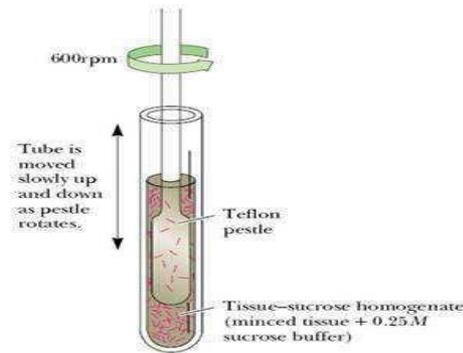




Université de RELIZANE  
Faculté des Sciences et de la Technologie  
Département: Sciences biologiques



# Isolement et purification des enzymes



Dr Berzou

*Année universitaire : 2022/2023*

## Introduction

➤ 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 **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 structure subcellulaire par des propriétés physiques et chimiques efficaces sans pour autant trop dénaturantes.

➤ 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**).

## 1.1. 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.

## 1.2. Extraction par homogénéisation à haute pression

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

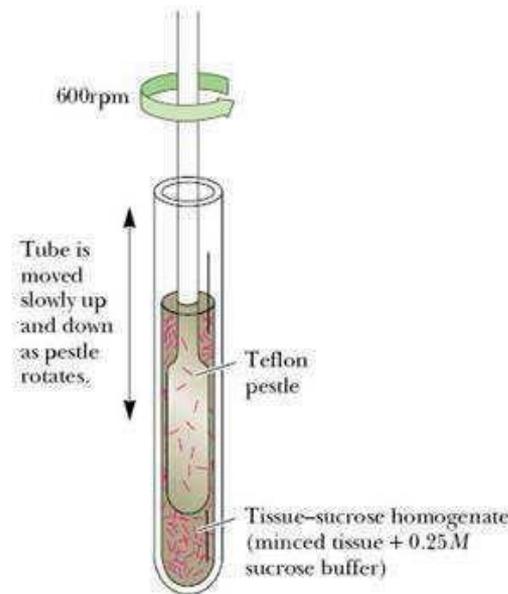


Fig.1 Appareil de Potter-Elvehjem



Vortex



Ultrasonic bath

### 1.3. Sonication

➤ Elle est liée à la mise en œuvre **de ultrason**, c'est un **appareil** qui propage des ondes à travers **une sonde entraînant** ainsi des **vibrations**.

### 1.4. 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.

### 1.5. Traitement alcalin

➤ Est une technique qui **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.

## 1.6. 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**.

Exemple : **le triton X100** permettre l'extraction d'une protéine lie à la membrane.

## 1.7. Lyse enzymatique

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

## 1.8. Extraction par des solvants organiques

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

## 1.9. 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.

## 2. 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:

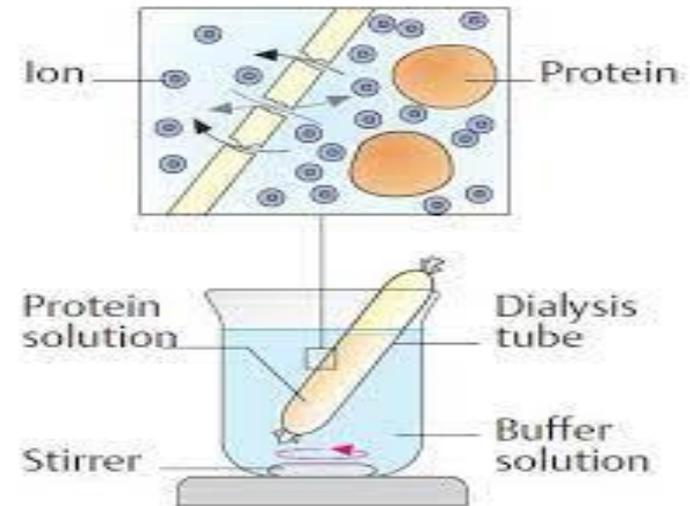
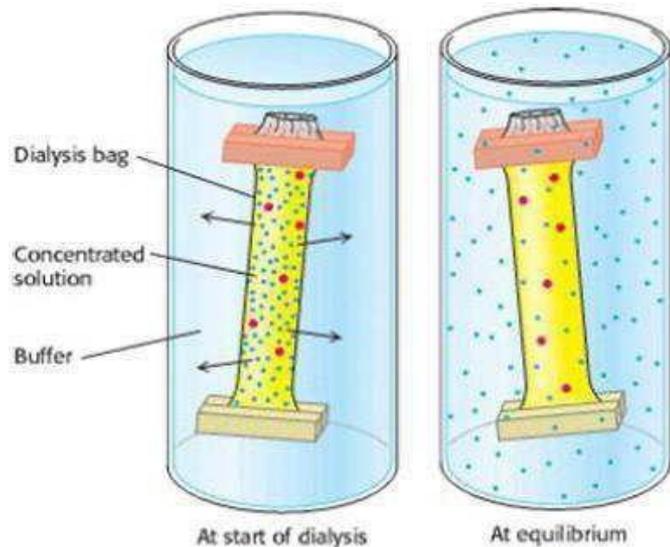
1. Taille moléculaire
2. Solubilité
3. Charge électrique
4. Affinité biologique

