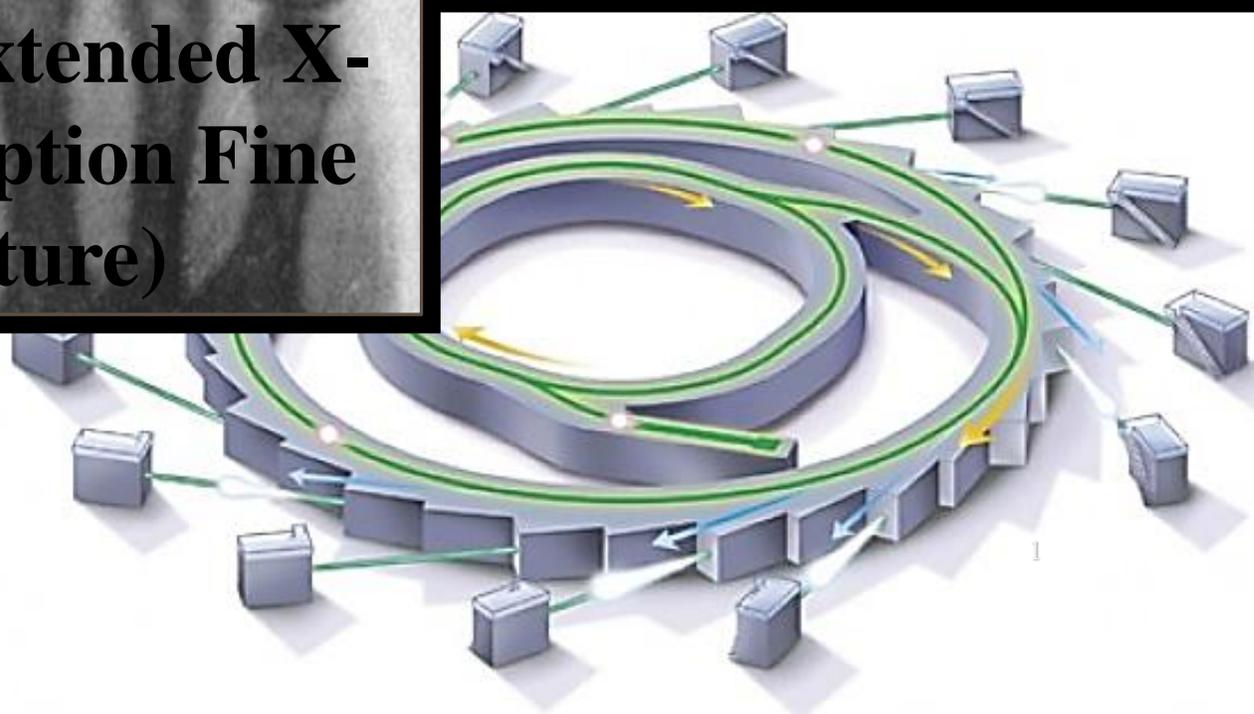
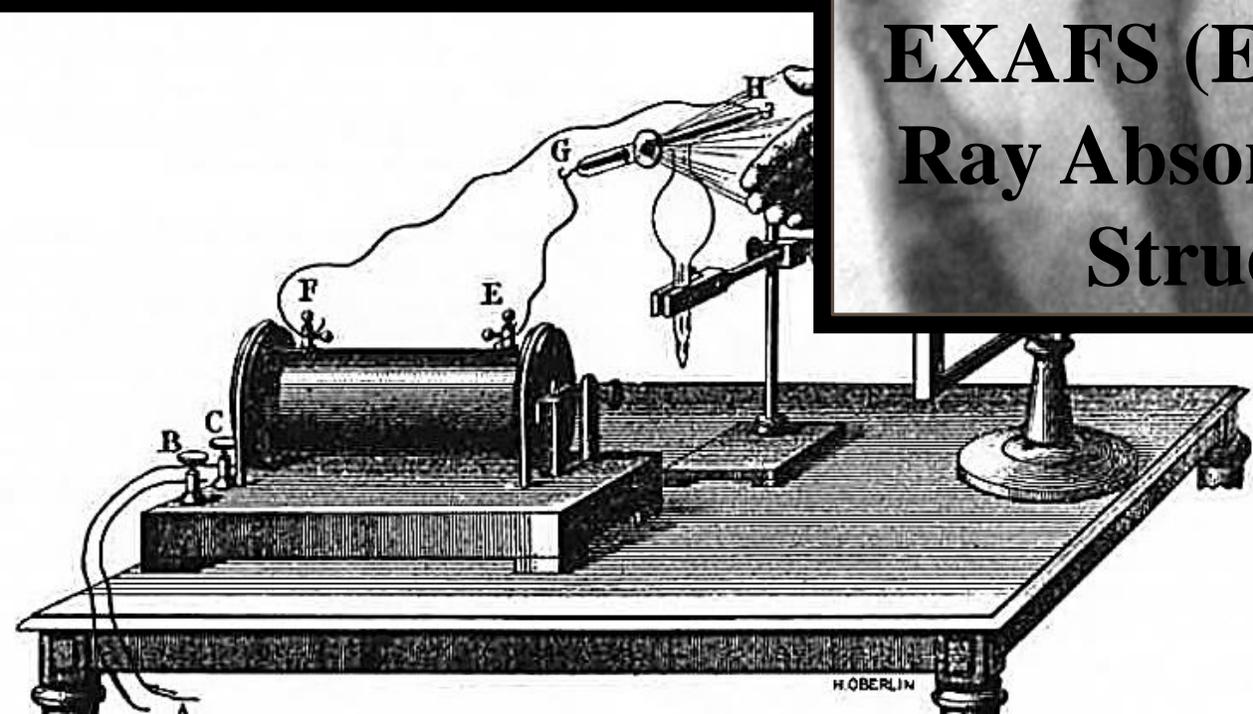
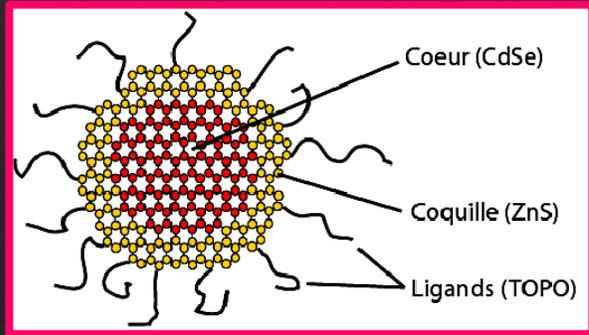


**Caractérisation des
molécules biologiques
par spectroscopie
EXAFS (Extended X-
Ray Absorption Fine
Structure)**

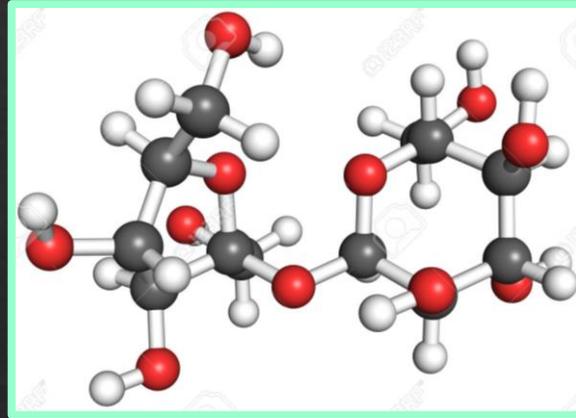


Introduction

- ❑ Spectroscopie d'absorption des rayons X : Etude des propriétés physicochimiques de la matière



matière inerte



matière vivante

- ❑ Spectroscopie EXAFS : technique de plus en plus utilisée



Synchrotron

- ❑ Etude de l'ordre local dans les systèmes plus ou moins ordonnés



Traitement des
eaux usées



Identification des
composantes des
roches

Mesure de l'absorption des photons X par la matière

Etude des molécules biologiques

Plan

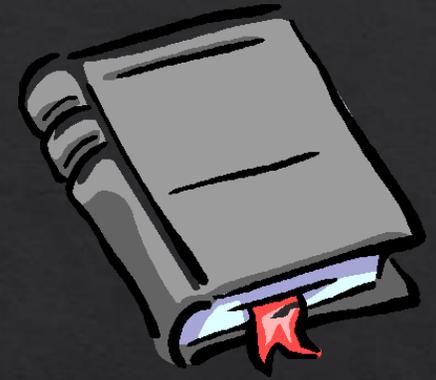
I- La spectroscopie par absorption de rayons X

II- Description de l'appareillage

III- Applications et limites de la technique en biologie : exemple issu d'un article scientifique

