

Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



Université Cadi Ayyad

**Faculté polydisciplinaire
Safi**



Filière science de la vie (S₃)

Module:

Techniques chimiques pour la biologie

Pr. Faissal AZIZ

faissalaziz@gmail.com / Faziz@kth.se

Electrophorèses

Poids moléculaire

pHi

Structure oligomérique



Carte d'identité d'une protéine

4 ELECTROPHORESE

Séparation de solutés chargés par migration dans un champ électrique

- la migration dépend:
 - de la charge de la protéine
 - de sa taille
 - du support (gel plus ou moins réticulé, papier)
- dans la focalisation isoélectrique (électrophorèse dans gradient de pH)
migration dépend uniquement du pI
- dans l'électrophorèse "SDS-PAGE"* , la vitesse de migration dépend
 - de la taille de sous-unité (protéine dénaturée)
 - du degré de réticulation du gel

* Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

ÉLECTROPHORÈSE

A. Théorie

- **l'électrophorèse**, la migration d'un ion dans un champ électrique, est utilisée dans les séparations analytiques des molécules biologiques

- selon les lois de l'électrostatique, la force électrique, $F_{\text{électrique}}$, sur un ion avec une charge q dans un champ électrique d'intensité, E , est:

$$F_{\text{électrique}} = qE$$

- la migration électrophorétique de l'ion à travers la solution est opposée par une force de friction: $F_{\text{friction}} = v f$

où v représente la vitesse de migration et f son **coefficient de friction**

- le coefficient de friction donne une mesure de la résistance exercée par la solution sur l'ion pendant sa migration

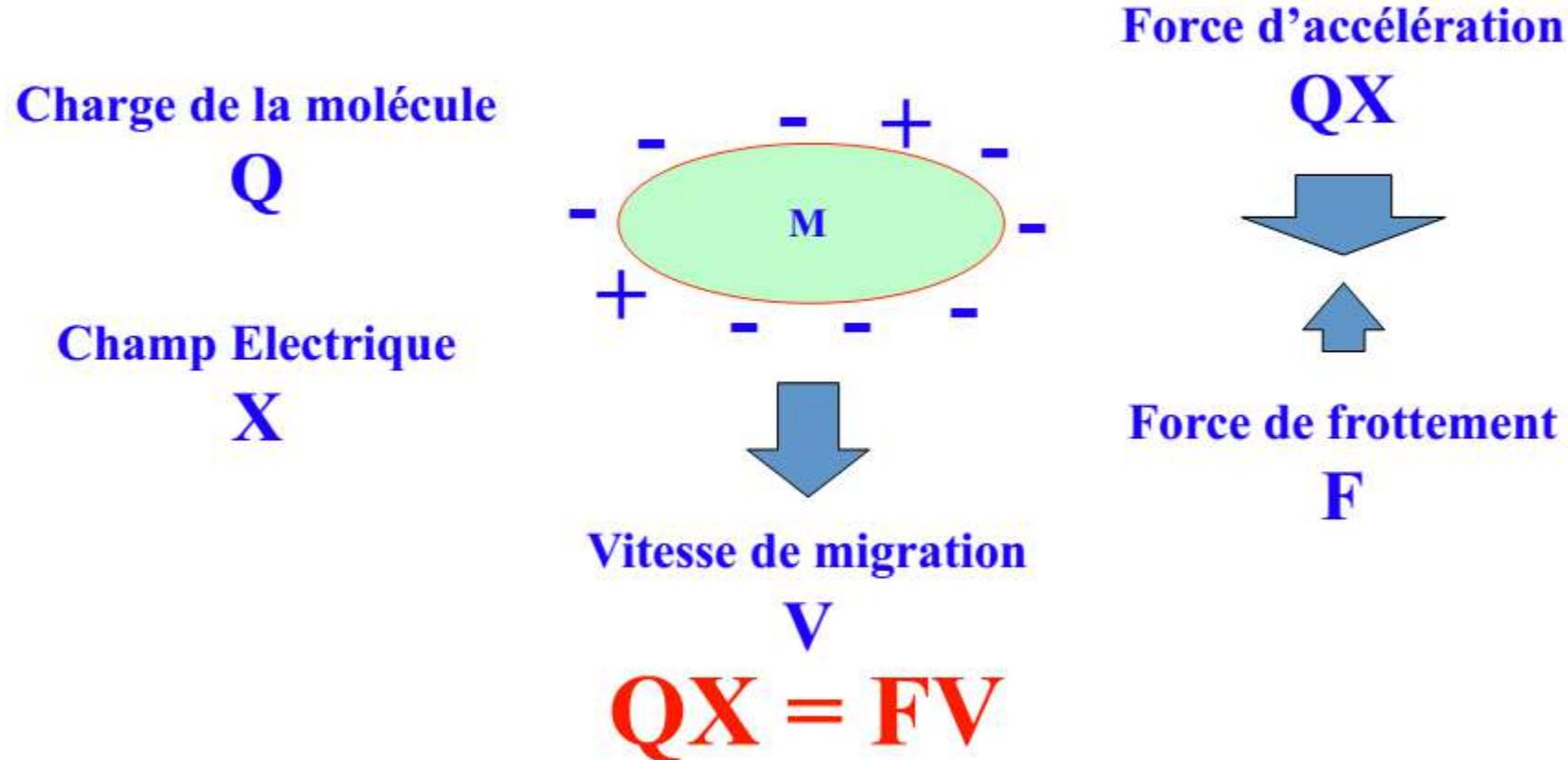
- ceci dépend de la taille, la forme, et l'état de solvation de l'ion ainsi que de la viscosité de la solution

- dans un champ électrique constant, les forces sur l'ion vont s'égaliser et :

$$qE = v f$$

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)

- donc, chaque ion se déplace avec une vitesse caractérisée par une **mobilité électrophorétique**, μ , définie par : $\mu = v / E = q / f$
- cette équation indique que les protéines à leur point isoélectrique (où $q=0$) possèdent une mobilité électrophorétique nulle
- la méthode d'électrophorèse la plus couramment utilisée est celle de **l'électrophorèse en zones**
 - technique dans laquelle l'échantillon est contraint à se déplacer dans une phase solide, comme le papier filtre, la cellulose, ou d'un gel

par cette technique

- 1) on **élimine largement l'agitation provoquée par la convection**, un facteur limitant du point de vue résolution.
- 2) en plus, cette technique **requiert une quantité faible de matériel** permettant ainsi la migration des composantes en bandes discrètes.

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):

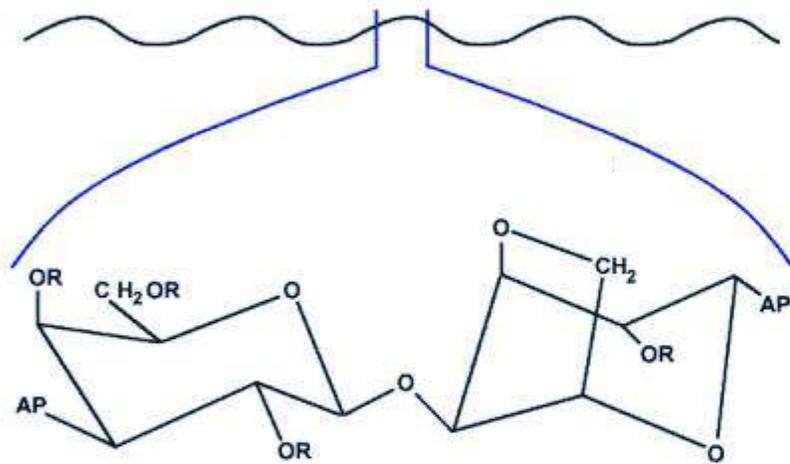
migration de protéines (dénaturées ou non) en fonction en présence de dénaturant

Electrophorèse bi-dimensionnelle (la protéomique):

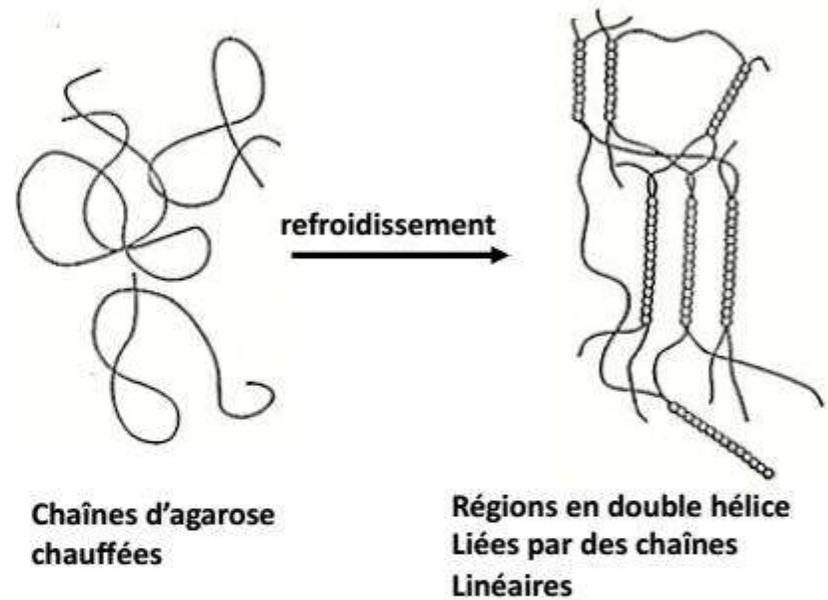
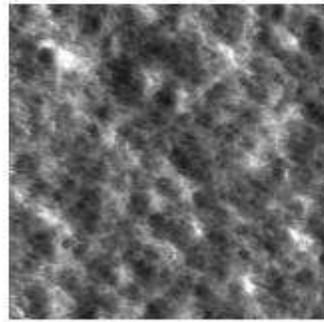
migration de protéines selon une combinaison des critères de pI et de taille

