

LES MÉTHODES ÉLECTROPHORÉTIQUES

Exercices d'application

Exercice n°1 : Étude comparée de deux types d'électrophorèse

La protéine P1 est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ dont les chaînes polypeptidiques ont des masses moléculaires respectives de 10 000 et 20 000 Da. Son pH_i est de 4.

Elle est comparée à une protéine P2 monomérique de masse moléculaire 60 000 Da et de pH_i égal à 8.

Ces protéines ne contiennent pas de pont disulfure.

Q1. Définir les termes : monomérique, hétérotétramère.

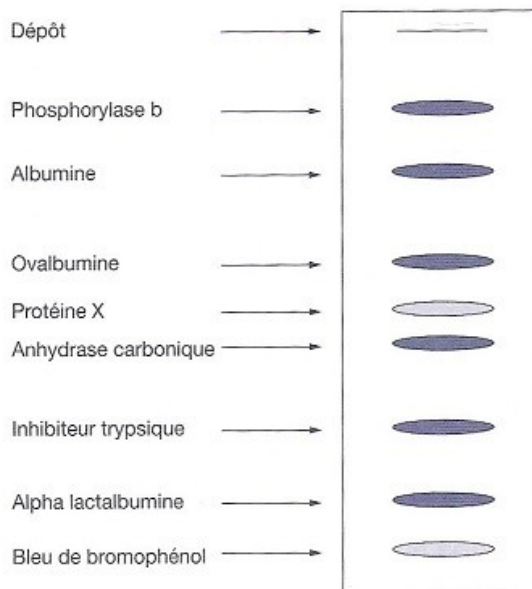
Q2. Comparer le comportement des deux protéines dans les systèmes suivants :

- électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose à pH 7.
- SDS-PAGE.

Exercice n°2 : Détermination de la masse molaire d'une protéine par SDS-PAGE

Une protéine X est soumise à une SDS-PAGE en présence de 2-mercaptoéthanol (ou β -mercaptoéthanol), parallèlement à des marqueurs de masse moléculaire connue. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

L'électrophorégramme est présenté ci-dessous :



→ Données :

Protéine	Masse moléculaire (Da)
Phosphorylase b	94 000
Albumine	67 000
Ovalbumine	43 000
Anhydrase carbonique	30 000
Inhibiteur trypsique	20 000
α -lactalbumine	14 400

- Q1.** Indiquer le rôle du 2-mercaptoéthanol.
Q2. Donner l'intérêt du bleu de bromophénol.
Q3. Indiquer sur l'électrophorégramme la position des électrodes et le sens de migration.
Q4. Tracer la droite d'étalonnage du gel sur papier millimétré et déterminer la masse molaire de la protéine X

La masse molaire de la protéine X a été évaluée par une autre méthode à 105 kDa.

- Q5.** Conclure.

Exercice n°3 : Analyse d'un échantillon de PEP carboxylase

On dispose de 2 échantillons, notés (2) et (3), de PEP carboxylase purifiée à partir de feuilles de maïs.

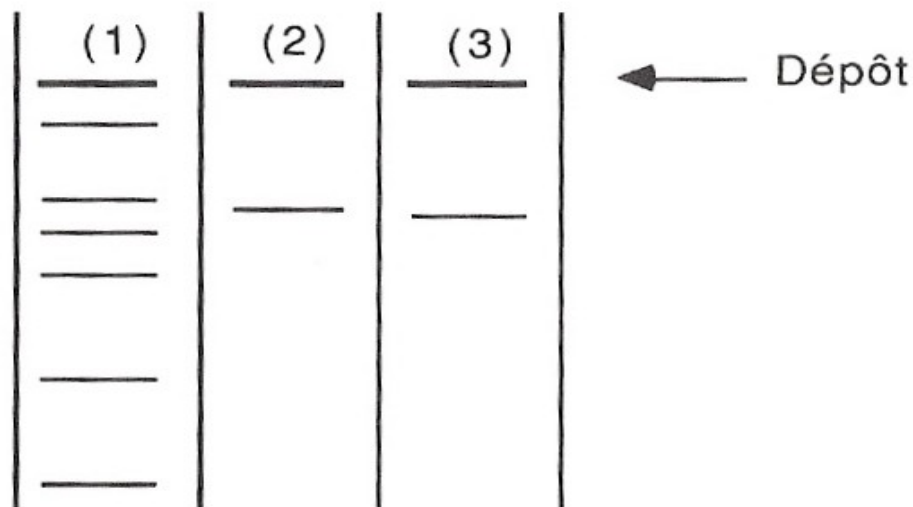
L'échantillon (2) a été obtenu à partir d'un processus de purification conduit en présence d'un inhibiteur de protéase, la chymostatine.

