

III- Isolement et purification des enzymes.

Les enzymes sont des molécules instables avec une organisation physico-chimique définie. Même un changement minime de cette organisation réduit l'activité de l'enzyme et parfois l'enzyme est totalement inactivée.

Par conséquent, les enzymes doivent être isolées dans des conditions commandées du pH, de la force ionique et de la température.

Puisqu'elles sont de nature protéique, les procédures standards d'extraction et de purification pour les enzymes sont identiques à celles utilisées pour les protéines **sauf que l'activité de l'enzyme est analysée à chacune des étapes de l'extraction et de purification.**

En effet, certains nombre d'éléments doivent être pris en considération :

1-La reconnaissance des caractéristiques de la matière première : sa nature (liquide, solide), son type générale (animal, végétal, microbien), sa structure biologique (cellulaire, tissulaire).

2- la localisation des produits recherchés (mitochondrie, cytoplasme, membrane...) ainsi que ses propriétés structurales et physico-chimiques (poids moléculaire, organisation structurale, constante cinétiques, stabilité moléculaire, pH optimum, point isoélectrique), activateurs et inhibiteurs.

3-Il faut un procédé de libération de la protéine sous forme soluble, sans perte d'activité des enzymes.

4-Pour ne pas détruire de l'édifice des enzymes, on doit opérer généralement à basse température (+4C°, appareil réfrigéré, réactifs refroidis ...) dans des milieux tamponnés, contenant ou non des agents protecteurs comme Éthylène Diamine Tétra-Acétique(EDTA) β -mercaptoéthanol...) aussi rapidement que possible.

3.1 Extraction des protéines

L'extraction d'une protéine à partir d'un tissu commence par la destruction de l'organisation cellulaire par des méthodes mécaniques, chimiques ou par l'action d'enzymes qui désorganisent les tissus. Le mélange résultant du matériel biologique ainsi brisé et du solvant est appelé **extrait brut** ou **homogénat**.

Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation: le matériel soluble est recueilli et dialysé pour éliminer les petites molécules. Diverses méthodes sont ensuite utilisées pour purifier une protéine particulière à partir du mélange.

Si la protéine est justement dans un compartiment cellulaire, on utilise généralement un détergent doux (Triton, Tween, etc., quelquefois déoxycholate) pour la libérer en dissolvant les membranes de ce compartiment. L'emploi de détergent doit souvent être fait de façon contrôlée car ils peuvent briser les lysosomes, ce qui libère des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, etc) qui peuvent attaquer et détruire les protéines ou autres molécules qu'on veut isoler. Des précautions particulières doivent être prises si on travaille avec des protéines sensibles à la dégradation ou peu nombreuses souvent en mélange ("cocktails") à large spectre d'action.

3.1.1. Techniques mécaniques

3.1.1.1. Le broyage mécanique :

Les broyeurs mécaniques sont utilisés pour réduire la taille des particules de différents types de matériaux. Ils sont utilisés dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée. Il existe deux types de broyeurs:

-A) L'homogénéisateur de type Dounce

Il ressemble à une éprouvette dans laquelle s'enfonce un piston serré (**Fig.1**). Le renflement du piston et la zone de broyage du mortier sont souvent en verre fritté. Le passage des cellules dans l'espace très petit entre le piston et la paroi interne du tube induit leur rupture.

B) L'homogénéisateur de type Potter-Elvehjem

Il s'agit d'un pilon composé d'une tige d'acier et un renflement de téflon ainsi que d'un mortier de verre épais (**Fig. 1**).

