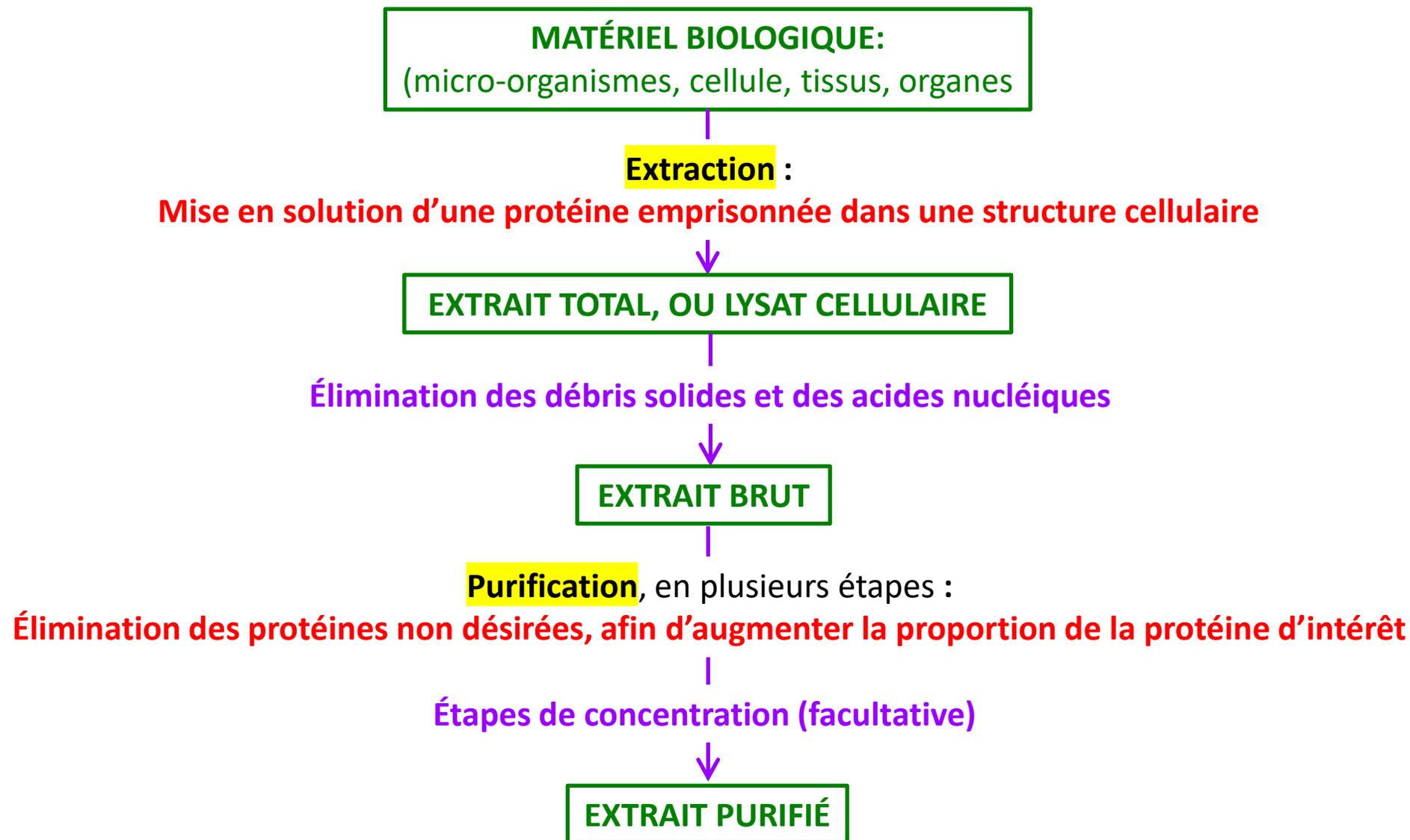


# **Extraction et purification des protéines**

Une cellule = des milliers de protéines différentes.

⇒ Pour étudier une protéine, il faut l'isoler des autres constituants cellulaires.

⇒ Démarche d'extraction et de purification.



Il est nécessaire de pouvoir suivre les différentes étapes de la purification pour évaluer leur efficacité.

Il n'existe pas de démarche prédéfinie : les techniques employées dépendront des propriétés physicochimiques (charge, taille, solubilité, caractère hydrophobe) et biologiques de la protéine d'intérêt à purifier.

## **1. Extraction des protéines**

L'extraction des protéines met en jeu une, ou plus généralement plusieurs méthodes afin d'**obtenir un extrait total** à partir d'un matériel biologique de départ.

**Pour les protéines intracellulaires les méthodes d'extraction consistent à rompre les membranes afin de récupérer le contenu cellulaire tout en respectant l'intégrité protéique.**

### **1.1. Sélection du matériel biologique**

Le matériel biologique de départ peut être de différentes natures :

