

III – Techniques de Purification et d'Analyse

A - Solubilisation – extraction des protéines

B - Précipitation différentielle

- 1 - précipitation isoélectrique
- 2 - précipitation par des sels

C - Techniques chromatographiques

- 1 - échange d'ions
- 2 - exclusion / diffusion
- 3 - affinité

D - Techniques électrophorétiques

- 1 - électrophorèse sur papier
- 2 - électrophorèse sur gel de polyacrylamide

E - Technique immunoenzymatiques



Introduction

- Les extraits biologiques sont des ensembles complexes comprenant souvent des dizaines de milliers de biomolécules différentes, chacune en proportions extrêmement variables, allant de 10^9 à 10^{23} exemplaires.
- Si on considère les biomolécules sur un plan qualitatif, elles présentent des **propriétés physico-chimiques variables** :
 - ❖ solubilité
 - ❖ polarité (hydrophobicité / hydrophilie)
 - ❖ charge électrique
 - ❖ taille
 - ❖ capacité à lier un ligand

Introduction

- Certaines de techniques ne sont employées que pour la purification des **protéines**, d'autres sont également applicables à la purification des **oligo/polysaccharides** ou des **acides nucléiques**.
- Concernant les **lipides**, les techniques de séparation en phase directe ou en phase inverse, sont privilégiées.
- La purification d'une biomolécule s'effectue en 3 phases :
 - 1 - préparation d'un **extrait brut** ;
 - 2 - **enrichissement** de la fraction biologique ;
 - 3 - **purification** finale.

A - Solubilisation – extraction des protéines

- Les **protéines hydrosolubles** sont généralement obtenues :
 - à partir d'un liquide physiologique (sérum, lait, ...) pour les protéines sécrétées
 - après lyse des cellules pour les protéines intracellulaires
- Les membranes biologiques sont habituellement déstructurées grâce à des techniques :
 - mécaniques (broyage par exemple)
 - physiques (sonication par ultrasons-microcavitation)
 - physico-chimique (détérgents par exemple)

A - Solubilisation – extraction des protéines

- Pour les **protéines membranaires**, un détergent permet leur solubilisation :
 - évite la perte de structure 3D (dénaturation),
 - empêche l'agrégation.

Maintien du détergent pendant toutes les étapes de la purification.

Après solubilisation, on obtient un **extrait brut**.

B - Précipitation différentielle des protéines

1 - Précipitation isoélectrique

Une étape intermédiaire d'enrichissement par **précipitation** permet souvent d'éliminer de nombreux contaminants contenus dans l'extrait.

Le pH de l'extrait brut est amené à la valeur du point isoélectrique ou pl de la protéine d'intérêt :

la charge globale de la protéine étant nulle

→ peu ou pas de répulsion électrostatique entre les molécules

→ agrégation puis la précipitation des agrégats.

Récupération de la protéine précipitée par centrifugation.

Resolubilisation dans une solution tampon au pH adéquat. On obtient un **extrait enrichi**.

On obtient un **extrait enrichi**.

B - Précipitation différentielle des protéines

2 - Précipitation par des sels

Des **concentrations croissantes en sels** (généralement le **sulfate d'ammonium**), sont ajoutées jusqu'à obtenir la **précipitation de la protéine d'intérêt** ou celles des protéines contaminantes :

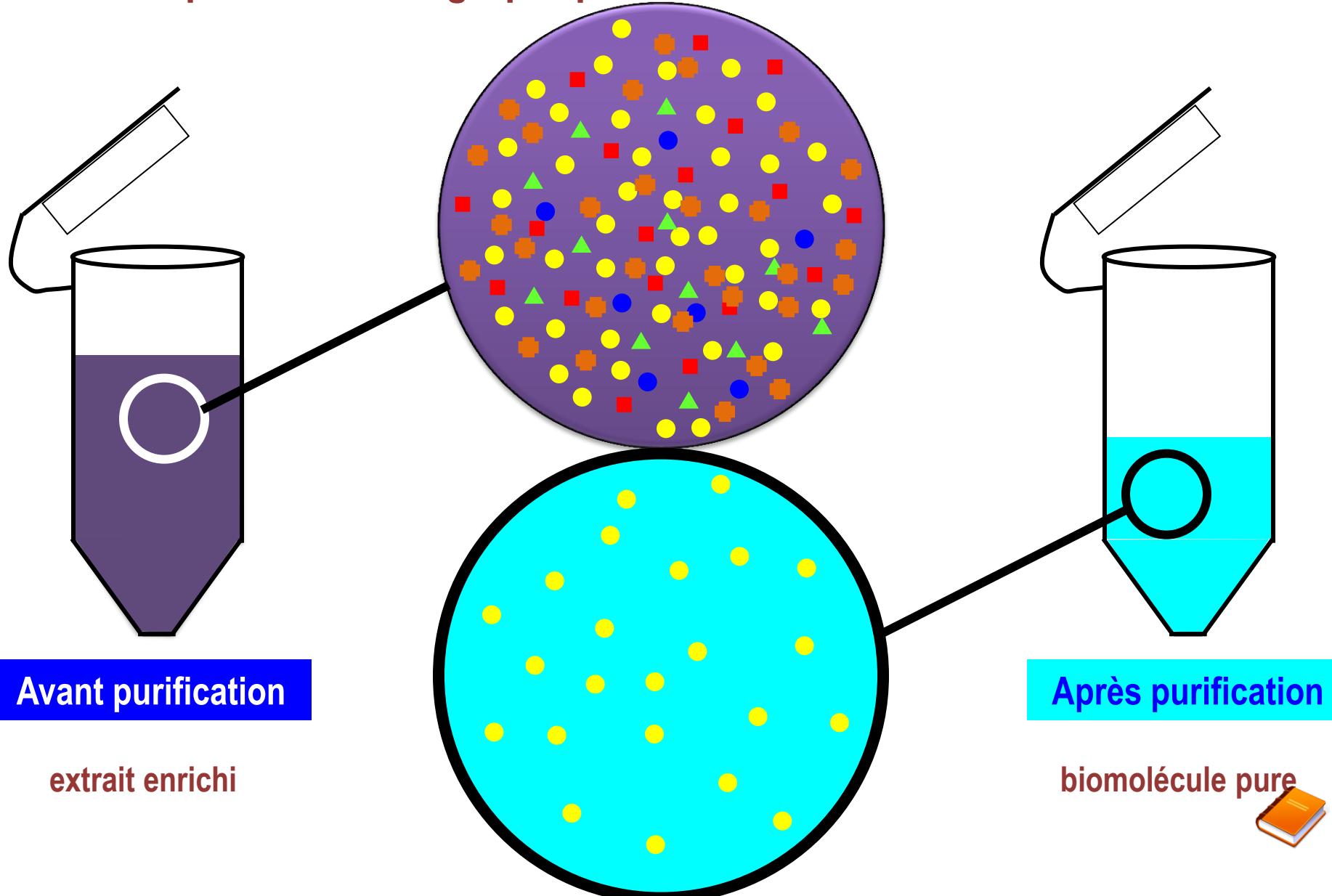
- le sel piège l'eau → précipitation des protéines.

Toutes les protéines ne précipitent pas pour des concentrations équivalentes en sels.

- plus la solubilité d'une protéine dans l'eau sera importante, plus la concentration en sels qu'il faudra ajouter pour obtenir sa précipitation sera élevée.

- les petites protéines sont généralement plus solubles que les grosses.

C - Techniques chromatographiques



C - Techniques chromatographiques



Mikhail Tswett
1872-1919

Technique inventée **en 1905** par un botaniste russe pour séparer les pigments présents dans les feuilles des plantes.

En chromatographie, les constituants d'un mélange se partagent entre 2 phases :

une **phase mobile** et une **phase stationnaire**.

Les différences entre les diverses chromatographies viennent de la nature des phases fixes et mobiles.

C - Techniques chromatographiques

- Le support (ou matrice) utilisé pour constituer la **phase stationnaire** s'appelle un gel de résine : très petites billes sphériques ou, plus rarement, de forme irrégulière (diamètre quelques micromètres)
- Ces billes sont des **polymères** de différents types de molécules comme par exemple :
 - de styrène-divinylbenzène pour certaines résines d'échange d'ions
 - de polyholosides pour les gels de tamisage moléculaire
 - de silice pour la chromatographie en phase inverse
- Différents traitements ou modifications chimiques de ces résines permettent d'obtenir divers types de phases stationnaires.

C - Techniques chromatographiques



pompes



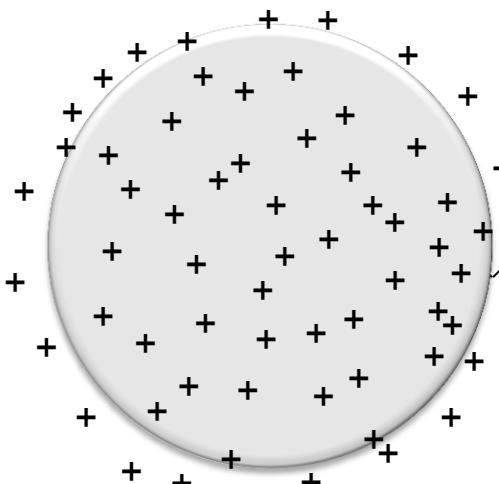
collecteur



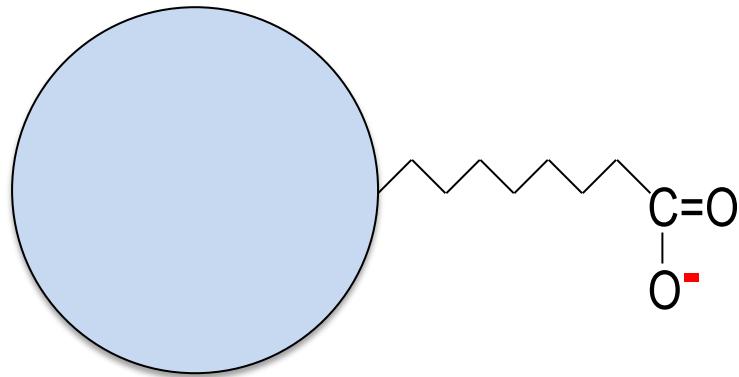
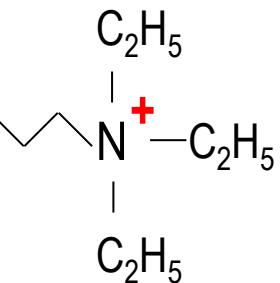
C - Techniques chromatographiques

1 – échange d'ions

Les **échangeurs d'ions** sont des macromolécules insolubles portant d'innombrables groupements ionisables :



triéthylammonium
échangeur d'**anions**



carboxylate
échangeur de **cations**

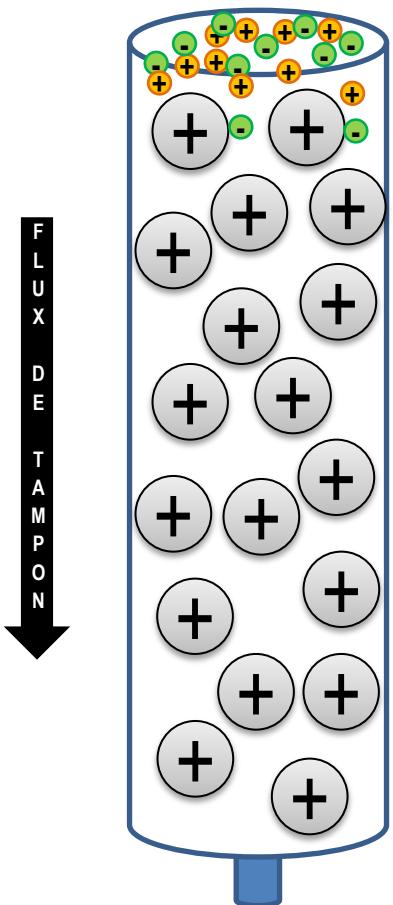
Ils peuvent **échanger**, de façon réversible, les ions qui leur sont liés au contact d'autres ions provenant d'une solution éluante.



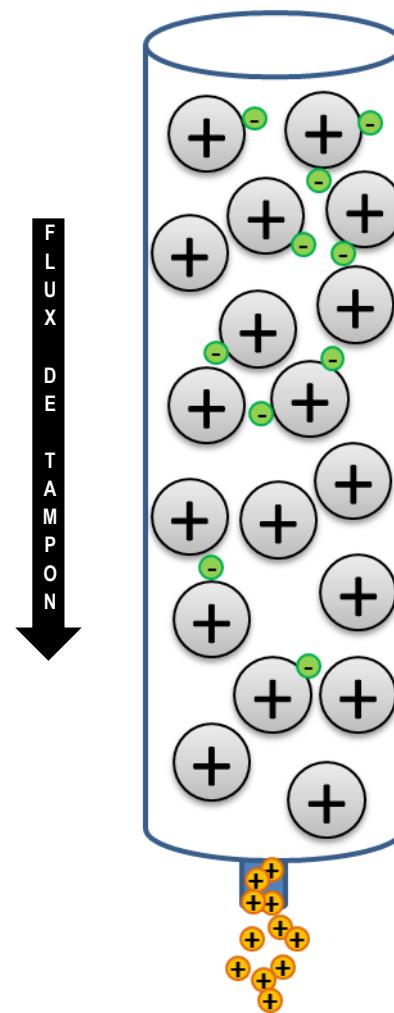
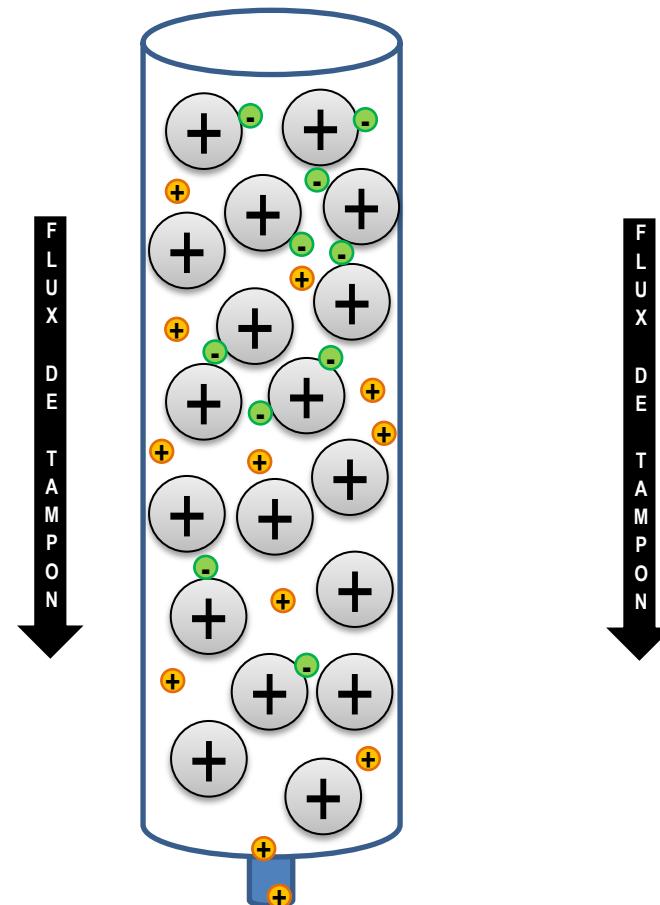
C - Techniques chromatographiques

1 – échange d'ions

charge



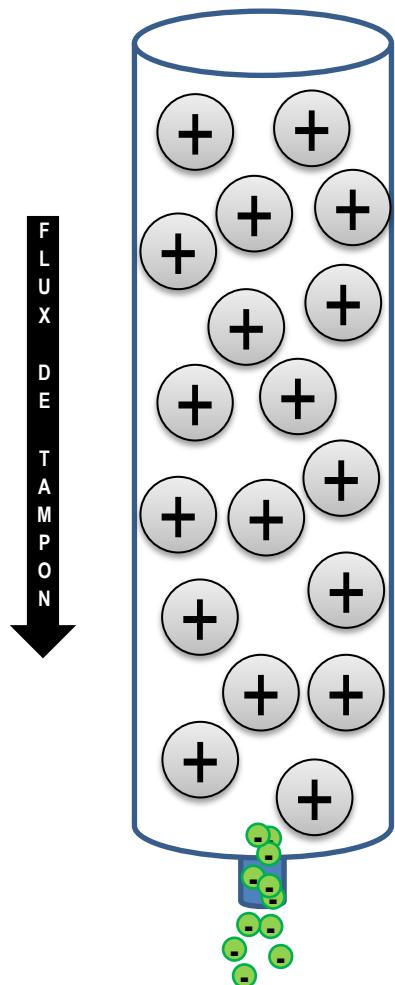
lavage



C - Techniques chromatographiques

1 – échange d'ions

élution



L'élution se réalise :

- *via une augmentation de la concentration en sels :*

Exemple : si $[NaCl]$ augmente dans la colonne, les charges + du Na entrent en compétition avec celles des groupements chimiques de la résine et les charges – du Cl entrent en compétition avec celles de la molécule verte.

