

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1
2012-2013

Christophe Morin

Mail: ch.morin@u-pec.fr

Claire Lacombe

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

II. Les techniques utilisées en Biochimie

Introduction

- Méthodes spectrométriques
- Techniques chromatographiques
- Dialyse
- Techniques d'électrophorèse

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques

-spectrométrie d'absorption (UV-visible, infrarouge)

« basée sur le principe des atomes libres pouvant absorber la lumière à certaine(s) longueur(s) d'onde spécifiques »

-spectrométrie d'émission (fluorescence, luminescence)

« les radiations émises permettent de caractériser les molécules étudiées ».

-spectrométrie de masse

« le mouvement des ions dans les champs électriques et magnétiques permet de classer ces ions en fonction de leur rapport masse/charge.»

Biochimie structurale

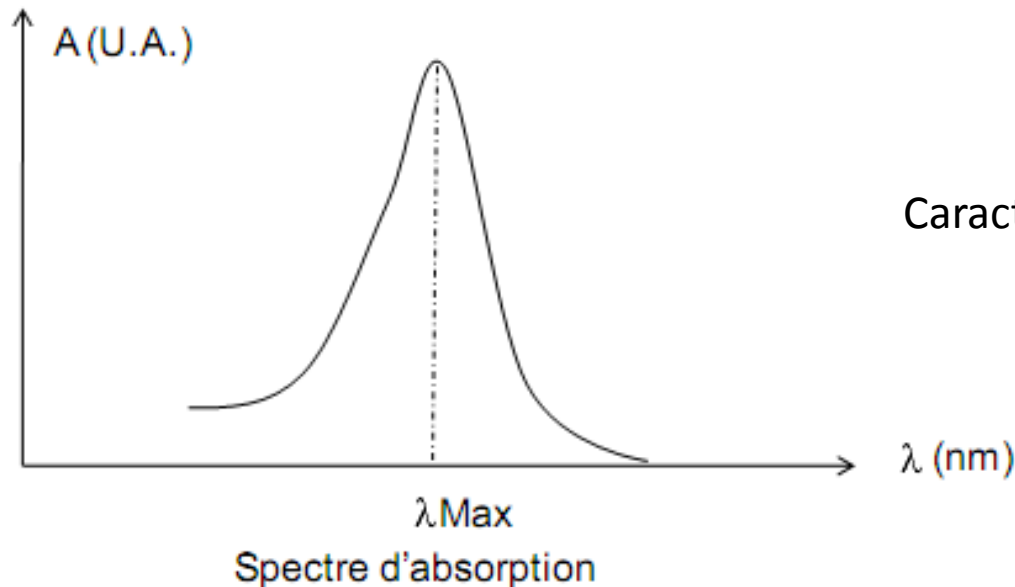
Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques

-spectrométrie d'absorption (UV-visible, infrarouge)

« basée sur le principe de l'absorption de la lumière à certaine(s) longueur(s) d'onde spécifiques par les atomes libres »



Caractériser une molécule:

-identifier

-doser

(échantillon, activité enzymatique)

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques

Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche ;

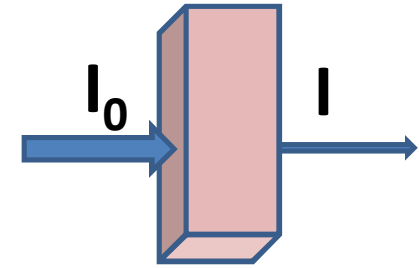
la couleur perçue par l'oeil résulte de la superposition des couleurs des radiations non absorbées.

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques



- La loi de Beer-Lambert : la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent.
- La lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse **un milieu homogène**, l'intensité de la lumière émergente I décroît exponentiellement lorsque l'épaisseur l du milieu absorbant augmente.

$$I = I_0 \cdot e^{-al}$$

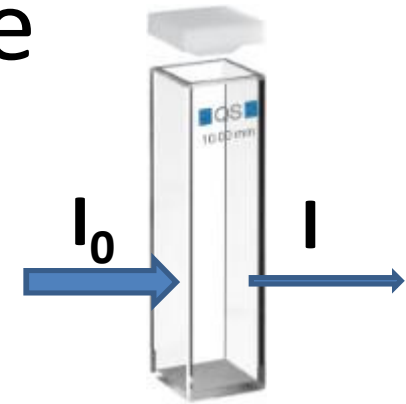
a = coefficient d'absorption, spécifique du milieu et de la longueur d'onde.

