

Méthodes d'étude des protéines

Contenu de la matière :

1. Méthodes d'extraction et de purification
2. Méthodes de dosage
3. Méthodes d'études structurales
4. Méthodes d'étude des enzymes
 - 4.1. Dosage de l'activité enzymatique
 - 4.2. Cinétique enzymatique et inhibition

Introduction générale :

Les protéines sont des biomolécules de première importance :

- par leur présence universelle dans le monde vivant, seuls des viroïdes en sont dépourvus
- par leur abondance cellulaire : c'est le premier constituant après l'eau (10 fois plus que des glucides).
- par leur extrême diversité : elles assurent des fonctions vitales tant structurales que dynamiques et de plus elles sont le support de la spécificité des "espèces".

I. Extraction et purification des protéines

L'extraction des protéines est un moyen efficace pour séparer et récupérer les protéines des autres constituants non protéiques dans les produits initiales pour avoir une mixture homogène et riche en protéines. Ces mixtures contiennent en général un taux de protéine plus élevé par rapport à leurs matières initiales. Pour isoler une certaine protéine dans cette mixture, on applique une méthode dite la purification de protéines. L'objectif de l'extraction et de la purification des protéines est de faciliter leur étude.

A. Extraction :

Il ya deux types de protéines : - des protéines sécrétoire (libre), ne nécessitent pas une extraction –des protéines liées : elles nécessitent une extraction car elles se trouvent à l'intérieur des cellules.

Techniques d'extraction (homogénéisation)

- L'extraction consiste à brisé le matériel biologique en question pour libérer les substances ou les structures désirées.
- Il s'agit d'une étape initiale à beaucoup de procédures expérimentales qui s'appelle l'homogénéisation. Celle-ci est obtenue par 2 types de traitements:

a. Extraction par lyse chimique et enzymatique :

- Lyse osmotique :

Le choc osmotique permet de briser certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. En créant par dilution une **hypotonicité** du milieu, on provoque l'éclatement des cellules. . On peut donner un coup de pouce à la technique avec un peu de détergent et avec un soutien mécanique.

- Modification de la force ionique (pH) :

En ajoutant des ions au milieu (en modifiant le pH), les membranes de certains types de cellules, deviennent plus perméables aux constituants du milieu et modifier ainsi l'équilibre du cytoplasme. Ceci entraînera une rupture de la membrane plasmique.

- Utilisation de détergents :

Les détergents sont capables de désorganiser les lipides membranaires. Ils affaiblissent de ce fait les interactions entre les différents constituants de la membrane.

- Enzymes lytiques :

Avec les levures, les plantes, les bactéries, il faut tenir compte de la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique. Si on n'opte pas pour une méthode mécanique et violente d'extraction, il faudra d'abord détruire cette paroi avant de s'en prendre au reste de la cellule.

Différents enzymes comme le lysozyme (du blanc d'oeuf de poule, par exemple) ou la lyticase de *S.aureus* sont disponibles pour s'occuper de cette tâche; il suffit de choisir la plus approprié.

b. Extraction par traitement mécaniques

Le broyage mécanique se fait à l'aide d'homogénéiseur ou de polybroyeurs de plusieurs sortes.

- **Broyeurs mécaniques**

- **Broyeurs** : Ultraturax et Polytron : un couteau tourne à grande vitesse dans un bol
- **Homogénéiseurs** : Potter, Dounce : En faisant tourner et descendre rapidement le piston dans le bol, on force les cellules à passer dans l'espace libre entre le piston et la paroi du bol. Par cisaillement, les membranes cellulaires s'ouvrent et libèrent les organites.

Suivant la taille des cellules, on utilise des Potter de "clearance" différentes. La "clearance" est l'espace compris entre le piston et la paroi du bol

- **Homogénéiseurs à gaz :**

Elle consiste en une chambre pressurisée dans laquelle les cellules sont traitées avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. On libère alors la pression tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclater. *L'intérêt de la technique est le fait que l'on travaille sous une atmosphère inerte ce qui élimine les risques de réactions d'oxydation, on ne provoque pas d'échauffement et les organites cytoplasmiques sont préservés.*

- **La presse Aminco- French**

La suspension de cellules est versée dans le cylindre. Le piston est installé, obstruant le trou, et une puissante vis sans fin commence à l'enfoncer dans le cylindre. Comme il n'y a que peu d'air dans le cylindre et qu'un liquide est incompressible, l'enfoncement du piston fait très rapidement grimper la pression sur les parois du cylindre. Quand on ouvre légèrement la valve, la suspension de cellules est éjectée comme de l'eau qu'on fait passer entre ses dents et les cellules sont déchiquetées. Plus la pression est haute dans le cylindre, plus totale est la lyse.

- **Sonication :**

On soumet les cellules à une source d'ultrasons. Les ultrasons sont générés par un "transducteur" en céramique, c'est un organe qui transforme l'énergie électrique en énergie ultrasonique.

Le mouvement des ultrasons est transmis au liquide par une "sonde" en titane qui provoque une alternance de compressions et décompressions dans le liquide (vibration violentes).

Les ultrasons déstructurent très efficacement les cellules. L'inconvénient de la méthode est une élévation de température de l'échantillon qui peut détruire les protéines.

B. Purification des protéines :

Une fois les protéines en solution, il est tout d'abord nécessaire de les purifier afin d'éliminer les impuretés, puis de les concentrer en éliminant l'eau en excès. Ces opérations sont parfois suivies par un fractionnement des protéines pour isoler une protéine d'intérêt.

Les techniques de séparation utilisent différents aspects physico-chimiques des protéines, telles que leur charge (chromatographie d'échange d'ions), leur masse (filtration sur gel, gradients de densité) et leur solubilité (précipitation différentielle au sulfate d'ammonium).

1- Centrifugation :

Plusieurs types de centrifugation peuvent être mis en œuvre pour la séparation :

Centrifugation différentielle en milieu homogène

Les particules migrent d'autant plus vite que leur taille est plus grande, à condition qu'elles soient toutes à peu près sphériques.

