



Mécanisme moléculaire et application des enzymes

Chapitre 2: Purification et caractérisation des enzymes

Responsable: Mme Benmansour M.

Plan du cours

Introduction

Méthodes d'extraction

Fractionnement

Méthodes de purification

Détermination de l'activité enzymatique

Introduction

Pour étudier une protéine (enzyme) en détail, il faut la séparer des autres protéines cellulaires. Les cellules contiennent des milliers de protéines différentes, la préparation à l'état pure d'une protéine est essentielle avant que ses propriétés, sa composition en acides aminés et sa séquence puissent être déterminées.



Question: Comment une protéine (enzyme) peut-elle être purifiée?

Végétal



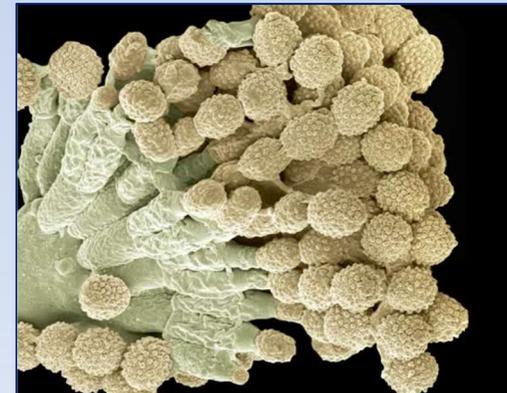
amylase

Animal

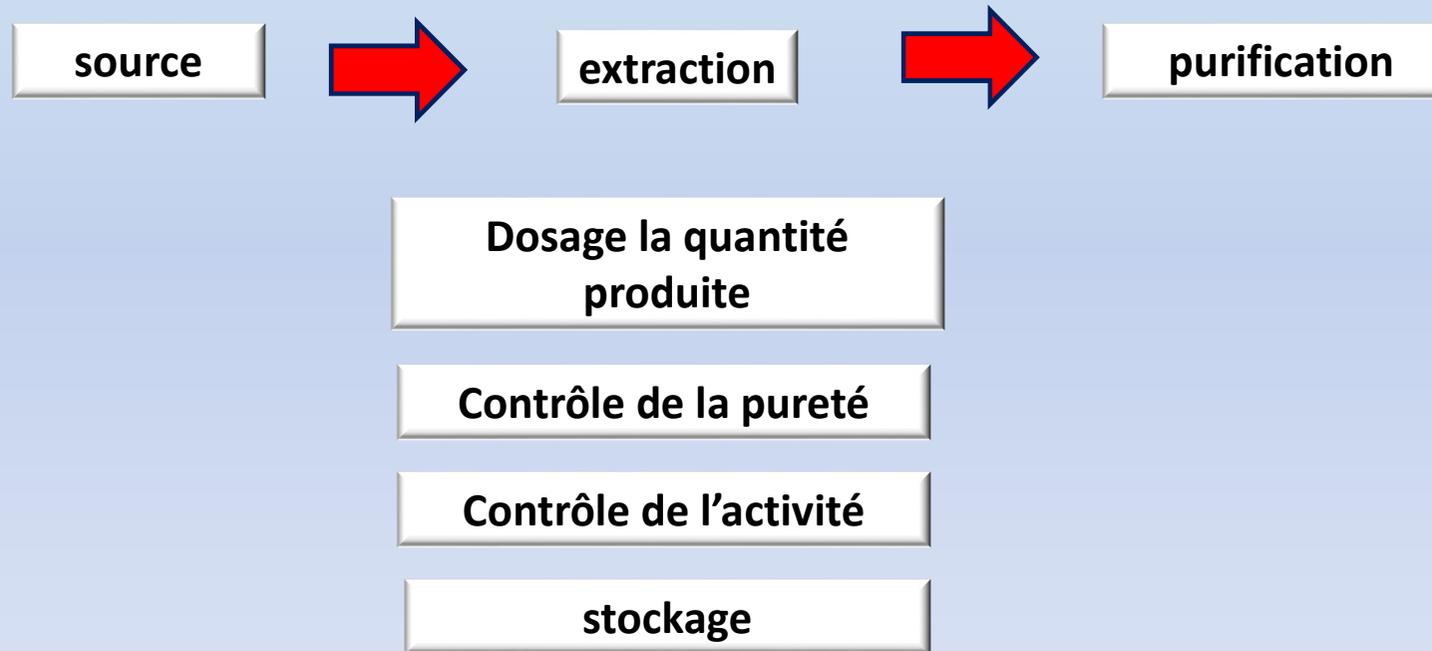


chymosine

microorganisme



enzyme



Méthodes d'extraction

L'objectif de l'extraction est de **libérer** les enzymes des cellules ou structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent

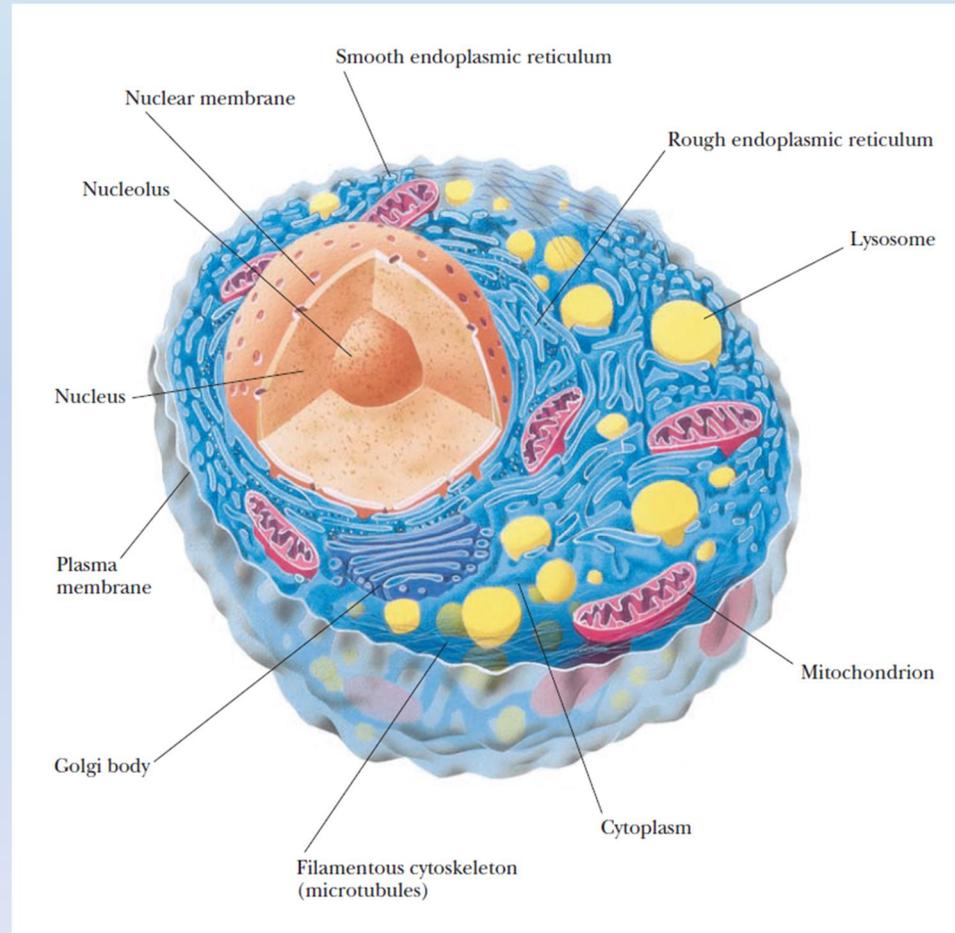


Destruction :

- la paroi,
- la membrane plasmique
- les structures subcellulaires



- Moyens physiques ou chimiques efficaces
- non dénaturants.
- extraction à froid, en présence de substances protégeant l'activité enzymatique.



