

Intitulé du Master : Biotechnologie végétale

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UEM1

Intitulé de la matière : Méthodes modernes d'analyses et de dosages en biologie.

Crédits : 4

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Actualiser les connaissances de l'étudiant en matière de nouvelles techniques d'analyse en biologie.

Connaissances préalables recommandées : Biologie.

Contenu de la matière

1. Méthodes spectroscopiques (Spectrophotométrie)
2. **Méthodes chromatographiques** (chromatographie d'absorption, échange ionique, affinité etc.)
3. Méthodes enzymatiques (dosage d'enzymes, de substrat etc.)
4. Méthodes électro-phorétiques et électrochimiques (réaction antigène anticorps, généralités sur les méthodes immunochimiques courantes, immuno-précipitation etc.)
5. Méthodes cytologiques et ultra structurales.
6. Méthodes cytogénétiques moléculaires (hybridation in situ, FISH, GICH.)

Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

Références : (Livres et photocopiés, sites internet, etc.)

I. Les méthodes Chromatographiques

1. Historique

La chromatographie (du grec chroma: couleur et graphein: écrire) a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett dans les années 1900. La première chromatographie a été réalisée par ce botaniste en 1905. Il a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l'éther de pétrole. Des bandes colorées qui se déplacent le long de la colonne à des vitesses propres sont obtenues.

Le prix Nobel de chimie est attribué en 1952 aux biochimistes Martin et Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.

2. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et doser des composés au sein d'échantillons divers.

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

3. Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène.

Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire.

4. Types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie en phase liquide (CPL):
 - Chromatographie sur couche mince (CCM).
 - Chromatographie de partage centrifuge (CPC).
 - Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), à séparer ou à purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé (**Tableau 1**).

4. 1. Chromatographie sur colonne

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- La phase stationnaire: support solide.
- La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la colonne est très lent.
- La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Le choix du type de chromatographie et du support dépend de la nature des composés à séparer (**Tableau 1**).

Tableau 1: Choix du type de chromatographie et du support.

Type de chromatographie	Nature de l'adsorbant	Nature des composés à séparer
Adsorption	Gel de silice	Molécules organiques simples, molécules contenant plusieurs groupements polaires, substances électrophiles, substances à haut poids moléculaire.
	Oxyde d'aluminium	Vitamines, alcaloïdes, colorants, substances à caractère nucléophile.
Partage	Gel de silice	Substances très polaires. Sucres et composés amphotères, acides aminés.
	Oxyde d'aluminium	
	Kieselguhr	
Partage en phase inverse	Film E.C.S. 511 V	Composés hydrophiles de séries homologues. Phénols et dérivés nitrés aromatiques. Acides gras et leurs esters méthyliques.
	Film E.C.S. 541 V	
	Polyamide	
	Cellulose	
Electrophorèse	Gel de silice	Amines, acides aminés et peptides, colorants Hétérocycles azotés polynucléaires Acides nucléiques
	Oxyde d'aluminium	
	Kieselguhr	
Echange d'ion	DEAE	Composés dont la charge électrique dépend du pH. (Nucléotides et acides carboxyliques)
	Ecteola	
	Sephadex	
	Dowex	

A) Eléments chromatographiques

Les éléments de la chromatographie sont: L'échantillon, la phase stationnaire, la phase mobile, la colonne, la pompe, le détecteur, le collecteur de fractions et l'enregistreur.

- ✓ L'échantillon: C'est la solution qui contient les composés à analyser.
- ✓ La phase stationnaire: C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne (**Tab. 2**). Les granules peuvent: être poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.

Tableau 2: Les différents types de granules en fonction des différents types de chromatographie.

