

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 540 627

(21) N° d'enregistrement national : 83 01801

(51) Int Cl³ : G 01 J 5/60; G 01 N 33/52.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 4 février 1983.

(30) Priorité

(71) Demandeur(s) : AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
DER DDR. — DD.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 32 du 10 août 1984.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(72) Inventeur(s) : Rolf Wetzel et Rudi Pittelkow.

(73) Titulaire(s) :

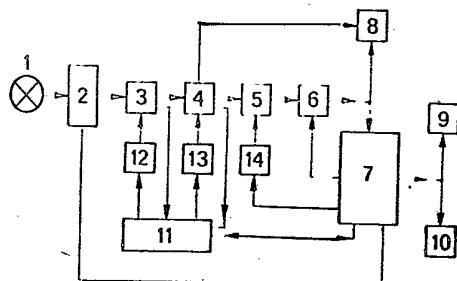
(74) Mandataire(s) : Bert, de Keravenant et Herrburger.

(54) Appareil de mesure de dichroïsme circulaire pour la détermination de transitions de phases dans des complexes moléculaires.

(57) a. Appareil de mesure de dichroïsme circulaire pour la
détermination de transitions de phases dans des composants
de complexes moléculaires.

b. Appareil caractérisé en ce que le monochromateur double
à dispersion additive habituel est remplacé par un monochro-
mateur double à dispersion soustractive, dont la fente 15 est
réalisée pour pouvoir être coulissée automatiquement, ou
comme un gabarit de fente rotatif.

c. Appareil permettant une mesure rapide et précise de
paramètres spécifiques suivant un programme pré-établi.



FR 2 540 627 - A3

1

" Appareil de mesure de dichroïsme circulaire pour la détermination de transitions de phases dans des complexes moléculaires ".

5 La présente invention concerne un appareil de mesure d'écart de coloration, c'est-à-dire de dichroïsme circulaire (désigné dans la suite par "appareil de mesure D.D"), qui permet la mesure simultanée de transitions de phases, notamment thermiquement provoquées, des 10 composants individuels, dans des complexes moléculaires à plusieurs composants, par exemple dans les recherches biologiques concernant des complexes de nucléoprotéides, tels que chromatine ou particules ribosomes, ainsi que des complexes d'acides nucléiques ou de protéines avec 15 ligands à bas poids moléculaire, ou préparations analogues.

Ainsi sont rendues possibles des mesures sur les complexes moléculaires quelconques, pourvu que les composants à étudier possèdent des chromophores optiquement actifs dans le domaine spectral accessible à la mesure, 20 ou pourvu que des activités optiques soient induites par un environnement chiral.

La mesure simultanée des structures fines de transitions de phases pour différents composants dans un 25 même système permet une affectation précise de valeurs, de T_m , d'amplitude et de capacité de coopération, à des

modifications de conformation apportées, ainsi que des particularités de structure réciproques imposées (par exemple entre des composants acide nucléique et protéine dans des particules de chromatine ou ribosomes), et permet ainsi également de déterminer les paramètres thermodynamiques correspondants de la transformation.

Il est ainsi possible de déterminer le type et la spécificité des forces de changement stabilisatrices et déstabilisatrices de structure (par exemple stabilisation de la structure DNA par protéine dans la chromatine et dans des sous-structures de chromatine) et leur localisation, ainsi que leur application à des portions de molécule déterminées. La connaissance de ces données apporte par exemple une contribution à l'explication des mécanismes moléculaires de transcription, reproduction et d'autres problèmes biologiques qui sont liés à des changements de conformation de macromolécules biologiques.

On connaît déjà de tels appareils de mesure de dichroïsme circulaire (C.D) pour la mesure de la dépendance de longueur d'onde de substances actives optiquement pour ce dichroïsme circulaire, notamment dans le domaine spectral compris entre $190 \mu\text{m}$ et 600 nm (L. Vellas, M. Legrand et M. Grosjean, éditeur Verlag Chemie GmbH Weinheim. Académic Press Inc. New York et Londres 1965). Par réglage de température de l'enceinte de cuvette, peuvent être mesurés, soit des spectres pour différentes valeurs discrètes de température, soit la dépendance du dichroïsme circulaire de la température pour une longueur d'onde donnée (c'est-à-dire pour une substance déterminée avec bande d'absorption optiquement active caractéristique dans la longueur d'onde de la mesure).

