

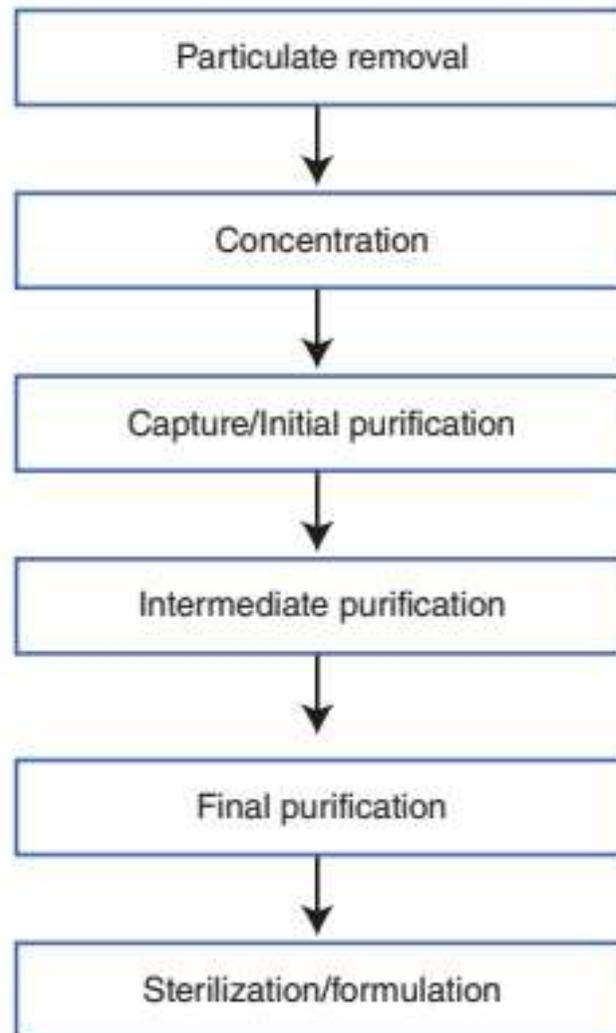
Tags d'affinité et purification des protéines

Purification des protéines

- Lors de la production d'une protéine in vitro, une protéine doit être purifiée et séparée des autres composants cellulaires.
- Ce processus commence généralement par une lyse cellulaire, au cours de laquelle la membrane cellulaire est rompue et son contenu interne libéré dans une solution appelée lysat brut.
- Le mélange obtenu peut être purifié.

Purification des protéines recombinantes

Downstream processing



Purification des protéines

Outils analytiques :

- Chromatographie
- Électrophorèse
- Spectrométrie de masse
- Techniques spectroscopiques et autres pour l'étude des structures d'ordre supérieur
 - Dichroïsme circulaire
 -

Purification des protéines

- Pour les protéines naturelles, une série d'étapes de purification peut être nécessaire pour obtenir une protéine suffisamment pure.
- Pour simplifier ce processus, la technologie de l'ADN recombinant est souvent utilisée pour ajouter des caractéristiques chimiques aux protéines afin de faciliter leur purification sans affecter leur structure ni leur activité.
- Dans ce cas, un marqueur (**Tag**), constitué d'une séquence d'acides aminés spécifique est utilisé.
- Plusieurs marqueurs ont été développés pour aider les chercheurs à purifier des protéines spécifiques à partir de mélanges complexes.

Purification des protéines

- De nombreux vecteurs de clonage ont été conçus pour que la protéine exprimée soit fusionnée à une autre protéine, appelée **Tag**, qui peut être utilisée pour faciliter sa purification.
- De nos jours, les vecteurs de clonage sont généralement construits de manière à ce que la séquence codante d'une séquence d'acides aminés clivée par une protéase spécifique soit insérée entre la séquence codante du Tag et le gène exprimé (gène d'intérêt).
- Après purification, le Tag peut être clivée par la protéase spécifique pour obtenir une protéine normale ou quasi normale.

Purification des protéines

- Les **Tags** (ou marqueurs protéiques ou étiquettes protéiques) sont des séquences peptidiques génétiquement greffées sur une protéine recombinante. Ils sont fixés aux protéines à diverses fins.
- Ils peuvent être ajoutés à l'une ou l'autre extrémité de la protéine cible, de sorte qu'ils sont spécifiques de l'extrémité C-terminale ou N-terminale, ou à la fois de l'extrémité C-terminale et N-terminale.
- Certains Tags sont également insérés à des sites au sein de la protéine d'intérêt ; on les appelle marqueurs internes.

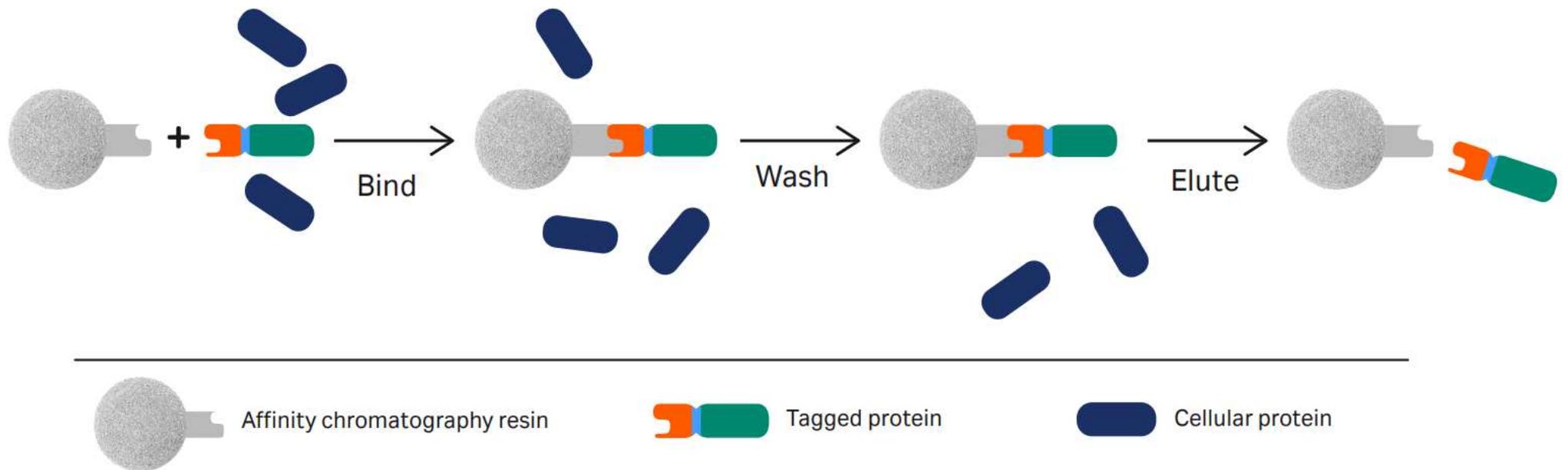
Tags : Exemples d'utilisation

- **Localisation des protéines**
- Une des applications les plus connues des Tags protéiques est la fusion d'une protéine d'intérêt à une protéine fluorescente. De telles protéines chimères sont utilisées en recherche fondamentale pour étudier la localisation des protéines, c'est-à-dire le positionnement dans la cellule de ces protéines.
- **Purification des protéines**
- Une des étapes importantes de la purification des protéines est la séparation de la protéine d'intérêt des protéines contaminantes. Pour cela, la protéine d'intérêt est généralement fusionnée à un tag, permettant « d'attraper » la protéine recombinante.

