

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**.

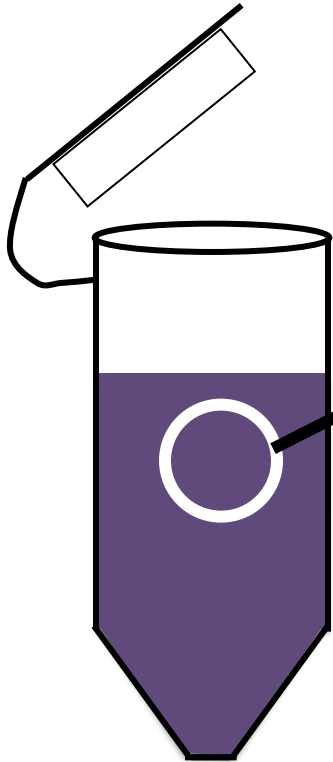
B - Précipitation différentielle des protéines

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 :

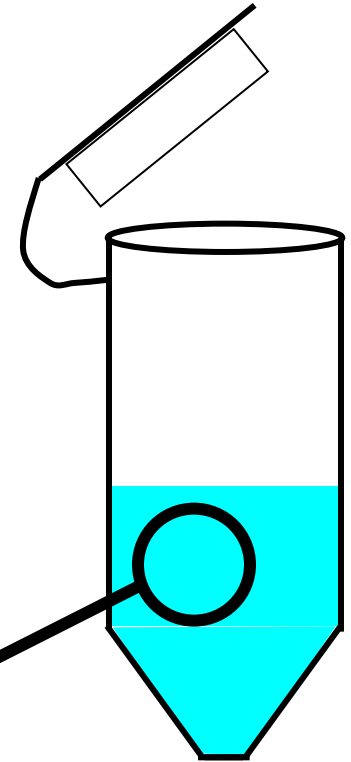
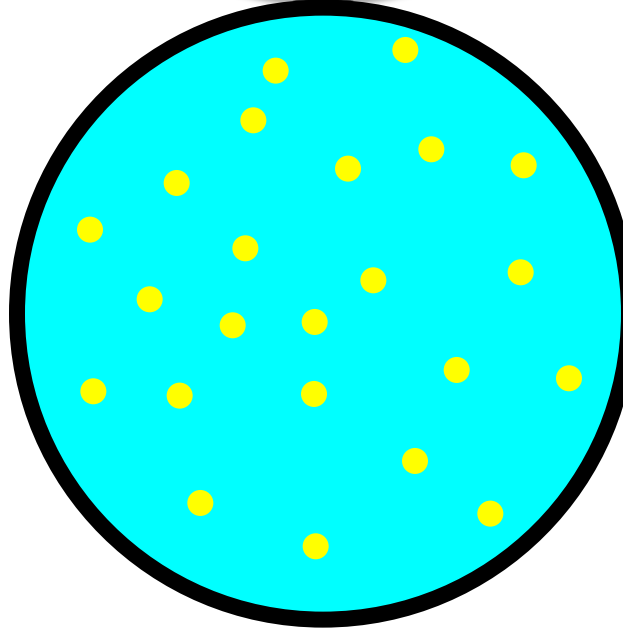
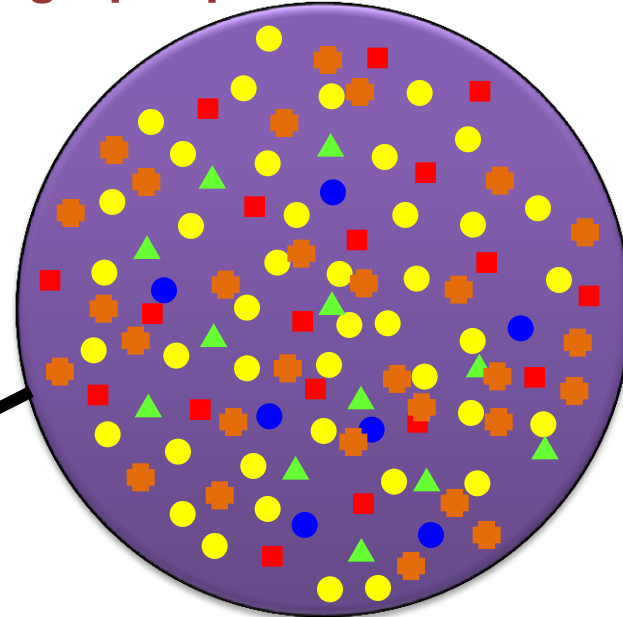
- le sel piège l'eau → précipitation des protéines.
Toutes les protéines ne précipitent pas pour des concentrations équivalentes en sels.
- plus la solubilité d'une protéine dans l'eau sera importante, plus la concentration en sels qu'il faudra ajouter pour obtenir sa précipitation sera élevée.
- les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



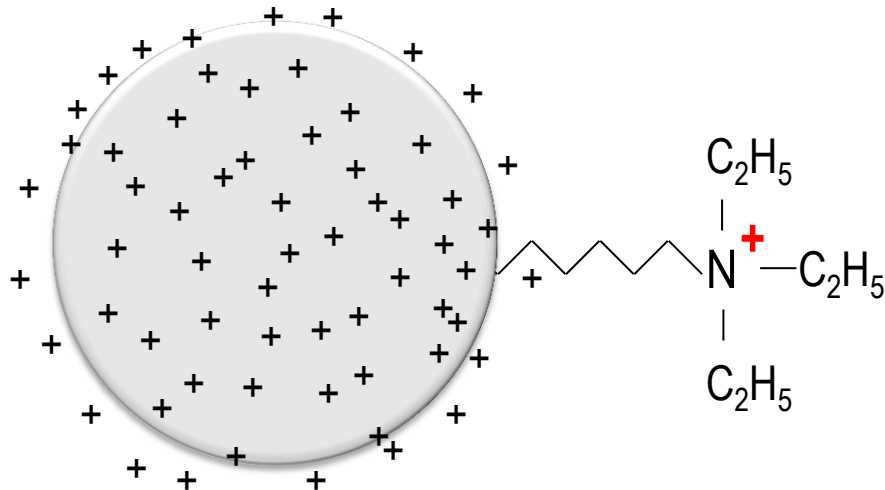
collecteur



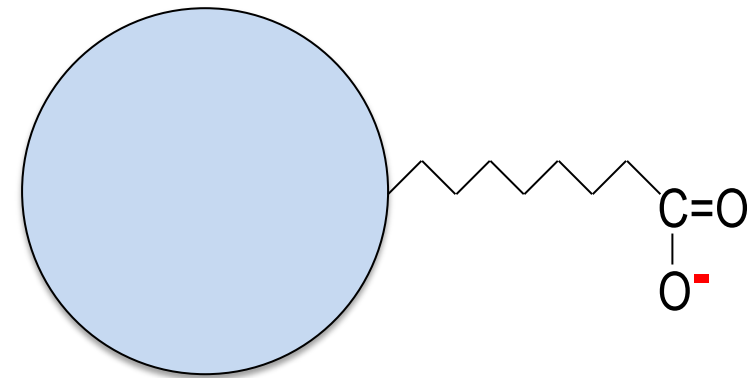
C - Techniques chromatographiques

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.

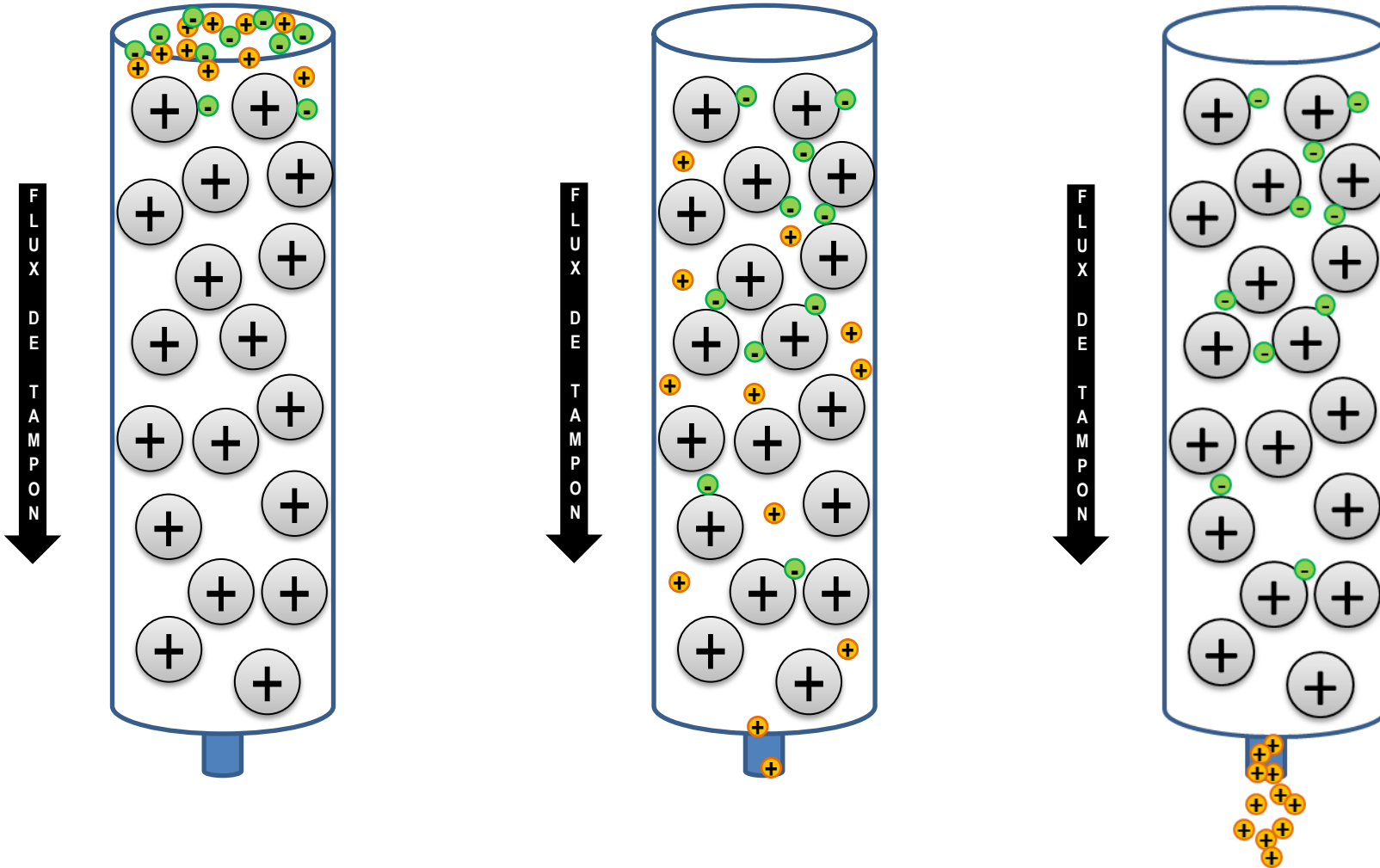


C - Techniques chromatographiques

1 - échange d'ions

charge

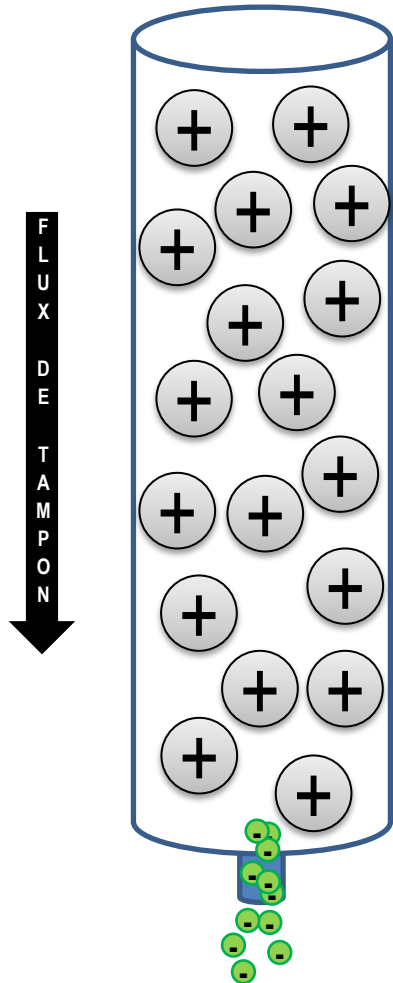
lavage



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.

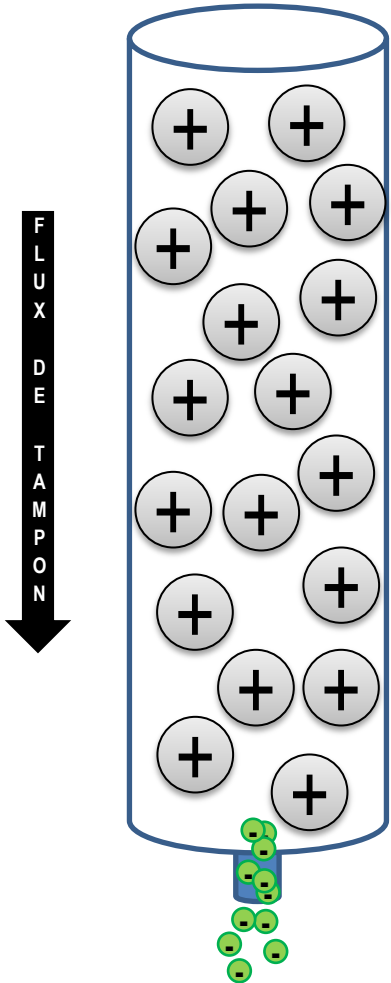
→ La molécule va se détacher du support immobile, elle est éluée.



