

Techniques chimiques pour la biologie

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

Chapitre IV

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

- Le but de la précipitation est la concentration des molécules biologiques en solution, et aussi d'opérer un fractionnement selon leurs propriétés hydrosolubles.
- la précipitation doit rester un processus réversible, c'est-à-dire que les molécules, rendu insolubles, ont leurs propriétés biologiques restaurées dès qu'elles sont diluées ou dialysées.

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

Parce qu'elles sont composées de résidus d'acides aminés aux caractéristiques différentes, les protéines ont une solubilité qui leur est spécifique et dépendante de:

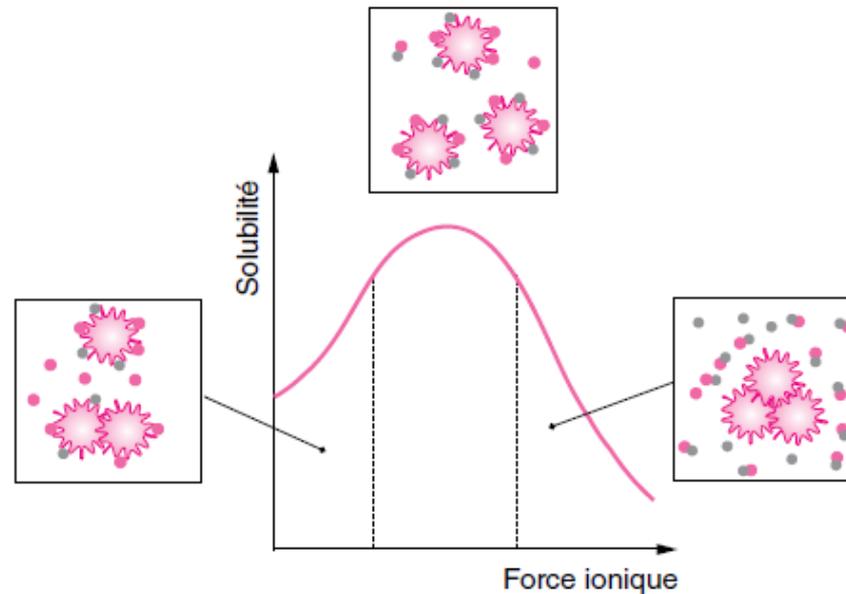
- la concentration en sels
- des solvants organiques
- pH.

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS

La **force ionique** qui correspond à la concentration en sels dissous dans une solution, a deux effets sur la solubilité des protéines.

- À faible force ionique, la solubilité d'une protéine augmente avec la concentration en sel. C'est le phénomène du « **salting in** » (solubilisation saline) lors duquel les ions ajoutés vont interagir avec les charges ioniques des chaînes latérales des résidus de la protéine et former un écran qui empêche les interactions directes entre les molécules de protéines.

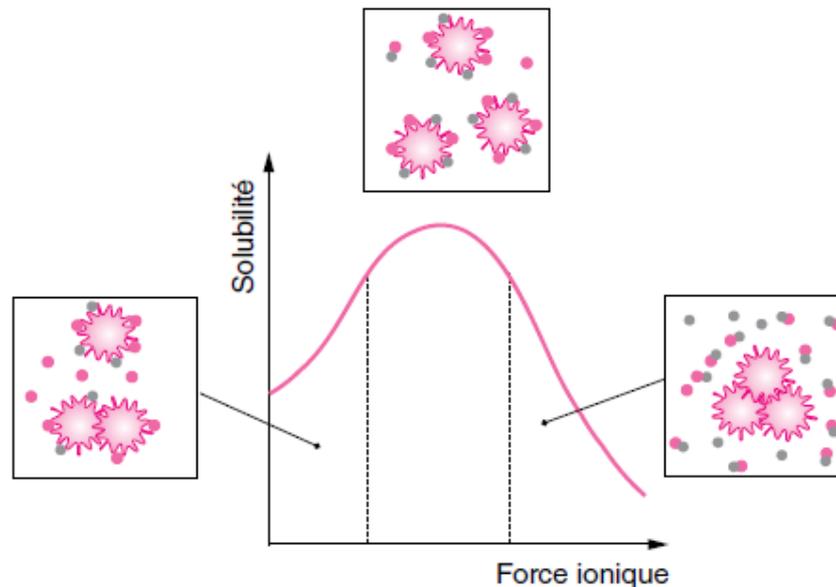


Influence de force ionique sur la solubilité
(les disques rouges représentent les molécules d'eau, les disques gris, les ions).

