

**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

1. Les électrophorèses : séparations selon les charges, et/ou formes et/ou tailles

Voir poly 1 - préparation

2. Réalisation d'une électrophorèse de protéines

L'objectif est de réaliser une électrophorèse en conditions non dénaturantes

2.1. Principe :

Le blanc d'œuf est une structure de réserve extra-embryonnaire chez les oiseaux. Il est riche en protéines, dont les principales sont données dans le tableau page suivante.

On se propose ici de séparer les protéines par électrophorèse, en cherchant à repérer l'ovalbumine, protéine majoritaire du blanc d'œuf.

La migration sera réalisée à un pH de 8,6. A ce pH, l'ovalbumine est chargée négativement.

➤ De quel côté (cathode : pôle positif, ou anode : pôle négatif) devra-t-on réaliser le dépôt pour que la migration se réalise dans le bon sens ?

➤ Que se passerait-il si on réalisait l'électrophorèse dans un tampon pH de 4,5 ?

On se propose de faire migrer aussi une solution de lysozyme.

➤ Justifier le dépôt de cette solution de lysozyme.

Protéines(*)	Proportion (% de l'extrait sec)	Masse moléculaire (kDa)	Glucides (%)	Point isoélectrique	Propriétés
Ovalbumine	54	45	3,5	4,5	Agent gélifiant, propriétés moussantes.
Conalbumine (ovotransferrine)	12	77,7	2	6,0	Fixation de cations métalliques, inhibiteur de bactéries.
Ovomucoïde	11	28	23	4,1	Inhibe la trypsine, allergisante.
Ovoglobuline G1	4	49	-	5,5	Propriétés moussantes.
Ovoglobuline G2	4	49	-	5,8	
Lysozyme	3,5	14,3	0	10,7	Lyse les polysaccharides pariétaux des bactéries Gram ⁺ , propriétés moussantes.
Ovomucine	3,5	200-8 000	25	4,5-5,0	Facteur de viscosité, agent gélifiant, inhibiteur de l'hémagglutination virale.
Ovoinhibiteur	1,5	49	6	5,1	Inhibe plusieurs protéases.
Ovoflavoprotéine	0,8	32	14	4,0	Une mole de protéine fixe une mole de vitamine B ₂ .
Ovomacroglobuline	0,5	760-900	-	4,5	Propriétés moussantes, allergisante, inhibiteur de l'hémagglutination virale.
Avidine	0,5	68	-	10,0	Fixe fortement la biotine.
Cystatine	0,05	12,7	0	5,1	Inhibe la papaïne et la ficine.

2.2 Matériel et Protocole :

TRAVAIL PAR GROUPE DE 2 BINOMES (4 étudiants).

Matériel par binôme :

- micropipettes P100 et cônes
- Solution de blanc d'œuf dilué
- Solution de lysozyme
- Solution de charge 6X (glycérol 50% – bleu de bromophénol)

Matériel pour un groupe de 4 étudiants :

- 1 gel d'agarose
- Cuve d'électrophorèse et générateur
- Tampon Tris véronal pH=8,6
- Bleu de comassie = colorant des protéines
- Solution éthanol – acide acétique = fixation des protéines sur le gel

Préparation des solutions

- Rajouter 40 µL de solution de charge 6X dans la solution de blanc d'œuf.
- Rajouter 40 µL de solution de charge 6X dans la solution de lysozyme.
- Mélanger les solutions en tapotant sur le côté du microtube.

Dépôt et migration

- Placer le gel d'agarose dans la cuve, et recouvrir intégralement de tampon de migration.
- Déposer 15 µL d'échantillon (blanc d'œuf / lysozyme) par puits.
- Fermer la cuve et mettre sous tension à 120 V.
- Laisser migrer jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne 0,5 à 1 cm du bas du gel.

Révélation

- Faire glisser le gel hors de son support, dans un bac rempli de fixateur et laisser 45 minutes (*min. 15-20 minutes*)
- Placer le gel dans un bac avec du bleu de Coomassie et laisser colorer 1 heure (*min. 15-30 minutes*).

