

UNIVERSITE 3 CONSTANTINE
FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE MEDECINE
1^{ERE} ANNEE MEDECINE

METHODES D'ETUDE DES PROTEINES

I. INTRODUCTION.

II. PURIFICATION DES PROTEINES.

1. PREPARATION DE L'EXTRAIT PROTEIQUE.
2. DOSAGE GLOBAL DES PROTEINES.

III. BASES TECHNIQUES DE L'ETUDE DES PROTEINES.

1. LA CHROMATOGRAPHIE.
2. L'ELECTROPHORESE.

I. INTRODUCTION :

Pour l'étude d'une protéine, il faut:

- Isoler la protéine responsable d'une fonction fractionnement cellulaire, ultracentrifugation, purification, caractérisation, dosage...
- Analyser la composition chimique de la protéine composition globale, séquençage, spectrométrie de masse...
- Découvrir la structure spatiale de la protéine dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X, RMN...
- Corréler la structure à la fonction de la protéine.

I. PURIFICATION DES PROTEINES

II.1. PREPARATION DE L'EXTRAIT PROTEIQUE :

Celle-ci est réalisée quand l'extrait ne provient pas d'une source soluble (sérum, LCR...) mais d'un tissu dont il faut donc extraire un homogénat.

II.1.1. Homogénéisation

- Elle peut être réalisée par des homogénéisations mécaniques, l'emploi d'ultrasons, l'utilisation de chocs osmotiques.
- La lyse des membranes cellulaires ainsi effectuée va permettre la libération du contenu cytoplasmique. Ceci aboutit à l'obtention d'une "soupe cellulaire" qu'il est nécessaire de clarifier par centrifugation pour séparer les protéines solubles, les sels minéraux, les petites molécules (oses, acides aminés, lipides, coenzymes).

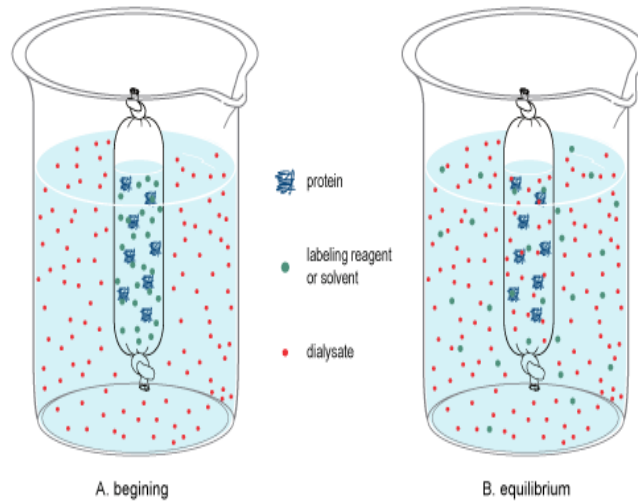
II.1.2. Centrifugation, ultracentrifugation

- Elle permet la séparation des cellules, organites et macromolécules biologiques.
- Le dispositif comporte un moteur faisant tourner un axe auquel sont fixés des tubes contenant les solutions à clarifier.
- La vitesse de sédimentation est proportionnelle à l'intensité du champ centrifuge. Le résultat d'une centrifugation est l'obtention de deux fractions : le sédiment ou culot (solide, au fond du tube), le surnageant (fraction liquide).
- Une sédimentation de 600 à 1000g pendant 10 minutes, dite "simple", permet par exemple d'extraire du sang total les hématies et leucocytes dans le culot, et le plasma en surnageant.



II.1.3. Elimination des petites molécules

- La dialyse est la méthode la plus connue. Le dispositif est simple : un bac d'eau distillée contient un sac de cellophane contenant un extrait protéique. Les petites molécules et l'eau vont diffuser à travers les pores du sac.
- Les macromolécules comme les protéines sont retenues dans le sac. Les protéines ne sont pas dialysables.



II.2. DOSAGE GLOBAL DES PROTEINES

II.2.1. Spectrophotométrie à 280nm

La spectrophotométrie n'est utile que pour les acides aminés aromatiques (Tyr, Trp) mais d'autres substances peuvent absorber à 280nm.