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS

- À force ionique élevée, la solubilité d'une protéine diminue avec la concentration en sel. C'est le phénomène du « **salting out** » (précipitation saline). Dans ce cas, les ions ajoutés « monopolisent » le solvant qui devient indisponible pour la protéine dissoute. Il y a déshydratation du milieu, les molécules de protéines vont interagir entre elles et précipiter.



Influence de force ionique sur la solubilité
(les disques rouges représentent les molécules d'eau, les disques gris, les ions).

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

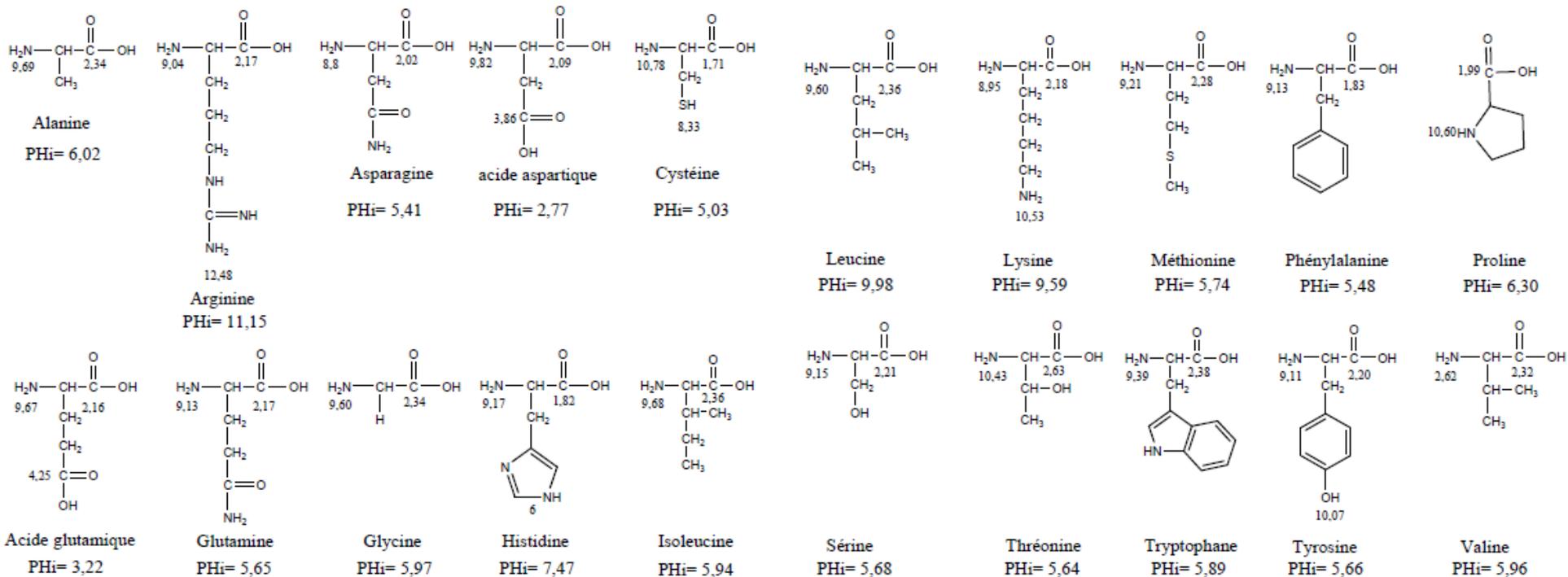
INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES

Les solvants organiques miscibles à l'eau tels que l'éthanol agissent en abaissant le **pouvoir de solvation** du solvant pour les protéines dissoutes. Ce pouvoir de solvation correspond à l'interaction des molécules de solvant (souvent de l'eau) avec la protéine. Les protéines vont alors interagir entre elles et précipiter.

