

Spectroscopie des macromolécules

I Principes généraux en spectroscopie

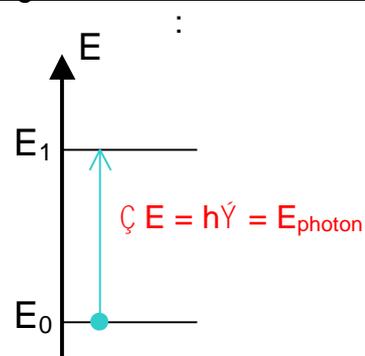
A. Quantification des énergies

Les propriétés des atomes et des molécules sont discontinues. La description de la matière au niveau moléculaire ne peut se faire par la physique classique, mais avec la physique quantique.

L'énergie associée à un mouvement ou à une déformation d'une molécule est quantifiée en niveaux d'énergie.

L'énergie totale d'une molécule est la somme des énergies associées à ses mouvements et déformations. Des niveaux d'énergie sont associés à chaque type d'énergie. Ceux-ci sont plus ou moins espacés, de la manière suivante : $E_{\text{électronique}} > E_{\text{vibration}} > E_{\text{rotation}}$. Le passage d'un niveau à un autre se fait par l'absorption d'un photon d'énergie $E_{\text{photon}} = \zeta E$.

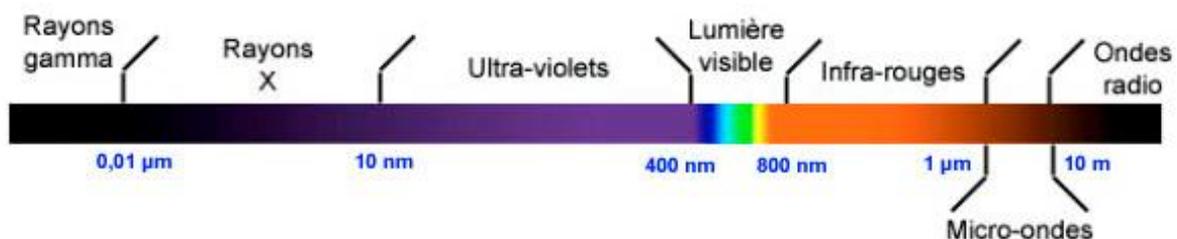
Schématisation d'un changement de niveau d'énergie



B. Le rayonnement électromagnétique

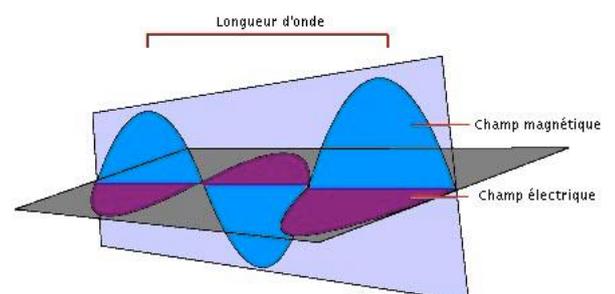
On caractérise un rayonnement électromagnétique par sa fréquence ou sa longueur d'onde.

<u>Fréquence (Hz)</u>	<u>Longueur d'onde</u>	<u>Nombre d'onde</u>
$\nu = 1 / T$	$\lambda = cT = c / \nu$ ($c = 3 * 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)	$\bar{\nu} = 1 / \lambda = \nu / c$



1) Description ondulatoire

Les rayonnements sont une propagation dans l'espace et dans le temps suivant un champ électrique E et un champ magnétique B.



2) Description particulière

La seule nature ondulatoire de la lumière ne permet pas d'expliquer ses interactions avec la matière. Planck puis Einstein proposent la théorie des quanta : l'énergie transportée par une radiation de fréquence ν est quantifiée en photons.

Un photon est une particule qui se propage à la vitesse de la lumière et possède un quantum d'énergie qui s'obtient par :

$$E_{\text{photon}} = h\nu$$

Et h est la constante de Planck et vaut $h = 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$

à Ainsi les échanges d'énergie entre matière et rayonnement ne peuvent s'effectuer que par quanta.

