

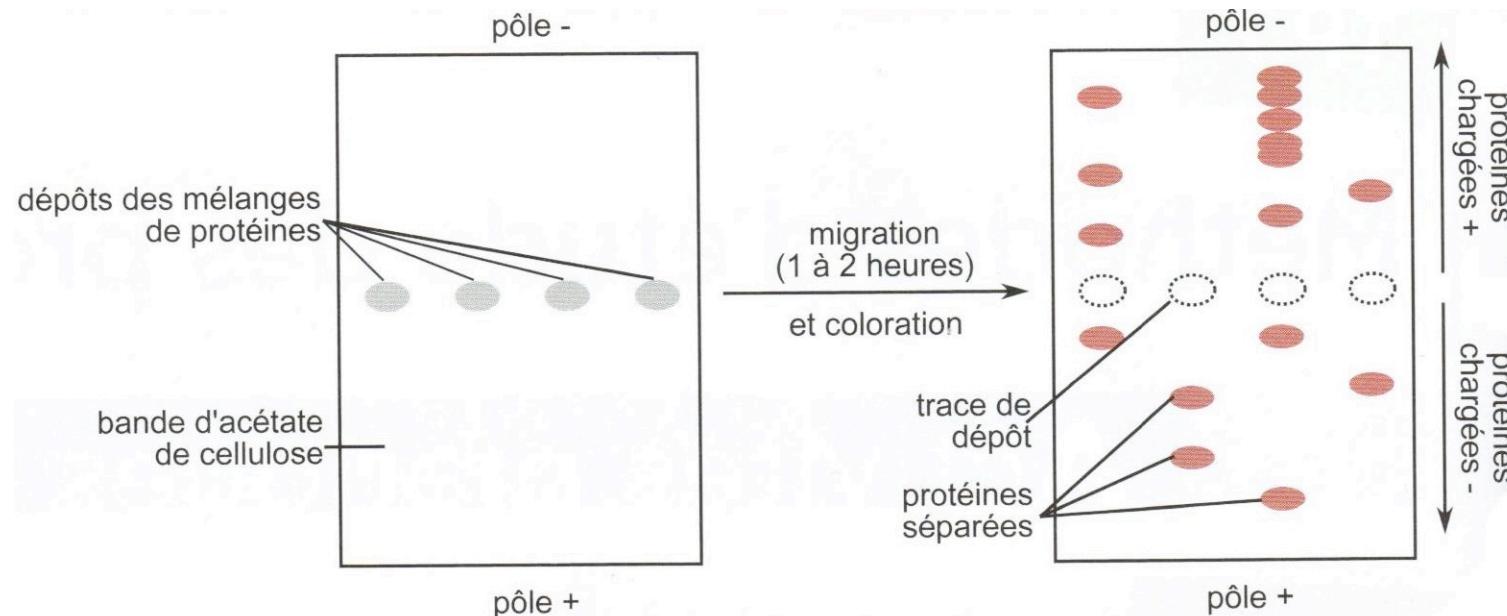
TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES

SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESES

Principe général des électrophorèses : ce sont des techniques de séparation de différentes molécules par l'**application d'un champ électrique** qui entraîne le déplacement des **molécules chargées** dans un support. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la **vitesse de migration** va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules

- **Electrophorèse en conditions natives**

Sépare les protéines principalement selon le critère de la **charge** (la masse intervient aussi mais dans une moindre mesure).



