

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

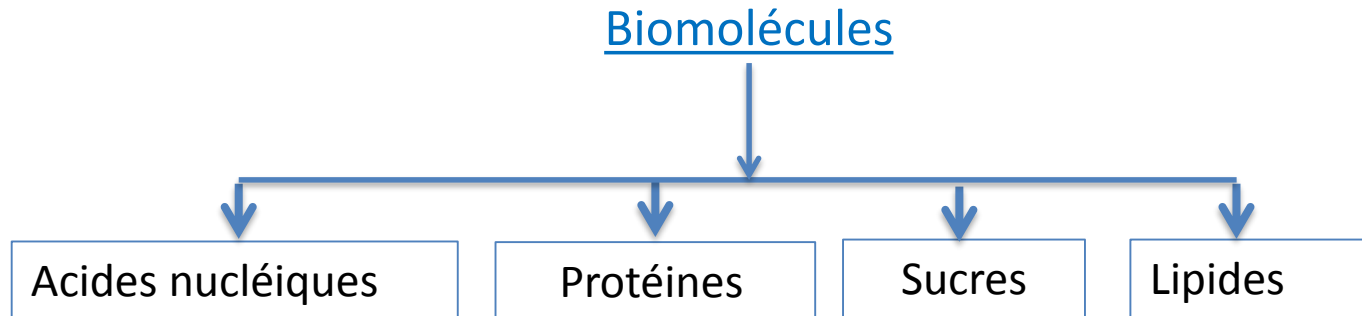


- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

TECHNIQUES CHIMIQUES POUR LA BIOLOGIE

En chimie = l'analyse consiste à déterminer les constituants d'un produit (matrice).

Déterminer **l'identité/ la quantité** = Basé sur la propriété physique et chimique des molécules.



CLASSIFICATION DES PROCÉDÉS D'ANALYSE

Qualitative ou Quantitative

l'**analyse qualitative** est l'ensemble des méthodes d'analyse chimique qui permettent d'identifier les substances chimiques présentes dans un échantillon,

l'**analyse quantitative** est l'ensemble des méthodes d'analyse chimique qui permettent de déterminer la concentration des différentes substances recherchées

En fonction des propriétés de l'analyse : **propriété physique** / **propriété chimique**

Une **propriété physique** est une propriété qui se manifeste ou que l'on observe sans que la nature d'une substance ne soit modifiée, utilisation des appareils électroniques,

propriété chimique décrit le comportement d'une substance lorsqu'elle prend part à une réaction chimique (représente le comportement d'une substance qui entre en contact avec une autre substance.).

Technique couplée : la combinaison et le couplage au moins de deux techniques d'analyse dans le but d'améliorer qualitative et quantitative d'une substance (exemple : chromatographie et spectroscopie)

LA STRATÉGIE D'ANALYSE

Ensemble d'actions coordonnées pour atteindre un but précise = ensemble des étapes individuelles (étapes élémentaires cohérentes)

Stratégie = 5 Blocks (phases)

1- Obtention de l'échantillons : transport, stockage

2- préparation de l'échantillon (analyte)

3- analyse

Identification ; quantification

3- Evaluation des résultats

4- Rapport de résultats

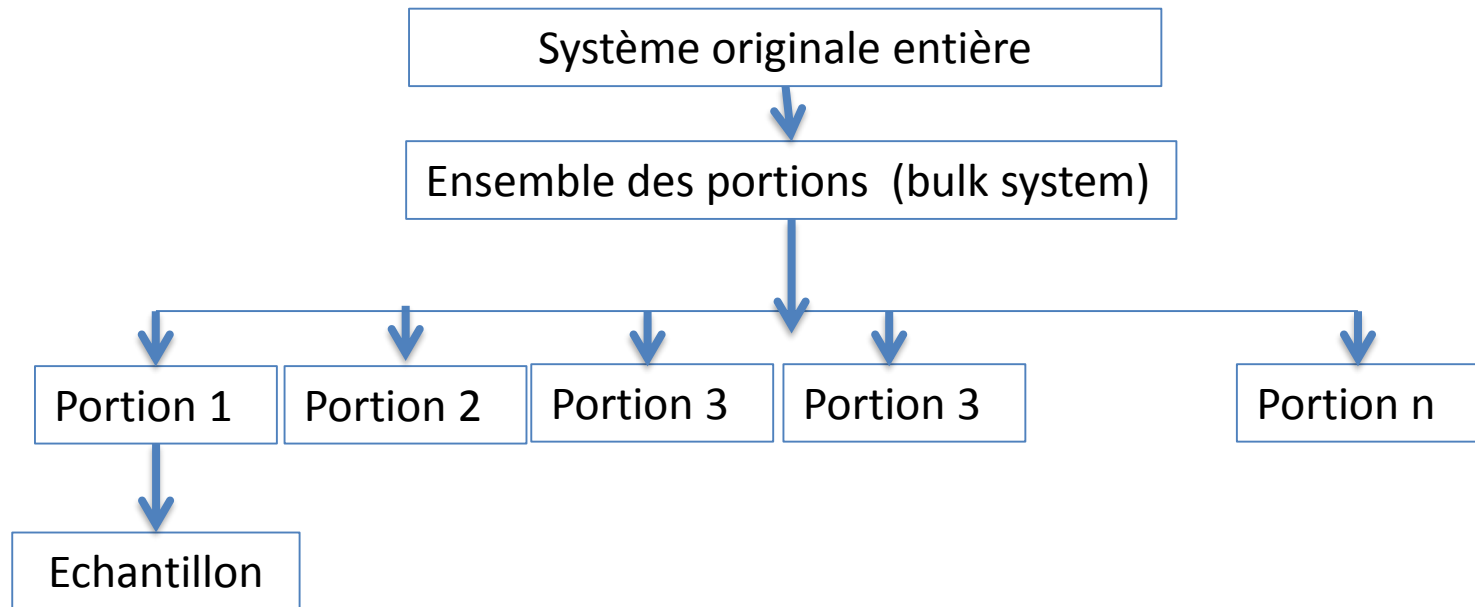
5- Décision

1- Obtention de l'échantillons : transport, stockage

un *échantillon* est une petite quantité d'une matière ou d'une information, d'une solution.

ECHANTILLON

Echantillon : portion représentative du système originale du point de vue homogénéité



L'analyse dans le cadre :

- étude environnemental
- Santé agriculture
- Biologie fondamentale
- **Observationnelle: sur le terrain le système biologique non contrôlé**
- **Interventionnelle : dans le laboratoire**

❖ **in vivo**, des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant, MEPS,
Micro-dialyse

❖ **in vitro**, qui sont effectués sur des **organes**, des tissus, des **cellules**, des composants
de la cellule, des **protéines**, ou des **biomolécules**

❖ **In situ**, sur place ; elle est utilisée en général pour désigner une opération ou un
phénomène observé sur place, à l'endroit où il se déroule (sans le prélever ni le déplacer),

Échantillonnage : doit être représentatif du système biologique de point de vue qualitative ou quantitative et permet de répondre à la question biologique posée,

Les outils de prélèvement de l'échantillon ne doivent pas introduire des contamination de l'échantillon,

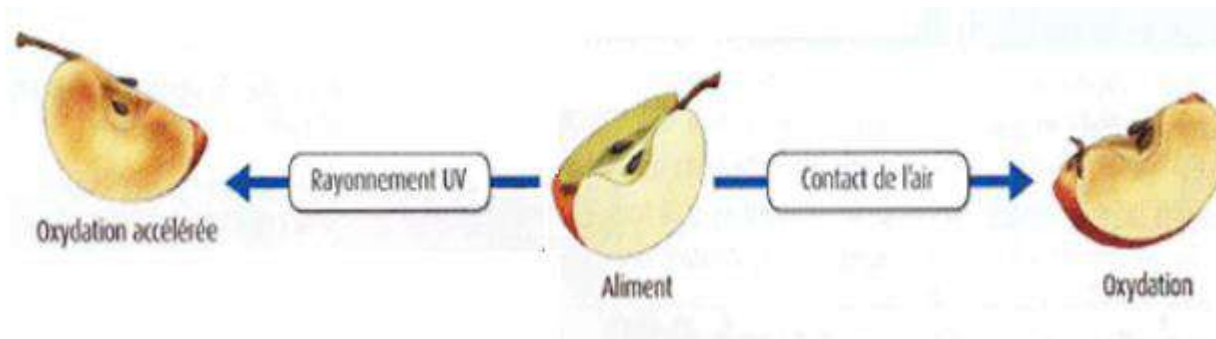
Transport/stockage de l' échantillons

Eviter la dégradation de l'analyse ; instabilité intrinsèque; contamination

Eviter l'oxydation : contact avec l'air O₂

Stabiliser l'état d'ionisation : contact avec l'air CO₂

Eviter la phot oxydation : contact avec la lumière UV



Eviter la contamination bactériennes

Eviter toute réactivité : chimique

Déshydrations

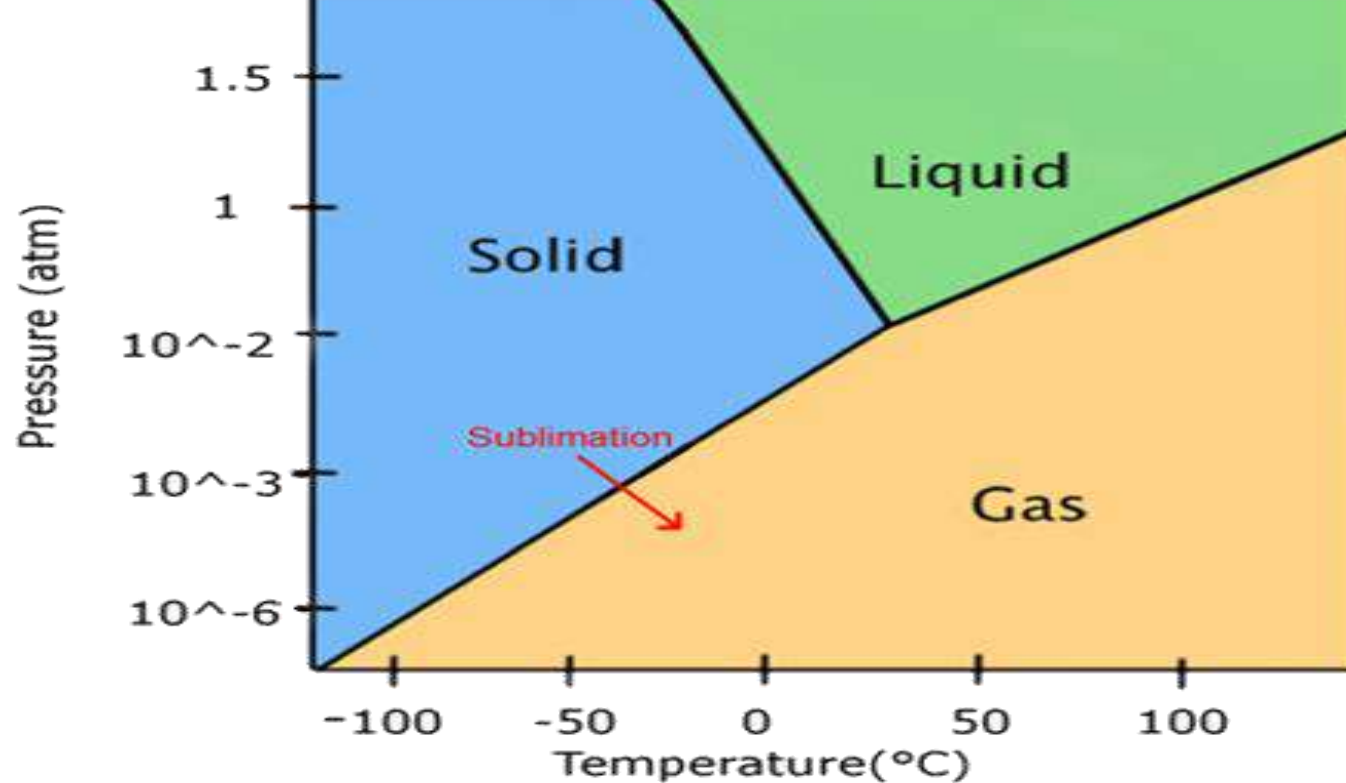
Congélation



Lyophilisation



La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre.



• **Phase 1**

La matière première est immédiatement surgelée.



• **Phase 2**

Le produit surgelé est lyophilisé grâce à une chambre à vide. L'eau devenue glace est transformée en vapeur d'eau par sublimation et s'extrait du produit.



• **Phase 3**

Les cellules étant intactes peuvent accepter une réhydratation instantanée.

