

Diplôme : BTSA ANABIOTEC

Module : M54 Méthodes instrumentales appliquées

Objectif général du module :
Maîtriser les principes et la mise en œuvre des méthodes instrumentales utilisées dans le cadre des applications analytiques

Indications de contenus, commentaires, recommandations pédagogiques

Un des objectifs importants de ce module est l'étude des appareils utilisés et leur utilisation dans le milieu professionnel : principe de fonctionnement, mode et précautions d'emploi, applications. A l'occasion de cette étude, il faut se préoccuper des qualités des appareils : fiabilité, précision ... et sensibiliser les étudiants au coût de ces appareils et des produits.

Il est indispensable de prendre en compte tous les problèmes liés à la sécurité et à l'environnement : connaissance des produits, des pictogrammes (réglementation REACH), stockage, toxicité, élimination des déchets.

L'outil informatique (ExAO, vidéos, logiciels dédiés (molécules en trois dimensions par exemple)) sera utilisé dans la mesure du possible et si cela se justifie. Il est important de montrer qu'Internet est un outil incontournable dans l'actualisation des connaissances à condition de prendre du recul sur ce qu'on y trouve.

Il sera judicieux d'emprunter des exemples aux bioindustries et en étroite relation avec les autres enseignements professionnels.

Objectif 1 - Maîtriser les principes des méthodes mises en œuvre

Objectif 1 –1 : Identifier les principales caractéristiques des composés chimiques, dont les biomolécules, en vue de leur analyse

Il ne s'agit pas ici de développer un cours de biochimie structurale mais de cibler les propriétés physico-chimiques en lien avec les méthodes d'analyse. Il faut éviter, dans la mesure du possible, les monographies fastidieuses.

Dans le cas des glucides, lipides, protides et acides nucléiques, il est important d'aborder les caractéristiques de ces

composés afin de comprendre les méthodes permettant leur détection et leur dosage : taille, charge, structure tridimensionnelle...

D'autres propriétés sont étudiées dans l'objectif 1.2.

C'est l'occasion de présenter certaines fonctions organiques, leur réactivité et leur nomenclature.

On peut expliquer les notions d'isomérisation à travers l'étude des glucides.

Pour chaque type de biomolécules on veille à citer les différentes méthodes d'analyses possibles.

Objectif 1 – 2 : Maîtriser les principes des méthodes volumétriques, électrochimiques, séparatives et spectrales

La compréhension des principes de ces méthodes nécessite la maîtrise de connaissances scientifiques. Certaines d'entre elles peuvent déjà avoir été acquises dans le secondaire et ne nécessiter que des rappels théoriques, qui peuvent être apportés lors des séances de TP.

Cet objectif vise à apporter les notions complémentaires indispensables. Celles-ci sont présentées de façon contextualisée en partant de la méthode elle-même et en évitant trop de développements théoriques.

- Pour les méthodes volumétriques :

Il est important de présenter les différents types de dosage en solution aqueuse (acido-basique, oxydo-réduction, complexométrie, précipitation) en prenant des exemples pris dans le domaine professionnel.

C'est l'occasion d'aborder les points suivants : principe du calcul du pH ; constitution, propriétés et préparation des solutions tampon ; potentiel d'oxydoréduction, relation de Nernst et influence du pH ; notions de complexe, stabilité d'un complexe ; formation d'un précipité, solubilité, K_S et pK_S . Tout en gardant une certaine rigueur, on ne rentrera pas dans un formalisme inutile.

Cette partie est enrichie par les bases de la cinétique chimique : vitesse de réaction, constante de vitesse, influence de la température, énergie d'activation, catalyse. Les différentes méthodes permettant de suivre l'évolution d'une réaction chimique sont présentées succinctement, elles seront développées dans l'objectif 3.

- Pour les méthodes électrochimiques :

On se limite aux méthodes conductimétriques et potentiométriques, utilisées classiquement dans les laboratoires.

On présente le principe de fonctionnement de la cellule de mesure du conductimètre sans entrer dans le vocabulaire technologique mais en explicitant le vocabulaire scientifique indispensable (notion de conductivité par exemple). On décrit la notion d'électrode de référence et on justifie son utilisation. L'électrode de verre est décrite ainsi qu'un exemple d'électrode sélective. La relation potentiel d'électrode-loi de Nernst-pH mesuré est exposée dans le but d'expliquer notamment le calibrage du pH-mètre.

- Pour les méthodes séparatives :

Cela nécessite des connaissances de bases sur les interactions solvant-soluté pour expliquer les mécanismes de séparations. Dans ce but on présente certains groupements fonctionnels (alcools, aldéhydes ...), leurs réactivités les liaisons chimiques covalente (moment dipolaire) et ionique, les liaisons de faible énergie (Van der Waals, hydrogène ... , étude descriptive, ordre de grandeur des énergies mises en jeu, exemples simples) ; les propriétés de l'eau, polarité, activité, solubilité, phénomènes de surface.

