

Matière : TAB

Niveau : L3

Cours: Purification des protéines

1. Introduction

Les protéines sont des molécules sensibles à leur environnement et peuvent être facilement dénaturées. C'est à dire que leur structure peut être modifiée jusqu'au point où elles perdent temporairement ou définitivement leurs propriétés biologiques.

D'autre part, il arrive fréquemment qu'on veuille séparer les protéines d'une solution, soit pour se débarrasser des protéines et ne garder que les petites molécules de solution, soit au contraire pour se débarrasser des petites molécules. On peut aussi vouloir se débarrasser d'une partie des protéines. Une des façons les plus rapides est évidemment de les précipiter. La précipitation peut aussi être contrôlée de façon à ne toucher que certaines d'entre elles, par précipitation différentielle, ce qui permet de les séparer dans des procédures d'isolement.

Très souvent la dénaturation cause la perte de solubilité des protéines. C'est pourquoi nous verrons ces deux phénomènes ensemble.

2. Principe de base

Un changement des conditions des protéines leur fait souvent perdre leurs propriétés biologiques et même physique.

Donc, la solubilité des protéines dans une solution aqueuse dépend, entre autres, des conditions ioniques et de pH. Trois phénomènes de base agissent pour affecter la solubilité des protéines en solution aqueuse : l'hydratation, la charge électrostatique et la leur conformation. Ces explications valent évidemment pour les protéines hydrosolubles et non pas pour les protéines hydrophobes des membranes. Très souvent ils se conjuguent ensemble et la précipitation résulte de plusieurs phénomènes additifs.

Chaque protéine a des caractéristiques particulières à ce niveau. Le comportement général de toutes les protéines est cependant le même.

Les protéines, sauf celles intégrées dans les membranes cellulaires, sont d'autant plus solubles en solution aqueuse qu'elles sont hydratées. Cette coque d'hydratation les empêche de s'agréger ensemble. Une trop grande agrégation les fait précipiter puisque la solvatation de ces agrégats est proportionnellement moins grande que celle des protéines individuelles. En

ajoutant des produits déshydratants qui compétitionnent avec les protéines pour l'eau d'hydratation, on peut donc provoquer la précipitation des protéines. Des produits comme le polyéthylène glycol agissent de cette façon.

Se superposant à ce phénomène, les conditions ioniques d'une solution affectent aussi la solubilité des protéines. En effet, si les protéines sont électriquement chargées de la même façon, elles auront tendance à se repousser, donc à ne pas s'agréger. Au contraire, si elles sont électriquement neutres, cette répulsion disparaît, et l'agrégation devient possible. On peut utiliser ce phénomène soit en jouant sur le pH de la solution ou avec des électrolytes.

Les électrolytes employés ici sont des sels très solubles en milieu aqueux. Les cations peuvent neutraliser les charges négatives des chaînes latérales des acides aminés et les anions neutralisent les charges positives. Ces protéines neutralisées ne se repousseront plus, elles pourront s'agréger en complexes de solubilité substantiellement réduite pouvant facilement précipiter. Au point isoélectrique les protéines sont également neutres. En amenant le pH au pI de certaines protéines, on peut donc aussi précipiter celles-ci. Dans les deux cas, pH ou électrolytes, les protéines ne précipiteront pas toutes en même temps puisque leur pI ou le nombre et la nature de leurs charges ne sont pas identiques. La plupart des électrolytes combinent à la fois la déshydratation et la neutralisation des protéines.

Un troisième phénomène peut aussi entrer en jeu, la structure des protéines et leur dénaturation. A leur état natif les protéines les groupes latéraux des acides aminés qui les composent leur permettent d'être solubles en milieu aqueux. En effet les chaînes latérales chargées (glu, asp, lys, arg. etc.) ou faciles à hydrater ou formant des ponts hydrogène avec l'eau (ser, thr, etc.) sont souvent dirigés vers l'extérieur de la molécule maximisant leur contact avec le milieu aqueux. Au contraire, les acides possédant des chaînes latérales hydrophobes (phe, trp, tyr) sont généralement camouflés à l'intérieur, minimisant ces contacts. La dénaturation brise cette organisation et ramène à la surface des groupements hydrophobes qui vont avoir tendance à s'agréger entre eux et avec les groupements hydrophobes des autres protéines dénaturées. Non seulement les protéines dénaturées sont agrégées, mais leurs groupements hydrophobes sont plus exposés au milieu aqueux, diminuant encore plus leur solubilité. Les solvants organiques (acétone, phénol), les acides forts peu concentrés ou des températures élevées sont souvent utilisés à cette fin.

3. Méthodologie et appareillage

3.1. Précipitation totale

Comme son nom l'indique les méthodes de précipitation totale des protéines visent à éliminer l'ensemble des protéines d'une solution. Ce résultat s'obtient par des conditions plutôt draconiennes qui, le plus souvent, dénaturent irréversiblement les protéines. La précipitation totale est utilisée quand on veut séparer les protéines des autres petites molécules contaminantes, acides aminés, sucres, etc., ou, quelquefois, des autres macromolécules. Cette approche est donc incompatible à des procédures où on veut récupérer une protéine intacte et fonctionnelle.