C. Interactions onde/matière

Un transfert n'est possible que si l'énergie d'un photon vaut le ΔE entre le niveau actuel et le niveau strictement supérieur de la molécule visée. Il faut aussi que la radiation et la molécule soient couplées. Il faut aussi que les règles de sélection soient respectées.

Lorsque les trois conditions sont respectées alors il se produit :

- q Absorption du photon
- q Émission spontanée
- q Émission induite
- q Diffusion

è C'est le premier qui va nous intéresser en spectroscopie.

On peut alors utiliser la loi de Boltzmann qui donnera la fréquence d'atomes (ou molécules) à l'état E_1 (qu'on appellera N_1) et à E_2 (respectivement N_2) :

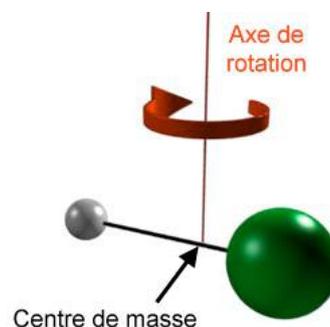
$$N_1 / N_2 = e^{(\Delta E/kT)}$$

où T est la température en K

et $k = R / N_A$

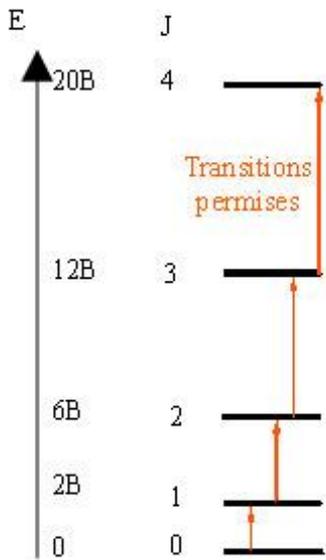
D. Spectres de rotation

Les molécules de substances vaporisables ou formant un gaz à basse pression peuvent tourner librement autour d'un axe de rotation (le centre de masse). Ces rotations ont des vitesses de rotation (désignées par J , le moment cinétique, qui peut être égal à 0,1,2,3 ...) quantifiées et donc des niveaux d'énergie de rotation quantifiés. Ainsi les transitions entre ces niveaux donnent lieu à des spectres de rotation.



L'énergie de rotation dépend aussi de B , lié au moment d'inertie I de la molécule qui s'obtient par :

$$B = h / (8\pi^2 c I)$$

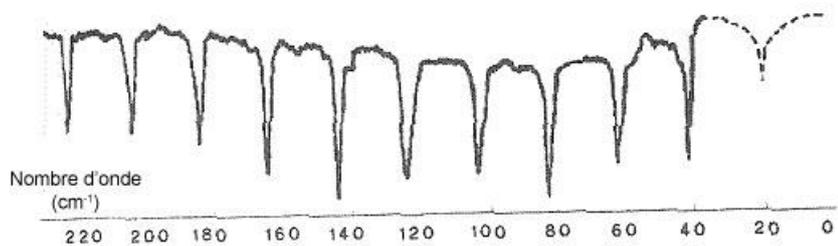


La transmission d'un niveau d'énergie à un autre ne peut se faire que dans une molécule polaire et seulement par ΔJ de 1. Ainsi, on obtient la valeur des niveaux d'énergie de rotation :

