

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Biochimie Option Biochimie appliquée

Purification des protéines recombinantes

Pour suivre une purification,
on a besoin de connaître la concentration des protéines dans l'échantillon et d'évaluer la pureté.

1. Détermination de la concentration en protéine

- Toutes les méthodes de détermination de la concentration d'une solution en protéine sont relatives,
- en effet elles dépendent de la composition en acide aminé qui n'est pas connue dans le cas d'un mélange de protéines.
- Traditionnellement, on utilise comme référence l'albumine de serum de veau (BSA), on fait une courbe étalon avec cette protéine puis on évalue la concentration de la solution.
- La BSA sera préparée dans le même solvant, le même tampon que l'échantillon pour détecter d'éventuelles interférences.

1. Détermination de la concentration en protéine

Les méthodes les plus utilisées sont l'absorption en UV et l'absorption dans le visible après réaction avec un colorant.

➤ **La spectrophotométrie UV**

- **Mesure à 280 nm.**

Les tryptophanes et la tyrosine absorbent à 280. La mesure est donc fortement dépendante de la présence de ces deux acides aminés dans la protéine.

- **Mesure à 205 nm.**

La liaison peptidique absorbe à 181-194 nm, mais cette longueur d'onde ne peut pas être utilisée du fait de l'absorption de l'oxygène.

Aussi, on effectue les mesures à 205 nm mais cette méthode est assez délicate à utiliser, il faut en effet avoir des cuvettes de quartz très propres.

1. Détermination de la concentration en protéine

Les méthodes les plus utilisées sont l'absorption en UV et l'absorption dans le visible après réaction avec un colorant.

➤ **La fluorimétrie**

- On peut utiliser la fluorescence intrinsèque de la protéine en utilisant la fluorescence des tryptophanes avec une excitation à 280 nm et une émission à 340 nm.

1. Détermination de la concentration en protéine

Les méthodes les plus utilisées sont l'absorption en UV et l'absorption dans le visible après réaction avec un colorant.

➤ **Les méthodes colorimétriques**

- Le cuivre

Dans des conditions alcalines, les ions cuivre (II) se lient à l'azote des protéines pour donner une coloration qui absorbe à 540-560 nm (violet).

La première méthode dite Biuret est peu spécifique et peu sensible (on détecte des concentrations de l'ordre de 1mg/ml).

Elle a été améliorée en y ajoutant le réactif de Folin-Ciocalteu (méthode de Lowry) qui colore la protéine en bleu.

La sensibilité est de l'ordre de 100µg/ml.

1. Détermination de la concentration en protéine

Les méthodes les plus utilisées sont l'absorption en UV et l'absorption dans le visible après réaction avec un colorant.

➤ **Les méthodes colorimétriques**

- **Les colorants**

Le coomassie (colorant de Bradford) est le plus utilisé, la liaison du colorant sur les arginines et les acides aminés aromatiques entraîne un déplacement de l'absorption de 465 nm (rouge) vers 595 (bleu).

Ce colorant est un des plus populaire du fait de la facilité de sa mise en œuvre.

D'autres colorants peuvent être utilisés, le rouge ponceau, l'orange G ou l' amino black principalement, leur liaison est peu forte.

1. Détermination de la concentration en protéine

Les méthodes les plus utilisées sont l'absorption en UV et l'absorption dans le visible après réaction avec un colorant.

➤ **Les méthodes colorimétriques**

- **L'argent**

Les protéines se lient à l'argent, cet essai est très sensible mais en parallèle est aussi très sensible à de nombreux autres composés (les anions, l'EDTA, le SDS, les agents réducteurs tels que le β -mercapéthanol)

Il n'est utilisé que lorsque la protéine est en très faible quantité et qu'il ne faut pas la « gâcher » uniquement pour déterminer sa concentration.

2. Solubilisation des protéines

➤ *Extraction des protéines cellulaires*

Pour aboutir à la purification d'une protéine, il faut tout d'abord préparer **l'extrait qui contient cette protéine**.

✓ **Si la protéine est intracellulaire**, on doit passer par une étape de solubilisation : on casse les cellules et on libère les protéines en solution.

