

Chapitre IV : Méthodes de Fractionnement

IV. méthode de fractionnement

CHROMATOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le nom de chromatographie dérive du mot grec khrôma qui signifie couleur, parce que le premier scientifique à utiliser cette technique, le botaniste russe Tswett, sépara en 1903 les pigments colorés d'une plante verte en filtrant un extrait de celle-ci sur une colonne de verre remplie de craie (CaCO₃) finement pulvérisée. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne.

- ✓ La chromatographie sur couche mince (CCM) (1938). (TLC : Thin Layer Chromatography).
- ✓ La chromatographie sur papier (1944).
- ✓ La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (1952). (GC : Gas Chromatography)
- ✓ La chromatographie sur gel (1959).
- ✓ La chromatographie liquide à haute pression (CLHP) (1967). (HPLC : High Pressure Liquid Chromatography).

DÉFINITION

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange, dans le but d'identifier ou de doser certains constituants du mélange.

PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA CHROMATOGRAPHIE

Quel que soit le genre de chromatographie effectué, la séparation des composés d'un mélange est basée sur la distribution différente de ces composés entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les composés seront séparés uniquement si certains d'entre eux sont plus fortement retenus par la phase stationnaire, pendant que les autres se déplacent plus rapidement au sein de la phase mobile.

PHÉNOMÈNES PHYSIQUES EXPLOITÉS EN CHROMATOGRAPHIE

Il existe en chromatographie plusieurs phénomènes physiques responsables de la rétention plus ou moins forte des composés sur la phase stationnaire. Les deux plus exploités sont les phénomènes d'adsorption et de partition.

Phénomène d'adsorption

Le phénomène d'adsorption est essentiellement un phénomène de surface par lequel les composés sont attirés sur les sites actifs de la phase stationnaire par des liaisons hydrogènes et électrostatiques. La phase stationnaire est un matériau solide en forme de petits granules de différentes grosseurs; les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre.

Influence de la polarité des composés

En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. Plus un composé est polaire, plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera.

Influence de la polarité de la phase mobile

À l'exception de la chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile, appelée également éluant, est un solvant ou un mélange de plusieurs solvants miscibles, dont le rôle est de déplacer les composés du mélange vers le haut de la plaque en chromatographie sur couche mince ou vers la sortie de la colonne en chromatographie sur colonne.

Lorsqu'on exploite le phénomène d'adsorption en chromatographie, la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. Plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement. En effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et entre en compétition avec les composés du mélange.

Phénomène de partition

Dans une chromatographie de partition, la phase stationnaire est non pas un solide, mais un liquide fixé physiquement ou greffé chimiquement sur un support solide. Les composés d'un mélange vont donc se solubiliser dans la phase liquide stationnaire, au lieu de s'y adsorber. C'est la solubilité différente des composés dans la phase stationnaire et dans la phase mobile qui rend la séparation chromatographique possible.

Influence de la solubilité des composés

- Dans la phase stationnaire :

Plus un composé est soluble dans la phase liquide stationnaire, moins vite il se déplacera.

- Dans la phase mobile :

Plus un composé est soluble dans la phase mobile, plus vite il se déplacera.

MODES DE CHROMATOGRAPHIE

Dépendant du système chromatographique utilisé, on distingue trois modes de chromatographie : la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne. À cause de l'appareillage spécialisé, la chromatographie sur colonne se subdivise également en quatre catégories, soit la chromatographie dite traditionnelle sur colonne, la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et la chromatographie sur gel.

Chromatographie sur couche mince

Bien que découverte en 1938, ce n'est qu'en 1958 que fut popularisée la chromatographie sur couche mince, telle que nous la connaissons actuellement.

Cette technique a rapidement supplanté la chromatographie sur papier, car elle est plus rapide et est utilisée autant pour les composés polaires que non polaires.

Principe de la chromatographie sur couche mince

Dépendant du choix des phases stationnaire et mobile, il est possible de réaliser sur couche mince des chromatographies en exploitant les phénomènes d'adsorption, de partition ou d'échange d'ions.

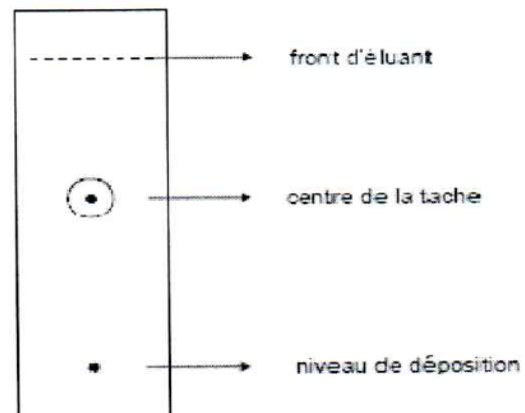
Appareillage

L'appareillage utilisé pour la chromatographie sur couche mince est relativement simple, étant composé d'une plaque et d'une cuve rectangulaire pour l'élution. On peut également utiliser un simple bocal de verre pour les couches minces plus petites.

Les plaques peuvent être préparées en répandant à l'aide d'un étaleur une mince couche uniforme de la phase stationnaire sur une plaque de verre, dont les dimensions varient de 2,5 x 7 cm à 20 x 20 cm.

On retrouve cependant dans le commerce des plaques prêtes à l'usage avec la phase stationnaire fixée sur une feuille en plastique ou en aluminium. Ces dernières

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$



ont l'avantage d'être faciles à entreposer et découpables en bandes selon les besoins de l'expérimentateur. Les phases stationnaires les plus utilisées en chromatographie sur couche mince sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre. La plupart des plaques commerciales contiennent un indicateur de fluorescence qui permet la visualisation des taches à la lumière ultraviolette.

Technique expérimentale

Les principales étapes d'une chromatographie sur couche mince sont :

- a) Préparation de la plaque (activation par chauffage à l'étuve)
- b) Déposition des échantillons inconnus et des standards
- c) Préparation de l'éluant et de la cuve
- d) Élution de la plaque
- e) Séchage de la plaque
- f) Révélation des taches (lampe U.V., iode ou réactifs chimiques spécifiques)
- g) Calcul des R_f et interprétation des résultats.

Résultats et interprétation

Dans une chromatographie sur couche mince, les composés apparaissent sous forme de taches rondes ou ovales. On peut obtenir parfois des traînées si l'échantillon déposé était trop concentré. Pour une phase stationnaire et une phase mobile données, chaque composé est caractérisé par son R_f :

La distance parcourue par le composé est calculée à partir du niveau de déposition jusqu'au centre de la tache, tandis que la distance parcourue par l'éluant est calculée à partir du niveau de déposition de l'échantillon jusqu'au front de l'éluant, marqué à la fin de l'éluant. Le R_f est un nombre sans unités qui varie entre 0 et 1; il est rapporté à deux décimales près (Ex. : $R_f = 0,62$).

