



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Automne-2014

Module18 :

Techniques Chimiques pour la Biologie

Techniques de précipitation



Pr. H. LAKHTAR

CHAPITRE 2 : Techniques de précipitation

- I. GENERALITES:**
- II. PRINCIPE DE BASE**
- III. SOLUBILITE DES PROTEINES**
- IV. INFLUENCE DU PH**
- V. INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES**
- VI. INFLUENCE DES ELECTROLYTES**
- VII. TECHNIQUE DE SEPARATION PAR LES SELS**

I. GENERALITES

1. Purification des protéines

Les protéines sont des molécules sensibles à leur environnement et peuvent être facilement dénaturées.

→ Perte temporaire ou définitive de leurs propriétés biologiques.

Pourquoi purifier ?

- Etudier les propriétés d'une protéine
- Déterminer sa séquence en acides aminés
- Déterminer sa structure tridimensionnelle

Difficulté :

Les cellules contiennent généralement plus de 1000 types de protéines différentes. Chaque protéine a donc en moyenne une abondance inférieure à 1/1000

Solution :

Tirer profit des différences de propriétés physicochimiques et biochimiques des protéines, à savoir ; la solubilité, la taille, le point isoélectrique, la charge, l'hydrophobilité et l'affinité pour certains ligands.

2. Stabilisation des protéines lors de leur purification

L'intégrité structurale des protéines et leur stabilité dépendent de plusieurs facteurs:

❖ pH

Utiliser des solutions tampon qui maintiennent le pH dans une zone « physiologique» (7,5-8) pour éviter d'endommager les protéines par des variations brusques de pH.

❖ Température

Les protéines sont facilement dénaturées à hautes températures. Plusieurs protéines se dénaturent lentement lorsqu'elles sont conservées à 25°C. La purification des protéines se fait normalement à des températures proches de 0-5°C. Une fois purifiées, les protéines peuvent se conserver à long terme à des températures de -20 à -80°C (par congélation)

❖ Protéases

Les cellules contiennent des protéases (enzymes qui hydrolysent les liens peptidiques). Ces protéases sont libérées lors de la lyse cellulaire et peuvent dégrader les protéines lors de la purification. L'ajout d'inhibiteurs de protéases (ex. EDTA) permet d'empêcher cette dégradation.

II. PRINCIPE DE BASE

Un changement des conditions environnant les protéines leur fait souvent perdre leurs propriétés biologiques et même physiques. Donc, **la solubilité des protéines** dans une solution aqueuse dépend, entre autres, **des conditions ioniques et de pH**.

La solubilité des protéines en solution aqueuse est affectée par :

- **L'hydratation:** association des molécules d'eau à la protéine

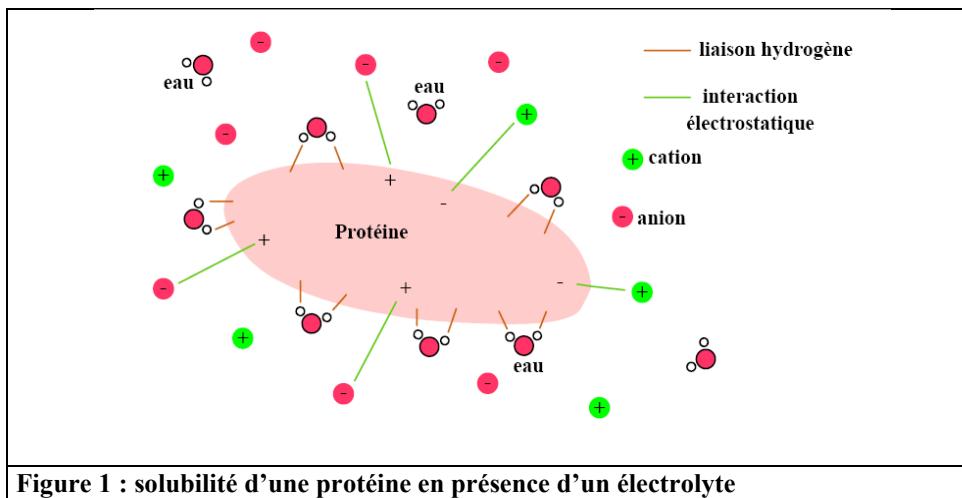
- **La charge électrostatique** : des protéines ayant même charge → répulsion
- **La conformation** : les acides aminés hydrophobes sont dirigés vers l'intérieur et hydrophiles sont dirigés vers l'extérieur → Maximiser le contact avec le milieu aqueux

Très souvent ils se conjuguent ensemble et la précipitation résulte de plusieurs phénomènes additifs. Chaque protéine a évidemment **des caractéristiques particulières** à ce niveau, mais le comportement général de toutes les protéines est cependant le même.