- *via une variation de pH du tampon d'élution :*

Exemple : si le pH diminue, la charge de la molécule va passer de négative à neutre puis positive.

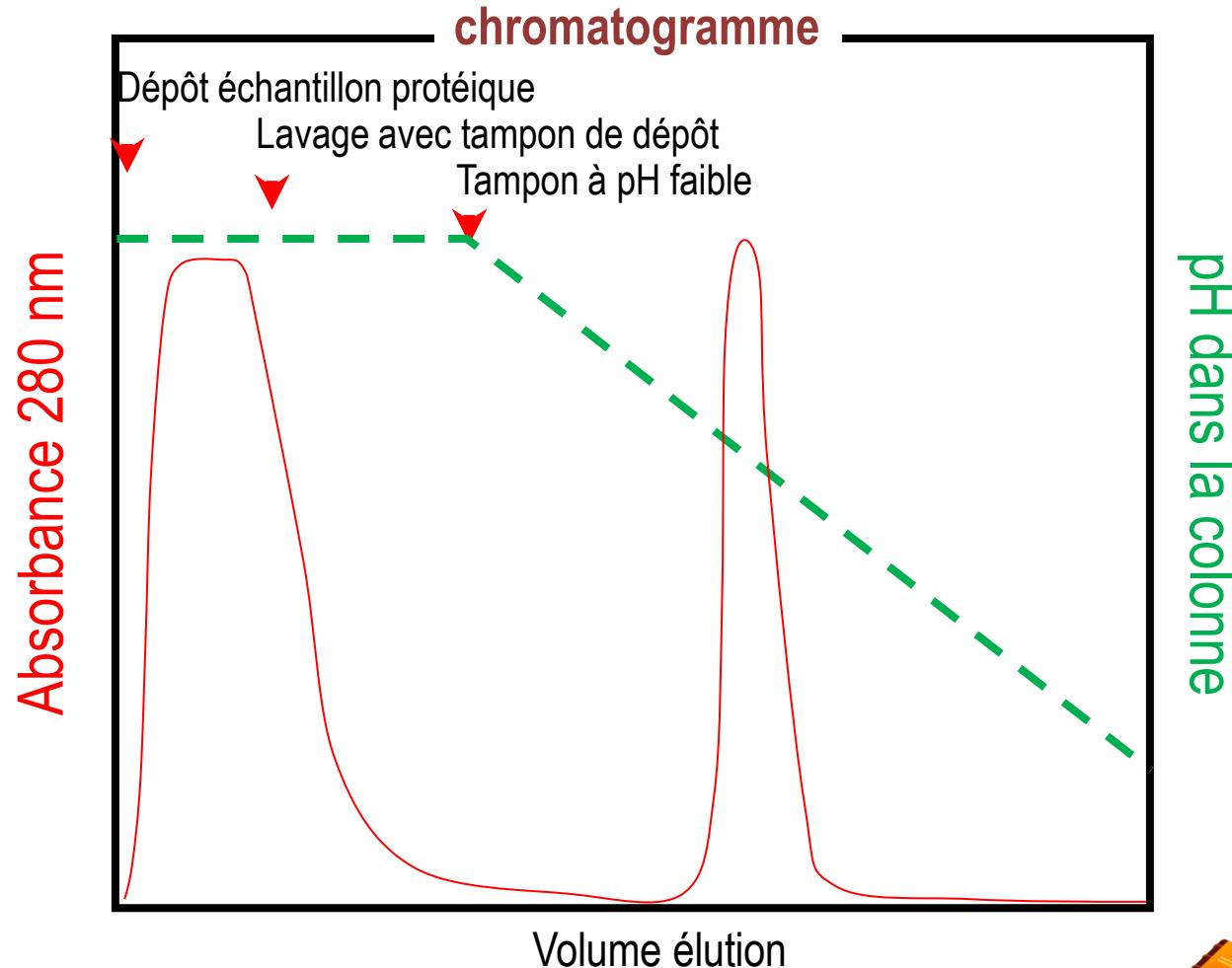
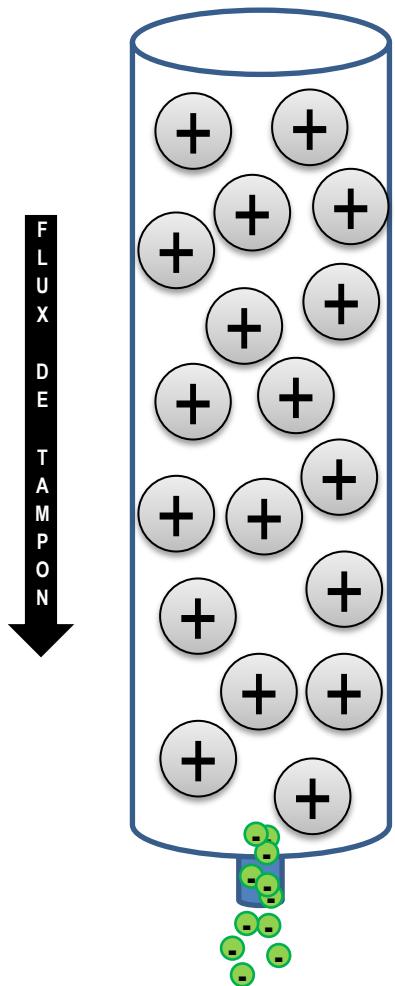
→ La molécule va se détacher du support immobile, elle est éluée.



C - Techniques chromatographiques

1 – échange d'ions

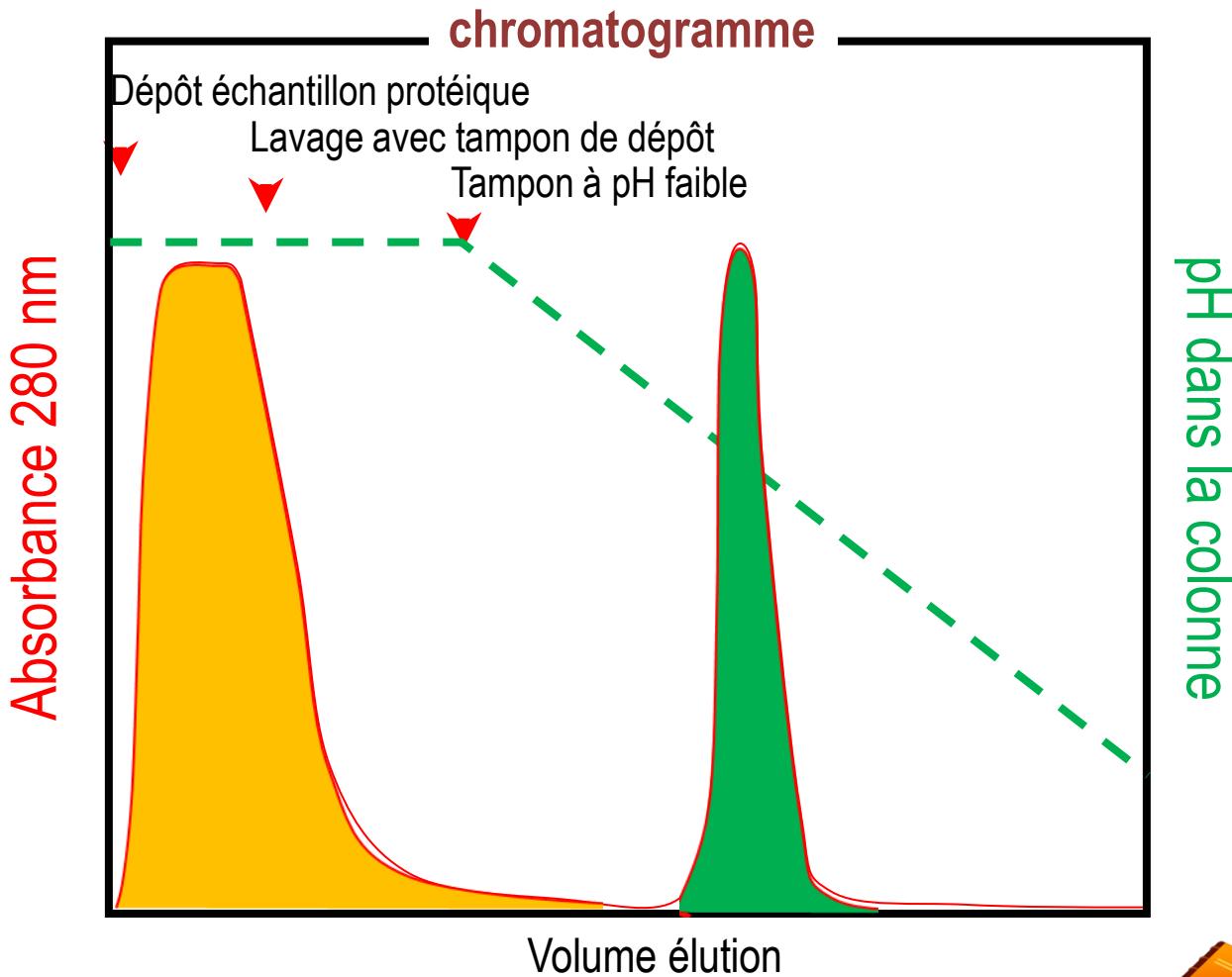
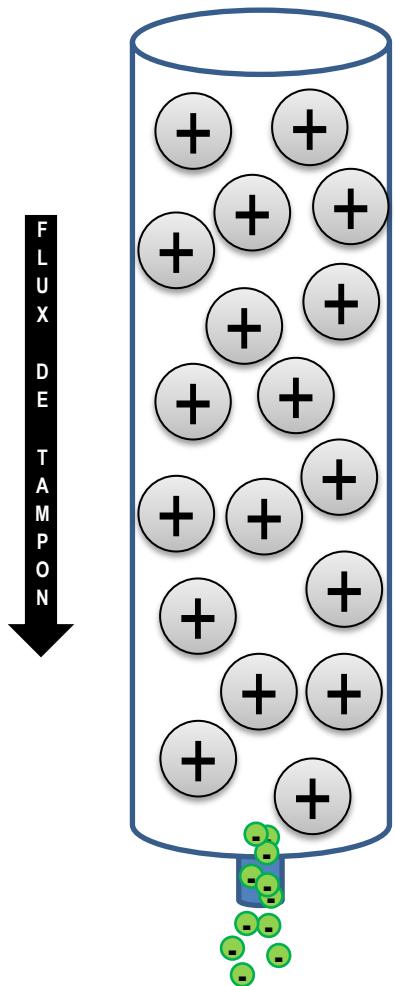
élution



C - Techniques chromatographiques

1 – échange d'ions

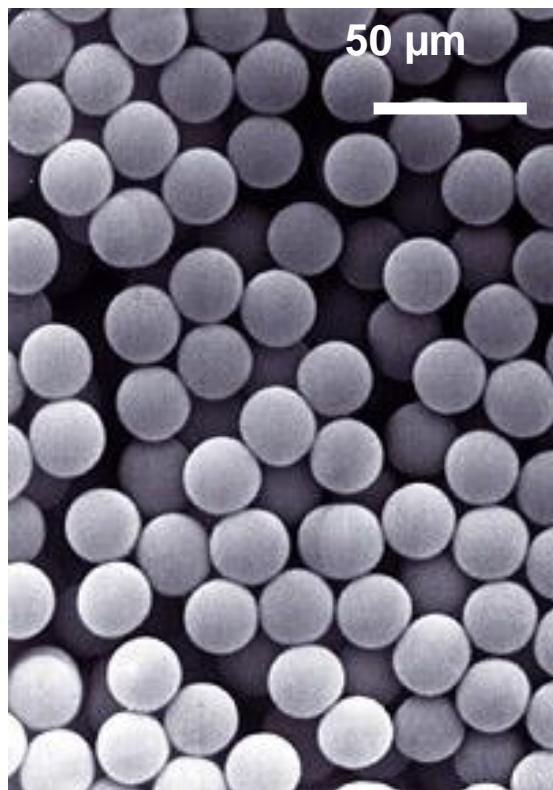
élution



C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

Elle permet de séparer les molécules en **fonction de leur taille** et donc (en approximation) en **fonction de leur poids moléculaire**.



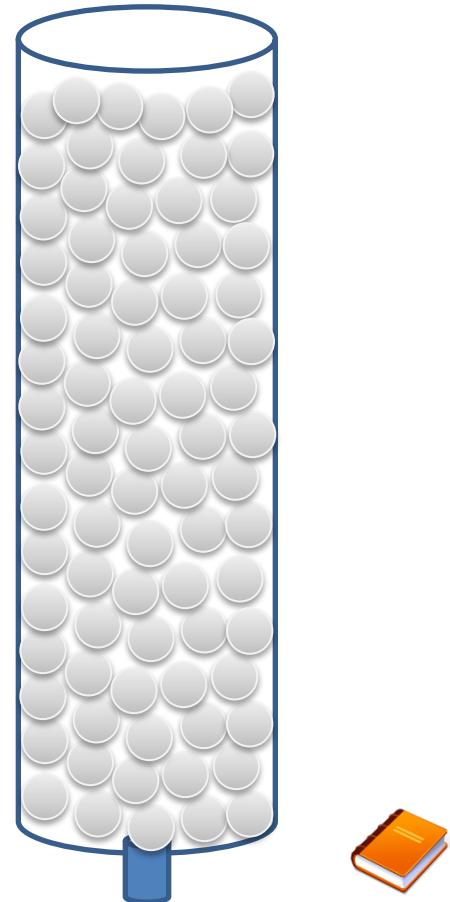
La filtration s'effectue sur **gel de dextrane** (polymère de sucres) de haut poids moléculaire (Sephadex, Sepharose...) : après traitement chimique, ces macromolécules forment des **réseaux poreux à 3 dimensions**.