GELS D'AGAROSE

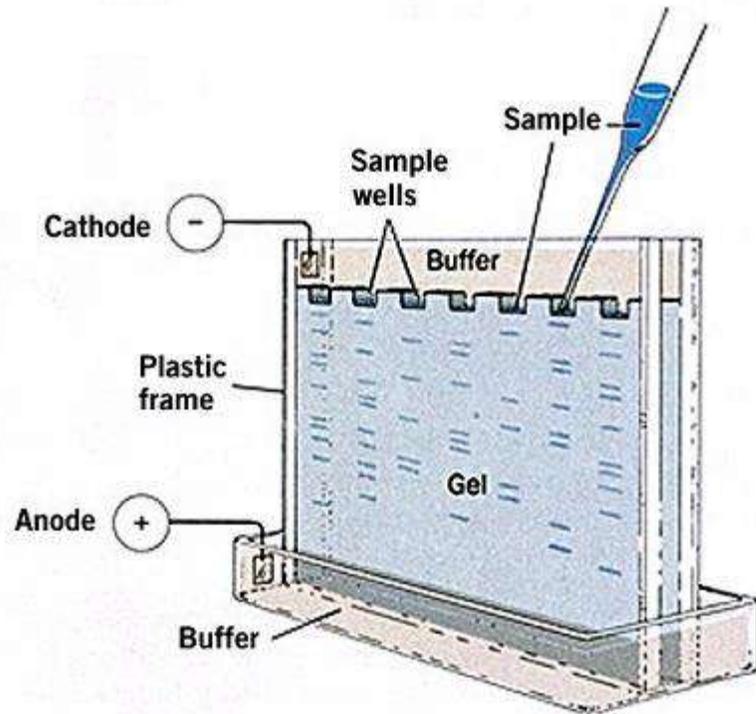
Une molécule d'agarose ~ 120 000 dalton



Gel d'agarose vu en microscopie électronique



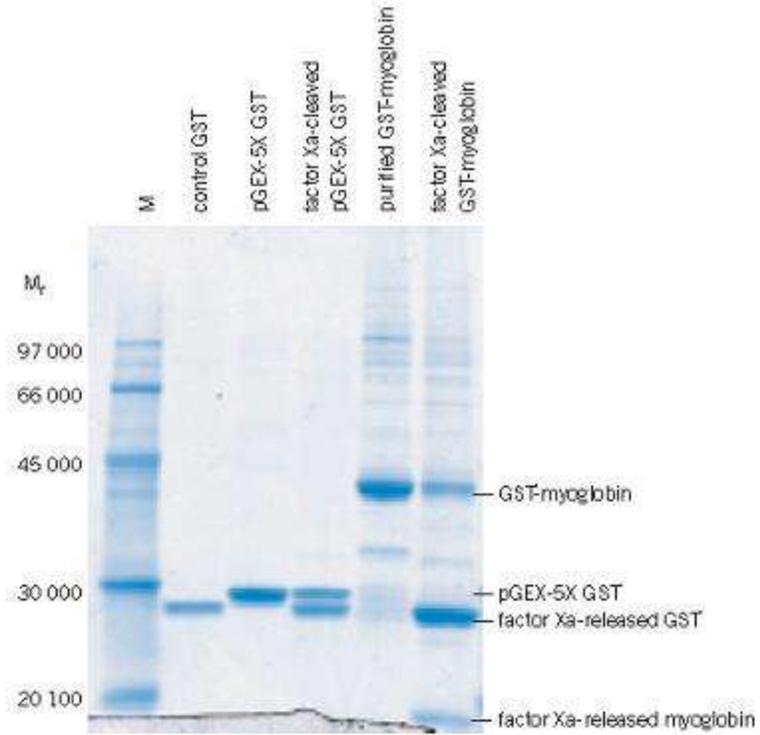
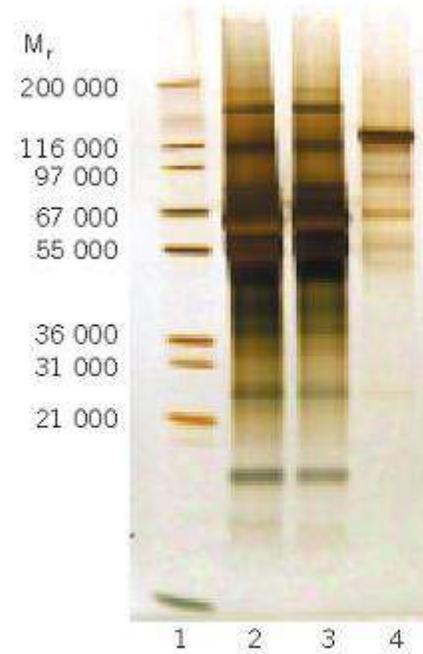
Gel de polyacrylamide

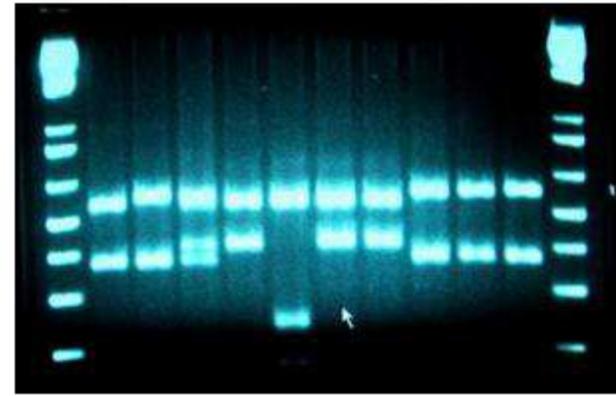
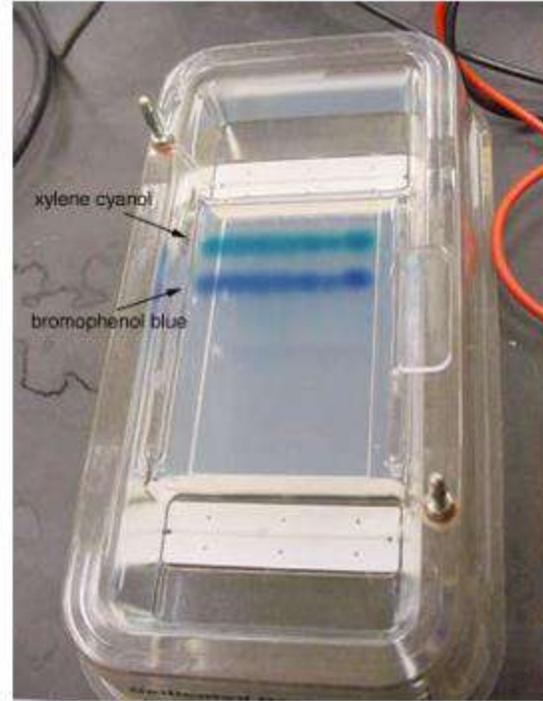
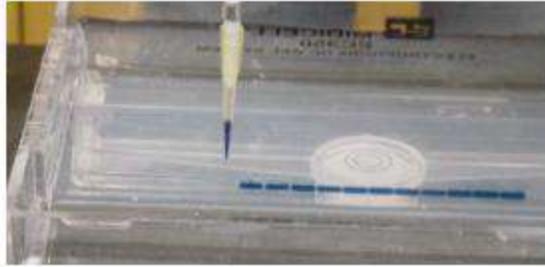


- Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel
- le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH ~9 pour que toutes les protéines aient une charge négative)
- un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration
 - les protéines migreront vers l'anode (+) selon leur ratio charge/masse
- après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées (voir pages suivantes)
- dans ce type de gel, plus le gel est long, meilleure est la finesse des bandes et la résolution

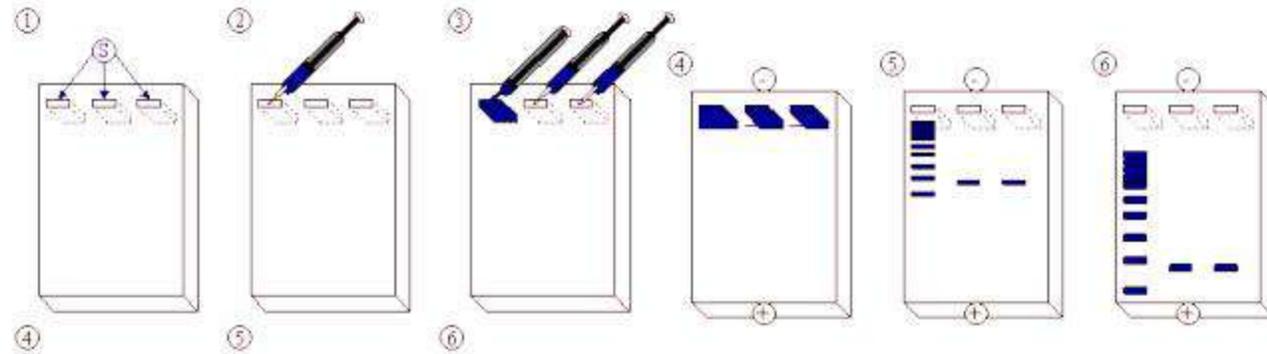
Visualisation des protéines dans les gels

- une fois que la migration des protéines dans le gel est terminée, il faut visualiser les bandes obtenues par les protéines
- les différentes approches sont:
 - la coloration avec le bleu de Coomassie brillant (Figure 7A)
 - la coloration au nitrate d'argent (Figure 7B)
 - autoradiographie (si les protéines sont marquées avec un isotope radioactif comme le S^{35} ou le C^{14})
- ces approches vont cependant détecter toutes les protéines sur le gel.
- une approche plus spécifique consiste à détecter la protéine d'intérêt avec un anticorps qui reconnaît cette protéine -> par immunobuvardage ou "Western blot"

