

**TP SV
D1****LES PROTEINES - 1**

COURS : SV-D-2.4 TP : SV-D2, SV-E, SV-F1, SV-F3



L'étude des biomolécules fait partie du domaine généralement désigné par le terme de « biologie moléculaire ». On regroupe sous le terme très général de « Biologie Moléculaire » toutes les techniques biologiques consistant en l'analyse et l'exploitation des molécules biologiques. On peut distinguer des techniques d'analyse (électrophorèse, chromatographie, etc.) visant à déterminer la composition d'un milieu ou à étudier une molécule donnée, et des techniques de génétique moléculaire visant à l'étude et à l'exploitation (y compris modification) de l'ADN (ou de l'ARN). Ces dernières techniques, de génétique moléculaire, seront abordées dans les TP de génétique moléculaire (SV-F1 et SV-F3)) : nous nous limiterons donc ici aux protéines.

L'objectif du TP est ici d'aborder quelques méthodes d'analyse des structures protéiques, en relation avec leurs fonctions. Cela nous permettra en particulier d'aborder les techniques d'électrophorèse.

Programme officiel :

- Interpréter un profil d'hydropathie
- Réaliser une électrophorèse de protéines en conditions natives
- Exploiter les résultats d'une électrophorèse en conditions natives ou dénaturantes
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de western blot ou d'immunomarquage

Compétences :

- Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes (western blot)
- Réaliser et exploiter une électrophorèse de protéines en conditions natives
- Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude des protéines : profil d'hydropathie, western blot, immunomarquage, électrophorèse en conditions dénaturantes

Plan du TP :**1. Les électrophorèses : séparations selon les charges, et/ou formes et/ou tailles**

- 1.1. Principe général des électrophorèses
- 1.2. Electrophorèses de protéines : dénaturantes et non dénaturantes

2. Réalisation d'une électrophorèse de protéines

- 2.1. Principe :
- 2.2. Matériel et Protocole :

3. Etude de profils d'hydropathie

- 3.1. Principe des profils d'hydropathie
- 3.2. Etude de profils d'hydropathie

4. Exercices**Travail préparatoire :**

Lecture attentive des textes expliquant le principe des électrophorèses, et de la différence entre une électrophorèse de protéine dénaturante ou non dénaturante.

Vous devez savoir : Expliquer le principe général d'une électrophorèse // Retrouver le sens de migration d'une protéine // Interpréter une électrophorèse de protéine non dénaturante // Interpréter une électrophorèse de protéine dénaturante // Expliquer le principe et l'objectif d'un Western Blot.

Faire les exercices 1 et 2

1. Les électrophorèses : séparations selon les charges, et/ou formes et/ou tailles**1.1. Principe général des électrophorèses**

L'électrophorèse est une technique analytique permettant de **séparer des molécules chargées dans un champ électrique**.

Lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique, ces molécules se déplacent : une molécule chargée négativement se déplace vers l'anode (électrode positive) et inversement une molécule chargée positivement se déplace vers la cathode (électrode négative).

Le déplacement d'une molécule dépend :

- De sa **taille** et de sa **forme** (à charge égale, la molécule la plus petite se déplace plus vite, et donc plus loin dans un laps de temps donné)
- Du signe et de la grandeur de sa **charge électrique globale** (à taille égale, la molécule la plus chargée de manière globale se déplace plus rapidement et donc plus loin dans un laps de temps donné)

L'électrophorèse se réalise sur un support, immergé dans un tampon de migration.

Support :

Plusieurs types de support sont possibles :

- **Bandes d'acétate de cellulose et supports similaires.** Ces bandes sont immergées à une extrémité dans une moitié de la cuve, en contact avec la cathode, et l'autre extrémité est plongée dans l'autre moitié de la cuve, dans le tampon en contact avec l'anode. Ce type de support permet des migrations basées en grande partie sur la charge des molécules : il est donc fondamental de bien déterminer au préalable le sens prévu de migration, afin de réaliser le dépôt au bon endroit (au milieu de la bande, du côté de l'anode, ou du côté de la cathode).
- **Gels, parfois d'agarose** (cas le plus courant pour l'ADN ou l'ARN), ou de **polyacrylamide** (cas le plus courant pour les protéines + séquençage de l'ADN). Le dépôt est réalisé à une extrémité du gel, les molécules étant placées dans un puits du gel. On se place dans des situations où les molécules sont chargées négativement, la migration a donc lieu de la cathode vers l'anode. La séparation des molécules est donc réalisée essentiellement sur la base de leur taille.

