@Mohamed_Nahli

BIOLOGIE MAROC
www.biologie-maroc.com

Techniques chimiques pour la biologie

SCIENCES DE LA VIE

Shop

• Cahiers de Biologie + Lexique
• Accessoires de Biologie

Etudier

Visiter Biologie Maroc pour étudier et passer des QUIZ et QCM enligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.

Emploi

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

Travaux pratiques de biochimie
BCM-1521

Responsable: Pascal Chartrand D-507 Téléphone : 343-5684
Courriel: p.chartrand@umontreal.ca

La biochimie moderne est une discipline descriptive visant à élucider les événements moléculaires impliqués dans le fonctionnement cellulaire. La compréhension de ces événements implique une démarche expérimentale afin de générer des données à partir desquelles on peut énoncer et tester des hypothèses.

L'objectif du cours: apprendre à l'étudiant(e) les pratiques et les méthodes expérimentales importantes dans un laboratoire de biochimie. A la fin du cours, l'étudiant(e) sera familiarisé(e) avec les techniques de purification et d'analyse des protéines et de l'ADN.

Le cours utilisera le livre Biochimie (auteurs : Voet & Voet, 3e édition) comme livre de référence ainsi que des matériaux de références supplémentaires fournis pendant le cours.

L'Atlas de Poche de Biochimie (auteurs : Koolman et Röhm; ed. Flammarion) est fortement conseillé comme excellent aide-mémoire.

Plan du cours théorique

I - Préparation au laboratoire et organisation du laboratoire — **Daniel Chevrier**

Rédaction d'un rapport de laboratoire — **~ 2 heures**

II - *Principes théoriques et pratiques* — **~ 9 heures**

1. Isolation des protéines (Voet & Voet ; chapitre 6)

A. Solubilisation d'une protéine
B. Effet de la concentration de sel
C. Effet du pH
D. Effet des solvants organiques

2. Séparation par chromatographie (Voet & Voet ; chapitre 6)

A. Échangeur d'ions
B. Tamis moléculaire
C. Chromatographie d'affinité

3. Électrophorèse (Voet & Voet ; chapitre 6)

A. Gel électrophorèse
B. SDS-PAGE

4. Ultracentrifugation (Voet & Voet ; chapitre 6)

A. Sédimentation

B. Ultracentrifugation préparative

5. Manipulation de l'ADN (Voet & Voet; chapitre 6)

6. Mesure des protéines et de l'activité enzymatique (Voet & Voet; chap.14)

A. Mesure de l'activité enzymatique - principes de base

B. Mesure de l'activité enzymatique par méthodes discontinues

C. Mesure de l'activité enzymatique par méthodes continues

D. Points pratiques en détermination de l'activité enzymatique

7. Chaîne respiratoire des mitochondries (Voet & Voet; chapitres 21 et 22)

Aide et questions

- Tutorat en ligne: www.agorabcm.com

-> si vous avez des questions sur des sujets vus dans le cours

- Liste de courrier électronique:
crs-h08-bcm1521-L@etudiants.umontreal.ca

- Il y aura une rencontre de deux heures avant l'examen pour l'étude d'un cas problème (30 janvier)

- L'examen final, d'une durée deux heures, portera sur la matière théorique vue au cours. L'examen comptera pour 30% de la note finale du cours (13 février)

L'organisation du cours théorique sera telle que les cours théoriques se dérouleront avant le commencement des laboratoires de travaux pratiques. Le contenu du cours théorique complémentera les expériences en laboratoire, avec comme objectif de mieux situer l'expérience dans son contexte scientifique.

Les laboratoires de travaux pratiques apporteront à l'étudiant(e) les connaissances suivantes:

- notions pratiques de spectrophotométrie
- notions pratiques de centrifugation
- notions pratiques de migration électrophorétique
- essais enzymatiques
- précipitation des macromolécules
- manipulation de l'ADN

Isolation des protéines

A. Méthodes de solubilisation

- La première étape dans la purification des protéines: les dissoudre dans une phase liquide

- sauf pour les protéines sanguines qui sont déjà solubles, les protéines en général doivent être libérées des cellules où elles se trouvent.

- si la protéine d'intérêt est située dans le cytosol de la cellule, sa libération ne demande que la lyse de la cellule en question

- la méthode la plus douce et la plus simple est la lyse osmotique, où les cellules sont resuspendues dans une solution hypotonique (solution dont la concentration molaire en solutés est inférieure à la concentration molaire à l'intérieur de la cellule)

    - cette différence en concentration résulte dans l'établissement d'une pression osmotique qui provoque le gonflement puis l'éclatement de la cellule

- cette méthode est particulièrement efficace avec les cellules animales (qui ne possèdent pas de paroi cellulaire)

- avec des cellules bactériennes, de levures ou végétales, l'utilisation de lysozyme, une enzyme qui dégrade les parois cellulaires, est nécessaire

-la plupart des tissus exigent cependant une désintégration mécanique afin de briser les cellules et permettre l'accès à leur contenu interne

- les techniques utilisées sont :
1. broyage avec du sable, de l'alumine ou des billes de verre de petite taille;
2. déchiquetage mécanique (blender de type Waring) ;
3. homogénéisateur (Potter en téflon) ;
4. rupture par haute pression (French press) ;
5. sonication par vibration ultrasonique

- une fois les cellules brisées, le lysat obtenu peut être filtré ou centrifugé afin d'enlever les particules ou débris cellulaires, laissant ainsi la protéine d'intérêt dans le surnageant de la solution

-si la protéine d'intérêt est présente dans un organelle (mitochondrie, chloroplaste…) ou dans une membrane, la centrifugation différentielle permettra d'enrichir cette composante cellulaire (Figure 1).

-La vitesse et la durée de centrifugation sont choisies pour que les composantes cellulaires plus denses sédimentent dans le culot, enrichissant le surnageant avec la protéine d'intérêt

-Une deuxième centrifugation est effectuée pour sédimenter la fraction cellulaire contenant la protéine étudiée

