

# 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:

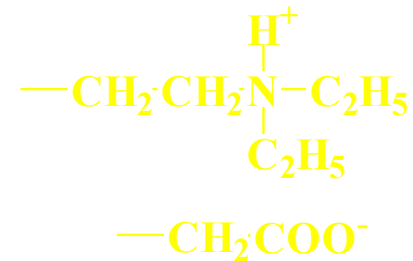
Cellulose	polymère de glucose, fibreuse
Sephacel	cellulose sphérique
Sephadex	gels de dextrans
Agarose	à base d'agar
Trisacryl	polymère synthétique

# 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 <sup>b,c</sup> TEAE <sup>b</sup> QAE <sup>b</sup>	CM <sup>b,c</sup> phospho <sup>b,c</sup>
Sephacel (spherical cellulose beads)	DEAE <sup>a</sup>	
Sephadex (dextran beads)	DEAE <sup>a</sup> QAE <sup>a</sup>	CM <sup>a</sup> Sulfopropyl <sup>a</sup>
Agarose-based	DEAE <sup>a,b</sup> PEI (Polybuffer exchanger) <sup>a</sup>	CM <sup>a,b</sup>
Synthetic-polymer-based (Trisacryl)	DEAE <sup>d</sup>	CM <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Pharmacia.

<sup>b</sup>Bio-Rad Laboratories.

<sup>c</sup>Whatman.

<sup>d</sup>LKB.

**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:

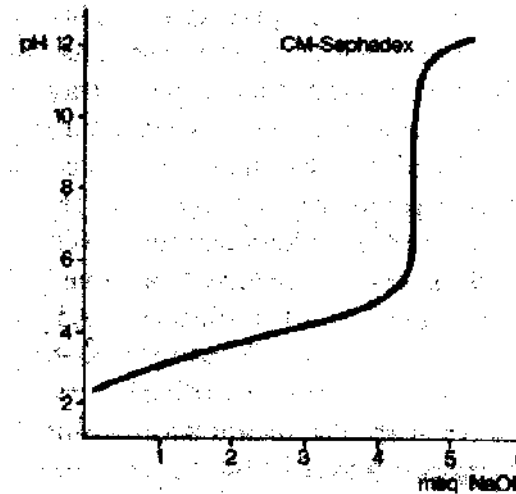
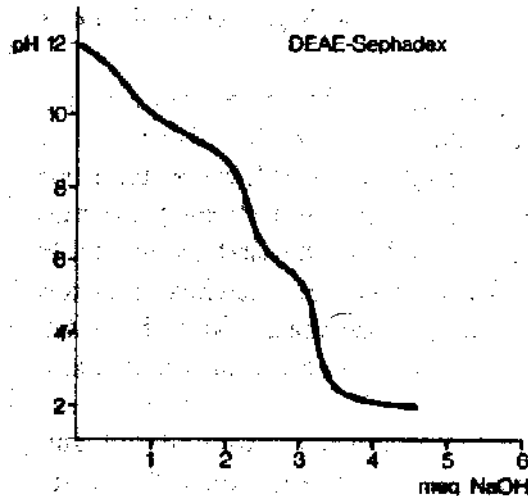


