

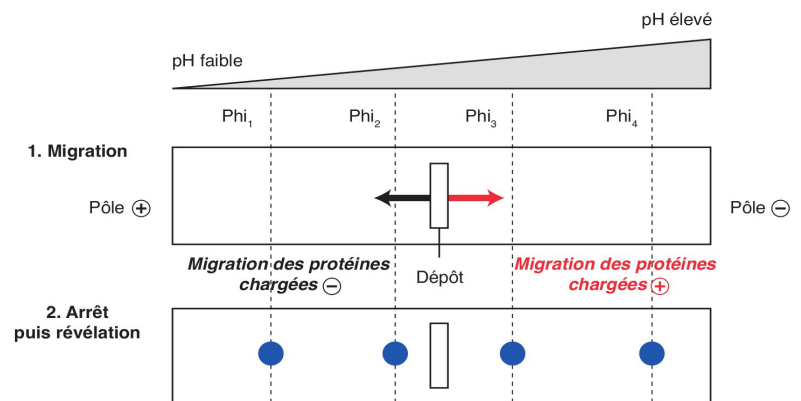
## TP 5 : étude expérimentale des protéines

### I- Séparer des protéines par électrophorèse

Principe : L'électrophorèse est une **technique de séparation de grosses molécules chargées** se déplaçant dans un champ électrique imposé à un support poreux ; elle est applicable aux protéines et aux acides nucléiques ADN ou ARN.

Variables :

- le support : poreux, il agit comme un tamis moléculaire, ralentissant les molécules de grande taille
  - papier
  - plaque de gel, en général polyacrylamide ou PAGE : en dosant l'agent gélifiant on obtient des gels plus ou moins discriminants
- le tampon
  - non dénaturant : les protéines conservent leur charge et leur structure tridimensionnelle ; la charge nette détermine le sens de migration tandis que la taille et la forme explique la vitesse de déplacement
  - non dénaturant avec gradient de pH : chaque protéine se déplace vers la position du support où le pH est égal au pHi. Une telle électrophorèse se nomme aussi isoélectrofocalisation.



- dénaturant : les protéines perdent leur structure tridimensionnelle (séparation des sous-unités, déroulage en structure primaire) ; la charge négative est imposée par le solvant d'où une migration unidirectionnelle ; le seul critère de tri est la longueur de la chaîne d'acides aminés.

Sauf pour les protéines colorées, l'électrophorèse est suivie d'une étape de révélation permettant de visualiser la position d'arrivée, bande ou spot.

Sans complément dans le protocole l'électrophorèse ne permet pas d'identifier les protéines, seulement de les séparer et donc de les compter.

L'épaisseur de la bande ou du spot traduit la quantité de protéines présentes dans le mélange initial.

### A- Réaliser une électrophorèse en conditions non dénaturantes (conditions natives)

Objectif : dénombrer les protéines constituant le blanc de l'œuf de poule en les séparant par électrophorèse sur papier en conditions natives (tampon non dénaturant à pH imposé).

Un blanc d'œuf filtré et dilué dans 100mL d'eau distillée a été préparé.

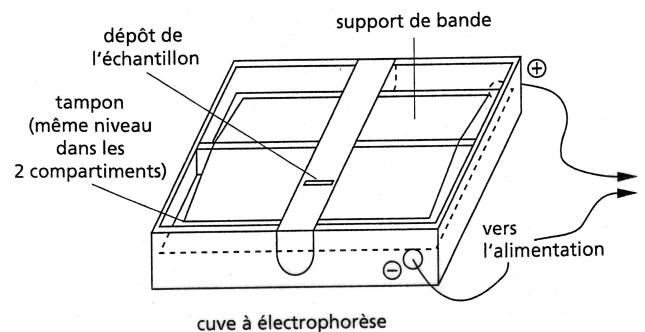
Protocole :

1- Préparation du papier :

- prélever une bande de papier avec une pince fine : **ne jamais mettre les doigts sur le papier**. Ce papier est imbibé de tampon.
- essorer légèrement entre 2 papiers filtres

2- Préparation de la migration : *méthode adaptée aux protéines dont on ignore la charge*

- vérifier que la cuve est débranchée
- installer la bande dans la cuve, **le coin coupé en bas à droite** : le papier présentera alors sa face mate absorbante vers le haut
- tendre le papier et le caler, dans une position bien **parallèle** aux bords de la cuve
- remplir la cuve avec 100 mL de tampon environ ; vérifier que la bande **trempe dans le liquide des deux côtés** (pont salin).
- avec la spatule de dépôt, **faire au milieu du papier 2 dépôts très fins** (on peut jouer sur la quantité) de blanc d'œuf dilué avec la micro-spatule, **au milieu de la bande** : 2 dépôts côte à côte.