L'échantillon (3) a été obtenu à partir d'un processus de purification ne faisant pas intervenir d'inhibiteur de protéase.

Une électrophorèse à pH 7 sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été réalisée.

Les marqueurs de masse moléculaire déposés en (1) sont les suivants : anhydrase carbonique (29 kDa), SAB (66 kDa), phosphorylase (97,4 kDa), β -galactosidase (116 kDa) et myosine (205 kDa).

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :



- Q1.** Définir protéase et inhibiteur de protéase.
Q2. Sur l'électrophorégramme, indiquer la position des électrodes. Justifier.
Q3. Attribuer chaque marqueur à la bande qui lui correspond. Justifier.
Q4. Déterminer la masse molaire de la protéine dans les deux expériences réalisées.
Q5. Commenter le résultat obtenu. Conclure quant à la pureté de l'échantillon.

Exercice n°4 : Analyse comparée d'une protéine par gel filtration et SDS-PAGE

On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse molaire (M) en Daltons.

On élue avec de l'eau distillée et le débit de la colonne est de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$:

	M (Da)	t_r (min)
Aldolase	145 000	10,4
Lactate déshydrogénase	135 000	11,4
Phosphatase alcaline	80 000	18,4
Ovalbumine	45 000	26,2
Lactoglobuline	37 100	28,6

- Q1.** Rappeler à quoi correspond le Dalton.
- Q2.** L'élution d'une chromatographie d'exclusion est qualifiée d'« isocratique ». Donner la signification de ce terme.
- Q3.** Déterminer les volumes d'élution des différentes protéines et tracer la droite d'étalonnage, sachant que le volume mort de la colonne est $V_0 = 15$ mL.
- Q4.** La protéine P a un temps de rétention $t_{r(\text{protéine P})} = 11,7$ min. Déterminer sa masse molaire.

L'analyse des mêmes protéines en électrophorèse SDS-PAGE donne les résultats suivants :

	M (Da)	Distance de migration (cm)
Aldolase	145 000	3,5
Lactate déshydrogénase	135 000	3,8
Phosphatase alcaline	80 000	6,1
Ovalbumine	45 000	8,7
Lactoglobuline	37 100	9,5
Protéine P	?	7

- Q5.** Déterminer la masse molaire de la protéine P à l'aide de ces résultats expérimentaux.
- Q6.** Comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes et conclure.

Exercice n°5 :

On veut séparer cinq protéines de 390 acides aminés (Wt, A, B, C, D) : soit une protéine sauvage (Wt) et 4 protéines mutantes qui diffèrent entre elles par une permutation d'un acide aminé pour les 4 premières, et la perte des 50 acides aminés C-terminaux pour la dernière.

Les modifications sont les suivantes :

	Protéine Wt	Mutation
Mutant A	aa chargé négativement (résidu acide)	aa apolaire (résidu sans charge)
Mutant B	aa chargé négativement (résidu acide)	aa chargé positivement (résidu basique)
Mutant C	aa apolaire (résidu sans charge)	aa apolaire avec deux résidus CH ₃ de plus
Mutant D		suppression des 50aa C-terminaux

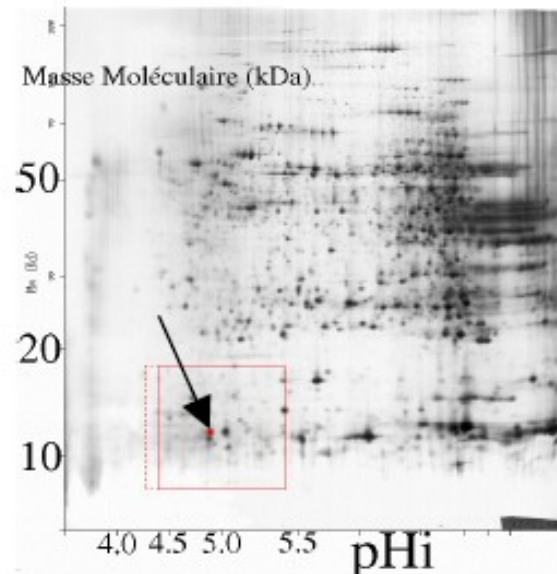
- Q1.** Expliquer les modifications (ou non) de migration de ces protéines sur une électrophorèse bidimensionnelle.
- Q2.** Montrer sur un schéma les positions respectives des protéines A, B, C, D et Wt après électrophorèse bidimensionnelle.

Exercice n°6 :**A - Gel 2D d'un extrait de foie humain**

Des chercheurs veulent savoir quelle est l'influence d'une substance toxique, sur l'expression des protéines présentes dans le foie humain.

À partir d'une biopsie d'un foie d'un patient intoxiqué, ils ont préparé un extrait qui est ensuite analysé par un gel PAGE bidimensionnel.

