

SOMMAIRE

DOSAGE DES PROTEINES SERIQUES	1
I. GENERALITES	2
1. Loi de Beer-Lamber	2
2. Dosage par étalonnage	3
II. MANIPULATION	3
1. Principe	3
2. Réactifs	4
3. Mode opératoire	4
ELECTROPHORESE	6
I. ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES SUR ACETATE DE CELLULOSE	7
1. Généralités	7
2. Principe	7
3. Manipulation	7
II. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE(PAGE)	9
1. Introduction - Principe	9
2. Supports	9
3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecylsulfate (PAGE-SDS)	10
a. Electrophorèse en tampons discontinus	11
b. Electrophorèse en tube ou sur plaque	12
c. Visualisation des protéines séparées par PAGE-SDS	12
4. Application de la technique PAGE-SDS pour analyser un extrait de protéines	13
CHROMATOGRAPHIE	16
I. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS	17
1- Généralités	17
a. Définition	17
b. Propriétés des résines échangeuses d'ions	17
<i>b1. Le squelette hydrocarboné de la résine</i>	17

<i>b2. Les groupements fonctionnels</i>	18
<i>α. Les groupements fonctionnels des résines cationiques</i>	18
<i>β. Les groupements fonctionnels des résines anioniques</i>	18
<i>b3. Granulométrie</i>	18
<i>b4. Capacité de rétention d'une résine</i>	19
c. Les différentes phases de la chromatographie échangeuse d'ions	19
d. Facteurs influant sur la séparation	19
2- application à la séparation d'un mélange de glutamate-arginine sur résine cationique	20
a. Caractéristiques de la résine	20
b. Principe de séparation	20
c. Réactifs	20
d. Technique de régénération	21
e. Mode opératoire	21
<i>e1. Préparation de la colonne</i>	21
<i>e2. Chromatographie</i>	21
<i>e3. Analyse colorimétrique des fractions</i>	22
II. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES ACIDES AMINES	23
1. Principe	23
2. Matériel et réactifs	23
3. Manipulation	24
a. Préparation du solvant d'élution	24
b. Préparation du papier Whatman chromatographique	24
c. Dépôt	24
d. Développement	24
e. Révélation	25
f. Résultats	25

DOSAGE DES PROTEINES

I. GENERALITES

Le terme dosage signifie tout simplement mesure ou quantification d'une substance dans une solution donnée. Dans notre manipulation on se propose de doser des protéines, donc on va essayer de déterminer la quantité ou la concentration de protéines dans la solution. Pour cela nous utiliserons une solution de référence de concentration connue : on parle de solution témoin ou gamme étalon.

Pour le dosage des protéines, la technique la plus simple est celle utilisant des réactions colorées d'où le terme dosage colorimétrique appelée aussi spectrométrie d'absorption moléculaire. On peut aussi utiliser la lecture de l'absorption directe à 280 nm (UV) étant donné que pratiquement toutes les protéines naturelles contiennent à peu près la même quantité d'acides aminés aromatiques dans leurs structures.

Les méthodes colorimétriques utilisent un réactif coloré et se différencient par la nature du réactif et par la sensibilité de la méthode. Parmi ces méthodes citons :

- Méthode de Biuret : utilise le réactif de Gornall pour des dosages de protéines dont la concentration est de l'ordre de quelques mg/ml. C'est la moins sensible des méthodes colorimétriques.
- Méthode de Lowry : utilise le réactif de Folin, elle est très sensible ($\mu\text{g/ml}$)
- Méthode de Bradford : utilise comme réactif le bleu de Coomassie et sa sensibilité est comprise entre le $\mu\text{g/ml}$ et le mg/ml .

1. Loi de Beer-Lambert

Quand une substance colorée, transparente et homogène est traversée par un rayon monochromatique, de longueur d'onde fixe, l'intensité I de la lumière transmise est inférieure à l'intensité I_0 de la lumière incidente (Loi de Lambert).

Le rapport I/I_0 est appelé transmittance (ou transmission) (T) de la solution (s'exprimant couramment en %, $0 < T < 100$) et correspond à la fraction de l'intensité lumineuse la traversant. Le logarithme décimal du rapport I_0/I est la densité optique (**DO**) ou absorbance (**A**) correspondant à la fraction lumineuse absorbée par la solution à une longueur d'onde λ . Ainsi : $\text{DO}_\lambda = -\log_{10} T$, un nombre sans unité et se mesure à l'aide d'un spectrophotomètre.

La loi de Beer-Lambert, aussi connue comme la loi de Beer-Lambert-Bouguer, est une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux dans lesquels elle passe. La loi établit une proportionnalité entre la concentration molaire (C) d'une entité chimique en solution (nombre de molécules de substance), l'absorbance et la longueur (l) du trajet parcouru par la lumière dans la solution.

La Loi de Beer-Lambert s'écrit :

$$\text{DO}_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot C \cdot l$$

- ϵ est une constante qui dépend de la longueur d'onde de la lumière (λ) et de la nature de la substance. On l'appelle « coefficient d'extinction molaire », exprimée en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Elle dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température.
- l est la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuve utilisée (en cm, en général $l = 1 \text{ cm}$).

- C'est la concentration molaire de la solution (en mol. L⁻¹).

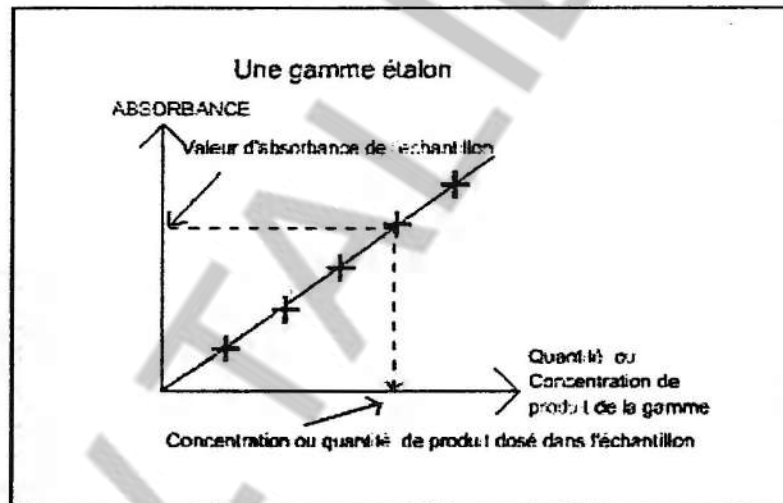
Cette équation est particulièrement utile pour la chimie analytique. En effet, si l et ϵ sont connus, la concentration d'une substance peut être déduite.