IV- Complémentarité avec une autre technique d'analyse : spectroscopie XANES

V-Conclusion



I- La spectroscopie par absorption de rayons X

1. Historique de la spectroscopie par absorption de rayons X

Manne Siegbahn
et Stenström

Découvertes de
Fricke et Hertz

Hanawalt

Travaux de Sayers,
Stern et Lytle

1916

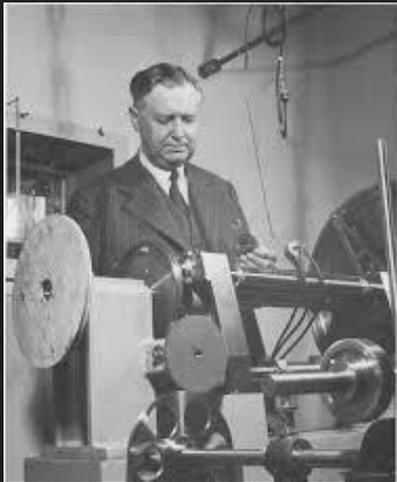
1920-1921

1931

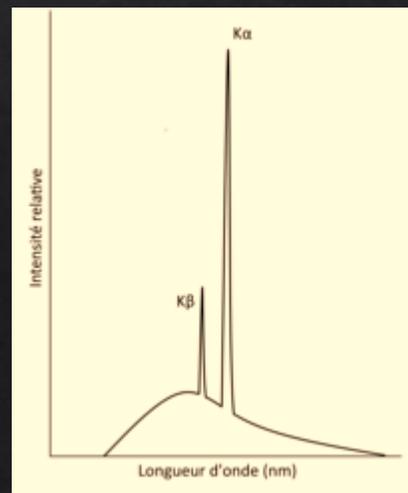
1960

1970

Développement du
premier spectromètre à
rayons X sous vide



Découverte des premiers
spectres d'absorption



Structure du
spectre affecté
selon état physique
et chimique de la
matière



+ observation
du phénomène
d'oscillations

Equipement du
spectromètre
d'absorption amélioré
pour obtenir de meilleurs
spectres.

Fondement
de la théorie
actuelle de
l'EXAFS

I- La spectroscopie par absorption de rayons X

☐ Rayons X : forme de rayonnement électromagnétique

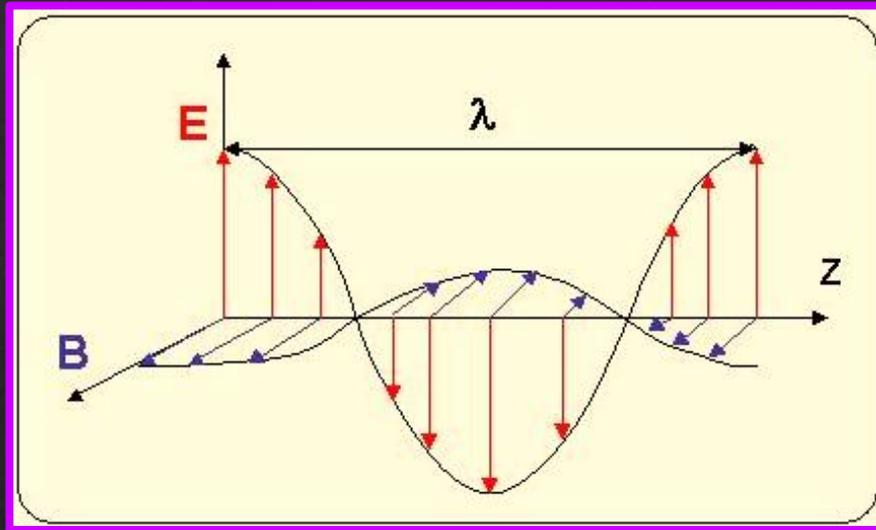


Fig 1 : Onde électromagnétique

☐ Spectre électromagnétique :

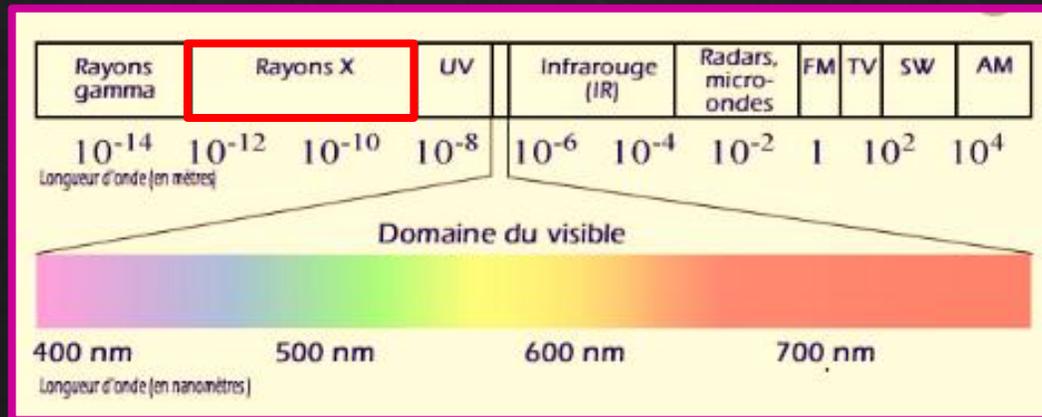


Fig 2 : Spectre électromagnétique

2. Interaction rayons X-matière

☐ Interaction rayons X-matière :

