

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

DANIEL GOULET

Spectroscopie photoacoustique de différents types
d'hémoglobine et quelques applications médicales

(MARS 1983)

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont collaboré à la réalisation de mon projet de maîtrise en biophysique, et, tout particulièrement :

- Le Dr Roger M. Leblanc, mon directeur de thèse, qui m'a donné l'opportunité d'accéder à son expérience de chercheur fort utile pour mener mon projet de recherche à bon terme;
- Le Dr Mário Fragata, en tant que directeur du Comité d'études avancées en biophysique, pour avoir suivi mon dossier académique de près tout au long de ma maîtrise;
- Le Dr Rogath Gagnon, directeur du module de biologie médicale qui s'est intéressé au cheminement pédagogique de ma maîtrise;
- M. Louis Marcotte, responsable du laboratoire d'hématologie au Centre Hospitalier Ste-Marie de Trois-Rivières, qui a bien voulu me fournir les nombreux prélèvements sanguins essentiels à l'étude de l'hémoglobine;
- Le Dr Jacques Dufresne et M. Antoine Léveillé, du Centre Hospitalier du Haut-Richelieu, pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'étude de la protoporphyrine dans les cas d'intoxication au plomb;

- Mme Marie-Josée Lacroix-Goulet, stagiaire en Biologie Médicale, pour s'être impliquée dans l'approche cytophysique différentielle en spectroscopie photoacoustique.

Je ne voudrais pas oublier tous ceux du Centre de recherche en photobiophysique, qui m'ont permis de m'impliquer dans une vie de chercheur très enrichissante.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
 Premier chapitre : INTRODUCTION	 1
1.1 Généralités	2
1.2 Spectroscopie photoacoustique	3
1.2.1 Principes de base de la spectroscopie photoacoustique	3
1.2.2 Saturation photoacoustique	11
1.3 Le pigment biologique hémoglobine	14
1.3.1 Contexte moléculaire	15
1.3.2 Caractéristiques spectrales des intermédiaires de l'hémoglobine	22
1.3.3 Spectres photoacoustiques de l'hémoglobine	25
1.4 But du projet	25
 Deuxième chapitre : Le spectromètre photoacoustique et ses composantes	 28
2.1 Diagramme schématique de l'instrumentation	28
2.2 Les composantes du spectromètre	30
2.2.1 Source lumineuse	30
2.2.2 Monochromateur	30
2.2.3 Modulateur de fréquence	31

	Page
2.2.4 Enceinte photoacoustique	31
2.2.5 Microphone et préamplificateur	39
2.2.6 Amplificateur synchrone	41
2.2.7 Enregistreur	41
2.2.8 Système de traitement des données	42
 Troisième chapitre : Méthodes expérimentales	 44
3.1 Etat physico-chimique des échantillons	44
3.2 Types de support-échantillon	46
3.2.1 Lamelle de verre	47
3.2.1.1 Description technique	47
3.2.1.2 Préparation des échantillons	47
3.2.1.3 Essais et spectre photoacoustique	48
3.2.2 Filtre Nucléopore	51
3.2.2.1 Description technique	51
3.2.2.2 Essais et spectre photoacoustique	51
3.2.3 Filtre Pellicon	54
3.2.3.1 Description technique	54
3.2.3.2 Essais et spectre photoacoustique	54
3.2.4 Filtre Millipore	57
3.2.4.1 Description technique	57
3.2.4.2 Préparation des échantillons	58
3.2.4.3 Essais et spectre photoacoustique	58
3.3 Echantillons à atmosphère contrôlée	59

	Page
Quatrième chapitre : Résultats et discussion	67
4.1 Traitement des données en spectroscopie photoacoustique	67
4.2 Spectre photoacoustique d'hémoprotéines sur lamelle	69
4.2.1 Spectre photoacoustique d'hémoprotéines à l'état de solide cristallin	73
4.2.2 Spectre photoacoustique du sang total à différentes fréquences de modulation	77
4.2.3 Spectre photoacoustique du sang et d'hémoglobine purifiée à différentes dilutions	79
4.3 Spectre photoacoustique de sang total dilué sur filtre Millipore	93
4.4 Spectre photoacoustique et d'absorption de quelques intermédiaires de l'hémoglobine	106
4.4.1 Oxyhémoglobine	108
4.4.2 Carboxyhémoglobine	112
4.4.3 Hémioglobine	119
4.5 Spectre photoacoustique de la protoporphyrine impliquée dans certaines pathologies médicales	119
4.6 Approches histologiques et cytologiques en spectroscopie photoacoustique	126
4.6.1 Spectre photoacoustique de <i>stratum corneum</i> en présence de PABA comme agent protecteur contre le rayonnement solaire	127
4.6.2 Spectre photoacoustique de tissus humains de nature saine et tumorale	128
4.6.3 Approche de la cytophysique différentielle en spectroscopie photoacoustique	131
CONCLUSION	139
PROJETS À VENIR	141
APPENDICES	143
BIBLIOGRAPHIE	152

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 - Diagramme énergétique d'un chromophore	4
Figure 2 - Coupe longitudinale des frontières physiques impliquées dans le phénomène photoacoustique	8
Figure 3 - Pente de saturation photoacoustique	12
Figure 4 - Modèles hypothétiques de non-saturation photo- acoustique	13
Figure 5 - Liaisons hème-globine	16
Figure 6 - Structure moléculaire du complexe protoporphyrine IX-fer	18
Figure 7 - Réarrangement des spins pour les électrons 3 de l'atome de fer	20
Figure 8 - Mécanisme de contact O ₂ -globines	21
Figure 9 - Localisation des électrons π de l'hémo- globine	24
Figure 10 - Diagramme schématique du spectromètre photo- acoustique	29
Figure 11A - Vue de plan et coupe longitudinale du porte- fenêtre	33
Figure 11B - Vue de plan de l'enceinte photoacoustique	35
Figure 11C - Coupe longitudinale de l'enceinte photo- acoustique	36
Figure 12 - Coupe longitudinale médiane du système de soupape	37
Figure 13 - Schéma du microphone condensateur-electret	40
Figure 14 - Diagramme du circuit électronique du préamplifi- cateur	40
Figure 15 - Spectre photoacoustique d'une lamelle de verre	49

Figure 16	-	Pente de saturation d'une lamelle de verre	50
Figure 17	-	Spectres photoacoustiques d'un filtre Nucléopore	52
Figure 18	-	Pente de saturation d'un filtre Nucléopore	53
Figure 19	-	Spectres photoacoustiques d'un filtre Pellicon	55
Figure 20	-	Pente de saturation d'un filtre Pellicon	56
Figure 21	-	Spectres photoacoustiques d'un filtre Millipore	60
Figure 22	-	Pente de saturation d'un filtre Millipore	61
Figure 23	-	Uniformité de l'étalement sur les supports- échantillon	62
Figure 24	-	Spectres photoacoustiques du noir de charbon en présence de différents gaz	64
Figure 25	-	Pente de saturation du noir de charbon	68
Figure 26	-	Spectres photoacoustiques du noir de charbon dans l'en- ceinte à atmosphère, sur lamelle	71
Figure 27	-	Spectres photoacoustiques du noir de charbon dans l'en- ceinte à atmosphère contrôlée	72
Figure 28	-	Spectre photoacoustique de l'hémoglobine à l'état de poudre cristalline, sur lamelle	74
Figure 29	-	Spectre photoacoustique de la myoglobine à l'état de poudre cristalline, sur lamelle	75
Figure 30	-	Spectre photoacoustique de l'hématine, sur lamelle	76
Figure 31	-	Spectre photoacoustique de sang total (ST) à différentes fréquences de modulation, sur lamelle	78
Figure 32	-	Spectre photoacoustique d'hémoglobine (Hb) (10), sur lamelle	80
Figure 33	-	Spectre photoacoustique de Hb (100), sur lamelle	81
Figure 34	-	Spectres photoacoustiques de Hb (500) et Hb (1000), sur lamelle	82
Figure 35	-	Pentes de saturation de Hb, sur lamelle	84

	Page
Figure 36 - Spectres photoacoustiques de ST(2), ST(5) et ST(10), sur lamelle	85
Figure 37 - Spectres photoacoustiques de ST(50), ST(100) et ST(500), sur lamelle	86
Figure 38 - Spectres photoacoustiques de ST(1000) et ST(2500), sur lamelle	87
Figure 39 - Pente de saturation de ST dilué, sur lamelle	89
Figure 40 - Pente de saturation de ST dilué, sur lamelle	90
Figure 41 - Spectre photoacoustique de ST, GR et Hb, sur lamelle	91
Figure 42 - Pentes de saturation de ST, GR et Hb, sur lamelle	92
Figure 43 - Spectres photoacoustiques de ST(50) _{f₁} , sur filtre Millipore	94
Figure 44 - Spectres photoacoustiques de ST(50) _{f₁} , ST(100) _{f₂} et ST (500) _{f₁₀} , sur filtre Millipore	95
Figure 45 - Spectres photoacoustiques de ST(50) _{f₁} , _{f₁₀} , sur filtre Millipore	97
Figure 46 - Spectres photoacoustiques de ST(2500) _{f₁} , _{f₁₀} , sur filtre Millipore	98
Figure 47 - Spectres photoacoustiques de ST(2500) _{f₁} , _{f₂} , _{f₁₀} , sur filtre Millipore	99
Figure 48 - Spectres photoacoustiques de ST, GR et Hb, sur filtre Millipore	100
Figure 49 - Pente de saturation de ST(50) _{f₁} , sur filtre Millipore	101
Figure 50 - Pente de saturation de ST(100) _{f₂} et ST(500) _{f₁₀} , sur filtre Millipore	102
Figure 51 - Pente de saturation de ST(50) _{f₁} , _{f₁₀} , sur filtre Millipore	103
Figure 52 - Pente de saturation de ST(2500) _{f₁} , _{f₂} , _{f₁₀} , sur filtre Millipore	104

Figure 53	-	Pente de saturation de ST, GR et Hb, sur filtre Millipore	105
Figure 54	-	Pente de saturation de ST(50) _{f2} , sur filtre Millipore	107
Figure 55	-	ST(50) sous forme HbO ₂ dans l'enceinte photo-acoustique à atmosphère non-contrôlée	109
Figure 56	-	ST(50) sous forme HbO ₂ dans l'enceinte photo-acoustique à atmosphère contrôlée	110
Figure 57	-	ST(50) sous forme HbO ₂ en spectroscopie d'absorption	111
Figure 58	-	ST(50) sous forme HbCO dans l'enceinte photo-acoustique à atmosphère non-contrôlée	113
Figure 59	-	ST(50) sous forme HbCO dans l'enceinte photo-acoustique à atmosphère contrôlée	114
Figure 60	-	Différentes transitions spectrales de ST(50) sous la forme HbO ₂ et HbCO dans l'enceinte photoacoustique à atmosphère non-contrôlée	115
Figure 61	-	Différentes transitions spectrales de ST(50) sous la forme HbO ₂ et HbCO dans l'enceinte photoacoustique à atmosphère contrôlée	116
Figure 62	-	ST(50) sous forme HbCO en spectroscopie d'absorption	117
Figure 63	-	Différentes transitions spectrales de ST(50) sous la forme HbO ₂ et HbCO en spectroscopie, d'absorption	118
Figure 64	-	ST(50) sous la forme HbO ₂ et HI dans l'enceinte photo-acoustique à atmosphère contrôlée	120
Figure 65A	-	ST(50) sous la forme HI en spectroscopie d'absorption	121
Figure 65B	-	ST(50) sous la forme HI en spectroscopie d'absorption	122
Figure 66	-	Spectres photoacoustiques de la protoporphyrine en fonction d'une intoxication au plomb	125
Figure 67	-	Spectre photoacoustique du glyceryl PABA	129

Figure 68	- Spectres photoacoustiques de l'application topique du glyceryl PABA sur l'épiderme sec ou hydraté	130
Figure 69	- Spectres photoacoustiques de tissus sains et tumoraux d'origine mammaire	132
Figure 70	- Spectres photoacoustiques du support-échantillon adéquat pour la méthode de cytophysique différentielle	134
Figure 71	- Cinétique de la réaction de Feulgen déterminée par le signal photoacoustique à 565 nm	136
Figure 72	- Spectres photoacoustiques de la cytophysique différentielle des carcinomes pulmonaires	137

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I - Le spin du groupement hème en présence de ligand	19
Tableau II - Structures porphyriques absorbantes	22
Tableau III - Bandes spectrales des intermédiaires de l'hémoglobine humaine	23
Tableau IV - Relation entre la variation de l'intensité photo-acoustique du noir de charbon en présence de différents gaz et les propriétés physiques du gaz	65

Citations : "Le point décisif est ici d'avoir reconnu que toute tentative est vouée à l'échec, qui aurait pour but d'analyser à l'aide des méthodes et des concepts de la physique classique l'individualité des processus atomiques qui résulte de l'existence du quantum d'action et cela parce qu'il est impossible de séparer nettement un comportement non perturbé des objets atomiques de leur interaction avec les instruments de mesure pour cette analyse"

(p. 34)

"Il faut d'abord se rendre compte que tout dispositif expérimental permettant d'étudier le comportement des atomes constituant un organisme dans la même mesure où l'on peut le faire pour des atomes individuels dans les expériences fondamentales de physique atomique - exclura la possibilité de maintenir cet organisme en vie".

(p. 37)

Ref. Physique atomique et connaissance humaine, Ed. Gonthier, Paris, 1961.

Neils Bohr (1885-1962)

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1 Généralités

Depuis l'origine de l'univers, la matière et l'énergie ont évolué vers la synthèse des premières molécules biologiques qui sont de véritables seuils entre le non-vivant et le vivant. Ces mêmes entités biologiques, de par leur nature électronique, échangent de l'énergie avec leur environnement sous diverses formes telles que les photons et les phonons. On comprend donc l'importance de ces interactions en examinant le rôle que joue la chlorophylle lorsqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique tout comme l'hémoglobine qui absorbe elle aussi les radiation visibles tout en étant capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire. Mais ces structures biologiques dépendent de leur état physique. Certaines de par leur solubilité et de leur propriété de transparence, nous permettent d'étudier leur identité spectrale à l'aide de la transmission partielle d'ondes lumineuses incidentes. Par contre, d'autres sont insolubles c'est-à-dire, qu'elles sont solides et souvent optiquement opaques ce à quoi la spectroscopie de transmission est vouée à l'échec tout en considérant la présence indésirable de diffusion de lumière. Inévitablement, on utilisera des méthodes d'extraction et de purification de façon à isoler ces molécules, mais doit-on conclure que l'information recueillie correspond réellement à leur configuration originale? D'où l'introduction d'une nouvelle méthode spectrale, la spectroscopie photoacoustique qui nous permet d'étudier un solide biologique optiquement opaque en minimisant sa dénaturation.

1.2 Spectroscopie photoacoustique

Les premières observations obtenues sur la transmission de sons à partir de substances absorbantes confinées dans un espace hermétique reviennent à Alexandre Graham Bell (2). Dans ses conclusions, il stipule que l'effet photoacoustique s'applique aux différents états de la matière tels que les gaz, les liquides et les solides. Il déduit par la suite que ledit phénomène photoacoustique provient de l'expulsion de gaz piégé à la surface de l'échantillon ce qui est considéré maintenant comme erroné.

1.2.1 Principes de base de la spectroscopie photoacoustique

Le phénomène photoacoustique tel que perçu actuellement résulte de l'énergie absorbée par l'échantillon à une fréquence de modulation donnée ce qui amène une fluctuation de température, alternant ainsi une période d'échauffement et de refroidissement qui se situe à l'interface échantillon-gaz. Le signal photoacoustique à proprement parler découle du flux thermique intermittent, originaire de la dissipation non-radiative dans l'échantillon en l'espace d'environ 10^{-8} s, qui se transmet directement à une mince couche de gaz ambiant. Vient ensuite un transfert de l'énergie cinétique de ces molécules gazeuses à l'ensemble du gaz créant un "effet piston" sous forme de variation de pression. Cette modulation de pression captée par le microphone caractérise les propriétés d'absorption et de diffusion thermique de l'échantillon à la longueur d'onde de la radiation incidente. La figure 1 démontre clairement, d'après

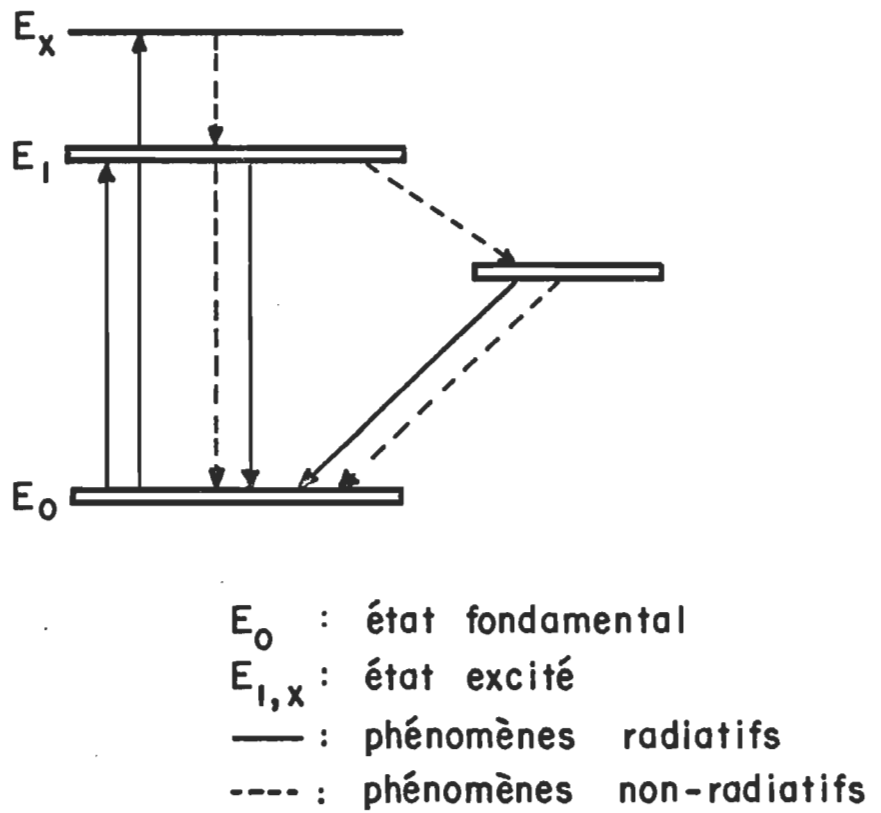


Figure 1:

DIAGRAMME ENERGETIQUE D'UN CHROMOPHORE

le diagramme de Jablonski, que tout chromophore excité par un faisceau électromagnétique au niveau des orbitales électroniques doit après un certain temps revenir à l'état fondamental, soit par fluorescence ou phosphorescence, soit par réaction photochimique, soit par le processus non-radiatif que la spectroscopie photoacoustique est à même de mesurer.

Quant à la base théorique qui définit l'intensité du signal photoacoustique en terme de puissance absorbée, il est possible d'utiliser la relation classique qui gouverne l'absorption de radiation électromagnétique par la matière. En terme de quantification, la puissance du signal photoacoustique tient compte de la fraction de radiation absorbée et d'un facteur d'efficacité de conversion non-radiative (3):

$$\begin{array}{lcl} \text{PUISSANCE} & & \text{PUISSANCE} \\ \text{DE SIGNAL} & = & \text{ABSORBÉE} \\ \text{PHOTOACOUSTIQUE} & & \text{X D'EFFICACITE} \\ \text{(watt)} & & \text{DE CONVERSION} \\ & & \text{NON-RADIATIVE} \end{array} \quad [1]$$

On peut transposer le signal photoacoustique observé sous forme d'une relation (3,4) dans laquelle on considère tous les paramètres expérimentaux:

$$P_{\text{obs}}(\lambda) = I_{\text{o}}(\lambda) L H T_{(\lambda)} S(\Omega/4\pi) (2.3\epsilon c l) \delta_{(\lambda)} (\gamma/\sigma) \quad [2]$$

$P_{\text{obs}}(\lambda)$: puissance du signal photoacoustique (W)

$I_{\text{o}}(\lambda)$: irradiance spectrale de la source lumineuse
(W cm⁻¹ nm⁻¹)

L : largeur de la fente du monochromateur (cm)

H : hauteur de la fente (cm)

$T_{(\lambda)}$: transmittance du monochromateur à une longueur d'onde déterminée
S	: largeur de la bande spectrale (nm)
$\Omega/4\pi$: angle solide (rad)
ϵ	: coefficient d'absorption molaire ($\ell \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
c	: concentration molaire de l'échantillon ($\text{mole } \ell^{-1}$)
ℓ	: épaisseur de l'échantillon (nm)
$\delta_{(\lambda)}$: facteur de rendement photoacoustique de l'échantillon
γ	: rapport de la capacité calorifique à pression constante à la capacité calorifique à volume constant (C_p/C_v)
σ	: diamètre moléculaire du gaz ambiant (nm)

L'analogie entre la spectroscopie photoacoustique et de transmission se caractérise par le terme $2.3\epsilon c\ell$ représentant la notion d'absorption selon la loi de Lambert-Beer. A noter que le coefficient d'absorption s'identifie à différents symboles tels que ϵ et β d'après le champ d'application, c'est-à-dire l'approche physico-chimique ou optique. Quant au facteur de rendement photoacoustique de l'échantillon, il regroupe le rapport quantique correspondant à l'énergie absorbée qui est convertie en énergie calorifique et le terme propre à la fraction d'énergie calorifique qui diffuse jusqu'au gaz (5). En ce qui concerne le facteur d'efficacité de transfert thermique du gaz ambiant (γ/σ) d'Eaton (4), celui-ci correspond au mécanisme de contact existant entre le gaz ambiant et la surface de l'échantillon. D'où l'intérêt de connaître l'effet photoacoustique d'un échantillon solide.

Chronologiquement, l'étude des solides tant biologiques qu'inorganiques remonte à la dernière décennie où Allan Rosencwaig obtint les

premiers spectres photoacoustiques d'hémoprotéines sous forme déshydratées (5). Par la suite, il développa avec la collaboration d'Allen Gersho (6) l'ébauche théorique de l'effet photoacoustique des solides. Comme toute radiation absorbée par un solide est partiellement ou totalement convertie en énergie non-radiative on doit délimiter les frontières physiques dans lesquelles les ondes lumineuses et thermiques se propagent. Considérons la figure 2 où la portion de l'enceinte nécessaire au phénomène photoacoustique est cylindrique avec un diamètre "D" et une hauteur "L".

L'échantillon d'épaisseur " ℓ_e " est déposé de manière à exposer sa surface au gaz ambiant de hauteur " ℓ_g ". On considère sa surface supérieure comme étant égale à une épaisseur zéro. Le support-échantillon est de longueur " ℓ_s ". Les indices e, g et s correspondent respectivement aux termes échantillon, gaz et support-échantillon.

Comme l'amplitude du signal photoacoustique découle de la variation sinusoidale de la pression (Q), celle-ci englobe les équations de l'intensité lumineuse et de diffusion thermique suivantes:

$$I = \frac{1}{2I_0} (1 + \cos \omega t) \quad [3]$$

I_0 : intensité du faisceau lumineux monochromatique incident ($W \text{ cm}^{-2}$)

ω : fréquence angulaire ($r \text{ s}^{-1}$);

t : temps (s)

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = \frac{1}{\alpha_e} \frac{\partial \phi}{\partial t} - A \exp(\beta y) [1 + \exp(j\omega t)]$$

pour $-\ell_e \leq y \leq 0$

$$j = \sqrt{-1}$$

$$A = \frac{\beta I_0 \eta}{2k_e}$$

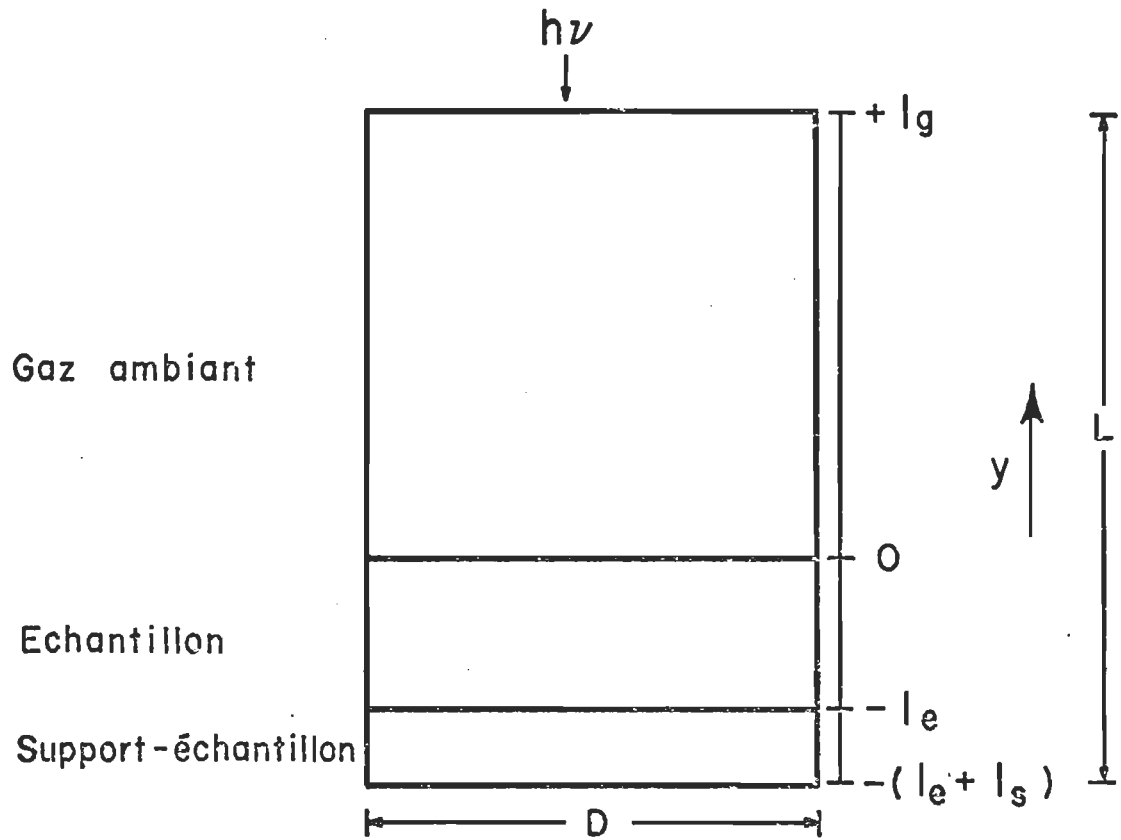


Figure 2:

COUPE LONGITUDINALE DES FRONTIERES PHYSIQUES IMPLIQUEES DANS LE PHENOMENE PHOTOACOUSTIQUE.

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad [5]$$

pour $-(\ell_e + \ell_s) \leq y \leq -\ell_e$

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad [6]$$

pour $0 \leq y \leq \ell_g$

ϕ : température ($^{\circ}\text{C}$)

α : diffusivité thermique ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

β : coefficient d'absorption optique (cm^{-1})

η : facteur d'efficacité de la conversion thermique de l'énergie absorbée à une longueur d'onde donnée

k : conductivité thermique ($\text{cal cm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{C}^{-1}$)

Par l'expansion des formules (3-6), on obtient :

$$Q = \frac{\beta I_0 \gamma P_0}{2\sqrt{2} k_e \ell_g a_g T_0 (\beta^2 - \sigma_e^2)} \frac{(r-1)(s+1)\exp(\sigma_e \ell_e) - (r+1)(s-1)\exp(-\sigma_e \ell_e) + 2(s-r)\exp(-\beta \ell_e)}{(g+1)(s+1)\exp(\sigma_e \ell_e) - (g-1)(s-1)\exp(-\sigma_e \ell_e)} \quad (7)$$

γ : rapport des capacités calorifiques du gaz ambiant

P_0 : pression ambiante à la surface de l'échantillon (Pa)

T_0 : température à la surface de l'échantillon ($^{\circ}\text{C}$)

a : coefficient de diffusion thermique (cm^{-1})

σ_e : $(1+j)a_e$

r : $(1-j)\beta/2a_e$

s : $k_s a_s / k_e a_e$

g : $k_g a_g / k_e a_e$

De l'expression [7] apparaissent les principaux paramètres interprétés en terme de longueur dont dépend le signal photoacoustique:

$$\begin{aligned} \ell_e, & \text{ l'épaisseur de l'échantillon} \\ \mu_\beta = 1/\beta, & \text{ la longueur d'absorption optique} \quad [8] \\ \mu_\alpha = 1/a_e, & \text{ la longueur de diffusion thermique} \quad [9] \end{aligned}$$

$$\text{où } a_e = (\omega/2\alpha)^{-1/2}$$

Le terme α , la diffusivité thermique, est égal à

$$\alpha = k/\rho c$$

ρ : densité de l'échantillon (g cm^{-3})

c : chaleur spécifique de l'échantillon ($\text{cal g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)

Selon l'ordre de grandeur relative de ces paramètres, la théorie de Rosencwaig-Gersho explique les variations de l'amplitude photoacoustique en fonction de la fréquence de modulation de la lumière incluant le phénomène de saturation. Cette saturation apparaît dans le cas d'échantillon dont la longueur d'absorption optique (μ_β) est inférieure à l'épaisseur de l'échantillon (ℓ_e) et la longueur de diffusion thermique (μ_α) résultant en un signal photoacoustique alors indépendant des propriétés optiques du spécimen avec une amplitude qui varie selon ω^{-1} . Par contre, dans le cas où l'échantillon a une longueur d'absorption optique supérieure à la longueur de diffusion thermique, l'amplitude du signal photoacoustique tend à être proportionnelle au coefficient d'absorption optique (β) et varie selon $\omega^{-1,5}$. Dans ce dernier cas, le spectre photoacoustique se compare au

spectre d'absorption.

1.2.2 Saturation photoacoustique

Expérimentalement, plusieurs publications (7, 8, 9, 10) confirment l'existence du phénomène de saturation pour un solide opaque en utilisant l'approche de Rosencwaig (11), qui mentionne que l'intensité du signal photoacoustique est inversement proportionnelle à la fréquence de modulation. Or, il suffit de tracer le graphique, tel que la figure 3, du logarithme de l'amplitude du signal photoacoustique en valeur absolue, en fonction du logarithme de la fréquence de modulation en Hz. On obtient une pente négative, d'une valeur de 1,0 en saturation et de 1,5 en absence de saturation.

Certains auteurs (12, 13, 14) signalent que le comportement spectral de la saturation photoacoustique s'identifie à l'affaïssement des bandes à haut coefficient d'absorption. Il convient donc d'examiner, à l'aide de la figure 4, l'interdépendance entre les trois distances caractéristiques et la forme des spectres. Prenons des modèles hypothétiques d'un chromophore ayant une bande "A" avec un coefficient d'absorption optique (β_A) élevé et une bande "B" avec un faible coefficient d'absorption optique (β_B) en tenant compte du fait que l'épaisseur de l'échantillon (l_e) et la longueur de diffusion thermique (μ_α) sont expérimentalement ajustables par l'intermédiaire de la fréquence de modulation, ce qui nous permet de simuler la non-saturation photoacoustique. Dans le cas I (fig. 4), il y a saturation de la bande A dont la longueur d'absorption optique (μ_{β_A})

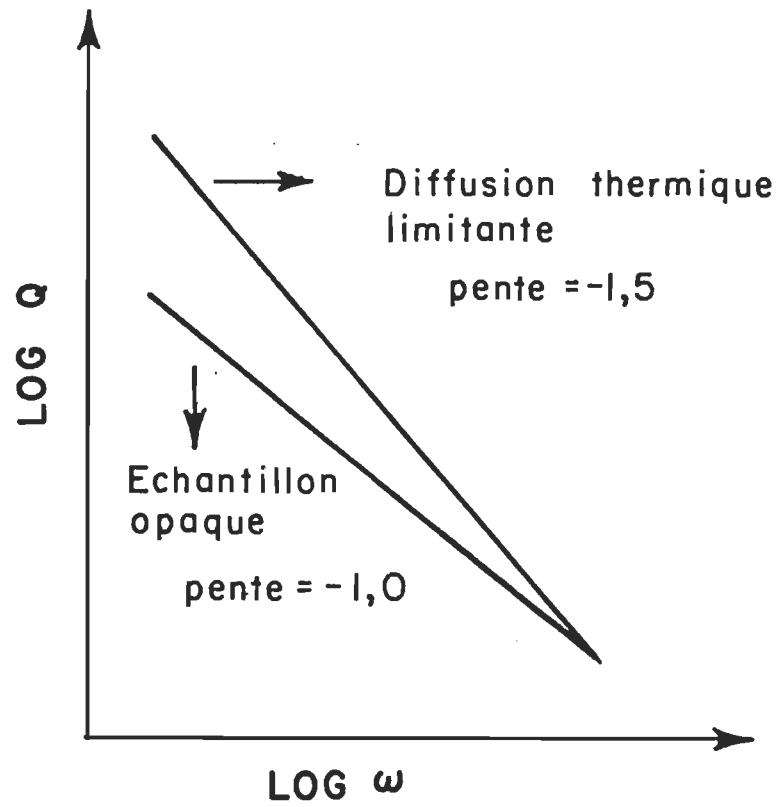
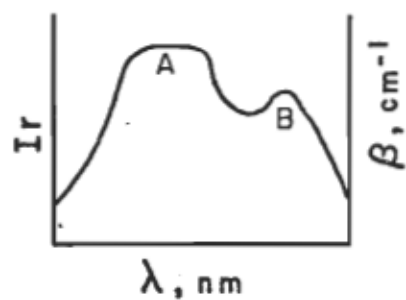
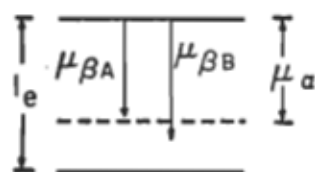


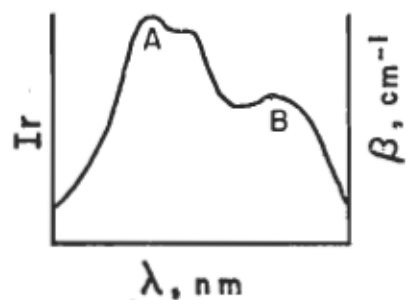
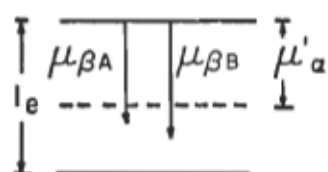
Figure 3:

PENTE DE SATURATION PHOTOACOUSTIQUE

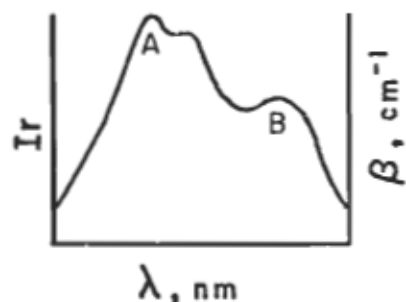
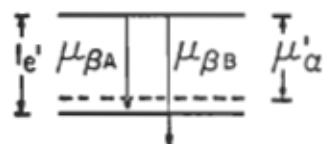
Cas I :



Cas II :



Cas III :



Ir : intensité relative

Figure 4:

MODELES HYPOTHETIQUES DE NON-SATURATION PHOTOACOUSTIQUE

est inférieure à la longueur de diffusion thermique (μ_α) de l'échantillon tandis que l'aspect de la bande B pour laquelle $\mu_\beta > \mu_\alpha$ correspond plutôt à son spectre d'absorption, d'où une bande A affaïssée et une bande B bien définie. On peut éliminer la saturation photoacoustique et obtenir un spectre fidèle aux deux coefficients d'absorption de deux façons. Le cas II suggère premièrement de réduire la longueur de diffusion thermique de manière à ce que μ_β soient supérieure à μ_α demeurant ainsi optiquement opaque. Quant au cas III, il se réfère à une épaisseur d'échantillon (l_e) légèrement plus grande que μ_α et optiquement transparent. Toutefois, ces deux possibilités compromettent sensiblement le rapport des bandes A et B car une importante fraction de l'énergie absorbée après une épaisseur largement supérieure à μ_α , dont la valeur est liée directement aux propriétés thermiques de l'échantillon, ne contribue pas au signal photoacoustique. Par conséquent, un signal photoacoustique exempt de saturation repose sur les propriétés opto-thermiques de l'échantillon dont on doit judicieusement tenir compte.

1.3 Le pigment biologique hémoglobine

Parmi les principaux pigments biologiques d'intérêt médical, l'hémoglobine tient un rôle physiologique primordial dans le maintien de la vie cellulaire. Il fixe réversiblement l'oxygène moléculaire à son atome de fer pour l'acheminer via le courant sanguin jusqu'aux tissus. Rappelons que le globule rouge, qui véhicule l'hémoglobine dans le sang, est une cellule exempte d'organites cellulaires tel que le noyau et que sa membrane de nature phospholipidique est capable d'échanges transmembranaires. L'érythrocyte normal forme un disque biconcave avec un diamètre d'environ

7,5 μm (15). Environ le tiers du poids du globule rouge est constitué d'hémoglobine ce qui représente à peu près 300 millions de molécules par érythrocyte, de plus on retrouve de l'eau, des ions K^+ , du glucose et des enzymes indirectement engagés dans des interactions de type coopératif. Comme la structure moléculaire de l'hémoglobine est directement impliquée dans le phénomène d'échanges gazeux que l'on peut observer sur un plan spectral, celle-ci fera l'objet de discussion des prochaines sections de ce chapitre.

1.3.1 Contexte moléculaire

La molécule d'hémoglobine est un tétramère de 64 500 daltons. Chaque monomère comprend une chaîne de globine et un groupement hème. La chaîne de globine de nature polypeptidique est constituée d'acides aminés réunis par des liaisons peptidiques. On retrouve deux types de chaînes, les chaînes α et β qui diffèrent l'une de l'autre par leur nombre d'acides aminés. Sa structure tertiaire ménage une cavité dans laquelle se loge un groupement hème fixé directement à la globine par des acides aminés histidine et des groupements proprioniques (15), telle que démontrée à la figure 5. Cette même structure tertiaire est stabilisée par des liaisons hydrogène et électrostatiques. Quant à la forme globale de la molécule d'hémoglobine dite structure quaternaire, elle représente l'association de deux chaînes α et de deux chaînes β .

Le groupement hème consiste en un atome de fer attaché à une structure organique plane appartenant à la classe des composés connus sous le

H : liaison histidine
p : liaison
acide propionique

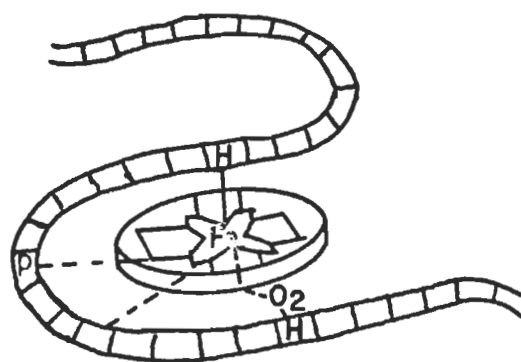


Figure 5:

LIAISONS HEME - GLOBINE

nom de porphyrine (16a). Chacun de ces composés contient quatre noyaux pyrroliques avec un atome d'azote à leur sommet et reliés entre eux par des ponts méthène (-CH=). Chaque porphyrine diffère l'une de l'autre par leurs chaînes latérales. La figure 6 illustre bien le cas du noyau tétrapyrrolique de l'hémoglobine, c'est-à-dire la protoporphyrine IX où nous avons quatre groupements méthyls (-CH₃), deux groupements propioniques (-CH₂)₂-COOH et deux groupements vinyls (-C=CH₂).

Quant à la nature des liaisons avec l'atome de fer sous forme ferreux ou ferrique, le tout dépend des conditions physico-chimiques telles que le pH, la température et le type de ligand comme l'oxygène et le monoxyde de carbone qui perturbent le spin de l'atome de fer et la conformation des globines. En présence de différents ligands, le tableau I et la figure 7 démontrent que ceux-ci engendrent un réarrangement des électrons périphériques de l'atome de fer d'où les changements de spin en accord avec les modèles de Pauling (17):

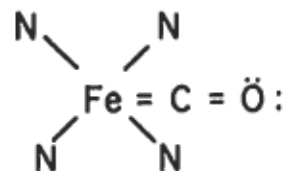
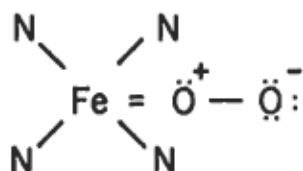


TABLEAU I *

Le spin du groupement hème en présence du ligand


INTERMEDIAIRE	TYPE DE LIGAND	SPIN
oxyhémoglobine (HbO ₂)	O ₂	0
carboxyhémoglobine (HbCO)	CO	0
désoxyhémoglobine	-	2


* D'après la référence 16c

Quant aux changements de conformation des globines que l'on retrouve souvent sous l'appellation "d'interactions hème-hème", ils sont responsables de la réversibilité de la fixation du ligand O₂ tout en étant à l'origine de la courbe sigmoïde de la saturation d'oxygène. Le modèle de Morimoto (18) sur la figure 8, suggère que le contact de l'oxygène avec les globines modifie certaines liaisons hydrogène et forces de Van der Waal des chaînes $\alpha_1\beta_2$ de manière à provoquer un changement de conformation encourageant la diffusion de l'oxygène vers le groupement hème.

Quant aux intermédiaires de l'hémoglobine où l'atome de fer est à l'état ferrique, on retrouve l'hémiglobine et la molécule hématine dont l'une des positions de coordination est occupée par un groupement hydroxyl. Il est à noter que la molécule de myoglobine est similaire à un monomère d'hémoglobine, toutefois son rôle physiologique se limite à emmagasiner l'oxygène dans les muscles.

Etat ferrique (Fe^{+3}), $(3d)^5$

(a)  $S = 5/2$

(b)  $S = 3/2$

(c)  $S = 1/2$

Etat ferreux (Fe^{+2}), $(3d)^6$

(a)  $S = 2$

(b)  $S = 1$

(c)  $S = 0$

Figure 7:

REARRANGEMENT DES SPINS POUR LES ELECTRONS 3d DE
L'ATOME DE FER

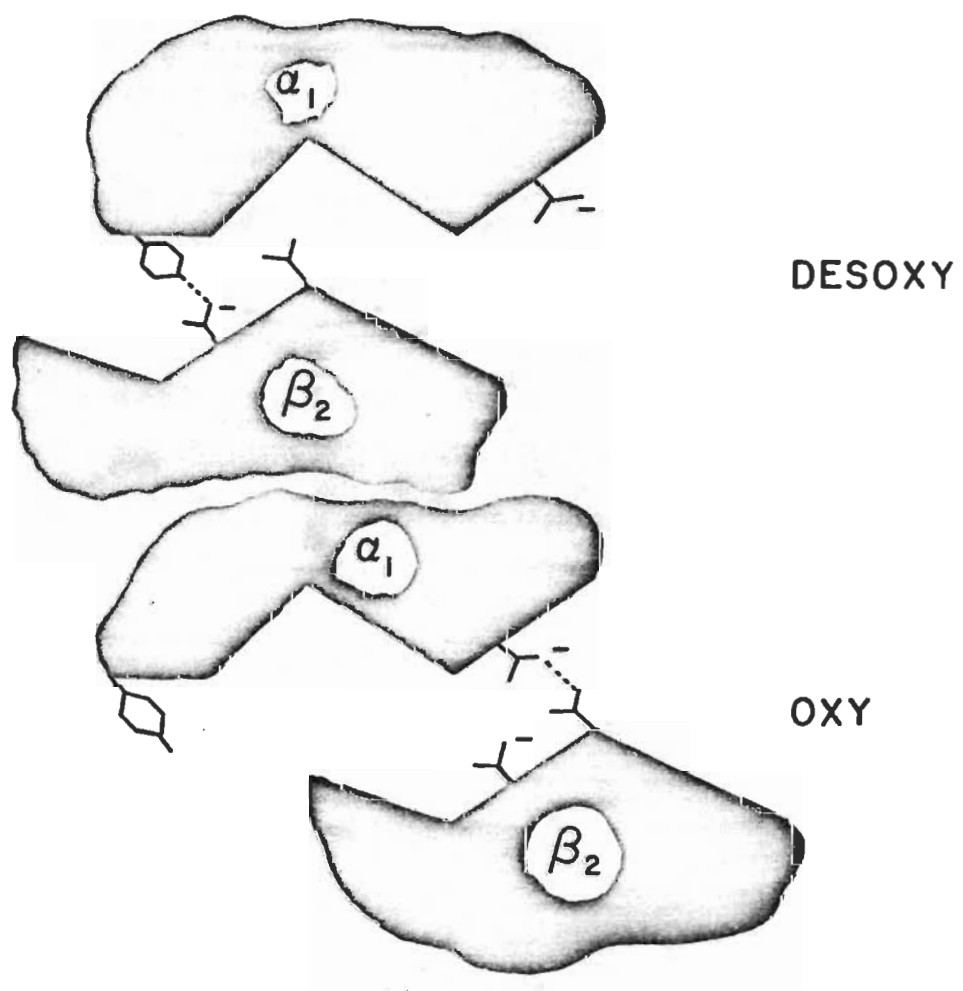


Figure 8:

MECANISME DE CONTACT O_2 - GLOBINES

1.3.2 Caractéristiques spectrales des intermédiaires de l'hémoglobine

Les radiations lumineuses de nature électromagnétique perturbent l'hémoglobine en provoquant un réarrangement électronique de son principal chromophore, c'est-à-dire la ferroprotoporphyrine de même qu'au niveau des acides aminés aromatiques de ses globines. C'est donc dire que tout changement dans la structure de l'hémoprotéine sera observable sur le spectre d'absorption. Parmi les facteurs susceptibles d'affecter les propriétés spectrales des porphyrines mentionnons les changements majeurs dans le patron de conjugaison en modifiant l'état de coordination du fer en présence de différents ligands et les substitutions des chaînes latérales électronégatives telles que décrites dans le tableau II.

TABLEAU II *

Structures porphyriques absorbantes

protoporphyrine ($C_{34}H_{20}N_4O_4$)

λ_{max} : 407, 505, 541, 575, 603, 630 (nm)

coproporphyrine ($C_{36}H_{22}N_4O_8$)

max: 400, 498, 532, 566, 594, 621 (nm)

uroporphyrine ($C_{40}H_{38}N_4O_6$)

max: 406, 502, 536, 572, —, 627 (nm)

* D'après la référence 19a

Le spectre de transmission de l'hémoglobine consiste en une bande entre 260 et 280 nm propre à l'absorption des groupements aromatiques des acides aminés tyrosine, tryptophane et la phénylalanine. Par contre, le groupement hème s'identifie principalement à une bande de dégénérescence à 340-360 nm (19b), une bande de Soret vers 410 nm, caractérisant la délocalisation des électrons π conjugués selon le schéma de la figure 9 et deux bandes β et α typiques à la région de 550 à 650 nm dont les transitions électroniques sont associées au transfert de charge des orbitales de l'atome métallique tel que le fer au ligand. Implicitement, les spectres des différents intermédiaires de l'hémoglobine dépendent surtout du type de ligand impliqué ce que le tableau III démontre clairement.

