

Purification et dosage de la phosphatase alcaline



Dimère de la phosphatase alcaline d *E.coli*

Table des matières

Fiche de synthèse

I.	Genèse du projet	1
II.	Présentation du matériel et des méthodes	2
II. 1.	Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford	2
II. 2.	Mise en évidence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.....	2
II. 2. 1)	Protocole	2
II. 2. 2)	Calcul de l'activité enzymatique.....	2
II. 3.	Purification par résine Sépharose 4B	3
II. 4.	Dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.).....	4
II. 5.	Budget	4
III.	Résultats	4
III. 1.	Analyses biologiques avant purification.....	4
III. 1. 1)	Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford.....	5
III. 1. 2)	Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	5
III. 2.	Purification	6
III. 3.	Analyses biologiques après purification	7
III. 3. 1)	Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford.....	7
III. 3. 2)	Mise en évidence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline	8
III. 3. 3)	Détermination du taux de purification.....	8
III. 4.	Dosage de la phosphatase alcaline par HPLC	9
IV.	Difficultés rencontrées	10
V.	Conclusion et perspective	10

Fiche de synthèse

Lors de la fête de la science, une partie de l'équipe du projet avait déjà présenté la phosphatase alcaline dans un contexte agro-alimentaire pour des analyses microbiologiques. Les professeurs, étant intéressés par l'étude de cette enzyme, nous ont donc conseillé de réaliser notre projet M58 sur la purification et le dosage par HPLC de la phosphatase alcaline.

Avant la purification, nous avons récupéré des extraits des années antérieures conservés dans la glace préalablement. Nous avons calculé la quantité de protéines présentes dans ces extraits par la méthode de Bradford. Nous avons ensuite calculé l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline par dosage enzymatique dans le but de choisir les échantillons d'extraits dont la concentration en protéines était la plus importante. Ces échantillons ont été ensuite purifiés.

La purification a été réalisée à l'aide d'une résine Sépharose 4B déposée dans une burette de 25 mL. Afin de visualiser correctement la séparation, nous avons versé, les échantillons en même temps que des colorants de faible masse molaire indiquant la fin de la purification : le Bleu de Coomassi et le Rouge PONCEAU. Des cuves en Quartz, contenant 1 mL de la solution purifiée, constituaient les différentes fractions passées au spectrophotomètre. Ainsi, on a déterminé les nouvelles fractions purifiées, dont la concentration en protéines était la plus élevée.

Après purification, nous avons à nouveau calculé, sur ces échantillons, la quantité en protéines et l'activité enzymatique en phosphatase alcaline. Puis nous avons effectué un dosage par HPLC avec une colonne C4. Nous avons choisi cette colonne car elle a un pouvoir de rétention plus faible permettant ainsi d'analyser de petites protéines. Enfin, nous avons pu quantifier la phosphatase alcaline dans les extraits purifiés.

I. Genèse du projet

La mise en place d'un protocole expérimental est une qualification importante pour tout futur technicien de laboratoire. Cette compétence est donc prise en compte dans le cadre du B.T.S. Nous avons décidé de travailler sur la phosphatase alcaline.

Lors d'un projet M.I.L. effectué lors de la fête de la Science, deux étudiants au sein du groupe ont déjà travaillé sur la phosphatase alcaline mais dans un contexte microbiologique. Intéressés par l'étude de cette enzyme et à la demande des professeurs, nous nous sommes proposés de réaliser comme projet de M 58 la purification et le dosage par HPLC de la phosphatase alcaline.

L'H.P.L.C était aussi utilisé par un autre groupe d'étudiantes travaillant sur la gelée royale. De ce fait, nous utilisons cet appareil lorsqu'elles l'analysaient par d'autres méthodes d'analyses chimiques.

