

UE LSV.3.10 Spectroscopie et biophysique moléculaire I

Programme - contenu de l'UE

I. Spectroscopie des Macromolécules : (CM : 9h ; TD : 6h)

Introduction aux méthodes spectroscopiques, spectroscopies de vibration – Rappel de la loi de Beer-Lambert, limite de validité ; chromophores des protéines ; applications aux dosages UV ou colorimétriques ; détermination d'un coefficient d'extinction moléculaire – principe de l'émission de fluorescence ; fluorophore des protéines ; applications aux changements de conformation des protéines et fixation de ligands - Principe du dichroïsme circulaire dans l'UV proche et lointain ; informations apportées – Méthodes de spectroscopie infrarouge appliquées aux protéines ; informations apportées.

II. Microscopie électronique et Diffraction : (CM : 7h30 ; TD : 7h30)

Introduction au monde quantique – Diffraction par des objets à une, deux ou trois dimension(s) ; application à la diffraction des rayons X par des objets non périodiques, exemple de fibres type ADN ; notions élémentaires de cristallographie, loi de Bragg – Le microscope électronique; mode image ; mode diffraction

1

C1/SV2

Intervenants

- Frédéric Favier (LCM3B)
- Claude Didierjean (LCM3B)
- Pierre Mutzenhardt (SRSMC)

2

C1/SV2

Rappels et caractéristiques générales de la spectroscopie

- **spectre** n. m. PHYS Bande composée d'une succession de raies ou de plages lumineuses, traduisant la répartition des fréquences qui constituent un rayonnement électromagnétique.
- **La spectroscopie** est l'analyse du rayonnement électromagnétique émis, absorbé ou diffusé par les molécules.
- **On s'intéresse à l'interaction rayonnement matière**

3

CI/SV2

Le rayonnement : Nature ondulatoire

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

fréquence (Hertz)

$$\nu = \frac{1}{T}$$

Période (seconde)

longueur d'onde (mètre)

$$\lambda = cT = \frac{c}{\nu}$$

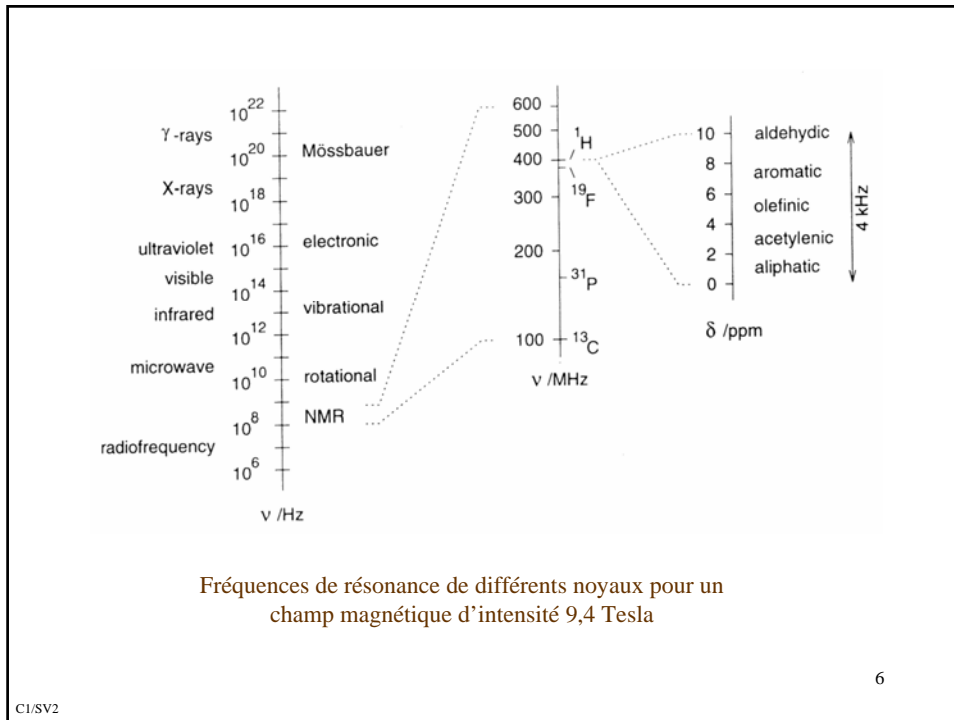
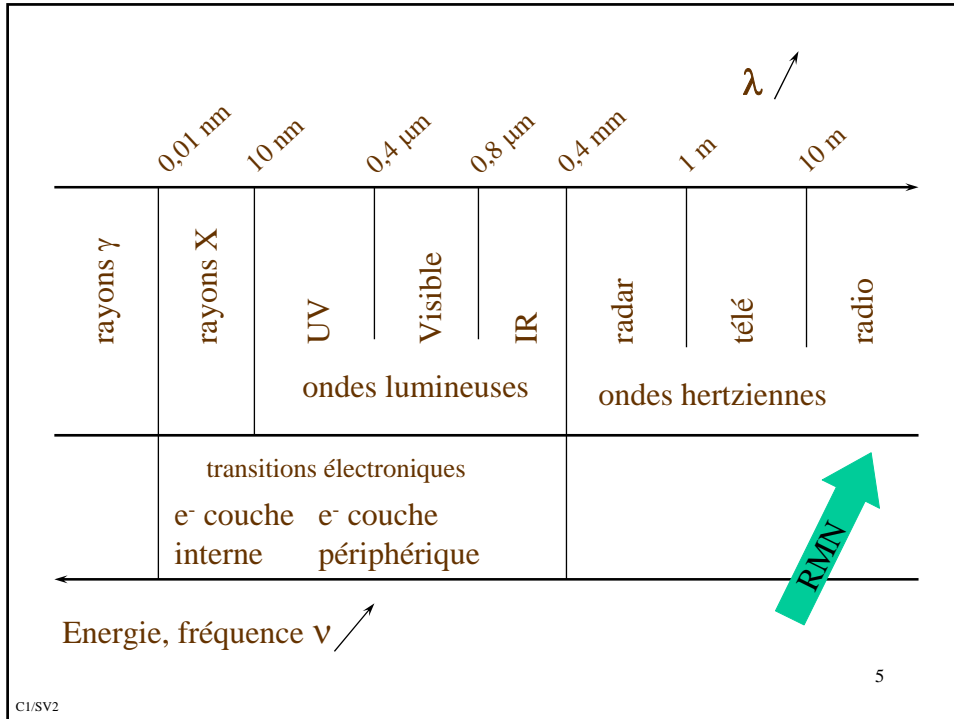
vitesse de la lumière
($3 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$)