TABLEAU III

Bandes spectrales des intermédiaires de l'hémoglobine humaine

INTERMEDIAIRE	SYMBOLE	VALENCE	BANDES SPECTRALES (nm)		
			Soret	β	α
oxyhémoglobine*	HbO ₂	2	415	541	577
carboxyhémoglobine*	HbCO	2	419	540	569
désoxyhémoglobine**	Hb	2	430	560	
hémiglobine**	Hi	3	405	500	630
hématine***		3	400	570	595-600
myoglobine**	Mb	-	435	555	-

* à pH=7, 20°C; d'après la référence 20

** D'après la référence 21

*** D'après la référence 22

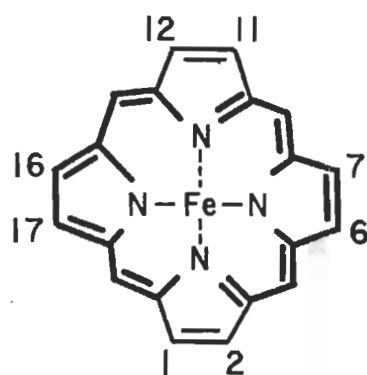


Figure 9:

DELOCALISATION DES ELECTRONS π DE
L'HEMOCHROMOGENE

1.3.3 Spectres photoacoustiques de l'hémoglobine

Une rétrospective des publications traitant des spectres photoacoustiques du pigment hémoglobine débute avec l'étude de Rosencwaig (5) où il démontre que le sang total sous forme déshydratée contient la même information spectrale que l'hémoglobine purifiée sans être affecté par la diffusion de la lumière. Quant à Kirkbright et al. (23), ils décrivent l'action du dithionite de sodium comme agent réducteur sur le sang total par la présence d'une bande à 560 nm caractéristique de la désoxyhémoglobine. La plupart des publications (24, 25) confirment la présence de la bande de Soret vers 420 nm. Tout récemment Vejux (26) mentionne que l'hémoglobine piégée dans une membrane artificielle par la technique d'immobilisation et dans les conditions d'atmosphère contrôlée, démontre un comportement spectral propre au gaz ambiant et aux réactifs agissant sur elle.

1.4 But du projet

A priori, on doit tenir compte du fait que le spectromètre se limite à la région uv-visible d'où l'emploi d'un pigment comme l'hémoglobine dont le chromophore absorbe dans cette zone de même qu'il ne faut pas oublier que l'ensemble des informations spectrales bien connues de tous vient d'échantillons liquides.

Nous démontrons que les bandes spectrales du même échantillon biologique à l'état liquide ou solide sont identiques.

De plus, nous envisageons dans le présent projet de faire une incursion au niveau des solides biologiques insolubles tels que les tissus et les cellules d'intérêt médical.

2. LE SPECTROMETRE PHOTOACOUSTIQUE
ET SES COMPOSANTES

2. LE SPECTROMETRE PHOTOACOUSTIQUE ET SES COMPOSANTES

Ce chapitre décrit les différents éléments optoélectroniques qui se rattachent au système photoacoustique. L'ensemble des composantes, tout en étant source de bruit de fond de par leur nature électrique ou acoustique (27) est choisi pour maximiser le signal photoacoustique. Dans un premier temps, nous traiterons du diagramme général du spectromètre à simple faisceau de façon à visualiser globalement le rôle de chacune des constituantes. En second lieu, il sera question de détailler les caractéristiques instrumentales propres à chaque élément et qui sont à l'origine de la qualité des spectres obtenus pendant le projet.

2.1 Diagramme schématique de l'instrumentation

Le phénomène photoacoustique, tel que mentionné dans la section 1.2.1, est observé dans l'enceinte photoacoustique à la suite de l'absorption de l'énergie radiative intermittente provenant de la source lumineuse après son passage à travers le monochromateur et le modulateur de fréquence. Quant au signal photoacoustique, il est généré par la variation adiabatique de la pression à l'interface échantillon-gaz ($P_1 V$) jusqu'au microphone ($P_2 V$). L'information est transmise à l'amplificateur synchrone par l'entremise de préamplificateurs susceptibles d'améliorer le signal. Par la suite, les données spectrales sont acheminées vers l'enregistreur donnant le spectre brut et simultanément vers le système de traitement des données. Schématiquement la disposition des différentes composantes est représentée sur la figure 10.

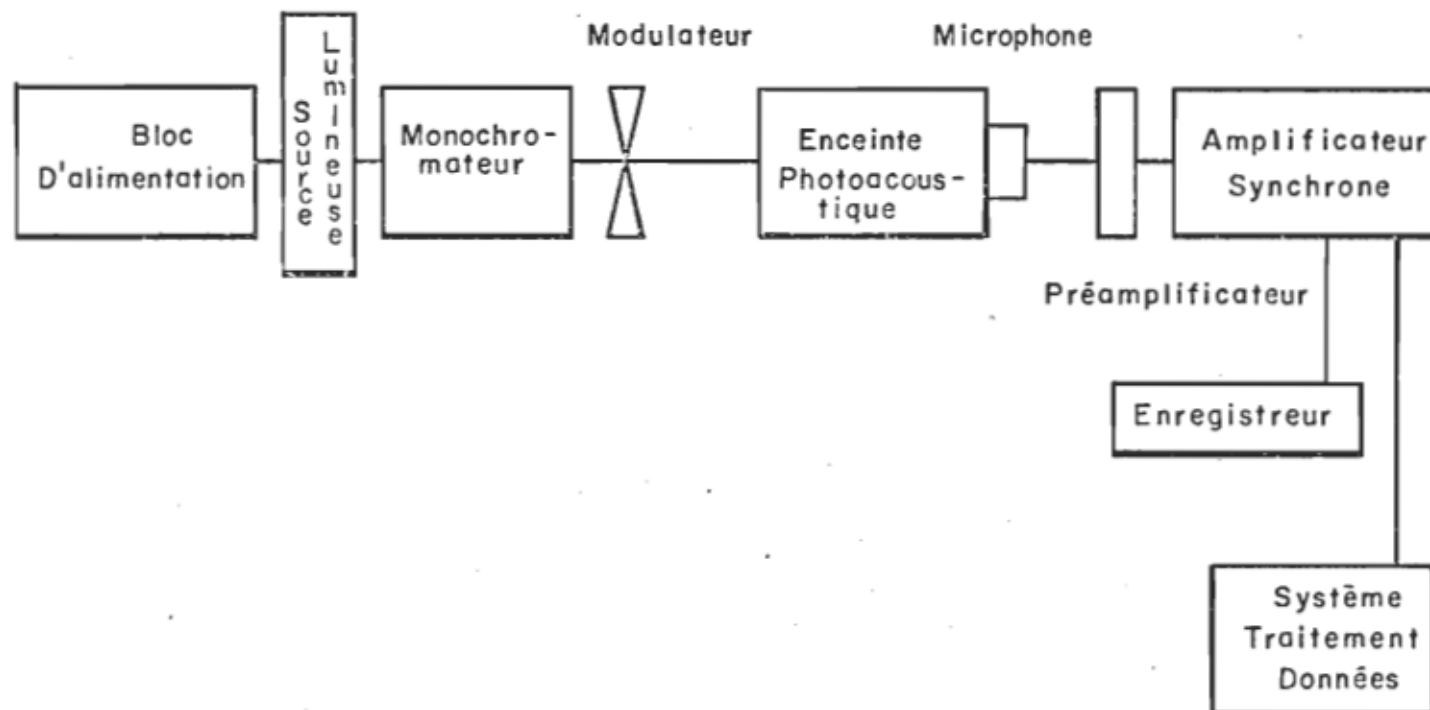


Figure 10:

DIAGRAMME SCHEMATIQUE DU SPECTROMETRE PHOTO-ACOUSTIQUE

2.2 Les composantes du spectromètre

Le spectromètre photoacoustique est opérationnel à la limite où les différents éléments sont compatibles avec la chaîne de mesure capable de déceler le phénomène à observer. D'où l'importance de décrire les caractéristiques de chaque unité.

2.2.1 Source lumineuse

Sachant que le signal photoacoustique augmente linéairement avec l'intensité de la source lumineuse (28), on la choisit en fonction d'un rendement optimum en puissance radiative (watt) dans la zone spectrale que l'on étudie. Dans notre cas, l'étendue de nos spectres se limite dans la région de l'uv-visible d'où l'utilisation d'une lampe à arc au Xénon de 1000 W à haute pression (No. L5179000, Canrad Hanovia) exigeant 44,4 ampères et 22,5 volts du bloc d'alimentation.

L'habitacle métallique de la lampe (LH151N, Schoeffel Instrument Corporation) se compose d'un miroir concave aluminisé, d'une lentille en quartz ($f/1,5$) nécessaire à la focalisation des radiations émises et d'un système de refroidissement à air propulsé pour éviter l'échauffement de la lampe.

2.2.2 Monochromateur

Le monochromateur à réseau (GM 250, Schoeffel Instrument Corporation), utilisé lors de nos essais, sélectionne les longueurs d'ondes de

manière à obtenir un faisceau monochromatique avec une dispersion linéaire de $3,3 \text{ nm mm}^{-1}$ et une ouverture effective de $f/3,6$. Le réseau est conçu pour un balayage spectral de 200 à 800 nm avec une diffusion de lumière d'environ 0,35% à 500 nm. L'étalonnage en longueur d'onde a été fait en utilisant les raies du mercure provenant d'une lampe à basse pression Hg. Un moteur synchrone réversible nous permet de choisir différentes vitesses de balayage (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 250 ou 500 nm min^{-1}).

2.2.3 Modulateur de fréquence

L'un des prérequis du phénomène photoacoustique est de générer un faisceau électromagnétique intermittent de nature sinusoïdale grâce à un modulateur à fréquence variable. Le modulateur disponible (Bentham 218F, Ithaco) se compose premièrement de disques métalliques recouverts d'un revêtement noir pour éliminer toute réflexion optique et sur lesquels on retrouve des fentes de mêmes dimensions et équidistantes l'une de l'autre; deuxièmement d'un système lumineux comme onde de référence pour l'amplificateur synchrone et troisièmement d'un sélecteur pour varier la fréquence. Les disques possèdent 2, 5, 10 ou 30 fentes justifiant le choix d'une fréquence entre 30 et 3 000 Hz.

2.2.4 Enceinte photoacoustique

Parmi les composantes essentielles du spectromètre, l'enceinte photoacoustique demeure l'entité responsable pour transmettre les caractéristiques de l'échantillon sous forme d'énergie thermique. La conception d'une enceinte photoacoustique se base sur ses propriétés thermiques,

acoustiques, géométriques et optiques d'où l'importance de décrire sa structure tant physique que chimique.

Comme la conductivité thermique de l'aluminium ($2,0 \text{ J cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$) (27) est supérieure à celle de l'acier inoxydable ($0,14 \text{ J cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$), diminuant ainsi toute chaleur provenant des parois suite à l'absorption de lumière réfléchie, on a fait construire l'infrastructure principale avec les deux porte-fenêtres en aluminium tout en prenant soin de les anodiser pour éviter toute réactivité avec des agents oxydants susceptibles de détériorer les parois.

Deux enceintes photoacoustiques ont été construites au cours de notre projet. Comme il n'existe peu de différence dans leur conception, une description générale est présentée, suivie d'une description spécifique de la seconde enceinte.

Description

Les porte-fenêtres sont constitués (fig. 11A) d'un orifice cylindrique de 2,4 cm de profondeur et de 2,6 cm de diamètre dans lequel on insère deux fenêtres en quartz séparées l'une de l'autre par un anneau en laiton flanqué de rondelles d'étanchéité placés de façon à minimiser l'apport de bruits acoustiques venant de l'extérieur. A noter que l'enceinte photoacoustique est munie de deux porte-fenêtres de manière à éliminer toute onde radiative qui n'est pas absorbée par l'échantillon. Le choix de quartz comme matière première pour les fenêtres se justifie par une faible diffusion thermique ($4,4 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) par rapport au verre ($6,0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (28), une faible absorption (0,02)

Echelle 
1.0 cm

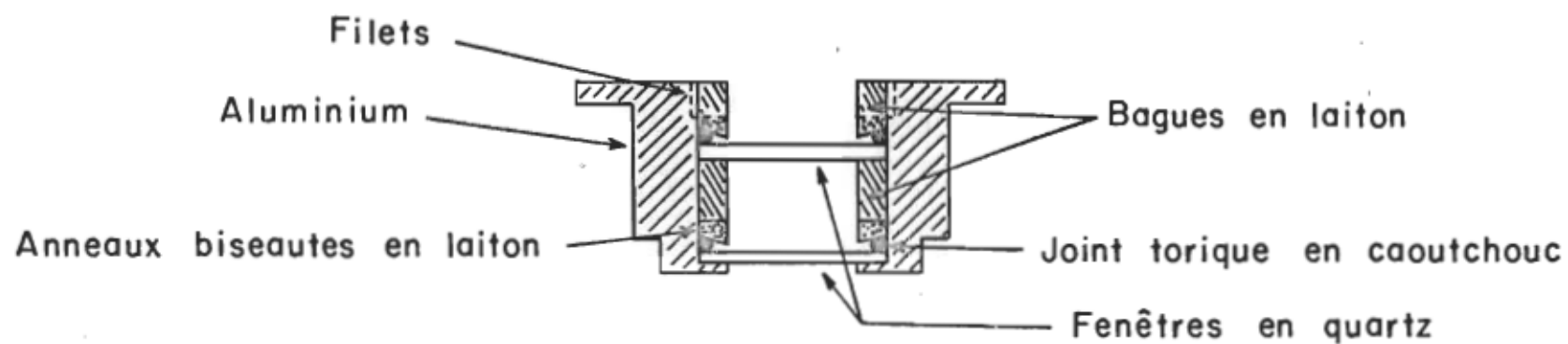
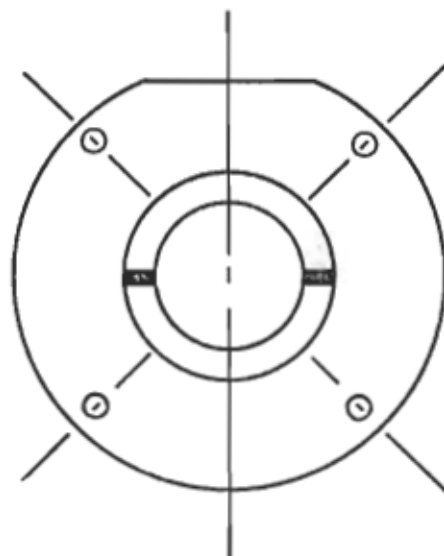


Figure 11A:

VUE DE PLAN ET COUPE LONGITUDINALE DU PORTE-FENETRE

dans la région de l'uv-visible et tout en étant une substance inerte. Chaque porte-fenêtre s'insère dans une ouverture prévue au niveau de l'infrastructure de l'enceinte que l'on visse ensuite pour assurer une complète herméticité.

Le corps cylindrique de l'enceinte photoacoustique (fig. 11B,C) se compose d'un puit central capable de loger les deux porte-fenêtres et de disposer d'un volume approximatif de $0,6 \text{ cm}^3$ pour loger l'échantillon avec une couche de gaz à sa partie supérieure. Ce même espace communique avec le tunnel acoustique, d'un diamètre d'environ 0,1 cm, jusqu'au diaphragme du microphone. Une bague en aluminium se greffe à la portion plane du corps cylindrique permettant de fixer le microphone proche du tunnel acoustique.

La distinction majeure entre l'enceinte déjà décrite et celle utilisant un système de soupapes propice à contrôler le type de gaz nécessaire dans les protocoles expérimentaux est la suivante. Le système de soupapes comprend deux conduits, d'environ 0,13 cm de diamètre, l'un vis-à-vis l'autre traversant la paroi de l'enceinte vers l'extérieur dans lesquels on colle à chacun une portion tronconnée d'aiguilles hypodermiques (18G 1,5, Becton Dickinson & Co. Canada Ltée) (voir fig. 12). Cette même aiguille est revêtue d'un tube de 3,5 cm de longueur en chlorure de polyvinyle, caractérisant sa souplesse propre à servir de soupape dans lequel on insère une seconde aiguille du même type à l'autre extrémité avec son adaptateur permettant ainsi l'entrée et la sortie du gaz de l'enceinte photoacoustique. Comme la section centrale de la tubulure est très faible, on maintient l'étanchéité lors des expériences avec des pinces Hoffman à vis (C6078-10, Canlab).

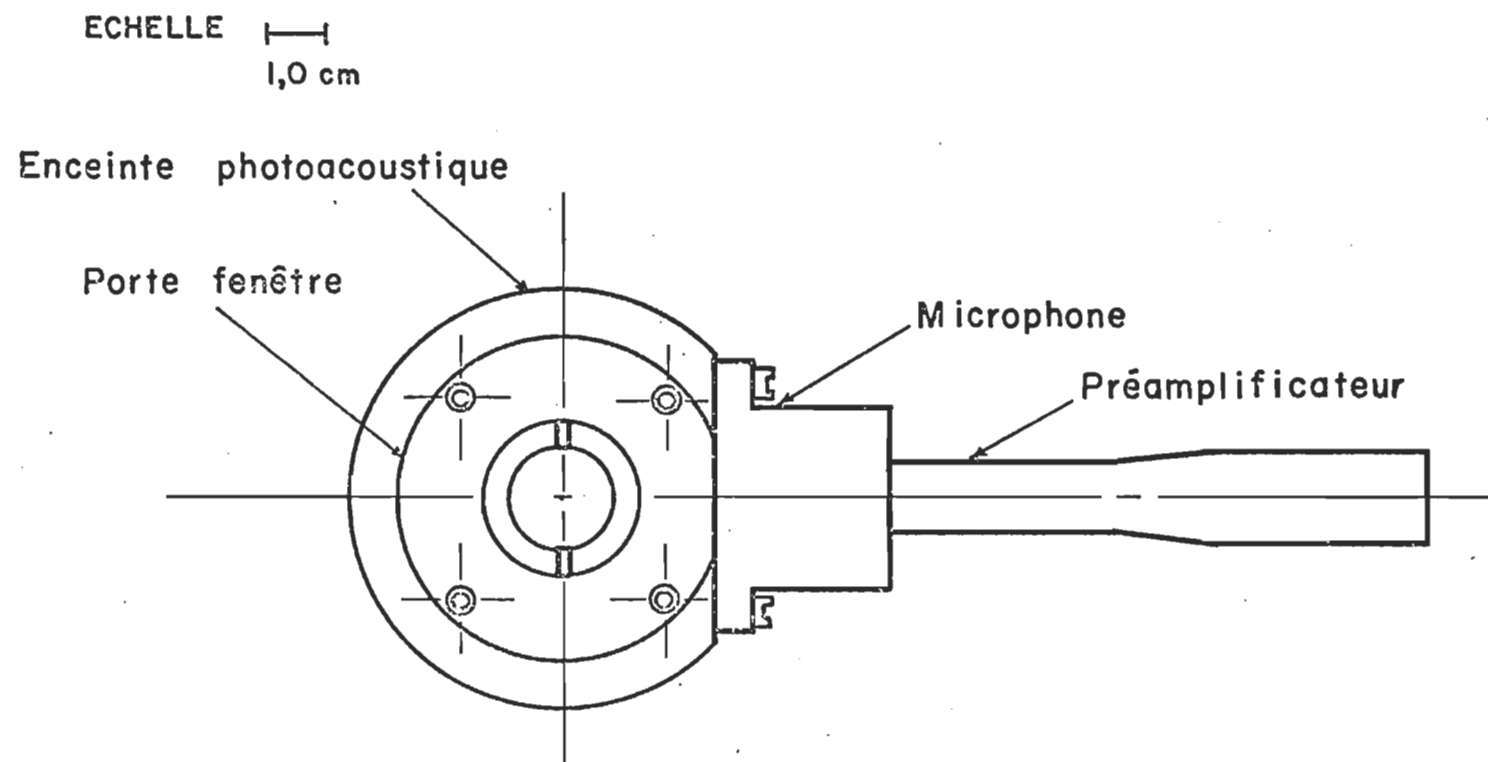


Figure 11B:

VUE DE PLAN DE L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE

ECHELLE

1,0 cm

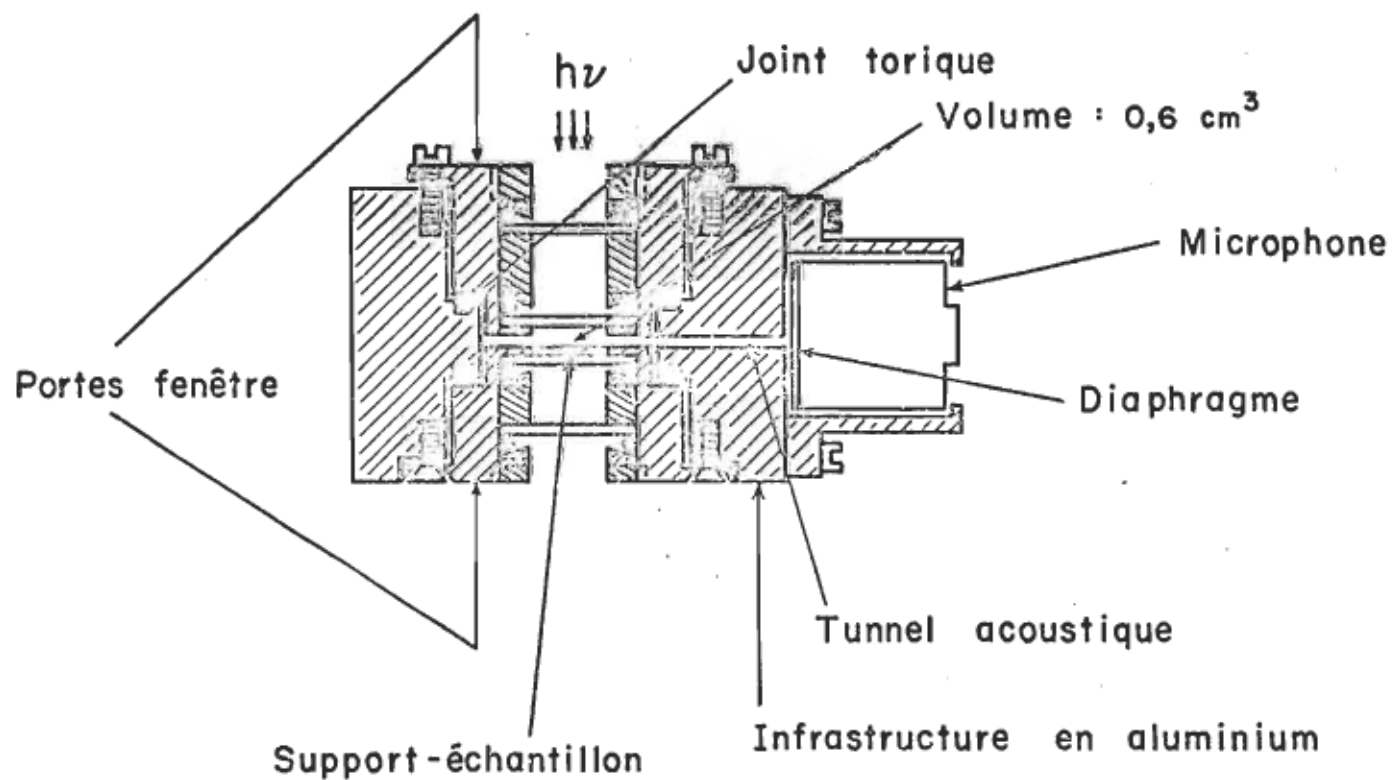


Figure 11C:

COUPE LONGITUDINALE DE L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE

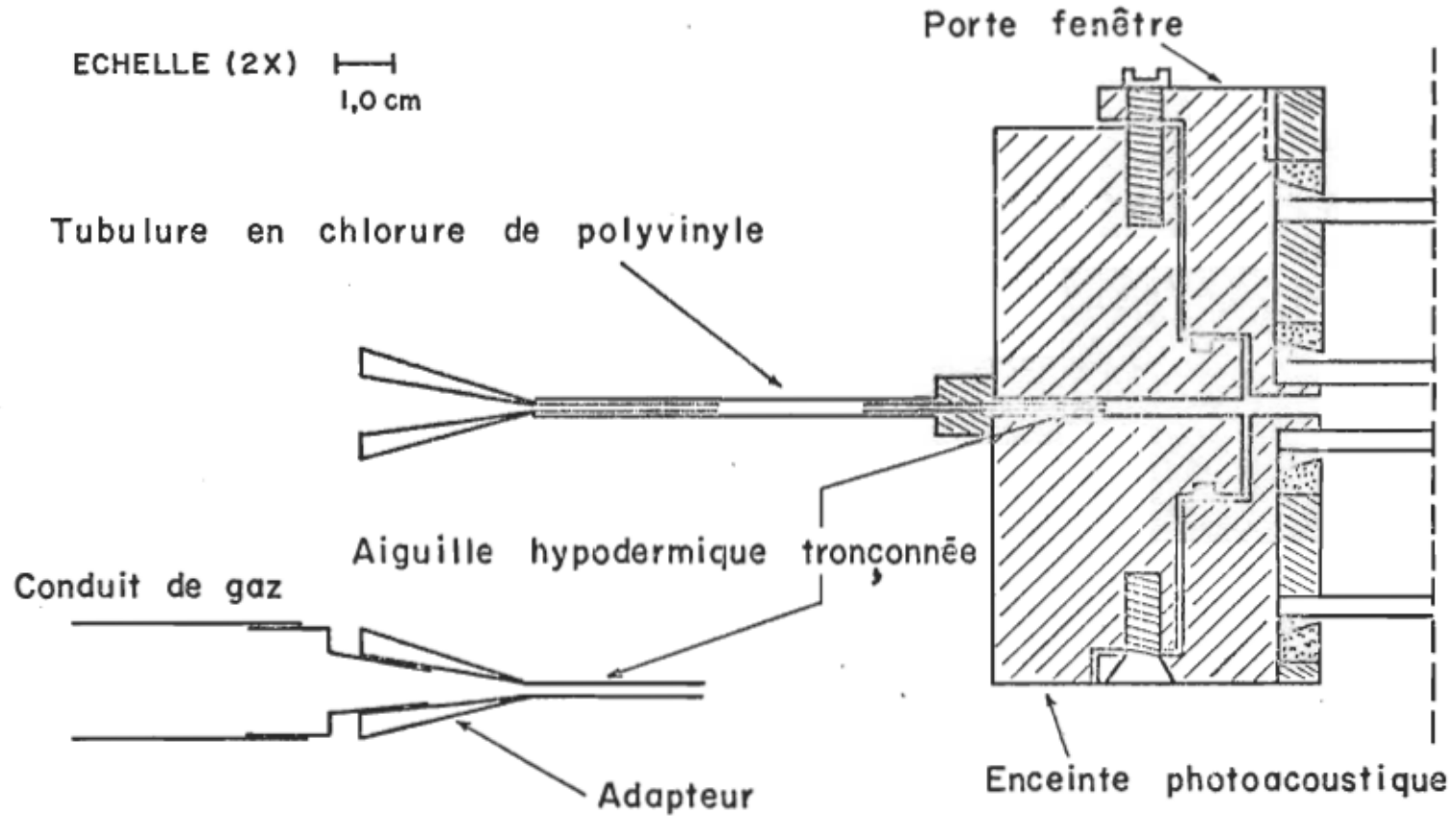


Figure 12:

COUPE LONGITUDINALE MEDIANE DU SYSTEME DE SOUPE

A noter que l'enceinte photoacoustique est supportée par une table anti-vibration en terrazzo (No. 386, Technilab Instruments Inc.).

L'un des critères choisis pour évaluer la sensibilité d'un instrument scientifique est le rapport signal sur bruit (SNR) que l'on peut facilement reproduire avec des conditions expérimentales définies. Les conditions nécessaires pour comparer les deux enceintes photoacoustiques se résument à une intensité lumineuse atteignant la surface des fenêtres de quartz d'environ 1,10 mW mesuré avec un radiomètre Optikon 21A (United Detector Technology Inc.), d'une fréquence de modulation de 100 Hz, d'un temps d'intégration de 1 s et l'air de la pièce comme gaz ambiant. L'échantillon utilisé pour le signal est le noir de charbon pour lequel on ajuste le monochromateur à 470 nm correspondant au maximum de puissance de la source lumineuse. Le bruit de fond est déterminé à partir du un cinquième de l'intensité du signal obtenu avec les enceintes photoacoustiques exemptes d'échantillons (27). Dans ces conditions le rapport signal sur bruit de l'enceinte atmosphère non-contrôlée est de 2 400 et de 1 400 pour l'enceinte à atmosphère contrôlée, c'est donc dire que cette dernière est moins sensible. Cette diminution de sensibilité est attribuée à l'une ou l'autre ou à l'ensemble des trois possibilités suivantes: (i) au système de soupapes qui n'est pas complètement étanche; (ii) au prolongement de la tubulure qui communique ses vibrations à l'enceinte photoacoustique; (iii) à l'augmentation du volume mort. Toutefois le rapport signal sur bruit est suffisamment élevé pour utiliser l'enceinte à atmosphère contrôlée dans notre étude.

2.2.5 Microphone et préamplificateur

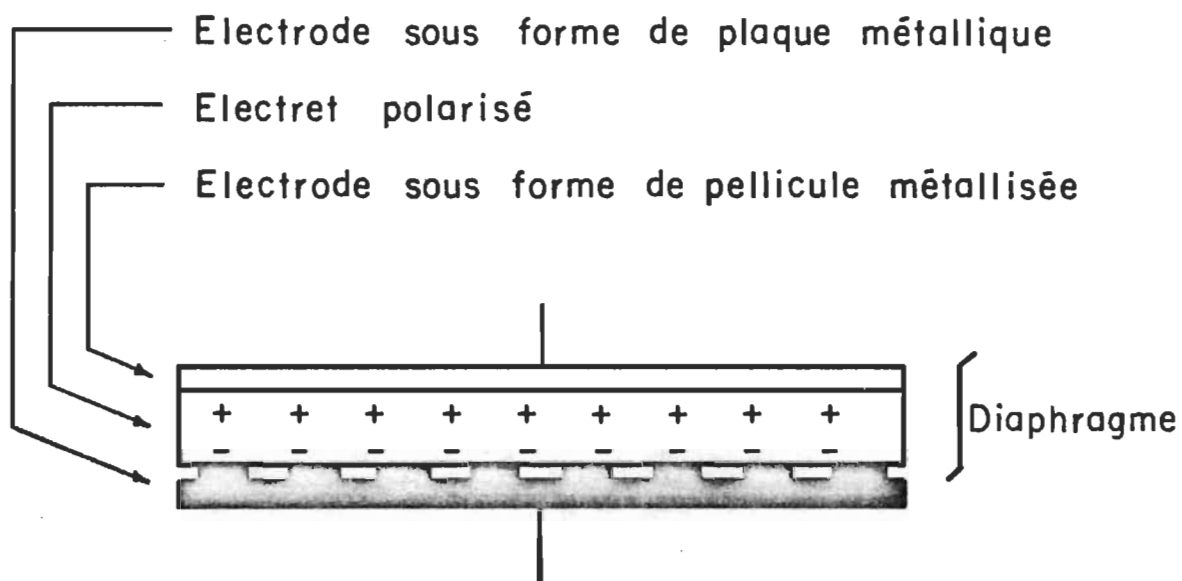
La détection du signal photoacoustique est assurée par un microphone très sensible couplé à deux préamplificateurs qui sont eux-mêmes reliés à l'amplificateur synchrone.

2.2.5.1 Microphone

Le microphone (No. 1961-9601, General Radio) du type condensateur-electret est utilisé pour mesurer la variation de pression transmise sous forme de son. Sa conception technique se caractérise par une réponse en fréquence constante tout en ayant un solide diélectrique polarisé en permanence comme diaphragme, ce qui élimine le besoin d'une source de voltage polarisé (fig. 13). L'absence de charge électrostatique libre à la surface du diaphragme permet au microphone de fonctionner dans un environnement humide (30), ce qui est le cas en présence d'échantillon solide hydraté. Le microphone est de forme cylindrique ayant un diamètre de 2,5 cm; il est omnidirectionnel avec une sensibilité égale à $1 \text{ V m}^2 \text{ N}^{-1}$ et une étendue de fréquence de 5Hz à 12kHz.

2.2.5.2. Préamplificateurs

Le premier préamplificateur (1972-9600, General Radio) est conçu pour amplifier le signal provenant de la source capacitive, c'est-à-dire le microphone avec une impédance de sortie de 10 ohms et une réponse en fréquence de 5 Hz à 100 kHz. Le second préamplificateur que l'on a fait construire sert dans un premier temps à amplifier une seconde fois le signal avec un gain A qui vaut:



SCHEMA DU MICROPHONE CONDENSATEUR - ELECTRET

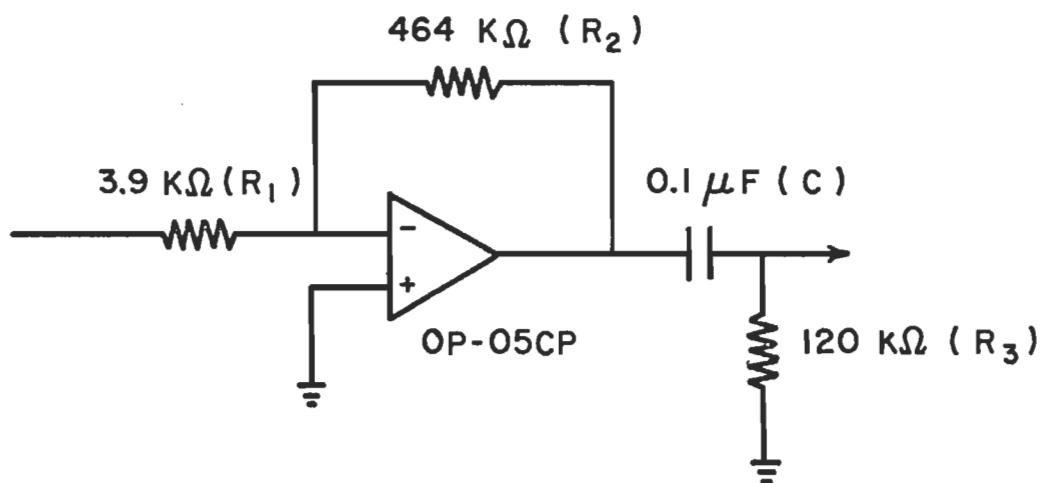


Figure 14:

DIAGRAMME DU CIRCUIT ELECTRONIQUE DU
PREAMPLIFICATEUR

$$A = \frac{R_2}{R_1} = \frac{464 \text{ k}\Omega}{3.9 \text{ k}\Omega} = 119$$

$$20 \log_{10} 119 = 441,5 \text{ db}$$

et à filtrer les basses fréquences avec un filtre passe-haut de type RC (résistance-condensateur) dont l'efficacité est de 70% pour les fréquences des oscillations électriques plus hautes que

$$f_c = \frac{1}{2\pi R_3 C} = \frac{1}{(6,28)(120\text{k}\Omega)(10^{-7}\text{F})} = 13 \text{ Hz}$$

Schématiquement, la figure 14 représente le diagramme du circuit électronique du préamplificateur.

2.2.6 Amplificateur synchrone

L'amplificateur (186A, Princeton Applied Research Corp.) est le module du spectromètre responsable de la quantification du signal photoacoustique synchronisé par rapport au signal de référence provenant du modulateur. Ses caractéristiques sont les suivantes: l'échelle de sensibilité varie entre 500 mV à 100 nV, le temps de réponse s'échelonne de 0,3 s à 300 s, l'étendue de fréquence de 0,5 Hz à 100 kHz et le sélecteur de phase correspond à 0°, 90°, 180° et 270°. Le signal démodulé par l'amplificateur est transformé en courant continu avec un voltage de sortie de 1 volt et est par la suite acheminé vers l'enregistreur.

2.2.7 Enregistreur

On obtient un spectre photoacoustique brut par l'entremise d'un enregistreur (Omniscribe Recordall série 5 000, Fisher) couplé à l'amplificateur synchrone transmettant l'information sous forme d'impulsions

électriques. Cette composante permet de tracer les spectres à différentes vitesses (2,5; 5,10; 12,5; 20; 25 cm min⁻¹).

2.2.8 Système de traitement des données

Parallèlement les données recueillies peuvent être traitées par un micro-ordinateur dont la capacité de traitement est de 8 "bit" et il possède un langage de type "basic". L'ensemble du système se compose d'un module capable d'introduire et d'extraire les données sur les disques (C2-SPDF, Ohio Scientific Inc) et d'un autre module qui est l'ordinateur et ses mémoires (CD-2, Ohio Scientific Inc.). Parmi les opérations disponibles, on peut diviser un spectre par un autre, diviser un spectre par une constante, additionner ou soustraire deux spectres, normaliser un spectre à une longueur d'onde donnée et obtenir la dérivée d'un spectre. On visualise les résultats soit sur l'écran cathodique, soit sur l'imprimante (Decuriter II, Digital) qui sont adjacents au système de traitement de données.

3. METHODES EXPERIMENTALES

3. METHODES EXPERIMENTALES

Jusqu'à maintenant, on s'est attardé à décrire le spectromètre photoacoustique comme un outil de travail suffisamment sensible pour détecter le phénomène avec un minimum d'artefact. Toutefois l'effet photoacoustique découle de l'absorption de l'énergie incidente par l'échantillon et des propriétés de son environnement immédiat se résument au gaz à l'interface gaz-specimen et au support-échantillon sur lequel repose la matière biologique à étudier. D'où l'importance de ce chapitre dans lequel nous détaillons le rôle de l'état physique des spécimens, du support-échantillon et du gaz ambiant.

3.1 Etat physico-chimique des échantillons

L'un des avantages de la spectroscopie photoacoustique est d'étudier l'état physique des échantillons tant sous forme solide anhydre que solide hydraté. Parmi les spécimens utilisés lors des essais, on retrouve l'hémoglobine purifiée (type IV: humain H-7379, Sigma Chemical Company) ou incorporée aux globules rouges du sang veineux prélevé chez l'humain, les hémoprotéines du type myoglobine (type I: muscle squelettique du cheval, M-0630, Sigma Chemical Company), l'hémine (type III: origine équine, H-2375 Sigma Chemical Company) et enfin les tissus de nature saine et pathologique.

Les solides biologiques purifiés préalablement par la compagnie Sigma Chemical sont disponibles à l'état de poudre obtenu par cristallisation et/ou par lyophilisation nécessitant parfois un dessalage, tel est le cas de la myoglobine. Nous n'avons repurifié aucun de ces produits commerciaux. En ce qui concerne les échantillons d'origine humaine, on obtient les prélèvements sanguins dans des tubes héparinés de façon à éviter que le sang ne coagule; quant aux tissus, ils proviennent d'une biopsie épidermique ou mammaire. A noter que les tissus mammaires sont congelés à -20°C et tranchés avec un microtome à une épaisseur d'environ 27 μm selon l'ouvrage de Betteridge (31).

Le terme solide hydraté correspond à deux manipulations successives. Dans un premier temps, on dilue l'échantillon dans un solvant approprié et deuxièmement, on filtre le spécimen sur un support-échantillon adéquat. Comme les molécules de myoglobine et d'hémoglobine sont hydrosolubles, l'eau distillée se révèle le solvant par excellence à l'exception des dilutions du sang où l'on préfère une solution saline isotonique de 0,85% (chlorure de sodium No. 5-3624, J.T. Baker Chemicals) de façon à conserver intact les globules rouges. Pour obtenir une bonne qualité d'eau, on filtre une première fois dans un système Nanopure de Barnstead contenant des cartouches organiques et de résine échangeuse d'ions, puis elle est bidistillée dans une colonne en quartz BI-18 (Amersil Inc.). Pour ce qui est du solvant de la molécule hémine, on prépare une solution de NH_4OH 1M.

3.2 Types de support-échantillon

Le choix d'un support-échantillon se doit d'être judicieux de façon à minimiser son signal photoacoustique tout en tenant compte de l'état du spécimen, c'est-à-dire en fonction de la dimension ou du poids moléculaire des entités à étudier, de leur stabilité et de leur nature physique, soit solide amorphe, soit solide hydraté. Plusieurs autres critères sont nécessaires pour la sélection d'un support-échantillon; mentionnons sa composition et sa dimension, sa susceptibilité aux réactifs et aux solvants, ses caractéristiques spectrales, sa rétention aqueuse sachant que la chaleur spécifique élevée de l'eau ($4,18 \text{ J g m}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$) (18) amortit le signal photoacoustique. Signalons que ce facteur d'amortissement peut conduire à de larges fluctuations du signal photoacoustique si le temps d'évaporation et l'uniformité de l'étalement ne sont pas contrôlés. A partir de critères énumérés, nous avons choisi quatre modèles de support-échantillon dont la lamelle de verre, le filtre Nucléopore, le filtre Pellicon et le filtre Millipore.

A noter que les conditions instrumentales pour les spectres de chaque support-échantillon sont toujours les mêmes, soient une bande passante de 6,6 nm, une constante de temps de 3 secondes, une vitesse de balayage de 50 nm min^{-1} , une fréquence de modulation de 150 Hz, une vitesse de déroulement du papier de $2,5 \text{ cm min}^{-1}$, un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm avec une lecture du micro-ordinateur à tous les 2 nm. Pour ce qui est des valeurs numériques des pentes de saturation, elles seront toutes incluses dans l'Appendice A.

3.2.1 Lamelle de verre

Initialement les essais de Daniel Ducharme (32) ont démontré que l'emploi d'une lamelle de verre comme support-échantillon suffisait pour obtenir un spectre photoacoustique de l'hémoglobine du sang avec une résolution moindre que celle en transmission (Unicam SP-1800). Toutefois, son protocole expérimental ne considère pas l'importance de l'étalement, critère auquel Lin (14) apporte une importance comme source de saturation photoacoustique.

3.2.1.1 Description technique

La lamelle de verre (No. 12-545-10, Fisher Scientific Co. Ltd.) se compose de borosilicate. Elle est optiquement transparente, d'un diamètre de 18 mm et d'une épaisseur variant entre 0,13 et 0,17 mm. Chaque lamelle est nettoyée premièrement avec de l'éthanol anhydre (Les Alcools de Commerce Ltée) pour éliminer les lipides en surface, deuxièmement avec de l'eau distillée et ensuite asséchée. De cette manière on évite les contaminants susceptibles d'affecter les mesures expérimentales.

3.2.1.2. Préparation des échantillons

Si nous avons une poudre, on appliquera un morceau de ruban adhésif (Scotch No. 600) épousant la forme de la lamelle et qui colle sur les deux faces pour ensuite saupoudrer l'échantillon de façon à recouvrir uniformément la surface. Par contre, les échantillons liquides sont simplement déposés en surface et doivent sécher pour une période de 12 à 24 heures. Quant aux tissus, une fois coupés, ils adhèrent facilement

à la lamelle.

3.2.1.3 Essais et spectre photoacoustique

A la figure 15, nous avons reproduit le spectre photoacoustique, normalisé par rapport au noir de charbon, d'une lamelle de verre suivi de la figure 16 représentant la pente de saturation.

A priori on remarque sur le plan spectral une diminution de l'intensité relative de 0,15 à 0,01 entre 250 et 350 nm, caractérisant les propriétés de l'absorption du verre dans l'ultraviolet, tout en ayant un signal photoacoustique négligeable dans la zone de 350 à 650 nm d'où le peu d'interférence dans les spectres de matière biologique absorbant dans la région du visible. La pente de saturation est de -1,1 d'où complète saturation acoustique. Vis-à-vis les autres critères pour le choix d'un support-échantillon, on note que la composition de la lamelle n'est pas affectée par les différents réactifs utilisés, que l'étude de macromolécules de faible dimension est acceptable étant donné l'absence de porosité du verre capable d'évacuer le solvant. Par contre, le temps requis pour l'évaporation soulève deux problèmes importants. Premièrement un étalement non-uniforme dû à une évaporation irrégulière se caractérisant par un échantillon accumulé à la périphérie de la lamelle (fig. 23A). Deuxièmement le facteur du temps pour étudier un échantillon instable comme c'est le cas pour les spécimens capables d'échanges gazeux avec leur environnement.