$$E_J = h c B J (J+1)$$

On remarque alors que : $\Delta E_{J \rightarrow J+1} = 2 h c B (J+1)$

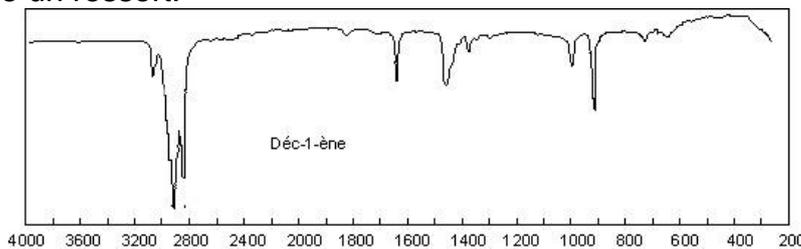
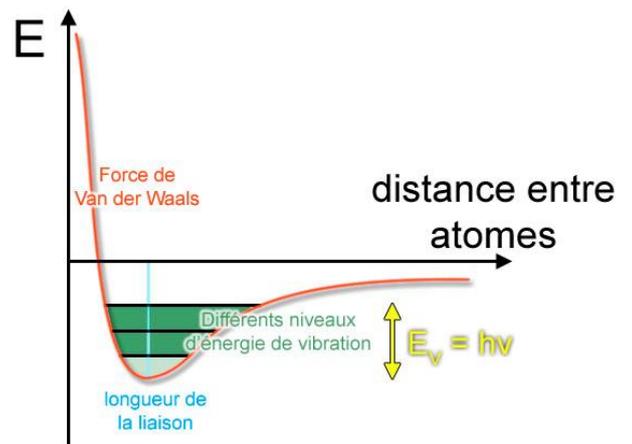
Ex : spectre de rotation de HCl



E. Spectres de vibration

Les atomes d'une molécule peuvent vibrer les uns par rapport aux autres après l'absorption d'un rayonnement électromagnétique. Différents niveaux de vibration correspondant à différents niveaux d'énergie existent. Ces niveaux d'énergie de vibration sont quantifiés.

Toutes les molécules peuvent vibrer. Les vibrations sont des oscillations des distances entre atomes. On peut en faire une bonne approximation en considérant le système comme un ressort.



On peut avoir une approximation des valeurs :

$$E_V = (V + \frac{1}{2}) * h \gamma_0 \text{ et } \gamma_0 = (k / \ddot{U})^{1/2} / 2\pi$$

V étant le niveau d'énergie et V = 0,1,2,3...

k étant la constante de raideur de la liaison associée à la force de Van der Waals

γ_0 est la constante propre de l'oscillateur

\ddot{U} est la masse réduite du système

Pour que la transition ait lieu, le moment dipolaire électrique de la molécule doit varier lors de la vibration. La transition ne se fait qu'entre niveaux successifs. Plusieurs types de vibrations peuvent survenir, qu'elles soient d'élongation, de flexion, symétriques ou asymétriques.

II Spectroscopie d'absorption UV-visible

A. Loi quantitative de l'absorption

On calcule avec la loi de Beer-Lambert :

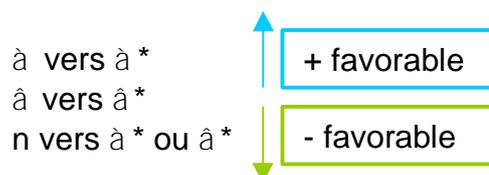
$$A = \log (I / I_0) = - \tilde{\nu} * C * l$$

B. Nature des transitions

L'énergie transportée par une radiation électromagnétique du domaine UV-visible effectue des transitions impliquant les électrons de valence et exclusivement entre niveaux successifs.

Or à température ambiante, presque tous les atomes sont à l'état fondamental E_0 ; ainsi, en spectroscopie UV-visible, **on ne prend en compte que les transitions $E_0 \rightarrow E_1$** .