Cellule animal

Méthodes d'extraction

1-Utilisation d'abrasifs

L'agitation violente en présence de microbilles de verre (broyage avec des abrasifs) désintègre les microorganismes par rupture de la paroi et libération des constituants cytoplasmiques.

2-Extraction par homogénéisation à haute pression

C'est le cas de l'appareil de **Potter** (figure).

A l'échelle industrielle, on utilise des appareils appelés « **homogénéisateurs** » basée sur le même principe de l'appareil de **Potter**.

3-Choc osmotique

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

4-Traitement alcalin

Le traitement alcalin hydrolyse la membrane (entre pH 11,5 et 12,5).

Cette technique est très douce et ne dénature pas les protéines..

Elle n'est applicable que si l'enzyme est stable au pH alcalin considéré au moins pendant 20 à 30 min.

Méthodes d'extraction

5-Emploi de détergents

Dans certaines conditions de pH, force ionique et température, les détergents (ioniques ou non) se combinent aux lipoprotéines formant ainsi des micelles rendant la membrane perméable.

Exemple: **Triton X100** permet d'extraire une enzyme liée à la membrane.

6-Lyse enzymatique

Le lysozyme hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques des peptidoglycanes responsables de la rigidité des bactéries Gram⁺ et Gram⁻

7-Sonication (Ultra-sons)

C'est un appareil qui propage des ondes à travers une sonde entraînant des vibrations.

8-Solvants organiques:

C'est une technique qui est peu utilisée à cause du coût du solvant, de sa toxicité, de la dénaturation des protéines.

9-Congélation et décongélation

Une fois les cellules brisées, le lysat obtenu peut être filtré ou centrifugé afin d'enlever les particules ou débris cellulaires, laissant ainsi la protéine d'intérêt dans le surnageant de la solution

Fractionnement

Il est possible d'isoler par **centrifugation différentielle** sur gradient continu ou discontinu: les noyaux, mitochondries, microsomes , ribosome, lysosomes et un surnageant cellulaire.

Exemple: extraction d'enzymes des cellules hépatiques

Étapes préliminaires:

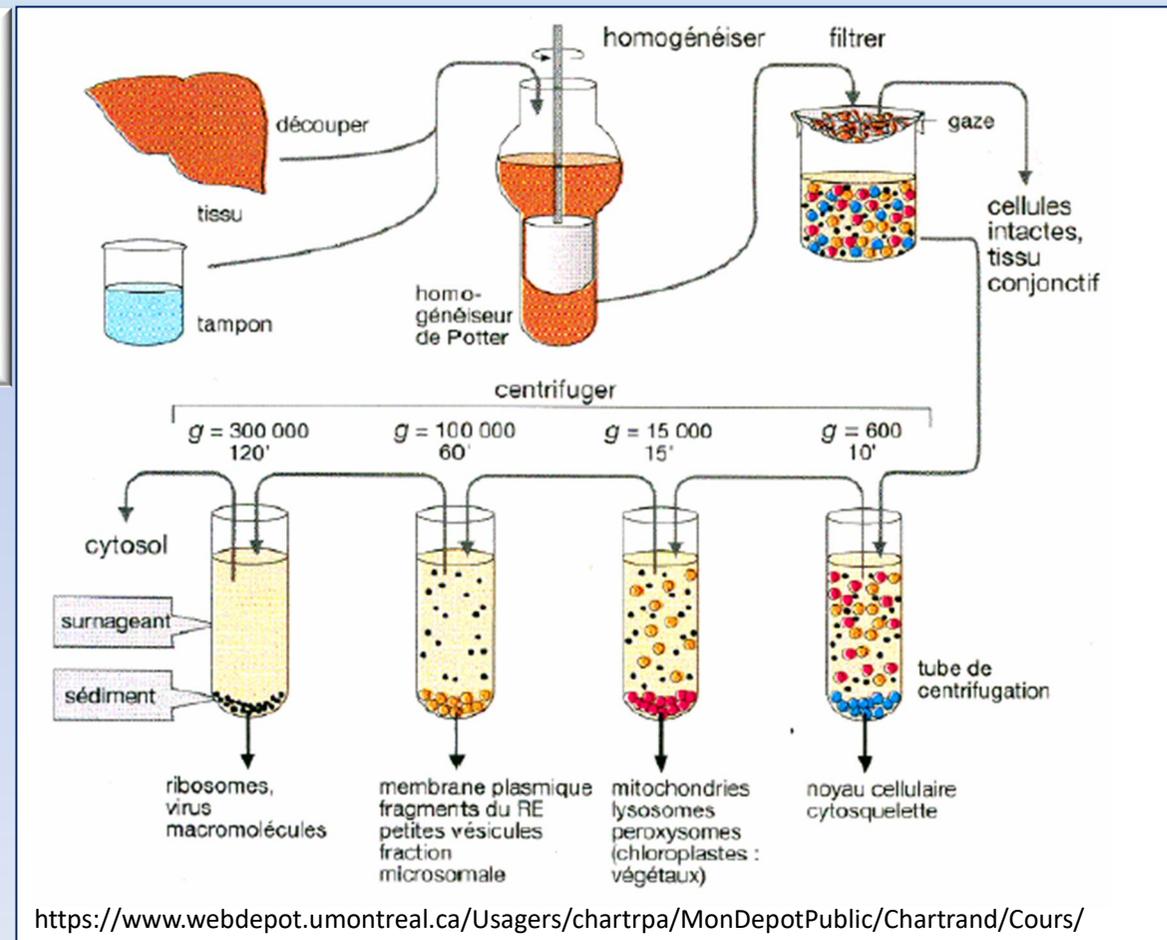
Les tissus peuvent être utilisés en biochimie sous forme de **fragments** d'organes, de **coupes fines**, de **broyat** (obtenu après passage dans un broyeur type mixer ménager) ou d'**homogénat** obtenu après passage dans un appareil de Potter.

 la solution obtenu est appelé **extrait brut**

Fractionnement

Si la protéine d'intérêt est présente dans un organelle (mitochondrie, chloroplaste...) ou dans une membrane, la centrifugation différentielle permettra d'enrichir cette composante cellulaire

L'homogénat ainsi obtenu est parfois utilisé directement, mais très souvent les constituants subcellulaires ou organites en sont isolés .



Fractionnement

Stabilisation des protéines lors de leur purification

L'intégrité structurale des protéines et leur stabilité dépendent de plusieurs facteurs:

- **pH**

L'utilisation 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.

- **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 des températures de -20 à -80°C

- **Protéases**

- les cellules contiennent des protéases (enzymes qui hydrolysent les liens peptidiques)
- ces protéases sont libérées lors de la lyse cellulaires et peuvent dégrader les protéines lors de la purification
- l'ajout d'inhibiteurs de protéases permet d'empêcher cette dégradation

Méthodes de purification

- 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 séparer un mélange de protéines selon:
 1. **taille moléculaire**
 2. **Solubilité**
 3. **charge électrique**
 4. **affinité biologique**

1-Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire

Dialyse

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacités respectives à franchir les pores d'une membrane appelée **membrane de dialyse**.

Application de la dialyse:

- Eliminer les produits diffusibles, exemple : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ contenu dans les solutions protéiques.
- Équilibrer une solution protéique avec un tampon qui modifie le pH de la solution protéique.
- Concentrer une solution protéique en plaçant le boudin dans du polyéthylène glycol en poudre. (eau quitte le boudin pour solubiliser le polyéthylène glycol, qui, non diffusible, ne pénètre pas dans la solution protéique.