On utilise fréquemment cette technique car sa mise en œuvre est assez simple : on centrifugé un homogénat à différentes vitesses et pendant des temps différents pour séparer les particules lourdes (dans le culot) des particules légères (dans le surnageant).

Centrifugation sur gradient de densité

Quelle que soit l'accélération, si la particule a la même masse volumique que le solvant, elle ne se déplacera pas dans le tube d'ultracentrifugation. Si le tube contient un gradient de densité, les particules s'arrêteront de migrer lorsqu'elles atteindront la zone de densité égale à leur propre densité. C'est le principe de la centrifugation **isopycnique** (à l'équilibre de densité).

Si le milieu contenu dans le tube est constitué par des couches superposées de densités croissantes, on parle de gradient de **densité discontinu**.

Si la densité du milieu croît de façon continue, on a un **gradient continu** de densité.

2- Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution (au contraire du NaCl, dont la solubilisation est exothermique) il ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

3- Dialyse :

La méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse. Dans une dialyse, les protéines dans une concentration de sels donnée sont séparées d'une solution à la concentration en sels différente par une membrane poreuse. Les pores de cette membrane peuvent avoir différentes tailles; certaines membranes ne laisseront passer que des ions alors que d'autres laisseront même passer de petites protéines (jusqu'à des poids moléculaires de 50 000 Da).

Afin d'accélérer le processus, il vaut mieux changer souvent le tampon de dialyse.

La vitesse de dialyse dépend beaucoup de la quantité de matériel à dialyser et de la viscosité des solutions.

Notez que l'eau sera la première à diffuser: il n'est pas rare de voir un sac de dialyse gonfler progressivement alors que l'eau y pénètre pour en réduire la concentration en solutés. Attention aux éclatements.

4- Chromatographie sur colonne :

Technique qui tend à séparer des molécules d'un mélange en fonction de leur différence d'adsorption (d'affinité, ou de solubilité) entre une phase stationnaire (immobile) et une phase mobile (qui les entraîne).

La chromatographie sur colonne est une méthode importante pour la séparation d'un produit contenant des impuretés.

a. Filtration sur gel :

- Il s'agit ici d'une séparation de protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire.
- Méthode fondée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans les pores de la phase stationnaire.
- La séparation des molécules s'effectue donc en fonction de leur taille et de leur forme

- Les molécules sont entraînées par la phase mobile à travers la phase stationnaire constituée d'un gel poreux.

La forme d'une colonne de filtration devrait être étroite et longue pour une meilleure séparation.

La filtration sur gel se fait avec un tampon dont la nature ne change pas pendant la séparation, à l'inverse de ce qui se passe dans une chromatographie d'échange d'ions. Les protéines assemblées en complexes macromoléculaires (comme par exemple les ARN polymérase, qui comptent un grand nombre de sous-unités) ont donc plus de chances de rester assemblées, puisqu'on n'interfère pas avec les interactions entre les différentes sous-unités.

b. Échange d'ions

Dans une colonne à échange d'ions, les protéines collent par affinité électrostatique à des groupements chargés de la résine. Une résine portant des groupements positifs est dite "échangeuse d'anions", parce que des ions négatifs ou les groupements acides d'une protéine peuvent interagir avec elle. Une résine portant des groupements négatifs est dite "échangeuse de cations" parce que ce sont des cations ou les groupements basiques d'une protéine qui interagissent avec elle.

Comme on veut favoriser l'interaction de la protéine avec la résine choisie, on aura avantage à jouer avec le pH de la solution tampon qui circule dans la colonne. Pour une résine échangeuse de, on voudra optimiser la charge *positive* de la protéine et donc travailler à un pH plus bas, histoire de bien former des groupements -NH_3^+ et -COOH plutôt que -NH_2 et -COO^- . Un tampon à pH acide serait approprié. À l'inverse, pour une résine échangeuse d'anions, on utilisera plutôt un tampon basique, favoriser la formation de groupements COO^- et de réduire la présence de groupements NH_3^+ .

Il existe une très grande variété de résines échangeuses d'ions, variant les groupes chargés comme la nature des supports solides

c. Interactions hydrophobes

En solution, les protéines à caractère hydrophobe cherchent davantage à s'associer entre elles qu'à s'hydrater avec les molécules d'eau.

Des résines portant des groupements hydrophobiques (cycliques ou aliphatiques) permettent de retenir de telles protéines sur une colonne. À l'inverse de ce qui se passe sur une colonne de chromatographie par échange d'ions, une colonne de chromatographie d'interaction

hydrophobe est chargée à haute force ionique (qui favorise les interactions hydrophobes) et est éluée avec un gradient de sel décroissant. Grâce à cela, on peut faire passer un échantillon élué (avec une haute concentration en sel) d'une colonne d'échange d'ions directement sur une colonne d'interaction hydrophobe, sans avoir à dialyser ou diluer.

Les résines les plus utilisées pour ce type de chromatographie sont l'octyl- et le phényl-sépharose.

d. Chromatographie d'affinité

Dans une telle technique, on a recours à l'affinité de certaines molécules pour d'autres. On pourra ainsi fixer des anticorps sur une matrice solide dans une colonne (Protéine A-sépharose, par exemple) et faire passer notre échantillon sur la colonne pour y attraper les protéines reconnues par l'anticorps.

On a souvent recours à des colonnes dont la matrice porte des fragments spécifiques d'ADN pour aller pêcher les protéines liant l'ADN. Le bromure de cyanogène (CNBr) est l'un des réactifs utilisés pour coupler ainsi une cible à la matrice d'une colonne.

Plusieurs protéines de fusion ont des étiquettes permettant de reconnaître et de fixer des résines spécialement adaptées. Une telle étiquette est la glutathione-S-transférase, qui permet à la protéine à laquelle elle est fusionnée de se fixer sur une résine de glutathione-sépharose. La *chitin-binding-protein* (CBP) fait la même chose pour une résine couplée à de la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine.