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques



- La loi de Beer-Lambert : la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent.

Pour les solutions, la loi de Beer-Lambert fait intervenir les concentrations.

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon lc}$$

ϵ est un coefficient d'absorbance ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), l est l'épaisseur de la cuve (cm) et c la concentration de la solution (mol/L).

La relation fondamentale est alors présentée sous la forme :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon lc$$

Biochimie structurale

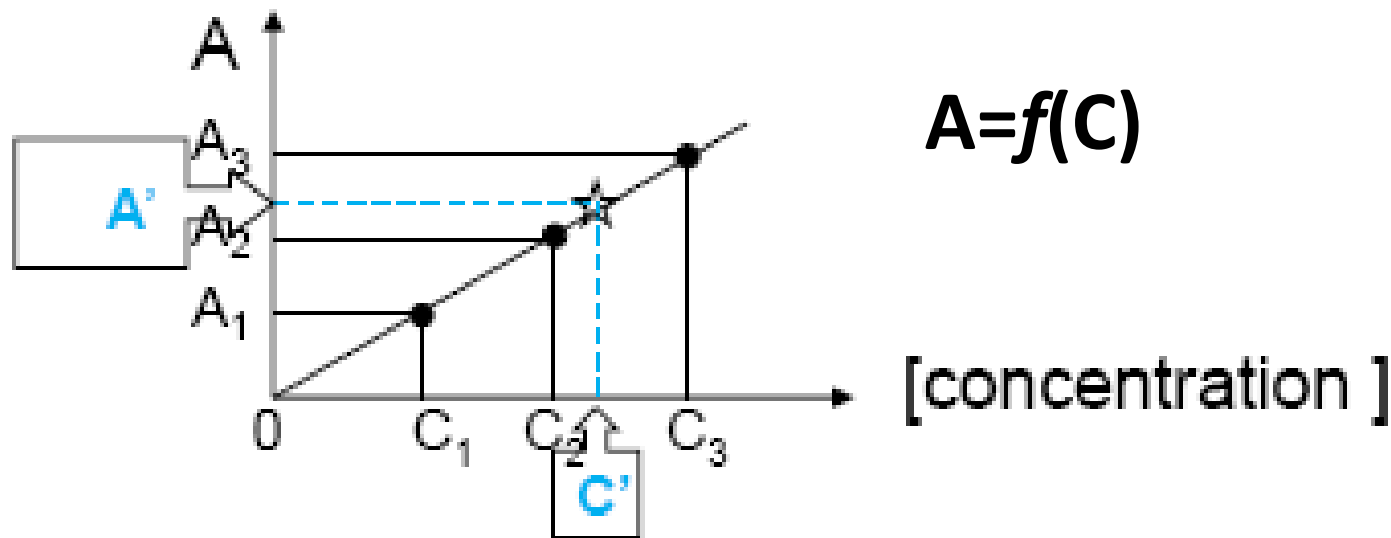
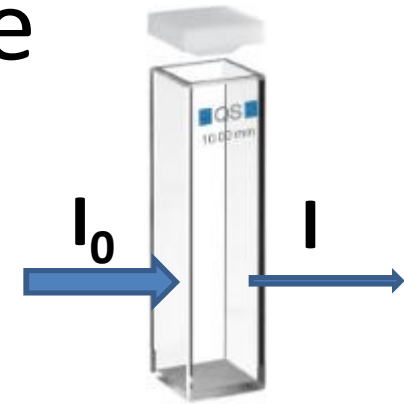
Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

A. Les méthodes spectrométriques

Notion de gamme étalon :

proportionnalité entre la concentration et l'absorbance



À une longueur d'onde donnée, l'absorbance A d'une solution constituée de 2 molécules qui absorbent est la somme de l'absorbance individuelle de chacune des molécules :

$$A = \epsilon_1 \cdot l \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot l \cdot C_2$$

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

-

Mikhail TSWETT en 1905: technique de séparation de pigments végétaux (chlorophylles et caroténoïdes) sur des colonnes remplies d'une substance adsorbante.

