

Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

Introduction : Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

Pour étudier une protéine en détail il faut la séparer des autres protéines cellulaires, les cellules contiennent des milliers de protéines différentes, la préparation à l'état pur d'une protéine donnée est essentielle avant que ses propriétés, sa composition en acide aminé et sa séquence puissent être déterminées. La question est comment une protéine donnée peut être purifiée ?

L'origine d'une protéine est généralement un tissu animal, végétal ou des cellules microbiennes, exemple de l'amylase extraite des céréales, la même enzyme est extraite à partir de la salive d'animal, l'invertase extraite à partir des levures.

La purification des protéines est un processus de plusieurs étapes :

Extraction, Précipitation, Dialyse, Séparations par chromatographie, Électrophorèse ...

1. Méthodes d'extraction

L'extraction a pour objectif de 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 structures subcellulaires par des propriétés physiques et chimiques efficaces sans pour autant trop dénaturantes.

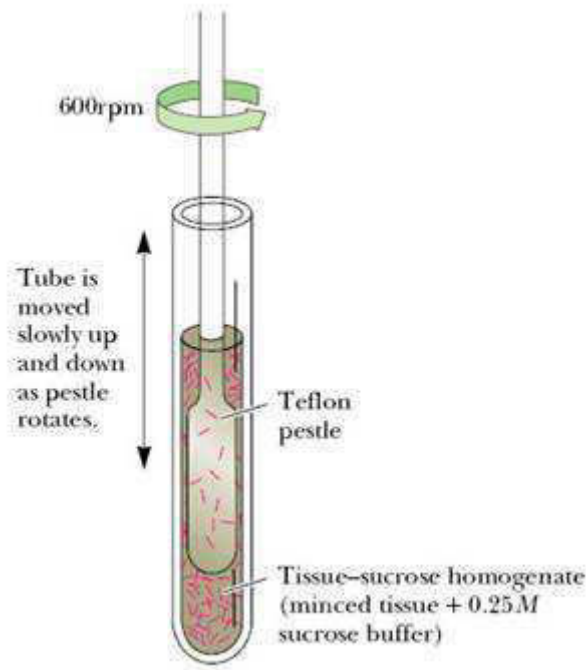
Les tissus peuvent être utilisés en biochimie sous forme de fragments d'organes, des coupes fines ou de broyat (obtenus après passage dans un broyeur type mixeur ménager).

- **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 cytoplasmiques.

- **Extraction par homogénéisation à haute pression :**

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



- **Sonication :**

Elle est liée à la mise en œuvre de l'ultrason, c'est un appareil qui propage des ondes à travers une sonde entraînant 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 et peu coûteuse, elle est applicable si l'enzyme est stable à pH alcalin, concéderiez au moins 20 à 30 minutes.

- **Emplois de détergents :**

Dans certaines conditions de pH et de force ionique, les détergents (ioniques 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.

Exemple : le Triton-X-100 permet l'extraction d'une protéine liée à la membrane.

- **Lyse enzymatique :**

Le lysozyme hydrolyse les liaisons type α (1 \rightarrow 4) de glycoprotéine (peptidoglycane) responsables de la rigidité des membranes des bactéries Gram⁺ et Gram⁻.

- **Extraction par des solvants organiques :**

Elle est peut utilisée a cause du cout du solvant, de sa toxicité et de la dénaturation des protéines

A la fi de l'extraction on est en présence d'un débris cellulaire et subcellulaire. Le milieu est débrasé de ses éléments solides par centrifugation, en obtient alors un milieu d'extraction clarifié, on appelle **extrait brute** la solution obtenu après extraction. L'homogénat ainsi obtenu et parfois utilisé directement (très rare mais très souvent les constituant subcellulaire ou organique en sont isolées, il est aussi possible les isolés par **centrifugation différentielle**, le noyau, mitochondries, ribosomes, microsomes et un surnageant.

L'homogénat est des fois le amusé pour éliminé les canicules biliaires, les vaisseaux sanguins et les tissus connectifs.