Les lectines comme l'agglutinine de germe de blé (WGA, pour *wheat germ agglutinin*) ont la très utile capacité de permettre l'adsorption de protéines glycosylées. Le WGA lie le N-acétylglucosamine; la concanavalin A (Con A) lie le mannose et le glucose.

Puisque la chromatographie d'affinité repose sur l'interaction entre deux ou plusieurs molécules, on devine que seule l'imagination limite ses possibilités de combinaison. Il suffit de disposer de deux substances qui ont de l'affinité l'une pour l'autre et d'en fixer une sur un support solide.

5- L'électrophorèse sur gel :

Pour pouvoir purifier et identifier les protéines selon leurs poids moléculaires, on peut utiliser l'électrophorèse. L'électrophorèse est la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique.

a. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Le SDS (Sodium DocéylSulfate) dénature les protéines et les charge négativement
 SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Legelvaralentirlamigrationdesgrossesmolécules:séparationdesmoléculesenfonctiondeleurmasse, les petites migrent plus loin dans le gel (plus près de l'anode).

b. Focalisation isoélectrique :

IEF, de l'anglais isoelectric focusing ou electrofocusing, est une technique de séparation des molécules ; elle a des applications autant préparatoires qu'analytiques. Elle est principalement utilisée dans le domaine de la biochimie. Elle sert essentiellement à séparer les protéines les unes des autres en fonction de leur point isoélectrique unique.

c. Électrophorèse bidimensionnelle :

Un gel de polyacrylamide sur lequel a été réalisé une isoélectrofocalisation (IEF) est déposé au-dessus d'un gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). Les protéines sont ainsi séparées dans la première dimension en fonction de leur pHi et dans la deuxième dimension en fonction de leur PM.

Figures et illustrations :