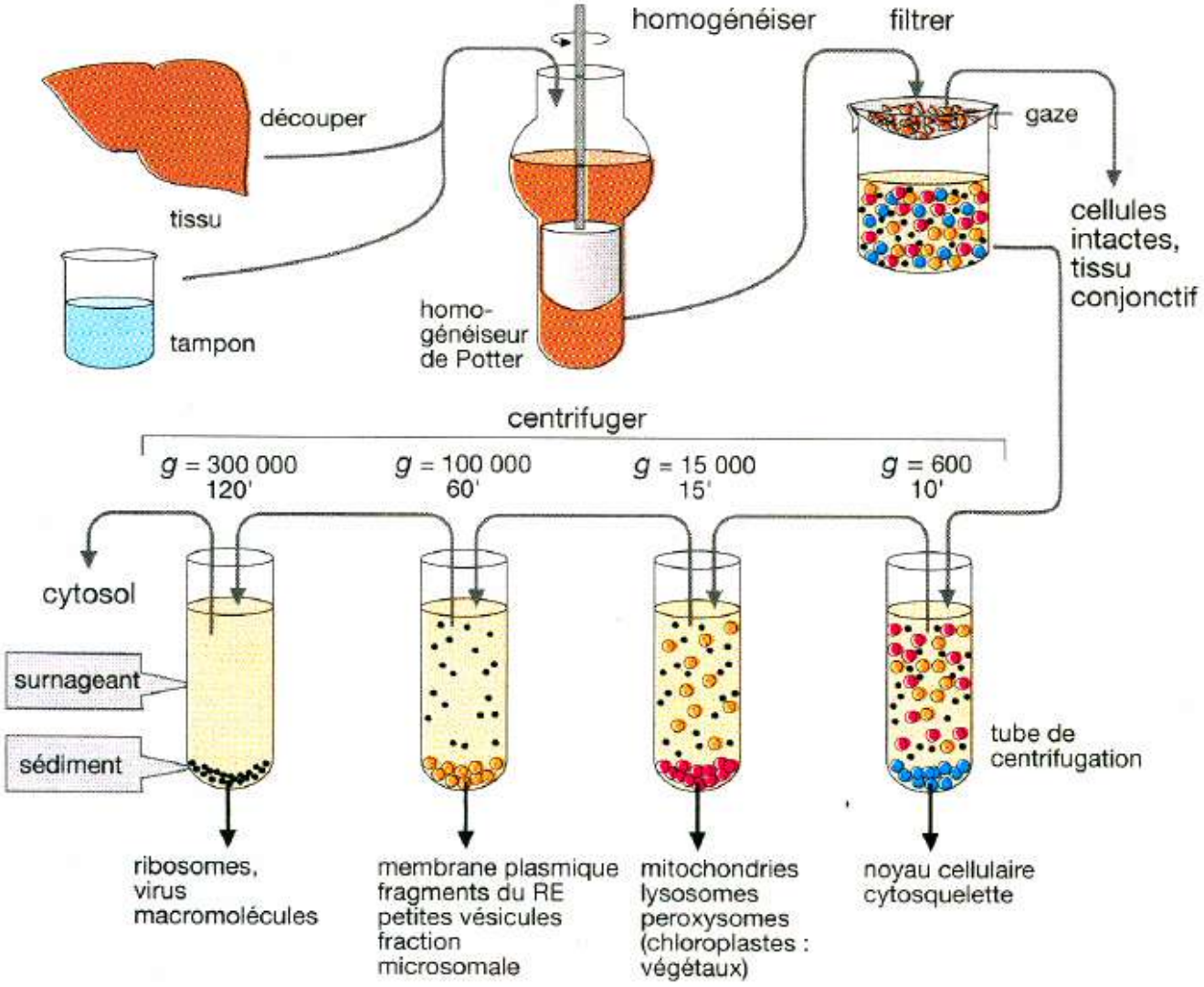

homogénéiser
filtrer
découper
tissu
gaze
cellules intactes, tissu conjonctif
tampon
homo-généiseur de Potter
centrifuger
g = 300 000 120'
g = 100 000 60'
g = 15 000 15'
g = 600 10'
cytosol
surnageant
sédiment
tube de centrifugation
ribosomes, virus macromolécules
membrane plasmique fragments du RE petites vésicules fraction microsomale
mitochondries lysosomes peroxysomes (chloroplastes : végétaux)
noyau cellulaire cytosquelette

Figure 1

-Chaque organite peut être identifié par certains marqueurs moléculaires

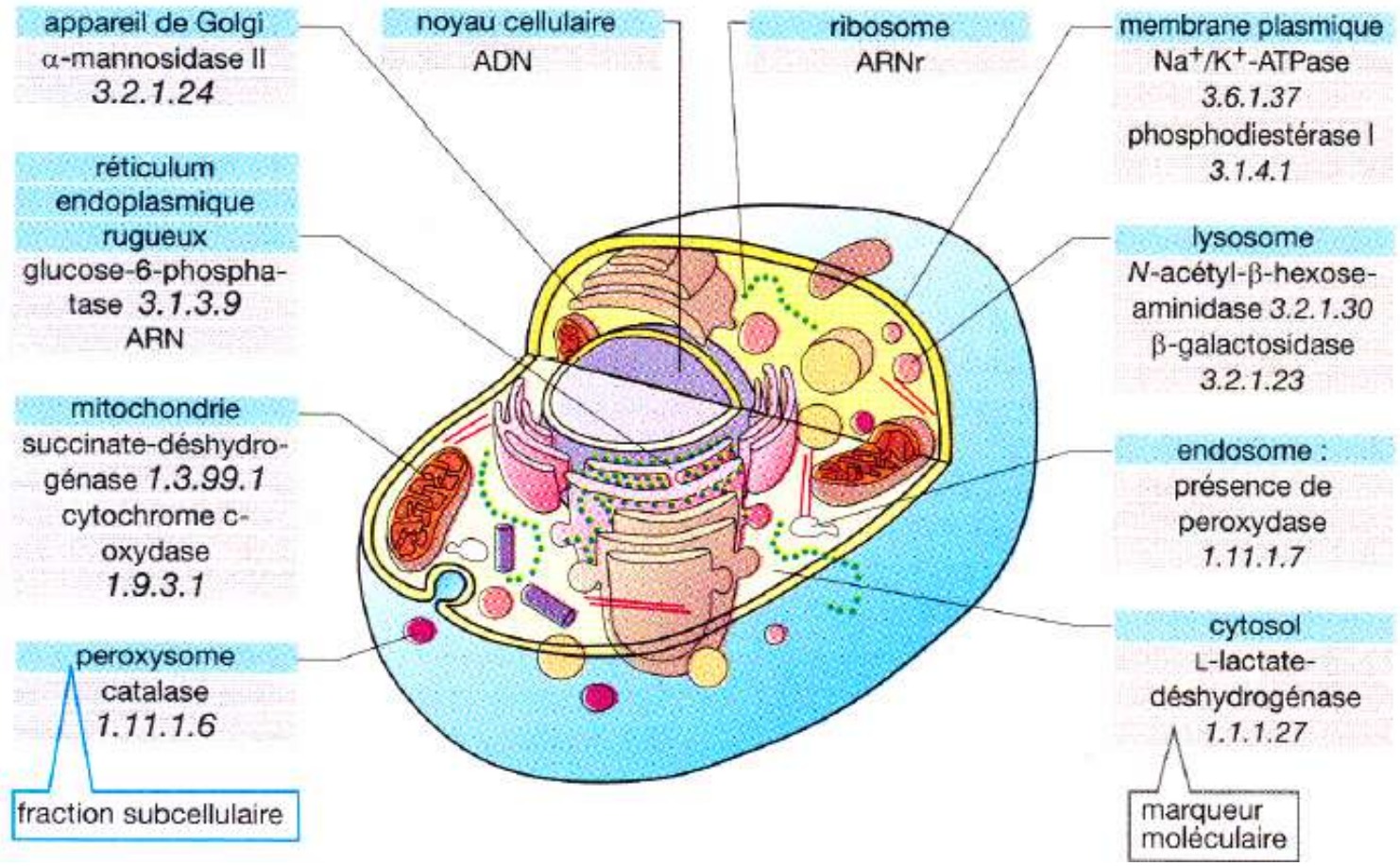


Figure 2

Stabilisation des protéines lors de leur purification

L'intégrité structurale des protéines et leur stabilité dépendent de plusieurs facteurs:

- **pH**
- **utilise des solutions tampon qui maintiennent le pH dans une zone "physiologique" (6.5-7.5/8.0) pour éviter d'endommager les protéines par des variations brusque de pH.**