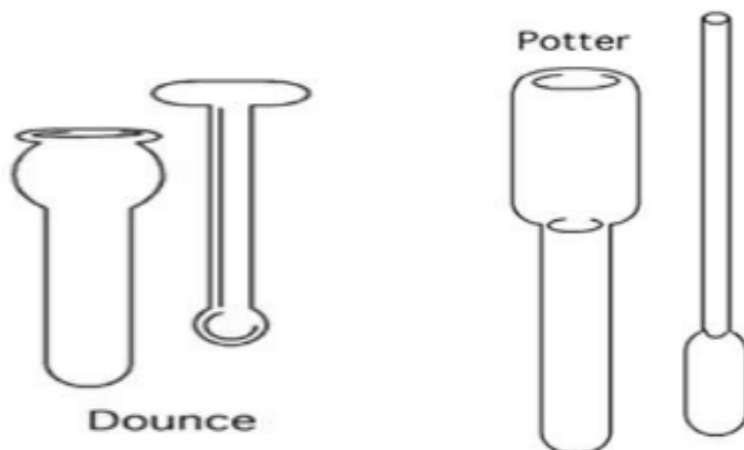


Figure 1. Broyeurs mécaniques en verre.

3.1.1.2. La bombe à disruption

Cette technique consiste à traiter l'échantillon avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. Par la suite, la pression est libérée tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclater.

3.1.1.3. La Presse de French :

C'est un cylindre creux en métal dans lequel s'enfonce un piston métallique doté de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide (**Fig. 2**).

Il est utilisé en expérimentation biologique pour interrompre la membrane plasmique des cellules en les faisant passer à travers une valve étroite sous haute pression, ce qui déchire leur membrane.

Plus que la pression est haute dans le cylindre, plus que la lyse est totale.

Cette technique est fiable, efficace et respecte l'activité des enzymes présentes dans les cellules biologiques.

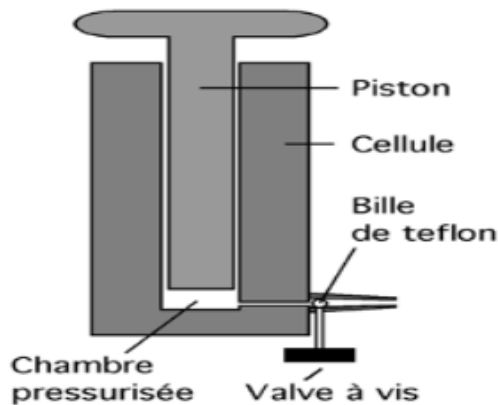


Figure 2. Schéma de la presse de french

3.1. 1. 4. Sonication (Ultrasons)

Elle consiste à détruire les cellules par les Ultrasons qui sont des ondes de même nature que le son mais dont la gamme de fréquence se situe entre 20 kHz et plusieurs centaines de mégahertz. Cette gamme est trop élevée pour que l'oreille humaine puisse la percevoir.

La sonication est réalisée grâce à un appareil appelé sonicateur qui permet de transformer l'énergie électrique en vibration mécanique longitudinale le long d'une sonde. Cette dernière permet de casser les cellules biologiques en suspension.

Il est indispensable de travailler à basse température et d'effectuer des pauses entre les cycles de sonication afin d'éviter la surchauffe de l'échantillon.

3.1. 1. 5. Congélation-décongélation

Des cycles de congélation (-20°C) et de décongélation (37°C) permettent de détruire les membranes plasmiques des cellules surtout lorsqu'il s'agit d'une protéine ou d'une enzyme bactérienne.

Durant la congélation des cristaux de glace se forment, ce qui provoque la désintégration de la membrane cellulaire.

3.1. 2. Techniques chimiques et enzymatiques

Ces techniques regroupent la lyse ou choc osmotique, la modification de la force ionique ou du pH et la lyse enzymatique.

3.1. 2. 1. Lyse ou choc osmotique :

Le choc osmotique consiste à incuber les cellules fragiles dans une solution hypo-osmotique, ce qui permet à l'eau d'entrer dans la cellule la fait gonfler jusqu'à ce que les membranes lipidiques se rompent et laissent passer leur contenu dans le milieu.

L'éclatement des organites est l'inconvénient de cette technique.

3.1. 2. 2. Modification de la force ionique ou du pH

La modification de la force ionique du milieu par addition des ions ou la modification du pH entraînent la rupture des membranes plasmiques de certains types cellulaires.

Ces traitements peuvent rendre les membranes plus perméables aux constituants du milieu.

