

N° d'ordre : 341

50376  
1984  
147

50376  
1984  
147

# THÈSE

présentée à

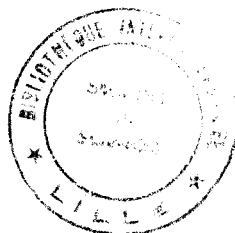
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR - INGENIEUR**

par

Nathalie LAFAGE - SZYDLOWSKI



## **APPORT DE LA SPECTROMETRIE RAMAN DE RESONANCE A L'ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE MELANGE DE CAROTENOIDES**

Soutenue le 3 mai 1984 devant la Commission d'Examen

MM.	DELHAYE	Président
	MERLIN	Rapporteur
	LHOMME	Examineur
	WARTEL	Examineur
	NOEL	Examineur
	ROUSSEL	Examineur
	FREUND	Examineur



DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACE GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUCHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

.../...

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL JACQUES	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie Inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux

M. WALLART Francis  
M. WARTEL Michel  
M. WATERLOT Michel  
M. WERNER Georges  
M. WOSNIAK Michel  
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie Infrarouge et Raman  
Chimie Inorganique  
Géologie générale  
Informatique fondamentale appliquée  
Hydrométallurgie  
Algèbre

Ce travail a été effectué au laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (L.P. 2641 C.N.R.S.), à l'Université de Lille I. Il s'inscrit dans le cadre des opérations du Groupe de Recherches Coordonnées "Manche" du C.N.R.S. (GRECO 19).

Que toutes les personnes qui par leurs conseils, leurs remarques et leur patience, m'ont permis d'arriver au terme de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie particulièrement les personnes qui ont accepté de faire partie du jury.

Monsieur DELHAYE, Directeur d'Institut au C.N.R.S., qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Monsieur MERLIN, Maître Assistant à l'Université de Lille I, qui a assuré mon encadrement et a toujours pris le temps de me faire profiter de son expérience et de ses connaissances.

Messieurs FREUND, Chef de Département à l'I.F.P., LHOMME, Professeur à l'E.N.S.C.L., NOËL, Chargé de Recherche au C.N.R.S., ROUSSEL, Ingénieur à l'I.F.P. et WARTEL, Professeur à l'Université de Lille I, qui ont accepté d'examiner ce travail et d'apporter à cette étude la caution de leur autorité scientifique.

Je remercie également Messieurs Raymond AUFFRAY pour la réalisation des dessins, Michel CARLIER pour ses conseils en informatique, Christian DUPRE pour son aide précieuse en électronique, ainsi que tous les membres du laboratoire en particulier Madame Chantal DESCAMPS pour la dactylographie et la mise en page de ce mémoire, Madame Guislaine PETIT pour l'enregistrement de nombreux spectres et Monsieur Pascal MOUVEAUX pour son aide technique.

Je remercie aussi la Société HOFFMAN-LAROCHE qui m'a procuré gracieusement les échantillons nécessaires aux études réalisées dans ce mémoire.

## SOMMAIRE

---

	<i>Page</i>
INTRODUCTION.....	1
RAPPELS GENERAUX ET BIBLIOGRAPHIE .....	3
1. LES CAROTENOIDES.....	3
2. SPECTRE D'ABSORPTION U.V.-VISIBLE DES CAROTENOIDES.....	6
3. SPECTRES DE VIBRATION DES CAROTENOIDES.....	10
1. Spectres I.R. et Raman.....	10
a) Généralités.....	10
b) Effet de la longueur de chaîne.....	12
c) Effet de solvant.....	12
d) Effet de la température.....	12
2. Spectres Raman de résonance des caroténoïdes.....	13
3. Profils d'excitation.....	14



CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE LA PIGMENTATION D'UN ORGANISME MARIN..... 17

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES .....	18
2. RESULTATS CONCERNANT LA MOULE "MYTILUS EDULIS".....	18
1. Etude du manteau .....	18
2. Etude du pied .....	19
3. Analyse d'un extrait acétonique brut de la moule.....	19
3. DISCUSSION .....	20
4. CONCLUSION .....	21

CHAPITRE 2 : DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION GLOBALE EN  
CAROTÉNOÏDES D'UN MÉLANGE..... 22

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES .....	22
2. RESULTATS .....	25
1. En absorption visible .....	25
2. En spectrométrie Raman de résonance (S.R.r.).....	27
3. DISCUSSION .....	28
4. CONCLUSION .....	29

CHAPITRE 3 : DÉTERMINATION DES PROPORTIONS RELATIVES DES  
CAROTÉNOÏDES DANS UN MÉLANGE..... 31

1. RESOLUTION D'UN SYSTEME D'EQUATIONS.....	31
1. Conditions expérimentales.....	31
a) En absorption visible .....	31
b) En S.R.r.....	32
2. Résultats .....	33
3. Discussion .....	33
2. CORRELATION ENTRE L'INTENSITE RAMAN ET LE MAXIMUM D'ABSORPTION VISIBLE. POSSIBILITE DE QUANTIFICATION.....	34
3. APPLICATION DE CES METHODES AU CAS DE LA MOULE "MYTILUS EDULIS".....	36
4. CONCLUSION.....	38

CHAPITRE 4 : ANALYSE QUALITATIVE DES CAROTÉNOÏDES DANS  
UN MÉLANGE..... 39

PREMIÈRE PARTIE : DETERMINATION DE CORRELATIONS ETABLIES A PARTIR DE DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET DE RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LES SPECTRES S.R.r. DE CARO- TENOÏDES.....	40
---	----

1. CAROTENOIDES DE LONGUEURS DE CHAINES IDENTIQUES.....	40
2. CAROTENOIDES DE LONGUEURS DE CHAINES DIFFERENTES.....	41

3. MISE EN EVIDENCE DU MOTIF ISOPRENIQUE.....	43
4. CONCLUSION.....	45
5. APPLICATION A LA MOULE "MYTILUS EDULIS".....	45

SECONDE PARTIE : ANALYSE QUALITATIVE D'UN MELANGE DE CAROTENOÏDES  
 PAR COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE  
 (C.C.M.) AVEC LA MICROSONDE RAMAN M.O.L.E..... 47

1. CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	48
1. <i>Choix de la plaque.....</i>	48
2. <i>Choix de l'éluant .....</i>	49
3. <i>Choix des conditions opératoires pour l'obtention de la chroma-        tographie la mieux résolue sur courte distance.....</i>	50
2. ETUDE DU COMPORTEMENT DES CAROTENOÏDES DEPOSES SUR PLAQUE SOUS IRRADIATION LASER.....	50
1. <i>Etude de la plaque seule .....</i>	51
2. <i>Etude du comportement d'un produit non photosensible :        le naphthalène .....</i>	51
3. <i>Etude de l'influence de l'irradiation LASER .....</i>	52
3. COUPLAGE C.C.M. - SONDE RAMAN POUR LA MISE EN EVIDENCE DES QUATRE CAROTENOÏDES D'UN MELANGE SYNTHETIQUE.....	53

4. APPLICATION A LA MISE EN EVIDENCE DU NOMBRE DE CAROTENOIDES DANS UN EXTRAIT ACETONIQUE BRUT DE MOULE "MYTILUS EDULIS".....	54
1. <i>Conditions expérimentales</i> .....	54
2. <i>Résultats</i> .....	55
3. <i>Discussion</i> .....	56
4. <i>Conclusion</i> .....	58
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	59
<u>ANNEXE 1</u> : EFFET RAMAN DE RÉSONANCE.....	62
<u>ANNEXE 2</u> : APPAREILLAGES UTILISÉS.....	76
- SPECTROMETRE U.V.-VISIBLE : DUOSPAC 203.....	78
- SPECTROMETRES RAMAN.....	78
. <i>Conventionnel</i> : R.T.....	78
. <i>Microsonde M.O.L.E.</i> .....	79
. <i>Microdil 28</i> .....	80
- PLATINE A DEPLACEMENT MICROMETRIQUE.....	83
<u>ANNEXE 3</u> : RÉOLUTION SUR ORDINATEUR DE LA MÉTHODE DE GAUSS-JORDAN.....	85

## INTRODUCTION

Les caroténoïdes sont responsables d'une grande variété de couleurs rencontrées dans le règne animal et végétal. Depuis le 19ème Siècle, un peu plus de 300 ont été isolés, caractérisés et synthétisés. Cette famille de composés est l'objet d'études intensives pour la compréhension de mécanismes biologiques.

Les caroténoïdes présentent, grâce à leur système de doubles liaisons conjuguées, des spectres intenses d'absorption visible. L'absorption visible permet de les différencier, après séparation et purification, même en milieu dilué. Cependant, comme souvent pour les spectres électroniques, les bandes sont larges et sans structure fine ; cette méthode ne permet donc pas d'accéder à une connaissance structurale approfondie du caroténoïde.

Pour essayer de contourner cet obstacle, nous avons exploré les possibilités de la Spectrométrie Raman de résonance (S.R.r.) pour le dosage et l'identification des caroténoïdes au sein d'un mélange.

En S.R.r., la longueur d'onde d'excitation est choisie proche du maximum d'absorption ; on obtient ainsi un couplage entre les niveaux électroniques excités de la structure responsable de l'absorption et les niveaux vibrationnels de celle-ci. Les vibrations correspondantes sont fortement exaltées (effet de résonance), alors que les autres conservent leur amplitude normale. Le spectre est plus simple et plus intense comparé à un spectre Raman ordinaire ou à un spectre Infrarouge. La S.R.r. doit donc permettre de caractériser les caroténoïdes en milieu dilué en faisant abstraction de la matrice si celle-ci n'absorbe pas aux mêmes longueurs d'onde que les caroténoïdes.

L'étude directe des caroténoïdes présents chez un organisme marin (Moule *Mytilus edulis*) par S.R.r. permettra de mettre en évidence la complexité des milieux naturels.

On cherchera d'abord à déterminer la concentration globale en caroténoïdes d'un mélange par simulation sur des mélanges synthétiques. La méthode utilisée jusqu'à présent est l'absorption visible qui considère que le mélange n'est constitué que d'un produit. L'erreur commise sera quantifiée et l'apport de la S.R.r. pour ce genre de détermination démontrée. On optimisera en S.R.r. les conditions expérimentales afin de minimiser les erreurs.

Dans la partie suivante, on déterminera les concentrations relatives à l'aide de corrélations établies entre les intensités des raies Raman et le maximum d'absorption des produits pré-séparés.

L'analyse qualitative des composants d'un mélange sera alors abordée en couplant une technique de séparation (la chromatographie sur couche mince : C.C.M.) et la microanalyse par effet Raman (ANNEXE 2.C). Des corrélations établies sur des données bibliographiques permettront également d'accéder à des informations structurales.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

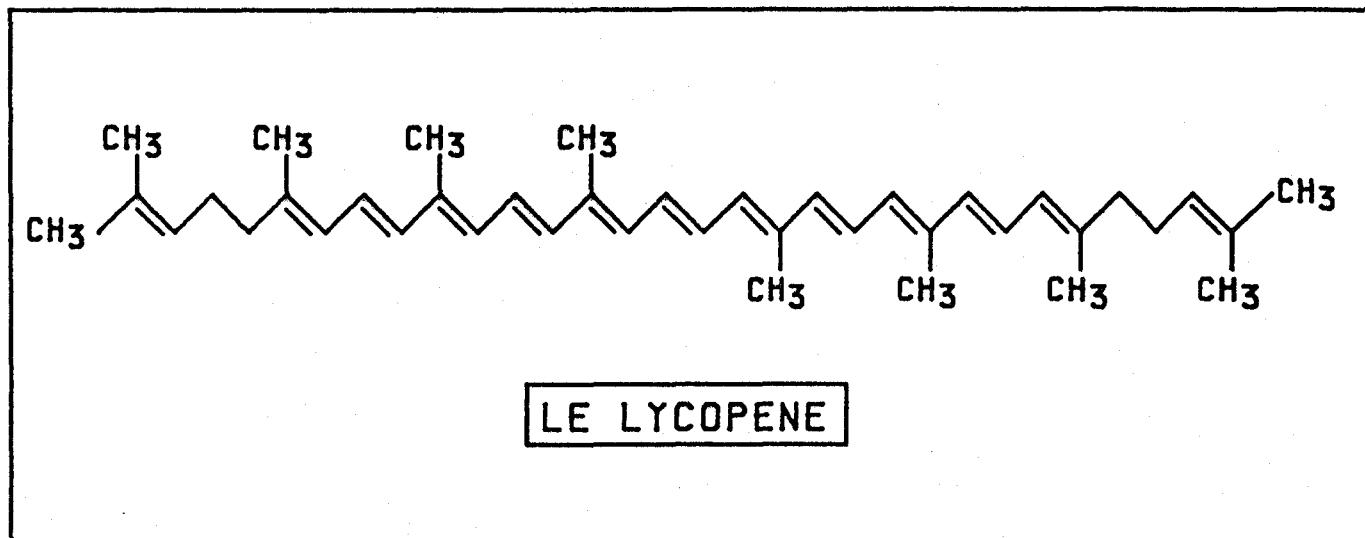
---

### 1. LES CAROTENOÏDES

Parmi les nombreux pigments responsables des colorations du monde animal et végétal, les caroténoïdes, composés liposolubles, sont fréquemment présents et sont responsables de colorations couvrant toute la gamme des couleurs visibles.

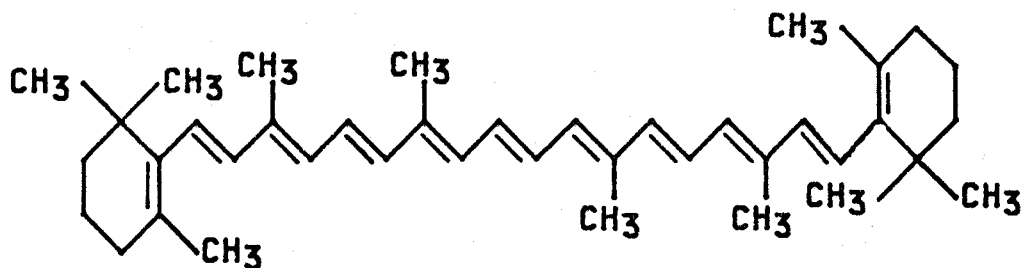
Synthétisés exclusivement par les plantes et les bactéries, ils sont assimilés et métabolisés par les êtres vivants soit tels quels, soit sous forme de précurseurs (John Heats, 1976, Denis L. Fox, 1979).

La structure commune à tous les caroténoïdes est l'enchaînement de X motifs isopréniques. Le lien entre chaque chaînon se faisant en "tête à queue" sauf au centre de la molécule où l'ordre est inversé. La structure de base est celle du Lycopène : pigment de la tomate, de formule brute  $C_{40}H_{56}$ .

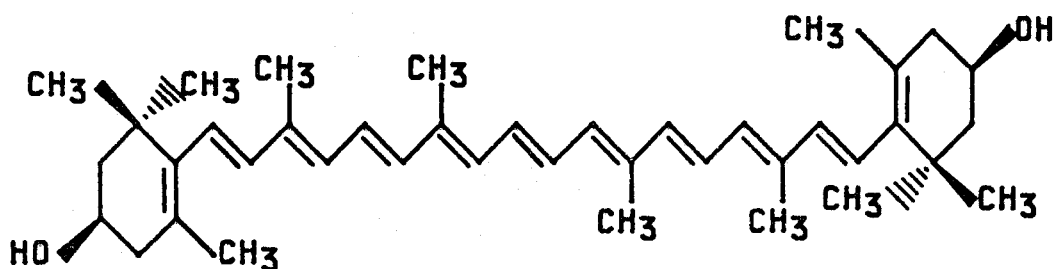


La plupart des caroténoïdes dérivent de cette structure par deshydrogénation, hydrogénation, oxydation, cyclisation ou l'introduction de groupements terminaux. Les deux principales classes de caroténoïdes sont constituées par les composés en  $C_{40}$  hydrocarbonés appelés carotènes et les composés dont la chaîne se termine par des noyaux portant des fonctions oxygénées, appelés xanthophylles. Deux structures types de ces composés sont représentées ci-après :





LE TRANS.  $\beta$ .CAROTENE



LA ZEAXANTHINE

De nombreuses publications décrivent de manière exhaustive les caroténoïdes présents dans le monde animal et végétal (Les caroténoïdes : répartition chez les invertébrés - T.W. Goodwin, 1965, Isler 1971).

Les principaux processus biologiques impliquant les caroténoïdes sont : la photoprotection (Kåre Jukshamk, 1981), la photosynthèse (Isler, 1971), la photostimulation et la photoinhibition (Komissanov, 1967, Vuillaume, 1969, Karnaukhov et coll. 1977), et la fonction chromatique de protection chez l'animal (P.Y. Noël 1983).

On conçoit donc tout l'intérêt porté par les biologistes à la détection, la caractérisation et le dosage de ces constituants.

2. SPECTRE D'ABSORPTION U.V.-VISIBLE DES CAROTENOÏDES (Stern et coll., 1970).

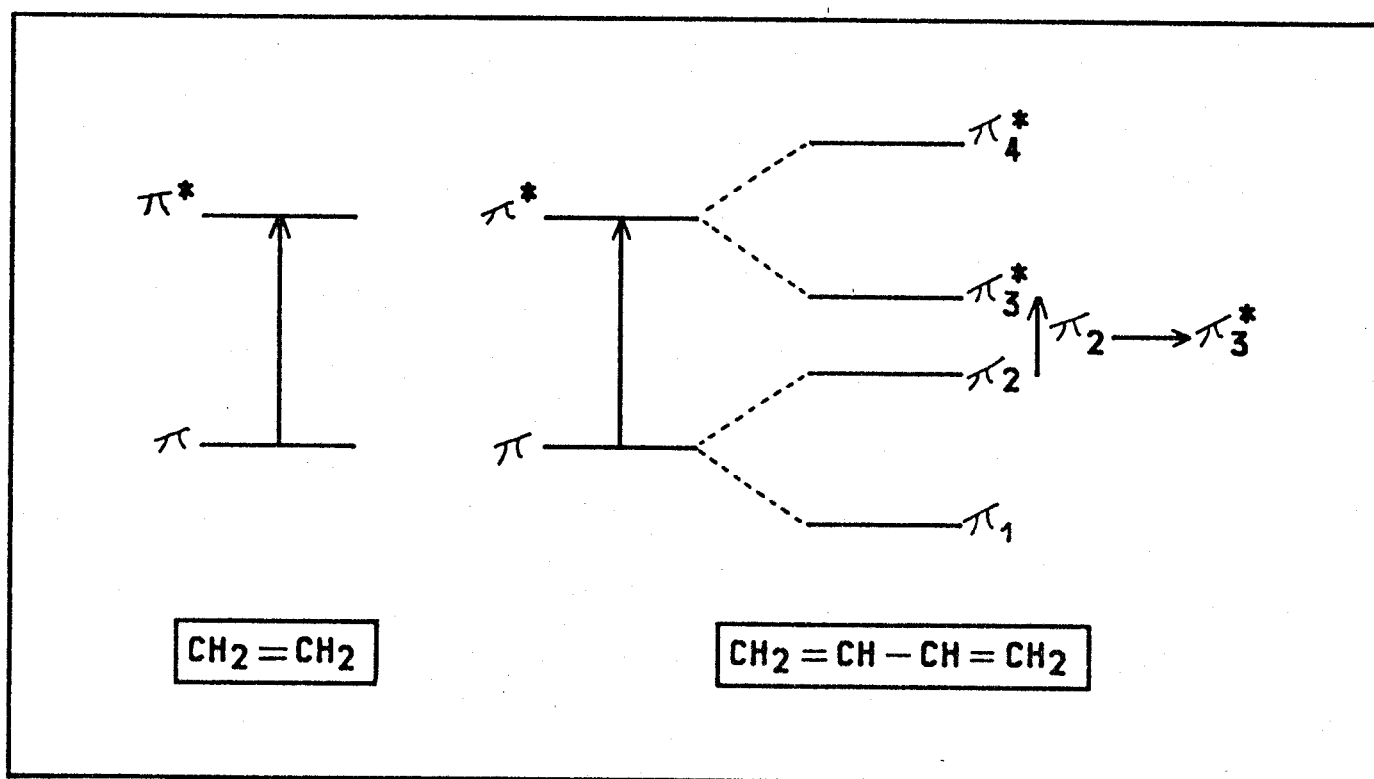
C'est l'interaction des multiples liaisons qui, formant un système conjugué, explique l'absorption visible des caroténoïdes.

Le raisonnement peut être conduit sur le butadiène :



Dans ce composé, les orbitales  $\pi$  des groupements éthyléniques interfèrent pour donner deux nouvelles orbitales  $\pi_1$  et  $\pi_2$  avec des énergies dans l'ordre :  $\pi_1 < \pi < \pi_2$ . Par absorption de la lumière un électron  $\pi$  situé sur une orbitale liante occupée transite sur une orbitale libre anti-liante  $\pi^*$ . On désignera cette transition par  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Dans le cas du butadiène, les deux orbitales  $\pi^*$  interfèrent pour donner deux nouvelles orbitales  $\pi_3^*$  et  $\pi_4^*$  avec des énergies dans l'ordre :  $\pi_3^* < \pi^* < \pi_4^*$ . La transition entre l'orbitale occupée la plus élevée en énergie et l'orbitale libre de plus faible énergie est la transition  $\pi_2 \rightarrow \pi_3^*$  dont l'énergie sera inférieure à celle du seul chromophore éthylénique.

Le diagramme ci-dessous schématise les transitions.



Cet abaissement de l'énergie requise correspond à un accroissement de la longueur d'onde d'absorption (effet bathochrome). De plus, la section efficace d'absorption du système électronique étant accrue par la conjugaison, on assiste à une augmentation de l'intensité d'absorption.

Pour les caroténoïdes où l'effet de conjugaison est augmenté, l'effet bathochromique est tel que l'absorption ne se produit plus seulement dans l'ultra-violet mais aussi et surtout dans le domaine du visible. Les composés auront aussi un coefficient d'extinction molaire élevé.

A la bande d'absorption électronique, sont en général associées des bandes de vibration. Ces bandes proviennent, au fur et à mesure que l'énergie croît, du passage du plus bas niveau vibrationnel dans l'état électronique fondamental (de nombre quantique 0) aux niveaux de vibrations d'énergie croissante du premier niveau électronique excité (nombre quantique 0, 1, 2, ...). L'écart moyen entre ces bandes est de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  et correspond à la séparation des niveaux vibrationnels de l'état excité. Les maximums des sous-niveaux effectifs de la bande d'absorption sont prédits par la relation :

$$\omega_e + v \nu_e$$

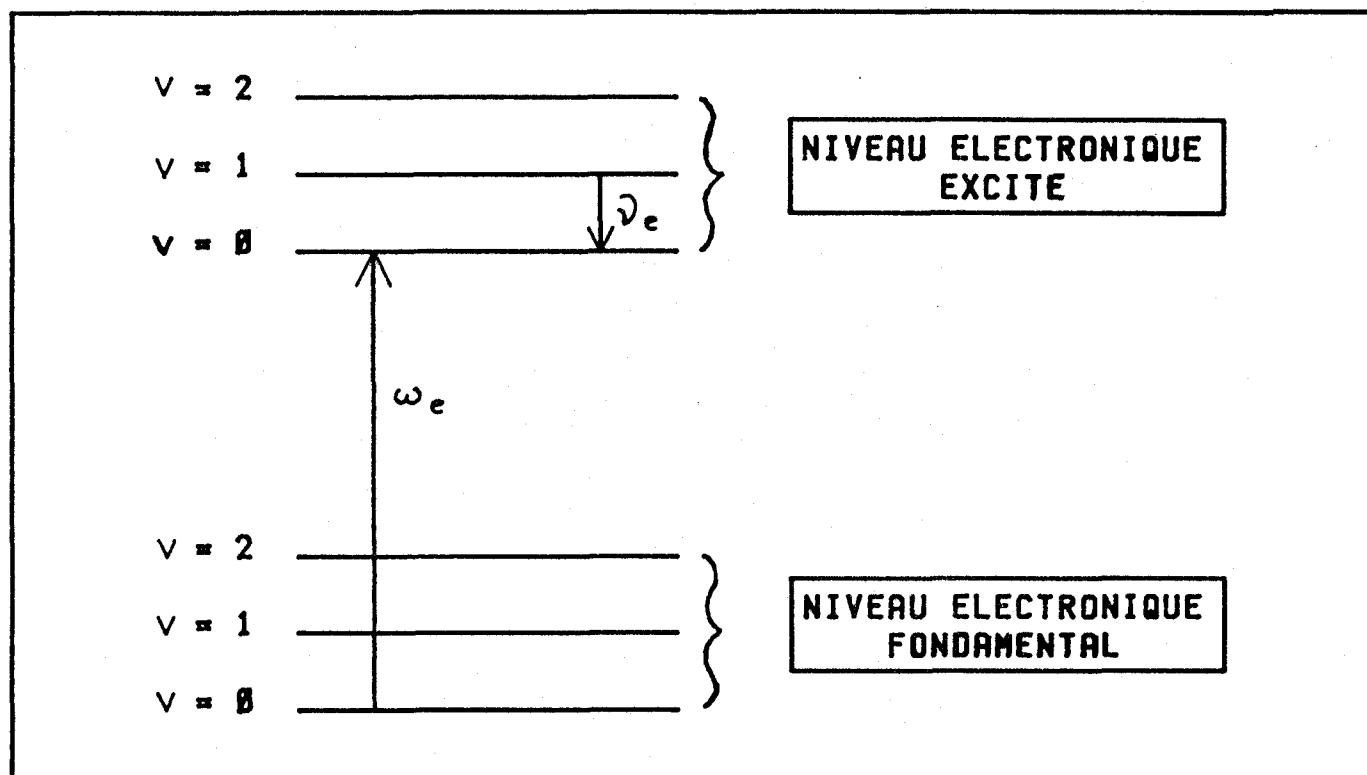
- avec -  $\omega_e$  : fréquence effective d'absorption du niveau le plus bas.  
-  $v$  : nombre quantique de vibration.  
-  $\nu_e$  : correspond aux vibrations de valence du groupement C = C.

On a donc le sous niveau 0-0 à la position  $\omega_e$

0-1 à la position  $\omega_e + \nu_e$

0-2 à la position  $\omega_e + 2 \nu_e$ .

Sur le schéma suivant, sont représentées les valeurs  $\omega_e$  et  $\nu_e$ .

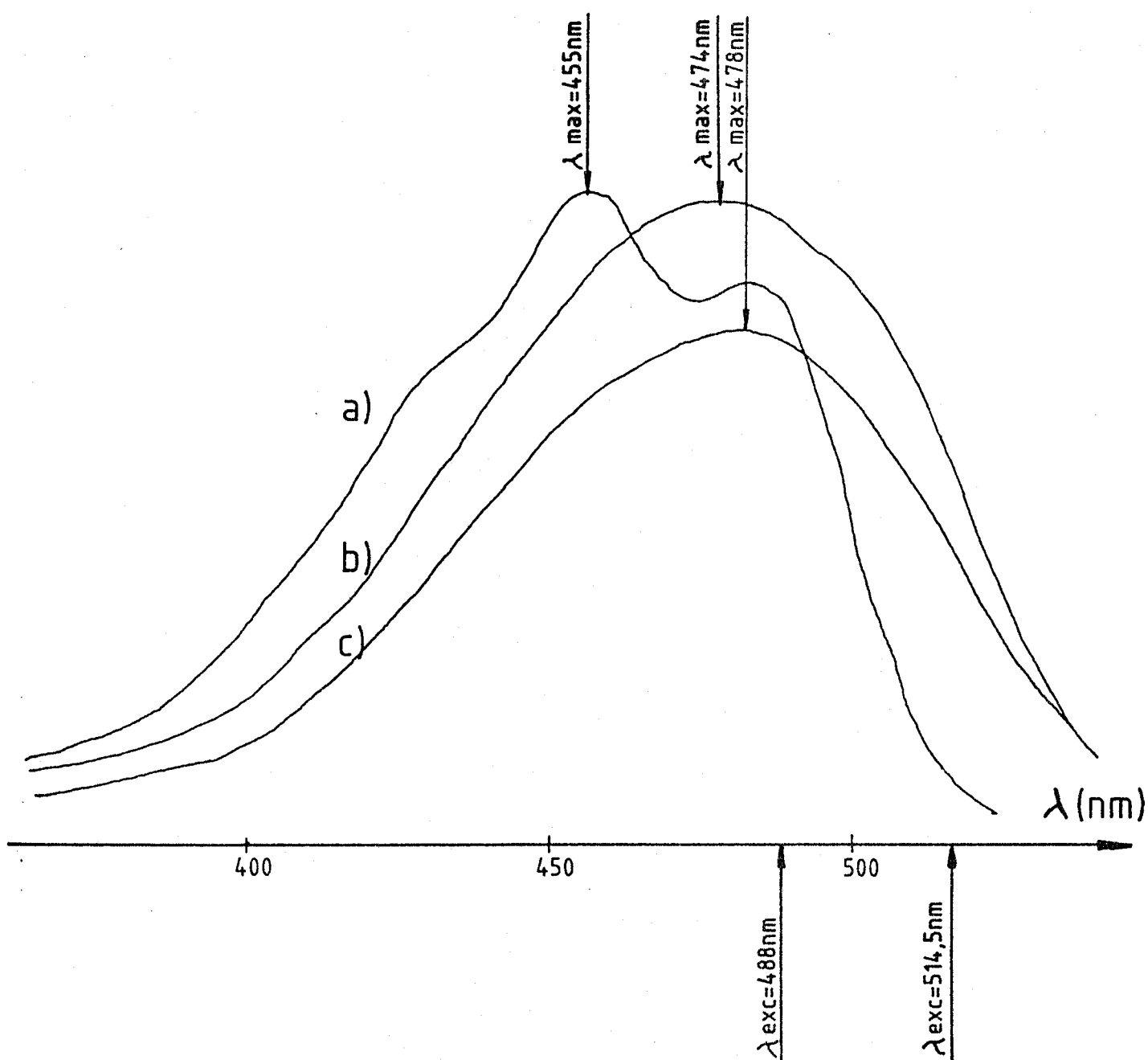


L'augmentation de la longueur de la chaîne polyénique provoque un accroissement de la bande correspondant à la transition  $0 \rightarrow 0$  au détriment de la bande correspondant à la transition  $0 \rightarrow 1$ .

Nous verrons, dans un paragraphe suivant, que la position des bandes de vibration peut aider à l'identification des caroténoïdes.

A titre d'exemple, on trouvera sur la Figure 1 le spectre d'absorption visible de trois caroténoïdes. Pour le  $\beta$  carotène, on repère effectivement trois maximums secondaires correspondant aux différents niveaux de vibration.

Dans le tableau ci-après, sont présentées les positions des maximums d'absorption pour plusieurs caroténoïdes. ( $n$  : nombre de doubles liaisons  $C = C$ ).



**FIG. 1: SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE**

- A) DU  $\beta$ .CAROTENE
- B) DE LA CANTHAXANTHINE
- C) DE L'ASTAXANTHINE

MAXIMUM DES SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE				
- SOLVANT : CS <sub>2</sub> -				
COMPOSE	n	LONGUEUR D'ONDE (NM)		
TORULARHODINE	12	582	564	502
RHODOVIOLASCINE	13	574	534	496
RHODOXANTHINE	10	564	525	491
LYCOPENE	13	548	507	477
LYCOPHYLLE	13	548	507	473
CAPSORUBINE	9	542	503	468
γ-CAROTENE	11	534	496	463
β-CAROTENE	9	520	485	(450)
α-CAROTENE	9	509	477	-
LUTEINE	9	508	476	445
CITROXANTHINE	9	490	459	-
FLAVOXANTHINE	9	478	449	420

Par abaissement de la température, une structure fine peut apparaître sur le spectre d'absorption visible. C'est le cas pour l'astaxanthine qui à 23°C présente un  $\lambda$  maximum à 488,0 nm dans le chloroforme et à -162°C 3 maximums à 524,0 - 490,0 et 463,0 nm dans un mélange diéther-isopentane-éthanol. (V.R. Salares et coll., 1976).

### 3. SPECTRES DE VIBRATION DES CAROTENOÏDES

#### 1. Spectres I.R. et Raman

##### a) Généralités

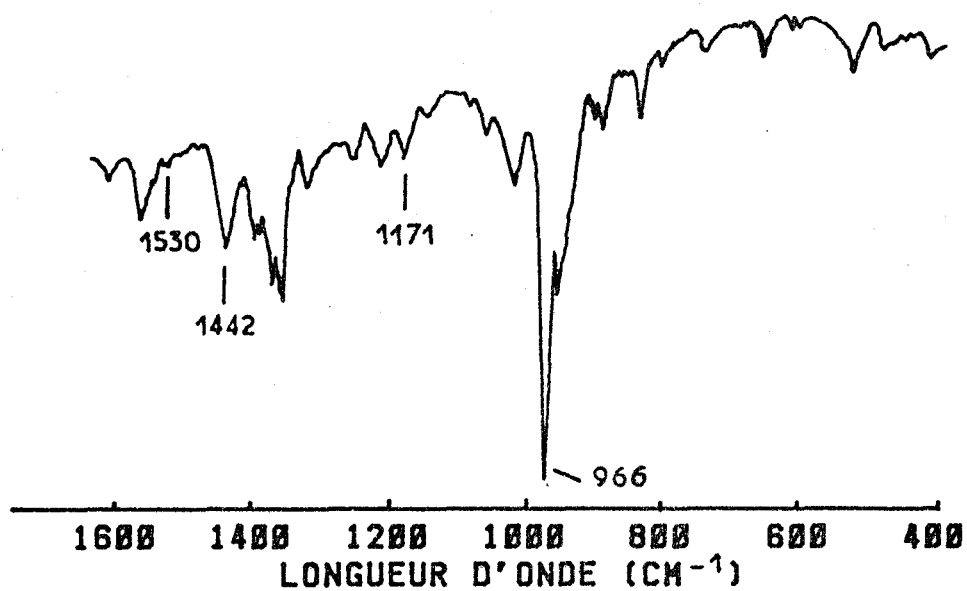
Les spectres de vibration I.R. et Raman de divers caroténoïdes ont été attribués dans le détail par Shigeki et coll., 1983.

On trouvera ci-contre (Figure 2), les spectres I.R. et Raman du trans  $\beta$  Carotène que nous utiliserons comme base de discussion, dans la seule zone qui nous intéresse. C'est la zone des fréquences inférieures à  $1600 \text{ cm}^{-1}$  où apparaissent les modes de vibration fondamentaux de la molécule.

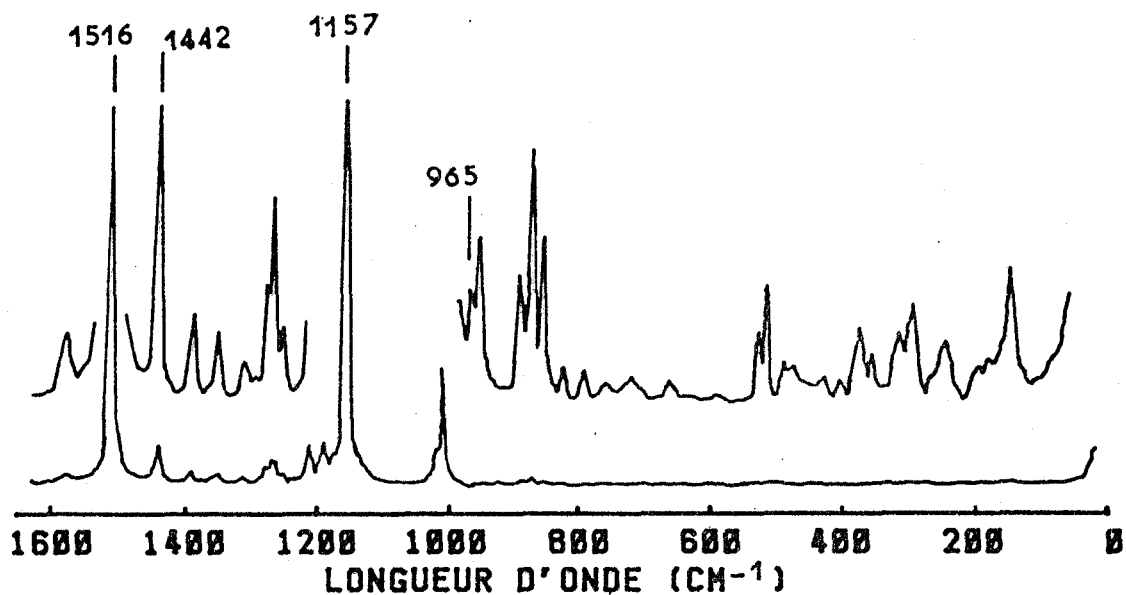
Le tableau suivant résume l'attribution spectrale succincte des modes vibrationnels des caroténoïdes (Pham Vañ Thoai, 1976, Shigeki Saïto et coll., 1983). (Pour une attribution plus complète des spectres des caroténoïdes, on pourra se référer à l'article de Shigeki et Tasumi (1983) qui par un calcul à priori des fréquences ont proposé une indexation complète des raies observées dans le  $\beta$  carotène et dans certains de ses isomères).

Parmi ces bandes de vibration, trois domaines spectraux retiendront plus particulièrement notre attention :

- La zone située vers  $1520 \text{ cm}^{-1}$  appelée mode  $\nu_1$  qui correspond aux vibrations de valence des liaisons C=C du centre de la chaîne.
- La zone située vers  $1160 \text{ cm}^{-1}$  appelée mode  $\nu_2$  qui correspond aux vibrations de valence des liaisons C-C contiguës aux doubles liaisons oléfiniques couplées aux déformations angulaires C-C-H.
- Le domaine spectral  $1100-1400 \text{ cm}^{-1}$ , "empreinte digitale" du caroténoïde, est caractéristique à la fois de la nature des groupements terminaux et de la conformation de la chaîne polyénique.



SPECTRE I.R. DU TOUT-TRANS  $\beta$ .CAROTENE  
(SHIGEKI SAITO ET COLL. 1983)



SPECTRE RAMAN DU TOUT-TRANS  $\beta$ .CAROTENE  
 $\lambda$  EXC. = 632.8 NM (He-Ne)  
(S. SAITO, M. TASUMI, C. H. EUGSTER)

FIG. 2: SPECTRES INFRA-ROUGE ET RAMAN DU TOUT-TRANS  $\beta$ .CAROTENE



## Attribution spectrale des modes vibrationnels des caroténoïdes

Domaine de nombre d'ondes	
966 cm <sup>-1</sup>	"C-H latéral" : vibration de déformation coplanaire C-H transéthylénique, active en I.R. et en Raman. En I.R., les bandes sont intenses, en Raman les raies sont dépolarisées.
1008 cm <sup>-1</sup>	"C-CH <sub>3</sub> " (isoprène) : vibration de valence du méthyl latéral du C-C, relativement intense, polarisée, faible dans les spectres des polyènes sans méthyls latéraux.
1160 cm <sup>-1</sup>	"C-C" + "C-C-H" : vibration de valence des C-C contigües aux doubles liaisons oléfiniques et déformations angulaires C-C-H.
1445 cm <sup>-1</sup>	"C-CH <sub>3</sub> " (isoprène) : vibration de déformation asymétrique à l'intérieur du groupement -CH <sub>3</sub> .
1520 cm <sup>-1</sup>	"C=C" : vibration de valence. C'est un mode où toutes les liaisons C=C vibrent approximativement en phase. Dans le tout-trans β carotène, la molécule a une structure dans l'état excité où les liaisons "C=C" et "C-C" sont plus ou moins longues par rapport aux distances dans l'état fondamental. Ces déplacements sont plus importants au centre de la chaîne qu'aux extrêmités (Shigeki, 1983).
1100-1400 cm <sup>-1</sup>	"C-H latéral" : vibration de déformation coplanaire C-H
1500-1600 cm <sup>-1</sup>	- polarisés - actifs en Raman (dépendant du solvant, du groupement terminal, de la protonation, de la configuration, de la longueur de la chaîne) et en I.R. (coïncident avec les raies Raman, sont de faible intensité car le changement du moment dipolaire provoqué par des déplacements $\nu_{C-C}$ le long du squelette conjugué est faible.

b) *Effet de la longueur de chaîne* (Pham-Vaň Thoaï, 1976)

On constate un abaissement de la fréquence de la  $\nu_{C=C}$  lorsque la chaîne conjuguée s'allonge. Ceci est à considérer en parallèle avec l'accroissement du  $\lambda$  max (effet bathochrome) de la transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  pour le même allongement. On note que la perte partielle du caractère de double liaison des C=C, liée à l'abaissement de la fréquence des  $\nu_{C=C}$ , n'est pas accompagnée d'un accroissement de la fréquence  $\nu_{C-C}$  des liaisons simples contigües. Tout se passe comme si l'accroissement de la conjugaison à l'état fondamental de la structure polyénique avait pour effet d'allonger les doubles liaisons seulement.

Du point de vue conformationnel, le passage d'une configuration entièrement trans à une configuration cis conjuguée correspond à une augmentation de la fréquence de vibration des  $\nu_{C=C}$ . Il y a diminution partielle du caractère de conjugaison par rupture de la colinéarité quand on passe de la configuration tout trans à la configuration tout cis.

c) *Effet de solvant* (Pham-Vaň Thoai, 1976)

Par leur action sur les longueurs des liaisons interatomiques, les solvants, par action intermoléculaire, ont un effet sur les fréquences.

Les solvants polaires, ou les solvants donnant lieu à des liaisons hydrogène avec les électrons  $\pi$  des C=C provoquent un abaissement de la fréquence de vibration de la  $\nu_{C=C}$ . Cet effet peut également être initié sur les groupements terminaux et se répercuter sur la position de la bande  $\nu_1$ .

d) *Effet de la température* (Z.Z HO et coll., 1982, Pham-Vaň Thoai, 1976)

Les spectres du trans et du 11-Cis Retinal en solution dans le méthanol à basse température (-120°C et à 25°C) montrent un faible changement de fréquence mais un changement notable de l'intensité des raies Raman. On observe un léger déplacement de la bande d'absorption électronique vers le rouge.

A basse température, la durée de vie moyenne dans chaque état est augmentée ce qui entraîne une diminution de la largeur des composantes vibroniques et du facteur d'amortissement correspondant. L'état de résonance vibronique est modifié ce qui explique la variation de l'intensité des bandes Raman observées.