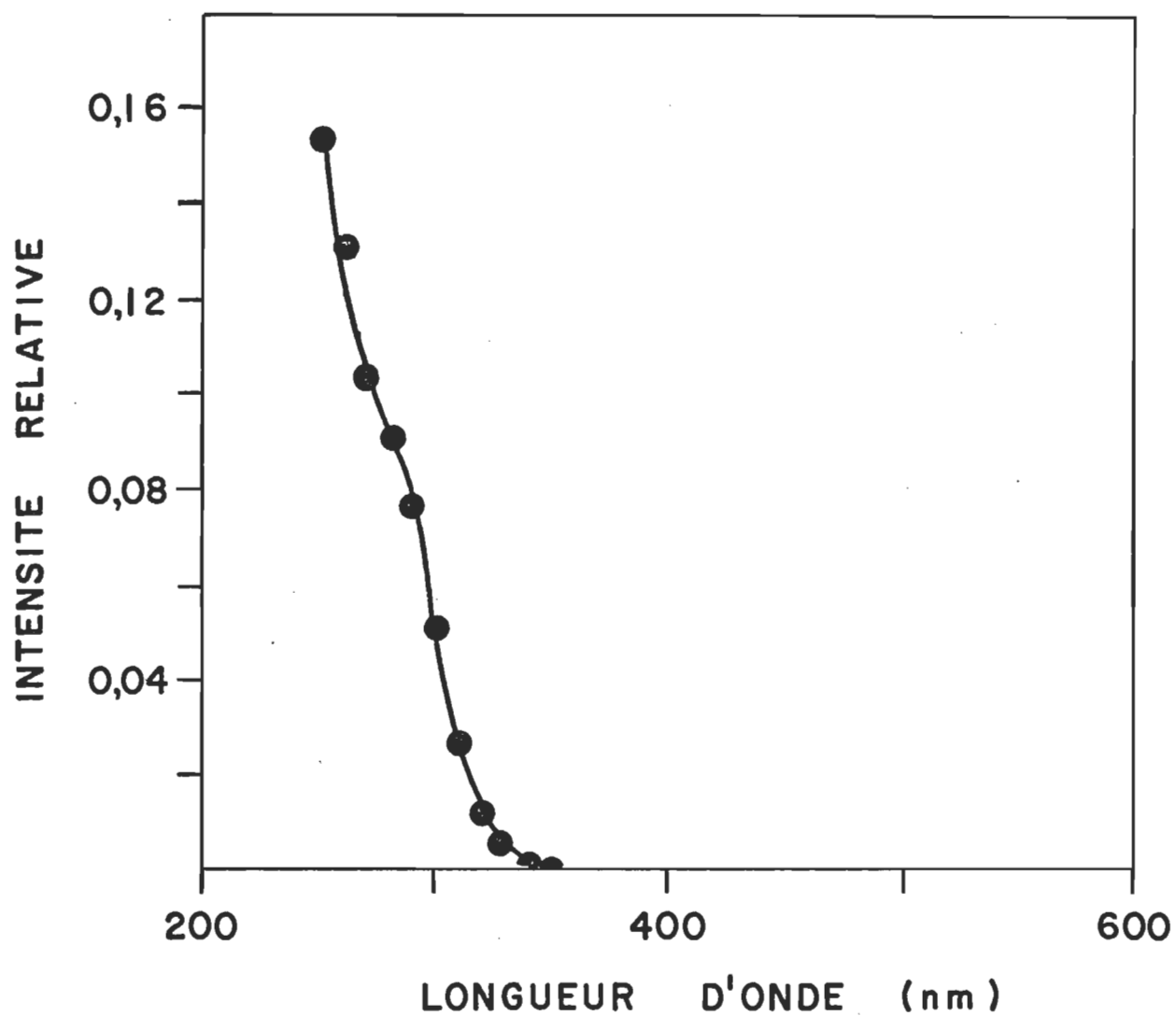


Figure 15:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE D'UNE LAMELLE DE VERRE

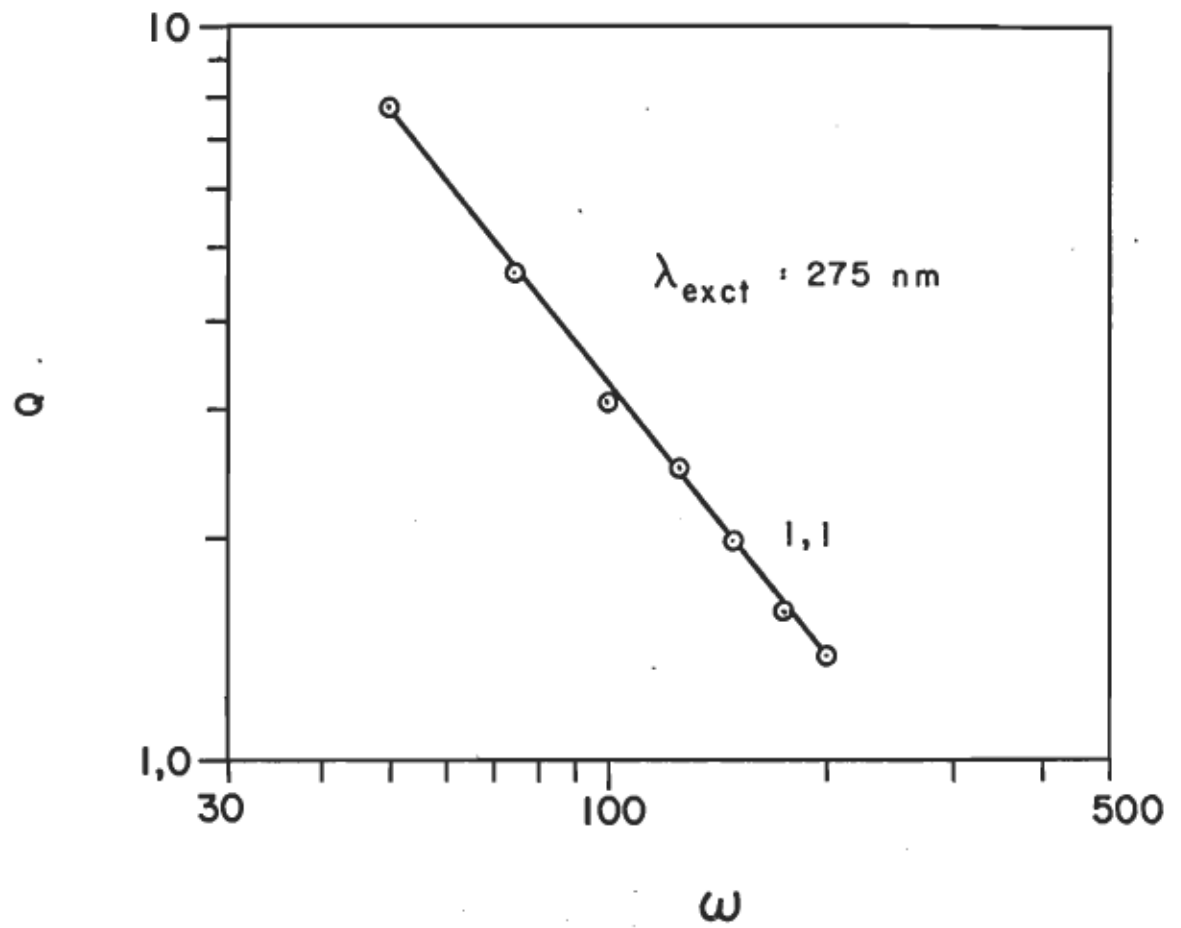


Figure 16:

PENTE DE SATURATION D'UNE LAMELLE DE VERRE

3.2.2 Filtre Nucléopore

Le choix d'un support-échantillon devra être orienté en fonction d'un meilleur étalement tout en évitant d'être obligé d'évaporer l'échantillon d'où l'utilisation des filtres.

3.2.2.1 Description technique

Le filtre Nucléopore (CA94566, Nucleopore Corporation) est une membrane en polycarbonate sur laquelle sont disposés régulièrement des pores symétriques de $1,0\text{ }\mu\text{m}$, d'un diamètre de 25 mm et chimiquement inerte. Le choix de la porosité du filtre se justifie aux valeurs inférieures au diamètre moyen de $7,5\text{ }\mu\text{m}$ des globules rouges, tel que mentionné dans la section 1.3.1, de manière à les retenir sélectivement à la surface de la membrane. Commercialement, le filtre est disponible soit avec un diamètre de 13 mm ou de 25 mm; on a dû machiner un instrument de perforation avec un rayon de 9 mm de façon à se restreindre à la surface disponible dans l'enceinte photoacoustique, c'est-à-dire $2,5\text{ cm}^2$. Etudions maintenant les caractéristiques spectrales et la qualité d'étalement de ce filtre.

3.2.2.2 Essais et spectre photoacoustique

On observe une qualité de déposition et une capacité de soustraire le solvant entourant les pigments qui puissent satisfaire les critères fixés au début de la section 3.2. Toutefois l'approche spectrale de la figure 17 révèle deux bandes distinctes dont l'une à 275 nm et l'autre

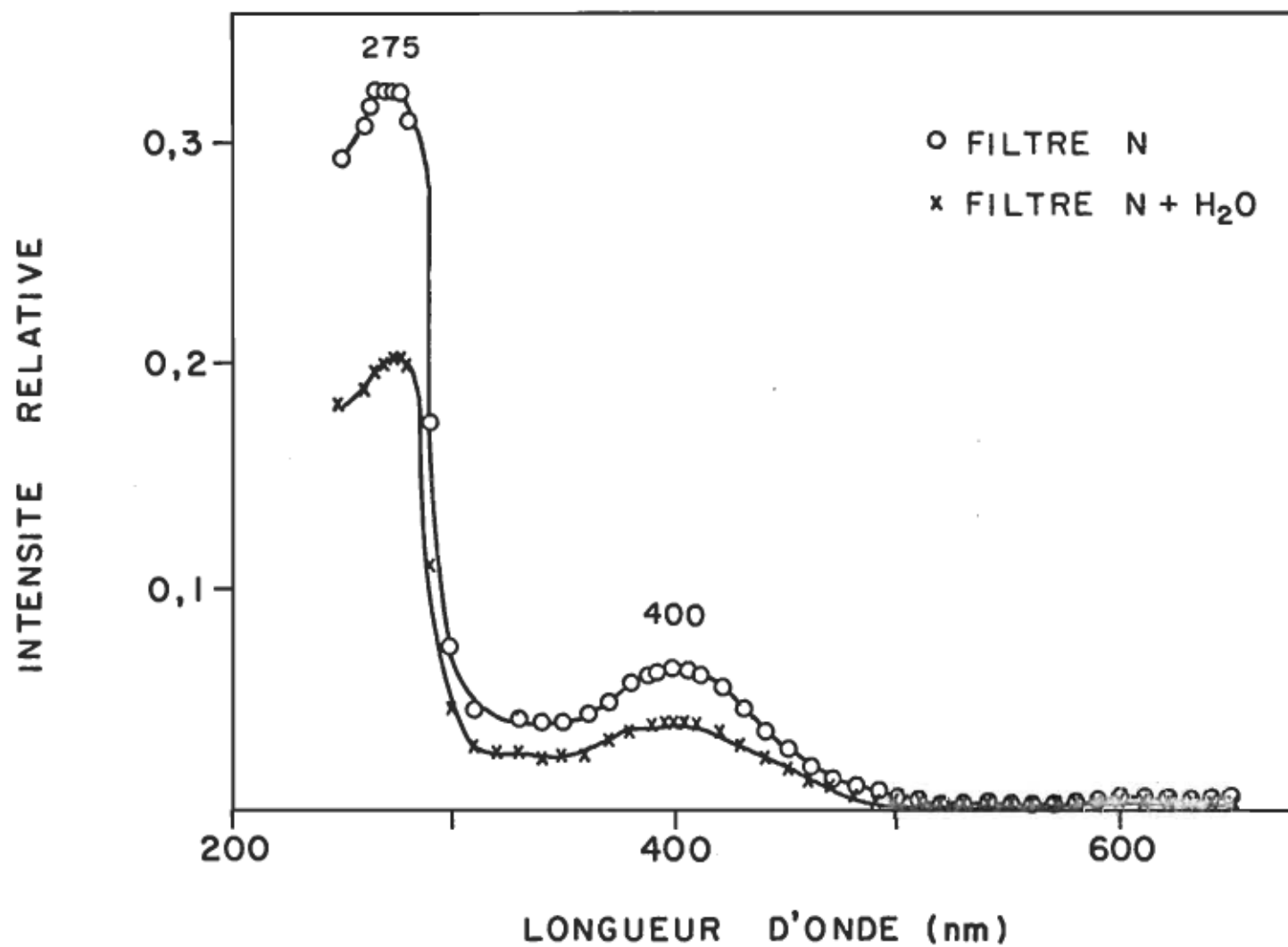


Figure 17:
SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES D'UN FILTRE NUCLE PORE

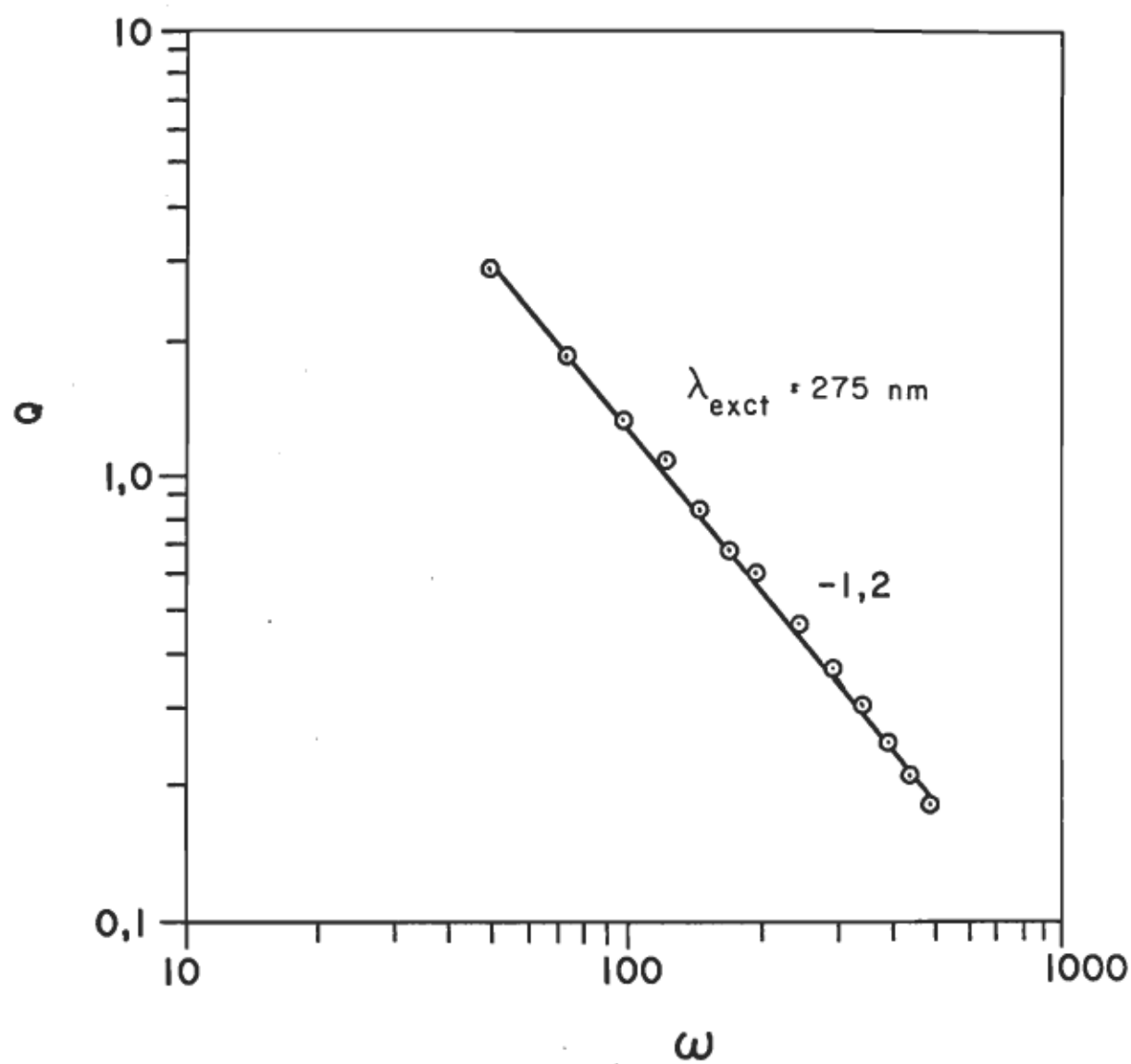


Figure 18:

PENTE DE SATURATION D'UN FILTRE NUCLEPORE

à 400 nm. Même si l'intensité relative est faible (lorsque le filtre est humide), elle risque d'introduire des artefacts dans les spectres d'échantillons dilués absorbant dans ces régions, ce que Bennett (33) ne spécifie pas en suggérant le filtre Nucléopore comme excellent support-échantillon pour des expériences à basse fréquence par rapport aux filtres de Téflon et Millipore. La pente de saturation de -1,2 représentée à la figure 18 indique un signal photoacoustique partiellement saturé optiquement.

3.2.3 Filtre Pellicon

La sélection du filtre Pellicon comme support-échantillon répond au besoin d'un filtre capable de maintenir les molécules à la surface en fonction de leur poids moléculaire tout en laissant passer le solvant.

3.2.3.1 Description technique

Chaque filtre Pellicon (PSED02510, Millipore Corp.) consiste en une membrane semi-perméable fixée à un polymère de nature poreuse, d'un diamètre de 25 mm que l'on taille à 18 mm pour nos besoins et chimiquement inerte avec les acides et les bases faibles sur une étendue de pH s'échelonnant entre 2,0 et 10,0.

3.2.3.2 Essais et spectre photoacoustique

Tant en présence d'un filtre sec qu'humidifié, on observe (figure 19) une bande spectrale à 280 nm avec une intensité relative d'environ 0,12, ce qui est suffisamment élevé pour masquer un chromophore

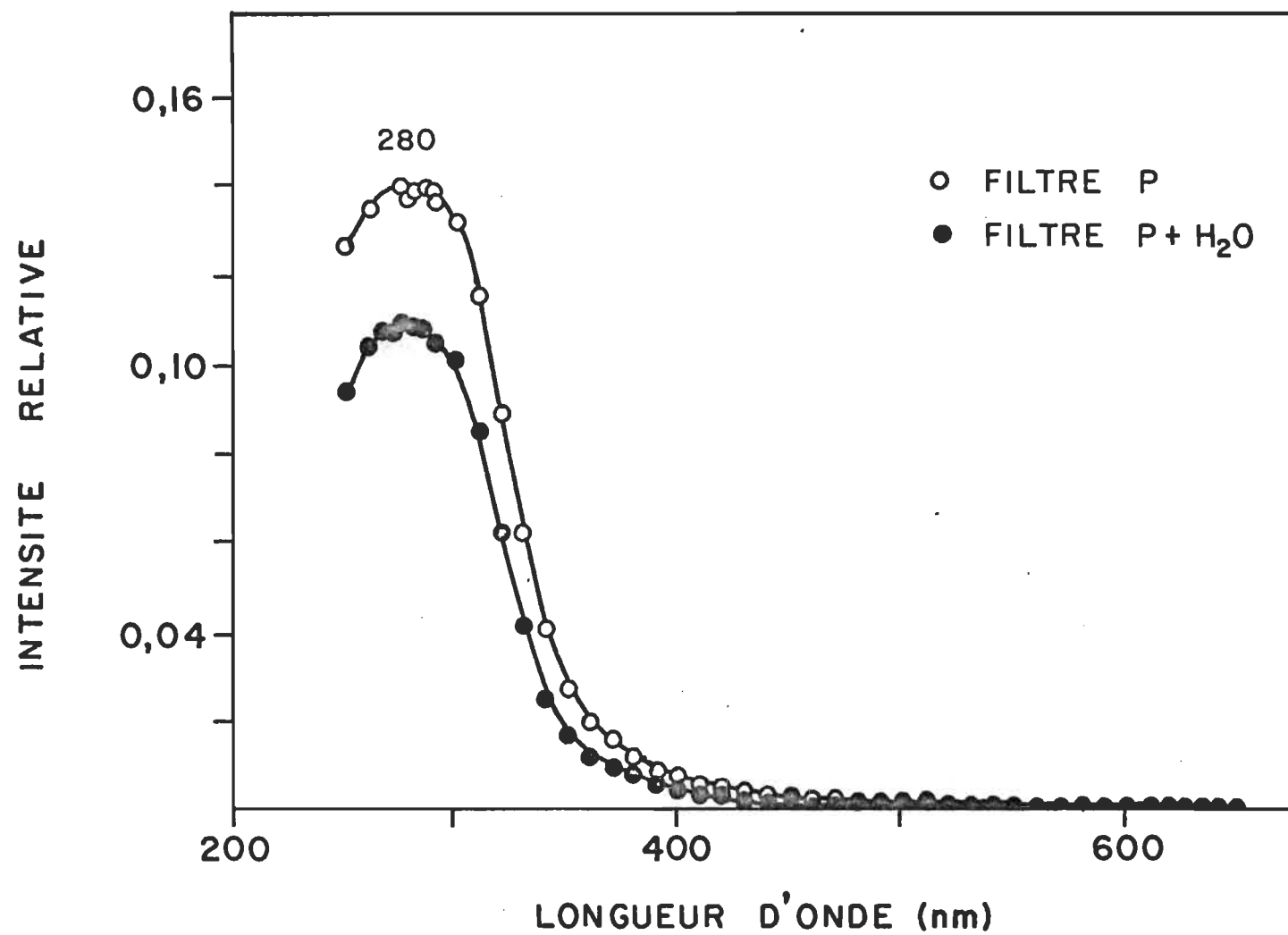


Figure 19:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES D'UN FILTRE PELLICON

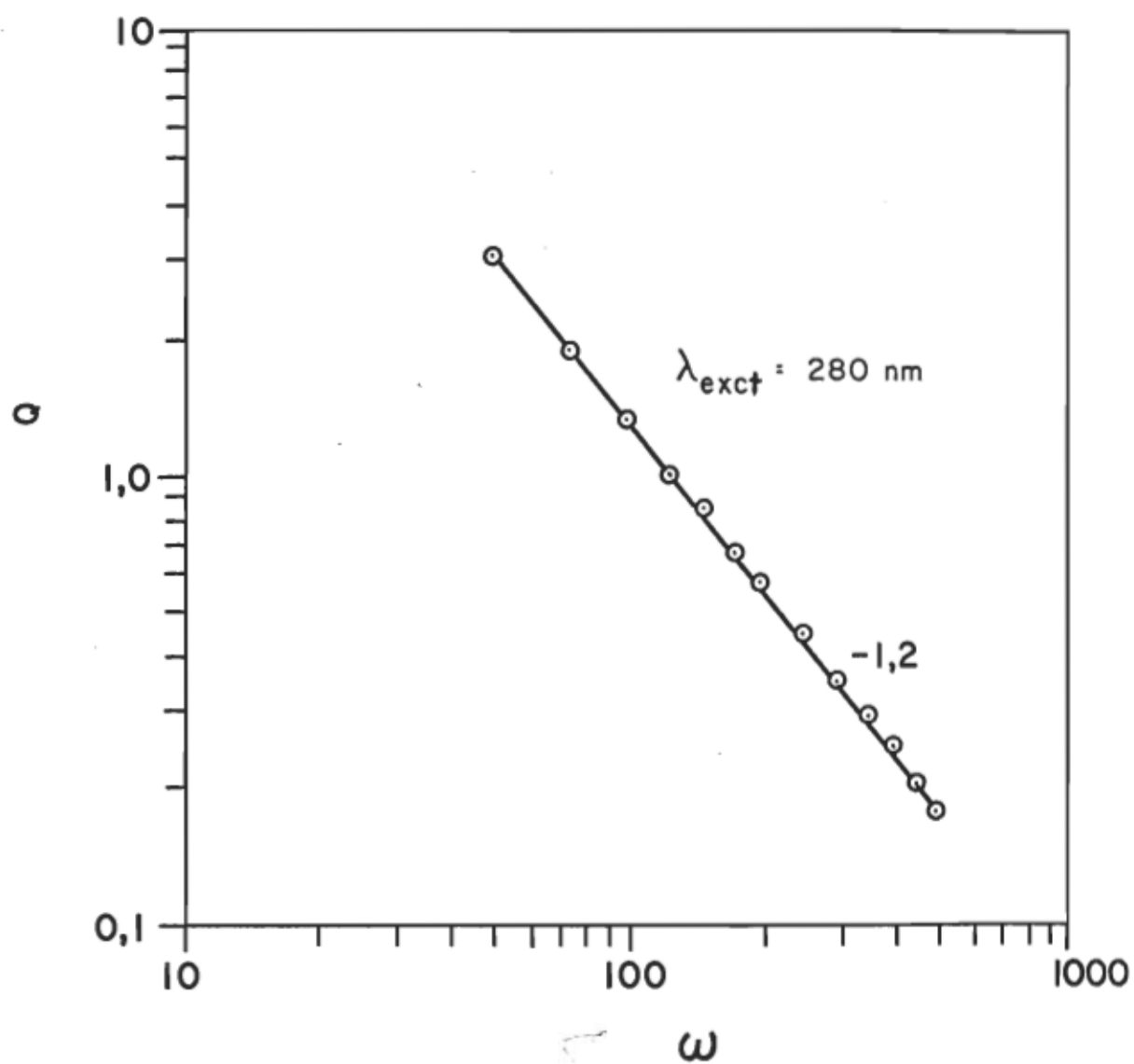


Figure 20:

PENTE DE SATURATION D'UN FILTRE PELLICON

ayant un faible coefficient d'absorption. L'autre facteur expérimental que l'on contrôle difficilement est l'uniformité de l'étalement ce qui pourrait s'expliquer par le phénomène de "polarisation de concentration" que le manufacturier (34) définit comme étant la formation d'un gel, qui change les caractéristiques de rétention, due à l'accumulation des molécules à la surface de la membrane (fig. 23B). Parallèlement, ce même phénomène allonge le temps nécessaire pour filtrer l'échantillon ce qui va à l'encontre du critère pré-établi pour le choix d'un filtre. Quant à la pente de saturation que représente la figure 20, sa valeur de -1,2 caractérise une saturation optique partielle.

3.2.4 Filtre Millipore

Jusqu'à maintenant, aucun support-échantillon ne répond adéquatement aux critères fixés d'où l'essai du filtre Millipore.

3.2.4.1 Description technique

La matière première du filtre (MF-RA, Millipore Corp.) se compose d'esters de cellulose formant un enchevêtrement de fibres dont la porosité de 1,2 μm est choisie en fonction de la dimension des globules rouges tout en minimisant la quantité de solvant par filtration. On utilise le même mode opératoire pour réduire le diamètre du filtre de 25 à 18 mm tel que stipulé dans la section 3.2.2.1, de manière à obtenir une surface d'étalement de 2,5 cm^2 . Cette membrane résiste à l'attaque des acides et des bases à faible concentration. Examinons de plus près la méthode expérimentale pour filtrer l'échantillon.

3.2.4.2 Préparation des échantillons

Nous avons utilisé deux systèmes de filtration pour déposer l'échantillon. Le système Swinnex (No. XX00025 00, Millipore Corp.) déverse un volume donné d'échantillon sur le filtre en appliquant une pression constante sur le piston de la seringue de manière à filtrer le solvant tout en laissant le soluté à la surface du filtre. Il existe certains désavantages à ce système, comme le fait d'exercer une telle pression sur l'échantillon au cours de la manipulation occasionne le bris mécanique d'un nombre indéterminé de globules rouges, donc l'étalement n'est pas nécessairement quantitatif. Il en est de même pour la présence indésirable de bulles d'air qui provoque parfois un étalement non-uniforme. D'où l'intérêt d'utiliser le système de filtration sous vide de la compagnie Millipore Corp. Il est conçu en borosilicate avec une capacité volumétrique de 15 ml (No. XX 10 025 14), d'un support en verre de fritte (No. XX 10 025 02) adapté à un bouchon de caoutchouc que l'on insère dans la fiole à tubulure de 250 ml (F4380-250, Canlab) et d'une pince en aluminium anodisé (No. XX 10 025 03) qui tient en place l'entonnoir sur le rebord en verre. Comme le débit de filtration de ce système est très rapide, l'opération n'exige que 1 à 2 minutes et dépend principalement du volume que l'on dépose sur le filtre inséré dans la partie inférieure de l'entonnoir.

3.2.4.3 Essais et spectre photoacoustique

Les spectres d'un filtre Millipore à l'état sec ou en présence d'eau sont représentés à la figure 21. Le spectre d'un filtre anhydre se

caractérise par un épaulement vers 254 nm suivi d'une bande vers 280 nm, que l'on observe aussi avec le filtre humidifié. A noter que la différence en intensité relative entre les deux spectres est bien marquée. Toutefois, le spectre du filtre Millipore humide est faible mais non-négligeable ce qui, à la rigueur, nous permet d'étudier seulement les chromophores à haute concentration dans la zone de 250 à 350 nm. Sinon nous serons dans l'impossibilité de discerner le signal du spécimen par rapport à celui du support-échantillon. Par contre, le spectre entre 350 et 650 nm ne révèle aucun pic d'où l'assurance d'obtenir des données propres aux chromophores sans artefact. La figure 22 indique une pente de -1,1 d'où saturation optique du signal pour le filtre Millipore. Si on considère l'uniformité de l'étalement, il suffit de l'examiner macroscopiquement en comparant avec les étalements sur lamelle de verre et filtre Pellicon de la figure 23.

3.3 Echantillons à atmosphère contrôlée

Dans le cadre de notre projet, on tenait à identifier certains intermédiaires de l'hémoglobine tels que l'oxyhémoglobine et la carboxyhémoglobine, la formation dépend de la nature du gaz ambiant. D'où la nécessité d'étudier le comportement du signal photoacoustique en présence d'un volume constant de différents gaz.

Le protocole expérimental utilisé lors de nos expériences se résume à changer le gaz en l'évacuant par l'une des soupapes pour ensuite faire le plein avec l'autre gaz pour une période d'une minute. Parmi les diffé-

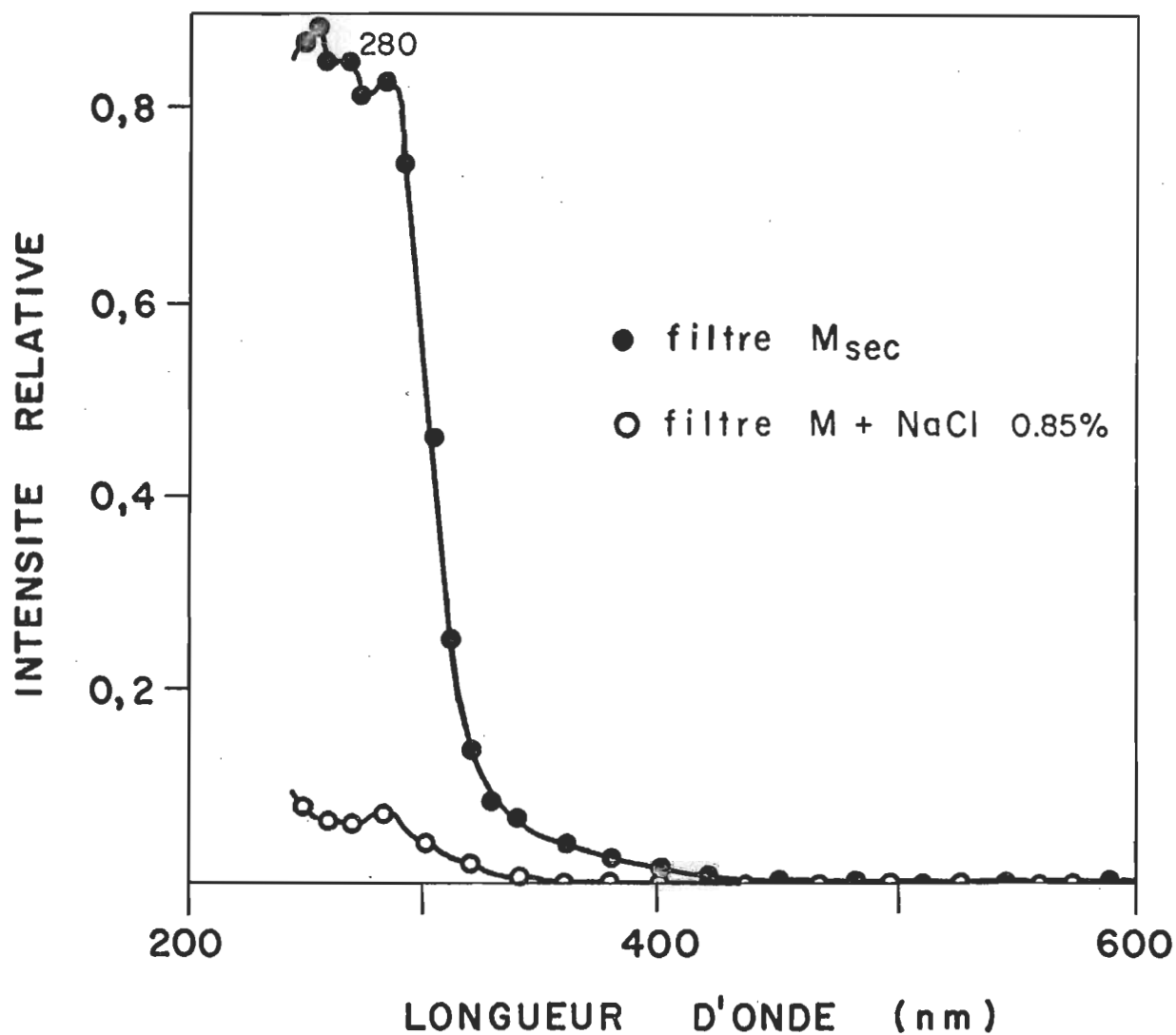


Figure 21:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES D'UN FILTRE MILLI-PORE

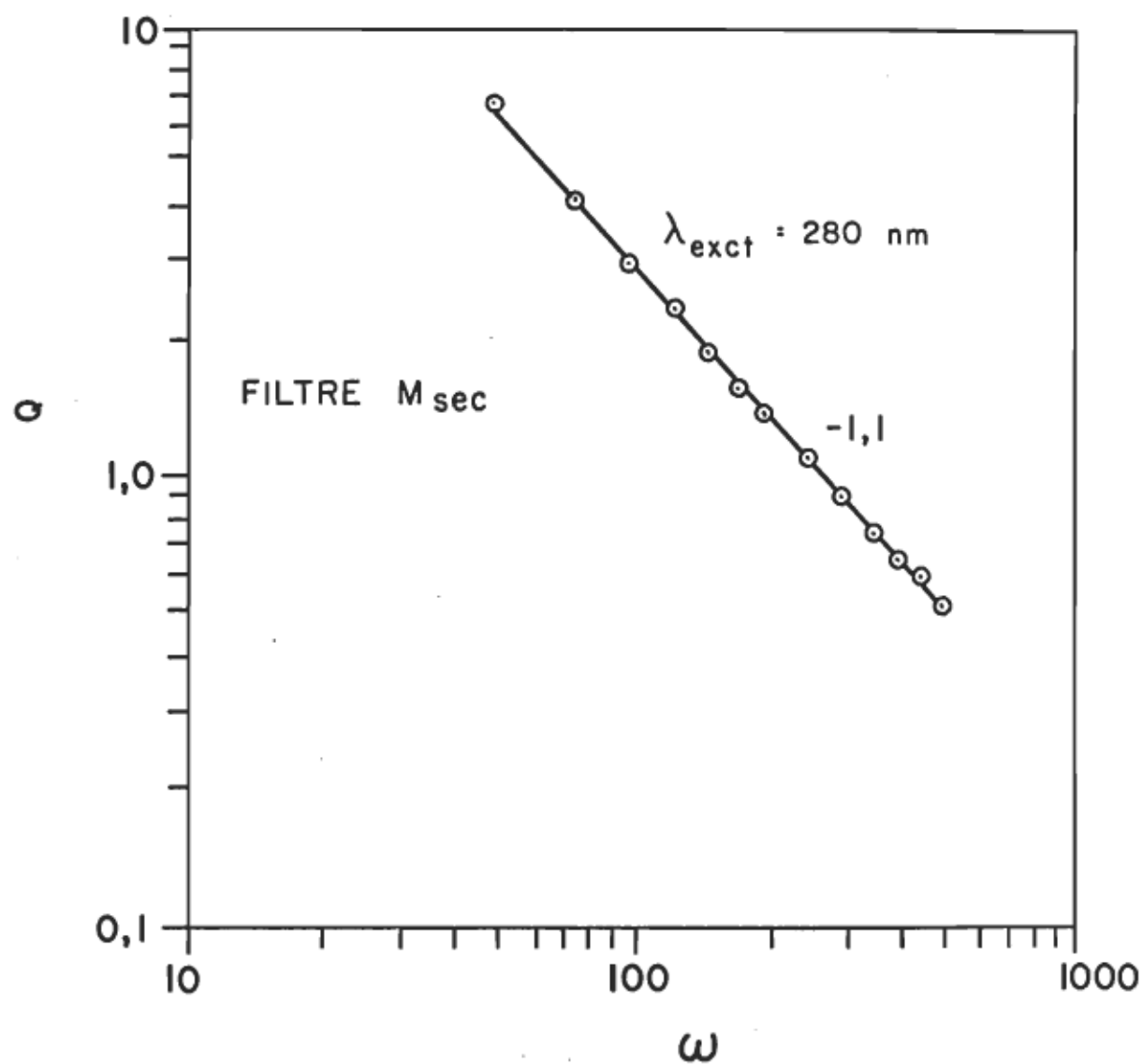


Figure 22:

PENTE DE SATURATION D'UN FILTRE MILLIPORE

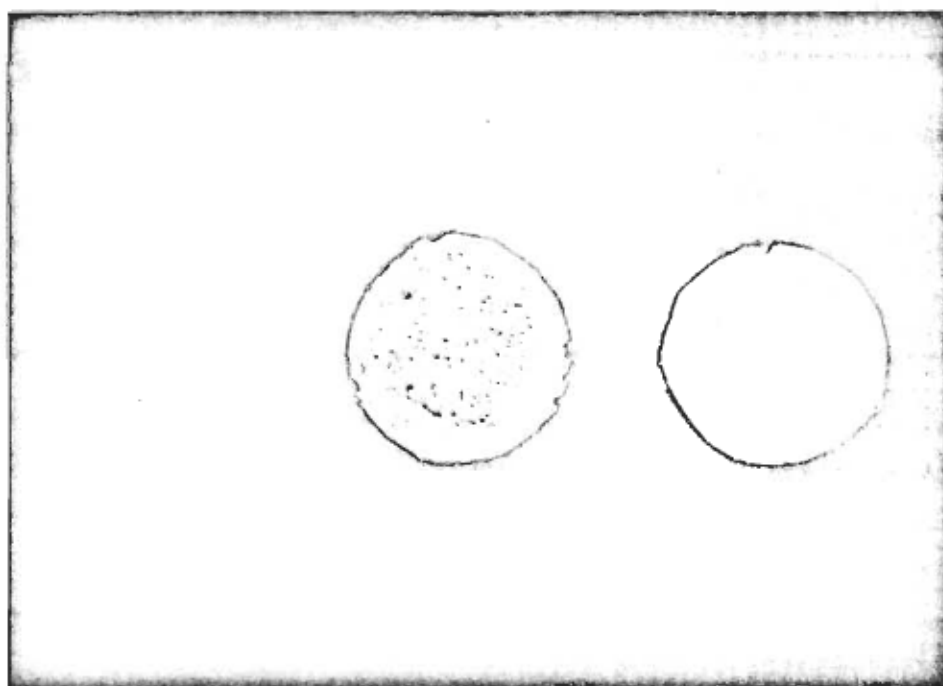


Figure 23:

UNIFORMITE DE L'ETALEMENT SUR LES SUPPORTS-
ECHANTILLON

les différents gaz étudiés, citons l'argon, l'oxygène, le monoxyde de carbone, l'azote et l'air. Les spectres photoacoustiques du noir de charbon (figure 24) en présence de divers gaz démontrent clairement que seul l'argon produit une augmentation significative de l'intensité du signal photoacoustique.

Le comportement de l'intensité du signal photoacoustique en présence de différents gaz se compare aux propriétés physico-chimiques de chaque gaz énuméré, selon les auteurs, dans le tableau IV. Adams (3) utilise le terme " γ ", c'est-à-dire le rapport entre la capacité calorifique à pression constante (C_p) du gaz étudié et la capacité calorifique à volume constant (C_v) du même gaz. Eaton (4) décrit son facteur d'efficacité du transfert thermique du gaz ambiant comme étant le rapport du terme " γ " et le diamètre moléculaire du gaz (σ). Quant au facteur d'augmentation (FA) de Wong (35), on réunit la relation des rapports des capacités calorifiques du gaz étudié par rapport à l'azote (γ_g/γ_{N_2}) à la relation des longueurs de diffusion thermique du même gaz vis-à-vis l'azote (α_g/α_{N_2}). A noter que le même auteur (35) signale que la nature du gaz affecte très peu la forme du spectre et ne modifie en rien la position des bandes.

Par conséquent, le changement du gaz ambiant peut:

- 1^e Modifier la transduction du flux thermique en signal PAS, c'est-à-dire son intensité comme c'est le cas pour le gaz argon (voir fig. 24).
- 2^e Affecter l'état moléculaire du pigment étudié en modifiant son spectre, ce que nous verrons avec les intermédiaires oxyhémoglobine et carboxyhémoglobine.

C'est donc dire que le phénomène photoacoustique tel qu'on le conçoit dépend en grande partie des propriétés physiques du support-échantillon et du gaz ambiant qui entourent l'échantillon. Dès lors, le bagage de notions expérimentales accumulé jusqu'à maintenant nous permet d'entamer le prochain chapitre axé sur l'étude spectroscopique de différents chromophores intégrés dans la matière biologique.

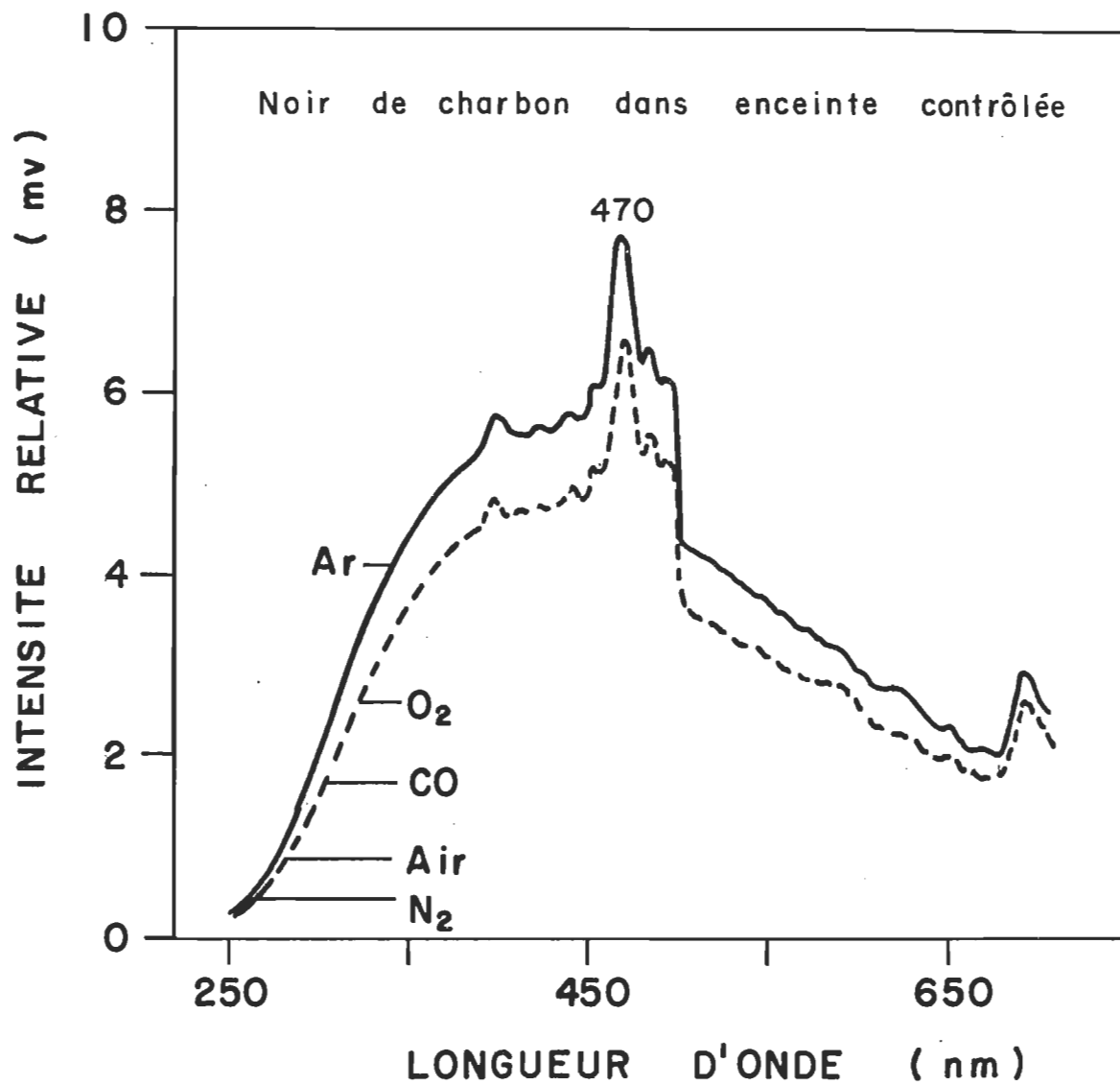


Figure 24:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DU NOIR DE CHARBON
EN PRESENCE DE DIFFERENTS GAZ.

TABLEAU IV

Relation entre la variation de l'intensité du signal photoacoustique du noir de charbon en présence de différent gaz et les propriétés physiques du gaz

GAZ	γ **	γ/σ **	FA ***	INTENSITE
	*	*	*	mV
Ar	1,67	1,19	1,12	7,7
O ₂	1,40	1,00	-	6,5
CO	-	-	-	6,5
N ₂	1,40	1,00	1,00	6,5
Air	1,40	1,00	0,96	6,5

* Unités arbitraires

** D'après la référence 4

*** D'après la référence 35

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4. RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre se consacre à l'étude des spectres photoacoustiques de pigments biologiques comme l'hémoglobine et ses dérivés à l'état de solide amorphe ou de solide hydraté en relation avec les supports-échantillon adéquats. Nous présentons aussi les pentes de saturation qui indiquent le degré de fidélité en relation avec le coefficient d'absorption optique de l'échantillon. Certains cas pourront être comparés aux spectres d'absorption. Par la même occasion, nous appliquerons la spectroscopie photoacoustique à des spécimens biologiques optiquement opaques tels que les tissus et les cellules. Nous consacrons la première section à expliciter les méthodes informatisées pour obtenir les données spectrales corrigées.

4.1 Traitement des données en spectroscopie photoacoustique

Les données d'un spectre brut sont ajustées de façon à ce que la phase soit au maximum dans la région où la désexcitation non-radiative de l'échantillon est la plus grande. Toutefois on ne tient pas compte des changements aléatoires dans l'intensité de la source lumineuse. Par conséquent, on corrige les spectres photoacoustiques en utilisant comme référence une substance très absorbante telle que le noir de charbon dont le signal est proportionnel à l'intensité de la lampe tout en étant indépendante de la longueur d'onde, c'est-à-dire en complète saturation photoacoustique (selon la pente de la figure 25). Le traitement des données consiste à faire la moyenne de deux ou trois spectres selon la stabilité de l'échantillon, de le

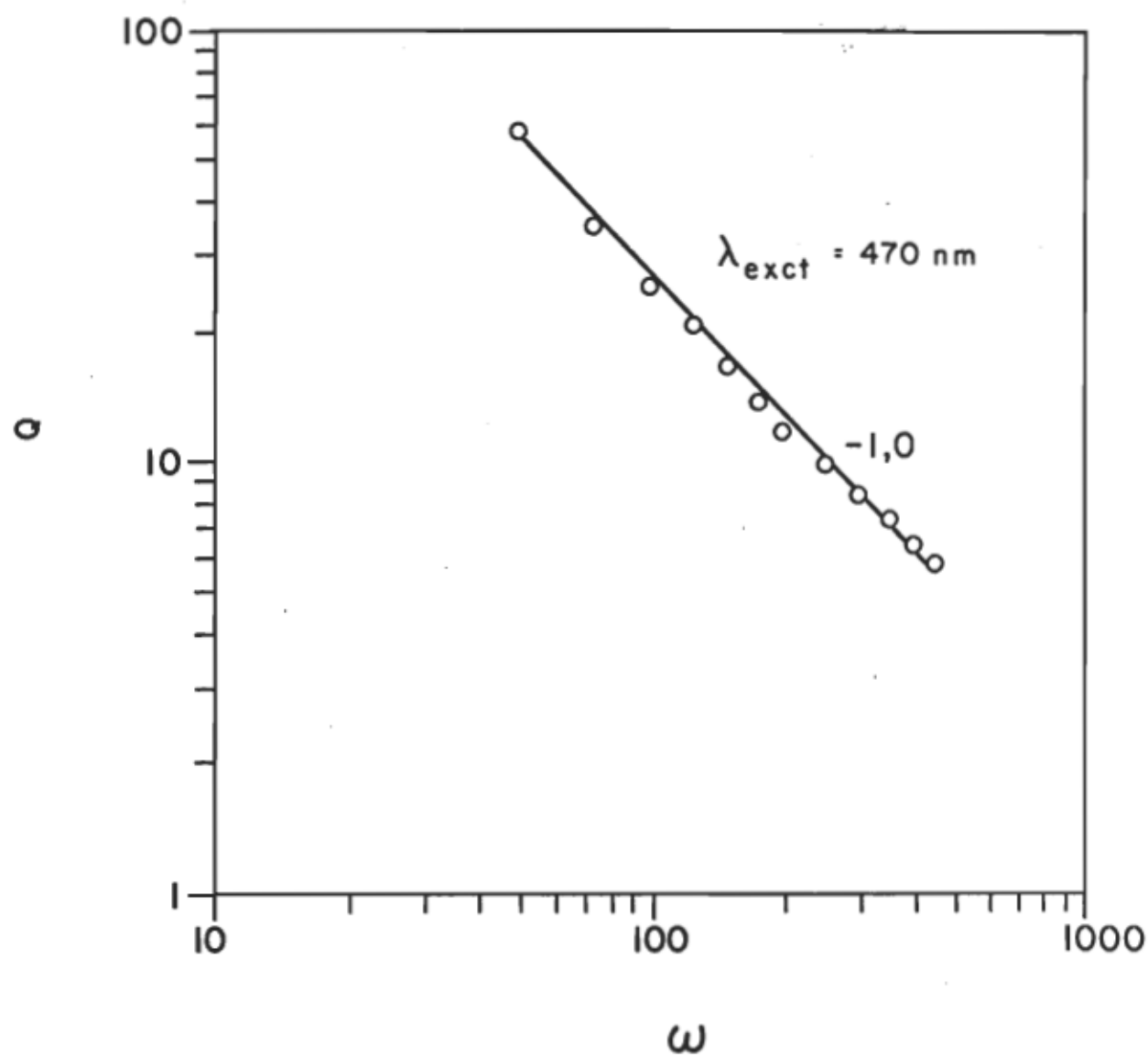


Figure 25:

PENTE DE SATURATION DU NOIR DE CHARBON

diviser par le spectre du noir de charbon enregistré périodiquement sur les bandes de mémoire du microordinateur. On divise à nouveau par la réciproque d'un facteur de correction s'apparentant au rapport des échelles de sensibilité échantillon-noir de charbon. Ceci nous permet donc de standardiser nos spectres dans l'optique de les comparer. La plupart des données spectrales sont inscrites à des intervalles réguliers de 2 nm.

