

TECHNIQUES DE D'ÉTUDES DES BIOMOLÉCULES DES PROTÉINES

Programme du cours :

Protéines

Acides nucléiques

Parcours : S6 / Biologie Moléculaire et Physiologie (BMP)

Département de Biologie

FST - Université de Nouakchott

2024-2025

Techniques de purification des protéines

Il existe plusieurs étapes à suivre dans le but de purifier et caractériser une protéine :

1- Extraction:

Solubilisation

Centrifugation

Précipitation

Centrifugation

Dialyse

2- Séparation et purification (Chromatographie)

Filtration sur Gel (exclusion par taille)

Echange d'ions (cations ou anions)

affinité

HPLC

Techniques de purification des protéines

3-Characterisation : analyse et détection :

Electrophorèse:

Milieu dénaturant Gel SDS

Milieu non dénaturant

Electrophorèse 2D

Iso électrophorèse

Transfert (électroblotting)

Marquage froid et radioactif

Concentration

(Amicon, lyophilisation, ...)

Quantification:

Dosage en UV

Méthodes colorimétriques (biuret, Bradford, ...)

4- Etude structurale: (notions générales)

Centrifugation analytique

Cristallographie

RMN

Séquençage

Spectroscopie de Masse

5- logiciels d'étude: (notions générales)

Prédiction de séquence

Recherche

Recherche et comparaison de séquences

Prédiction de la conformation et des séquences

Rappels sur les fonctions structures et des protéines

Fonctions:

Contraction musculaire (actine, myosine)

Respiration (hémoglobine)

Immunité (anticorps)

Enzymologie (enzymes)

Définition:

Chaîne d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (amide)

Extrémités N-terminale et C-terminale

Origine :

Transcription : ADN \longrightarrow ARNm

Traduction : ARNm \Longrightarrow protéine

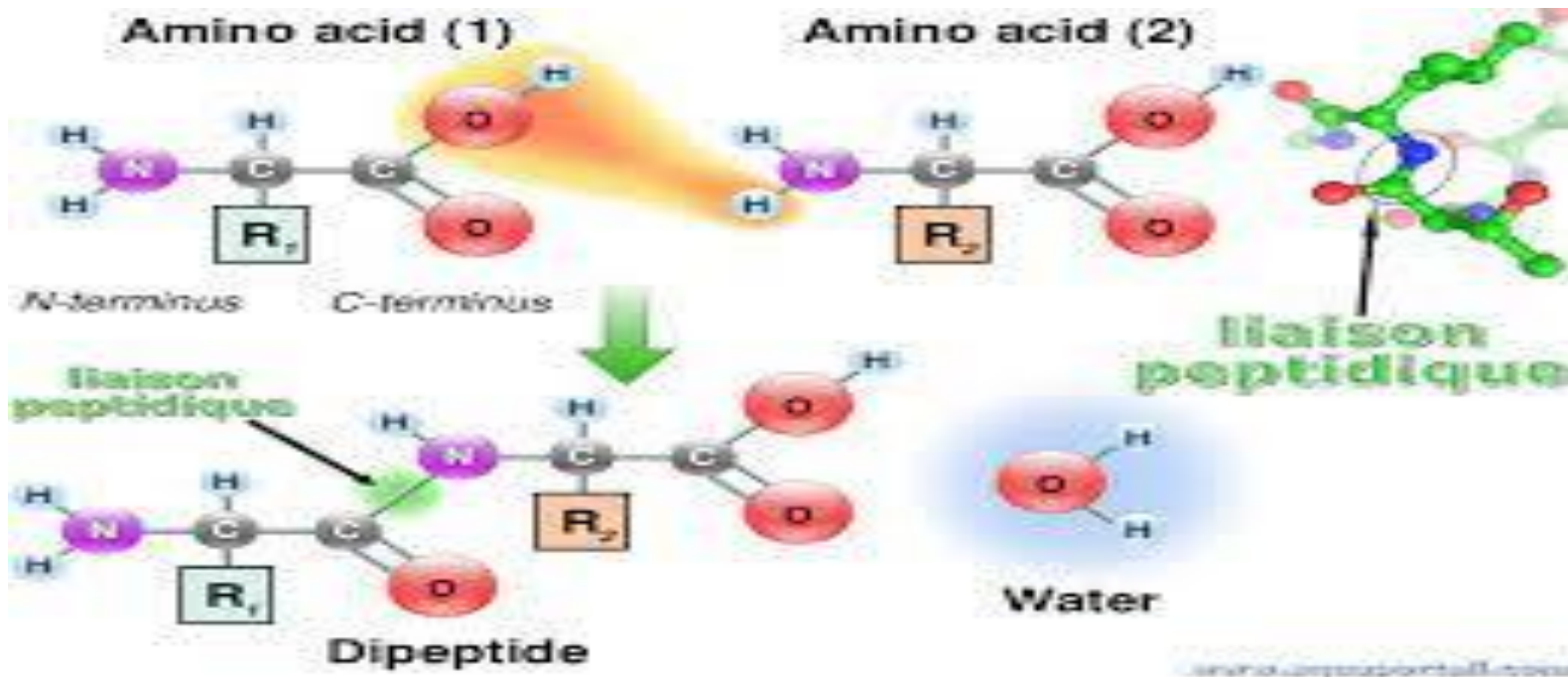
La liaison peptidique

Il y a 20 acides aminés dits standards.

Dans une protéine, la **liaison peptidique** est formée durant l'étape de traduction.

C'est **une liaison covalente de type amide** entre un groupement **α -aminé** d'un acide aminé et le **groupement carboxylique** d'un autre acide aminé.

Une molécule d'eau est éliminée.



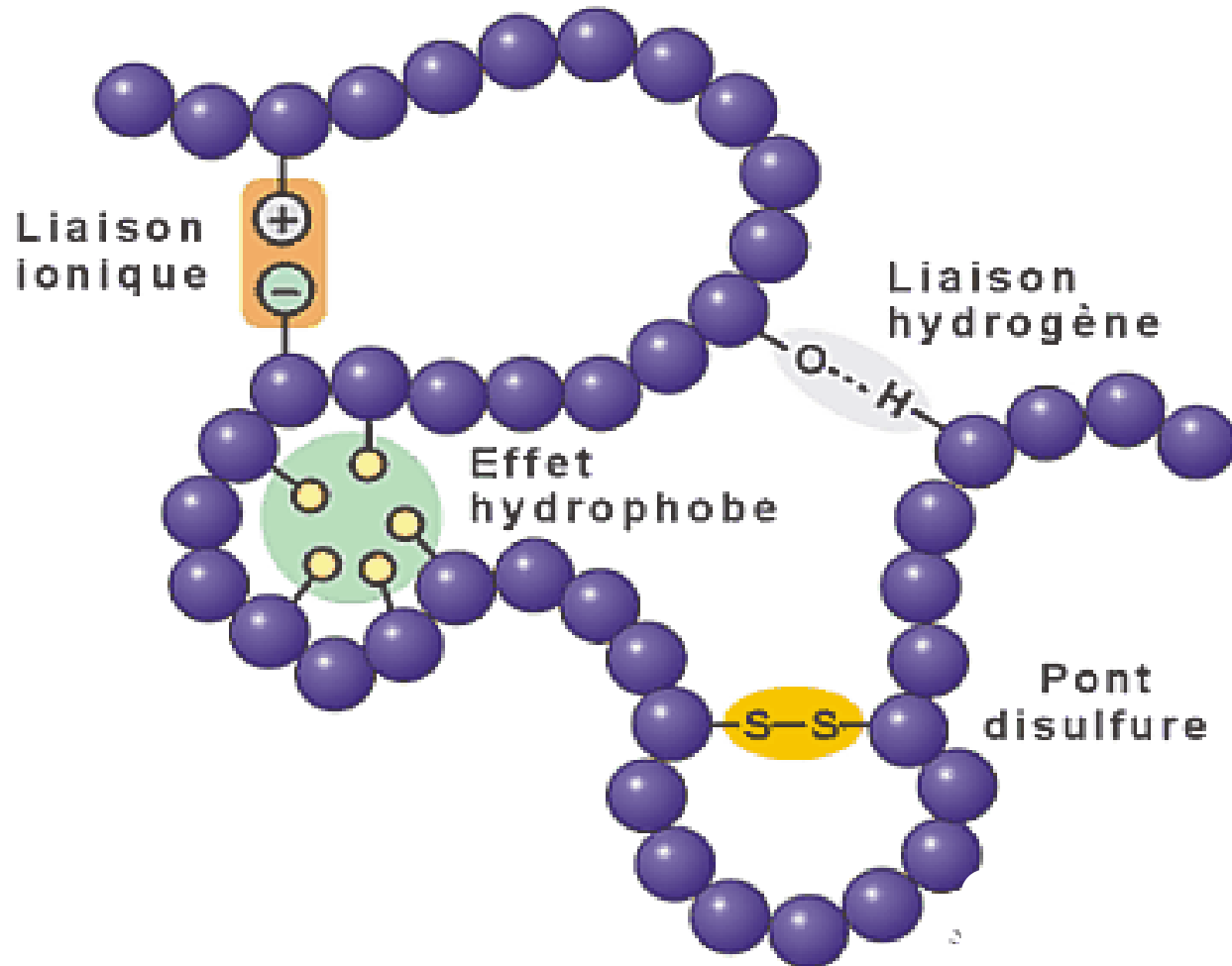
Les grands types d'interactions régissant le repliement de la chaîne polypeptidique

