



PURIFICATION DES PROTEINES

SCIENCES EN TETE BIOLOGIE-ANNEE 2020-2021

1. PRINCIPE

La purification des protéines est une série de processus destinée à isoler une ou des protéines à partir d'un mélange complexe (cellules, tissus, organe...). Les différentes étapes de la purification sont l'extraction puis la séparation.

2. EXTRACTION DES PROTEINES

Si la protéine se trouve dissoute dans un milieu biologique liquide (ex: plasma, lait, ...) aucune méthode d'extraction n'est nécessaire.

Si la protéine est à extraire d'un tissu ou d'une culture de cellules, 3 méthodes sont possibles :

- Pour un tissu entier un broyage à l'appareil de Potter est fait au préalable, puis les membranes des cellules sont lysées et l'homogénat cellulaire est centrifugé. La solubilisation des protéines se fait dans des solutions salines.
- Pour un type de cellules isolées à partir du tissu, un trieur de cellules sélectionne les cellules contenant les protéines d'intérêt (cytofluorimètre).
- Pour un organe particulier un fractionnement cellulaire est nécessaire, c'est-à-dire les différents constituants de la cellule sont séparés par ultracentrifugation.

A noter que lors des manipulations il faut veiller à ce que les protéines ne soient pas dénaturées (contrôle de la température, du pH, utilisation d'inhibiteurs de protéases, élimination de l'eau et du sel...)

2. METHODES DE PURIFICATION

CHROMATOGRAPHIE

Séparation des protéines par migration différentielle à travers un système composé d'une phase mobile (billes fonctionnalisées) et d'une phase fixe (tampon d'éluion).

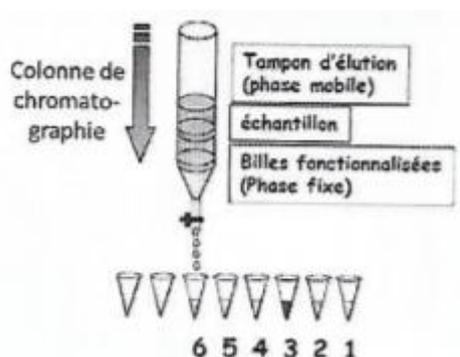


Figure 1 : Principe général de la chromatographie : en sortie de colonne les gouttes sont récupérées de manière séquentielle dans des tubes au cours du temps et forment des fractions d'éluion. (Source cours de biochimie)

Il est ainsi possible de tracer le profil d'éluion avec en abscisse la fraction d'éluion (numéro du tube) et en ordonnée la quantité de protéines dosées dans chaque fraction.



Trois grands types de chromatographie séparent les protéines selon leur taille, charge, adsorption spécifique

Chromatographie par filtration sur gel ou gel filtration :

Les petites molécules pénètrent dans les billes poreuses de la colonne et avancent moins vite tandis que les plus grosses sont exclues et migrent plus rapidement vers l'extrémité inférieure de la colonne. Les protéines séparées sont récupérées dans l'éluat.

Chromatographie par échange d'ions :

Dans la colonne sont disposées des billes chargées positivement ou négativement. Les protéines de charge opposée aux billes interagissent avec elles et sont donc retenues sur la colonne, tandis que les protéines de même charge n'interagissent pas et sortent donc dans les premières fractions d'éluat. Les interactions entre les protéines et les billes de la colonne sont levées par ajout d'un tampon d'éluat avec une charge ionique de plus en plus importante : les protéines de faible charge se décrochent plus rapidement que les protéines avec une forte charge ionique.

Chromatographie d'affinité :

Les billes de la colonne sont fixées de manière covalente à un ligand qui interagit spécifiquement avec la protéine d'intérêt. Les protéines retenues sont récupérées par application d'un tampon éluat avec une charge ionique croissante.