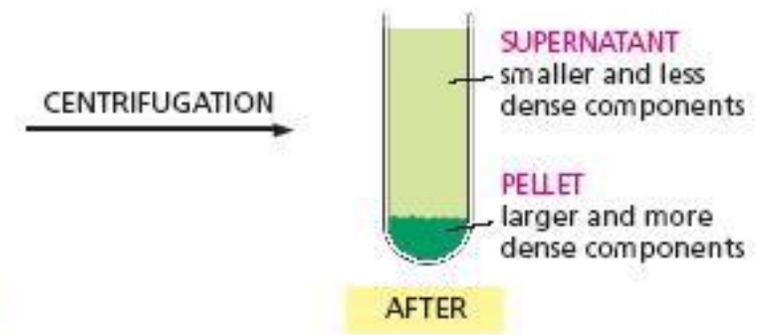
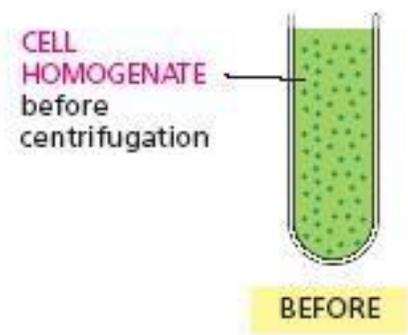
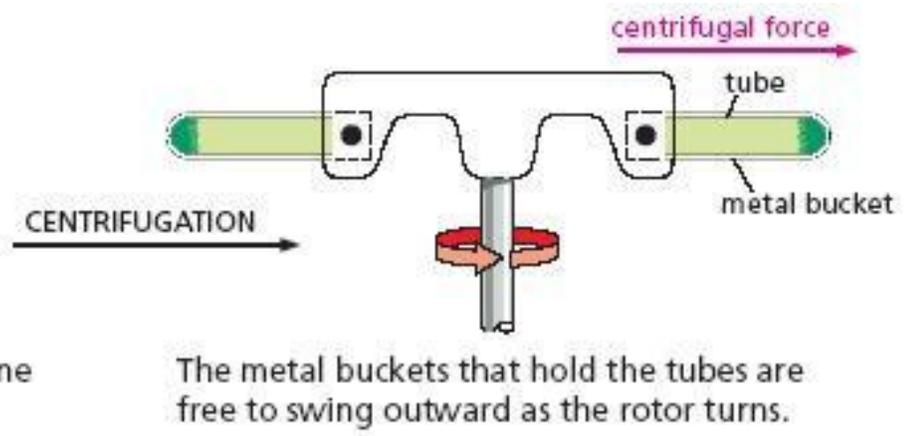
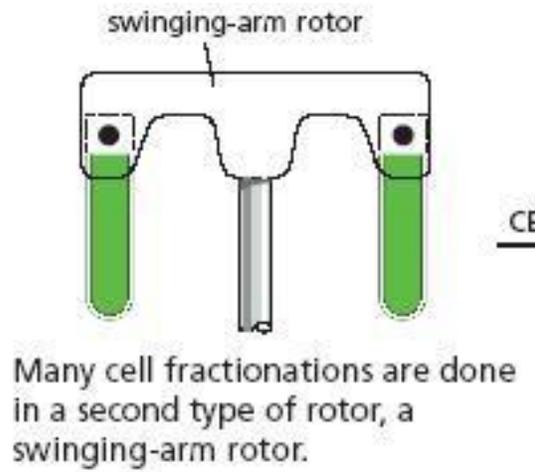
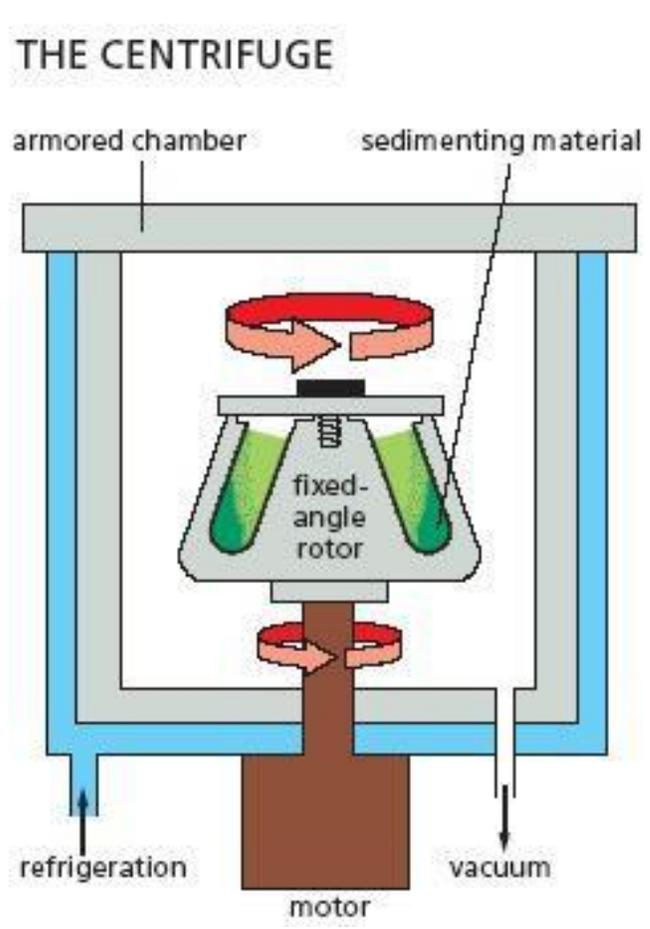
– **les micro-organismes** :

Matériels très utilisés car ils sont de culture facile, sources de nombreuses protéines enzymatiques, sources de protéines recombinantes obtenues par génie génétique.

– **les tissus animaux** (exemples : foie, pancréas, sang, muscles, *etc.*)

– **les tissus végétaux.**

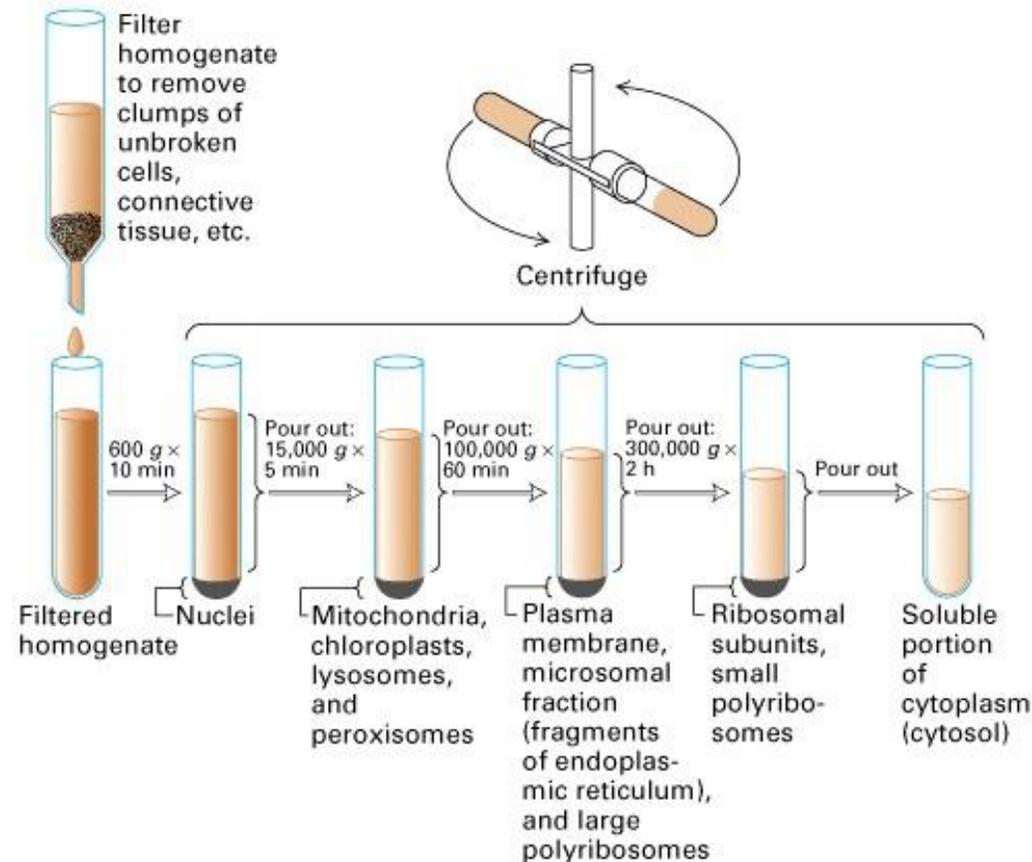
Les cellules sont **recupérées** par filtration ou par centrifugation (après dissociation tissulaire, si besoin).



