

### **PURIFICATION DES ENZYMES ET MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

#### **I. Sources des enzymes**

L'origine d'une protéine enzymatique est généralement un tissu animal, végétale ou des cellules microbiennes :

Exemples : Amylase extraite des céréales ou de la salive d'animal, Invertase extraite a partir des levures.

#### **II. Extraction et purification**

La purification des enzymes est un processus de plusieurs étapes faisant appel à des Extraction et fractionnement (purification)

##### **II.1. Méthodes d'extraction**

L'extraction a pour objectif de libéré 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 structures subcellulaire par moyens physiques ou chimiques efficaces non dénaturantes. Les tissus sont broyés peuvent être utilisés en biochimie sous forme de fragment organes.

- Utilisation d'abrasifs : agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les micro-organismes par rupture de la paroi et libration des constituants cytoplasmique.
- Homogénéisation à haute pression dans un appareil de Potter-Elvehjem
- Homogénéisation par Sonication L ou utilisation des ultrasons.
- Choc osmotique : dispersion d'une suspension de cellules réalisée dans un milieu hypertonique
- Traitement alcalin : Hydrolyse de la membrane cellulaire à un pH entre 11,5 et 12,5.
- Emplois de détergents : Exemple : le triton-x-100 permettre l'extraction d'une protéine lie à la membrane.
- Lyse enzymatique des membranes et parois cellulaires
- Extraction par des solvants organiques

**Clarification :** L'homogénat obtenu par extraction sera clarifié par **filtration ou centrifugation**

## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

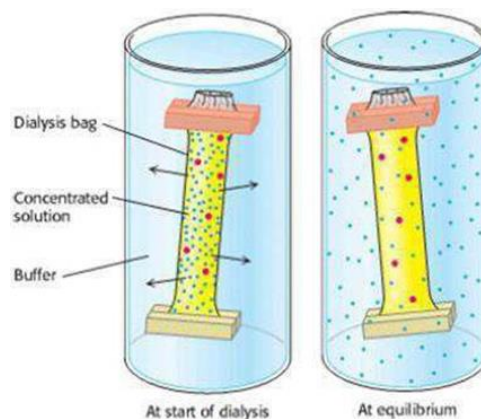
### II.2. Méthodes de purification

L'enzyme présente dans l'extrait enzymatique sera purifiée en utilisant une ou plusieurs techniques de purification successives et/ou complémentaires : précipitation, chromatographiques, fractionnement liquide-liquide.

Les propriétés caractéristiques des protéines peuvent être exploitées pour séparer un mélange de protéine selon : taille moléculaire ; solubilité et charges électriques ; affinité biologique pour d'autres molécules et différences d'adsorption caractéristiques.

NB : La purification des protéines nécessite des conditions rigoureuses, solution aqueuse avec une température entre 0°C et 4 °C, pH non dénaturant

**II.2.1. Dialyse** La dialyse est une technique qui sépare des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse (en cellophane ou autre matière) les petites molécules dans le boudin sortent du sac vers le liquide de contre-dialyse. Les membranes de dialyse sont sous forme d'un cylindre allongé qu'il faut fermer de deux extrémités et qui contient le liquide à dialyser, ce cylindre porte le nom de **boudin de dialyse**.



**II.2.2. Filtration et ultrafiltration :** Ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective permet la séparation des substances selon leur taille moléculaire, approximativement selon leur poids moléculaire. Les petites molécules sont séparées par ultrafiltration dans laquelle une réaction ou une force centrifugeuse est utilisée pour filtrer les petites molécules de soluté à travers une membrane semi-perméable qui retient les molécules protéiques.

### II.2.3. Centrifugation en gradient de densité zonal et isopycnique

La centrifugation en gradient de densité zonal constitue un procédé de séparation utile non seulement pour les protéines mais également des macromolécules (enzymes, hormones, sous-unité ribosomale) dans la plupart des techniques courantes 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 du tube. Le mélange de macromolécule est déposé à la partie supérieure du gradient, la centrifugation a grande

## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

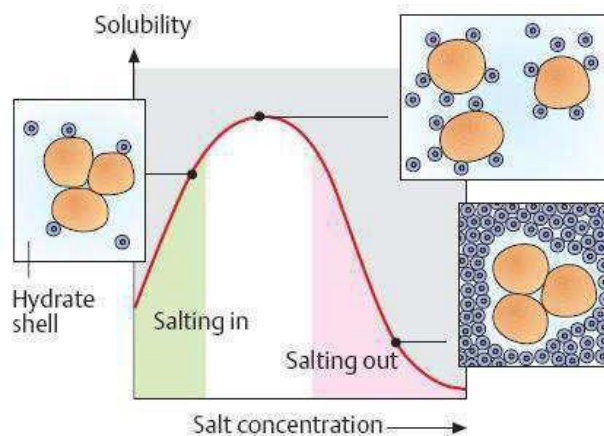
vitesse amène chaque type de macromolécule à sédimenter à sa propre vitesse déterminée essentiellement par le poids de la particule et la densité et la forme des molécules qui se traduit par des bandes séparées par des zones.

