

ANALYSE PROTEOMIQUE

Chapitre II : Extraction et purification des protéines

1. Les différentes étapes d'une purification

2.1. Paramètres

Ce sont ses caractéristiques intrinsèques, celles qui rendent une protéine unique, qui vous permettront de la séparer des autres protéines cellulaires : masse, forme, structures primaire, secondaire, tertiaire et peut-être quaternaire; charge à un pH donné, densité; degré d'hydrophilicité ou d'hydrophobicité ; isoformes suite à un épissage alternatif. Elle se retrouve peut-être dans une certaine région de la cellule ou dans une organelle donnée.

Tous ces critères peuvent être utilisés dans la démarche.

Paramètre	Technique
Taille	Filtration sur gel
Solubilité	Précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium
Charge	Chromatographie d'échange d'ions
Densité	Centrifugation sur gradient; ultracentrifugation
Hydrophobicité	Chromatographie en phase inverse
Marqueur ajouté	Chromatographie d'affinité

2.2. Planification

La planification doit inclure les étapes suivantes.

- a- Dosage :** Comment suivre votre protéine pendant sa purification.
- b- Choix de la source de matériel.** Source native vs source recombinante; source dispendieuse mais idéale vs source moins idéale mais peu chère; impératifs scientifiques vs impératifs pratiques...
- c- Choix d'une technique d'extraction.** Elles sont nombreuses, et présentent toutes des avantages et des inconvénients.
- d- Séparation et enrichissement.** D'une masse de protéines et de contaminants cellulaires, vous devrez extraire *la pépite d'or*. Les techniques de séparation utilisent différents aspects physico-chimiques des protéines, telles que leur charge (chromatographie d'échange d'ions), leur masse (filtration sur gel, gradients de densité) et leur solubilité (précipitation différentielle au sulfate d'ammonium).

2 3. Dosages

Une purification peut prendre plusieurs jours et nous voulons savoir à chaque étape où en est notre protéine.

Il est possible de vérifier la *présence* aussi bien que *l'activité* d'une protéine.

Quoiqu'il en soit, il est impératif de toujours garder des **aliquots** (? définir) de matériel à chaque étape. De cette manière, on peut retracer après coup le déroulement de la purification, comprendre quelles en sont les étapes les plus utiles ou les plus dommageables, et améliorer notre protocole pour l'avenir.

2.3.2. Dosage des protéines (en général)

- Par mesure de l'absorption aux UV.

Ce type d'analyse est très pratique pour suivre la course de protéines sur une série de colonnes de chromatographie. Tous les systèmes de chromatographie sont équipés d'une cellule spectrophotométrique pour mesurer l'absorption des rayons UV par le matériel qui sort des colonnes.

En outre, n'oublions pas que l'ADN et l'ARN absorbent vers 250-260nm, ce qui risque de causer des soucis de précision!

On peut utiliser le spectro pour détecter la présence de protéines parce que le tryptophane (Trp, W) absorbe la lumière UV avec un pic à 280 nm. La tyrosine (Tyr, Y) le peut aussi, quoiqu'à un degré moindre, et un troisième acide aminé cyclique, la phénylalanine, le peut aussi très faiblement.

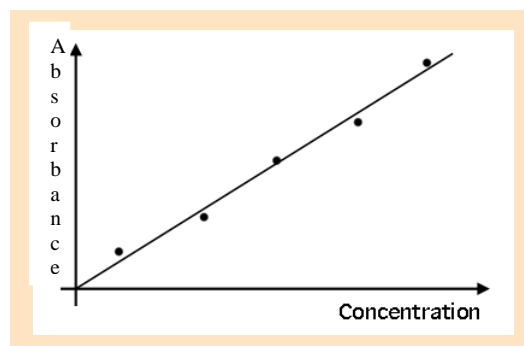
- Par Méthodes colorimétriques.

Ces techniques demandent un traitement de l'échantillon à mesurer par une substance chimique qui, au contact des protéines, produira un changement de couleur que l'on peut quantifier par spectrophotométrie si on dispose d'une courbe standard fiable.

Pour cela, une courbe standard faite avec des quantités connues de BSA est nécessaire.

Exemple de courbe standard: la mesure de l'absorbance (Abs) de plusieurs échantillons avec une concentration croissante en protéines donne à chaque fois une Abs plus élevée.

Voir courbe ci-dessous.



Toujours avoir plusieurs points sur notre courbe standard: on limite ainsi l'effet de ceux qui auraient eu une mauvaise réaction.

Voici trois méthodes colorimétriques : voir tableau suivant

<p>Méthode du biuret</p>	<p>Basée sur la réduction du cuivre Cu^{2+} en Cu^+.</p> <p>Cu^+ réagit avec le tryptophane (Trp, W), la tyrosine (Tyr, Y) et la cystéine (Cys, C). Il leur donne une couleur bleue. Le pic d'absorption pour un test du biuret est à 550nm.</p> <p>Ce test est peu sensible.</p> <p>Il résiste assez bien aux différents composés présents dans les tampons mais est sensible aux sels d'ammonium.</p>
<p>Méthode de Lowry</p>	<p>Basée sur la réaction du biuret, elle utilise aussi la réduction du Cu^{2+} en Cu^+. Depuis 1951, la méthode de Lowry est la plus citée de toutes dans la littérature scientifique.</p> <p>Dans la méthode de Lowry, le Cu^+ est utilisé pour réduire le réactif de Folin (une solution phénolique contenant des composés de tungstène et de molybdène) qui change sa couleur du jaune au bleu. On lit la réaction à 750 nm.</p> <p>Plus sensible que la réaction du biuret, la méthode de Lowry est utilisée pour des quantités de 2–100 μg.</p> <p>Elle est sensible à plusieurs agents, dont l'EDTA, le DTT, le β-mercapto, l'Hepes, le Tris, le triton X-100, le NP-40, etc.</p>
<p>Méthode de Bradford</p>	<p>Le bleu de Coomassie se lie à l'arginine (Arg, R), la tyrosine (Tyr, Y), le tryptophane (Trp, W), l'histidine (His, H) et la phénylalanine (Phe, F) (surtout à R; huit fois plus qu'aux autres en fait).</p> <p>Il est assez insensible aux agents des tampons, mais est sensible aux détergents.</p> <p>En solution, il a une forme cationique rouge qui absorbe à 470nm. Lié aux protéines, il a une forme anionique bleue qui absorbe à 595nm.</p> <p>Parce que les deux spectres d'absorption se chevauchent un peu, une courbe standard de Bradford n'est pas parfaitement linéaire sur toute sa distance.</p> <p>La méthode de Bradford est encore plus sensible que celle de Lowry (0,2 – 20 μg de protéines).</p>