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme retrouvée chez de nombreux organismes vivants tels que les animaux, les bactéries, les êtres humains. Chez les animaux, y compris les hommes, elle est présente dans tous les tissus de l'organisme, mais est particulièrement concentrée dans le foie, le rein, les os (elle joue un rôle primordial dans leur croissance) et le placenta. Cette enzyme possède un intérêt particulier pour l'homme car elle est fréquemment utilisée lors des analyses médicales et dans le domaine de la recherche. Dans le domaine médical, leur dosage s'intègre dans le cadre d'un bilan hépatocellulaire (il s'agit d'un comptage de cellules présentes dans le foie) et/ou d'un bilan osseux. Elle présente donc un intérêt dans l'élaboration d'un diagnostic médical.

Pour mener à bien notre projet, nous avons réalisé des tests sur des échantillons de phosphatase alcaline produite par les anciennes promotions ainsi que la nôtre. Ces échantillons proviennent d'une souche d'*E.coli* K12 extraite par deux méthodes différentes :

- Une extraction par le lysozyme-EDTA en milieu isotonique (échantillon « extraction 1 »)
- Une extraction par dénaturation réversible (échantillon « extraction 4 »)

A partir de ces échantillons nous avons effectué quatre analyses : détermination de la quantité de protéines totales par méthode de Bradford, la mise en évidence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, une purification par séparation des molécules par chromatographie d'exclusion et un dosage des protéines par HPLC.

II. Présentation du matériel et des méthodes

II. 1. Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford

Les extraits sont conservés dans la glace.

On réalise une gamme étalon à partir d'Albumine de Sérum Bovin (S.A.B.) :

C en $\mu\text{g/mL}$	0	20	40	60	80	100
V SAB (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
V eau (mL)	0	1.8	1.6	1.4	1.2	1
Absorbance	0	0.016	0.044	0.077	0.082	0.121

Pour chaque extrait, insérer dans un tube à hémolyse :

- 100 μL de chaque tube de la gamme et ajouter 2 mL de réactif de Bradford
- 100 μL d'extrait et 2 mL de réactif de Bradford

Homogénéisation et laisser 20 minutes à température ambiante après ajout du réactif de Bradford.

Lecture de l'absorbance à 595 nm. (Utilisation de cuves adéquates au domaine du visible)



Utilisation des gants, des lunettes et de la blouse car le réactif de Bradford est un produit C.M.R., corrosif.

II. 2. Mise en évidence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline

II. 2. 1) Protocole

Pour chaque extrait dans des tubes hémolyse :

- 2 mL de solution Tris-PNPP pré incubé à 30°C
 - 1 cachet de PNPP anhydre
 - 10 mL d'eau (Homogénéisation de la solution de Tris-PNPP à l'obscurité car sinon une réaction enzymatique a lieu à la lumière, altérant la solution)
- 200 μL d'extrait enzymatique

Incubation pendant 10 min à 30°C et arrêt de la réaction par ajout de 1 mL de solution de NaOH à 2 mol.L⁻¹. Lecture de l'absorbance à 405 nm.

II. 2. 2) Calcul de l'activité enzymatique

Voici la méthode pour calculer l'activité enzymatique appliquée pour les échantillons choisis.

a) Détermination de la concentration en phosphatase alcaline

Par lecture au spectrophotomètre à $\lambda = 405 \text{ nm}$, on obtient les valeurs d'absorbance qui nous permettront de déterminer la concentration de la phosphatase alcaline grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon * l * C$$

$$\text{Donc } C = A / \epsilon * l$$

A : Absorbance de l'échantillon
 ϵ : coefficient d'extinction molaire en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
 $\epsilon = 17\,500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
l : largeur de la cuve. $l = 1 \text{ cm}$

b) Détermination de la quantité de matière en PAL notée n

$n = C * V$ avec V = le volume du mélange réactionnel présent dans les cuves. $V = 3 \text{ mL}$

c) Détermination de l'activité enzymatique A_T pour 200 μL d'enzyme présent dans les extraits

$A_T = n / t$ avec t : le temps de la réaction. $t = 10 \text{ min}$ soit $t = 600 \text{ s}$.

A_T : activité enzymatique en mol.s^{-1}

d) Détermination de A_T en nanokatal

1 nanokatal = $1 * 10^{-9} \text{ mol.s}^{-1}$

En appliquant un produit en croix avec les valeurs trouvées précédemment, on en déduit l'activité enzymatique en nanokatal.