L'importance des conditions instrumentales dans l'interprétation d'un spectre n'est plus à justifier. Il suffit de regarder le comportement spectral du noir de charbon à différents temps d'intégration sur les figures 26 et 27 pour comprendre que les déplacements bathochromes et la mauvaise résolution des bandes sont inhérents à l'augmentation du temps de réponse de l'amplificateur synchrone. D'où la nécessité d'indiquer tous les paramètres instrumentaux susceptibles d'influencer un spectre photoacoustique.

4.2 Spectre photoacoustique d'hémoprotéines sur lamelle

Le choix de la lamelle de verre comme support-échantillon répond au besoin d'une matrice rigide pour déposer adéquatement une quantité donnée d'hémoprotéine à l'état solide. Dans un premier temps, nous étudierons les spectres photoacoustiques d'hémoglobine, d'hématine et de myoglobine sous forme de poudre cristalline. Deuxièmement, nous analyserons le comportement spectral de l'hémoglobine du sang total dans différentes conditions expérimentales soit en faisant varier un paramètre instrumental, soit en modifiant le contexte moléculaire par dilution ou par extraction.

Spectres photoacoustiques du noir de charbon en fonction du temps
d'intégration dans les deux enceintes

Paramètres instrumentaux:

Bande passante: 6,6 nm

Fréquence: 100 Hz

Vitesse de balayage: 50 nm min⁻¹

Vitesse de déroulement du papier: 2,5 cm min⁻¹

Temps d'intégration: 1, 3, 10 s

Gaz ambiant: air

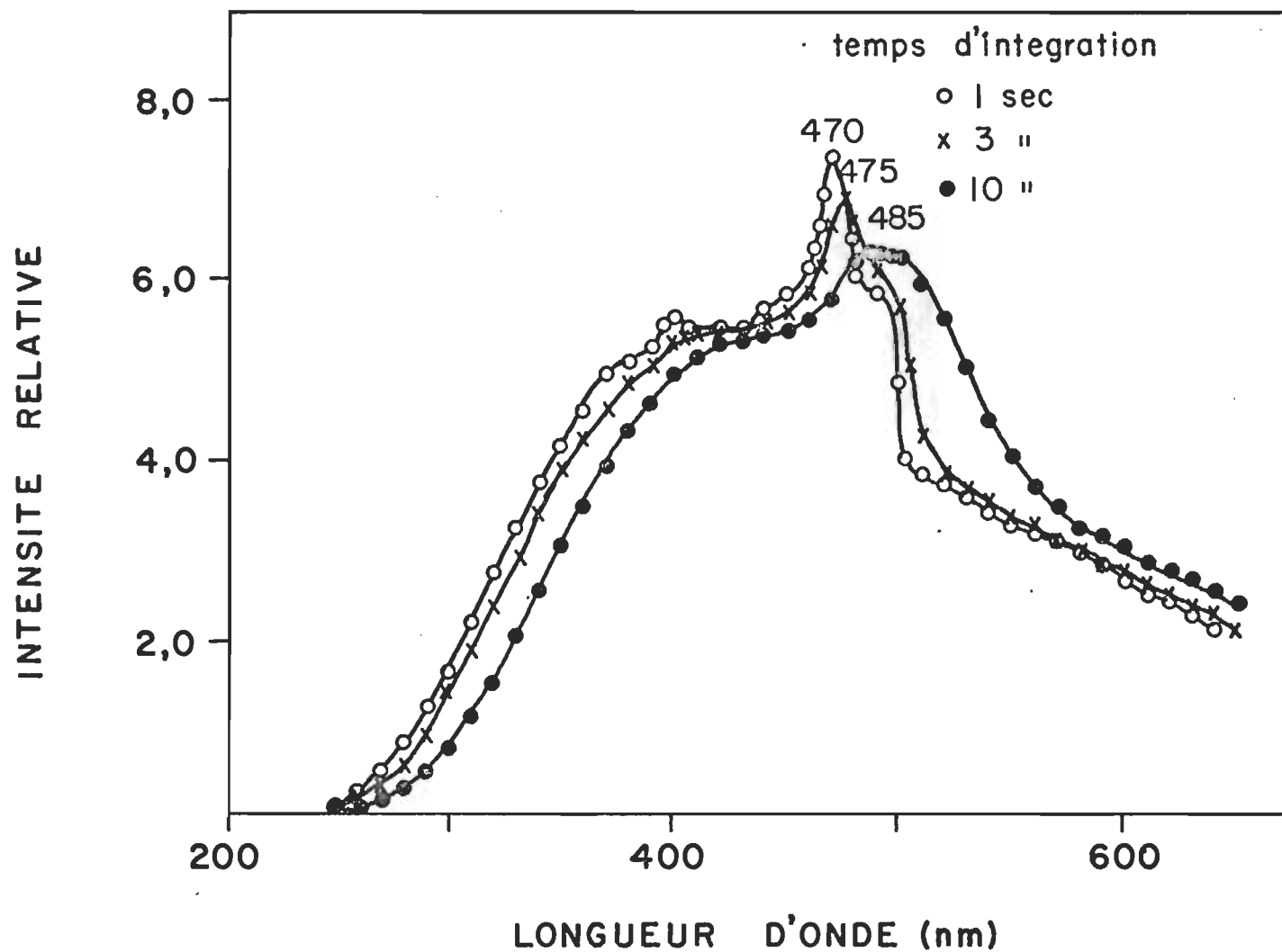


Figure 26:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DU NOIR DE CHARBON DANS L'ENCEINTE A
A ATMOSPHERE NON-CONTROLEE

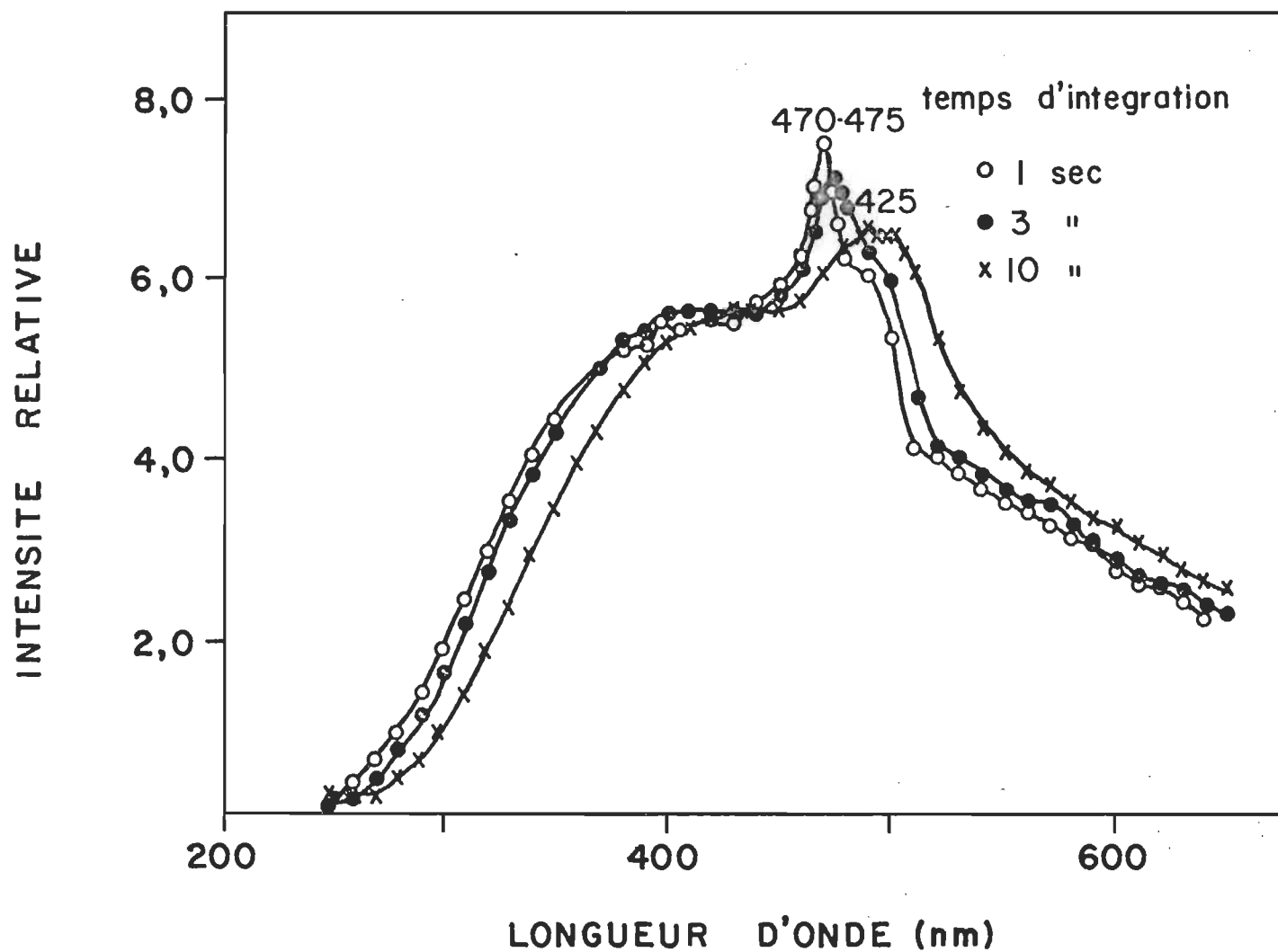


Figure 27:
SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DU NOIR DE CHARBON DANS L'ENCEINTE
A ATMOSPHERE CONTROLEE

4.2.1 Spectre photoacoustique d'hémo protéines à l'état de solide cristallin

Implicitement la spectroscopie photoacoustique est en mesure d'étudier des solides biologiques tels que les poudres d'hémoglobine, d'hématine et de myoglobine. Tous les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions instrumentales, soient: une bande passante de 6,6 nm, un temps d'intégration de 3 s, une vitesse de balayage de 50 nm min^{-1} , une fréquence de modulation de 100 Hz, une vitesse de déroulement du papier de $2,5 \text{ cm min}^{-1}$, un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm. En examinant les spectres photoacoustiques de l'hémoglobine et de la myoglobine, aux figures 28 et 29, nous observons que leurs bandes sont similaires à celles obtenues en transmission (voir tableau III, page 23). A noter que l'effet bathochrome sur le spectre de l'hémoglobine est causé par le temps d'intégration de 3 s et l'état solide de l'échantillon (36). Pour ce qui est de l'hématine, les tentatives de déterminer ses bandes à l'état solide se sont avérées un échec dû au fait que son chromophore absorbe énormément au point d'être en pleine saturation photoacoustique. D'où la dilution de l'hématine dans un solvant basique comme le NaOH, 1N que l'on détaille dans l'Appendice C. L'addition du NaOH modifie l'hémine en échangeant son atome de chlore pour un groupement hydroxyl donnant ainsi un composé verdâtre appelé hématine dont le spectre photoacoustique à la figure 30 se définit par une bande bien caractérisée à 400 nm et une bande dans le visible à 590 nm que l'on peut associer aux bandes de 570 et 595 nm en transmission. C'est donc dire que l'étude de solides biologiques en spectroscopie photoacoustique sous certaines conditions instrumentales est possible dans la mesure où le coefficient d'absorp-

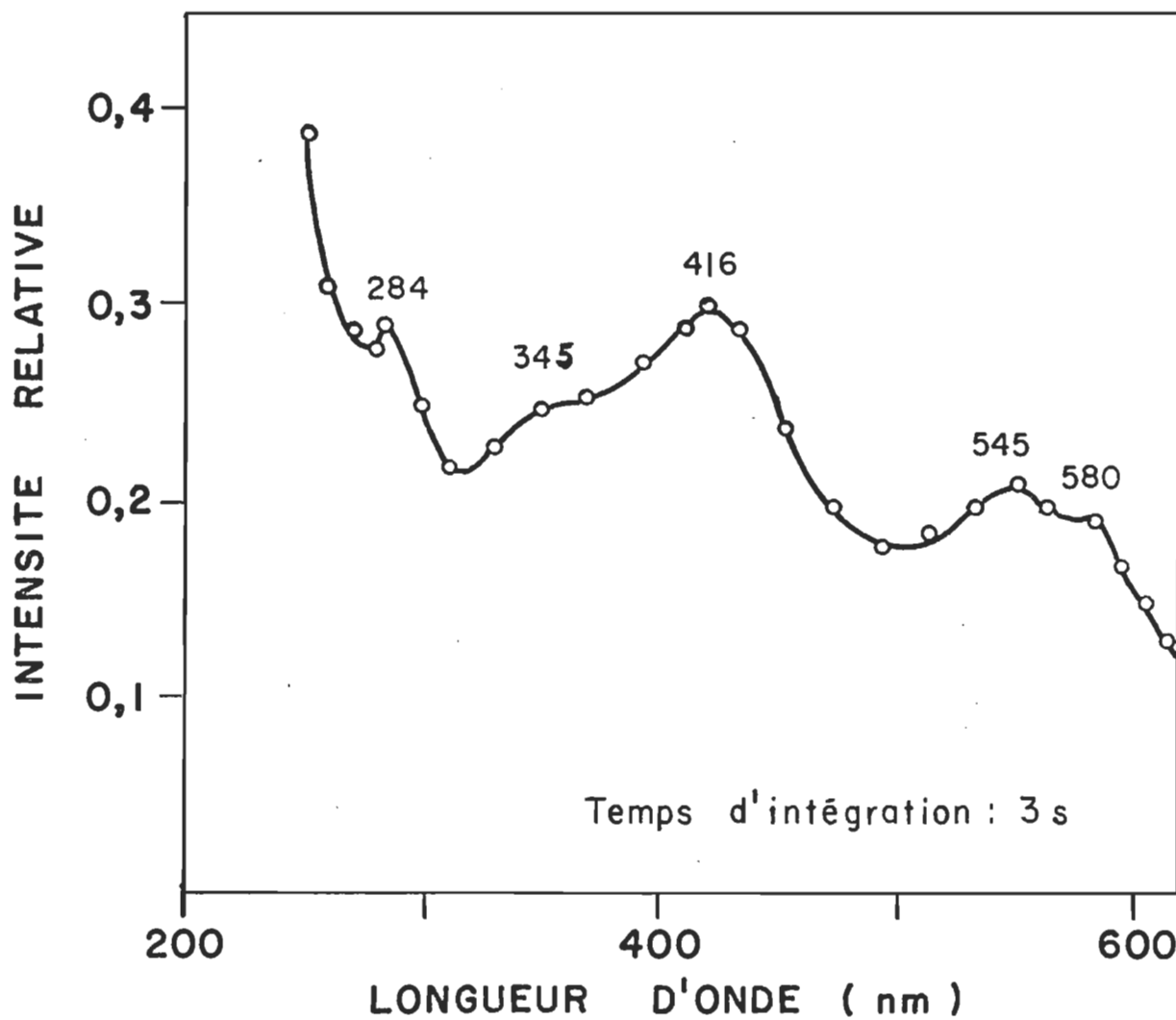


Figure 28:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE DE L'HEMOGLOBINE A L'ETAT DE POUDRE CRISTALLINE.

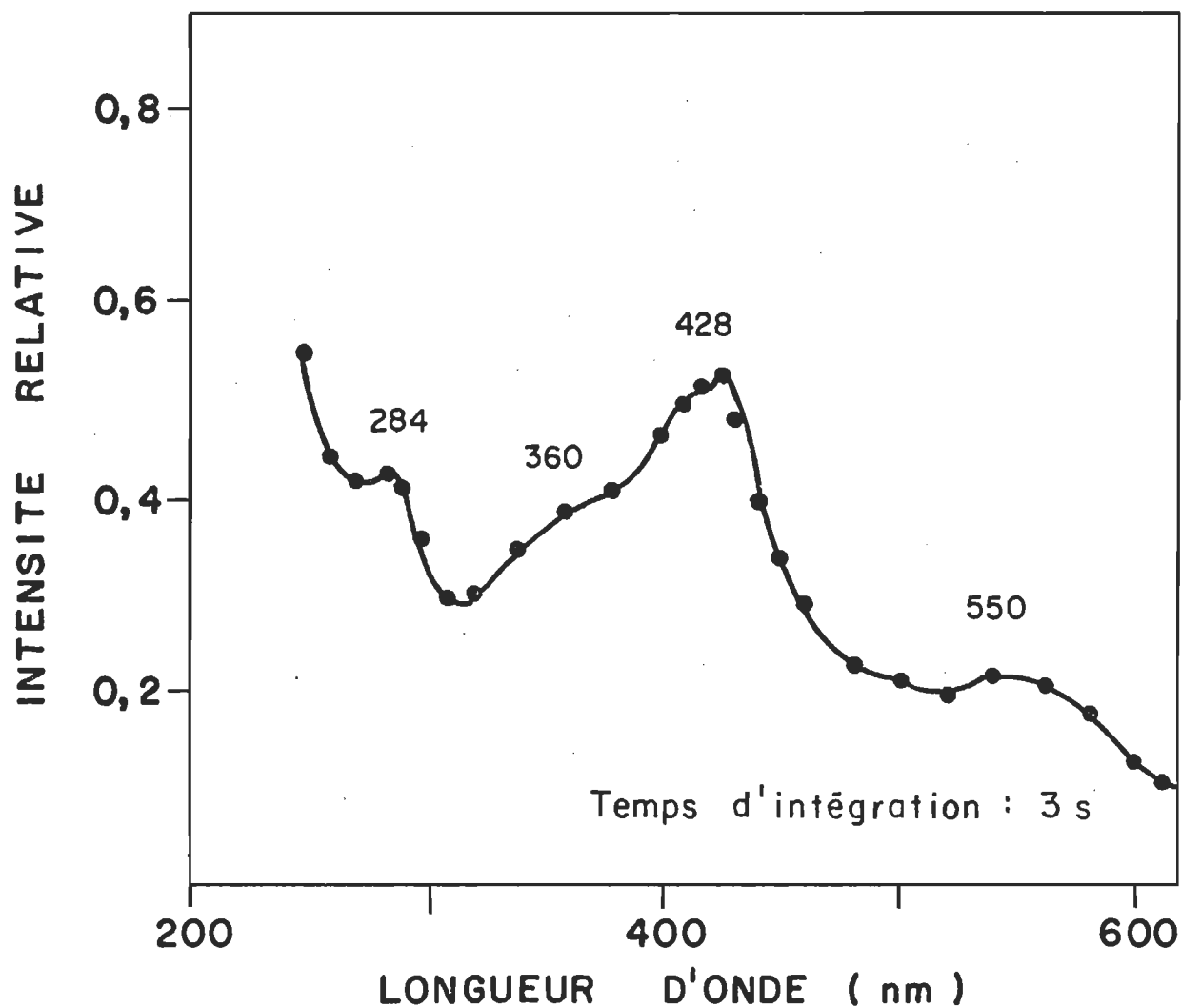


Figure 29:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE DE LA MYOGLOBINE A L'ETAT DE POUDRE CRISTALLINE.

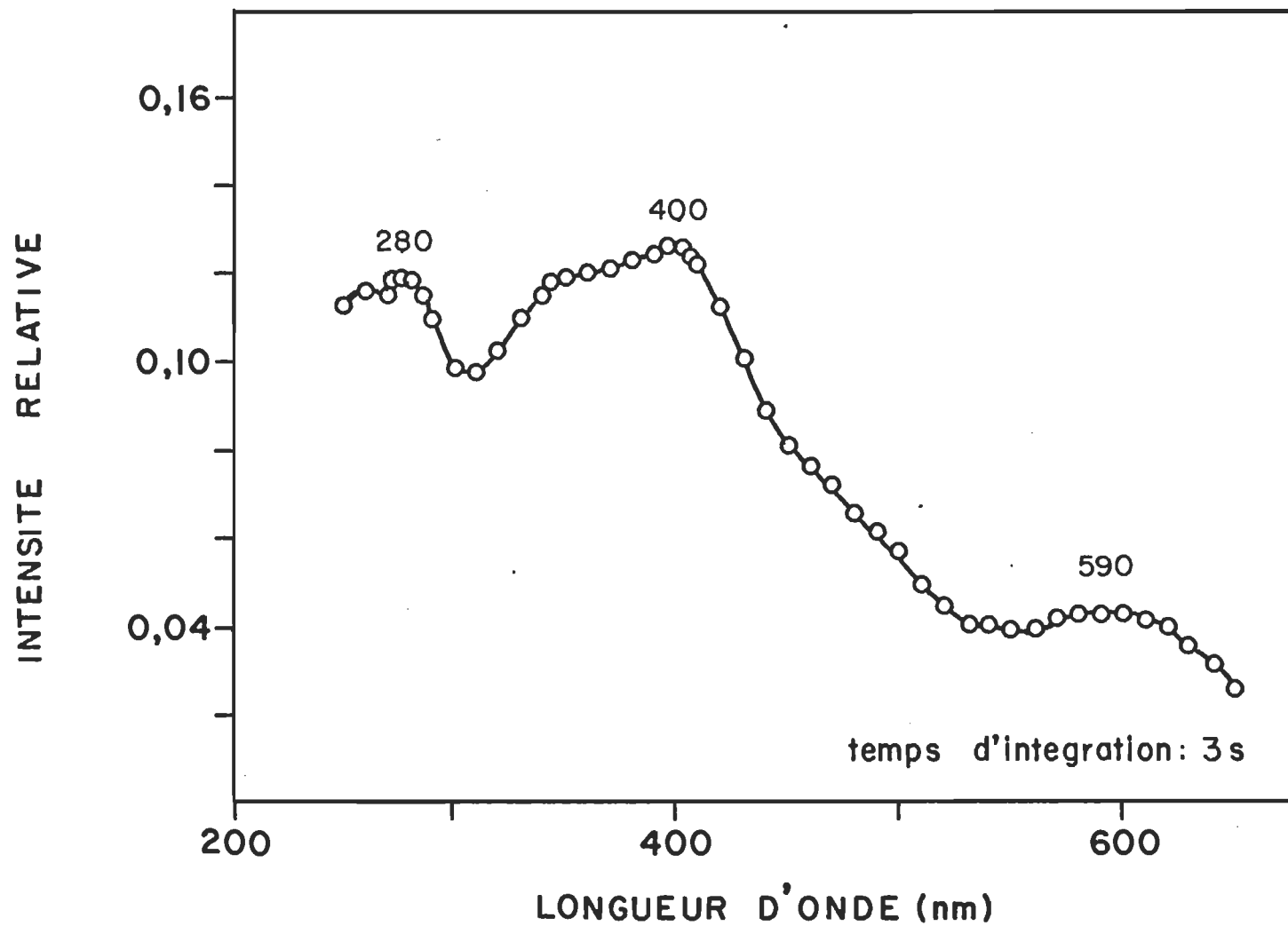


Figure 30:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE DE L'HEMATINE

tion optique du spécimen ne soit pas un facteur limitant en terme de saturation photoacoustique. Tel que mentionné dans la section 1.2.2, on peut éviter la saturation en diminuant la longueur de diffusion thermique μ_a , en augmentant la fréquence de modulation ou en restreignant l'épaisseur de l'échantillon par une dilution appropriée.

4.2.2 Spectre photoacoustique du sang total à différentes fréquences de modulation

Afin de réduire l'effet de saturation acoustique, nous avons déposé une quantité du sang total séché sur une lamelle et augmenté la fréquence de modulation jusqu'au moment où l'on obtient un spectre fidèle au coefficient d'absorption optique du chromophore étudié. Les autres paramètres instrumentaux sont les suivants: une bande passante de 6,6 nm, un temps d'intégration de 1 s, une vitesse de balayage de 50 nm min^{-1} , une vitesse de déroulement du papier de $2,5 \text{ cm min}^{-1}$, un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm. En examinant la figure 31, on remarque que l'augmentation de la fréquence de modulation diminue l'intensité du signal acoustique dû au fait que la longueur de diffusion thermique est plus petite. Par conséquent cette approche n'apporte aucune amélioration notable pour définir les bandes spectrales.

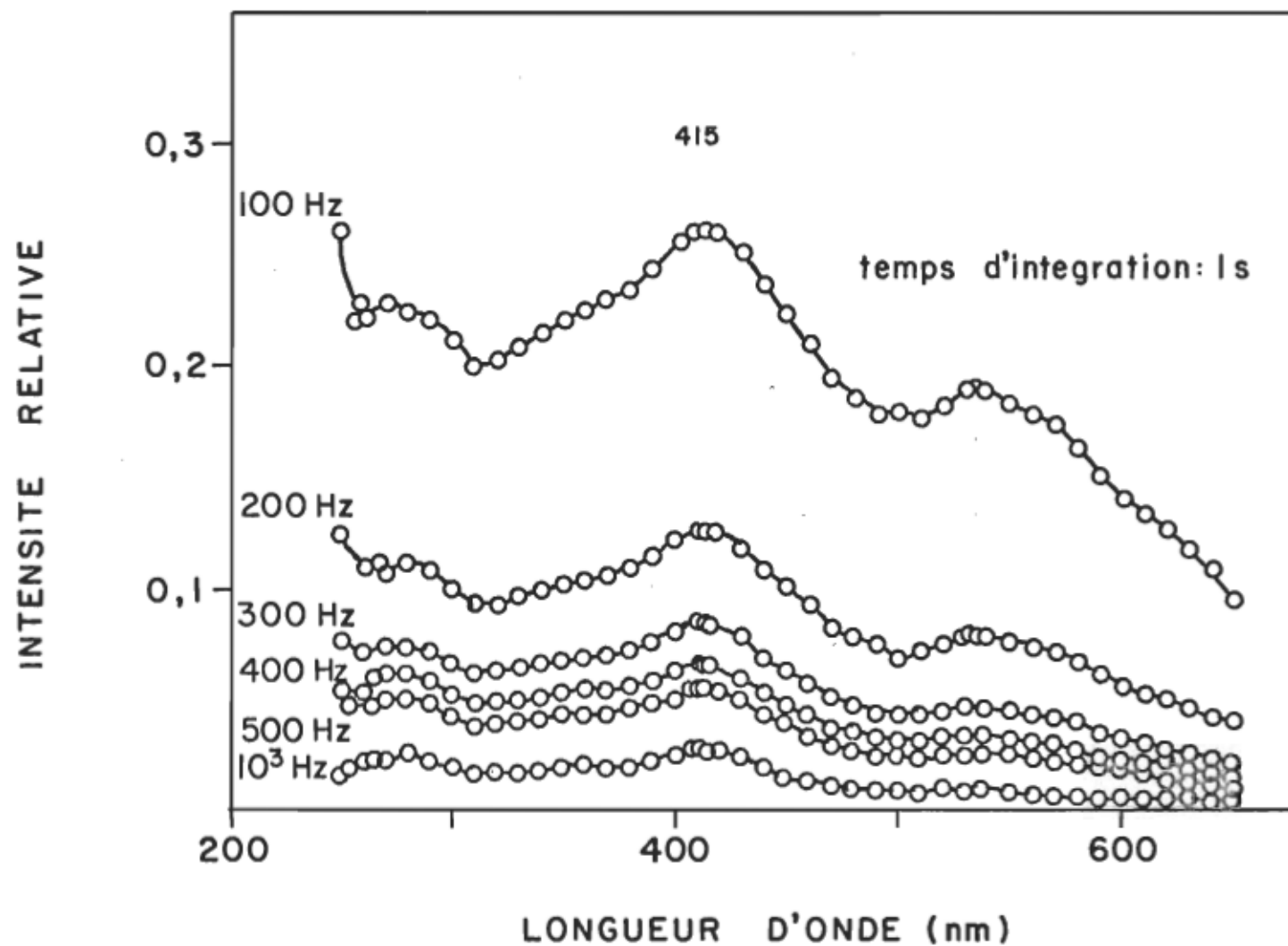


Figure 31:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE ST A DIFFERENTES FREQUENCES
DE MODULATION

4.2.3 Spectre photoacoustique du sang et d'hémoglobine purifiée à différentes dilutions

La deuxième approche consiste à diluer l'échantillon de manière à réduire l'opacité de l'échantillon absorbant la lumière incidente. Les conditions instrumentales sont identiques à celles de la section 4.2.2, à l'exception des temps d'intégration de 3 à 10 s et d'une fréquence de modulation de 100 Hz. Quant au volume déposé sur les lamelles avant la période de séchage, il est de 200 μL . Il est à noter que les facteurs de dilution utilisés lors des expériences correspondent aux valeurs numériques entre parenthèses que l'on retrouve adjacentes au symbole caractérisant le complexe de métalloporphyrine.

La première série de résultats se réfère aux dilutions de l'hémoglobine purifiée (Hb). L'analyse des figures 32 à 34 démontre que le signal photoacoustique diminue non-linéairement lorsqu'on augmente le facteur de dilution. La principale cause de ce comportement spectral s'apparente à une évaporation irrégulière du solvant, c'est-à-dire l'eau. Ceci résulte en une surface irradiée non-uniforme telle que montrée à la figure 23 de la section 3.2.4.3. L'examen des bandes spectrales confirme la présence de la bande de Soret entre 416 et 420 nm dont la position exacte est reliée au temps d'intégration. La bande ou l'épaulement à 260 nm dépend de la présence et de l'état des globines sujettes à des conditions physico-chimiques drastiques étant donné l'absence d'un tampon adéquat, jugé inutile pour examiner les propriétés du chromophore. Toutefois, on n'observe pas entre 450 et 650 nm des bandes caractéristiques d'un intermédiaire précis, ce qui confirme la remarque du fournisseur

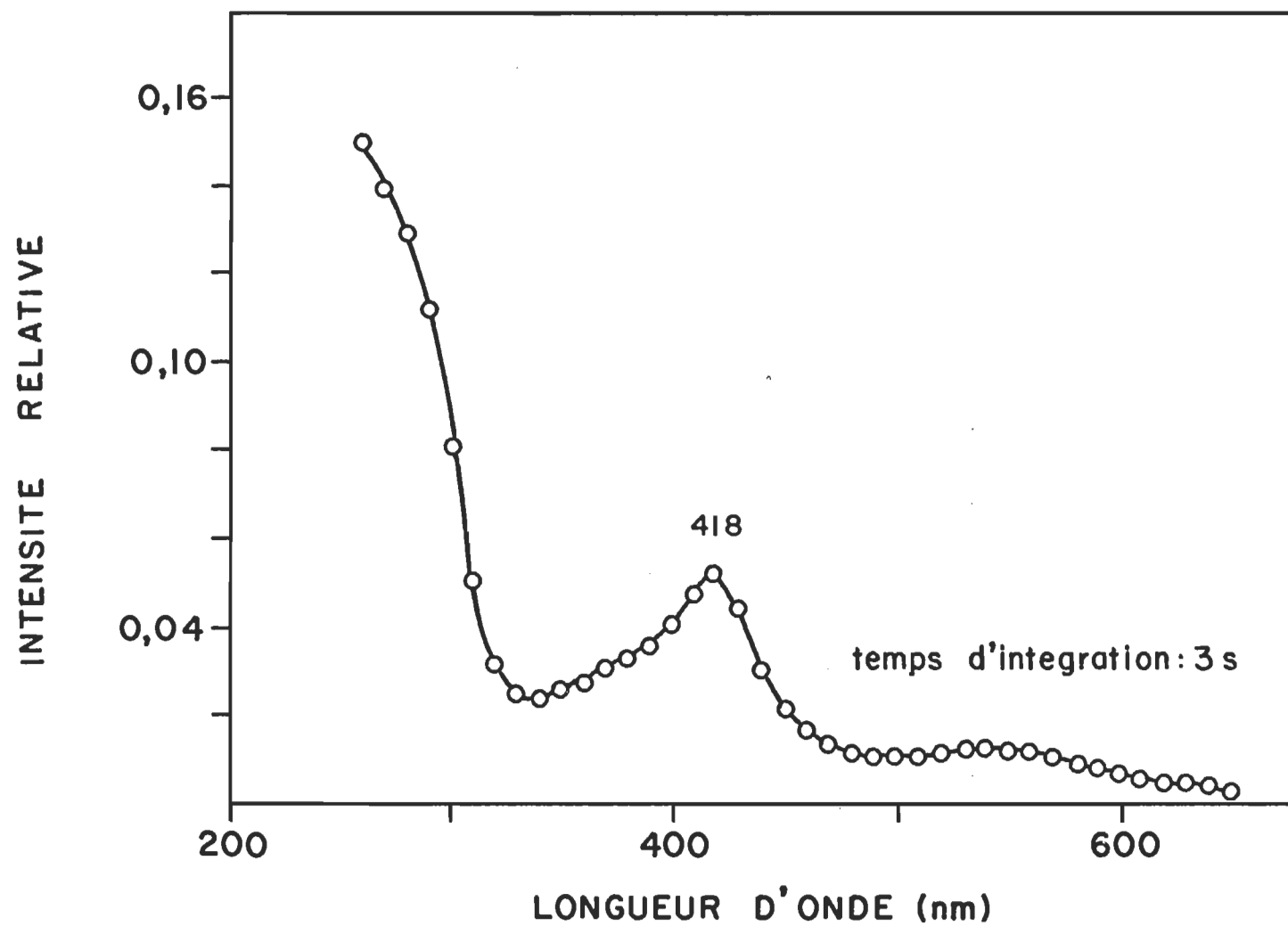


Figure 32:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE Hb(10)

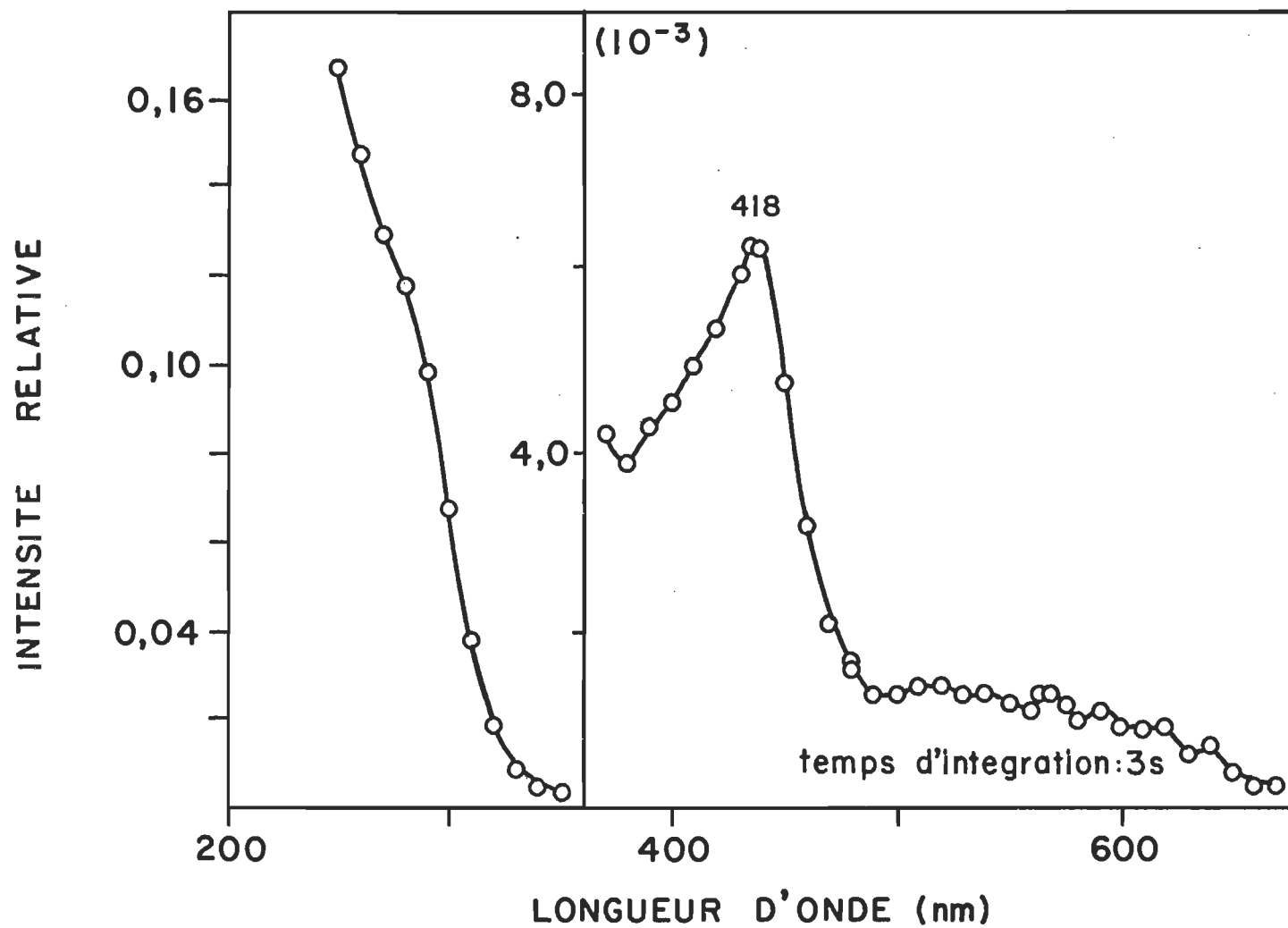


Figure 33:

SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE Hb (100)

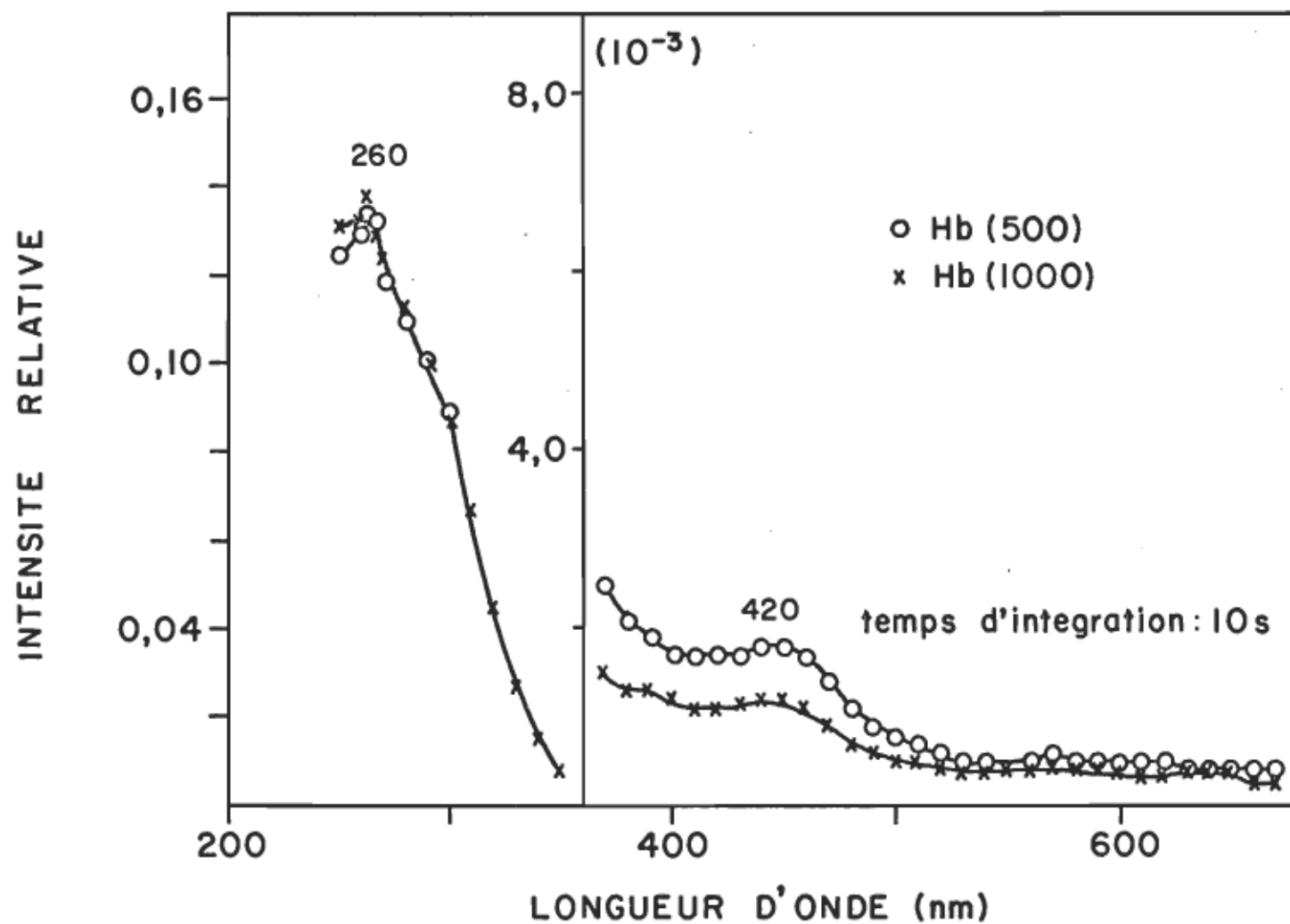


Figure 34:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES Hb(500) ET Hb(1000)

soulignant que le pigment hémoglobine s'oxyde facilement en présence d'air d'où la composition d'un mélange de 25% d'oxyhémoglobine et de 75% de méthémoglobine. Il est à remarquer qu'en augmentant le facteur de dilution, on peut modifier légèrement les pentes de saturation (figure 35) vers une saturation acoustique partielle de -1,2. Par contre un facteur de dilution supérieur à 500 affecte la précision des mesures expérimentales car le signal photoacoustique s'affaiblit au point que le bruit de fond peut interférer dans les mesures des pentes de saturation.

