

# **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 (détergents 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  $pI$  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**.

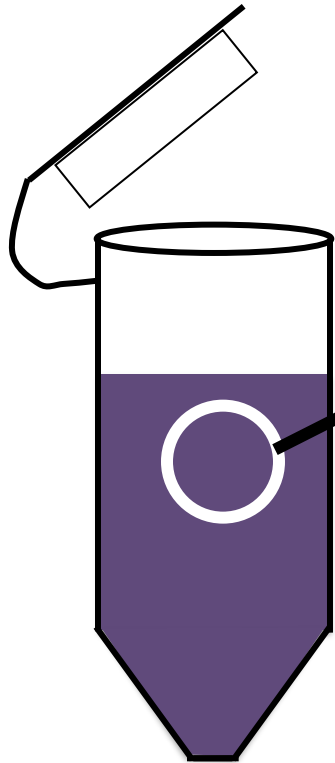
## B - Précipitation différentielle des protéines

### 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 :

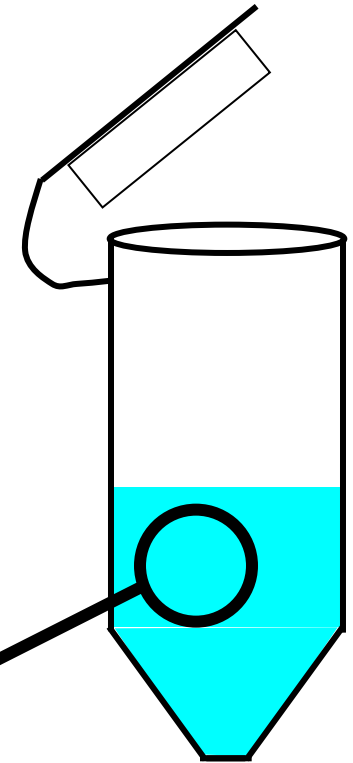
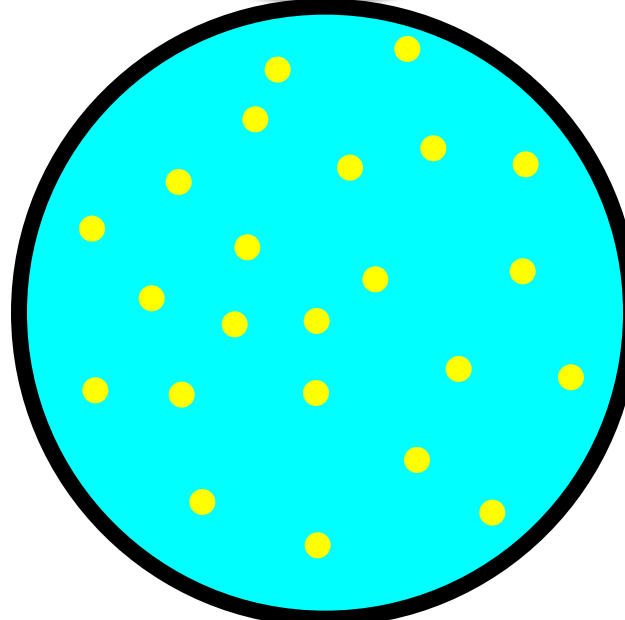
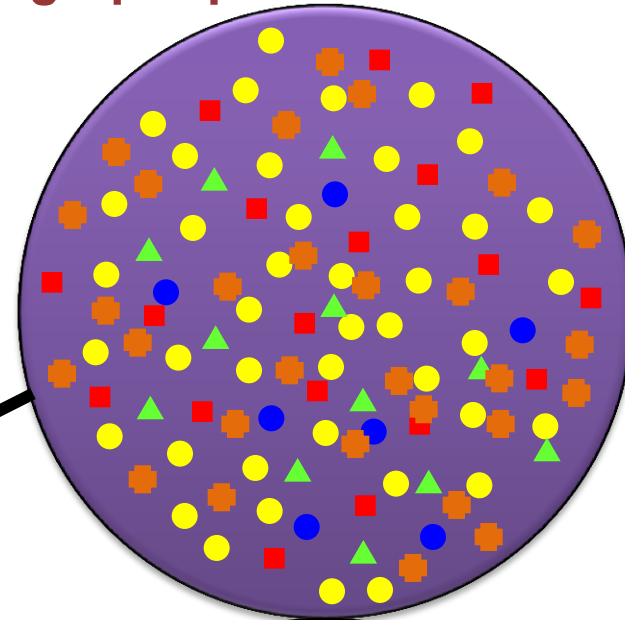
- le sel piège l'eau → précipitation des protéines.  
Toutes les protéines ne précipitent pas pour des concentrations équivalentes en sels.
- plus la solubilité d'une protéine dans l'eau sera importante, plus la concentration en sels qu'il faudra ajouter pour obtenir sa précipitation sera élevée.
- les petites protéines sont généralement plus solubles que les grosses.

## C - Techniques chromatographiques



Avant purification

extrait enrichi



Après purification

biomolécule pure





## 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 :

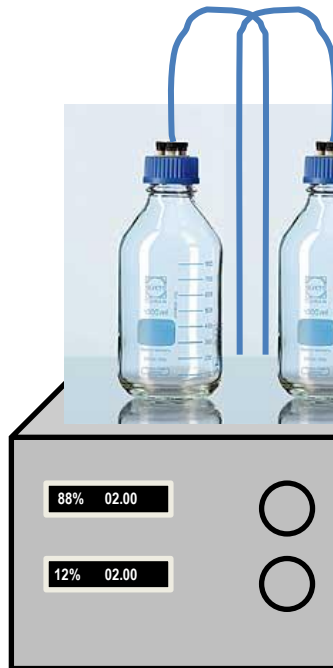
une **phase mobile** et une **phase stationnaire**.

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



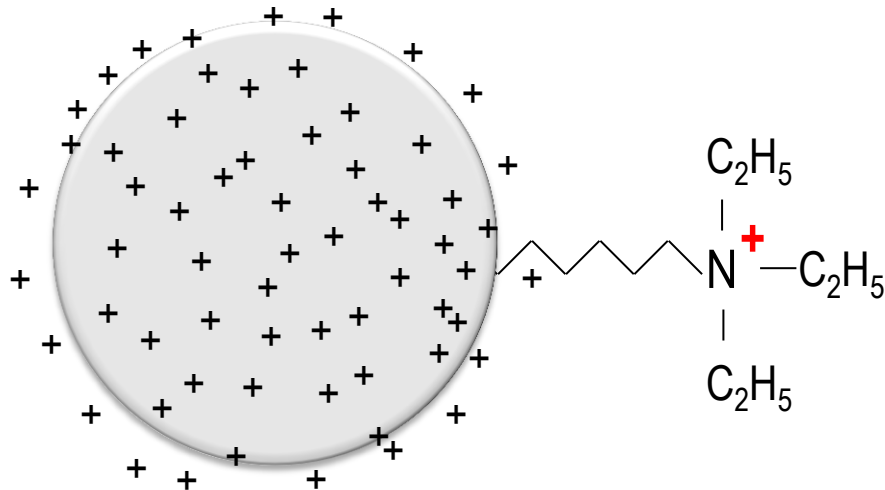
collecteur



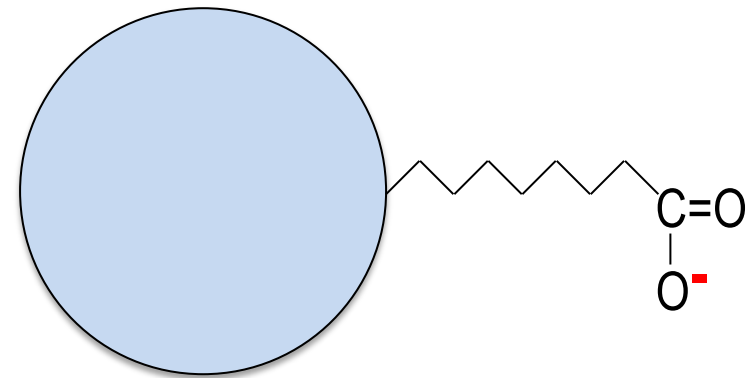
# C - Techniques chromatographiques

## 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.

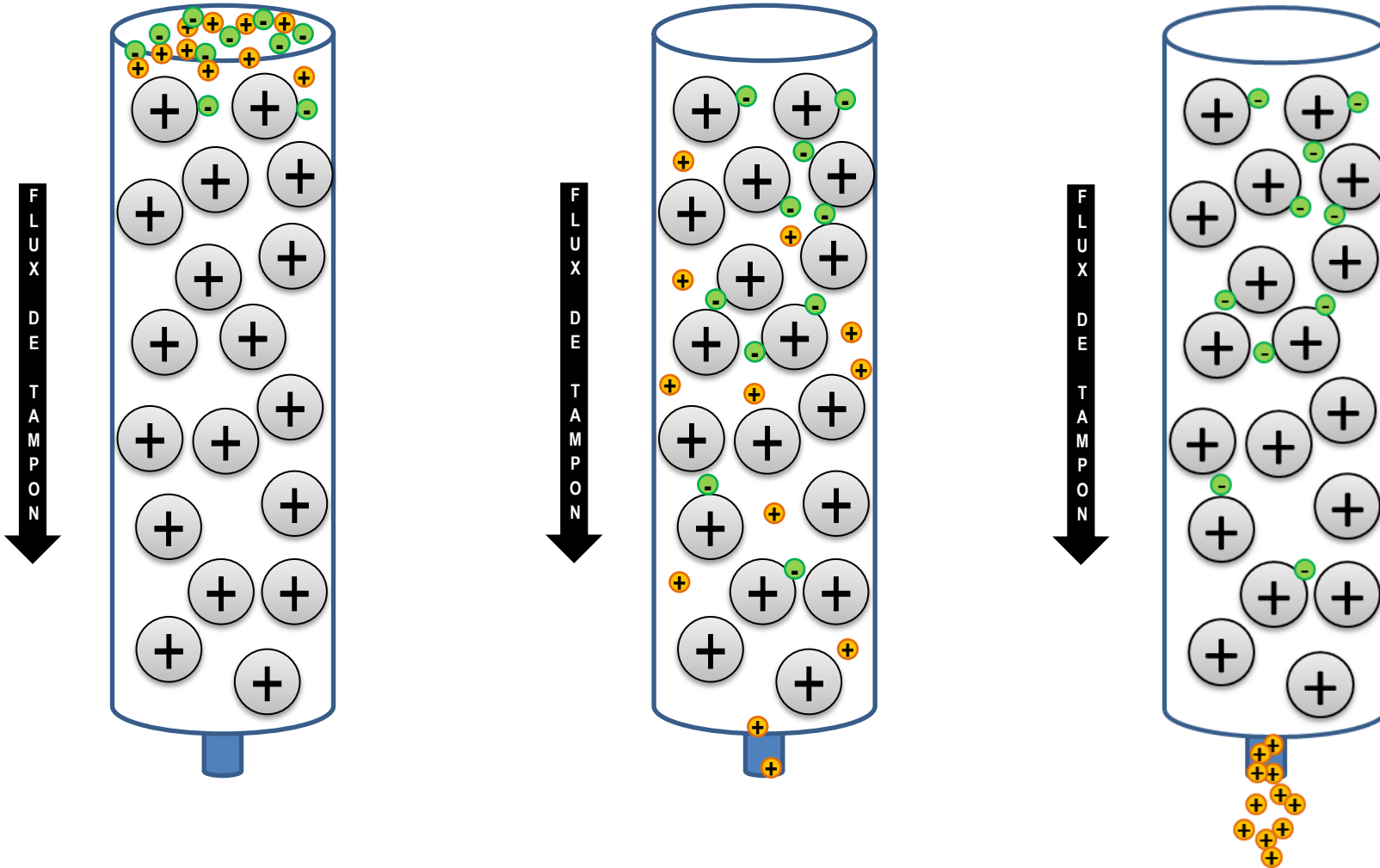


# C - Techniques chromatographiques

## 1 - échange d'ions

charge

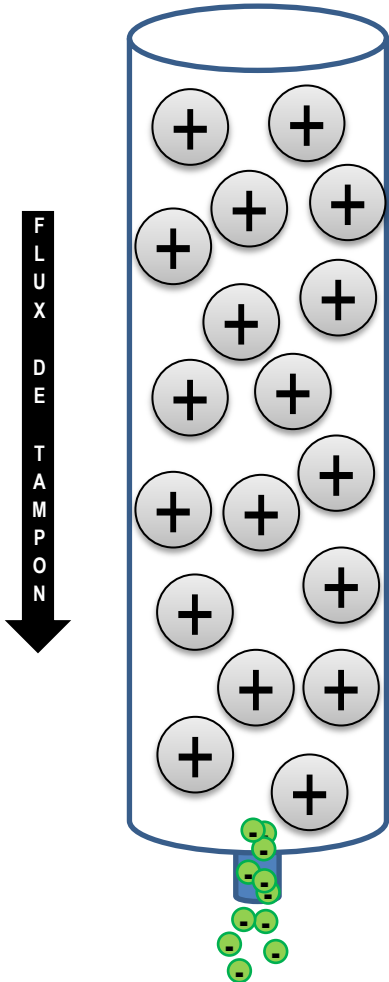
lavage



# C - Techniques chromatographiques

## 1 – échange d'ions

### élution



L'élution se réalise :

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

Exemple : si  $[\text{NaCl}]$  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.

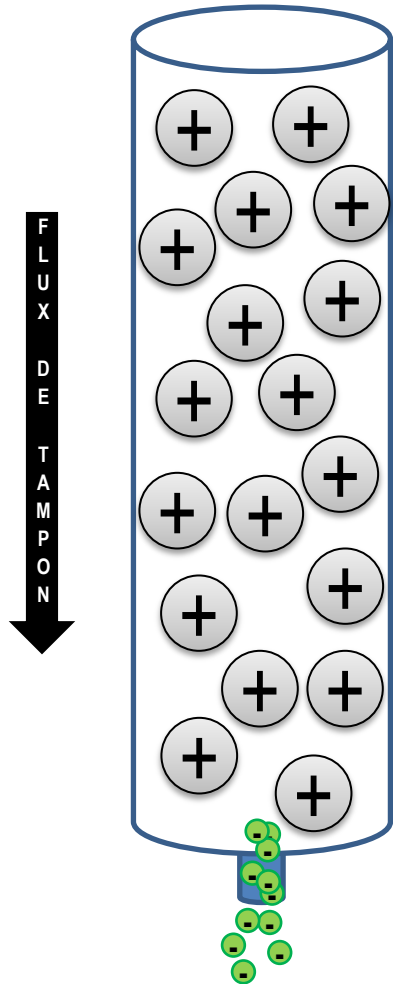
→ La molécule va se détacher du support immobile, elle est éluée.