Avantages de la purification des protéines avec des Tags

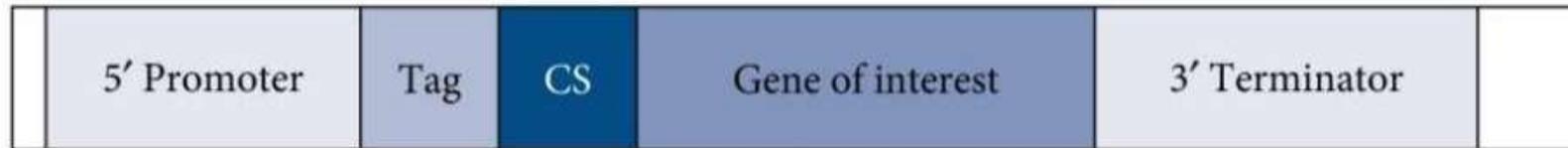
- **Purification rapide** : La haute sélectivité des Tags d'affinité pour cibler la protéine d'intérêt à partir d'un mélange protéique complexe permet une purification en une seule étape. Autrement dit, les protéines exprimées peuvent être directement transférées à travers la colonne de chromatographie avec le lysat cellulaire brut, le milieu et les contaminants présents.
- **Purification spécifique** : Le marquage des protéines recombinantes permet une séparation spécifique de la protéine d'intérêt de toutes les molécules présentes dans le mélange. Cette caractéristique est obtenue grâce à la forte affinité entre le Tag et son ligand.
- **Haute résolution** : La purification des protéines par Tag d'affinité est reconnue pour sa haute résolution. Elle se traduit par une séparation efficace de la protéine d'intérêt, facilement détectable sur le graphique d'élution.

Purification des protéines



Purification des protéines

(i)



↓
Transcribe and translate

N  C
Tag fused to the N-terminus of the protein of interest

A horizontal bar representing a protein. From left to right, it is divided into three segments: a light blue segment labeled 'N', a dark blue segment labeled 'CS', and a medium blue segment labeled 'C'. The 'CS' segment is positioned at the beginning of the protein.

(ii)



↓
Transcribe and translate

N  C
Tag fused to the C-terminus of the protein of interest

A horizontal bar representing a protein. From left to right, it is divided into three segments: a medium blue segment labeled 'N', a dark blue segment labeled 'CS', and a light blue segment labeled 'C'. The 'CS' segment is positioned at the end of the protein.

target cleavage sequence (CS)

Fusion partner (tag)	Size	Tag placement	Uses
His-tag	6, 8, or 10 aa	N- or C-terminus	Purification, detection
Thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
Calmodulin-binding domain (CBD)	26 aa	N- or C-terminus	Purification
Avidin/streptavidin <i>Strep</i>-tag	8 aa	N- or C-terminus	Purification, secretion
Glutathione <i>S</i>-transferase (GST)	26 kDa	N-terminus	Purification, solubility enhancement
Maltose binding protein (MBP)	396 aa (40 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
Green fluorescent protein (GFP)	220 aa (27 kDa)	N- or C-terminus	Localization, detection, purification
Poly-Arg	5-16 aa	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
N-utilization substance A (NusA)	495 aa (54.8 kDa)	N-terminus	Solubility enhancement

1. Tags d'affinité

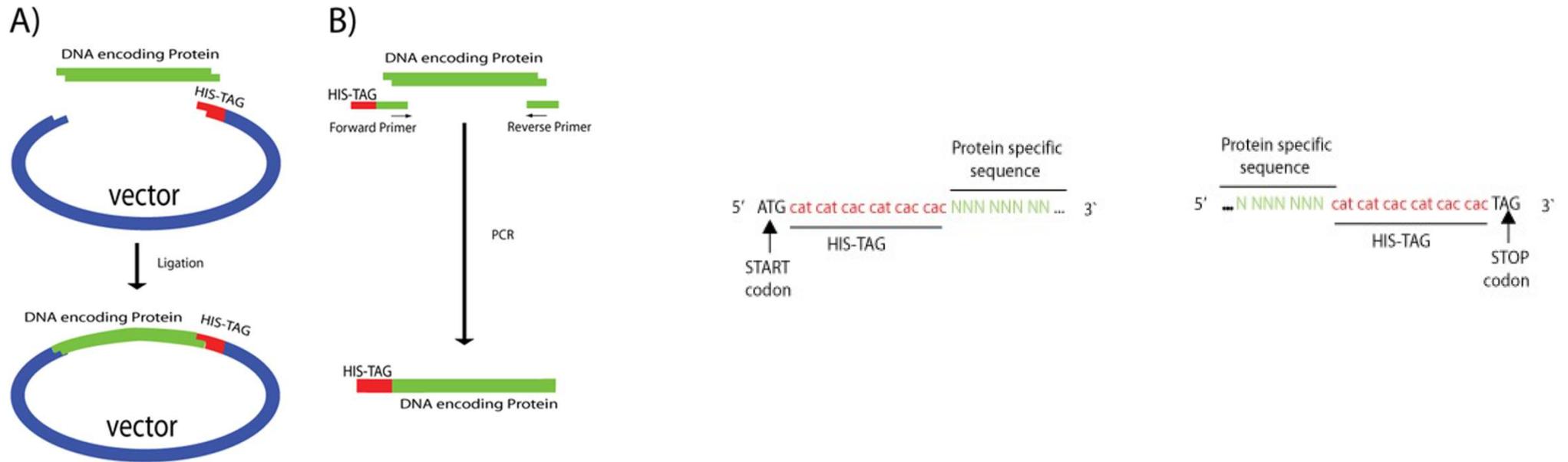
- Ces Tags sont de petite taille et altèrent rarement la structure et la fonction de la protéine. Elles permettent de séparer des protéines spécifiques d'un mélange protéique complexe.
- Des Tags d'affinité sont ajoutés aux protéines afin de permettre leur purification à partir de leur source biologique brute par une technique d'affinité.
- Parmi ces marqueurs d'affinité figurent
 - polyhistidine-tag,
 - la protéine de liaison à la chitine (CBP),
 - la protéine de liaison au maltose (MBP),
 - le Strep-tag
 - la glutathion-S-transférase (GST).
- Le Tag poly(His) est une protéine largement utilisée, qui se lie aux matrices contenant des ions métalliques immobilisés.