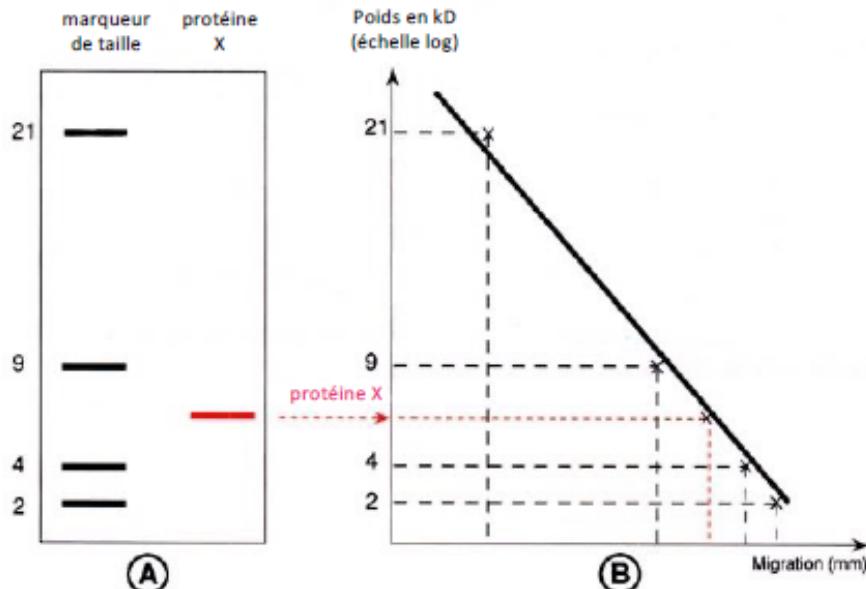
A retenir : l'électrophorèse de protéines en conditions natives sépare les protéines en fonction de leur charge.

• Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

Ce type d'électrophorèse des protéines se réalise dans un gel de polyacrylamide (PAGE) (voire dans un gel d'agarose en TP) : ce gel est constitué de polymères d'acrylamide (ou d'agarose) organisés en réseau. Ces molécules créent une sorte de maillage fin, au travers duquel les protéines migreront d'autant plus difficilement qu'elles sont volumineuses.

Les protéines sont au préalable dénaturées par traitement à la chaleur (rupture des liaisons faibles), au β mercapto-éthanol (rupture des ponts-disulfure) et au SDS (sodium dodecyl-sulfate, détergent anionique qui s'associe à la protéine en la recouvrant).

Dénaturées et uniformément chargées, les protéines migrent uniquement en fonction de la longueur de leur chaîne polypeptidique, c'est-à-dire en fonction de leur **masse molaire**. La distance de migration est inversement proportionnelle au logarithme de la masse molaire (d'où l'utilisation du papier semi-log pour quantifier précisément la masse molaire de protéines séparées par électrophorèse).



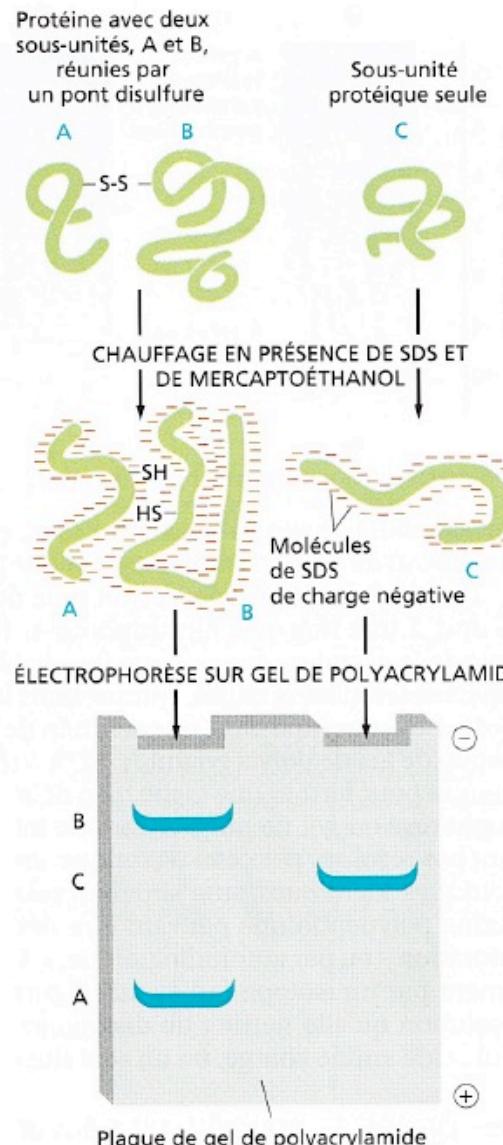
la masse des protéines et leur distance de migration suit une loi de type:

$$\log (\text{masse}) = A - B(\text{distance de migration})$$

Cette technique permet également **d'identifier les protomères** lorsqu'il y a une **structure quaternaire (IV)**, puisque les sous-unités sont désolidarisées par le traitement dénaturant :