2. Méthodes de purification

Une fois que l'extrait ou la préparation de l'organite est prête certains nombre de méthodes sont disponible pour séparé les protéines

Méthodes par précipitation, méthodes chromatographiques, fractionnement liquide-liquide

La purification d'une protéine (enzyme, protéine de transport, hormone) devra mettre en œuvre plusieurs techniques successives et/ou complémentaires. Les propriétés caractéristiques des protéines peuvent être exploitées pour sépare un mélange de protéine selon :

- Leur taille moléculaire ;
- Leurs solubilité leurs charges électriques ;
- Leur affinité biologique pour d'autres molécules ;
- Leurs différences d'adsorption caractéristiques.

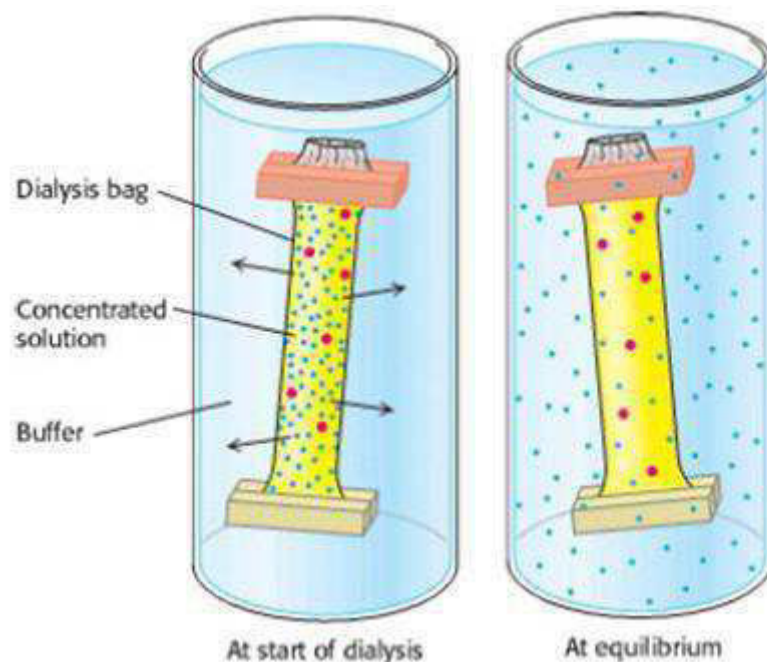
La purification des protéines nécessite des conditions rigoureuses, solution aqueuse avec une température entre 0°C et 4 °C, pH non dénaturant

2.1. Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :

- **Dialyse** La dialyse est une technique qui sépare des substances on utilisant leur capacité respective à franchir pores d'une membrane appelle membrane de dialyse (en cellophane ou autre matière) les petites molécules dans le boudin sort 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 dialysé, ce cylindre port le nom de **boudin de dialyse**.

Le dialyse set souvent appliqué pour concentré une substance protéique et pour éliminé les produits diffusible tel que les ions.



- **Filtration et ultrafiltration (figure 5)**

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.

– Centrifugation en gradient de densité

Il existe deux types : **zonal** et **isopycnique**

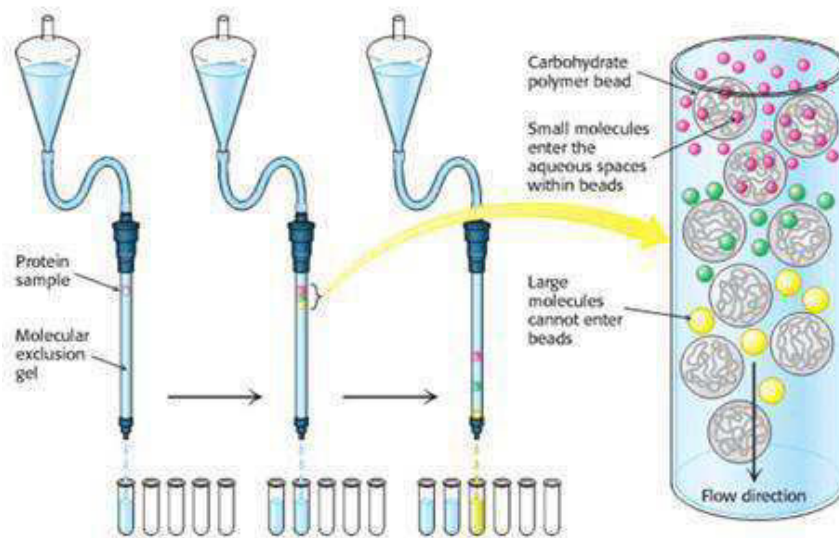
La centrifugation en gradient de densité zonal constitue un procédé de séparations utile non seulement pour les protéines mais également des macromolécules (enzymes, hormones, sous unité ribosomale) dans la plupart des technique courante un gradient de densité constitué de saccharose est d'abord préparé 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 supérieure 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.