II. 3. Purification par résine Sépharose 4B

Pour purifier nos extraits de phosphatase alcaline, nous avons préparé une colonne de purification par résine Sépharose 4B dans une burette graduée de 25 mL. On a choisi cette résine car elle retient les protéines de 60 000 Da à 20 000 000 Da. La phosphatase alcaline, dont la masse molaire ($170\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) appartient à cet intervalle, est donc retenue.

Nous avons purifié les échantillons sélectionnés précédemment, soit E1 (2014-2015) et E4 (2015-2016) selon la manipulation suivante :

- Injection de 1 mL d'extrait d'échantillons
- Injection de 1 mL de tampon phosphate à $\text{pH}=7,4$
- Ajout de quelques gouttes de colorant (bleu de Coomassie, rouge PONCEAU)
- Ajout progressif de 25mL de tampon phosphate

Nous récupérons une fraction de 1 mL des échantillons purifiés dans des cuves à quartz que nous avons passé ensuite au spectrophotomètre à 220 nm pour les échantillons E4 (2015-2016) et à 205 nm pour les échantillons E1 (2014-2015)



II. 4. Dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.)

A partir d'une phase mobile à 1% d'acétonitrile composée également du T.F.A. (acide trifluoroacétique) et d'eau ultra pure pour HPLC, nous avons débuté par un dosage de la phosphatase alcaline pure à 1 g/L afin de pouvoir avoir le pic correspondant à cette enzyme. On a injecté 50 μ L de solution de phosphatase alcaline pure à 1g/L (dilution de 1 μ L de phosphatase alcaline pure dans 990 μ L d'eau pure pour HPLC) dans une colonne C4 à une longueur d'onde de 205 nm et un débit de 1 mL par minute.



T.F.A et acétonitrile : manipulation sous la hotte de chimie, port des gants, lunettes et de la blouse obligatoire.

II. 5. Budget

Produits	Quantité pour projet	Conditionnement	Prix € en HT
Phosphate dibasique anhydre	142 g	500 g	36.55
Phosphate monobasique anhydre	120 g	500 g	32.69
Sérum d'Albumine Bovine anhydre	200 mg	1 g	67.20
TFA (acide trifluoroacétique)	100 mL	100 mL	64.10
sepharose 4B	1 mL	100 mL	173
solution de Bradford	1 L	500 mL	101
acétonitrile	1 L	1 L	87.30
Phosphatase alcaline provenant de la muqueuse intestinale bovine	-	-	150.50
Cône de pipetage non stérile	-	100 cônes	14.00
Boîte de gants	-	100 gants	3.90

III. Résultats

III. 1. Analyses biologiques avant purification

Devant le nombre important d'échantillons à analyser, nous avons décidé de réaliser une sélection selon la concentration en S.A.B. présent dans les extraits. En effet, les échantillons présentant une faible concentration ont une activité enzymatique qui est faible. De ce fait, il est inutile de les analyser car le dosage de la phosphatase alcaline par HPLC révélerait des concentrations faibles en enzyme.

III. 1. 1) Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford

On obtient les résultats suivants :

Concentration en $\mu\text{g/mL}$	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Absorbance gamme SAB	0	0,016	0,044	0,07	0,083	0,102
E1 2015/2016	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
E1' 2015/2016	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022
E4 2015/2016	0,1011	0,1011	0,1011	0,1011	0,1011	0,1011
E4' 2015/2016	0,0851	0,0851	0,0851	0,0851	0,0851	0,0851
E1 2014/2015	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755
E4 2014/2015	0,0385	0,0385	0,0385	0,0385	0,0385	0,0385
E1 2010	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009

On obtient les concentrations suivantes :

Echantillon	Concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$
E1 2015	2
E4 2015	20,1753555
E4' 2015	17,1421801
E1 2014	15,3175355
E4 2014	2,82938389
E1 2010	1,43127962

Au vu des résultats, les échantillons E4 2015/2016, E1 2014/2015 seront purifiés par gel Sépharose 4B pour la purification et H.P.L.C. pour le dosage de la phosphatase alcaline car les concentrations en S.A.B. sont acceptables, les autres échantillons possèdent des valeurs trop faibles. Leur activité enzymatique est donc trop faible.

