

Aspect méthodologique d'isolement et purification des protéines

La purification d'une protéine est un processus qui prend plusieurs étapes: extraction initiale, précipitation différentielle, dialyse, chromatographies de divers types, etc.

Principales étapes d'une purification

- Typiquement, on broie tout d'abord le matériel d'où on veut extraire la protéine (tissu animal, partie de plantes, bactéries, etc). Divers appareils peuvent être employés à cette fin. Cette homogénéisation se fait dans un tampon de composition appropriée. Cette étape est évidemment la première.
- L'homogénat ainsi obtenu est ensuite clarifié, le plus souvent par centrifugation, pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées ou encore pour obtenir la fraction cellulaire contenant la protéine recherchée. 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. Certains tissus comme le pancréas et le foie sont reconnus pour contenir de grandes quantités de ces enzymes, ce qui pose tout un défi quand on travaille avec ces tissus. Une solution fréquente à ce problème est l'inclusion dans les solutions d'inhibiteurs de protéases qui sont soit physiologiques (inhibiteur de trypsine, antipainé, leupeptine...) ou artificiels (E64, PMSF...). Pour maximiser leur action, on les emploie souvent en mélange ("cocktails") à large spectre d'action.
- Ensuite on utilise diverses techniques pour séparer la protéine recherchée de toutes les autres présentes. 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'interactions hydrophobes, 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, la chromatographie d'affinité 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.

MÉTHODOLOGIE ET MATERIEL

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 fabrique certains milieux plus ou moins "physiologiques", comme le 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.

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 (formation d'un lien disulfure). Les protéines cytoplasmiques sont particulièrement sensibles car leur milieu naturel, le cytosol, 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 liens

disulfures.

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.

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.

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).

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.

Tableau de 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, RIA, etc. Un tableau de purification (voir section "calculs") 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 contaminants diminue au fur et à mesure du processus pour finir, idéalement, par une seule espèce protéique.

CALCULS

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%.

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

Étape	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Facteur de purification (n fois)	Rendement (%)
Homogénat initial	600	6000	10.0	1	100
Surnageant	150	3750	25.0	2.5	63
Fraction 20-50% sat. (NH ₄) ₂ 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.

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, par dosage enzymatique s'il s'agit d'une enzyme. Si la protéine n'a aucune activité enzymatique, on peut recourir à des bio-dosages, ELISA, RIA, etc. Pour connaître la quantité totale de protéines il faut

également connaître le volume de la fraction en question: [protéines dans la fraction] * volume de fraction (par exemple mg/mL * mL).

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 ($3750 \text{ U} \div 6000 \text{ U} = 62.5\%$).

Tableau de purification (exercice d'application)

Une enzyme de masse moléculaire 70000, présente dans le cerveau de rat, est purifiée en deux étapes de chromatographie, à partir d'un extrait brut de 25 g de protéines. Cet extrait présente une activité enzymatique spécifique de 400 UE / g de protéines.

- Etape 1 :

La première étape consiste en une chromatographie d'exclusion sur colonne : les 25 g de protéines sont repris dans un tampon à pH 7,4 puis déposés sur la colonne à un temps zéro. A partir de ce moment, on recueille en sortie de colonne des fractions éluées de 5 ml dans lesquelles on dose l'activité enzymatique. Le résultat des dosages est donné ci-dessous, ainsi que la concentration protéique de chaque fraction :

n° de la fraction :	AE (UE/ml) :	concentration protéique (mg/ml) :
1	4	420
2	37	540
3	328	480
4	1256	570
5	216	420
6	23	280
7	2	250

AE : activité enzymatique. **UE** : nombre d'unités enzymatiques.

Les trois fractions contenant majoritairement l'enzyme d'intérêt sont recueillies et mélangées.

- Etape 2 :

Le mélange des trois fractions (pH 7,4) est déposé sur une colonne contenant une résine échangeuse d'ions, qui va permettre la deuxième étape de purification de l'enzyme (pHi de l'enzyme = 9,6). Au cours de l'éluion, des fractions de 5 ml sont récoltées et l'activité enzymatique est dosée dans chacune de ces fractions (voir tableau ci-après).

n° de la fraction :	AE (UE/ml) :
1	1
2	3
3	2
4	2
5	8
6	982
7	12

La fraction n° 6 est récupérée et la densité optique à 260 nm est mesurée sur cette fraction : $DO_{260\text{ nm}} = 0,740$. La valeur du coefficient d'extinction molaire pour l'enzyme est : $\epsilon = 115\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La longueur de la cuve est 1 cm. (On considérera pour les calculs que l'enzyme est pure.)

Questions :

1 - A l'issue de la chromatographie d'exclusion (étape 1), quelles sont les trois fractions que l'on mélange ? Calculer le nombre total d'UE recueilli, ainsi que la quantité totale de protéines. Quel est le volume d'élution de l'enzyme ?

- **Fractions :**

- **Nombre total d'UE recueilli :**

- **Quantité totale de protéines :**

- **Volume d'élution :**

2 - Quel est le type d'ion que peut échanger la résine de l'étape 2 ? Justifier la réponse. Donner un exemple de groupement chimique pour une telle résine.

- **Type d'échangeur d'ions :**

- **Exemple de groupement :**

3 - A quel pH va être réalisée l'élution pour la chromatographie échangeuse d'ions ? Justifier la réponse. Quel est le volume d'élution de l'enzyme ?

- **Volume d'élution :**

4 - Déterminer le rendement de chacune des 2 étapes de purification, ainsi que le rendement global.

5 - Calculer la quantité de protéines récupérée après l'étape 2 (chromatographie d'échange d'ions). Quel est le taux de purification de l'enzyme à l'issue de chaque étape chromatographique ? Conclusion ?

(pour répondre aux questions 4 et 5, remplir le tableau ci-dessous :)

	protéines (g) :	AE (UE) :	rendement :	taux de purification :
extrait :				
étape 1 :				
étape 2 :				

- **Rendement global :**

- **Conclusion :**

Précipitation différentielle (Aspect technique)

Le tableau ci-dessous donne les quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

La procédure suivie d'habitude quand on travaille en aveugle est de préparer quelques précipitats avec des concentrations croissantes de sulfate (qu'on peut ajouter directement à la solution protéique):

- | | |
|---|---|
| (1) Ajustement à 20% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C20) |
| (2) Ajustement du surnageant à 40% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C40) |
| (3) Ajustement du surnageant à 60% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C60) |
| (4) Ajustement du surnageant à 80% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C80) |
| (5) Ajustement du surnageant à 100% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C100) |

Notre protéine se trouvera dans une des fractions C20, C40, C60, C80 ou C100.

Bien sûr, si on sait à l'avance comment notre protéine réagit au *salting-out*, on peut viser avec plus de précision. Si elle précipite à environ 35% sulfate, on fera une première coupure avec 30% sulfate, une deuxième à 40% sulfate, et une dernière (juste au cas) à une teneur en sel plus élevée. Mais nous saurons déjà que notre protéine se trouve dans la fraction C40, et qu'elle est débarrassée de tout ce qui précipite en-deçà de 30% sulfate et au-delà de 40%.