3.1. 2. 3. Lyse enzymatique :

Pour lyser la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique de plusieurs types de cellules (les levures, les plantes et les bactéries), différentes enzymes comme le lysozyme du blanc d'œuf de poule ou la lyticase de *S. aureus* peuvent être utilisées.

3.2. Fractionnement et purification des protéines enzymatiques

Diverses techniques sont appliquées pour séparer la protéine ou protéine enzymatique recherchée de toutes les autres présentes dans le mélange. Habituellement les premières étapes sont des techniques peu spécifiques mais bien adaptées à la manipulation de gros volumes. Ensuite, au fur et à mesure des étapes, on utilise des techniques de plus en plus spécifiques qui sont souvent applicables à des préparations de volume réduit.

Une des méthodes se prêtant le mieux à de gros volumes est la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. C'est pourquoi on l'utilise très souvent immédiatement après l'homogénéisation pour se débarrasser du gros des contaminants.

Les chromatographies d'échange ionique ou les chromatographies d'affinité, applicables à de bons volumes d'échantillon mais ayant un assez bon pouvoir de séparation, constituent de bonnes méthodes intermédiaires.

En finale, on utilise souvent le tamisage moléculaire ou l'isofocalisation qui permettent de raffiner la pureté, mais nécessitent de très petits volumes de protéines concentrées.

Souvent, entre ces étapes, il faut éliminer les sels ou produits utilisés dans ces chromatographies. On utilise alors une dialyse ou une ultrafiltration. Si on a besoin de concentrer la préparation, on la lyophilise. Si on veut éviter ces procédures, on doit choisir des méthodes qui ne sont pas affectées négativement par ces produits.

3.3 Dosage des protéines et dosage de l'activité des protéines

Toutes ces étapes doivent être suivies de près pour vérifier si les techniques fonctionnent bien. Pour cela, **il est très courant de doser la protéine à purifier après chaque étape**. Il faut donc posséder une méthode de dosage (enzymatique, immunologique, biologique, etc.) pour suivre le processus. On mesure aussi la quantité totale de protéines. Cette dernière valeur servira à calculer l'activité spécifique (voir tableau de purification)

Dans le cas où il s'agit de la première fois que la protéine est isolée, il faudra développer la méthode de dosage avant même de développer la méthode de purification.

Durant toutes ces étapes, il faut évidemment éviter de dénaturer la protéine qu'on veut isoler. Il faut donc utiliser des milieux dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des protéines (pH, force ionique, osmolarité, sels, antioxydants, etc.). Pour cela on utilise certains milieux plus ou moins "physiologiques", comme le phosphate buffered saline (PBS) ou le salin, qui possèdent quelques-unes de ces propriétés. Ainsi, le salin (NaCl 150 mM ou 0.85 %) a une osmolarité presque physiologique de 300 mOs. On utilise souvent un tampon destiné à maintenir le pH (généralement aux alentours de 7.4). Le PBS ("phosphate buffered saline") contient un tampon phosphate pH 7.4 et l'osmolarité de la somme de toutes ses composantes est de 315 mOs..

Pour maintenir le pH à un niveau adéquat on inclut généralement un produit tampon dans les solutions. Le phosphate (en mélange mono- et dibasique) est utilisé dans le PBS. Le Tris trishydroxy-méthyl-aminométhane (Tris) est très fréquemment utilisé en raison de son coût peu élevé, même s'il est peu efficace à pH 7.4 et inhibe certaines réactions physiologiques.

L'hydroxyéthyl-pipérazine-éthane-sulfate (HEPES) est aussi souvent employé. Les qualités et défauts des principaux produits utilisés pour tamponner le pH dans les solutions.

Il faut aussi éviter de dénaturer les protéines en les exposant à l'air ou en les faisant mousser, ce qui cause une dénaturation et favorise l'oxydation. C'est particulièrement le cas de l'oxydation de la fonction thiol des cystéines en cystines, i.e. formation d'un pont disulfurique. Les protéines cytoplasmiques sont particulièrement sensibles car leur milieu naturel, le cytoplasme, est légèrement réducteur. Elles supportent donc mal leur solubilisation dans le milieu ambiant qui est oxydant. L'emploi d'agents antioxydants comme le β -mercapto-éthanol ou un des réactifs de Cleland, dithiothréitol ou dithiothréitol, est souvent recommandé pour protéger ces protéines. Les protéines des compartiments extracellulaires (sang, liquide céphalo-rachidien, etc.) sont beaucoup moins susceptibles à ce problème car ce sont des milieux légèrement oxydants. Les protéines de ces compartiments ne contiennent pas ou très peu de thiols libres mais plutôt des pont disulfuriques.

