

# Chapitre I: Purification des Protéines

Obtenir en quantité suffisante une protéine « pure » tout en préservant ses propriétés physiologiques (structure et activité).

Source  Extraction  Purification

- Dosage de la quantité produite
- Contrôle de la pureté
- Contrôle de l'activité
- Stockage

# Origine de l'enzyme

animale

végétale

microbienne

broyage

intracellulaire

extracellulaire

broyage cellulaire

centrifugation / filtration

mécanique

non mécanique

cellules

surageant

élimination des acides nucléiques

UF / diafiltration

# Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

## 1. Méthodes d'extraction

L'objectif: libérer des enzymes des cellules ou des structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent.

il est donc nécessaire de détruire selon le cas : la paroi, la membrane cellulaire et les structure subcellulaire par des propriétés physiques et chimiques efficaces.

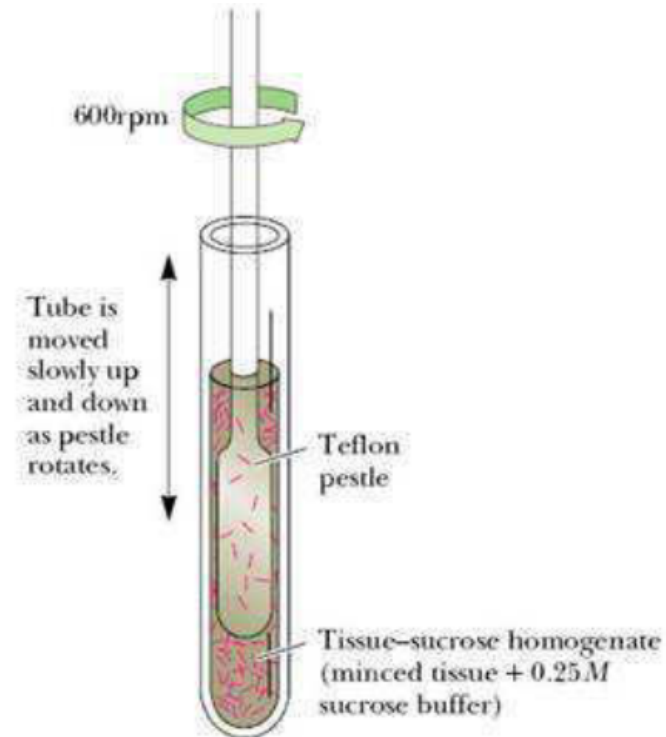
Les tissus peuvent être utilisés en biochimie sous forme de fragment organes, des coupe fines ou de broyat (obtenus après passage dans un broyeur type mixeur ménager).

## - Utilisation d'abrasifs :

L'agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les micro-organismes par rupture de la paroi et libération des constituants cytoplasmique.

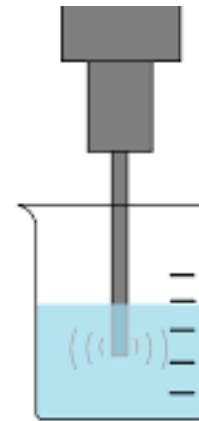
## - Extraction par homogénéisation a haute pression :

L'homogénat est obtenu après passage dans un appareil de Potter-Elvehjem



**- Sonication :**

C'est un appareil qui propage des ondes a travers une sonde entrainant ainsi des vibrations.



## **Choc osmotique :**

La dispersion d'une suspension dense de cellules réalisée dans un milieu hypertonique (saccharose 20%) dans l'eau à 4 °C provoque la libération des constituants cellulaires, cette technique est très douce et ne dénature pas les protéines.

## **Traitement alcalin :**

Hydrolyse de la membrane cellulaire à un pH entre 11,5 et 12,5. Cette technique est simple. Applicable si l'enzyme est stable a pH alcalin.

## **Emplois de détergents :**

Dans certain condition de pH et de force ionique les détergents (ionique ou non) se combinent aux lipoprotéines ainsi des micelles rendant la membrane perméable.

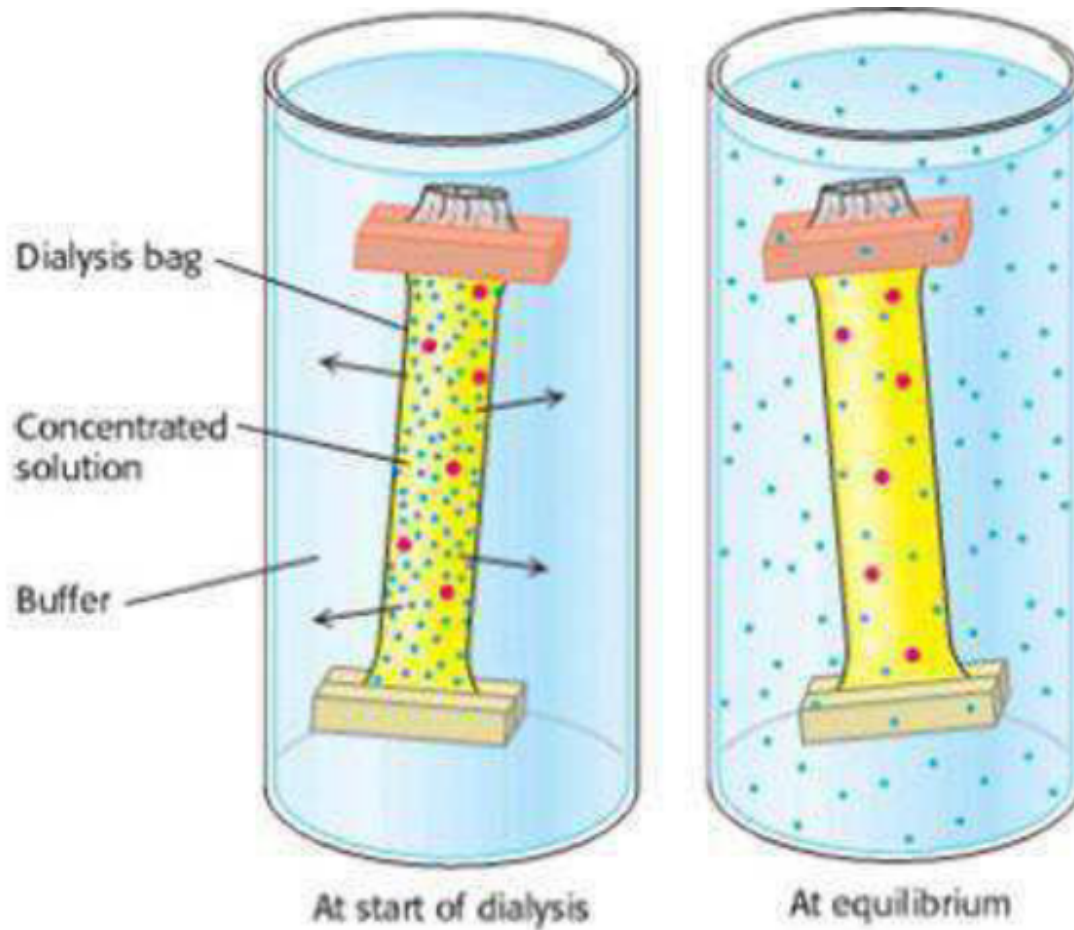
L'inconvénient de cette méthode est la possibilité de dénaturation des enzymes sous l'effet des détergents.

