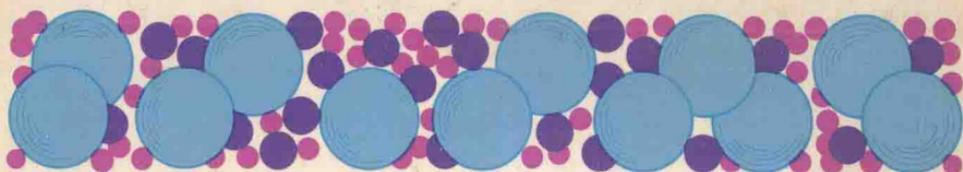


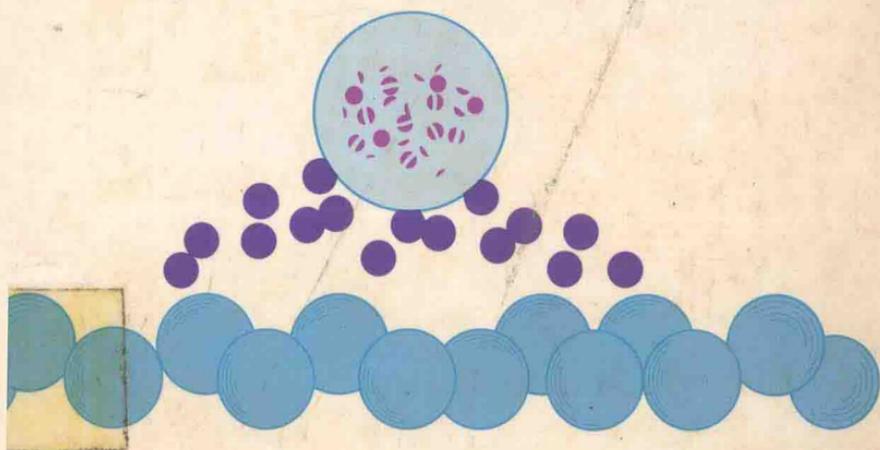
Techniques de laboratoire

8



LES MÉTHODES DE
PURIFICATION ET D'ANALYSE
DES PROTÉINES

JEAN-MARIE FRÈRE CHARLES GERDAY



MASSON

2
LES MÉTHODES DE
PURIFICATION ET D'ANALYSE
DES PROTÉINES

① **Jean-Marie Frère**

Chargé de cours associé
à l'Université de Liège

Charles Gerday

Maître de conférences
à l'Université de Liège

MASSON

Paris New York Barcelone Milan Mexico Rio de Janeiro

1981

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés,
réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© *Masson, Paris, 1981*

ISBN : 2-225-68850-8

ISSN : 0240-2351

MASSON S.A.	120, Bd Saint-Germain, 75280 Paris Cedex 06
MASSON PUBLISHING U.S.A. Inc.	14 East 60th Street, New York, N.Y. 10022
TORAY-MASSON S.A.	Balmes 151, Barcelona 8
MASSON ITALIA EDITORI S.p.A.	Via Giovanni Pascoli 55, 20133 Milano
MASSON EDITORES	Dakota 383, Colonia Napoles, Mexico 18 DF
EDITORIA MASSON DO BRASIL LTDA	Rua da Quitanda, 20/S 301, Rio de Janeiro, R.J.

Table des matières

Avant-propos	7
Abréviations et symboles	8
Première partie. — Les méthodes chromatographiques	9
1. Théories générales de la chromatographie	11
Introduction	11
Coefficient de partage	11
Isothermes	12
Déséquilibre local	13
Théorie des plateaux	13
Théorie cinétique	14
2. Les tamis moléculaires	16
Principe	16
Types de tamis	16
Choix du support. Dimensions des grains	19
Coefficient de distribution	20
Pouvoir de résolution	21
Facteurs influençant la séparation	21
Applications	22
Détails pratiques	25
3. L'échange d'ions	28
Principe	28
Aspects théoriques	28
Types d'échangeurs et propriétés	30
Courbes de titration. Capacité	36
Applications et aspects pratiques	37
4. La chromatographie d'affinité	44
Principe	44
Supports solides	45
Ligands	46
Principaux types de supports activés	47
Aspects pratiques	49
5. Autres méthodes chromatographiques	56
La chromatographie hydrophobe	56
Adsorption sur gel de phosphate calcique	58
Adsorption sur gel d'hydroxylapatite	58
Elution par un substrat ou un effecteur	59
Chromatographie liquide de haute performance	59