1. Hydratation (Figure 1):

Les protéines, sont d'autant plus solubles en solution aqueuse qu'elles sont hydratées en formant une coque. Cette coque d'hydratation les empêche de s'agrégner ensemble.

En ajoutant des produits déshydratants (polyéthylène glycol) on peut donc provoquer la précipitation des protéines.



2. Charge électrostatique (figure 1) :

Si les protéines sont électriquement chargées de la même façon, elles auront tendance à se repousser, donc à ne pas s'agrégner. Au contraire, si elles sont électriquement neutres, cette répulsion disparaît, et l'agrégation devient possible.

On peut utiliser ce phénomène soit en jouant sur le pH de la solution ou avec des électrolytes. Les électrolytes employés ici sont des sels très solubles en milieu aqueux : les cations peuvent neutraliser les charges négatives des chaînes latérales des acides aminés et les anions neutralisent les charges positives.

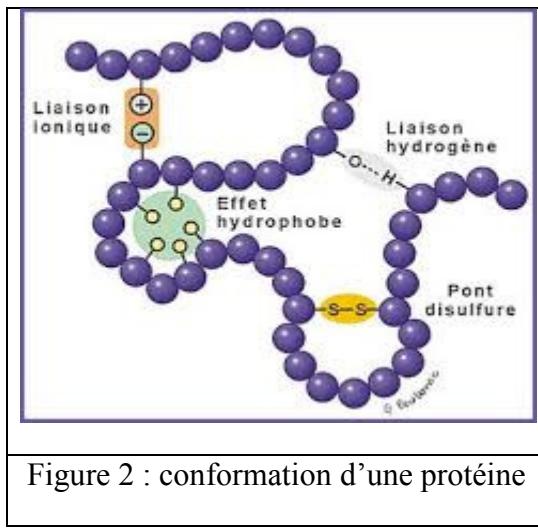
En amenant le pH au pI de certaines protéines, on peut donc aussi précipiter celles-ci.

Dans les deux cas, pH ou électrolytes, les protéines ne précipiteront pas toutes en même temps puisque leur pI ou le nombre et la nature de leurs charges ne sont pas identiques.