233. Dosage de l'activité enzymatique

Le choix de l'essai repose une fois de plus sur la nature de la protéine : si c'est une kinase, nous testerons sa capacité à phosphoryler un substrat ; si c'est une polymérase, à synthétiser des polymères.

On distingue des méthodes dites continue, discontinue et couplée pour les essais enzymatiques :

- Méthode continue

Dans la méthode continue, le produit de l'enzyme est différent du substrat. Il n'est donc pas besoin de les séparer avant de quantifier l'activité de l'enzyme. La méthode continue peut s'effectuer directement dans la solution où se retrouve l'enzyme purifié.

C'est le cas de différentes phosphomonoestérases. On les teste en les incubant avec le 4-nitrophényl phosphate, un composé incolore. L'action de ces enzymes convertit ce substrat en nitrophénol de couleur jaune. Comme la couleur finale est distincte de la couleur initiale, on peut l'évaluer directement (voir exemples du travail personnel).

- Méthode discontinue

Il peut arriver que notre substrat ne puisse se distinguer du produit par la méthode de quantification utilisée. Le cas le plus flagrant est celui des méthodes utilisant des isotopes radioactifs.

Un test de kinase, par exemple, peut requérir l'utilisation d'ATP radioactif; la kinase, en utilisant cet ATP, transfère un groupement phosphate isotopique sur son substrat. Il est cependant impossible de distinguer, dans le mélange réactionnel, le substrat nouvellement phosphorylé de l'ATP se trouvant dans la solution, puisque tous les deux sont radioactifs. Il faut donc d'abord les séparer.

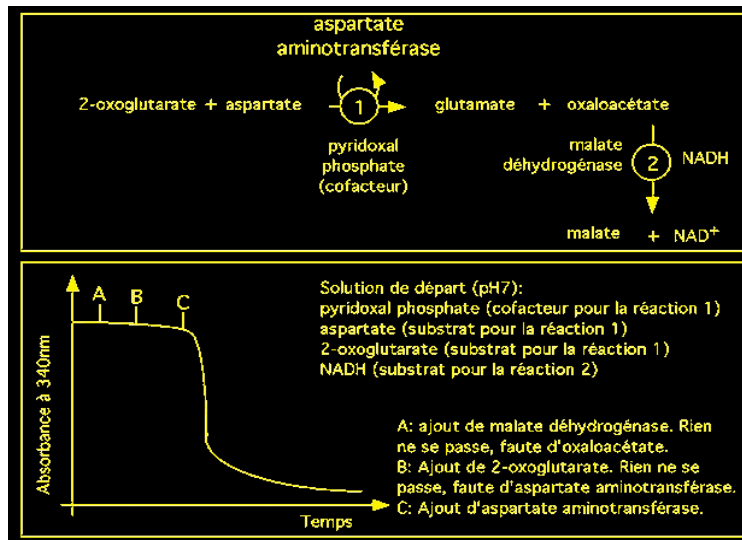
- Méthode couplée (ou indirecte)

Utilisée dans le cas où le produit d'une réaction particulière n'a pas de résultat facilement observable. On a recourt à une deuxième réaction qui utilise le produit de la première comme substrat. C'est le cas de la glucose-oxydase utilisée pour le dosage de la glycémie.

Voir aussi l'exemple ci-dessous :

Dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase. Cet enzyme convertit le 2-oxoglutarate et l'aspartate en glutamate et en oxaloacétate.

Cette réaction est couplée à une deuxième réaction pour révéler sa présence : l'action de l'enzyme malate déhydrogénase, qui convertit l'oxaloacétate et le NADH en malate et en NAD^+ . Cette dernière qui est responsable de la baisse d'absorbance observée. Une telle méthode couplée nous permet donc de mesurer indirectement l'activité d'un enzyme dont le produit immédiat ne se prêterait pas à une mesure plus directe.



3. Source de matériel

31. Généralités

Alors qu'une protéine dans son contexte naturel ne représente qu'une fraction infime du pourcentage de la masse totale des protéines, une protéine surexprimée peut en représenter une fraction impressionnante.

Le tableau qui suit présente les caractéristiques de différentes sources de protéines exprimées à partir d'un vecteur d'expression.