Une des protéines (pointée par une flèche, dans le gel ci-dessous) présente des variations importantes de son taux d'expression ; il est important de pouvoir l'identifier.



Q1. Préciser quelle était la position des électrodes pour chacune des deux dimensions.

Q2. Évaluer approximativement la masse molaire et le pH_i de la protéine pointée

B – À partir d'un morceau du gel contenant la protéine, on peut réaliser une analyse de sa composition en acides aminés par hydrolyse acide (HCl 6N, 105°C, 36 à 72h).

Le résultat de cette analyse est donné dans le tableau 1 (**pourcentage molaire**).

Amino acid (Da)	%	Amino acid	%
Ala (89)	5.4%	Leu (131)	10.1%
Arg (174)	5.4%	Lys (146)	5.4%
Asn (132)		Met (149)	0.9%
Asp (133)	12.0%	Phe (165)	2.8%
Cys (121)	0.9%	Pro (115)	5.4%
Glu (147)		Ser (105)	3.7%
Glu (147)	11.9%	Thr (119)	5.5%
Gly (75)	4.6%	Trp (204)	1.8% *
His (155)	1.8%	Tyr (181)	3.7%
Ile (131)	7.3%	Val (117)	7.3%

*Déterminé par spectrophotométrie

Tableau 1

Q3. Combien de proline sont présentes dans cette protéine?

Q4. Nommer une méthode permettant d'identifier les différents acides aminés issus d'une hydrolyse acide.

Q5. Expliquer pourquoi la concentration en tryptophane peut être déterminée par spectrophotométrie

C - En utilisant cette composition, on peut interroger une banque de données pour savoir quelles sont les protéines ayant une composition semblable chez l'espèce humaine.

Q6. Dans la liste reproduite ci-dessous, identifier en justifiant le meilleur candidat

The closest SWISS-PROT entries (in terms of AA composition) for the species *Homo sapiens sapiens* :

Protein	(pI	Mw)	Description
AKD1_HUMAN	7.14	37377	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase
CGC6_HUMAN	6.91	19458	Protein CGI-126 (Protein HSPC155).
UBCG_HUMAN	5.20	19509	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1
COXA_HUMAN	4.88	12513	Cytochrome C oxidase polypeptide Va
ABE1_HUMAN	8.63	67314	ATP-binding cassette sub-family E member
LOX5_HUMAN	5.51	77852	Arachidonate 5-lipoxygenase
PHS3_HUMAN	6.40	96696	Glycogen phosphorylase, brain form
TIE2_HUMAN	6.52	124051	Angiopoietin 1 receptor
SAD1_HUMAN	6.69	72201	SAM domain and HD domain-containing
MYOF_HUMAN	5.84	234709	Myoferlin (Fer-1 like protein 3).

Exercice n°7 : Identification de protéines de stress chez *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle

Voici un extrait d'un article de recherche :

1. INTRODUCTION

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* est une bactérie lactique homofermentaire utilisée comme ferment pour la production de yoghourts et de fromages de type suisse.

Outre sa fonction d'acidification du lait par fermentation du lactose en acide lactique, *L. bulgaricus* participe également à l'élaboration des qualités organoleptiques du produit, notamment par la production de composés aromatiques comme l'acétoïne et l'acétaldéhyde, ainsi que par la production de polysaccharides qui interviennent dans la texture des laits fermentés.

Pour *L. bulgaricus*, le pH optimal de croissance est d'environ 6, alors que le pH limite de croissance se situe autour de 3,8 en milieu MRS. L'acidification croissante du milieu impose à cette bactérie d'exprimer des mécanismes d'adaptation qui lui permettent de poursuivre sa croissance jusqu'à pH 3,8 et d'y survivre après l'arrêt de croissance.

L'acidité du milieu constitue un exemple de stress rencontré par la bactérie, notamment dans le yoghourt (environ pH 4,5) et dans l'estomac (pH < 3).

L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes de résistance aux stress chez *L. bulgaricus* et d'en identifier les composants majeurs.

Nous avons mis en évidence l'existence d'une réponse adaptative au stress acide et entrepris la caractérisation des protéines induites lors de cette adaptation par électrophorèse bidimensionnelle.