- Si la protéine est constituée de **n protomères identiques** : une seule bande, mais dont la masse molaire est égale à la masse molaire de la protéine complète divisée par n
- Si la protéine est constituée de **protomères différents** : plusieurs bandes (cas AB sur le schéma)

A retenir : l'électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sépare les protéines en fonction de leur masse, les petites protéines migrant le plus loin. Cette technique sépare également les sous unités (=protomères) d'une protéine en structure IV.



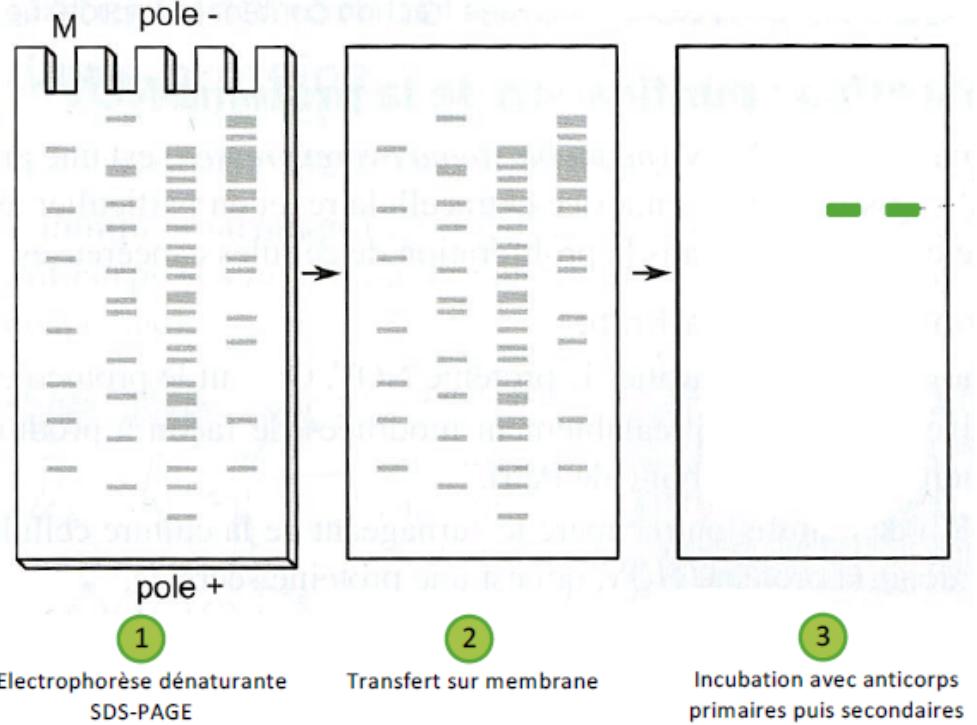
REVELATION SPECIFIQUE DE PROTEINES : WESTERN BLOT

Le Western blot est une technique complémentaire de l'électrophorèse des protéines.

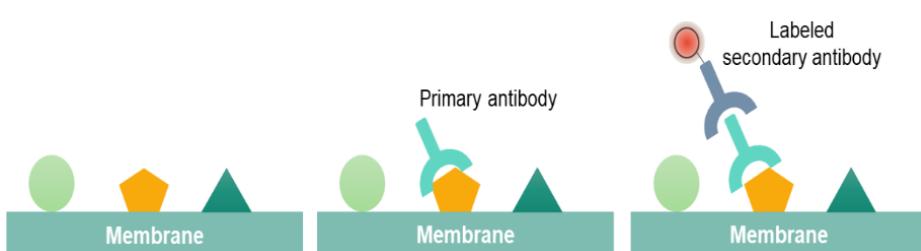
Après électrophorèse dans un gel de polyacrylamide, les **protéines** sont transférées sur une **membrane** grâce à l'application d'un champ électrique. La membrane obtenue est l'exacte réplique du gel de polyacrylamide après migration.