Suivent certaines techniques de dénaturation totale.

a. Précipitation à l'éthanol ou à l'acétone: On peut facilement précipiter les protéines en présence d'éthanol 80% (EtOH) en les gardant à -20°C quelques heures ou en amenant le mélange à ébullition durant quelques minutes. Une centrifugation permet alors de sédimenter les protéines précipitées. L'éthanol résiduel peut être enlevé par extraction des protéines resuspendues en milieu aqueux avec du chloroforme. Le principal inconvénient de cette méthode est le grand volume d'EtOH qu'on doit utiliser, au moins quatre fois celui de la solution protéique aqueuse. Il faut souligner en plus que la précipitation n'est pas complète, car certaines protéines sont plus ou moins solubles dans l'éthanol. Une variante plus efficace utilise de l'acétone au lieu de l'EtOH. Deux fois le volume de solution protéique est suffisant. La précipitation à l'acétone est aussi plus efficace car, contrairement à l'éthanol, très peu de protéines sont solubles dans l'acétone. Cependant la préparation de protéines résultante est très difficile à redissoudre.

b. Précipitation au phénol

Une méthode a été développée spécifiquement pour extraire des petites quantités de protéines avec du phénol. Les protéines se dénaturent et beaucoup deviennent solubles dans le phénol ou s'agglomèrent à l'interface phénol-eau, contrairement aux petites molécules et aux acides nucléiques qui restent solubles dans la phase aqueuse. Il faut remarquer que cette méthode est souvent utilisée pour des fins inverses, récupérer les acides nucléiques débarrassés des protéines.

c. Milieux alcalins ou acides

Les protéines ne sont souvent solubles qu'à l'intérieur d'une gamme restreinte de pH. Donc acidifier ou alcaliniser fortement une solution rendra les protéines insolubles. Même des concentrations modérées d'acides peuvent induire une dénaturation et une précipitation des protéines.

d. Précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)

Cette approche consiste à mettre la solution de protéines en présence de TCA pour obtenir une concentration finale de l'ordre de 5-10% de l'acide. Pour éviter une dégradation des protéines, il faut toujours travailler à 2-4°C. Une exposition de 10 minutes est généralement suffisante. On peut ensuite séparer les protéines précipitées par centrifugation à faible vitesse. On peut se débarrasser du TCA résiduel par quelques lavages à l'éther. Le sédiment de protéines résultant est très difficile à redissoudre. Il faut une quantité relativement grande de protéines en solution pour obtenir une précipitation quantitative. Pour les très petites quantités de protéines, on peut les traiter avec le détergent désoxycholate de sodium. Les micelles résultantes sont relativement faciles à précipiter (Peterson, 1976). Parmi les inconvénients de la précipitation au TCA, il y a le fait que c'est un produit très corrosif et qu'il doit être manipuler avec prudence. Il faut également se souvenir que le TCA n'est pas très stable à des concentrations inférieures à 30%v/v et qu'il faut préparer des solutions stock concentrées. La préparation de TCA 100% (100 g de TCA dans 100 mL de solution) comme solution stock se fait facilement et permet de faciliter les calculs de dilution.

e. Précipitation à l'acide perchlorique (PCA)

Une autre méthode similaire de précipitation à l'acide est celle à l'acide perchlorique. Des concentrations finales de 5-7% sont normalement suffisantes. Un des avantages du PCA sur le TCA est qu'on peut le précipiter avec du KOH puisque le perchlorate de potassium est pratiquement insoluble à 0-4°C. C'est une approche beaucoup plus simple que les lavages à l'éther pour débarrasser les protéines de l'excédent de PCA. D'un autre côté, un inconvénient majeur du PCA rendant son emploi très rare est le danger de ce produit. En effet, en plus de sa corrosivité, le PCA est explosif, obligeant donc manipuler ce produit avec la plus grande prudence dans des installations prévues à cette fin.

f. Précipitation au sulfate de zinc ou au tungstate de sodium

Le sulfate de zinc (ou le sulfate de cadmium) en présence d'une base forte (NaOH ou Ba(OH)₂) est un précipitant efficace. C'est une technique cependant un peu complexe, particulièrement si on utilise le Ba(OH)₂ qui doit être conservé à l'abri de l'air. Une autre méthode du même type utilise du tungstate de sodium en présence d'un acide fort (H₂SO₄).

3.2. Précipitation différentielle

La précipitation différentielle, ou précipitation fractionnée, est beaucoup plus douce que la précipitation totale et préserve généralement l'intégrité fonctionnelle des protéines. C'est donc

une approche très fréquemment utilisée comme étape dans l'isolement des protéines. Elle est basée sur le fait que les conditions ioniques ou de pH qui rendent les protéines insolubles varient pour chaque espèce de protéine. On peut donc ajuster les concentrations de l'électrolyte ou le pH pour isoler la protéine désirée.