➤ Transférer le gel dans un bac rempli d'eau et laisser à décolorer. Indiquer le nom des membres du groupe sur un papier placé sous le bac. Venir voir le gel vendredi au laboratoire et prendre une photo.

2.3 Interprétation :

- ➡ Réaliser un schéma légendé de l'électrophorogramme obtenu.
- ➡ Interpréter le résultat obtenu.

3. Etude de profils d'hydropathie

3.1. Principe des profils d'hydropathie

Il est possible de déterminer un degré **d'hydrophilie** (et donc **d'hydropathie** à l'inverse) de chaque chaîne latérale d'acide aminé : c'est l'index d'hydrophobie, qui a une valeur positive si l'acide aminé est hydrophobe. En représentant sur un même graphe les index d'hydrophobie des acides aminés successifs constitutifs d'une protéine, on obtient un profil d'hydropathie. Les domaines fortement hydrophobes indiquent une forte probabilité d'existence d'une traversée transmembranaire.

AA hydrophobes : * Aliphatiques simples (GLY, ALA, VAL, LEU, ILE)
 * Aliphatiques soufrés (CYS, MET)
 * PHE, TRP, HIS, PRO

AA hydrophiles : * Hydroxylés (SER, THR, TYR)
 * Diacides/Diamines/Amides (ASP, GLU, LYS, ARG, ASN, GLN)

3.2. Etude de profils d'hydropathie

L'ordre des acides aminés s'entend de l'extrémité N-terminale (fonction NH_2) vers l'extrémité C-terminale (fonction COOH).

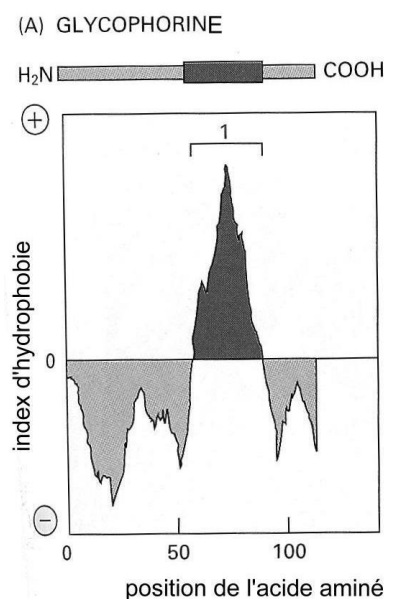
⇒ Exercice 1 : la glycophorine

Les glycophorines sont des protéines transmembranaires de la membrane plasmique des érythrocytes (globules rouges). On s'intéresse ici à la glycophorine A, protéine de 131 acides aminés, qui porte les antigènes sanguins M ou N.

- ➡ Interpréter le profil d'hydropathie.

On dispose de liposomes (= vésicules lipidiques de synthèse) portant des glycophorines, que l'on incube avec des anticorps dirigés contre la région 20-35 de la protéine (AC_{20-35}) et d'anticorps dirigés contre la région 70-85 de la protéine (AC_{70-85}) et contre la région 105-120 ($\text{AC}_{105-120}$). Après lavage, on mesure la présence des anticorps spécifiques, ainsi que d'un anticorps dirigé contre l'actine (une protéine du cytosquelette). Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Anticorps	AC_{20-35}	AC_{70-85}	$\text{AC}_{105-120}$	Actine
Fixation	+	-	-	-



La même expérience, réalisée avec un liposome sans ajout de glycophorine, ne montre aucune fixation d'anticorps.

- ➡ Justifier le choix des trois anticorps utilisés.
- ➡ Quelle précision est apportée grâce à cette expérience ?