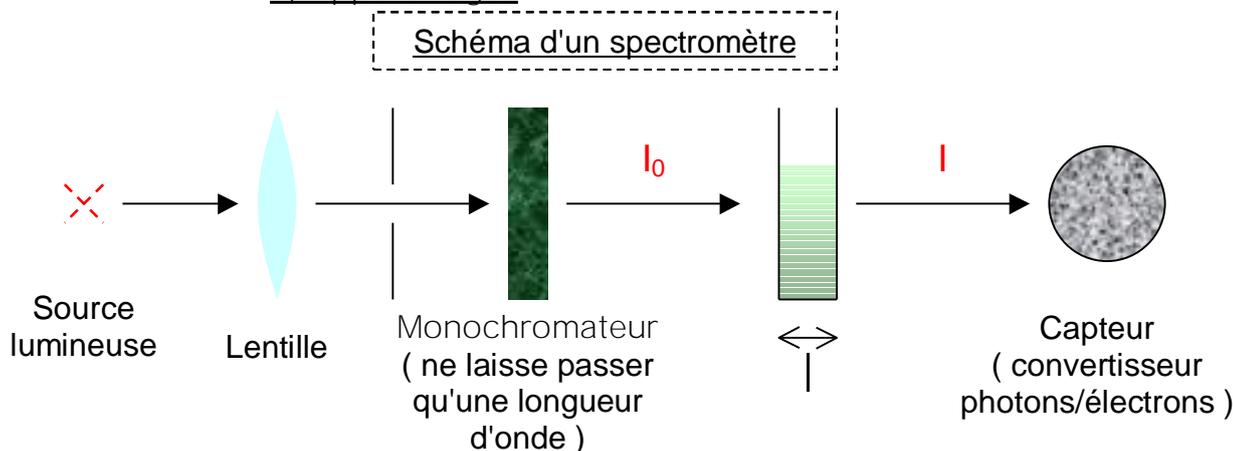
Les règles de sélection de la mécanique quantique obligent que n'aient lieu que les transitions entre orbitales suivantes :



On peut aussi observer des transitions vers des niveaux d'énergie de vibration et/ou de rotation proches du niveau électronique atteint. En effet, cela s'explique par le fait que la molécule reçoit en fait plus d'une longueur d'onde, et que ces niveaux d'énergie sont très proches les uns des autres.

C. Techniques expérimentales

1) Appareillages



2) Largeur de bande

En **théorie**, on ne devrait avoir que des pics dans les mesures dus aux niveaux d'énergie quantifiés.

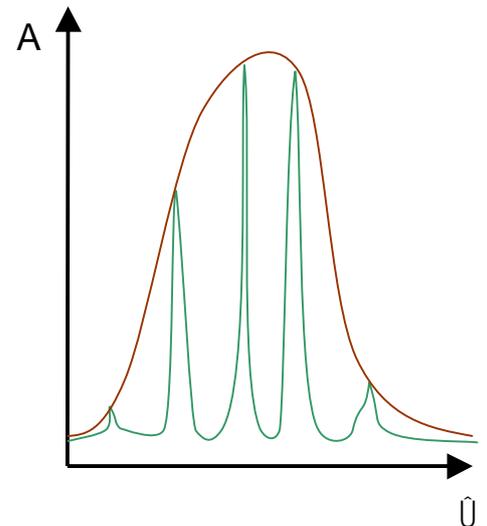
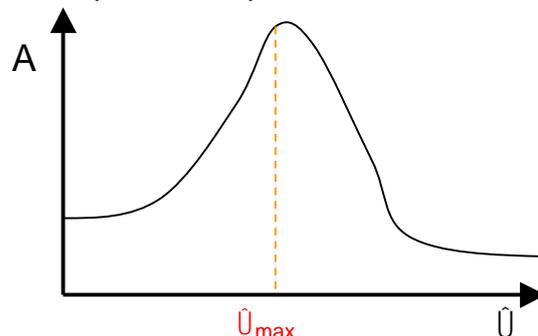
En **pratique**, l'appareil envoyant plusieurs longueurs d'onde en même temps et l'absorption dépendant des facteurs cinétiques de la solution étudiée, la courbe subit un lissage extrême.

D. Application aux molécules biologiques

Le spectre d'absorption UV-visible d'une molécule comporte des bandes dont la localisation dans le spectre est caractéristique des chromophores de la molécule.

Un chromophore est un groupement fonctionnel (atome ou groupe d'atomes) d'une molécule où se déroulent les transitions électroniques qui donnent lieu à la bande spectrale d'absorption.

