

BIOCHIMIE 1

Les méthodes de séparation et d'analyses des macromolécules biologiques *Chromatographies & Electrophorèses*

Marc de Tapia
detapia@unistra.fr

Chromatographies



Mikhail Tswett invente le terme de chromatographie (« khrôma » couleur et « graphô » écrire). Il utilise des colonnes d'adsorption pour séparer des pigments de plantes (tswett est le mot russe pour « couleur »)

1931

Edgar Lederer introduit la chromatographie comme instrument d'analyse. Il isole bon nombre de substances et détermine leur structure chimique et leur activité biologique.



Archer Martin et Richard Synge reçoivent le prix Nobel de chimie pour leur invention de la chromatographie de partage

1970-80

Les premières HPLC font leurs apparitions (utilisation de pompe pour augmenter le débit d'élution)

Séparation des molécules par leurs différences d'interactions avec une phase fixe et une phase mobile

La phase fixe :

Points communs :

- utilisation d'un **support** (poudre très fine en grains, ou solide percé de canalicules → surface importante)
- il se crée des **interactions physiques** entre les particules du support et la substance à analyser (van der Waals, polaires).

La phase mobile :

Points communs :

- le **solvant** doit solubiliser la substance à séparer et doit circuler entre les particules du support ou les microcanalicules
- il se crée des **interactions physiques** entre le **solvant** et la substance à analyser (van der Waals, polaires).

Les chromatographies

utilisent les propriétés globales d'interactions des protéines

- encombrements et tailles

Chromatographie Exclusion-diffusion

- interactions spécifiques avec un ligand

Chromatographie d'affinité

utilisent les propriétés d'interactions des acides aminés

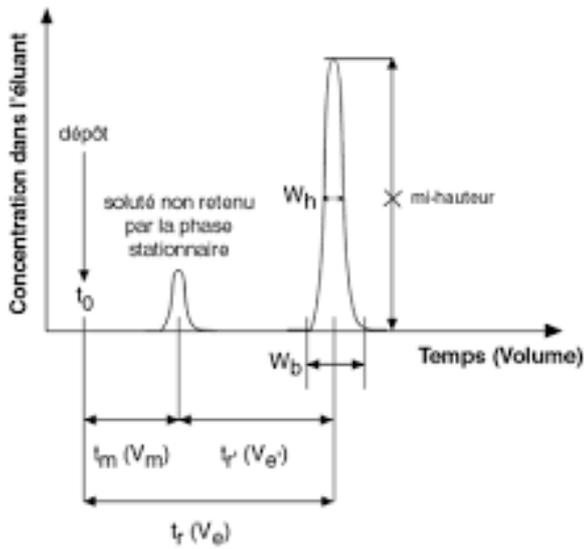
- propriétés ioniques

Chromatographie Echangeuse d'ions

- propriétés hydrophobes/hydrophyles

Chromatographie Phase inverse

Courbe d'élution type



t_0 : début de l'injection

V_m : volume mort de la colonne

t_m : temps mort

V_e : volume d'élution d'un composé

t_e (ou t_r) : temps de rétention d'un composé

V_e' : volume d'élution réduit

($V_e = V_e' + V_m$)

t_r' : temps de rétention réduit

($t_r = t_r' + t_m$)

W_b : largeur du pic à la base

W_h : largeur du pic à mi-hauteur

V_e (volume d'élution) = d (débit) x t (temps)

Les principaux paramètres d'une chromatographie

Vitesse de déplacement des solutés

Facteurs de capacité

Efficacité d'une colonne

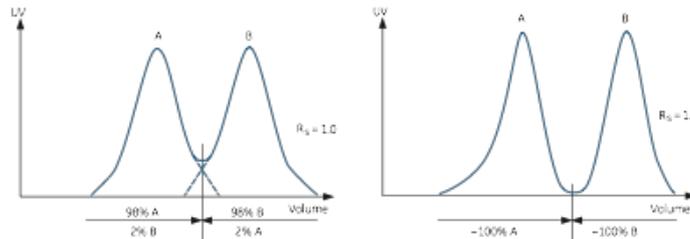
Résolution d'une colonne

L'efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne dépend du degré d'élargissement du pic qui se produit au fur et à mesure de l'élution (effet de dilution du dépôt par diffusion). Cet élargissement dépend de la distribution de la substance dans les deux phases.

t_R grand \Rightarrow pics larges

t_R petit \Rightarrow pics fins



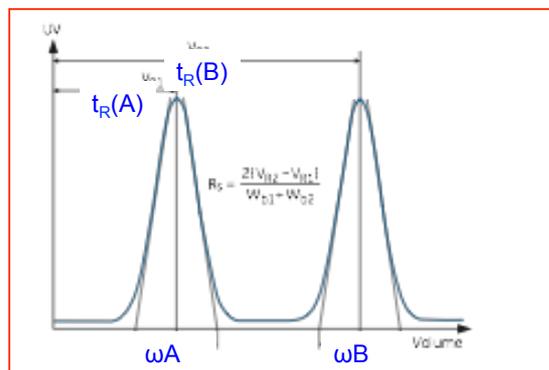
La hauteur L d'une colonne définit un nombre de plateau théorique N (nombre de séparations théoriques) ayant chacun une hauteur H (hauteur de colonne qu'occupe chaque soluté).

L'élargissement du pic est minimisé en réduisant la granulométrie du support, le compactage et le diamètre de la colonne.

La résolution d'une colonne

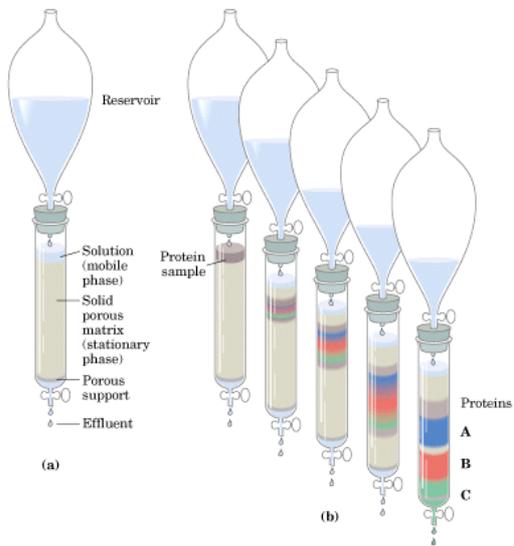
La résolution R_S est la mesure quantitative de la capacité à séparer deux substances A et B.

$$R_S = 2 \frac{t_R(B) - t_R(A)}{\omega_B + \omega_A}$$

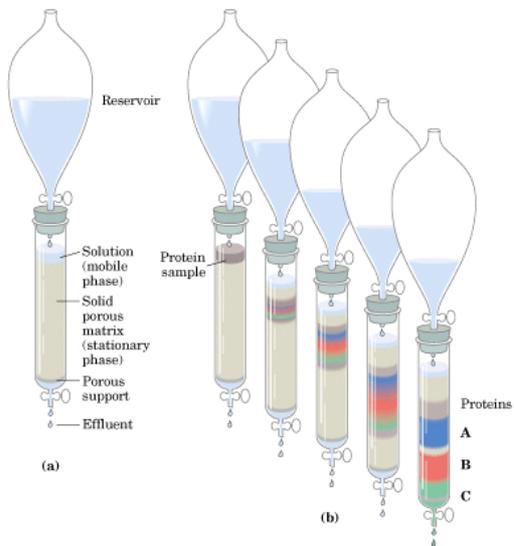


(ω est la largeur de la base du pic)

- Si $R_S > 1,5$: Séparation complète de A et B
- Si $R_S = 1,5$: Séparation incomplète de A et B
- Si $R_S < 1,5$: A et B mal séparés



- L'élargissement de la bande de protéine dans la phase mobile est due aux différentes propriétés d'interaction et de diffusion des protéines. La résolution augmente avec la longueur de la colonne.



- L'élargissement de la bande de protéine dans la phase mobile est due par les différentes propriétés d'interaction et de diffusion des protéines. La résolution augmente avec la longueur de la colonne.
- La résolution décroît avec les phénomènes de diffusion. Ces derniers peuvent être atténués par le débit et la vitesse de la phase mobile.

