

Isolement et purification des enzymes

Introduction

Dans la biologie moderne, la connaissance structurale des macromolécules, et tout particulièrement des protéines, prend une place de plus en plus importante. Ainsi, l'étude des composants moléculaires d'une cellule, tel que les enzymes, nécessite leur extraction et leur séparation du contenu cellulaire à partir d'un milieu biologique (animal, végétal ou microbien).

Pour mener une étude structurale, il faut produire la protéine sous sa forme native, avec un haut degré de pureté et un bon rendement afin d'obtenir les quantités nécessaires. Les méthodes de purification dépendent d'abord de la matière première (d'origine animale, végétale, microbienne, ...) et de la localisation de la protéine (intra- ou extracellulaire, soluble ou membranaire).

Pour ne pas perdre l'activité de la protéine et ne pas la dénaturer, il faut travailler à basse température (4 à 10°C), avec des milieux tamponnés, additionnées d'agents de protection plus ou moins spécifiques (antiprotéases, saccharose, ...) et aussi rapidement que possible, avec le plus grand soin.

1. Sources des enzymes :

L'origine d'une enzyme est généralement un tissu animal, végétale ou des cellules microbiennes (bactéries, levure, champignon, etc) ; 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.

2. Localisation des enzymes :

Il existe :

Enzymes extracellulaires (exoenzymes) : synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis sécrétées dans l'espace extracellulaire.

Enzymes intracellulaires (endoenzymes) : synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule où elles sont généralement liées à des particules subcellulaires ou membranes intracellulaires rendant leur extraction plus difficile.

3. Les étapes de la purification

Le procédé de purification des enzymes ou de protéines s'effectue généralement selon trois grandes étapes principales :

L'extraction, le fractionnement et la purification finale.

Le tableau ci-dessous récapitule le protocole de purification :

Origines du matériel biologique	Etape	Molécules	Extrait
<i>Animale</i>	Extraction	Mélange de molécules solubles	Total
<i>Végétale</i>	Fractionnement	Mélange de familles de molécules	Brut
<i>Microbienne</i>	Purification	Molécules identiques	Pure

3.1. Méthodes d'extraction

Elles consistent à libérer les protéines des cellules ou des constituants cellulaires, ce qui peut nécessiter l'éclatement des parois et membranes par divers procédés.

Définition

L'extraction consiste à transférer un composé d'une phase à une autre :

- D'une phase liquide à une autre phase liquide.
- D'une phase solide à une phase liquide.

Donc l'extraction a pour objectif de libérer les enzymes des cellules ou des structures subcellulaires au sein desquelles elles se trouvent. Il est ainsi nécessaire de détruire selon le cas la paroi, la membrane cellulaire et les structures subcellulaire par moyens physiques ou chimiques efficaces et non dénaturantes.

Choix de la technique d'extraction :

Le choix de la technique se fait en fonction de :

- ✓ Type de cellules utilisées ;
- ✓ La localisation de l'enzyme ;
- ✓ Les conditions de purification (température, pH, sels, solvants, etc) ;
- ✓ L'équipement disponible.

Procédés mécaniques

- ✓ Sont fondés sur le broyage de la matière première, généralement en milieu aqueux, tamponné et salin afin d'assurer la solubilité des protéines.
- ✓ Le broyeur utilisé peut être mécanique, électrique ou encore manuel comme l'appareil de Potter.
- ✓ L'homogénat obtenu est plus ou moins grossiers et dépend de la nature de la matière première. Il contient des molécules de diverses natures mais solubles dans ces conditions.

Procédés physiques

Ils s'appliquent surtout aux cellules isolées, microbiennes ou provenant d'une culture et aux constituants cellulaires préalablement séparés. Les procédés les plus utilisés sont :

Les cycles de congélation/décongélation

Créent des microcristaux et cassent les structures cellulaires lors des brusques changements de phases (par exemple : allers retours de -80°C à $+37^{\circ}\text{C}$ ou de l'azote liquide à température ambiante).

La sonication

Déstabilise les édifices membranaires par les ultrasons (ondes sonores).

L'homogénéisation à haute pression

Utilisées surtout pour les suspensions bactériennes, crée une surpression en faisant passer la suspension congelée à travers un orifice restreint.

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.

Précipitation à froid (cryoprécipitation)

La solubilité de la plupart des protéines augmente avec la température jusqu'à un seuil limité (40 et 50°C). Au-delà de ce seuil, les protéines précipitent irréversiblement sous forme d'un coagulum. Donc elles perdent leur solubilité à basse température ($+4^{\circ}\text{C}$) de façon différente entre elles.