2- Préparation de l'échantillon : lavage, Le broyage , enrichissement,
extraction, Séparation, purification

HOMOGENÉISATION

Méthode mécanique / physique

Avec l'ajout d'un tampon pour solubiliser l'échantillon
Force mécanique : rupture de la structure cellulaire

Obtention d'un extrait liquide (aqueuse, organique) = extrait acellulaire suite un broyage (désintégration de la structure cellulaire totalement ou partiellement)

Exemples

Broyage: dans un mortier / pilon (+ abrasif sable) en présence de l'azote liquide + tampon



Cisaillement

Broyeur à couteaux



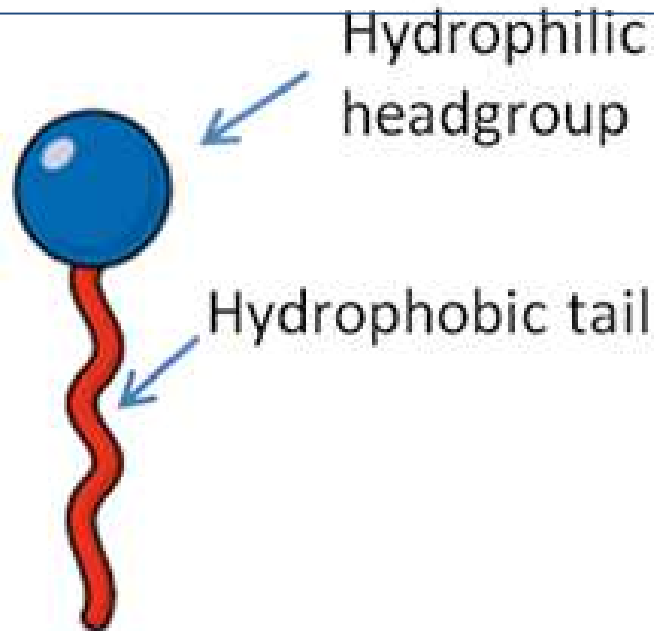
Sonde



1-Détergent

Un **détergent** (ou agent de surface, détersif, surfactant) est un composé chimique

La molécule du détergent est amphiphile, c'est-à-dire dotée d'une tête polaire, hydrophile (ou lipophobe), attirant l'eau, et d'une longue chaîne hydrocarbonée, apolaire, hydrophobe (ou lipophile), attirant les lipides (huiles et graisses). L'extrémité hydrophile est miscible à l'eau tandis que l'extrémité lipophile de la molécule est miscible au solvant apolaire.

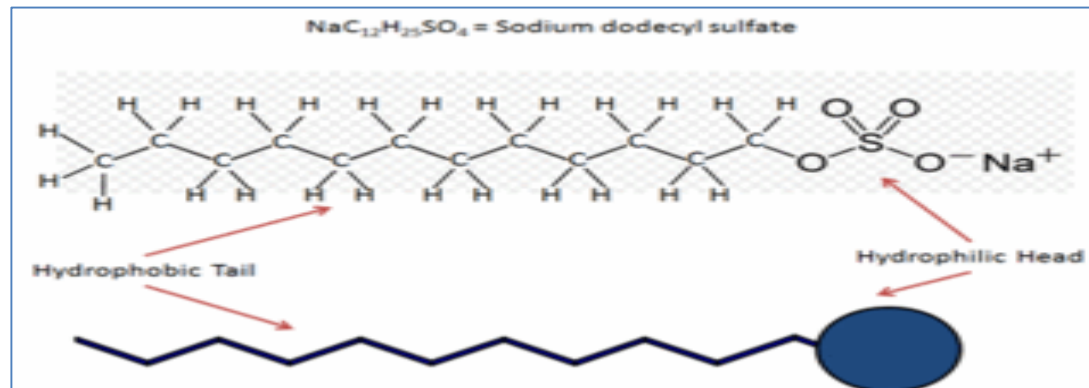
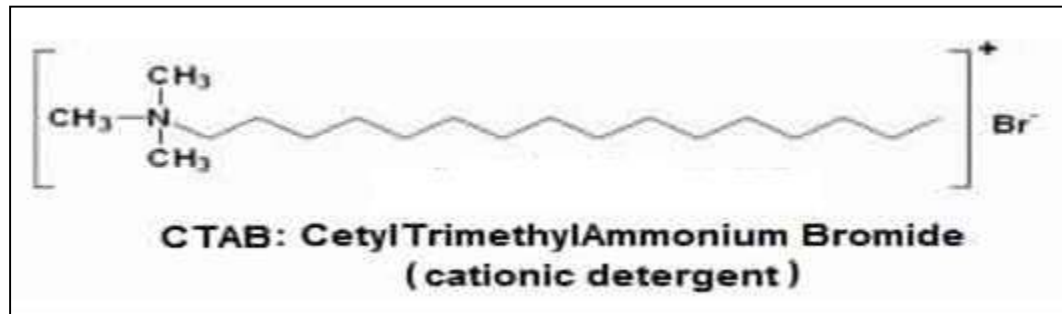


- Utilisation détergent / surfactant

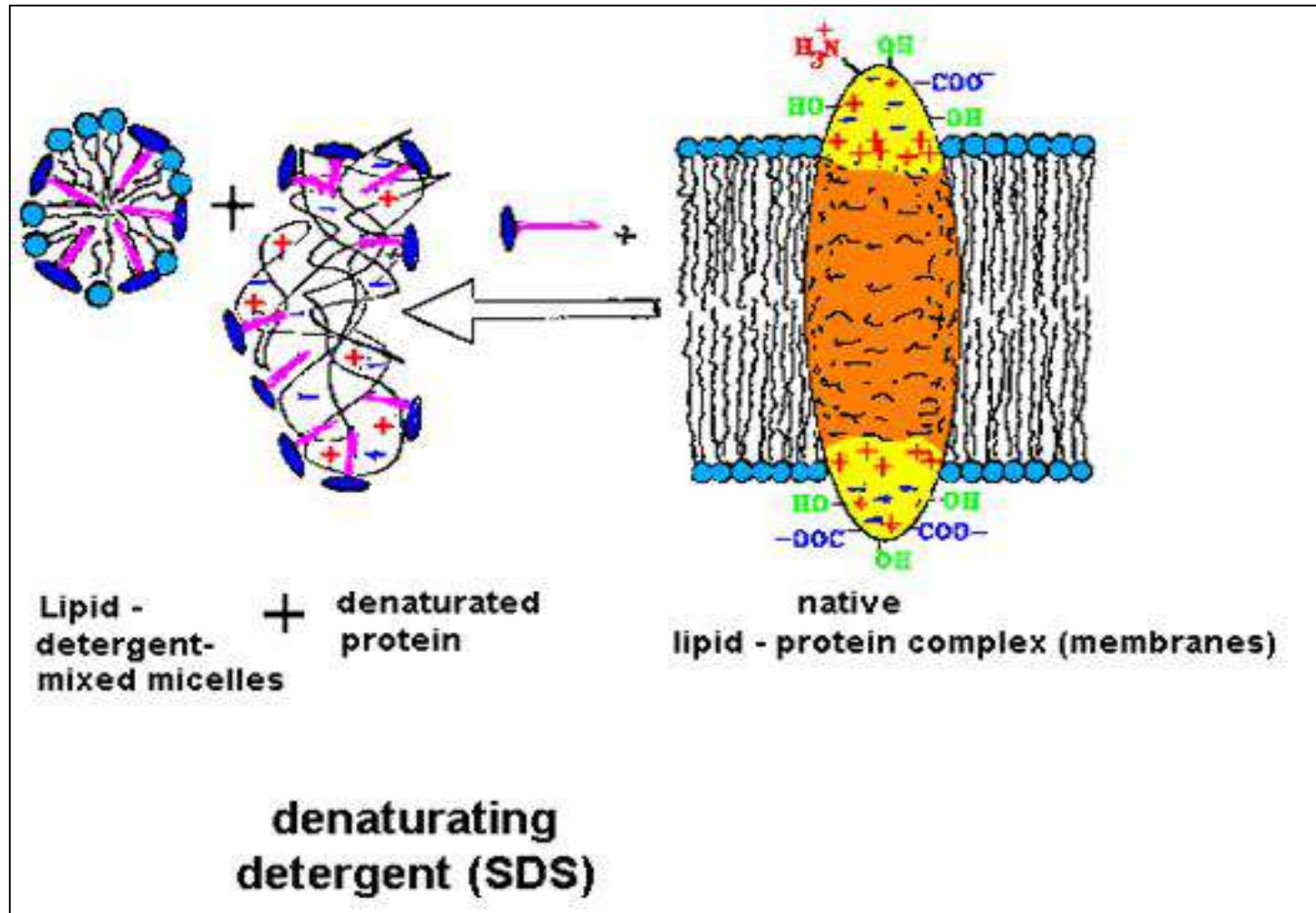
- ✓ Détergent ionique
- ✓ Détergent non ionique
- ✓ Détergent Zwitterionic

✓ Détergent ionique

Détergents ioniques : un groupe de tête hydrophile qui est chargé et peut être chargé négativement (anionique) ou positivement (cationique). Les détergents ioniques sont utilisés pour la disruption complète des structures cellulaires et la dénaturation des protéines.

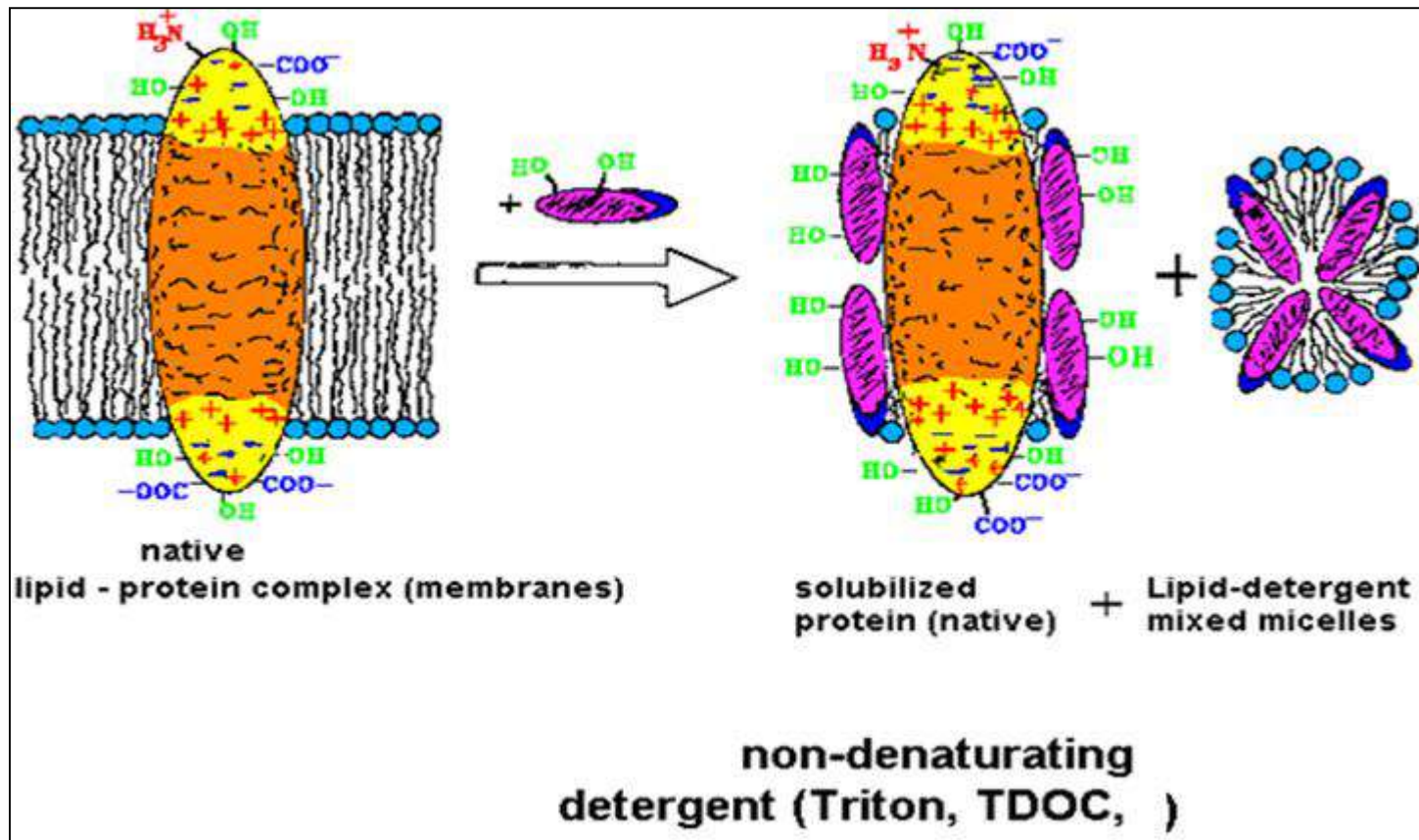


SDS is a very effective surfactant in solubilizing almost all proteins. It disrupts non-covalent bonds within and between proteins; thus it denatures them, resulting in the loss of their native conformation and function.