Tampon :

La migration a lieu dans une solution tampon. Le **pH** de cette solution est particulièrement **important** : c'est lui qui gouverne la charge des molécules, et donc leurs capacités de mouvement au cours de l'électrophorèse ! Par exemple, lorsque l'on réalise une électrophorèse avec des acides aminés isolés, leur sens de migration dépend de leur charge, elle-même dépendante du pH (revoir obligatoirement la notion de pH_i à ce propos : à partir des indications du pH_i d'un acide aminé, vous devez être capable de prévoir sa charge et donc son sens de migration dans une électrophorèse conduite à un pH donnée).

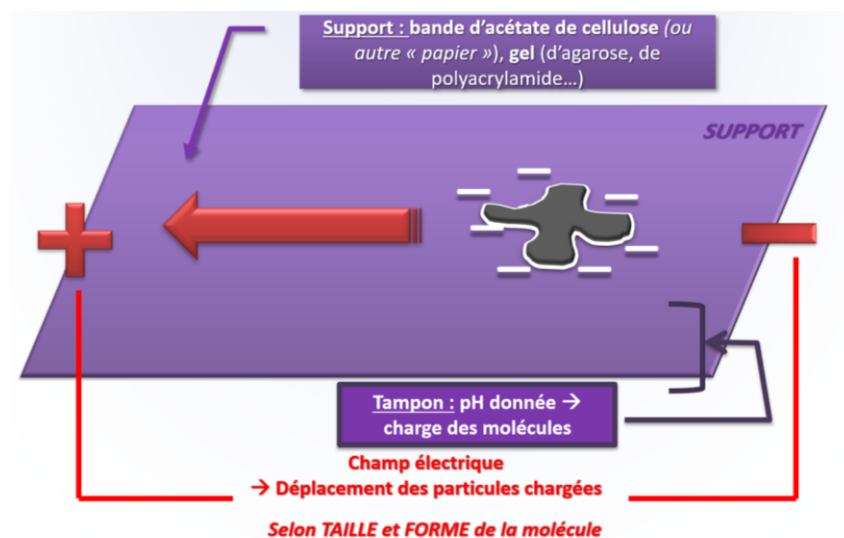
Le **support** (« papier » ou gel) doit obligatoirement **tremper** dans la solution tampon, dans deux bacs isolés (afin de pouvoir mettre en place un courant électrique). Afin que le champ électrique soit appliqué de manière uniforme, le support doit être **imprégné** du même tampon de migration :

- Dans le cas d'une bande d'acétate de cellulose, il est donc nécessaire de faire tremper les bandes dans le tampon afin qu'elles s'en imprègnent.
- Dans le cas d'un gel, ce gel est réalisé par ajout soit d'agarose, soit de polyacrylamide, à la solution tampon.

Importance de la charge des molécules :

La migration se réalisant dans un champ électrique, elle ne peut concerner que les molécules chargées ! Il n'est ainsi pas possible de réaliser d'électrophorèse de pigments (ce sont souvent des molécules lipidiques, non ionisables) ni de glucides : pour ces molécules on utilisera alors des techniques de chromatographie).

Le sens de migration dépend de la charge globale de la molécule, qui doit donc impérativement être connu avant de réaliser l'électrophorèse.



Attention : toujours bien les protocoles utilisés, les variations étant très très nombreuses au niveau des électrophorèses (et donc impossibles à toutes aborder ici !).