Si on mesure, à la même longueur d'onde, plusieurs solutions de la même substance (ϵ constante) à des concentrations différentes, la densité optique ou l'intensité de l'absorption sera directement proportionnelle à la concentration de cette substance : $DO = f(C)$.

2. Dosage par étalonnage

Pour appliquer une technique de dosage colorimétrique à une solution inconnue, on doit utiliser parallèlement, dans **des conditions expérimentales identiques**, une série de solutions de concentrations connues de la même substance (ou substance très voisine), ce qui constitue la gamme étalon. Pour le dosage des protéines, la substance couramment utilisée pour préparer la gamme étalon est la BSA (Bovine Sérum Albumine) et on mesure l'absorbance de chaque solution.

On reporte les résultats de mesure sur un graphe avec en abscisses la concentration (ou la quantité) de substance et en ordonnées la valeur d'absorbance correspondante. Ce graphe ($DO = f(C)$) constitue la droite étalon ou droite d'étalonnage qui permet de déterminer la quantité ou la concentration inconnue de la substance à doser.



II. MANIPULATION

Le but de la manipulation est de déterminer la concentration en protéines du blanc d'œuf par la méthode de biuret qui met en évidence la présence des liaisons peptidiques.

1. Principe :

En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet. Un dosage colorimétrique est donc possible à la longueur d'onde λ de 540 nm. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall.

2. Réactifs :

- Réactif de coloration : réactif de Gornall. Il est composé :
 - o de sulfate de cuivre qui donne la coloration bleu du réactif due aux ions cuivre ;
 - o d'hydroxyde de sodium qui rend le milieu basique ;
 - o de tartrate double de sodium et de potassium, qui « chelate » (piège) le ions Cu^{2+} et évite leur précipitation en milieu basique sous forme d'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble ;
 - o d'iode de potassium (KI), pour éviter la réduction du cuivre et assurer ainsi la stabilité du réactif.
- 1 œuf.
- Etalon protéines (solution de BSA) à 10 mg/ml.
- Eau physiologique.

3. Mode opératoire :

• Préparation de la gamme étalon

A partir de la solution étalon à 10,0 mg/ml, réaliser une gamme de 5 tubes contenant de 2 à 10 mg de protéines par tube.

Compléter et réaliser la gamme d'étalonnage selon le tableau suivant :

Tubes à essais (N°)	1	2	3	4	5	6
Solution BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau physiologique (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Quantité de protéines par tube (mg)	0	2	4	6	8	10

• Préparation de la solution de blanc d'œuf :

- Peser un blanc d'œuf.
- Mettre en solution dans un litre d'eau physiologique (solution S).
- Dans deux tubes à essais, numérotés 7 et 8, introduire 1 ml de la solution S (dans le but d'effectuer le dosage en double).
- Ajouter simultanément dans les 8 tubes (les 6 tubes de la gamme étalon de 1 à 6 et les deux tubes de dosage 7 et 8) 4 ml de réactif de Gornall. **Il est impératif de traiter tous les tubes dans les mêmes conditions expérimentales.**

Tubes à essais N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Réactif de Gornall (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4

- Homogénéiser et laisser reposer 30 min à température ambiante.

- Lire l'absorbance de tous les tubes à $\lambda = 540 \text{ nm}$ contre le témoin de la **gamme** en réglant le zéro optique avec le tube n°1 (tube blanc ne contenant pas de protéines).

• **Résultats :**

- Compléter le tableau de résultats ci-dessous :

Tubes à essais (N°)	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution BSA en ml	0						-	-
Solution S en ml	-	-	-	-	-	-	1	1
Eau physiologique (ml)	1						-	-
Réactif de Gornall (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4
DO à 540 nm	0							
Quantité de protéines par tube (mg)	0							

- Sur papier millimétré, tracer la courbe d'étalonnage : $DO = f([BSA])$.
- Déduire la concentration en protéines (exprimée en g/L) dans la solution S puis en déduire la teneur en protéines pour 100 g de blanc d'œuf.
- Conclure.

Données : Composition moyenne du blanc d'œuf :

- eau : 85 %, glucides 0,8 %, protéines : 12,9 %, sels minéraux : 1,0 %, lipides : 0,3 %.

ELECTROPHORESE

WWW.TALIB24.COM

I- ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES SUR ACETATE DE CELLULOSE

1. Généralités

On appelle électrophorèse le déplacement de particules chargées dans un champ électrique. Le déplacement de la particule dépend principalement de plusieurs facteurs dont :

- Le temps de migration
- La force ionique du tampon de migration
- La température
- Le courant électrique continu
- La force de freinage
- Le pH du tampon**

En effet une particule ayant une charge électrique nette et soumise à l'action d'un champ électrique se déplace dans la direction du champ vers le pôle de signe opposé à sa charge. Cette opération entraîne la séparation des particules chargées : c'est une séparation électrophorétique ou électrophorèse.

On distingue plusieurs types d'électrophorèse qui se différencient uniquement par rapport au support (acétate de cellulose, polyacrylamide, agarose ...)

2. Principe

Une particule chargée soumise à un champ électrique continu se déplace avec une vitesse V . Cette vitesse dépend donc de la valeur du champ électrique E mais aussi de la mobilité électrophorétique de chaque particule.

La mobilité est une caractéristique de la particule dans des conditions données qui définissent aussi bien la charge de la particule que la viscosité du milieu. Ces conditions sont déterminées par le pH et la force ionique du tampon de migration.

Le pH détermine la nature mais surtout l'importance de la charge de la particule. Ainsi pour les protéines sériques dont les pH_i sont inférieurs à 7,2-7,3 on travaillera à un pH alcalin (8,8) qui est supérieur aux pH_i des protéines sériques qu'on veut séparer. En effet toutes les fractions protéiques seront chargées négativement et migreront vers l'anode.

3. Manipulation

- Réactifs :
 - # Tampon : Tris-Barbital-Sodium-Barbital pH 8.8
 - # Colorant : Solution rouge Ponceau S
 - # Décolorant : acide acétique 5%
- Mode opératoire : (Toutes ces opérations seront réalisées par l'enseignant responsable mais font partie intégrante de la séance de TP et par conséquent peuvent faire l'objet de questions d'examen).
 - 1) Les bandes d'acétate de cellulose sont immergées dans le tampon de migration pendant au moins 15 minutes (Pas d'empreintes sur les bandes)
 - 2) Les compartiments de la cuve à électrophorèse sont remplis par le tampon de migration puis les deux électrodes sont placées respectivement dans les compartiments.