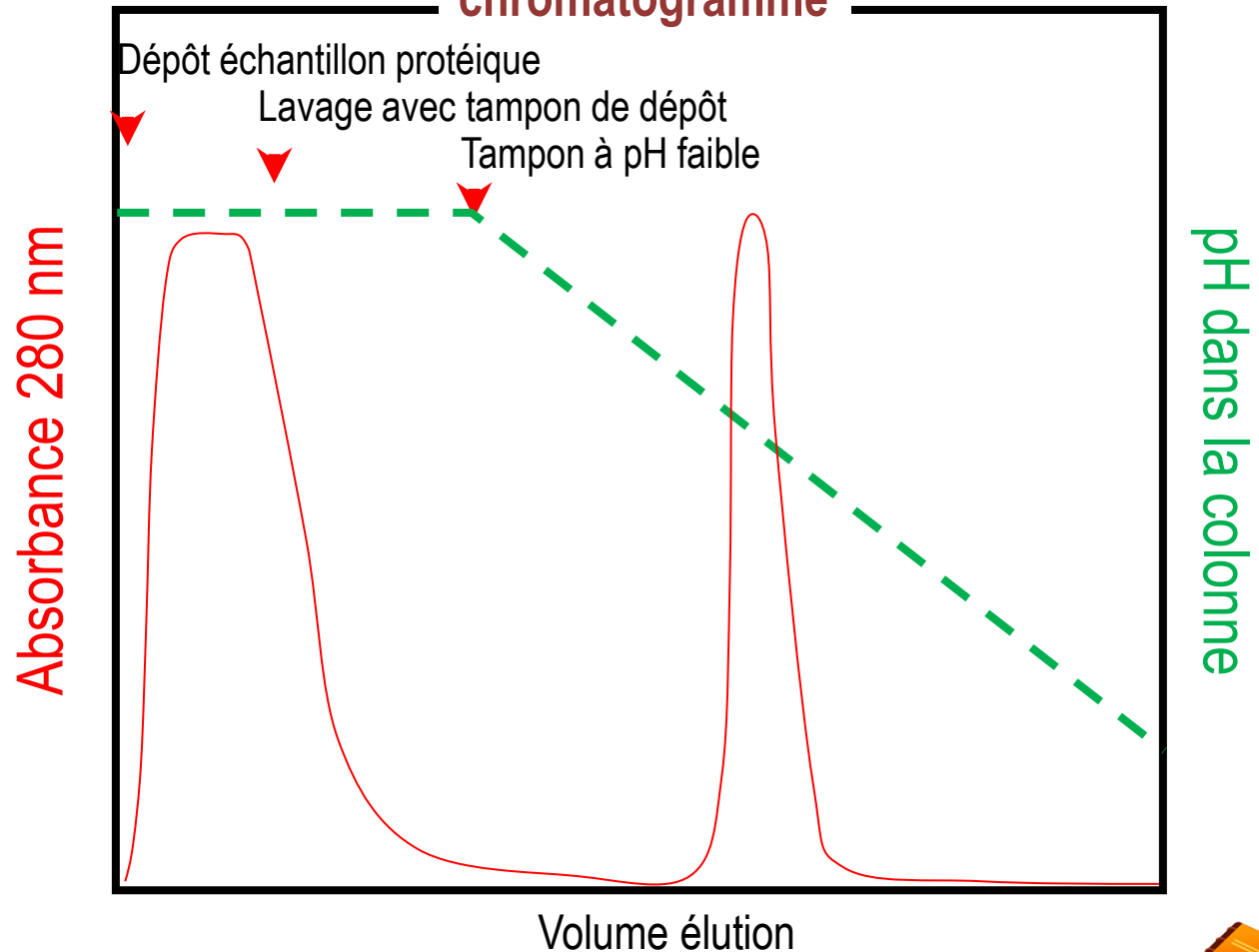
C - Techniques chromatographiques

1 - échange d'ions

élution



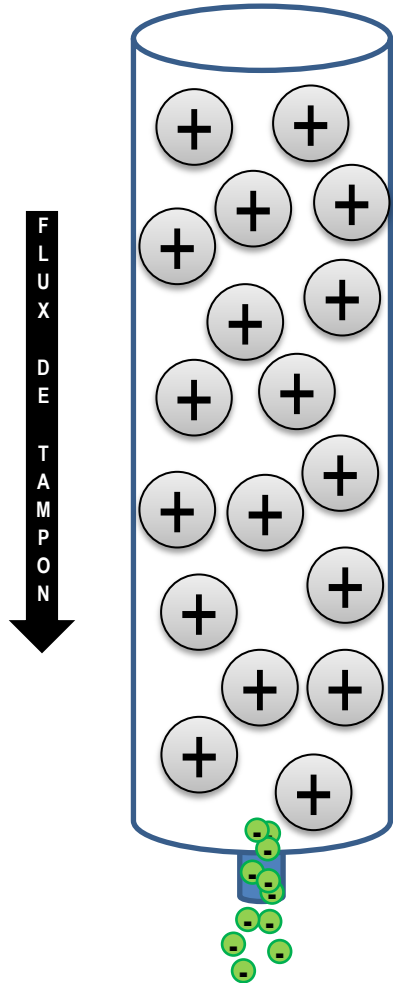
chromatogramme



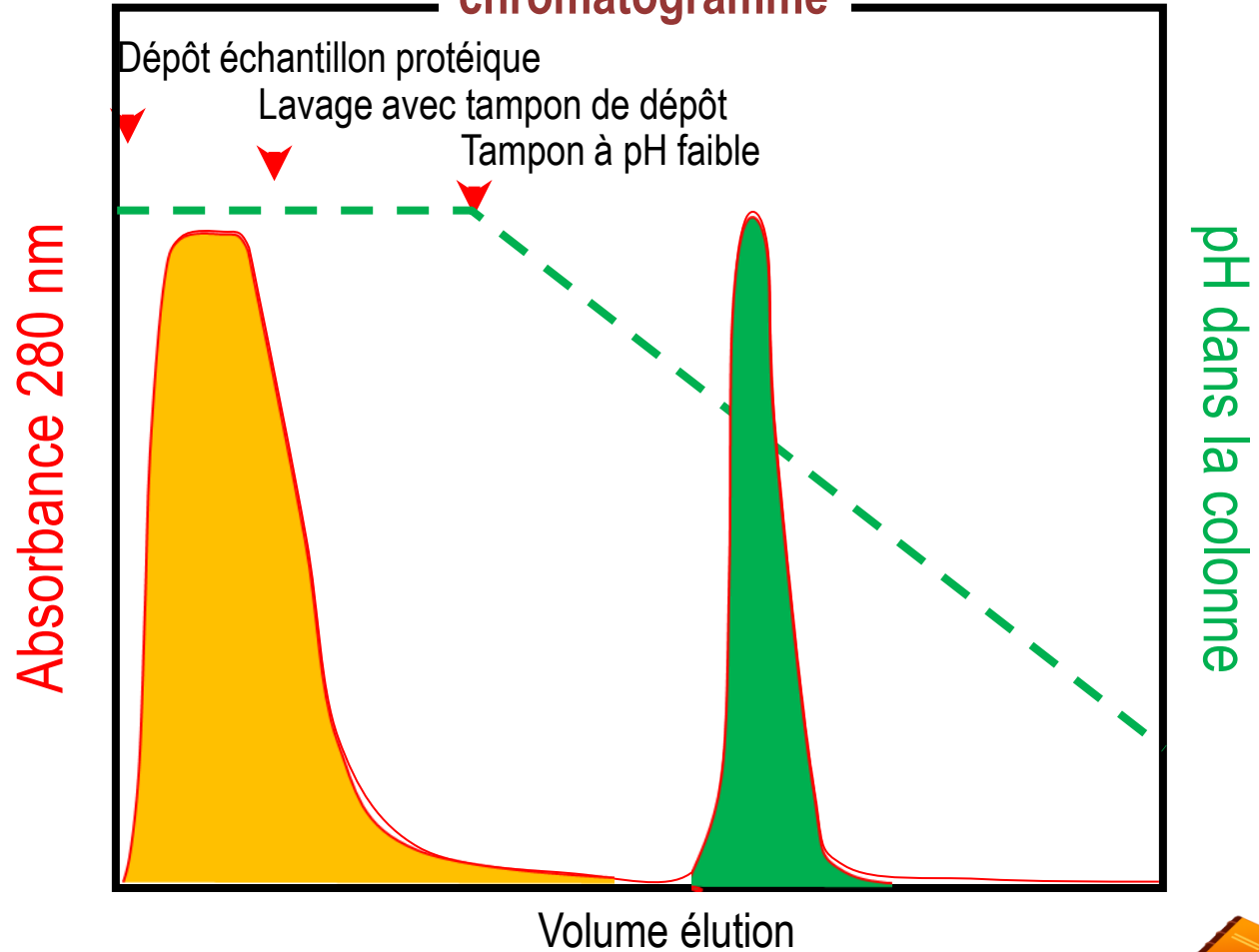
C - Techniques chromatographiques

1 - échange d'ions

élution



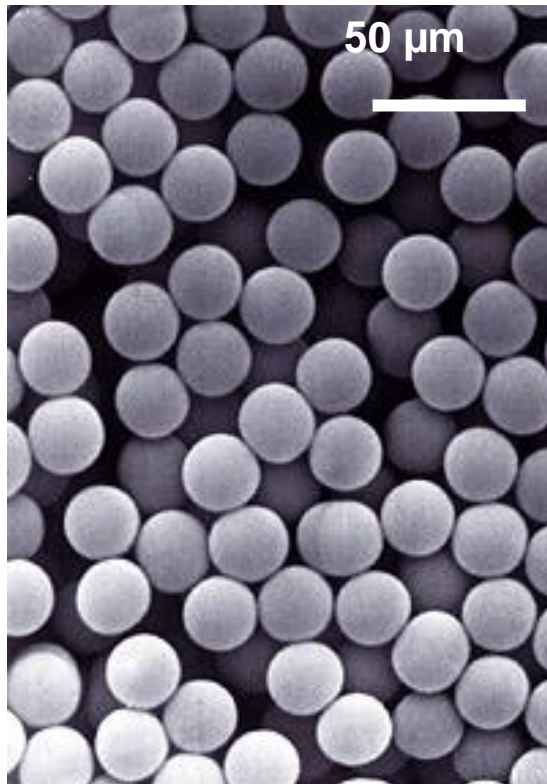
chromatogramme



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**.



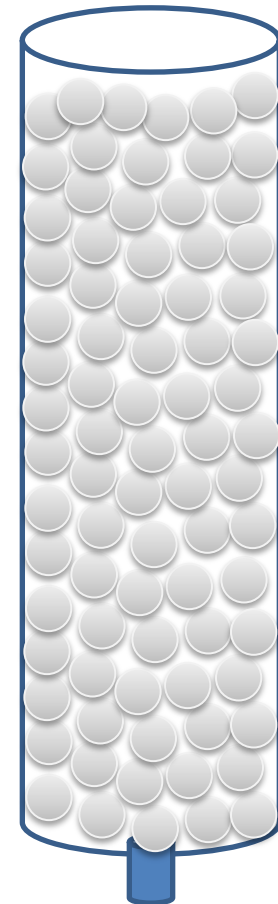
La filtration s'effectue sur **gel de dextrane** (polymère de sucres) de haut poids moléculaire (Sephadex, Sepharose...) :
après traitement chimique, ces macromolécules forment des **réseaux poreux à 3 dimensions**.



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 :

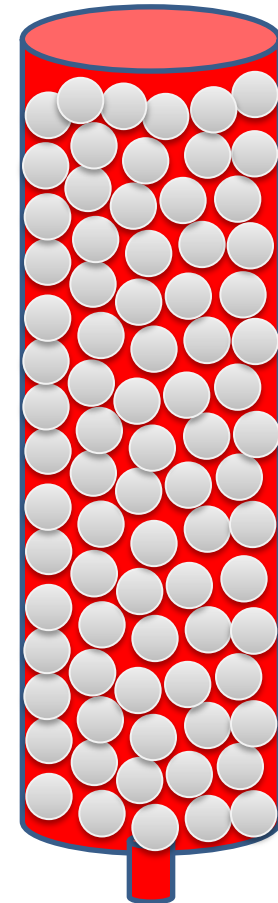


C - Techniques chromatographiques

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

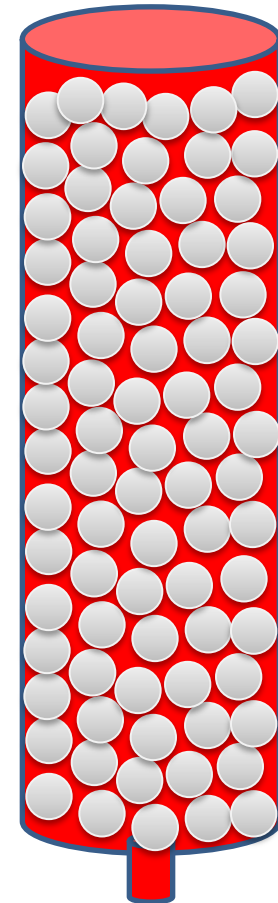
2 – exclusion diffusion

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.

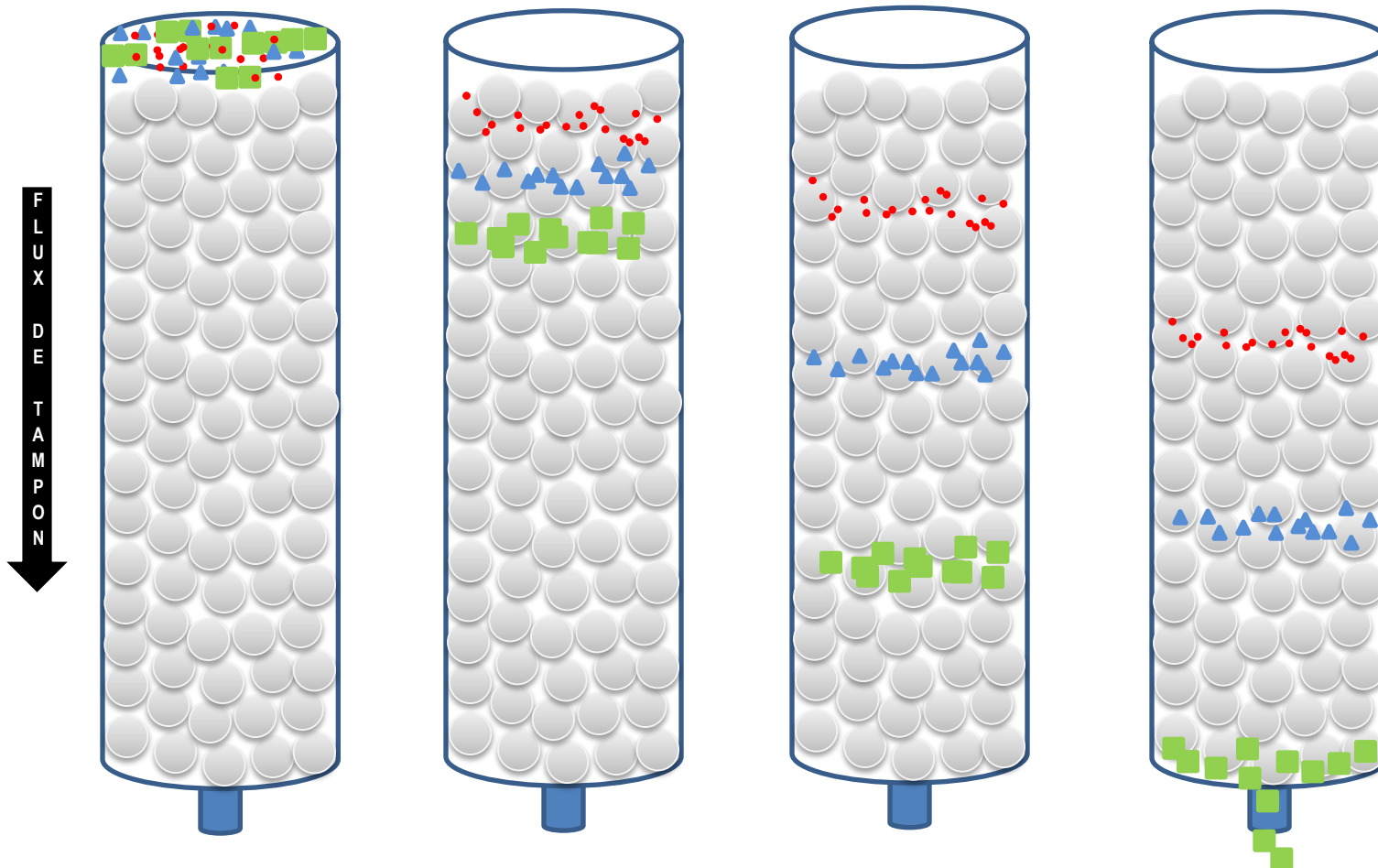
Les molécules de taille plus petite pénètrent **aussi** dans le réseau 3D des billes de Sephadex :