Dès telles mesures à des températures différentes présentent l'inconvénient que les mesures ne sont possibles que dans des intervalles de température relativement grands, c'est-à-dire que des transitions entre phases ne

peuvent pas être caractérisées avec précision. Des mesures avec une longueur d'onde donnée ne permettent la détermination de transitions entre phases que pour une substance isolée ou un composant d'un complexe moléculaire (par exemple, pour le composant acide nucléique dans la chromatine, par mesure avec une longueur d'onde d'environ 275 nm). Pour la mesure des transitions de phases de plusieurs composants d'un complexe, il est donc nécessaire de procéder à plusieurs mesures successives des composants individuels dans différentes préparations. Une détermination précise de corrélations de structure n'est donc plus possible.

Un autre inconvénient a réside jusqu'à maintenant, pour la mesure de la dépendance entre l'activité optique et la température, dans la précision insuffisante obtenue dans la détermination des courbes caractéristiques qui sont nécessaires pour la caractéristique des transitions entre phases (structure fine de courbes de transition), précision relative à la position des valeurs T_m , d'amplitudes et de largeurs de transition, comme mesure de la capacité de coopération des transitions.

Il est en outre connu de mesurer le comportement CD sous fusion des composants protéine et acide nucléique dans la chromatine. Pour cela, après des accroissements de température déterminés, dans un appareil traditionnel de mesure de CD, on réalise une commutation mécanique entre les prismes et le mono-chromateur, et des mesures alternatives peuvent ainsi être effectuées avec les longueurs d'ondes spécifiques pour le DNA (environ 275 nm) et pour la protéine (environ 220 nm). Un inconvénient réside en ce que, en raison des temps de commutation importants nécessités pour le réglage mécanique de position des prismes (déplacement de masses relativement grandes), qui doivent être soustraits du temps de mesure proprement dit, il se produit une perte d'information.

considérable, qui s'oppose à la mesure précise de la structure fine de transitions entre phases!

D'après le brevet DE 21 47 142, est connue une disposition qui permet la commutation rapide entre deux longueurs d'onde. Dans ce cas, en plus de la trop faible mono-chrominance de la lumière pour des recherches CD, avec l'emploi de filtres comme sélecteurs de lumière, l'inconvénient majeur réside en ce que, pour chaque longueur d'onde, doit être utilisé un sélecteur de lumière spécial, et que l'on dispose seulement de deux longueurs d'onde. Ainsi, des recherches exactes de CD dans des systèmes à plusieurs composants ne sont pas possibles, car, déjà pour des systèmes à deux composants, il est nécessaire d'effectuer des mesures sur au moins trois longueurs d'onde différentes, en vue de contrôler efficacement des influences possibles de lumière de dispersion différentielle.

La présente invention a pour but d'obvier aux inconvénients des méthodes connues et de pouvoir effectuer, avec un appareil de mesure CD, la mesure de transitions entre phases, notamment de transitions thermiques, simultanément pour plusieurs composants de complexes moléculaires, avec une densité suffisante des points résultats de mesure sur des courbes de transition caractéristiques individuelles. Par utilisation de la technique par dérivation, la détermination de la structure fine des transitions entre phases est possible, c'est-à-dire la détermination précise des courbes caractéristiques et également la détection de faibles modifications de conformation.

L'invention propose, pour un appareil de mesure CD, une constitution qui donne la possibilité de programmer une commutation rapide et précise de longueurs d'onde dans l'appareil de mesure.

Dans ce but, l'invention a pour objet un appareil de mesure de dichroïsme circulaire (CD) destiné à la

détermination simultanée de transitions de phases dans des complexes moléculaires, notamment de transitions de phases, induites thermiquement, des composants individuels dans des complexes moléculaires à plusieurs composants, caractérisé en ce que, au lieu du mono-chromateur double habituel avec dispersion additive, il est prévu un mono-chromateur double avec disparition soustractive, dont la fente intermédiaire est coulissante automatiquement ou constituée comme un gabarit de fente rotatif.

Conformément à l'invention, la fente intermédiaire est constituée par des plaques de tôle déplaçables (par un moteur commandé par programme) ou encore par un gabarit de fente constitué par un disque monté à rotation qui libère chaque fois la fente désirée. Il est avantageux de prévoir que les fentes pour les différentes longueurs d'onde et largeurs de bande, sont réalisées plusieurs fois dans le disque. Grâce à un déplacement continu de position de la tôle à fentes, il est possible d'enregistrer même des spectres CD, avec la disposition prévue.

