

DOCUMENT D'ACCOMPAGNEMENT

Programme de physique-chimie du nouveau référentiel du BTS Biologie Médicale

Christophe Berthier-Belléard
IA-IPR de physique chimie
Académie de Bordeaux

INTRODUCTION

I. Présentation du nouveau programme de physique-chimie en BTS ABM

Le programme de physique-chimie du BTS Biologie Médicale a été profondément repensé pour mieux répondre aux exigences du métier de technicien supérieur en laboratoire de biologie médicale. Il s'inscrit dans une dynamique de professionnalisation des savoirs scientifiques, où les contenus ne sont pas abordés comme des disciplines abstraites, mais comme des outils au service de l'analyse biomédicale.

Objectifs généraux du programme

Ce nouveau programme poursuit plusieurs objectifs majeurs :

- **fournir des bases scientifiques solides** en physique et en chimie pour comprendre, maîtriser et exploiter les protocoles et dispositifs présents dans un laboratoire d'analyses médicales ;
- **faire le lien entre phénomènes physico-chimiques et procédés techniques** : la mesure d'absorbance, la migration électrophorétique, l'interprétation de spectres, la centrifugation, etc. ;
- **intégrer les connaissances et savoir-faire** avec un raisonnement centré sur les **capacités exigibles** et des situations concrètes rencontrées dans les pratiques de laboratoire ;
- **favoriser l'interdisciplinarité** avec les enseignements professionnels, en mettant en évidence les interactions entre ces domaines.

Un programme structuré en modules complémentaires

Le programme est organisé en quatre modules :

- | | |
|-----------------|---|
| Module 1 | La mesure. |
| Module 2 | Comprendre l'architecture et les transformations d'une molécule d'intérêt biologique. |
| Module 3 | Maîtriser les concepts sous-jacents aux réactions supports des analyses et/ou au prétraitement avant analyse. |
| Module 4 | Comprendre les phénomènes physiques intervenant dans une chaîne ou une technique de mesure. |

Le module 1 est un socle transversal, qui ne se traite pas de manière isolée. Il est distillé sur les deux années, en lien avec les trois autres modules, au fil des séquences d'enseignement. Il contient les compétences transversales d'analyse élémentaire d'une chaîne de mesure, d'étalonnage, d'exploitation des mesures et de présentation des résultats.

Les modules 2 à 4 sont étroitement liés avec les pratiques de laboratoire. Ils intègrent notamment des notions de chimie organique, de chimie des solutions, de chimie physique, de mécanique du point, d'optique, de comportements des fluides ... en lien avec les pratiques de laboratoire.

Une forte articulation avec les enseignements professionnels

Le nouveau référentiel met en avant une logique de liens entre théorie et pratique. Chaque notion est pensée en rapport avec :

- **des appareils de laboratoire utilisés au quotidien** : spectrophotomètres, centrifugeuses, chromatographes, spectromètres de masse...
- **des molécules du vivants** : formation de glycérides, formation des protéines, structure des bases azotées, rôle des groupements fonctionnels...
- **des gestes techniques du métier** : étalonnage d'un appareil de mesure, analyse d'un spectre, interprétation d'un chromatogramme...

Par exemple, des mesures d'absorbances, interprétées à l'aune de la loi de Beer-Lambert permettent d'évaluer une activité enzymatique. Les notions d'énergie cinétique et d'énergie potentielle électrique permettent de prédire de manière simple un temps de vol dans un spectromètre de masse (MALDI-TOF) dans le cadre de l'identification de biomolécules. Ou encore, l'analyse d'un écoulement de fluide permet de modéliser les principes physiques d'une perfusion ou d'une prise de sang.

Capacités exigibles : de la connaissance à l'action

Chaque item du programme est accompagné de capacités exigibles, qui permettent de s'approprier une situation contextualisée et de mobiliser les savoirs appropriés à cette situation, de raisonner à partir de données expérimentales, d'analyser un protocole fourni en fonction de contraintes ou d'objectifs ou encore de valider un résultat de mesure.

Ces capacités sont exprimées avec des verbes d'action explicites. Lorsque des lois ou des formules sont à exploiter sans que leurs connaissances soient exigibles, le programme précise « la loi ou la relation étant fournie ».

Une pédagogie active, contextualisée et intégrée

Au vu des éléments ci-dessus, les enseignants sont ainsi invités à utiliser des documents authentiques, à mettre les étudiants en situation d'analyse et de choix raisonné, à réaliser des activités de mesure, d'interprétation et de modélisation.

II. Comparaison entre l'ancien programme (ABM) et le nouveau programme physique-chimie en (BM).

L'analyse comparée ci-dessous permet de faire apparaître les principaux changements, tant en contenus qu'en approche pédagogique.

Aspect	Ancien référentiel	Nouveau référentiel
Organisation des contenus	Répartis selon une logique académique (optique, thermodynamique, chimie organique, etc.)	Regroupement en 4 modules liés aux pratiques professionnelles
Module transversal	Absent (outils de calcul ou d'analyse vus au fil de l'eau)	Module 1 transversal , perlé sur les deux années, au fil des besoins.
Capacités exigibles	Souvent implicites	Rédigées de manière explicite pour chaque notion y compris les capacités expérimentales.
Chimie organique	Très centrée sur les mécanismes et les familles chimiques	Approche plus appliquée à l'architecture et aux transformations des molécules d'intérêt biologique.
Thermodynamique	Présence du formalisme classique (enthalpie libre, ΔG , etc.)	On travaille directement avec la comparaison du quotient de réaction et de la constante d'équilibre pour le sens d'évolution d'un système chimique, sans passer par ΔG . L'énergie échangée avec l'extérieur au cours d'une transformation n'est plus calculée mais doit être interprétée si elle est donnée.
Cinétique et catalyse	Peu reliée au vivant, centrée sur des exemples dont le contexte était éloigné des problématiques du vivant	Contextualisation plus forte liée aux pratiques biochimiques. Abandon de l'ordre de réaction.

Optique	Approche usuelle de la formation des images.	Rendu plus fonctionnel autour de l'œil et du pouvoir de résolution du microscope.
Physique des fluides	Peu développée	Plus complète (pression, débit, viscosité) avec exemples biomédicaux (prise de sang, perfusion...)
Spectroscopies	Peu de liens fort avec les outils	Spectrophotométrie, fluorescence, spectrométrie de masse sont intégrées avec usages (dosages, MALDI-TOF).

Nous présentons dans ce qui suit quelques éléments saillants de chaque module, sans les décliner tous quand les notions étaient déjà traitées dans l'ancien programme.

I- La chaîne de mesure

La biologie médicale repose sur des résultats chiffrés fiables, qu'il s'agisse de la concentration d'une espèce chimique, du pH d'un milieu, de l'intensité d'un signal fluorescent ou de la vitesse de sédimentation d'un culot cellulaire. Dans tous les cas ces résultats sont issus de mesures, réalisées à l'aide de dispositifs plus ou moins complexes, que le technicien doit savoir interpréter.

La mesure est le processus qui permet d'associer une grandeur physique à une valeur numérique, via un appareil de mesure. Comprendre comment cette mesure est obtenue et validée est essentiel pour garantir la qualité des analyses. Sa précision, sa fiabilité et sa traçabilité sont cruciales, en particulier lorsqu'elle contribue à orienter un diagnostic ou à suivre l'évolution d'un traitement.

La chaîne de mesure : un modèle indispensable

La chaîne de mesure est un ensemble structuré de dispositifs permettant de transformer une grandeur physique non directement exploitable (température, concentration, pH, etc.) en une information lisible et interprétable (valeur affichée sur un écran, graphique, alarme...). La chaîne fonctionnelle, qui présente tous les organes de l'appareil de mesure, se distingue de la chaîne métrologique constituée de trois grands étages fondamentaux.

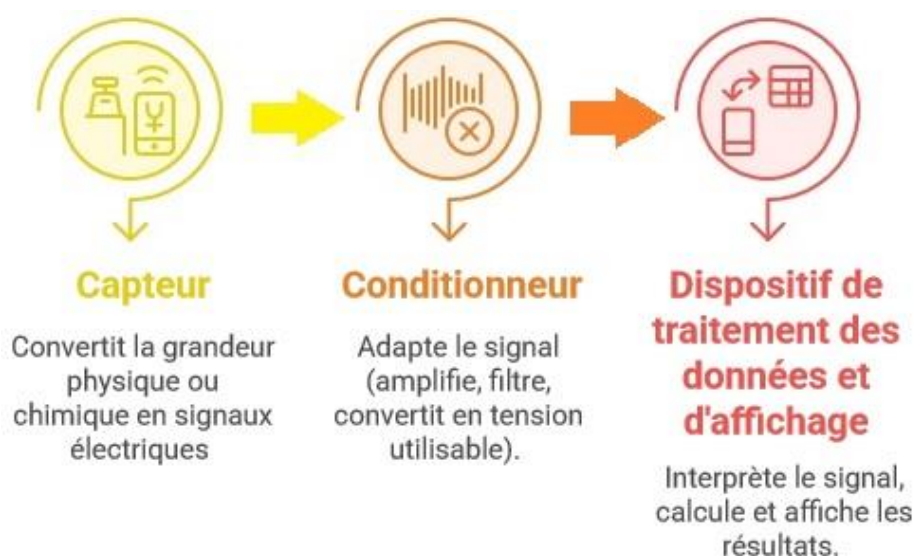


Fig 1 : les 3 étages fondamentaux de la chaîne métrologique

Remarque : dans certains dispositifs, une étape de conversion analogique/numérique peut intervenir entre le conditionneur et le traitement. Elle est généralement incluse dans le bloc de traitement global.

Ce modèle en 3 étages permet aux étudiants :

- de comprendre plus finement le fonctionnement des automates,
- de localiser l'origine d'un éventuel dysfonctionnement,
- de relier les mesures physiques aux paramètres biologiques à interpréter.

Dans la suite du livret, de nombreuses techniques instrumentales seront reliées à cette chaîne de mesure, en identifiant pour chacune les étages concernés.

Fiabilité d'une mesure : variabilité, incertitude, erreurs et interprétation

Les compétences associées à l'analyse critique des résultats expérimentaux sont déjà abordées en lycée, en voie générale et en voie technologique. Au lycée professionnel le formalisme est souvent moins développé, mais les élèves sont sensibilisés à la variabilité des mesures. Les enseignants de BTS peuvent donc s'appuyer sur ces prérequis disparates pour consolider une approche plus rigoureuse et professionnalisante.

➤ Variabilité et fiabilité d'une mesure

Une mesure scientifique est rarement parfaitement reproductible. On distingue deux grandes sources de variabilité :

- celles dues à des fluctuations incontrôlables (bruit de fond, environnement, opérateur...),
- celles dues à un biais constant (mauvais étalonnage, appareil défectueux...)

On s'intéresse alors à deux dimensions fondamentales :

- les conditions opératoires pour effectuer la même mesure
- la capacité à retrouver le même résultat dans des conditions différentes (temps, lieu, opérateur...)

➤ Incertitude et présentation des résultats

Un résultat n'a de sens que s'il est accompagné d'une incertitude-type.

Les notions suivantes sont utiles :

- Chiffres significatifs et règles d'arrondi,
- Incertitude-type : notée souvent u , correspond à la meilleure estimation de l'incertitude associée à la mesure,
- Présentation du résultat sous la forme :

$$x = (\text{valeurmésurée}) \pm (\text{incertitude} - \text{type})$$

➤ Comparaison à une valeur de référence

Dans le contexte biomédical, on a souvent besoin de comparer une valeur mesurée à une valeur de référence.

Le Z-score est l'indicateur désormais privilégié pour cela. Il permet de comparer le résultat d'une mesure m_{mes} à une valeur de référence m_{ref} en prenant en compte l'incertitude-type, $u(m)$, associée au résultat.

$$Z = \frac{|m_{mes} - m_{ref}|}{u(m)}$$

Si $|Z| \leq 2$ cela signifie que l'écart entre la valeur mesurée et la valeur de référence est inférieur à deux fois l'incertitude-type de mesure. Ce seuil de 2 est couramment utilisé car, dans une distribution normale, environ 95 % des valeurs se situent à moins de deux fois l'incertitude-type de la mesure.

Ces notions de mesure, d'incertitude et d'interprétation des résultats sont directement reliées aux compétences du **module 1** du référentiel BTS Biologie Médicale.

MODULE 2

I- Lire une molécule – Familles fonctionnelles du vivant et construction des capacités exigibles

Cette section du programme vise à développer chez les étudiants la capacité à interpréter des formules chimiques (développées, semi-développées ou topologiques) de molécules organiques, en particulier celles rencontrées dans les systèmes biologiques.

L'objectif est de leur faire identifier efficacement les chaînes carbonées et les groupes caractéristiques, préalablement à l'étude des grandes familles de composés du vivant (oses, acides aminés, acides gras, etc.).

Nous rappelons ci-dessous quelques définitions.

➤ Oses (glucides simples)

Un ose, ou monosaccharide, est un glucide simple, constitué d'une chaîne carbonée non ramifiée portant un groupe carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupes hydroxyle. Ils obéissent à la formule générale : $C_n(H_2O)_n$ avec n pouvant varier de 3 à 8.

Leur structure peut servir de point d'appui pour étudier leur solubilité dans l'eau (liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle et les molécules d'eau), leur cyclisation en solution aqueuse (réaction intramoléculaire entre un groupe carbonyle et un groupe hydroxyle conduisant à des formes furanose ou pyranose), ou encore la formation de polysaccharides par condensation entre oses, donnant naissance à des liaisons osidiques.

➤ Acides gras

Un acide gras est une molécule constituée d'une chaîne hydrocarbonée (linéaire et saturée ou insaturée) portant un groupe carboxyle terminal.

Leur structure peut servir de point d'appui pour introduire l'insaturation (présence de doubles liaisons), l'isomérisation Z/E, qui modifie la conformation de la chaîne et ses propriétés biologiques, ainsi que la formation des triglycérides (réaction d'estérification entre trois acides gras et un glycérol), base des graisses et huiles biologiques.

➤ Acides α -aminés

Un acide aminé est une molécule organique bifonctionnelle portant à la fois un groupe amino ($-\text{NH}_2$) et un groupe carboxyle ($-\text{COOH}$), généralement portés par un même atome de carbone central, appelé carbone α . Cet atome de carbone α porte également un atome d'hydrogène et une chaîne latérale variable (notée R), qui confère à chacun des 20 acides aminés protéinogènes ses propriétés spécifiques.

Il existe également d'autres types d'acides aminés non α , dans lesquels les groupes amine et carboxyle ne sont pas portés par le même atome de carbone.

Leur structure peut servir de point d'appui pour étudier le comportement acido-basique des groupes fonctionnels (en particulier leur ionisation selon le pH), la notion de charge nette et de point isoélectrique, ainsi que la formation de liaisons peptidiques lors de la constitution des protéines (réaction entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amino d'un autre).

➤ Nucléotides et acides nucléiques

Un nucléotide l'unité de base des acides nucléiques. C'est une molécule trifonctionnelle, composée de trois éléments :

- une base azotée (purique ou pyrimidique),
- un pentose (ribose ou désoxyribose),
- un ou plusieurs groupes phosphate.

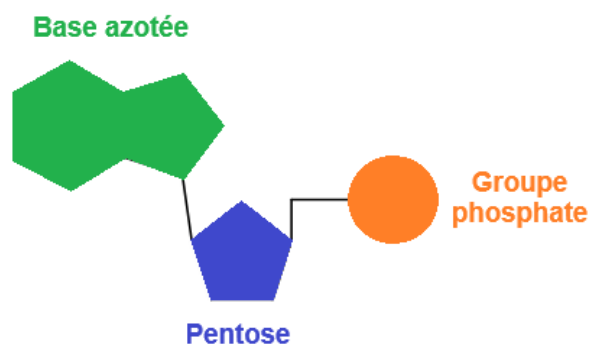


Image libre de droit

Fig 2 : structure générale d'un nucléotide

Les bases azotées sont des molécules hétérocycliques contenant des atomes d'azote, jouant un rôle central dans la structure des nucléotides. Elles sont

notées A (Adénine), G (Guanine), C (Cytosine), T (Thymine) et U (Uracile). Elles appartiennent à deux familles : les purines qui comportent deux cycles accolés et les pyrimidines qui ne comportent qu'un seul cycle.

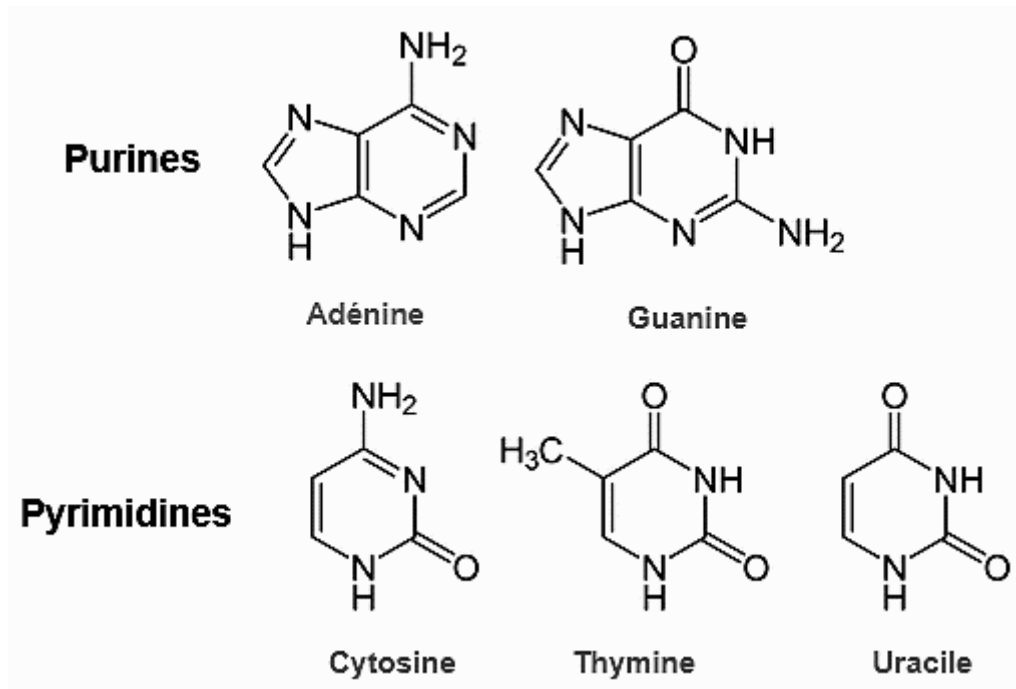


Fig 3 : les différentes bases azotées

Les sucres présents dans les nucléotides sont le ribose et le désoxyribose. Ils appartiennent à la famille des pentoses, c'est-à-dire des oses à cinq atomes de carbone. Tous deux adoptent en solution une forme cyclique à cinq chaînons (forme furanose). Le ribose possède un groupe hydroxyle ($-\text{OH}$) sur l'atome de carbone 2. Le désoxyribose s'en distingue par le remplacement de ce groupe hydroxyle par un atome d'hydrogène au même emplacement.

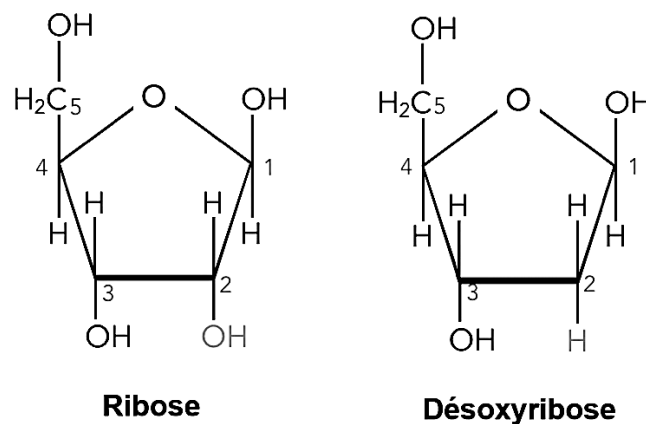


Fig 4 : les pentoses présents dans les nucléotides

Le groupe phosphate est un groupement chimique dérivé de l'acide phosphorique (H_3PO_4), dont la formule brute est généralement notée PO_4^{3-} dans sa forme déprotonnée. Il est constitué d'un atome de phosphore central tétravalent lié à quatre atomes d'oxygène. Selon le pH du milieu, certains de ces atomes d'oxygène peuvent porter une charge négative ou former des liaisons doubles avec le phosphore.

Les acides nucléiques sont de grands polymères biologiques formés par l'enchaînement de nucléotides, chacun étant relié au suivant par des liaisons phosphodiester impliquant le groupe phosphate fixé sur l'atome de carbone 5 du pentose. On distingue deux types principaux d'acides nucléiques :

- ADN (acide désoxyribonucléique) : constitué de nucléotides à désoxyribose et contenant les bases A, T, C, G. Il forme une double hélice antiparallèle.
- ARN (acide ribonucléique) : constitué de nucléotides à ribose, avec les bases A, U, C, G. Il est monocaténaire (simple brin).

II- Mésonérie des bases azotées de l'ADN

L'une des caractéristiques essentielles des bases azotées est leur capacité à former des liaisons hydrogène, ce qui permet la structuration de la double hélice de l'ADN. Les bases azotées de l'ADN — adénine, thymine, guanine et cytosine — s'apparient de façon spécifique :

- **A-T** : 2 liaisons hydrogène,
- **G-C** : 3 liaisons hydrogène

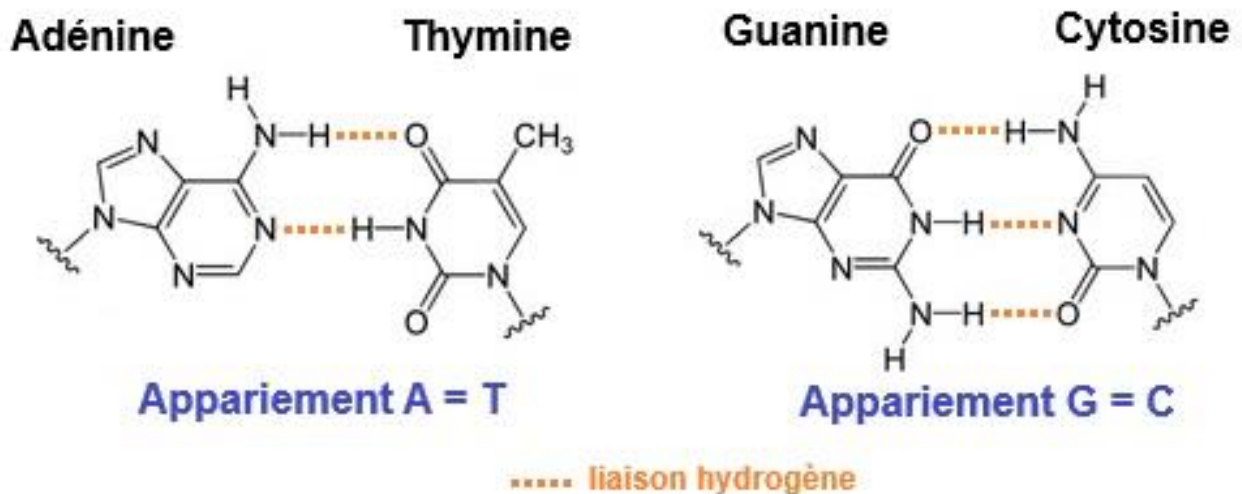


Fig 5 : Appariement des bases azotées dans l'ADN

La mésomérie est un modèle qui permet d'expliquer une délocalisation partielle de certains doublets électroniques, ce qui permet de comprendre :

- la stabilisation des charges partielles sur les atomes porteurs de doublets (O et N), les rendant plus électrophiles ou nucléophiles selon le contexte.
- la géométrie rigide et plane des cycles aromatiques (purines et pyrimidines), assurant ainsi un alignement optimal des donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.