2. RÉSULTATS (extrait)

Des résultats obtenus sont présentés dans les figures suivantes :

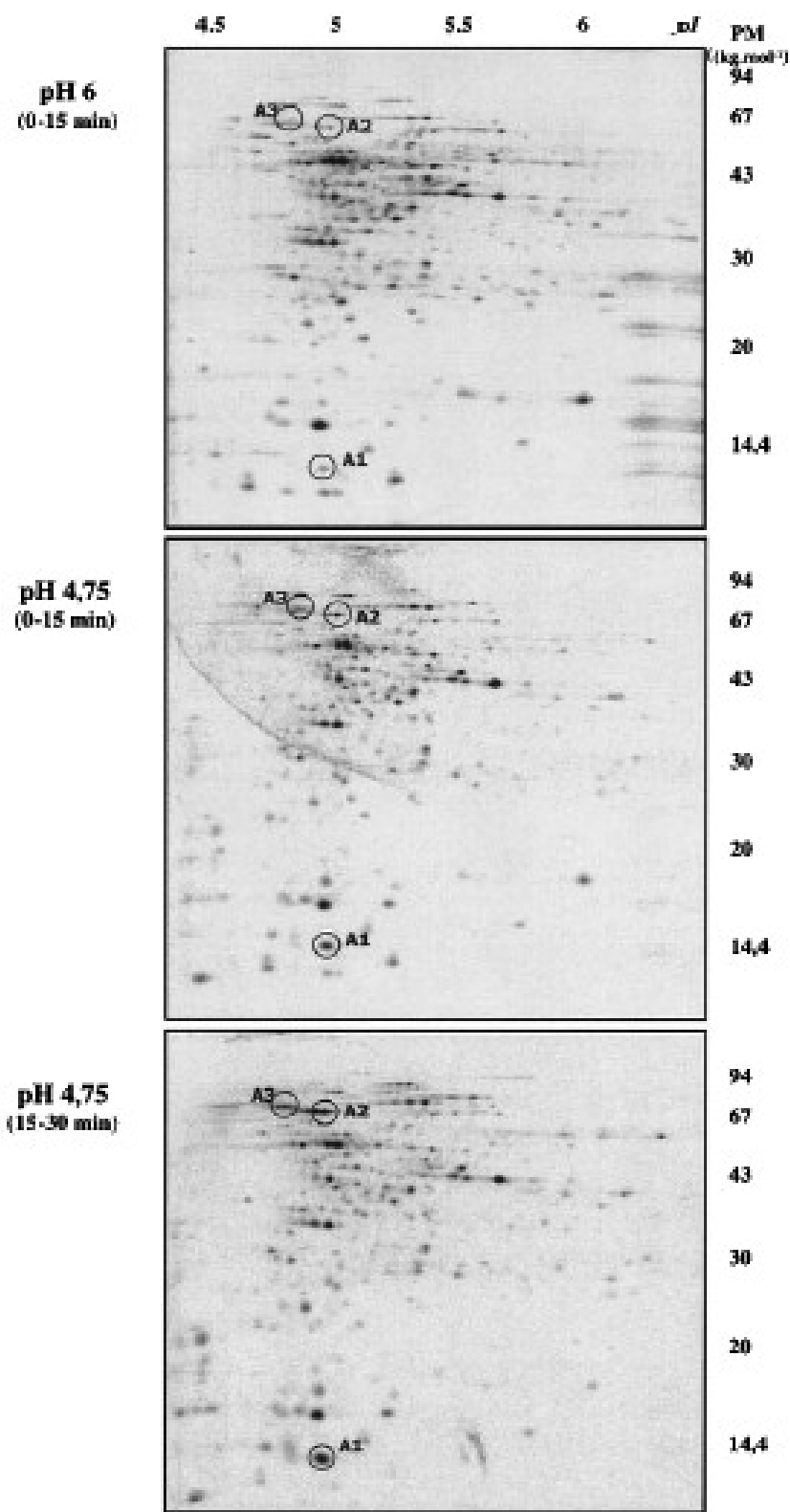


Figure 1 : Gels d'électrophorèse 2D de protéines marqués à la méthionine ^{35}S , à pH 6 de 0 à 15 minutes et à pH 4,75 de 0 à 15 minutes et de 15 à 30 minutes. Les 3 spots fortement induits à pH 4,75 sont entourés d'un cercle.

Tableau 1 : Caractérisation des trois protéines induites à pH 4,75

Spot	pI ^a	PM (kg·mol ⁻¹) ^a	Séquence N-ter.	Protéine homologue ^b
A1	4,9	10	MLQPIGD	GroES <i>Lactobacillus helveticus</i>
A2	4,9	57	AKDIKFSED	GroEL <i>Bacillus</i> sp.
A3	4,75	67	XXVIGIDLG	DnaK <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

^a Estimation sur gel.

^b Protéine 100 % identique dans la région N-terminale.

- Q1.** Rechercher sur internet le rôle de la méthionine ³⁵S.
- Q2.** Par des recherches sur internet, identifier la technique utilisée dans ce cas pour révéler le gel, et en donner son principe.
- Q3.** Analyser la figure 1 (on précisera en particulier quelle est la caractéristique des protéines présentes au niveau des spots A1, A2 et A3).