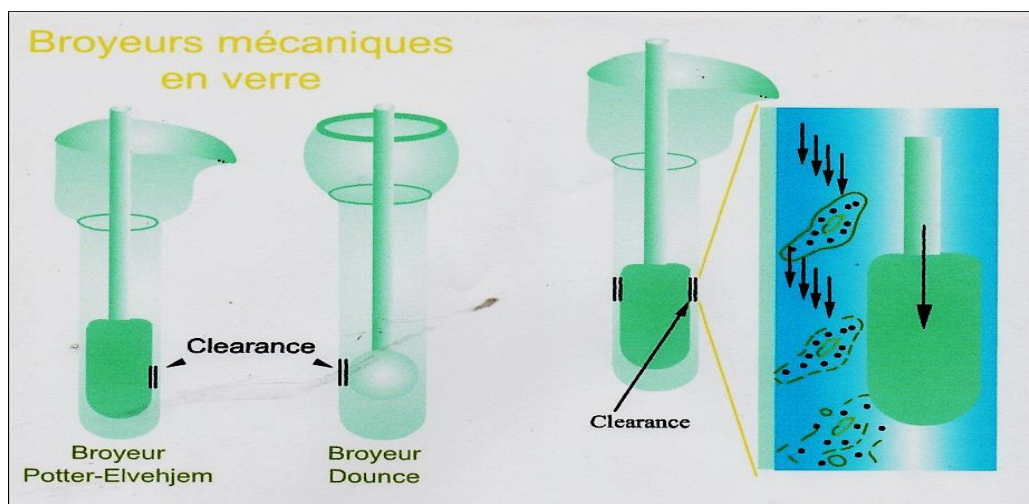


Figure 1 : Homogénéiseurs : Potter, Dounce

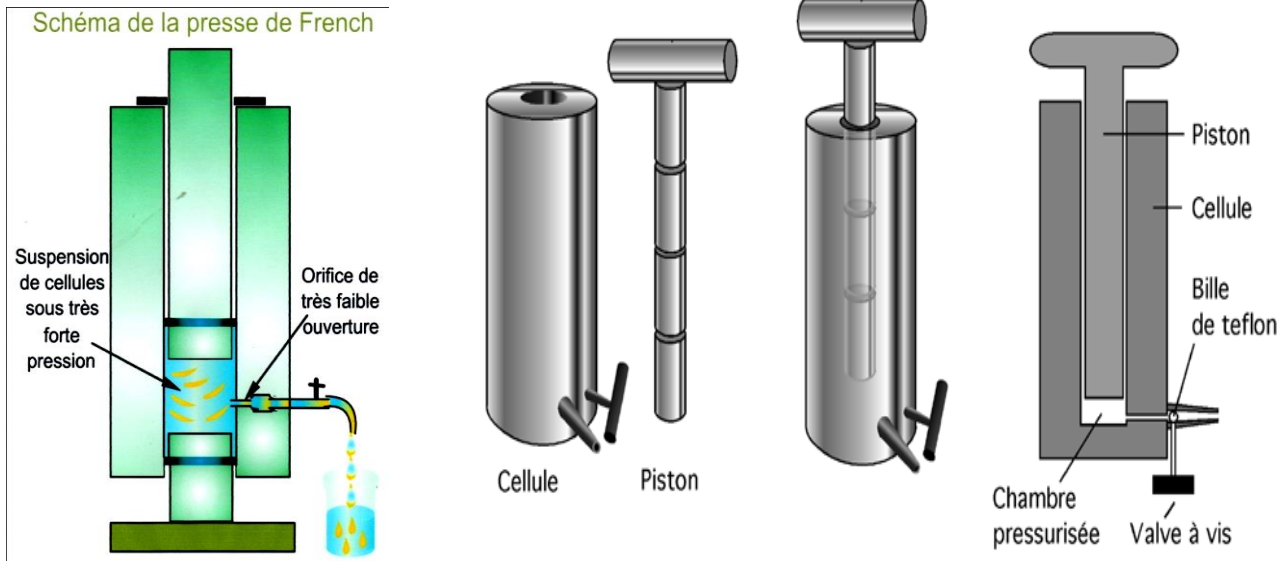


Figure 2 : La presse Aminco- French

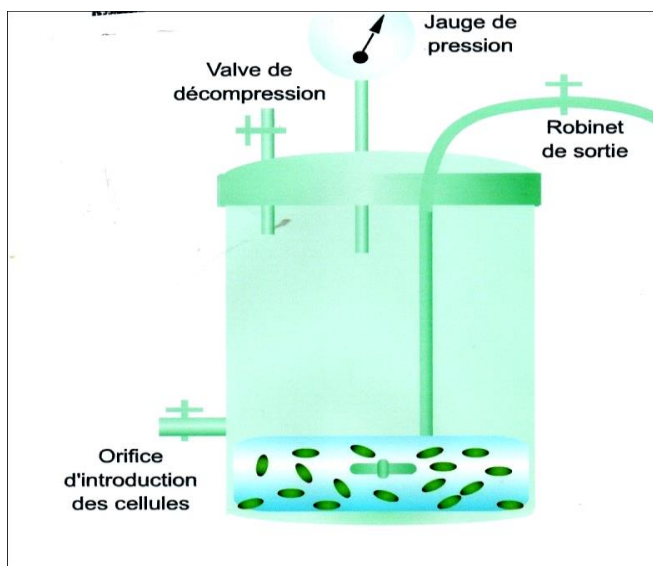


Figure 3 : Homogénéiseurs à gaz

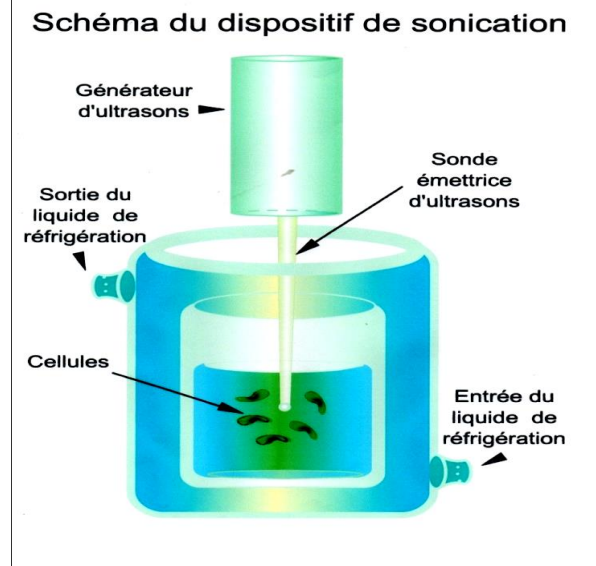
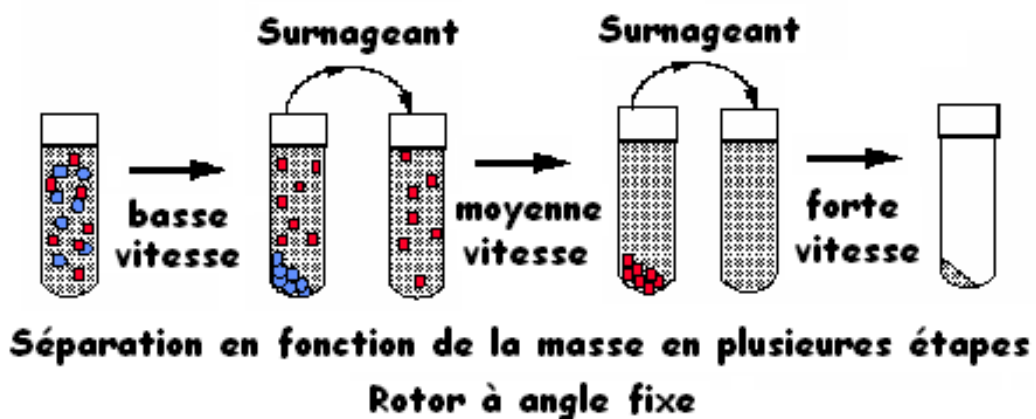