- 3) Les bandes bien essorées par du papier Joseph sont ensuite placées sur leur support de façon à ce que leurs extrémités soient bien appliquées contre le support et plongeant dans le tampon.
- 4) La solution de protéines sériques est déposée à l'aide d'un applicateur
- 5) La cuve est alors connectée au générateur et une tension de 140 V est appliquée pendant 1 heure.
- 6) Une fois la migration terminée, les bandes sont colorées puis décolorées.

• **Résultats :**

Après décoloration, on remarque que le colorant rouge Ponceau n'est présent que là où il y a des protéines. Ainsi on distingue aisément le sérum albumine et les différentes globulines sériques (**figure 1**).

L'électrophorégramme obtenu est ainsi appelé protéinogramme.

La figure 1 représente la courbe des densités optiques obtenues pour chaque position de la bande par densitométrie. La surface totale de l'enregistrement représente l'ensemble des protéines sériques alors que la surface de chaque pic ne représente que l'une des protéines. Le rapport de la surface de chaque pic sur la surface totale exprime alors le pourcentage de cette protéine.

Les résultats obtenus dépendent des conditions opératoires, mais les valeurs moyennes pour un sérum humain adulte sont :

Albumine : 50 à 60% ; α_1 -globuline : 3 à 5% ; α_2 -globuline : 7 à 10%

β -globuline : 10 à 14% ; γ -globulines : 16 à 23%

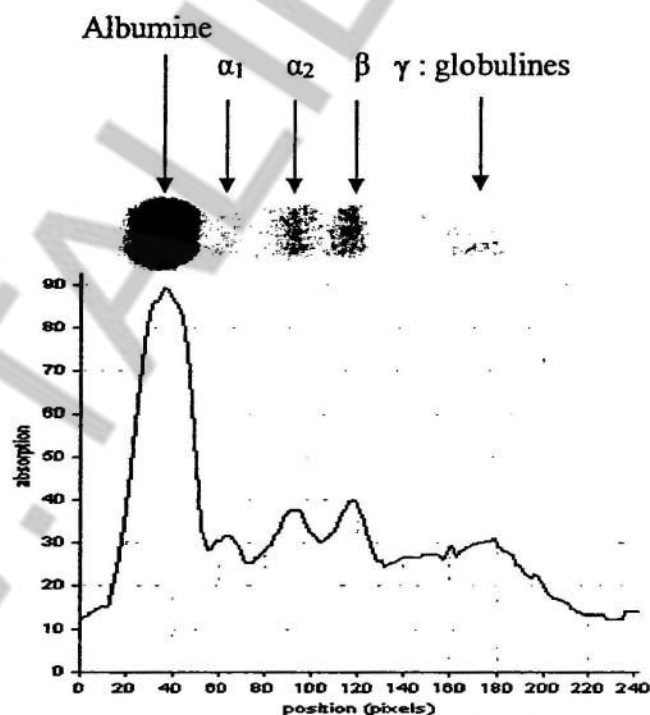


Figure 1 : Electrophorèse et analyse densitométrique
Du sérum humain (profil obtenu avec Mesurm).

II- ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (PAGE)

1. Introduction - Principe

Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés dont certains d'entre eux peuvent être chargés électriquement lorsque le pH de la solution est différent de leur pKa. Il en résulte que toutes les protéines possèdent une charge nette électrique dont le signe et l'intensité varient en fonction du pH de la solution et de leur **point isoélectrique (pI)** :

- à un pH inférieur à leur pI (valeur de pH pour laquelle la protéine est électriquement neutre), elles auront une charge nette positive et se comporteront donc comme des cations lorsqu'elles seront soumises à un champ électrique ;
- à l'inverse, à un pH supérieur à leur pI, elles se comporteront comme des anions.

L'électrophorèse est basée sur le mouvement des ions en solution sous l'action d'un champ électrique. Leur vitesse de migration dans un champ électrique dépend de leur **densité de charge** c'est-à-dire du rapport charge nette électrique / taille de la protéine. Plus ce rapport est élevé plus la protéine migrera vite dans un champ électrique donné.

2. Supports

L'électrophorèse est pratiquée sur un **support solide** : feuilles de papier ou d'acétate de cellulose, couche de silice, d'alumine ou de cellulose, gels d'agarose, d'amidon ou de polyacrylamide. Ces supports solides sont inertes vis-à-vis des protéines. Ils minimisent les mouvements de convection. La séparation des protéines est alors principalement basée sur leur différence en densité de charge à un pH donné.

Les divers gels peuvent avoir une action dans le processus de séparation électrophorétique en interagissant avec les protéines : ces gels sont en effet assimilables à *un milieu poreux* où les molécules protéiques vont devoir passer à travers les pores. La vitesse de migration électrophorétique des protéines va donc être dépendante non seulement de leur densité de charge mais également de leur **taille**. Ainsi, 2 protéines ayant des charges identiques mais des tailles différentes vont pouvoir être séparées sur des gels poreux : la protéine la plus grosse sera retardée. L'importance de cet effet dans la séparation électrophorétique est corrélée avec la taille des pores des gels : plus celle-ci sera voisine de celle des protéines à séparer plus cet effet sera important (Figure 2).

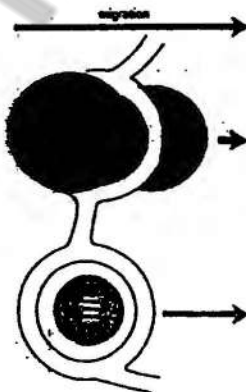


Figure 2 : Effet de la taille d'un gel comme le polyacrylamide sur la migration électrophorétique des protéines.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecylsulfate (PAGE-SDS)

Le gel de polyacrylamide est obtenu par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED, persulfate d'ammonium par exemple) (Figure 3). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel.