Principe:

Cherche à séparer les molécules d'un mélange en fonction de leur différences d'adsorption (d'affinité, ou de solubilité) entre une phase stationnaire (immobile) et une phase mobile (qui les entraîne).

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

•

3 classifications:

Nature physique
des phases

Phase mobile:
fluide (liquide, gaz)
Phase stationnaire:
solide ou liquide

- liquide/solide (Tswett) (LSC)
- liquide/liquide (LLC)
- gaz/solide (GSC ou GC)
- gaz/liquide (GLC ou GC)

Phénomène
chromatographique

Dépend de la nature et
structure de la phase
stationnaire

- d'adsorption
- de partage
- d'échange d'ions
- d'exclusion

Procédé
utilisé

- conditionnement de la phase stationnaire:
colonne
papier
couche mince
- Phase mobile:
élution

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

- Chromatographie d'adsorption

-mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide

fixation plus ou moins importante d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide;

elle met en jeu des liaisons à faible énergie (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques...). Pour être utilisable à des fins séparatives, l'adsorption doit être réversible.

-mécanisme d'élution (désorption) par la phase mobile liquide ou gazeuse (éluant).

extraction du soluté adsorbé à l'aide d'un solvant : l'éluant.

Utilisation: séparation **des molécules organiques de masse molaire 100 à 1000 g/mol et de polarité moyenne;**

- lipides : stérols et stéroïdes, caroténoïdes, phospholipides...
- pigments, médicaments...
- oses et oligosides, acides aminés et oligopeptides

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

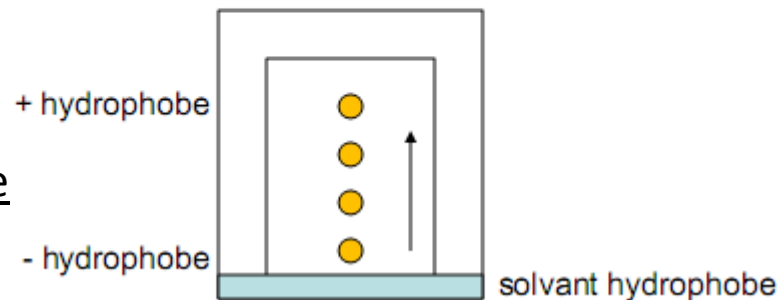
- Chromatographie de partage

mécanisme de **partition entre solvants** constitué par :

- la phase stationnaire : un film liquide non miscible avec la phase mobile et **imprégné** sur un support rigide (ex: silice) ou *fixé* par liaison covalente (phases greffées)
- la phase mobile.

Migration de la phase mobile organique par capillarité sur un support poreux hydrophile. Plus les molécules sont hydrophobes, plus elles se laissent entraîner par la phase mobile.