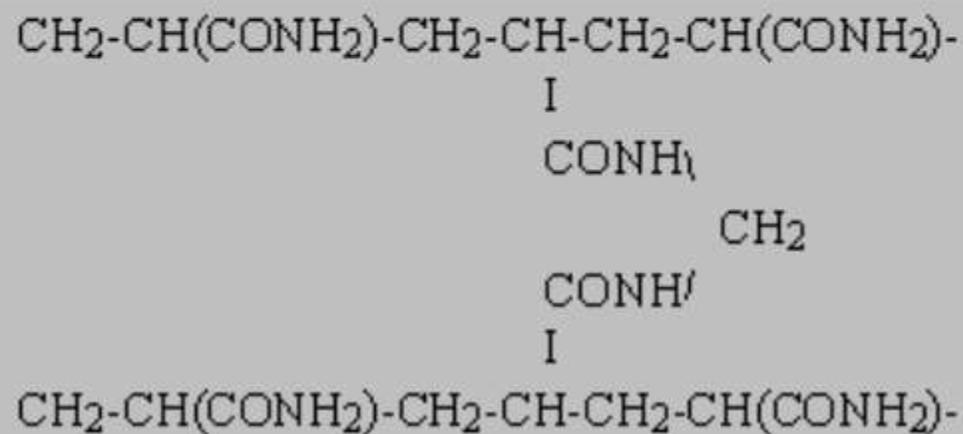
A**Coloration au Bleu de Coomassie brillant****B****Coloration au nitrate d'argent****Figure 7**



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 :



Gel

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

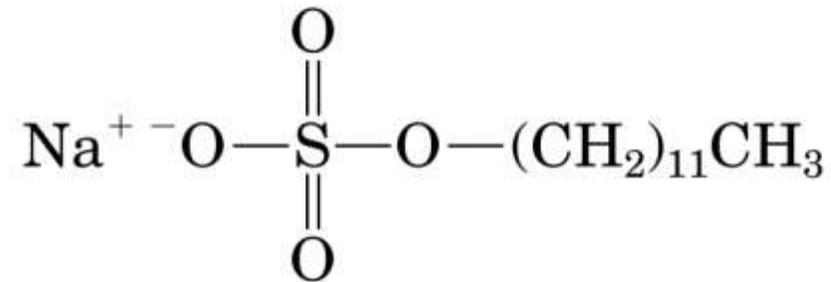
$\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH}_2$ acrylamide

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

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

Charge négative

Chaîne carbonée hydrophobe

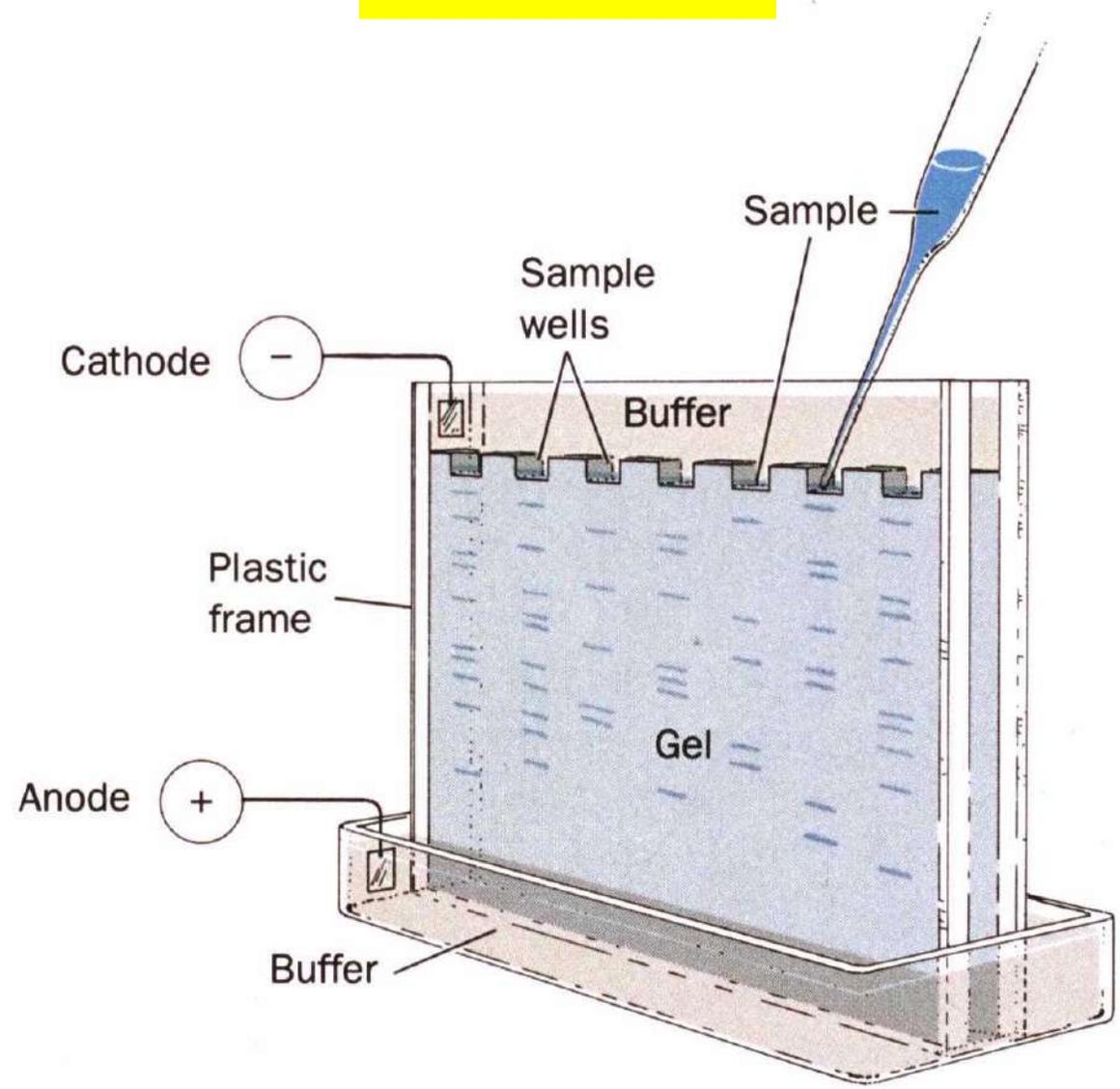


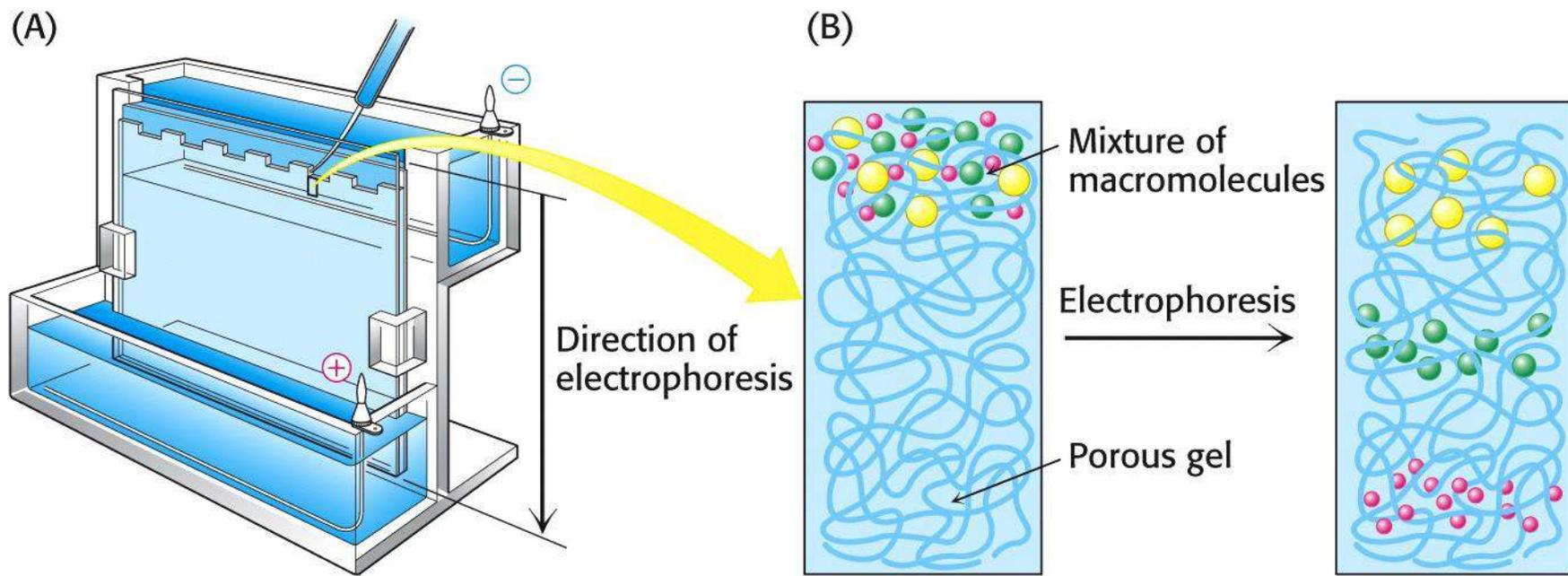
Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

