

Biochimie Structurale



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

DEUG SV2

Année universitaire 2002-2003

Cours de Biochimie Structurale

Chapitre 4 : Les protéines

Partie 2

Jacques C. BARATTI

chapitre 4 § 3.3 : Les méthodes de séparation

3.3. Les méthodes de séparation

3.3.1. Précipitation

3.3.2. Adsorption

3.3.3. Séparation en solution

chapitre 4 § 3.3.1 : Précipitation

Trois méthodes courantes (rappels):

- Par les sels :
- par les solvants organiques :
- par le pH ou la T

chapitre 4 § 3.3.1 : Précipitation par les sels

- **Précipitation par les sels ou "salting out"**
 - l'addition de sulfate d'ammonium à forte concentration diminue la quantité d'eau disponible pour solvater les protéines qui précipitent
 - on exprime la concentration en % de la saturation
- **Cette méthode est très utilisée pour concentrer une solution de protéine :**
 - précipitation
 - centrifugation
 - dissolution dans un petit volume
 - dialyse
- **On peut aussi faire du fractionnement**

chapitre 4 § 3.3.1 : Autres précipitations

- **par les solvants organiques :**
 - principe: complexation des molécules d'eau
 - solvants utilisés: acétone, éthanol à basse T
 - nécessité de travailler à basse température pour éviter la dénaturation des protéines
- **par le pH ou la T**
 - principe: solubilité réduite au pHi mais dénaturation possible
 - dénaturation des protéines contaminantes (ex trypsine)
 - traitement thermique pour les enzymes thermostables (exemple: production d'une protéine issue d'un microorganisme thermophile dans *E. coli*)

chapitre 4 § 3.3.2 : Séparation par adsorption

3.3. Les méthodes de séparation

3.3.1. Précipitation

3.3.2. Adsorption

3.3.3. Séparation en solution

chapitre 4 § 3.3.2 : Méthodes par adsorption

- **Techniques les plus couramment utilisées car les plus efficaces**
- **On distingue**
 - échange d'ions,
 - affinité
 - immunoabsorbant
 - hydrophobe
 - colorant

chapitre 4 § 3.3.2 : Échange d'ions

- On réalise une séparation en fonction de la charge des protéines au pH de la chromatographie
- La charge dépend du point isoélectrique
 - charge + pour $\text{pH} < \text{pHi}$
 - charge 0 pour $\text{pH} = \text{pHi}$
 - charge - pour $\text{pH} > \text{pHi}$
- Les supports les plus courants sont:

Cellulose	polymère de glucose, fibreuse
Sephacel	cellulose sphérique
Sephadex	gels de dextrans
Agarose	à base d'agar
Trisacryl	polymère synthétique

chapitre 4 § 3.3.2 : Échange d'ions

- Les substituants les plus courants:

Diéthyl amino ethyl: DEAE

Carboxyméthyl: CM

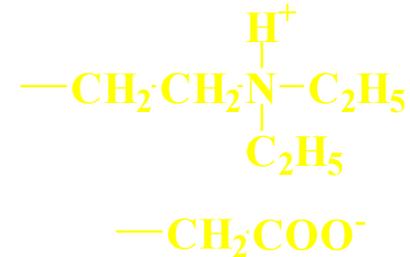


Table 4.4. Some Commercially Available Ion Exchange Products

	Anion exchangers	Cation exchangers
Cellulose-based	DEAE ^{b,c} TEAE ^b QAE ^b	CM ^{b,c} phospho ^{b,c}
Sephacel (spherical cellulose beads)	DEAE ^a	
Sephadex (dextran beads)	DEAE ^a QAE ^a	CM ^a Sulfopropyl ^a
Agarose-based	DEAE ^{a,b} PEI (Polybuffer exchanger) ^a	CM ^{a,b}
Synthetic-polymer-based (Trisacryl)	DEAE ^d	CM ^d

^aPharmacia.

^bBio-Rad Laboratories.

^cWhatman.

^dLKB.