Procédés chimiques

Regroupent les méthodes :

Perméabilisation des membranes :

Soit par lyse alcaline si la protéine à purifier est stable dans ces conditions, soit par lyse enzymatique (emploi du lysozyme, trypsine ou phospholipase C).

L'extraction par solvants organiques :

Elle se limite à l'emploi de solvants polaires, comme des alcools et l'acétone, car ils ne doivent pas être dénaturants pour la protéine à purifier.

Extraction par les détergents :

Les détergents, dans certaines conditions de pH et de force ionique, vont se combiner aux lipides et protéines membranaires pour former des micelles, assurant l'extraction des protéines ancrées tout en maintenant leur stabilité.

3.2. Méthodes de fractionnement

Ces méthodes sont basées sur les différences physicochimiques ou biologiques entre les molécules à séparer. Elles utilisent les propriétés caractéristiques des protéines tels que : la taille, la densité, la charge, la solubilité, l'hydrophobicité et certains marqueurs ajoutés.

✓ Les précipitations sélectives :

- **Précipitation isoélectrique.** Les protéines précipitent au point isoélectrique (pI ou pHi) car, à cette valeur de pH, elles n'ont pas de charge électrique nette (forme zwitterion).
- **Précipitation par affinité** repose sur la formation de réseaux intermoléculaires créés par fixation de ligands multifonctionnels aux protéines à purifiées. Lorsque le réseau est suffisamment important en taille, il précipite (anticorps IgG, substrat ou inhibiteur).

✓ La dialyse.

Elle permet de séparer des substances en utilisant leur capacité à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse.

✓ L'électrodialyse.

Elle permet l'élimination des sels minéraux par l'établissement d'un courant électrique continu de quelques milliampères.

✓ La filtration.

Elle consiste à séparer les particules solides qui se trouvent en suspension dans un liquide en utilisant des filtres. Le milieu filtrant est composé de papier ou d'une matière granulaire qui forme des canaux étroits dans lesquels circule le liquide (verre fritté).

✓ L'ultrafiltration.

Elle permet la séparation des substances selon leur taille moléculaire, donc selon leur masse moléculaire, en utilisant des membranes à perméabilité sélective. La force permettant l'ultrafiltration est une pression exercée sur le liquide à filtrer par de l'azote ou de l'air comprimé.

✓ Centrifugation

Elle permet de séparer les constituants d'un mélange sur la base de leur différence de densité dans un solvant et en utilisant une force centrifuge. Elle peut être différentielle ou en gradient.

✓ Ultracentrifugation préparatives :

Elle permet d'obtenir des accélérations élevées (≥ 100000 g). Son but est d'obtenir des préparations purifiées de particules présentes dans un milieu liquide. Elle peut être différentielle ou en gradient.

✓ La chromatographie :

- Elle permet de séparer les éléments d'un mélange en solution plus ou moins complexe.
- Le principe de base est la répartition des molécules d'un mélange (analyte) entre deux phases non miscibles suivant un coefficient de partage K_d .
- L'une de ces phases, appelée phase stationnaire, peut être solide ou liquide. La seconde, la phase mobile, peut être liquide ou gazeuse.
- Les molécules sont plus ou moins retenues selon l'importance de leur interaction avec la phase stationnaire. Elles sont alors entraînées par la phase mobile plus ou moins vite en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui permet leur séparation.
- La chromatographie peut être analytique (qualitative ou quantitative) ou préparative.
- Les techniques chromatographiques sont classées selon le mécanisme de séparation mis en jeu et les propriétés de la phase stationnaire.

○ **Chromatographie d'exclusion moléculaire :**

Appelée aussi chromatographie sur gel filtration ou de tamisage moléculaire, est utilisée pour séparer les molécules selon leur taille par des composés organiques polymères. Ces derniers sont capables de s'hydrater et de donner, grâce à un réseau tridimensionnel particulier, une matrice poreuse appelée « gel » qui constitue la phase stationnaire.

Les particules les plus larges sont complètement exclues alors que les petites molécules sont distribuées entre la phase mobile et la phase stationnaire puisqu'elles peuvent diffuser dans les pores du gel.

○ **Chromatographie d'échange d'ions (anionique ou cationique)**

Cette technique permet de séparer les molécules chargées grâce à l'utilisation des échangeurs d'ions. Ainsi la charge nette est dépendante du pKa de la substance et du pH de la solution. La fixation des analytes s'effectue selon leur affinité.

