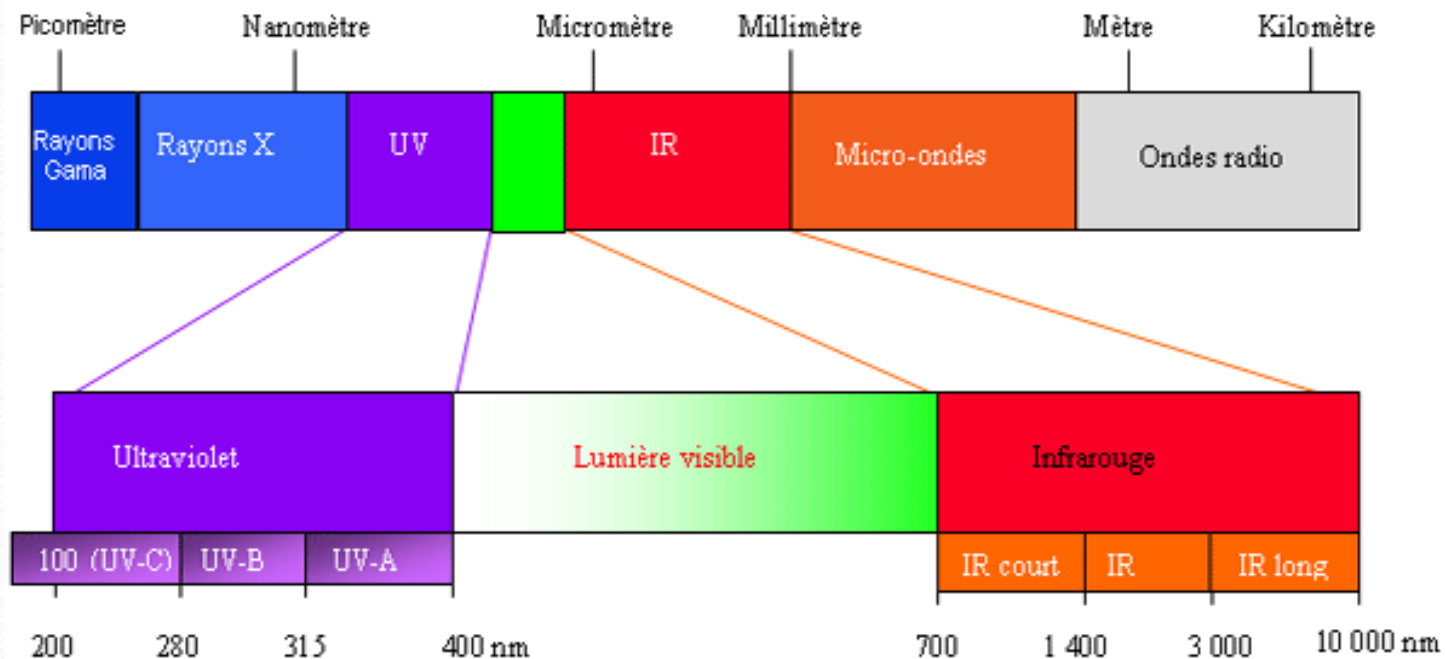


Spectrophotométrie

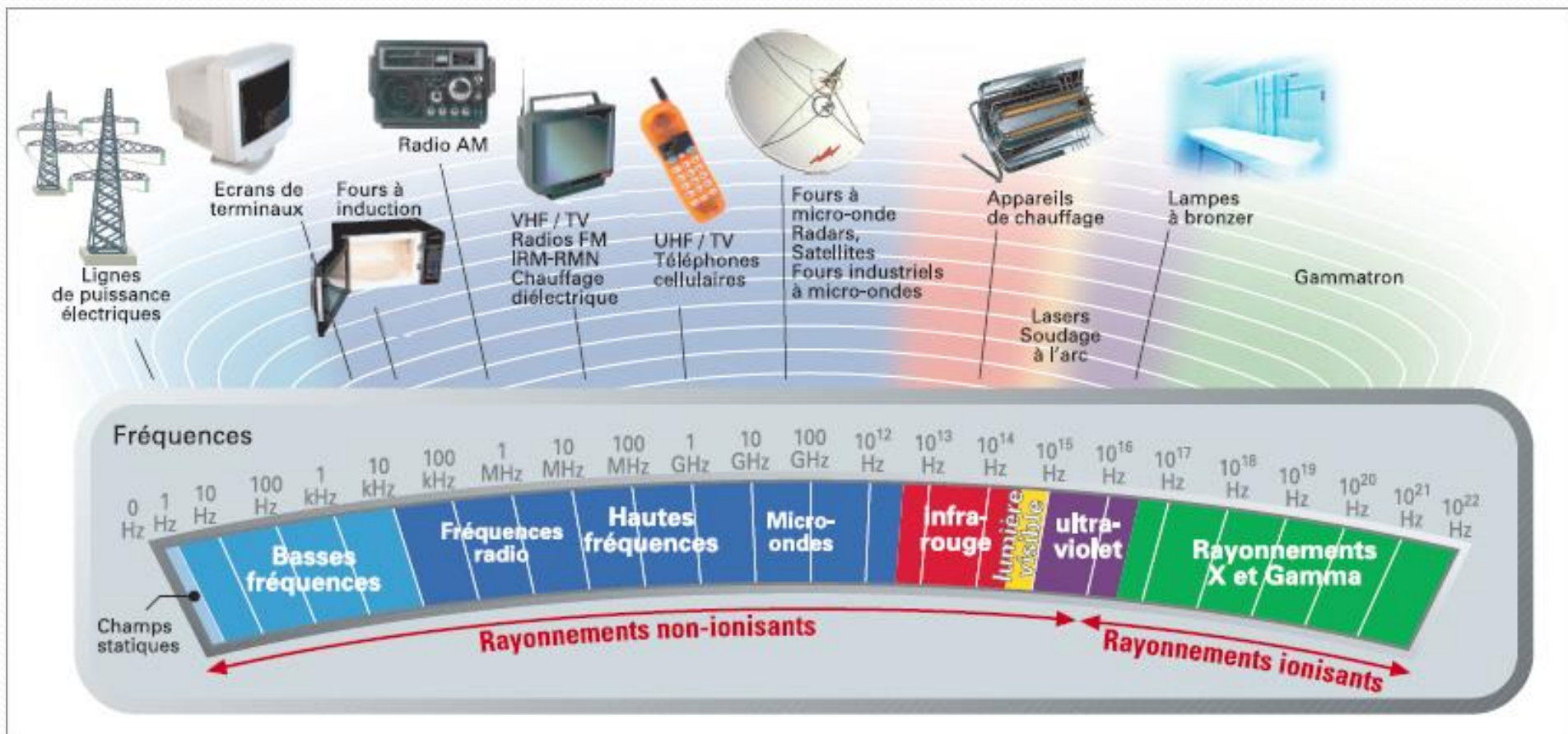


Radiation électromagnétique

- **Radiation électromagnétique**: énergie qui se propage à grande vitesse
→ ondes électromagnétiques
- **Longueur d'onde**: distance linéaire parcourue par une onde complète
- **Interaction avec les biomolécules**: étude de leurs propriétés.

