

Tutorat n°3

Notions fondamentales de biologie – Purification des protéines

La toxine botulique de type A (BoNTA) ou Botox est utilisée dans le traitement de maladies neurologiques comportant une trop grande activité musculaire (contractions et mouvements anormaux, crampes, spasticité, dystonie). Elle est aussi employée en cosmétique, par exemple pour réduire les rides faciales ou la transpiration excessive.

La BoNTA est composée d'une chaîne lourde de 100 kDa et d'une chaîne légère de 50 kDa, liées par un pont disulfure. L'activité protéasique du Botox est portée par la chaîne légère et nécessite un ion Zn^{2+} lié aux chaînes latérales de deux acides glutamiques et de deux histidines (figure 1).

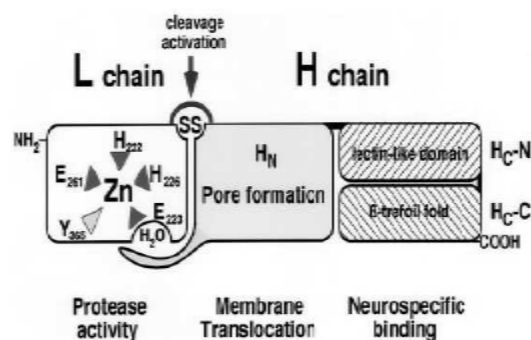


Figure 1

Preparation and Characterisation of Homogeneous Neurotoxin Type A from Clostridium botulinum, Eur. J. Biochem 122, 493-500, 1982.

Dans cet article, les auteurs rapportent les différentes étapes du protocole de purification du Botox. Dans ce cas, la protéine d'intérêt est obtenue à partir de cultures de Clostridium botulinum. Après la lyse cellulaire, le botox est obtenu en complexe avec l'hémagglutinine (voir le gel dénaturant SDS-PAGE Figure 2 Piste 1).

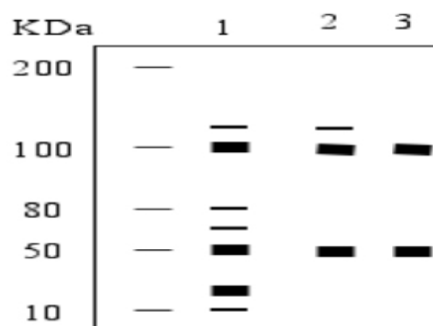


Figure 2

- A quoi correspondent les différentes bandes observées en piste 1 du gel SDS-PAGE?
- Deux protéines forment le complexe. Pourquoi voit-on 3 bandes majoritaires ?

1° étape : chromatographie d'affinité

- Donner le principe.
- Sachant qu'il existe un inhibiteur irréversible de l'hémagglutinine, proposez un protocole de purification du botox à partir du complexe botox-hémagglutinine.

Après le dépôt des protéines sur la colonne, celle-ci est lavée par une grande quantité de tampon de charge (50 mM Phosphate pH 6.3). Puis le botox est élué par variation du pH avec le tampon 0.1 M Phosphate pH 7.9, 1M NaCl.

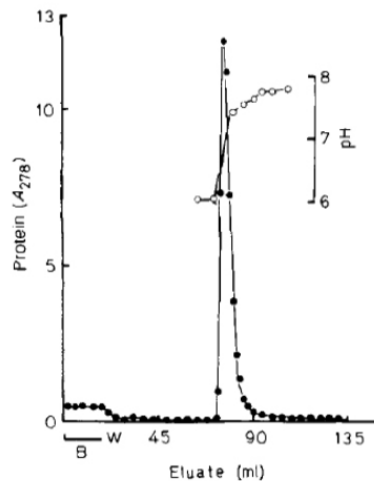


Fig. 4. Affinity chromatography of haemagglutinin-neurotoxin complexes on p-aminophenyl β -D-thiogalactopyranoside-Sepharose 4B. The sample was reacted with the gel in 50 mM phosphate buffer pH 6.3 for a total of 2.5 h at 25 °C, breakthrough (B) collected, washed with equilibrating buffer (W), and then eluted with 0.1 M phosphate buffer pH 7.9/1 M NaCl. pH (○) and A_{278} (●) of the fractions were measured

Figure 3

- Pourquoi lave-t-on la colonne après le dépôt des protéines ?
 - Décrire la figure 3. Comment est éluée la protéine ?
- Le pic de la figure 2 est analysé par gel dénaturant SDS-PAGE (figure 2 piste 2).
- Qu'en concluez-vous ?

2° étape : échange d'ions

La deuxième étape de purification est un échange d'ions sur colonne DEAE-Sephadex. Les groupements actifs DEAE (DiéthylAminoEthyl) sont chargés positivement à pH basique. Avant le dépôt des protéines, la résine est équilibrée dans le tampon 0.1 M Phosphate pH 7.9.

- Quel est le principe d'une échangeuse d'ions ?
- Quel est l'intérêt d'équilibrer la colonne ?

- D'après la figure 4, comment sont éluées les protéines ?

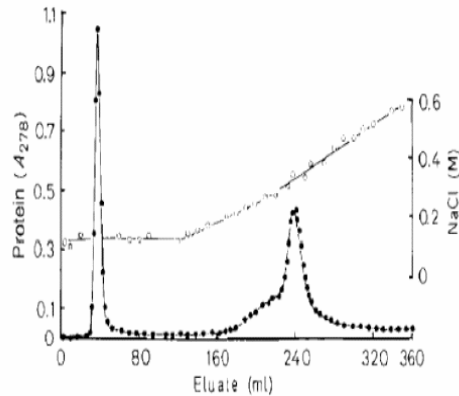


Fig.6. DEAE-Sepharose chromatography of toxin purified by affinity chromatography. Haemagglutinin-free toxin (44.8 mg) eluted from the affinity gel (Fig.4) was dialyzed against 0.15 M Tris/HCl, pH 7.9, and applied to the ion-exchange column (50×1 cm). After washing with two bed volumes, a linear NaCl gradient (0–0.5 M) in the same buffer was applied. A₂₇₈ (●) and chloride concentration (○) were monitored, in the latter case by a Hg(CNS)₂ colorimetric method

Figure 4

Le pic de la figure 4 est analysé par gel dénaturant SDS-PAGE (figure 2 piste 3).

- Qu'en concluez-vous ?

3^o étape : calcul de concentration

Nous voulons connaître la concentration de notre protéine purifiée.

Suivant la Relation de Beer-Lambert $A = E \times L \times c$ avec A, l'absorbance de la solution pour une longueur d'onde L, c (en M) est la concentration du soluté, L (en cm) est la longueur du trajet optique et E (en M⁻¹ cm⁻¹) le coefficient d'extinction molaire qui dépend de la nature du soluté et de la longueur d'onde

- Sachant que coefficient d'extinction molaire de BoNTA E (**botox**), 280nm = 193260 M⁻¹ cm⁻¹ et la longueur du trajet optique = 1 cm, calculer la concentration de protéine purifiée.

Projet industriel

Sur la base des outils et/ou techniques abordés dans ce tutorat, proposez une application à retombées industrielle et économique.