Ainsi, suite à cette manipulation, la concentration en phosphatase alcaline avant purification est déterminée dans les extractions citées ci-dessus avant purification, soit $[\text{protéines}]_{\text{E4 2015/2016}} = 20.18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $[\text{protéines}]_{\text{E1 2014/2015}} = 15.32 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

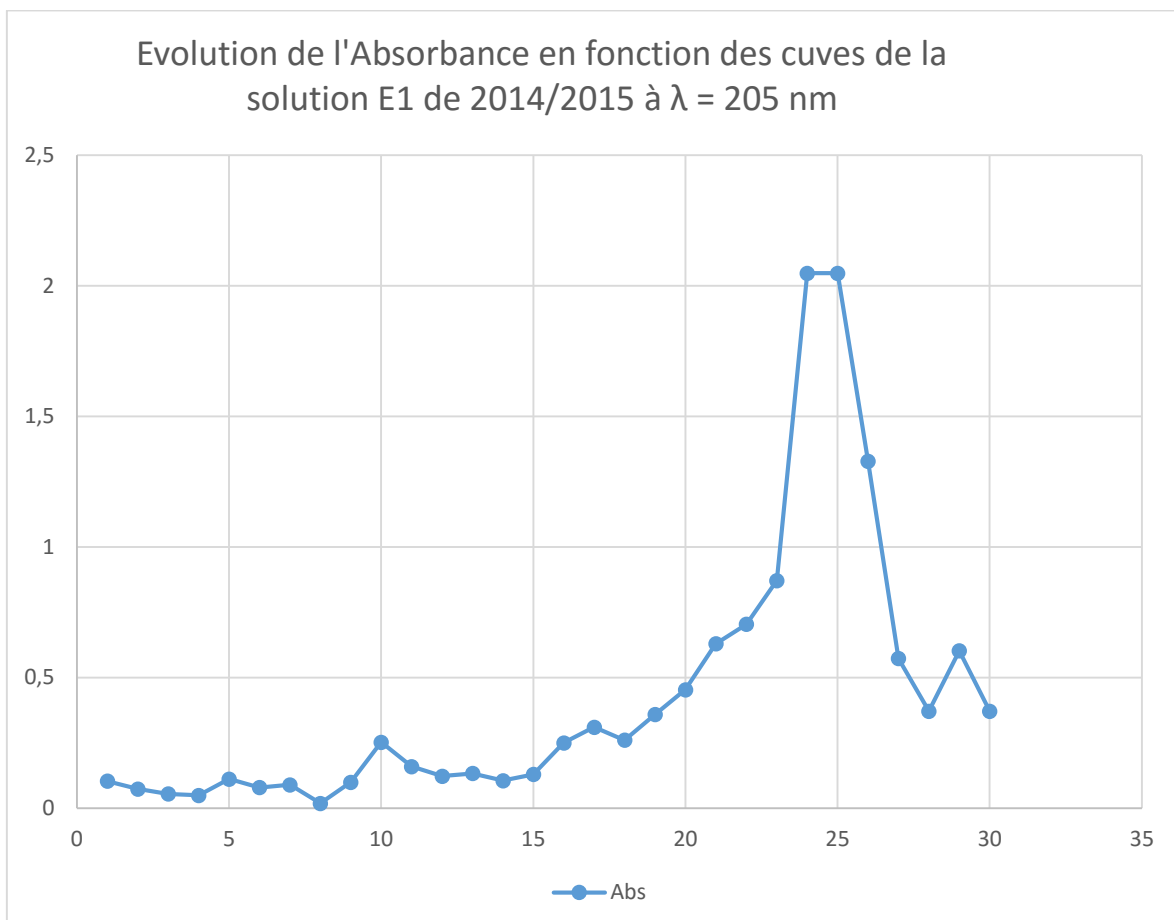
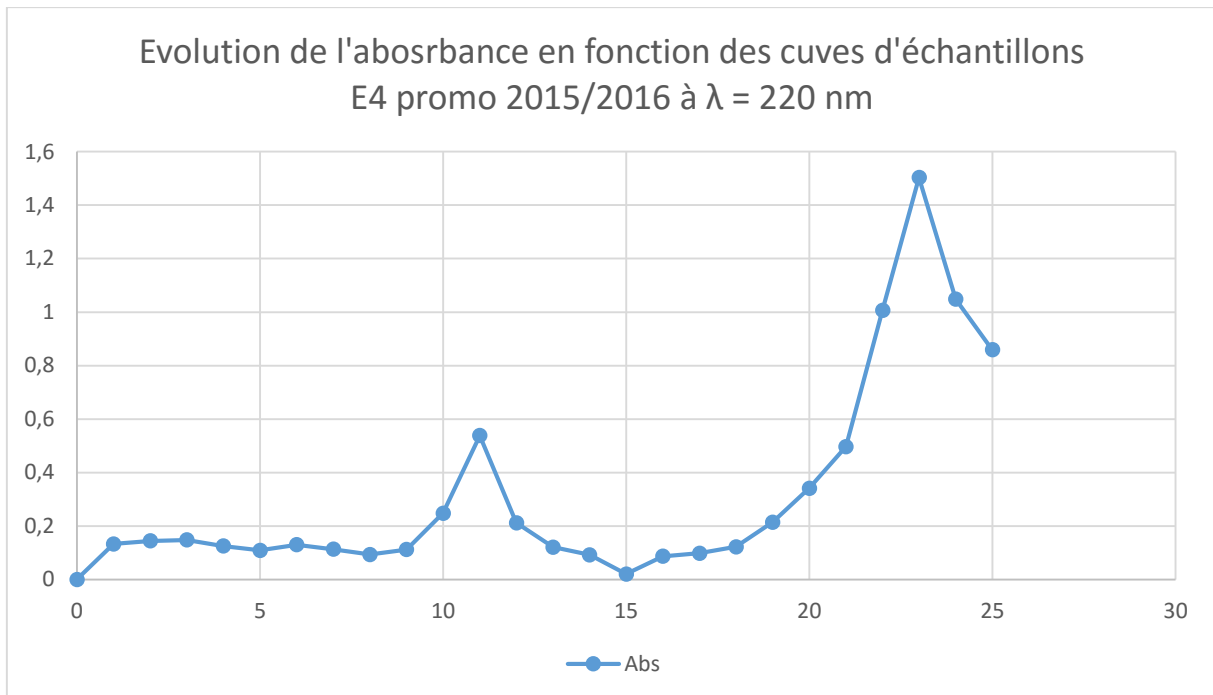
III. 1. 2) Mise en évidence de l'activité enzymatique