⇒ Exercice 2 : la bactériorhodopsine

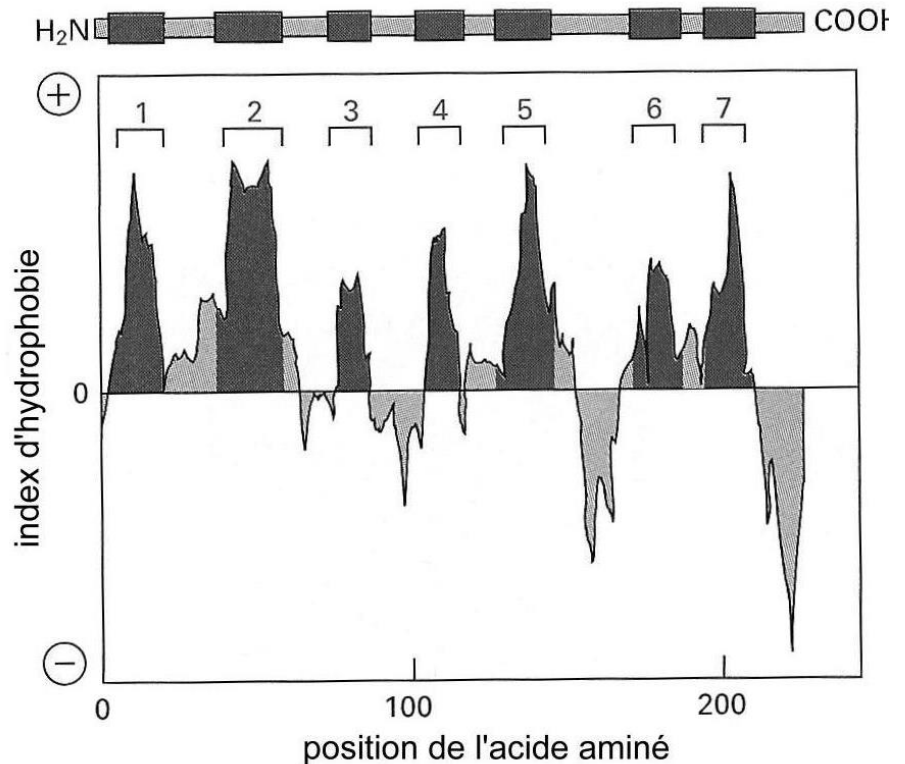
La bactériorhodopsine est une protéine de 248 acides aminés présente chez certaines Archées. Cette protéine est une pompe à protons utilisant l'énergie lumineuse : la captation de photons est couplée au pompage de protons.

Une culture d'archées *Halobacterium salinarum* est placée en présence de lumière. On observe une diminution du pH du milieu.

➡ Que nous apprend cette observation sur la fonction de la bactériorhodopsine ?

➡ Interpréter le profil d'hydrophobie.

(B) BACTERIORHODOPSINE



On incube la culture cellulaire en présence d'une protéase hydrolysant le domaine protéique situé entre les domaines notés 3 et 4 dans la figure. On procède ensuite à une fixation des cellules et à la perméabilisation de leur membrane, puis on incube avec un anticorps reconnaissant le domaine protéique situé entre les domaines 3 et 4.

Les résultats sont donnés dans le tableau :

Traitement des cellules	Pas de protéase	protéase	Autre protéase
Fixation de l'anticorps	+	-	+
Fixation d'un anticorps reconnaissant une autre protéine de l'archée	+	+	+