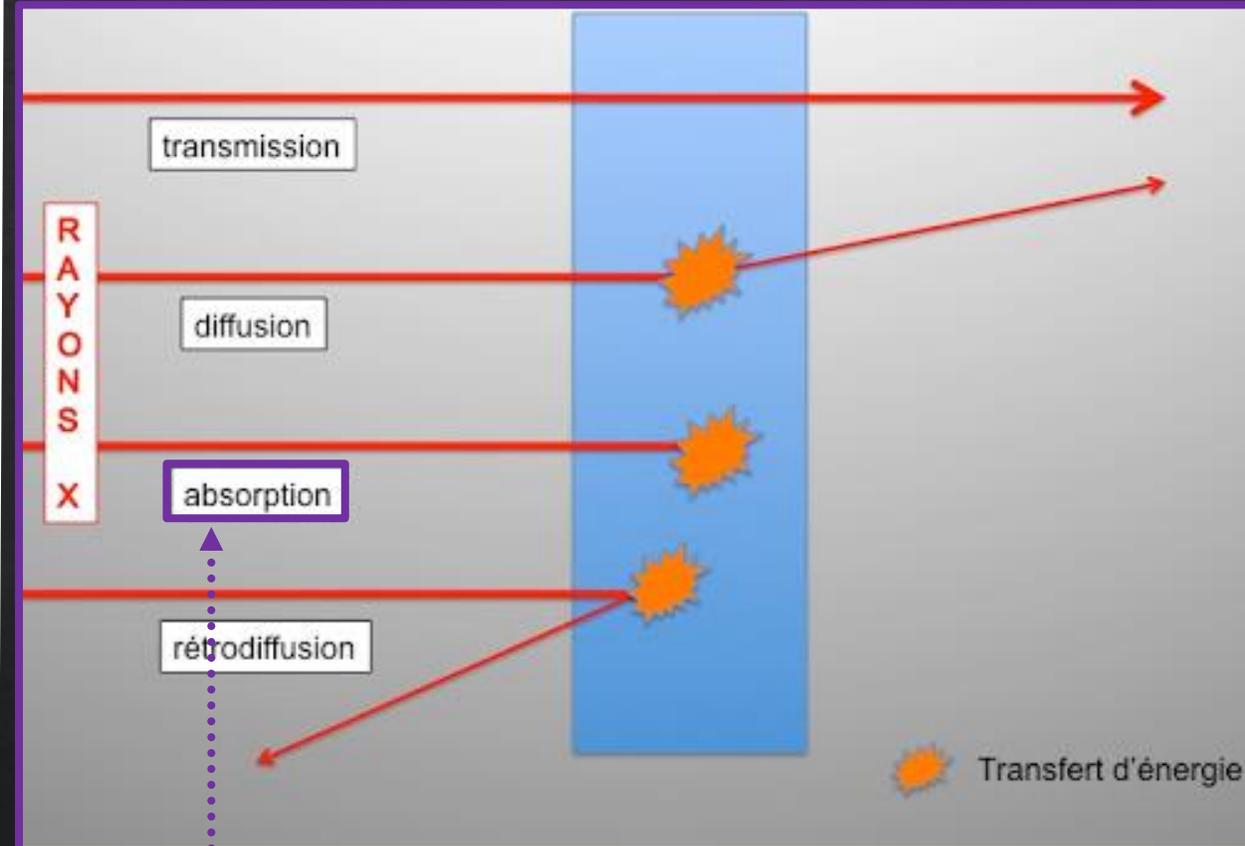


Fig 3 : Interactions des rayons X avec la matière

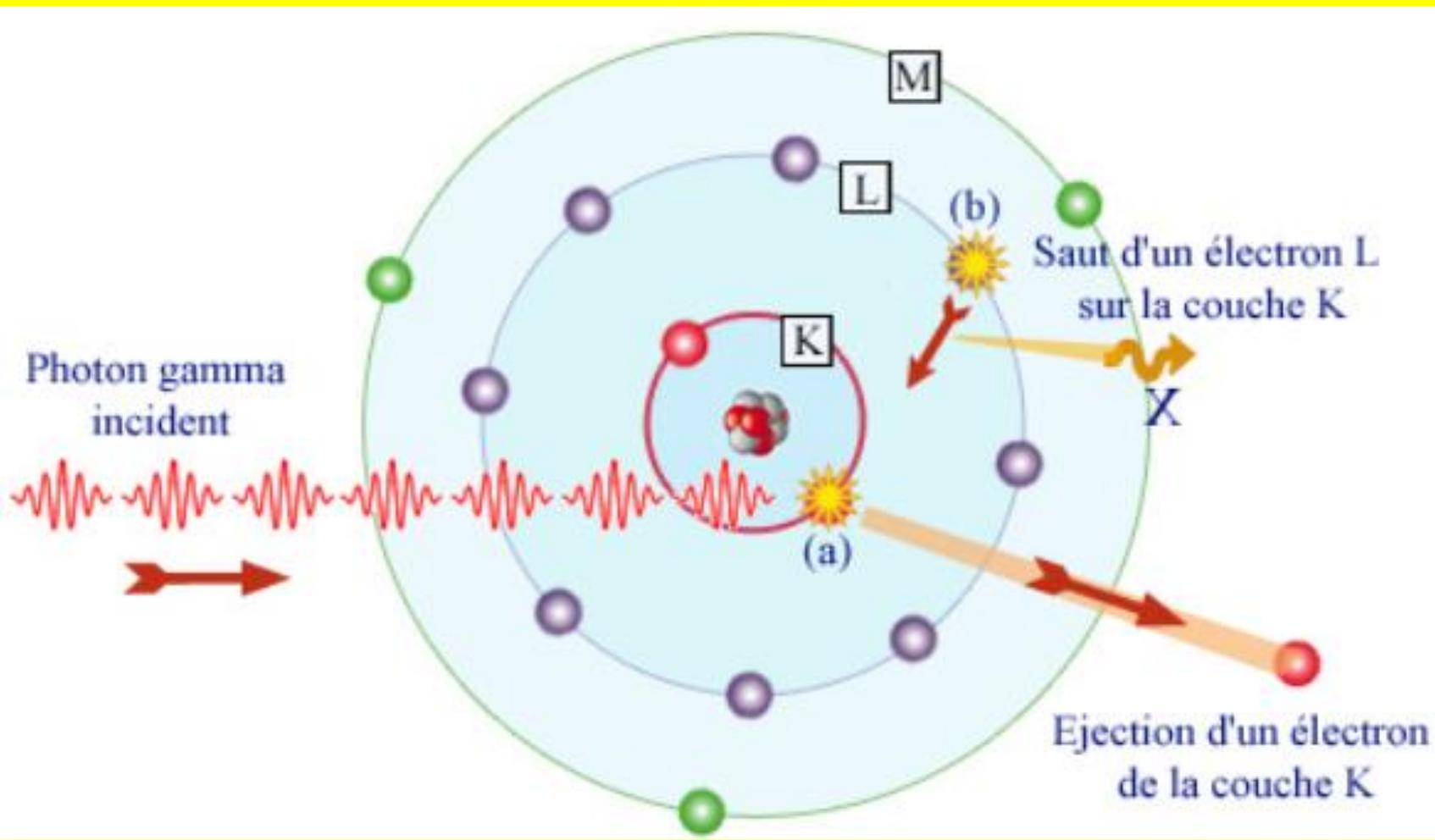
Spectroscopie EXAFS : technique basée sur l'absorption de rayons X

I- La spectroscopie par absorption de rayons X

3. Spectroscopie EXAFS : éléments théoriques 3.1 Principe général

Définition

Suivi de l'évolution du **coefficient d'absorption** d'un échantillon en fonction de l'énergie incidente du faisceau

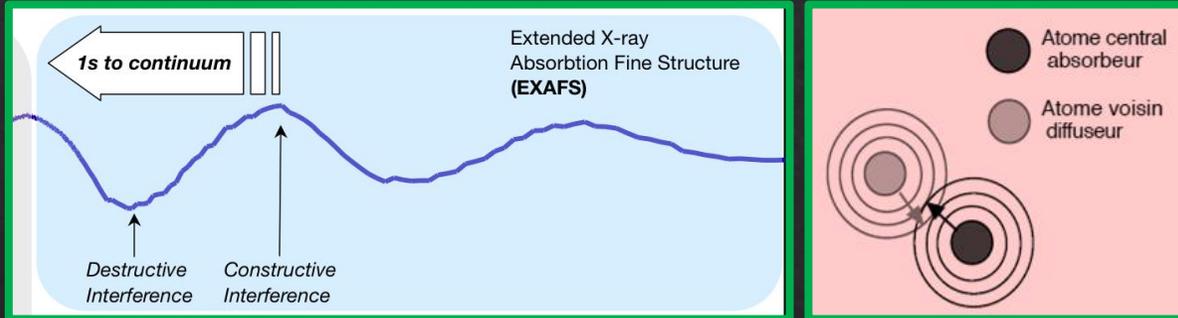


☐ **Phénomène physique :**
Absorption d'un photon X,
suivi de l'éjection d'un électron
de cœur de l'atome absorbant

Fig 4 : Schéma représentant le phénomène physique à l'origine de l'absorption d'un photon X

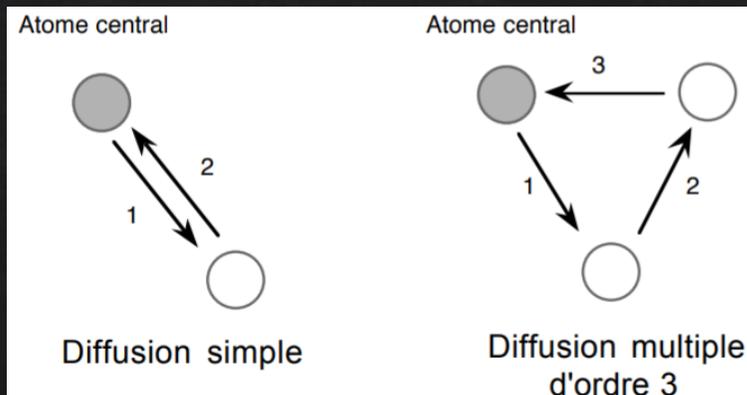
I- La spectroscopie par absorption de rayons X

Cas d'un atome se trouvant dans une molécule ou un matériau :



OSCILLATIONS EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)