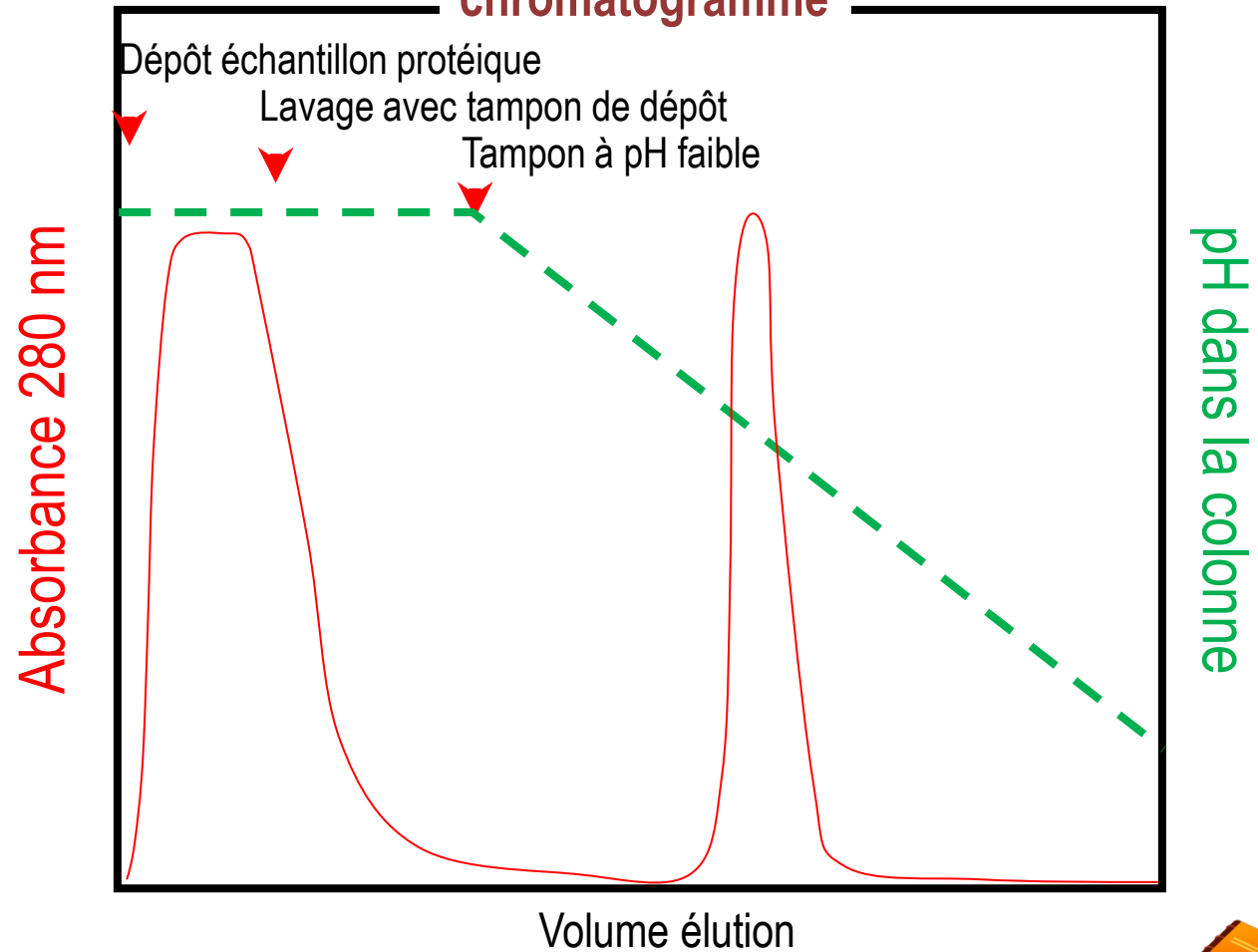
# C - Techniques chromatographiques

## 1 - échange d'ions

### élution



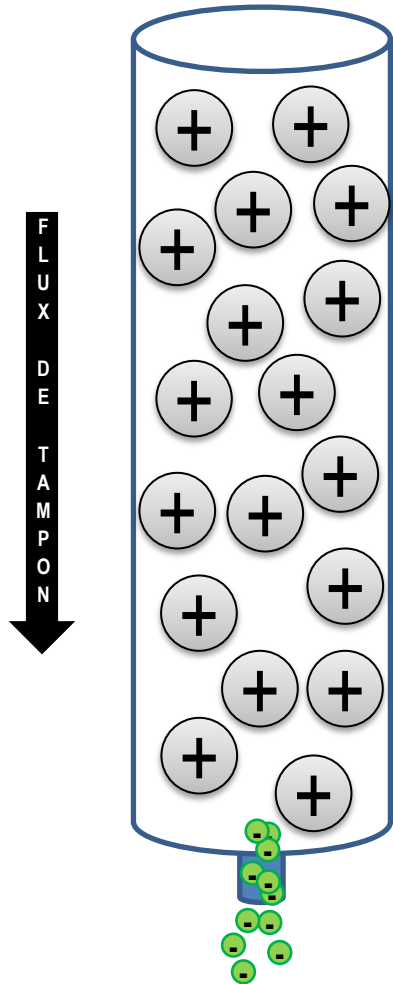
### chromatogramme



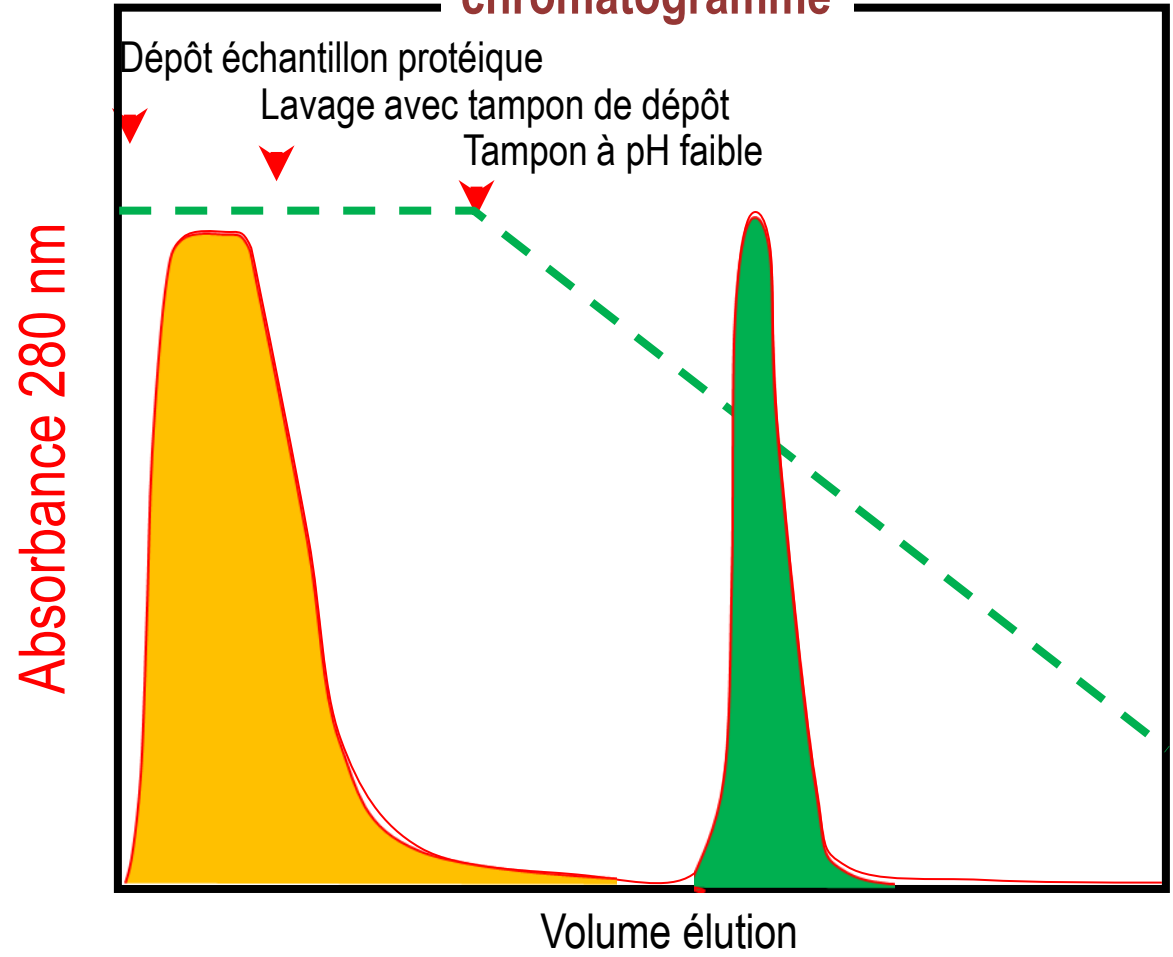
# C - Techniques chromatographiques

## 1 - échange d'ions

élution



chromatogramme

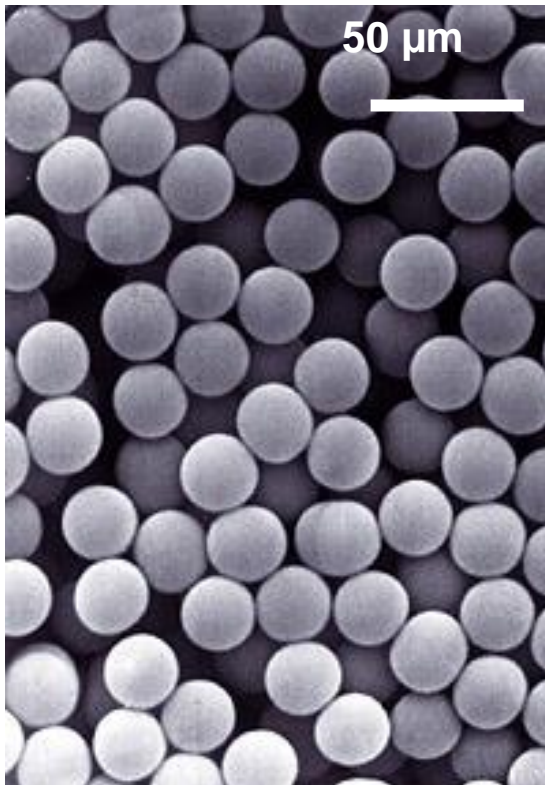




## C - Techniques chromatographiques

### 2 – exclusion diffusion

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



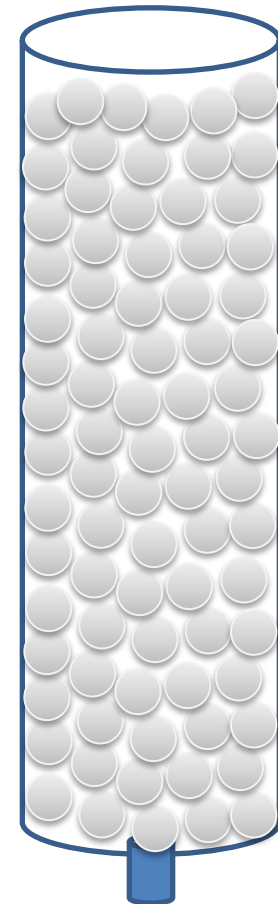
La filtration s'effectue sur **gel de dextrane** (polymère de sucres) de haut poids moléculaire (Sephadex, Sepharose...) : après traitement chimique, ces macromolécules forment des **réseaux poreux à 3 dimensions**.



## 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 :

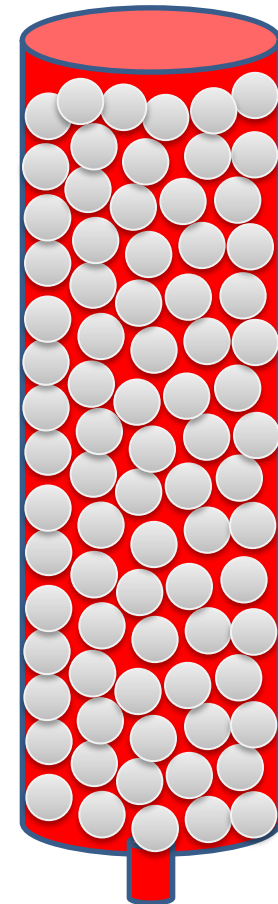


## C - Techniques chromatographiques

### 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

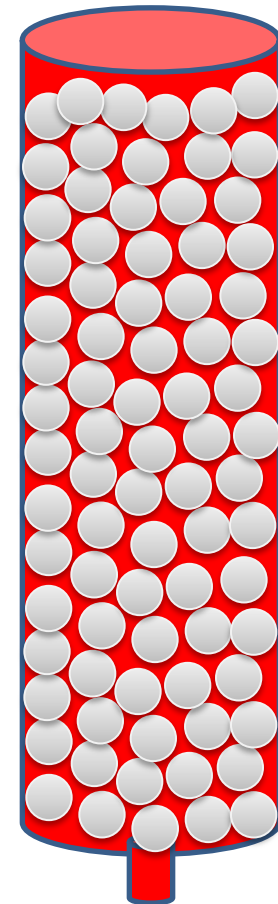
### 2 – exclusion diffusion

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.