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

INFLUENCE DU PH

Les protéines possèdent de nombreux groupements ionisables, principalement représentés par les chaînes latérales des résidus glutamate, aspartate, lysine, arginine et histidine

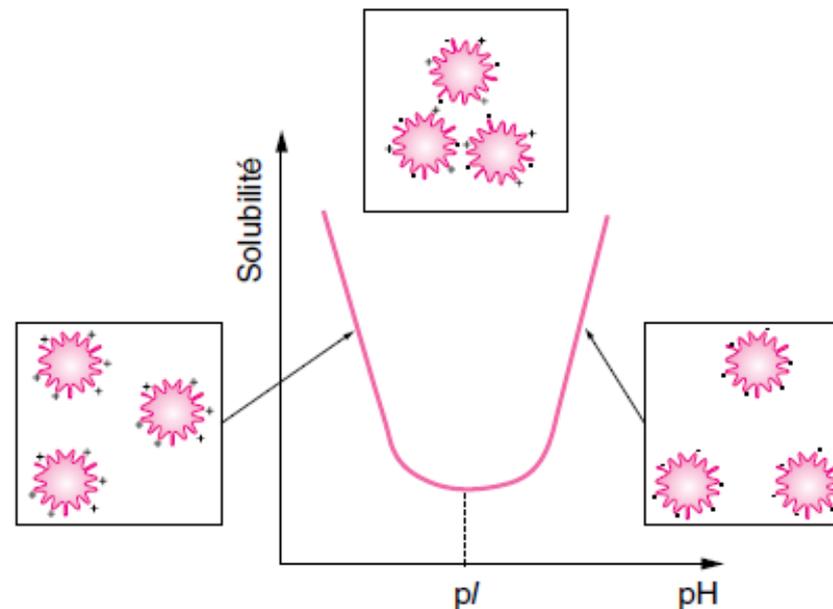


TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

INFLUENCE DU PH

Chaque groupe ionisable possède un pKa différent ; il existe une valeur de pH pour laquelle la charge électrique globale de la protéine est nulle. Ce pH est appelé **pH isoélectrique (pHi)**.

À cette valeur de pH, les interactions entre les charges de surface sont favorisées, les protéines vont former des agrégats. Pour des valeurs de pH éloignées du pHi, la protéine a une charge globale positive ou négative, les molécules de protéine vont donc se repousser mutuellement, ce qui favorise leur maintien en solution.