Figure 4 : Sonicateur

Centrifugation différentielle



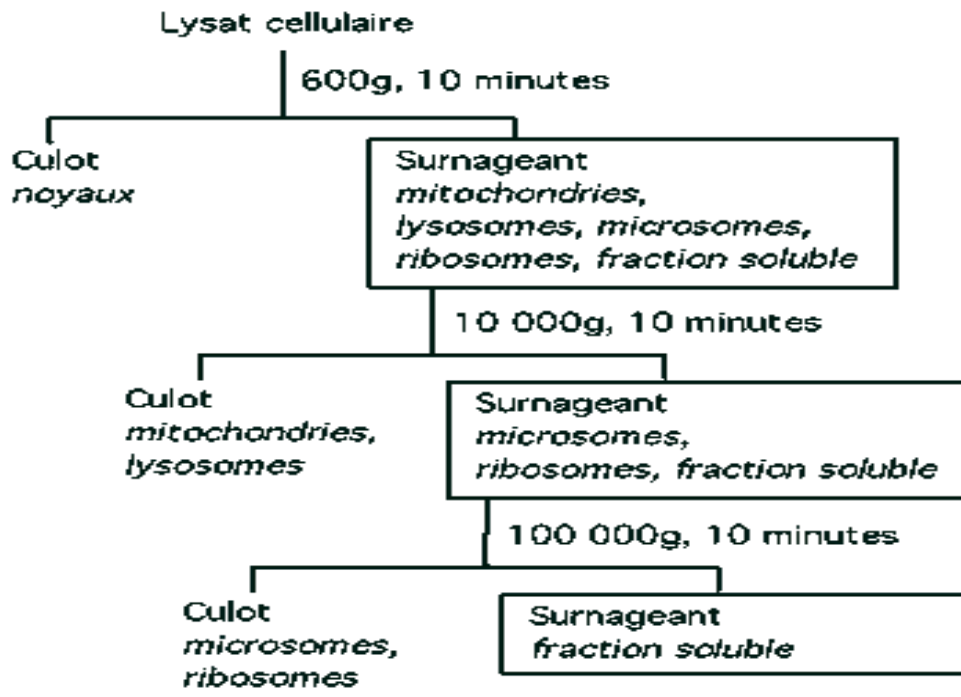


Figure 5 : Centrifugation différentielle en milieu homogène

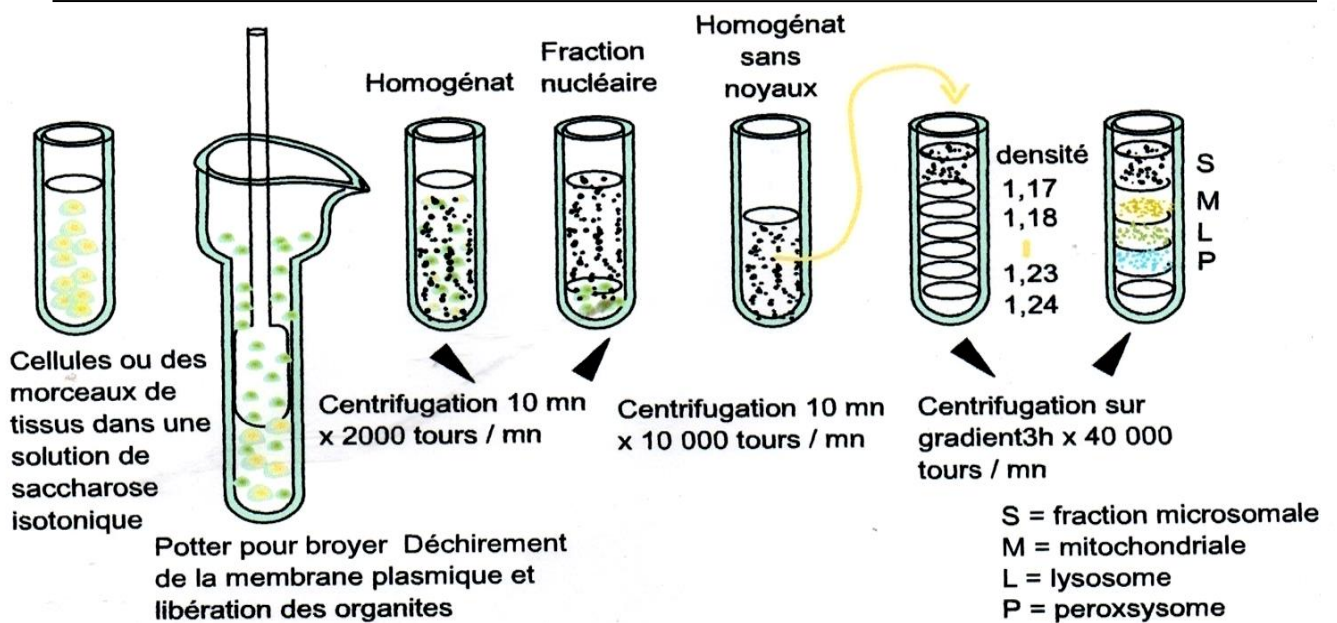


Figure 6 : Centrifugation sur gradient de densité

Tableau 1 : Propriétés des protéines et Techniques de purification :

| Paramètre | Technique |
|-----------------|--|
| Taille | Filtration sur gel |
| Solubilité | Précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium |
| Charge | Chromatographie d'échange d'ions |
| Densité | Centrifugation sur gradient; ultracentrifugation |
| Hydrophobicité | Chromatographie en phase inverse |
| Marqueur ajouté | Chromatographie d'affinité |