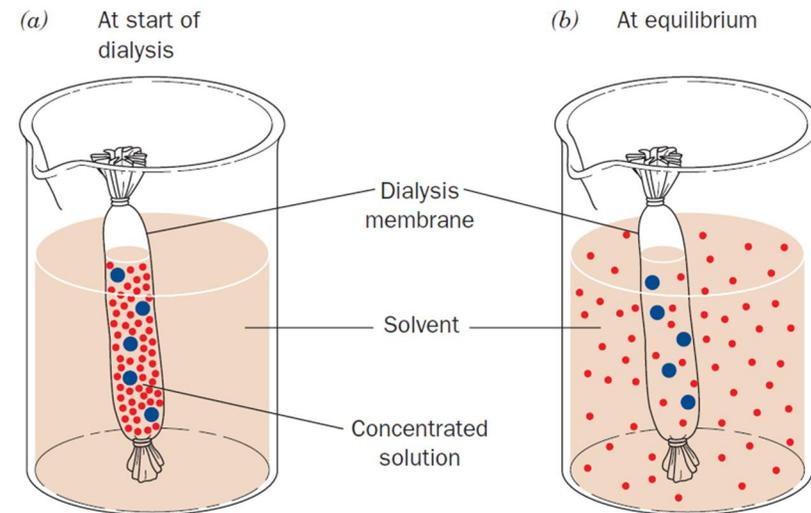


Figure 6-11 Use of dialysis to separate small and large molecules. (a) Only small molecules can diffuse through the pores in the bag, which is shown here as a tube knotted at both ends. (b) At equilibrium, the concentrations of small molecules are nearly the same inside and outside the bag, whereas the macromolecules remain in the bag.

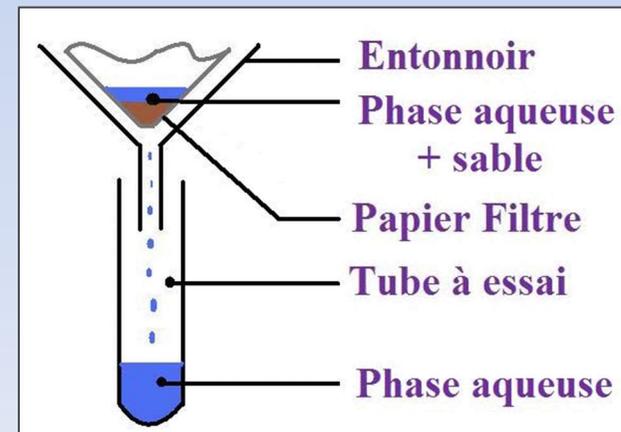
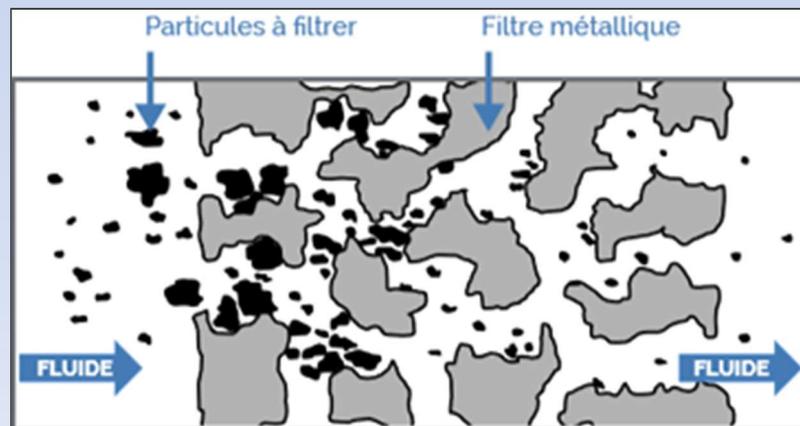
1-Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire

b-Filtration et ultrafiltration

❖ **Filtres en profondeur:** sont constituées de substances fibreuses (amiante, cellulose, coton, fibre de verre,...) ou de substances agglomérées (sable, charbon)

❖ **Filtres écrans:** retiennent à leur surface toutes les particules dont la taille est supérieur à celle des pores du filtre.

L'**ultrafiltration** sur membrane à perméabilité sélective permet la séparation de substances selon leur taille moléculaire, donc selon leur poids moléculaire; les membranes jouent le rôle de filtres-écrans.



1-Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire

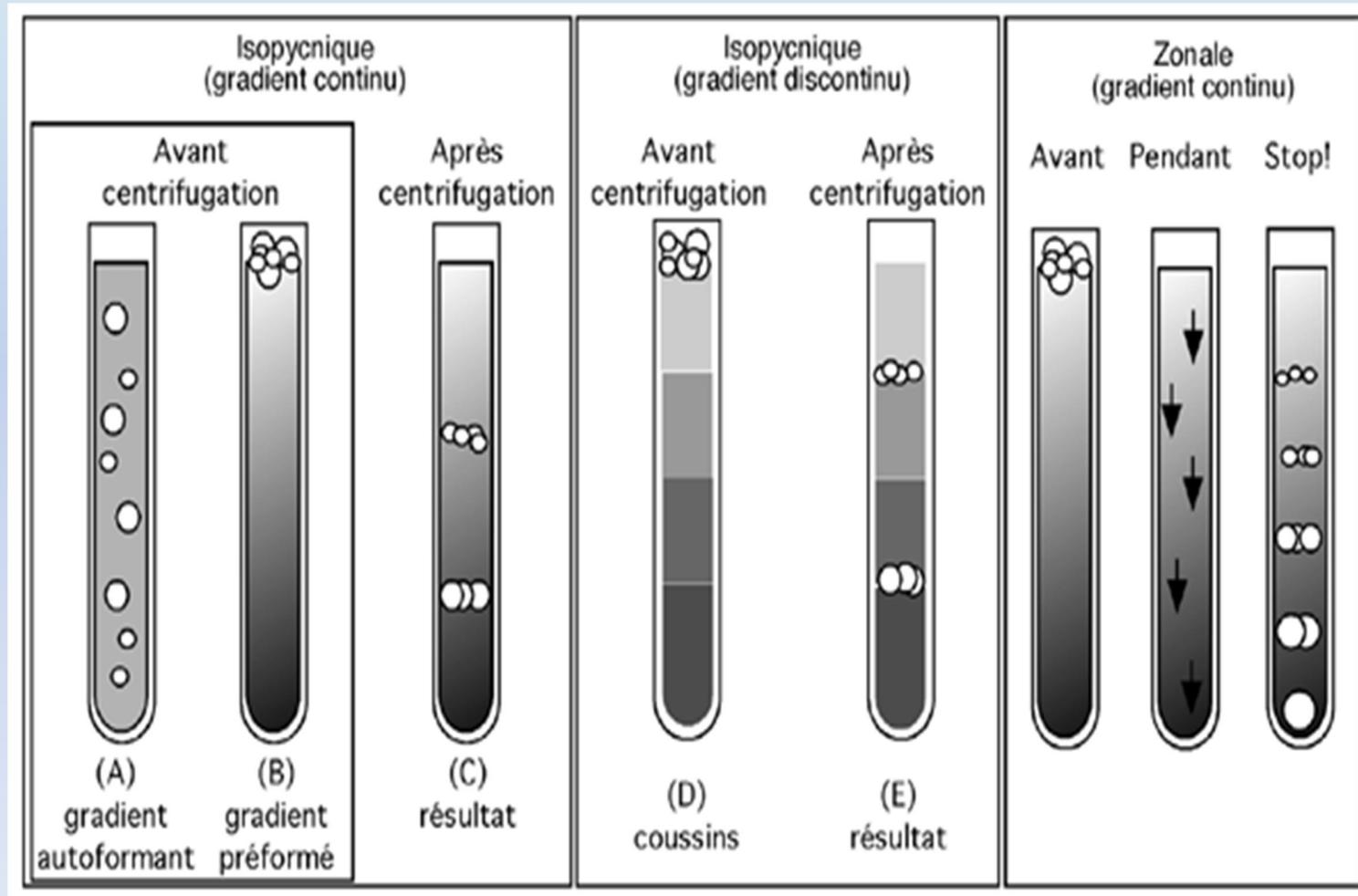
c-Centrifugation en gradient de densité: Il existe deux types: **zone** et **isopycnique**.