Key: DEAE—diethylaminoethyl; TEAE—triethylaminoethyl; QAE—diethyl-(2-hydroxypropyl) aminoethyl; PEI—polyethylene imino; CM—carboxymethyl.

chapitre 4 § 3.3.2 : Échange d'ions

- Courbe de titrage des échangeurs d'ions:

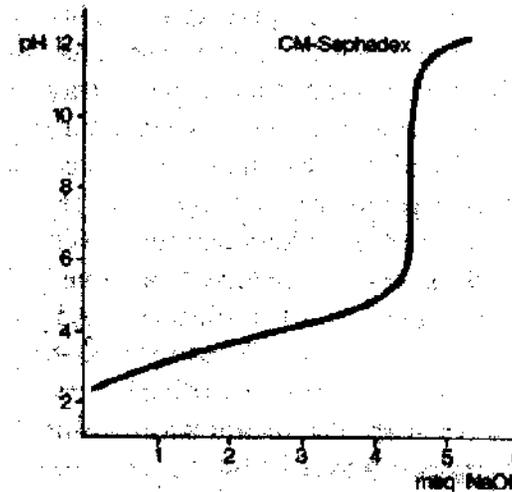
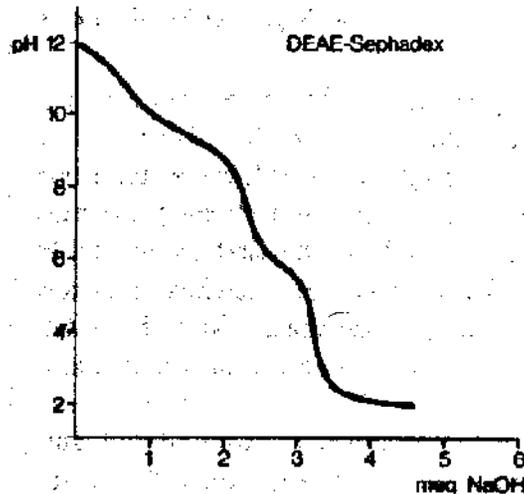


Figure 4.9. Titration curves of Sephadex ion exchangers in 1 M KCl [courtesy Pharmacia Fine Chemicals (41).]

- Travailler à pH
plutôt acide pour les DEAE
plutôt basique pour les CM

chapitre 4 § 3.3.2 : Échange d'ions

- Principe de la séparation:
 - protéines non retenues de charge identiques au support
 - élution des protéines retenues par un gradient en sel (élution selon point isolélectrique)
- Très bon pouvoir de résolution
- Très utilisée

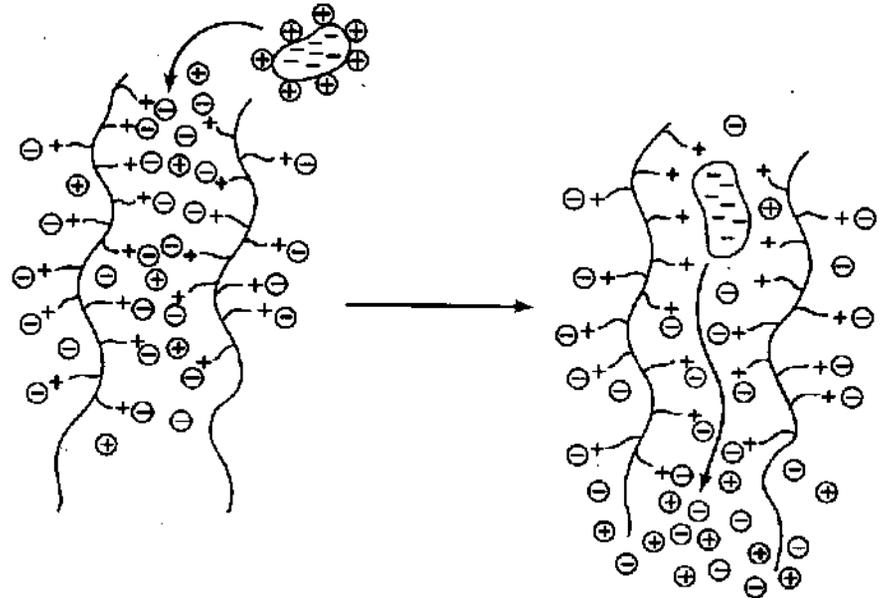


Figure 4.6. Illustration of the “ion exchange” occurring when a negatively charged protein adsorbs to an anion exchanger. Seven positively charged ions (c.g., HTris^+) associated with the protein molecule are displaced, together with seven negative ions (Cl^-) from the exchanger.