Liaison ionique

Effet hydrophobe

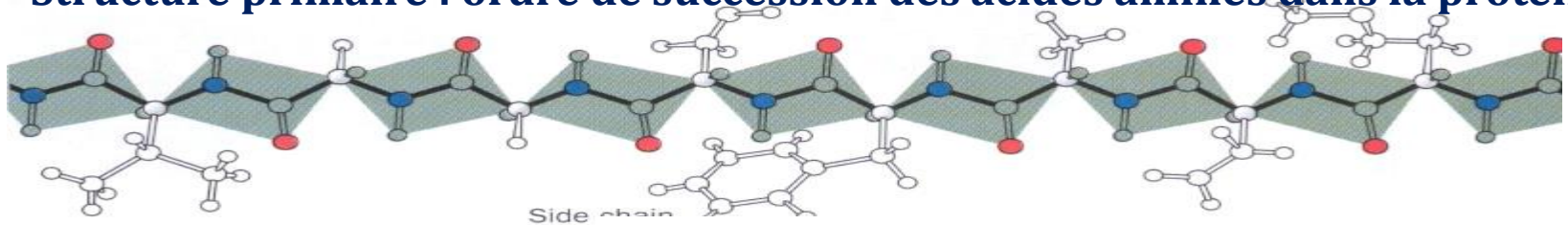
Ponts disulfure

Liaisons hydrogène

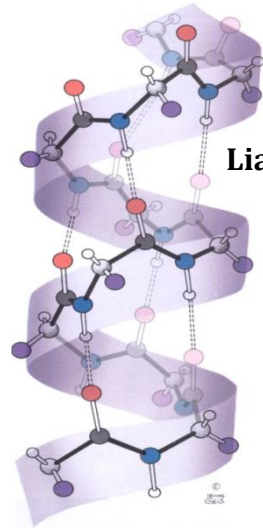


Les structures Primaire et Secondaire

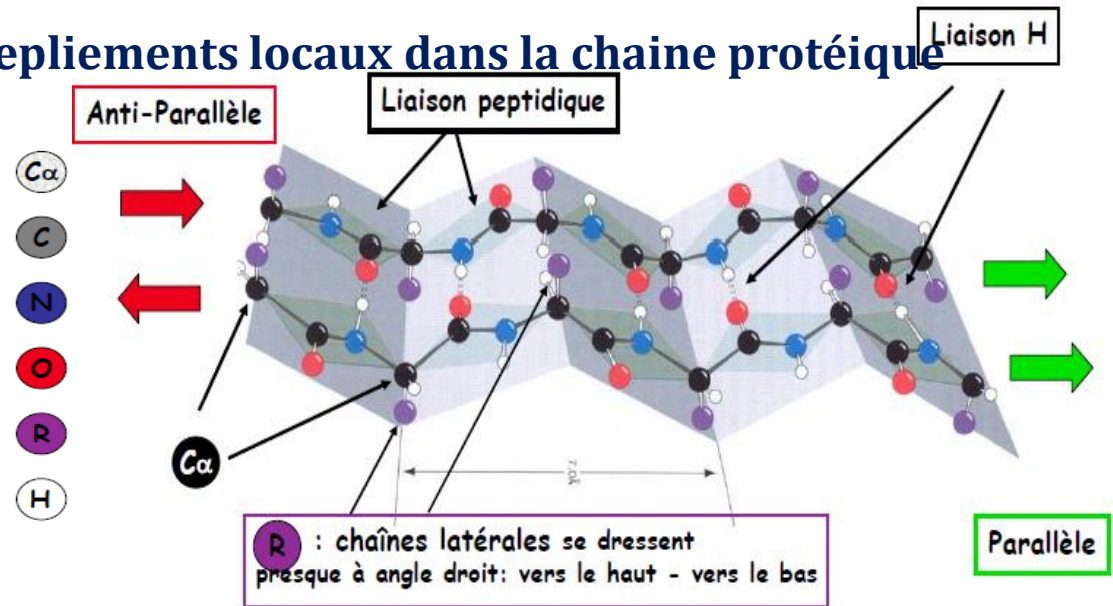
Structure primaire : ordre de succession des acides aminés dans la protéine



Structure secondaire : repliements locaux dans la chaîne protéique



Hélice Alpha



Feuillet β

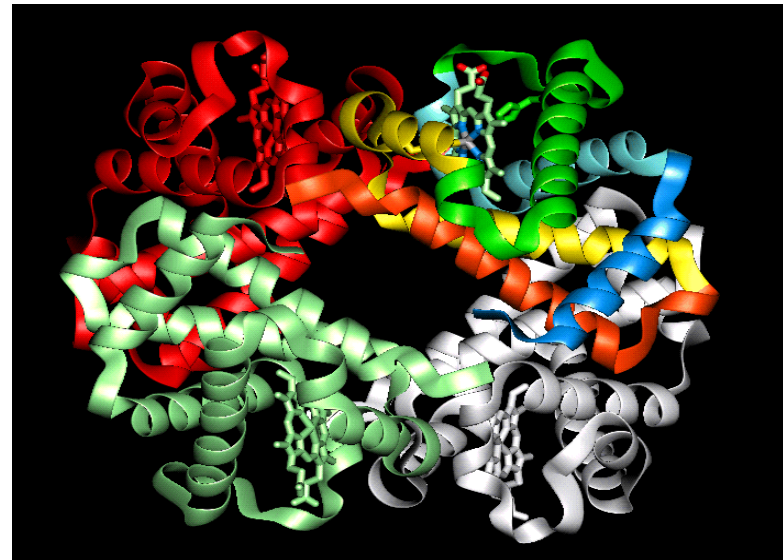
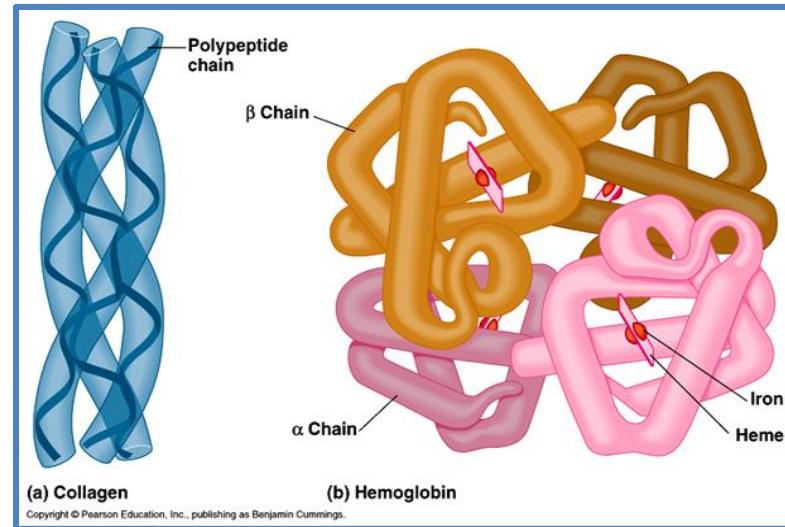
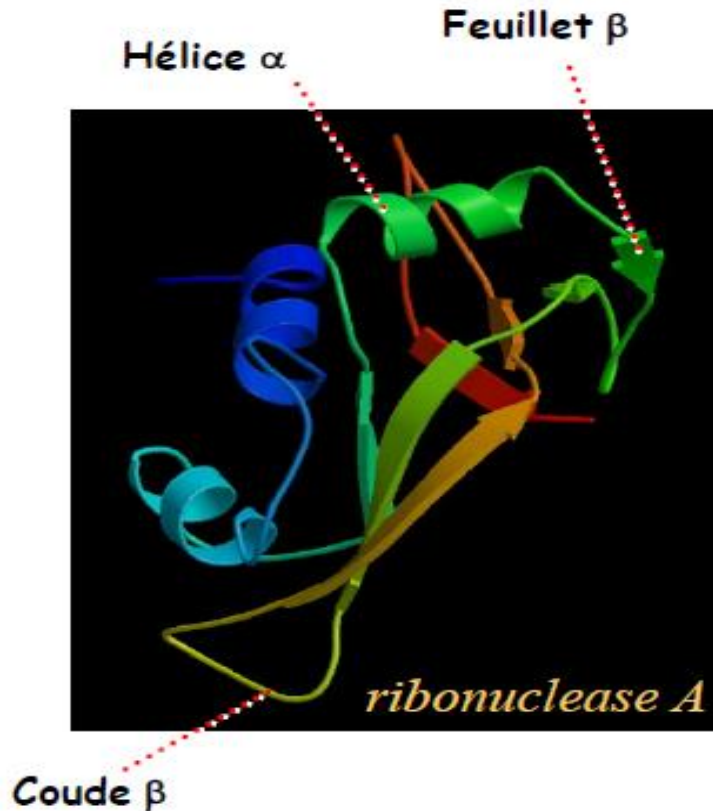
Les hélices α : L'hélice α est caractérisée par une translation le long de l'axe central parallèle au grand axe de l'hélice de 5,4 Å par tour d'hélice. Il y a environ 3,6 résidus par tour d'hélice

Les feuillets β : Les résidus acides aminés sont placés face à face dans 2 chaînes qui peuvent se déployer, soit en sens contraire (chaînes antiparallèles), soit dans le même sens (chaînes parallèles)

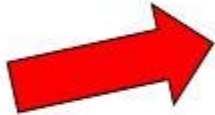
Les structures Tertiaire et Quaternaire

Structure quaternaire : nombre de sous unités

Structure tertiaire :
conformation globale de la protéine



Procédure générale de la Purification et étude des protéines



Extraction



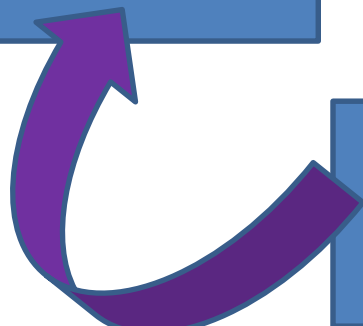
Centrifugation
Dialyse



Purification



Caractérisation



Etude structurale

Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Protéines musculaires (Myosine, Actine)

1- Homogénéisation

Le tissu (muscle) est mis dans un tampon donné puis broyé dans un blender

2- Centrifugation

3 – Resuspension du culot cellulaire et lyse des cellules

Protéines recombinantes (bactéries)

1-Cultures bactériennes

2- Centrifugation de la culture

3 – Resuspension du culot bactérien et lyse des bactéries

Protéines du sang (hémoglobine)

1- Préparation des hématies

2-centrifugation

3- lavage du culot et lyse des hématies

Les membranes des cellules sont cassées pour libérer le contenu de la cellule contenant notre protéine.

Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Méthodes de lyse cellulaire

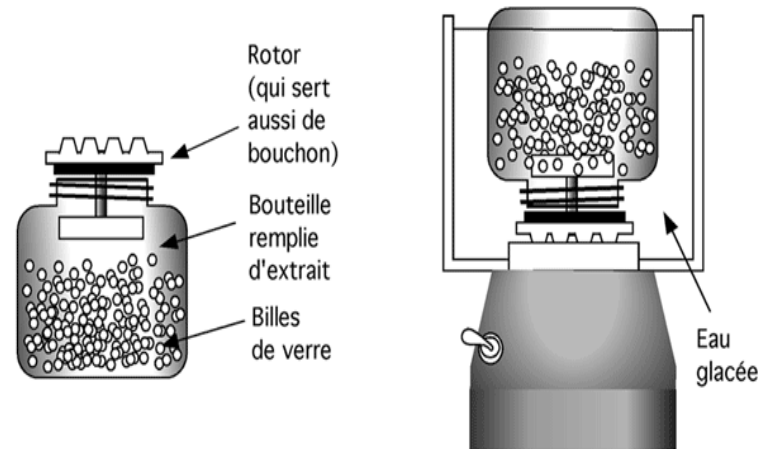
1- Broyage :

Application : muscle

Processus : Le muscle est coupé en petits morceaux puis repris dans un tampon.

Le broyage se fait :

- Mixeur de cuisine (blender) : cassure des membranes cellulaires par la lame du mixeur et libération des protéines musculaires.
- Billes de verre : cassure des membranes cellulaires par la rotation des billes de verre et libération du contenu cellulaire.



Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Méthodes de lyse cellulaire

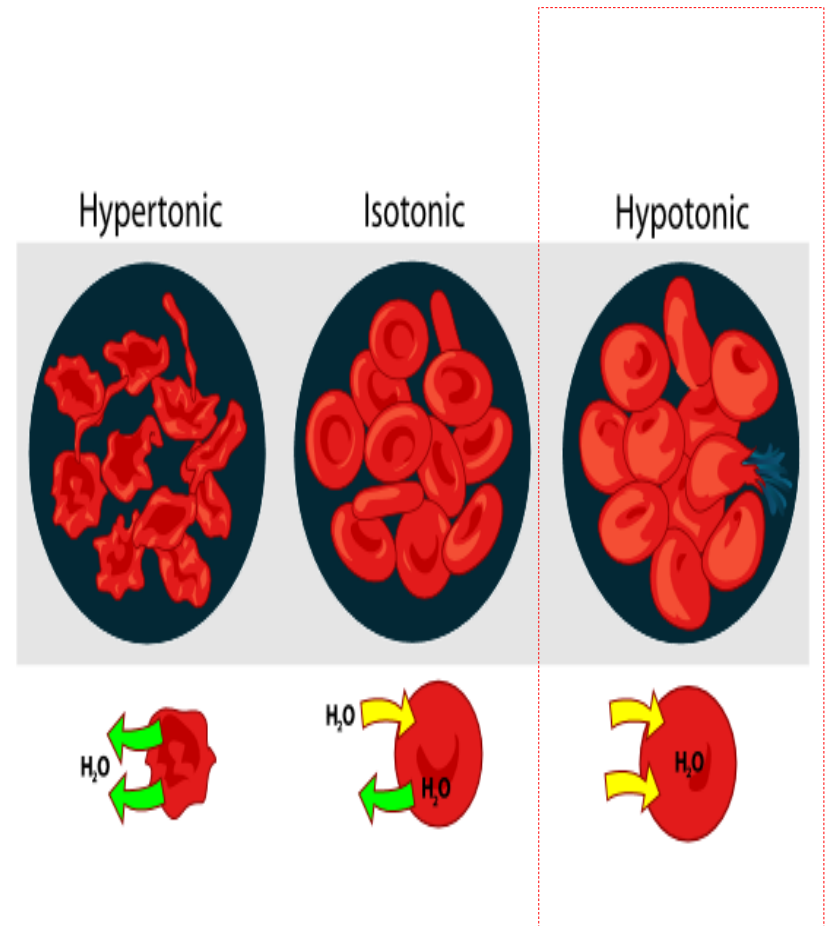
2- Choc osmotique :

Application : hémolyse

Processus : Les cellules sont incubées dans un tampon de concentration saline plus faible (hypo osmotique).

L'entrée d'eau dans les cellules pour rétablir l'équilibre de concentration saline va éclater la paroi membranaire.

Une petite agitation mécanique peut aider le processus.



Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Méthodes de lyse cellulaire

3- Sonication:

Application : générale

Processus :

La destruction des membranes cellulaires par les ultrasons.

Les vibrations ultrasoniques causent une augmentation locale de la pression et de la température entraînant la cassure des membranes cellulaires.

la sonication doit se faire très rapidement et en mettant le tube dans un bac de glace (refroidissement).



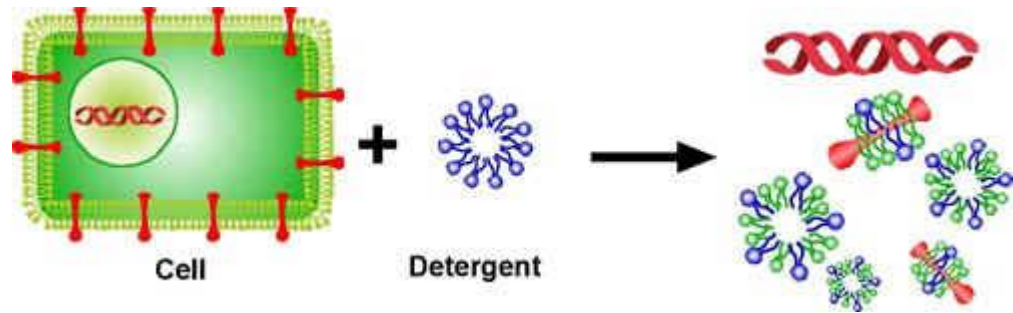
Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Méthodes de lyse cellulaire

4- Détergents :

Application : réduite



Processus :

Alternative à la technique mécanique. les détergents détruisent la barrière lipidique

Les détergents non ioniques (comme le Triton, CHAPS) entraînent moins de dénaturation protéique et sont donc le premier choix quand il est nécessaire de maintenir les fonctions et les interactions protéiques.

Les détergents ioniques (SDS) sont de bons solubilisateurs mais augmentent les chances de dénaturations des protéines.

5- autres processus de lyse : cycles de congélation-décongélation

Techniques de purification des protéines

1- Extraction

Méthodes de lyse cellulaire

5- autres processus de lyse : cycles de congélation-decongélation

Précautions à prendre pendant ou après la lyse cellulaire :

- Utiliser si nécessaire des inhibiteurs de protéase juste après lyse
- Ajouter des DNAses pour réduire la viscosité due à l'ADN
- Faire la centrifugation rapidement
- Garder l'extrait au froid

Techniques de purification des protéines

Traitement du lysat cellulaire :

1- Filtration :

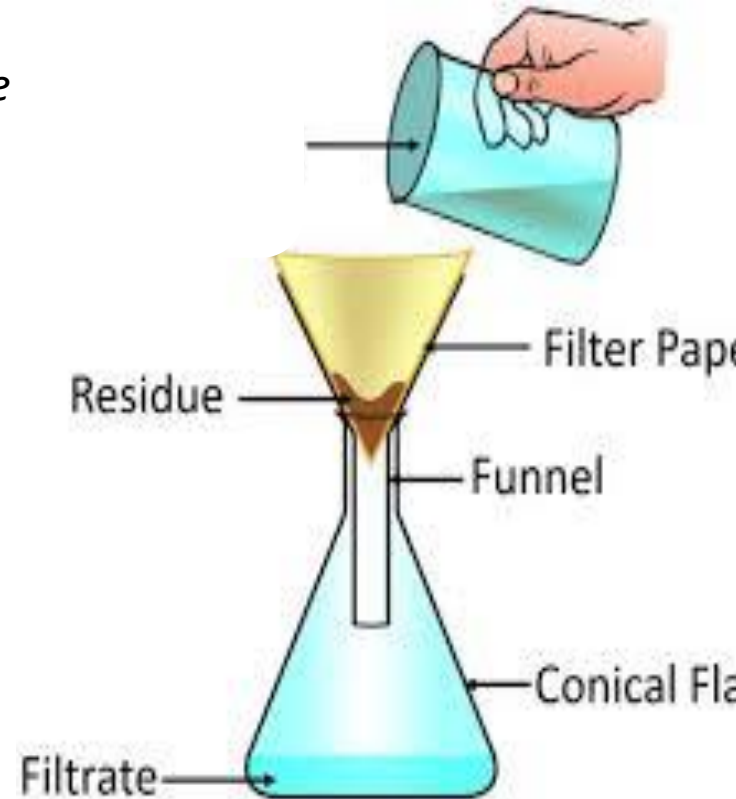
elle permet de séparer les constituants de la lyse cellulaire :