Cuve	E1 2014/2015	E4 2015/2016
Absorbance	0.004	0.176
[PAL] en mol/L	$1.005 \cdot 10^{-5}$	$2.28 \cdot 10^{-7}$
n_{PAL} en mol	$3.015 \cdot 10^{-8}$	$6.84 \cdot 10^{-10}$
A_{T} en mol.s^{-1}	$5.025 \cdot 10^{-11}$	$1.14 \cdot 10^{-12}$
A_{T} en nanokatal	0.05025	$1.14 \cdot 10^{-3}$

Les deux échantillons sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion sur colonne Sépharose 4B.

III. 2. Purification

On obtient les graphiques suivants :



On a décidé de garder les fractions 10, 17, 25, 29 de l'extraction E1 (2014-2015) ; 11 et 23 pour l'extraction E4 (2015-2016) qui semblait avoir la plus forte concentration en protéines. Ces fractions sont ensuite analysées par méthode de Bradford et dosées par HPLC.

III. 3. Analyses biologiques après purification

Premièrement, nous avons fait un dosage de Bradford pour avoir une première idée de la concentration en protéines.

III. 3. 1) Estimation de la quantité de protéines par méthode de Bradford

a) Echantillons E1, 2014-2015

[S.A.B.]	0	20	40	60	80	100
Absorbance	0	0,011	0,045	0,059	0,088	0,112

Cuve n°	Absorbance
10	0.213
17	0.215
25	0.247
29	0.272

$$[\text{Protéines}] = A / 0.0165$$

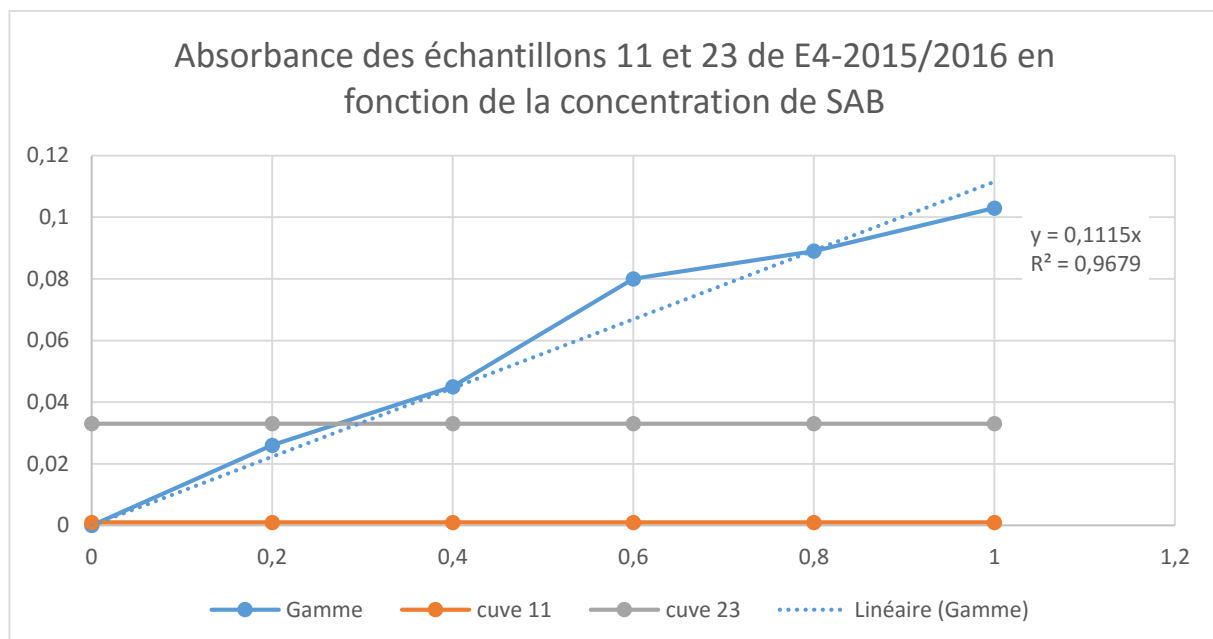
[protéines] en µg/mL	
Cuve 10	12,9090909
Cuve 17	13,030303
Cuve 25	14,969697
Cuve 29	16,4848485

b) Echantillon E4, 2015-2016

Les résultats pour l'extraction 4 de 2015-2016 sont:

[S.A.B.] en µg/mL	0	20	40	60	80	100
Abs	0	0.026	0.045	0.08	0.089	0.103

Cuve n°	Absorbance
11	0.001
23	0.033



Donc [protéines]_{CUVE 11} = $8.97 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$ et [protéines]_{CUVE 23} = $2.96 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$.

III. 3. 2) Mise en évidence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline

Afin d'exploiter les résultats précédents, nous devons les comparer avec l'activité de la phosphatase présente dans ces échantillons. Nous avons de ce fait réalisé un test d'activité enzymatique spécifique de la phosphatase et nous avons obtenu les résultats suivants:

a) Echantillons E1, 2014-2015

Cuve	10	17	25	29
Absorbance	0.003	0	0.014	0.015
[PAL] en mol/L	$1.71 \cdot 10^{-7}$	0	$8 \cdot 10^{-7}$	$8.57 \cdot 10^{-7}$
n_{PAL} en mol	$5.13 \cdot 10^{-10}$	0	$2.4 \cdot 10^{-9}$	$2.57 \cdot 10^{-9}$
A_T en mol.s ⁻¹	$8.55 \cdot 10^{-13}$	0	$4.0 \cdot 10^{-12}$	$4.28 \cdot 10^{-12}$
A_T en nanokatal	$8.55 \cdot 10^{-4}$	0	$4.0 \cdot 10^{-3}$	$4.28 \cdot 10^{-3}$