## **Lyse enzymatique :**

Le lysozyme hydrolyse les liaisons type  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) de glycoprotéine (peptidoglycane) responsables de la rigidité des membranes des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>.

# Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :

## 1- Dialyse





# **Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :**

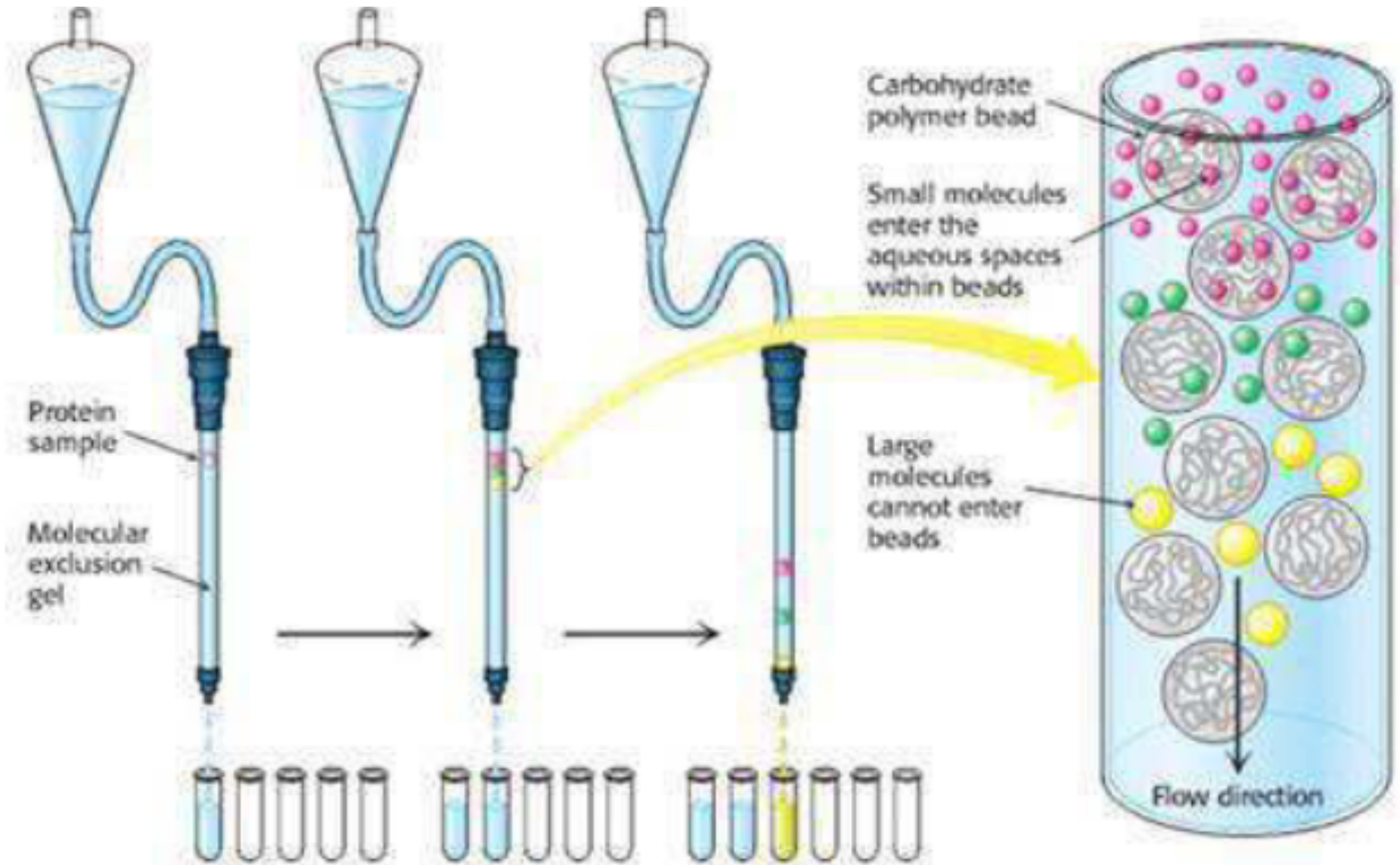
## **Filtration et ultrafiltration :**

Ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective permettre la séparation des substances selon leur tailles moléculaire, approximativement selon leur poids moléculaire.