1.2.Électrophorèses de protéines : dénaturantes et non dénaturantes

⇒ Électrophorèses en conditions non dénaturantes [cf. expérience 1]

En conditions non dénaturantes, la migration des protéines dépend de leur charge globale, mais aussi de leur capacité à progresser au sein des mailles du support de migration. Ainsi la forme des protéines joue alors un rôle fondamental : une protéine globulaire, compacte, aura plus de facilités à progresser (et migrera donc plus loin) qu'une protéine « étirée ».

Il est ainsi possible de mettre en évidence des différences très minimes (en terme de séquence par exemple) entre deux protéines par une électrophorèse en conditions non dénaturantes, si ces différences se traduisent par des conformations tridimensionnelles différentes.

⇒ Électrophorèses en conditions dénaturante : exemple des électrophorèses SDS-PAGE [cf. exercices]

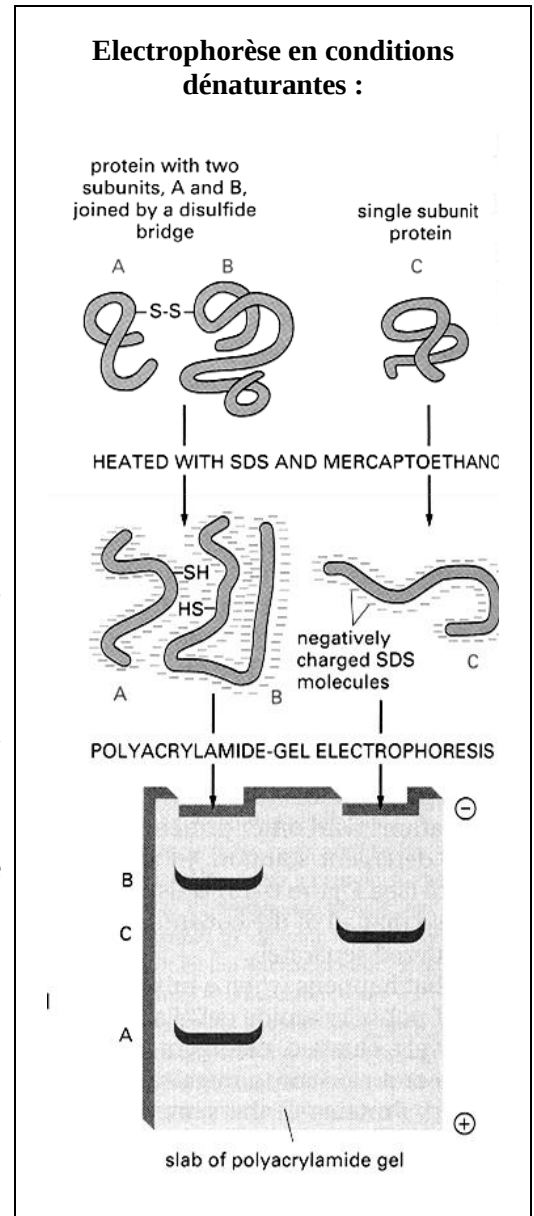
Le principe d'une électrophorèse conditions dénaturantes est de dénaturer la protéine étudiée, c'est-à-dire de lui faire perdre sa structure tridimensionnelle. Dans ces conditions, la migration devient indépendante de la forme initiale de la protéine, ainsi que de sa charge (le processus impliquant de charger toutes les protéines de manière importante) : seule la masse moléculaire intervient, et on réalise donc une séparation basée sur la masse moléculaire et donc la taille des protéines.

Ce type d'électrophorèse des protéines se réalise en général **dans un gel** de polyacrylamide. Ce gel est constitué de polymères d'acrylamide organisés en **réseau**. Ces molécules créent une sorte de maillage fin, au travers duquel les protéines migreront d'autant plus difficilement qu'elles seront volumineuses.