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



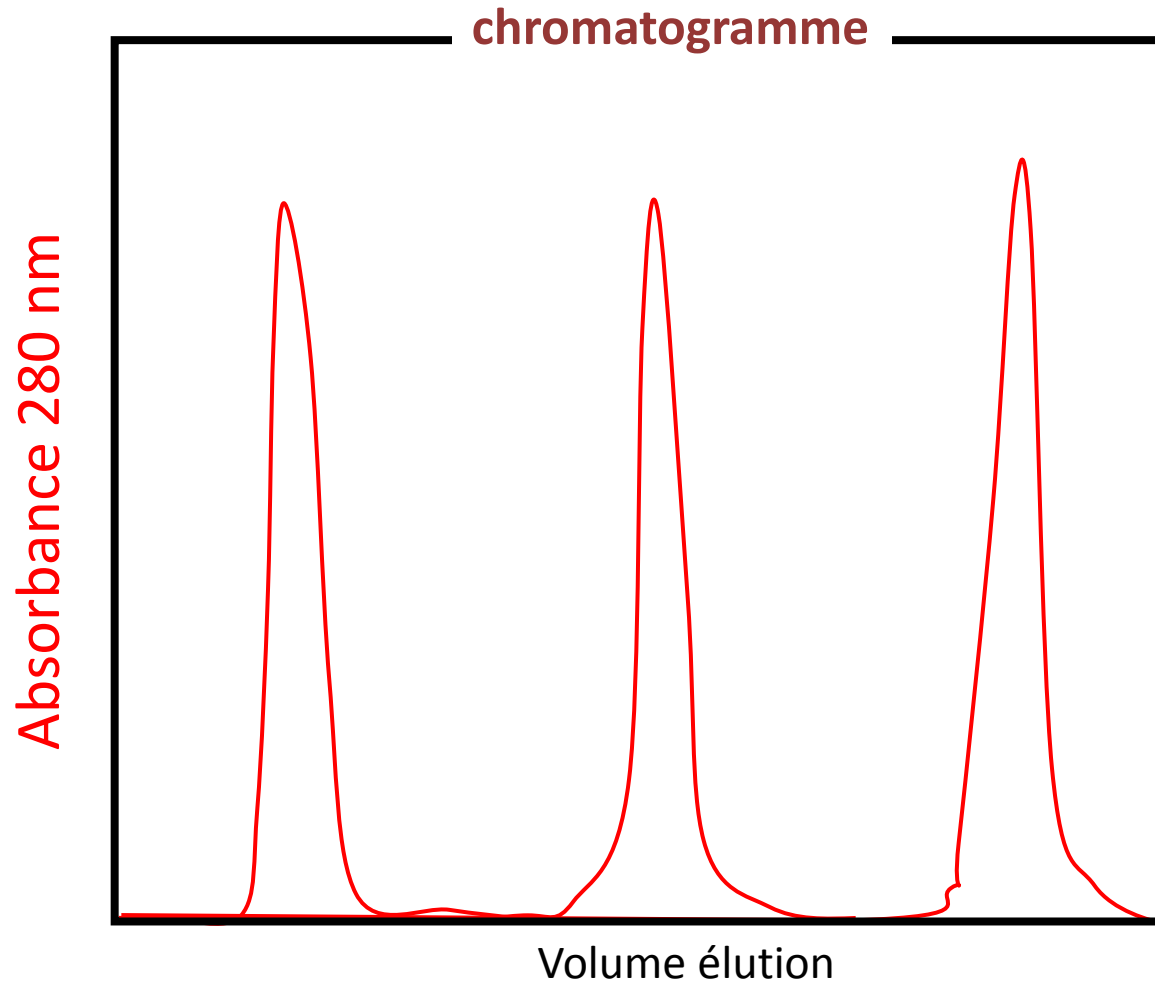
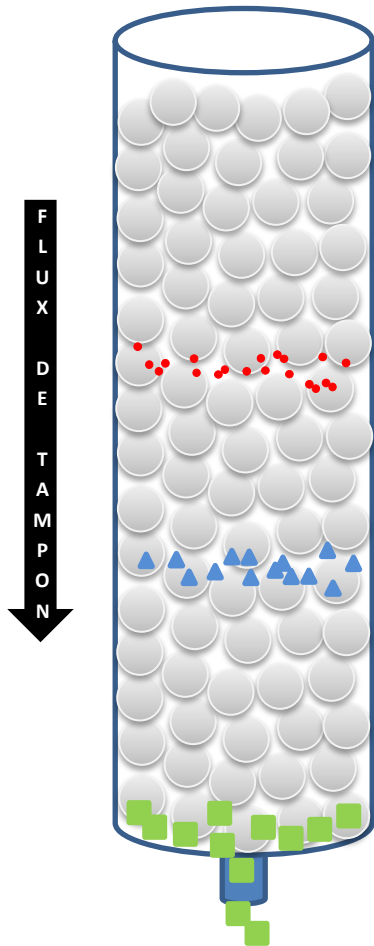
C - Techniques chromatographiques

2 – exclusion diffusion



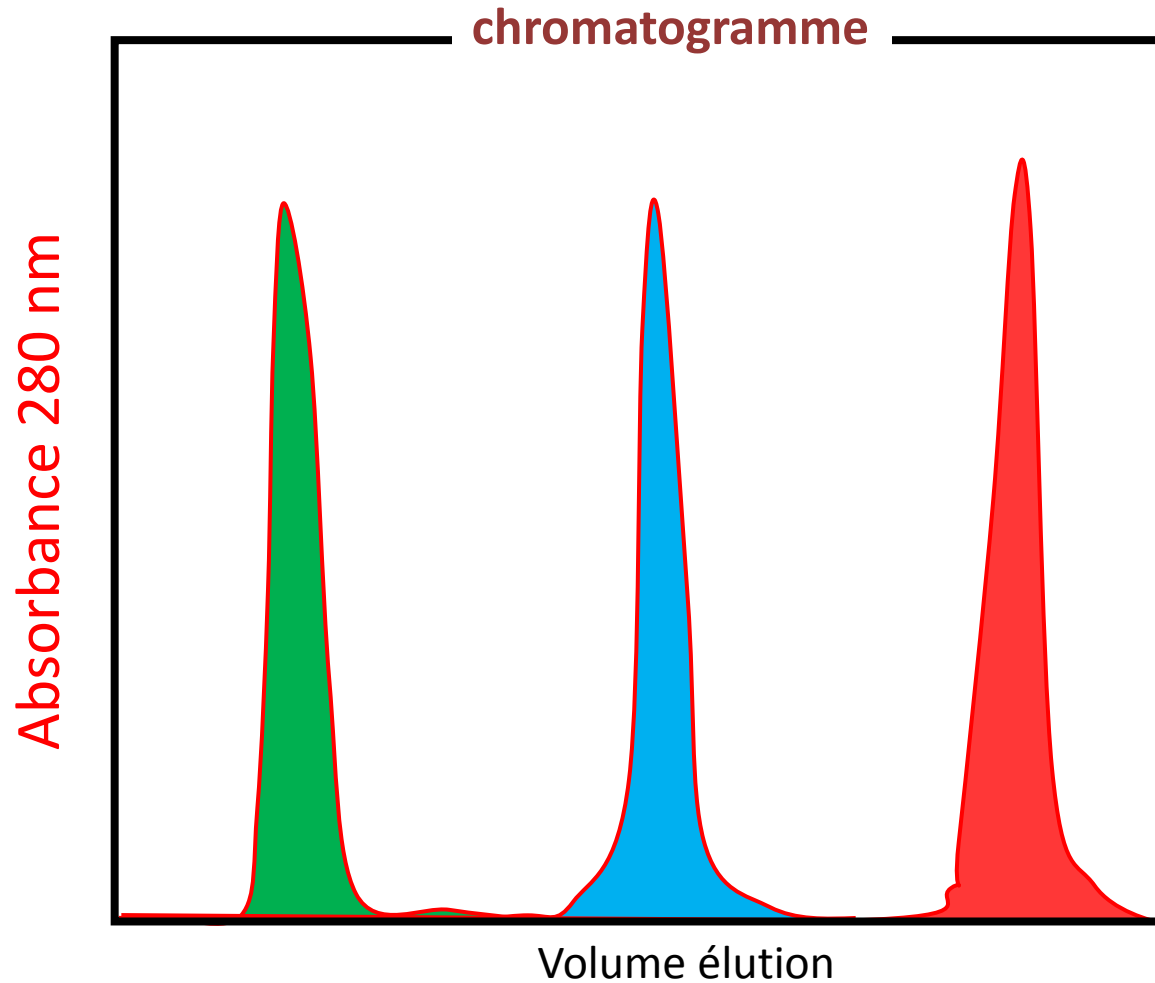
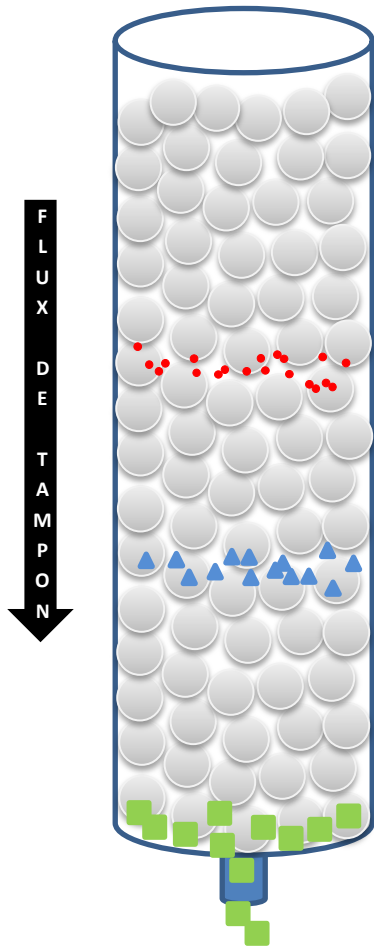
C - Techniques chromatographiques

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.

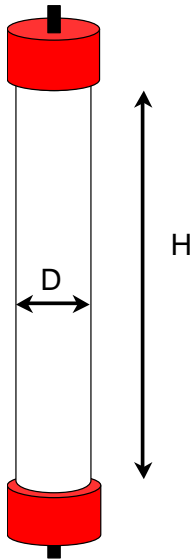
Le paramètre expérimental à déterminer :

→ **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

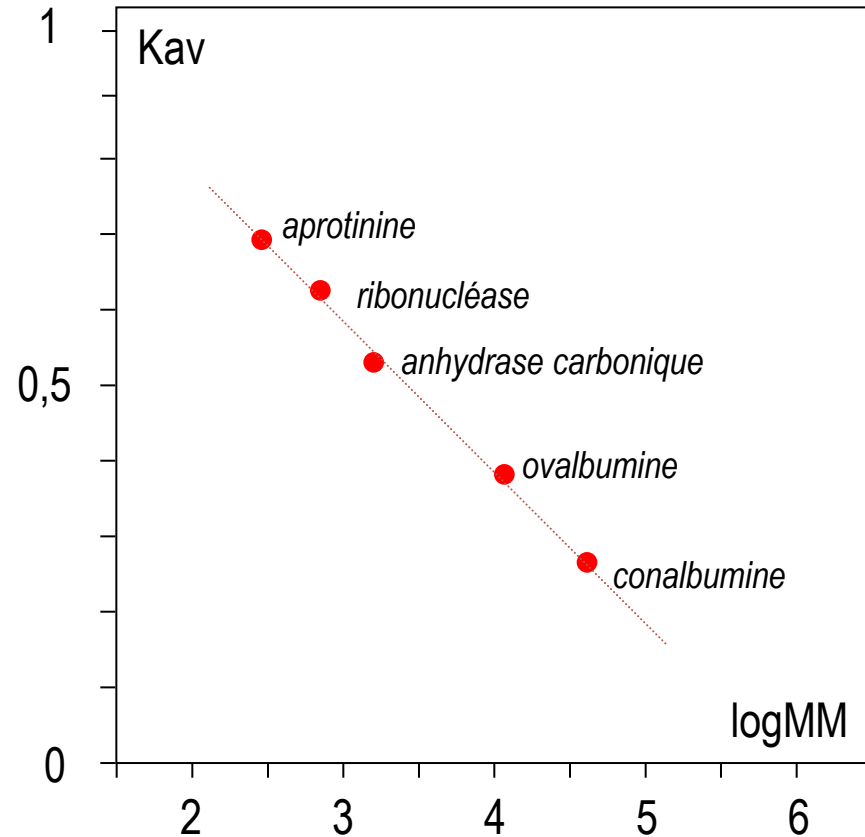
→ estimer la **MM** d'une protéine inconnue

(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.