➤ 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

### 2.1.1. Dialyse

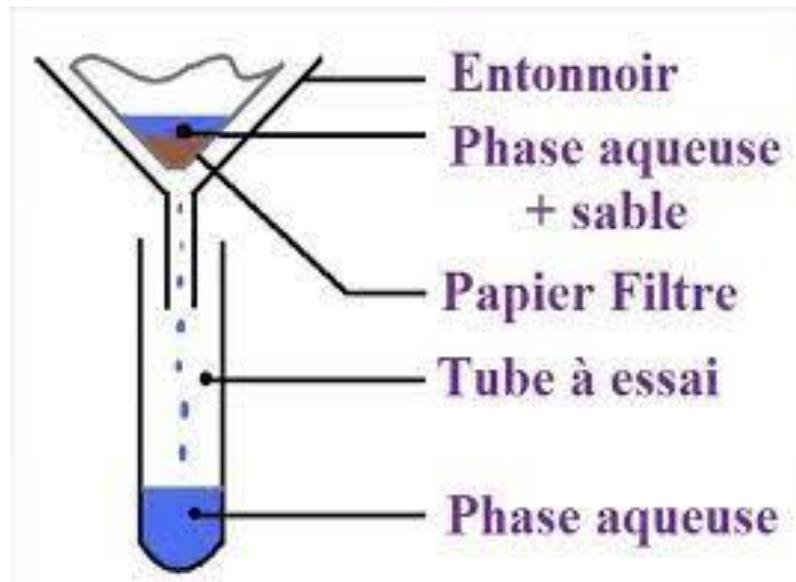
- Technique qui **sépare** des substances on utilisant **leur capacité respective** à franchir **pores d'une membrane** appelle **membrane de dialyse** (en cellophane ou autre matière).
- Les membranes de dialyse sont sous forme d'un cylindre allongé qu'il faut fermer de deux extrémités et qui contient le liquide à dialysé, ce cylindre port le nom de boudin de dialyse.



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

## 2.1.2. Filtration et ultrafiltration

- **Ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective** permet de séparer les substances selon leur taille moléculaire, approximativement selon leur poids moléculaire.
- **Filtres en profondeur**: sont constitués 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 supérieure à celle des pores du filtre.



## 2.1.3 Centrifugation en gradient de densité

➤ **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**.



Sédimentation en plusieurs phases

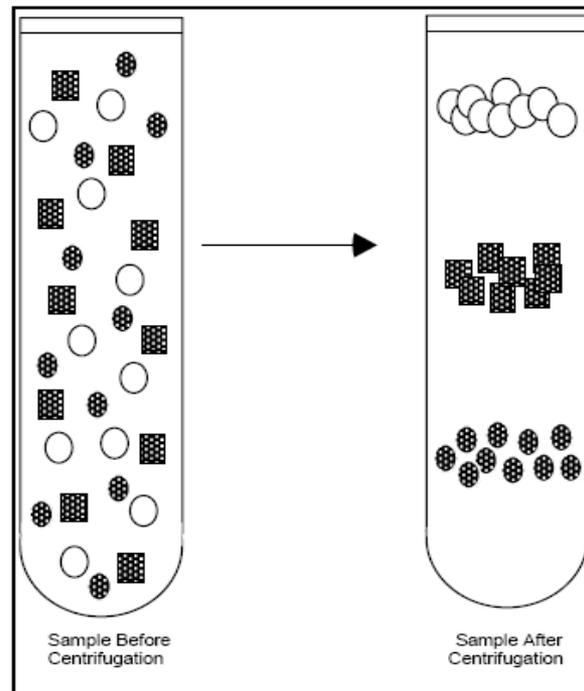


Centrifugeuse

## 2.1.3 Centrifugation en gradient de densité

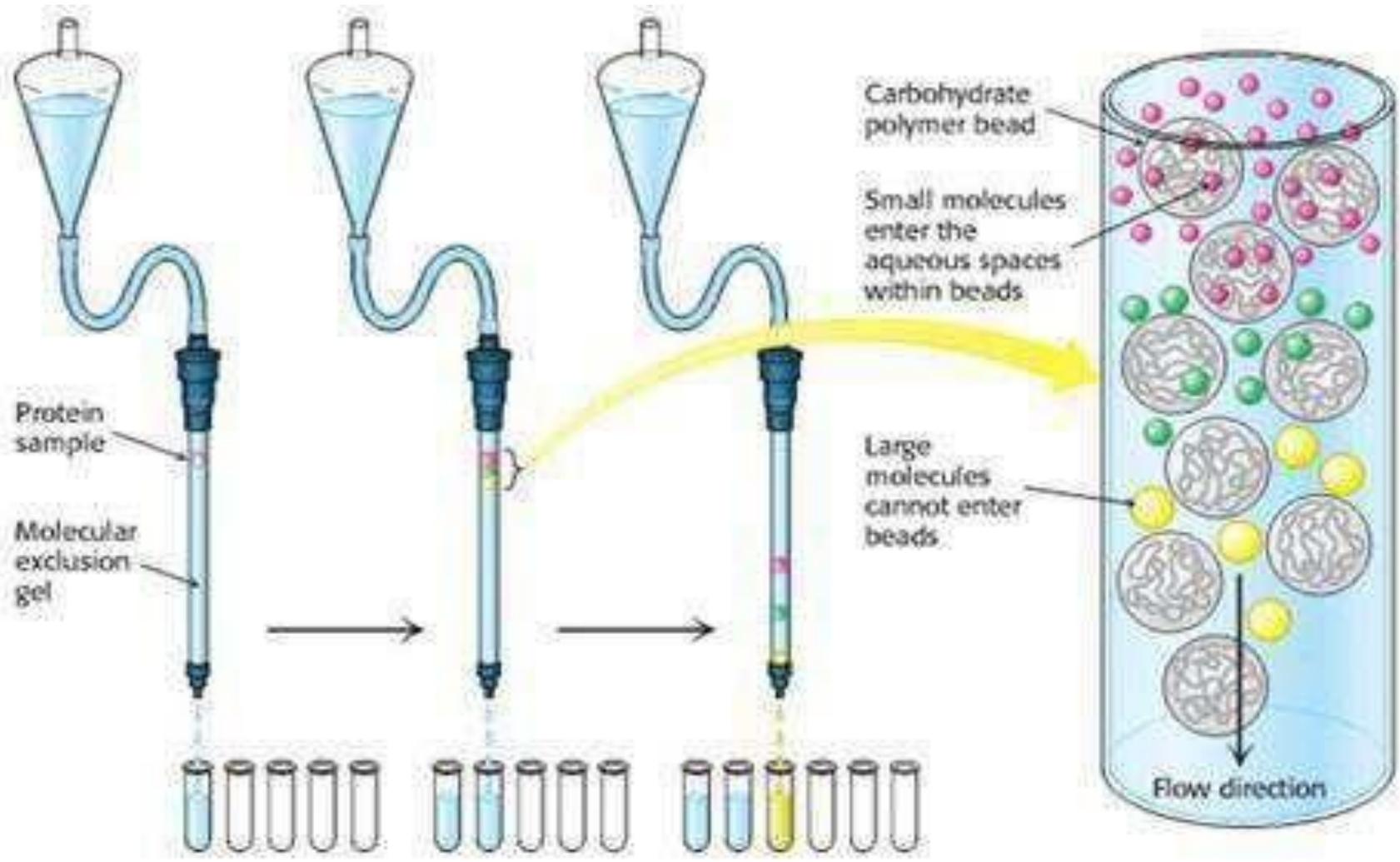
➤ **La centrifugation isopycnique** consiste à utiliser un gradient de densité recouvrant les densités des différentes particules. Après un certain temps de centrifugation, celles-ci se rassemblent à un point où leur densité est égale à celle du milieu de sédimentation (position isopycnique).