Exemple de la paire G-C :

- **Cytosine :**
La cytosine présente plusieurs formes mésomères. Le doublet libre de l'azote exocyclique ($-NH_2$) peut participer à la résonance, redistribuant la densité électronique dans le cycle. Cette délocalisation entraîne une polarisation : l'atome d'oxygène du groupement cétone porte une charge partielle négative, tandis que certains azotes du cycle présentent une charge partielle positive.
- **Guanine :**
La guanine, présente aussi plusieurs formes mésomères dues à la délocalisation des doublets électroniques des atomes d'azote du cycle et de l'oxygène du groupement carbonyle.
Cette mésomérie accroît la densité électronique sur l'oxygène (charge partielle négative) et la réduit sur certains azotes (charge partielle positive). Ainsi polarisée, la guanine peut établir des liaisons hydrogène fortes avec la cytosine : elle agit comme accepteur via son atome d'oxygène et comme donneur via les atomes d'hydrogène de son groupe NH_2 .

La structure réelle de la cytosine et de la guanine est un hybride de résonance résultant de la moyenne pondérée des différentes formes mésomères.

III- Transformations usuelles en chimie organique et chimie du vivant

L'objectif de cette partie est de présenter de façon synthétique les grandes transformations de chimie organique mobilisées dans quelques exemples de la chimie du vivant, en précisant les groupes fonctionnels qui réagissent, la nouvelle liaison formée ou rompue.

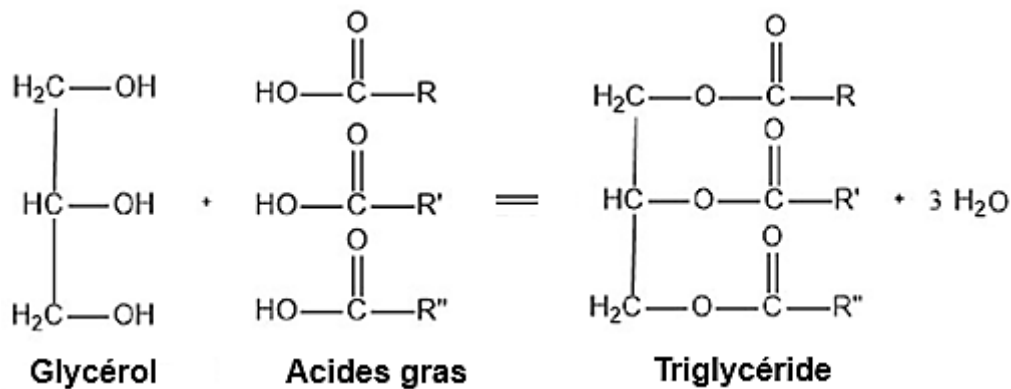
Les contextes biochimiques indiqués ci-dessous sont donnés à titre d'illustration et ne sont pas à mémoriser par les étudiants. En revanche, un contexte leur étant fourni, ils doivent être capables de reconnaître le type de transformation mis en jeu et de le rattacher à une réaction générale étudiée.

Estérification/hydrolyse

➤ Formation des triglycérides (estérification)

Contexte biochimique : dans les cellules, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, obtenus par estérification entre les fonctions $-OH$ du glycérol et les fonctions $-COOH$ des acides gras, catalysée par des acyl-transférases.

- **Groupes fonctionnels impliqués :**
 - Hydroxyle ($-OH$) du glycérol.
 - carboxyle ($-COOH$) des acides gras.
- **Nouveau groupe formé :** ester ($-COO-$).
- **Équation type :**



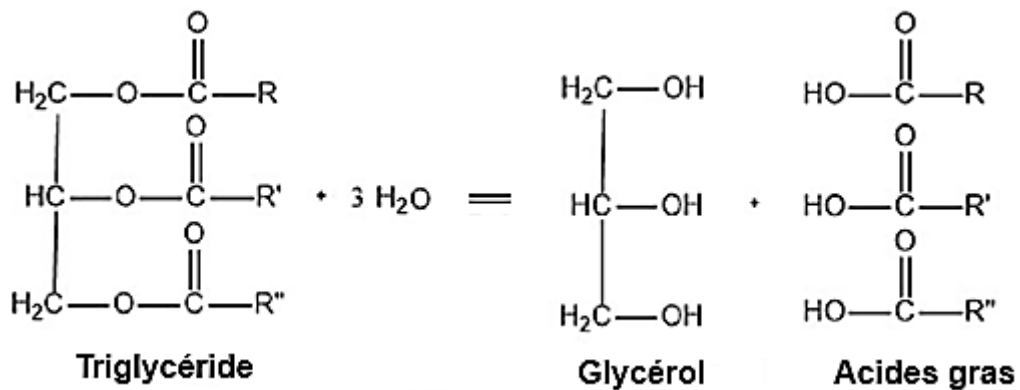
➤ Digestion des triglycérides (hydrolyse acide ou basique)

Contexte biochimique : au cours de la digestion, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras sous l'action des lipases, par rupture des liaisons ester. C'est la réaction inverse de l'estérification.

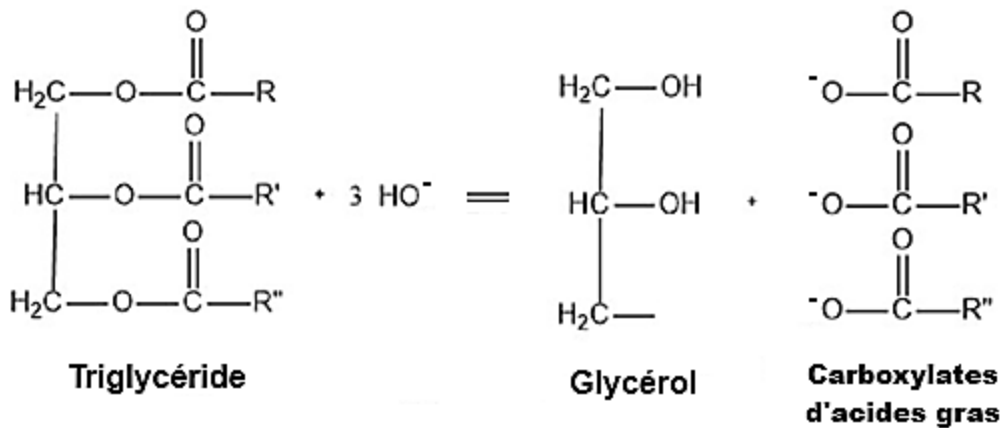
- **Groupe fonctionnel impliqué :** ester ($-COO-$) soumis à l'attaque d'eau ou d'ion hydroxyde.
- **Groupe détruit :** ester

- **Équations types :**

Hydrolyse acide dans l'estomac¹ (pH entre 1 et 3) :



Hydrolyse basique (saponification) dans l'intestin grêle (pH autour de 7 à 8) :



Formation d'amide – Liaison peptidique

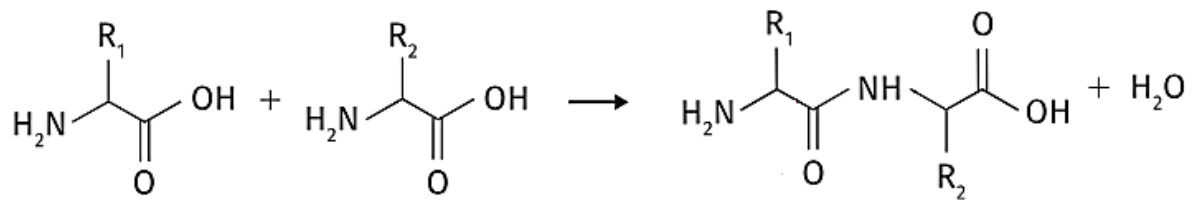
Contexte biochimique : lors de la traduction, le ribosome catalyse la condensation d'un groupe $-\text{COOH}$ d'un acide aminé avec le groupe $-\text{NH}_2$ d'un autre, formant une liaison peptidique (amide) entre les acides aminés d'une protéine.

- **Groupes fonctionnels impliqués :**

- *carboxyle* ($-\text{COOH}$) d'un des deux acides aminés.
- *amine* ($-\text{NH}_2$) de l'autre acide aminé.

¹ Ce qui se passe dans l'estomac lors de la digestion des triglycérides est quantitativement très limité : la lipase gastrique commence l'hydrolyse, mais la majeure partie de la digestion des lipides (hydrolyse complète en acides gras et glycérol) se fait dans l'intestin grêle grâce à la lipase pancréatique et à l'action de la bile.

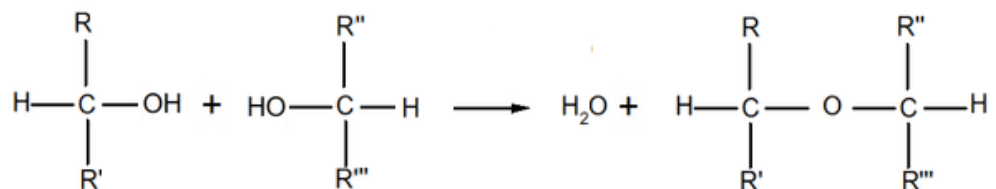
- **Nouveau groupe formé :** *amide* (liaison peptidique) –CO–NH
- **Équation type :**



Acétalisation/cétalisation – Polymérisation et cyclisation des oses

Contexte biochimique : les oses peuvent se combiner entre eux par formation d'une liaison osidique, qui résulte de la condensation entre la fonction hémiacétal d'un ose (portant un groupement –OH sur l'atome de carbone anomérique) et la fonction alcool d'un autre. Cette réaction produit un disaccharide (ou un polysaccharide), avec élimination d'eau. Par ailleurs, un ose libre comme le glucose adopte spontanément en solution une forme cyclique stable via une réaction intramoléculaire entre un groupe carbonyle (–CHO) et une fonction alcool éloignée, formant un hémiacétal cyclique (forme pyranosique ou furanosique).

- **Familles impliquées :**
 - Pour la liaison osidique : *alcool* (–OH) + *hémiacétal* (–OH sur l'atome de carbone anomérique).
 - Pour la cyclisation : *aldéhyde* (–CHO) ou *cétone* (C=O) + *alcool* (–OH).
- **Nouvelle liaison formée :**
 - **Liaison osidique** (C–O–C) entre deux oses.



- **Liaison hémiacétal** (ou héli-cétal) C–O–C–OH, puis éventuellement acétal (C–O–C–O–C) en cas de second alcool.

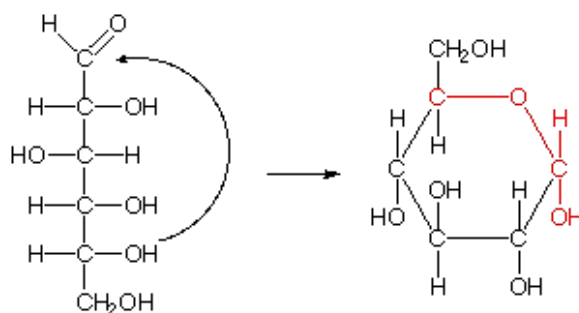


Fig 6 : exemple de cyclisation du glucose

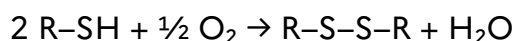
Oxydation (alcools, carbonyles, thiols)

Contexte biochimique : de nombreuses étapes du métabolisme, comme la respiration cellulaire ou la formation des ponts disulfure dans les protéines, reposent sur des réactions d'oxydation catalysées par des oxydoréductases.

- **Familles impliquées :**
 - alcool primaire → aldéhyde → acide carboxylique.
 - alcool secondaire → cétone.
 - thiol (-SH) → disulfure (-S-S-).

- **Nouvelles liaisons formées :**
 - Liaison C=O (carbonyle) ou C-O-H (acide).
 - Liaison S-S dans les ponts disulfure.

- **Exemple biochimique :**
 - Oxydation de deux cystéines → pont disulfure (ex : insuline).



Réduction des carbonyles

Contexte biochimique : les composés carbonylés sont réduits en alcools dans de nombreuses voies métaboliques, par exemple lors de la conversion du pyruvate en lactate en condition anaérobie.

- **Groupes fonctionnels et familles impliqués :**
 - carbonyle (C=O): aldéhyde ou cétone.

- **Nouvelle liaison formée** : liaisons C–H supplémentaires, conversion en alcool primaire ou secondaire.

Déshydratation des alcools – Formation d'alcènes

Contexte biochimique : certaines enzymes comme l'énolase catalysent des déshydratations biologiques, par exemple dans la glycolyse où le 2-phosphoglycérate est converti en phosphoénolpyruvate (PEP) avec élimination d'eau.

- **Famille impliquée** : alcool (–OH) éliminant H₂O.
- **Nouvelle liaison formée** : double liaison C=C (alcène).

Complément : retour sur les nucléotides et les acides nucléiques

Les réactions qui forment les liaisons N-glycosidique et phosphodiester sont des types spécifiques de réactions de condensation, qui sont essentielles dans la biochimie des acides nucléiques et des nucléotides. Elles ne correspondent pas aux types de transformations évoquées précédemment.

➤ Liaison N-Glycosidique

Description :

- **Groupes fonctionnels impliqués** : un groupe hydroxyle et un groupe amine.

Un pentose (comme le ribose ou le désoxyribose) réagit avec une base azotée (comme l'adénine, la guanine, la cytosine, la thymine ou l'uracile) pour former une liaison N-glycosidique, libérant une molécule d'eau.

➤ Liaison Phosphodiester

Description :

- **Groupes fonctionnels impliqués** : un groupe phosphate et un groupe hydroxyle.

Un groupe phosphate d'un nucléotide réagit avec le groupe hydroxyle du pentose d'un autre nucléotide, libérant une molécule d'eau et formant une liaison phosphodiester. Cette réaction se produit lors de la formation des acides nucléiques (ADN et ARN), où les nucléotides sont liés ensemble pour former une chaîne polynucléotidique.

IV – La chromatographie : un outil analytique transversal

La chromatographie est une méthode de séparation très utilisée en biologie médicale et en biotechnologie. Elle permet d'isoler, d'identifier ou de doser les constituants d'un mélange complexe. Que ce soit pour contrôler la pureté d'un médicament, vérifier la présence d'un composé toxique ou analyser un extrait biologique, la chromatographie s'impose comme un outil analytique incontournable.

Cette étude permet d'exploiter les connaissances dans le cadre de la polarité des molécules, des interactions entre entités et du **module 1**.

Principe général d'une chromatographie

La séparation chromatographique repose sur la migration différentielle des constituants d'un mélange, sous l'effet de deux phases :

- une phase stationnaire (ou phase fixe), fixée sur un support (papier, silice, colonne) ;
- une phase mobile (ou éluant), qui entraîne les composés à travers la phase stationnaire.

Chaque composé est ralenti différemment selon son affinité relative pour chacune des phases, ce qui permet leur séparation. Cette affinité dépend des interactions intermoléculaires directement liées à la nature chimique des entités mises en jeu : polarité, taille et possibilité de liaisons hydrogène ou interactions de Van der Waals.

Sous l'effet antagoniste des interactions (molécule ↔ phase fixe) d'une part et (molécule ↔ phase mobile) d'autre part, les constituants du mélange sont séparés et migrent avec des vitesses différentes.

La CCM, un modèle pour illustrer les principes fondamentaux

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique utilisée pour illustrer les principes chromatographiques dans l'enseignement secondaire.

Cette technique simple, et visuelle est remobilisée ici pour poser les bases de techniques chromatographiques instrumentales : phase stationnaire, phase mobile, migration, analyse qualitative simple en comparant les hauteurs de migration des taches. Le paramètre mesuré est ici le rapport frontal.

Certaines phases stationnaires utilisées sont en gel de silice, polymère inorganique réticulé de formule $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$ avec n très proche de 0.

L'étude des interactions entre entités peut être ici réinvestie de manière pertinente, étant entendu que la structure du gel n'est pas à connaître.

La surface du gel de silice est très polaire, en raison de la présence de groupes silanols ($-\text{Si}-\text{OH}$).

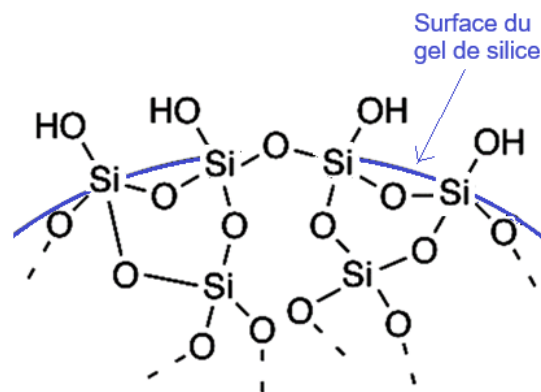


Image libre de droit
Fig 7 : Surface du gel de silice

Ces sites permettent une variété d'interactions spécifiques avec les molécules analysées.

- **Des liaisons hydrogène** : ce sont les interactions dominantes. Elles se forment entre l'atome d'hydrogène du groupe silanol et les groupes accepteurs de liaisons H (comme le groupe carbonyle - d'une cétone ou d'un aldéhyde - ou le groupe carboxyle d'un acide carboxylique).

Elles peuvent se former également entre l'atome d'oxygène du silanol et les groupes donneurs de liaisons H (comme les groupes hydroxyle $-\text{OH}$ ou amine $-\text{NH}_2$ des analytes).

- **Des interactions de Van der Waals de type dipôle-dipôle** : observées avec des molécules polaires, même sans liaison hydrogène directe.

Ces interactions expliquent pourquoi la phase stationnaire en silice retient mieux les composés polaires : ils interagissent plus fortement avec la surface que les composés apolaires.

Il est également possible de modifier la polarité de la phase stationnaire en greffant aux groupes silanols des molécules organiques à la polarité choisie (on parle de polarité de phase inversée).

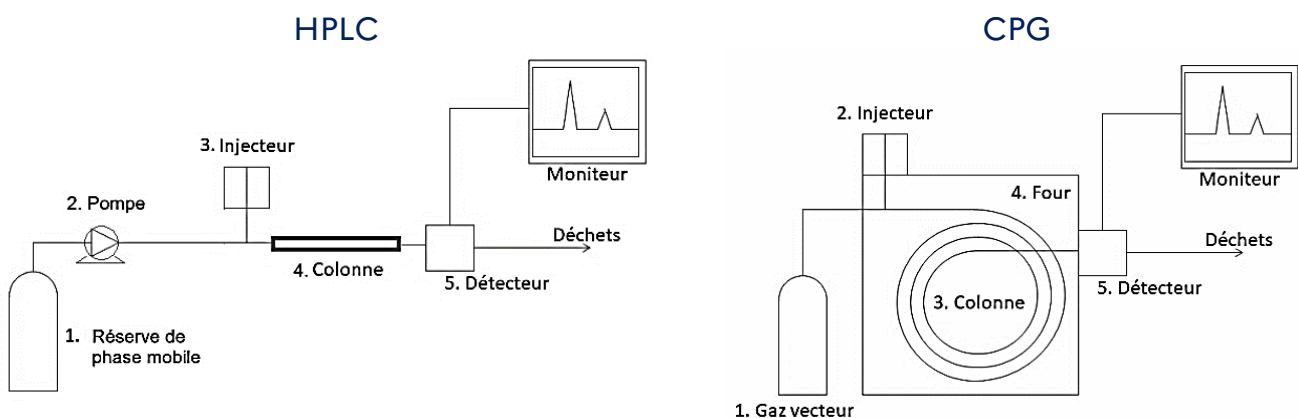
Notons que les groupes siloxanes -Si-O-Si- sont beaucoup moins polaires que les silanols et inertes vis-à-vis des liaisons hydrogène.

Vers les chromatographes en colonne, des dispositifs instrumentés.

Dans les chromatographies en colonne, on injecte un échantillon dans un flux contrôlé de phase mobile, au contact d'une phase stationnaire.

- Deux niveaux de lecture : organes internes et chaîne de mesure

Les deux schémas suivants illustrent la constitution des chromatographes utilisés en chromatographie en phase liquide (HPLC) et en phase gazeuse (CPG).



Images libres de droit

Fig 8 : Chromatographes HPLC et CPG

Au niveau pédagogique, il est utile de distinguer avec les étudiants deux niveaux de description complémentaires d'un chromatographe, cette approche pouvant être bien évidemment généralisée à d'autres appareils de mesure rencontrés dans le programme.

Lecture fonctionnelle : les organes internes du chromatographe

Cette lecture repose sur l'analyse des parties matérielles du système, souvent présentées dans les manuels techniques. Un chromatographe, quel que soit le type (HPLC, CPG), comporte trois organes fondamentaux : l'injecteur, la colonne et le détecteur.

Organe interne	Rôle
Injecteur	Permet l'introduction contrôlée de l'échantillon dans le système
Colonne	Réalise la séparation des constituants selon leurs interactions avec la phase fixe et la phase mobile.
Détecteur	Mesure la concentration de chaque composé au moment de son passage.

Cette organisation est observable dans les schémas des fabricants ou dans les vues éclatées des appareils. Elle permet de travailler la capacité suivante du **module 1** : « À partir d'une documentation fournie, savoir identifier les étages stratégiques d'un instrument ou d'un automate. »

Lecture métrologique : la chaîne d'acquisition et de traitement du signal

Par ailleurs, un chromatographe s'inscrit dans un processus de mesure, modélisable par la chaîne d'acquisition et de restitution des données, en trois étages décrits dans le module 1.

Étape de la chaîne de mesure	Élément du chromatographe	Rôle
Capteur	Détecteur.	Fournit un signal lié à la concentration.
Conditionneur	Interface analogique/numérique.	Adapte et convertit le signal.
Traitement des données	Logiciel d'analyse.	Génère le chromatogramme, quantifie les composés.

Les détecteurs utilisés dans les chromatographes peuvent être de natures différentes : spectromètre UV, spectromètre IR, spectromètre de fluorescence, spectromètre de masse... Les techniques correspondantes sont, quant à elles, développées dans le **module 4** du programme.

