

Purification des protéines : les enzymes

D) Introduction

Un protocole efficace de purification d'enzyme est défini par :

- un rendement en activité le plus élevé possible;
- Une activité spécifique la plus élevée possible (synonyme de grande pureté);
- La reproductibilité de la technique;
- L'utilisation d'un appareillage disponible au laboratoire et peu coûteux;
- La rapidité et la facilité de mise en œuvre de la méthode

Pour aboutir à la purification d'une protéine, il faut tout d'abord préparer l'extrait qui contient cette protéine. Il faut ensuite passer à l'étape de purification proprement dite et enfin tester la pureté de l'enzyme.

II) Préparation de l'extrait

1-Les différentes sources d'enzymes : Chez les animaux et les hommes, on peut extraire les enzymes du foie, des muscles, du cœur des reins et du sang. Chez les plantes, la disponibilité est saisonnière. Les microorganismes sont la source d'enzymes la plus utilisée car on peut en produire de grandes quantités et les procédés sont plus faciles à reproduire. Pour les animaux et les hommes, les tissus sont récupérés et congelés à -20°C . Pour les microorganismes, on fait des cultures et on récupère les cellules : par filtration pour les champignons et par centrifugation (différence de masse volumique). On récupère le filtrat (ou le culot) en fonction du fait que les enzymes sont extra ou intra cellulaires.

2-Solubilisation : Si les enzymes sont intracellulaires, on doit passer par une étape de solubilisation ; les cellules sont détruites pour libérer les protéines en solution. Différentes méthodes sont utilisées pour casser les cellules : choc osmotique, lyse des parois par méthode enzymatique (lysosyme), homogénéiseur à lames : Potter (pour les cellules animales), choc par pression (French Presse), ultrasons ; billes de verre (pour les levures) . les extraits sont clarifiés par ultrafiltration ou centrifugation,

NB : La solubilisation des protéines membranaires nécessite l'utilisation d'un détergent qui, par interaction hydrophobe, va solubiliser la protéine.

3-Clarification : Elle se fait par concentration, dialyse et dessalage.
i- **Concentration :** Pour réduire le volume de la solution, la méthode la plus utilisée est l'ultrafiltration. On soumet donc la solution protéique à l'action d'une filtration; la taille des pores du filtre doit être telle que les protéines doivent être retenues. Les sels ne sont cependant pas complètement éliminés, on doit procéder à une dialyse.

ii- **Dialyse :** Son principe est de mettre la solution dans un boudin de dialyse qui lui même est dans un tampon dépourvu de sels. Par phénomène de diffusion, les sels vont sortir du

boudin jusqu'à atteindre l'équilibre entre la concentration dans le boyau et la concentration dans le tampon. Elle peut durer jusqu'à 48 heures.

iii- Dessalage : Grâce à une filtration sur gel (colonne Sephadex G25), la solution va être débarrassée des sels qui vont rester sur le gel.

III) Méthodes de séparation

1-Précipitation

Elle est souvent utilisée en première étape ou en étape de concentration entre deux colonnes de purification. On ajoute donc des sels dans le milieu pour précipiter les protéines ou des solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone. Un changement de pH ou de température peut aussi précipiter les protéines.

i-Précipitation par les sels

Les protéines sont solubles dans l'eau car elles (leur partie hydrophyle) ont des interactions avec les molécules d'eau. Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. NH_4^+ et SO_4^{2-} peuvent eux aussi interagir avec l'eau : si la concentration en sels augmente, on pompe l'eau de la solution donc il y a moins d'eau disponible pour les protéines. Elles forment donc des agrégats en interagissant par leur partie hydrophobe. Quand la taille de l'agrégat est suffisante, il y a précipitation.

ii-Précipitation par les solvants organiques

C'est le même principe mais les solvants ont un effet dénaturant. Il faut donc travailler entre -15 et 0°C.

iii-Précipitation par le pH et la température

Si on atteint des valeurs élevées, on dénature les protéines et on les précipite, mais il faut faire attention à la stabilité de l'enzyme.

Ex : la phosphatase alcaline d'E. Coli avec la température.