La centrifugation zonale sépare les macromolécules suivant leurs coefficients de sédimentation. Elle consiste à déposer une solution contenant les particules à séparer sur une colonne liquide constituant un gradient de densité. Sous l'effet de la force centrifuge, les particules d'une même espèce ayant la même vitesse de sédimentation se regroupent en zones séparées.

La centrifugation isopycnique consiste à utiliser un gradient de densité recouvrant les densités des différentes particules. Après un certain temps de centrifugation, celles-ci se rassemblent à un point où leur densité est égale à celle du milieu de sédimentation (position isopycnique).

1-Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire

c-Centrifugation en gradient de densité: Il existe deux types: **zone** et **isopycnique**.



1-Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire

d-Chromatographie d'exclusion moléculaire (gel filtration moléculaire)

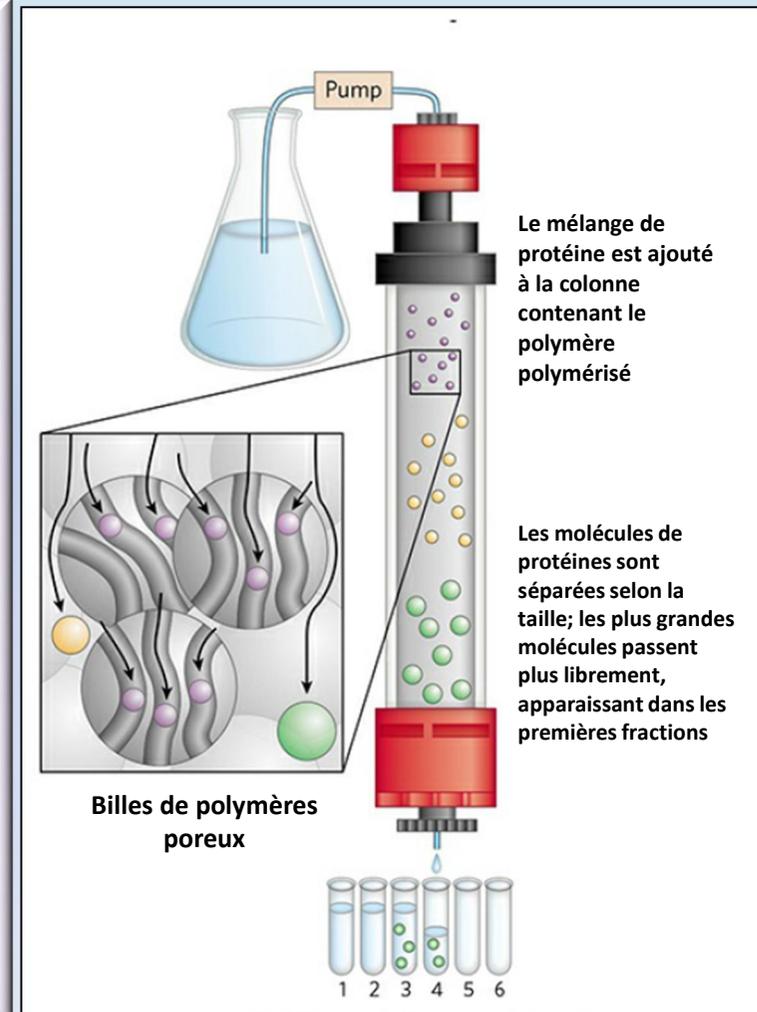
Ce type de chromatographie sépare les molécules en fonction de leur taille selon qu'elles pénètrent ou non dans les mailles du gel. Les molécules dont la taille est supérieure à celles des plus gros pores ne peuvent y pénétrer. Elles migrent dans la phase aqueuse qui entoure les grains du gel et quittent les premières le lit du gel dans une colonne de chromatographie. On dit qu'elles sont **exclues**.

Les gels utilisés généralement sont formés de polymères linéaires:

gel de Séphadex (polymères de glucose)

Biogel P (dérivé de polyacrylamide)

Biogel A (dérivé d'Agarose)

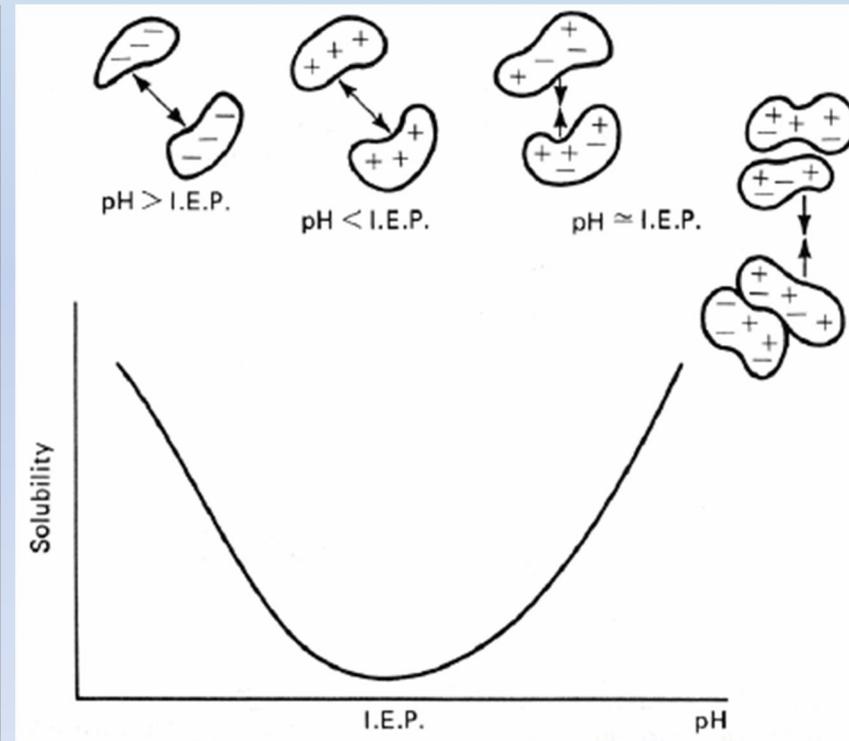


2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

La solubilité des protéines en solution est fonction du **pH**, la **force ionique**, les **propriétés électriques** du solvant, la **température**.

a-précipitation isoélectrique (effet du pH)

Au **pHi**, la solubilité est minimale: la charge globale des protéines est nulle; en limitant les répulsions électrostatiques, favorisant la formation d'**agrégats** (force ionique et pH s'additionnent).

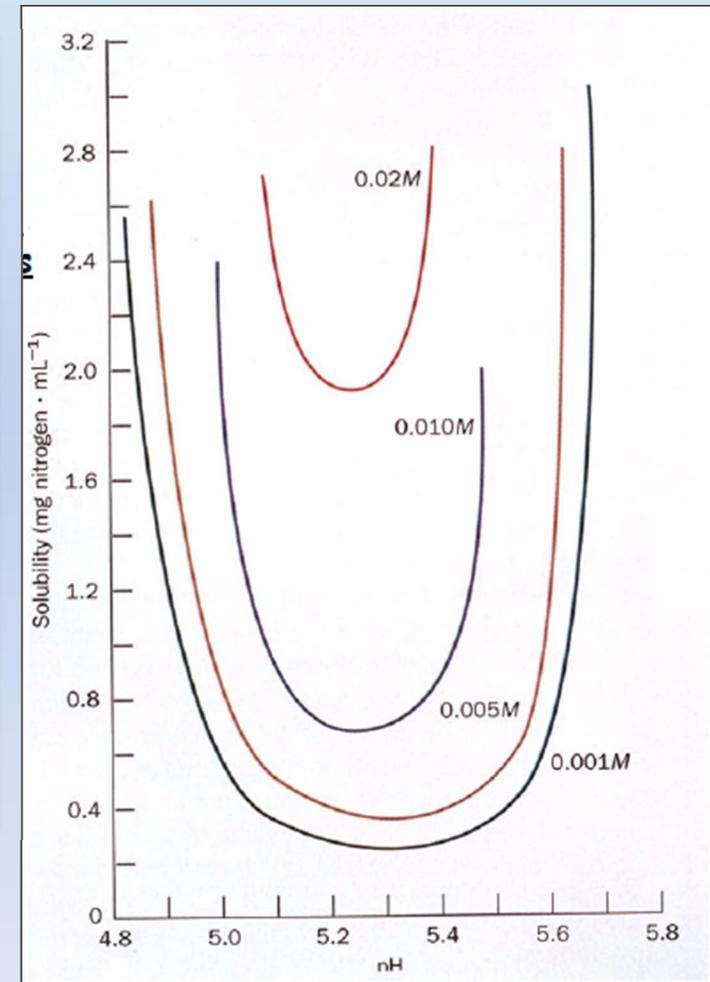


Solubilité d'une protéine globulaire près de son point isoélectrique (IEP)