3. Conformation électrique (Figure 2) :

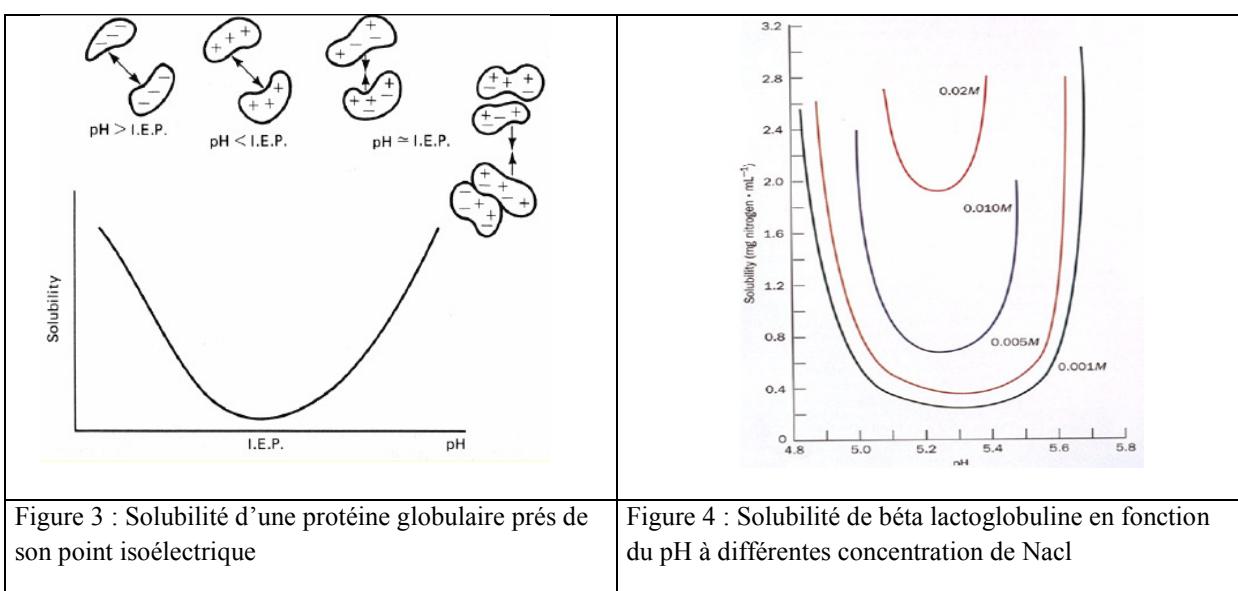
Les groupes latéraux des acides aminés permettent aux protéines d'être solubles en milieu aqueux: Les chaînes latérales chargées (glu, asp, lys, arg. etc.) ou polaire non chargé (ser, thr, etc.) sont souvent dirigés vers l'extérieur maximisant leur contact avec le milieu aqueux. En revanche, les acides possédant des chaînes latérales hydrophobes (phe, trp, Gly) sont généralement camouflés à l'intérieur, minimisant ces contacts.

La dénaturation brise cette organisation → groupements hydrophobes s'agrègent entre eux et avec les groupements hydrophobes des autres protéines dénaturées + leurs groupements hydrophobes sont plus exposés au milieu aqueux, diminuant encore plus leur solubilité.
Les solvants organiques (acétone, phénol), les acides forts peu concentrés ou des températures élevées sont souvent utilisés à cette fin



III. INFLUENCE DU pH (figure 3 et 4):

- Les protéines sont constituées de nombreux **groupes ionisables** possédant des pK_a différents. En effet, chaque protéine possède **un point ou pH isoélectrique** où il y a autant de charges positives que de négatives → **la charge nette de la protéine = 0**,
- au **pH isoélectrique, une protéine a tendance à devenir moins soluble** → la répulsion électrostatique est minimale → les forces électrostatiques locales prédominent → **agrégation** (formation d'un réseau de protéine) → **Précipitation**.
- ce phénomène est décrit sous le nom de **précipitation isoélectrique** et permet de purifier une protéine sélectivement en amenant le pH au point isoélectrique de cette protéine.
- ce phénomène est décrit sous le nom de **précipitation isoélectrique** et permet de purifier une protéine sélectivement en amenant le pH au point isoélectrique de cette protéine.



Dans un mélange des protéines, cette situation est compliquée par la présence d'interactions hétérogènes: des protéines qui possèdent des points isoélectriques différents s'agrègent afin des

former un précipité isoélectrique. La spécificité de la précipitation isoélectrique peut être améliorée par l'inclusion d'un sel qui décroît d'avantage la solubilité de la protéine d'intérêt (figure 4).

IV. INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES :

L'inclusion de **solvants miscibles** au milieu représente une perturbation considérable. Les solvants organiques les plus utilisés sont le **méthanol**, l'**éthanol**, le **butanol** et l'**acétone**. Ceux-ci possèdent à la fois des régions **hydrophobe** et **polaire**. Ces solvants entrent en compétition avec l'eau en interagissant avec **les groupements polaires de la protéine**. Les solvants, en réduisant la concentration de l'eau, diminuent l'hydratation de la protéine. Les **groupes hydrophobes** des solvants peuvent aussi **abolir les interactions hydrophobes** internes stabilisant la structure protéique et entraînent leur redistribution.

Cependant, deux inconvénients sont soulevés :

- **Le grand volume des solvants** (EtOH, 4 fois volume et Acétone, 2fois le volume) → point isoélectrique
- **La dénaturation des protéines** → température négative ($<0^{\circ}\text{C}$).