4. Exercices

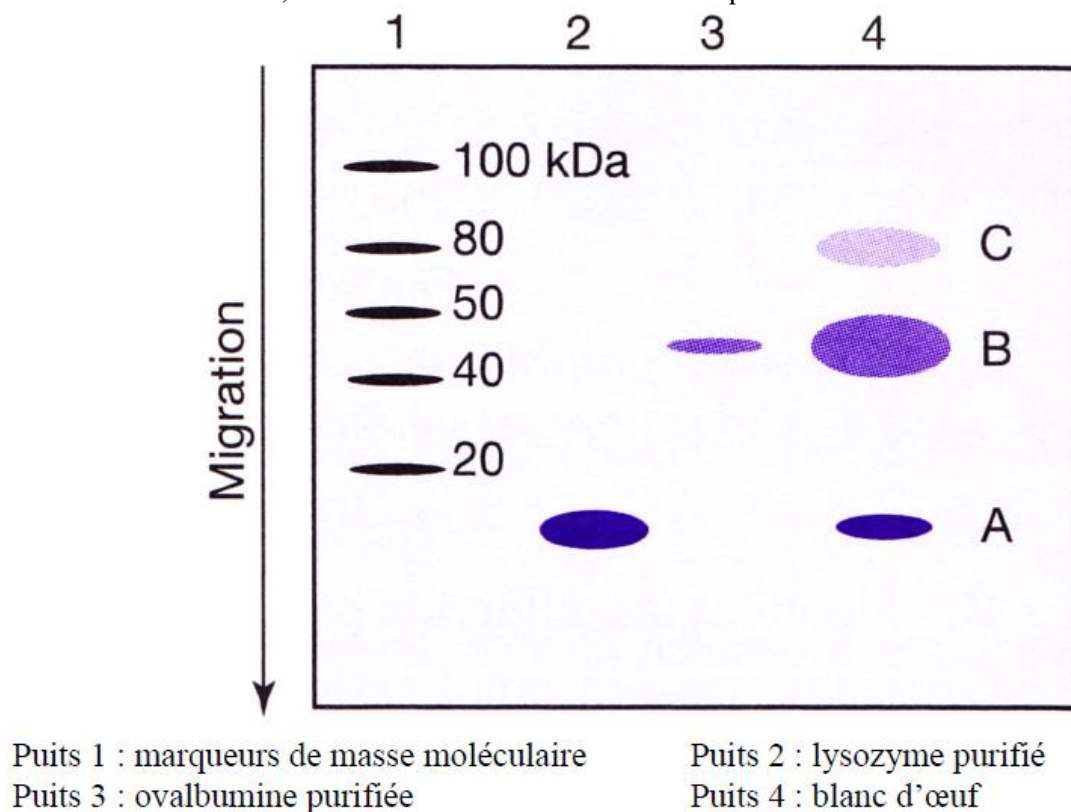
Exercices 1 et 2 : voir poly 1 – travail préparatoire

Exercice 3 – Encore un peu sur le blanc d'œuf...

On dispose d'un résultat de SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie réalisée à partir d'extraits de blancs d'œuf. Les distances de migration ont été mesurées et sont les suivantes :

Bande	100 kDa	80 kDa	50 kDa	40 kDa	20 kDa	A	B	C
Distance (mm)	8	15	28	35	56	68	32	14

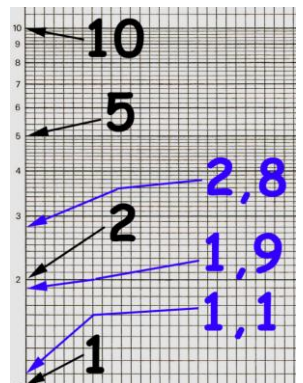
- 1) Analyser les résultats obtenus
- 2) Construire sur papier semi-log la courbe étalon **distance de migration = f(poids moléculaire (en kDa))** pour le marqueur de masse moléculaire
- 3) A partir de cette courbe étalon, déterminer la masse moléculaire des protéines contenues dans le blanc d'œuf.



Méthode : L'utilisation de papier semi-logarithmique

Pour tracer une courbe étalon (ou pour toute autre cas en biologie nécessitant de tracer sur un même graphe des valeurs différent de plusieurs puissances de 10), on peut soit placer en ordonnée le logarithme de la valeur, soit utiliser un papier semi-logarithmique : ce dernier présent en ordonnée une échelle logarithmique, qui dispense donc du calcul.

Sur une telle échelle, chaque « module » correspond à une puissance de 10, par exemple de $10^0=1$ à $10^1=10$, ou de $10^2=100$ à $10^3=1000$, etc.



Exercice 4 – caractérisation d'interactions protéiques au cours de la réplication par Western-Blot et co-immunoprécipitation

La réplication de l'ADN correspond à la formation de deux molécules d'ADN identiques entre elles à partir d'une molécule d'ADN initiale. Ce processus, qui se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire, est indispensable à la réalisation ultérieure de la mitose.

On observe au cours du processus de réplication deux phénomènes distincts :

- Plusieurs protéines, dont les ADN polymérases, permettent la synthèse de nouveaux brins d'ADN à partir des brins parentaux de la molécule d'ADN mère. On obtient ainsi deux molécules d'ADN filles identiques entre elles et identiques à la molécule d'ADN mère.
- Des protéines, les histones, sont associées à l'ADN, pour former une structure stable, la chromatine (qui correspond à l'état de l'information génétique en interphase, c'est-à-dire entre les divisions cellulaires).

La mise en place de l'association ADN-histones est permise par l'intervention de deux protéines : CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1 ; Cette protéine est formée de 3 sous-unités : p48, p60 et p150) et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

On montre par immunocytochimie (figure ci-dessous) que CAF-1 et PCNA co-localisent, c'est-à-dire sont situées aux mêmes endroits de l'ADN. On suppose qu'il s'agit des zones de l'ADN en cours de réplication.

Il a par ailleurs été montré que :

- PCNA s'associe à l'ADN et aux ADN polymérases, et est donc probablement localisée au niveau des sites des réplifications ;
- CAF-1 est indispensable à la mise en place de l'association ADN-histones.

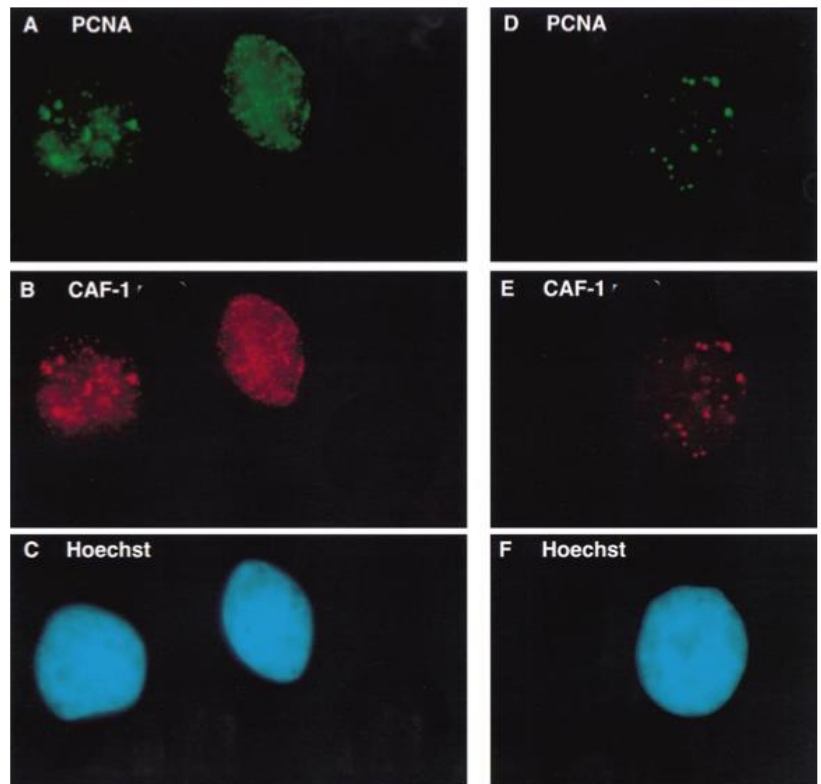


Figure 1 - marquage fluorescent de PCNA (A,D), CAF-1 (B,E) et de l'ADN (C,F) dans des cellules HeLa

Le Hoechst 33258 est une molécule permettant l'obtention d'une fluorescence au niveau de l'ADN. PCNA et CAF-1 sont marqués par des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome.

On réalise une co-immunoprécipitation *in vitro* avec des protéines purifiées : l'expérience consiste à provoquer la précipitation d'une protéine par l'ajout d'un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine, puis à observer si d'autres biomolécules ont précipité avec la protéine en question.

Gel A : 105 pmol de PCNA sont incubées avec 7,5 pmol de CAF-1 (pistes + des gels) ou avec du tampon (pistes - des gels). On ajoute au mélange des anticorps anti-p60 (α -p60) ou anti-p150 (α -p150) dirigés contre CAF-1.

Au bout d'une heure, les immunoprécipités sont isolés, lavés et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes.

De la protéine PCNA purifiée est déposée sur la piste « input ». Le western blot avec des anticorps anti-PCNA radiomarqués donne les résultats du panneau A ci-dessous.

Gel C : Le même protocole est réalisé, en incubant PCNA avec des sous-unités p48 ou p60 ou p150 de CAF-1 marquées au ^{35}S et avec des anticorps anti PCNA (α -PCNA). Chaque Western blot est révélé avec des anticorps radiomarqués dirigés contre la sous-unité utilisée. Ces mêmes sous-unités sont déposées dans la piste « input » de chaque condition. Les résultats sont donnés dans le panneau C ci-dessous.

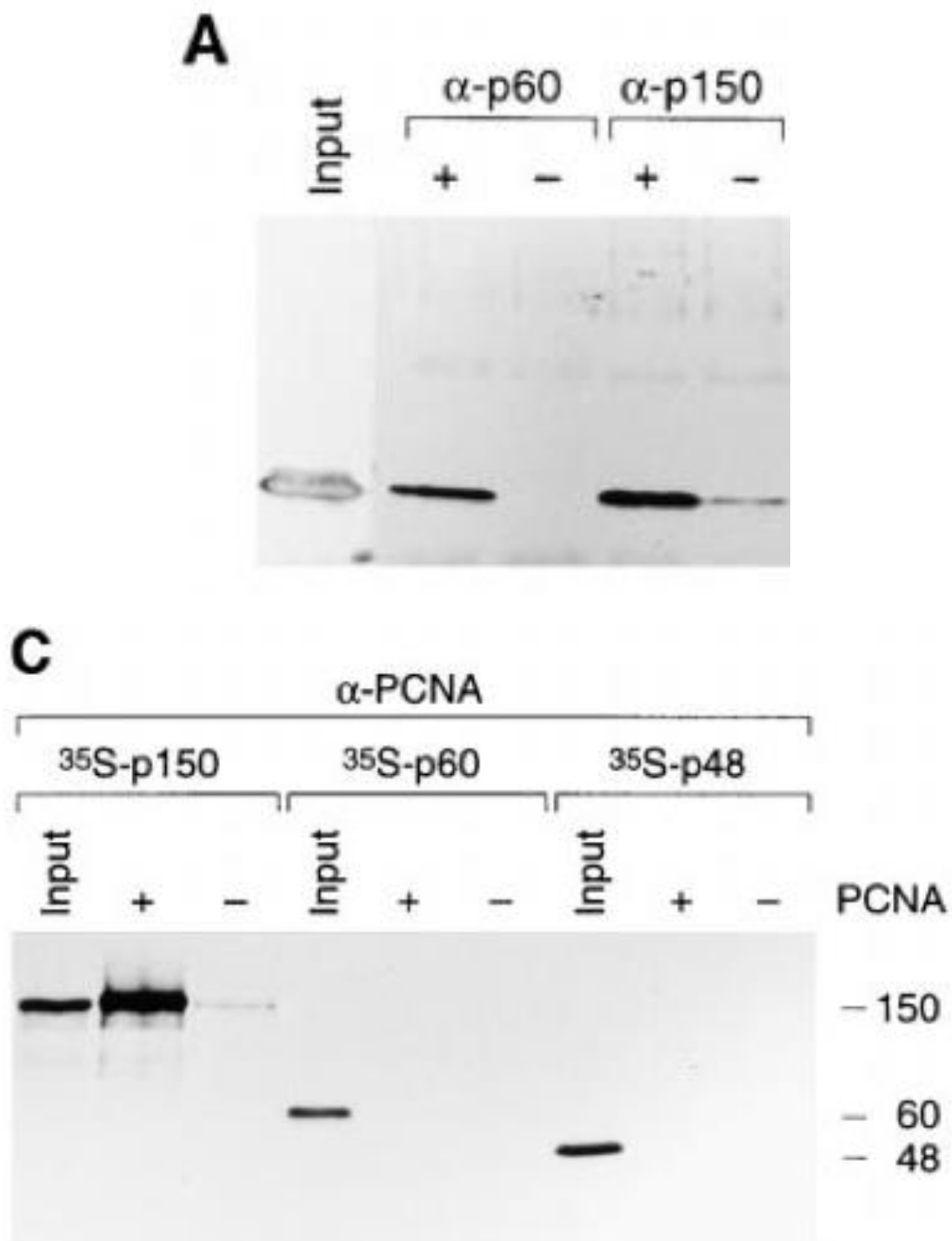


Figure 2 – résultats des gels

Question : Analyser les gels obtenus pour déterminer la nature des relations entre CAF-1 et PCNA.