b) Echantillons E4, 2015-2016

Cuve	11	23
Absorbance	0.003	0.004
[PAL] en mol/L	$1.71 \cdot 10^{-7}$	$2.29 \cdot 10^{-7}$
n_{PAL} en mol	$5.14 \cdot 10^{-10}$	$6.86 \cdot 10^{-10}$
A_T en mol.s ⁻¹	$8.57 \cdot 10^{-13}$	$1.14 \cdot 10^{-12}$
A_T en nanokatal	$8.57 \cdot 10^{-4}$	$1.14 \cdot 10^{-3}$

En les comparant, nous pouvons dire que les cuves où se situe la phosphatase la plus pure sont les cuves 10 de l'extraction 1 et la cuve 11 de l'extraction 4. En effet, la concentration en protéines donnée par le dosage de Bradford dans ces cuves est faible, mais l'activité est pratiquement égale à celle avant la purification. Ce qui signifie qu'il n'y a quasiment que de la phosphatase.

III. 3. 3) Détermination du taux de purification

a) Echantillon E1 2014-2015

Echantillons	Concentration en µg/mL		Activité enzymatique en nanokatal		Activité spécifique en nanokatal/µg		Facteur de purification
	Avant purification	Après purification	Avant purification	Après purification	Avant purification	Après purification	
Cuve 10	15,32	0,44	$1,14 \times 10^{-2}$	$8,55 \times 10^{-4}$	$7,44 \cdot 10^{-4}$	0,00194	2,61
Cuve 17	15,32	0,5	$1,14 \times 10^{-2}$	0	$7,44 \cdot 10^{-4}$	0	0
Cuve 25	15,32	1,22	$1,14 \times 10^{-2}$	4×10^{-3}	$7,44 \cdot 10^{-4}$	0,00328	4,41
Cuve 29	15,32	2,28	$1,14 \times 10^{-2}$	$4,28 \times 10^{-3}$	$7,44 \cdot 10^{-4}$	0,00188	2,53

Le facteur de purification est obtenu par le calcul suivant :

$$\text{Facteur de purification} = \frac{\text{Activité spécifique après purification}}{\text{activité spécifique avant purification}}$$

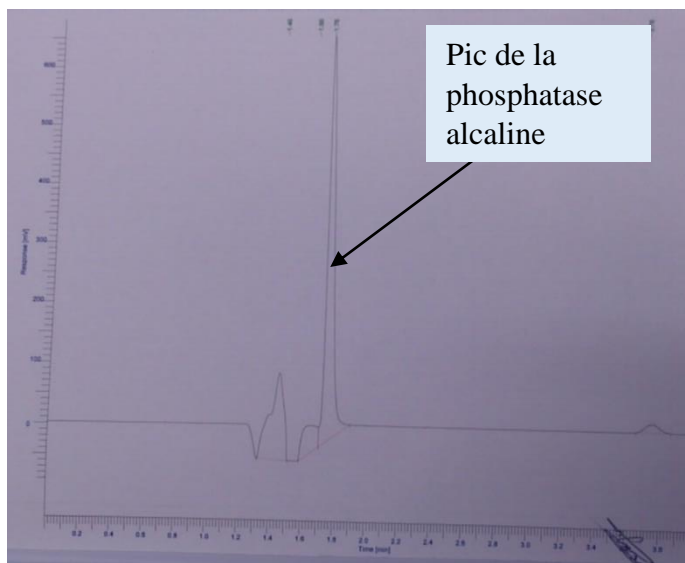
b) Echantillons E4 2015-2016

Echantillons E4	Concentration en $\mu\text{g/mL}$		Activité enzymatique en nanokatal		Activité spécifique en nanokatal/ μg		Facteur de purification
	Avant purification	Après purification	Avant purification	Après purification	Avant purification	Après purification	
cuve 11	20,18	$8,97 \cdot 10^{-3}$	0,05025	$8,57 \cdot 10^{-4}$	$2,49 \cdot 10^{-3}$	0,09554	38,37
cuve 23	20,18	0,296	0,05025	$1,14 \cdot 10^{-3}$	$2,49 \cdot 10^{-3}$	$3,85 \cdot 10^{-3}$	1,55

En opposant ces résultats avec ceux obtenus en HPLC, on va pouvoir vérifier la véracité de cette hypothèse.

