

Séparer pour mieux comprendre!

J. CHAMIEH, B. CHAUMANDE, S. SAFI, A. HAGEGE, L. SABATIER
Laboratoire de Chimie Analytique et Minérale



Et si je ne mangeais que les rouges!

Combien y en a-t-il de différents ?

Comment trouver une aiguille dans une botte de foin?



Soit en mettant la paille d'un côté et l'aiguille de l'autre :
c'est la SEPARATION

Soit en utilisant un aimant :
c'est la DETECTION

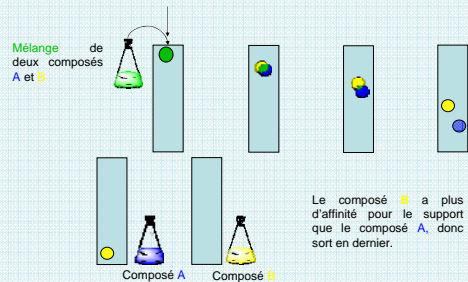


La SEPARATION

Comment arrive-t-on à séparer des molécules si on ne les voit pas à l'œil nu ?

Grâce à une technique appelée la chromatographie (du grec khroma, couleur et graphein, écrire), on arrive à séparer des molécules en se basant sur des phénomènes de rétention et de partage entre un support dit la phase stationnaire, qui tend à retarder l'échantillon et une phase dite mobile qui tend à emporter l'échantillon avec elle. Deux composés d'un même mélange seront donc séparés selon leur "amour" pour l'une ou l'autre de ces deux phases.

De ce fait, la chromatographie se prête bien à l'analyse de mélanges complexes tels que les produits pétroliers, les polymères ou les fluides biologiques. Elle sert également à l'analyse de traces dans l'environnement ou au contrôle de la pureté de molécules à visée thérapeutique.



La chromatographie se présente sous différents aspects : la chromatographie planaire sur plaque (fig1), la chromatographie liquide sur colonne (fig2 a, b, c), la chromatographie gazeuse dans un capillaire (fig3)...

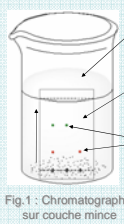


Fig.2.a : Chromatographie liquide sur colonne

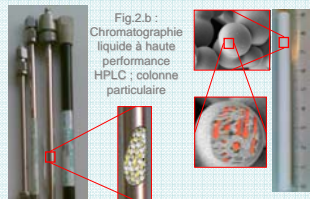
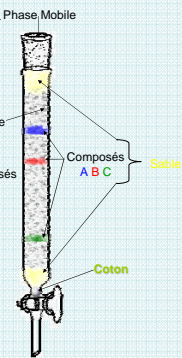


Fig.2.c : Chromatographie liquide à haute performance; colonne monolithique (développée dans notre laboratoire)



Comment séparer un très grand nombre de protéines ?

Mais tout d'abord pourquoi le faire ??

Pour la recherche en biologie, il est nécessaire de disposer d'outils permettant l'étude de ce qui se passe au niveau moléculaire dans les cellules. Cela est indispensable pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes de la vie, au niveau médical ou encore dans l'adaptation à divers changements d'environnement...

L'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode efficace pour séparer un très grand nombre de protéines et mettre en évidence des différences entre deux états d'un individu ou d'une cellule, comme par exemple entre un individu sain et malade.

... Vous avez dit L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE ??????

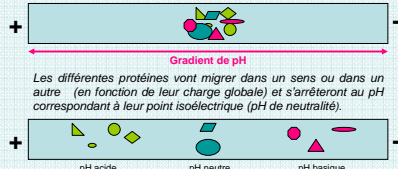
...Explications

Question préliminaire... C'est quoi une protéine ?

Une protéine est une grosse molécule qui possède un rôle fonctionnel ou structural dans les cellules de tout organisme vivant. Toutes les protéines sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés (de quelques dizaines à quelques milliers). Ces acides aminés peuvent être chargés (positivement, négativement) ou non chargés (neutralité) en fonction du pH et l'ensemble donne une charge globale à chaque protéine.



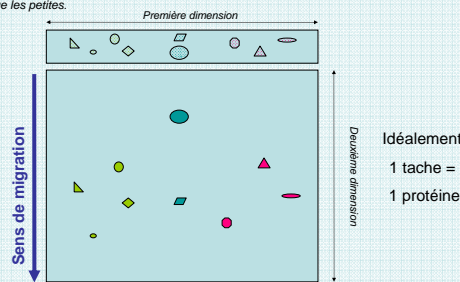
Que font les protéines soumises à un champ électrique dans un gradient de pH ?



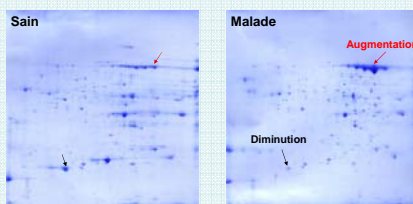
Ceci est la première dimension...

Maintenant passons à la seconde

Cette seconde séparation est basée sur la différence de taille des protéines. Imaginez une multitude de tamis les uns sur les autres : les grosses molécules iront beaucoup moins vite que les petites.



Voici un exemple de ce que l'on obtient en pratique par cette technique : Comparaison d'un individu sain et d'un individu malade



Puis, les protéines pourront être identifiées par différentes méthodes, par exemple par spectrométrie de masse.

La DETECTION

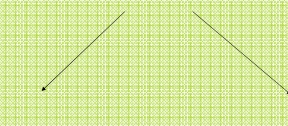
Tout dépend de la quantité



Comment détecter et doser les protéines

Pourquoi ?

La détection et le dosage des différentes protéines dans les milieux biologiques permettra de comprendre leurs rôles. ex: la détection des protéines issues de cellules cancéreuses permet de détecter un cancer dans un stade précoce. Ces méthodes se divisent en deux grandes catégories :



Cette approche permet de détecter la protéine elle-même. Les méthodes suivantes sont les plus répandues :

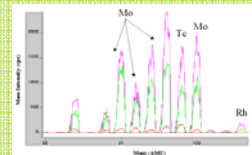
Ce type de détection permet de doser un constituant de la protéine par exemple un métal.

En effet plus d'un tiers de protéines contiennent des métaux qui sont, soit indispensables au bon fonctionnement de l'organisme vivant, soit toxiques pour cet organisme. Dans tous les cas il est important de les détecter et les quantifier ex: ARSENIC.

La méthode la plus sensible pour ce type d'analyse est l'ICP-MS.

1) Détection UV/visible :

Lumière visible : On peut colorer les protéines et déterminer leurs quantités par l'intensité de la couleur.
Lumière UV : Les protéines sont formées d'acides aminés dont certains absorbent les UV. La quantité de lumière absorbée permet de déterminer la quantité de protéine.



2) Détection en masse

En 1988 il devient possible d'analyser les protéines par spectrométrie de masse. Cette méthode permet de déterminer la masse des protéines à partir de quantités très faibles d'échantillon.



Principe : La méthode consiste à ioniser les métaux à partir de l'échantillon dans un plasma d'argon, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions par une sorte de flamme extrêmement chaude : jusqu'à 253 °C. Par la suite ces ions sont guidés vers un détecteur de masse.