✓ Détergent non ionique

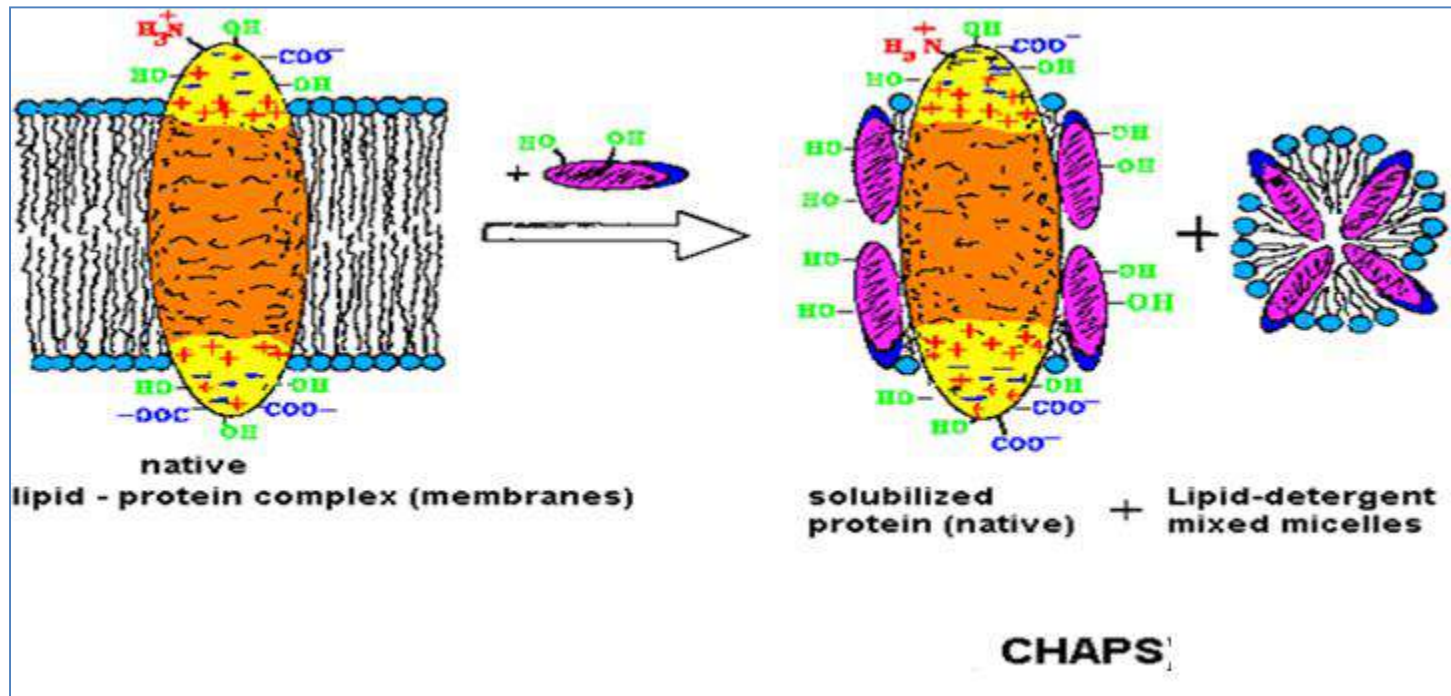
Nonionic detergents have uncharged and hydrophilic headgroups. They are considered mild surfactants as they break protein-lipid, lipid-lipid associations, but not protein-protein interactions, and most of them do not denature proteins. Therefore, proteins are solubilized and isolated in their native and active form, retaining their protein interactors. They are preferred for the isolation of membrane proteins.



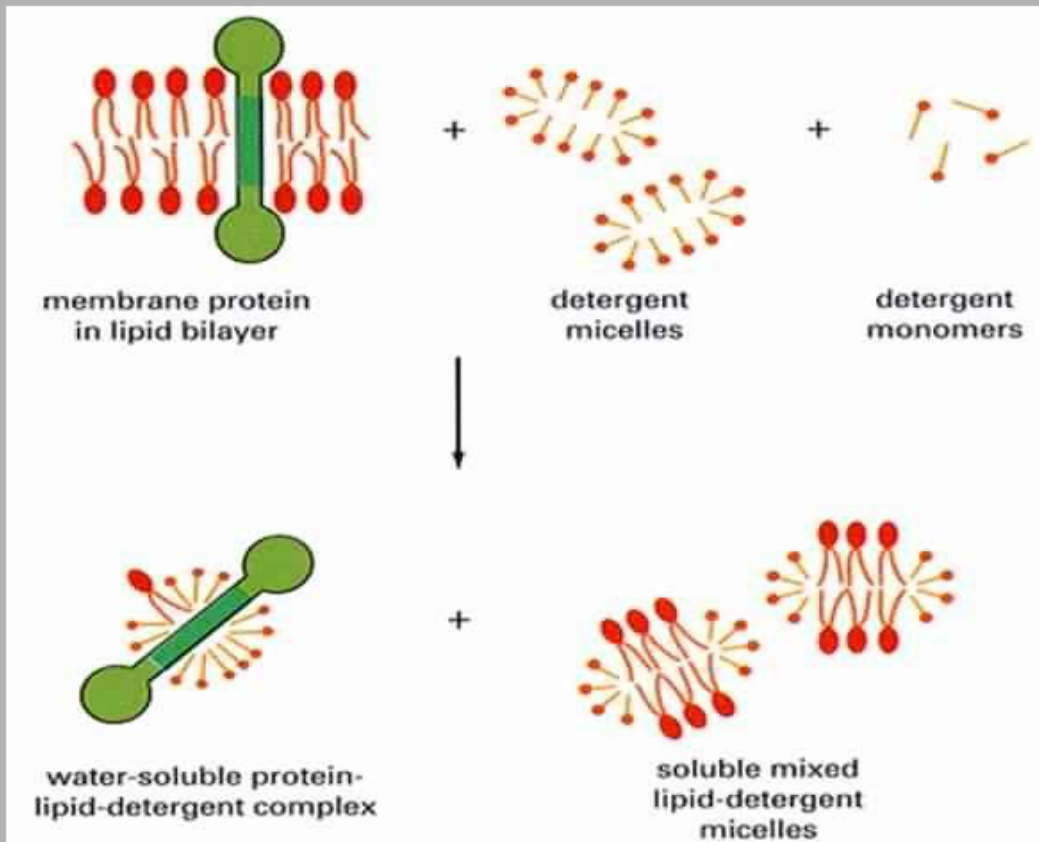
✓ Détergent Zwitterionic

The headgroups of zwitterionic (or amphoteric) detergents are hydrophilic and contain both positive and negative charges in equal numbers, resulting in zero net charge. They are more harsh surfactants than the nonionic ones

Zwitterionic detergents protect the native state of proteins without altering the native charge of the protein molecules.

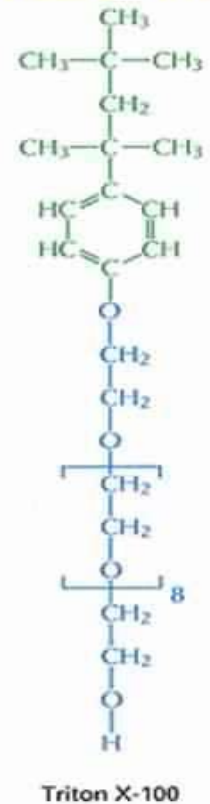
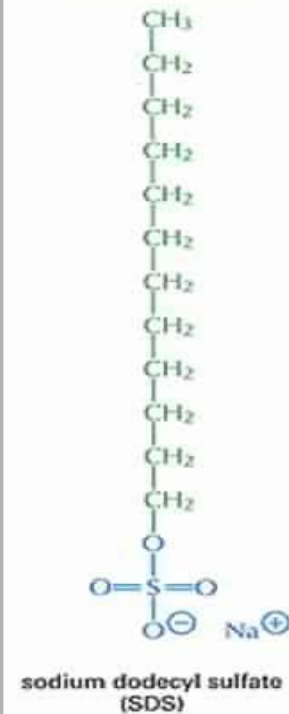


Principe d'action des détergents



**détergent
non-ionique**

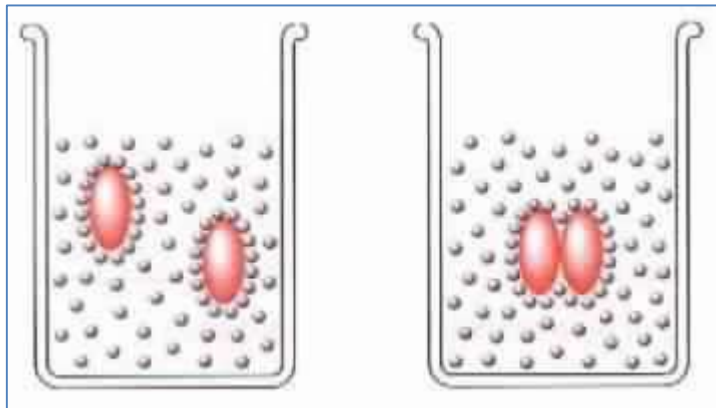
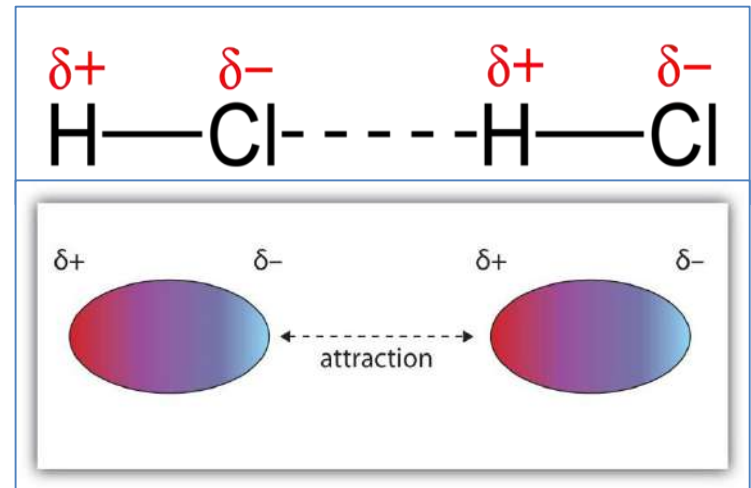
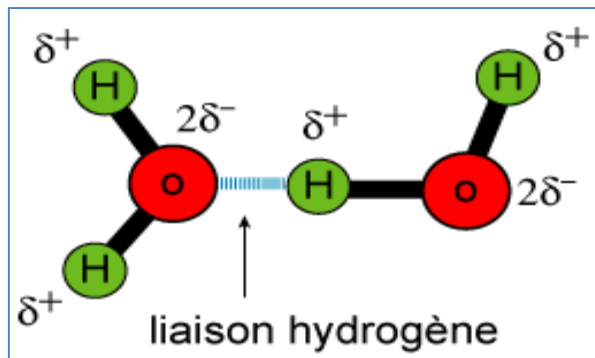
**détergent
ionique**



2-Chaotropes

Petites molécules chargés électriquement, cassent les interaction faible entre les molécules,

Chaotropic agents are similar substances to surfactants in that they break non-covalent interactions (hydrogen bonds, dipole-dipole interactions, hydrophobic interactions) facilitating protein denaturation, which in this case is usually reversible.



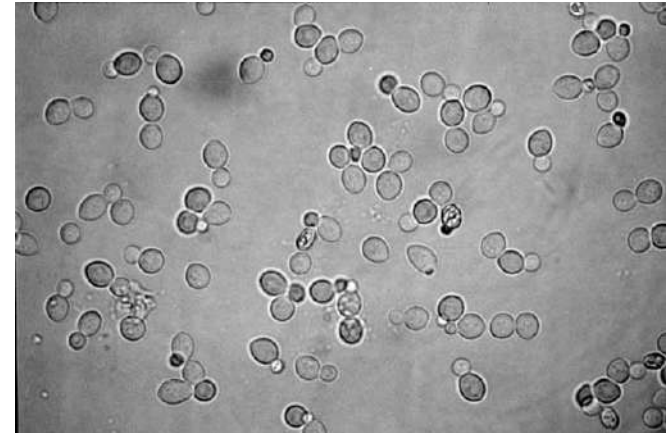
2-Enzymes

- lyse de la paroi ou/et membrane cellulaire
- lyse de la matrice extracellulaire