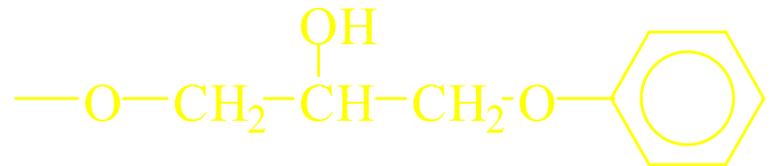
chapitre 4 § 3.3.2 : Chromatographie hydrophobe

- Principe :
interactions entre chaînes hydrophobes du support (aliphatiques ou aromatiques) et les groupements hydrophobes de l'enzyme

- 2 exemples :
aliphatiques: C4 à C10,
par ex hexyl Sepharose



- aromatiques:
par phenyl Sepharose



chapitre 4 § 3.3.2 : Chromatographie avec des colorants

- Principe :
interaction spécifique (?!)
entre le site actif
(deshydrogénase) et le
colorant
- Exemple:
rouge de Procion
- Éluion par des sels

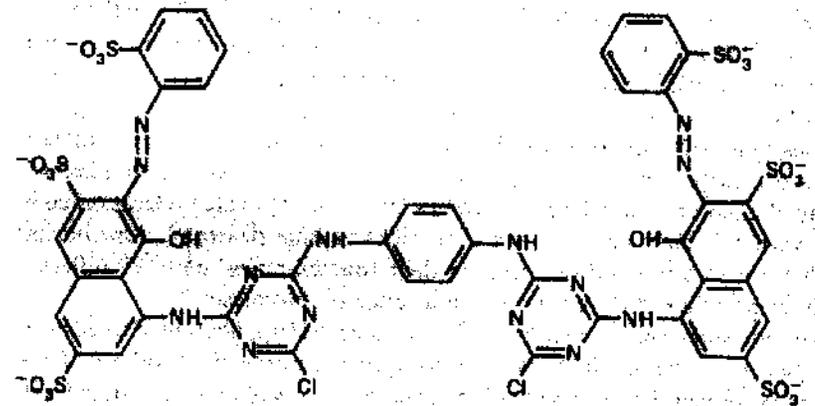


Figure 4.47. The structure of Procion Red HE-3B (reactive red 120). This is a bifunctional dye; one of the triazinyl chlorides attaches to the agarose when synthesizing the adsorbent, whereas the other may be hydrolysed.

- La rétention des protéines n'est pas prévisible: nécessité de faire des essais préalables
- Très bonne résolution

chapitre 4 § 3.3.2 : Chromatographie d'affinité

- Principe :
 - fait appel à la spécificité de l'interaction protéine-ligand
 - le support contient un ligand lié par liaison covalente
 - seule la protéine fixant le ligand sera retenue
- Très gros facteur de résolution
- nécessite de connaître la protéine

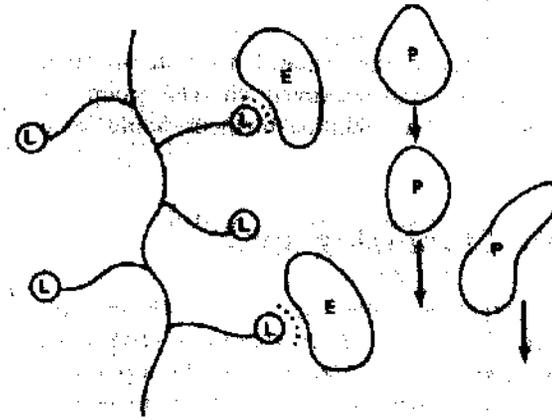
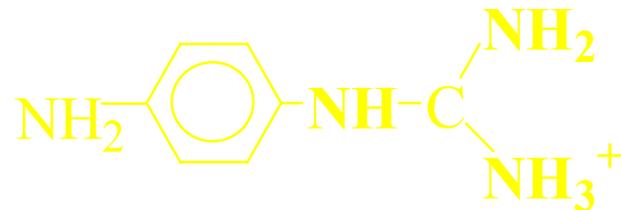


Figure 4.32. Basic principle of affinity adsorption chromatography. A ligand *L* is covalently attached to the backbone matrix. Only enzymes *E* with a specific affinity for *L* bind to the adsorbent. Proteins *P* pass through unaffected.

