

1^{ère} PARTIE : SPECTROPHOTOMÉTRIE d'ABSORPTION UV-VISIBLE

(10,5 points)

Méthode spectrophotométrique pour la détermination de la concentration de plusieurs peptides en solution.

Les biochimistes ont l'habitude d'utiliser comme méthode d'analyse quantitative rapide et non destructrice, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-Visible. Ces peptides absorbent principalement aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm. Les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre double faisceau CAMSPEC M550 (cf figure 1).

1^{ère} question

(1 point)

Indiquer directement sur la figure les éléments essentiels constitutifs d'un tel spectrophotomètre :

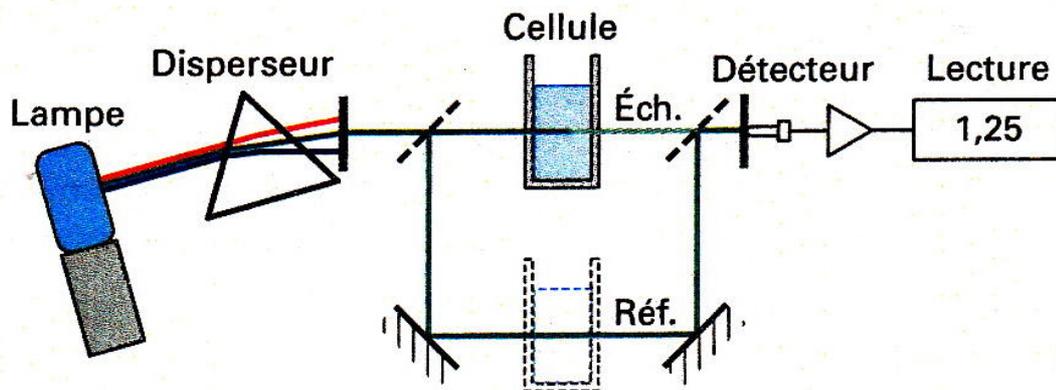


Figure 1 : Synoptique d'un spectrophotomètre double-faisceau

2^{ème} question

(1,5 points)

Quelle est la nature du disperser rencontré dans ce type d'appareil ?

Quel(s) type(s) de cuve peut-on utiliser pour analyser les peptides. Justifier votre réponse.

Réponse du candidat :

Le disperser est un réseau de diffraction plan, de forme rectangulaire, qui fait office de miroir plan et de séparation des longueurs d'onde.

Étant donné que les peptides n'absorbent que dans l'UV, on ne peut utiliser que des cuves en quartz, matériau n'absorbant pas le rayonnement UV.

3^{ème} question**(1 point)**

Soit une solution contenant deux espèces absorbantes 1 et 2 ayant des propriétés d'absorption de la lumière à la longueur d'onde λ . Ces espèces chimiques présentent des concentrations respectives C_{1sol} et C_{2sol} dans la solution.

À cette longueur d'onde particulière, ces deux espèces possèdent des coefficients d'absorption molaire que l'on notera ϵ_1 et ϵ_2 .

Rappeler la loi d'additivité des absorbances dans ce cas-là. Réécrire cette loi à l'aide de la loi de Beer-Lambert.

Réponse du candidat :

$$A_{solution} = A_1 + A_2 = \epsilon_1 \cdot b \cdot C_{1sol} + \epsilon_2 \cdot b \cdot C_{2sol}$$

Le tableau ci-dessous donne les absorbances mesurées indépendantes de deux peptides 1 et 2 à des concentrations respectives :

$C_1 = 2,00 \cdot 10^{-5}$ et $C_2 = 6,00 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ avec des cuves de $b = 1$ cm de trajet optique.

Tableau : Absorbances à 260 et 280 nm des peptides 1 et 2.

| | Peptide 1 | Peptide 2 |
|-------------|-----------|-----------|
| A^{260nm} | 0,140 | 0,000 |
| A^{280nm} | 0,370 | 0,210 |

4^{ème} question**(2 points)**

Calculer les coefficients d'absorption molaire à 260 et 280 nm ϵ_1^{260nm} et ϵ_1^{280nm} du peptide 1.