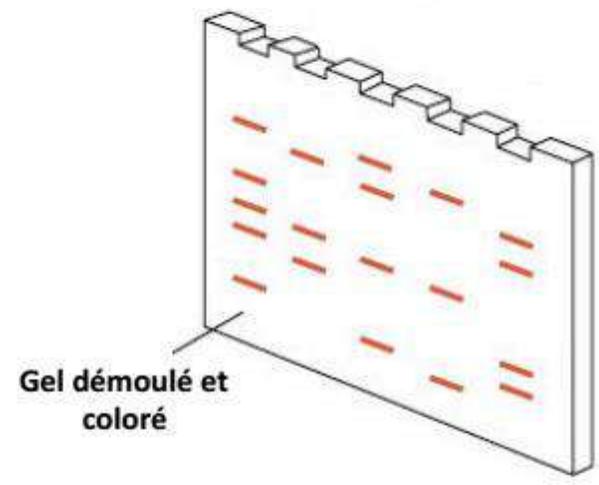
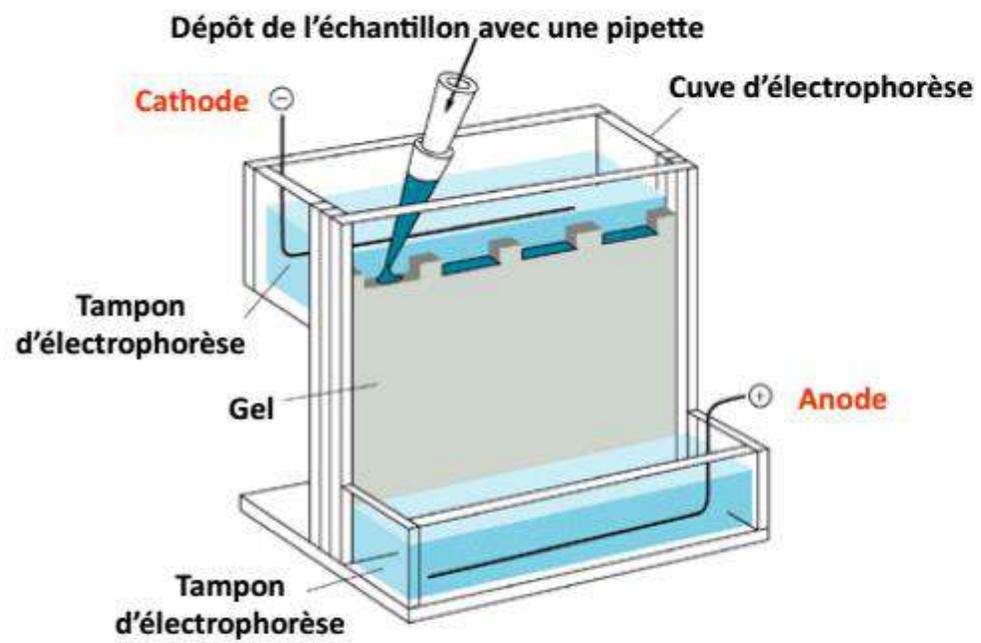
Le SDS se fixe à la plupart des protéines par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes à raison d'une molécule de SD pour 2 acides aminés.

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

SDS-PAGE

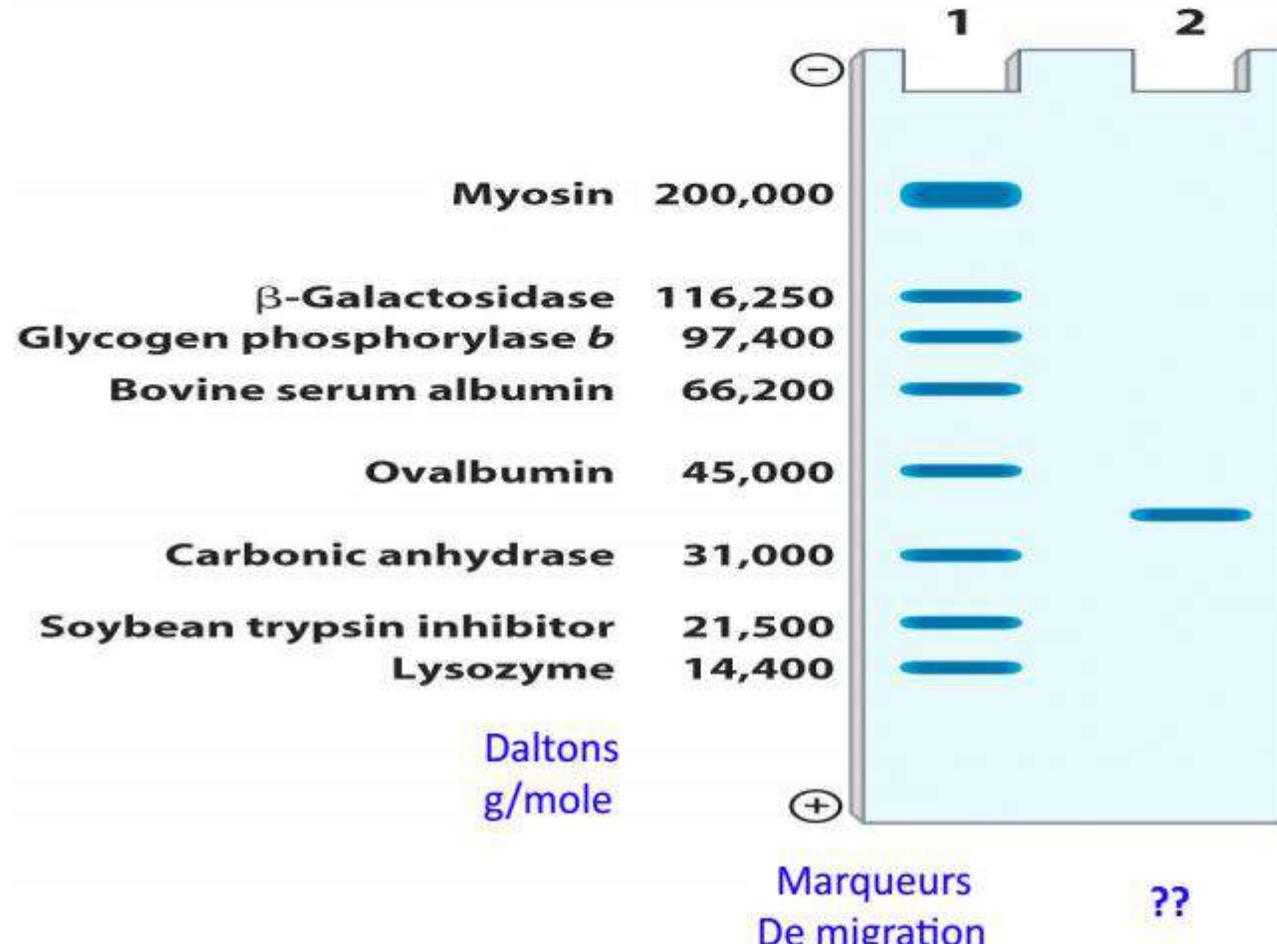




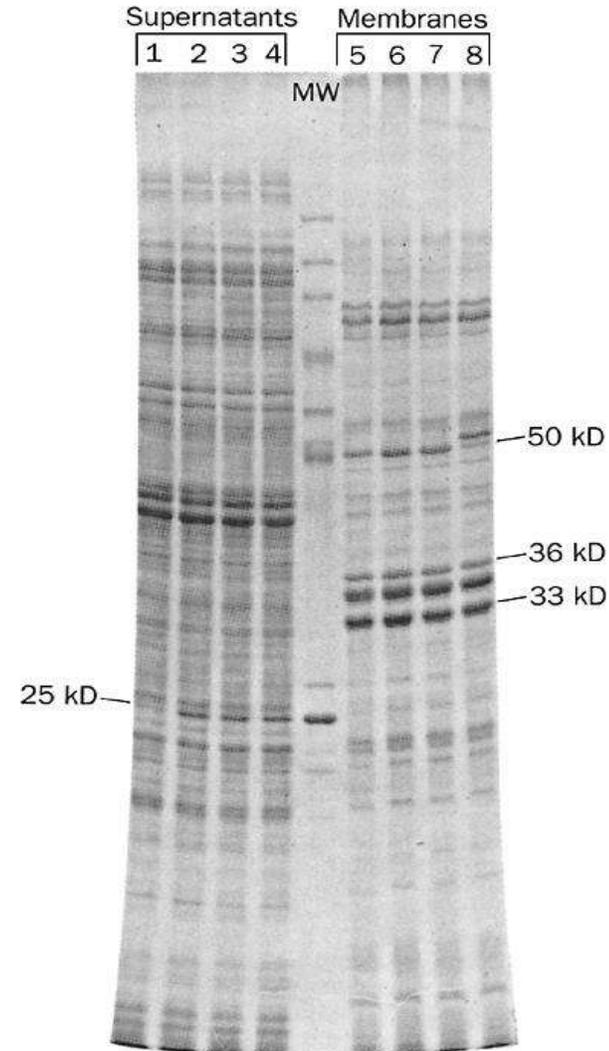
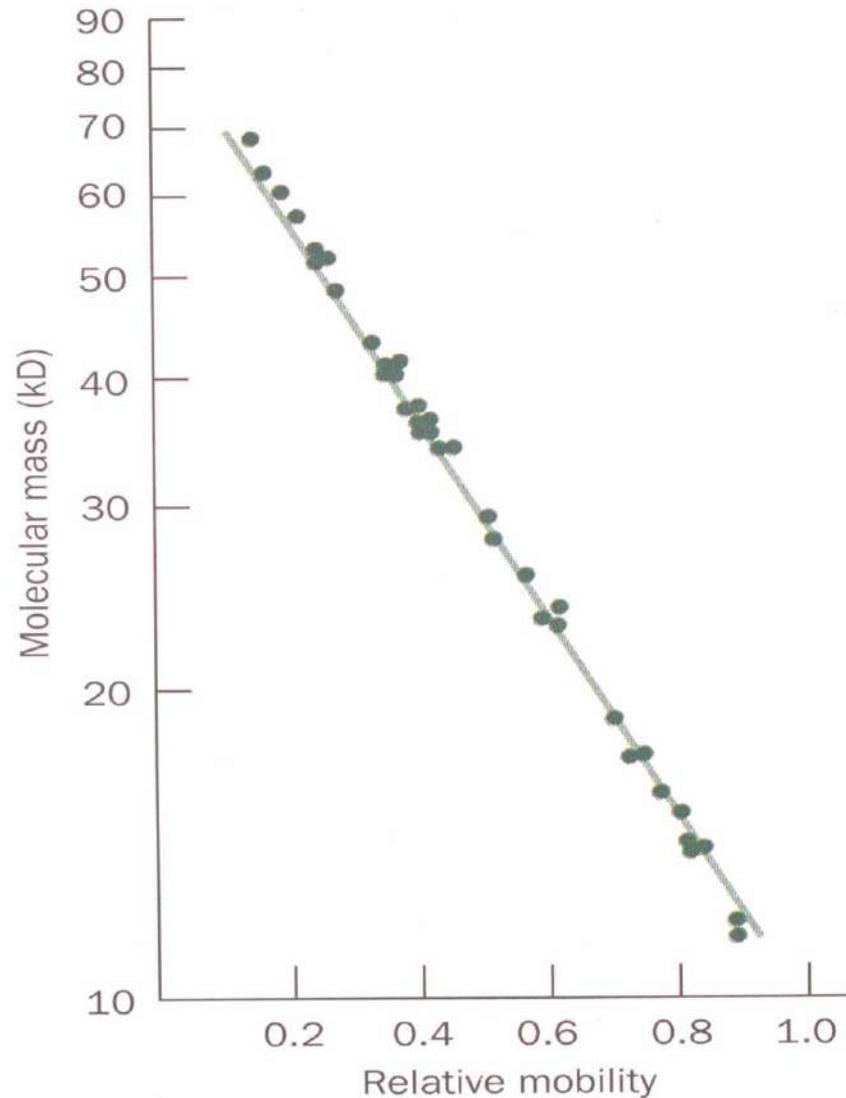