Pour casser les cellules, on a à notre disposition différentes méthodes :

- choc osmotique
- lyse des parois par méthode enzymatique, on utilise par exemple le lysosyme pour dissoudre la paroi des bactéries Gram+.
- broyage à l'aide d'un homogénéiseur à lames ou d'un potter.
- choc par pression (French Press)
- ultrasons
- billes de verre (pour les levures)

2. Solubilisation des protéines

➤ *Extraction des protéines cellulaires*

Pour aboutir à la purification d'une protéine, il faut tout d'abord préparer **l'extrait qui contient cette protéine**.

✓ **Parfois les protéines sont membranaires** et il est difficile de les solubiliser.

On peut alors utiliser un détergent qui, par interactions hydrophobes, va solubiliser la protéine.

Mais il faut faire attention car un détergeant trop fort peut inactiver la protéine

✓ Après séparation par ultrafiltration ou centrifugation, on obtient un extrait clarifié.

2. Solubilisation des protéines

➤ *Extraction des protéines cellulaires*

Cas particulier des protéines thermostables :

Les protéines thermostables comme par exemple la **taq DNA polymérase** sont stables à haute température, au dessus de 80°C.

Si on exprime une protéine thermostable dans un organisme mésophile comme E. coli, la protéine thermostable se trouve mélangée à des protéines thermosensibles.

Pour purifier la protéine thermostable il suffit de chauffer l'extrait à 80°C, les protéines thermosensibles se dénaturent et précipitent. A la suite d'une centrifugation, on obtient la protéine thermostable pure.

❖ On peut utiliser cette technique pour purifier des petites protéines recombinantes en les fusionnant à une protéine thermostable. Comme elles sont petites, la fusion n'affecte pas la stabilité thermique de la protéine thermostable et la fusion peut se purifier en dénaturant les autres protéines.

2. Solubilisation des protéines

➤ *Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion*

1. La technique de purification consiste à purifier les corps d'inclusion par **centrifugation** ou par **filtration** sur filtre de 0,45 µm.

2. Les corps d'inclusions sont alors **lavés** en ajoutant de l'EDTA, des détergents non dénaturants tels que le Triton X-100 ou le desoxycholate ou des détergents dénaturants à faible concentration.

Cette opération de lavage des corps d'inclusion a pour but d'éliminer les protéines solubles, présentes dans le surnageant qui sont éliminées par centrifugation ou filtration.

3. Les corps d'inclusion sont alors **solubilisés** en utilisant généralement soit l'urée soit le chlorure de guanidinium, cette solubilisation correspond à leur dénaturation.

2. Solubilisation des protéines

➤ *Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion*

3.

- On peut utiliser une concentration de dénaturant qui dénature que partiellement la protéine, la renaturation sera souvent plus facile. Dans ce dernier cas, on recherche la concentration minimale qui permet la solubilisation.
- Pour purifier la protéine d'intérêt on peut effectuer une solubilisation différentielle des protéines. En effet, une première solubilisation à une faible concentration d'agent dénaturant ne solubilisant pas la protéine recombinante permet d'éliminer les protéines non désirées.
- Il faut le plus souvent ajouter un agent réducteur tel que le dithiotreitol (DTT) ou le β mercaptoethanol pour réduire les ponts disulfures non natifs ou éviter qu'ils ne se forment lors de la solubilisation.

4. **Le repliement de la protéine** est ensuite effectué par élimination de l'agent dénaturant soit par dialyse, par diafiltration soit en accrochant la protéine sur une colonne d'affinité. Ce repliement de la protéine s'avère souvent difficile voir impossible.

3. La concentration des protéines

➤ *Par précipitation*

- Pour concentrer les protéines on utilise souvent la précipitation par augmentation de la force ionique (salting out).

Les protéines sont solubles dans l'eau car leurs surfaces hydrophiles présentent des interactions avec les molécules d'eau.

Le sel interagit avec l'eau, si la concentration en sels augmente, on pompe l'eau de la solution et il y a moins d'eau disponible pour les protéines.

Elles forment des agrégats en interagissant par leur partie hydrophobe. Quand la taille de l'agrégat est suffisante, **il y a précipitation.**

3. La concentration des protéines

➤ *Par précipitation*

- Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium à 70% de la saturation, (La saturation est la solubilité dans l'eau à 20°C).