Région qui peut s'étendre jusqu'à 1000 ou 2000 eV au-delà du seuil



3. Méthode EXAFS : éléments théoriques

3.2 Phénomène physique des oscillations EXAFS : dualité onde-corpuscule

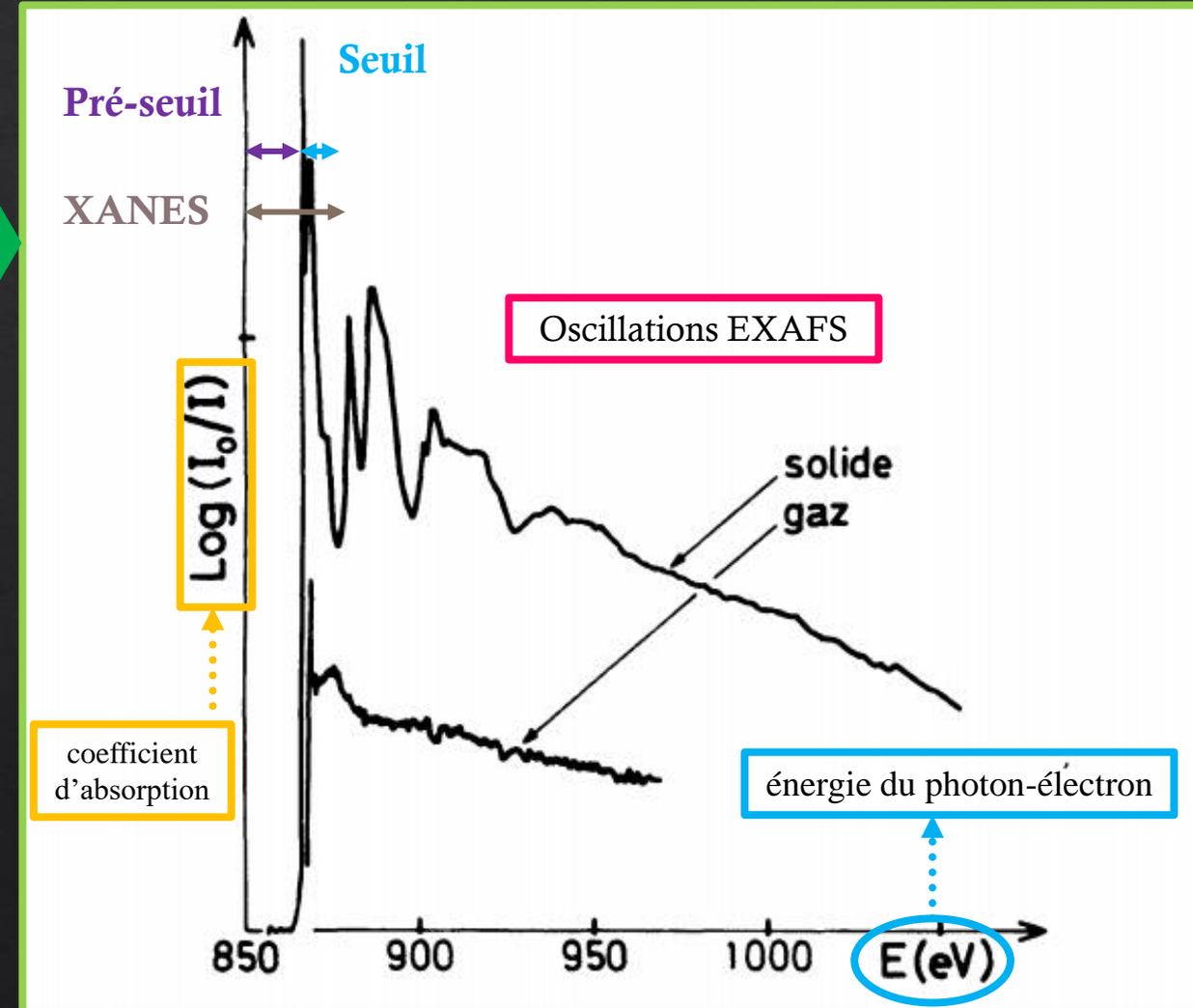


Fig 5 : Absorption en fonction de l'énergie des photons X incidents pour le seuil du néon, à l'état solide et gazeux

I- La spectroscopie par absorption de rayons X

3. Spectroscopie EXAFS : éléments théoriques

3.3 Phénomène physique des oscillations EXAFS

EXAFS

Formule EXAFS : Expression des oscillations EXAFS

S_0 : Terme de réduction rendant compte des effets électroniques

N_i : Nombre d'atomes voisins situés à la distance R_i de l'atome central

k : Vecteur d'onde du photoélectron

$$k = \sqrt{\frac{8\pi^2 m_e}{h^2} (E - E_0)}$$

δ : Déphasage de l'atome central

$$k\chi(k) = -S_0^2 \sum_i \left[\frac{N_i}{R_i^2} |f_i(\pi, k, R)| e^{-2\sigma^2 k^2} e^{-2\left(\frac{R_i}{\lambda(k)}\right)} \sin(2kR_i + 2\delta_1(k) + \psi_i(k)) \right]$$

i : Nombre de chemins de diffusion

λ : Libre parcours moyen de l'électron éjecté

Ψ : Déphasage de l'atome voisin

σ : Facteur de Debye Waller : rend compte de l'atténuation du signal dû au désordre au voisinage de l'atome absorbeur (agitation thermique)

I- La spectroscopie par absorption de rayons X

Technique très **précise** et **spécifique** : analyse d'un seul élément sans l'interférence avec les autres éléments



Technique très sensible => étude de systèmes très dilués

Dans un système complexe, information sur l'ordre local autour de chacun des constituants

Détection des variations dans l'échantillon total, pas seulement de la partie cristalline,



4. Avantages et inconvénients de la spectroscopie EXAFS



Difficulté dans l'analyse d'un spectre EXAFS (diverses approximations)

Extrême sensibilité de l'EXAFS => limite l'étude des milieux désordonnés

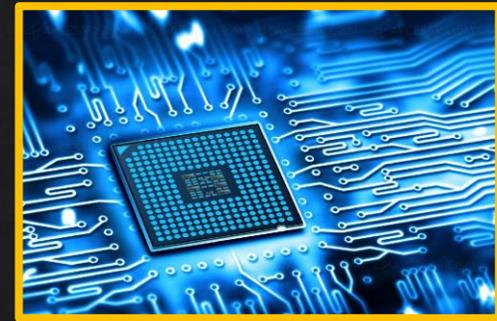
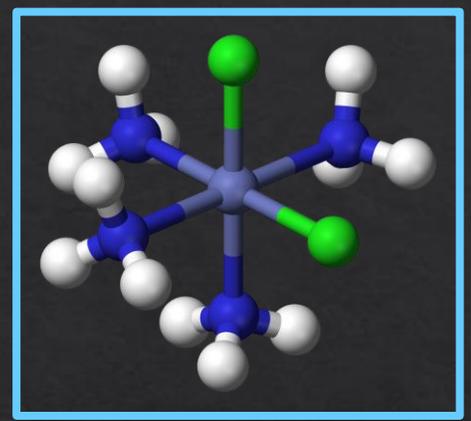
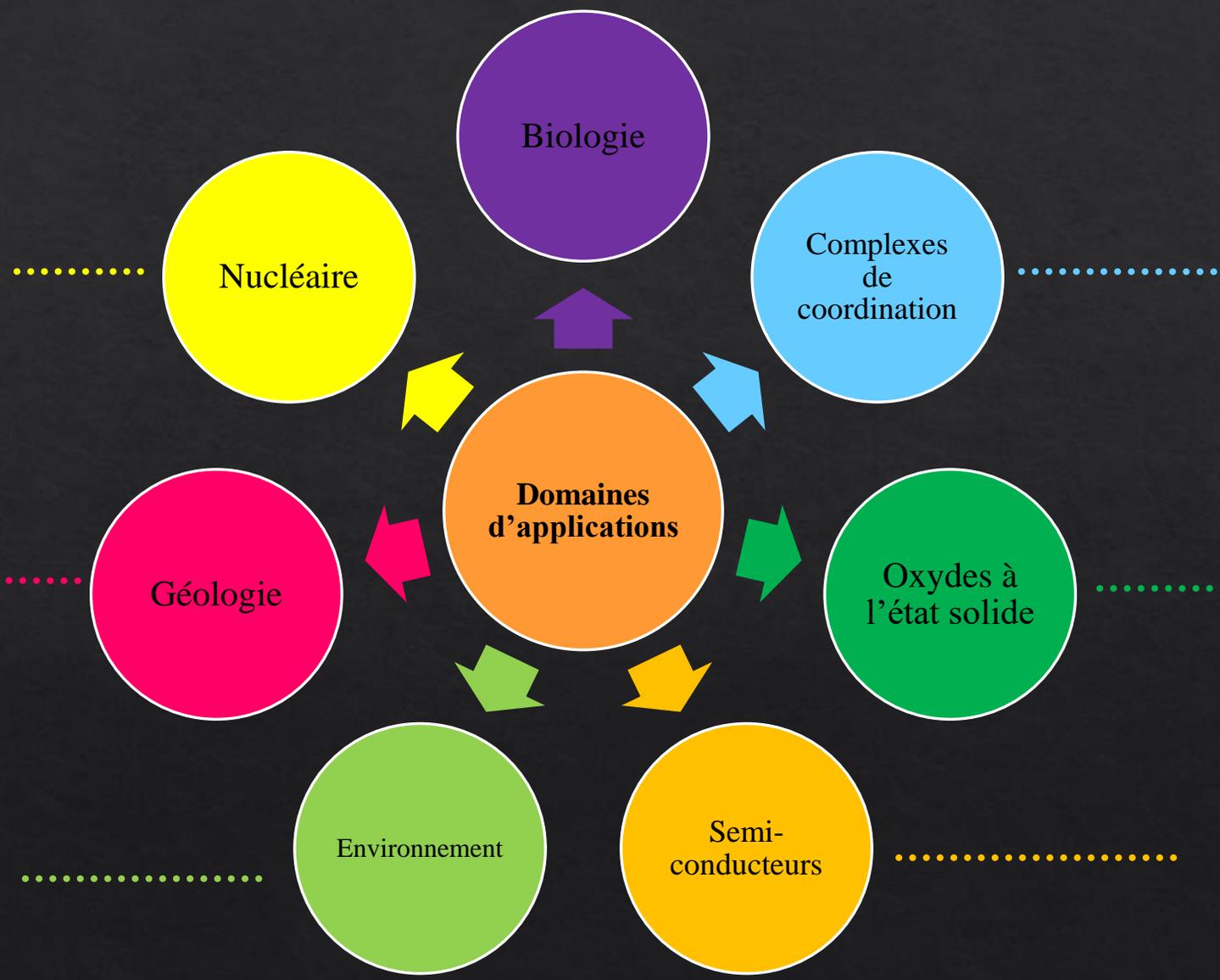
Technique encombrante et qui prend du temps

Etude des molécules biologiques par rayonnement X => dommageable pour la molécule