	Bactérie	Levure	Insecte	Mammifère	<i>in vitro</i>
Facilité du procédé	+/- complexe, lent	+/- complexe, lent	complexe, lent	complexe, lent	simple, rapide
Expression	rapide	rapide	assez lente	assez lente	très rapide
Production	élevée	élevée	moyenne	moyenne	faible
milieu	pas cher	pas cher	coûteux	couteux	couteux
protéine sécrétée?	souvent, avec aussi corps d'inclusion	souvent	parfois	rarement	ne s'applique pas
purification	simple	simple	assez simple	assez simple	simple
co-expression	difficile	difficile	assez facile	difficile	facile

Interférence avec l'hôte	rarement	rarement	rarement	rarement	non
Repliement correct	pas toujours	pas toujours	oui	oui	pas toujours
N-glycosylation	non	oui, riche en mannose	simple, pas d'acide sialique	complexe	non
O-glycosylation	non	oui	oui	oui	non
phosphorylation	sur Tyr; très rare sur Ser et Thr	oui	oui	oui	non
acétylation	non	oui	oui	oui	non
acylation du N-terminus	non	oui	oui	oui	non
gamma-carboxylation	non	non	non	oui	non

Tissu

Travailler avec du tissu comme source de matériel peut être indispensable, mais ce n'est certes pas commode. Le tissu devra souvent être brisé (à la moulinette ou au *blender!*) et/ou traité à la collagénase pour en briser les fibres insolubles et très solides. Un avantage est que la protéine vient de son milieu naturel; un autre est que le tissu en question est peut être vendu à prix très avantageux.

Cellules en culture

Probablement la source la plus courante de protéines non-exprimées dans un système recombinant procaryote.

Les levures

Les conditions de culture pour les levures sont élémentaires, elles peuvent donner énormément de matériel, et elles ont l'avantage (par rapport aux procaryotes) d'être plus près, évolutivement parlant, des eucaryotes supérieurs.

Les bactéries

Elles restent ce qui se fait de moins cher et de plus puissant en fait d'usines moléculaires. Les bactéries peuvent être utilisées pour exprimer des quantités astronomiques de matériel.

Les virus

Une approche intéressante pour la production de protéines par des cellules eucaryotes est d'en introduire la séquence codante dans le génome d'un virus, puis d'utiliser celui-ci pour infecter des cellules.

On utilise beaucoup le baculovirus pour infecter des cellules d'insectes.

4. Extraction

4.1 Généralités

À moins que notre candidate ne soit une protéine sécrétée et donc disponible dans le milieu, nous devons sélectionner une méthode pour briser les cellules et en extraire le contenu.

Plusieurs choix s'offrent à nous, choix qui seront faits en fonction du type de cellule utilisé, des conditions de purification de notre protéine, de l'équipement disponible, et même de nos goûts personnels.

Les principales approches de lyse des cellules sont les suivantes. Un choc osmotique peut suffire à briser la membrane cellulaire de cellules fragiles. Ce choc peut être assisté par un léger traitement avec un détergent (ce qui permet aussi d'aider à maintenir les protéines en solution). Une certaine action mécanique peut aussi être ajoutée au processus: un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères.

Pour les cellules de plantes, de levures ou les bactéries, toute approche "douce" devra tenir compte de la présence d'une paroi cellulaire très résistante; les protoplastes de telles cellules seront préparés en traitant ces dernières avec des enzymes (telle la lyticase) qui détruiront la paroi sans briser la membrane plasmique.

Finalement, dans tous les cas, une méthode brutale peut aussi être utilisée. Le traitement aux ultrasons, une lyse mécanique utilisant des billes de verre ou une presse Aminco-French, comme les cycles de congélation/décongélation, sont tous des moyens envisageables.

4.2. Tampon

L'extraction s'effectuera dans une solution tampon, dans laquelle les cellules seront resuspendues après une centrifugation visant à les concentrer. Le tampon de lyse répondra à certaines exigences expérimentales. Il devrait avoir un fort pouvoir tampon, car le contenu des cellules peut être à un pH inapproprié.

Rappelons-vous que le pouvoir tampon d'une substance est plus élevée dans une région de pH proche de son pKa; voici les pKa de certains tampons populaires.

Bis-TRIS	6,46
PIPES	6,76
MOPS	7,20
TES	7,40
HEPES	7,48
Tris	8,06
Glycine	9,78

Le HEPES (pour la chromatographie d'échange de cations) et le Tris (pour l'échange d'anions) sont ceux que vous rencontrerez le plus souvent en purification de protéines.

La protéine devra être protégée d'une oxydation excessive : c'est pourquoi un agent réducteur comme la glutathione, l'acide ascorbique, le beta-mercaptoethanol ou le dithiothreitol (DTT) pourra être ajouté au tampon.

On retrouve souvent du glycérol dans la composition des tampons. Il stabilise les interactions protéine-protéine.

4.3. Addition d'inhibiteurs de protéases

La cellule même d'où elle provient est remplie de protéases qui peuvent l'hydrolyser. En brisant les lysosomes (particulièrement si nos cellules de départ ont une forte activité catabolique, comme les cellules du foie; ou si ce sont des cellules de plantes avec des vacuoles riches en protéases) nous avons libéré une horde de protéases dans le même tampon de lyse que notre protéine. La solution? Tenir le pH élevé (entre 7 et 8), garder la soupe au frais (4°C) et ajouter des inhibiteurs de protéases à la solution.

Voici quelques-uns de ces inhibiteurs:

Inhibiteurs	Cible
PMSF	Toutes les sérine protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaine, etc).
AEBSF	Toutes les sérine protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaine, etc). Plus soluble et moins toxique que son prédécesseur, le PMSF.
EDTA et EGTA	métalloprotéases (métal comme cofacteur)
Benzamidine	sérine protéases
Pepstatin A	protéases aspartiques comme la cathepsine D, la rénine, la pepsine et les protéases d'HIV.
Leupeptin	sérine- (trypsine, plasmine, kallikréine porcine) et cystéine-protéases (papaine, cathepsine B). N'inhibe pas la thrombine ni la chymotrypsine.
Aprotinin	sérine protéases, mais pas la thrombine ou le facteur X.
Chymostatin	sérine protéases avec une spécificité de type chymotrypsine (chymotrypsine, chymases, cathepsine G et des cystéine protéases comme les cathepsines B, H et L.
Antipain	Inhibe la papaine, la trypsine et la plasmine jusqu'à un certain point. Plus spécifique pour la trypsine et la papaine que ne l'est la leupeptine.