La deuxième série de dilutions se réfère au sang total ce qui nous permet de mieux observer le comportement des bandes spectrales de l'intermédiaire précis qu'est l'oxyhémoglobine. Selon les spectres présentés aux figures 36 à 38, la bande des protéines à 284 nm correspond à ce qui est attendu en tenant compte du temps d'intégration de 3 s pour les facteurs de dilution 2 à 500. Toutefois, un facteur de dilution supérieur à 500 semble modifier l'environnement des globines au point de retrouver la bande entre 260 et 270 nm. La bande de Soret change sensiblement de configuration en augmentant le facteur de dilution de manière à retrouver le pic caractéristique de l'oxyhémoglobine vers 416-418 nm indiquant un rapprochement vers le coefficient d'absorption optique. La valeur spectrale de 424 nm pour les facteurs de dilution 1 000 et 2 500 s'explique par un temps d'intégration de 10 s servant à éliminer le bruit de fond en présence de faible concentration du chromophore. Quant aux bandes α et β , dont les maxima se situent à 546 et 575 nm, elles sont bien définies pour les facteurs de dilution 10 et 50. Dans l'ensemble, tout déplacement bathochrome des

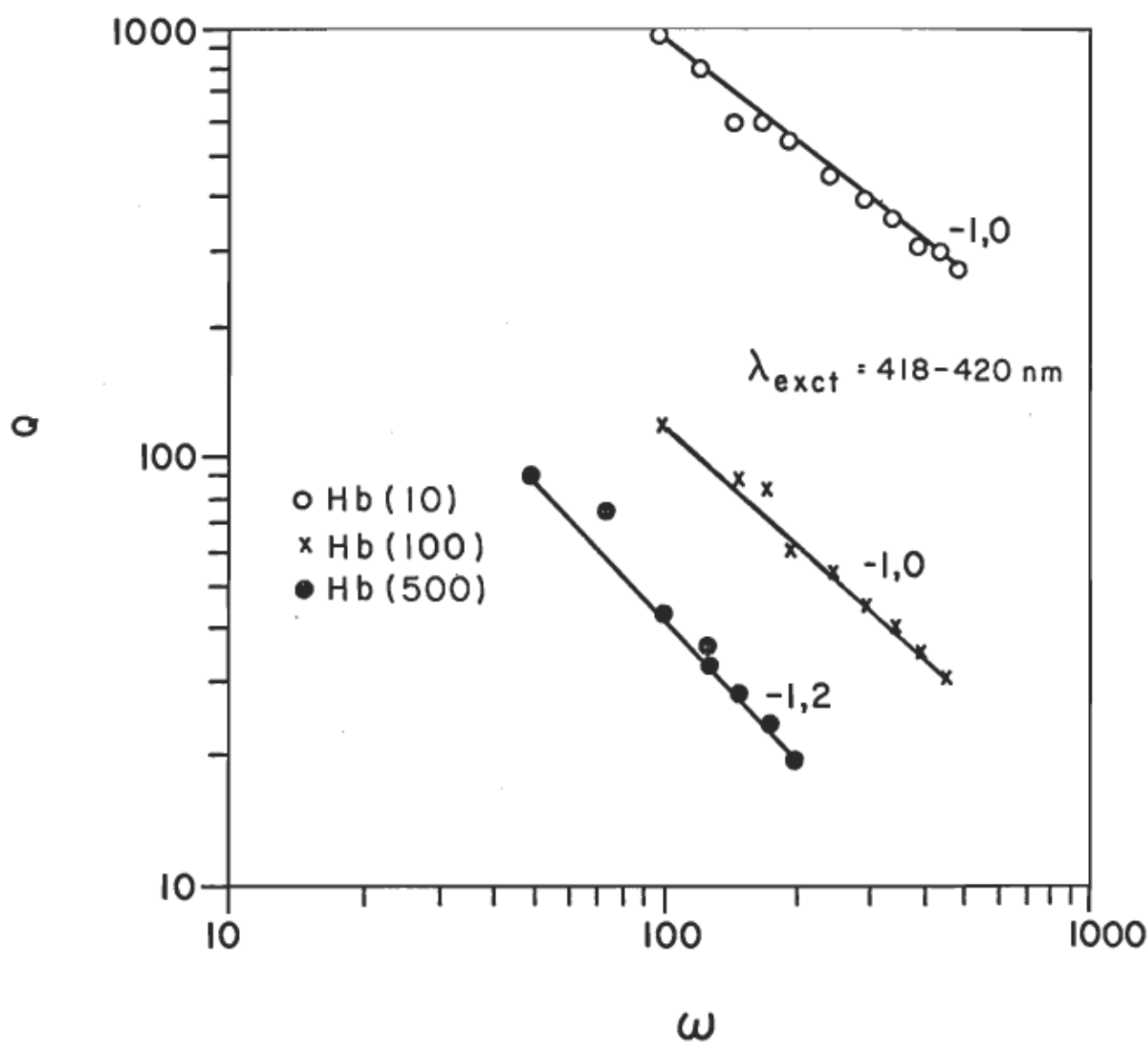


Figure 35:

PENTES DE SATURATION DE Hb

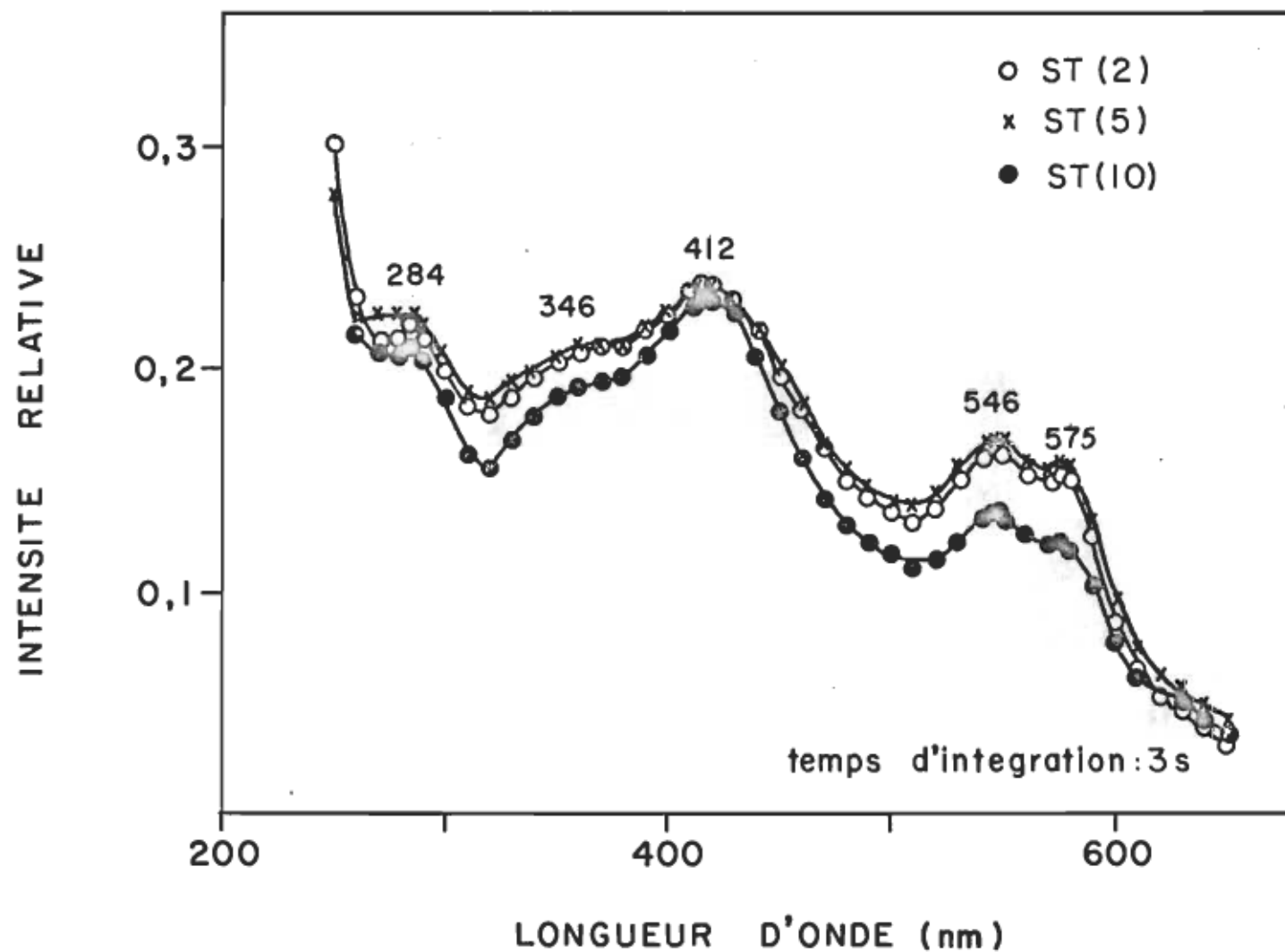


Figure 36:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES ST DILUE

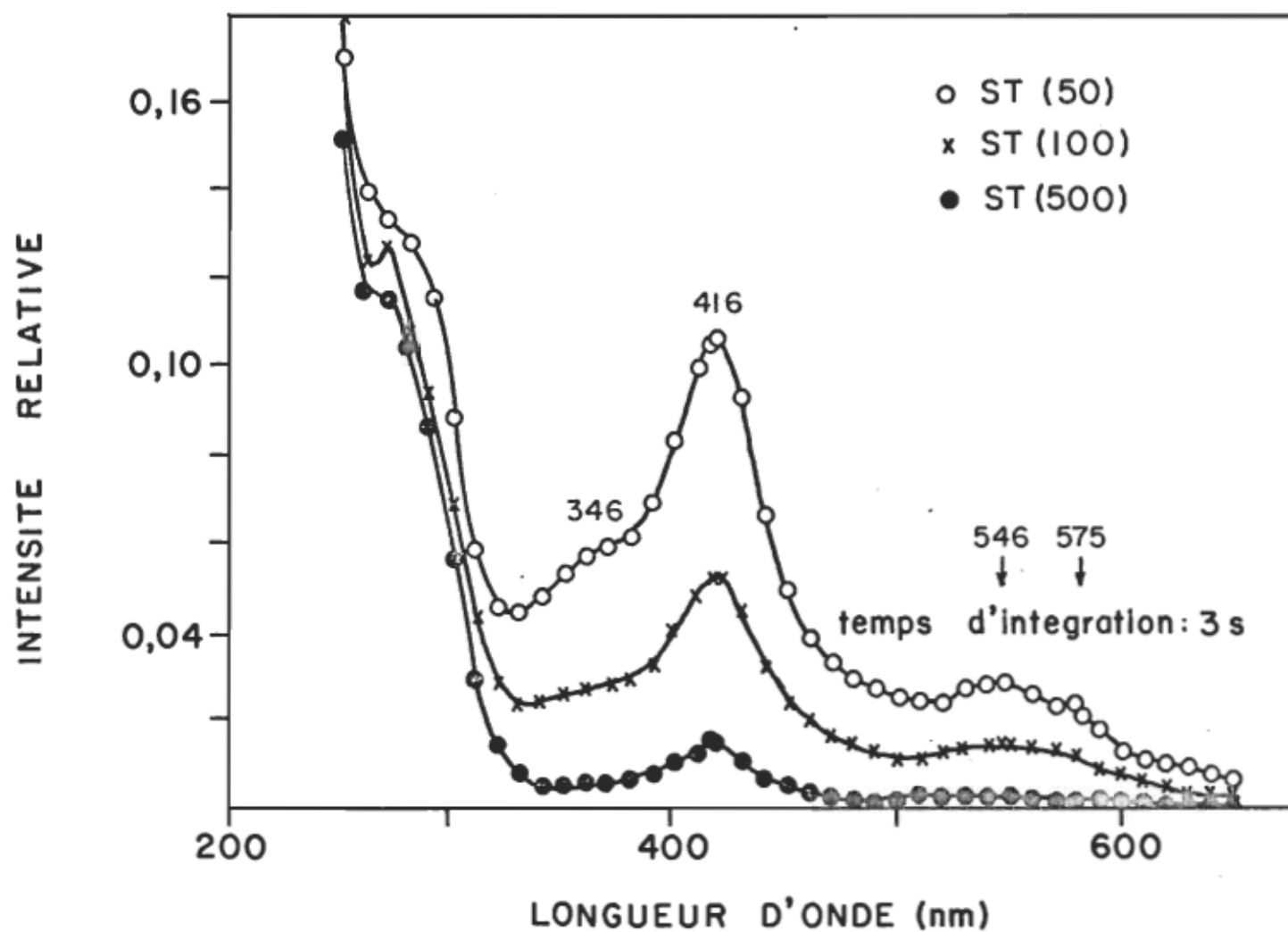


Figure 37:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES ST DILUE

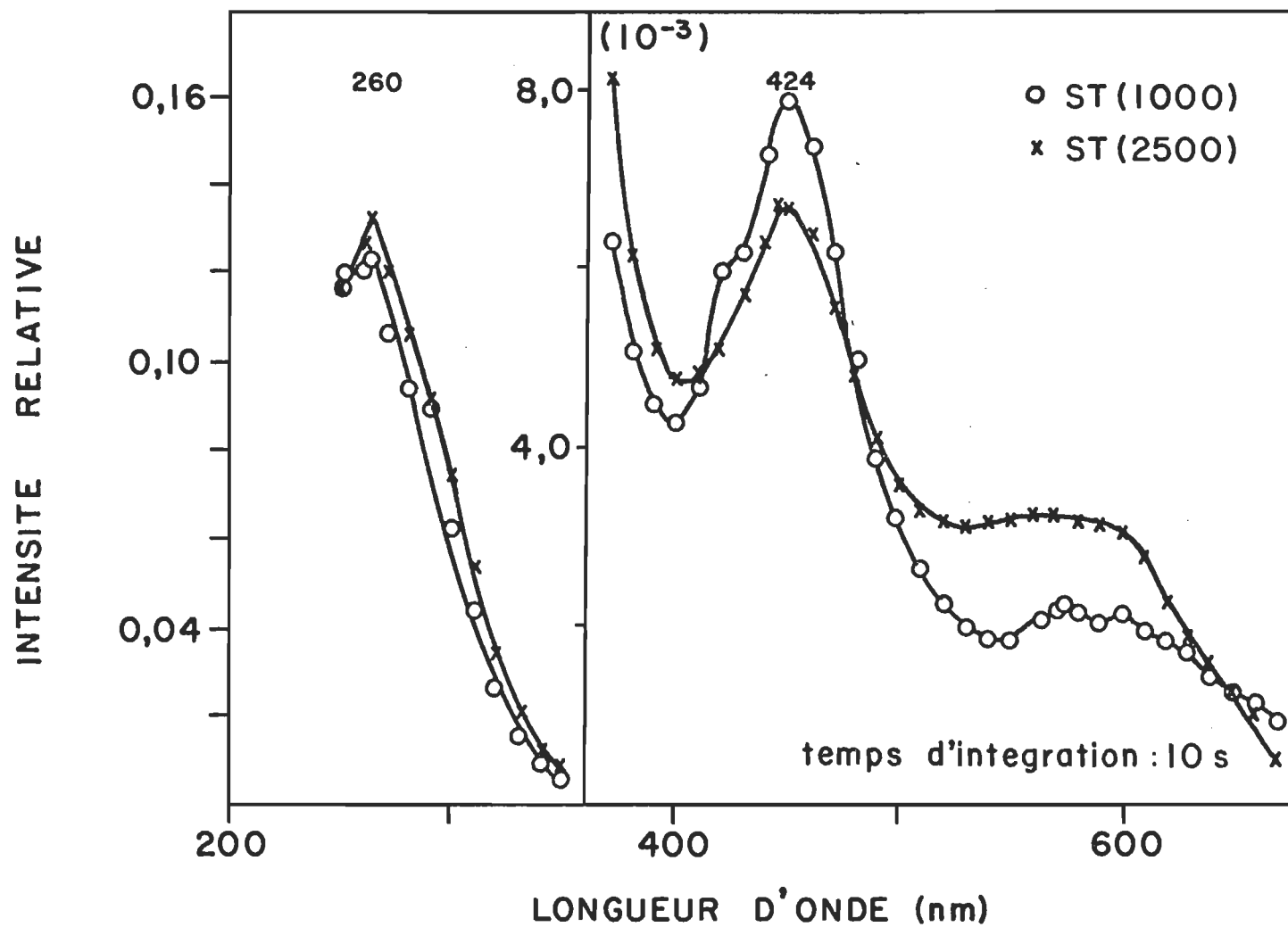


Figure 38:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE ST DILUE

bandes de spectre photoacoustique du sang total à différentes dilutions est causée par l'emploi de temps d'intégration différent et possiblement par l'état solide des échantillons. En terme de rapport d'intensité des bandes Soret, α et β , seul le facteur de dilution 50 se rapproche des données connues de la littérature (20b). L'examen des pentes de saturation à des valeurs de -0,9 à -1,2, des figures 39 et 40 nous amène à conclure que diluer l'échantillon de façon à réduire son épaisseur conduit à la non-saturation dans la mesure où l'on peut discerner un signal photoacoustique du chromophore étudié avec un minimum de bruit de fond. L'évidence expérimentale qui nous permet d'affirmer que nous sommes bien en présence du pigment hémoglobine est confirmée par le protocole expérimental (Appendice C) permettant de caractériser l'hémoglobine (Hb) lors de son extraction des globules rouges (GR) et du sang total (ST). Les spectres photoacoustiques à la figure 41 appuient cette évidence. En résumé, on note que les bandes spectrales retrouvées dans le sang total et les globules rouges caractérisent l'oxyhémoglobine, que l'affaïssement des bandes de Soret suggère une saturation acoustique ce qui est conforme aux pentes de saturation de la figure 42, que l'intensité du spectre photoacoustique de l'hémoglobine extraite est plus faible en raison d'une extraction partielle.

Jusqu'à maintenant, on peut obtenir un spectre photoacoustique des chromophores constituant l'hémoglobine sur lamelle. Cependant des problèmes expérimentaux majeurs tels qu'un étalement dont on ne peut contrôler l'uniformité et un temps d'évaporation relativement long pour assécher l'échantillon nous empêchent de suivre, dans des conditions expérimentales contrôlées, le comportement des intermédiaires de l'hémoglobine capables d'échanges gazeux.

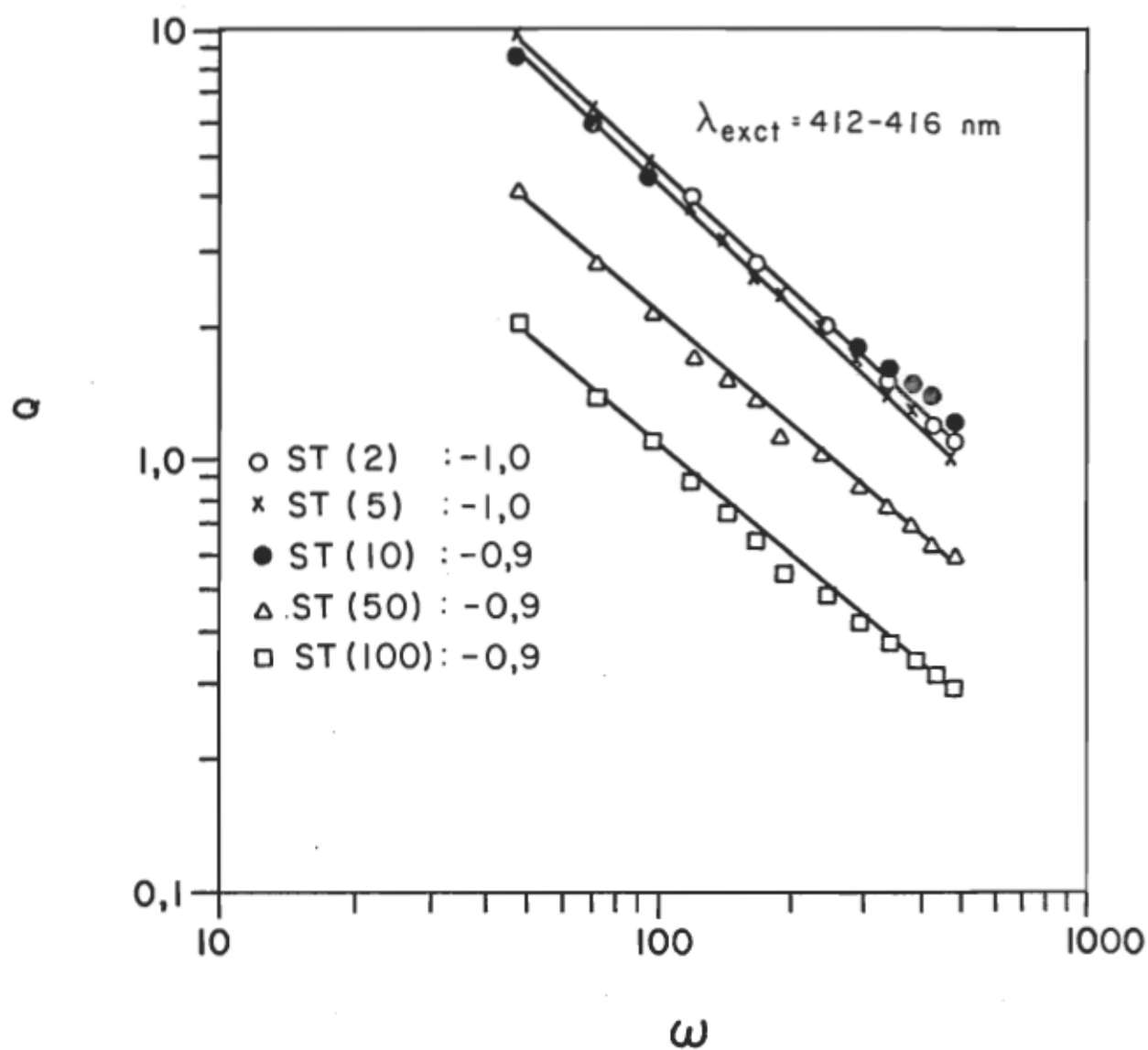


Figure 39:

PENTES DE SATURATION ST DILUE

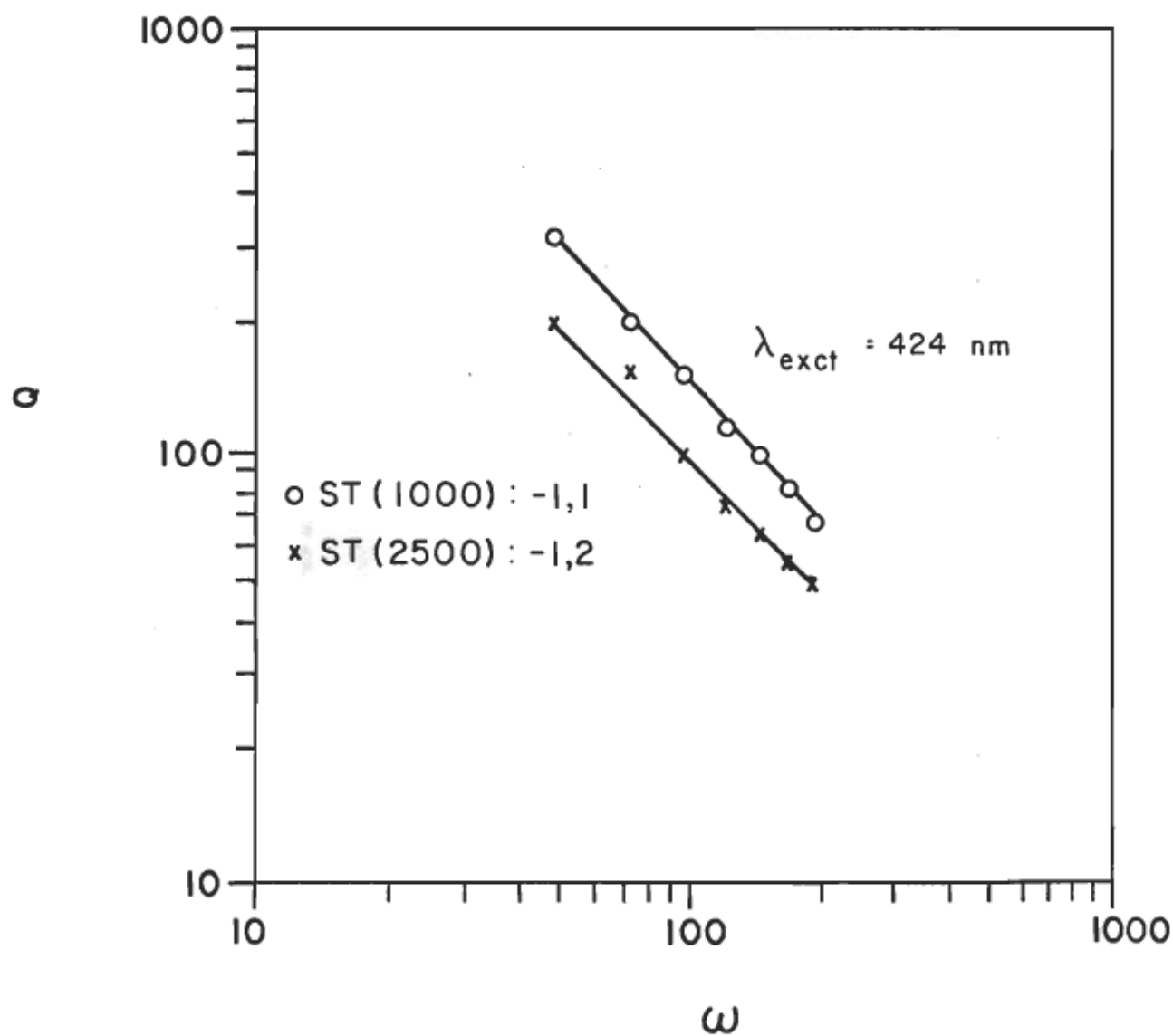


Figure 40:

PENTES DE SATURATION ST DILUE

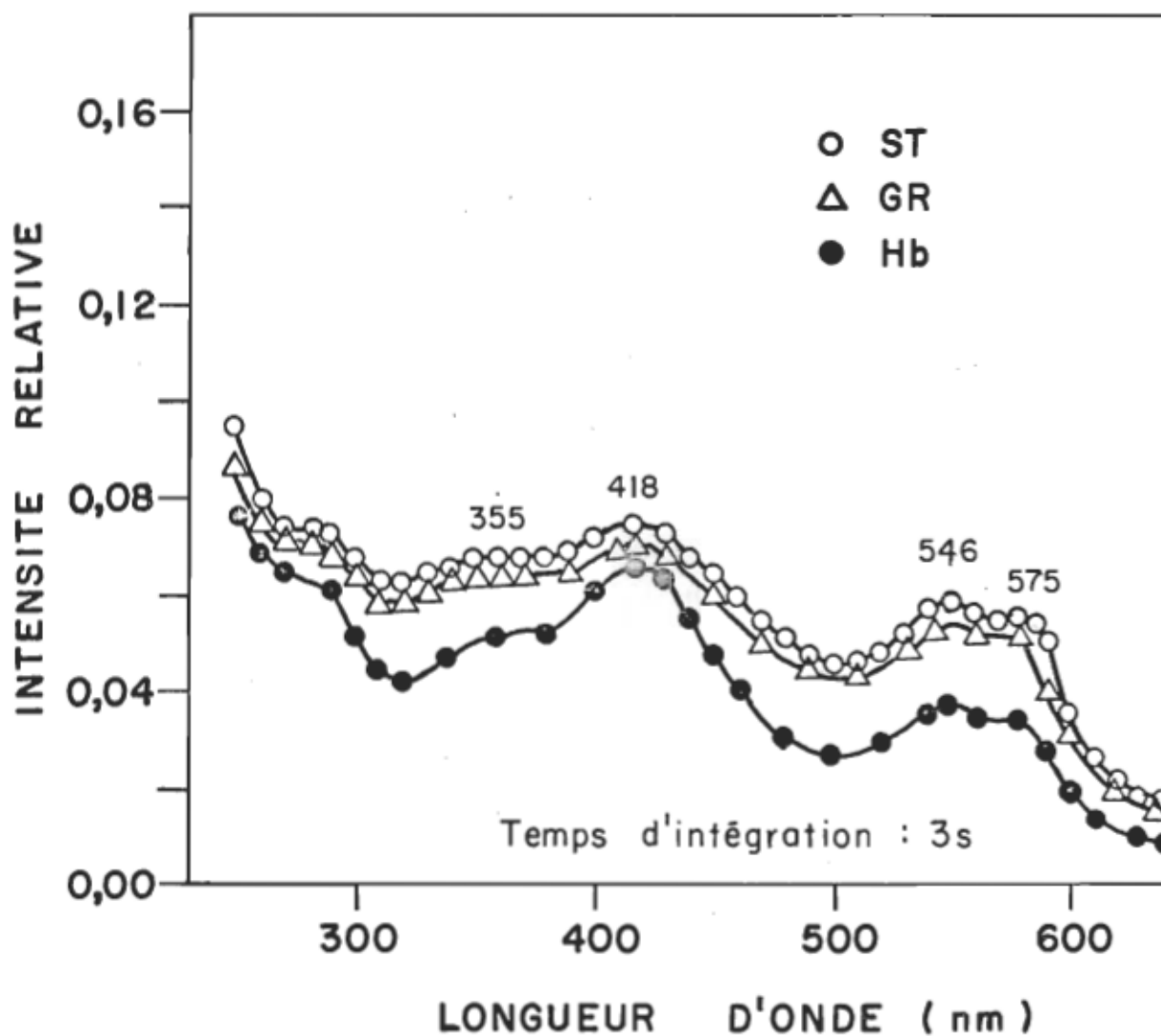


Figure 41:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES ST , GR , Hb SUR LAMELLE

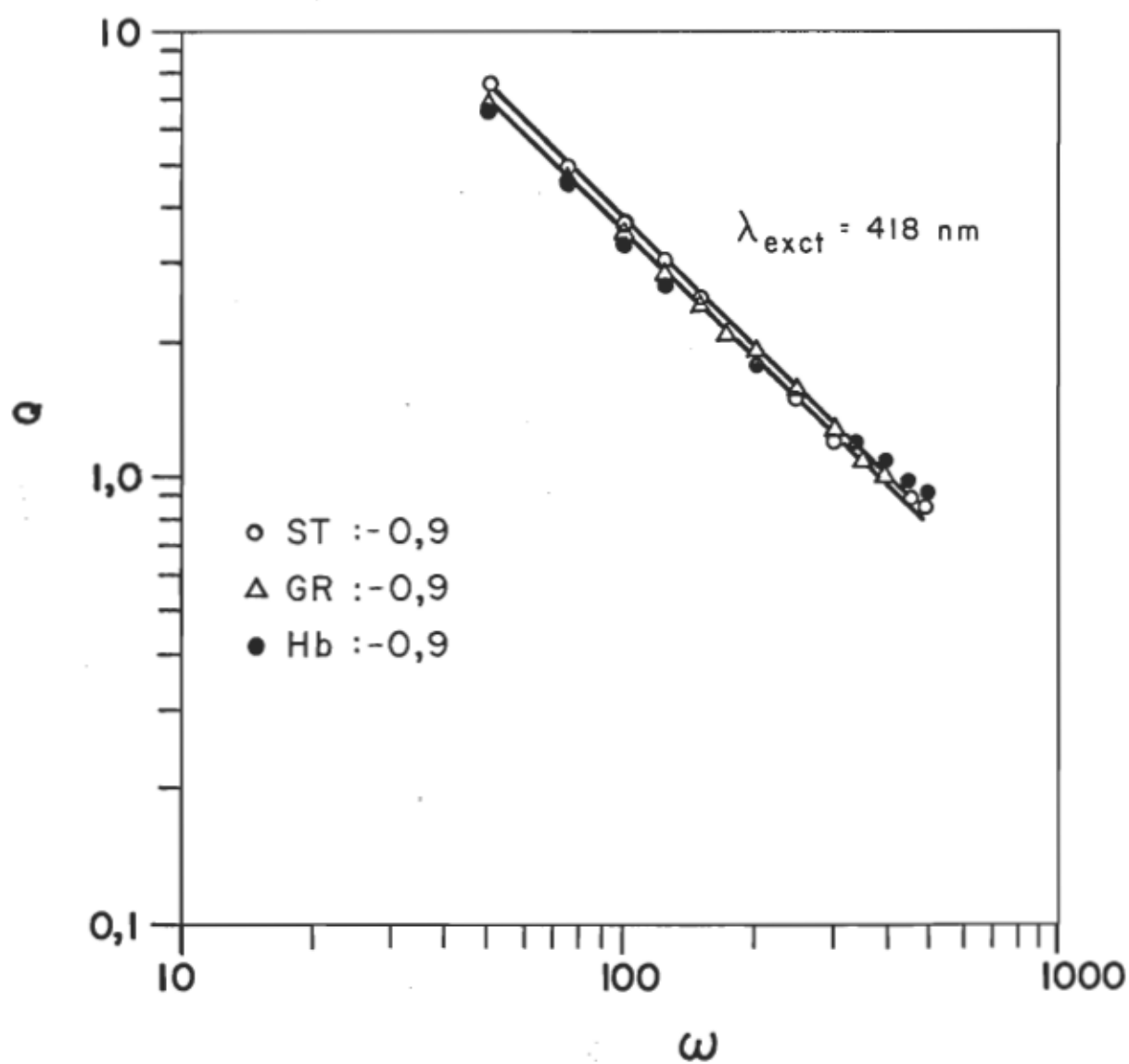


Figure 42:

PENTE DE SATURATION ST , GR , Hb SUR LAMELLE

4.3 Spectre photoacoustique de sang total dilué sur filtre Millipore

Parmi les différents support-échantillon étudiés dans le précédent chapitre, le filtre Millipore permet d'éliminer en grande partie le solvant au point de considérer l'échantillon comme un solide hydraté. Dans l'ensemble, les spectres photoacoustiques sont pris dans les mêmes conditions instrumentales que la section 4.2.2, à l'exception d'un temps d'intégration de 3 s et d'une fréquence de modulation que l'on indiquera pour chaque expérience. On décrit chaque essai en fonction du facteur de dilution désigné par le nombre entre parenthèses suivi de la lettre "f" rattachée au volume filtré du sang total dilué.

Dans un premier temps, les spectres photoacoustiques de la figure 43 se réfèrent à un facteur de dilution de 50 avec un volume de filtration de 1 ml à 150, 300 et 500 Hz en fréquence de modulation. Les trois spectres caractérisent les trois bandes de l'oxyhémoglobine mais l'interprétation des bandes entre 250 et 300 nm est limitée par leur faible intensité relative dans le même ordre de grandeur que celle du filtre Millipore humidifié et qu'on ne peut dissocier l'un de l'autre. En se basant sur la résolution spectrale, le spectre à 150 Hz est bien défini, on note une bonne résolution à 370 nm. Deuxièmement, on présente sur la figure 44 la corrélation existant entre des facteurs de dilution croissants tout en ajustant le volume filtré de façon à retrouver une quantité fixe de globules rouges.

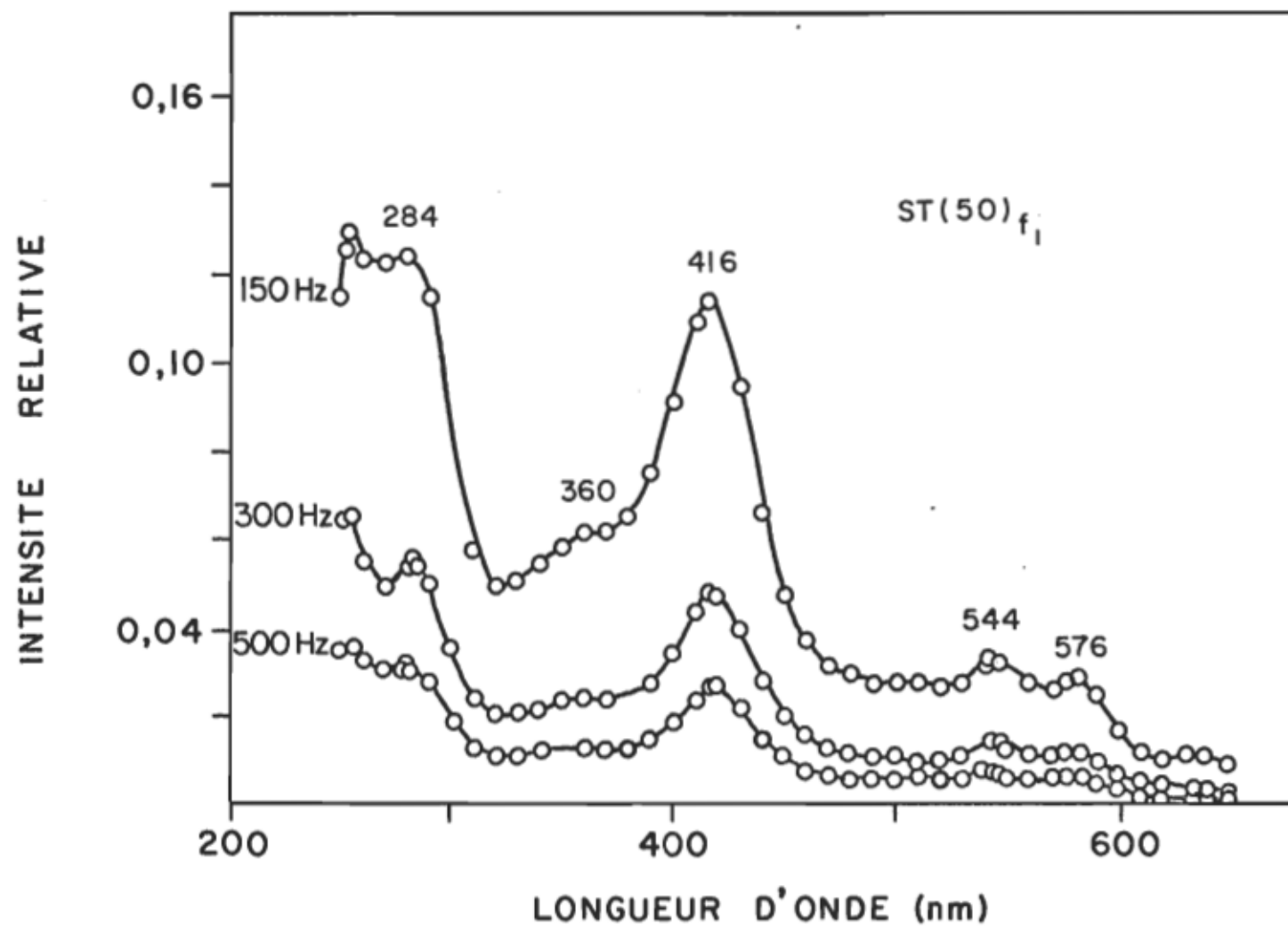


Figure 43:
SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE ST DILUE SUR FILTRE MILLIPORE

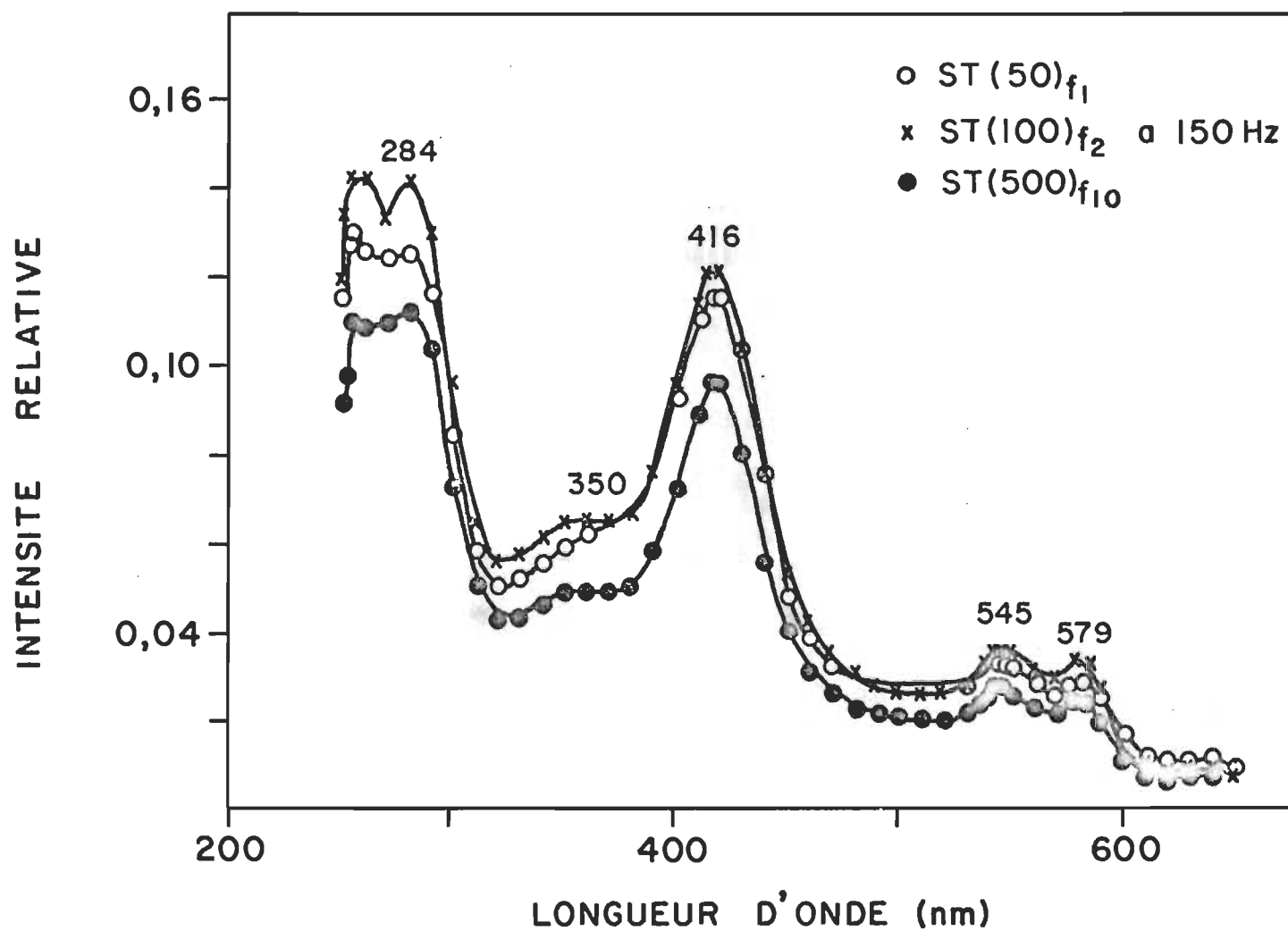


Figure 44:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE ST(50), ST(100) ET ST(500) SUR
FILTRE MILLIPORE

Il semble qu'en faisant varier ces deux paramètres en parallèle, on peut obtenir un signal photoacoustique identique avec une erreur expérimentale d'environ 15% ce qui est justifiable en tenant compte du bris mécanique des globules rouges que l'on contrôle difficilement. La troisième série de spectres telle que présentée à la figure 45 montre les interrelations possibles entre facteur de dilution, volume de filtration et fréquence de modulation. La seule observation valable d'être citée se résume au fait que les intensités relatives d'une quantité fixe de globules rouges à des fréquences de modulation dont l'une vaut la moitié de l'autre correspondent au même rapport. Pour ce qui est des figures 46 et 47, nous avons utilisé un facteur de dilution de 2 500, c'est-à-dire à la limite de détection pour examiner son comportement spectral en terme d'intensité relative possiblement quantifiable correspondant à environ 232 mg d'hémoglobine par cm^2 . Cette quantité d'hémoglobine par unité de surface est calculée en considérant qu'un millilitre de sang total avec un facteur de dilution de 2 500 contient 580 mg d'hémoglobine après une filtration sur une surface de $2,5 \text{ cm}^2$. L'interprétation rejoint les conclusions précédente. En guise de référence, nous comparons la résolution spectrale du chromophore hémoglobine sur lamelle et sur filtre Millipore par la même méthode d'extraction du sang total et des globules rouges donnée dans la section 4.2.3. En comparant les figures 41 et 48, on constate que les spectres photoacoustiques de l'hémoglobine sur filtre Millipore possèdent des bandes mieux définies que celles obtenues sur lamelle, les spectres ayant été obtenus dans les mêmes conditions instrumentales et expérimentales.