Réponse du candidat :

D'après la loi de Beer-Lambert : $A^{260nm} = \epsilon_1^{260nm} \cdot b \cdot C_1$

$$\epsilon_1^{260nm} = \frac{A^{260nm}}{b \cdot C_1} = \frac{0,140}{1 \text{ cm} \times 2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = 7000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

D'après la loi de Beer-Lambert : $A^{280nm} = \epsilon_1^{280nm} \cdot b \cdot C_1$

$$\epsilon_1^{280nm} = \frac{A^{280nm}}{b \cdot C_1} = \frac{0,370}{1 \text{ cm} \times 2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = 18500 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

5^{ème} question**(2 points)**

Même question pour le peptide 2 (Attention aux notations pour le peptide 2 : $\epsilon_2^{260\text{nm}}$ et $\epsilon_2^{280\text{nm}}$).

Réponse du candidat :

D'après la loi de Beer-Lambert : $A^{260\text{nm}} = \epsilon_2^{260\text{nm}} \cdot b \cdot C_2$

$$\epsilon_2^{260\text{nm}} = \frac{A^{260\text{nm}}}{b \cdot C_2} = \frac{0,000}{1 \text{ cm} \times 6,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = 0 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

Le peptide 2 n'absorbe pas à 260 nm.

D'après la loi de Beer-Lambert : $A^{280\text{nm}} = \epsilon_2^{280\text{nm}} \cdot b \cdot C_2$

$$\epsilon_2^{280\text{nm}} = \frac{A^{280\text{nm}}}{b \cdot C_2} = \frac{0,210}{1 \text{ cm} \times 6,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = 35000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

6^{ème} question**(3 points)**

Déterminer les concentrations molaires respectives $C_{1\text{sol}}$ et $C_{2\text{sol}}$ des peptides 1 et 2 présents dans un mélange sachant que l'absorbance du mélange à 260 nm est de 0,320 et que celle à 280 nm est de 0,860. Les cuves utilisées ont pour trajet optique $b = 1 \text{ cm}$.

Vous utiliserez la loi d'additivité des absorbances pour chaque longueur d'onde.

Réponse du candidat :

À 260 nm : $A_{\text{solution}} = A_1 + A_2 = \epsilon_1^{260\text{nm}} \cdot b \cdot C_{1\text{sol}} + \epsilon_2^{260\text{nm}} \cdot b \cdot C_{2\text{sol}} = \epsilon_1^{260\text{nm}} \cdot b \cdot C_{1\text{sol}}$

$$C_{1\text{sol}} = \frac{A_{\text{solution}}}{\epsilon_1^{260\text{nm}} \cdot b} = \frac{0,320}{7000} = 4,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

À 280 nm : $A_{\text{solution}} = A_1 + A_2 = \epsilon_1^{280\text{nm}} \cdot b \cdot C_{1\text{sol}} + \epsilon_2^{280\text{nm}} \cdot b \cdot C_{2\text{sol}}$

$$C_{2\text{sol}} = \frac{A_{\text{solution}}}{\epsilon_2^{280\text{nm}} \cdot b} - \frac{\epsilon_1^{280\text{nm}}}{\epsilon_2^{280\text{nm}}} \cdot C_{1\text{sol}} = \frac{0,860}{35000} - \frac{18500}{35000} \times 4,57 \cdot 10^{-5} = 4,08 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2^{ème} PARTIE : SPECTROFLUORIMÉTRIE (9,5 points)

7^{ème} question

(1 point)

Indiquer la relation simple entre l'intensité de fluorescence F et la concentration C d'un analyte

Réponse du candidat :

$$F = KC \quad \text{avec} \quad K = 2,3.K'.P_0.\epsilon.b$$

Où K et K' sont des constantes,

P_0 la puissance lumineuse incidente fournie par la source lumineuse,

ϵ le coefficient d'absorption moléculaire de la molécule fluorescente,

b la longueur du chemin optique traversant la solution fluorescente.

8^{ème} question

(2 points)

Les méthodes d'analyse par fluorescence sont 10 à 1000 fois plus sensibles que les méthodes spectrophotométriques. **Indiquer les deux méthodes principales pour augmenter la sensibilité de la spectrofluorimétrie. Expliquer pourquoi cela n'a pas d'effet en spectrophotométrie.**

Réponse du candidat :

1/ Augmenter la puissance du rayonnement d'excitation.