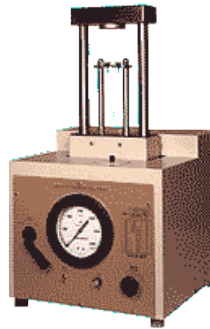
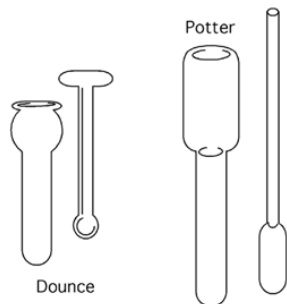
4.4. Techniques d'extraction

- Choc osmotique

Le choc osmotique permet de briser certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique. Cherchant à rétablir l'équilibre osmotique, l'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique. On peut ajouter un peu de détergent (NP-40, LDAO, triton X-100) et un moyen mécanique.

- Homogénéisateurs (voir schéma): exemples

de type Dounce,
de type Potter-Elvehjem
la presse Aminco- French



- **Les billes de verre**

L'appareil utilisé pour cette technique ressemble à un *blender*, à ceci près qu'il est beaucoup plus petit et ne contient pas de lames. Son contenant amovible est rempli de petites billes de verre sur lesquelles on verse la suspension de cellules. La suspension se répartit entre les billes. Le tout est alors scellé et on lance la machine, qui fait tourbillonner les billes de verre fortement dont l'action abrasive fait réduire les cellules en bouillie. Les billes coulent au fond dès que l'agitation cesse.

- **La sonication**

Elle consiste en la destruction des cellules par les ultrasons. Ici, une tige de métal (le "sonicateur") à l'extrémité très fine est introduite dans la suspension de cellules et induite à vibrer violemment, émettant un bruit très fort déplaisant.

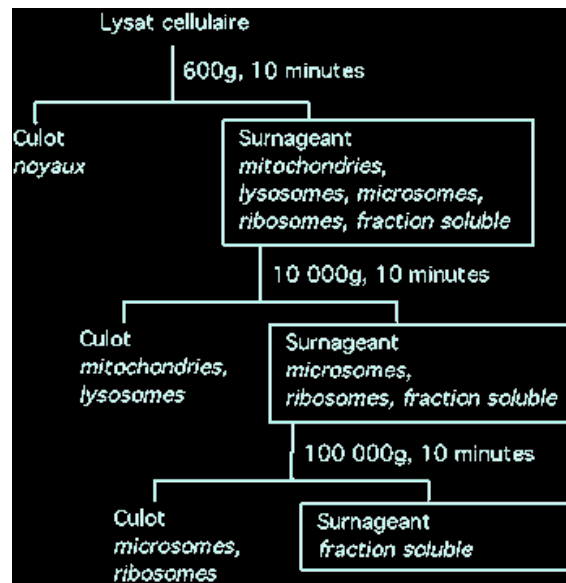
- **Enzymes lytiques**

Différents enzymes comme le lysozyme (du blanc d'oeuf de poule, par exemple) ou la lyticase de *S.aureus* sont disponibles pour hydrolyser les parois des cellules; il suffit de choisir le plus approprié.

4.5. Élimination précoce de ce qui n'est pas utile

Plusieurs protocoles existent pour isoler ces organelles les unes des autres par centrifugation. Une extraction douce des organelles suivie de leur isolation donne une très grande longueur d'avance pour la suite de la purification.

Exemple ci-dessous : séparation des composantes cellulaires par centrifugation différentielle.



Les protéines nucléaires sont presque toujours préparées à partir de noyaux et pas de cellules entières. Une bonne façon de séparer les noyaux du reste est de déposer le lysat cellulaire (avec les noyaux intacts) sur un coussin de saccharose. La densité du sucrose ne laisse passer que les particules denses comme les noyaux, les débarrassant de la majeure partie du reste du matériel cellulaire.

- **La chromatine**

Selon la technique utilisée, nous nous retrouverons avec un extrait protéique brut contenant de l'ADN plus ou moins intact et associé à un grand nombre d'histones. Plus cette chromatine est intacte, et plus notre soupe est visqueuse. Une extraction à la presse Aminco-French ou au sonicateur va pulvériser la chromatine et n'en laisser que des débris.

On peut séparer la plupart des protéines de la chromatine en changeant la force ionique de la solution (ce qui se passe lors d'une précipitation au sulfate d'ammonium, par exemple).

- **Protéines membranaires**

Ces protéines ne se promènent pas librement en milieu aqueux puisqu'elles comptent au moins un domaine transmembranaire hydrophobe. Elles sont donc assez insolubles et difficiles à préparer. Leur purification requiert l'utilisation de détergents.

- **Corps d'inclusion**

La même chose est vraie de protéines exprimées chez *E.coli*, surexprimées ou non, et qui se retrouvent dans des agrégats insolubles appelés corps d'inclusion.

Les corps d'inclusion peuvent être récupérés par centrifugation puis resolubilisation des protéines qu'ils contiennent avec des agents vigoureux comme la guanidine-HCl, le SDS ou l'urée 8M sont utilisés pour resuspendre les agrégats; ils doivent ensuite être éliminés pour permettre la renaturation.