Deux facteurs peuvent influencer la précipitation des protéines par solvants

La taille de la protéine (figure 5) : plus grande est la protéine, plus basse est la concentration en solvant organique nécessaire afin de la précipiter

La longueur de la chaîne aliphatique de l'alcool (figure 6) : plus longue la chaîne aliphatique, plus basse est la concentration en solvant organique nécessaire à la précipitation.

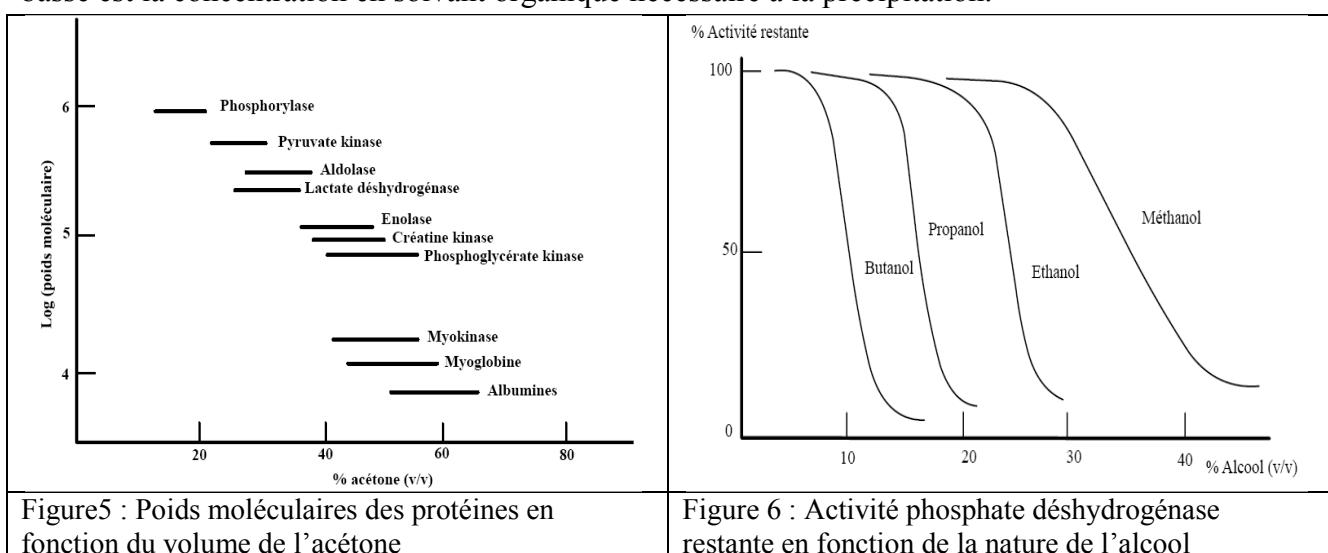


Figure 5 : Poids moléculaires des protéines en fonction du volume de l'acétone

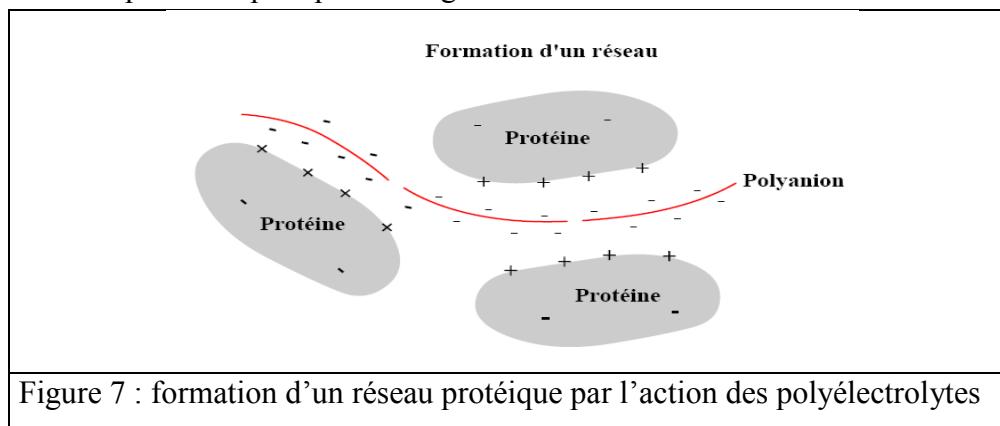
Figure 6 : Activité phosphate déshydrogénase restante en fonction de la nature de l'alcool