Migration de protéines dénaturées en présence de SDS
Protéines chargées négativement de façon uniforme

Migration en fonction de la taille
ou poids moléculaire

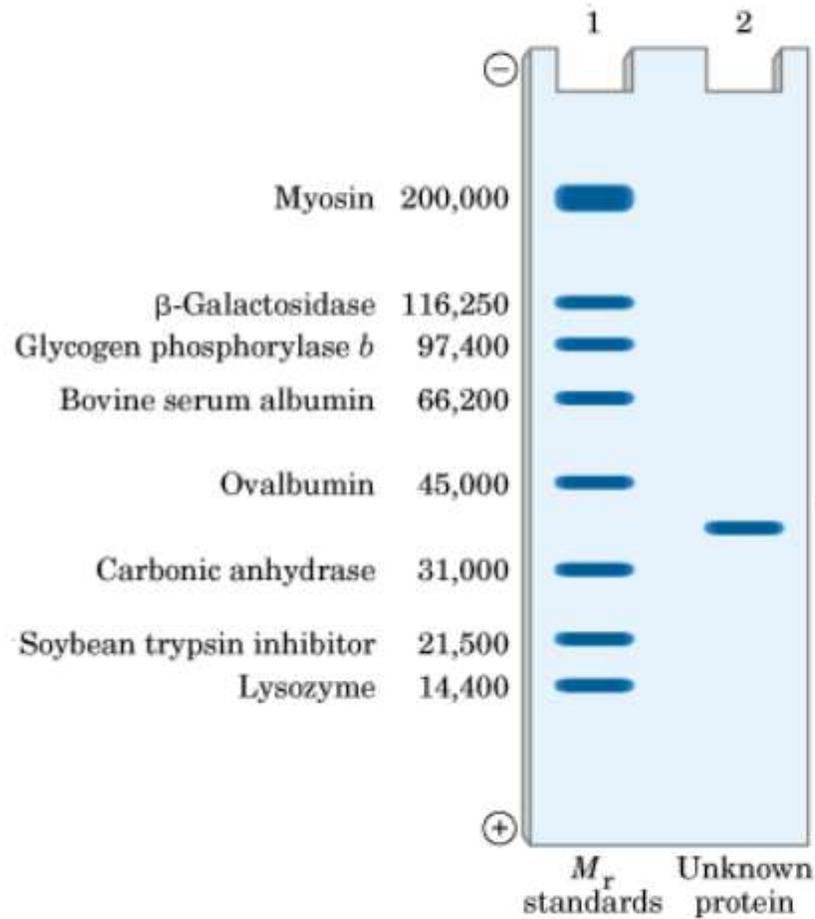


Relation logarithmique entre la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique relative en SDS-PAGE

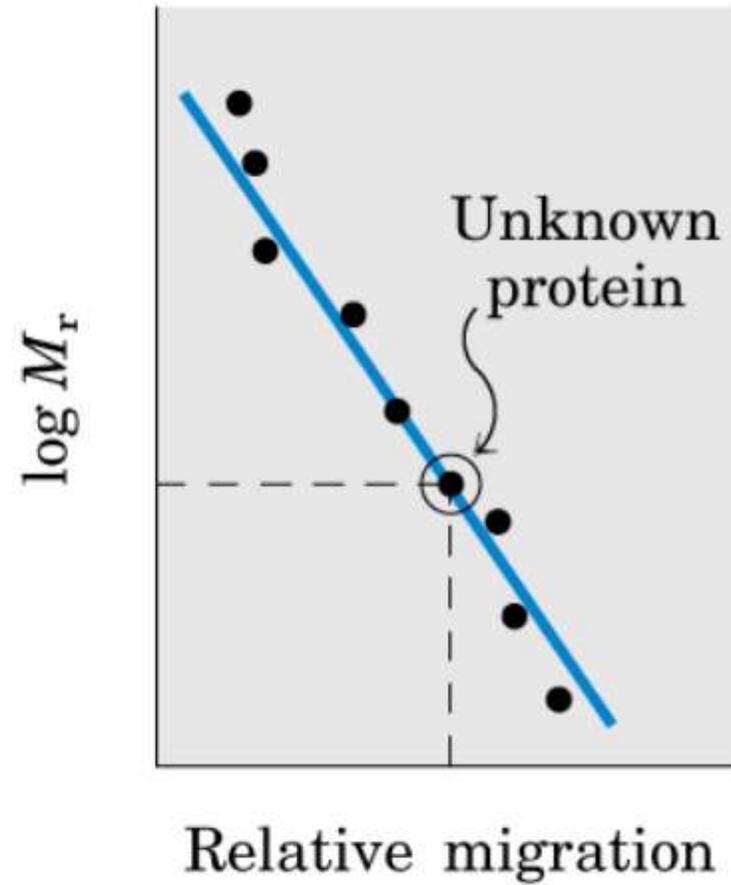


Courtesy of Giovanna F. Ames, University of California at Berkeley.

Détermination du PM d'une protéine



(a)

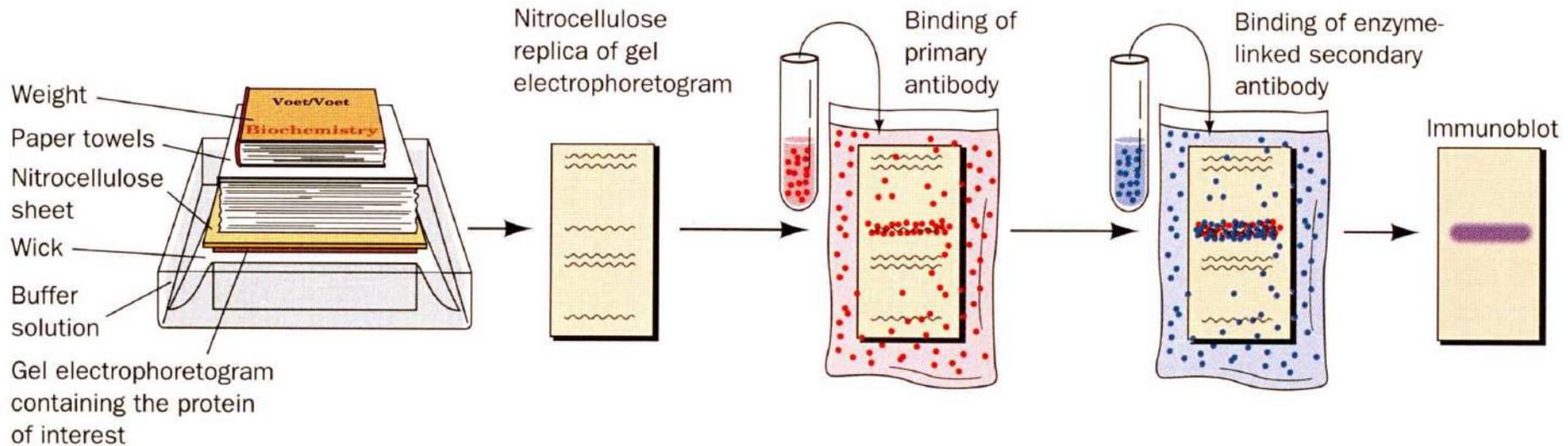


(b)

"Western blot" = "immunoempreinte"