I- La spectroscopie par absorption de rayons X

5. Domaines d'applications de la spectroscopie EXAFS



II- Description de l'appareillage

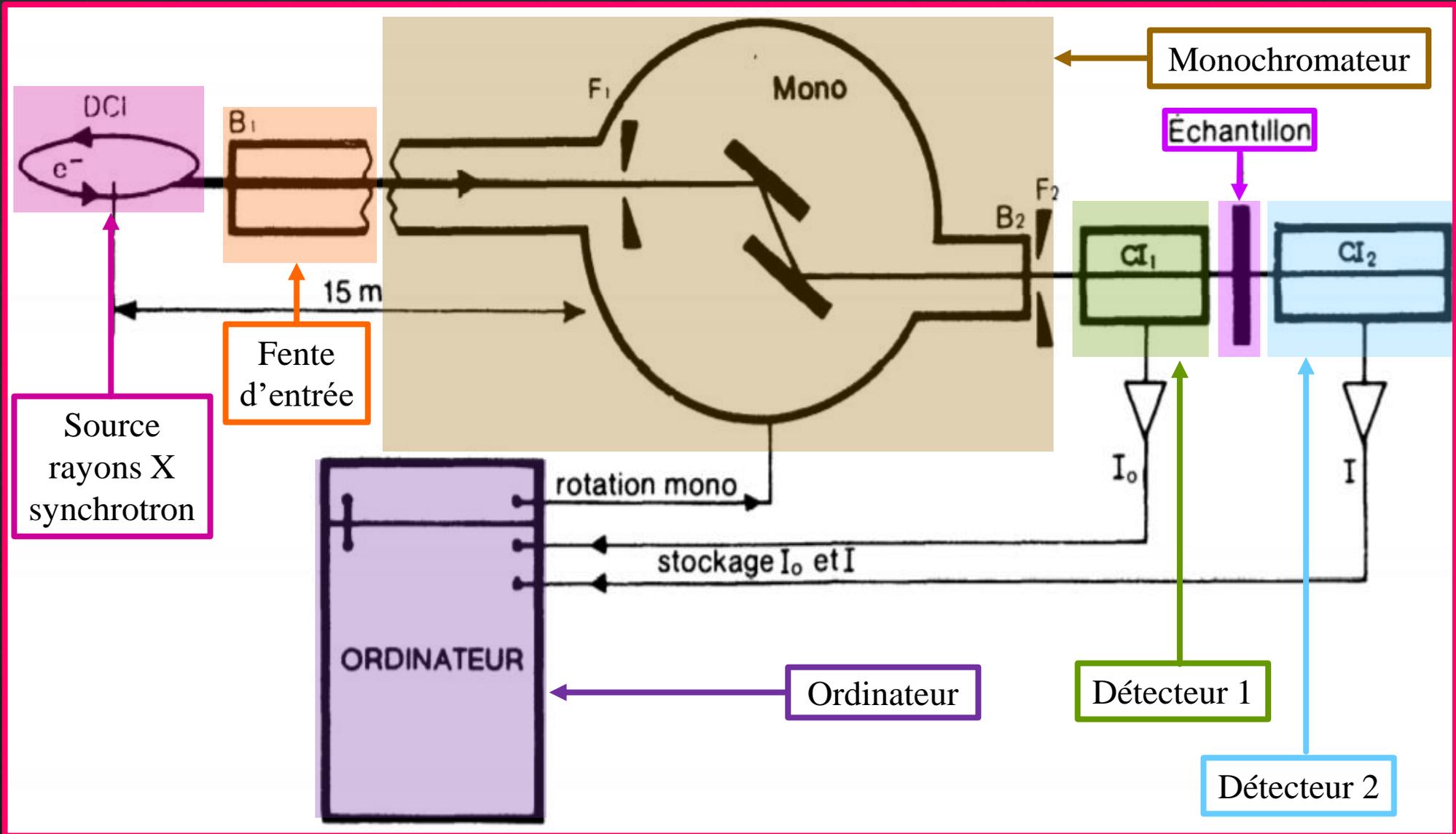


Fig 6 : Schéma du principe d'une mesure par spectroscopie EXAFS

II- Description de l'appareillage

Canon à électrons

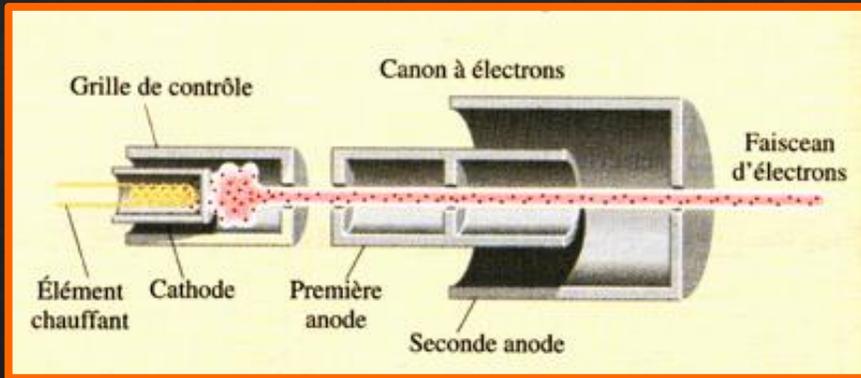


Fig 7 : Schéma du principe d'un canon à électrons

Sources de rayons X : synchrotron = accélérateur de particules (électrons) circulaire