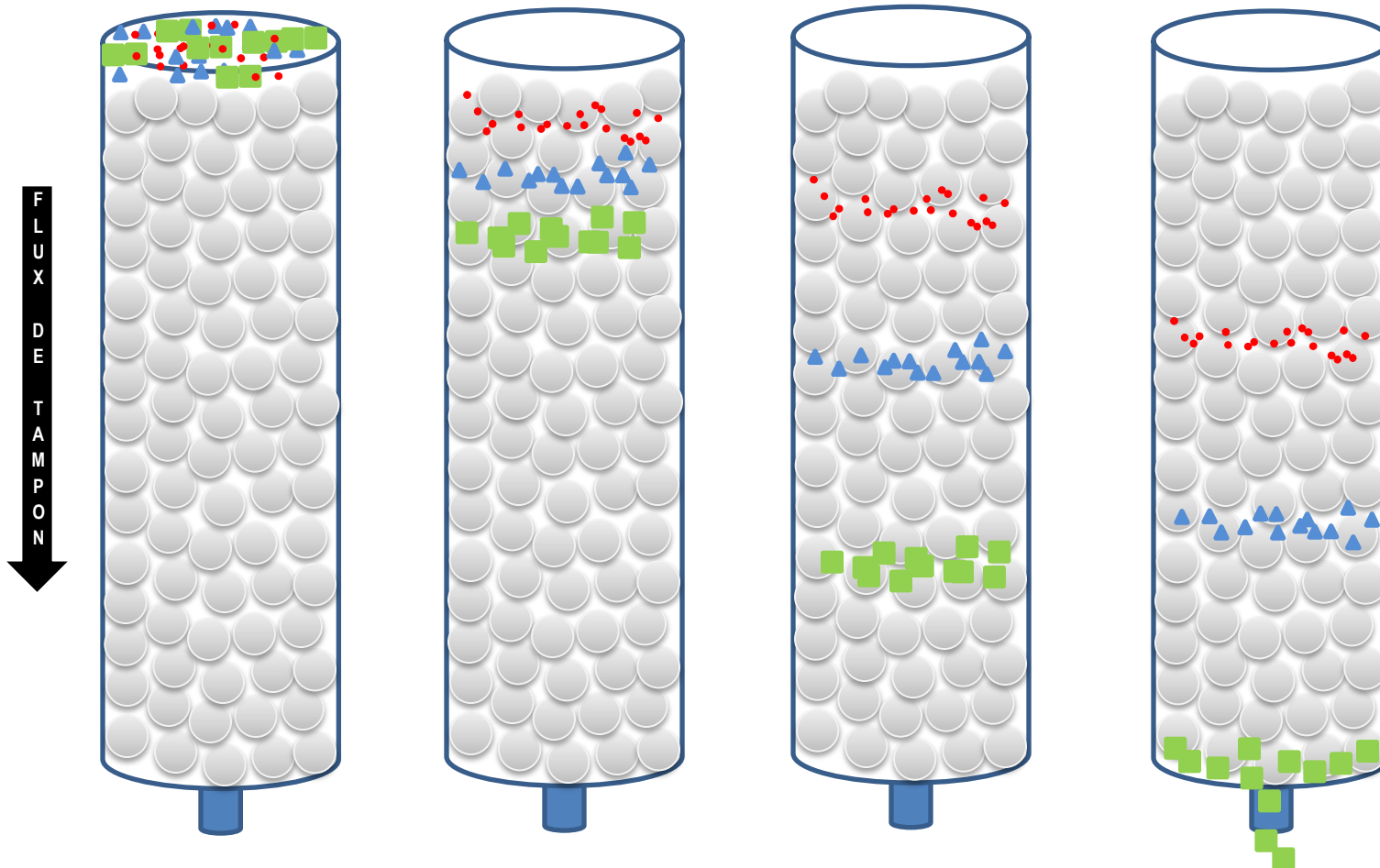
Les molécules de taille plus petite pénètrent **aussi** dans le réseau 3D des billes de Sephadex :

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



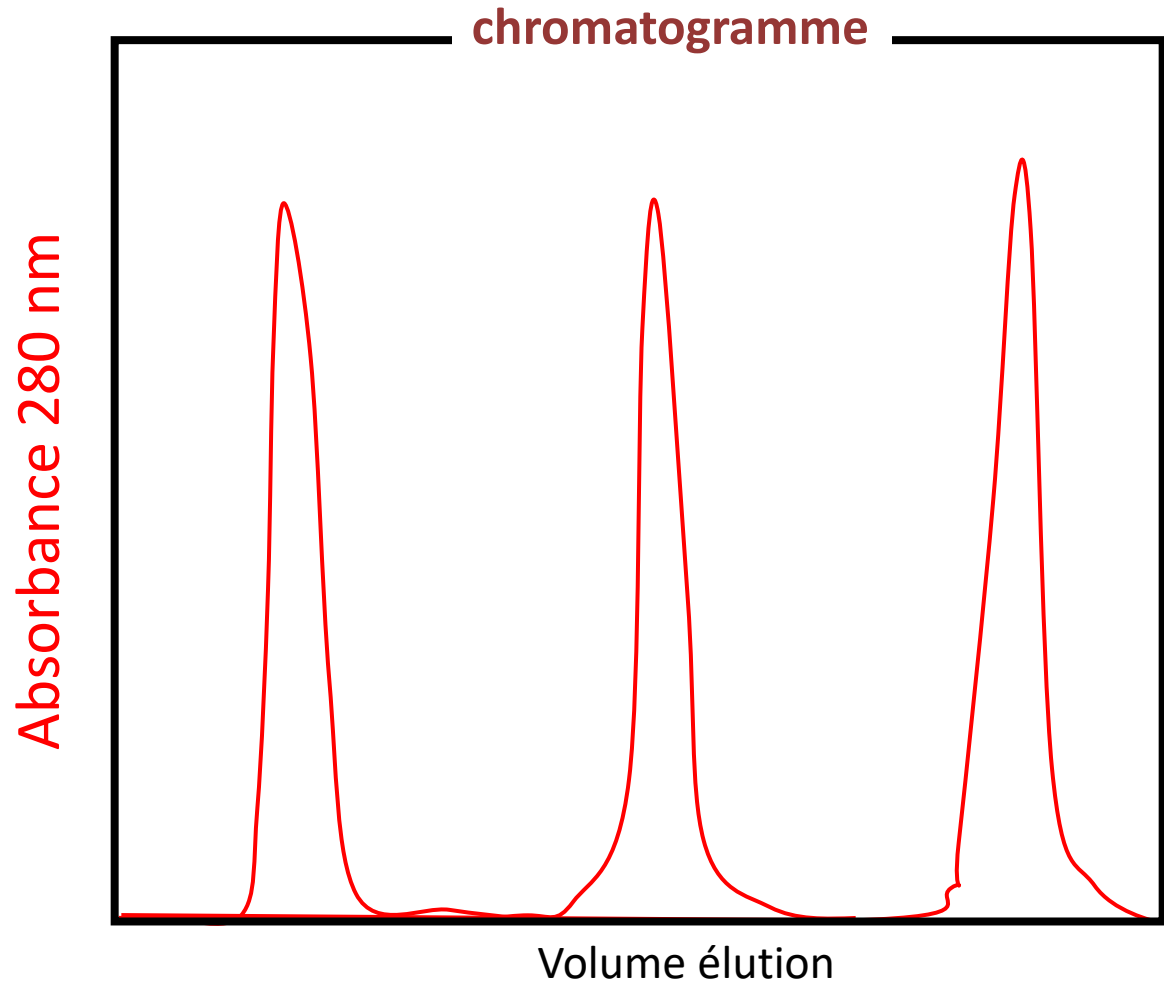
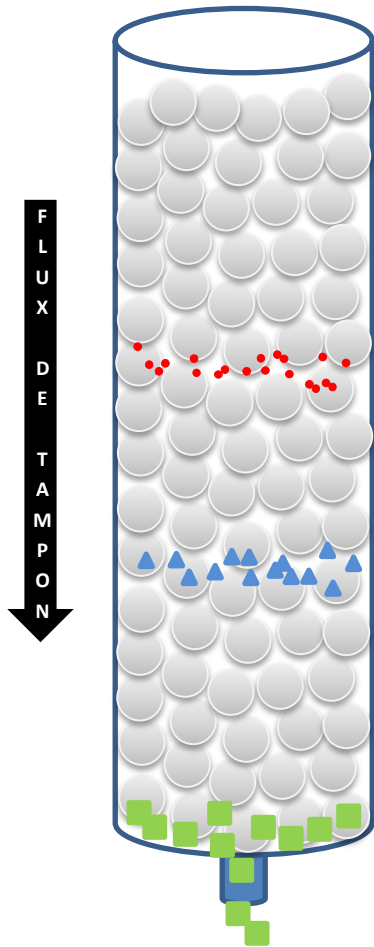
# C - Techniques chromatographiques

## 2 – exclusion diffusion



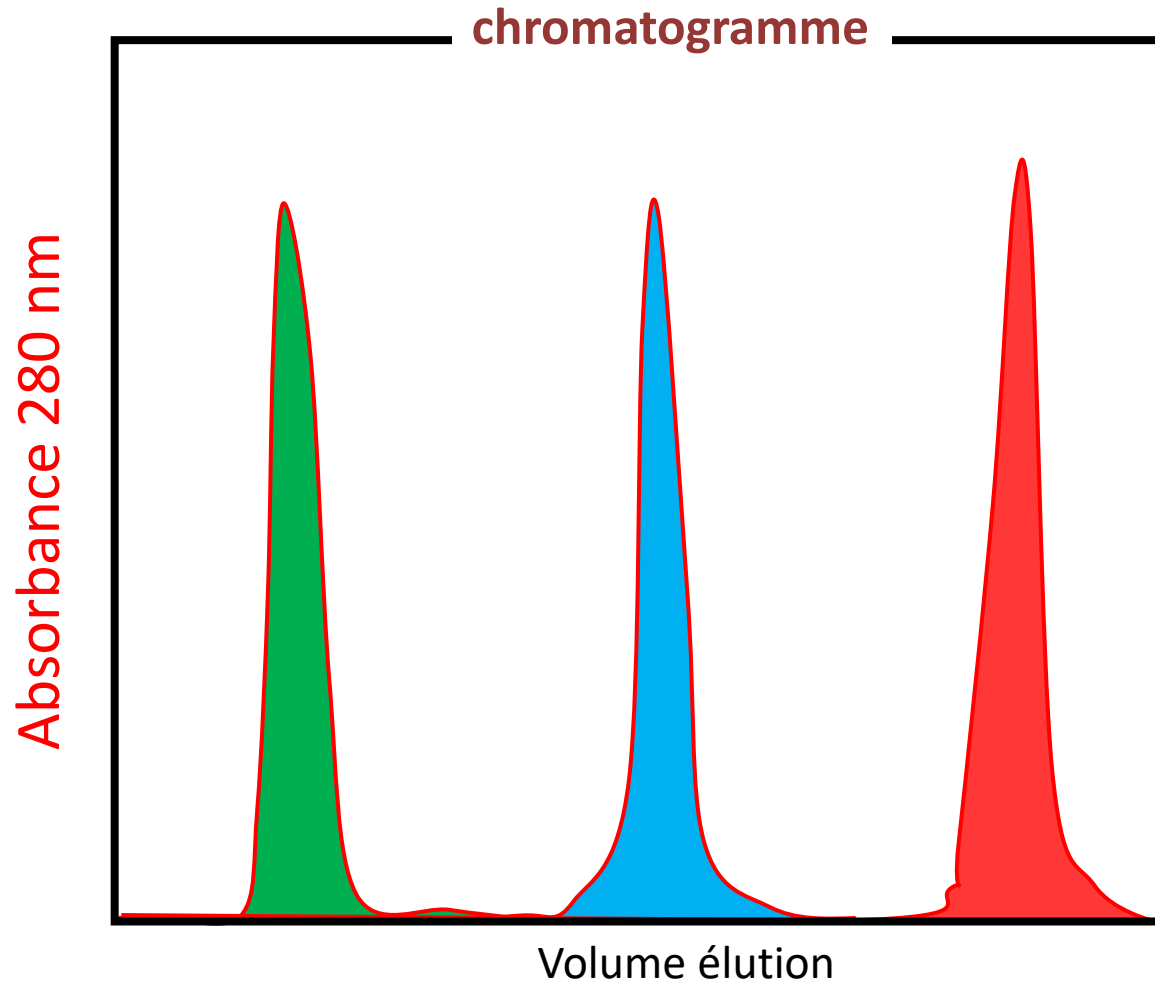
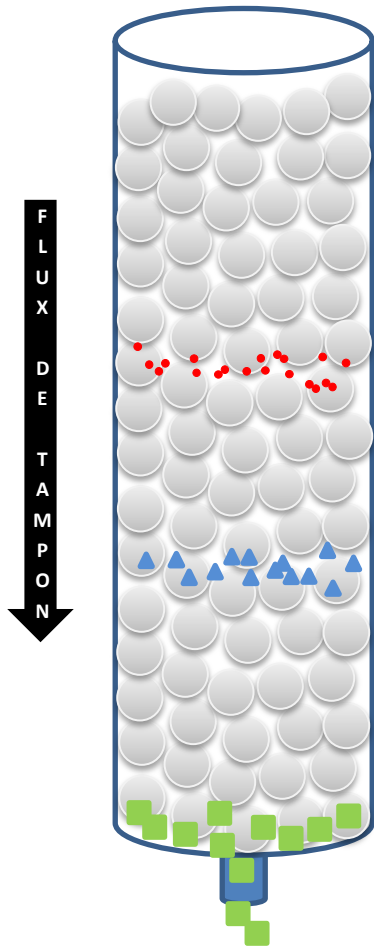
# C - Techniques chromatographiques

## 2 – exclusion diffusion



# C - Techniques chromatographiques

## 2 – exclusion diffusion



## 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 :

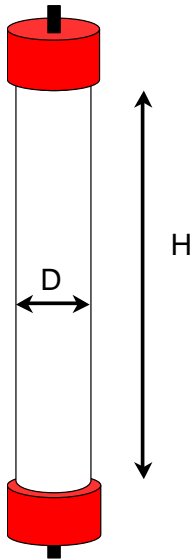
→ **constante de volume de colonne accessible** de la molécule.





# C - Techniques chromatographiques

## 2 – exclusion diffusion



$V_t = \Sigma$  volume des billes + volume extérieur aux billes

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

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

$V_0$  = volume d'éluion d'une molécule exclue = volume extérieur aux billes  
=  $V_t$  - volume des billes

$V_e$  = volume d'éluion d'une molécule X =  $V_0$  + 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**

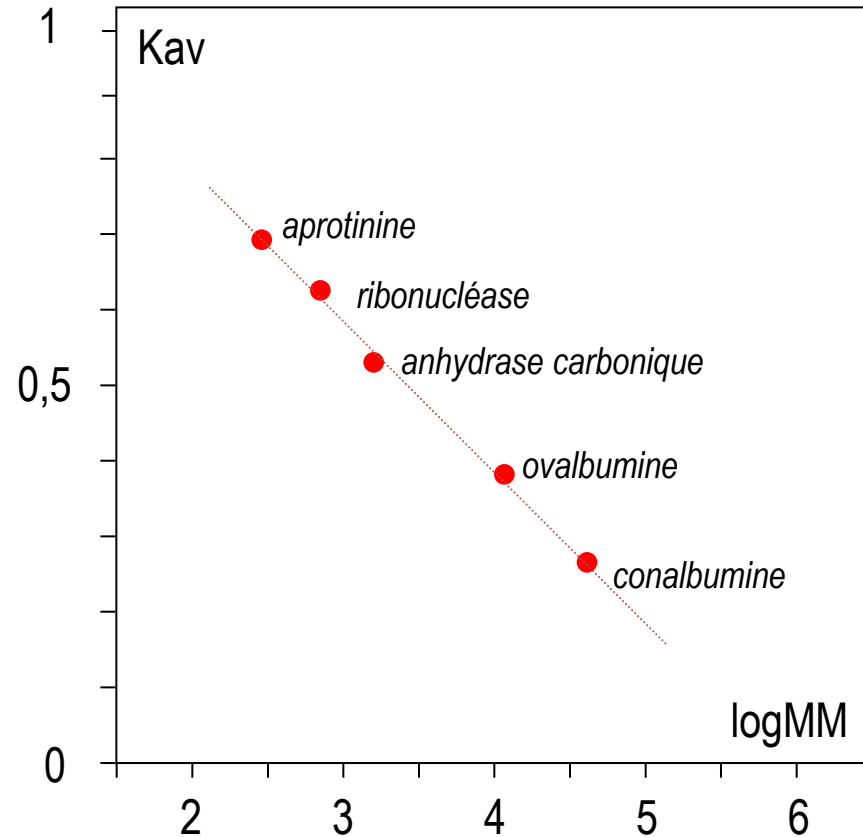
→ estimer la **MM** d'une protéine inconnue

(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.**

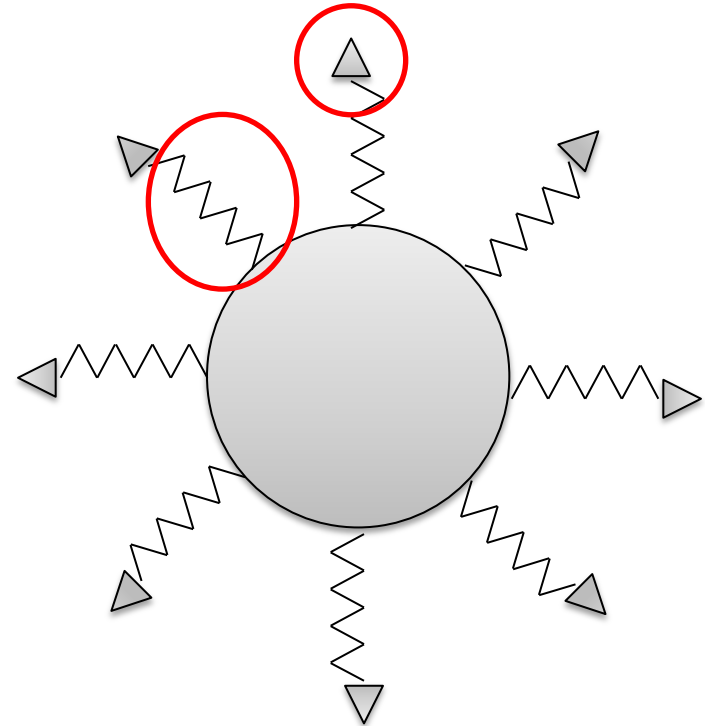
- 1<sup>ère</sup> étape : **fixer de façon covalente le ligand sur la phase stationnaire** (utilisation d'un groupement chimique réactif).
- L'élution se fait grâce à un excès libre de ligand, un saut de pH ou une augmentation de la force ionique de la phase mobile.