Figure 3. ISOPYCNIC (DENSITY) SEPARATION



## 2.1.34 Chromatographie d'exclusion moléculaire (gel filtration moléculaire)

- La chromatographie a pour principe de séparer les molécules en fonction de leur taille.
- 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 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 le lit du gel dans une colonne de chromatographie. On dit qu'elles sont exclues.
- Les gels sont sous forme de polymères linéaires :
- les principaux gels sont Sephadex : **Dextrans (polymères de glucose)**
- **Biogel A : dérivés d'agarose,**
- **Biogel P : Dérivé de polyacrylamide**



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

## 2.2. Procédées de séparation basée 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.

### 2.2.1. 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.

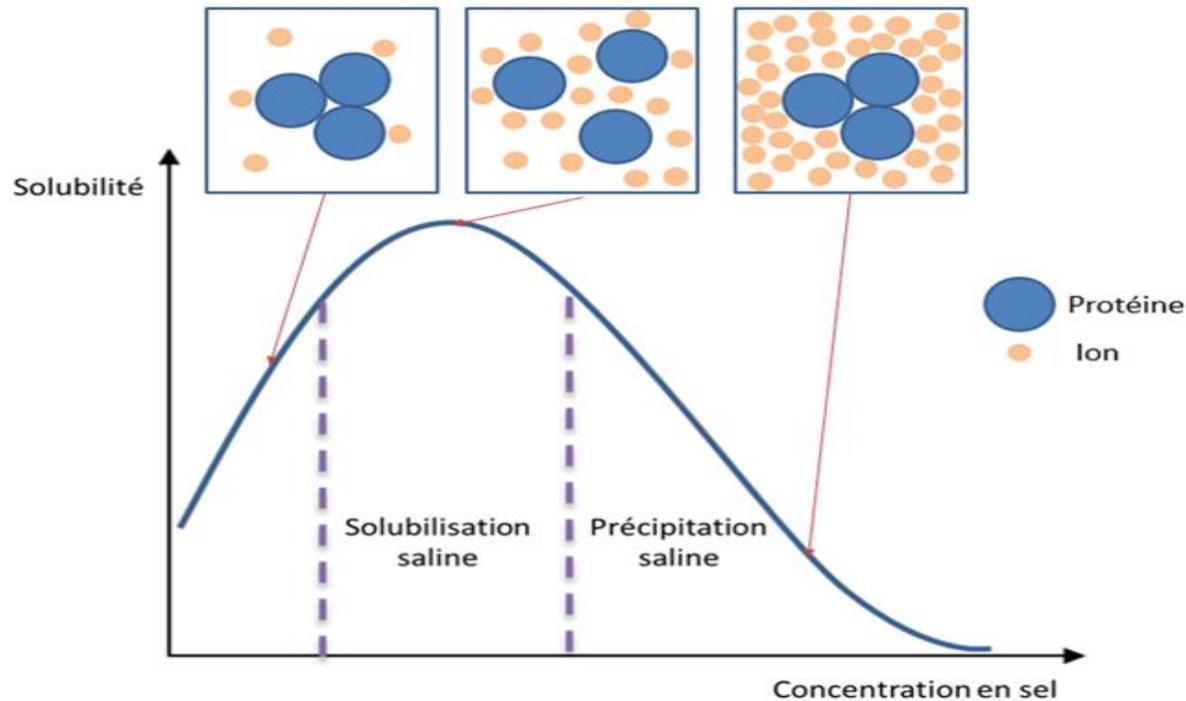
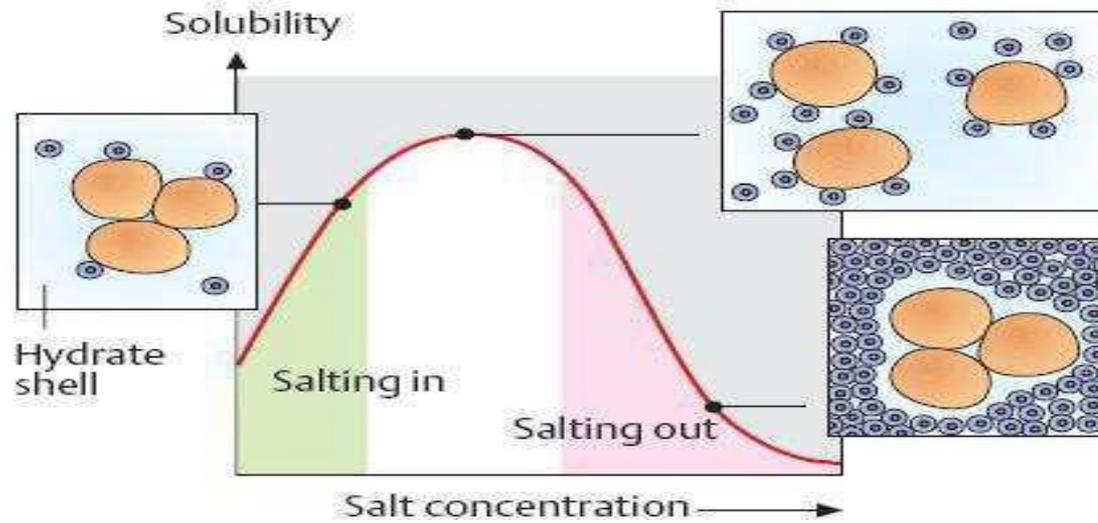
**Exemple:** l'effet de pH et la concentration de NaCl sur la solubilité d'une protéine du lait la  $\beta$ -lactoglobuline.