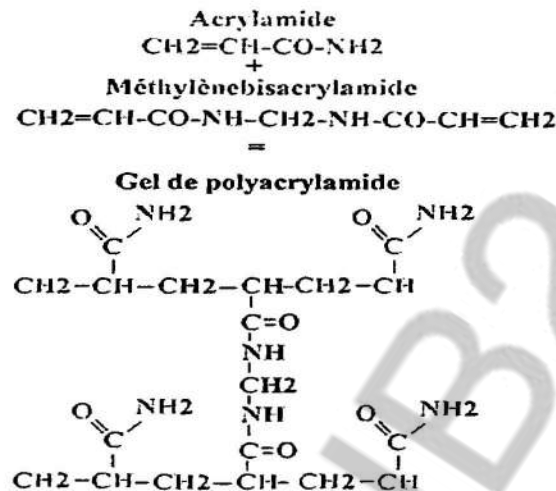


Figure 3 : Structures chimiques et réaction de polymérisation de l'acrylamide

Comme toute technique électrophorétique, la SDS-PAGE permet la séparation des particules en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille. Dans le cas de la SDS-PAGE, la séparation est réalisée en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de SDS (dodécylsulfate de sodium) : le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. La structure native de la protéine est donc dénaturée, et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine.

En présence de SDS, les protéines auront donc toutes une charge apparente négative, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Les protéines ayant un petit poids moléculaire, seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront donc plus loin que les grosses.

La taille des pores des gels varie en fonction de la concentration totale en acrylamide. La concentration totale en acrylamide est calculée d'après la formule suivante :

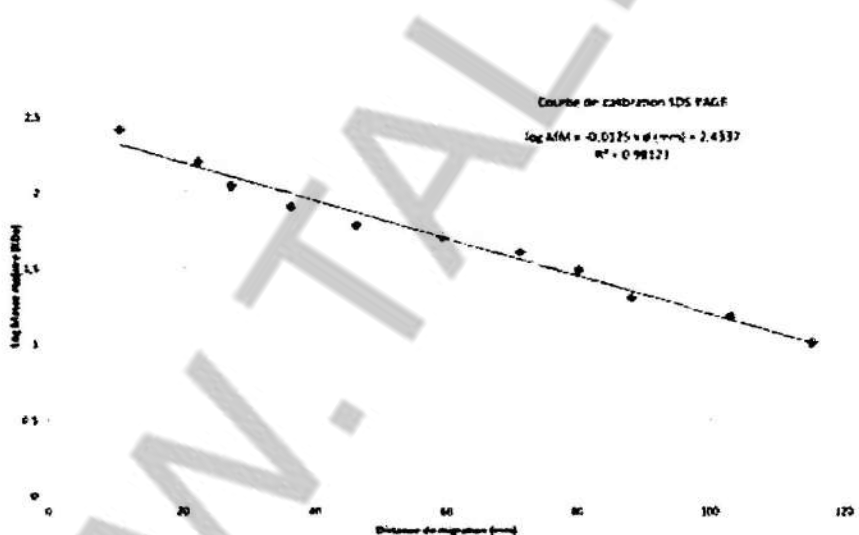
$$\% T = \frac{a + b}{m}$$

a : quantité d'acrylamide en grammes
b : quantité de bisacrylamide en grammes
m : 100 ml de volume final de gel

Des gels à moins de 2,5 % en ce monomère permettent de séparer avec effet de taille des protéines dont la masse moléculaire est d'environ 10^6 et des gels à 30% des polypeptides de 2000 de masse moléculaire. Pour une concentration donnée en acrylamide, la taille effective des pores, la rigidité, la fragilité et les propriétés de gonflement du gel de polyacrylamide va varier avec la concentration en bisacrylamide : la taille de pores est ainsi inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant. Cette relation ne s'applique que jusqu'à une concentration en bisacrylamide égale à 5% de celle de l'acrylamide.

Remarque : on ajoute aussi très souvent au mélange dénaturant du 2-mercaptoéthanol. Ce composé réduit les ponts disulfures unissant les différentes sous-unités des protéines oligomériques. Chaque sous-unité, une fois dissociée, fixe le SDS et prend une charge apparente négative. Les sous-unités étant dissociées, sur le gel apparaîtront après migration, autant de bandes qu'il y avait de sous-unités constitutives.

Si l'électrophorèse d'un mélange protéique est effectuée dans ces conditions et en parallèle avec un mélange de protéines de masses moléculaires connues, il est possible de déterminer la masse moléculaire de ces protéines. De nombreux kits contenant des protéines de masses moléculaires connues sont commercialisés.



a. Electrophorèse en tampons discontinus

L'électrophorèse peut être pratiquée avec un tampon unique (en particulier vis-à-vis du pH) présent tant au niveau de l'échantillon protéique à séparer que du gel et des bacs où se trouvent les électrodes. Ce système désigné sous le nom de « continu » est peu résolutif lorsque les protéines à séparer se trouvent à l'état dilué, ce qui est bien souvent le cas. Aussi, préfère-t-on utiliser un système électrophorétique dit « discontinu », qui permet de concentrer

les protéines en des zones extrêmement fines (de l'ordre du micron) avant qu'elles soient séparées en fonction de leur taille dans le gel résolutif. Le système électrophorétique discontinu comprend plusieurs tampons, différents tant par leur composition que par leur pH, et un gel de concentration (stacking) en amont du gel résolutif. Le gel de concentration est constitué de polyacrylamide à large pores (% T ~ 4%) de façon à ce que les protéines ne soient pas retardées par leur taille. La différence de mobilité entre les ions du tampon dans le compartiment cathodique et ceux du tampon dans lequel se trouvent l'échantillon protéique et le gel de concentration induit la formation d'une zone frontière extrêmement fine, dans laquelle les protéines sont concentrées. Lorsque cette zone frontière atteint le gel résolutif, les protéines sont ralenties par les pores du gel. Elles vont migrer et se séparer sous forme de fines bandes en fonction de leur masse moléculaire apparente. Le système discontinu est ainsi très résolutif (d'autant qu'il peut être utilisé avec un gel à gradient de porosité) (Figure 4).