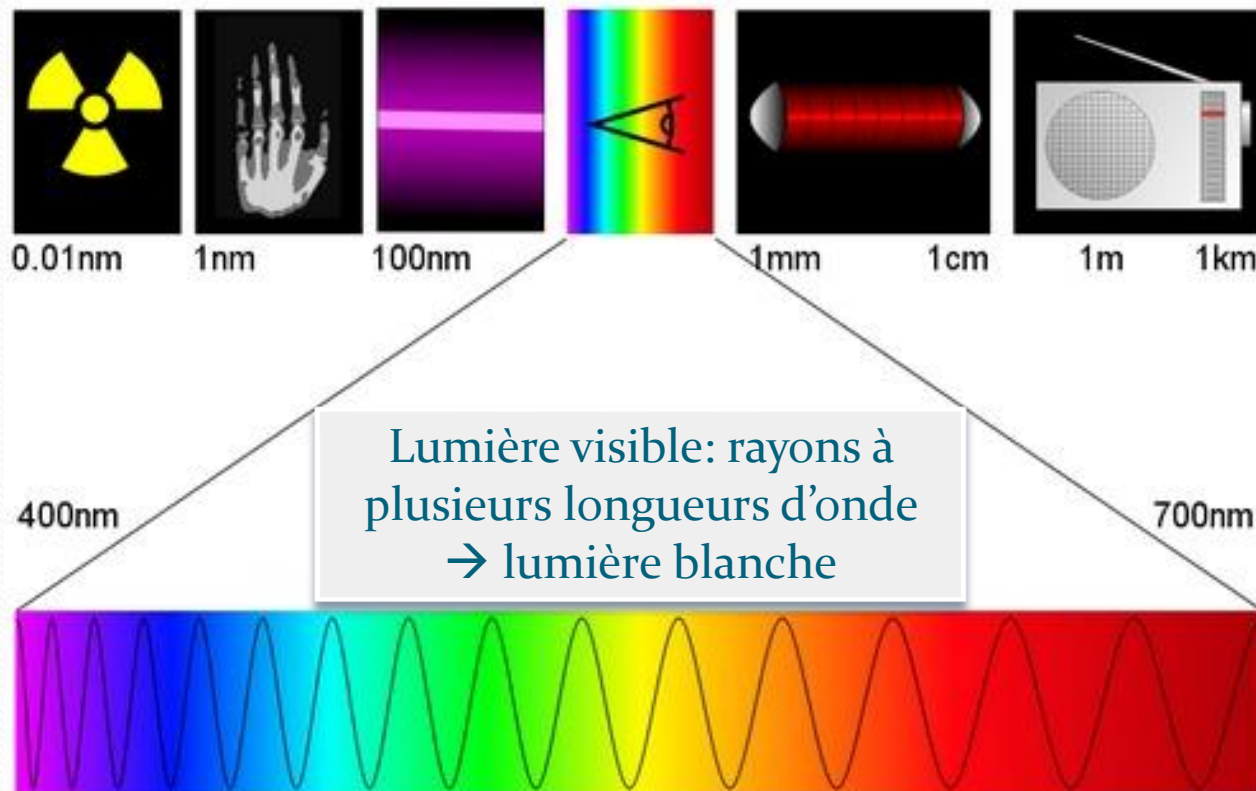


Spectre du rayonnement électromagnétique



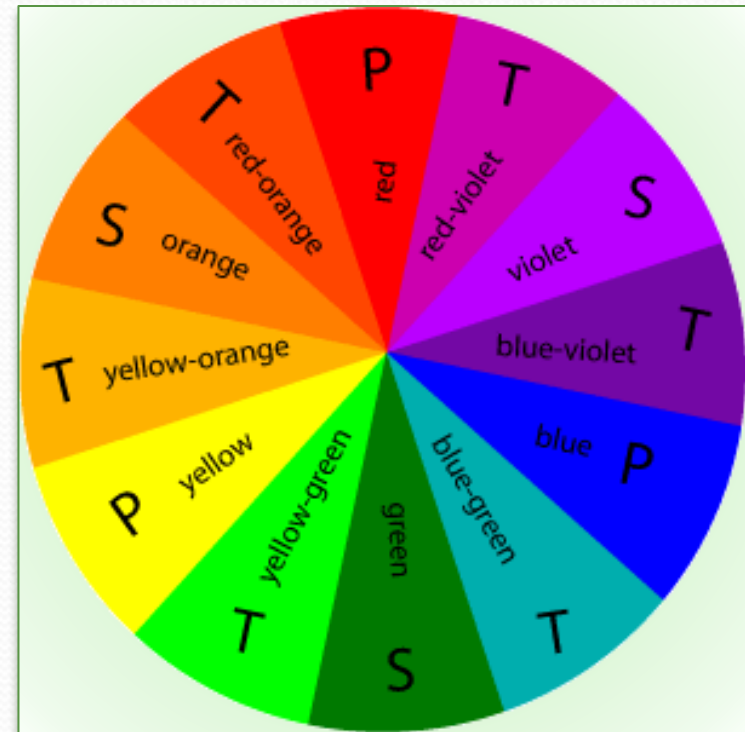
Spectrophotométrie

- **Spectrophotométrie**: mesure de l'absorbance des radiations électromagnétiques par les molécules (domaine visible, UV, IR) → structure, concentration, composition des solutions (échantillons biologiques)....



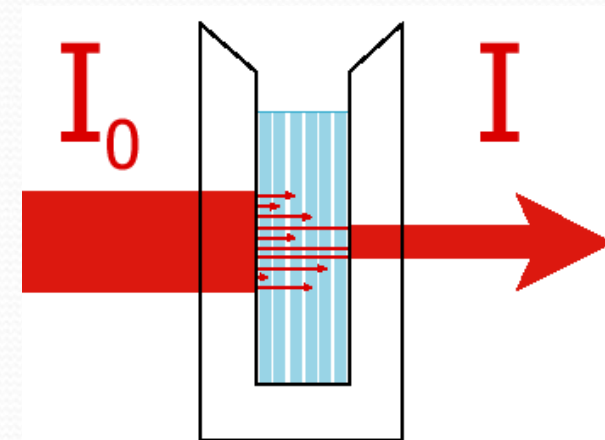
Absorbance de la lumière visible

- **Biomolécules**: absorbance + réflexion partielle de la lumière visible
- **Lumière reflétée**: couleur complémentaire à celle absorbée
 - Hb: pic d'absorbance de la lumière verte (505–555 nm) → réflexion de la lumière complémentaire (rouge).