- **Température**
- **les protéines sont facilement dénaturées à hautes températures**
- **plusieurs protéines se dénaturent lentement lorsque conservées à 25°C**
- **la purification des protéines se fait normalement à des températures proches de 0-5°C**
- **une fois purifiées, les protéines peuvent se conserver à long terme à des températures de –20 à -80°C**

- **Protéases**
- **les cellules contiennent des protéases (enzymes qui hydrolysent les liens peptidiques)**
- **ces protéases sont libérées lors de la lyse cellulaires et peuvent dégrader les protéines lors de la purification**
- **l'ajout d'inhibiteurs de protéases permet d'empêcher cette dégradation**

Stratégie d'ensemble pour purifier une protéine d'intérêt

- les protéines sont purifiées par des méthodes de fractionnement
  - on utilise les différentes propriétés physico-chimiques de la protéine étudiée pour l'isoler progressivement des autres substances cellulaires

- les propriétés physico-chimiques exploitées dans les différentes techniques de séparation sont:
  - la solubilité
  - la charge ionique
  - la taille moléculaire
  - les propriétés d'adsorption et de liaison à d'autres molécules biologiques

Propriété physico-chimique	Techniques de séparation
solubilité	- précipitation
charge ionique	- chromatographie par échange d'ions - électrophorèse - focalisation isoélectrique
taille moléculaire	- ultracentrifugation - chromatographie par gel-filtration - électrophorèse
spécificité	- chromatographie d'affinité

B. Solubilité et précipitation des protéines

- une approche couramment utilisée pour purifier une ou des protéines est de les précipiter (diminuer sélectivement leur solubilité dans l'eau)

- la distribution des résidus d'acides aminés de types hydrophobe à la surface des protéines est aussi importante dans la solubilité des protéines que les résidus de type polaires ou chargés.

Les figures suivantes rappellent certains concepts:

1. Rappel des différents acides aminés (Figure 3)
2. La structure des protéines (Figure 4)
3. Exemple d'une structure de protéine: l'aldolase (Figure 5)
4. Représentation de surface d'une protéine (aldolase, Figure 6)
5. Représentation simplifiée de n'importe quelle protéine (Figure 7)

Liste des acides aminés

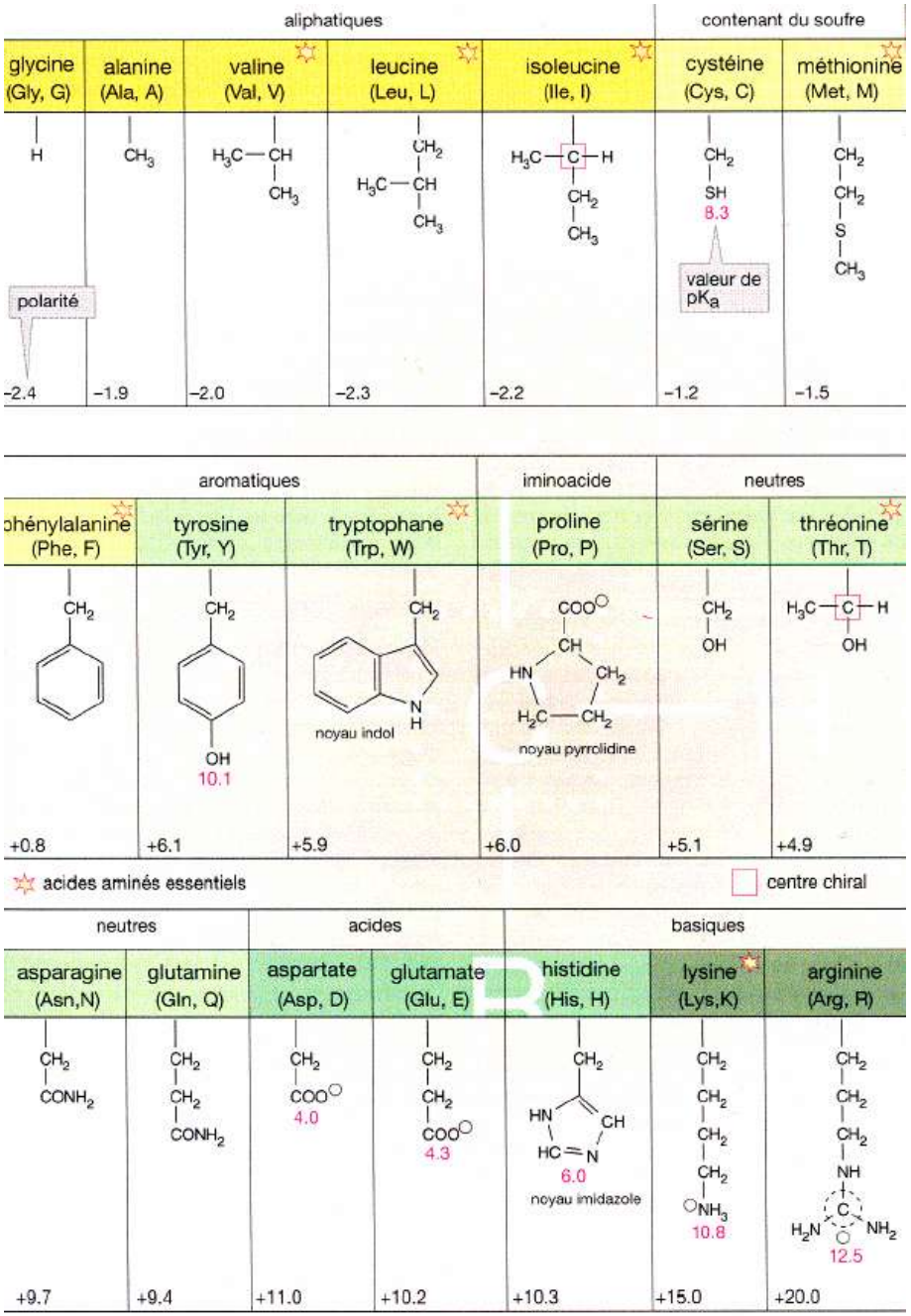
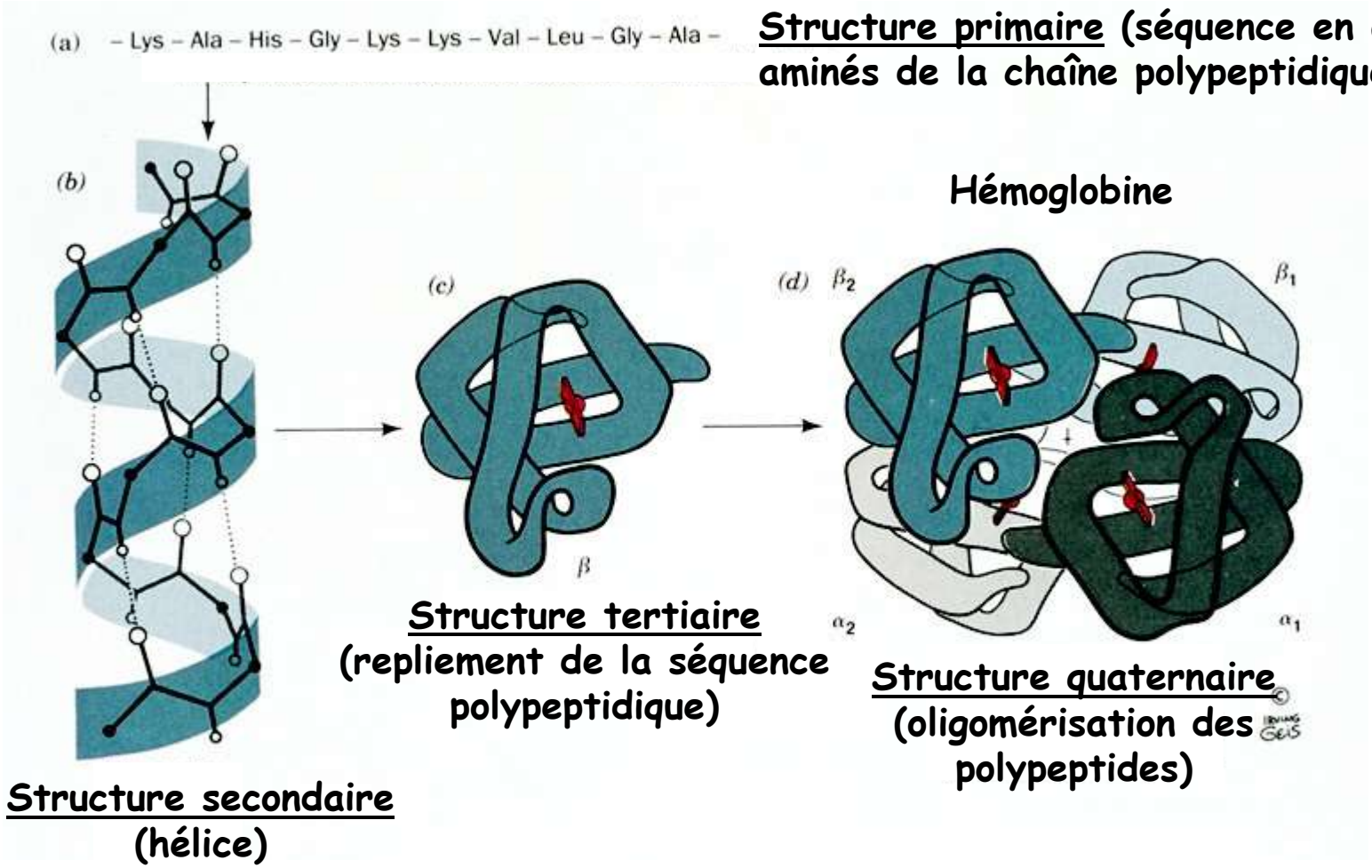