Exemple: Trypsine
p-aminobenzamidine



chapitre 4 § 3.3.2 : Immunoadsorbants

- **Principe :**
 - on immobilise l'antigène (anticorps) sur un support
 - permet de purifier l'anticorps (antigène = enzyme)
 - élution à pH acide (pH 3)
- **Excellente résolution**
- **Possibilité d'inactivation de l'enzyme lors de l'élution**
- **Utilisé pour préparer un polypeptide par exemple pour séquençage**
- **permet de purifier les anticorps**

chapitre 4 § 3.3.3 : Séparation en solution

3.3. Les méthodes de séparation

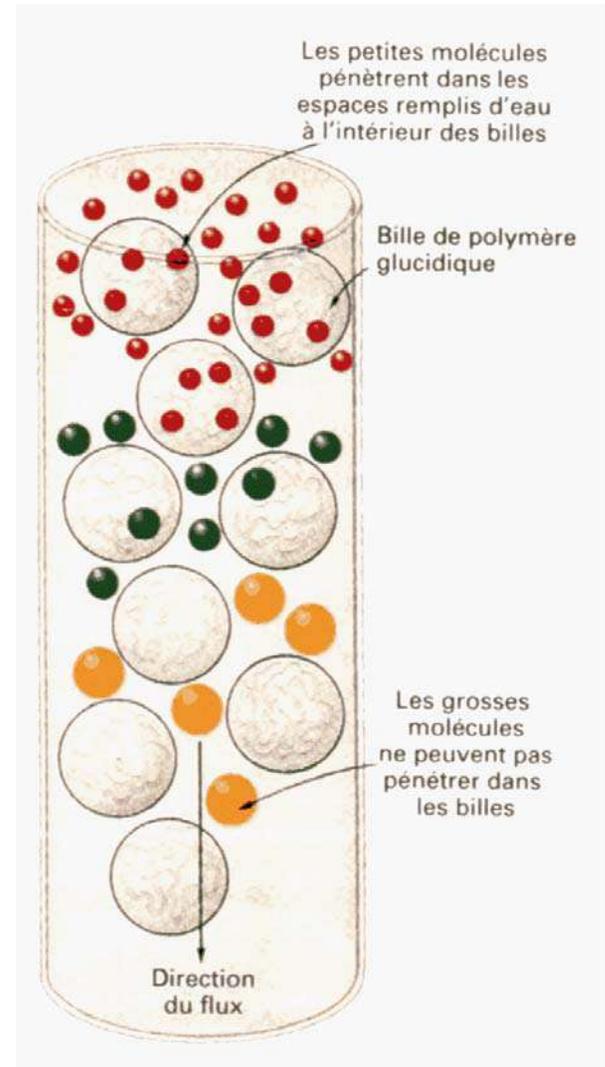
3.3.1. Précipitation

3.3.2. Adsorption

3.3.3. Séparation en solution

chapitre 4 § 3.3.3 : Filtration sur gel

- **Principe: les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire :**
 - les plus petites sont plus retenues car elles peuvent pénétrer à l'intérieur des pores
 - les plus grosses passent à travers les billes de support sans pénétrer dans les pores
 - un protéine de taille moyenne pénètre dans une partie des pores



chapitre 4 § 3.3.3 : Filtration sur gel

- **Coefficient K_{av}**

soit V_0 le volume d'élution d'un polymère coloré (Bleu dextrane)

soit V_e le volume d'élution de la protéine

soit V_t le volume total accessible à une petite molécule

on a

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

- Le numérateur représente le volume accessible à la protéine
- le dénominateur représente le volume accessible aux petites molécules
- le rapport est donc la fraction du volume accessible à la protéine

chapitre 4 § 3.3.3 : Filtration sur gel

- Exemple de gels commerciaux: Sephadex et Sepharose

Table 5.1. Gel Filtration Media

Company	Gel code	Gel type	Useful working range for globular molecules (MW)
Pharmacia Sephadex	G-10*	Dextran	50–700
	G-15*	Dextran	50–1500
	G-25*	Dextran	1000–5000
	G-50	Dextran	1500–30000
	G-75	Dextran	3000–70000
	G-100	Dextran	4000–150000
	G-150	Dextran	5000–300000
	G-200	Dextran	5000–600000
Pharmacia Sepharoses	6B	Agarose	10000– 4×10^6
	4B	Agarose	60000– 20×10^6
	2B*	Agarose	70000– 40×10^6
	CL-6B	Cross-linked agarose	10000– 4×10^6
	CL-4B	Cross-linked agarose	60000– 20×10^6
	CL-2B*	Cross-linked agarose	70000– 40×10^6