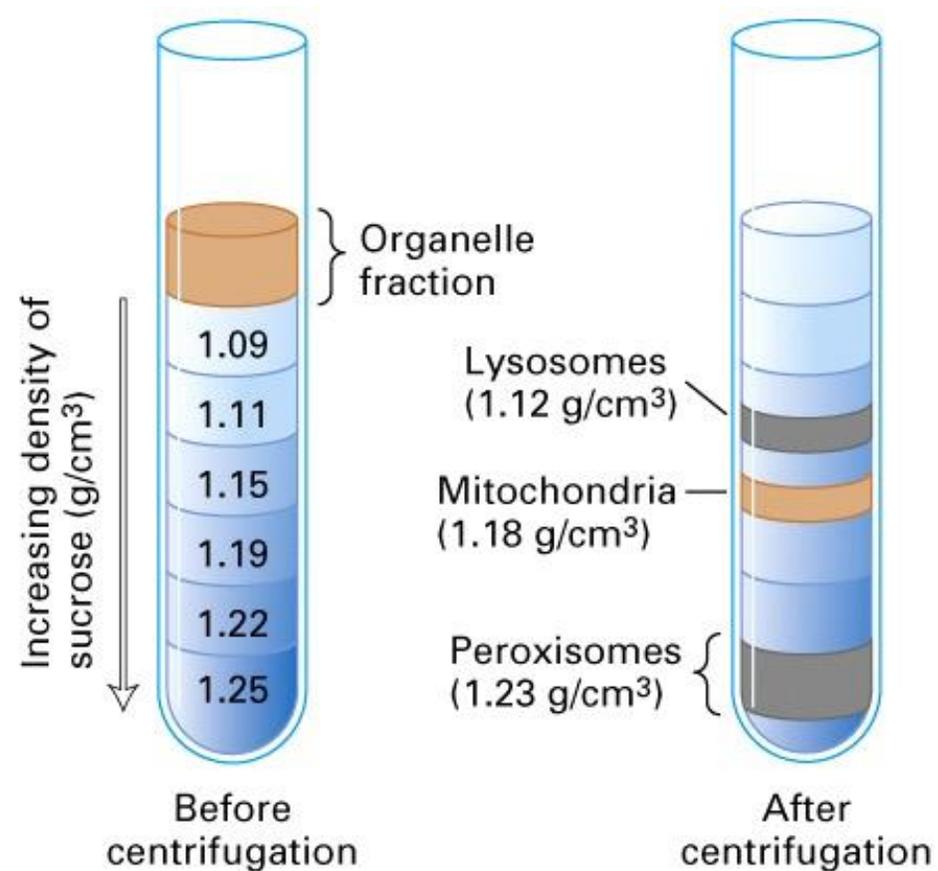
## 1.2. Fractionnement cellulaire (étape facultative)

Chez les cellules eucaryotes, de nombreuses protéines sont concentrées dans une région limitée de la cellule. Il est alors intéressant de commencer par isoler le(s) organe(s) d'intérêt (pour se débarrasser précocement de tout ce qui n'est pas utile).

Pour cela, on peut réaliser une **centrifugation différentielle** qui permet de **séparer les particules en fonction de leur taille par une succession de centrifugations à des temps et des accélérations croissants**.



On peut également procéder à une **centrifugation en gradient de densité** qui **permet de séparer les fractions subcellulaires en fonction de leur densité**.



### 1.3. Méthodes chimiques : les enzymes lytiques

Les cellules végétales, les cellules fongiques (levures, moisissures) et les bactéries possèdent une paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique.

⇒ utilisation d'enzymes lytiques pour éliminer la paroi :

- le lysozyme, ou muramidase :

Hydrolase acide, permettant l'hydrolyse des liaisons  $\beta_{1\rightarrow 4}$  reliant l'acide N-acétylmuramique et la N-acétyl-D-glucosamine formant le peptidoglycane, qui est un constituant de la paroi bactérienne.

Le lysozyme peut être purifié à partir du blanc d'oeuf.

- la chitinase, la zymolyase / lyticase :

Ces enzymes sont des hydrolases permettant la dégradation de la paroi des mycètes.

- la pectinase et la cellulase :

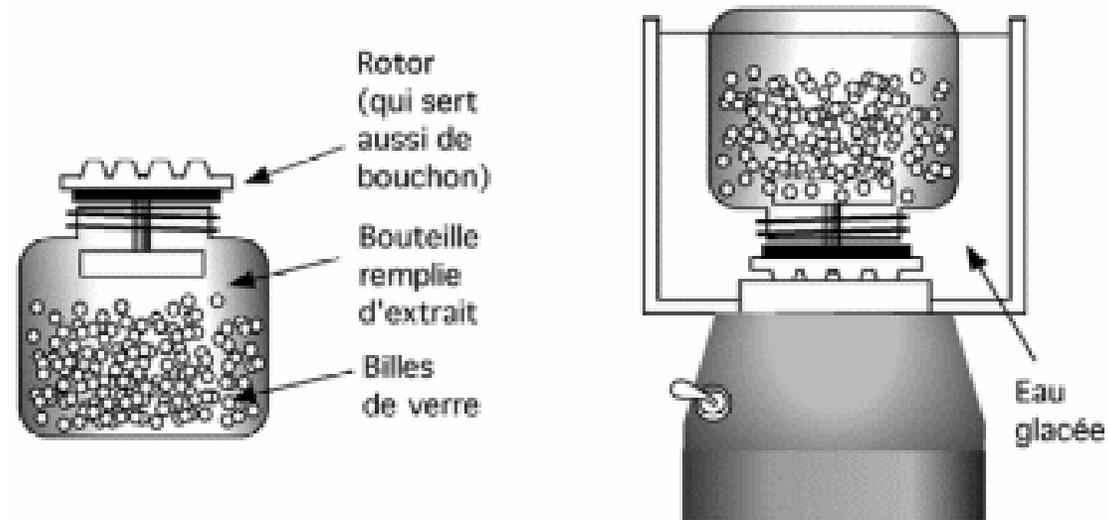
Hydrolases permettant la dégradation de la paroi pecto-cellulosique des cellules végétales.

Le traitement des cellules par des enzymes lytiques permet d'obtenir des cellules dépourvues de paroi appelées protoplastes, uniquement délimités par une membrane cytoplasmique, et de forme sphérique.

## 1.4. Méthodes physiques d'extraction

### 1.4.1. Abrasion par des microbilles de verre

L'appareil ressemble à un blender mais ne contient pas de lames : on a des microbilles de verre.



Le contenant est rempli de microbilles de verre. La suspension cellulaire se répartit entre les billes.

Il faut éviter la présence d'air pour éviter la formation de mousse et l'oxydation des protéines.

La séparation des microbilles du lysat cellulaire est aisée car les microbilles coulent au fond dès que l'agitation cesse.

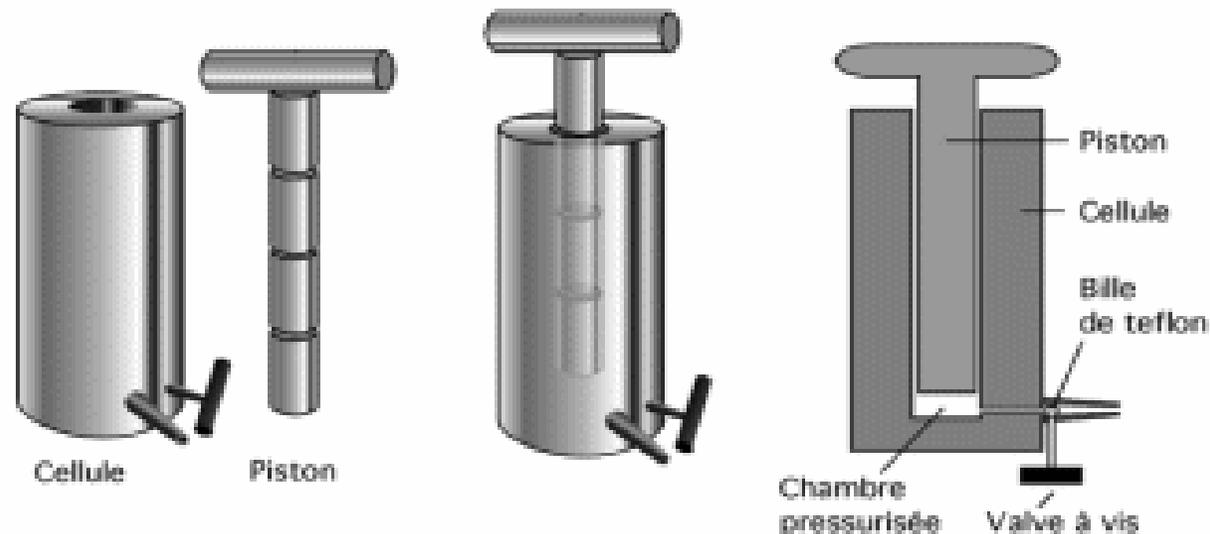
Il est nécessaire de travailler à basse température car le mouvement des billes génère beaucoup de chaleur qui serait responsable de la dénaturation thermique des protéines