- q Pour mesurer l'absorbance d'une molécule, il vaut mieux utiliser la longueur d'onde λ_{\max} correspondant à son maximum d'absorption λ_{\max} qui donnera des



résultats plus faciles à mesurer.

- q Lorsque plusieurs chromophores sont réunis dans une même molécule :
- q Si les chromophores sont indépendants, les absorptions s'additionnent
 - q S'ils sont conjugués, on observera des effets bathochromes (déplacement vers des longueurs d'onde plus élevées) et des effets hypochromes (modification des coefficients d'absorption).
- à On observera aussi des effets bathochromes et hypochromes si la molécule est dans un environnement moins polaire qu'elle-même.

I Chromophores principalement utilisés :

- Protéines

Absorption dans l'UV liée aux résidus aromatique (Tyr, Phe, Try) et aux pont disulfures (Cys). Souvent à $\lambda = 280 \text{ nm}$.

- Cofacteur NAD(H) et NADP(H)

Sous forme réduite, ils absorbent à 340 nm .

- Groupements hèmes
- Acides nucléiques

Absorption liée aux purines et pyrimidines, à 250-270 nm.

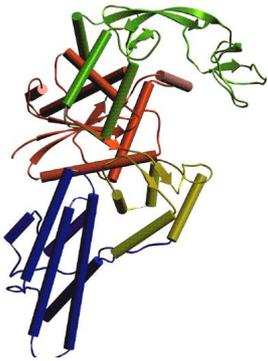
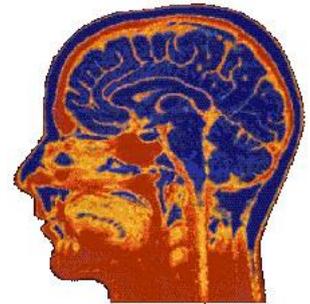
J Lors de mélanges bases + protéines, il faut mesurer les absorption à 250 et 280 nm pour vérifier ce que l'on mesure.

I Lorsque l'on veut doser une protéine :
à la substance possède un pic d'absorption caractéristique è dosage direct (non destructif)
à la substance ne possède pas de pic d'absorption caractéristique è dosage indirect (destructif grâce à un réactif coloré)

Exemples de réactifs utilisés : Biuret et Bradford

III_ Autres méthodes importantes

I Spectroscopie de résonance magnétique :
_ Transition entre les niveaux d'énergie du spin nucléaire
_ Fréquences de l'ordre de la centaine de MHz
_ Identification complète d'une molécule
_ Structure 3D



I Cristallographie des Rayons X :
_ Ce n'est pas une spectroscopie
_ Analyse des solides et des cristaux, structure 3D des molécules

I Spectrométrie de Masse :
_ Ce n'est pas une spectroscopie
_ Ionisation et découpage des molécules en fragment
_ Obtention de la masse molaire ou moléculaire



III_ Spectre de fluorescence

A. Origine de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène, parmi d'autres, qui suit l'absorption d'un photon par une molécule :

B. Appareillage

Un spectromètre de fluorescence est composé des éléments suivants :

- q Source de radiation
- q Monochromateur d'excitation (choisit une longueur d'onde d'émission)
- q Cellule-support échantillon (cuve à 4 faces en quartz)
- q Monochromateur d'émission (ne laisse passer que la longueur d'onde à mesurer)
- q Détecteur (mesure l'intensité des radiations après être passées dans l'échantillon)