chapitre 4 § 3.3.3 : Filtration sur gel

- Exemple de gels commerciaux: Polyacrylamide

Table 5.1. Gel Filtration Media

Company	Gel code	Gel type	Useful working range for globular molecules (MW)
Bio-Rad	P-2*	Polyacrylamide	100–1800
Biogels	P-4*	Polyacrylamide	800–4000
	P-6*	Polyacrylamide	1000–6000
	P-10*	Polyacrylamide	1500–20000
	P-30*	Polyacrylamide	2500–40000
	P-60	Polyacrylamide	3000–60000
	P-100	Polyacrylamide	5000–100000
	P-150	Polyacrylamide	15000–150000
	P-200	Polyacrylamide	30000–200000
	P-300	Polyacrylamide	60000–400000
	A-0.5m	Agarose	1000– 0.5×10^6
	A-1.5m	Agarose	2000– 1.5×10^6
	A-5.0m	Agarose	4000– 5×10^6
	A-15m*	Agarose	60000– 15×10^6
	A-50m*	Agarose	200000– 50×10^6
	A-150m*	Agarose	1×10^6 – 150×10^6

chapitre 4 § 3.4 : Les méthodes analytiques

3.1. Introduction

3.2. Préparation des extraits enzymatiques

3.3. Les méthodes de séparation

3.4. Les méthodes analytiques

3.5. Protocole de purification

chapitre 4 § 3.4 : Tester la pureté d'une préparation

3.4. Tester la pureté d'une préparation de protéine

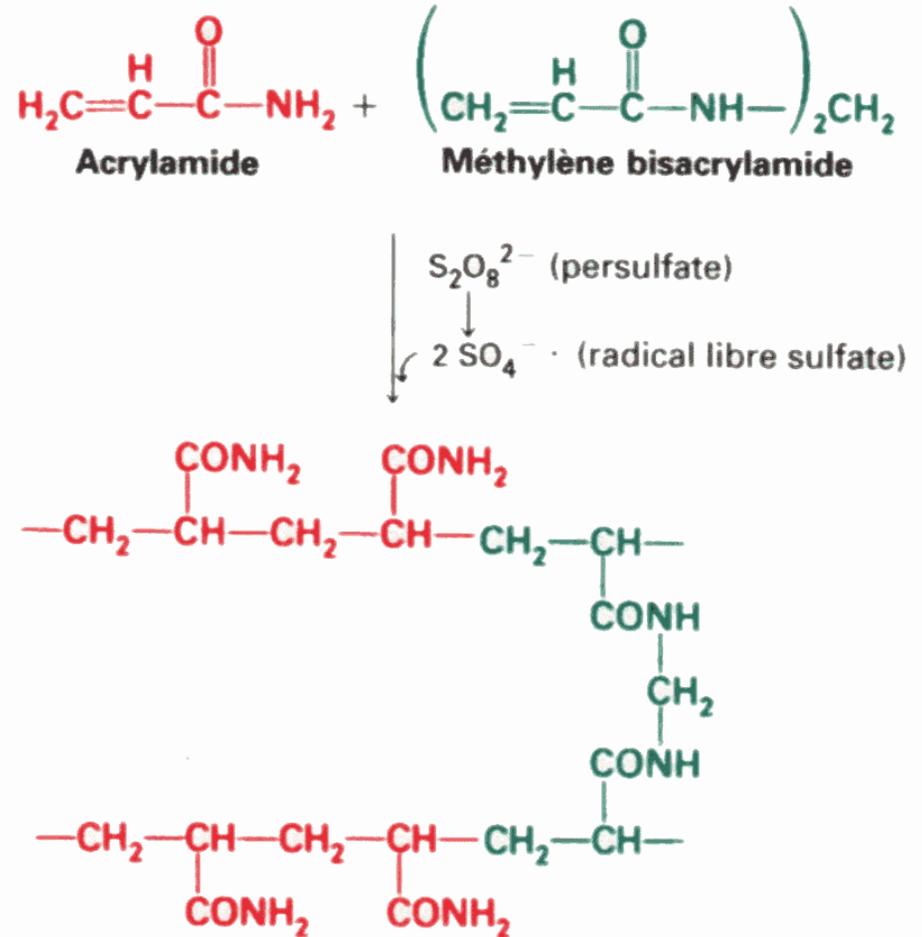
3.4.1. Electrophorèse

3.4.2. Electrofocalisation

3.4.3. Électrophorèse à deux dimensions

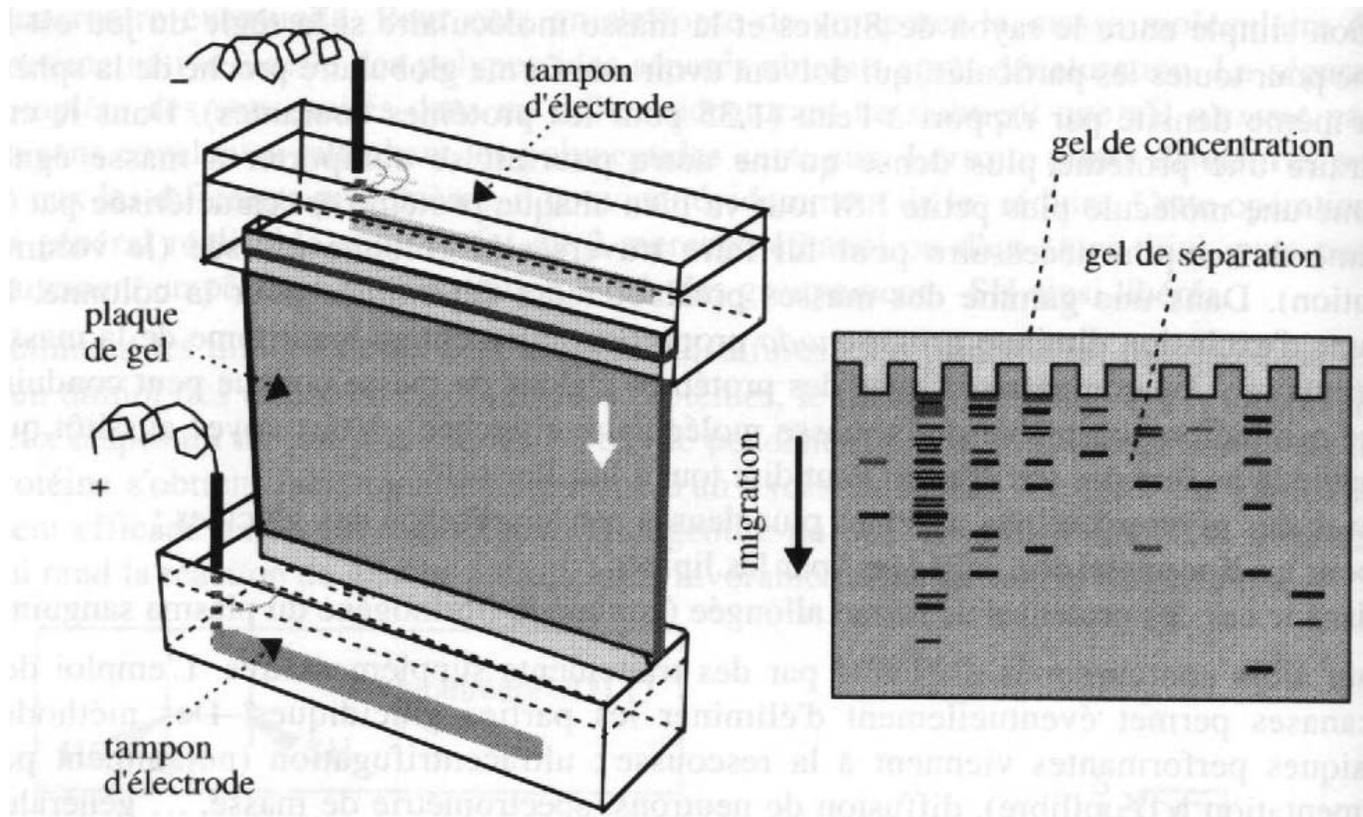
chapitre 4 § 3.4 : Gel de polyacrylamide