** la phase liquide formée des constituants de la cellule y compris les protéines et qui traversera les pores du filtre : filtrat*

** la phase solide formée des membranes cellulaires et qui est retenue par le filtre
filtration*



*Produit de
la lyse
cellulaire*

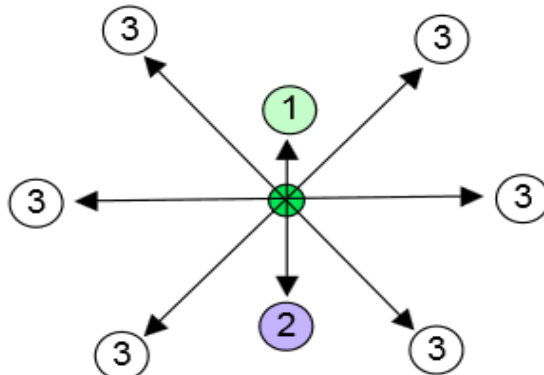


Techniques d'analyse des Biomolécules

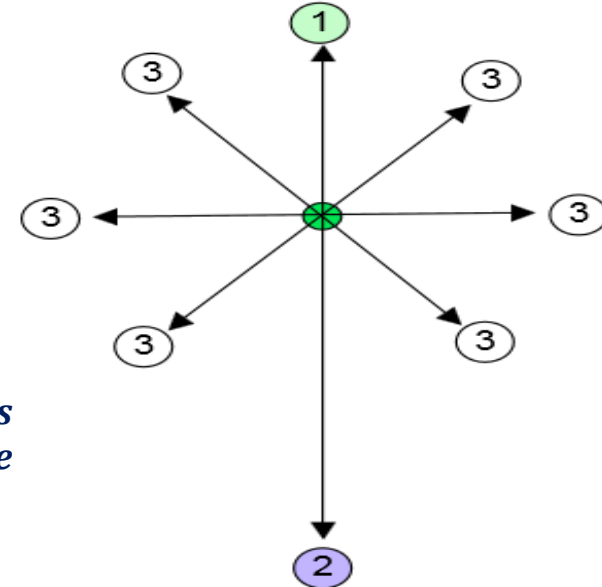
Traitement du lysat cellulaire :

2-Centrifugation

On observe que les particules des molécules ou toutes substances solide qui repose dans une phase liquide, se trouvant sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède (et parfois agitation moléculaire), tendent à tomber vers le fond (sédimentation) ou à remonter vers la surface, selon leur densité et leur taille.



Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide. La force de gravité et la poussée d'Archimède sont faible comparées à l'agitation moléculaire



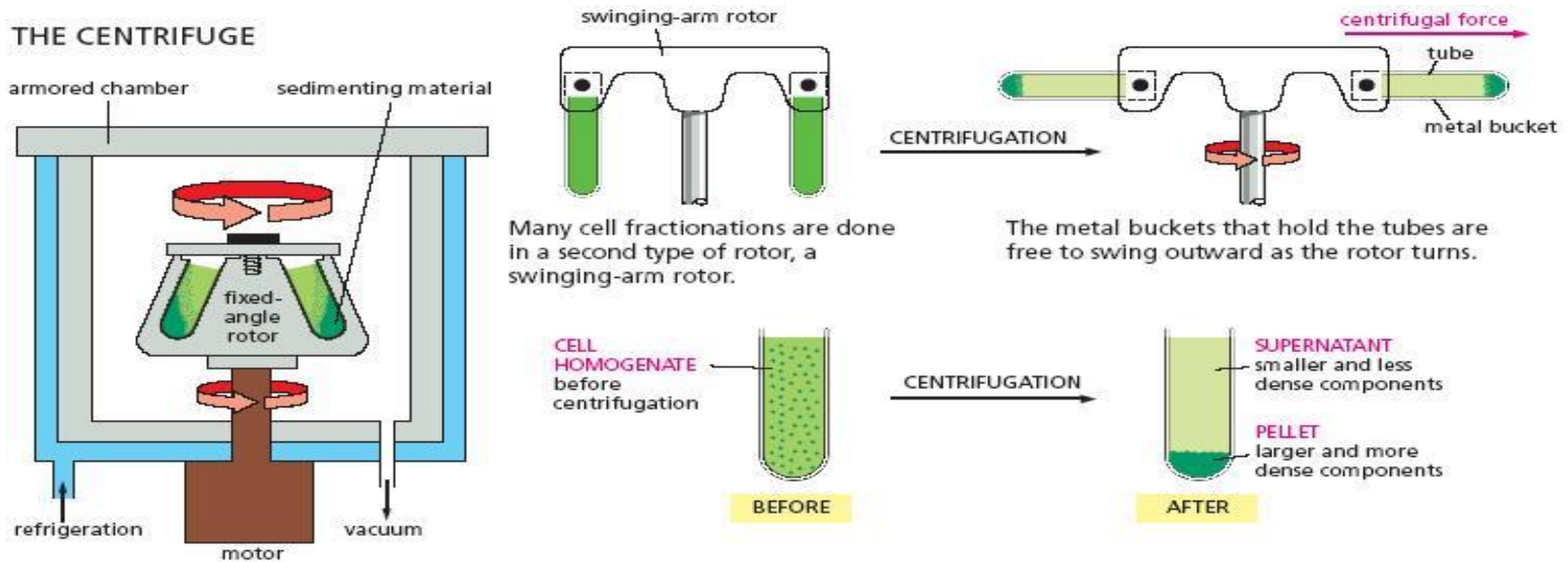
Forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à centrifugation. La force de gravité et la poussée d'Archimède sont augmentées au contraire de l'agitation moléculaire, et elle ne sont plus négligeables

- ① Poussé d'Archimèdes
- ② Gravité
- ③ Agitation moléculaire

On peut donc d'augmenter le pouvoir séparateur du champ de pesanteur vertical en lui substituant un champ centrifuge radial: centrifugation

Techniques de purification des protéines

Traitement du lysat cellulaire : 2- CENTRIFUGATION



Techniques d'analyse des Biomolécules

La centrifugation

Appareillage e force de centrifuge

Une centrifugeuse est constituée de une chambre de centrifugation dans laquelle sort l'axe de rotation, qui est relié au moteur. Sur l'axe on fixe le rotor et dans les emplacements du rotor on met les éprouvettes contenant l'échantillon à centrifuger.

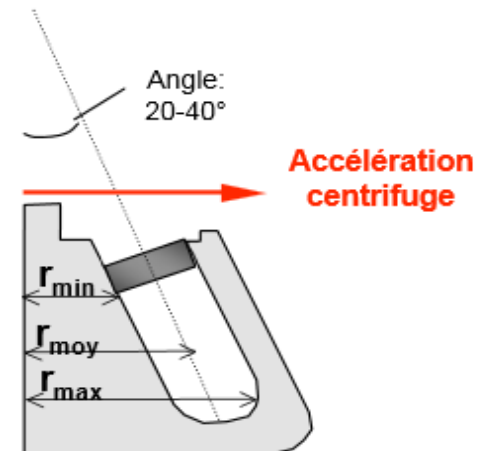
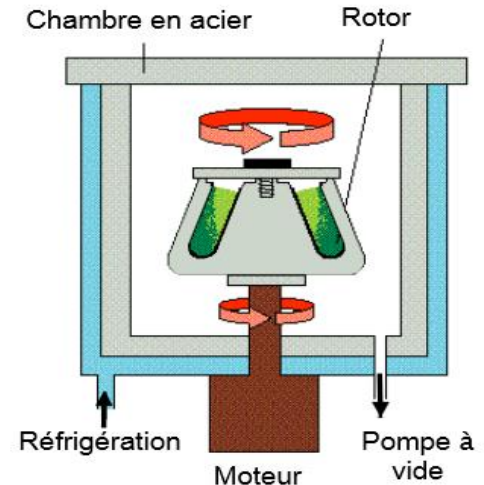
L'accélération centrifuge ou champ centrifuge, généré par le mouvement circulaire uniforme, est dirigé radialement vers l'extérieure et dépend de la vitesse angulaire (ω) et de distance (**r en m**) de l'axe de rotation, selon l'équation:

$$f = \omega^2 r \quad \text{avec} \quad \omega = 2\pi n$$

r rayon moyen du rotor (m)
 n = nombre de rpm (rotation par minute) soit n rpm/60 (rotation par seconde)

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

on a donc : $f = (2\pi \text{ rpm}/60)^2 r$



Techniques d'analyse des Biomolécules

La centrifugation

Appareillage e force de centrifuge

Une centrifugeuse est constituée de une chambre de centrifugation dans laquelle sort l'axe de rotation, qui est relié au moteur. Sur l'axe on fixe le rotor et dans les emplacements du rotor on met les éprouvettes contenant l'échantillon à centrifuger.