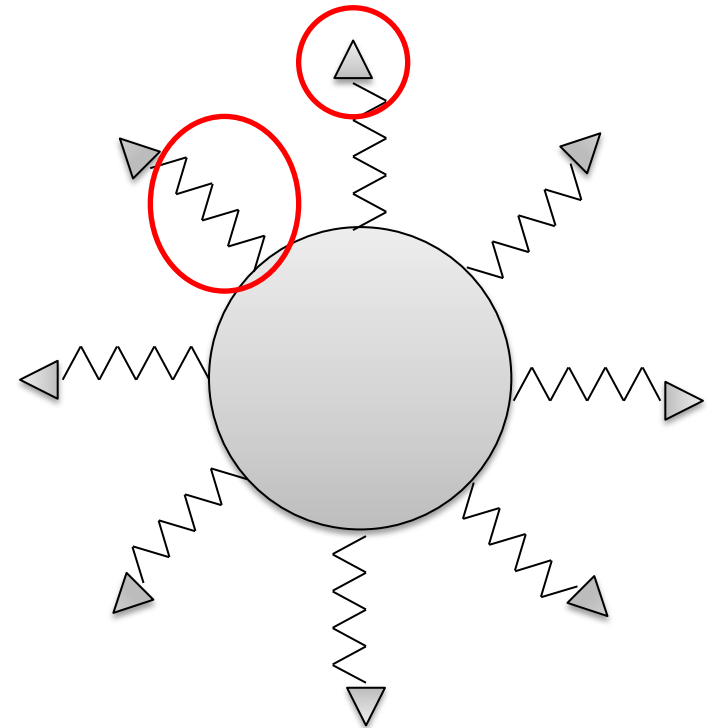
- 1^{ère} étape : **fixer de façon covalente le ligand sur la phase stationnaire** (utilisation d'un groupement chimique réactif).
- L'élution se fait grâce à un excès libre de ligand, un saut de pH ou une augmentation de la force ionique de la phase mobile.

C - Techniques chromatographiques

3 – affinité

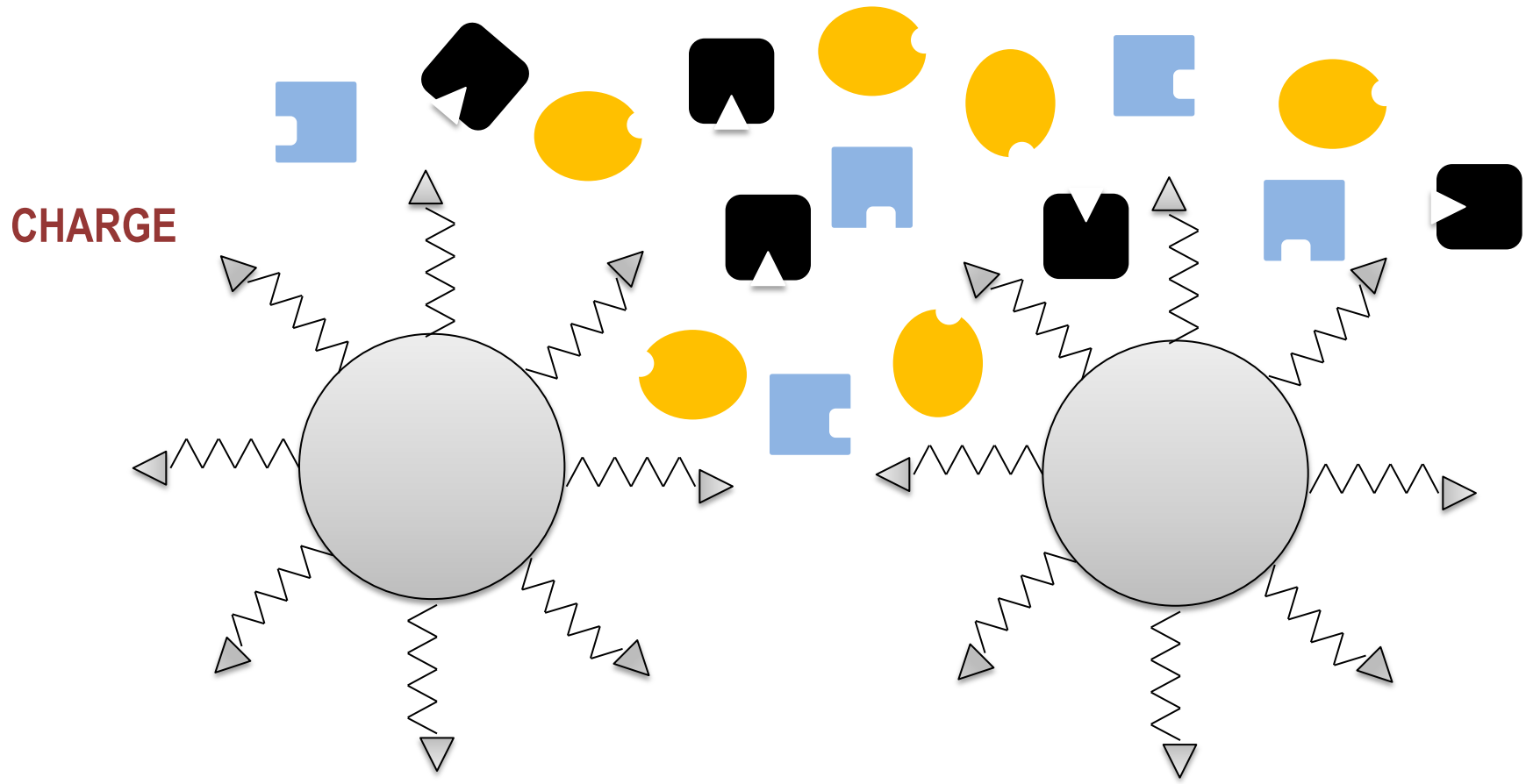
La fixation du ligand sur la résine se fait *via* un bras chimique appelé **espaceur**.

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



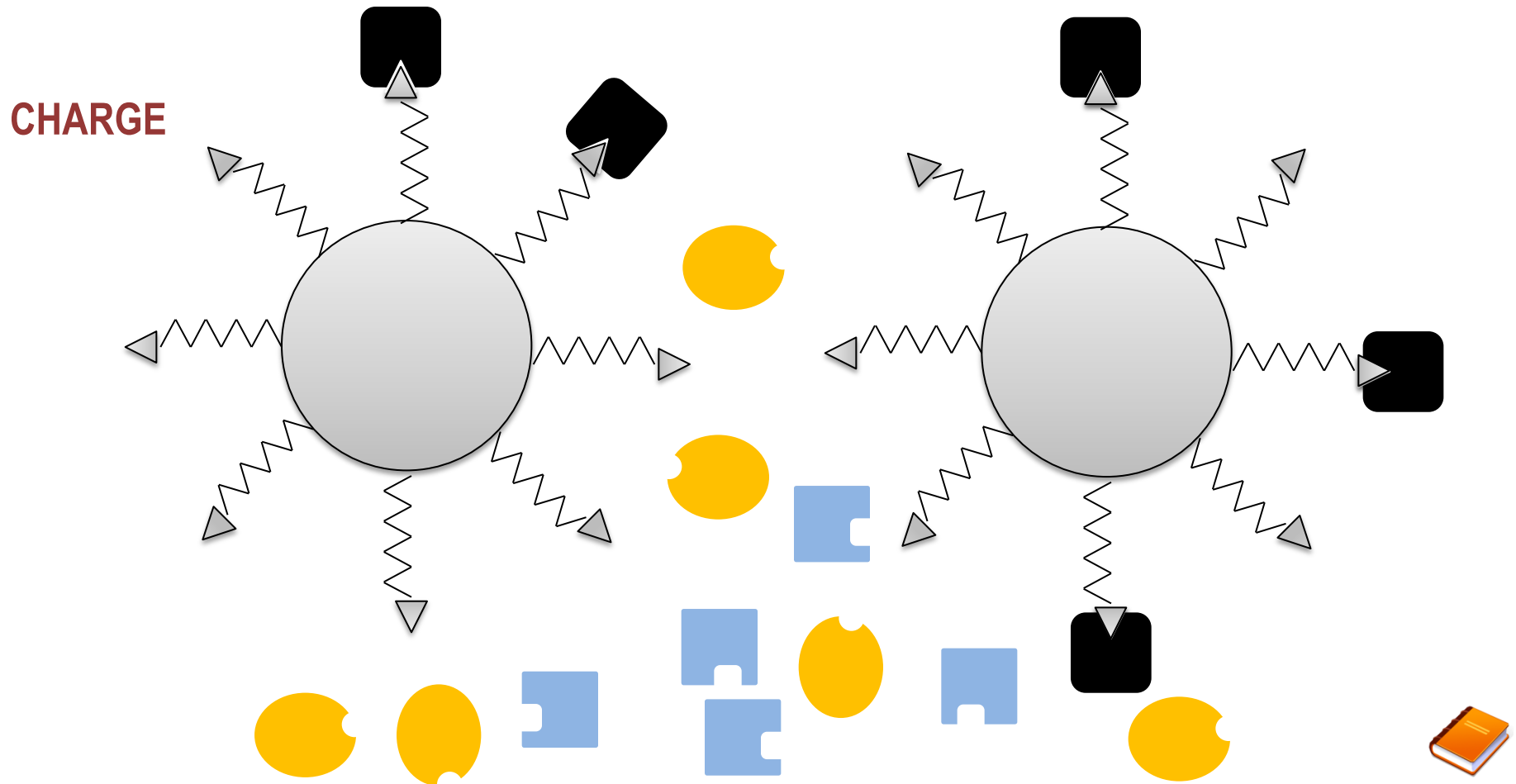
C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



C - Techniques chromatographiques

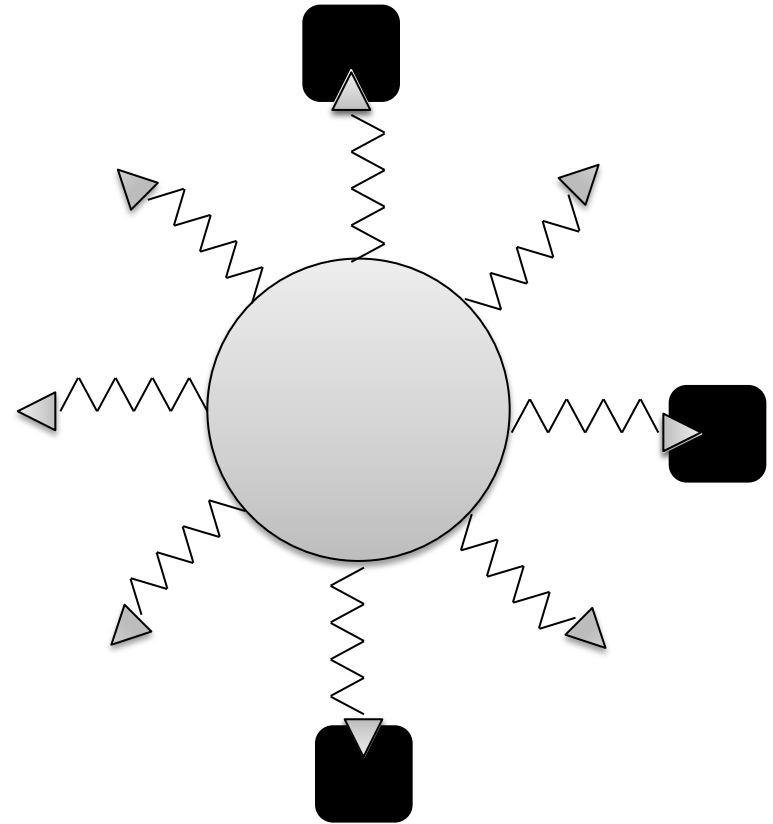
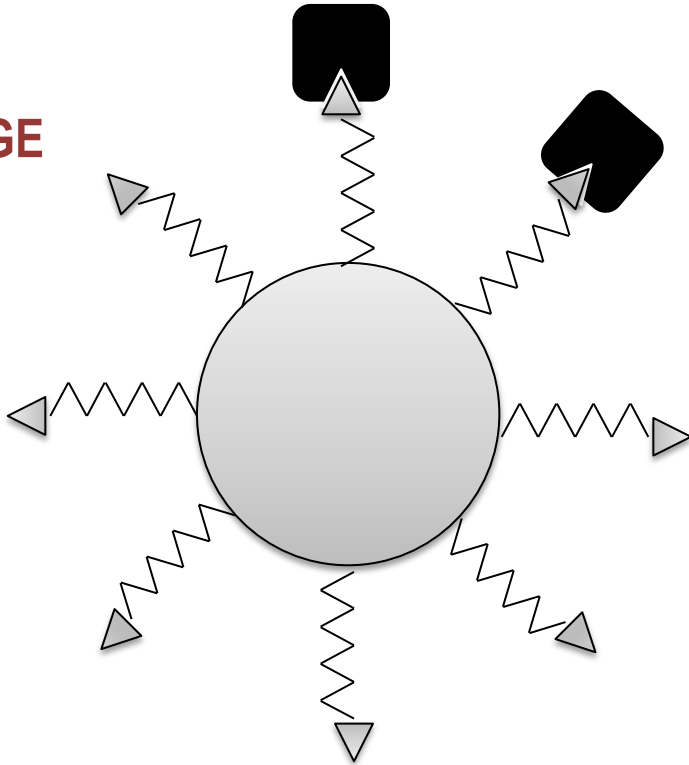
3 – affinité