Chromatographie couche mince



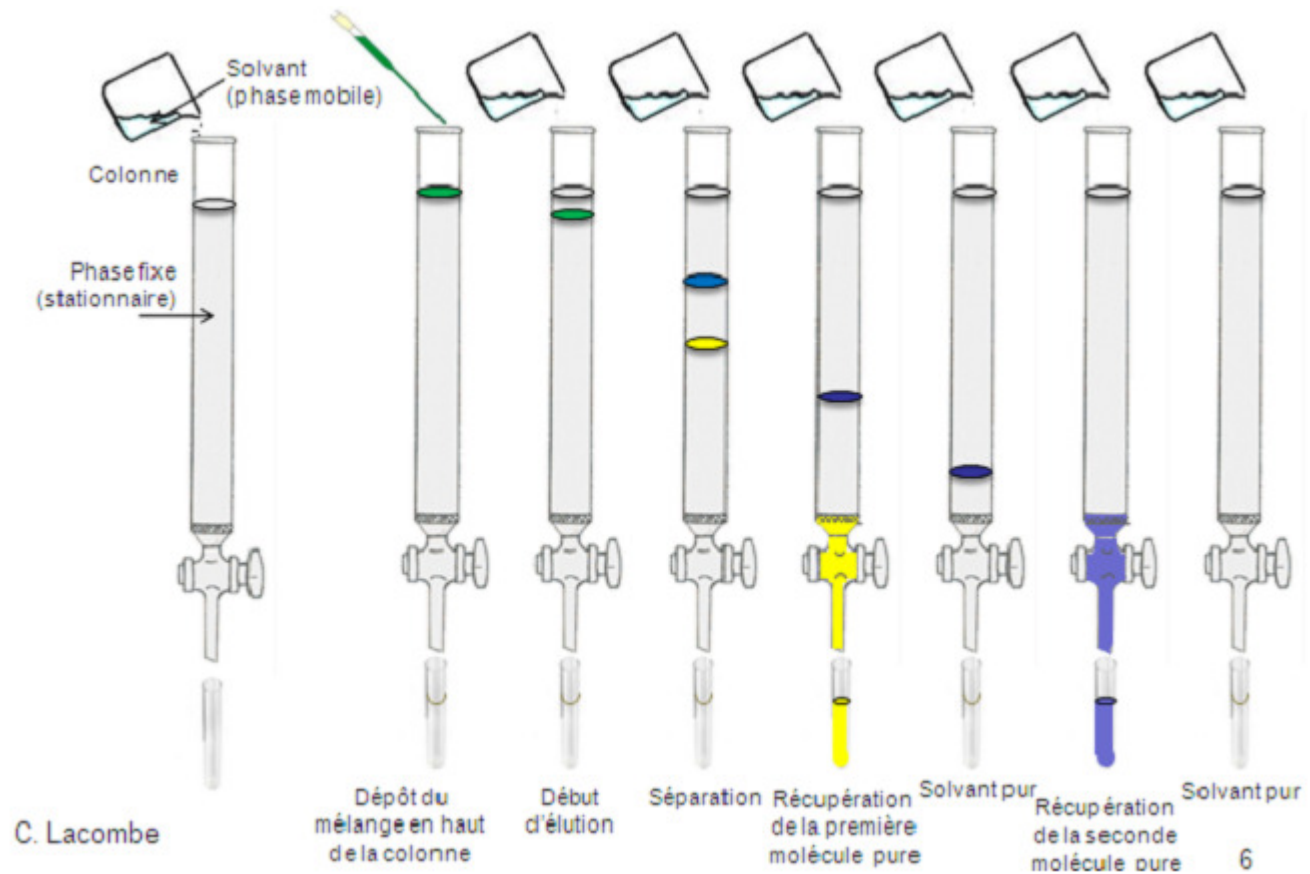
Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

- Chromatographie de partage



Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

- Chromatographie échangeuse d'ions

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables

Ils échangent de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

Résine cationique : $\text{Résine-G}^- / \text{X}^+ + \text{cation}^+ \rightleftharpoons \text{Résine-G}^- / \text{cation}^+ + \text{X}^+$

Résines anioniques: $\text{Résine-G}^+ / \text{Y}^- + \text{anion}^- \rightleftharpoons \text{Résine-G}^+ / \text{anion}^- + \text{Y}^-$

L'élution consistera à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité, de charge et de concentration plus élevée : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

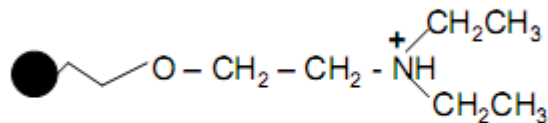
III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

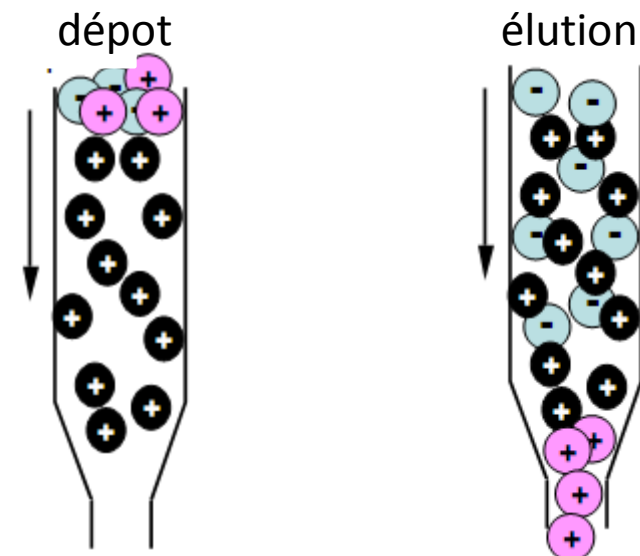
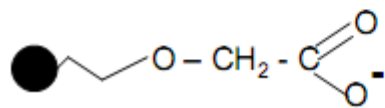
- Chromatographie échangeuse d'ions

2 exemples de résines :

-Échangeur d'anions : DEAE (diéthylamnioéthyl)



-Échangeur de cations : CM (carboxyméthyl)



L'élution consistera à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité, de charge et de concentration plus élevée : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ...

