

DOSAGE ET DETECTION DES PROTÉINES

Introduction :

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Des comparaisons entre ces méthodes sont disponibles. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon, etc.

La courbe d'étalonnage :

Elle repose sur l'utilisation de solutions (appelées solutions étalons) qui contiennent l'espèce chimique à doser en différentes concentrations connues. Il suppose également que la concentration de l'espèce chimique influe sur une grandeur physique (absorbance, conductivité...) qu'il est possible de mesurer. En reportant sur un graphique des points dont l'abscisse correspond à la concentration des solutions connues et l'ordonnée à la grandeur physique mesurée on obtient alors une courbe d'étalonnage. Il suffit alors de mesurer la grandeur physique de la solution à doser afin d'obtenir un point de la courbe dont l'abscisse indique la concentration recherchée.

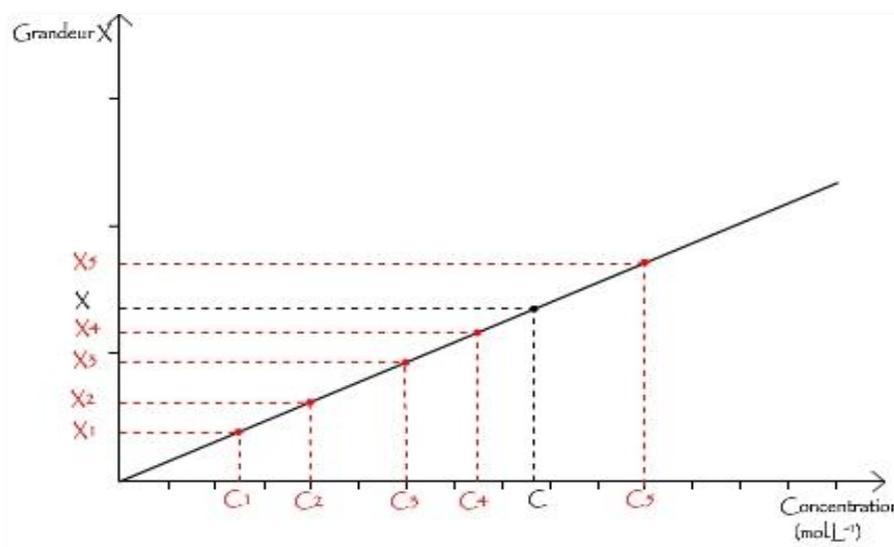


Figure. La courbe d'étalonnage

Le graphique ci-dessus représente une courbe d'étalonnage linéaire (ce qui est souvent le cas). Elle a été tracée en utilisant des solutions étalons de concentration C_1 , C_2 , C_3 , C_4 et C_5 associées respectivement à des grandeurs X_1 , X_2 , X_3 , X_4 et X_5 . La solution dosée a une concentration C qui peut être trouvée en plaçant sur la courbe le point d'ordonnée X "grandeur mesurée pour la solution dosée".

1- Méthode directe (*mesure de l'absorption UV*):

Les acides aminés aromatiques absorbent la lumière dans l'UV. Le maximum d'absorption a lieu à 280 nm. En mesurant la D.O (densité optique) on peut donc déterminer assez précisément la concentration de ces protéines en appliquant la relation de Beer-Lambert :

$$A_{\lambda} = \log\left(\frac{I_t}{I_o}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l$$

ϵ_{λ} : coefficient d'absorption molaire (mol/cm)

C : concentration (Mol)

l : longueur de la cuve (en générale 1 cm)

- ✓ Si on connaît ϵ de la substance à doser : on mesure A et on calcule [C]. Il faut que la solution soit **homogène**.

Le coefficient d'extinction molaire est déduit expérimentalement ou connu; On peut aussi facilement avoir une valeur approximative à partir de la séquence de la protéine.

- ✓ Si on ne connaît pas ϵ : on réalise une gamme étalon et une courbe d'étalonnage $A=f([C])$

1 mg protéine/ml a une absorbance à 280 nm d'environ 0.5-2.

Avantage:

Bonne sensibilité (50-100 μ g)

Facile à mettre en place

Non destructif

Désavantage:

Peu adapté aux mélanges

Sensible à la contamination (ex ADN 260nm, tampon).

L'absorption du tryptophane est modulée par l'environnement (pH, force ionique)

Très bonne méthode pour les protéines pures.