En outre, on attend qu'à basse température, l'interaction entre la chaîne polyène très polarisable et l'environnement soit accrue, ce qui devrait provoquer un changement de fréquence.

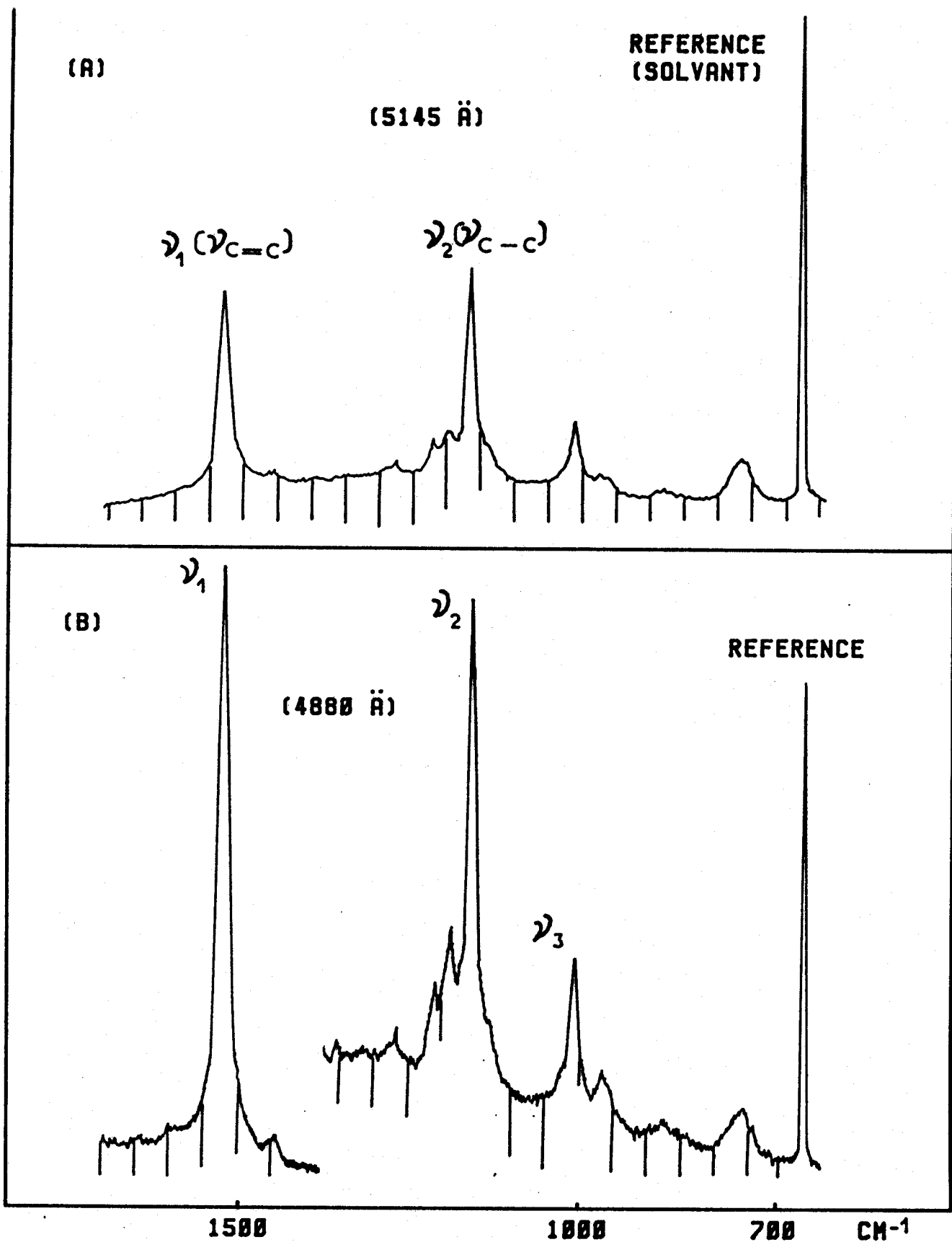
Ce changement de fréquence ( $50 \text{ cm}^{-1}$ ) a été observé sur le  $\beta$  carotène (à  $118^\circ\text{K}$ ) en solution dans l'isopentane par (Z.Z. HO et coll., 1976).

## 2. Spectres Raman de résonance des caroténoïdes

Il convient tout d'abord de rappeler brièvement et qualitativement le principe de la spectrométrie Raman de résonance (S.R.r.) dont on trouvera la justification théorique dans l'annexe 1.

Il y a effet de résonance lorsque la fréquence de la radiation excitatrice  $\nu_0$  est voisine d'une bande d'absorption électronique de la molécule étudiée. Dans ces conditions, il se produit une exaltation de certaines raies du spectre Raman. Ce phénomène résulte du couplage entre les transitions électroniques et vibrationnelles. Les raies exaltées sont propres à des groupes d'atomes (chromophores) dont les transitions électroniques sont responsables de l'absorption électronique.

La S.R.r. doit donc être applicable aux caroténoïdes puisqu'il y a un chromophore constitué des enchaînements polyisopréniques. C'est ce que l'on constate sur le spectre S.R.r. du  $\beta$  carotène (Figure 3) lorsque les longueurs d'onde excitatrices sont choisies à 488 nm et à 514,5 nm. Elles s'approchent plus ou moins d'un maximum de la bande d'absorption visible décrite précédemment.



**FIG. 3:** EXALTATION RAMAN DE RESONANCE : SPECTRES RAMAN DE RESONANCE RIGOUREUSE DE LA SOLUTION DE CAROTENE DANS LE CHLOROFORME A  $\sim 10^{-5}$  MOLE/LITRE, A LA TEMPERATURE AMBIANTE, EXCITEE PAR LA RAIE LASER (A) 5145Å ET (B) 4880Å.

En comparant ce spectre S.R.r. au spectre Raman classique présenté figure (2), on constate effectivement une très forte exaltation essentiellement pour trois bandes : ce sont celles attribuées aux modes  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  caractéristiques de l'enchaînement isoprénolique.

Ce phénomène est général pour l'ensemble des caroténoïdes. En S.R.r., ces trois modes seront toujours exaltés, la fréquence et les intensités de ces vibrations dépendant de la configuration et de la longueur de la chaîne, de la présence et de la nature des groupements terminaux.

On rappelle qu'en Raman de résonance :

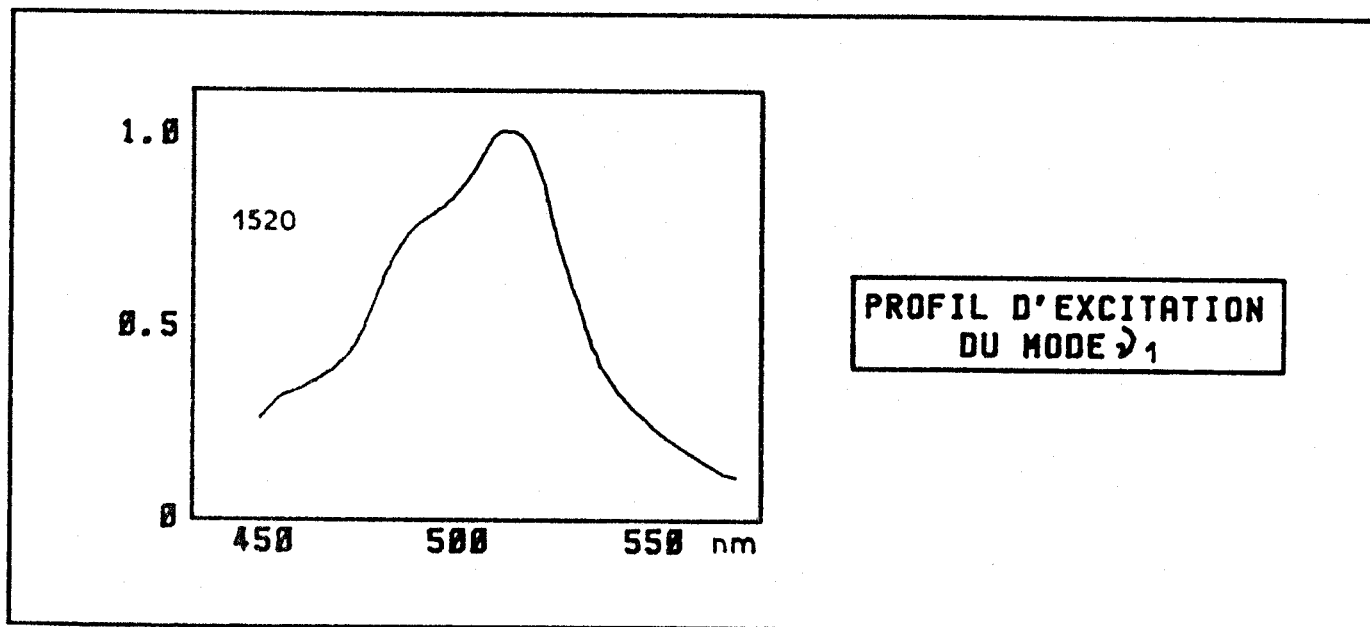
- La fréquence de vibration est indépendante de la longueur d'onde d'excitation. Elle ne dépend donc que de la conformation de la molécule dans l'état fondamental.
- L'intensité de la bande dépend de la position du maximum d'absorption. Elle est donc fonction de l'état fondamental et de l'état électronique excité.
- Comme en spectrométrie Raman conventionnelle, l'intensité est directement proportionnelle à la concentration pour une longueur d'onde d'excitation donnée.

### 3. Profils d'excitation

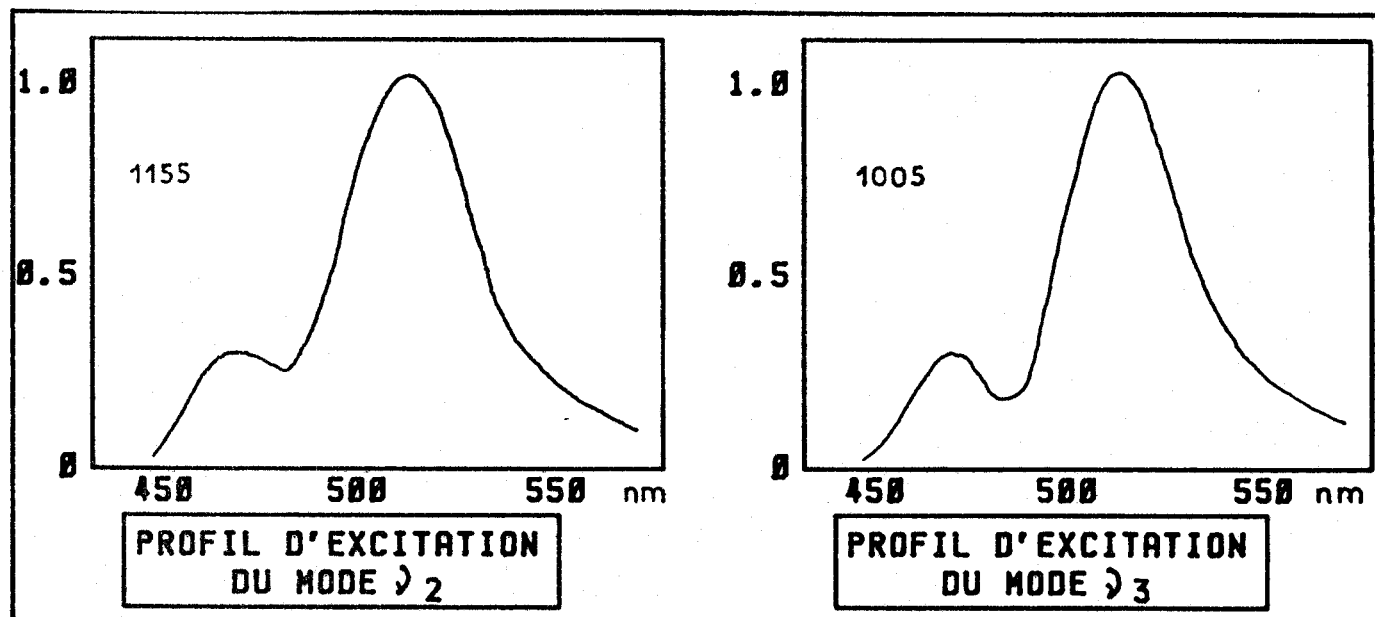
On appelle profil d'excitation la courbe obtenue en portant l'intensité d'une bande vibrationnelle Raman en fonction de la fréquence de la radiation excitatrice.

L'intensité des raies Raman varie fortement en fonction de la fréquence excitatrice et elle est différente d'un mode vibrationnel à l'autre.

Pour le trans  $\beta$  carotène, le profil d'excitation (S. Sufra et coll., 1977) de la bande correspondant au mode  $\nu_1$  coïncide assez bien avec le contour de la bande d'absorption électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Figure 1).



En ce qui concerne les modes  $\nu_2$  et  $\nu_3$ , le profil d'excitation montre qu'ils sont couplés avec le mode  $\nu_1$  principal. En effet, ces profils présentent un maximum bien défini très proche du niveau vibronique 0-0.

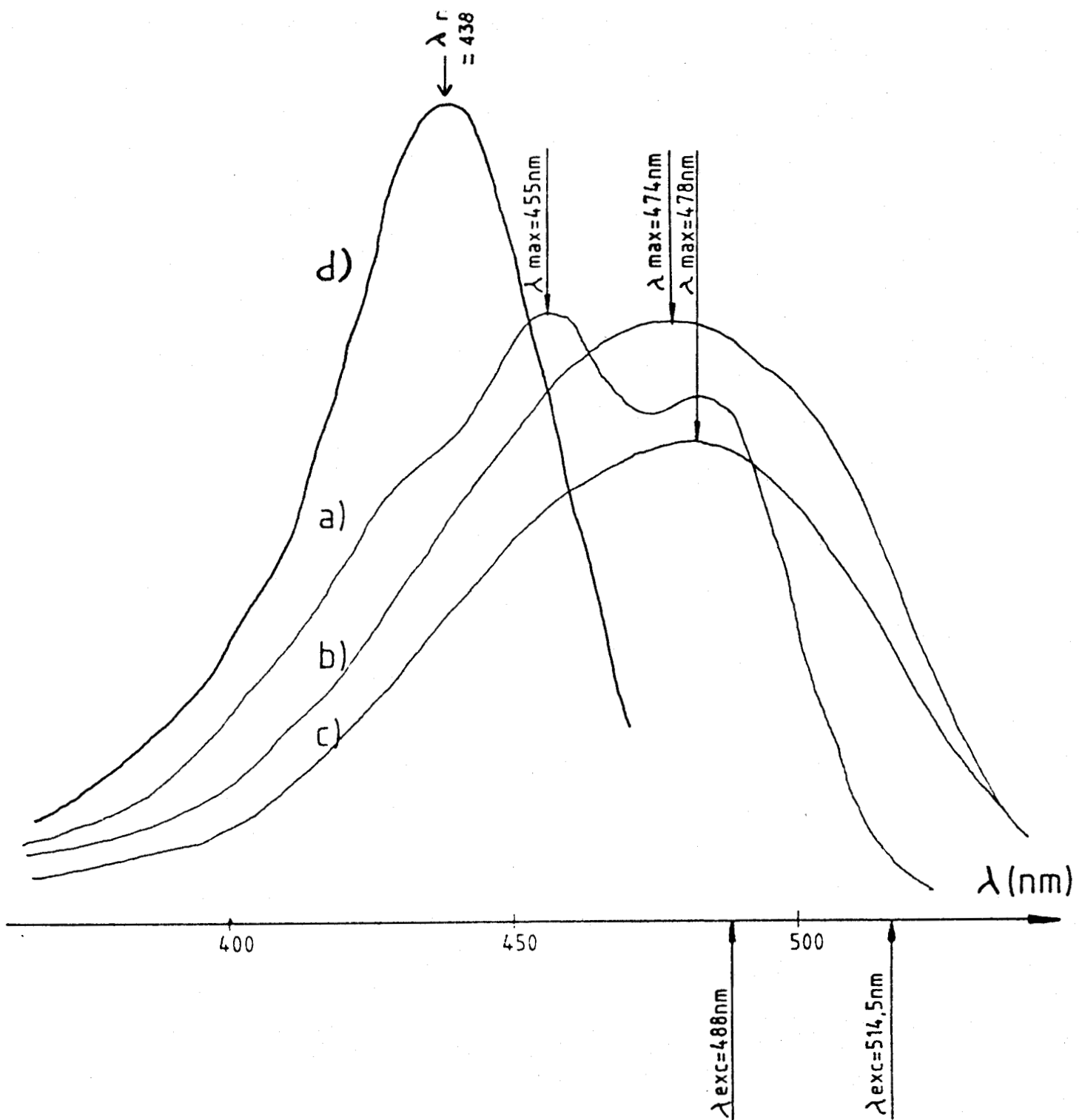


En S.R.r., les profils d'excitation procurent donc des informations intéressantes sur les propriétés des états électroniques excités de la molécule. Les intensités calculées d'après la théorie d'Albrecht (Annexe 1) permettent de définir s'il y a interaction vibrationnelle avec un seul état électronique excité ou couplage vibronique de deux états électroniques excités.

Pour tous les caroténoïdes étudiés dans ce mémoire, c'est le terme A de la théorie d'Albrecht qui prédomine. L'exaltation des raies est donc due à l'interaction vibrationnelle avec un seul état électronique excité.

De ce qui précède, se dégagent deux caractéristiques très intéressantes de la S.R.r. :

- a) Grâce au choix judicieux de la fréquence de la radiation excitatrice, on peut exalter les vibrations de certains chromophores. On atteint ainsi une sélectivité que ne possède pas l'absorption U.V.-visible. Pour un mélange de caroténoïdes et d'autres pigments (tétrapyrroliques par exemple), en S.R.r. les vibrations de l'enchaînement polyisoprénique pourront être exaltées et facilement repérées. Il n'en est pas de même en absorption U.V.-visible où les deux types de composés interfèrent (Figure 4).
- b) L'exaltation produite par effet de résonance conduit à des accroissements considérables d'intensité qui peuvent atteindre un facteur  $10^6$ . On peut donc envisager de travailler en solution très diluée (jusqu'à  $10^{-8}$  M) même sur des substrats naturels où les caroténoïdes seraient en très faible concentration et sans préparation préalable.



**FIG. 4:** SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE

- A) DU  $\beta$ . CAROTENE
- B) DE LA CANTHAXANTHINE
- C) DE L'ASTAXANTHINE
- D) DE LA CHLOROPHYLLE



## CHAPITRE 1

---

### ETUDE DE LA PIGMENTATION DE LA MOULE

#### "MYTILUS EDULIS"

Comme on l'a vu, les biologistes s'intéressent à la nature des caroténoïdes présents dans le monde animal et végétal. C'est en particulier le cas pour la moule "*Mytilus edulis*" dont la composition en caroténoïdes a été étudiée par différents auteurs (Campbell, 1970, Czezuga, 1976, Tanaka, 1979, Weedon, 1965). Cette composition varie en particulier avec la maturité sexuelle de l'animal (Ringelberg, 1976)

D'autres auteurs ont également mis en évidence des variations de composition relative selon l'alimentation et le degré d'oxygénation du milieu (Karnaukhov et coll., 1977).

Toutes ces études sont longues car elles nécessitent des extractions, séparations, et purifications.

Compte-tenu des potentialités de la S.R.r., on a tenté l'étude directe des caroténoïdes de la moule.

## 1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les études *in vivo* ont été réalisées à l'aide de la microsonde Raman (M.O.L.E.) (Annexe 2.C). La moule a été ouverte ; une partie de l'organe à analyser a été prélevée, déposée entre lame et lamelle du microscope en présence d'eau de mer et placée sous le faisceau laser. Pour l'étude du pied, des coupes ont été réalisées au cryostat pour accéder à la partie interne de l'organe ; l'épaisseur des coupes est de 0,5 mm. Cette méthode par rapport à celle qui consiste à insérer l'organe dans un bloc de résine ou de paraffine, évite l'introduction d'impuretés qui peuvent être la cause d'un fond de fluorescence lors de l'enregistrement des spectres Raman et évite la dissolution des caroténoïdes dans les solvants utilisés.

Les spectres d'absorption visible et de S.R.r. ont été réalisés respectivement sur le Duospac 203 (Annexe 2.1) et le R.T. (Annexe 2.B). Les extraits acétoniques purs des moules ont été enregistrés sans purification particulière.

Pour le choix de la radiation excitatrice, on s'est reporté au spectre d'absorption visible qui présente un maximum vers 420 nm (Figure 5).

Compte-tenu des fréquences disponibles sur le laser à Argon, la radiation 488,0 nm a été utilisée, ce qui nous place dans le cas favorable de la résonance (Annexe 1).

## 2. RESULTATS

### 1. Etude du manteau

Le manteau de la moule renferme des gonades. Les caroténoïdes qui colorent la moule varient selon la maturité sexuelle de l'animal, et expliquent les différentes couleurs observées pour le manteau (Keats J).

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Sensibilité : 1  
Fente : 0,5mm  
Enregistrement : 30mm/mn  
120nm/mn

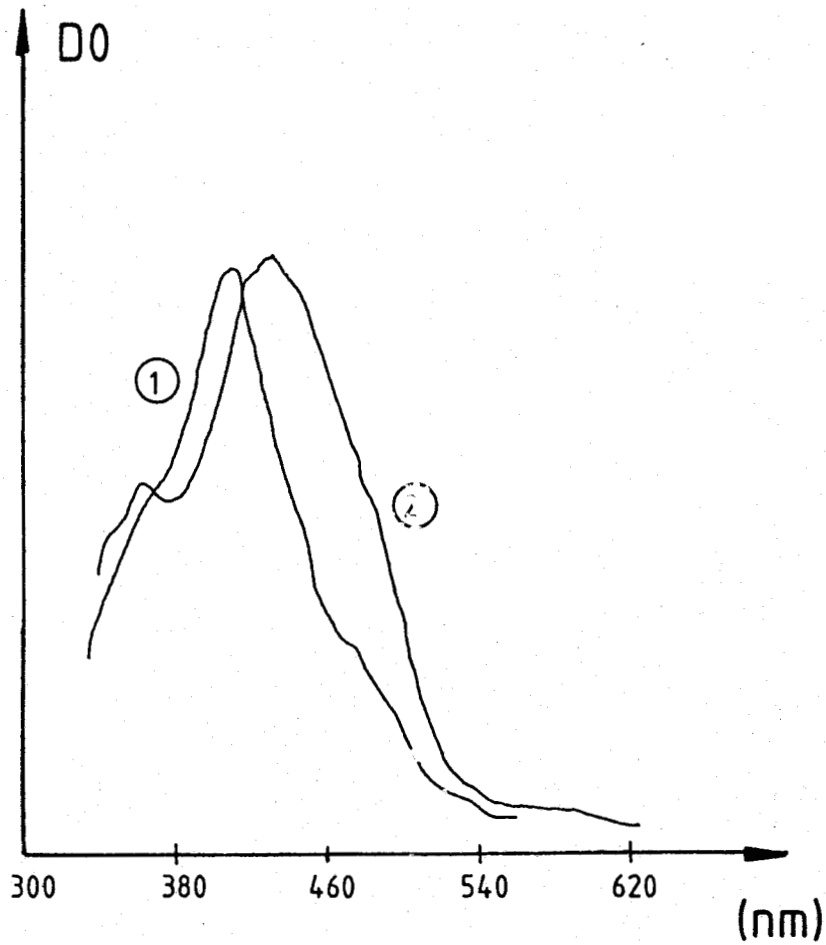


FIG. 5: SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE D'EXTRAITS ACETONIQUES  
DE MOULES RECOLTEES AU MEME ENDROIT A UN MOIS  
D'INTERVALLE

Les spectres Raman de manteaux de moule, de différentes couleurs (du jaune à l'orange) ont été enregistrés (Figure 6). Comme ils sont identiques en fréquence et rapport d'intensité, un seul d'entre-eux a été représenté.

## 2. Etude du pied

Le pied a en surface une pigmentation allant du brun au violet.

Sur la photo (Figure 7) représentant une coupe transversale du pied apparaissent quatre zones :

- une zone centrale jaunâtre      A
- une zone blanchâtre              B
- une zone peu pigmentée        C
- une zone très pigmentée        D

L'observation des zones C et D a un grossissement supérieur fait apparaître la juxtaposition de petits granules marrons et violets d'environ 2  $\mu\text{m}$  de diamètre.

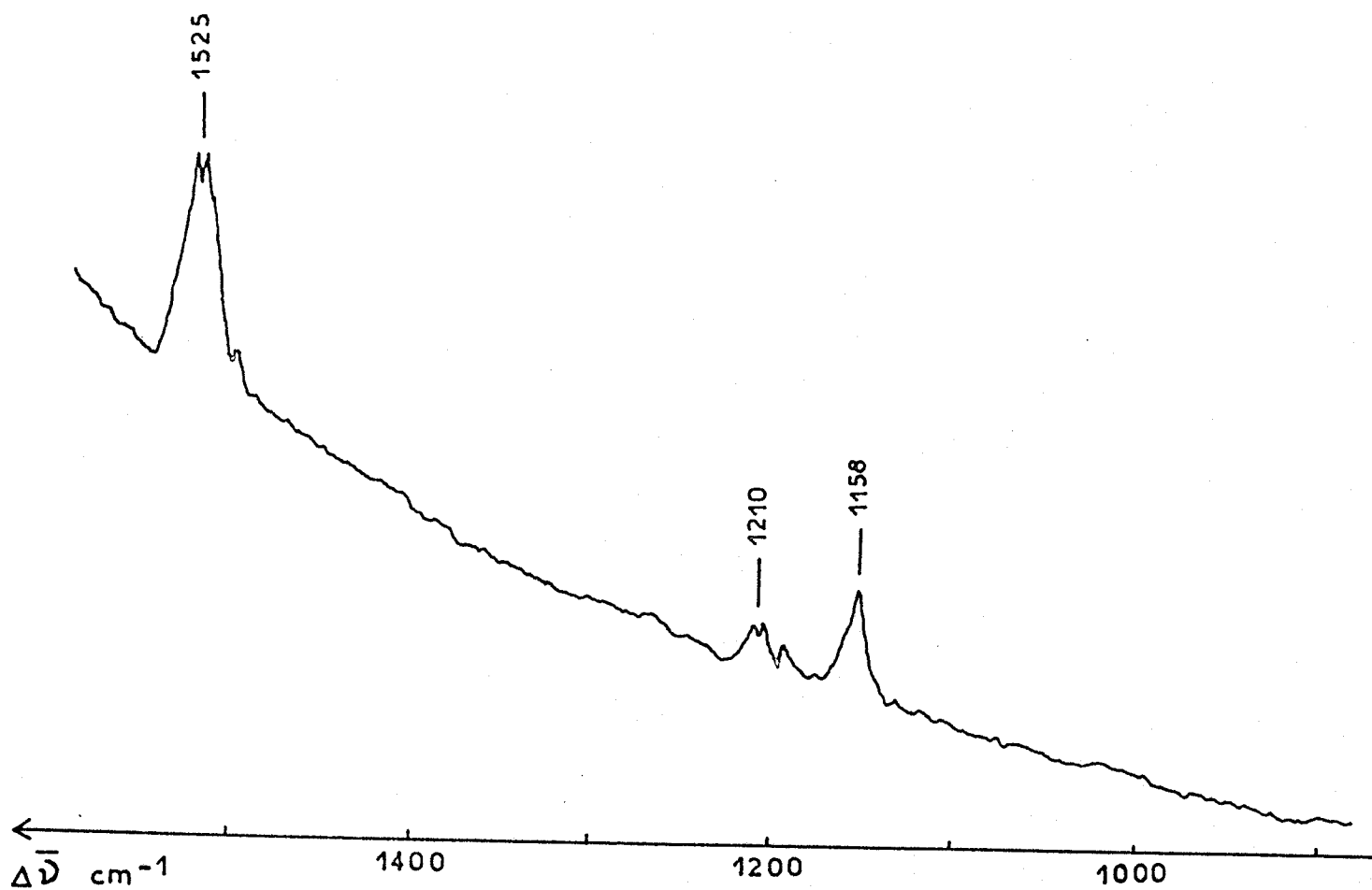
Les spectres de ces quatre zones ont été successivement enregistrés (Figure 8). La zone blanchâtre est exempte de caroténoïdes car aucun spectre n'a pu être obtenu.

## 3. Analyse d'un extrait acétonique brut de moule

A titre de comparaison, nous avons également enregistré les spectres S.R.r. et d'absorption d'extraits acétoniques de moules prélevées à deux mois d'intervalle dans le même site.

Une première série, prélevée en Mars 1983, donne des extraits dont l'étude en absorption visible montre un maximum à 412 nm (Figure 5).

La deuxième série, prélevée en Avril 1983, donne des extraits dont le maximum dans le visible est situé à 426 nm. (Figure 5).



**FIG. 6:** SPECTRES RAMAN DE RESONANCE DU MANTEAU DE LA MOULE  
MYTILUS EDULIS -EXCITATRICE : 488.0 NM-

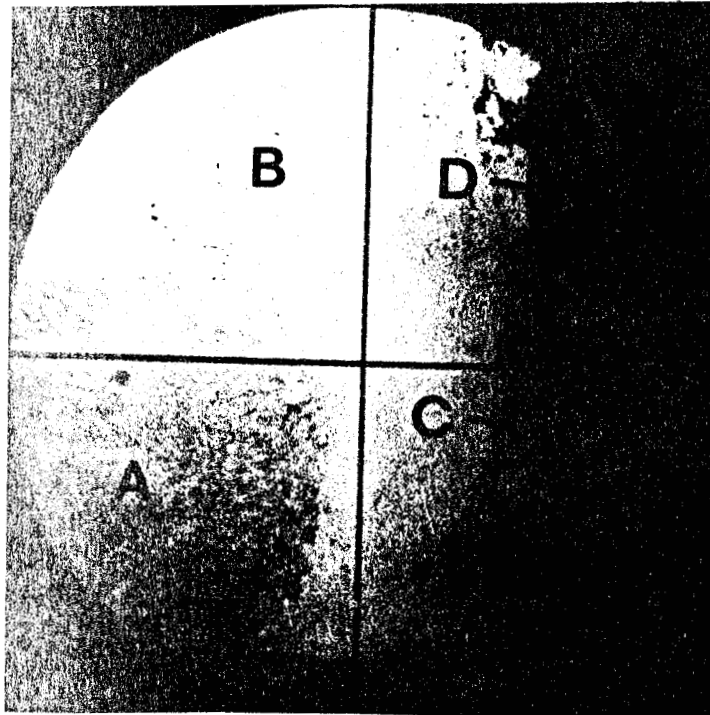
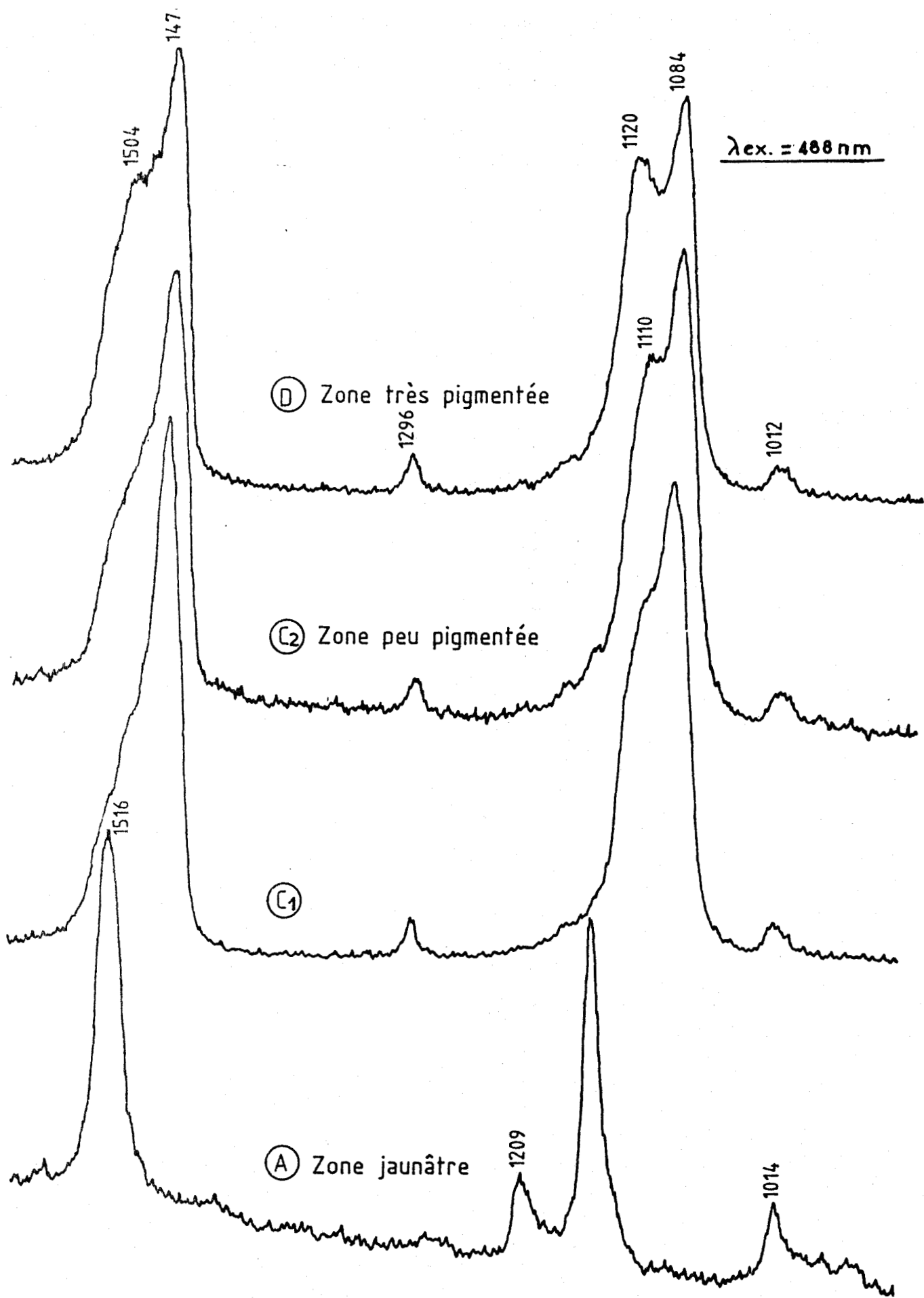


FIG. 7: COUPE TRANSVERSE D'UN PIED DE MOULE



**FIG. 8: SPECTRES RAMAN DES ZONES A, D, C D'UNE COUPE TRANSVERSE DE PIED DE MOULE (FIG. 7)**

Les mesures sont ramenées à 1 g. de moule séchée et sans tendon. Les moules recueillies sur le littoral de la mer du Nord ont été débarassées de leur coquille, rincées plusieurs fois à l'eau distillée, pesées, broyées puis placées dans l'acétone. L'extrait acétonique, décanté puis filtré a été étudié en Raman et en absorption visible sans purification particulière.

Les spectres S.R.r. sont enregistrés avec la même excitatrice (488,0 nm) et on mesure à la fois les densités optiques aux maximums d'absorption visible et l'intensité Raman du mode  $\nu_1$  (vers  $1525 \text{ cm}^{-1}$ ). On utilise le rapport d'intensité de cette bande et de celle de l'acétone à  $1710 \text{ cm}^{-1}$ . Les solutions étant très diluées, le solvant peut être considéré comme ayant un titre constant. Par ailleurs, la proximité des deux bandes permet de négliger les corrections dues à la réponse de l'appareil.

La Figure 9 présente la densité optique (D.O.) des extraits en fonction du rapport de ces raies Raman  $\left(\frac{I_{1525 \text{ cm}^{-1}}}{I_{1710 \text{ cm}^{-1}}}\right)$ . Si chacune des méthodes est quantitative,

on doit obtenir deux droites en fonction de la concentration, correspondant aux deux séries de prélèvements.

### 3. DISCUSSION

Les spectres Raman des manteaux de moules de différentes couleurs (Figure 6) sont semblables entre-eux et à celui d'un caroténoïde de même longueur de chaîne que le  $\beta$ -carotène, avec une bande correspondant au mode  $\nu_1$  à  $1528 \text{ cm}^{-1}$  et l'autre correspondant au mode  $\nu_2$  à  $1158 \text{ cm}^{-1}$ .

On aboutit à la même conclusion pour la masse jaunâtre notée A sur la Figure 8, du pied de moule.

Pour les zones C et D, on remarque que les modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  sont à des fréquences plus basses que pour le  $\beta$ -carotène. Ceci implique que la chaîne polyénique est plus longue que celle du  $\beta$ -carotène ou qu'une complexation modifiant  $\nu_1$  et  $\nu_2$  intervient. La variation des intensités relatives des



modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  prouve qu'il y a au moins deux types de pigments. Dans la partie D (Figure 8), on a  $\nu_{1a} = 1504 \text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{1b} = 1474 \text{ cm}^{-1}$  ;  $\nu_{2a} = 1120 \text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{2b} = 1084 \text{ cm}^{-1}$ .

En ce qui concerne l'étude des extraits acétoniques totaux, la dispersion des points sur la courbe (Figure 9) est importante. Elle ne provient pas seulement des erreurs sur les mesures mais peut être expliquée aussi par les deux phénomènes suivants :

- a) L'absorption visible n'est pas suffisamment sélective et prend en compte des constituants extraits qui eux ne répondent pas en S.R.r.
- b) Le coefficient d'exaltation en S.R.r. dépend fortement du composé étudié. Or, on a un mélange et une réponse qui varient en fonction des proportions relatives des constituants du mélange. Des corrections d'absorption (Annexe 1) seraient à évaluer pour chaque solution.

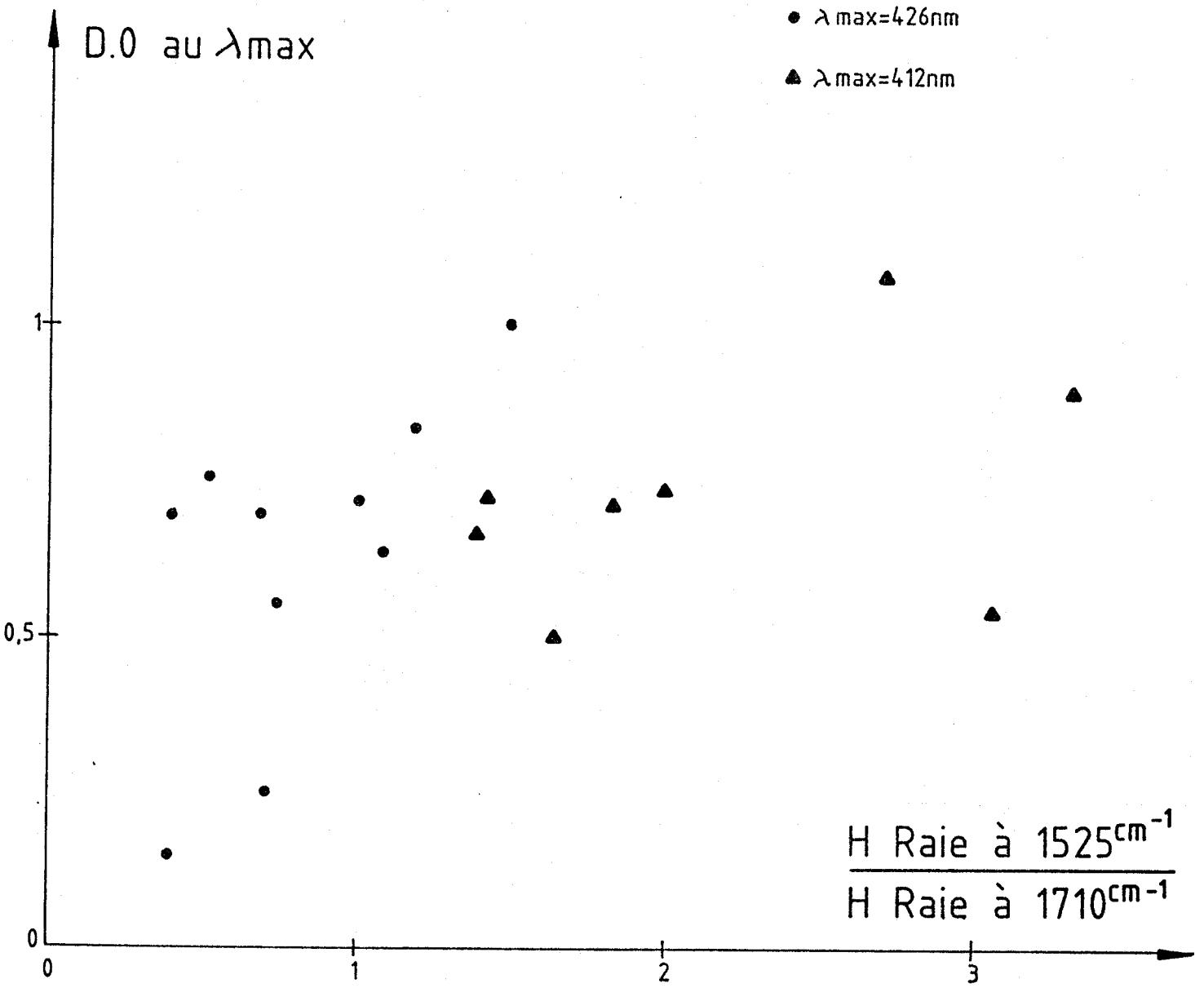
#### 4. CONCLUSION

La S.R.r. permet donc bien de mettre en évidence, sans purification préalable, l'existence de plusieurs types de pigments chez la moule. Les spectres sont intenses et l'effet de matrice quasiment nul (présence quelquefois d'un fond de fluorescence).

Il s'agit là d'un avantage considérable par rapport à l'absorption visible qui ne peut sans séparation différencier le nombre de caroténoïdes présents, ni s'affranchir de l'absorption de la matrice.

Toutefois, l'étude menée montre la présence de mélanges.

Il s'agit donc, après cet essai, d'améliorer les possibilités de la S.R.r. pour l'analyse quantitative (totale et par composant) et qualitative.



