL de la phase aqueuse qui a été préalablement dosée avec 4mL de la solution d'hydroxyde de sodium de concentration 0,002 mol/L. En déduisez la quantité d'acide benzoïque extraite par le solvant.
2. Le coefficient de partage a-t-il changé ?
3. Calculez le rendement de l'extraction dans ce cas. Conclure.

Corrigé :

1. Le soluté doit être plus soluble dans le solvant extracteur que dans le solvant initial.
2. Parce qu'il présente de nombreuses interactions avec le solvant comme interaction Vander Walls, pont d'hydrogène...etc.
3. **La densité** de la phase organique est supérieure à celle de la phase aqueuse : la phase organique est sous la phase aqueuse.

4. Quantité d'acide restante dans 20mL de la solution d'acide (acide +eau) :

$n_{\text{acide}} = n_{\text{base}} = c(\text{NaOH}) \times V(\text{NaOH})$, soit $n(\text{restant}) = 0,002 \times 18,1 \times 10^{-3} = 3,62 \times 10^{-5} \text{ mol}$

-Quantité d'acide extraite, à partir de 20mL de la solution acide, avec le solvant :

$n(\text{extrait}) = n(\text{initial}) - n(\text{restant})$, soit $n(\text{initial}) = c(\text{NaOH})_i \times V(\text{NaOH})_i = 0,002 \times 22,8 \times 10^{-3} = 4,56 \times 10^{-4} \text{ mol}$; donc $n(\text{extrait}) = 4,56 \times 10^{-4} - 3,6 \times 10^{-5} = 4,2 \times 10^{-4} \text{ mol}$

5. Coefficient de partage

$$K_d = \frac{[C_6H_5COOH]_{org}}{[C_6H_5COOH]_{aq}}$$

$[C_6H_5COOH]_{org} = n/V$ avec n : la quantité totale d'acide extraite à partir de $V_0=40\text{mL}$ de la solution d'acide et V : le volume de dichlorométhane.

Le volume de l'extraction de l'acide est de 20mL, donc $n(40\text{mL})=2n(\text{extrait}(20\text{mL}))$

$[C_6H_5COOH]_{org} = 2n(\text{extrait})/V = 2 \times 4,2 \times 10^{-4} / 10 \times 10^{-3} = 0,084 \text{ mol/L}$

De même :

$[C_6H_5COOH]_{aq} = n(\text{restant})/V_{aq} = 3,62 \times 10^{-5} / 20 \times 10^{-3} = 0,00181 \text{ mol/L}$

$K_d = (0,084 / 0,00181) = 46,409$

-Le rendement : $\eta\% = Q_{org}/Q_{aq} = (4,2 \times 10^{-4} / 4,56 \times 10^{-4}) \times 100\% = 92,105 \%$

II.3 Extraction de produits organiques volatiles à partir des matrices solides et des liquides

Lors de l'étape d'extraction de matrices solides, les composés sont libérés de la matrice à l'aide d'un solvant et via un mécanisme chimique et/ou mécanique puis transférés dans le milieu d'extraction. L'extraction de produits organiques volatils (POV) à partir de matrices solides et liquides est une méthode couramment utilisée pour isoler et concentrer ces composés. Les familles de COV qui reviennent le plus souvent dans la littérature sont :

- Les aliphatiques (heptane, hexane, pentane, ...)
- Les aromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène appelé aussi famille des BTEX)
- Les alcools (éthanol, méthanol, butanol, IPA : alcool isopropanol ...)
- Les cétones (acétone, méthyléthylcétone, cyclohexanone...)
- Les esters (acétates d'éthyle, de butyle, d'isopropyle...)
- Les chlorés (perchloréthylène, trichloréthylène, dichlorométhane)

Les composés azotés (amines, nitriles...)

- Les composés soufrés (mercaptans, diméthylsulfure...)
- Les éthers (1,4-Dioxane)
- Les aldéhydes (formaldéhyde)

À titre d'exemple, la Figure II.6 présente un classement de micropolluants en fonction de leur polarité et volatilité ainsi que plusieurs techniques d'extraction/concentration en phase aqueuse relatives aux propriétés physico-chimiques des composés.

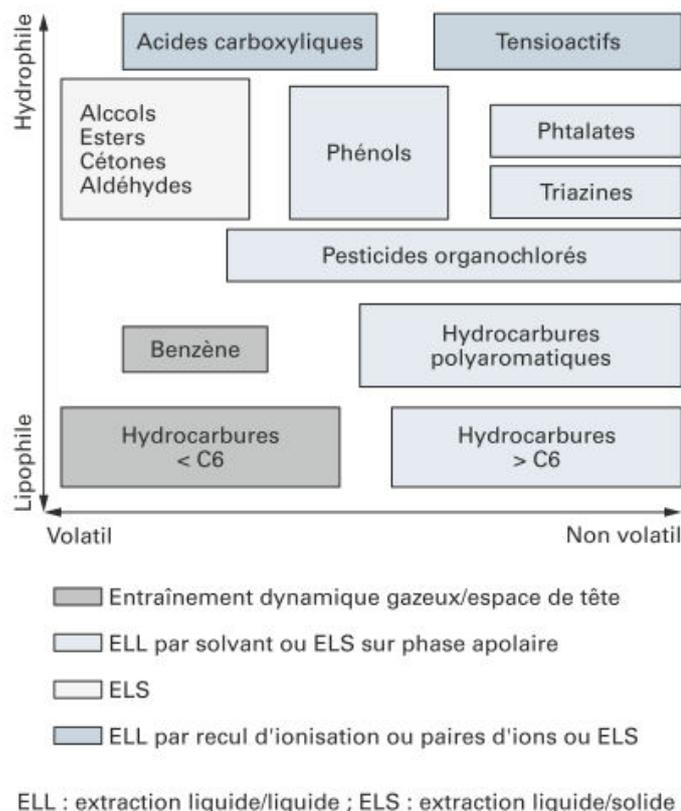


Figure II. 3 : Classement des micropolluants et techniques d'extraction appropriées.

L'analyse des COV passe par deux étapes obligatoires :

1. l'échantillonnage
2. l'analyse proprement dite qualitative et/ou quantitative

II.3.1 Techniques d'extraction et de concentrations

Les techniques de concentration ont pour but d'augmenter la concentration des molécules sans modifier leur concentration relative.

- ❖ **L'espace de tête Les COV :** la technique de l'espace de tête (ou headspace) est couramment utilisée pour le prélèvement des COVs. Un échantillon liquide ou solide est mis dans un récipient clos jusqu'à ce que les composés volatils parviennent à un équilibre entre l'échantillon et la phase gazeuse constituant l'espace de tête. Un volume de cet espace de tête est ensuite prélevé pour l'analyse.
- ❖ **Le système cryogénique :** Cette méthode dépend du point de fusion des molécules. L'échantillon contenant les COV circule dans un tube en forme de U, immergé dans un milieu réfrigérant (glace, azote liquide ou hélium liquide). Certaines molécules vont alors se condenser, en fonction de leur point de fusion et pourront être ainsi récupérées.
- ❖ **Les adsorbants :** Les adsorbants sont des matériaux poreux à la surface desquels les molécules peuvent facilement être piégées. Il existe une grande variété de matériaux adsorbants (ex : le carbone graphite, le carboxen, le charbon actif, le Tenax...). Des mélanges de différents adsorbants sont également couramment utilisés. Chaque adsorbant ayant une affinité préférentielle pour une famille de COV, on peut ainsi piéger une large variété de composés. Le choix de l'adsorbant dépendra de la nature (polarité, taille, volatilité) du composé à concentrer. Les molécules ainsi piégées subiront ensuite une désorption thermique qui permettra de les libérer vers l'analyseur.
- ❖ **La microextraction en phase solide (SPME) :** Il s'agit d'une technique d'adsorption/désorption permettant de concentrer les COV d'échantillons liquides ou gazeux (espace de tête). L'adsorbant se situe à la surface d'une fibre de verre constituant l'extrémité de l'aiguille d'une seringue. La fibre sera ensuite thermo-désorbée dans l'analyseur. Les variables à contrôler au cours du processus d'adsorption sont la polarité et la finesse de la fibre, l'état (liquide ou gazeux), le pH et le volume de l'échantillon.
- ❖ **La pervaporation :** est un processus de séparation basé sur le transport sélectif de composés au travers d'une épaisse membrane suivi d'une vaporisation du perméat. La séparation est liée aux taux de perméabilité relatif des composés à travers la membrane. Le mélange liquide est mis en circulation en contact avec la membrane et les composants diffusent à travers elle. Les composants qui ont diffusé sont ensuite collectés dans un récipient sous vide, puis condensés et évacués. Le changement d'état (passage de l'état liquide à l'état vapeur), qui est spécifique de ce procédé, contribue fortement à la sélectivité de la pervaporation. L'extraction des COV en milieu aqueux est l'une des applications du procédé de pervaporation.
- ❖ **L'extraction/distillation :** Des opérations simultanées de distillation par entraînement à la vapeur et d'extraction par solvant de la fraction volatile sont réalisables sur les COV en particulier dans le domaine des arômes alimentaires. Des processus d'extraction par des solvants suivis d'une concentration par de l'azote ou par une rotation à la vapeur sont également réalisables.

II.4 Extraction des produits Semi-Volatils (COSV) à partir des liquides et des matrices solides

Les COSV regroupent un vaste ensemble de molécules, d'origines naturelles et anthropiques. Certaines sont classées en tant que molécules persistantes (POPs) et sont plus ou moins réglementées en raison de leur ubiquité et de leur caractère toxique. Un composé est classé comme POP si (i) il présente une persistance dans l'environnement, c'est-à-dire une dégradabilité lente ; (ii) il s'accumule dans les organismes : phénomène de bioaccumulation ; (iii) il est toxique et présente un risque sanitaire ; (iv) il est "mobile" c'est-à-dire qu'il peut être transporté sur de grandes distances. Les composés inorganiques semi-volatils, quant à eux, regroupent les métaux dont certains sont réglementés du fait des risques sanitaires majeurs qu'ils présentent. Parmi les composés semi-volatils on peut citer : les HAP, les pesticides, les métaux et les PCBs.

		volatility →		
		volatile	semi-volatile	non-volatile
↑ polarity	polar	alcohols ketones carboxylic acids	alcohols ketones carboxylic acids phenols	high molecular electrolytes carbohydrates fulvic acid
	semi-polar	ethers esters aldehydes	ethers esters aldehydes epoxides heterocyclic compounds	protein carbohydrates humic acids
	non-polar	aliphatic compounds aromatic compounds	aliphatic compounds aromatic compounds alicyclic compounds	non-ionic polymers lignin
		small	medium	large
		molecular weight →		

Figure II.4: Classification des substances chimiques.

La figure suivante résume les différentes techniques d'extraction :

		volatility →			
		volatile	semi-volatile	non-volatile	
↑ polarity	polar	none	derivatisation	reduced pressure distillation	
		liquid-solid phase extraction	liquid-liquid extraction liquid-solid extraction		
	semi-polar	distillation	pH adjustment	freeze dry	
		purge & trap	liquid-liquid extraction liquid-solid extraction		
	non-polar	head space	liquid-liquid extraction	liquid-solid extraction	ultrafiltration
		small	medium	large	
		molecular weight →			

Figure II.5 : Méthodes de séparation physico-chimique pour l'échantillon.

Chapitre III : Techniques d'extraction, d'isolement et de la purification des acides nucléiques

III.1 Introduction

L'histoire des acides nucléiques remonte au XIX^e siècle, mais leur rôle fondamental dans la génétique et la biologie moléculaire n'a été pleinement compris que plus tard, au XX^e siècle.

1869 : Friedrich Miescher découvre une substance chimique riche en phosphore et en azote dans les noyaux des cellules qu'il appelle « nucléine ». Cette découverte constitue la première identification d'une substance qui plus tard sera reconnue comme de l'ADN.

1944 : Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty réalisent des expériences qui démontrent que l'ADN est le support de l'information génétique et qu'il est responsable de la transformation des bactéries.

1953 : James Watson et Francis Crick proposent la structure en double hélice de l'ADN, basée sur les travaux de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, ainsi que sur les données complémentaires de Chargaff. Cette découverte de la structure de l'ADN ouvre la voie à la compréhension de la réplication de l'ADN et de son rôle dans la transmission de l'information génétique.

1961 : François Jacob et Jacques Monod décrivent le modèle de l'opéron et la régulation de l'expression génétique, montrant comment les gènes sont activés et désactivés dans les cellules.

1970 : Werner Arber, Hamilton Smith et Daniel Nathans découvrent et mettent en œuvre les enzymes de restriction, permettant la manipulation et l'étude spécifique de l'ADN.

1977 : Frederick Sanger développe la méthode de séquençage de l'ADN, permettant la détermination de l'ordre précis des nucléotides dans une molécule d'ADN.

1983 : Kary Mullis invente la réaction en chaîne par polymérase (PCR), une technique révolutionnaire permettant l'amplification exponentielle de l'ADN, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications en génétique et en biotechnologie.

Depuis lors, de nombreuses avancées ont été réalisées dans le domaine des acides nucléiques, notamment le séquençage de l'ADN à grande échelle, le développement de méthodes de synthèse d'ADN, l'ingénierie génétique, le séquençage de l'ARN et l'étude de l'expression des gènes à l'échelle du génome. Ces avancées ont révolutionné la biologie moléculaire, la génétique et ont ouvert de nouvelles perspectives dans des domaines tels que la médecine personnalisée, l'agriculture et la recherche scientifique.

III.2 Généralités sur les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des macromolécules biologiques composées de monomères appelés nucléotides. Ils sont essentiels pour le stockage, la transmission et l'expression de l'information génétique dans les cellules.

Il existe deux principaux types d'acides nucléiques :

- ❖ **L'ADN (acide désoxyribonucléique)** : L'ADN est présent dans le noyau des cellules et constitue le support de l'information génétique. Il est formé de deux brins enroulés en une double hélice. Chaque brin est composé de nucléotides contenant une base azotée (adénine, thymine, cytosine ou guanine), un sucre (désoxyribose) et un groupe phosphate. L'ordre séquentiel des bases dans l'ADN constitue le code génétique qui détermine les caractéristiques héréditaires d'un organisme.

- ❖ **L'ARN (acide ribonucléique)** : L'ARN est présent dans les cellules et joue divers rôles dans la synthèse des protéines et la régulation génétique. Contrairement à l'ADN, il existe plusieurs types d'ARN :
 - a. **ARN messager (ARNm)** : L'ARNm est transcrit à partir de l'ADN lors du processus de transcription. Il transporte les informations génétiques des gènes du noyau cellulaire vers les ribosomes, où la synthèse des protéines a lieu.
 - b. **ARN ribosomique (ARNr)** : L'ARNr fait partie de la structure des ribosomes, les organites cellulaires responsables de la synthèse des protéines. Il joue un rôle crucial dans la traduction de l'ARNm en protéines.
 - c. **ARN de transfert (ARNt)** : L'ARNt est impliqué dans la traduction de l'ARNm en protéines. Il transporte les acides aminés correspondants aux codons de l'ARNm vers les ribosomes.
 - d. **ARN interférent (ARNi)** : L'ARNi est impliqué dans la régulation de l'expression génétique. Il peut interférer avec la traduction de l'ARNm ou dégrader l'ARNm cible, contrôlant ainsi la production de protéines.
 - e. **ARN long non codant (ARNlnc)** : Les ARNlnc sont des acides nucléiques non codants de longue taille qui ne sont pas traduits en protéines. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes et peuvent avoir divers rôles dans les processus cellulaires.

III.3 Méthodes d'extraction, d'isolement et de purification des acides nucléiques

Les étapes d'extraction, d'isolement et de purification des acides nucléiques comprennent généralement les étapes suivantes :

- **Rupture des membranes cellulaires** : Cette étape vise à libérer les acides nucléiques des cellules. Elle peut être réalisée par différents moyens, tels que la lyse cellulaire chimique, l'utilisation de détergents ou de traitements thermiques.
- **Élimination des contaminants cellulaires** : Après la rupture des membranes, les échantillons contiennent divers contaminants, tels que les protéines, les lipides et les polysaccharides. Des étapes de précipitation, de centrifugation ou de filtration sont souvent utilisées pour éliminer ces contaminants et récupérer les acides nucléiques.
- **Isolement des acides nucléiques** : Cette étape permet de séparer les acides nucléiques des autres composants cellulaires. Elle peut inclure l'utilisation de méthodes chimiques, physiques ou enzymatiques spécifiques. Par exemple, l'ADN et l'ARN peuvent être séparés en ajustant le pH ou en utilisant des enzymes spécifiques qui ciblent l'un ou l'autre.
- **Purification des acides nucléiques** : Une fois isolés, les acides nucléiques peuvent encore contenir des contaminants résiduels tels que des enzymes, des inhibiteurs ou des résidus chimiques. La purification vise à éliminer ces contaminants et à obtenir des acides nucléiques de haute pureté. Des techniques telles que la précipitation, l'extraction au phénol/chloroforme, la chromatographie ou l'utilisation de colonnes de purification à base de silice peuvent être employées.
- **Quantification et évaluation de la qualité** : Les acides nucléiques purifiés sont ensuite quantifiés pour déterminer leur concentration. De plus, leur qualité peut être évaluée en mesurant le rapport d'absorption à différentes longueurs d'onde ou en utilisant des méthodes telles que l'électrophorèse sur gel.

Ces étapes d'extraction, d'isolement et de purification des acides nucléiques peuvent varier en fonction de l'échantillon, des objectifs de recherche et des techniques spécifiques utilisées.

III.3.1 Méthodes d'extraction/purification

Les méthodes d'extraction/purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques et avec plusieurs étapes ; telles que :

- ✓ Lyse des cellules
- ✓ Elimination des protéines
- ✓ Elimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)
- ✓ Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool
- ✓ Extraction/précipitation
- ✓ Chromatographie
- ✓ Centrifugation
- ✓ Séparation par affinité

III. 3.1.1 Lyse des cellules

La lyse cellulaire, également connue sous le nom de rupture cellulaire, est le processus de destruction ou de rupture de la membrane cellulaire, permettant la libération du contenu cellulaire. La lyse cellulaire peut être réalisée dans le but d'extraire les composants cellulaires, tels que les protéines, les acides nucléiques ou les organites, ou pour libérer des substances d'intérêt.

Il existe différentes méthodes pour induire la lyse cellulaire, notamment :

- **Lyse mécanique** : Cette méthode utilise des forces physiques pour briser les cellules. Elle peut être réalisée par agitation vigoureuse, homogénéisation, broyage ou sonication des cellules. Les forces mécaniques provoquent la rupture des membranes cellulaires, libérant le contenu cellulaire.
- **Lyse chimique** : Des agents chimiques, tels que des détergents ou des agents chaotropiques ou des solvants organiques, peuvent être utilisés pour dissoudre ou perturber les membranes cellulaires. Ces agents interagissent avec les lipides de la membrane, provoquant leur rupture et la libération des constituants cellulaires.
- **Lyse enzymatique** : Certains enzymes, tels que la lysozyme ou la cellulase, peuvent être utilisés pour dégrader spécifiquement les composants de la paroi cellulaire, facilitant ainsi la lyse des cellules bactériennes ou végétales.
- **Lyse osmotique** : Cette méthode repose sur la différence de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. En exposant les cellules à une solution hypotonique ou hypertonique, la pression osmotique entraîne la rupture des membranes cellulaires.

Exemple des agents utilisés pour la l'extraction et purification des acides nucléiques :

1. **Les agents chaotropiques** : sont des substances chimiques utilisées en biologie moléculaire et en biochimie pour dénaturer les protéines, déstabiliser les interactions moléculaires et favoriser la solubilisation des biomolécules. Ces agents perturbent l'organisation structurale des protéines et des acides nucléiques en rompant les liaisons hydrophobes et en déstabilisant les forces d'interaction non covalentes. Certains des agents chaotropiques les plus couramment utilisés sont :

- **L'urée** : L'urée est un composé organique présent dans l'urine et est souvent utilisée comme agent chaotropique. Elle est capable de rompre les liaisons hydrophobes des protéines et de dénaturer leur structure tridimensionnelle.
 - **Le thiocyanate de guanidinium** : C'est un autre agent chaotropique puissant utilisé pour la solubilisation des protéines et la purification de l'ARN. Il agit en déstabilisant les interactions entre les molécules d'eau et les biomolécules, favorisant ainsi leur séparation.
 - **Le chlorure de sodium (sel)** : Bien que le chlorure de sodium ne soit pas un agent chaotropique à part entière, il peut être utilisé dans certaines situations pour augmenter la force ionique d'une solution, ce qui peut influencer la structure des protéines et faciliter leur solubilisation.
2. **La protéinase K** : est une enzyme protéolytique largement utilisée en biologie moléculaire et en biochimie pour la digestion des protéines. Elle est obtenue à partir de la bactérie thermophile *Engyodontium album*. La protéinase K est une endopeptidase, ce qui signifie qu'elle clive les liaisons peptidiques à l'intérieur des protéines. Elle est hautement active et présente une large spécificité de substrat, ce qui lui permet de digérer de nombreuses protéines différentes. La protéinase K est couramment utilisée dans les protocoles d'extraction d'ADN et d'ARN pour éliminer les protéines contaminantes et améliorer la pureté des acides nucléiques isolés. Elle peut également être utilisée pour la dégradation des protéines dans les échantillons biologiques avant des analyses spécifiques, telles que l'électrophorèse sur gel, l'immunoprécipitation ou la spectrométrie de masse.
3. **Lyse détergente** : Différents types de détergents peuvent être utilisés, tels que les détergents non-ioniques (par exemple, le Triton X-100, le NP-40) ou les détergents ioniques (par exemple, le dodécylsulfate de sodium - SDS).
4. **Les sels chaotropiques** sont des sels inorganiques qui, à des concentrations élevées, ont la capacité de perturber les interactions moléculaires, y compris les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène. Ces sels sont utilisés en biologie moléculaire et en biochimie pour dénaturer les protéines, déstabiliser les complexes macromoléculaires et faciliter la purification de l'ADN ou de l'ARN. Les sels chaotropiques couramment utilisés :
- **Guanidinium thiocyanate (GuSCN)** : Le GuSCN est un sel chaotropique souvent utilisé dans les protocoles d'extraction d'ARN. Il dénature les protéines et rompt les interactions protéine-ARN, ce qui permet la libération de l'ARN des complexes protéiques et cellulaires.
 - **Chlorure de guanidinium (GuCl)** : Le GuCl est un autre sel chaotropique utilisé pour la dénaturation des protéines et l'extraction d'ADN ou d'ARN. Il a des propriétés similaires au GuSCN et peut être utilisé dans des protocoles similaires.

Exercice 1:

On veut extraire des protéines ou d'ADN d'un morceau de tissu cellulaire en utilisant la lyse détergente. Citer les différentes étapes nécessaires pour l'extraction de protéines.

Corrigé :

La lyse détergente est l'utilisation du détergent Triton X-100 pour la lyse cellulaire. Le Triton X-100 est un détergent non-ionique souvent utilisé dans les protocoles d'extraction de protéines ou d'ADN.

Protocole opératoire de lyse détergente utilisant le Triton X-100 :

- **Collecte des cellules** : Récoltez les cellules d'intérêt en suivant les techniques de culture cellulaire appropriées.

- **Lavage des cellules** : Lavez les cellules avec un tampon approprié pour éliminer les contaminants et les substances indésirables.
- **Préparation du tampon de lyse** : Préparez un tampon de lyse contenant une solution saline tamponnée (par exemple, tampon phosphate salin) avec l'addition de Triton X-100 à une concentration appropriée. La concentration de Triton X-100 peut varier en fonction du type de cellules et des objectifs de l'expérience. Habituellement, une concentration entre 0,1% et 2% est utilisée.
- **Lyse cellulaire** : Ajoutez le tampon de lyse contenant le Triton X-100 aux cellules et incubez pendant une période déterminée à une température appropriée. Pendant cette incubation, le Triton X-100 solubilise les membranes cellulaires et libère les composants cellulaires dans la solution.
- **Collecte du lysat** : Collectez le lysat cellulaire, qui contient les composants cellulaires libérés, en centrifugeant les cellules lysées à une vitesse et une durée appropriée pour éliminer les débris cellulaires non solubilisés.

Le lysat obtenu peut ensuite être utilisé pour différentes analyses, telles que l'isolement de protéines, l'extraction d'ADN ou d'ARN, ou toute autre étude spécifique.

III. 3.1.2 Extraction/Précipitation

On peut faire appel à un large éventail de méthodes d'extraction de l'acide nucléique pratiquées à l'aide de trousse commerciales ou fondées sur des procédures publiées dans la presse scientifique. Les méthodes les plus couramment utilisées sont :

- ❖ **Extraction au phénol-chloroforme et au PEG en deux étapes** : Cette méthode traditionnelle est utilisée pour extraire les acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques. Elle implique l'utilisation d'un mélange de phénol et de chloroforme pour séparer les acides nucléiques des protéines et des lipides. Les acides nucléiques sont ensuite précipités à l'aide d'alcool et lavés pour éliminer les impuretés. L'extraction au chloroforme ou éther : complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol. Cette procédure a été associée aux méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
- ❖ **Méthode de précipitation à l'alcool** : Cette méthode consiste à ajouter un alcool tel que l'éthanol ou l'isopropanol à l'échantillon contenant les acides nucléiques. L'ADN ou l'ARN précipite alors, ce qui permet de le séparer du reste des composants de l'échantillon. Les acides nucléiques précipités sont ensuite collectés par centrifugation et lavés pour éliminer les contaminants.
- ❖ **Extraction par colonne** : Les kits commerciaux basés sur l'extraction par colonne sont largement utilisés pour l'extraction des acides nucléiques. Ces kits fournissent des colonnes contenant des résines spécifiques qui se lient sélectivement à l'ADN ou à l'ARN, tandis que les contaminants sont éliminés lors des étapes de lavage. Les acides nucléiques sont ensuite récupérés en les éluant de la colonne avec un tampon approprié.
- ❖ **Extraction par précipitation au sel** : Cette méthode utilise des sels chaotropiques, tels que le chlorure de sodium ou le guanidinium thiocyanate, pour dénaturer les protéines et libérer les acides nucléiques. Les acides nucléiques sont ensuite précipités à l'aide d'un alcool et purifiés par centrifugation et lavage. Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un

véhicule inerte (tel que le glycogène) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation. D'autres méthodes de précipitation des acides nucléiques incluent la précipitation sélective à l'aide de fortes concentrations de sel (« relargage ») ou la précipitation de protéines en changeant le pH du milieu.