L'électrophorèse SDS-PAGE se réalise avec des **protéines dénaturées** par traitement au SDS, au β -mercapto-éthanol et à la chaleur :

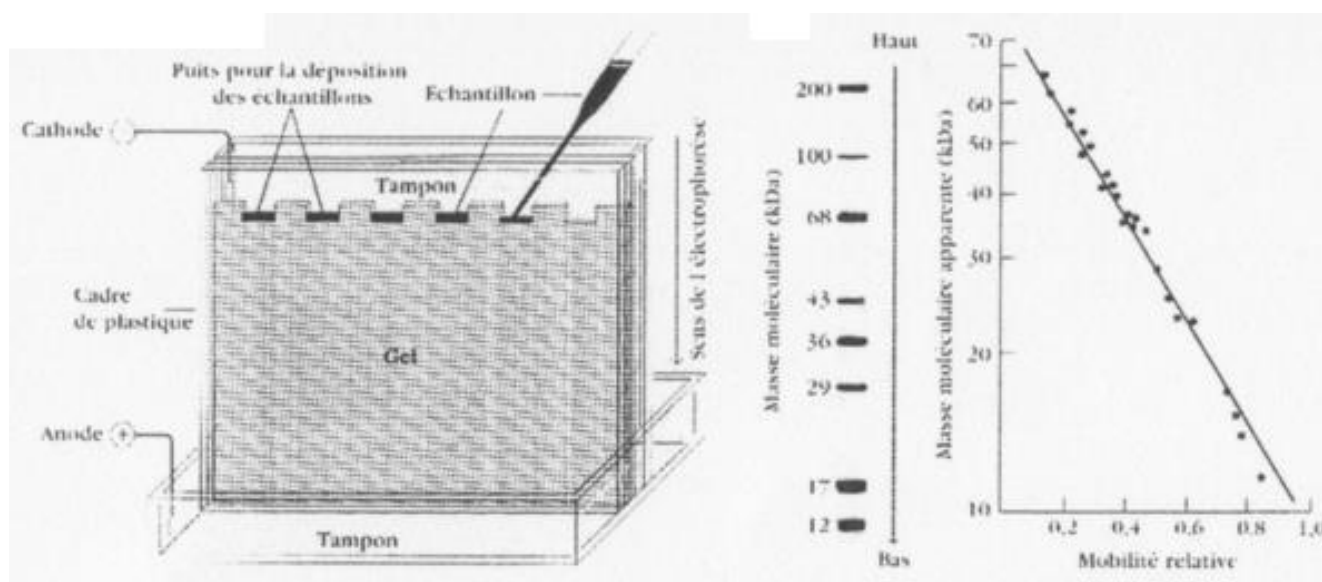
- Le **passage à 90-100°C** détruit les structures secondaires, tertiaires et quaternaires.
- Le **β mercapto-éthanol** rompt les ponts disulfures (donc les sous-unités d'une même protéine migrent de manière indépendante).
- Le **SDS** est un détergent chargé négativement, qui s'associe à la protéine en la recouvrant entièrement : toutes les protéines sont alors fortement chargées négativement et migrent vers le pôle positif.

Dénaturées et uniformément chargées, les protéines vont migrer uniquement **en fonction de la longueur de leur chaîne polypeptidique !**



Electrophorèse de protéine en conditions non dénaturantes	Electrophorèse de protéines en conditions dénaturantes
La protéine garde sa forme 3D	La protéine ne garde pas sa forme 3D
La charge de la protéine dépend de ses acides aminés	La protéine est chargée négativement, quels que soient ses acides aminés
Migration selon la forme, la charge totale et la masse de la protéine	Migration selon la masse totale de la protéine uniquement

La distance parcourue par une protéine dans une SDS-Page est **inversement proportionnelle au logarithme de sa masse moléculaire**. On réalise toujours une migration d'un ensemble de protéines de masses connues : ceci permet d'établir une **courbe étalon**, qui permet ensuite de calculer la masse moléculaire apparente des protéines étudiées.



