

## \* Introduction :

Les protéines sont une grande famille de macronutriments essentiels à l'organisme. Elles sont composées d'acides aminés, dont certains peuvent être fabriqués par le corps tandis que 8 autres doivent être apportés par l'alimentation : Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Thréonine, Tryptophane, Valine et Histidine. Ils sont dits « indispensables » car l'organisme est incapable de les fabriquer. Les protéines ont un rôle structural essentiel (muscles, os, ...) et sont également importantes pour la digestion, les réponses immunitaires, le transport d'oxygène...

Pourquoi faire une Analyse des Protéines ?

- Vérifier la pureté d'un produit à base de protéines ou d'une matière première et identifier d'éventuels contaminants.
- Etablir un aminogramme qui permet de juger la qualité nutritionnelle d'une protéine.
- Déterminer l'authenticité des aliments et des ingrédients protéiques.
- Analyser le contenu nutritionnel des aliments pour l'étiquetage comme le pourcentage des protéines.

Les protéines peuvent être purifiées en utilisant leurs propriétés de solubilité, poids moléculaire, charge et liaisons d'affinité. Les principales techniques utilisées sont : la chromatographie, l'électrophorèse et les techniques spectrales.

## 1. Séparation et concentration des protéines par filtration, centrifugation et dialyse :

### 1.1. La filtration :

#### a. Définition:

Séparation des constituants d'un mélange liquide/solide, par passage (grâce à la différence de pression) à travers d'un filtre caractérisé par des pores calibrés (même diamètre et distribution égale dans la surface du filtre). Le filtre permet de retenir les particules du mélange qui sont plus grosses que les trous du filtre. Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme rétentat.

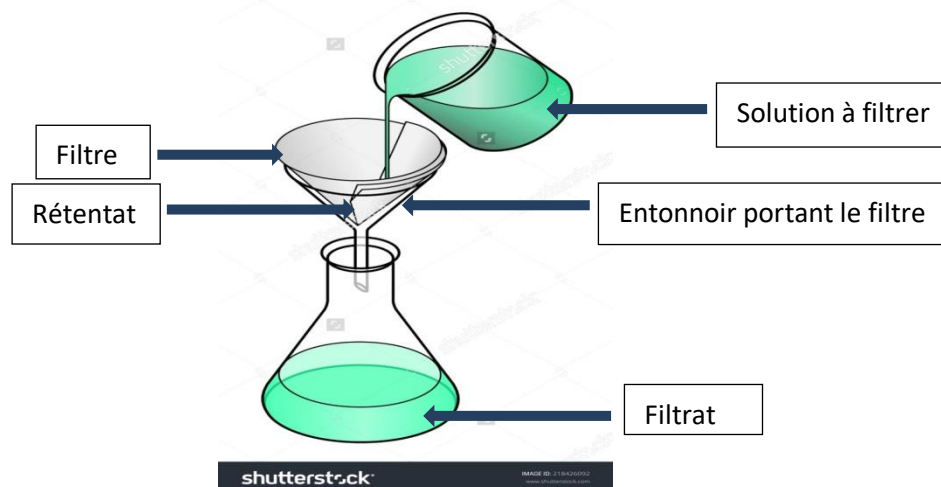


Fig. 1 : Modèle d'un système de filtration.

**Microfiltration** : permet la filtration des macromolécules comme les protéines. Le diamètre des pores des filtres millipores varie entre 0.1 et 10 $\mu$ m.

**Ultrafiltration**: filtration des macromolécules mais beaucoup plus des virus (diamètre des pores entre 0.01 et 0.1 $\mu$ m). Exemples d'application : l'industrie laitière.

**Nanofiltration** : utilisée pour éliminer les ions multivalents et les petites molécules toxiques durant le traitement de l'eau potable. Le diamètre des pores varie entre 0,001 et 0,01 $\mu$ m.

**b. Les filtres:** Il existe deux types de filtres :

\* Les filtres de profondeur (d'épaisseur) : constitués de substances fibreuses (papier, cellulose, coton, verre ...) où les particules sont retenues dans un réseau de fibres, ou de substances agglomérées (verre fritté, sable, charbon ...) où les particules sont retenues dans des canalicules. L'efficacité des filtres de profondeur augmente avec leur épaisseur et diminue si la pression appliquée durant la filtration est élevée.