- ❖ **Méthode de l'ARNzol** : Cette méthode est spécifiquement utilisée pour l'extraction de l'ARN. Elle utilise un réactif appelé TRIzol ou ARNzol, qui contient du phénol et du guanidinium thiocyanate, pour dénaturer les protéines et les membranes cellulaires. Les acides nucléiques sont ensuite séparés par centrifugation, et l'ARN est récupéré en précipitant à l'aide d'un alcool.
- ❖ **Méthode avec tampon EDTA** : Le tissu peut être homogénéisé (à 1:4 (m/v)) dans un tampon de lyse simple (NaOH à 50 mM, EDTA à 2,5 mM) puis incubé (à approximativement 25 °C pendant 15 min) ou centrifugé (à 12 000 g et 4 °C pendant 15 min). Le surnageant peut alors, en fonction du niveau de sensibilité requis, servir soit directement à la RT-PCR (sensibilité moindre), soit être déposé sur une membrane en nitrocellulose et élué dans de l'eau distillée stérile (sensibilité supérieure). Bien que la concentration de viroïde soit plus faible en suivant la méthode avec tampon EDTA qu'avec les autres méthodes d'extraction décrites, cela ne devrait pas constituer un facteur limitant lorsque cette méthode est associée à une RT-PCR ou à une hybridation par sonde marquée à la dioxycénine (DIG)

L'extraction des acides nucléiques est peut également réalisée :

- Soit à l'aide d'un kit commercial utilisant des colonnes de silice ;
- Soit à l'aide d'un automate (KingFisher DuoPrime, Thermo Scientific) et d'un kit commercial utilisant des billes magnétiques.

III.3.1.3 Techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques sont également utilisées pour l'extraction et la purification des acides nucléiques. Voici quelques-unes des techniques chromatographiques couramment utilisées dans ce contexte :

- ❖ **Chromatographie d'affinité** : La chromatographie d'affinité est basée sur l'interaction spécifique entre une molécule cible et un ligand immobilisé sur une colonne chromatographique. Dans le cas de l'extraction et de la purification des acides nucléiques, la colonne peut être fonctionnalisée avec des ligands spécifiques qui se lient sélectivement à l'ADN ou à l'ARN. Cette technique permet de séparer les acides nucléiques des autres composants de l'échantillon, tels que les protéines et les contaminants.
- ❖ **Chromatographie d'échange d'ions** : La chromatographie d'échange d'ions utilise des résines échangeuses d'ions pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur charge électrique. Les acides nucléiques peuvent être chargés positivement (ADN) ou négativement (ARN), et leur interaction avec les résines échangeuses d'ions dépend du pH et de la force ionique du tampon de chromatographie. Cette technique permet d'isoler et de purifier les acides nucléiques en fonction de leurs propriétés de charge.

- ❖ **Chromatographie par taille d'exclusion** : La chromatographie par taille d'exclusion, également appelée chromatographie par exclusion stérique ou gel filtration, est utilisée pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille. Une colonne chromatographique remplie de billes poreuses est utilisée, et les plus petites molécules, y compris les contaminants de faible poids moléculaire, pénètrent dans les pores et sont retardées, tandis que les acides nucléiques de plus grande taille s'écoulent plus rapidement. Cela permet d'isoler les acides nucléiques de différentes tailles, ou de se débarrasser des contaminants de faible poids moléculaire.
- ❖ **Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** : La HPLC est une technique chromatographique avancée utilisée pour la séparation et la purification des acides nucléiques. Elle utilise une colonne à haute résolution et une phase mobile liquide pour séparer les différentes molécules en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire. La HPLC peut être utilisée pour purifier des échantillons d'acides nucléiques complexes, notamment pour séparer différentes séquences d'ADN ou d'ARN.

III.3.2 Méthodes de séparation des acides nucléiques

III.3.2.1 Electrophorèse

Il convient de noter que l'électrophorèse n'est pas une méthode d'extraction des acides nucléiques, mais plutôt une technique d'analyse utilisée pour séparer et visualiser les acides nucléiques extraits. L'électrophorèse est utilisée pour déterminer la taille, la quantité et la pureté des acides nucléiques extraits. Parmi les méthodes de séparation par électrophorèse, on cite :

- ❖ **Préparation du gel** : Un gel d'agarose ou de polyacrylamide est préparé avec une concentration appropriée en fonction de la taille des acides nucléiques à séparer. Le gel est coulé dans une cassette ou une plaque de gel et des puits sont formés pour charger les échantillons.
- ❖ **Préparation des échantillons** : Les échantillons contenant les acides nucléiques extraits sont mélangés avec un tampon de chargement contenant un agent de chargement (généralement un colorant) et éventuellement un tampon de chargeur de taille (pour stabiliser les échantillons).
- ❖ **Chargement des échantillons** : Les échantillons sont chargés dans les puits du gel à l'aide d'une micropipette ou d'une pointe de pipette fine. Un marqueur de taille, contenant des fragments d'ADN de tailles connues, est également chargé pour permettre l'estimation de la taille des échantillons inconnus.
- ❖ **Application du courant électrique** : La cassette de gel est placée dans une chambre d'électrophorèse remplie de tampon de course. Les électrodes sont connectées aux extrémités du gel, et un courant électrique est appliqué. Les acides nucléiques chargés négativement se déplacent vers l'électrode positive (anode) à travers le gel.
- ❖ **Séparation des acides nucléiques** : Pendant l'électrophorèse, les acides nucléiques se déplacent à des vitesses différentes en fonction de leur taille. Les plus petits fragments se déplacent plus rapidement et migrent plus loin dans le gel, tandis que les plus grands fragments se déplacent plus lentement et restent plus proches du point de chargement. Cela permet de séparer les fragments d'ADN ou d'ARN en bandes distinctes.
- ❖ **Visualisation des acides nucléiques** : Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est retiré de la chambre d'électrophorèse. Les acides nucléiques peuvent être visualisés en utilisant un

colorant tel que le bromure d'éthidium qui interagit avec l'ADN et émet une fluorescence sous une lumière UV. Les bandes d'ADN ou d'ARN peuvent être photographiées ou quantifiées à l'aide d'un système de détection approprié.

❖ **L'électrophorèse en conditions non dénaturantes** : utilisée pour séparer les acides nucléiques en préservant leur structure native, c'est-à-dire leur structure tridimensionnelle et leur appariement de bases. Cette technique permet de maintenir les interactions spécifiques entre les brins d'ADN ou d'ARN, ce qui est important pour certaines applications telles que l'analyse de la conformation des acides nucléiques ou la détection de complexes d'ARN-protéines. Les principales caractéristiques de l'électrophorèse en conditions non dénaturantes sont :

- **Gel** : Un gel d'agarose ou de polyacrylamide est utilisé, tout comme pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes. Cependant, dans ce cas, le gel est préparé dans un tampon de course qui maintient les conditions physiologiques appropriées pour préserver la structure native des acides nucléiques.
- **Tampon de course** : Le tampon de course utilisé pour l'électrophorèse en conditions non dénaturantes contient des ions et des agents tampons qui maintiennent le pH, la force ionique et les conditions physiologiques appropriées. Cela permet de conserver les interactions intermoléculaires, telles que les appariements de bases, entre les brins d'ADN ou d'ARN.
- **Vitesse de migration** : Lors de l'électrophorèse en conditions non dénaturantes, les acides nucléiques se déplacent en fonction de leur taille, de leur charge et de leur conformation native. Les acides nucléiques plus grands se déplacent plus lentement à travers le gel, tandis que les plus petits se déplacent plus rapidement.
- **Détection** : Une fois l'électrophorèse terminée, les acides nucléiques peuvent être visualisés en utilisant des colorants spécifiques, tels que le bromure d'éthidium, qui interagissent avec l'ADN ou l'ARN et émettent une fluorescence. La détection peut également être réalisée par hybridation avec des sondes spécifiques ou par d'autres méthodes analytiques, en fonction de l'objectif de l'expérience.

❖ **L'électrophorèse en conditions dénaturantes** : est utilisée pour séparer les acides nucléiques en perturbant leur structure native. Dans cette méthode, les conditions de l'échantillon sont modifiées de manière à rompre les appariements de bases et à dénaturer l'ADN ou l'ARN, ce qui permet une séparation basée principalement sur la taille des fragments. Les principales caractéristiques de l'électrophorèse en conditions dénaturantes sont :

- **Dénaturation de l'ADN ou de l'ARN** : Avant l'électrophorèse, l'échantillon d'ADN ou d'ARN est généralement traité avec un agent dénaturant, tel que le formamide, l'urée ou le désoxycholate de sodium, ou chauffé à une température élevée. Cela dénature les brins d'ADN ou d'ARN, rompant les appariements de bases et convertissant la structure native en une structure linéaire.
- **Gel dénaturant** : Un gel d'acrylamide ou de polyacrylamide dénaturant est utilisé pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes. Ce gel contient un dénaturant, tel que l'urée, qui aide à maintenir la dénaturation des acides nucléiques pendant l'électrophorèse.

- **Migration des fragments** : Les fragments d'ADN ou d'ARN dénaturés se déplacent principalement en fonction de leur taille lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique dans le gel dénaturant. Les fragments plus petits se déplacent plus rapidement à travers le gel, tandis que les fragments plus grands se déplacent plus lentement.
- **Détection** : Une fois l'électrophorèse terminée, les fragments d'ADN ou d'ARN peuvent être visualisés en utilisant des colorants spécifiques, tels que le bromure d'éthidium, qui interagissent avec les acides nucléiques et émettent une fluorescence. La détection peut également être réalisée par hybridation avec des sondes spécifiques ou par d'autres méthodes analytiques.
- ❖ **L'électrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre)** peut également être utilisée pour la séparation des acides nucléiques, tels que l'ADN et l'ARN. Cette technique offre plusieurs avantages par rapport à l'électrophorèse sur gel, notamment une séparation plus rapide, une meilleure résolution et la possibilité de réaliser des analyses en temps réel. Voici comment l'électrophorèse en veine liquide est appliquée aux acides nucléiques :
 - **Capillaire** : Un capillaire de silice fondue ou de polymère est utilisé pour la séparation des acides nucléiques. La taille interne du capillaire peut varier en fonction de la taille des fragments d'acides nucléiques à séparer.
 - **Préparation de l'échantillon** : L'échantillon d'ADN ou d'ARN est généralement dénaturé en chauffant l'échantillon avec une solution contenant du formamide ou de l'urée pour rompre les appariements de bases et obtenir des brins simples.
 - **Injection de l'échantillon** : L'échantillon est injecté dans le capillaire, généralement en appliquant une pression ou en utilisant une électro-injection. L'échantillon est introduit à une extrémité du capillaire et est poussé par la force électro-osmotique ou par une pression hydrostatique à travers le capillaire.
 - **Séparation** : Un champ électrique est appliqué aux extrémités du capillaire, ce qui entraîne la migration des acides nucléiques à travers le capillaire en fonction de leur charge et de leur taille. Les fragments d'ADN ou d'ARN se séparent en bandes distinctes en fonction de leur taille, les fragments plus petits se déplaçant plus rapidement que les fragments plus grands.
 - **Détection** : La détection des acides nucléiques séparés peut être réalisée en ligne, pendant la séparation, ou après la séparation en utilisant des méthodes telles que la détection par fluorescence, la détection UV/visible ou la détection par spectrométrie de masse. Certains capillaires peuvent également être revêtus de matériaux spécifiques pour améliorer la détection.

III.3.2.2 Hybridation moléculaire

Cette méthode utilise des sondes moléculaires complémentaires marquées avec une sonde radioactive ou fluorescente pour se lier spécifiquement à des séquences d'ADN ou d'ARN cibles. La séparation des acides nucléiques peut être réalisée en utilisant des techniques telles que l'hybridation sur membranes (Southern blot) ou l'hybridation en solution.

III.3.2.3 Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une technique de séparation basée sur la différence de densité des acides nucléiques. Par la centrifugation à des vitesses très élevées, les fragments d'ADN ou d'ARN se séparent en fonction de leur densité et de leur taille. Cette méthode est particulièrement utilisée pour séparer les différentes formes d'ADN, telles que l'ADN superenroulé, linéaire ou circulaire.

III.2.5 Séparation par membrane

La séparation membranaire des acides nucléiques est une technique utilisée pour isoler et purifier les acides nucléiques, notamment l'ADN et l'ARN, en les liant sélectivement à une membrane. Les principales étapes de la séparation membranaire des acides nucléiques sont :

- **Préparation de la membrane** : Une membrane spécifique pour la liaison des acides nucléiques est préparée. Les membranes les plus couramment utilisées sont les membranes de nitrocellulose ou les membranes de nylon. La membrane est prétraitée pour la rendre hydrophile et prête à recevoir les acides nucléiques.
- **Application de l'échantillon** : L'échantillon contenant les acides nucléiques est appliqué sur la membrane. Cela peut être réalisé par dépôt direct, par transfert par aspiration ou par d'autres méthodes d'application. Les acides nucléiques présents dans l'échantillon se lient à la membrane par des interactions électrostatiques ou des liaisons covalentes.
- **Fixation des acides nucléiques** : Après l'application de l'échantillon, les acides nucléiques sont fixés à la membrane en les exposant à des conditions spécifiques, telles que le chauffage ou l'exposition à une lumière UV. Cela permet d'assurer une fixation solide des acides nucléiques à la membrane.
- **Lavage de la membrane** : La membrane est lavée pour éliminer les contaminants non liés et les impuretés. Cela permet d'améliorer la pureté des acides nucléiques liés à la membrane.
- **Elution des acides nucléiques** : Les acides nucléiques liés à la membrane sont ensuite élués, c'est-à-dire récupérés de la membrane. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour l'éluion, telles que le chauffage, l'utilisation de tampons spécifiques ou d'enzymes, ou l'utilisation de produits chimiques pour briser les liaisons.

D'autres méthodes peuvent également être utilisées pour la séparation des acides nucléiques telles que : la micro, nano et ultrafiltration.

III.3 L'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN)

Relativement similaire, les brins d'ADN et d'ARN sont tous deux issus d'une polymérisation d'une unité que l'on nomme nucléotide. Ce dernier se compose de trois éléments : la nucléobase, le sucre et le groupement phosphate. La nucléobase peut présenter un noyau de type purine ou de type pyrimidine. On retrouve dans l'ADN et l'ARN l'adénine (A), la guanine (G) et la cytosine (C). La thymine (T) n'est présente que dans l'ADN alors que l'uracile (U) quant à elle n'est observée que dans l'ARN. Et enfin, les nucléobases possèdent différents sites accepteurs et donneurs de liaisons hydrogènes, indispensables pour l'appariement des bases

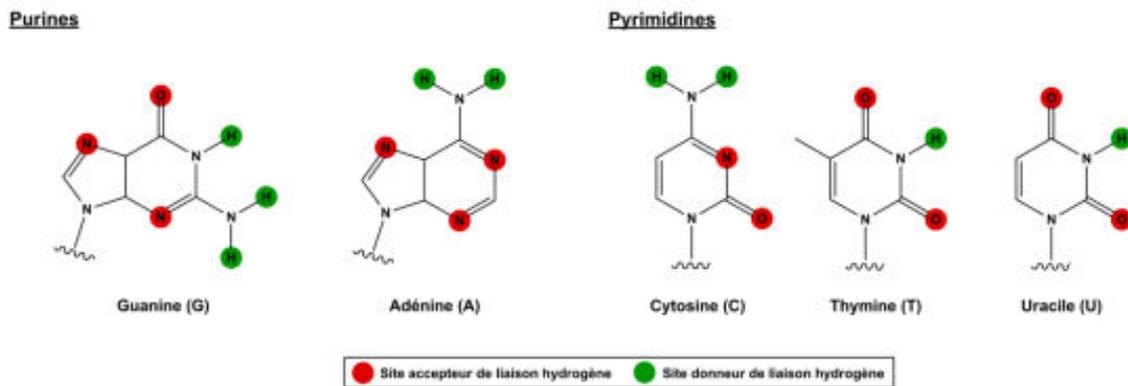


Figure III.1 : structures des bases azotées de l'ADN et de l'ARN

Les différents nucléosides sont reliés entre eux par une liaison phosphodiester. La biosynthèse du polynucléotide (ADN ou ARN) se fait via un mécanisme de polymérisation par des polymérases et implique les dérivés 5'-triphosphates des nucléosides (Figure 2b).

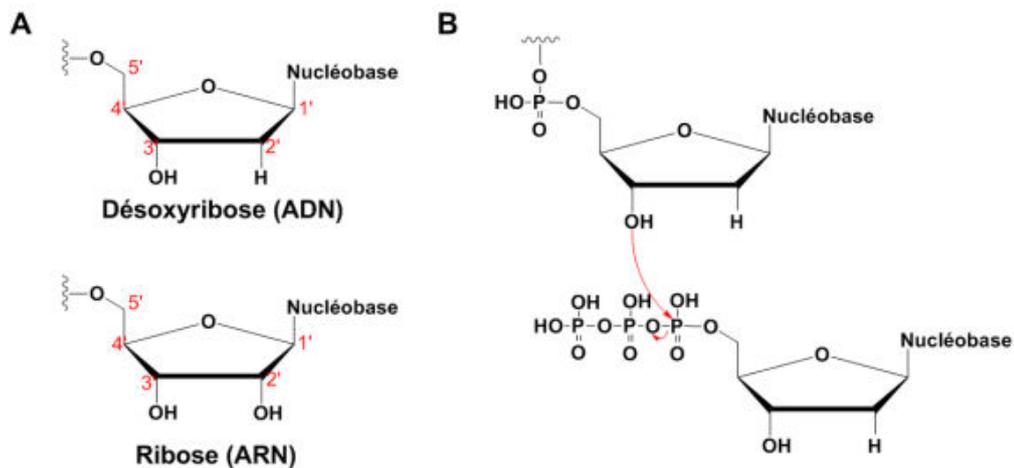


Figure III.2 : (a) représentation de la partie saccharidique du nucléotide et (b) mécanisme de formation d'un polynucléotide (ici sous forme ADN)

- ❖ **Structures usuelles de l'ADN et de l'ARN** : L'hélice double brin des acides nucléiques est la structure secondaire la plus connue. On retrouve au sein de cette structure deux polynucléotides complémentaires qui s'apparient par le biais de liaisons hydrogène de type Watson-Crick. Cette association s'effectue entre deux couples de bases, une purine et une pyrimidine, à savoir : l'adénine avec la thymine et la cytosine avec la guanine, créant deux et trois liaisons hydrogènes, respectivement. Cette association est la base du modèle double hélice de l'ADN proposé par J. Watson et F. Crick. La topologie de la double hélice d'ADN peut varier et présenter différentes conformations. En effet, les purines et les pyrimidines n'ont pas la même dimension provoquant un appariement asymétrique des bases par rapport à l'axe de rotation. Il en résulte l'apparition d'un petit et d'un grand sillon. Trois conformations de la double hélice d'ADN existent : les hélices A, B et Z.

III.4 Méthodes d'extraction d'ADN

Les méthodes classiques sont des méthodes manuelles qui assurent l'isolement de l'ADN par l'utilisation de solutions chimiques de différentes concentrations et/ou l'introduction d'éléments qui facilitent l'isolement de l'ADN. Les méthodes classiques diffèrent au niveau des produits chimiques utilisés, les techniques, les détails des protocoles (quantités ajoutés, temps d'incubation, température d'incubation, temps de centrifugation, vortexage ou agitation manuelle, ordre d'utilisation des produits...). La méthode la plus répandue est celle du Phénol-Chloroforme (PCI : Phénol Chloroforme Isoamile). D'autres méthodes existent telles que : la méthode saline, méthode phénolique, méthode du Chelex 100 (résine sous forme de perles qui lie les ions en métal comme le magnésium), méthodes des kits ainsi que des méthodes automatisées.

Exemple : Méthodes alcoolique

Elle s'effectue par l'ajout d'un alcool fort (éthanol absolu ou isopropanol, actifs à partir de -20°C) et du NaCl. C'est par ce procédé que l'ADN devient visible sous forme de « méduse » ou de filaments blancs qui se ressemblent par agitation légère du tube. Puis ce tube est centrifugé. L'ADN se retrouve alors sous la forme d'un culot, c'est-à-dire un précipité solide collé au fond du tube qui contient le tampon. Il suffit ensuite d'évacuer le tampon sans faire tomber le culot, puis de laisser sécher l'ADN.

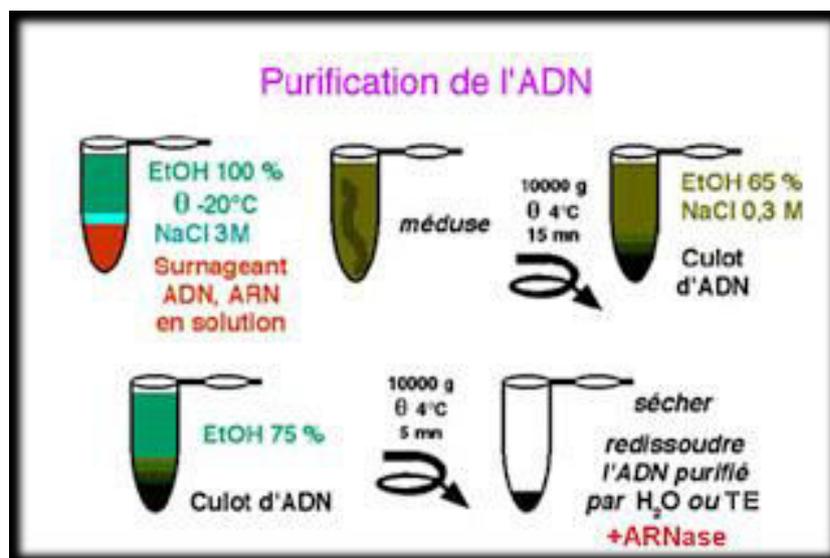


Figure III.3 : Purification de l'ADN par l'éthanol.

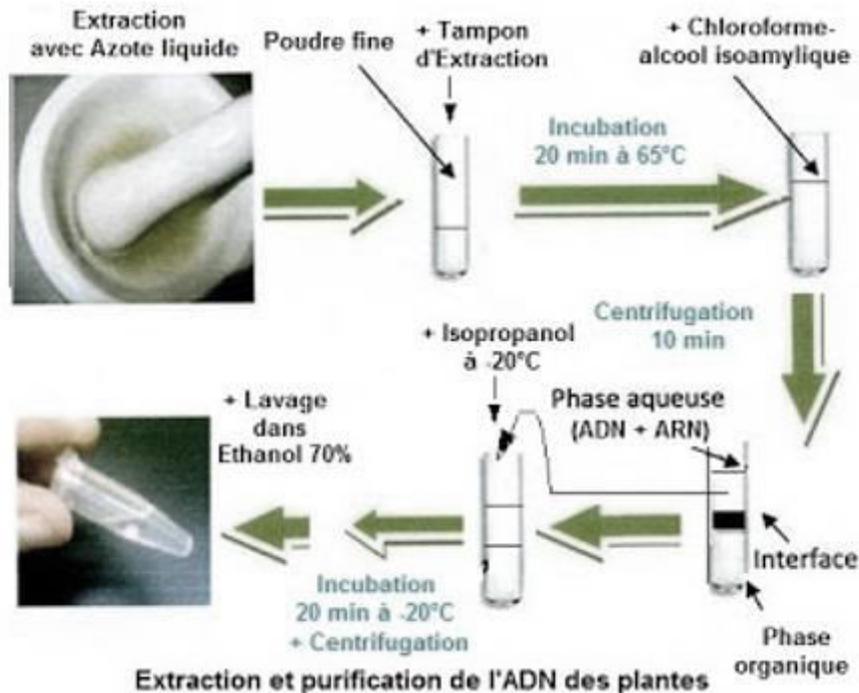


Figure III.5: extraction d'ADN par Chloroforme-alcool isoamylique.

III.5 Préparation des témoins dans l'analyse d'ADN

Différentes méthodes de séquençage de l'ADN ont été développées : le séquençage de première génération : par la méthode de Sanger et par la méthode de Maxam et Gilbert ; le séquençage de deuxième génération : sur phase solide, par hybridation, par spectrométrie de masse, cyclique sur puce, par microélectrophorèse et par nanopore et le séquençage de nouvelle génération NGS (Next Generation Sequencing) est également en cours de développement car ce domaine est en pleine mutation

La préparation d'un témoin dans l'analyse d'ADN est une étape cruciale pour évaluer la fiabilité et l'exactitude de vos résultats. Voici quelques étapes clés pour la préparation d'un témoin dans une analyse d'ADN :

- ❖ **Choix du type de témoin :** Le choix du témoin dépend de l'objectif de votre analyse. Vous pouvez préparer un témoin positif, qui contient l'ADN cible que vous souhaitez détecter, ainsi qu'un témoin négatif, qui ne contient pas l'ADN cible. Le témoin positif vous permettra de vérifier la sensibilité et la spécificité de votre méthode d'analyse, tandis que le témoin négatif servira de contrôle pour détecter les éventuelles contaminations.
- ❖ **Préparation de l'échantillon de témoin positif :** Si vous préparez un témoin positif, vous devrez extraire et purifier l'ADN cible à partir d'une source connue. Cela peut être fait en utilisant différentes méthodes d'extraction d'ADN, telles que l'extraction par la phénol-chloroforme, l'extraction à base de colonnes ou d'autres techniques spécialisées.
- ❖ **Quantification de l'ADN du témoin :** Une fois que vous avez extrait l'ADN du témoin positif, il est important de quantifier sa concentration. Cela peut être réalisé en utilisant des techniques de spectrophotométrie ou de fluorimétrie, qui mesurent l'absorbance ou la fluorescence de l'échantillon, respectivement. La quantification de l'ADN vous permettra de préparer une quantité appropriée de témoin pour votre analyse.

- ❖ **Dilution du témoin** : En fonction de la concentration de l'ADN dans votre témoin positif, vous devrez le diluer à une concentration appropriée pour votre analyse. Assurez-vous de préparer des dilutions en série si vous souhaitez tester différentes concentrations.
- ❖ **Intégration du témoin dans l'analyse** : Ajoutez le témoin dilué à chaque étape de votre analyse d'ADN. Cela peut inclure des réactions de PCR, de séquençage, d'hybridation ou d'autres techniques spécifiques. Utilisez le témoin comme référence pour comparer les résultats obtenus à partir de vos échantillons inconnus.