C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

Les substances dont le poids moléculaire (donc la taille) dépasse le diamètre des pores (« limite du gel ») sont exclues du réseau :

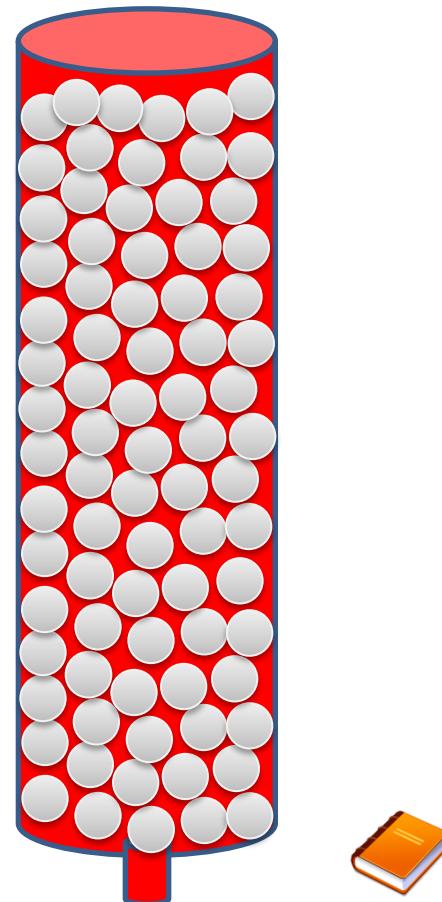


C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

Les substances dont le poids moléculaire (donc la taille) dépasse le diamètre des pores (« limite du gel ») sont exclues du réseau :

→ elles n'ont accès qu'au volume de solvant extérieur aux billes du gel et sortent les premières de la colonne.



C - Techniques chromatographiques

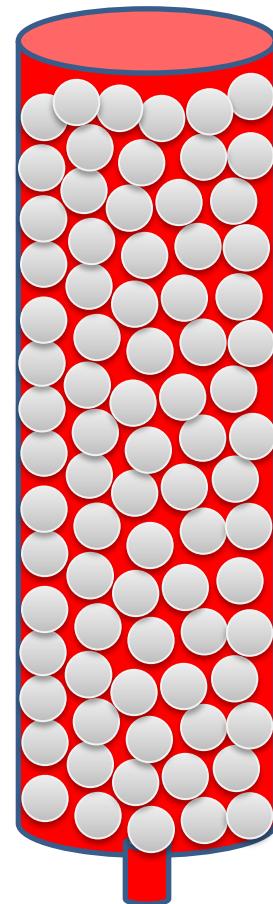
2 – exclusion diffusion

Les substances dont le poids moléculaire (donc la taille) dépasse le diamètre des pores (« limite du gel ») sont exclues du réseau :

→ elles n'ont accès qu'au volume de solvant extérieur aux billes du gel et sortent les premières de la colonne.

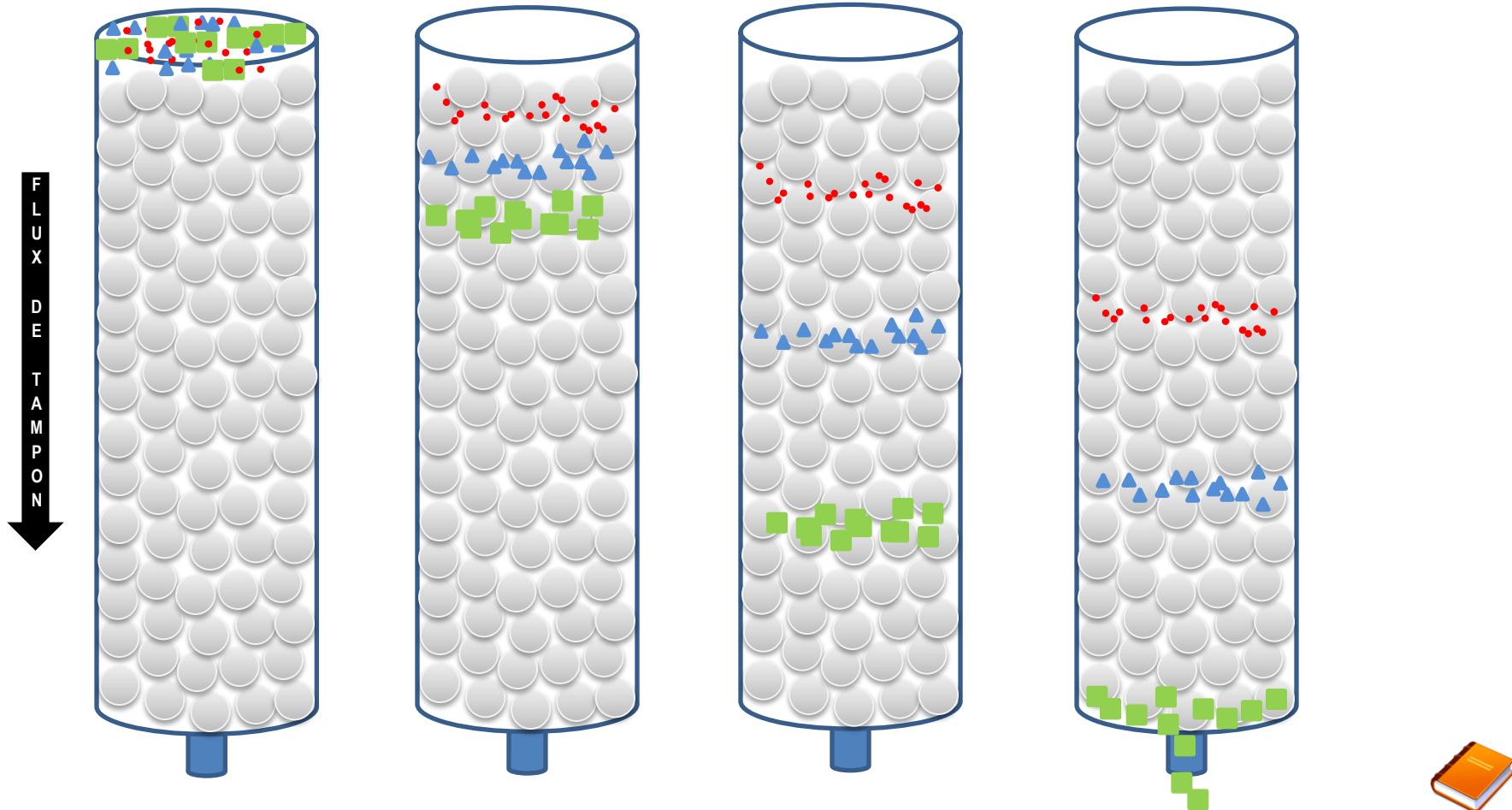
Les molécules de taille plus petite pénètrent aussi dans le réseau 3D des billes de Sephadex :

→ elles ont accès à un plus grand volume dans la colonne et nécessitent un volume de tampon plus important pour les faire sortir.



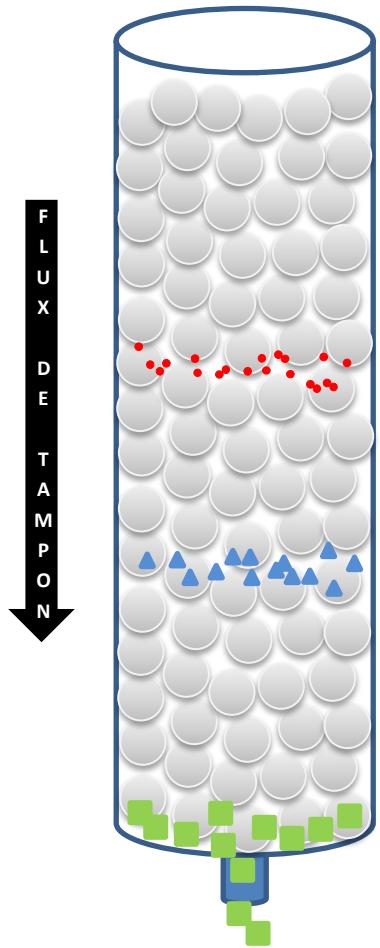
C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

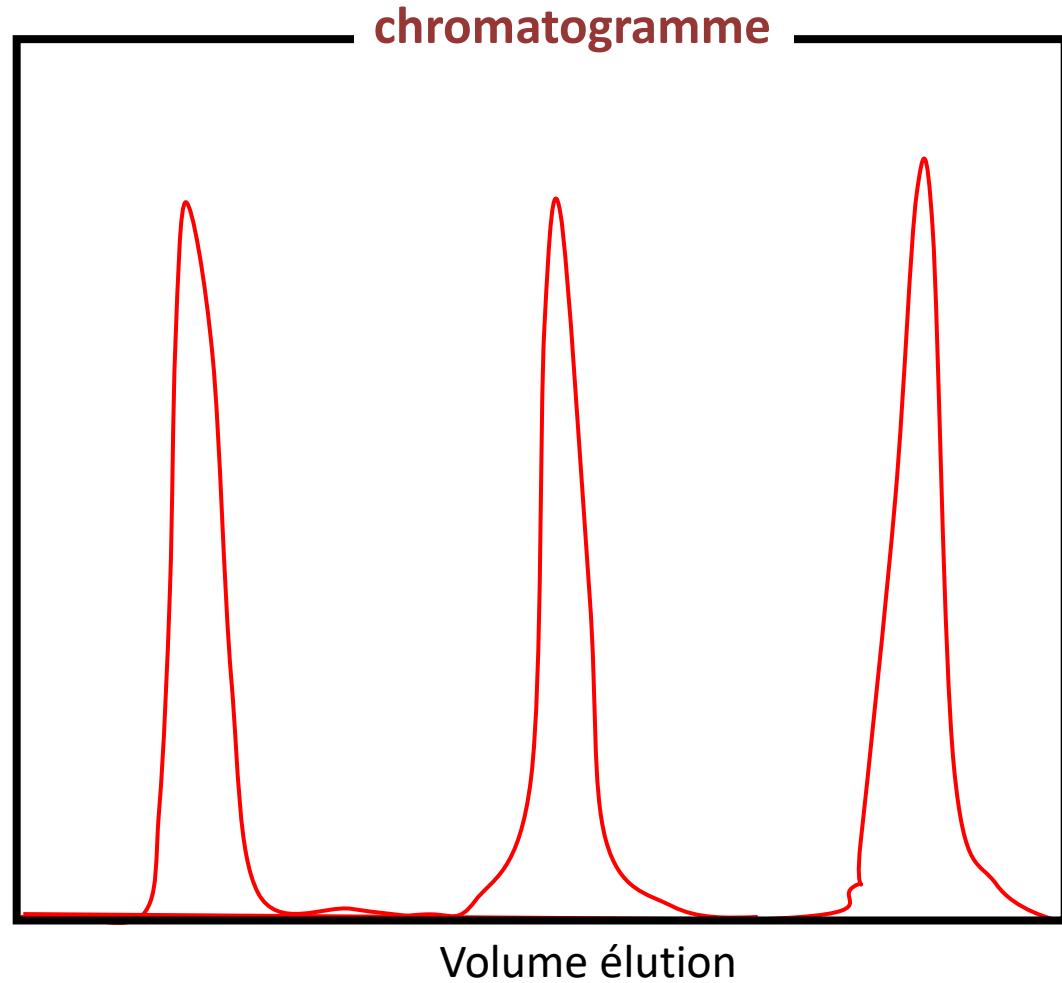


C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

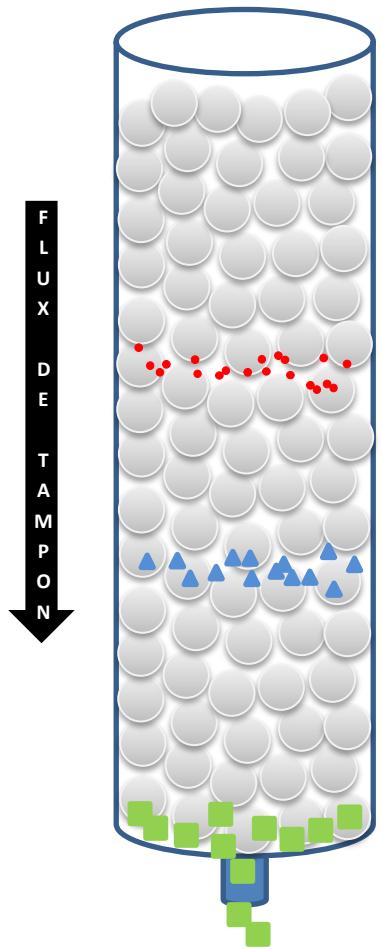


Absorbance 280 nm

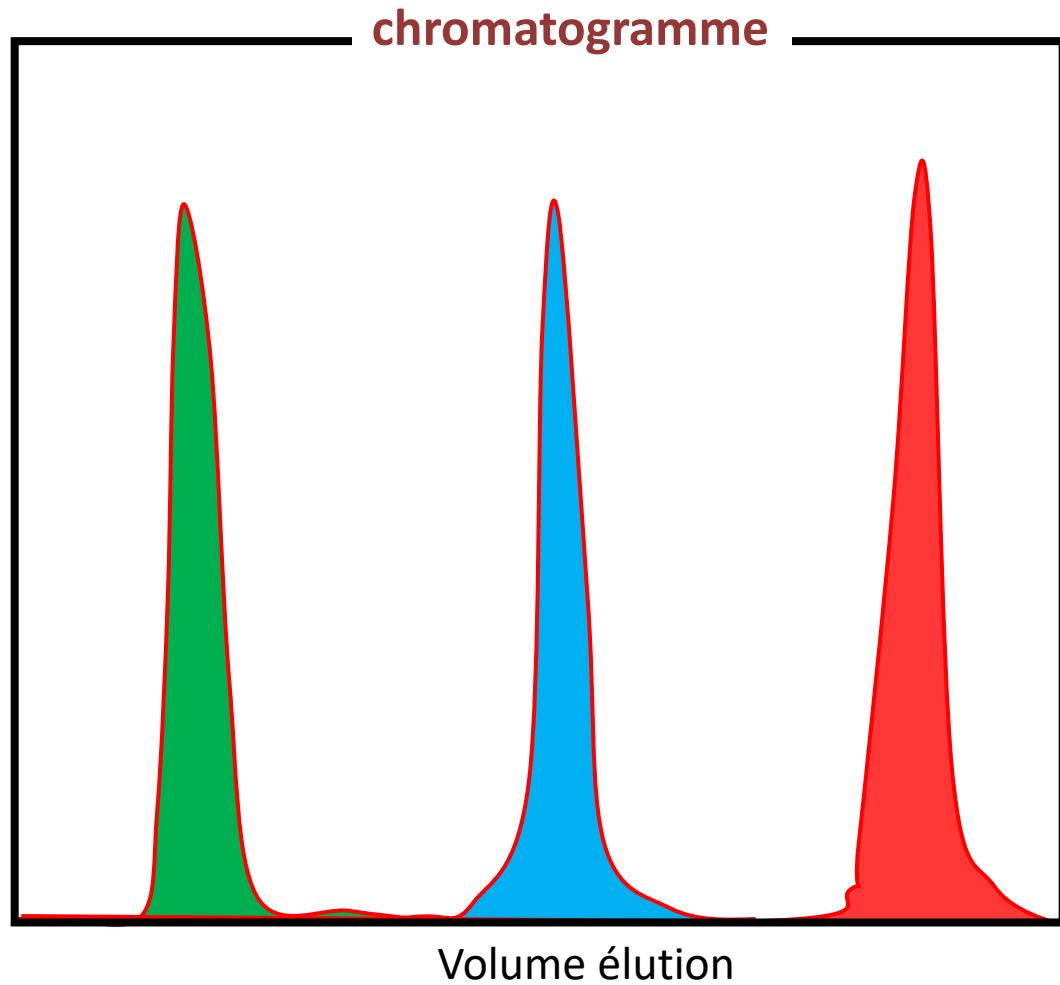


C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion



Absorbance 280 nm



C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

Cette technique permet de **séparer des molécules selon leur taille et leur forme en solution.**

Une estimation de la masse molaire des molécules séparées est possible → calibration de la colonne par des molécules de masses molaires connues.