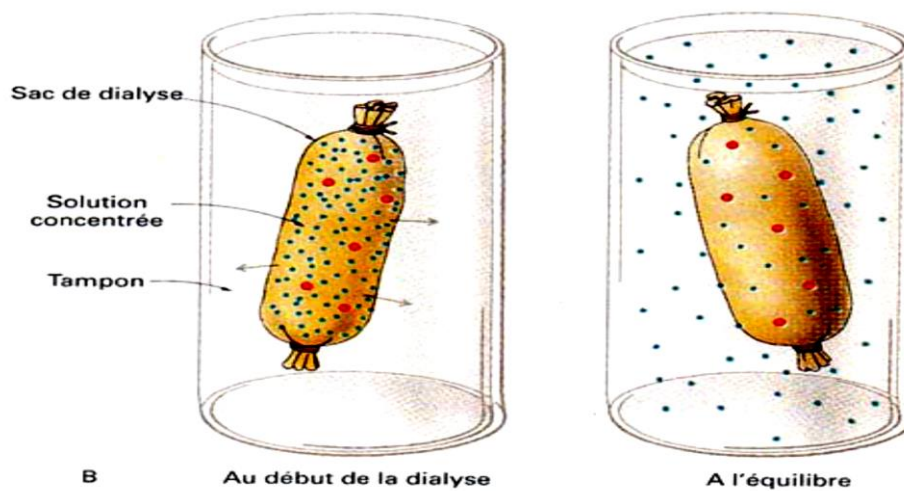
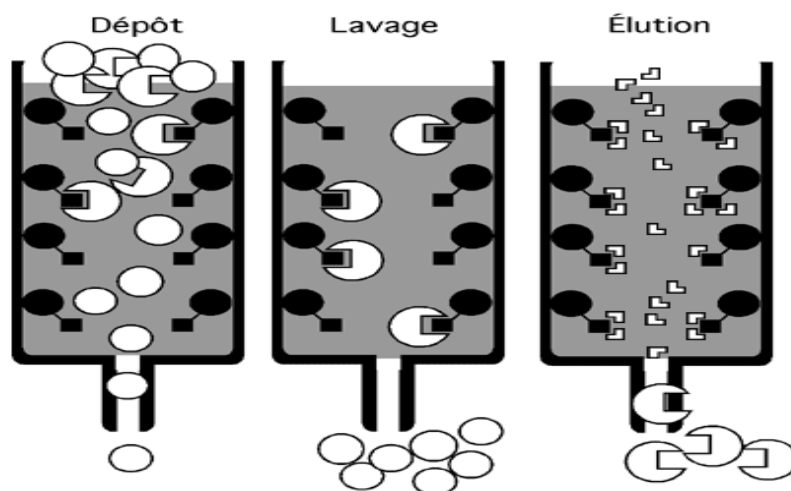
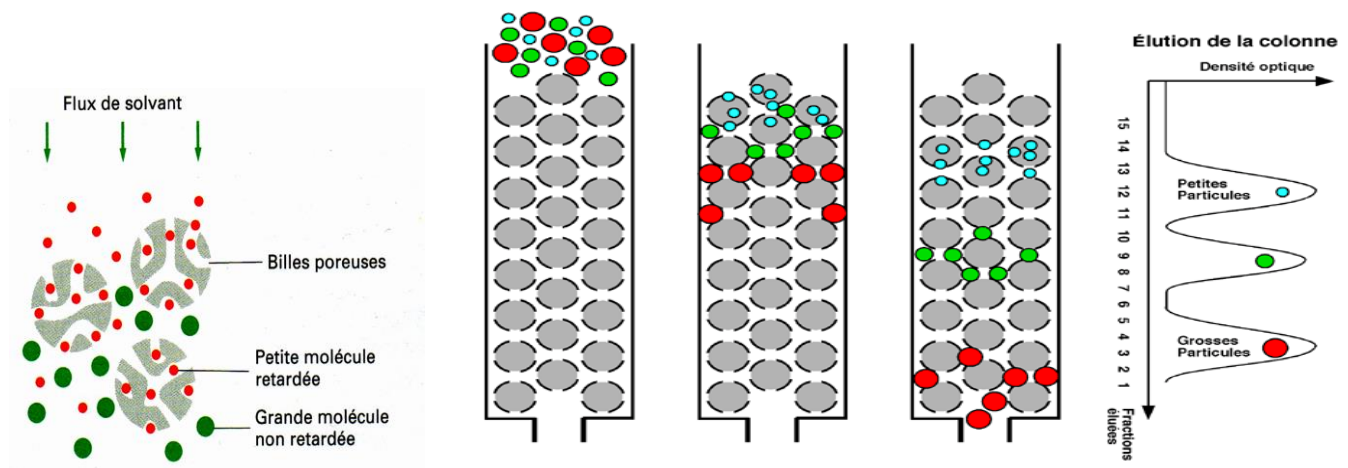


Figure7 : La dialyse

Chromatographie d'affinité :

Chromatographie par exclusion de taille (gel-filtration) :



Nom de la résine

type dextran

Sephadex G-10

Sephadex G-25

Sephadex G-75

Sephadex G-200

type polyacrylamide

Bio-gel P2

Bio-gel P6

Bio-gel P-150

Bio-gel P-300

type agarose

Sepharose 2B

Sepharose 4B

Bio-gel A-0,5M

Bio-gel A-15M

Bio-gel A-150M

Capacité de fractionnement (en Da)