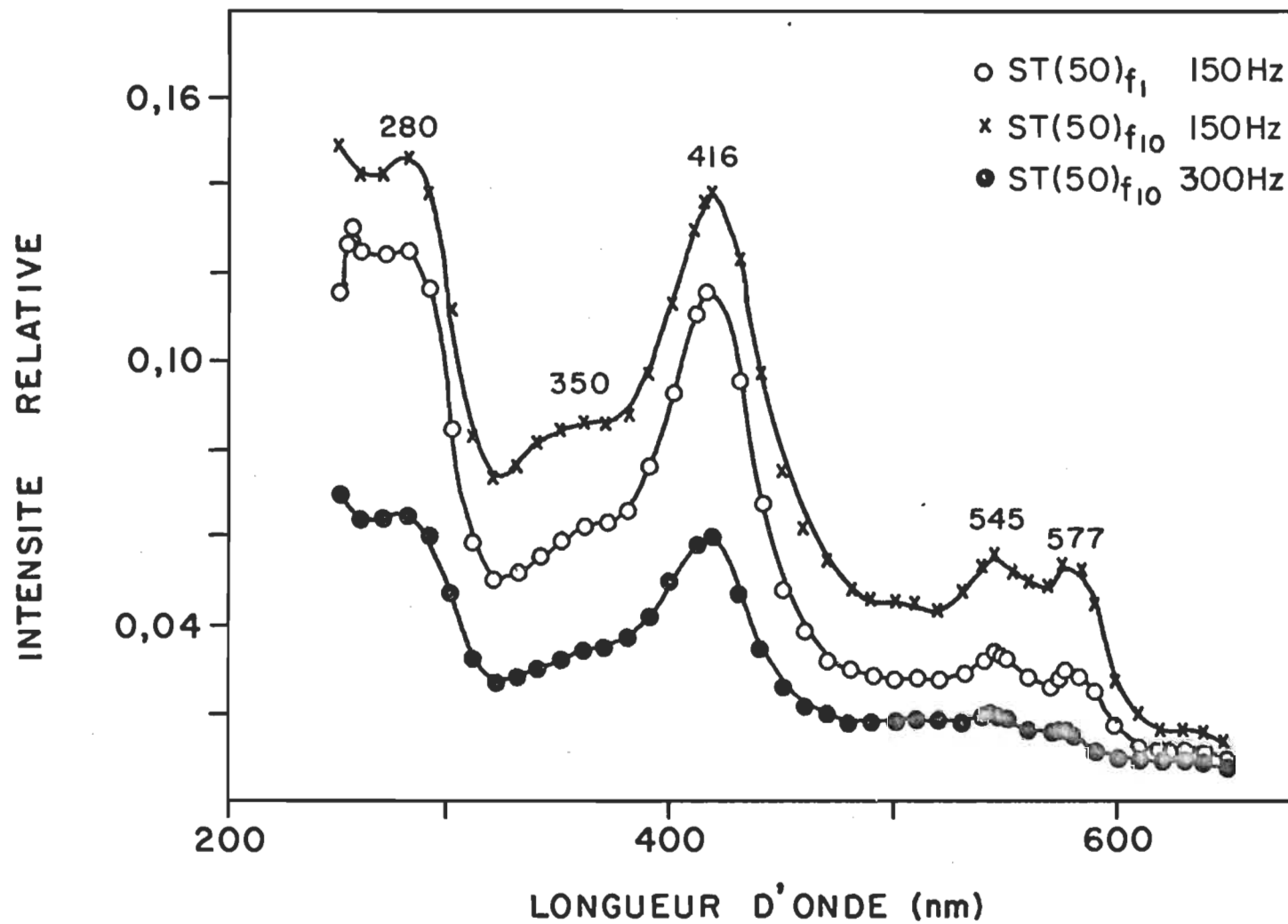


Figure 45:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE ST (50) SUR FILTRE MILLIPORE

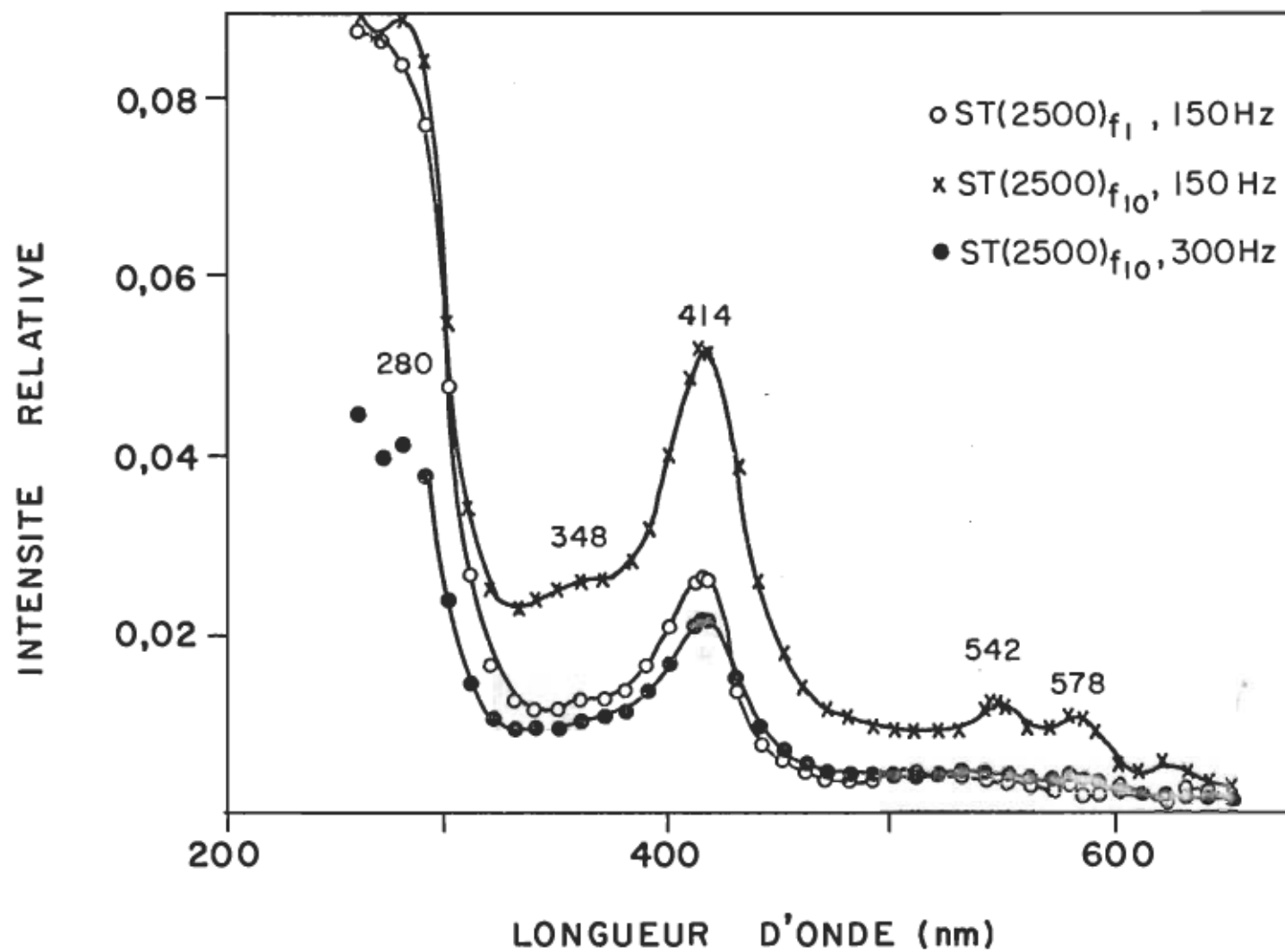


Figure 46:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE ST(2500) SUR FILTRE MILLIPORE

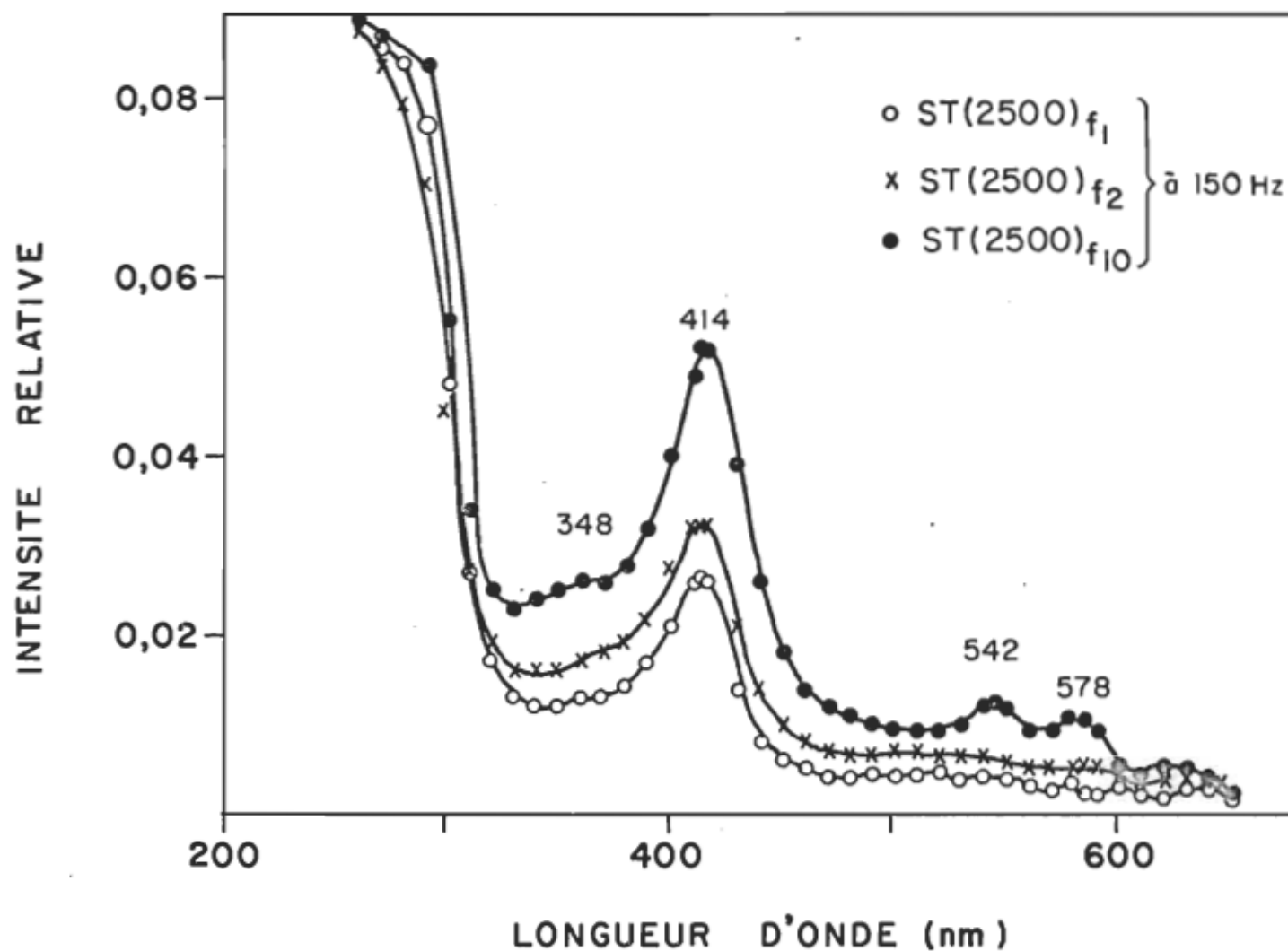


Figure 47:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES ST(2500) SUR FILTRE MILLIPORE

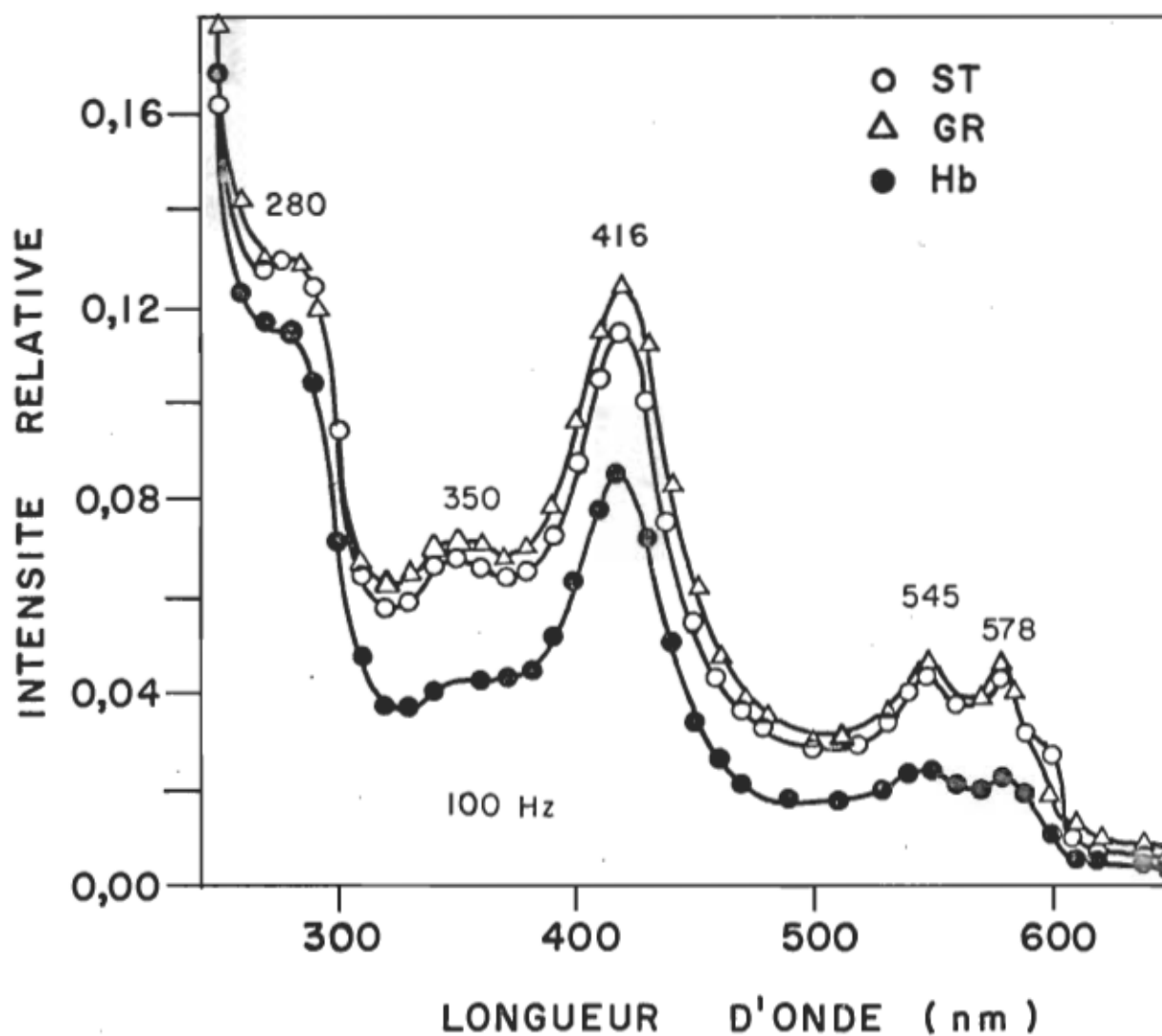


Figure 48:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES ST, GR, Hb SUR
FILTRE MILLIPORE.

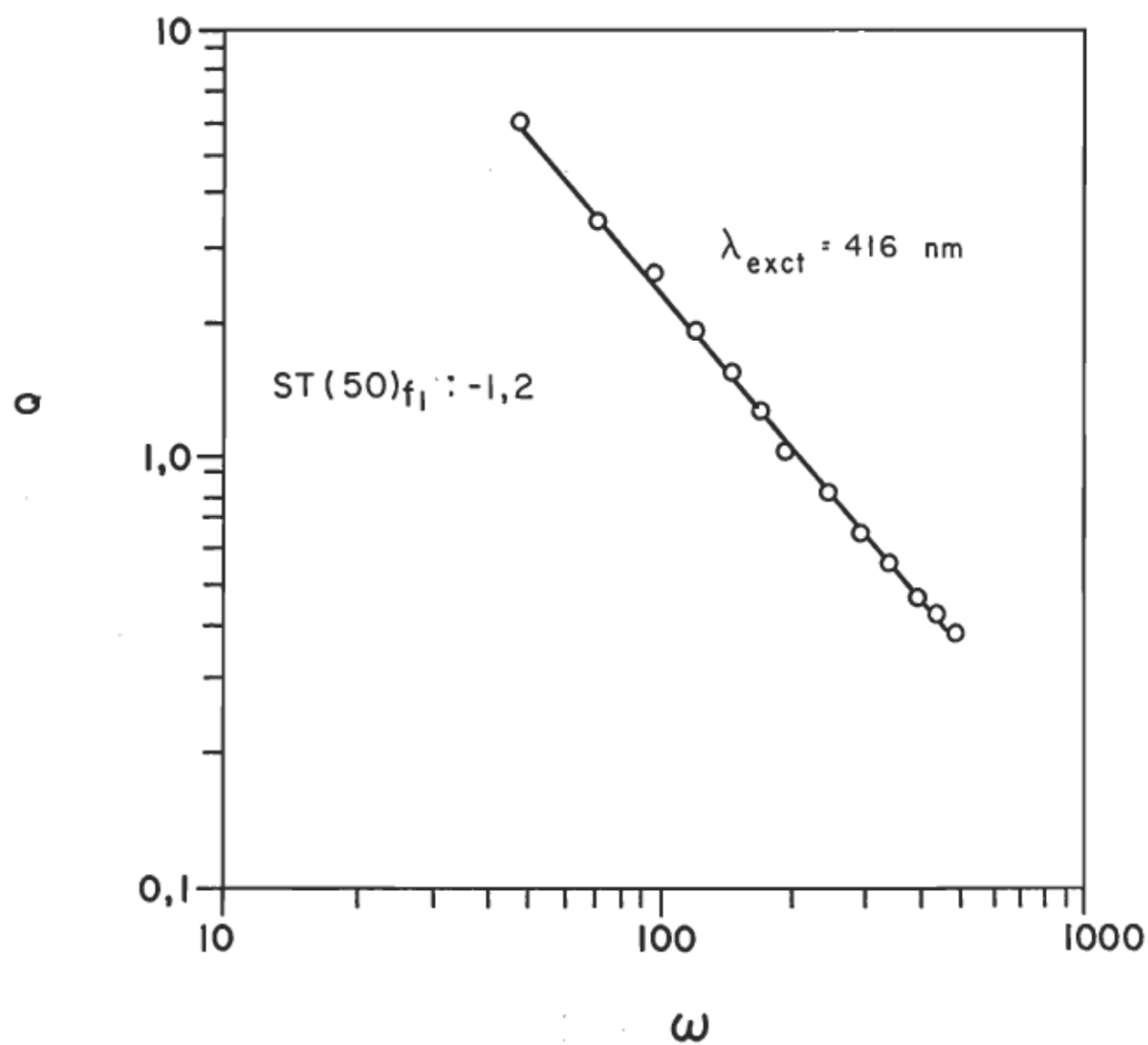


Figure 49:

PENTE DE SATURATION DE $ST(50)_{f_1}$

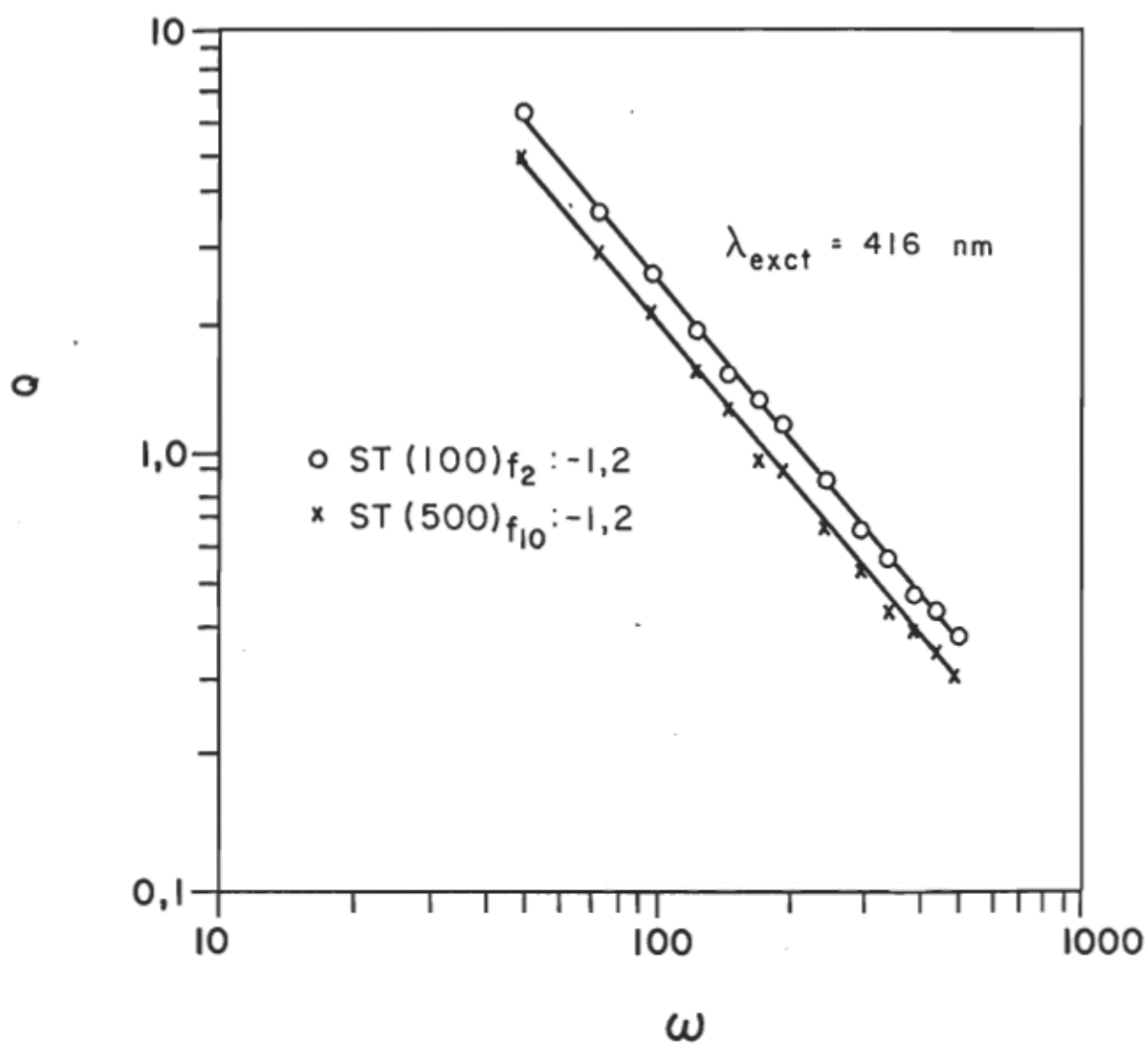


Figure 50:

PENTES DE SATURATION DE ST (100) $_{f_2}$ ET ST (500) $_{f_{10}}$

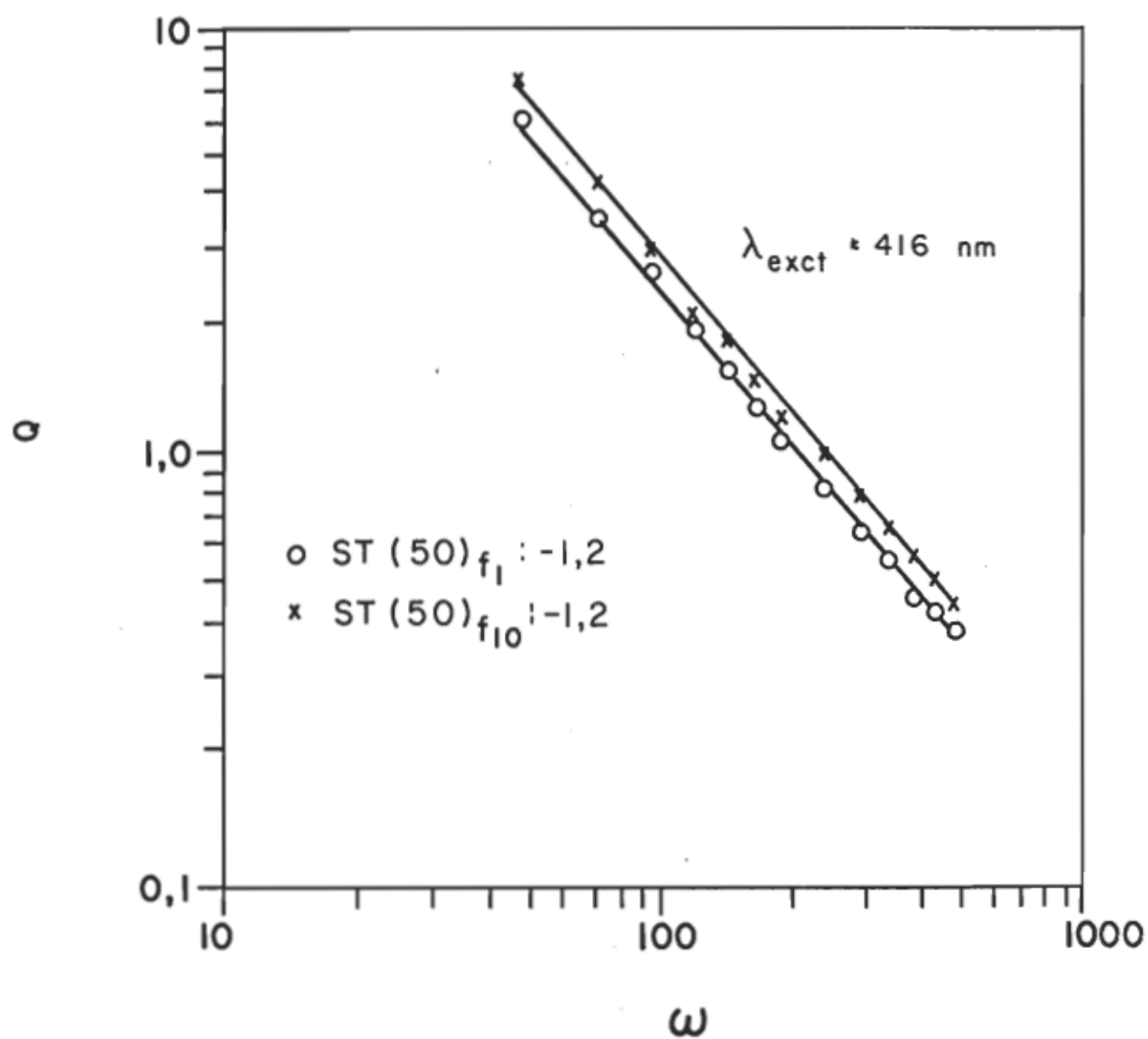


Figure 51:

PENTES DE SATURATION DE ST(50) $_{f_1}$ ET ST(50) $_{f_{10}}$

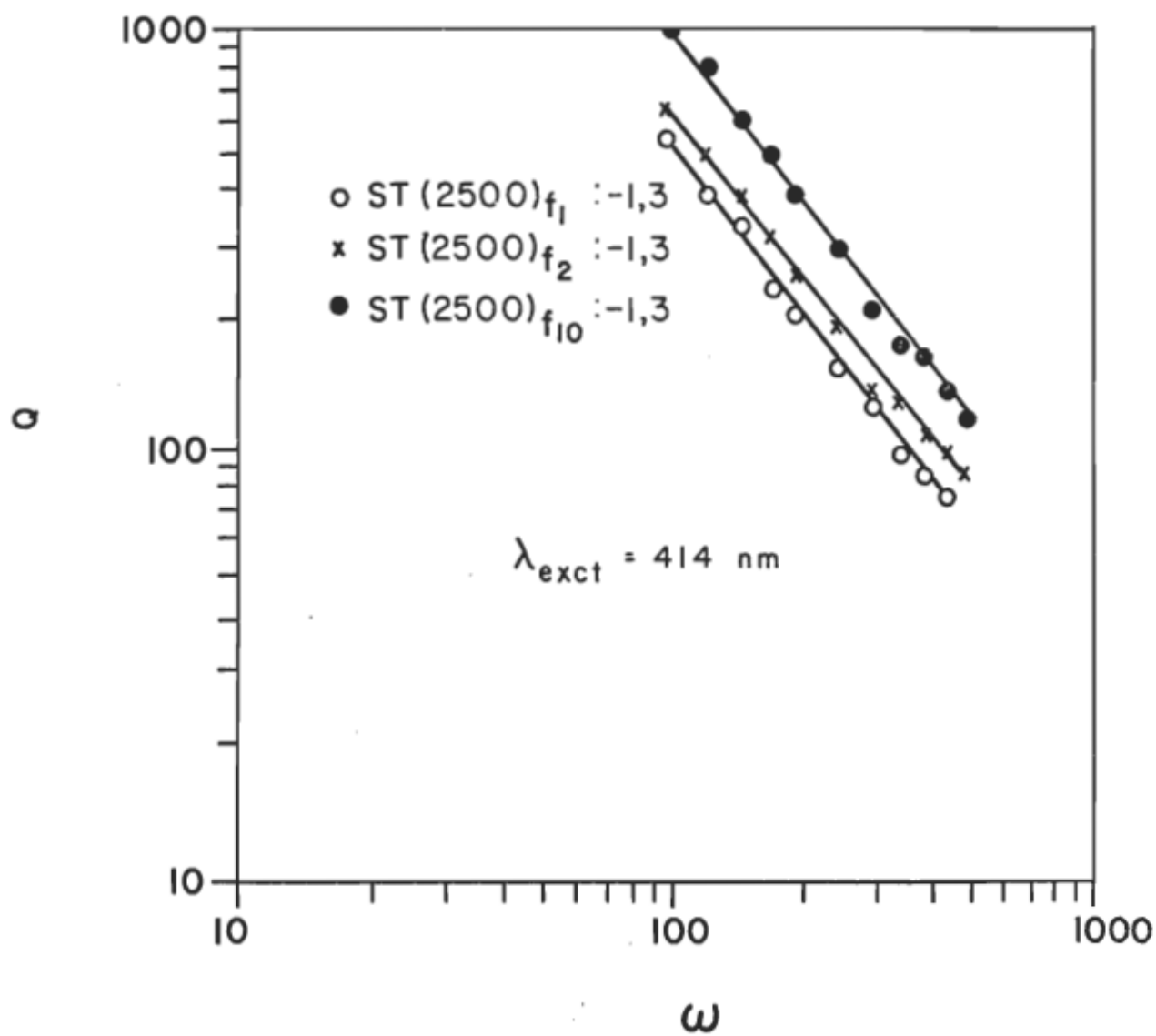


Figure 52:

PENTES DE SATURATION ST (2500)

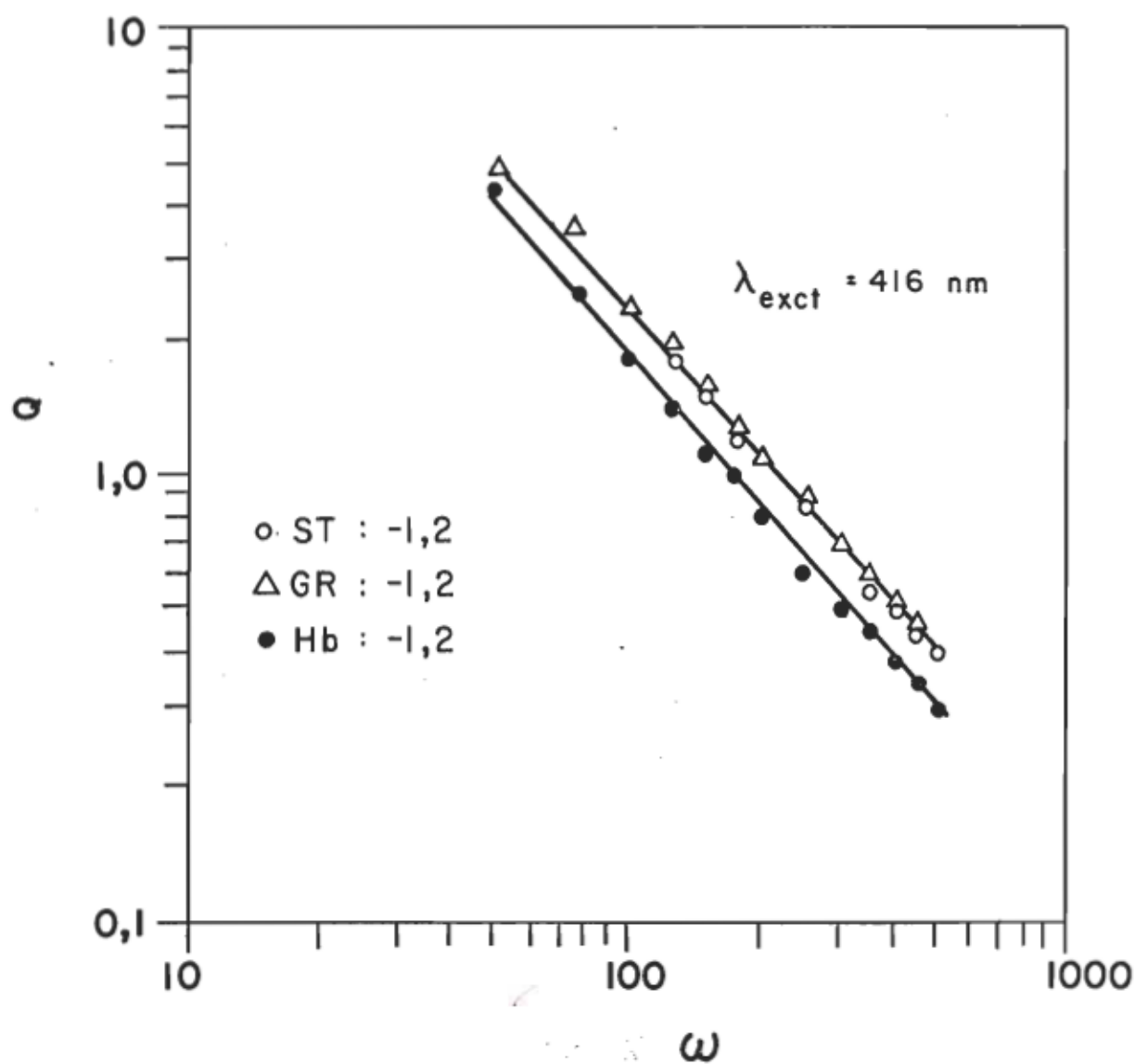


Figure 53:

PENTE DE SATURATION ST, GR, Hb SUR FILTRE MILLIPORE.

En examinant les résultats des pentes de saturation des essais sur filtre Millipore, que l'on retrouve sur les figures 49 à 53, on note une valeur de -1,2 pour les facteurs de dilution 50, 100 et 500 et de -1,3 pour le facteur de dilution 2 500. Ceci indique une tendance vers une non-saturation que l'on peut expliquer par la diminution de l'épaisseur de l'échantillon (l_e).

En résumé, les résultats expérimentaux suggèrent que l'utilisation d'un filtre Millipore comme support-échantillon permet d'obtenir rapidement un échantillon sous forme de solide hydraté. Dans ces conditions, l'intensité relative du signal photoacoustique caractérise bien les bandes spectrales du chromophore de l'hémoglobine. De plus on observe que les valeurs des pentes de saturation de cette série d'expériences (voir appendice B) indiquent une diminution de saturation optique en augmentant le facteur de dilution des différents échantillons d'hémoprotéine. Par contre, aucune méthode expérimentale n'est capable d'éliminer complètement la saturation. Comme par exemple le sang total avec un facteur de dilution de 2 500 se comporte comme un échantillon partiellement saturé avec une pente de saturation de -1,3. Ceci s'explique par la constitution des globules rouges qui sont des particules homogènes contenant l'hémoglobine dont le coefficient d'absorption (β) est très élevé. En effet, seule une monocouche particulière de globules rouges absorbe presque toute la lumière, c'est-à-dire qu'une fraction de la surface du filtre couverte contribuera au signal photoacoustique, donc présence de saturation.

L'ensemble des données expérimentales recueillies jusqu'à maintenant nous permet de choisir le filtre Millipore comme un support-échantillon adéquat pour étudier les intermédiaires de l'hémoglobine sensibles à leur environnement moléculaire.

4.4 Spectre photoacoustique et d'absorption de quelques intermédiaires de l'hémoglobine

En perspective, cette section tentera de vérifier la corrélation spectrale entre l'état solide hydraté et liquide des intermédiaires de l'hémoglobine par l'entremise de la spectroscopie photoacoustique et de transmission. On contrôlera premièrement le type de gaz comme ligand des intermédiaires oxyhémoglobine et carboxyhémoglobine. Le type de solvant qui agit sur l'état de coordination du fer comme c'est le cas pour l'hémoglobine et deuxièmement le modèle qui convient aux deux types de spectroscopie est la dilution d'un facteur 50 une solution de globules rouges avec

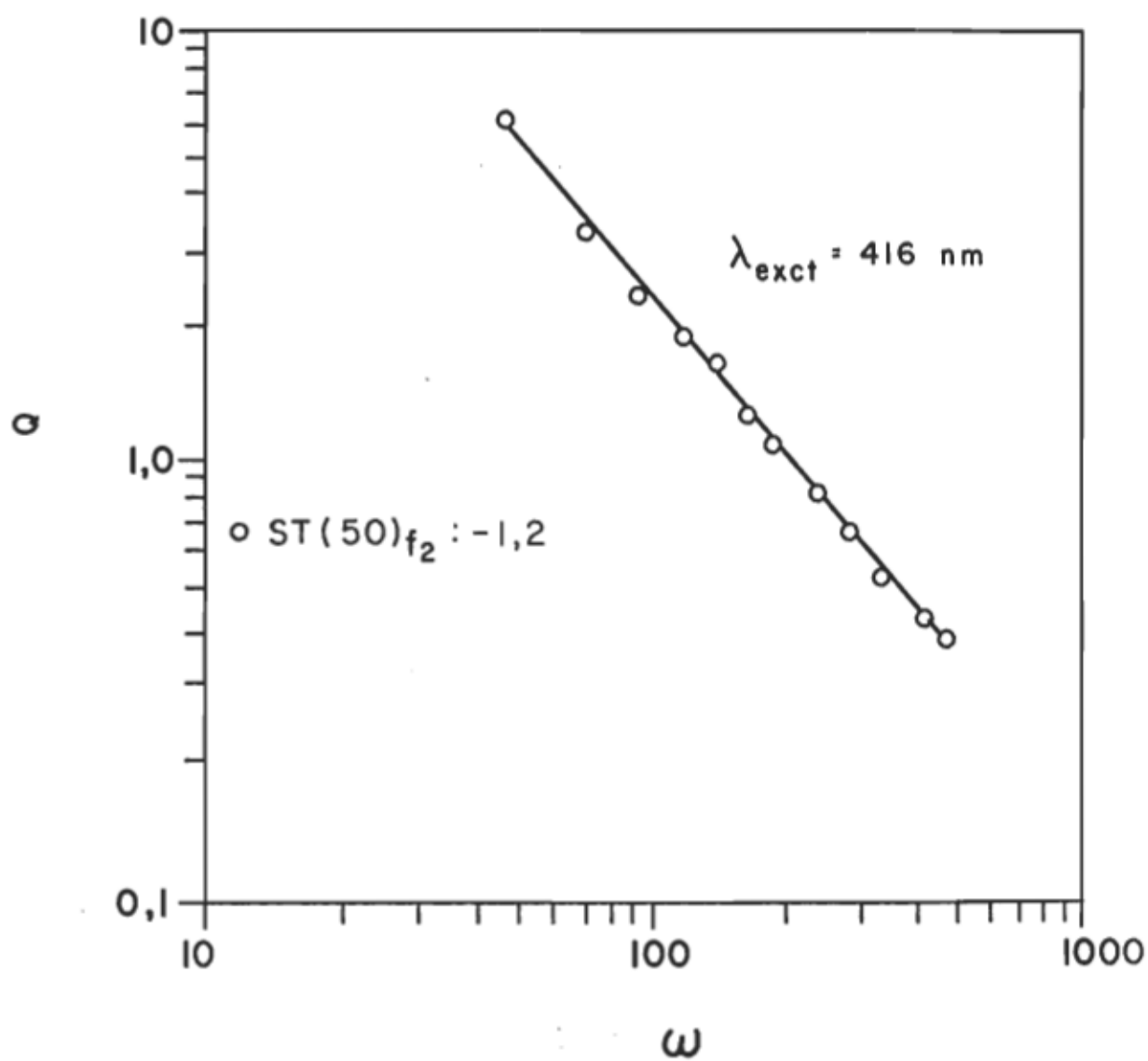


Figure 54:

PENTE DE SATURATION DE $\text{ST}(50)_{f_2}$

un volume de filtration de 2 ml. Le signal photoacoustique est convenable quoique légèrement saturé d'après la figure 54 et parfaitement observable en absorption. Les conditions instrumentales que l'on utilise pour déterminer le spectre photoacoustique de chaque intermédiaire de l'hémoglobine sont les suivantes: une bande passante de 6,6 nm, une vitesse de balayage de 50 nm min^{-1} , une vitesse de déroulement du papier de $2,5 \text{ cm min}^{-1}$, une fréquence de modulation de 100 Hz, un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm. Les seuls paramètres variables lors des expériences se limitent au temps d'intégration de 1, 3 et 10 s ainsi qu'au gaz ambiant, soit l'oxygène, le monoxyde de carbone ou l'air. Pour ce qui est des conditions en spectroscopie d'absorption, on retrouve une vitesse de balayage spectral de 60 nm min^{-1} , une vitesse de déroulement du papier de 5 cm min^{-1} , un balayage en longueur d'onde entre 250 et 650 nm et une densité optique de 2,0 pleine échelle combinée à une suppression 0,5 dans certains cas.

4.4.1 L'oxyhémoglobine

Les spectres photoacoustiques d'une solution d'hémoglobine déposée le support-échantillon après un barbotage à l'oxygène révèlent les bandes caractéristiques des protéines, de dégénérescence, de Soret, des bandes β et α soit sous une atmosphère non-contrôlée ou contrôlée en présence O_2 . Le déplacement bathochrome que l'on observe entre les spectres des figures 55 et 56 dépend uniquement d'un temps d'intégration supérieur imposé par un faible rapport signal sur bruit dans l'enceinte à atmosphère contrôlée. En comparant les spectres photoacoustiques de l'oxyhémoglobine au spectre d'absorption, tel que démontre la figure 57, on en déduit les mêmes caractéristiques spectrales tant à l'état solide hydraté qu'à l'état liquide.

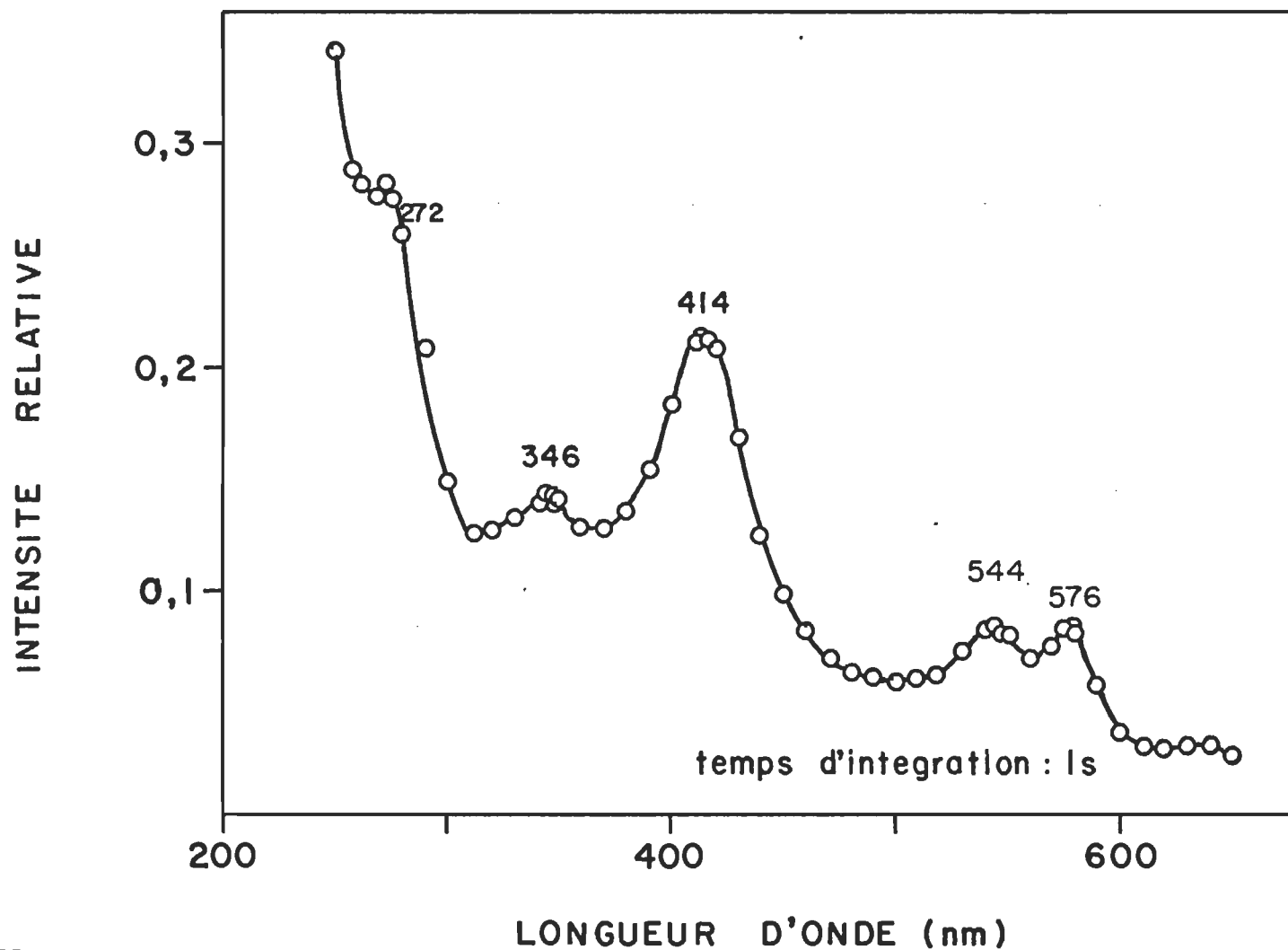


Figure 55:

ST(50) SOUS FORME HbO_2 DANS L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE A
ATMOSPHERE NON-CONTROLEE

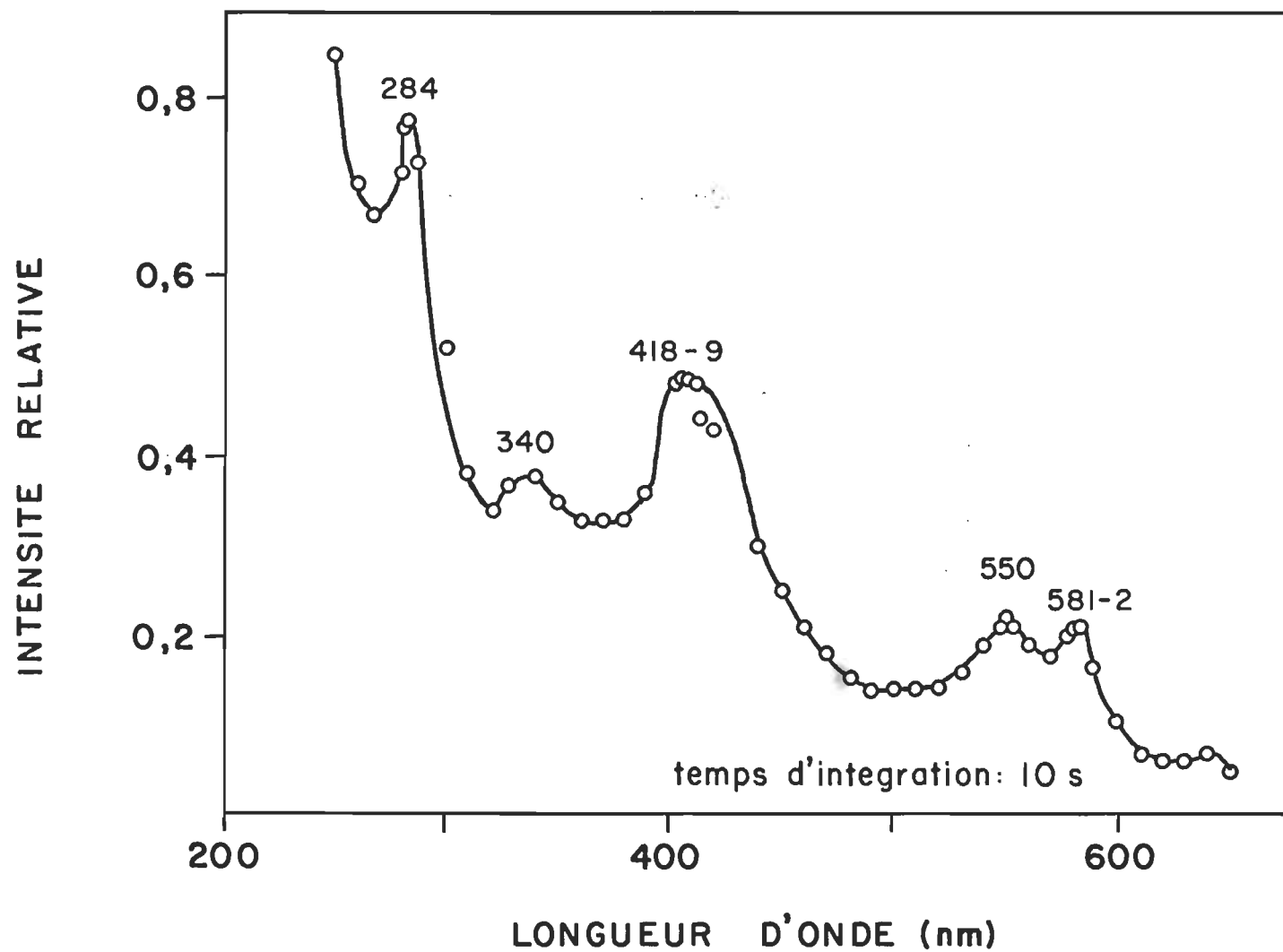


Figure 56:

ST(50) SOUS FORME HbO₂ DANS L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE
A ATMOSPHERE CONTROLEE

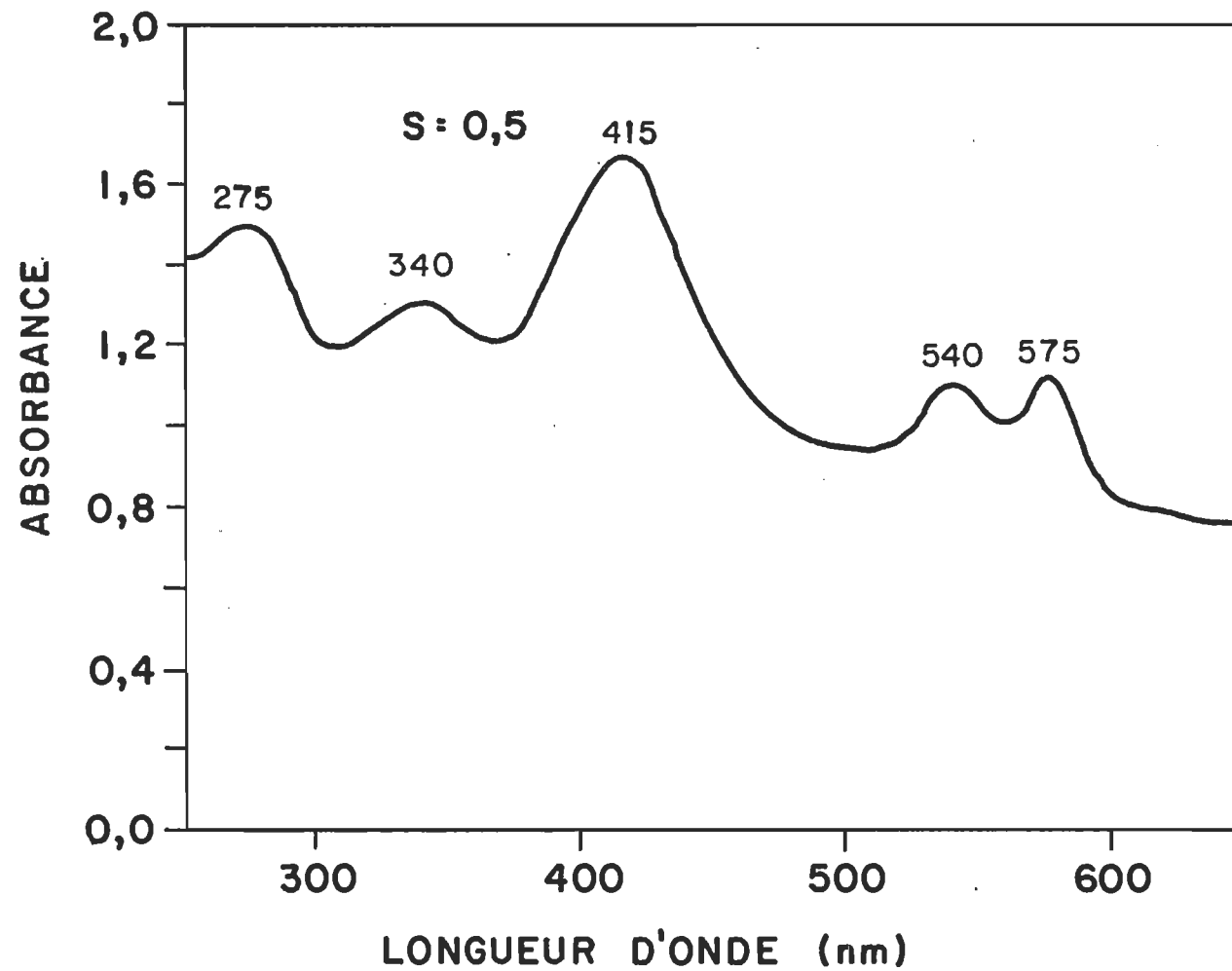


Figure 57:

ST(50) SOUS FORME HbO_2 EN SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION
(CARY 17 D)

4.4.2 La carboxyhémoglobine

L'intermédiaire carboxyhémoglobine se différencie de l'oxyhémoglobine par la liaison du monoxyde de carbone au lieu de l'oxygène comme ligand. Pathologiquement cet intermédiaire se rencontre dans les cas d'inhalation du gaz provenant du tuyau d'échappement d'un véhicule motorisé. Le changement de ligand entraîne des variations du patron de conjugaison de la protoporphyrine qui cause des déplacements des bandes spectrales. En examinant les spectres photoacoustiques des figures 58 à 61, on s'aperçoit qu'il existe effectivement un déplacement bathochrome de la bande de Soret et hypsochrome pour les bande β et α . Il est à remarquer que l'enceinte à atmosphère contrôlée accentue sensiblement la différence entre les déplacements de bande de l'oxyhémoglobine et la carboxyhémoglobine. Ce résultat peut être attribué au temps d'intégration, ainsi qu'au gaz ambiant. L'emploi d'un gaz spécifique pour former l'intermédiaire désiré élimine la possibilité d'un échange avec un gaz contaminant. Les spectres photoacoustiques présentent une similitude par rapport aux spectres de transmission de la carboxyhémoglobine et de l'oxyhémoglobine (voir figures 62 et 63). Nous pouvons conclure que les propriétés d'absorption optique de ces intermédiaires à l'état solide hydraté et liquide sont identiques.