## 1.4.2. Homogénéisation à haute pression

Les étapes de l'extraction par homogénéisation à haute pression sont :

- 1) La suspension cellulaire est versée dans le cylindre (également appelé cellule),
- 2) Le piston est installé :  
son enfouissement fait très rapidement grimper la pression sur les parois du cylindre,
- 4) Quand on ouvre légèrement la valve à vis, la suspension cellulaire est éjectée et les cellules sont déchiquetées par la bille de téflon.

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



D'autres mécanismes d'homogénéisation à pression existent : Dounce, Potter.

### 1.4.3. Sonication

**La sonication consiste en la destruction des cellules par les ultrasons.**

Une tige de métal (le « sonicateur »), à l'extrémité très fine, est introduite dans la suspension cellulaire et est induite à vibrer violemment, émettant ainsi des vibrations ultrasoniques, permettant la lyse cellulaire.

Le sonicateur génère beaucoup de chaleur dans le matériel biologique. Il est donc nécessaire de garder le tube dans lequel a lieu la sonication dans un bac à glace.

### 1.4.4. Choc osmotique

L'extraction par choc osmotique permet la lyse de cellules fragiles et des protoplastes obtenus après actions d'enzymes lytiques.

**Les cellules sont incubées dans une solution hypotonique : l'eau va alors entrer dans la cellule, entraînant l'état de turgescence puis la lyse cellulaire par rupture de la membrane cytoplasmique.**

On peut, en plus :

- ajouter un détergent (exemple : Triton X-100) afin de fragiliser les membranes cellulaires.
- utiliser un piston (Dounce, Potter).

### 1.4.3. Choc thermique

Des cycles de congélation-décongelations successifs permettent la formation de cristaux de glace à l'intérieur des cellules, conduisant à la rupture de la membrane cytoplasmique.

### 1.5. Les conditions d'extraction

L'extraction s'effectuera dans une solution tampon appelé tampon d'extraction, ou tampon de lyse.

Le tampon de lyse doit répondre à certaines exigences expérimentales :

✓ Exercer un fort pouvoir tampon :

Un tampon est une solution dont le  $pH$  varie peu :

- lorsqu'on y ajoute une petite quantité d'acide ou de base.
- lorsqu'on la dilue.

En général, les tampons sont composés du **mélange d'un acide faible et de sa base conjuguée**.

Le **pouvoir tampon maximal** est obtenu pour un **mélange équimolaire**.

Dans ce cas, le  $pH$  est égal au  $pK_a$  du couple en solution. La zone tampon se situe entre  $pK_a - 1$  et  $pK_a + 1$ .

On évite ainsi une variation de  $pH$  trop importante qui pourrait dénaturer la protéine d'intérêt.

Tampon	$pK_a$	Tampon	$pK_a$
Acétate	4,76	MOPS	7,20
Succinate	5,64	Tris	8,06
MES	6,15	Éthanolamine	9,50
Phosphate	7,20	Glycine	9,78

✓ **Contenir un agent réducteur :**

L'intérieur des cellules est un environnement réducteur alors que l'atmosphère dans laquelle nous vivons est au contraire oxydante. Il faut donc protéger les protéines d'une oxydation excessive grâce à la présence d'un agent réducteur dans le tampon de lyse tel que le glutathion, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le dithiothreitol (DTT) à de faibles concentrations.

✓ **Contenir du glycérol :**

Le glycérol permet de stabiliser les interactions protéine-protéine.

✓ **Contenir des inhibiteurs de protéase :**

Les inhibiteurs de protéases agissent sur les enzymes qui seraient responsables de la dégradation des protéines présentes dans le lysat. Il faut notamment inhiber l'action des hydrolases acides lysosomiales (cathépsines) et des hydrolases vacuolaires.

Certains inhibiteurs et leur cible sont :

INHIBITEURS	CIBLES
EDTA ou EGTA	métalloprotéases
PMSF (fluorure de phenyl-méthyl-sulfonyle)	Toutes les sérine-protéases (trypsine, chymotrypsine, thrombine, papaïne, etc...)
AEBSF (fluorure hydrochlorure 4,2-amino-éthyl-benzene-sulfonyle)	Toutes les sérine-protéases (trypsine, chymotrypsine, thrombine, papaïne, etc...) Plus soluble et moins toxique que le PMSF.
Benzamidine	Sérine-protéases

**L'extraction doit être réalisée à basse température (0 à 4°C)** pour éviter la dénaturation thermique de la protéine

## 1.6. Cas particulier de l'extraction des protéines membranaires

Les traitements précédents ne solubilisent pas les protéines membranaires.

Dans ce cas, il est nécessaire de rompre les interactions entre les protéines membranaires et les lipides membranaires.

Pour cela :

- utilisation de détergents. Exemples : triton X100 – détergent non ionique, SDS
- utilisation de solvants organiques. Exemple : butanol

## 2. Purification des protéines

Définition : **purification des protéines** = série de processus destinés à isoler une ou des protéines à partir d'un mélange complexe (extrait brut).

Les différentes étapes de la purification consistent en des processus successifs de simplification du mélange complexe initial (extrait brut) :

- retrait des déchets cellulaires (membranes, organites),
- élimination du matériel génétique,
- élimination ou conservation de certaines protéines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (taille, charge électrique, affinité),
- isolement par affinité spécifique de la protéine d'intérêt.