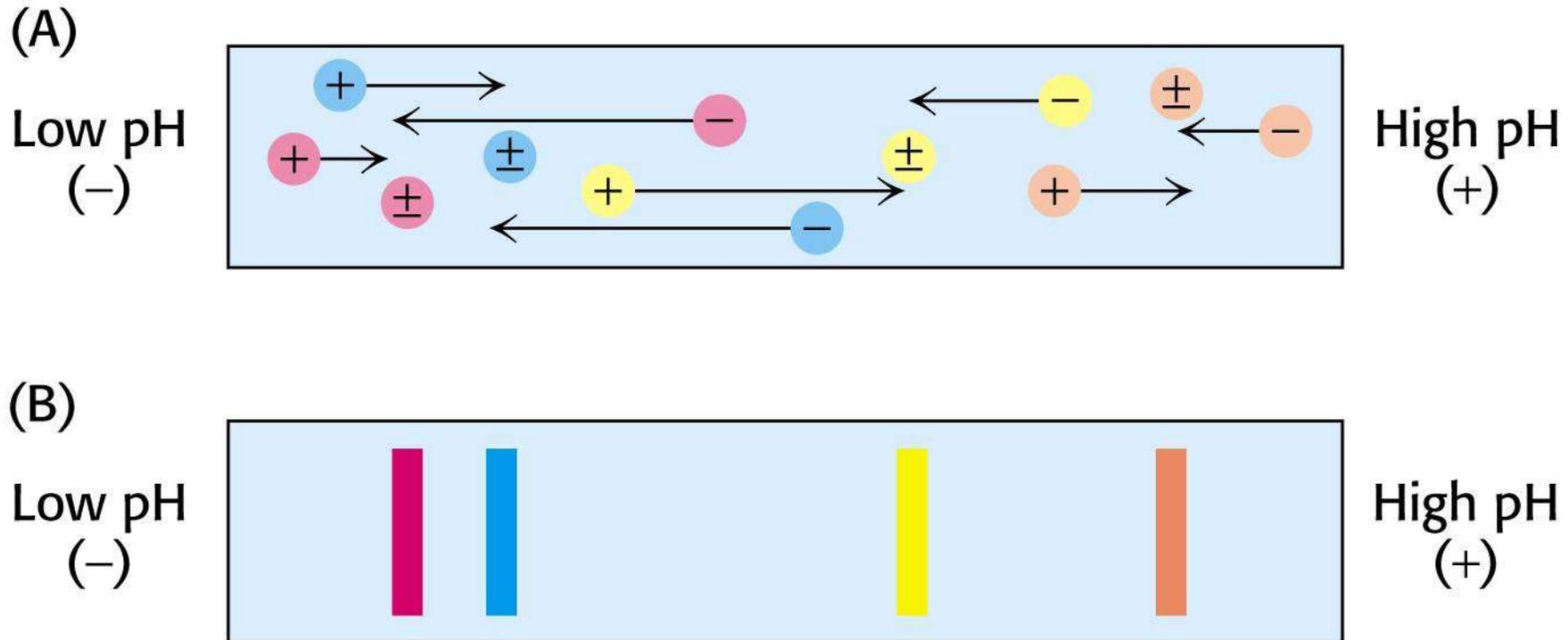
Révélation d'une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique

- 1 Perform gel electrophoresis on a sample containing the protein of interest
- 2 Blot the proteins from the gel onto nitrocellulose
- 3 Block the unoccupied binding sites on the nitrocellulose with casein
- 4 Incubate with rabbit antibody to the protein of interest
- 5 Wash and incubate with an enzyme-linked goat anti-rabbit antibody
- 6 Assay the linked enzyme with a colorimetric reaction

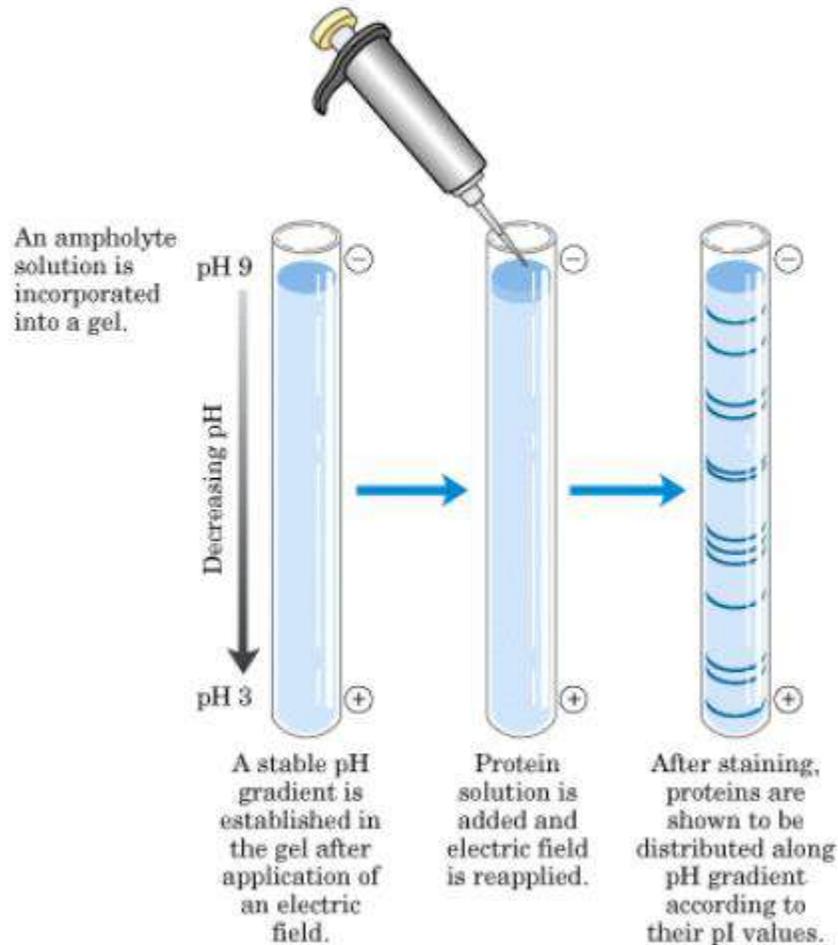


B. Focalisation isoélectrique

Si un mélange de protéines est soumis à une électrophorèse dans une matrice ayant un gradient de pH et dont le pH augmente lentement de l'anode vers la cathode, chaque protéine va migrer jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son point isoélectrique:

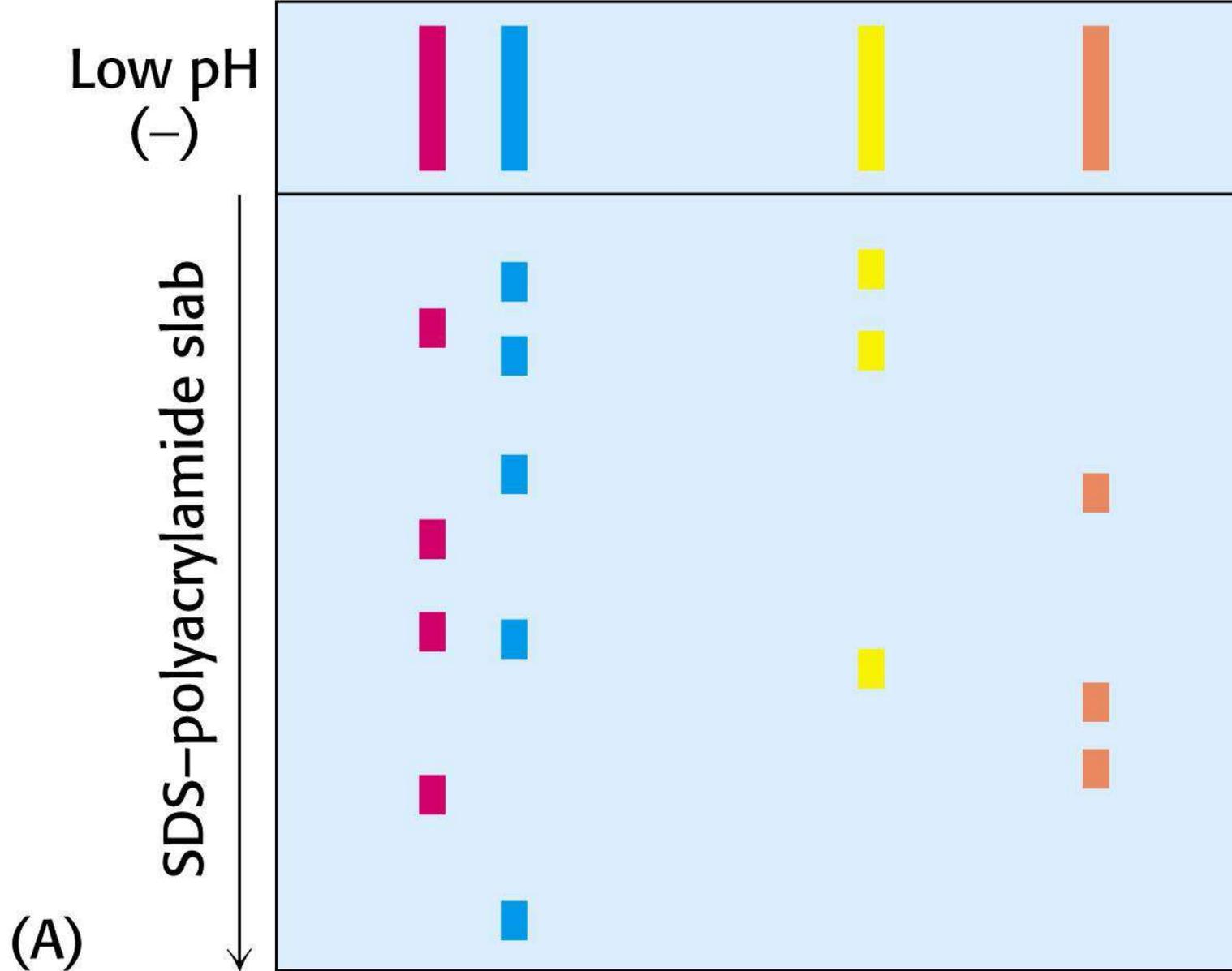


Isoelectrofocalisation



- 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

Electrophorèse sur gel en deux dimensions (électrophorèse 2D)



(B)