2/ Amplifier le signal du détecteur c.a.d augmenter la sensibilité du spectrofluorimètre.

Aucunes de ces options n'améliore la sensibilité des méthodes d'absorption spectrophotométrique.

En effet,

$$C = k.A = k.\log\frac{P_0}{P}$$

L'augmentation de P_0 augmente de façon proportionnellement P et n'a donc aucun effet sur la sensibilité.

De même, le taux d'amplification du signal issu du détecteur affecte les deux quantités mesurées de manière identique, ce qui n'entraîne aucun avantage.

9^{ème} question

(0,5 point)

Quelle est la méthode directe qui permet de rendre fluorescent un composé chimique organique qui ne l'est pas à priori.

Réponse du candidat :

Elle est basée sur la réaction du composé chimique avec un agent chélatant pour former un complexe fluorescent.

D'après MA (J.Y.C), MA (J.K.H), WEBER (K.C), Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipides, Journal of Lipid Research, vol. 26, 1985, p.735-744.

Les substances médicamenteuses amphiphiles et cationiques telles que l'imipramine (antidépresseur) et la chlorphentermine (anorexigène) peuvent causer des désordres au niveau des phospholipides.

Lüllman, Rossen et Seiler démontrèrent en effet que de telles molécules induisaient une lipidose. Le terme lipidose est un terme regroupant un ensemble d'enzymopathies congénitales et héréditaires affectant le métabolisme lipidique et habituellement d'une grande gravité, entraînant l'accumulation anormale de lipides dans les cellules du système nerveux et souvent d'autres organes. Ce phénomène était directement lié à la concentration de la molécule dans les tissus.

Les résultats ont suggéré que la liaison de ces molécules amphiphiles aux tissus et peut-être aux phospholipides serait nécessaire à l'induction de la lipidose. Pour Lüllman, Lüllmann-Rauch et Wassermann, ces molécules interagiraient avec les phospholipides à la fois par des forces électrostatiques et hydrophobes et de telles liaisons pourraient conduire à un métabolisme anormal des phospholipides : ils seraient attaqués par des phospholipases et leur catabolisme serait inhibé. Afin de mieux connaître la nature de ces interactions et leurs conséquences, l'équipe a réalisé des expériences de liaison grâce à une méthode fluorimétrique utilisant l'ANS (1-anilino-8-naphtalène sulfonate) et le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) comme réactifs fluorescents sur des phospholipides commerciaux.

Pour caractériser les interactions hydrophobes, le DPH est utilisé. Le DPH lié aux lipides fluoresce alors que le DPH libre en solution aqueuse ne fluoresce pas. De plus, l'addition d'une substance médicamenteuse provoque une diminution de la fluorescence due à sa fixation sur ou à côté du site de fixation du DPH. Pour caractériser les interactions électrostatiques, la molécule d'ANS est utilisée. Ces caractéristiques de fluorescence sont différentes lorsque la molécule est

fixée ou libre, ce qui permet de mesurer assez facilement la fraction liée et la fraction libre.

Ce sujet étudie les interactions avec la chlorphentermine dont la formule est donnée par la figure n° 2 ci-dessous.

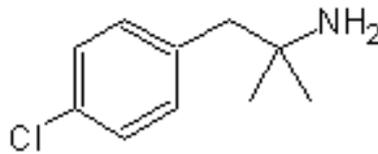


Figure 2 : Formule topologique de la chlorphentermine

10^{ème} question

(1 point)

Ne connaissant pas les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales du DPH, une solution de DPH est préparée dans un solvant organique puis placée dans un spectrofluorimètre. Quel type de cuve doit-on utiliser et pourquoi ?

Réponse du candidat :

On doit utiliser une cuve en quartz car rien ne nous indique la partie du spectre correspondant aux l.o d'excitation et d'émission de DPH.