Quand on travaille avec des protéines en quantités très faibles, il est important d'éviter de contaminer la préparation avec des protéases. Les sources de protéases peuvent être endogènes, présentes dans la préparation même, par exemple dans les lysosomes qui sont brisés lors du broyage des cellules ou par la présence de détergents. Il y a également des sources exogènes, venant de l'extérieur, comme les mains, la salive, etc.

3.4. Purification et critères de pureté

Durant toutes ces étapes, il est essentiel d'évaluer les deux facteurs clef, **pureté et rendement**. Le rendement (la quantité de protéine obtenue) peut facilement être mesuré par dosage enzymatique, radioimmunoassay (RIA), etc. Un tableau de purification (voir paragraphe 3.5 tableau de purification) est aussi un outil très utile à cette fin. Si on s'aperçoit qu'une des étapes de purification provoque une perte substantielle d'activité ou de quantité de la protéine, on doit remettre en question son utilité ou la qualité de son exécution. L'activité spécifique est une mesure quantitative de la pureté de la préparation. Encore ici, si on s'aperçoit qu'une étape ne permet pas l'augmentation de la pureté, il faut alors s'interroger sur sa pertinence. Pour être en mesure de calculer le rendement et la purification, il ne faut pas

oublier de mesurer le volume total de la fraction obtenue après chaque étape et d'en prélever des échantillons qui permettront de doser les protéines totales et la quantité de la protéine qu'on cherche à isoler.

La pureté d'une préparation de protéine peut aussi être évaluée selon des critères qualitatifs. Ainsi elle peut être facilement visualisée qualitativement par électrophorèse à haute résolution ou focalisation isoélectrique. Si on n'aperçoit qu'une seule bande protéique, on peut conclure que la préparation ne contient qu'une protéine. Cette évaluation qualitative peut cependant être faussée si la protéine est contaminée par une ou plusieurs autres de même mobilité dans les conditions d'électrophorèse ou de focalisation. Ces techniques permettent aussi de suivre la purification et de voir si le nombre de protéines contaminantes diminue au fur et à mesure du processus pour finir, idéalement, par une seule espèce protéique.

3.5 Tableau de purification

On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique. L'activité est la quantité de la protéine exprimée non pas en termes de poids mais de capacité catalytique ou biologique. L'activité spécifique est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités (enzymatique ou autre) par poids de protéines totales (e.g. 12.34 U/mg de protéines). Plus l'activité spécifique est élevée, plus la protéine est pure. Il est fréquent d'obtenir des facteurs de purifications de l'ordre de 5000 fois et des rendements de l'ordre de 5%.

La concentration des protéines totales est généralement obtenue en dosant les protéines totales d'échantillons récoltés lors des différentes fractions obtenues lors de la purification. On fait de même pour la protéine spécifiquement isolée: on mesure la quantité de cette protéine, pas dosage enzymatique s'il s'agit d'une enzyme. Si la protéine n'a aucune activité enzymatique, on peut recourir à des bio-dosages, des Elisa, RIA, etc. Pour connaître la quantité totale de protéines (totales ou d'intérêt) il faut également connaître le volume de la fraction en question: [protéines dans la fraction] * volume de fraction (par exemple mg/mL * mL).

Il est courant de résumer les étapes de purification des protéines par un tableau de purification. Un tableau de purification a l'allure présentée ci-dessous:

3.5.1 Unités enzymatiques

Unités enzymatiques et vitesse initiale. L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzymes active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie en termes **de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps.**

- **L'unité officielle: 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 μ kat (10^{-6} katal).