➤ La solubilité de la  $\beta$ -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.

## 2.2.2. Précipitation par les sels

- La solubilité d'une protéine en solution aqueuse fonction selon la concentration en sels dissous.
- 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  $(\text{Na}_2\text{SO}_4)$



## Résumé du phénomène de dessalage

### 2.2.3. Fractionnement par des solvants

➤ Chaque solvant est caractérisé par une **constante diélectrique**, l'addition du solvant organique neutre non chargé soluble à 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.

➤ 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 solvatation de l'eau pour des ions dissous (comme les protéines).

Exemple: **DMSO (diméthyl sulfoxyde)**

**DMF (N,N-diméthyl formamide)**

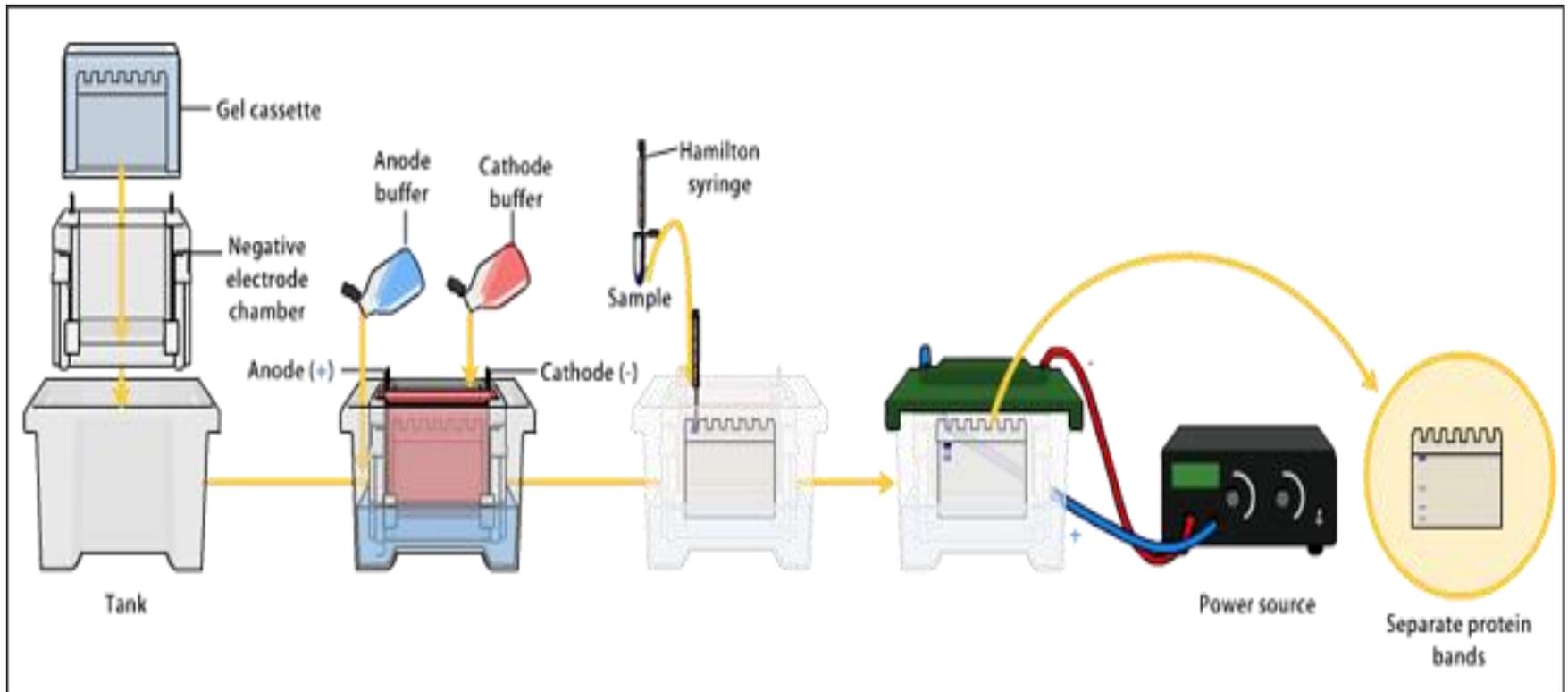
## 2.3. Procédées de séparation basée sur la charge électrique

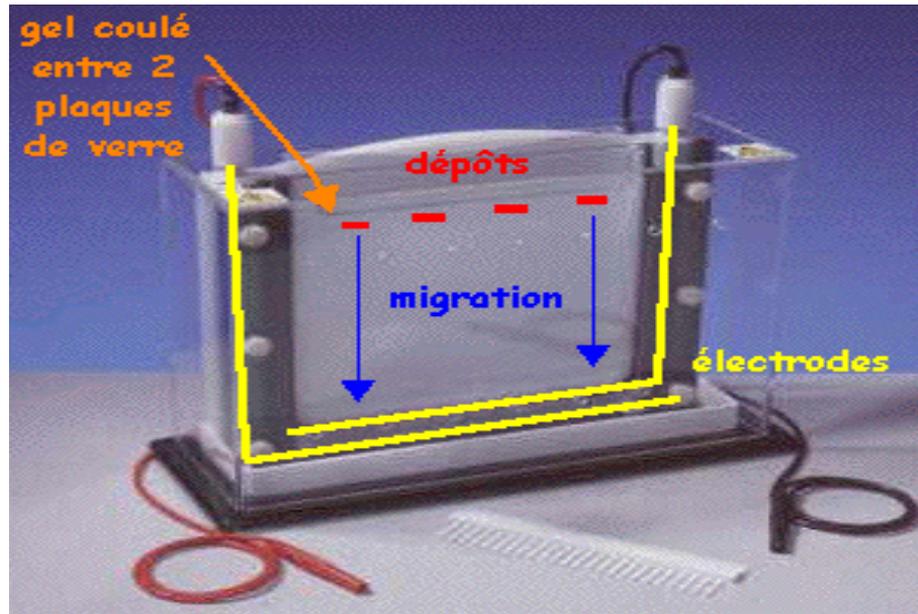
### 2.3.1. Electrophorèse en zone

- Principe: c'est le déplacement de particules chargées dans un champs 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.