Type de chromatographie	Type de granules
Chromatographie d'exclusion stérique	Poreuses (réticulées)
Chromatographie échangeuse d'ion	Portent une charge ionique positive ou négative
Chromatographie d'affinité	Portent un site d'affinité

- ✓ **La phase mobile:** C'est un liquide qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant avec lui les composés de l'échantillon. Elle doit être soluble et interagir avec les composés de l'échantillon et non pas avec la phase stationnaire.
- ✓ **La colonne:** C'est le support de la phase stationnaire (gel ou résine). A travers lequel, la phase mobile passe. Elle peut être en verre, en plastique ou en inox et de différentes dimensions (**Fig. 1**).

**Figure 1.** La colonne chromatographique.

- ✓ **La pompe:** Elle permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne (**Fig. 2**).

**Figure 2.** La pompe.

- ✓ **Le détecteur:** Il évalue la quantité de chacun des composés séparés et envoie un signal électronique vers l'enregistreur (**Fig. 3**). Par exemple, les protéines sont détectées grâce à un détecteur UV-visible.



Figure 3. Le détecteur.

- ✓ **L'enregistreur:** Il dessine les pics en fonction de leur intensité (Fig. 4).



Figure 4. L'enregistreur.

- ✓ **Le collecteur de fractions:** permet de collecter les fractions de l'échantillon (Fig. 5).



Figure 5. Le collecteur de fraction.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Effectuer l'élution.

- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

4. 1. 1. Chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

C'est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur **poinds moléculaire** et de leur **forme**. La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer. Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc élués en premier. Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel, leurs migration est donc retardée (**Fig. 6**).

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards.

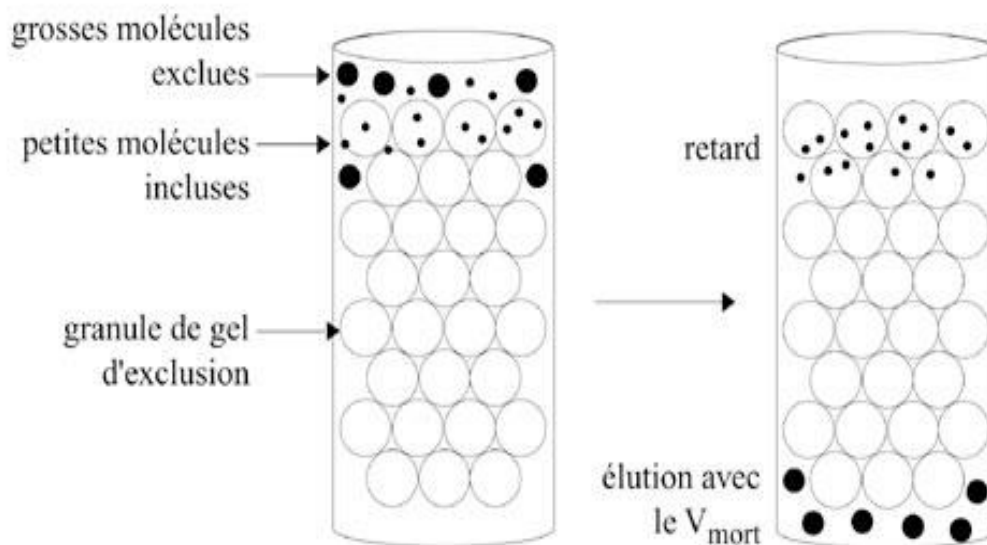


Figure 6. Tamisage moléculaire.

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

- **Le diamètre des pores (la porosité):** Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation (séparation microporeuse ou macroporeuse).

- **L'inertie chimique:** Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.
- **La stabilité physico-chimique:** Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.
- **La taille et la forme des particules (la granulométrie):** Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance.
- **La forme:** La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.
- **La nature:** Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose.
- **La consistance:** Elle varie selon la nature et le degré de réticulation des gels. On distingue:
 - **Les xérogels:** Sont des gels semi-rigides qui ne gardent pas leur forme initiale lorsque la phase dispersante est éliminée.
 - **Les aérogels:** Sont des gels rigides intéressants lorsqu'on travaille avec des débits élevés ou sous forte pression.