La plupart des biochimistes préfèrent l'unité internationale(UI), qui est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de : 1μ mole de substrat par minute (01μ mole/min) .

- **L'activité enzymatique moléculaire(AEM)** : est le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme par minute. $AEM = \mu \text{ mol/min} / \mu \text{ mol protéine} = UI / \mu \text{ mol protéine}$

- **L'activité spécifique(AS)** : est le nombre de molécules de substrat transformées par minute et par mg d'enzymes ($\mu \text{ mol/min/mg de protéine}=\text{UI/mg de protéines}$). Elle mesure le **degré de pureté** d'une préparation enzymatique.

AS= Activité enzymatique (UI= μ mole de protéine/min) / Quantité de protéine en mg

- **Le rendement de la purification** =Activité enzymatique totale de l'extrait (obtenu) / Activité enzymatique totale de départ X 100 (x100% pour l'exprimer en%)
- **Le taux (indice) de purification** = Activité spécifique de l'extrait (obtenu) /Activité spécifique de départ (initiale)

| Étape | Protéines totales (mg) | Activité totale (U) | Activité spécifique (U/mg protéines) | Facteur de purification | Rendement (%) |
|---|------------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------|
| Homogénat initial | 600 | 6000 | 10.0 | 1 | 100 |
| Supernatant | 150 | 3750 | 25.0 | 2.5 | 63 |
| Fraction 20-50% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 40 | 2500 | 62.5 | 6.3 | 42 |
| Chromatographie d'échange ionique | 8 | 2000 | 250.0 | 25.0 | 33 |

Ce tableau sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Il fait appel à des notions et à des termes précis. Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure. Normalement cette valeur est de plus en plus élevée au fur et à mesure des étapes. En effet la purification a justement pour but d'obtenir une protéine de plus en plus pure, ayant donc une préparation dont l'activité spécifique de plus en plus élevée. Le rendement de la purification est la proportion, en %, de la quantité de la protéine purifiée qui reste par rapport à la quantité initiale. Le rendement diminue à chaque étape puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel à chacune. Une purification est donc un "compromis" entre le désir d'obtenir une protéine la plus pure possible (facteur de purification élevé) en quantité maximale (rendement élevé). En effet, chaque étape supplémentaire, qui permet d'augmenter la pureté, cause des pertes de matériel, donc diminue le rendement. Au cours d'une purification typique le facteur de purification augmente au fur et à mesure des étapes tandis que, parallèlement, le rendement diminue.

Pour construire un tel tableau, on dose à chaque étape de purification la quantité de protéines totales et l'activité volumique de la protéine en question. Généralement il s'agit d'une enzyme et son activité est exprimée en unités enzymatiques. D'autres unités peuvent servir à définir des protéines sans activité enzymatique. Sachant le volume de chaque fraction, la concentration des protéines totales et l'activité volumique, il devient facile de construire le tableau de purification.

On peut obtenir les valeurs du tableau précédent avec les données suivantes. Pour chacune des fractions qu'on a obtenues lors de la purification, on a mesuré le volume et prélevé des aliquotes pour doser les protéines totales et l'activité de la protéine qu'on voulait isoler. Par exemple, l'homogénat du tableau a un volume de 150 mL et contient 4 mg de protéines/mL et 40 U d'enzyme/mL. Cela permet d'obtenir la quantité de protéines totale ($150 \text{ mL} \times 4 \text{ mg/mL} = 600 \text{ mg}$ de protéines totales), l'activité totale ($40 \text{ U/mL} \times 150 \text{ mL} = 6000 \text{ U}$) et l'activité spécifique ($6000 \text{ U} \div 600 \text{ mg} = 10 \text{ U/mg}$). De la même façon on obtient les valeurs des autres fractions. La purification et le rendement se déduisent ensuite facilement. Ainsi pour le surnageant, on peut calculer la purification ($25 \text{ U/mg} \div 10 \text{ U/mg} = 2.5\text{X}$) et le rendement ($3750 \text{ U} \div 6000 \text{ U} = 62.5\%$).