V. INFLUENCE DES ELECTROLYTES (figure 7):

Les polyélectrolytes sont des polymères chargés pouvant former des réseaux intermoléculaires avec les protéines. Ce mode de précipitation utilise des pourcentages très faibles en polyélectrolytes (0,05 à 0,10% m/v). Parmi les polyélectrolytes les plus employés, se situent les acides polyacryliques $[\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{COOH})]_n$, la carboxyméthylcellulose ainsi que des polyosides naturels tels que les alginates, pectates et carraghénanes. Toutefois, des polyélectrolytes synthétiques comme le DEAE-Dextran peuvent être aussi utilisés en industrie.

Le choix des polyélectrolytes est fonction de deux critères importants que sont **le point isoélectrique** de la protéine et **la zone de pH** dans laquelle elle conserve son activité biologique. Ainsi les polyélectrolytes **anioniques** comme les **acides polyacryliques** doivent être utilisés à des valeurs de **pH inférieurs** à celle du point isoélectrique de la protéine. Ces molécules sont principalement employées dans des conditions acides (**pH de 3 à 6**), ce qui peut limiter fortement leur application dans la purification d'enzymes.

Au contraire, les **polyélectrolytes cationiques**, comme le **polyéthylène imine** $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}]_n$ sont utilisés au-dessus du point isoélectrique dans un domaine de pH plus compatible avec la stabilité des enzymes. Plus le polymère a une densité de charge élevée (polyélectrolyte de haut poids moléculaire) et plus le nombre de protéines précipitées est grand.



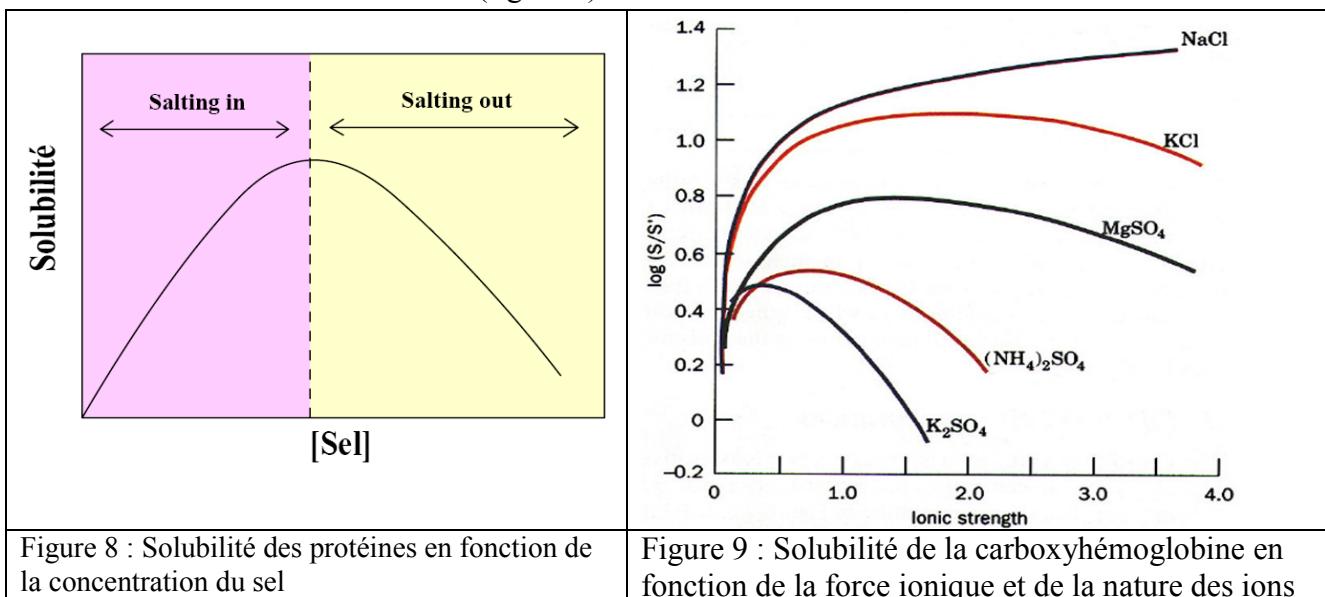
VI. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SEL

