

Jihad René Albani

ABSORPTION ET FLUORESCENCE

principes et applications

Editions
TEC
& **DOC**

ABSORPTION ET FLUORESCENCE

principes et applications

Cet ouvrage est le premier manuel consacré à l'absorption et à la fluorescence publié en français.

Décrivant les principes des deux techniques et explicitant les développements mathématiques utilisés, les six premiers chapitres sont fondamentaux :

- l'absorption lumineuse par une molécule ;
- la fluorescence : principes et paramètres ;
- les marqueurs de fluorescence ;
- l'inhibition de la fluorescence ;
- la polarisation de fluorescence ;
- le transfert d'énergie par résonance.

Conçu de façon pédagogique pour faciliter l'assimilation des connaissances, cet ouvrage est jalonné d'exercices théoriques et pratiques. Le 7^e chapitre est consacré à l'étude de la structure et de la dynamique de l'acide α 1-glycoprotéine (orosomucoïde) par fluorescence, mettant en évidence les interactions entre la structure, la dynamique et la fonction biologique de cette macromolécule.

Absorption et fluorescence : principes et applications s'adresse aux étudiants des 2^{es} et 3^{es} cycles de biochimie, de biologie, de chimie et de physique. Les enseignants, les chercheurs et les professionnels des bio-industries y trouveront un outil précieux, alors même que ces deux techniques sont de plus en plus fréquemment employées pour l'étude et la caractérisation des molécules biologiques.

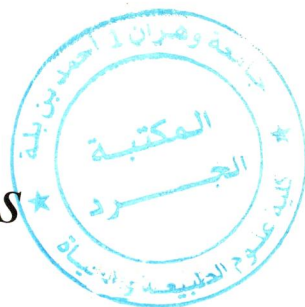
Jihad René Albani, docteur es sciences, est maître de conférences à l'Université des sciences et technologies de Lille (USTL) – Lille 1, dont il dirige le laboratoire de recherche de biophysique moléculaire.

2-7430-0481-9



9782743004811

Table des matières



Chapitre 1

Absorption lumineuse par une molécule _____ 1

1. Diagramme de Jablonski ou diagramme des transitions électroniques	1
2. Théorie des orbitales moléculaires	3
2.1. Constitution de l'atome : rappels de base	3
2.1.1. Le noyau	3
2.1.2. Le nuage électronique	3
2.2. Notion de probabilité de présence de l'électron	4
2.2.1. Probabilité de présence de l'électron ou notion d'orbitale atomique	4
2.2.1. Nombres quantiques	5
2.3. Forme des orbitales	6
2.4. Principe d'exclusion de Pauli	7
2.5. Liaisons chimiques	7
2.5.1. Caractéristiques des gaz inertes	7
2.5.2. Potentiel d'ionisation	7
2.5.3. Électronégativité	7
2.5.4. Types de liaisons chimiques	7
2.5.5. Caractéristiques de la liaison covalente	8
2.6. Polarité des liaisons et des molécules	8
3. Interaction lumière-molécule	10
3.1. Introduction	10
3.2. Transitions électroniques	12
3.2.1. Niveaux d'énergie	12
3.2.2. Probabilité de transition et lois de sélection	12
3.3. La courbe de Morse	14
4. Absorption	17
4.1. Spectres d'absorption	17