**II.2.4. Méthodes de précipitations** La solubilité des protéines en solution est fonction de plusieurs facteurs : pH, température, force ionique, propriété électrique du solvant ect... ces variables peuvent être utilisées pour séparer des mélanges protéiques.

**Précipitation isoélectrique (effet de pH) :** Le pH modifie l'ionisation des groupes de charge au pH **isoélectrique** la stabilité est minimale la charge globale nulle favorise la formation des agrégats

**Précipitation par des sels :** 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.

L'effet **salting-in** est dû à des modifications de la tendance d'ionisation des chaînes latérales dissociables sur la protéine par ailleurs lorsque la force ionique augmente la solubilité commence à diminuer, lorsque la force ionique est suffisamment élevée une protéine peut être complètement précipitée, cet effet est appelé **salting-out** ou relargage.



**Précipitation par les solvants :** l'addition du solvant organique neutre non chargé en particulier l'éthanol ou l'acétone diminue la solubilité dans de l'eau de la plupart des protéines globulaires de tel sorte qu'elles peuvent précipiter dans la solution.

## II.2.5. Méthodes chromatographiques

### Chromatographie par échange ionique

C'est une méthode utilisant le comportement acido-basique des protéines pour leur séparation par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions, cette technique exploite essentiellement les différences de signe et d'amplitude des charges électriques nettes des protéines.

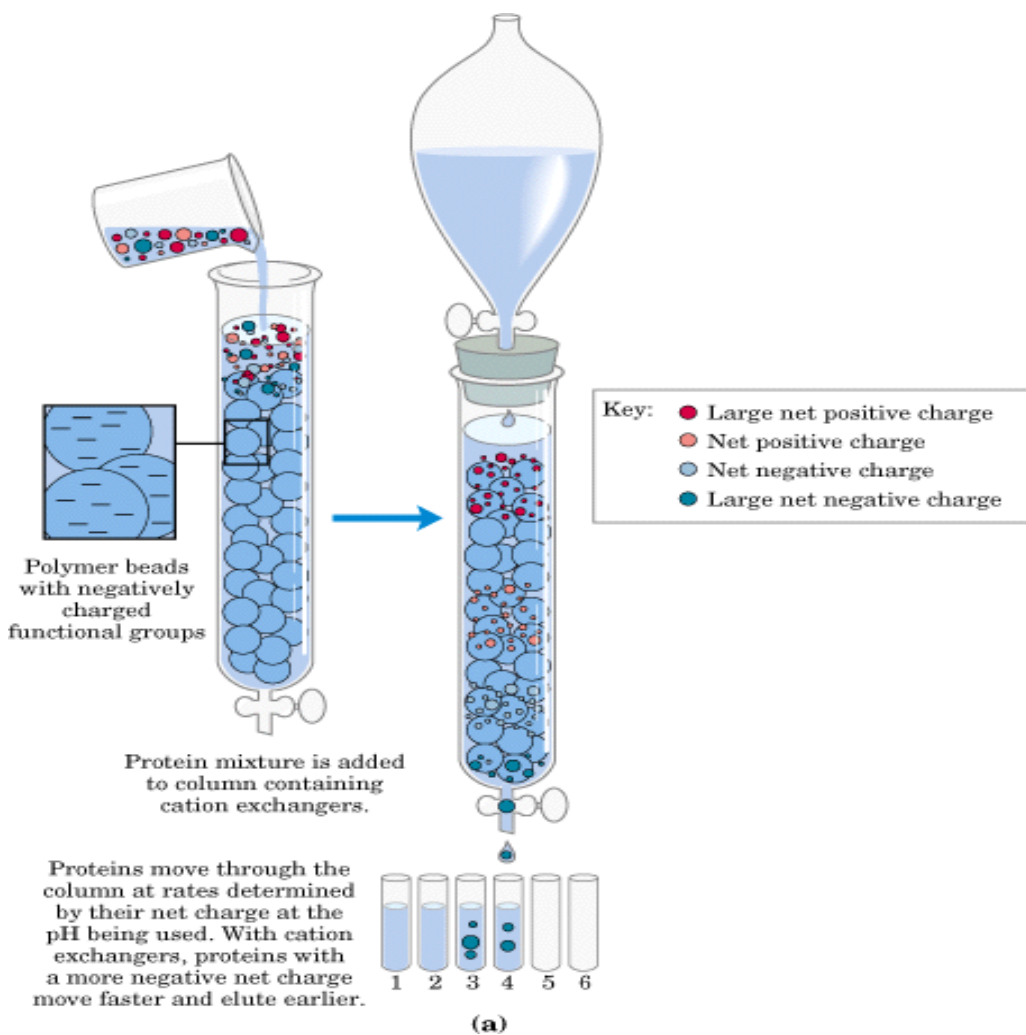
On distingue deux types d'échangeuse d'ions selon la nature de la substance qui sert de support ou

## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

groupement chimiques chargés : échangeurs cationiques et échangeurs ioniques

*Exemple échangeur d'anion* : DEAE Cellulose: di-ethylamino-ethyl cellulose cellulose-(CH<sub>2</sub>-NH=(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>) . Le DEAE cellulose contient des groupements chargés positivement en pH=7. Les protéines ayant la charge la plus négative se lie a la colonne le plus solidement et donc migrent le plus lentement, ceux ayant la charge la plus positive migrent le plus rapidement donc éluent les premières.

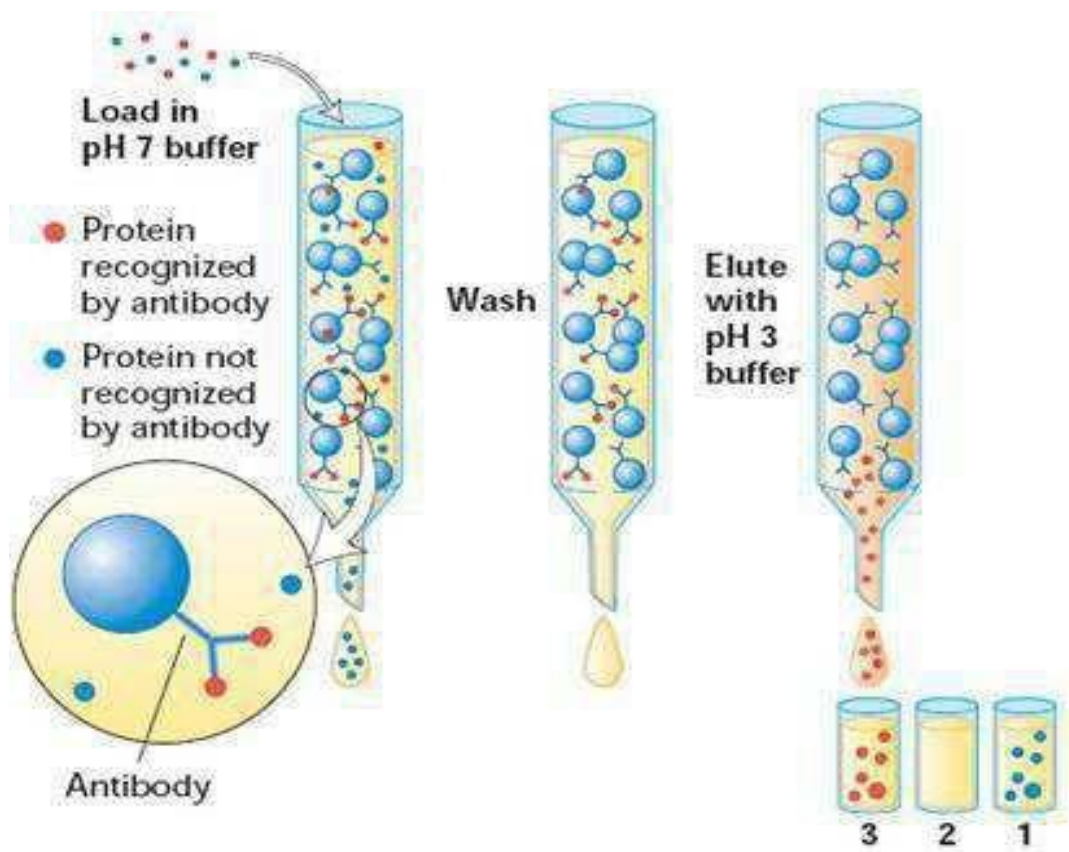
*Exemple échangeur de cations*: Carboxy-méthyl-cellulose. Il contient des groupement chargée négativement à pH = 7. Les protéines ayant la charge la plus positive se lie a la colonne le plus solidement et donc migrent le plus lentement, ceux ayant la charge la plus négatives migrent le plus rapidement donc éluent les premières.



## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

**Chromatographie d'affinité** : Procédées de séparation basée sur la spécificité du ligand

La chromatographie d'affinité repose sur des interactions spécifiques qui peuvent exister entre deux molécules exemple enzyme-inhibiteur. L'essentiel de la technique repose par la fixation par des liaisons covalentes de cet effecteur sur un support inerte introduit dans une colonne à chromatographie en faisons passer dans cette colonne la solution de protéine ayant de l'affinité pour l'effecteur. On observe la formation d'un complexe stable mais réversible, alors que les autres protéines (impureté) de la solution sortent librement de la colonne. Dans un deuxième temps on change les conditions d'élution, en dissocie le complexe effecteur-protéine et la protéine souhaité sort de la colonne de pureté préfet.



## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

### III. Analyse de la purification

La purification peut être suivie par des méthodes physico chimique tel que l'électrophorèse ou ultracentrifugation analytique, soit par des méthodes biologiques telles que la détermination de l'activité catalytique rapporté au poids de protéine (calcul de l'activité spécifique), laquelle augmente bien entendu en fonction de la purification, la quantité d'enzyme d'une solution ou un extrait tissulaire peut être mesuré par l'activité catalytique c-à-d par augmentation de la vitesse à laquelle son substrat est transformé en produit quand l'enzyme est présent.

Après chaque étape de purification on mesure l'activité de l'enzyme en (UI)\* et la quantité de protéines récupérée.

- ✓ L'activité catalytique et la quantité de la protéine totale diminuent généralement à chaque étape : L'activité enzymatique diminue à cause de l'existence de certaines pertes qui sont dues à l'inactivation ou des interactions non idéales avec les matériaux de la chromatographie ;
- ✓ Le taux des protéines totale diminue par ce que l'objectif est de retirer autant de protéine non spécifique au cours d'une étape fructueuse, la perte des protéines non spécifique est beaucoup plus grande que la perte de l'activité et donc l'activité spécifique augmente même lorsque l'activité totale diminue ;

Pour mesurer le degré de pureté après chaque étape de purification on mesure l'activité spécifique (Act sp) et le facteur de purification ou taux de purification (enrichissement) ( $\mathcal{F}$ ):

$$\text{Act sp.} = \frac{\text{Activité enzymatique (UI)}}{\text{Quantité de protéine (mg)}}$$

$$\mathcal{F} = \frac{\text{Activité spécifique de chaque étape de purification (UI/mg)}}{\text{Activité spécifique de l'étape initiale (UI/mg)}}$$

Une protéine est généralement considérée comme pure après chaque étape de purification si d'autres étapes de purification ne permettent plus d'augmenter l'activité spécifique ;

## Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

Le rendement Rd de purification, c'est le pourcentage % de récupération de l'activité enzymatique 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 :

$$\text{Rd (\%)} = \frac{\text{Activité enzymatique totale récupérée au cours de l'étape de purification (UI)}}{\text{Activité enzymatique totale initiale (UI)}}$$

### Exemple de Tableau de purification

Fraction	Volume de la fraction	Masse de protéine mg	Activité UI	Activité spécifique UI /mg	$\mathcal{F}$	Rdt %
1. extrait cellulaire brut	1400	10000	100000	10	1	100
2. précipitation	280	30000	96000	32	3,2	96
3. Chromatographie échangeuse d'ions	90	400	80000	200	20	80
4. Chromatographie d'exclusion moléculaire	80	100	60000	600	60	60
5. Chromatographie d'affinité	6	3	45000	1500	150	45

### L'activité enzymatique en UI

Par accord international, une unité d'activité enzymatique est défini comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation d'une micro molaire 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 enzymatique spécifique

L'activité spécifique est le nombre d'unité 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.

### L'activité enzymatique moléculaire

Nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme par minute :

$$\text{AEM} = \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol protéine} = \text{UI}/\mu\text{mol protéine}$$

**L'activité enzymatique en 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 général on utilise le  $\mu\text{kat}$  ( $10^{-6}$  katal).

$$1 \mu\text{kat} = 60 \text{ IU}$$