➤ HPCL versus CPG : techniques similaires, phases mobiles différentes

Il est important de noter que ces deux techniques de chromatographie si elles partagent des points communs différent par la nature de la phase mobile.

Technique	Phase mobile	Phase stationnaire
HPLC	Liquide	Gel de silice
CPG	Gaz (He, N ₂ , H ₂ ...)	Polymère fixé sur la paroi de la colonne ou support solide

Le chromatogramme : lecture et exploitation

Le chromatogramme représente l'intensité du signal en fonction du temps. Chaque pic correspond à l'élution d'un composé.

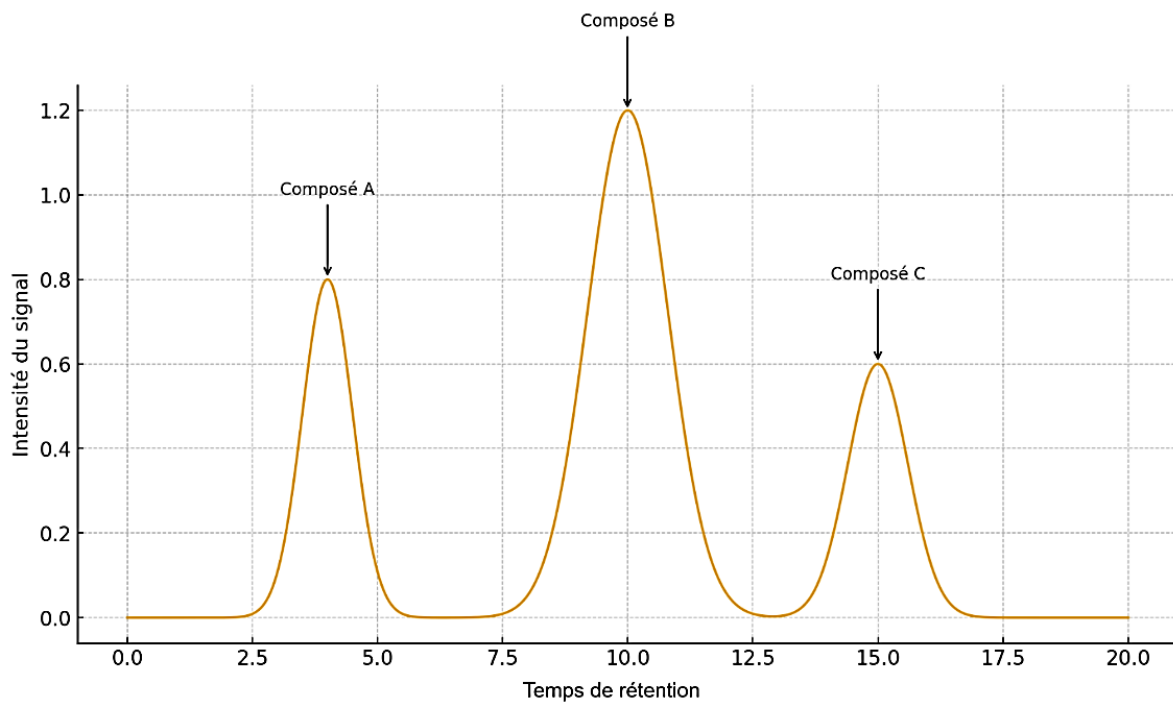


Image libre de droit
Fig 9 : aspect général d'un chromatogramme

Deux paramètres permettent d'interpréter le chromatogramme.

- **Le temps de rétention** : temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic → identification.
- **L'aire sous le pic** : proportion relative du composé → dosage possible.

Les étudiants doivent pouvoir interpréter l'ordre d'élution et identifier des composés selon les données dont ils disposent.

Pour le dosage, on utilise souvent une courbe d'étalonnage :

- la surface du pic est proportionnelle à la masse du composé injecté
- la relation est linéaire dans une certaine gamme de concentrations.

Deux méthodes principales sont utilisées.

- **L'étalonnage externe** : courbe construite avec des solutions étalons analysées séparément.
- **L'étalonnage interne** : ajout d'un composé de référence dans chaque solution et chaque échantillon, ce qui corrige les variations de volume injecté.

Les étudiants ne réalisent pas de quantification en autonomie. Tout dosage à partir d'un chromatogramme sera guidé.

L'étude de la chromatographie permet ainsi de croiser les compétences des **modules 1 et 4**, tout en ancrant les concepts théoriques dans des pratiques professionnelles concrètes.

MODULE 3

I- Les réactions modélisant des équilibres en solution : continuités et nouveautés

Le nouveau programme de BTS Biologie Médicale conserve l'étude des réactions classiques qui modélisent des équilibres en solution. Dissolution-précipitation, complexation, acide-base et oxydoréduction permettent d'en avoir une vue d'ensemble suffisante. Toutefois, cette étude est allégée en supprimant certains développements comme la géométrie des complexes, l'influence du pH et de la complexation sur la solubilité, le calcul du pH de solution ou encore l'étude des électrolyses et de l'ampérométrie. À l'inverse, le nouveau programme valorise des aspects plus expérimentaux pour travailler sur l'interface entre la chimie et les techniques d'analyse instrumentale. C'est le cas des titrages directs et indirects.

Un formalisme déjà connu des élèves : l'approche par les couples

Les transformations étudiées dans le cadre des réactions acide/base ou des réactions d'oxydo-réduction reposent sur des équilibres modélisés par des échanges d'ion hydrogène ou d'électrons conduisant au formalisme des couples, la nature de la particule échangée permettant de passer d'une espèce du couple à sa conjuguée. Les étudiants doivent être capables de :

- reconnaître un couple à partir de l'écriture de la demi-équation associée
- écrire une équation de réaction à partir des deux couples mis en jeu
- exprimer, calculer et exploiter la constante d'équilibre associée.

Dans le domaine des réactions acidobasique, la constante d'équilibre d'une réaction est calculée à partir des constantes d'acidité des couples mis en jeu. Dans le domaine des réactions d'oxydoréduction, elle est calculée à partir des potentiels standard d'électrode E_1° et E_2° des couples mis en jeu, selon la relation fournie :

$$\ln(K_r) = \frac{n_1 \times n_2}{R \times T} \times F \times (E_2^\circ - E_1^\circ), n_1 \text{ et } n_2 \text{ étant le nombre d'électrons échangés.}$$

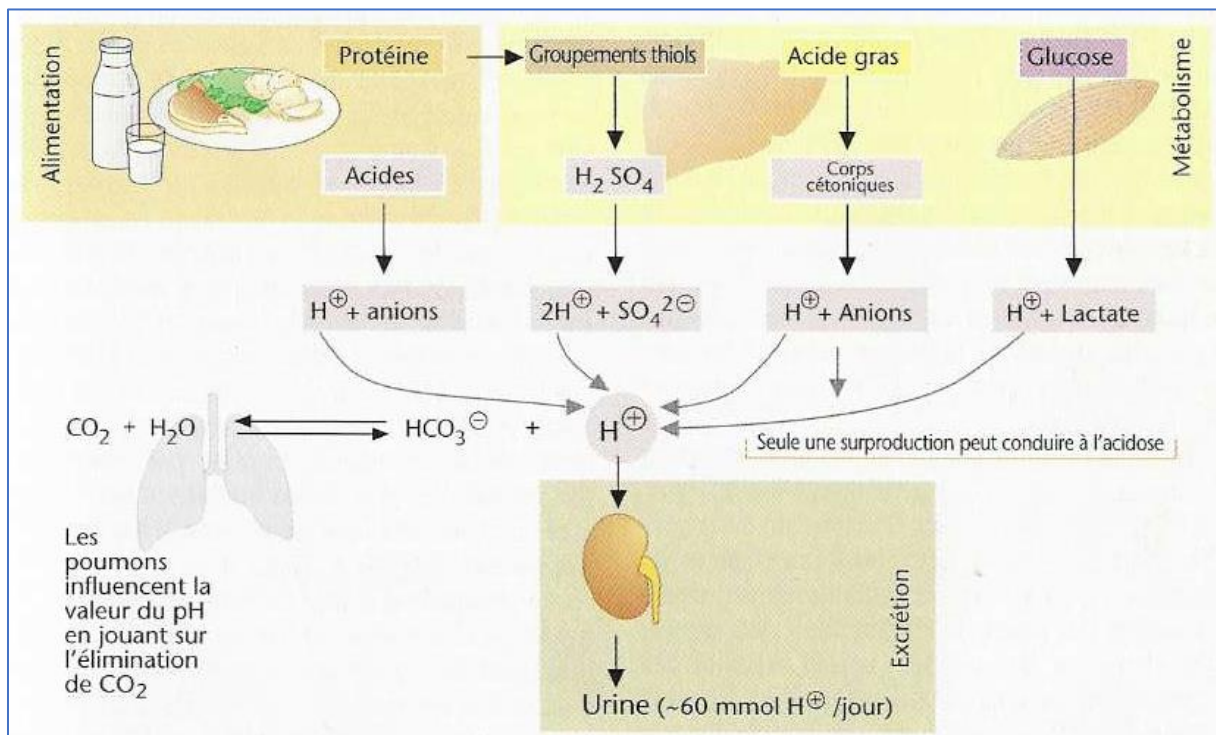
Solutions tampons et systèmes biologiques de régulation du pH

L'étude des solutions tampon reste un élément qui permet de donner du sens aux équilibres acide-base. Dans les systèmes biologiques, la régulation du pH est cruciale. Deux grands systèmes tampons sont à connaître.

➤ Le système bicarbonate ($\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$)

C'est le principal système tampon du plasma sanguin. Il repose sur l'équilibre dont l'équation est $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}^+$.

Ce système est couplé à la régulation respiratoire (élimination du dioxyde de carbone) et rénale (élimination des ions hydrogène), ce qui permet de maintenir un pH sanguin proche de 7,4.



Source : Atlas de biochimie (Médecine-sciences/Flammarion)

Fig 10 : régulation de l'équilibre acido-basique

➤ Le système phosphate ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$)

Actif dans les fluides intracellulaires et les urines, ce système tampon repose sur l'équilibre : $\text{HPO}_4^- = \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$.

Il est efficace autour de $\text{pKa} \approx 7,2$, ce qui le rend pertinent pour maintenir la stabilité du pH à l'intérieur des cellules.

La mesure du pH : un outil transversal au carrefour des équilibres, de l'oxydo-réduction et des chaînes de mesure.

La mesure de pH, outre les analyses et suivi qu'elle permet de faire dans le cadre de l'étude de certains équilibres en solution, permet de mobiliser des connaissances dans le domaine de l'oxydo-réduction et de donner sens à la notion d'étalonnage.

- Comprendre la nécessité d'un étalonnage

Un pH-mètre est un voltmètre spécialisé qui mesure la différence de potentiel entre une électrode sensible aux ions hydrogène et une électrode de référence.

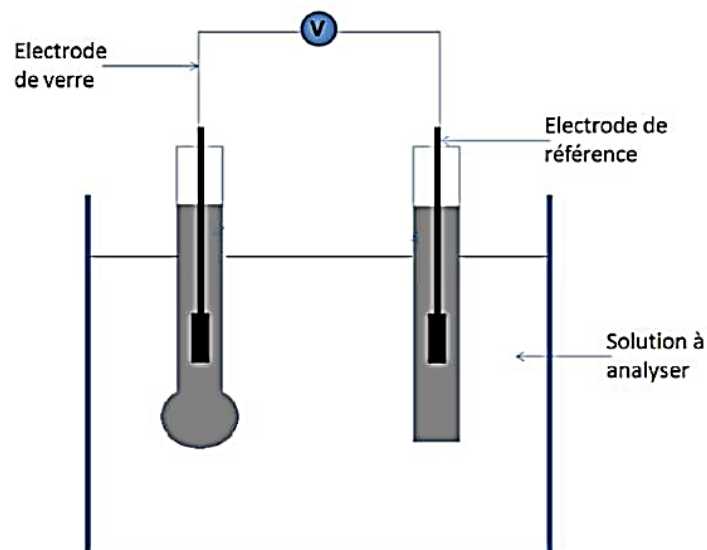


Image libre de droit

Fig 11 : schéma de principe d'un pH-mètre

Les électrodes de référence les plus utilisées sont l'électrode au calomel saturé et l'électrode au chlorure d'argent. L'électrode indicatrice est une électrode de verre dont la membrane est sensible aux ions hydrogène. Elle fournit un potentiel qui dépend directement du pH de l'échantillon. L'électrode de référence présente quant à elle, un potentiel constant. La mesure de pH repose sur la différence de potentiel entre ces deux électrodes.

L'électrode de verre met en jeu l'équilibre du couple redox de l'hydrogène (modélisation simplifiée par le couple H^+/H_2) : $2H^+ + 2e^- = H_2(g)$

Le potentiel d'électrode est donné par l'équation de Nernst :

$$E_{\text{verre}} = E_{H^+/H_2}^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]}{c^\circ}$$

Soit en l'exprimant en fonction du pH :

$$E_{\text{verre}} = E_{\text{H}^+/\text{H}_2}^{\circ} - \frac{2,303 \cdot RT}{F} \cdot \text{pH}$$

L'électrode de référence a un potentiel E_{ref} qui est fixe. Le pH-mètre mesure la différence de potentiel : $E_{\text{mesuré}} = E_{\text{verre}} - E_{\text{ref}}$

On peut écrire de manière simplifiée :

$$E_{\text{mesuré}} = (E_{\text{verre}}^{\circ} - E_{\text{ref}}) - \left(\frac{2,303 \cdot RT}{F} \right) \cdot \text{pH}$$

E_{verre}° inclut notamment le potentiel interne de la solution de référence dans l'électrode de verre ainsi que les caractéristiques de la membrane de verre. D'autres effets (asymétrie de membrane, jonction liquide, vieillissement...) influencent la mesure. On se base alors sur une relation du type :

$$E_{\text{mesuré}} = a - S \times \text{pH}$$

- a est une constante ajustée pour que $E_{\text{mesuré}} = 0$ à $\text{pH} = 7$ (point zéro),
- S est la pente expérimentale déterminée à partir de deux points (généralement $\text{pH} = 4$ et $\text{pH} = 7$, ou $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 10$). Cette pente est ajustée pour être proche de la pente théorique à 25 °C égale à :

$$-\frac{2,303 \cdot RT}{F} = -0,05916 \text{ V/pH}$$

Cette modélisation permet d'expliquer pourquoi un pH-mètre nécessite toujours une phase d'étalonnage avant mesure, et pourquoi le potentiel mesuré n'a pas de signification directe sans calibration.

➤ La chaîne de mesure du pH

La chaîne fonctionnelle du pH-mètre permet d'identifier les éléments suivants :

1. Une électrode combinée

Dans la plupart des pH-mètres modernes, les électrodes de mesure et de référence sont combinées en une seule sonde pour faciliter l'utilisation.

2. Un amplificateur de signal

Le potentiel généré entre les deux électrodes est très faible (de l'ordre du millivolt). Un amplificateur à haute impédance est utilisé pour renforcer ce signal sans le perturber.

3. Un convertisseur analogique-numérique

Le signal analogique amplifié est converti en une valeur numérique que le microprocesseur peut traiter.

4. Un microprocesseur

Le microprocesseur calcule la valeur du pH à partir du signal numérique, en tenant compte de la température (compensation automatique ou manuelle).

5. Un dispositif d'affichage

La valeur du pH est ensuite affichée sur l'écran du pH-mètre.

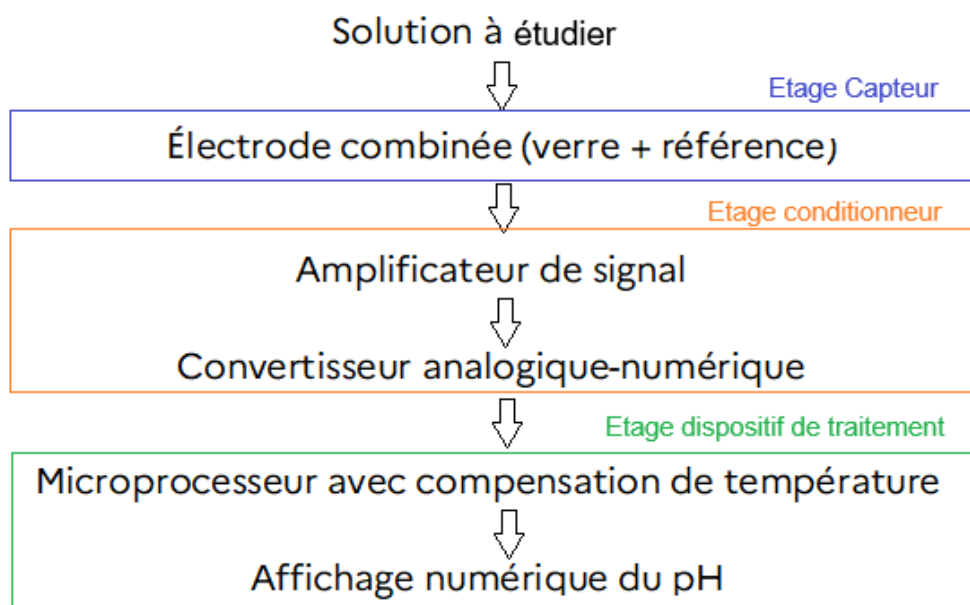
6. Une sonde de température

La mesure du pH est influencée par la température. Une sonde de température intégrée ou externe permet de compenser cette influence pour obtenir une mesure précise.

La lecture métrologique retient, quant à elle, les trois étages suivants.

- **Capteur** : électrode de verre
- **Conditionneur** : amplificateur de tension et convertisseur analogique/numérique ;
- **Dispositif de traitement et d'affichage** : relation entre la différence de potentiel mesurée et le pH puis affichage de la valeur.

En résumé :



Ce type de dispositif de mesure, combinant une réponse chimique et un traitement électronique, est d'autant plus essentiel à comprendre que des dispositifs analogues se retrouvent dans les automates de laboratoire. C'est pourquoi la question de la fiabilité des données numériques produites devient centrale.

- Pourquoi limiter à deux chiffres après la virgule l'expression d'une valeur de pH ?

Dans tout système de mesure, il est essentiel d'accorder le nombre de décimales affichées à la précision réelle de l'instrument.

Même après un bon étalonnage, un pH-mètre de laboratoire a une incertitude typique de l'ordre de $\pm 0,05$ à $\pm 0,1$ unité de pH. Cela signifie qu'une valeur de pH affichée à trois ou quatre décimales donne l'illusion d'une exactitude trompeuse, car l'appareil n'est pas capable de garantir une telle précision.

Exprimer une valeur de pH avec deux chiffres après la virgule correspond à la résolution pertinente d'un instrument fiable et correctement étalonné.

II- Cinétique chimique et activité enzymatique

Une approche simplifiée de la cinétique chimique

Le nouveau programme de BTS Biologie Médicale conserve les grands principes de l'étude de la cinétique en réacteur fermé et uniforme, mais allège considérablement certains aspects théoriques.

Il n'est plus attendu de déterminer l'ordre d'une réaction, d'introduire l'énergie d'activation ni d'exploiter la loi d'Arrhenius.

L'objectif est de renforcer les compétences expérimentales des étudiants et de consolider les notions essentielles : vitesse de réaction, temps de demi-réaction, influence des paramètres expérimentaux, suivi cinétique et rôle des catalyseurs qui permet d'ouvrir sur la détermination d'une activité enzymatique.

L'activité enzymatique

Les dosages enzymatiques sont couramment pratiqués en laboratoire de biologie médicale pour évaluer l'état fonctionnel d'organes ou détecter des pathologies spécifiques². Ces dosages reposent sur la détermination de l'activité enzymatique, via le suivi cinétique de la transformation d'un substrat. On ne dose ici ni l'enzyme directement, ni sa masse, mais l'effet qu'elle produit : la vitesse de transformation d'un substrat spécifique, mesurée dans des conditions standardisées. Lorsque le substrat ou l'un des produits formés absorbe dans le visible, il est possible de suivre la transformation par spectrophotométrie.

On attend de l'étudiant qu'il soit capable de justifier l'emploi de l'absorbance pour l'évaluation de l'activité enzymatique, sa définition étant fournie.

L'activité enzymatique z_{enzyme} est définie comme la quantité de matière de substrat transformée par unité de temps dans des conditions données (notamment de pH, température, etc). Elle correspond à la vitesse totale de transformation et s'exprime généralement en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. On définit également la concentration d'activité enzymatique $b_{enzyme} = \frac{z_{enzyme}}{V_{enzyme}}$, V_{enzyme} étant le volume d'enzyme introduit dans le milieu réactionnel.

Prenons l'exemple d'une réaction entre une enzyme E et un substrat S. Il se forme un complexe enzyme-substrat, puis deux produits différents P_1 et P_2 . L'enzyme est libérée et le cycle se répète.

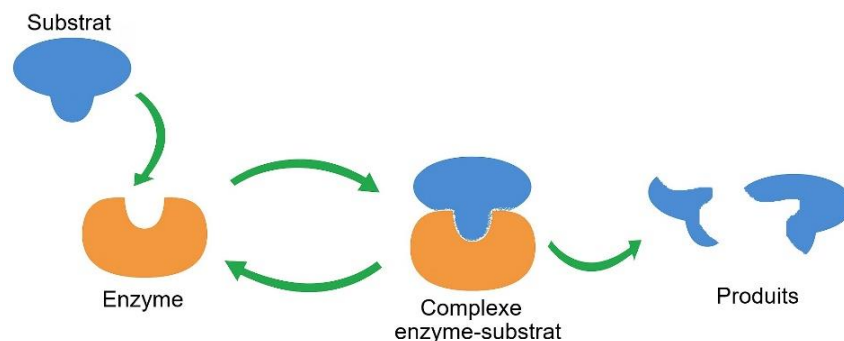
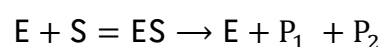


Image libre de droit

Fig 12 : complexe enzyme-substrat



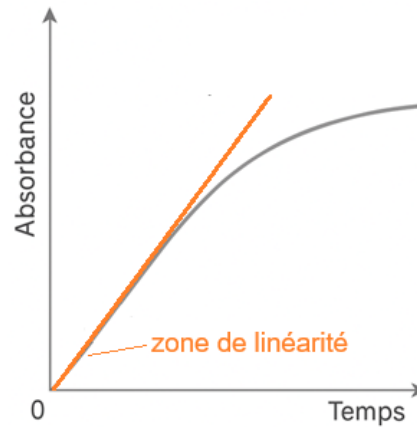
² On peut citer par exemple le dosage des transaminases (ALAT, ASAT) pour l'exploration des atteintes hépatiques, le dosage de l'amylase ou lipase pour le diagnostic de pancréatite ou encore le dosage de la CK (créatine kinase) pour la surveillance des atteintes musculaires ou cardiaques.