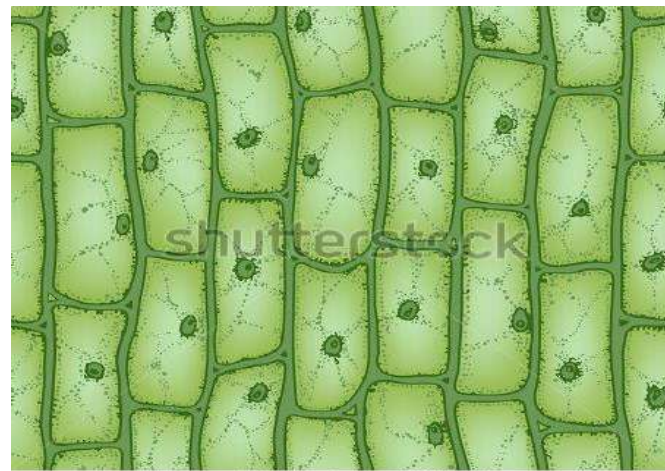
Lysozyme : lyse de le bactéries



Glucosidase: lyse de levure



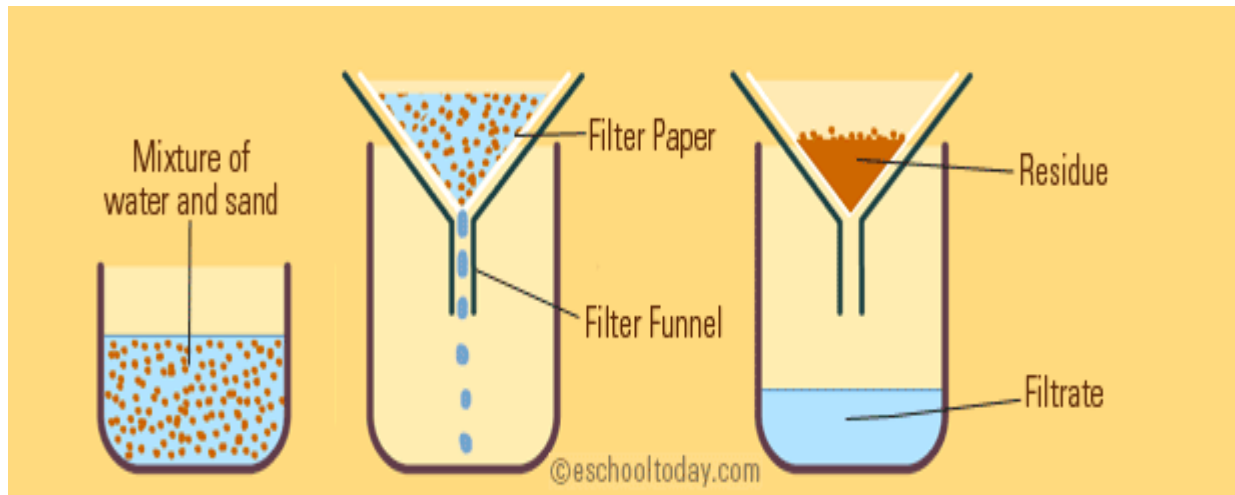
cellulase protéase : lyse de plante



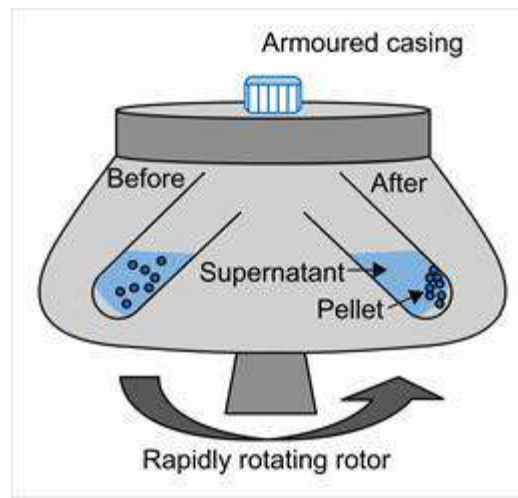
Chantinase : lyse de champignons



Filtration



Centrifugation



Extraction

Extraction liquide-liquide

https://www.youtube.com/watch?v=K3VcPJ7M_Ak

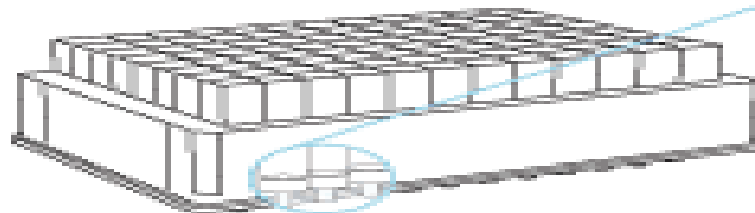
Extraction solide-liquide/ gaz-liquide

L'**extraction en phase solide** (*solid-phase extraction*, ou SPE) est une méthode de préparation de l'échantillon au cours de laquelle des composés en solution ou en suspension dans une phase liquide sont séparés des autres éléments du mélange par **adsorption** sélective sur une phase solide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Ce procédé utilise une phase stationnaire composé d'un adsorbant ou d'un polymère à empreinte moléculaire. Cette méthode est utilisée en chimie analytique pour concentrer et purifier des molécules d'intérêts contenues dans un échantillons avant analyse.

La SPE utilise l'affinité des solutés dissous ou en suspension dans un liquide (la phase mobile) pour un solide poreux à travers lequel l'échantillon est passé (la phase stationnaire). Selon le cas, soit les impuretés sont retenues par la phase stationnaire, ce qui purifie l'analyte d'intérêt dans la phase mobile, soit l'analyte est retenu sur la phase stationnaire, les impuretés sont éliminées avec la phase mobile. Dans ce dernier cas, une étape supplémentaire est requise : l'élution de l'analyte, qui doit être désorbé de la phase stationnaire par un solvant approprié

Remove Proteins

Eliminate Phospholipids



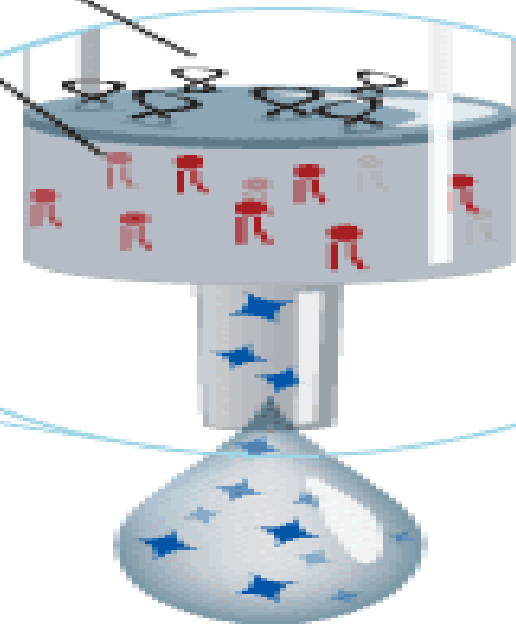
Proteins



Phospholipids



Target Analyte

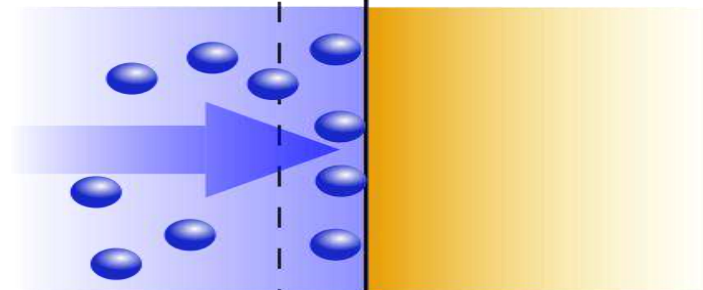


Interface liquide-solide

Film liquide

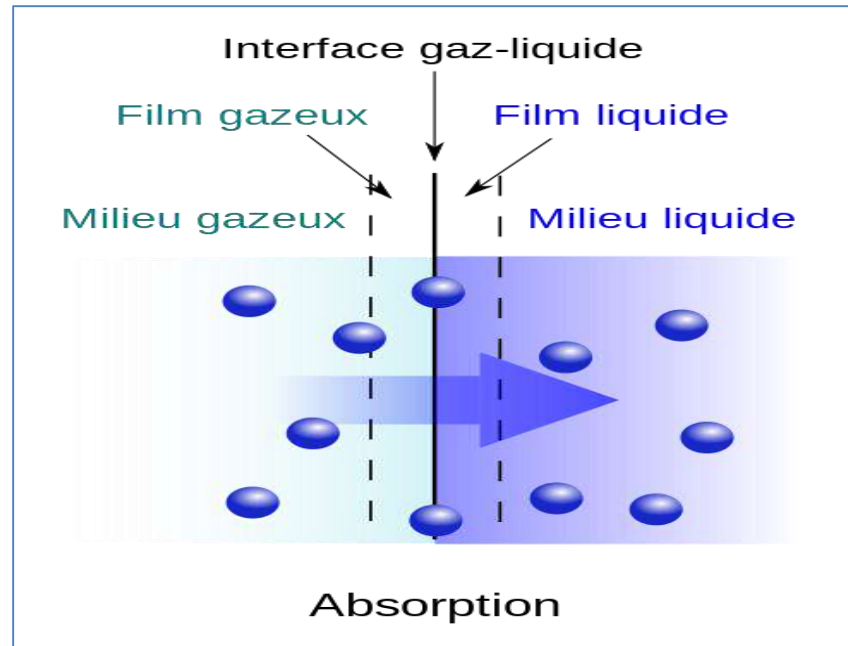
Milieu liquide

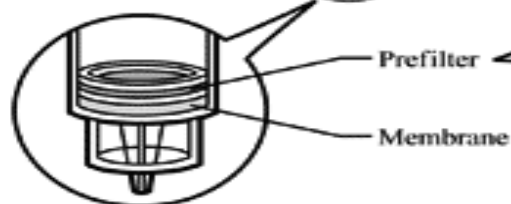
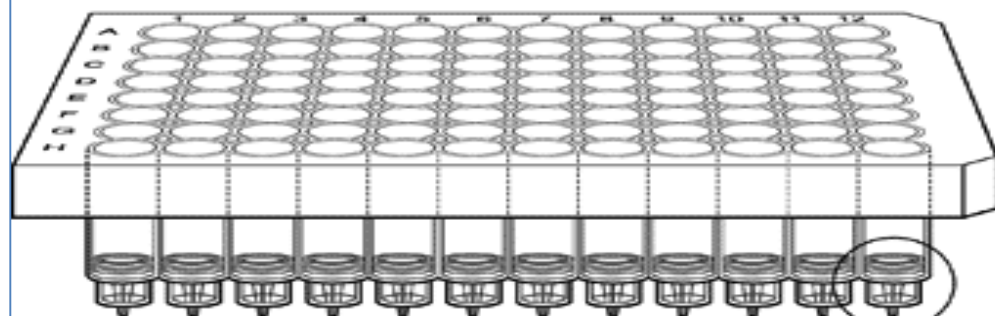
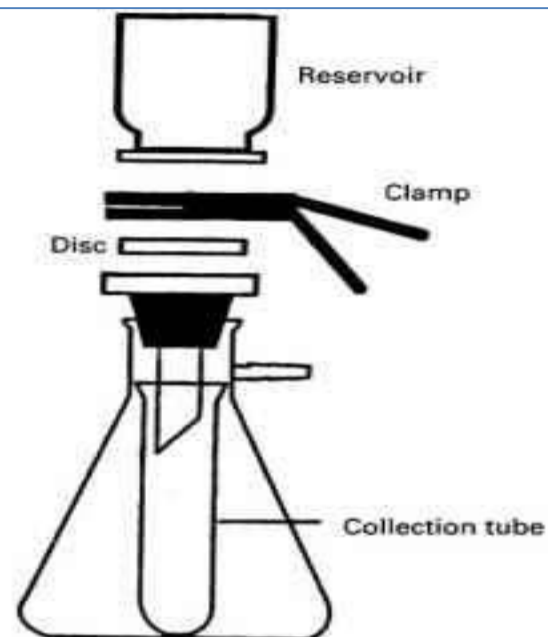
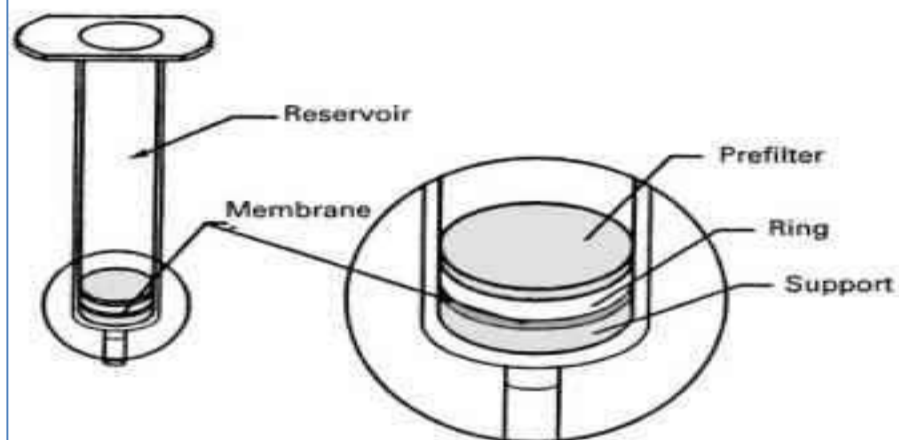
Milieu solide



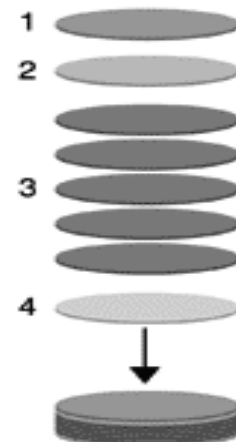
Adsorption

L'**absorption (extraction gaz-liquide)** est un phénomène ou processus physique et chimique dans lequel des atomes, molécules ou ions pénètrent dans une phase gazeuse, liquide ou solide. Ce phénomène est différent de l'adsorption où les molécules adsorbées restent à la surface.