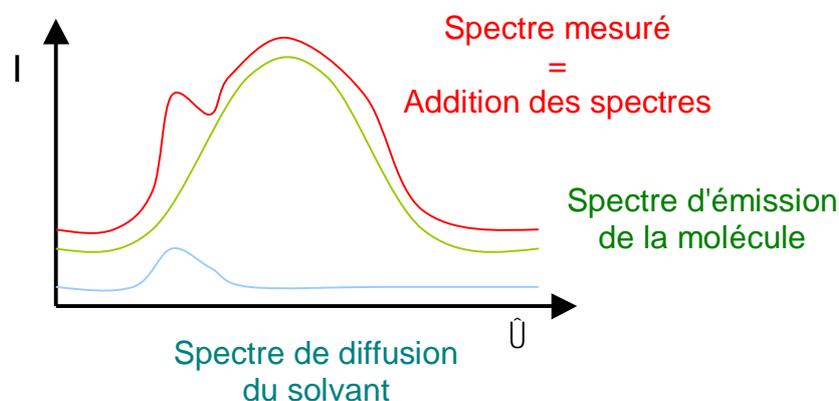
L'émission de fluorescence se fait dans toutes les directions. Le signal sera le plus souvent détecté à 90° du faisceau incident, pour ne pas mesurer l'onde initiale incomplètement absorbée.

C. Exploitation

$$I_F = I_0 * A \hat{I}_F$$

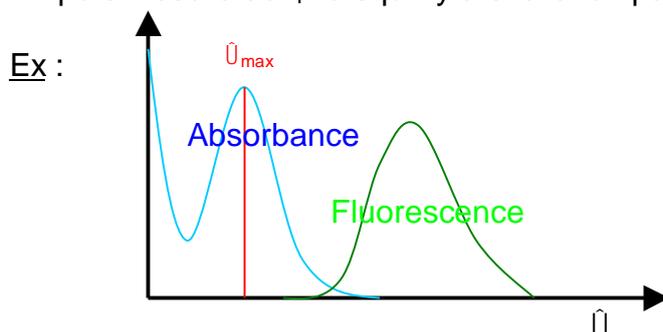
Une des difficultés majeures est la diffusion par le solvant ; c'est la déviation de l'onde par le solvant (quand la longueur d'onde est plus grande que les molécules du solvant).

- q La majorité des radiations gardent la même longueur d'onde, et on peut alors diminuer cet effet en diminuant la bande passante.
- q Une petite partie voit sa longueur d'onde modifiée (notamment par les fonctions $-OH$ comme dans l'eau). On ne peut éviter ce problème, et on observera alors un signal parasite sur la courbe d'émission, qui est le signal Raman du solvant.



On choisit la longueur d'onde d'excitation en fonction des fluorophores (= groupements qui émettent de la fluorescence) de la molécule.

! Méthode : Mesure de l'absorbance et choix de λ_{max} au maximum d'absorption puis mesure de I_F lorsqu'il y a excitation par λ_{max} .



On peut aussi utiliser l'atténuation de fluorescence. On compare alors le rendement de fluorescence avec et sans atténuateur. On peut donc mesurer l'accessibilité du fluorophore, ce qui signifie savoir s'il est plutôt dans le cœur ou à la surface de la protéine.

Le transfert de fluorescence peut aussi être utilisé. C'est ce qui se passe lorsque la longueur d'onde de fluorescence va exciter un autre fluorophore qui va à son tour émettre une autre onde différente, et ainsi de suite. Les fluorophores doivent être proches. Lorsque l'on observe toutes ces longueurs d'ondes, on peut en déduire que les fluorophores sont rapprochés.

D. Application aux protéines

Les fluorophores peuvent être intrinsèques (faisant partie de la protéine) ou extrinsèques (rajoutés sur la protéine).

1) Les fluorophores intrinsèques

à Les rendements de fluorescence sont différents entre acides aminés

Acide aminé	Absorbance	Fluorescence	Sensibilité
Trp	280	255	730
Tyr	275	204	200
Phe	258	282	4

è Phe n'est pas utilisée, tandis que Trp et Tyr sont très utilisés

h Émission de Trp très sensible à son environnement (les acides aminés proches et le solvant), ainsi lorsqu'il y a beaucoup d'acides aminés alentour, le spectre d'émission décroît beaucoup. Cette propriété est très utile pour mesurer l'état de dénaturation de la protéine.