– Chromatographie d'exclusion moléculaire (gel filtration moléculaire)

Ce type de chromatographie a pour principe de séparer les molécules en fonction de leur taille ; selon qu'elles pénètrent ou non dans les mailles du gel, les molécules dont la taille est supérieure à celle de grand pore ne peuvent y pénétrer, elles migrent dans la phase aqueuse qui entoure les grains de gel et quittent les premiers le lit du gel placé dans une colonne de chromatographie. En dit qu'elles sont exclues, les molécules plus petites pénètrent dans le gel ou elles séjournent plus au moins longtemps selon leur taille, elles quittent dans l'ordre inverse de leur masse moléculaire.

Le mélange de protéine est dissous dans un tampon convenable qui va traverser par gravité une colonne contenant des billes tassées d'un matériel inerte extrêmement hydraté et polymérique qu'il a été préparé et lavé par le même tampon.

Les gels sont sous forme de polymères linéaires de taille à peu près identiques ; les principaux gels sont Sephadex : des dextrans (polymères de glucose) Biogel A : dérivés d'agarose, Biogel P : dérivé de polyacrylamide



2.2. 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 ou pH_i la stabilité est minimale la charge globale nulle favorise la formation des agrégats

Exemple l'effet de pH et la concentration de NaCl sue la solubilité d'une protéine du lait la β -lactoglobuline

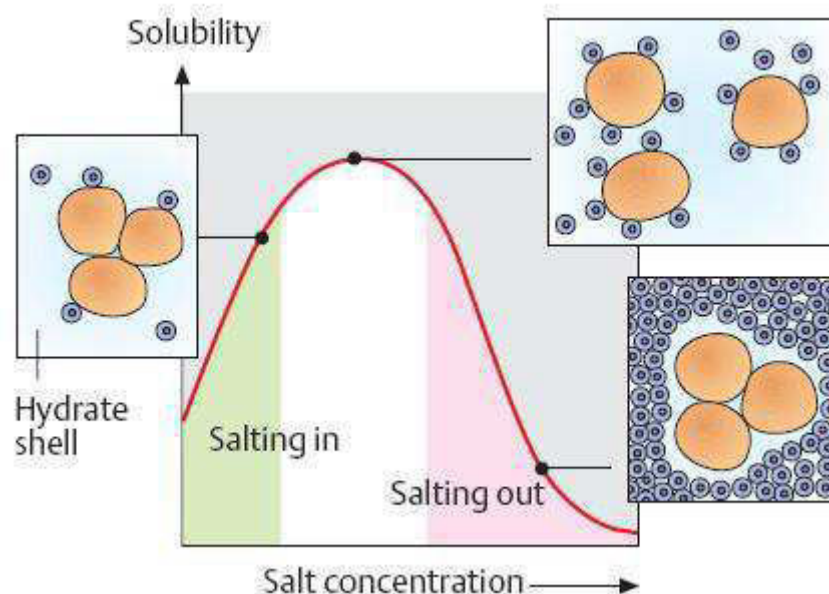
Dans cette figure la solubilité de la β -lactoglobuline est minimale a pH de 5,2 quelque soit la concentration en NaCl de part et d'autre de pH_i la solubilité augment d'une manière considérablement

pH_i isoélectrique : défini comme le pH pour lequel dans ces condition il n'existe pas de répulsion électrostatique entre les molécules protéique voisine et elle sont tendance a participé.