Les différentes étapes de la chromatographie d'exclusion stérique regroupent:

- ✓ Le choix du gel: Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer (**Tab. 3**).
- ✓ Le choix de la phase mobile: Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire.
- ✓ La préparation du gel: Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.
- ✓ Le remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.
- ✓ L'équilibration de la colonne: C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).
- ✓ L'injection de l'échantillon.
- ✓ L'élution: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon.
- ✓ La collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.

La régénération du gel: Pour éliminer les contaminants, le gel est lavé par une solution saline. Le gel est conservé à 2-4°C après addition d'un agent antimicrobien et de conservation (azide de sodium).

Tableau 3: Les différents types de gel et leur capacité de rétention.

Type de gel	Capacité de rétention (Da)
Dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1000-5000
Sephadex G-75	3000-70000
Sephadex G-200	5000-800000
Polyacrylamide	
Bio-gel P2	200-2000
Bio-gel P6	1000-6000
Bio-gel P-150	15000-150000
Bio-gel P-300	60000-400000
Agarose	
Sepharose 2B	2 000000-25000000
Sepharose 4B	300000-3000000
Bio-gel A-0,5M	30000-500000
Bio-gel A-15M	30000-15000000
Bio-gel A-150M	5000000-150000000

Applications de la chromatographie d'exclusion stérique

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

- Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) et la purification d'une protéine après marquage à l'iode 131.
- Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques (immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.
- Fractionnement de petites molécules: Il regroupe l'analyse de peptides (en analyse alimentaire dans les fromages), l'analyse d'enzymes et l'analyse de colorants dans les produits alimentaires.
- Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.

➤ Détermination des poids moléculaires (Annexe 1): La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la γ -globuline (160000).

4. 1. 2. Chromatographie échangeuse d'ions

Elle permet la séparation de **molécules chargées** (la séparation est en fonction de la charge électrique). La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisés. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution (**Fig. 7**).

C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée échangeur d'ion, des contre ions échangeables ou mobiles et un soluté ou protéine chargé.

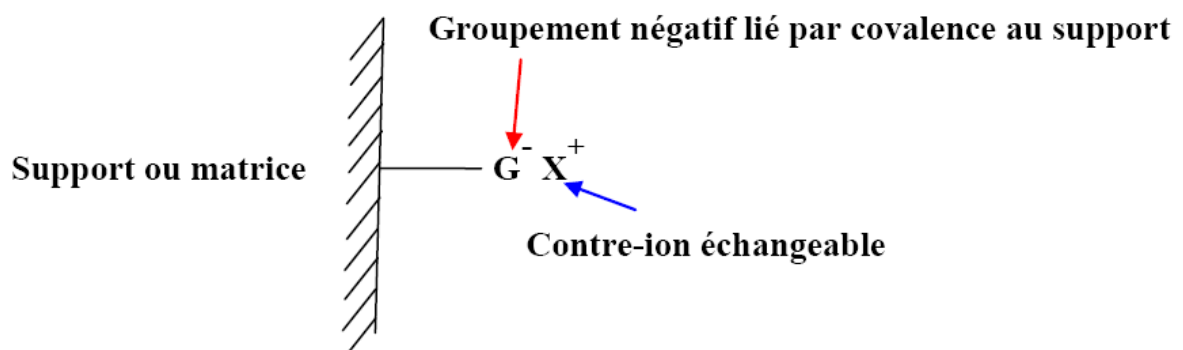


Figure 7. Schéma d'une résine échangeuse de cations (résine cationique).

A) Les échangeurs d'ions

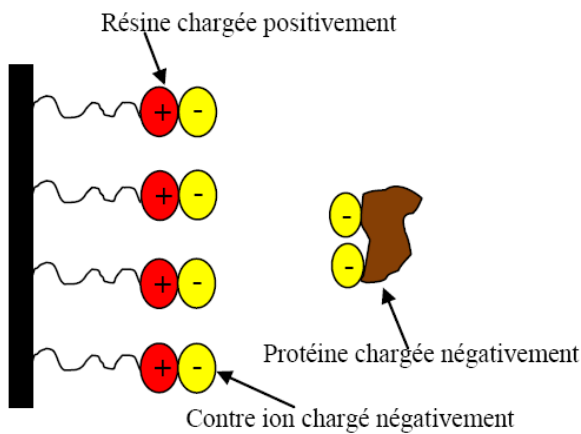
Ce sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie (**Fig. 8**):

1. Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quelque soit le pH).
- Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.
- Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).

- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).
- 2. Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:
 - Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
 - Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

A) Echangeurs anionique



B) Echangeur cationique

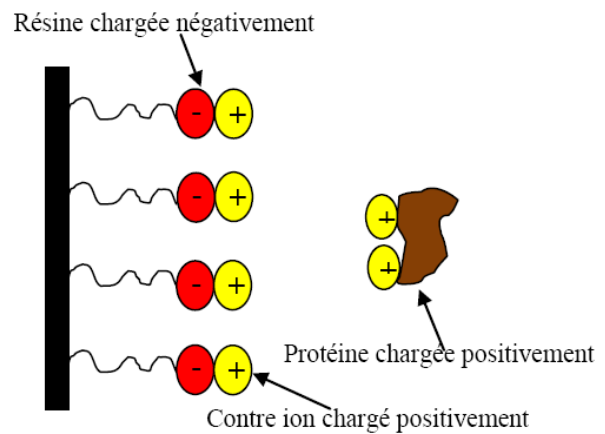
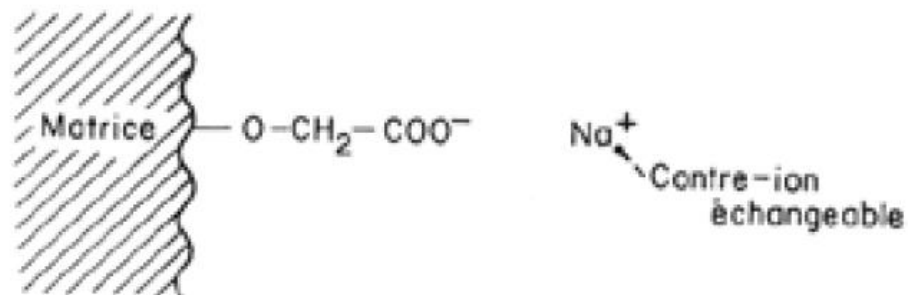


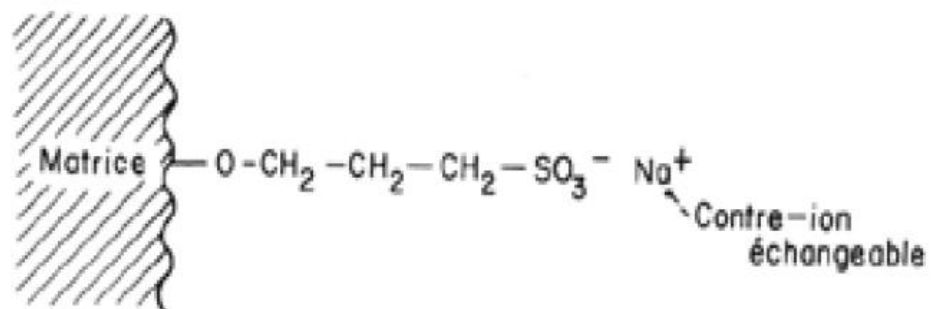
Figure 8. Les différents types d'échangeurs ioniques.

Les échangeurs cationiques sont:

- Le CM-polyoside (carboxyméthyle): c'est un échangeur faible.

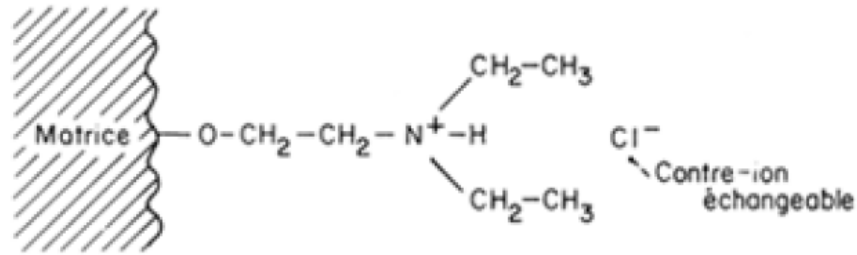


- Le SP-polyoside (sulfopropyle): C'est un échangeur fort.