Les petites molécules sont séparées par ultrafiltration dans laquelle une réaction ou une force centrifugeuse est utilisé pour filtré les petit molécules de soluté a travers une membrane semi-perméable qui retient les molécules protéiques.

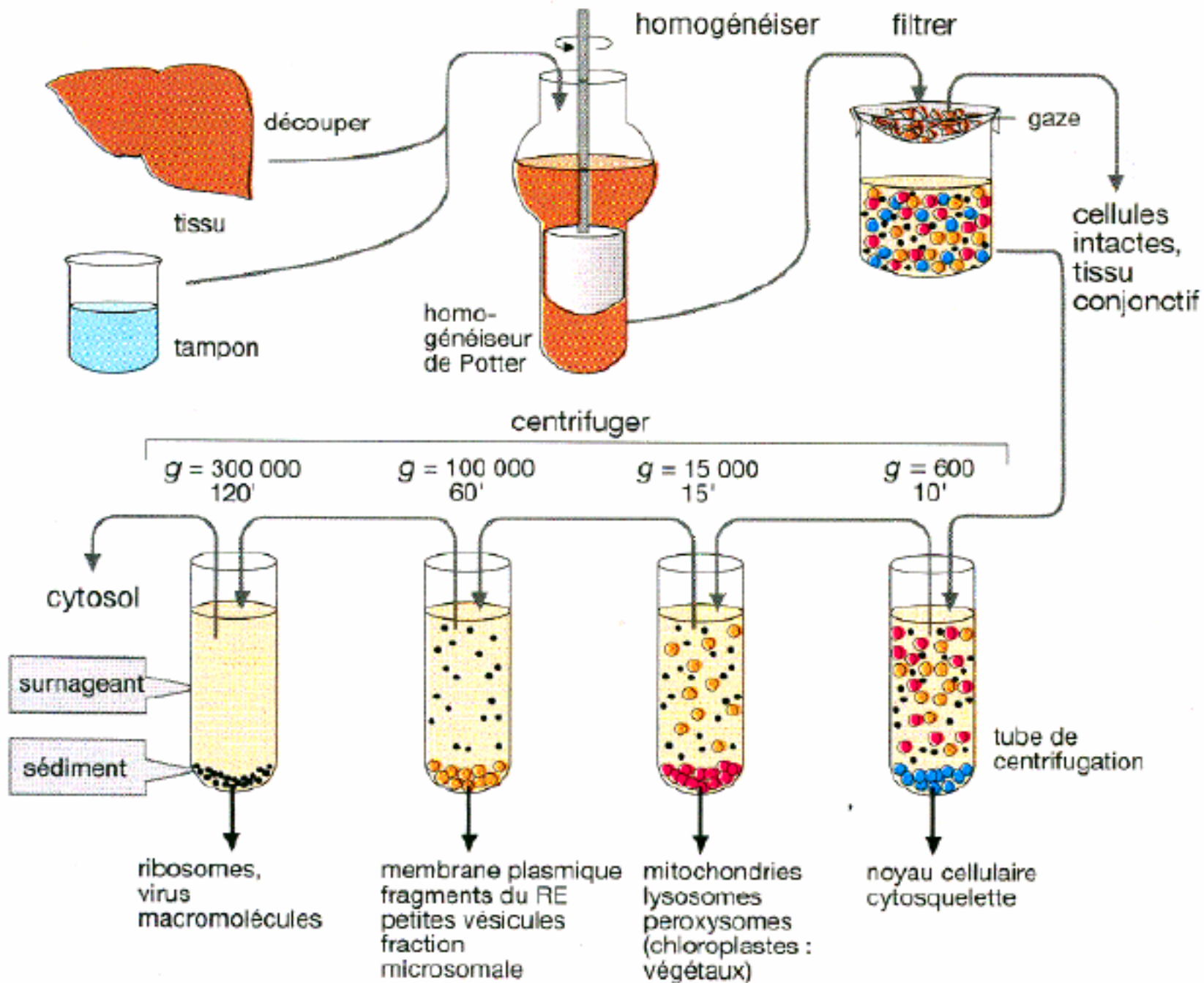
# Procédés de séparation basée sur la taille moléculaire :