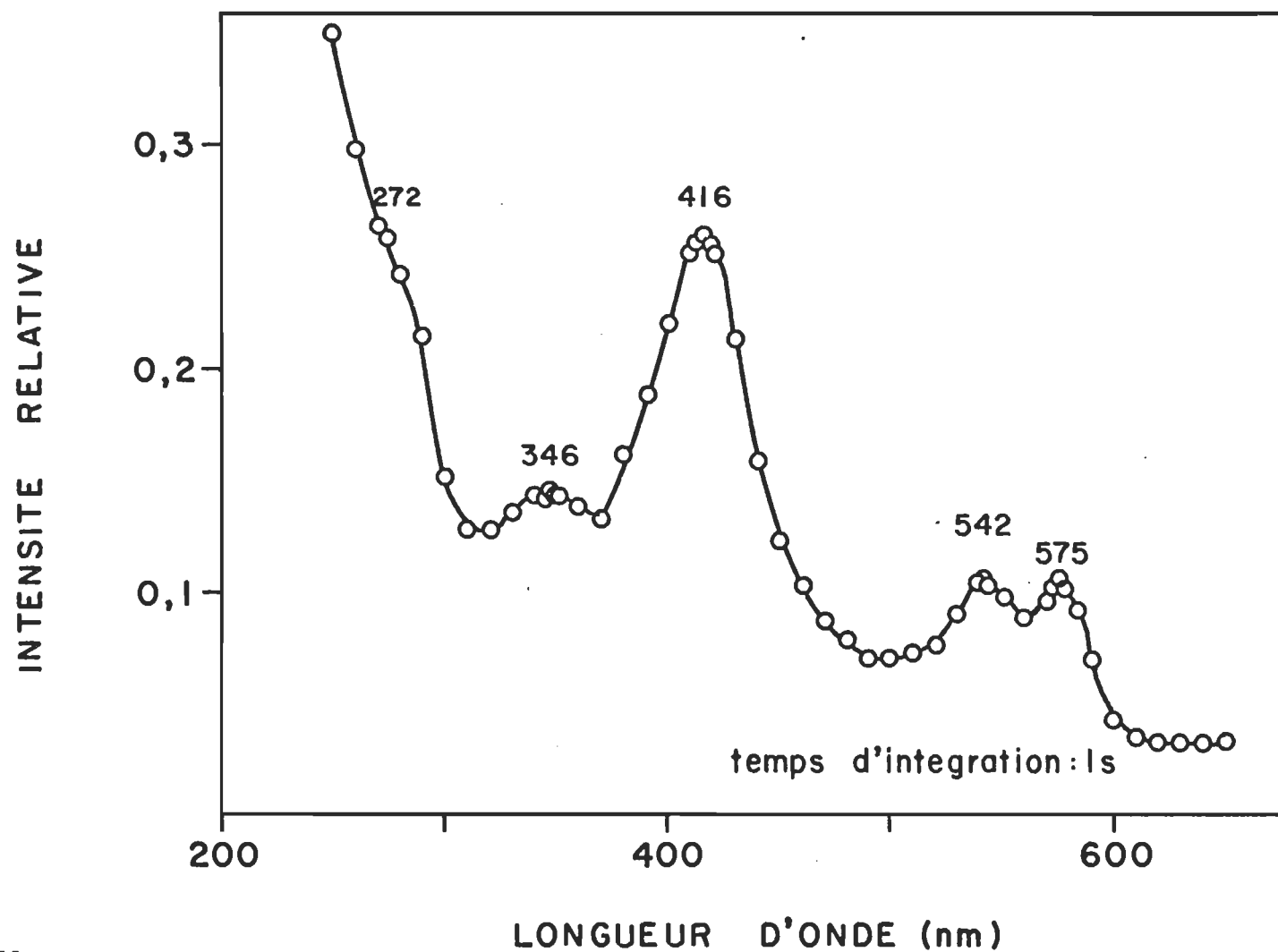


Figure 58:

ST (50) SOUS FORME HbCO DANS L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE A
ATMOSPHERE NON-CONTROLEE

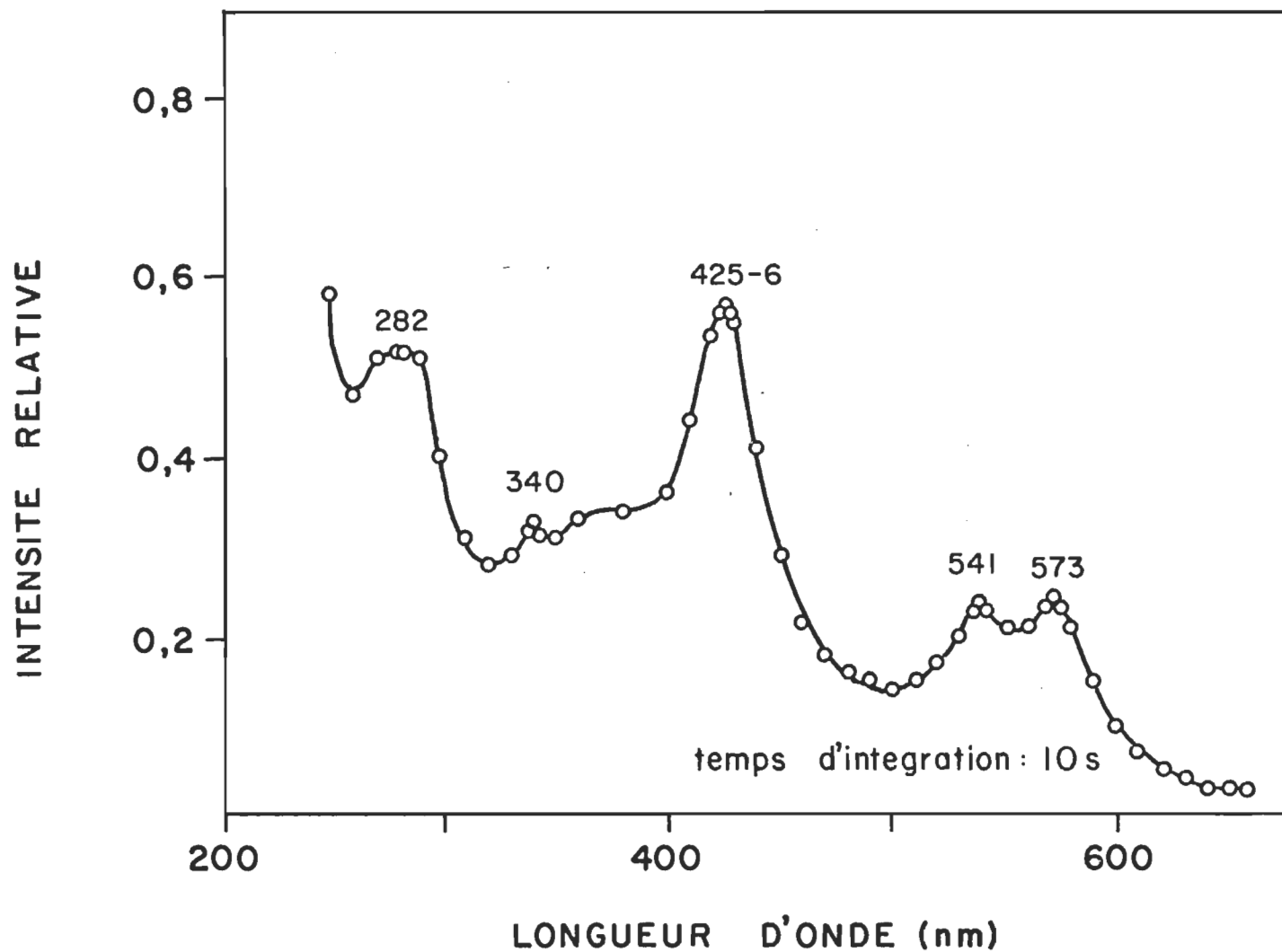


Figure 59:

ST(50) SOUS FORME HbCO DANS L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE
A ATMOSPHERE CONTROLEE

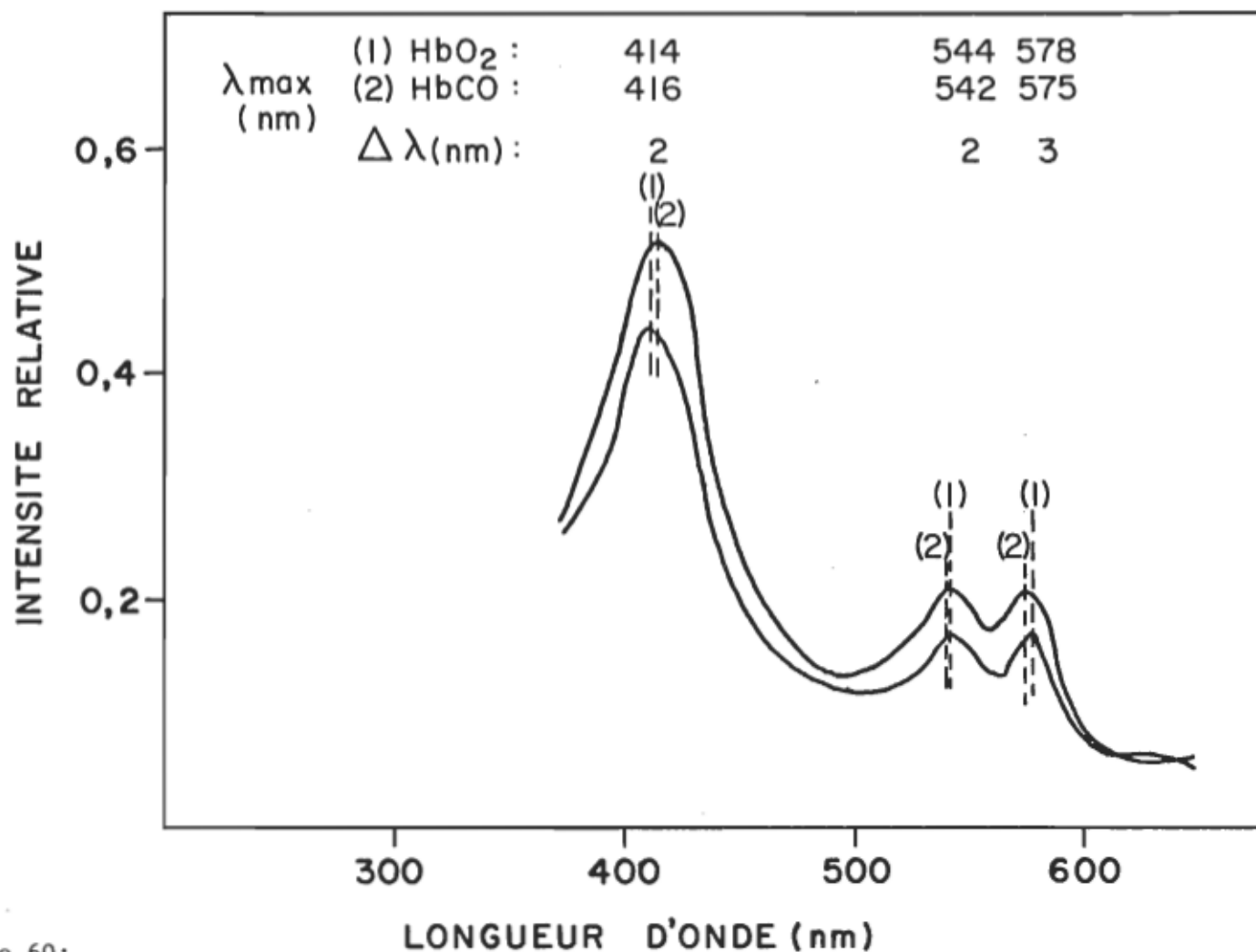


Figure 60:

DIFFERENTES TRANSITIONS DE L'HEMOGLOBINE DANS L'ENCEINTE
PHOTOACOUSTIQUE A ATMOSPHERE NON-CONTROLEE

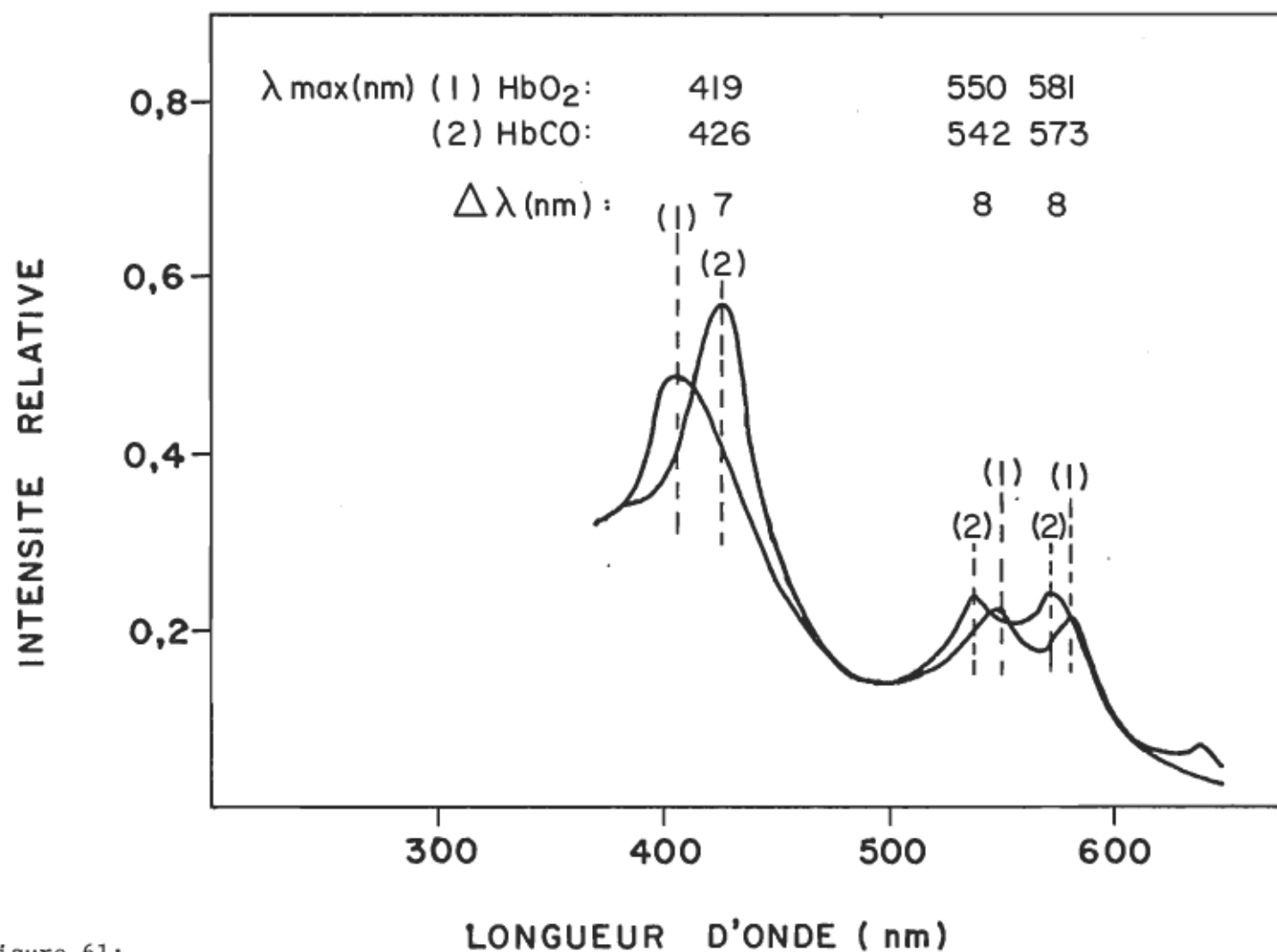


Figure 61:

DIFFERENTES TRANSITIONS DE L'HEMOGLOBINE DANS L'ENCEINTE PHOTOACOUSTIQUE A ATMOSPHERE CONTROLEE

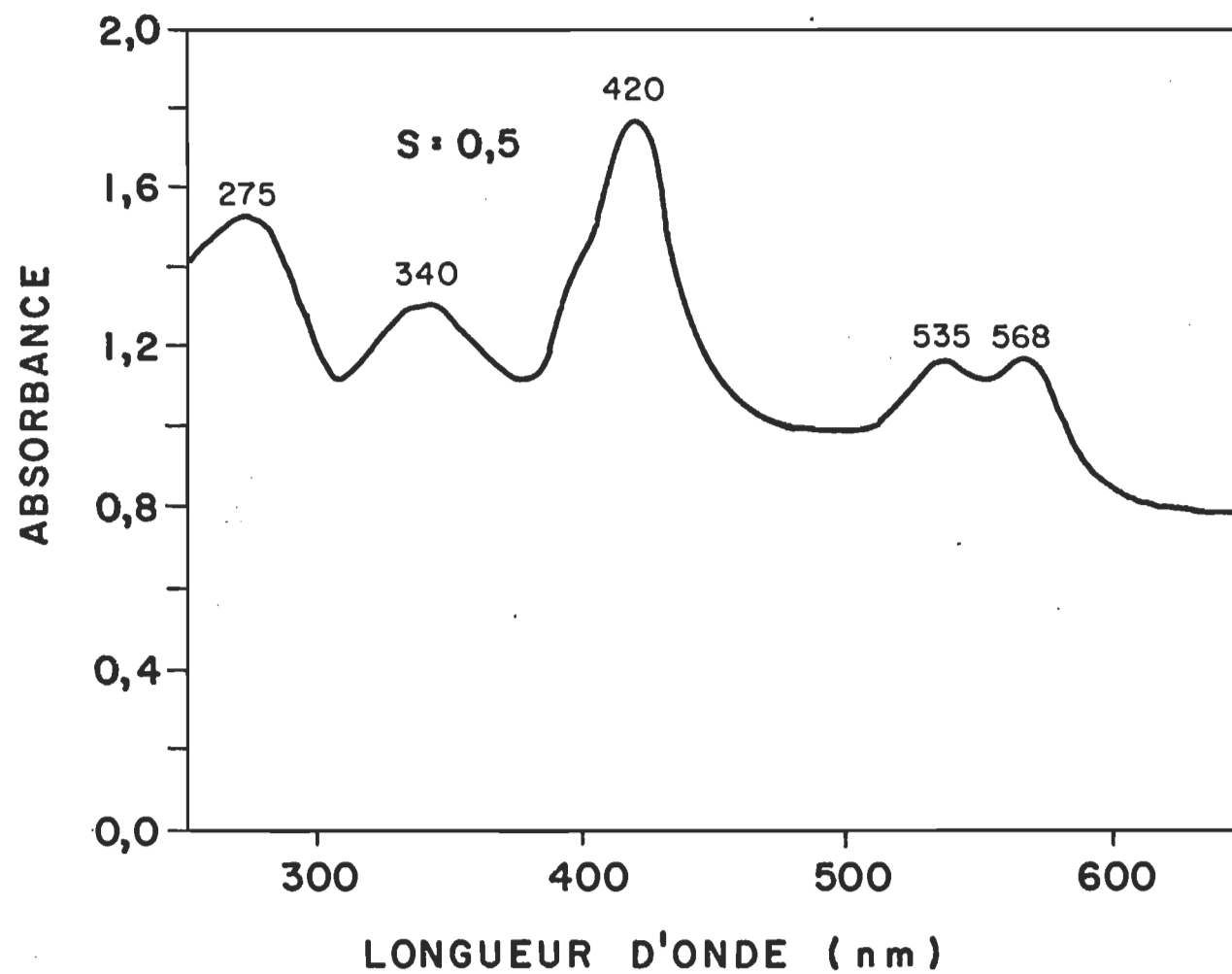


Figure 62:

ST(50) SOUS FORME HbCO EN SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION
(CARY 17 D)

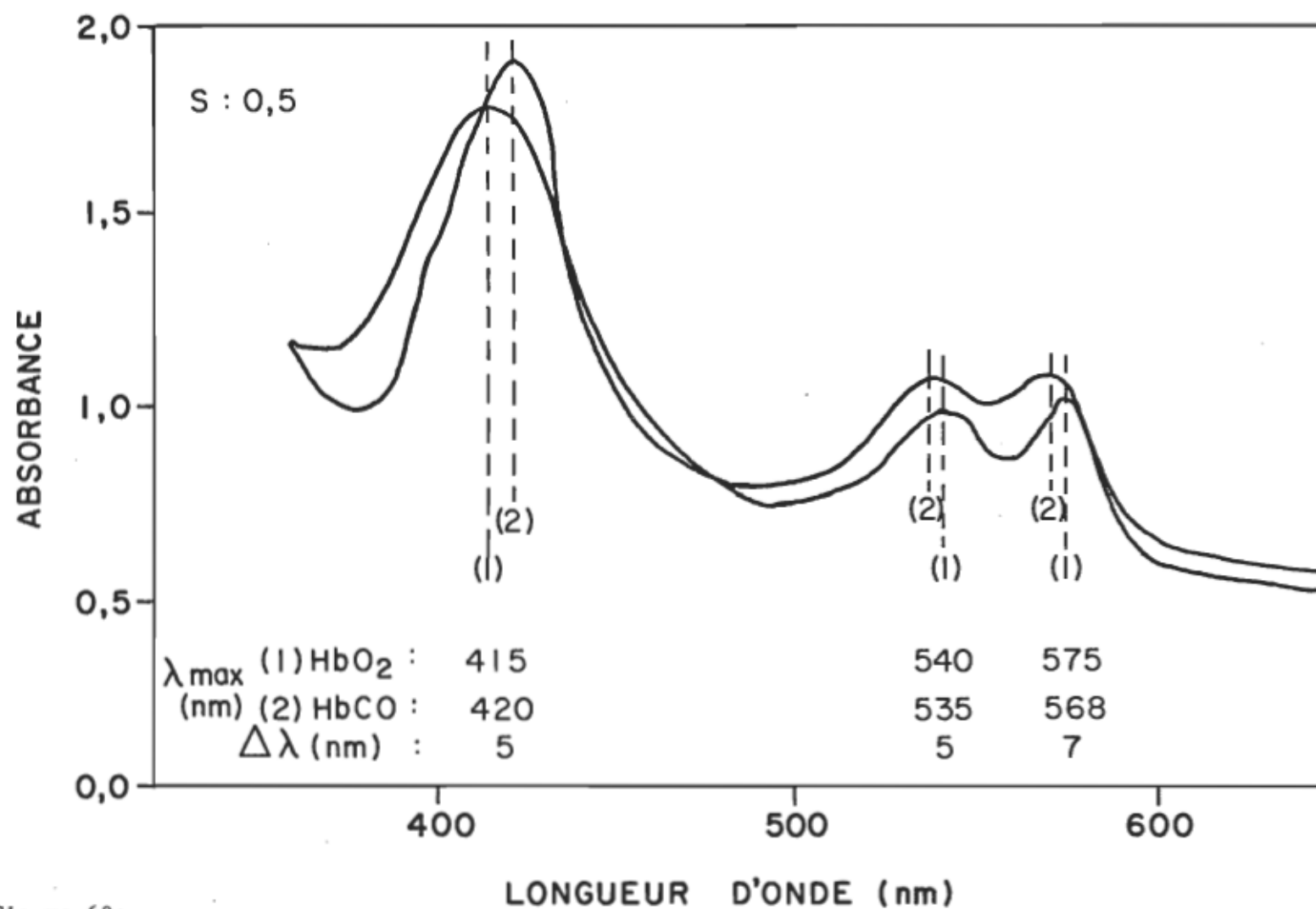


Figure 63:

DIFFERENTES TRANSITIONS DE L'HEMOGLOBINE EN SPECTROSCOPIE DE TRANSMISSION (CARY 17D)

4.4.3 L'hémiglobine

L'intermédiaire hémiglobine résulte de l'oxydation irréversible de l'atome de fer sous l'action du nitrite de sodium (Appendice C) empêchant ainsi la fixation de l'oxygène. L'hémiglobine se retrouve en forte concentration dans le sang des individus affligés d'un désordre génétique appelé hémoglobine M. L'étude des spectres photoacoustiques de la figure 64 caractérise bien les bandes propres à l'oxyhémoglobine et à l'hémiglobine. Cette même constatation s'applique aux spectres d'absorption des figures 65A et 65B mais les spectres photoacoustiques semblent mieux définis en terme de résolution des bandes spectrales de l'hémiglobine.

En résumé, l'étude par spectroscopie photoacoustique des intermédiaires de l'hémiglobine à l'état de solide hydraté confirme leurs caractéristiques spectrales observées à l'état liquide en spectroscopie d'absorption. En terme de sensibilité, le spectromètre photoacoustique est supérieur pour la détection de ces chromophores biologiques.

4.5 Spectre photoacoustique de la protoporphyrine impliquée dans certaines pathologies médicales

La perturbation de l'activité enzymatique au niveau de la biosynthèse de l'hème est à caractère, soit génétique soit environnemental. Les matières de base telles que la protoporphyrine et le fer servant en temps normal à la synthèse se retrouvent à l'état libre. Leur accumulation se produit principalement dans les globules rouges, le plasma, le foie et l'épiderme. Dans le cas de désordres génétiques tels que la

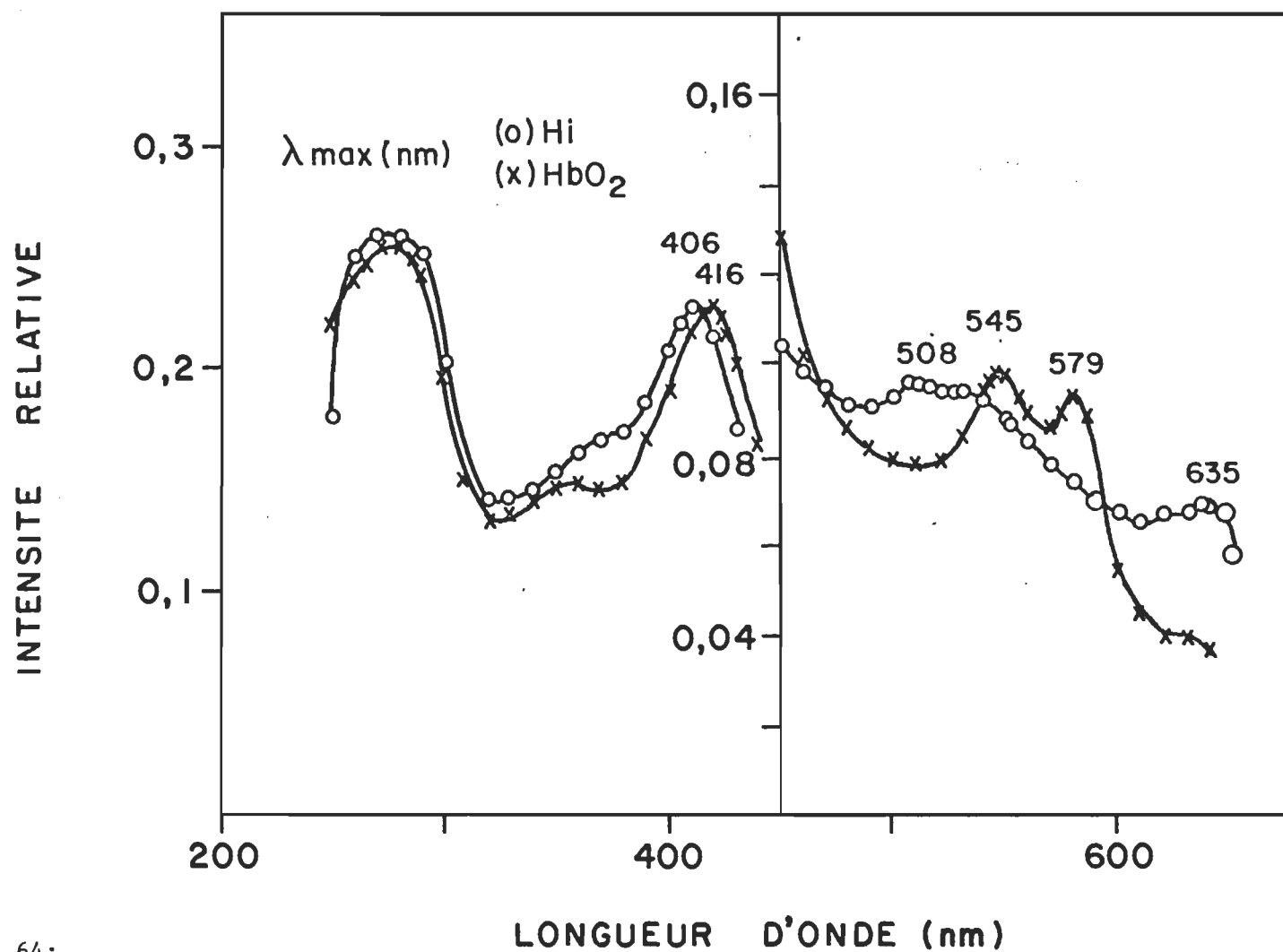
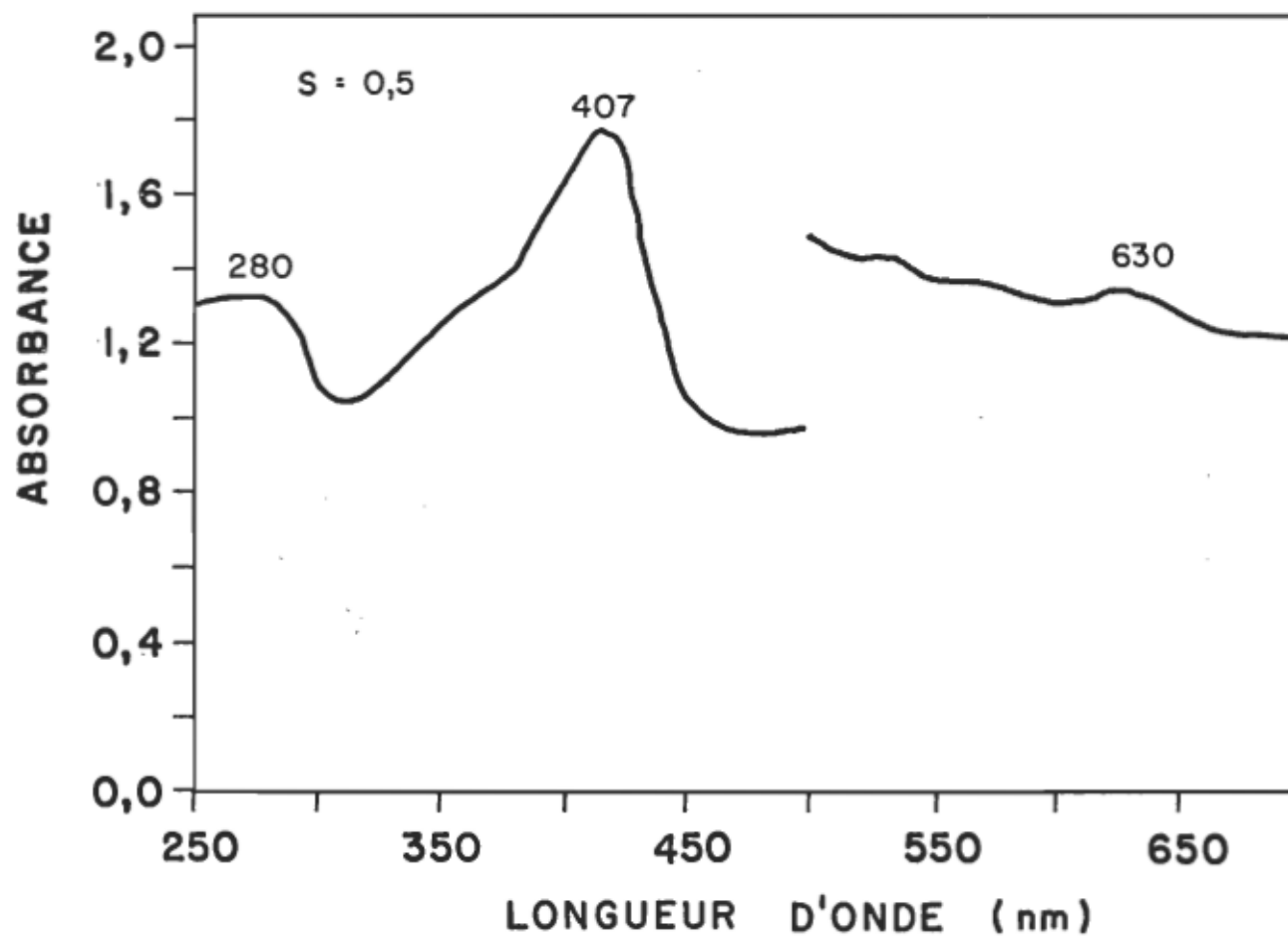


Figure 64:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE L'OXYHEMOGLOBINE ET D'HEMIGLOBINE
A ATMOSPHERE CONTROLEE



Figures 65A et 65B:

SPECTRE D'ABSORPTION DE L'HEMIGLOBINE

porphyrie variée et la protoporphyrine érythropoïétique, on les classe en fonction de la photosensibilité de l'épiderme à la lumière solaire (37). Ces photodermatites se caractérisent par une absorption de ces pigments vers 405 nm correspondant à la principale bande de la protoporphyrine (38) que l'on pourrait éventuellement identifier "in situ" par un spectre photoacoustique de l'épiderme. Comme ce type de pathologie est relativement peu fréquent, l'expérimentation serait affectée par un approvisionnement irrégulier d'échantillons. Quant aux porphyries dites acquises, elles apparaissent en présence d'agents provocateurs de nature médicamenteuse ou bien de polluant industriel comme le plomb que l'on diagnostique cliniquement par une forte concentration de protoporphyrine érythrocytaire (39). Nous tenterons de confirmer dans cette section la corrélation entre l'augmentation de l'intensité relative de la bande de Soret de cette protoporphyrine et le degré d'intoxication au plomb.

L'irrégularité des prélèvements sanguins de gens intoxiqués au plomb, nous limitent le nombre d'essais à pour caractériser la protoporphyrine dans le sang total. Les propriétés physico-chimiques des échantillons sont probablement altérées étant donné qu'aucune précaution n'a été prise lors de l'expédition par la poste. L'extraction en milieu acide, telle que décrite dans l'Appendice C, nous permet de récupérer quantitativement la protoporphyrine dans la phase aqueuse (40). L'hémoglobine érythrocytaire, dont la bande Soret est similaire à celle de la protoporphyrine, ne vient pas interférer dans les résultats car elle est absente de la phase aqueuse.

Le principal inconvénient de l'extraction se résume à la photodégradation de la protoporphyrine isolée dans une solution acide, ce qui nous contraint à manipuler rapidement l'échantillon. Le choix du support-échantillon s'avère difficile car dans un premier temps, on ne peut utiliser la lamelle du fait qu'on doit éviter l'évaporation d'un échantillon instable et que deuxièmement, il n'existe aucun filtre susceptible d'adsorber une molécule porphyrique de 563 daltons en poids moléculaire. C'est donc dire que l'emploi d'un filtre Millipore de $1,2\ \mu\text{m}$ empêche de quantifier de façon précise les résultats obtenus.

Les paramètres instrumentaux du spectromètre photoacoustique sont les suivantes: une bande passante de 6,6 nm, une vitesse de balayage de $10\ \text{nm min}^{-1}$, une vitesse de déroulement du papier de $1\ \text{cm min}^{-1}$, une fréquence de modulation de 100 Hz, un temps d'intégration de 10 s et un balayage en longueur d'onde de 350 et 450 nm. Le balayage spectral est court en raison d'une vitesse réduite pour bien définir la bande de Soret tout en évitant la dégradation de notre échantillon en fonction du temps.

La figure 66 illustre bien la corrélation entre l'augmentation de l'intensité relative du massif spectral de la protoporphyrine et une plus forte teneur en plomb accumulé dans le sang. On observe une intensité relative pour l'échantillon contrôle étant donné qu'il existe normalement une faible concentration de protoporphyrine dans le sang. Quant à la localisation de la bande de Soret à 400 nm, elle ne correspond pas

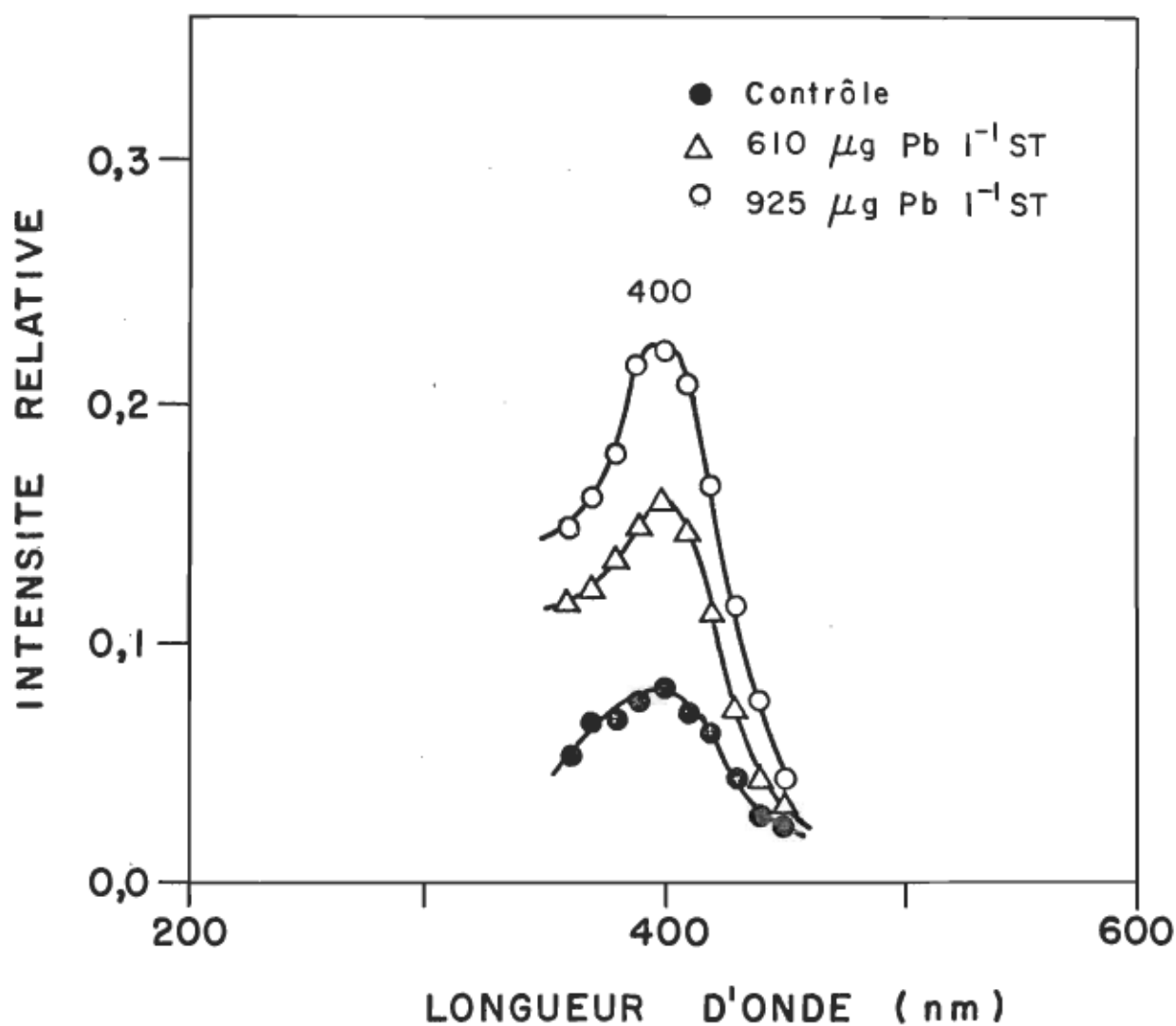


Figure 66:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE LA PROTO-PORPHYRINE EN FONCTION D'UNE INTOXICATION AU PLOMB.

spécifiquement à la protoporphyrine selon le tableau II (page 22) du chapitre I, toutefois elle se justifie par le mélange de cette porphyrine avec l'uroporphyrine et la coproporphyrine que l'on recueille au moment de l'extraction (39). Quantitativement, ces deux porphyrines sont des impuretés n'affectant pas les résultats car elles ne subissent aucun changement de concentration dans les intoxications au plomb. On constate une faible reproductibilité de ces résultats pour la bonne raison que l'on ne contrôle pas la photodégradation de la protoporphyrine et la quantité déposée en raison d'un support-échantillon inadéquat.

4.6 Approches histologiques et cytologiques en spectroscopie photoacoustique

Nous exploiterons dans cette section le principal avantage de la spectroscopie photoacoustique qui est de fournir des informations spectrales sur des solides biologiques insolubles qui sont souvent optiquement opaques. On doit avouer qu'actuellement les sciences histologiques et cytologiques sont presque exclusivement descriptives, l'oeil humain servant de détecteur. Par conséquent l'uniformité et la quantification des observations sont assujetties aux disparités existant d'un individu à l'autre, ce que la spectroscopie photoacoustique en tant que méthode analytique est en mesure de corriger. Parmi les expériences entreprises citons l'étude de la protection spectrale offerte à l'épiderme (stratum corneum) par une crème solaire; de (s) chromophore (s) naturel (s) impliqué (s) dans la pathologie tumorale des tissus mammaires et enfin des chromophores marqueurs utilisés pour quantifier certaines substances biologiques comme l'ADN (acide désoxyribonucléique) aptes à classer spectroscopiquement les différentes étapes d'un cancer au niveau cellulaire.

4.6.1 Spectre photoacoustique du *stratum corneum* en présence de PABA comme agent protecteur contre le rayonnement solaire

Les ondes électromagnétiques environnant les êtres vivants les affectent constamment. Deux régions du spectre solaire sont susceptibles d'infliger des lésions cutanées soit mineures avec les rayonnements entre 320 et 400 nm correspondant à l'exposition dite de bronzage, soit majeures où l'absorption s'effectue entre 290 et 320 nm résultant en des brûlures. L'une des pratiques courantes des vacanciers sur le bord des plages est de s'exposer au soleil ce qui occasionne bien souvent des "coups de soleil" que l'on peut éviter en appliquant une crème solaire contenant un agent protecteur tel que l'acide para-aminobenzoïque (PABA). C'est donc dire que le PABA empêche la photodégradation des chromophores localisés dans les tissus conjonctifs de l'épiderme en filtrant les rayons ultraviolets.

Expérimentalement nous allons définir le rôle spectral du glyceryl PABA, incorporé dans une crème solaire commerciale (Sea of Ski, Smithkline Corp.), sur l'épiderme. Les conditions instrumentales du spectromètre photoacoustique se résument ainsi, une bande passante de 6,6 nm, une vitesse de balayage spectral de 25 nm min^{-1} , une vitesse de déroulement du papier de $2,5 \text{ cm min}^{-1}$, une fréquence de modulation de 100 Hz, un temps d'intégration de 3 s et un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm.

Le spectre de la figure 67 représente les caractéristiques spectrales du glyceryl PABA que l'on a badigeonné sur une lamelle de

verre, avec une bande unique se situant entre 280 et 330 nm, offrant ainsi une zone de protection contre l'érythème solaire.

L'enchevêtrement de polymères protéiniques insolubles, qui constitue la kératine est originaire des cellules ectoblastiques de l'épiderme (41). L'une de leurs propriétés physiques est de diffuser la lumière justifiant ainsi l'usage de la spectroscopie photoacoustique comme le préconise la publication de Pines (42). L'échantillon cutané que l'on étudie couvre une surface de $0,48 \text{ cm}^2$. Le spectre du *stratum corneum* (SC) présenté à la figure 68 montre une bande à environ 290 nm que l'on peut associer aux acides aminés aromatiques tryptophane, tyrosine et phénylalanine (43). En ce qui concerne l'application topique de la crème solaire contenant le glycéryl PABA à l'épiderme, on confirme spectralement, selon la figure 68, son rôle d'écran protecteur couvrant l'étendue entre 280 et 320 nm. Sur cette même figure, on observe que l'addition d'eau de mer (Appendice C) à la température de la pièce sur l'épiderme en présence de crème solaire n'empêche pas la protection contre les rayons ultraviolets qui détériorent les chromophores protéiniques absorbant entre 290 et 320 nm. La grande capacité de dissipation thermique de l'eau explique l'artefact que l'on observe par la diminution de l'intensité relative du spectre de l'épiderme avec la crème solaire en présence d'eau de mer par rapport au spectre de l'épiderme avec seulement la crème solaire. Par contre toute variation du signal photoacoustique entre 350 et 650 nm, où aucune bande ne prédomine est imputable au bruit de fond.