2-Séparation par Adsorption sur support : Chromatographie sur colonne

La chromatographie est une technique de séparation qui utilise une colonne contenant un support qui possède plusieurs propriétés. Ses propriétés font qu'il retient les protéines selon leurs propres propriétés physicochimiques.

Les différentes étapes de chromatographie sont en ordre : 1-Choix du support; 2-Préparation du support : régénération et équilibrage avec le tampon; 3-Préparation de la colonne (charge de la solution protéique; lavage avec le tampon : séparation par rétention sur la colonne selon l'affinité protéine/ support; et élution : changement des propriétés physicochimiques du tampon (progressif -> gradient ou brutal) et donc élution des protéines retenues sur la colonne).

i-chromatographie échangeuse d'ions

On sépare les protéines selon leur charge. Les protéines sont des polyélectrolytes, ainsi, à un pH donné, chacun des groupements ionisables sera dans un état d'ionisation donné (en

fonction du pKa). Le pH_i est le pH auquel la charge globale de la protéine est nulle. Si $pH < pH_i$, la molécule est positive. Si $pH > pH_i$, la molécule est négative. Ainsi, selon la charge du support et sa propre charge, la protéine va interagir ou pas avec le support. Il existe différents types de supports : cellulose, sephadex. On peut y fixer des substituants qui vont porter soit une charge positive (DEAE (diethyl amino ethyl) est chargé positivement) soit une charge négative. (CM (carboxymethyl) est chargé négativement.).

Si on est à pH 7, les protéines dont le $pH_i > 7$ seront éluées en premier car elles sont positives et n'ont donc aucune affinité avec le support qui lui aussi est positif. Par contre les protéines dont le $pH_i < 7$, seront retenues et donc éluées avec le gradient de sel.

ii-Chromatographie hydrophobe

On utilise un support qui contient un greffage hydrophobe et qui peut donc interagir avec les protéines hydrophobes. On connaît deux types de support : les amines aliphatiques ; La longueur des chaînes amine peut varier (C4->C10). Ex : le butyl sepharose est un greffage en C4. et les amines avec noyau aromatique : phenyl-sepharose.

Ces supports retiennent les protéines par interaction hydrophobe. On charge la colonne en présence de sel car il favorise les interactions hydrophobes ($(NH_4)_2 SO_4$ à 1M). L'éluion peut se faire de deux façons : Diminution de la concentration en sels -> l'interaction diminue aussi. Si les protéines restent accrochées, on va les décrocher spécifiquement en ajoutant un détergent qui solubilise les interactions hydrophobes. Cependant, il faut songer à enlever le détergent par la suite grâce à une dialyse.

iii-Chromatographie avec colorants

Elle ressemble à une chromatographie d'affinité. Les colorants utilisés ont beaucoup de cycles et on se sert du NAD pour purifier les deshydrogénases. On peut bien sûr purifier d'autres protéines que les deshydrogénases. Ex : le bleu de Ciliacron possède des groupements NAD, on l'immobilise donc sur un support et les protéines qui interagissent normalement avec le NAD vont être retenues sur la colonne. L'éluion s'effectue grâce à un gradient de sels.

iv-Chromatographie d'affinité

On fixe sur le support un ligand dont on sait qu'il a une forte interaction avec la protéine que l'on cherche à purifier. Attention, le ligand n'est pas un substrat. Ex : purification de la trypsine à l'aide de son inhibiteur fixé sur le support. L'éluion peut être non spécifique (augmentation de la force ionique) ou spécifique (éluion avec le ligand libre -> compétition et fixation de la protéine sur ce ligand libre; le ligand libre est alors éliminé par dialyse). L'avantage de cette dernière méthode est qu'elle ne fait pas appel aux propriétés physicochimiques qui peuvent être communes à plusieurs protéines mais à la spécificité : en une seule étape, on a une meilleure purification qu'avec l'échange d'ions ou la chromatographie hydrophobe. Il faut évidemment avoir une certaine connaissance de l'enzyme.

v-Immunoabsorbants

On immobilise un anticorps spécifique de la protéine à purifier et les autres protéines seront éluées : cette technique est donc extrêmement spécifique. Cependant, l'interaction antigène/anticorps est tellement forte qu'il est ensuite difficile de les séparer : les constantes

de dissociation sont comprises entre 10^{-6} à 10^{-12} . L'éluion est donc problématique. La seule manière de les dissocier serait de baisser fortement le pH (jusqu'à 2) mais à ce pH là, l'enzyme est totalement dénaturée. Cette technique n'est donc utilisable que pour avoir la chaîne polypeptidique et non pas la protéine native.