III.6 Préparation des témoins pour l'analyse d'ARN

Les ARN sont plus difficiles à étudier parce qu'ils sont très sensibles aux ribonucléases (RNase A) qui sont très actives et présentes même sur les doigts du manipulateur. Elles peuvent résister à un traitement à 90°C pendant une heure. Il faut donc des conditions de stérilité parfaite pour travailler avec ces acides nucléiques. La préparation des témoins pour l'analyse de l'ARN dépendra du type d'analyse que vous souhaitez réaliser. La procédure générale qui peut être utilisée pour préparer des témoins pour l'analyse de l'ARN comporte :

- ✓ Collecte de l'échantillon : Prélevez l'échantillon biologique contenant l'ARN que vous souhaitez analyser (du tissu, des cellules, du sang, de la salive, etc.).
- ✓ Extraction de l'ARN : les tissus ou les cellules sont homogénéisés dans un tampon acétate contenant :

- Un détergent puissant (SDS ou sarcosyl)
- Un agent dissociant (thiocyanate ou guanidine)
- Un agent réducteur (DTT ou 2-mercaptoéthanol)

Ce type de tampon permet d'inhiber les RNases endogènes, de dénaturer les acides nucléiques et de dissocier les protéines. Après une centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, les RNA sont extraits suivant plusieurs techniques. La technique par précipitation différentielle du RNA et du DNA en fonction du pH et de la concentration en éthanol donne de très bons rendements. On peut également utiliser l'ultracentrifugation. Le culot est récupéré, lavé avec le tampon acétate et précipité à l'éthanol. Il peut se conserver congelé à -70°C pendant un an. Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules, la classe la plus étudiée est celle des ARN messagers. Ils se caractérisent par la présence du côté 3'-terminal d'une longue queue poly(A) synthétisée à la phase post-transcriptionnelle.

- On utilisera une chromatographie d'affinité entre cette queue poly(A) et une colonne dont la phase fixe est pourvue de fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A).
- Après avoir lavé la colonne en milieu alcalin (potasse), on charge les RNA totaux à haute force ionique (KCl 0,5 M) puis on rince la colonne avec du KCl 0,1 M en surveillant l'absorbance de l'éluant à 260 nm pour s'assurer de l'élimination des RNA non retenus par la colonne (rRNA, tRNA, ...). Enfin, on élue la fraction retenue par la colonne en abaissant la concentration de KCl à 0,01 M et en élevant la température.

Exemple :

Procédure d'extraction d'ARN végétal

Homogénéiser le tissu de la plante (à 1:10 (m/v)) dans le tampon de lyse (isothiocyanate de guanidine à 4 M, acétate de sodium à 0,2 M, EDTA à 25 mM, PVP40 à 2,5 pour cent (m/v), et 2-

mercaptoéthanol à 1 pour cent (v/v) ajouté juste avant l'utilisation). Mélanger un millilitre d'homogénat avec 100 µl de sarkosyl à 20 pour cent (m/v) puis incubé à 70 °C pendant 10 min dans un thermo-mélangeur en agitant à 1 200 tours par minute. Cette méthode peut servir à extraire un ARN de qualité à partir d'une large gamme d'espèces végétales.

Chapitre IV : Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique et spectroscopique des surfaces et des films solides

IV.1 Introduction

De nos jours, rechercher la modification de la surface en vue de développer des matériaux performants constitue l'un des principaux objectifs de la caractérisation de surface. De manière similaire au contrôle qualité des fabricants, elle requiert une analyse précise d'une série de paramètres, notamment les propriétés mécaniques, chimiques et tribologiques : la rugosité, la dureté, la rigidité ou l'élasticité, la résistance, le potentiel / la charge, la structure de la surface, etc.

Les études typiques sur les matériaux permettent de prédire leurs comportements lors de son usage. Les propriétés de surface d'un matériau ont une grande importance tant sur le plan scientifique que sur le plan des applications pratiques. Sur le plan thermodynamique, la surface possède une énergie libre en excès qui conditionne sa réactivité superficielle et le succès d'une opération d'assemblage par collage, par exemple. L'aspect esthétique du produit fini conditionne souvent sa valeur marchande. La surface est le lieu de phénomènes produisant des évolutions majeures du matériau

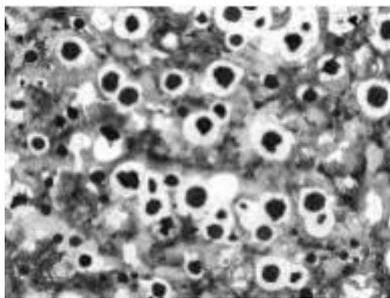
et influant sur sa durée de vie : formation de fissures par fatigue thermomécanique, dégradation par corrosion, interactions mécaniques avec un autre matériau solide responsables du frottement et de l'usure. Les propriétés du matériau découlent de son histoire (élaboration et mise en forme, etc.) et sont très souvent significativement différentes en volume et en extrême surface. La mesure des propriétés d'extrême surface est donc à la fois un problème important et difficile, nécessitant le plus souvent des techniques spécifiques. Ces problèmes sont particulièrement notables pour les polymères, matériaux peu denses et aux molécules relativement mobiles à température ambiante, donc plus sensibles à l'environnement que la plupart des alliages métalliques courants.

La métallographie est une technique consistant à déterminer la structure d'un métal en observant sa microstructure au microscope optique. On peut déterminer ainsi, selon les cas :

- la taille et la forme des cristallites (grains) ;
- la répartition des phases ;
- la direction des lignes de glissement (intersection des plans de glissement avec la surface), dans le cas d'un échantillon déformé.

La préparation des échantillons est l'étape clé de l'analyse métallographique, elle nécessite :

- Un tronçonnage (une épaisseur réduite) ;
- Un enrobage (couche protectrice) ;
- Un polissage (bon état de surface) ;
- Mise en évidence de la microstructure (attaque chimique, oxydation, choc thermique).



Micrographie d'une fonte ductile



Structure d'un acier inoxydable après une attaque colorante - Grossissement 100X

La préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique et spectroscopique des surfaces et des films solides est une étape cruciale pour obtenir des données fiables et représentatives. Les étapes générales sur la préparation d'échantillons pour ces types de caractérisations sont :

1. Nettoyage : La première étape essentielle consiste à nettoyer minutieusement l'échantillon pour éliminer toute contamination de surface, telle que la poussière, les graisses ou les résidus. Les méthodes de nettoyage varient en fonction de la nature de l'échantillon, mais elles peuvent inclure :

- Nettoyage ultrasonique : Immerger l'échantillon dans un solvant approprié et le soumettre à des vibrations ultrasoniques pour éliminer les contaminants.
- Nettoyage au plasma : Utiliser un plasma réactif pour éliminer les contaminants organiques et inorganiques de la surface de l'échantillon.
- Nettoyage mécanique : Utiliser des tampons de nettoyage doux, des pinces ou des chiffons en microfibrilles pour essuyer délicatement la surface.

2. Préparation de l'échantillon : Ensuite, préparez l'échantillon de manière appropriée en fonction de la technique de caractérisation que vous utiliserez. Par exemples en microscopie électronique à balayage (MEB) : pour les échantillons non conducteurs, il peut être nécessaire de les recouvrir d'une fine couche de métal (par exemple, or ou platine) par pulvérisation pour améliorer la

conductivité et réduire les charges d'électrons accumulées. Alors que la microscopie à force atomique (AFM) : les échantillons AFM nécessitent de les monter sur des supports rigides et plats pour assurer une bonne stabilité. Et pour la spectroscopie Raman : les échantillons sont préparés de manière à ce qu'ils soient uniformément répartis sur une surface plane pour minimiser la fluorescence et optimiser le signal Raman.

3. Échantillonnage de films minces : Si vous caractérisez des films minces, il est important de préparer les échantillons de manière à ce qu'ils soient bien adhérents à leur support. Utilisez des méthodes appropriées de dépôt, d'évaporation ou de spin-coating pour obtenir des films uniformes et bien attachés.

IV.2 Microscope optique

Le microscope optique ou microscope photonique est un **instrument d'optique** composé de plusieurs lentilles superposées permettant d'augmenter le pouvoir grossissant (Voir Figure IV.1). **Anthony Van Leeuwenhoek** (1632-1723), naturaliste néerlandais, inventa le microscope vers la fin du XVII^e siècle. Cette invention lui permettait d'étudier des formes de vie de très petite taille. À la même époque, **Robert Hooke** (1635-1703), naturaliste anglais, superpose deux loupes pour observer animaux et végétaux. Il observe ainsi les toutes petites cavités remplies d'air, du liège, etc. Il leur donne le nom de cellules, que l'on utilise depuis, pour nommer l'élément de structure fondamental des êtres vivants.

Le microscope dans sa forme la plus réduite est constitué d'un simple objectif et d'un oculaire, c'est-à-dire de deux lentilles convergentes. Ces deux lentilles forment une image très agrandie de l'objet et permettent d'observer des détails fins dans l'échantillon. Dans la pratique, on ne dépasse pas le grossissement 1000. La qualité essentielle d'un système optique n'est pas son grossissement mais son pouvoir séparateur, c'est-à-dire sa capacité à distinguer deux points situés l'un à côté de l'autre. La limite de ce pouvoir séparateur est de $0,2 \mu\text{m}$ pour les meilleurs objectifs apochromatiques, ayant une ouverture numérique de 1,4 et fonctionnant à l'aide d'un condenseur particulier (un condenseur achromatique-aplanétique).

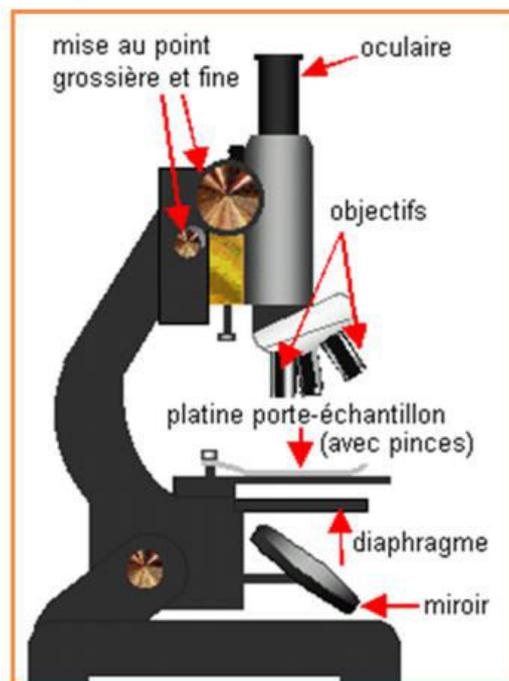


Figure IV.1 : Microscope optique.

Il est utilisé en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage.

On peut distinguer :

- ❖ **Microscopie en réflexion** : La lumière produite par la source passe une première fois par l'objectif, arrive sur l'échantillon, est réfléchi et repasse par l'objectif pour observation.
- ❖ **Éclairage épiscopique** : L'éclairage épiscopique permet d'observer des objets opaques en couleur.
- ❖ **Microscopie en champ clair** : L'échantillon est illuminé par dessous et observé par-dessus.
- ❖ **Microscopie en champ sombre** : Il permet d'améliorer le contraste d'échantillons transparents consiste à collecter soigneusement la lumière diffusée par l'échantillon. π
Illumination oblique : L'utilisation d'une illumination oblique (par le côté) donne une image d'apparence tridimensionnelle et peut mettre en valeur des aspects invisibles autrement.
- ❖ **Microscopie en lumière polarisée** : on place l'échantillon entre un polariseur et un analyseur afin de détecter les variations de polarisation (concentration) de la lumière après la traversée de l'échantillon (utile en minéralogie).
- ❖ **Microscopie en fluorescence** : Cette technique nécessite un émetteur laser d'un rayonnement photonique (électromagnétique) ayant une longueur d'onde précise, pour exciter une molécule cible dotée de propriétés fluorescentes (couleur de fluorescence).
- ❖ **Microscope binoculaire** : Ce moyen d'observation macroscopique permet de réaliser des premières observations sur les échantillons qui nous sont confiés. Nous pouvons ainsi observer les zones d'intérêts sur les échantillons avant les étapes de préparation ou de découpe. Ce microscope permet également d'observer un échantillon pour des phases de préparation minutieuses telles que le prélèvement de particules pour identification.
- ❖ **Microscope 3D Haute résolution** : Cet équipement pour des observations macroscopiques et microscopique et un complément au microscope binoculaire. Il est tout à fait transportable sur site pour observer des pièces volumineuses avant découpe ou pour expertise. Avec ses modules optiques pouvant aller de X5 à X7000, ce microscope permet bon nombre d'observation en imagerie de Haute Résolution, tout en gardant la netteté de l'image avec son logiciel de reconstruction 3D. La précision de l'image permet d'observer des cristaux, des microfissurations, des whiskers ou même le sens de déroulement d'une casse. Sa modularité permet également l'observation de grandes ou petites pièces sans problèmes. La caméra 360° ou l'étalonnage de l'appareil permettent à la fois l'acquisition d'imageries de haute qualité mais aussi la prise de valeurs dimensionnelles précises dur tout type de matériaux.
- ❖ **Microscope optique à platine inversée** : Le microscope à platine inversée est le moyen essentiel dans l'activité d'expertise métallurgique. La capacité d'observation des structures et microstructures à cœur en fait un appareil incontournable à l'analyse métallographique. Les possibilités d'observations standardisées ou en relation avec les normes existantes avec notre platine motorisée nous permet d'intervenir en contrôle qualité de nombreux industriels. Il permet d'observer à cœur de tous types de métaux après attaque chimique ou électrolytique, afin de déterminer ses caractéristiques de réalisation ou la présence de défauts.

IV.2.1 La préparation des échantillons surfaciques en microscopie optique

Les protocoles varient en fonction de l'échantillon et du microscope. Avant d'être soumis à l'observation, les échantillons prélevés de la substance à analyser doivent subir un traitement spécial.

- ❖ **Polissage** : Le polissage comprend deux étapes :
 - Polissage sur des papiers abrasifs de plus en plus fin (100-18 μ m) ;
 - Polissage avec des abrasifs en suspension dans un liquide (eau ou huile) où l'abrasif est une poudre d'alumine ou de diamant dont le diamètre des grains va de 15 à 0.05 μ m.
- ❖ **Attaque chimique ou électrolytique** : Après le polissage, on soumet la surface de l'échantillon à une attaque chimique pour mettre en évidence la microstructure de l'échantillon (la surface de l'échantillon subit une légère dissolution différentielle dans le réactif utilisé). Les réactifs d'attaque dépendent des alliages étudiés et des phases que l'on veut mettre en évidence. Après l'attaque, les différents constituants de la microstructure n'ont plus le même pouvoir réfléchissant et ainsi on peut les observer.

Le processus général pour les préparations histologiques ou biologique comporte :

- La **fixation** - Les fixateurs chimiques protègent les tissus en empêchant leur dégradation, et aident à maintenir la structure de la cellule et des composants sous-cellulaires. Le fixateur le plus connu pour la microscopie optique est le formol tamponné neutre à 10 %.
- La **déshydratation** - on élimine l'eau de l'échantillon, car elle ne se mélange pas avec le milieu d'inclusion.
- L'**inclusion** - on plonge l'échantillon dans une matrice externe solide pour faciliter la coupe.
- La **coupe** - on coupe l'échantillon en fines tranches. L'épaisseur des tranches dépend de l'échantillon et de la question de recherche. Pour les travaux courants d'histologie, ces tranches ont une épaisseur de 2 à 5 micromètres.
- Le **montage** : consiste à placer les échantillons sur la lame de microscopie.
- La **coloration** : on colore l'échantillon pour accentuer le contraste et différencier les éléments à étudier.

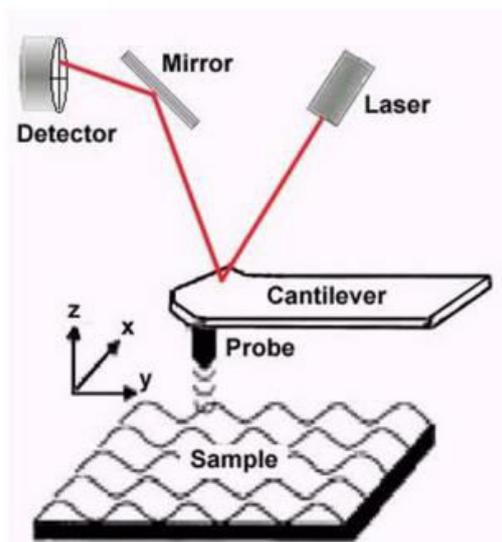
IV.3 Microscope à sonde locale

La microscopie à sonde locale est une technique de microscopie permettant de mesurer ou modifier les propriétés de surface de la matière ainsi que de cartographier le relief (nanotopographie), en balayant la surface à imager à l'aide d'une pointe très fine (la pointe est idéalement un cône se terminant par un seul atome). \wp Le pouvoir de résolution obtenu par cette technique permet d'observer jusqu'à des atomes, ce qui est physiquement impossible avec un microscope optique, quel que soit son grossissement. \wp La microscopie en champ proche est donc devenue en quelques décennies un outil indispensable pour la recherche scientifique, notamment dans le développement des nanotechnologies et l'industrie des semi-conducteurs. On distingue principalement trois types de microscopies :

- ❖ **Microscope à force atomique** : Le microscope à force atomique est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon jusqu'à des résolutions atomiques. Le MFA permet de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique. Un système optique utilisant un laser pour détecter la déviation de la pointe. \wp Le microscope à force

atomique peut aussi mesurer la force exercée par la surface sur la pointe, il devient donc l'un des appareils fondamentaux pour les recherches tribologiques. En utilisant des pointes magnétiques ou électriques permettent de mesurer les propriétés magnétiques et électriques de la surface.

- ❖ **Microscope à effet tunnel** : un STM (Scanning Tunneling Microscopy) utilise une pointe mobile très pointue (idéalement terminée par un unique atome) qui va servir à scanner la surface. Le principe consiste à déplacer la pointe au-dessus de la surface du film (à l'aide de céramiques piézoélectriques) en maintenant le courant tunnel constant par un dispositif d'asservissement. La distance pointe-échantillon reste constante et l'enregistrement des déplacements verticaux de la pointe reproduit alors fidèlement la topographie de la surface. Un STM peut renseigner les propriétés électroniques locales du matériau, en mesurant le courant de la pointe en fonction de la tension électrique.



Exemple de Microscope à effet Tunnel

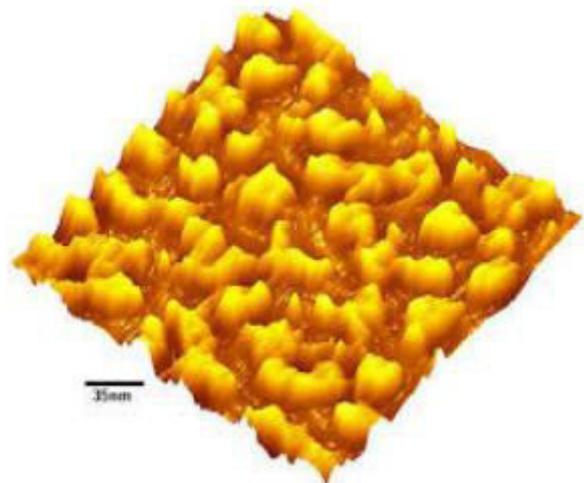


Image obtenue par Microscopie Tunnel

IV. 4 Microscope électronique

Un microscope électronique (ME) est un type de microscope qui utilise des lentilles électromagnétiques (pour focalisation) et un faisceau de particules d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. ⚡ Ils peuvent obtenir des grossissements beaucoup plus élevés allant jusqu'à 5 millions de fois. ⚡ Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, afin de conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. On distingue principalement trois types de microscopies :

- a. Microscope électronique en transmission ;
- b. Microscope électronique à balayage ;
- c. Microscope électronique par réflexion ;
- d. Microscope électronique à balayage en transmission.

IV.4.1 préparation des échantillons pour microscopie électronique

La préparation pour observation microscopique électronique comporte les étapes suivantes :

- **Fixation** : soit chimique (glutaraldéhyde ou tétraoxyde d'osmium) ou physique (cryofixation avec azote liquide).
- **Déshydratation** : remplacement de l'eau avec des solvants organiques (éthanol ou acétone), suivie d'une phase critique de séchage ou d'infiltration de résines d'enrobage.
- **Polissage**
- **Inclusion dans la résine** : elle consiste à placer l'échantillon de petite taille (0.1 à 1 mm³) dans un moule ou une gélule que l'on remplit d'une solution de résine liquide. Souvent un dégazage préalable de l'échantillon ainsi qu'un enrobage sous vide sont nécessaires pour une bonne adhérence résine-échantillon. On peut, selon les cas, inclure dans soit des résines époxy apolaires et polymérisables à chaud (50 à 120°C), soit dans des résines acryliques polaires et polymérisables à chaud ou aux UV.
- **Enrobage** : c'est une étape préparatoire à la réalisation de coupes ultrafines et obtenue après une imprégnation progressive du matériel dans une résine époxy type EPON.
- **Ultra-microtomie** : C'est une étape clé qui précède l'observation. Elle donne accès à l'ultrastructure des surfaces grâce à la réalisation de coupes ultrafines (50-100 nm). Les coupes sont effectuées à l'aide d'un couteau diamant ou de verre. Les coupes semi-fines d'épaisseur de 0.1 µm sont déposées sur une lame en verre, alors que les coupes ultrafines (50 à 100 nm) sont récupérées sur une grille métallique (Cu, Ni, Au) de 3 mm de diamètre. Les coupes sont ensuite contrastées avec l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb.
- **Sectionnement** : produit de fines tranches du spécimen, semi-transparent aux électrons sur 60-90 nm d'épaisseur. Des tranches jetables en verre sont également utilisés. La récupération des coupes se fait avec un anneau spécial.
- **Préparation de grilles** recouvertes d'une membrane de carbone ou de formvar.
- **Coloration des coupes** biologiques soit par acétate d'uranyl (coloration positive).
- **Métallisation** : avec de métaux lourds comme le plomb, l'uranium ou de tungstène pour disperser les électrons d'imagerie et donc donner du contraste entre différentes structures par pulvérisation cathodique (palladium-or) ou par dépôt de carbone.

IV.4.2 La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique traditionnellement utilisée dans l'analyse des surfaces. Elle permet d'analyser la morphologie de la surface et la composition chimique de la plupart des matériaux solides. Cette technique a la particularité d'offrir une très grande profondeur de champ (plusieurs centaines de microns) et donne des vues qualitatives des surfaces d'une grande utilité. En revanche, la mesure absolue des dimensions dans le sens de la hauteur nécessite l'analyse d'une section de l'échantillon.

Le fonctionnement du microscope est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon (électrons secondaires et rétrodiffusés). Un faisceau primaire d'électrons de diamètre compris entre 5 et 20 nm et d'énergie allant de quelques keV à 50 keV est focalisé sur l'échantillon (sous vide). Ce faisceau est balayé sur la surface à étudier par un système de déflexion (Figure IV.2).

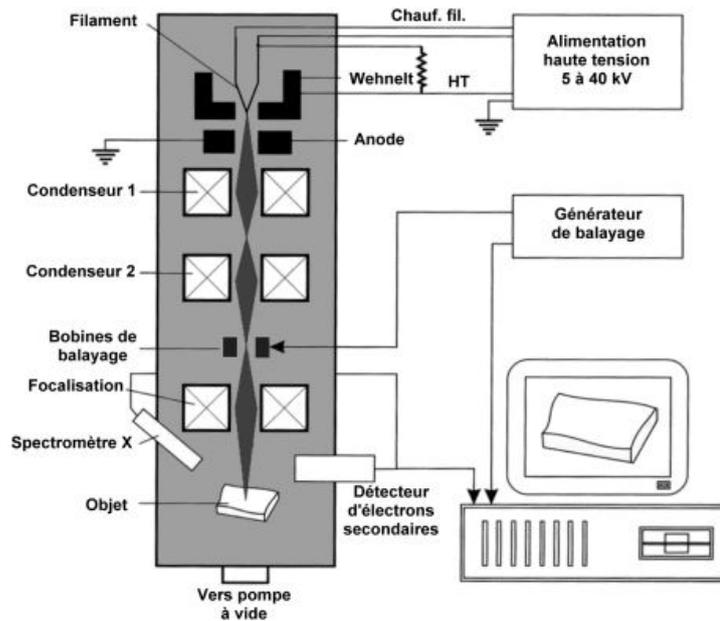


Figure IV.2 : Principe du microscope électronique à balayage.

Les électrons émis par l'échantillon sont détectés par un scintillateur couplé à un photomultiplicateur. Le signal obtenu est amplifié et sert à moduler l'intensité du faisceau d'un oscilloscope dont le balayage est synchrone avec celui du faisceau primaire. A chaque point de la zone balayée sur l'échantillon correspond donc un point sur l'écran de visualisation. L'image est obtenue séquentiellement point par point en déplaçant le faisceau d'électrons. Le grandissement s'obtient en changeant les dimensions de la zone balayée. Le contraste de l'image observée provient pour l'essentiel des différences de relief qui existent sur l'échantillon.

IV.4.2.1 Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique MEB

Le mode de préparation d'un échantillon dépend de l'information recherchée, topographie, microstructure ou composition et bien sûr de la nature de l'échantillon et de la forme dans laquelle il se présente : échantillon dur et massif, échantillon biologique, poudre, etc.... La clé d'une bonne observation ou d'une analyse correcte réside dans une préparation adéquate de son échantillon. L'observation et la caractérisation d'un échantillon au microscope électronique à balayage nécessitent le plus souvent une préparation spécifique de sa surface, hormis lorsqu'il s'agit d'observer directement le faciès initial (rupture, clivage, etc.). Selon la nature des observations ou des caractérisations à effectuer, il est nécessaire de préparer l'échantillon et sa surface de telle sorte qu'aucun artefact de préparation ne vienne les perturber, voire les empêcher. La première étape de la préparation d'un échantillon consiste, en général, à réaliser un prélèvement dans un morceau de matériau de volume ou de surface plus ou moins importants selon sa provenance. Il peut se faire en plusieurs étapes, notamment si le volume initial de matière est très important. Dans tous les cas il faudra sans doute passer par une préparation préalable de mise en forme de l'échantillon : sciage, polissage, carottage, meulage concave, enrobage.

- **L'enrobage** des échantillons est dans la plupart des cas nécessaire avant l'opération de polissage. Il permet en effet de polir les échantillons trop petits pour être manipulés et d'assurer une bonne préparation des bords. Différentes techniques d'enrobage peuvent être

prises en œuvre en fonction de la nature de l'échantillon et du type d'analyses nécessaires à son examen.