Dans un premier temps on amène la concentration de l'électrolyte ou le pH à un niveau un peu inférieur à celui de la protéine d'intérêt. Les protéines insolubles dans ces conditions peuvent donc être éliminées, par exemple par centrifugation. La solution contenant les protéines non précipitées, incluant la protéine d'intérêt, est récupérée. On y ajoute une quantité d'électrolyte ou on ajuste le pH de façon à ce que cette protéine devienne insoluble. On peut alors récupérer la protéine d'intérêt qui a précipité. Cette protéine est alors débarrassée de beaucoup de protéines contaminantes. Celles qui sont moins solubles que les protéines ont été éliminées dans le premier précipité, celles qui le sont plus, sont restées dans le deuxième surnageant.

Cette approche est cependant assez grossière et ne permet pas une purification très poussée. En effet, pour s'assurer un bon rendement en protéine, on ajuste les concentrations, d'électrolytes ou le pH à des niveaux où d'autres protéines de solubilité similaire coprecipiteront. De plus plusieurs protéines peuvent avoir des solubilités relativement similaires. La précipitation différentielle est donc une des premières étapes de purification. La principale méthode de précipitation différentielle est celle qui utilise le sulfate d'ammonium. D'autres méthodes sont beaucoup moins fréquentes (thermique, pI, etc.).

Précipitation au sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄

L'électrolyte le plus employé pour la précipitation différentielle est le sulfate d'ammonium. Ce sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et compétitionne efficacement avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines pour les neutraliser. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives.

Récupération des protéines précipitées

La façon la plus courante de récupérer les protéines précipitées est la centrifugation. Une autre approche est la filtration.

Purification des protéines

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Cette méthode relativement peu spécifique s'applique bien aux grands

volumes qu'on obtient souvent en début de processus de purification. Elle permet d'enlever une bonne partie protéines dont on veut se débarrasser. Il faut toutefois faire suivre cette étape d'une dialyse ou d'une ultrafiltration pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel.

4. Aspects techniques

Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines contaminantes dans une solution contenant un mélange complexe de protéines.

Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium (SA) dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Cette quantité est celle nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de SA suffisante pour saturer cette solution à la température et au pH où on travaille. C'est pourquoi il s'agit bien du % de saturation (non pas du % de concentration en tant que tel). A cette concentration les protéines contaminantes, en fait une partie d'entre elles précipiteront sans entraîner la protéine désirée. Pour déterminer la quantité de SA à ajouter on utilise un tableau de saturation ou, plus rarement un nomogramme.

Exemple

On désire aller chercher une protéine soluble dans du SA 50% mais insoluble à 75%; cette protéine étant contenue dans une solution de 260 mL. En se servant dut tableau ci-dessous, il faudrait donc tout d'abord ajouter 29.5 g de SA par 100 mL. Cela amènerait le % de saturation de 0 à 50%. Si notre solution est de 260 mL il faudra donc ajouter 76.7 g de SA pour amener la saturation à 50%.

Tableau très simplifié de saturation du sulfate d'ammonium (0°C, pH 7)

Concentration initiale de sulfate d'ammonium (% de la saturation à 0°C et pH 7.0)	Concentration finale de sulfate d'ammonium (% de la saturation à 0°C et pH 7.0)				
	0%	25%	50%	75%	100%
	g de sulfate d'ammonium à ajouter par 100 mL de solution				
0%	0	13.6	29.5	48.3	70.7
25%		0	14.8	32.1	52.9
50%			0	16.1	35.3
75%				0	17.6
100%					0

Les valeurs sont données en termes de % de saturation, c'est-à-dire en proportion de la quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour saturer complètement une solution d'eau à pH 7.0 à 0°C (3.90 mol/L). Ce tableau est évidemment très simplifié pour des fins explicatives, les vrais tableaux donnent des valeurs à tous les 5% de saturation.

Les protéines insolubles (et non voulues) ayant précipitées par centrifugation, le sédiment contiendra les protéines indésirables et insolubles dans 50 % de SA. Le surnageant lui contiendra, entre autres, la protéine d'intérêt et des protéines contaminantes solubles dans 50% de S.A.. On reprend alors ce surnageant résultant pour en faire précipiter la protéine d'intérêt. On doit amener la concentration de SA de 50% (dans le surnageant) à 75%, le point d'insolubilité de la protéine recherchée. Pour cela, d'après le tableau des solubilités, il faudra ajouter 16.1 g de SA par 100 mL. Cela représente 41.86 g dans 260 mL. Cette addition causera la précipitation des protéines insolubles à entre 50 et 75% de saturation, incluant la protéine désirée plus d'autres protéines contaminantes insolubles dans ces conditions. En centrifugeant, le sédiment contiendra ces dernières: la protéine désirée et les contaminantes. Ce sédiment pourra être resolubilisé, puis souvent dialysé pour éliminer le SA. Ensuite on pourra procéder à d'autres procédures de purification pour éliminer les protéines contaminantes et non désirées.