3.6. Conservation et rangement des protéines

Les protéines purifiées sont souvent peu stables et doivent généralement être conservées dans des conditions les protégeant de la dégradation. La conservation à basse température est de rigueur. Certaines protéines sont beaucoup plus exigeantes que d'autres et doivent être gardées à -80°C , cependant beaucoup se conservent aux alentours de -20°C . Si les protéines sont stables sous forme sèche (en poudre), c'est la meilleure façon de les conserver. Il est possible aussi de garder des protéines qui se dénaturent durant la congélation dans une solution de glycérol. Cette méthode a l'avantage que le glycérol ne dénature pratiquement jamais les protéines et ne gèle pas aux températures de l'ordre de -20°C . Certaines enzymes peuvent aussi être conservées dans une suspension de cristaux de sulfate d'ammonium. Ces cristaux semblent stabiliser certaines protéines. Il convient aussi d'éviter de répéter des cycles de congélation et de décongélation. La façon la plus commune d'éviter ce problème est de congeler la préparation en petites fractions qui pourront être décongelées une à la fois. Le rangement dans des solutions de glycérol ou des suspensions de sulfate d'ammonium permet aussi d'éviter ce problème puisqu'elles restent liquides à -20°C ; mais il faudra probablement se débarrasser de ce glycérol ou de ce sulfate d'ammonium pour travailler avec ces protéines

Durant toutes ces étapes, il faut évidemment éviter de dénaturer la protéine qu'on veut isoler. Il faut donc utiliser des milieux dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des protéines (pH, force ionique, osmolarité, antioxydant, etc.). Pour cela on fabrique certains milieux plus ou moins "physiologiques", comme le PBS ou le salin, qui possèdent quelques-unes de ces propriétés. Pour maintenir le pH à un niveau adéquat on inclut généralement un produit tampon dans les solutions. Il faut aussi éviter de dénaturer les protéines en les exposant à l'air ou en les faisant mousser, ce qui cause une dénaturation et favorise l'oxydation, particulièrement des cystéines en cystine (i.e. formation d'un lien disulfure). Les protéines cytoplasmiques sont particulièrement sensibles car leur milieu naturel, le cytosol, est légèrement réducteur. Elles supportent donc mal une solubilisation dans le milieu ambiant qui est oxydant. Une oxydation peut non seulement inactiver ou dénaturer les protéines, mais aussi causer leur agrégation si la cystéine d'une protéine forme un lien disulfure avec celle d'une autre protéine. L'emploi d'agents anti-oxydant comme le β -mercapto-éthanol ou un des réactifs de Cleland (dithiothréitol ou dithiotréitol) est recommandé pour protéger ces protéines particulièrement sensibles. Ces deux derniers remplacent de plus en plus souvent le β -mercaptoéthanol, car ils sont beaucoup moins "odorants".

La présence d'EDTA, pour chelater les ions métalliques, peut être utile car ces derniers accélèrent les réactions d'oxydation des protéines. Le travail à basse température, "sur glace", ralentit aussi les processus de dénaturation. Les opérations d'homogénéisation mécanique et

de centrifugation sont particulièrement à surveiller, car elles causent souvent une surchauffe de l'extrait.

Quand on isole ou on travaille avec de faibles quantités de protéines, il est important d'éviter de contaminer la préparation avec des protéases. Les sources de protéases peuvent être endogènes, présentes dans la préparation même, par exemple dans les lysosomes qui sont brisés lors du broyage des cellules. Certains tissus comme le pancréas en contiennent de grandes quantités. Elles peuvent aussi être exogènes, provenant de l'extérieur, comme les mains, la salive, etc. Il existe de nombreuses préparations commerciales d'inhibiteurs ayant des spécificités diverses par rapport au type de protéase. Ces inhibiteurs peuvent être des produits chimiques simples comme l'EDTA qui bloque les métalloprotéases. On retrouve aussi des produits chimiques spécialisés, comme le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) qui inhibe les protéases à sérine. Des inhibiteurs biologiques sont aussi employés, comme la pepstatine, la β -macroglobuline, etc. On peut même se procurer des mélanges contenant un "cocktail" de divers inhibiteurs.