- **Polissage mécanique** : après la découpe, les différentes étapes de polissage comportent le rodage, le polissage grossier, le polissage fin et la finition. Toutes ces opérations ont en commun le fait de mettre en contact des particules abrasives avec l'échantillon en présence d'un lubrifiant qui assure simultanément le transport des copeaux et le refroidissement de l'échantillon et de l'abrasif.
- **Systèmes de fixation** : une fois préparé correctement, l'échantillon doit être introduit dans la chambre objet du microscope et fixé sur un support adéquat. La nature du support et la manière de le fixer sur ce support dépend à la fois de la de l'échantillon (échantillon massif, échantillon mince, poudres ou poussières...) et du type d'observation et/ou analyse. Dans le cas d'une observation topographique d'un échantillon massif, la méthode la plus courante est de le coller sur un porte échantillon à l'aide d'une laque conductrice (laque à l'argent ou au carbone) ou éventuellement d'un ruban adhésif double face. L'échantillon peut également être pris dans un étau, solution indispensable dans le cas d'échantillons de faible épaisseur observés sur la tranche. Pour la microanalyse, où une surface plane polie est nécessaire, on utilise un porte-échantillon à plan de référence supérieur, l'échantillon étant plaqué sur la partie supérieure du portoir par un dispositif à ressort. Les poudres peuvent être fixées directement à l'aide de laques conductrices ou d'un ruban adhésif. On peut également, pour des poudres très fines, les déposer sur un film mince posé sur une grille de microscope.
- **Métallisation des échantillons** : L'observation d'échantillons non-conducteurs dans un microscope électronique à balayage est rendue difficile par l'accumulation de charges à la surface de l'échantillon. Ces charges génèrent de nombreux défauts ou artefacts à la fois en imagerie mais également en microanalyse. Pour remédier à ces effets de charges, il est parfois possible de travailler à très basse tension ou dans un MEB à chambre à pression contrôlée. Cependant, ces solutions ne sont pas toujours compatibles avec les observations à réaliser et il est alors nécessaire de métalliser la surface des échantillons à observer ou à analyser. Nous allons donc présenter les différentes solutions qui existent pour rendre conductrice une surface isolante. Ceci inclura, en particulier, des données sur la nature du dépôt et les techniques de dépôt ;

Exemples :

✓ **Métaux et céramiques :**

- Pas de problème d'épaisseur d'échantillon.
- Limite de la taille des échantillons imposée par la platine du microscope.
- Nettoyage des échantillons (solvant + ultra - sons)
- Coller les échantillons sur le support.
- Assurer un bon contact électrique avec une peinture d'argent
- Métalliser l'échantillon et son support

✓ **Grains de poudre et fibres :**

- Les poudres sont déposées ou pulvérisées sur leur support.
- Vérifier en soufflant avec un gaz propre que seules demeurent les particules qui adhèrent - Métalliser l'ensemble après avoir laissé sécher 24 heures.

✓ **Matériaux hydratés :**

- Sécher le matériau : séchage au four, à l'air, avec contrôle de l'humidité, avec substitution eau/solvant, par lyophilisation.
- Le fixer, puis le métalliser.

✓ **Matériaux isolants** : il faut que les charges s'écoulent. On utilise de l'or ou or palladium en général épaisseur 10 nm.

La plupart des échantillons massifs non hydratés ne réclament aucune préparation spéciale. Les autres types d'échantillons poudres, matériaux hydratés, matériaux biologiques, réclament un savoir-faire que l'on peut retrouver dans des articles scientifiques. Une règle de base : la propreté.

IV.4.3 Microscopie électronique en Transmission (MET)

Le principe de la lentille électromagnétique permettant de focaliser des électrons est à l'origine du microscope électronique en transmission. Elle a été mise au point à partir de 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier ayant reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie qui utilise des électrons de haute énergie (soumis à des fortes tensions d'accélération de 60 à 400 kV) pour former une image d'objets de faible épaisseur (de l'ordre de 50 à 150 nm). La faible longueur d'onde des électrons, par rapport à la lumière visible, assure une bien meilleure résolution au MET qu'à la microscopie optique. Cependant, en raison de l'imperfection des lentilles électromagnétiques, la résolution des microscopes électroniques tombe bien en-dessous de ce que laisserait attendre la longueur d'onde de De Broglie des électrons (0,00251 nm pour des électrons accélérés à 200 kV) ; en réalité, les meilleurs microscopes à l'heure actuelle ont des résolutions de l'ordre de 1 Å. Un microscope électronique en transmission (Fig. 1.1) se compose principalement :

- d'un système de pompes à vide ;
- d'un canon à électron composé d'une source d'électrons, d'un système de focalisation et d'un accélérateur d'électrons ;
- d'une colonne optique électronique contenant les lentilles électromagnétiques et les diaphragmes ;
- d'un porte échantillon équipé d'un système de refroidissement à l'azote ;
- d'un détecteur d'électrons ;
- éventuellement d'autres éléments électroniques de mesure.

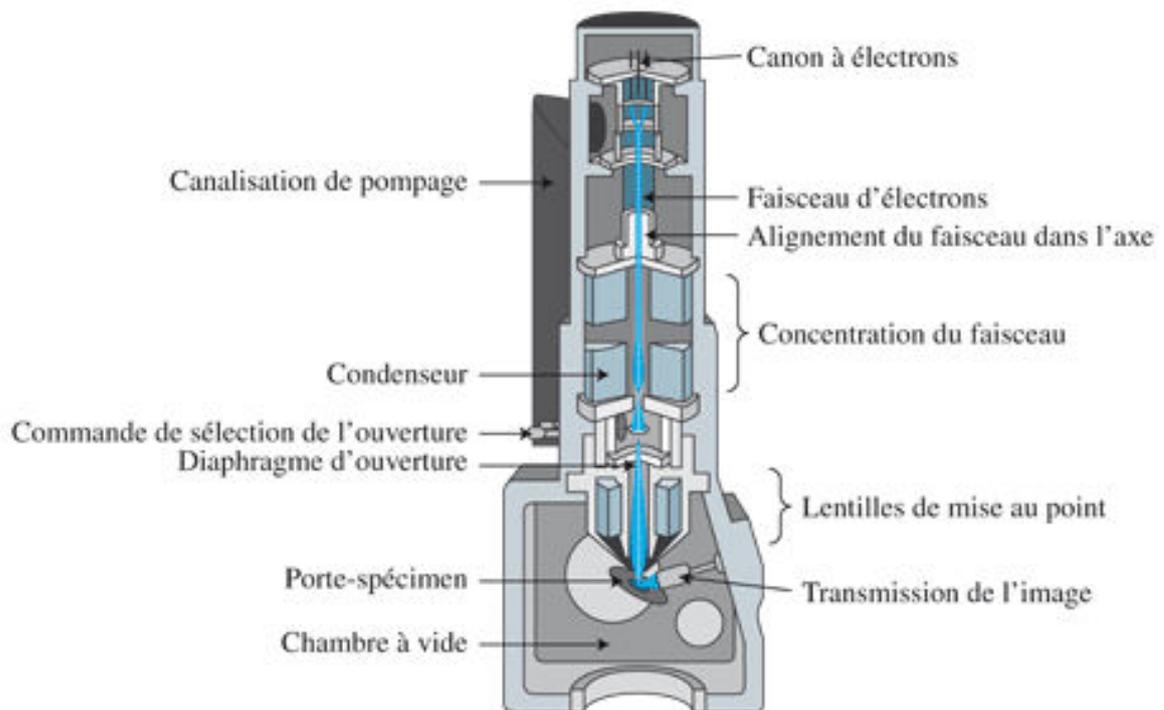


Figure IV.3 : Schéma d'un M.E.T

Vu que les électrons interagissent fortement avec la matière, ils interagissent aussi avec les molécules d'air, c'est pourquoi la colonne doit être gardée en permanence sous vide poussé (environ 1.10^{-5} Pa = 1.10^{-8} millibars). Pour la formation d'une image on réduit souvent l'étude du système optique à la lentille la plus proche de l'échantillon, ou lentille-objectif. En effet, c'est elle qui assure l'interaction du faisceau avec l'échantillon et la formation de la première image agrandie de l'objet, et c'est donc elle qui va déterminer la qualité (essentiellement : la résolution) des images. Il existe plusieurs modes d'utilisation en microscopie électronique en transmission : le mode image, le mode diffraction et la haute résolution.

IV.4.3.1 Préparation d'échantillons pour la caractérisation microscopique MET

La préparation des échantillons pour le TEM est souvent une opération délicate et compliquée. Il est important d'employer les techniques qui ne perturbent pas ou peu la microstructure de l'échantillon. La taille des échantillons est normalisée à 3.0 mm de diamètre (parfois 2.3 mm) pour tous les microscopes. L'épaisseur de la plage à observer dépend de l'énergie des électrons, du poids atomique du matériau étudié et du type d'observation visé (de 1 micron à 10nm).

Les étapes de préparation des échantillons pour observation MET sont illustrées sur la figure IV.4.

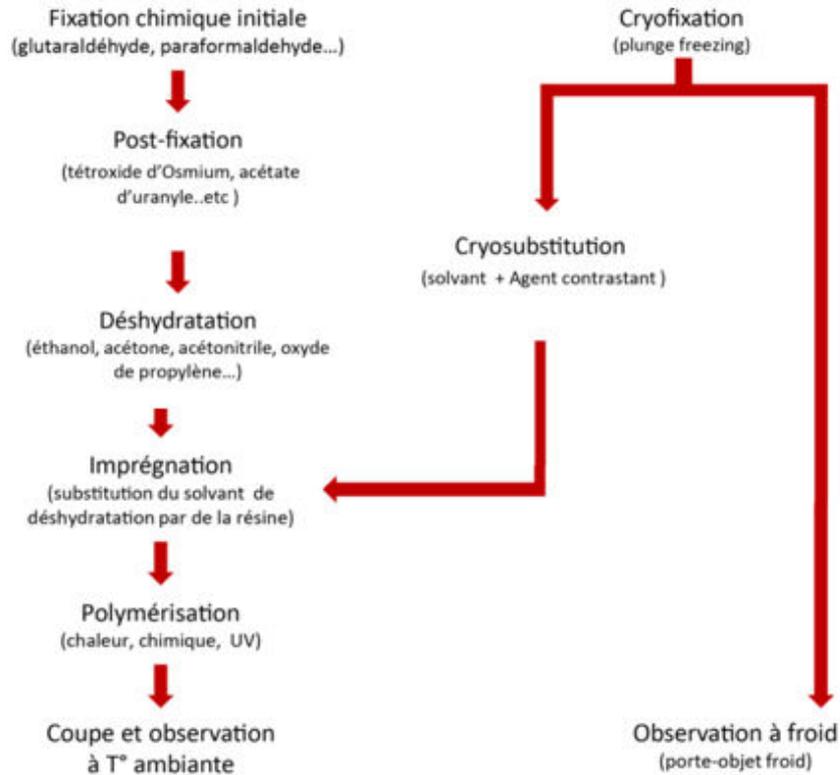


Figure IV. 4: Préparation des échantillons pour la MET.

- ✓ **Poudres** : Lorsque l'échantillon est sous forme d'une poudre dont les grains sont transparents aux électrons, une goutte d'une suspension de celle-ci dans de l'eau distillée ou de l'éthanol peut être déposée sur un film de plastic, film de carbone amorphe.... De quelques nm d'épaisseur. Ce film est lui-même supporté par un treillis à maille fine (une « grille » souvent en cuivre). Lorsque la poudre est trop grossière pour être transparente, elle peut être enrobée dans une matrice ad hoc (film déposé par galvanoplastie, résine époxy, ...) et aminci comme un matériau massif.
- ✓ **Films superficiels**
 - **Vues en plan** : Le film est décollé de son substrat par une attaque ad hoc de ce dernier et il est monté sur une « grille ». Si son épaisseur est trop élevée pour qu'il soit électron-transparent il peut être aminci par bombardement ionique.
 - **Coupes transverses** : Lorsqu'il s'agit de suivre la structure ou la composition du substrat dans le film à travers l'interface, un « échantillon massif » est préparé en collant deux morceaux de l'échantillon film contre film avec une époxy le plus souvent. Cet échantillon composite est ensuite scié dans un plan perpendiculaire au plan de l'interface, poli mécaniquement et aminci par bombardement ionique. La différence de comportement entre le substrat, le film et la colle peut créer des situations où l'amincissement demande une bonne maîtrise des paramètres expérimentaux. Cette démarche est difficilement transportable aux amincissements électrochimiques et chimiques en raison du caractère inerte de la colle.
- ✓ **Matériaux massifs** : Les matériaux massifs nécessitent d'être amenés à la transparence aux électrons. Plusieurs techniques sont utilisées.

- **Broyage** : La technique la plus simple de réduire la taille d'un objet massif fragile consiste à le broyer dans un mortier. Les grains les plus fins peuvent être directement observés. Toutefois la microstructure est affectée par une forte densité de dislocations. Une variante consiste à gratter ou obtenir des éclats de la surface lorsque l'on cherche à étudier un film superficiel. La poudre obtenue est déposée sur un film support transparent aux électrons.
- **Clivage** : Les semi-conducteurs et d'une façon plus générale les matériaux monocristallins fragiles peuvent être préparés en les clivant selon deux plans de faible énergie. Les plages à proximité de l'arête du dièdre préparé ainsi sont transparentes et relativement peu affectées si la fracture a bien suivi les directions cristallographiques. Les échantillons sont ensuite collés sur un support ad hoc. Cette méthode est particulièrement rapide. Elle a l'avantage en outre de permettre le calcul de l'épaisseur de la plage observée à partir de la connaissance de sa distance à l'arête et de l'angle du dièdre (fixé par la cristallographie du matériau).
- **Répliques** : Cette technique substitue à l'échantillon un moulage de sa surface. Il en existe de nombreuses variantes : réplique directe où un film mince (souvent carbone) est déposé sur la surface, puis décollé et posé sur une grille en cuivre pour être observé au microscope. Cette méthode est avantageuse lorsque la rugosité de la surface est très élevée ou lorsque l'échantillon est de grande dimension et on ne souhaite pas le détruire.
- ✓ **Polissage** : Le découpage des échantillons est souvent suivi par un polissage mécanique aussi doux que possible (poudres abrasives de diamant, alumine, magnésie,...). Parfois il est totalement contre-indiqué et remplacé par un polissage par électroérosion à faible puissance ou un polissage électrochimique. Par contre, les échantillons fragiles peuvent être polis jusqu'à quelques 10-30 microns d'épaisseur, voir jusqu'à la transparence aux électrons.
- ✓ **Amincissement final**
 - **Les conducteurs** : Les échantillons conducteurs sont amincis par polissage électrochimique dans une cellule ad hoc, le plus souvent constitué de deux jets d'électrolyte incidents sur chaque face de la lame qui constitue l'anode du système.
 - **Les semi-conducteurs et les céramiques** : Les semi-conducteurs et les céramiques sont parfois amincis par dissolution chimique. Le plus souvent l'amincissement se fait par érosion ou bombardement ionique. Une ou deux faces de la lame sont exposées sous l'incidence rasante à un ou deux faisceaux d'ions de 2 à 5 keV (en général d'Ar) qui pulvérisent la surface. L'impact d'ions affecte une couche de l'ordre de quelques nm. Ainsi chaque face comporte une couche superficielle amorphisée (1-2 nm d'épaisseur) et une sous-couche riche en dégâts d'irradiation (atomes d'argon implantés, défauts ponctuels, boucles de dislocations).

IV. 5 Application des RX à la détermination des phases et à l'étude des surfaces et interfaces

L'étude des surfaces et des interfaces au moyen des rayons X a connu d'importants développements ces dernières années. Certaines méthodes sont maintenant largement utilisées pour caractériser des surfaces industrielles, comme la photoémission (encore souvent appelée ESCA). D'autres méthodes émergent de plus en plus dans de nombreux laboratoires de recherche appliquée, telles que la diffraction des rayons X rasants et la réflectométrie X. Enfin, certaines restent encore principalement dans le domaine de la recherche fondamentale, comme l'EXAFS, la photodiffraction et le dichroïsme magnétique. À première vue, l'utilisation des rayons X pour l'analyse des surfaces peut sembler moins idéale, car ce rayonnement pénètre profondément dans la matière (au moins quelques micromètres). Il est donc nécessaire de jouer sur les différentes

interactions entre les rayons X et la matière afin de limiter les effets de cette grande pénétration. Cependant, dans le cas d'études de systèmes comportant des interfaces multiples, comme les multicouches, une plus grande pénétration peut être tolérée.

Le spectromètre à rayons X est un accessoire, devenu actuellement courant, du microscope électronique à balayage. Il permet la détermination de la nature et de la concentration des éléments présents. Analyse possible sur échantillons petits ou large, massifs ou minces supportant le vide et le faisceau d'électrons. L'impact des électrons produit un spectre d'émission X caractéristique, permettant des résultats quantitatifs et qualitatifs. L'échantillon est bombardé par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 5 à 30 keV. L'impact provoque l'émission des rayons X caractéristiques des éléments constituant l'échantillon. L'émission se produit dans une "poire" de dimensions de l'ordre du micromètre avec deux conséquences :

- la résolution spatiale de l'analyse est de l'ordre du μm ,
- la profondeur analysée est également de l'ordre du micron, ce qui peut poser des problèmes particuliers pour l'analyse de petites particules ou de films minces.

La diffraction des rayons X (DRX) est une méthode d'analyse particulièrement adaptée à l'étude des matériaux poly-cristallins, car elle permet d'identifier les différentes structures cristallines présentes dans un échantillon. Pour effectuer cette analyse sur des échantillons solides cristallins, deux approches courantes sont utilisées :

- **Échantillon sous forme de poudre désorientée** : Dans cette méthode, l'échantillon solide est réduit en poudre, qui est ensuite déposée uniformément sur un porte-échantillon. Pour éviter toute orientation préférentielle de la poudre, sa surface est soigneusement aplanie. Cette précaution garantit que les pics de diffraction obtenus ne sont pas influencés par une orientation spécifique de la poudre, ce qui pourrait fausser les résultats d'analyse.
- **Échantillon sous forme de lame orientée** : Cette approche est spécifiquement utilisée pour l'étude des phyllosilicates, un groupe de minéraux en feuillets. Pour préparer un échantillon de phyllosilicates sur lame de verre, on procède à l'extraction de la fraction argileuse après divers traitements physiques et chimiques, tels que le broyage, le délitage, la décarbonatation et l'élimination de la matière organique. Cette préparation sur lame permet d'orienter les phyllosilicates de manière à renforcer les réflexions principales sur les plans cristallographiques (001), facilitant ainsi leur identification. L'analyse est effectuée d'abord sur l'échantillon non traité, puis après des traitements spécifiques, tels que la saturation à l'éthylène glycol, à l'hydrazine et le chauffage.

Pour déterminer les proportions relatives des phases cristallines présentes dans l'échantillon, une analyse semi-quantitative est réalisée à l'aide de divers logiciels, aussi bien pour les échantillons en poudre que pour les lames orientées. Cette approche permet d'obtenir des informations précises sur la composition et la structure cristalline des matériaux étudiés.

IV.5.1 Nature des rayonnements - dualité onde-corpuscule

La figure résume les divers processus qui entrent en compétition au cours de l'interaction entre photons X et matière. Dans le domaine d'énergie qui nous intéresse (10 eV - 30 keV) on pourra négliger la production de paires électron - positron et les phénomènes dominants seront l'absorption photoélectrique et la diffusion.

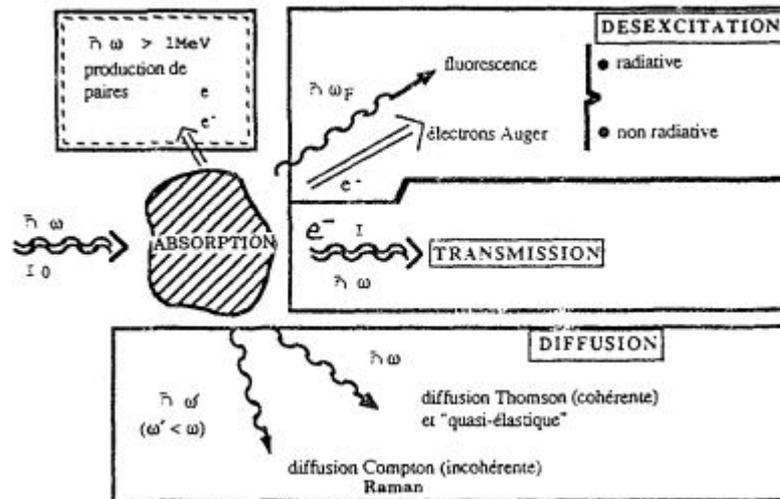


Figure IV.5 : Différents processus d'interaction entre les rayons X et la matière.

On appelle Rayons X les radiations électromagnétiques comprises entre $0,1$ et 50\AA (les radiations électromagnétiques pouvant avoir une longueur d'onde variant entre $0,001 \text{\AA}$ et plusieurs kilomètres). Ils sont émis par le bombardement de la surface d'un solide par des rayons cathodiques qui sont des faisceaux d'électrons accélérés par des tensions variant entre 10^3 et 10^6 volts

On distingue deux types de rayonnements, suivant leur nature : les rayonnements électromagnétiques et les rayonnements corpusculaires.

- **Rayonnements électromagnétiques** : Ce sont des champs électromagnétiques sinusoïdaux de fréquence ν , qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière c (longueur d'onde $\lambda = c/\nu$). L'énergie est quantifiée sous forme de photons. Chaque photon transporte une énergie $E = h\nu$ où h est la constante de Planck.

Exemples de rayonnements électromagnétiques : I.R., lumière visible, U.V., rayons X, γ .

- **Rayonnements corpusculaires** : Ils sont constitués par des corpuscules de masse m animés d'une vitesse v , d'énergie cinétique $E = 1/2 mv^2$. Louis de Broglie a montré, en 1924, qu'à tout corpuscule en mouvement on peut associer une onde, de longueur d'onde $\lambda = h/p = h/mv$. **Exemples de rayonnements corpusculaires** : électrons, neutrons.

Pour les deux types de rayonnements, il apparaît donc une dualité onde-corpuscule qui explique les similitudes observées dans l'interaction de ces rayonnements avec la matière. Certaines interactions s'interprètent à partir de l'aspect corpusculaire (exemple : ionisation), d'autres s'expliquent en tenant compte de l'aspect ondulatoire (exemple : diffusion).

➤ Intensité des rayonnements

L'intensité d'un rayonnement émis d'une source ponctuelle est l'énergie traversant l'unité d'angle solide par unité de temps. L'unité S.I. est le watt par stéradian. Dans certains cas (exemple : onde plane), on utilise la densité de flux, exprimée en W.m^{-2} . En pratique l'intensité est mesurée par le taux de comptage du détecteur de rayonnement.

IV.5.2 Relations entre énergie et longueur d'onde

Les rayons-X sont une technique puissante pour caractériser la structure des matériaux cristallins en exploitant leur capacité à interagir de manière spécifique avec les réseaux cristallins. Cette

interaction se manifeste principalement par la diffraction des rayons-X, qui est régie par la loi de Bragg. Voici une formulation de ces concepts :

Les rayons-X sont utilisés pour différencier les matériaux cristallins des matériaux amorphes en raison de leur capacité à interagir avec les réseaux cristallins de manière distinctive. Dans un cristal, les atomes sont arrangés de manière ordonnée dans un motif tridimensionnel, se répétant de manière identique le long de trois directions. Cette répétition régulière est caractérisée par des plans parallèles et équidistants, appelés "plans réticulaires" et notés (h, k, l), où h, k et l sont des indices qui décrivent la position relative de ces plans dans la structure cristalline. Les distances entre ces plans réticulaires dépendent de la disposition précise des atomes dans le réseau cristallin, y compris leur taille et leur arrangement.

La diffraction des rayons-X par un cristal se produit lorsque les faisceaux de rayons-X interagissent avec ces plans réticulaires en respectant la loi de Bragg. Selon la loi de Bragg, la diffraction constructive se produit lorsque la différence de chemin optique entre les rayons-X réfléchis par deux plans réticulaires consécutifs est un multiple entier de la longueur d'onde des rayons-X incidente. Cela crée un motif de diffraction qui peut être observé expérimentalement. L'angle de diffraction θ , qui est l'angle entre le rayon incident et le rayon réfléchi, est directement lié à la distance inter-réticulaire d du cristal par la relation de Bragg :

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

Où :

- n est un nombre entier correspondant à l'ordre de diffraction,
- λ est la longueur d'onde des rayons-X incidente,
- d est la distance inter-réticulaire du plan réticulaire,
- θ est l'angle de diffraction.

En mesurant l'angle de diffraction θ et en connaissant la longueur d'onde des rayons-X utilisés, on peut calculer avec précision la distance interatomique d dans le réseau cristallin. Ces distances interatomiques sont des constantes caractéristiques du cristal et sont essentielles pour la détermination de sa structure cristalline. Ainsi, la diffraction des rayons-X nous permet de sonder la structure des matériaux cristallins en mesurant les distances interatomiques et en déterminant la disposition spatiale des atomes dans le cristal.

▪ **Cas des rayonnements électromagnétiques :**

$$E = h\nu = hc/\lambda \Rightarrow \lambda = hc/E \text{ avec : } c=299792458 \text{ m.s}^{-1} (\approx 3.108\text{m.s}^{-1}) \text{ et } h=6,6260755(40).10^{-34} \text{ J.s} = 4,1356692(12).10^{-15} \text{ eV.s} \quad \lambda (\text{\AA}) \approx 12400/E (\text{eV})$$

Exemple : les rayons X de 0,2 à 2Å correspondent à des énergies comprises entre ≈ 60 keV et ≈ 6 keV.

▪ **Cas du rayonnement électronique :**

$$\lambda (\text{\AA}) = h/p = h/m_0v = h/ (2m_0E_e)^{1/2} \approx 12,264/ E(\text{eV})^{(1/2)}$$

" m_0 " est la masse de l'électron (au repos) $\approx 9,1093897(54).10^{-31}$ kg

Exemple : Une énergie de 100 eV correspond une longueur d'onde de 1,23 Å.

▪ **Cas du rayonnement neutronique :**

Les neutrons utilisés pour la diffraction sont des neutrons lents ou neutrons thermiques (neutrons rapides ralentis par le modérateur d'une pile atomique). A la suite d'un grand nombre de collisions ces neutrons thermiques sont en équilibre thermique avec les atomes du modérateur et ont une énergie cinétique moyenne :

$$E_c = (1/2) M_{nv}^2 = (3/2) k.T \text{ où}$$

M_n est la masse du neutron,

k la constante de Boltzmann,

T la température absolue.

Leur longueur d'onde moyenne sera donc :

$$\lambda = h/p = h/M_{nv} = h/ (2M E_n c)^{(1/2)} = h/ (3M kT)^{(1/2)}$$

avec $k = 8,617385(73) \cdot 10^{-5} \text{ eV} \cdot \text{K}^{-1}$ et $M_n = 1,6749286(10) \cdot 10^{-27} \text{ kg}$:

$$\lambda (\text{Å}) = 0,286/ (E \text{ eV})^{(1/2)} = 25,16/ (T \text{ K})^{(1/2)}$$

Pour une température comprise entre 0 et 100 °C, la longueur d'onde varie entre 1,55 et 1,35Å (l'énergie correspondante variant entre 35 et 48 meV).