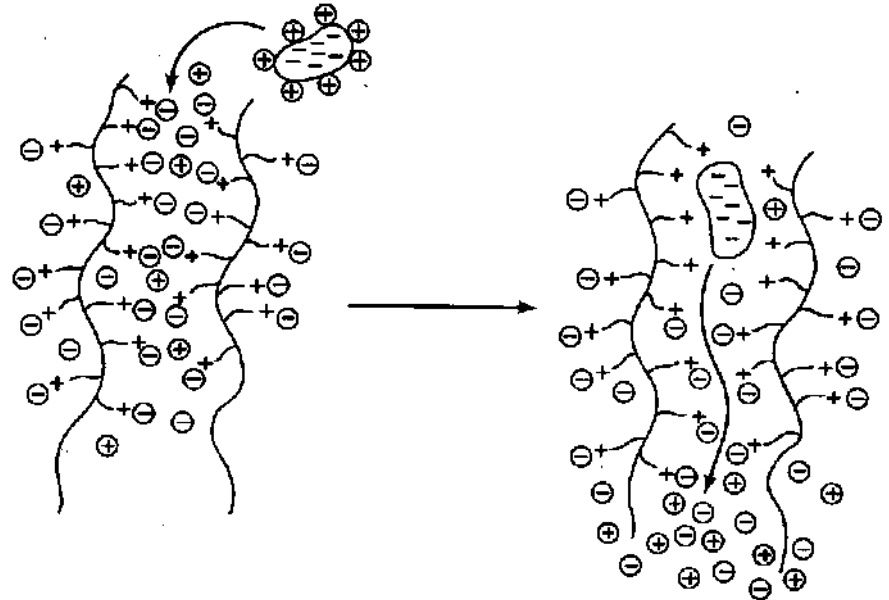
Figure 4.9. Titration curves of Sephadex ion exchangers in 1 M KCl [courtesy Pharmacia Fine Chemicals (41).]

- 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



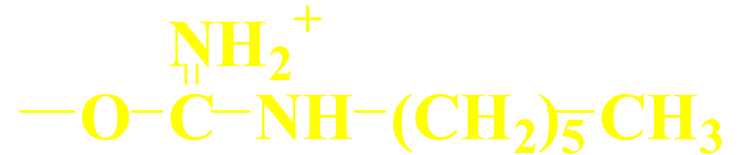
**Figure 4.6.** Illustration of the “ion exchange” occurring when a negatively charged protein adsorbs to an anion exchanger. Seven positively charged ions (c.g.,  $\text{HTris}^+$ ) associated with the protein molecule are displaced, together with seven negative ions ( $\text{Cl}^-$ ) from the exchanger.

## chapitre 4 § 3.3.2 : Chromatographie hydrophobe

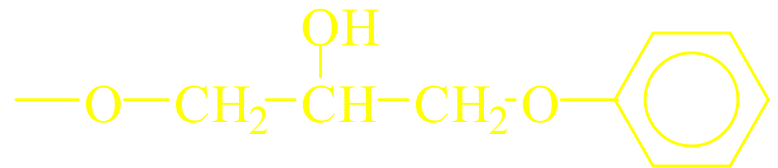
---

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

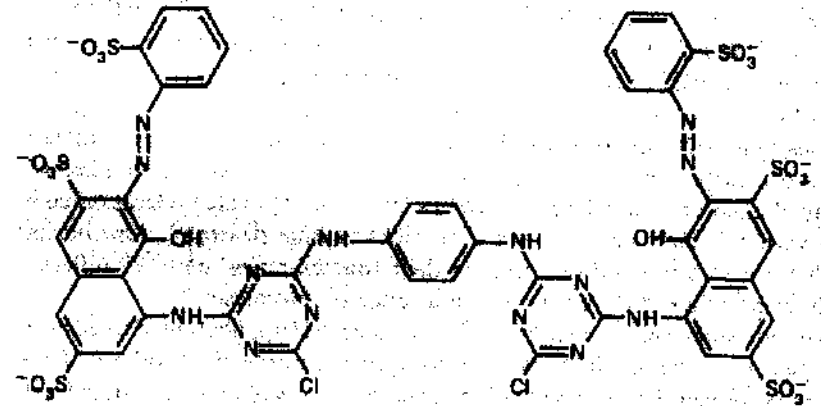


Figure 4.47. The structure of Procion Red HE-3B (reactive red 120). This is a bifunctional dye; one of the triazinyl chlorides attaches to the agarose when synthesizing the adsorbent, whereas the other may be hydrolysed.