Les différentes chromatographies

Chromatographie Exclusion-diffusion

(encombrements et tailles)

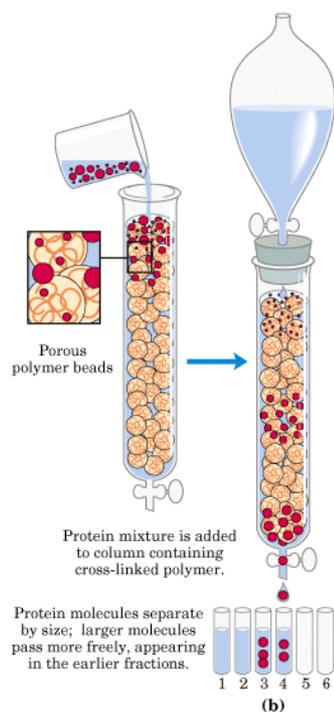
Chromatographie Echangeuse d'ions

(propriétés ioniques)

Chromatographie d'affinité

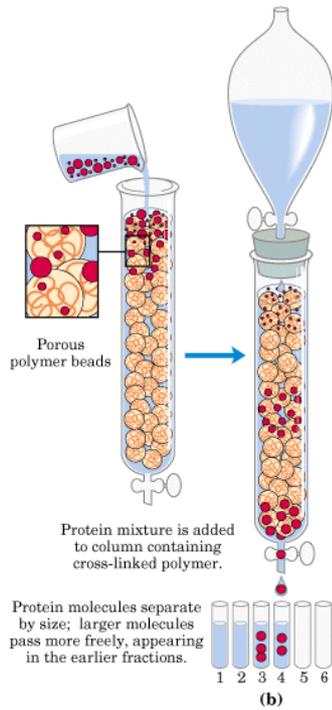
(interactions spécifiques avec un ligand)

Chromatographie d'exclusion-diffusion (tamis moléculaire)



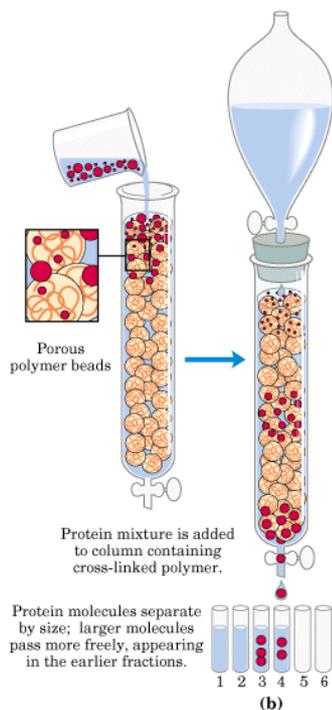
- Aussi appelé gel filtration: Support de polymères glucidiques (dextran) liés par de l'agarose réalisant des pores de tailles définies.

Chromatographie d'exclusion-diffusion (tamis moléculaire)

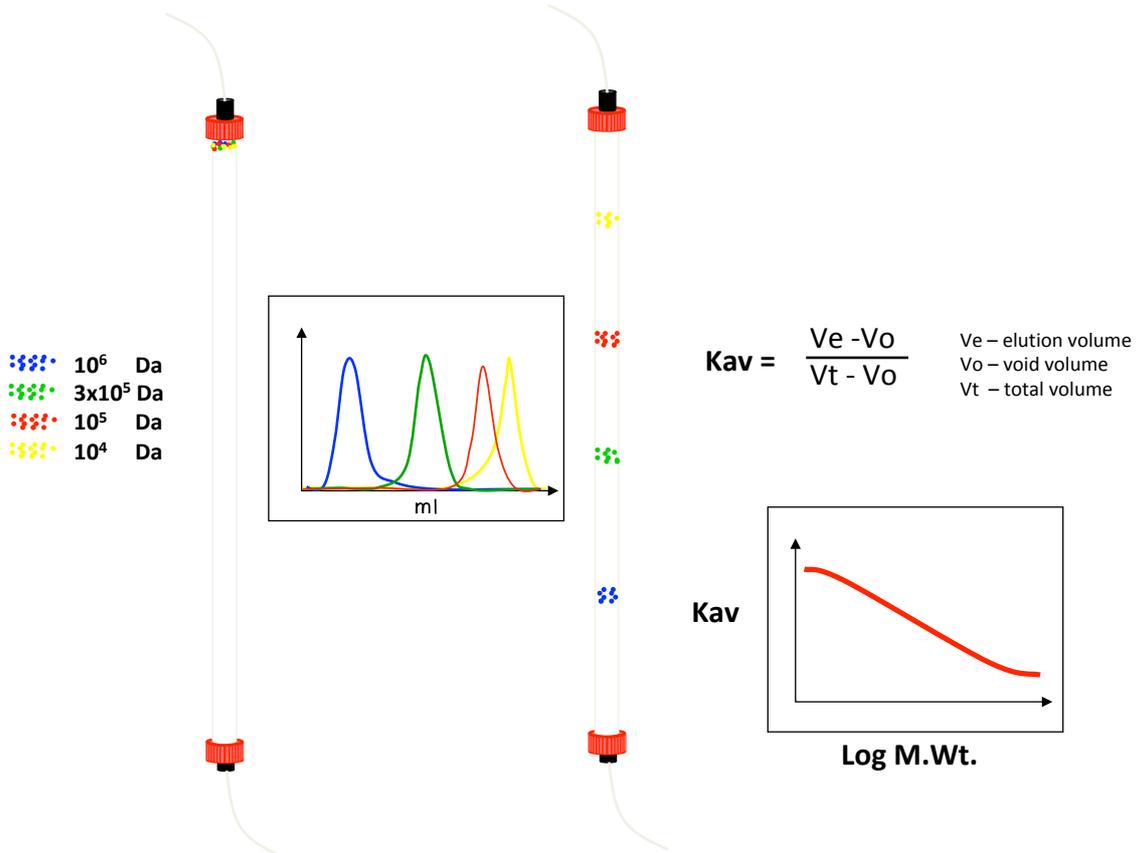
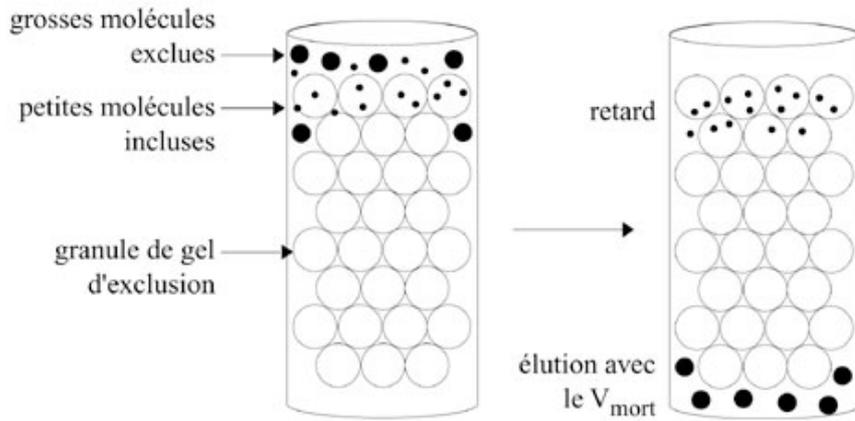
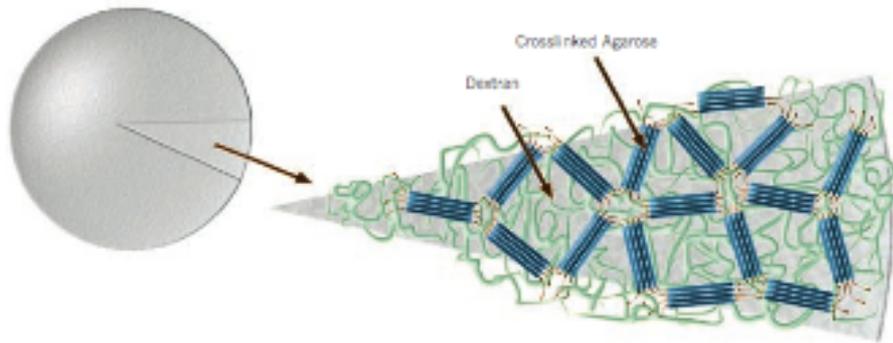