Supposons que le produit P_1 absorbe dans le visible, sa concentration $[P_1]$ peut être suivie dans le temps grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot [P_1]$$

- A est l'absorbance du milieu à l'instant t
- ε est le coefficient d'absorption molaire (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- l est la largeur de la solution traversée (en cm)
- $[P_1]$ est la concentration de l'espèce absorbante

La courbe donnant les variations $A(t)$ permet ainsi de suivre $[P_1](t)$.



L'absorbance augmente progressivement, et sa croissance est linéaire uniquement au début de la réaction. En pratique, on détermine expérimentalement l'activité enzymatique à l'origine de la transformation, dans la zone linéaire de la courbe d'absorbance, afin d'obtenir une mesure représentative de la vitesse maximale initiale.

D'après la définition de l'activité enzymatique :

$$Z_{\text{enzyme}} = -\frac{dn_S}{dt}$$

Par conservation de la matière, dans une réaction du type $S \rightarrow P_1 + P_2$, le substrat étant consommé et le produit formé à raison de 1 pour 1 on a :

$$Z_{\text{enzyme}} = \frac{dn_{P_1}}{dt}$$

Si l'on se place sur un intervalle court autour de l'origine on a :

$$Z_{\text{enzyme}} = \frac{\Delta n_{P_1}}{\Delta t} \text{ or}$$

$\Delta n_{P_1} = \Delta [P_1] \times V_{\text{tot}}$ avec V_{tot} le volume total du milieu réactionnel.

$$\text{Donc } Z_{\text{enzyme}} = \frac{\Delta n_{P_1}}{\Delta t} = \frac{\Delta [P_1]}{\Delta t} \times V_{\text{tot}}$$

On déduit facilement :

$$Z_{\text{enzyme}} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot l} \times V_{\text{tot}}$$

ou encore :

$$b_{\text{enzyme}} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enzyme}}}$$

Ces formules permettent une exploitation quantitative du suivi spectrophotométrique d'une activité enzymatique, et justifient rigoureusement l'apparition de l'absorbance dans les calculs.

Les unités d'activité enzymatique ne sont évidemment pas exigibles dans le cadre du programme de physique-chimie. Toutefois, les enseignants peuvent utilement faire le lien avec les enseignements professionnels :

Le Système International définit l'unité catal (kat) : $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ mais en pratique, on utilise plutôt les $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ (qui est l'unité enzymatique, notée U) car adaptée aux faibles concentrations.

Il est facile de montrer que $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} = 1,667 \cdot 10^{-8} \text{ kat}$.

MODULE 4

Ce module est constitué d'un gros redéploiement des contenus de physique issus des anciens programmes et introduit de nouveaux contenus. Son objectif est de rassembler les connaissances et compétences nécessaires à la compréhension des phénomènes physiques impliqués dans des techniques ou des instruments d'analyse utilisées en laboratoire. Il met ainsi l'accent sur des approches concrètes, adossées à l'expérimentation, et articulées avec le **module 1** et les enseignements professionnels.

Le programme allège certains domaines tout en renforçant d'autres thèmes, tels que la spectrométrie de masse par temps de vol ou la dynamique des fluides.

A partir de notions fondamentales développées avec un corpus mathématique abordable pour des étudiants venant d'orientations diverses, l'objectif est de les amener à reconnaître des phénomènes physiques dans les dispositifs expérimentaux et à pouvoir appliquer des lois pour comprendre une technique d'analyse ou le fonctionnement d'un appareil de mesure.

I. La radioactivité, le marquage radioactif et les traceurs

Le nouveau programme introduit une approche plus qualitative de la radioactivité que dans l'ancien programme. Les étudiants n'ont pas à maîtriser les outils mathématiques liés à la loi de décroissance exponentielle, désormais hors programme. L'accent est davantage mis sur l'interprétation de courbes de décroissance et l'exploitation du temps de demi-vie par itération.

Des techniques d'imagerie médicale utilisant la radioactivité

Dans le cadre des techniques d'imagerie nucléaire, un isotope radioactif peut être intégré à une espèce chimique injectée dans l'organisme de deux façons distinctes :

- Soit il est greffé sur une molécule biologique d'intérêt, à laquelle il confère un pouvoir de suivi précis – on parle alors de marquage radioactif. Ce marquage peut se faire par substitution d'un atome stable (par exemple, ^{14}C ou ^3H) ou par ajout d'un atome radioactif sur la molécule (comme ^{18}F greffé sur une molécule de glucose). Le marqueur ainsi obtenu permet d'étudier avec finesse le devenir de cette molécule dans l'organisme (localisation, absorption, transformation...).

- Soit l'isotope est injecté seul ou faiblement associé à une entité chimique, sans ciblage moléculaire spécifique – on parle alors de traceur radioactif. Le traceur permet d'observer la répartition de l'isotope dans un tissu ou un organe. C'est le cas par exemple de l'iode-123 en scintigraphie thyroïdienne, ou du technétium-99m, utilisé dans de nombreux examens scintigraphiques.

Dans les deux cas, le rayonnement émis par la désintégration radioactive est détecté par un dispositif adapté, intégré à une chaîne de mesure, permettant de reconstituer une image fonctionnelle de l'organisme.

➤ Quelques applications biomédicales

La Tomographie par Émission de Positons (TEP-scan)

• **Principe**

Dans cette technique, le traceur le plus utilisé est le fluor 18 (^{18}F), isotope émetteur de positons (β^+) avec un temps de demi-vie d'environ 110 min. Il est incorporé dans une molécule analogue au glucose, le fluorodésoxyglucose, noté FDG (fig 13). Cette molécule oriente la distribution du traceur dans l'organisme en suivant les voies du métabolisme glucidique, ce qui permet notamment de repérer des zones à forte consommation de glucose, comme les tissus tumoraux.

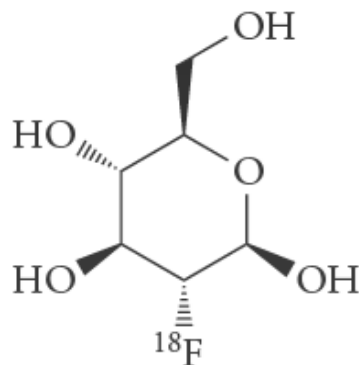


Fig 13 : fluorodésoxyglucose

Lors de sa désintégration, le ^{18}F émet un positon qui annihile un électron. Il y a alors émission de deux photons γ , émis en coïncidence (chacun d'énergie 511 keV et émis à 180° l'un de l'autre).

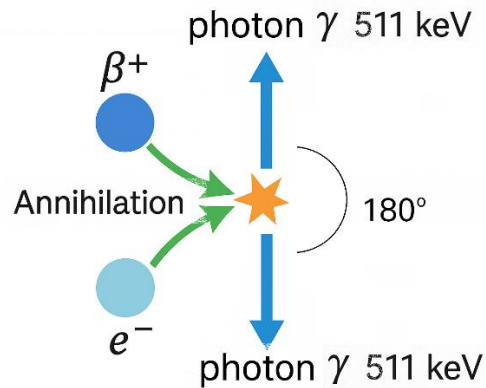
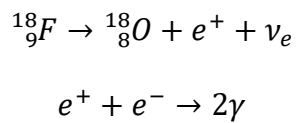


Image libre de droit

Fig 14 : annihilation positon-électron

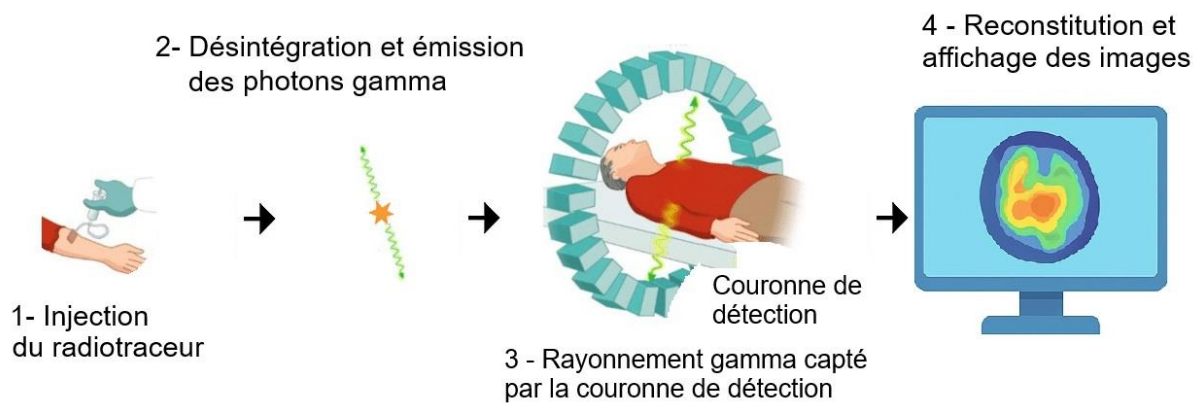
Le TEP-scan (ou PET-scan) est un dispositif capable de détecter les deux photons gamma émis en coïncidence lors de l'annihilation d'un positon avec un électron. En enregistrant simultanément ces photons émis à 180° l'un de l'autre, l'appareil reconstitue la ligne d'émission et localise leur point d'origine, c'est-à-dire le site de l'annihilation. Comme ce point se situe à quelques millimètres de l'endroit où le fluor-18 s'est accumulé, il est possible de cartographier les zones métaboliquement actives de l'organisme.

- **La chaîne fonctionnelle et la chaîne métrologique du TEP-scan**

Après l'injection du traceur et la désintégration des isotopes, le rayonnement gamma émis atteint la couronne de détection du dispositif. Il entre alors en interaction avec des scintillateurs, le plus souvent constitués de matériaux cristallins (comme l'iodure de sodium dopé au thallium, ou encore l'oxyde de bismuth et de germanium). Ces scintillateurs convertissent l'énergie du photon gamma en lumière visible, qui est ensuite captée par des photodétecteurs (photodiodes ou photomultiplicateurs). Le signal lumineux est alors transformé en signal électrique, puis amplifié, numérisé et traité informatiquement afin de reconstituer une image des zones d'émission.

La chaîne fonctionnelle est ainsi constituée des étages suivants.

- 1- La source radioactive (traceur injecté) ;
- 2- L'interaction physique (désintégration, annihilation) ;
- 3- La détection des rayonnements (scintillateur et photodétecteurs) ;
- 4- Le conditionnement et le traitement puis la reconstitution de l'image.



Source : d'après CEA

Fig 15 : chaîne de mesure d'un traçage radioactif

La chaîne métrologique comporte quant à elle moins d'étages. Le scintillateur, est un composant optique passif : il convertit les photons gamma en photons de lumière visible, mais ce n'est pas un capteur au sens de la chaîne de mesure, car il ne génère pas encore de signal exploitable. Le capteur au sens strict est le photodétecteur qui suit.

Etage de la chaîne	Elément du TEP-scan	Rôle
Capteur	Photodétecteur	Transforme la lumière visible du scintillateur en signal électrique
Conditionneur	Circuit d'amplification et conversion analogique/numérique	Il adapte le signal (filtrage, amplification, numérisation)
Dispositif de traitement	Logiciel de reconstitution	Localise les émissions gamma et génère l'image TEP

Scintigraphie

Cette technique permet d'évaluer l'état fonctionnel d'un tissu. Elle repose sur l'utilisation d'isotopes radioactifs, comme le technétium-99m ou l'iode-131, ciblant des organes spécifiques tels que les os ou la thyroïde.

Certaines scintigraphies fonctionnent selon le même principe de marquage radioactif que les TEP-scans : l'isotope est alors couplé à une molécule organique spécifiquement dirigée vers un tissu ou un organe. C'est le cas, par exemple, des scintigraphies osseuses ou rénales.

D'autres scintigraphies utilisent un isotope radioactif non couplé à une molécule, autrement dit un traceur. Celui-ci est capté spontanément par l'organe cible en fonction de son métabolisme. C'est le cas de l'iode-123, fixé sélectivement par la thyroïde, qui consomme naturellement l'iode.

Dans le cadre de la scintigraphie, les rayons gamma sont émis directement par le noyau radioactif du traceur ou du marqueur injecté, sans passer par une annihilation, comme c'est le cas en TEP. Ces photons gamma sont émis lors de la désexcitation du noyau, qui rejoint un état plus stable sans modification de sa nature chimique.

La chaîne fonctionnelle de l'appareil de scintigraphie diffère de celle mise en œuvre en TEP, notamment au niveau de la gamma-caméra. En revanche, à partir du photodétecteur, la chaîne métrologique reste similaire : le signal est converti, amplifié, numérisé, puis analysé afin de reconstituer l'image.

II- Les phénomènes optiques rencontrés dans les techniques biomédicales

L'optique intervient dans de nombreuses techniques d'analyse utilisées en biologie et en médecine. Dans le cadre du programme de BTS Biologie Médicale, une approche qualitative et quantitative est adoptée, basée sur l'optique géométrique et l'identification des phénomènes de propagation de la lumière.

Les phénomènes optiques sont exploités dans diverses applications biomédicales, notamment les microscopes pour l'imagerie cellulaire, les fibres optiques pour l'endoscopie, les spectrophotomètres pour les dosages enzymatiques, et les cytomètres pour l'analyse cellulaire.

Modèle de l'optique géométrique

Ce modèle, utilisé lorsque la longueur d'onde de la lumière est négligeable devant les dimensions des obstacles traversés, permet de représenter la lumière par des rayons lumineux.

Ce modèle est particulièrement utile car il simplifie l'analyse des systèmes optiques en utilisant des rayons lumineux, facilitant ainsi la conception et l'optimisation des instruments optiques.

Les phénomènes optiques rencontrés dans le programme

Phénomène	Utilisation biomédicale
Réflexion	Miroirs, réflexion interne dans les fibres optiques.
Réfraction	Lentilles de microscope, interfaces des fibres optiques.
Réflexion totale	Transmission dans les fibres optiques à saut d'indice.
Diffraction	Explique la limite de résolution des microscopes.
Diffusion	Photométrie des milieux troubles.
Absorption	Photométrie, dosages enzymatiques, spectroscopie.

Le phénomène de réflexion totale est crucial dans la compréhension de certaines fibres optiques. Le phénomène d'absorption, quant à lui, à la base des mesures spectrophotométriques très fortement rencontrées.

La diffusion est à distinguer de la diffraction. La diffusion est due à des particules en suspension, tandis que la diffraction résulte du passage de la lumière au voisinage d'obstacles ou d'ouvertures dont la taille est comparable à la longueur d'onde.

Réflexion, diffusion : quelles différences physiques ?

Dans le cadre du programme, on distingue réflexion et diffusion comme deux phénomènes optiques, mais la frontière entre les deux est parfois floue.

- La réflexion est un phénomène spéculaire : le rayon incident rebondit sur une surface sans changement de direction aléatoire, selon les lois de Snell-Descartes. Il n'y a pas d'interaction profonde avec la matière : le photon ne perd pas d'énergie, sa longueur d'onde reste inchangée, et l'angle réfléchi est défini.
- La diffusion, en revanche, implique une interaction entre les photons et les particules de la matière (molécules, grains...). Elle conduit à une réémission de lumière dans des directions variées, souvent aléatoires, et parfois à des modifications de fréquence :

En diffusion élastique (diffusion de Rayleigh ou diffusion de Mie), le photon ne perd pas d'énergie et la longueur d'onde de l'onde diffusée ne change pas, mais certaines directions de diffusion peuvent être privilégiées, en fonction de la taille relative des particules par rapport à la longueur d'onde.

La diffusion de Rayleigh se produit lorsque les particules sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde de la lumière, tandis que la diffusion de Mie se produit lorsque les particules sont de taille comparable à la longueur d'onde.

Dans le cas de la diffusion de Rayleigh l'intensité I de la lumière diffusée est proportionnelle à $\frac{1}{\lambda^4}$. Cela signifie que les courtes longueurs d'onde (bleu/violet) sont beaucoup plus diffusées que les longues (rouge). Ce type de diffusion est aussi anisotrope : il y a une dépendance directionnelle, plus forte à certains angles.

La diffusion de Mie est moins dépendante de la longueur d'onde. La lumière est diffusée dans des directions privilégiées, souvent vers l'avant.

En diffusion inélastique, le photon perd de l'énergie, et la lumière diffusée a une longueur d'onde modifiée (ex. : effet Raman).

Ces phénomènes de diffusion sont exploités dans plusieurs techniques biomédicales détaillées ci-dessous, notamment la turbidimétrie, la néphélométrie et la cytométrie en flux.

III- La photométrie des milieux troubles

La photométrie des milieux troubles désigne l'ensemble des techniques permettant d'évaluer le trouble d'un milieu. Dans un liquide contenant des particules en suspension (cellules, macromolécules, colloïdes...), l'interaction avec la lumière se traduit par un phénomène de diffusion. Chaque particule se comporte alors comme une source secondaire de lumière. Plus la concentration de particules est élevée, plus la lumière incidente est diffusée et/ou absorbée, ce qui rend le milieu visuellement trouble.

Turbidimétrie-opacimétrie

Dans la pratique, la turbidimétrie peut être mise en œuvre de manière visuelle, par comparaison avec des étalons de turbidité (comme l'échelle de Mac Farland utilisée en microbiologie), ou de manière instrumentale, en mesurant l'atténuation du rayonnement lumineux dans l'axe du faisceau incident.

Lorsque la mesure est faite dans l'axe du faisceau lumineux incident, on parle plus précisément d'opacimétrie. Cette méthode repose sur la quantification de la lumière transmise, et l'atténuation mesurée dépend à la fois de l'absorption par les particules et de leur capacité à dévier la lumière. Le résultat est exprimé par l'atténuation D (à ne pas confondre avec l'absorbance réservée aux milieux homogènes), définie par :

$$D = \log\left(\frac{I_0}{I_T}\right)$$

où I_0 est l'intensité lumineuse incidente et I_T l'intensité transmise.

On peut dans certains cas assimiler l'atténuation à une loi de type linéaire :

$$D = k \cdot C_N \cdot l$$

où k est un coefficient d'atténuation dépendant de nombreux facteurs (forme, taille, nature des particules), C_N leur concentration et l la largeur de la cuve.

L'opacimétrie est particulièrement adaptée à l'estimation rapide de la biomasse totale en culture microbienne, sans distinction entre cellules vivantes et mortes.

Enfin, la longueur d'onde utilisée influence la sensibilité de la mesure : plus la lumière est bleue (courte longueur d'onde), plus l'atténuation est forte. En revanche, des longueurs d'onde trop courtes peuvent être absorbées par le milieu. Un compromis est souvent trouvé entre 550 et 700 nm.

Néphélométrie

La néphélométrie repose sur la mesure de la lumière diffusée par les particules en suspension, généralement sous un angle de 90° par rapport au faisceau incident. Cette méthode est particulièrement sensible et permet la détection de très faibles concentrations de particules ou de macromolécules, notamment dans des applications immunologiques (dosages d'anticorps, d'antigènes ou de protéines sériques par immunoprécipitation).

Le principe repose sur la loi de Rayleigh évoquée plus haut, qui modélise la diffusion de la lumière par des particules de taille inférieure ou proche de la longueur d'onde de la lumière incidente. Cette loi permet d'exprimer l'intensité lumineuse diffusée selon un angle θ par la relation :

$$I_D(\theta) = K(n, \theta) \cdot I_0 \cdot V^2 \cdot \frac{1}{\lambda_0^4} \cdot C \quad \text{où :}$$

- $I_D(\theta)$ est l'intensité de la lumière diffusée dans la direction θ ;
- I_0 est l'intensité de la lumière incidente ;
- V est le volume moyen des particules ;
- C est la concentration en particules ;
- λ_0 est la longueur d'onde de la lumière dans le vide ;
- $K(n, \theta)$ est un facteur dépendant de l'indice de réfraction et de l'angle d'observation.

Cette relation montre que l'intensité de la lumière diffusée est inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde. Ainsi, les courtes longueurs d'onde sont beaucoup plus diffusées que les longues longueurs d'onde. Pour deux longueurs d'onde de 400 nm (bleu) et 710 nm (rouge), on observe un facteur de diffusion d'environ 10 fois plus fort dans le bleu. Cela explique pourquoi la néphélométrie est plus sensible à courte longueur d'onde.

L'unité de mesure classiquement utilisée est l'UTN (Unité de Turbidité Néphélométrique).

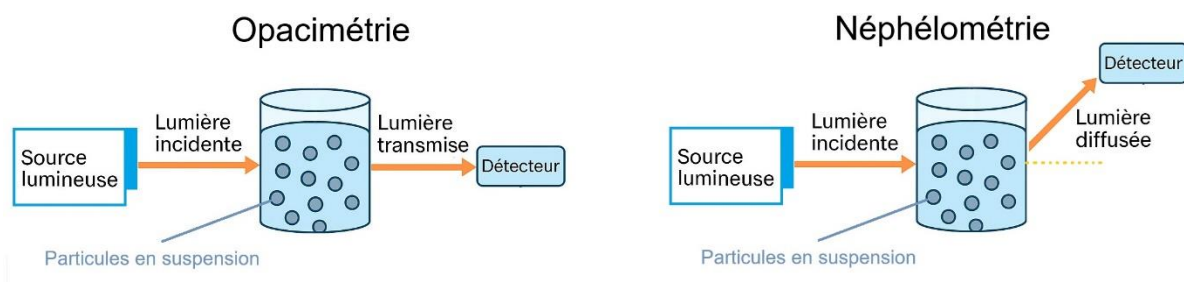


Image libre de droit

Fig 16 : principe de l'opacimétrie et la néphélométrie

Il est à noter que selon les ouvrages, le terme turbidimétrie est parfois utilisé de façon générique pour désigner à la fois les approches fondées sur la lumière transmise (opacimétrie) et/ou celles basées sur la lumière diffusée (néphélométrie).

La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse qui permet d'étudier individuellement des cellules ou des particules en suspension, en les faisant circuler dans un flux liquide étroitement canalisé. Chaque particule traverse une zone, dite zone d'interrogation, où elle croise un faisceau laser. Comme en turbidimétrie ou en néphélométrie, l'interaction entre la lumière et les

particules entraîne une partie de la lumière transmise dans l'axe initial, et une autre partie diffusée dans d'autres directions.