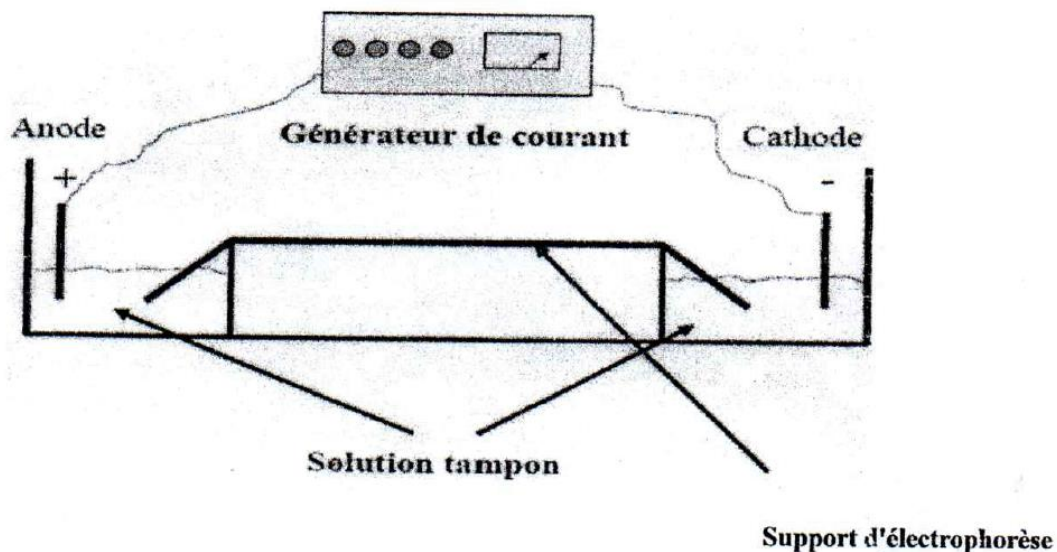
III L'ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse permet la séparation de particules sous l'action d'un champ électrique. Cette technique est principalement analytique mais peut être également utilisée comme technique préparative.

PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ÉLECTROPHORÈSE

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon. Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant. Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

SCHÉMA D'UN MONTAGE D'ÉLECTROPHORÈSE



LES DIFFÉRENTS SUPPORTS D'ÉLECTROPHORÈSE

Différents supports peuvent être utilisés en électrophorèse. Ces supports sont soit des supports solides, soit des gels.

Les supports solides peuvent être :

- une feuille de papier
- une feuille d'acétate de cellulose

Les supports sous forme de gels sont constitués :

- de Polyacrylamide
- d'agarose

ELECTROPHORESES SUR SUPPORTS SOLIDES

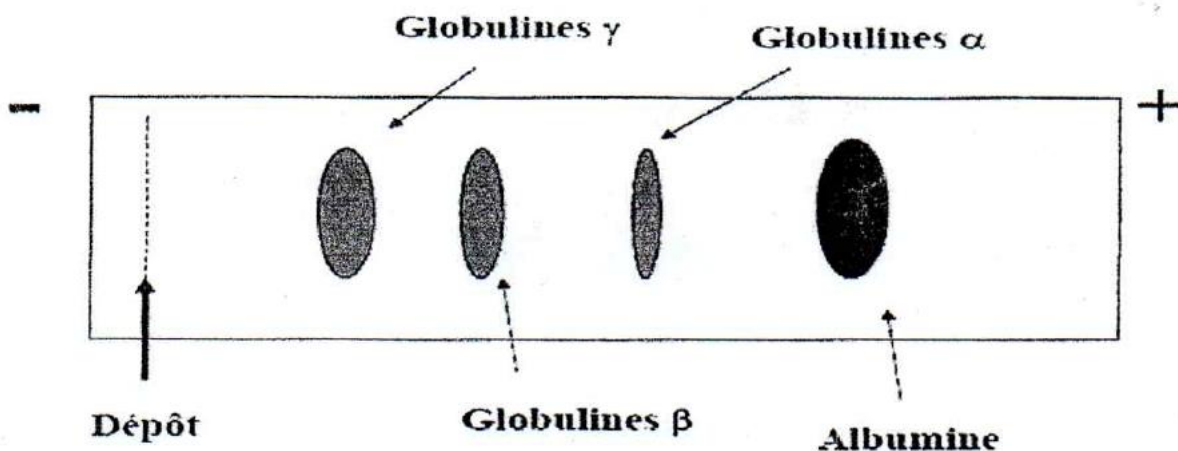
Cette catégorie d'électrophorèse concerne essentiellement la séparation des protéines. Il s'agit d'électrophoreses en conditions non dénaturantes.

La migration des molécules se fait principalement en fonction de leur charge globale. Exemple : séparation des protéines du sérum sur acétate de cellulose.

SÉPARATION DES PROTÉINES DU SÉRUM SUR ACÉTATE DE CELLULOSE

Tampon pH 9,2 ; migration 40 minutes sous 180 V

Révélation par coloration des protéines au noir amido.



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Cette catégorie d'électrophorèse concerne exclusivement la séparation des protéines. La migration des molécules se fait en fonction de leur charge globale, de

leur taille et de leur forme. Ces électrophorèses sont possibles en conditions dénaturantes ou non dénaturantes. Elles sont essentiellement utilisées en conditions dénaturantes.

On parle alors d'électrophorèses SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

