

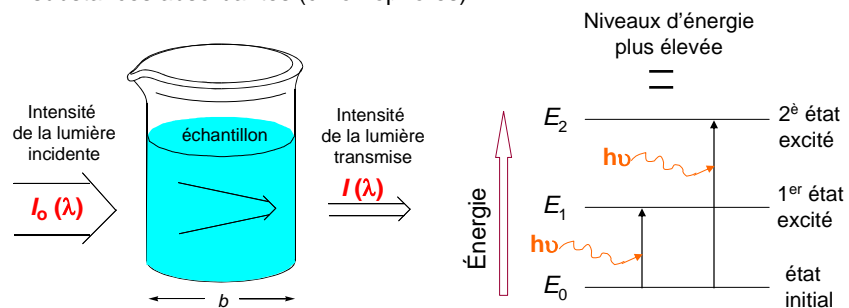
2. Spectrophotométrie moléculaire appliquée aux biomolécules

- ❖ Spectrophotométrie d'absorption UV-vis
- ❖ Fluorimétrie
- ❖ Spectroscopie infrarouge

61

2.1 Principes de la spectrophotométrie d'absorption UV-vis

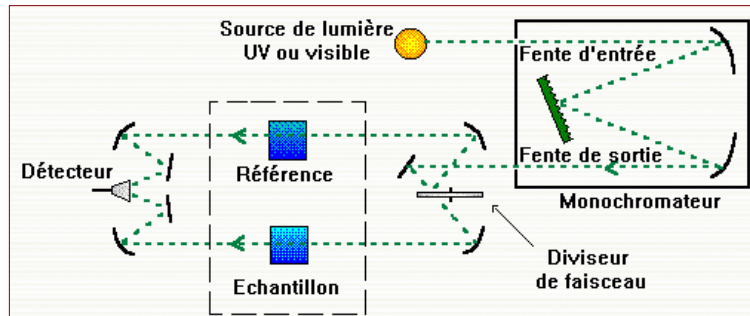
- ❖ La spectrophotométrie d'absorption consiste à mesurer l'atténuation de la lumière traversant un milieu pour en tirer les concentrations des substances absorbantes (chromophores).



- ❖ Longueurs d'onde balayées: ~200 à 800 nm (UV-vis)

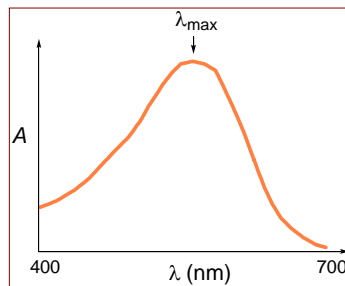
62

Schéma d'un spectrophotomètre UV/vis à double faisceau



(www.chez.com/dalmeyda/cours/spectro/UV-spectro.htm)

Spectre absorption: $A = f(\lambda)$



63

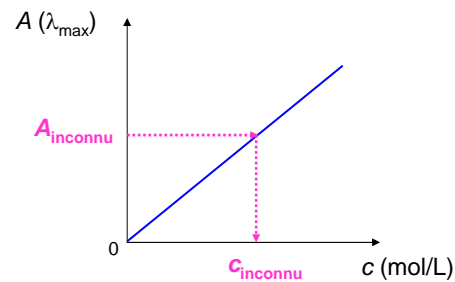
Loi de Beer-Lambert

❖ Loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_o(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)cb$$

- ❖ Si c est exprimée en concentration molaire, ε est l'**absorptivité molaire** (en $M^{-1}cm^{-1}$).
- ❖ Si c est exprimée en mg/mL, ε est l'**absorptivité massique** (en $mL/(mg \cdot cm)$).