## C - Techniques chromatographiques

### 3 – affinité

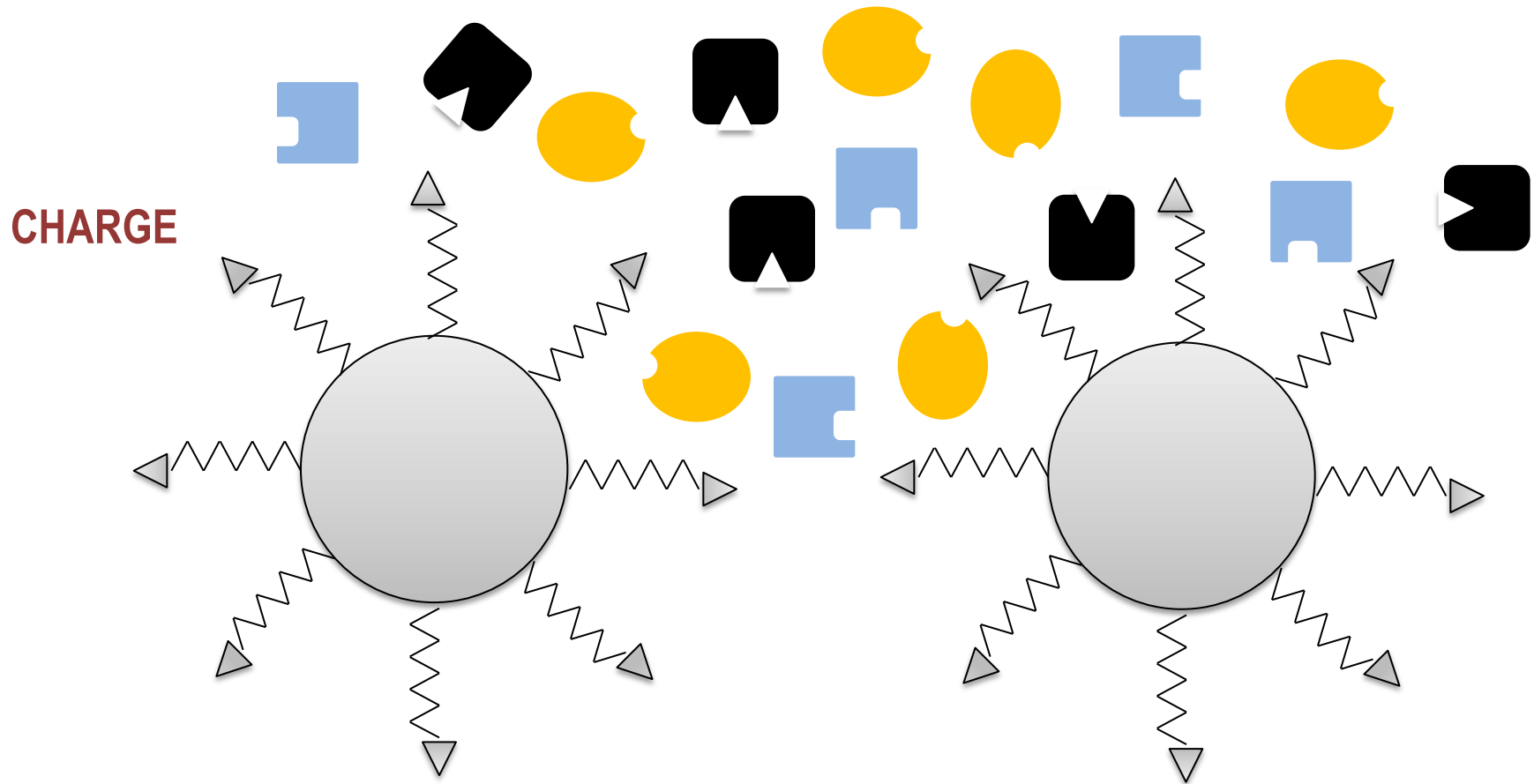
La fixation du ligand sur la résine se fait *via* un bras chimique appelé **espaceur**.

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



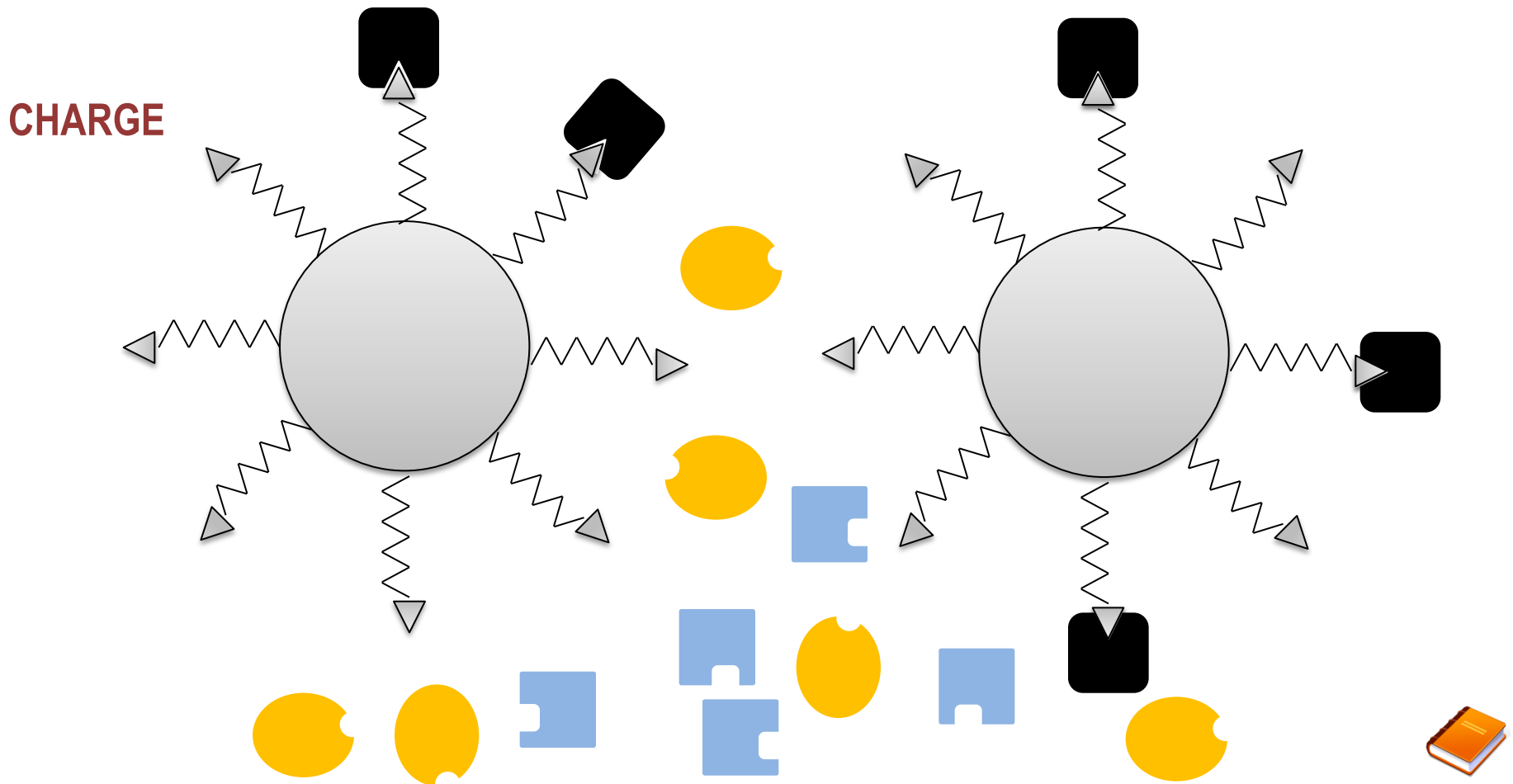
# C - Techniques chromatographiques

## 3 – affinité



# C - Techniques chromatographiques

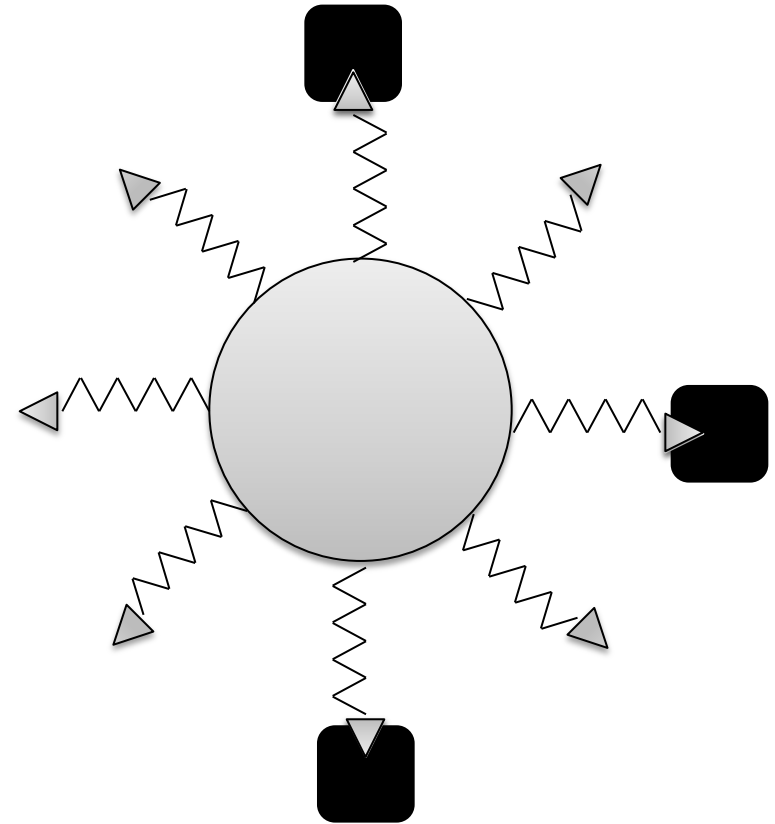
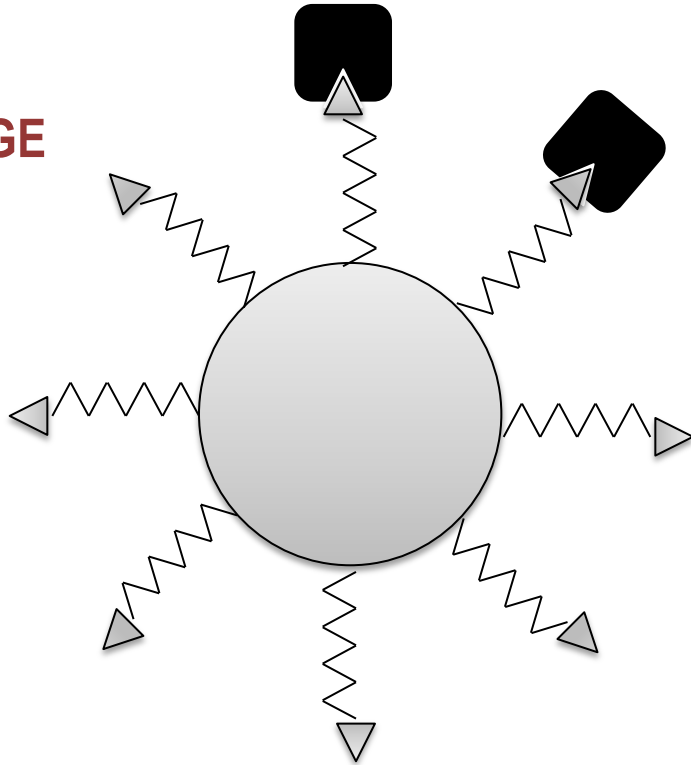
## 3 – affinité