Un dépôt sur gel d'acrylamide (à gauche) et un exemple de courbe étalon (à droite $\rightarrow \log M = f(\text{distance parcourue})$)

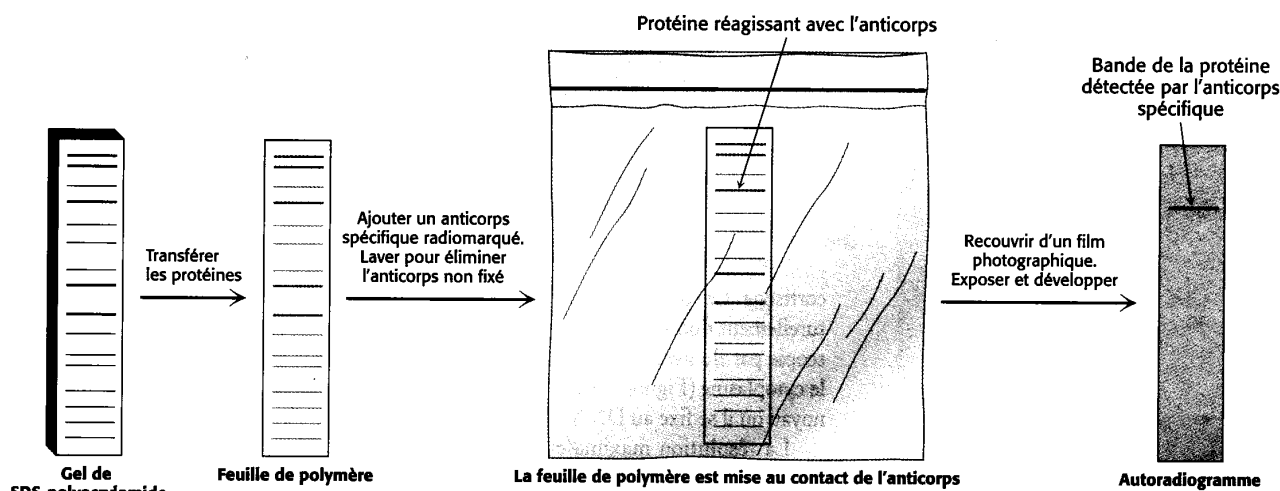
$\Rightarrow$ Révélation spécifique des protéines séparées par électrophorèse : le **Western-Blot** [cf. exercices]

Le Western blot est une technique complémentaire de l'électrophorèse des protéines. Après **migration** dans un gel de polyacrylamide, en général en conditions dénaturantes, les protéines sont **transférées** sur une **membrane** grâce à l'application d'un champ électrique.

La membrane obtenue est **l'exacte réplique** du gel de polyacrylamide après migration.

La présence de protéines particulières est ensuite **révélée** par réaction avec un **anticorps** reconnaissant la protéine recherchée.

L'anticorps utilisé peut être **marqué** par un fluorochrome, par un isotope radioactif ou lié à une enzyme dont la réaction avec son substrat produit une substance colorée.



A retenir :

Blot : électrophorèse suivie d'une révélation spécifique (donc seuls les molécules « ciblées » sont visibles sur le résultat, alors que dans le cas d'une « simple » électrophorèse toutes les molécules sont visibles après révélation).

Western Blot : blot de protéine = électrophorèse de protéines (en général en conditions dénaturantes) puis révélation du résultat en utilisant des anticorps (marqués) permettant la révélation des seules bandes contenant la protéine « ciblée ».

4. Exercices

Exercice 1 – Structure d'une protéine, la cytochrome oxydase

Les mitochondries et les chloroplastes possèdent une information génétique qui code une minorité de leurs protéines. La **cytochrome oxydase** est une enzyme membranaire mitochondriale impliquée dans la chaîne respiratoire de transporteurs d'électrons.

On cherche à comprendre la structure, la synthèse et l'assemblage de cette protéine.

Une culture de levures en croissance est divisée en trois lots :

- Lot T : il reçoit un mélange d'acides aminés tritiés.
- Lot A : il reçoit simultanément des acides aminés tritiés et du chloramphénicol (CAP), antibiotique qui inhibe sélectivement la traduction par les ribosomes mitochondriaux (action identique sur les ribosomes chloroplastiques et bactériens).
- Lot B : il reçoit simultanément des acides aminés tritiés et de la cycloheximide (CHI), antibiotique inhibant sélectivement la traduction par les ribosomes cytoplasmiques.