D'une manière générale, les protéines ne sont pas dénaturées par cette précipitation.

Comme toutes les protéines ne précipitent pas avec la même facilité, on peut faire des précipitations avec différentes concentrations de sulfate d'ammonium.

Pour quelques protéines, on peut utiliser des solvants organiques tels que l'acétone ou l'éthanol. Mais l'utilisation de ces solvants organiques est limitée, en effet ils occasionnent souvent une dénaturation irréversible de la protéine.

3. La concentration des protéines

➤ *Par filtration*

- Pour réduire le volume de la solution, la méthode la plus utilisée est l'ultrafiltration.

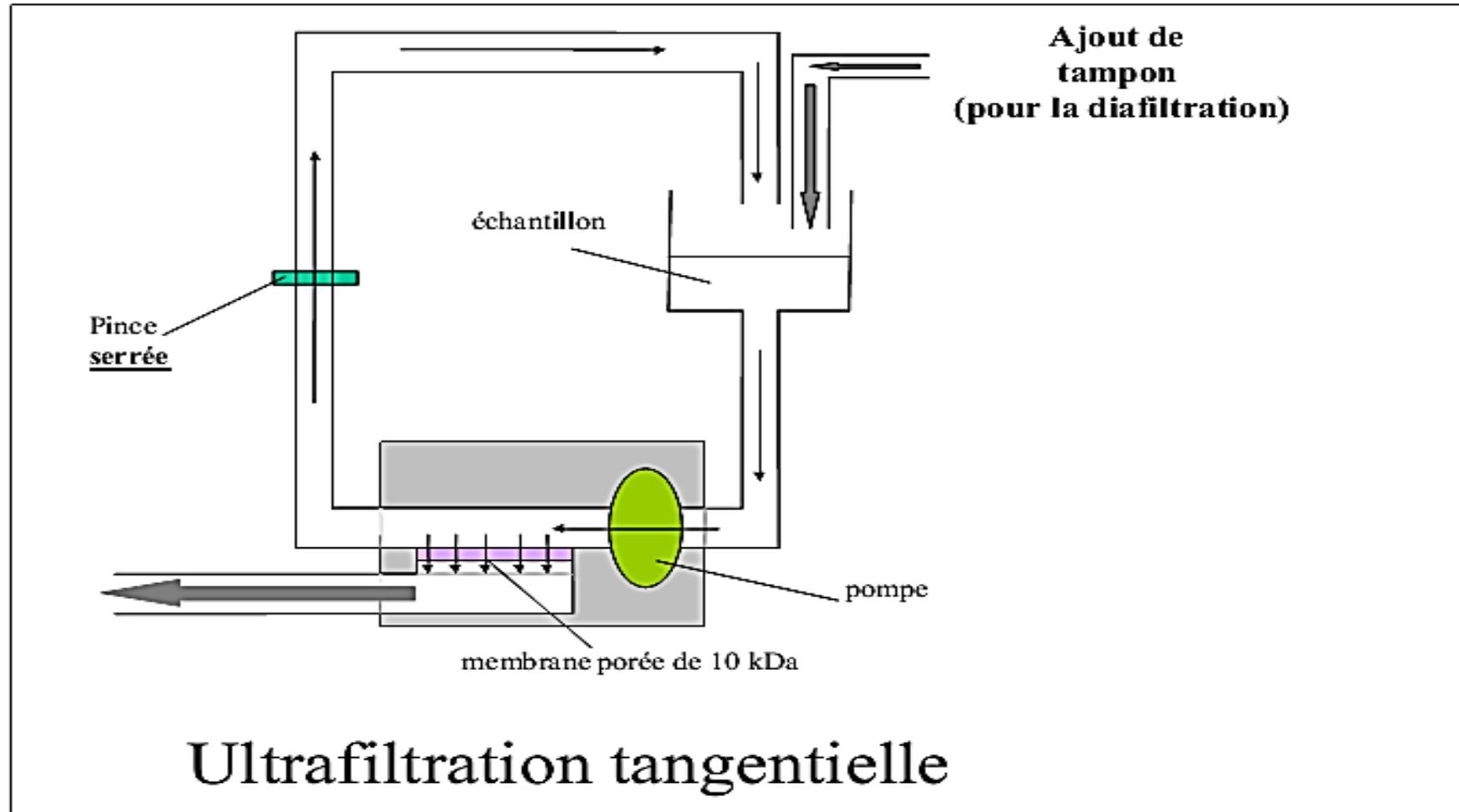
On soumet la solution protéique à l'action d'une filtration; la taille des pores du filtre doit être telle que les protéines doivent être retenues.