– La dissolution par des sels

A faible concentration les sels augment la solubilité de nombreuse protéine ; 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 fourni par les sels.

L'effet salting-in est dû a des modifications de la tendance d'ionisation des chaines latérales dissociables sur la protéine par ailleurs lorsque la force ionique augmente la solubilité commence a diminué, lorsque la force ionique est suffisamment élevé une protéine peut être complètement précipité, Cet effet est appelé **salting-out** ou relargage.



– Fractionnement par des solvants :

Chaque solvant est caractérisé par une constante diélectrique, l'addition du solvant organique neutre non chargé soluble a l'eau en particulier l'éthanol ou l'acétone diminue la solubilité dans de l'eau de la plus part des protéines globulaire de tel sort qu'elles peuvent précipitées dans la solution.

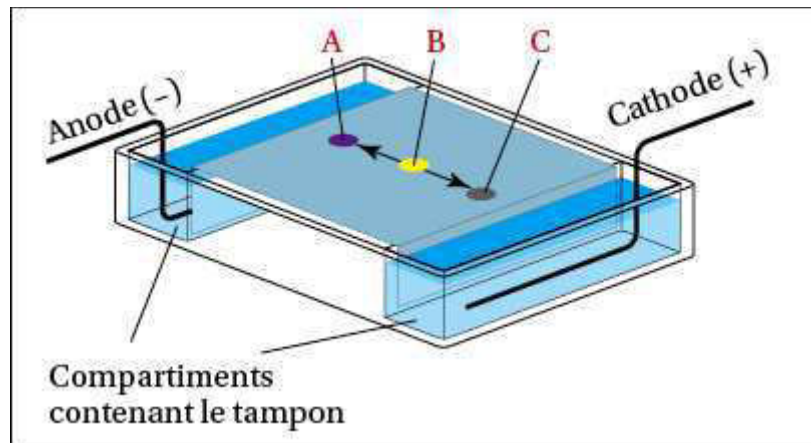
Constants diélectrique de quelque liquide à 20 °C			
eau	80	acéton	21,4
méthanol	33	benzen	2,3
éthanol	24	hexan	1,9

2.3. 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.



Les différences de migration des protéines dans un champ électrique peuvent être mises à profit pour leurs séparations.

On distingue : l'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse sur acétate de cellulose

Les composés protéiques sont séparés en zones ou en bandes. La révélation est réalisée en colorant par le noir amide ou le rouge ponceau qui se fixent sur les protéines et persiste même après lavage des appareils spéciaux (densitomètres) permettant de mesurer l'intensité de coloration de chaque bande et de déduire le pourcentage de chaque zone de migration qui est proportionnelle à la quantité des protéines dans le mélange.

– 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.

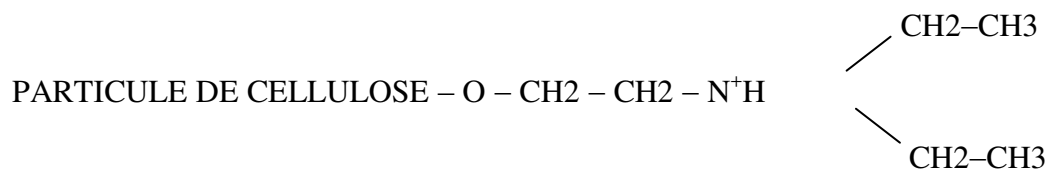
La colonne de chromatographie est formée de long tube remplis de particules synthétiques contenant des groupements fixés chargés.

On distingue deux types d'échangeuses d'ions selon la nature de la substance qui sert de support ou groupement chimique chargé

- Résines échangeuses d'ions ;
- Les échangeurs doux dérivent de cellulose, portés par les dérivés de cellulose ou autres polymères glucidiques, dans tous les cas il existe des échangeurs de cation et des échangeurs d'anion. Ceux possédant un groupement anion fixe sont appelés résines échangeuses de cations à l'inverse ceux possédant un groupement cation fixe sont appelés résines échangeuses de anions.
- Les matériaux les plus utilisés sont des dérivés de cellulose ils sont peut-être dénaturants comparés aux résines, mais par contre moins résistants aux conditions extrêmes physiques et chimiques en particulier à la pression et pH.