C - Techniques chromatographiques

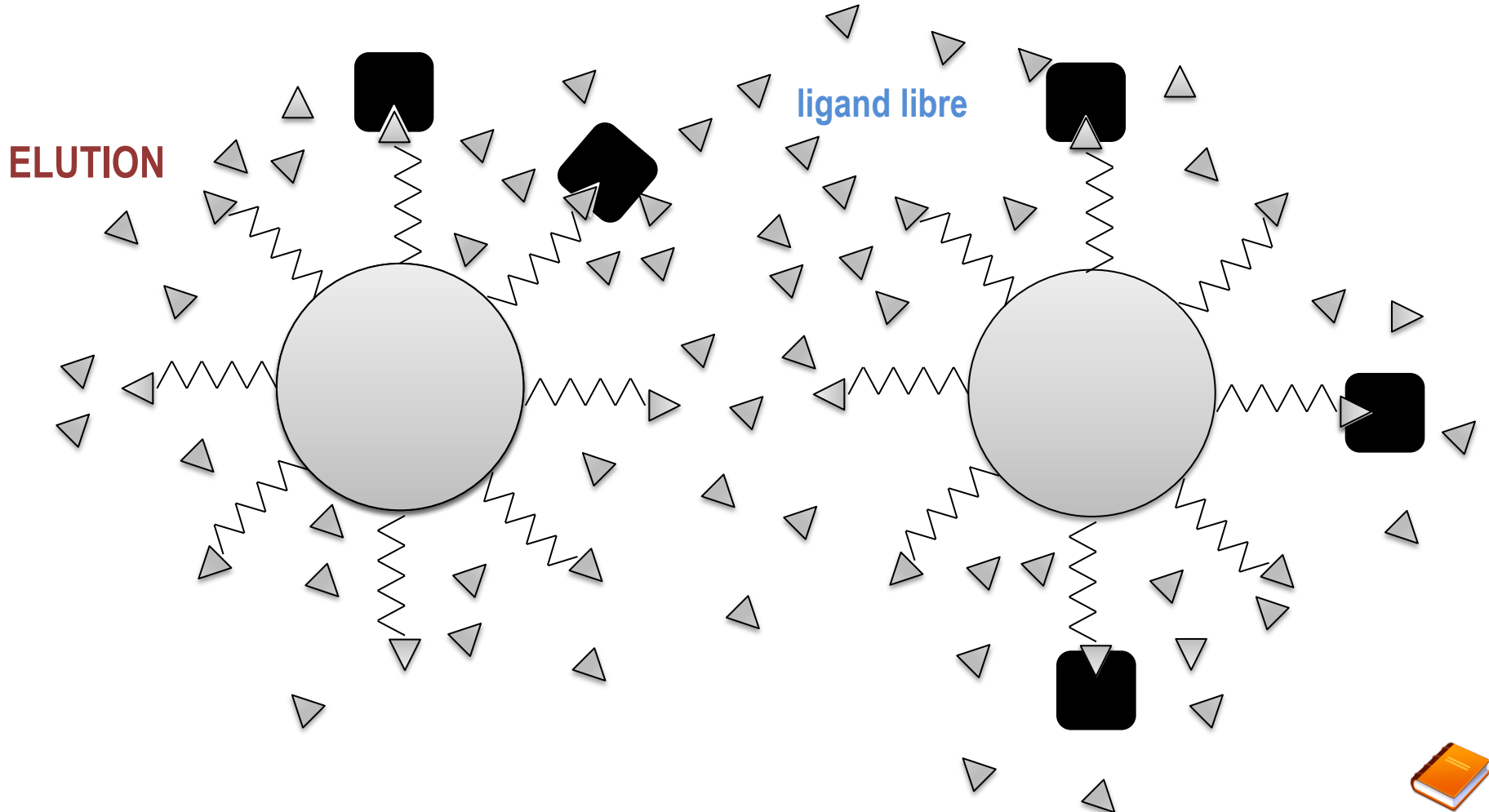
3 – affinité

LAVAGE



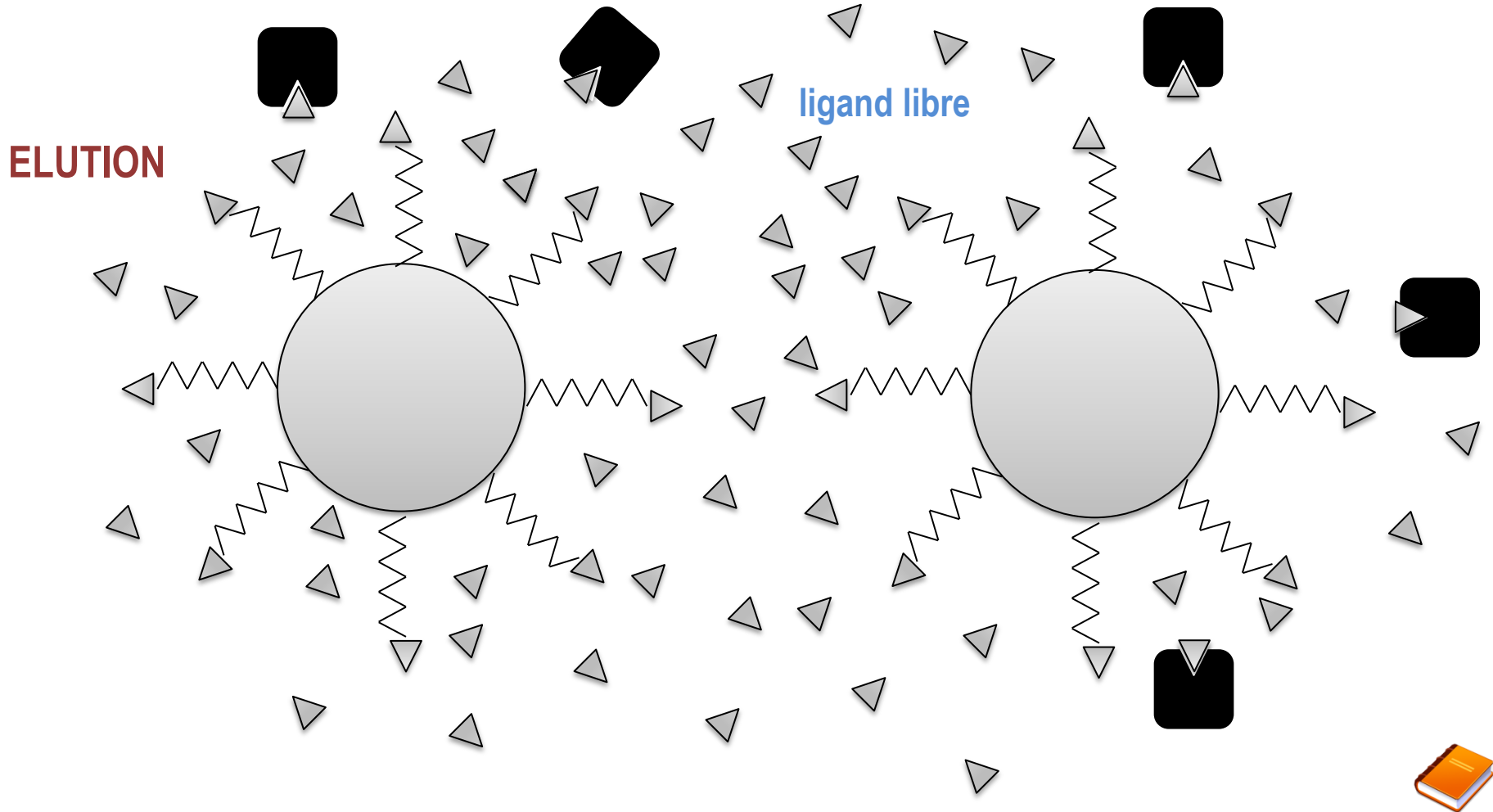
C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



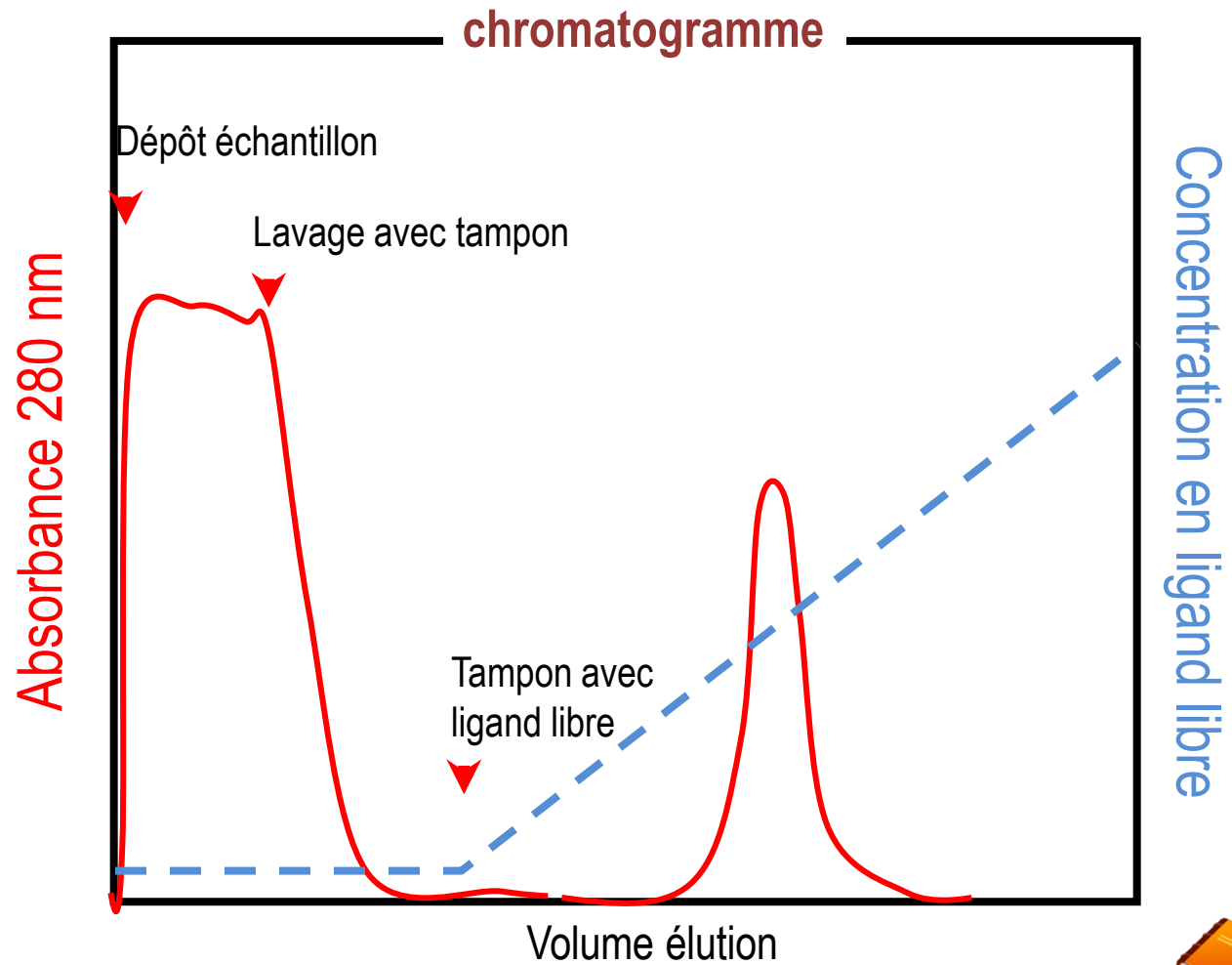
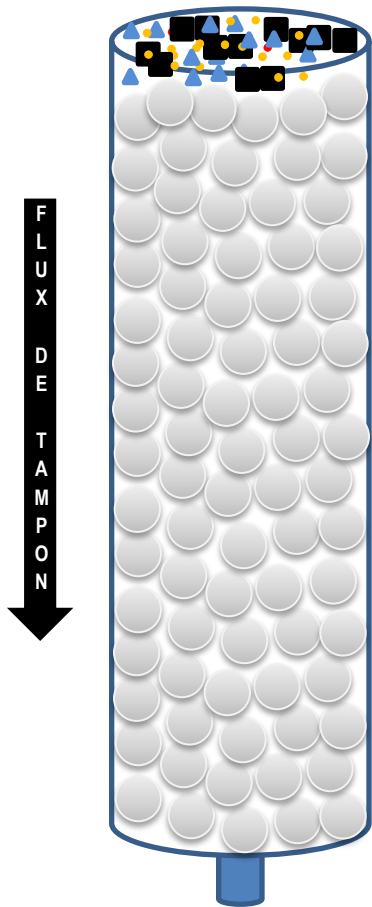
C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



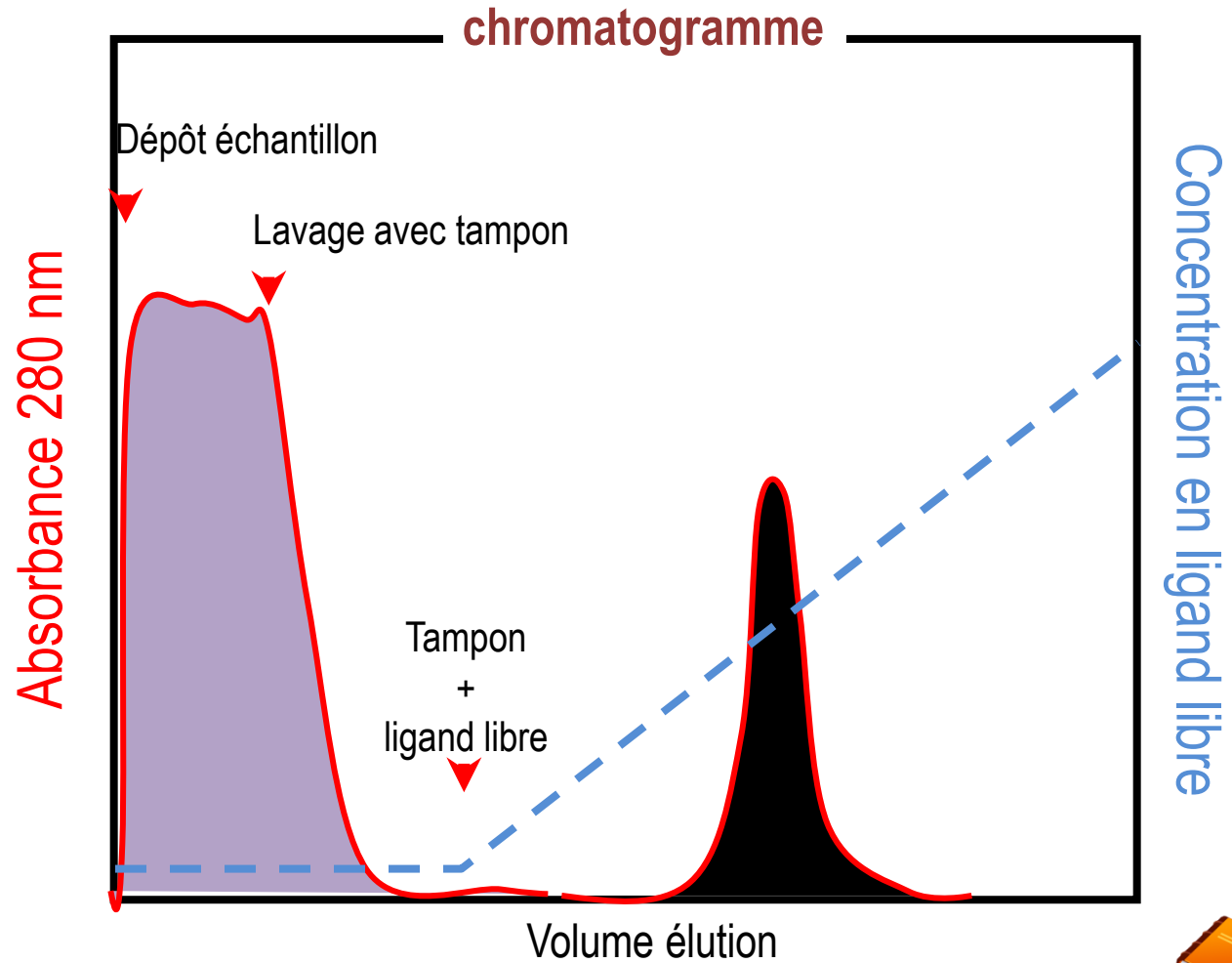
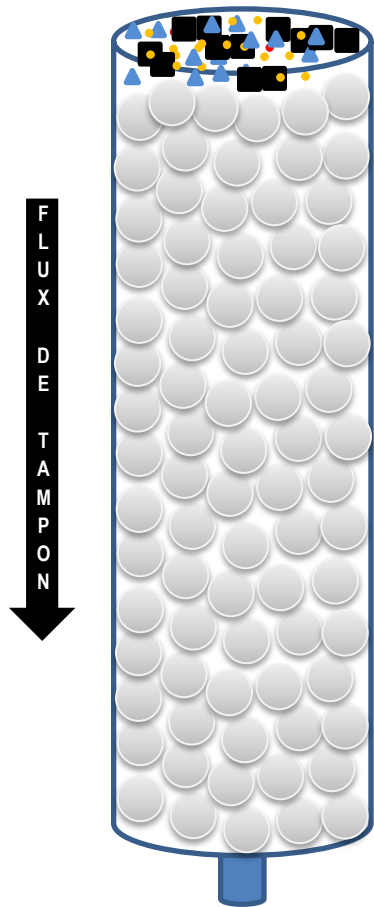
C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