ELECTROPHORESE

Electrophorèse mono-dimensionnelle ou SDS-PAGE :

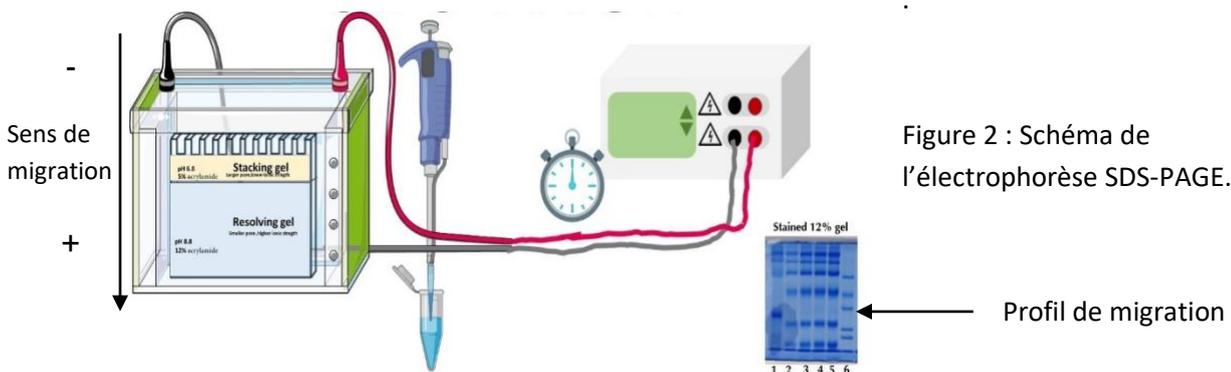


Figure 2 : Schéma de l'électrophorèse SDS-PAGE.

Le SDS-PAGE repose sur l'utilisation de deux éléments : le SDS de charge négative est un détergent qui dénature les protéines et le béta-mercaptoéthanol un agent réducteur des ponts disulfures. La queue hydrophobe du SDS interagit avec les protéines et le nombre de SDS fixé est proportionnel à la taille de la protéine. Le complexe protéine-SDS de charge négative migre vers l'extrémité + et plus la protéine sera petite, plus elle migre vite. Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire en faisant migrer sur une autre piste de gel un mélange de protéines dont le poids moléculaire est connu.



Electrophorèse bi-dimensionnelle

Les protéines sont séparées selon 2 paramètres le pI et leur taille ou poids moléculaire. La première dimension qui est l'électrofocalisation permet grâce à un gradient de pH présent dans le gel de séparer les protéines selon leur pI, et l'application d'un champ électrique permet la migration des protéines jusqu'à ce que les charges globales de celles-ci soient nulles ($\text{pH} = \text{pI}$). La deuxième dimension correspond à une SDS-PAGE.

SOLUBILITE

La solubilité peut être utilisée pour purifier certaines protéines car certaines sont solubles dans des conditions données alors que d'autres précipitent dans ces mêmes conditions. Cette solubilité est influencée par la concentration en sel, l'utilisation d'un solvant organique ou encore par le pH.

AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages	Inconvénients
Caractérisation de la protéine par son poids moléculaire et vérification de l'état de pureté de celle-ci	Manipulations rigoureuses afin de ne pas dénaturer la protéine
Grande variété de techniques rapides	Utilisation de produits neurotoxiques (gel d'acrylamide)
Principes simples et coûts abordables	

APPLICATIONS

Dans le domaine de la biochimie ces techniques permettent par exemple la détection de résidus médicamenteux ou d'antibiotiques.

SOURCES ET EN SAVOIR PLUS

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-chromatographie>

<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/biochimie/chapitre4/ProteineTechniques.pdf>

https://www.youtube.com/watch?v=E_4pxMDb2o (SDS-PAGE)

[https://www.news-medical.net/life-sciences/Applications-of-Thin-Layer-Chromatography-\(French\).aspx#:~:text=La%20chromatographie%20sur%20couche%20mince%20est%20employ%C3%A9e%20souvent%20pour%20isoler,%2C%20et%20de%20l'urine.](https://www.news-medical.net/life-sciences/Applications-of-Thin-Layer-Chromatography-(French).aspx#:~:text=La%20chromatographie%20sur%20couche%20mince%20est%20employ%C3%A9e%20souvent%20pour%20isoler,%2C%20et%20de%20l'urine.)