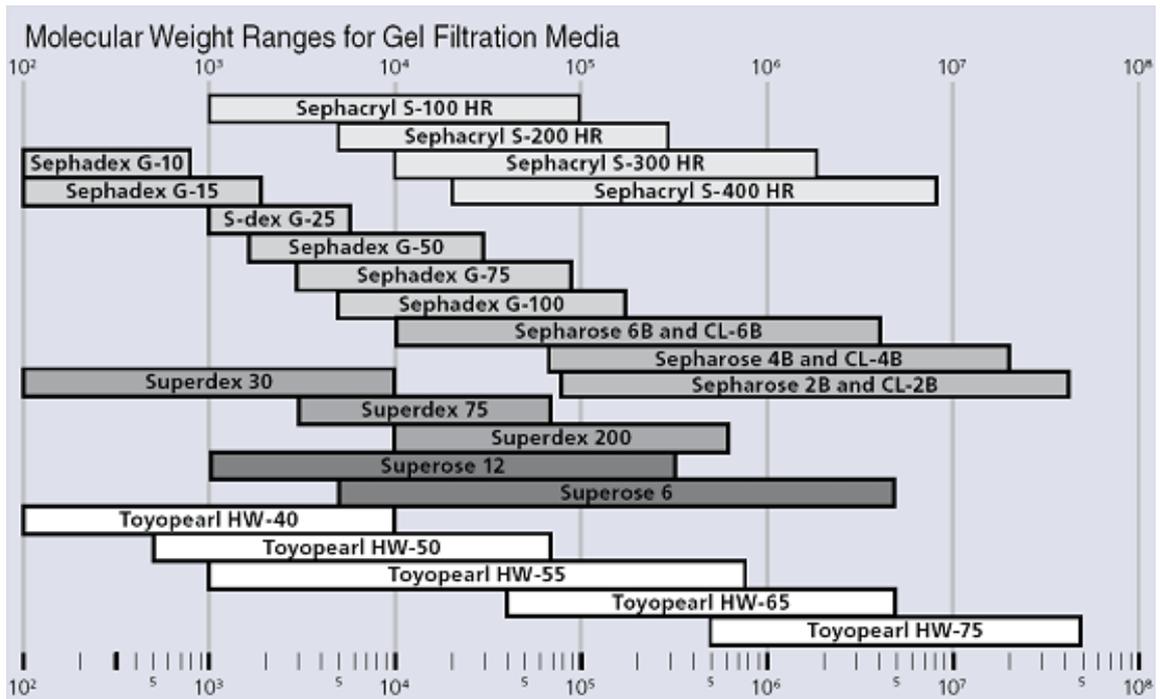
- Aussi appelé gel filtration: Support de polymères glucidiques (dextran) liés par de l'agarose réalisant des pores de tailles définies.
- Les protéines de grandes tailles migrent rapidement car elles sont exclues des pores alors que les protéines de petites tailles pénètrent les pores du support migrent lentement.

Chromatographie d'exclusion-diffusion (tamis moléculaire)



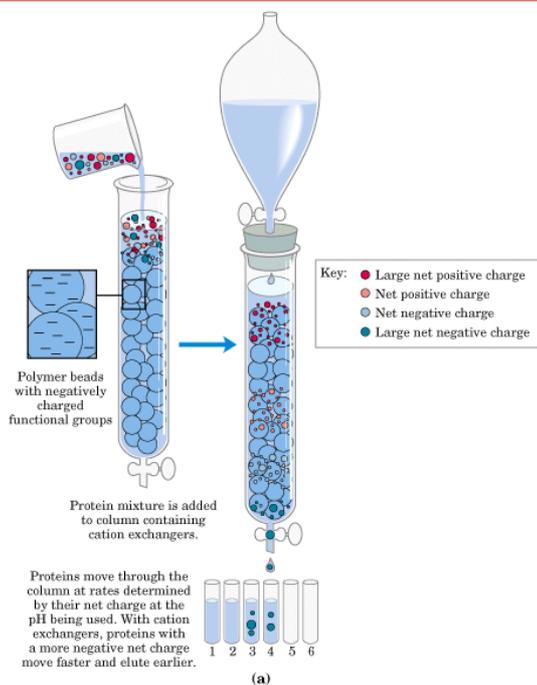
- Aussi appelé gel filtration: Support de polymères glucidiques (dextran) liés par de l'agarose réalisant des pores de tailles définies.
- Les protéines de grandes tailles migrent rapidement car elles sont exclues des pores alors que les protéines de petites tailles pénètrent les pores du support migrent lentement.
- La séparation est fonction du volume de la protéine (rayon de Stokes) et de sa capacité à utiliser le volume des pores.





Chromatographie échangeuse d'ions

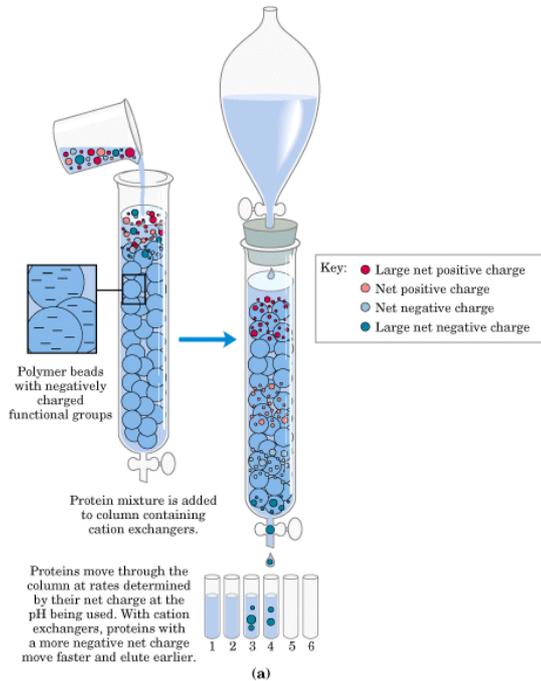
Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution



- Echangeurs de **Cations**: polymères chargés négativement
- Echangeurs **d'Anions**: polymères chargés positivement

Chromatographie échangeuse d'ions

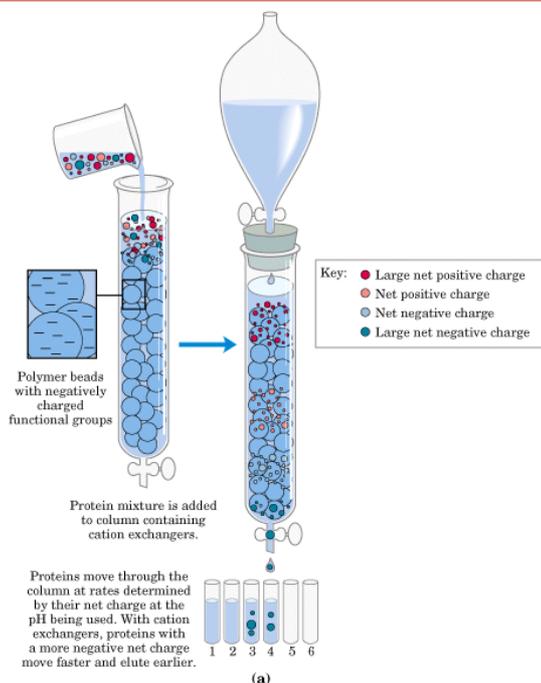
Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution



- Echangeurs de **Cations**: polymères chargés négativement
Echangeurs **d'Anions**: polymères chargés positivement
- **L'élu**tion consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de charge et de concentration plus élevée. On utilise de petits ions fortement chargés : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ... ou par variation de pH afin d'éliminer les interactions ioniques.