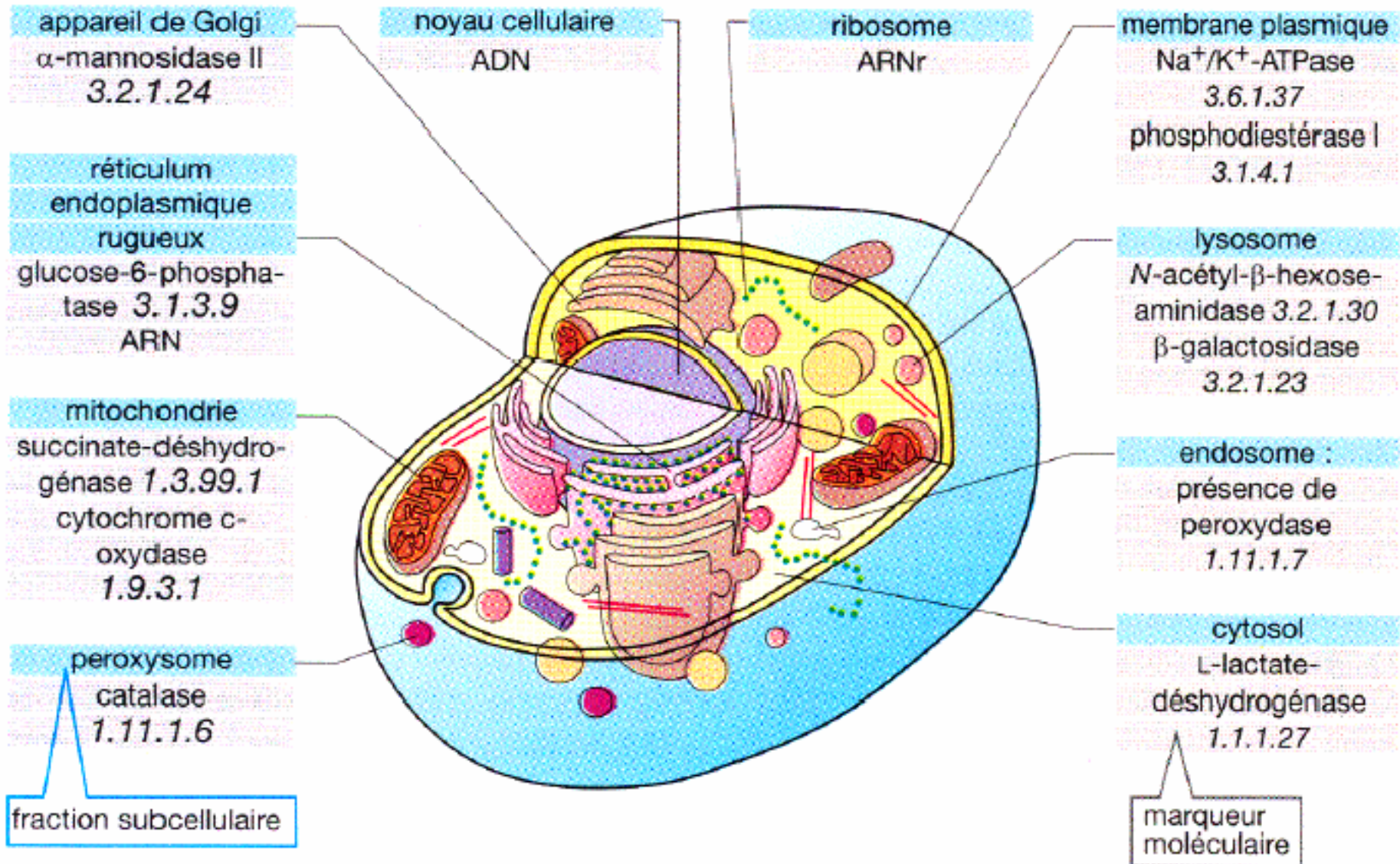
## Filtration et ultrafiltration :



# Centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité zonal constitue un procédé de séparations utile non seulement pour les protéines mais également des macromolécules (enzymes, hormones, sous unité ribosomale) dans la plupart des technique courante un gradient de densité constitué de saccharose est d'abord préparé dans un tube est rempli de telle sorte que la densité soit la plus grande à l'extrémité de tube. Le mélange de macromolécule est déposé à la partie supérieur de gradient , la centrifugation à grande vitesse amène chaque type de macromolécule à sédimenté à sa propre vitesse déterminé essentiellement par le poids de la particule et la densité et la forme des molécules qui se traduit par des bande séparées par des zones.





## *Stratégie d'ensemble pour purifier une protéine d'intérêt*

- les protéines sont purifiées par des méthodes de fractionnement
  - on utilise les différentes propriétés physico-chimiques de la protéine étudiée pour l'isoler progressivement des autres substances cellulaires
- les propriétés physico-chimiques exploitées dans les différentes techniques de séparation sont:
  - la solubilité
  - la charge ionique
  - la taille moléculaire
  - les propriétés d'adsorption et de liaison à d'autres molécules biologiques

### Propriété physico-chimique

solubilité

charge ionique

taille moléculaire

spécificité

### Techniques de séparation

- précipitation

- chromatographie par échange d'ions  
- électrophorèse  
- focalisation isoélectrique

- ultracentrifugation  
- chromatographie par gel-filtration  
- électrophorèse

- chromatographie d'affinité

## **Procédés basé sur les différences de solubilité**

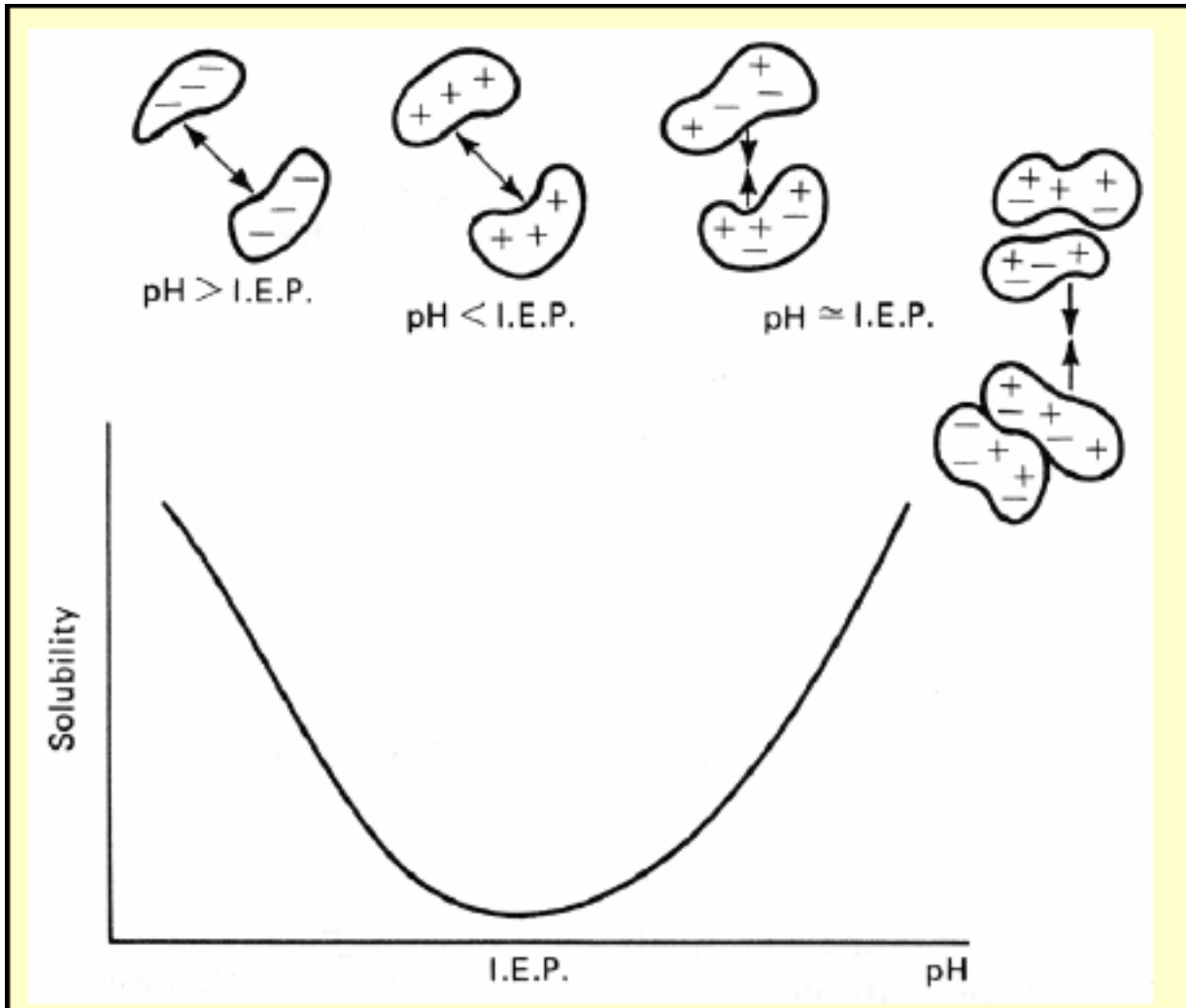
La solubilité des protéines en solution est fonction de plusieurs facteurs : pH, température, force ionique, propriété électrique du solvant ect... ces variables peuvent être utilisé pour séparé des mélange protéique.