5. Séparation et enrichissement

Après avoir choisi une source de matériel et sélectionné une technique d'extraction, vous voici arrivé à l'étape de la séparation des protéines et de l'enrichissement de celle que vous voulez purifier.

5.1 Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité: neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et compétitionner avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sort de solution et précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de *salting-out*.

Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

La série de Hofmeister ci-dessous décrit les effets relatifs de différents ions sur la précipitation des protéines ou la promotion de leurs interactions hydrophobiques. (L'anion phosphate et le cation ammonium sont les plus efficaces pour précipiter les protéines; l'anion chlorate et le cation Ca^{2+} sont au contraire les plus efficaces pour les remettre en solution. Notez que ce ne sont pas toutes les combinaisons de ces ions qui donnent un sel soluble).

précipitation $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$ chaotropique
(salting out) $\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (salting in)

Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution (au contraire du NaCl, dont la solubilisation exothermique aide à faire fondre la glace dans les rues l'hiver), il ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

Le procédé suivi d'habitude est la précipitation fractionnée comme indiquée dans le tableau ci-dessous.

(1) Ajustement à 20% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C20)
(2) Ajustement du surnageant à 40% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C40)
(3) Ajustement du surnageant à 60% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C60)

(4) Ajustement du surnageant à 80% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C80)
(5) Ajustement du surnageant à 100% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C100)

La protéine se retrouvera dans une des fractions C20, C40, C60, C80 ou C100.

Les culots de protéines peuvent alors être resuspendus. Ils contiendront cependant encore une grande quantité de sulfate dont il faut se débarrasser par dialyse ou désalage.

5.2. Dialyse

La méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse. Dans une dialyse, les protéines dans une concentration de sels donnée sont séparées d'une solution à la concentration en sels différente par une membrane poreuse. Les pores de cette membrane peuvent avoir différentes tailles; certaines membranes ne laisseront passer que des ions alors que d'autres laisseront même passer de petites protéines (jusqu'à des poids moléculaires de 50 000 Da).

Les sels auront tendance à équilibrer leur concentration de part et d'autre de la membrane. En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on changera rapidement la teneur en sels de celle-ci en la même que celle du tampon de dialyse.

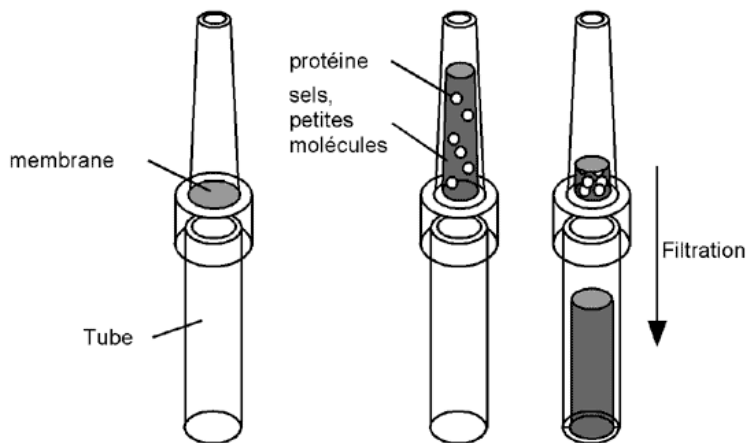
Afin d'accélérer le processus, il vaut mieux changer souvent le tampon de dialyse pour du tampon neuf plutôt que d'utiliser une seule quantité (même grande) de tampon. Voyez plutôt: puisque $C_1V_1=C_2V_2$, la dialyse de 10mL de solution protéique à 500mM dans 1000mL de tampon de dialyse à 100mM donnera une concentration de 104 mM à l'équilibre.

$$(500\text{mM} \times 10 \text{ mL}) + (100\text{mM} \times 1000\text{mL}) = 1010 \text{ mL} \times \underline{104\text{mM}}$$

On aurait pu atteindre la même concentration en dialysant dans un plus petit volume et en changeant le tampon une fois:

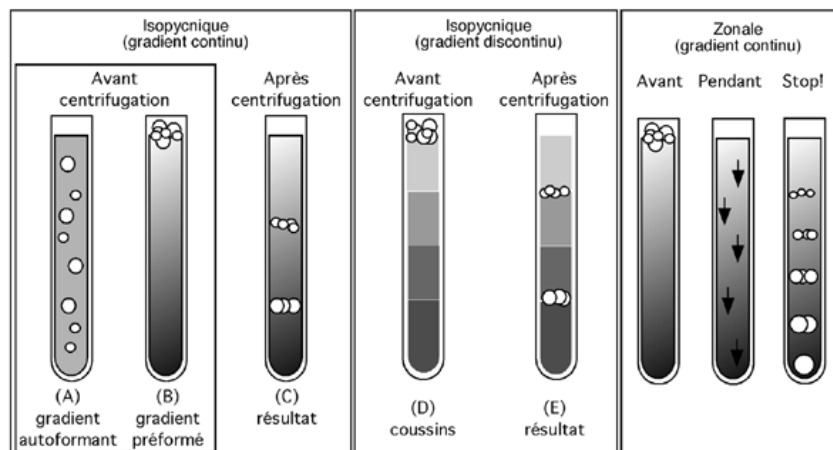
5.3. Filtration sur membrane (unités de filtration)

On y utilise des membranes avec une porosité permettant à certaines substances de passer (sels, petites molécules, petites protéines).



5.4. Sédimentation

Les protéines ont un coefficient de sédimentation défini par leur taille, leur forme et leur densité. On peut donc les séparer par ultracentrifugation sur des coussins ou des gradients de sucrose ou d'autres substances.