L'ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE

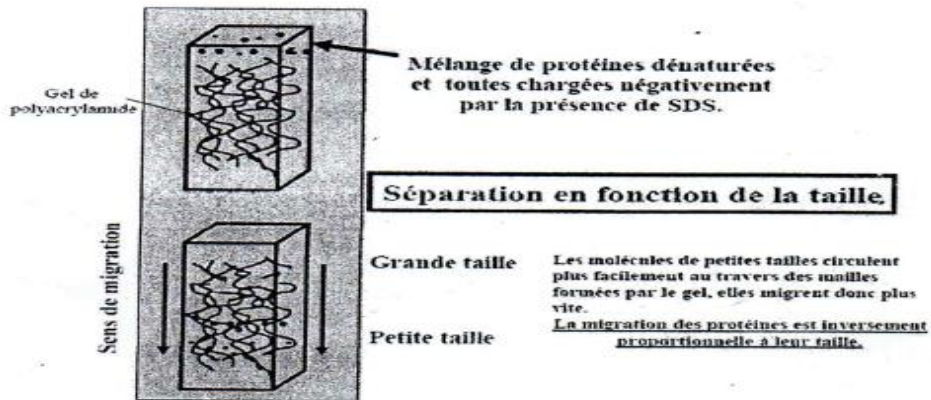
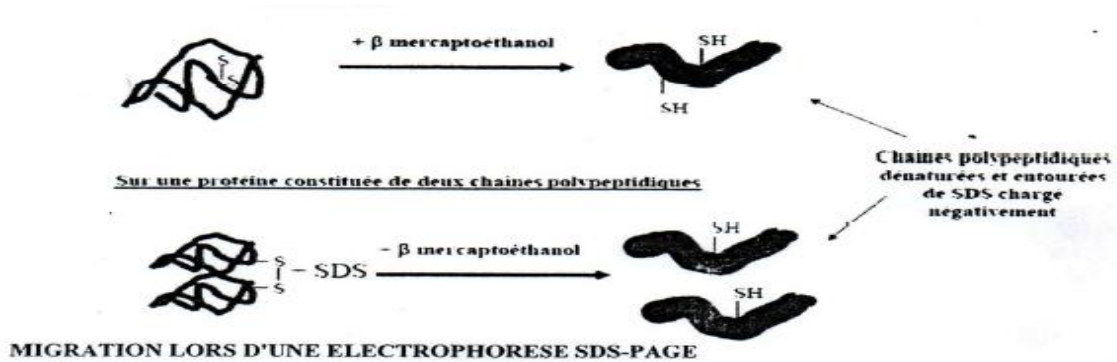
Les conditions utilisées permettent de supprimer les facteurs forme et charge lors de la migration. La séparation des protéines s'effectue donc uniquement en fonction de leur taille. Pour ce faire, les échantillons sont traités par :

du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) qui est un détergent anionique. Ce composé dénature les protéines et les enrobe de charges négatives.

- du β mercaptoéthanol qui est un agent réducteur. Ce composé entraîne la rupture des ponts disulfures.

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes : les molécules sont soumise à un traitement dénaturant détruisant la nature tridimensionnelle native : traitement thermique (Hante Tc°) + Agent dénaturant urée + SDS.

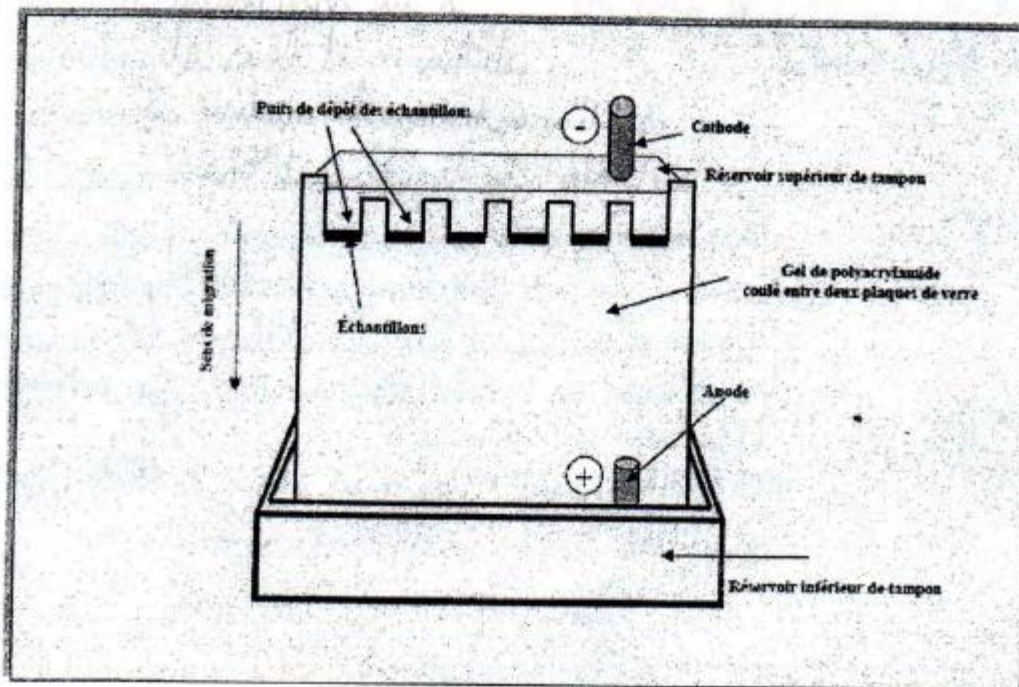
ACTIONS DU SDS SUR LES PROTEINES EN PRESENCE DE β MERCAPTOETHANOL



- du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) qui est un détergent anionique. Ce composé dénature les protéines et les enrobe de charges négatives.

- du β mercaptoéthanol qui est un agent réducteur. Ce composé entraîne la rupture des ponts disulfures.

MATERIEL POUR UNE ELECTROPHORESE SDS-PAGE



REVELATION DES PROTEINES PRESENTES SUR LE GEL

La visualisation de l'ensemble des protéines présentes dans le gel se fait par coloration.

La coloration est effectuée dans [a majorité des cas avec du bleu de Coomassie. Il est également possible de colorer les protéines présentes avec de l'argent.

Afin de visualiser uniquement la présence de certaines protéines, il est possible d'utiliser des anticorps marqués qui reconnaissent de manière spécifique ces protéines. Pour ce faire il est nécessaire de transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose (Western blot). Ce support, plus solide que les gels, permet une manipulation plus aisée. -

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Ce type d'électrophorèse concerne la séparation de fragments d'acides nucléiques.

La migration des molécules se fait sur le même principe que ce qui a été décrit pour les protéines dans un gel de polyacrylamide.

Les facteurs formes et charges n'interviennent plus car les fragments d'acides nucléiques sont naturellement tous sous forme linéaire et chargés négativement. La séparation s'effectue donc directement en fonction de la taille.

Une solution tampon : est une solution qui maintient ????? approximativement le même pH malgré l'addition de petites quantités d'un acide ou une base ou malgré une dilution.

L'électrophorèse en conditions

1- Non dénaturantes :

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif.

2- Dénaturantes

les molécules sont soumises à un traitement dénaturant détruisant leur structure tridimensionnelle native. Il existe différentes hauteurs de force ionique qui vont perturber les liaisons faibles (Hydrogènes-Electrostatiques).

Utilisation d'agents dénaturants comme :

- L'urée ou le SDS (Sodium dodécyle sulfate) (chargée négativement)
- Le ????: qui entraîne la rupture des ponts disulfures.

LA CENTRIFUGATION

PRINCIPE DE LA CENTRIFUGATION

La centrifugation permet la séparation de particules sous l'action d'un champ de gravitation.