Loi de Lambert-Beer

- Relation entre l'absorbance de la lumière par un soluté et sa concentration en solution aqueuse
- $I = I_0 \times e^{-\epsilon cd}$
 - I : intensité du flux lumineux émergent
 - I_0 : intensité du flux lumineux incident
 - e : base des logarithmes naturels
 - ϵ : coefficient molaire d'absorbance linéaire [L/mol/cm] → nature du soluté, longueur d'onde du faisceau incident
 - c : concentration molaire
 - d : longueur du trajet optique (1 cm).



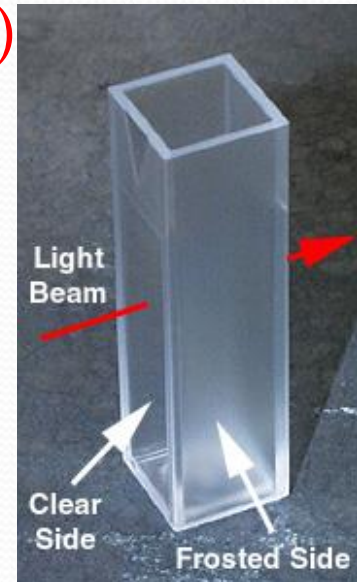
L'intensité émergente décroît avec la concentration du soluté

Densité optique (absorbance)

- **Densité optique**: expression de l'absorbance de la lumière

$$DO = -\ln(I/I_0) = \ln(I_0/I) = \epsilon cd$$

- **Importance**: calcul de la concentration des solutions
- **Intervalle de variation**: généralement 0 – 1
- **Conditions à respecter (relation de proportionnalité)**
 - Lumière incidente monochromatique
 - Solution limpide (cuve à parois parallèles et propres)
 - pH constant
 - Solution diluée ($c < 10 \text{ mmol/L}$).



Transmittance

- Intensité du flux lumineux reflété par le soluté (expression en %)

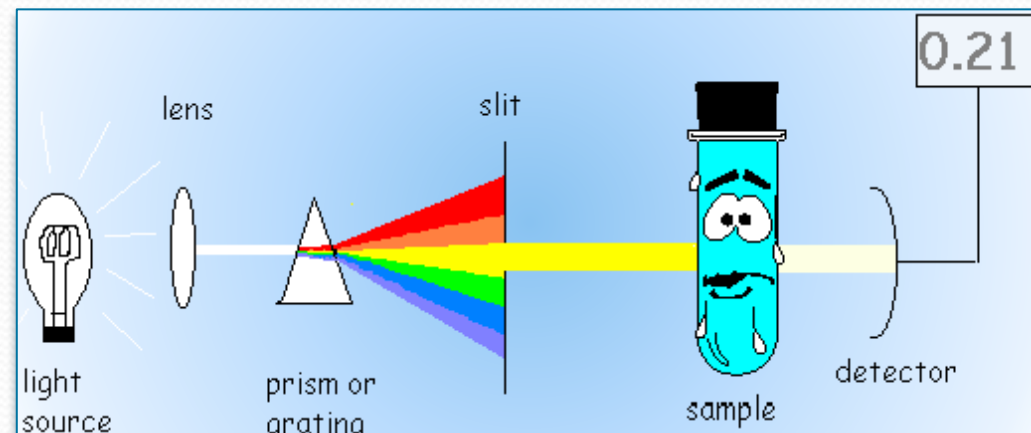
$$T (\%) = (I/I_0) \times 100 = e^{-\epsilon cd} \times 100$$

- Intervalle de variation: 0-100 %
- Relation entre DO et T (pour les liquides):

$$DO = 2 - \log T (\%).$$

Spectrophotomètre

- Mesure de la DO/T; lecture par rapport à un blanc (solvants, tampons...)
- Éléments constitutifs
 - **Sources de lumière**: deutérium (UV) + tungstène (lumière visible)
 - **Filtre monochromatique**: sélection de la longueur d'onde
 - **Système optique** (fentes, lentilles, miroirs): amplification lumineuse → focalisation sur l'échantillon
 - **Cuve traversée par le fascicule lumineux**: parois transparentes, parallèles
 - **Détecteur**: cellule photo-électrique/photodiode ($I, I_0 \rightarrow$ courant électrique)
 - **Écran d'affichage**.