Deuxième partie. — Les méthodes non chromatographiques	61
6. L'électrophorèse	63
Considérations théoriques	63
Electrophorèse en milieu homogène	66
Electrophorèse en milieu hétérogène	68
7. L'ultracentrifugation	85
Généralités	85
Caractéristiques principales des instruments	85
Sédimentation de vitesse	89
Sédimentation d'équilibre et détermination des poids moléculaires	100
Résumé des principales applications	102
Ultracentrifugation préparative	102
8. Dialyse. Ultrafiltration. Lyophilisation	107
Dialyse	107
Ultrafiltration	108
Lyophilisation	112
9. Les méthodes de précipitation	113
Précipitation au sulfate ammonique	113
Ions de métaux lourds	114
Conditions extrêmes	114
Précipitation par les solvants organiques	114
10. Conclusion. Notion de stratégie	115
Isolement de la protéine	115
Vérification de la pureté	118
Ouvrages à consulter	119
Index	125



LES MÉTHODES DE
PURIFICATION ET D'ANALYSE
DES PROTÉINES

CHEZ LE MÊME ÉDITEUR

Dans la même collection :

- 1 - LA PRATIQUE DE L'IMMUNOÉLECTROPHORÈSE, par M. KAMINSKI. 1979, 88 pages, 34 figures.
- 2 - LA PRATIQUE DE L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE, par G. BATELIER. 1979, 88 pages, 40 figures.
- 3 - LA PRATIQUE DU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE EN BIOLOGIE, par D. GUILLAUMIN. 1980, 128 pages, 57 figures.
- 4 - LA PRATIQUE DU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE CONVENTIONNEL, par R. et J. HAGÈGE. 1980, 128 pages, 28 figures, 21 planches.
- 5 - INTRODUCTION A L'EMPLOI DES RADIOÉLÉMENTS EN BIOLOGIE ET EN BIOCHIMIE, par S. APELGOT. 1981, 80 pages, 32 figures.
- 6 - LA PRATIQUE DE L'AGGLUTINATION DES ÉRYTHROCYTES ET DU TEST DE COOMBS, par Ph. Rouger et Ch. Salmon. 1981, 89 pages, 22 figures.
- 7 - LE RAT DE LABORATOIRE. I. - *Réactif biologique*, par G. JADOT. 1981, 96 pages, 11 figures.
- 9 - LA PRATIQUE DE L'ÉLECTROPHORÈSE APPLIQUÉE A LA DÉTECTION DES POLYMORPHISMES HUMAINS, par J. SÉGER et G. LUCOTTE (*Sous presse*).
- 10 - LA PRATIQUE DES GROUPES ET GROUPAGES ÉRYTHROCYTAIRES, par Ph. ROUGER et Ch. SALMON (*Sous presse*).
- 11 - LA PRATIQUE DE L'ANALYSE CHROMOSOMIQUE, par B. DUTRILLAUX et J. COUTURIER (*Sous presse*).

Autres ouvrages :

- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE ET CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A HAUTE RÉOLUTION. Journées de Paris, 8-9 Novembre 1978. *Monographies des périodiques Masson, série Sciences n° 1*. 1979, 100 pages, 90 figures, 7 tableaux.
- CHIMIE ANALYTIQUE DES SOLUTIONS ET MICROINFORMATIQUE, par R. ROSSET, D. BAUER et J. DESBARRES. 1979, 168 pages, 58 figures.
- MANUEL DE MICROSCOPIE, par M. LOCQUIN et M. LANGERON. 1978, 364 pages, 152 figures.
- ÉCOLOGIE MICROBIENNE DU TUBE DIGESTIF. Ces microbes qui nous protègent, par R. DUCLUZEAU et P. RAIBAUD. *Actualités Scientifiques et Agronomiques de l'INRA*. 1979, 104 pages, 21 figures en noir et 20 en couleurs.
- CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE DES VIRUS. Troisième rapport du Comité international de Taxonomie, par R.E.F. MATTHEWS. Traduit de l'anglais par J. Maurin. 1980, 224 pages.

Périodique :

Biochimie. 8 fascicules/an.