Différents types de gradients permettant la séparation de particules en fonction de leur densité.

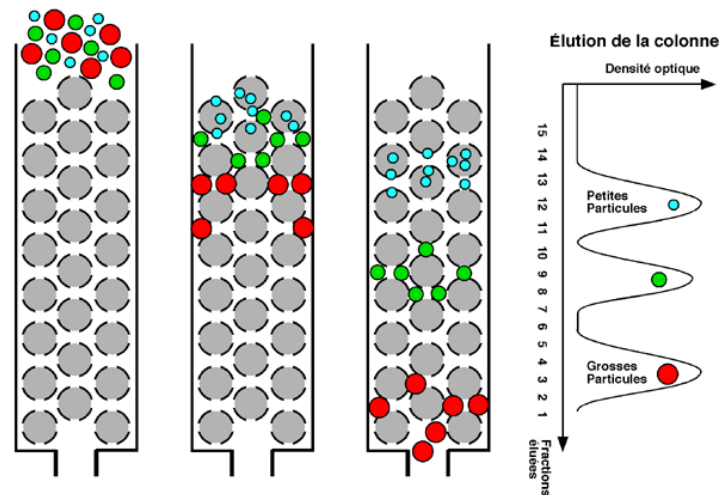
Une centrifugation isopycnique utilise un tampon avec gradient de densité incluant les densités de toutes les particules à séparer. Les particules vont donc se stabiliser à un point du gradient égal à leur propre densité.

La centrifugation zonale utilise un coussin ou un gradient dans lequel les particules s'enfoncent plus ou moins vite en fonction de leur coefficient de sédimentation. Comme la densité maximale du gradient ne dépasse pas celles des particules, celles-ci s'enfonceraient toutes jusqu'au fond si on ne les arrêtait pas avant.

6. Purification par les méthodes chromatographiques

6.1. Filtration sur gel

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine consistant en billes creuses et poreuses. La taille des pores de ces billes est telle que certaines protéines (petites) peuvent entrer et sortir à leur guise; que certaines (plus ou moins grosses) peuvent essayer d'entrer mais avec plus ou moins de succès, alors que d'autres (trop grosses) ne peuvent pas entrer du tout et passent tout droit.



Les plus grosses protéines, celles qui passent carrément entre les billes, sortent en premier de la colonne. Les autres sont retardées par leurs interactions avec les billes; les plus petites protéines, qui peuvent entrer et sortir à leur guise, sont les dernières à quitter la colonne.

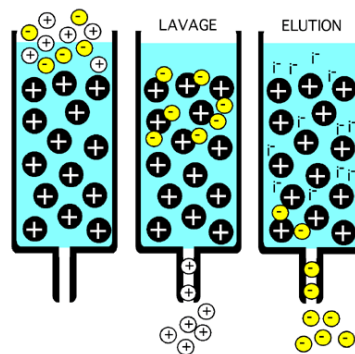
Nom de la résine	Capacité de fractionnement (en Da)
type dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1 000- 5 000
Sephadex G-75	3 000- 70 000
Sephadex G-200	5 000- 800 000
type polyacrylamide	
Bio-gel P2	200- 2 000
Bio-gel P6	1 000- 6 000
Bio-gel P-150	15 000- 150 000
Bio-gel P-300	60 000- 400 000
type agarose	

Sepharose 2B	2 000 000- 25 000 000
Sepharose 4B	300 000- 3 000 000
Bio-gel A-0,5M	30 000- 500 000
Bio-gel A-15M	30 000- 15 000 000
Bio-gel A-150M	5 000 000- 150 000 000

Cette technique est très efficace mais nécessite une haute concentration et un faible volume de matériel de départ parce que les protéines ont tendance à s'étaler le long de la colonne, ce qui réduit la qualité de leur séparation si elle n'y entrent pas relativement toutes en même temps.

La forme d'une colonne de filtration devrait être étroite et longue pour une meilleure séparation.

6.2. Échange d'ions

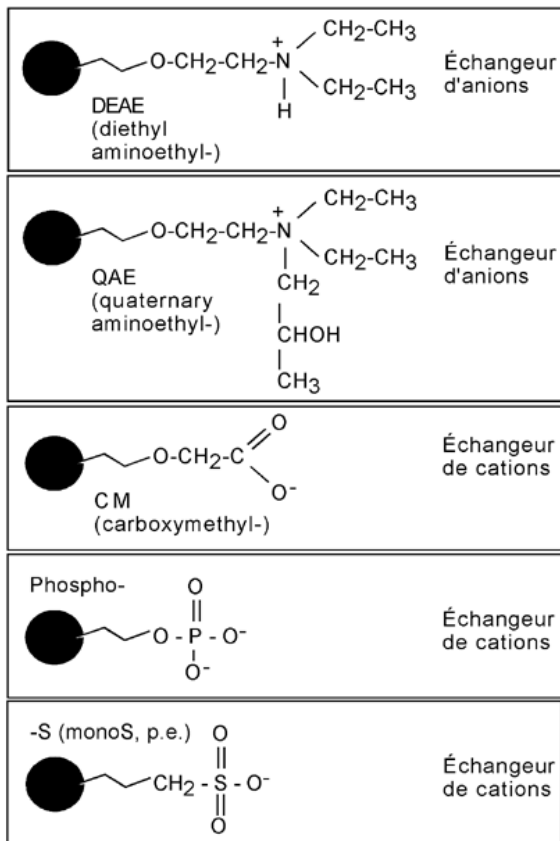


Dans une colonne à échange d'ions, les protéines collent par affinité électrostatique à des groupements chargés de la résine. Une résine portant des groupements positifs est dite "échangeuse d'anions", parce que des ions négatifs ou les groupements acides d'une protéine peuvent interagir avec. Une résine portant des groupements négatifs est dite "échangeuse de cations" parce que ce sont des cations ou les groupements basiques d'une protéine qui interagissent avec elle.