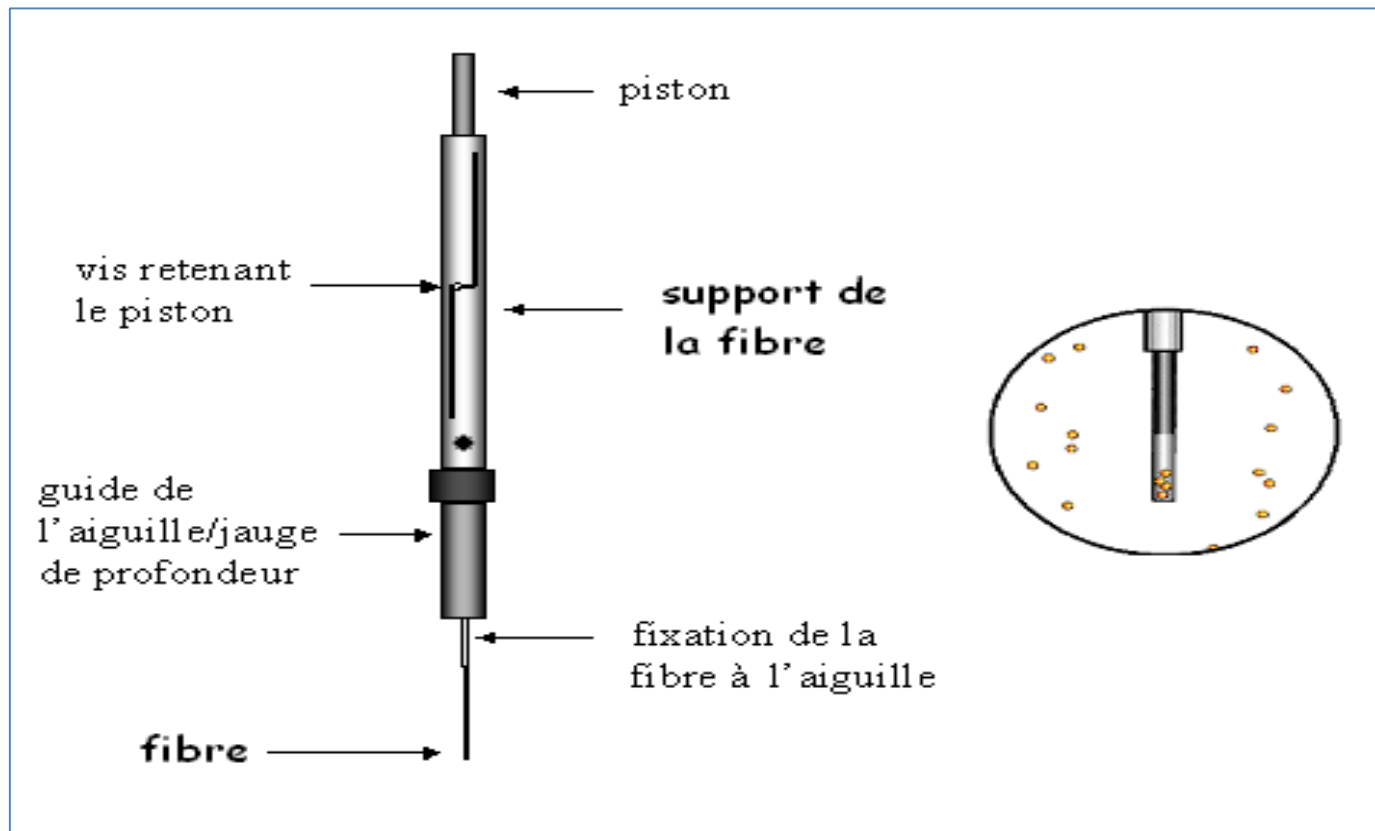


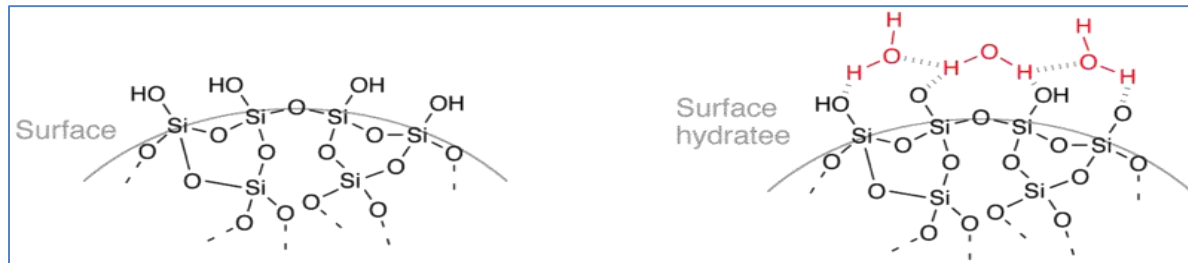
3M Patented Polypropylene Prefilter



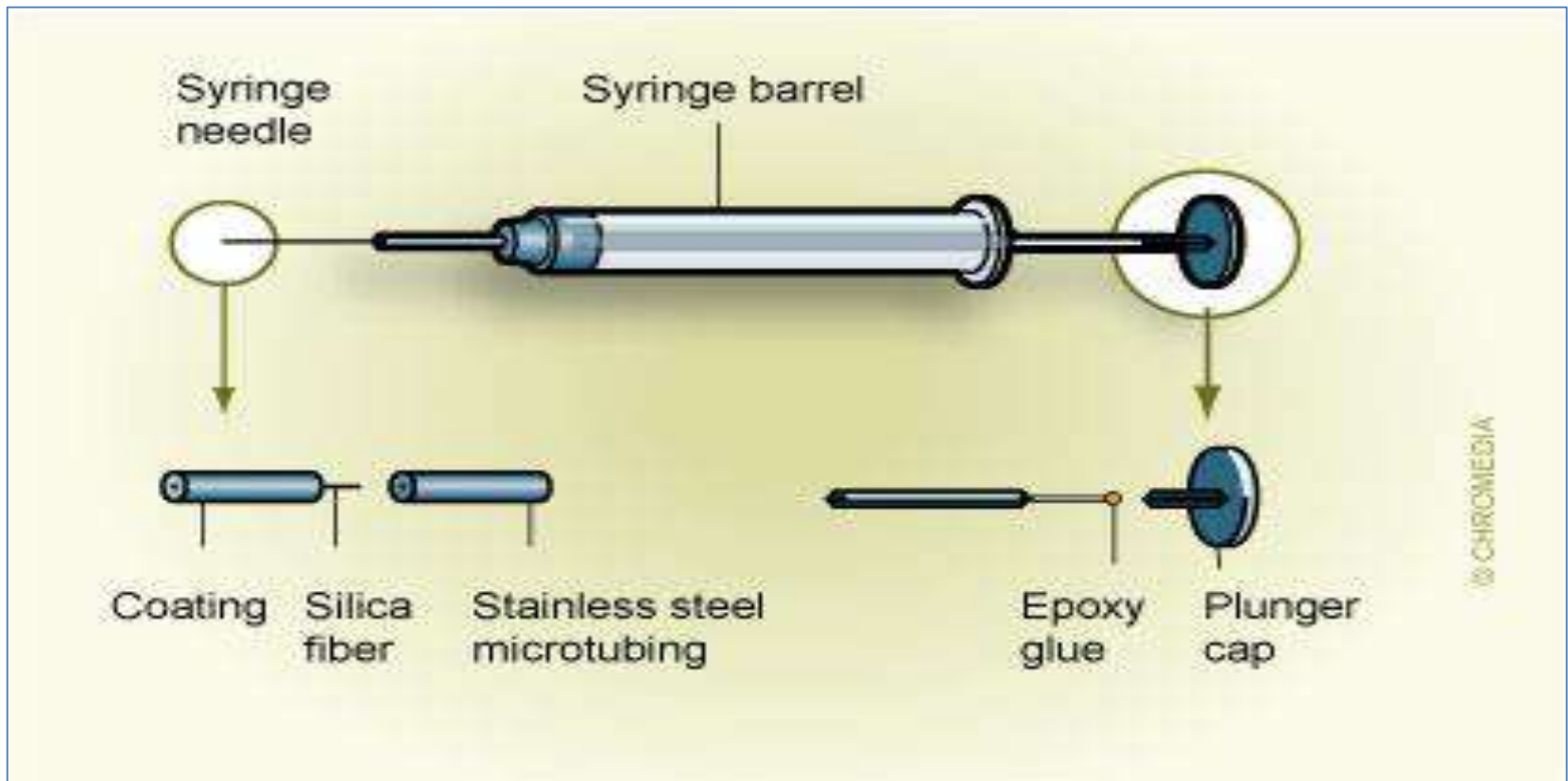
La Micro Extraction en Phase Solide

Cette méthode permet l'extraction et la concentration des composés volatils dans l'air ou dans l'espace de tête d'un échantillon. Elle consiste à piéger les molécules sur une fibre de silice fondue recouvert d'un ou plusieurs polymères. La fixation des molécules se fait soit par adsorption soit par absorption suivant la nature du polymère.





Silice

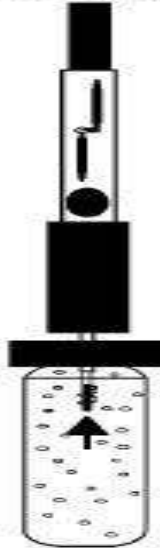


Extraction Procedure

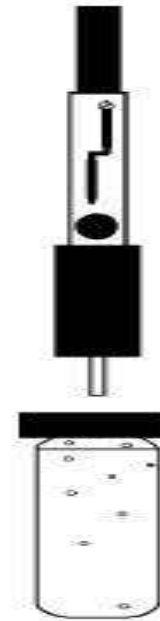
Pierce septum
on sample container.



Expose SPME
fiber/extract analytes.

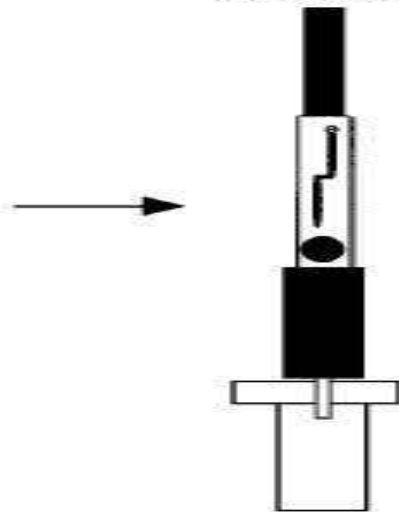


Retract fiber/withdraw needle.



Desorption Procedure

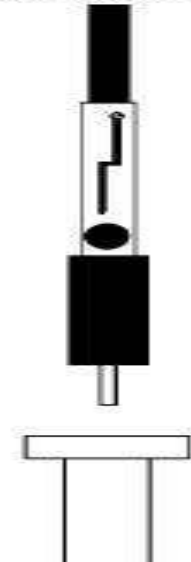
Pierce septum in GC inlet (or
introduce needle into SPME/HPLC
interface).



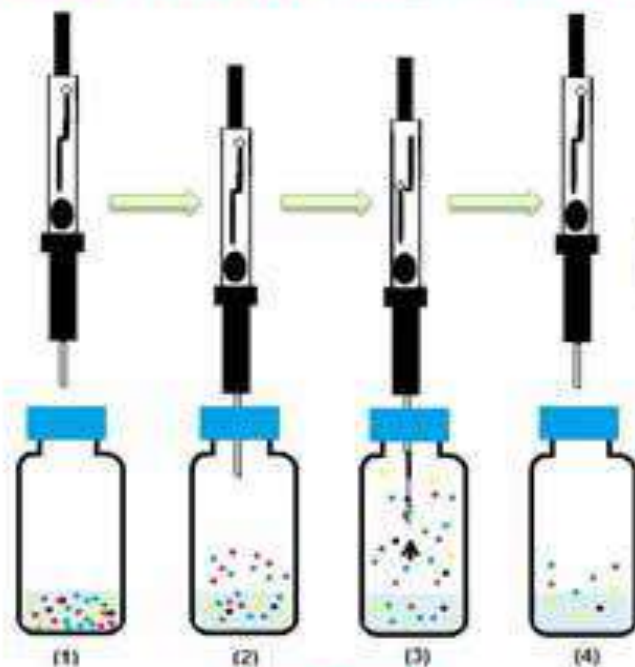
Expose fiber/desorb analytes.



Retract fiber/
withdraw needle.



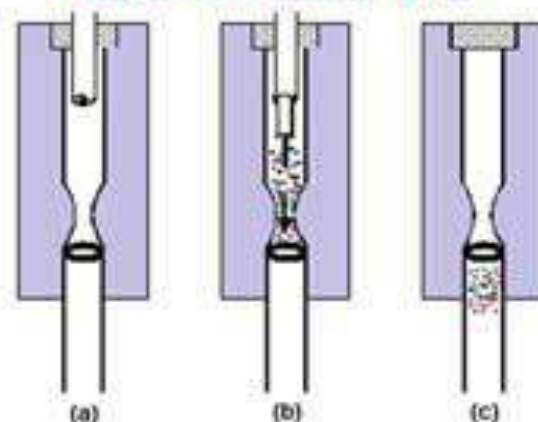
Headspace Solid-phase Microextraction (HS-SPME)



magnetic stirring speed: 600 r/min

- (1) The spiked-blank sample was placed in a 10 mL headspace-vial;
- (2) Equilibrated for 3 min at 60 °C;
- (3) Exposed the 65 µm PDMS-DVB fiber and extracted the analytes for 20 min at 60 °C;
- (4) Retracted fiber and withdrew the needle

Sample Desorption Steps

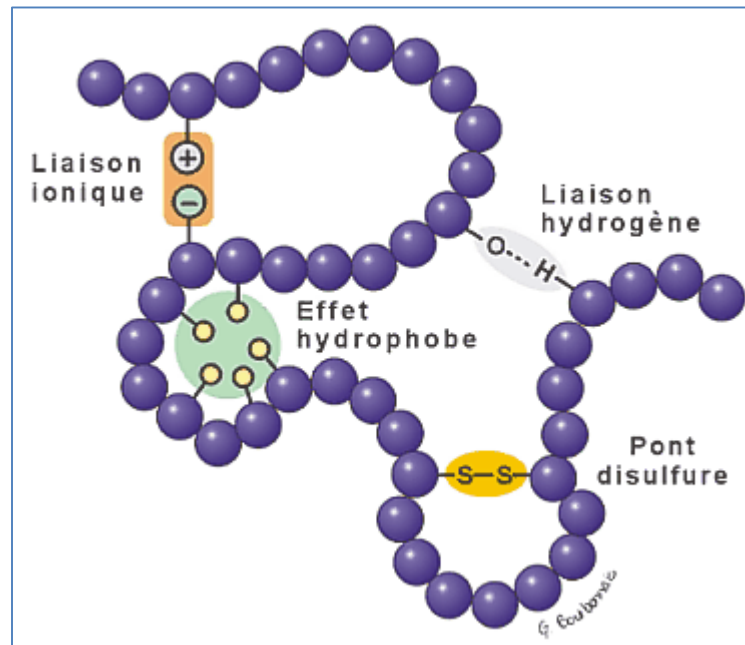
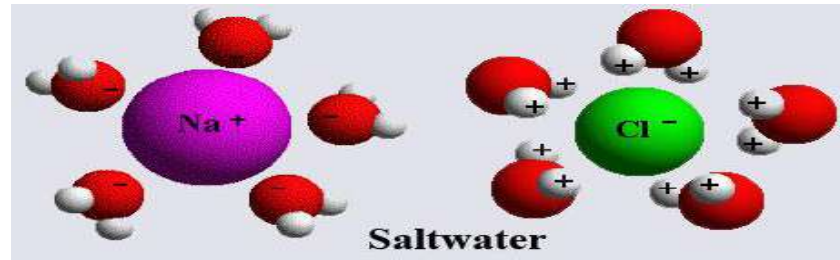


- (a) Needle penetrates the septum;
- (b) Thermal desorption of the analytes, 3 min at 250 °C;
- (c) Chromatographic analysis of the analytes.

- celestolide
- musk ambrette
- tonalide
- musk xylene
- musk ketone
- not the target analytes

Solubilité/précipitation

La **solubilité** est la capacité d'une substance, appelée soluté, à se dissoudre dans une autre substance, appelée solvant, pour former un mélange homogène appelé solution.