Très intéressant pour comparer des concentrations entre des échantillons mesurés dans les mêmes conditions

NB : Il existe une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde: à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation:

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

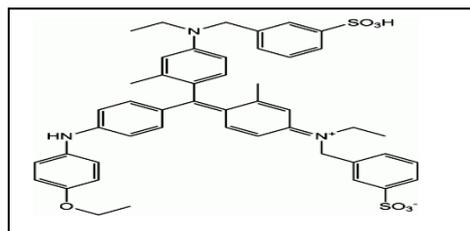
Parmi les autres contaminants potentiels, les produits tampons et les détergents peuvent aussi être souvent problématiques. Une façon simple d'éliminer ce facteur est d'inclure ces produits dans le blanc. Pour appliquer cette solution, il faut cependant connaître précisément leur concentration, ce qui n'est pas toujours faisable. Un autre facteur à considérer est le pH et la force ionique de la solution contenant les protéines. En effet, l'absorption du tryptophane et des autres acides aminés est dépendante de ces facteurs physiques et il faut les maintenir constants.

2- Dosage colorimétrique (méthode indirecte) :

a. dosage au bleu de Coomassie (Bradford)

Le colorant bleu de Coomassie G250 s'adsorbe sur les protéines

(acides aminés aromatiques) en milieu acide.



Le colorant passe du rouge au bleu (absorbance à 595 nm)

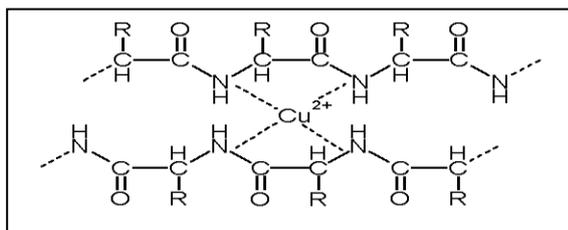
Inconvénient. Il a une réactivité différente selon les protéines. Par exemple il s'adsorbe beaucoup sur l'albumine. De plus la gamme de linéarité est très étroite (2mg-120mg)

On l'utilise plutôt pour visualiser les protéines sur les gels

b. Dosage par la méthode de Biuret

Le cuivre se complexe avec les azotes de la chaîne principale à pH alcalin. Le cuivre ainsi coordonné absorbe à 540nm (violet).

Défaut méthode peu sensible (1-5 mg/mL).



c. Méthode de Lowry :

Combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu (à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate) qui réagit avec tyrosine pour donner une coloration bleue.

La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité, elle peut atteindre 5-10 µg. La zone de linéarité de la réaction est cependant étroite et il faut utiliser la portion linéaire de la courbe qui correspond à l'absorption de l'inconnu.

Cette méthode est très sensible à de très nombreuses substances interférentes: certains peptides et acides aminés, le saccharose, les tris, le glycérol, les dérivés mercaptan, l'EDTA, de nombreux détergents, etc.

d. Dosage à l'acide bicinchonique (amélioration de la méthode de Lowry)

On couple le dosage par la méthode du Biuret avec l'acide bicinchonique.

Cu^{2+} est réduit grâce à certains acides aminés (et par les liaisons peptidique à haute température $\geq 37^\circ\text{C}$). Ensuite 2 molécules de BCA chélate spécifiquement Cu^{+1} et le complexe absorbe à 562nm (pourpre).

Cette méthode est très sensible (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 2 mg/mL)

Très bonne linéarité et peu sensible aux détergents

Méthode expérimentale.

On a une protéine de référence. En générale la BSA (Bovine serum albumin).

On fait une gamme de dilution de 20mg/ml à 2mg/ml (gamme étalon).

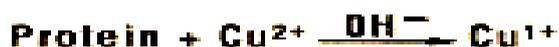
On met l'échantillon et la gamme étalon au contact des réactifs (BCA).