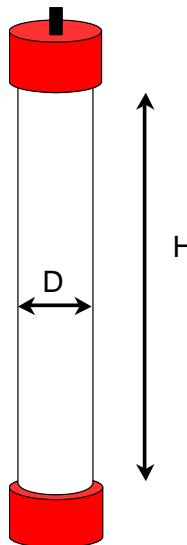
Le paramètre expérimental à déterminer :

→ **constante de volume de colonne accessible** de la molécule.



C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion



$$V_t = \Sigma \text{ volume des billes} + \text{volume extérieur aux billes}$$

V_t = volume d'élution d'une molécule de très faible masse molaire (100 Da)

$$V_t = H \times \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

$$V_0 = \text{volume d'élution d'une molécule exclue} = \text{volume extérieur aux billes} \\ = V_t - \text{volume des billes}$$

$$V_e = \text{volume d'élution d'une molécule X} = V_0 + \text{volume des billes traversées}$$

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

+ la molécule est petite

+ le volume des billes traversées ↗

+ V_e tendra vers V_t

$$K_{av} \rightarrow 1$$



C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion

K_{av} = constante de volume accessible

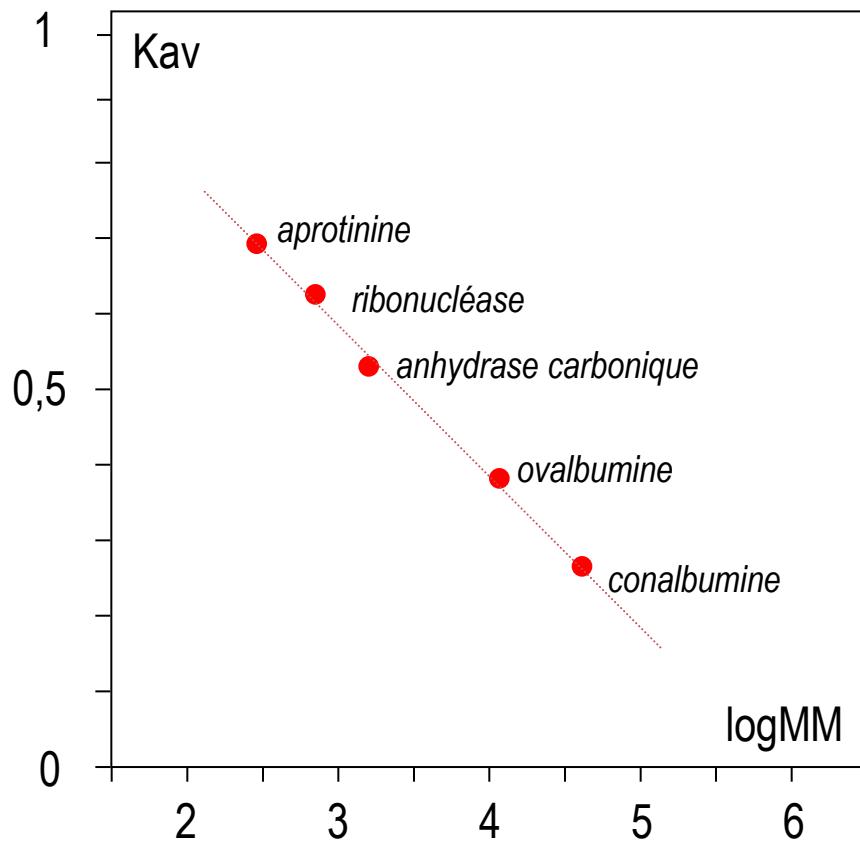
→ estimer la MM d'une protéine inconnue

(fraction des billes accessible aux molécules)

Mélange injecté (témoins)

NOM	kDa
Aprotinine	6,5
Ribonucléase	13,7
Anhydrase carbonique	29
Ovalbumine	43
Conalbumine	75

- MM connue
- K_{av} calculé



C - Techniques chromatographiques

3 – affinité

- Ce type de chromatographie met à profit l'**affinité** de la molécule à purifier pour une seconde molécule (appelée **ligand**) fixée sur la phase stationnaire :

enzyme/substrat ou enzyme/cofacteur

antigène/anticorps

glycoprotéine/lectine

hormone/récepteur.

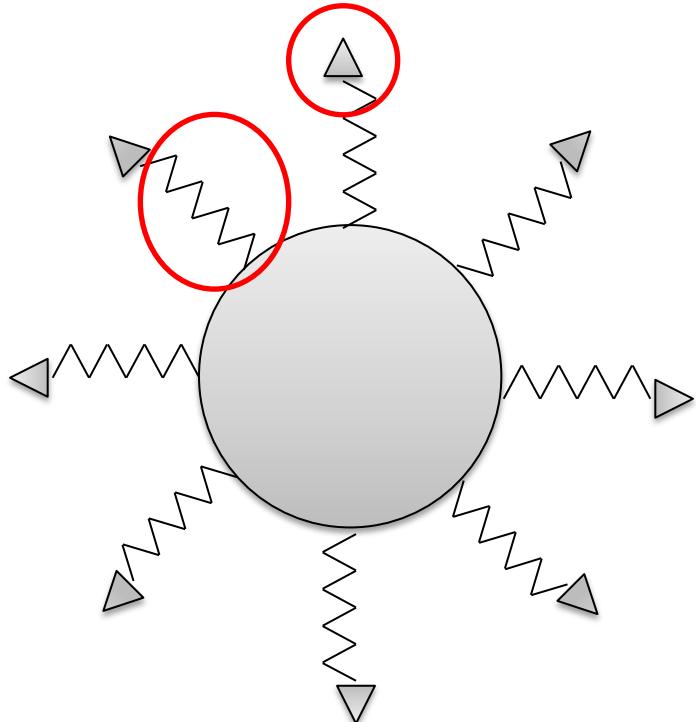
- 1^{ère} étape : **fixer de façon covalente le ligand sur la phase stationnaire** (utilisation d'un groupement chimique réactif).
- L'élution se fait grâce à un excès libre de ligand, un saut de pH ou une augmentation de la force ionique de la phase mobile.

C - Techniques chromatographiques

3 – affinité

La fixation du ligand sur la résine se fait *via* un bras chimique appelé **espaceur**.

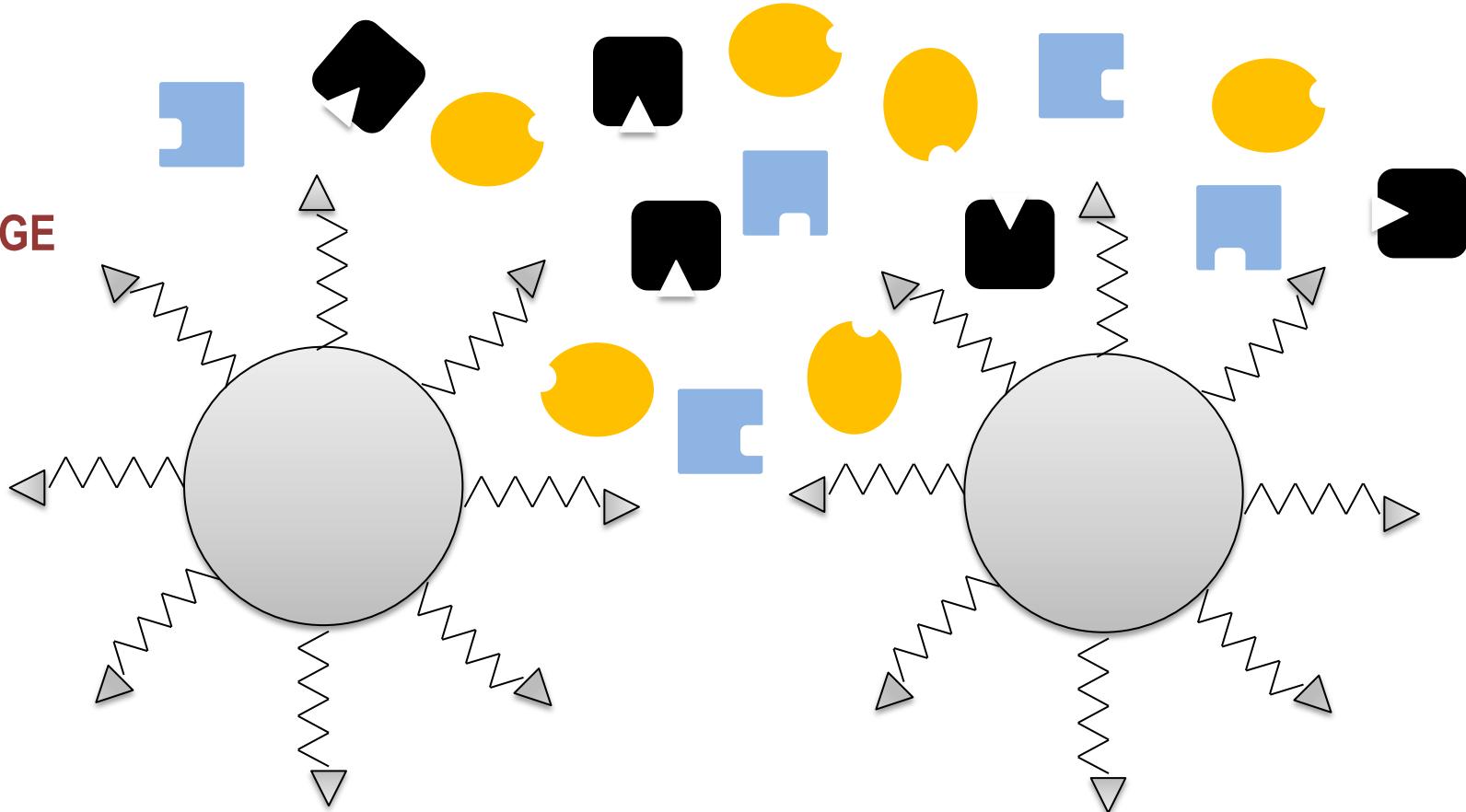
La molécule qui a de l'affinité pour le ligand se fixe alors que les autres molécules du mélange traversent la colonne.