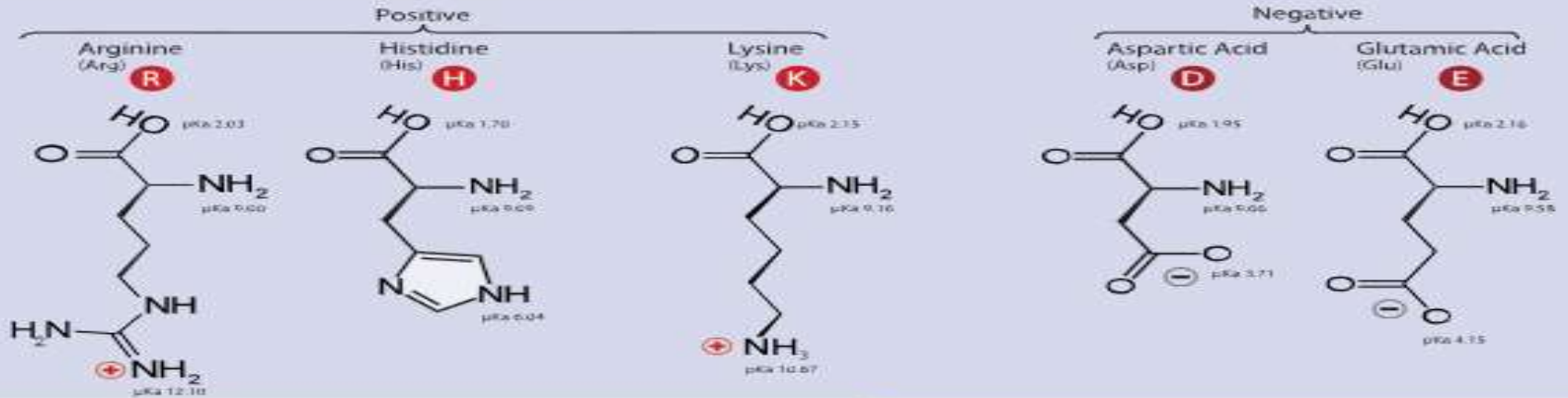
Twenty-One Amino Acids

⊕ Positive

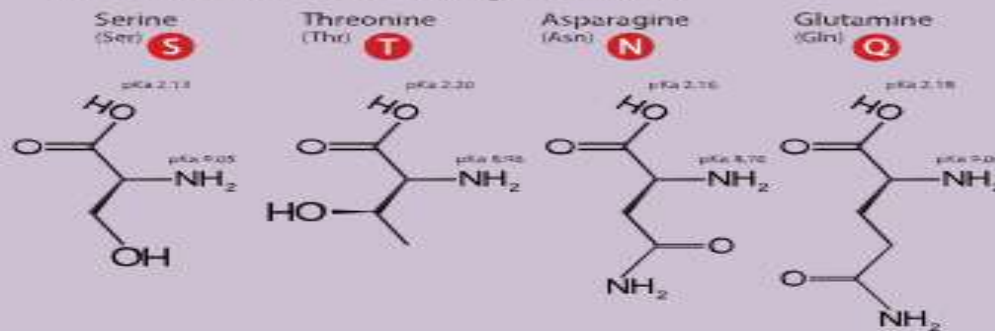
⊖ Negative

• Side chain charge at physiological pH 7.4

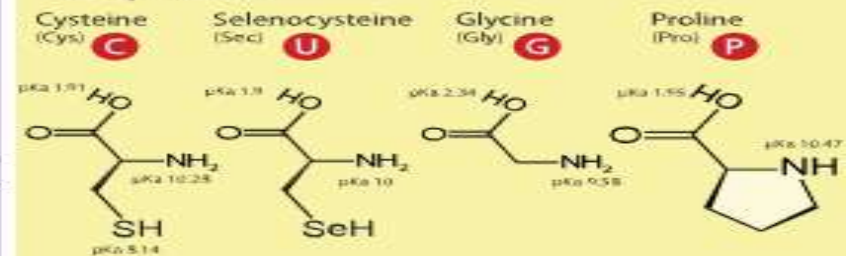
A. Amino Acids with Electrically Charged Side Chains



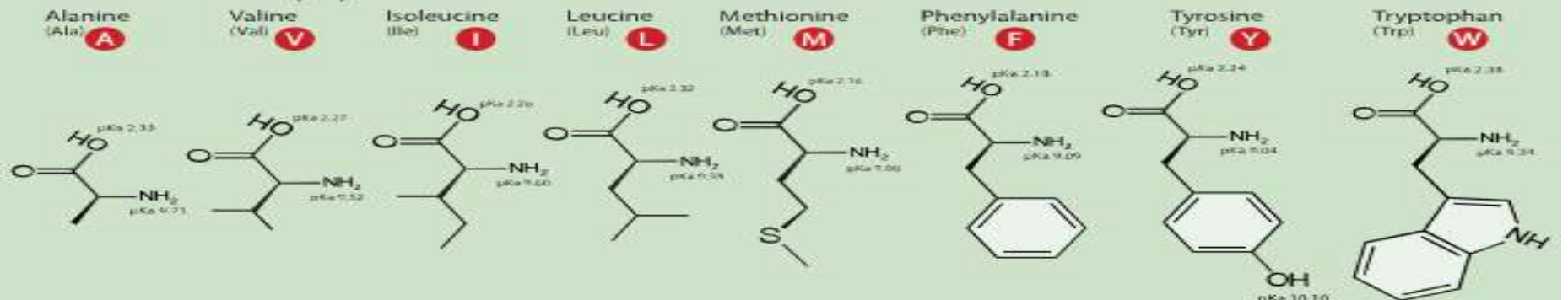
B. Amino Acids with Polar Uncharged Side Chains



C. Special Cases

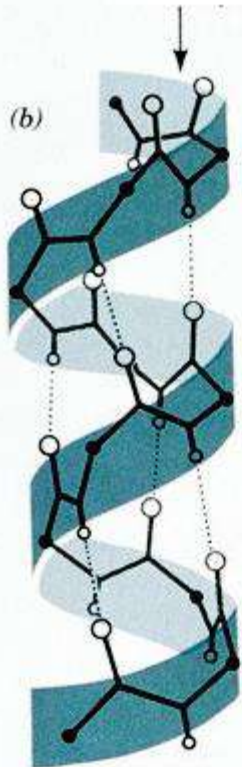


D. Amino Acids with Hydrophobic Side Chain

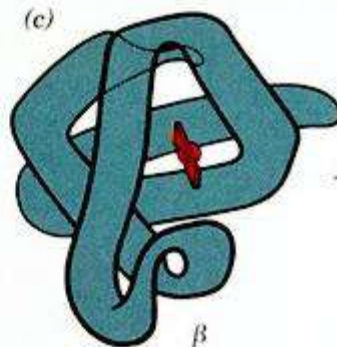


(a) - Lys - Ala - His - Gly - Lys - Lys - Val - Leu - Gly - Ala -

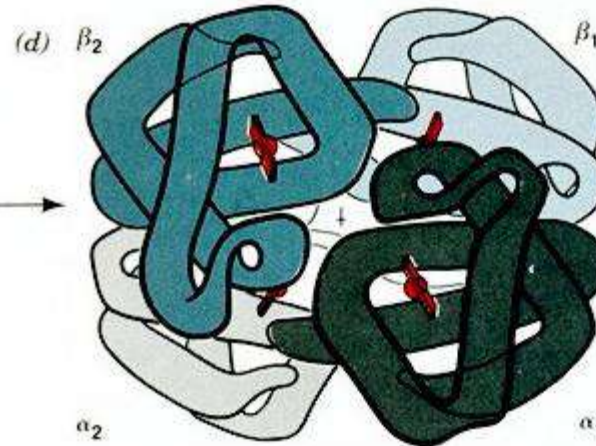
Structure primaire (séquence en acide aminés de la chaîne polypeptidique)



Structure secondaire
(hélice)

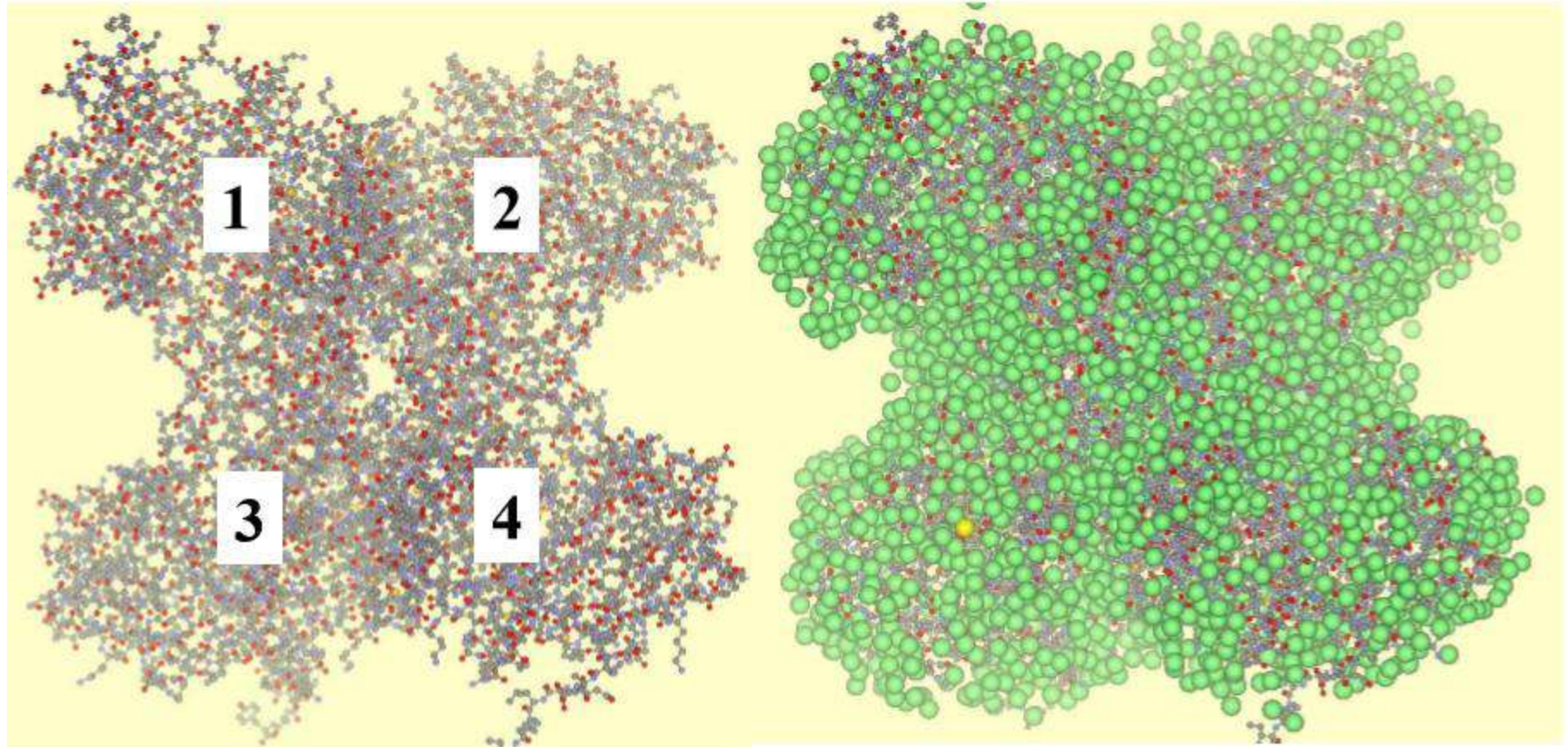


Structure tertiaire
(repliement de la séquence polypeptidique)



Structure quaternaire
(oligomérisation des polypeptides)

Structure tridimensionnelle de la protéine aldolase: un homo-tétramère



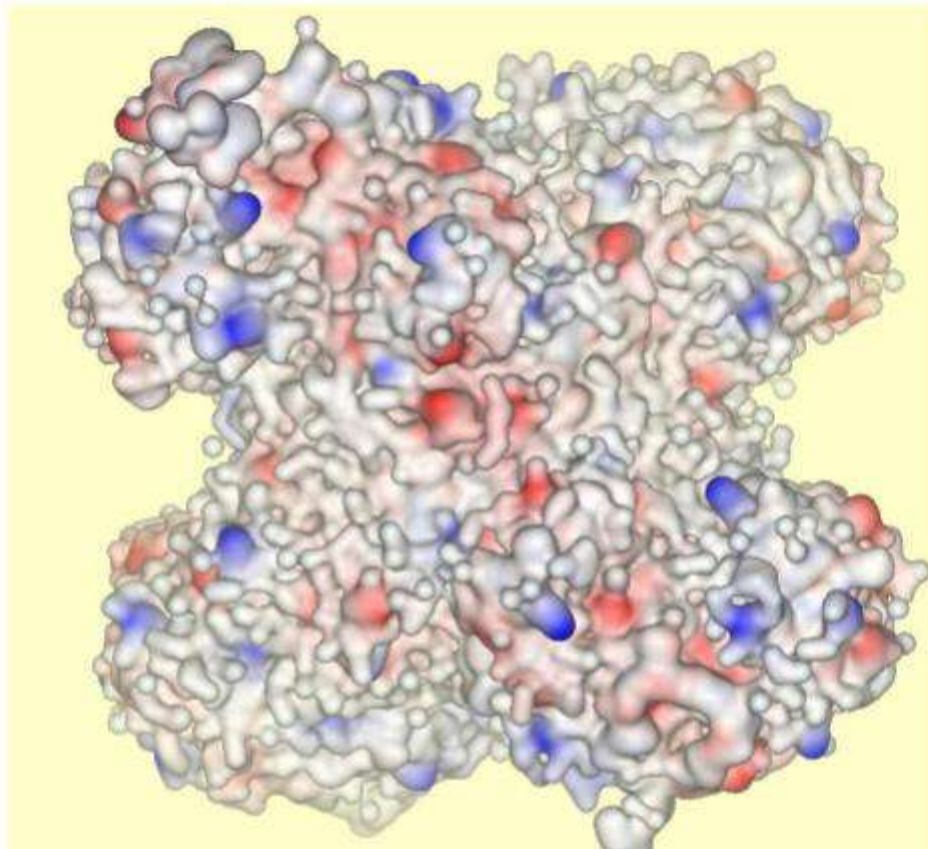
11,100 atomes (sauf
hydrogène)