On voit donc que les rayonnements diffractables par la matière, par exemple avec des longueurs d'onde de 4 à 0,4 Å, sont : - les rayons X d'énergie moyenne (3 à 40 keV) - les électrons de faibles énergie (électrons lents de 10 à 1000 eV) - les neutrons thermiques de faibles énergie (5 à 500 meV).

IV.5.3 Production des rayons X

Ils ont été découverts par Röntgen en 1895 et leur nature ondulatoire a été établie en 1913 avec la réalisation des premières expériences de Von Laüe. Le domaine de longueur d'onde des rayons X va de 0,1 Å (limite des rayons γ) à 100 Å (limite de l'U.V. lointain). En termes d'énergie ceci correspond à la gamme 0,1 - 100 keV :

$$\lambda (\text{Å}) = 12400/E (\text{eV})$$

En radiocristallographie on utilise des rayons X dont la longueur d'onde est comprise entre 0,5 et 2,5 Å. Des rayons X peuvent être obtenus à partir de : - transitions électroniques dans les couches internes atomiques - dans le spectre du rayonnement électromagnétique émis par accélération ou décélération de particules chargées relativistes.

➤ Le rayonnement synchrotron

Toute particule chargée soumise à une accélération (ou une décélération) émet un rayonnement électromagnétique. Lorsque l'accélération est faible le rayonnement quasi monochromatique est émis dans tout l'espace de façon isotrope (ex : antenne radio). Si au contraire l'accélération est forte il faut utiliser la mécanique relativiste et le rayonnement est émis exclusivement de façon tangentielle à la trajectoire des particules mais avec un spectre large en énergie (donc en longueur d'onde). Le rayonnement synchrotron est émis par des particules chargées, telles que des électrons ou des positrons, accélérées à une vitesse proche de celle de la lumière. C'est le cas dans les accélérateurs et les anneaux de stockage dans lesquels les vitesses des particules proches de celle de la lumière sont obtenues grâce à des accélérations centripètes très élevées produites par des champs magnétiques intenses qui incurvent leur trajectoire. Le spectre d'émission $I(\lambda)$ a une forme comparable au fond continu d'un tube.

La longueur d'onde critique (au maximum d'intensité) est donnée par :

$$\lambda_c = 5,6R/E^3 = 18,6/(BE^2)$$

λ_c (Å);

R (rayon de courbure ;

m);

B (champ magnétique ; teslas);

E (énergie des particules ;

Exemple de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble, l'un des plus puissants synchrotrons actuels :

$R=22,36\text{m}$;

$E = 6\text{GeV} \Rightarrow \lambda_c = 0,58\text{\AA}$ (21,4KeV)

Le rayonnement obtenu est utilisable en diffraction mais aussi pour la diffusion nucléaire de la spectrométrie Mössbauer.

Principales propriétés du rayonnement synchrotron :

- ✓ continuité spectrale exceptionnelle, de l'infrarouge lointain jusqu'aux rayons X.
- ✓ faible divergence d'émission dans le plan vertical ce qui conduit à une brillance bien supérieure à celle des tubes de rayons X et permet une excellente focalisation des faisceaux.
- ✓ intensité du rayonnement de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle des générateurs de rayons X des laboratoires.
- ✓ forte polarisation linéaire dans le plan de l'orbite des particules.
- ✓ intensité moyenne décroissante au cours du temps, ce qui oblige à réinjecter des particules dans les machines de une fois par semaine jusqu'à plusieurs fois par jour.

IV.5.4 Détection des rayons X

IV.5.4.1 Les écrans fluorescents

Les rayons X, invisibles à l'oeil, peuvent être transformés en radiations visibles en rendant fluorescentes (ne pas confondre la "fluorescence dans le visible" avec la "fluorescence X" décrite précédemment) certaines substances comme le platinocyanure de baryum, le sulfure de zinc... La lumière émise par un écran soumis à l'action des rayons X est d'autant plus intense que l'intensité du faisceau est importante. De tels écrans sont utilisés pour la localisation des faisceaux RX lors des réglages.

IV.5.4.2 Les films photographiques

Les films photographiques ont longtemps été utilisés pour la détermination précise de la position et de l'intensité des raies dans les diagrammes de diffraction. Les mesures d'intensité sur les films sont maintenant abandonnées au profit d'autres techniques plus précises. Les émulsions photographiques utilisées sont des émulsions à gros grains de bromure d'argent. Actuellement l'usage des films est surtout réservé aux techniques qui ne nécessitent pas la mesure de l'intensité des taches de diffraction. Pour les monocristaux on leur préfère l'utilisation de détecteurs bidimensionnels plus récents.

IV5.5 Spectroscopie de photoémission des rayons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons par rayons X, ou X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), est une technique de caractérisation de surface non destructive qui repose sur l'utilisation de l'effet photoélectrique découvert par H. Hertz en 1887, puis expliqué par A. Einstein en 1905. La technologie actuelle de l'XPS fut développée dans les années 50 par K. Siegbahn, ce qui lui valut d'être récompensé par un prix Nobel de physique en 1981. Cette technique détecte tous les éléments du tableau périodique sauf l'hydrogène et l'hélium. Elle est couramment appliquée dans divers domaines de la recherche et de l'industrie, notamment la corrosion, la catalyse hétérogène, la technologie photovoltaïque, les nanomatériaux, la microélectronique, les polymères, les batteries, les interfaces, les oxydes, les matériaux bactéricides, et bien d'autres, qu'il s'agisse de matériaux massifs ou de couches minces. Cette technique permet de sonder les niveaux d'énergie occupés dans la

matière. Cette méthode permet de faire du quantitatif relatif entre les différents éléments présents dans l'échantillon. La force de cette technique est de permettre la quantification relative entre les différents groupements chimiques en surface et pour les matériaux ordonnés ou amorphe. L'XPS permet aussi d'analyser les bandes de valence. Cela nous permet d'analyser les phases, la composition et l'identification des inclusions dans les matériaux métalliques ainsi que l'analyse de revêtement de surface et de placage de matériaux solides, tels que : détection de revêtement de surface de film métallisé. Et encore l'analyse qualitative et quantitative des composants de micro-zone à la surface des matériaux et analyse de la distribution de surface, de ligne et de point des éléments à la surface des matériaux.

XPS et UPS permettent :

- d'identifier tous les éléments dans les échantillons sauf H et He (XPS, Auger).
- de déterminer qualitativement et quantitativement des concentrations entre les différents éléments (Principalement XPS).
- le seuil de détection atomique d'environ 2 pour 1000 (XPS, Auger).
- L'XPS permet grâce au déplacement des niveaux de cœur d'obtenir des informations sur les groupements chimiques (degrés d'oxydation).
- de mesurer les bandes de valences apporte des informations précieuses sur les propriétés électroniques de surface (XPS-UPS).

La spectroscopie de photoélectrons par rayons X repose sur le principe de la conservation de l'énergie du photon incident et s'exprime comme suit :

$$h\nu = E_c + E_L + \varphi_{ech}$$

Avec :

$h\nu$ l'énergie du photon incident (h étant la constante de Planck et ν la fréquence du photon incident) E_c l'énergie cinétique du photoélectron

E_L l'énergie de liaison du niveau de cœur considéré

φ_{ech} le travail de sortie de l'échantillon.

La Figure suivante illustre ce principe de conservation de l'énergie :

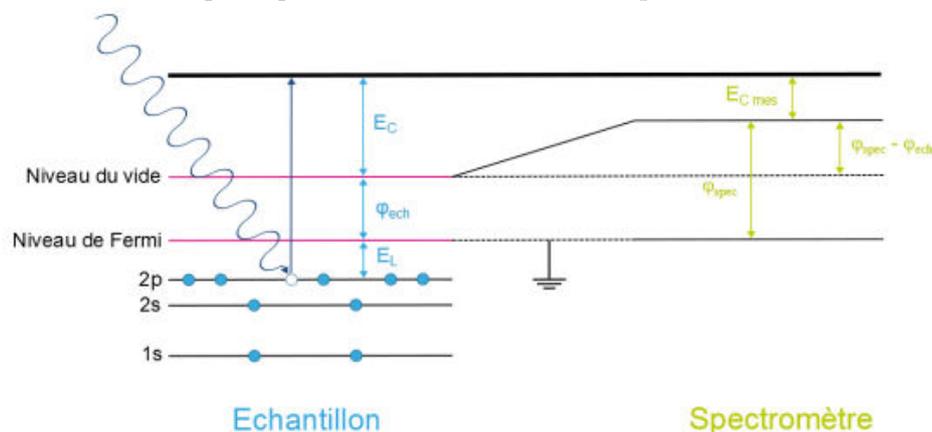


Figure IV. 6: Conservation de l'énergie totale lors d'un phénomène photoélectronique, ainsi que lors de sa mesure par un spectromètre.

Ainsi, au niveau du spectromètre, la conservation de l'énergie s'exprime comme suit :

$$E_L = h\nu - E_{c,mes} - \varphi_{spec}$$

Avec :

$E_{c,mes}$ l'énergie cinétique du photoélectron mesurée

φ_{spec} le travail de sortie du spectromètre.

Le travail de sortie du spectromètre ainsi que l'énergie des photons incidents sont des paramètres connus du montage expérimental. En mesurant l'énergie cinétique des photoélectrons $E_{c,mes}$, il est alors possible d'accéder à l'énergie de liaison EL du niveau électronique dont le photoélectron est issu. Chaque élément chimique génère un ou plusieurs pics caractéristiques sur le spectre XPS. Il est important de souligner que l'énergie de liaison n'est pas une quantité associée à un seul niveau électronique mais qu'elle correspond à la différence entre l'énergie des N électrons de l'atome non-ionisé (état initial) et l'énergie des N-1 électrons de l'atome ionisé (état final).

Le principe fondamental de l'XPS est le suivant :

- **Introduction des échantillons sous Ultra Vide :** Pour effectuer une analyse XPS, il est impératif de travailler dans un environnement sous vide extrêmement poussé. Les échantillons sont placés dans une chambre à ultra vide pour éviter toute interaction des électrons émis avec des molécules de gaz résiduelles. Cela garantit des mesures précises.
- **Irradiation avec des photons X "mous" :** Une source de rayons X "mous" émet des photons d'une énergie bien définie, généralement autour de 1253,6 eV (source Mg) ou 1486,6 eV (source Al). Ces photons sont dirigés vers la surface de l'échantillon.
- **Émission d'électrons :** Lorsque les photons X "mous" interagissent avec la surface de l'échantillon, ils peuvent éjecter des électrons des couches électroniques internes des atomes constituant l'échantillon. Ces électrons éjectés sont appelés électrons photoélectrons.
- **Analyse des électrons émis :** Les électrons photoélectrons émis ont des énergies spécifiques qui dépendent des niveaux d'énergie des atomes et des liaisons chimiques dans l'échantillon. Ces électrons sont dirigés vers un détecteur qui mesure leur énergie cinétique et leur intensité.
- **Spectres XPS :** Les données recueillies sont utilisées pour générer des spectres XPS. Ces spectres présentent des pics à des énergies caractéristiques des différents éléments présents dans l'échantillon. La position et l'intensité de ces pics fournissent des informations sur la composition chimique et la nature des liaisons chimiques à la surface de l'échantillon.
- **Profondeur d'analyse :** La profondeur d'analyse typique de l'XPS est relativement faible, de l'ordre de 2 à 10 nanomètres. Cela signifie que seule la couche superficielle de l'échantillon est analysée, ce qui est particulièrement utile pour étudier les propriétés de surface.

IV.5.5.1 Appareillage

Spectroscopie photoélectronique par rayons X est composé d'une chambre d'échantillonnage, d'un système à ultra-vide, d'une source d'excitation à rayons X, d'une source d'ions, d'un système d'analyse d'énergie et d'un système d'acquisition et de traitement de données informatiques, etc. Elle repose sur le principe de la détection des rayons X, qui, lorsqu'ils atteignent la zone sensible du détecteur, provoquent une ionisation, créant ainsi un grand nombre de paires électron-trou. Sous l'influence d'un champ électrique appliqué, les électrons et les trous se déplacent rapidement vers les électrodes positives et négatives respectives, où ils sont collectés pour former un signal électrique pulsé dans le circuit de sortie du détecteur. Ces paires électron-trou dans le détecteur à semi-conducteur contiennent l'information essentielle détectée par l'appareil.

Le système d'analyse comprend également un analyseur d'amplitude d'impulsion multicanal (MCA), qui est un instrument chargé de traiter la distribution d'amplitude des signaux d'impulsion. Le MCA effectue une classification des signaux pulsés en fonction de leur amplitude et enregistre le nombre de signaux dans chaque catégorie. Il se compose principalement de trois éléments : un convertisseur analogique-numérique (ADC), un codeur d'adresse, et une mémoire. Le détecteur convertit les rayons X de différentes énergies en signaux d'impulsion d'amplitude proportionnelle à l'énergie des photons incidents. Ces signaux sont ensuite dirigés vers l'ADC, où ils sont convertis en valeurs numériques. Ensuite, ces données numériques sont stockées dans la mémoire, associées à des adresses spécifiques. Chaque adresse mémoire correspond à un canal doté d'un compteur. Après la fin de la mesure, le résultat est affiché sous la forme d'une carte bidimensionnelle du spectre d'énergie, où l'axe horizontal représente les différents canaux (amplitudes des signaux) et l'axe vertical représente le nombre de signaux dans chaque catégorie. Cette représentation permet de visualiser le spectre d'énergie des rayons X détectés avec une résolution en fonction de l'amplitude des signaux, offrant ainsi une analyse détaillée des énergies présentes dans l'échantillon examiné. Cette méthode est essentielle dans divers domaines de la recherche, tels que la spectroscopie de rayons X et la caractérisation des matériaux.

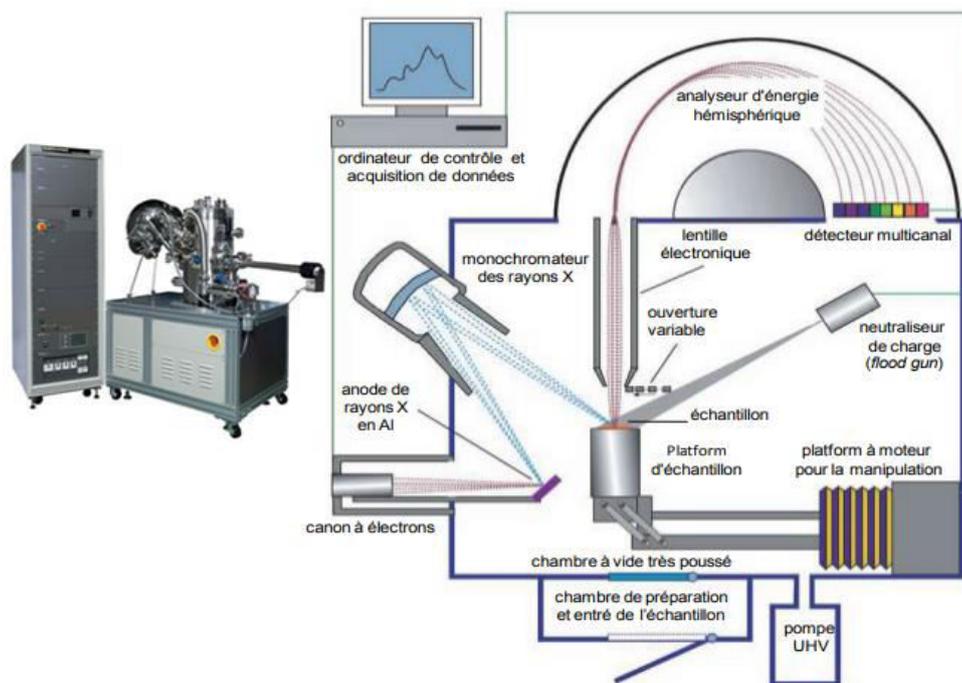


Figure IV. 7 : spectromètre de l'XPS utilisant une source de rayon X monochromatisée.

- ❖ **Chambre d'échantillonnage :** Le spectromètre photoélectronique à rayons X est équipé d'une chambre d'injection rapide, conçue pour une injection rapide sans casser l'ultra-vide de la chambre d'analyse. Le volume de la chambre d'injection rapide est suffisamment petit pour atteindre un vide poussé de 10^{-3} Pa en 5-10 min.
- ❖ **Systèmes d'ultra-vide :** Ultra-vide sont nécessaires pour la spectrométrie photoélectronique à rayons X pour deux raisons principales. Premièrement, XPS est une technique d'analyse de surface, et si le vide dans la chambre d'analyse est faible, la surface propre de l'échantillon peut être recouverte de molécules de gaz résiduelles dans le vide en très peu de temps. Deuxièmement, comme le signal et l'énergie des photoélectrons sont très faibles, si le niveau

de vide est faible, les photoélectrons peuvent facilement entrer en collision avec les molécules de gaz résiduel dans le vide et perdre de l'énergie, et finalement ne peuvent pas atteindre le détecteur. Dans un spectromètre photoélectronique à rayons X, pour que le vide de la chambre d'analyse puisse atteindre 10^{-8} Pa, le système de pompe à vide à trois étages est généralement utilisé.

- ❖ **Source d'excitation de rayons X :** L'énergie de liaison des électrons dans la couche de coque interne des atomes est élevée et des photons d'énergie plus élevée sont nécessaires pour les battre. Les énergies photoniques obtenues à partir de sources de rayons X avec du magnésium ou de l'aluminium comme matériaux d'anode sont respectivement de 1253.6 eV et 1486.6 eV, et les énergies photoniques dans cette gamme sont suffisantes pour battre les électrons 1s des atomes avec de petites masses atomiques. La source de rayons X de cet instrument est Al K α , et après la monochromatisation, la largeur de raie peut être réduite de 0.8 eV à 0.2 eV, et les lignes parasites et le rayonnement dur dans les rayons X peuvent être éliminés.
- ❖ **Source d'ions :** Le but d'avoir une source d'ions dans XPS est de nettoyer la surface de l'échantillon ou de décaper quantitativement la surface de l'échantillon. Dans les spectromètres XPS, des sources d'ions Ar sont souvent utilisées, qui peuvent être divisées en sources fixes et à balayage. Les sources d'ions Ar fixes sont utilisées uniquement pour le nettoyage de surface car elles ne peuvent pas effectuer de décapage par balayage et ont une mauvaise uniformité de gravure sur la surface de l'échantillon. Pour une analyse approfondie, une source d'ions Ar à balayage doit être utilisée.
- ❖ **Analyseurs d'énergie :** Il existe deux types d'analyseurs d'énergie pour les photoélectrons à rayons X, les analyseurs d'énergie hémisphériques et les analyseurs d'énergie à miroir barillet. L'analyseur d'énergie hémisphérique est principalement utilisé dans les spectromètres XPS en raison de sa grande efficacité de transmission des photoélectrons et de sa bonne résolution en énergie. L'analyseur d'énergie à miroir barillet est principalement utilisé dans le spectromètre à rayons X en raison de la grande efficacité de la transmission des électrons oscillants. Pour certains spectromètres d'électrons multifonctionnels, le choix de l'analyseur d'énergie est principalement basé sur la méthode d'analyse en raison de la similitude et de la focalisation de XPS et AES. Un analyseur d'énergie hémisphérique est principalement utilisé pour le XPS, tandis qu'un analyseur d'énergie de type cartouche est principalement utilisé pour l'OSCE.
- ❖ **Système informatique :** En raison de la complexité de l'acquisition des données et du contrôle du spectromètre photoélectronique à rayons X, le traitement informatique des spectres est également une partie importante, comme l'identification automatique des éléments, le calcul semi-quantitatif, l'ajustement des pics spectraux, etc.

Les spécifications de la spectroscopie photoélectronique à rayons X sont données dans le tableau suivant :

Tableau IV.1 : Spécifications de la spectroscopie photoélectronique à rayons X

Sensibilité	700 kcps (Ag3d $_{5/2}$)
Source de rayons X	MgK α 12kV, 30mA (cible Mg/Al en option)

Niveau de vide	5×10^{-7} Pa ou moins
Résolution	FWHM Ag3d5/2 0.8eV
Cellule de réaction au gaz	1000°C@1bar, 400°C@6bar

IV.5.5.2 Préparation des échantillons de test de spectroscopie photoélectronique à rayons X

La préparation des échantillons en analyse spectromètre photoélectronique à rayons X (XPS) varie en fonction de la nature des échantillons à analyser. Pour :

- a. **Échantillons en poudre** : Il est généralement nécessaire de disposer d'au moins 0,2 ml ou 10 mg de poudre pour le test, et l'échantillon doit être sec.
- b. **Échantillons solides** : Les échantillons solides doivent être sous forme de blocs de taille d'environ 5x5 mm, avec une épaisseur de préférence inférieure à 4 mm. La surface doit être plate, et les échantillons doivent être séchés.
- c. **Échantillons liquides** : Les échantillons liquides doivent être séchés sur une feuille d'aluminium ou sur d'autres supports tels que des plaquettes de silicium pour former un film liquide. Ce processus est généralement répété de 3 à 5 fois, et les gouttes séchées ne doivent pratiquement pas être visibles sur le substrat.
- d. **Nature des matériaux** : Les matériaux doivent être des substances non radioactives, non toxiques et non volatiles. Certains éléments tels que le sodium (Na), le potassium (K), le soufre (S), le phosphore (P), le zinc (Zn), le sélénium (Se), l'arsenic (As), l'iode (I), le tellure (Te), le mercure (Hg), etc., ne sont pas pris en charge.

IV.5.6 Spectroscopies d'absorption des rayons X

On doit à Maurice de Broglie les premiers spectres d'absorption des rayons X, en 1913. En faisant fluctuer l'énergie du faisceau, il constata des sauts dans l'absorption qu'il attribua à des transitions d'électrons de cœur vers des couches libres ou le continuum. Des expériences plus précises menées par Fricke et Hertz (1920) montrèrent qu'à ces sauts se superposaient des oscillations qui furent délivrées par Ralph Kronig (1931, 1932) à la diffusion du photo-électron par le réseau. La spectroscopie d'absorption des rayons X (X-ray Absorption Spectroscopy, XAS) correspond à l'excitation des électrons de niveau de cœur provoquée par l'absorption d'un photon. Dans une expérience d'absorption on mesure le coefficient d'absorption des rayons X (μ) d'un échantillon en fonction de l'énergie du rayonnement incident (E). Ce coefficient est donné par la loi de Beer-Lambert à partir des intensités des faisceaux incident (I_0) et transmis (I_t) et de l'épaisseur de l'échantillon (x) :

$$I_t = I_0 \exp(-\mu x)$$

Le coefficient μ autour du seuil d'absorption de l'élément d'intérêt en fonction de l'énergie peut être déterminé par la :

- transmission du faisceau des rayons X
- fluorescence : émise à la suite de la réorganisation du nuage électronique.
- détection du courant total d'électrons.

Ainsi le spectre d'absorption d'un élément donné présente trois zones distinctes (voir la figure IV.8) :

- **La région du pré-seuil** : Dans cette zone, l'énergie du photon incident n'est pas suffisante pour exciter les électrons des niveaux de cœur de l'atome, l'absorption qui peut exister dans cette région provient des couches externes de l'atome ou bien d'autres composants de l'échantillon.
- **La région du seuil ou XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure)** : Cette zone s'étend jusqu'à 50 eV après le seuil et donne des renseignements sur les liaisons chimiques et sur la symétrie de l'atome cible.
- **La région du loin du seuil ou l'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure)** : L'étude de la structure fine s'étendant au-delà du seuil d'absorption d'énergie E_0 dans l'intervalle d'énergie de photon compris entre E_0+50 eV et E_0+1000 eV. Dans cette zone, l'électron de cœur est éjecté dans le continuum. L'énergie cinétique étant importante et le libre parcours moyen faible, le photoélectron est essentiellement impliqué dans des phénomènes de diffusion simple avec les atomes voisins. Le spectre d'absorption présente deux composantes : une fonction lentement décroissante notée $\mu_0(E)$ et une fonction oscillante autour de $\mu_1(E)$. L'onde qui est associée à ces photoélectrons va être rétrodiffusée par les atomes de la sphère de coordination de l'atome central et va interférer avec l'onde émergente. Cela donne lieu aux oscillations EXAFS dont l'étude permet de caractériser la nature et le nombre des voisins de l'atome cible, les distances absorbeur-voisins et le désordre structural au sein d'un échantillon.

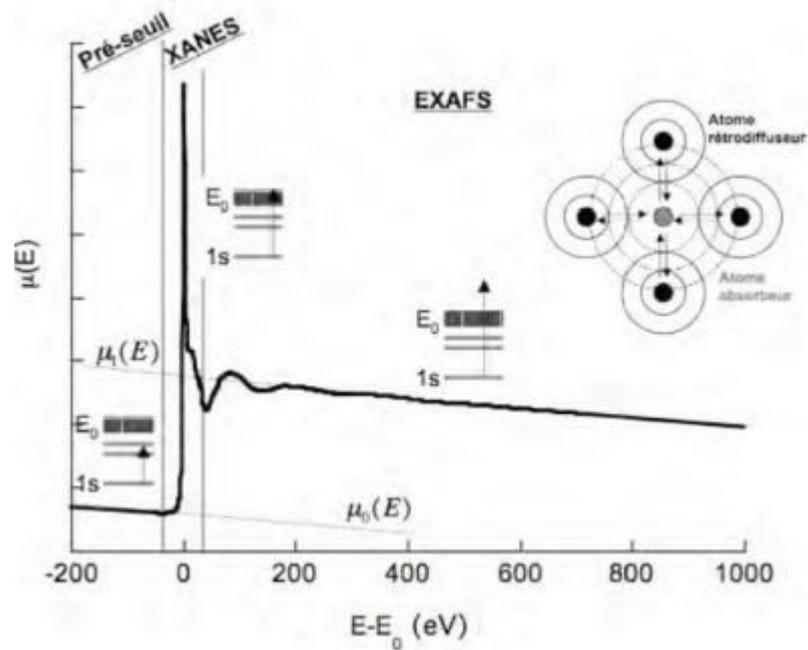


Figure IV.8 : spectre typique d'absorption avec les différentes zones

Dans les études des matériaux magnétiques, on utilise le dichroïsme magnétique circulaire (ou XMCD, pour X-ray Magnetic Circular Dichroism).