C - Techniques chromatographiques

3 – affinité



D - Techniques électrophorétiques

1 – électrophorèse sur papier



Trempage tampon de migration



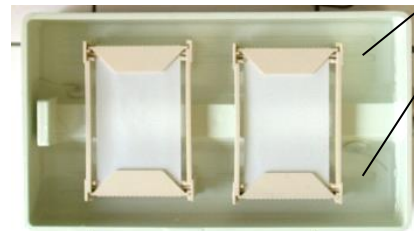
Essorage



Fixation sur support

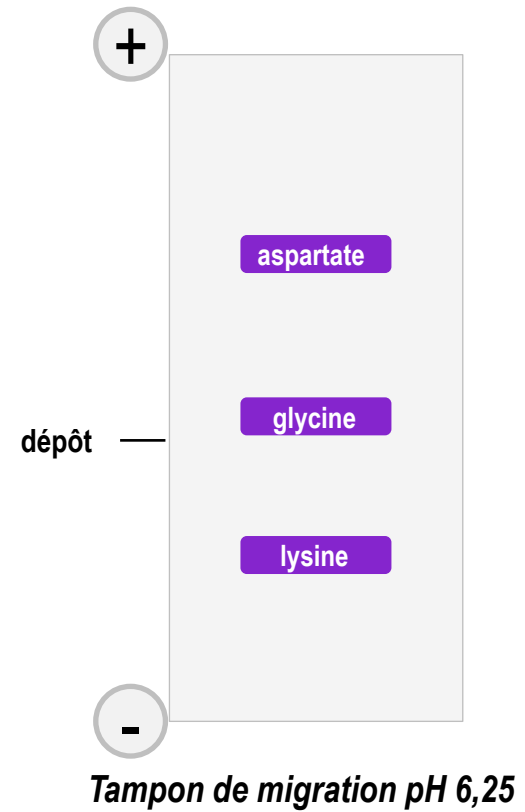


Migration sous champs électrique



Mise en place dans la cuve

tampon de migration

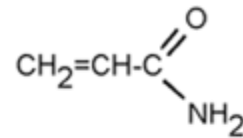


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'**acrylamide** est une petite molécule

acrylamide

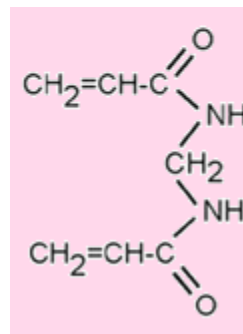
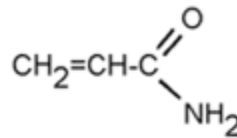


D - Techniques électrophorétiques

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



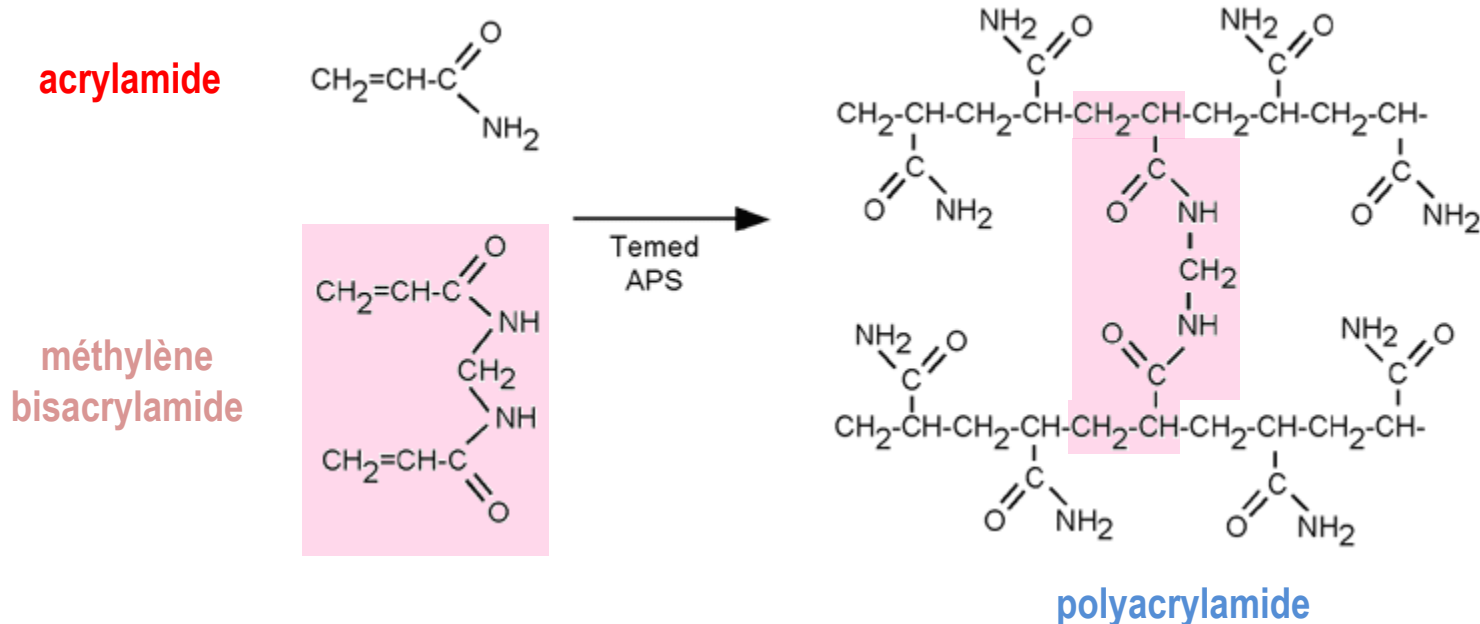
méthylène bisacrylamide



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 :

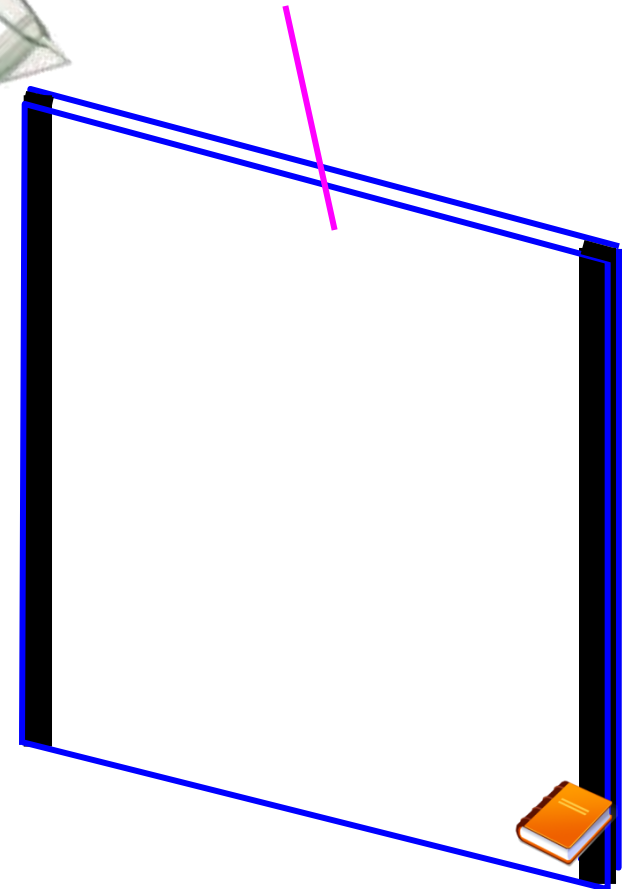


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

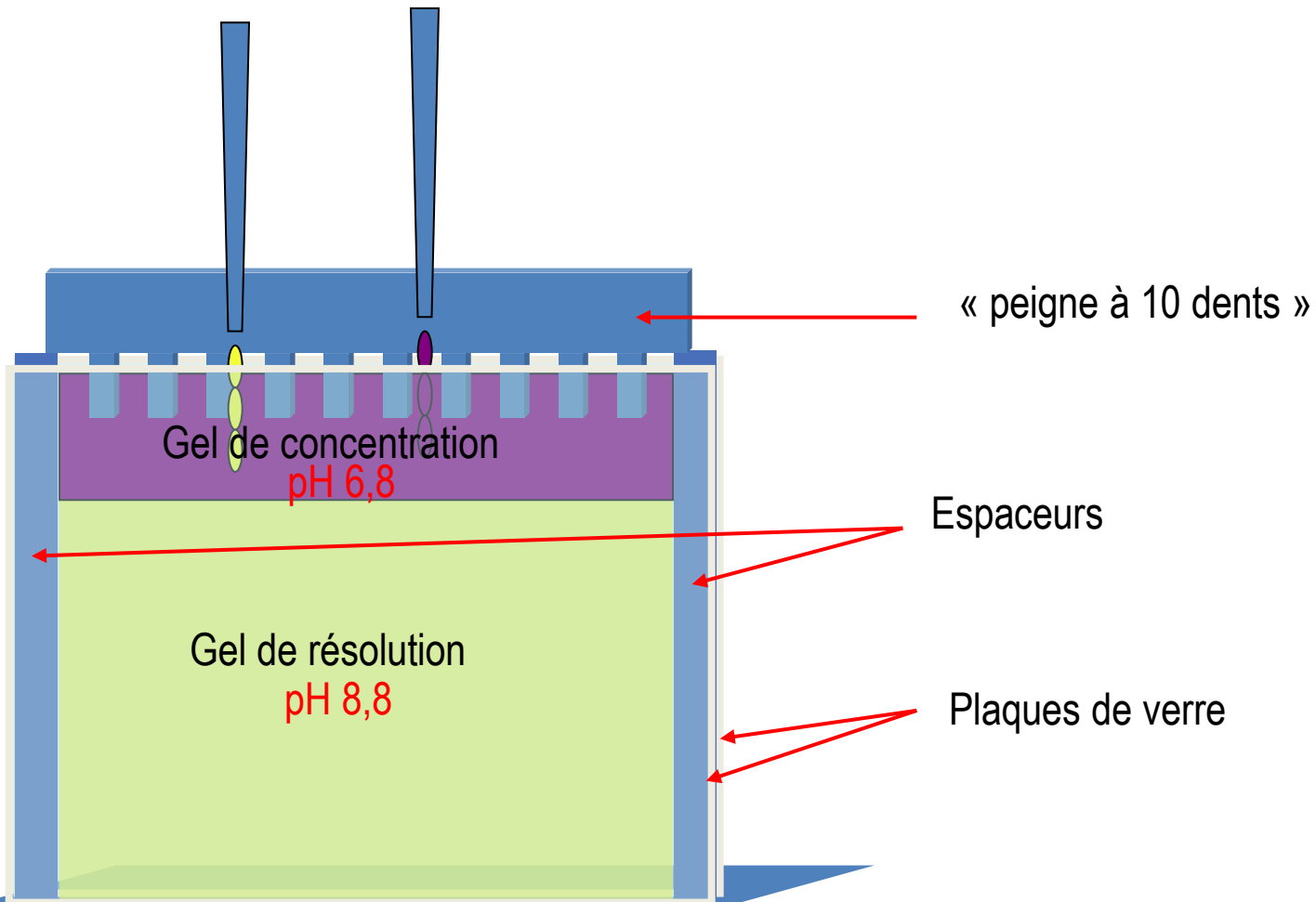
Le gel d'acrylamide
polymérise entre
2 plaques de verre

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



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

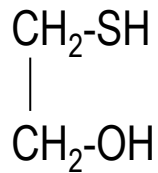


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

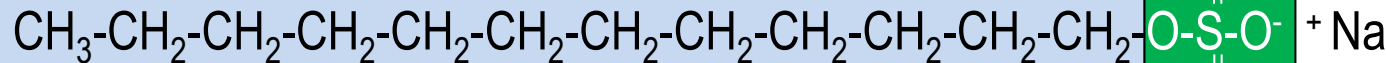
Préparation des échantillons protéiques

Les protéines sont incubées en présence de :



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

Partie chargée négativement



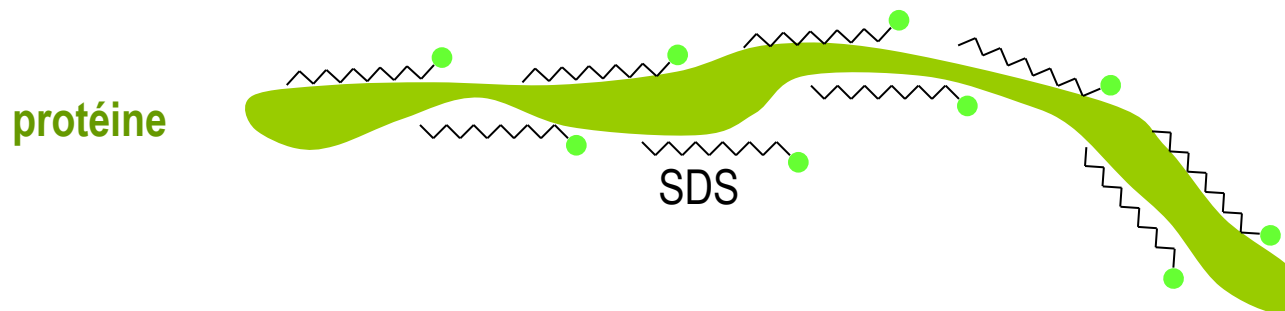
Partie hydrophobe



D - Techniques électrophorétiques

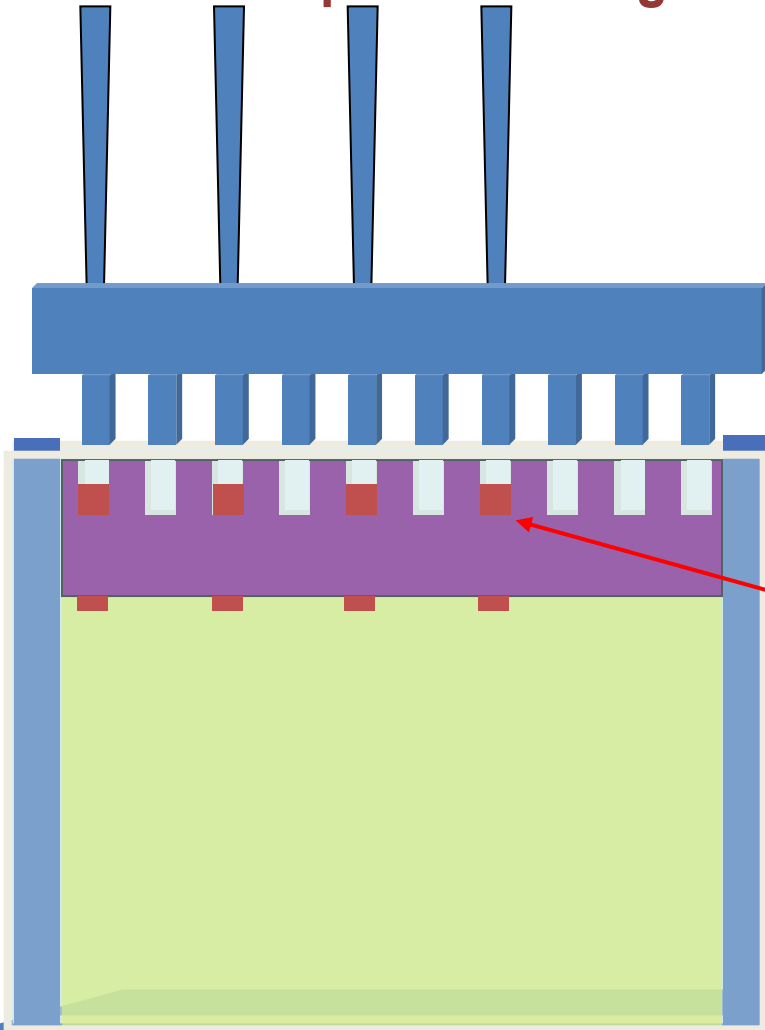
2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