- méthodes de séparation solvant-soluté : techniques d'extraction, techniques de sédimentation et centrifugation, techniques membranaires.

Traiter en particulier les techniques de séparations :

- extraction (par solvant, sur phase solide (SPE), etc.)
- rupture de phase (recristallisation, précipitation par différentes techniques),
- transport de la matière (sédimentation, centrifugation, ultracentrifugation),
- techniques membranaires : filtration, micro-, ultra- et nano-filtration, osmose inverse et dialyse et électrodialyse.

- méthodes chromatographiques :

Techniques mises en jeu (CCM, chromatographie basse pression, HPLC, GC, CI...)

Caractéristiques d'une colonne (capacité, sélectivité, efficacité et résolution) et d'un chromatogramme (temps ou volume de rétention, largeur de pic, surface....)

Pour chaque principe de séparation, adsorption, partage, gel filtration, échange d'ion, affinité... s'attacher à présenter les principales phases stationnaires utilisées actuellement.

Le but est de décrire les appareillages actuellement utilisés et à suivre leurs évolutions:

- en ce qui concerne la chromatographie sur couche mince (CCM) ne pas oublier la chromatographie planaire,
- en ce qui concerne la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), penser aussi aux détecteurs tels que le fluorimètre, la diffusion de lumière, le réfractomètre différentiel et le couplage avec le spectromètre de masse.

Pour chaque technique, il faut insister sur les applications dans les différents secteurs d'activité.

La chromatographie ionique (CI) est l'occasion de parler du conductimètre comme détecteur.

En CPG, aborder le détecteur à ionisation de flamme, le catharomètre, le détecteur à capture d'électrons, le couplage

avec le spectromètre de masse.

- méthodes électrophorétiques sur acétate de cellulose, gel d'agarose et polyacrylamide
Phénomènes élémentaires influençant la mobilité électrophorétique, principes liés aux différents supports
Différentes techniques mises en œuvre : électrophorèse horizontale/verticale, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de sulfatedodécyl de sodium (SDS-PAGE), électrofocalisation, immunoélectrophorèse, électrophorèse capillaire.
Le couplage de l'électrophorèse avec le spectromètre de masse peut être évoqué.

- Pour les méthodes spectrales :

Se limiter au strict nécessaire pour expliquer l'interaction rayonnement-matière et l'introduction des méthodes spectrométriques : notions d'atomistique, nature duale de la lumière, régions du spectre, notion de quantification, relation $E = h\nu$, transitions électroniques, nombre d'onde, lumière monochromatique ...

- spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible, UV, IR

Introduire et montrer expérimentalement la loi de Beer-Lambert.

Pour chaque technique, décrire les sources lumineuses, les monochromateurs et les détecteurs utilisés actuellement.

Traiter du proche infrarouge (analyseur dans le secteur agroalimentaire) et du moyen infrarouge.

Evoquer l'infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et ses nombreuses applications.

- photométrie des milieux troubles : néphélométrie, opacimétrie

Insister sur les applications de la néphélométrie (turbidimétrie) dans l'analyse des eaux usées.

Insister sur les applications de l'opacimétrie en biotechnologie (dosage biomasse).

- spectrofluorimétrie et ses applications

Evoquer les deux aspects du spectrofluorimètre : comme méthode d'analyse quantitative à part entière et comme détecteur d'HPLC. Insister sur sa sensibilité de détection.

Faire le lien avec la chimioluminescence, le microscope à épifluorescence utilisé en biologie.

- spectrométries d'émission et d'absorption atomique

Ne pas se limiter au photomètre de flamme et décrire également de nouvelles techniques comme le plasma inductif (ICP) etc.

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) doit être traitée en tant que technique analytique d'importance.

- spectrométrie de masse

Décrire succinctement le principe et connaître ses applications, notamment son utilisation en tant que détecteur.

La description de l'appareillage rendra compte des modes d'ionisation, de séparations et de l'analyse de spectres et des applications.

Evoquer le spectromètre de masse en tandem (MS/MS).

Insister sur l'utilisation de plus en plus importante de la MS comme détecteur couplé à l'HPLC et la CG.

- résonance magnétique nucléaire (RMN)

Aborder les propriétés du noyau (magnétiques, isotopie, demi-vie) en lien avec les techniques de marquage et la RMN.

Présenter de manière succincte le principe et l'appareillage de la RMN et citer quelques applications.

Objectif 1-3 : Choisir la méthode adaptée à l'analyse

Mettre en relation l'objectif de l'analyse (recherche de molécules particulières, de groupes biochimiques, d'altérations, de groupements particuliers...) avec les principes des techniques. Montrer que pour les glucides ou les protéines par exemple de nombreuses techniques sont utilisées mais qu'elles diffèrent dans leur principe et que chacune est adaptée à une analyse particulière. Préciser que dans de nombreux cas une technique peut être utilisée par défaut et que le résultat nécessite alors une correction.