Figure 3

Structure des protéines



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

Hémoglobine

Structure secondaire (hélice)

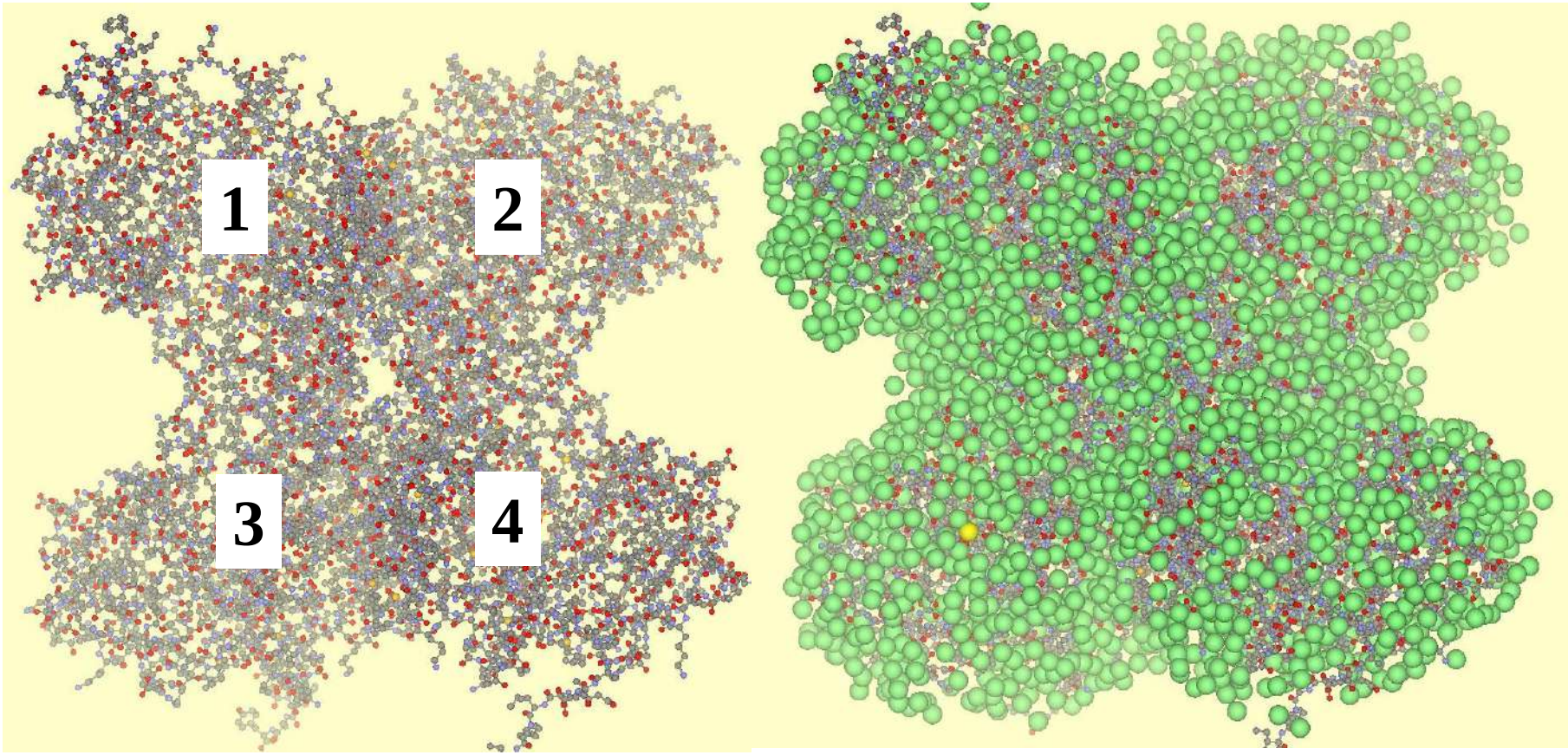
Structure tertiaire (repliement de la séquence polypeptidique)

Structure quaternaire (oligomérisation des polypeptides)

L'hémoglobine (ci-dessus) est un hétéro-tétramère (constitué de deux polypeptides α et deux polypeptides β)