2) Les fluorophores extrinsèques

On utilise souvent des cofacteurs :

- _ **NADH** (ou NADPH) qui absorbe à 340 nm et émet à 450 nm
- _ FAD, FMN qui absorbe à 450 nm et émet à 540 nm

Ou bien ce peuvent être des sondes.

3) Application

à Peu pratique pour les dosages

à Très utilisé pour les études de conformation : environnement de Trp, modifications du repliement

à Permet d'étudier la fixation de partenaires

IV Dichroïsme circulaire

A. Spectroscopie des molécules chirales

Les molécules possédant des centres asymétriques ont un comportement particulier dans le phénomène d'observation de la lumière polarisée :

- q Dispersion rotatoire : exploite la lumière polarisée rectilignement
à déviaton du plan de polarisation par la molécule chirale
- q Dichroïsme circulaire : exploite la lumière polarisée circulairement
à Absorption différente de la lumière polarisée par la molécule chirale, à droite ou à gauche

Le dichroïsme circulaire s'obtient alors :

$$DC = A_g - A_d = (\epsilon_g - \epsilon_d) * C * l$$

B. Dichroïsme circulaire des protéines

Le dichroïsme circulaire repose sur l'absorption des chromophores des protéines, avec en particulier :

- à *UV lointain 170 à 250 nm : liaison peptidique*
- à *UV proche 250 à 300 nm : composés aromatiques, ponts disulfures*

Remarque : Le signal des chaînes aromatiques et des ponts disulfures varie finement selon l'environnement du groupement. On obtient alors des spectres complexes qui permettent d'étudier les changements de structure tridimensionnelle de la protéine.

Avec le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine, on arrive à déterminer la composition en structures secondaires de la protéine (hélices \bar{N} , feuillets \bar{O} ...).

V Spectroscopie d'absorption infrarouge

A. Vibration/rotation des molécules

Les molécules contenant plus de deux atomes peuvent vibrer selon plusieurs modes : élongation, déformation ou rotation. Une **molécule non-linéaire** à n atomes possède **$3n - 6$ modes** normaux de vibration. Une **molécule linéaire** possède **$3n - 5$ modes** normaux de vibration.

Dans une molécule complexe telle qu'une protéine, il y a un grand nombre d'atomes et les groupements peuvent vibrer ensemble. Parfois, certains groupements vibrent isolément du reste de la molécule. On peut alors identifier parmi les modes de vibration de la molécule, les fréquences qui sont spécifiques à ces groupements.

B. Spectre infrarouge

Souvent en spectroscopie infrarouge, on identifie les rayonnements électromagnétique par leur nombre d'onde : $\bar{\nu} = 1 / \bar{U}$. Le rayonnement utilisé se situe :

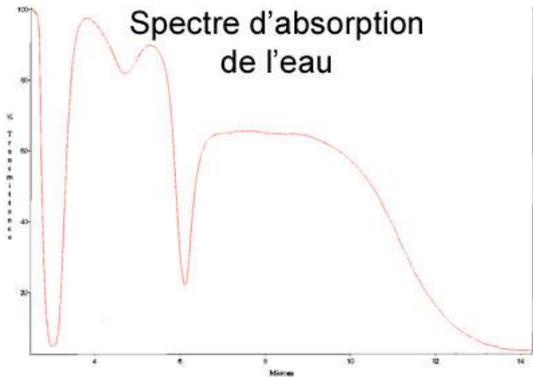
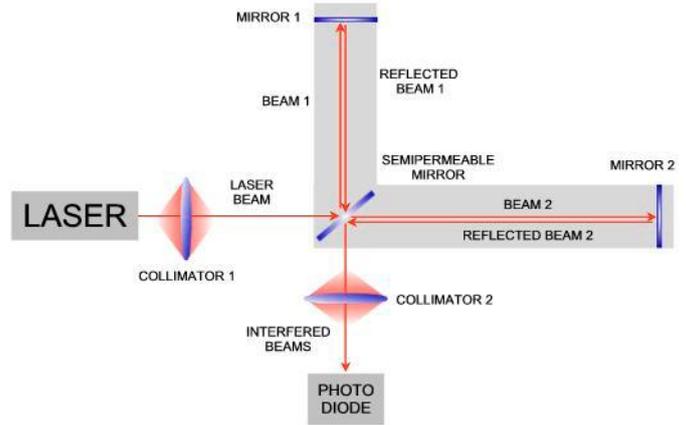
$$\bar{U} = 25 \text{ à } 2,5 \text{ } \bar{U}m \text{ soit } \bar{\nu} = 400 \text{ à } 4000 \text{ } cm^{-1}$$