Cette technique est principalement préparative. Après centrifugation, la partie située dans le fond du tube est appelée culot de centrifugation et la partie supérieure est appelée surnageant.

LE MATÉRIEL DE CENTRIFUGATION

Un moteur capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers de tours par minute,
o Un rotor capable de supporter de telles vitesses, o Une enceinte réfrigérée, sous vide et blindée.

- Jusqu'à 20 000 x g, on parle de centrifugeuse.
- Au-delà de 20 000 x g on parle d'une ultracentrifugeuse.

LA FORCE CENTRIFUGE La force centrifuge relative (F.C.R.) est exprimée en multiple de l'accélération terrestre (g).

$$\mathbf{F.C.R. (g) = 1,12rn^2}$$

r : rayon de centrifugation

exprimé en mm n : nombre de tours par minutes /1000

On observe que la F.C.R. dépend du rayon de centrifugation donc, du matériel utilisé (centrifugeuse et type de rotor).

De ce fait, dans un protocole, la vitesse de centrifugation s'exprime obligatoirement en g,,(F.C.R.) et non en nombre de tours par minute.

Suivant le rapport de densité entre les particules à séparer et le solvant dans lequel elles se trouvent, on distinguera trois principes de centrifugation :

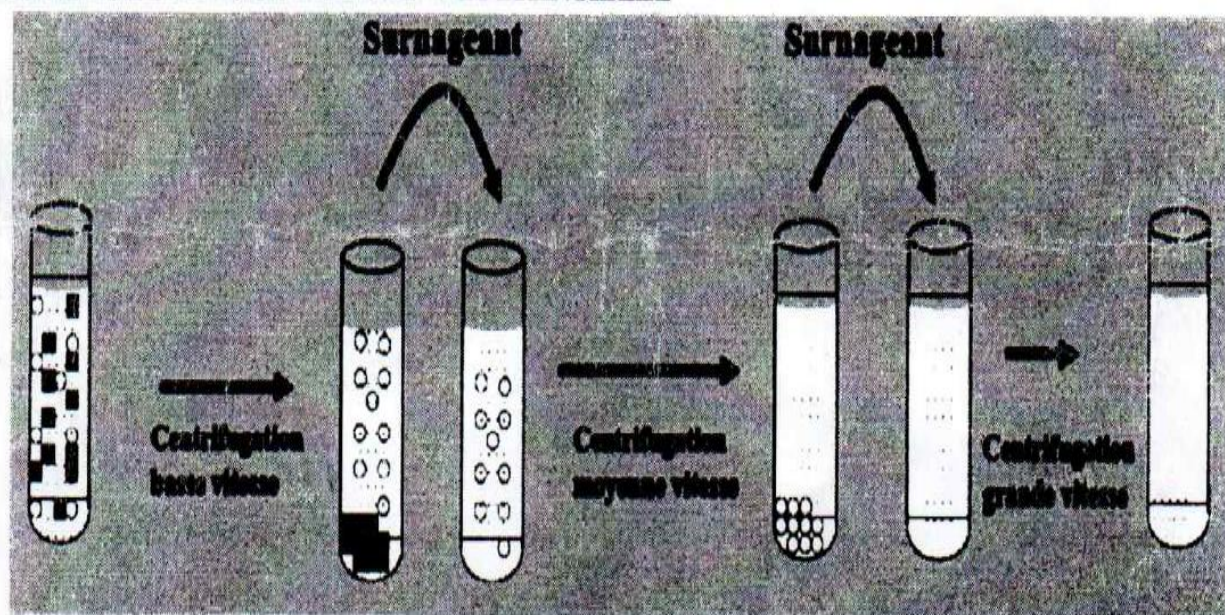
- la centrifugation différentielle ou culottage,
- la centrifugation zonale,
- la centrifugation à l'équilibre (isopycnique).

LA CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE OU CULOTTAGE

La densité du solvant est la même dans tous le tube. La densité de toutes les particules est supérieure à la densité du solvant. Les particules auront une vitesse de sédimentation proportionnelle à leur densité. Les particules de forte densité seront les premières à atteindre le fond du tube. Si le temps de centrifugation est long, toutes les particules dont la vitesse de sédimentation est non négligeable finissent par se retrouver au fond du tube.

En choisissant un temps de centrifugation approprié, il est possible d'avoir au fond du tube un ensemble de particules alors que des particules de densités plus faibles sont toujours en suspension. Il est alors simple de séparer physiquement ces catégories de particules en isolant le culot du surnageant.