Le choix des différentes méthodes de purification est basés sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de la protéine d'intérêt :

<b>Propriété de la protéine à purifier</b>	<b>Méthodes de purification</b>
<b>Solubilité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilisation (salting in) / précipitation salines (salting out)</li> <li>- Précipitation isoélectrique (modification de <math>pH</math>)</li> <li>- Précipitation par la température</li> <li>- Précipitation par l'utilisation de solvants organiques</li> <li>- Précipitation par affinité (exemple : immunoprécipitation)</li> </ul>
<b>Charge ionique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographies échangeuses d'ions</li> <li>- Électrophorèses</li> <li>- Focalisation isoélectrique (IEF)</li> </ul>
<b>Caractère (a)polaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographies de partage</li> <li>- Chromatographies d'adsorption en phase normale ou en phase inverse</li> <li>- Chromatographies par interactions hydrophobes</li> </ul>
<b>Taille</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Électrophorèses</li> <li>- Chromatographies d'exclusion-diffusion</li> <li>- Dialyse et ultrafiltration</li> </ul>
<b>Spécificité de liaison</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographies d'affinité / immunoaffinité</li> <li>- Chromatographie par chélation (IMAC)</li> </ul>

## 2.1. Méthodes de purification basées sur la solubilité

2.1.1. Modification de la concentration en sels : *salting in* et *salting out*

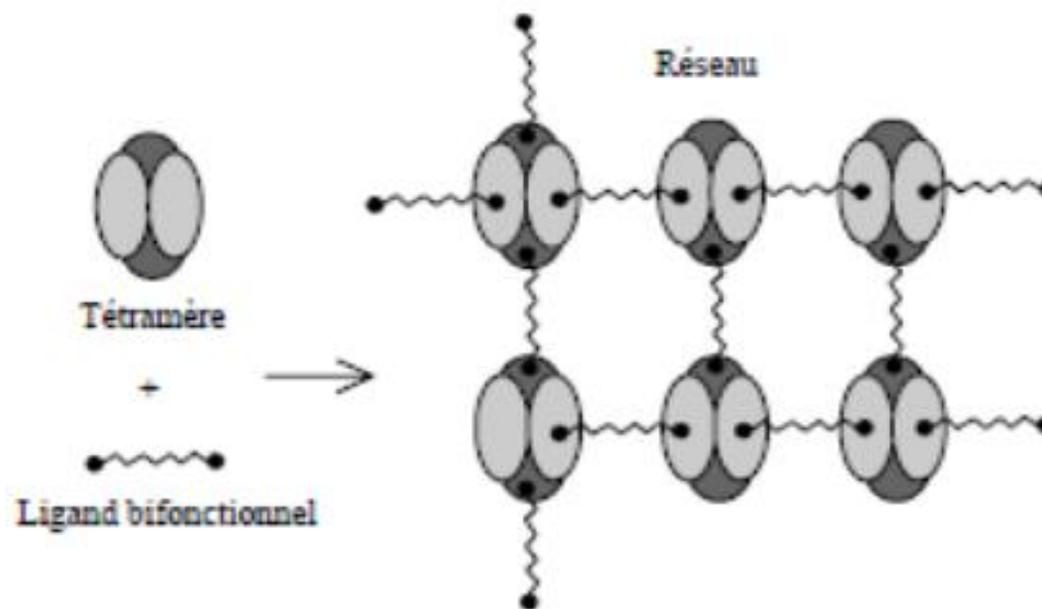
2.1.2. Précipitation par modification du pH : précipitation isoélectrique

2.1.3. Précipitation par la température

2.1.4. Précipitation par utilisation de solvants organiques

2.1.5. Précipitation par affinité

Principe : **précipitation par affinité** = formation de réseaux intermoléculaires créés par fixation de ligands multifonctionnels aux protéines à purifier.

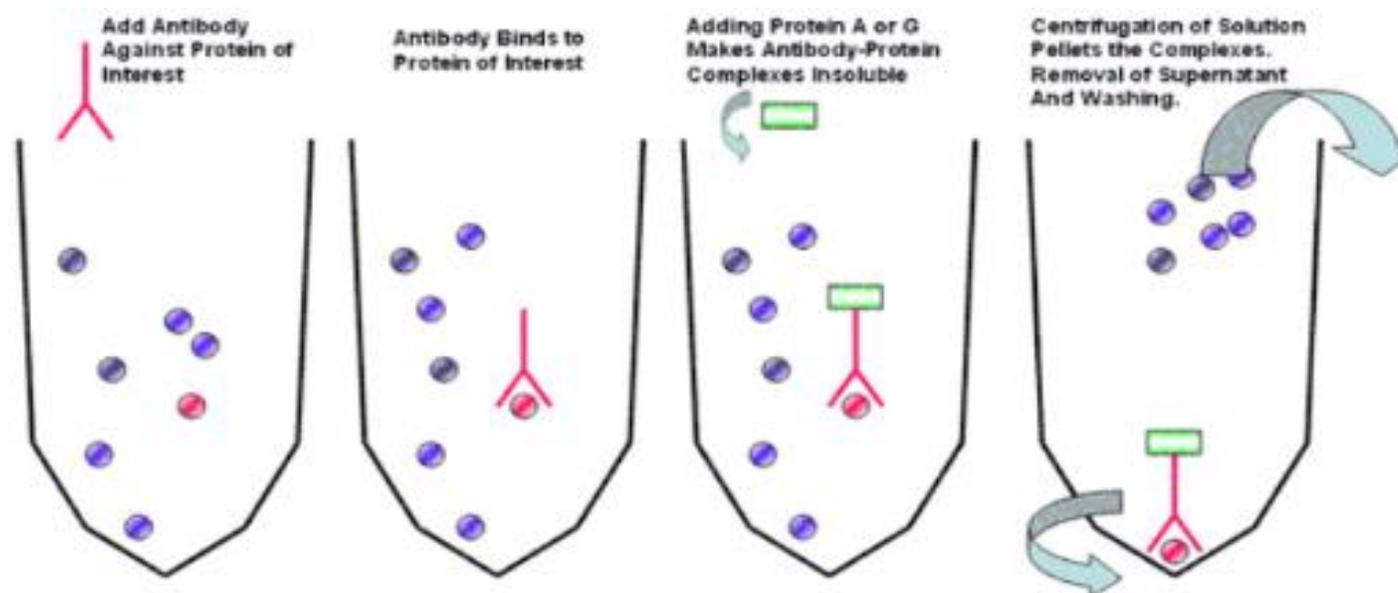


Les ligands d'affinité utilisés (substrat, inhibiteurs, etc...) permettent un haut degré de spécificité et de sélectivité de la fixation.

Cette technique permet alors une purification en une seule étape. Toutefois, les rendements obtenus peuvent être très variables selon les rapports stœchiométriques protéine/ligand.

Après centrifugation, la protéine d'intérêt peut être dissociée par l'intermédiaire de substrats, inhibiteurs, analogues structuraux ou simplement par une variation du pH ou de la force ionique du milieu.