C - Techniques chromatographiques

3 – affinité

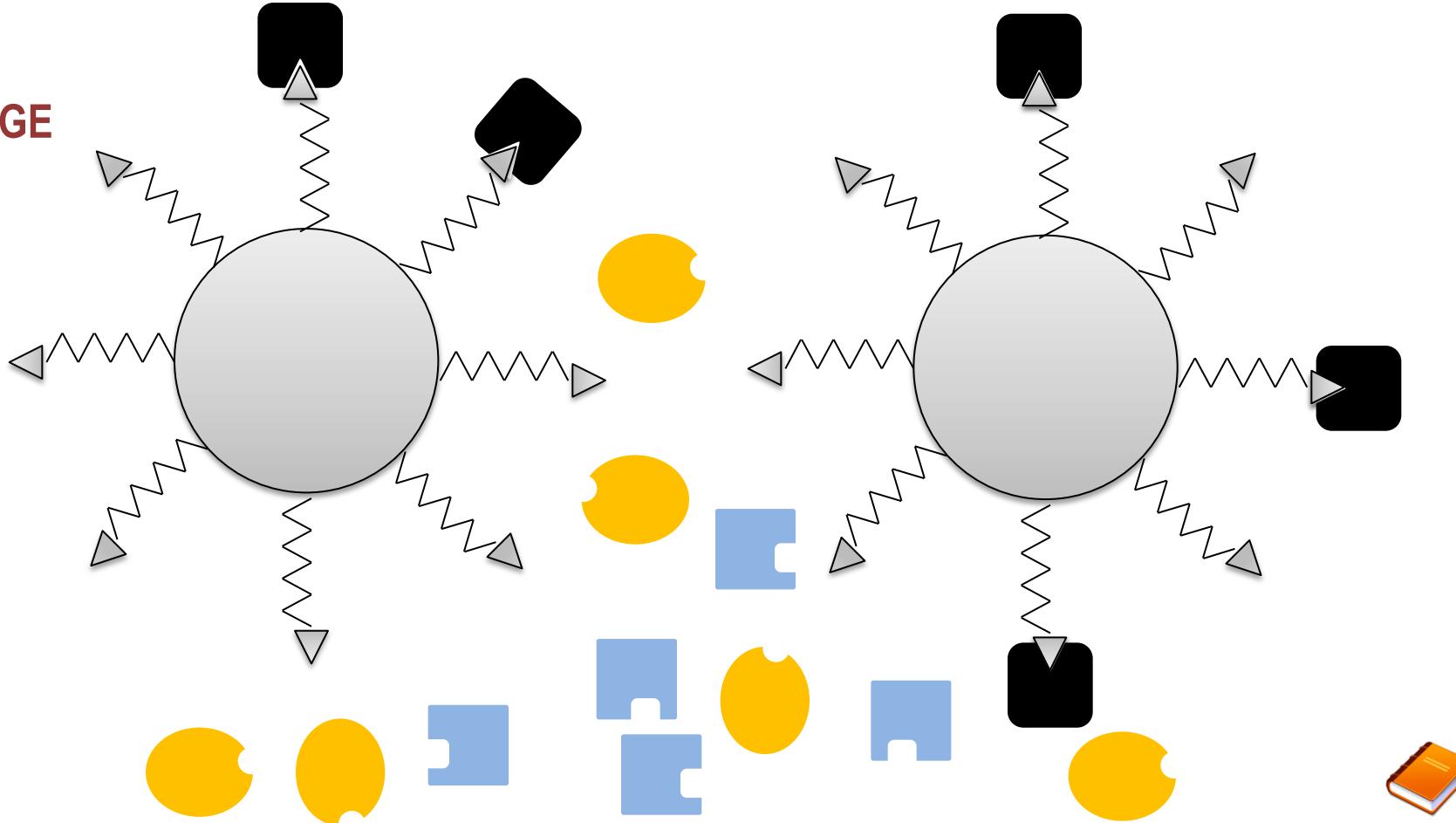
CHARGE



C - Techniques chromatographiques

3 – affinité

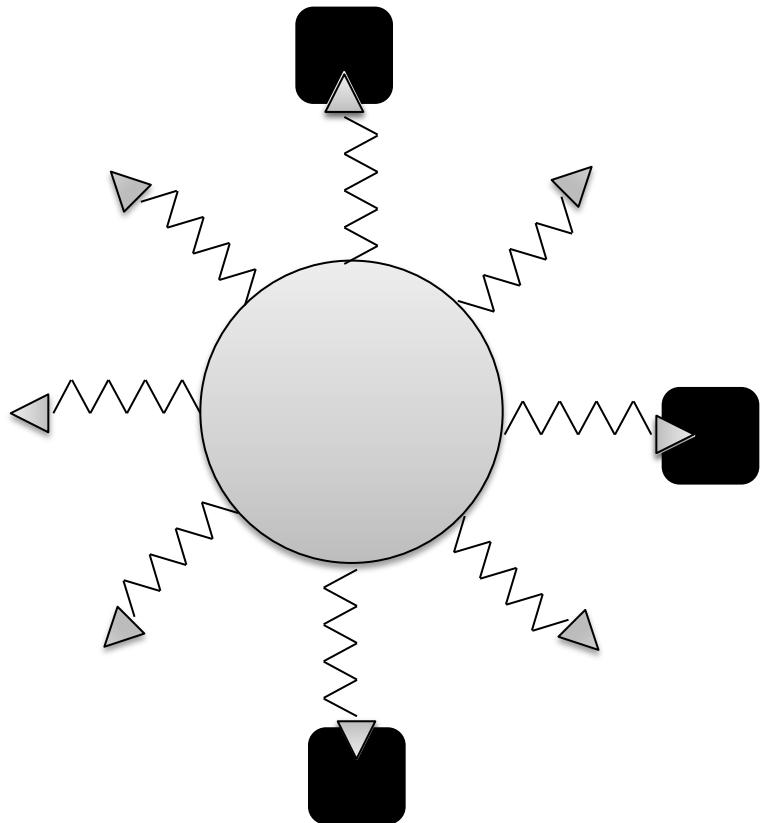
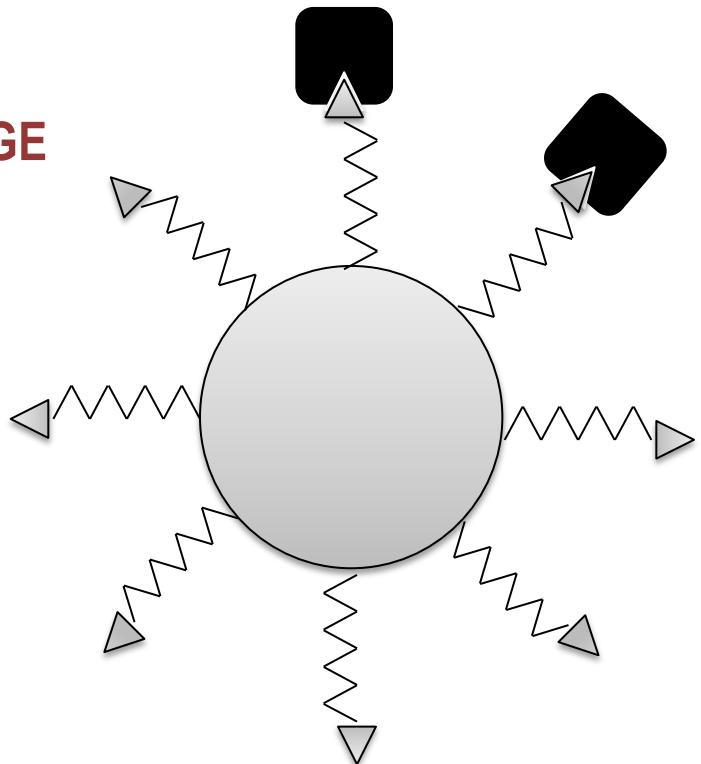
CHARGE



C - Techniques chromatographiques

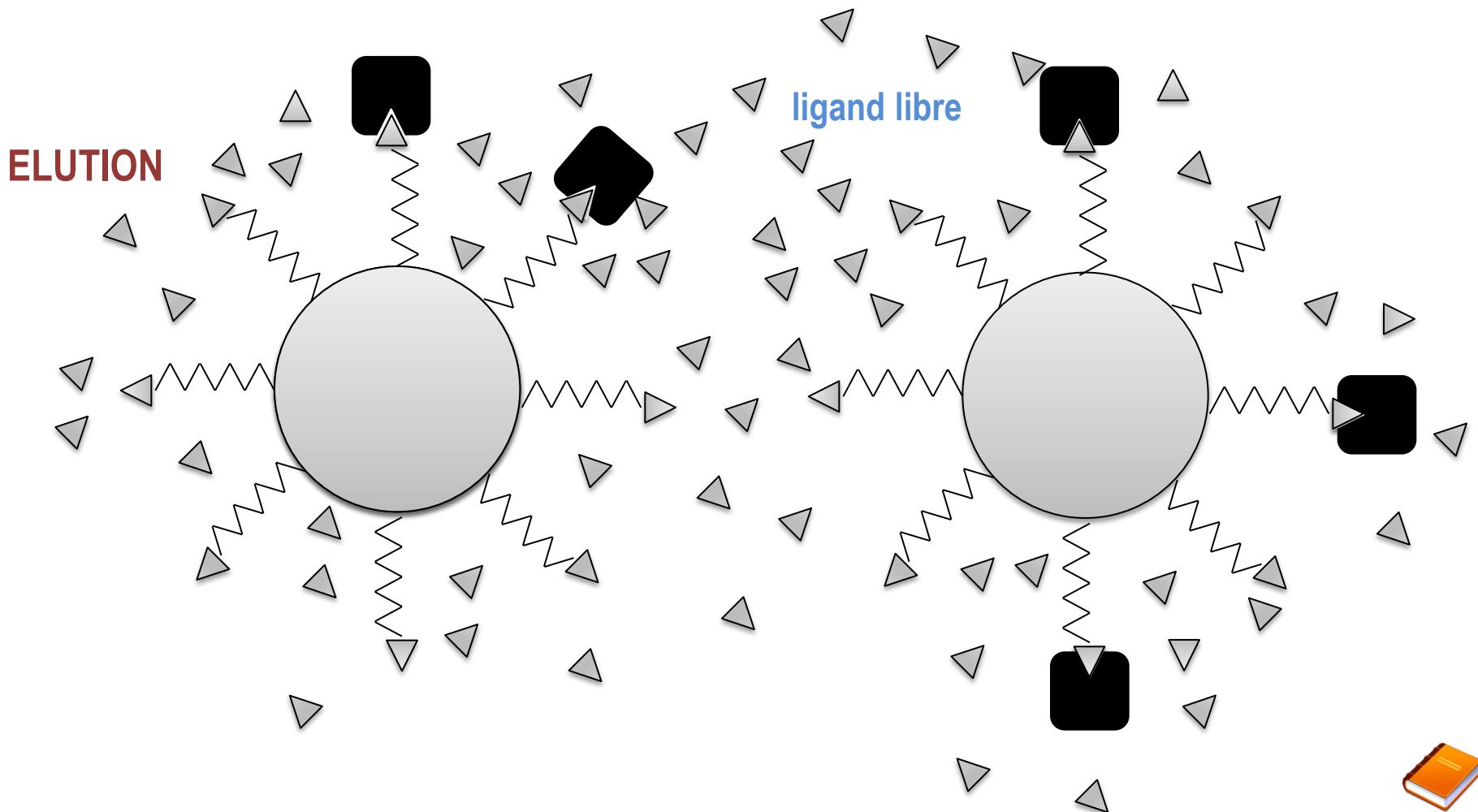
3 – affinité

LAVAGE



C - Techniques chromatographiques

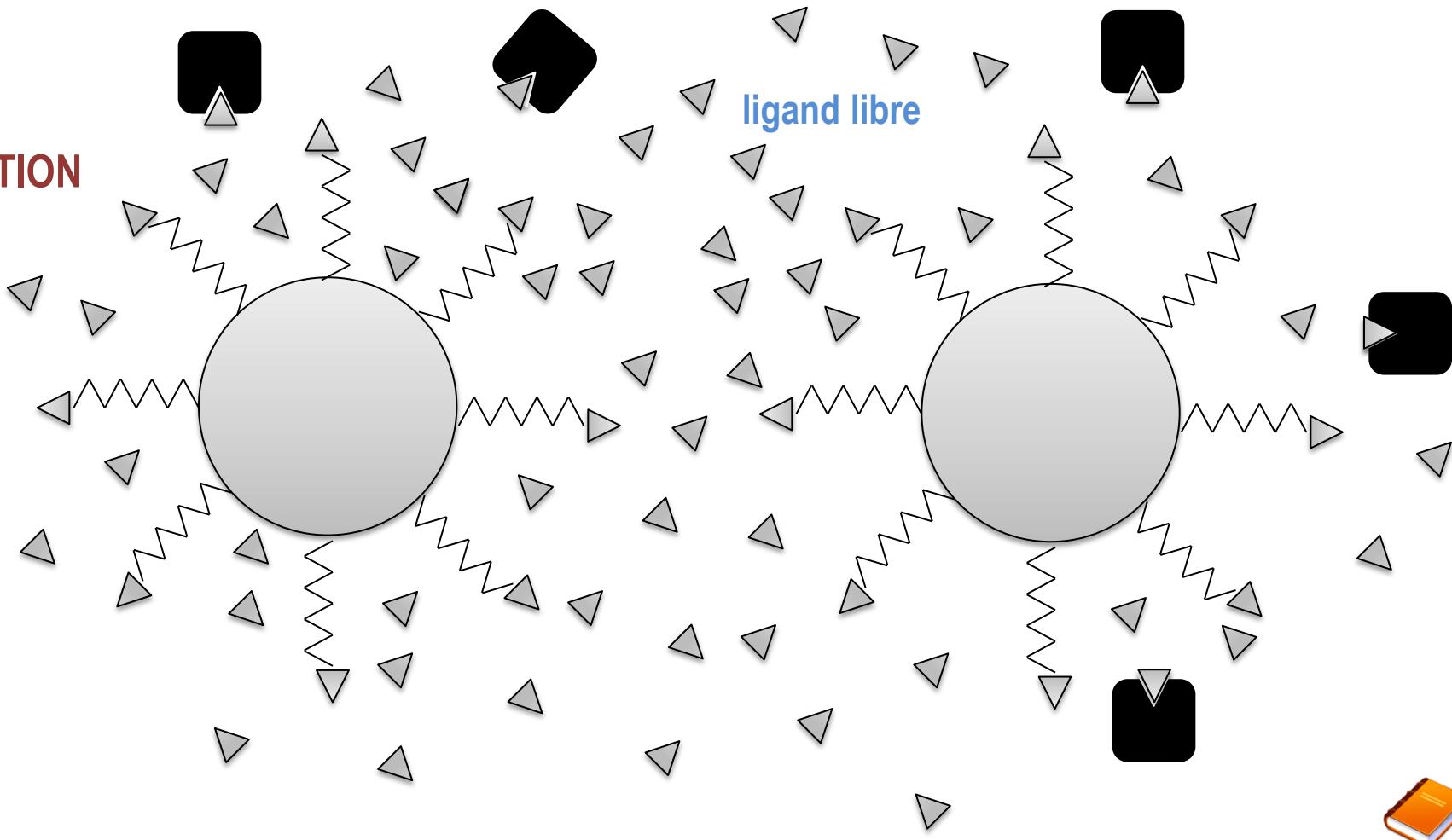
3 – affinité



C - Techniques chromatographiques

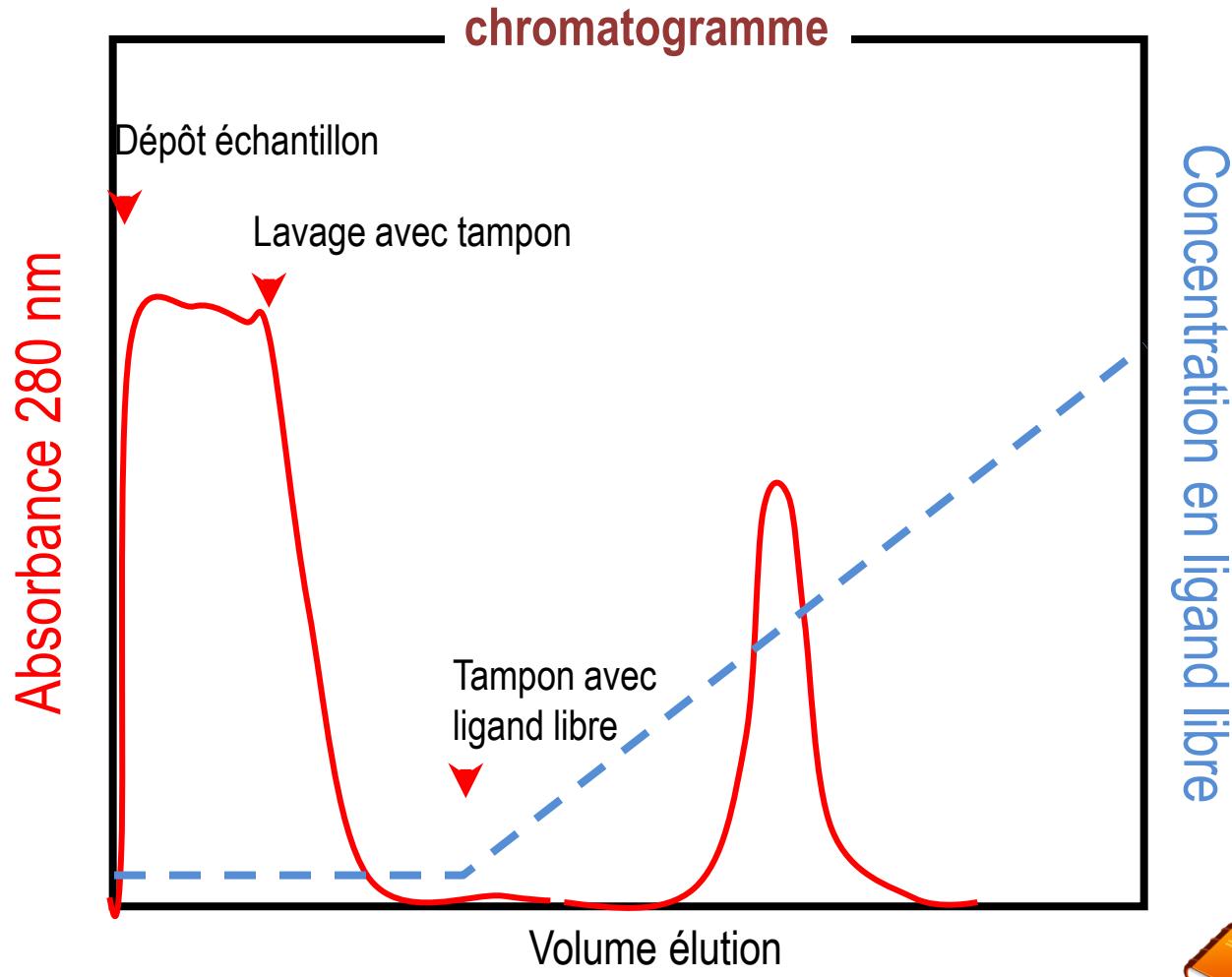
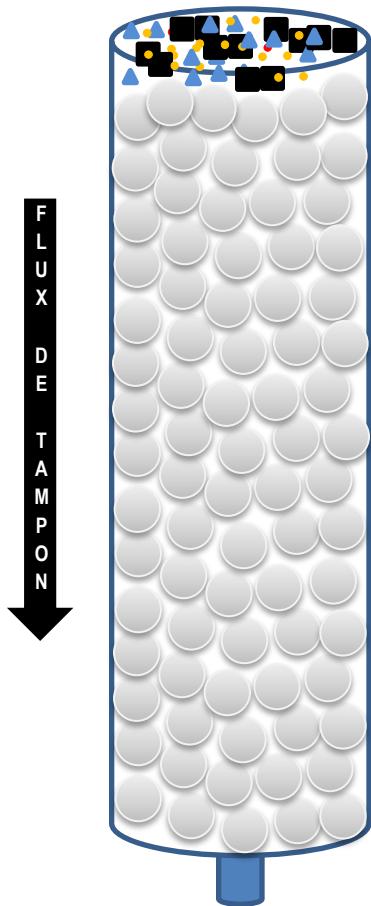
3 – affinité