+ 2,800 molécules d'eau

Figure 5

Protéine Aldolase

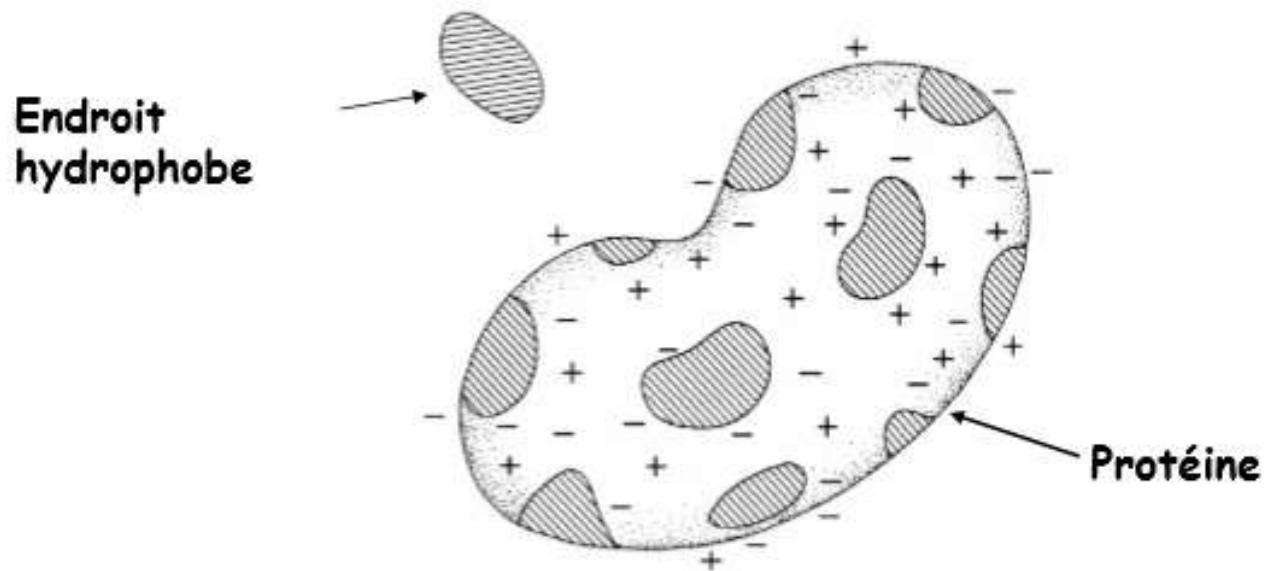
Représentation de surface



Surface de la protéine
aldolase en fonctions des
potentiels électrostatiques
des acides aminés

- Rouge - charge négative
- Bleu - charge positive
- Blanc - neutre

Représentation simplifiée d'une protéine



Distribution des charges et des régions hydrophobes sur la surface d'une protéine -> les régions non-polaires constitueraient plus de 50% de la surface des protéines globulaires

Figure 7

Les protéines, sont d'autant plus solubles en solution aqueuse qu'elles sont hydratées en formant une coque. Cette coque d'hydratation les empêche de s'agréger ensemble

B. Solubilité et précipitation des protéines

la **solubilité d'une protéine dépend**:

- a) des **interactions polaires avec le solvant aqueux**
- b) des **interactions ioniques avec les sels en solution**
- c) des **forces électrostatiques répulsives entre molécules ou agrégats de charge similaire**

ces facteurs augmentent les interactions avec la solution et diminuent les interactions protéines-protéines, empêchant l'agrégation des protéines.

- **la précipitation exige la formation d'agrégats de protéines**

normalement, le mouvement thermique 'Brownien' exerce une certaine force sur chaque agrégat, les gardant ainsi en solution

-à partir d'une certaine taille d'agrégats, cette force n'est pas suffisante pour contrecarrer celle de la force gravitationnelle, ce qui mène à la précipitation

le solvant utilisé dans l'isolement des protéines est toujours aqueux, mais ses propriétés peuvent être changées pour que la solubilité d'une protéine soit modifiée

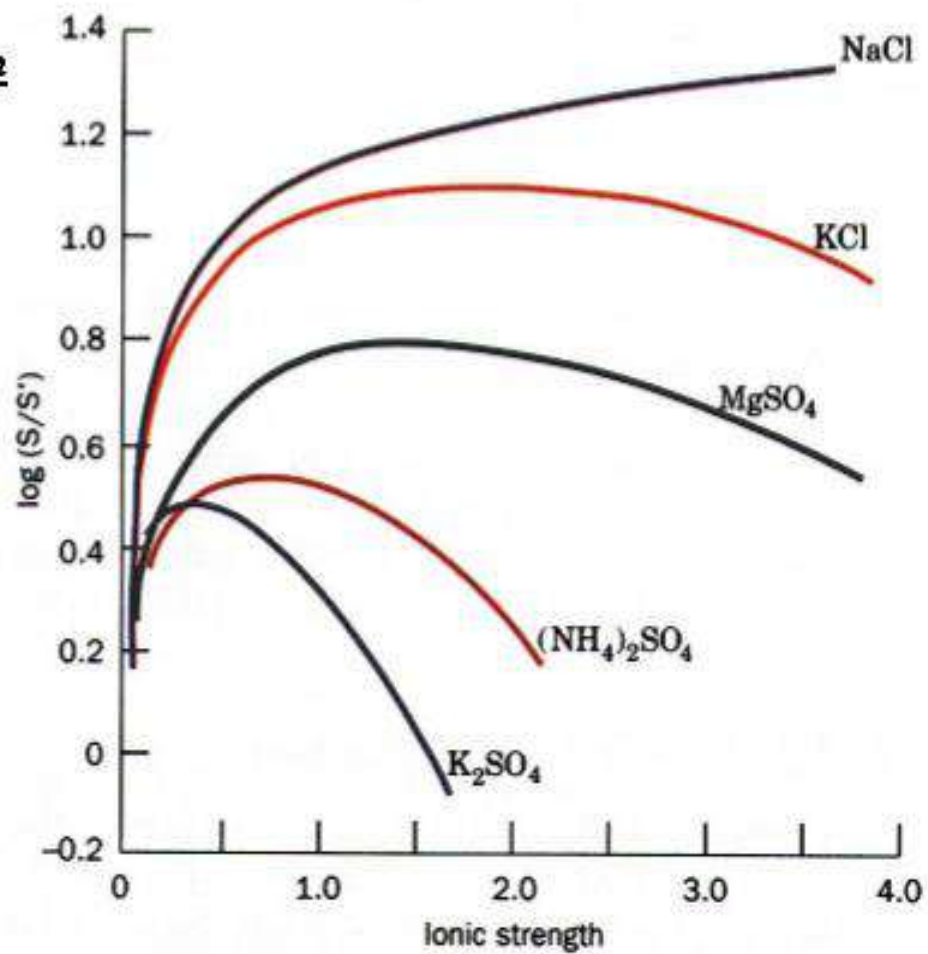
- les variations typiquement utilisées pour diminuer la solubilité d'une protéine sont :
 - **la force ionique** (concentration saline)
 - **le pH**
 - **ajout de solvants organiques**
 - **ajout de polymères inertes**

Solubilité / précipitation en fonction de la force ionique

B.1 Solubilité des protéines à faible concentration de sels.

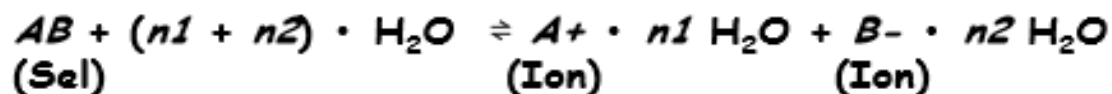
- la solubilité d'une protéine en solution aqueuse **dépend de la concentration en sels dissous**
- cette concentration en sels est exprimée par la **force ionique, I** , $I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$
où c_i représente la concentration de chaque espèce ionique i et Z_i est leur charge électrique
- la solubilité d'une protéine varie selon la nature des ions en solution et augmente généralement avec la concentration de sels en solution (Figure 8)
- dans la zone de force ionique de zéro à 0.5M, l'augmentation en solubilité avec une concentration croissante en sels est connue sous le nom de "**salting in**"
- à ces concentrations, **les sels lient directement les protéines et augmentent leur charge nette**, ce qui favorise leur solubilité parce que:
 - les sels augmentent les interactions avec l'eau
 - les sels augmentent la répulsion entre protéines (↓ agrégation)

Solubilité de la
carboxyhémoglobine
en fonction de la
force ionique et de
la nature des ions



B.2 Dessalage à des concentrations de sels élevées.

- le dessalage ou « **salting out** » d'une protéine à de hautes concentrations de sel représente une des techniques les plus utilisées en purification des protéines
- ce phénomène est dû essentiellement à la **compétition entre les ions salins ajoutés et les protéines pour la solvation** (i.e, **accès aux molécules d'eau**)
- l'hydratation des ions de sels a une forte tendance à séquestrer les molécules d'eau



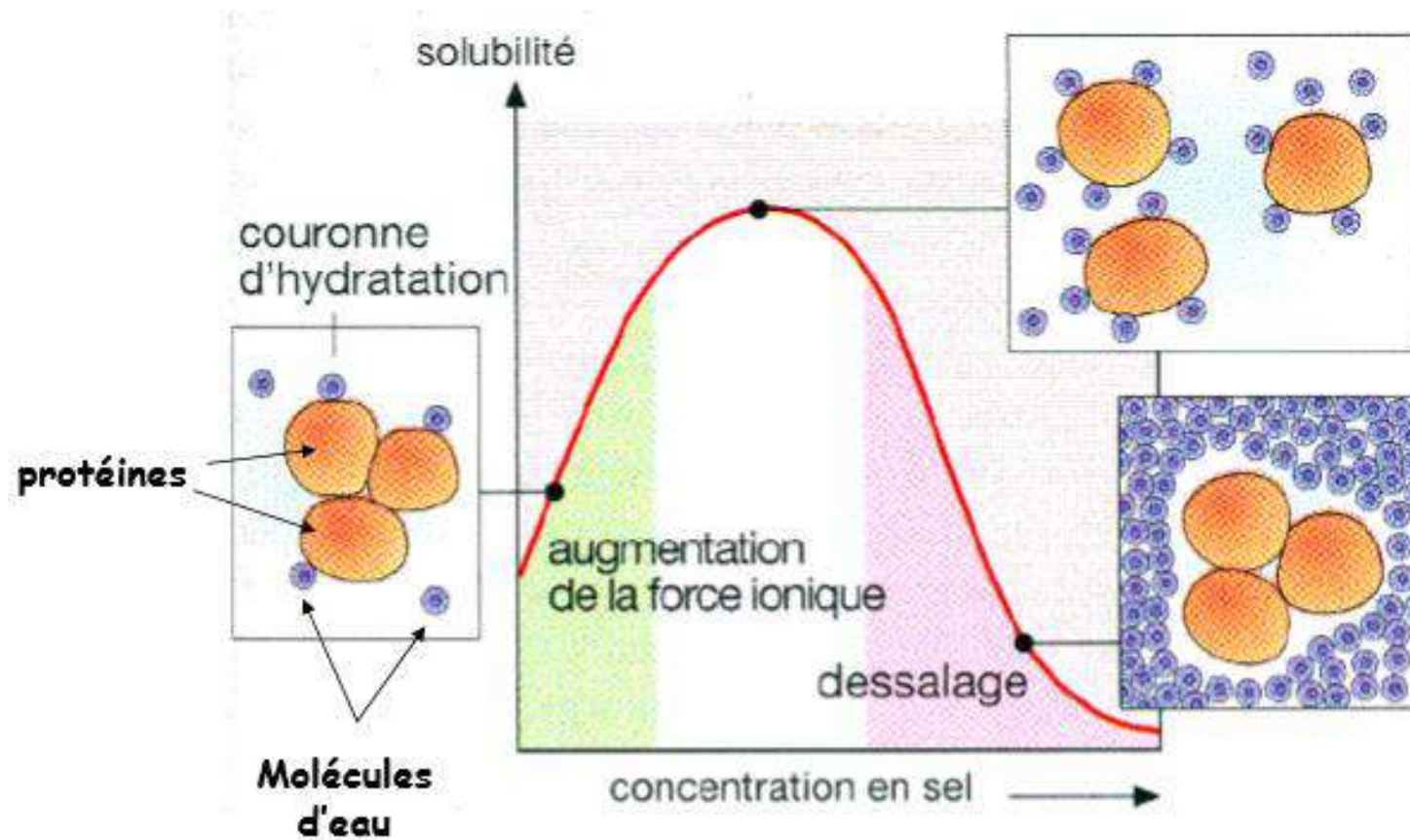
- la **séquestration de l'eau résultera en une diminution de la solvation des protéines**
- une fois qu'une quantité suffisante de molécules d'eau a été séquestrée, les protéines auront moins de surface solvatée, ce qui favorisera leur agrégation (Figure 9)
- le dessalage est largement une fonction de l'hydrophobicité de la protéine:
les régions hydrophobes seront les premières à être moins bien solvatées

Récapitulation : le dessalage d'une protéine, c'est:

- une **agrégation protéique** qui implique des **régions hydrophobes** sur la surface d'une protéine.
- au fur et à mesure que les **ions de sels** deviennent solvatés, les **molécules d'eau libres** deviennent peu nombreuses.
- Il y aura une plus **grande tendance** pour la protéine de perdre des **molécules d'eau** autour des **résidus hydrophobes**
 - ce qui favorise l'agrégation, puisque les régions hydrophobes exposées ont une préférence à interagir entre elles plutôt qu'avec de l'eau

(Figure 10)

Résumé du phénomène de dessalage

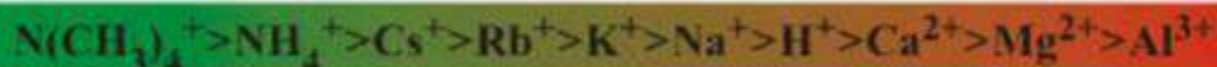
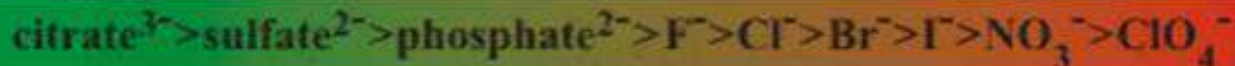


Certains ions facilitent la précipitation des protéines: La série Hofmeister

- Hofmeister a montré, en 1888, que certains ions favorisent la précipitation des protéines à haute concentration (salting out) alors que d'autres favorisent leur solubilisation à faible concentration (salting in)

Favorisent la précipitation

strongly hydrated anions



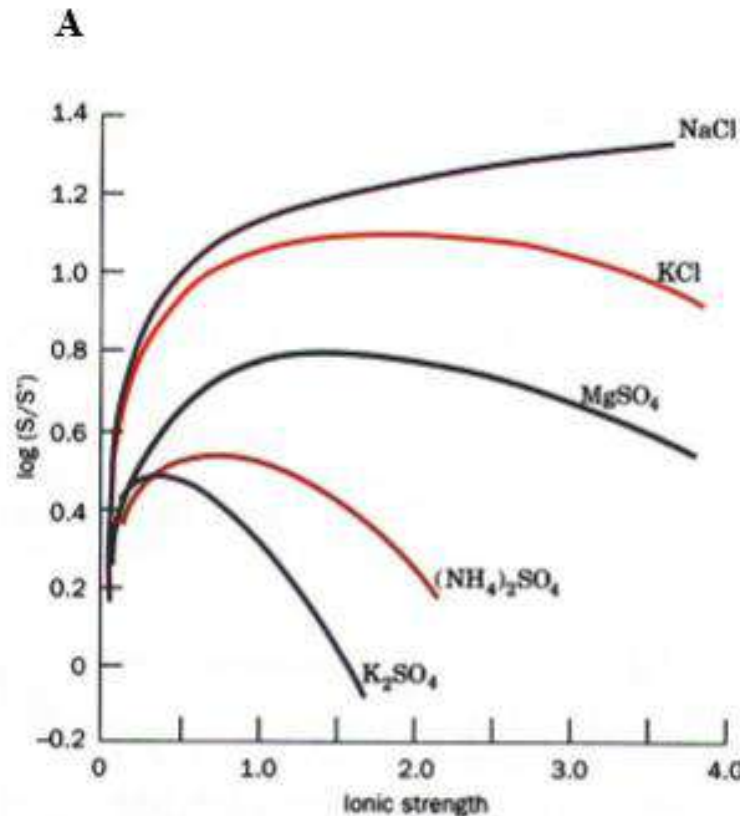
weakly hydrated cations

Favorisent la solubilité

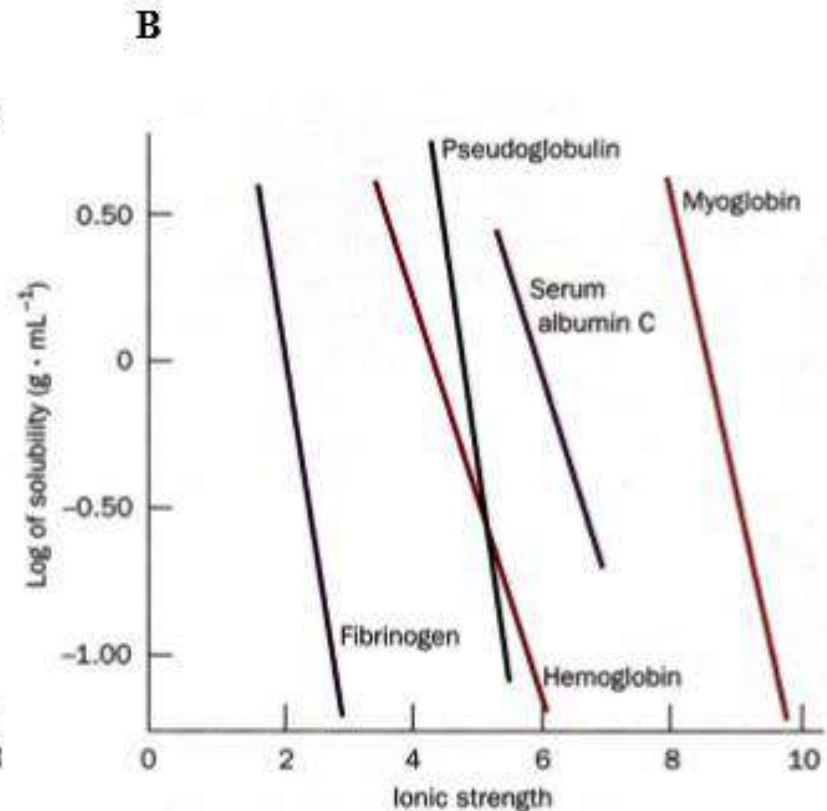
weakly hydrated anions

strongly hydrated cations

- le sel utilisé le plus couramment en précipitation de protéines est le **sulfate d'ammonium** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Solubilité de la carboxyhémoglobine en fonction de la force ionique et de la nature des ions



Solubilité de plusieurs protéines dans des solutions de sulfate d'ammonium

Résumé

Salting in: augmentation de la solubilité d'une protéine dans l'eau par l'ajout de faibles concentrations de sels

- les ions salins interagissent directement avec les protéines
- les ions de même charge augmentent la répulsion entre protéines, ce qui réduit leur agrégation → **favorise leur solubilité**
- ces ions (qui sont hydrophiles) augmentent les interactions des protéines avec le solvant aqueux → **favorise leur solubilité**

Salting out: diminution de la solubilité d'une protéine dans l'eau par l'ajout de hautes concentrations de sels.

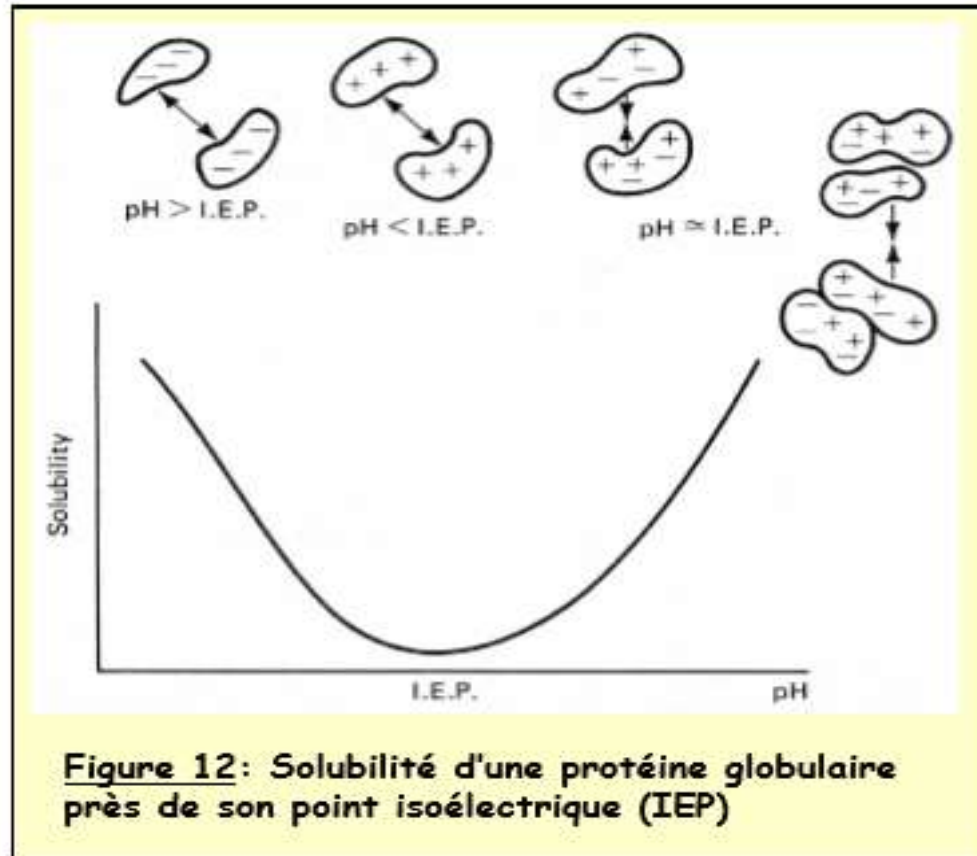
- les ions salins n'interagissent pas avec les protéines
- l'ajout de hautes concentrations de sels très hydrophiles amène la séquestration des molécules d'eau par ces ions
- la quantité de molécules d'eau disponible pour solubiliser les protéines diminue
- les régions hydrophobes des protéines seront déshydratées en premier lieu ce qui favorisera le rapprochement des régions hydrophobes des protéines (via interactions hydrophobe -> effet goutte d'huile)

Solubilité/précipitation en fonction de pH

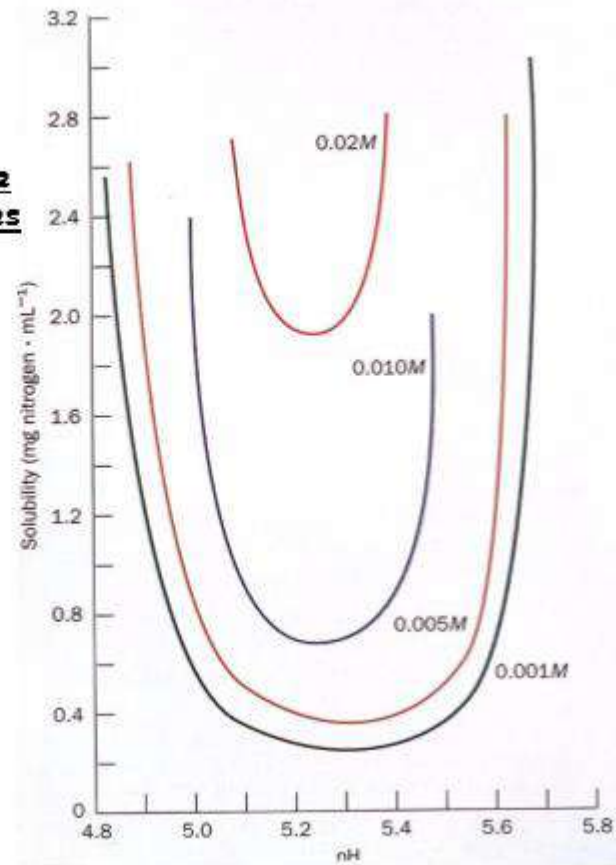
B.3 Effet du pH sur la solubilité d'une protéine

- les protéines sont constituées de nombreux groupes ionisables possédant des pK_a différents
- chaque protéine possède un point ou pH isoélectrique où il y a autant de charges positives que de négatives -> la charge nette de la protéine = 0
- au pH isoélectrique, une protéine a tendance à devenir moins soluble: une protéine avec une charge globale nette près de zéro minimise la répulsion électrostatique et permet aux forces électrostatiques locales de prédominer menant ainsi à une attraction entre les molécules -> agrégation -> précipitation (Figure 12)
- ce phénomène est décrit sous le nom de précipitation isoélectrique et permet de purifier une protéine sélectivement en amenant le pH au point isoélectrique de cette protéine
- dans un mélange des protéines, cette situation est compliquée par la présence d'interactions hétérogènes: des protéines qui possèdent des points isoélectriques différents s'agrègent afin de former un précipité isoélectrique.
 - la spécificité de la précipitation isoélectrique peut être améliorée par l'inclusion d'un sel qui décroît d'avantage la solubilité de la protéine d'intérêt (Figure 13)

Solubilité d'une protéine selon le pH



Solubilité de la β -lactoglobuline
en fonction du pH à différentes
concentrations de NaCl



Précipitation par solvants organique

B.4 Précipitation des protéines avec des solvants organiques.

- l'addition d'un solvant miscible avec l'eau, comme l'éthanol ou l'acétone, à un mélange contenant des protéines diminue leur solubilité
- le pouvoir de l'eau de solubiliser une macromolécule chargée décroît avec la concentration du solvant organique dans la solution
- ceci serait attribuable à une réduction de la constante diélectrique de l'eau
 - **constante diélectrique**: pouvoir de solvatation de l'eau pour des ions dissous (comme les protéines)
 - couplé à l'utilisation du dessalage (salting out), l'ajout de solvant organique favorisera la précipitation des protéines
- l'agrégation est provoquée par l'interaction entre des régions possédant des charges opposées
- un facteur qui détermine la solubilité dans un solvant aqueux/organique est la **taille de la protéine**: plus grande est la protéine, plus basse est la concentration en solvant organique nécessaire afin de la précipiter
- les protéines plus larges possèdent une surface plus grande, donc une meilleure chance d'avoir une région à la surface chargée qui est complémentaire avec une autre protéine

Précipitation par polymères polaires (non ionique)



Polyethylene glycol (PEG₄)

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