La **solubilité** d'une protéine en solution aqueuse dépend de la **concentration en sels** dissous. Cette concentration en sels est exprimée par la force ionique, I :

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2 \quad \text{avec } C \text{ la concentration et } Z \text{ la charge du groupe ionisé.}$$

Un grand nombre de sels neutres ou légèrement acides ont été utilisés pour solubiliser, précipiter ou fractionner les protéines. A l'origine, le NaCl a été très utilisé à la fois comme précipitant mais aussi comme solvant pour un grand nombre de protéines : la propriété de solubiliser (salting in) est reliée à une faible concentration de sel (0,1 à 0,3 M) et de précipiter (salting out) à des concentrations supérieures à 1 M (figure 8).

La solubilité d'une protéine varie selon la nature des ions en solution et augmente généralement avec la concentration de sels en solution (figure 9).



1. Salting-in (solubilisation saline):

A des concentrations faibles, les sels lient directement les protéines et augmentent leur charge nette, ce qui favorise leur solubilité parce que :

- les sels augmentent les interactions avec l'eau
- les sels augmentent la répulsion entre protéines (\downarrow agrégation)

Application : (précipitation par dialyse)

Cette propriété peut être utile pendant **la purification**, lorsqu'on veut **dessaler la protéine par dialyse** :

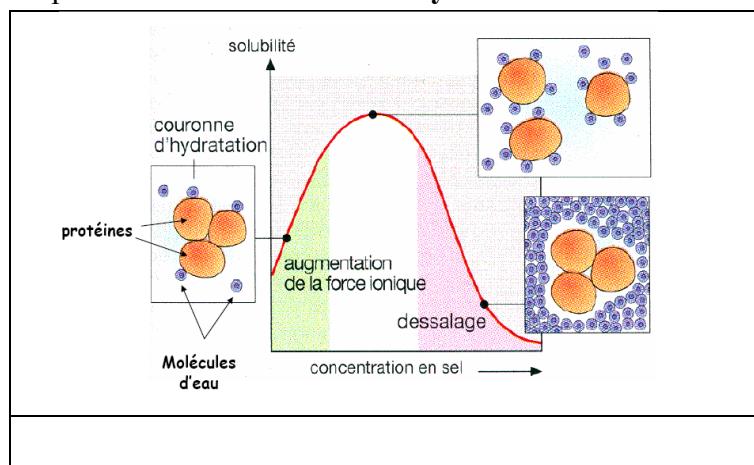
- La dialyse contre un tampon de faible force ionique peut provoquer la précipitation des protéines

➔ peut utiliser ce phénomène pour purifier notre protéine d'intérêt:

- soit la protéine d'intérêt précipite sélectivement dans ces conditions
- soit les autres protéines précipitent alors que notre protéine d'intérêt reste en solution

2. Salting-out (Dessalage):

Le dessalage ou « salting out » d'une protéine à de hautes concentrations de sel représente une des techniques les plus utilisées en purification des protéines. Ce phénomène est dû essentiellement à **la compétition entre les ions salins ajoutés et les protéines pour la solvatation** (i.e, accès aux molécules d'eau). L'hydratation des ions de sels à une forte tendance à séquestrer les molécules d'eau. La **séquestration** de l'eau résultera en une diminution de la solvatation des protéines ➔ les protéines auront moins de surface hydratée, ce qui favorisera leur agrégation. Les régions **hydrophobes** seront les premières à être moins bien **hydratées**.



3. Nature des sels

La nature du sel est très importante. En effet, **deux sortes** de sels sont utilisés pour la précipitation de protéines:

les sels « chaotropiques » : qui se lient et interagissent directement avec la protéine peuvent avoir un effet déstabilisant (groupes anioniques: tannate, picrate, tungstate, perchlorate, trichloracétate ou sulfosalicylate et es cations métalliques : Zn^{2+} , Cd^{2+} et Ba^{2+} qui s'utilisent plutôt pour éliminer les protéines afin d'analyser les composés non protéiques)

les sels optimaux : sont ceux qui encouragent l'hydratation des régions polaires et la déhydratation des régions hydrophobes chez une protéine sans avoir aucune interaction avec la protéine:

Certains ions facilitent la précipitation des protéines: La série Hofmeister.