3- Migration

- fermer le couvercle et relier la cuve à l'alimentation en respectant les couleurs
- régler la tension sur la valeur la plus forte
- laisser migrer 30 minutes environ en vérifiant régulièrement la présence de bulles et de buée signalant la propagation de l'électricité. Si le générateur se met en arrêt, vérifier qu'il n'y a pas trop de liquide.

4- Révélation : *méthode adaptée aux protéines de tous types*

- déconnecter l'alimentation avant d'ouvrir
- prélever la bande de papier et la baigner 1 minute dans le **rouge Ponceau**, face absorbante vers le bas. Ce colorant est un **colorant à haute affinité des protéines**.
- transférer la bande dans 2 bains successifs de rinçage (acide acétique), pour effacer la couleur de fond.
- déposer la bande sur un papier absorbant ; lisser et laisser sécher.
- **ne pas jeter** le rouge Ponceau ni les solvants dans l'évier : ces composants sont toxiques pour l'environnement.

**Résultats :**

- réaliser un dessin d'observation légendé de l'électrophorèse
- Imaginer le résultat d'une électrophorèse sur gradient de pH en tenant compte des information du tableau

	Masse moléculaire (Da)	pH isoélectrique	Pourcentage massique de l'extrait sec	Fonction biologique
ovalbumine	46000	4,6	58%	Agent gélifiant Réserve d'acides aminés
ovotransferrine (conalbumine)	82000	6,5	14%	Complexe des ions métalliques Inhibiteur de bactéries
ovomucoïde	28000	5,6	11%	Inhibiteur de protéase (trypsine)
lysozyme	14300	11	7%	Hydrolyse du peptidoglycane de la paroi bactérienne => lyse des bactéries

## B- Étudier une électrophorèse en conditions dénaturantes

### 1- Le tampon SDS

Le tampon SDS rompt toutes les liaisons faibles structurant les protéines et accrochent des ions sulfates négatifs de façon régulière le long de la structure primaire.

Le tampon SDS est en général complété par du  $\beta$ -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfure.

### 2- Le blanc d'œuf

On réalise deux électrophorèses des protéines du blanc d'œuf, purifiées ou non, dans des gels plus ou moins riches en acrylamide.

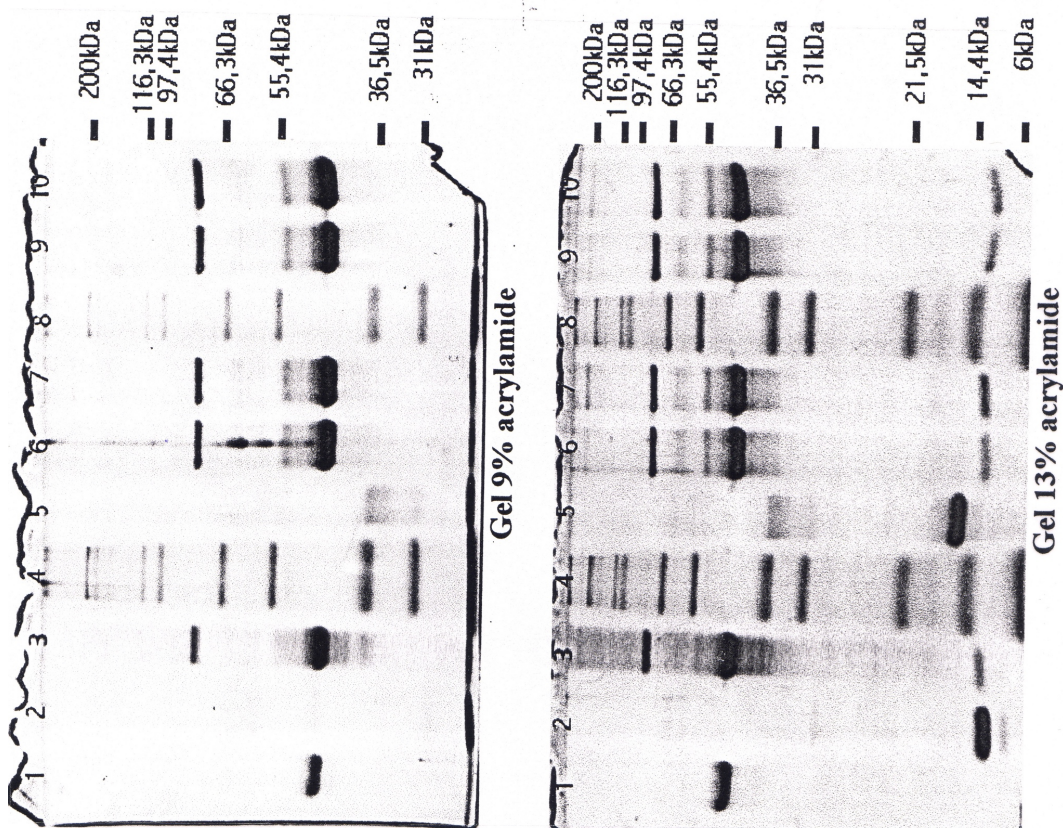
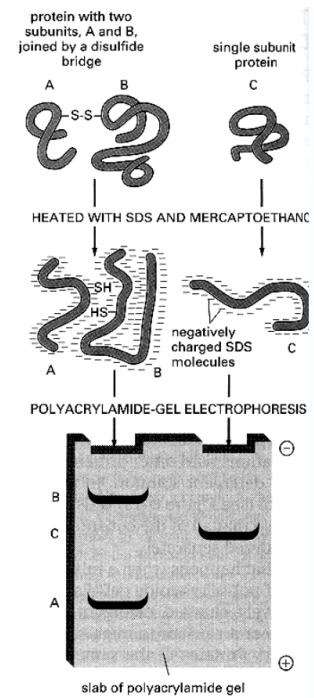
#### Dépôts :

- |  |  |
|--|--|
| 1 : OA pure 10 $\mu$ l (2 $\mu$ g)         | 6 : blanc frais 10 $\mu$ l (5 $\mu$ g)                 |
| 2 : Lysozyme 10 $\mu$ l (2 $\mu$ g)        | 7 : blanc frais collé au jaune 10 $\mu$ l (5 $\mu$ g)  |
| 3 : OA crude 10 $\mu$ l (5 $\mu$ g)        | 8 : Mark 12 15 $\mu$ l (1,5 $\mu$ g/bande)             |
| 4 : Mark 12 15 $\mu$ l (1,5 $\mu$ g/bande) | 9 : blanc vieux 10 $\mu$ l (5 $\mu$ g)                 |
| 5 : Myoglobine 10 $\mu$ l (2 $\mu$ g)      | 10 : blanc vieux collé au jaune 10 $\mu$ l (5 $\mu$ g) |

a. Comparer les deux gels entre eux et, pour la colonne « blanc frais » à votre électrophorèse.

b. Utiliser la colonne « mark » du gel 13% contenant un mélange protéique de poids moléculaire connu pour tracer la courbe : **logarithme népérien du poids moléculaire exprimé en kDa en fonction de la distance parcourue sur le gel en mm.**

c. Utiliser la courbe obtenue pour calculer le poids moléculaire de l'ovalbumine et du lysozyme.



### C- La possibilité d'une électrophorèse en 2 dimensions

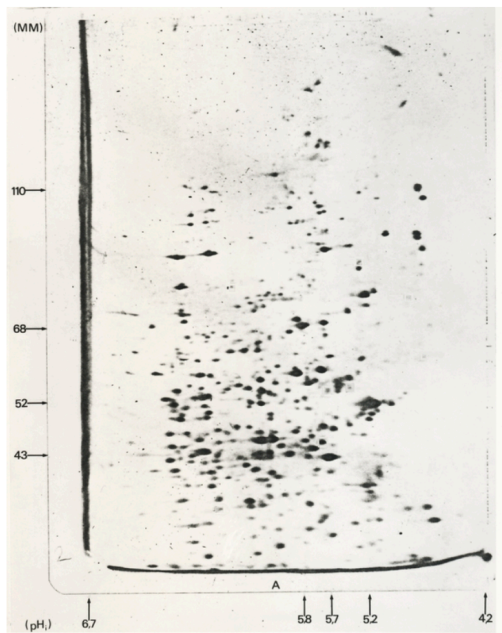
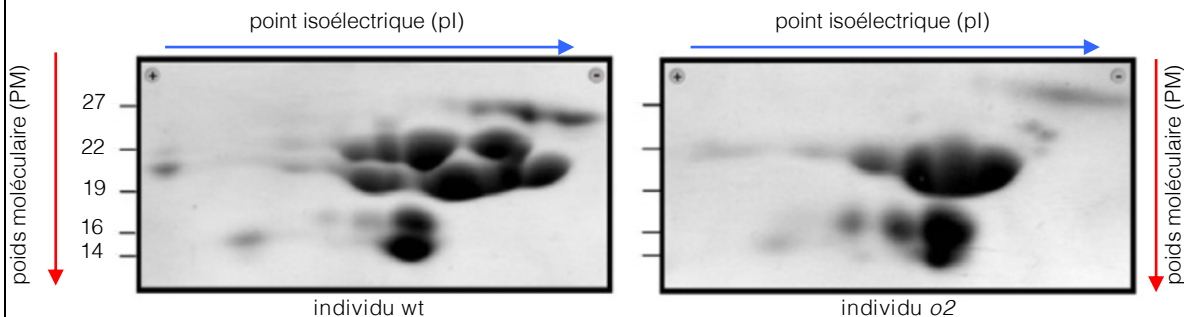


Figure 2 - Analyse de protéines totales d'ovocytes sur un gel bidimensionnel

On commence par faire un SDS-PAGE permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Cependant, dans un échantillon complexe comme un broyat total d'un tissu, le nombre de protéines est tel (plusieurs milliers), que de nombreuses molécules possèdent une masse moléculaire apparente identique, et ne sont donc pas séparées les unes des autres lors de cette première étape.

On réalise alors une isoélectrofocalisation à 90 degrés de la première migration, d'où le nom d'électrophorèse bidimensionnelle. A l'issue de cette deuxième étape permettant de séparer les molécules selon un second critère, leur point isoélectrique, on obtient des spots sur toute la surface du gel (voir Fig. 4). Plusieurs centaines de spots peuvent ainsi être individualisés sur des gels de grande taille. Ce pouvoir de résolution très intéressant est particulièrement mis à profit en génomique, domaine qui étudie l'expression moléculaire du génome dans son ensemble.

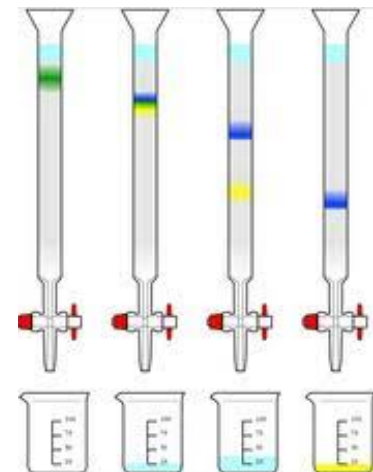
**Exercice d'application n°1:** on extrait d'un grain de Maïs sauvage et d'un grain mutant les protéines de réserve de la famille des zéines et on les sépare par une électrophorèse en 2D ; la mutation du grain mutant touche le gène O2 qui code une protéine capable de se fixer sur l'ADN. Analyser et interpréter les résultats expérimentaux.



### D- L'alternative : la chromatographie sur colonne

Une chromatographie sur colonne est un protocole de séparation des molécules selon leur affinité avec le solvant : un mélange est déposé au sommet d'une colonne et s'écoule ; les différentes molécules traversent la colonne à des vitesses différentes et sont recueillies dans des tubes (ou fractions) successifs.

Cette méthode est adaptée aux protéines mais fonctionne aussi pour d'autres mélanges (acides aminés, oses,....).



## II- Identifier et localiser des protéines

### A- L'utilisation d'anticorps

Les anticorps (ou immunoglobulines) sont des protéines capables de se fixer très sélectivement à une autre molécule dite antigène.

Conséquence de la fixation anticorps-antigène :

- formation d'un complexe immun lourd, qui précipite lorsque la reconnaissance s'effectue dans un liquide
- immobilisation de l'anticorps sur l'antigène lorsqu'il est utilisé sur un support solide (cellule ou coupe de cellule notamment)
- jamais de destruction de l'antigène !!!!!

Marquage des anticorps préalable à leur utilisation :

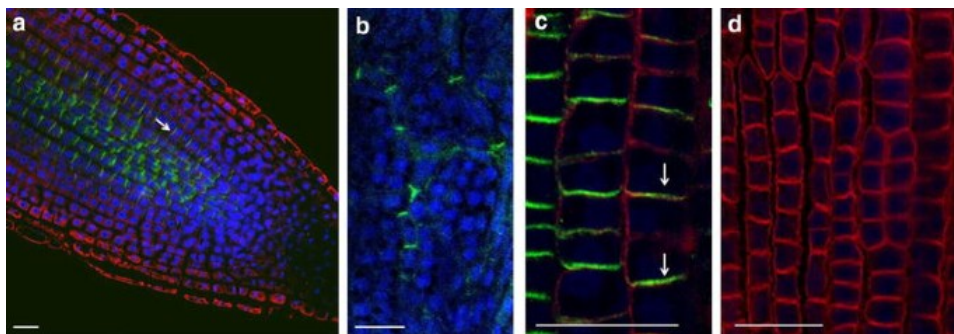
- marquage par une particule d'or, opaque aux électrons lors d'une observation en microscopie électronique
- marquage radioactif repérable en autoradiographie
- marquage par un fluorochrome, pour observation au microscope optique à fluorescence

### 1- Anticorps et immunolocalisation

L'immunolocalisation consiste à ajouter un anticorps marqué sur un objet biologique pour constater la présence ou l'absence d'une protéine cible, et le cas échéant pour la localiser.

Pour augmenter le marquage on peut utiliser 2 anticorps en série : un anticorps reconnaissant la protéine cible puis un anticorps anti-anticorps marqué

Exemple :



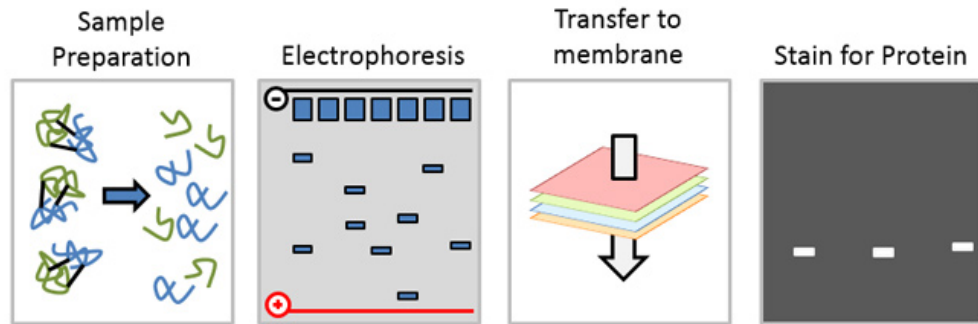
Coupe longitudinale de racine  
marquage bleu DAPI de l'ADN ; marquage rouge de la cellulose ; en vert immunolocalisation d'un transporteur de l'hormone Auxine

Remarque : un anticorps est trop gros pour traverser les membranes cellulaires, sauf si celles-ci sont perméabilisées par un traitement.

### 2- Le western-blot

Objectif : identifier une protéine présente dans un mélange

Principe : un mélange est séparé par électrophorèse en conditions dénaturantes ; puis le contenu du gel est transféré par capillarité sur la surface d'une membrane, c'est l'étape de « blotting » ; enfin on incube la membrane avec un anticorps dirigé contre une protéine supposée présente dans le mélange et on révèle.

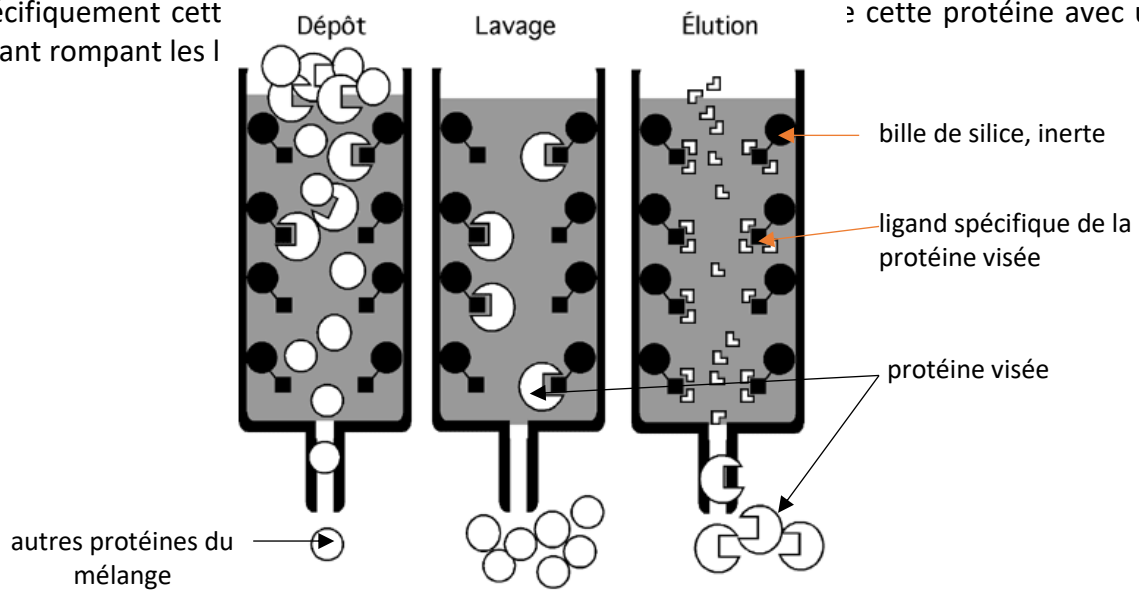


Témoin de charge : on ajoute souvent un second anticorps dirigé contre une protéine ubiquitaire (enzyme de la glycolyse, protéine du cytosquelette), ce qui permet de valider la qualité du dépôt et de rendre la comparaison entre les pistes efficace.

### C- La chromatographie d'affinité

Objectif : isoler une protéine présente dans un mélange

Principe : on construit une colonne de billes de silice enrobées d'une molécule choisie parce qu'elle se fixe spécifiquement avec la ou les molécules que l'on veut purifier. On extrait alors spécifiquement cette protéine avec un éluant rompant les liaisons.



### Exercice d'application 2 : le récepteur nicotinique à l'acétylcholine

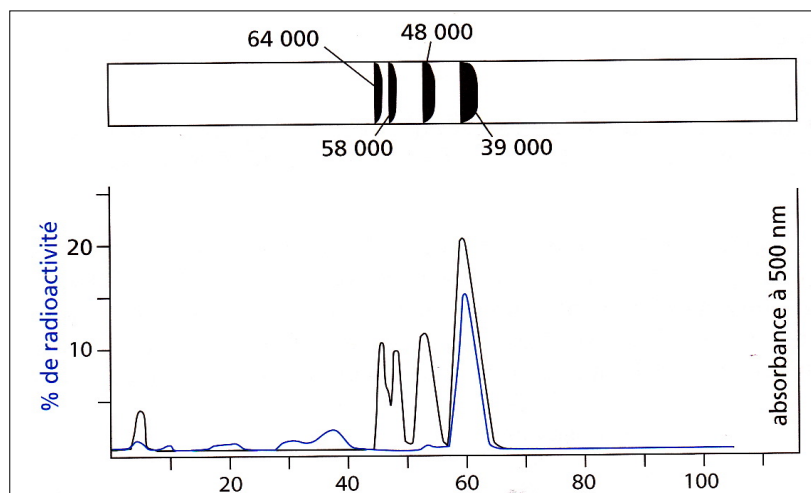
Le récepteur nicotinique est une protéine de la membrane des cellules musculaires, au niveau des synapses. Il est capable de se fixer spécifiquement au messenger Acétylcholine.

On réalise le protocole suivant :

- chromatographie d'affinité d'un broyat de cellules musculaires ; les billes inertes de la colonne sont coatées déacétylcholine
- élution de la colonne
- électrophorèse en conditions SDS de l'éluant ; coloration au rouge ponceau
- transfert sur membrane et incubation avec de l'acétylcholine tritiée
- mesure de l'absorbance du rouge et mesure de la radioactivité

Faire un schéma du protocole.

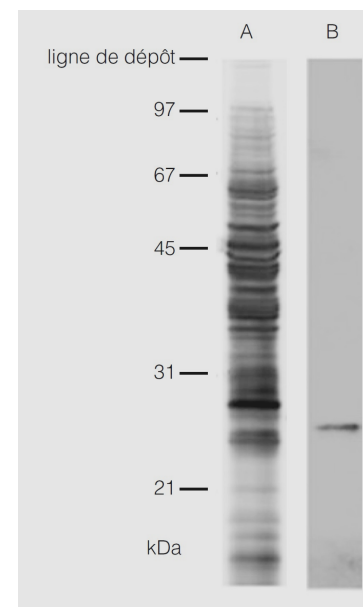
Analyser, interpréter.



### Exercice d'application 3 :

Des ovocytes II de xénope (*Xenopus laevis*) sont prélevés. Afin d'en extraire les protéines, les cellules sont broyées puis le broyat est soumis à une ultracentrifugation. L'extrait soluble est incubé 5 minutes à 95°C dans un tampon contenant des agents dénaturants dont du SDS. L'extrait est ensuite soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide baignant dans un tampon contenant du SDS. Après la migration, le gel est incubé avec un colorant spécifique des protéines, le bleu de Coomassie.

La même électrophorèse est réalisée en parallèle. Le gel est utilisé pour réaliser un transfert vers une membrane (technique du western-blot). Cette dernière est ensuite incubée avec un anticorps dirigé contre la dicalcine, une protéine de la matrice extracellulaire. L'anticorps anti-dicalcine est reconnu par un anticorps secondaire dont le marquage est détectable par impression d'un film photographique.



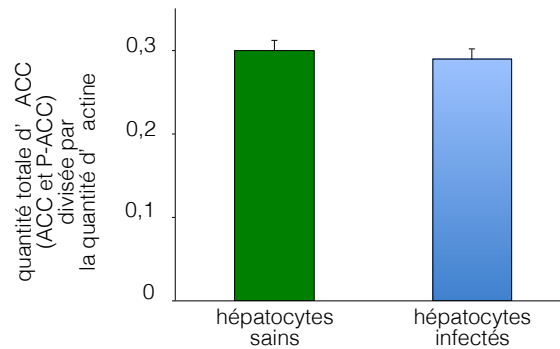
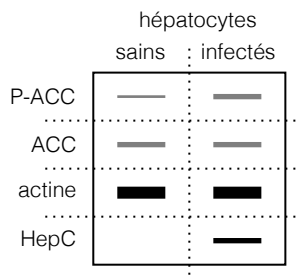


**Exercice d'application 4 :**

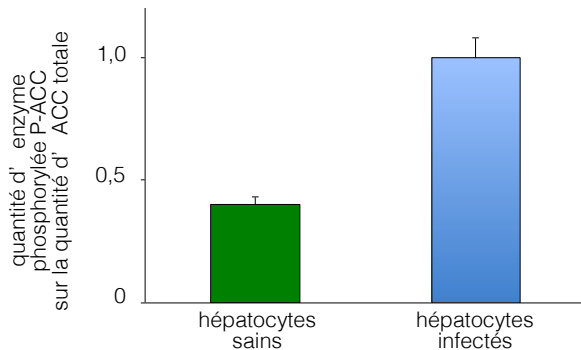
On réalise un Western-blot des protéines des hépatocytes sains ou infectés depuis dix jours par le virus de l'hépatite C : après transfert sur papier ou blotting, le papier est mis au contact d'anticorps radioactifs dirigés respectivement contre l'enzyme ACC, P-ACC, l'actine ou la protéine virale HepC, puis révélé par autoradiographie.

ACC est une enzyme qui catalyse la 1<sup>ère</sup> réaction de la biosynthèse d'un acide gras et existe sous forme phosphorylée notée P-ACC et sous forme non phosphorylée. Elle assure la production de malonyl-coenzymeA.

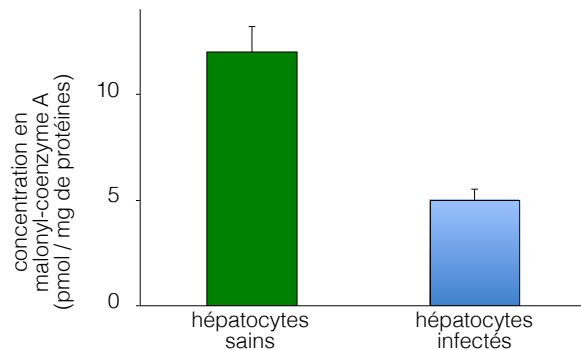
L'autoradiographie est schématisée. On évalue ensuite la quantité de protéines dans chaque bande pour calculer la quantité d'enzyme ACC totale (phosphorylée ou non) rapportée à la quantité d'actine et la proportion d'enzyme ACC phosphorylée. On dose par ailleurs la quantité de malonyl-coenzymeA dans les cellules.



C



D

**III- Modéliser des protéines****A- Comment construire un modèle protéique**

Des résultats expérimentaux :

- le séquençage
- l'analyse par diffraction aux rayons X d'un cristal de la protéine purifiée
- mutagenèse dirigée contre un acide aminé
- comparaison avec d'autres protéines connues
- pour les protéines membranaires, utilisation du profil d'hydrophathie
- etc...

Puis une recherche de la forme tridimensionnelle la plus stable répondant à l'ensemble des observations.

## B- Des logiciels d'imagerie

Les logiciels disponibles :

- Rastop (logiciel Éducation Nationale, gratuit)
- Libmol (en ligne)
- Pymol (logiciel professionnel, version débutant gratuite)

Application : visualiser le site actif d'une enzyme avec et sans substrat. Exemple de la carboxypeptidase

La carboxypeptidase est une protéase du duodénum, dégradant les polypeptides en coupant l'acide aminé de l'extrémité C-terminale.

- Ouvrir le logiciel Rastop

Vous disposez d'une fiche technique présentant les principales commandes du logiciel.

- Ouvrir le fichier cpaseul.pdb

- Afficher selon différents critères : choisir ce qui vous semble le plus lisible

- Mettre le fond en blanc

- Le site actif possède un atome de zinc. Le colorer dans la couleur de votre choix en suivant les consignes suivantes :

- Ouvrir la fenêtre de sélection Abc
- Dans la ligne Expression écrire \*.zn
- Ouvrir la palette et choisir une couleur.

- L'acide aminé responsable de la fixation du substrat est le N°248

- Identifier sa nature
- Mettre cet acide aminés en couleur

- Exploitation :

- Décrire la structure de la protéine
- Activer l'onglet Distance. Mesurer la distance entre l'atome de zinc et l'extrémité de la Tyrosine 248.
- Réaliser une capture d'écran

- Ouvrir ensuite le fichier présentant l'enzyme avec le substrat : cpasub.pdb

- Demander une coloration par chaîne : le substrat et l'enzyme sont dans deux couleurs différentes

- Obtenir la même présentation (mêmes couleurs, sphères) pour la partie enzyme

- Afin de pouvoir comparer, orienter l'enzyme de la même façon

- Mesurer à nouveau la distance entre l'atome de zinc et l'extrémité de la Tyrosine 248.

- Réaliser une capture d'écran

- Exploitation :

- Introduire les captures d'écran dans un logiciel de traitement de texte.
- Titrer, légendier, comparer en une ou deux phrases les deux productions
- Enregistrer en .pdf ; poster sur CdP