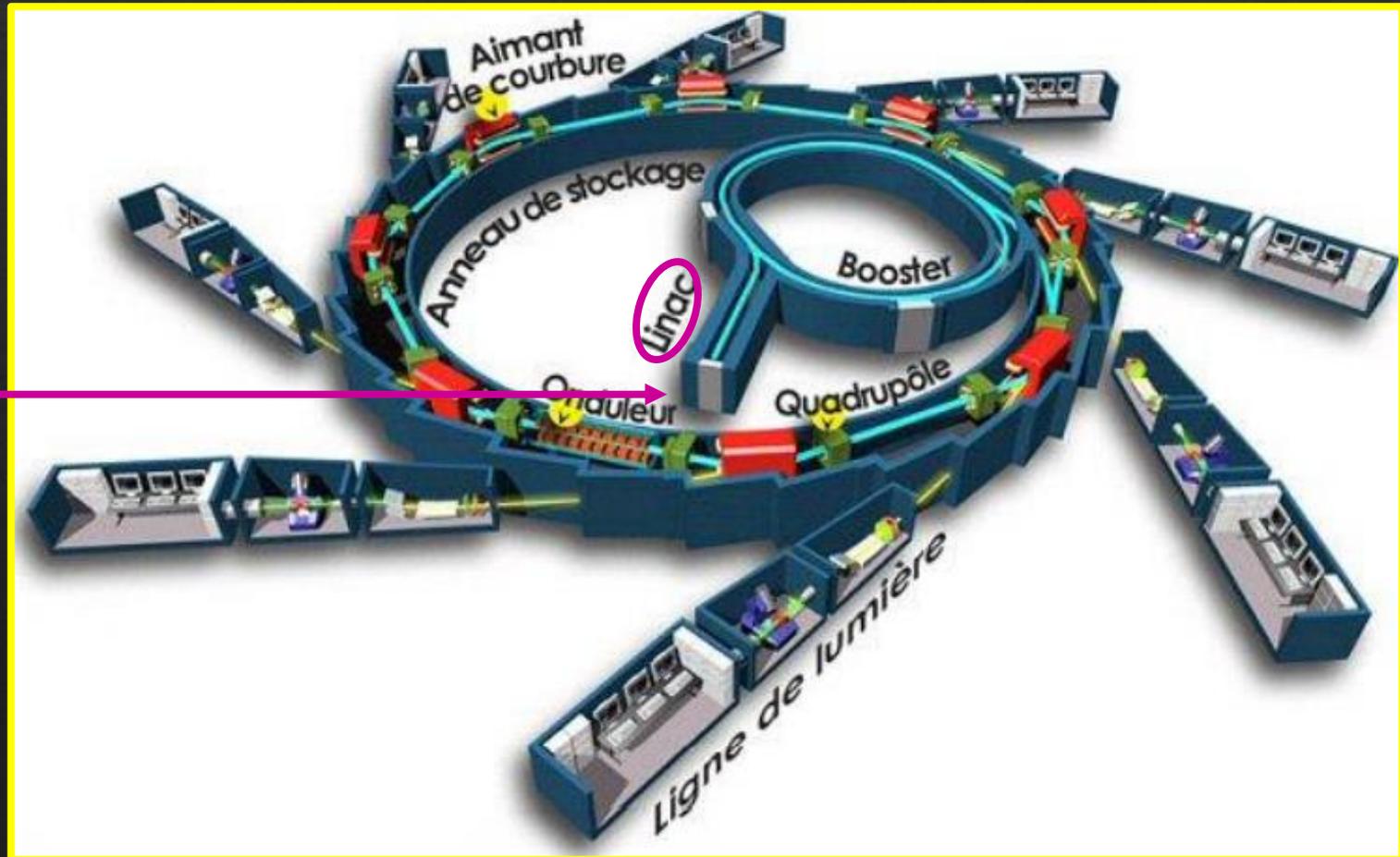


Fig 8 : Schéma du principe de fonctionnement d'un synchrotron

II- Description de l'appareillage

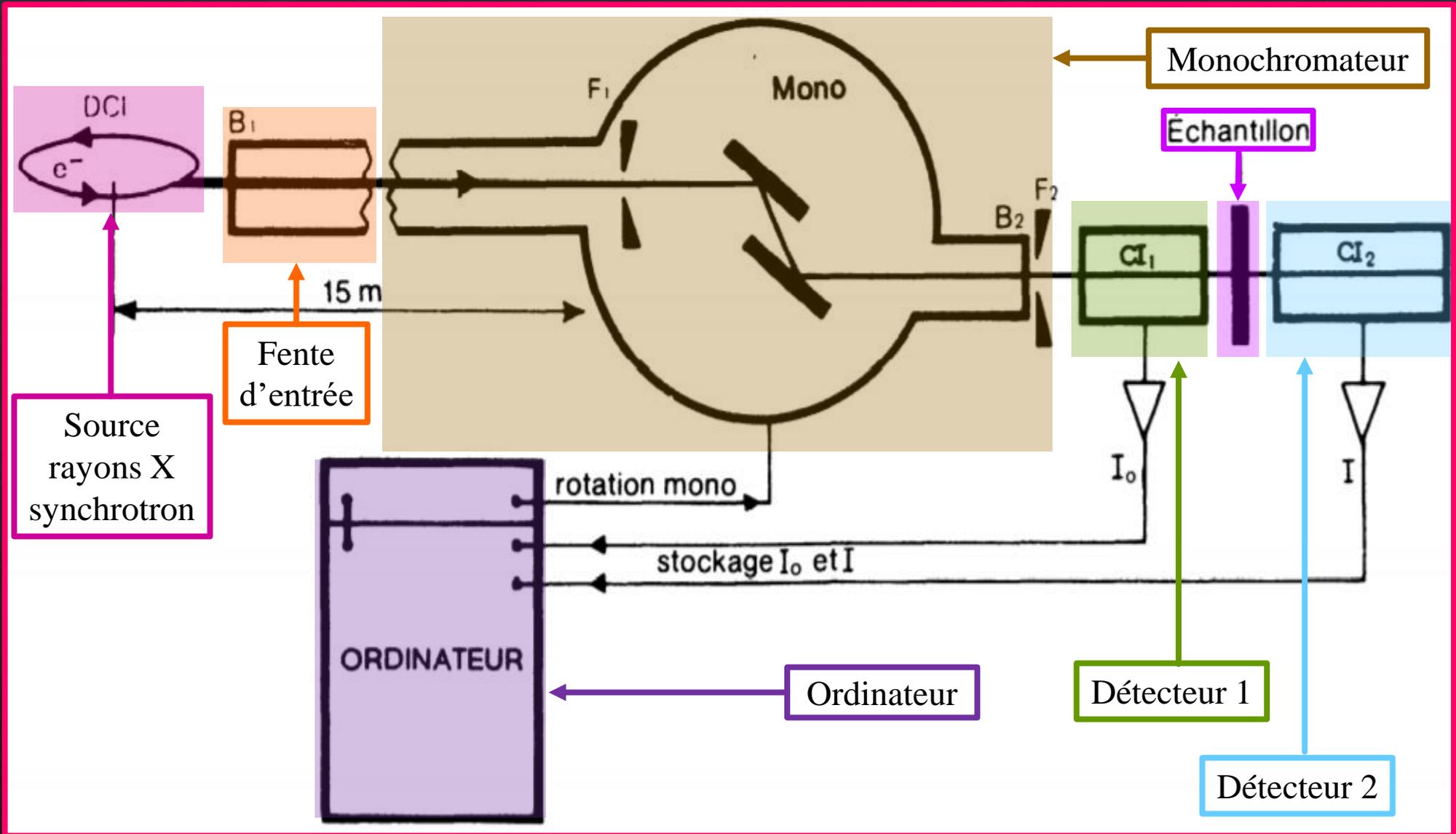
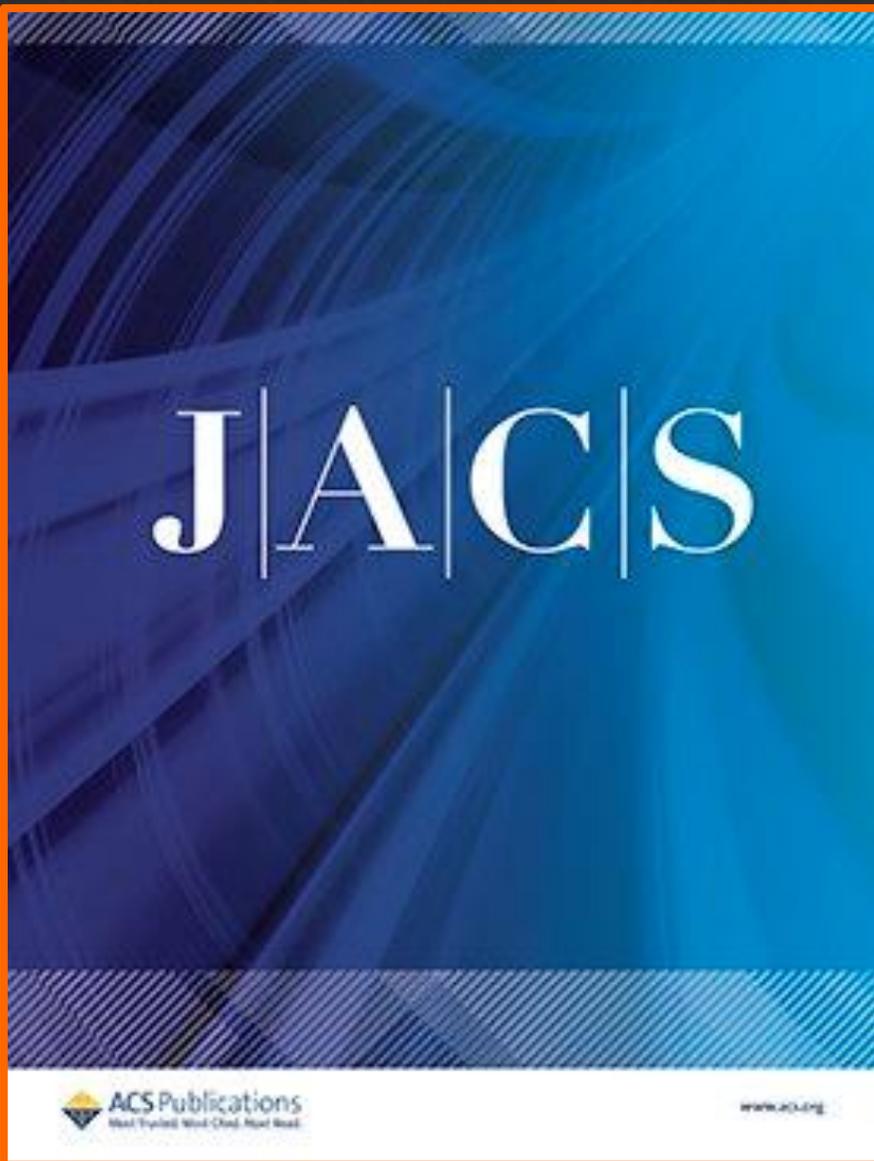


Fig 9 : Schéma du principe d'une mesure par spectroscopie EXAFS



Published on Web 02/22/2007

Identification of a Mo–Fe–S Cluster on NifEN by Mo K-Edge Extended X-ray Absorption Fine Structure

Simon J. George,[†] Robert Y. Igarashi,[‡] Cinthia Piamonteze,[†] Basem Soboh,[‡]
Stephen P. Cramer,^{†,§} and Luis M. Rubio^{*,‡}

Department of Plant and Microbial Biology, University of California—Berkeley, 111 Koshland Hall, Berkeley, California 94720, Advanced Biological and Environmental X-ray Facility, Lawrence Berkeley National Laboratory, 1 Cyclotron Road, Berkeley, California 94720, and Department of Applied Science, University of California—Davis, Davis, California 95616

Received August 31, 2006; E-mail: lrubio@nature.berkeley.edu

Référence bibliographique :

GEORGE, Simon J., IGARASHI, Robert Y., PIAMONTEZE, Cinthia, *et al.* Identification of a Mo– Fe– S Cluster on NifEN by Mo K-Edge Extended X-ray Absorption Fine Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, vol. 129, no 11, p. 3060-3061.