On laisse incuber 30 min à 37°C (à cette température la réduction du cuivre est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques)

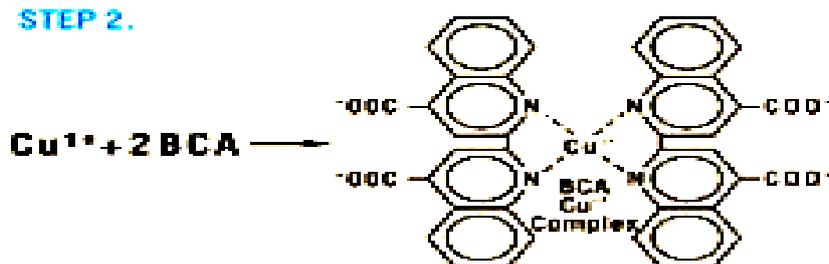
On mesure l'absorbation à 562nm. On utilise comme cuve de référence un tube sans protéine pour faire le blanc.

La mesure de la DO reporté sur la courbe étalon indique la concentration en protéines de l'échantillon.

STEP 1.



STEP 2.



3 -dosage par la mesure d'activité

Si on travaille avec une enzyme, on peut estimer sa concentration à partir de la mesure de l'activité de l'échantillons (U.I ou Katal).

U: 1 unité 1 mmole de substrat hydrolysé par min

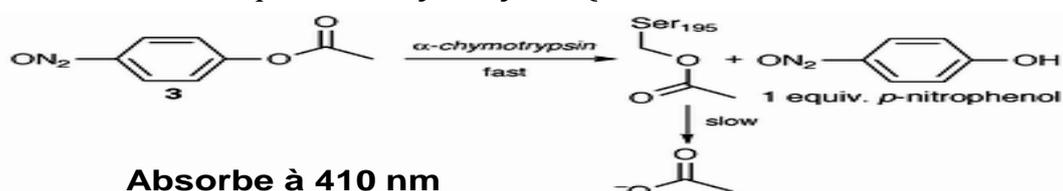
Kat: Katal 1 mol de substrat hydrolysé par s

Pour cela il faut connaître l'activité spécifique de l'enzyme.

Attention :

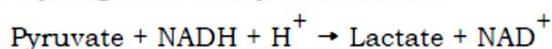
Il faut faire l'expérience dans des conditions précises (T° , pH, force ionique, ...) car ces paramètres influencent l'activité d'une enzyme.

Il existe de très nombreux substrats qui changent leurs absorptions U.V-visible ou leurs fluorescences lorsqu'il sont hydrolysés. (C'est très facile de mesuré l'activité)

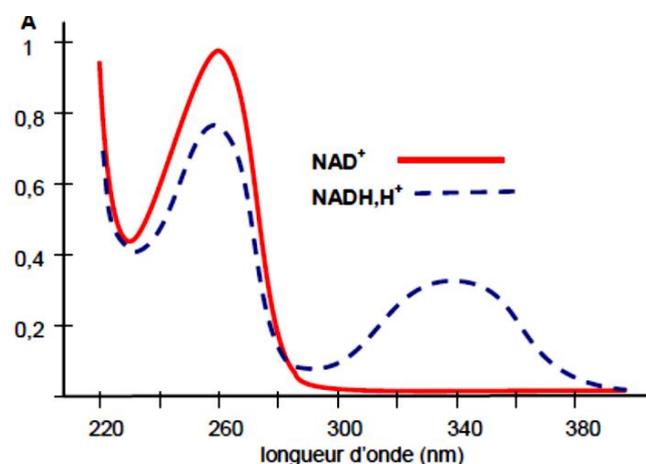


Le NADH, la forme réduite, absorbe fortement autour de 340 nm alors que sa forme oxydée, le NAD^+ , n'absorbe pratiquement pas.

Application : sachant que la lactate déshydrogénase catalyse la réaction :



Proposer, compte tenu de ces résultats, une méthode de suivi de cette réaction.

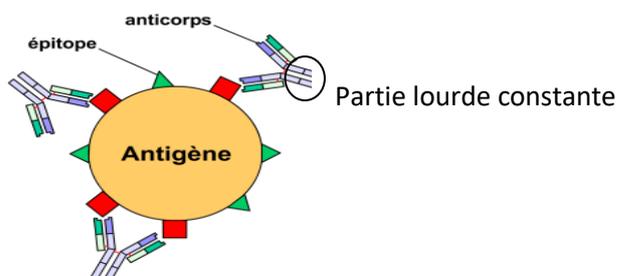


La LDH est généralement dosée par méthode spectrophotométrique de type cinétique. Le principe est donc de suivre la diminution de l' A_{340} , si on incube du NADH et du pyruvate, ou son augmentation, si on incube du NAD^+ et du lactate.