L'invention est expliquée ci-après à l'aide d'exemples de réalisation avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 est une représentation schématique d'ensemble de l'appareil.
 - la figure 2 est une vue en élévation et en plan de la tôle à fentes, à déplacement automatique.
 - la figure 3 est une vue en élévation et en plan d'un gabarit de fente constitué comme un disque à fentes.
- Conformément à la figure 1, l'appareil comprend, à la suite du monochromateur double 2, comme il est habituel dans les appareils de mesure CD, l'installation de modulation 3, la cuvette de mesure 4 à régulation de température, et le récepteur de rayonnement 5 (multiplicateur électronique secondaire SEV). La partie électronique

de l'appareil consiste en un dispositif indicateur électronique 6, un dispositif scripteur 8, qui indique le signal en dépendance de la température ou du temps, et la calculatrice ou microprocesseur 7, pour le traitement 5 des valeurs mesurées des grandeurs de mesure.

A la calculatrice de traitement 7, sont raccordés un second dispositif scripteur 9 et une imprimante ou dispositif perforateur de bande 10. La calculatrice 7 commande, suivant un programme prédéterminé, la position 10 de réglage du système de fentes (longueur d'onde et largeur de bande) dans le monochromateur double 2, la tension du modulateur par l'unité d'asservissement 11, l'unité d'alimentation en courant 12, la température de cuvette par l'unité asservie 11, l'alimentation en courant de 15 chauffage et de refroidissement 13, et la tension du multiplicateur électronique secondaire SEV par l'alimentation en courant 14. La calculatrice 7 contrôle par l'intermédiaire des divers groupes de construction mentionnés, la température de cuvette, la largeur d'onde et la 20 largeur de bande prédéterminées, la tension SEV et la tension du modulateur. La calculatrice donne à l'électronique d'indication l'ordre de mesure et elle détermine la durée de la mesure.

Conformément à la figure 2, la fente intermédiaire 25 consiste en deux plaques de tôle 15 qui sont fixées à des fils d'acier minces 16 qui passent sur des poulies 20 qui sont fixées sur un arbre moteur, et sur des contre-poulies 18 qui sont montées à rotation libre sur des axes. Le diamètre des poulies est choisi de telle sorte 30 que, avec une rotation d'environ 0,9 tour, l'ouverture de fente ait son image formée au-dessus de la portion indiquée en tirets dans la figure, dans le plan 19 de fente intermédiaire, sur le domaine spectral nécessaire. Les fils d'acier 16 sont enroulés sans glissement ni 35 boucle sur les poulies 20. Les poulies 20 sont entraî-

nées par des moteurs pas à pas 17 avec engrenage réducteur, sans relâchement. Les tôles de fente sont guidées dans une gorge 22 du profilé de guidage 21.

Les moteurs 17 sont commandés par un dispositif 5 processeur 7 et les longueurs d'onde à largeur de bande spectrale désirées sont réglées par coulissemement des tôles de fente 15. Le réglage a lieu en fractions de seconde de telle sorte que sont évitées des pertes d'informations dues à des temps de réglage trop longs.

10 Comme le montre la figure 3, les fentes 27 sont formées dans le disque à fente 25 formant un gabarit à fente. Par rotation au moyen d'un moteur 26, de préférence un moteur pas à pas, ces fentes sont amenées l'une après l'autre dans le plan de fente intermédiaire 28. Les 15 fentes 27 désirées sont ainsi réglées suivant les longueurs d'onde et les largeurs de bande désirées. Le disque à fente 25 est constitué de telle manière que le programme pour les longueurs d'onde et les largeurs de bandes spectrales soit reproduit plusieurs fois sur le disque de sorte que différents programmes se succèdent. Il en résulte que les distances entre la position de la fente 27 ne sont pas trop grandes et que le disque 25 doit être déplacé seulement dans une direction, de sorte que les temps nécessaires pour une commutation d'une longueur 20 d'onde sur une autre restent très courts.