Il existe plusieurs systèmes, le plus simple utilise un boudin de dialyse, la solution est à l'intérieur du boudin et à l'extérieur on place un polymère absorbant tel que l'« aquacide ». L'eau comme les petites molécules passent par les pores du boudin, les protéines restent à l'intérieur.

On utilise souvent des filtres pour concentrer les protéines, pour les volumes importants, on crée un courant sur le filtre pour éviter les colmatages, on parle alors d'ultrafiltration tangentielle.

3. La concentration des protéines

➤ *Par filtration*



4. La séparation des protéines

On peut utiliser deux grands types de méthodes pour séparer les protéines,

- la chromatographie
- l'électrophorèse

Certaines méthodes seront utilisées pour **purifier** alors que d'autres seront plutôt utilisées pour **vérifier la pureté** de la solution.

4. La séparation des protéines

➤ *La chromatographie*

La chromatographie est une technique de séparation qui utilise une colonne contenant un support qui possède plusieurs propriétés (Il existe différents types de supports : **cellulose**, **sephadex**.).

On distingue plusieurs étapes

1. Régénération et équilibrage de la colonne avec le tampon.
2. Charge de la solution protéique
3. Lavage avec le tampon. On utilise tout d'abord le tampon de charge et au besoin successivement plusieurs tampons qui vont décrocher des protéines contaminantes.
4. Elution : elle peut se faire en ajoutant directement le tampon d'éluion, en faisant un gradient entre le tampon de lavage et le tampon d'éluion. Ce gradient peut être continu ou discret.

4. La séparation des protéines

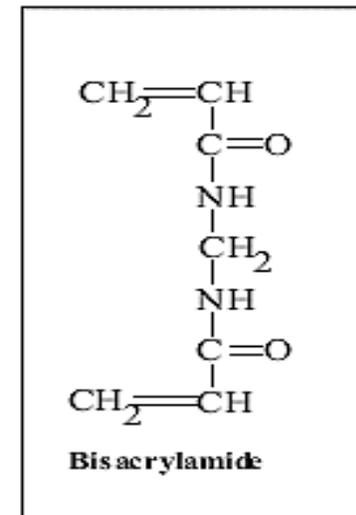
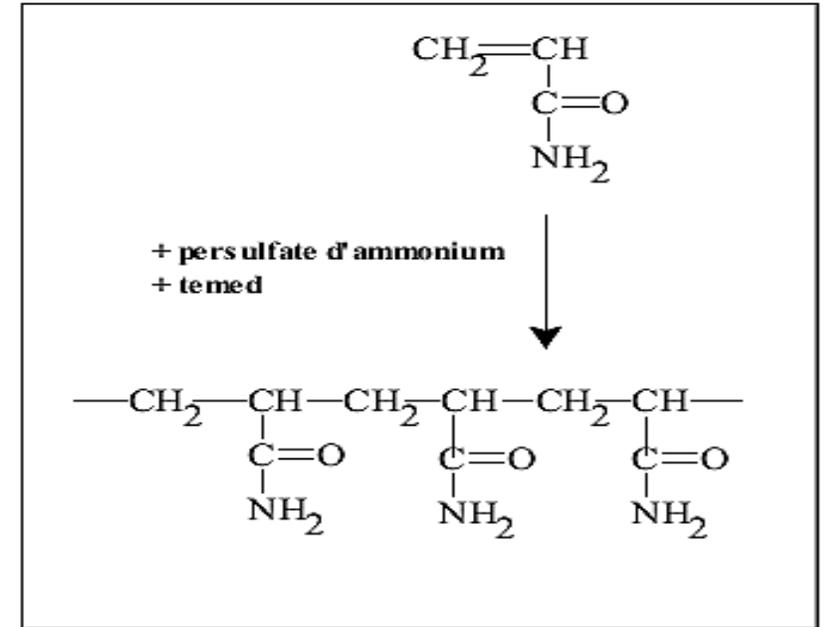
➤ L'électrophorèse

La technique consiste à faire migrer les protéines dans un gel. Le gel le plus utilisé est un gel d'**acrylamide**.