vi-Filtration sur gel

Avec la chromatographie échangeuse d'ions, c'est la technique la plus utilisée. Elle a été introduite par Porath en 1959 avec la fabrication de polymères de dextran avec deux caractéristiques essentielles : taille des pores très bien calibrée et diamètre des billes pour contrôler le débit. La séparation des protéines se fait en fonction de leur taille : les grosses sont éluées en premier, tandis que les petites sont retenues dans les billes et sont donc éluées après. Un paramètre caractérise la séparation : le K_{av} . On le calcule à partir d'un diagramme d'éluion :

V_0 = Volume mort. On le détermine en faisant passer une grosse molécule dont on connaît la taille. Il correspond au volume minimum à l'extérieur des billes. La molécule est colorée avec du bleu dextrane.

V_t = Volume total. On le détermine avec une très petite molécule qui va être éluée en dernier. La molécule est colorée avec du para nitro phénol.

V_e = Volume nécessaire pour éluer ma molécule.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

En utilisant une gamme étalon, on peut déterminer la masse moléculaire de la protéine étudiée. La filtration sur gel se fait sur colonne Sephadex (G10 -> G200). La séparation est fonction de la masse moléculaire, de la longueur de la colonne (plus elle est longue, plus la séparation est efficace) et du débit de la colonne (plus il est lent, plus la séparation est efficace).

IV) Détermination de la pureté de la préparation

Cela consiste à vérifier la pureté de la protéine purifiée. Pour cela on utilise les technique d'électrophorèse : A un pH donné, la protéine a une charge donnée. On peut donc utiliser cette propriété pour réaliser une migration sur champ électrique et ainsi séparer les protéines selon le signe de leur charge et selon leur quantité de charge.

On utilise des gels de polyacrylamide mais surtout des gels d'acétate de cellulose.

1. électrophorèse sur Gel de polyacrylamide PAGE

On utilise le gel PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) qui, suivant le pourcentage de bisacrylamide et d'acrylamide, sera constitué de pores plus ou moins grands. Etant donné que l'on applique un courant électrique sur le gel, les protéines vont migrer en fonction de leur taille et donc de leur charge. Le gel agit comme un tamis qui va retenir les grosses molécules et laisser passer les petites. Le gel est soit en cylindre, soit en plaque. La majorité des protéines sont chargées négativement et vont donc migrer vers le pôle positif. La résolution est très fine. On révèle les protéines grâce à du bleu de Coomassie. Ces gels sont appelés natifs car la protéine garde son activité. On peut d'ailleurs révéler l'activité grâce à un test coloré. Le seuil de détection est de 2 à $5 \mu\text{g}$. On peut aussi avoir des gels dits dénaturants qui utilisent le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Les protéines ont une très forte interaction avec le SDS et sont dénaturées en sa présence.

Mesure de l'activité enzymatique

I) Introduction

Ne connaissant rien sauf la réaction, comment peut-on doser l'activité enzymatique ?
La mesure de cette activité est basée sur la vitesse de la réaction.

II) Méthodes de mesure de la concentration de substrat ou de protéines

1. Spectrophotométrie

On travaille soit dans l'UV (200-300 nm) pour les composés aromatiques, soit dans le visible (300-800 nm).

On choisit une longueur d'onde en fonction du spectre d'absorption du produit.

Absorbance $A = \log I/I_0$

Loi de Beer Lambert $A = ECl$ avec E : le coefficient d'extinction molaire en $M^{-1} cm^{-1}$, C : la concentration en $mol l^{-1}$ et l : la longueur du trajet optique en cm^{-1} .

exemple : NADH à 840nm, $E = 6.23 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$

Para nitrophénol à 400nm, $E = 1,28 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Remarque : Il existe une zone de validité de la loi de BEER LAMBERT : elle n'est linéaire que jusqu'à une valeur de 2 unités de DO. Si on a un témoin qui a une forte absorption, il faut faire attention aux décalages dus aux réactions qui peuvent se faire dans le témoin (plus le témoin absorbe, moins la mesure est précise).