Figure 4

Structure tridimensionnelle de la protéine aldolase: un homo-tétramère

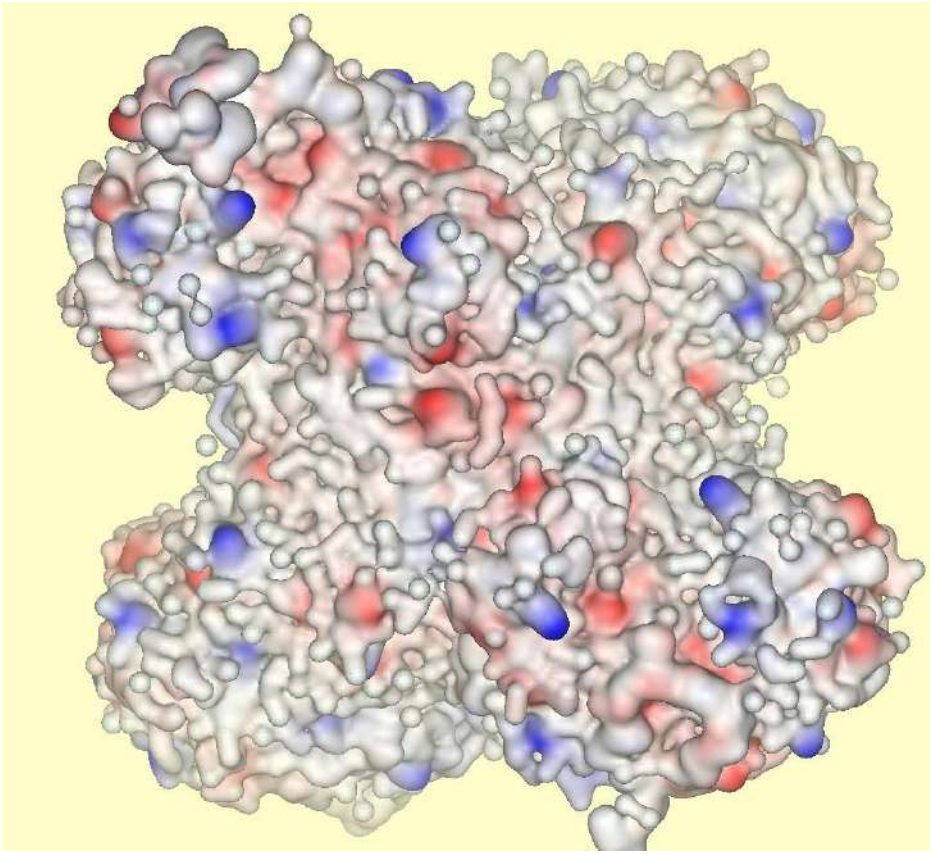


11,100 atomes (sauf hydrogène)

+ 2,800 molécules d'eau

Figure 5

Protéine Aldolase
Représentation de surface

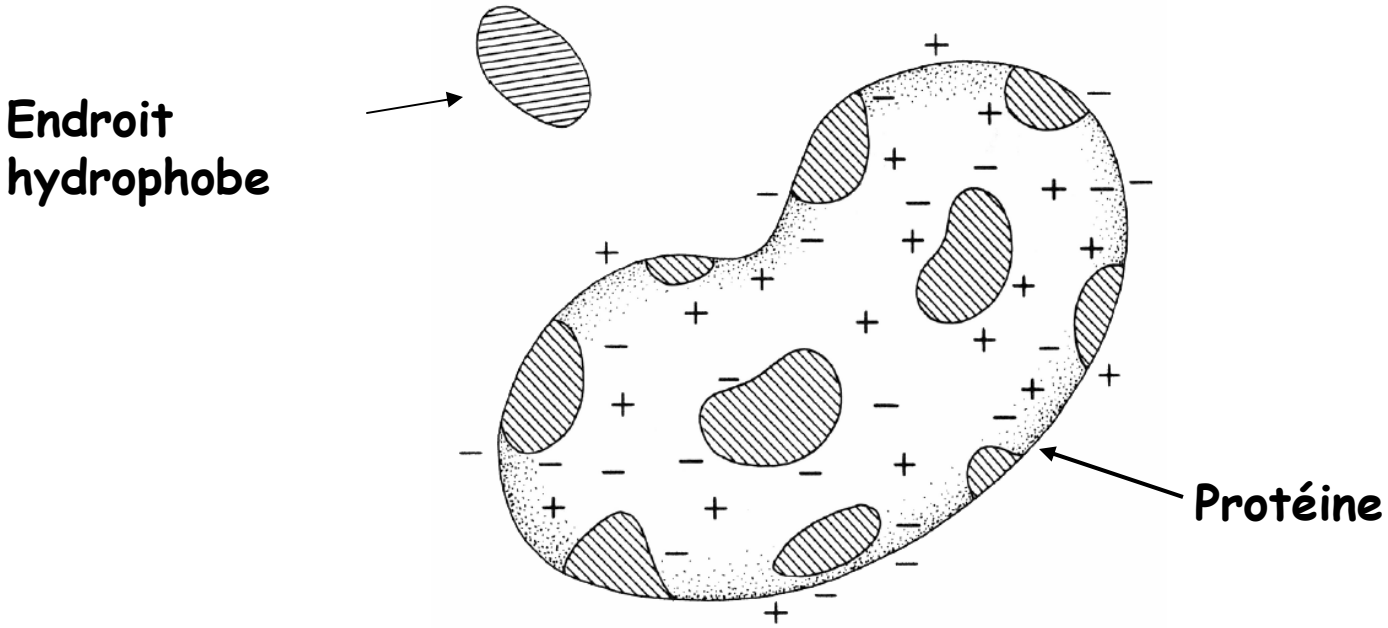


Surface de la protéine aldolase en fonctions des potentiels électrostatiques des acides aminés