- Fabrication des gels :
 - polymérisation d'acrylamide
 - ajout de bis acrylamide pour relier les chaînes
- Électrophorèse en gel de polyacrylamide
 - méthode de migration dans un champ électrique
 - dans un gel avec une taille de maille



chapitre 4 § 3.4 : PAGE

- Appareillage:



chapitre 4 § 3.4 : Électrophorèse en gel natif

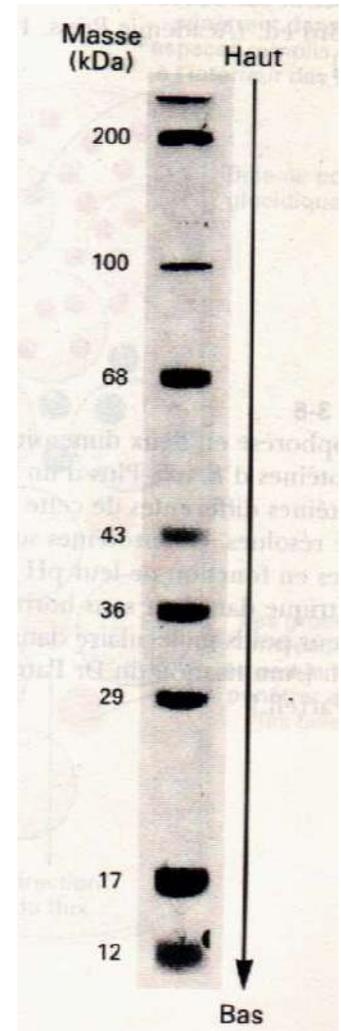
- **Principe: séparation selon la charge et la masse moléculaire**
 - les protéines les plus chargées au pH du tampon (en général voisin de 9) migre le plus
 - les protéines de faible masse moléculaire migrent le plus
- **On fait varier la concentration d'acrylamide et de bis-acrylamide pour obtenir la migration souhaitée (entre 7 et 15%)**
- **Après migration: fixation dans l'acide acétique et coloration avec:**
 - **Bleu de Coomassie (le plus courant)**
 - **Nitrate d'argent (plus sensible)**

chapitre 4 § 3.4 : PAGE avec gradient

- **Principe:**
 - on réalise un gradient d'acrylamide (4-30%) sur le gel
 - les protéines migrent jusqu'à immobilisation par effet de tamis
- **On a donc une séparation selon la masse moléculaire**
- **Permet d'estimer la masse moléculaire de la protéine native par comparaison avec des témoins de masse moléculaire connue**
- **Moyennement utilisée**

chapitre 4 § 3.4 : PAGE avec SDS

- Principe:
 - on dénature les protéines avec un détergent : le dodecyl sulfate de sodium
 - toutes les protéines sont chargés négativement
 - la migration se fait uniquement selon la masse moléculaire (les petites molécules migrent beaucoup)
- Étalonnage avec protéines de MM connues permet de déterminer la masse moléculaire (voir après)