**FIG. 9:** DENSITE OPTIQUE AU MAXIMUM D'ABSORPTION VISIBLE EN FONCTION DU RAPPORT D'INTENSITE RAMAN A 1525 CM<sup>-1</sup> ET 1710 CM<sup>-1</sup> POUR UNE LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION DE 488.0 NM

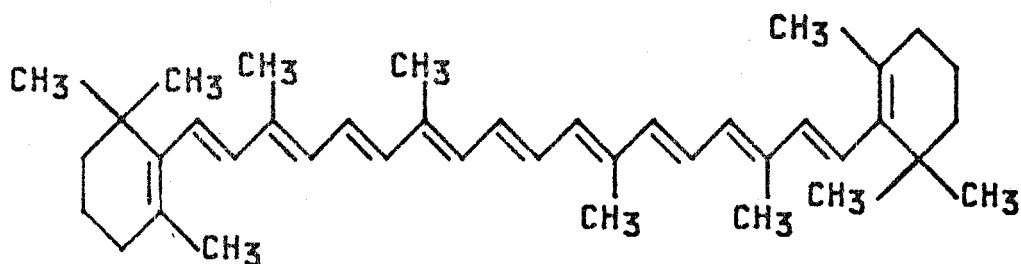
## CHAPITRE 2

### DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION GLOBALE EN CAROTÉNOÏDES D'UN MÉLANGE

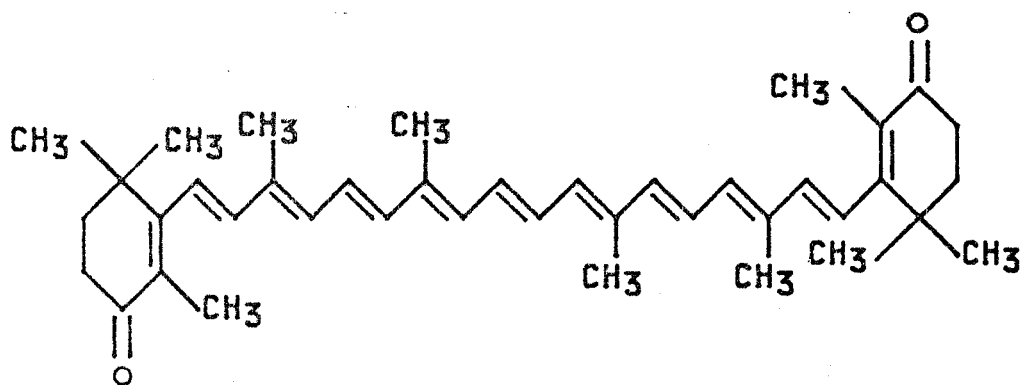
Malgré les possibilités de la S.R.r. démontrées au chapitre précédent, on se heurte au cas des mélanges. On a donc décidé d'essayer de déterminer la composition globale en caroténoïdes de mélanges synthétiques binaires. Nous nous sommes placés dans les meilleures conditions pour l'absorption visible en n'ajoutant aucun autre pigment. Une étude comparative a été menée en absorption visible et en S.R.r.

#### 1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les solutions étalons ont été préparées à partir de  $\beta$ -carotène et de canthaxanthine (Hoffmann-Laroche) et d'acétone (Prolabo).



LE  $\beta$ . CAROTENE



LA CANTHAXANTHINE

Les solutions sont analysées en :

- S.R.r. avec deux excitatrices (488,0 nm - 514,5 nm) au R.T. (Annexe 2.B)
- en absorption au duospac (Annexe 2.A).

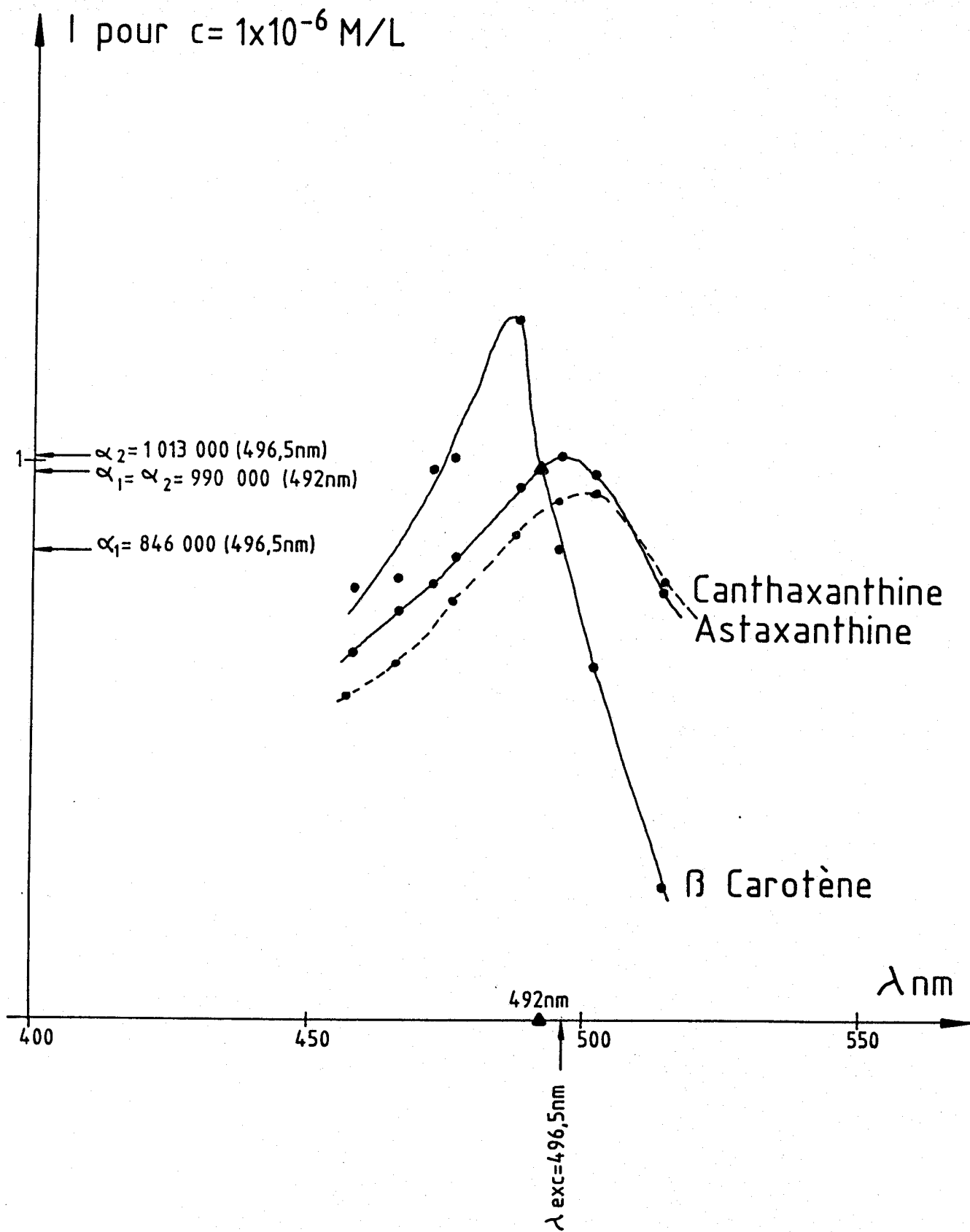
En S.R.r., les mesures se font à  $1525\text{ cm}^{-1}$ . Elles pourraient être réalisées à  $1160\text{ cm}^{-1}$ , qui correspond aussi à une raie intense et conduire ainsi à des résultats comparables.

Le solvant utilisé est l'acétone, car la majorité des caroténoïdes y sont très solubles. De plus, le spectre Raman de ce solvant présente deux raies intenses à  $790\text{ cm}^{-1}$  et  $1710\text{ cm}^{-1}$ , suffisamment voisines des deux raies principales des caroténoïdes pour pouvoir servir de référence interne. On travaillera en général en milieu dilué ( $< 10^{-5}$  M/L). La raie de l'acétone pourra donc être supposée constante pour toutes les solutions. Les corrections dues à la réponse de l'appareil (réponse du photomultiplicateur, efficacité des réseaux) sont dans ce cas négligeables.

La méthode la plus couramment utilisée pour le dosage de caroténoïdes globaux dans un mélange est l'absorption visible. Le spectre du mélange obtenu après extraction est enregistré et comparé avec ceux de composés purs. On considère que le mélange est alors formé d'un seul constituant : celui dont le spectre ressemble le plus au spectre d'absorption visible du mélange. La courbe d'étalonnage de ce produit pris comme référence, obtenue en portant la densité optique en fonction de la concentration est utilisée pour déterminer une concentration globale approchée. Pour calquer cette méthode, nous avons procédé comme suit : A partir de mélanges synthétiques de  $\beta$ -carotène et de canthaxanthine en proportions relatives connues, la concentration globale est déterminée en considérant que le mélange est composé d'un seul produit majoritaire. Pour ceci, nous nous reportons à des courbes d'étalonnage réalisées en diffusion Raman et en absorption visible pour chacun des deux produits.

Notre choix s'est porté sur ces deux caroténoïdes car ils possèdent des profils d'excitation suffisamment différents pour être distingués dans un mélange (Figure 10) et peuvent être obtenus avec une grande pureté par voie de synthèse.

L'étude a été réalisée simultanément en absorption visible et en S.R.r. Dans tous les cas, le spectre d'absorption visible a été enregistré avant et après l'analyse en S.R.r. pour vérifier qu'il n'y a aucune dégradation sous le faisceau laser (ce qui fut le cas).



**FIG. 10:** PROFIL D'EXCITATION DU  $\beta$ .CAROTENE, DE LA CANTHAXANTHINE ET DE L'ASTAXANTHINE

## 2. RESULTATS

### 1. En absorption visible

La densité optique à une longueur d'onde  $\lambda$  est égale pour un mélange binaire, d'après la loi de Beer-Lambert à :

$$DO(\lambda) = l (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)$$

- $C_1$  et  $C_2$  les concentrations des constituants.
- $\epsilon_1$  et  $\epsilon_2$  les coefficients d'extinction molaire à la longueur d'onde  $\lambda$ .
- $l$ , le trajet optique en cm.

Pour calculer une concentration équivalente du composé 1, on utilise la relation :

$$DO(\lambda) = l \epsilon_1 C_{\text{equiv.}}$$

On introduit ainsi une erreur relative égale à :

$$\frac{(C_1 + C_2) - C_{\text{equiv.}}}{(C_1 + C_2)}$$

Si on appelle  $x_1$ , la fraction molaire du constituant 1, l'erreur relative commise peut s'écrire :

$$\left(1 - \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}\right) - x_1 \left(1 - \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}\right)$$

(On a une forme symétrique si on choisit le composé 2 comme référence).

La formulation de l'erreur commise montre qu'elle est d'autant plus grande que les  $\epsilon$  sont différents pour la longueur d'onde choisie. Il s'en suit, qu'on a intérêt, pour minimiser l'erreur, non pas à se placer au maximum d'absorption mais à l'intersection des spectres d'absorption rapportés à une concentration déterminée. Les deux coefficients d'extinction molaire sont identiques en ce point.

A titre d'exemple, on a reporté dans le tableau ci-dessous, l'erreur théorique commise, selon que l'un ou l'autre des composés a été choisi comme référence pour le dosage du mélange binaire.

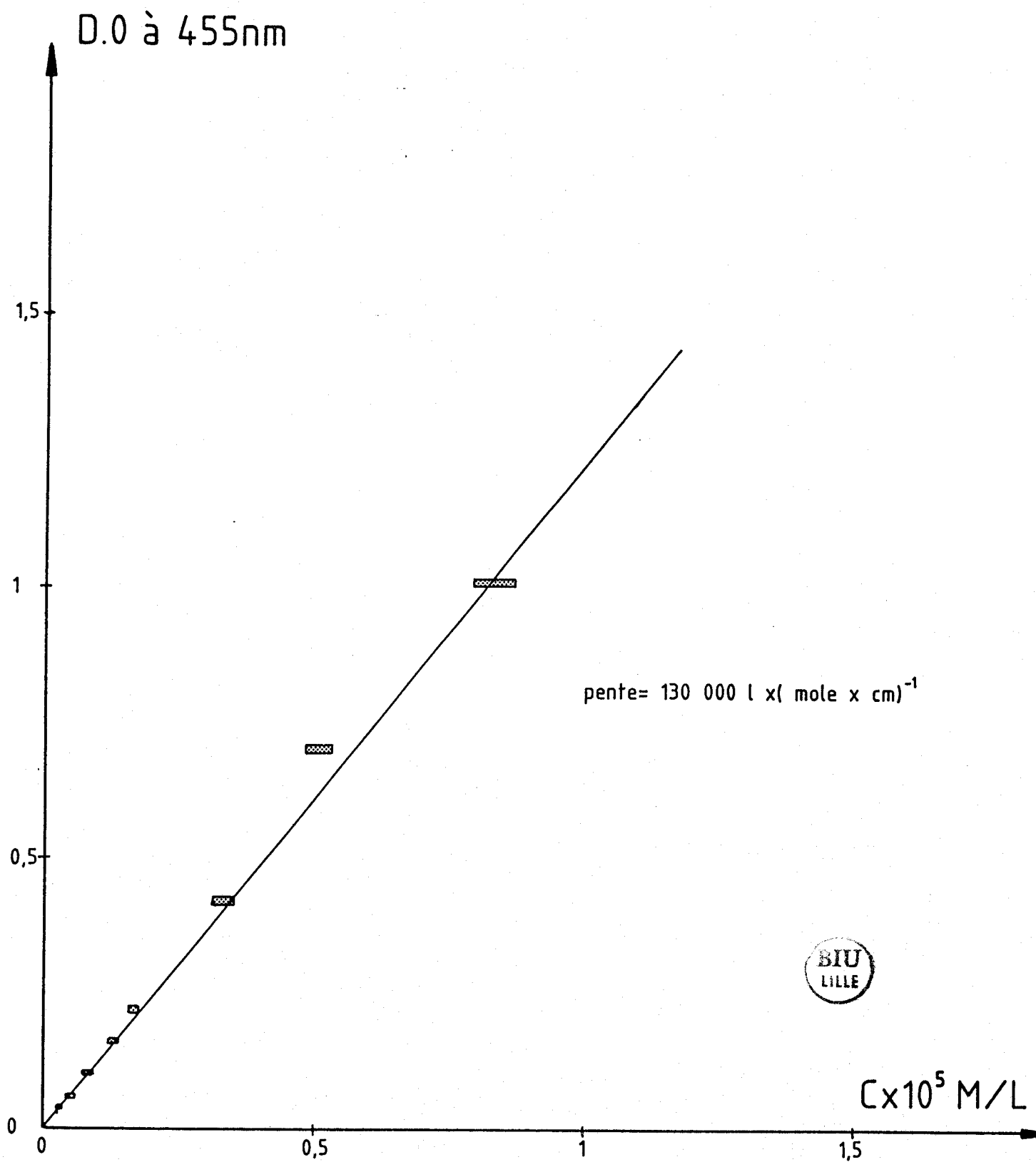
Les coefficients  $\epsilon$  sont calculés à partir des courbes représentées sur les figures 11 et 12.

	: $\beta$ -carotène	: Canthaxanthine	: Erreur maximale
Référence 1	: $\epsilon_1 = 130\ 000$	: $\epsilon_2 = 119\ 500$	: + 0,08
$\lambda = 455\ \text{nm}$	: $1\ (\text{mole cm})^{-1}$	: $1\ (\text{mole cm})^{-1}$	:
Référence 2	: $\epsilon_1 = 110300$	: $\epsilon_2 = 135000$	: + 0,18
$\lambda = 474\ \text{nm}$	: $1\ (\text{mole cm})^{-1}$	: $1\ (\text{mole cm})^{-1}$	:
	:	:	:

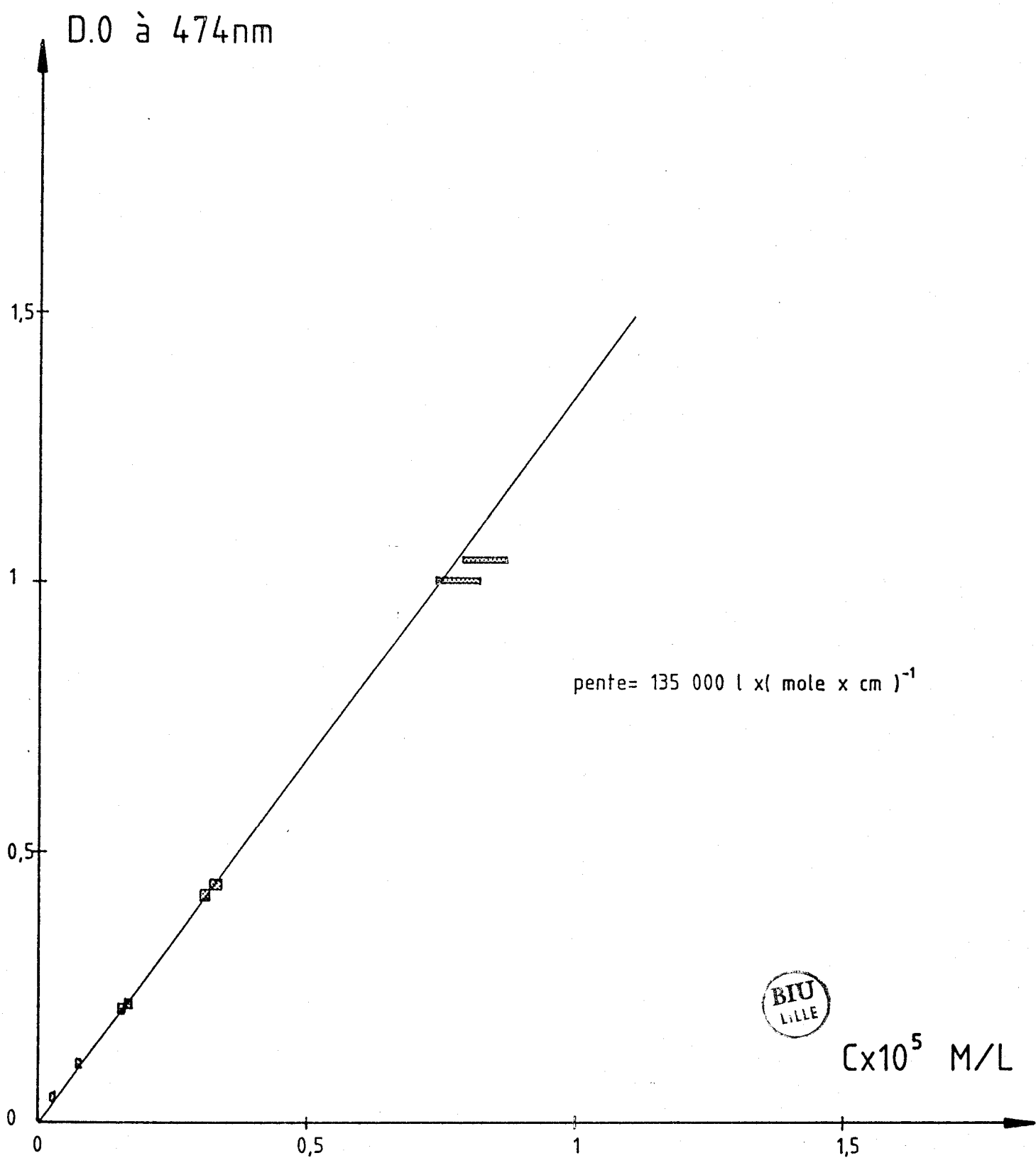
Les courbes correspondantes : erreur commise en fonction de la fraction molaire en  $\beta$ -carotène sont représentées sur la Figure 13.

Il faut rappeler qu'il s'agit là seulement de l'erreur de principe, à laquelle s'ajoutent les erreurs expérimentales sur les mesures de densités optiques et sur les concentrations.

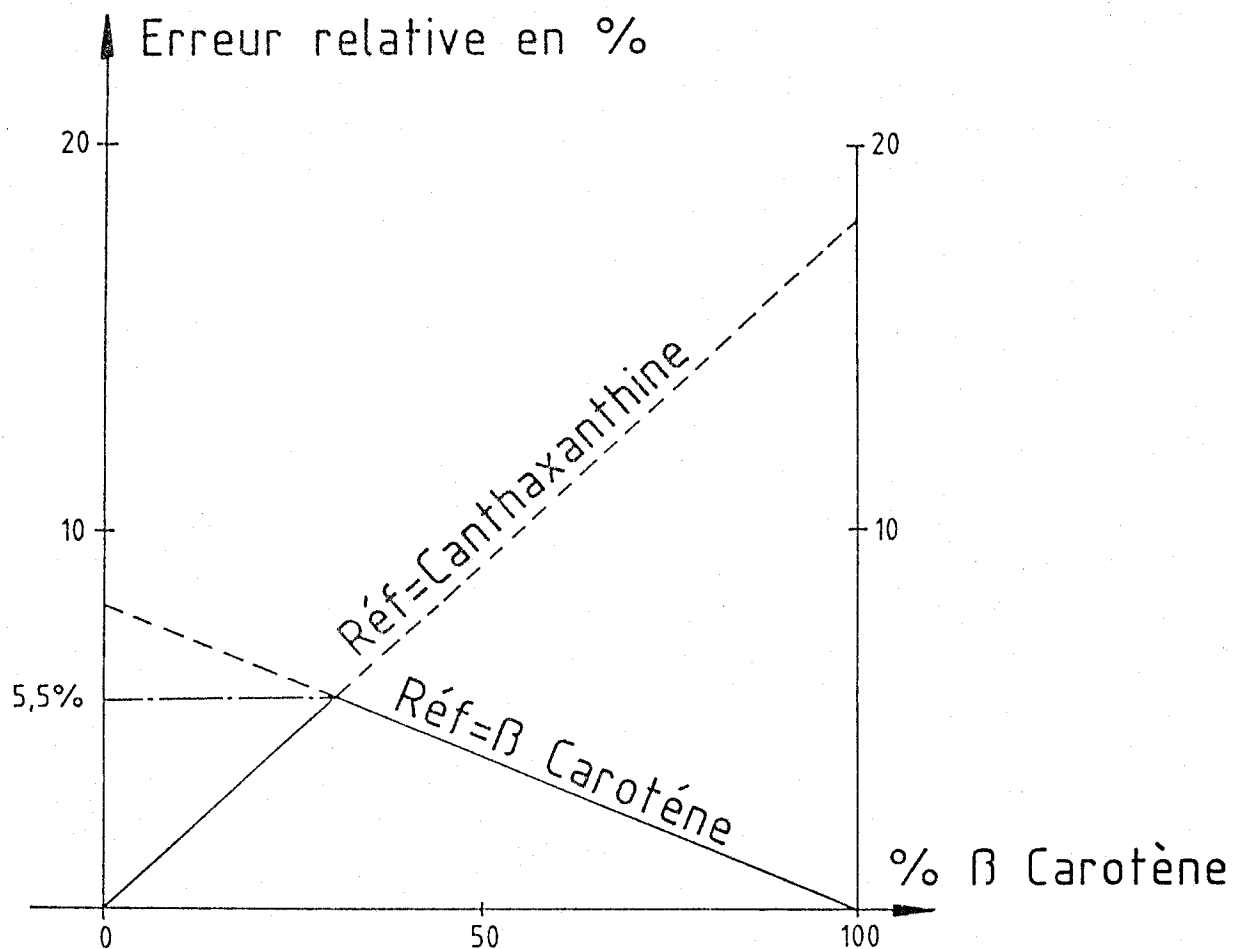




**FIG. 11:** COURBE D'ETALONNAGE DU  $\beta$ . CAROTENE DANS L'ACETONE



**FIG. 12: COURBE D'ETALONNAGE DE LA CANTHAXANTHINE DANS L'ACETONE**



**FIG. 13:** ERREUR RELATIVE = F(%  $\beta$ . CAROTENE) SUIVANT LA REFERENCE CHOISIE EN ABSORPTION VISIBLE

## 2. En S.R.t.

Les deux radiations excitatrices utilisées (488,0 nm ; 514,5 nm) permettent une exaltation des vibrations du mode  $\nu_1$  mais avec des intensités différentes.

Des équations analogues à celles précédemment obtenues en absorption visible, conduisent à l'expression suivante de l'erreur commise ;

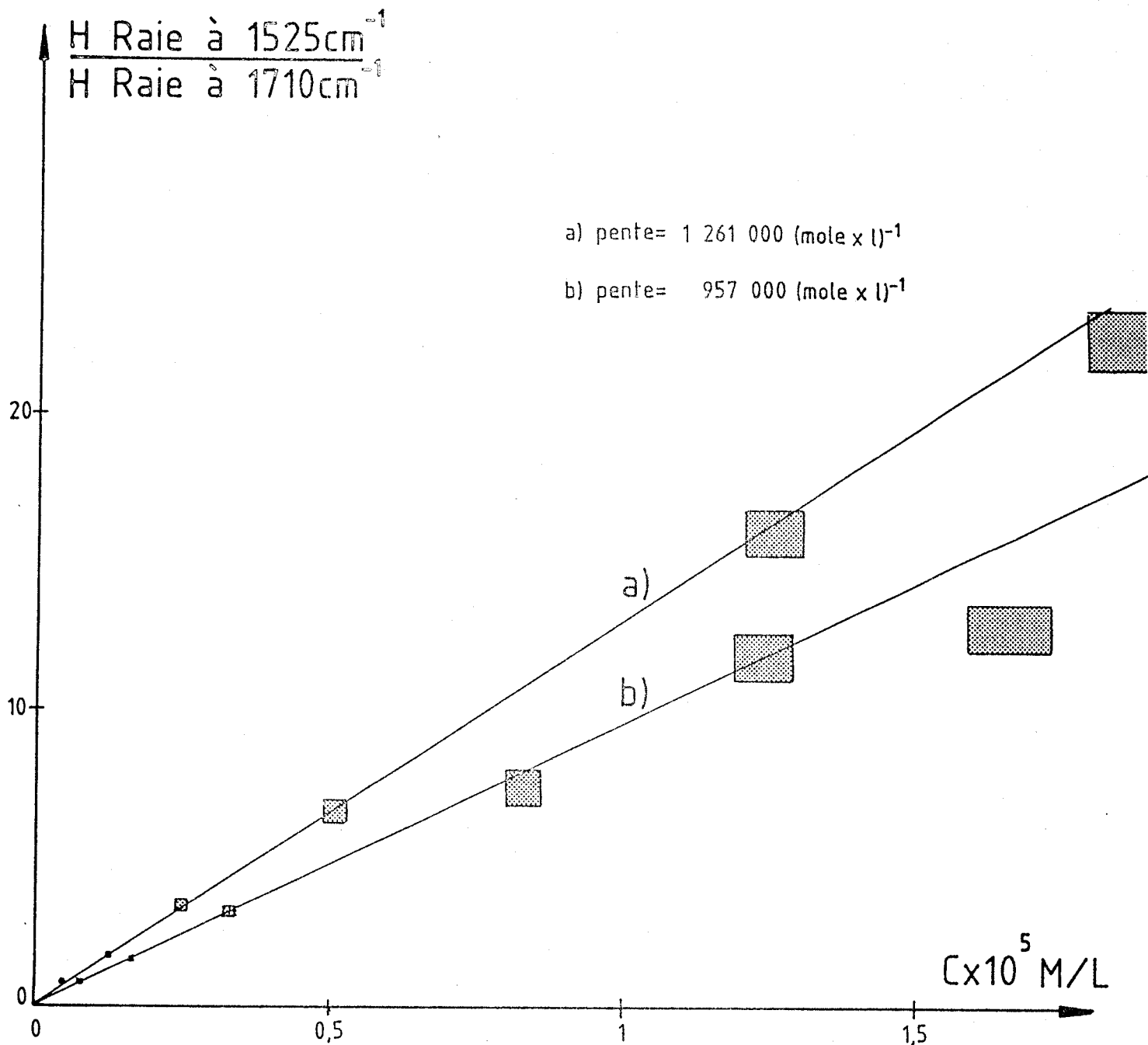
Erreur commise si le composé 1 est pris comme référence

$$= \left(1 - \frac{\alpha_2}{\alpha_1}\right) \cdot x_1 \cdot \left(1 - \frac{\alpha_2}{\alpha_1}\right)$$

- $x_1$  représente la fraction molaire du composé 1.
- $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  représentent les coefficients de proportionnalité entre l'intensité Raman de la bande à  $1525 \text{ cm}^{-1}$  mesurée  $I$  et la concentration  $C$  ( $I = \alpha_C$ ). Ces coefficients font intervenir la section efficace de la molécule à la longueur d'onde utilisée et les conditions expérimentales (solvant, réponse spectrale de la chaîne de mesure).

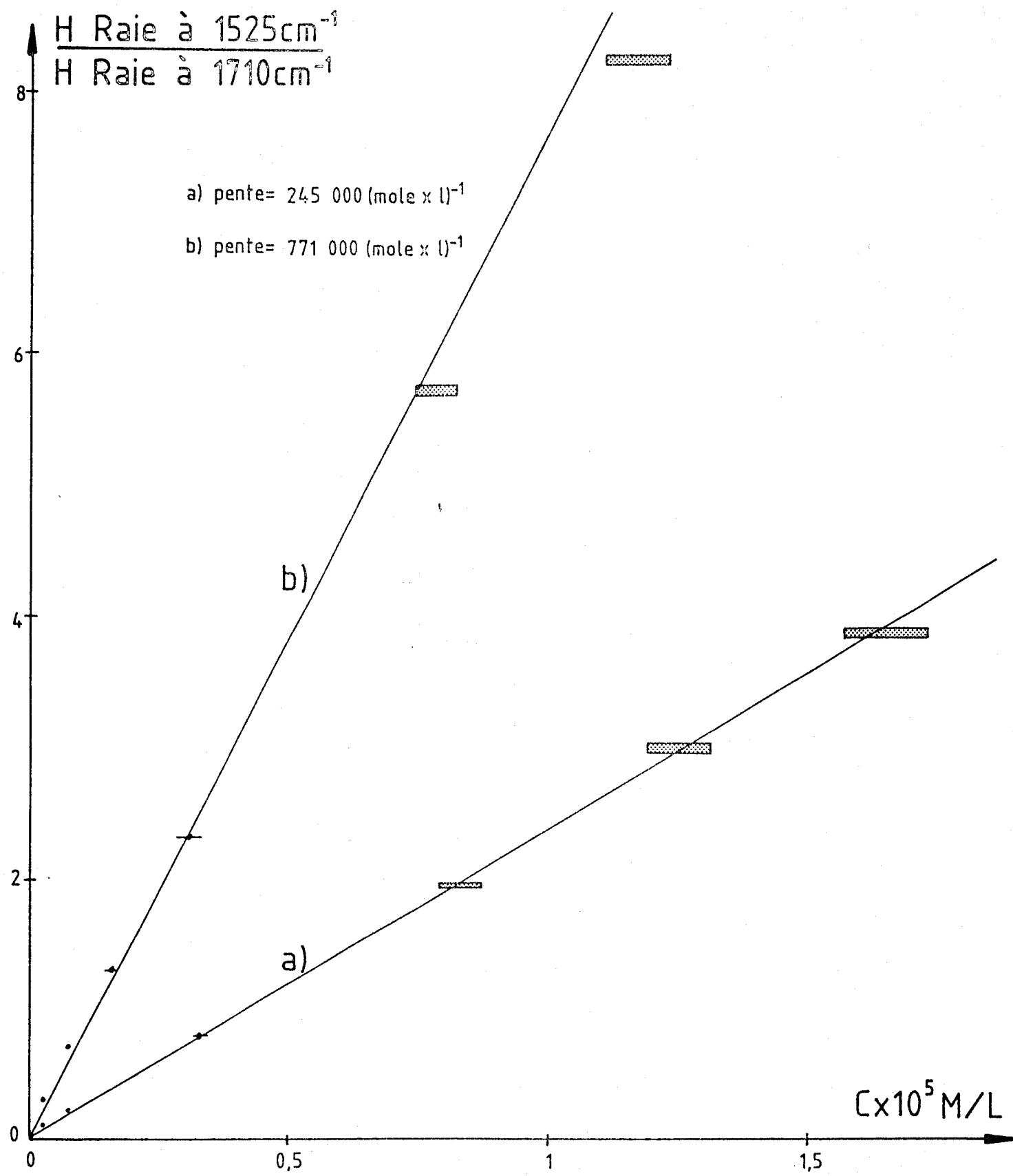
Le tableau suivant résume les résultats. Les coefficients  $\alpha$  sont calculés à partir des courbes représentées sur les figures 14 à 17.

	λ ex = 488,0 nm	λ ex = 514,5 nm
$\alpha_1$	1 261 000	245 000
$\alpha_2$	957 000	771 000
Erreur commise avec le composé 1 pris comme référence	+ 0,24	- 2,15
Erreur commise avec le composé 2 pris comme référence	- 0,32	+ 0,68



**A) FIG. 14:** COURBE D'ETALONNAGE DU  $\beta$ . CAROTENE DANS L'ACETONE  
 -EN RAMAN-  $\lambda$  EX. = 488.0 NM

**B) FIG. 15:** COURBE D'ETALONNAGE DE LA CANTHAXANTHINE DANS  
 L'ACETONE -EN RAMAN-  $\lambda$  EX. = 488.0 NM



A) FIG. 16: COURBE D'ETALONNAGE DU  $\beta$ . CAROTENE -EN RAMAN-  
 $\lambda \text{ EX.} = 514.5 \text{ NM}$

B) FIG. 17: COURBE D'ETALONNAGE DE LA CANTHAXANTHINE -EN RAMAN-  
 $\lambda \text{ EX.} = 514.5 \text{ NM}$

Les courbes correspondantes : erreur commise en fonction de la fraction molaire en  $\beta$ -carotène sont représentées sur la figure 18.

Comme en absorption visible, à cette erreur de principe s'ajoutent les erreurs expérimentales.

### 3. DISCUSSION

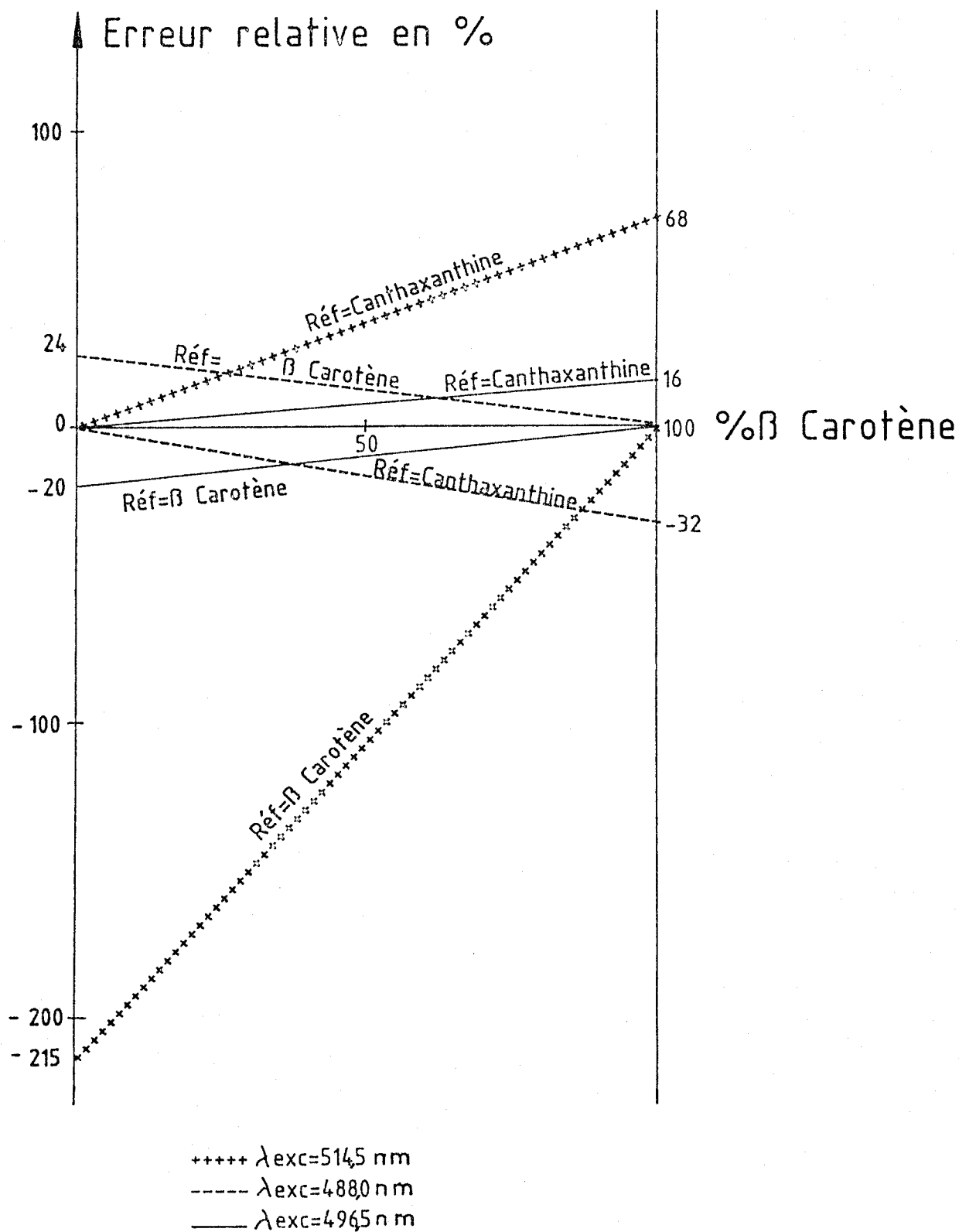
*En absorption visible*, l'erreur est plus faible à 455,0 nm ( $\epsilon_2 - \epsilon_1 = 10\ 500$ ) qu'à 474,0 nm ( $\epsilon_2 - \epsilon_1 = 24\ 700$ ). Comme indiqué ci-dessus, l'annulation de cette erreur ne peut se faire, si on utilise un composé de référence, qu'en égalant les  $\epsilon$ . Il faut se placer à l'intersection des spectres d'absorption normés. Dans le cas présent, la longueur d'onde pour laquelle cette intersection a lieu est égale à 463,0 nm.

*En S.R.r.*, on remarque l'influence de l'excitatrice sur les erreurs commises, correspondant à des exaltations différentes selon les composés.

Avec l'excitatrice à 488,0 nm, la concentration calculée est surestimée avec le  $\beta$ -carotène comme référence, sous estimée avec la canthaxanthine. La situation est inverse avec la 514,5 nm. Ceci s'explique par l'étude des profils d'excitation (Figure 10). Comme en absorption visible, l'intersection des deux profils à 492,0 nm correspond à l'égalité des  $\alpha$ . C'est en se plaçant à cette longueur d'onde qu'on annule l'erreur commise par le choix d'une référence. Le choix du caroténoïde de référence est alors indifférent puisque les  $\alpha$  sont égaux.

Pour le laser à argon dont on dispose, la longueur d'onde disponible la plus proche est de 496,5 nm.

On voit sur la Figure 18 que le choix de cette longueur d'onde minimise considérablement l'erreur.



**FIG. 18:** ERREUR RELATIVE=F(% EN  $\beta$ . CAROTENE) EN RAMAN SUIVANT LA REFERENCE CHOISIE ET A DIFFERENTES LONGUEURS D'ONDE EXCITATRICE



#### 4. CONCLUSION

A partir de l'étude de ce mélange binaire, il est possible de tirer des conclusions quant à la validité des méthodes de dosages employées et les erreurs qu'elles impliquent.

*En absorption visible*, la première condition à réaliser, est de s'assurer que les caroténoïdes sont les seuls pigments présents absorbant dans le visible. Si cette condition n'est pas réalisée, une séparation et une purification sont indispensables. Cette condition étant réalisée, le profil général de la courbe fournit une indication sur l'étalon à choisir. Le dosage global des caroténoïdes est alors possible, en commettant une erreur raisonnable, dans la mesure où les  $\epsilon$  sont voisins, au moins pour une même famille de caroténoïdes.

*En spectrométrie Raman*, le choix de la longueur d'onde excitatrice est primordial. On a vu que l'utilisation d'une excitatrice mal adaptée au mélange et à l'étalon peut conduire à des valeurs totalement erronées. Pour réduire les erreurs, et si l'on connaît la composition qualitative du mélange, on doit enregistrer les différents profils d'excitation. On choisit l'excitatrice pour laquelle les  $\alpha$  sont les plus proches les uns des autres.

Il faut souligner que dans l'étude du mélange choisi, les conditions de travail en absorption étaient les plus favorables (absence de pigments parasites), alors qu'en S.R.r. les conditions étaient défavorables. En effet, les longueurs de chaînes des deux composés choisis sont égales. Les vibrations des modes  $\nu_1$  ont donc la même fréquence. Le dosage aurait été plus aisé si les modes  $\nu_1$  avaient été nettement séparés.

*En absorption visible*, il est facile de déterminer le produit majoritaire puisque son spectre prédomine dans celui du mélange. Lorsque les produits sont séparés, il est simple de travailler à la longueur d'onde correspondant à l'égalité des  $\epsilon$ .

En S.R.r., le choix de la référence est plus délicat dans la mesure où les caroténoïdes utilisés ont une fréquence de vibration  $\nu_1$  identique. Lorsque les profils d'excitation sont réalisés, il n'est pas aisé (à moins d'avoir un laser à colorant accordable) de travailler à la longueur d'onde correspondant à l'égalité des  $\alpha$ .

Néanmoins, ces tests appliqués à un mélange binaire, sont encourageants. Ils conduisent à des erreurs de 5,5 % en absorption visible et 10 % en S.R.r. si les corrections sont correctement choisies. A ces erreurs de principe, il faut naturellement ajouter les erreurs expérimentales.

## CHAPITRE 3

---

### DÉTERMINATION DES PROPORTIONS RELATIVES DES CAROTÉNOÏDES DANS UN MÉLANGE

La première approche consistait à déterminer la concentration globale en caroténoïdes. Il est naturellement plus intéressant de déterminer la concentration relative de chacun des constituants du mélange. Pour cela, on propose deux méthodes :

- La résolution d'un système d'équations linéaires en absorption visible et en S.R.r.
- L'utilisation d'une corrélation entre la longueur d'onde du maximum d'absorption visible et l'intensité du mode  $\nu_1$  en S.R.r.

#### 1. RESOLUTION D'UN SYSTEME D'EQUATIONS

##### 1. Conditions expérimentales

a) *en absorption visible*

La loi de Beer Lambert s'écrit :  $DO\lambda = \sum_{i=1}^n \epsilon_i c_i l$

Pour l'étude, on a adopté un mélange ternaire de  $\beta$ -carotène, canthaxanthine et astaxanthine.  $n$  étant égal à 3, il faut donc au minimum 3 équations pour résoudre le système et obtenir les 3 concentrations.