\* Les filtres écrans (membrane): constitués d'une fine membrane, généralement à base de cellulose. La membrane est percée de pores calibrés (de même diamètre) et retient à sa surface les particules à filtrer. Les plus utilisés sont les filtres millipores qui comportent un très grand nombre des pores de faible diamètre. Vu la forte densité des pores (65 à 85% du volume de filtre) et la profondeur faible des filtres, la filtration par les f. millipores est rapide, mais ils présentent l'inconvénient du colmatage. **Les filtres millipores peuvent être donc utilisés en microfiltration pour filtrer des protéines.**

**c. Méthodes de filtration :**

\* **F. gravimétrique** : la différence de pression créée par le poids du liquide permet la filtration. Cette méthode n'est pas rapide.

\***F. sous vide** : nécessite l'utilisation d'une pompe sous vide liée au récipient de récupération du filtrat. Technique rapide et efficace mais peut causer le colmatage des filtres millipores.

\***F. sous pression** : Il s'agit d'exercer une pression sur le liquide à filtrer. Ce type de filtration peut être exercé au laboratoire par l'utilisation des filtres seringue.

**1.2. La centrifugation :**

**a. Notion de la sédimentation :**

La sédimentation est une technique qui permet de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur lorsque la dispersion est formée d'une substance plus dense que le liquide (décantation). Si la dispersion est moins dense, on procède à une centrifugation. La centrifugation permet de remplacer l'accélération de la pesanteur par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (2000 à 10000 rpm).

**b. Relargage (salting out) :**

Le relargage est une technique qui consiste à séparer une substance (protéine) en solution de son solvant en introduisant une autre substance (sels : comme le sulfate d'ammonium) plus soluble qui

prend sa place. La concentration en sels nécessaire pour le relargage varie d'une protéine à une autre. Les sels peuvent être éliminés ensuite par dialyse.

### **c. Ultracentrifugation :**

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide. L'**ultracentrifugation** utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

### **d. Types de centrifugation :** Deux principaux types :

#### **\* Centrifugation différentielle :**

Elle se base sur la différence de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante.

#### **\*Centrifugation en gradient de densité :**

C'est le type de centrifugation le plus utilisé pour séparer un mélange de protéines. Dans cette méthode, les particules se sédimentent au sein d'un gradient de densité formé par des dépôts successifs de solutions de densité décroissante de bas en haut. A l'équilibre, les particules se stabilisent dans la zone du gradient où la densité est égale à la siennes. Les gradients les plus utilisés sont à base de Saccharose ou de chlorure de Césium (CsCl).

Il existe deux types de gradients :

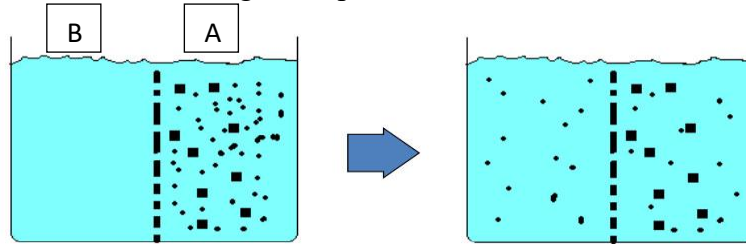
- **Le gradient discontinu :** les concentrations utilisées dans le gradient sont à nombre limité et de valeurs éloignées.
- **Le gradient continu :** La concentration du Saccharose ou du CsCl diminue graduellement le long du gradient. On l'utilise lorsqu'on n'a pas une idée exacte sur la densité des particules à séparer.

## **1.3. La dialyse :**

### **a. Définition et principe :**

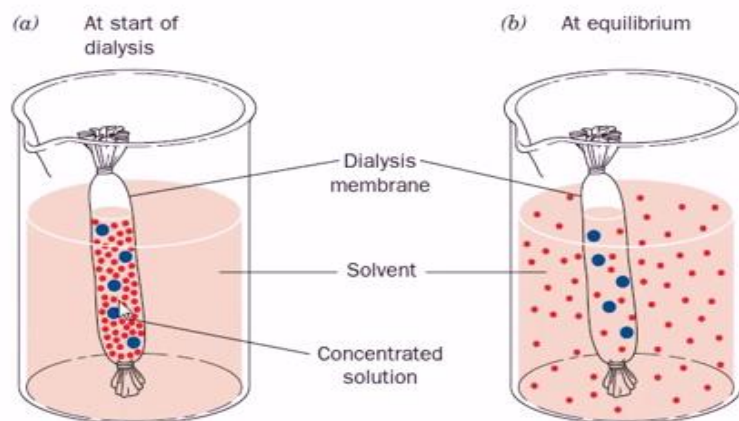
La dialyse est une technique de séparation ou de purification des solutions pour les débarrasser des petites molécules ou des ions, qui passent d'un milieu liquide à un autre à travers d'une membrane semi-perméable grâce à une différence de concentration. Dans la figure suivante, la solution concentrée A contient des molécules de masses moléculaires élevées, des ions minéraux et des petites

molécules. Les ions et les petites molécules traversent la membrane et passent dans le compartiment B jusqu'à ce que leur concentration soit égale de part et d'autre de la membrane.