Les techniques d'**immunoprécipitation** sont des méthodes de **précipitation par affinité** qui peuvent être utilisées pour purifier des protéines d'intérêt et mettant en jeu des **interactions de type « antigène/anticorps »** :



Remarque : la protéine A (issue de *Staphylococcus aureus*) et la protéine G (issue de *Streptococcus* du groupe G) établissent une liaison avec les anticorps de types IgG (réaction avec le fragment constant Fc des IgG)

## **2.2. Méthodes de purification basées sur la charge électrique**

### **2.2.1. Chromatographies échangeuses d'ions**

### **2.2.2. Électrophorèses**

### **2.2.3. Focalisation isoélectrique (IEF)**

## **2.3. Méthodes de purification basées sur le caractère polaire**

### **2.3.1. Chromatographies de partage**

### **2.3.2. Chromatographies d'adsorption en phase normale ou en phase inverse**

### **2.3.2. Chromatographies par interactions hydrophobes**

## **2.4. Méthodes de purification basées sur la taille**

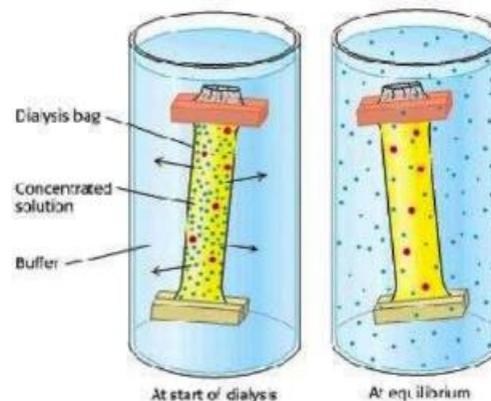
### **2.4.1. Électrophorèses**

### **2.4.2. Chromatographie d'exclusion-diffusion**

## 2.2. Méthodes de purification basées sur la taille

### 2.2.1. Dialyse et ultrafiltration

Principe : **dialyse** = séparation de solutés de différentes tailles en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane dont les dimensions des pores sont inférieures aux dimensions des protéines (cellophane, nitrocellulose, etc.).



Un sac de dialyse contenant les différents solutés est placé dans un tampon hypotonique.

**Selon la loi de diffusion, les solutés diffusent librement à travers une membrane semi-perméable selon leur gradient de concentration jusqu'à l'équilibre qui est atteint lorsque les solutés qui ont diffusé sont en concentration égale de part-et-d'autre de la membrane.**

Dans le cas de la dialyse, seules les molécules dont la taille est inférieure à celle des pores de la membrane diffuseront et formeront le dialysat. Les protéines, qui sont de grandes tailles, resteront dans le sac de dialyse formant le rétenant.

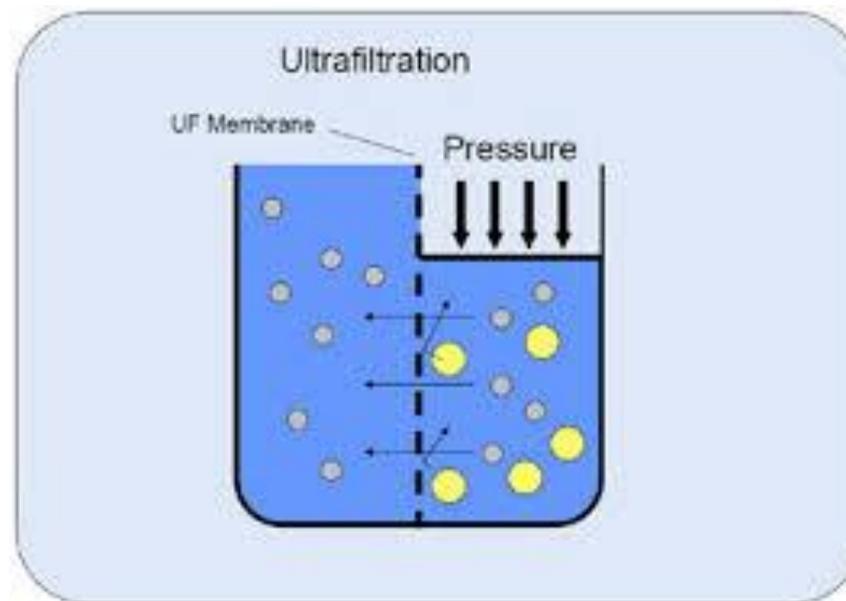
La dialyse peut être également utilisée pour dessaler (élimination des sels neutres utilisés pour une précipitation) ou éliminer un ligand compétiteur.

## 2.2. Méthodes de purification basées sur la taille

### 2.2.1. Dialyse et ultrafiltration

Principe : **ultrafiltration** = filtration sur membrane où le liquide traverse une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression (pression transmembranaire ou TMP).

Les particules en solution ou en suspension de haut poids moléculaire (protéines) sont retenues tandis que l'eau et les molécules de faible poids moléculaire (sels) passent à travers la membrane.



L'ultrafiltration peut être utilisée pour le **fractionnement**, le **dessalage**, ou la **concentration** de l'extrait à purifier.

### **3. Suivi de purification**

Chaque étape de la purification d'une protéine doit être suivie afin d'évaluer l'efficacité de la purification.

#### **3.1. Détection des protéines**

Afin de détecter les protéines, on réalise :

**1. un dosage total des protéines dans l'échantillon à chaque étape de la purification.**

Les méthodes les plus utilisées sont la spectrophotométrie d'absorption moléculaire et la fluorimétrie.

**2. un dosage de la protéine d'intérêt dans l'échantillon à chaque étape de la purification.**

Pour les protéines ne présentant pas d'activité enzymatique, on peut réaliser des dosages basés sur des méthodes immunologiques (exemple : E.L.I.S.A.).

Dans le cas des enzymes, on détermine l'activité enzymatique de l'échantillon à chaque étape de la purification.

## 3.2. Technique de contrôle de la purification

### 3.2.1. Électrophorèses de contrôle

#### 3.2.1.1 SDS-PAGE

Après migration, les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel.

Les protéines sont révélées :

- soit directement, de manière non spécifique :

Coloration au **bleu de Coomassie** : détection de quantités de l'ordre du  $\mu\text{g}$  – nécessité de décolorer gel.

Révélation au **nitrate d'argent** : les protéines réduisent  $\text{Ag}^+$  en Ag qui précipite (couleur brun orangé à noir). Très sensible : détection de l'ordre du ng. Technique onéreuse.

- soit après transfert sur nitrocellulose, de manière spécifique : **western blot avec immunodétection** :  
Nécessité de disposer d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine étudiée.

#### 3.2.1.1 Focalisation isoélectrique

#### 3.2.1.1 Électrophorèse capillaire

### 3.2.2. Ultracentrifugations

Les macromolécules en solutions ne sédimentent pas de manière perceptible.

Si l'on souhaite étudier leur sédimentation, il est nécessaire de faire subir de très fortes accélérations (> 100 000 g) : c'est l'ultracentrifugation.

Une solution protéique est pure si l'on obtient un seul pic symétrique en ultracentrifugation.