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)

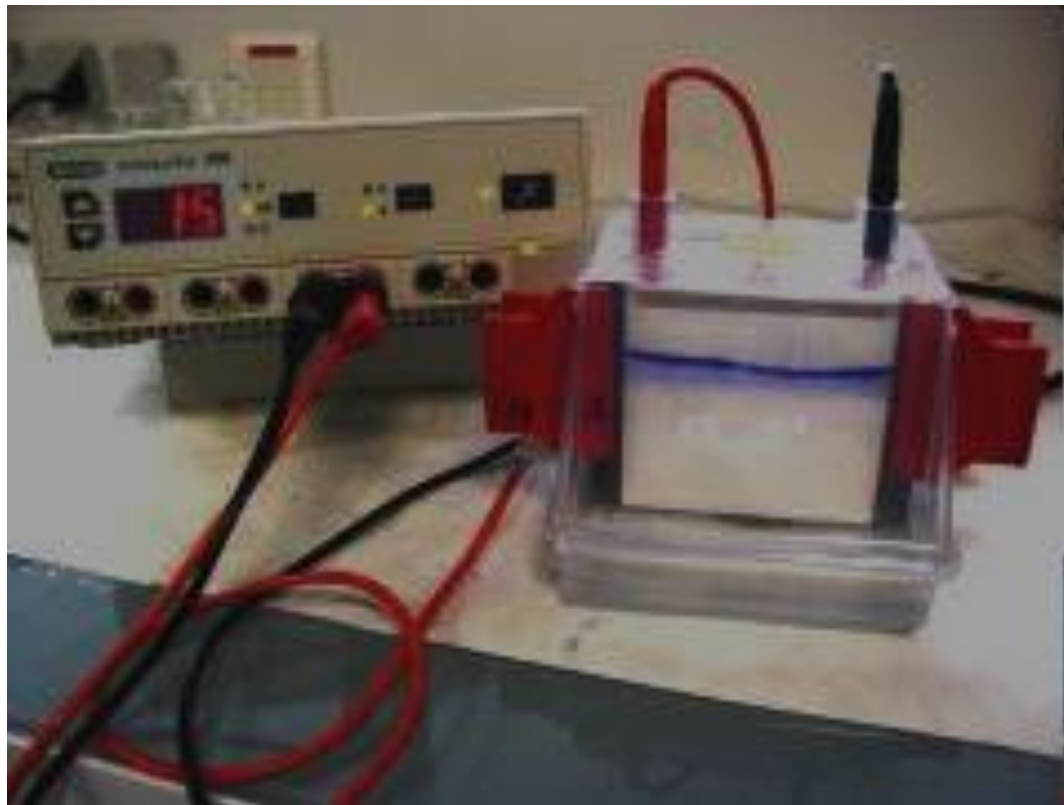


D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

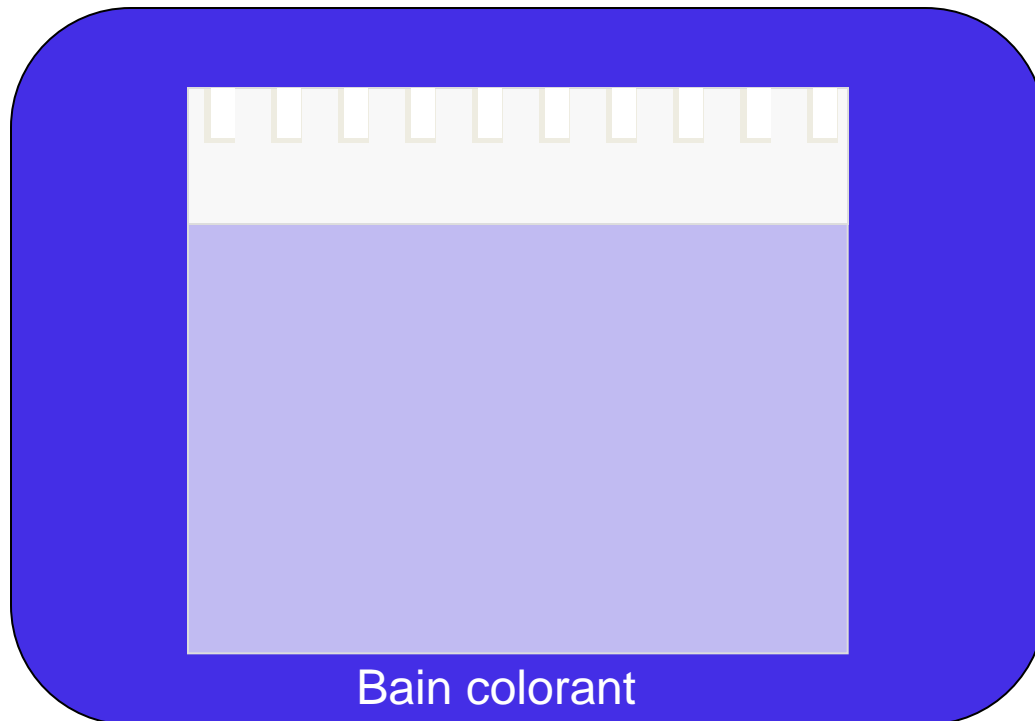
Après dépôt des protéines, le gel est mis **sous tension**.

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



D - Techniques électrophorétiques

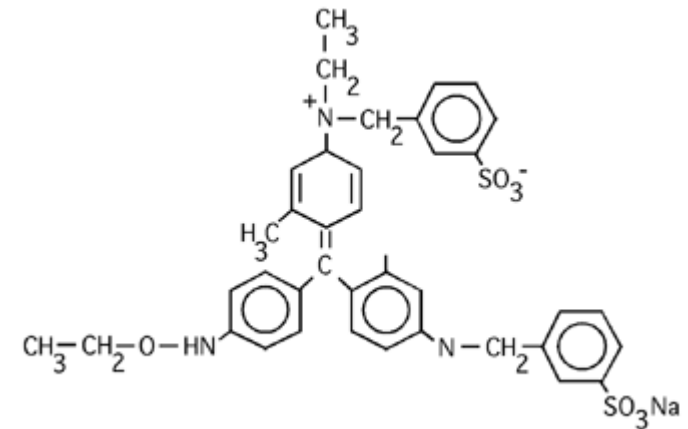
2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



COLORATION

- Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1 μg



bleu de Coomassie

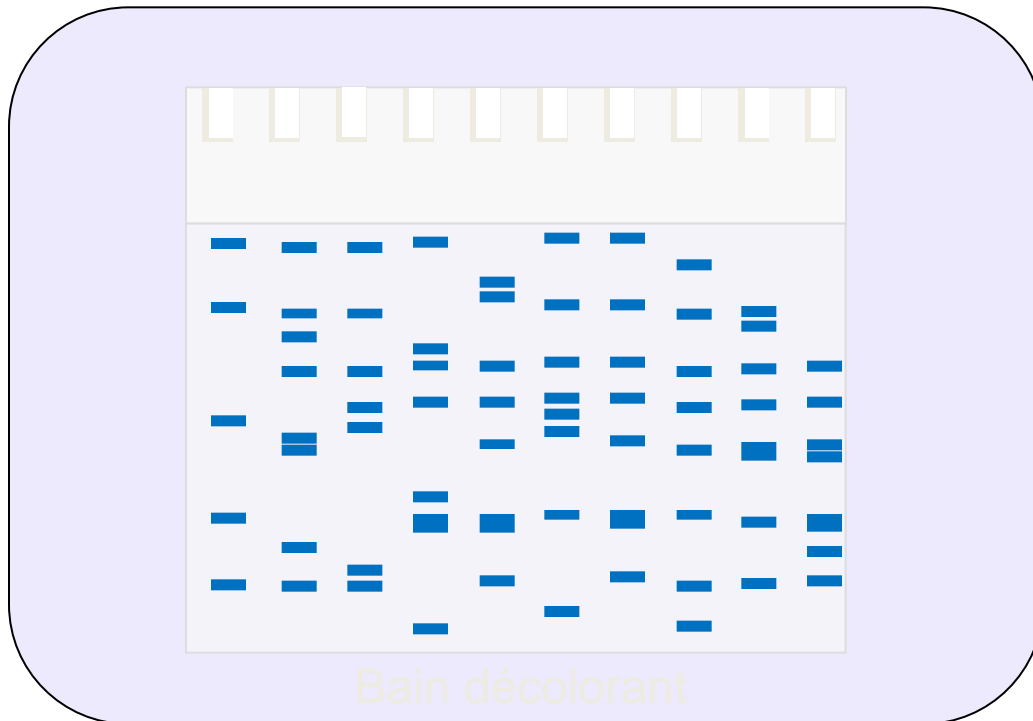
- Nitrate d'argent

Limite de détection : 10 ng



D - Techniques électrophorétiques

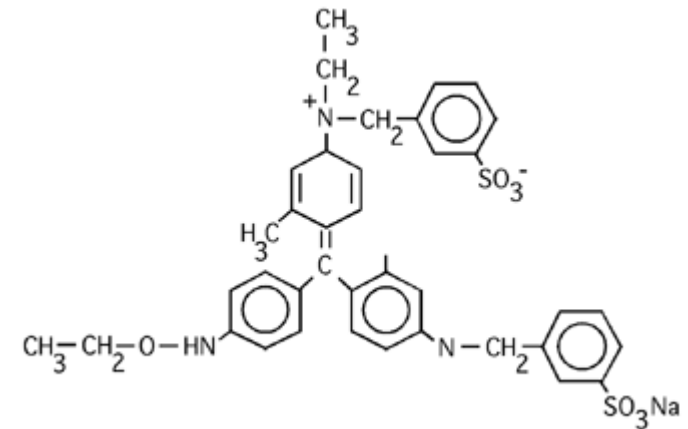
2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



COLORATION

- Bleu de Coomassie

Limite de détection : 0,1 µg



bleu de Coomassie

- Nitrate d'argent

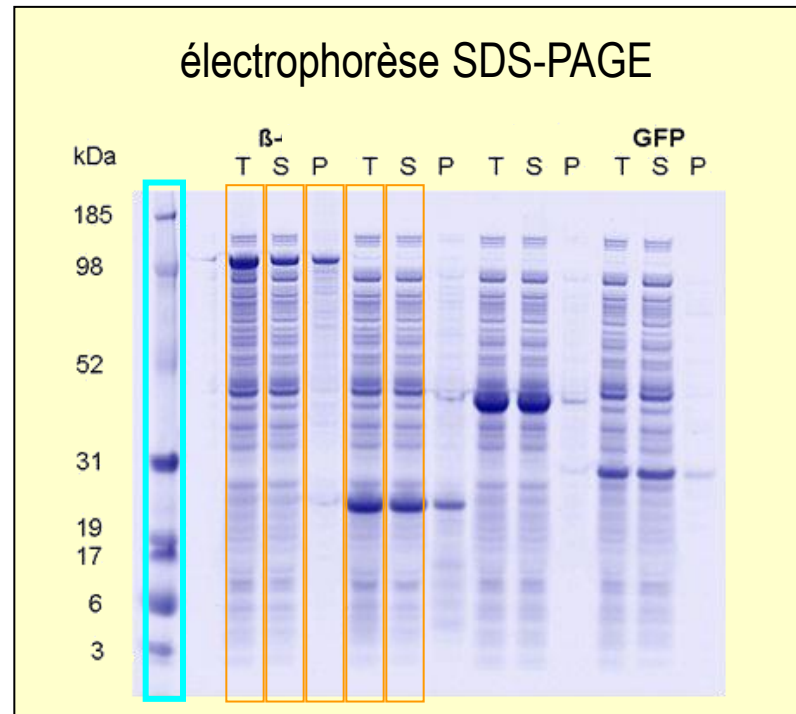
Limite de détection : 10 ng

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



D - Techniques électrophorétiques

2 – électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)