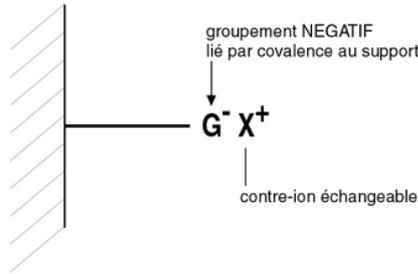
Chromatographie échangeuse d'ions

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution



- Echangeurs de **Cations**: polymères chargés négativement
Echangeurs **d'Anions**: polymères chargés positivement
- **L'élu**tion consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de charge et de concentration plus élevée. On utilise de petits ions fortement chargés : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ... ou par variation de pH afin d'éliminer les interactions ioniques.
- La **Capacité** de rétention d'un échangeur d'ions est le nombre de millimoles (mmol) d'ions que la résine peut échanger par gramme de résine sèche.

Résine échangeuse de cations (cationique) :



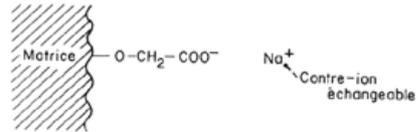
Résine cationique forte (acide / sodique):

Sulfonique: Résine-SO₃⁻ / H⁺ ou Na⁺

- le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :

Résine cationique intermédiaire:

groupe ment phospho : Résine-H₂PO₄⁻ / H⁺ ou Na⁺



Résine cationique faible:

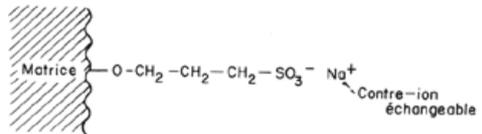
groupe ment carboxylique: Résine-COO⁻ / H⁺ ou Na⁺

groupe ment carboxyméthyl : Résine-CH₂-COO⁻ / H⁺ ou Na⁺

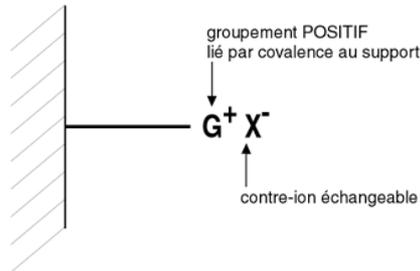
- le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :

Résine cationique très faible:

phénolique : Résine-O⁻ / H⁺ ou Na⁺



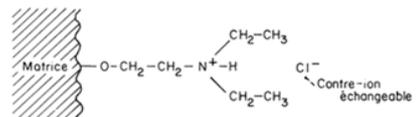
Résine échangeuse d'anions (anionique) :



Résines anioniques faibles:

résines à groupements aminés secondaires et primaires.

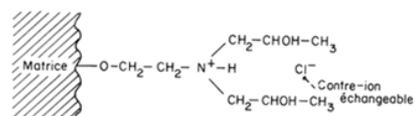
- le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :



Résines anioniques fortes:

- résines à groupements aminés quaternaires.
- résines à groupements aminés tertiaires.

- le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :



Elution par compétition

L'ordre d'efficacité croissant des contre-ions pour les résines échangeuses de cations est le suivant :

- cations monovalents : $\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+$
- cations divalents : $\text{Cd}_2^+ < \text{Mn}_2^+ < \text{Mg}_2^+ < \text{Zn}_2^+ < \text{Cu}_2^+ < \text{Ca}_2^+$
- l'efficacité augmente avec la charge : $\text{K}^+ < \text{Ca}_2^+ < \text{Al}_3^+$

Elution par variation de pH

Considérons une protéine de $\text{pI} = 5$:

- si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est inférieur au pI de la protéine

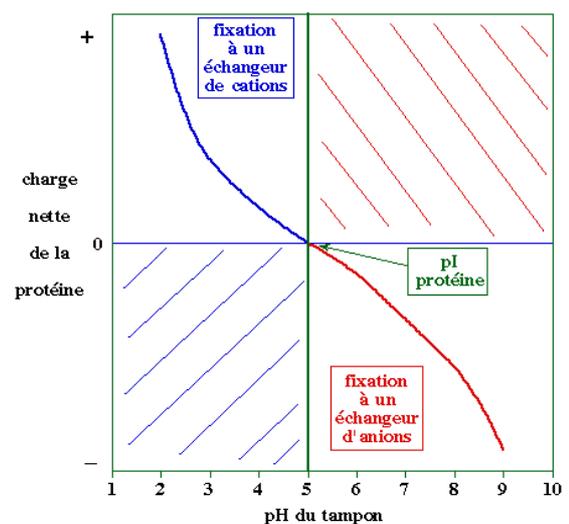
La protéine est chargée positivement (zone bleue)

=> il faut utiliser un échangeur de cations

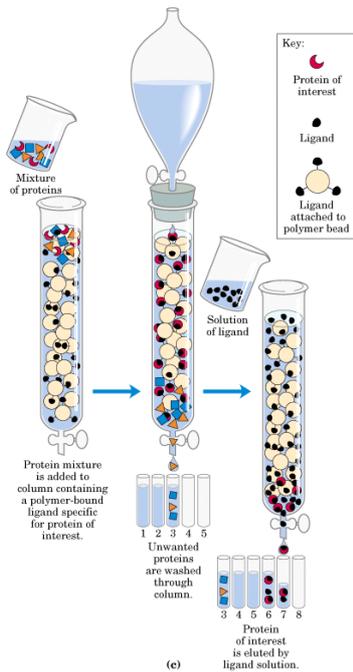
- si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est supérieur au pI de la protéine

La protéine est chargée négativement (zone rouge)

=> il faut utiliser un échangeur d'anions.

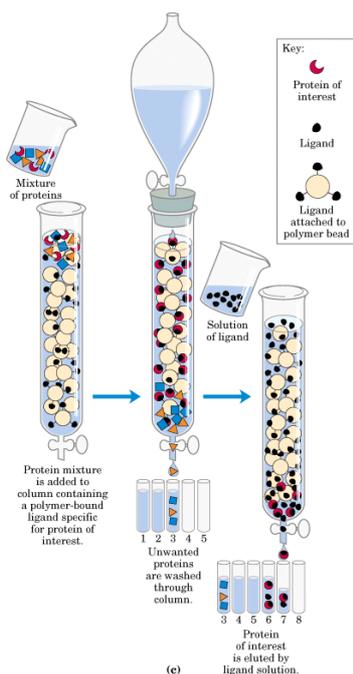


Chromatographie d'affinité



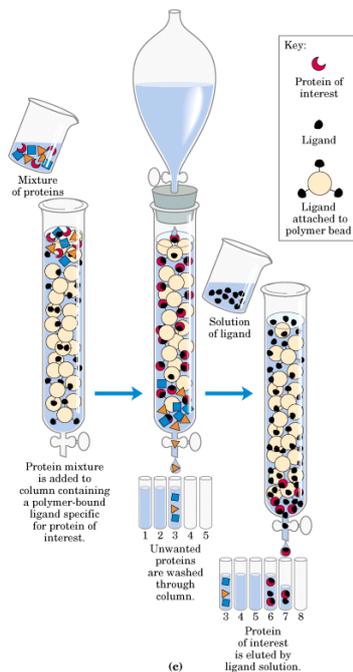
- La séparation des protéines est basée sur les interactions spécifiques. Les protéines n'ayant pas d'affinité pour le ligand sont éliminées lors du lavage.

Chromatographie d'affinité



- La séparation des protéines est basée sur les interactions spécifiques. Les protéines n'ayant pas d'affinité pour le ligand sont éliminées lors du lavage.
- Le ligand est fixé sur un support inerte.

Chromatographie d'affinité

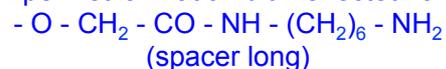


- La séparation des protéines est basée sur les interactions spécifiques. Les protéines n'ayant pas d'affinité pour le ligand sont éliminées lors du lavage.
- Le ligand est fixé sur un support inerte.
- L'éluion de la protéine fixée est réalisée soit par compétition, soit par variation de force ionique soit par variation du pH.

Le ligand est fixé par covalence au support inerte par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais) qui permet l'élimination des contraintes stériques.