1. Tags d'affinité

- **Polyhistidine-tag (6His Tag) :**
- Le Tag poly-histidine est un motif d'acides aminés dans une protéine constitué d'au moins six résidus histidine, souvent insérés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine. On la désigne parfois par les noms hexa-histidine tag (en anglais), 6xHis-tag.
- Elle est fréquemment utilisée pour la purification par chromatographie d'affinité de protéines recombinantes

1. Tags d'affinité

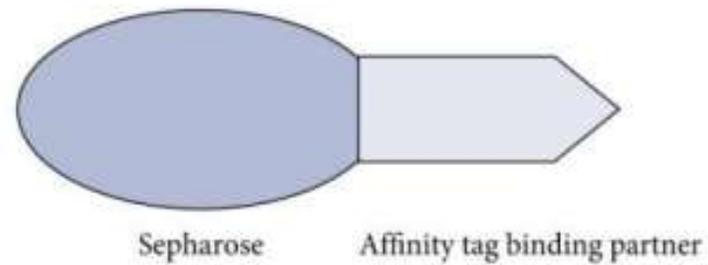
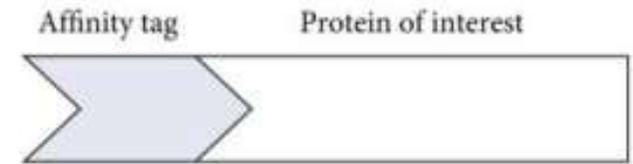
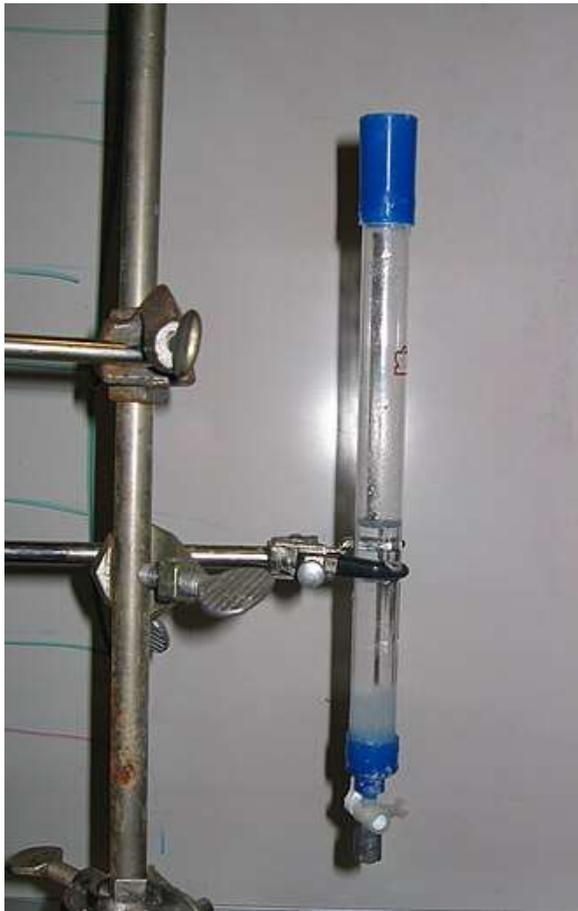
- **Polyhistidine-tag (6His Tag) :**



1. Tags d'affinité

- **Polyhistidine-tag (6His Tag) :**
- L'inclusion d'un Tag poly-histidine dans le gène recombinant permet d'avoir sur la protéine un motif pouvant être reconnu par chromatographie d'affinité et de purifier la protéine.
- Les médias d'affinité utilisés peuvent être le Ni Sepharose, le NTA-agarose, le His60 Ni, la résine HisPur, ou encore la résine TALON.
- Ils portent des ions métalliques, soit du nickel, soit du cobalt auxquels l'étiquette polyhistidine se lie avec une affinité micromolaire.
- La résine est alors éluée avec un tampon phosphate de façon à éliminer les protéines qui ne portent pas de résidus polyhistidine, et qui ne se sont donc pas liées à la résine.
- L'ajout de 20 mM d'imidazole permet souvent d'obtenir un meilleur résultat.

Chromatographie d'affinité



**Immobilized binding partner of
affinity tag**

TPEG (substrate analogue of
 β -galactosidase)

Glutathione

Immunoglobulin G

Cu II, Co II or Ni II

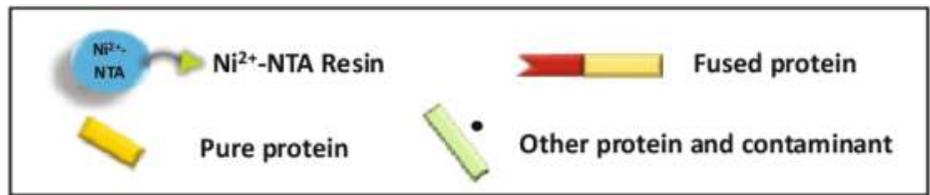
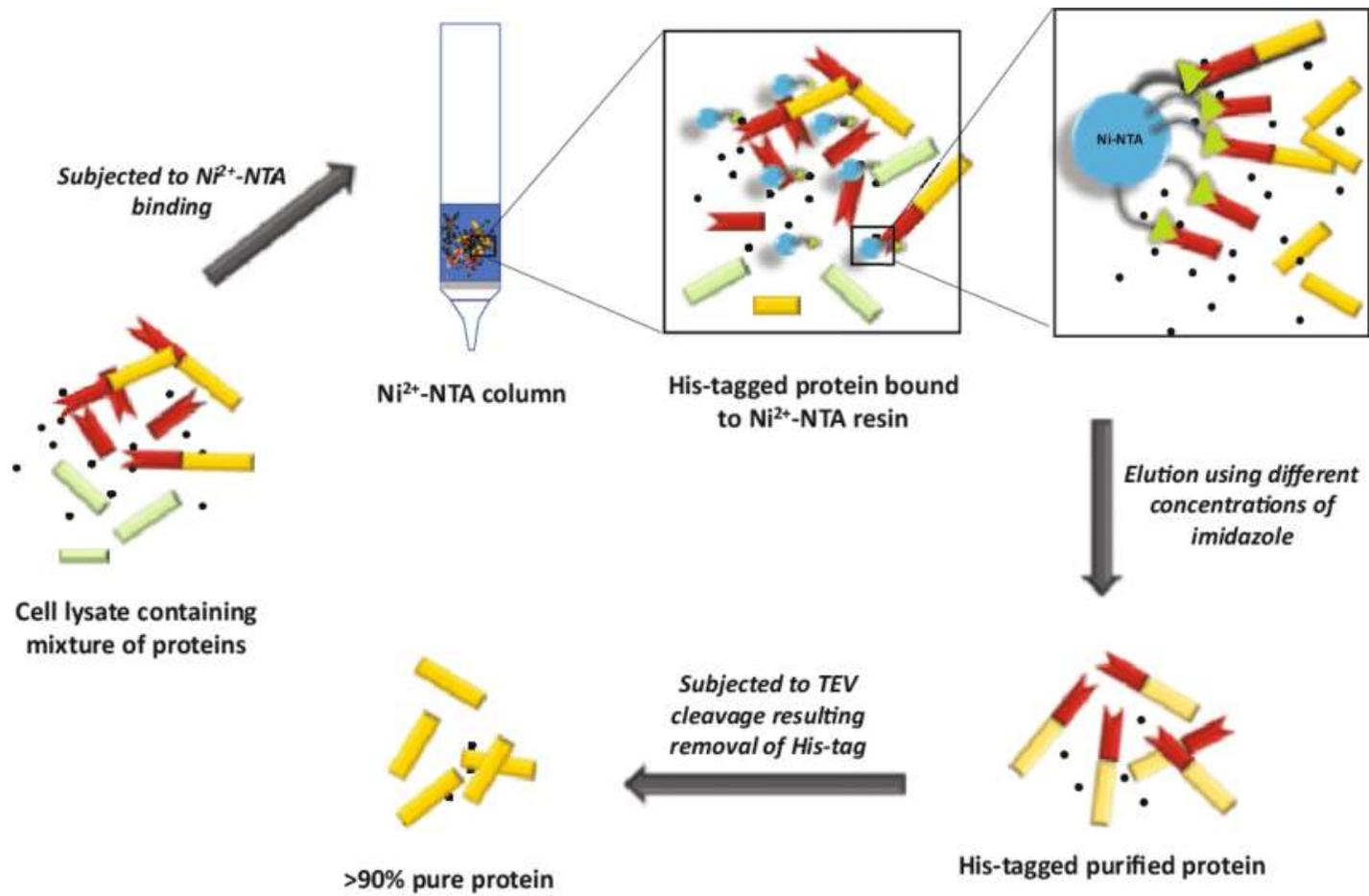
**Affinity tag fused to N- or C-terminus
of protein**