ELUTION



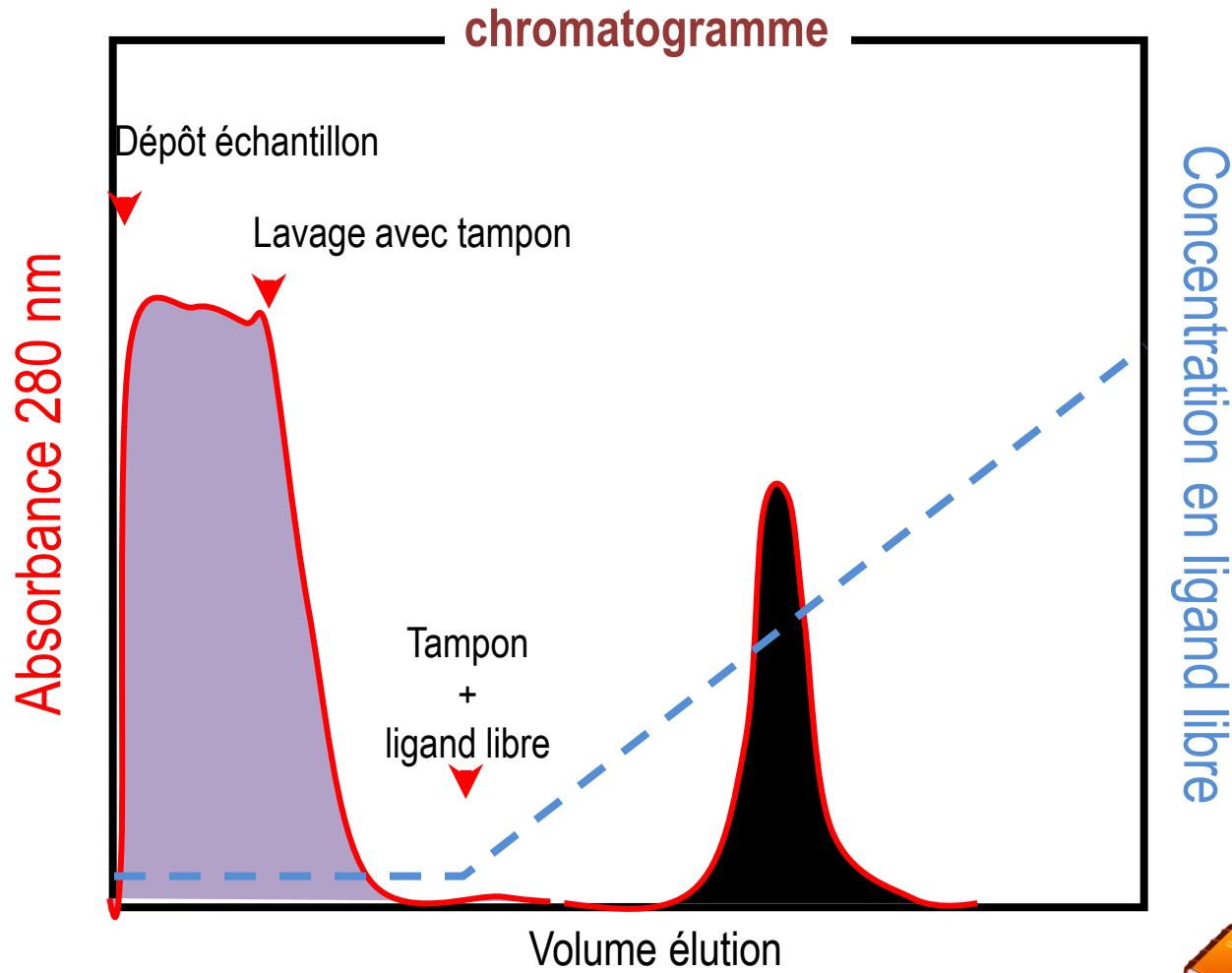
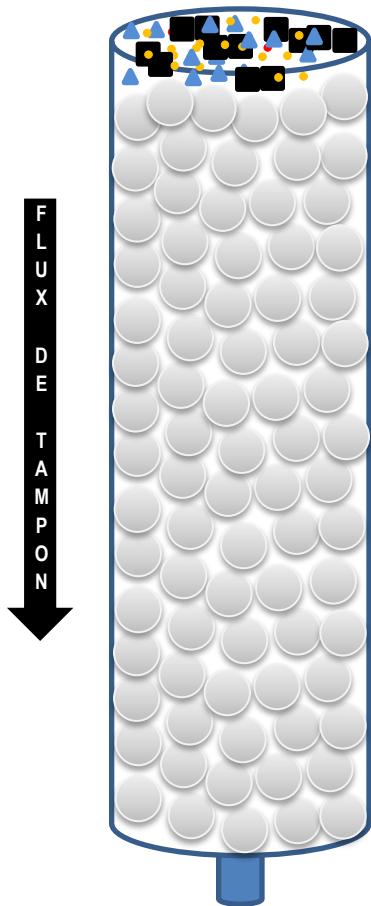
C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



D - Techniques électrophorétiques

1 – électrophorèse sur papier



Tampon de migration



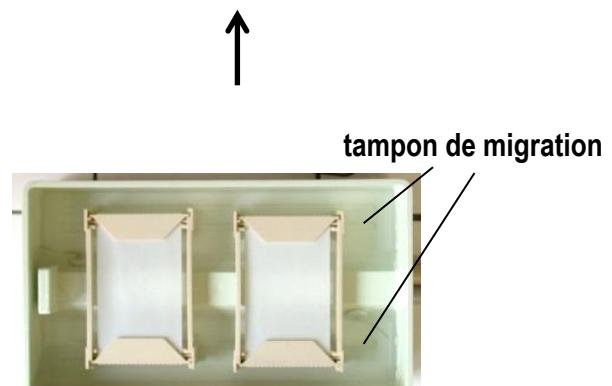
Essorage



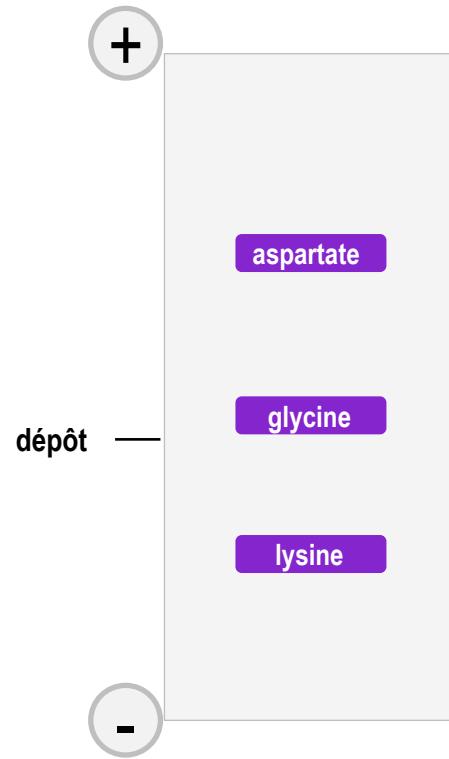
Fixation sur support



Migration sous champs électrique



Mise en place dans la cuve



Tampon de migration pH 6,25

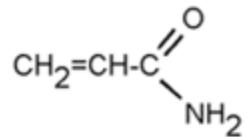


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'**acrylamide** est une petite molécule

acrylamide

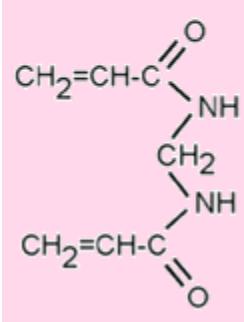
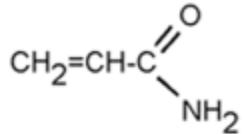


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'**acrylamide** est une petite molécule qui peut former un **polymère réticulé** dans certaines conditions et en présence de **méthylène bisacrylamide**.

acrylamide



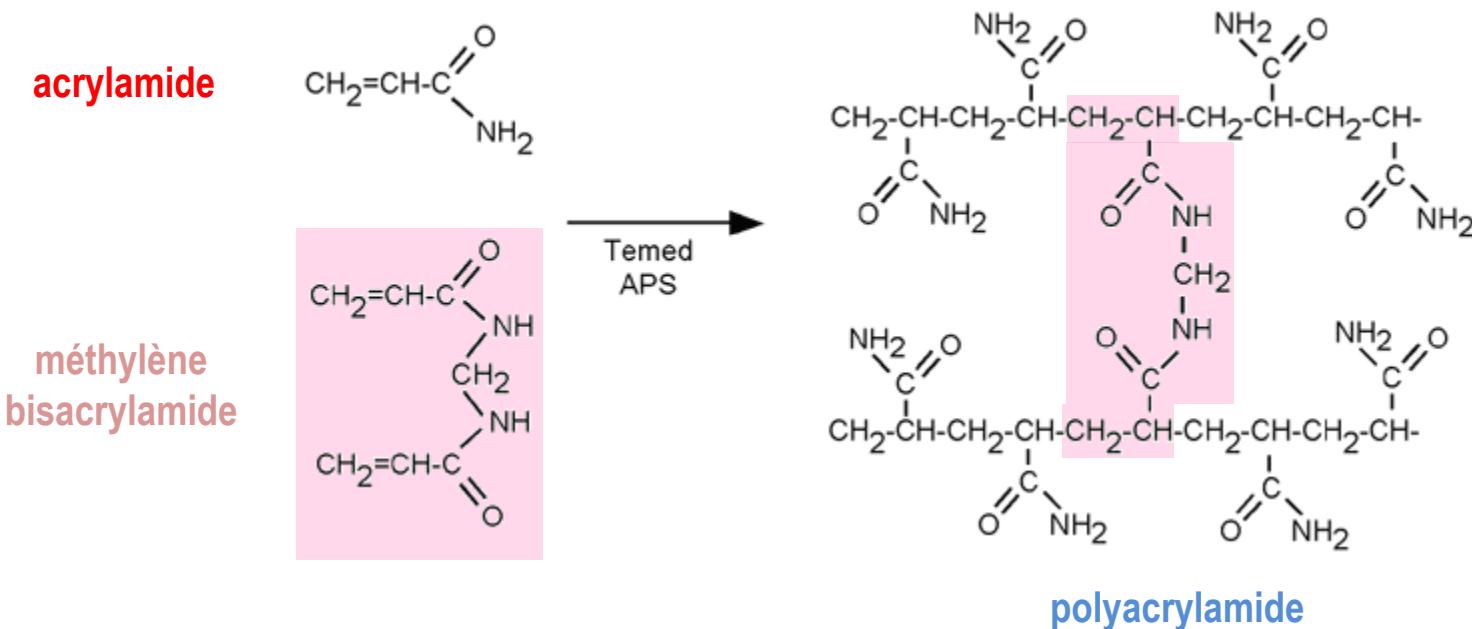
méthylène bisacrylamide



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

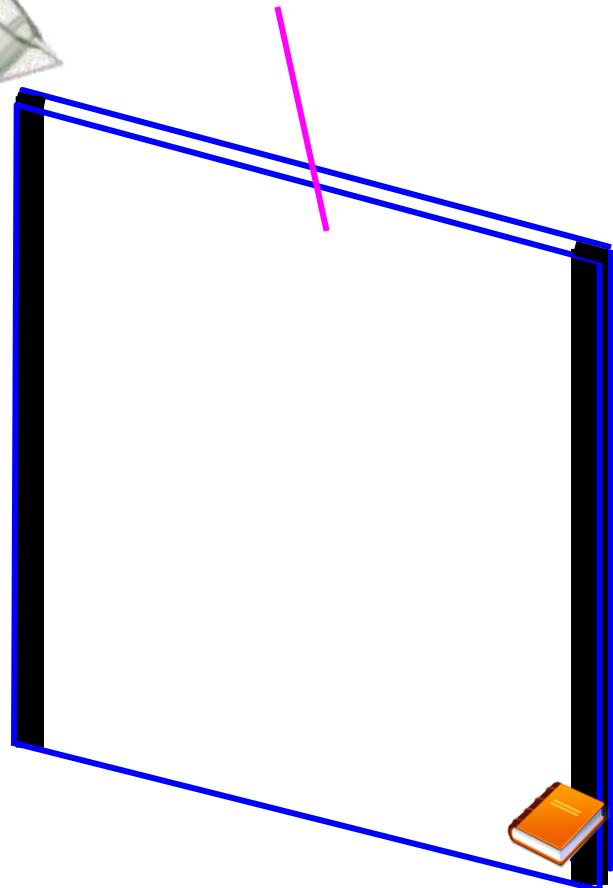
Acrylamide et méthylène bisacrylamide, en présence de 2 autres molécules (catalyseurs) vont former un gel composé d'un réseau de mailles :



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

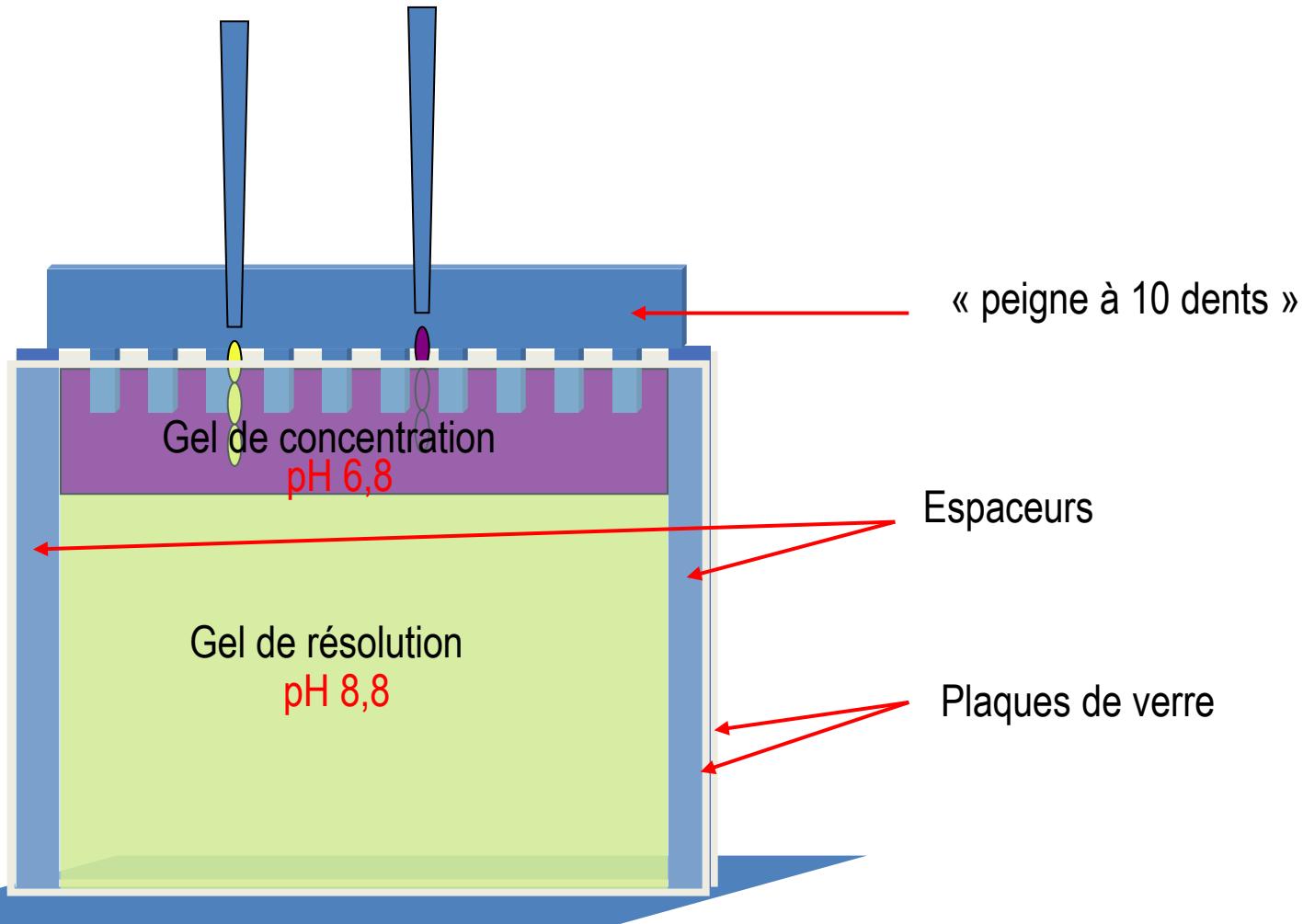
Acrylamide/bisacrylamide
Tampon Tris pH6,8 ou 8,8
SDS
Persulfate d'ammonium
TEMED