Ce bras doit posséder une réactivité chimique aux deux extrémités

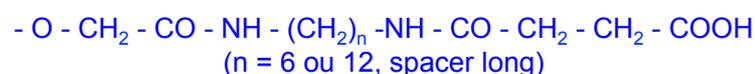
- bras aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle :

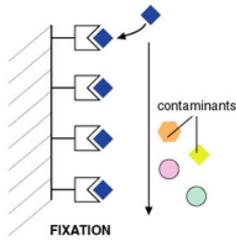


- bras hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle :

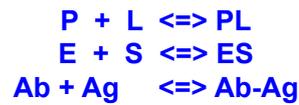


- bras aminohexylique (ou aminododécylique) succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction $-NH_2$ réactive :

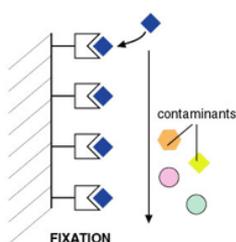
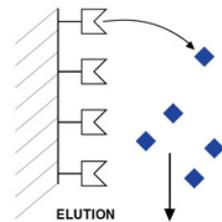
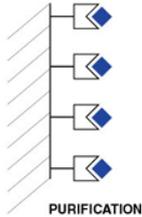




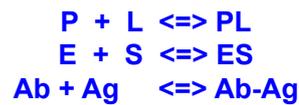
La fixation suit l'équilibre de formation du complexe



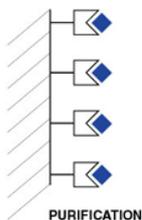
Constante d'équilibre $K_a = (P).(L) / (PL)$



La fixation suit l'équilibre de formation du complexe

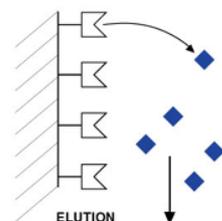


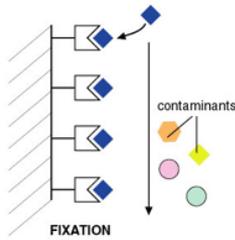
Constante d'équilibre $K_a = (P).(L) / (PL)$



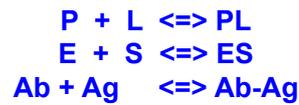
la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte (agarose - sépharose)

⇒ seule la molécule présentant une affinité forte est retenue
(utilisation de tampon de force ionique modérée, de détergents pour éliminer les interactions aspécifiques)

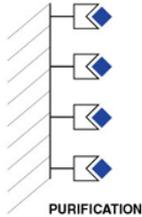




La fixation suit l'équilibre de formation du complexe

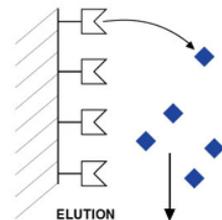


Constante d'équilibre $K_a = (P).(L) / (PL)$



la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte (agarose - sépharose)

⇒ seule la molécule présentant une affinité forte est retenue
(utilisation de tampon de force ionique modérée, de détergents pour éliminer les interactions aspécifiques)



L'élué est obtenu par déplacement de l'équilibre de liaison :

- * par le ligand libre en concentration élevée (GSH/GST-Ag)
- * par variation de pH (ProtéineA-Sépharose)
- * par variation de la force ionique

Electrophorèses

Poids moléculaire

pHi

Structure oligomérique



Carte d'identité d'une protéine

1959 => Davis et Raymond publient simultanément l'utilisation du PAG pour séparer les protéines

1970 => Laemmli publie la séparation des protéines du bactériophage Lamba par PAGE

=> O'Farrel : séparation de protéines sous formes de spots individuels par des Gels de polycacrylamide en deux dimensions pour les protéines

1^{ère} dimension = ISOELECTROFOCALISATION en fonction du pHi

2^{ème} dimension = CONDITIONS DISSOCIANTES en fonction du PM (SDS)

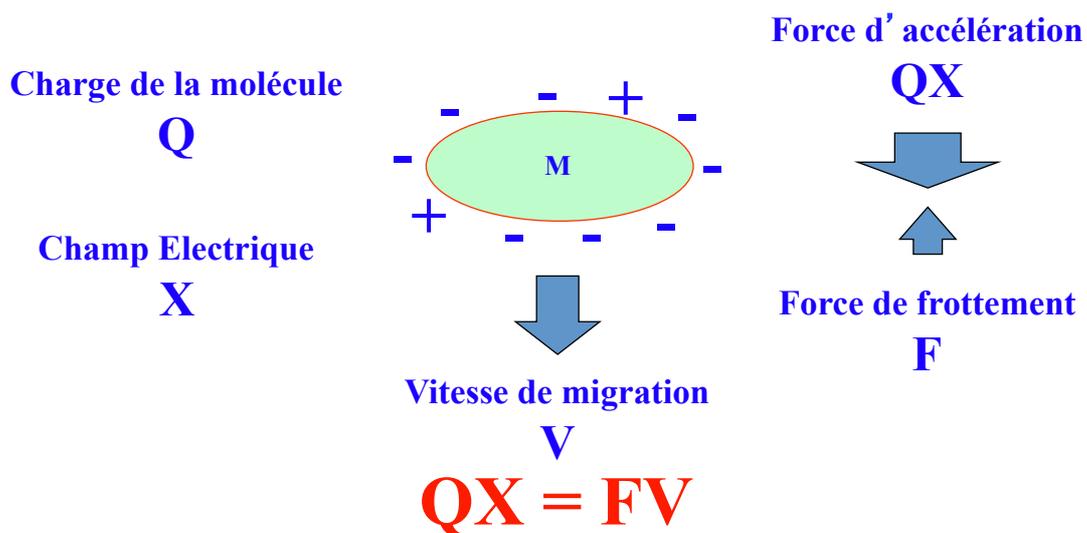
1977 => Klose : Application à des extraits cellulaires et à des tissus

1980 => Utilisations des ampholines (substances amphotères) : Stabilisation des gradients de pH (1^{ère} dimension) et amélioration de la reproductibilité

1995 => Développement de la PROTEOMIQUE = Analyse systématique des protéines présentes dans des tissus, cellules ou organes donnés à un moment donné du développement, d'un traitement, etc...

Principe général de l'électrophorèse

Migration de molécules chargés dans un champs électrique



F : fonction de la molécule (encombrement) et du milieu de migration (viscosité)

Les supports électrophorétiques

ACIDES NUCLEIQUES => AGAROSE et POLYCRYLAMIDE

PROTEINES => POLYACRYLAMIDE

Conditions d'électrophorèses et choix du critère de séparation

Electrophorèse native ou Non-Dissociantes basée sur l'encombrement:

la structure conformationnelle des macromolécules reste sous forme native
migration selon les charges intrinsèques des protéines (pH)

Electrophorèse dissociante basée sur la taille:

la structure conformationnelle des macromolécules est dénaturée
migration de protéines dénaturées en présence de dénaturant

Protéine : gels SDS (Charges ajoutées)

Acides nucléiques : gels Urée (Charges intrinsèques)

Isoélectrofocalisation basée sur le pI (dissociants ou non):

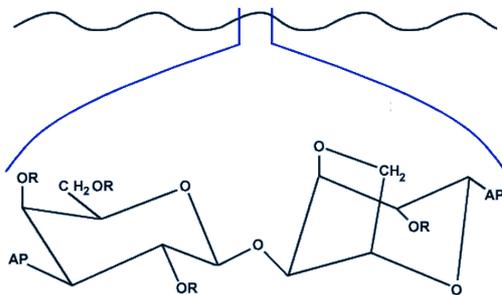
migration de protéines (dénaturées ou non) en fonction en présence de dénaturant