SCHÉMA DE LA CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

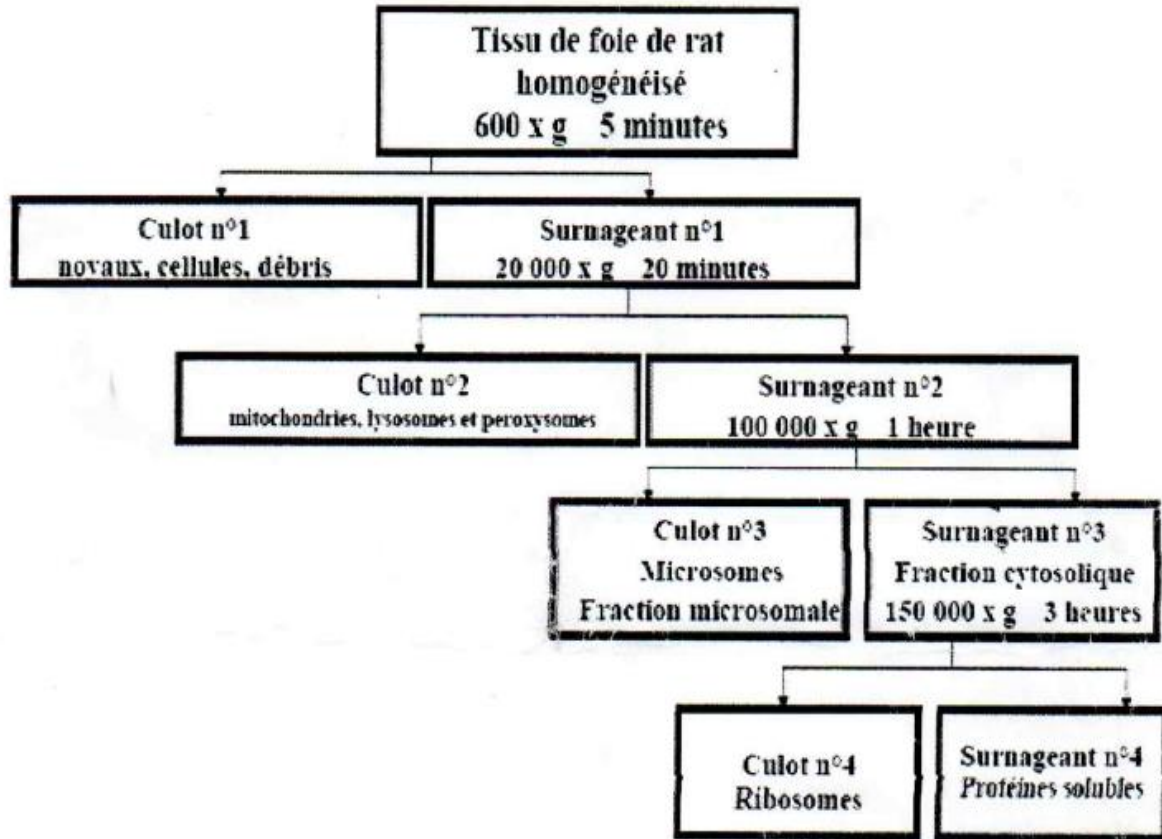


Particules de forte densité

○ Particules de moyenne densité

· Particules de faible densité

EXEMPLE DE CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

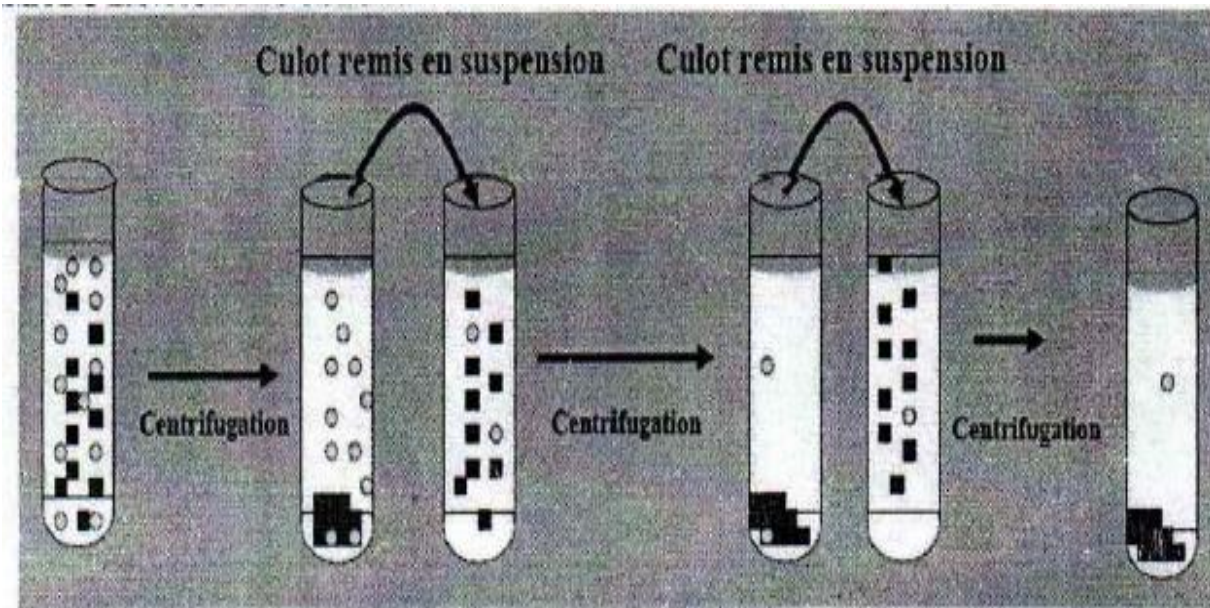


LE LAVAGE DES CULOTS

Lors de la formation du culot pendant une centrifugation différentielle, un certain nombre de particules sont entraînées vers le fond du tube par contact avec les particules de fortes densités. Le culot est donc contaminé par des particules qui devraient se trouver dans le surnageant.

Afin de débarrasser les culots de ces impuretés, on effectue des lavages. Ces lavages consistent à remettre le culot en suspension puis à recentrifuger dans les mêmes conditions. Un culot identique doit se reformer en laissant quelque impuretés dans le surnageant. Après plusieurs lavages successifs on arrive ainsi à éliminer les impuretés présentes dans le culot initial.

SCHEMA DU LAVAGE DES CULOTS



LA CENTRIFUGATION ZONALE

Le mélange de particules est déposé sur un solvant qui forme un gradient de densité à l'intérieur du tube (très souvent du sucrose (saccharose)).

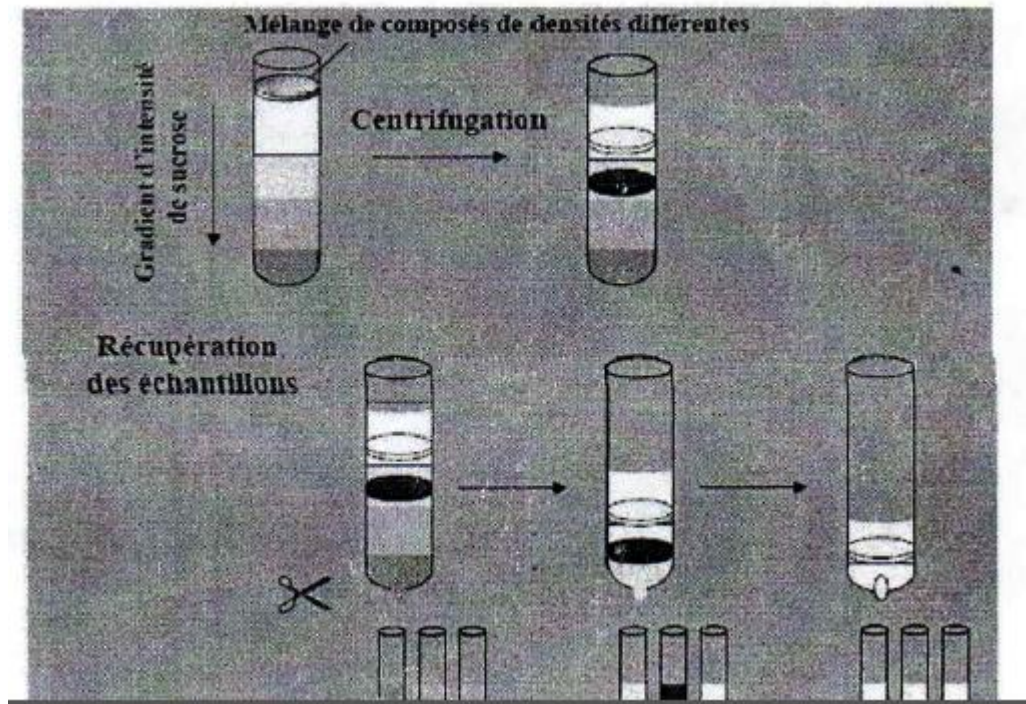
La densité de toutes les particules est supérieure à celle du solvant en tous points du tube.