2 LES MÉTHODES DE
PURIFICATION ET D'ANALYSE
DES PROTÉINES

① **Jean-Marie Frère**

Chargé de cours associé
à l'Université de Liège

Charles Gerday

Maître de conférences
à l'Université de Liège

MASSON

Paris New York Barcelone Milan Mexico Rio de Janeiro

1981

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés,
réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© *Masson, Paris, 1981*

ISBN : 2-225-68850-8

ISSN : 0240-2351

MASSON S.A.
MASSON PUBLISHING U.S.A. Inc.
TORAY-MASSON S.A.
MASSON ITALIA EDITORI S.p.A.
MASSON EDITORES
EDITORIA MASSON DO BRASIL LTDA

120, Bd Saint-Germain, 75280 Paris Cedex 06
14 East 60th Street, New York, N.Y. 10022
Balma 151, Barcelona 8
Via Giovanni Pascoli 55, 20133 Milano
Dakota 383, Colonia Napoles, Mexico 18 DF
Rua da Quitanda, 20/S 301, Rio de Janeiro, R.J.

Table des matières

Avant-propos	7
Abréviations et symboles	8
Première partie. — Les méthodes chromatographiques	9
1. Théories générales de la chromatographie	11
Introduction	11
Coefficient de partage	11
Isothermes	12
Déséquilibre local	13
Théorie des plateaux	13
Théorie cinétique	14
2. Les tamis moléculaires	16
Principe	16
Types de tamis	16
Choix du support. Dimensions des grains	19
Coefficient de distribution	20
Pouvoir de résolution	21
Facteurs influençant la séparation	21
Applications	22
Détails pratiques	25
3. L'échange d'ions	28
Principe	28
Aspects théoriques	28
Types d'échangeurs et propriétés	30
Courbes de titration. Capacité	36
Applications et aspects pratiques	37
4. La chromatographie d'affinité	44
Principe	44
Supports solides	45
Ligands	46
Principaux types de supports activés	47
Aspects pratiques	49
5. Autres méthodes chromatographiques	56
La chromatographie hydrophobe	56
Adsorption sur gel de phosphate calcique	58
Adsorption sur gel d'hydroxylapatite	58
Elution par un substrat ou un effecteur	59
Chromatographie liquide de haute performance	59

Deuxième partie. — Les méthodes non chromatographiques	61
6. L'électrophorèse	63
Considérations théoriques	63
Electrophorèse en milieu homogène	66
Electrophorèse en milieu hétérogène	68
7. L'ultracentrifugation	85
Généralités	85
Caractéristiques principales des instruments	85
Sédimentation de vitesse	89
Sédimentation d'équilibre et détermination des poids moléculaires	100
Résumé des principales applications	102
Ultracentrifugation préparative	102
8. Dialyse. Ultrafiltration. Lyophilisation	107
Dialyse	107
Ultrafiltration	108
Lyophilisation	112
9. Les méthodes de précipitation	113
Précipitation au sulfate ammonique	113
Ions de métaux lourds	114
Conditions extrêmes	114
Précipitation par les solvants organiques	114
10. Conclusion. Notion de stratégie	115
Isolement de la protéine	115
Vérification de la pureté	118
Ouvrages à consulter	119
Index	125



Avant propos

En préparant cet ouvrage, notre ambition n'a certes pas été de présenter et de discuter de façon exhaustive chacune des méthodes de purification ou d'analyse des protéines. Prétendre que l'on peut, en trois pages, résumer les traités qui ont été consacrés à l'immunoélectrophorèse, par exemple, serait faire preuve d'un naïveté ou d'une prétention inexcusable. Notre but a été de passer rapidement en revue les méthodes les plus utilisées en insistant sur l'aspect pratique de leur utilisation. Nous espérons que le lecteur trouvera dans ce livre, non seulement une série de recettes, mais aussi des idées claires sur les avantages et les limitations de chaque technique.

Nous voudrions remercier Messieurs Guy Maghuin-Rogister et André Piron dont les conseils nous ont été précieux dans la rédaction du chapitre sur l'électrophorèse et Jacques Aghion, Victor Stalon et Walter Verly qui ont gentiment accepté de critiquer notre première version.