○ **Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite**

Dans cette technique, la phase stationnaire est constituée par un minéral comme le phosphate de calcium $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. La rétention et la désorption des protéines est selon le point isoélectrique situé entre 3,5 et 11. L'éluion des protéines acides et basiques se fait par des sels.

- **Chromatographie d'interactions hydrophobes**

L'hydrophobicité est définie comme la répulsion qui s'établit entre une structure non polaire et un environnement polaire tel que l'eau.

Dans la chromatographie HIC, la phase stationnaire contient une matrice hydrophile (gel) portant des chaînes carbonées apolaires ou des groupes aromatiques comme le groupe phényle. La phase mobile est constituée par une solution aqueuse chargée en sels.

- **Chromatographie d'affinité**

Cette chromatographie exploite les propriétés des interactions biologiques afin de séparer et de purifier les substances. Elle a été à l'origine développée pour la purification des enzymes. Elle nécessite que le matériel à isoler soit capable de se lier réversiblement à un ligand spécifique, lequel est attaché à une matrice insoluble (dextrans réticulés, agarose, gels de polyacrylamides, ...).

L'éluion de la molécule purifiée fixée est effectuée soit spécifiquement (avec un compétiteur), soit non spécifiquement (par changement de pH).

- **Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)**

Dans cette technique, la séparation se produit dans une colonne où la phase stationnaire est très divisée et supportant sans dommage une pression qui peut s'élever jusqu'à 10 MPa. La diversité de la phase stationnaire permet à la HPLC de mettre en jeu toutes les interactions possibles (partage, échange d'ions, exclusion moléculaire, affinité et interactions hydrophobes).

3.3. Méthodes de purification finale

La dernière étape de chromatographie peut permettre d'obtenir la pureté attendue, mais généralement il reste un ultime contaminant qu'il faut éliminer.

4. Techniques de contrôle de pureté biochimique

Il existe des méthodes qui permettent de contrôler la pureté d'un extrait après l'étape finale :

- ✓ Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (sodium dodécyl sulfate) SDS-PAGE :

C'est la méthode la plus employée pour séparer et déterminer le poids moléculaire des protéines. Le SDS, appelé aussi laurylsulfate, est un détergent anionique qui se lie fortement aux protéines et les dénatures.

- ✓ Isoélectrofocalisation :

Cette technique, appelée aussi électrofocusing, permet de séparer les protéines et d'autres molécules biologiques amphotères dans un gradient de pH où la région anodique est à un pH inférieure à celui de la région cathodique. Ainsi, les analytes cessent de migrer au pH isoélectrique qui donne l'état zwitterion.

✓ Spectre de résonance magnétique nucléaire (spectre RMN) :

C'est une technique qui repose sur le magnétisme du noyau. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption d'une radiation dans le domaine des fréquences radio par un noyau atomique dans un champ magnétique fort.

Elle constitue l'une des plus puissantes méthodes de détermination de la structure des molécules aussi bien organiques qu'inorganiques. L'absorption est fonction de certains noyaux présents dans la molécule étudiée.

- ✓ Composition en acides aminés,
- ✓ Séquençage,
- ✓ Utilisation de critères d'ordre immunologique.

5. Critères de l'homogénéité d'une protéine enzymatique purifiée

L'activité d'une enzyme dans une fraction particulière est exprimée par son activité spécifique qui est déterminée à chaque étape de purification :

$$Zs = Z / [Pt]$$

Un bon fractionnement permet d'obtenir une fraction avec une activité spécifique élevée.

Les principaux critères d'homogénéité d'une protéine sont :

Le degré de purification (enrichissement E)

Appelé aussi facteur de purification, il correspond au rapport de l'activité spécifique après purification (Zs_2) à l'activité spécifique avant purification (Zs_1) :

$$\text{Degré de pureté (E)} = Zs_2 / Zs_1$$

Le rendement de purification

Appelé aussi pourcentage de récupération, il correspond au rapport de l'activité enzymatique après purification (Z_2) à l'activité enzymatique avant purification (Z_1) :

$$\text{Rendement (\%)} = Z_2 / Z_1 \cdot 100$$

Exemple de Tableau de purification :

Fraction	Volume de la fraction	Masse de protéine mg	Activité UI	Activité spécifique UI /mg	\mathcal{F}	Rdt %
1. extrait cellulaire brut	1400	10000	100000	10	1	100
2. précipitation	280	30000	96000	32	3,2	96
3. Chromatographie échangeuse d'ions	90	400	80000	200	20	80
4. Chromatographie d'exclusion moléculaire	80	100	60000	600	60	60
5. Chromatographie d'affinité	6	3	45000	1500	150	45