Le gel d'acrylamide
polymérise entre
2 plaques de verre

D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

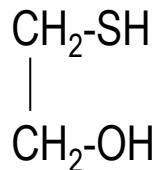


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

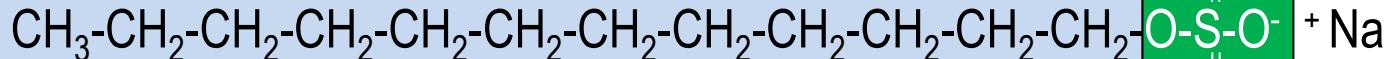
Préparation des échantillons protéiques

Les protéines sont incubées en présence de :

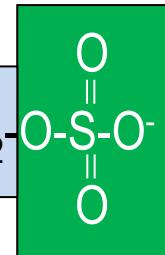


- détergent anionique (SDS : sodium dodécyl sulfate)
- agent réducteur (β mercaptoéthanol) : rompt les ponts disulfure
- tampon de haute densité (glycérol) / colorant bleu.
- 5 minutes à 100°C.

Partie chargée négativement



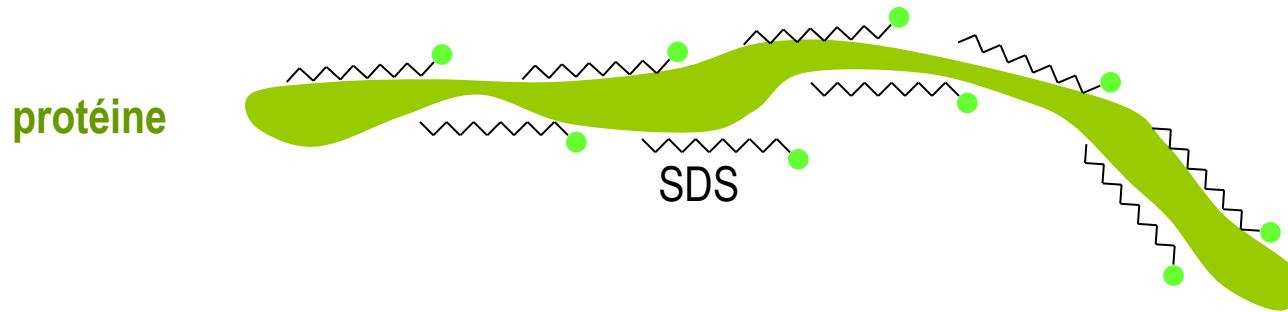
Partie hydrophobe



D - Techniques électrophorétiques

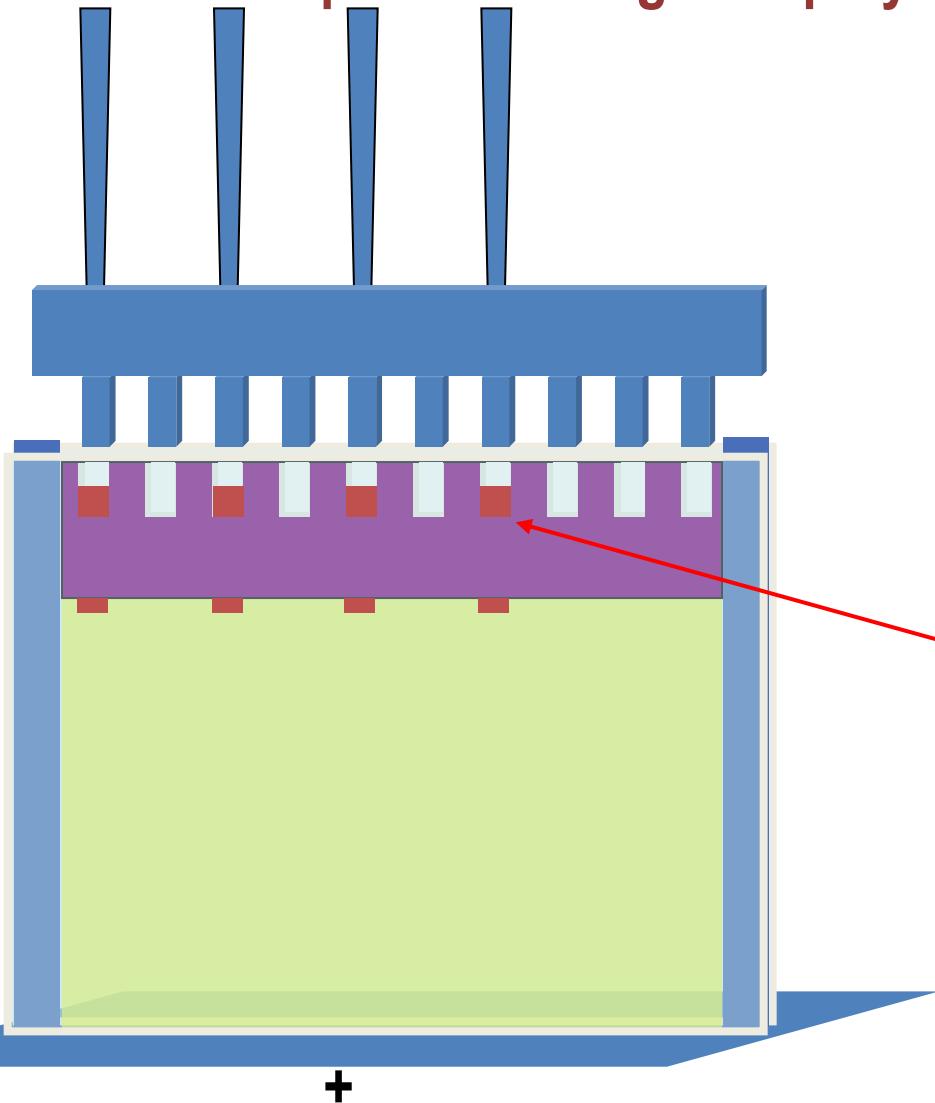
2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Les protéines sont « nappées » de SDS et ont un rapport masse/charge négative constant.



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



échantillon protéique dans un
milieu dense (exemple :
glycérol)



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

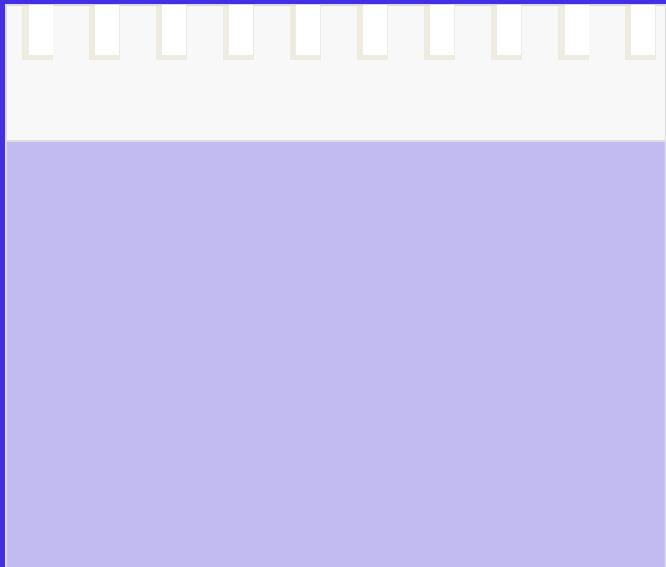
Après dépôt des protéines, le gel est mis **sous tension**.

La migration se fait dans un tampon Tris, glycine, SDS à pH 8,3.



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

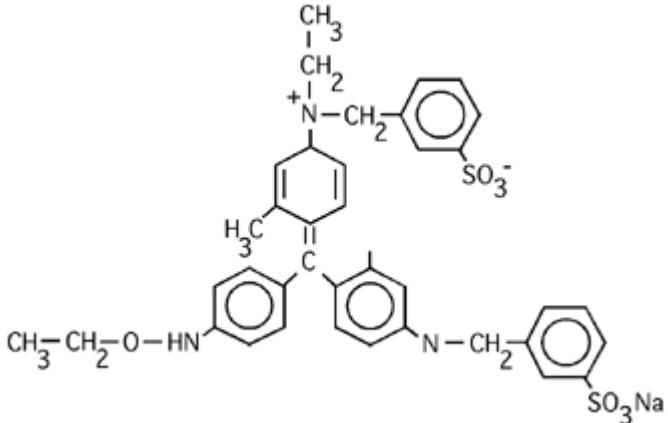


Bain colorant

COLORATION

- Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1 µg



bleu de Coomassie

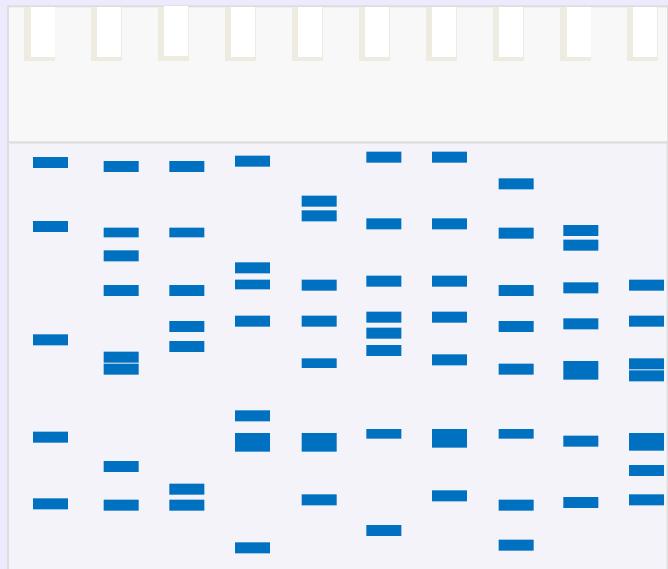
- Nitrate d'argent

Limite de détection : 10 ng



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

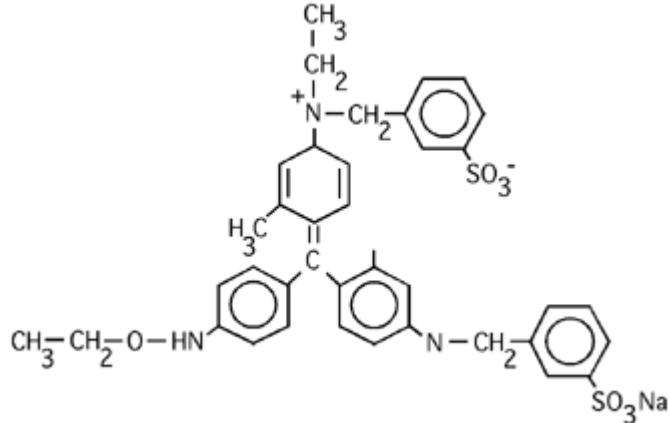


Bain décolorant

COLORATION

- Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1 µg



bleu de Coomassie

- Nitrate d'argent

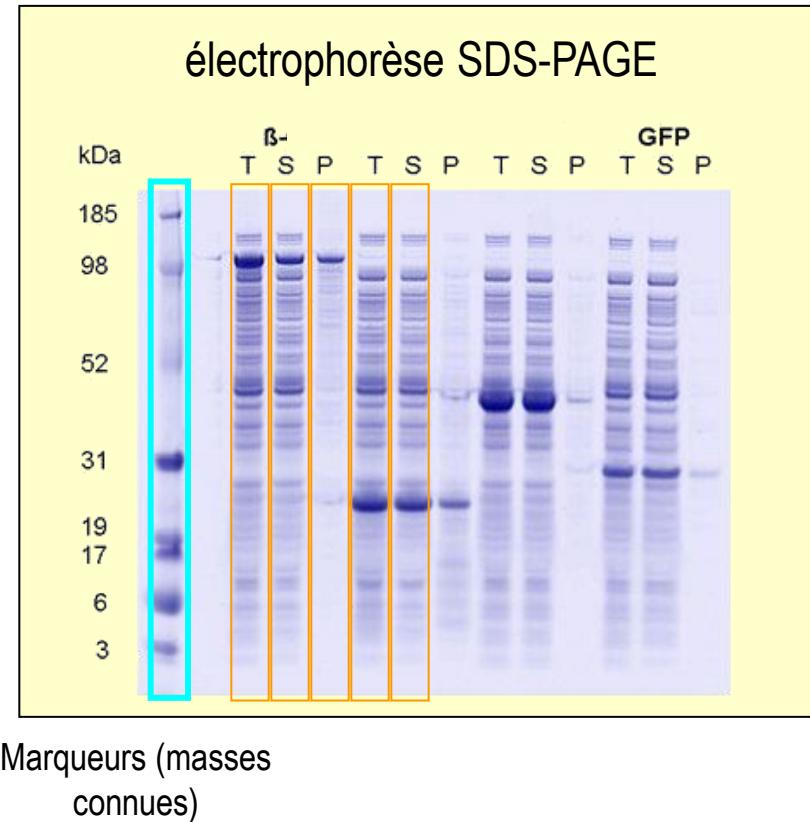
Limite de détection : 10 ng

Estimation de la masse moléculaire des protéines : précision 5-10%



D - Techniques électrophorétiques

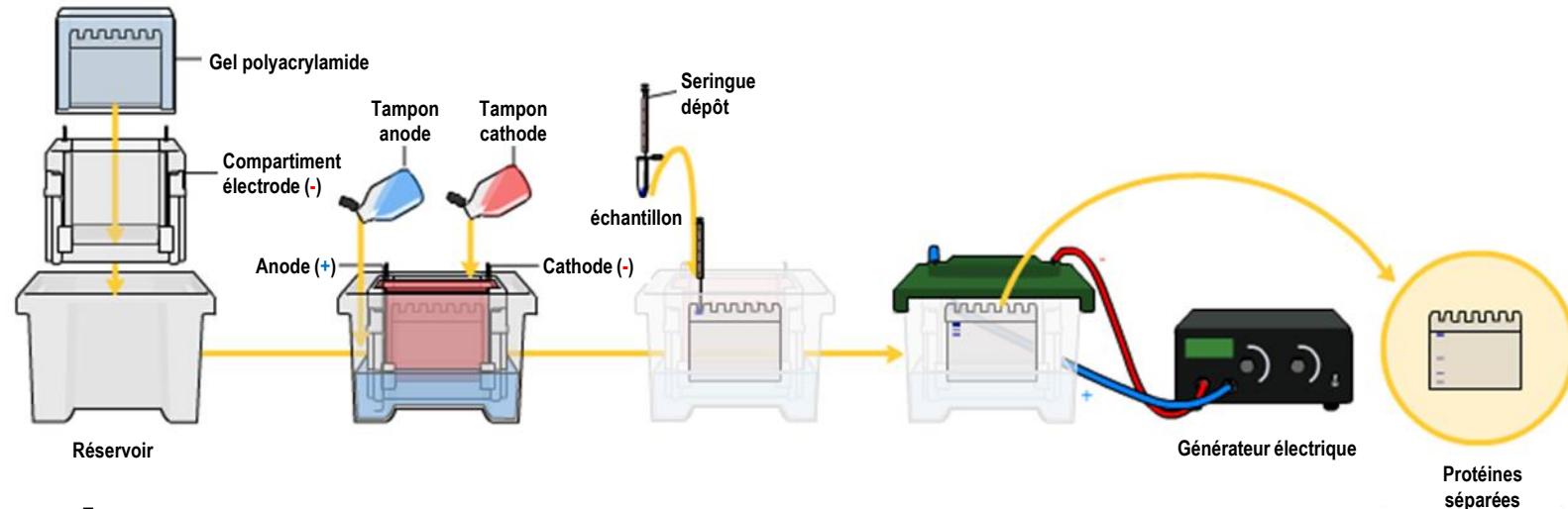
2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