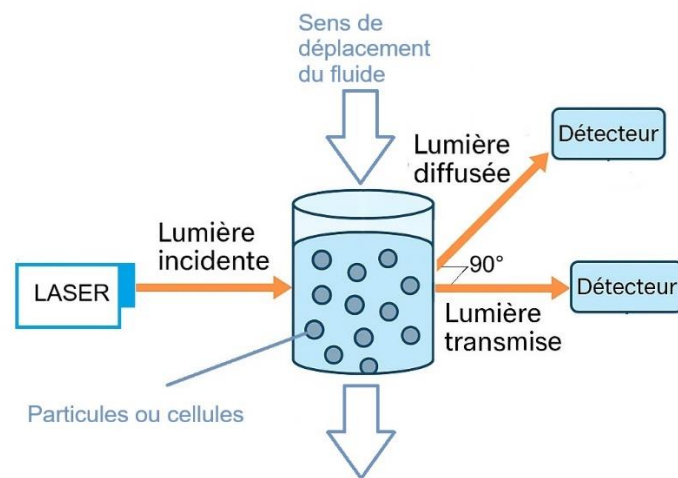


Image libre de droit

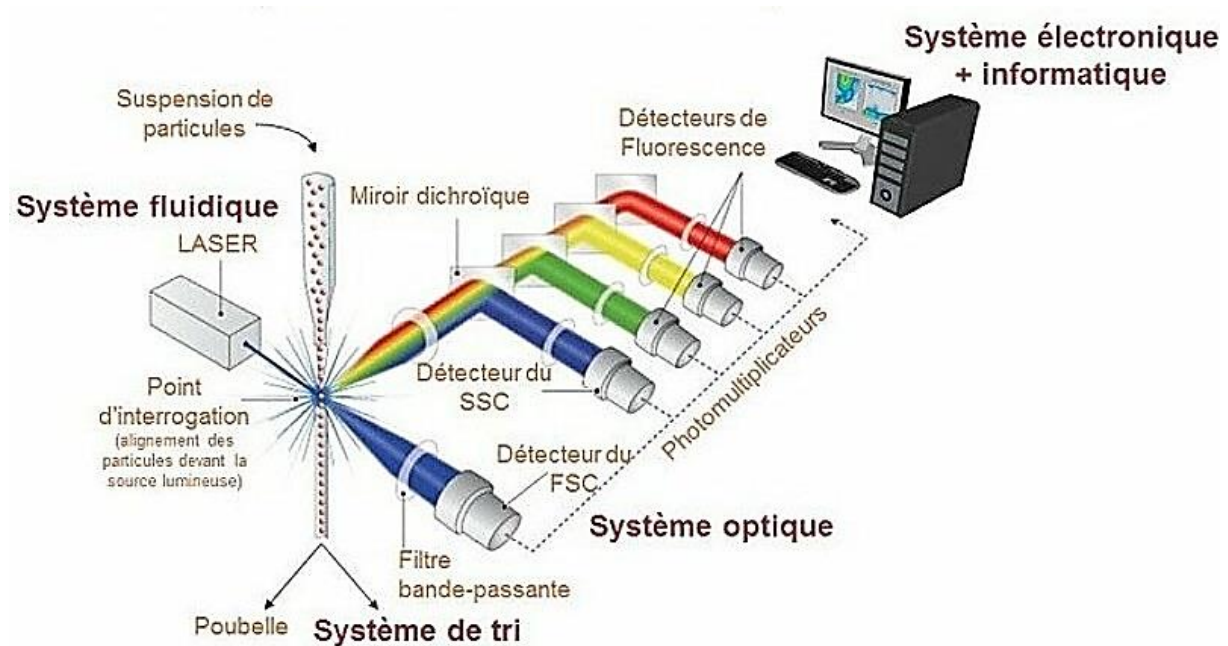
Fig 17 : principe de la cytométrie en flux

La lumière transmise dans l'axe du faisceau est désignée sous le nom de *Forward Scatter* (FSC) : elle est directement liée à la taille de la cellule. La lumière diffusée latéralement, notamment à 90° par rapport à l'axe, est appelée *Side Scatter* (SSC) : elle donne des indications sur la granularité interne de la cellule, c'est-à-dire sa complexité structurale (présence de granules, segmentation du noyau, etc.). Ce principe optique est donc une généralisation des techniques de diffusion de la lumière vues précédemment, mais ici appliqué à des particules biologiques individuelles.

La cytométrie en flux va plus loin, car elle peut combiner à ces mesures physiques des données biochimiques grâce à l'utilisation de fluorochromes. Ceux-ci sont des composés capables d'absorber la lumière incidente (celle du laser) et de réémettre une lumière de plus grande longueur d'onde. En couplant ces fluorochromes à des anticorps dirigés contre des marqueurs cellulaires spécifiques, il devient par exemple possible de repérer la présence de ces marqueurs à la surface des cellules, ou même à l'intérieur après perméabilisation.

La cellule croise donc le faisceau laser dans le flux, et les différentes lumières issues de la diffusion ou de la fluorescence sont recueillies, filtrées, séparées par longueur d'onde, puis quantifiées. Le système de détection permet d'associer à chaque cellule une série d'informations : taille, granularité, et intensités de fluorescence selon les marqueurs utilisés.

Pour assurer cette analyse, le cytomètre repose sur une chaîne de mesure complète, composée de plusieurs sous-systèmes.



Source : <https://bicel.univ-lille.fr>

Fig 18 : chaîne fonctionnelle d'un cytomètre en flux

Le système fluïdique dirige les cellules, en suspension dans un fluïde, dans un flux central aligné grâce à un liquide de gaine. Ce dispositif assure que les cellules arrivent une par une dans la zone de mesure (point ou zone d'interrogation), évitant tout chevauchement. Le système optique comprend les lasers, les filtres et les photomultiplicateurs. Chaque laser peut exciter plusieurs fluorochromes, qui réémettent leur lumière à des longueurs d'onde distinctes. Ces signaux sont ensuite collectés et amplifiés.

Les signaux lumineux sont transformés en signaux électriques dans le système électronique, puis numérisés et transmis au système informatique. Celui-ci permet d'afficher les résultats sous forme de nuages de points, d'histogrammes ou de diagrammes bidimensionnels. Une cellule peut ainsi être localisée en fonction de deux paramètres, par exemple SSC et intensité de fluorescence, permettant de distinguer des sous-populations cellulaires de façon fine.

La cytométrie en flux peut également être couplée à un système de tri, permettant de récupérer physiquement certaines cellules identifiées sur la base de leurs caractéristiques.

IV- La fibre optique à saut d'indice

Les fibres optiques sont des dispositifs destinés à guider la lumière sur de longues distances. Elles sont constituées d'un cœur central cylindrique, de petit diamètre, entourée d'une gaine.

Dans une fibre à saut d'indice, le matériau du cœur possède un indice optique n_1 légèrement supérieur à celui de la gaine n_2 .

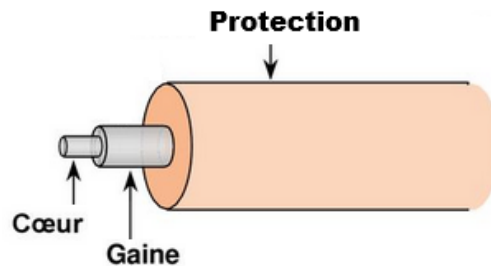


Image libre de droit
Fig 19 : fibre optique

Le fonctionnement des fibres optiques peut être expliqué de manière satisfaisante par l'optique géométrique, dès lors que les dimensions du cœur sont très supérieures à la longueur d'onde. La notion de rayon lumineux y reste pertinente, et les lois de Snell-Descartes permettent de prédire les conditions de confinement ou de fuite. Deux phénomènes d'optique géométrique sont mis en jeu dans la fibre : la réfraction, lorsque la lumière traverse une interface entre deux milieux d'indices différents, et la réflexion totale interne, si certaines conditions sont réunies.

Cône d'acceptance et ouverture numérique

Lorsque la lumière entre dans le cœur avec un angle adapté, elle subit la réflexion totale.

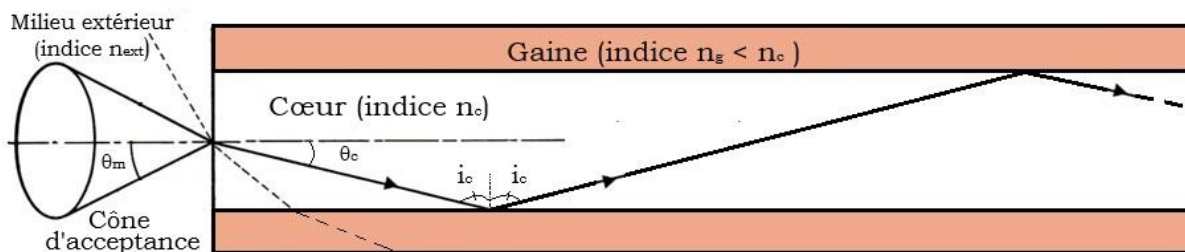


Image libre de droit
Fig 20 : cône d'acceptance et trajet de la lumière dans la fibre

Cette réflexion totale sur les parois intérieures de la gaine ne se produit que si l'angle d'incidence à l'interface cœur/gaine est supérieur à l'angle limite de réfraction pour cette interface.

Lorsqu'un faisceau lumineux entre dans la fibre depuis un milieu extérieur, seule une partie des rayons incident sur la face d'entrée du cœur donnera lieu à un guidage efficace. Tous les rayons qui pénètrent avec un angle trop élevé seront partiellement transmis dans la gaine, ou diffusés. L'ensemble des directions incidentes compatibles avec une réflexion totale forme ce qu'on appelle le cône d'acceptance de la fibre de demi-angle au sommet θ_m . L'ouverture numérique, ON, ou en anglais « numeric aperture » (NA) de la fibre est définie par la relation $ON = n_{\text{ext}} \sin(\theta_m)$.

La déduction mathématique de l'ouverture numérique repose sur deux étapes. D'abord, à l'entrée dans la fibre (air vers cœur), la lumière est réfractée. La loi de Snell-Descartes s'écrit alors :

$$n_{\text{ext}} \sin(\theta_m) = n_c \sin(\theta_c) \text{ soit } \sin(\theta_m) = \frac{n_c}{n_{\text{ext}}} \sin(\theta_c)$$

où θ_m est l'angle maximal d'entrée (par rapport à l'axe de la fibre) et θ_c l'angle du rayon réfracté dans le cœur. Ce rayon atteint ensuite l'interface cœur-gaine. Pour que la réflexion soit totale, il faut que l'angle d'incidence i à cette interface soit supérieur ou égal à l'angle critique donné par $\sin(i_c) = \frac{n_g}{n_c}$. En combinant ces deux relations, on détermine la valeur de θ_m .

$n_{\text{ext}} \sin(\theta_m) = n_c \sin(\theta_c) = n_c \sin(90 - i_c) = n_c \cos(i_c)$ en tenant compte de l'égalité $\cos(i_c)^2 + \sin(i_c)^2 = 1$ on obtient facilement l'expression de l'ouverture numérique, ON, de la fibre :

$$ON = n_{\text{ext}} \sin(\theta_m) = \sqrt{(n_c^2 - n_g^2)}.$$

$$\text{L'angle critique } \theta_c \text{ est donné par } \sin(\theta_c) = \frac{\sqrt{n_c^2 - n_g^2}}{n_c}.$$

Pour se propager dans le long de la fibre, le faisceau incident doit appartenir au cône d'acceptance d'angle θ_m .

Notons que dans les fiches constructeurs on trouve la valeur Δ du contraste d'indice relatif $\Delta = \frac{(n_c^2 - n_g^2)}{2n_c^2}$ soit $\sin(\theta_c) = \sqrt{2\Delta}$ et $ON = n_c \sqrt{2\Delta}$

Applications

Les fibres optiques sont largement utilisées dans les systèmes optiques biomédicaux. En endoscopie, elles permettent d'acheminer la lumière à l'intérieur du corps humain, même dans des zones difficiles d'accès. Dans certains dispositifs de mesure, comme les spectromètres miniatures ou les turbidimètres à lecture déportée, des fibres sont utilisées pour guider la lumière incidente ou collecter la lumière issue de l'échantillon analysé.

Complément– Autres types de fibres optiques

Il existe plusieurs variantes techniques de fibres optiques, dont certaines ne relèvent plus strictement de l'optique géométrique, mais il est utile d'en mentionner brièvement l'existence.

Les fibres à gradient d'indice sont des fibres dans lesquelles l'indice optique varie progressivement du centre vers la périphérie. Cela permet de réduire la dispersion des rayons lumineux en rendant les trajectoires plus synchrones. Par ailleurs, on distingue :

- les fibres multimodes, dans lesquelles plusieurs rayons peuvent se propager simultanément avec des angles différents (cas typique des fibres médicales standards),
- et les fibres monomodes, qui n'acceptent qu'un seul mode de propagation, ce qui améliore la résolution et la stabilité dans les télécommunications ou certaines applications de capteurs.

Dans le cadre du BTS Biologie Médicale, la fibre à saut d'indice et la réflexion totale sont les seuls aspects explicitement attendus. Il est cependant judicieux de montrer leur lien avec les lois vues en optique géométrique (réfraction, réflexion, angle critique), tout en introduisant la notion de contrôle directionnel du faisceau grâce à la condition sur l'angle d'acceptance.

V- Microscopie – Comprendre et améliorer le pouvoir de résolution

Le microscope est un outil important en biologie médicale. Ce sujet étant déjà très développé dans l'ancien programme, nous ne développons ici que son pouvoir de résolution c'est à dire capacité à distinguer deux objets très proches. Cette limite de résolution dépend directement de paramètres qui permettent de faire le lien avec d'autres parties du module 4.

La diffraction, limite fondamentale du microscope optique

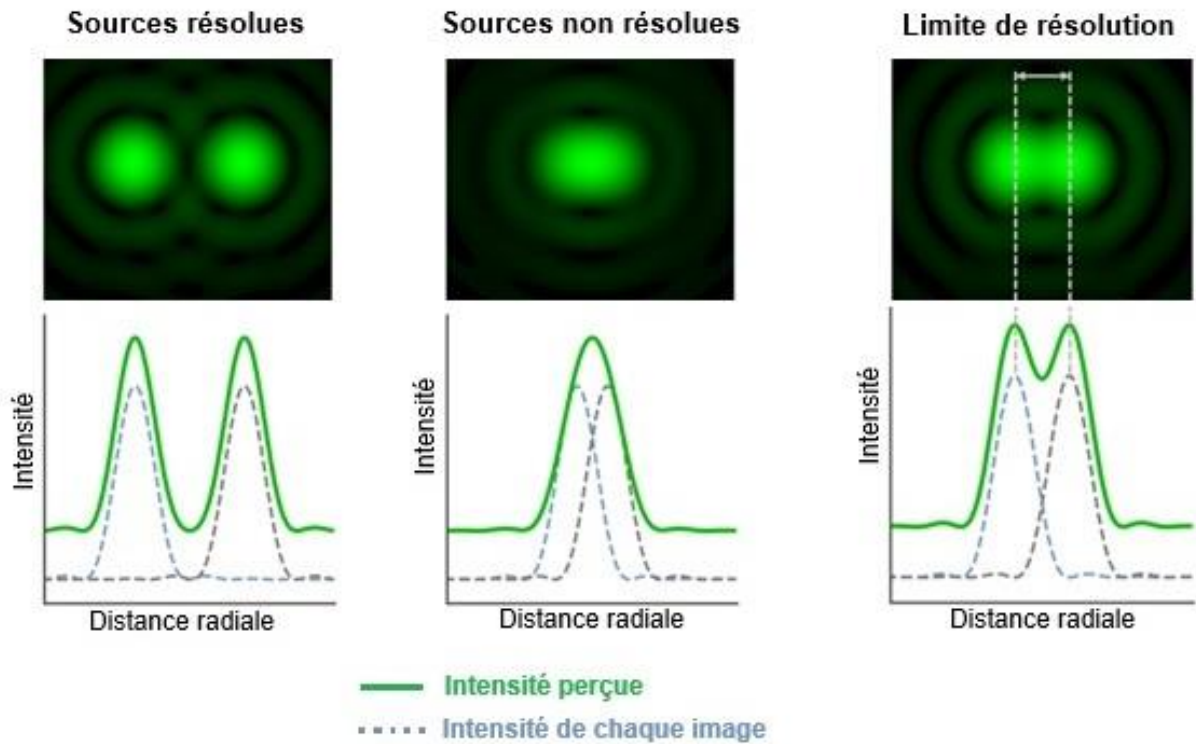
Même avec des lentilles parfaites, un microscope ne permet pas de distinguer deux objets si leur distance mutuelle est inférieure à une certaine limite physique. Cette limite est imposée par la diffraction de la lumière. En effet, lorsqu'une onde lumineuse traverse une ouverture circulaire (comme l'objectif du microscope), elle ne peut pas se focaliser en un point : elle forme une tache centrale de diffraction, entourée d'anneaux concentriques, appelée tache d'Airy.

Ce phénomène entraîne une perte de netteté et empêche de discerner des détails trop proches. L'image d'un point n'est donc jamais ponctuelle. Plus la tache est large, moins on peut distinguer deux sources lumineuses proches.

Le développement qui suit n'est pas exigible des candidats mais il permet de comprendre l'origine du phénomène de diffraction dans la formule du pouvoir de séparation du microscope.

➤ Le critère de Rayleigh

Selon le critère de Rayleigh, deux sources sont dites résolues lorsque le maximum principal d'intensité de la tache d'Airy de l'une coïncide avec le premier minimum nul de l'autre.



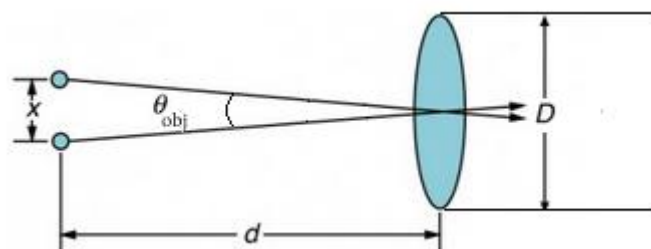
Source : d'après <https://www.edinst.com>
 Fig 21 : Critère de Rayleigh

L'angle minimal de séparation entre deux points est alors donné par :

$\theta_{min} = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{D}$ où λ est la longueur d'onde de la lumière utilisée dans le milieu de propagation et D le diamètre de l'ouverture circulaire, ici l'objectif du microscope.

➤ Du critère angulaire à la distance minimale de séparation

La figure 22 montre deux points dans l'espace objet et séparés d'une distance d de l'objectif du microscope de diamètre D .



Source : d'après infopro, Wikimedia Commons
 Fig 22 : séparation angulaire de points dans l'espace objet

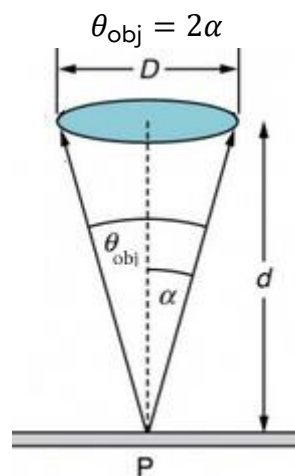
La séparation angulaire géométrique θ_{obj} de ces deux points est donnée par

$$\theta_{obj} \approx \frac{x}{d} \text{ (approximation des petits angles)}$$

Pour que les deux objets soient résolus, il faut donc que $\theta_{obj} \geq \theta_{diff}$ ce qui implique que $\frac{x}{d} \geq \frac{1,22 \cdot \lambda}{D}$. On en déduit une expression de la distance minimale δ qu'il faut entre deux objets pour qu'ils soient résolus : $\delta = \frac{1,22 \cdot \lambda \cdot d}{D}$.

C'est la formule géométrique du pouvoir de résolution : elle exprime la distance minimale x que doivent avoir deux objets pour être discernables.

Le cône de lumière capté par l'objectif est lié à son angle d'ouverture α .



Source : d'après infopro, Wikimedia Commons
Fig 23 : cône de lumière capté par l'objectif du microscope

Géométriquement et dans le cas de l'approximation des petits angles :

$$\sin \alpha \approx \tan \alpha = \frac{D}{2d}$$

Ce qui donne $\delta = \frac{0,61 \cdot \lambda \cdot d}{\sin \alpha}$

Cette grandeur est plus efficacement exprimée via l'ouverture numérique (ON), qui combine l'angle α d'ouverture de l'objectif et l'indice de réfraction n du milieu entre l'objectif et l'objet : $ON = n \sin \alpha$.

Si l'on introduit la longueur d'onde de la lumière dans le vide, $\lambda = \frac{\lambda_0}{n}$, on obtient l'expression finale du pouvoir de résolution du microscope³ :

$$\delta = \frac{0,61 \cdot \lambda_0}{ON}$$

Ainsi, plus la longueur d'onde dans le vide est courte, meilleure est la résolution.

➤ Limite de perception par l'œil et plus petit objet observable

Le pouvoir de résolution d'un microscope n'a de sens que si l'image formée est observable à l'œil nu. Autrement dit, il ne suffit pas que le microscope forme une image résolue, encore faut-il que l'œil de l'observateur soit capable de distinguer les détails révélés.

Le pouvoir séparateur de l'œil est la plus petite distance angulaire $\theta_{\min, \text{œil}}$ que l'œil peut distinguer entre deux points vus sans lentille, à grande distance.

Il vaut environ $\theta_{\min, \text{œil}} \approx 1'$ (une minute d'arc) $= \frac{1^\circ}{60} \approx 3 \cdot 10^{-4}$ rad.

À la distance d'observation de référence de 25 cm (dite distance de vision distincte), cela correspond à une séparation linéaire minimale

$$\delta_{\text{œil}} = d_{\text{œil}} \theta_{\min, \text{œil}} = 0,25 \times 3 \cdot 10^{-4} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$$

Ainsi, l'œil humain non assisté ne peut pas distinguer deux points séparés de moins de 75 micromètres.

Le microscope observe des objets très proches, séparés d'une distance l_{objet} . Grâce à son système optique, il forme une image agrandie, mais cette image ne sera visible que si elle est perçue avec un angle au moins égal à $\theta_{\min, \text{œil}}$.

Dans les conditions usuelles d'observation (image à l'infini, vision nette à 25 cm), la taille minimale visible l_{\min} (ou la taille apparente minimale discernable par l'œil) est reliée à la puissance intrinsèque \mathcal{P}_i du microscope par :

$l_{\min} = \frac{\theta_{\min, \text{œil}}}{\mathcal{P}_i}$ ou encore $l_{\min} = \frac{\theta_{\min, \text{œil}}}{4 G_c}$ en introduisant le grossissement commercial G_c .

³ Il s'agit ici du pouvoir de résolution latéral, c'est-à-dire dans le plan perpendiculaire à l'axe optique. Il existe également une résolution axiale (en profondeur), plus difficile à modéliser. Celle-ci peut être estimée par la formule $\delta_z = \frac{2 \cdot n \cdot \lambda_0}{ON^2}$ donnée sans démonstration ici.

Ce seuil correspond à la condition pour que l'image soit perçue comme résolue par l'œil humain, en fonction du grossissement commercial.

Changer le milieu d'observation : le microscope optique à immersion

Pour améliorer la résolution d'un microscope, on peut augmenter l'ouverture numérique en augmentant n , l'indice optique du milieu de propagation de la lumière. C'est le cas avec un objectif à immersion.

Dans un microscope à immersion, une goutte d'un liquide d'indice élevé (souvent huile d'immersion) est placée entre la lame et l'objectif. Le liquide remplace l'air ($n = 1$) et augmente l'indice du milieu entre l'objectif et l'échantillon. Le milieu entre lamelle et objectif est homogénéisé par l'immersion, ce qui évite la transition air-verre et minimise la réfraction non contrôlée.