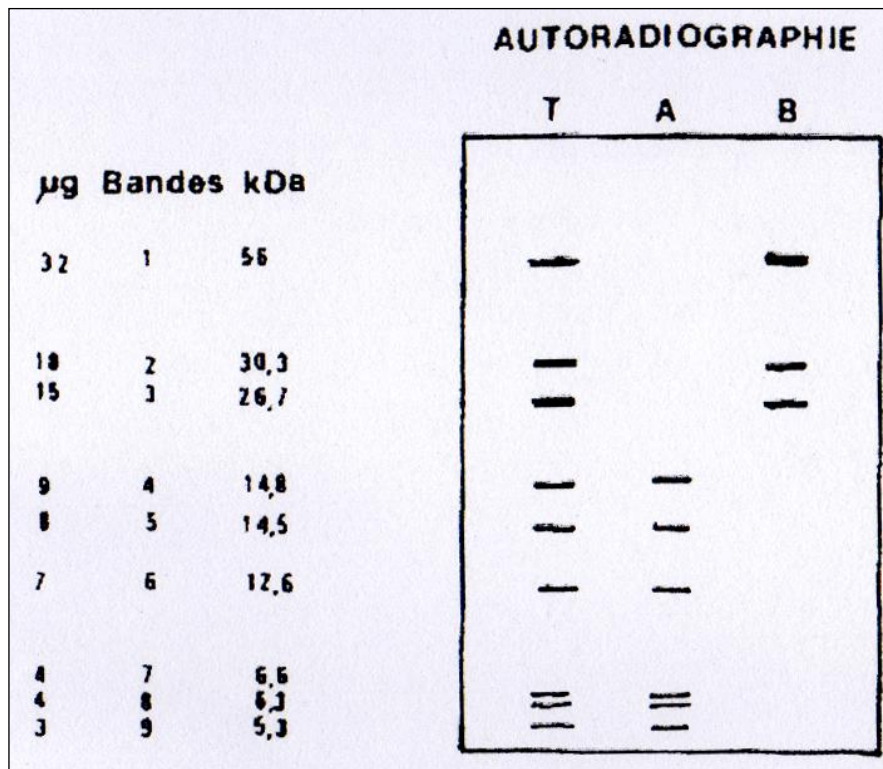
Après deux jours d'incubation, on effectue les mesures suivantes :

Les levures sont broyées, les mitochondries sont isolées et les membranes mitochondriales sont purifiées puis traitées par un détergent.

Les cytochromes oxydases ainsi solubilisées dans chaque lot sont purifiées et déposées sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS), agent réducteur.

Après électrophorèse, le gel est coloré avec un colorant des protéines puis autoradiographié (à droite sur la figure ci-dessous).

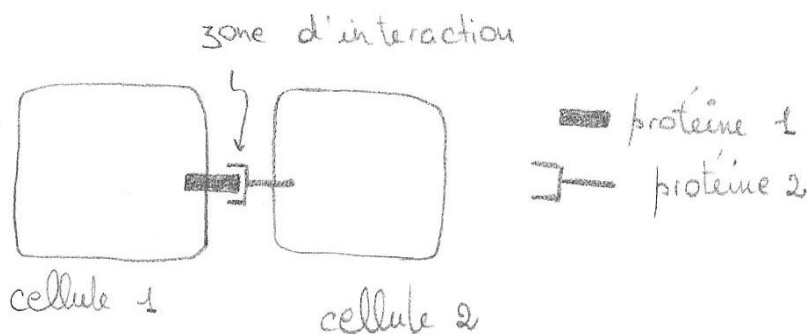
En parallèle, on effectue une analyse quantitative : 100 µg de cytochrome oxydase extraite du lot T sont déposés sur un gel, et après migration le contenu de chaque bande est déterminé (à gauche sur la figure ci-dessous).