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

Figure 6

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

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

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

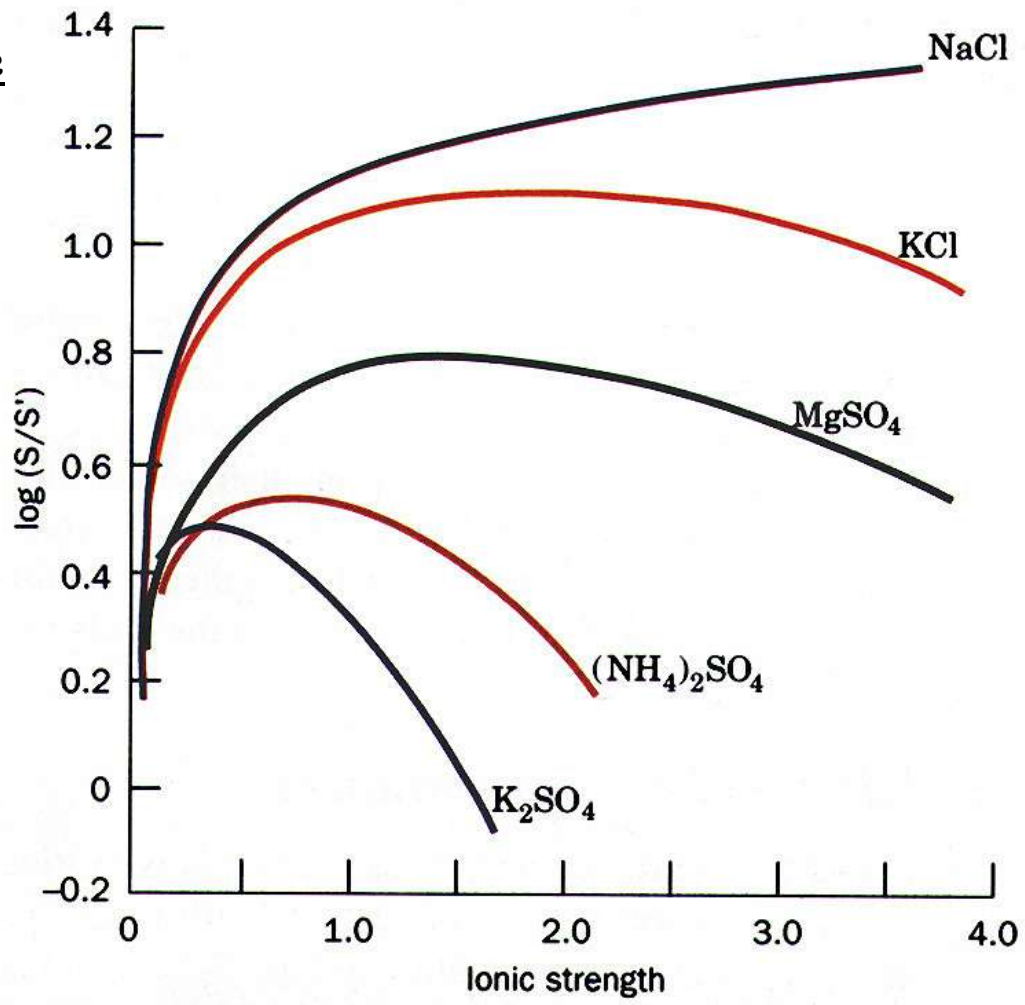


Figure 8

- la solubilité des protéines de type globulaire décroît avec la diminution de la concentration de sel.

- cette propriété peut être utile pendant la purification, lorsqu'on veut dessaler la protéine par dialyse

  - la dialyse contre un tampon de faible force ionique peut provoquer la précipitation des protéines => peut utiliser ce phénomène pour purifier notre protéine d'intérêt

    - soit la protéine d'intérêt précipite sélectivement dans ces conditions

    - soit les autres protéines précipitent alors que notre protéine d'intérêt reste en solution

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 solvatation (i.e, accès aux molécules d'eau)

- l'hydratation des ions de sels a une forte tendance à séquestrer les molécules d'eau

$$\underset{\text{(Sel)}}{AB + (n1 + n2) \cdot H_2O} \rightleftharpoons \underset{\text{(Ion)}}{A+ \cdot n1\, H_2O} + \underset{\text{(Ion)}}{B- \cdot n2\, H_2O}$$

- la séquestration de l'eau résultera en une diminution de la solvatation 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

