

## **Chapitre 3. Techniques de purification des protéines.**

Techniques fondamentales utilisées pour étudier les protéines

1. Introduction et généralités sur la chromatographie
2. Chromatographie par filtration sur gel
3. Chromatographie par échange d'ions
4. Chromatographie par interactions hydrophobes
5. Chromatographie par affinité
6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)
7. Dosage global des protéines

Techniques fondamentales utilisées pour étudier les protéines.

### **1. Introduction et généralités sur la chromatographie**

Le terme chromatographie désigne un ensemble de techniques de séparation qui reposent sur l'affinité différentielle des molécules d'un mélange pour une phase stationnaire ou matrice, solide et une phase mobile, liquide ou gazeuse.

Dans le cas des protéines, le mélange est déposé au sommet de la phase stationnaire contenue dans une colonne. La phase mobile, un éluant, traverse la phase stationnaire et entraîne progressivement les molécules vers le bas de la colonne où l'effluent est collecté en différentes fractions qui sont ensuite analysées.

Selon le type de matrice, les molécules de protéines sont retenues et retardées par la colonne en fonction de paramètres physico-chimiques variés : taille, charge électrique, hydrophobicité de la surface ou affinité pour des ligands déterminés.

Cette technique chromatographique est également nommée chromatographie par exclusion ou chromatographie par tamisage moléculaire.

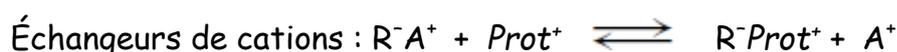
Dans cette technique, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne de gel constitué de billes de porosité définie. Ces billes sont constituées de dextran (polymère de glucose), d'agarose (polymère de dérivés du galactose) de Séphadex LH20, ou de polyacrylamide.

## 2. Chromatographie par filtration sur gel

Les molécules de petite taille (petites protéines et polypeptides) pénètrent dans les billes et sont donc retardées, alors que les molécules de taille supérieure à celle des pores ne pénètrent pas dans les billes et traversent donc plus rapidement la colonne. Les gels utilisés : Gel de Séphadex LH20.

## 3. Chromatographie par échange d'ions

Dans cette chromatographie, la matrice (cellulose, polystyrène, agarose, dextrane) contient des groupes ionisés qui fixent des ions de charge opposée ( $A^+$ ,  $B^-$ ) présents dans la solution ; ces ions pourront être échangés avec des protéines. On distingue les échangeurs d'anions (matrice R chargée positivement) et les échangeurs de cations (matrice chargée négativement) :



Les protéines se fixent à la matrice en fonction de leur affinité pour les groupes ionisés.

La colonne est ensuite lavée avec un tampon (tampon d'élution), qui entraîne en premier lieu les protéines les plus faiblement liées à l'échangeur. Les protéines

les plus fortement liée seront libérées en dernier ou resteront fixées sur la matrice. On réussit en général à libérer l'ensemble des protéines fixées en faisant varier le pH du tampon d'élution ou en augmentant progressivement sa force ionique.

#### **4. Chromatographie par interactions hydrophobes**

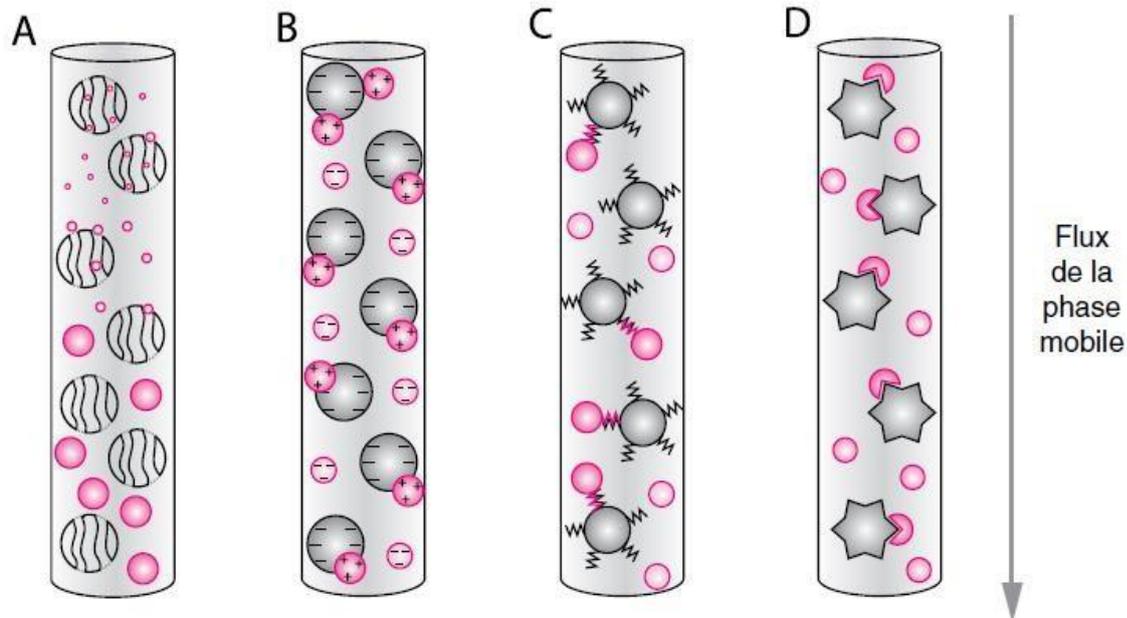
Cette méthode met à profit l'existence de zones hydrophobes discrètes à la surface des protéines. La matrice contenue dans la colonne contient des groupes apolaires (groupes phényl ou méthyl -CH<sub>3</sub>) qui peuvent retenir les protéines en s'associant à leurs régions hydrophobes.