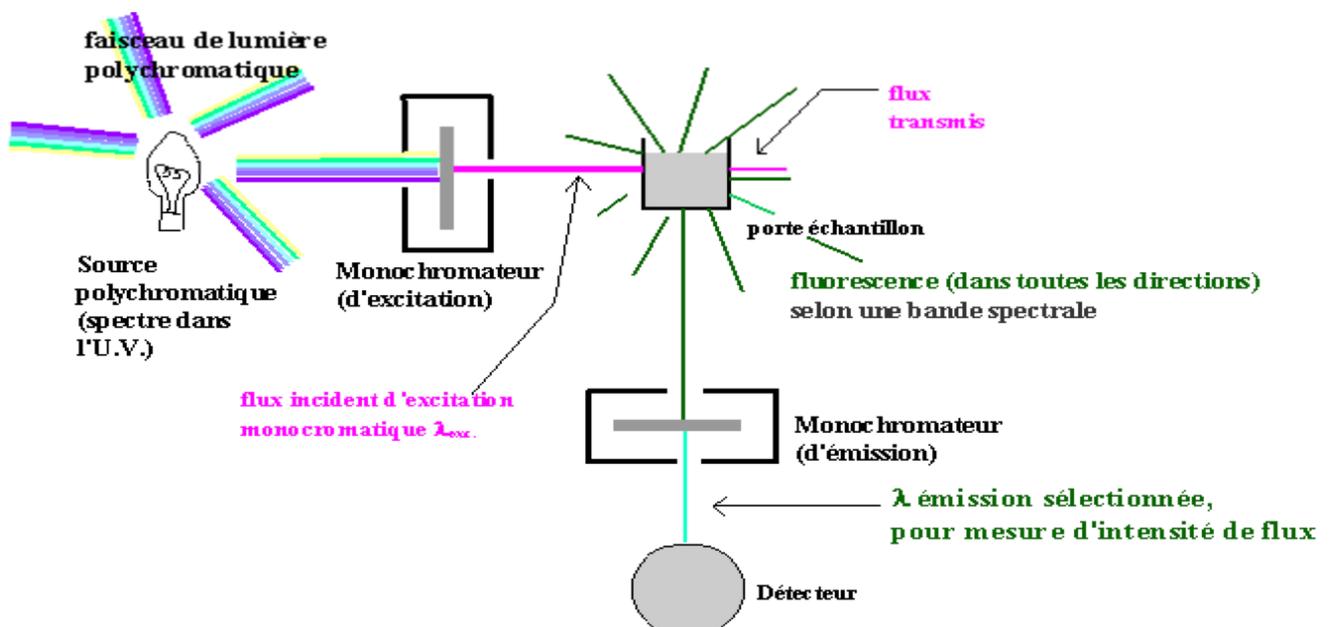
Il faut 4 faces optiques, car en fluorescence, le signal détecté est perpendiculaire au flux incident.

11^{ème} question

(3 points)

Faire le synoptique d'un spectrofluorimètre mono-faisceau. Vous expliquerez le rôle de chaque partie.

Réponse du candidat :



Réponse du candidat :

- ① La source fournit le spectre e.m UV et visible (généralement une lampe Xe).
- ② Le monochromateur d'excitation permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation optimale $\lambda_{exc\ opt}$ ou de balayer en longueur d'onde d'excitation afin d'obtenir un spectre d'excitation.
- ③ Compartiment échantillon où l'on place la cuve 4 faces optiques contenant l'échantillon fluorescent.
- ④ Le monochromateur d'émission permet de sélectionner la longueur d'onde d'émission optimale $\lambda_{em\ opt}$ ou de balayer en longueur d'onde d'émission afin d'obtenir un spectre d'émission.
- ⑤ Le détecteur convertit le signal lumineux en signal électrique exploitable.

12^{ème} question

(2 points)

L'étude de la fluorescence donne les longueurs d'onde de 386 et 440 nm.
Préciser quelle est la longueur d'onde d'émission et quelle est la longueur d'onde d'excitation en justifiant.

Réponse du candidat :

$$E_{em} < E_{exc}$$

$$\frac{hc}{\lambda_{em}} < \frac{hc}{\lambda_{ex}}$$

$$\lambda_{ex} < \lambda_{em}$$

Finalement, on en déduit que : $\lambda_{ex} = 386$ nm et $\lambda_{em} = 440$ nm.