On obtient alors des spectres d'absorption qui dépendent des liaisons présentes au sein de la molécule. De manière générale, on peut dire :

- à **Plus la liaison est forte, plus la fréquence d'absorption est élevée.**
- à **Plus les atomes sont lourds, plus la fréquence d'absorption est faible**

MICHELSON INTERFEROMETER

Pour mesurer le spectre, on utilise un interféromètre de Michelson. On obtient à la réception des ondes qui interfèrent, que l'on traite par la transformée de Fourier pour obtenir une onde dont on peut mesurer la longueur d'onde.



Dans la plupart des solvants, en particulier l'eau, on observe une absorption forte dans le domaine de l'infrarouge. On soustrait alors le spectre du solvant (spectre étalon) au spectre de la molécule.

Les bandes spectrales sont souvent superposées et on a alors recours à un affinement du signal.

- q Méthode de la dérivée seconde : ses minima correspondent aux bandes d'absorption ; on définit alors des bandes pures qui correspondent aux pics et dont la somme donne la courbe d'origine.
- q Méthode de Fourier : on effectue la transformée, on traite le signal, puis on le reconvertit pour obtenir un signal plus précis.

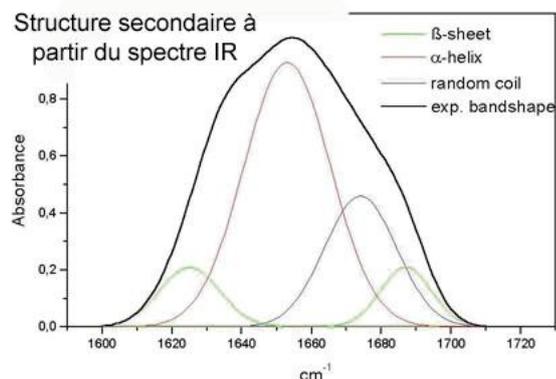
C. Application aux protéines

Une protéine est constituée de beaucoup d'atomes et possède donc un spectre assez diffus. Mais grâce aux bandes spécifiques on peut tout de même exploiter le spectre infrarouge.

On peut notamment observer les bandes d'absorption relatives aux amides. Ces groupements étant très répétés, on observera un fort signal. Les principales bandes caractéristiques des amides sont :

$$\text{à } \tilde{\nu}_1 = 1650 \text{ cm}^{-1} \text{ et } \tilde{\nu}_2 = 1540 \text{ cm}^{-1}$$

Ces maxima sont modifiés en fonction de la structure secondaire de la protéine. Il est alors possible de déterminer le taux des différentes structures secondaires dans la protéine.



Cependant, l'eau absorbe fortement dans la même zone spectrale. On utilisera alors préférentiellement de l'eau lourde. Il faut remarquer que l'eau lourde a pour effet de remplacer peu à peu les H par des ^2H , d'où un déplacement des bandes d'absorption vers des fréquences plus basses.

Bien que le signal provenant des chaînes latérales soit bien plus faible, il peut parfois être exploité. Cette méthode est peu recommandée.

On peut aussi avoir recours à la méthode ATR (Attenuated Total Reflection). On propage une onde électromagnétique à travers un cristal où elle va être réfléchi une vingtaine de fois, tout en s'enrichissant du signal de la protéine.



Cette méthode est particulièrement pratique pour étudier la structure des protéines membranaires qui sont difficilement observables par la cristallographie.