Cette interaction est d'autant plus forte que la force ionique est élevée. Aussi, et à l'inverse de la chromatographie d'échange d'ions, la colonne hydrophobe est éluee par un tampon de force ionique décroissante, ce qui a pour effet d'affaiblir progressivement l'interaction hydrophobe entre les protéines et la matrice.

En principe, les protéines contenant peu de zones hydrophobes à leur périphérie sont éluees en premier, les protéines les plus hydrophobes sont éluees en dernier.

#### **5. Chromatographie par affinité**

Dans cette technique, les protéines sont séparées en fonction de leur affinité pour un groupement (analogue de substrat, anticorps spécifique, lectine, etc.) greffé sur la matrice. La protéine d'intérêt est éluee de la colonne par déplacement avec un analogue de la structure ou molécule reconnue par le groupement lié.



**Figure 1.** Différents types de chromatographie.

- (A) **Chromatographie par filtration sur gel.** Les protéines (disques roses) de taille supérieure au diamètre des pores ne sont pas retardées par la matrice (disques gris).
- (B) **Chromatographie par échange d'ions.** Les protéines (disques roses) chargées positivement sont retenues par la matrice (disques gris) chargée négativement.
- (C) **Chromatographie par interactions hydrophobes.** Les protéines (disques roses) les plus hydrophobes sont retenues par la matrice (disques gris), elle-même hydrophobe.
- (D) **Chromatographie par affinité.** Les protéines (disques roses) les plus affines sont retenues par la matrice (disques gris) sur laquelle est greffé le ligand spécifique de la protéine d'intérêt.

## 6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'HPLC est une méthode de séparation des molécules au sein d'un mélange complexe. Elle repose sur un phénomène de rétention dépendant d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Le système est composé :

1. d'un réservoir de phase mobile (solvant) également appelé « éluant » qui va entraîner l'échantillon à analyser dans le système. Plusieurs éluants peuvent être utilisés pour réaliser des gradients d'éluant.
2. d'une pompe permettant de travailler en mode isocratique avec 100% de la même phase mobile injecté tout au long de l'analyse ou en mode gradient avec des variations de concentrations des éluants. Le débit de cette pompe est de l'ordre de quelques  $\mu\text{L}$  à plusieurs mL/min.
3. d'une vanne d'injection qui permet d'injecter toujours le même volume d'échantillon. Son volume varie en fonction de la colonne et de la concentration supposée des composés à analyser.
4. d'une colonne inerte en inox ou en verre contenant la phase stationnaire.
5. d'un détecteur (type spectrophotomètre UV-V) qui détecte les molécules
6. d'un enregistreur qui enregistre les chromatogrammes.
7. Un réservoir de récupération.