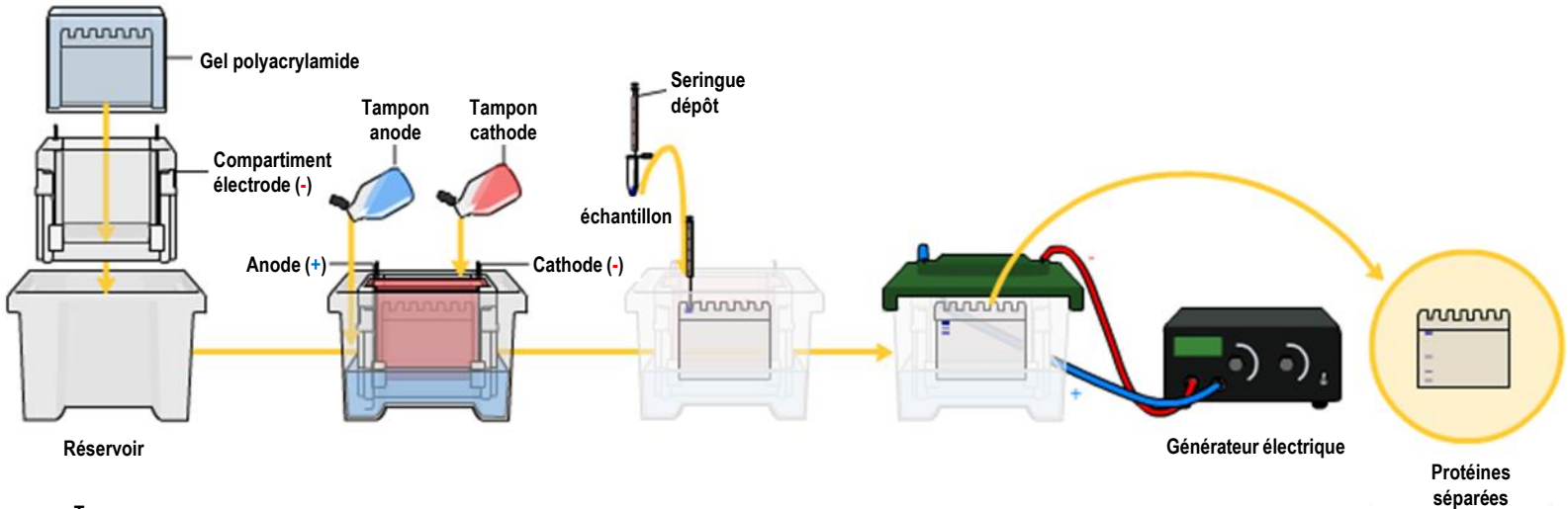
Marqueurs (masses
connues)



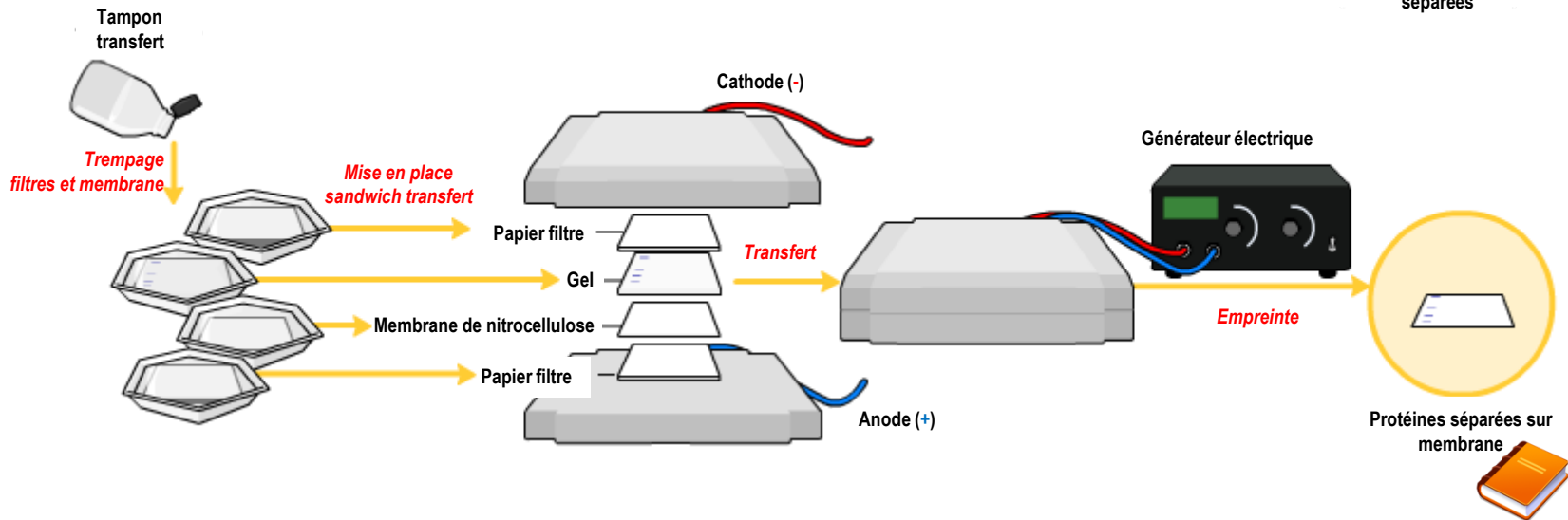
E - Techniques immunoenzymatiques

1- Western Blot

1^{ère} étape



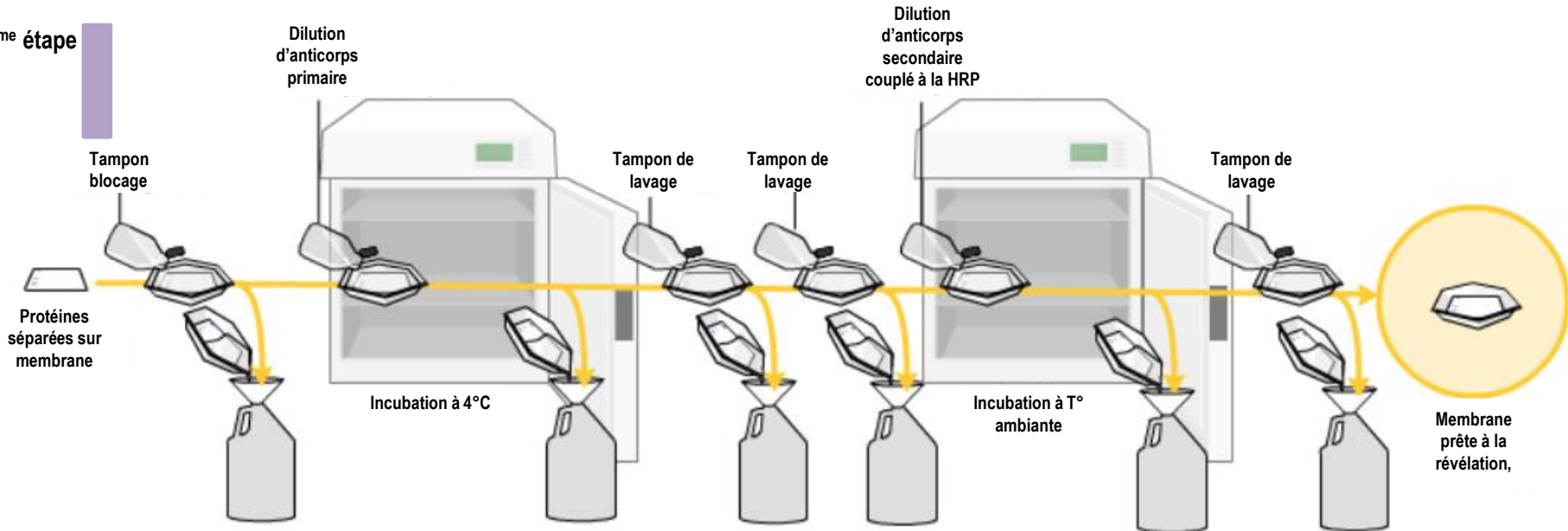
2^{ème} étape



E - Techniques immunoenzymatiques

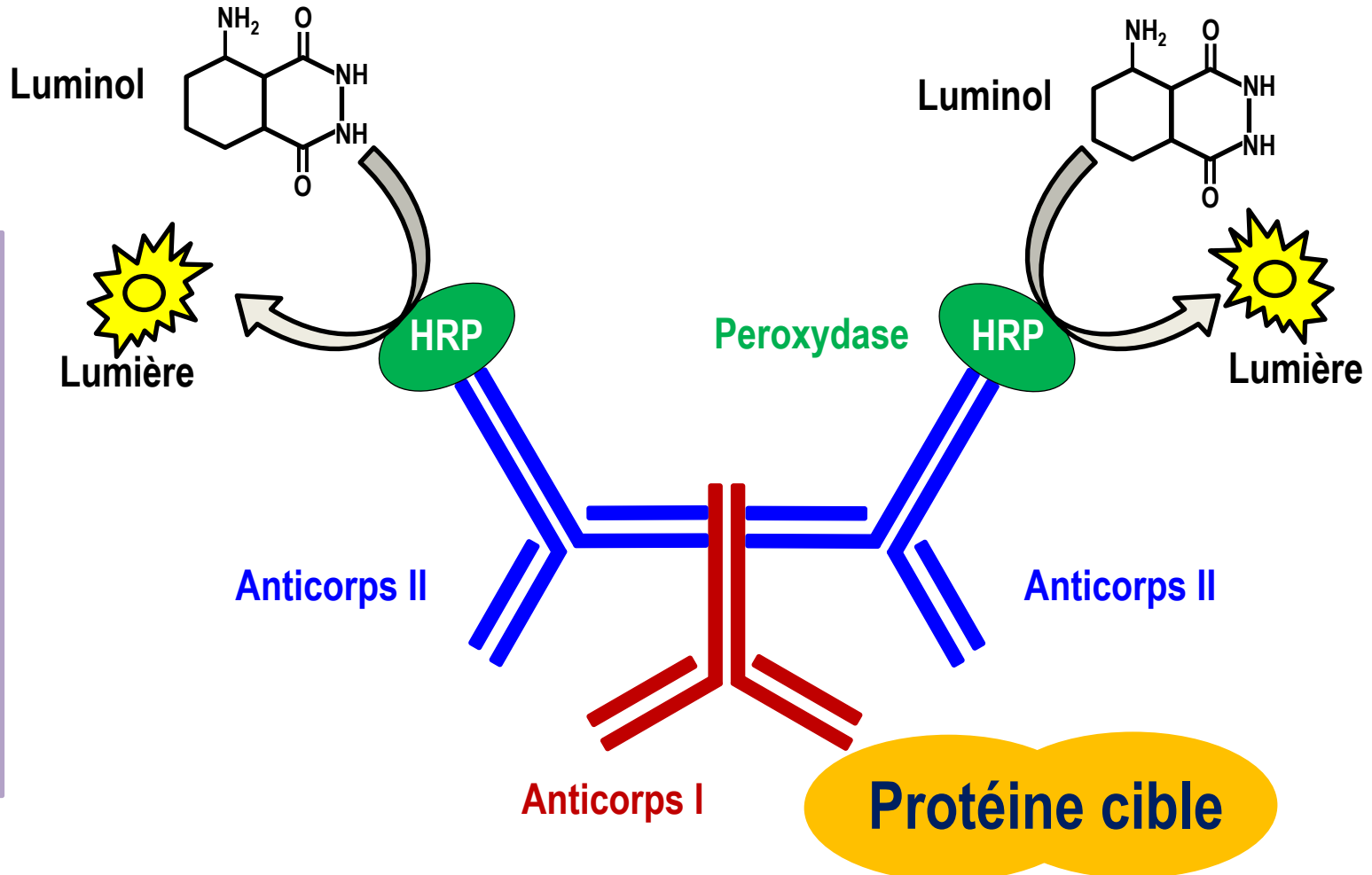
1- Western Blot

3^{ème} étape



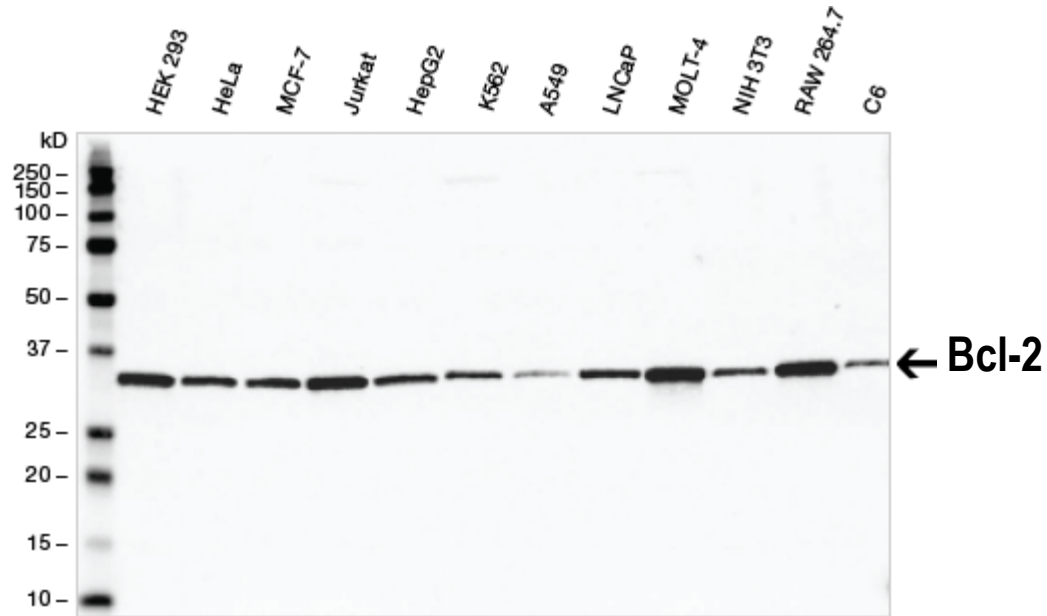
E - Techniques immunoenzymatiques

1- Western Blot



E - Techniques immunoenzymatiques

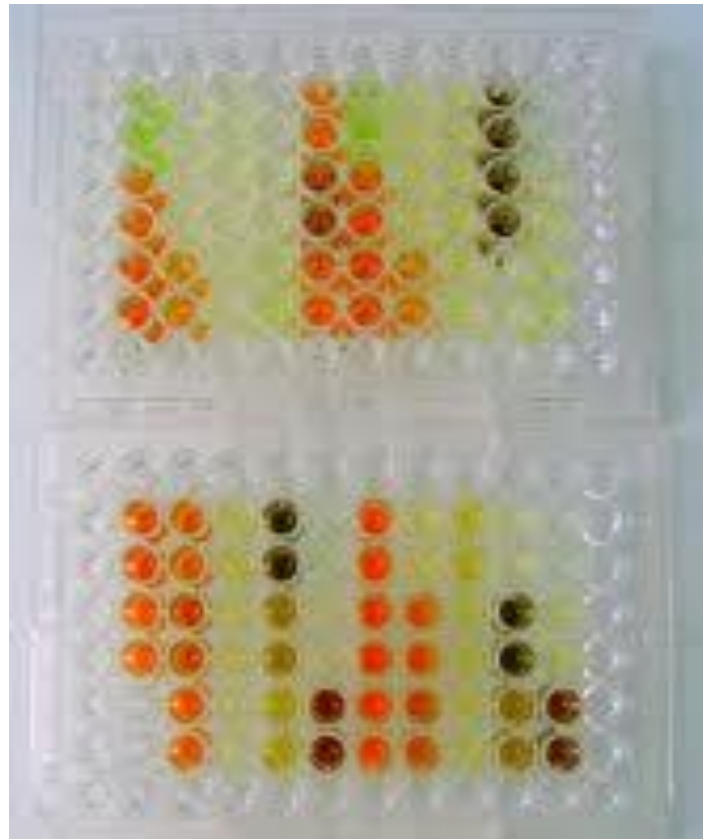
1- Western Blot



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