On fera décoller les protéines d'une telle résine en augmentant progressivement la force ionique du tampon d'élution, ou en changeant le pH de telle façon que la protéine soit moins chargée. Un gradient salin permet de séparer les protéines selon leur degré de charge positive ou négative à un certain pH et est une étape de choix dans une purification.

La résine n'a pas à être utilisée en colonne. On peut la mettre au fond d'un bécher et y ajouter la solution de protéine (ce qui est pratique dans les premières étapes d'une purification si on a de très grands volumes de matériel). On peut aussi mettre les protéines en contact avec la résine dans un bécher ou un tube, effectuer des lavages à faible force ionique dans le même récipient, puis déposer la résine dans une colonne vide pour procéder à une élution plus contrôlée.

Il existe une très grande variété de résines échangeuses d'ions, variant les groupes chargés comme la nature des supports solides.



6.3. Interactions hydrophobes

En solution, les protéines à caractère hydrophobe cherchent davantage à s'associer entre elles qu'à s'hydrater avec les molécules d'eau.

Des résines portant des groupements hydrophobiques (cycliques ou aliphatiques) permettent de retenir de telles protéines sur une colonne. À l'inverse de ce qui se passe sur une colonne de chromatographie par échange d'ions, une colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe est chargée à haute force ionique (qui favorise les interactions hydrophobes) et est éluée avec un gradient de sel à la baisse. Grâce à cela, on peut faire passer un échantillon frais élué (avec une haute concentration en sel) d'une colonne d'échange d'ions directement sur une colonne d'interaction hydrophobe, sans avoir à dialyser ou diluer.

Les résines les plus utilisées pour ce type de chromatographie sont l'octyl- et le phényl-sépharose.

6.4. Hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est du phosphate de calcium cristallisé comme nos dents en contiennent. Cette substance retient les protéines de deux façons: son calcium interagit avec les groupements acides des protéines alors que son phosphate interagit avec leurs groupements aminés. L'éluion n'est pas ici faite avec un gradient de sel mais plutôt avec un gradient de phosphate ou de potassium pour compétitionner ces interactions.

6.5. Chromatographie d'affinité

Dans une telle technique, on a recours à l'affinité de certaines molécules pour d'autres. On pourra ainsi fixer des anticorps sur une matrice solide dans une colonne (Protéine A-

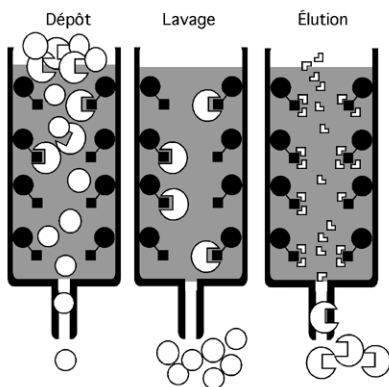
sépharose, par exemple) et faire passer notre échantillon sur la colonne pour y attraper les protéines reconnues par l'anticorps.

On a souvent recours à des colonnes dont la matrice porte des fragments spécifiques d'ADN pour aller pêcher les protéines liant l'ADN. Le bromure de cyanogène (CNBr) est l'un des réactifs utilisés pour coupler ainsi une cible à la matrice d'une colonne.

Plusieurs protéines de fusion ont des étiquettes permettant de reconnaître et de fixer des résines spécialement adaptées. Une telle étiquette est la glutathione-S-transférase, qui permet à la protéine à laquelle elle est fusionnée de se fixer sur une résine de glutathione-sépharose. La *chitin-binding-protein* (CBP) fait la même chose pour une résine couplée à de la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine.

Les lectines comme l'agglutinine de germe de blé (*WGA*, pour *wheat germ agglutinin*) ont la très utile capacité de permettre l'adsorption de protéines glycosylées. Le WGA lie le N-acétylglucosamine; la concanavalin A (Con A) lie le mannose et le glucose

Puisque la chromatographie d'affinité repose sur l'interaction entre deux ou plusieurs molécules, on devine que seule l'imagination limite ses possibilités de combinaison. Il suffit de disposer de deux substances qui ont de l'affinité l'une pour l'autre et d'en fixer une sur un support solide.

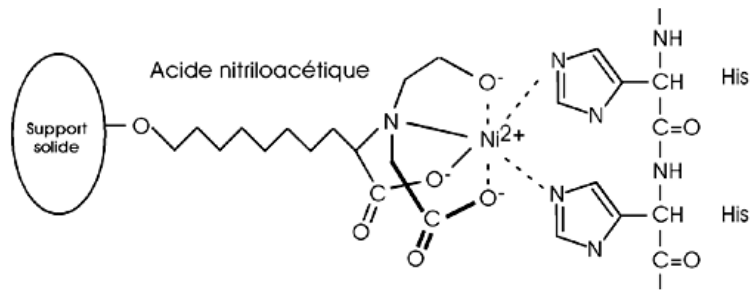


On retrouve dans le commerce des résines d'affinité déjà faites.

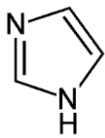
6.6. IMAC (immobilized metal affinity chromatography)

Ce type de chromatographie d'affinité fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique comme le nickel ou le cobalt. Cet atome immobilisé peut établir des liens de coordination avec certains polypeptides, comme par exemple une chaîne d'histidines. L'étiquette 6-His est justement ajoutée aux protéines pour que ces dernières soient plus aisément purifiées par chromatographie d'affinité pour le métal.