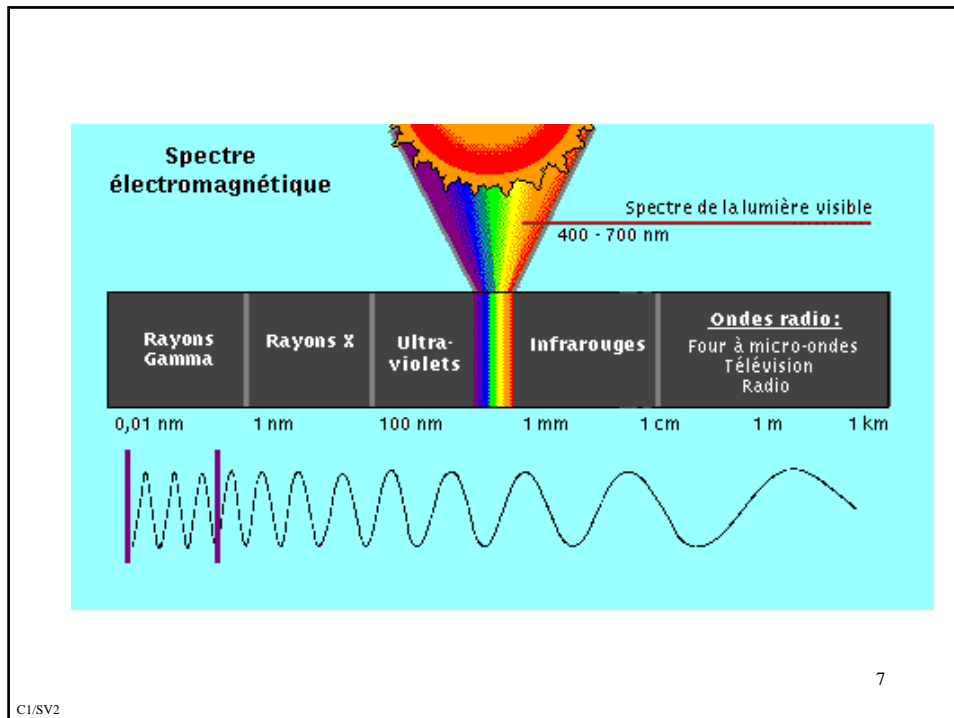
Nombre d'onde

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

4

CI/SV2





Le rayonnement : Nature corpusculaire

- La seule nature ondulatoire de la lumière ne permet pas d'interpréter les phénomènes d'interactions entre lumière et matière (ex: l'effet photo-électrique).
- Plank puis Einstein proposèrent la théorie des quanta : L'énergie transportée par une radiation de fréquence ν est quantifiée : le photon
- Le photon est une particule qui se propage à la vitesse de la lumière et possède un quantum d'énergie :

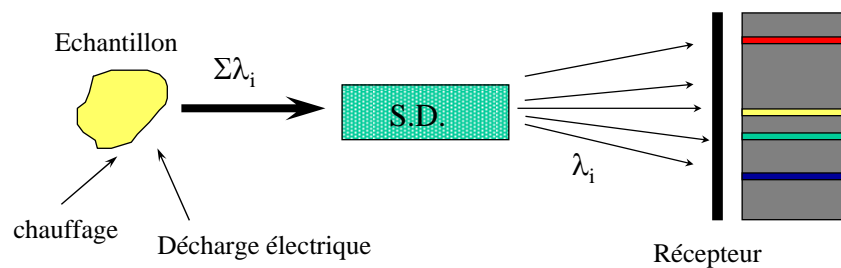
$$E = h\nu \text{ (h est la constante de Plank = } 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s)}$$

En conséquence, les échanges d'énergie entre matière et rayonnement ne peuvent s'effectuer que par quanta.

Les spectres

- Examiner le spectre d'une lumière ($\Sigma\lambda_i$) consiste à décomposer cette lumière à l'aide d'un système dispersif (SD) en diverses radiations monochromatiques (λ_i).

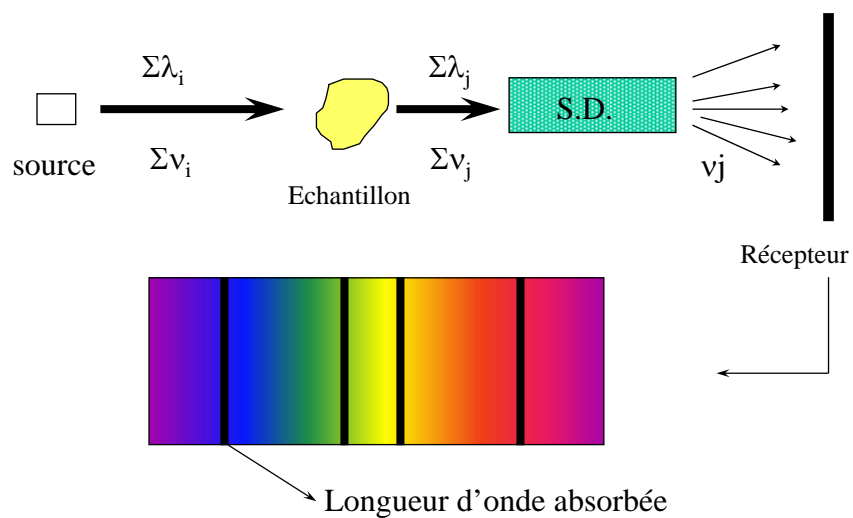
Spectroscopie d'émission (Principe)



C1/SV2

9

• Spectroscopie d'absorption (Principe)



C1/SV2

10

Niveaux d'énergie

- Les spectres d'absorption et d'émission sont quantifiés, les longueurs d'ondes des raies ne prennent que des valeurs bien déterminées qui sont caractéristiques d'un échantillon.
- Un atome ou une molécule ne peut exister que dans certains états d'énergie quantifiés.
- Un photon est émis ou absorbé lorsque l'atome ou la molécule passe d'un niveau d'énergie à un autre.