## 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

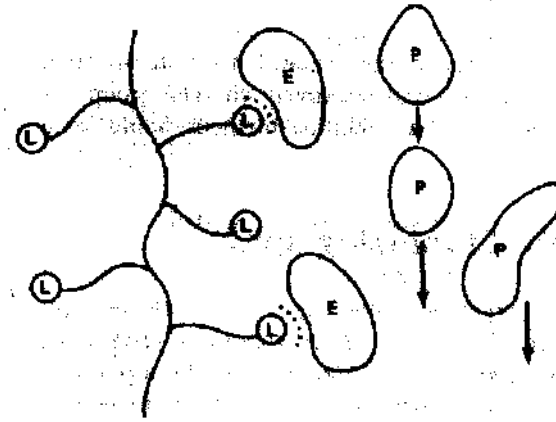
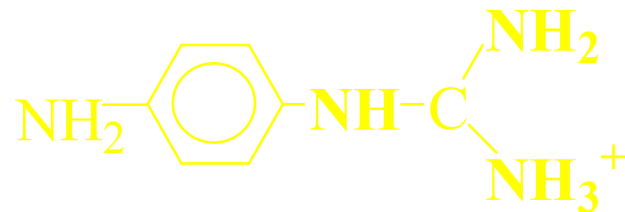


Figure 4.32. Basic principle of affinity adsorption chromatography. A ligand *L* is covalently attached to the backbone matrix. Only enzymes *E* with a specific affinity for *L* bind to the adsorbent. Proteins *P* pass through unaffected.

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

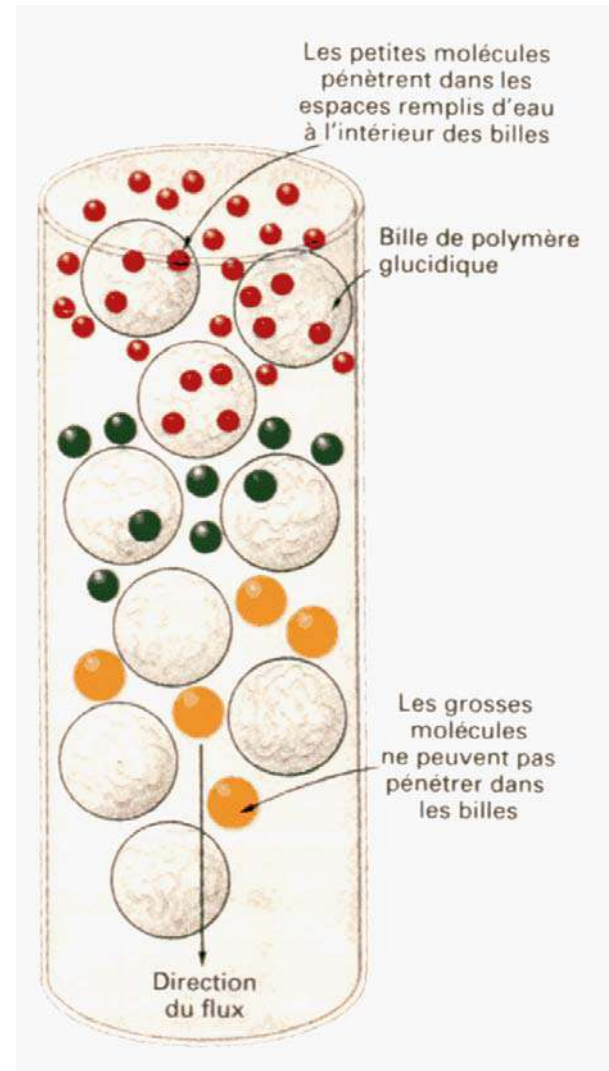
### 3.3.1. Précipitation

### 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
  - une 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– $4 \times 10^6$
	4B	Agarose	60000– $20 \times 10^6$
	2B*	Agarose	70000– $40 \times 10^6$
	CL-6B	Cross-linked agarose	10000– $4 \times 10^6$
	CL-4B	Cross-linked agarose	60000– $20 \times 10^6$
	CL-2B*	Cross-linked agarose	70000– $40 \times 10^6$