### **Précipitation isoélectrique (effet de pH)**

Le pH modifie l'ionisation des groupe de charge

- Utilise des solutions tampon qui maintiennent le pH dans une zone "physiologique » (6.5-7.5/8.0) pour éviter d'endommager les protéines par des variations brusque de pH.

**La solubilité de la  $\beta$ -lactoglobuline est minimale a pH de 5,2 quelque soit la concentration en NaCl**



**Figure 12: Solubilité d'une protéine globulaire près de son point isoélectrique (IEP)**



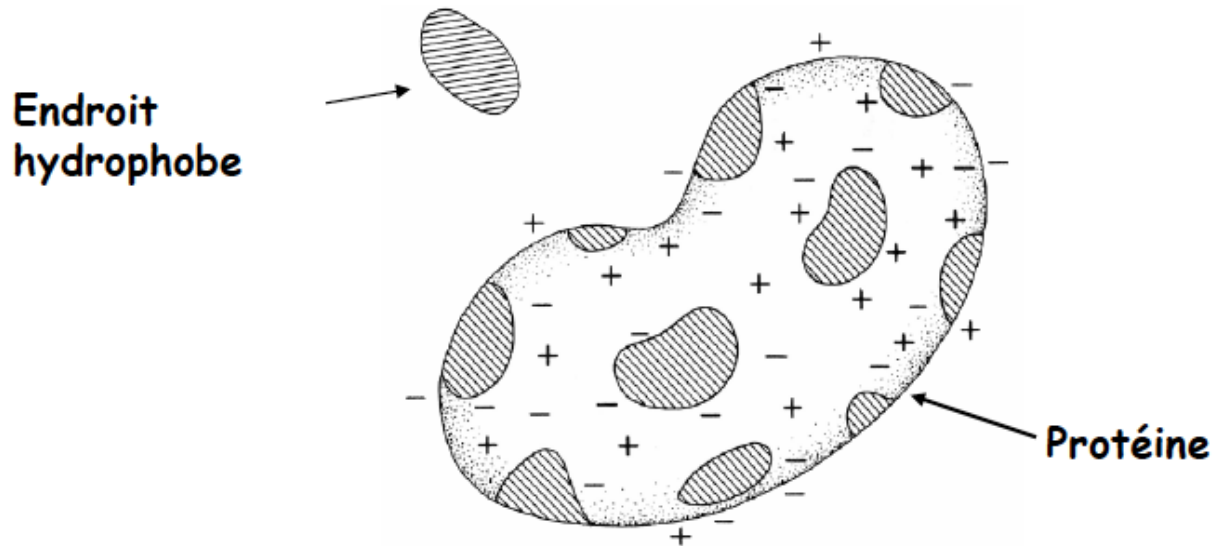
## **Température**

- les protéines sont facilement dénaturées à hautes températures
- plusieurs protéines se dénaturent lentement lorsque 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 de températures de -20 à -80°C