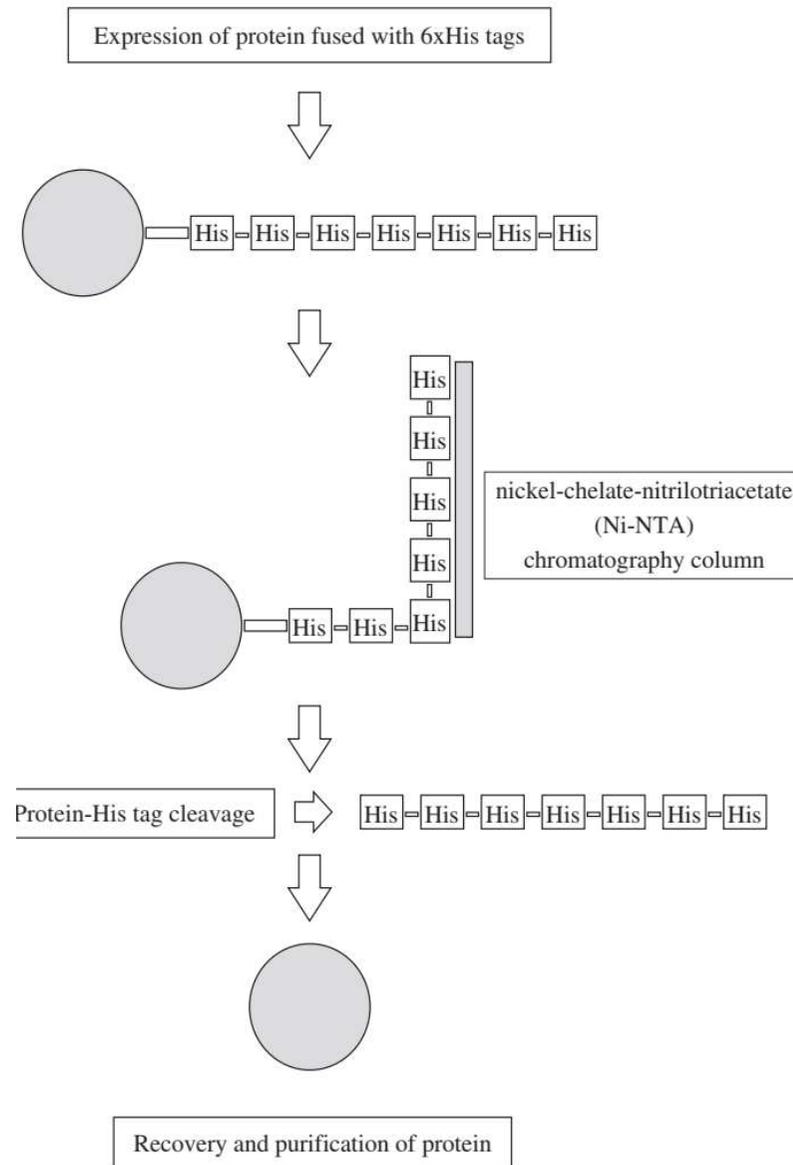
β -galactosidase

Glutathione-S-Transferase

Protein A

poly His or poly Cys





Recovery of proteins using His₆-tag and Ni-NTA chromatographic columns.

1. Tags d'affinité

- **Polyhistidine-tag (6His Tag)** : Marquage fluorescent
- Des marqueurs fluorescents appelés Hexahistidine CyDye ont été développés. Il s'agit d'atomes de nickel liés de façon covalente à des groupes EDTA eux-mêmes attachés à des fluorophores, permettant de créer des pigments qui s'attachent à l'étiquette polyhistidine.
- Cela permet de suivre la migration et la circulation des protéines modifiées.
- Cette technique est aussi efficace pour mesurer des distances en utilisant le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes;

2. Tags de solubilité

- Outre leurs propriétés purificatrices, les Tags de solubilité protègent les protéines marquées de la protéolyse et améliorent leur solubilité.
- Cependant, leur taille plus importante complexifie le processus en aval. Il est donc important de cliver le marqueur en fin de purification afin d'éliminer le risque d'altération de la conformation naturelle de la protéine d'intérêt.