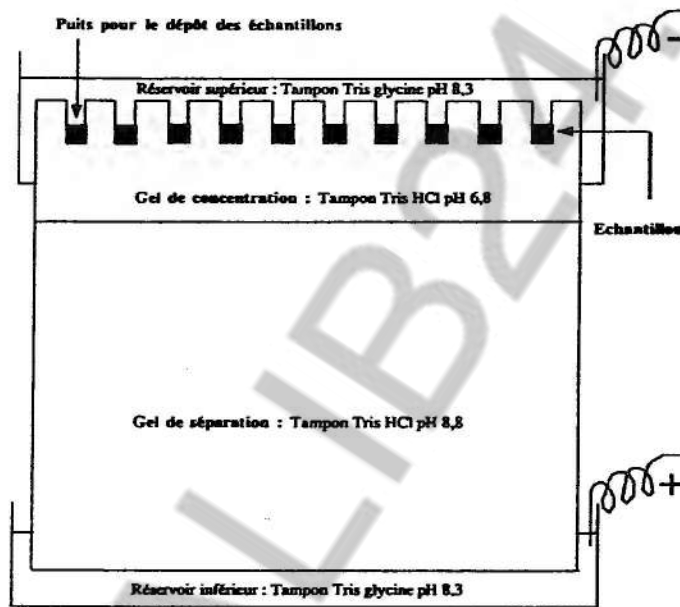


Figure 4 : Electrophorèse en système discontinu

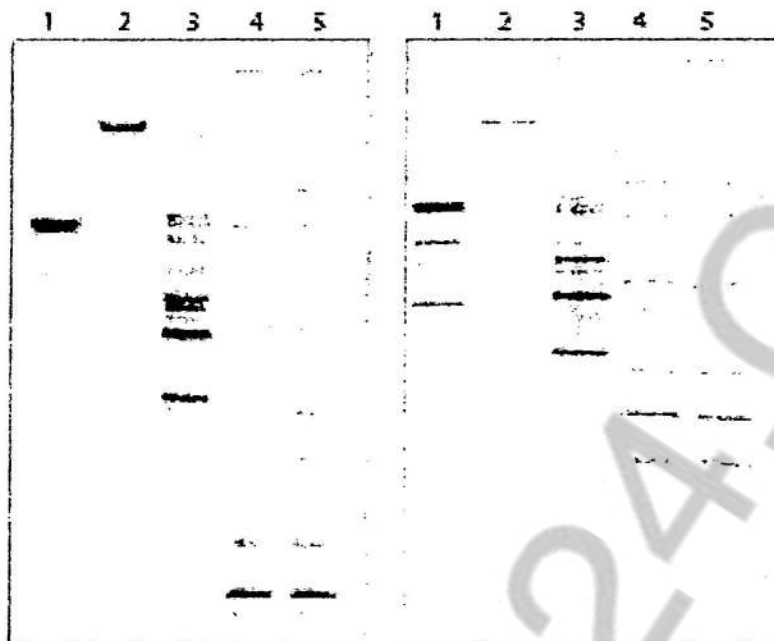
b. Electrophorèse en tube ou sur plaque

A l'origine, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide était pratiquée dans des tubes en verre. Cette méthode est de plus en plus abandonnée au profit de l'électrophorèse sur un gel de polyacrylamide de 0,75 à 3 mm d'épaisseur coulé entre 2 plaques de verre. Outre l'avantage de pouvoir déposer plusieurs échantillons sur le même gel (migrant alors dans les mêmes conditions électrophorétiques), la distorsion des bandes protéiques est réduite car la chaleur créée lors de l'électrophorèse est plus facilement dissipée. D'autres part, ces gels sont plus aisément séchés, se prêtent mieux aux mesures densitométriques et à la prise d'images photographiques. En plus, on peut déposer sur le même gel plusieurs échantillons différents.

c. Visualisation des protéines séparées par PAGE-SDS

Plusieurs techniques de coloration sont utilisées pour visualiser les protéines séparées dans un gel PAGE-SDS. Parmi celles les plus utilisées, on cite la coloration au bleu de Coomassie qui détecte jusqu'à 0,2 µg de protéines. On peut utiliser aussi la coloration au nitrate d'argent qui est beaucoup plus sensible (0,38 ng / cm² de protéine pour la sérum albumine bovine).

* Exemple de gel après coloration au bleu de Coomassie :



4. Application : Utilisation de la technique PAGE-SDS pour analyser un extrait de protéines

❖ Préparation des échantillons et solutions tampons

- Solution mère Acrylamide / Bisacrylamide

Acrylamide 29,2 %
Bisacrylamide 0,8 %
Préparer 100 ml

- Tampon pour gel de séparation pH 8,8

Tris/HCl 3M
SDS 0,8%
Préparer 100 ml

- Tampon pour gel de concentration pH 6,8

Tris/HCl 0,5M
SDS 0,4%
Préparer 100 ml

- Persulfate 10%

Préparer 1ml

- Tampon de solubilisation de l'échantillon : (Laemmli, 1970)

Tampon Laemmli 2x
(0,125M Tris-HCl pH 6,8 ; 4 % SDS ; 20% Glycérol)

1M Tris-HCl pH 6,8 : 1,2 ml
SDS 10 % : 4 ml
Glycérol : 2 ml
H₂O : 2,8 ml

Tampon Laemmli 1x (tampon Laemmli 2x dilué au ½)
(0,0625M Tris -HCl pH 6,8 ; 2 % SDS ; 10 % Glycérol)
5 volumes du tampon 2x
4 volumes d'eau
1 volume de β-mercaptoéthanol
0,1 % bleu de bromophénol

- **Tampon d'électrophorèse (tampon de migration)**

Tris 0,025 M
Glycine 0,129 M
SDS 0,1%
Préparer 1 litre

- **Colorant bleu de Coomassie Serva R 250**

Solution de coloration 0,025 de colorant dissout dans 50 % méthanol
Préparer 100 ml

- **Solution de décoloration**

50 % éthanol & 7% acide acétique
Préparer 50 ml

- **Echantillons de protéines**

Les échantillons de protéines à analyser sont traités avec le tampon de solubilisation dans des tubes eppendorf, puis chauffés à 100°C pendant 5 min.

On déposera :

- 5 et 10µl de chaque échantillon dans 2 puits voisins
- 5µl du kit dilué dans un puits à l'extrémité du gel.

- **Kit pharmacia**

Le Kit de protéines de masses moléculaires apparentes (MMA) connues (14 kDa à 97 kDa) vous est donné dilué 16 fois dans le tampon Laemmli.