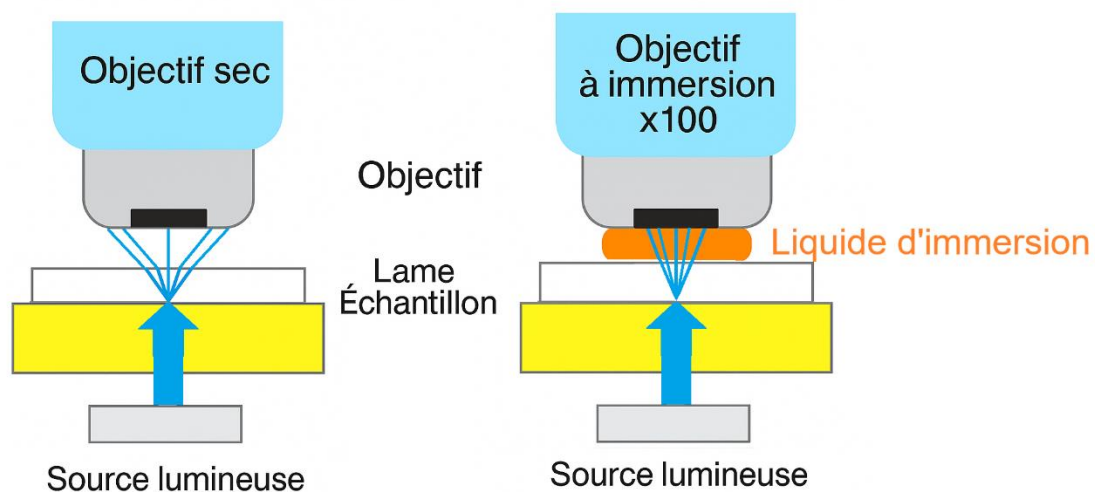


Image libre de droit

Fig 24 : Objectif sec versus objectif à immersion

Avec l'objectif à immersion, les rayons lumineux sont collectés en minimisant l'étalement de la lumière à la sortie de la lame contrairement à un objectif sec. Le liquide d'immersion est choisi pour avoir un indice proche de celui du verre, ce qui minimise les réflexions parasites aux interfaces. La valeur de cet indice optique étant plus élevée que celui de l'air, elle maximise l'ouverture numérique ($ON = n \sin \alpha$) et donc la résolution s'améliore.

Comparons à angle égal, les ouvertures numériques pour l'objectif sec et l'objectif à immersion dans une huile d'indice 1,52.

Pour l'objectif sec l'ouverture numérique s'exprime par $ON = 1,00 \cdot \sin(\alpha)$ et pour l'objectif à immersion par $ON_{\text{huile}} = 1,52 \cdot \sin(\alpha)$. À angle égal, l'ouverture numérique augmente d'environ 50 %.

Supposons que l'objectif a une ouverture numérique de 0,95 dans l'air. L'angle d'ouverture est alors $\alpha = \arcsin(0,85) \approx 58^\circ$. En gardant le même angle et en immergeant l'objectif dans une huile d'indice 1,52 il vient $ON_{\text{huile}} = 1,52 \cdot \sin(58^\circ) \approx 1,3$. Le nouveau pouvoir de résolution s'exprime par $\delta_{\text{huile}} = \frac{0,61 \cdot \lambda_0}{1,3}$ au lieu de $\delta_{\text{air}} = \frac{0,61 \cdot \lambda_0}{0,85}$. Soit une amélioration relative :

$\frac{\delta_{\text{huile}}}{\delta_{\text{air}}} \approx 0,65$. Le pouvoir de résolution s'améliore d'environ 35 %, simplement en changeant le milieu d'observation.

➤ Un objectif à immersion peut-il fonctionner dans l'air ?

Un objectif à immersion doit toujours être utilisé avec le liquide prévu. Le système optique est calculé pour que la lumière passe à travers un milieu d'indice $n > 1$. Sans immersion, la qualité de l'image chute fortement. Il y a une perte de résolution (ON inférieure), des aberrations optiques (réfraction inattendue à l'interface air/verre) voire un risque de casse ou d'endommagement (la lentille frontale est souvent très proche de l'échantillon). L'utilisateur doit impérativement mettre une goutte d'huile ou d'eau selon le type d'objectif (mentionné sur le fut de l'objectif : huile, eau, glycérol...).

Notons qu'il existe des objectifs dits « multi-immersion ». Ils sont conçus pour fonctionner avec plusieurs milieux d'immersion mais c'est indiqué clairement par le fabricant, et l'usage nécessite des réglages précis.

Inversement un objectif sec, n'est pas destiné à être immergé.

➤ Quel est le pouvoir de résolution minimal en microscopie optique ?

Dans les meilleures conditions classiques on utilise une lumière bleue ou violette ($\lambda_0 \approx 400 \text{ nm}$) avec un objectif à immersion dans l'huile ($n \approx 1,52$) et un angle d'ouverture élevé. Cela permet d'atteindre une ouverture numérique allant jusqu'à 1,4, ce qui donne un pouvoir de résolution minimal :

$$\delta_{\min} = \frac{0,61 \cdot 400}{1,4} \approx 1,7 \cdot 10^2 \text{ nm}$$

La limite pratique de résolution en microscopie optique est donc de l'ordre de 200 nm, ce qui explique pourquoi on ne peut pas observer des structures plus fines (comme les virus ou les détails subcellulaires) avec un microscope optique classique.

Remarque :

Certains objectifs très spécialisés (immersion huile + technologies avancées) peuvent atteindre $ON \approx 1,45$ voire 1,49, mais cela reste exceptionnel et coûteux.

La valeur standard haute généralement retenue dans les calculs est $ON = 1,4$, ce qui correspond aux meilleurs objectifs à immersion disponibles en routine.

Changer d'onde d'observation : la microscopie électronique à transmission (TEM)

La microscopie optique est limitée par la diffraction de la lumière. Même avec un objectif à immersion et une lumière bleue, le pouvoir de résolution reste plafonné à la valeur minimale calculée plus haut.

$$\delta_{\text{optique}} \geq \frac{0,61 \cdot \lambda_0}{NA} \approx 200 \text{ nm}$$

Il devient alors physiquement impossible de distinguer deux objets séparés par une distance inférieure à cette limite ($\sim 200 \text{ nm}$). Cela exclut l'observation directe de virus, d'organites subcellulaires fins ou de macromolécules.

Pour surmonter cette limite, on utilise non plus de la lumière, mais un faisceau d'électrons. Leur comportement ondulatoire permet d'accéder à des longueurs d'onde extrêmement faibles, donc à une résolution bien meilleure.

Les développements qui suivent sont destinés à l'enseignant. L'étudiant ne doit retenir que le changement d'onde (lumière \rightarrow électrons) pour améliorer la résolution.

➤ Longueur d'onde de l'électron : formule de de Broglie

Tout électron, selon la relation de de Broglie, possède une longueur d'onde associée :

$\lambda_e = \frac{h}{p}$, p étant la quantité de mouvement de l'électron et h la constante de Planck.

Un électron de masse m_0 et de charge e , accéléré à travers une tension V acquiert une énergie cinétique $E_c = \frac{1}{2}mv^2 = eV$.

Sa longueur d'onde de de Broglie est $\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2m_0eV}}$

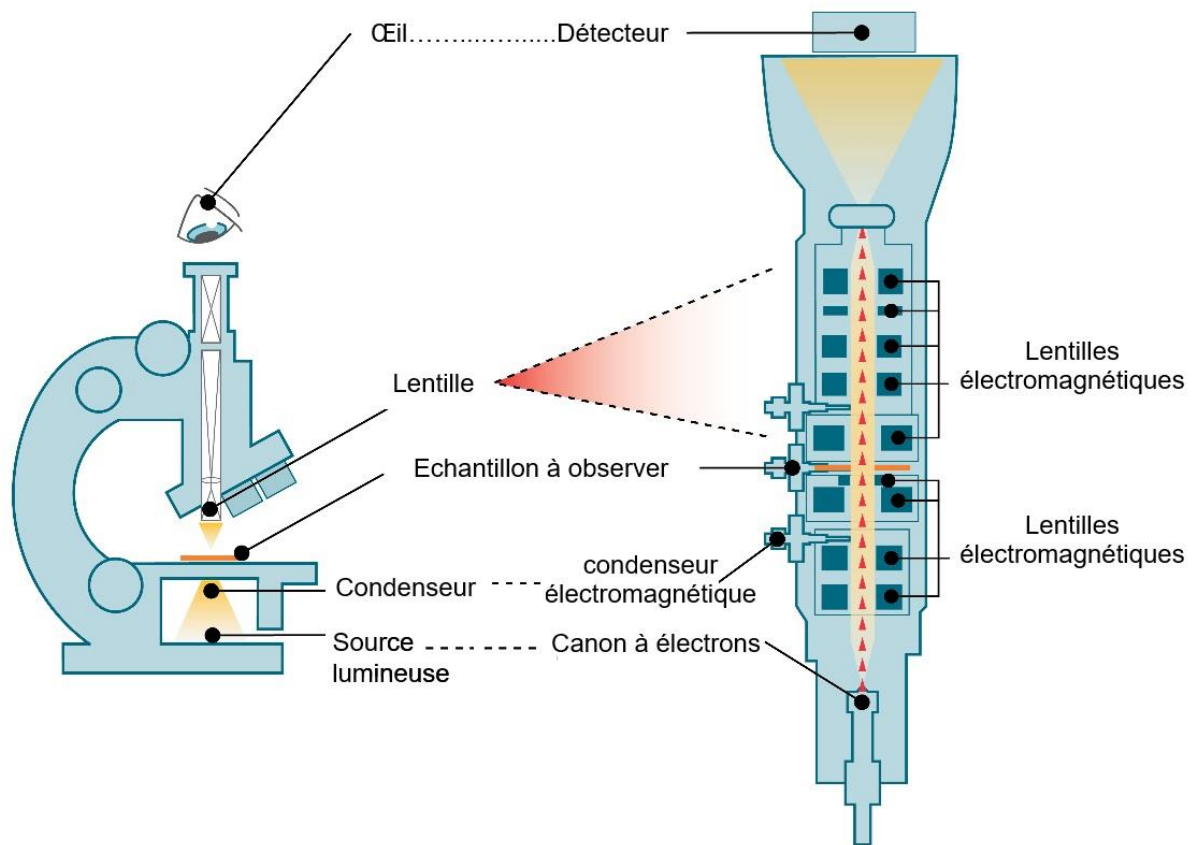
Les tensions accélératrices étant supérieure à 100 kV, les électrons sont en fait relativistes et la relation devient : $\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2m_0eV(1+\frac{eV}{2m_0c^2})}}$ (c est la vitesse de la lumière dans le vide).

Pour $V = 100$ kV , on obtient : $\lambda_e \approx 0,0035$ nm. La longueur d'onde de l'électron est environ 100 000 fois plus petite que la longueur d'onde d'une onde lumineuse visible.

➤ Constitution d'un microscope électronique

Le microscope électronique reprend la chaîne optique de l'optique classique, en remplaçant

- la **source lumineuse** par un **canon à électrons**,
- les **lentilles de verre** par des **lentilles électromagnétiques**,
- les surfaces de verre par des environnements sous **vide**,
- le **détecteur optique (œil ou capteur CDD)** par des **détecteurs électroniques** et numériques



Source : d'après <https://thermofisher.com>

Fig 25 : Comparaison microscope optique/microscope électronique

➤ La résolution en microscopie électronique

Par analogie formelle avec l'optique, on peut exprimer une résolution théorique idéale par :

$$\delta_e = \frac{0,61 \cdot \lambda_e}{\sin(\alpha)} = \frac{0,61 \cdot \lambda_e}{ON_e}$$

avec :

- α l'angle d'ouverture du faisceau d'électrons,
- $ON_e = \sin(\alpha)$ l'ouverture numérique, par analogie avec l'optique.

Mais cette formule n'est pas celle qui limite réellement la résolution. En pratique, la résolution d'un microscope électronique est limitée par les aberrations optiques des lentilles électromagnétiques, notamment l'aberration sphérique. Le pouvoir de résolution s'exprime par la formule de Scherzer :

$$\delta_{sch} \approx 0,66 \cdot (C_s \cdot \lambda_e^3)^{1/4}$$

où C_s est le coefficient d'aberration sphérique (qui vaut typiquement de 0,5 mm à 1 mm en fonction des tensions accélératrices⁴). Cette formule montre que même si la longueur d'onde est très faible, la résolution est plafonnée par la qualité du système.

En prenant une tension accélératrice de 100 kV et un coefficient d'aberration sphérique on trouve un pouvoir de résolution de 0,3 nm soit plus de 600 fois plus faible que le pouvoir de résolution en microscopie optique.

VI- La fluorescence et la spectrofluorométrie

En biologie médicale, la spectrofluorométrie est une technique très sensible utilisée pour le dosage de nombreuses substances d'intérêt biologique, comme l'ADN, l'ARN ou certaines protéines, notamment lorsqu'une grande précision est requise à faibles concentrations.

Qu'est-ce que la fluorescence ?

La fluorescence est un phénomène de réémission de lumière par une molécule appelée fluorophore, après absorption d'un photon. Lorsqu'elle est excitée par une lumière de courte longueur d'onde (souvent dans l'UV ou le bleu), elle peut réémettre une lumière à plus grande longueur d'onde, généralement dans le visible. Ce phénomène est immédiat (de l'ordre de la nanoseconde) et cesse dès que l'excitation s'arrête.

Pour expliquer la fluorescence aux étudiants, il est utile d'introduire un diagramme d'énergie simplifié du type de celui de Jablonski.

⁴ <https://www.jeol.com/words/emterms/20121023.040959.php#gsc.tab=0>

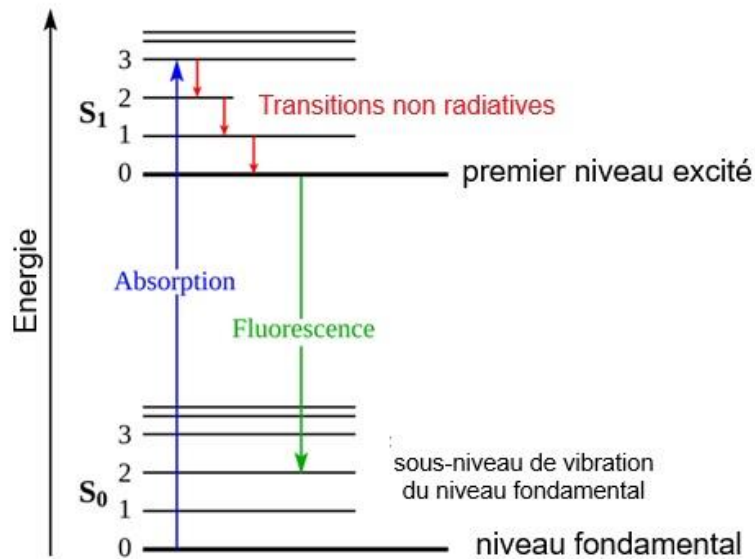


Image libre de droit
 Fig 26 : diagramme de Jablonski

Les niveaux énergétiques de la molécule comportent des sous-niveaux vibrationnels. Lors de l'absorption d'un photon, elle passe d'un niveau électronique fondamental S_0 à un niveau excité S_1 . Cette transition est rapide ($\sim 10^{-15}$ s).

La molécule se relaxe ensuite, de manière non radiative, vers le sous-niveau vibrationnel le plus bas de S_1 ($\sim 10^{-12}$ s).

Puis elle émet un photon en retournant vers un sous-niveau vibrationnel de S_0 ($\sim 10^{-8}$ s), avec une énergie plus faible que le photon absorbé.

C'est le décalage des longueurs d'onde, que l'on appelle déplacement de Stokes, qui explique que la lumière émise est plus rouge (plus longue en longueur d'onde) que celle absorbée.

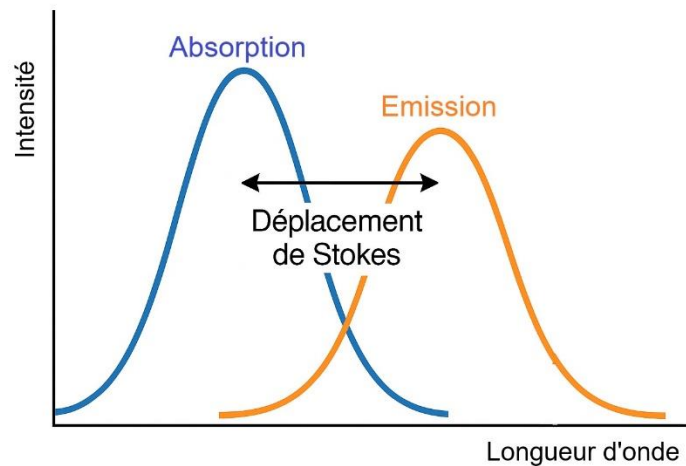


Image libre de droit
Fig 27 : décalage de Stokes

Remarque pour l'enseignant :

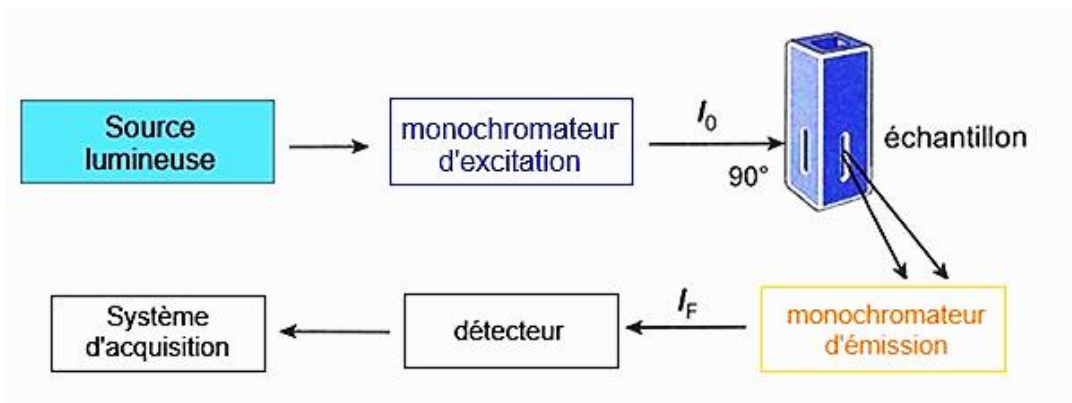
Les états S_0 , S_1 , etc, sont appelés états singulets, c'est-à-dire que les deux électrons occupent des orbitales avec des spins antiparallèles (comme dans toute orbitale doublement occupée). Il peut arriver que, par un phénomène rare (croisement intersystème), un électron change son spin : on parle alors d'état triplet (T_1), où les spins sont parallèles. Le retour d'un état triplet vers S_0 (qui engendre la phosphorescence) est beaucoup plus lent.

La notion de sous-niveau vibrationnel suffit à expliquer la fluorescence aux étudiants.

Chaîne de mesure d'un spectrofluoromètre

La chaîne fonctionnelle d'un spectrofluoromètre est constituée des étages suivants :

1. **Source de lumière d'excitation** (lampe, LED, ou laser) ;
2. **Filtre ou monochromateur d'excitation** pour sélectionner la longueur d'onde incidente ;
3. **Échantillon** placé dans une cuve transparente ;
4. **Filtre ou monochromateur d'émission**, perpendiculaire au faisceau incident (souvent à 90°) ;
5. **Détecteur** (photomultiplicateur, photodiode) ;
6. **Système de traitement et d'affichage du signal.**



Source : d'après techniques instrumentales d'analyse chimique, Dunod
Fig 28 : chaîne de mesure du spectrofluoromètre

Le positionnement du monochromateur d'émission et du détecteur dans une direction perpendiculaire au monochromateur d'excitation est un choix instrumental d'optimisation du signal. Il ne s'agit pas d'une nécessité physique car la fluorescence est émise dans toutes les directions. Mais si le détecteur était dans l'axe du faisceau incident, il recevrait une partie intense du faisceau d'excitation (direct ou diffusé), ce qui saturerait la mesure et rendrait la détection de la fluorescence (souvent faible) très difficile.

Aspect quantitatif

L'intensité de fluorescence I_f est donnée par la relation :

$$I_f = k \cdot \Phi \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A})$$

où :

- I_0 est l'intensité de la lumière d'excitation ;
- A est l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'excitation ;
- k est un facteur instrumental.
- Φ est le rendement quantique de fluorescence (entre 0 et 1) défini comme le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

Si l'absorbance est faible ($A \ll 1$), un développement limité à l'ordre 1 permet d'écrire :

$$1 - 10^{-A} \approx A \ln 10 \approx A$$

Et en combinant avec la loi de Beer-Lambert $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ on obtient :

$$I_f = k \cdot \Phi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot C$$

où :

- ε est le coefficient d'absorption molaire (en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),
- l est la largeur de la solution traversée (en cm),
- C est la concentration molaire du fluorophore (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Remarques :

Pour que cette relation reste linéaire, il est impératif de travailler avec des solutions diluées, typiquement avec une absorbance $A < 0,05$, ce qui impose souvent une dilution importante de l'échantillon.

Techniques utilisant la fluorescence (non spectroscopiques)

La fluorescence peut être exploitée dans des techniques dites non spectroscopiques. L'idée n'est alors pas d'enregistrer un spectre d'émission, mais de capter l'intensité ou la localisation de la lumière émise, ce qui permet de détecter ou visualiser certains composants biologiques dans des conditions ciblées.

Comme évoqué plus haut, la **cytométrie en flux** permet de faire défiler les cellules une à une devant un faisceau laser, tout en analysant les signaux émis par les fluorophores fixés sur des cellules préalablement marquées.

Lors de leur passage devant le faisceau, ces fluorophores sont excités et réémettent une lumière fluorescente, captée par différents détecteurs. Selon l'intensité, la couleur et le nombre de signaux fluorescents recueillis, il est possible d'identifier différents types cellulaires, de déterminer l'expression de certains marqueurs, ou encore d'évaluer l'état fonctionnel des cellules (activation, apoptose, cycle cellulaire...).

Cette technique est précieuse en hématologie, immunologie ou cancérologie, car elle permet des analyses multiparamétriques sur des milliers de cellules en quelques secondes.

L'angiographie fluorescente est une technique d'imagerie médicale utilisée pour observer la circulation sanguine dans les vaisseaux, en particulier au niveau de la rétine (diagnostic des rétinopathies diabétiques, par exemple).

On injecte dans la circulation sanguine un marqueur fluorescent, comme la fluorescéine sodique, qui se répartit dans les vaisseaux. En éclairant les tissus avec une lumière adaptée le colorant est excité puis il émet une lumière

fluorescente détectée par une caméra adaptée. Cela permet de visualiser la morphologie du réseau vasculaire et de repérer d'éventuelles zones de fuite, d'obstruction ou de néovascularisation.