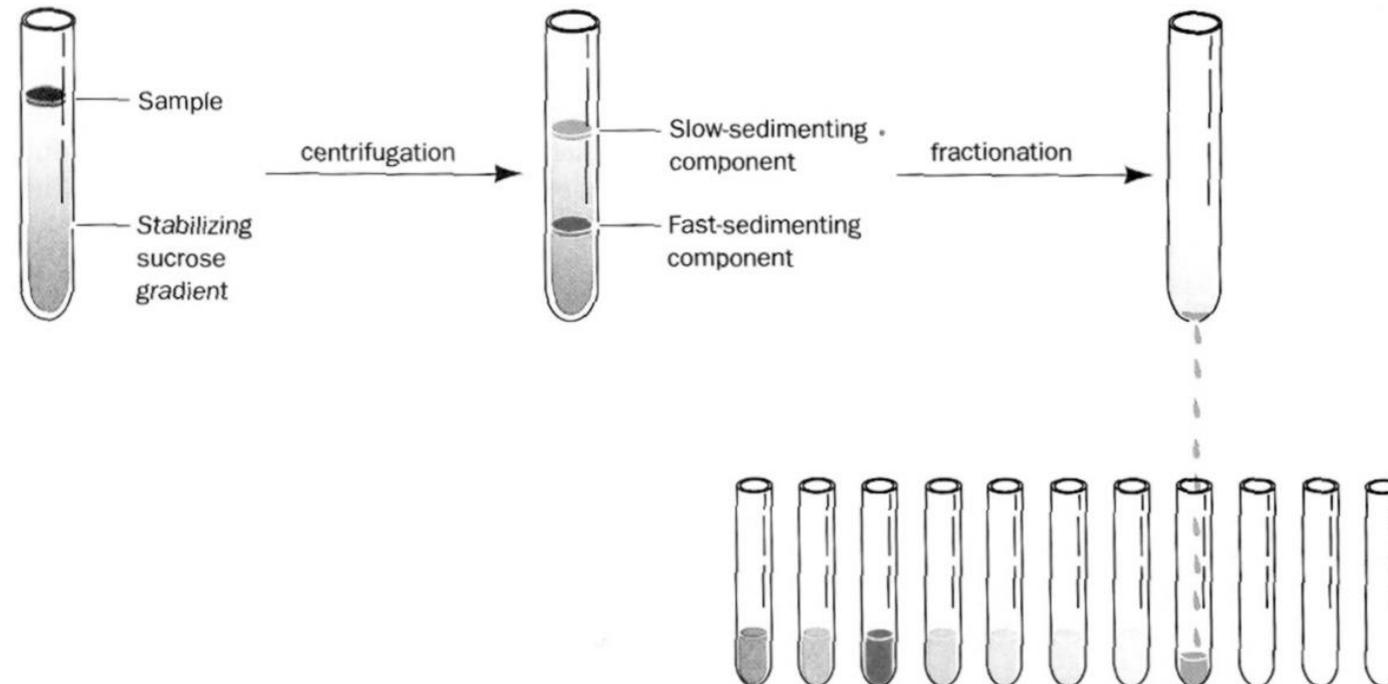
On peut augmenter le pouvoir de résolution en travaillant avec des gradients de densité.

En effet, la différence entre la densité de la particule et celle du solvant influence la vitesse de sédimentation :

- si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimente,
- plus la différence de densité entre particule et milieu est grande plus la sédimentation est rapide,
- si il n'y a aucune différence de densité entre la particule et le milieu, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.

### 3.2.2.1 Ultracentrifugation zonale en gradient de densité préformé

L'échantillon est déposé au sommet d'un gradient de densité préformé.



**FIGURE 5-33.** A diagrammatic representation of zonal ultracentrifugation. The sample is layered onto a sucrose gradient (*left*). Under centrifugation (*middle*), each particle

sediments at a rate that depends largely on its mass. After the end of the run, the centrifugation tube is punctured and the separated particles (zones) are collected (*right*).

On utilise un tampon dont la densité maximale est inférieure à celle des molécules à séparer (exemple : saccharose)  
**Les protéines se déplacent selon leur coefficient de sédimentation, largement dépendant de leur masse : les plus lourdes migrent plus bas dans le tube.**

### 3.2.2.2 Ultracentrifugation sur gradient à l'équilibre, ou ultracentrifugation isopycniq

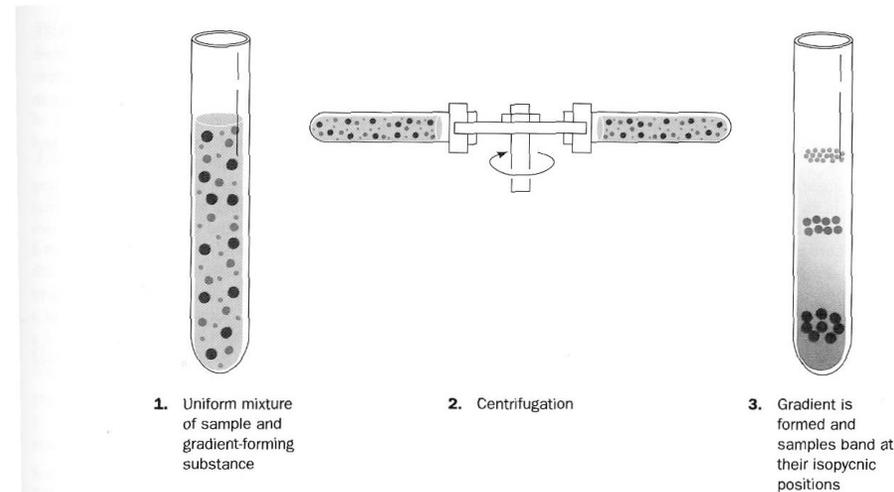


FIGURE 5-35. Isopycnic ultracentrifugation. The centrifugation of a uniform mixture of a macromolecular sample dissolved in a solution of a dense, fast-diffusing solute

such as CsCl (*left*). At equilibrium in a centrifugational field, the solute forms a density gradient in which the macromolecules migrate to their positions of buoyant density (*right*).

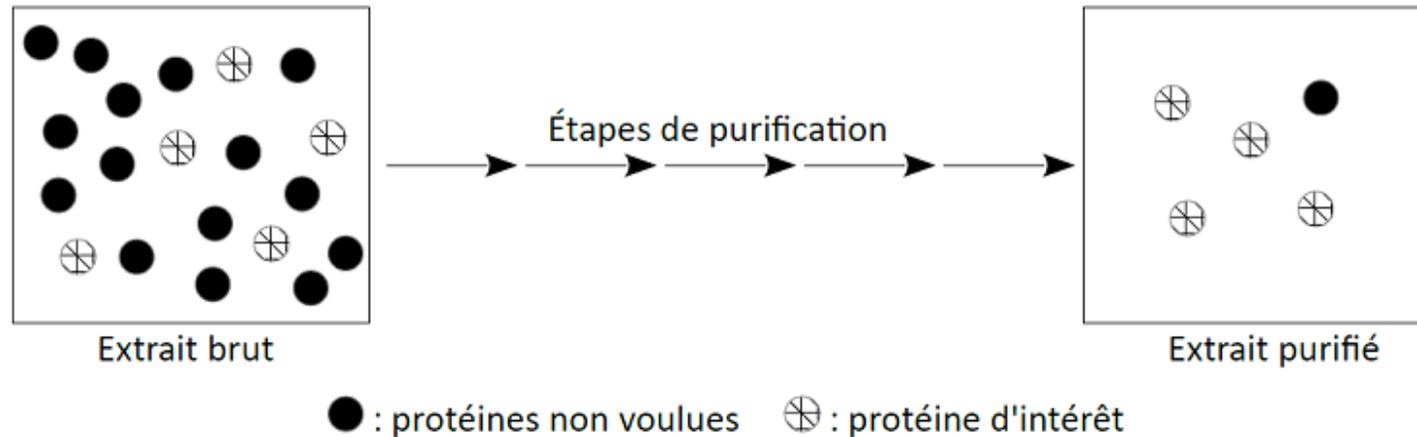
Dans ce cas, l'échantillon est placé dans une solution d'une substance dense et de faible masse molaire.  
Exemple : chlorure de césium CsCl

**Lors de la centrifugation, un gradient de CsCl se forme et chaque molécule de l'échantillon migre à un niveau où sa densité est égale à celle du milieu ambiant.  
Donc on sépare selon la densité.**

Cependant cette méthode est plutôt réalisée pour les acides nucléiques (moins efficace pour les protéines)

### 3.3. Rendement et enrichissement

Considérons la purification suivante :



#### 3.3.1. Rendement de purification $R$ , ou pourcentage de récupération

**Définition :** rendement  $R$  = proportion, exprimée en pourcentage, de la quantité finale de la protéine d'intérêt dans l'extrait purifié par rapport à la quantité initiale de la protéine d'intérêt dans l'extrait brut.