Tenir compte du type d'analyse (recherche approfondie, expérimentation, routine...) pour une adaptation optimale.

Objectif 2 : Utiliser de manière raisonnée et optimale les appareillages

Pour être utilisés de façon optimale, les appareillages, du plus simple au plus complexe, doivent être préparés, entretenus, correctement manipulés et stockés dans les meilleures conditions. Cet objectif permet aux étudiants de découvrir les différentes facettes de la mise en œuvre des appareils de laboratoire. Il est évidemment à relier avec le suivant.

Objectif 2-1 : Utiliser de manière raisonnée les instruments d'optiques

Pour cet objectif, on se limite au microscope optique et au réfractomètre. Le polarimètre n'est pas au programme car de moins en moins utilisé.

Il faut se restreindre au juste nécessaire dans l'apport de connaissances en optique géométrique pour expliquer le fonctionnement des instruments, comme par exemple les notions élémentaires sur la réflexion, la réfraction, la dispersion de la lumière par un prisme, les propriétés de la lentille convergente ...

Dans le but d'évaluer les limites des appareils, on se réfère aux termes employés par les utilisateurs : grandissement, grossissement, ouverture numérique, résolution...

On peut aussi faire une comparaison avec le microscope électronique.

L'entretien des appareils d'optique est abordé.

Objectif 2–2 : Maîtriser les techniques volumétriques, électrochimiques, séparatives et spectrales

Il s'agit de présenter les matériels associés à ces techniques (gamme de qualité, précision annoncée, limites d'utilisation...) et leurs particularités par rapport à leur préparation, leur utilisation et leur entretien. Cette approche peut être réalisée à travers des travaux pratiques spécifiques ou dans le cadre d'analyses particulières.

Objectif 2 – 3 : Savoir réagir à un dysfonctionnement

Recenser, pour les appareillages utilisés, les différents dysfonctionnements qui peuvent survenir et proposer pour chacun d'eux, des solutions adaptées. Il est important que les étudiants soient capables de repérer un dysfonctionnement au cours de l'utilisation des techniques d'analyse. Il est possible de les mettre en situation au cours de travaux pratiques.

Objectif 2 – 4 : Réaliser la maintenance de base des appareillages

Les étudiants doivent être capables de réaliser la maintenance préventive des appareils mis en oeuvre en fonction des notices des fabricants ainsi que la maintenance curative de premier niveau (nouveau réglage de l'appareil, débouchage de circuits, démontage des pièces autorisées....).

Objectif 3 - Mettre en oeuvre les analyses dans le respect des règles d'hygiène, de sécurité et de la protection de l'environnement

Cette partie sert de support à l'apprentissage des bonnes pratiques de laboratoire : gestuelle, rigueur, précision et choix du matériel, organisation du poste de travail.

La critique objective des résultats obtenus lors des différentes étapes d'un protocole donné doit être un souci permanent.

Objectif 3–1 : Identifier les applications des méthodes instrumentales

Cet objectif est à traiter en relation avec le M53. Il s'agit de mettre en relation les applications (biologiques microbiologiques, immunologiques, biologie moléculaire, physique, chimie...) avec les méthodes instrumentales utilisables. Le choix de la méthode instrumentale peut faire l'objet d'une étude critique.

Objectif 3–2 : Mettre en oeuvre les analyses utilisant ces méthodes

Il s'agit de privilégier des types d'analyses réalisées en milieu professionnel.

- Les méthodes volumétriques

Il n'est pas inutile de revenir sur certaines opérations de base : préparation d'une solution de référence à partir d'un réactif commercial solide ou liquide, choix et mise en oeuvre une méthode de dosage adaptée pour vérifier le titre d'une solution de référence...

Exemples : alcalinité de l'eau, indice d'acide et de saponification, méthode de Kjeldahl, suivi d'une cinétique (hydrolyse d'un ester par la méthode de la trempe), méthode Bertrand, indice d'iode, indice de permanganate, DCO, DBO, dureté de l'eau, dosage des chlorures ...

- Les méthodes électrochimiques :

- Les méthodes conductimétriques

Ex : comparaison des différents types d'eaux utilisées au laboratoire, mouillage du lait, dosage des chlorures dans le lait, suivi de la cinétique de l'hydrolyse du 2-chloro-2-méthylpropane...

- Les méthodes potentiométriques

Ex. : dosage d'un polyacide ou d'une polybase.

- Les méthodes séparatives

L'aspect pratique est mis en évidence à l'occasion des préparations des échantillons dans différents TP des autres modules et en pluridisciplinarité (défécation, relargage, centrifugation..) en fonction de l'équipement des laboratoires.