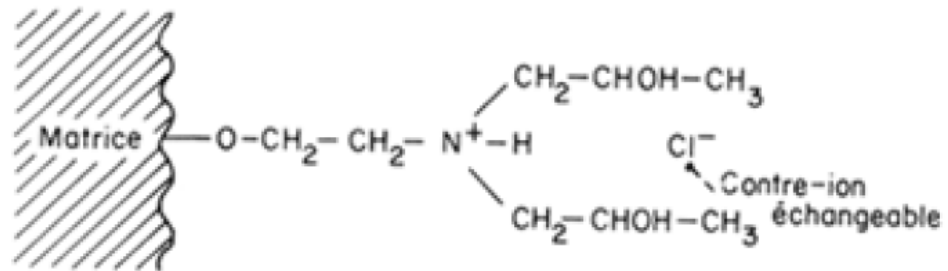


Les échangeurs anioniques sont:

- Le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle): C'est un échangeur faible.



- Le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle): C'est un échangeur fort.



B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir le gel.
- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne (fixation des contres ions).
- Injecter l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines).
- Effectuer l'élution (étape de désorption par la Fi ou pH).
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une élution soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu.

Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

- Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.

• Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de concentration plus élevée (exp. Cl⁻, HO⁻, Na⁺, H⁺...)).

C) Applications

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon. Elle s'applique à l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés.

4. 1. 3. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant) (**Tab. 4; Fig. 9**). Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur).

Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

Tableau 4: Exemples de ligand et d'affinant.

Ligand	Affinant
Une enzyme	Le substrat ou l'inhibiteur
Un antigène	L'anticorps
Une hormone	Le récepteur

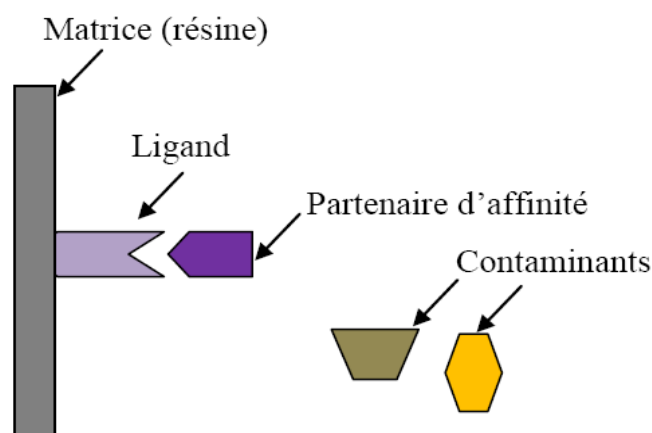


Figure 9. Principe de la chromatographie d'affinité.

- **La phase stationnaire (le gel):** Est constituée d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux (matrice ou résine) par l'intermédiaire d'une chaîne latérale: le bras fixateur. Le support peut-être en dexran, en agarose ou en polyachrylamide. Ce sont des particules uniformes. Il doit être insoluble dans l'eau, stable chimiquement et mécaniquement et doit porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des bras fixateurs
- **Le bras fixateur:** C'est une chaîne polycarbonnée (C₆-C₈) intercalée entre la matrice et le ligand.
- **Le ligand:** Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

Les effecteurs utilisés sont:

- Pour la purification des enzymes:
 - Des substrats et analogue de substrat.
 - Des inhibiteurs réversibles.
 - Des effecteurs allostériques.
 - Des coenzymes.
- En immunologie:
 - Des haptènes.
 - Des antigènes.
 - Des anticorps.
- Pour l'étude des protéines réceptrices:
 - Des hormones.