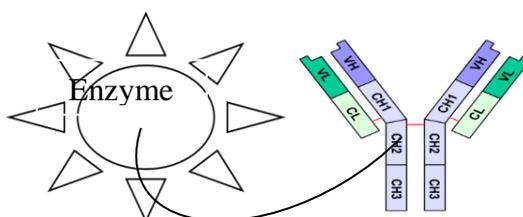
4 dosage avec des anticorps (immunodosages)

Les techniques immunochimiques sont très sensibles et spécifiques. Ces méthodes utilisent des **anticorps** produites par le système immunitaire d'un animal en réponse à l'injection d'une protéine étrangère (**anticorps polyclonaux**)

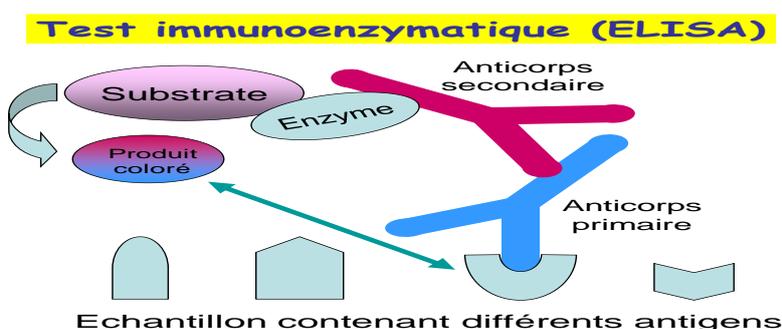
On peut également obtenir des **anticorps monoclonaux** en fusionnant une cellule produisant l'anticorps avec une cellule d'un cancer du système immunitaire appelé **myélome**.



Les anticorps possèdent une partie constante sur la chaîne lourde qui peut être reconnue par d'autres anticorps. Ces anticorps sont couplés chimiquement à des enzymes qui serviront de marqueurs.

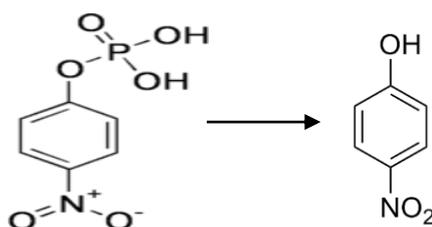


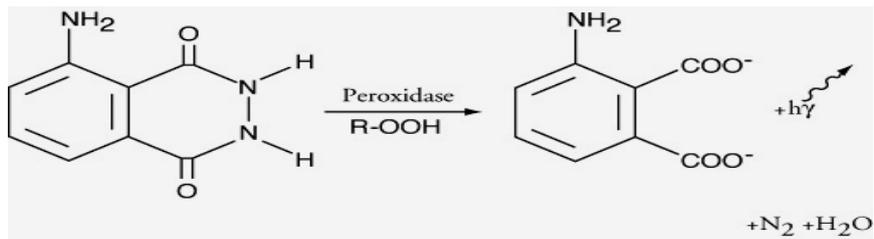
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).



Ces enzymes peuvent être la phosphatase alcaline ou la peroxydase :

La phosphatase alcaline : catalyse l'hydrolyse du para-nitrophénolphosphate : Hydrolysé, ce substrat devient jaune et absorbe à 410 nm.



La peroxydase :

Cette réaction émet des photons. Détection par film photos ou camera CCD
C'est une méthode très sensible

DETECTION QUALITATIVE DE PROTEINES :

Il arrive fréquemment qu'on veuille détecter seulement la présence de protéines pour suivre une chromatographie, colorer un gel d'acrylamide ou une chromatographie sur couche mince. Dans ces cas on emploie souvent des approches similaires du point de vue réactionnel.

Ainsi on peut suivre l'élution des protéines durant une chromatographie en mesurant l'absorption à 280 nm. Pour les détections plus sensibles souvent requises en HPLC on peut mesurer le lien peptidique, aux alentours de 230 nm. Cette dernière approche permet de suivre les protéines pauvres en acides aminés absorbant à 280 nm, mais elle nécessite des détecteurs plus coûteux capables de travailler dans l'UV lointain.

La réaction de biuret, simple et facile d'emploi est particulièrement adaptée aux TLC.

Pour les gels d'acrylamide, le bleu de Coomassie en milieu acide est la méthode la plus fréquemment employée.