Isoelectric focusing

SDS-PAGE



Le gradient de pH est obtenu en mélangeant des oligomères de faible mass (300-600 Da) qui portent des groupes amino et carboxyliques aliphatiques (**ampholytes**) formant ainsi un éventail de points isoélectriques

IEF : IsoElectroFocalisation

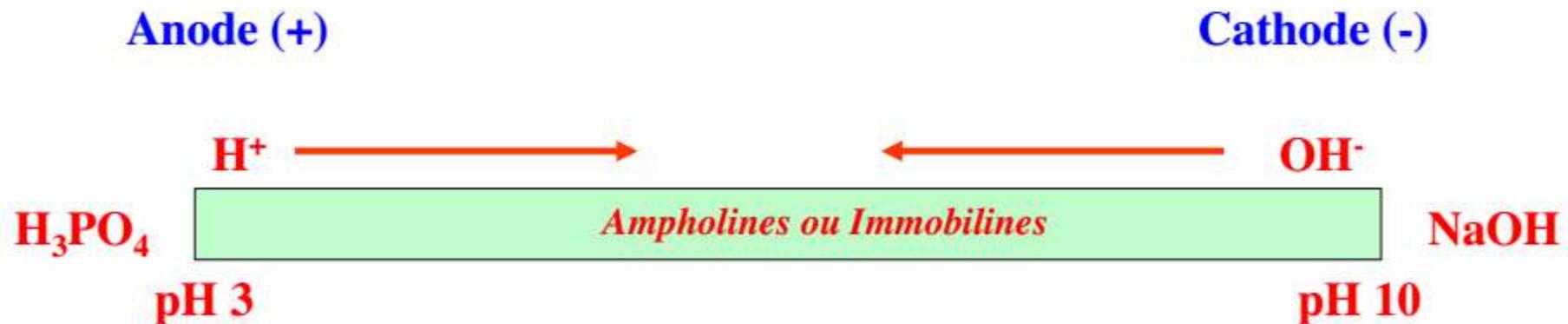
(Immobilisation des protéines et des ampholines à l'équilibre)

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

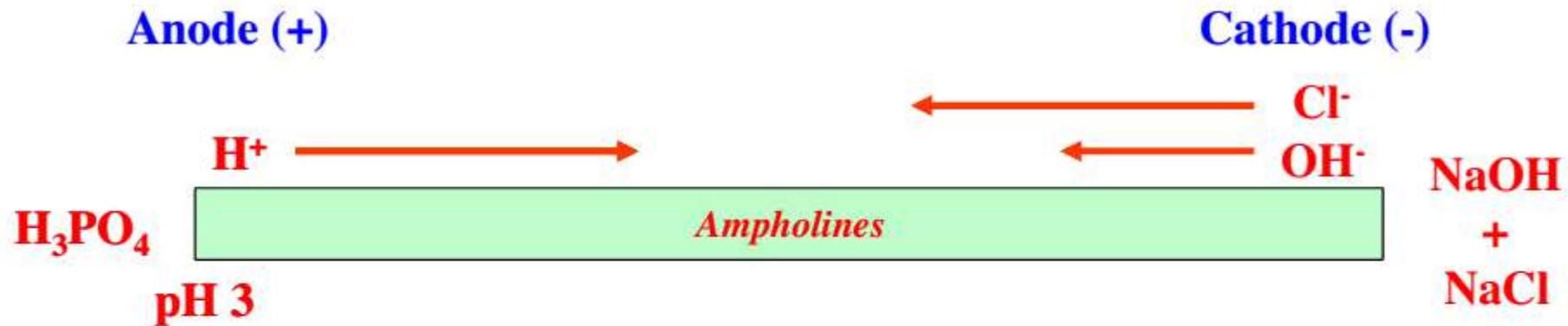


NEPHG : Non Equilibrium PH Gradient Electrophoresis

Migration des protéines et des ampholines sans atteinte de l'équilibre

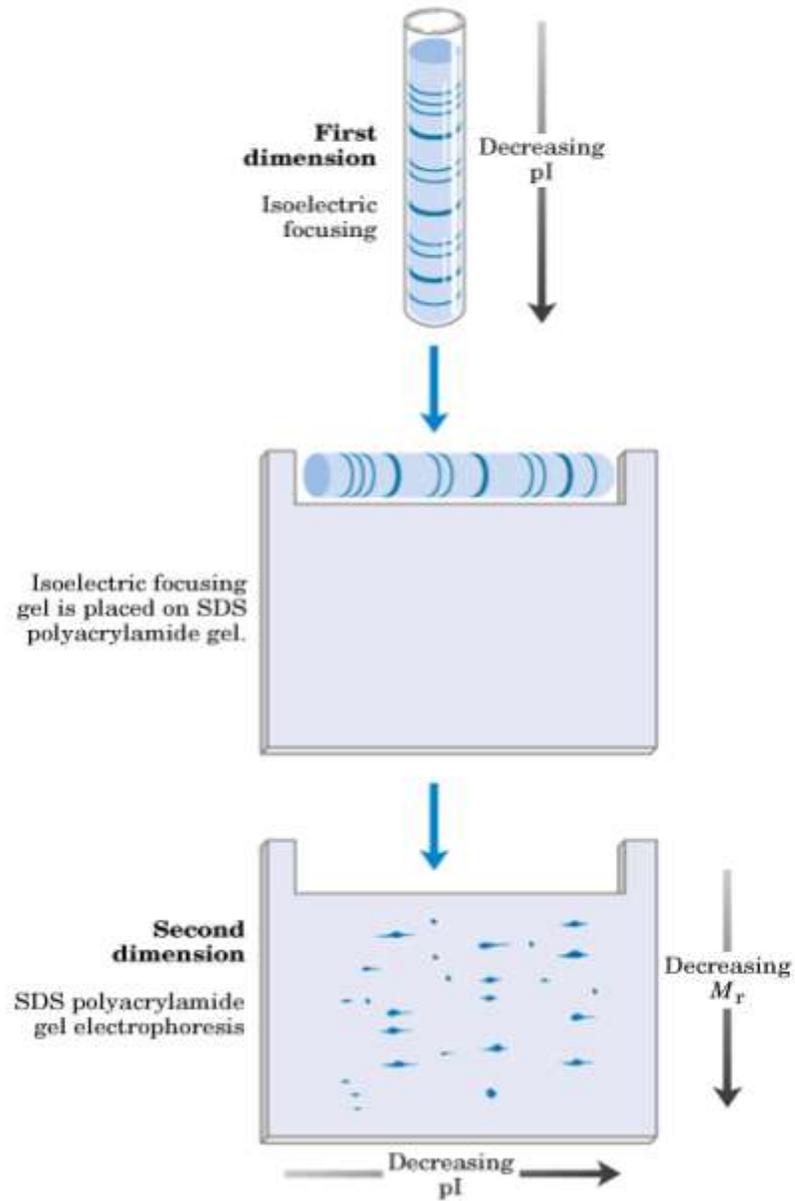
Le gradient de pH évolue au cours de la migration

La molécule de pI donné qui a atteint la partie du gel de pH = pI continue de migrer en suivant le pH