2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

- ❖ La solubilité de **β -lactoglobuline** est au minimum pour un pH proche de son **$pI = 5,2$** (**point isoélectrique**) dans des solutions de NaCl diluées, et qu'elle augmente de façon plus au moins symétrique de part et d'autre de son **pI** .
- ❖ La solubilité d'une protéine en fonction du pH atteindra un minimum au **pI** de la protéine et augmentera lorsque le pH s'écarte du **pI**

Solubilité de la β -lactoglobuline en fonction du pH à différentes concentrations de NaCl



2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

b-Précipitation par les sels

La solubilité d'une protéine en solution aqueuse est fonction de la concentration en sels dissous.

La concentration en sels est exprimée par la **force ionique I** :

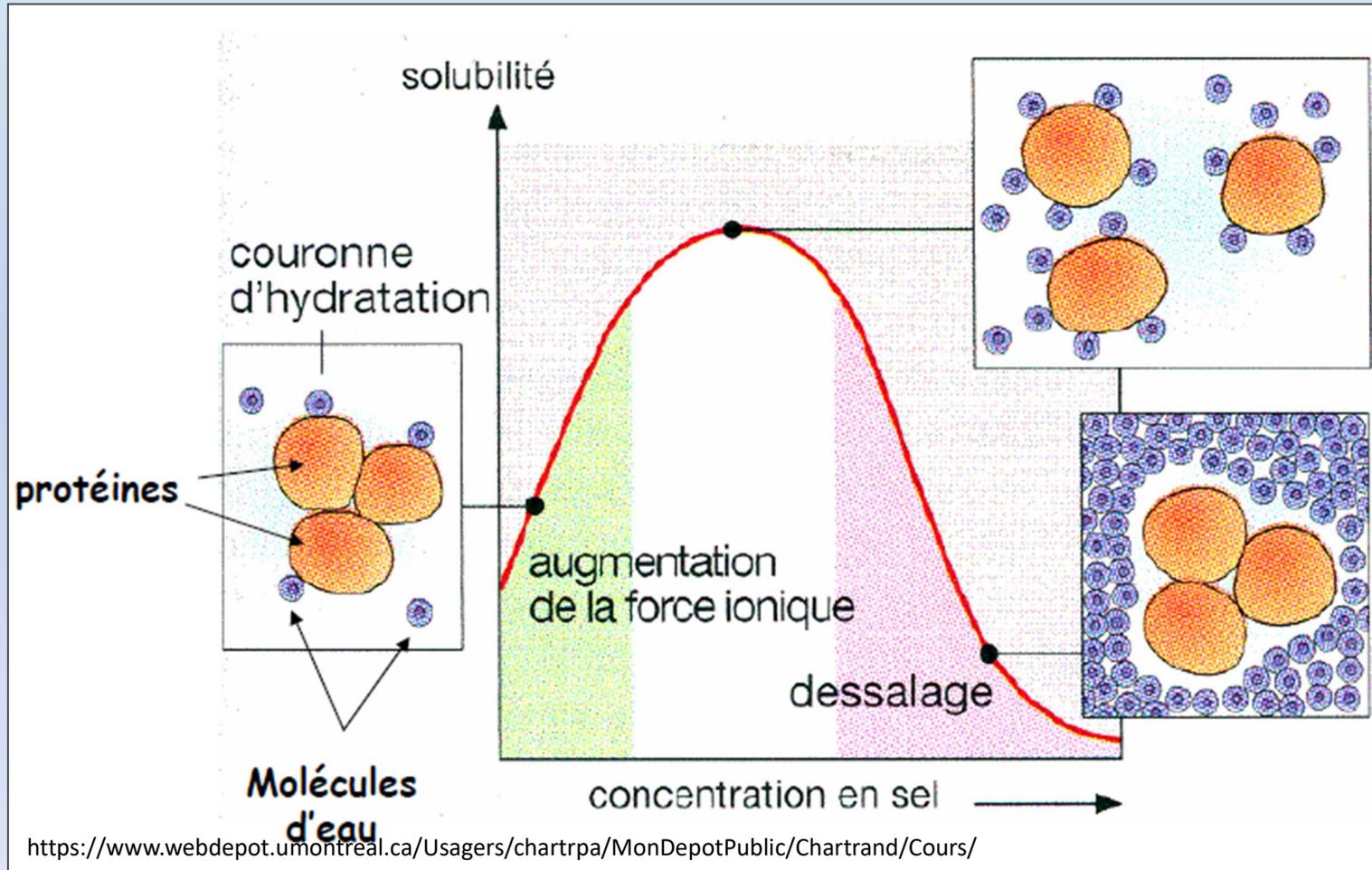
$$I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$$

C_i : concentration molaire des différentes espèces
 Z_i : charge ionique des espèces

- Les sels neutres ont une action contradictoire sur la solubilité aqueuse (**S**) des protéines.
 - **A faibles force ionique**, ils réduisent les liaisons électrostatiques et favorisent l'hydratation des groupes polaires: leur effet est **dissolvant (salting-in)**.
 - **A force ionique élevée**, ils fixent l'eau aux dépend de la surface protéique: ils ont un effet insolubilisant, on parle de **relargage (salting-out)**.
- Les sels utilisés sont:
 - sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,**
 - sulfate de sodium (Na_2SO_4) .**

2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

Résumé du phénomène de dessalage

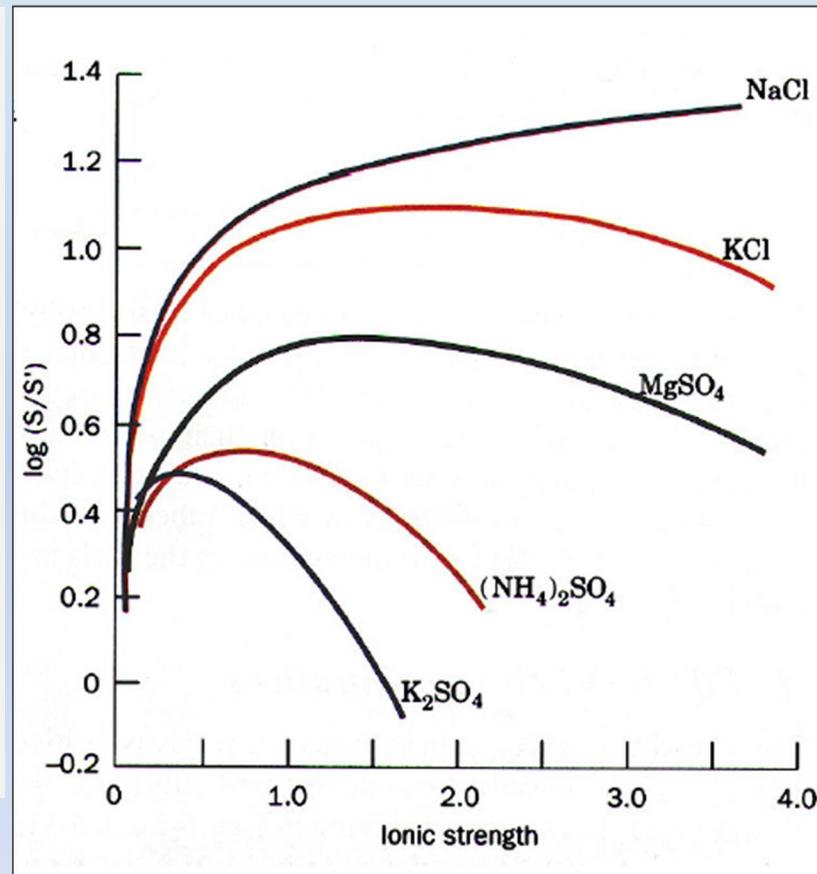


2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

La solubilité des protéines:

La solubilisation d'une macromolécule protéique dans l'eau est un phénomène complexe dans lequel interviennent:

- ❖ la géométrie de la molécule (masse, taille, forme)
- ❖ les interactions de faible énergie des molécules entre elles (attractions ou répulsions électrostatiques), et de la surface protéique avec le solvant.