700

1 000- 5 000

3 000- 70 000

5 000- 800 000

200- 2 000

1 000- 6 000

15 000- 150 000

60 000- 400 000

2 000 000- 25 000 000

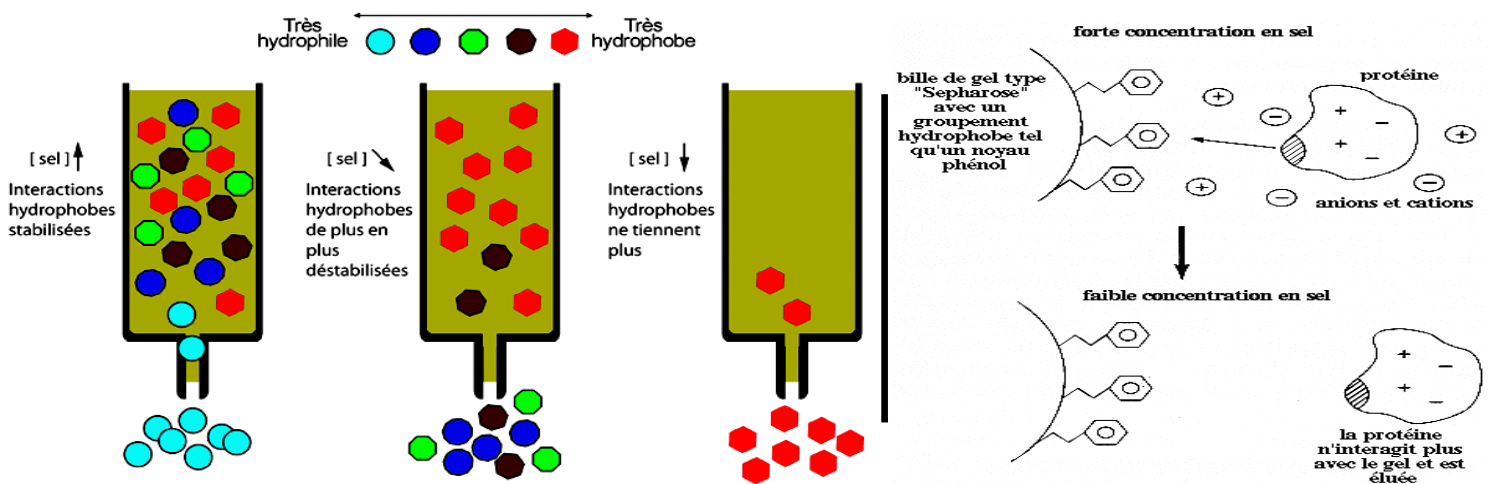
300 000- 3 000 000

30 000- 500 000

30 000- 15 000 000

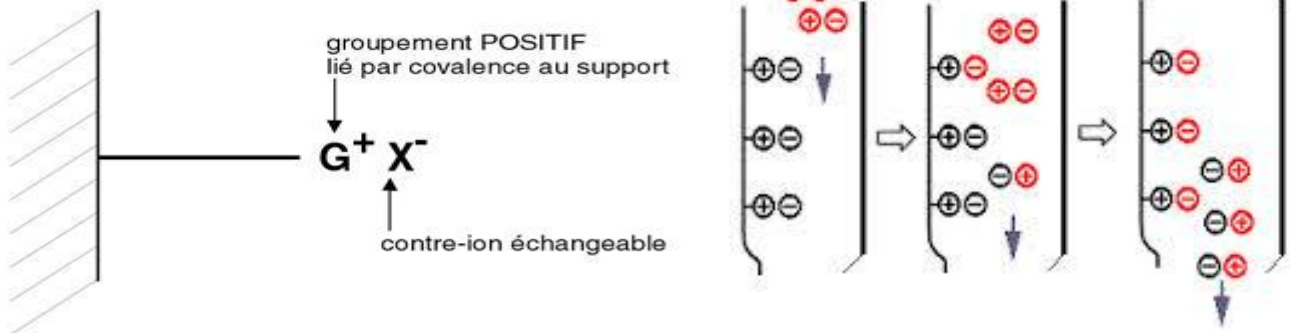
5 000 000- 150 000 000

Les interactions hydrophobes :



Chromatographie échangeuse d'ions :

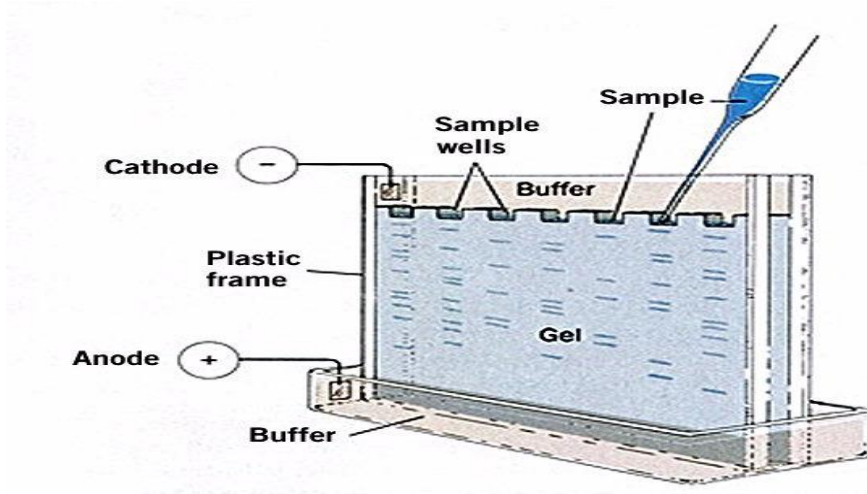
Résine échangeuse d'anions (anionique) :



| | | |
|--|-------------------------------|----------------------|
| | <chem>CCN(CC)CCOC</chem> | Échangeur d'anions |
| | <chem>CC(C)CN(CC)CCOC</chem> | Échangeur d'anions |
| | <chem>CC(=O)OC</chem> | Échangeur de cations |
| | <chem>OP(=O)([O-])[O-]</chem> | Échangeur de cations |
| | <chem>OS(=O)(=O)[O-]</chem> | Échangeur de cations |

Électrophorèse :

- **Électrophorèse en gel:**
 - Migration des molécules dans un champ électrique
 - Les grosses molécules sont ralenties par rapport aux petites
- **Chromatographie en gel-filtration:**
 - Migration des molécules par gravité
 - Les petites molécules sont ralenties par rapport aux grosses



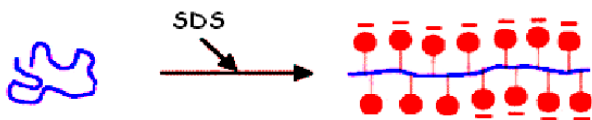
- Migration selon la taille et la charge des molécules
 - Les plus chargées (-) migrent plus loin vers l'anode
 - Pour deux molécules de même charge:
 - Les plus petites migrent plus loin que les plus grosses
- La charge des molécules dépend du pH du tampon.

SDS – PAGE :

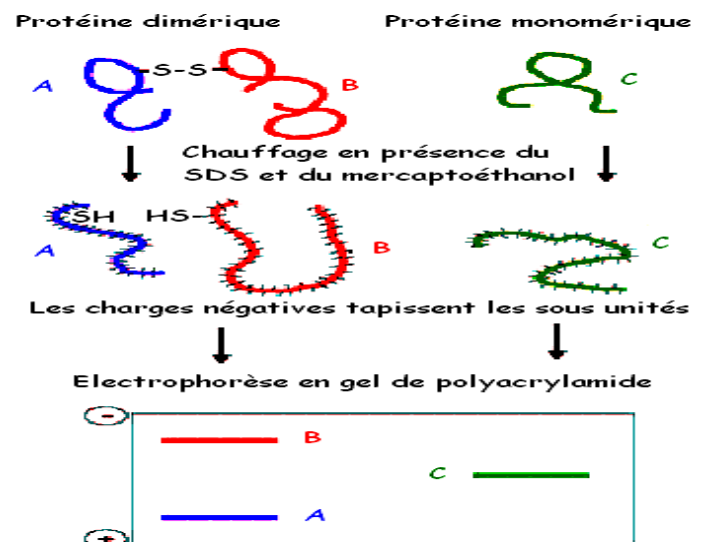
Principe de formation du complexe SDS-protéines dénaturées