## 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– $0.5 \times 10^6$
	A-1.5m	Agarose	2000– $1.5 \times 10^6$
	A-5.0m	Agarose	4000– $5 \times 10^6$
	A-15m*	Agarose	60000– $15 \times 10^6$
	A-50m*	Agarose	200000– $50 \times 10^6$
	A-150m*	Agarose	$1 \times 10^6$ – $150 \times 10^6$

# 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

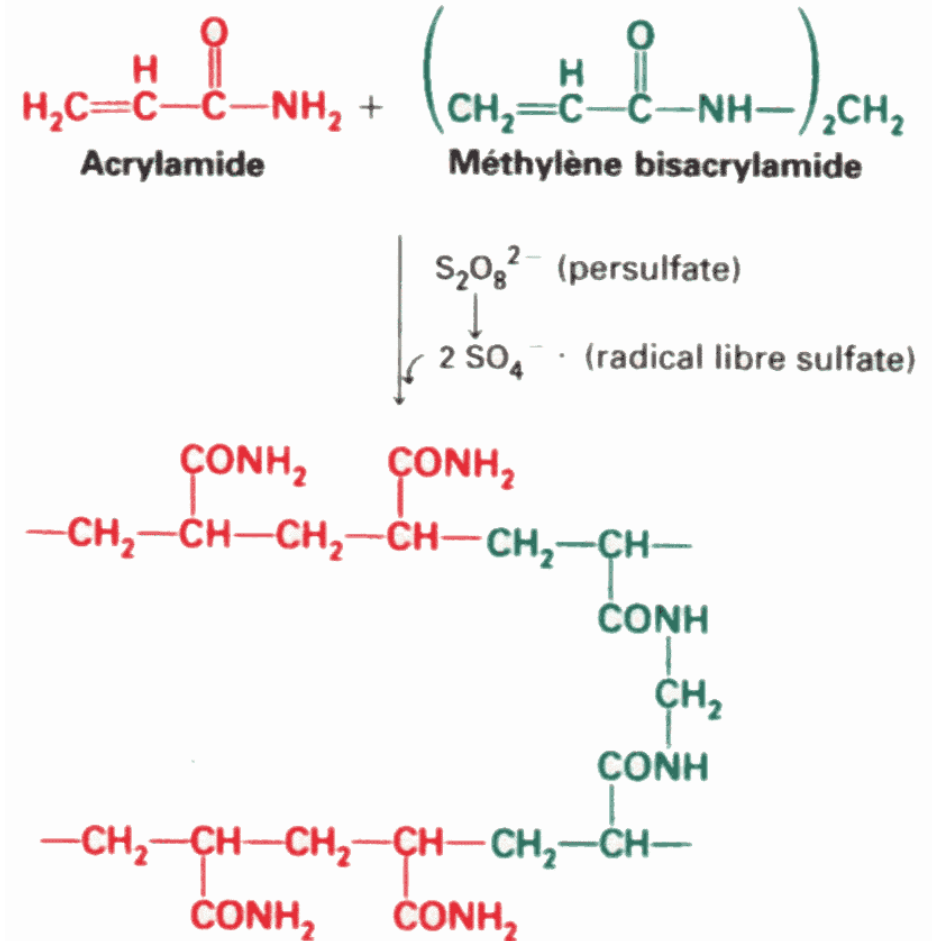