2. Tags de solubilité

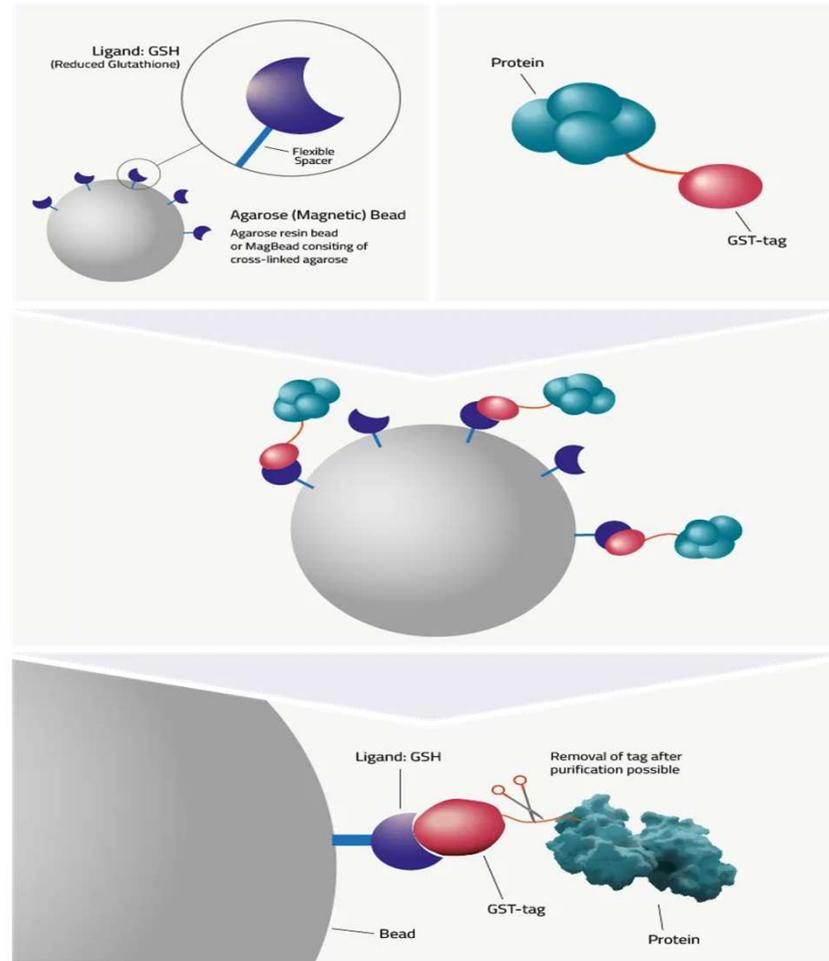
- Les Tags de solubilisation sont utilisés, notamment pour les protéines recombinantes exprimées par des espèces telles qu'E. coli, afin de favoriser leur repliement correct et d'empêcher leur agrégation dans les corps d'inclusion.
- Ces Tags comprennent
 - GST
 - la thiorédoxine (TRX) et
 - le poly(NANP).
 - MBP
- Certains marqueurs d'affinité, comme la MBP et la GST, jouent un double rôle d'agent de solubilisation.

2. Tags de solubilité

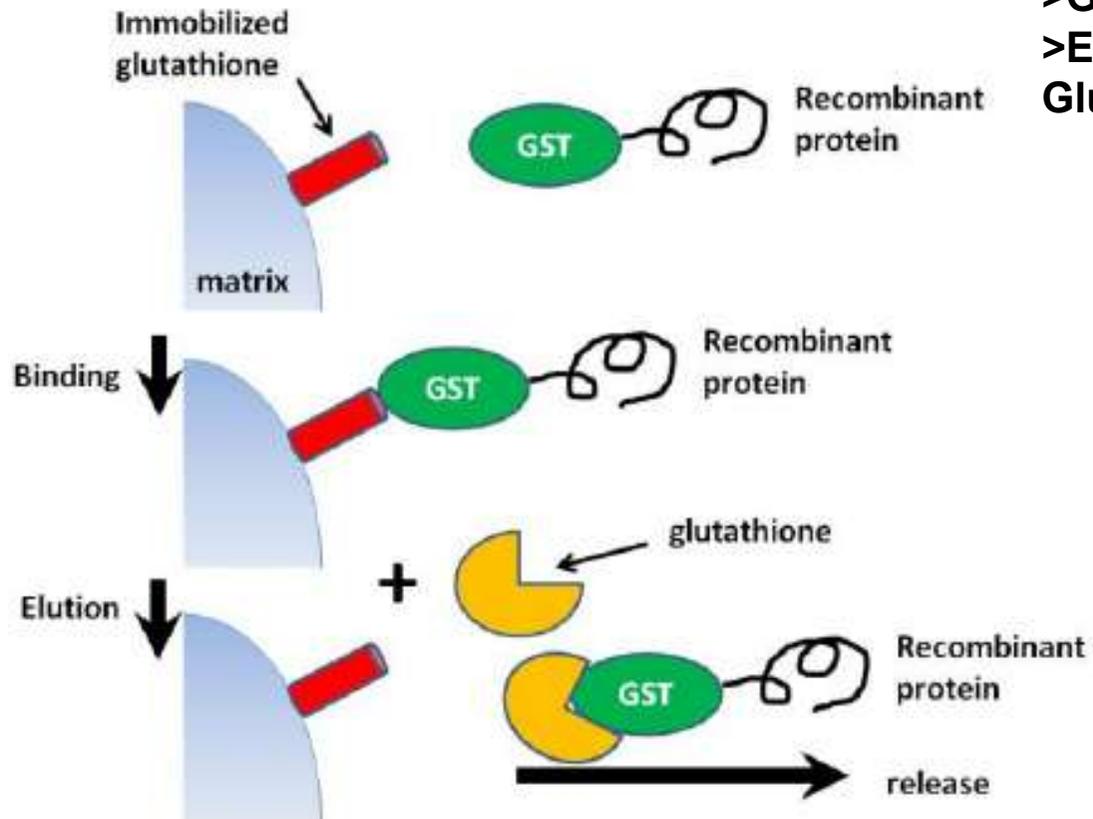
- **GST-tag:**
- Les glutathion S-transférases (GST), auparavant connues sous le nom de ligandines, sont une famille d'isoenzymes métaboliques de phase II eucaryotes et procaryotes, surtout connues pour leur capacité à catalyser la conjugaison de la forme réduite du glutathion (GSH) à des substrats xénobiotiques à des fins de détoxification.
- Le GST Tag est utilisé pour la purification des protéines depuis la fin des années 1980 et s'est imposé comme une méthode fiable pour les tests de purification de protéines exigeant un niveau de pureté optimal.
- La taille du marqueur GST est de 26 kDa, ce qui le rend très important par rapport aux autres Tags d'affinité. En théorie, il peut être fusionné à l'extrémité C ou N d'une protéine, mais nous recommandons fortement de l'ajouter à l'extrémité N. Jusqu'à présent, il a été utilisé avec succès pour purifier des protéines issues de cellules bactériennes, de levures et de cellules de mammifères.