Courbe d'étalonnage



64

Quantification des protéines et acides nucléiques par spectrophotométrie

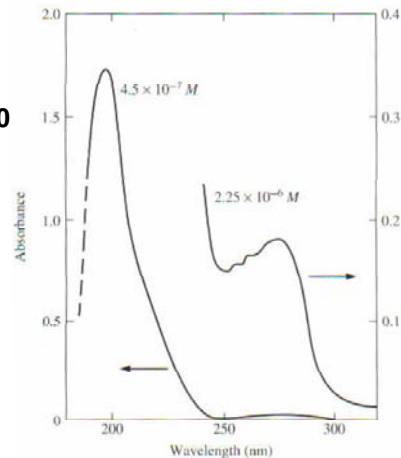
- ❖ Les acides aminés et les nucléotides n'absorbent pas dans la région visible (de 400 à 800 nm) du spectre électromagnétique.
- ❖ Par contre, les protéines et les acides nucléiques ont des bandes d'absorption dans la région de l'UV proche (de 200 à 400 nm). Ces biomolécules peuvent donc être analysées par la spectrophotométrie d'absorption.
- ❖ L'absorption dans l'UV proche permet la quantification des protéines et acides nucléiques et fournit de l'information à propos de la conformation (ou structure tridimensionnelle) des molécules en solution.

65

2.1.1 Spectres d'absorption des acides aminés et protéines

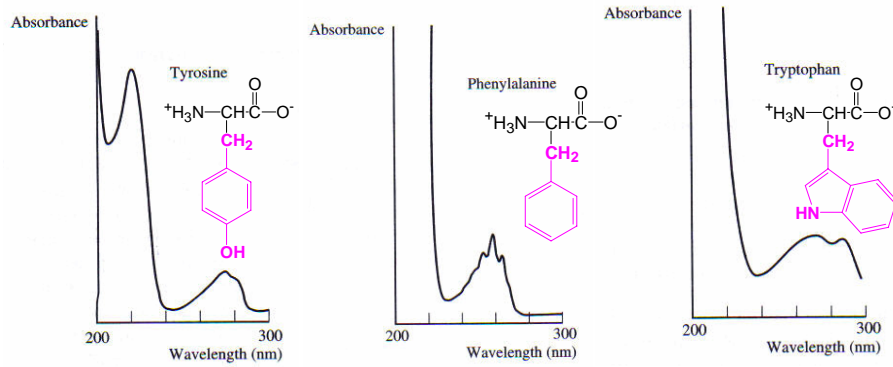
- ❖ Dans le spectre d'absorption de l'albumine de sérum bovin (BSA), une protéine modèle, on retrouve des bandes d'absorption maximale autour de **280 nm** (moins intense) et entre **190 et 210 nm** (plus intense).
- ❖ **Bande à 280 nm:** transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ dans les acides α -aminés aromatiques
- ❖ **Bande à 200 nm:** transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ dans les groupements amides (liens peptidiques)

Spectre de l'albumine de sérum bovin
— Masse moléculaire de 66.4 kDa



(D'après I. Tinoco, K.Sauer & J.C. Wang, *Physical Chemistry: Principles & Applications in Biological Sciences*, 3^e éd, 1995) 66

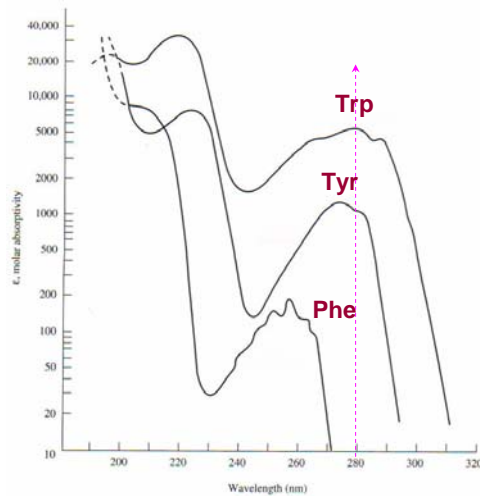
Spectres absorption des α -acides aminés aromatiques



(D'après D.J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3è éd., 1998)

67

Comparaison des absorptivités molaires des acides α -aminés aromatiques

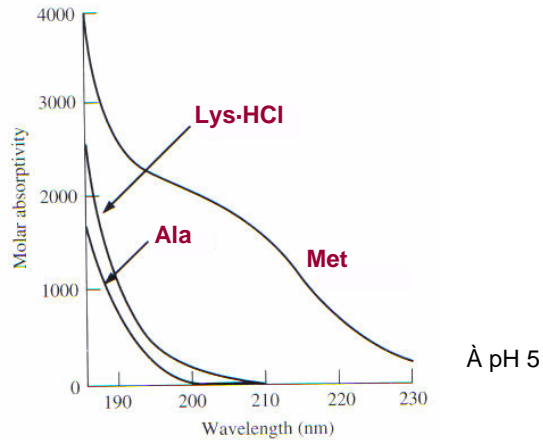


pH 7, 25°C	$\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda_{\text{max}})$
Trp	5600 (280 nm)
Tyr	1400 (274 nm)
Phe	200 (257 nm)