Sels classés selon leur pouvoir de salting-out								
++++ Salting - out -----								
Anions	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	CH_3COO^-	Cl^-	NO_3^-	ClO_4^-	I^-	SCN^-
Cations	NH_4^+	Rb^+	K^+	Na^+	Cs^+	Li^+	Mg^{2+}	

4. La précipitation totale

Elle est utilisée quand on veut séparer les protéines des autres petites molécules contaminantes, acides aminés, sucres, etc.., ou, quelquefois, des autres macromolécules. Cette approche est donc incompatible à des procédures où on veut récupérer une protéine intacte et fonctionnelle.

Exemples de certaines techniques de précipitation (dénaturation) totale:

- ✓ Précipitation à l'éthanol ou à l'acétone,
- ✓ Précipitation au phénol: extraction et purification des acides nucléiques
- ✓ Précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA): arrêt des réactions enzymatiques
- ✓ Précipitation au sulfate de zinc ou au tungstate de sodium: se déroule en présence d'une base forte (NaOH) ou un acide fort (H₂SO₄) respectivement

5. La précipitation différentielle:

La précipitation différentielle, ou **précipitation fractionnée**, est beaucoup plus douce que la précipitation totale et **préserve généralement l'intégrité fonctionnelle des protéines**. C'est une approche très fréquemment utilisée comme étape dans l'isolement des protéines.

Elle est basée sur le fait que les **conditions ioniques ou de pH** qui rendent les protéines insolubles varient pour chaque espèce de protéine. On peut donc ajuster les concentrations de l'électrolyte ou le pH pour isoler la protéine désirée.

La principale méthode de précipitation différentielle est celle qui utilise **le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄**. D'autres méthodes sont beaucoup moins fréquentes (thermique, pI, etc.). Ce sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et se met efficacement en compétition avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammonium **sont relativement petits** et peuvent facilement **s'approcher des résidus chargés des protéines pour les neutraliser**. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives.

Les différentes manières d'employer le sulfate d'ammonium :

Précipitation à des concentrations croissantes: La procédure suivie d'habitude quand on travaille en aveugle est de préparer quelques précipitats avec des concentrations croissantes de sulfate (qu'on peut ajouter directement à la solution protéique).

Le tableau ci-dessous donne les quantités de (NH₄)₂SO₄ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C et à pH 7. Il indique aussi combien de sel ajouté à une solution qui en contient déjà.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100

grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25	
0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488		30	
0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453			35	
0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418				40	
0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383					45	
0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348						50	
0	30	61	93	127	161	197	235	273	313							55	
0	31	62	95	129	164	201	239	279								60	
0	31	63	97	132	168	205	244									65	
0	32	65	99	134	171	209										70	
0	32	66	101	137	174											75	
0	33	67	103	139												80	
0	34	68	105													85	
0	34	70														90	
0	35															95	
0																100	

Précipitation à un taux de saturation connu:

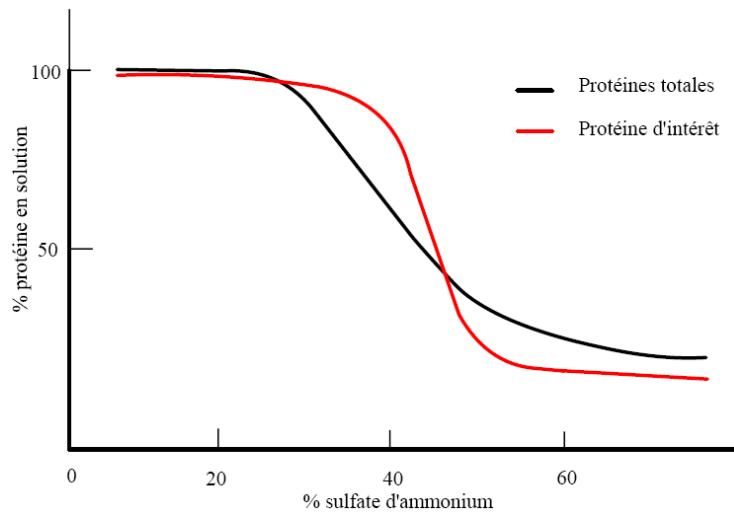
Dans **un premier temps** on amène la concentration de l'électrolyte à un niveau un peu inférieur à celui de la protéine d'intérêt. Les protéines **insolubles** dans ces conditions peuvent donc être **éliminées**, par exemple par **centrifugation**. La solution contenant les protéines non précipitées, incluant la protéine d'intérêt, est récupérée. On y ajoute une quantité d'électrolyte de façon à ce que cette protéine devienne insoluble. On peut alors récupérer la protéine d'intérêt qui a précipité. Cette protéine est alors débarrassée de beaucoup de protéines contaminantes. Celles qui sont moins solubles que les protéines ont été éliminées dans le premier précipité, celles qui le sont plus, sont restées dans le deuxième surnageant.

6. Protocole expérimental :

Avant de débuter la précipitation, l'homogénat ou l'extrait est clarifié par centrifugation. Cet extrait est ensuite tamponné à pH neutre sauf cas contraire. Généralement, la force ionique du milieu reste proche de celle trouvée pour les conditions physiologiques.

Le volume du milieu est sans importance mais la concentration doit se situer entre 5 et 30 mg de protéine/cm³. Cette concentration quoique élevée favorise la stabilité des protéines et minimise leur dénaturation. De plus, cette concentration est un compromis entre le rendement et la sélectivité de la précipitation. Un accroissement de la teneur en protéine élève le rendement mais diminue la sélectivité.

Le sulfate d'ammonium est ajouté par petites fractions à la solution à traiter, celle-ci est maintenue à 0°C sous agitation. La température basse évite la dénaturation des protéines. La turbidité de la solution évolue lentement (temps d'équilibration nécessaire à la formation du précipité). Lorsque la solution a reçu toute la quantité de sulfate d'ammonium, le floculat est séparé de la partie soluble par centrifugation. En fonction de la quantité de sulfate d'ammonium ajouté à la solution, la courbe de précipitation a le profil suivant :



Sur le graphe, la protéine d'intérêt précipite vers 45%. Les autres constituants précipitent en partie avant et/ou après la protéine d'intérêt, ils peuvent être facilement retirés du milieu ce qui, par conséquent, augmente le taux de purification². Cette augmentation est, dans la plupart des cas, modérée.

Les acides nucléiques peuvent interférer, ils doivent être retirés du milieu en ajoutant de la protamine, de la streptomycine ou encore du MgCl₂ qui provoquent la formation de complexes. Ces derniers sont facilement éliminés par centrifugation.

Précautions à prendre :

- Si le milieu contient des polysaccharides comme l'amidon ou le glycogène, un apport d'amylases ou de carbohydrolases évite leur co-précipitation avec les protéines.
- L'agitation du milieu lors des additions de sel doit être lente pour éviter la pénétration de l'air dans la solution (oxydation des protéines conduisant à leur dénaturation).
- La méthode de dosage des protéines doit être compatible avec les hautes teneurs en sel du milieu. Par exemple, le dosage selon Lowry qui est utilisé à plus de 80% des cas, ne peut être employé dans de tels milieux à cause d'interférences avec les sels. Le sulfate d'ammonium est le sel le plus utilisé, ses avantages majeurs sont :
 - A saturation, il est à une molarité suffisante pour causer la précipitation de la plupart des protéines.
 - Il ne produit pas une chaleur excessive lors de sa dissolution, ce qui permet à la chaleur générée d'être facilement dissipée.
 - Même à saturation (~ 4,0 M à 20°C), il possède une densité moyenne (1,235 g/cm³) qui n'interfère pas avec la sédimentation des protéines précipitées.
 - En solution concentrée, il prévient ou limite la croissance bactérienne.
 - Il protège la plupart des protéines de la dénaturation. Cette propriété est mise à profit dans la conservation des protéines purifiées en solution saturée de sulfate d'ammonium.