### b. Membranes de dialyse :

On place la solution à dialyser dans un tube fait d'une membrane semi-perméable, souvent de la cellulose ou un dérivé. On referme les deux bouts de ce tube, formant ainsi un "boudin". On place ce boudin dans la solution contre laquelle on veut faire la dialyse (liquide de contre-dialyse).



La dialyse est utilisée pour :

- Le dessalement des solutions protéiques, purification des enzymes, ...
- La purification du lactosérum.

## II. Les techniques chromatographiques :

### 1. Historique :

La chromatographie (du grec chroma: couleur et graphe: écrire) a été réalisée pour la première fois par le botaniste Mikhail Tswett en 1905. Il a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l'éther de pétrole. Des bandes colorées qui se déplacent le long de la colonne à des vitesses propres sont obtenues, d'où le nom de la technique.

### 2. Définition et principe :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Elle est basée sur les différentes affinités de l'échantillon à l'égard de deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire. Si

plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

### **3. Analyse des mélanges d'acides aminés par chromatographie planaire :**

#### **3.1. Principe :**

La chromatographie planaire (chromatographie sur couche mince=CCM et chromatographie sur papier) est une technique d'analyse, très utile et simple à mettre en œuvre. Elle repose sur les phénomènes d'adsorption à la phase stationnaire et de solubilité dans la phase mobile.

L'échantillon est placé sur un support solide (phase stationnaire) et l'on applique un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, va monter le long de support. La phase mobile, en montant dans la phase stationnaire, va entraîner les composés de l'échantillon que l'on avait déposé, et ce à une hauteur variant en fonction de leurs affinités à la phase mobile et à la phase stationnaire.

#### **3.2. Matériel :**

**A. La phase stationnaire (plaques CCM ou papier whatman) :** Les plaques CCM sont constituées d'une couche uniforme (épaisseur d'environ 0.2 mm) de Silice, Alumine ou de cellulose, étalée sur un support en Aluminium ou en verre. Le choix dépend de la nature de l'échantillon, pour les composés polaires comme les acides aminés, on utilise la cellulose.

**B. La phase mobile (éluant):** généralement, un mélange de solvants à des proportions bien définies et à polarités différentes. Pour les acides aminés, on utilise généralement l'acide acétique et le butanol qui sont des solvants polaires.

#### **3.3. Conduite de la CCM :**

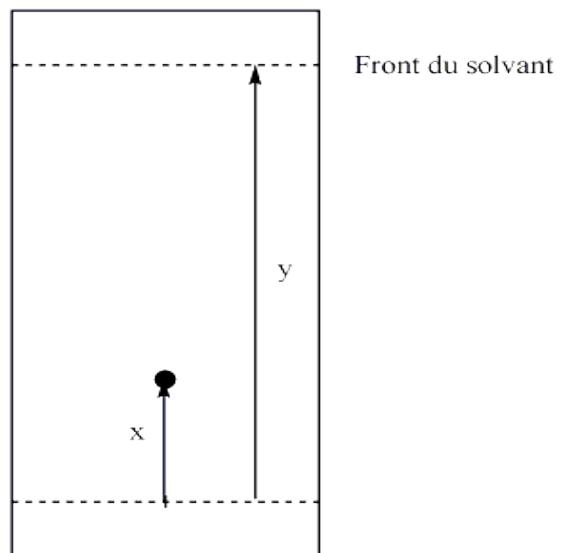
##### **A. Dépôt d'échantillon et migration :**

On trace sur la plaque ou le papier à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon (ligne de départ), et on marque les points où on va déposer l'échantillon (10 à 20 $\mu$ l) en laissant au moins 1cm entre chaque échantillon et l'autre et 1cm des deux bords latéraux. Après la migration du solvant par capillarité (front de solvant), on sèche la plaque ou le papier et on procède à la révélation.

**B. Révélation:** Les acides aminés sont incolores, on doit les révéler par atomisation ou pulvérisation du réactif Ninhydrine sur la plaque CCM ou le papier.

**C. Le rapport frontal (RF) :** C'est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant. Cette valeur est caractéristique pour chaque composé dans les mêmes conditions. L'identification d'un composé se fait par la comparaison des RF des échantillons à ceux des témoins.

$$RF = x/y$$



Selon le but de la CCM, on utilise des témoins purs pour identifier ou bien pour s'assurer de la pureté de l'échantillon, voir quantifier par densitométrie.