Solubilité de la carboxyhémoglobine en fonction de la force ionique et de la nature des ions

2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

c-fractionnement par des solvants

▪ Chaque solvant est caractérisé par une **constante diélectrique**. L'addition d'un solvant organique neutre (non chargée) miscible à l'eau en particulier le **méthanol**, l'**éthanol**, le **butanol** et l'**acétone** diminue la solubilité dans l'eau de la plupart des protéines globulaires de tel sorte qu'elles peuvent précipiter dans la solution (risque de dénaturation).

▪ Le pouvoir de l'eau de solubiliser une macromolécule chargée décroît avec la concentration du solvant organique dans la solution

➤ ceci serait attribuable à une réduction de la constante diélectrique de l'eau

▪ **Constante diélectrique:** pouvoir de solvation de l'eau pour des ions dissous (comme les protéines).

▪ Exemple: **DMSO (diméthyl sulfoxyde)**
DMF (N,N-diméthyl formamide)

2-Procédés de séparation basés sur les différences de solubilité

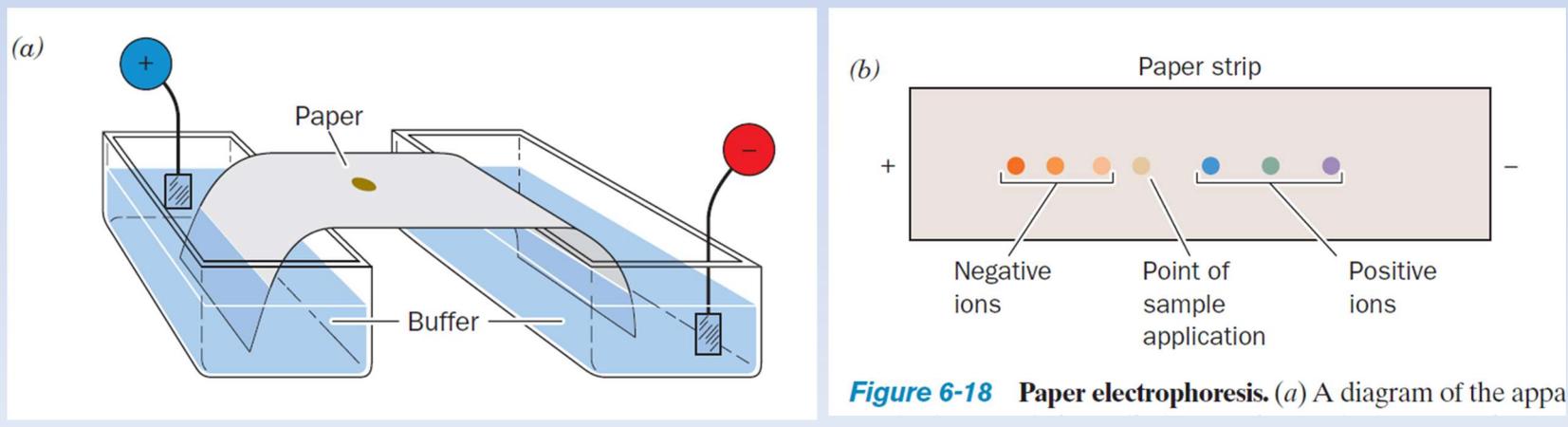
d-température

- Une élévation de la température affaiblit les forces d'interactions dipolaires (liaison hydrogène; interactions électrostatiques) , mais favorise la formation d'interactions hydrophobes responsables du phénomène de précipitation.
- Les procédés de fractionnement des protéines sont habituellement effectués à 0°C ou à des températures plus basses puisque la plupart des protéines sont stables à basse température.

3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

a-électrophorèse en zone: méthodes électrophorétiques

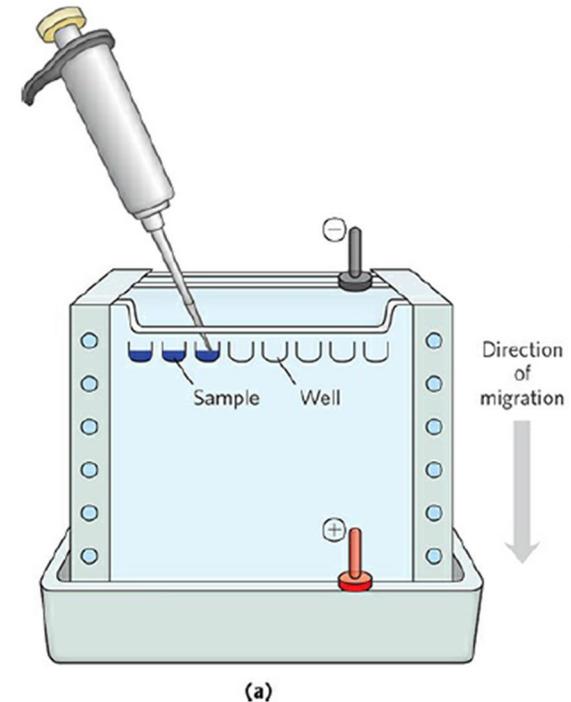
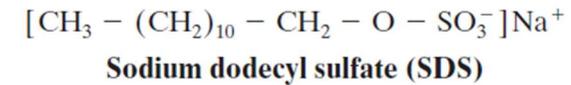
- Principe: c'est le déplacement de particules chargées dans un champ électrique continu.
- Le déplacement de la particule dépend de plusieurs facteurs: temps de migration, force ionique du tampon, température, courant électrique, forces de freinage, pH du tampon.
- Électrophorèse sur **papier**
- Électrophorèse sur **acétate de cellulose** (plus rapide 30 à 120 min/voltage élevé). Elle est spécifique pour la séparation des protéines.
- Électrophorèse **en gel**: sépare les protéines à la fois selon leur mobilité électrophorétique et de la filtration sur gel. Les gels utilisés **polyacrylamide** et **agarose**.



3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

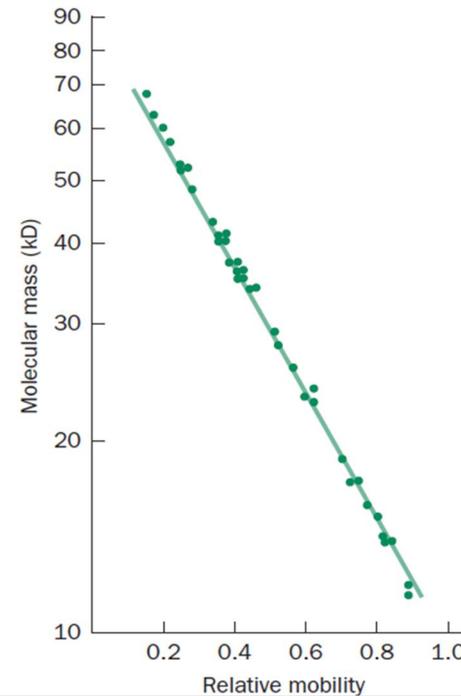
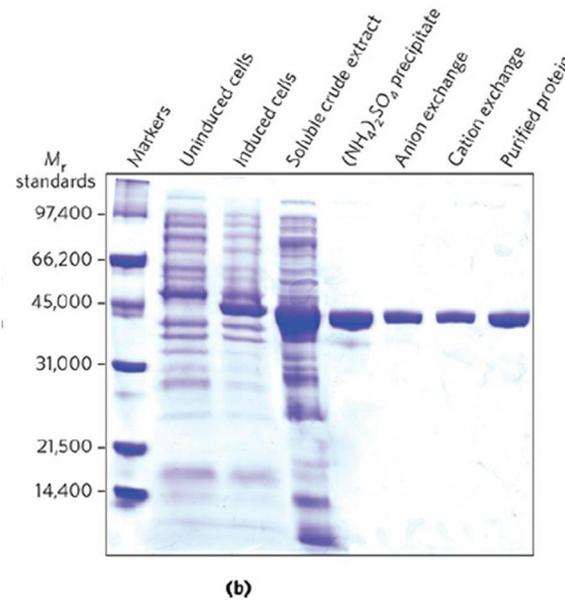
SDS PAGE: Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions dénaturantes

- Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) un détergent se lie très fortement aux protéines en leur conférant une forme de **bâtonnet**.
- La plupart des protéines se lient au SDS dans le même rapport: **1.4 g de SDS/g de protéine** (environ une molécule de SDS pour deux résidus d'aa).
- La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines, toutes les protéines ont tendance à avoir des rapports charge/masse identiques et des formes semblables.



3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

- La **SDS-PAGE** séparent les protéines en fonction de leur masse moléculaire, par effet de filtration sur gel.
- La **SDS-PAGE** permet de déterminer la MM des protéines « normales » avec une précision de l'ordre de 5 à 10%
- Les mobilités relatives des protéines dans de tels gels varient de façon linéaire avec le logarithme de leur masse moléculaire



Relation logarithmique entre la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique relative en SDS-PAGE

3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

b-chromatographie par échange ionique

- Principe: elle est basée sur la formation de « **liaisons ioniques** »: le support ou échangeurs d'ions, est constitué de volumineuses molécules insolubles, hérissées de charges électriques toutes de même signe.

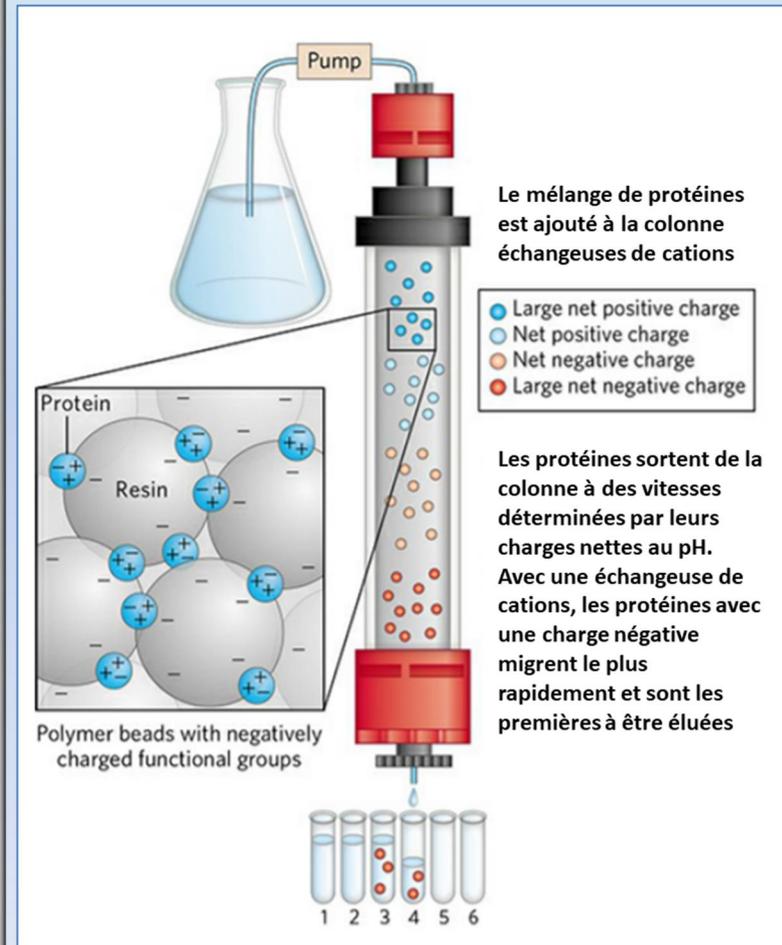
- méthode utilisant le **comportement acido-basique** des protéines pour leur séparation.

- technique qui exploite essentiellement les différences des signes et d'amplitudes des charges électriques nettes des protéines

- 2 types d'échangeurs:

résines échangeuses de cations

résines échangeuses d'anions



3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

b-chromatographie par échange ionique

Tableau 6-2 Quelques échangeurs d'ions utilisés en biochimie

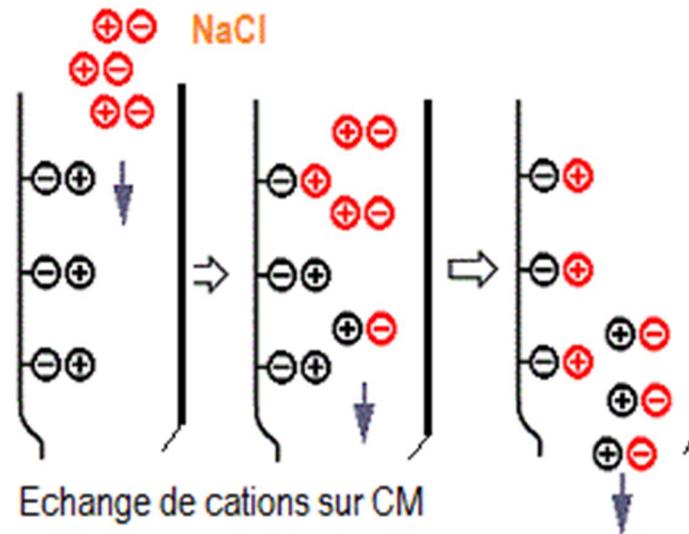
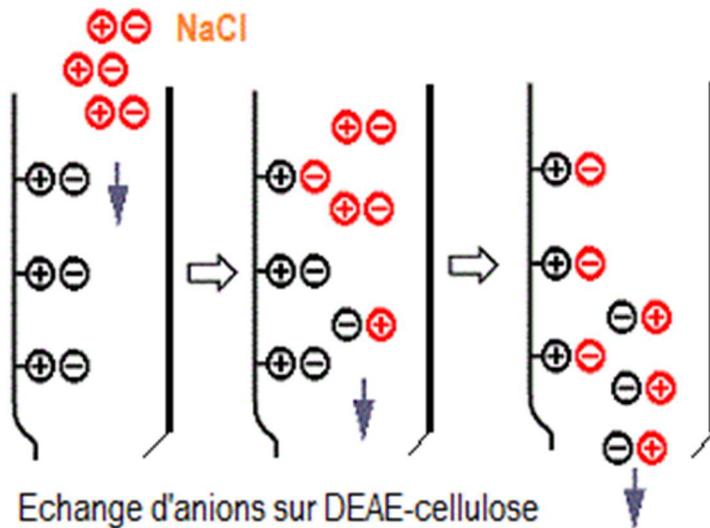
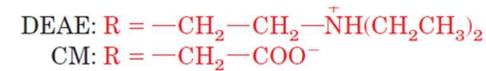
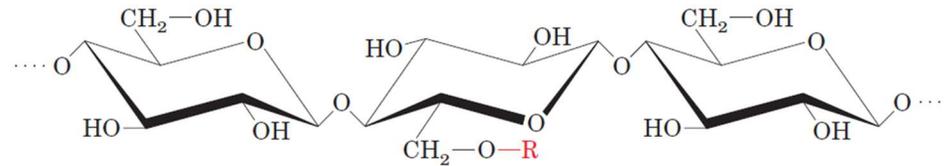
Name ^a	Type	Ionizable Group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO ₃ H ₂	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid —COOH	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sepharose	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate —CH ₂ SO ₃ H	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins

^aSephadex and Sepharose are products of GE Healthcare; Bio-Rex resins are products of BioRad Laboratories.