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

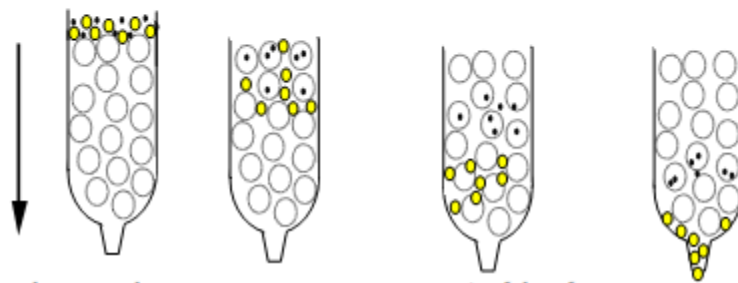
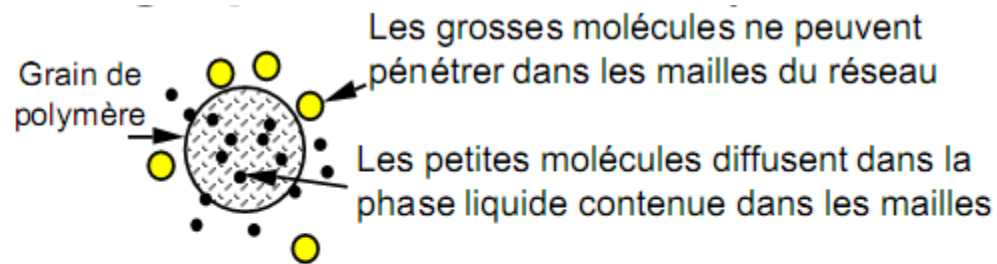
III. Les techniques utilisées en Biochimie

B. Les méthodes chromatographiques

- Chromatographie d'exclusion

aussi appelée **FILTRATION SUR GEL** ou **TAMISAGE MOLECULAIRE**.

Apparut en 1959 : polymère de Dextran (glucose α 1-6) réticulé (billes): le **Sephadex**



Les molécules les plus grosses sont éluées en premier.

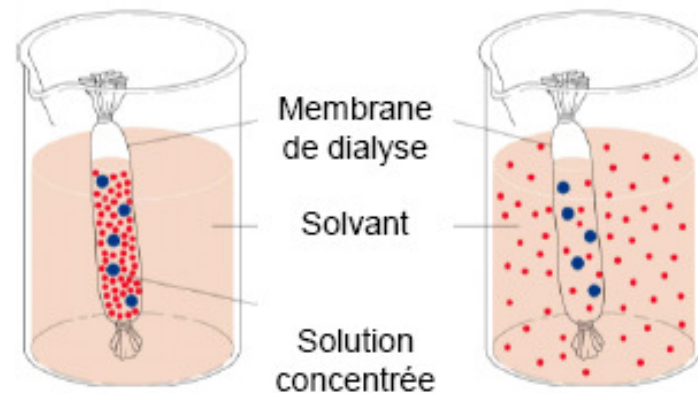
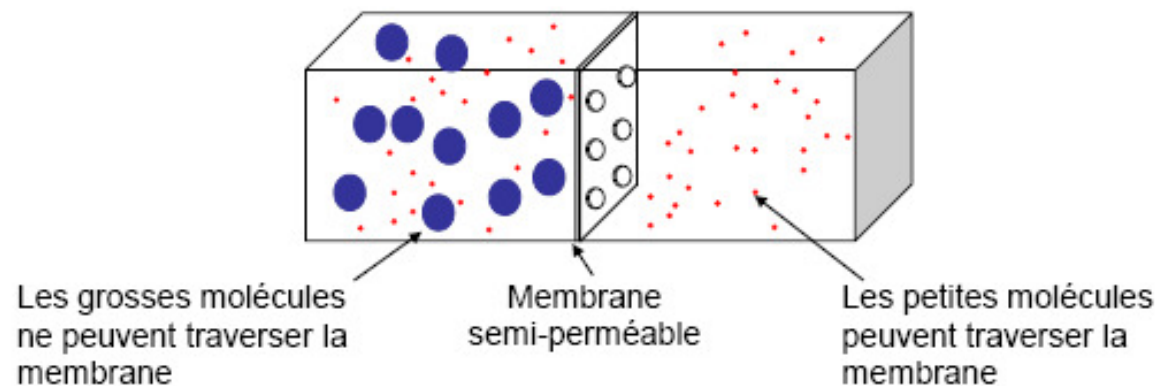
Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