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

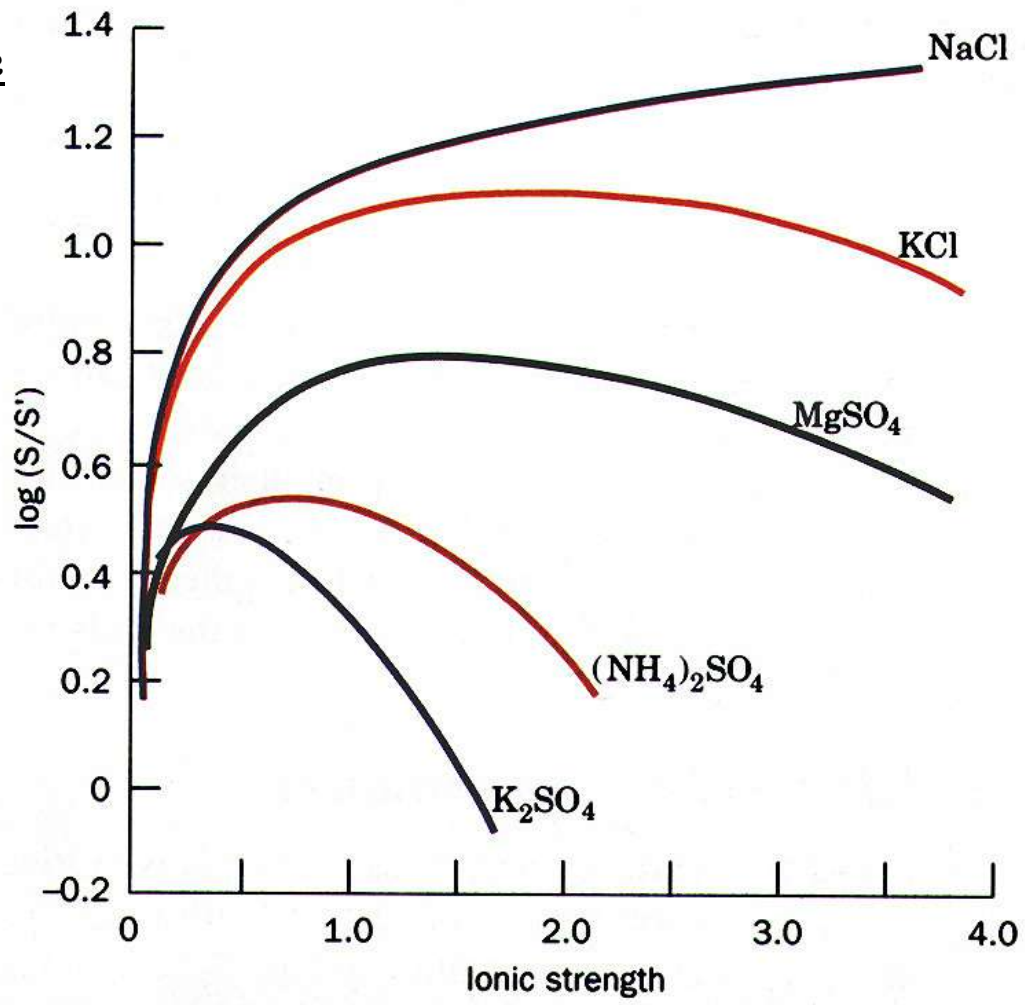


Figure 9

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

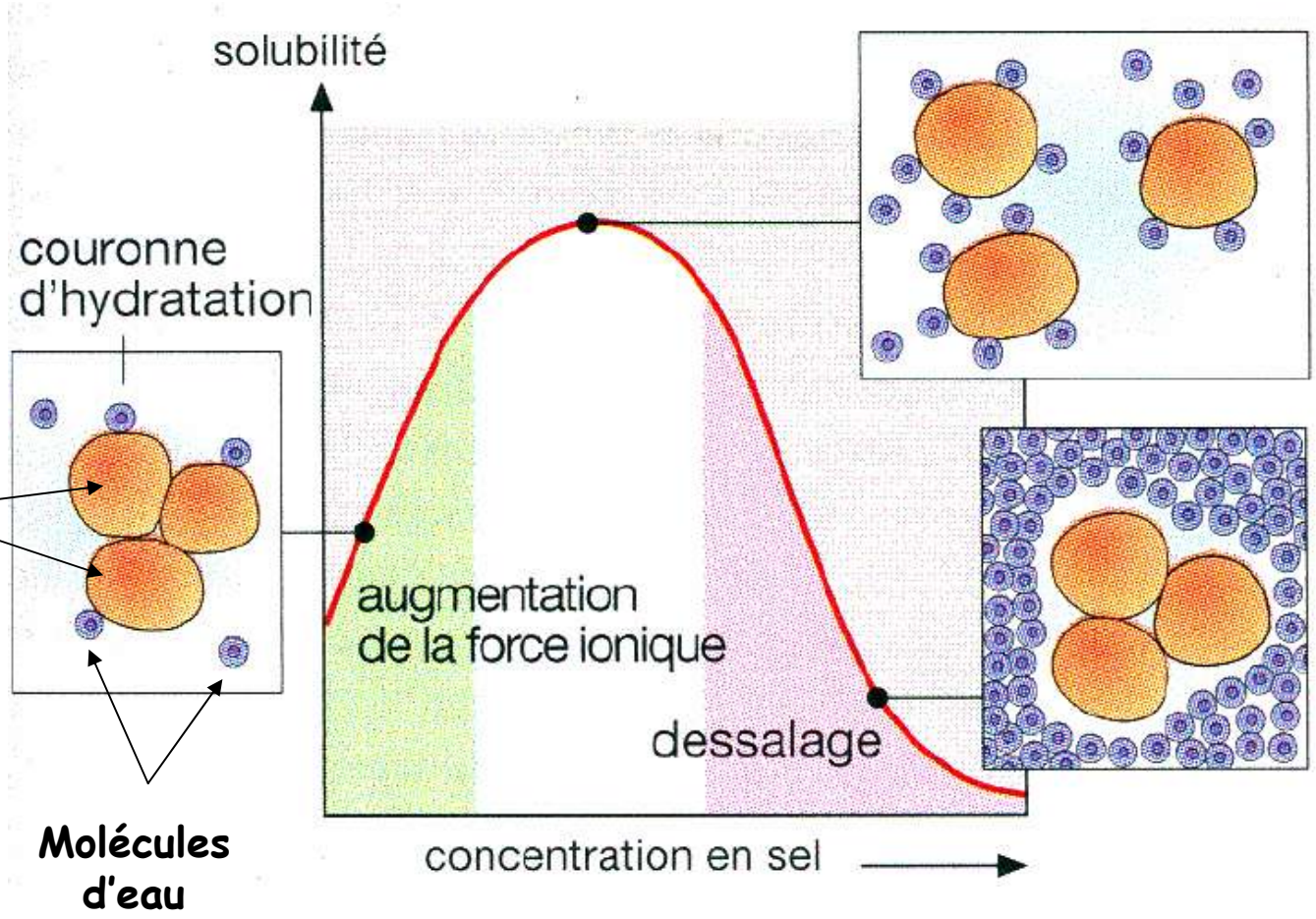


Figure 10

Deux sortes de sels sont utilisés pour la précipitation de protéines

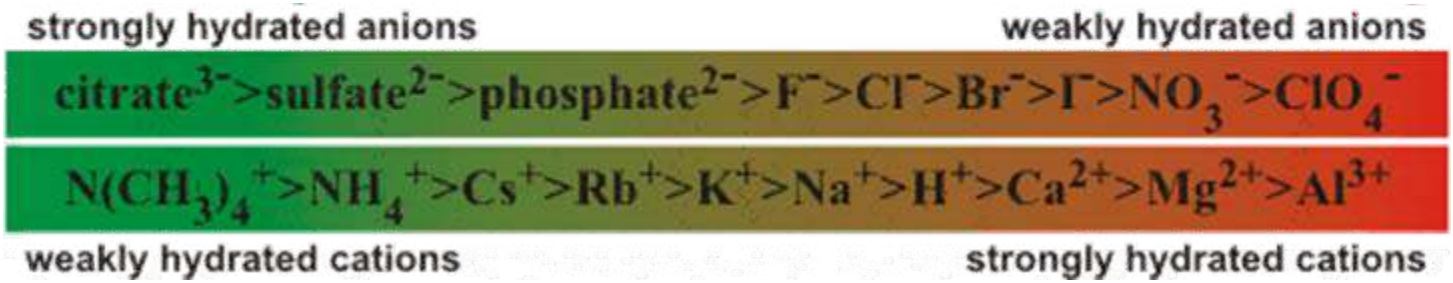
- la nature du sel est très importante; les sels qui se lient et interagissent directement avec la protéine peuvent avoir un effet déstabilisant et sont désignés « chaotropiques »

- les sels optimaux sont ceux qui encouragent l'hydratation des régions polaires et la déshydratation des régions hydrophobes chez une protéine sans avoir aucune interaction avec la protéine

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 — Favorisent la solubilité



- cette série montre qu'il existe une forte corrélation entre les anions fortement hydratés et leur capacité à précipiter les protéines

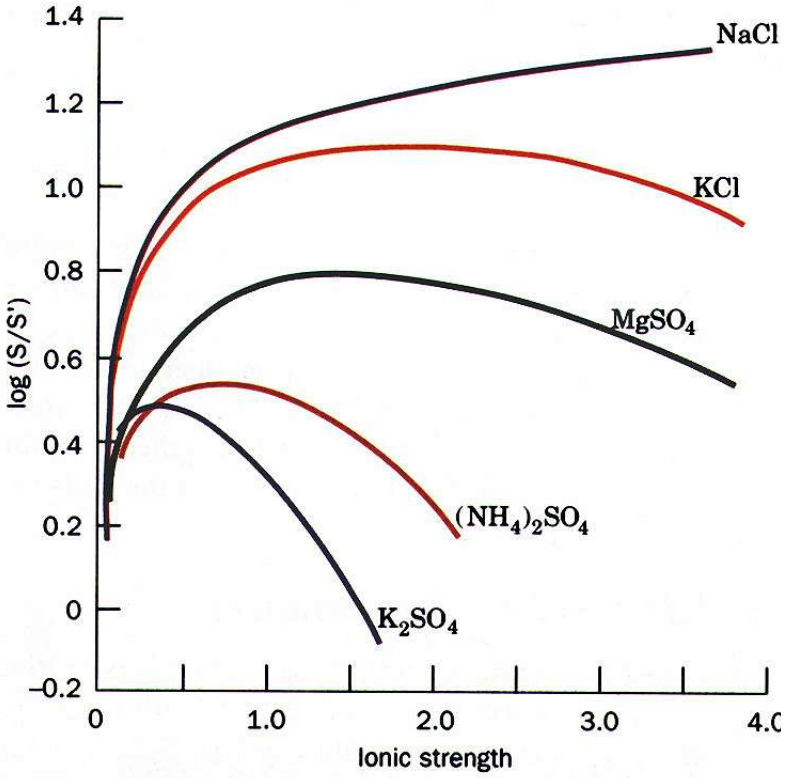
  - les anions ont tendance à être plus fortement hydratés que les cations
  - supporte le modèle que la séquestration de l'eau par les ions est importante dans l'effet de salting out

- des anions multivalents comme le sulfate, le phosphate et le citrate avec des cations comme le potassium, le sodium et l'ammonium sont préférés. Ces sels sont solubles aux hautes concentrations essentielles pour le dessalage (Figure 11A)

  - le sel utilisé le plus couramment en précipitation de protéines est le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$