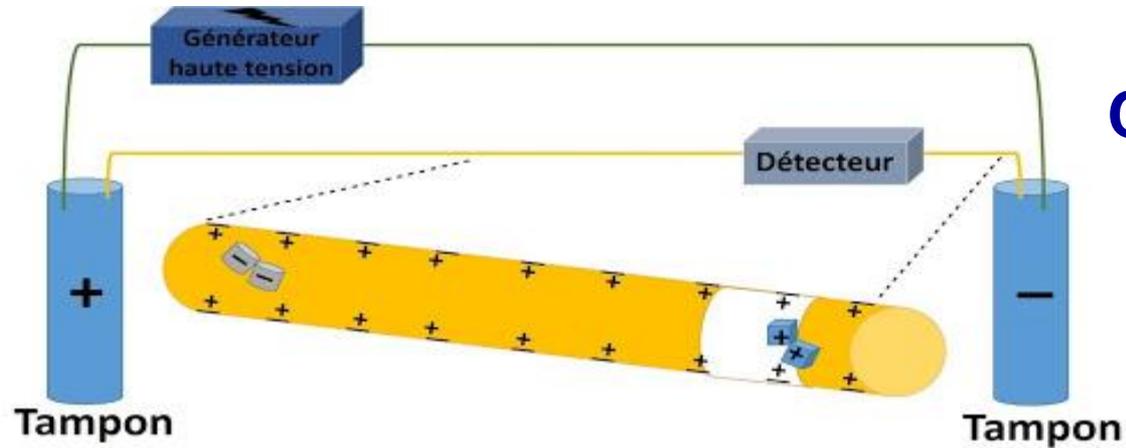
➤ La manipulation nécessite :

- Une cuve à électrophorèse + un générateur électrique,
- Un gel de polyacrylamide (précoulé en cassette ou à préparer) contenant des puits pour dépôt, des solutions tampons adaptées au gel.





Anode



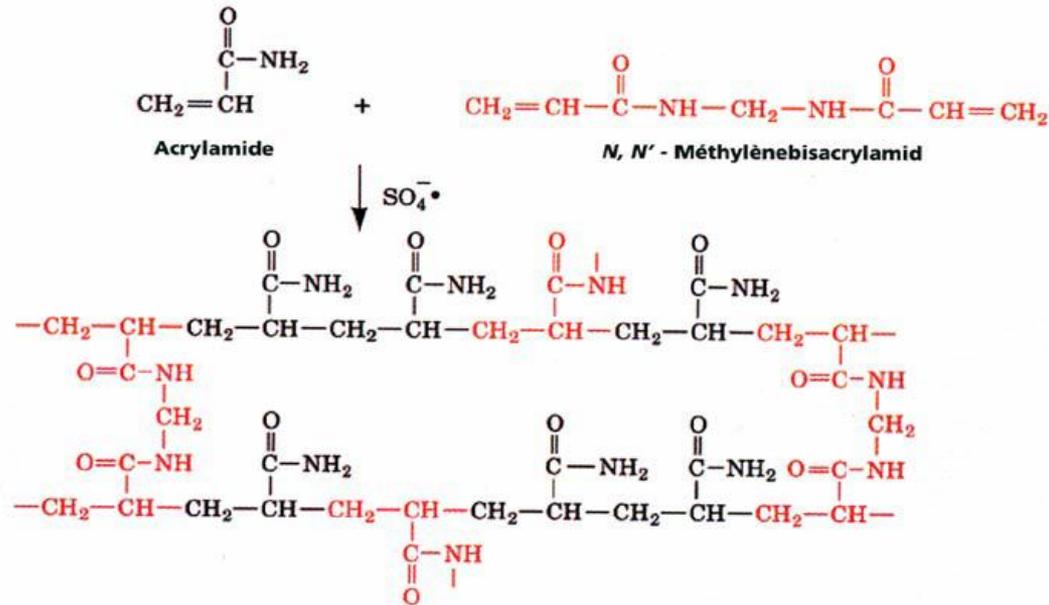
Cathode

➤ Plus la molécule est de petite de taille et plus elle migre vite dans le gel

## ➤ Électrophorèse PAGE-SDS

➤ Aussi appelé **PAGE** (pour **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis)

➤ Les gels sont fabriqués à partir d'une polymérisation radicalaire d'acrylamide **sous l'action** du **N,N'-méthylènebisacrylamide** (TEDEM) et persulfate d'ammonium dans un tampon.

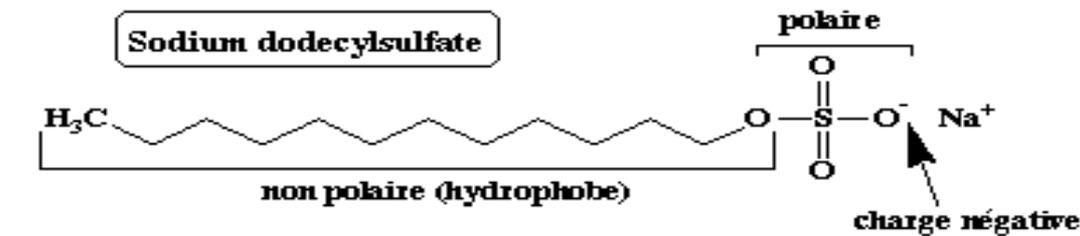


➤ Ce type d'électrophorèse peut être réalisé en utilisant des systèmes tampons **dissociant** ou **non dissociant**, **continus** ou **non continus**.