III. 4. Dosage de la phosphatase alcaline par HPLC

On obtient le chromatogramme suivant de la phosphatase alcaline pure :



Ainsi, on obtient un pic d'une aire de 1 958 452.25 $\mu\text{V/s}$ à $t = 1.761$ min.

Après rinçage avec la phase mobile de l'HPLC pendant 15 minutes, on a injecté successivement les cuves des fractions d'échantillon présentant un pic d'absorbance représentant la phosphatase alcaline.

Tableau présentant la concentration de phosphatase alcaline dans les échantillons de 2014-2015, extraction 1

Cuve des échantillons	Temps (min)	Aire du pic ($\mu\text{V/s}$)	[phosphatase alcaline] en g/L
10	1.757	123 418.81	0.0630
17	1.794	59 683.3	0.0305
25	1.743	415 573.55	0.2122
29	1.759	443 687.16	0.2265

Tableau présentant la concentration en phosphatase alcaline
dans les échantillons de 2015-2016, extraction 4

Cuve d'échantillon	Temps (min)	Aire du pic ($\mu\text{V/s}$)	[phosphatase alcaline] en g/L pour solution diluée	[phosphatase alcaline] en g/L pour solution non diluée
11 (solution diluée au 10e)	1.769	64 104.12	0.0327	0.327
19 (solution diluée au 10e)	1.769	68 091.58	0.0348	0.348
23 (solution diluée au 10e)	1.784	86 769.64	0.0443	0.443

Les solutions ont été diluées au 10^{ème} car les fractions d'échantillon sans dilution présentaient un pic saturé, soit la solution est très concentrée en protéines.

IV. Difficultés rencontrées

Afin de réaliser ce projet, nous avons été obligés de faire des recherches bibliographiques concernant les modalités d'analyse de la phosphatase alcaline. En effet, aucune analyse normalisée n'existe pour le dosage et la purification de cette protéine. Pour cela, nous avons fait appel à un professionnel en chromatographie liquide, M. Christophe MEILLAT, qui nous a donné des informations sur la phase mobile à utiliser ainsi que sur le choix de la colonne. Enfin, on a eu un problème de communication par rapport aux moments d'utilisation de l'H.P.L.C. avec un autre groupe d'étudiants qui l'utilisait aussi.

V. Conclusion et perspective

La colonne Sépharose 4B a permis de purifier les solutions obtenues suite aux différentes méthodes d'extraction lors des travaux pratiques de biologie. En ce qui concerne les échantillons issus de l'extraction 1 de la promotion 2014-2015 et l'échantillon 23 E4-2015/2016, le produit obtenu purifié contient entre 2 et 5 fois plus de phosphatase alcaline que dans le produit initial. Or, une attention particulière est portée pour l'échantillon 11 de l'extraction 4 de la promotion 2015-2016 : on constate que ce produit purifié contient 38 fois plus d'enzyme que l'échantillon de départ. Ainsi, la colonne Sépharose 4B a été nettement efficace sur cet extrait. Pour améliorer cette analyse, nous pourrions utiliser une autre méthode de dosage et/ou de purification en utilisant une chromatographie d'affinité ; une chromatographie qui permet d'être plus spécifique en ayant un intervalle de retient de l'enzyme beaucoup plus proche de la masse molaire de la phosphatase alcaline. En amont, l'enzyme a été extraite par dénaturation réversible et par le lysozyme-EDTA en milieu isotonique. Une autre méthode peut être envisagée pour améliorer l'extraction en réalisant par exemple un choc osmotique.