# C - Techniques chromatographiques

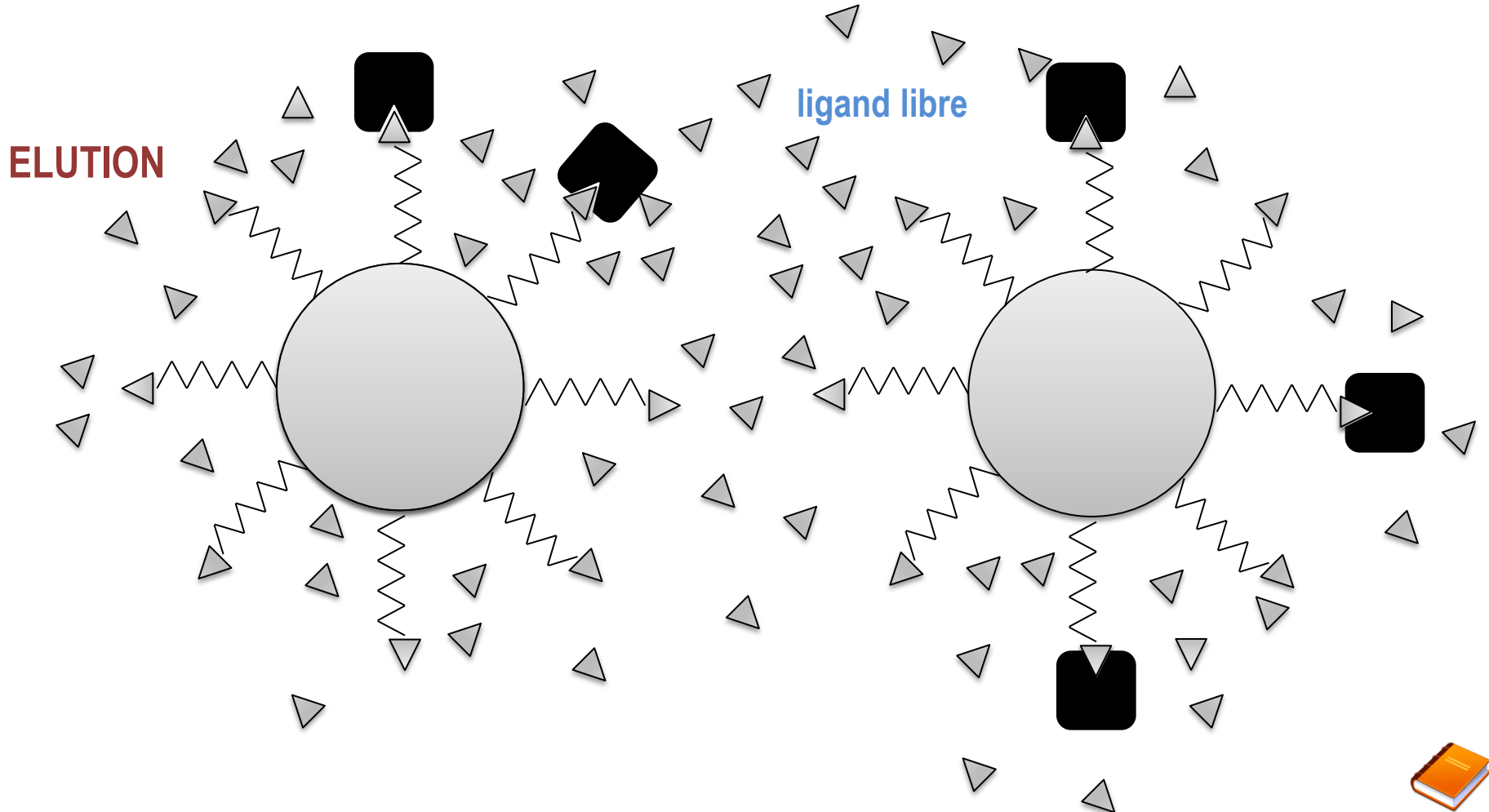
## 3 – affinité

LAVAGE



# C - Techniques chromatographiques

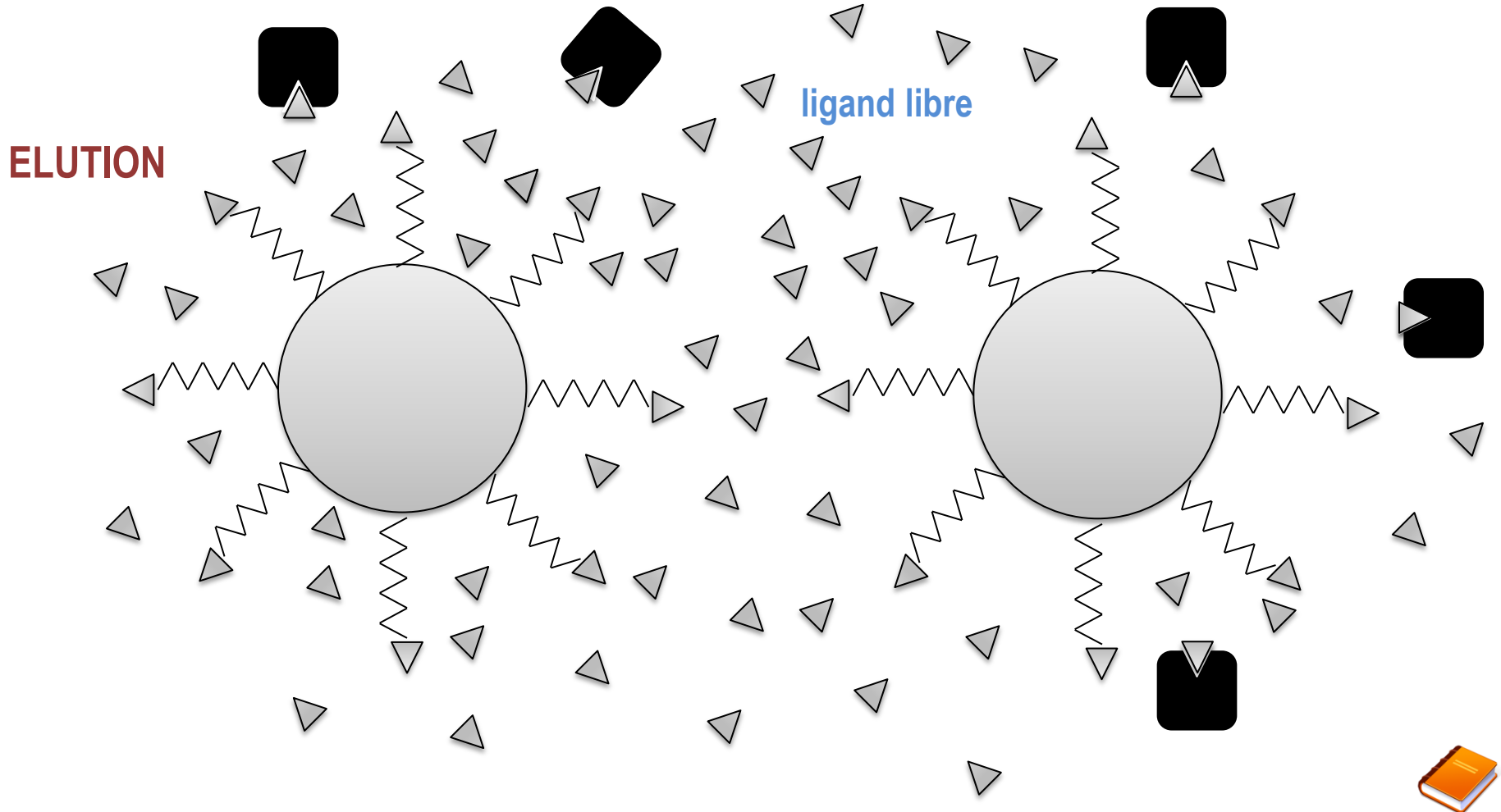
## 3 – affinité





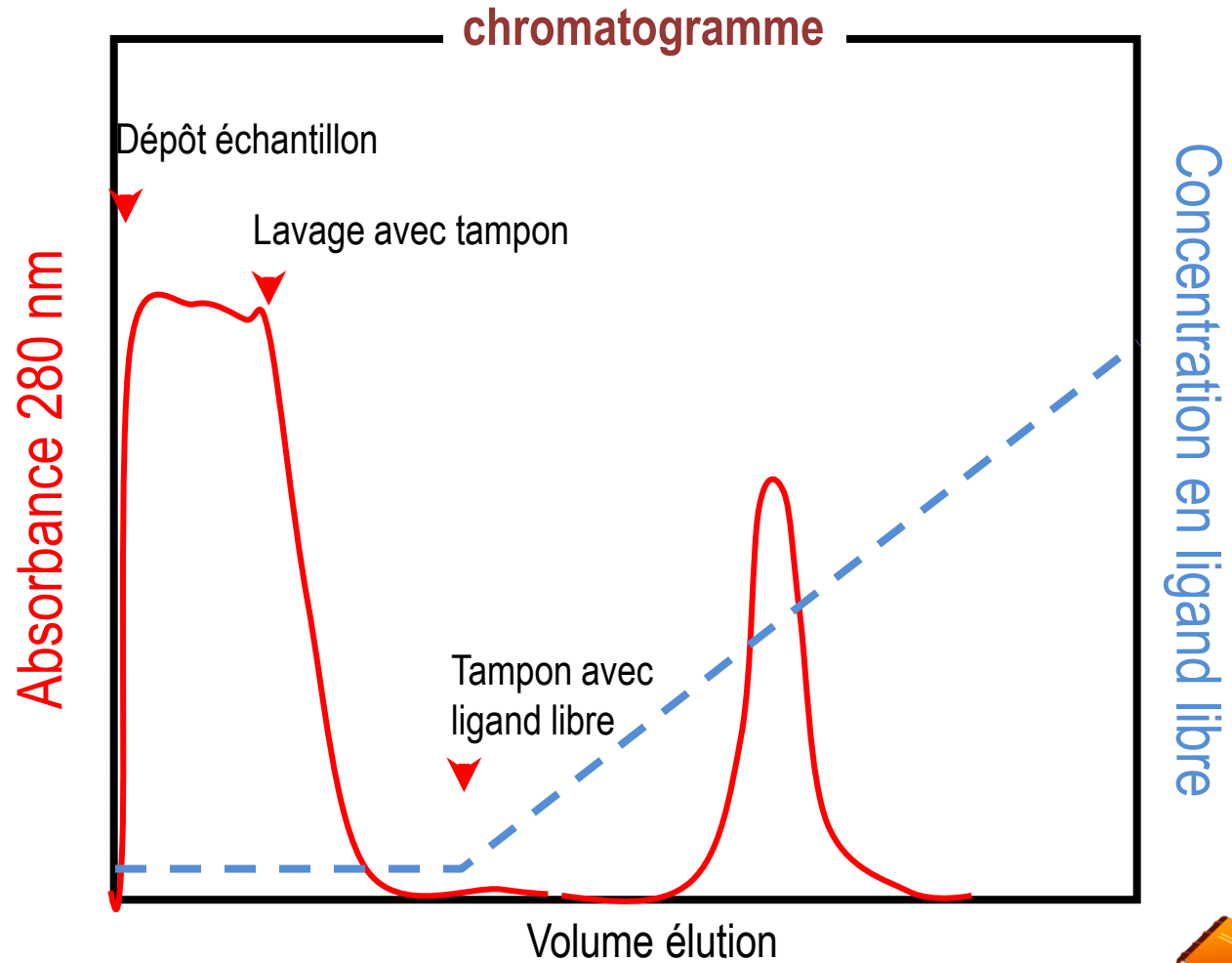
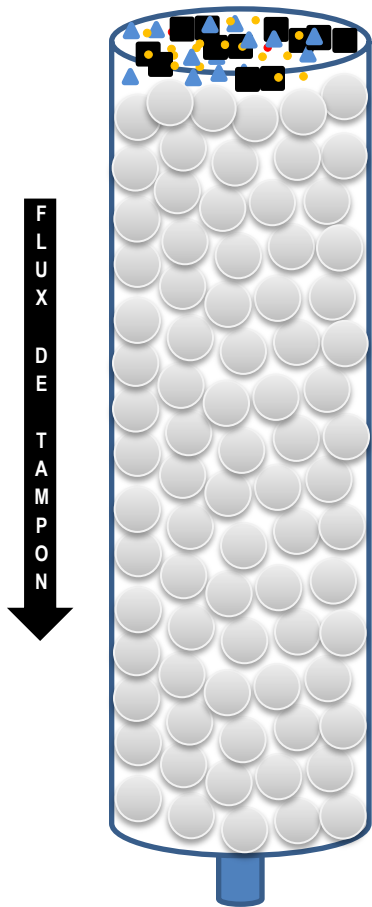
# C - Techniques chromatographiques

## 3 – affinité



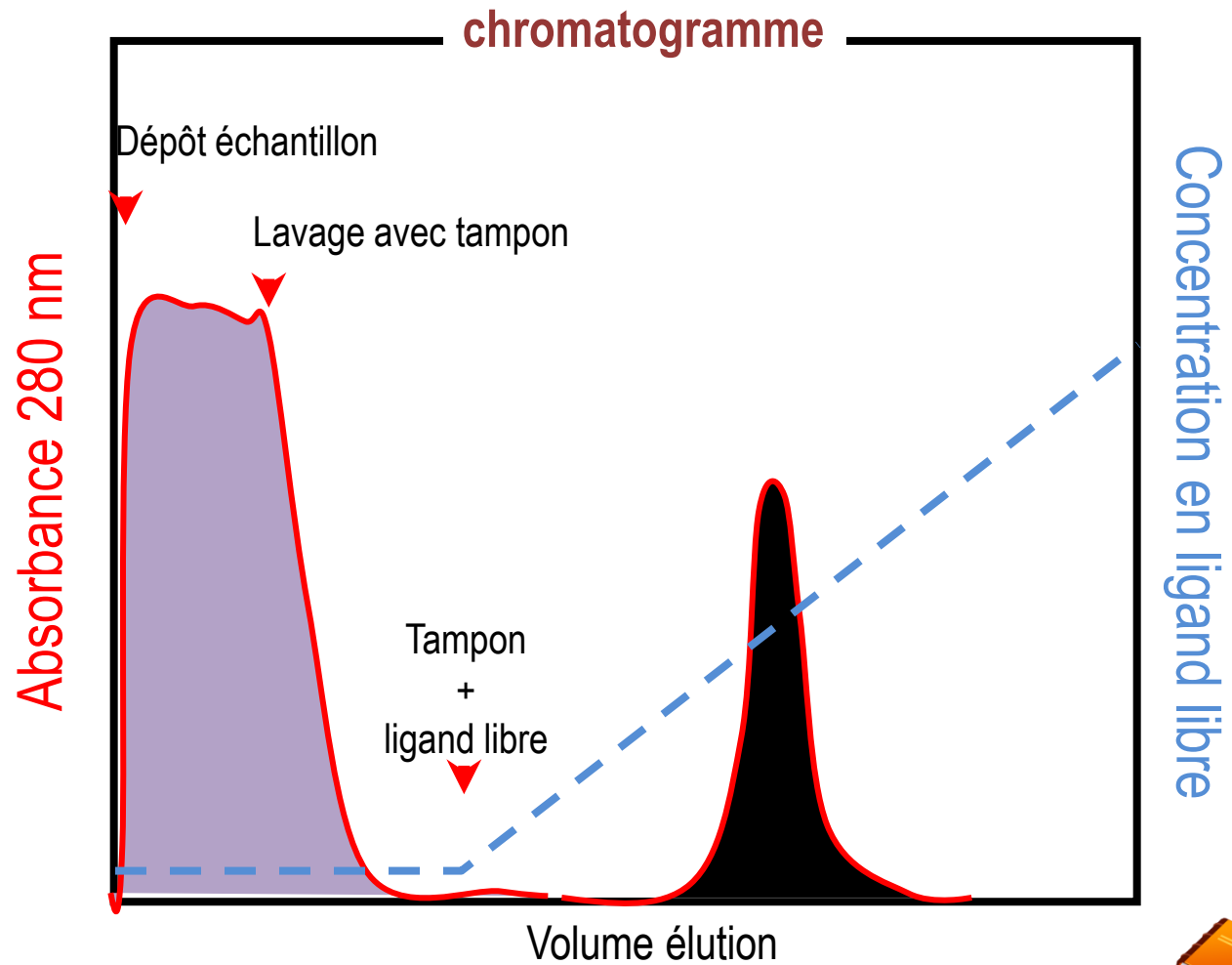
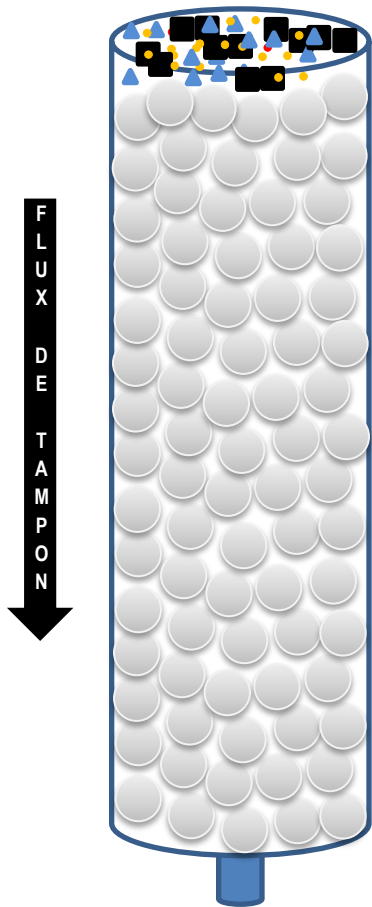
# C - Techniques chromatographiques