Dans la figure ci-dessous, une résine IMAC populaire (*nickel-nitriloacetic acid* ou nickel-NTA) utilise un ion de nickel comme site actif. L'ion Ni^{2+} possède six liens de coordination. Quatre sont sollicités par le NTA pour l'immobiliser sur la résine; il en reste donc deux pour interagir avec les atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidines.



À pH < 6, les résidus histidines commenceront à être réduits et ne pourront plus lier le nickel. On peut donc utiliser une variation de pH pour faire décoller les protéines. Cependant, la technique d'éluion la plus usuelle (plus douce) se fera à l'aide d'un composé qui compétitionnera avec l'histidine pour le nickel: l'imidazole.

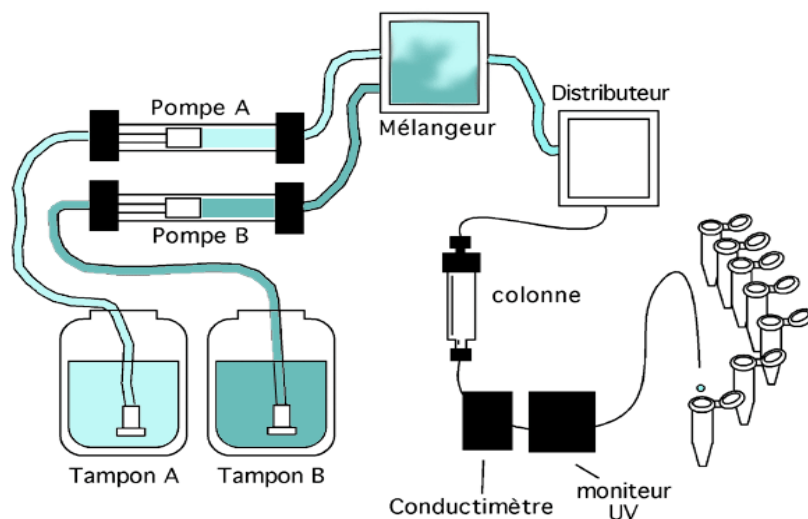


Imidazole, un composé compétitionnant avec l'histidine pour permettre l'éluion de protéines d'une colonne d'affinité pour le métal immobilisé.

Le nickel peut être chélaté par l'EDTA et l'EGTA, aussi ces composés doivent être utilisés avec parcimonie (et selon les instructions du fournisseur en résine).

6.7. Schéma d'un système de chromatographie

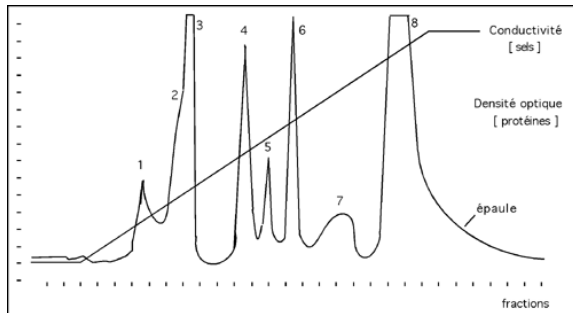
La figure ci-dessous décrit un système de base de chromatographie (il est inspiré du système FPLC d'Amersham Biosciences).



Bien comprendre les différents composants et leur utilité

En aval de la colonne, on installe d'habitude un conductimètre, qui enregistre la conductivité du tampon (et donc sa concentration en sel) et une cellule spectrophotométrique qui enregistre l'absorbance aux UV pour détecter le passage des protéines. L'éluat de la colonne est ensuite recueilli en petites fractions par un collecteur.

La figure ci-dessous nous montre ce à quoi ressemble l'enregistrement de l'absorbance de l'éluat en fonction du temps pendant une chromatographie d'échange d'ions avec un gradient de sel.



Le conductimètre a enregistré le passage d'une concentrations en ions de plus en plus élevée avec le temps. Les protéines, elles, décrochent de la colonne en fonction de l'effet qu'a ce gradient de sel sur leur interaction avec les groupements chargés de la colonne. Les protéines du pic 1 décrochent avant les protéines du pic 8; c'est donc que leur interaction avec la colonne était plus faible.

6.8. HPLC

High performance liquid chromatography: il s'agit d'une technique permettant de séparer les protéines (entre autres) avec une très grande résolution.

En gros, un système HPLC ressemble au système vu ci-haut: les différences majeures seront que la colonne est généralement en acier et que le tampon de chromatographie (le solvant) est sous haute pression pendant la séparation.

Plusieurs types de séparation sont possibles en HPLC. La chromatographie d'échange d'ions et la filtration sur gel s'y pratiquent selon les mêmes principes qu'avec une chromatographie "low pressure" (même si à strictement parler, ce n'est pas un "gel" qu'on trouve ici dans la colonne pour effectuer la filtration).

On distingue souvent en HPLC la chromatographie en phase normale de la chromatographie en phase inverse. En phase normale, la matrice de la colonne est très polaire (de style silice, par exemple) et la phase mobile (le solvant) est non-polaire (n-hexane, par exemple). En phase inverse, vous l'avez deviné, c'est le contraire: la matrice de la colonne est non-polaire ou hydrophobique et le solvant est polaire (eau, méthanol, acétonitrile). C'est le pendant à haute pression de la chromatographie à interaction hydrophobe.

Le HPLC se distingue par le très petit diamètre de ses colonnes (moins de 5 mm); un flot à haute pression de solvant; la capacité de séparer et détecter de très petites quantités; et finalement une très haute résolution.