La centrifugation doit être arrêtée avant que les particules n'atteignent le fond du tube.

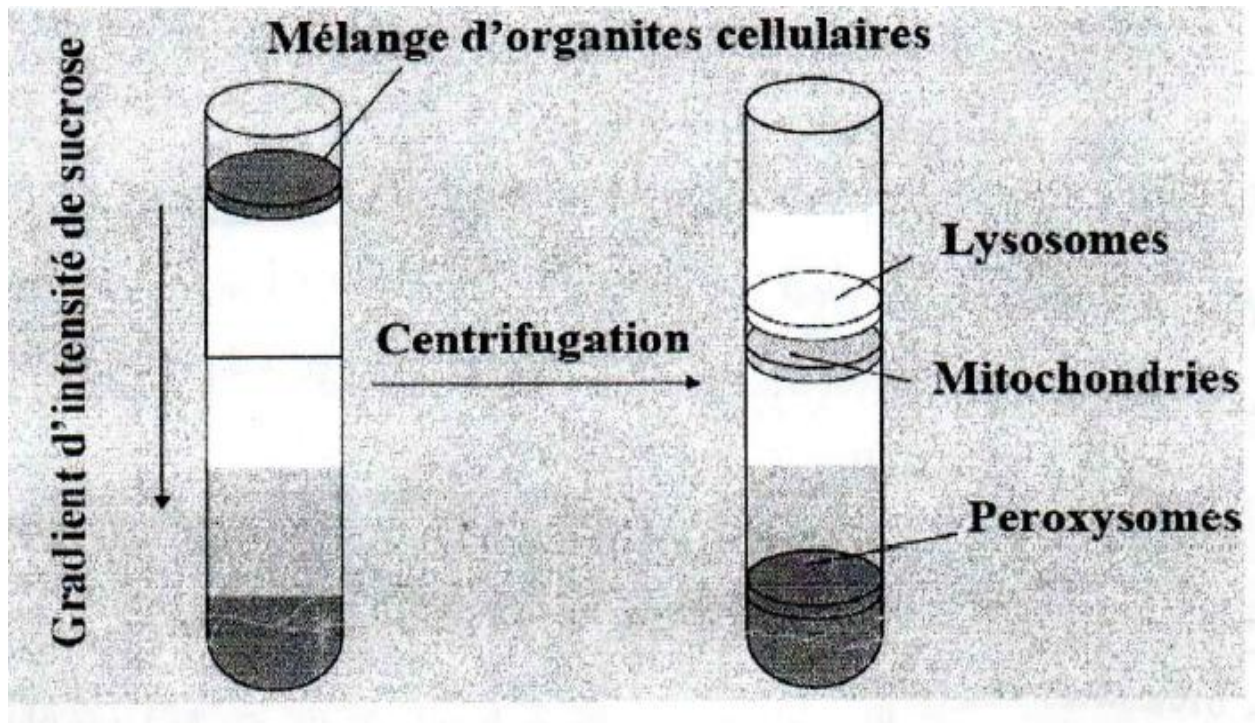
L'évolution de la différence de densité entre particules et solvant tout au long du tube fait apparaître une vitesse de sédimentation évolutive pour chaque particule au cours de sa migration. Ce principe permet la séparation de particules de densités peu différentes.

En perçant le fond du tube, il est ensuite possible de récupérer les particules séparées.

SCHÉMA DE LA CENTRIFUGATION ZONALE



EXEMPLE DE CENTRIFUGATION ZONALE

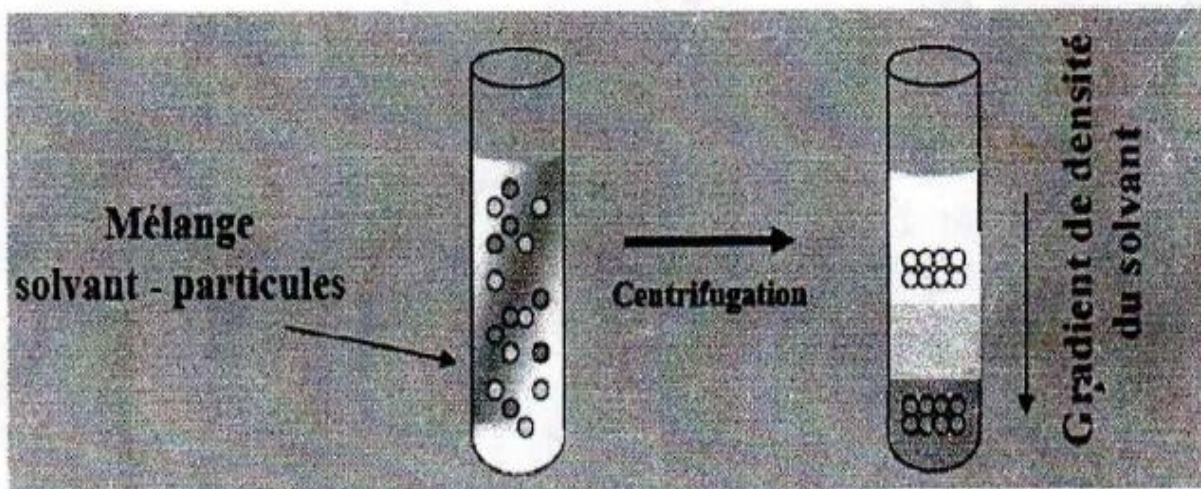


LA CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE (CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE)

Les particules sont mélangées à un solvant capable de former son propre gradient de concentration sous l'effet d'un champ de gravitation.

Pendant la centrifugation, le solvant forme un gradient de densité qui englobe les densités des différentes particules présentes à l'intérieur du tube.

Chaque particule s'arrête à l'endroit où sa densité est égale à celle du solvant. En effet la différence de densité entre une particule et le solvant est nulle, la vitesse de



sédimentation de la particule est égale à zéro.

Exemple : Séparation de fragments d'ADN en gradient de chlorure de césium.

La centrifugation zonale : séparation pour la taille et masse (en ???)

La centrifugation isopycniqque : séparation par la densité.

Acide nucléique : chlorure de césium (CSCL).

C.Z : séparer des macromolécules selon leur poids moléculaire et/ou leur forme dans une solution de centrifugation sous l'effet d'un champ gravitationnel intense. La distance de migration est fonction du PM et de la forme de la macromolécules.