Cette membrane est ensuite incubée avec des **anticorps** ciblant une protéine recherchée. L'anticorps utilisé peut être **marqué** par un fluorochrome, par un isotope radioactif ou lié à une enzyme dont la réaction avec son substrat produit une substance colorée. On peut ainsi révéler la présence d'une protéine particulière.

En parallèle, on réalise pour le même dépôt le marquage d'une protéine constitutivement exprimée dans la cellule (protéine du cytosquelette comme actine ou tubuline, protéine chaperonne, enzyme de glycolyse ...) afin de s'assurer que la même quantité de protéines a été déposée dans chaque puits de l'électrophorèse. Il s'agit d'un **témoin de charge**, indispensable pour vérifier que les puits ont été correctement chargés.



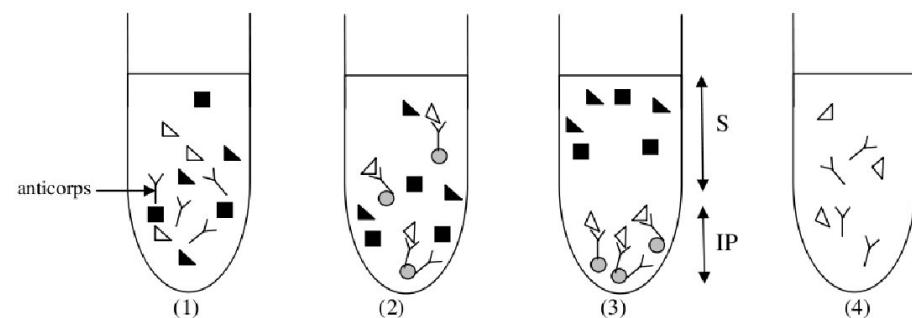
Remarque: sur le gel 1 et sur la membrane 2, aucune protéine n'est visible à l'œil (puisque pas de coloration). Les bandes grises représentent la localisation des protéines (présentes mais non visibles). Sur la membrane 3, seules les protéines X apparaissent, car c'est l'endroit où les anticorps secondaires (qui ont le fluorochrome) sont fixés.



MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS ENTRE PROTEINES : COIMMUNOPRECIPITATION

La technique de coimmunoprecipitation consiste à mélanger des protéines choisies puis à les incuber en présence d'un anticorps spécifique de l'une des protéines.

Ces anticorps sont ensuite liés de façon covalente à un support solide (billes grises). Le complexe antigène-anticorps, lié au support solide, est ensuite séparé par centrifugation du surnageant (S) : ce complexe antigène-anticorps forme l'**immunoprécipité** (IP). L'IP est ensuite lavé, le support solide est décroché et le complexe antigène-anticorps dissocié ; les protéines peuvent ensuite être identifiées.



SEPARATION DE PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIES

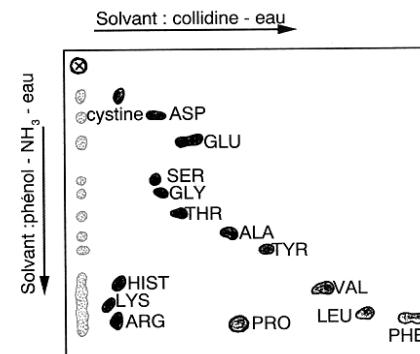
Principe général de la chromatographie : La chromatographie repose sur l'**entraînement différentiel** des constituants d'un mélange par une phase mobile (= **éluant**), le long d'une phase stationnaire (= **phase fixe**).

La technique de **chromatographie sur papier** s'applique aussi aux protéines, et permet de séparer efficacement des acides aminés et des oligopeptides.

Lorsque des molécules ont des profils de migration superposés en une dimension, on peut effectuer une chromatographie dans les **2 dimensions** pour les séparer plus finement.