2. Tags de solubilité

- **GST-tag:**



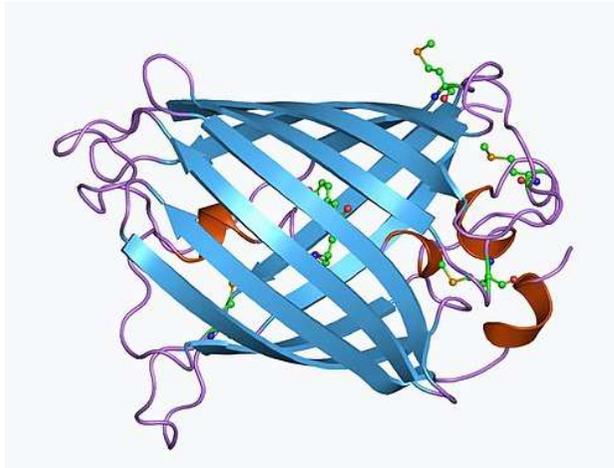
3. GST-Tagged Protein



>Glutathione Sepharose
>Elution with Reduced
Glutathione

3. Tags de fluorescence

- Les Tags fluorescents permettent de visualiser une protéine.
- La protéine fluorescente verte (GFP) et ses variantes sont les marqueurs fluorescents les plus couramment utilisés.
- Des applications plus avancées de la GFP incluent son utilisation comme rapporteur de repliement (fluorescent si plié, incolore sinon).



3. Tags de fluorescence

- **GFP Tag:**
- La protéine fluorescente verte (GFP) est une protéine qui présente une fluorescence verte lorsqu'elle est exposée à une lumière dans la gamme du bleu à l'ultraviolet.
- La GFP est une protéine autofluorescente de 30 Kda, découverte et isolée pour la première fois en 1962 à partir de la méduse *Aequorea victoria*
- En biologie cellulaire et moléculaire, le gène GFP est fréquemment utilisé comme rapporteur d'expression

3. Tags de fluorescence

- **GFP Tag:**
- Différents variants plus efficace ou émettant à différentes longueur d'onde ont été générés par mutagenèse:
- GFPuv se replie plus facilement que la GFP et a un rendement de fluorescence 16 fois plus importante que la GFP
- GFPmut1 contient deux mutations (F64L et S65T) son rendement de fluorescence est 35 fois supérieur à celui de la GFP
- GFP+ combine les mutations de GFPuv et de GFPmut1 ce qui lui donne une augmentation de 130 fois par rapport à la GFP
- L'EGFP est un variant optimisée pour l'expression en cellules eucaryotes.

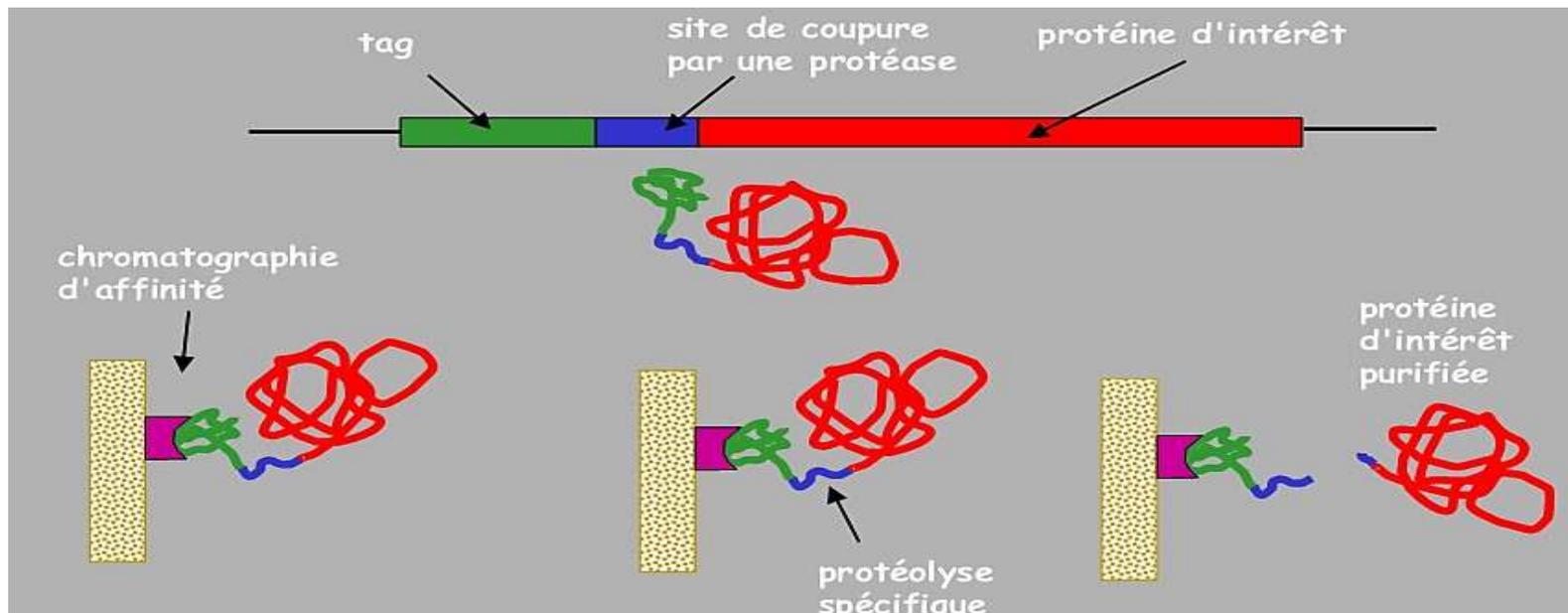
4. Tags Epitopes

- Il s'agit de courtes séquences d'acides aminés qui interfèrent rarement avec la conformation et l'activité des protéines. Les épitopes servent à la purification des anticorps et à la détection des protéines.
- FLAG : Généralement considéré comme un marqueur universel, il peut capturer la région FC des immunoglobulines.
- c-Myc : Ce marqueur est fiable pour diverses applications telles que l'immunoprécipitation (IP), le Western blot (WB), l'immunofluorescence (IF)...
- Protéine A : La protéine A confère une affinité hautement spécifique à la région FC de l'anticorps. De plus, elle cible une grande variété d'espèces, de l'homme à la souris, en passant par l'âne et le lapin...

Purification des protéines: Clivage des Tags

Souvent on veut enlever des fusions entre deux protéines après une expression in vitro et purification.

Dans ce cas, on intercale entre les deux protéines une séquence qui va coder pour un site de coupure.



Purification des protéines: Clivage des Tags

L'optimisation de cette étape a préoccupé diverses équipes de recherche qui ont développé plusieurs méthodes de clivage

Clivage chimique

Self-clivage

Protéases spécifiques

Exopeptidases

Purification des protéines: Clivage des Tags

Clivage chimique

Le clivage de protéines de fusion par voie chimique est devenu possible grâce à la reconnaissance et l'action de certains produits chimiques au niveau de séquences de un à deux résidus.