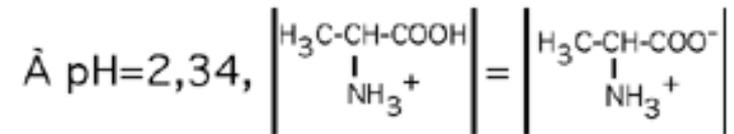
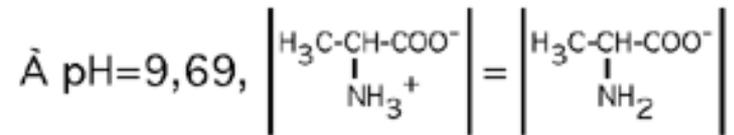
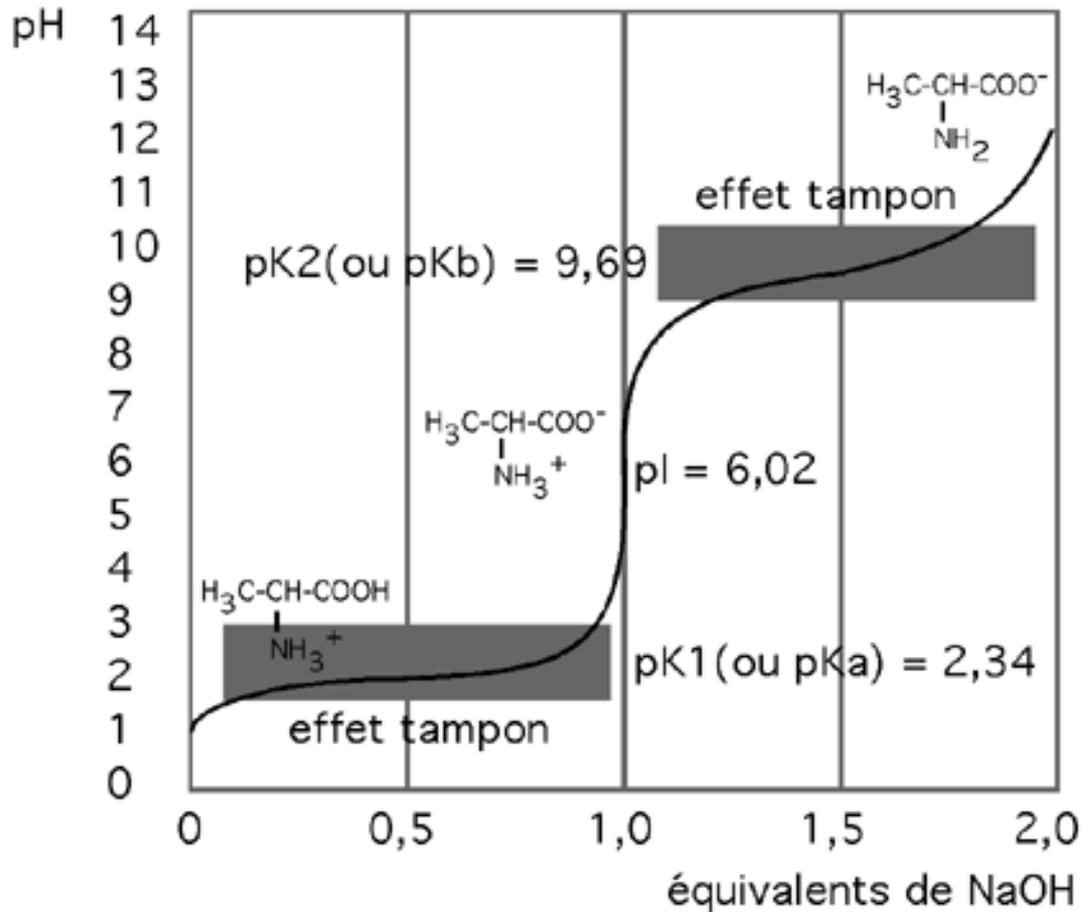


Influence du pH sur la solubilité.

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

INFLUENCE DU PH

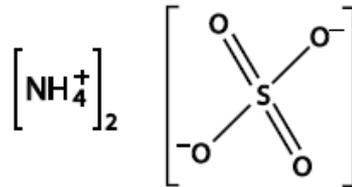
Titration de l'alanine



TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE AU SULFATE D'AMMONIUM DES PROTÉINES

Généralement, cette technique est utilisée dans les premières étapes de la purification des protéines. En effet, elle est peu coûteuse et possède une capacité de fractionnement différentiel élevée. La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium est un cas particulier du phénomène de « salting out ».



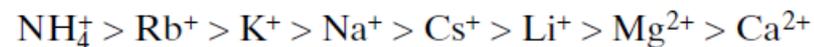
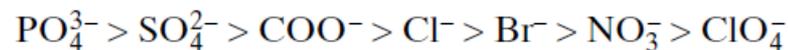
Formule du sulfate d'ammonium.

L'utilisation de ce sel est particulièrement intéressante pour plusieurs raisons :

- Le sulfate d'ammonium présente une très forte solubilité dans l'eau (744 g.L⁻¹ à 20 °C).
- Le sulfate d'ammonium est constitué de deux ions (SO₄²⁻ et NH₄⁺) classés, selon les **séries de Hofmeister** ou **séries lyotropes**, comme possédant une forte capacité de précipitation (*salting out*).

Capacité à la précipitation

(*salting out*)



TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION

En règle générale, le sulfate d'ammonium n'a pas d'effets négatifs sur l'activité des enzymes.

La procédure de purification consiste à soumettre l'extrait protéique à des concentrations croissantes en sulfate d'ammonium, à récupérer le précipité par centrifugation et à repérer la protéine d'intérêt par une technique appropriée.

La mise en évidence de la protéine d'intérêt nécessite d'éliminer préalablement le sulfate d'ammonium. La dialyse permet cette opération.