On utilise alors deux solvants différents :

- Première chromatographie dans une direction avec un premier solvant
- Deuxième chromatographie en tournant la feuille de 90° avec un deuxième solvant.



Séparation d'un mélange d'acides aminés issus de l'hydrolyse d'une protéine. Point de dépôt : en haut à gauche.

Chromatographie sur colonne :

L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne contenant une **matrice solide poreuse = phase stationnaire** (ex : microbilles de cellulose) immergée dans un solvant. Du **solvant (phase mobile)** est continuellement ajouté au sommet de la colonne, l'éluant est collecté dans des tubes à essais en bas de colonne (fractions d'élution). Les **divers composants de l'échantillon** sont **plus ou moins retenus sur la phase stationnaire** en fonction de leur charge, de leur taille ou de leur affinité pour un substrat : les composants se déplacent donc à des vitesses différentes dans la colonne et sont ainsi fractionnés.

Quelques exemples de chromatographies :

- **Chromatographie par filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion**

Les microbilles placées dans la colonne sont poreuses. Les petites protéines pourront passer par l'intérieur de ces microbilles tandis que les grosses protéines sont exclues des billes et passeront plus rapidement à travers la colonne. Les protéines récupérées dans les premiers extraits sont celles de plus grosse masse, et on récupère progressivement les différentes protéines du mélange par masse molaire décroissante.

- **Chromatographie par échange d'ions**

Les microbilles utilisées sont chargées +.

Les protéines ou acides aminés sont mis au contact des billes dans un tampon de très haut pH, dans lequel ils sont chargés : les protéines ou acides aminés 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 ou acides aminés sont progressivement élusés en fonction de leur pHi.

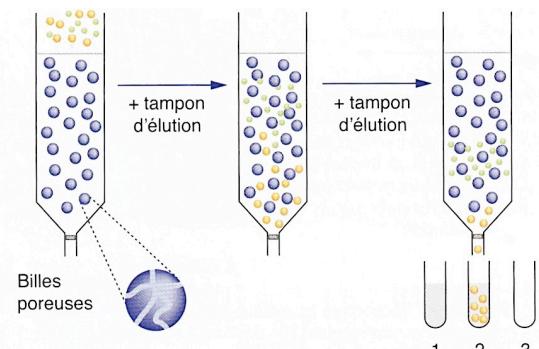
Les différents extraits récupérés contiennent donc des protéines différentes aux différents pHi.

- **Chromatographie d'affinité**

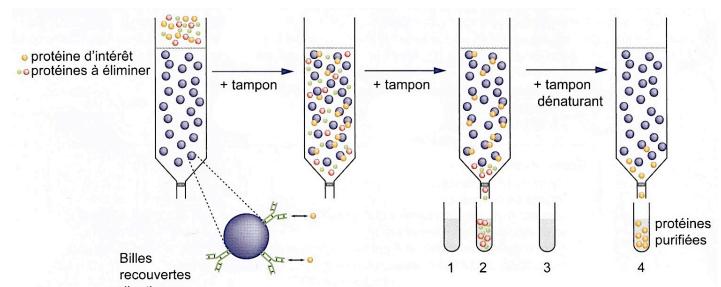
Les microbilles utilisées sont recouvertes d'une molécule « ligand » (substrat d'une enzyme, anticorps, récepteur). Les protéines interagissant avec le ligand sont retenues dans la colonne.

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 (haute salinité ou pH différent) qui décroche les protéines.

Rq : La **méthode d'HPLC** (chromatographie liquide à haute performance) consiste à faire passer la phase mobile sur la colonne avec de fortes pressions. Cette méthode, rapide et sensible, permet d'augmenter le pouvoir de séparation par rapport à d'autres techniques de chromatographie



Chromatographie par filtration sur gel



Chromatographie d'affinité

LOCALISER DES PROTEINES PAR IMMUNOMARQUAGE

Principe général de l'immunomarquage : localisation d'un déterminant antigénique (souvent une **protéine**) au moyen de l'exposition d'une coupe à un **anticorps spécifique**, couplé directement ou indirectement à un marqueur (fluorochrome, ou enzyme détectable par un substrat à l'origine d'un produit coloré).