### 3.4.1. Electrophorèse

### 3.4.2. Electrofocalisation

### 3.4.3. Électrophorèse à deux dimensions

# chapitre 4 § 3.4 : Gel de polyacrylamide

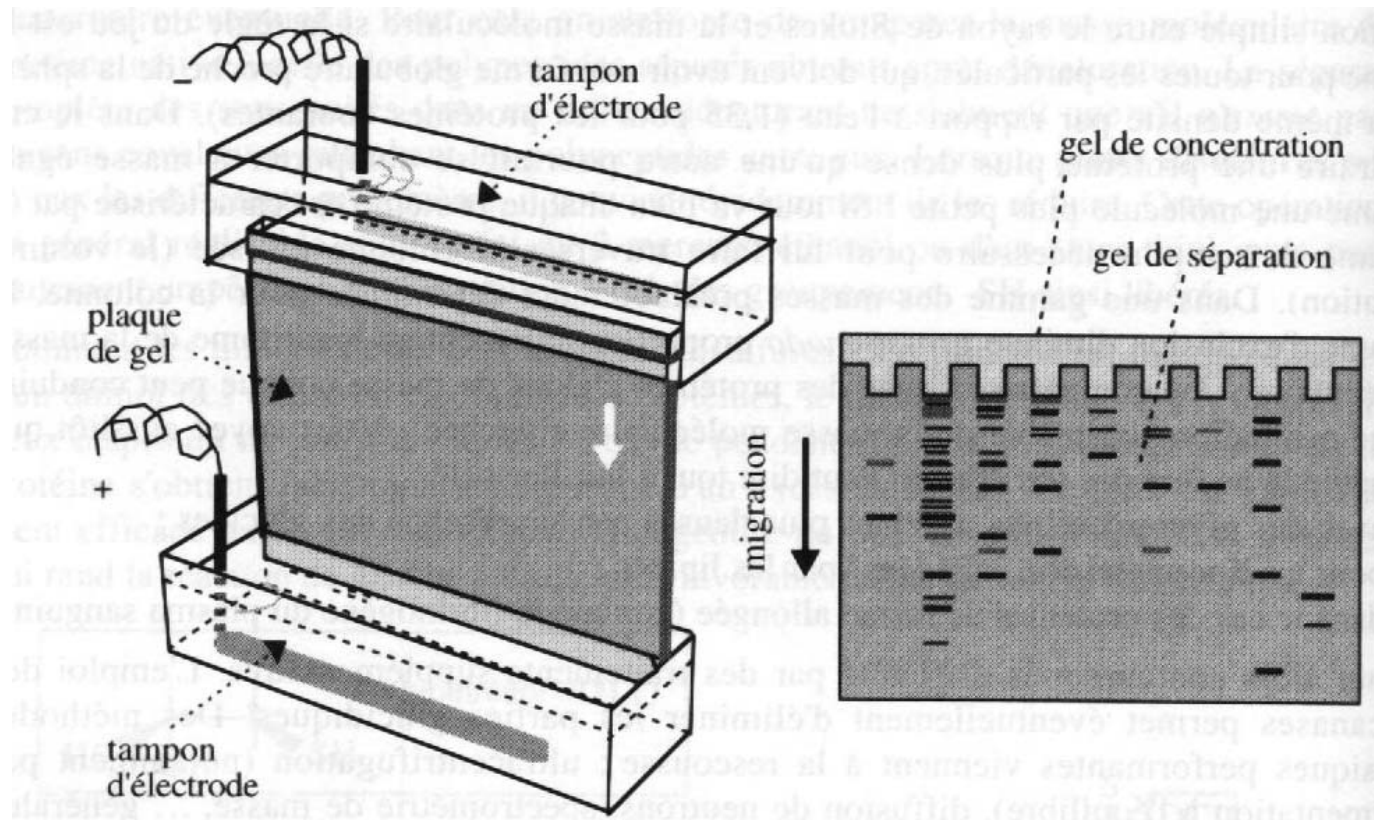
- Fabrication des gels :
  - polymérisation d'acrylamide
  - ajout de bis acrylamide pour relier les chaînes
- Électrophorèse en gel de polyacrylamide
  - méthode de migration dans un champ électrique
  - dans un gel avec une taille de maille