Exemple : activité de l'enzyme alcool deshydrogénase



On mesure l'activité de l'enzyme grâce à la mesure de DO à 340nm, car le NADH absorbe et pas le NAD^+ .

2. Spectrofluorométrie

On regardera l'intensité lumineuse absorbée et retournée.

Exemple : NADH $\lambda_a = 340nm$; $\lambda_e = 460 nm$

Trp $\lambda_a = 280nm$; $\lambda_e = 335nm$

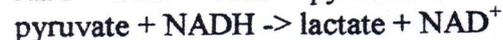
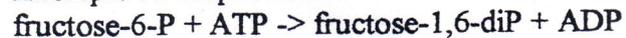
La sensibilité est 100 fois meilleure qu'en spectrophotométrie.

3. Dosages couplés

On les utilise quand le substrat et le produit absorbent à la même longueur d'onde ou n'absorbent pas.

Le principe de ce dosage, à partir de la réaction à étudier, est d'aboutir à une réaction dont le produit ou le substrat absorbent à une longueur d'onde connue.

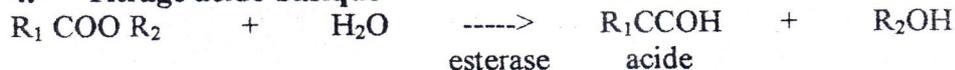
Exemple : Phosphofructokinase PFK



On mesure la disparition de NADH à 360nm.

Il faut cependant faire attention à ce que les réactions suivantes soient plus rapides que la première (celle ci doit être limitante).

4. Titrage acido basique



On va donc doser l'apparition d'acide par addition de base, en restant à pH constant. La méthode est dite de pH stat. On peut mesurer ainsi l'activité des lipases.

Etant donné que les protéines deviennent toutes chargées positivement à cause de cette interaction, elles ne vont plus migrer en fonction de leur quantité de charge mais seulement en fonction de leur taille.

2-Electrofocalisation

Dans un gel natif de polyacrylamide, on ajoute des ampholines qui sont des polymères avec des groupements ionisables : on pourra donc créer un gradient de pH dans le gel. Ainsi la protéine va migrer jusqu'au niveau de pH qui correspond à son pHi. Cette méthode est très utilisée car elle est très résolutive : elle sépare les isoenzymes qui sont très proches en séquence d'acides aminés. On peut mettre des témoins dont on connaît le pHi et qui vont nous servir de gamme pour trouver le pHi de notre protéine.

3-Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une association des méthodes d'électrofocalisation et d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

On réalise une première étape d'électrofocalisation, puis, à 90°, une étape en gel SDS, ainsi, deux protéines qui auraient le même pHi, vont pouvoir être séparées selon leur poids moléculaire.

5. Séparation du produit et du substrat

En général, on utilise ce système quand le produit et le substrat ont la même absorption. On incube donc en discontinu, on sépare par chromatographie puis on quantifie.

a-Chromatographie sur couche mince

Cette méthode est semi-quantitative. On place la base d'un support de silice ou d'acétate de cellulose, sur lequel on a imprégné le produit et le substrat, dans une cuve remplie de solvant. Selon l'affinité qu'ont le produit et le substrat avec le solvant, ils vont migrer par capillarité différemment sur le support.

b-HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance)

Elle se fait à haute pression et augmente donc la résolution.

c-CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse)

On augmente la température jusqu'à se trouver dans une zone où le composé est volatile et on le propulse à travers la colonne à l'aide d'un gaz vecteur tels que l'hélium ou l'azote.

d-Radioactivité

Si l'on marque le substrat à l'aide d'un élément radioactif, le produit sera aussi marqué, et, en séparant les deux, on pourra quantifier le produit formé. La sensibilité de cette méthode est très forte. Son seuil de détection est de 10^{-5} picomole. Les isotopes utilisés sont : ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I .

III Mesure de l'activité enzymatique

1. Unité de mesure

En mesurant la vitesse de la réaction, on voit que la vitesse est fonction de la concentration d'enzyme, mais on ne sait pas le coefficient de proportionnalité. L'unité d'activité va donc être liée à la vitesse de la réaction.