## 3 – affinité



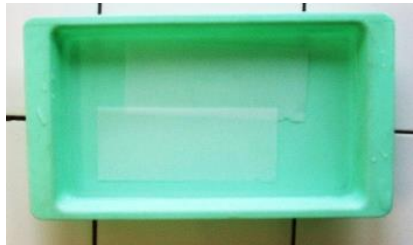
# C - Techniques chromatographiques

## 3 – affinité



# D - Techniques électrophorétiques

## 1 – électrophorèse sur papier



Trempage tampon de migration



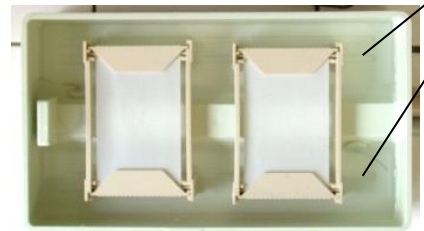
Essorage



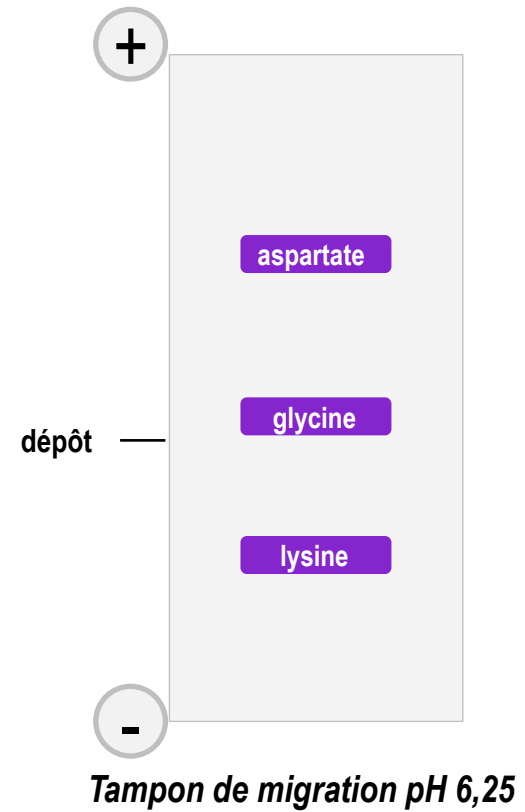
Fixation sur support



Migration sous champs électrique



Mise en place dans la cuve

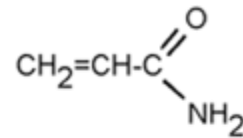


## D - Techniques électrophorétiques

### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'**acrylamide** est une petite molécule

**acrylamide**

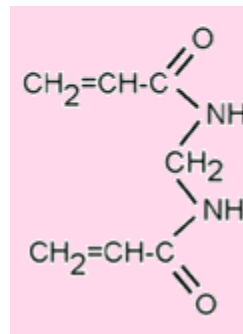
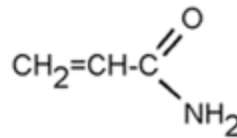


## D - Techniques électrophorétiques

### 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



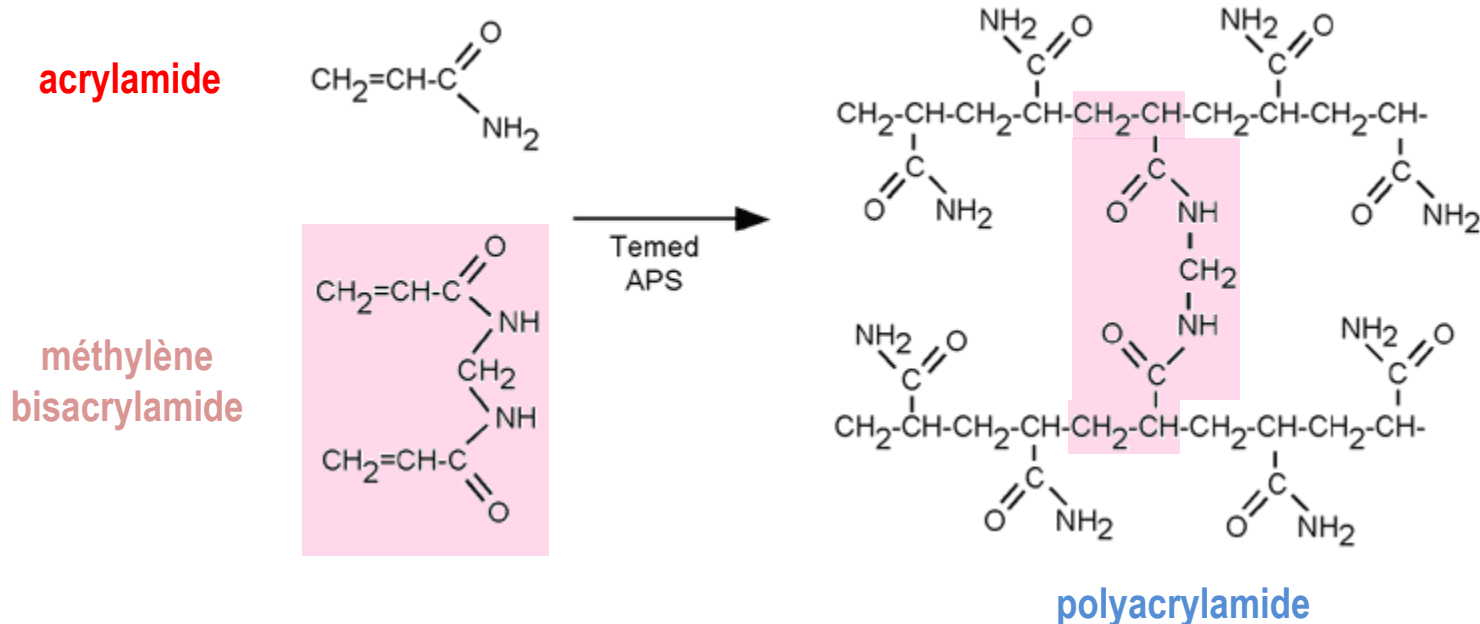
méthylène bisacrylamide



## 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 :

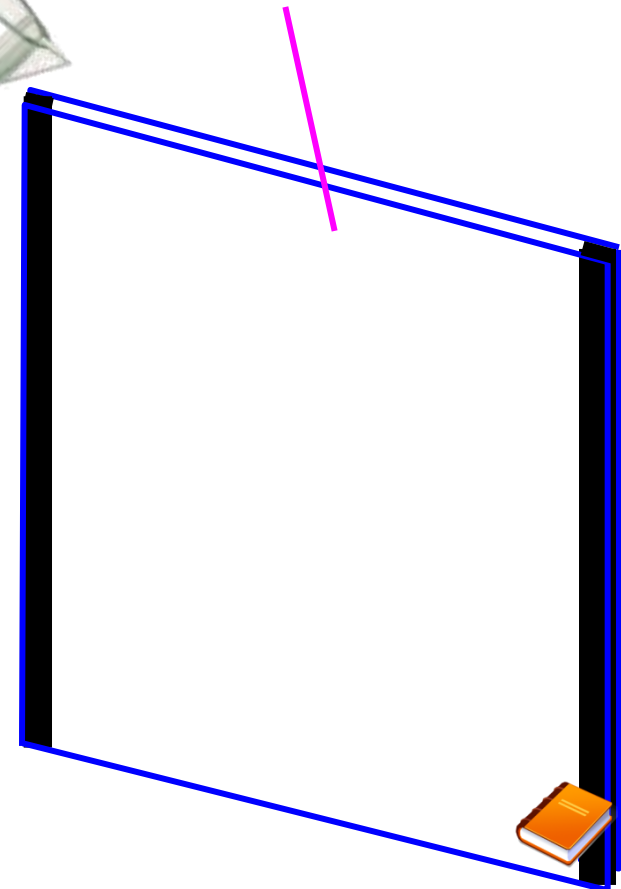


## D - Techniques électrophorétiques

### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Le gel d'acrylamide  
polymérise entre  
2 plaques de verre

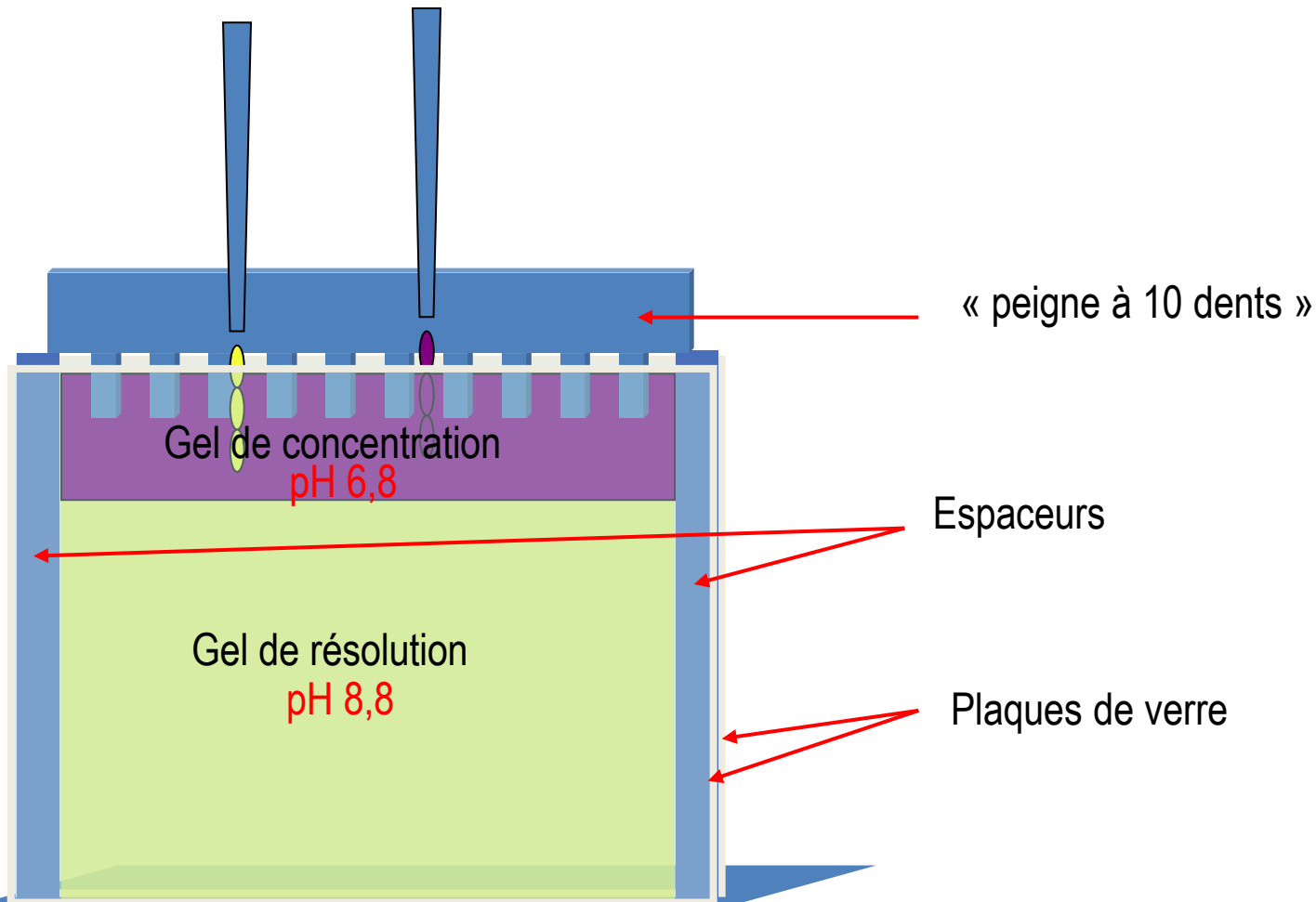
Acrylamide/bisacrylamide  
Tampon Tris pH6,8 ou 8,8  
SDS  
Persulfate d'ammonium  
**TEMED**





## D - Techniques électrophorétiques

### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

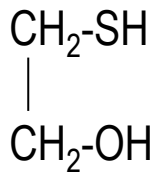


## D - Techniques électrophorétiques

### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

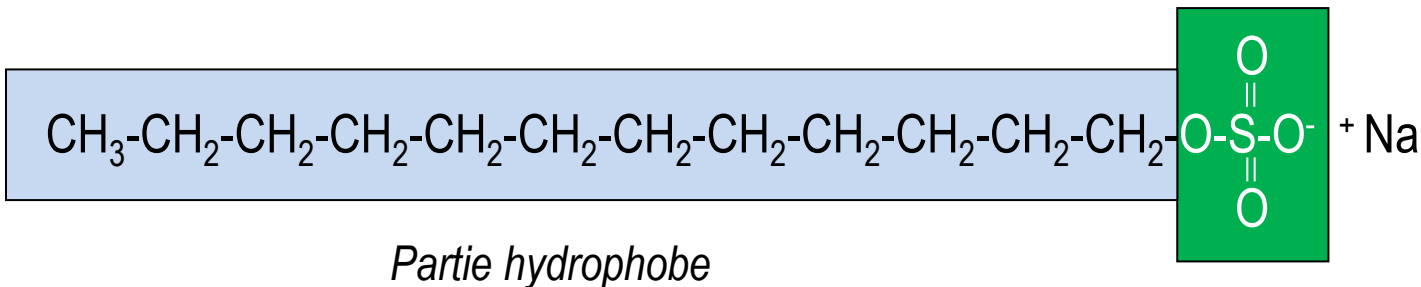
#### Préparation des échantillons protéiques