# 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

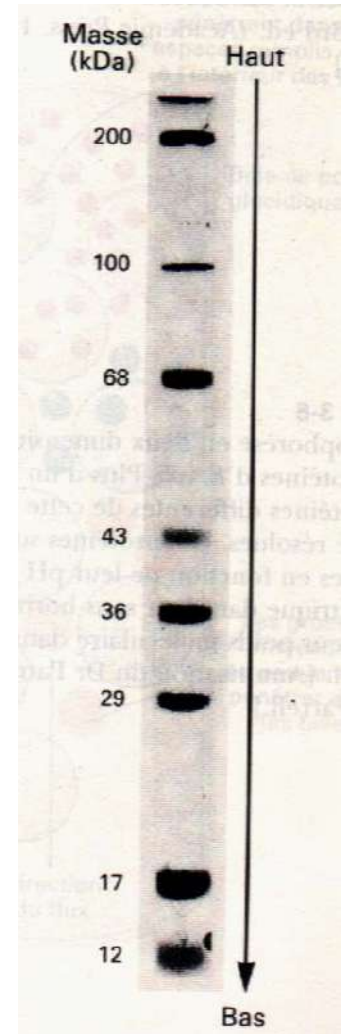
---

- **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**

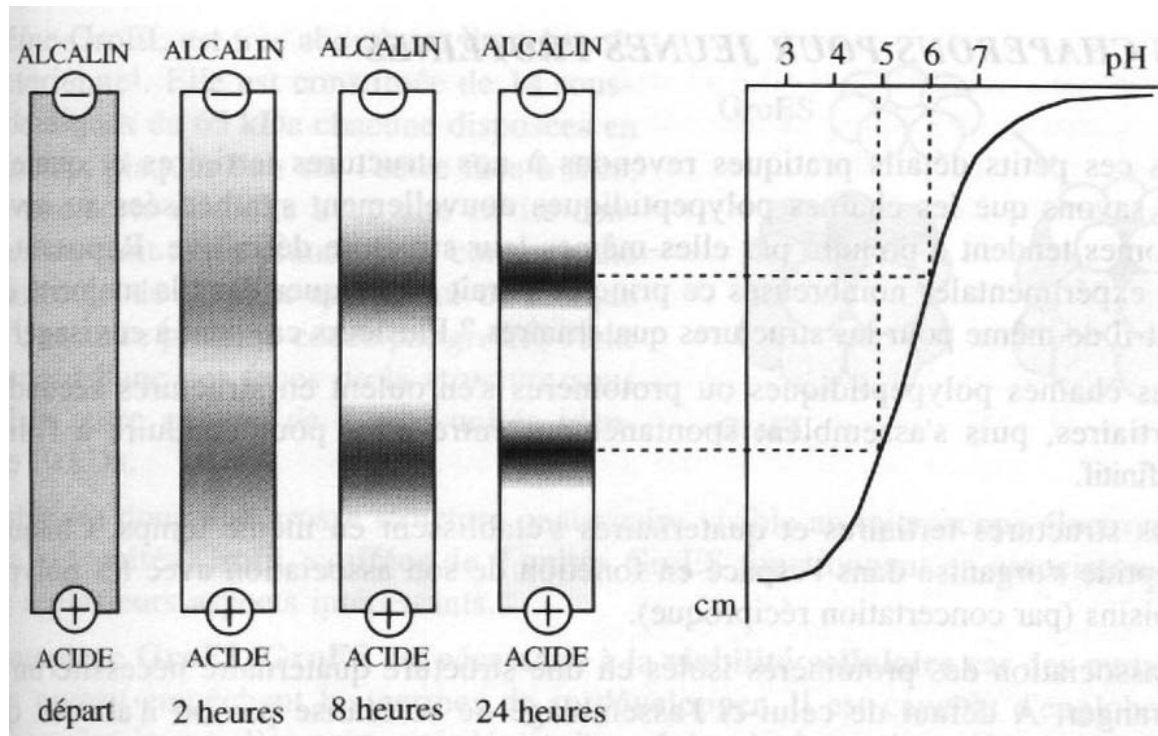
#### **3.4.1. Electrophorèse**

#### **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**

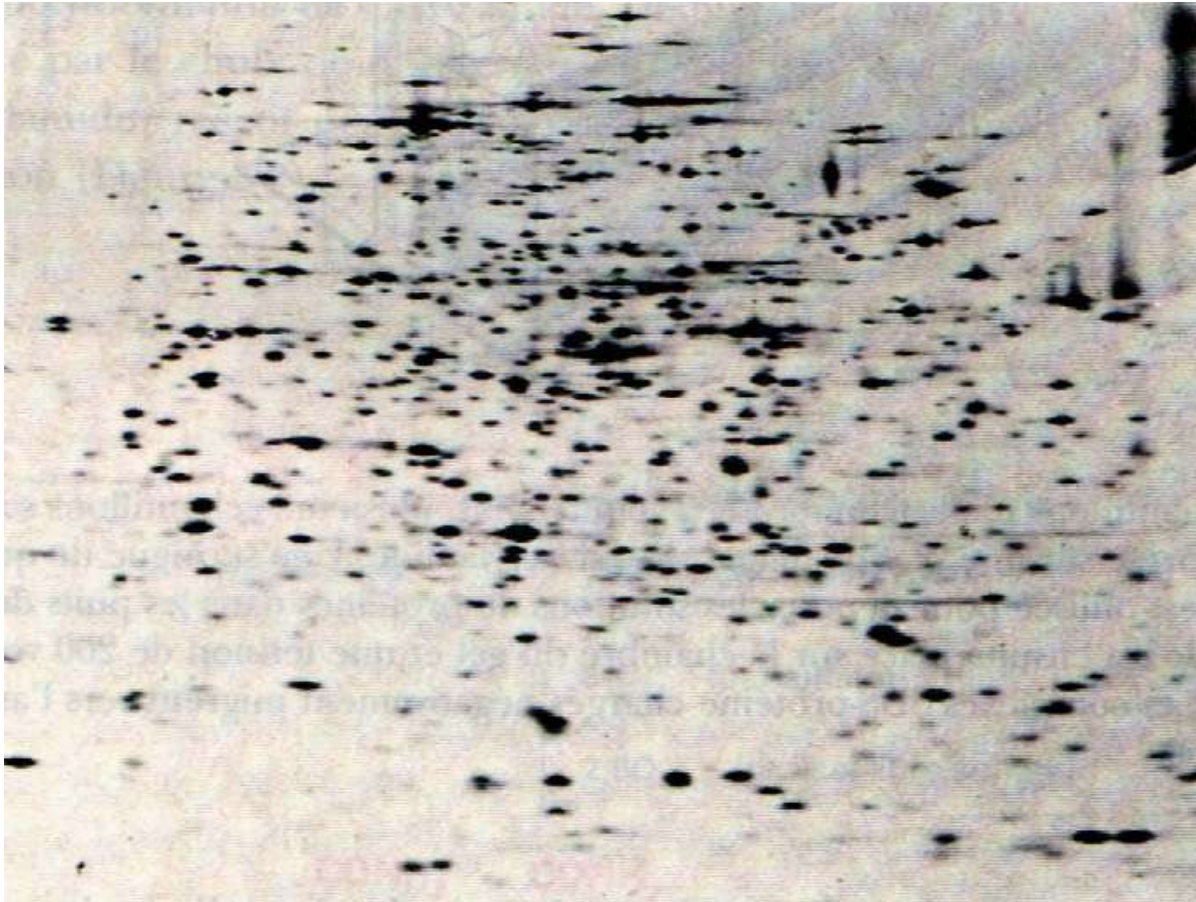
---

- **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 basée sur:**

**choc de pression, ultrason**



**séparation des débris**

**centrifugation,  
microfiltration**

**Extrait brut**

**ultrafiltration**

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



**Extrait brut concentré**

## 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**

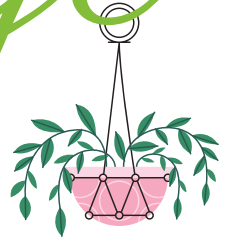
**Enzyme purifiée**

- **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