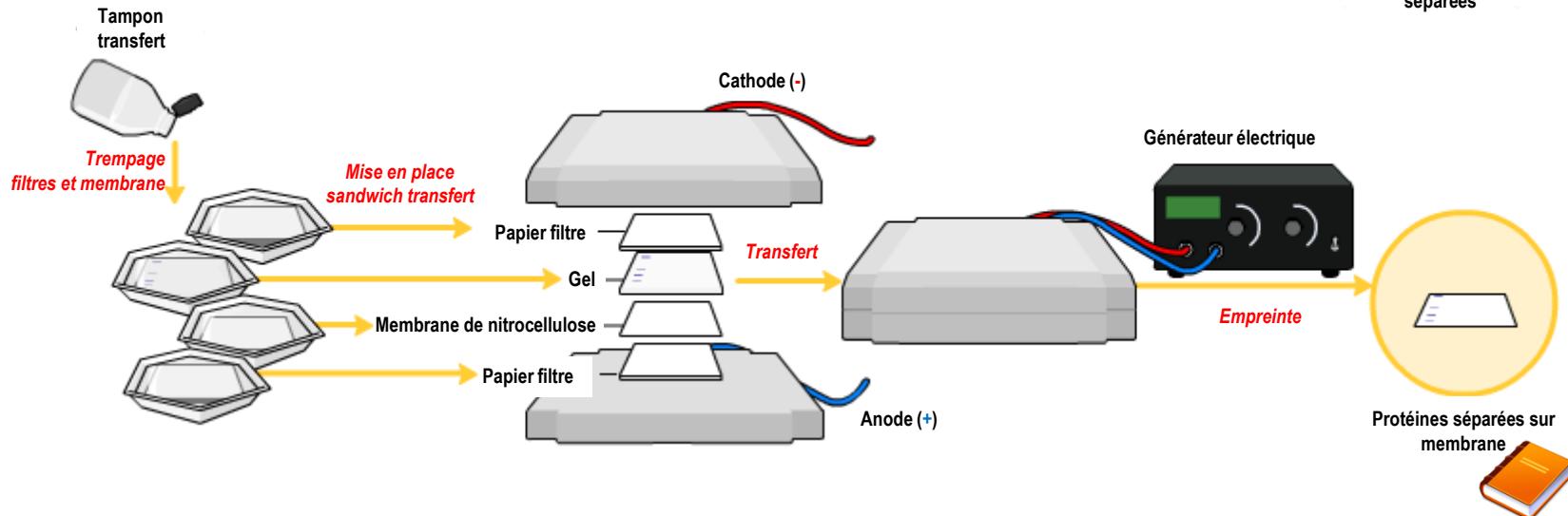
E - Techniques immunoenzymatiques

1- Western Blot

1^{ère} étape

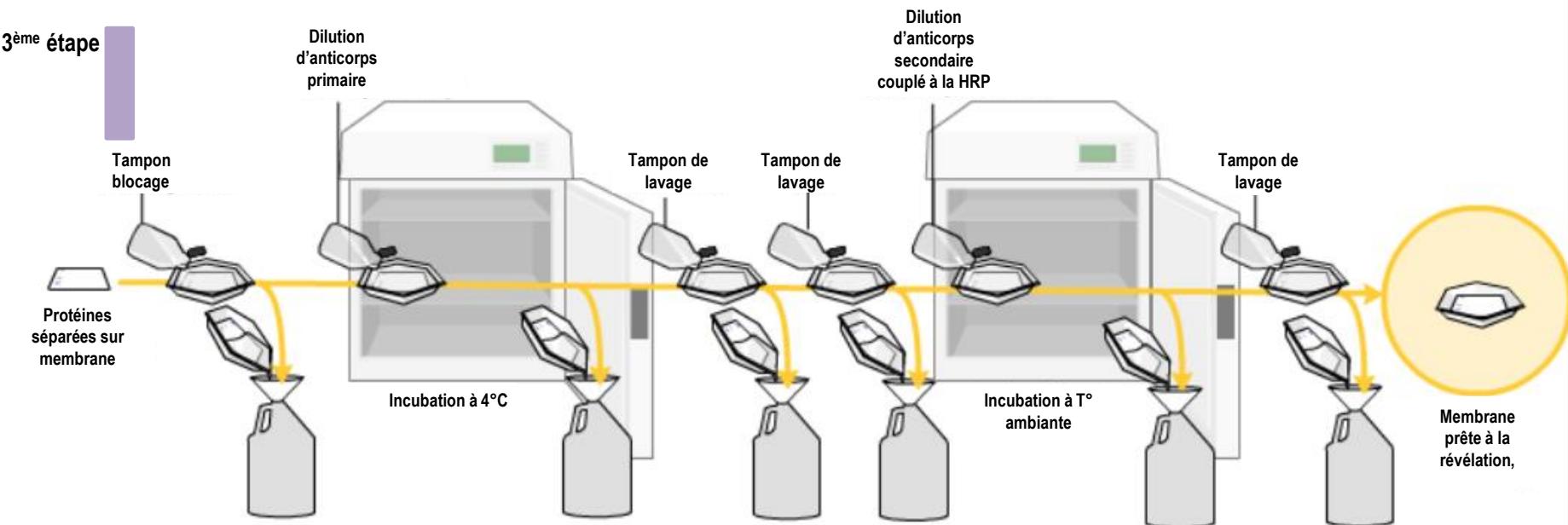


2^{ème} étape



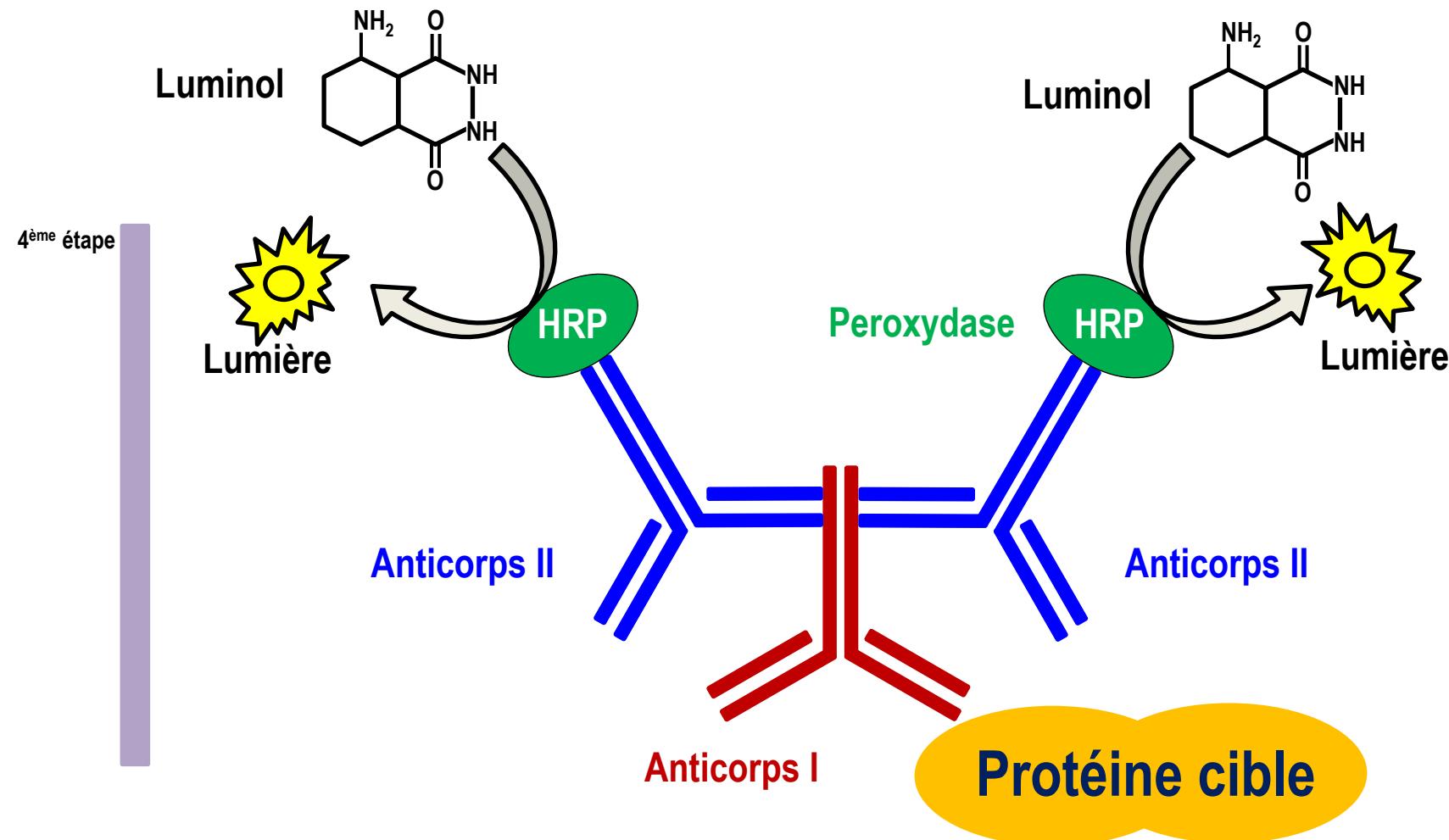
E - Techniques immunoenzymatiques

1- Western Blot



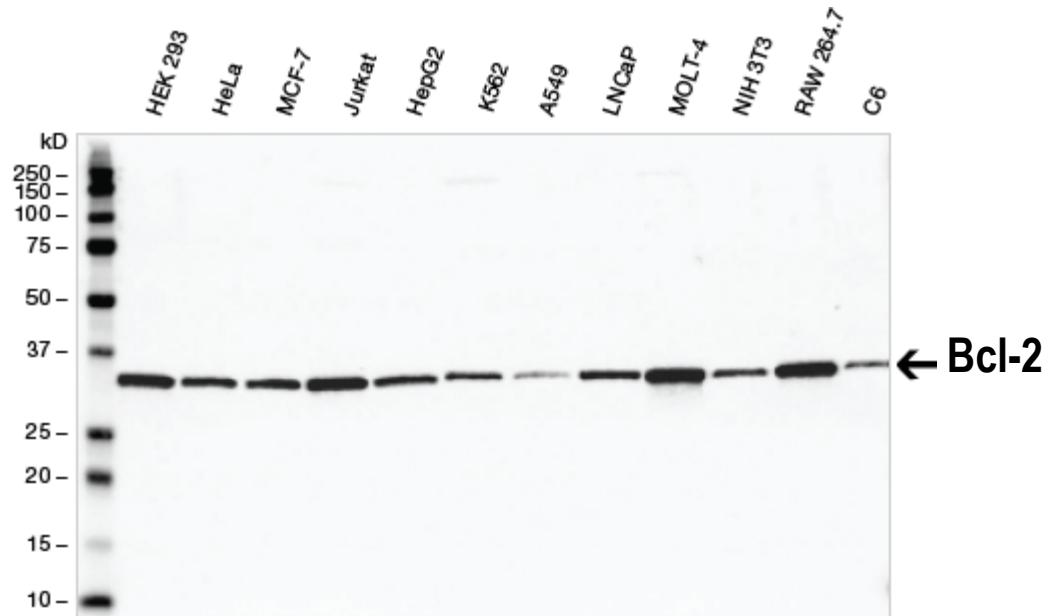
E - Techniques immunoenzymatiques

1- Western Blot



E - Techniques immunoenzymatiques

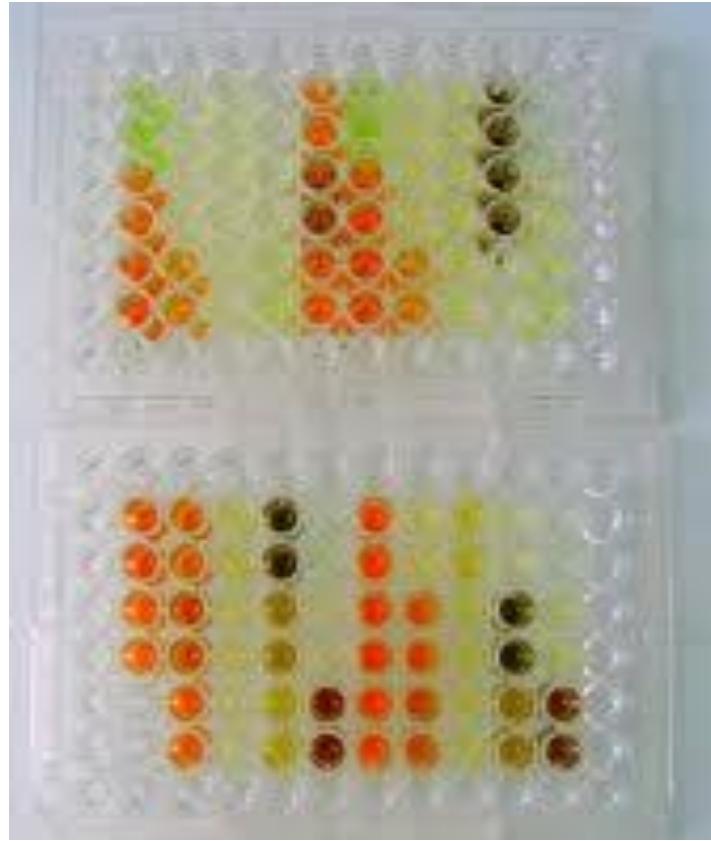
1- Western Blot



E - Techniques immunoenzymatiques

2- ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est très utilisée en laboratoire.



E - Techniques immunoenzymatiques

2- ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est très utilisée en laboratoire.

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

- ▲ Antigène
- Enzyme
- Substrat
- ★ Produit coloré