2. Conditions expérimentales : Les conditions expérimentales se résument :

- au choix du substrat en fonction de nos critères (révélation, vitesse...);
- à la définition des conditions physicochimiques : pH, température, tampon;
- à la définition d'un temps de réaction : si la réaction est d'ordre 0, la concentration en produit varie linéairement en fonction du temps. Le temps n'est donc pas critique, on peut prendre le temps que l'on veut. Par contre si la réaction est d'ordre 1, le temps est critique car on n'a une relation linéaire entre la concentration de produit et le temps que pour un temps court. Il faut donc se placer à un temps court pour mesurer la vitesse. On a alors un pseudo ordre 0. Comme la concentration de produit formé est faible ainsi que la concentration de substrat disparu, le taux de conversion est faible lui aussi (1 à 5%). On pourra donc dire que la concentration de substrat est constante et on a donc bien un ordre 0.

Si $[S] \gg K_m \rightarrow$ ordre 0 \rightarrow meilleures conditions pour mesurer l'activité enzymatique;

Si $[S] \ll K_m \rightarrow$ ordre 1;

- à la vérification de la réponse du test : il faut vérifier que la vitesse est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

3. Activité et Activité spécifique

Il faut définir une unité enzymatique : c'est la quantité d'enzyme qui dégrade 1 μ mole de substrat par minute dans les conditions du dosage. Le rendement est l'activité enzymatique mesurée à une étape de purification divisée par l'activité initiale.

$$\text{Rdt} = (\text{Activité de l'étape} / \text{Activité initiale}) * 100$$

En général, on donne l'activité en unité/ml. Si on multiplie par le volume total on aura donc les unités totales. L'activité spécifique est définie en fonction de l'activité enzymatique et de la masse de protéines de la solution et est donc donnée en unités/mg de protéines.

$$\text{AS} = \text{Activité } (\mu\text{mol/min}) / \text{Masse protéines (mg)}$$

On peut quantifier les protéines par différentes techniques : Biuret, Folin, Lowry, Bradford. Si on calcule l'activité totale (unités/ml) et la masse totale de protéines (mg/ml), on a aussi une activité spécifique. L'activité spécifique donne une notion de pureté de l'enzyme : si on la calcule pour deux étapes de purification et qu'elle augmente, cela veut dire qu'on a enrichi notre préparation avec notre enzyme d'intérêt. le facteur de purification nous donne alors le nombre de fois que l'on a purifié l'enzyme en calculant le rapport : **AS de l'étape/ASinitiale**

IV. Unités d'activité enzymatique

Unité officielle: **katal (kat)**, quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de **1 mole de substrat par seconde**. Le **katal** n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand. On doit utiliser des sous-unités comme les **μ kat** (10^{-6} katal), **nkat** (10^{-9} katal) ou **pkat** (10^{-12} katal).

La plupart des biochimistes préfèrent l' "**unité internationale**" (**IU**, International Unit), qui est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de **1 μ mole de substrat par minute**. 60 IU valent donc 1 μ kat.

Le **nombre de rotations** (**k_{cat}**) est le nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme par seconde (ou le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme).

On peut aussi calculer l'**activité molaire**, le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme par minute (**$k_{\text{cat}} \times 60$**).

Si on connaît pas le poids moléculaire de l'enzyme, on peut quand même mesurer l'**activité spécifique**, soit l'activité par mg de protéine purifiée. Normalement, elle est donnée en **IU/mg protéine**.

Si on calcule l'**activité spécifique** sur un extrait non-purifié (soit un mélange de protéines), elle indique la pureté d'une enzyme. Au cours d'une purification d'enzyme, on mesurera donc régulièrement: l'**activité totale** (**IU** ou **μ kat**) ; la **quantité totale de protéines (mg)** et le **volume total** de solution (**ml**). Et on pourra calculer : De ces trois valeurs, on pourra calculer: l'**activité spécifique** (activité totale / quantité totale de protéine, **IU/mg**), le **rendement** (activité totale / activité totale avant la première étape de purification) et le **taux de purification** (activité spécifique / activité spécifique avant la première étape de purification).

L'**activité spécifique** et le **taux de purification** atteignent une valeur maximale lorsque l'enzyme est pure.