Exemple 01 :

DEAE : di-éthylamino-éthyl cellulose $\text{cellulose}-(\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2)$

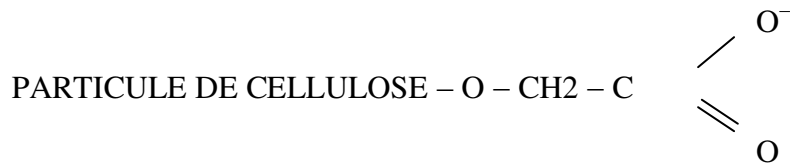


Il y a fixation de groupement polaire sur chaque sous-unité de glucose d'une cellulose spécialement traitée pour être facilement perméable

Le DEAE cellulose contient des groupements chargés positivement en pH=7 et se comporte ainsi comme échangeur d'anion.

Exemple 02 :

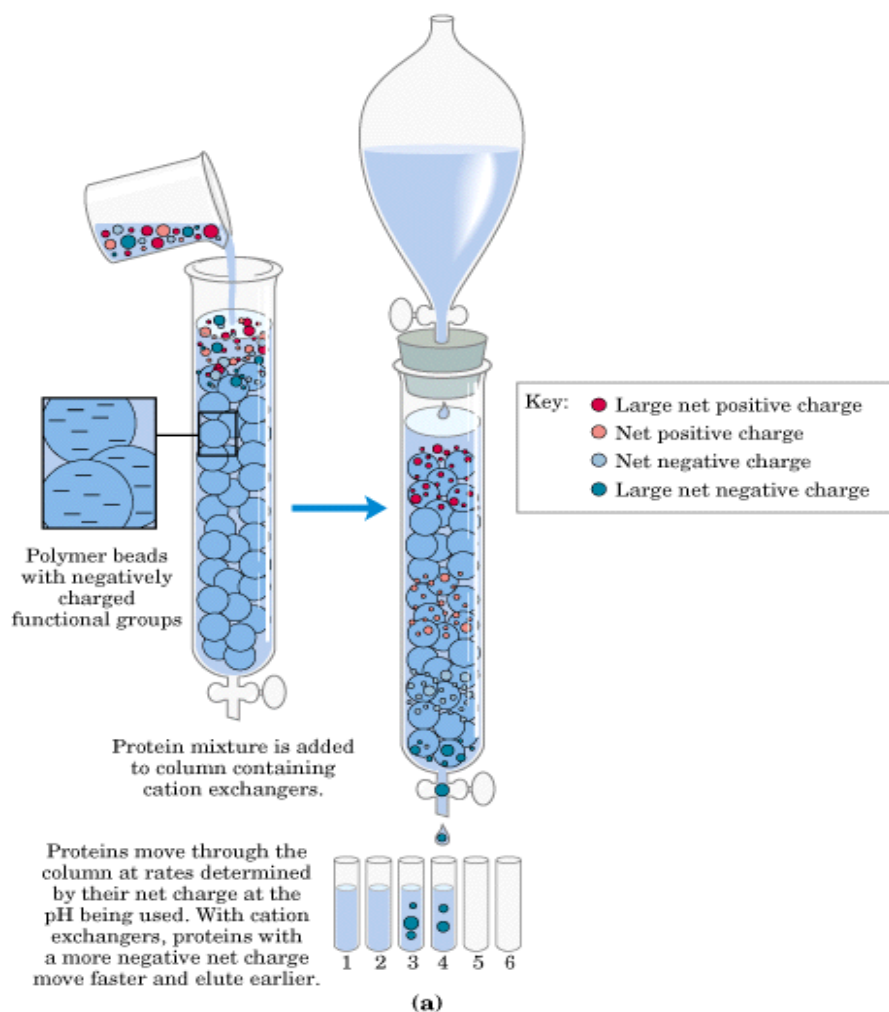
Carboxy-méthyl-cellulose



Il contient des groupement chargée négativement à pH = 7 et se comporte donc comme échangeur de cations

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.