(D'après I. Tinoco, K.Sauer & J.C. Wang, *Physical Chemistry: Principles & Applications in Biological Sciences*, 3è éd, 1995)

68

Absorptivités molaires d'autres acides α -aminés



(D'après I. Tinoco, K. Sauer & J.C. Wang,
**Physical Chemistry: Principles & Applications
in Biological Sciences**, 3^e éd, 1995)

69

Dosage spectrophotométrique des protéines

- ❖ Dans l'analyse des protéines, il est soit nécessaire d'identifier les fractions contenant des protéines ou de déterminer la concentration de protéine dans un échantillon purifié.
- ❖ L'absorbance à la longueur d'onde caractéristique de 280 nm (i.e. $A_{280\text{nm}}$) est communément utilisée pour estimer la concentration totale de protéines dans un échantillon.
- ❖ $A_{280\text{nm}}$ est proportionnel à:
 - la quantité des acides aminés aromatiques (Trp, Tyr) et des résidus Cys dans une protéine (ou polypeptide)
 - la concentration de la protéine en solution.
- ❖ $A_{280\text{nm}}$ ne peut être utilisée pour fins d'analyse quantitative sans posséder une information supplémentaire puisque la composition des acides aminés varie d'une protéine à une autre. C'est-à-dire, des variations dans la composition des acides aminés donnent des absorptivités molaires ($\epsilon_{280\text{nm}}$) qui varient d'une protéine à une autre.

70

Protéine	Absorptivité molaire (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Masse molaire (Da)
BSA	$\epsilon_{280\text{nm}}=4.6 \times 10^4$	66 430
Lysozyme	$\epsilon_{280\text{nm}}=3.8 \times 10^4$	14 600
β -lactoglobulin	$\epsilon_{278\text{nm}}=1.8 \times 10^4$	18 400
Insuline	$\epsilon_{280\text{nm}}=0.55 \times 10^4$	5 734

- ❖ Modèle de Gill et von Hippel (basé sur 18 protéines globulaires) pour estimer $\epsilon_{280\text{nm}}$ des protéines dénaturées (6 M guanidine-HCl):

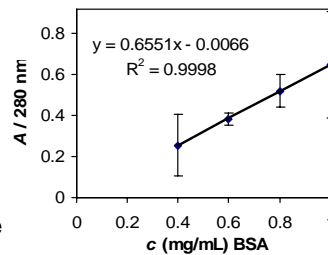
$$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = (\# \text{ résidus Trp}) \cdot 5690 + (\# \text{ résidus Tyr}) \cdot 1280 + (\# \text{ résidus Cys}) \cdot 120$$

- ❖ Modèle de Pace *et al.* (basé sur 80 protéines) pour estimer $\epsilon_{280\text{nm}}$ des protéines repliées dans une solution aqueuse:

$$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = (\# \text{ résidus Trp}) \cdot 5500 + (\# \text{ résidus Tyr}) \cdot 1490 + (\# \text{ résidus Cys}) \cdot 125$$

71

- ❖ La concentration d'une protéine dans un échantillon inconnu peut être déterminée à partir de sa valeur de $\epsilon_{280\text{nm}}$ (dans la région de linéarité de la loi Beer-Lambert) ou à partir d'une courbe d'étalonnage préparée avec des échantillons contenant différentes concentrations de la protéine en question.



- ❖ La quantification des protéines dans un mélange complexe (e.g. fractions isolées de cellules) par l'absorption UV-vis est difficile puisque la composition des protéines et leurs coefficients d'absorption ne sont pas connus.
- ❖ L'absorption dans la région de 200 nm (liaisons peptidiques) peut aussi être utilisée pour le dosage spectrophotométrique des protéines. La longueur d'onde de 280 nm est favorisée pour le dosage puisque les protéines absorbent fortement à 280 nm et d'autres composés qui sont souvent présents dans les matrices de protéines n'absorbent pas à 280 nm.
- ❖ Pour la majorité des protéines, l'absorption UV-vis permet de descendre à une concentration massique d'environ 100 $\mu\text{g/mL}$.

72