IV.5.7 Spectrométrie par fluorescence des rayons X (XRF)

La fluorescence X (XRF) est une technique d'analyse qui peut être utilisée pour déterminer la composition chimique d'une grande variété de types d'échantillons, y compris les solides, les liquides, les boues et les poudres libres. La fluorescence X est également utilisée pour déterminer l'épaisseur et la composition des couches et des revêtements. Elle peut analyser des éléments allant du béryllium (Be) à l'uranium (U) dans des gammes de concentrations allant de 100 wt% à des niveaux inférieurs au ppm. En XRF, un échantillon est exposé à des rayons X à haute énergie, ce qui provoque l'excitation des atomes de l'échantillon. Au fur et à mesure que les électrons excités reviennent à leurs niveaux d'énergie inférieurs, ils émettent des rayons X caractéristiques spécifiques aux éléments présents dans l'échantillon. En analysant l'énergie et l'intensité de ces rayons X émis, les scientifiques peuvent identifier les éléments dans l'échantillon et déterminer leurs concentrations. La représentation graphique du signal obtenu est appelé spectre brut de fluorescence X ; ce dernier présente l'intensité recueillie par le détecteur en fonction de l'énergie émise par l'échantillon (ou en longueur d'onde). Il est constitué de pics caractéristiques qui correspondent chacun à une transition électronique d'un atome constituant l'échantillon et d'un fond continu. Les différents éléments sont aisément identifiés à partir de la position des pics. L'axe des abscisses traduit les niveaux d'énergie, et l'axe des ordonnées représente le nombre de count (nombre de fois où un électron d'énergie $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$ ou $L\beta$ frappe la surface réceptrice du capteur). Le spectre de la figure suivante est le résultat brut d'une analyse de fluorescence X; il n'y a donc pas qu'un seul élément. On remarque la multiplicité des différentes raies. Nous comprenons ainsi mieux la difficulté à identifier les éléments (hauteur des pics, superposition des raies relativement proches, bruit...).

La technologie utilisée pour la séparation (dispersion), l'identification et la mesure de l'intensité du spectre de fluorescence X d'un échantillon donne lieu à deux principaux types de spectromètre : les systèmes à dispersion de longueur d'onde (WDXRF) et à dispersion d'énergie (EDXRF).

IV.5.7.1 Préparation des échantillons

Lors de l'analyse par spectrométrie XRF (fluorescence des rayons X), les échantillons peuvent se présenter sous diverses formes, et la préparation nécessaire peut varier en fonction de la nature de l'échantillon. Citons quelques exemples :

- le matériau brut sans préparation le cas d'un échantillon solide de bonne dimension, le cas des spectromètres portables.
- Dans d'autres cas, l'échantillon doit faire l'objet d'une préparation.
- Dans le cas d'un échantillon liquide (eau, huile,..), il ne nécessite pas de préparation particulière avant l'analyse ; Un petit volume d'échantillon est placé dans une coupelle dont le fond est constitué d'un film de polypropylène ou de mylar (polyester) très peu absorbant aux rayons X. Ainsi la profondeur d'absorption atteint 1 cm pour les hydrocarbures.
- dans le cas de la poudre obtenue par broyage : mise dans une coupe dont le fond est un film polymère, l'analyse se faisant sous hélium (pour éviter que la poudre ne vole sous l'effet du pompage) ; ou pressée sous la forme d'une pastille, avec ou sans liant ; les principaux liants utilisés sont la cire et la cellulose microcristalline.
- Quand au verre obtenu par dissolution du matériau préalablement réduit en poudre dans un mélange de méta borate de lithium LiBO_2 et de tétra borate de lithium $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (ce mélange est appelé fondant ou flux) : technique de la perle fondue ; c'est la technique la plus complexe, mais qui donne les meilleurs résultats pour des solides hétérogènes.



Figure IV.9: (a) échantillon liquide et (b) pastille

- **Perle Fondue (Fused Bead) :** Cette méthode de préparation implique la dissolution d'un échantillon solide dans un verre fondu, généralement un mélange de métaborate de lithium (LiBO_2) et de tétraborate de lithium ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$), appelé flux. Des dilutions sont réalisées, généralement de 1/5 (1 gramme d'échantillon à analyser et 4 grammes de flux) à 1/20. L'échantillon résultant est appelé une "perle" (bead). Cette méthode offre l'avantage de produire des échantillons homogènes avec une dilution permettant de minimiser les variations dues à la matrice. Cependant, elle peut présenter des problèmes tels que la volatilisation de certains composés à des températures élevées.
- **Échantillons Solides Bruts :** Dans certains cas, il est possible de mesurer un échantillon solide sans aucune préparation spéciale. Cependant, cela est généralement limité à des

mesures qualitatives, car l'homogénéité de l'échantillon n'est pas garantie, et les concentrations exactes peuvent varier.

- **Poudres** : Les échantillons pulvérulents ou broyés peuvent être mesurés directement en les plaçant dans un porte-échantillon transparent aux rayons X. Ces poudres peuvent être analysées en l'état ou préparées sous forme de pastilles avec un liant tel que de la cire ou de l'acide borique pour obtenir un échantillon solide mesurable sous vide.
- **Mesures sur Filtre** : Les solides collectés sur un filtre, par exemple lors du filtrage d'une solution ou de la capture de particules en suspension, peuvent être mesurés directement sur le filtre. Dans ce cas, les effets de matrice sont négligeables, et une simple calibration en mg/cm² ou µg/cm² est généralement utilisée.
- **Mesure sur Liquide** : Les liquides, tels que les solutions ou les huiles, peuvent être mesurés directement en les plaçant dans un porte-échantillon transparent aux rayons X. Une atmosphère d'hélium est souvent utilisée pour éviter l'ébullition du liquide. Il est essentiel de choisir un film plastique adapté pour éviter les réactions chimiques indésirables entre le liquide et le film.

Chacune de ces méthodes de préparation présente des avantages et des inconvénients, et le choix dépendra de la nature de l'échantillon et des objectifs de l'analyse. La préparation correcte de l'échantillon est essentielle pour obtenir des résultats précis en spectrométrie XRF.

IV.6 Spectroscopie Raman

Les spectromètres Raman compacts et modernes comportent plusieurs composants de base, notamment un faisceau laser qui sert de source d'excitation pour induire la diffusion Raman. Les instruments modernes Raman émettant des ondes de longueurs standard (532, 785, 830 et 1064 nm) sont généralement dotés de laser à semi-conducteur. Les lasers émettant des ondes plus courtes disposent de sections de diffusion Raman transversales plus importantes. Le signal est donc plus fort, mais l'incidence de la fluorescence est aussi plus élevée. C'est pourquoi de nombreux systèmes Raman sont équipés d'un laser 785 nm. L'énergie du laser est acheminée vers l'échantillon puis collectée par des câbles en fibre optique. Un filtre à fente ou à bordure permet d'éliminer la diffusion Rayleigh et anti-Stokes.

La lumière diffusée Stokes restante est transmise à un élément de dispersion, généralement une grille holographique. Un détecteur CCD capture la lumière pour générer le spectre Raman. Tous les matériaux peuvent être analysés par spectroscopie Raman, quel que soit l'état sous lequel ils se présentent (solide, liquide ou gazeux) et sans préparation préalable particulière. Importantes applications analytiques (domaine de la recherche et dans l'industrie), information principalement qualitative dans certains cas quantitatifs.

- Détermination de la structure chimique (C=O, C=C, O-H, C-O, C-C, C-S, ... etc.) ;
- Conformation : domaine biologie ;
- Détermination de la cristallinité et de l'épaisseur lamellaire (modes à basses fréquences) pour les polymères ;
- Etude des forces intra et intermoléculaires (liaison hydrogène) ;
- Etude de l'orientation des molécules (polarisation) ;
- Analyses de traces (police scientifique : drogues, explosifs, sang, peinture dans les œuvres d'art).

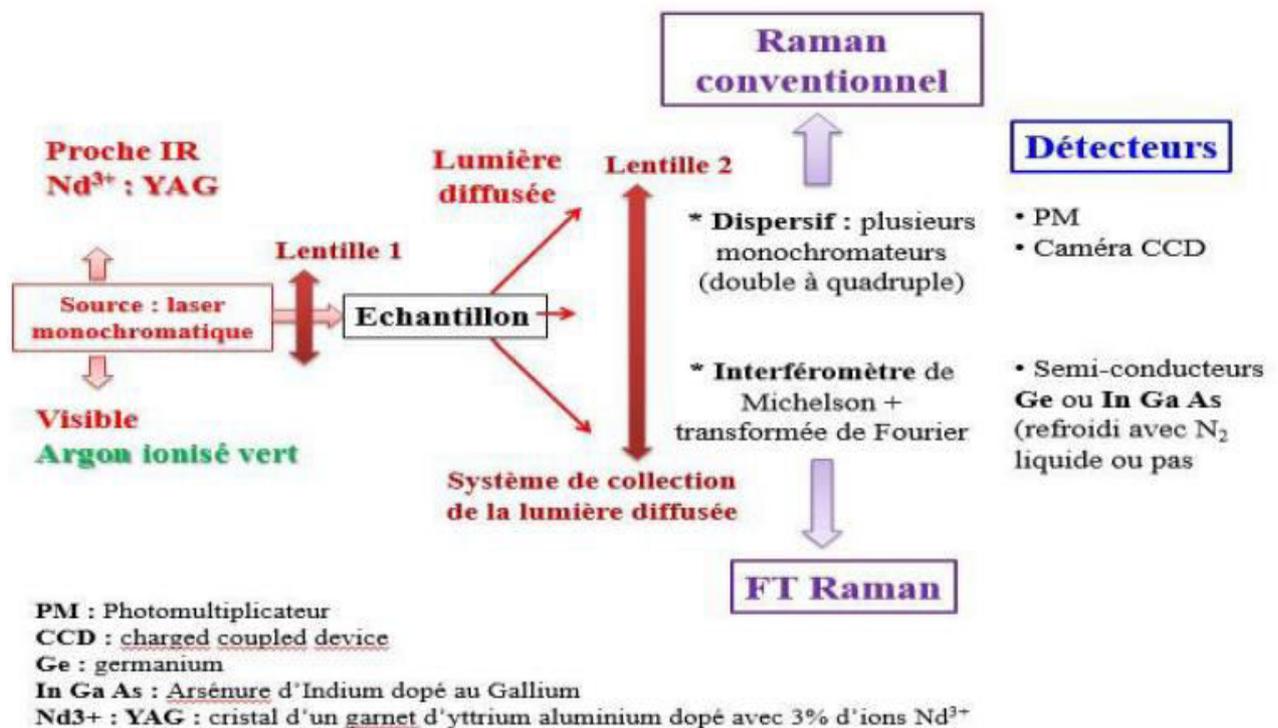


Figure IV.10 : Principe de fonctionnement de spectroscopie Raman.

IV.6.1 Préparation des échantillons pour analyse Raman

Lors de l'utilisation de dispositifs Raman portables, les échantillons peuvent être directement analysés avec peu ou pas de préparation. Ces dispositifs peuvent être utilisés pour analyser des échantillons présents sous différentes formes (poudre, cristaux, comprimés, gélules et liquide) et procéder à un balayage au travers d'une fine épaisseur de matériau d'emballage courant, comme du verre ou du plastique transparent ou translucide. Dans certains cas, toutefois, lorsque le faisceau laser ne peut pas traverser le matériau d'emballage, il peut être nécessaire de préparer l'échantillon. Pour les échantillons solides, une quantité appropriée est placée dans un paquet en plastique transparent, tandis que pour les échantillons liquides, une petite quantité est placée dans un flacon en verre transparent, en vue d'un balayage direct. Le balayage s'effectue généralement en tenant l'échantillon analysé près de l'ouverture du laser (par contact direct ou pointage, par exemple) et en pressant quelques boutons sur le dispositif Raman pour le lancement. Les résultats s'affichent ensuite à l'écran du dispositif en une à deux minutes.

Généralement, la spectroscopie Raman nécessite :

❖ Préparation de l'échantillon :

- **Nettoyage**: s'assurer que l'échantillon est propre. Les contaminants de surface peuvent perturber les mesures Raman. Utilisez des solvants appropriés, tels que l'éthanol ou l'acétone, pour éliminer les impuretés.
- **Séchage** : Éviter les résidus d'eau ou de solvant en séchant soigneusement l'échantillon avec de l'azote gazeux ou de l'air sec.
- **Montage** : s'assurer que l'échantillon est correctement monté ou fixé sur le substrat. Des méthodes telles que l'utilisation de ruban adhésif ou de supports transparents peuvent être utiles pour maintenir l'échantillon en place.

❖ Sélection du substrat :

- **Réflexion ou transmission** : Les substrats pour la spectroscopie Raman peuvent être choisis en fonction de l'application. Les substrats réfléchissants (comme les lames de verre) sont couramment utilisés pour la Raman en réflexion, tandis que les substrats transparents (comme les plaquettes de silice) sont utilisés pour la Raman en transmission.
 - **Substrats améliorés** : Les substrats métallisés, tels que l'argent ou l'or, peuvent augmenter considérablement l'intensité du signal Raman par l'effet d'amplification de surface (SERS) ou l'effet d'amplification de champ électromagnétique (EFTEM). Les substrats nanostructurés sont souvent utilisés pour exploiter ces effets.
- ❖ **Optimisation des conditions d'acquisition** :
- **Réglage du laser** : Utiliser la longueur d'onde laser appropriée pour votre échantillon. Certains matériaux présentent des résonances Raman à des longueurs d'onde spécifiques.
 - **Puissance laser** : Régler la puissance laser de manière à éviter la photodégradation de l'échantillon.
 - **Temps d'intégration** : Opter pour un temps d'intégration approprié pour obtenir un bon rapport signal/bruit sans surexposer l'échantillon.
 - **Filtrage** : Utilisez des filtres appropriés pour éliminer la lumière parasite et les raies laser.
- ❖ **Analyse des données** :
- **Correction baseline** : Souvent, les spectres Raman ont une ligne de base non linéaire due à la fluorescence. Appliquez une correction de la ligne de base pour améliorer la précision des mesures.
 - **Soustraction de fond** : Pour éliminer les raies spectrales du substrat, effectuez une soustraction de fond appropriée.
 - **Analyse statistique** : Pour les techniques avancées comme le SERS, utilisez des outils statistiques pour extraire des informations significatives.

IV.6.2 Amélioration des surfaces par des techniques de préparation témoin et de substrat en Raman

L'amélioration des surfaces par des techniques de préparation témoin et de substrat est un domaine important en spectroscopie Raman. La spectroscopie Raman est une technique de caractérisation des matériaux qui repose sur la diffusion inélastique des photons par des molécules. Elle permet d'obtenir des informations sur la composition chimique, la structure moléculaire et les interactions moléculaires d'un échantillon. La préparation témoin et le choix du substrat sont essentiels pour améliorer la sensibilité et la qualité des mesures Raman. Voici quelques techniques couramment utilisées pour améliorer les surfaces dans la spectroscopie Raman :

- ❖ **Nettoyage de surface** : Avant toute mesure Raman, il est essentiel de nettoyer soigneusement la surface de l'échantillon. Des contaminants tels que la poussière, l'huile ou d'autres substances peuvent perturber les mesures. Le nettoyage à l'aide de solvants appropriés ou de plasma est souvent nécessaire.
- ❖ **Polissage** : Pour les matériaux transparents ou à faible rugosité, le polissage de la surface peut améliorer la qualité des mesures Raman en réduisant la rugosité de la surface et en éliminant les défauts.

- ❖ **Utilisation de substrats adaptés** : Les substrats métalliques ou diélectriques peuvent être utilisés pour améliorer la sensibilité des mesures Raman. Les substrats métalliques, tels que l'argent ou l'or, sont couramment utilisés pour la spectroscopie Raman améliorée par effet de surface (SERS), qui augmente considérablement la sensibilité en raison de l'amplification électromagnétique à la surface métallique.
- ❖ **Revêtements antireflets** : Pour éviter les interférences dues à la réflexion de la lumière laser à la surface de l'échantillon, des revêtements antireflets spécifiques peuvent être appliqués sur le substrat. Ces revêtements réduisent la réflectivité et augmentent le signal Raman détecté.
- ❖ **Étalonnage du système** : Avant de commencer les mesures, il est recommandé de réaliser un étalonnage du système en utilisant une substance de référence dont le spectre Raman est bien connu. Cela permet de corriger les variations instrumentales et d'obtenir des données quantitatives précises.
- ❖ **Revêtements spécifiques** : Des revêtements spécifiques peuvent être appliqués sur les substrats pour améliorer la performance. Par exemple, des couches minces de diélectriques peuvent être déposées sur des substrats métalliques pour améliorer la sensibilité tout en maintenant les avantages de la SERS.
- ❖ **Modification chimique de la surface** : Des réactions chimiques spécifiques peuvent être utilisées pour modifier la surface de l'échantillon afin d'améliorer la sensibilité Raman. Par exemple, la fonctionnalisation de la surface avec des groupes Raman-actifs peut permettre une détection plus sensible de certaines molécules cibles.
- ❖ **Élimination de la fluorescence** : Dans certains cas, la fluorescence intrinsèque de l'échantillon peut masquer le signal Raman. Des techniques telles que la réduction de la température ou l'utilisation de longueurs d'onde laser appropriées peuvent aider à minimiser cet effet.
- ❖ **Contrôle de la rugosité**

IV.6.2.1 La diffusion Raman exaltée de surface (SERS)

La spectroscopie Raman classique (ou spontanée) est une technique très peu sensible, ce qui limite l'analyse de produits à faible concentration. Néanmoins, l'adsorption de molécules à la surface de nanostructures métalliques (principalement or et argent), permet d'exalter leur signature Raman, y compris à très faible concentration. On parlera de diffusion Raman exaltée de surface (DRES ou SERS en anglais, pour surface enhanced raman scattering). Cette adsorption doit se faire sur une surface rugueuse, dans une solution colloïdale ou sur des substrats de particules métalliques auto-assemblées ou lithographiées. L'exaltation des spectres Raman peut atteindre ainsi un facteur de l'ordre de 10^7 - 10^8 . Un autre aspect de l'effet DRES est l'extinction de la fluorescence des adsorbats. Aussi, les avantages de cette méthode facile à mettre en œuvre ont suscité de nombreuses études et des applications dans des domaines aussi variés que la médecine, la pharmacologie, la défense ou le monde de l'art. Les premières observations d'un spectre Raman exalté de surface ont été faites au milieu des années 70 dans le cas de la pyridine adsorbée à la surface d'une électrode d'argent rendue rugueuse par des cycles d'oxydo-réduction, et en solution colloïdale d'argent agrégé. L'origine de l'effet DRES est attribuée à l'amplification du champ électrique local, consécutif à l'excitation des plasmons de surface localisés (PSL).

En 1974, Fleischmann et al. observèrent pour la première fois un signal Raman de la pyridine d'une intensité exceptionnelle. Cette incroyable amplification ne fut pas directement associée à un effet «

nouveau », mais fut plutôt attribuée à une augmentation de la rugosité des électrodes d'argent après plusieurs cycles d'oxydo-réduction, avec pour conséquence une augmentation de la surface spécifique et donc du nombre de molécules de pyridine adsorbées sur cette surface. Cependant, dès 1977, Jeanmaire et Van Duyne ainsi que Creighton et Albrecht, ont été les premiers à reconnaître que cette intensification ne résultait pas uniquement des molécules concentrées en une zone mais à des propriétés intrinsèques de la surface. Ils nommèrent alors cet effet « nouveau » d'effet de surface.

En 1980, Billmann et Otto mettent en évidence, sur une électrode soumise à des cycles redox, la présence de structures à l'échelle nanométrique (rugosité de surface) et l'associe à une exaltation SERS macroscopique de 10^6 . Dans les années 1990, les équipes de Nie et Emory et de Kneipp ont enregistré les premiers spectres de molécules uniques et reporté des facteurs d'exaltation supérieurs de plusieurs ordres de grandeur. Ces deux expériences furent menées à partir de solutions colloïdales, auxquelles furent ajoutées respectivement la rhodamine 6G et le cristal violet. Afin de satisfaire certaines exigences, notamment pour éviter que le signal Raman ne provienne de plusieurs molécules, les deux équipes pionnières se placèrent dans des conditions de dilution extrême et de résonance. Il apparaît alors que le phénomène d'exaltation de surface présente des caractéristiques remarquables.

La première étant que toutes les nanoparticules ne sont pas actives puisque les spectres Raman exaltés ne sont obtenus que sur un nombre très restreint d'agrégats. Il existe donc dans l'ensemble de la population d'agrégats des individus actifs et d'autres intrinsèquement inertes vis-à-vis des phénomènes d'amplification du signal Raman. Cette observation est illustrée sur la figure suivante. Sur ces points particuliers, appelés points chauds (hots spot en anglais), la sensibilité de détection du signal Raman devient comparable à celle du signal de fluorescence, ce qui se traduit par une section efficace de diffusion Raman du même ordre de grandeur que celle de la fluorescence. Néanmoins, tous ces points ne sont présents que sur un nombre très limité de nanostructures. D'autre part, à l'échelle d'une nanostructure unique, l'augmentation de la concentration en molécules sondes conduit à l'observation d'un accroissement non linéaire accompagné d'un phénomène de saturation du signal de diffusion exaltée. Une telle évolution du signal quand on augmente le nombre de molécules par nanostructure démontre que le nombre de points chauds par agrégat est lui-même limité. Bien que certains paramètres soient encore imparfaitement compris, l'effet SERS est un phénomène complexe dont on connaît aujourd'hui les fondements théoriques. Il est maintenant établi que l'effet SERS met en jeu simultanément deux types de phénomènes.

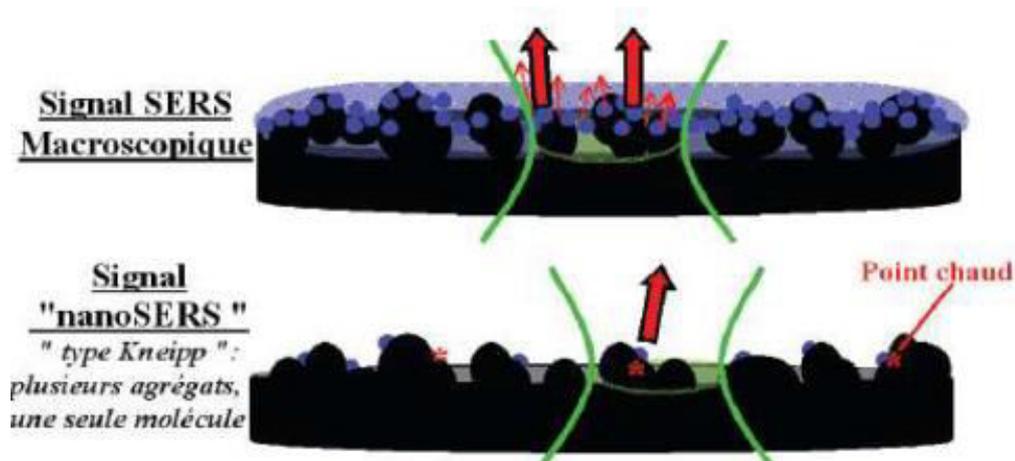


Figure IV.11 : Illustration des caractéristiques spécifiques aux expériences macro et « nano » SERS.

IV.6.2.2 Substrats pour Raman

Les substrats et les techniques de préparation de surface sont souvent utilisés pour améliorer la sensibilité et la qualité des spectres Raman. Voici quelques-unes des techniques courantes :

1. **Substrats métalliques** : Les substrats métalliques tels que l'or et l'argent peuvent augmenter l'intensité du signal Raman en amplifiant le champ électromagnétique à la surface du matériau étudié. Cela crée un phénomène connu sous le nom de "résonance de surface plasmonique", qui peut augmenter considérablement la sensibilité Raman.
2. **Substrats diélectriques** : Les substrats diélectriques tels que le silicium peuvent également être utilisés pour améliorer la sensibilité Raman. Ils peuvent réduire le bruit de fond et améliorer la résolution spectrale.
3. **Techniques de préparation de surface** : Des techniques de préparation de surface telles que la rugosité contrôlée, la gravure chimique ou la fonctionnalisation de surface peuvent être utilisées pour améliorer la sensibilité Raman. Ces techniques permettent d'augmenter la probabilité de diffusion Raman en modifiant la surface du matériau.
4. **Substrats nanostructurés** : Les substrats nanostructurés, tels que les nanostructures en nid d'abeille, les nanoparticules et les nanotubes, peuvent être utilisés pour amplifier le signal Raman en augmentant la surface spécifique disponible pour l'interaction Raman.
5. **Substrats à résonance** : Les substrats à résonance sont conçus pour correspondre à une fréquence spécifique de vibration moléculaire. Cela peut considérablement améliorer la sensibilité Raman pour les molécules spécifiques ciblées.

L'utilisation de substrats et de techniques de préparation de surface en spectroscopie Raman dépendra de la nature du matériau étudié, de l'objectif de l'expérience et de la sensibilité recherchée. Il est important de noter que le choix du substrat et des techniques de préparation de surface doit être fait avec soin, car ils peuvent influencer les résultats de manière significative. De plus, il est essentiel de bien comprendre les interactions entre le matériau d'essai, le substrat et la lumière Raman pour interpréter correctement les données obtenues.

IV.6.2 .2.1 Substrats "SERS-actifs" pour la détection

L'aspect le plus critique du SERS est donc la recherche de substrats efficaces, avec des paramètres physiques appropriés tels que la nature, la taille, la forme et l'espacement des nanostructures à l'origine de l'exaltation. Généralement, les systèmes à base de nanostructures d'Ag et d'Au sont considérés comme parmi les meilleurs candidats. Les trois catégories de systèmes SERS-actifs les plus répandus sont les nanostructures directement fabriquées sur des substrats solides, les nanoparticules métalliques en suspension et les nanoparticules métalliques organisées sur des substrats solides. Néanmoins, la fabrication de substrats SERS avec une sensibilité et une stabilité élevée reste difficile et coûte assez cher à l'industrialisation.

IV.6.2.2.2 Nanostructuration de surface

L'effet SERS a été observé pour la première fois à travers le signal de la molécule de pyridine sur la surface rugueuse d'une électrode d'argent. Depuis, différentes méthodes ont été utilisées pour nanostructurer la surface d'un métal.

- ❖ **Ablation laser** : L'ablation laser est une méthode souple pour la fabrication de substrats SERS actifs sur une grande zone. Elle consiste en un balayage du laser horizontalement et verticalement formant des micro-carrés sur des surfaces de Si qui sont ensuite recouvertes d'une couche mince d'Ag. Cette approche permet l'obtention de substrats présentant une homogénéité de signal, des facteurs élevés d'amplification du signal SERS et une bonne stabilité chimique. Cependant, elle demeure coûteuse et nécessite des temps d'élaboration assez longs pour obtenir des substrats avec de grandes zones actives.
- ❖ **Lithographie par faisceau d'électrons** : L'utilisation d'un faisceau d'électrons pour créer des motifs sur une surface est connue sous le nom de lithographie par faisceau d'électrons. Cette technique permet de repousser les limites de la diffraction de la lumière et de dessiner des motifs en offrant un contrôle précis de la géométrie des nanostructures avec une résolution pouvant aller jusqu'à environ 10 nm et en garantissant une reproductibilité de fabrication. Les substrats obtenus par lithographie par faisceau d'électrons montrent une grande stabilité et bonne reproductibilité et peuvent être optimisés pour travailler aux longueurs d'onde désirées. Néanmoins, cette méthode présente quelques inconvénients. Le temps requis pour élaborer un substrat de grande taille est très long et la technique reste assez coûteuse.

