

**TP SV
D2**
LES PROTEINES - 2

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.

Programme officiel :

Analyser des résultats expérimentaux utilisant des techniques d'extraction et de purification de protéines comme la chromatographie d'affinité
 Analyser des données expérimentales sur les interactions entre une protéine et un ligand
 Exploiter des données de modélisation moléculaire
 Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de mutagenèse et de transgenèse

Compétences :

Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes (transgenèse, mutagenèse dirigée et aléatoire, northern blot, hybridation *in situ*, utilisation de gène rapporteur, puce à ADN, PCR et RTPCR)
 Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude des protéines : chromatographie d'affinité
 Exploiter des données de modélisation moléculaire

Plan du TP :
1. Les chromatographies : séparations selon les affinités relatives à des solvants

- 1.1. Principe général des chromatographies
- 1.2. La chromatographie d'affinité
- 1.3. Quelques grandes catégories de chromatographies

Exercice 1 ; Exercice 2

2. Etude d'interactions protéines – ligand en visualisation moléculaire

- 2.1. Principe général
- 2.2. Etude d'un site actif : la carboxypeptidase
- 2.3. Observation de changements de conformation

3. Etude d'interactions protéines – ligand : le complexe ES

- 3.1. Equation de Michaelis-Menten
- 3.2. Exercices

Exercice 3 ; Exercice 4

4. Etude d'interactions protéines – ligand par dialyse à l'équilibre

- 4.1. Principe de la technique
- 4.2. Exercice d'application

Exercice 5

5. Etude d'interactions protéine – ligand et biologie moléculaire

- 5.1. Co-immunoprécipitation
- 5.2. Mutagenèse

Exercice 6

- 5.3. Transgenèse

Exercice 7

Travail préparatoire :

Lecture attentive des textes expliquant le principe des chromatographies. Lecture attentive de la démonstration de l'équation de Michaelis-Menten, et surtout de la signification de cette équation.

Vous devez savoir dire à quoi correspondent le V_{max} et le K_M .

Faire l'auto-test en ligne (et revoir le poly si erreurs) : <https://www.quiziniere.com/diffusions/XJ2KMM>

Faire les exercices 1 et 2

1. Les chromatographies : séparations selon les affinités relatives à des solvants

1.1. Principe général des chromatographies

Le terme de chromatographie désigne un ensemble hétérogène de techniques permettant de séparer des molécules organiques suivant :

- Leur taille : tamisage moléculaire ou **chromatographie par exclusion**
- Leurs propriétés de solubilité dans certains solvants : **chromatographie de partage** entre deux solvants
- Leurs propriétés de charge électrique : chromatographie sur résine **échangeuse d'ions**
- Leurs propriétés d'affinité par rapport à un groupement chimique ou fonctionnel précis : **chromatographie d'affinité**

De manière générale, une chromatographie utilise la migration d'un liquide ou d'un gaz sur un support solide (papier filtre, gel, etc.). Les constituants à séparer migrent plus ou moins vite (en fonction des propriétés citées ci-dessus).

1.2. La chromatographie d'affinité

Certaines chromatographies font intervenir une migration au sein d'un support contenu dans une « colonne ». On parle alors, de manière générale, de **chromatographie sur colonne**. On n'observe pas un état stationnaire, mais les liquides s'écoulant en bas de la colonne sont récoltés de manière séquentielle. On obtient ainsi **différentes fractions**, contenant les différentes molécules présentes dans le mélange initial.

Dans une première étape, on **dépose** donc le mélange sur la colonne. Puis dans une deuxième étape on dépose un solvant d'élution, qui permet de récupérer en bas de la colonne les molécules entraînées par l'éluant : c'est l'étape **d'élution**.

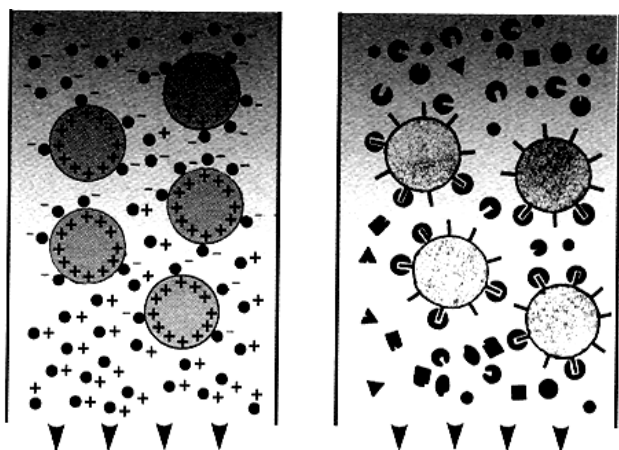
Dans le cas d'une chromatographie d'affinité, les microbilles utilisées sont recouvertes d'une molécule **Ligand**.

Les protéines interagissant avec le ligand seront **retenues** dans la colonne.

Une fois la colonne lavée, elle ne contiendra plus que des protéines complémentaires du ligand. On pourra ensuite récupérer ces protéines en faisant circuler un tampon d'élution spécial qui décrochera les protéines.

Le ligand utilisé peut être, par exemple :

- Un ligand se fixant naturellement sur la protéine étudiée ;
- Un substrat modifié (qui ne sera pas catalysé puis relâché) dans le cas d'une enzyme ;
- Un anticorps.



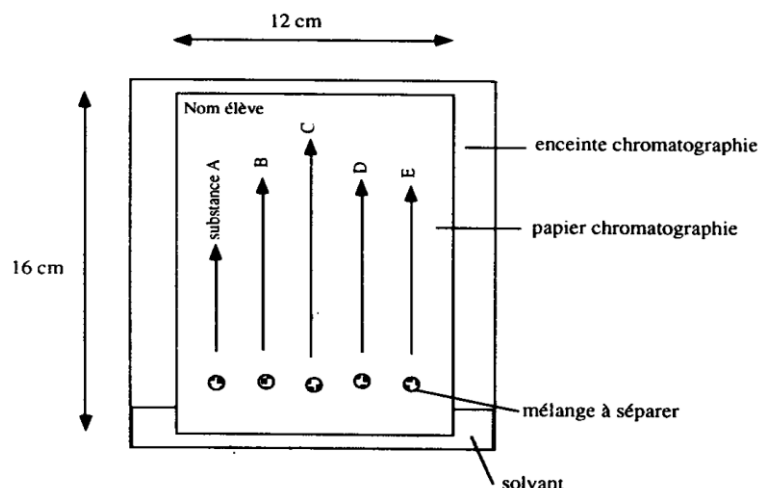
Principes de la chromatographie par échanges d'ions
et de la chromatographie d'affinité

À gauche, aspect schématique des microbilles portant des groupements chimiques chargés positivement, auxquels les molécules de charge électrique opposée ont tendance à se fixer ; celles-ci seront ainsi retenues sur la colonne.

À droite, aspect schématique des microbilles auxquelles on a greffé un ligand approprié capable de fixer une seule espèce moléculaire, qui sera ainsi retenue sur la colonne.

1.3. Quelques grandes catégories de chromatographies

⇒ Chromatographie de partage et rapport frontal R_f



Les chromatographies de partage peuvent être réalisées en une dimension, en utilisant un seul solvant. Toutefois, dans le cas où de nombreuses molécules chimiquement proches sont étudiées, cette méthode reste insuffisante pour séparer tous les composants du mélange initial.

On peut alors procéder à une **chromatographie bidimensionnelle** : à partir d'un dépôt unique sur un support solide (en général, papier), on réalise **une première chromatographie** de partage en utilisant un premier solvant. Puis, dans un deuxième temps, on réalise **une deuxième chromatographie**, en utilisant un deuxième solvant (qui doit être suffisamment différent du premier...) ; la deuxième chromatographie est réalisée **perpendiculairement** à la première.

Un exemple de chromatographie bidimensionnelle à partir d'un mélange d'acides aminés →

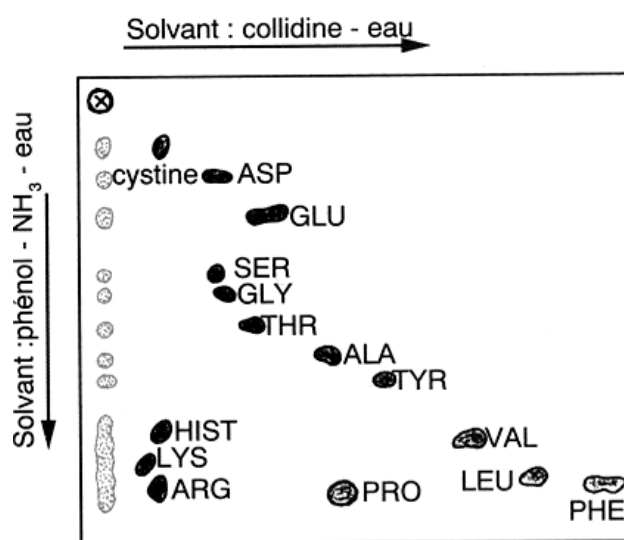
La chromatographie de partage permet de **séparer** différentes molécules en fonction de leur **affinité** pour un **solvant organique** (qui migre par capillarité dans le support).

Le solvant **monte progressivement par capillarité** dans la feuille de cellulose. Ce solvant entraîne dans sa migration les solutés déposés sur la feuille.

La **rapidité de migration** dépend de l'**affinité** de chaque molécule pour le solvant.

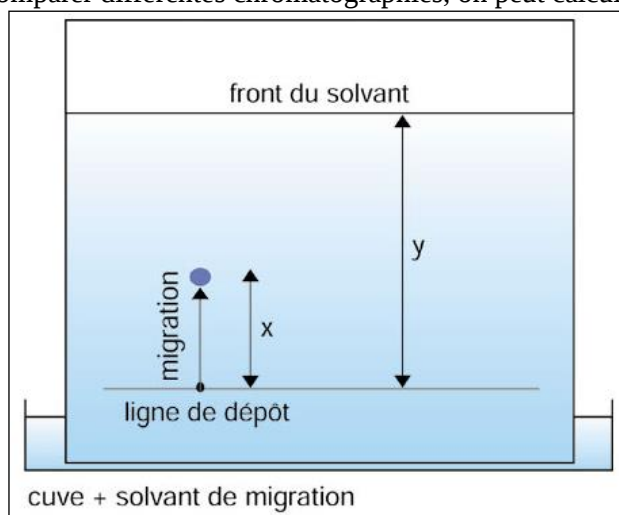
Les solutés les **moins polaires** ont beaucoup d'affinité avec le solvant et migrent **rapidement**, alors que les solutés **polaires** migrent lentement.

← exemple de chromatographie de partage



On peut aussi réaliser une chromatographie, suivie d'une électrophorèse, pour combiner séparation selon des propriétés de solubilité et selon les charges électriques.

Dans les chromatographies de partage, on observe au final un état d'équilibre, chaque biomolécule migrant en fonction de ses propriétés vis-à-vis du solvant utilisé. L'équilibre observé dépend du temps de migration en particulier : afin de comparer différentes chromatographies, on peut calculer un coefficient de migration, ou rapport frontal R_F :



Le rapport frontal (ou coefficient de migration) correspond au rapport de la distance parcourue par le soluté par rapport à la distance parcourue par le solvant.

Soit :

$$R_F = \frac{x}{y} \quad (R_F < 1)$$

Un composé très soluble dans le solvant (phase mobile) aura un R_F proche de 1, alors qu'un composé très soluble dans la phase solide aura lui un R_F très petit.

Remarque : on peut aussi définir un R_F relatif par rapport à un composé témoin, dont on pose le rapport comme étant égal à 1.

$$R_{F(\text{relatif})} = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le témoin}}$$

Les chromatographies de partage peuvent être réalisées sur un support « épais » (feuille de cellulose par exemple) ou sur une mince couche de silice (on parle alors de CCM, pour Chromatographie sur Couche Mince).

⇒ La chromatographie d'exclusion

Il s'agit d'une chromatographie **sur des colonnes remplies de microbilles**.

Les microbilles placées dans la colonne sont **poreuses**, et les petites protéines pourront passer par l'intérieur de ces microbilles.

Les grosses protéines sont **exclues** des billes (d'où le nom de la technique) et passeront plus rapidement à travers la colonne.

Les protéines récupérées dans **les premiers extraits** sont celles de plus grosse taille, et on récupère progressivement les différentes protéines du mélange.

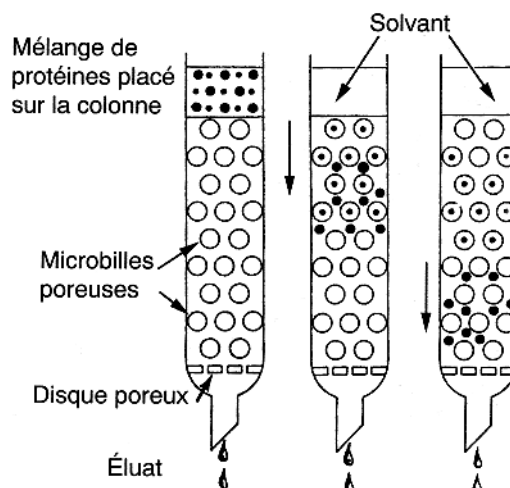
⇒ La chromatographie échangeuse d'ions

Les microbilles utilisées sont **chargées +**.

Les protéines sont mises au contact des billes dans un tampon de très haut pH, auquel elles sont chargées -, et auquel les protéines se lient donc aux billes par **interactions électrostatiques**.

Le **pH** du tampon d'élution qui circule dans la colonne est progressivement abaissé, et les protéines sont **progressivement éluées en fonction de leur pHi**.

Les différents extraits récupérés contiennent donc des protéines différentes aux différents pHi.



Principe du tamisage moléculaire sur un support de microbilles poreuses : chromatographie d'exclusion

Les molécules les plus petites (colorées) peuvent pénétrer au sein des microbilles, tandis que les plus grosses en sont exclues et passent seulement entre elles. Au cours de l'élution sur une colonne, la séparation des deux catégories de molécules est due à la différence de trajet parcouru, les plus petites étant les plus ralenties.

EXERCICE 1

La ribulose-1-5-biphosphate carboxylase (Rubisco, ou RuBP-Case) est une enzyme dont on souhaite déterminer la structure.

Cette enzyme catalyse la fixation du CO₂ dans les chloroplastes lors de la photosynthèse. Elle est localisée dans le stroma des chloroplastes et représente 20% du poids des protéines solubles.

Des euglènes, algues unicellulaires, cultivées à la lumière sont très fortement broyées dans un tampon de manière à casser toutes les structures cellulaires, puis centrifugées à 50 000 g pendant 10 minutes.

Le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose qui se comporte comme un gradient de viscosité, puis centrifugé 15h à 150 000 g. le fond du tube est alors percé, et on récolte successivement différentes fractions numérotées de 1 à 70 sur la figure 1.

Les acides aminés aromatiques absorbent à 280 nm. La D.O. (densité optique) à 280 nm est mesurée : le tracé de la D.O. représente ainsi la concentration en protéines le long du gradient (courbe).

La présence d'une activité RuBP-Case est également mesurée dans ces différentes fractions (histogramme).

- 1) La première centrifugation est nommée **centrifugation différentielle**. Que permet-elle ? (précisez ce que contient le surnageant)
- 2) Comment-on la deuxième centrifugation ?
- 3) Comparez le tracé de la D.O. avec l'histogramme d'activité RuBP-Case. Proposez une hypothèse sur la nature des molécules contenues dans le pic A, et dans le pic B.

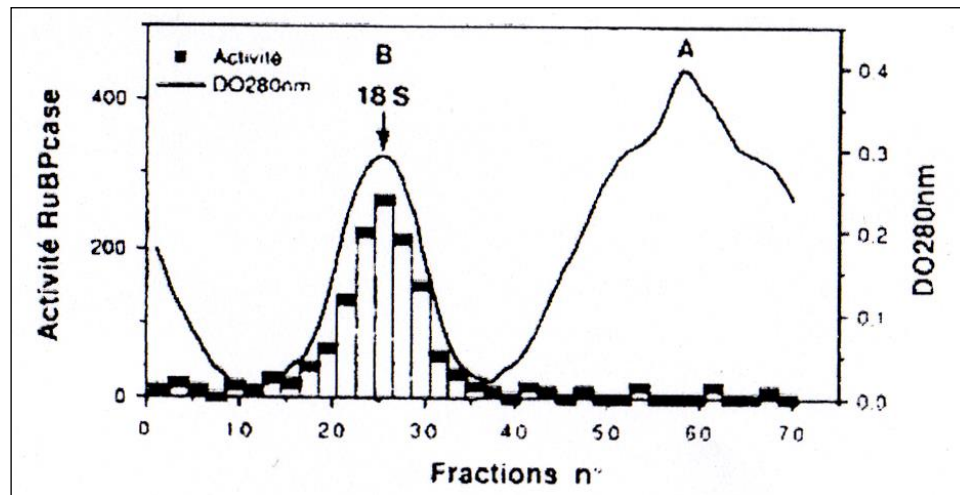


Figure 1

La position du pic B dans le gradient permet de lui affecter un coefficient de sédimentation de 18S, ce qui correspond à une masse moléculaire de 550 kDa.

Des aliquotes des fractions correspondant aux pics A et B du gradient, et des protéines M de masses moléculaires connues servant de marqueurs de masse moléculaire, sont déposés dans les puits A, B et M d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol. Le gel est coloré après migration électrophorétique et la position des marqueurs permet de calculer que les deux polypeptides de B ont des masses de 55 et 14 kDa. Un dosage a par ailleurs montré qu'ils sont présents dans le gel en quantités équimoléculaires (figure 2).

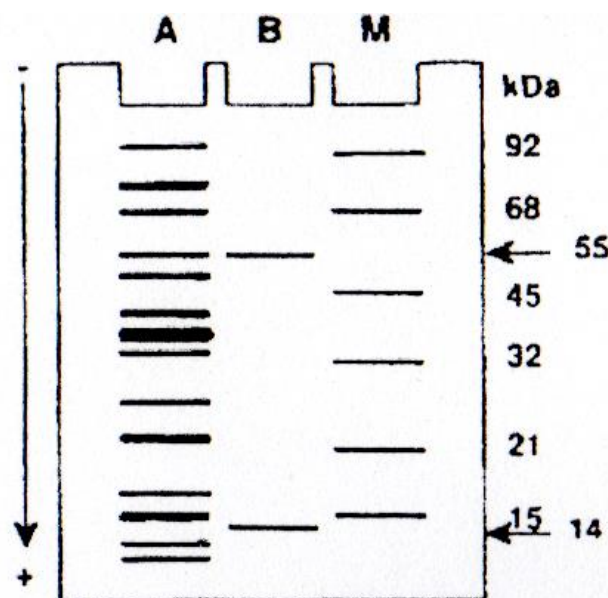


Figure 2

- 4) Ces résultats confirment-ils votre réponse à la question précédente ?
- 5) La RuBP-Case possède-t-elle une structure quaternaire ? Si oui, laquelle ?

EXERCICE 2 – PURIFICATION DE LA PROTEINE NOV

Chez les mammifères, NOV (nephroblastoma overexpressed) est une protéine extracellulaire de 48 kDa interagissant avec la matrice extracellulaire, et en particulier avec les glycosaminoglycanes. Elle est impliquée dans la prolifération de cellules cancéreuses.

On cherche à produire et purifier la protéine NOV.

On suit le protocole suivant :

- On cultive des cellules préalablement modifiées de façon à produire la protéine NOV, en milieu liquide, dans une boîte de Petri.

- Après 48 h de culture, on récupère le surnageant de la culture cellulaire. Il devrait normalement contenir la protéine NOV, qui est une protéine sécrétée.
- On fait subir à ce surnageant une chromatographie d'affinité en utilisant un gel constitué d'héparine, un glycosaminoglycane pour lequel la protéine NOV a une affinité.
- L'élution utilise une solution de NaCl à 0,8 mol.L⁻¹.

1) Justifier le protocole suivi.

Chaque fraction récupérée lors de la chromatographie d'affinité est analysée à la fois par SDS-PAGE (électrophorèse dénaturante) et par western blot.

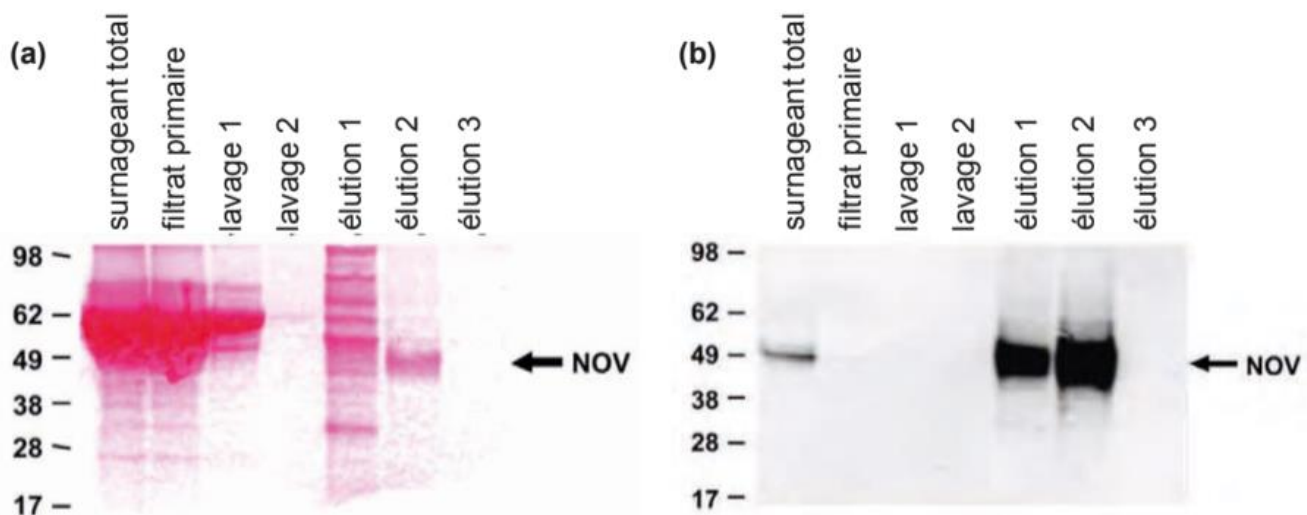


Figure TP7.7. Analyse par SDS-PAGE (a) et par *western blot* (b) de la composition des diverses fractions isolées par chromatographie d'affinité.

Surnageant total : échantillon initial non purifié. Filtrat primaire : première fraction récupérée. Lavages 1 et 2 : deux fractions successives obtenues après un ou deux lavages à l'eau. Éluion 1, 2 et 3 : trois fractions successives obtenues après un, deux ou trois lavages avec une solution de NaCl à 0,8 mol.L⁻¹. Les tailles des protéines, en kDa, sont données à gauche de chacune des deux images. Les anticorps utilisés pour le *western blot* sont des anticorps anti-NOV. (Modifié d'après Bohr et al., 2010, *PLoS ONE* 5(12): e16000).

- 2) Quel peut être l'intérêt de l'électrophorèse SDS-PAGE, réalisée en plus du Western Blot ?
- 3) Que permettent de vérifier les deux lavages réalisés ?
- 4) Quelle fraction peut être considérée comme permettant de purifier la protéine Nov ?

3. Etude d'interactions protéines – ligand : le complexe ES

Le complexe ES correspond à l'association entre une enzyme (= protéine) et son substrat (qui est donc son ligand).

3.1. Equation de Michaelis-Menten

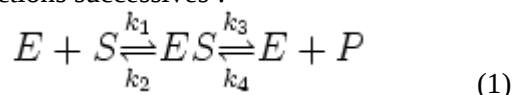
Leonor Michaelis et Maud Menten ont étudié en 1913 la cinétique des enzymes et ont proposé une équation permettant de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant un substrat pour donner un produit. Elle relie la vitesse de la réaction à la concentration de substrat et à des paramètres constants, caractéristiques de l'enzyme.

L'équation de Michaelis-Menten décrit uniquement la cinétique des enzymes à structure tertiaire ; elle ne concerne donc pas les enzymes allostériques, en particulier.

⇒ Equations et paramètres cinétiques à considérer

L'équation de Michaelis-Menten étudie l'évolution d'un système composé d'une enzyme catalysant la transformation d'un substrat en produit. La réalisation de cette catalyse passe par la mise en place d'un complexe

enzyme-substrat, préalable nécessaire à la transformation du substrat en produit. On peut donc modéliser une réaction enzymatique sous la forme de deux réactions successives :



k_1, k_2, k_3, k_4 sont les constantes de vitesse des réactions (cf. *cours de cinétique chimique*). La réaction de formation du complexe enzyme-substrat est une réaction équilibrée, donc les deux réactions ($E+S \rightarrow ES$ et $ES \rightarrow E+S$) sont à prendre en considération.

Deux hypothèses simplificatrices sont émises :

- La réaction de formation du produit est très fortement déséquilibrée dans le sens de **la formation du produit** : on considère que le déséquilibre est tel que cette réaction est **quasiment irréversible**. On considère donc que :

$$k_4 \approx 0 \quad (2)$$

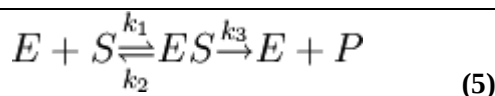
- On considère que la formation du complexe enzyme-substrat est extrêmement rapide par rapport à la transformation du substrat en produit ; c'est cette deuxième étape qui est limitante en terme de vitesse de réaction, et donc de cinétique : dans tous les cas, c'est la vitesse de la réaction ($ES \rightarrow E+P$) qui détermine la vitesse de la réaction enzymatique prise dans son ensemble. Donc, on considère :

$$v \approx k_3[ES] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \quad (4)$$

L'équation (4) correspond au fait que la **concentration en complexe ES est stable**.

L'équation (1) se simplifie donc :



⇒ Détermination de l'équation de Michaelis - Menten

On peut déterminer la vitesse de formation du complexe enzyme-substrat :

$$v_1 = k_1[E][S] \quad (6)$$

De même, on détermine la vitesse de disparition du complexe enzyme-substrat :

$$v_2 = (k_2 + k_3)[ES] \quad (7)$$

Puisque l'on considère (4) que la concentration en complexe enzyme-substrat est constante, alors la vitesse de formation de ce complexe est égale à celle de sa dissociation :

$$v_1 = v_2 \leftrightarrow k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1}{k_2 + k_3} [E][S] \quad (8)$$

On définit alors une constante, la constante de Michaelis :

$$Km = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (9)$$

$$Km = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (9')$$

On peut toutefois exprimer $[ES]$ en fonction de $[E]$, concentration en enzyme libre dans le milieu réactionnel, et de $[E_T]$, concentration en enzyme totale :

$$[E_T] = [E] + [ES] \leftrightarrow [E] = [E_T] - [ES] \quad (10)$$

En combinant (9') et (10), on obtient :

$$Km = \frac{([E_T] - [ES])}{[ES]} [S] = \frac{[E_T][S]}{[ES]} - [S]$$

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{Km + [S]} \quad (11)$$

A partir de (11) et de (3), on peut donc évaluer la vitesse de la réaction :

$$v = k_3 \frac{[E_T][S]}{Km + [S]} \quad (12)$$

La vitesse de la réaction calculée ici est la vitesse initiale de la réaction : $v_i = k_3 [ES]$. Si toute l'enzyme est complexée avec le substrat, alors la vitesse est maximale, et $[ES] = [E_T]$. Donc :

$$v_{max} = k_3[E_T] \quad (13)$$

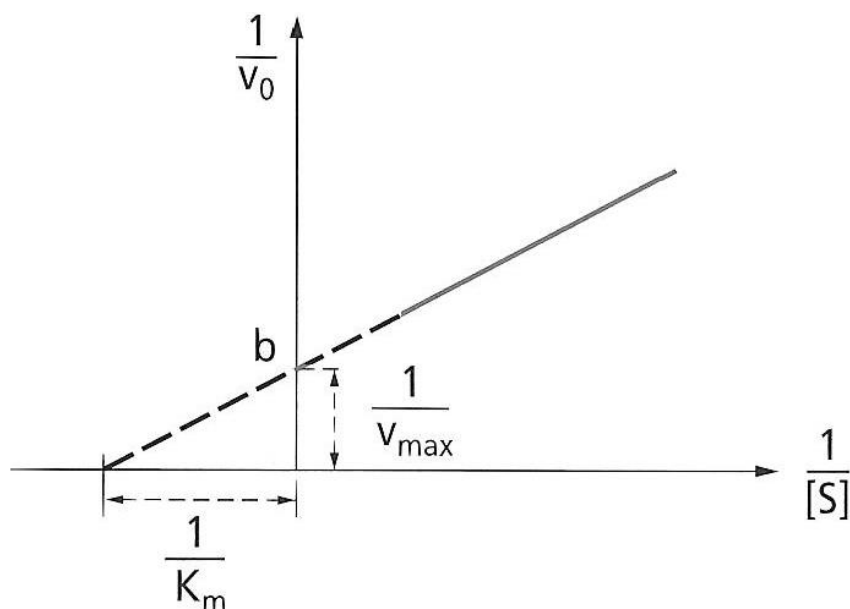
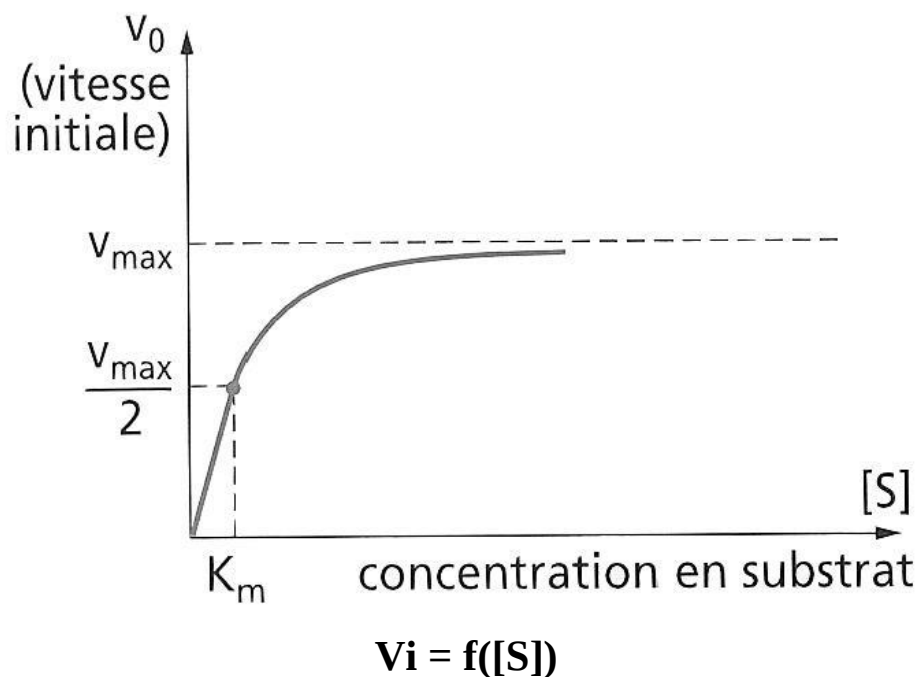
En éliminant k_3 de l'équation (12) grâce à l'équation (13) :

$$v_i = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (14)$$

Equation fondamentale de la cinétique enzymatique Michaelienne

⇒ Courbes cinétiques des enzymes Michaeliennes

L'équation de Michaelis-Menten se traduit graphiquement par une **courbe hyperbolique** tendant vers un maximum représentant la **vitesse maximale de la réaction**. On peut inverser les paramètres, et représenter $1/v_i$ en fonction de $1/[S]$: la représentation graphique est alors celle d'une droite (*à redémontrer – très simple*) → représentation en coordonnées inverses, ou de Lineweaver-Burk (cette représentation est plus intéressante d'un point de vue expérimental, car elle autorise les régressions linéaires et donc une détermination relativement rigoureuse des paramètres cinétiques, V_{max} et K_m).



$$1/v_i = f(1/[S]) = K_m/V_{max}(1/[S]) + 1/V_{max}$$