Abréviations et symboles

A ₂₈₀	=	absorbance à 280 nm
C	=	concentration
D	=	constante de diffusion
h	=	hauteur équivalente à un plateau théorique
HAc	=	acide acétique
I	=	force ionique
M ou PM	=	poids moléculaire
N	=	nombre d'Avogadro
n	=	nombre de molécules
n	=	indice de réfraction
r	=	rayon d'une particule
s	=	coefficient de sédimentation
TCA	=	acide trichloracétique
u	=	mobilité électrophorétique
v	=	vitesse
v̄	=	volume spécifique partiel
V	=	volume
η	=	viscosité
λ	=	longueur d'onde



première partie

Les méthodes
chromatographiques



Théories générales de la chromatographie

1. Introduction

Le terme chromatographie recouvre des méthodes de séparation basées sur la répartition des solutés entre une phase stationnaire (ou fixe) et une phase mobile. La première peut être solide ou liquide, la seconde liquide ou gazeuse, ce qui conduit aux combinaisons suivantes :

- solide-liquide
- liquide-liquide
- solide-gaz
- liquide-gaz.

Seules les deux premières combinaisons sont utilisées pour les purifications de protéines (solide-liquide : échange d'ions, affinité, adsorption, gels de phosphate calcique et d'hydroxylapatite; liquide-liquide : tamis moléculaires).

2. Coefficient de partage

Lors d'une chromatographie, la phase mobile se déplace à une vitesse constante v . Elle entraîne ainsi le soluté S qui se répartit entre les deux phases dans des proportions déterminées. Si R représente la fraction de soluté présente dans la phase mobile, $1 - R$ est égal à la fraction présente dans la phase fixe. La vitesse de progression du soluté, v_s , est donnée par la relation $v_s = Rv$. R représente aussi la fraction de temps que le soluté passe dans la phase mobile.

Le coefficient de partage α est le rapport des *concentrations* de S dans la phase fixe (C_f) et dans la phase mobile (C_m), respectivement :

$$\alpha = \frac{C_f}{C_m} = \frac{1 - R}{R} \frac{V_m}{V_f} \quad \text{et} \quad R = \frac{V_m}{V_m + \alpha V_f}$$

où V_m et V_f sont les volumes des phases mobile et fixe, respectivement.

3. Isothermes

A une température donnée, la relation entre les concentrations de S dans la phase fixe et la phase mobile est habituellement linéaire pour de faibles valeurs de C_m (isotherme linéaire : R et α sont constants lorsque C_m varie). Lorsque l'isotherme est linéaire, le pic d'éluion du soluté est symétrique car tous les points de la zone d'éluion du soluté migrent à la même vitesse bien que la concentration à l'intérieur de la zone varie. L'équation de l'isotherme est donnée par la relation :

$$\frac{dx}{dV_m} = \frac{C_m}{f(S)}$$

dans laquelle dx/dV_m représente la distance parcourue pour une variation de volume dV_m , C_m la concentration de soluté et $f(S)$ la quantité de soluté présente dans la phase fixe.

Pour une isotherme linéaire (fig. 1), $f(S) = KC_m$ et $dx/dV_m = 1/K =$ constante.

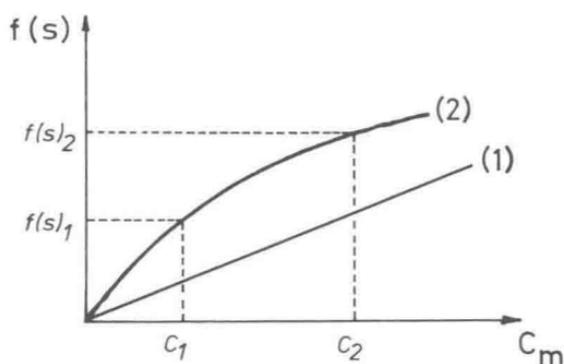


Fig. 1. — Isothermes linéaire (1) et non linéaire de type Langmuir (2).

Dans le cas d'une isotherme non linéaire (exemple, fig. 1), les parties de la bande de soluté correspondant à de faibles concentrations se déplaceront moins vite que celles de concentrations élevées. En effet :

$$\frac{C_1}{f(S)_1} < \frac{C_2}{f(S)_2} \quad \text{d'où} \quad \left(\frac{dx}{dV} \right)_1 < \left(\frac{dx}{dV} \right)_2$$

On obtiendra dans ce cas un front de zone abrupt et une « queue » s'étalant progressivement. Les isothermes non linéaires conduisent toujours à des pics non symétriques.

Des isothermes de type Langmuir indiquent souvent une saturation de la phase fixe.