- 1) Déterminez la structure de la cytochrome oxydase, en précisant la proportion relative de ses sous-unités constitutives, sachant que sa masse moléculaire est de 175 kDa.
- 2) Dans quels compartiments cellulaires les différentes sous-unités de la cytochrome oxydase sont-elles synthétisées ?
- 3) Quelle est la localisation probable de l'information génétique nécessaire à la synthèse des différentes sous-unités ? (*un transfert d'ARN du cytoplasme vers la matrice mitochondriale n'a jamais été mis en évidence*)
- 4) Quelle hypothèse pouvez-vous formuler concernant le devenir des polypeptides 4 à 9 après leur synthèse ?

Exercice 2 – Etude d'une interaction protéine-protéine

Au cours du développement les cellules nerveuses adhèrent aux cellules musculaires. L'adhérence est absolument spécifique puisque des fibroblastes et des hépatocytes ne présentent aucune adhérence pour les cellules musculaires. On cherche à étudier les molécules qui permettent l'adhérence entre les cellules nerveuses et les cellules musculaires. L'adhérence est réalisée par l'interaction (par liaisons faibles) entre des protéines insérées dans la membrane des cellules :



On a réussi à isoler et purifier la protéine M, présente à la surface des cellules musculaire. On cherche à connaître sa structure, on réalise une électrophorèse en condition dénaturante ou non.

Des fragments peptidiques de tailles connues sont aussi soumis à cette électrophorèse. L'électrophorèse est révélée au bleu de Coomassie, colorant général des protéines.

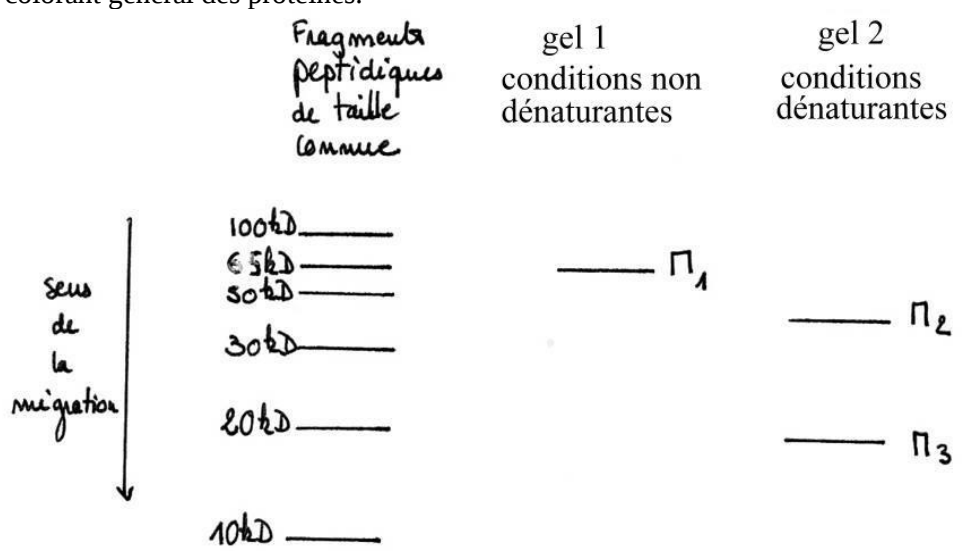


Figure 1 – résultat des gels

1) Déterminez la structure de la protéine M, expliquez ce que sont M1, M2 et M3.

On a ensuite isolé la molécule d'adhérence transmembranaire qui se trouve à la surface des cellules nerveuses. Cette molécule nommée est nommée N, elle a un poids moléculaire de 80kD. On réalise une électrophorèse en conditions non dénaturantes de la molécule N marquée radioactivement, en présence ou en l'absence des protéines M1, M2 ou M3 isolées lors de la précédente électrophorèse (Figure 1). L'électrophorèse est révélée par autoradiographie, les résultats sont donnés ci-dessous (Figure 2).