IV.6.2.2.3 Nanoparticules métalliques en suspension

Les colloïdes d'Au et d'Ag sont des systèmes SERS-actifs typiques. Ces nanoparticules métalliques sont stables, faciles à la fabrication, et présentent d'excellents signaux SERS. Les nanoparticules métalliques en suspension peuvent être préparées par des méthodes physiques ou chimiques. Une des méthodes physiques est l'ablation de laser pulsé de métaux en milieu liquide. Dans cette méthode, des nanoparticules d'Ag et d'Au stabilisées sont obtenues en plaçant une cible dans l'eau ou dans un solvant organique. Les impulsions laser concentrées sur la cible produisent un plasma qui pulvérise le matériau de la cible. Le matériau pulvérisé se retrouve en contact avec les espèces présentes dans le liquide, ce qui va mener à la nucléation et la croissance des nanoparticules. L'avantage de cette technique est que les nanoparticules sont exemptes d'espèces organiques ou ioniques. La taille des particules dépend du temps d'irradiation, plus il est long et plus les particules sont petites.

La méthode chimique d'élaboration de colloïdes d'Au et d'Ag la plus répandue est la réduction des ions d'argent ou d'or dans une solution, généralement aqueuse, en utilisant des agents réducteurs

tels que le citrate ou le borohydrure de sodium. Les méthodes chimiques de réduction emploient également des agents qui empêchent l'agrégation des particules. Les étapes de nucléation et de croissance pendant la réduction chimique déterminent la distribution de taille des particules. Pendant le processus de nucléation, les atomes métalliques se combinent et forment des groupes puis des noyaux. Pendant l'étape de croissance, les noyaux, ou "germes", se développent pour former des nanoparticules. La taille des particules peut être contrôlée avec la concentration et la puissance de l'agent réducteur. En général, un agent puissant tel que le borohydrure de sodium produit de grosses particules alors qu'un agent plus faible comme le citrate de sodium donne des particules plus petites. De plus, la forme des nanoparticules peut être contrôlée en ajoutant des surfactants durant la synthèse. Selon le surfactant et la nature du métal choisi, une grande variété de formes peut être obtenue telle que les nano-tiges, les nano-sphères, les nano-triangles et les nano-étoiles.

Concernant les nanoparticules bimétalliques Au-Ag, elles peuvent être préparées par différentes méthodes, parmi les plus répandues on peut citer l'utilisation de sels métalliques tels que le HAuCl_4 et le AgNO_3 et leur réduction simultanée avec du citrate de sodium, ainsi que la synthèse par irradiation laser en présence d'alcool polyvinylique d'un mélange de HAuCl_4 et d' AgNO_3 , d'un mélange de nanoparticules d'au et d' AgNO_3 ou encore d'un mélange de nanoparticules d'au et d'Ag.

IV.6.2.2.4 Nanoparticules métalliques sur des substrats solides

L'immobilisation des nanoparticules sur un substrat solide fournit un moyen permettant d'amener les nanoparticules à proximité les unes des autres. Une des méthodes consiste à fonctionnaliser le substrat pour ancrer des particules d'au ou d'Ag. Dans cette approche, les substrats de silice sont fonctionnalisés par silanisation avec du (3-mercaptopropyl) triméthoxysilane (MPMS) et les particules d'au ou d'Ag sont préparées par la réduction respectivement de HAuCl_4 ou AgNO_3 par le triacétate de sodium. Les substrats sont par la suite immergés dans les solutions colloïdales de nanoparticules métalliques qui viennent s'ancrer à la surface. Une autre technique consiste à déposer des nanoparticules métalliques en solution colloïdale par séchage ou évaporation de solvant sur un substrat solide. L'attrait des substrats obtenus par cette méthode réside dans la variété de morphologies accessibles mais également dans la facilité du processus de fabrication. Cependant, le contrôle limité de la taille et de la forme des nanoparticules de même que de la distribution de ces paramètres n'en fait pas une méthode de choix pour des mesures SERS reproductibles.

IV.6.2.2.5 Substrats SERS commercialisés

Il existe un certain nombre de substrats SERS-actifs commercialisés peu coûteux, compacts, et robustes. Malheureusement, la plupart des fournisseurs de ces substrats n'offrent que très peu de détails sur leurs méthodes de fabrication. Il existe également très peu d'informations sur la performance de ces substrats. Real Time Analyzers a été parmi les premières entreprises à proposer des substrats SERS-actifs présentant une durée de vie supérieure à un an. Ceux-ci sont constitués de nanoparticules d'Ag dispersées au sein d'une matrice poreuse élaborée par voie sol-gel. De son côté, Sigma-Aldrich produit des nanoparticules d'au revêtues de silice de 5 nm, 10 nm et 20 nm de diamètre ainsi que des nanobâtonnets d'au enrobés de silice, de 10 nm de diamètre. Horiba Scientific propose des substrats SERS-actifs de $4 \times 3 \text{ mm}^2$ ou $5 \times 7 \text{ mm}^2$ recouverts de nanobâtonnets d'au. De même, Ocean Optics propose des substrats SERS constitués de nanofils d'Ag ou d'au avec

une zone active de forme carrée ($4 \times 4 \text{ mm}^2$) ou circulaire (diamètre 5 mm). Notons que Ato ID commercialise des substrats SERS jetables. Ces substrats sont réactifs, par conséquent, ils doivent être stockés sous vide et ne sont utilisables que pendant deux mois après la date de fabrication. Enfin, Mesophonics a développé des substrats Klarite® constitués d'un réseau de puits pyramidaux gravés dans du silicium par lithographie. Les dimensions des puits sont calculées pour produire des plasmons localisés avec des propriétés idéales pour l'exaltation du signal SERS, la surface étant revêtue d'une couche d'Or pour la rendre active.

IV. 7 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Cet échantillon peut être à l'état gazeux, solide ou liquide. Elle permet via l'absorption des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques présentes dans la matière. Le principe du FTIR repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge lorsque la longueur d'onde (l'énergie) du faisceau est égale à l'énergie de vibration de la molécule.

Le domaine infrarouge (IR) du spectre électromagnétique peut être divisé en trois régions selon les longueurs d'onde : le lointain IR entre 25 et 1000 μm ($4000 - 13000 \text{ cm}^{-1}$), le moyen IR entre 2,5 et 25 μm ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) et le proche IR entre 0,75 et 2,5 μm ($10 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Suivant ces régions, des phénomènes différents sont observés en spectroscopie IR. En lointain IR, se sont les rotations moléculaires qui sont étudiées, dans le moyen IR, les vibrations (et les rotations-vibrations), et dans le proche IR des vibrations plus complexes comme des harmoniques ou des combinaisons. La spectroscopie d'absorption infrarouge peut exploiter deux interactions rayonnement-matière différentes : la transmission et la réflexion. Le plus courant est de déterminer l'absorbance d'un matériau en mesurant, par rapport à l'intensité du rayonnement incident, celle du rayonnement transmis. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des échantillons de faible épaisseur. Ce mode d'analyse est très courant pour les gaz et les liquides.

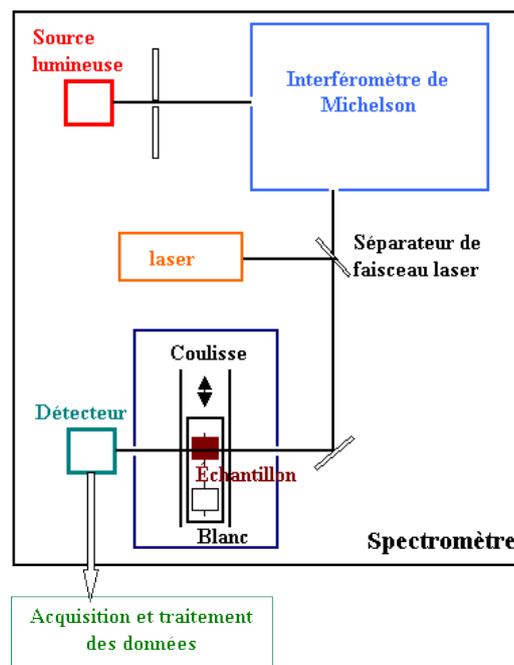


Figure IV. 7 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier.

IV.7.1 Préparation d'un échantillon Infrarouge

Suivant la nature de l'échantillon, solide ou liquide, les techniques diffèrent. Un solide sera broyé en présence de bromure de potassium (qui est transparent jusqu'à 400 cm^{-1}) puis comprimé sous pression réduite pour former une fine pastille. Une autre technique consiste à disperser le solide dans une paraffine (le nujol) et à déposer la suspension sur une pastille de chlorure de sodium monocristallin (transparent jusqu'à 625 cm^{-1}). Un liquide sera déposé entre deux pastilles de chlorure de sodium monocristallin comprimées, de manière à obtenir un film fin, ou placé dans une cuve dont les fenêtres seront des monocristaux de chlorure de sodium ou de fluorure de calcium (qui a l'avantage de ne pas être altéré par l'eau). Dans le cas des liquides purs, l'épaisseur de la cuve est souvent trop importante pour obtenir un spectre de qualité satisfaisante.

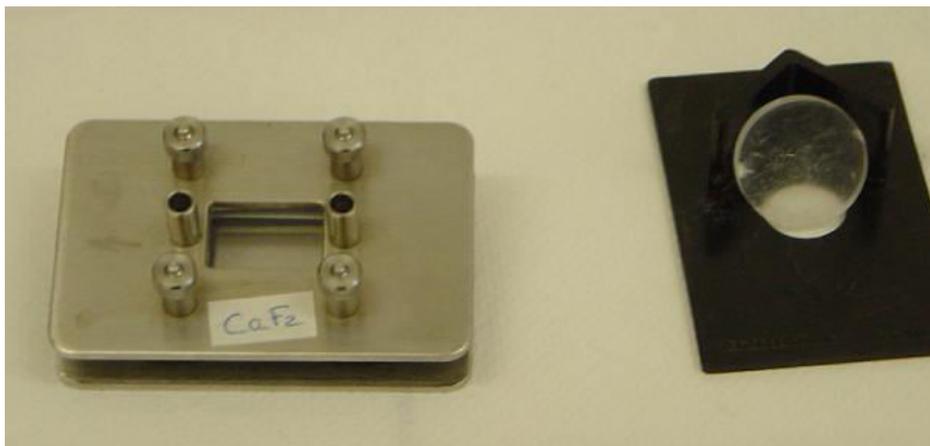


Figure IV.8 : Cuve en fluorure de calcium (CaF_2) et monocristal de chlorure de sodium

Une autre technique, valable aussi bien pour les liquides que les solides, consiste à préparer une solution diluée du produit dans un solvant, puis à étudier cette solution dans les cuves précédemment décrites. Il faut noter que tous les solvants possèdent des bandes d'absorption en infrarouge et qu'il est nécessaire de compenser ses bandes par une référence. La compensation n'étant pas toujours parfaite, les solvants utilisés pour les solutions sont choisis pour ne pas présenter de bandes d'absorption dans les zones particulièrement intéressantes du spectre. Les plus couramment employés sont le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le sulfure de carbone (CS_2).

IV. 7.2 Amélioration des surfaces par des techniques de préparation témoin et de substrat en spectroscopie infrarouge

IV.7.2.1 Spectroscopie Infrarouge Exaltée de Surface (Surface Enhanced InfraRed Absorption : SEIRA)

L'effet SEIRA a été observé pour la première fois en 1980 par Hartstein et al. Ils ont montré que l'absorption infrarouge d'une monocouche d'acide 4-nitrobenzoïque est amplifiée lorsqu'elle est en contact avec un film métallique rugueux d'argent de quelques dizaines d'Angströms d'épaisseur. Un facteur d'exaltation de 20 a été démontré entre les différentes épaisseurs métalliques. Aussi, l'intérêt de ce phénomène est encore mis en relief par les dizaines d'autres auteurs ayant publié des articles sur l'effet SEIRA. Il existe deux principaux mécanismes à l'origine des phénomènes d'exaltation observés. Il s'agit de l'effet électromagnétique et de l'effet chimique, qui contribuent chacun à leur manière à l'exaltation finale.

❖ Origine électromagnétique

- **La résonance plasmonique de surface** : Les métaux comme l'or, l'argent, le cuivre ou encore l'aluminium possèdent des propriétés optiques très différentes des milieux diélectriques. Ils sont, par exemple, utilisés comme matériaux pour miroir en raison de leur très bonne capacité à réfléchir la lumière. Ces propriétés particulières trouvent leur explication dans les structures atomiques de ces métaux et la présence d'électrons de conduction libres se déplaçant autour d'ions positivement chargés. L'utilisation de nanoparticules métalliques pour modifier les propriétés optiques de certains matériaux est une technique qui date de l'antiquité. Lorsqu'un faisceau lumineux irradie une nanoparticule métallique, la lumière peut faire osciller les électrons de conduction libres du métal par rapport à leur état d'équilibre. Il y a alors transfert d'énergie de la lumière vers les électrons libres des nanoparticules. Pour décrire ce phénomène, le concept de plasmon est apparu dans les années 1950. Selon Pines, « un plasmon est une quasi-particule quantique représentant les excitations ou modes élémentaires des oscillations de densité de charge dans un plasma ». On distingue différents types de plasmon comme les plasmons de surface délocalisés, les plasmons de surface localisés et les plasmons de surface propagatifs. Ces différents types sont générés suivant les dimensions des structures métalliques.
- ❖ **Champ électrique local** : Les plasmons de surface engendrent un champ électrique local évanescent à l'interface métal/diélectrique. Dans le cas du SEIRA, seuls les plasmons de surface localisés et propagatifs sont à considérer. Sous l'influence du champ électrique de la lumière, la nanosphère se polarise créant ainsi un nouveau champ électrique dit champ électrique local induit qui se répartit tout autour de la sphère. Les lignes de champ électrique autour de cette sphère métallique polarisée sont normales à la surface en tout point. Ces champs évanescents créés localement vont pouvoir interagir avec des molécules situées au voisinage de la nanoparticule en induisant notamment une augmentation de l'absorption de l'énergie de la lumière qui est la base de l'effet SEIRA. Lorsque le facteur d'excentricité augmente pour des nanoparticules allongées, les charges s'accumulent préférentiellement aux extrémités créant ainsi des effets de pointe. Le champ électrique local induit est alors maximal à ces extrémités. Pour l'effet SEIRA, il nous faut disposer de structures amplifiant le champ électrique local dans le moyen IR.
- ❖ **Origine chimique** : Plusieurs descriptions de ce mécanisme existent dans la littérature montrant qu'il demeure assez mal connu même si son origine semble être identique. Il s'agirait d'un transfert de charge du métal vers les orbitales moléculaires de la molécule liée au dit métal. La structure électronique de la molécule serait alors perturbée par celle du métal modifiant alors la polarisabilité du composé, amplifiant davantage sa réponse optique. C'est notamment le phénomène qui permet l'exaltation du signal en spectroscopie Raman exaltée de surface (effet SERS) et qui interviendrait aussi pour l'effet SEIRA. Par ailleurs, le coefficient d'absorption qui nous intéresse pour l'effet SEIRA de molécules liées au métal par une liaison chimique est plus important sous l'effet des oscillations de charge du métal.

La dernière contribution au phénomène SEIRA est communément appelée "règles de sélection de surface". L'organisation des molécules sur une surface métallique (Figure 1-4) va modifier le signal mesuré en spectroscopie de vibration.

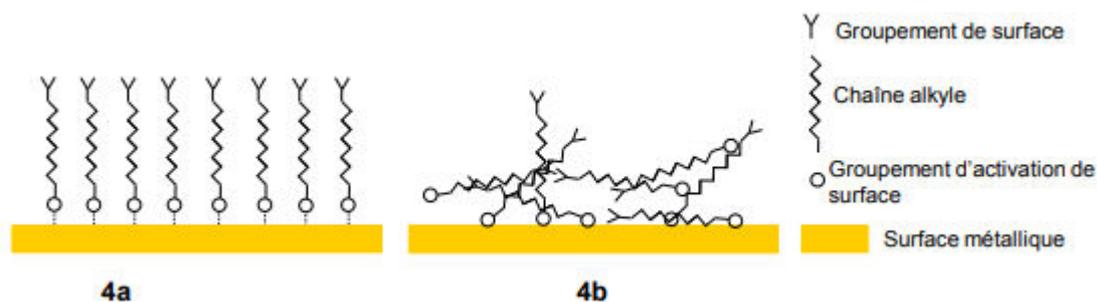


Figure IV .9 : Représentation de molécules chimisorbées formant une monocouche auto-assemblée (4a) et physisorbées (4b) sur une surface métallique.

Les molécules peuvent créer une liaison chimique, par l'intermédiaire du groupement d'activation de surface, leur permettant d'être adsorbées à la surface du métal (Figure IV.9a). Cela induit une mise en commun des électrons nécessaire pour l'effet SEIRA (et pour l'effet SERS) comme il vient d'être montré dans la partie précédente. Ce processus est appelé la chimisorption et après un certain nombre de réactions, des molécules spécifiques peuvent être ordonnées en surface formant alors une monocouche auto-assemblée (ou SAMs pour Self Assembled Monolayers). Souvent, ces composés possèdent un groupement d'activation de surface nitro (NO_2) ou thiol (SH). La conséquence est que certaines bandes de vibration vont s'éteindre lors de la mesure. La condition pour qu'un mode de vibration soit actif par les phénomènes d'exaltation est que son moment dipolaire doit être colinéaire aux lignes de champ. C'est notamment le cas pour les molécules chimisorbées et notamment les monocouches auto-assemblées qui favorisent alors des groupements orientés dans la même direction que le champ électrique local induit. Au contraire, les molécules n'ayant pas établi de liaison chimique avec la surface métallique ont une probabilité plus grande d'être désordonnées (Figure IV.9b) et l'on parle de physisorption. Dans ce cas, le signal mesuré prend en compte toutes les liaisons chimiques de la molécule qui sont aléatoirement orientées. L'orientation des molécules sondées est donc un critère important pour leur observation par des phénomènes d'exaltation de surface. Les oscillations de plasmons de surface se produisent à une certaine fréquence qui correspond à la bande plasmon. Plusieurs mécanismes permettent de comprendre les phénomènes d'exaltation et la bande plasmon dépend de différents critères liés au métal ou au faisceau lumineux.

- ❖ **Choix du métal :** Les principes de base qui gouvernent l'effet SEIRA et donc les exaltations sont principalement liés aux oscillations collectives des électrons de surface de nanoparticules métalliques. De nombreux métaux sont donc potentiellement candidats pour ces phénomènes d'exaltation. En effet, dans la littérature, il existe de nombreuses études sur l'effet SEIRA utilisant différents métaux. Les nanoparticules d'argent, qui ont été à l'origine de la découverte de l'effet SEIRA, même si par la suite les nanoparticules d'or ont reçu plus d'attention. Cependant, d'autres métaux comme le nickel, le palladium, l'indium, le platine, l'étain, le fer, le zinc ou le cuivre ont prouvé leur efficacité quand à l'exaltation de surface. Ces métaux ont tous leurs propres caractéristiques chimiques, physiques ou optiques et selon l'application visée, le choix du métal peut s'avérer nécessaire. Par exemple, l'or est souvent utilisé en raison de sa résistance à l'oxydation, sa réactivité chimique notamment

pour les composés possédant un groupement SH et de sa biocompatibilité. Cependant, la bande plasmon de l'argent est plus fine et plus sensible au changement d'indice de réfraction du milieu rendant alors son utilisation plus aisée pour les capteurs SPR.

- ❖ **Influence de la morphologie et du couplage sur la bande plasmon** : L'interaction d'une onde lumineuse avec une nanoparticule métallique engendre une résonance des électrons de conduction correspondant à la bande plasmon qui se traduit par l'absorption de la lumière à la condition de résonance. Cependant, lorsque que l'on mesure cette absorption, la diffusion de la lumière peut s'ajouter à cette dernière. La taille et la géométrie d'une nanoparticule métallique va alors influencer ses caractéristiques optiques. Par exemple, Les nanosphères et les nanocubes ne peuvent s'utiliser que dans le domaine du visible. Pour avoir une fréquence de résonance des plasmons située dans l'infrarouge dans le cadre de l'effet SEIRA, certaines nanostructures sont bien adaptées comme les nanocoquilles sphériques et les nanoantennes dont la bande plasmon peut se situer jusqu'à 10 μm . Le domaine d'utilisation des nanocoquilles ellipsoïdales et des nanoprismes est limité au proche-infrarouge. Pour avoir des résonances situées dans le domaine infrarouge, il faut privilégier des nanoparticules au facteur d'excentricité élevé comme pour les nanoantennes ou alors des structures ayant une enveloppe métallique comme les nanocoquilles. Le couplage de matrice des nanoparticules à trois puis sept nanocoquilles sphériques permet de décaler la bande plasmon vers le domaine infrarouge.
- ❖ **Sélection du substrat transparent dans l'infrarouge** : L'observation des phénomènes d'exaltation dans le domaine infrarouge à l'aide de nanoparticules métalliques nécessite comme support aux nanoparticules un matériau ou substrat qui soit transparent au rayonnement infrarouge. De nombreuses études sur l'effet SEIRA ont été réalisées avec différents substrats comme CaF_2 , ZnS , ZnSe , Ge. Les indices de réfraction et les constantes diélectriques sont propres à chaque matériau et conditionnent la fréquence de résonance des plasmons. La permittivité relative du milieu environnant une nanoparticule métallique influence aussi la position et l'intensité des bandes d'extinction, de diffusion et d'absorption.

Par analogie avec l'effet SERS, l'effet SEIRA se traduit par une exaltation du signal de molécules en contact ou au voisinage d'un film métallique rugueux ou de nanoparticules métalliques. Les bandes amplifiées peuvent parfois présenter une déformation attribuée à la résonance de type Fano qui est, en plus de l'exaltation, une caractéristique de l'effet SEIRA. Par ailleurs, selon la morphologie (géométrie, épaisseur, densité) des nanoparticules métalliques, les facteurs d'exaltation sont plus ou moins importants. Dans tous les cas, des spectrophotomètres infrarouges à transformée de Fourier sont utilisés de nos jours en réalisant une analyse simultanée de toute la bande spectrale choisie à partir du signal enregistré, grâce à un interféromètre de Michelson placé entre la source et l'échantillon.

- ❖ **Transmission infrarouge** : Le mode transmission infrarouge a été le plus largement utilisé en raison de sa simplicité de mise en œuvre et est la possibilité d'utiliser différentes références comme par exemple un substrat avec ou sans dépôt métallique, ou bien l'air. Son principe est représenté sur la Figure IV.12. Lorsque la surface du substrat est recouverte de nanoparticules d'or, il suffit de placer l'échantillon sur un porte échantillon à l'intérieur du spectrophotomètre. En effet, la surface sondée sera grande. L'utilisation complémentaire d'un microscope infrarouge peut s'avérer nécessaire lorsque les nanostructures métalliques sont localisées dans une certaine

zone de la surface du substrat. Par exemple, pour les nanoantennes, les zones concernées ont des dimensions de quelques dizaines de micromètres. Il faut donc focaliser le faisceau sur ces zones d'intérêt. Les spectres SEIRA de molécules en mode transmission peuvent directement être comparés avec ceux des fabricants pour localiser les bandes caractéristiques.

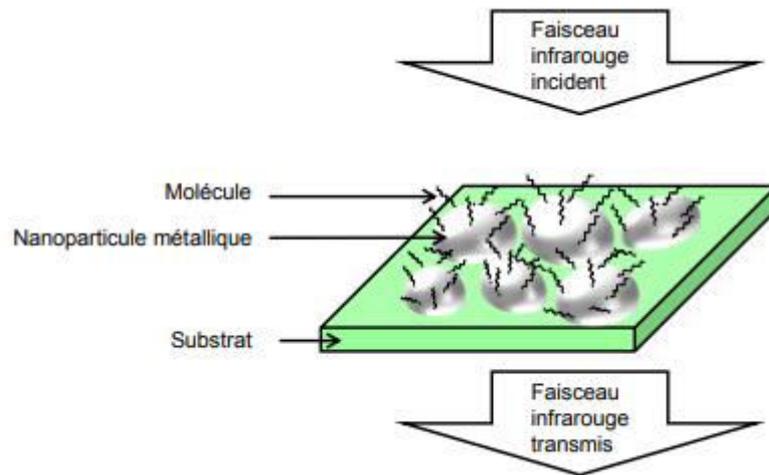


Figure IV.12 : schéma de principe d'une mesure en mode transmission avec un substrat SEIRA.

❖ **Réflexion/Absorption** : En mode réflexion/absorption, le faisceau infrarouge incident arrive à la surface du substrat avec un certain angle. Les molécules vont absorber aux longueurs d'onde caractéristiques et le signal va repartir vers le détecteur (Figure IV.13). De même que pour le mode transmission, un microscope infrarouge peut s'avérer nécessaire afin de récolter le maximum de signal. L'inconvénient principal de ce mode est la perte d'une partie du rayonnement incident par diffusion ou transmission au travers de l'échantillon. Il est donc très peu utilisé pour caractériser l'effet SEIRA.

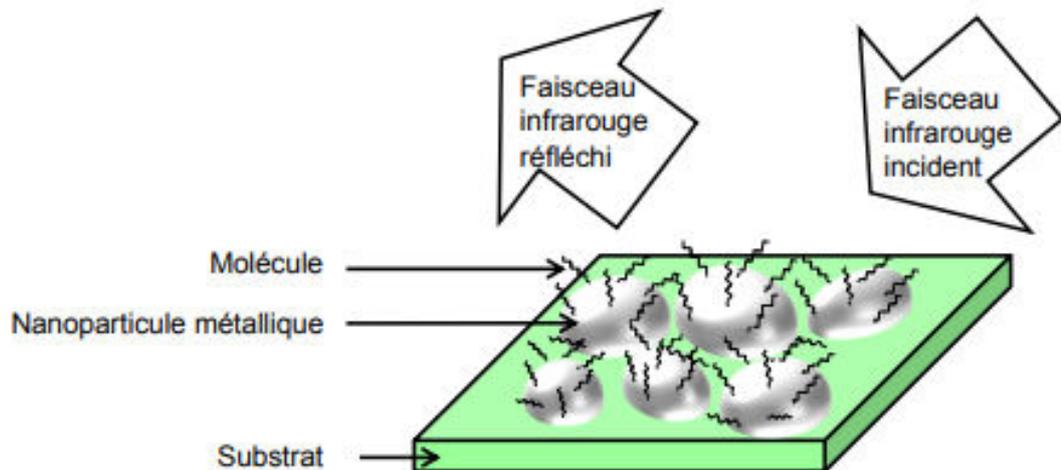


Figure IV.13 : Schéma de principe d'une mesure en mode réflexion/absorption avec un substrat SEIRA.