Electrophorèse bi-dimensionnelle (la protéomique):

migration de protéines selon une combinaison des critères de pI et de taille

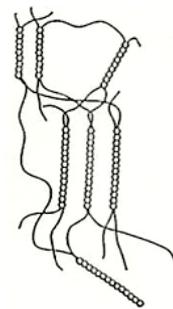
GELS D' AGAROSE

Une molécule d' agarose ~ 120 000 dalton



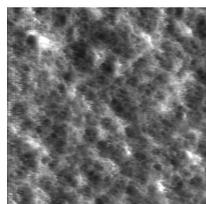
Chaînes d' agarose
chauffées

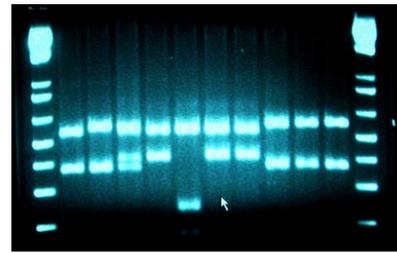
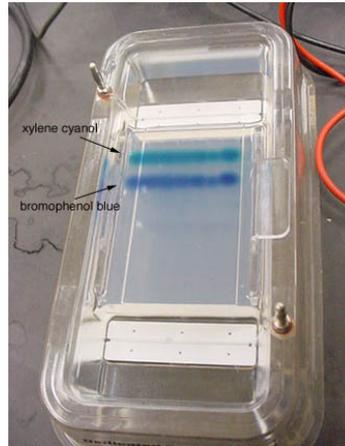
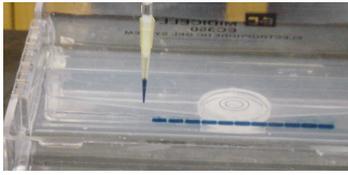
refroidissement



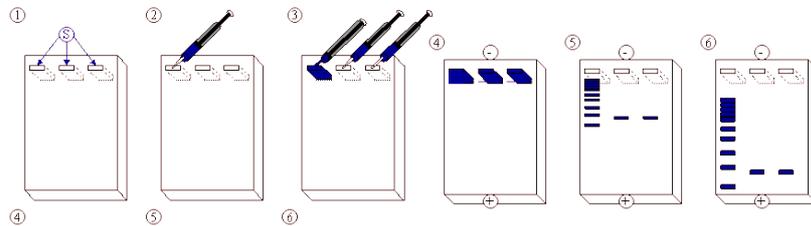
Régions en double hélice
Liées par des chaînes
Linéaires

Gel d' agarose vu en
microscopie électronique

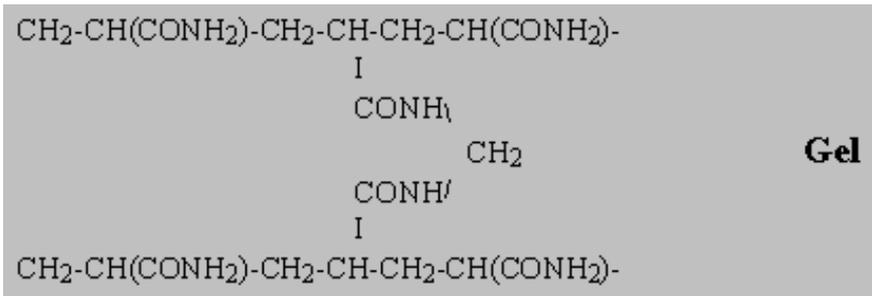




Les acides nucléiques sont visualisés sous UV grâce à un colorant phosphorescent le bromure d'éthidium qui s'intercale entre les plateaux de bases



GELS DE POLYACRYLAMIDE :



En faisant varier la concentration d'acrylamide et de méthylène (bis acrylamide), on obtient des mailles très différentes par polymérisation.

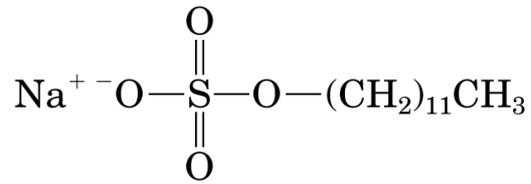
$\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH}_2$ acrylamide

$(\text{CH}_2=\text{CH-CONH})_2\text{CH}$ méthylène bis acrylamide

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Charge négative

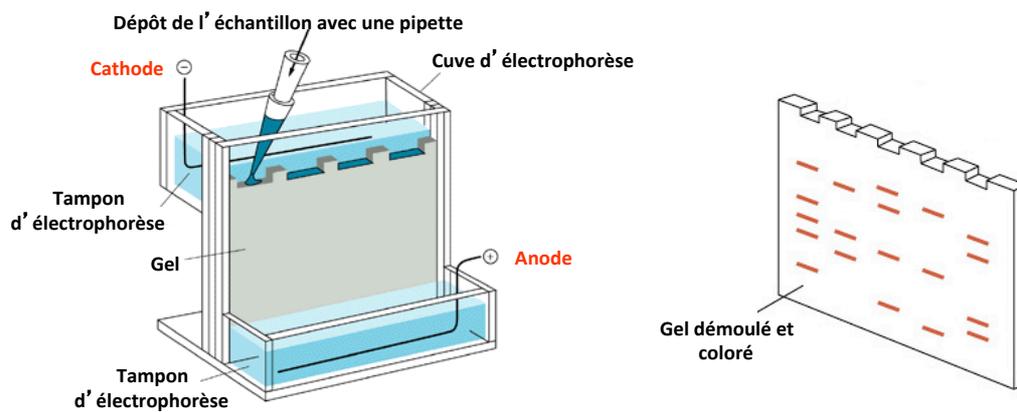
Chaîne carbonée hydrophobe



Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

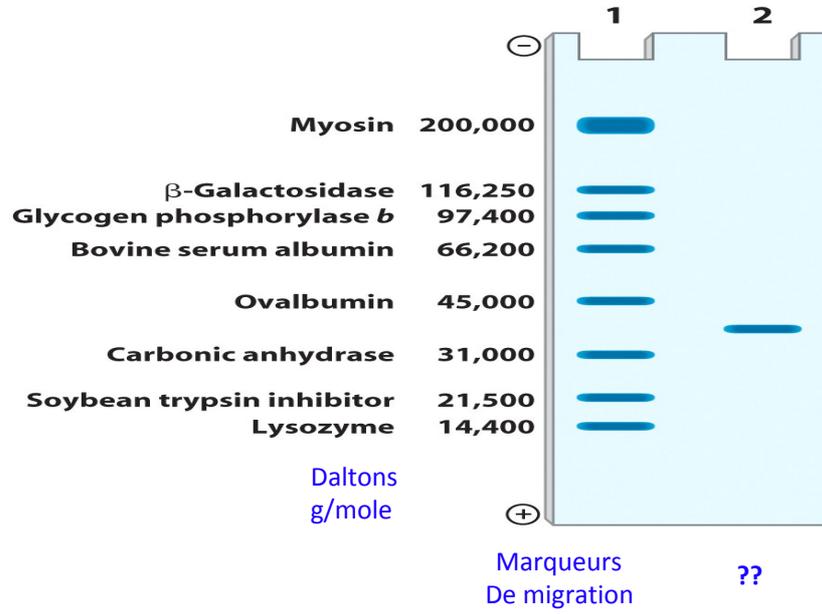
Le SDS se fixe à la plupart des protéines par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes à raison d'une molécule de SD pour 2 acides aminés.

=> Toutes les protéines ont un même rapport charge sur masse

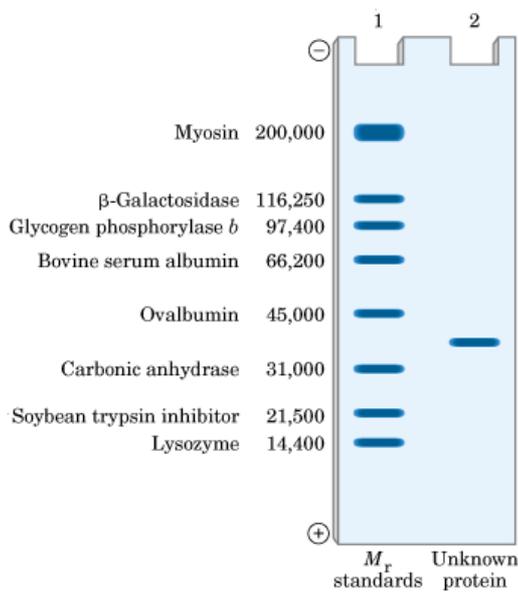


Migration de protéines dénaturées en présence de SDS
Protéines chargées négativement de façon uniforme