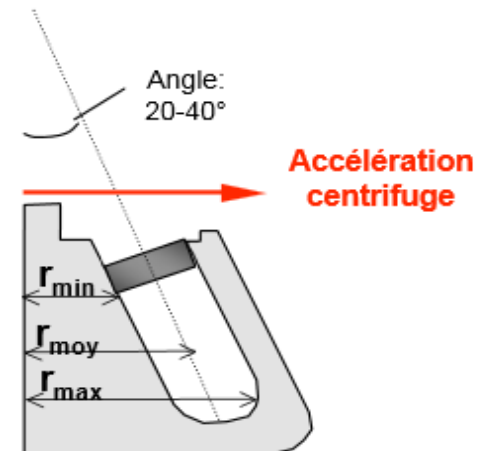
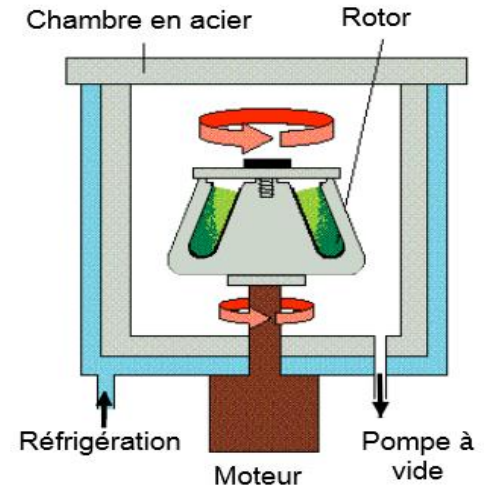
L'accélération centrifuge ou champ centrifuge, généré par le mouvement circulaire uniforme, est dirigé radialement vers l'extérieure et dépend de la vitesse angulaire (ω) et de distance (**r en m**) de l'axe de rotation, selon l'équation:

$$f = \omega^2 r \quad \text{avec} \quad \omega = 2\pi n$$

r rayon moyen du rotor (m)
 n = nombre de rpm (rotation par minute) soit n rpm/60 (rotation par seconde)

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

$$\text{on a donc} : f = (2\pi \text{ rpm}/60)^2 r$$



Techniques d'analyse des Biomolécules

La centrifugation

La force centrifuge relative

La force centrifuge (F_c) qui agit sur l'échantillon dépend de sa masse (m), de la vitesse angulaire (ω) et de distance (r) de l'axe de rotation, selon l'équation:

$$F_c = m \omega^2 r$$

Etant donné que tout les corps sur terre sont soumis à la force de gravité on peut définir le Champ Centrifuge Relative (RCF, relative centrifugal field) comme le rapport entre la force centrifuge appliquée par la centrifugeuse sur la particule et la force de gravité ($F_g = mg$ où $g = 9.81 \text{ m sec}^{-2}$).

$$RCF = F_c / F_g = m \omega^2 r / mg = \omega^2 r / g$$

Le Champ Centrifuge Relatif est exprimé en nombre de g et il n'a pas de dimension (NB. le rad n'a pas de dimension). Il nous indique le nombre de g nécessaire pour sédimenter ou séparer une particule. Si l'on exprime la vitesse angulaire en tours par minute (rpm) et on substitue à g sa valeur (9.81 m sec^{-2}), on obtient:

$$RCF = (2\pi \text{ rpm}/60)^2 r / 9.81 = 1.118 \times 10^{-3} \times \text{rpm}^2 \times r$$

Le Champ Centrifuge Relatif nous dit donc de combien de fois le champ d'accélération centrifuge doit être multiplié de l'accélération gravitationnelle, il est donc une valeur absolue à laquelle je soumet la particule pour la séparation. Par la formule nous mettons cette valeur en relation avec la vitesse de la centrifugeuse (vitesse de rotation en rpm) et le rayon du rotor.

Techniques d'analyse des Biomolécules

La centrifugation

Le nomogramme de la centrifugation

Bien que il soit possible de calculer facilement la valeur de RCF avec la formule:

$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-3} \times \text{rpm}^2 \times r \quad r \text{ en m}$$

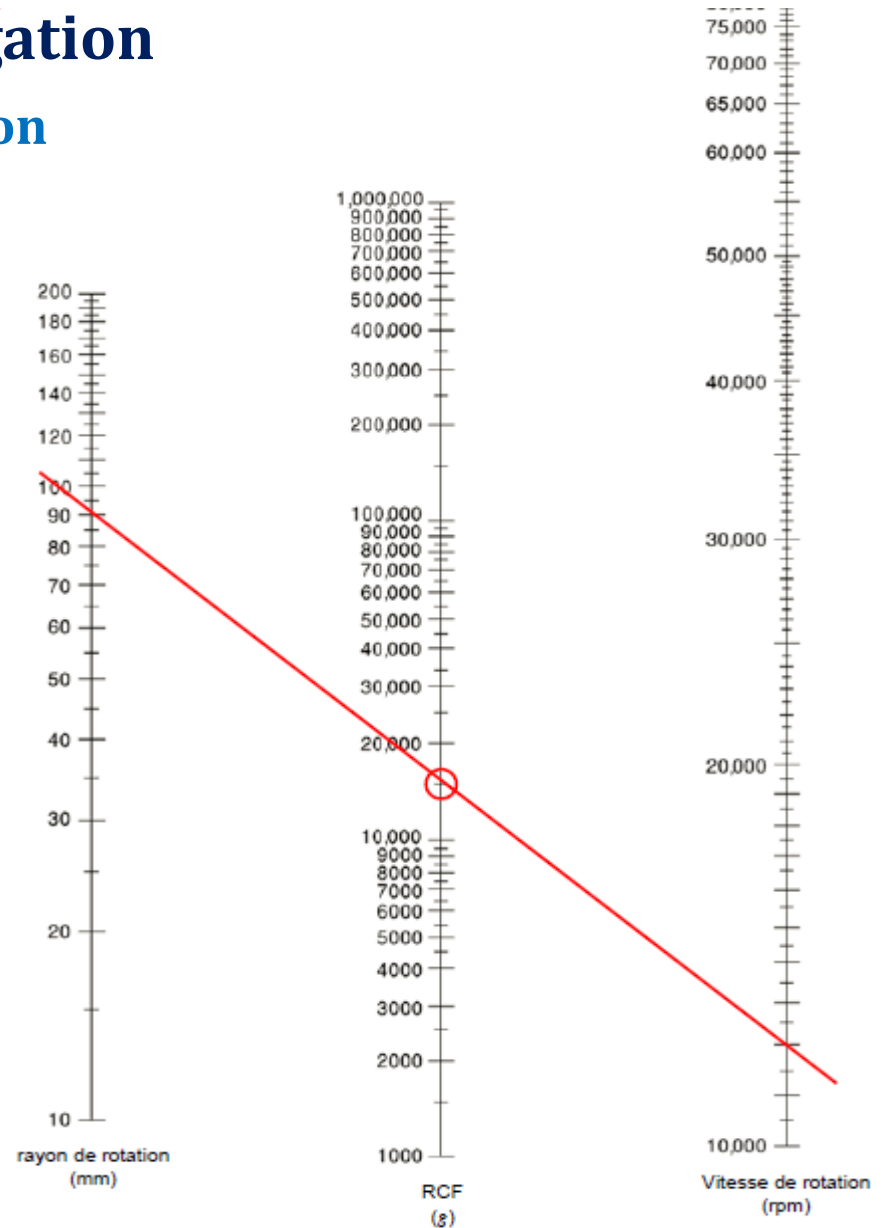
Il est possible d'utiliser un nomogramme pour calculer la valeur de RCF en g en connaissant le rayon de rotation d'un déterminé rotor et la vitesse de rotation en rpm.

Ex. rayon de rotation 9 cm = 0.06 m; vitesse d rotation

12000 rpm

Réponse :

RCF = 15000 g



Techniques de purification des protéines

1- Extraction

B - Précipitation des protéines du surnageant :

Objectif : C'est la séparation des protéines du reste des autres constituants cellulaires.

Définition : Conversion des molécules/protéines d'un état soluble vers un état insoluble puis séparation.

Processus :

Altération des conditions du solvant qui changent la solubilité des protéines par rapport aux autres macromolécules de l'extrait.

Mécanisme :

- Les protéines se lient entre elles divers types de liaisons
- Le mode de liaison le plus commun : liaisons hydrophobes
- La solubilité des protéines va dépendre des facteurs qui vont interagir sur ces liaisons (liaisons hydrophobes) et donc sur la solubilité des protéines

Agents de précipitation :

Sels : sulfate d'ammonium, NaCl...