11

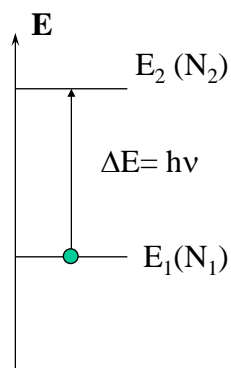
C1/SV2

• Exemple de niveaux d'énergies

- électronique (atome, molécule)
- vibration
- rotation
- spin électronique,
- spin nucléaire (RMN)

- A une température donnée les populations des niveaux peuvent être calculées selon la loi de Boltzmann

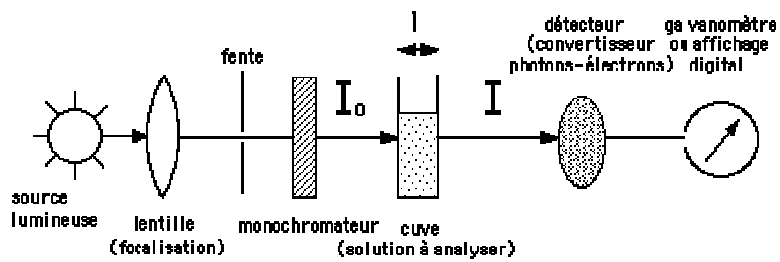
$$\frac{N_1}{N_2} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)$$



12

C1/SV2

Mesure d'intensité (1)



13

C1/SV2

Mesure d'intensité (2)

- L'intensité avec laquelle le rayonnement est absorbé dépend de l'identité de l'espèce absorbante, de sa concentration, de la fréquence du rayonnement, de la longueur du trajet du rayonnement dans l'échantillon :

$$\log T = -\epsilon c l \quad \text{avec } T = \frac{I}{I_0}$$

Loi de Bert-Lambert

- ϵ est le coefficient d'absorption molaire et dépend de la fréquence de la lumière incidente. T est la transmittance
- $A = \epsilon c l$ est l'absorbance (autrefois appelé densité optique ou D.O.)

14

C1/SV2

Mesure d'intensité (3)

- On écrit quelquefois

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon c l}$$

- Cette forme de la loi de Beer Lambert montre que l'intensité du rayonnement décroît exponentiellement avec la longueur du trajet dans l'échantillon.
- Applications:
 - Détermination de concentration
 - Visualisation d'équilibre entre deux formes (points isosbestiques).

15

CI/SV2

Spectroscopie de rotation (1)

- Les molécules de substances vaporisables ou formant un gaz à basse pression peuvent tourner librement.
- Les niveaux d'énergie des molécules en rotation sont quantifiés et les transitions entre ces niveaux donnent lieu à des spectres de rotation
- Longueur d'onde de l'ordre du cm

Les niveaux d'énergie sont de la forme

$$E_J = hcBJ(J + 1) \text{ avec } J = 0, 1, 2, \dots$$

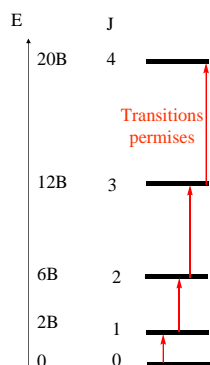
$$B = \frac{\hbar}{4\pi cI}$$

16

CI/SV2

Spectroscopie de rotation (2)

- I est le moment d'inertie de la molécule (par exemple pour une molécule diatomique $I = \mu r^2$)



$$\Delta E_{J \rightarrow J+1} = 2hcB(J + 1)$$

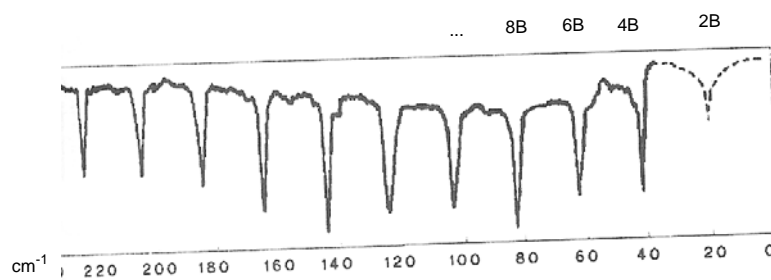
- Règle de Sélection:**
 - Molécule polaire
 - $\Delta J = +1$ ou -1

C1/SV2

17

Transitions de rotation : spectroscopie micro-ondes (3)

Exemples : Spectre de rotation de HCl

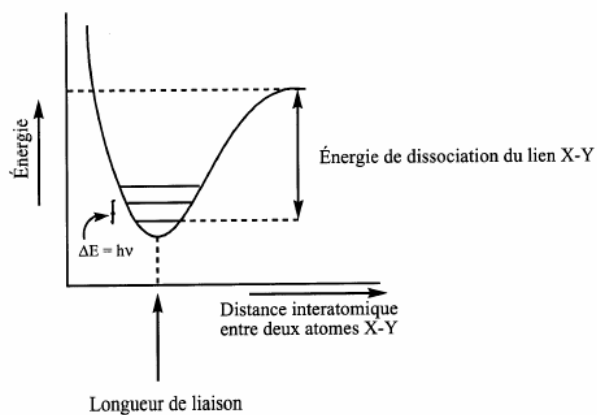


C1/SV2

18

Spectroscopie de vibration (1)

- Toutes les molécules sont capables de vibrer. Les niveaux de vibrations sont quantifiés.