Les protéines sont incubées en présence de :



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

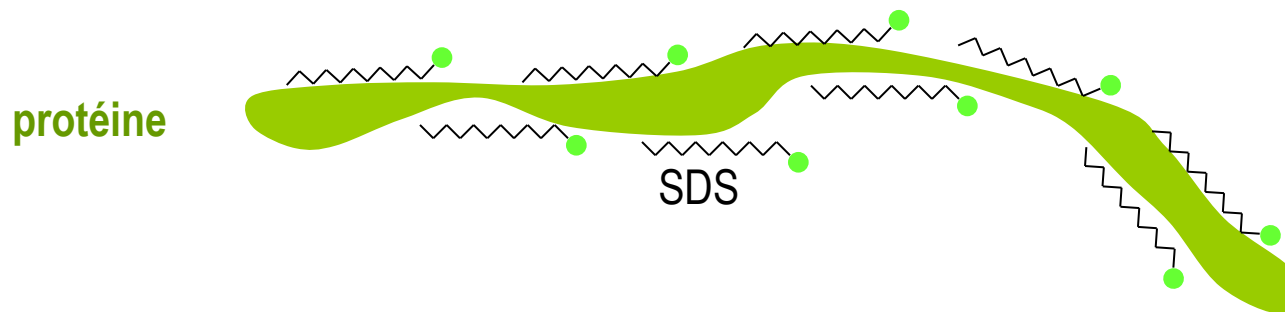
*Partie chargée négativement*



## D - Techniques électrophorétiques

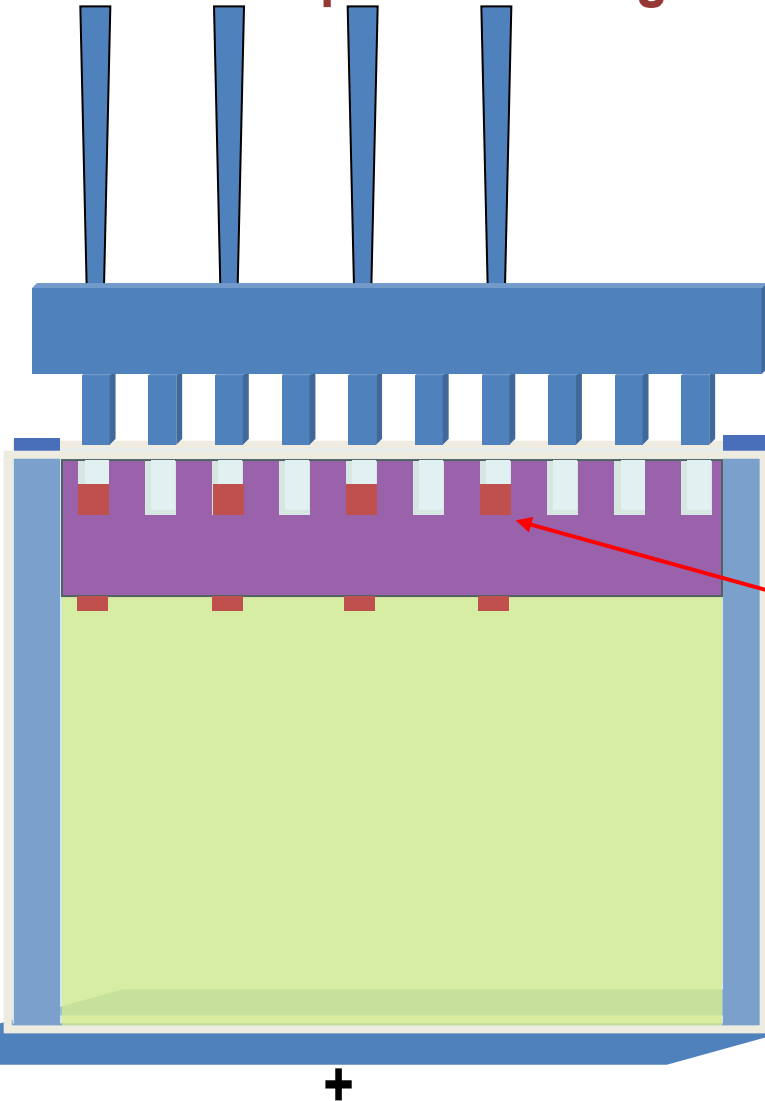
### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

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)

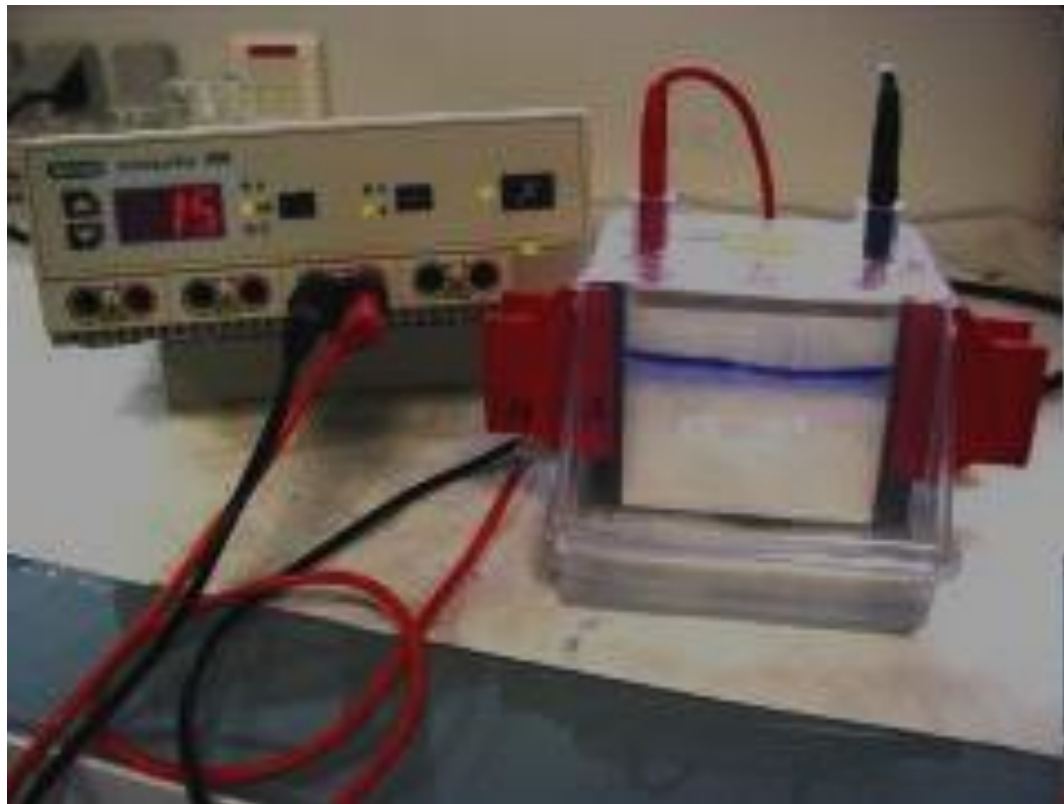


## D - Techniques électrophorétiques

### 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

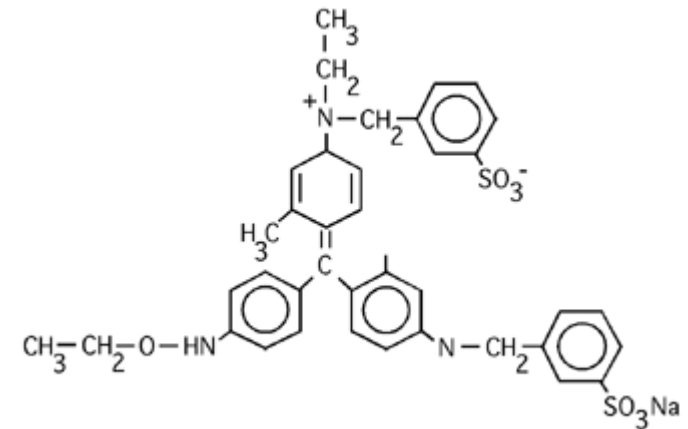
### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



#### COLORATION

##### - Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1  $\mu\text{g}$



bleu de Coomassie

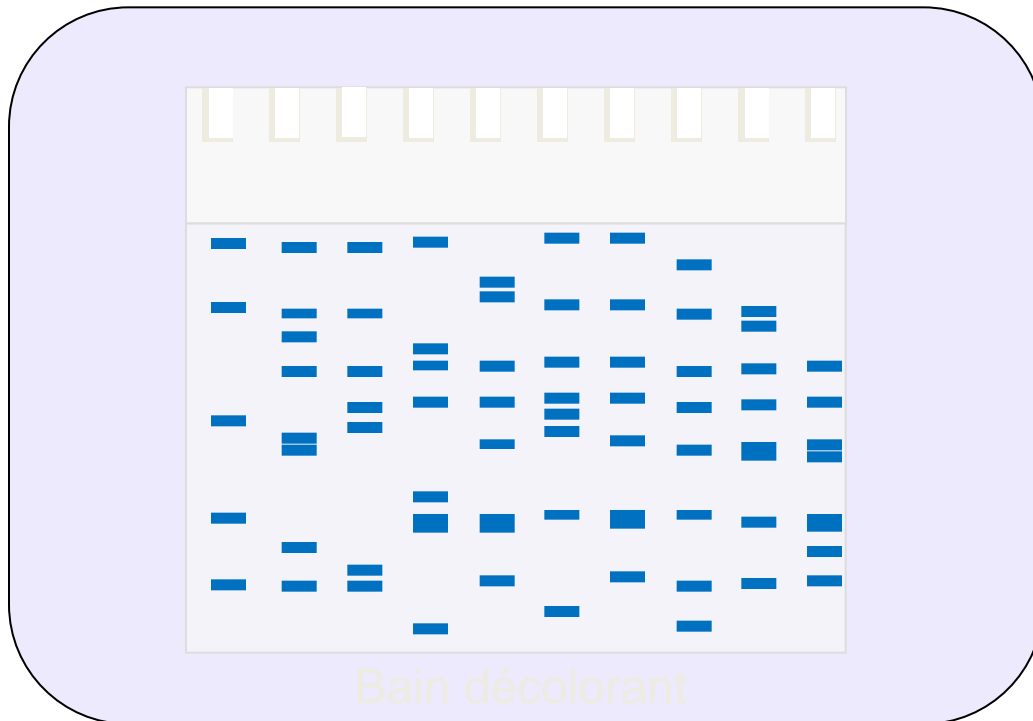
##### - Nitrate d'argent

Limite de détection : 10 ng



## D - Techniques électrophorétiques

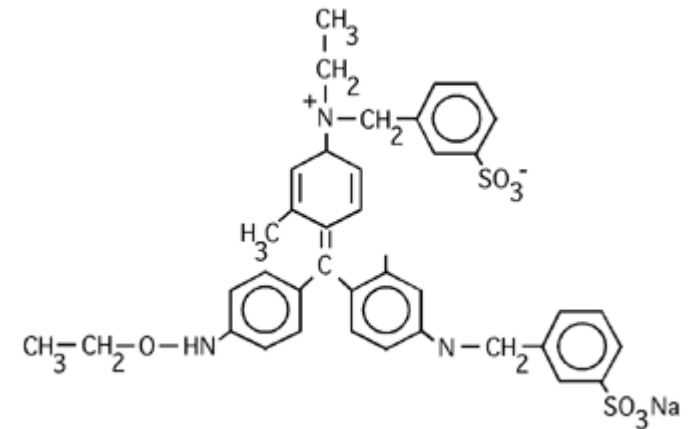
### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



#### COLORATION

##### - Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1 µg



bleu de Coomassie

##### - Nitrate d'argent

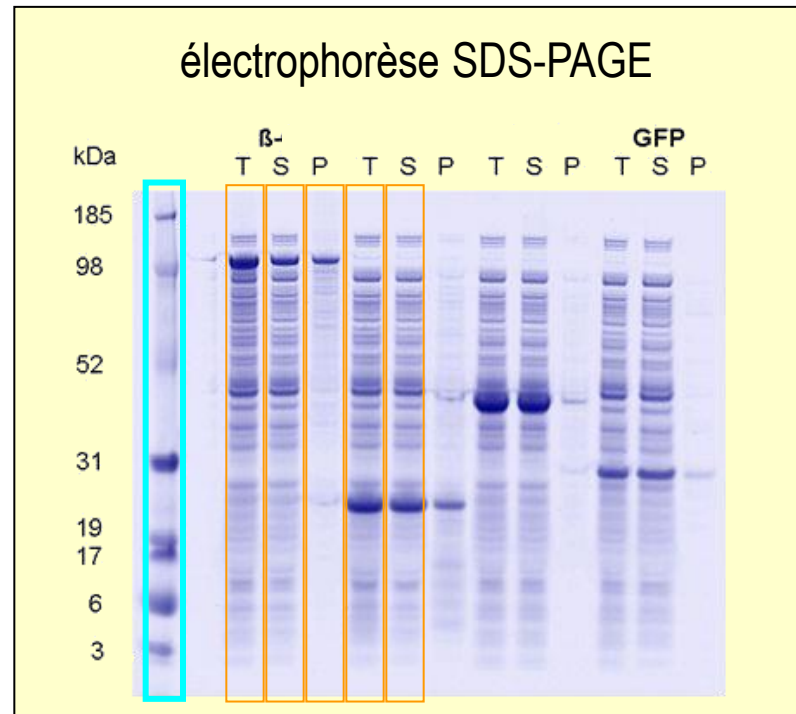
Limite de détection : 10 ng

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



## D - Techniques électrophorétiques

### 2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



Marqueurs (masses  
connues)