MM Tris = 121,1 g

MM Glycine = 75 g

- ❖ **Composition des gels**

- **Gel de séparation 12,5 % (15 ml)**

Acrylamide-Bis	6,25 ml
Tampon gel séparation	1,9 ml
H ₂ O	6,8 ml
TEMED	10 µl
Persulfate	150 µl

• **Gel de concentration 7,5 % (10 ml)**

Acrylamide-Bis	2 ml
Tampon gel séparation	2,5 ml
H ₂ O	5,4 ml
TEMED	10 µl
Persulfate	150 µl

❖ **Procédure**

En démonstration effectuée par l'enseignant :

- On montera les 2 plaques de verre espacées par les espaceurs offerts avec chacun des 2 systèmes d'électrophorèse (Bio Rad ou Hoeffer).
- On coulera ensuite le gel de séparation.
- Après sa polymérisation, on coulera le gel de concentration après avoir placé délicatement le peigne pour réaliser les puits de dépôt d'échantillon au sein du gel de concentration.
- Verser ensuite le tampon d'électrophorèse dans chacun des réservoirs du haut et du bas.

❖ **Conditions de migration**

100 V pendant les premiers ¼ d'heures ensuite 150V jusqu'à la fin de la migration électrophorétique (front de migration indique par le bleu de bromophénol arrivant à l'extrémité inférieure du gel de séparation).

❖ **Visualisation des protéines séparées en EGPA-SDS**

Après arrêt de l'électrophorèse, démouler le gel dans une boîte de pétri contenant 10 ml du colorant bleu de Coomassie. Laisser au moins 1h dans le colorant / fixateur, en agitant de temps en temps. Ensuite tremper le gel dans 10 ml de la solution de décoloration pendant au moins 1h. Changer le bain du décolorant 2 fois.

❖ **Interprétation des résultats**

Rédiger sur 1 à 2 pages vos résultats :

- Analyse du gel.
- Courbe étalon des MMA en fonction du rapport RF du front de migration.
- Détermination des MMA des protéines de l'échantillon.

CHROMATOGRAPHIE

I. CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

1- Généralités

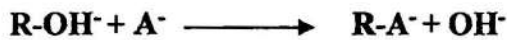
a. Définition

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles, portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger réversiblement certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution.

On nomme résines cationiques, celles qui échangent des cations :



On nomme résines anioniques, celles qui échangent des anions :

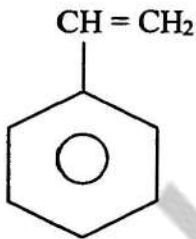


b. Propriétés des résines échangeuses d'ions

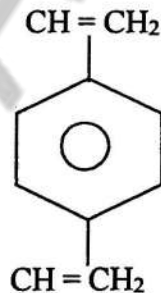
b1. Le squelette hydrocarboné de la résine

Il est formé par copolymérisation de carbones insaturés.

Exemple : résine formée par la copolymérisation de styrène et divinylbenzène.



Styrène



Divinylbenzène (DVB)

C'est le divinylbenzène qui crée la « réticulation » du polymère.

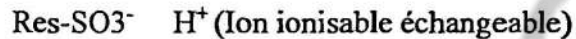
- **Pontage** : le nombre de ponts varie en changeant le rapport DVB/styrène. Le réseau est d'autant plus dense que le pourcentage de DVB est important (ce pourcentage varie de 1 à 30%).
- **Dimension des pores** : le diamètre des pores de 5 à 35 Å ; il est d'autant plus petit que le pourcentage de DVNB est grand. Pratiquement, le choix de pontage dépend du diamètre des ions à séparer. Plus les pores sont fins, plus le passage des ions de la

solution est lent ; pour les petits ions, on choisit les pourcentages de DVB de 0 à 10% ; pour les ions plus gros (peptides) on choisit des pourcentages de DVB de 1 à 4%. Les groupements fonctionnels ionisables sont fixés sur cette résine.

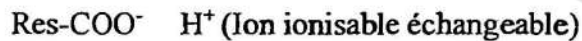
b2. Les groupements fonctionnels

α. Les groupements fonctionnels des résines cationiques

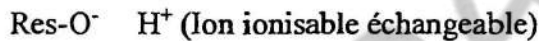
- Résines cationiques fortes : résines sulfoniques



- Résines cationiques faibles : résines carboxyliques



- Résines cationiques très faibles : résines phénoliques

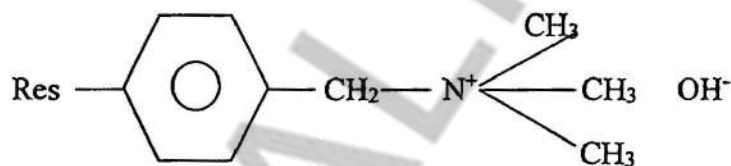


β. Les groupements fonctionnels des résines anioniques

- Résines anioniques fortes :

- Résines à groupements aminés quaternaires :

Exemple :



- Résines à groupements aminés tertiaires.

- Résines anioniques faibles :

- Résines à groupements secondaires et primaires.

b3. Granulométrie

C'est une grandeur qui caractérise la taille des particules de résine. Les particules ont un diamètre de 30 à 800 μm et elles sont calibrées par tamissage. La granulométrie est exprimée en mesh.

Granulométrie :

- inférieure à 20 mesh
- de 20 à 50 mesh

Diamètre :

- supérieur à 850 μm
- compris entre 850 et 300 μm

- | | |
|------------------------|--|
| - de 50 à 100 mesh | compris entre 300 et 150 μm |
| - de 100 à 200 mesh | compris entre 150 et 75 μm |
| - de 200 à 400 mesh | compris entre 75 et 38 μm |
| - supérieur à 400 mesh | inférieur à 38 μm |

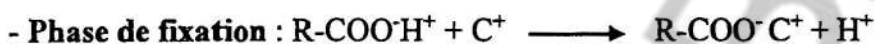
Les échanges sont d'autant plus actifs que la résine est divisée.

b4. Capacité de rétention d'une résine

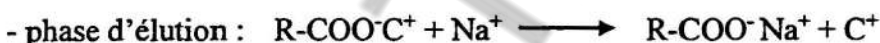
C'est le nombre de moles d'ions que la résine peut échanger par unité de masse ou de volume.

c. Les différentes phases de la chromatographie échangeuse d'ions

Envisageons à titre d'exemple le cas d'un cation retenu par une résine cationique faible, la résine étant initialement à l'état régénéré :



Dans certains cas, le cation fixé est déplacé par un autre cation plus fortement fixé, les différentes phases sont alors :



d. Facteurs influant sur la séparation

La séparation des différents composés ionisés d'un mélange n'est possible que si l'affinité réciproque résine-ions du mélange est différente pour chacun des ions.