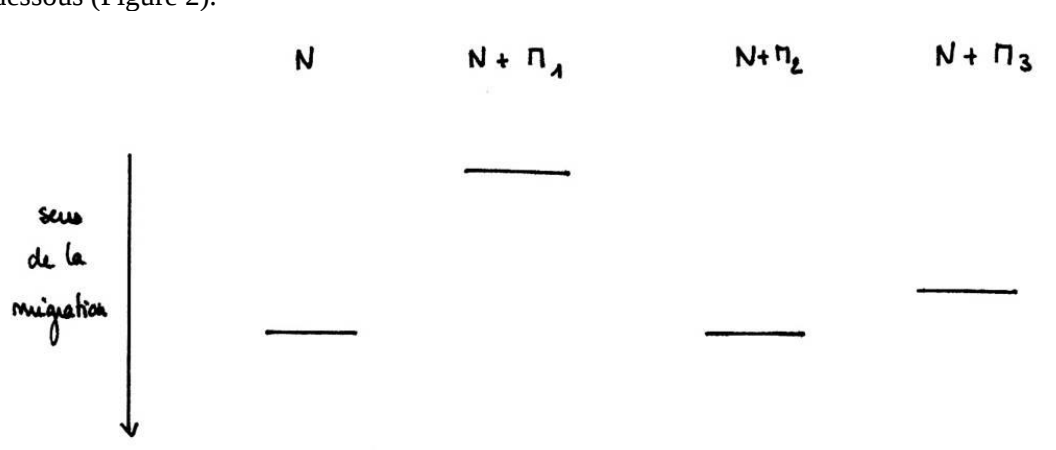


Figure 2 – résultat des gels

2) Sachant que la dénaturation rompt toutes les liaisons faibles, proposez un schéma de l'interaction entre la protéine N et la protéine M.

ANNEXE : LES ACIDES AMINES

					polaire ?	hydrophobe ?	charge ?
ALIPHATIQUES	SIMPLES	GLYCOCOLLE ou GLYCINE	GLY	$\text{H}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Hydrophobes apolaires	X	
		ALANINE	ALA	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$			
		VALINE	VAL	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}}-\text{CH}-\text{COOH}$			
		LEUCINE	LEU	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$			
		ISOLEUCINE	ILE	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{CH}_3-\text{CH}_2}{\text{CH}}}-\text{CH}-\text{COOH}$			
	HYDROXYLÉS	SERINE	SER	$\text{CH}_2(\text{OH})-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Hydrophiles polaires (OH)	X	
		THRÉONINE	THR	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{CH}(\text{OH})}{\text{CH}}}-\text{CH}-\text{COOH}$	Hydrophiles polaires (OH)		
	SOUFRÉS	CYSTEINE	CYS	$(\text{HS})-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Hydrophobes apolaires	X	
		MÉTHIONINE	MET	$\text{CH}_3-(\text{S})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Hydrophobes apolaires		
	DIACIDES	ACIDE ASPARTIQUE aspartate	ASP	$(\text{COOH})-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	solubles polaires hydrophiles	X	(-)
		ACIDE GLUTAMIQUE glutamate	GLU	$(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$			
	AMIDES	Asparagine	ASN	$\text{NH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	solubles polaires hydrophiles	X	
		Glutamine	GLN	$\text{NH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$			
	DIAMINES (basiques)	LYSINE	LYS	$(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	solubles polaires hydrophiles	X	(+)
ARGININE		ARG	$\text{NH}_2-\underset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\underset{\text{NH}}{\underset{\text{ }}{\text{N}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$				
AROMATIQUES	PHENYLALANINE	PHE	$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{COOH}$	hydrophobes apolaires sang T/R (-OH)	X		
	TRYPTOPHANE	TRP	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{COOH}$				
	TYROSINE	TYR	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{COOH}$				
HÉTÉROCYCLES	HISTIDINE	HIS	$\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{COOH}$	solubles polaires	X	(+)	
	PROLINE	PRO	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}-\text{COOH}$	hydrophobe	X		