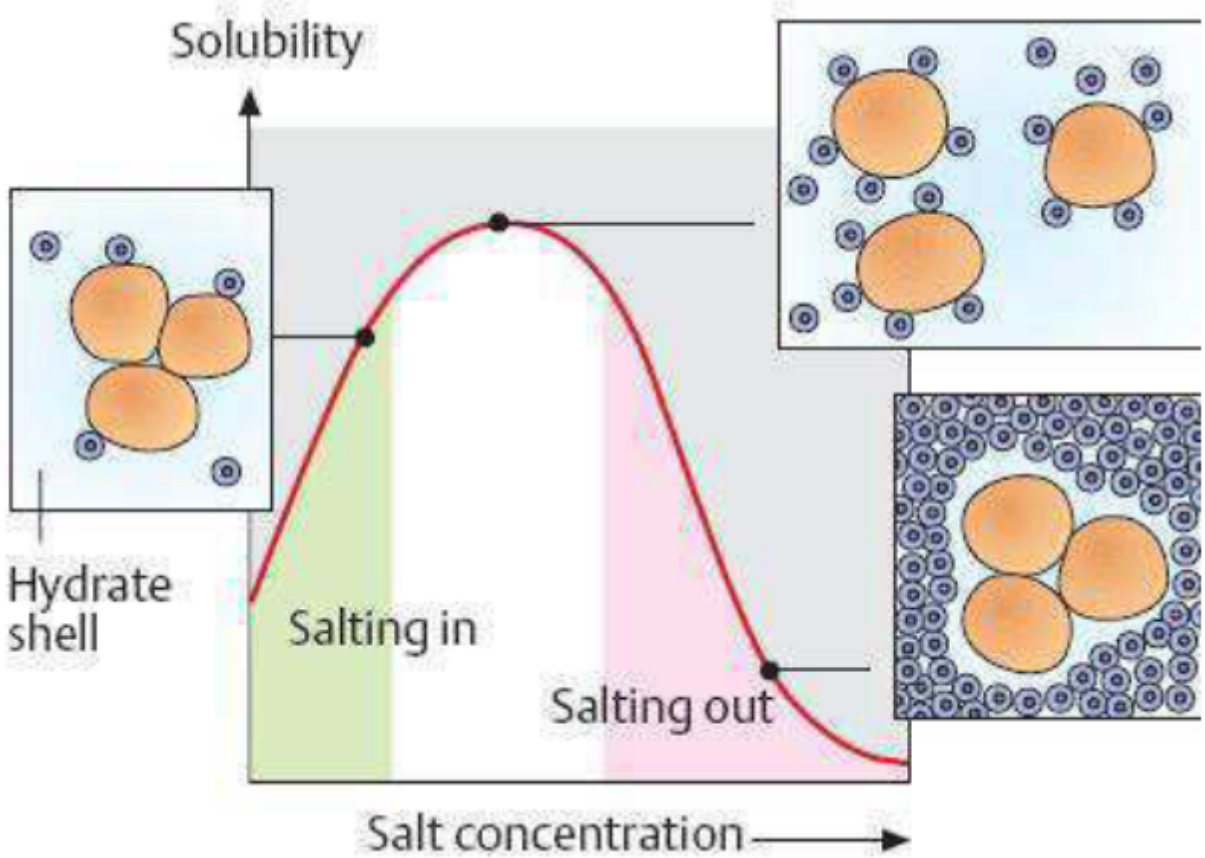
# La dissolution par des sels

une approche couramment utilisée pour purifier une ou des protéines est de les précipiter (diminuer sélectivement leur solubilité dans l'eau).

- la distribution des résidus d'acides aminés de types hydrophobe à la surface des protéines est aussi importante dans la solubilité des protéines que les résidus de type polaires ou chargés



A faible concentration les sels augmentent la solubilité de nombreuses protéines ; phénomène appelé la dissolution par les sels ou salting-in, l'action des sels sur les protéines est fonction de leur force ionique qui mesure à la fois la concentration et charge sur les cations et les anions fournis par les sels.



## Fractionnement par des solvants :

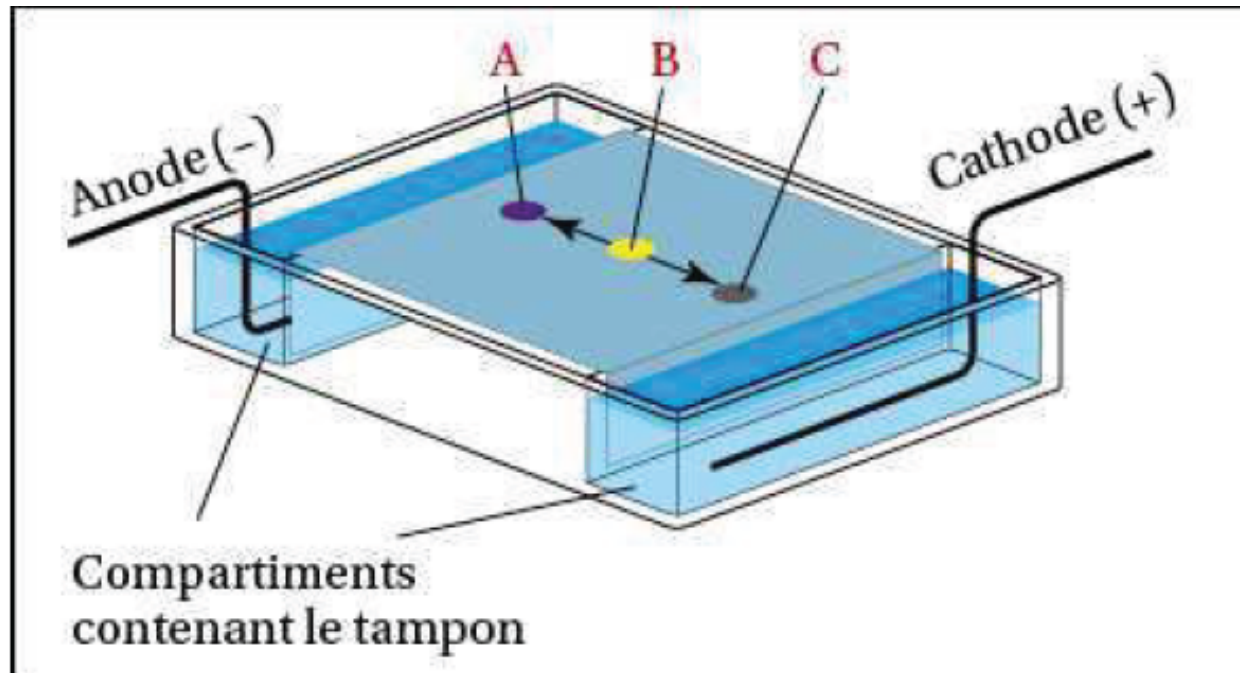
<b>Constants diélectrique de quelque liquide à 20 °C</b>			
<b>eau</b>	<b>80</b>	<b>acéton</b>	<b>21,4</b>
<b>méthanol</b>	<b>33</b>	<b>benzen</b>	<b>2,3</b>
<b>éthanol</b>	<b>24</b>	<b>hexan</b>	<b>1,9</b>

un facteur qui détermine la solubilité dans un solvant aqueux/organique est la taille de la protéine: plus grande est la protéine, plus basse est la concentration en solvant organique nécessaire afin de la précipiter