3-Procédés de séparation basés sur la charge électrique

b-chromatographie par échange ionique

- Les échangeurs cellulosiques sont parmi les plus utilisés pour séparer les molécules biologiques
- La cellulose préparée à partir du bois ou du coton, est légèrement modifiée par l'adjonction de groupes ioniques

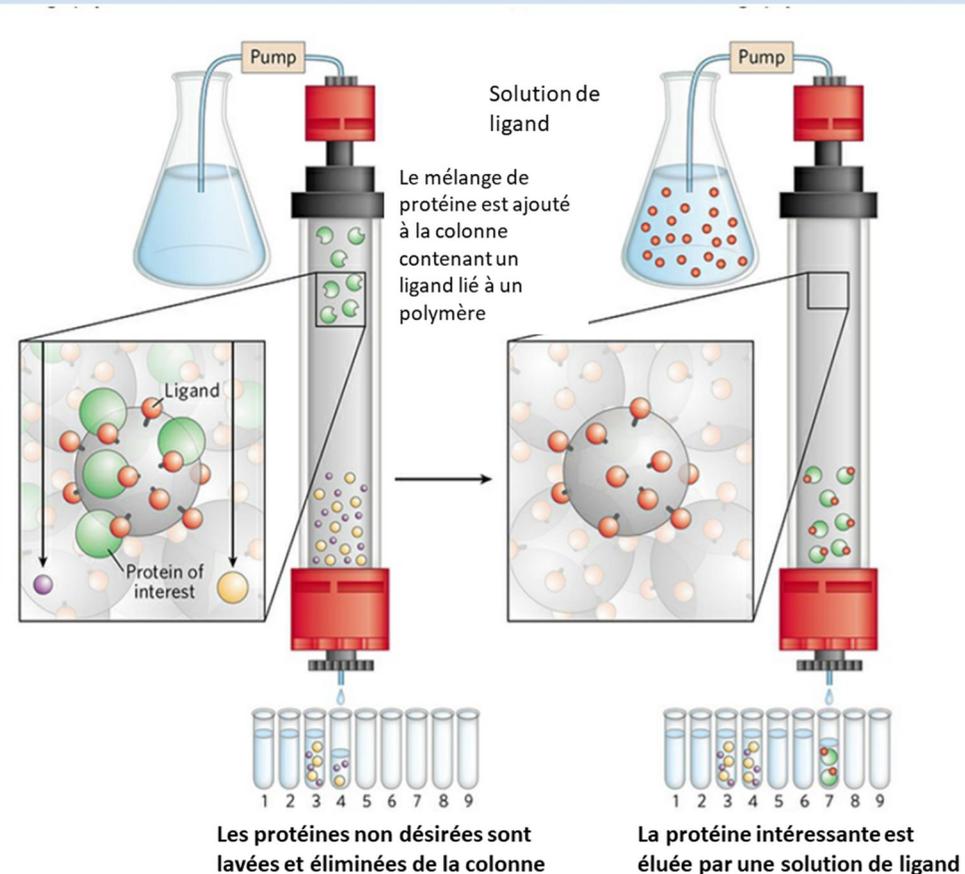


4-Procédés de séparation basés sur l'affinité

Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité ne tient compte ni au poids moléculaire, ni à la forme, ni à la solubilité, ni à la charge électrique des protéines; elle repose sur des interactions spécifiques qui peuvent exister entre deux molécules:

Exemple: enzyme-substrat;
enzyme-inhibiteur compétitif



Détermination de l'activité et de l'activité spécifique:

- ❖ La **purification** peut être suivie:
 - méthodes physico-chimiques (solubilité, électrophorèse, ultracentrifugation)
 - méthodes biologiques telles que la détermination de l'activité spécifique (cas des enzymes).

- ❖ La quantité d'enzyme dans une solution ou un extrait cellulaire peut être mesurée par **l'activité catalytique** qu'elle produit, c'est à dire par l'augmentation de la vitesse à laquelle son substrat est transformé en produits de réaction quand l'enzyme est présent.
 - Dans ce but, il faut connaître:
 - l'équation globale de la réaction catalysée.
 - avoir un procédé analytique pour déterminer la disparition de S ou l'apparition de P.
 - si l'enzyme a besoin de cofacteurs (ions métalliques ou coenzymes).
 - la dépendance de l'activité enzymatique/[S].
 - le pH optimum
 - une zone de température dans laquelle l'enzyme est stable et possède une activité élevée

- ❖ Le terme d'**activité** fait référence aux unités totales d'enzymes dans la solution.
- ❖ **L'activité** est la quantité de la protéine exprimée non pas en terme de poids mais de capacité **catalytique** ou **biologique**. Elle peut être exprimée:
 - **Unité international (UI): 1 unité d'activité enzymatique** est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation de **1 μ mol de substrat** par **minute** à **25°C** dans les conditions optimales de mesure.
 - **Katal (kat):** est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation de **1 mol de substrat** par **seconde** à **25°C** dans les conditions optimales de mesure.
- ❖ **L'activité spécifique** est le nombre d'unités d'enzymes par milligramme de protéines.

L'activité spécifique est une mesure de la pureté enzymatique; elle augmente au cours de la purification d'un enzyme et devient maximale et constante quand l'enzyme est pure (tableau).

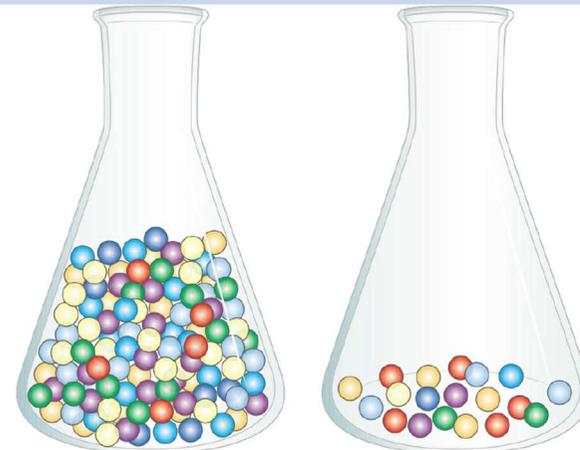


FIGURE 3-22 Activity versus specific activity. The difference between these

Tableau de purification d'une enzyme

Procédé ou étape	Volume de la fraction (mL)	Protéine totale (mg)	Activité A (unités)	Activité spécifique A* (unités/mg)
1-Extrait cellulaire brut	1400	10000	100000	10
2-Précipitation	280	3000	96000	32
3-Chromatographie sur échangeur d'ions	90	400	80000	200
4-Chromatographie d'exclusion moléculaire	80	100	60000	600
5-Chromatographie d'affinité	6	3	45000	15000

Rendement et enrichissement de purification:

Pour mesurer le degré de purification, on contrôle l'activité de la protéine après chaque étape de purification et on détermine:

▪ **Rendement de purification R:** (c'est le % de récupération de l'activité par rapport à la première étape).

Le rendement R est le rapport (le plus souvent exprimé en %) des activités totales entre les étapes 2 et 1.

▪ **Taux de purification (enrichissement):** c'est le coefficient de purification par rapport à la première étape.

L'enrichissement entre étape 1 et 2 est le rapport entre l'activité spécifique (exprimée en UI/mg) correspondant à l'étape 2 (AS_2) et l'activité spécifique correspondant à l'étape 1 (AS_1).

▪ **Bibliographie:**

- Lehninger, Nelson, D.L., Cox, M.M.(2017). Principles of biochemistry: 7^e Edition, international edition.
- Voet, D., Voet J.G (2016). Biochemistry: 4^e Edition. JOHN WILEY & SONS , INC.