L'acrylamide est un monomère, en présence de radicaux libres (en général persulfate d'ammonium stabilisé par le TEMED), une réaction en chaîne est initialisée et on obtient un polymère.

Si la réaction est faite en présence de N. N'méthylènebisacrylamide, on a formation d'un réseau de mailles plus ou moins serrées en fonction de la concentration de l'acrylamide.

On obtient donc un gel dont les largeurs des mailles dépendent des concentrations en acrylamide et bisacrylamide de départ.



4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ **Dialyse**

Son principe est de mettre la solution dans un boudin de dialyse qui lui-même se trouve dans un tampon dépourvu de sels.

Le boudin de dialyse est constitué d'une membrane qui laisse passer les petites molécules.

Les boudins les plus couramment utilisés laissent passer les molécules qui présentent un poids moléculaire inférieur à 10 kDa, mais il existe des boudins avec d'autres seuils de coupure, soit plus faibles (3 kDa) soit plus importants (30, 50 ou 100 kDa).

Par un phénomène de diffusion, les sels vont sortir du boudin jusqu'à atteindre l'équilibre entre la concentration dans le boyau et la concentration dans le tampon.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ Filtration sur gel

Le principe est de faire passer la solution de protéine dans un gel constitué de billes creuses,

les petites molécules passent par l'intérieur des billes et font donc un chemin plus long que les grosses molécules qui ne passent pas par l'intérieur des billes.

Cette méthode est aussi utilisée comme dessalage pour éliminer les sels d'une solution ou pour changer le tampon.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ **Ultrafiltration**

La solution est filtrée sur une membrane ayant un seuil de coupure correspondant à des poids moléculaires de 1 à 100 kDa.

Le filtrat ne contient donc que des petites molécules et, si la solution ne passant pas par la membrane est diluée plusieurs fois avec le tampon, elle ne contient que des molécules de grande taille.

Cette méthode est plutôt utilisée pour les grands volumes.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ **Ultracentrifugation**

Les protéines sont séparées en fonction de leur vitesse de sédimentation dans un milieu visqueux, généralement une solution concentrée de saccharose.

Les protéines les plus grosses sédimentent plus vite que les molécules plus petites.

L'ultracentrifugation ne permet de séparer que de petits échantillons, c'est donc une méthode analytique.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

- Les protéines sont des polyélectrolytes, ainsi, à un pH donné, chacun des groupements ionisables sera dans un état d'ionisation donné (en fonction du pKa).

Le pI est le pH auquel la charge globale de la protéine est nulle.

Si $\text{pH} < \text{pI}$, la molécule est positive.

Si $\text{pH} > \text{pI}$, la molécule est négative.

On utilise **la chromatographie d'échange d'ion**.

Ainsi, selon la charge du support et sa propre charge, la protéine va interagir ou pas avec le support.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

- On peut utiliser **l'électrofocalisation**. Il s'agit d'une électrophorèse qui permet de focaliser les protéines dans une région du gel qui correspond à leurs points isoélectriques.

Pour avoir un gel avec un gradient de pH, on ajoute des ampholines qui sont des polymères avec des groupements ionisables.

La protéine va migrer jusqu'au niveau de pH qui correspond à son pI.

Cette méthode est très utilisée car elle est très résolutive : elle sépare les isoenzymes qui sont très proches en séquence d'acides aminés.