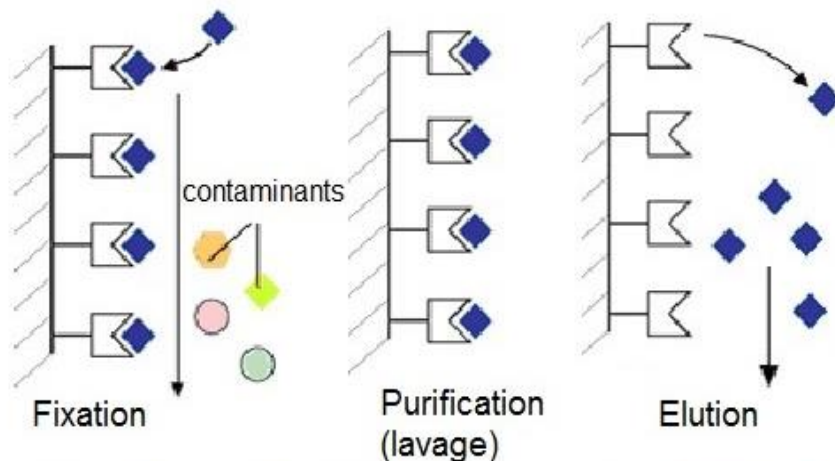
A) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Laver la colonne pour éliminer les substances non adsorbées.
- Eluer les substances adsorbée ou fixée.
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.

- Régénérer le gel.

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur le support. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité. On y fait passer la solution aqueuse contenant la substance à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. Des lavages successifs permettent d'éliminer toute trace de produits indésirables. Enfin, on élue la substance retenue en décomposant le complexe (Fig. 10).



Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

B) Elution

Pour éluer les substances adsorbées, il est nécessaire de modifier certains paramètres:

- Le pH: Le substrat voit alors ses charges électriques se modifier et son affinité pour le ligand changer voire disparaître (élution non spécifique).
- La force ionique en augmentant la concentration en sels (élution non spécifique).
- La composition en ajoutant un composé (un tampon d'élution qui contient un compétiteur ou un ligand non fixé) dont l'affinité avec le ligand est plus forte (élution spécifique).

C) Applications

La chromatographie d'affinité est adaptée, soit à l'analyse, soit à la préparation de substances biologiques. Elle a été utilisée en:

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

4. 1. 4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Elle a été utilisée depuis 1975 et elle a réduit en moyenne de dix fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- Des composés thermosensibles.
- Des composés très polaires.
- Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules: un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données (**Fig. 12**).

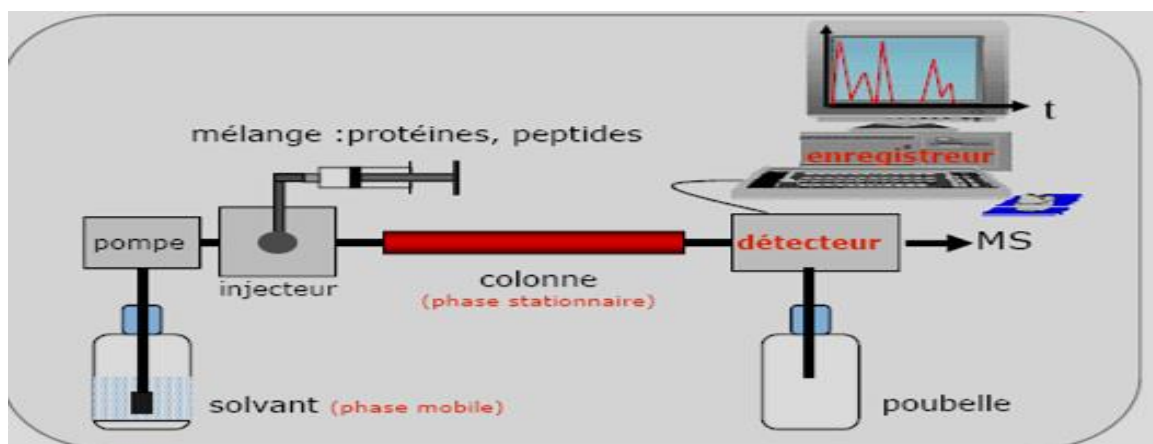


Figure 12. Appareillage de l'HPLC.