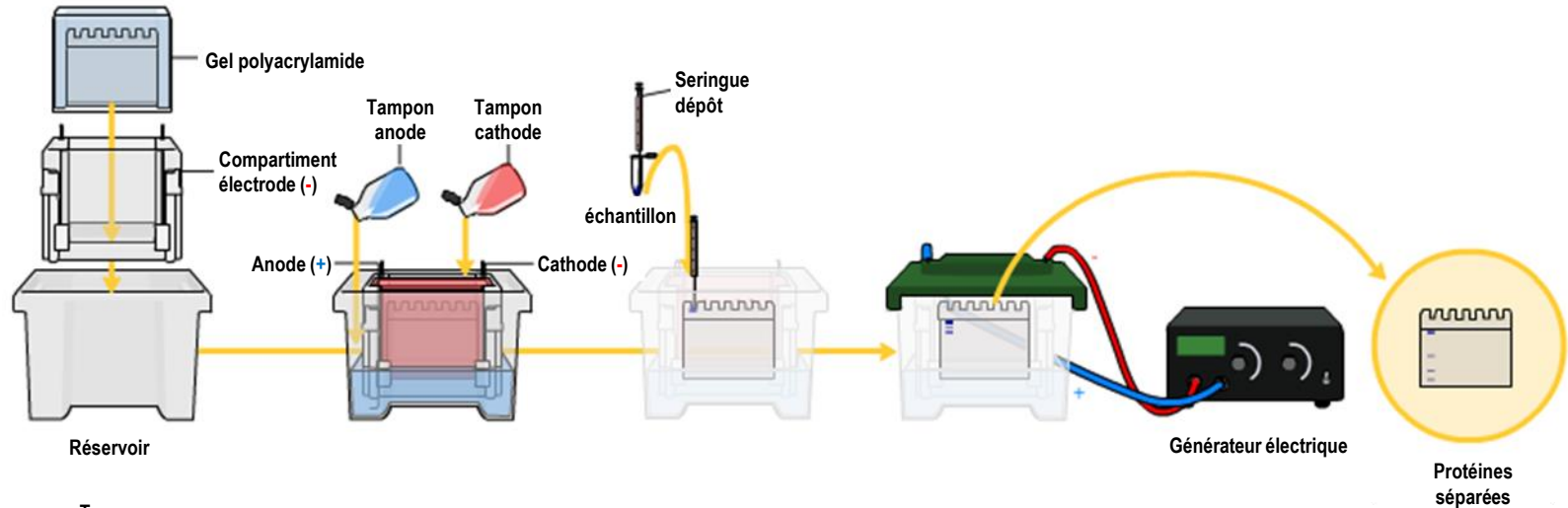




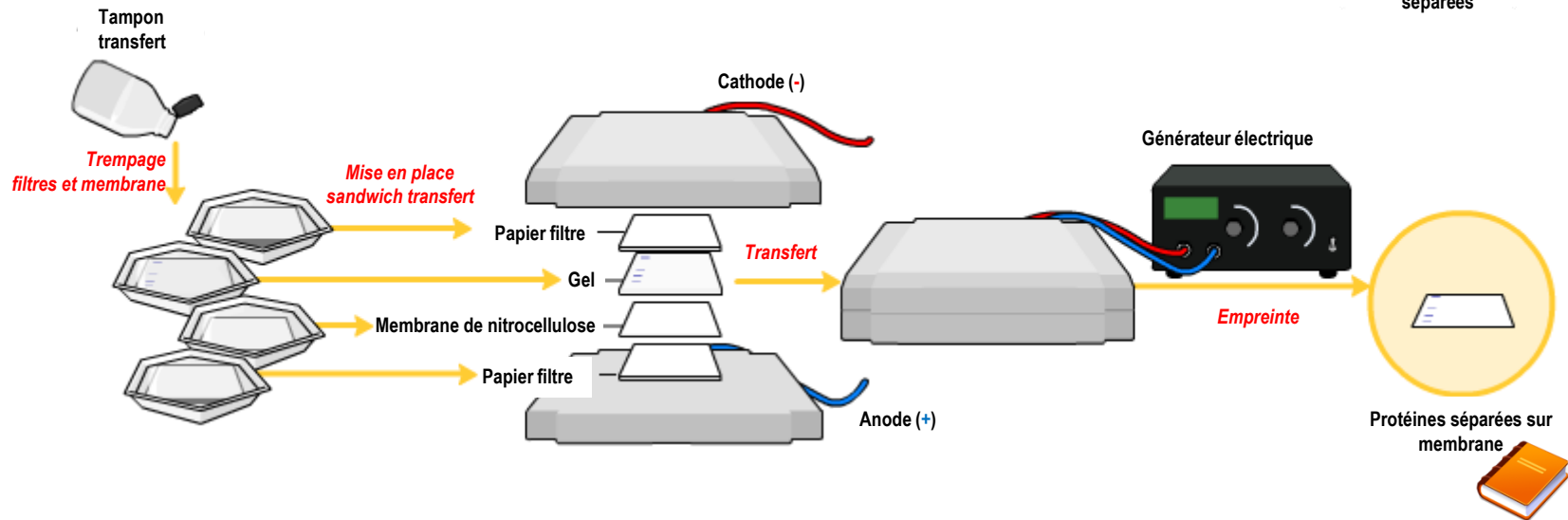
# E - Techniques immunoenzymatiques

## 1- Western Blot

1<sup>ère</sup> étape



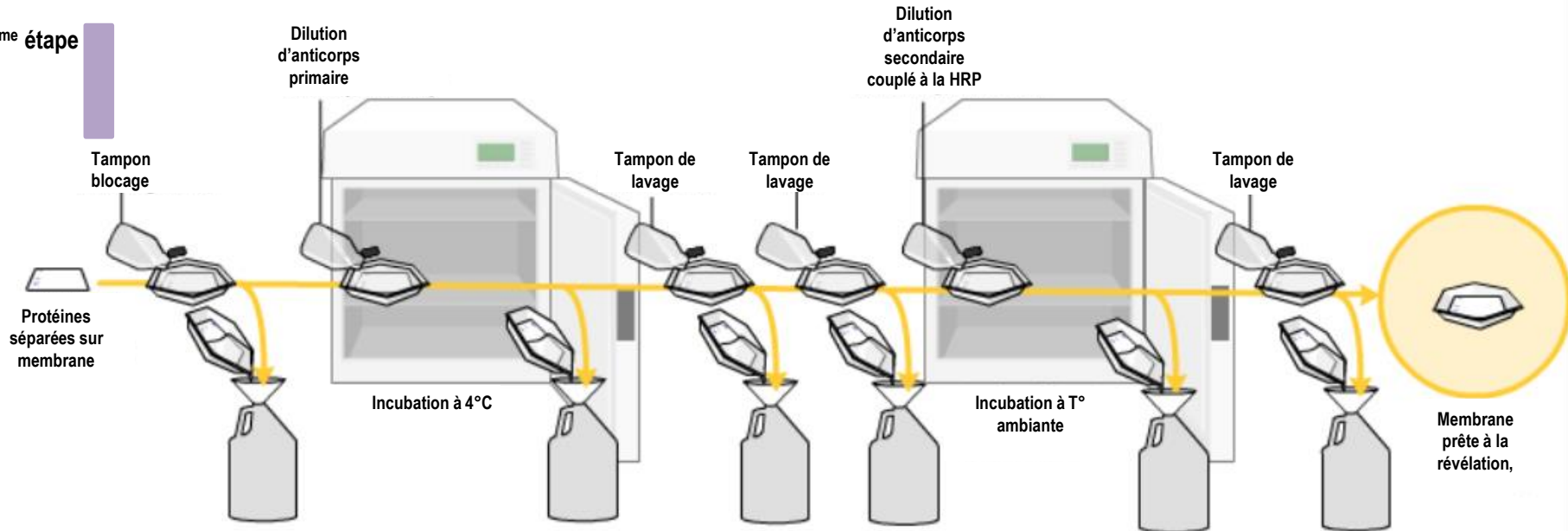
2<sup>ème</sup> étape



# E - Techniques immunoenzymatiques

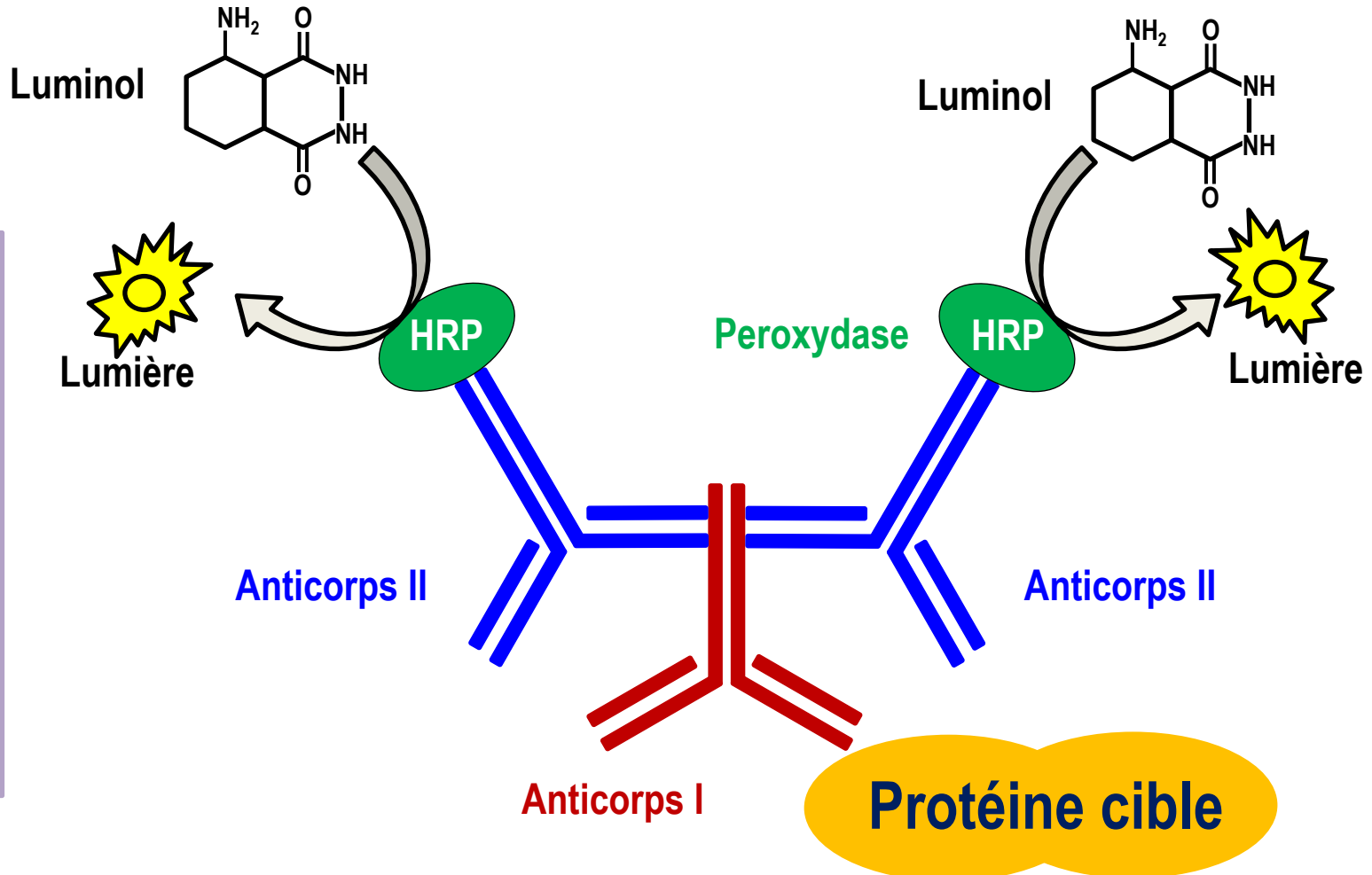
## 1- Western Blot

3<sup>ème</sup> étape



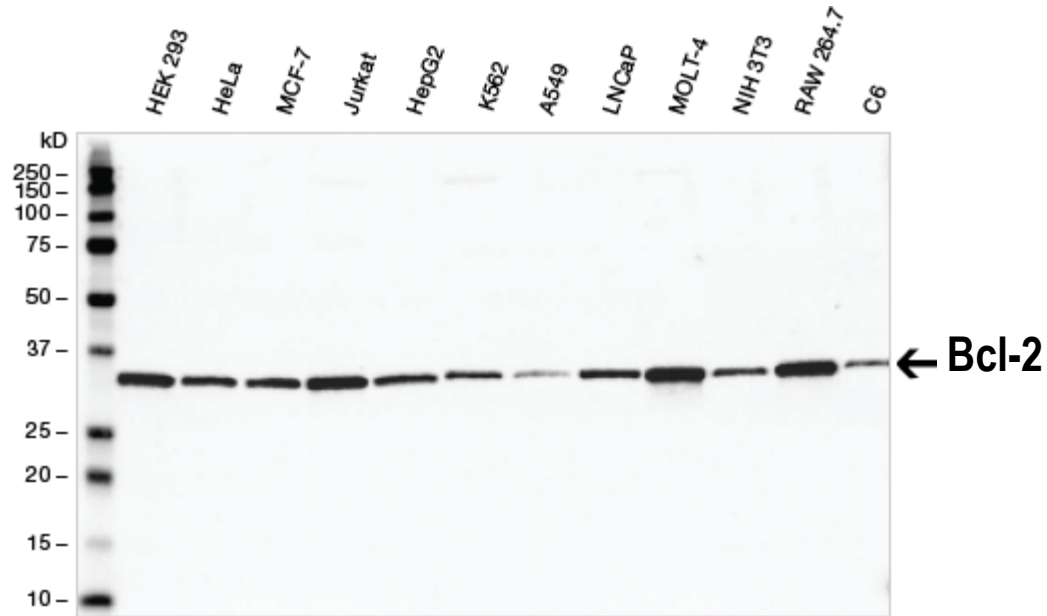
# E - Techniques immunoenzymatiques

## 1- Western Blot



# E - Techniques immunoenzymatiques

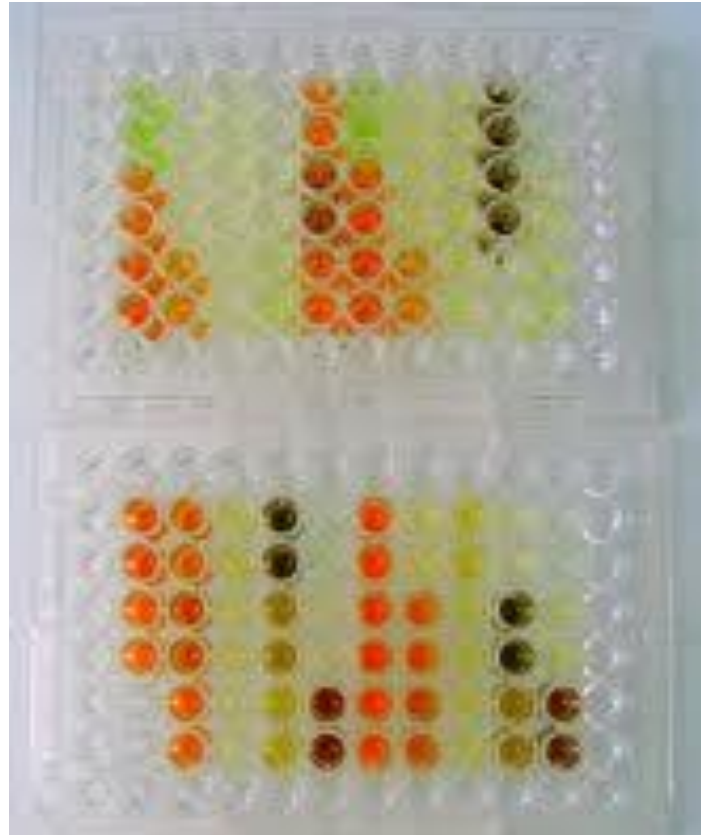
## 1- Western Blot



## 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

4

3

2

1