# 1.1 Traitement des échantillon des protéines dans milieu dénaturant ou dissociant

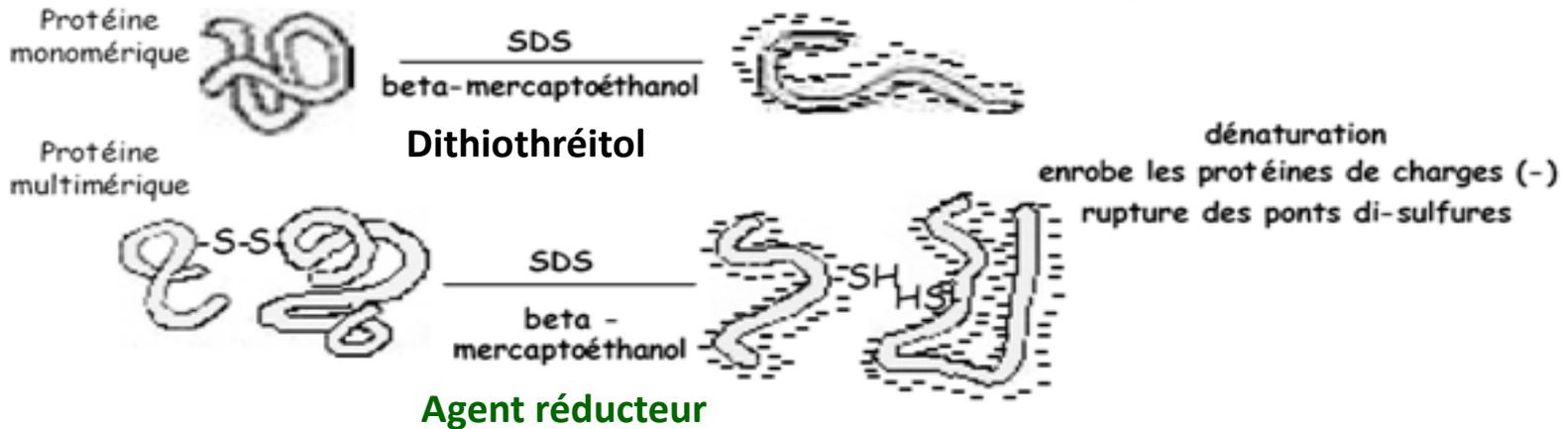
➤ L'agent dissociant le plus utilisé est le détergent anionique; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

➤ Une fois fixé sur les protéines le SDS affecte une charge négative (-) à tous les polypeptides.



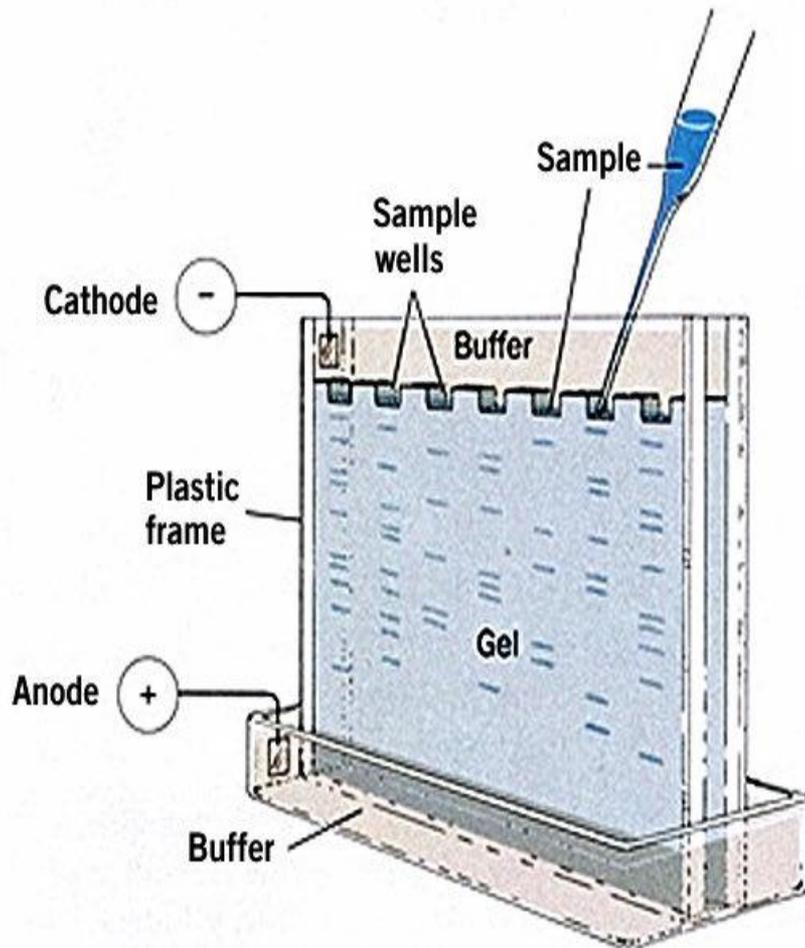
➤ **Dénature les protéines**  
Forme tridimensionnelle

➤ **Attribue une charge (-) aux protéines**



➤ Ces derniers migreront, donc, dans le gel de polyacrylamide selon leur taille, uniquement.

## 2. Différents étapes pour la préparation de l'échantillon



➤ Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel

➤ Le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH ~9 pour que toutes les protéines aient une charge négative).