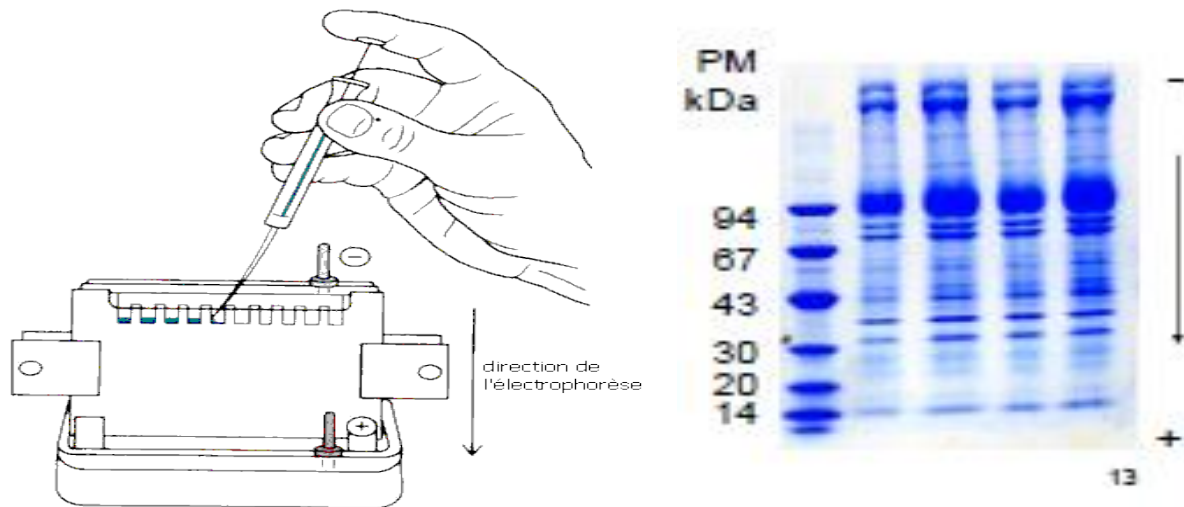


Combinaison d'une protéine avec SDS



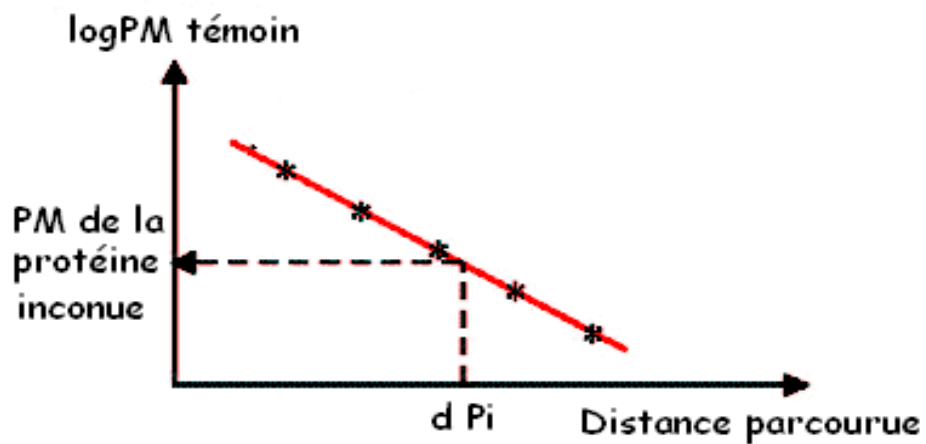
Les protéines sont chargées négativement.
Elles migrent vers l'anode en fonction de leur PM





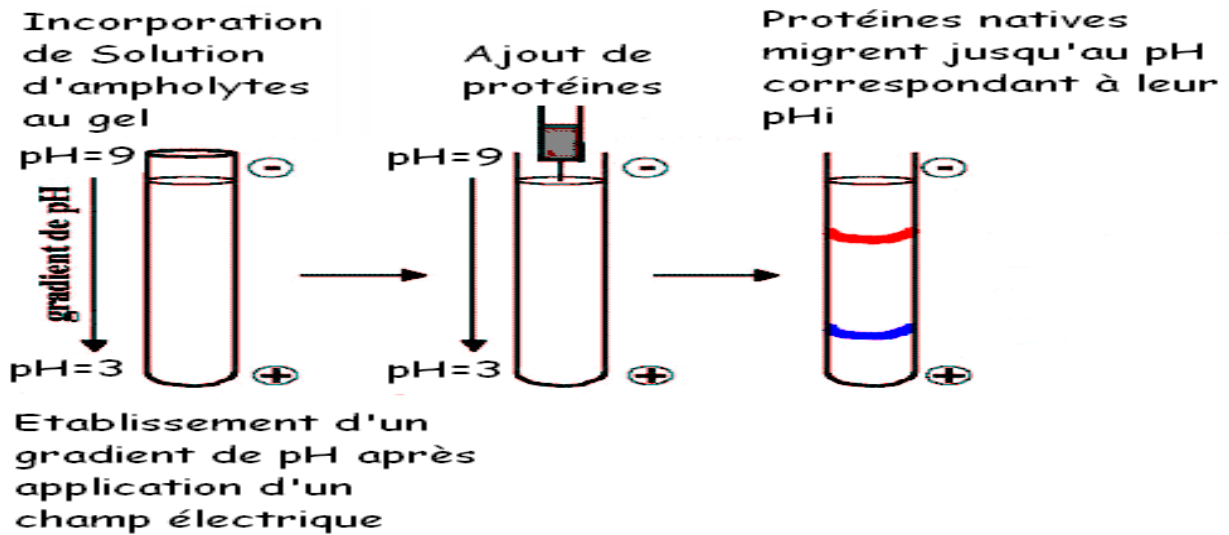
Détermination du PM d'une protéine inconnue par utilisation d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

On utilise des marqueurs (Protéines à PM connu)



IEF :

- 1- Création d'un gradient de pH (solution d'ampholytes)
2. Séparation des protéines natives en fonction du pHi



Électrophorèse bidimensionnelle :

- 1^{ère} dimension: séparation en fonction du pHi
Electrophorèse sur gradient de pH
- 2^{ème} dimension: séparation en fonction du PM
Electrophorèse en gel de polyacrylamide: CDR