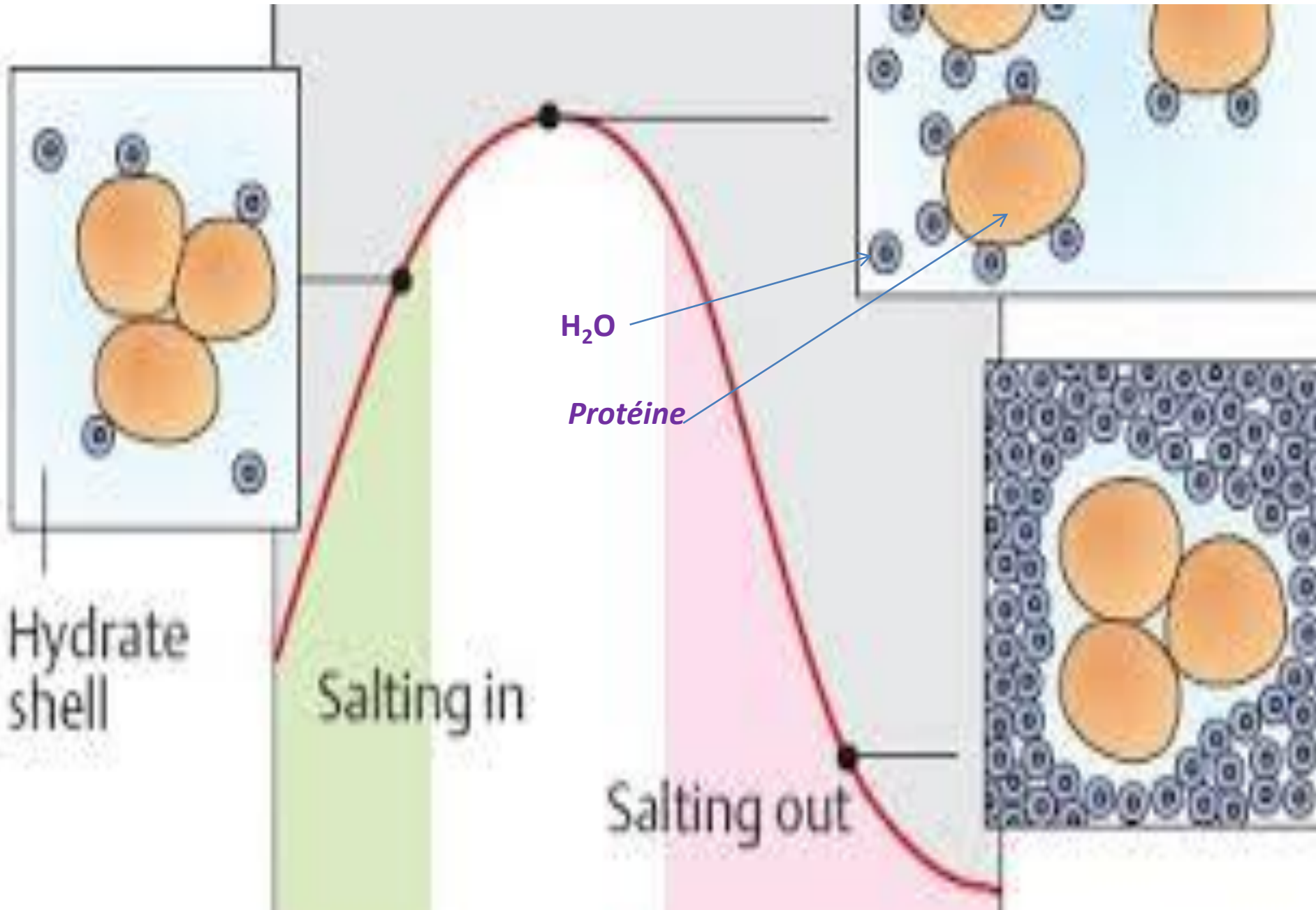
Solvants organiques : éthanol, acétone

B - Précipitation des protéines du surnageant :

Utilisation des Sels

SALTING IN ET SALTING OUT

- *Le degré de solubilité d'une protéine dépend du nombre d'acides aminés hydrophiliques à la surface de la protéine. Le principe de la précipitation des protéines par le sel est basé sur la suppression/compétition des interactions entre ces acides aminés hydrophiliques dans la protéine d'une part et les molécules d'eau d'autre part. Donc de façon générale :*
- *Les faibles concentrations en sels favorisent la dissolution (non précipitation) des protéines. les molécules de sel stabilisent les molécules de protéines en diminuant l'énergie électrostatique entre les molécules de protéines, ce qui augmente l'interaction avec les molécules d'eau et donc la solubilité des protéines : **SALTING IN***
- ** A forte concentration, les molécules de sel rivalisent avec les molécules de protéines pour se lier à l'eau. Ce phénomène favorisera l'agrégation et la précipitation des protéines : il y a contact entre les surfaces hydrophobes des protéines : précipitation des protéines : **SALTING OUT***



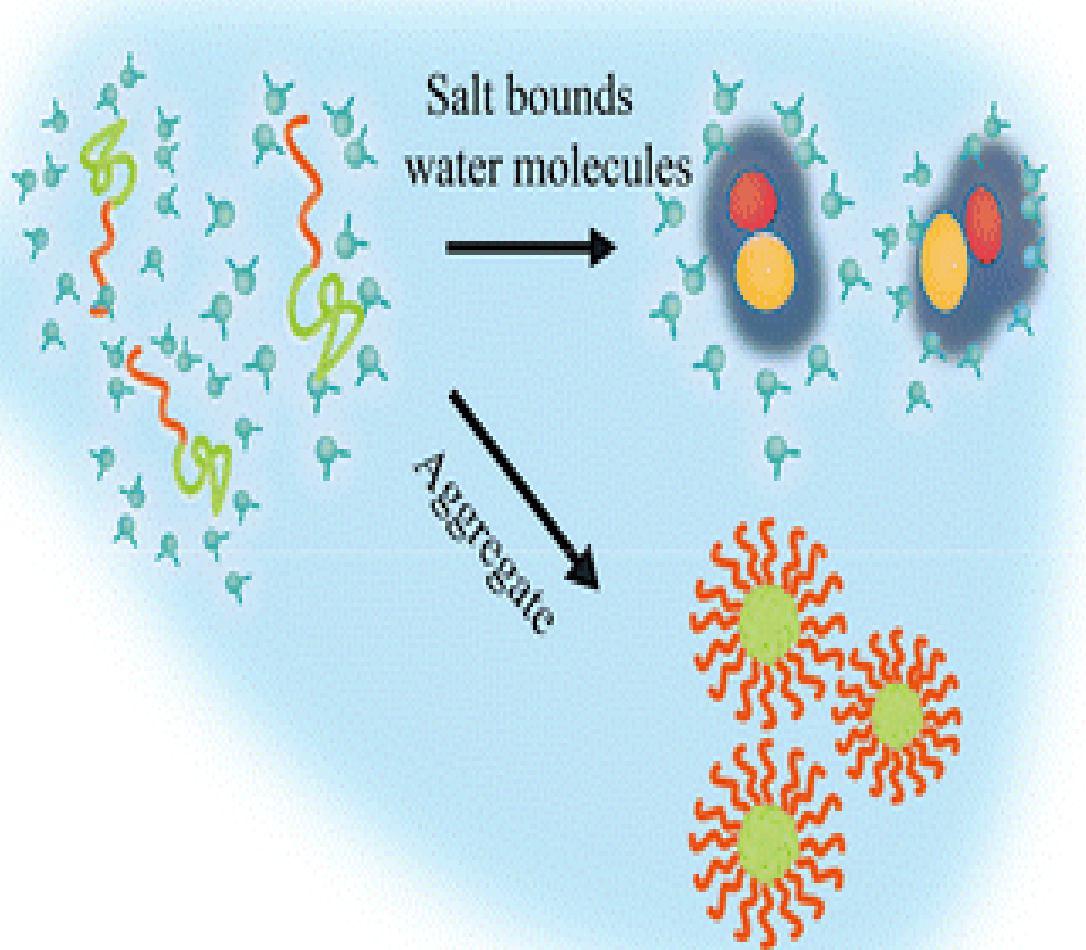
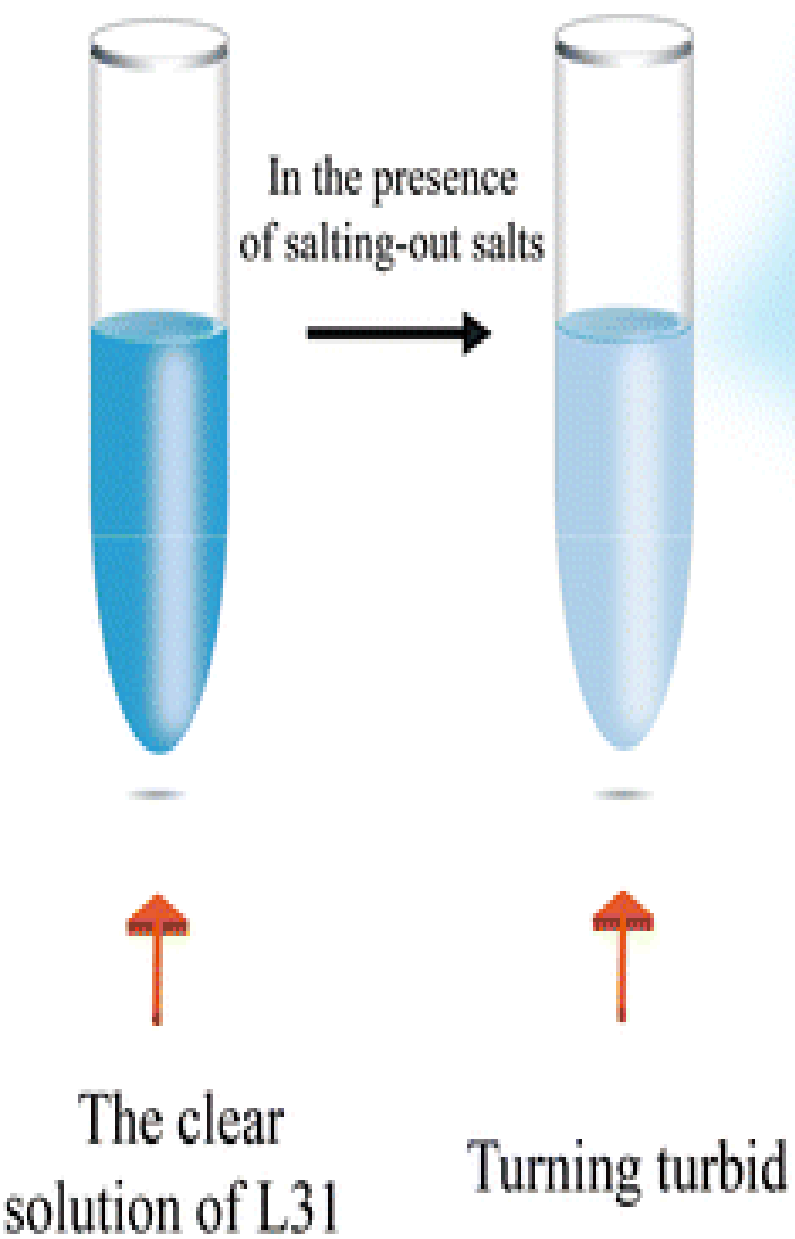
Hydrate shell

Salting in

Salting out

H₂O

Protéine



B - Précipitation des protéines du surnageant :

Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Avantage sur les autres sels :

- * Réversible**

- * Non dénaturante : Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution (au contraire du NaCl, dont la solubilisation est exothermique).**

- * Grande solubilité (3.6 M)**

Techniques de purification des protéines

B - Précipitation des protéines du surnageant :