II.2.2. Réaction du biuret

Les protéines sont placées en milieu alcalin Cu^{2+} formant un complexe violet proportionnel à la quantité de protéines. C'est en fait les liaisons peptidiques qui sont dosées dans cette technique.

II.2.3. Technique de Lowry

La technique de Lowry, très sensible, ne dose que la tyrosine.

II.2.4. Colorations spécifiques

- La coloration dénature les protéines.
- Divers colorants comme le noir amide, le bleu de Bromophénol, le rouge ponceau, le bleu de Coomassie se fixent aux protéines.
- Généralement la coloration est effectuée pour révéler les résultats d'une électrophorèse.

II. BASES TECHNIQUES DE L'ETUDE DES PROTEINES :

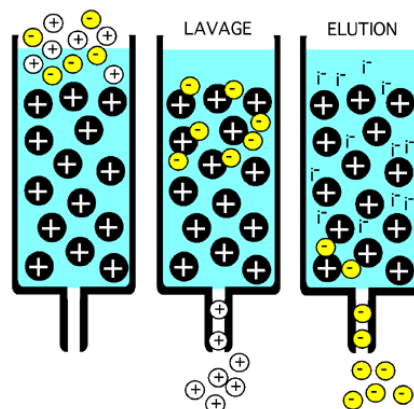
III.1. La Chromatographie

- La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile).

- Le mécanisme général correspond à l'entraînement de ces constituants par une phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire ou fixe (solide, gel de silice sur plaque aluminium par exemple) contenue dans une colonne.
- Le solvant de chromatographie de la phase mobile déposé en haut de colonne va descendre par capillarité dans la phase stationnaire entraînant avec lui les composants protéiques. Selon leur hydrophilie, pHi ou encore selon leur P.M ils migreront plus ou moins vite dans la phase fixe.
- La chromatographie liquide haute performance ou CLHP (HPLC en anglais) améliore les performances de séparation en mettant la phase mobile sous pression (plus précis, plus rapide).
- Le dispositif est alors modifié : le diamètre de la colonne est réduit, des pompes sont ajoutées, les phases fixes employées doivent être capables de résister à la pression (donc phase stationnaire en silice).

EXEMPLE : CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS :

- La phase mobile est une solution tampon aqueuse et la phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre, lesquelles ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques.
- Ces phases permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions, de même signes présents dans la phase mobile.
- La séparation repose sur les forces de distributions ioniques entre les deux phases.
- Les protéines sont éluées sélectivement par augmentation progressive de la concentration du tampon et éventuellement variation du pH.