Exemple : - dans l'extrait brut : 5 protéines d'intérêt

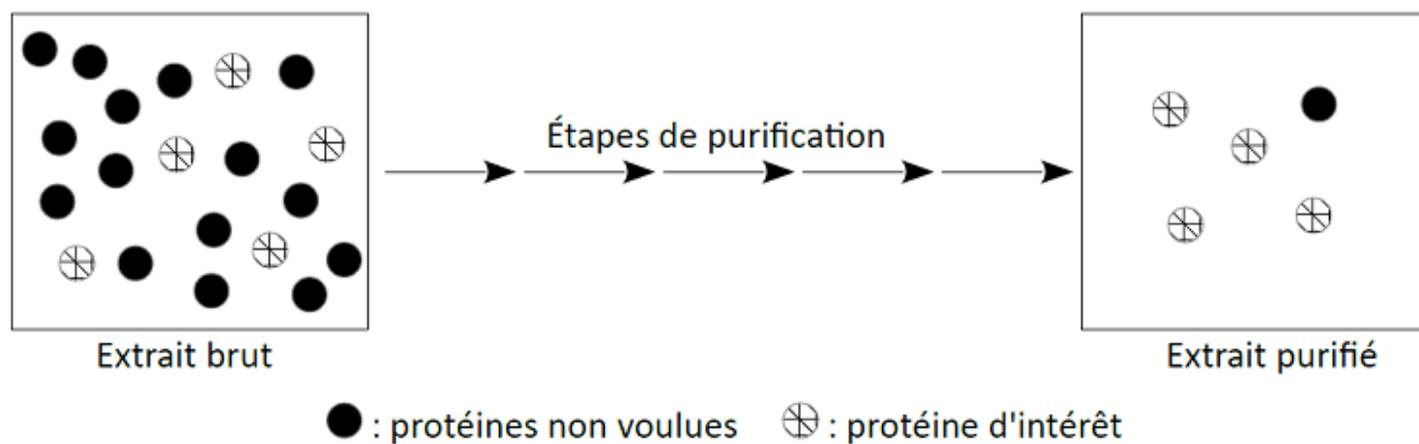
- dans l'extrait purifié : 4 protéines d'intérêt

$R = 4/5 = 0,8 = 80 \% \Rightarrow$  on a récupéré 80 % des protéines d'intérêt

Le rendement est toujours inférieur à 100 car il y a toujours des pertes de protéines d'intérêt à cause des techniques de purification : plus il y a d'étapes dans la purification, plus  $R$  sera faible.

### 3.3.1. Enrichissement $E$ , ou facteur de purification, ou facteur d'enrichissement, ou taux de purification

**Définition :** **Enrichissement  $E$**  = rapport entre la proportion finale de la protéine d'intérêt en fin de purification dans l'extrait purifié et la proportion initiale de protéine d'intérêt dans l'extrait brut.



Exemple :

- proportion de la protéine d'intérêt dans l'extrait purifié : 4 protéines d'intérêt sur 5 =  $4/5 = 0,8$
  - proportion de la protéine d'intérêt dans l'extrait brut : 5 protéines d'intérêt sur 20 =  $5/20 = 0,25$
- $E = 0,8/0,25 = 3,2 \Rightarrow$  l'extrait purifié est enrichi 3,2 fois en protéine d'intérêt par rapport à l'extrait brut.

L'enrichissement doit être supérieur à 1 pour une purification efficace.

### 3.3.1. Cas particulier des enzymes

Doser une enzyme consiste à évaluer sa capacité à catalyser une réaction dans des conditions opératoires définies. On n'exprime pas la quantité d'enzyme par un nombre de moles ou une masse, mais par un paramètre appelé activité

- L'**activité catalytique**, notée  $z_{(\text{substrat})}$ , est la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une quantité définie de substrat (ou former une quantité définie de produit) par unité de temps, et dans des conditions opératoires définies.

Elle s'exprime :

- en U (ou UI, ou UIE) : 1 U correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1  $\mu\text{mol}$  de substrat par minute dans les conditions opératoires définies.
- en katal (kat) : 1 kat correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une mole de substrat par seconde dans des conditions opératoires définies.
- La **concentration d'activité catalytique** d'une solution enzymatique, notée  $b_{(\text{substrat})}$ , est la **quantité de substrat transformé (ou de produit formé) par unité de temps et par litre de solution enzymatique, et dans des conditions expérimentales définies.**  
Elle s'exprime en  $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$  de solution enzymatique ou  $\text{katal}\cdot\text{L}^{-1}$  de solution enzymatique.

$$b_{(\text{substrat})} = \frac{z_{(\text{substrat})}}{V_{\text{solution enzymatique}}}$$

- **L'activité spécifique**, notée  $z_{sp(\text{substrat})}$ , est la **quantité de substrat transformé et ou de produit formé par unité de temps et par mg d'enzymes, et dans des conditions expérimentales définies.**

Elle s'exprime en  $U \cdot g^{-1}$  d'enzymes ou  $kat \cdot g^{-1}$  d'enzymes.

$$z_{sp(\text{substrat})} = \frac{z_{(\text{substrat})}}{m_{\text{enzyme}}} = \frac{b_{(\text{substrat})}}{\rho_{(\text{enzyme ; solution enzymatique})}}$$

Dans le cas de la purification d'une enzyme, on aura :

$$R = \frac{z_{(\text{substrat})} \text{ après purification}}{z_{(\text{substrat})} \text{ avant purification}} \times 100$$

$$E = \frac{z_{sp(\text{substrat})} \text{ après purification}}{z_{sp(\text{substrat})} \text{ avant purification}}$$

Pour faciliter les calculs on peut établir un tableau de suivi de purification :

Étapes de la purification	Volume de la fraction	Masse totale de protéines	$Z_{(\text{substrat})}$	$Z_{\text{sp} (\text{substrat})}$	Rendement $R$	Enrichissement $E$
Extrait brut						
Étape n°1						
Étape n°2						
Étape n°3						
Étape n°4						
Extrait purifié						

## 4. Élaboration de protocoles d'extraction et de purification

L'élaboration d'un protocole de purification d'une protéine doit prendre en compte les objectifs suivants :

- obtenir un **bon rendement de purification**,
- obtenir un **enrichissement élevé**,
- mettre au point un protocole avec des **méthodes reproductibles**,
- utiliser des **méthodes et des appareillages peu coûteux**,
- mettre en œuvre des **méthodes rapides et faciles**.