VII- Quelques exemples autour de la statique et la dynamique des fluides

Nous développons ci-dessous trois exemples qui permettent d'illustrer la façon dont les lois de la mécanique des fluides s'appliquent dans le contexte de médecine ou de biologie médicale, que ce soit pour l'administration de fluides, le prélèvement sanguin ou l'analyse cellulaire.

La perfusion intraveineuse

La perfusion par gravité est une technique simple permettant d'introduire un liquide (sérum physiologique, solution glucosée, médicament dilué, traceur) dans la circulation veineuse d'un patient.

Le liquide perfusé est contenu dans une poche souple suspendue à une certaine hauteur au-dessus du patient. Le fluide s'écoule de cette poche, traverse une tubulure, passe par un dispositif de régulation, puis entre dans une veine via une aiguille ou un cathéter.

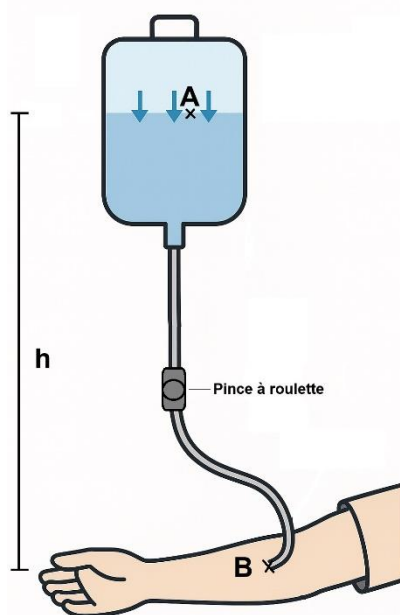


Image libre de droit
Fig 29 : perfusion par gravité

L'écoulement est principalement dû à la pression motrice, c'est-à-dire à la différence de pression entre le point A (surface libre du liquide dans la poche, à la pression atmosphérique) et le point B (entrée dans la veine, à la pression veineuse).

Cette différence de pression s'exprime, selon la relation fondamentale de l'hydrostatique, par :

$$P_A - P_B = -\rho gh = -\rho g(z_A - z_B)$$

où ρ la masse volumique du liquide, g l'intensité de la pesanteur, et h la hauteur entre la surface libre du liquide et le point d'injection.

Pour que le liquide puisse s'écouler dans la veine, il faut que cette pression dépasse la pression veineuse, généralement comprise entre 600 et 2 000 pascals. Une poche placée à environ un mètre de hauteur exerce une pression hydrostatique de l'ordre de $1,0 \times 10^5$ Pa, suffisante pour permettre l'écoulement.

Le débit du fluide perfusé n'est pas constant : il dépend des caractéristiques du circuit de perfusion, et notamment de sa résistance hydraulique. Dans le cas d'une perfusion par gravité, la pression motrice est imposée par la hauteur de la poche, donc approximativement constante. Le débit est alors donné par la relation suivante, dérivée de la loi de Poiseuille :

$$Q = \frac{\Delta P}{R}$$

où Q est le débit de volume et R la résistance hydraulique du circuit. Cette dernière dépend de plusieurs paramètres géométriques et physiques, en particulier du rayon intérieur du tube :

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

avec η la viscosité dynamique du fluide, L la longueur de la section considérée et r le rayon intérieur du tube.

Une pince à roulette, placée sur la tubulure, permet d'ajuster le débit en comprimant localement le tuyau. Cette compression réduit le diamètre intérieur, ce qui augmente la résistance hydraulique et diminue le débit selon la loi de Poiseuille.

Du fait de la dépendance de la résistance à r^4 , une faible réduction du rayon entraîne une augmentation très marquée de la résistance hydraulique, et donc une diminution sensible du débit. Ce système permet ainsi de contrôler finement le débit sans modifier la hauteur de la poche.

L'ensemble de ce dispositif fonctionne donc en régime à pression motrice constante. Le rôle de la pince est d'ajuster la résistance, ce qui influe sur le débit selon une logique comparable à celle d'un circuit électrique alimenté par une tension constante. Dans ce dernier cas, la résistance détermine l'intensité du courant ; dans le cas de la perfusion, elle détermine le débit du liquide.

Cette méthode est adaptée à une perfusion veineuse, mais pas à une perfusion artérielle. Les artères sont des vaisseaux sanguins dans lesquels la pression est

très élevée, entre $1,3 \times 10^5$ et $1,6 \times 10^5$ Pa. Même avec une poche située à 1,5 m de haut, en supposant un liquide dont la masse volumique est proche de celle de l'eau, la pression motrice serait :

$$\Delta P = 1000 \times 9,81 \times 1,5 \approx 1,5 \times 10^5 \text{ Pa}$$

Cette pression motrice permet de vaincre la pression veineuse, mais pas suffisamment la pression artérielle, particulièrement élevée en phase de systole⁵. Pour perfuser dans une artère, il faudrait utiliser une pompe à perfusion, qui impose une pression artificielle. Notons qu'une perfusion dans une artère peut être dangereuse (risque de spasme, d'ischémie ou d'embolie), sauf dans des cas très particuliers (ex : artère radiale en soins intensifs).

La prise de sang : diamètre de l'aiguille, débit et qualité du prélèvement

La prise de sang consiste à ponctionner une veine pour en prélever un échantillon sanguin. Le sang est aspiré dans un tube sous vide partiel (de l'ordre de 0,2 atm) à travers une aiguille creuse. Le débit d'écoulement du sang dépend de plusieurs paramètres physiques :

- de la différence de pression entre la veine et le vide dans le tube ;
- de la viscosité du sang ;
- du diamètre et de la longueur de l'aiguille.

Le diamètre est désigné par un calibre ou gauge, noté par une valeur suivie de « G ». Il s'agit d'un système inversé : plus le nombre est élevé, plus le diamètre est petit. Le tableau ci-dessous donne les valeurs usuelles pour les aiguilles les plus couramment utilisées en biologie médicale :

Calibre (G)	Diamètre extérieur (mm)	Diamètre intérieur estimé (mm)
21G	0,82	0,51
22G	0,72	0,41
23G	0,64	0,34

⁵ La systole est la phase de contraction du cœur (le ventricule gauche éjecte le sang) et la pression est maximale. La diastole est la phase de relâchement, le cœur se remplit et la pression est minimale.

Selon la loi de Poiseuille, la résistance à l'écoulement est très sensible au diamètre r du conduit :

$$R = \frac{8 \eta L}{\pi r^4}$$

Une aiguille trop fine (gauge trop élevée) ralentit le débit et peut induire des phénomènes de cisaillement. Le cisaillement correspond aux forces de frottement internes qui s'exercent entre les couches du fluide se déplaçant à des vitesses différentes. Si le sang traverse une aiguille très fine à grande vitesse, ces forces augmentent fortement. Cela peut détériorer les cellules sanguines, notamment les hématies, par déformation ou rupture, ce qui altère la fiabilité de certains examens (ex. hémolyse faussant les dosages de potassium ou d'enzymes intracellulaires).

Ainsi, le choix de l'aiguille est un compromis entre plusieurs facteurs :

- la taille de la veine du patient (jugée à l'œil et au toucher par le professionnel de santé),
- le type d'analyse demandé (certains examens nécessitent un sang non hémolysé),
- le confort du patient (aiguille trop grosse = douleur, trop fine = risque de bouchage ou de débit trop faible).

Un rapide calcul, basé sur la loi de Poiseuille, permet d'estimer un ordre de grandeur du débit obtenu lors d'une prise de sang standard.

À titre d'exemple, pour une aiguille 21G (diamètre intérieur estimé à 0,51 mm, soit un rayon de 0,255 mm), une pression veineuse moyenne de 1400 Pa, une longueur d'aiguille de 25 mm de long et une viscosité du sang⁶ de $\eta = 4,0 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$, on obtient un débit théorique :

$$Q = \frac{\pi \cdot \Delta P \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \approx 1,39 \text{ mL/min}$$

Ce débit permet de remplir un tube standard de 5 mL en moins de 4 minutes, ce qui reste dans une gamme acceptable en contexte clinique.

Ce type de modélisation repose sur des hypothèses simplificatrices (fluide visqueux newtonien, parois rigides, régime stationnaire...), mais il permet

⁶ la viscosité du sang n'est pas strictement newtonienne, mais que ce modèle reste pertinent dans un premier ordre d'analyse.

d'illustrer de façon concrète l'influence déterminante des paramètres physiques sur la qualité et l'efficacité du prélèvement.

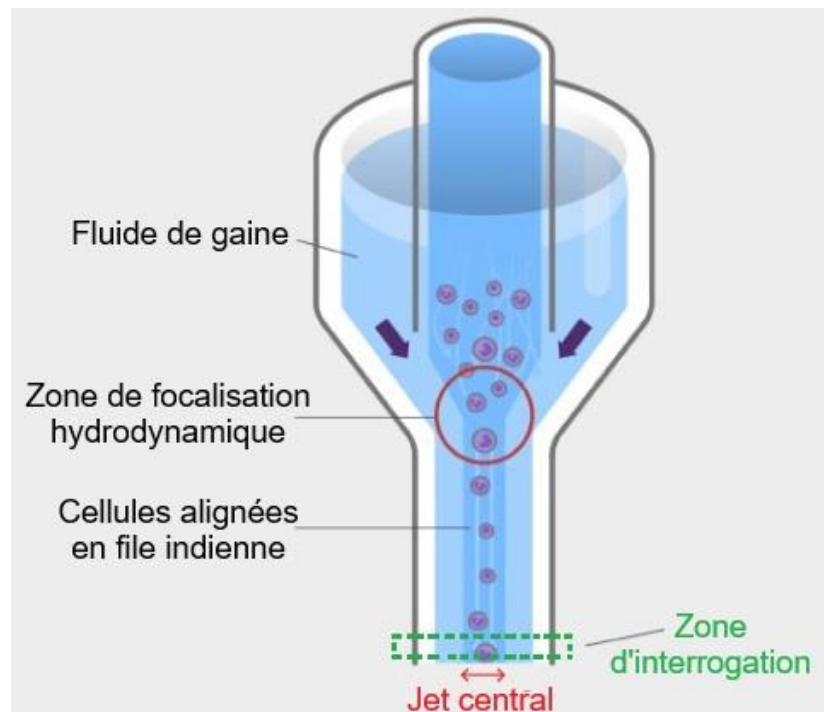
Ce lien entre diamètre de l'aiguille et débit explique pourquoi certaines prises de sang très lentes peuvent être améliorées simplement en changeant d'aiguille, sans avoir besoin de modifier la position ou de suspecter une mauvaise veine.

La cytométrie en flux et la focalisation hydrodynamique

Déjà abordée dans le cadre de l'optique et de la fluorescence, la cytométrie en flux repose également sur une maîtrise fine de la dynamique des fluides. Elle repose sur l'écoulement contrôlé d'un fluide dans un canal très fin, permettant la focalisation hydrodynamique des cellules une par une devant un faisceau laser dans la zone de mesure (aussi appelée zone ou point d'interrogation).

Deux fluides sont injectés simultanément dans le système :

- le fluide d'échantillon, contenant les cellules à analyser ;
- le fluide de gaine, un liquide clair, souvent isotonique, non miscible avec l'échantillon, qui l'enveloppe et le contraint au centre du canal.



Source : d'après thermofischer.com

Fig 30 : fluides de gaine et d'échantillon en cytométrie en flux

Deux arrivées latérales injectent le fluide de gaine à un débit très supérieur à celui de l'échantillon – typiquement $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ contre $30 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Ce déséquilibre de débit pousse l'échantillon à s'aligner au centre du flux, dans un filet très fin de quelques micromètres de diamètre. Le fluide de gaine joue ici un rôle double : il isole physiquement l'échantillon et le centre dans le canal, tout en maintenant un écoulement régulier.

Ce fonctionnement repose sur une régulation fine du débit pour maintenir un écoulement laminaire : un régime d'écoulement dans lequel les couches de fluide glissent sans se mélanger. Contrairement au régime turbulent – où apparaissent remous et mélanges – le régime laminaire garantit que les cellules restent alignées, sans se croiser, ni se disperser. C'est un point fondamental en cytométrie : il permet d'analyser les cellules une par une, à intervalles réguliers, sans chevauchement.

La conservation du débit ($D = S \cdot v$, où S est la section du canal et v la vitesse moyenne du fluide) impose qu'à mesure que la section du flux diminue dans la buse de focalisation, la vitesse augmente. Cela permet d'accélérer les cellules et de les présenter successivement à l'analyse.

Enfin, le passage dans la zone de focalisation, très étroite, génère une perte de charge. Une pression suffisante est donc nécessaire pour maintenir un débit constant et garantir la stabilité du jet laminaire. Un débit trop faible entraînerait un temps d'analyse excessif et une instabilité du jet, tandis qu'un débit trop élevé risquerait de faire entrer le système en turbulence, avec chevauchement cellulaire et perte de résolution.

VIII- Mouvement d'une particule sphérique dans un fluide visqueux – la sédimentation et la centrifugation

La sédimentation est une méthode de séparation reposant sur la différence de densité entre les constituants d'un mélange. Sous l'effet de la pesanteur, les particules plus denses que le liquide dans lequel elles sont dispersées migrent lentement vers le fond (décantation). Ce phénomène peut concerner des solides en suspension dans un liquide ou deux liquides non miscibles.

Pour accélérer cette séparation, on utilise une centrifugeuse : le champ gravitationnel est alors remplacé par une force centrifuge beaucoup plus intense, générée par la rotation rapide d'un rotor (de 6 000 à 10 000 tours par

minute, voire plus en ultracentrifugation). Cela permet de récupérer un culot (particules sédimentées) et un surnageant.

Cas d'une sédimentation naturelle

On considère une particule sphérique de rayon R , de densité ρ_p , plongée dans un fluide de viscosité dynamique η et de densité ρ_f , au repos dans un référentiel galiléen terrestre. Elle chute verticalement dans le fluide.

➤ Forces en présence

Poids : $\vec{P} = \rho_p V g \vec{e}_z$

Poussée d'Archimède : $\vec{F}_A = -\rho_f V g \vec{e}_z$

Force de frottement visqueux : $\vec{F}_f = -k v_z \vec{e}_z$, avec $k = 6\pi\eta R$

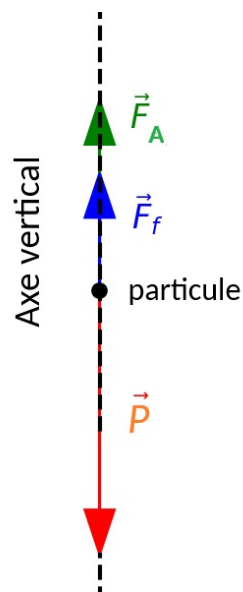


Fig 31 : Forces agissant sur une particule sphérique en chute dans un fluide visqueux

➤ Application de la seconde loi de Newton en projection sur l'axe vertical

$$\rho_p V \frac{dv_z}{dt} = \rho_p V g - \rho_f V g - k v_z$$

À l'équilibre (vitesse constante), on a $\frac{dv_z}{dt} = 0$ donc $\rho_p V g - \rho_f V g - k v_z = 0$

Soit : $v_z = \frac{Vg(\rho_p - \rho_f)}{k}$

En remplaçant $V = \frac{4}{3}\pi R^3$ et $k = 6\pi\eta R$ on obtient la vitesse limite de sédimentation :

$$v_z = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_p - \rho_f)gR^2}{\eta}$$

Cas de la centrifugation

La centrifugation repose sur l'application d'une force centrifuge qui entraîne les particules vers l'extérieur, selon leur masse, leur densité et leur taille. Cette force dépend directement du rayon du rotor et de la vitesse de rotation. Plus ces valeurs sont grandes, plus la séparation est rapide et efficace.

Les démonstrations qui suivent pour aboutir à la vitesse de sédimentation dans le cas de la centrifugation sont données pour l'enseignant mais ne sont pas à développer avec les étudiants.

➤ Modélisation

Dans une centrifugeuse, la particule est soumise à une accélération centrifuge $a_c = r\omega^2$, où :

- r est la distance radiale à l'axe de rotation ;
- ω est la vitesse angulaire (en rad/s).

On suppose que l'axe de la centrifugeuse est vertical, et que l'écoulement est radial (dans le plan horizontal).

➤ Forces dans le référentiel tournant

On se place sur un axe radial.

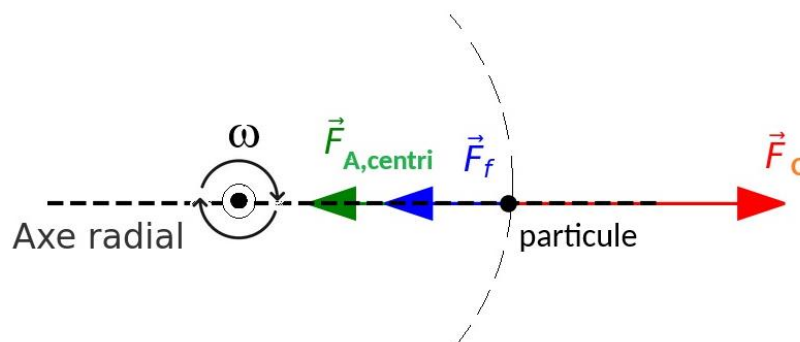


Fig 32 : Forces agissant sur une particule sphérique en chute dans un fluide dans le référentiel tournant

Dans ce référentiel non galiléen, on introduit la force fictive centrifuge

$\vec{F}_c = mr\omega^2 \vec{e}_r$ qui joue le rôle d'un champ d'accélération radial.

Le poids et poussée d'Archimède sont négligeables dans la direction radiale (car verticaux). La résultante des forces devient :

$$\vec{F}_{résultante} = \vec{F}_c + \vec{F}_{A,centri} + \vec{F}_f$$

où la poussée d'Archimède "centrifuge" $\vec{F}_{A,centri}$ est de même forme que la force centrifuge, mais calculée avec ρ_f

$$\vec{F}_{A,centri} = -\rho_f Vr\omega^2 \vec{e}_r$$

Cette force représente la force opposée à la force centrifuge agissant sur la particule, due au fluide déplacé par la particule. Elle est essentielle pour comprendre la sédimentation dans une centrifugeuse, car elle compense partiellement la force centrifuge agissant sur la particule, tout comme la poussée d'Archimède compense partiellement le poids de la particule dans le cas de la sédimentation gravitaire.

Dans le référentiel tournant en régime stationnaire $\vec{F}_{résultante} = \vec{0}$

$$0 = \rho_p Vr\omega^2 - \rho_f Vr\omega^2 - kv_r \Rightarrow v_r = \frac{Vr\omega^2(\rho_p - \rho_f)}{k}$$

Avec les mêmes expressions que précédemment, on retrouve :

$$v_r = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_p - \rho_f)r\omega^2 R^2}{\eta}$$

Encart pour le professeur : intérêt du référentiel tournant

Dans le référentiel galiléen, la particule conserve un mouvement de rotation (à vitesse angulaire constante), mais commence à sédimenter radialement dès que son poids apparent la détache du mouvement du fluide. Cela conduit à une trajectoire hélicoïdale, dont la résolution rigoureuse est complexe, car elle implique des équations différentielles couplées en coordonnées cylindriques :

$$\vec{a} = (\ddot{r} - r\dot{\theta}^2)\vec{e}_r + (r\ddot{\theta} + 2\dot{r}\dot{\theta})\vec{e}_\theta$$

Ce traitement rigoureux montre que la force centrifuge est une force fictive, utile pour simplifier le raisonnement dans le référentiel tournant. On y récupère un système équivalent à celui de la gravité, mais avec un "champ d'accélération" $r\omega^2$, d'où l'analogie suffisante pour les étudiants : « *Tout se passe comme si g était remplacé par $r\omega^2$* ».

Le nombre de g ou force centrifuge relative (RCF)

Dans une centrifugeuse, on compare l'accélération centrifuge à l'accélération gravitationnelle g . Le nombre de g - noté n_g ou RCF - est défini comme :

$$n_g = \frac{a_{\text{centrifuge}}}{g} = \frac{r\omega^2}{g}$$

La vitesse angulaire ω est liée à la vitesse de rotation N (en tours/min) par :

$$\omega = \frac{2\pi N}{60}$$

$$\text{Donc : } r\omega^2 = r \cdot \left(\frac{2\pi N}{60}\right)^2 = r \cdot \frac{4\pi^2 N^2}{3600}$$

$$\text{Ainsi, } n_g = \frac{r\left(\frac{2\pi N}{60}\right)^2}{g}, \text{ soit } n_g \approx 1,118 \times 10^{-6} \times r \times N^2$$

Avec

- $g \approx 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
- r est en mm
- N en tours par minutes (rpm)

Ce qui donne la formule pratique utilisée dans les laboratoires :

$$N = 1000 \sqrt{\frac{RCF}{1,118 \times r}}$$

Voici quelques valeurs typiques du nombre de g selon les types de particules à séparer :

Application	Nombre de g typique
Décantation simple (gravité seule)	1 x g
Séparation de cellules sanguines (centrifugeuse standard)	300 à 1 500 x g
Séparation de bactéries	3 000 à 10 000 x g
Précipitation de protéines	10 000 à 20 000 x g
Séparation d'organites (ex. mitochondries, noyaux)	15 000 à 50 000 x g
Ultracentrifugation (ex. virus, ribosomes)	100 000 à 600 000 x g

Le choix de la vitesse de rotation dépend donc du type de particules ciblées, mais aussi du compromis entre efficacité de séparation et contraintes mécaniques sur les échantillons.

IX- Mouvement d'une particule placée dans un champ électrique : application au MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse utilisée pour déterminer la masse de molécules ou d'ions. Elle repose sur trois grandes étapes :

1. **Ionisation** : transformer une molécule neutre en un ion ;
2. **Séparation** : séparer les ions selon le rapport de leur masse/charge $\frac{m}{z}$;
3. **Détection** : enregistrement du signal et production d'un spectre.

Tous les appareils de spectrométrie de masse permettent l'obtention d'un spectre de masse mais ne reposent pas sur la même technologie, chacun ayant sa précision. Certaines techniques utilisent un champ magnétique, d'autre un champ électrique, des piègeages d'ions, la résonance cyclotronique ou le temps de vol.

La méthode MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) utilise le temps de vol. Elle est couramment utilisée en biologie médicale, notamment pour l'identification des bactéries. Elle repose sur l'ionisation douce d'un échantillon solide, déposé sur une plaque avec une matrice cristallisée. Un laser provoque la désorption des molécules, qui sont alors ionisées. Ces ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et parcourent une distance jusqu'au détecteur. Leur temps de vol dépend de leur masse et de leur charge.