Le bromure de cyanogène, l'hydroxylamine et l'acide formique sont les réactifs les plus utilisés

- ➔ Le bromure de cyanogène reconnaît les méthionines et coupe au niveau de leur extrémité C-terminale
- ➔ l'hydroxylamine et l'acide formique rompent respectivement les liaisons asparagine/glycine et aspartate/proline

Purification des protéines: Clivage des Tags

Clivage chimique

le clivage chimique se limite à quelques cas de peptides et de protéines de petite taille.

Il nécessite une étude préalable de la séquence de la protéine de fusion

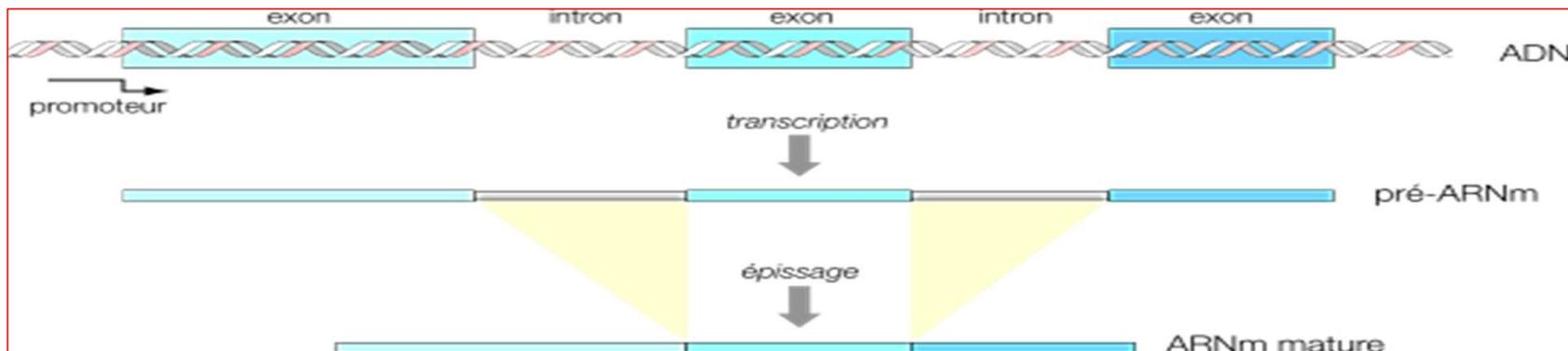
et aussi des caractéristiques physico-chimiques des deux partenaires de fusion.

Purification des protéines: Clivage des Tags

Self-clivage

Naturellement, l'épissage protéique est un processus auto-catalytique permettant la maturation de certaines protéines.

Lors de l'épissage de ces protéines, les segments internes dans le produit de traduction (intéines) s'excisent eux-mêmes de la protéine pendant que les polypeptides qui les encadrent (extéines) se réunissent pour former la protéine finale



Purification des protéines: Clivage des Tags

Self-clivage

L'application biotechnologique d'une protéine intéine au niveau du clivage de protéines de fusion nécessite sa transformation d'une séquence d'auto-épissage à un simple élément d'auto-clivage en atténuant son potentiel de ligation.

Cette modification peut être effectuée en mutant l'extrémité N ou C-terminale de la jonction d'épissage avant son insertion entre les deux partenaires de fusion afin d'induire le processus d'auto-clivage dans des conditions contrôlables

Purification des protéines: Clivage des Tags

Self-clivage

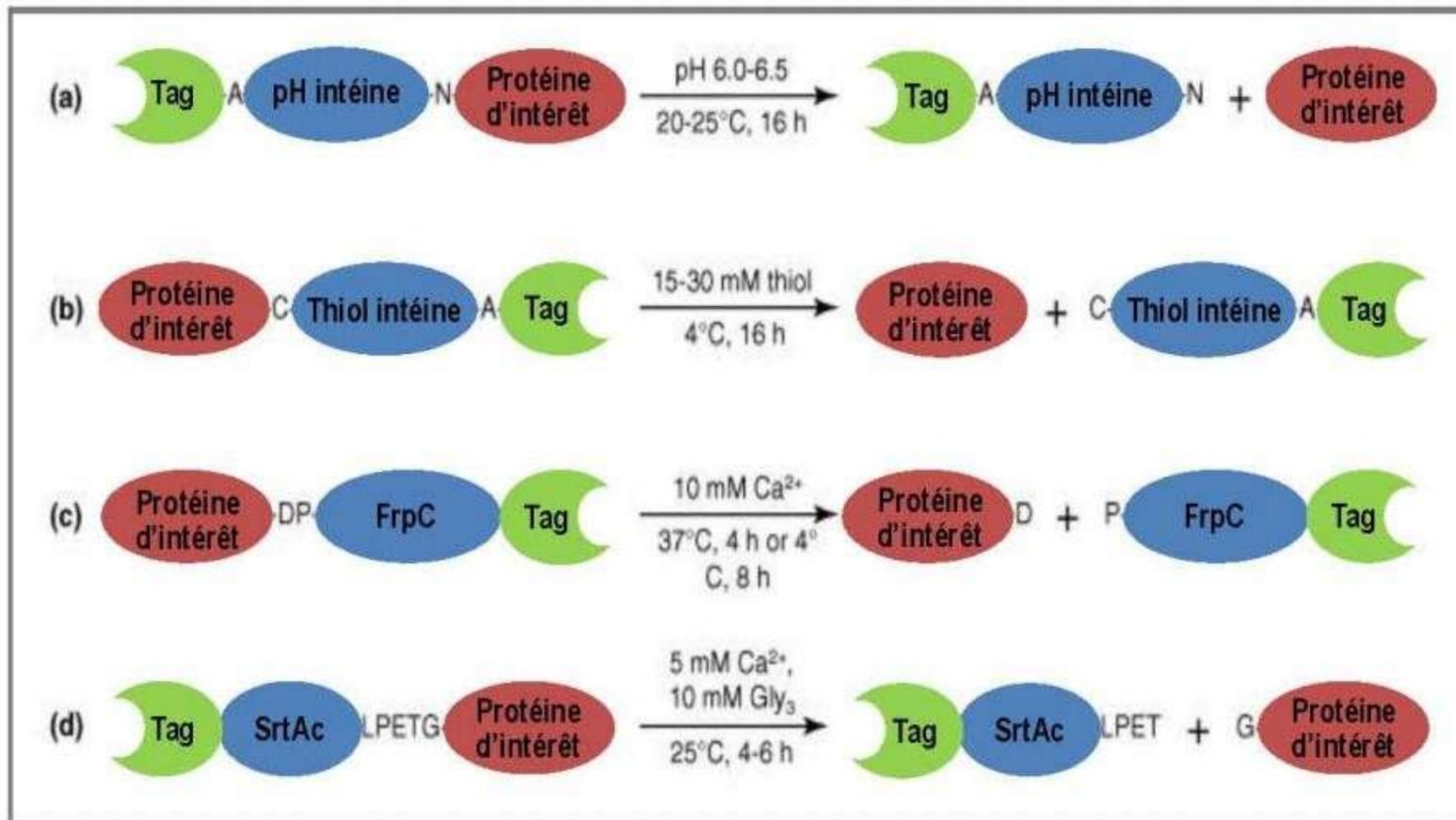
En fonction du mode de contrôle de leur réaction d'auto-clivage, les protéines intéines peuvent être répertoriées en deux catégories :

Les intéines inductibles au pH s'auto-clivent vers leur extrémité C-terminale

des intéines inductibles au thiol, qui présente les deux types de coupure N et C-terminale.