La force d'attraction entre la résine et l'ion dépend de la charge et de la taille de ce dernier : un ion est d'autant plus fixé qu'il est chargé et à charge égale, il est d'autant plus fixé qu'il est petit. Par ailleurs, le degré d'ionisation des groupements ionisables de la résine et des ions du mélange dépend des propriétés physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, température, nature du solvant, etc.).

2- Application à la séparation d'un mélange de glutamate-arginine sur résine cationique

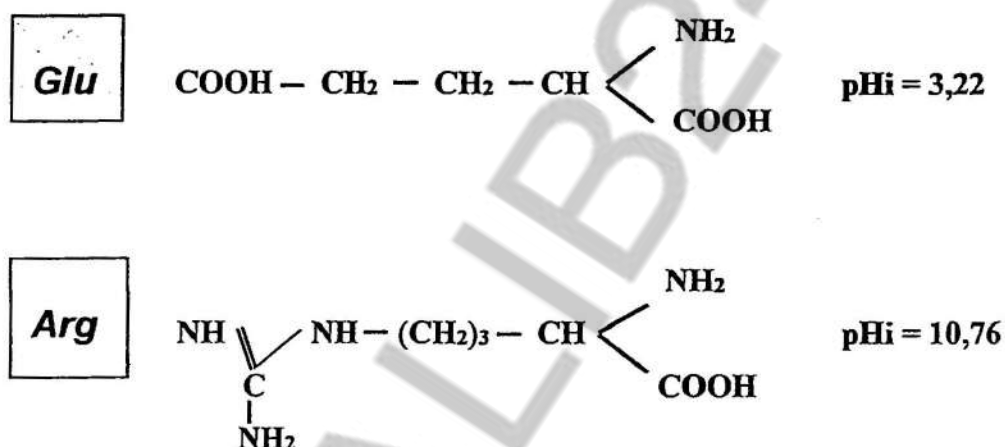
a. Caractéristiques de la résine

Le bio-Rex 70 est une résine faiblement acide, dont le groupement actif est carboxylique (-COOH) (Granulation : 1000 à 200 mesh).

Cette résine est utilisée, équilibrée à pH 4,2, par mise en suspension dans un tampon acétate.

b. Principe de séparation

Le mélange contient de l'acide glutamique, acide aminé acide, et de l'arginine, acide aminé basique.



Les acides aminés sont des ampholytes, leur état ionique dépend du pH du milieu. A pH 4,2, l'acide glutamique est très faiblement ionisé (charge nette négative) par contre, l'arginine est sous forme d'acide aminé cationique (charge nette positive).

Dans ces conditions, Bio-Rex 70 retiendra sélectivement l'arginine du mélange. Le glutamate passera dans l'éluat.

Dans un deuxième temps, l'arginine fixée sur la résine est éluée par l'hydroxyde de sodium (Na⁺OH⁻).

En milieu alcalin, l'arginine perd son ionisation positive, et l'ion Na⁺, ayant une densité de charge supérieure, déplace l'arginine, qui libérée, passe dans l'éluat.

c. Réactifs

- Mélange à analyser :

- | | |
|--------------------|--------|
| - Acide glutamique | 1 g |
| - Arginine | 2 g |
| - Eau distillée | 500 ml |

- Tampon acétate de sodium 0,1 M, pH = 4,2 :

- Acide acétique pur cristallisable	4,3 ml
- Acétate de sodium (CH ₃ COONa, 3H ₂ O)	3,59 g
- Eau distillée q.s.p.	1000 ml
- Bio-Rex 70, régénérée en suspension dans du tampon acétate de Na⁺, pH = 4,2 ; 0,1M.
- Solution de soude 1N.
- Tampon acétate de sodium 1M, pH = 5,5 :

- Acide acétique pur cristallisable	7,9 ml
- Acétate de sodium (CH ₃ COONa, 3H ₂ O)	117,5 g
- Eau distillée q.s.p.	1000 ml
- Réactif à la ninhydrine :
 - Dissoudre 1 g de ninhydrine dans 100ml d'éthanol pur.

d. Technique de régénération du Bio-Rex 70 :

La résine Bio-Rex 70 est traitée par la soude 2N (à l'aide d'un agitateur magnétique), puis lavé à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH = 7. Après cette opération, la résine est traitée par HCl 2N et lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Ce cycle de régénération réalisé, le Bio-Rex 70 est mis en suspension dans une solution de tampon acétate de sodium pH = 4,2 ; 0,1 M.

e. Mode opératoire

e1. Préparation de la colonne

Placer au fond d'une colonne (diamètre 1,5 cm, hauteur 40 cm), un tampon de laine de verre, puis verser lentement la résine en suspension dans du tampon de sodium pH = 4,2 ; 0,1 M, de manière à obtenir une colonne de résine de 6 cm de hauteur. Eviter les bulles d'air. Tapoter légèrement la colonne avec un agitateur muni d'un embout de caoutchouc.

Abaisser le niveau du liquide surnageant de manière à amener le ménisque tangent à la surface de la résine.

Ne jamais laisser la colonne à sec.

e2. Chromatographie

- Préparer une série de 15 tubes jaugés à 5 ml, numérotés de 1 à 15.
- Déposer 1 ml de la solution d'acides aminés à la surface de la résine ; faire pénétrer en réglant la vitesse d'écoulement une goutte toutes les 5 secondes (vitesse que l'on gardera pendant toute la manipulation). Recueillir le filtrat dans les tubes jaugés, par fractions de

5 ml. - Lorsque la solution d'acides aminés a pénétré dans la résine, opérer de même avec 1 ml de tampon de sodium 0,1 M pH = 4,2.

- Faire passer 35 ml de ce même tampon tout en recueillant le filtrat dans les tubes jaugés, par fractions de 5 ml en respectant l'ordre de numérotation.
- Lorsque le tampon est passé, verser 5 ml de soude 1N à la surface de la résine, recommencer l'écoulement. Opérer de la même manière avec encore 35 ml de soude 1N.
- Recueillir toujours l'éluat dans les tubes jaugés, à la suite du filtrat et dans les mêmes conditions d'écoulement.

e3. Analyse colorimétrique des fractions

- Ajouter à chaque tube 1 ml de tampon acétate de sodium 1 M. pH = 5,5 ;
- Puis 1 ml de réactif à la ninhydrine.
- Mélanger le contenu de chaque tube à l'aide du vortex.
- Boucher les tubes avec du papier d'aluminium.
- Porter au bain-marie bouillant pendant 15 min.
- Refroidir les tubes dans un bain d'eau froide.
- Placer 30 min à l'obscurité.
- Lire la densité optique à 570 nm contre un blanc réactif constitué comme chacune des fractions, mais en remplaçant 5 ml de filtrat ou d'éluat par l'eau distillée.