Il faut disposer des spectres d'absorption visible des trois composés purs (pour connaître les  $\epsilon_i$  à toutes les longueurs d'onde). On effectue ensuite la mesure à trois longueurs d'onde différentes et on résoud le système d'équations. Toutefois, par cette méthode les erreurs sont importantes. On utilise la méthode de Gauss-Jordan (Annexe 3), employée par Young en I.R. pour améliorer la précision. Cette méthode consiste à considérer davantage d'équations que l'on a d'inconnues à déterminer. Dans notre cas, les concentrations sont calculées à partir de 8 équations obtenues à partir de la mesure des absorptions à 8 longueurs d'onde (420,0 nm, 440,0 nm, 455,0 nm, 460,0 nm, 474,0 nm, 480,0 nm, 495,0 nm, 500,0 nm).

*b) en S.R.r.*

La méthode mettant en jeu un système d'équations linéaires à déjà été utilisée avec succès par Lippert (1976) et Williams (1980) pour déterminer les conformations des protéines en solution.

Pour le mélange ci-dessus, où les longueurs de chaînes sont identiques, les modes  $\nu_1$  ont tous la même fréquence de vibration et on ne peut donc pas distinguer les trois constituants.

Pour lever cette difficulté, c'est en faisant varier la longueur d'onde excitatrice, donc en exaltant différemment chacun des constituants du mélange, qu'on obtient le nombre d'équations nécessaires à la résolution du problème.

L'intensité du mode  $\nu_1$  représente la somme des intensités des modes correspondant de chacun des 3 caroténoïdes et l'on peut écrire :

$$I_{\nu_{ex}} = \sum_{i=1}^3 \alpha_i c_i$$

Comme en absorption visible, en principe 3 équations (donc 3 excitatrices) suffisent à la résolution du problème.

Pour les mêmes raisons qu'en absorption visible, pour améliorer la précision, on utilise 8 équations construites à partir des 8 radiations excitatrices disponibles sur le laser à argon (457,9 nm, 465,8 nm, 472,7 nm, 476,5 nm, 488,0 nm, 496,5 nm, 501,7 nm, 514,5 nm).

## 2. Résultats

	: C raies : mole/l x10 <sup>6</sup> :	: C x 10 <sup>6</sup> mole/l : déterminée par : absorption vi- : sible	: % erreur	: C x 10 <sup>6</sup> mole/l : déterminée par : S.R.r.	: % erreur
β-carotène	: 1,95 ± 0,2	: 1,45	: 25 %	: 1,64	: 16 %
Canthaxanthine	: 2,95 ± 0,2	: 3,25	: 10 %	: 2,21	: 25 %
Astaxanthine	: 2,20 ± 0,2	: 1,95	: 11 %	: 2,89	: 31 %
	:	:	:	:	:

## 3. Discussion

Les erreurs en *absorption visible* sont de l'ordre de 15 % en moyenne. Il faut bien considérer que ce résultat n'est pas optimisé. En effet, dans la méthode de Gauss-Jordan, on dispose de deux paramètres :

- Le nombre d'équations.
- Les longueurs d'onde de travail.

Cette méthode demanderait donc un développement ultérieur. La première phase consisterait à choisir les longueurs d'onde d'absorption les plus pertinentes à partir des spectres d'absorption des composés purs. En second lieu, le nombre d'équations serait à optimiser ce qui ne pose pas de problème puisque le spectre d'absorption est continu en longueur d'onde  $\lambda$ .

*En S.R.r.*, les erreurs sont plus importantes et peuvent atteindre 30 %. Ceci est dû au bruit de fond très important pour certains spectres enregistrés avec des excitatrices de faible énergie mais surtout à la similitude des profils d'excitation de l'astaxanthine et de la canthaxanthine. Contrairement à l'absorption visible, le choix des longueurs d'onde excitatrices n'a pas été arbitraire. En effet, on a utilisé les longueurs d'onde discrètes du laser à Argon. (Le nombre de longueurs d'onde excitatrices, donc le nombre d'équations pourrait tout de même être augmenté en traçant le profil d'excitation avec un laser à colorant accordable).

Il convient toutefois de souligner qu'on s'est placé dans le cas où les modes  $\nu_1$  des constituants concordent. Ce cas n'est pas favorable mais représente le plus courant dans la nature. Si on dispose d'un mélange où les modes  $\nu_1$  ont des fréquences très différentes, on peut envisager des dosages individuels. Si les modes  $\nu_1$  présentaient des recouvrements, on pourrait envisager une décomposition en bandes individuelles (à condition que le mélange ne soit pas trop complexe).

## 2. CORRELATION ENTRE L'INTENSITE RAMAN ET LE MAXIMUM D'ABSORPTION VISIBLE. POSSIBILITE DE QUANTIFICATION.

La connaissance des lois théoriques qui régissent l'effet Raman de résonance permet d'envisager une autre méthode de dosage dans la mesure où les termes  $\alpha$  peuvent être calculés à priori.

Albrecht (Annexe 1) a étudié ces lois théoriques. Il a défini ainsi un domaine de pré-résonance (excitatrice non confondue avec le maximum d'absorption) où l'interaction vibrationnelle n'a lieu qu'avec un seul état excité.

Dans ces conditions, il a montré que l'intensité d'une raie Raman de résonance, de mode  $\nu_1$  par exemple peut se mettre sous la forme :

$$I = K \left[ \frac{\nu_e^2 + \nu_o^2}{(\nu_e^2 - \nu_o^2)^2} \right]^2$$

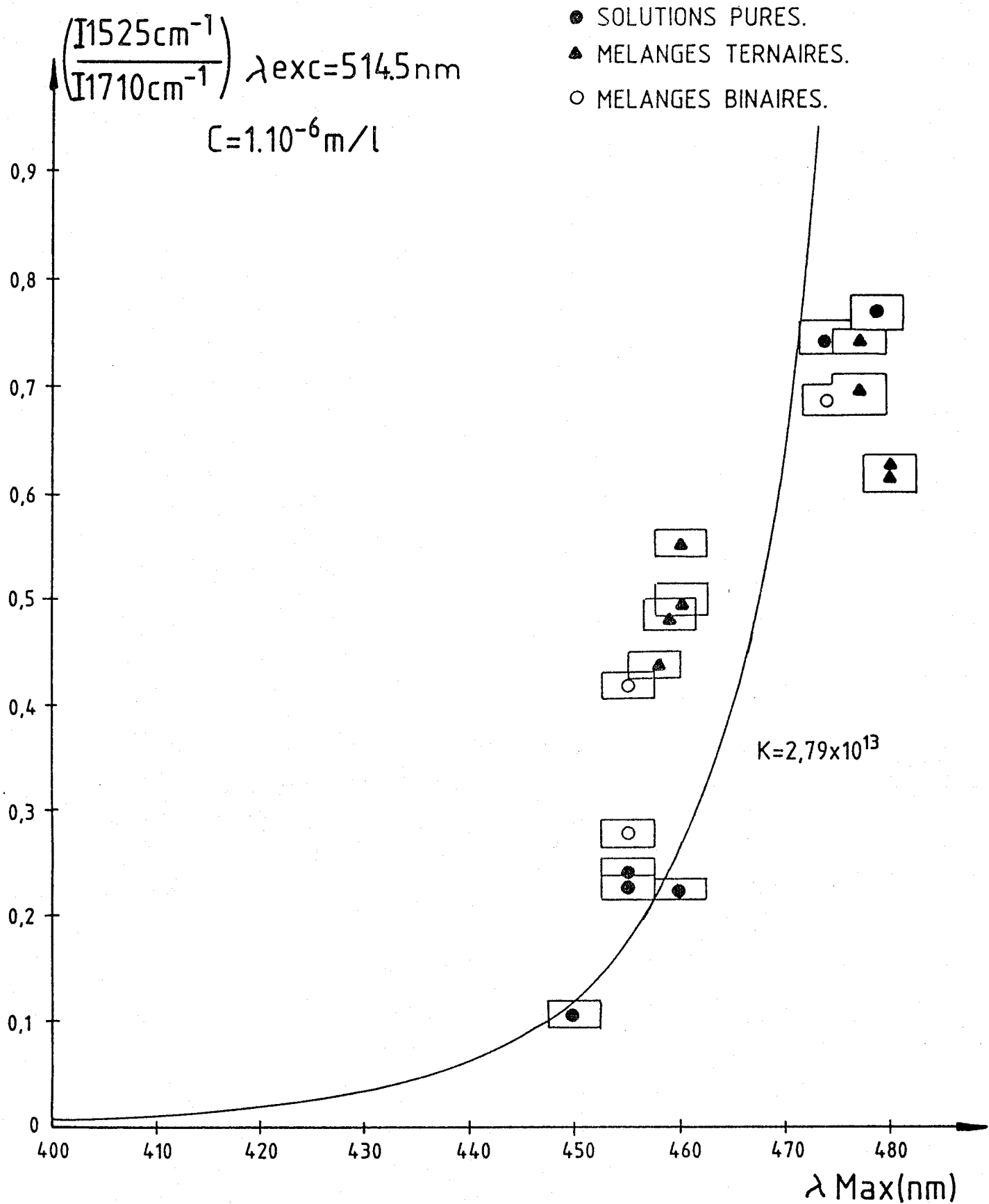
- $\nu_o$  : fréquence de la radiation excitatrice
- $\nu_e$  : fréquence du maximum d'absorption visible
- K : le coefficient de proportionnalité

On a cherché à vérifier cette relation sur un certain nombre de solutions :  $\beta$ -carotène - canthaxanthine, astaxanthine, zéaxanthine,  $\beta$  apo 8'caroténal, apocarotenetlyester. Les solutions sont faites dans l'acétone pour ces corps purs, ainsi que pour des mélanges binaires ( $\beta$ -carotène - canthaxanthine) et ternaires ( $\beta$ -carotène - canthaxanthine - astaxanthine).

La constante K est déterminée pour plusieurs corps purs. L'excitatrice est choisie à 514,5 nm assez loin du maximum d'absorption pour respecter les conditions de pré-résonance. ( $K = 2,792 \times 10^{13}$  pour les points dont les maximums d'absorption sont à 455 nm et 457,5 nm).

La courbe théorique correspondante est portée sur la Figure 19. Les points s'écartent d'autant plus de la courbe théorique que l'on s'approche de la résonance rigoureuse donc que le  $\lambda$  du maximum d'absorption est proche de la radiation excitatrice (514,5 nm). Cette courbe serait à tracer avec une excitatrice dans la zone correspondant au rouge ou au jaune pour s'affranchir du phénomène de résonance rigoureuse.

Les nombres d'onde Raman  $\Delta\bar{\nu} = 1710 \text{ cm}^{-1}$  et  $\Delta\bar{\nu} = 1525 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\bar{\nu} = \nu_{\text{exc}} - \nu_{\text{d}}$ ) ont permis le calcul de la longueur d'onde absolue  $\lambda_{\text{d}}$  des deux raies obtenues grâce à la raie excitatrice  $\nu_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ . Les longueurs d'onde absolues respectives (564 nm et 558 nm) ont été placées sur les spectres d'absorption visible



**FIG. 19: INTENSITE RAMAN POUR UNE CONCENTRATION DE  $10^{-6}$  M/L EN FONCTION DU MAXIMUM D'ABSORPTION VISIBLE**



des mélanges (Figure 20). Elles se trouvent à chaque fois en dehors du spectre. Les corrections d'absorption sont donc négligeables.

S'il est plausible d'admettre que les intensités Raman s'additionnent pour les mélanges, il est difficile de comprendre l'effet de "moyennage" sur la position du  $\lambda$  max. En effet, le  $\lambda$  max d'un mélange A, B n'a aucune raison de se trouver au milieu du  $\lambda$  max de A et du  $\lambda$  max de B. Pour cette raison, aucune explication ne sera avancée quant à ces mélanges qui semblent suivre la loi théorique.

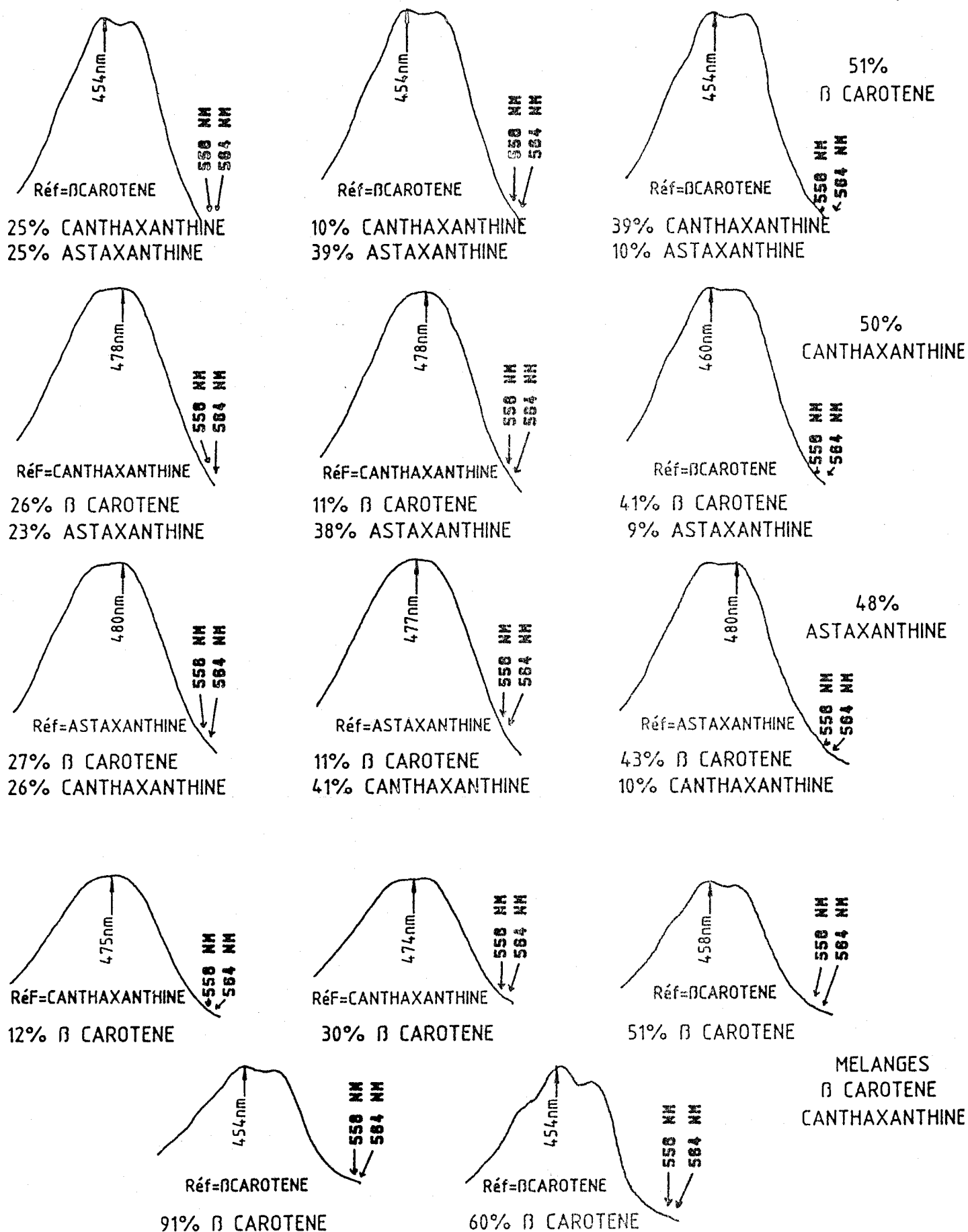
Le nombre de points expérimentaux demanderait à être augmenté mais on constate tout de même un bon accord avec la théorie.

On peut prévoir deux applications à cette relation :

- Pour un caroténoïde isolé d'un mélange, on commence par rechercher son maximum d'absorption visible puis l'intensité S.R.r. du mode  $\nu_1$  sous une excitation de 514,5 nm. L'utilisation de ces valeurs et la courbe (Figure 19) normée à une concentration unitaire donnent la concentration recherchée.
- On peut envisager de reconstituer le profil d'excitation d'un composé puisque le profil déterminé à une concentration inconnue peut être normalisé grâce à la valeur déterminée pour la radiation de 514,5 nm (on a vu que la connaissance de ce profil est nécessaire pour le calcul des concentrations relatives des constituants d'un mélange).

### 3. APPLICATION DE CES METHODES AU CAS DE LA MOULE "MYTILUS EDULIS"

Reprenant le matériel étudié au Chapitre 1, on a tenté d'appliquer ces méthodes de dosage quantitatif des caroténoïdes présents dans l'extrait acétonique total.



**FIG. 20: CHOIX DE LA REFERENCE POUR UN MELANGE PAR LA POSITION DU  $\lambda_{max}$ . ET LE PROFIL DE LA BANDE D'ABSORPTION**

On s'est limité aux composés majoritaires (notés 1, 2 et 3 sur la Figure 21. Les autres produits ont été réunis et remis en solution pour former une solution unique notée 4.

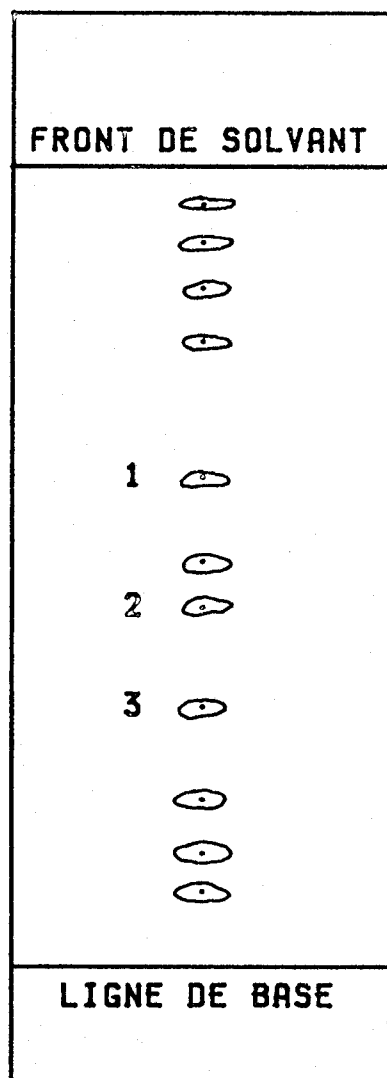
Comme on ne connaît pas les  $\alpha_i$  et  $\epsilon_i$  des produits, les méthodes approchées ont dû être utilisées.

*En absorption visible*, les dosages ont été faits par rapport au caroténoïde pur dont le spectre ressemble le plus à celui des composés extraits. On dispose des spectres d'absorption visible de la littérature (Isler, 1971). Les spectres d'absorption visible des solutions 1, 2, 3 et 4 (Figure 22) ont été comparés.

Les spectres des solutions 3 et 4 ont une intensité trop faible pour pouvoir être comparés.

	: Référence :	: C M/L :
Solution 1	: $\beta$ -carotène :	: $0,25 \times 10^{-5}$ :
Solution 2	: $\beta$ -carotène :	: $0,077 \times 10^{-5}$ :
Solution 3	: :	: :
Solution 4	: :	: :

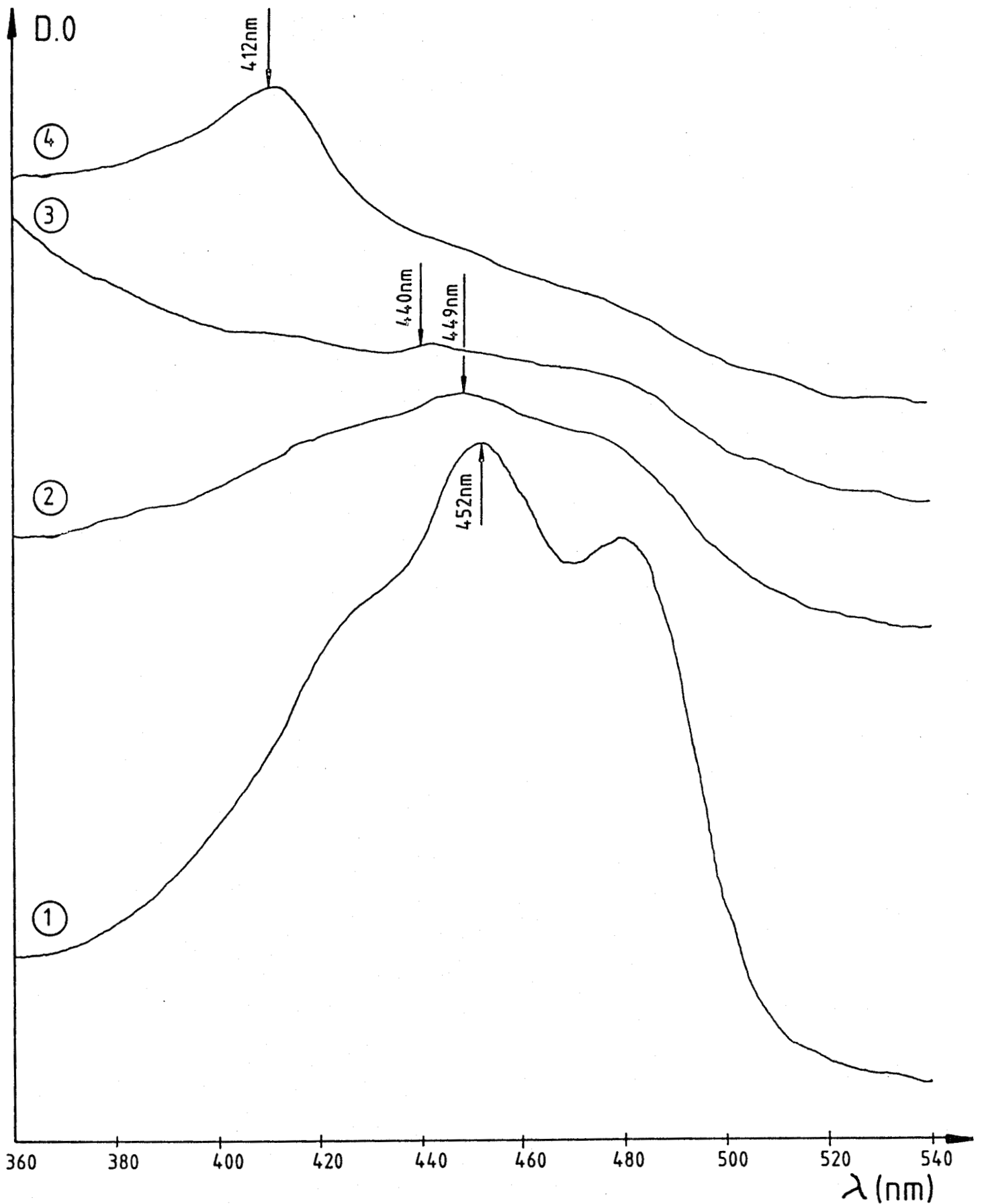
*En S.R.r.* la méthode équivalente n'a pas été tentée car le spectre Raman de résonance ne donne pas d'indication sur la référence à choisir. On a utilisé la relation liant la longueur d'onde du maximum d'absorption visible à l'intensité de la raie Raman du mode  $\nu_1$  quand on excite à 514,5 nm.



**FIG. 21:** CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'UN EXTRAIT  
ACETONIQUE BRUT DE MOULES

ELUANT: 12.5% ACETONE

87.5% ETHER DE PETROLE (40°-60°)



**FIG. 22:** SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE DE CAROTENOIDES D'EXTRAITS DE MOULES EN SOLUTION DANS L'ACETONE, PURIFIES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les maximums d'absorption ont été repérés, puis grâce à la figure 19, les concentrations ont été déduites :

	λ <sub>max</sub>	C M/L	Fraction molaire
Solution 1	452,0 nm	0,212	0,40
Solution 2	449,0 nm	0,088	0,17
Solution 3	440,0 nm	0,060	0,11
Solution 4		0,163	0,32

On voit que l'accord est bon pour les solutions 1 et 2 et que les déterminations ont été possibles pour les solutions 3 et 4. Par contre en absorption visible, les concentrations des solutions 3 et 4 sont inaccessibles.

#### 4. CONCLUSION

L'utilisation de la courbe reliant le maximum d'absorption visible à l'intensité Raman sous certaines conditions permet effectivement d'effectuer des dosages dans des conditions difficiles et de plus sans avoir recours à des spectres normés de corps purs.

## CHAPITRE 4

---

### ANALYSE QUALITATIVE DES CAROTÉNOÏDES

#### DANS UN MÉLANGE

Dans le chapitre précédent, le problème de l'analyse quantitative a été abordé. Il convient maintenant d'essayer d'accéder à certaines informations structurales pour définir qualitativement les différents composants d'un mélange.

Cette étude sera abordée de deux façons :

- Dans une première partie, on essaiera d'établir des corrélations à partir des spectres Raman de résonance de différentes chaînes polyèniques et polyisopréniques, tirés de la littérature.
- Dans la seconde partie, seront examinés en détail tous les paramètres expérimentaux à prendre en compte pour une analyse qualitative (et quantitative) des caroténoïdes. Le microspectromètre Raman M.O.L.E. (Annexe 2.C) sera utilisé comme détecteur après séparation sur plaque chromatographique.

## PREMIERE PARTIE

---

### DÉTERMINATION DE CORRÉLATIONS ÉTABLIES À PARTIR DE DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES ET DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX SUR LES SPECTRES S.R.R. DE CAROTÉNOÏDES

On a essayé d'exploiter les résultats de la littérature afin d'aboutir à des corrélations générales pour les caroténoïdes. Les données ont été regroupées de façon à avoir des renseignements :

- sur les caroténoïdes de longueurs de chaînes identiques ;
- sur les caroténoïdes de longueurs de chaînes différentes ;
- sur la mise en évidence du motif isoprénique.

#### 1. CAROTENOÏDES DE LONGUEURS DE CHAINES IDENTIQUES

Sur la Figure 23, ont été reportés les spectres S.R.r. des principaux caroténoïdes utilisés lors de cette étude. On voit que la comparaison directe des spectres apporte peu de renseignements, principalement pour le  $\beta$ -carotène, la zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine. On peut toutefois différencier l'astaxanthine des trois autres caroténoïdes cités grâce à la raie à  $1277 \text{ cm}^{-1}$  bien définie. L'état de substitution des cycles terminaux n'influe pratiquement



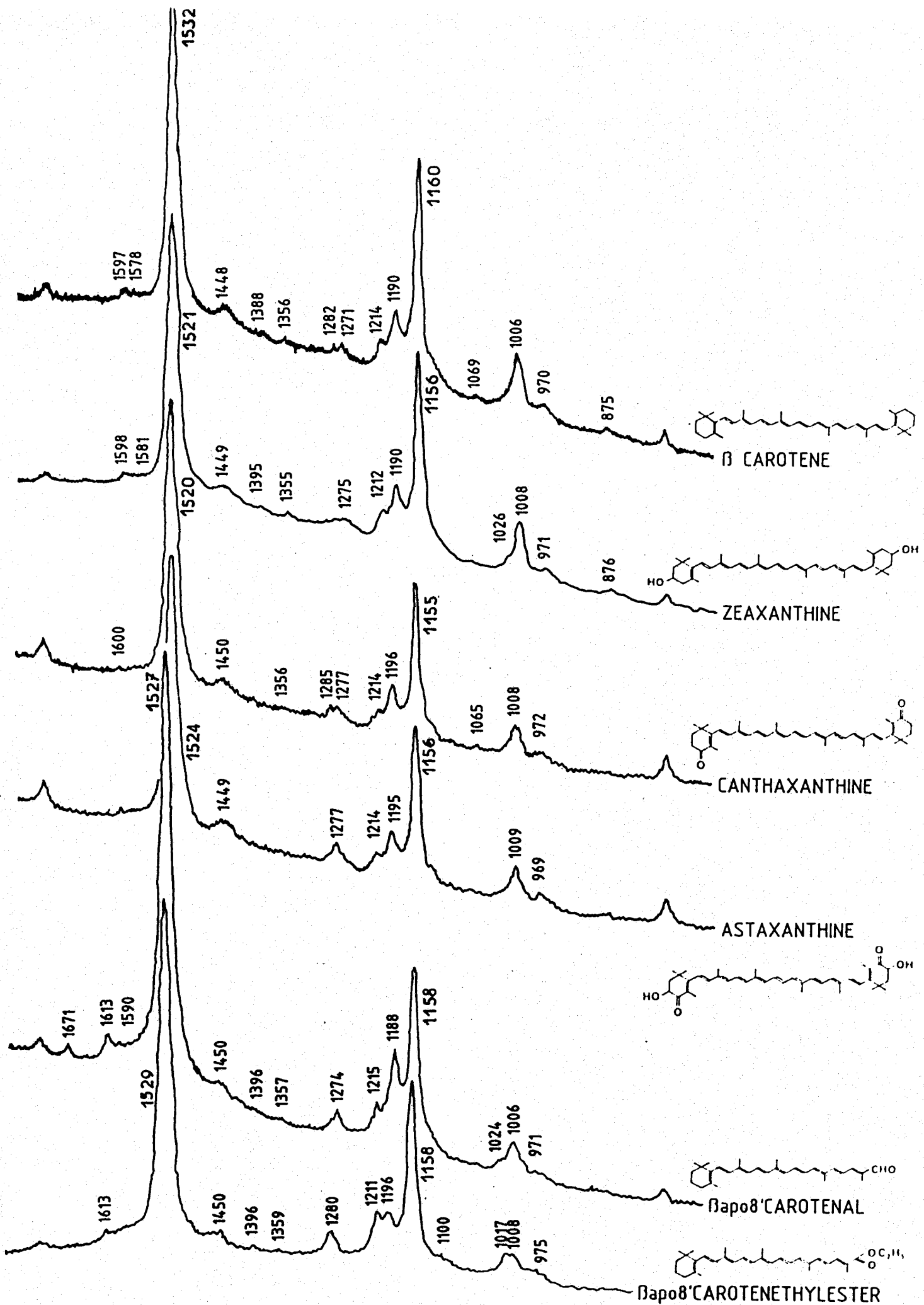


FIG. 23: SPECTRES RAMAN DE DIFFERENTS CAROTENIDES

pas ici sur les spectres Raman de résonance. Seules de légères variations de la fréquence du mode  $\nu_1$  et de l'intensité relative des modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  peuvent rendre compte de l'état de délocalisation de la chaîne polyénique. Pour le  $\beta$  apo 8'-caroténal et l'apo-caroténaléthylester qui possèdent des groupements terminaux différents et une chaîne polyénique plus courte, on remarque une augmentation de la fréquence du mode  $\nu_1$  et des variations d'intensité relative dans la région du mode  $\nu_2$ .

La S.R.r. s'avère donc une méthode relativement pauvre pour différencier les caroténoïdes de longueur de chaîne identique.

## 2. CAROTENOÏDES DE LONGUEURS DE CHAINES DIFFERENTES

Pour des caroténoïdes dont les longueurs de chaînes sont différentes ainsi que pour un même caroténoïde mis en solution dans divers solvants, une relation entre le mode  $\nu_1$  et le  $\lambda_{\max}$  de la bande d'absorption a pu être mis en évidence (Heyde et coll., 1971, Rimai et coll., 1973). En portant  $\nu_1$  en fonction de  $1/\lambda_{\max}$ , il est possible de voir qu'une augmentation de  $\lambda_{\max}$  conduit à une diminution de la fréquence d'élongation C=C. Cependant cette relation peut présenter certains inconvénients car elle fait appel à deux phénomènes physiques différents :

- . La valeur du nombre d'onde Raman est liée aux états vibrationnels de l'état électronique fondamental de la molécule.
- . La longueur d'onde du maximum d'absorption est caractéristique d'une transition électronique ; elle dépend donc des états électroniques fondamental et excité.

Comme certains auteurs (Salarès et coll., 1977) l'ont montré, à une perturbation électronique excitée peut correspondre un écart à la relation précédemment définie.

Afin de pouvoir relier le nombre d'onde  $\nu_1$  à l'état de délocalisation de la chaîne polyénique dans son état fondamental, on préfère employer une relation faisant intervenir le nombre de carbones présents dans la chaîne. Ce type de

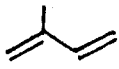
relation a déjà été déterminé empiriquement dans le cas de polyacétylène portant N doubles liaisons (SCHÜGERL et KUZMANY, 1981)

$$\nu (\text{C} = \text{C}) = 1459 + \frac{1440}{2(N+1)}$$

$2(N+1)$  étant le nombre de motifs CH dans une chaîne infinie  $\{\text{CH}=\text{CH}\}_x$

A partir des résultats de la littérature concernant les caroténoïdes et les molécules de type polyène (IVANOVA et coll., 1965, RIMAI et coll., 1973, DALLINGER et coll., 1981), on a voulu vérifier cette loi empirique (droite continue sur la figure 24).

On peut remarquer que la relation théorique utilisée peut s'appliquer à l'ensemble des motifs polyéniques de type R  $\{\text{CH}=\text{CH}\}_{N/2}$ -R' sauf pour les faibles valeurs de N. Dans ce cas, le nombre de carbone n'est plus l'élément déterminant pour évaluer la délocalisation le long de la chaîne. Les groupements terminaux peuvent alors jouer un rôle prédominant.

Pour les molécules possédant le motif isoprénique () comme les caroténoïdes, une telle relation peut être obtenue (trait pointillé sur la Figure 24) mais avec un coefficient directeur un peu différent.

Toutes les valeurs reportées sont généralement inférieures à celles attendues par l'application de la relation précédente. L'effet donneur des groupements méthyles branchés sur la chaîne ne peut expliquer cette diminution de la fréquence de vibration, car en enrichissant le nuage électronique, il devrait conduire à une augmentation de fréquence. Des couplages mécaniques avec d'autres modes de vibration  $\delta\text{C-H}$  ou  $\delta\text{C-CH}_3$  doivent influencer cette fréquence.

Différents facteurs comme l'influence des groupements terminaux, les effets de solvant et la complexation peuvent disperser les points expérimentaux autour de cette droite. Ainsi pour les caroténoïdes étudiés comportant 9 doubles liaisons conjuguées, la fréquence d'élongation C=C s'étend de 1520 à 1540  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 25). Il conviendra donc de connaître ces différents facteurs pour pouvoir déterminer la longueur de chaîne à partir de la fréquence  $\nu_1$ .

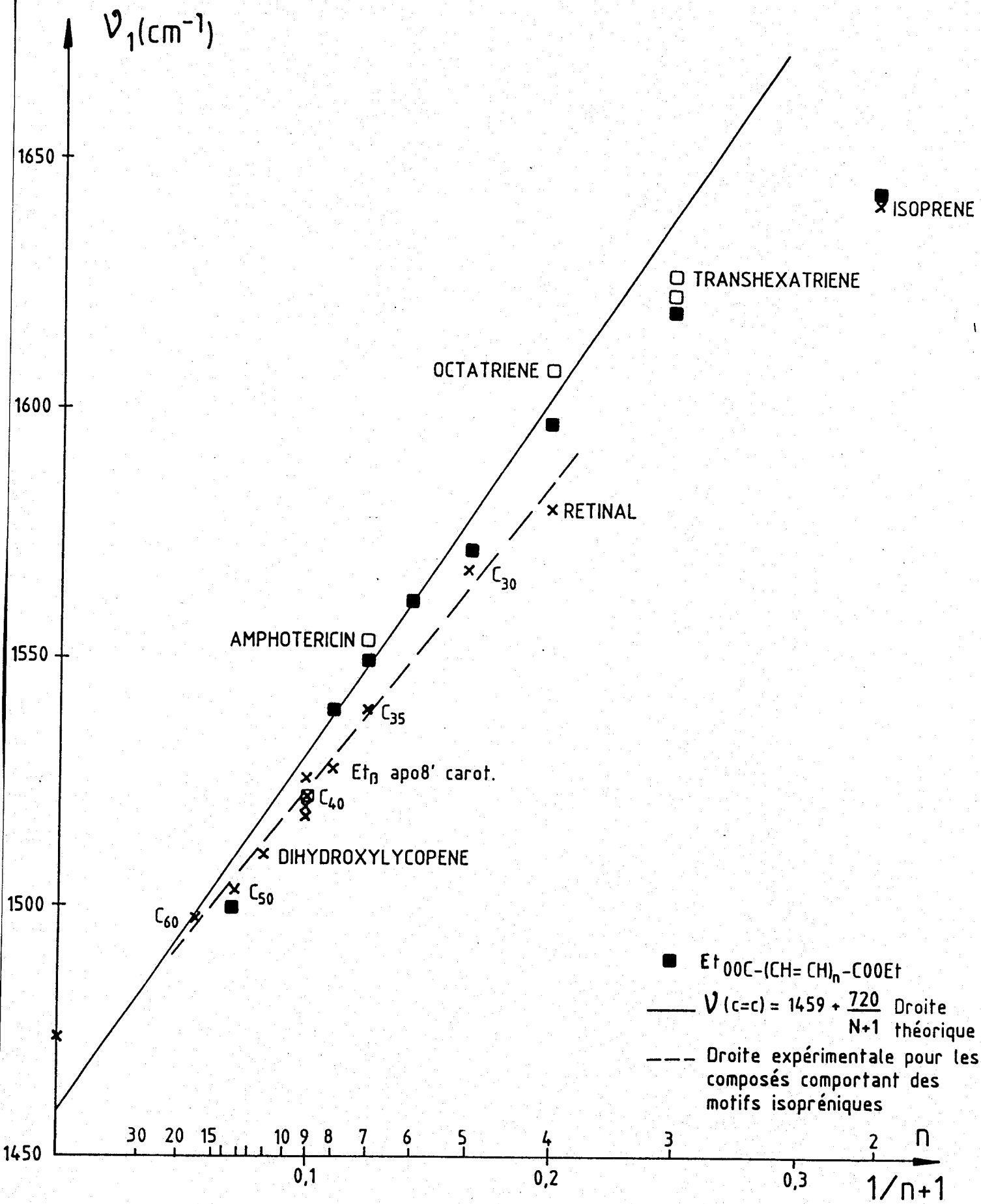
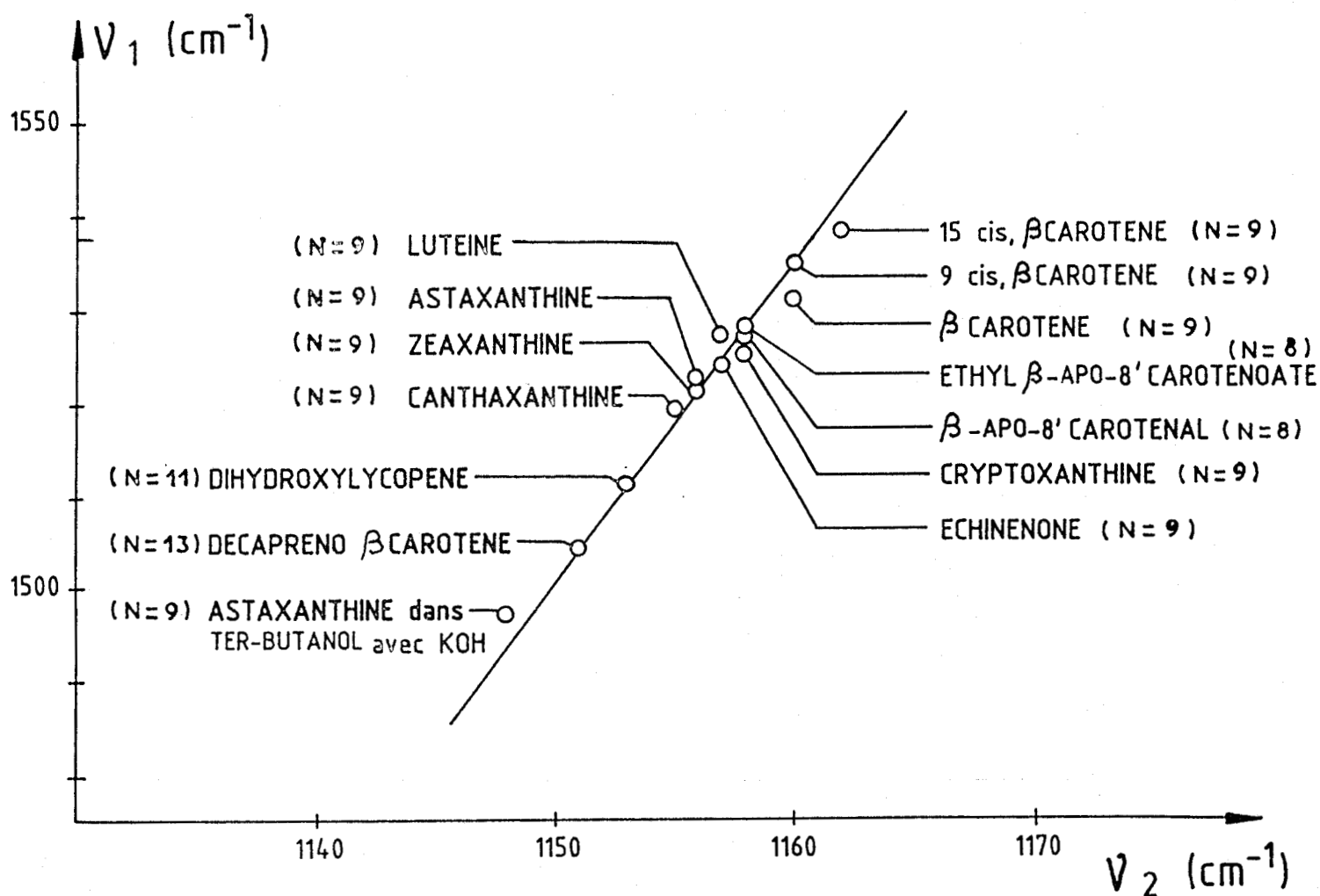


FIG. 24:  $\nu_1 = f(\text{NOMBRE DE DOUBLES LIAISONS})$



**FIG. 25:** FREQUENCE DE VIBRATION DU MODE  $\nu_1$  EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE VIBRATION DU MODE  $\nu_2$  POUR DIFFERENTS CAROTENOIDES (N: NOMBRE DE DOUBLES LIAISONS C=C DE LA CHAINE ISOPRENIQUE)

### 3. MISE EN EVIDENCE DU MOTIF ISOPRENIQUE

Les nombres d'onde des modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  des différents caroténoïdes étudiés ont été reportés sur la Figure 25.