Présentation

The iron–molybdenum cofactor (FeMo-co) is the complex metal–sulfur cofactor found within the active site of the molybdenum–iron protein (MoFe protein) component of the nitrogenase enzyme complex.¹ FeMo-co is among the most complex metal–sulfur cofactors known in biology and is composed of 7 Fe, 9 S, Mo, X (C, N, or O) and *R*-homocitrate.² This cofactor is required

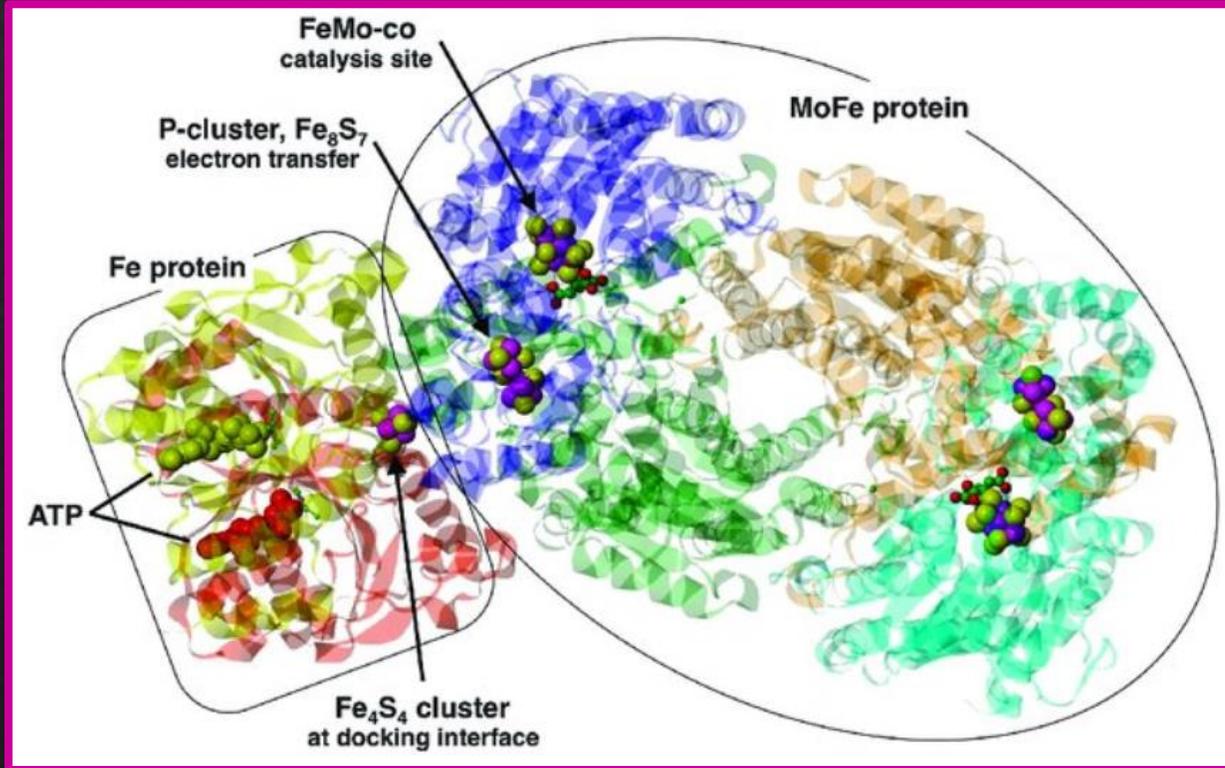


Fig 10 : Structure de la nitrogénase à Mo d'Azotobacter vinelandii

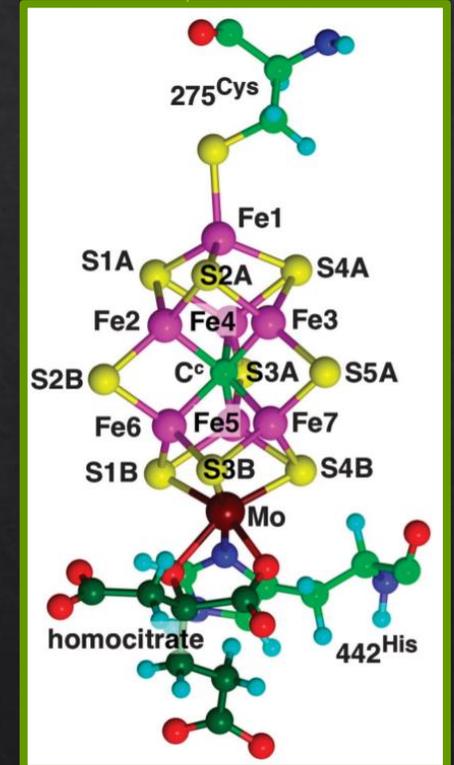


Fig 11 : Structure détaillée du site catalytique FeMo-co



Intérêt d'étudier le site catalytique FeMo-co

III- Applications et limites de la technique en biologie : exemple issu d'un article scientifique

2. Contexte

But de l'article

NifB, NifEN = essentiels
pour la biosynthèse de
FeMo-co

NifB, NifEN, and the nitrogenase Fe protein (NifH) are minimally essential for the biosynthesis of FeMo-co, and novel enzymatic reactions for assembling and modifying Fe-S clusters are hypothesized for NifB and NifEN. NifB, a member of the "SAM-radical enzyme" family,⁴ has recently been isolated and used to start the assembly of FeMo-co in vitro using Fe²⁺ and S²⁻ as its initial substrates.⁵ NifB catalyzes the formation of NifB-co, an isolable low-molecular-weight intermediate of the FeMo-co biosynthesis pathway that is hypothesized to provide the majority of the Fe and S atoms of FeMo-co, but not Mo.⁶ In experiments using

NifB catalyse la formation, de NifB-co

As mentioned above, the combined action of NifEN and NifH have been shown to be required for conversion of NifB-co into FeMo-co. The mechanism of this conversion that occurs within the NifEN protein is largely unknown. Among the key questions

the NifEN protein is largely unknown. Among the key questions are (i) what are the structures of the Fe-S and Mo substrates? (ii) how many and what types of metal clusters are present on NifEN? (iii) how do the substrates interact with the pre-existing clusters?

Objectifs de l'article :

- ✓ Quels types de clusters métalliques sont présents sur le NifEN ?
- ✓ Comment est-il alors possible de synthétiser le FeMo-co à partir de NifB-co.

III- Applications et limites de la technique en biologie : exemple issu d'un article scientifique

Expériences

is suitable for in vitro FeMo-co synthesis. In this study, the ligand environment of the Mo bound on the as purified NifEN is examined by Mo K-edge X-ray absorption spectroscopy (XAS).

Analyse de l'environnement des ligands situés autour du Mo lié sur le NifEN purifié par spectroscopie d'absorption des rayons X du bord K du Mo (EXAFS).

Résultats obtenus

- ❑ Présence d'un groupe $[\text{MoFe}_3\text{S}^{3+X}]$ dans le NifEN distinct du groupement $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$.
- ❑ Les sites Mo dans le NifEN et la protéine MoFe présentent des états d'oxydation similaires mais des champs de ligands significativement différents.

3. Expériences réalisées et résultats obtenus

Conclusion

- ❑ Le complexe protéique NifEN sert de structure moléculaire où se déroulent certaines des étapes de l'assemblage du cofacteur fer-molybdène (FeMo-co) de la nitrogénase.
- ❑ Les EXAFS effectués sur le NifEN purifié montrent que le Mo lié au NifEN fait partie d'un environnement de ligand $[\text{MoFe}_3\text{S}^{3+X}]$.
- ❑ C'est la présence d'un groupe de $[\text{MoFe}_3\text{S}^{3+X}]$ dans le NifEN qui est impliqué dans la synthèse du FeMo-co. Ce groupement pourrait bien agir comme donneur de Mo pour le précurseur FeMo-co dérivé du NifB-co.