Après le démarrage, le microprocesseur délivre, conformément au programme prévu, les signaux de commande pour la température et l'accroissement de température ($\Delta T / \Delta t$), la longueur d'onde, la largeur de bande, la 30 tension du modulateur et la tension SEV, sur les groupes de construction correspondants et il contrôle ces paramètres. Une fois que tous les paramètres ont été réglés et contrôlés, le microprocesseur délivre à l'électronique indicateur l'ordre pour le début de la mesure et pour la 35 fin de la mesure. Après exécution de cette mesure confor-

2540627

8

mément à la durée de mesure prédéterminée, de nouveaux paramètres sont inscrits dans le programme, et le résultat déjà obtenu par la mesure est transmis au dispositif scripteur à bande perforée ou à une imprimante.

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Appareil de mesure de dichroïsme circulaire (CD) destiné à la détermination simultanée de transitions de phases dans des complexes moléculaires, notamment de transitions de phases, induites thermiquement, des composants individuels dans des complexes moléculaires à plusieurs composants, appareil caractérisé en ce que, au lieu du monochromateur double habituel avec dispersion additive, il est prévu un monochromateur double (2) avec dispersion soustractive, dont la fente intermédiaire (15) est coulissante automatiquement, ou constituée comme un gabarit de fente rotatif (25).

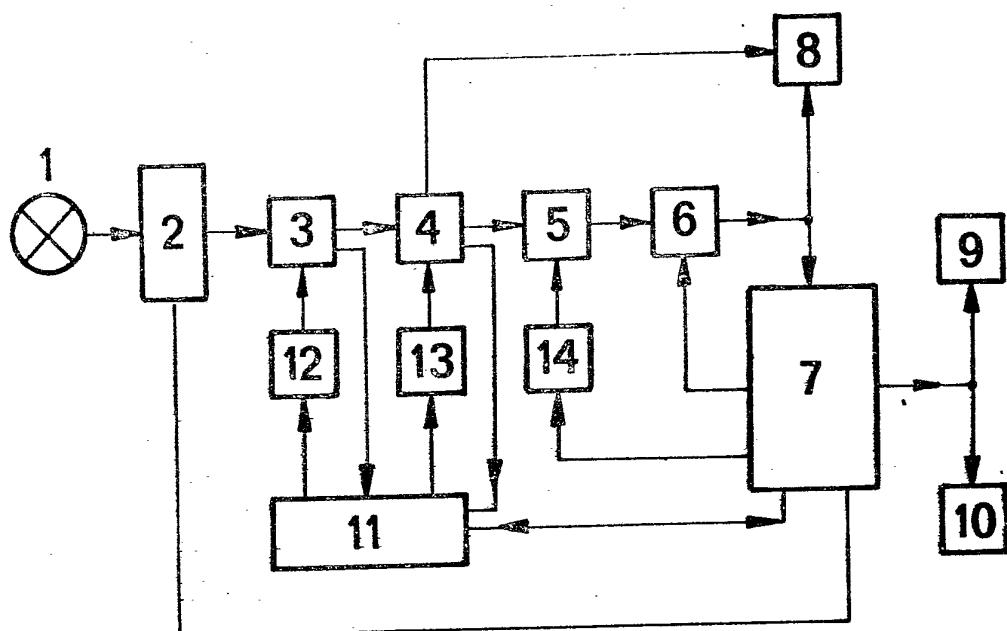
2°) Appareil de mesure CD suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la fente intermédiaire du monochromateur double est constituée par des tôles de fente (15) fixées sur des fils d'acier (16), et qui sont guidées dans une gorge (22), les fils d'acier étant tendus rigidement sur une poulie (20) montée sur un moteur pas à pas (17) et sur une contre-poulie (18).