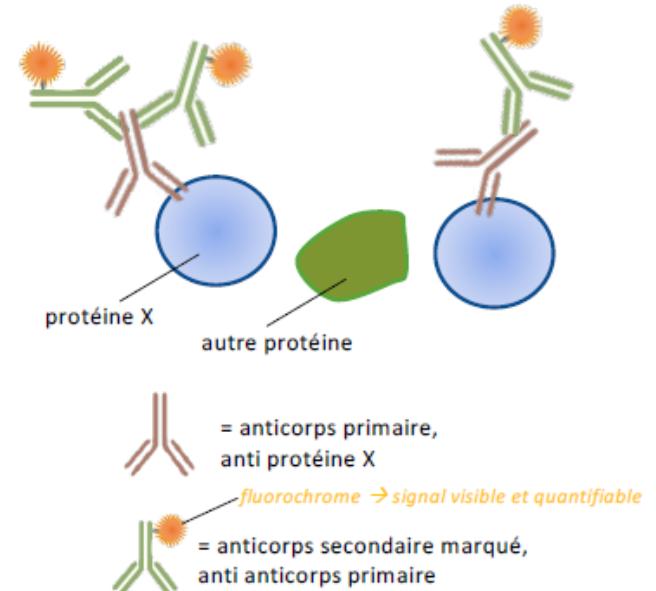
Le tissu sur lequel on cherche à déterminer la localisation de la protéine X est placé dans une solution contenant les anticorps anti-X.

Les anticorps anti-X se fixent sur les protéines X présentes dans le tissu ; le tissu est rincé pour éliminer les anticorps non fixés.

On ajoute des anticorps anti-lapin (qui reconnaissent la partie constante des anticorps de lapin à la préparation précédente (= le tissu où sont fixés des anticorps anti-X)).

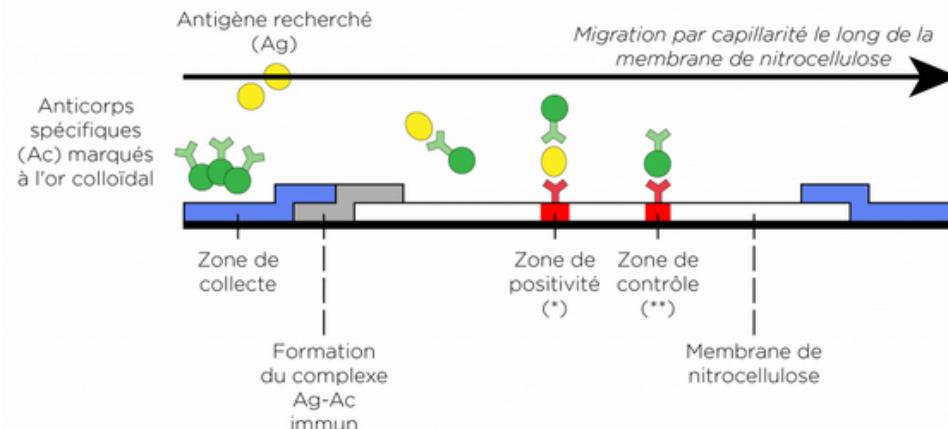
Les anticorps anti-anti-X se fixent sur les anticorps anti-X.

On rince à nouveau pour éliminer les anticorps anti-anti-X non fixés, et on observe le tissu au microscope à fluorescence pour détecter et localiser les anticorps anti-anti-X (eux-mêmes fixés aux anticorps anti-X, eux-mêmes fixés aux protéines X).



Ce principe est utilisé dans les tests antigéniques (test de grossesse, test Covid) : il s'agit d'un test d'immunochromatographie.

Pour information :



(*) Capture du complexe Ag-Ac par un 2ème Ac spécifique et formation d'une première ligne rouge

(**) Capture de l'excédent d'Ac marqués à l'or colloïdal et formation d'une seconde ligne rouge