# Procédées de séparation basée sur la charge électrique

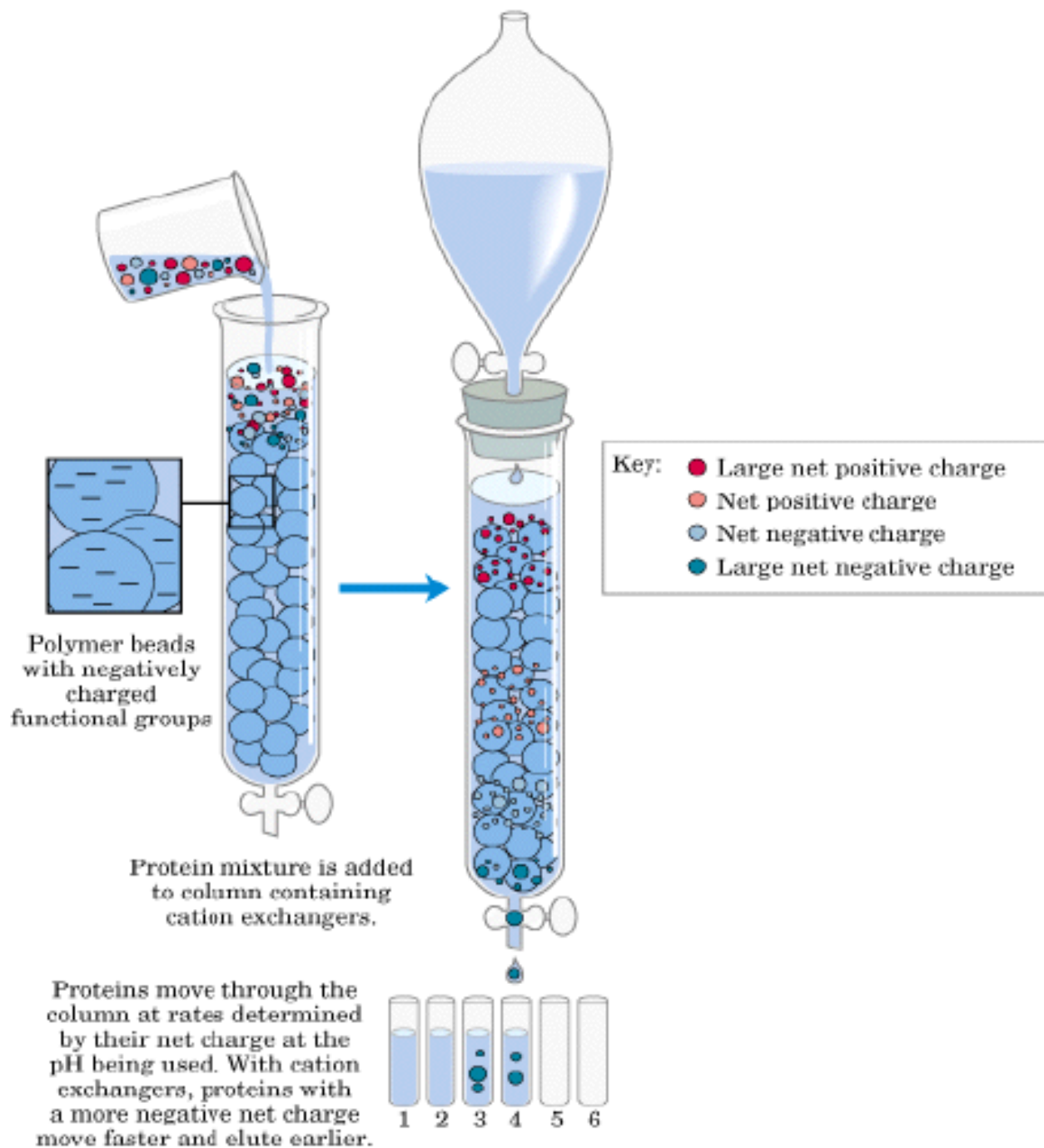
## Electrophorèse en zone

On appelle électrophorèse le déplacement des particules chargées dans un champ électrique continu, le déplacement de la particule dépend de plusieurs facteurs : Temps de migration, force ionique et pH du tampon, de la température du courant électrique appliqué.