IV. Technique complémentaire : spectroscopie XANES

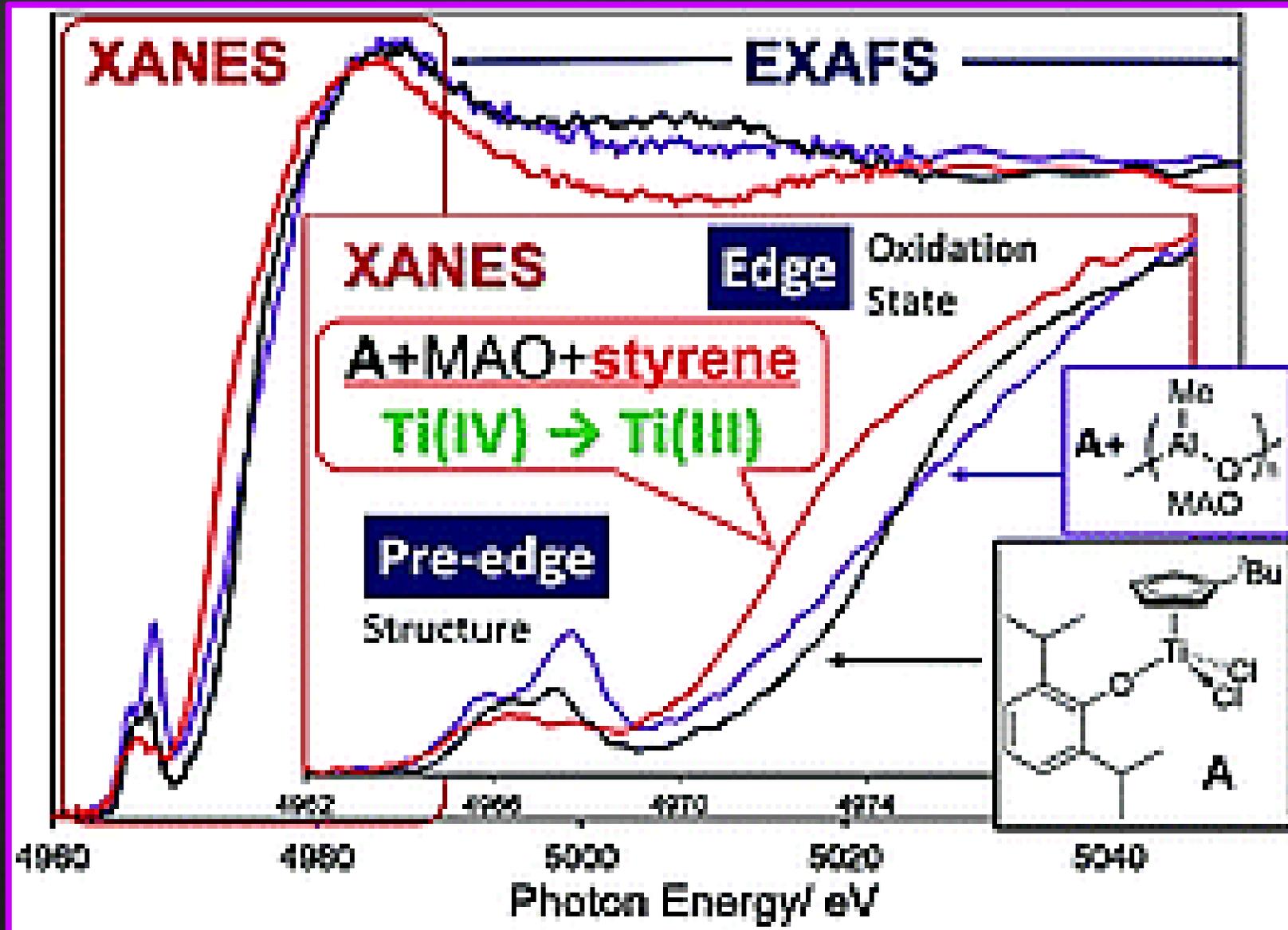
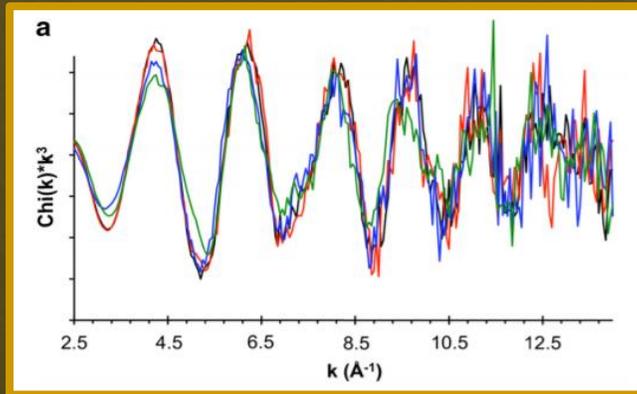
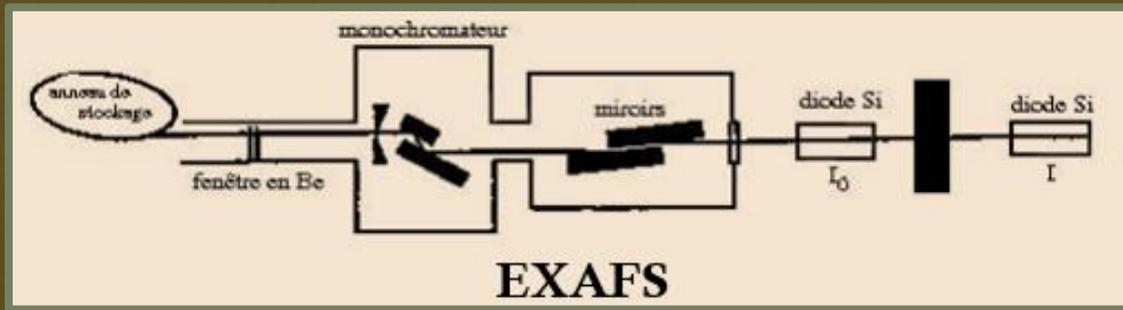
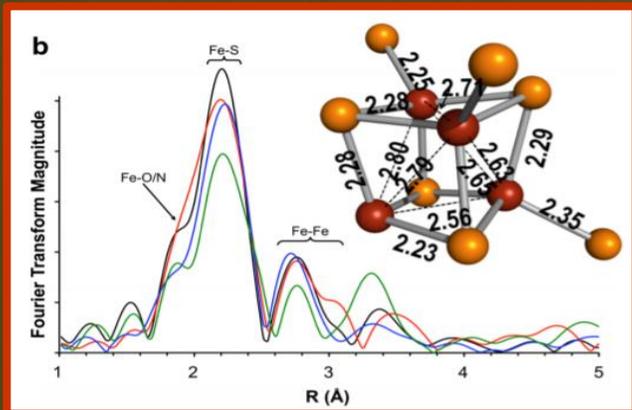


Fig 12 : Représentation d'un spectre obtenu par spectroscopie d'absorption des rayons X

V. Conclusion

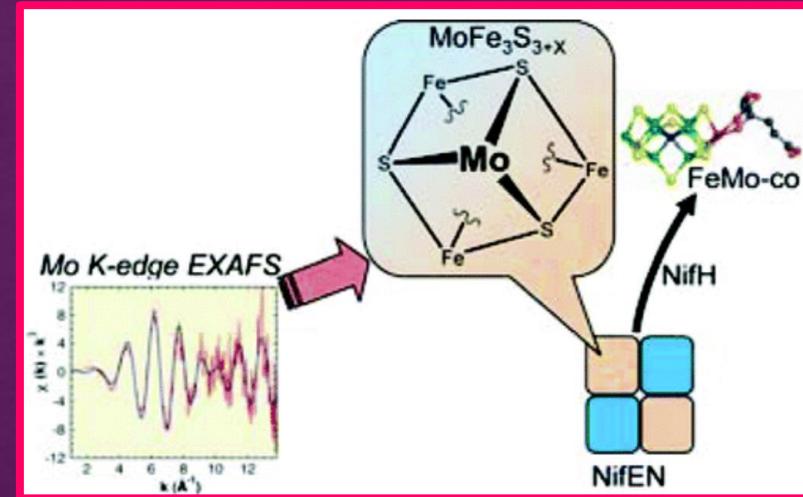


(a) Exemples de spectres EXAFS

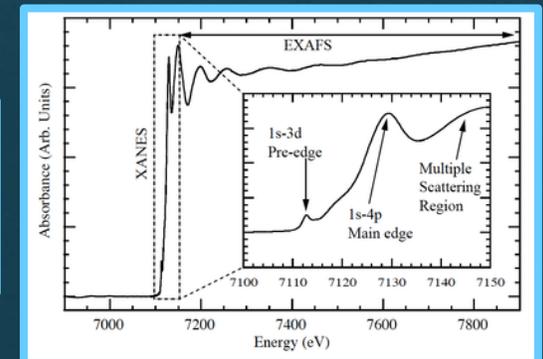


(b) Transformée de Fourier des spectres EXAFS présentés en a.

APPLICATION DE LA MÉTHODE EXAFS DANS LE DOMAINE BIOLOGIQUE



MÉTHODE COMPLÉMENTAIRE : spectroscopie XANES



Merci pour votre attention !

Bibliographie

- [1] ERICSON, Agneta, HEDMAN, Britt, HODGSON, Keith O., *et al.* Structural characterization by EXAFS spectroscopy of the binuclear iron center in protein A of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of the American Chemical Society*, 1988, vol. 110, no 7, p. 2330-2332.
- [2] GEORGE, Simon J., HERNANDEZ, Jose A., JIMENEZ-VICENTE, Emilio, *et al.* EXAFS reveals two Mo environments in the nitrogenase iron–molybdenum cofactor biosynthetic protein NifQ. *Chemical communications*, 2016, vol. 52, no 79, p. 11811-11814.
- [3] <http://doxa.u-pec.fr/theses/th0211095-4-Chapitre2.pdf>
- [4] <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/CRG/BM30B/Sub-Systems/XAS-Station/EXAFS/EXAFS.html>
- [5] KONINGSBERGER, D. C. et PRINS, Roelof. X-ray absorption : principles, applications, techniques of EXAFS, SEXAFS, and XANES. 1988.
- [6] RAOUX, D., PETIAU, J., BONDOT, P., *et al.* Effet Mössbauer et techniques complémentaires : III.—L'EXAFS appliqué aux déterminations structurales de milieux désordonnés. 1980.
- [7] SCARROW, Robert C., MARONEY, Michael J., PALMER, Sharon M., *et al.* EXAFS studies of binuclear iron proteins: hemerythrin and ribonucleotide reductase. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, vol. 109, no 25, p. 7857-7864.
- [8] TEO, Boon K. *EXAFS : basic principles and data analysis*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [9] TEO, Boon-Keng. Extended x-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy : techniques and applications. In : *EXAFS Spectroscopy*. Springer, Boston, MA, 1981. p. 13-58.
- [10] YI, Jun, NAKATANI, Naoki, et NOMURA, Kotohiro. Solution XANES and EXAFS analysis of active species of titanium, vanadium complex catalysts in ethylene polymerisation/dimerisation and syndiospecific styrene polymerisation. *Dalton Transactions*, 2020.