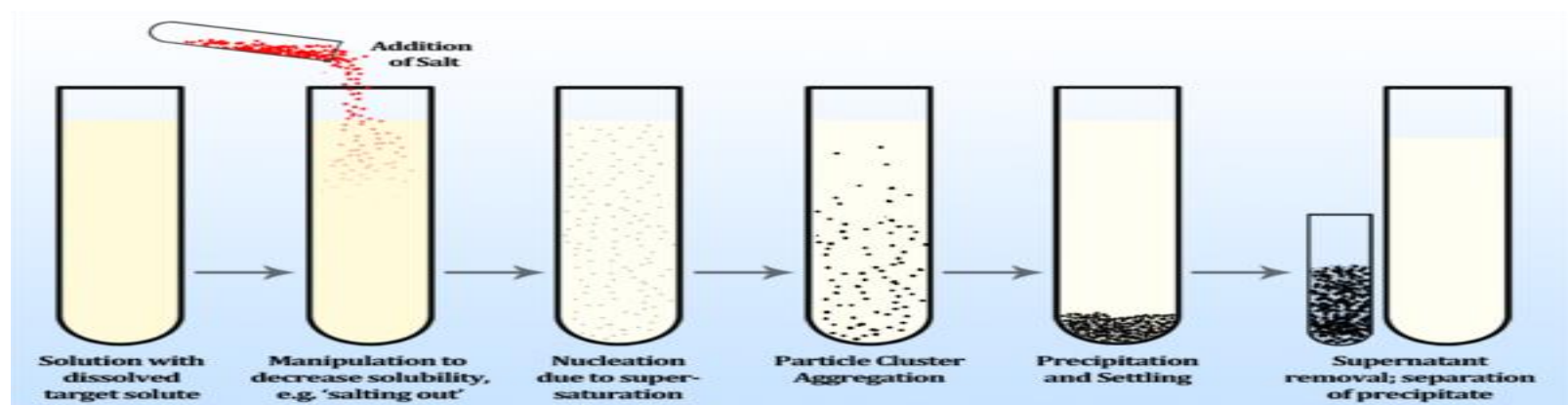
Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Précautions: Addition lente et sous agitation ; Connaitre la concentration requise pour chaque protéine ; Travailler à basse température (4°C)

Les protéines généralement solubles à une concentration similaire à celle du cytoplasme :

0.15 - 0.25 M (eucaryotes) 0.3 - 0.6 M (bactéries)

Les protéines insolubles à très faible concentrations :
précipitation par dessalage (dialyse ou gel filtration)



B - Précipitation des protéines par les sels:

Les protéines selon leur composition en acides aminés ont des propriétés de solubilité différentes.

- Leur salting out (précipitation) dépendra donc de la concentration de sel : on peut donc utiliser la concentration en sel pour faire un fractionnement (séparation) des protéines**

Techniques de purification des protéines

B - Précipitation des protéines du surnageant :

Solvants organiques : éthanol, acétone...

Mécanisme similaire à l'effet du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

- **Ethanol** : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
- L'ajout d'éthanol à la solution réduit l'hydratation de la protéine, en éliminant l'eau et les protéines environnantes, ce qui conduit à l'agrégation et à la précipitation.
- l'éthanol s'associe plus fortement avec les molécules d'eau que les protéines:
 - *Inconvenient* : Grand volume d'EtOH à utiliser: au moins 4 fois celui de la solution protéique aqueuse.
- Protocole général de précipitation de l'éthanol :
 - * Ajoutez 9 volumes d'éthanol à 1 volume de solution protéique aqueuse.
 - * Laisser refroidir à $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pendant au moins 2 heures, puis centrifuger pendant 30 minutes à $> 14\ 000\ \text{tr/min}$ dans une centrifugeuse réfrigérée.

Techniques de purification des protéines

B - Précipitation des protéines du surnageant :

Solvants organiques : éthanol, acétone...

- *Acétone* : CH₃-CO-CH₃
- plus efficace que l'éthanol mais re-dissolution plus difficile

– Précautions :

Basse température (0 à -20°C)

Eviter la dénaturation

Techniques de purification des protéines

B - Précipitation des protéines du surnageant :

L'effet du pH

La variation du pH du tampon peut conduire à la précipitation des protéines :

pH inférieur à pHi : les protéines ont une charge nette globale positive

pH supérieur à pHi : les protéines ont une charge nette globale négative

pH=Phi la charge nette est = 0 : réductions d'interactions entre les protéines
donc réduction de solubilité : **Précipitation**

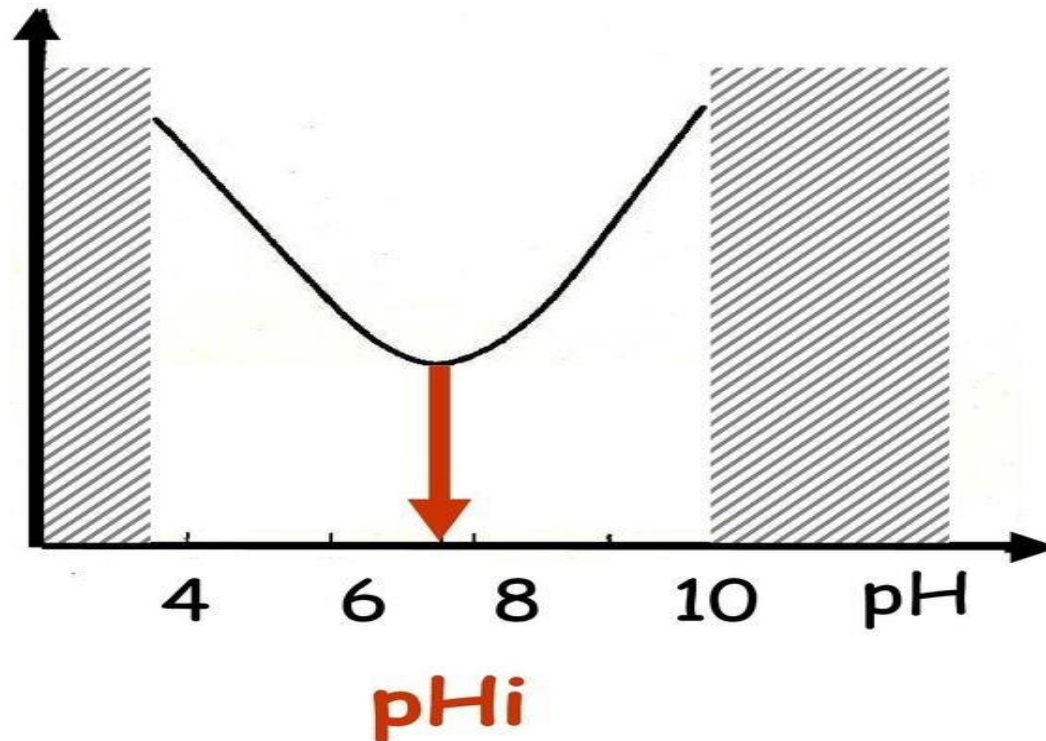
Précautions :

Certaines protéines dénaturent à leur pHi

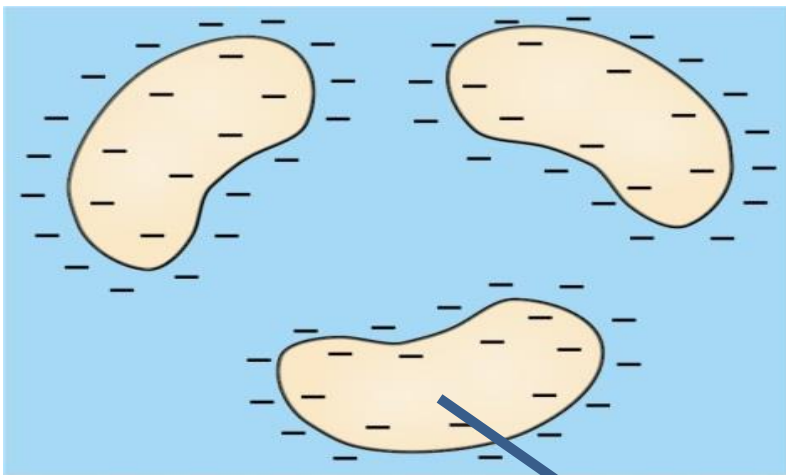
Solubilité

* **Influence du pH** : solubilité minimale au point isoélectrique
(en dehors des pH extrêmes).