4.2.	Caractéristiques des bandes spectrales	19
4.3.	Enregistrement des spectres d'absorption	21
4.4.	Précautions à prendre dans les mesures de la densité optique	23
4.5.	Procédé à suivre dans l'enregistrement des spectres d'absorption	23
4.5.1.	Temps de mise en route de l'appareil	23
4.5.2.	Ligne de base de l'appareil	23
4.5.3.	Ligne de base du solvant	23
4.5.4.	Enregistrement du spectre d'absorption	24
4.6.	Loi de Beer-Lambert-Bouguer	24
4.7.	Détermination du coefficient d'extinction molaire	27
4.8.	Détermination de la concentration protéique à l'aide de colorant. Méthode de Bradford	29
4.9.	Effet de la saturation optique sur les bandes spectrales	29
4.10.	Effet de saturation sur la loi de Beer-Lambert-Bouguer	31
4.11.	Effet du solvant sur les spectres d'absorption	31
4.12.	Absorption par un système à plusieurs composés	31
4.12.1.	Cas d'un mélange	31
4.12.2.	Complexes par transfert de charges	34
4.13.	Méthode des spectres de différence	35
4.13.1.	But et principe	35
4.13.2.	Détermination de la stœchiométrie du complexe : méthode de Job	36
4.14.	Calcul de la constante d'équilibre d'un mélange acide-base	42
4.15.	Dosage des résidus Trp des protéines	43
4.16.	Détermination de la constante d'association d'un complexe par inhibition de la densité optique : méthode d'Albani	43
5.	Méthode du « stopped flow »	45
5.1.	Principe du « stopped flow »	45
5.2.	Principe de l'appareillage	45
5.3.	Temps mort de l'appareil	46
5.3.1.	Définition	46
5.3.2.	Calcul du temps mort	46
5.4.	Principaux problèmes que peut avoir l'appareil du « stopped flow »	48
5.4.1.	Présence de bulles d'air	48
5.4.2.	Opérations menées en aérobiose	48
5.4.3.	Effet d'une différence de température dans la chambre d'observation	48
5.4.4.	Diffusion d'une « seringue de mélange » à l'autre	48
5.4.5.	Inefficacité des mélanges incomplets	48
5.5.	Calcul des constantes de vitesse	48
5.6.	Application : étude cinétique du transfert d'électrons entre le noyau cytochromique b_2 et le cytochrome c de la même levure <i>Hansenula anomala</i>	49
5.6.1.	Introduction	49
5.6.2.	Détermination du point isobeste du noyau cytochromique b_2 ..	49

Annexe	183
Valeurs des viscosités dans l'eau à plusieurs températures	183

Chapitre 6

Transfert d'énergie par résonance (Förster energy transfer)	185
--	------------

1. Principes	185
2. Paramètres du transfert	188
3. Estimation de la distance tryptophane-poche de l'hème dans le noyau cytochrome b_2	189
4. Comparaison de l'inhibition de fluorescence par transfert d'énergie et par choc moléculaire	192
5. Relation entre le transfert d'énergie type Förster et la radioactivité	194

Chapitre 7

Étude de la structure et de la dynamique d'une glycoprotéine extraite du plasma humain, l'acide α_1-glycoprotéine (orosomucoïde) par fluorescence	197
--	------------

1. Introduction	197
2. Étude des mouvements moyens de l'orosomucoïde en solution	198
2.1. Propriétés de fluorescence du TNS et des résidus Trp de l'orosomucoïde	198
2.2. Dynamique du TNS complexé à l'orosomucoïde	199
2.3. Dynamique des résidus Trp de l'orosomucoïde en absence et en présence de progestérone	201
2.4. Spectres de fluorescence de chacune des classes de résidus Trp	204
2.5. Étude de la dynamique de chaque classe de résidus Trp	206
2.5.1. Mesures de l'anisotropie et du temps de vie à différentes températures	207
2.5.2. Dynamique des résidus Trp de l'orosomucoïde par inhibition sélective de l'anisotropie de fluorescence	209
3. Origine de la dynamique de l'orosomucoïde	212
4. Structure et dynamique de l'orosomucoïde cristallisée	214
5. Structure et dynamique des glycannes de l'orosomucoïde	224
5.1. Caractéristiques du complexe calcofluor-orosomucoïde	224
5.2. Dynamique des glycannes de l'orosomucoïde	228
6. Interaction calcofluor-orosomucoïde à forte concentration de calcofluor	231
7. Conclusions générales sur les résultats obtenus sur l'orosomucoïde	236
8. Importance de nos travaux sur la compréhension du fonctionnement de l'orosomucoïde	236

Bibliographie	239
----------------------------	------------

Index	246
--------------------	------------