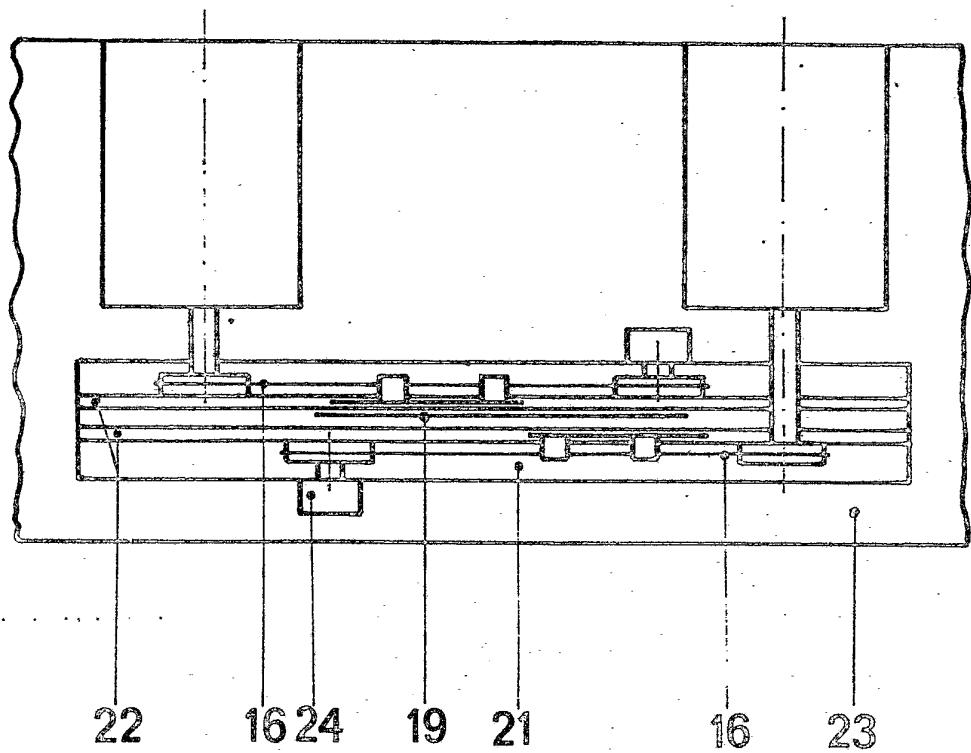
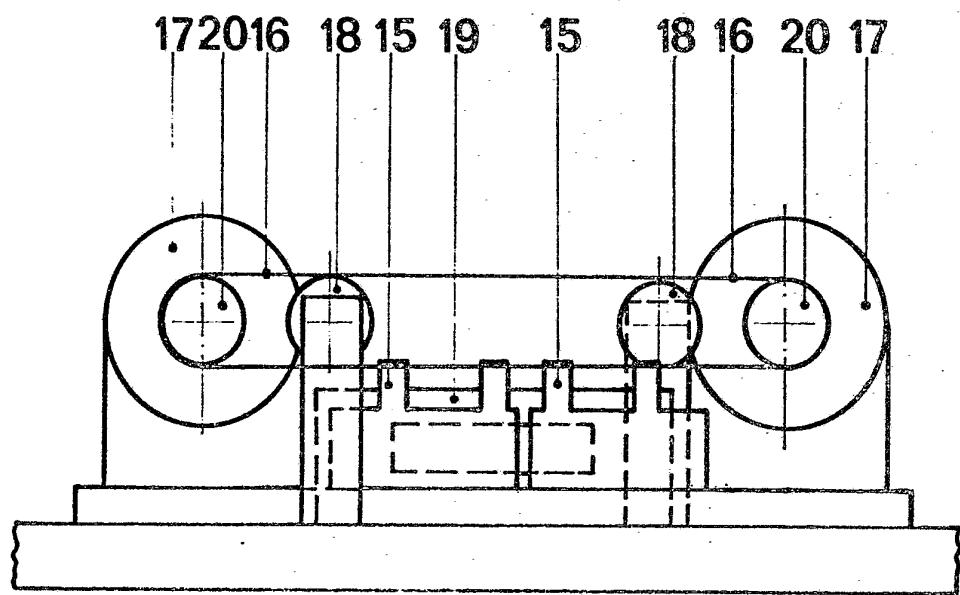
3°) Appareil de mesure CD suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le gabarit de fente est constitué par un disque dans lequel sont incluses des fentes pour différentes longueurs d'onde et différentes largeurs de bande, qui sont réglables en position par rotation du disque dans le plan de fente intermédiaire (28) au moyen d'un moteur (26).

4°) Appareil de mesure CD suivant l'une quelconque des revendications 1 et 3, caractérisé en ce que les fentes pour les différentes longueurs d'onde et largeurs de bande, sont formées plusieurs fois sur le disque, de telle sorte que le programme désiré de longueurs d'onde et de largeurs de bande est inscrit plusieurs fois sur le disque à fente (25).

Fig.1

2540627





PL III/3
Fig.3

2540627