La solution de centrifugation est un gradient de saccharose. Il permet de stabiliser la séparation des molécules au cours puis à la fin de l'ultracentrifugation. Ici, la mesure de la vitesse de migration d'une particule donnée permet de déterminer sa

constante de sédimentation (S) qui est lié à la forme et ou PM de la particule étudiée.

Utilisation majeurs purification des bras (court et long) des phages.

Sélection de fragment d'ADN de tailles correctes.

Isolement des polysomes.

Fractionner des ARN (Séparer des ARN28S, 18S, 5S, ARNr et ARNm).

La C en à l'équilibre : les # constituants atteignent une position dont ils ne vont plus bouger, or l'équilibre est atteint lorsque la densité d'une particule est égale à la densité du solvant.

LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985. par Karry Mullis. C'est une technique d'amplification génique. c'est-à-dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis. même présent en quantité infime dans un mélange. puis de le multiplier rapidement.

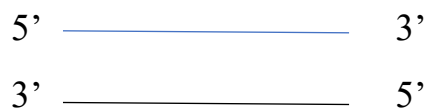
En effet. moins de 3 ans après sa mise au point. l'ensemble des laboratoires de biologie moléculaire l'utilisaient.

Le principe de la PCR

Le principe de la PCR consiste à utiliser. de manière répétitive, l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

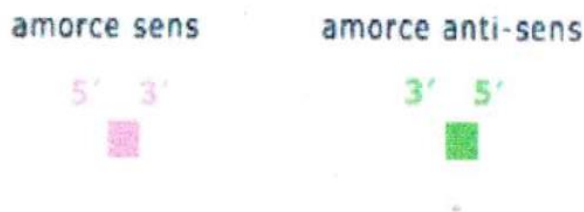
L'ADN

Généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier. Nous le représenterons comme ceci :



Deux amorces, sens et anti-sens

Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.



Une enzyme

La Taq Polymerase (Taq Pol). une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à

des passages successifs à 95°C. ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Taq

dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.



La réaction

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

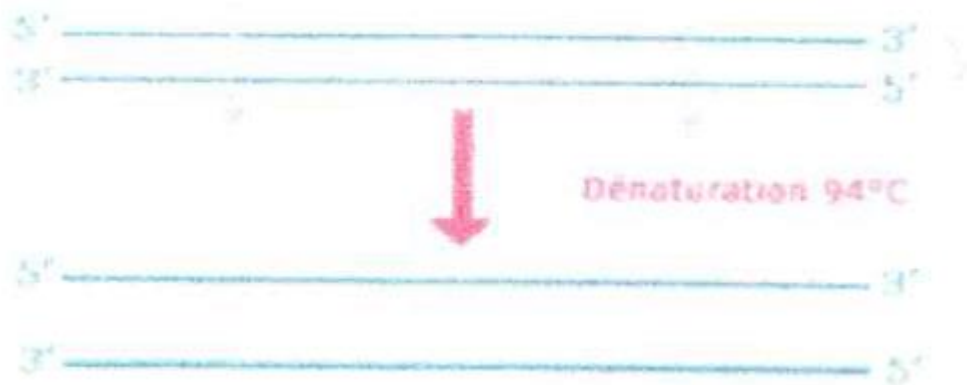
- Dénaturation
- Hybridation
- Elongation

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

Que se passe-t-il à chaque étape ?

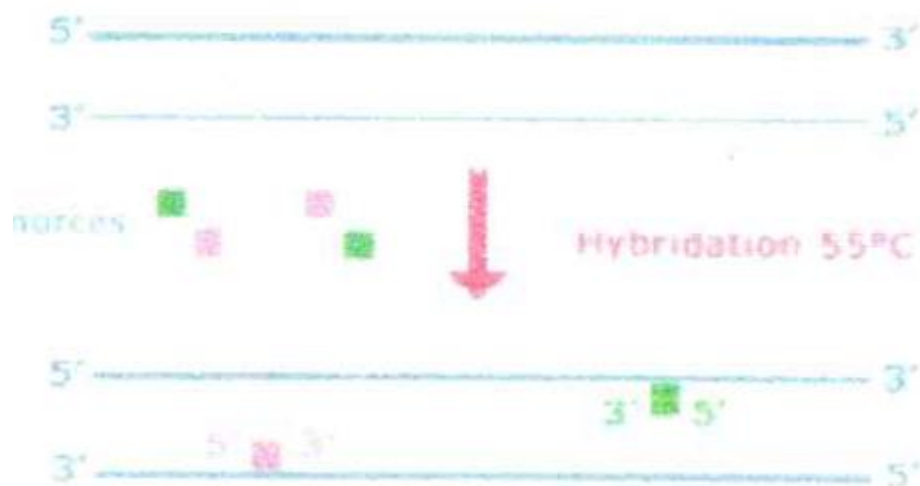
Dénaturation

Le tube est chauffé quelques secondes à 94°C. Les double-brins d'ADN se séparent. On dit alors que l'ADN est dénaturé.



Hybridation

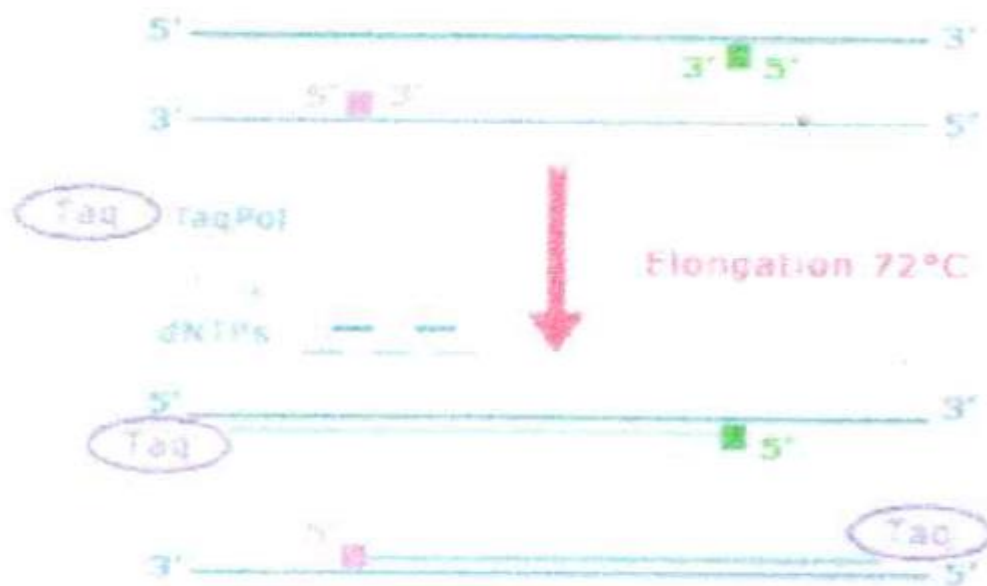
La température est rapidement abaissée à 55°C. Les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. L'ADN total plus long, n'aura pas le temps de se réhybrider.