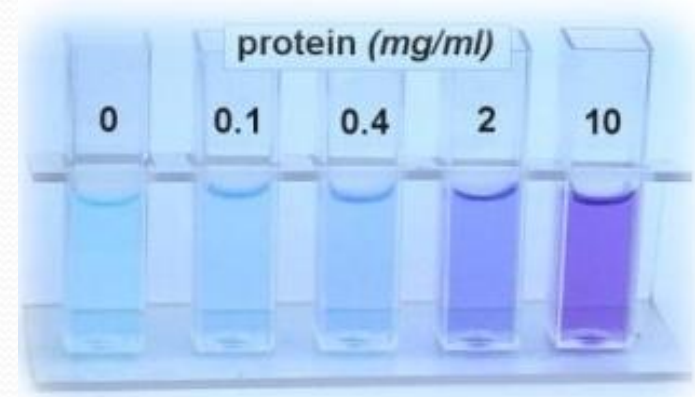
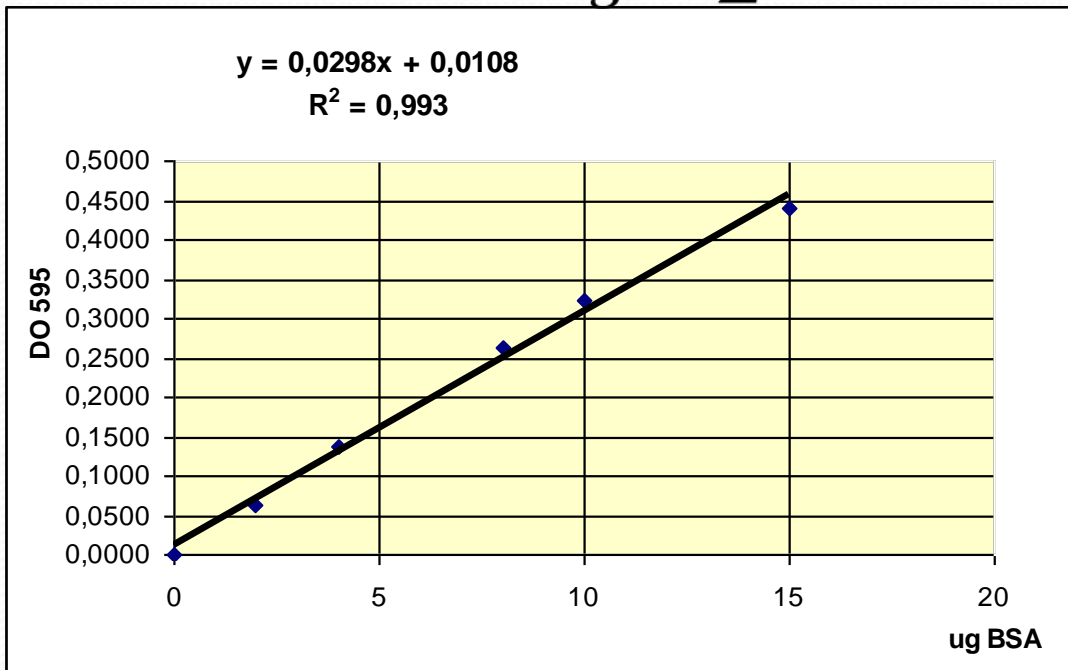


Calcul de la concentration

1. $DO = \epsilon c d \rightarrow c = \frac{DO}{\epsilon d}$
2. **Utilisation d'un standard** (solution de concentration connue, même soluté)
 - $DO_{st} = \epsilon c_{st} d$
 - $DO_{éch} = \epsilon c_{éch} d$
 - $\frac{DO_{st}}{DO_{éch}} = \frac{c_{st}}{c_{éch}} \rightarrow c_{éch} = c_{st} \times \frac{DO_{éch}}{DO_{st}}$
3. **Utilisation d'une gamme d'étalonnage**: plusieurs standards \rightarrow DO.