Une diminution de l'ordre de la liaison C=C par effet de conjugaison donc par abaissement de la fréquence du mode  $\nu_1$  devrait entraîner une augmentation de l'ordre de la liaison C-C donc un glissement vers les hautes fréquences du mode  $\nu_2$ . On s'aperçoit sur la Figure 25 que la relation est inverse de celle attendue. Sans pouvoir établir de relation rigoureuse entre  $\nu_1$  et  $\nu_2$ , nous pouvons proposer plusieurs explications pour cette relation particulière entre  $\nu_1$  et  $\nu_2$  :

- La participation d'un mode d'élongation C=C au mode  $\nu_2$ . Cette participation évaluée à 9 % par S. SAITO et M. TASUMI (1983) est sans doute trop faible pour imposer un tel comportement.
- Le mode d'élongation C-C participe très peu au mode observé vers  $1160 \text{ cm}^{-1}$ . Il aurait sa contribution principale vers  $1003 \text{ cm}^{-1}$  (DALLINGER et coll., 1979). Cependant la forte intensité du mode  $\nu_2$  ainsi que les calculs à priori des fréquences (SAITO et TASUMI, 1983) sont en accord avec une élongation majoritaire des C-C.
- Le fort couplage entre le mode d'élongation C-C et la déformation C-C-H peut modifier fortement les fréquences de vibration de ces modes.

L'étude de différents isomères du  $\beta$ -carotène (KOYAMA, 1983, LUTZ, 1978) montre que les raies observées dans cette région sont fortement perturbées en fréquence et en intensité. Cela suggère que la répartition d'énergie potentielle se fait de manière différente pour chacun des isomères.

Il serait donc possible et c'est cette hypothèse qui semble la plus plausible, qu'une modification de la délocalisation électronique le long de la chaîne modifie la répartition d'énergie potentielle à l'intérieur du mode  $\nu_2$ , rendant ainsi impossible toute relation simple basée sur l'ordre des liaisons. Cette modification pourrait ainsi être le résultat d'une perturbation structurale comme d'un changement de planéarité de la chaîne polyénique.

Les motifs polyéniques dépourvus de groupements méthyls latéraux présentent également deux modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  très intenses dont les fréquences varient avec la longueur de chaîne.

	$\nu_1$ (cm <sup>-1</sup> ) : $\nu_2$ (cm <sup>-1</sup> )		
polyacétylène (chaîne infinie)	1474	1080	FUYUKIKO INAGAKI (1975)
transhexatriène	1627	1190	MYERS et coll. (1982)

En général, à longueur de chaîne identique, le mode  $\nu_2$  est observé à fréquence beaucoup plus faible (environ 30 cm<sup>-1</sup>) pour les polyènes que pour les caroténoïdes, ce qui permet de les différencier. Dans les spectres de polyènes apparaît toujours deux raies à fréquences peu variables avec la longueur de chaîne, à 1010 cm<sup>-1</sup> et 1300 cm<sup>-1</sup>.

#### 4. CONCLUSION

La S.R.r. s'avère être une méthode relativement pauvre pour la caractérisation de caroténoïdes de longueur de chaîne identique ou différente. Différents facteurs comme l'influence des groupements terminaux, les effets de solvant et la complexation influent beaucoup sur la valeur du mode  $\nu_1$ .

Il est possible de différencier les polyènes des polyisoprènes par la position du mode  $\nu_2$ . Celle-ci est pour les polyènes d'environ  $30 \text{ cm}^{-1}$  inférieure à celle attendue pour les polyisoprènes.

#### 5. APPLICATION A LA MOULE "MYTILUS EDULIS"

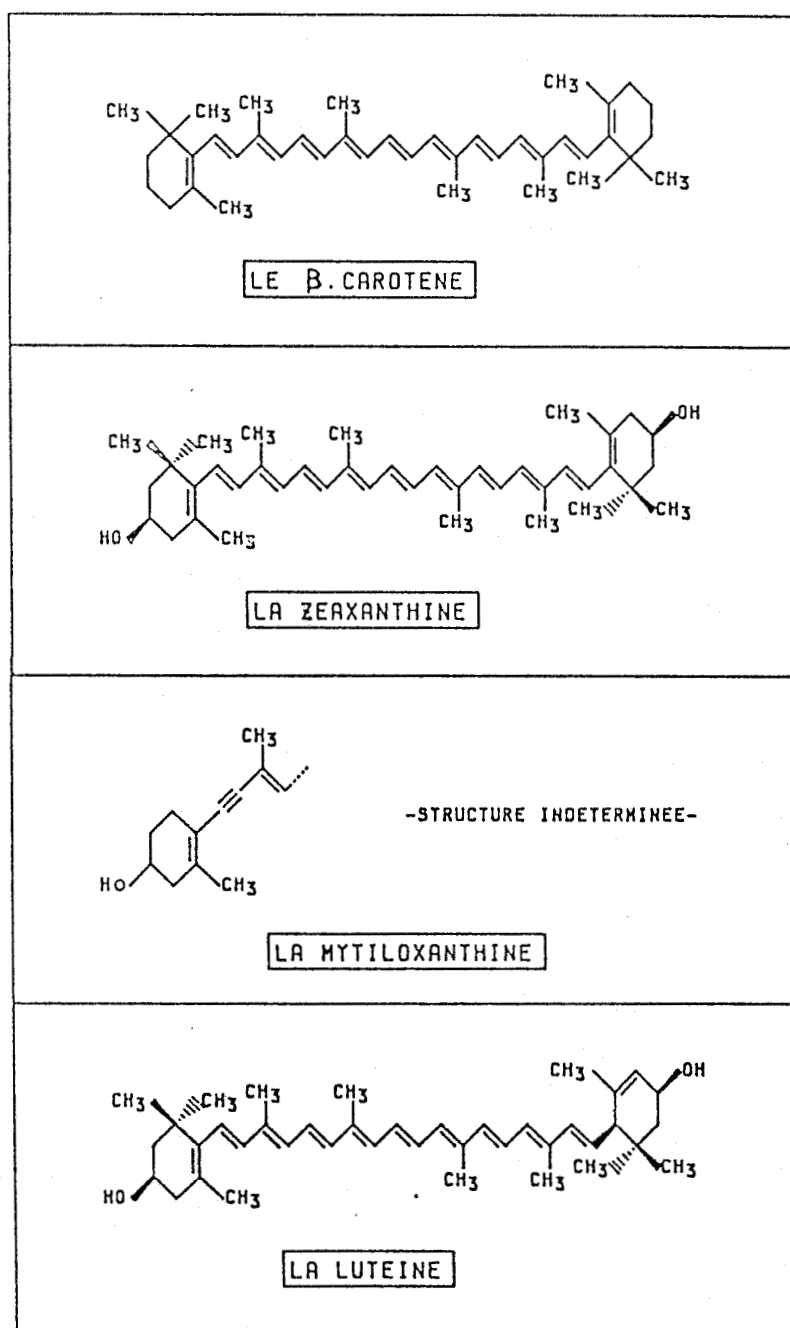
D'après les valeurs des modes  $\nu_1$  et  $\nu_2$  des pigments mis en évidence dans le pied et le manteau de la moule, on peut conclure que :

- Le manteau de la moule est coloré par un caroténoïde comportant 9 doubles liaisons en considérant
  - . que le pigment n'est pas complexé ;
  - . qu'il ne possède pas de groupements terminaux qui le polarisent fortement ;
  - . qu'il est soluble dans l'acétone et que son spectre est comparable à celui du  $\beta$ -carotène dans les mêmes conditions.
  
- La masse jaunâtre est colorée par un pigment de la même famille que celui décrit ci-dessus en admettant les mêmes hypothèses.
  
- Les deux pigments mis en évidence dans la zone fortement pigmentée dans la coupe transverse du pied (Figure 7 et 8) sont d'après la position du mode  $\nu_2$  des polyènes et non pas des polyisoprènes. Leur longueur de chaîne respective serait de  $16 \pm 2$  doubles liaisons ( $\nu_1 = 1504 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2 = 1120 \text{ cm}^{-1}$ ) et de  $47 \pm 6$  doubles liaisons ( $\nu_1 = 1474 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2 = 1084 \text{ cm}^{-1}$ ) (Figure 24), si aucune perturbation ne vient modifier ces fréquences.



C'est la première fois que ce type de composé a été mis en évidence dans des espèces vivantes (sauf chez les bactéries).

Les différents types de pigments peuvent être comparés à ceux mis en évidence par différents auteurs (CAMPBELL, 1970, CZEZUGA, 1976, TARRAKA, 1979, WEEDON, 1965). Les caroténoïdes majoritaires sont :



## SECONDE PARTIE

### ANALYSE QUALITATIVE D'UN MÉLANGE DE CAROTÉNOÏDES PAR COUPLAGE DE LA C.C.M. AVEC LA MICROSONDE RAMAN M.O.L.E.

On se propose dans ce chapitre de mettre au point une méthode de couplage entre la chromatographie sur couche mince et la microsonde Raman M.O.L.E. (Annexe 2).

Pour cela, l'étude sera réalisée sur un mélange de quatre caroténoïdes de longueur de chaîne identique : le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine, l'astaxanthine et la zéaxanthine.

On se propose de :

- Déterminer les meilleures conditions opératoires pour la chromatographie sur couche mince sur courte distance.
- Mettre en évidence les phénomènes de dégradation des caroténoïdes sous l'effet de la lumière pour l'étude sous faisceau laser.

L'analyse sera conduite à nombre d'onde fixe caractéristique des caroténoïdes de longueur de chaîne identique. On mesurera l'intensité de la raie Raman à  $1525 \text{ cm}^{-1}$  en fonction de l'élution. La radiation excitatrice utilisée est la  $514,5 \text{ nm}$ .

La plaque de C.C.M. sera fixée sur une platine à déplacement micrométrique (Annexe 2.E) adaptable sous l'objectif du microscope.

Le déplacement de l'échantillon par rapport au point de focalisation du laser est synchronisé au système de comptage de photons. La platine avance d'un pas de 1, 5, 10, 50, 100 ou  $250 \mu\text{m}$  pour un temps de comptage de  $t_s$ .

Le déplacement maximal de l'échantillon est de 5 cm.

En tenant compte des contraintes suivantes :

- course maximale de l'échantillon de 5 cm ;
- durée de l'enregistrement du chromatogramme ;
- largeur des taches de chromatographie de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  de largeur ;
- temps de comptage  $t$  de 1 s. pour avoir un signal exploitable.

Nous avons choisi d'enregistrer des chromatogrammes de 2 cm de longueur, en déplaçant la platine de  $10 \mu\text{m}$  toutes les secondes. La durée de l'analyse est ainsi de 35 mn.

## 1. CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

### 1. Choix de la plaque

Pour le but fixé (la plus petite chromatographie avec la meilleure résolution possible), le choix du gel est important.

Les plus performantes existent sous forme d'une couche de 200  $\mu\text{m}$ , pour des grains de 5 à 10  $\mu\text{m}$  sur plaques de verre ou d'aluminium. Les premières ne peuvent pas être découpées et ne sont donc pas adaptées à notre problème.

Pour avoir la meilleure résolution, il faut éviter l'étalement des taches au maximum. Le dépôt initial est très important, car sous l'effet de forces dites de propagation (montée du solvant, solubilité du produit) ou de retardement (forces du type "Van der Waals", échange d'ions, ponts hydrogène, force d'adsorption ou force de partage du produit entre le solvant et le support), les taches s'étaient au fur et à mesure de la montée du solvant. De nouvelles plaques dites à zone de concentration (MERCK 60 F 254) ont été réalisées. Une zone de dépôt ménagée à la partie inférieure de la plaque est recouverte d'une couche de phase solide de même nature chimique mais de plus grande porosité que la partie supérieure de la plaque. Les substances sous la montée de l'éluant, se rassemblent rapidement à la limite des deux zones pour migrer ensuite à partir d'une véritable ligne de départ très fine. Ces plaques ne sont commercialisées que sur plaque de verre et ne peuvent donc pas être découpées facilement pour être ensuite fixées sur la platine à déplacement micrométrique.

Notre choix s'est donc porté sur des plaques de gel de silice à haute performance déposé sur feuille d'aluminium (MERCK 60) sans indicateur fluorescent.

## 2. Choix de l'éluant

D'après EGON STAHL, 1965, le mélange éther de pétrole - acétone convient parfaitement pour la séparation d'un mélange de caroténoïdes. L'éther de pétrole (40-60°) et l'acétone R.P. Prolabo ont été utilisés. Les chromatographies sont réalisées dans une boîte de Shandow ( $\emptyset$  : 13 cm) et de hauteur (25 cm). En conservant tous les paramètres d'éluion (position de la ligne de base, longueur d'éluion), le meilleur éluant est sélectionné pour la meilleure séparation des Rf des constituants ( $R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$  (Figure 26).

L'éluant choisi contient 12,5 % d'acétone et 87,5 % d'éther de pétrole.

### 3. Choix des conditions opératoires pour l'obtention de la chromatographie la mieux résolue sur courte distance

L'étude de la vitesse de montée du solvant en fonction de la distance parcourue par l'éluant (Figure 28), et de l'évolution des Rf en fonction de la distance parcourue par l'éluant, la ligne de base étant à 2 cm (Figure 27) montre que :

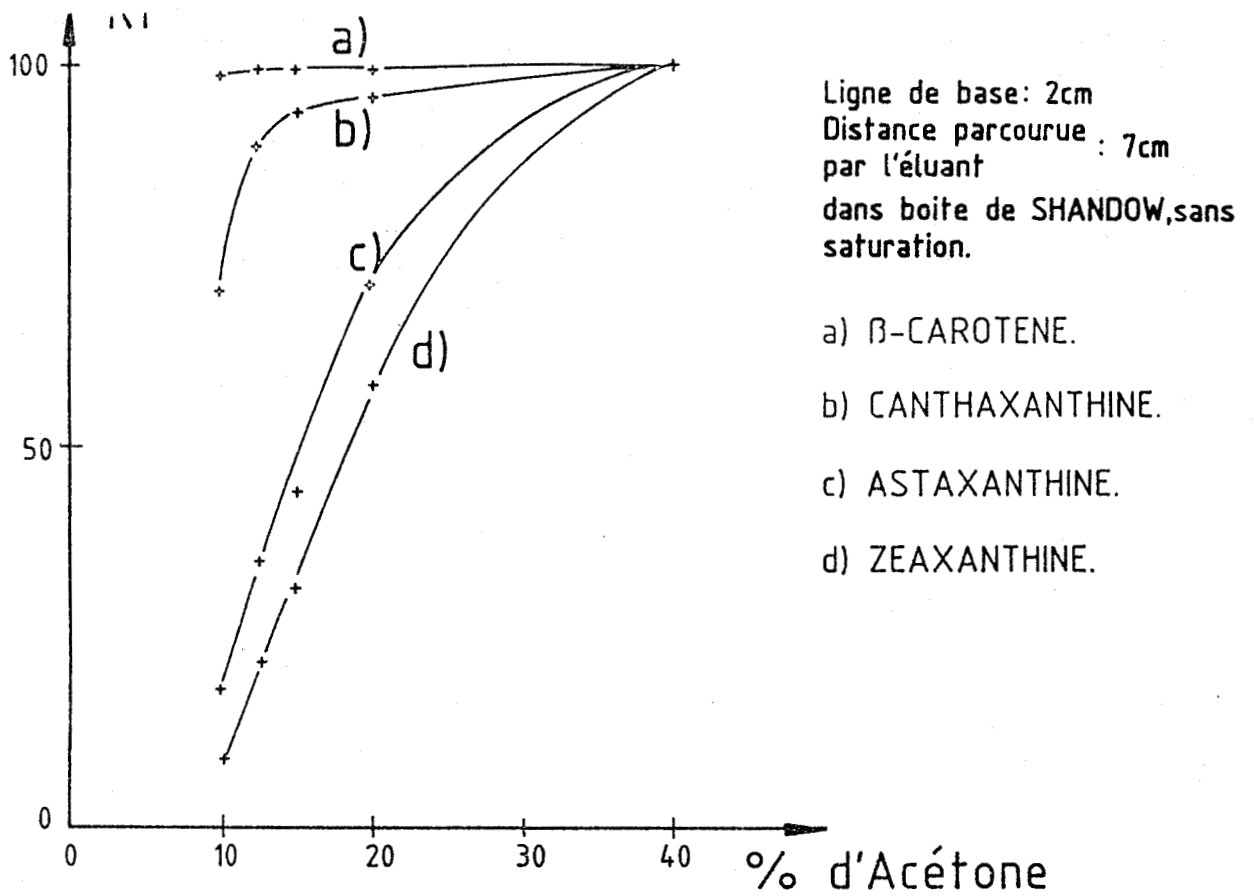
- La vitesse de montée du solvant n'est pas uniforme, et qu'elle varie en fonction de la géométrie du récipient utilisé. Cette vitesse d'éluion a un rôle primordial sur la qualité de la séparation ; il faut à chaque instant réaliser l'équilibre entre la phase mobile (solvant) et la phase stationnaire (silice).
- Les Rf se stabilisent lorsque la vitesse de montée du solvant est faible. L'équilibre des phases est réalisée. La séparation est la meilleure.

A la vue de ces résultats, on peut espérer réaliser une bonne chromatographie, en situant la ligne de base très haut (à 6 cm du bord). L'équilibre des phases est obtenu lorsque le solvant atteint le spot du mélange. Ceci s'est confirmé par l'étude de l'évolution des Rf en fonction de la position de la ligne de base (Figure 29).

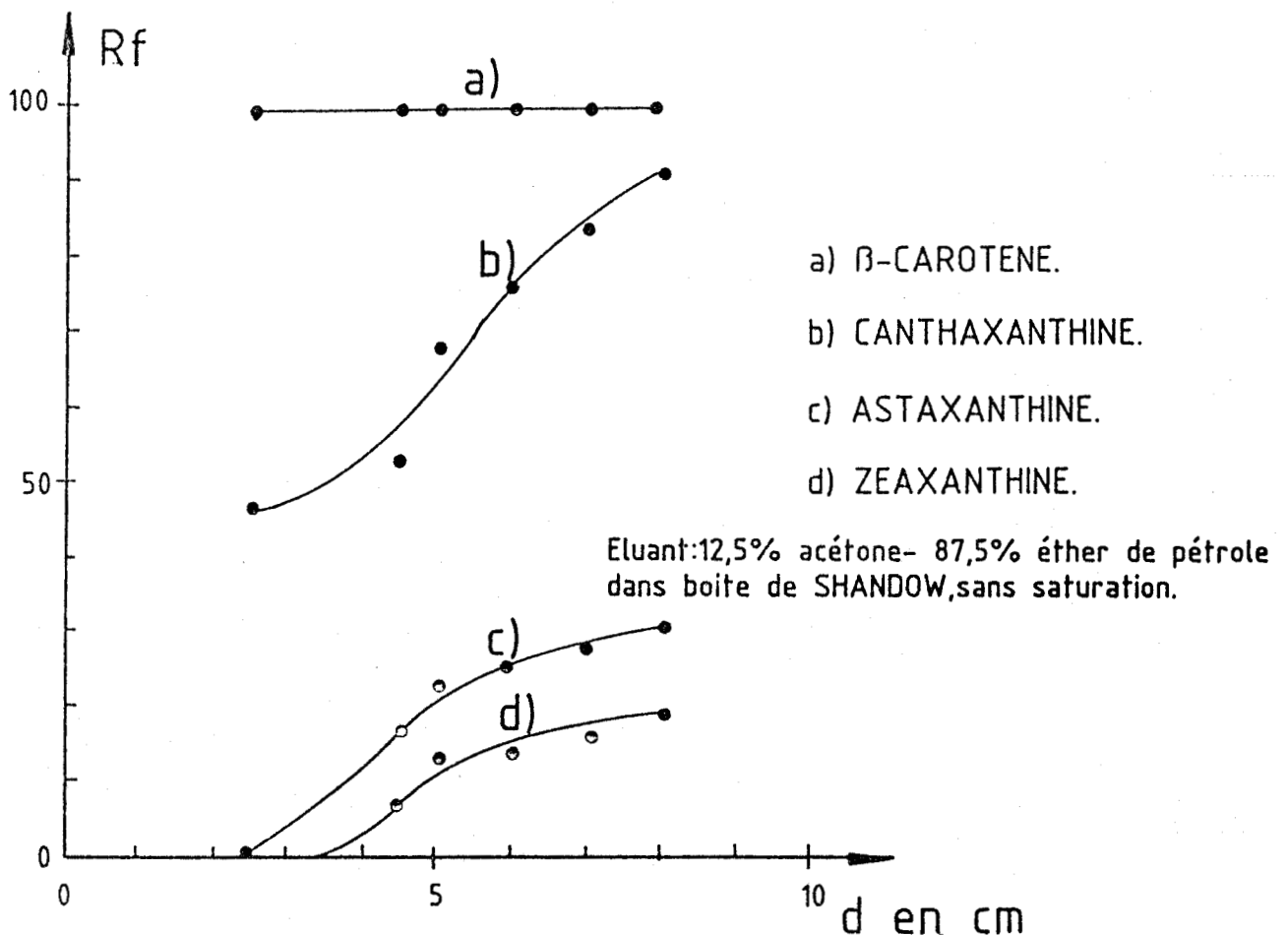
## 2. ETUDE DU COMPORTEMENT DES CAROTENOIDES DEPOSES SUR PLAQUE SOUS IRRADIATION LASER

L'étude de la raie caractéristique d'un caroténoïde vers  $1528 \text{ cm}^{-1}$ , déposé sur plaque de gel de silice, démontre qu'il y a diminution rapide de l'intensité de la raie en fonction du temps (Figure 30). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette variation :

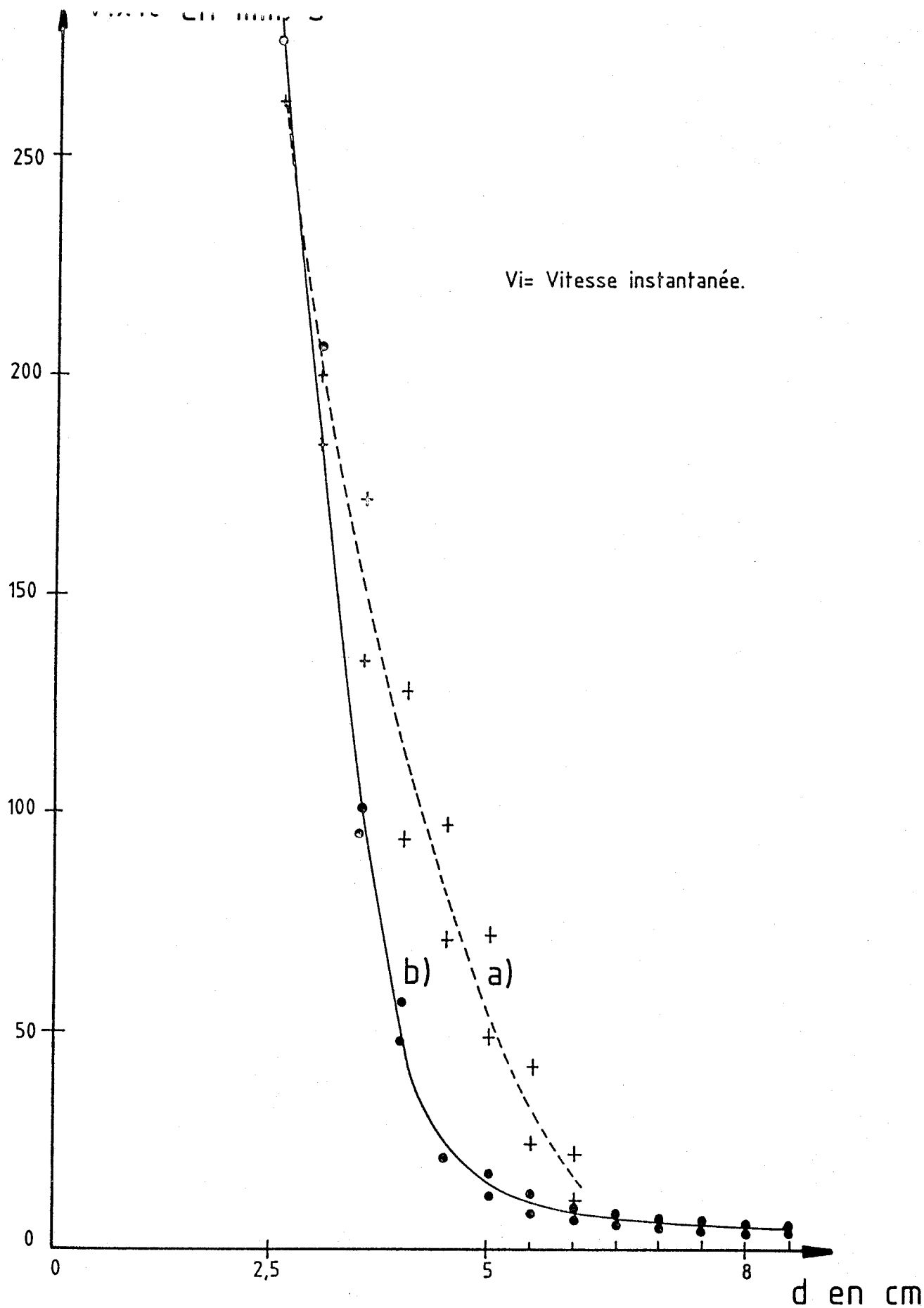
- Une migration des molécules sous l'impact du faisceau LASER ; migration favorisée par des traces de solvant résiduel.



**FIG. 26: EVOLUTION DU  $R_f$  EN FONCTION DE LA COMPOSITION DE L'ELUANT**



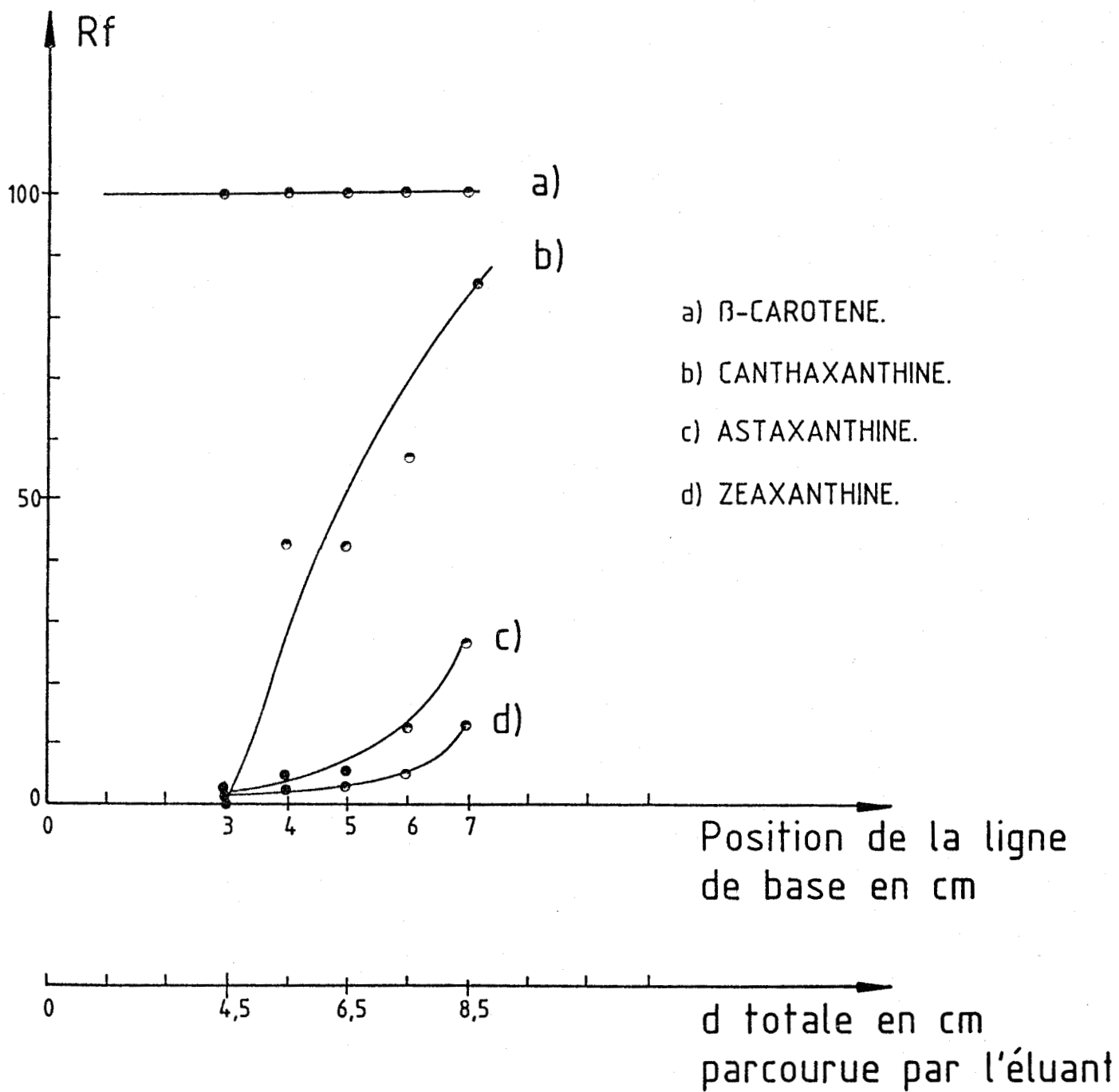
**FIG. 27: EVOLUTION DU  $R_f$  EN FONCTION DE LA DISTANCE PARCOURUE PAR L'ELUANT LIGNE DE BASE A 2 CM**



**FIG. 28:** EVOLUTION DE  $V_i$  EN FONCTION DE LA DISTANCE PARCOURUE PAR L'ELUANT COMPOSE DE 12.5 % D'ACETONE-87.5 % D'ETHER DE PETROLE

A) DANS UN BECHER

B) DANS UNE BOITE DE SHANDOW

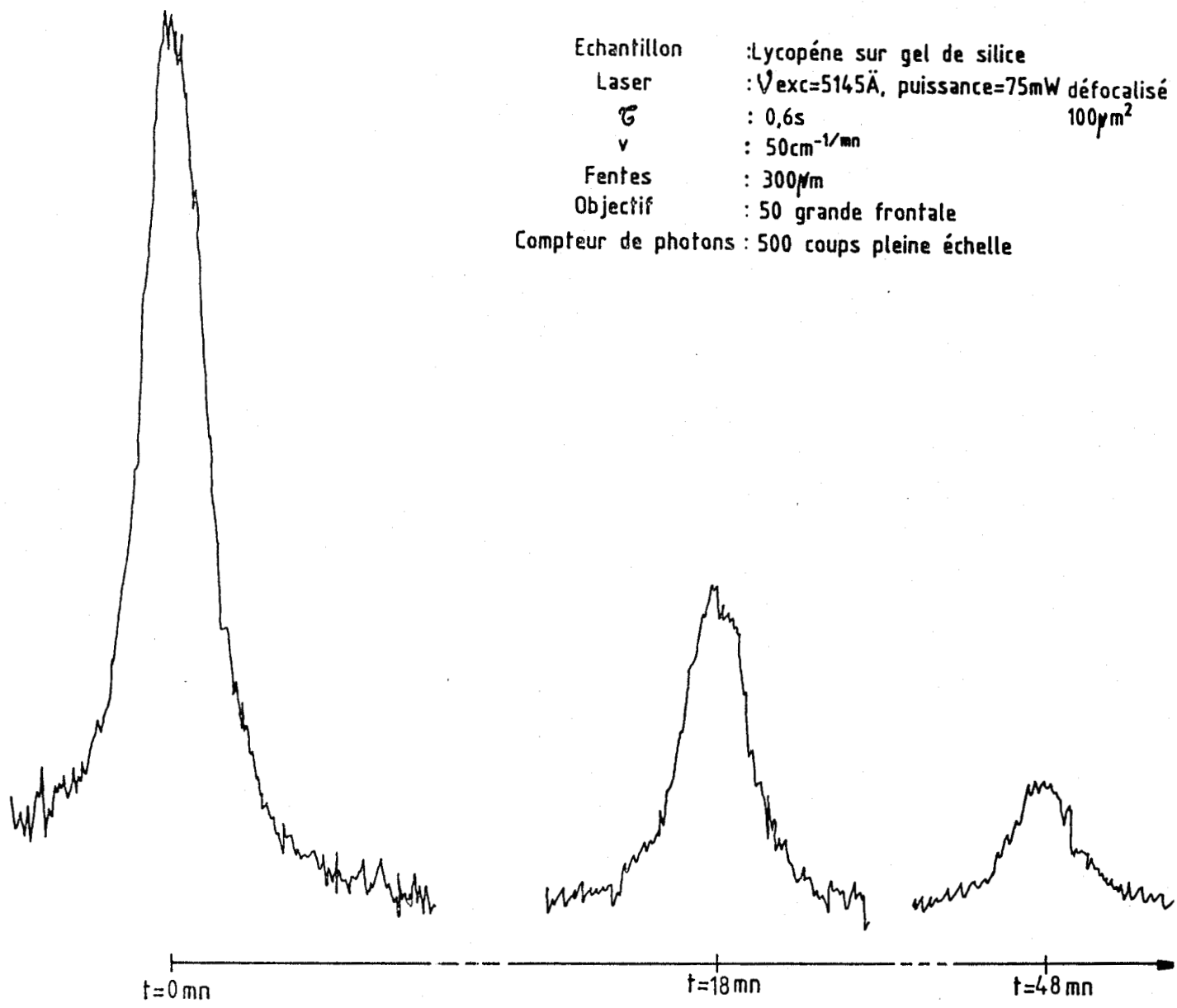


Eluant: 12,5% acétone- 87,5% éther de pétrole  
dans boîte de SHANDOW, sans saturation.

**FIG. 29: EVOLUTION DU  $R_f$  EN FONCTION DE LA POSITION DE LA LIGNE DE BASE**



Echantillon : Lycopéne sur gel de silice  
 Laser :  $\lambda_{exc}=5145\text{\AA}$ , puissance=75mW défocalisé  
 $\sigma$  : 0,6s 100 $\mu\text{m}^2$   
 $\nu$  : 50cm<sup>-1</sup>/mn  
 Fentes : 300 $\mu\text{m}$   
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 500 coups pleine échelle



**FIG. 3B:** EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DE LA RAIE A  $1525 \text{ CM}^{-1}$   
 D'UN CAROTENOIDE -IRRADIANCE =  $75 \cdot 10^{-6} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -

- Des effets thermiques ou photochimiques provoqués par la force irradiance du LASER.
- Evolution mécanique du support.

Afin de mieux cerner ces phénomènes, nous avons étudié à l'aide de la Microsonde Raman M.O.L.E. :

- La plaque seule ;
- le comportement d'un composé non photosensible : le naphthalène ;
- le comportement d'un caroténoïde sous différentes conditions.

### 1. Etude de la plaque seule

Pour avoir des supports dans le même état initial au moment des analyses, les plaques sont séchées dans une étuve à 120°C pendant une heure puis tirées sous vide afin de désorber les gaz éventuellement physisorbés. Elles sont ensuite entreposées dans un endroit sec, à température ambiante jusqu'au moment de leur utilisation.

Le gel de silice ne présente pas de spectre Raman détectable sous les conditions dans lesquelles on travaille ; aucun signal parasite ne modifie fortement la ligne de base. L'analyse du fond continu fortement amplifié montre sa stabilité sous l'impact du faisceau laser. On note toutefois la présence de petits grains fluorescents sur les plaques commerciales.

### 3. Etude du comportement d'un produit non photosensible : le naphthalène

Une solution benzénique de naphthalène est déposée sur une plaque de gel de silice.

D'après la Figure 31, l'intensité de la raie à  $1380\text{ cm}^{-1}$  du naphthalène décroît en fonction du temps lorsque la plaque est simplement séchée à l'air avant l'analyse.

L'intensité reste constante, lorsque la plaque est placée sous vide afin d'éliminer toute trace résiduelle du solvant (Figure 32). Ceci montre sans ambiguïté le rôle du solvant. Il est la cause d'une micromigration au niveau du point d'analyse, ou une déformation locale de la plaque par évaporation qui conduirait à une modification de la géométrie d'illumination.

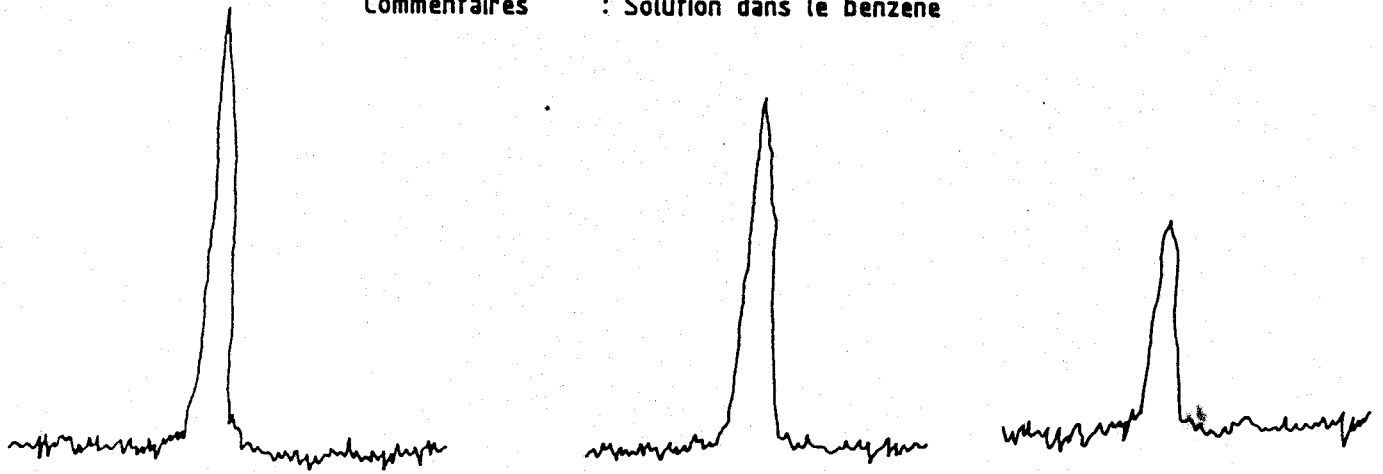
Il faut donc veiller à éliminer toute trace de solvant avant l'étude spectroscopique.

### 3. Etude de l'influence de l'irradiation LASER

Les caroténoïdes sont des molécules très sensibles aux phénomènes thermiques et photochimiques, ce qui explique l'évolution temporelle de l'intensité, même si toute trace résiduelle de solvant a été éliminée avant observation. La dégradation des caroténoïdes par effet photonique est mise en évidence par la courbe (Figure 33). L'intensité de la raie vers  $1525\text{ cm}^{-1}$  d'une solution de lycopène déposée sur plaque diminue d'autant plus rapidement que la puissance du faisceau est importante et que le laser est parfaitement localisé (irradiance plus importante).