Annexe (1)

Chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique est appliquée au fractionnement de mélanges de macromolécules et à la détermination (approximative) de la masse molaire des protéines. IL existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire. Dans ce dernier cas, il faut d'abord étalonner la colonne avec des protéines de masse molaire connue, tracer le courbe $\log (M)$ en fonction du volume d'éluion, puis effectuer une détermination graphique.

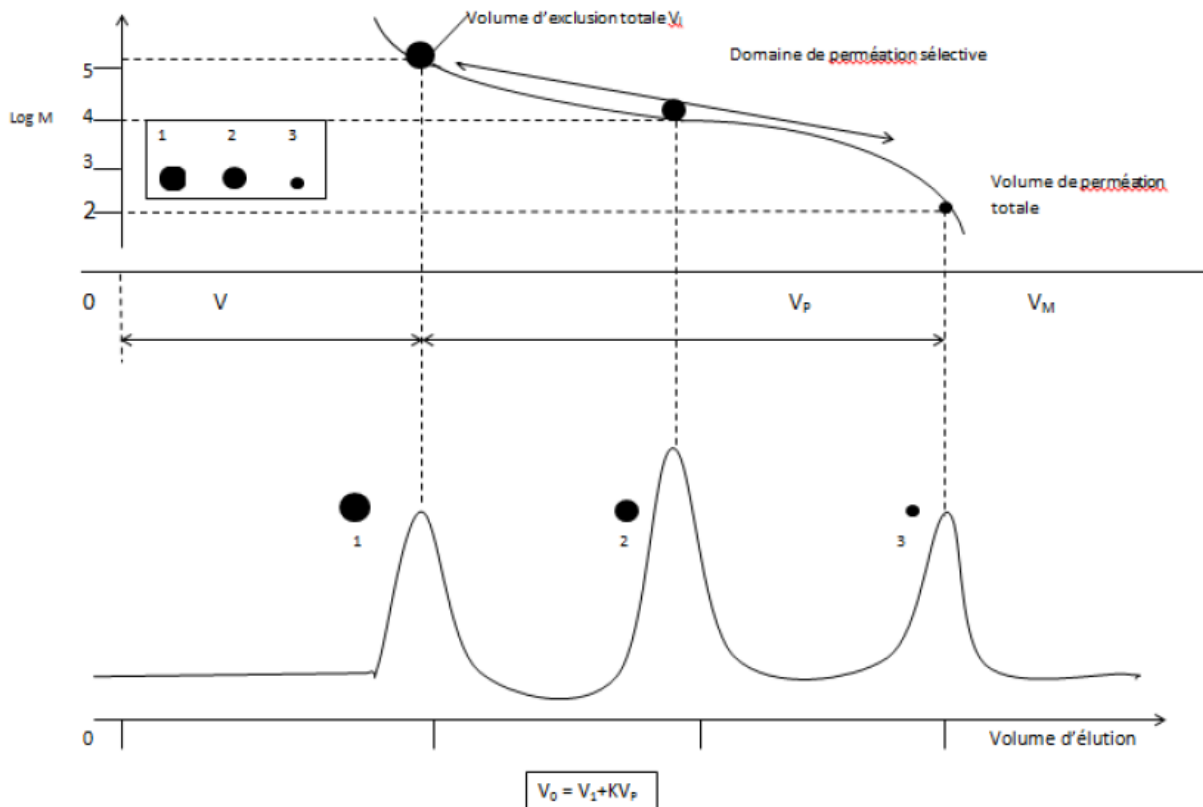


Fig.5.2 : Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1, 2, 3) et

la courbe $\log (M) = f (V_e)$