De fraction sont collées a l'extrémité de la colonne et sont a analysée quantitativement.



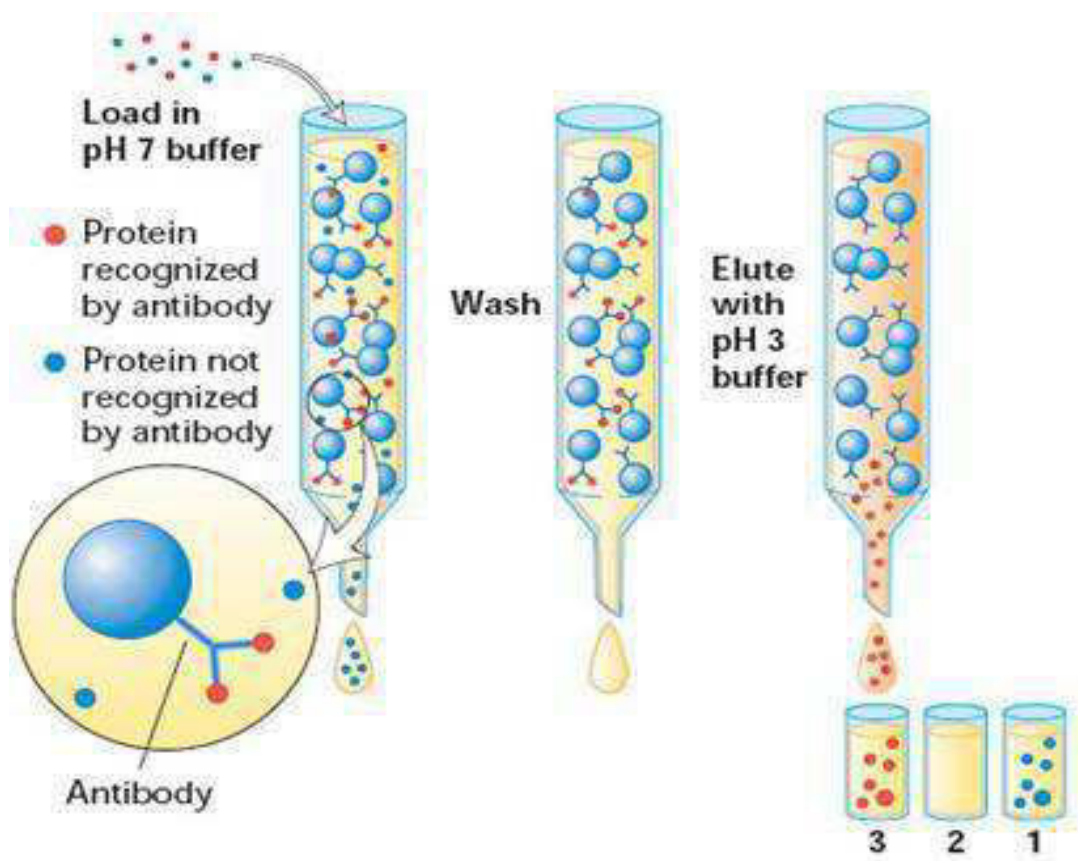
2.4. Procédées de séparation basée sur la spécificité du ligand

La chromatographie d'affinité ne tient compte ni le poids moléculaire ni de la solubilité ni de la charge électrique des protéines ni de la forme, elle 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 sorts 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

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 et à mesure 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.

De ce but il faut connaître :

- 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 est constante quand l'enzyme est pure.

Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

Tableau de purification

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

Après chaque étape de purification on mesure l'activité de l'enzyme en (UI), la quantité de protéines est déterminée indépendamment et le rapport donne l'activité spécifique

L'activité catalytique et la quantité de la protéine totale démontre généralement à chaque étape

- L'activité enzymatique diminue à cause de l'existence de certaines pertes qui est due 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 ;

Purification des enzymes et mesure de l'activité enzymatique

- 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

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