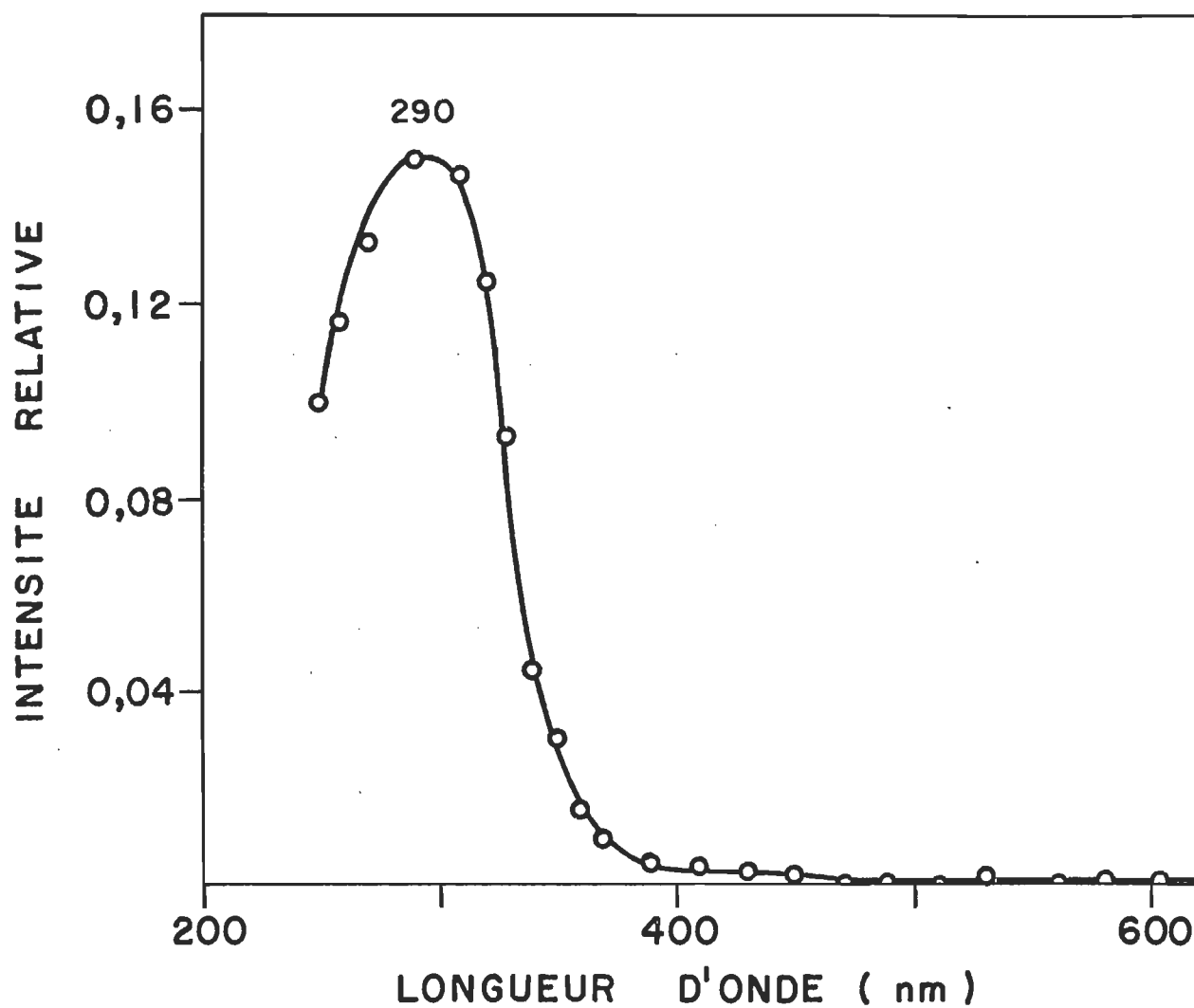


Figure 67:
SPECTRE PHOTOACOUSTIQUE DU GLYCERYL PABA

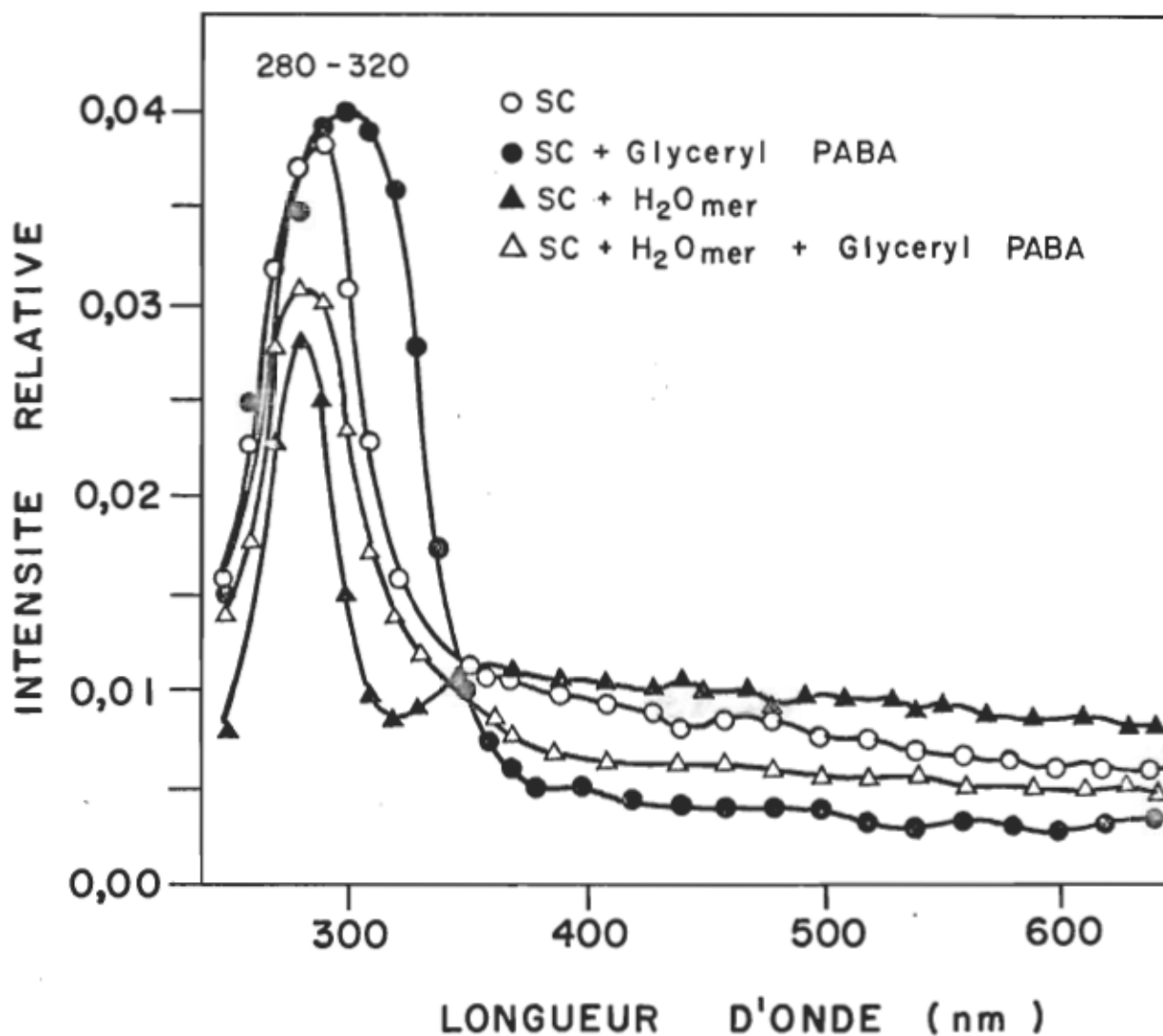


Figure 68:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE L'APPLICATION
TOPIQUE DU GLYCERYL PABA SUR L'EPIDERME
SEC OU HYDRATE

4.6.2. Spectre photoacoustique de tissus humains de nature saine et tumorale

Par définition, le cancer est une prolifération anarchique de cellules immatures impliquant une déficience métabolique au niveau de la synthèse protéinique. Spectralement peut-on identifier des chromophores capables de différencier un tissu sain d'une tumeur? Une nouvelle approche en utilisant la spectroscopie photoacoustique est examinée afin de déterminer la nature physique d'échantillon optiquement épais.

Les paramètres ajustés sur le spectromètre photoacoustique se limitent à ceux de la section 4.6.1 sauf pour la fréquence de modulation qui est de 150 Hz. Les données recueillies sur les spectres de la figure 69 nous amènent à conclure qu'il n'existe pas de bande spectrale à proprement parlé mais plutôt un épaulement s'étendant entre 280 et 320 nm que l'on peut associer aux chromophores d'acides aminés aromatiques, suivi de la diminution drastique de l'intensité relative au point d'être négligeable à 350 nm. De plus, on ne peut observer aucune différence entre un tissu sain et tumorale d'origine mammaire. L'absence d'une bande à 400 nm qui aurait démontré la présence de sang dans l'échantillon se justifie par le peu de vascularisation de certaines régions mammaires tout comme c'est le cas pour les tumeurs en général. Suite à cette expérience, on doit avouer que la mise en évidence de tissu tumoral par la spectroscopie photoacoustique des chromophores naturels absorbant dans la région uv-visible n'est pas suffisamment spécifique pour déceler les différences significatives. Par conséquent, l'emploi de chromophores marqueurs, que l'on fixe aux molécules biologiques identifiées dans les carcinogénèses, fait le sujet de discussions dans la prochaine section.

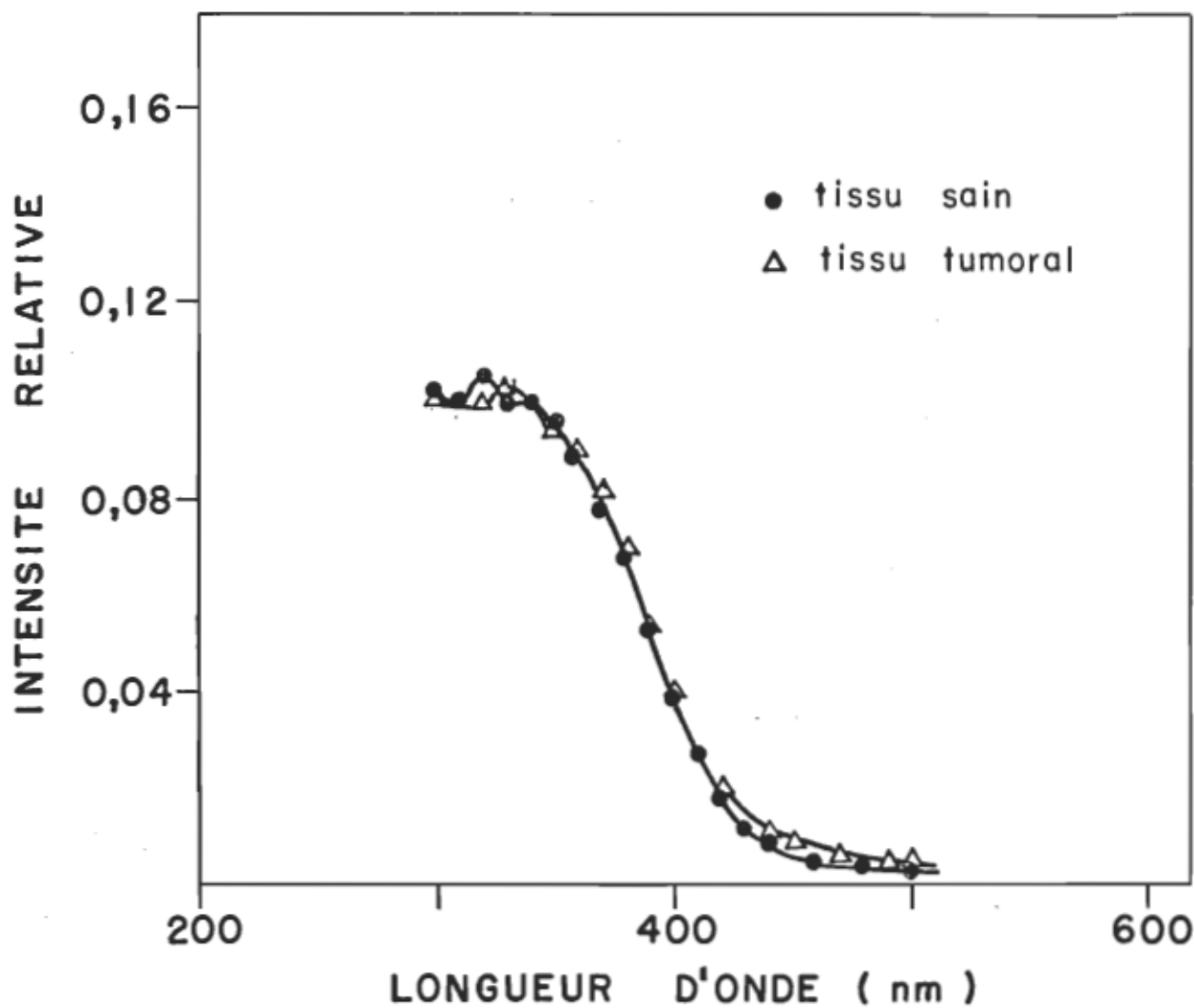


Figure 69:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE TISSUS SAINS ET
TUMORAUX D'ORIGINE MAMMAIRE.

4.6.3 Approche de la cytophysique différentielle en spectroscopie photoacoustique

Parmi les changements morphologiques d'une cellule cancéreuse, on remarque que le noyau est hyperchromatique ce qui est associé à une augmentation non-négligeable de l'ADN (acide désoxyribonucléique) nucléaire (44). Vraisemblablement, le réactif de Schiff comme chromophore marqueur absorbant dans la région spectrale du visible est à même de révéler quantitativement la présence de l'ADN dans le noyau des cellules normales et carcinogéniques. Ainsi on peut classer spectralement à l'aide de la spectroscopie photoacoustique les différents types de carcinomes pulmonaires venant des expectorations pulmonaires exempt de mucus que l'on utilise comme échantillon. Le mécanisme intime de la réaction de Feulgen se résume à l'hydrolyse acide de l'ADN de façon à libérer les groupements aldéhydes du désoxyribose qui vont se fixer au réactif de Schiff, qui est une fuschine basique décolorée, pour former un complexe coloré absorbant à 560 nm. Les principales étapes de la réaction de Feulgen sont explicitées dans l'Appendice C. Les conditions instrumentales consistent en une bande passante de 6,6 nm, une vitesse de balayage spectral de 100 nm min⁻¹, une vitesse de déroulement du papier de 2,5 cm min⁻¹, une fréquence de modulation de 50 Hz, un temps d'intégration de 3 s et un balayage en longueur d'onde de 250 à 650 nm. L'enceinte photoacoustique à atmosphère non-contrôlée est employée pour cette étude. Quant aux variantes du protocole expérimental qui nous servent à maximiser le rendement de cette méthode, nous avons dans un premier temps choisi le support-échantillon adéquat pour fixer les cellules normales avant l'hydrolyse en fonction des

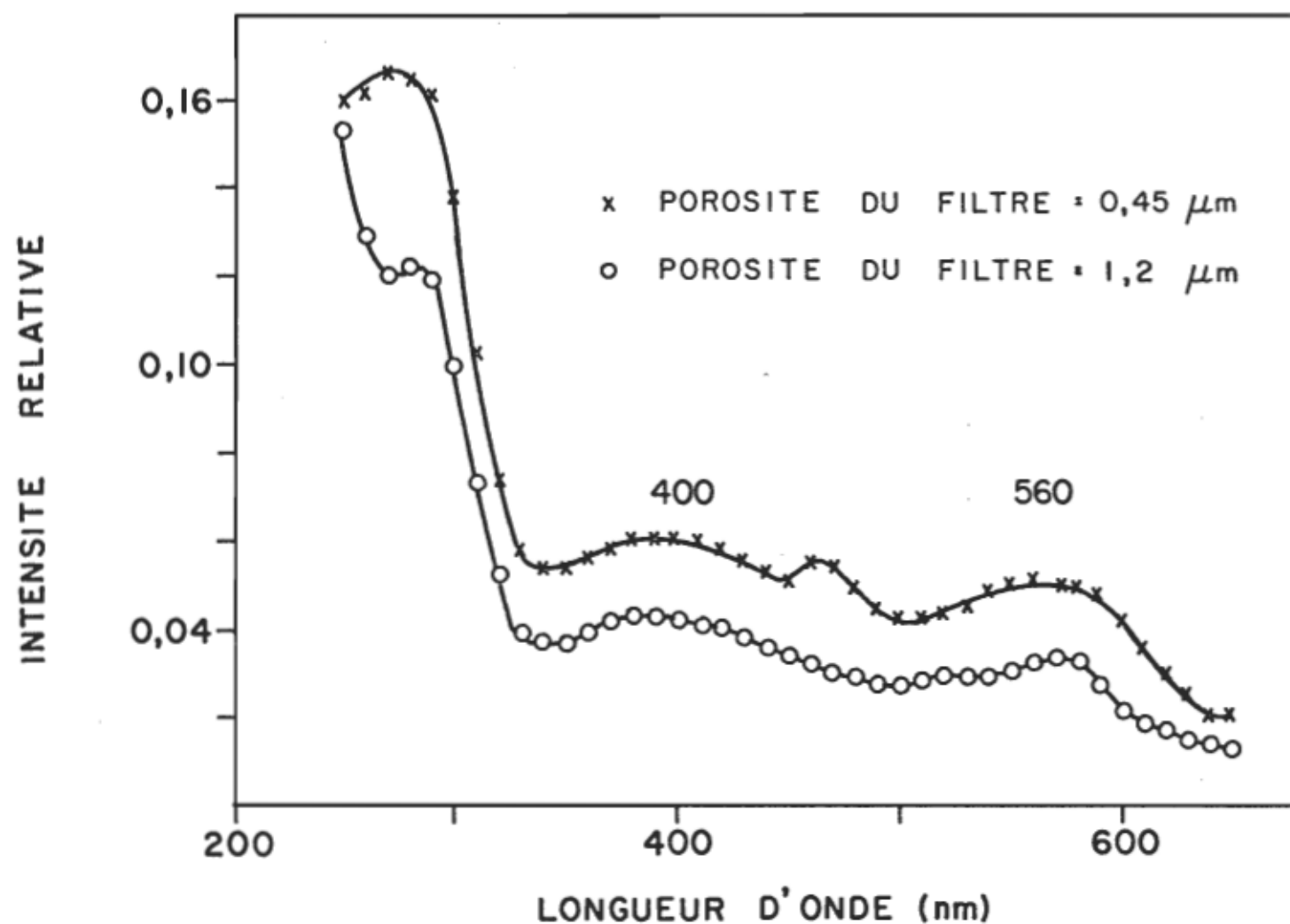


Figure 70:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DU SUPPORT-ECHANTILLON ADEQUAT POUR LA METHODE CYTOPHYSIQUE DIFFERENTIELLE

spectres photoacoustiques de la figure 70, pour un volume constant de 25 μl du culot cellulaire. En examinant les deux spectres, le filtre Millipore avec une porosité de 0,45 μm par rapport à 1,2 μm semble indiquer une meilleure adhérence des cellules, de plus on remarque la présence d'une bande à 400 nm s'identifiant à l'hémoglobine que l'on peut associer à la teinte rougeâtre de l'échantillon. Deuxièmement, nous avons déterminé un temps d'hydrolyse optimum de 7 minutes où les molécules impliquées ne sont pas dégradées, c'est ce que démontre la figure 71.

L'étape cruciale de cette méthode est de comparer les spectres de cellules normales à ceux de cellules carcinogéniques en contrôlant leur nombre par un décompte à l'aide d'un hématocytomètre (Appendice C). En analysant les spectres photoacoustiques de la figure 72, on constate une augmentation de l'intensité relative liée à la quantité d'ADN nucléaire des cellules carcinogéniques par rapport à celle des cellules normales. La marge est de 31% pour le premier échantillon carcinogénique et de 65% dans le deuxième cas ce qui indique différents degrés de pathogénicité. Un diagnostic en parallèle confirme cette hypothèse. En terme de reproductibilité, il suffit de comparer le spectre des deux échantillons normaux pour en déduire la quantification de la méthode cytophysique et ceci en tenant compte du nombre de cellules qui est de $1,01 \times 10^6$ cellules par mm^3 de culot dans un cas et de $1,04 \times 10^6$ cellules par mm^3 de culot dans l'autre. Par contre, l'erreur expérimentale de 7,2% que l'on retrouve entre les deux étalements du premier échantillon carcinogénique est imputable au compactage cellulaire qui peut varier en fonction du temps.

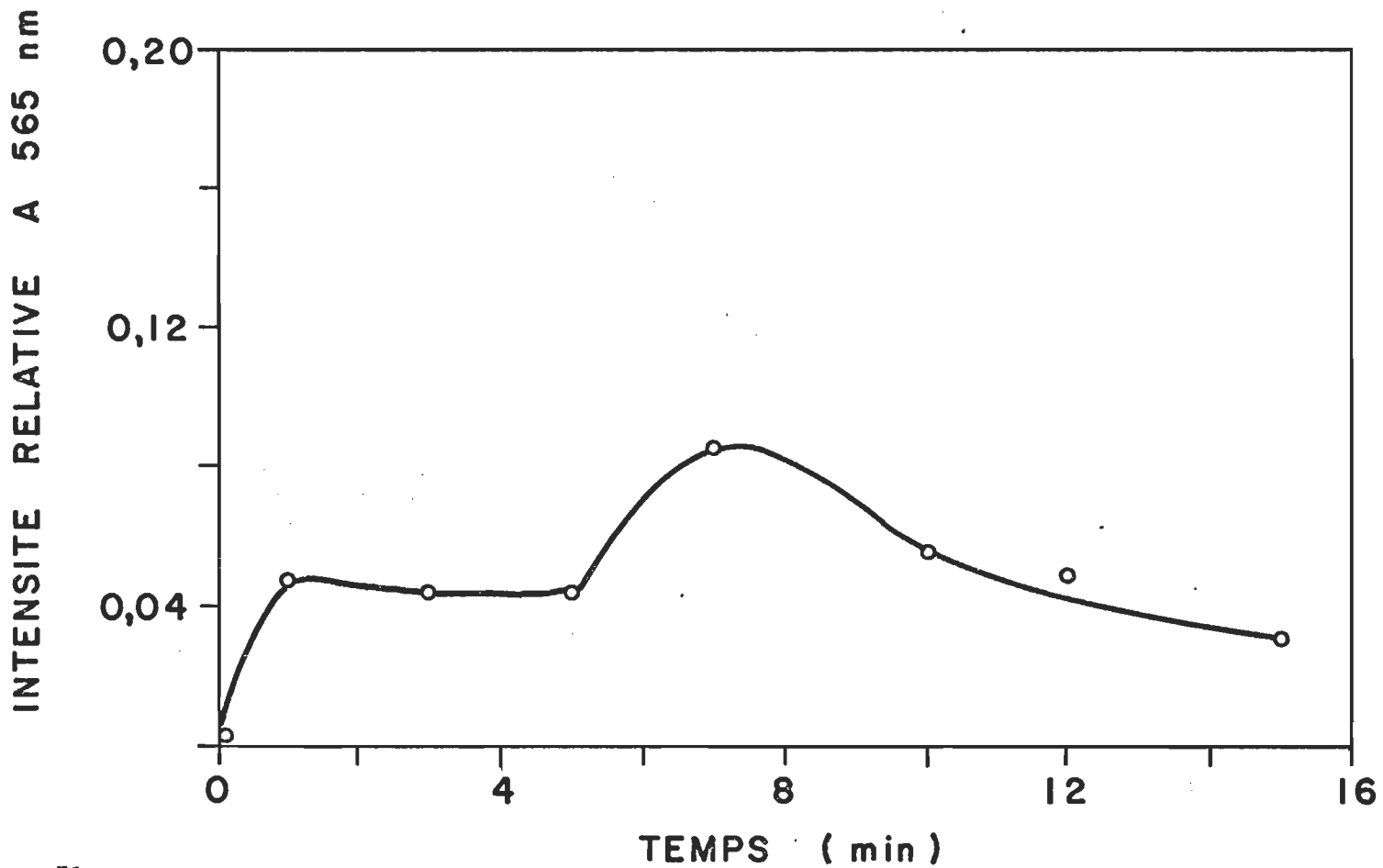


Figure 71:

CINETIQUE DE LA REACTION DE FEULGEN DETERMINEE PAR LE
SIGNAL PHOTOACOUSTIQUE A 565 nm

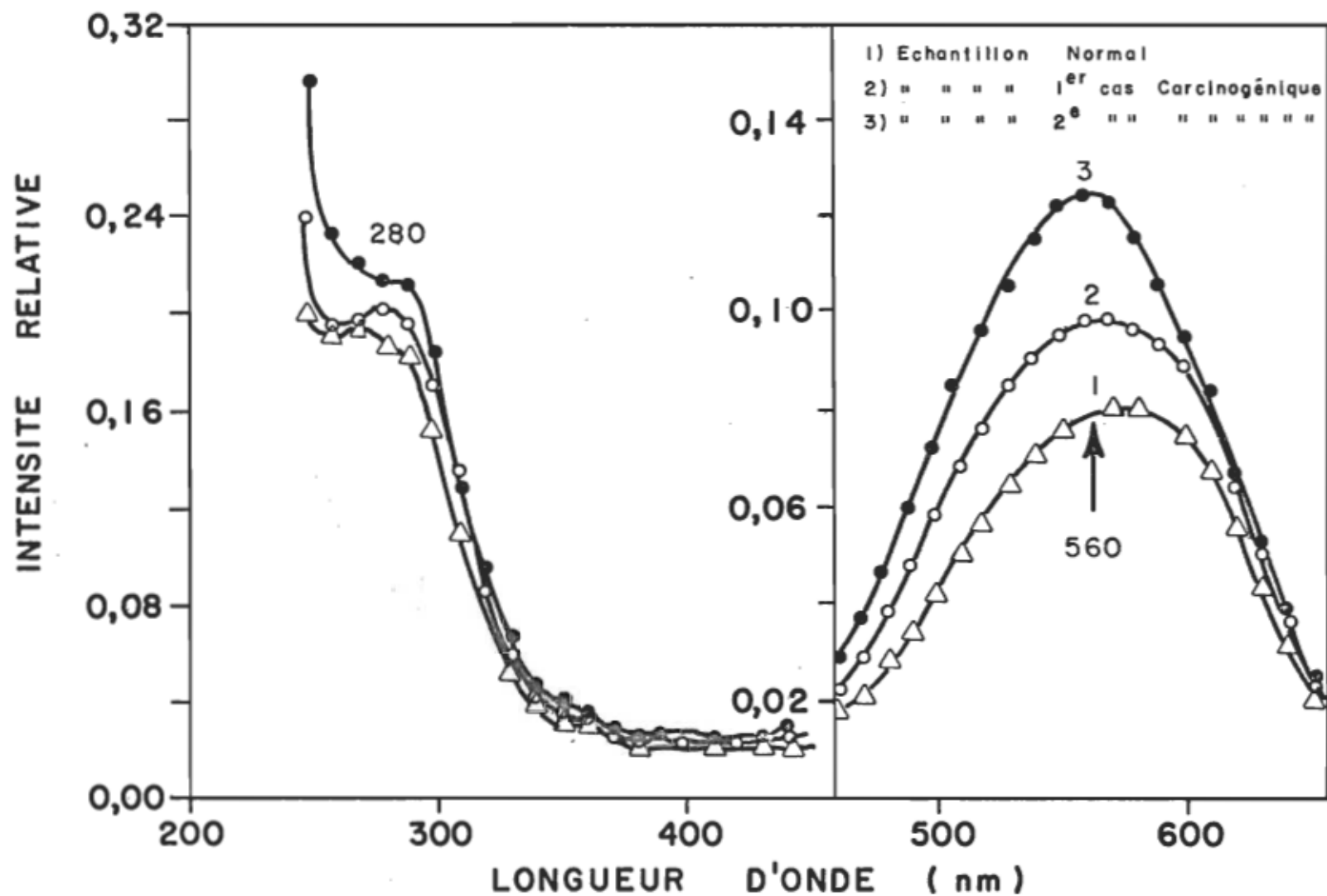


Figure 72:

SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE LA CYTOPHYSIQUE DIFFERENTIELLE
DES CARCINOMES PULMONAIRES

Pour ce qui est de l'augmentation de la bande des protéines vers 280 nm en présence des échantillons pathologiques, on l'explique par le lien existant entre l'ADN et la synthèse protéinique; toutefois en ne doit pas oublier que le support-échantillon absorbe dans la même région spectrale.

L'avenir de la spectroscopie photoacoustique comme méthode biophysique semble un outil propice pour étudier les différents types de carcinomes.

CONCLUSION

L'emphase de notre projet a porté principalement sur l'étude de chromophores biologiques à l'aide de la spectroscopie photoacoustique, c'est-à-dire définir les meilleures conditions expérimentales et instrumentales aptes à caractériser spectralement les molécules biologiques dans la région uv-visible. Initialement nous avons déterminé l'importance des paramètres tels que le support-échantillon et le gaz ambiant qui font partie de l'environnement immédiat de l'échantillon. Par la suite, on a vérifié le comportement spectral de matière biologique sous diverses formes comme l'état liquide, le solide hydraté et le solide amorphe en s'appuyant sur les données recueillies dans la littérature et enfin on s'est attardé aux spectres de spécimens optiquement opaques comme les cellules et les tissus humains pour comprendre leurs propriétés physico-chimiques tant normales que pathologiques.

Dans la première étape, nous sommes parvenus à un compromis en choisissant le filtre Millipore comme support-échantillon ce qui permet un étalement plus uniforme tout en éliminant rapidement le solvant et ce malgré une légère absorption spectrale du filtre dans le proche ultraviolet. Ce support a permis d'examiner des chromophores tels que les intermédiaires de l'hémoglobine qui sont capables d'échanges gazeux avec leur environnement. Parallèlement, on a pu contrôler la saturation photoacoustique en diminuant le nombre de chromophores hydrosolubles absorbant la lumière incidente avec une dilution appropriée, ainsi on a observé les caractéristiques optiques réelles de la molécule hémoglobine.

Quant à la deuxième étape, elle se résume à étudier les propriétés d'absorption de l'oxyhémoglobine, la carboxyhémoglobine et l'hémoglobine en présence d'un gaz ambiant adéquat limitant ainsi les interactions moléculaires indésirables. Par la même occasion, on a confirmé que l'état solide ou liquide de l'échantillon influence très peu les spectres des intermédiaires de l'hémoglobine.

Par contre l'étude des cellules et des tissus humains ouvre une nouvelle perspective de recherche qui est accessible seulement à la spectroscopie photoacoustique dû au fait que ces entités biologiques, de par leur composition, diffusent facilement la lumière.

En se basant sur nos expériences, nous croyons que la spectroscopie photoacoustique peut se tailler une place dans un avenir rapproché comme instrument analytique dans un laboratoire biomédical.

PROJETS À VENIR

Des différentes études entreprises jusqu'à maintenant, de nouveaux développements sont toujours anticipés, c'est ce à quoi nous tenterons d'explicitier dans les prochaines lignes de façon à promouvoir une continuité des recherches effectuées.

Effectivement nos expériences confirment que l'on peut observer en spectroscopie photoacoustique les propriétés d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la carboxyhémoglobine à l'état de solide hydraté qui sont similaires à celles obtenues en absorption, c'est-à-dire à l'état liquide. Toutefois, on doit signaler que les différences spectrales entre ces deux intermédiaires sont imputables au gaz utilisé comme ligand au moment du barbotage en solution. Mais on peut se demander si l'introduction du gaz dans les molécules d'hémoglobine serait aussi aisé à l'état de solide hydraté sachant que le modèle de Morimoto suggère un rôle prépondérant des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals des chaînes au niveau des changements de conformation des globines α_1 , β_2 en contact avec l'oxygène impliquant ainsi directement ou indirectement le solvant qui entoure les molécules. Le modèle expérimental que nous suggérons est simple, il suffit dans un premier temps de caractériser par spectroscopie photoacoustique la désoxyhémoglobine, c'est-à-dire l'hémoglobine à l'état ferreux exempt d'oxygène que l'on a déposé sur un filtre Millipore de manière à considérer l'échantillon comme un solide hydraté. Par la suite, on introduit l'oxygène graduellement dans l'enceinte à atmosphère contrôlée permettant ainsi de vérifier la présence d'oxyhémoglobine. Parallèlement on peut observer les changements de conformation de

l'hémoglobine à l'état de solide hydraté en étudiant la forme de la courbe sigmoïde de l'affinité de l'oxygène vis-à-vis cette molécule telle que préconisée dans la section 1.3.1. L'utilisation de la désoxyhémoglobine comme intermédiaire se justifie par la possibilité que le mécanisme de saturation d'oxygène des molécules d'hémoglobine sous forme de solide hydraté ne soit que partiel, par conséquent on doit choisir un intermédiaire ayant des caractéristiques spectrales bien différentes de l'oxyhémoglobine, ce qui est le cas de la zone entre 500 et 650 nm.

Quant à la continuité des études relatives à la protoporphyrine et les tissus humains, ils seraient possible d'envisager une expérience en spectroscopie photoacoustique démontrant la localisation histologique et le rôle des porphyrines que l'on utilise actuellement comme agent thérapeutique dans certaines tumeurs superficielles.

En ce qui concerne le projet de cytophysique différentielle, on peut maintenant discerner les échantillons normaux par rapport à des échantillons carcinogéniques à l'aide du spectre photoacoustique des chromophores liés à l'ADN nucléaire. Eventuellement, on pourrait raffiner la méthode pour détecter les cas faiblement pathologiques comme les dysplasies. En terme d'innovation, il faudrait fixer un chromophore marqueur compatible à l'anticorps des protéines localisées en forte concentration dans les cellules tumorales. Présentement, le Dr MacManus du Conseil National de Recherches du Canada est à produire l'anticorps de l'oncomoduline susceptible de répondre au besoin de ce projet.

APPENDICE A

Données expérimentales pour les pentes de saturation

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique				
	Fig. 16 (mV)	Fig. 18 (mV)	Fig. 20 (mV)	Fig. 22 (mV)	Fig. 25 (mV)
50	0,70	3,0	3,30	7,0	56,0
75	0,46	1,90	2,0	4,20	36,0
100	0,31	1,35	1,40	3,0	26,0
125	0,25	1,05	1,05	2,40	21,0
150	0,20	0,84	0,88	1,90	17,0
175	0,16	0,68	0,70	1,60	14,0
200	0,14	0,60	0,60	1,40	12,0
250		0,46	0,46	1,10	10,0
300		0,36	0,36	0,90	8,5
350		0,30	0,30	0,75	7,5
400		0,25	0,26	0,65	6,5
450		0,21	0,21	0,60	6,0
500		0,18	0,20	0,52	5,0

Fig. 35

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique		
	Hb(10) (mV)	Hb(100)	Hb(500) (mV)
50	2,10	0,24 (mV)	95,0
75	1,40	0,16	54,0
100	1,0	0,12	44,0
125	0,80	0,10	36,0
150	0,60	90,0 (μ V)	28,0
175	0,60	85,0	24,0
200	0,55	60,0	19,0
250	0,45	55,0	
300	0,40	45,0	
350	0,36	40,0	
400	0,32	35,0	
450	0,30	30,0	
500	0,28	30,0	

Figures 39 et 40

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique						
	ST(2) (mV)	ST(5) (mV)	ST(10) (mV)	ST(50) (mV)	ST(100) (mV)	ST(1000) (μ V)	ST(2500) (μ V)
50	10,0	10,20	8,60	4,20	2,10	320,0	200,0
75	6,40	6,40	6,0	2,80	1,40	205,0	130,0
100	4,80	4,80	4,60	2,20	1,10	155,0	100,0
125	4,0	3,80	4,0	1,70	0,90	115,0	45,0
150	3,20	3,20	3,20	1,50	0,75	100,0	65,0
175	2,80	2,60	2,80	1,30	0,65	85,0	55,0
200	2,40	2,40	2,40	1,10	0,55	70,0	45,0
250	2,0	2,0	2,0	1,0	0,48		
300	1,70	1,70	1,80	0,85	0,42		
350	1,50	1,40	1,60	0,75	0,38		
400	1,30	1,30	1,50	0,70	0,34		
450	1,20	1,20	1,40	0,65	0,32		
500	1,10	1,0	1,20	0,60	0,30		

Figure 42

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique		
	ST (mV)	GR (mV)	Hb (mV)
50	7,60	7,0	6,60
75	5,0	4,60	4,40
100	3,70	3,50	3,30
125	3,0	2,90	2,70
150	2,50	2,40	2,40
175	2,10	2,10	2,10
200	1,90	1,90	1,80
250	1,50	1,60	1,50
300	1,20	1,30	1,30
350	1,10	1,10	1,20
400	1,0	1,0	1,10
450	0,90	0,95	1,0
500	0,85	0,90	0,95

Fig. 49, 50, 51 et 52

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique					
	$ST(50)f_1$	$ST(100)f_2$	$ST(500)f_{10}$	$ST(2500)f_1$	$ST(2500)f_2$	$ST(2500)f_{10}$
	(mV)	(mV)	(mV)	(mV)		
50	6,10	6,40	5,10	7,60	1,45 (mV)	2,70 (mV)
75	3,60	3,80	3,0	4,30	0,80	1,50
100	2,70	2,70	2,20	3,0	0,54	1,0
125	2,0	2,0	1,60	2,10	0,40	0,80
150	1,60	1,60	1,30	1,80	0,34	0,60
175	1,30	1,40	1,0	1,50	0,24	0,50
200	1,10	1,20	0,95	1,10	0,21	0,40
250	0,85	0,90	0,70	1,0	0,16	0,30
300	0,68	0,70	0,55	0,80	0,13	0,22
350	0,58	0,60	0,48	0,68	100,0 (μ V)	0,18
400	0,48	0,50	0,41	0,58	90,0	170,0 (μ V)
450	0,44	0,46	0,36	0,52	80,0	140,0
500	0,40	0,40	0,32	0,46	80,0	120,0

Figure 53

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique		
	ST (mV)	GR (mV)	Hb (mV)
50	5,90	5,90	4,40
75	3,60	3,60	2,60
100	2,40	2,40	1,80
125	1,80	2,0	1,40
150	1,50	1,60	1,10
175	1,20	1,30	1,0
200	1,10	1,10	0,80
250	0,85	0,90	0,60
300	0,70	0,70	0,50
350	0,55	0,60	0,44
400	0,50	0,52	0,38
450	0,44	0,46	0,34
500	0,40	0,40	0,30

Fig. 54

Fréquence (Hz)	Signal photoacoustique $ST(50)f_2$
	(mV)
50	6,0
75	3,40
100	2,40
125	1,90
150	1,70
175	1,30
200	1,10
250	0,85
300	0,70
350	0,55
400	0,55
450	0,44
500	0,40

APPENDICE B

<u>Figure</u>	<u>Echantillon</u>	<u>λ_{exct} (nm)</u>	<u>Intervalle f(Hz)</u>	<u>Pente</u>
16	Lamelle verre	275	7(25) , 6(50)	-1,1
18	Nuclépore	275	7(25) , 6(50)	-1,2
20	Pellicon	280	7(25) , 6(50)	-1,2
22	Millipore	280	7(25) , 6(50)	-1,1
25	Noir charbon	470	7(25) , 6(50)	-1,0
35	Hb (10)	418	7(25) , 6(50)	-1,0
	Hb (100)	418	7(25) , 6(50)	-1,0
	Hb (500)	420	7(25) , 6(50)	-1,2
39	ST (2)	412	7(25) , 6(50)	-1,0
	ST (5)	412	7(25) , 6(50)	-0,9
	ST (10)	412	7(25) , 6(50)	-0,9
	ST (50)	416	7(25) , 6(50)	-0,9
	ST (100)	416	7(25) , 6(50)	-0,9
40	ST (1000)	424	7(25) , 6(50)	-1,1
	ST (2500)	424	7(25) , 6(50)	-1,2
42	ST	418	7(25) , 6(50)	-0,9
	GR	418	7(25) , 6(50)	-0,9
	Hb	418	7(25) , 6(50)	-0,9
49	ST (50)f ₁	416	7(25) , 6(50)	-1,2
50	ST (100)f ₂	416	7(25) , 6(50)	-1,2
	ST (500)f ₁₀	416	7(25) , 6(50)	-1,2
51	ST (50)f ₁	416	7(25) , 6(50)	-1,2
	ST (50)f ₁₀	416	7(25) , 6(50)	-1,2
52	ST (2500)f ₁	414	7(25) , 6(50)	-1,3
	ST (2500)f ₂	414	7(25) , 6(50)	-1,3
	ST (2500)f ₁₀	414	7(25) , 6(50)	-1,3
53	ST	416	7(25) , 6(50)	-1,2
	GR	416	7(25) , 6(50)	-1,2
	Hb	416	7(25) , 6(50)	-1,2
54	ST (50)f ₂	416	7(25) , 6(50)	-1,2

APPENDICE CPréparation de l'échantillon d'hématine

- On dissout 10 mg d'hémine dans 3 ml d'éther
- On agite pendant 1 min
- On ajoute 7 ml NaOH 1N
- On agite à nouveau pendant 1 min
- On décante le surnageant (phase éther)
- Couleur du pigment hématine : verdâtre

Isolation des globules rouges et de l'hémoglobine du sang total

- On recueille 1 ml de sang du tube hépariné (ST)
- On centrifuge à 10^3 révolutions min^{-1} pendant 15 min
- On lave le culot (2x) avec 5 volumes de NaCl 0,85% (P/V)
- On centrifuge à 10^3 révolutions min^{-1} pendant 5 min (GR)
- On hémolyse avec 3 volumes H_2O distillée par volume de culot
- On incube 15 min en agitant la solution
- On centrifuge à 10^3 révolutions min^{-1} pendant 15 min
- On recueille l'hémolysat
- On extrait les débris membranaires avec une solution de toluène 40%
- On décante le surnageant (Hb)

Formation d'hémiglobine par oxydation (19)

- On ajoute 5 mg de NaNO_2 0,1% (P/V) à une solution de 5 ml de sang total dilué 1:50
- On incube 1 heure à la température de la pièce
- On centrifuge 5 min à 2 000 révolutions min^{-1}
- On décante le surnageant pour éliminer l'excédent de nitrite de sodium
- Couleur du pigment hémiglobine : brun

Méthode d'extraction de la protoporphyrine (38)

- On recueille 10 ml de sang total du tube hépariné
- On ajoute 1 500 l d'acétate d'éthyl-acide acétique (2:1)
- On ajoute 1 500 l de HCl 0,5N
- On centrifuge 10^3 révolutions min^{-1} pendant 5 min
- On décante le surnageant

Composition de l'eau de mer

H ₂ O	:	96,4 %
NaCl	:	2,8 %
MgCl ₂	:	0,4 %
MgSO ₄	:	0,2 %
CaSO ₄	:	0,1 %
KCl	:	0,1 %

(D.R. Chapman, Dictionary of Science,
Penguin, p. 341 (1971)).

Réaction nucléale de Feulgen

- On hydrolyse avec HCl 1N à 60°C
- On rince à l'eau distillée l'échantillon
- On colore en ajoutant 10 ml de la base fuschine décolorée (réactif de Schiff, SO-S-32 Fisher Scientific Co Ltd), pendant 1 heure
- On élimine l'excès de colorant à l'aide de papier adsorbant

Décompte cellulaire avec un hématocytomètre

(36)

L'hématocytomètre consiste en une lame de verre pourvue d'un grillage gradué servant au décompte cellulaire. On utilise principalement la partie centrale de ce grillage contenant 25 carreaux avec un volume fixe de 0,1 mm³. Le seul paramètre à ajuster est le facteur de dilution relié au nombre de cellules présentes dans le volume du culot. Suite à plusieurs essais, on détermine que 10³ est le facteur de dilution qui nous convient. La formule qui nous permet un décompte cellulaire pour 1 mm³ de culot est la suivante:

$$\begin{array}{l} \text{Nombre de cellules} \\ \text{par mm}^3 \text{ de culot} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Nombre de cellules} \\ \text{dans 0,1 mm}^3 \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Facteur de} \\ \text{dilution} \end{array} \times 10$$

BIBLIOGRAPHIE

1. Bohr, N. (1961). Physique atomique et connaissance humaine, Gonthier p. 34 et 37.
2. Bell, A.G. (1981). Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, 92e tome, pp. 1206-1224.
3. Adams, M.J., A.A. King et G.F. Kirkbright (1976). Analyst, 101: 73-85.
4. Eaton, H.E. et J.D. Stuart (1977). Analyst, 102: 531-534.
5. Rosencwaig, A. (1973). Science, 181: 657-658.
6. Rosencwaig, A. et A. Gersho (1976). J. Appl. Phys., 47: 64-69.
7. Wetsel, G.C. et F.A. McDonald (1977). Ultrasonic Symp. Proceeding, #77CH1264-ISU, pp. 347-351.
8. Wetsel, G.C. et F.A. McDonald (1978). J. Appl. Phys., 49: 2313-2322.
9. Wetsel, G.C. et F.A. McDonald (1977). Appl. Phys. Lett., 30: 252-254.
10. McClelland, J.F. et R.N Kniseley (1976). Applied Optics, 15 2658-2663.
11. Rosencwaig, A. (1977). Rev. Sci. Instrum., 48: 1133-1137.
12. Cahen, D. (1979). TIBS, Oct., pp. N240-N243.
13. Somoano, R.B. (1978). Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 17: 238-245.
14. Lin, J.W. et L.P. Dudek (1979). Anal. Chem., 51: 1627-1632.
15. Bernard, J. et J.P. Lévy (1976). Abrégé d'hématologie, Masson, pp. 15-30.
16. Wessbluth, M. (1974). Hemoglobin: Cooperativity and Electronic Properties, Springer-Verlag
 - (a) pp. 10-12
 - (b) p. 13
 - (c) p. 15

18. Morimoto, H. et H. Lehmann (1971). *Nature*, 232: 408-412.
19. Dolphin, D. (1978). *The Porphyrins*, Academic Press
 (a) vol. I, pp. 290-320
 (b) vol. III, p. 188
20. Antonini, E. et M. Brunori (1971). *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, American Elsevier
 (a) p. 19
 (b) p. 42
21. Documenta Geigy (1970). *Scientific Tables*, Ciba-Geigy, pp. 355-362.
22. Clezy, P.S. et D.B. Morell (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 165-171.
23. Adams, M.J., B.C. Beadle et G.F. Kirkbright (1976). *TIBS*, Dec., pp. N278-N279.
24. Adams, M.J., B.C. Beadle et G.F. Kirkbright (1976). *Analyst*, 101: 553-561.
25. Poulet, P., R. Unterreiner et J. Chambron (1980). *J. Biophys. Med. Med. Nucl.*, 4: 83-90.
26. Vejux, A.M. et P. Bae (1980). *J. Opt. Soc. Am.*, 70: 560-562.
27. Munroe, D.M. et H.S. Reichard (1976). *Princeton Applied Research*, no. 147.
28. Rosencwaig, A. (1978). *Adv. Electron. and Electron Phys.*, 46: 207-311.
29. Ducharme, D., A. Tessier et R.M. Leblanc (1979). *Rev. Sci. Instrum.*, 50: 42-43.
30. *Microphones and accessories*, GenRad, 1977.
31. Betteridge, D., H.E. Hallam et P.J. Meyer (1978). *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 290: 353-356.
32. Ducharme, D. *Thèse de maîtrise*, U.Q.T.R.
33. Bennett, C.A. et R.R. Patty (1981). *Applied Optics*, 20: 910-911.

35. Wong, K.Y. (1978). J. Appl. Phys., 49: 3033-3035.
36. Rosencwaig, A. (1973). Optics Communications, 7: 305-308.
37. Wintrobe, M.M. (1974). Clinical Hematology, Lea & Febiger, p. 1022.
38. Thorn, G.W. (1974). Principles of Internal Medecine, McGraw Hill, p. 286.
39. Granick, S. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2381-2385.
40. Wranne, L. (1960). Acta Paediatrica, 124: 1-78.
41. Ham. A.W. (1974). Histology, Lippincott, pp. 192-193.
42. Pines, E. (1978). J. Soc. Cosmet. Chem., 29: 559-564.
43. Rosencwaig, A. et E. Pines (1977). J. Invest. Dermatol, 69: 296-298.
44. Koss, L.G. (1968). Diagnostic Cytology, Lippincott, p. 48.