❖ **Réflexion totale atténuée** : ce mode a permis de montrer pour la première fois l'effet SEIRA. Il est basé sur le principe de la création d'une onde évanescente après réflexion à l'interface entre deux matériaux d'indice de réfraction différents (Figure IV.14). Cette onde est générée lorsque l'angle du faisceau incident est supérieur à l'angle critique. Il y aura une

réflexion totale sur chacune des faces à l'intérieur du substrat. La présence d'un composé en surface induit des absorptions à certaines longueurs d'onde infrarouge et la réflexion sera donc atténuée. Ce mode est particulièrement bien adapté pour la détection de composés en solution aqueuse car il permet de s'affranchir de l'absorption importante de l'eau. Par exemple, la détection d'hydrocarbures en solution aqueuse est possible. Un film polymère hydrophobe est déposé à la surface du substrat sans nanoparticules métalliques. L'hydrocarbure est pré-concentré ou extrait dans cette matrice et va pouvoir être sondé par l'onde évanescente. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas encore d'études sur l'effet SEIRA en mode ATR utilisant un film polymère. La mise en œuvre de cette technique est moins aisée que les deux premières et de grandes surfaces nanostructurées sont nécessaires. Il est important de souligner que l'exaltation dépend de l'angle d'incidence du faisceau incident.

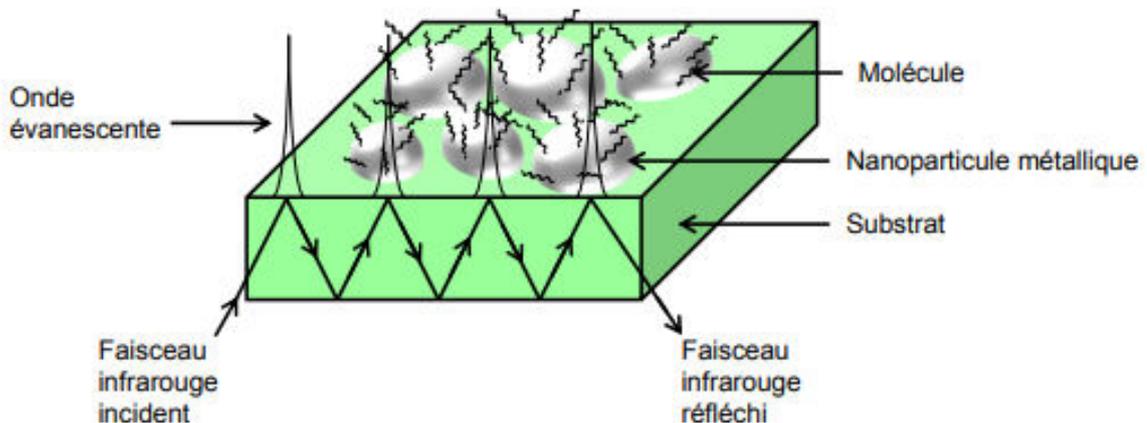


Figure IV. 14 : Schéma de principe d'une mesure en mode réflexion totale atténuée avec un substrat SEIRA.

IV.7.2.2 Les voies de synthèse des nanoparticules métalliques

La synthèse de ces nanoparticules est donc un enjeu majeur et ces dernières années ont vu l'apparition de nouvelles techniques de synthèse même si les techniques de base restent encore employées. Les techniques les plus courantes de synthèse de nanoparticules métalliques pour l'effet SEIRA sont :

- ❖ **Processus physiques : pulvérisation cathodique et évaporation thermique :** Ils permettent d'obtenir des films minces métalliques plus ou moins structurés ou rugueux formés de nanostructures sphériques comme des îlots ou des plots. Il est toutefois nécessaire de maîtriser les paramètres de dépôt. Ces deux techniques reposent sur le principe d'expulsion atomique d'une cible métallique sur un substrat placé à l'intérieur d'une enceinte sous vide. Il est aussi possible de fabriquer des nanocoquilles sphériques et des nanoprismes en pulvérisant le métal par-dessus des nanosphères préalablement déposées sur le substrat qui servent alors de masque. Les nanocoquilles sphériques sont directement formées et les nanoprismes sont révélés par retrait du masque.

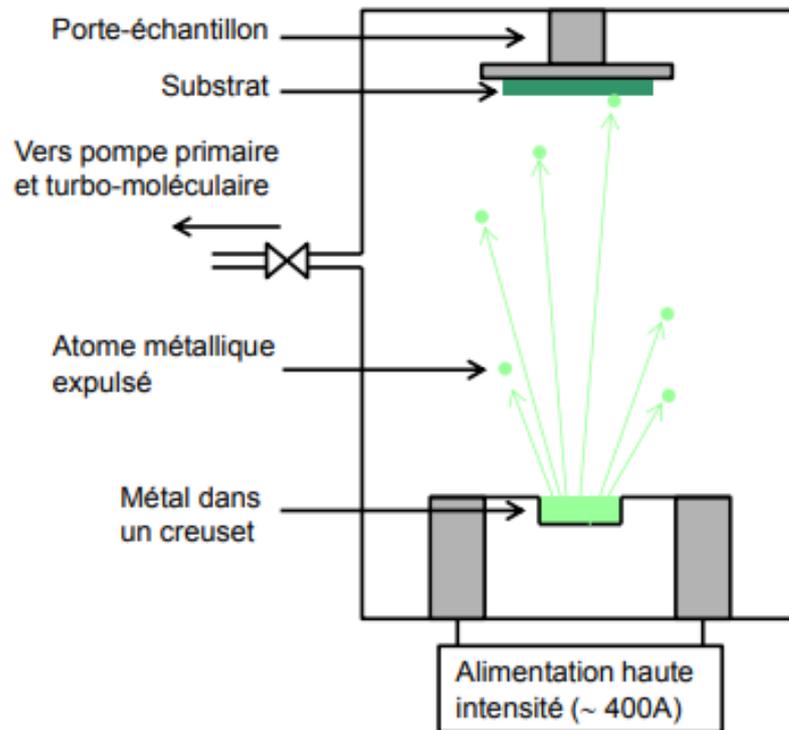


Figure IV.10 : Schéma de principe d'un dépôt métallique en phase vapeur

- ❖ **La seconde méthode par voie physique** est le dépôt en phase vapeur ou évaporation thermique. Dans ce cas Le métal à évaporer est introduit dans un creuset relié à une alimentation haute intensité d'environ 400 A. Le substrat, préalablement nettoyé, est placé sur un porte-échantillon en face du creuset à quelques centimètres. Il peut être orienté de façon parallèle au creuset ou avec un certain angle pour générer des structures anisotropiques. L'ensemble du dispositif à l'intérieur de l'enceinte est soumis à un vide d'environ 10^{-6} à 10^{-7} mbar. Le creuset étant relié à l'alimentation haute intensité, celui-ci est chauffé par effet Joules jusqu'à la température de fusion du métal. Après la fusion, il se sublime ou s'évapore en fonction des conditions de pression et de température puis se condense à la surface du substrat. L'avantage de cette méthode, comparé à la pulvérisation cathodique, est qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'un gaz inerte pour générer un plasma qui est à la base de la pulvérisation cathodique. Par ailleurs, il est possible de recouvrir des surfaces relativement grandes comme dans le cas de la pulvérisation cathodique. Il n'est cependant pas possible de contrôler la morphologie des nanoparticules directement sauf par l'utilisation d'un masque préalablement déposé sur le substrat.
- ❖ **Lithographie électronique** : Elle est souvent utilisée pour la synthèse de nanoparticules métalliques est la lithographie par faisceau électronique dont le principe est présenté sur la Figure suivante.

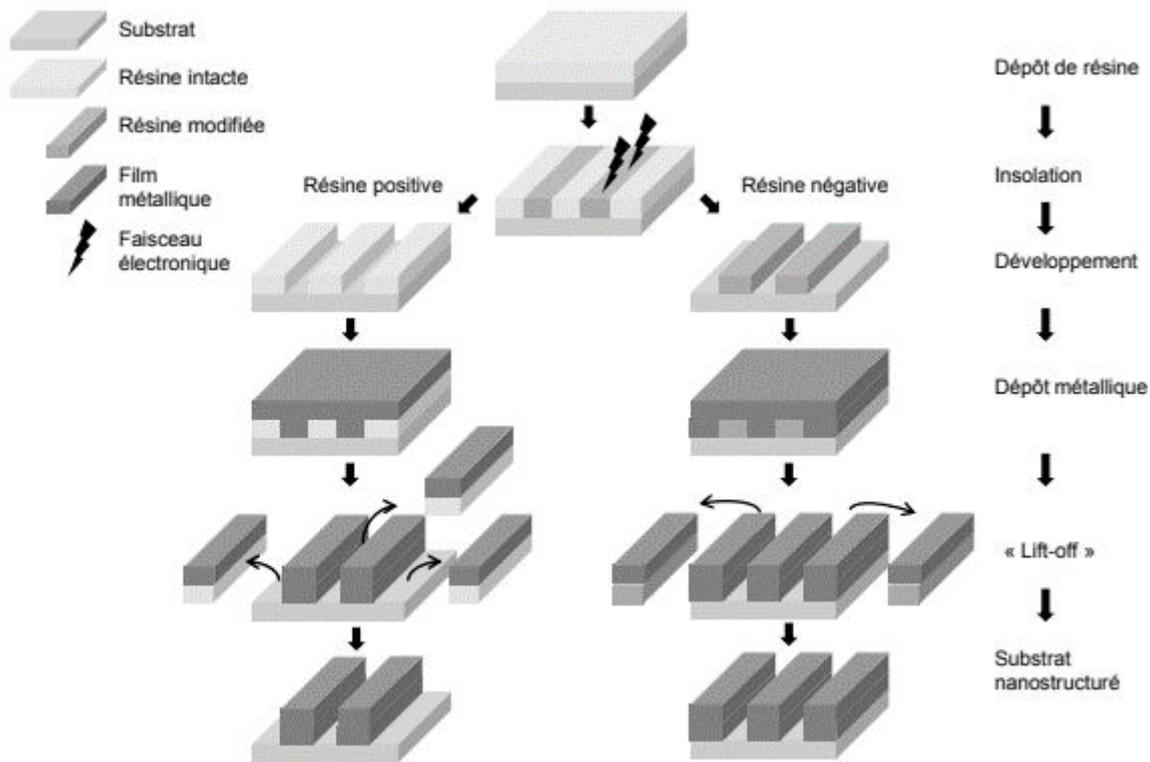


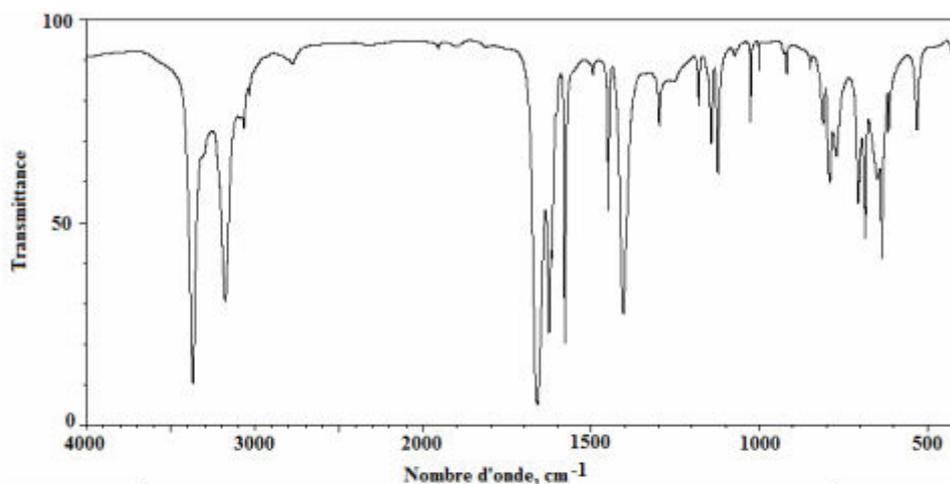
Figure IV.11 : Schéma de principe de nanostructuration métallique d'un substrat par lithographie électronique.

Le principe de base est l'irradiation d'un matériau électrosensible, généralement une résine, dont les propriétés chimiques vont être modifiées sous l'influence du faisceau d'électrons lors de l'insolation. Les résines sont composées d'une matrice insensible au rayonnement et d'un composé actif qui lui est sensible aux électrons. Durant le développement, ce composé va soit accélérer la dissolution de la résine dans un solvant et l'on parle alors de résine positive. A l'inverse, une résine négative devient plus résistante et ne subit pas la dissolution. Par la suite, un dépôt métallique par évaporation sous vide est réalisé avec généralement un pré-dépôt de chrome dans le cas de film d'or pour assurer une bonne accroche sur le substrat. Il s'agit ensuite de dissoudre la résine dans un solvant par le procédé « lift-off » afin de révéler la nanostructuration. Cette technique permet de synthétiser des nanoparticules dont la morphologie est contrôlée à quelques nanomètres près avec une grande reproductibilité et fiabilité. Les principales limitations sont liées à l'espacement entre les nanoparticules dont il est difficile d'obtenir une largeur de moins de 5 nm où le couplage est important, mais aussi à la surface pouvant être nanostructurée moins grande par rapport aux techniques de pulvérisation et d'évaporation. Les nanostructures peuvent être observées par microscopie à balayage électronique et par microscopie à force atomique.

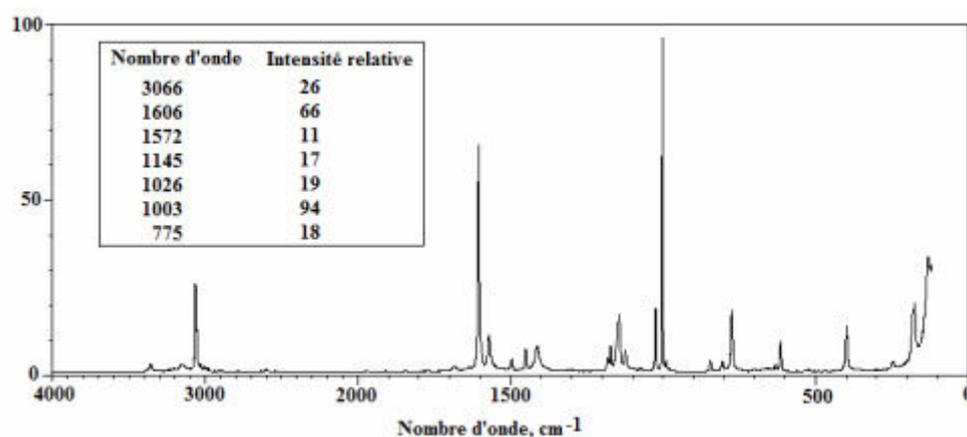
D'autres techniques existent pour fabriquer des nanostructures métalliques comme la voie électrochimique, chimique, ou pour créer une surface métallique rugueuse comme la gravure plasma, la sublimation laser ou encore l'électrochimie. Il est cependant intéressant de noter que la voie chimique permet d'obtenir tous types de nanostructures allant de la nanosphère à la nanoétoile en passant par la nanoantenne. Par ailleurs, la technique à utiliser dépend aussi des propriétés du substrat (rugosité de surface, dimensions, accroche avec le métal, résistivité à différents solutions acides ou basiques,...).

Exercice :

On étudie les spectres d'un composé de formule brute C_7H_7NO .



3369	10	1626	21	1405	26	1026	72	792	57	637	39
3177	29	1618	39	1298	70	1002	64	771	64		
3066	70	1579	19	1181	77	919	84	705	52		
3032	79	1495	64	1144	66	849	84	686	44		
1661	4	1450	50	1124	60	811	70	650	58		



1. Comment identifier les deux spectres Raman et IR ?
2. Citez la méthode de préparation de cet échantillon pour analyse IR et Raman.
3. Analyser le plus complètement possible ces spectres et préciser la structure du composé étudié.
4. Supposons que le signal obtenu par les deux techniques IR et Raman est faible, proposez une solution pour exalter le signal et améliorer la qualité du spectre.

Solution :

1/Identification des spectres

La différence entre un spectre IR (spectroscopie infrarouge) et un spectre Raman (spectroscopie Raman) réside principalement dans les informations qu'ils fournissent sur les vibrations moléculaires des échantillons. Voici quelques-unes des principales distinctions entre les deux techniques :

❖ Principe de base

- **IR** : Les spectres infrarouges sont basés sur l'absorption d'ondes infrarouges par les molécules. Les pics dans un spectre IR indiquent les fréquences auxquelles les liaisons chimiques absorbent l'énergie infrarouge.
- **Raman** : Les spectres Raman sont basés sur la diffusion inélastique de la lumière (photon) par les molécules. Les pics dans un spectre Raman indiquent les fréquences auxquelles les molécules dispersent la lumière d'une manière spécifique due aux vibrations moléculaires.
- ❖ **Gamme de fréquence :**
 - **IR** : Les spectres infrarouges couvrent la gamme des fréquences infrarouges, généralement exprimée en nombre d'onde (cm^{-1}). Les fréquences infrarouges correspondent aux vibrations des liaisons chimiques.
 - **Raman** : Les spectres Raman couvrent également une gamme de fréquences, généralement exprimée en nombre d'onde (cm^{-1}). Cependant, les fréquences Raman sont liées aux changements de polarisabilité moléculaire et ne sont pas directement liées aux vibrations des liaisons chimiques.
- ❖ **Type de spectre :**
 - **IR** : Les spectres infrarouges présentent des pics d'absorption. Les pics sont dus à l'absorption d'énergie infrarouge par les liaisons chimiques de l'échantillon.
 - **Raman** : Les spectres Raman présentent des pics de diffusion. Les pics sont dus à la diffusion inélastique de la lumière par les molécules de l'échantillon.
- ❖ **Sensibilité à la polarisation :**
 - **IR** : La spectroscopie IR est sensible à la polarisation de la lumière. Les spectres IR peuvent varier en fonction de l'orientation de la polarisation de la lumière incidente par rapport à l'échantillon.
 - **Raman** : La spectroscopie Raman est également sensible à la polarisation de la lumière, mais elle offre généralement plus de flexibilité dans la manipulation de la polarisation.
- ❖ **Intensité des pics :**
 - **IR** : Les pics dans un spectre IR sont généralement plus forts et plus intenses que dans un spectre Raman, en particulier pour les échantillons en phase liquide ou gazeuse.
 - **Raman** : Les pics dans un spectre Raman sont généralement moins intenses que dans un spectre IR, mais ils peuvent fournir des informations spécifiques sur la symétrie des modes de vibration.

2/Préparation des échantillons pour IR et Raman

Pour la spectroscopie IR :

- L'échantillon doit être sous forme solide ou liquide. Pour les échantillons solides, vous pouvez préparer une pastille en mélangeant l'échantillon avec un matériau de support, comme du KBr, et en comprimant la poudre obtenue en une pastille.
- Les échantillons liquides sont généralement placés entre deux fenêtres en NaCl ou KBr pour former une cellule d'IR.
- Les échantillons gazeux peuvent être analysés directement à l'aide de cellules à gaz spéciales.

Pour la spectroscopie Raman :

- Les échantillons solides, liquides ou gazeux peuvent être analysés en spectroscopie Raman. La préparation dépend de la forme de l'échantillon. L'échantillon peut être préparé en utilisant une cellule transparente.

3/ Analyse des spectres

Le premier est spectres corresponds au spectre IR et le deuxième est celui de Raman.

IR

Région 4000 - 2000 cm⁻¹

Nombre d'onde, cm ⁻¹	Attribution
3369 } 3177 }	νNH ₂
3066	
3032	ν=CH

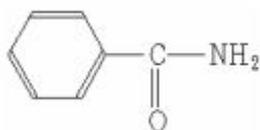
Région 2000 - 400 cm⁻¹

Nombre d'onde, cm ⁻¹	Attribution	
1661	νC=O	
1626	δNH ₂	
1618 } 1579 } 1495 } 1450 }	νC=C (noyau benzénique)	
1298		νC-NH ₂ (Aromatique)
771 } 705 ou 686 }		γ-CH (noyau aromatique monosubstitué)

RAMAN

Nombre d'onde, cm ⁻¹	Attribution
3066	ν=CH
1606 1572	νC=C (Aromatique) et δNH ₂

La formule proposée est :



3/ Exaltation du signal IR et Raman

- **Pour l'IR :** L'utilisation d'un interféromètre FTIR permet d'obtenir de meilleurs rapports signal/bruit. L'exaltation du signal IR peut être réalisée en utilisant des techniques d'atténuation totale réfléchie (ATR) ou de réflexion diffuse (DRIFT). L'ATR est particulièrement utile pour les échantillons solides ou liquides, tandis que le DRIFT est adapté aux échantillons solides.

- **Pour la Raman :** L'effet d'accrochage de surface (SERS) peut être utilisé pour amplifier le signal Raman. Pour cela, des substrats spécialement conçus avec des nanostructures métalliques sont employés (comme des nanoparticules d'argent ou d'or) qui sont capables d'amplifier le signal Raman par SERS. Ces substrats permettent de détecter des concentrations plus faibles de la substance étudiée.

Références bibliographiques

- [1] SKOOG, Douglas A. et WEST, Donald M. *Chimie analytique*. De Boeck Supérieur, 2015.
- [2] CROUCH, Stanley R., HOLLER, F. James, SKOOG, Douglas A., *et al.* *Chimie analytique*. De Boeck, 2012.
- [3] COYNE, Jerry A., ORR, H. Allen, *et al.* *Speciation*. Sunderland, MA : Sinauer associates, 2004.
- [4] Mahuzier G., Hamon M., Ferrier D., Prognon P. *Chimie analytique. Méthodes de séparation. Tome 2. 3ème édition*. Masson, Paris, 1999: 1-312.
- [5] DAHMOUNE, Farid, MADANI, Khodir, et REMINI, Hocine. *Les techniques d'extraction*. Éditions universitaires européennes, 2016.
- [6] CHEMAT, Farid. *Eco-extraction du végétal*. Dunod, 2011.
- [7] GÉRARD, C. O. T. E. *Extraction liquide-liquide-Définition du procédé-Réactifs industriels*. 2016.
- [8] DUROUDIER, Jean-Paul. *Les extracteurs liquide-liquide et liquide-solide*. ISTE Group, 2017.
- [9] VIGNERON, Maurice. *Fractionnements par solvants, extraction solide-liquide, extraction liquide-liquide, fractionnements par chromatographie d'adsorption et de répartition, échanges d'ions*. Vigot frères, 1954.
- [10] Bégin D., Gérin M. *Solvants industriels. Les grandes familles de solvants organiques*. Ed. Masson, 2002: 13-38.
- [11] Audigé CI., Dupont G., Zonzain F. *Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome I*. Doin Editeurs, Paris, 1995: 7-84.
- [12] Bourguet E., Auge C. *Les techniques de laboratoire: Purification et analyse des composés organiques*. Ellipses Edition Marketing S.A., 2008: 19-27; 77-96.
- [13] Burgot G., Burgot J-L. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales*. Editions Médicales internationales. 2ème édition, TEC & DOC, 2006: 3-194.
- [14] Rouessac A., Rouessac F. Cruché D., Duverger-Arfulso C., Martel A. *Analyse Chimique: Méthodes et technique instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés. Partie 1: Méthodes séparatives*. 7e édition. Dunod, Paris, 2004: 7-35; 35-60; 115-122.
- [14] Cicolella A. *Les composés organiques volatils (COV): Définition, classification et propriétés*. Rev. Mal. Respir. Elsevier Masson SAS, 2008, 25: 155-163.
- [15] MAFTAH, Abderrahman et JULIEN, Raymond. *Biologie moléculaire*. Masson, 1996.
- [16] MOUSSARD, Christian. *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires*. De Boeck Supérieur, 2005.
- [17] KAISERMANN, John, PAWLOWSKI, Milos, et MENDEL, Yavor. *Techniques de biologie moléculaire II*. Cambridge Stanford Books, 2020.
- [18] TAGU, Denis et MOUSSARD, Christian. *Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée*. Editions Quae, 2006.
- [19] WATSON, James D., GILMAN, Michael, WITKOWSKI, Jan Anthony, *et al.* *ADN recombinant*. De Boeck Université, 1994.

- [20] CREIGHTON, Thomas E. *The encyclopedia of molecular biology. Volume 1.* Wiley, 1999.
- [21] MENDHAM, John. *Analyse chimique quantitative de Vogel.* De Boeck Supérieur, 2005.
- [22] SKOOG, Douglas A., HOLLER, F. James, et NIEMAN, Timothy A. *Principes d'analyse instrumentale.* De Boeck Supérieur, 2003.
- [23] SKOOG, Douglas A., HOLLER, F. James, et CROUCH, Stanley R. *Principles of instrumental analysis.* Cengage learning, 2017.
- [24] BRISDON, Alan K. *Inorganic spectroscopic methods.* New York : Oxford University Press, 1998.
- [24] ANDERSON, Rosaleen J., BENDELL, David J., et GROUNDWATER, Paul W. *Organic spectroscopic analysis.* Royal Society of Chemistry, 2004.
- [25] GUERNET, Michel, MAHUZIER, Georges, HAMON, Michel, *et al.* Chimie analytique. vol. 3, méthodes spectrales et analyse organique, 1998.
- [26] BRISSET, François, *et al.* *Microscopie électronique à balayage et microanalyses.* EDP sciences, 2012.
- [27] PAQUETON, Henri et RUSTE, Jacky. Microscopie électronique à balayage: images, applications et développements. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 2006, no P866.
- [28] RUSTE, Jacky. Microscopie électronique à balayage-Images, applications et développements. *Techniques de l'ingénieur*, 2013.
- [26] AYACHE, Jeanne, BEAUNIER, Luc, POTTU-BOUMENDIL, Jacqueline, *et al.* Guide de préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission, tome2. 2007.
- [27] TURRELL, George et CORSET, Jacques (ed.). *Raman microscopy: developments and applications.* Academic Press, 1996.
- [28] LIN-VIEN, Daimay, COLTHUP, Norman B., FATELEY, William G., *et al.* *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules.* Elsevier, 1991.
- [29] LARKIN, Peter. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation.* Elsevier, 2017.
- [30] LE RU, Eric et ETCHEGOIN, Pablo. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects.* Elsevier, 2008.
- [31] BERTRAND, Dominique et DUFOUR, E. *La spectroscopie infrarouge.* Lavoisier, 2006.
- [32] BIÉMONT, Émile. *Spectroscopie moléculaire: structures moléculaires et analyse spectrale.* De Boeck Supérieur, 2008.
- [33] SIESLER, Heinz W., OZAKI, Yukihiro, KAWATA, Satoshi, *et al.* (ed.). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications.* John Wiley & Sons, 2008.