- Les méthodes chromatographiques :

Pour exemples :

- Dosage des sucres ou des acides organiques par CCM
- Dosage des sucres, acides et alcools par HPLC détection en réfractométrie différentielle
- Dosage des méthylxanthines par HPLC
- Dosage d'alcools par chromatographie en phase gazeuse CPG ou GC
- Séparation de colorants sur colonne basse pression par gel-filtration.

- Purification de biomolécules sur colonne basse pression par échange d'ions ...
- Les méthodes électrophorétiques :

La mise en œuvre de l'électrophorèse en gel d'agarose et de l'immunoélectrophorèse peut être réalisée en relation avec le M55.

- Les méthodes spectrales

Des TP seront réalisés, en fonction des équipements, pour chaque région spectrale (UV-visible-IR) :

- Réalisation et étude de spectres d'absorption dans l'UV et/ou le visible.
- Dosage quantitatif : ion nitrite, phosphore, protéines, sucres....
- Suivi d'une cinétique : oxydation des ions iodure par les ions peroxodisulfate. On peut en profiter pour utiliser l'EXAO (élaboration et comparaison de plusieurs courbes).
- Suivi cinétique d'une réaction enzymatique. Hypothèse michaélienne, paramètres qui influencent la cinétique michaélienne. En profiter pour présenter succinctement une cinétique non michaélienne (par ex. cinétique allostérique).

On peut également contrôler la qualité métrologique d'un spectrophotomètre (linéarité, exactitude...) lors d'un TP en s'appuyant sur la normalisation ISO en vigueur.

- photométrie des milieux troubles : néphélométrie , opacimétrie

L'aspect pratique peut être mis en évidence à l'occasion de TP dans d'autres modules (M56, M57) et en pluridisciplinarité en fonction de l'équipement des laboratoires.

- spectrométries d'émission et d'absorption atomique

Utiliser en particulier la photométrie de flamme et la SAA pour l'analyse des produits alimentaires et des eaux.

Objectif 3.3 : Exploiter et interpréter les résultats de manière critique

Après la mise en œuvre d'un protocole analytique adapté à l'analyse des résultats, ceux-ci sont interprétés par rapport à la normalisation et à la réglementation. A tout résultat est associée son incertitude. L'analyse et l'interprétation statistique se font en fonction des enseignements du M53.

Références documentaires ou bibliographiques pour ce module

- Skoog, Holler, Nieman**, *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck Université, 2003. 956 p. ISBN 2-7445-0112-3
- Mendham, Denney, Barnes, Thomas**, *Analyse chimique quantitative de Vogel*. De Boeck Université, 2006. 889 p. ISBN 2-8041-4799-1
- Skoog, West, Holler**, *Chimie analytique*. De boeck Université, 1997. 870 p. ISBN 2-8041-2114-3
- Rouessac Francis, Rouessac Annick**, *Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod, 2000. 430 p. ISBN 2-10-004971-2
- Plummer T. David**, *Introduction aux techniques de biochimie*. Mc Graw Hill, 1989. 331 p. ISBN 2-7042-1202-3
- Audigié, Dupont, Zonzain**, *Principes des méthodes d'analyse biochimique Tome 1*. Doin éditeurs Paris, 1995. 190 p. Collection biologie appliquée. ISBN 2-7040-0416-1
- Audigié, Dupont, Zonzain**, *Principes des méthodes d'analyse biochimique Tome 2*. Doin éditeurs Paris, 1995. 144 p. Collection biologie appliquée. ISBN 2-7040-0431-5
- Le Maréchal Jean François, Gariel Marie Alice**, L'initiation à la biochimie comme cours transversal de formation des enseignants de sciences physiques. *BUP*, janvier 2009, N° 910, p. 3-17.
- Oddou Stéphane**, *La chimie : En classe de technicien supérieur*. Vuibert, 2007. 372 p. ISBN : 9782711789702
Au CRDP d'Aquitaine :
- Frenot M., Vierling E.**, *Biochimie des aliments, diététique du sujet bien portant*
- Joffin J.N., Leyral G.**, *Microbiologie technique T 1 et 2*
- Fasquel M, Dumon J.P., Fasquel A.M.**, *Activités techniques en biochimie T 1 et 2* –
- Gavrilovic M. et al.**, *Manipulations d'analyse biochimique - -Doin Ed. (Collection bioscience et technique)*, 1992
- Contrôle de la qualité des produits alimentaires: laits et produits laitiers, analyses physico-chimiques (recueil de normes) -Afnor*, 1993

Voir aussi les autres normes d'analyse des produits. Pour cela contacter l'AFNOR.

AFNOR : éditeur des normes d'analyse de référence, imposées par les textes réglementaires. Incontournables. Site internet : www.afnor.fr