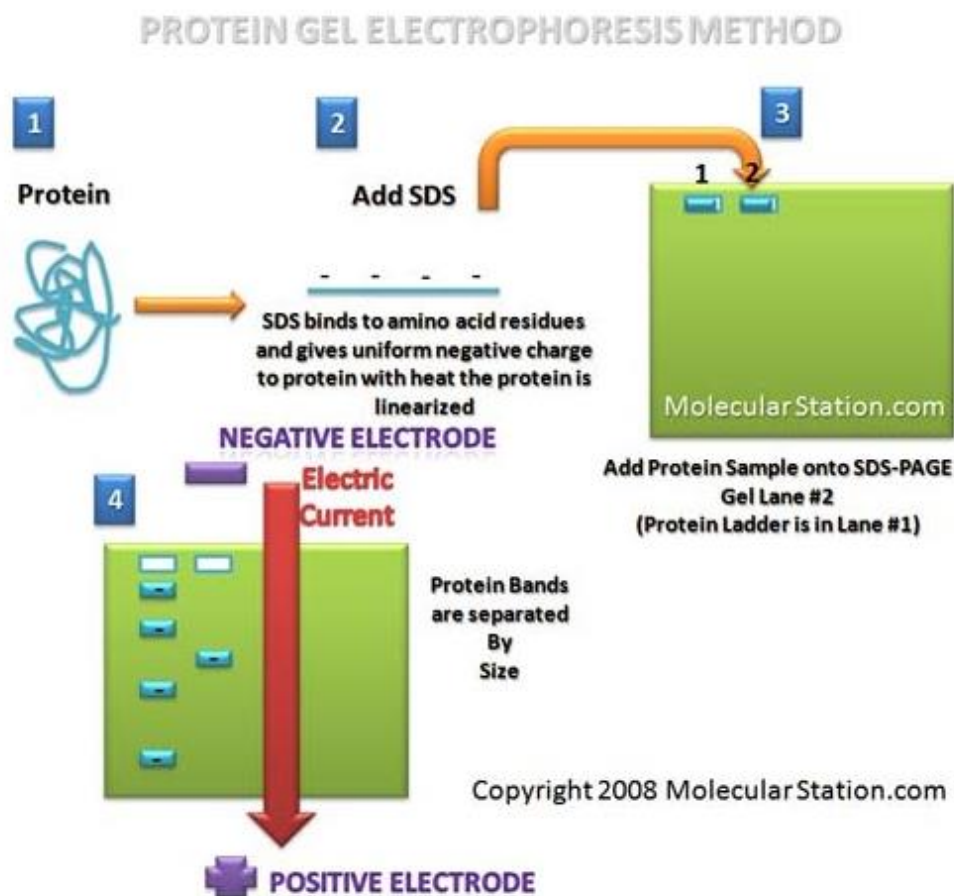
III.2. L'électrophorèse

- La migration différentielle de molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique constitue la base de cette technique de fractionnement.
- Le système est composé d'une plaque de verre recouverte de gel d'agarose ou d'Acrylamide creusé à un bout de puits recevant les échantillons à étudier.
- De part et d'autre de cette plaque, se disposent cathode et anode au contact du tampon de migration (solution riche en ions pour la conduction de l'électricité) placé à chaque bout de la plaque.
- Une différence de potentiel entre les électrodes est réalisée par un courant continu haut voltage.
- Plus les composés auront des charges importantes et plus vite ils migreront.

- A la fin de la migration, il suffit de relever l'emplacement des composés d'acides aminés via des colorants (tels que le bleu de Coomassie) et la distance parcourue (leur déplacement) et de comparer avec des témoins.
- Dans l'électrophorèse, c'est un courant électrique qui entraîne les molécules. Seules celles qui sont chargées se déplaceront.

III.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

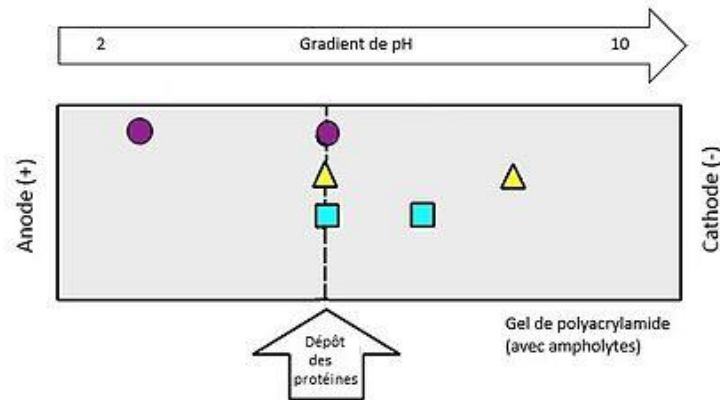
- La polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'acrylamide qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bis-acrylamide qui forme des ponts entre les chaînes; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).
- En présence de Sodium Dodécylsulfate (SDS), détergent anionique qui défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules sont chargées de la même façon, et la séparation est alors uniquement fonction de la masse molaire.



III.2.2. Electrofocalisation (IEF — Isoélectrofocalisation).

- L'électrolocalisation ou focalisation isoélectrique utilise avantageusement la charge que possède chaque protéine à un pH donné.

- Elle consiste en une migration, induite par un courant électrique, des protéines dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur pHi -moment auquel elles cessent de migrer, puisque leur charge nette est nulle.
- Cette technique, qui sépare les polypeptides en fonction de leur charge plutôt que de leur masse, est très sensible: elle peut distinguer des protéines dont la différence de pHi est aussi faible que 0,01 unité de pH.



III.2.3 .Electrophorèse bidimensionnelle

- On sépare selon le pHi dans une dimension (IEF) et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS); on sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum !
- On peut établir de cette manière la "carte d'identité protéique" des principaux tissus et organes humains. La lecture nécessite alors un système informatisé d'analyse d'images.