C. La dialyse

La dialyse est la diffusion de molécules en fonction de leur taille à travers une membrane semi-perméable.



C. Lacombe

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

D. L'électrophorèse

Définition:

Des molécules possédant une charge électrique nette et soumises à l'action d'un champ électrique sont déplacées vers le pôle de signe opposé à leur charge, à une vitesse proportionnelle à cette charge.

Dans le cas d'une solution de molécules hétérogènes, cela entraîne leur séparation de en fonction de leur charge: c'est la séparation électrophorétique ou électrophorèse.

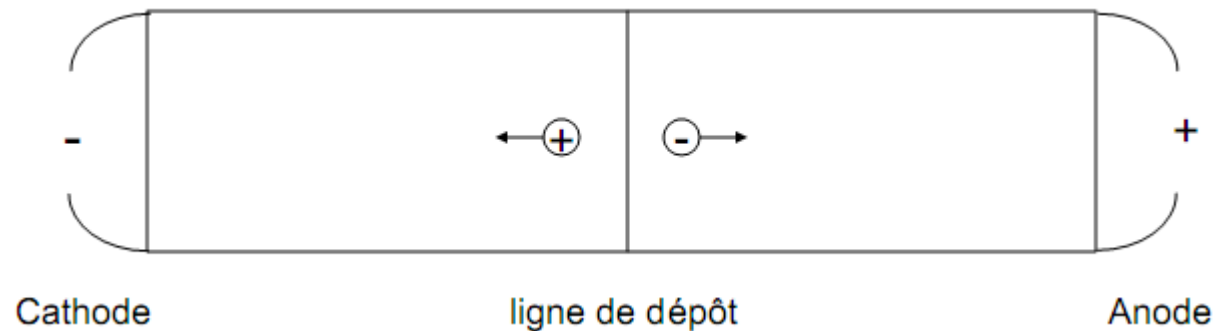
Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

D. L'électrophorèse

1-Electrophorèse sur couche mince



RMQ: Le **pH isoélectrique** d'une particule (pH_i ou pI) est le **pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique** (définition expérimentale).

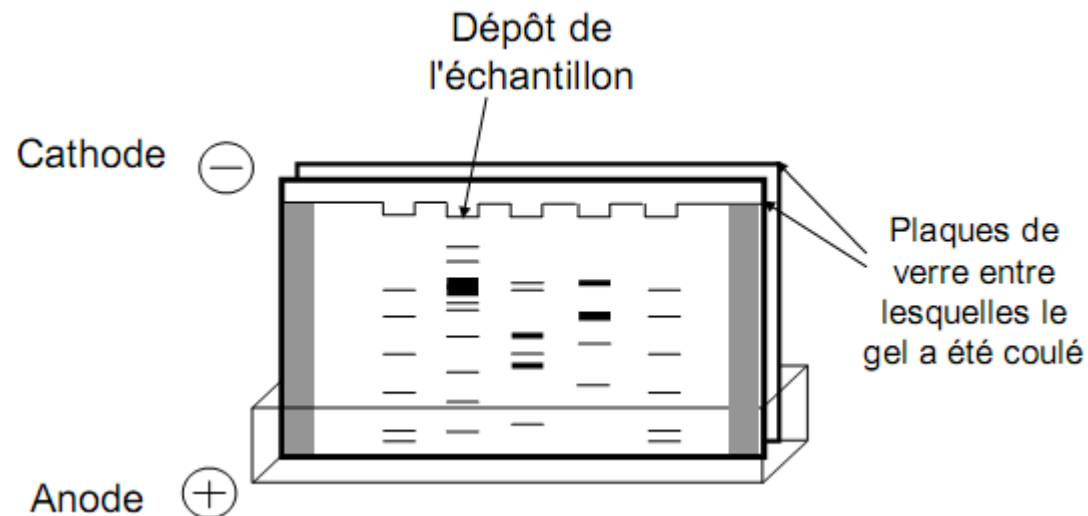
Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

D. L'électrophorèse

2-Electrophorèse sur gel



RMQ: la charge des molécules ne sert ici que de « moteur » de déplacement!
La séparation des molécules a lieu en fonction de leur taille : le gel va ralentir la migration des grosses molécules.

Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

D. L'électrophorèse

2-Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

décrite par Ulrich Laemmli en 1970.

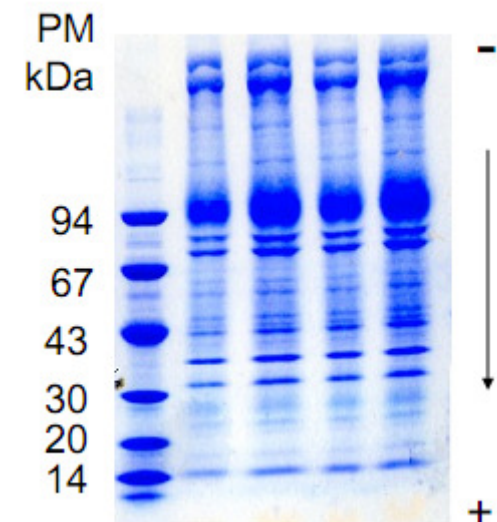
Le mélange de protéines est bouilli en présence :

-d'un agent réducteur : le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.

-d'un détergent anionique : le sodium dodecyl sulfate (SDS) place autour des protéines des charges négatives qui se repoussent entre elles et déplient les chaînes polypeptidiques.

Conséquence :

les protéines sont dénaturées : elles perdent leur structure tridimensionnelle et n'ont plus de pont disulfure (forme monomérique)



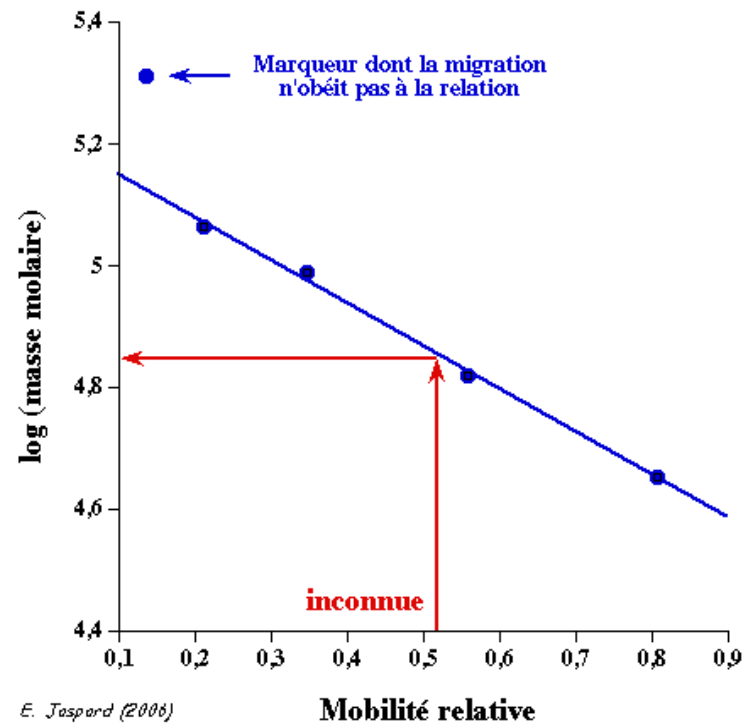
Biochimie structurale

Licence 1- Semestre 1

III. Les techniques utilisées en Biochimie

D. L'électrophorèse

2-Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)



Masse molaire et masse moléculaire

Masse molaire s'exprime en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. C'est la masse d'une mole ($6,023 \cdot 10^{23}$ molécules) de la substance considérée.

Masse moléculaire s'exprime en daltons (Da). C'est la somme des masses atomiques des atomes constitutifs de la molécule.

$1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g} = \text{masse d'un atome d'hydrogène}$)

Rappel : le nombre d'Avogadro provient du fait qu'il faut $6,023 \cdot 10^{23}$ atomes d'hydrogène, de masse $1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$, pour avoir 1 g d'hydrogène.