Gamme d'étalonnage

- **Droite d'étalonnage**: représentation de la variation de la *DO* en fonction de *c* → la droite croise l'origine des axes
- **Calcul de la concentration de l'échantillon**: projection sur l'axe des abscisses ou selon l'équation de la droite
- **Facteur de pente** $F = \frac{1}{\text{tg}\alpha} = \frac{\sum c}{\sum \text{DO}} \rightarrow c_{\text{éch}} \cong \text{DO}_{\text{éch}} \times F$.



Méthodes de dosage des protéines

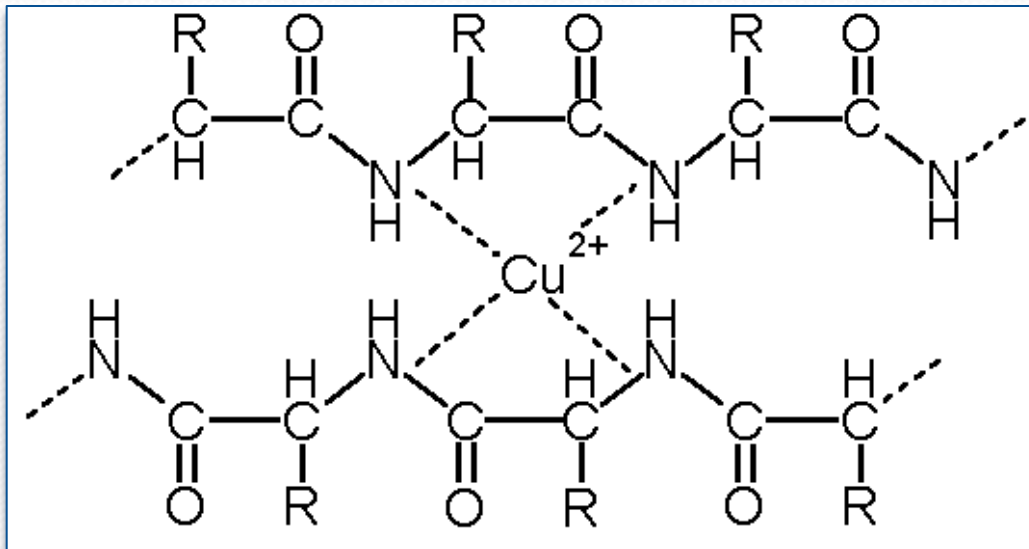
- **Principe du dosage par spectrophotométrie:** 1) DO à 280 nm ou 2) acides aminés → complexes colorés → mesure de l'absorbance.

Méthode	Principe	Sensibilité et limite de détection	Observations
Réaction du biuret	Atomes d'azote des liaisons peptidiques + Cu^{2+} → complexe violet	Faible sensibilité Limite: 10 mg	Perte de la fonction biologique Indépendante de la composition en AA
Méthode de Lowry	Réaction du biuret + réaction des AA aromatiques → ↑ couleur	Haute sensibilité Limite: 5 μg	Perte de la fonction biologique Dépendante du % d'AA aromatiques
Méthode de Bradford	Réaction avec le colorant CBB → mesure de la DO	Haute sensibilité Limite: 1 μg	Perte de la fonction biologique Couleur variable en selon la nature des protéines
DO à 280 nm	Mesure de l'absorbance UV des AA aromatiques	Sensibilité moyenne Limite: 500 μg	Maintien de la fonction biologique Dépendante du % d'AA aromatiques, interférence avec ADN, ARN

Réaction du biuret

- **Principe**

- Protéines (N des fonctions NH) + Cu^{2+} (pH alcalin) \rightarrow complexe violet
- Intensité de la couleur \approx nombre de liaisons peptidiques \rightarrow DO proportionnelle à la concentration de protéines en solution
- Solution standard: albumine sérique bovine (BSA).



Dosage des protéines du sérum



- **Intervalle de variation:** 6-8 g/dL
- **Hyper-protéinémie**
 - Apparente: hémococoncentration (déshydratation → diarrhée, vomissements, insuffisance rénale...)
 - Réelle: ↑ globulines → infections, inflammations, gammopathies monoclonales (prolifération tumorale des plasmocytes)
- **Hypo-protéinémie**
 - Apparente: hémodilution (perfusion prolongée → hyperhydratation)
 - Réelle: ↓ albumine → malnutrition / malabsorption, défaut de synthèse (insuffisance hépatique), pertes excessives (hémorragies, maladies rénales, brûlures...)
 - Hypoalbuminémie → œdèmes, rétention de Na^+ , transport ↓ des ligands.