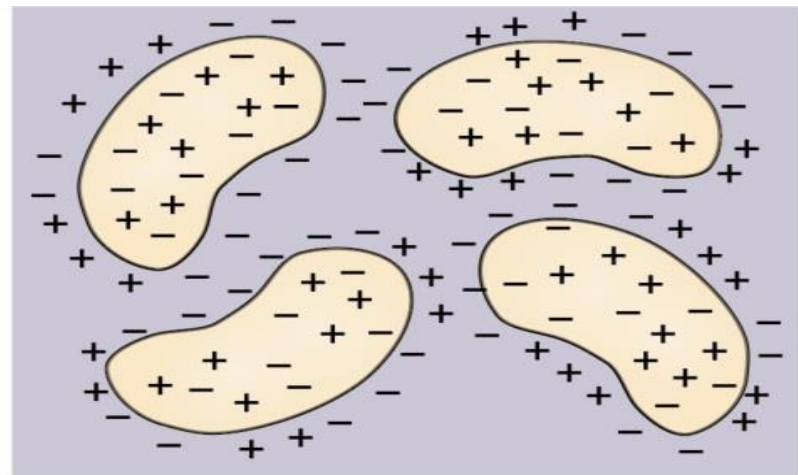
Log. solubilité



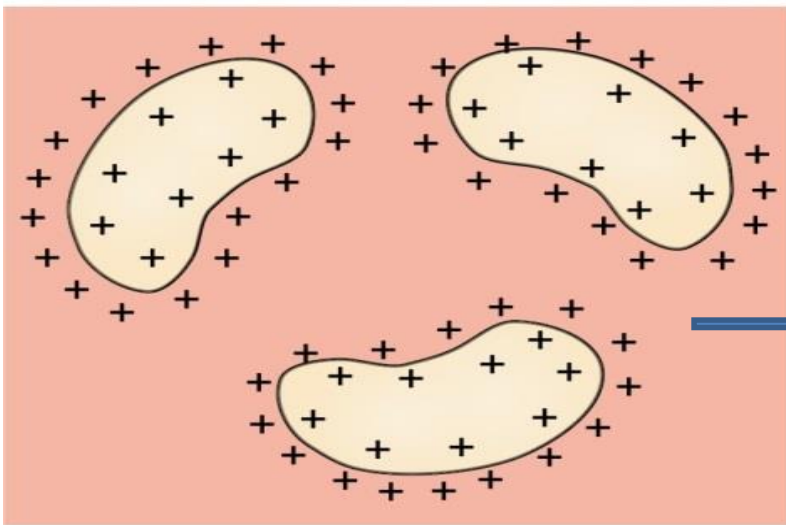
L'absence de charge électrique supprime les forces de répulsions inter-moléculaires



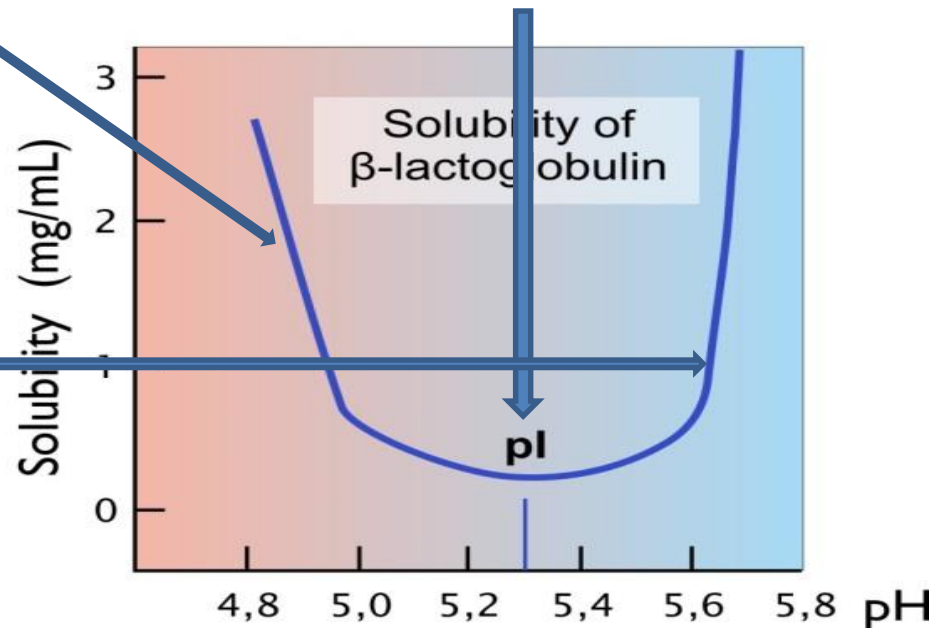
a) At pH values above the isoelectric point the protein is negatively charged



b) $\text{pH} = \text{pI}$, the number of negative and positive charges is equal



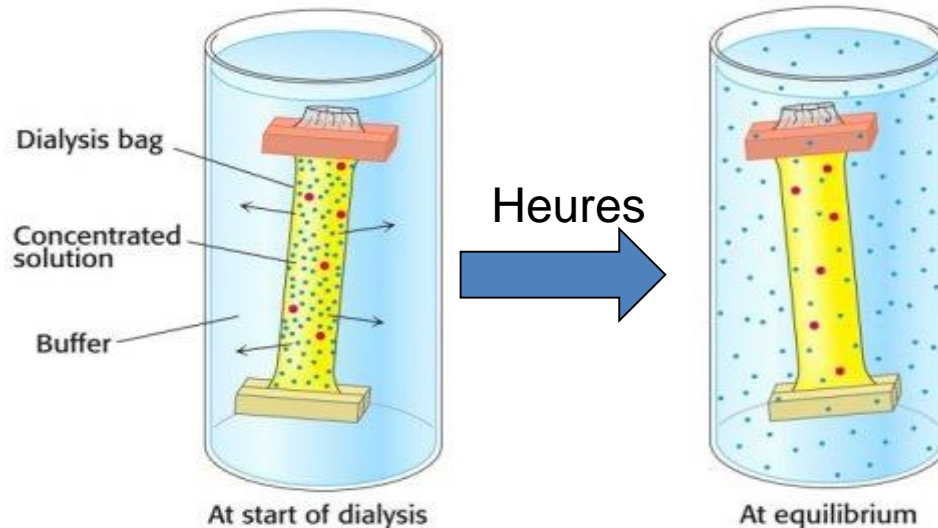
c) At pH values below the isoelectric point the protein is positively charged



d) pH-dependence of the solubility of the β -lactoglobulin protein

Dialyse :

Parce que le sel ajouté pour le « salting out » inhibe l'activité des protéines, il doit être enlevé avant de continuer la purification. Ceci est fait par dialyse;



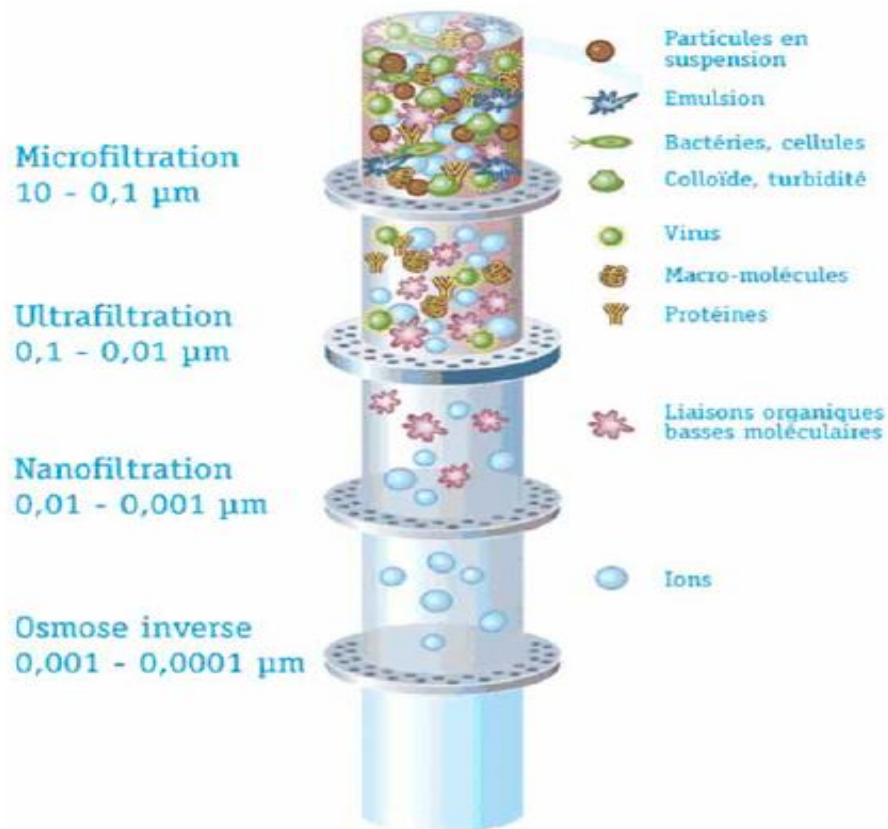
La solution de protéine est simplement introduite dans un sac fabriqué d'une membrane semi-perméable:

- *Perméable* aux petites molécules (e.g. sels);
- *Imperméable* aux protéines;

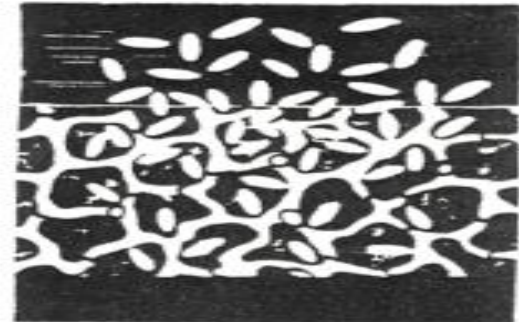
Techniques de purification des protéines

Filtration:

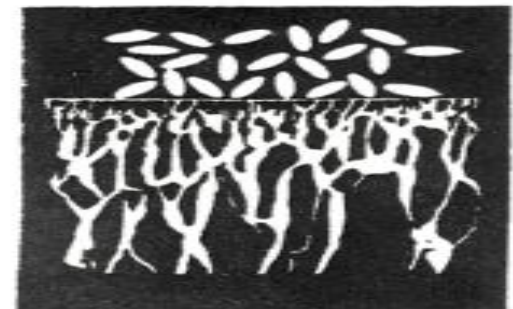
Dans certains cas, on peut éliminer les sels par la technique de filtration. La filtration est aussi fréquemment employée en biochimie pour un grand nombre d'applications : stérilisation, isolement de précipité, élimination de sels de solutions, concentration de macromolécules,



Membrane de type « en profondeur »



Membrane de type « écran »



RESUME DES ETAPES DE L'EXTRACTION DES PROTEINE

HOMOGENÉISATION



LYSE CELLULAIRE



CENTRIFUGATION



PRÉCIPITATION



CENTRIFUGATION



DIALYSE