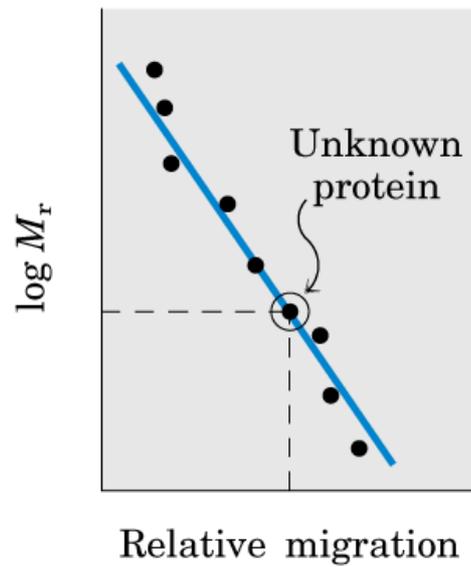
Migration en fonction de la taille
 ou poids moléculaire



Détermination du PM d'une protéine

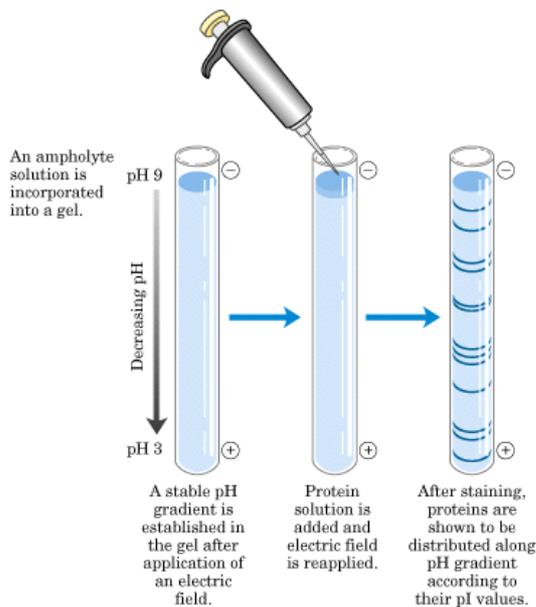


(a)



(b)

Isoelectrofocalisation



- A son pI; une protéine à une charge globale nette =0
- Un gradient de pH est établi par l'ajout de substances amphotères : les ampholytes.
- La protéines migrent tant que sa charge n'est pas nulle, c'est à dire à un pH égal au pI

IEF : IsoElectroFocalisation

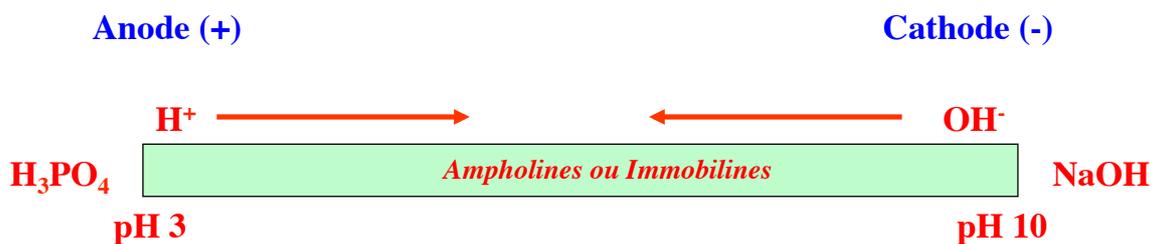
(Immobilisation des protéines et des ampholines à l'équilibre)

Ampholines : Molécules amphotères présentes dans le gel qui migreront entre les bornes de pH définies par les solutions d'électrophorèse

IPG : Immobilized PH Gradient

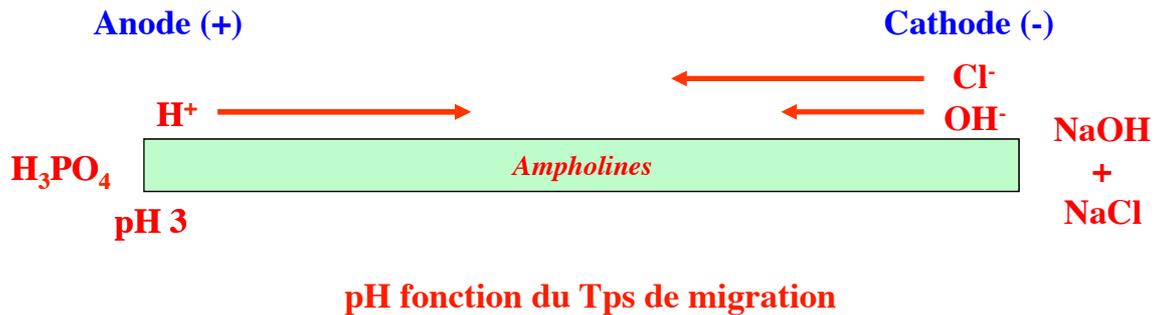
(Immobilisation des protéines dans un gradient de pH préformé)

Immobilines : Molécules identiques aux ampholines mais qui sont immobilisées dans le support électrophorétique définissant un gradient de pH fixe et stable

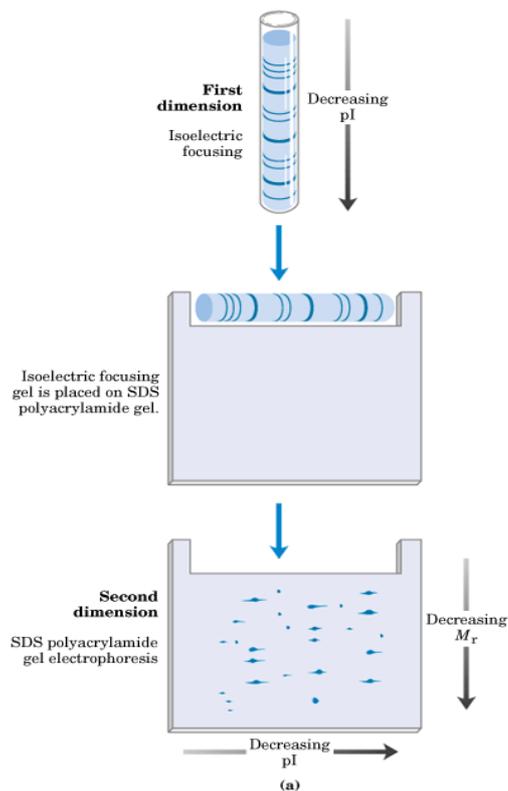


NEPHG : Non Equilibrium PH Gradient Electrophoresis
Migration des protéines et des ampholines sans atteinte de l'équilibre

*Le gradient de pH évolue au cours de la migration
 La molécule de pI donnée qui a atteint la partie du gel de pH = pI continue de migrer
 en suivant le pH*



Résultat d'une électrophorèse 2D



- Les protéines de même PM et de pI différents sont séparées horizontalement.
- Les protéines de même pI et de PM différents sont séparées verticalement

1995 - Le Protéome

PROTEine complement expressed by a genOME

*Le PROTEOME change en fonction
- du temps, du développement, des conditions extracellulaires, des conditions
intracellulaires, etc...*

*Identification de l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule,
d'un tissu ou d'un organe à un moment donné*

1997 - La Protéomique (P. James)

Identification des protéines dans l'ère post-génomique => Développement rapide de la protéomique



Description dynamique de la régulation des gènes
grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles

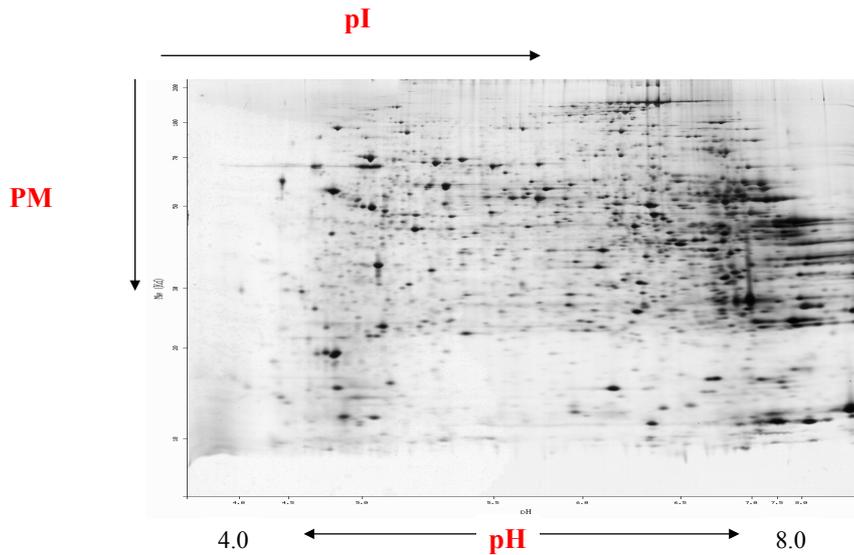
Electrophorèse
Bidimensionnelle

Spectrométrie
de Masse

Bio-Informatique



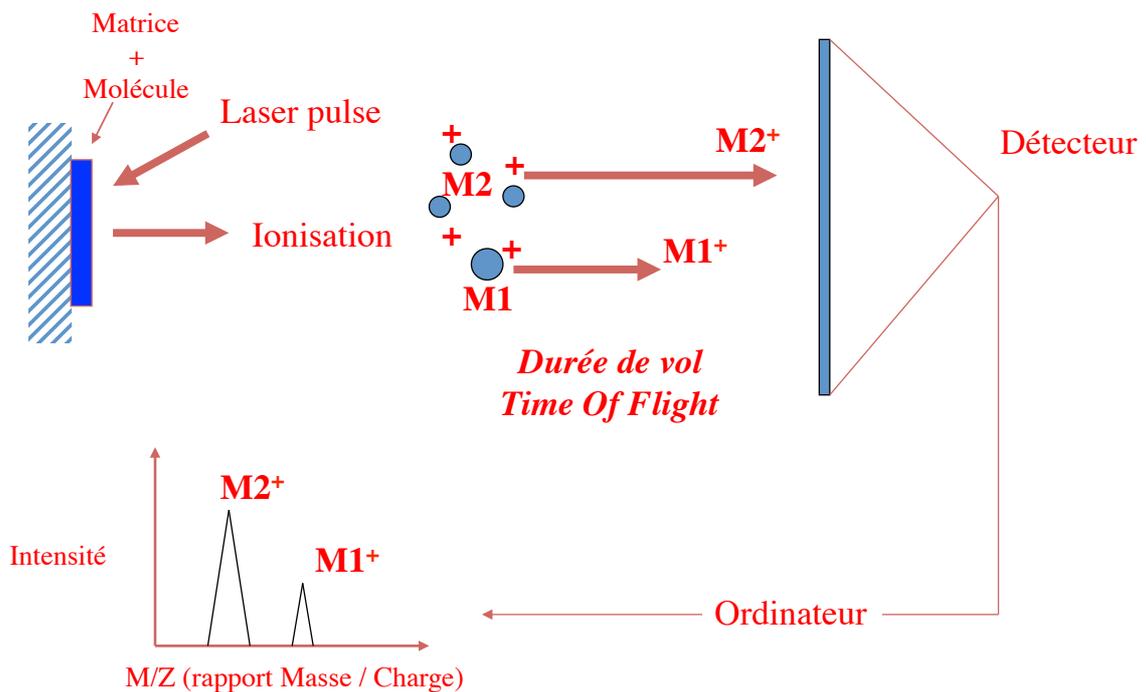
Identification d'un
PROTEOME



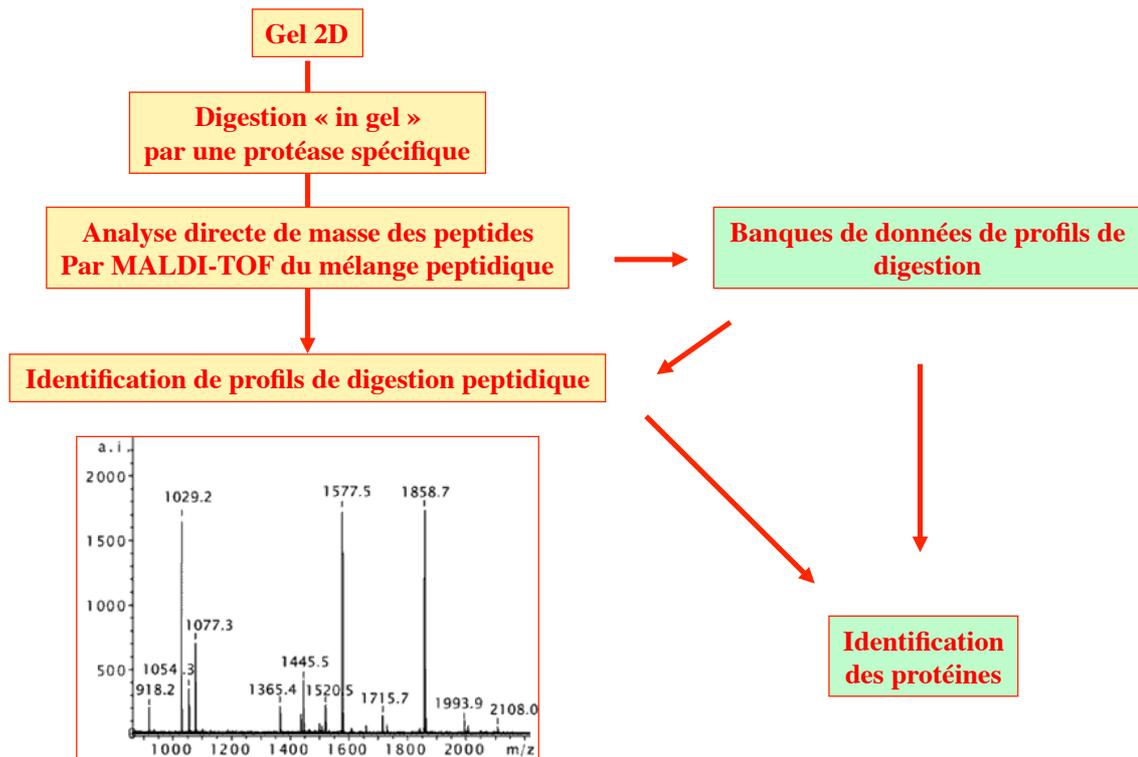
- Permet l'identification de plusieurs centaines de spots*
- Recherche de spots spécifiques d'une condition donnée en fonction de l'obtention de l'extrait protéique séparé*
- Carte de référence pour une cellule, un tissu ou un complexe protéique donné à un moment donné et/ou dans des conditions physiologiques définies*

Spectrométrie de Masse MALDI-TOF

Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization - Time Of Flight
(1988 Karas & Hillenkamp)



La MS & l'identification des protéines
Identification par les profils de digestion



Bio-Informatique

Branche de l'informatique appliquée à une partie de la biologie : la recherche sur les gènes et les protéines.

Création de banques de données utilisant des méthodes de calculs spécifiques.

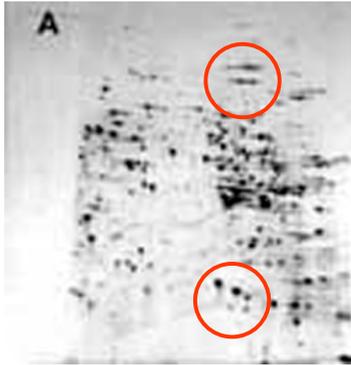
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.expasy.org>

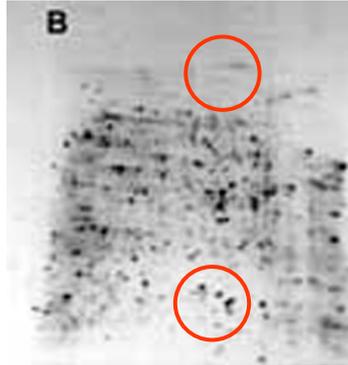
Un exemple: L' influence du choix des tampons sur l' image

Un même tissu, une même méthode d' homogénéisation mais
des tampons de solubilisations différents

Tampon Tris-HCl
Centrifugation avant dépôt



Tampon Tris-HCl
8M Urée, 0,5% Triton X100,
20mM DTT, 0,5% Ampholytes
Centrifugation avant dépôt



Tampon Tris-HCl
7M Urée, 2M Thiourée, 4%
CHAPS, 66mM DTT
0,5% Ampholytes
Centrifugation avant dépôt