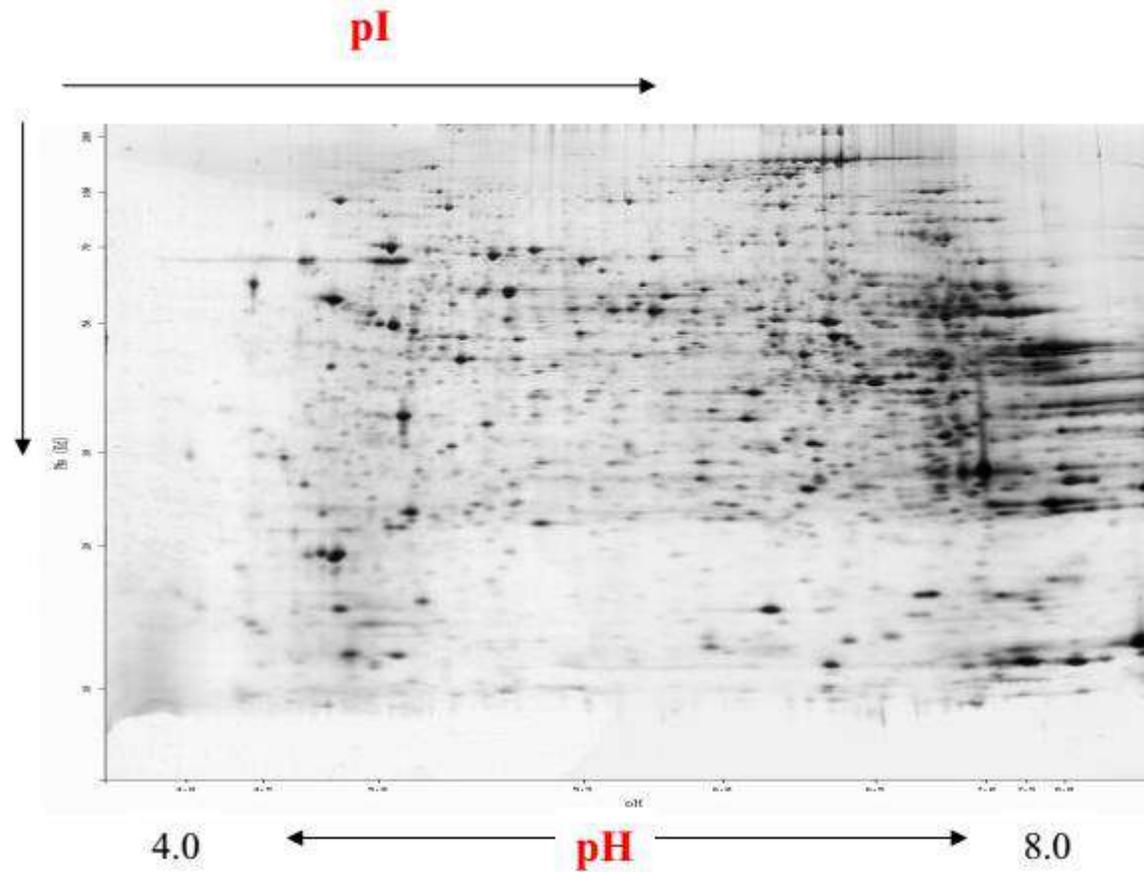
pH fonction du Tps de migration

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

PM



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

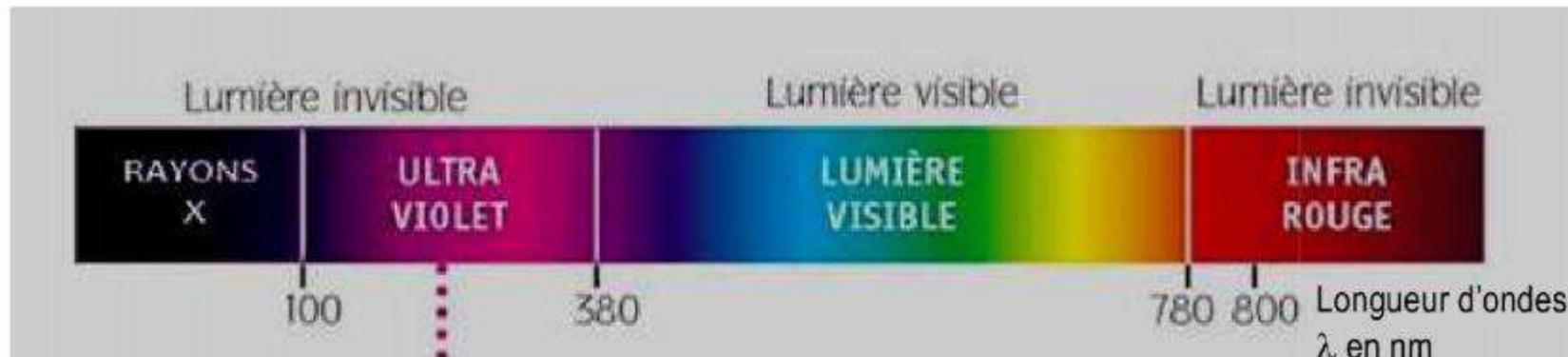
Carte de référence pour une cellule, un tissu ou un complexe protéique donné à un moment donné et/ou dans des conditions physiologiques définies

Méthodes Optique

Les molécules sont capables d'absorber la lumière et cette absorbance est utilisée,

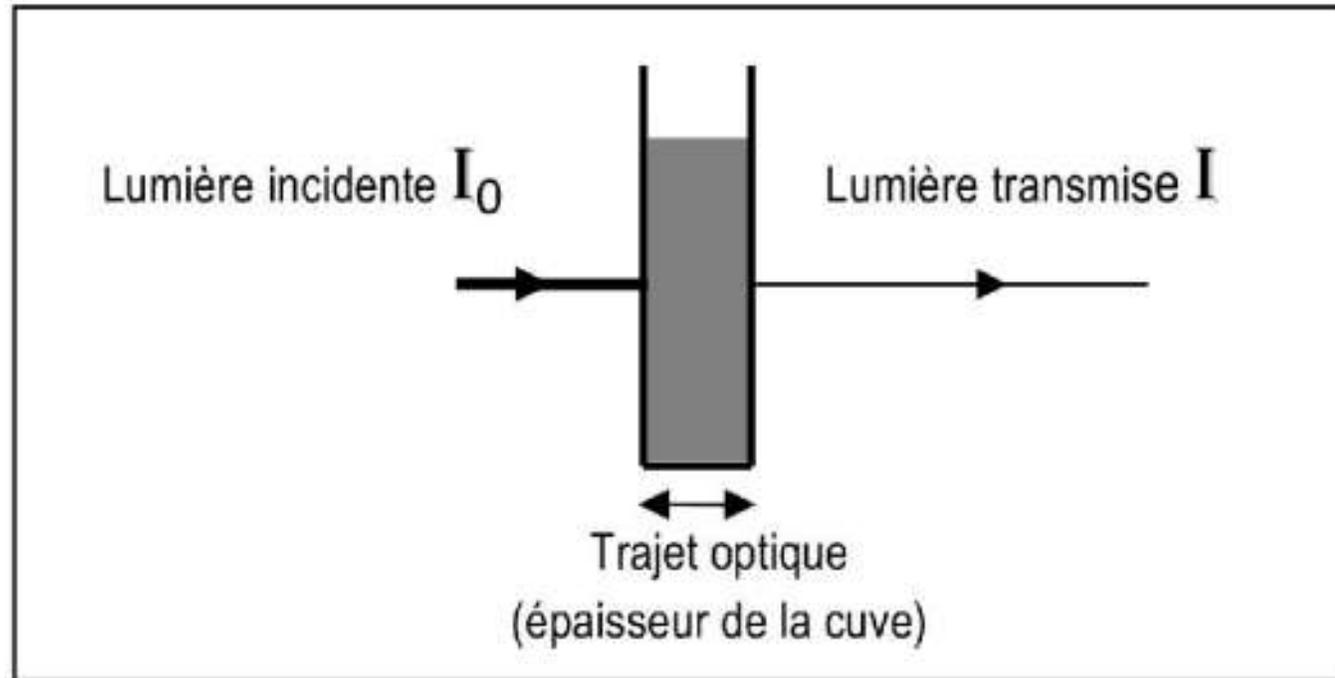
L'absorbance d'une molécule est maximale à une longueur d'ondes précise

Fig 36 : Spectre de la lumière



1°/ Spectrophotométrie UV-Visible

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s).



L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance (A) ou densité optique (DO) de la solution comme :

$$A = DO = \log (I_0 / I)$$

Cette absorbance peut être exprimée en fonction de la concentration par la loi de Beer-Lambert :

$$DO_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times L \times C$$

- DO est la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ ;
- C est la concentration de la substance absorbante (en mol./L);
- L est la longueur du trajet optique (en cm);
- ϵ_{λ} est le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution (en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Fig 37 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV/Visible

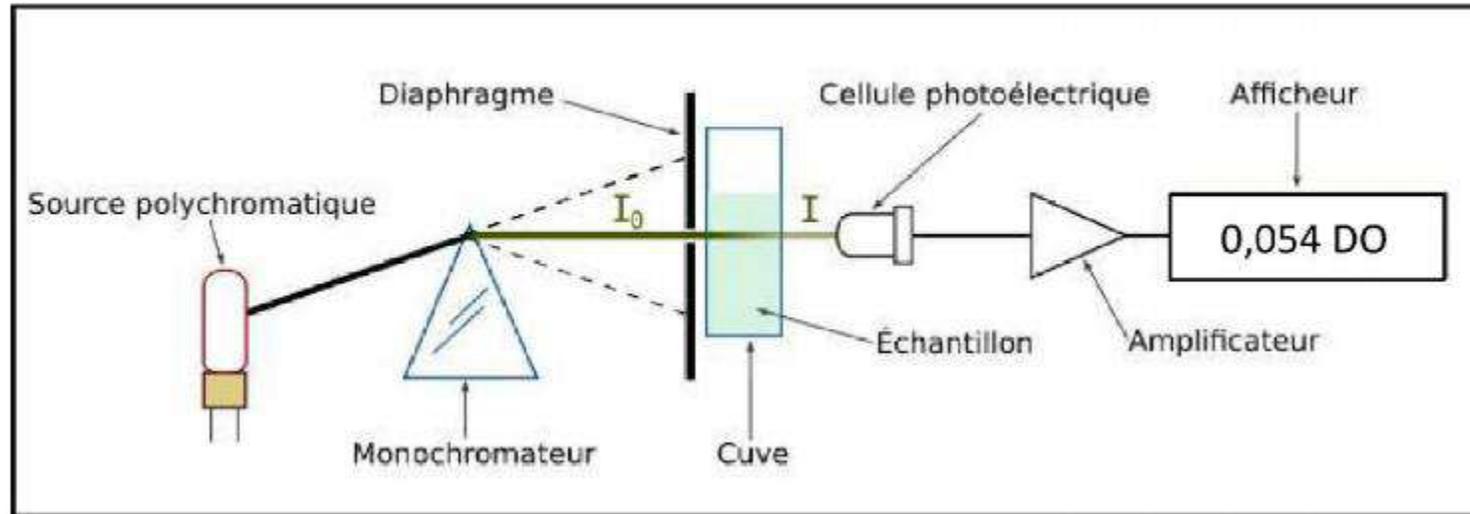
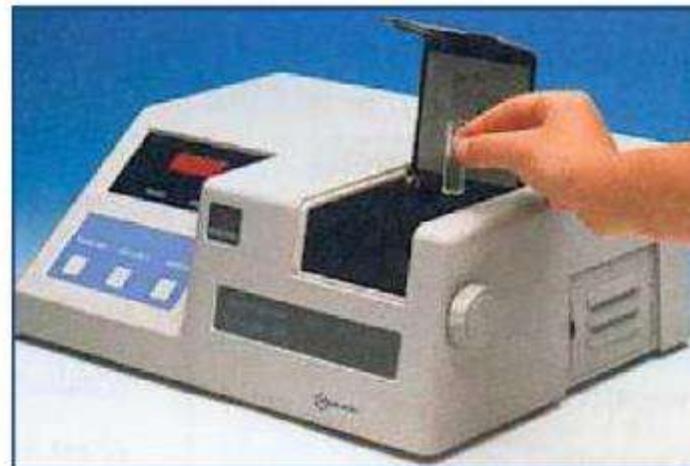


Fig 38 : Photo d'un spectrophotomètre



Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