chapitre 4 § 3.4.2 : Electrofocalisation

3.4. Tester la pureté d'une préparation de protéine

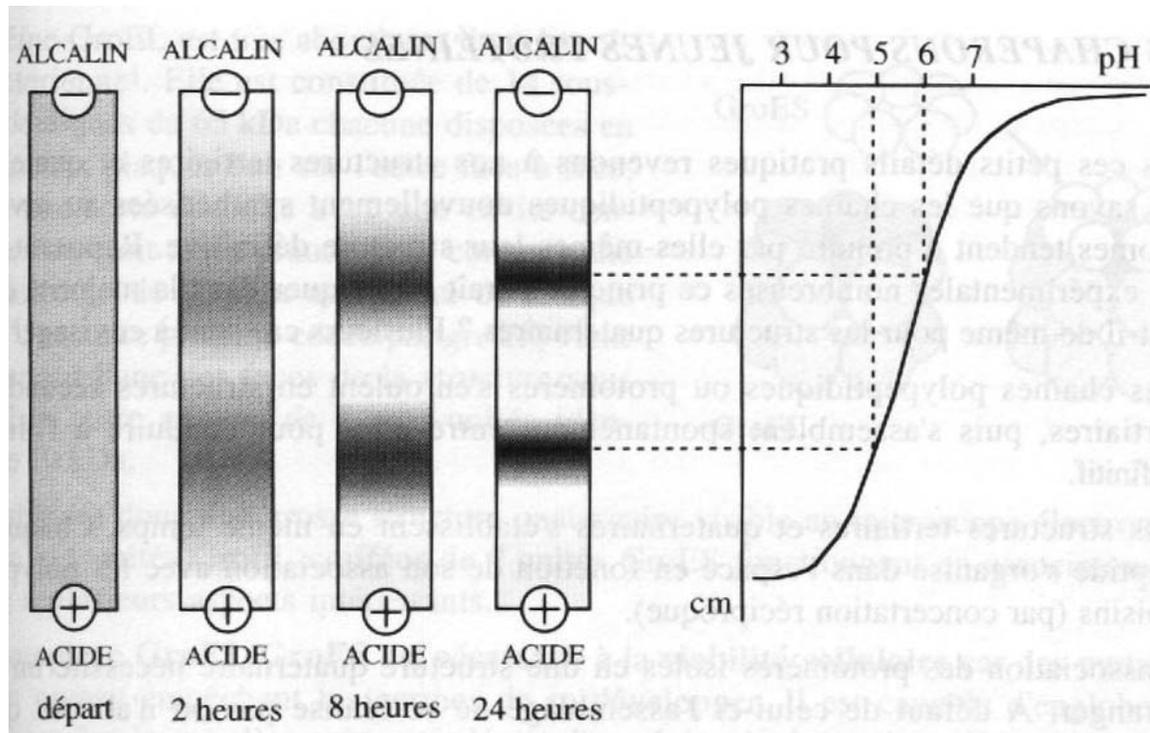
3.4.1. Electrophorèse

3.4.2. Electrofocalisation

3.4.3. Électrophorèse à deux dimensions

chapitre 4 § 3.4.2 : Electrofocalisation

- Principe: création d'un gradient de pH sur un gel de polyacrylamide à l'aide d'ampholines, séparation le pHi



- Excellente résolution et détermination du pHi par comparaison avec protéines de pHi connu

chapitre 4 § 3.4.3 : **Électrophorèse bidimensionnelle**

3.4. Tester la pureté d'une préparation de protéine

3.4.1. Electrophorèse

3.4.2. Electrofocalisation

3.4.3. Électrophorèse à deux dimensions

chapitre 4 § 3.4.3 : **Électrophorèse bidimensionnelle**

- **Principe: deux migrations à 90°**
- **Première migration en electrofocalisation**
- **Deuxième migration en PAGE SDS**
- **Les deux directions font appel à des propriétés différentes**
- **Il en résulte une très grande résolution**
- **On peut séparer au moins 1.000 protéines par cette technique**

chapitre 4 § 3.4.3 : Électrophorèse bidimensionnelle



Utilisé en test de pureté efficace ou en "protéomique"

chapitre 4 § 3.5 : Protocole de purification

3.1. Introduction

3.2. Préparation des extraits enzymatiques

3.3. Les méthodes de séparation

3.4. Les méthodes analytiques

3.5. Protocole de purification

chapitre 4 § 3.5 : Définir un protocole de purification

- **Objectifs**
 - 1. Obtenir un bon rendement (rdt)**
 - 2. Obtenir un bon degré de pureté (AS)**
 - 3. Mettre au point une méthodologie reproductible**
 - 4. Utiliser des méthodes et des appareillages peu coûteux**
 - 5. Méthode rapide et facile à mettre en œuvre au laboratoire**

chapitre 4 § 3.5 : Définir un protocole de purification

- **Commentaires**
 - les points 1 et 2 sont les plus importants sur le plan scientifique
 - le point 3 est crucial au niveau expérimental (laboratoire et ailleurs)
 - les points 4 et 5 sont techniques
 - point 4: matériels disponible au laboratoire
 - point 5 réaliser les différentes étapes pendant les horaires de laboratoire

chapitre 4 § 3.5 : Exemple de protocole

- Chaque protocole est différent et il n'y a pas de règles absolues pour le définir

Matériel de départ

cassage des cellules



séparation des débris

Extrait brut

ultrafiltration



Extrait brut concentré

Séparation basée sur:

choc de pression, ultrason

**centrifugation,
microfiltration**

**Taille: élimination des sels et
petites molécules,
concentration**

chapitre 4 § 3.5 : Exemple de protocole

Extrait brut concentré

↓ chromatographie
d'échange d'ions

Fractions actives

↓ Chromatographie
hydrophobe

Fractions actives

↓ précipitation (sels)
ou ultrafiltration

Fractions concentrées

Séparation basée sur:

Charge

Hydrophobicité

**Solubilité, taille : augmente
la résolution de l'étape
suivante**

chapitre 4 § 3.5 : Exemple de protocole

Fractions concentrées



Filtration sur gel

Séparation basée sur:

Masse moléculaire

Fractions actives



**Chromatographie
d'affinité**

Spécificité biologique

Fractions actives



**stabilisation pour
stockage**

**ajout glycérol,
lyophilisation**

Enzyme purifiée

- **Le protocole peut comporter moins d'étapes**

à suivre .../...

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