Élongation

La température du tube est ensuite augmentée à 72°C. ce qui permet à la Taq Pol d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées. dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire). Cette étape dure | minute.

Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible. vient d'être synthétisé.



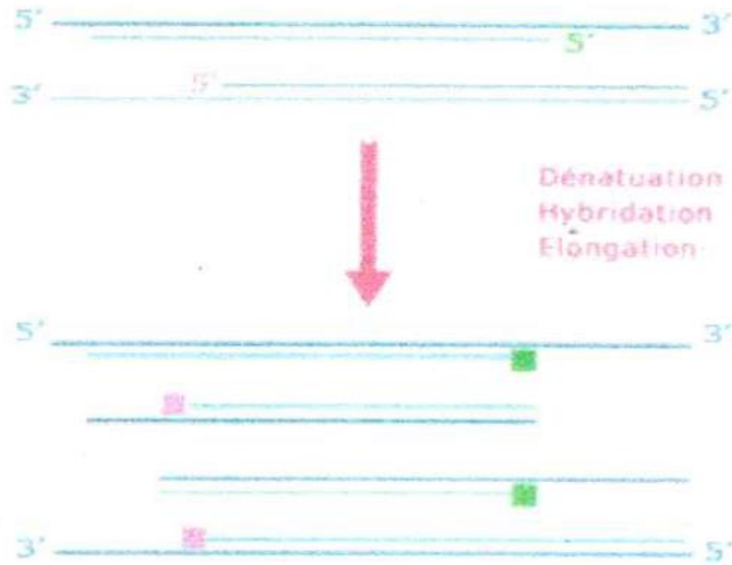
Que se passe-t-il à chaque cycle ?

Le premier cycle

Il a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

Le deuxième cycle

La quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins, dont la taille est limitée par les deux amorces font leur apparition

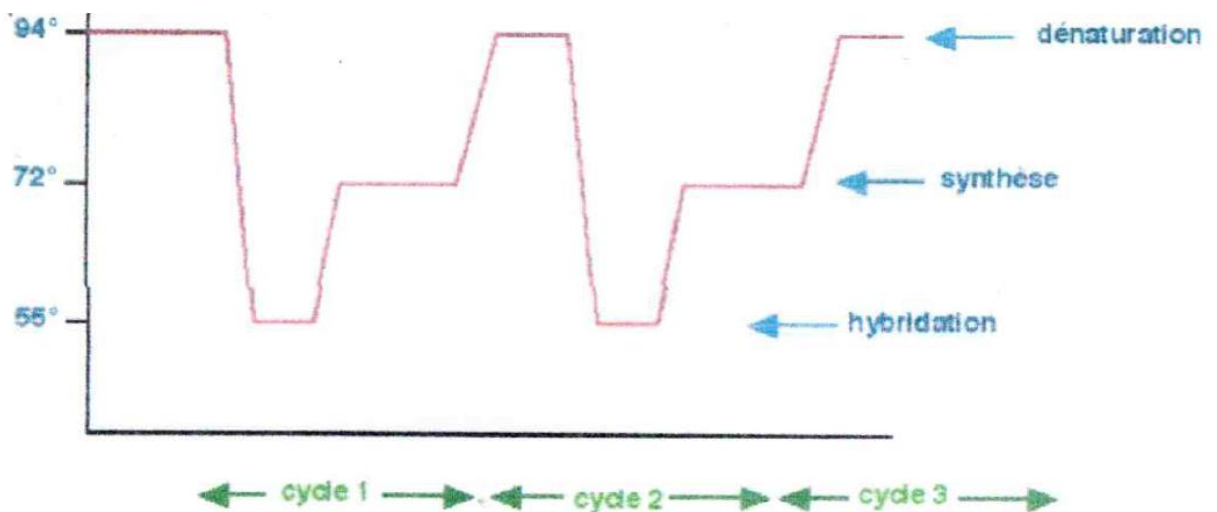
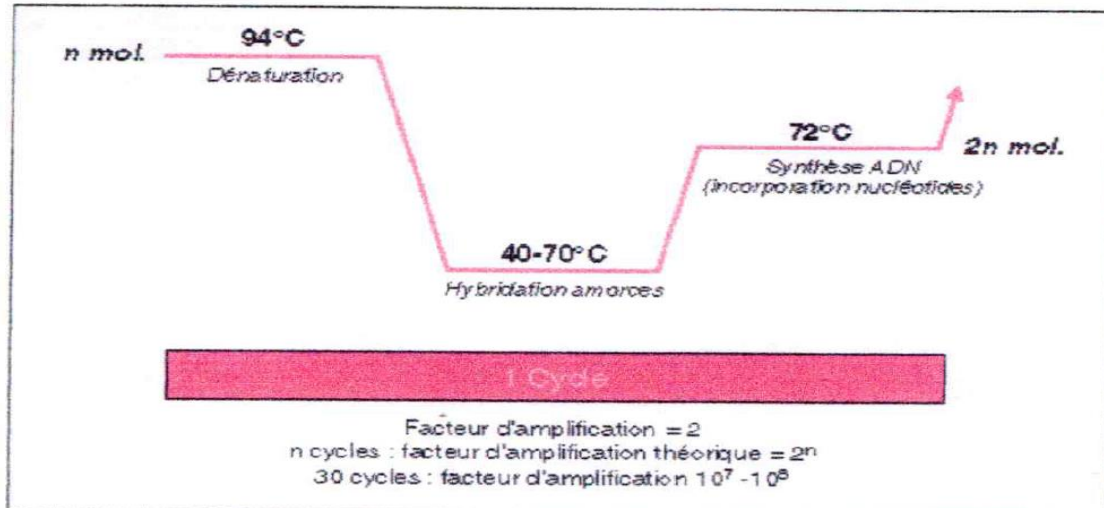


Le troisième cycle

Les premiers amplicons apparaissent. ADN double-brins bornés par les amorces, correspondants au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilobases (Kb).



Au fil des cycles la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On obtient. En théorie 2^n copies pour n cycles. Dans la pratique. pour un rendement classique de 85%. une PCR de 30 cycles produit environ 10^9 copies (amplicons de taille attendue).



Comment visualiser les produits d'amplification ?

Leur quantité est suffisante pour être visualisée avec le Bromure d'Ethidium (BE). Produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Lorsqu'elle est intercalée. Cette molécule présente une fluorescence orange sous illumination par des UV courts (environ 300 nm).

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt. La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées.