

TP 2 : Méthodes d'études des protéines

Il existe de nombreuses méthodes d'études des molécules, aux applications multiples.

- Nous avons déjà vu cette année, lors du premier TP, des méthodes de coloration des molécules (exemple : eau iodée et amidon)
- Il existe également des méthodes de séparation (+ éventuelle coloration) des biomolécules. Nous nous intéressons aujourd'hui aux protéines.

SOMMAIRE

I – Électrophorèse en conditions natives

II – Électrophorèse en conditions dénaturantes

III – Western blot

I – Électrophorèse en conditions natives

→ Voir le protocole au tableau.

Pour réviser chez vous, voici au QR Code suivant le protocole pour HbA/HbS (ce n'est pas du gel qui est utilisé, mais une bande d'acétate de cellulose ; le principe est le même).

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-svt/electrophorese-des-hemoglobines-a-et-s-sur-bande-d-acetate-de>



Conclusion :

Dans ce type d'électrophorèse, les protéines migrent en fonction de :

- leur **masse moléculaire** : plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible.
- leur **charge** au pH de la solution tampon
- leur **forme tridimensionnelle** : à masse moléculaire égale, une molécule pourra, selon sa forme, être plus ou moins ralentie dans sa progression par le support. Par exemple, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse.

Les résultats sont donc **souvent difficiles à interpréter** : si une protéine a migré plus loin, c'est dû à sa charge ? Sa forme ? Sa masse ?

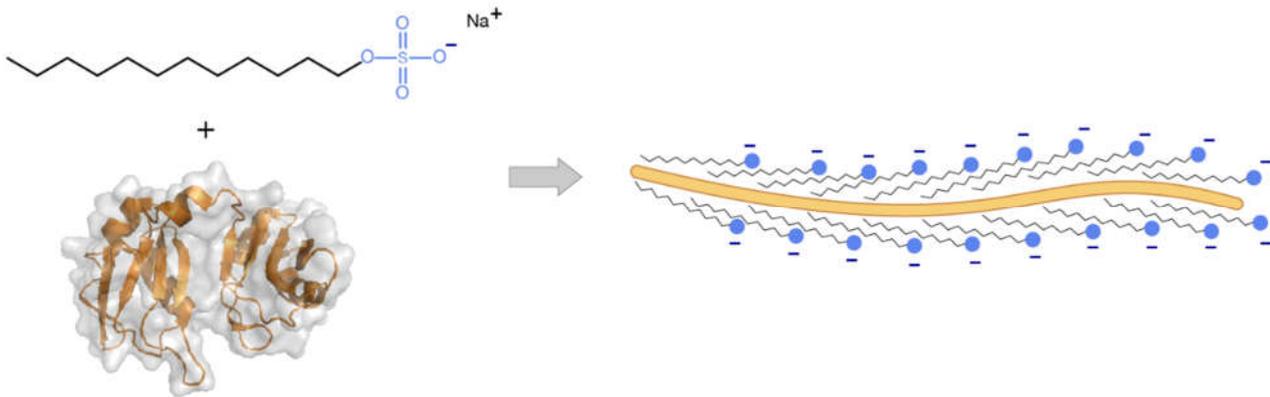
Interpréter les résultats obtenus :

II – Électrophorèse en conditions dénaturantes

Ce type d'électrophorèse est très couramment utilisé. Comme son nom l'indique, dans cette variante, les protéines sont soumises à un **traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique**, détruisant la structure tridimensionnelle native de la protéine.

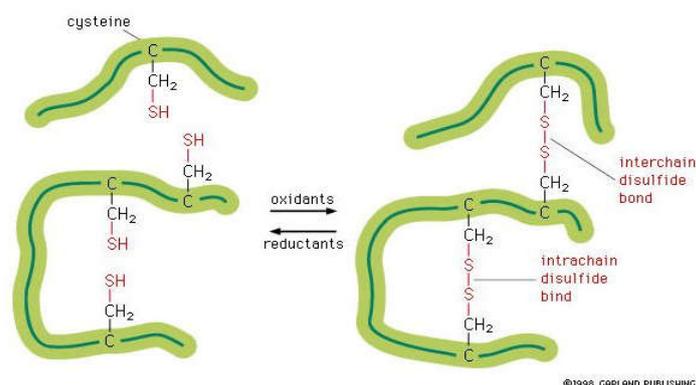
Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont (i) les traitements thermiques, (ii) les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), et (iii) l'utilisation d'agents dénaturants comme l'urée ou le **SDS** (sodium dodécyl sulfate). Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines. Il se fixe sur les protéines avec une densité linéaire approximativement constante, c'est-à-dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire. En sa présence, toutes les protéines vont donc adopter la même forme linéarisée avec une charge **NEGATIVE** proportionnelle à la masse moléculaire. Un gel d'électrophorèse réalisé après un traitement au SDS s'appelle un SDS-PAGE (PAGE = PolyAcrylamid Gel Electrophoresis).

Note : le SDS porte une charge négative par son groupement sulfate, ainsi qu'une longue chaîne hydrogénocarbonée hydrophobe lui permettant d'interagir avec de nombreux acides aminés. L'ion Na^+ est quant à lui solubilisé dans le tampon, et ne reste pas lié.

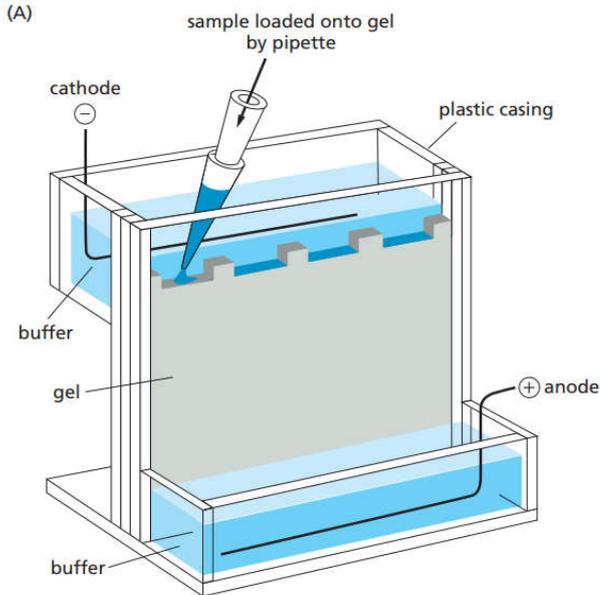


La charge native est donc négligeable par rapport aux charges portées par le SDS. Il en résulte qu'en présence de SDS **la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire**. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses). En conséquence, **l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non dénaturante**.

Un autre agent chimique couramment utilisé est le **β -mercaptoéthanol**. C'est un agent réducteur qui a pour propriété de **réduire les ponts disulfures des protéines**, donc de détruire ces pontages covalents qui ne sont pas cassés par le SDS. Cela permet de **séparer les différents polypeptides** reliés par de tels ponts au sein d'une même protéine. La comparaison de SDS-PAGEs avec et sans β -mercaptoéthanol d'un même échantillon est donc riche d'informations sur la **structure quaternaire** (= nombre de sous-unités) des protéines.



En pratique



La protéine d'intérêt, ou les protéines d'intérêt, dont on veut déterminer la structure, sont d'abord purifiées.

Ensuite, les protéines sont dénaturées (par exemple avec du SDS), puis on dépose l'échantillon dans un gel de polyacrylamide. On dépose également une solution de protéines connues, achetée dans le commerce, dont on connaît la masse moléculaire.

Les protéines migrent ensuite le long du gel, en fonction de leur masse : les protéines les plus lourdes, plus volumineuses, migrent moins que les protéines les plus légères, qui se déplacent plus facilement au travers du gel.

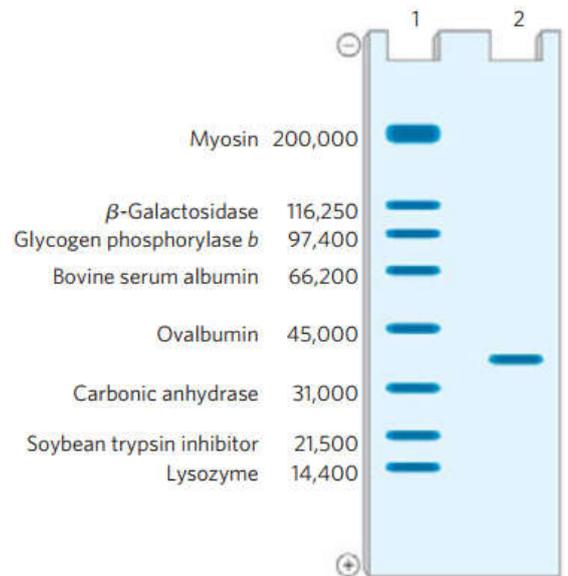
La protéine d'intérêt, purifiée, est déposée dans la figure ci-contre sur la piste 2. Sur la piste 1, on a déposé une solution de protéines de masses connues.

Attention, pour chaque « tache bleue », on ne parle pas de « tache », mais de **BANDE** d'électrophorèse.

La distance de migration d'une protéine est reliée à sa masse moléculaire par une fonction logarithmique. Afin de déterminer la taille de la protéine d'intérêt, on réalise donc un graphique en coordonnées logarithmiques.

On positionne en premier lieu tous les points des protéines connues (piste 1 sur l'exemple ci-dessus), et on trace une droite.

Après positionnement des coordonnées la protéine d'intérêt, on a alors accès à sa masse moléculaire.



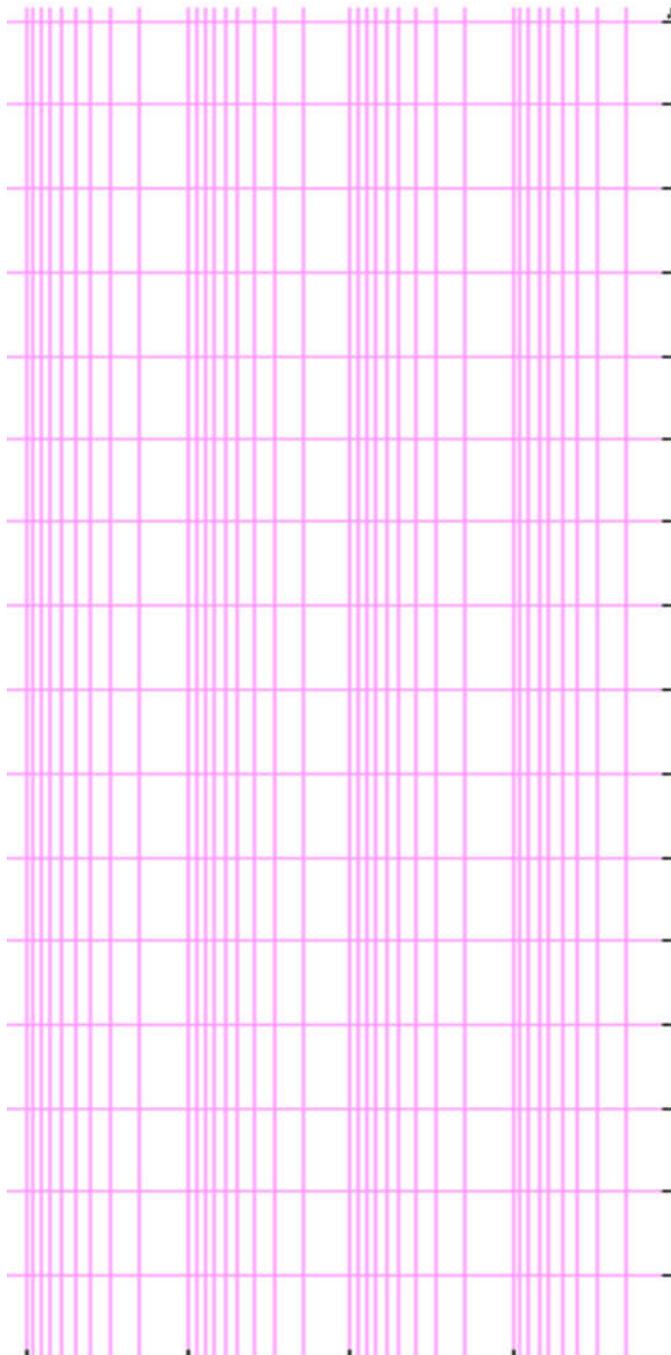
Exercice : Détermination de la taille d'une protéine

On souhaite déterminer la taille d'une protéine après sa migration sur un gel d'électrophorèse, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

On utilise des protéines dont on connaît la taille, auxquelles on fait subir une électrophorèse. On note pour chaque protéine sa masse moléculaire, et on mesure sa distance de migration. On obtient le tableau ci-dessous.

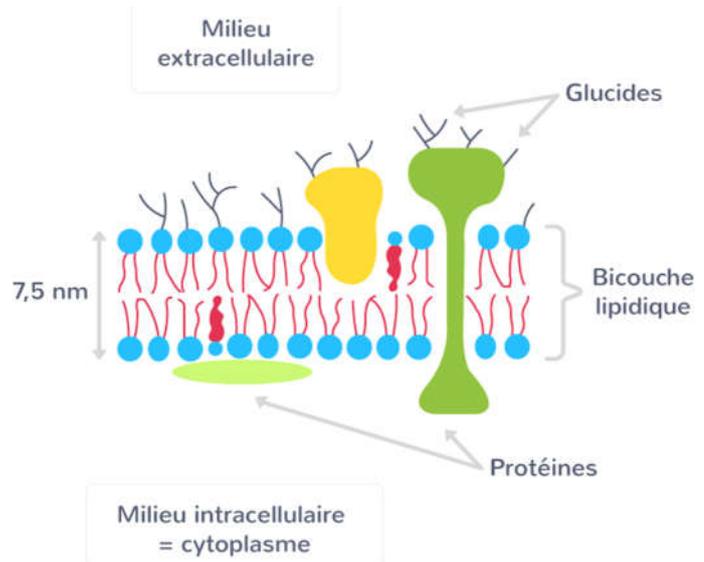
Masse moléculaire (kDa)	350	266	200	100	50	33	5
Log (masse moléculaire)							
Distance de migration (cm)	1.2	1.8	2.4	3.8	5.2	6	10

1. Sur le papier semi-log fourni ci-dessous, tracer la courbe étalon donnant la masse moléculaire en fonction de la distance de migration.
2. Déterminer la masse moléculaire du fragment de protéine inconnu, sachant qu'il a migré à 4.1 cm.



Exercice : identification des protéines de la membrane plasmique des hématies

Rappel sur l'organisation d'une membrane plasmique (1^{ère} Enseignement scientifique)



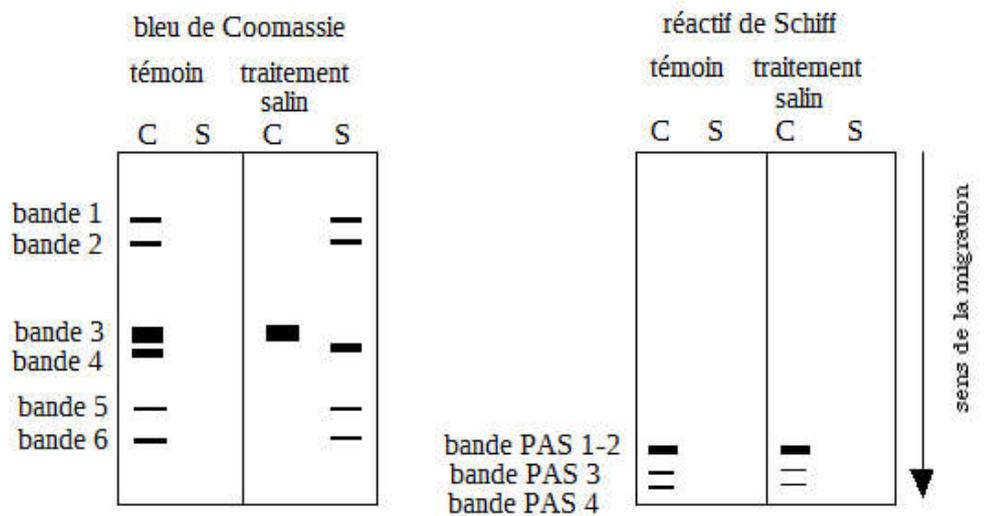
1. Des globules rouges humains (ou hématies) sont placés dans une solution hypotonique (c'est à dire moins concentrée que l'intérieur du globule rouge) : ils gonflent, leur membrane plasmique se rompt et libère le contenu intracellulaire. Les membranes plasmiques (ouvertes) sont récupérées puis lavées de nombreuses fois afin de ne conserver que la membrane et ses constituants.

- Les membranes sont remises en suspension dans la dernière solution de lavage, par agitation, puis sont partagées en 2 lots :
- un lot témoin (sans traitement supplémentaire)
 - un lot qui subit un traitement salin à forte concentration ionique (on rajoute du NaCl en forte concentration). Le traitement salin modifie les forces ioniques qui lient les protéines périphériques de la membrane à d'autres composants de la membrane plasmique (lipides ou protéines).

Les 2 lots sont ensuite centrifugés afin de faire tomber au fond du tube les structures membranaires : on obtient ainsi un culot, noté C et un surnageant, noté S.

Les culots et les surnageants sont traités avec un détergent appelé SDS. Les protéines récupérées subissent une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Lorsque la migration électrophorétique est suffisante, les gels sont colorés par du bleu de Coomassie (colorant des protéines) ou par du réactif de Schiff (colorant des glucides). Les résultats sont présentés figure 1.

Figure 1 : électrophorèse des protéines du surnageant et du culot, avec ou sans traitement salin



Questions :

1. **Faire** un schéma du protocole et expliquer pourquoi une hématie placée dans une solution hypotonique gonfle jusqu'à explosion.
2. **Positionner** les pôles + et – et rappeler ce qui permet la migration des molécules.
3. **Analyser** et **interpréter** les résultats obtenus après coloration du gel au bleu de Coomassie.
4. **Analyser** et **interpréter** les résultats obtenus après coloration du gel au réactif de Schiff.

1. En milieu hypotonique, le potentiel hydrique de l'intérieur de la cellule est plus faible que celui de l'extérieur (potentiel osmotique plus faible). L'eau rentre. Pour une cellule animale, aucune paroi ne s'oppose à la l'augmentation du volume ; cette entrée d'eau se fait donc jusqu'à explosion.

2. Il s'agit ici d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Toutes les protéines sont chargées négativement par l'addition de SDS. La migration ne dépend donc que de la masse de la protéine.

3. La coloration au bleu de Coomassie chez le témoin révèle la présence de 6 protéines dans le culot. L'énoncé nous indique que le culot correspond aux fractions membranaires : ces 6 protéines sont donc liées à la membrane plasmique.

Si on réalise un traitement salin, une seule protéine reste liée à la membrane (bande 3). Cela signifie donc que les 5 autres protéines étaient liées par des liaisons faibles et se sont détachées de la membrane lors du traitement : ce sont des protéines périphériques.

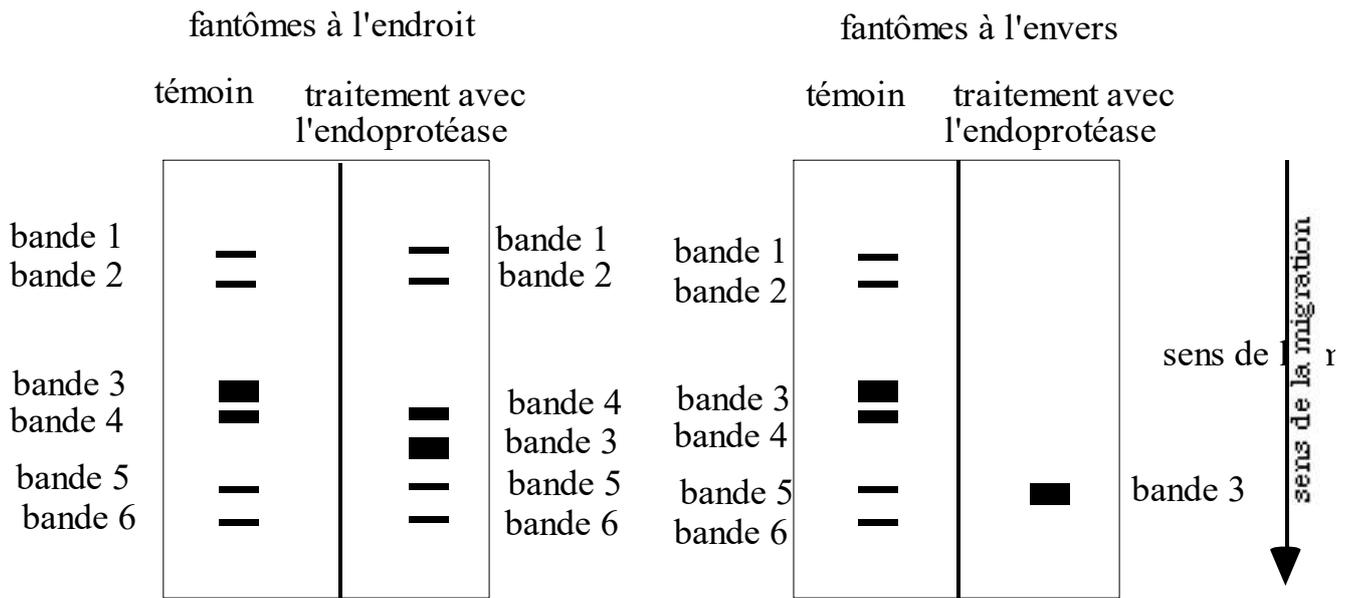
4. Le traitement au réactif de Schiff après migration révèle la présence de groupements glucidiques sur les protéines. On observe que 3 protéines glycosylées sont associées à la membrane avant traitement salin, et le restent après. Ce sont 3 protéines membranaires intrinsèques.

Note : ces 3 protéines n'étaient pas présentes lors du traitement au bleu de Coomassie. On peut supposer qu'elles étaient présentes mais en trop faible quantité pour être révélées au bleu de Coomassie. Le réactif de Schiff doit être plus sensible.

2. En mettant les membranes plasmiques dans des conditions de milieu spécifiques, elles se referment : on produit alors des "fantômes" de globule rouge, c'est-à-dire des vésicules limitées par une membrane plasmique. On produit ainsi 2 types de fantômes, à membrane retournée (à l'envers, c'est-à-dire d'orientation inverse à celle de la membrane plasmique) ou non (à l'endroit). Ces 2 types de fantômes sont traités de la manière suivante :

- a. traitement (ou non) par une endoprotéase, enzyme qui coupe les chaînes polypeptidiques en morceaux plus petits, les acides aminés, non révélés par l'électrophorèse. Un lot témoin n'est pas traité par l'endoprotéase.
 - b. traitement avec du SDS, puis électrophorèse des protéines récupérées sur gel de polyacrylamide.
 - c. coloration au bleu de Coomassie.
- Les résultats obtenus sont les suivants :

Figure 2 : électrophorèse des protéines des fantômes, avec ou sans traitement préalable par une endoprotéase.

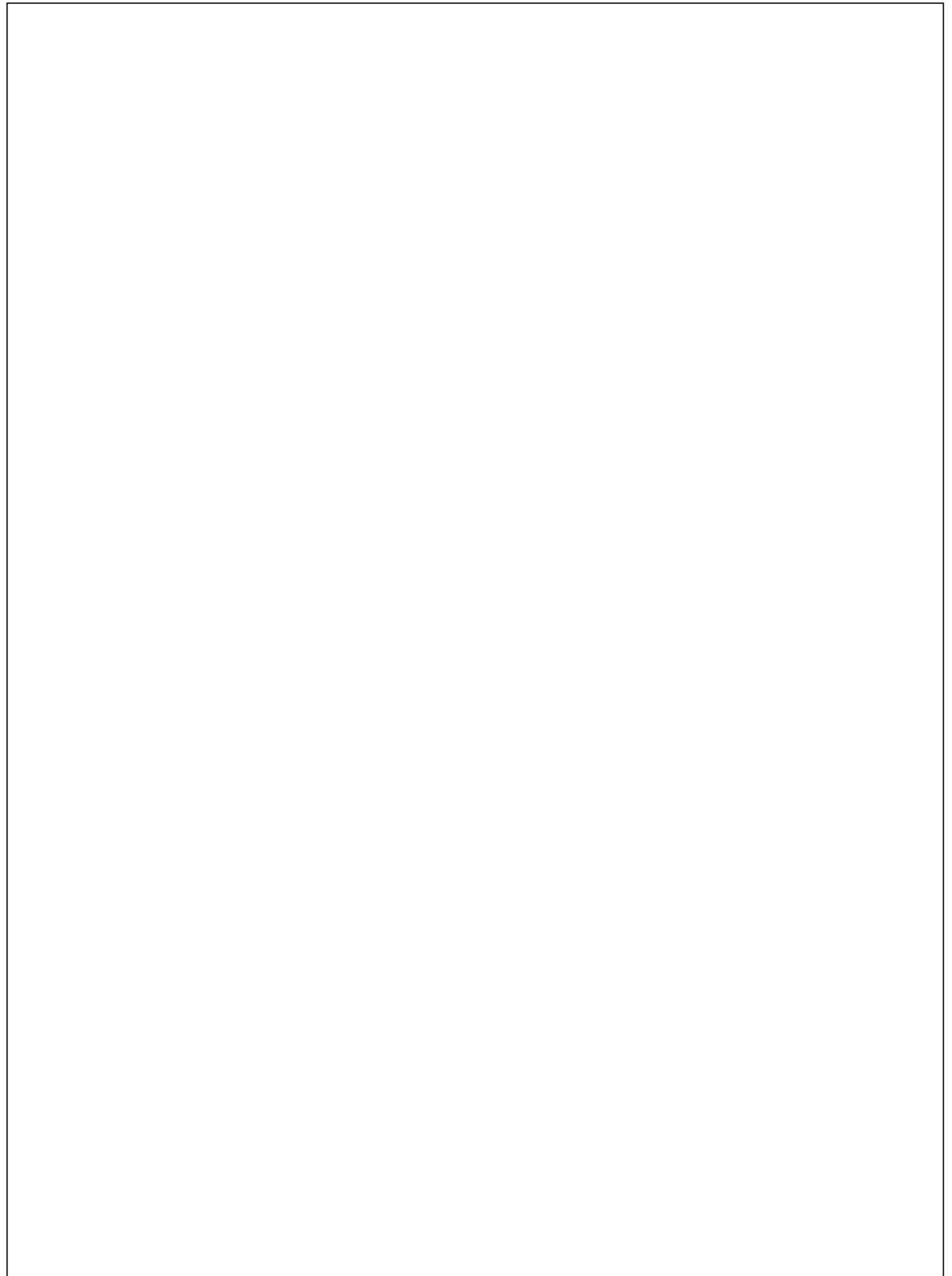


1. À partir de l'analyse précise des résultats d'électrophorèse, **indiquer la localisation** par rapport à la membrane plasmique (côté externe ou interne) des protéines correspondant aux bandes 1, 2, 4, 5 et 6
2. **Expliquer** pourquoi la bande 3 se trouve beaucoup plus bas dans le gel après traitement avec l'endoprotéase.
3. À partir de l'analyse précise des résultats d'électrophorèse, **schématiser** la localisation et la taille des différentes protéines par rapport à la membrane plasmique.

1. On observe chez le témoin que les protéines sont présentes, que ce soit sur les fantômes à l'endroit ou à l'envers. Les 6 protéines restent présentes lors du traitement à l'endoprotéase des fantômes à l'endroit, ce qui indique qu'elles sont protégées de la digestion. Elles doivent donc être localisées sur la face interne de la membrane. Cela est confirmé par le traitement sur les fantômes à l'envers. Toutes les protéines disparaissent, sauf la bande 3.

2. Cela suggère donc que cette protéine est transmembranaire, et a un domaine qui dépasse de chaque côté de la membrane. Elle est donc protégée de la dégradation totale. Cela explique également que les bandes se déplacent vers le bas (fragments plus petits) dans les 2 cas : les domaines protéiques exposés hors de la membrane sont digérés.

3.
 Une protéine intrinsèque avec 2 domaines intra et extracytosoliques : bande 3
 5 protéines intrinsèques liées par des liaisons faibles et situées sur la face interne de la membrane



III – Western blot

Une électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Elle permet donc de déterminer la taille d'une protéine préalablement purifiée.

Il peut cependant arriver qu'on n'ait pas pu purifier la protéine... dans ce cas, comment faire pour l'étudier, parmi l'ensemble de toutes les protéines cellulaires ??!

ATTENTION, LES MOLÉCULES CITÉES CI-DESSOUS N'EXISTENT PAS, C'EST UN EXEMPLE THEORIQUE !!!
Ce sont des personnages de Dragon Ball Z...

Etude de cas :

Situation initiale : Je suis en laboratoire, et j'étudie l'effet d'une molécule appelée FREEZER sur la protéine SAIYAN exprimée par des cellules en culture.

Hypothèse : Je fais l'hypothèse que la cellule se met à exprimer la protéine SAIYAN lorsque la cellule est mise en présence de FREEZER.

Protocole : Je cultive donc des cellules témoins, sans FREEZER, et des cellules traitées, avec FREEZER. Je souhaite regarder si la protéine SAIYAN est produite. Je m'oriente donc vers la réalisation d'une électrophorèse de protéines.

PROBLEME : Parmi l'ensemble des protéines cellulaires, comment identifier SAIYAN, et voir si cette protéine est exprimée en +/- grande quantité ?

Et c'est là que le Western blot vous sauve ! Le principe de cette méthode, extrêmement utilisée en laboratoire, est basé sur la reconnaissance spécifique d'une protéine par des anticorps.

Etape 1 : Extraire toutes les protéines des 2 conditions (cellules avec et sans exposition à FREEZER).

Etape 2 : Réaliser une électrophorèse de toutes les protéines (SDS-PAGE)

Etape 3 : Transférer les protéines sur une membrane (le plus souvent, en papier buvard en nitrocellulose, d'où le nom de « blot » = buvard en Anglais !)

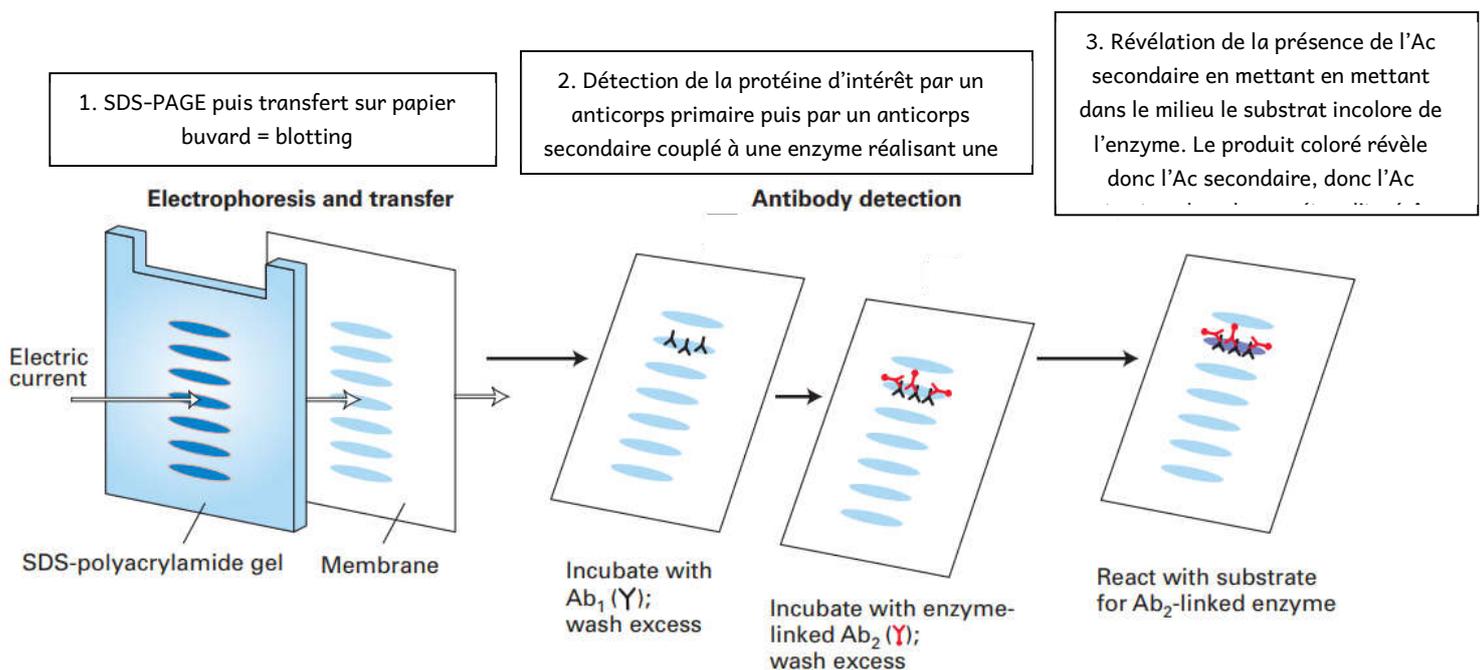
Etape 4 : Déposer sur la membrane de nitrocellulose les anticorps (Ac, ou « antibodies = Ab » en Anglais) anti-SAIYAN, qui se fixeront spécifiquement à la protéine SAIYAN

Etape 5 : Laver les excès d'Ac, qui n'ont pas pu se fixer. Seuls les Ac fixés restent.

Etape 6 : Déposer des Ac secondaires, reconnaissant la partie constante des Ac anti-SAIYAN, et couplés à une enzyme qui catalyse la formation d'un produit coloré à partir d'un substrat incolore (réaction « chromogénique »)

Etape 7 : Déposer le substrat de l'enzyme, et observer. Les bandes qui deviennent sombres révèlent la présence de :

- Du substrat de l'enzyme DONC de l'enzyme
- DONC de l'anticorps secondaire
- DONC de l'anticorps primaire anti-SAIYAN
- DONC ... de la protéine SAIYAN



La technique de Western blot, ou immunodétection, permet donc, sans même connaître la structure d'une protéine, de déterminer si elle est ou non exprimée dans la cellule d'intérêt.

De plus, même une petite quantité de protéine d'intérêt suffit à la révéler, puisque la fixation d'un anticorps primaire puis secondaire permet d'amplifier la coloration.

Note : purifier une protéine est, le plus souvent, compliqué, et suppose des grandes quantités de la protéine en question. Produire un anticorps spécifique d'une protéine X est beaucoup plus facile : il « suffit » d'injecter la protéine X dans une souris/un lapin/un cobaye... de laboratoire, et d'attendre que l'organisme en question produise des anticorps. On n'a alors plus qu'à les extraire du sérum de l'animal.

Exercice d'interprétation des résultats d'un Western Blot

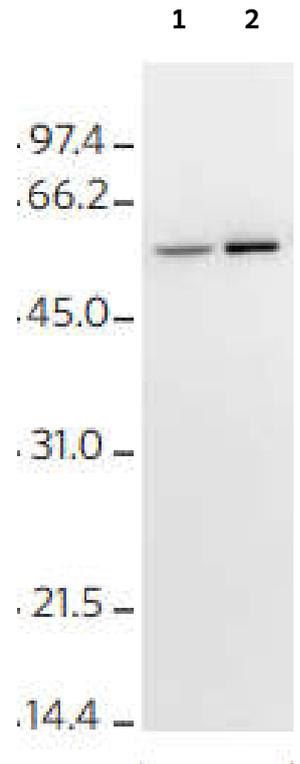
La piste 1 correspond à un Western Blot anti-SAIYAN réalisé après un SDS-PAGE sur des cellules témoins.

La piste 2 correspond à un Western Blot anti-SAIYAN réalisé après un SDS-PAGE sur des cellules traitées avec FREEZER.

Les valeurs de gauche correspondent à une échelle de masses moléculaires (en kDa).

Conclure sur l'influence de FREEZER sur l'expression de SAIYAN.

Indiquer ce qu'il manque sur ce document.



Parce qu'on ne s'en lassera jamais... <https://www.youtube.com/watch?v=7kWoQKADEKY>

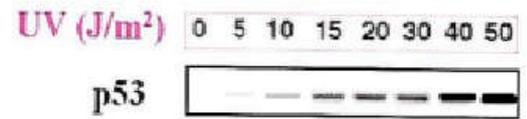


Exercice : Rôle de la protéine p53 dans le devenir des cellules

La protéine p53 joue un rôle important dans le contrôle de la vie de la cellule. Sa synthèse est sous le contrôle de nombreux facteurs externes, et c'est une protéine de signalisation dans de nombreuses voies.

1. On mesure par Western blot dans le document 1 ci-contre le taux d'expression de p53 chez des cellules soumises à une exposition croissante aux UV.

- Indiquer** ce qu'il manquerait sur ce document pour être sûr que p53 n'est pas exprimé pour une exposition nulle aux UV.
- Analyser** la variation du taux d'expression de p53 en fonction du taux d'UV reçus par une culture cellulaire.
- Formuler une hypothèse** sur les conditions contrôlant l'expression de p53.



Taux d'expression de p53 en fonction de l'intensité d'exposition aux UV d'une culture cellulaire

a.

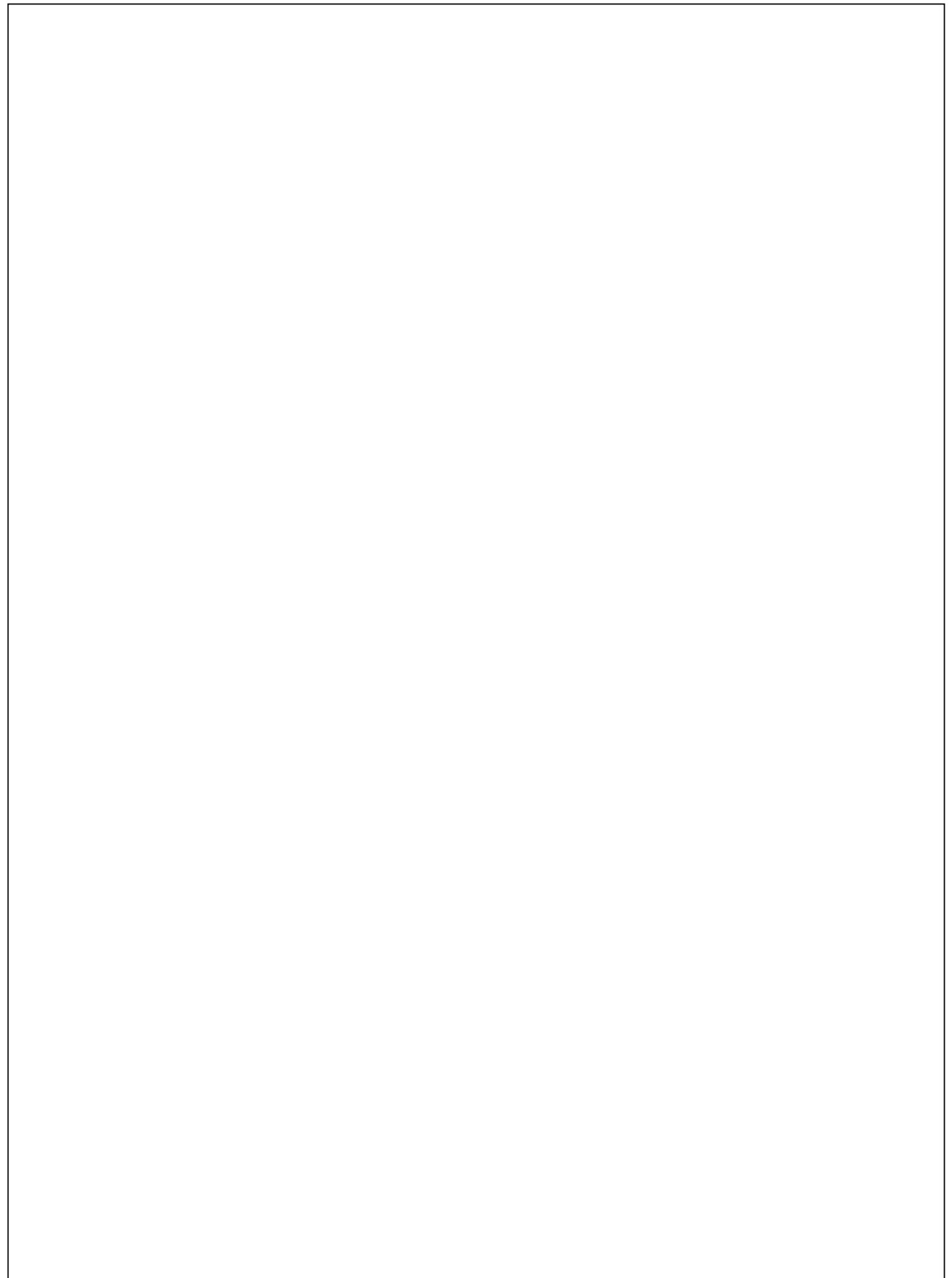
Il manquerait un **témoin de charge** avec une autre protéine (par exemple, l'actine), pour être sûr que le protocole a fonctionné et qu'une absence de bande signifie réellement une absence d'expression, et non pas un écueil expérimental.

b.

Une augmentation du taux d'exposition aux UV entraîne une présence accrue de p53 chez les cellules.

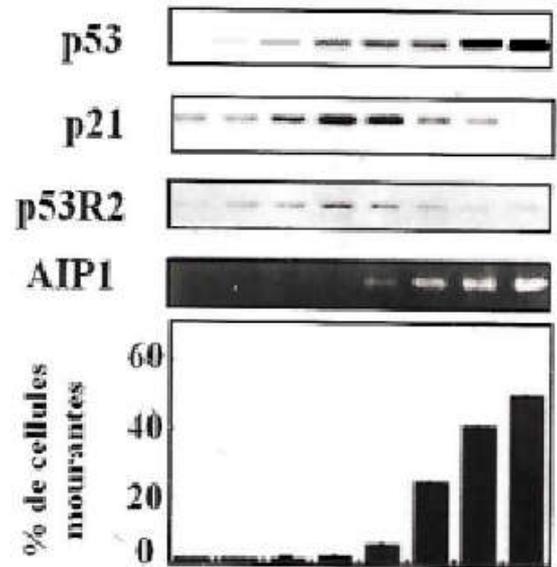
c.

Soit les UV stimulent la synthèse de cette protéine, soit ils empêchent sa dégradation. On peut émettre l'hypothèse que p53 est une protéine impliquée dans la protection ou la réparation de l'ADN, synthétisée en présence d'agents mutagènes.



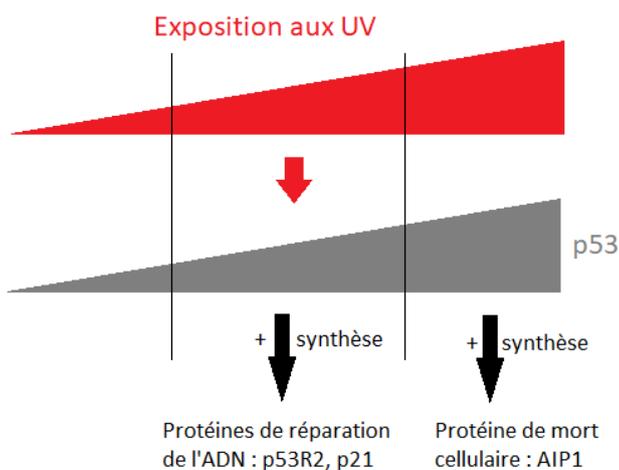
Les protéines p21 et p53R2 sont impliquées dans la réparation de l'ADN, tandis que la protéine AIP1 entraîne la mort cellulaire programmée de cellules chez qui elle est exprimée.

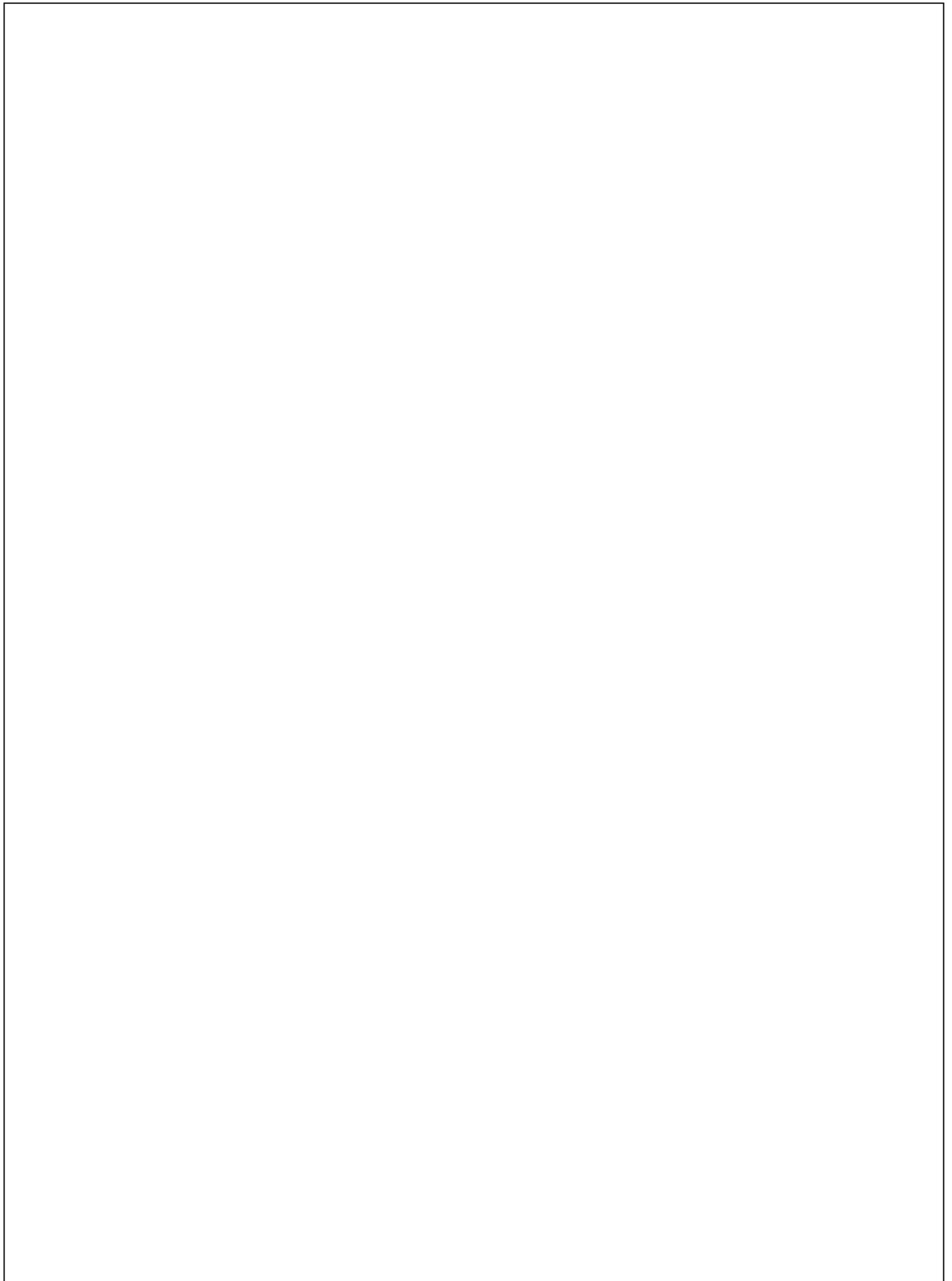
2. On stimule artificiellement l'expression de p53 dans une culture cellulaire, et on quantifie par Western blot le taux d'expression de p21, p53R2 et AIP1. À partir des documents ci-contre, **expliquez** comment le taux d'expression de p53 influence le destin des cellules suite à une exposition aux UV. **Vous réaliserez un schéma** montrant le lien entre exposition aux UV, expression de p53, réparation de l'ADN et mort cellulaire.



Taux d'expression de certaines protéines en fonction de la quantité de protéine p53 dans la cellule

- Les protéines de réparation de l'ADN (p21 et p53R2) sont synthétisées en grande quantité lorsque p53 est moyennement présente. En dehors de ces valeurs elles le sont peu ou pas.
 - La protéine (AIP1) est exprimée pour de fortes concentrations de p53, correspondant à une forte exposition aux UV. Parallèlement le pourcentage de cellules mortes augmente dans la culture, ce qui nous permet de confirmer que l'expression de cette protéine entraîne la mort cellulaire.
 Finalement, les UV stimulent de façon dose dépendante la synthèse de p53, qui va stimuler la réparation de l'ADN si l'exposition est suffisamment faible, et provoquer la mort cellulaire si elle est trop importante. **P53 participe donc au maintien dans la culture cellulaire de cellules à ADN non endommagé.** Cette protéine est donc qualifiée de « gardien du génome ».





CONCLUSION :

Résumer en 2-3 phrases le principe de chaque technique :

Électrophorèse en conditions natives	
Électrophorèse en conditions dénaturantes (avec SDS seul)	
Électrophorèse en conditions dénaturantes (avec SDS + β-mercaptoéthanol)	
Western blot	