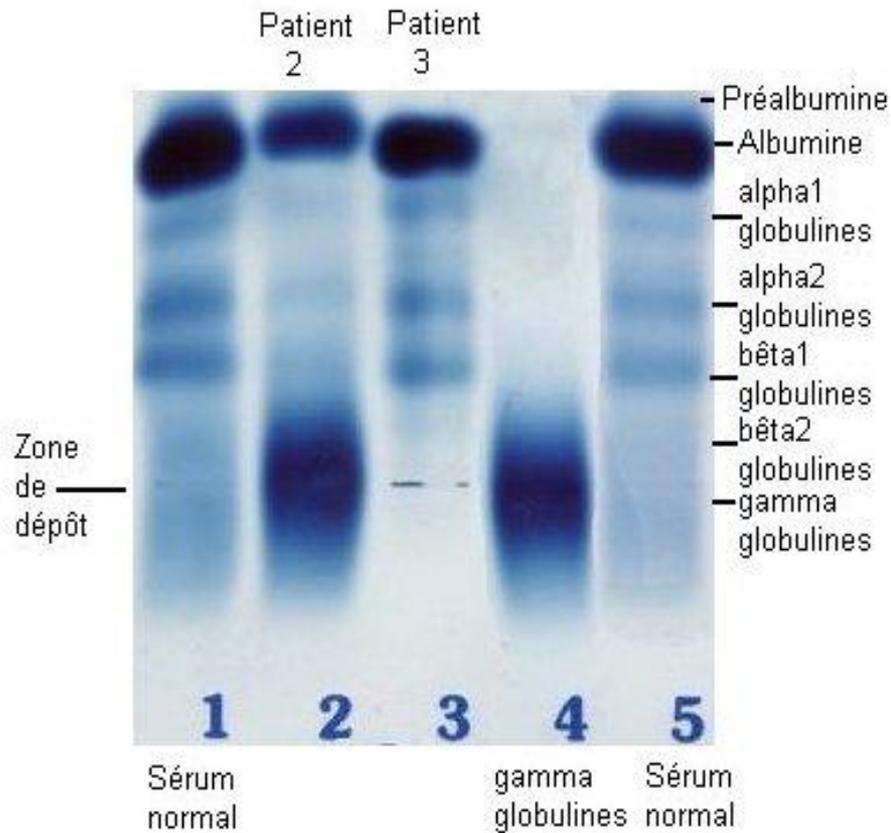
➤ Un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration

Les protéines migreront vers l'anode (+) selon leur ratio charge/masse

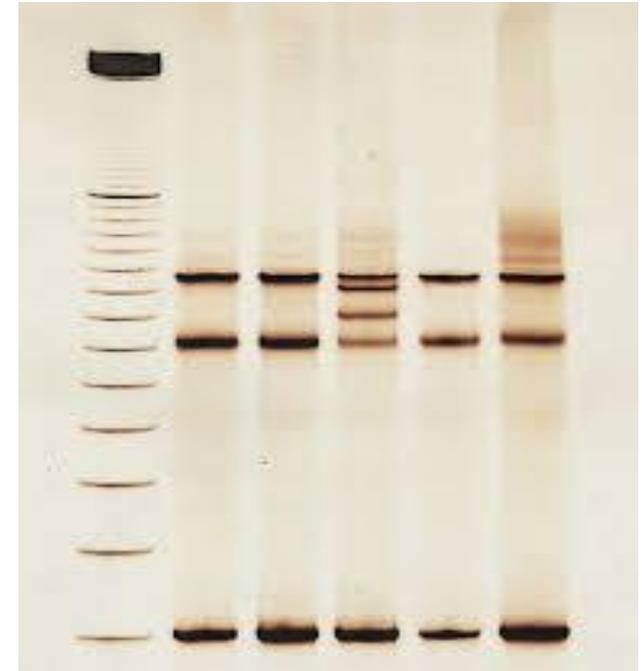
➤ Après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées

➤ Dans ce type de gel, plus le gel est long, meilleure est la finesse des bandes et la résolution.

# ➤ Révélation des protéines par coloration sur gel



Coloration avec le bleu de Coomassie brillant



Coloration au nitrate d'argent

Coloration de gels de protéines

## 2.3.2. Chromatographie par échange ionique

- Le principe est basé sur la charge ionique de l'enzyme (qui dépend de sa composition en acide aminé acide et basique).
- La séparation est due aux interactions ioniques entre les groupes chargés de la phase stationnaire échangeuse d'ion et ceux des molécules de l'échantillon.
- Donc l'extrait brut contenant l'enzyme est déposé au sommet d'une colonne contenant une phase stationnaire chargée **positivement** (**diéthylaminoéthyl cellulose DEAE-C**) ou **négativement** (**carboxyméthyle cellulose CM-C**).
- Les protéines contaminantes sont éliminées avec le tampon de lavage par contre l'enzyme chargée est retenue par la phase stationnaire.
- L'élution (récupération de l'enzyme) se fait par changement de pH (acide ou base) ou de la force ionique du tampon d'élution.

➤ 2 types d'échangeurs:

Résines échangeuses de cations

Résines échangeuses d'anions

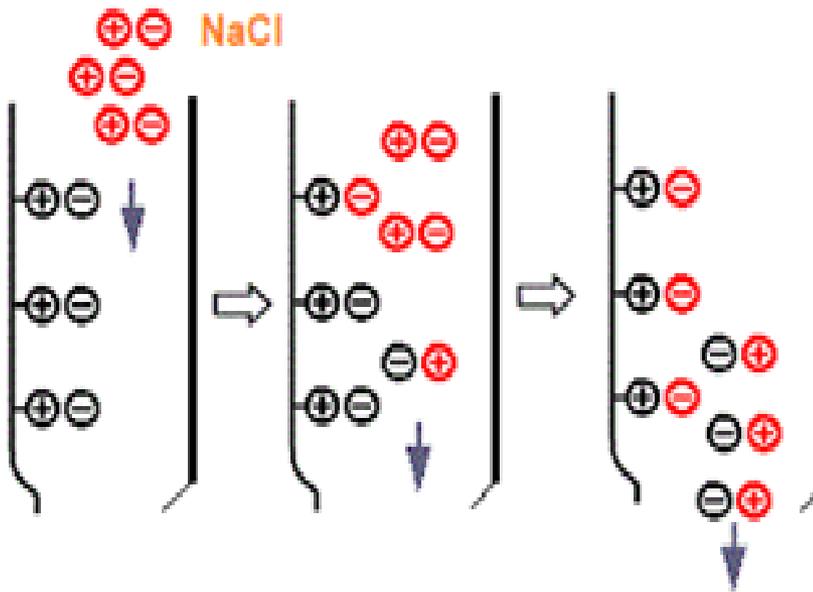


Fig.1 Chromatographie d'échange anionique

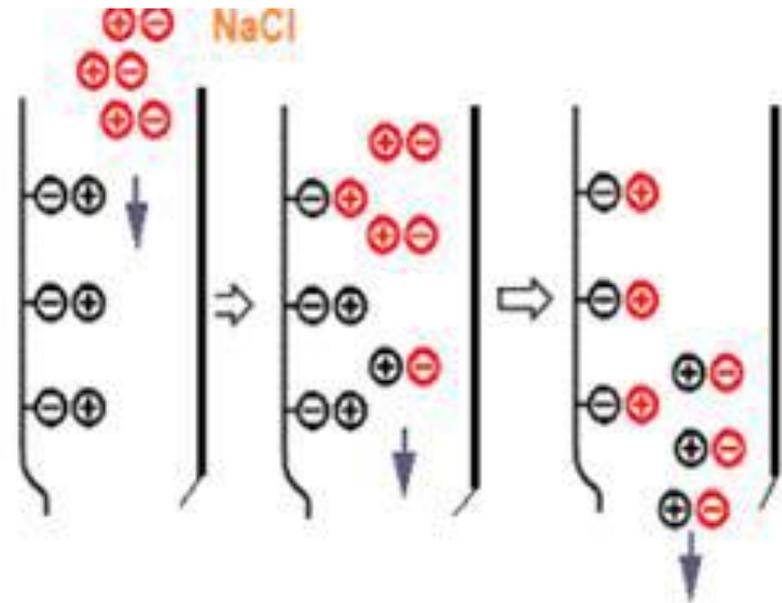
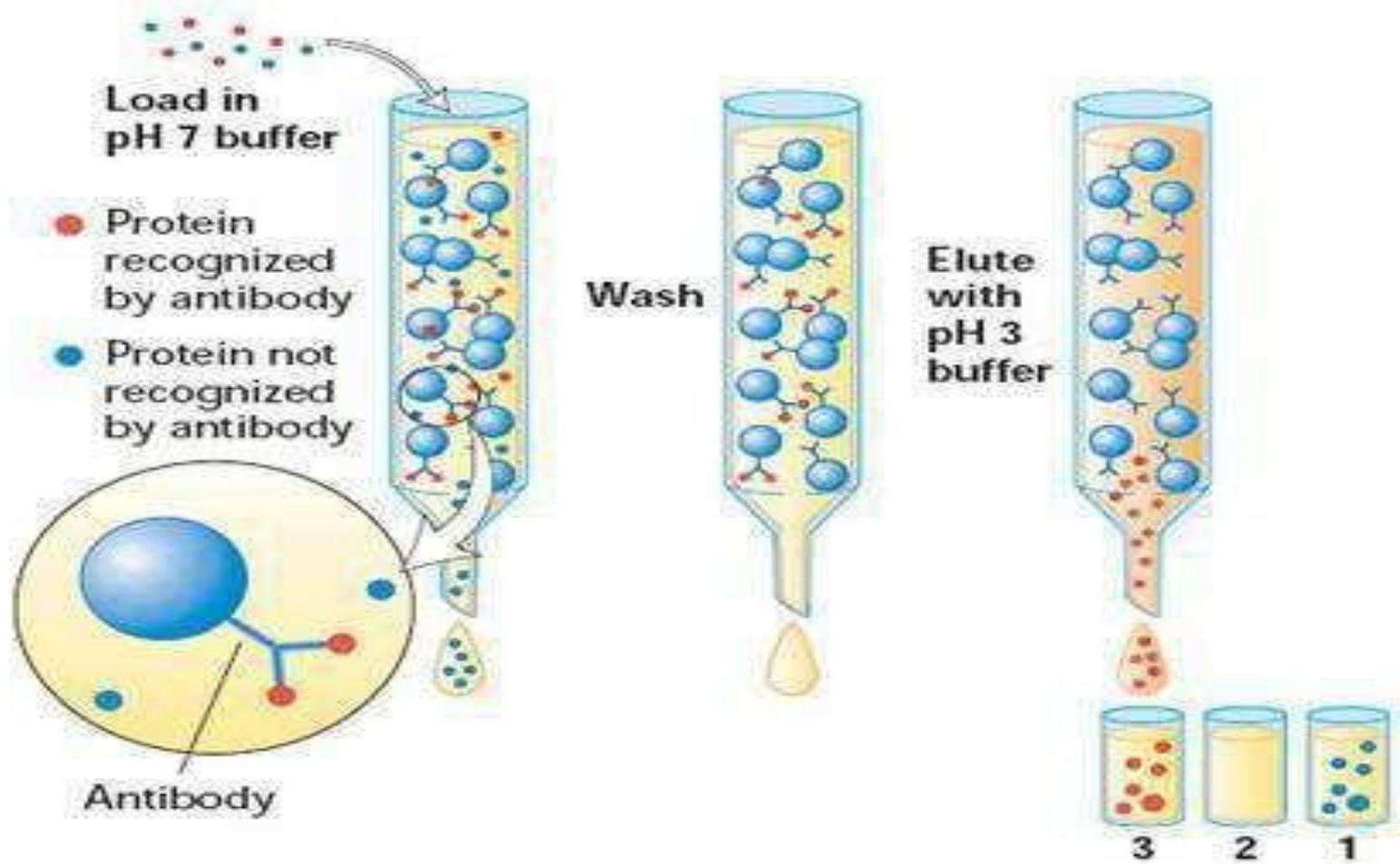


Fig. 2 Chromatographie d'échange cationique



### 3. Détermination de l'activité et de l'activité spécifique

➤ 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  $1\mu\text{mol}$  de substrat par minute à  $25^\circ\text{C}$  dans les conditions optimales de mesure.

❖ **Katal (kat):** est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation de  $1\text{mol}$  de substrat par seconde à  $25^\circ\text{C}$  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).

**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

## 4. 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.

$A_1$  : activité totale de la purification impure

$A_2$  : activité totale de la purification pure

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

❖ **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 ( $AS_1$ ).

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