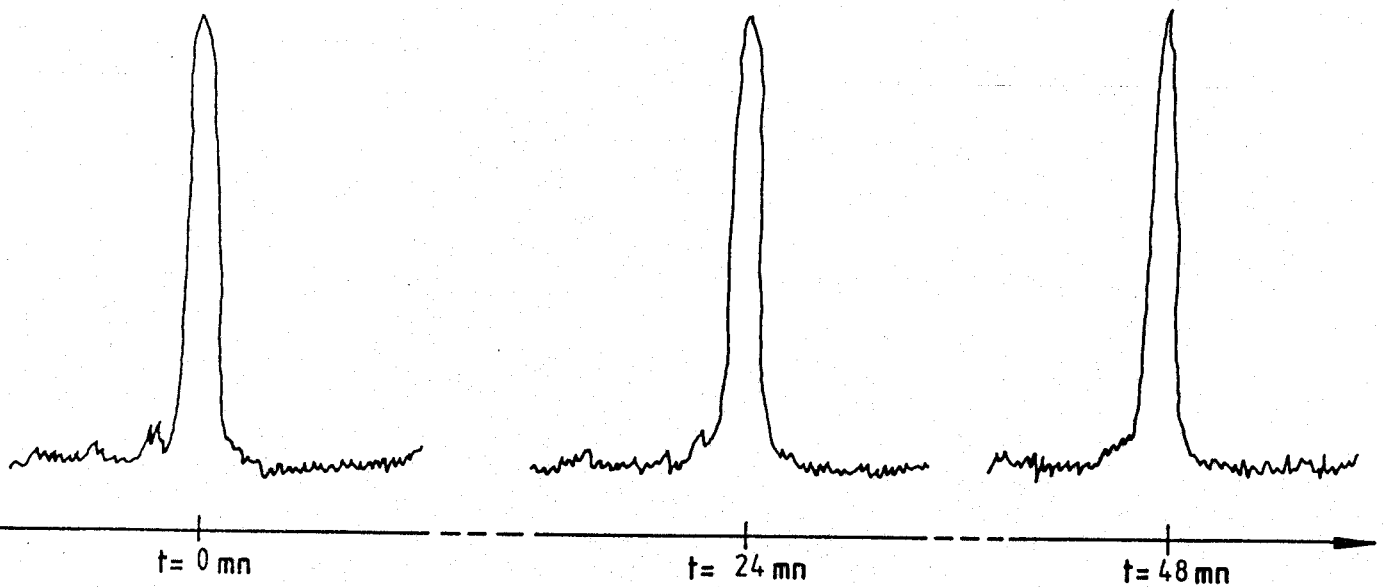
Pour diminuer le phénomène de décomposition thermique, une goutte d'eau a été déposée sur la tache à analyser. L'eau étant un bon vecteur d'élimination des calories, l'échauffement local doit être beaucoup plus faible ; de plus, les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau, ce qui empêche toute migration. Pour s'affranchir des phénomènes liés à l'évaporation de l'eau en cours d'analyse (réarrangement des grains), on interpose une lamelle de microscope entre la plaque et le faisceau laser. L'intensité de la raie diminue de façon moins rapide que lorsque la plaque était parfaitement sèche (Figure 34), mais l'évolu-

Echantillon : Naphtalène déposé sur plaque de gel de silice  
 Laser :  $\lambda_{exc} = 5145 \text{ \AA}$ , puissance = 100 mW  
 : 1 s  
 v :  $50 \text{ cm}^{-1} / \text{mn}$   
 Fentes :  $500 \mu\text{m}$   
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 5000 coups pleine échelle  
 Commentaires : Solution dans le benzène



A) PLAQUE SECHEE A L'AIR APRES DEPOT DE LA SOLUTION

-IRRADIANCE =  $10^{-3} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -



B) PLAQUE TIREE SOUS VIDE APRES DEPOT DE LA SOLUTION

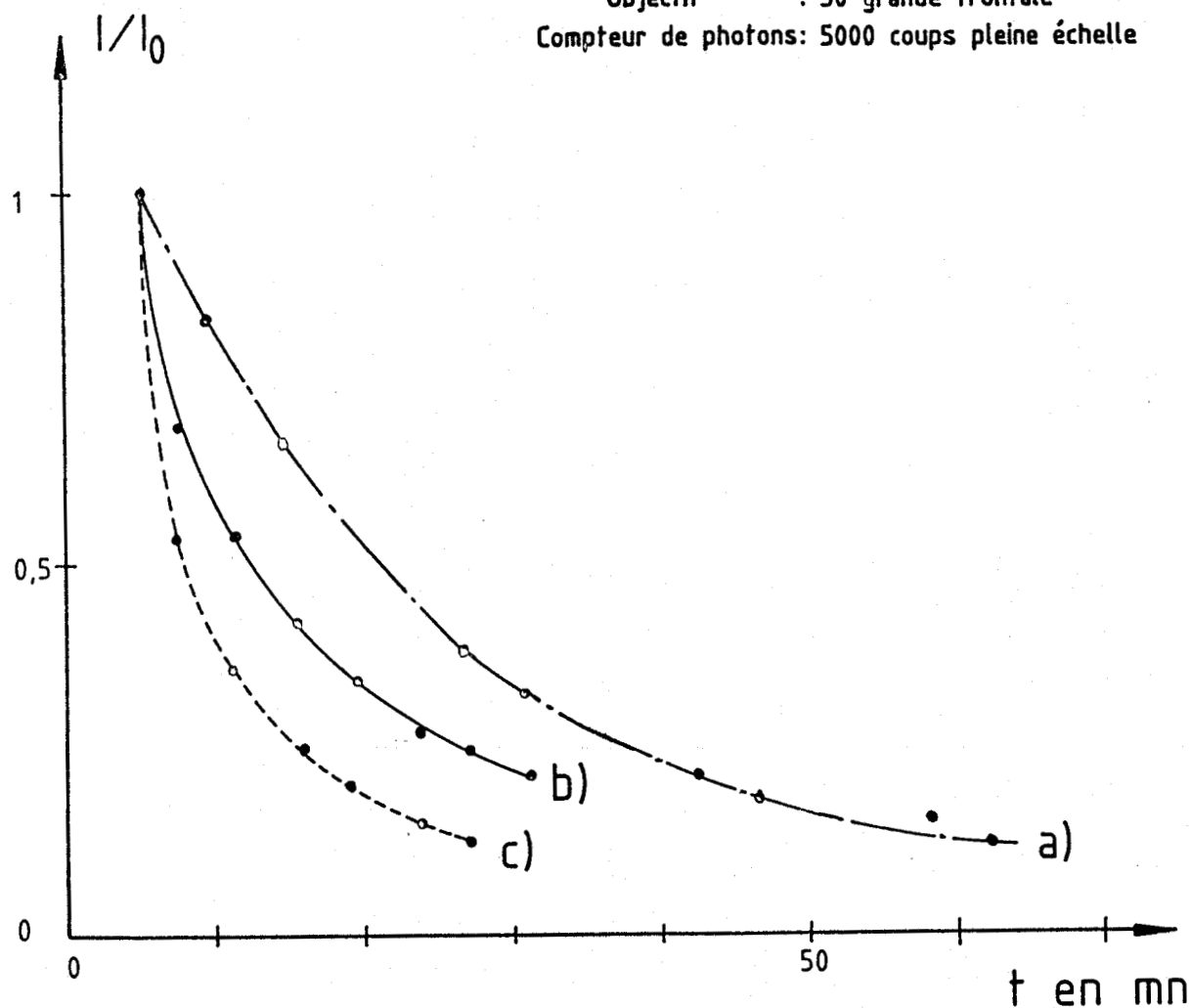
-IRRADIANCE =  $10^{-3} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -

EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DE L'INTENSITE DE LA  
 RAIE A  $1380 \text{ CM}^{-1}$  DU NAPHTALENE

A) FIG. 31: SOLVANT NON EVAPORE

B) FIG. 32: SOLVANT EVAPORE

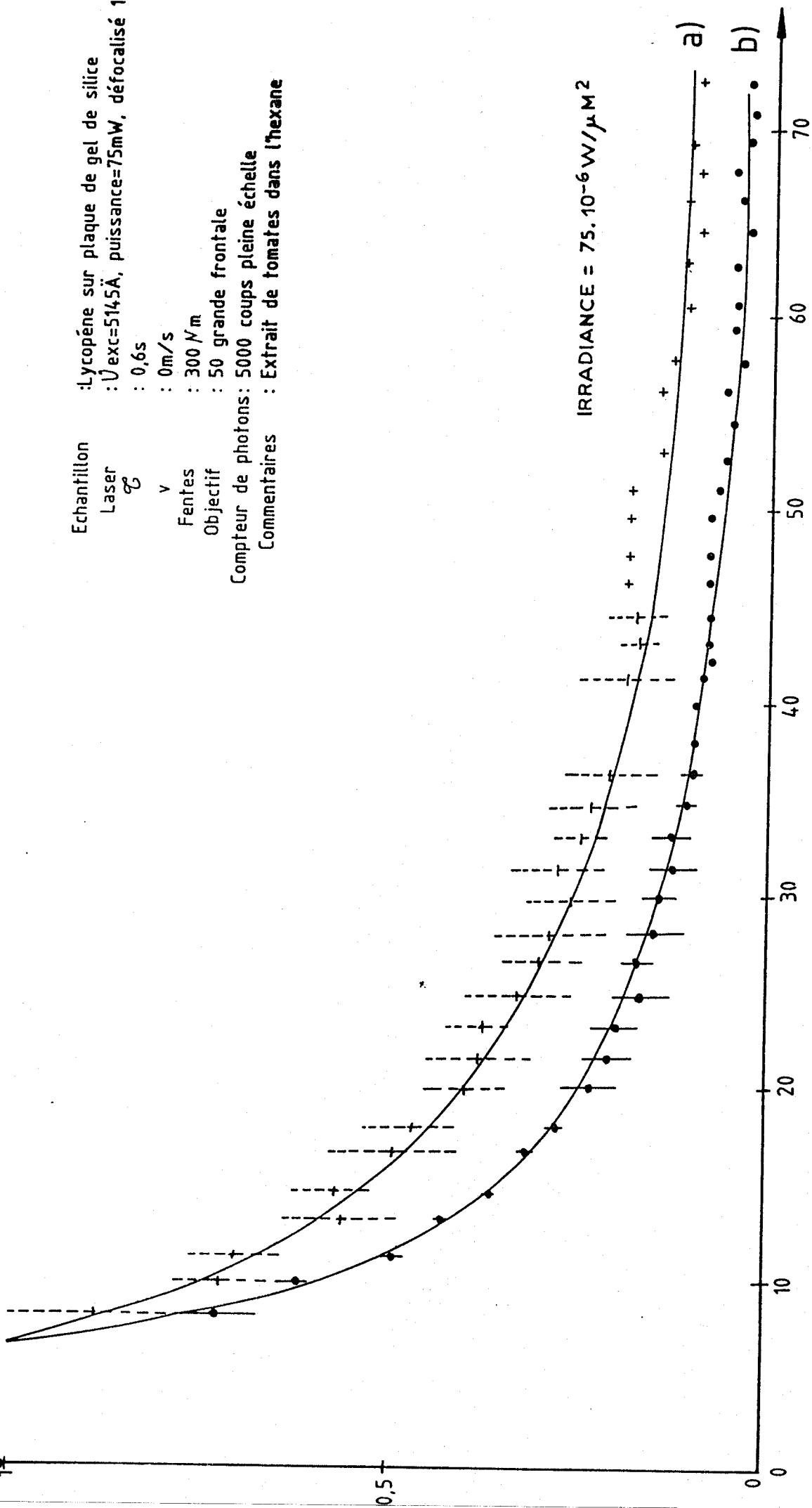
Echantillon : Lycopéne sur plaque de gel de silice  
 Laser :  $\lambda_{exc} = 5145 \text{ \AA}$   
 $\tau$  : 0,6s  
 $\nu$  :  $20 \text{ cm}^{-1} / \text{mn}$   
 Fentes : 250  $\mu\text{m}$   
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 5000 coups pleine échelle



**FIG. 33:** EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DE L'INTENSITE DE LA RAIE A  $1530 \text{ cm}^{-1}$

- A) EN FOCALISE A 75 MW - IRRADIANCE =  $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -  
 B) EN DEFOCALISE A 75 MW  
 - IRRADIANCE =  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -  
 C) EN DEFOCALISE A 150 MW  
 - IRRADIANCE =  $15 \cdot 10^{-5} \text{ W}/\mu\text{M}^2$ -

Echantillon : Lycopène sur plaque de gel de silice  
 Laser :  $\lambda_{exc} = 5145 \text{ \AA}$ , puissance =  $75 \text{ mW}$ , défocalisé 100 $\mu$   
 $\sigma$  : 0,6s  
 v : 0m/s  
 Fentes : 300  $\mu$ m  
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 5000 coups pleine échelle  
 Commentaires : Extrait de tomates dans l'hexane



**FIG. 34: EVOLUTION DU PIC D'UN CAROTENOÏDE VERS 1530  $\text{CM}^{-1}$  EN FONCTION DU TEMPS**

**A) PLAQUE SECHE**

**B) PLAQUE HUMIDIFIEE**

tion de la raie en fonction du temps est toujours observée. Ceci est normal si on se rappelle que le phénomène de dégradation thermique est lié au temps de relaxation des molécules, et dépend beaucoup du contact molécule-support, mais qu'il n'en est pas de même pour le phénomène de dégradation photochimique. La présence d'eau annihile donc le premier effet sans modifier le second.

La densité des photons du faisceau laser est donc à l'origine aussi du phénomène de dégradation des caroténoïdes. Celui-ci est difficile à maîtriser. Seul un abaissement de la température au voisinage de la température de l'azote liquide pourrait supprimer ce phénomène.

Le phénomène de photooxydation est lui parfaitement cerné en manipulant sous azote. La décroissance de la raie est quasiment inexistante même si la plaque est sèche et ceci pour une durée d'étude largement supérieure au temps d'enregistrement du domaine spectral  $1500-1550 \text{ cm}^{-1}$ . Ceci prouve la prépondérance des phénomènes de photooxydation.

Pour les études ultérieures, il conviendra donc de contrôler sévèrement les conditions expérimentales : plaque humidifiée, avec lamelle, faible irradiance et flux d'azote.

### 3. COUPLAGE C.C.M. - SONDE RAMAN POUR LA MISE EN EVIDENCE DES QUATRE CAROTENOIDES DU MELANGE SYNTHETIQUE

Sur la figure 35 est représenté un profil d'intensité obtenu en réglant le spectromètre à  $1530 \text{ cm}^{-1}$  et en déplaçant la plaque par pas de  $10 \text{ }\mu\text{m/s}$ . (Excitatrice :  $514,5 \text{ nm}$ ).

La chromatographie d'un mélange synthétique de quatre caroténoïdes a été réalisée sur plaque MERCK (60) en utilisant un mélange éther de pétrole (87,5 %), acétone (12,5 %). Un spot de  $200 \text{ }\mu\text{m}$  de diamètre, d'un mélange équimolaire ( $5.10^{-5} \text{ M/l}$ ) des quatre caroténoïdes a été déposé à  $6 \text{ cm}$  du bord de la plaque et l'élution a été réalisée sur  $1,5 \text{ cm}$ .

Vitesse de la platine: 10  $\mu\text{m/s}$   
 Eluant: 12,5% acétone. 87,5% éther de pétrole  
 Ligne de base: 6,5cm  
 Trajet de l'extrait: 1,5cm

Echantillon : Mélange de  $\beta$  Carotène-Canthaxanthine-Astaxanthine-Zeaxanthine, sur gel de sili  
 Laser :  $\lambda_{\text{exc}}=5145\text{\AA}$ , puissance=80mW  
 $t$  : 1s  
 $v$  : 0cm/s  
 Fentes : 600  $\mu\text{m}$   
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 5000 coups pleine échelle

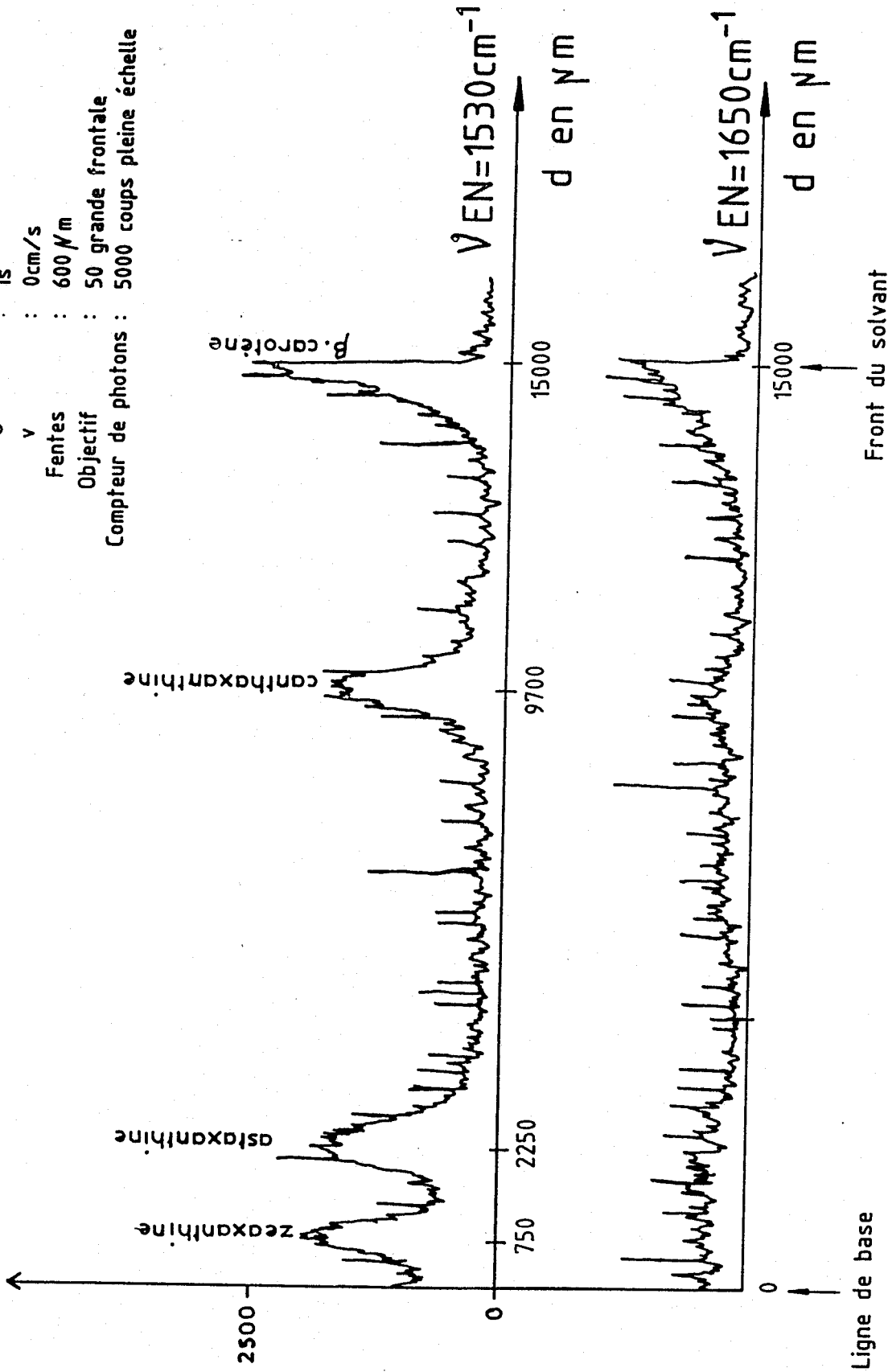


FIG. 35: CHROMATOGRAMME RAMAN - IRRADIANCE =  $8.10^{-4} \text{ W}/\mu\text{m}^2$ .



Sur le chromatogramme, réalisé en calant le spectromètre à  $1530 \text{ cm}^{-1}$ , les quatre pics observés correspondent respectivement à la zéaxanthine ( $750 \mu\text{m}$ ), à l'astaxanthine ( $2250 \mu\text{m}$ ), à la canthaxanthine ( $9700 \mu\text{m}$ ) et au  $\beta$ -carotène ( $15000 \mu\text{m}$ ). Les Rf ainsi calculés : 5, 15, 65 et 100 sont en accord avec les résultats préalablement obtenus.

Pour apprécier le bruit de fond, un enregistrement complet du chromatogramme a été réalisé à une longueur d'onde ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) où n'absorbent pas les caroténoïdes. L'augmentation du fond continu près du fond du solvant peut s'expliquer par l'entraînement de certaines substances fluorescentes présentes dans la plaque ou dans le solvant lui-même.

Les phénomènes de photooxydation, très importants lorsqu'on enregistre un spectre à partir d'un point particulier de la plaque sont beaucoup moins critiques quand on enregistre un chromatogramme. En effet, chaque valeur mesurée correspond à une nouvelle zone étudiée et si une décomposition se produit, le signal obtenu au cours de la première seconde d'éclairement est suffisant pour caractériser la substance. Le chromatogramme Raman présenté sur la Figure 35 a pu être obtenu sans prendre de précautions particulières. La plaque est sèche et elle est manipulée sous atmosphère ambiante.

#### 4. APPLICATION A LA MISE EN EVIDENCE DU NOMBRE DE CAROTENOIDES DANS UN EXTRAIT ACETONIQUE BRUT DE MOULE "MYTILUS EDULIS"

##### 1. Conditions expérimentales

Une solution acétonique brute de corps de moules est préparée. Après une nuit d'agitation du mélange, et décantation, la phase acétonique surnageante est récupérée puis purifiée par ajout d'éther de pétrole et d'eau. Les caroténoïdes étant plus solubles dans l'éther de pétrole que dans l'acétone et insolubles dans l'eau, ils se concentrent dans l'éther de pétrole. Une partie des impuretés reste solubilisée dans la phase constituée par l'eau et l'acétone.

Après chaque étape de purification, seule la phase supérieure (éther de pétrole) contenant les caroténoïdes est récupérée. La solution finale obtenue après trois étapes de purification est concentrée par évaporation à sec sous vide du solvant. Le résidu est resolubilisé par l'acétone jusqu'à un volume final n'excédant pas  $1 \text{ cm}^3$ .

Deux chromatographies comparatives ont été réalisées ; une microchromatographie (ligne de base à 6,5 cm - élution des caroténoïdes sur 1,8 cm) et une chromatographie traditionnelle (ligne de base à 2 cm - élution des caroténoïdes sur 10 cm).

Un chromatogramme Raman a ensuite été enregistré sur une distance de 1,8 cm, afin de déterminer le nombre de caroténoïdes présents. L'analyse a d'abord été réalisée au nombre d'onde  $1530 \text{ cm}^{-1}$  caractéristique du mode  $\nu_1$  puis à  $1625 \text{ cm}^{-1}$  pour visualiser le bruit de fond. Le spectre Raman a ensuite été enregistré entre  $1100$  et  $1550 \text{ cm}^{-1}$  en plaçant le faisceau laser aux abscisses correspondant au maximum de chaque pic du chromatogramme.

## 2. Résultats

D'après le microchromatogramme Raman obtenu (Figure 36), les  $R_f$  des différents produits ont pu être calculés, puis comparés à ceux obtenus, dans les mêmes conditions opératoires, pour la chromatographie traditionnelle.

Vitesse de la platine: 10  $\mu\text{m/s}$   
 Eluant: 70%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -30%  $\text{CH}_3\text{-C}^{\text{O}}\text{-OC}_2\text{H}_5$

Ligne de base à 6,5cm  
 Trajet de l'extrait: 1,9cm

○ : Intensité estimée

$\nu_{\text{EN}} = \nu_{\text{EN}} \text{REGISTREMENT}$

Echantillon : Extrait acétonique de jus de moules sur gel de silice  
 Laser :  $\nu_{\text{exc}} = 5145\text{\AA}$ , puissance = 80mW  
 $\tau$  : 1s  
 v : 0cm/s  
 Fentes : 600  $\mu\text{m}$   
 Objectif : 50 grande frontale  
 Compteur de photons : 5000 coups pleine échelle

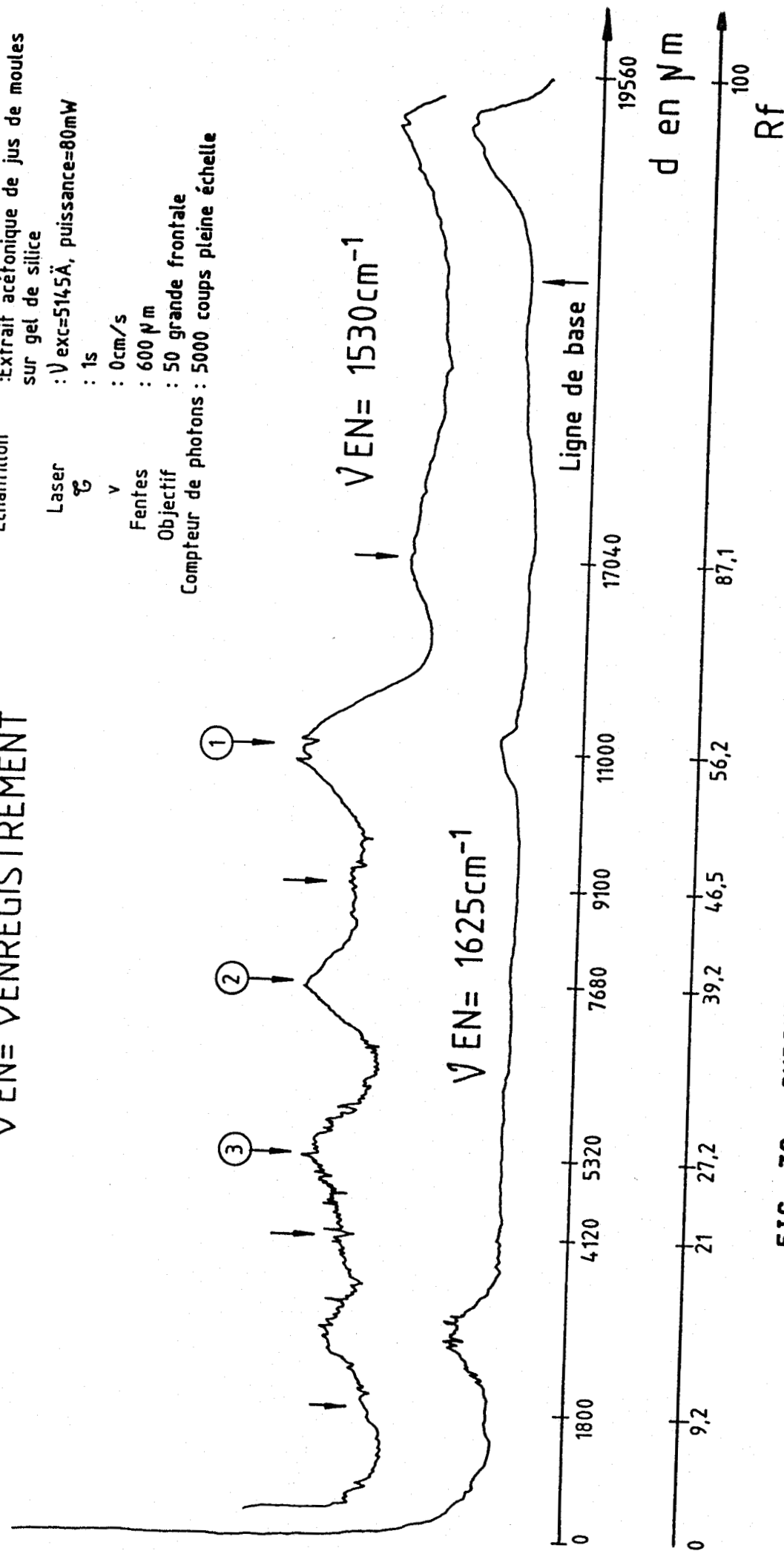


FIG. 36: CHROMATOGRAMME RAMAN

R<sub>f</sub> obtenus après séparation par chromatographie sur courte et longue distance pour un extrait acétonique de moules

Numérotation	Longueur trajet=10cm R <sub>f</sub> × 100	Longueur trajet=1,95cm R <sub>f</sub> × 100	Couleur	Intensité estimée
1	0	0	vert	
2	8	9,2	jaune	
3	13	14,3	vert	
4	20	21,1	orange pâle	
5	32	27,2	" intense	③
6	46	39,3	orange	②
7	51	46,5	jaune	
8	62	56,2	jaune intense	①
9	80	-	orange	
10	87	87,1	saumon	
11	93	-	vert	
12	96	95,4	vert	
13	98,5	100	vert	

### 3. Discussion

Les spectres Raman enregistrés entre 1100 et 1550  $\text{cm}^{-1}$  montrent que les composés notés 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 sur le tableau précédent sont des caroténoïdes dont la  $\nu_1$  se trouve à 1525  $\text{cm}^{-1}$  et la  $\nu_2$  à 1160  $\text{cm}^{-1}$ . Les autres composés notés 1, 3, 11, 12 et 13 sont certainement des chlorophylles ou des pigments biliaries.

Ceci montre que le procédé de purification est imparfait mais que le couplage C.C.M.-Microsonde Raman présente l'avantage de détecter sélectivement les caroténoïdes.

On note que le caroténoïde noté 9 ( $R_f = 80$ ) sur la chromatographie traditionnelle n'est pas mis en évidence sur le microchromatogramme, ainsi que le pigment 11 ( $R_f = 93$ ). La résolution de la méthode n'est pas assez bonne ou leur concentration est trop faible.

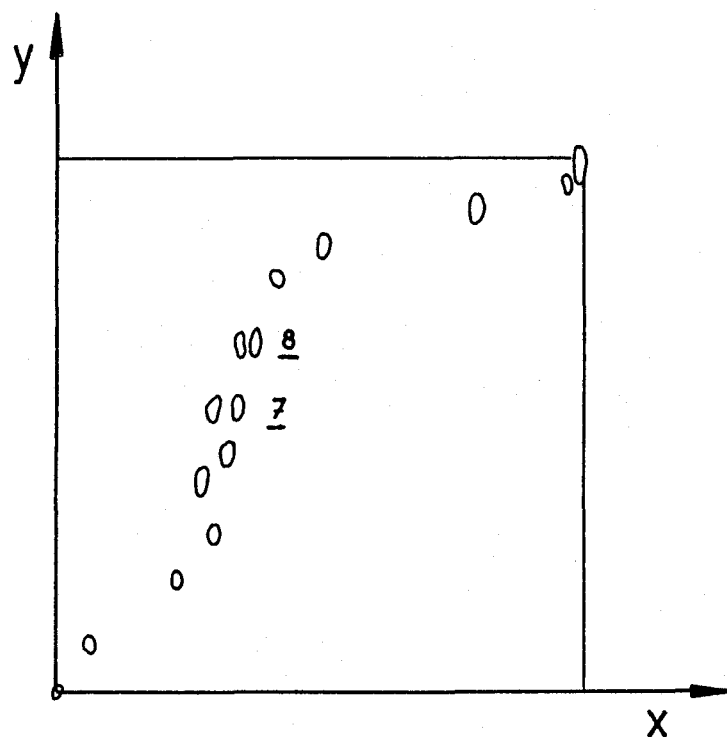
Les  $R_f$  pour un parcours moyen de 2 cm sont moins grands que pour un trajet de 10 cm. La vitesse d'élution est rapide, les composés migrent vite et l'équilibre ne s'établit qu'après.

En toute logique, pour avoir une détermination plus valable du nombre total de caroténoïdes, il faut réaliser une chromatographie bidimensionnelle afin de séparer par un autre solvant les produits non séparés par le premier éluant.

La chromatographie suivante (Figure 37) est réalisée sur un trajet de 7 cm de l'éluant (ligne de base à 2 cm). Deux dédoublements sont mis en évidence (taches n° 7 et 8 de la chromatographie précédente unidimensionnelle).

Le nombre de caroténoïdes de notre mélange est donc au moins de 10. Sally A. Campbell (1970) a séparé par chromatographie sur colonne quinze caroténoïdes chez la moule (tous de longueur de chaîne : 9). Il est donc probable que, soit la méthode d'extraction est incomplète, soit certains pigments sont en trop faible concentration pour être détectés. Comme nous n'avons pas opéré sous azote, il se peut qu'il y ait dégradation partielle par oxydation.

L'utilisation d'une détection multicanale qui analyse simultanément tous les éléments d'un domaine spectral, permet d'obtenir un spectre en un temps très court et devrait diminuer considérablement les processus photoniques au niveau de l'échantillon. C'est ce que nous avons pu démontrer en utilisant le Microdil 28 (Annexe 2.C).



**FIG. 37: CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE D'UN EXTRAIT  
ACETONIQUE PURIFIE DE MOULES**

ELUANT SUIVANT X: 70%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - 30%ACETATE D'ETHYLE  
ELUANT SUIVANT Y: 20%ACETONE - 80%ETHER DE PETROLE

Une tache d'astaxanthine a été déposée sur une plaque de chromatographie ; le spectre du dépôt a été enregistré à l'aide de la microsonde M.O.L.E., puis avec le Microdil 28 (Figure 38). Ces spectres sont comparés au spectre de l'astaxanthine en solution dans l'acétone enregistré au R.T. Le spectre enregistré avec le Microdil 28 a été obtenu à l'aide de 15 accumulations de une seconde chacune ; c'est à dire que le dépôt a été irradié pendant 15 secondes.

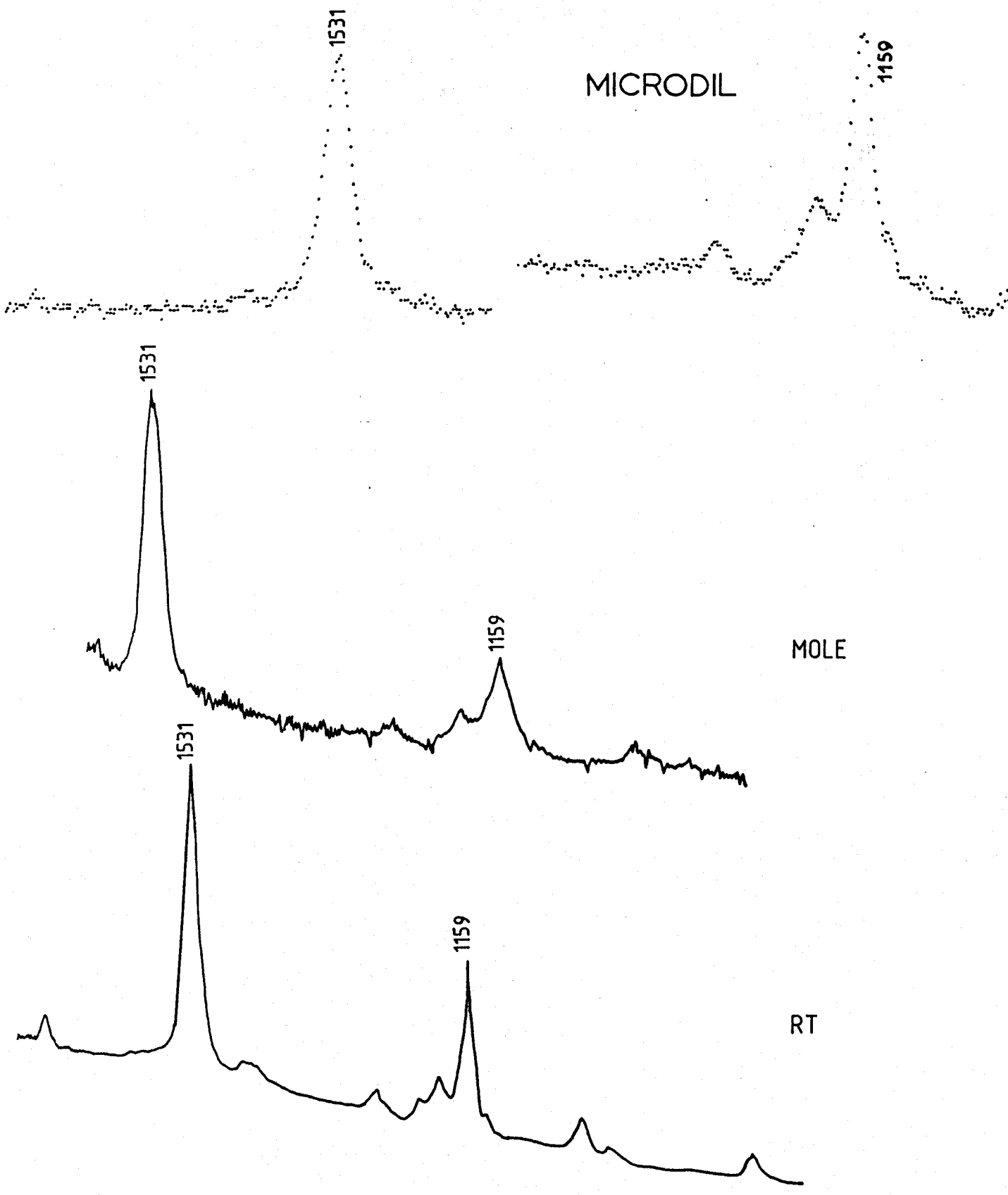
Un temps d'enregistrement de 15 minutes a été nécessaire pour obtenir le même spectre avec la microsonde M.O.L.E. (défilement décroissant des nombres d'onde).

Au Microdil, les deux raies à  $1531$  et  $1159\text{ cm}^{-1}$  sont enregistrées simultanément, pour un même état de dégradation du caroténoïde. A la M.O.L.E., si on excite en continu, les deux raies sont enregistrées pour une dégradation différente. Leur rapport d'intensité est donc inférieur à celui obtenu par enregistrement au Microdil.

L'utilisation du dispositif optique permettant de défléchir le faisceau laser au niveau de l'échantillon devrait encore minimiser la dégradation des caroténoïdes.

#### 4. Conclusion

Le couplage de la chromatographie sur couche mince avec la microanalyse par effet Raman permet de déterminer la nature des constituants d'un mélange par analyse "in situ" et semble donc être une méthode d'investigation très prometteuse. Si les effets photoniques sont limitants, il est cependant possible de les réduire en protégeant l'échantillon des phénomènes physique et photochimique ou en diminuant de manière appréciable le temps d'analyse.



**FIG. 38: SPECTRES DE L'ASTAXANTHINE ENREGISTRES SUR DIFFERENTS SPECTROMETRES - $\lambda_{EX}$  = 514.5 NM-**



## CONCLUSION GENERALE

L'étude présentée dans ce mémoire permet de préciser les possibilités et les limites de la Spectrométrie Raman de résonance (S.R.r.) appliquée aux caroténoïdes.

Les avantages de la S.R.r. résident essentiellement dans l'absence de l'effet de matrice (ce qui permet de s'affranchir de purifications préalables), et dans la très forte sensibilité.

De par le principe même de la S.R.r., sont exaltées les raies Raman correspondant au chromophore. La plupart des autres vibrations moléculaires restent actives dans le spectre Raman mais leur intensité est comparativement si faible, qu'elles sont noyées dans le bruit de fond du spectre. Le spectre S.R.r. ne permettra donc pas d'accéder à la détermination de la structure vibrationnelle d'une molécule comme en Raman ou en I.R., mais donnera d'autres informations.

Pour les caroténoïdes, trois modes vibrationnels sont sélectivement exaltés : le mode  $\nu_1$  (vibration de valence des C=C), le mode  $\nu_2$  (vibration de valence des C-C de la chaîne et déformation angulaire des C-C-H) et le mode  $\nu_3$  (généralement attribué aux vibrations de valence des méthyles latéraux des C-C). L'exaltation ne se produit que lorsque la fréquence d'excitation est voisine du maximum d'absorption visible du chromophore.

Pour l'analyse quantitative, dans un mélange l'évaluation de la quantité totale en caroténoïdes est possible mais impose pour avoir une précision raisonnable, le choix du caroténoïde majoritaire comme référence, et une longueur d'onde d'excitation où les coefficients d'exaltation sont les plus proches possibles. Le choix de la référence est rendu difficile par la similitude des spectres des caroténoïdes et celui de la longueur d'onde d'excitation nécessite la connaissance des profils d'excitation. Une séparation est donc indispensable.

Lorsque les produits sont séparés, l'utilisation de la corrélation liant le maximum d'absorption visible à l'intensité du mode  $\nu_1$  pour une excitatrice de longueur d'onde 514,5 nm est d'une grande souplesse d'emploi et permet de s'affranchir de la connaissance des coefficients d'exaltation pour la détermination des concentrations relatives des constituants d'un mélange.

En analyse qualitative, la S.R.r. ne permet pas de différencier de manière très fine les caroténoïdes car le mode  $\nu_1$  est très affecté par l'environnement et par les groupements terminaux. Elle permet, par contre, de différencier les polyènes des polyisoprènes par la position du mode  $\nu_2$ .

Le couplage d'une technique de séparation : la chromatographie sur couche mince (C.C.M.) et de la microsonde Raman M.O.L.E. permet de repérer et de caractériser les pigments. Les conditions opératoires à respecter ont été étudiées pour minimiser les phénomènes de photooxydation et de dégradation photochimiques et thermiques.

L'étude par S.R.r. d'un organisme marin : la moule "*Mytilus edulis*" a permis de mettre en évidence :

- "in vitro" dans le pied de la moule, deux pigments à structures polyéniques comportant 47 et 16 doubles liaisons. Ce type de composés n'a pas encore été mis en évidence chez les organismes vivants sauf chez les bactéries.
- Après séparation d'un extrait acétonique, 10 caroténoïdes dont les spectres ressemblent à celui du  $\beta$ -carotène dans les mêmes conditions.

Comme suite à ce travail, nous proposons les perspectives suivantes :

- Dans l'étude d'un mélange, enregistrer les profils d'excitation avec un grand nombre de raies excitatrices. A condition de disposer d'un catalogue de profils d'excitation des caroténoïdes, il serait possible par décomposition des profils en bandes élémentaires de déterminer les concentrations relatives dans le mélange.
  
- Utiliser en mode microsonde, une détection simultanée de toutes les longueurs d'onde (détection multicanale). On accéderait ainsi à des images tridimensionnelles (intensité des raies, position des raies, déplacement du faisceau laser), qui traitées par ordinateur permettraient des attributions plus fines des caroténoïdes rencontrés.
  
- Modifier le système d'exploration de l'objet afin de pouvoir l'adapter à l'étude de plaques de chromatographie sur couche mince traditionnelles (trajet de l'ordre de 20 cm) en des temps raisonnables. On s'affranchirait ainsi des problèmes de résolution sur C.C.M. sur courte distance.

ANNEXE 1  
-----

EFFET RAMAN DE RÉSONANCE

## EFFET RAMAN DE RESONANCE

### 1. SPECTROSCOPIE DE DIFFUSION RAMAN

### 2. EFFET RAMAN DE RESONANCE

#### 2.1. *Intensité de l'effet Raman de résonance*

a) *Raman de pré-résonance de type A.*

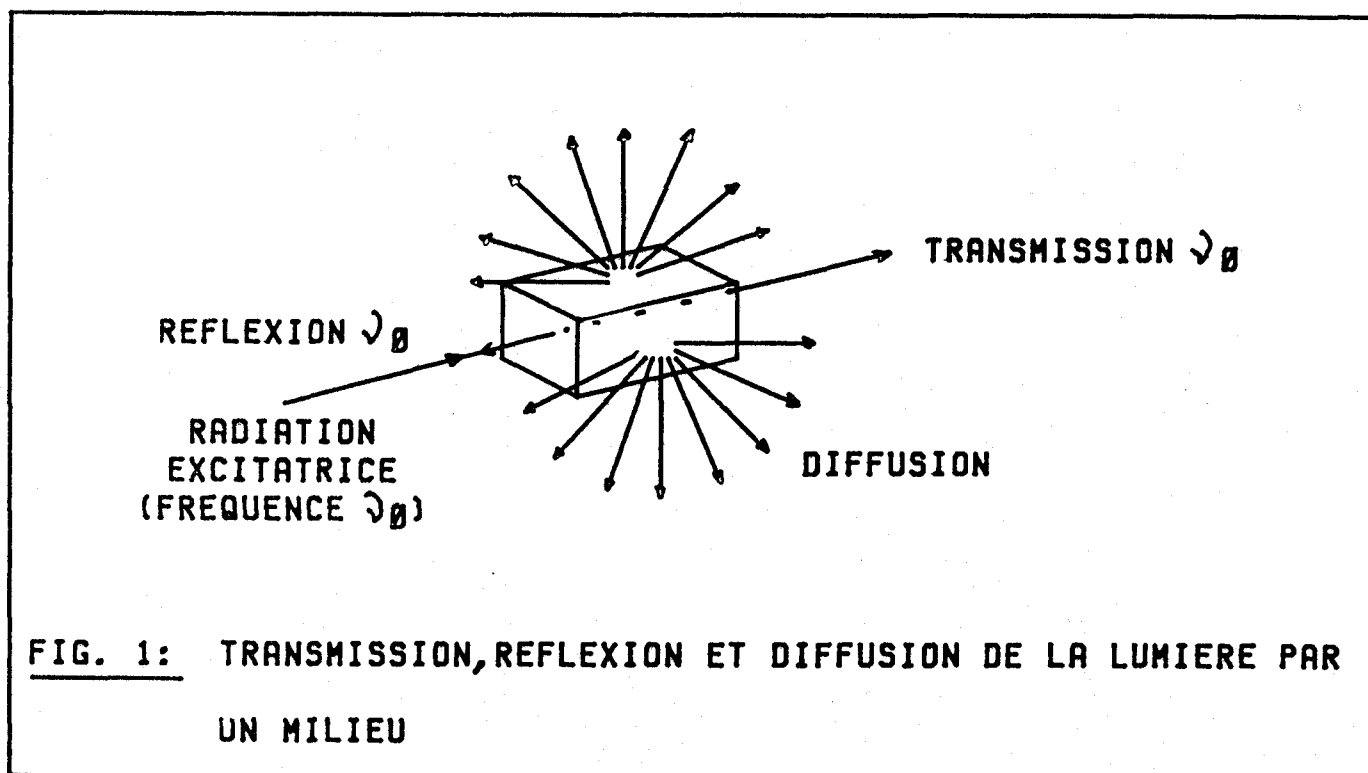
b) *Raman de pré-résonance de type B.*

c) *Cas de la résonance rigoureuse.*

#### 2.2. *Correction due à l'absorption de l'intensité diffusée*

### 1. SPECTROSCOPIE DE DIFFUSION RAMAN

Si on éclaire un milieu matériel par une lumière monochromatique  $\nu_0$ , les photons constituant cette radiation excitatrice peuvent être réfléchis, transmis, absorbés ou diffusés dans toutes les directions de l'espace (Figure 1).



L'analyse spectroscopique de la lumière diffusée montre qu'une fraction importante des photons a la même fréquence que le rayonnement excitateur. Pour une fraction bien plus faible, moins d'un millièrne des photons diffusés, un changement de fréquence est observé : cela correspond à l'effet Raman.

Si les fréquences des photons diffusés  $\nu_d$  sont inférieures à la fréquence excitatrice ( $\nu_d = \nu_0 - \nu_1$ ), on parle de diffusion "Raman Stokes".

Si les fréquences sont supérieures à la fréquence  $\nu_0$ , ( $\nu_d = \nu_0 + \nu_i$ ) on parle de diffusion "Raman anti-Stokes".

Les raies Raman Stokes et anti-Stokes sont symétriques par rapport à la raie de fréquence  $\nu_0$  dite Rayleigh.

Dans chaque cas, les écarts de fréquence  $\nu_i$  sont égaux aux fréquences des mouvements de vibration des molécules présentes dans le milieu diffusant ; ils sont indépendants du choix de la radiation excitatrice. Pour une molécule comportant N atomes, le nombre de modes normaux de vibration est  $3N-6$  ( $3N-5$  pour une molécule linéaire).

La figure 2 présente l'allure d'un spectre Raman. L'axe des abscisses est gradué en nombre d'onde  $\bar{\nu}$  ( $\bar{\nu} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{1}{\lambda \text{ (cm)}} = \frac{\nu}{c}$  avec  $\nu$  la fréquence et  $c$  la célérité de la lumière). Au lieu de repérer les différentes raies du spectre par leur nombre d'onde absolu, on préfère faire coïncider le zéro de l'échelle avec le nombre d'onde de la radiation excitatrice. La position d'une raie est ainsi directement déterminée par l'écart en  $\text{cm}^{-1}$  par rapport à la raie Rayleigh (DELHAYE M., MERLIN J.C., 1975).

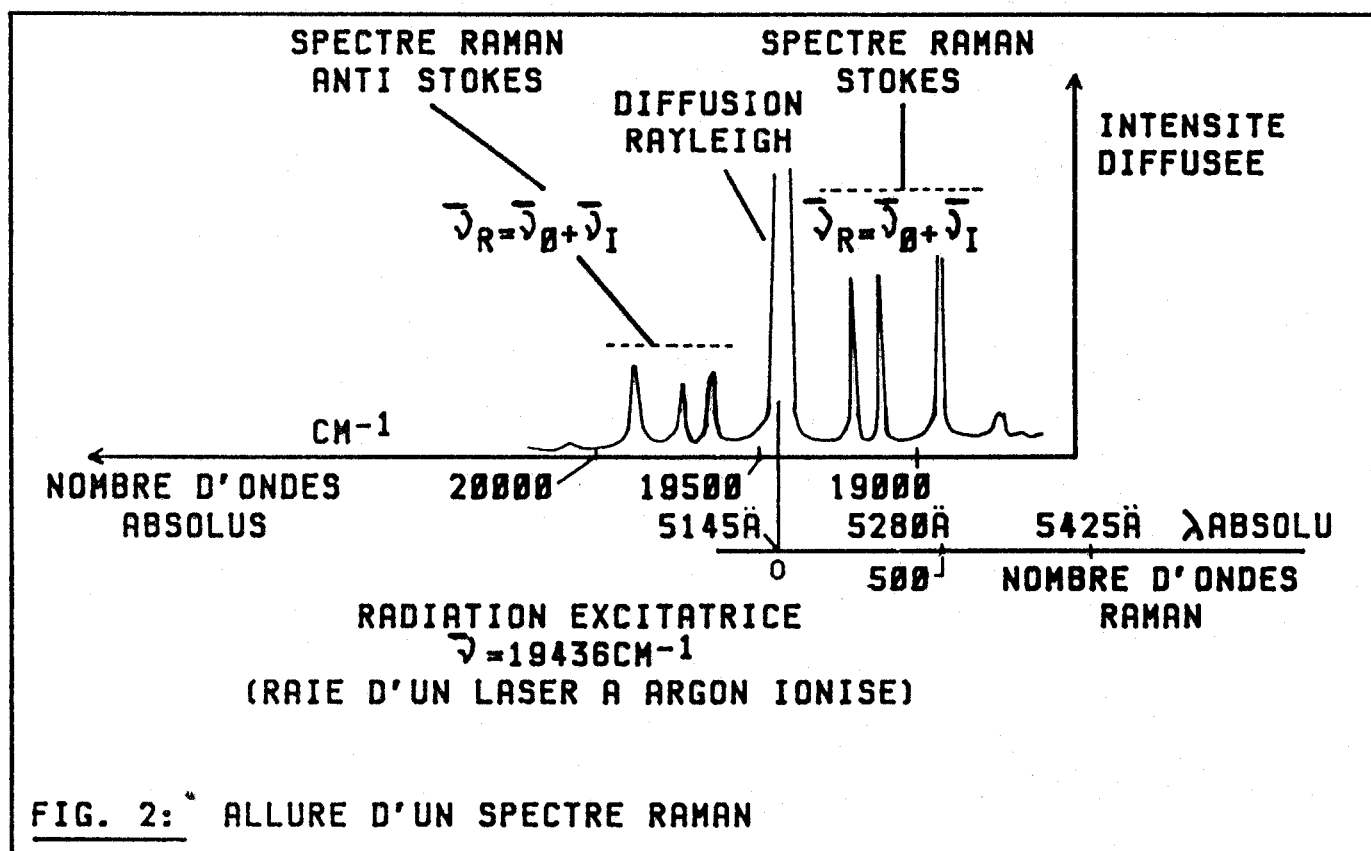


FIG. 2: ALLURE D'UN SPECTRE RAMAN

## 2. EFFET RAMAN DE RESONANCE

Lorsque la fréquence excitatrice  $\nu_0$  se situe au voisinage d'une bande d'absorption électronique de la molécule étudiée, une exaltation de certaines raies du spectre est observée ; ce phénomène, appelé "Effet Raman de résonance" résulte du couplage entre les transitions électroniques et vibrationnelles.

Deux phénomènes peuvent être observés : (Figure 3)

- La pré-résonance quand la fréquence excitatrice est proche de la bande d'absorption.
- La résonance rigoureuse quand la fréquence excitatrice coïncide avec la bande d'absorption de la molécule. Dans ce cas, les règles de sélection classiques ne sont plus valables.

Les raies exaltées sont propres à des groupes d'atomes (chromophores) dont les transitions électroniques sont responsables de la bande d'absorption mise en jeu.

Dans un édifice moléculaire complexe, par un choix judicieux de la longueur d'onde excitatrice, la spectroscopie Raman de résonance permet de mettre en évidence les fréquences des vibrations du chromophore indépendamment du reste de la molécule et de son environnement (non absorbant à cette longueur d'onde). De plus, la forte exaltation de certains modes (jusque  $10^6$ ) permet l'obtention de spectres Raman pour des solutions à très faibles concentrations ( $10^{-7}$  M).



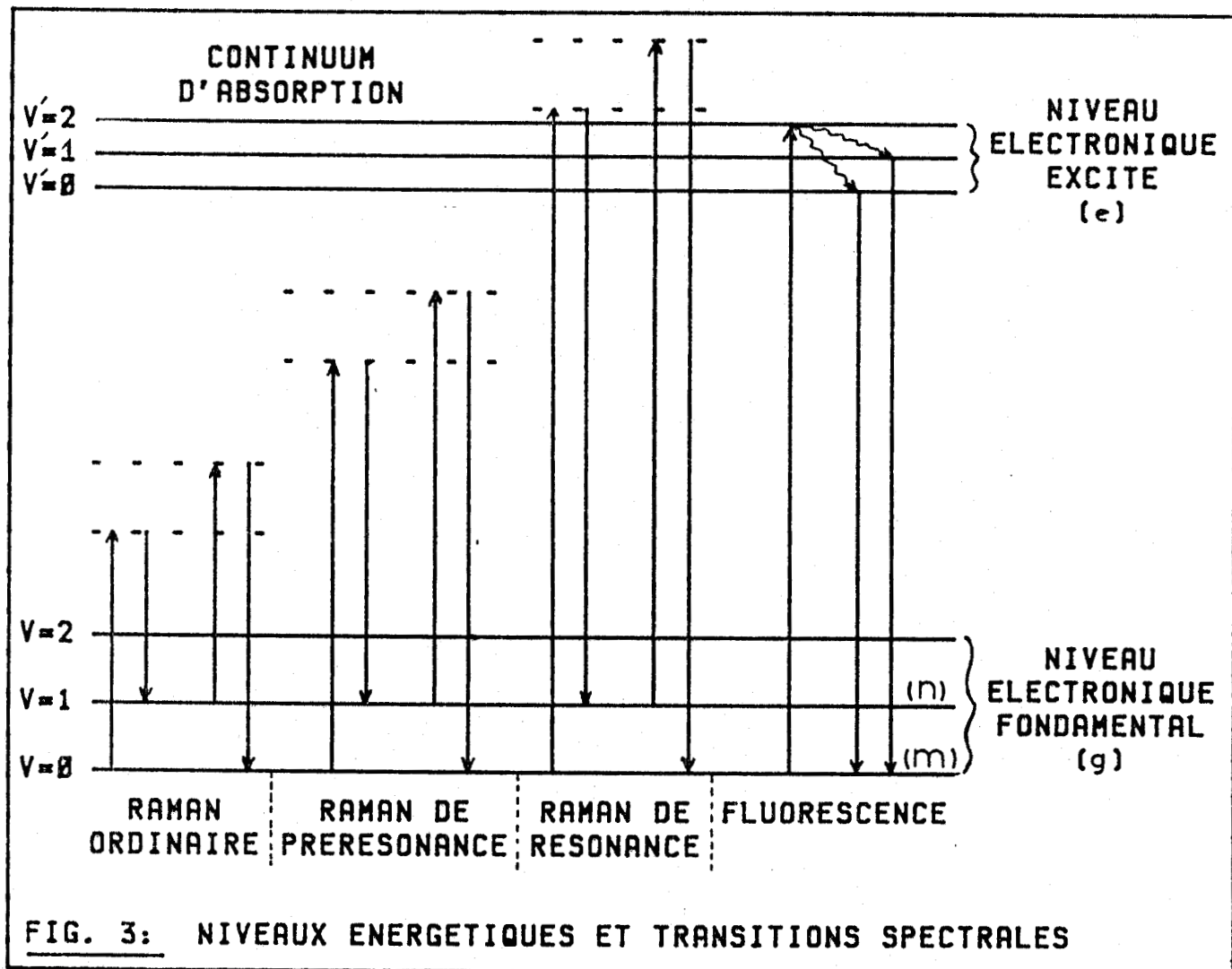


FIG. 3: NIVEAUX ENERGETIQUES ET TRANSITIONS SPECTRALES

2.1. Intensité de l'effet Raman de résonance

L'intensité d'une raie Raman, correspondant à une transition entre un état initial m et un état final n, suivant un angle solide  $4 \pi$  est donnée par l'équation de KRAMERS-HEISENBERG-DIRAC (J. BEHRINGER, 1967, J. TANG, A.C. ALBRECHT, 1970).

$$I_{m \rightarrow n} = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} I_0 (\nu_0 \pm \Delta\nu)^4 \sum_{ij} |(\alpha_{ij})_{mn}|^2$$

- avec :
- $I_0$  l'intensité incidente de fréquence  $\nu_0$
  - $\Delta\nu$  la fréquence de la raie Raman
  - $\alpha_{ij}$  un élément du tenseur de diffusion  $(\alpha_{ij})_{m \rightarrow n}$  pour une transition vibrationnelle de l'état  $m$  à l'état  $n$ .

Le tenseur de diffusion  $(\alpha_{ij})_{m \rightarrow n}$  relie le champ électrique à l'élément de matrice du moment de transition induit  $P_{mn}$  et son  $(ij)$ <sup>ème</sup> élément a pour expression :

$$(\alpha_{ij}) = \frac{1}{h} \sum_e \left[ \frac{(M_j)_{m \rightarrow e} (M_i)_{e \rightarrow n}}{\nu_e - \nu_0 - \nu_m + i\delta_e} + \frac{(M_i)_{m \rightarrow e} (M_j)_{e \rightarrow n}}{\nu_e - \nu_n + \nu_0 + i\delta_e} \right]$$

- avec :
- $(M_j)$  et  $(M_i)$  les moments de transition de l'opérateur moment électrique dipolaire suivant les directions  $j$  et  $i$  de l'état  $m$  vers l'état  $e$  et de l'état  $e$  vers l'état  $n$ .
  - $\nu_0$  la fréquence de la radiation incidente.
  - $\nu_m$  et  $\nu_n$  les fréquences propres des états  $m$  et  $n$ .
  - $\nu_e$  la fréquence de l'état électronique excité.
  - $\delta_e$  une constante d'amortissement qui tient compte de la durée de vie finie et de la largeur spectrale de l'état intermédiaire dû aux transitions radiatives spontanées d'un état vers d'autres états, ou aux radiations non radiatives

$$\delta_e = \frac{1}{4 \pi \tau_e} \quad \text{avec } \tau_e \text{ la durée de vie de la molécule dans l'état intermédiaire}$$

Si la fréquence de la radiation excitatrice  $\nu_0$  se rapproche de l'une des fréquences propres  $\nu_e - \nu_m$ , le premier terme de  $\alpha_{ij}$  peut augmenter fortement sans tendre vers l'infini à cause du terme d'amortissement  $\delta_e$ . Ceci explique le phénomène de résonance qui exalte certains modes normaux de vibration.

Pour obtenir des renseignements sur le type de vibrations intervenant dans le phénomène de résonance, plusieurs théories ont été développées (JACON et al., 1971, MORTENSEN, 1970, ALBRECHT, 1961, 1971, PETICOLAS et al., 1970, SHORYGIN, 1971, CHAO et al., 1976) ; la plus utilisée est celle d'ALBRECHT, 1961, qui emploie l'approximation adiabatique de Born-Oppenheimer. Cette approximation est basée sur la séparation des fonctions d'onde vibrationnelles et électroniques. La fonction d'onde électronique est développée en série de Taylor suivant les déplacements des noyaux en utilisant le formalisme de HERZBERG-TELLER. PETICOLAS et al., 1970, a abouti à des expressions semblables à celles d'ALBRECHT, en appliquant une théorie basée sur une perturbation du 3ème ordre dépendante du temps. On obtient alors l'expression de  $\alpha_{ij}$  simplifiée dans laquelle le facteur d'amortissement a été supprimé limitant ainsi le domaine de validité de cette relation à l'effet Raman de pré-résonance.

$$\alpha_{ij} = \frac{1}{h} \sum \left[ \frac{(M_j)_{g \rightarrow e} h \Delta\nu_{e \rightarrow f} (M_i)_{f \rightarrow g}}{(\nu_e - \nu_0) (\nu_g - \nu_d)} + \frac{(M_i)_{g \rightarrow e} h \Delta\nu_{e \rightarrow f} (M_j)_{f \rightarrow g}}{(\nu_e + \nu_d) (\nu_f + \nu_0)} \right]$$

La sommation a été faite sur tous les états excités e et f pris deux à deux. On ne tient cependant compte que des deux premiers états excités ; leur contribution étant considérée de loin comme la plus importante dans le tenseur de diffusion.

$(M_j)_{g \rightarrow e}$  et  $(M_i)_{f \rightarrow g}$  sont les moments de transition de l'opérateur moment dipolaire électronique suivant les directions j et i, de g à e, et de f à g respectivement, avec g l'état électronique fondamental,  $\nu_e$  et  $\nu_f$  les fréquences de transition électronique de e à f.

$h_{e \rightarrow f}^{\Delta\nu}$  est l'élément de matrice du couplage vibronique liant les états e et f par l'intermédiaire de la vibration de fréquence  $\Delta\nu = \nu_0$  ( $\nu_0$  et  $\nu_d$  sont les fréquences respectives des photons incidents et diffusés).

Deux mécanismes d'exaltation sont donc attendus dans le phénomène de pré-résonance ; ils correspondent aux conditions :  $e \neq f$  (terme B),  $e = f$  (terme A) définies par ALBRECHT (1961).

2.1. a) Raman de pré-résonance de type A

Les deux états e et f sont confondus.  $\alpha_{ij}$  devient égal au terme A mettant en jeu l'interaction vibrationnelle avec un seul état électronique excité ; c'est le mécanisme de résonance le plus couramment observé.

L'élément de matrice  $h_{e \rightarrow f}^{\Delta\nu}$  relie l'énergie de l'état e et la coordonnée vibrationnelle, et s'exprime grâce aux intégrales de recouvrement de FRANCK-CONDON. Pour des vibrations totalement symétriques, ces intégrales sont nulles pour les niveaux initial et final de la molécule et sont maximales pour les modes vibrationnels qui conduisent à une plus grande déformation de l'état électronique excité.

Pour les modes de vibration les plus perturbés par les modifications de l'état électronique de la molécule, on aura une forte exaltation.

Pour une résonance de type A, l'intensité diffusée sera proportionnelle à  $F_A^2$  qui a pour expression :

$$I \approx F_A^2 = (\nu_0 - \nu_{m \rightarrow n})^2 \left[ \frac{\nu_e^2 + \nu_0^2}{(\nu_e^2 - \nu_0^2)^2} \right]^2$$

2.1. b) Raman de pré-résonance de type B

Ce phénomène d'exaltation correspond à la condition  $e \neq f$  ; le tenseur  $(\alpha_{ij})$  est égal au terme B et met en jeu le couplage vibronique entre les deux états électroniques excités e et f de la molécule.

Les vibrations exaltées peuvent ou non être totalement symétriques à condition que leurs symétries soient contenues dans le produit direct des représentations des deux transitions électroniques couplées. L'amplitude de l'exaltation va dépendre de l'élément de matrice  $h_{e \rightarrow f}^{\Delta v}$  et du moment lié à la transition électronique.

L'intensité sera proportionnelle au terme  $F_B^2$

$$I \approx F_B^2 = (v_0 - v_{m \rightarrow n})^2 \left[ \frac{v_e v_f + v_0^2}{(v_e^2 - v_0^2)(v_f^2 - v_0^2)} \right]^2$$

En général, l'exaltation liée à un processus de type B est plus faible que celle de type A.

Dans un cas plus général,  $(\alpha_{ij})$  a pour expression :

$$(\alpha_{ij}) = A + B + C + D$$

- avec :
- A : terme de totale symétrie
  - B : terme de couplage vibronique
  - C : terme anti-résonnant
  - D : terme de radiation adiabatique

En général C et D sont négligeables devant les termes A et B.

### 2.1. c) Cas de la résonance rigoureuse

Dans ce cas,  $\nu_0$  est très proche de  $\nu_e$ . Les équations deviennent complexes. Cependant dans le cas d'une bande d'absorption très fine de fréquence  $\nu_e$ , pour une vibration totalement symétrique, l'intensité diffusée sera proportionnelle au terme :

$$I \approx (\alpha_{ij})^2 = \frac{(\nu_0 - \Delta\nu)^4}{(\nu_e - \nu_0)^2 + \delta^2}$$

La détermination de  $\delta$  peut se faire de différentes façons ; J. BEHRINGER (1967), W.L. PETICOLAS et al. (1970), M. MINGARDI et al. (1975) proposent de prendre la demi-valeur de la largeur à mi-hauteur de la bande d'absorption électronique considérée. R.S.L. CHAO et al. (1976), préfèrent prendre la demi-valeur de la largeur à mi-hauteur du profil d'excitation expérimental.

Des théories plus complètes ont été développées (MINGARDI et al., 1975, VAN LABEKE, 1975, B.B. JOHNSON et al., 1976).

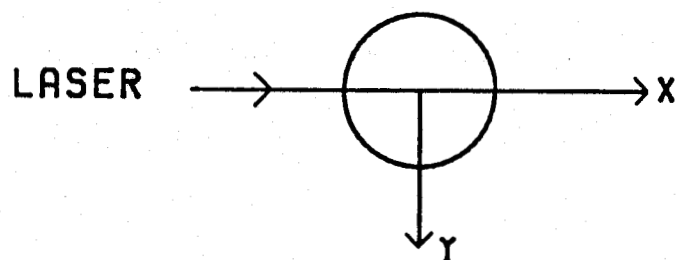
### 2.2. CORRECTION DUE A L'ABSORPTION DE L'INTENSITE DIFFUSEE (J.C. MERLIN, 1979)

L'obtention d'un spectre Raman de résonance est parfois plus délicate que celle d'un spectre Raman ordinaire. Une forte densité optique de l'échantillon peut se traduire par une diminution importante de l'intensité du faisceau excitateur, et une forte absorption de la lumière diffusée ; ces deux phénomènes conduisent à une diminution sensible du signal Raman observé.

Dans le cas où la connaissance des intensités diffusées exactes est nécessaire, les intensités mesurées des raies Raman doivent être corrigées en fonction de l'absorption du milieu étudié.

L'utilisation de source LASER permet de présenter le modèle simplifié suivant :

- soit un échantillon absorbant contenu dans une cellule cylindrique et traversée par un faisceau LASER (voir Figure 4).



**FIG. 4: SCHEMA D'UNE CELLULE CYLINDRIQUE TRAVERSEE PAR UN FAISCEAU LASER.**

avec :  $x$  = longueur traversée par le faisceau LASER à l'intérieur de l'échantillon

$y$  = longueur traversée par le faisceau diffusé à l'intérieur de l'échantillon

L'introduction de cellules cylindriques permet de faire l'approximation suivante :  $x = y$ .

L'intensité Raman observée provenant d'un élément de faisceau excitateur  $dx$  sera égale à :

$$dI_{\epsilon} = I_x \cdot k \cdot c \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot y} dx$$

avec :  $I_x = I_0 e^{-2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c \cdot x}$ , l'intensité du faisceau excitateur au point de coordonnée x.

$I_0$  = l'intensité de la radiation excitatrice.

k = le facteur de proportionnalité faisant intervenir la section efficace différentielle  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  Raman du composé.

c : la concentration de l'espèce diffusante.

$\epsilon_0$  : le coefficient d'extinction molaire correspond à la fréquence d'excitation.

$\epsilon$  : le coefficient d'extinction molaire correspondant à la fréquence diffusée, responsable de la perturbation de  $I_\epsilon$ .

En négligeant l'absorption de la lumière diffusée provenant du centre du faisceau et parcourant la distance  $r_0$  (rayon du faisceau LASER au point de focalisation ;  $r_0 \ll y$ ), l'intégration de l'équation précédente suivant x aboutit à l'expression suivante :

$$I_\epsilon = I_0 \cdot k \cdot c \cdot e^{-2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c \cdot y} \frac{1 - e^{-2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c \cdot x}}{2,303 \cdot \epsilon_0 \cdot c}$$

Dans tout le domaine de concentration (0 -  $\infty$ ), le rapport d'intensité  $I_{\epsilon 1}/I_{\epsilon 2}$  pour deux raies de diffusion sera égal à :

$$\frac{I_{\epsilon 1}}{I_{\epsilon 2}} = \frac{I_1}{I_2} e^{-2,303 \cdot c \cdot y \cdot \Delta \epsilon}$$



avec :  $I_1$  et  $I_2$  les intensités vraies.

$\Delta\epsilon$  la différence des coefficients d'extinction molaire entre les deux fréquences diffusées. Dans le cas où la raie indicée 2 est prise comme référence interne (bande attribuable au solvant) l'expression devient :

$$\begin{aligned} I_{\epsilon} &= I e^{-2,303.c.y.\Delta\epsilon} \\ &= I e^{-2,303.\Delta} \text{ (OO)} \end{aligned}$$

$y = 0,4$  mm dans notre cas (tube en verre cylindrique, de diamètre 0,4 mm).

ANNEXE 2

APPAREILLAGES UTILISÉS

- A. SPECTROMETRE U.V.-VISIBLE : DUOSPAC 30
  
- B. SPECTROMETRE RAMAN CONVENTIONNEL : R.T.
  
- C. SPECTROMETRE RAMAN MICROSONDE M.O.L.E.
  
- D. MICROSPECTROMETRE RAMAN MULTICANAL : MICRODIL 28
  
- E. PLATINE A DEPLACEMENT MICROMETRIQUE

A. SPECTROMETRE U.V. -VISIBLE DUOSPAC 203

Le Duospac 203 JOBIN YVON est un spectromètre à double faisceau avec un monochromateur à réseau holographique plan, d'une lampe à tungstène pour le visible et d'une lampe au deutérium pour l'ultra-violet. Le taux de lumière parasite est inférieur à 0,2 % à 210 nm. La résolution est de 0,5 nm et la précision sur les mesures de 0,005 D.O.

B. SPECTROMETRE RAMAN CONVENTIONNEL R.T.

Le spectromètre utilisé pour l'étude des solutions est un spectromètre à balayage lent, comportant un triple monochromateur monté en additif, de 800 mm de focale. Chaque monochromateur est constitué d'un réseau plan de 1800 traits/mm. Le taux de lumière parasite est très faible ( $10^{-12}$  à  $50 \text{ cm}^{-1}$  de la raie Rayleigh), la réjection de la radiation excitatrice est donc excellente.

La détection est assurée par un photomultiplicateur refroidi par effet Peltier pour diminuer le bruit thermique. La tension enregistrée aux bornes du circuit RC est amplifiée puis enregistrée sur papier à l'aide d'un enregistreur potentiométrique, dont le défilement est synchronisé au dispositif de balayage mécanique assurant la rotation des réseaux.

### C. MICROSONDE M.O.L.E. A EFFET RAMAN

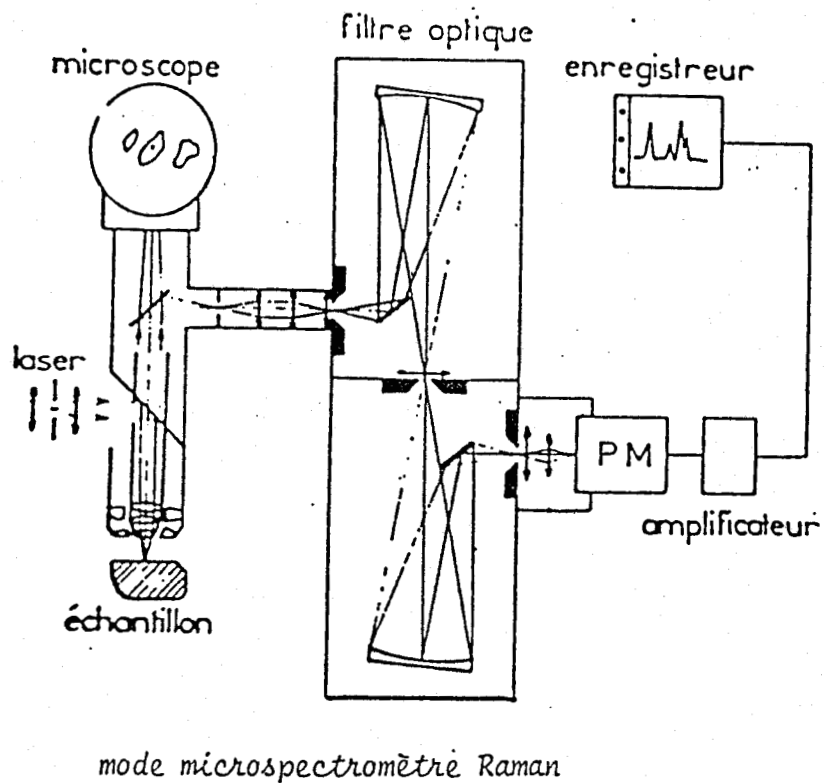
L'analyse ponctuelle par effet Raman est une technique mise au point au laboratoire (C.N.R.S. - L.P. 2641, M. DELHAYE et P. DHAMELIN COURT, 1975). La radiation monochromatique émise par un laser est focalisée sur une très petite surface de l'échantillon. L'analyse de la lumière diffusée par le volume irradié permet l'identification et la localisation des différents édifices polyatomiques présents dans l'échantillon.

La Microsonde se compose d'un microscope optique classique, d'un filtre optique à réseaux holographiques concaves à très faible taux de lumière parasite et d'un système de détection monocanale et multicanale (Figure 1).

L'objectif du microscope focalise le faisceau Laser sur l'échantillon et recueille la lumière diffusée qui est analysée par le filtre optique. Le détecteur est un photomultiplicateur ou un tube intensificateur d'images suivi d'une caméra de télévision.

Le spectre Raman obtenu permet l'identification des espèces polyatomiques contenues dans le volume irradié. C'est ce mode de fonctionnement que nous avons utilisé au cours de nos manipulations, en prenant toutefois certaines conditions.

La Microsonde moléculaire M.O.L.E. est équipée d'un système d'acquisition de données permettant d'effectuer des accumulations de spectre.



**FIG. 1:** SCHEMA SIMPLIFIE DU MODE DE FONCTIONNEMENT UTILISE DE LA MICROSONDE MOLE

D. MICRODIL 28 (J. BARBILLAT, 1983).

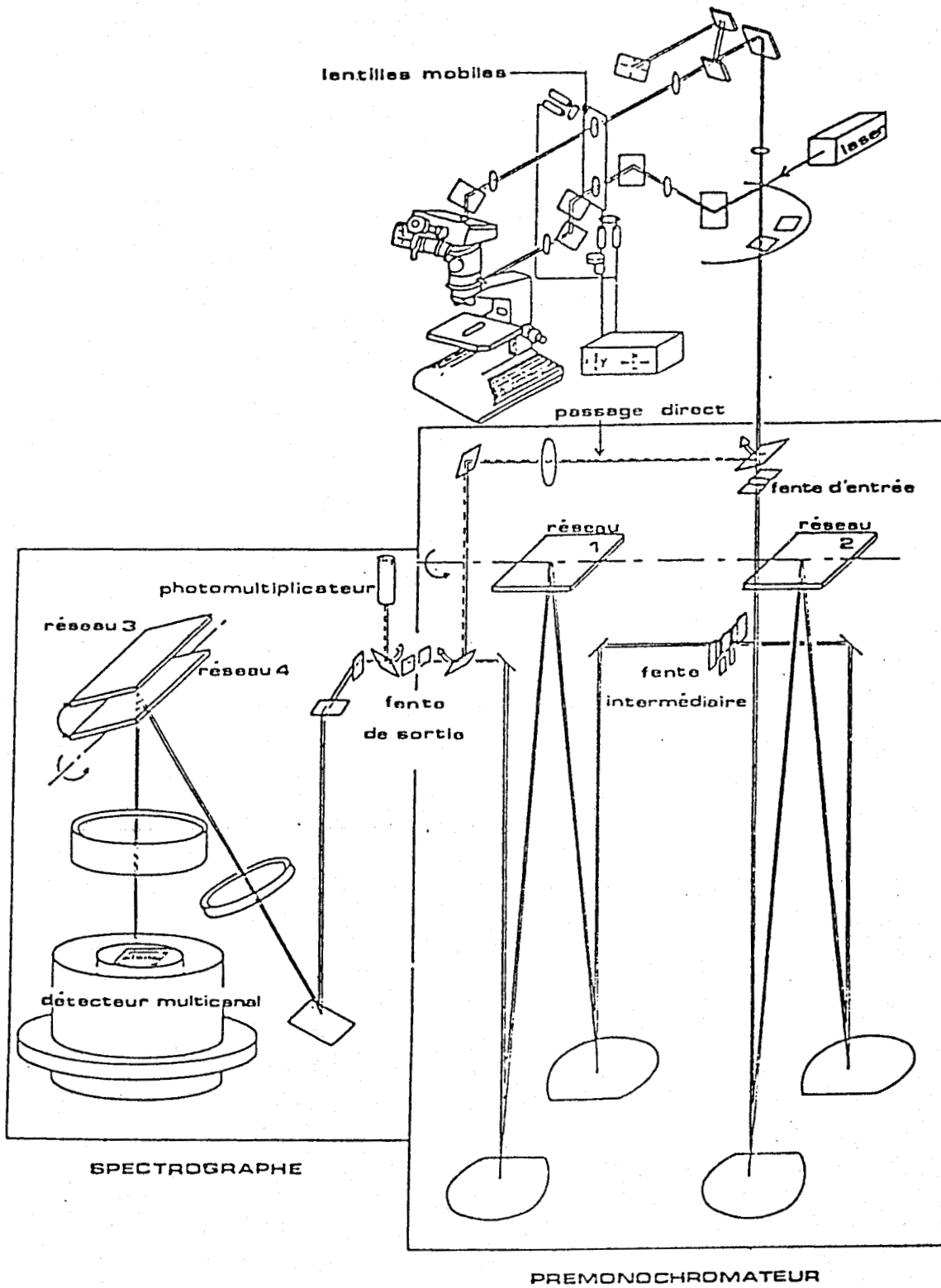
L'appareil a été réalisé au laboratoire dans le cadre d'une collaboration avec une Société d'instrumentation et fait partie de la nouvelle génération de Microsondes moléculaires.

L'instrument permet l'enregistrement du spectre de micro-échantillons. Il comporte également un dispositif d'exploration "optique" de l'échantillon, point par point ou ligne par ligne, destiné au tracé de profils d'intensité et à la reconstruction d'images sélectives de la préparation à partir de raies Raman caractéristiques.

La figure 2 représente la configuration actuelle du MICRODIL 28. Il est constitué d'un microscope OLYMPUS type BHM équipé d'un éclairage en lumière blanche par réflexion. Un dispositif optique permet d'analyser n'importe quel point situé dans le champ du microscope sans déplacer l'échantillon. Le déplacement des lentilles mobiles est assuré par des moteurs pas à pas commandés manuellement ou par ordinateur qui permettent de déplacer le faisceau laser avec une très grande précision et une bonne reproductibilité. Un pas moteur correspond à un déplacement d'environ 0,05  $\mu\text{m}$  du point d'impact du faisceau laser sur la préparation quand on utilise l'objectif 100.

Le microscope et la source laser sont directement fixés sur le spectromètre, ce qui assure une excellente stabilité mécanique à l'ensemble de l'instrument.

Le système dispersif comprend un double monochromateur soustractif qui joue le rôle de filtre optique passe bande, suivi d'un spectrographe stigmatique.



**FIG. 2: SCHEMA DU MICRODIL**



Le prémonochromateur comporte deux étages dispersifs identiques de type Czerny-Turner, équipés de réseaux holographiques plans 1800 traits/mm et de collimateurs à miroirs sphériques de 500 mm de longueur focale. Ces monochromateurs sont couplés de telle façon que la dispersion dans le plan de la fente de sortie soit nulle. Les radiations transmises par le premier étage sont recombinaées par le second monochromateur et focalisées sur la fente de sortie du filtre. La fente intermédiaire large permet d'isoler le domaine spectral à analyser dont l'étendue dépend de la longueur d'onde.

La conception du système dispersif permet deux modes de fonctionnement :

a) Fonctionnement monocanal

Le prémonochromateur peut être converti en microspectromètre classique. La fente intermédiaire large est remplacée par une fente fine. Les radiations dispersées sont envoyées sur un photomultiplicateur suivi d'une électronique à comptage de photons. L'exploration du spectre se fait séquentiellement par rotation des réseaux au moyen d'une barre cosécante et d'un moteur pas à pas.

b) Fonctionnement multicanal

La fente de sortie du prémonochromateur constitue la fente d'entrée du spectrographe. Celui-ci comporte un collimateur à lentilles de grande focale (400 mm) et un objectif à grande ouverture de 300 mm de longueur focale corrigés pour donner un champ plan de 25 mm. Il est équipé de deux réseaux holographiques plans de 1800 et 500 traits par mm interchangeables montés dos à dos sur une tourelle ce qui permet de modifier la dispersion et la résolution du spectre dans le plan focal.

Le détecteur de rayonnement est une barrette de photodiodes intensifiée et représente une des originalités du Microdil. Ce détecteur analyse simultanément, en un temps très court, tous les éléments spectraux qui constituent le spectre Raman. Il permet donc de réduire les risques de dégradation en limitant la durée d'exposition sous le faisceau laser. La sensibilité élevée des photodiodes intensifiées, associée à la possibilité d'intégrer le signal lumineux pendant une longue période, peut être mise à profit pour détecter des signaux peu intenses ou pour abaisser la puissance d'excitation en deçà du seuil de décomposition dans le cas d'échantillons absorbant fortement la radiation laser.

Le système d'acquisition du Microdil 28 est actuellement bâti autour d'un ordinateur Apple II de 64 K de mémoire RAM. Il permet d'enregistrer un spectre ou d'en accumuler un grand nombre et il est équipé d'unités périphériques telles que : écran vidéo, lecteur de disquettes, imprimantes, qui permettent de visualiser les spectres et de les conserver sur disques ou sur papier.

La Société D.I.L.O.R. développe les programmes d'acquisition et de traitement.

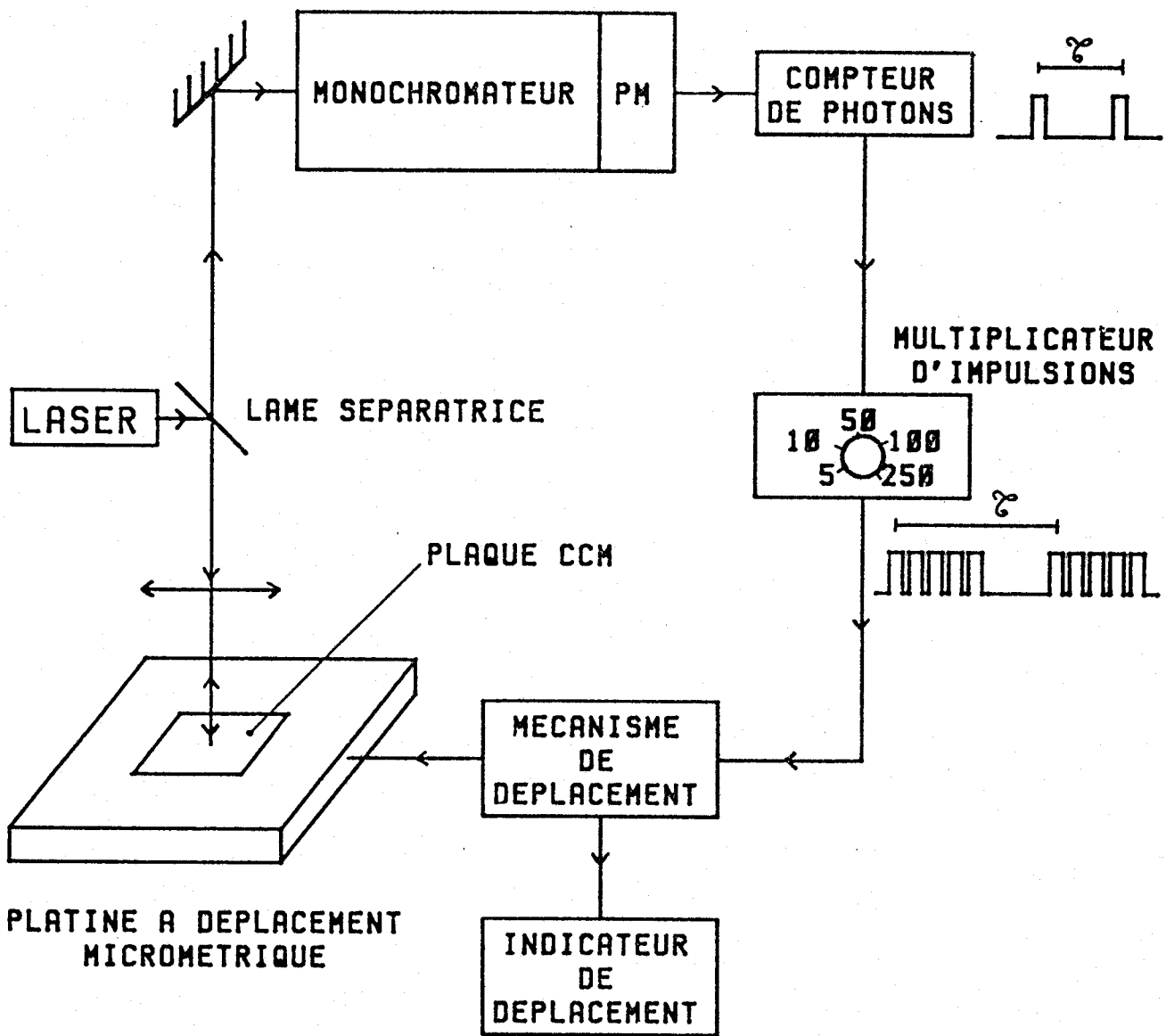
#### E. DESCRIPTION DE LA PLATINE A DEPLACEMENT MICROMETRIQUE

On dispose au laboratoire d'une platine à déplacement micrométrique adaptable sous l'objectif du microscope. Le déplacement de l'échantillon par rapport au point de focalisation du faisceau LASER est synchronisé au système de comptage de photons. Ce dispositif permet, après un temps de comptage  $\tau$ , de faire avancer la platine d'un pas de 1 micron pour un nouveau temps de comptage  $\tau$  grâce à une impulsion libérée par le compteur de photons. Un indicateur digital de déplacement affiche à chaque instant la distance parcourue depuis le début de l'analyse (Figure 3).

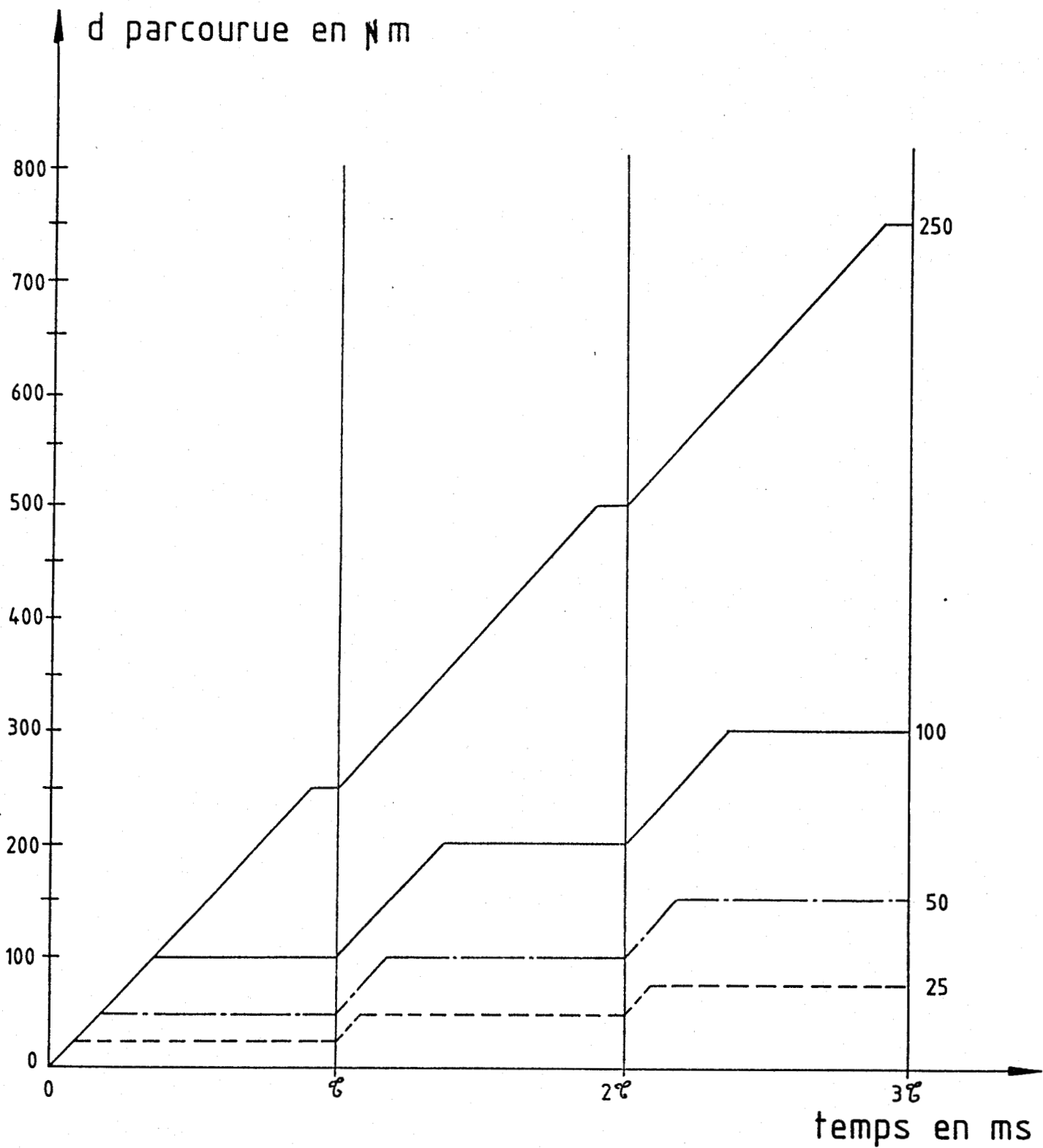
Une résolution de 1  $\mu\text{m}$  n'est pas adaptée à l'étude des plaques de chromatographie comportant des taches étalées sur plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$ . De plus, pour un temps de comptage voisin de la seconde (temps moyen de comptage pour obtenir un signal exploitable), l'analyse est beaucoup trop longue. En effet pour balayer une zone de 1 cm avec un temps de comptage de 1 s. il faut 2 h.46'.

Entre le compteur de photons et le mécanisme de déplacement, un multiplicateur d'impulsions a été réalisé pour permettre de modifier le pas d'avancement de la platine. Ce dispositif permet de diminuer considérablement le temps d'analyse et d'obtenir rapidement les informations avant une dégradation importante des produits déposés sur la plaque.

Comme la vitesse de déplacement de la platine pendant le train d'impulsions demeure constante pour tous les facteurs multiplicatifs (2,78  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), on ne peut pas considérer que la plaque reste immobile pendant tout le temps de comptage. Comme le montre le diagramme représenté sur la Figure 4, pour un temps de comptage  $\tau$ , on observe une période de translation et une période d'arrêt.



**FIG. 3: ADAPTATION A LA MICROSONDE MOLE D'UN SYSTEME DE BALAYAGE CHROMATOGRAPHIQUE**



**FIG. 4:** DIAGRAMME DE FONCTIONNEMENT DE LA PLATINE A  
 DEPLACEMENT MICROMETRIQUE

Si pour les faibles valeurs du facteur de proportionnalité (10, 25 et 50) la valeur affichée sur l'indicateur de déplacement correspond bien à la position du point analysé, une grande partie de la mesure réalisée avec des facteurs de proportionnalité élevés (100 et 250) est faite au cours du déplacement de la plaque devant le faisceau LASER.

Dans le premier cas, on obtient une bonne résolution spatiale, mais la focalisation du faisceau LASER sur un même point pendant tout le temps de comptage, peut conduire à une dégradation de l'échantillon.

Dans le second cas, on a un résultat intégré sur une zone plus large mais le déplacement de l'échantillon par rapport au point de focalisation réduit considérablement les effets photoniques sur les substances étudiées.

ANNEXE 3

RÉSOLUTION SUR MICROORDINATEUR

DE LA MÉTHODE DE GAUSS-JORDAN

Le problème posé est la résolution d'un système expérimental de n équations à m inconnues. Il s'agit donc :

- d'une part, de le transformer en un système mathématiquement résolvable ;
- d'autre part, de le résoudre à l'aide d'un traitement informatique approprié.

### 1. ETUDE MATHEMATIQUE

Soit un système expérimental de n équations à m inconnues

$$\begin{array}{rcl}
 a_{11} x_1 + a_{12} x_2 + \dots & & a_{1m} x_m = D_1 \text{ observé} \\
 a_{21} x_1 + a_{22} x_2 + \dots & & + a_{2m} x_m = D_2 \text{ observé} \\
 \cdot & & \\
 \cdot & & \\
 \cdot & & \\
 \cdot & & \\
 a_{n1} x_1 + a_{n2} x_2 + \dots & & + a_{nm} x_m = D_n \text{ observé}
 \end{array}$$

Ce système expérimental n'est pas nécessairement résolvable. Il faut donc le transformer en un système mathématiquement résolvable. Pour cela, nous utilisons la méthode des moindres carrés. Cela consiste à trouver les solutions  $(x_1, x_2, \dots, x_m)$  telles que la somme des différences ( $D_{\text{observé}} - D_{\text{calculé}}$ ) au carré soit minimale.



$$\sum_{i=1}^n (D_i \text{ observé} - D_i \text{ calculé})^2 \text{ minimale avec } D_i \text{ cal} = \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j$$

$$\Leftrightarrow \sum_{i=1}^n (D_i \text{ observé} - \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j)^2 \text{ minimale}$$

Pour que cette somme soit minimale, il faut et il suffit que sa dérivée par rapport à chaque variable soit nulle.

$$\frac{d}{dx_K} \left( \sum_{i=1}^n (D_i \text{ obs} - \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j)^2 \right) = 0 \text{ pour } K \text{ variant de } 1 \text{ à } m$$

$$\frac{d}{dx_K} \left( \sum_{i=1}^n (D_i \text{ obs})^2 + \left( \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j \right)^2 - 2 (D_i \text{ obs}) \left( \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j \right) \right) = 0$$

$$\frac{d}{dx_K} \left( \sum_{i=1}^n (D_i \text{ obs})^2 + \sum_{j=1}^m \sum_{K=1}^m a_{ij} a_{iK} x_K - 2 D_i \text{ obs} \left( \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j \right) \right) = 0$$

$A_K$

pour  $K$  variant de 1 à  $m$

pour  $K = 1$

$$A_1 = \sum_{i=1}^m (2 \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j a_{i1} - 2 D_{i \text{ obs}} a_{i2}) = 0$$

pour  $K = 2$

$$A_2 = \sum_{i=j}^m (2 \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j a_{i2} - 2 D_{i \text{ obs}} a_{i2}) = 0$$

pour  $K = m$

$$A_m = \sum_{i=1}^n (2 \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j a_{im} - 2 D_{i \text{ obs}} a_{im}) = 0$$

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m a_{ij} x_j a_{im} = \sum_{i=1}^n D_{i \text{ obs}} a_{im}$$

Nous obtenons ainsi un système mathématiquement résolvable de m équations à m inconnues.

$$\sum_{i=1}^n \left( \sum_{j=1}^m a_{ij} a_{iK} x_j \right) = \sum_{i=1}^n D_{i \text{ obs}} a_{iK} \text{ pour } K \text{ variant de } 1 \text{ à } m$$

Nous avons ensuite cherché une résolution informatique de ce système, en nous basant sur les critères suivants : facilité de programmation, exécution rapide des calculs. Notre choix s'est porté sur la méthode dite de "Gauss-Jordan" utilisée par YOUNG en infrarouge, qui s'applique aux systèmes d'équations linéaires. Elle utilise le calcul matriciel et s'appuie sur le fait que ces systèmes ne sont pas affectés par des modifications du type : inversion de deux équations, multiplication d'une équation par un nombre non nul, ... Elle aboutit ensuite aux solutions à l'aide du procédé par élimination suivant :

Soit un système de  $m$  équations à  $m$  inconnues :

$$a_{11} x_1 + a_{12} x_2 + \dots + a_{1m} x_m = D_1$$

$$a_{21} x_1 + a_{22} x_2 + \dots + a_{2m} x_m = D_2$$

.

.

.

$$a_{m1} x_1 + a_{m2} x_2 + \dots + a_{mm} x_m = D_m$$

Le système est représenté par la matrice carrée des coefficients  $(a_{11}, \dots, a_{mm})$  et une colonne supplémentaire formée des constantes  $(D_1, \dots, D_m)$

$$a_{11} \quad a_{12} \quad \dots \quad a_{1m} \quad D_1$$

$$a_{21} \quad a_{22} \quad \dots \quad a_{2m} \quad D_2$$

.

.

.

$$a_{m1} \quad a_{m2} \quad \dots \quad a_{mm} \quad D_m$$

Formation de la première colonne de la nouvelle matrice

*ligne 1 divisée par  $a_{11}$*

$$\begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{12}}{a_{11}} & \dots \\ a_{21} & a_{22} & \dots \\ \cdot & & \\ \cdot & & \\ \cdot & & \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots \end{bmatrix}$$

*ligne 2 - ( $a_{21} \times$  ligne 1)*

$$\begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{12}}{a_{11}} & \dots \\ a_{21} - a_{21} & a_{22} - (a_{22} \times \frac{a_{12}}{a_{11}}) & \dots \\ \cdot & & \\ \cdot & & \\ \cdot & & \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots \end{bmatrix}$$

*ligne m - ( $a_{m1} \times$  ligne 1)*

$$\begin{bmatrix} 1 & A_{12} & \dots \\ 0 & A_{22} & \dots \\ 0 & A_{m2} & \dots \end{bmatrix}$$

Formation de la seconde colonne

ligne 2 divisée par  $A_{22}$

ligne 1 - ( $a_{12}$  × ligne 2)

ligne m - ( $a_{m2}$  × ligne 2)

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & A_{13} & \dots\dots \\ 0 & 1 & A_{23} & \dots\dots \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & \cdot & & \\ 0 & 0 & A_{m3} & \dots\dots \end{bmatrix}$$

Formation de la  $K^{i\text{ème}}$  colonne

ligne k divisée par  $a_{kk}$

ligne 1 - ( $a_{1K}$  × ligne K)

ligne 2 - ( $a_{2K}$  × ligne K)

·

·

·

exclure ligne K

·

·

·

ligne m - ( $a_{mk}$  × ligne K)

Nous aboutissons  
à la matrice

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & X_1 \\ 0 & 1 & & X_2 \\ & & & \\ & & & \\ 0 & 0 & 1 & X_m \end{bmatrix}$$

Matrice unitaire    Colonne  
supplémentaire  
formée des so-  
lutions du  
système d'équa-  
tion

Cette méthode ne présente pas de difficultés majeures quant à son utilisation. Son seul inconvénient est qu'elle ne peut être appliquée à un système dont un des éléments de la diagonale serait nul (cela aboutirait à une division par zéro. Il est alors possible de pallier à ce problème par un réarrangement de matrice). Dans notre cas, chaque coefficient du système est non nul. Nous retenons donc la méthode de Gauss-Jordan pour la résolution de nos systèmes d'équations.

En conclusion, nous présentons une application de notre étude mathématique au système suivant :

$$\begin{array}{rcl} 2 X_1 + X_2 & = & 4 \\ 2 X_1 + 2 X_2 & = & 6 \end{array} \quad \text{qui admet pour solutions} \quad \begin{array}{l} X_1 = 1 \\ X_2 = 2 \end{array}$$

Système obtenu par la méthode des moindres carrées

$$\begin{array}{rcl} 8 X_1 + 6 X_2 & = & 20 \\ 6 X_1 + 5 X_2 & = & 16 \end{array}$$

Matrices obtenues par la méthode de Gauss-Jordan

$$\begin{bmatrix} 8 & 6 & 20 \\ 6 & 5 & 16 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 1 & 3/4 & 5/2 \\ 0 & 1/2 & 1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 2 \end{bmatrix}$$

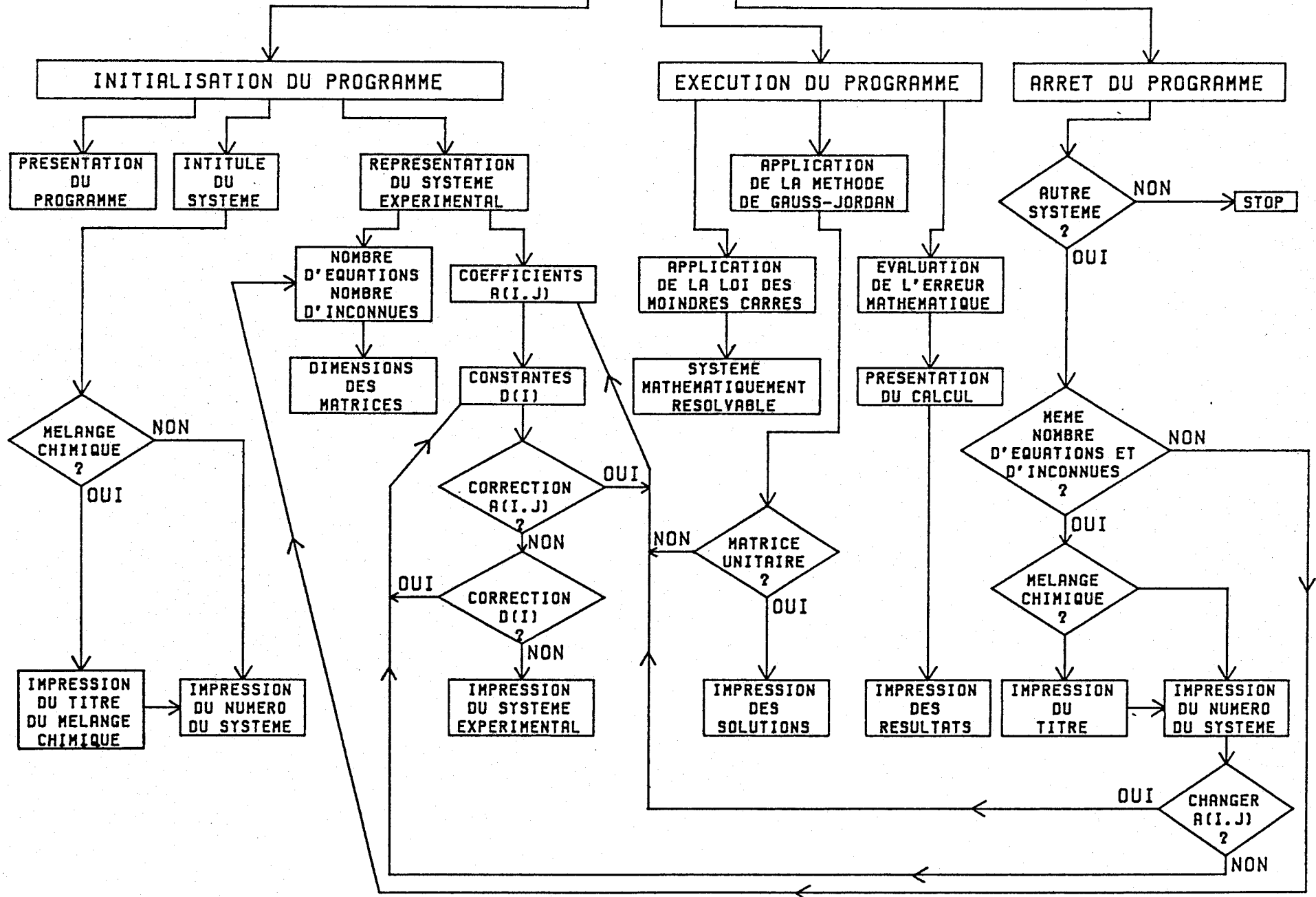
Nous trouvons bien la matrice unitaire  $\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$  et une colonne  $\begin{array}{l} X_1 = 1 \\ X_2 = 2 \end{array}$ .

## 2. ETUDE INFORMATIQUE

Tous les calculs développés dans le paragraphe précédent sont réalisés à l'aide d'un microordinateur COMMODORE. Le programme écrit en langage BASIC se présente de la façon suivante : (voir arbre programmatique). On trouvera ensuite le listing du programme.

Une étude a été réalisée dans les conditions les plus défavorables (3 équations pour 3 inconnues) sur 9 systèmes. Une variation de  $\pm 5\%$  des coefficients  $a_{ij}$  ou  $z_i$  implique une erreur au plus égale à  $10\%$  sur les solutions du système. Une variation de  $\pm 10\%$  amène une erreur de  $20\%$ . Si l'on admet donc une erreur expérimentale sur les mesures des  $a_{ij}$  et  $z_i$  de  $5\%$ , les résultats seront donc donnés à  $10\%$  près. On notera que cette erreur ira en décroissant quand le nombre d'équations augmente.

# RESOLUTION D'UN SYSTEME DE N EQUATIONS A M INCONNUES





```

1 OPEN1,4:CMD1
2 LIST
3 REM
4 REM
5 REM
6 REM RESOLUTION D'UN SYSTEME DE N EQUATIONS LINEAIRES A M INCONNUES
7 REM
8 REM
9 REM INITIALISATION DU PROGRAMME
10 REM
11 REM
12 REM PRESENTATION DU PROGRAMME
13 REM
14 REM
20 PRINT:PRINT:PRINT"JE M'APPELLE NATHALIE.....BONJOUR!":PRINT:PRINT
30 INPUT"QUEL EST VOTRE PRENOM";CA$:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
40 PRINTCA$". JE VAIS VOUS AIDER A RESOUDRE UN SYSTEME D'EQUATIONS EXPERIMENTAL
50 PRINT:PRINT
60 PRINT"JE LE TRANSFORME EN UN SYSTEME MATHEMATIQUEMENT RESOLVABLE"
70 PRINT"J'UTILISE POUR CELA LA METHODE DES MOINDRES CARRES"
80 PRINT"J'APPLIQUE ENSUITE LA METHODE DE GAUSS-JORDAN POUR LE RESOUDRE"
90 PRINT:PRINT"TOUTES LES DONNEES VOUS SERONT DEMANDEES AU DEBUT DU CALCUL"
100 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT"APRES CES QUELQUES RAPPELS,"CA$". COMMENCONS ENSEMBL
110 FOR I=1 TO 9000:NEXT I:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
111 GO TO 119
112 RUN 113
113 OPEN 1,4:NO$="OUI"
114 REM
115 REM
116 REM INTITULE DU SYSTEME
117 REM
118 REM
119 PRINT"ETUDIEZ-VOUS UN MELANGE DE COMPOSES CHIMIQUES?-REPOUDRE OUI OU NON-"
121 PRINT:INPUTFG$
123 IF FG$="NON" THEN 150
125 PRINT:PRINT:PRINT"LE MELANGE ETUDIE? -LE DEFINIR EN LIGNES MAXIMUM-":PF
126 REM
127 REM
128 REM IMPRESSION DU TITRE DU MELANGE CHIMIQUE OU DU NUMERO DU SYSTEME
129 REM
130 REM
131 PRINT#1,"MELANGE ETUDIE"
140 PRINT#1,"":PRINT#1,TAB(5);DD$:PRINT#1
150 PRINT:PRINT:INPUT"LE NUMERO DU SYSTEME";EE$:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
160 PRINT#1,"NUMERO DU SYSTEME: "EE$
170 PRINT#1,"":PRINT#1:PRINT#1
171 REM
172 REM
173 REM REPRESENTATION DU SYSTEME EXPERIMENTAL
174 REM
175 REM
176 REM NOMBRE D'EQUATIONS ET NOMBRE D'INCONNUES
177 REM
178 REM
180 PRINT"VOTRE SYSTEME SE COMPOSE DE EQUATIONS A INCONNUES":PRINT:PRI
190 INPUT"COMBIEN Y A-T-IL D'EQUATIONS";E:PRINT
200 INPUT"COMBIEN D'INCONNUES DESIREZ-VOUS CALCULER";M
201 REM
202 REM

```

```

203 REM      DIMENSIONS DES MATRICES
204 REM
205 REM
208 DIM(E)
210 DIMA(E,M):DIMC(M,M):DIMD(E):DIMB(E):DIMG(M,M+1):DIMH(M,M+1):DIMJ(E):DIM
215 IF NO#="OUI" THEN 250
220 PRINT:PRINT:PRINTCA#",VOTRE SYSTEME SE PRESENTE DONC SOUS LA FORME:";PRINT
230 PRINT:PRINT"      SOMME DES ( A(I,J)*B(J) ) = D(I)"
240 PRINT:PRINT:PRINT"POUR      I= 1 A"E"      ET      J= 1 A"M:FOR I=1 TO 7000
NEXT I
250 PRINT:PRINT
251 REM
252 REM
253 REM      COEFFICIENTS A(I,J) ET CONSTANTES D(I)
254 REM
255 REM
260 PRINTCA#",DITES-MOI D'ABORD EN COMBIEN DE CHIFFRES S'EXPRIMENT LES A(I
"
270 PRINT:PRINT
280 PRINT"VERIFIEZ BIEN QUE VOUS ME DONNEZ LA VALEUR LA PLUS GRANDE!"
290 PRINT:INPUTF
300 PRINT:PRINT:PRINTCA#",DONNEZ-MOI MAINTENANT LES VALEURS DES COEFFICIENTS A
I,J) ET D(I)"
310 PRINT:PRINT:FOR L=1 TO E
320 PRINT" EQUATION L:PRINT
330 FOR C=1 TO M
340 PRINT" A(L,"C") = ";PRINT
350 INPUTA(L,C):PRINT
360 NEXT C:PRINT
370 PRINT" D(L) = ";PRINT:INPUTD(L)
380 PRINT:PRINT:PRINT:NEXT L:PRINT:PRINT:PRINT
390 GO TO 430
400 FOR L=1 TO E
410 PRINT" D(L) = ";PRINT:INPUT D(L):PRINT:PRINT:PRINT
420 NEXT L
430 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT"LE SYSTEME A RESOUDRE EST DONC LE SUIVANT:";PRINT:
PRINT
440 FOR L=1 TO E
450 FOR C=1 TO M
460 IF C=M THEN 490
470 PRINTA(L,C)"* B(C)";
480 GO TO 500
490 PRINTA(L,C)"* B(C)"="D(L)
500 NEXT C:PRINT:PRINT:FOR I=1 TO 5000:NEXT I
510 NEXT L:PRINT:PRINT
511 REM
512 REM
513 REM      CORRECTION DES A(I,J) OU D(I)
514 REM
515 REM
520 INPUT"VOULEZ-VOUS CORRIGER UN COEFFICIENT? -REPOUDRE OUI OU NON-";CH#:PRI
T:PRINT
530 IF CH#="NON" THEN 640
540 INPUT"LEQUEL VOULEZ-VOUS CHANGER: A(I,J) OU D(I)? -REPOUDRE A OU D-";CR
550 PRINT:PRINT:IF CR#="A" THEN 570
560 IF CR#="D" THEN 620
570 PRINTCA#",LE COEFFICIENT A(I,J) SE CARACTERISE PAR SES INDICES I ET J"
580 PRINT:INPUT"QUELLE EST LA VALEUR DE I";L
590 PRINT:INPUT"QUELLE EST LA VALEUR DE J";C
600 PRINT:PRINT:PRINT"VALEUR CORRIGEE:";PRINT:PRINT"      A(L,"C") =
:PRINT:INPUTA(L,C)
610 GO TO 430
620 INPUT"QUEL COEFFICIENT D(I) VOULEZ-VOUS CORRIGER?-DONNER LA VALEUR DE I"
L
630 PRINT:PRINT:PRINT"VALEUR CORRIGEE:";PRINT:PRINT"      D(L) = "
NT:INPUT D(L):GOTO430

```

631 REM  
632 REM  
633 REM  
634 REM  
635 REM

IMPRESSION DU SYSTEME EXPERIMENTAL A RESOUDRE

640 IF M>10 THEN 930  
650 IF F>8 THEN 930  
660 PRINT#1,"SYSTEME EXPERIMENTAL A RESOUDRE"  
670 PRINT#1,"":PRINT#1  
680 FOR L=1 TO E  
685 IF T>64 THEN 695  
690 FOR C=1 TO M  
700 T=(((C-1)\*(F+10))+(2\*(C-2))):U=((C-1)\*(F+12)):V=(((C-1)\*10)+(C\*(F+2)):  
710 IF T>64 THEN 730  
720 GO TO 830  
730 IF T>127 THEN 790  
740 IF T<81 THEN 760  
750 GO TO 770  
760 PRINT#1  
770 T=T-64:U=U-64:V=V-64  
780 GO TO 830  
790 IF T<147 THEN 810  
800 GO TO 920  
810 PRINT#1  
820 T=T-127:U=U-127:V=V-127  
830 IF C=1 THEN 880  
840 IF C=M THEN 900  
850 PRINT#1,TAB(T);"+ ";CHR\$(141);TAB(U);A(L,C);CHR\$(141);  
860 PRINT#1,TAB(V);" \* X"C;CHR\$(141);  
870 GO TO 920  
880 PRINT#1,TAB(0);A(L,C);CHR\$(141);TAB(F+2);" \* X"C;CHR\$(141);  
890 GO TO 920  
900 PRINT#1,TAB(T);"+ ";CHR\$(141);TAB(U);A(L,C);CHR\$(141);  
910 PRINT#1,TAB(V);" \* X"C = "D(L);CHR\$(141);  
920 NEXT C:PRINT#1:PRINT#1:NEXT L:PRINT#1

921 REM  
922 REM

EXECUTION DU PROGRAMME

923 REM  
924 REM  
925 REM  
926 REM  
927 REM  
928 REM

APPLICATION DE LA LOI DES MOINDRES CARRES

930 FOR K=1 TO M  
940 FOR J=1 TO M  
950 C(K,J)=0  
960 FOR I=1 TO E  
970 C(K,J)=C(K,J)+(A(I,J)\*A(I,K))  
980 NEXT I  
990 NEXT J

1000 NEXT K  
1010 FOR K=1 TO M  
1020 B(K)=0  
1030 FOR I=1 TO E  
1040 B(K)=B(K)+(D(I)\*A(I,K))  
1050 NEXT I  
1060 NEXT K

1061 REM  
1062 REM

APPLICATION DE LA METHODE DE GAUSS-JORDAN

1063 REM  
1064 REM  
1065 REM  
1070 FOR K=1 TO M  
1080 FOR J=1 TO M  
1090 G(K,J)=C(K,J)  
1100 NEXT J

```

1120 NEXT K
1130 FOR L=1 TO M
1140 FOR C=1 TO M+1
1150 H(L,C)=G(L,C)/G(L,L)
1160 NEXT C
1170 FOR C=1 TO M+1
1180 G(L,C)=H(L,C)
1190 NEXT C
1200 FOR S=1 TO M
1210 IF S=L THEN 1230
1220 FOR C=1 TO M+1
1230 H(S,C)=G(S,C)-(G(L,C)*G(S,L))
1240 NEXT C
1250 FOR C=1 TO M+1
1260 G(S,C)=H(S,C)
1270 NEXT C
1280 NEXT S
1290 NEXT L
1291 REM
1292 REM
1293 REM
1294 REM
1295 REM
1300 PRINTCHR$(L'EMPLOI DE LA METHODE DE GAUSS-JORDAN DONNE LA MATRICE UNITAIRE

```

**VERIFICATION DE LA MATRICE UNITAIRE**

```

1310 PRINT"VOUS ALLONS DONC VERIFIER ENSEMBLE CETTE MATRICE ALIGNE PAR LIGNE"
1320 FOR I=1 TO 3000:NEXT I
1330 PRINT:PRINT:PRINT
1340 FOR L=1 TO M:PRINT"ALIGNE" L:FOR I=1 TO 1000:NEXT I:PRINT
1350 FOR C=1 TO M
1360 PRINTG(L,C);
1370 NEXT C:PRINT:PRINT:FOR I=1 TO 3000:NEXT I
1380 NEXT L:PRINT:PRINT
1390 INPUT"VOULEZ-VOUS REVERIFIER CETTE MATRICE -REPONDRE OUI OU NON-":RR#
1400 IF RR#="OUI" THEN 1330
1410 PRINT:PRINT:INPUT"LA MATRICE EST-ELLE BIEN UNITAIRE" -REPONDRE OUI OU NON

```

```

":RR#
1420 PRINT:PRINT:IF RR#="NON" THEN 2150
1421 REM
1422 REM
1423 REM
1424 REM
1425 REM

```

**IMPRESSION DES SOLUTIONS**

```

1430 PRINT:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT"LES SOLUTIONS DU SYSTEME SONT DONC":F
PRINT:PRINT:PRINT
1440 FOR L=1 TO M
1450 C=M+1
1460 PRINT" L" = "G(L,C):FOR I=1 TO 1000:NEXT I:PRINT:PRINT
1470 NEXT L:PRINT:PRINT:PRINT:PRINT
1480 PRINT#1,"SOLUTIONS DU SYSTEME"
1490 PRINT#1,"":PRINT#1
1500 FOR L=1 TO M
1510 C=M+1
1520 PRINT#1,"%L"="G(L,C):PRINT#1
1530 NEXT L:PRINT#1
1535 IF NO#="OUI" THEN 1640
1536 REM
1537 REM
1538 REM
1539 REM
1540 REM

```

**EVALUATION DE L'ERREUR MATHEMATIQUE**

```

1541 PRINT"RECALCULONS AVEC LES SOLUTIONS TROUVEES LES COEFFICIENTS D(I):DICALC
1550 PRINT:PRINT
1560 PRINT"POUR EVALUER LA PRECISION DES RESULTATS,COMPARONS DICALC(I) A D
(I)"

```

```

1580 PRINT:PRINT"LA FORMULE UTILISEE EST LA SUIVANTE:"PRINT
1590 PRINT" | D(OBS(I)-D(OBS(I)) | "
1600 PRINT" | | | * 100 = SR(D)"
1610 PRINT" | (D(OBS(I))+D(OBS(I)))/2 | "
1620 PRINT:PRINT"SR(D) EXPRIMEE EN % REPRESENTE L'INCERTITUDE RELATIVE SUR LE
D(I)"

```

```

1630 FOR I=1 TO 1500:NEXT I:PRINT:PRINT
1640 FOR L=1 TO M:O=M+1:X(L)=G(L,D):NEXT L
1650 FOR L=1 TO E:I(L)=0
1660 FOR C=1 TO M
1670 I(L)=I(L)+(R(L,C)*X(C))
1680 NEXT C
1690 J(L)=(I(L)-D(L))/((I(L)+D(L))/2)*100
1695 IF J(L)<0 THEN 1700
1697 GO TO 1710
1700 J(L)=-J(L)
1710 NEXT L
1711 REM
1712 REM
1713 REM
1714 REM
1715 REM

```

IMPRESSION DES RESULTATS

```

1720 PRINT" "
1725 PRINT" | | "
1730 PRINT" D(I) | D(I) | "
1735 PRINT" OBSERVES | | CALCULES | "
1740 PRINT" ;TAB(13);" ;TAB(27);" | "
1745 PRINT" "
1750 FOR L=1 TO E
1755 PRINT" D(L);TAB(13);" | "I(L);TAB(27);" | "
1760 FOR I=1 TO 1000:NEXT I
1765 NEXT L
1770 PRINT" "
1775 PRINT:PRINT
1780 PRINT" "
1785 PRINT" | "
1790 PRINT" | "
1795 PRINT" | "
1800 PRINT" | "
1805 PRINT" | "
1810 PRINT" | "

```

```

1812 FOR L=1 TO E
1815 PRINT" J(L);TAB(17);" | "
1820 FOR I=1 TO 1000:NEXT I
1825 NEXT L
1830 PRINT" "
1840 PRINT" | "
1850 PRINT" | "
1860 PRINT" | D(I) | "
1870 PRINT" | OBSERVES | CALCULES | "
1880 PRINT" ;TAB(0);" ;TAB(13);" | " ;TAB(14);" | " ;TAB(9);"EN %";TAB(4);" | "
1890 PRINT" | "
1900 FOR L=1 TO E
1910 PRINT" ;TAB(0);" ;D(L);CHR$(141);TAB(14);" | " ;I(L);CHR$(141);
1920 PRINT" ;TAB(29);" | " ;J(L);CHR$(141);TAB(47);" | "
1930 NEXT L
1940 PRINT" | "
1950 PRINT" | "
1960 PRINT:PRINT:PRINT
1961 REM
1962 REM
1963 REM
1964 REM
1965 REM

```

ARRRET DU PROGRAMME



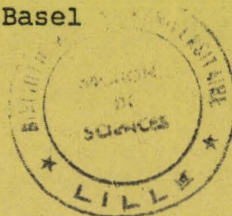
-----  
! REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES !  
-----

- ALBRECHT.A.C. J.Chem.Phys. , 34, 5, 1476 (1961)
- ALBRECHT.A.C;HUTLEY.M.C. J.Chem.Phys. , 55, 4438 (1971)
- BARBILLAT.J. Thèse de doctorat ès sciences Lille (1983)
- BEHRINGER.J. J.of.Raman Spectroscopy,  
vol 1, H.A.Szymanski Ed., Plenum, N.Y.(1967)
- CAMPBELL.S.A. Marine Biology 4, 227-232 (1969)
- CHAO.R.S.L;LIPPINCOTT.E.L. Applied spectroscopy, 30, 3, 270  
(1976)
- CZEZUGA. Hydrobiologia, 51, 1, 71 (1976)
- DALLINGER.R.F;WOODRUFF.W.H.J. J.Am.Chem.Soc., 101 (1979)
- DALLINGER.R.F;FARQUHARSON.S.;WOODRUFF.W.H;RODGERS.M.A.J.  
J.Am.Chem.Soc, 103, 7433-7440 (1981)
- DELHAYE.M;DHAMELINCOURT.P. J.of.Raman Spectros., 3, 33-34  
(1975)
- FOX.D.L. Biol.Rev. 54, p237-268 (1979)
- FUYUHIKO.I. et coll; J.of Raman Spectroscopy 3, 335-343  
(1975)
- GOODWIN.T.W. Academic press- London and New-York p127-142  
(1965)
- HEYDE.M.E;GILL.D;KILPONEN.R.G;RIMAI.L.  
J.Am.Chem.Soc., 93,p6776-6780 (1971)
- HO.Z.Z. et coll; J.Chem.Phy 77-7- (1982)
- ISLER.O. Carotenoids -Birkhauser Verlag (1971)
- IVANOVA.T.M;YANOVSKAYA.L.A;SHORYGIN.P.P.  
Opt.I.Spektrokopiya, 18, p206-211 (1965)
- JACON.M;BERJOT.M;BERNARD;  
C.R.Acad.Sci., Paris, 273 B, 595 (1971)
- JACON.M;BERJOT.M;BERNARD;  
C.R.Acad.Sci., Paris, 273 B, 956 (1971)

- JOHNSON.B.B;PETICOLAS.W.L.  
Ann.Rev.Phys.Chem., 27, 645 (1976)
- KARE.J. Fisk.Dir.Skr.Serv.Ersehing, 1, 5, 161 (1981)
- KARNAUKHOV.V.N;MILOVIDOVA.N.Y;KARGOPOLOVA.I.N.  
Comp.Biochem.Physiol. Vol 56A p189-193 (1977)
- KEATS.J. Pigments and colors p465-487 ch11
- KOMISSANOV. Biofizika, 12, 558 (1967)
- KOYAMA.Y;TAKII.T;SAIKI.K;TSUKIDA.K. Photobiochem,  
Photobiophys., 5, p139-150 (1983)
- LIPPERT.J.L;TYMINSKI.D;DESMEULES.P.J.  
J.Am.Chem.Soc 98-7075 (1976)
- LUTZ.M;AGALIDIS.I;HERVO.G;COGDELL.R.J;REISS-HUSSON.F.  
Biochim, Biophys.Acta, 503, p287-303 (1978)
- MERLIN.J.C. Thèse doct ès Sciences, Lille (1979)
- MINGARDI.M;SIEBRAND.W. J.Chem.Phys., 62, 1074 (1975)
- MINGARDI.M;SIEBRAND.W;VAN LABEKE.D;JACON.M.  
Chem.Phys.Letters, 31, 208 (1975)
- MORTENSEN.O.S. Chem.Phys.Letters., 5, 1965 (1970)
- MYERS.A.B. et coll; J.Chem.Phy 77-7 (1982)
- NOEL.P.Y; Bulletin de la société zoologique de France  
Tome 108, No 2, p196 (1983)
- PETICOLAS.W.L;NAFIE.L;STEIN.P;FANCONI.B.  
J.Chem.Phys., 53, 1576 (1970)
- PHAM.V.T; Thèse doctorat 3e cycle Physique (1976)
- RIMAI.L.;HEYDE.M.E;GILL.D.  
J.Am.Chem.Soc., 95, p4493-4501 (1973)
- RINGELBERG.J;HALLEGRAESS.G.M.  
Hydrobiologio, Tome 51, p113-118 (1976)
- SAITO.S;TASUMI.M. J.Raman.Spectros. 14(5) p310-321 (1983)



- SAITO.S. et coll; Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan
- SALARES.V.R;MENDELSON.R;CAREY.P.R;BERNSTEIN.H.J.  
J.of.Phy.Chem. , Vol 80, No 11 (1976)
- SALARES.V.R;YOUNG.N.M;CAREY.P.R;BERNSTEIN.H.J.  
J.Raman.Spectros. 6(6), 282-288 (1977)
- SCHIGEKI.S. et coll; Journal of Raman Spectroscopy,  
Vol 14, No 5 (1983)
- SCHUGERL.F.B;KUZMANY.H. J.Chem.Phys. 74(2) 953-958 (1981)
- SHORYGIN.P.P. Russian.J.Phys.Chem., 40, 367 (1971)
- STAHL.E. "Thin layer chromatography-A laboratory handbook"  
Springer Verlag- Berlin, Heidelberg, New-York  
p553 (1965)
- STERN.E.S;TIMMONS.C.J. Electronic Absorption Spectroscopy in  
Organic Chemistry  
Arnold Edward Ltd- London (1970)
- SUFRA.S. et coll; Journal of Raman Spectroscopy,  
Vol 6, No 6 (1977)
- TANAKA.Y;KATAYAMA.T. Mem.Fac.Fish.Kagoshima Univ. Vol 28  
p9-16 (1979)
- TANG.J;ALBKNECHT.A.C. "Raman spectroscopy", vol 2,  
H.A.Szymanski.Ed., Plenum N.Y. (1970)
- VAN LABEKE.D. Thèse doct-ès sciences, Reims (1975)
- VUILLAUME. Les pigments des invertébrés, Masson (1969)
- WEEDON. Chem.and.Biochem.of plant pigments  
Chapter 3 - p75-125  
Academic press- London and New-York (1965)
- WILLIAMS.R.W;DUNKER.A.K;PETICOLAS.W.L.  
Febs Lett 115, 306 (1980)
- YOUNG. Components mixtures  
"Infrared and Raman Spectroscopy" p410-420 part B  
Mariel Decker, INC New York and Basel



RESUME :

Le travail présenté dans ce mémoire permet de préciser les possibilités et les limites de la spectrométrie Raman de résonance (S.R.r) appliquée à l'étude des caroténoïdes, et de comparer cette technique à la spectrométrie d'absorption visible généralement utilisée pour étudier ces pigments.

L'évaluation de la quantité globale des caroténoïdes d'un mélange est possible mais impose, pour obtenir une précision raisonnable un choix judicieux du caroténoïde de référence et d'une longueur d'onde d'excitation pour laquelle les coefficients d'exaltation sont les plus proches. Ce choix de la référence, relativement simple en spectrométrie d'absorption est difficile en S.R.r à cause de la similitude des spectres. La connaissance des coefficients d'exaltation nécessite le tracé des profils d'excitation des différents constituants du mélange donc une séparation complète et une purification des constituants.

Les concentrations relatives des n constituants d'un mélange peuvent être déterminées en mettant à profit le profil d'excitation propre de chaque caroténoïde. Une corrélation établie entre le maximum d'absorption visible et l'intensité d'une raie Raman pour une longueur d'onde d'excitation fixe située dans le domaine de la prérésonance, permet de s'affranchir de l'opération de purification des constituants nécessaire lors des études réalisées en spectrométrie d'absorption visible.

La S.R.r ne permet pas une différenciation très fine des caroténoïdes car les principales caractéristiques spectrales sont très peu affectées par les différents groupements terminaux distinguant les caroténoïdes entre eux. Cependant une analyse approfondie des spectres permet de déterminer la longueur de la chaîne et de différencier les polyènes des polyisoprènes.

Le couplage entre une technique de séparation : la chromatographie sur couche mince (CCM) et la microanalyse par effet Raman permet de repérer et de caractériser rapidement les pigments d'un mélange. Une application à l'étude par S.R.r de la pigmentation d'un organisme marin : la moule "Mytilus edulis" est présentée. L'existence d'un nouveau type de pigment polyénique a pu être démontré

MOTS CLEFS :

Caroténoïdes  
Raman de résonance