C1/SV2

19

Spectroscopie de vibration (2)

- Niveaux d'énergie: approximation parabolique et modèle du ressort

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h \nu_0$$

avec

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

C1/SV2

20

Spectroscopie de vibration (3)

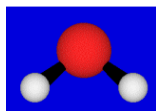
- **Transitions permises**
 - Le moment dipolaire électrique de la molécule doit varier lors de la vibration
 - $\Delta v = +1$ ou -1
- **Domaine de l'infrarouge pour les vibrations: spectroscopie infrarouge (entre 40 et 4000 cm^{-1} en nombre d'ondes)**

21

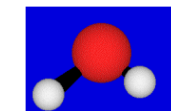
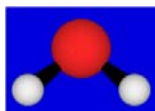
CI/SV2

Spectroscopie de vibration (4)

- **Vibrations des molécules polyatomiques ($3N-6$ modes de vibrations pour les molécules non linéaires).**



Élongations



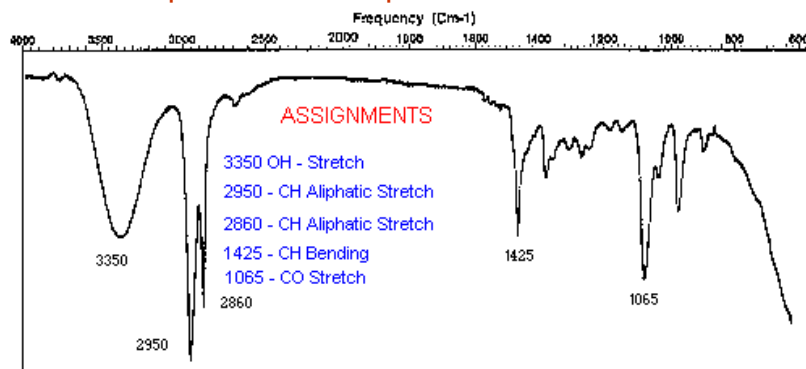
Flexion

22

CI/SV2

Spectroscopie de vibration (5)

- Un exemple caractéristique



On distingue les absorptions par leur fréquence, leur intensité et leur largeur

23

CI/SV2

Transitions électroniques : spectres UV et visible (1)

- Il s'agit de transitions entre niveaux d'énergie moléculaires (modification de la distribution des électrons dans les molécules).
- Transitions entre orbitales moléculaires du à des chromophores
- Domaine de l'ultraviolet et du visible (de 10 nm à 800 nm)
- Utilisation directe de la loi de Beer-Lambert pour le dosage des espèces en solution

24

CI/SV2

Transitions électroniques : spectres UV et visible (2)

Chromophores élémentaires	λ max (nm)	ϵ max (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
> C = C < (alcène)	173*	10000
- C - C - (alcyne)	178*	2000
> C = O (cétone)	290	16
- CH = O (aldéhyde)	279	15
- COOH (acide)	208	32
- COCl (chlorure d'acide)	220	100
- CONH2 (amide)	220	63
- COOR (ester)	211	57
- NO2 (nitro)	214	17
- N = N - (azométhane)	338	4
Liaisons peptidiques	190	4-8000 (sensible à la conformation)
Pont disulfure	250	300
NADH, NADPH	338	6400

Méthodes de dosage directe (ϵ connu) ou indirecte : $A = \epsilon c l$

25

C1/SV2

Autres méthodes importantes

- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (UE 3.18)
 - 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
- Cristallographie ou Rayon X
 - Ce n'est pas une spectroscopie
 - Analyse des solides et des cristaux, structure 3D des molécules
- Spectrométrie de Masse (UE 3.18)
 - Ce n'est pas une spectroscopie
 - Ionisation et découpage des molécules en fragment
 - Obtention de la masse molaire ou moléculaire

26

C1/SV2