L'électrofocalisation ne permet pas de séparer une grande quantité de protéine. Cette méthode a été adaptée à la chromatographie et a pris le nom de **chromatofocalisation**

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

- On utilise une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives.
- Etant donné que l'on applique un courant électrique sur le gel, les protéines vont migrer en fonction de leur taille et de leur charge.
- Le gel agit comme un tamis qui va plus retenir les grosses molécules que les petites.
- La majorité des protéines sont chargées négativement et vont donc migrer vers le pôle positif.
- Ces gels sont appelés natifs car la protéine garde son activité.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

- Chromatographie: On utilise un support qui contient un greffage hydrophobe et qui peut donc interagir avec les protéines hydrophobes.
- On charge la colonne en présence de sel car il favorise les interactions hydrophobes ((NH₄)₂SO₄ à 1M).
- L'élution peut se faire soit en diminuant la concentration en sels soit en ajoutant un détergent qui solubilise les interactions hydrophobes.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ *Site actif*

- On fixe sur le support un ligand dont on sait qu'il a une forte interaction avec la protéine que l'on cherche à purifier.
- L'élution peut être non spécifique (augmentation de la force ionique) ou spécifique (élution avec le ligand libre - il y a alors compétition et fixation de la protéine sur ce ligand libre; le ligand libre est enfin éliminé par dialyse).
- L'avantage de cette dernière méthode est qu'elle ne fait pas appel aux propriétés physico-chimiques qui peuvent être communes à plusieurs protéines mais à la spécificité :
- Exemple de chromatographie d'affinité avec des tag :
 - Glutathion-S-transférase : l'élution se fait en rajoutant du glutathion dans le tampon
 - Strep-tag : l'élution est obtenue en ajoutant de la desthiobiotine

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ *Modification post traductionnelle*

- On peut trier des protéines glycosylées des protéines non glycosylées en utilisant une lectine fixée sur une colonne.
- Une lectine est une protéine qui a une forte affinité pour les sucres.
- En utilisant une lectine qui reconnaît un sucre composant les structures glycosylées des protéines, on peut accrocher les protéines glycosylées sur la colonne et les éluer en utilisant le sucre dans la phase mobile.
- Une des lectines les plus utilisées est la **concanavalline A** qui reconnaît le mannose.

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

➤ *Séquence primaire*

Certaines séquences peuvent être reconnues par des ligands. Par exemple, **les queues homopolymériques d'histidine** peuvent être purifiées avec des colonnes de Nickel ou de Cobalt.

L'élution est obtenue avec une solution contenant de l'imidazole ou avec une solution d'EDTA.

Cette méthode proposée en 1975 par Porath et al., est actuellement la méthode de purification la plus populaire.

Le cobalt est quelquefois préféré au nickel, parce que la liaison est moins sensible au β -mercaptoethanol et parce que le cobalt forme quatre liaisons avec les histidines au lieu de deux pour le Nickel ce qui rend l'affinité plus spécifique

4. La séparation des protéines

Séparation selon la taille

Séparation selon la taille et la charge

Séparation selon l'affinité

Séparation selon la charge

Séparation selon l'hydrophobicité

Séparation par des colorants

Elles ressemblent à une chromatographie d'affinité mais sont moins spécifiques.

Bleu de cybacron : on l'a tout d'abord utilisé comme chromatographie d'affinité pour purifier les protéines ayant un site de reconnaissance du NAD.

Comme de nombreuses protéines sont retenues par le bleu de cybacron, on s'en est servi pour purifier un grand nombre de protéines.

L'élution s'effectue grâce à un gradient de sels.

5. Evaluation de la pureté

- Si la protéine à purifier a une activité enzymatique, on peut la suivre dans les étapes de purification grâce à cette activité, et quantifier le rendement de chaque étape en calculant l'activité spécifique, activité observée/ concentration en protéine.

- On estime le plus souvent la pureté d'une protéine par un gel dénaturant.

On utilise les propriétés du sodium dodecyl sulfate (SDS), c'est un détergent anionique qui dénature les protéines en se fixant sur les zones hydrophobes.

Etant donné que les protéines deviennent toutes chargées négativement à cause de cette interaction, elles ne vont plus migrer en fonction de leur quantité de charge mais **seulement en fonction de leur taille**.

5. Evaluation de la pureté

- Comme plusieurs protéines peuvent migrer à la même place dans un gel SDS, on peut augmenter la séparation en effectuant une **électrophorèse bidimensionnelle**.

C'est une association des méthodes d'électrofocalisation et d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

On réalise une première étape d'électrofocalisation, puis, à 90°, une étape en gel SDS, ainsi, deux protéines qui ont le même pI vont pouvoir être séparées selon leur poids moléculaire.