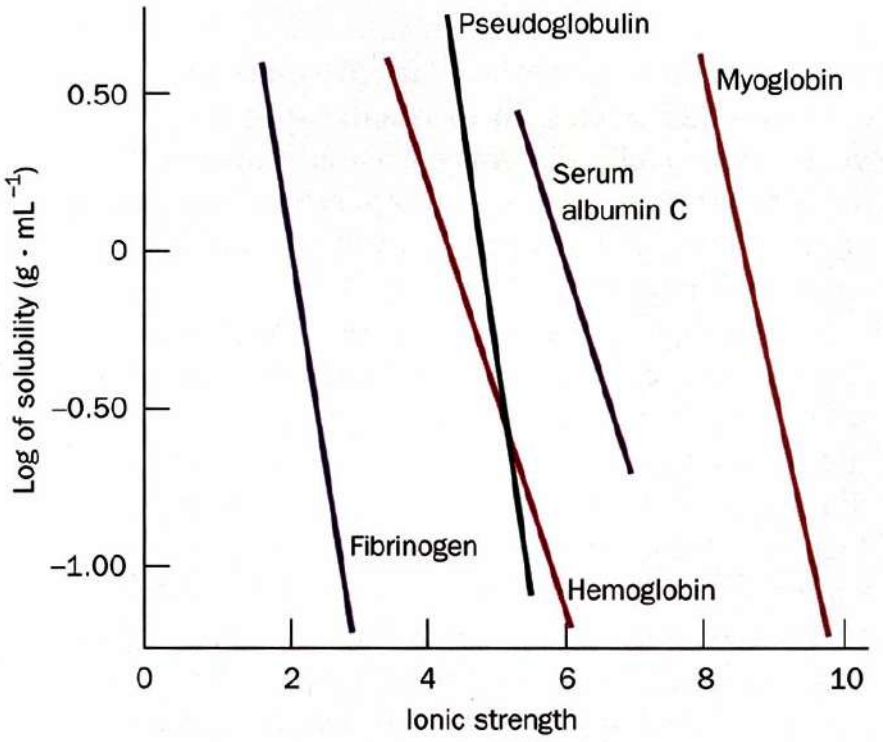
- comme la solubilité des différentes protéines varie fortement avec la concentration de sels, cette approche permet de séparer rapidement les protéines entre elles en jouant avec la concentration en sels dans la solution de protéines (Figure 11B) > précipitation différentielle

A



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

B



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

Figure 11

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)

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 à 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 attirance 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 des 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

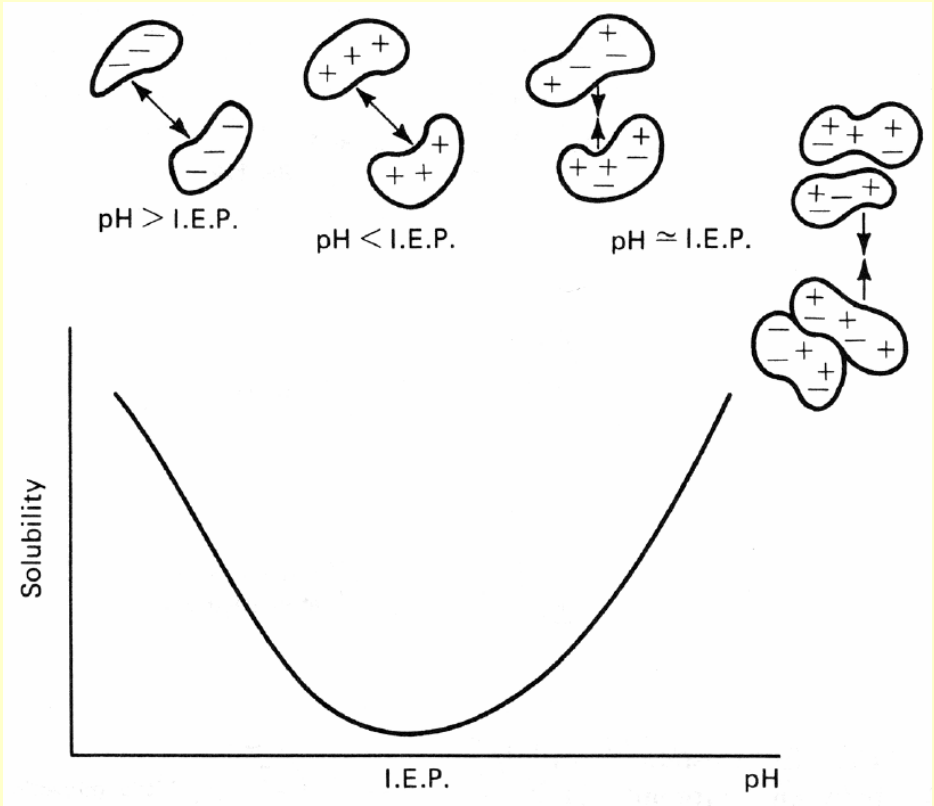


Figure 12: Solubilité d'une protéine globulaire près de son point isoélectrique (IEP)

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

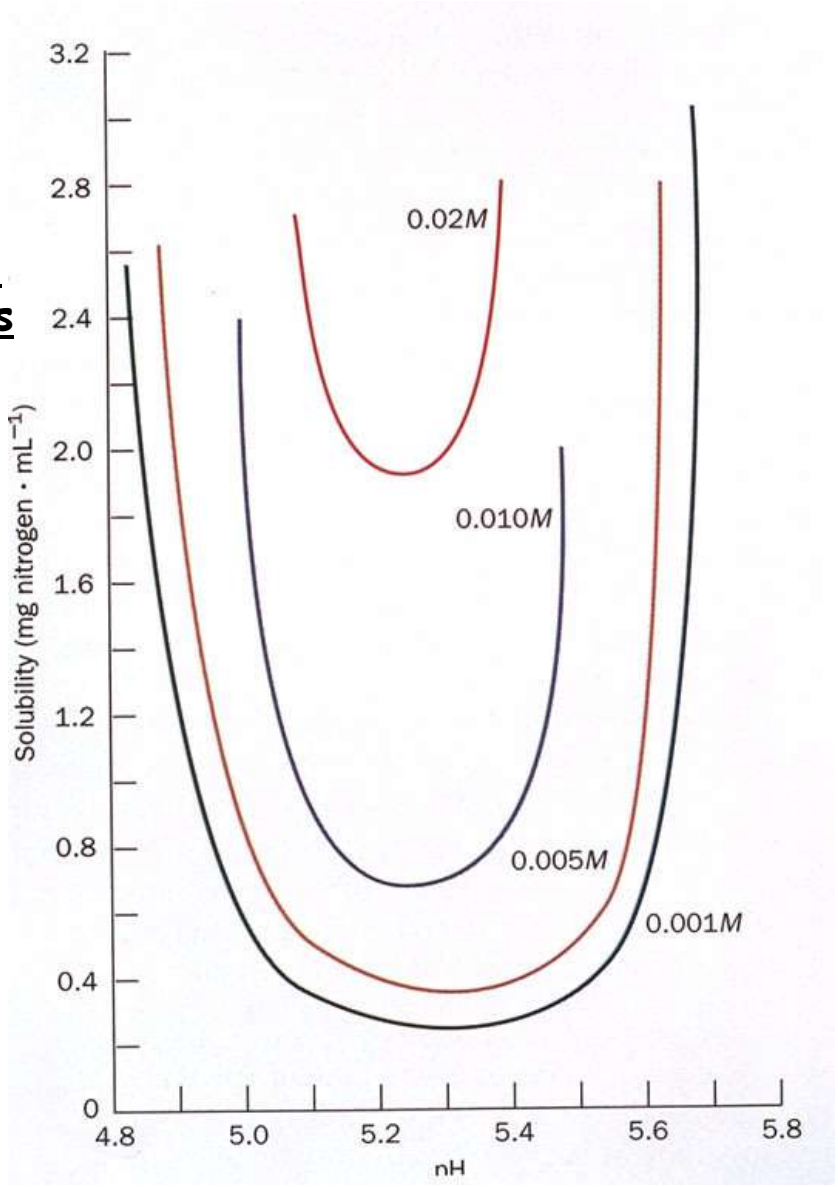


Figure 13

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

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