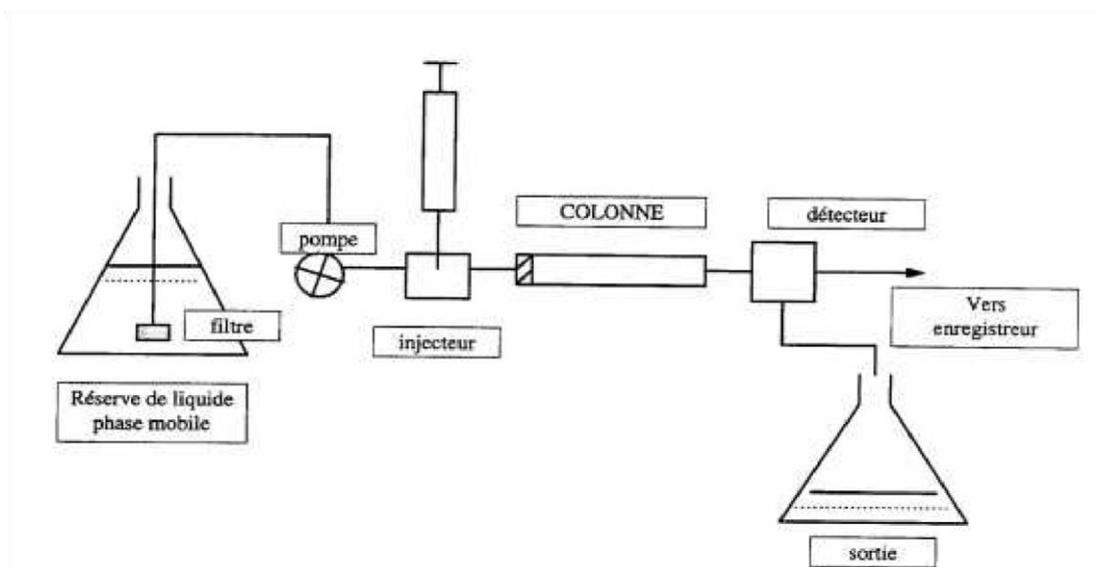


Figure 2 : Schéma des différents composants d'une HPLC.

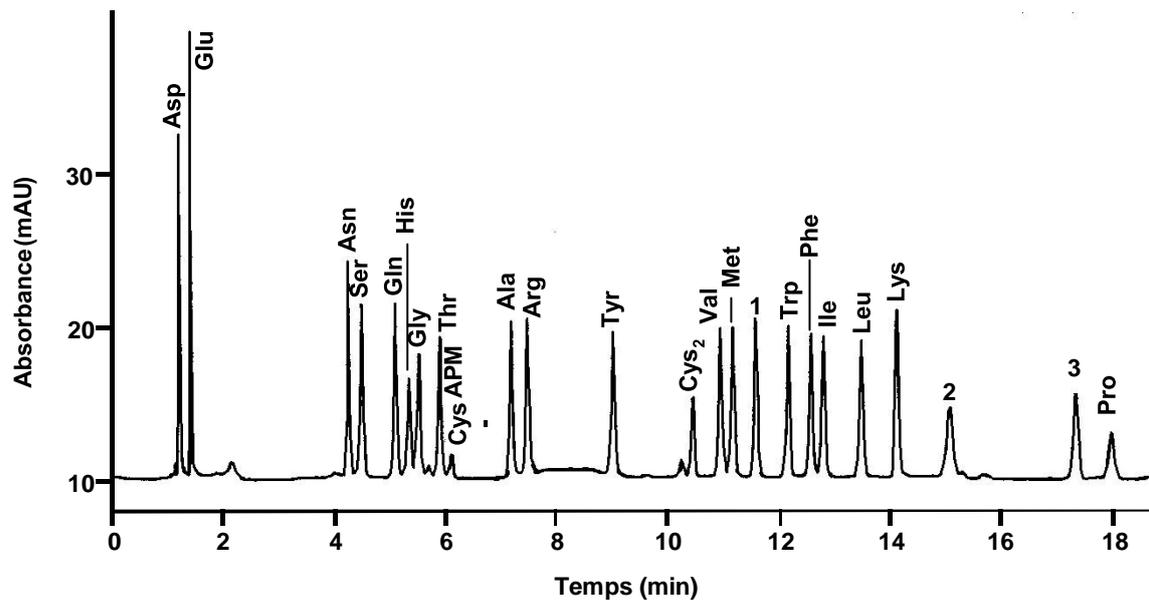


Figure 3 : Un chromatogramme d'acides aminés constitutifs d'une protéine.

## 7. Dosage global des protéines

Spectrophotométrie UV à 280nm : La spectrophotométrie n'est utile que pour les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) mais d'autres substances peuvent absorber à 280nm.

Réaction du biuret : Les protéines sont placées en milieu alcalin  $\text{Cu}^{2+}$  formant un complexe violet proportionnel à la quantité de protéines. C'est en fait les liaisons peptidiques qui sont dosées dans cette technique.

Technique de Lowry : La technique de Lowry, très sensible, ne dose que la tyrosine.

Colorations spécifiques :

- La coloration dénature les protéines.
- Divers colorants comme le noir amide, le bleu de Bromophénol, le rouge ponceau, le bleu de Coomassie se fixent aux protéines.
- Généralement la coloration est effectuée pour révéler les résultats d'une électrophorèse.