Purification des protéines: Clivage des Tags

Self-clivage



Purification des protéines: Clivage des Tags

Protéases spécifiques

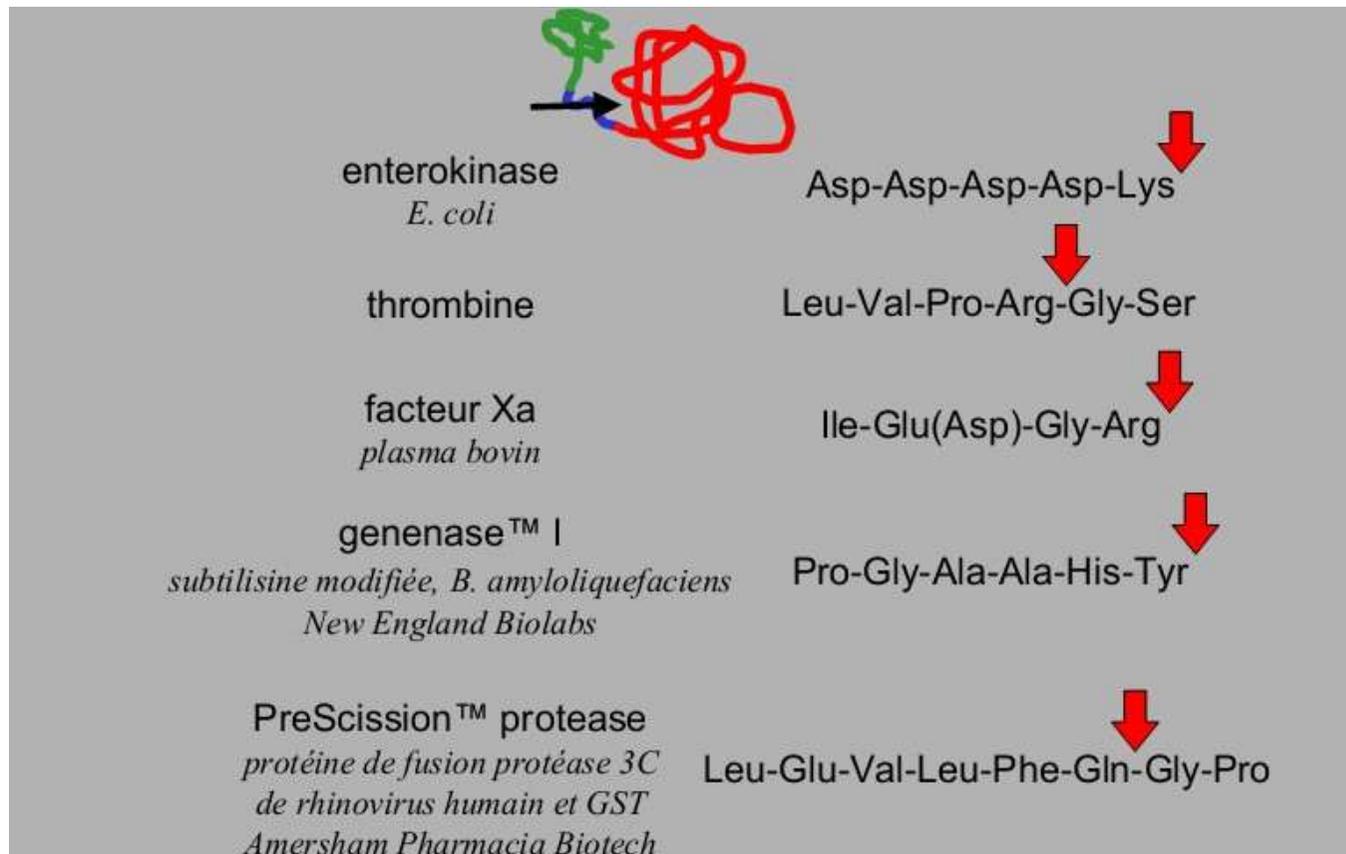
On peut utiliser une méthode enzymatique, des protéases spécifiques d'une séquence.

- **L'enterokinase** reconnaît et coupe la séquence Asp-Asp-Asp-Asp-Lys/
- **La thrombine** reconnaît et coupe la séquence Leu-Val-Pro-Arg-/-Gly-Ser. Selon le positionnement de la fusion à l'extrémité N ou en C terminale, on obtiendra deux ou quatre acides aminés.
- **Le facteur Xa** coupe en C-terminal de la séquence de reconnaissance Ile-Glu-Gly-Arg/
- **Les TEV protéinase** (Tobacco Etch Virus Proteinase) reconnaît la séquence Glu-X-X-Tyr-Gln/ avec X symbolisant n'importe quel acide aminé. Cette protéase a l'avantage d'être très spécifique de son site de coupure et de ne pas être inhibée par les inhibiteurs de protéase à sérine.

Purification des protéines: Clivage des Tags

Protéases spécifiques

Les protéases spécifiques



Purification des protéines: Clivage des Tags

Protéases spécifiques

Il y a plusieurs désavantages à l'utilisation de protéases:

- la coupure n'est pas toujours spécifique et on peut couper la protéine d'intérêt.
- La température assez haute nécessaire à la coupure peut affecter la stabilité de la protéine d'intérêt.
- La coupure est souvent inefficace du fait de l'inaccessibilité du site de coupure dans la protéine de fusion.
- Après la coupure, il faut retirer la protéine de fusion, qui va s'accrocher sur la colonne d'affinité ayant permis la purification. La protéase est retirée par exemple en utilisant une protéase biotinylée qui va s'accrocher sur une colonne de streptavidine agarose.

Tags d'affinité

- Les inconvénients pour les Tags d'affinité sont :
 - Le coût de la matrice d'affinité qui lie le marqueur et nécessité d'une étape chromatographique
 - Possibilité d'un effet délétère sur les propriétés de la protéine cible, comme:
 - Un changement de conformation ;
 - Des rendements inférieurs ;
 - Une inhibition de l'activité enzymatique ;
 - Une altération de l'activité biologique ;
 - Une flexibilité indésirable dans les études structurales ; et
 - Une toxicité.