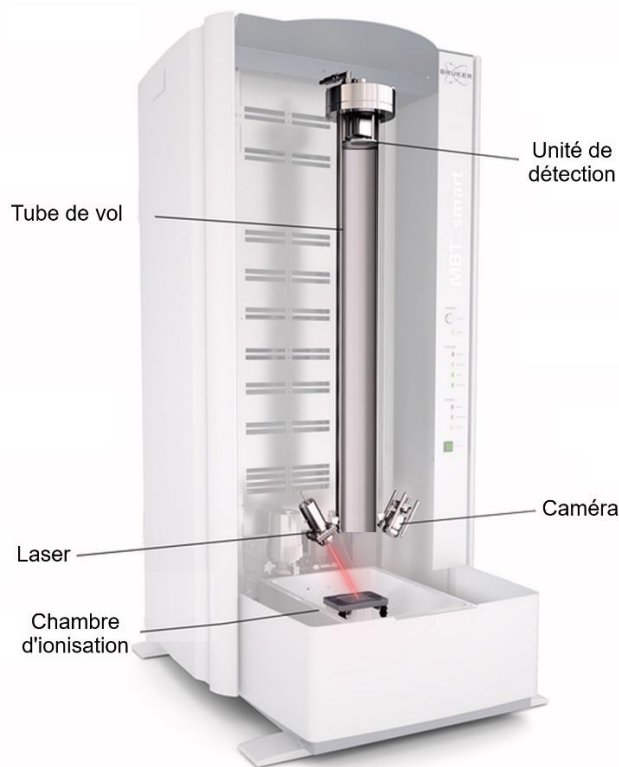
Chaîne fonctionnelle du MALDI-TOF

La chaîne fonctionnelle est composée des étapes suivantes :

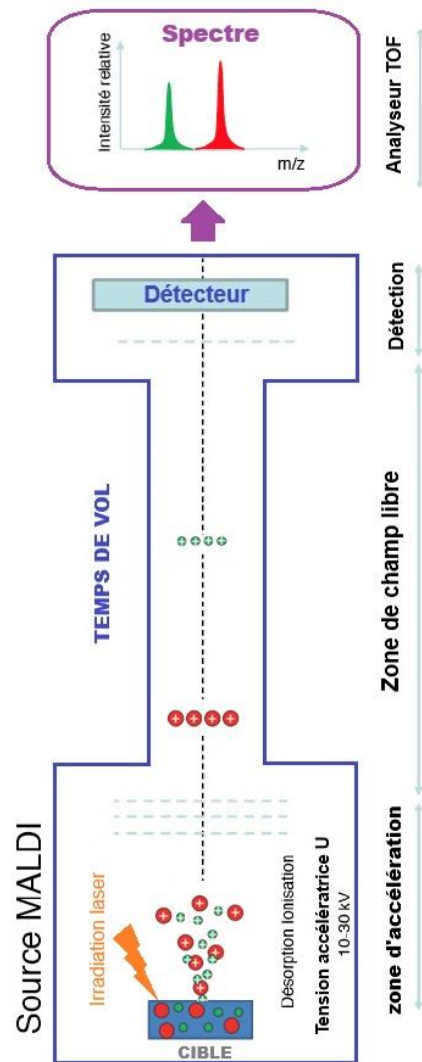
1. **Ionisation MALDI** : Un laser frappe une matrice sur laquelle est disposé l'échantillon, les molécules sont désorbées puis ionisées (souvent en cation monovalent : M^+)
2. **Accélération** : ces ions sont soumis à une différence de potentiel U , ce qui leur confère une énergie cinétique.
3. **Vol libre** : dans une zone de champ libre (sans champ électrique), les ions conservent leur vitesse constante.

4. **Détection** : les ions arrivent sur un capteur qui convertit l'impact en un signal électrique.
5. **Traitement du signal et affichage** : obtention d'un spectre de masse.

C'est le temps mis pour parcourir la distance entre l'accélération et la détection qui est mesuré.



Source : <https://planet-vie.ens.fr>
 Fig 33 : Coupe d'un MALDI-TOF



Source : d'après les feuillets de biologie
 Fig 34 : chaîne fonctionnelle du MALDI-TOF

Il est possible d'établir le temps de vol en utilisant la conservation de l'énergie.

Soit un ion de masse m et de charge q , au repos en un point A situé à un potentiel V_A . Il est accéléré jusqu'au point B, de potentiel V_B , avec une vitesse v . On néglige tout frottement et on néglige le poids de l'ion⁷.

En appliquant le principe de conservation de l'énergie mécanique on peut écrire que :

$$E_{m,A} = E_{m,B}$$

En introduisant l'énergie cinétique et l'énergie potentielle électrique

$$E_{c,A} + E_{p,A} = E_{c,B} + E_{p,B}$$

Soit

$$0 + qV_A = \frac{1}{2}mv^2 + qV_B$$

$$\frac{1}{2}mv^2 = q(V_A - V_B)$$

En notant $U = V_A - V_B$, la différence de potentiel appliquée entre les points A et B il vient facilement :

$$v = \sqrt{\frac{2qU}{m}}$$

Dans la zone de vol libre (sans champ), la vitesse est constante. Si L est la longueur de la zone, on peut exprimer le temps de vol.

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU}}$$

Le temps de vol augmente avec la racine carrée de la masse, ce qui permet de les séparer. Il est proportionnel à la racine carrée du rapport masse/charge :

$$t \propto \sqrt{\frac{m}{q}}$$

La charge de l'ion étant $q = ze$, on peut exprimer le rapport

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

⁷ Le poids de l'ion est négligeable devant la force électrique générée par la tension d'accélération (généralement de l'ordre de 10 à 30 kV dans un spectromètre MALDI-TOF). Par exemple, pour un ion de masse 100 u et de charge +1, la force électrique est environ 10^9 supérieure au poids.

Chaîne métrologique

La chaîne métrologique du MALDI-TOF comprend les trois étages suivants

- **Le capteur** qui détecte l'arrivée des ions.
- **Le conditionneur** qui transforme le signal physique en un signal électrique exploitable.
- **Le dispositif de traitement et d'affichage** qui convertit le signal en un spectre, avec des pics en fonction du rapport $\frac{m}{z}$.

➤ Spectre obtenu

Le spectre obtenu présente en axe horizontal le rapport $\frac{m}{z}$ et en axe vertical l'intensité (proportion relative d'ions détectés).

De manière générale, la façon dont les molécules sont ionisées engendre plus ou moins leur fragmentation. Les fragmentations sont très fréquentes dans les techniques qui utilisent des impacts d'électrons à 70 eV, mais beaucoup moins pour les techniques plus douces. Dans le cadre du MALDI-TOF, l'ion moléculaire est monovalent et la fragmentation reste rare, mais on peut observer :

- des pertes simples (radical H·, NH₂, OH, COOH...);
- des fragments issus de cassures aux liaisons faibles.

Le pic principal correspond alors à l'ion moléculaire M⁺ et l'on peut distinguer des pics secondaires.

Exemple : la glycine (C₂H₅NO₂, masse molaire ≈ 75 g/mol ≈ 75u⁸)

On attend un pic principal à $\frac{m}{z} \approx 75$ qui correspond à l'ion moléculaire C₂H₅NO₂⁺

Voici quelques exemples typiques de fragments observables :

Fragment	Formule chimique	Masse (u)	m/z	Commentaire
Ion moléculaire M ⁺	C ₂ H ₅ NO ₂ ⁺	75,0	75	Pic principal attendu
Perte d'un (radical) H·	C ₂ H ₄ NO ₂ ⁺	74,0	74	Assez commun
Perte du groupement COOH	NH ₂ – CH ₂ ⁺	~30	30	Fragment stable classique

⁸ Les unités de *m* sont les unités de masse atomique : 1u = 1,660 54 × 10⁻²⁷ kg

Fragment	Formule chimique	Masse (u)	m/z	Commentaire
Perte du groupement NH ₂	CH ₂ – COOH ⁺	~45	45	Moins fréquent

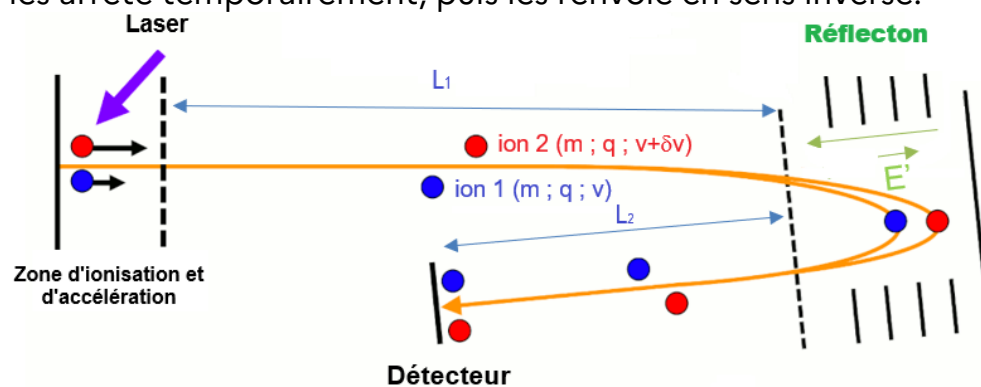
Dans une analyse exploratoire, on ne cherche pas un ion précis, mais à identifier les pics présents. On compare les valeurs de m/z obtenues à des bases de données ou à des spectres théoriques attendus à partir des masses des fragments connus. C'est ainsi que l'on peut identifier des peptides, des acides aminés...

➤ Pouvoir de résolution

Le pouvoir résolution R du MALDI-TOF s'exprime par $R = \frac{m}{\Delta m}$ où m désigne la masse choisie et la largeur du pic à mi-hauteur. Plus il est grand plus il permet de distinguer des masses proches.

Le réflecton : focalisation temporelle et amélioration de la résolution

Dans un spectromètre de masse à temps de vol (TOF), tous les ions de même rapport m/z n'acquièrent pas exactement la même énergie cinétique lors de l'accélération initiale. Il y a de légères différences de vitesse : les ions plus rapides arrivent plus tôt sur le détecteur, ce qui élargit les pics du spectre. Pour améliorer la résolution, on introduit un réflecton : une région dans laquelle les ions pénètrent dans un champ électrique inverse. Ce champ freine les ions, les arrête temporairement, puis les renvoie en sens inverse.



Source : d'après reseachgate.net

Fig 35 : principe du réflecton

Les ions les plus rapides pénètrent plus profondément, donc parcourent une plus grande distance dans le réflecton. Les ions plus lents pénètrent moins profondément. Grâce à un réglage précis du champ électrique, il est possible de compenser les différences de vitesse. Tous les ions de même rapport m/z

arrivent alors simultanément sur le détecteur. C'est ce qu'on appelle la focalisation temporelle.

Considérons deux ions de même masse m , de même charge q , l'un de vitesse v , l'autre de vitesse $v + \delta v$.

Leur temps de vol total comprend :

- Un trajet initial de longueur L_1 ,
- Un aller-retour dans le réflecton (pénétration de profondeur différentes dans le champ \vec{E}'),
- Un trajet final de longueur L_2 .

On démontre qu'au premier ordre la différence de temps d'arrivée sur le détecteur entre les deux ions est donnée par :

$$\Delta t \approx \delta v \times \left(\frac{(L_1+L_2)}{v^2} - \frac{2m}{qE'} \right).$$

La condition de focalisation temporelle $\Delta t = 0$ conduit à la condition

$$E' = \frac{2mv^2}{q(L_1+L_2)} \text{ pour régler correctement le réflecton.}$$

X- Mouvement d'une particule chargée dans un fluide visqueux soumis à un champ électrique : application à l'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique d'analyse et de séparation des espèces chargées (acides nucléiques, protéines, peptides...) qui repose sur le déplacement de ces particules dans un milieu visqueux sous l'effet d'un champ électrique.

Cette situation combine deux effets déjà étudiés dans ce livret :

- le mouvement d'une particule dans un champ électrique uniforme
- le mouvement d'une particule dans un fluide visqueux.

Mobilité électrophorétique

Considérons une particule sphérique de rayon r , de charge q . Elle est plongée dans un fluide de masse volumique ρ_f et de viscosité dynamique η , et elle est soumise à un champ électrique uniforme \vec{E} .

Trois forces principales s'exercent sur la particule :

- **La force électrique**, qui tend à la déplacer dans la direction du champ électrique :

$$\vec{F}_e = q\vec{E}$$

- **La force de frottement visqueux**, qui s'oppose au mouvement dans le fluide :

$$\vec{F}_f = -6\pi\eta r\vec{v}$$

- **La poussée d'Archimède** : $\vec{F}_A = -\rho_f V\vec{g}$

- **Le poids** : $\vec{P} = m\vec{g}$

➤ Cas d'une électrophorèse à champ horizontal

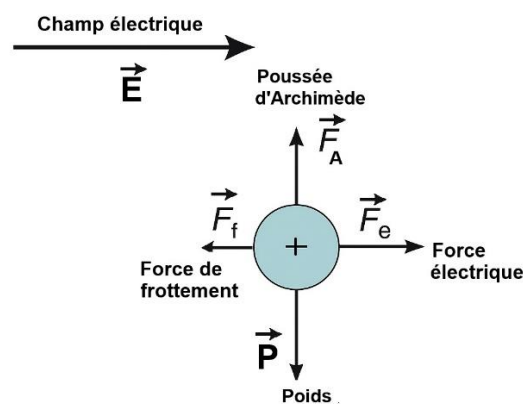


Image libre de droit

Fig 36 : forces dans le cas d'une électrophorèse à champ horizontal

Après une phase transitoire très courte, le système atteint un régime permanent, et la vitesse de la particule devient constante (vitesse limite). Les forces se compensent en vertu du principe d'inertie.

$$\vec{F}_e + \vec{F}_f + \vec{F}_A + \vec{P} = \vec{0}$$

Ce qui donne sur l'axe horizontal : $\vec{F}_e + \vec{F}_f = \vec{0}$

$$q\vec{E} = 6\pi\eta r\vec{v}_{lim} \quad \text{soit} \quad \vec{v}_{lim} = \frac{q}{6\pi\eta r}\vec{E}$$

La vitesse limite est donc proportionnelle au champ appliqué, à la charge de la particule, et inversement proportionnelle à son rayon et à la viscosité du milieu.

On définit alors la mobilité électrophorétique μ de la particule comme le rapport entre sa vitesse et le champ :

$$\overrightarrow{v_{lum}} = \mu \overrightarrow{E} \text{ avec } \mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \text{ (}\mu \text{ s'exprime en } m^2V^{-1}s^{-1}\text{)}$$

Cette équation, bien que simplifiée, permet de comprendre les principes fondamentaux de l'électrophorèse :

- Les particules plus chargées (en valeur absolue) ou plus petites migrent plus vite.
- Le type de milieu (gel, tampon...) influence fortement la vitesse.
- Le champ électrique impose le sens du déplacement (de l'anode vers la cathode ou l'inverse selon le signe de la charge).

➤ Cas d'une électrophorèse à champ vertical

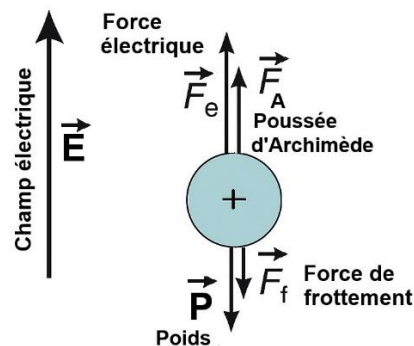


Image libre de droit

Fig 37 : forces dans le cas d'une électrophorèse à champ vertical

En régime permanent les forces se compensent $\overrightarrow{F_e} + \overrightarrow{F_f} + \overrightarrow{F_A} + \overrightarrow{P} = \overrightarrow{0}$

$$q\overrightarrow{E} - 6\pi\eta r\overrightarrow{v_{lum}} - \rho_f V\overrightarrow{g} + m\overrightarrow{g} = \overrightarrow{0}$$

soit

$$\overrightarrow{v_{lum}} = \frac{(\rho_f - \rho_{part})V\overrightarrow{g} + q\overrightarrow{E}}{6\pi\eta r}$$

Si la masse volumique des particules est proche de celle du fluide, le terme gravitationnel est négligeable et/ou si la force électrique est dominante, on retrouve le modèle précédent :

$$\overrightarrow{v_{lum}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \overrightarrow{E}$$

Complément : quelques techniques d'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel (notamment d'agarose) et l'électrophorèse capillaire reposent toutes deux sur la même base théorique mais diffèrent par le support, les conditions expérimentales et les possibilités d'automatisation.

➤ Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode classique, simple à mettre en œuvre, et toujours utilisée pour séparer de grandes biomolécules, notamment des acides nucléiques (ADN, ARN) ou certaines protéines. Le gel agit comme un tamis moléculaire qui freine différemment les espèces en fonction de leur taille et de leur charge.

Principe :

Un gel d'agarose est coulé entre deux électrodes, puis placé dans une cuve remplie d'un tampon conducteur. Les échantillons à analyser sont déposés dans des puits à une extrémité du gel. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, les particules chargées migrent dans le gel :

- les anions (ex. ADN, ARN) migrent vers l'anode (+) ;
- les cations (protéines chargées positivement) migrent vers la cathode (-).

Mobilité électrophorétique

Le mouvement dépend de la charge globale de la molécule, de la viscosité du gel et de la force électrique exercée. Comme démontré précédemment, on peut écrire :

$$v_{lim} = \mu E$$

Analyse

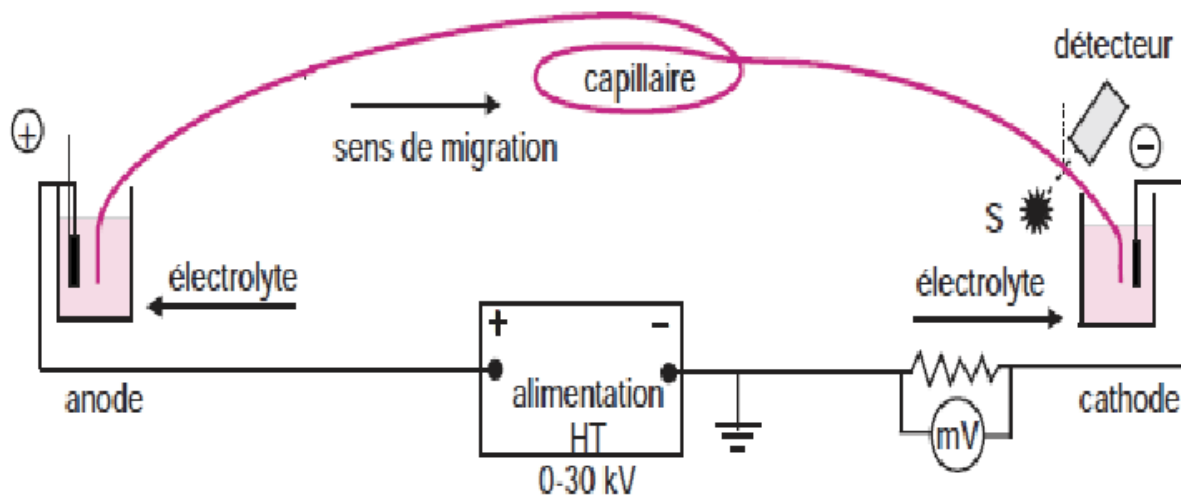
Les molécules sont séparées en fonction de leur vitesse de migration, ce qui aboutit à une série de bandes visibles après coloration (par exemple au bromure d'éthidium pour l'ADN ou au bleu de Coomassie pour les protéines). Chaque bande correspond à un groupe de molécules de même taille et charge.

➤ Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique moderne, automatisée et à haute résolution, utilisée notamment pour l'analyse des hémoglobines, des protéines sériques, ou encore la caractérisation fine d'échantillons biologiques.

Principe

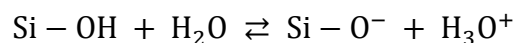
Elle utilise un capillaire de silice très fin (diamètre typique : 50 μm) rempli d'un tampon. L'échantillon est injecté à une extrémité, puis un champ électrique intense (de l'ordre de 20 à 30 kV) est appliqué. Contrairement au gel, le capillaire ne constitue pas un tamis physique : la séparation repose sur la différence de mobilité électrophorétique.



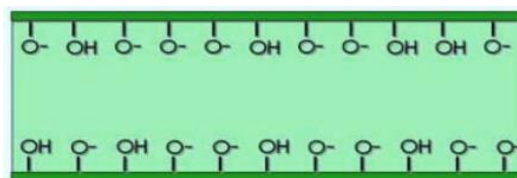
Source : d'après techniques instrumentales d'analyse chimique (Dunod)
Fig 38 : principe de l'électrophorèse capillaire

Écoulement électro-osmotique

Le capillaire de silice porte des charges négatives : il comporte en surface de nombreux groupements silanols ($\text{Si}-\text{OH}$) qui sont ionisés en silanoates ($\text{Si}-\text{O}^-$) si la valeur du pH est appropriée.



Il se crée alors une couche polyanionique fixe.



Source : image libre de droit
Fig 39 : paroi du tube capillaire

Etant chargé négativement, le capillaire attire les cations du tampon, qui forment une couche diffuse à sa surface. Lorsque le champ est appliqué, cette

couche se met en mouvement, entraînant le liquide tout entier : c'est le flux électro-osmotique (EOF). Ce flux s'ajoute à la migration propre de chaque ion, et permet même à des espèces neutres d'être entraînées vers le détecteur.

La vitesse totale d'une particule est alors la somme de sa propre vitesse électrophorétique et de celle du flux électro-osmotique :

$$v_{\text{total}} = (\mu_e + \mu_{\text{EOF}})E$$

où :

- μ_e est la mobilité électrophorétique de la particule,
- μ_{EOF} est la mobilité du flux électro-osmotique.

Le sens de migration dépend du signe de la charge : cations, anions et molécules neutres sont ainsi séparés en quelques minutes, avec une très faible consommation d'échantillon.

Détection

Une détection UV ou spectrofluorimétrique est souvent placée à l'extrémité du capillaire. On obtient un électrophorégramme (courbe de réponse en fonction du temps), analogue à un chromatogramme.

SITOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHIE

<https://planet-vie.ens.fr>

<https://canal-u.tv>

<https://app.jove.com>

<https://www.edmundoptics.fr>

<https://chimieanalytique.com>

<https://fr.Khanacademy.org>

Weill.F. *Optique moderne* . Ellipses

Sarrazin.J & Verdagner.M. *L'oxydoréduction* Ellipses

Kodman.J & Röhm.K . *Atlas de biochimie* . Dunod

Aurengo. A & Petitclerc.T ; *Biophysique*. Flammarion

Rouessac, F & Rouessac, A. (2011). *Techniques instrumentales d'analyse chimique: en 23 fiches*. Dunod.

Miomandre, F. & Sadki, S. & Audebert, P., & Méallet-Renault, R. (2019). *Électrochimie-4e éd.: Des concepts aux applications-Cours et exercices corrigés*. Dunod.

Barchiesi, D. (2010). *Mesure physique et instrumentation : analyse statistique et spectrale des mesures, capteurs*. Ellipses.