Remarque : Dans certains tubes, la concentration en acides aminés est très élevée et la réaction à la ninhydrine engendre un précipité. Avant d'effectuer la lecture, diluer quantitativement à l'éthanol pur jusqu'à dissolution du précipité.

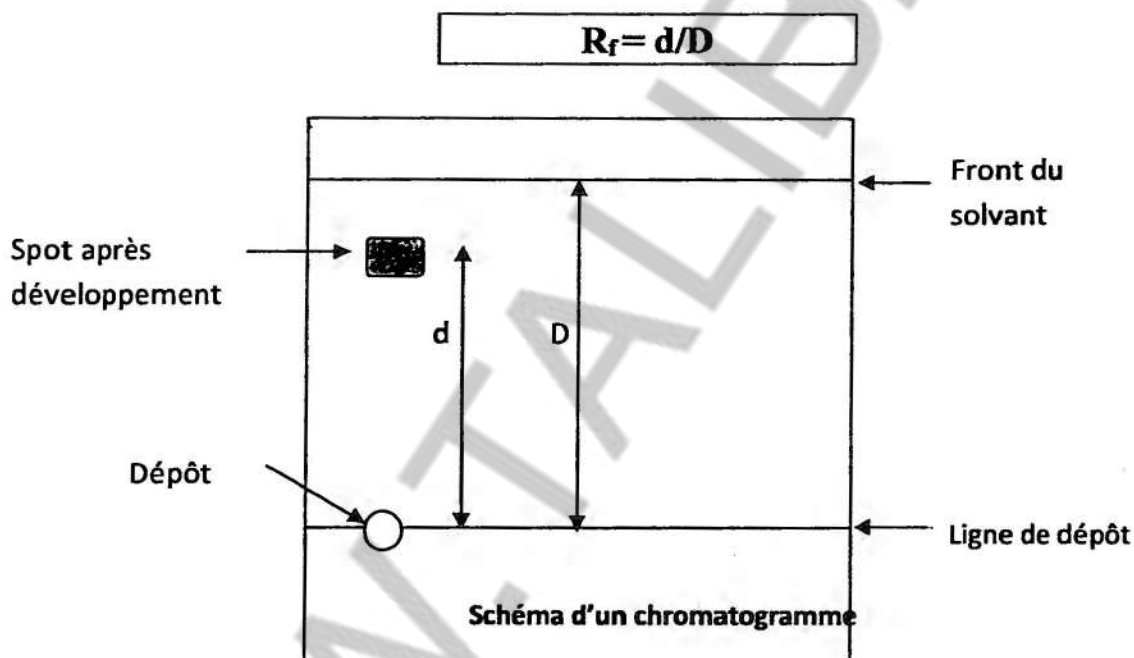
- Tracer la courbe D.O. = f (volume de l'effluent).
- Interpréter cette courbe.

II. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES ACIDES AMINES

1. Principe

Cette manipulation consiste à identifier les acides aminés d'un mélange à l'aide d'acides aminés témoins. La séparation des acides aminés se fait par migration différentielle dans un milieu poreux ; chacun d'eux est soumis à une force de fixation due à l'affinité pour la phase stationnaire, et une force d'entraînement par la phase mobile. La phase stationnaire est constituée de solvant retenu par le papier, la phase mobile est constituée de solvant qui parcourt le papier ; le papier n'étant qu'un support.

Après migration, les spots sont révélés par une réaction colorée à la ninhydrine couramment utilisée pour caractériser et doser les acides aminés. L'identification est rendue possible grâce à des témoins, acides aminés connus déposés dans les mêmes conditions que le mélange à analyser. Chaque acide aminé est caractérisé par son R_f , rapport de la distance d de migration du spot sur la distance de migration D du front de solvant :



2. Matériel et réactifs

- Mélange d'acides aminés inconnus
- Solution alcoolique de ninhydrine
- Butanol normal
- Acide acétique pour analyse

- Cuve chromatographique
- Papier chromatographique Whatman N° 3
- Pipette Pasteur
- Acides aminés témoins

3. Manipulation

La chromatographie est réalisée sur papier Whatman. La phase mobile est constituée d'un mélange butanol/acide acétique/eau.

a. Préparation du solvant d'élution

- Le mélange est préparé directement dans la cuve chromatographique :
 - 25 ml n-butanol
 - 5,5 ml acide acétique glacial
 - 12,5 ml eau distillée
- Fermer la cuve et laisser 15 min pour saturation.

b. Préparation du papier Whatman chromatographique

(Papier Whatman 20 cm/18 cm)

Tracer au crayon, très légèrement à 2 cm du bord du papier chromatographique un trait horizontal. Marquer sur ce trait les emplacements des dépôts par des petits cercles, régulièrement espacés de 2 cm en laissant 2 cm de chaque côté. Tracer un trait à 2 cm du bord supérieur.

c. Dépôt

Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur un aliquote de chaque échantillon et le déposer au centre de chaque cercle en notant le contenu du dépôt (utiliser des pipettes Pasteur différentes et éviter de les mélanger). Laisser sécher et répéter cette opération 2 fois.

d. Développement

- Mettre le papier dans la cuve en prenant soin de bien la fermer.
- Laisser le développement se poursuivre jusqu'au moment où le front du solvant atteint le trait effectué à 2 cm du bord supérieur.
- Sortir le papier de la cuve, le sécher sous la hotte en le maintenant verticalement.

e. Révélation

Pulvériser la ninhydrine sur tout le papier chromatographique sans gaspillage (utiliser un pulvérisateur contenant la solution de ninhydrine à 0,25% dans l'éthanol 95 %).

Le mettre ensuite pendant 5 minutes à l'étuve à 100 °C.

Des spots bleus violets apparaissent dans divers endroits correspondants aux différents acides aminés révélés par la ninhydrine.

f. Résultats

- Entourer les divers spots, mesurer leurs distances par rapport à leurs dépôts de départ. Calculer les Rf.

$$Rf = \frac{\text{distance de la tâche}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

- Déterminer les acides aminés du mélange (le papier chromatographique doit accompagner le compte-rendu).