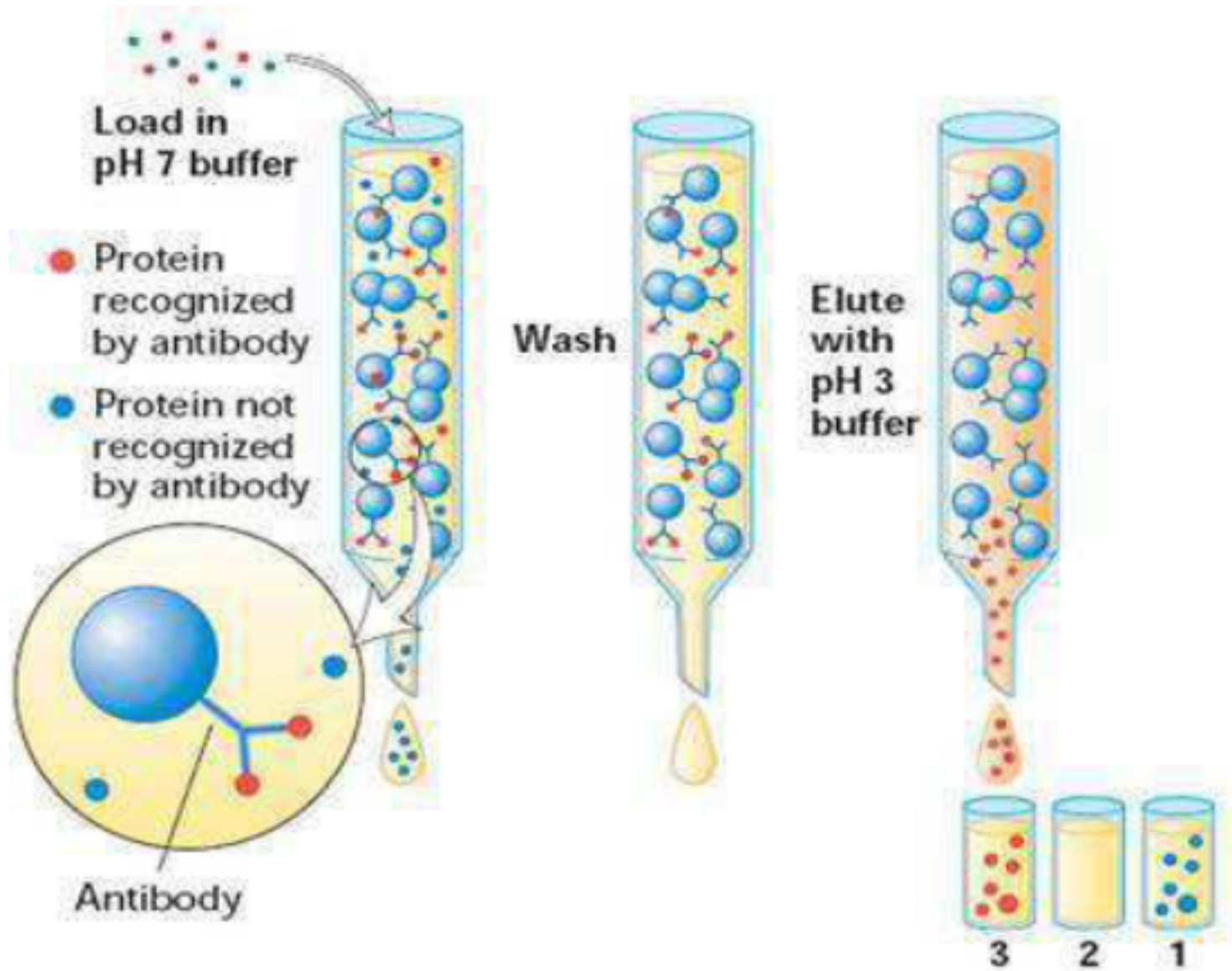


## **Chromatographie par échange ionique**

**C'est une méthode utilisant le comportement acido-basique des protéines pour leur séparation comme les acides aminés, les protéines peuvent être purifiées par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions, cette technique exploite essentiellement les différences de signe et d'amplitude des charges électriques nettes des protéines. La colonne de chromatographie est formée de long tube remplis de particules synthétiques contenant des groupements fixés chargés.**



# Procédées de séparation basée sur la spécificité du ligand





- L'équation globale de la réaction catalysée ;
- Si l'enzyme a besoin de cofacteur tel que les ions métallique ou coenzyme ;
- Avoir un procédé analytique pour suivre la disparition de substrat ou l'apparition de produit ;
- La dépendance de l'activité enzymatique par rapport à la concentration de substrat
- pH optimum ;
- une zone de température dans laquelle l'enzyme est stable possède une activité élevée.

Par accord international, une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation d'une micromolaire par minute de substrat dans les conditions optimales, le terme d'activité fait référence à une unité totale d'enzyme dans la solution.

L'activité spécifique est le nombre d'unités d'enzymes par mg de protéine, c'est une mesure de la pureté enzymatique, elle augmente au cours de la purification et devient maximale et constante quand l'enzyme est pure.

fraction	volume de la fraction	masse de protéine mg	activité UI	activité spécifique
1. extrait cellulaire brut	1400	10000	100000	10
2. précipitation	280	30000	96000	32
3. Chromatographie échangeuse d'ions	90	400	80000	200
4. Chromatographie d'exclusion moléculaire	80	100	60000	600
5. Chromatographie d'affinité	6	3	45000	1500

- Une protéine est généralement considérée comme pure après chaque étape de purifications que plusieurs étapes de purification ne permet pas d'augmenté l'activité spécifique ;

- Pour mesuré le degré de pureté on contrôle l'activité de la protéine après chaque étape de purification est on détermine :

Le rendement R de purification, c'est le pourcentage % de récupération de l'activité par rapport à la première étape.

Le rendement est le rapport de l'activité totale obtenue dans une étape et la l'activité totale obtenue dans la première étape

$A_1$  : activité totale de la purification impure

$A_2$  : activité totale de la purification pure

$$R = \frac{A_2}{A_1} \times 100$$

Le taux de purification (enrichissement):

C'est le coefficient de purification par rapport des premières étapes

$$T = \frac{AS_2}{AS_1}$$

- L'activité spécifique (AS) représente un nombre d'unités enzymatiques (UE) par gramme de protéines (g) :

$$\text{AS} = (\text{UE} / \text{g})$$

- Le taux de purification d'une enzyme est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification, sur l'AS mesurée à l'étape précédente :

$$\text{Taux de purification} = \text{AS après une étape} / \text{AS avant cette même étape}$$

- Le rendement correspond à un nombre d'UE mesuré après une étape de purification, sur un nombre d'UE mesuré à l'étape précédente :

$$\text{Rendement} = \text{UE après une étape} / \text{UE avant cette même étape}$$