

I – Généralités

A – But : comment les protéines

- Fixent leur ligand / substrat
- Réalisent la catalyse enzymatique
- Transportent l'énergie
- Acquièrent leur structure tridimensionnelle
- Intéragissent globalement en réseau dans une cellule

Analyse individuelle de la protéine :
PURIFICATION

Analyse globale de la protéine :
PROTEOME

B – Analyse individuelle

1/ Purification

- La purification est l'étape indispensable et va utiliser pour ce faire les caractéristiques physicochimiques de la molécule
 - o Solubilité
 - o Charge électrique
 - o Taille/masse moléculaire
 - o Propriété de fixation à un ligand
- Méthode de séparation des protéines : chromatographie et électrophorèse
- Problème majeur : suivre la protéine pendant les étapes de la purification
- Il faut faire un essai de l'activité biologique (activité enzymatique, fixation à un ligand)

2/ Caractérisation

- Electrophorèse
- Chromatographie
- Utilisation d'anticorps
- Caractérisation structurelle
 - o Spectométrie de masse
 - o Cristallographie : structure 3D

Analytique

C – Analyse globale : le protéome

- Analyse simultanée de toutes les protéines dans une cellule à un instant donné
- Analyse dynamique qui est variable en fonction
 - o Du type cellulaire
 - o Du stade de développement de l'organe/organisme
 - o De l'état fonctionnel de la cellule
 - o De l'environnement de la cellule (signaux hormonaux)
- Le protéome prend en compte des modifications post-traductionnelles (phosphorylations)
- Le transcriptome est l'analyse des ARNm, il est également dynamique
- Le génome est une représentation statique de cellule en cellule (aucune différence)

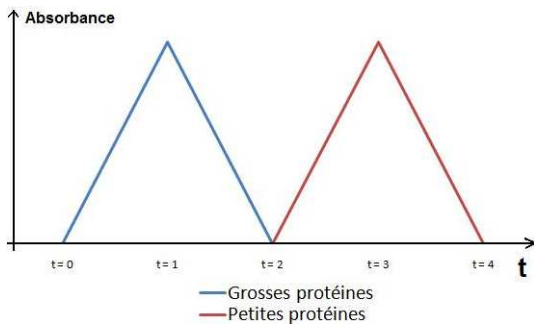


Cette 1^{ère} page est dure à apprendre et franchement peu utile en vue du concours. Essayez néanmoins de l'enregistrer comme un index, c'est utile pour la suite !

II – Chromatographie liquide sur colonne

A – Chromatographie d'exclusion : filtration sur gel

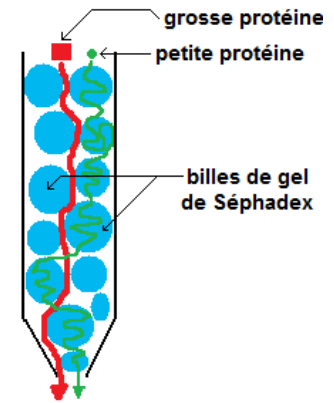
- Différenciation via la taille de la protéine



- Les grosses protéines sont éluées en 1ères car elles ne se prennent pas dans les petites mailles du Sephadex (Fr) / Sephalex (UK)

- Les petites molécules elles sont prises au piège et donc ralenties, elles sont éluées plus tardivement

- Cela permet d'estimer la masse moléculaire en Dalton

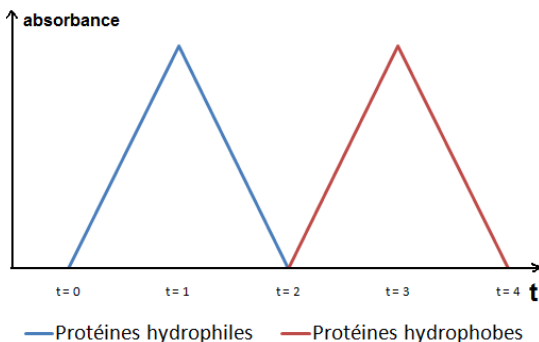


B – Chromatographie par échange d'ions

- Différenciation via la charge de la protéines
 - o Voir cours du professeur Feugeas (cours n°4)

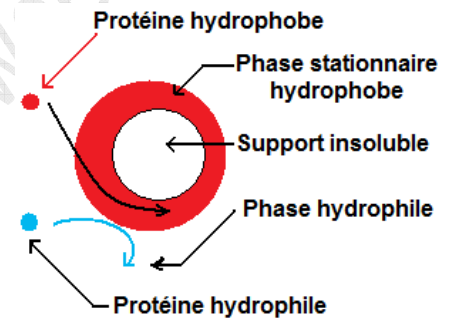
C – Chromatographie de partage (en phase inverse)

- Différenciation via la polarité des protéines
- Si on prend une protéine hydrophobe (apolaire) elle va pouvoir rentrer dans la phase stationnaire et y être retenue



- Une protéine hydrophile ne va pas être retenue et sera éluée immédiatement

- On fait évoluer progressivement la phase mobile liquide : au début polaire, puis de plus en plus apolaire, pour faire sortir (= éluer) les protéines retenues dans la phase stationnaire hydrophobe



D – Chromatographie d'affinité : spécificité protéine de liaison avec un ligand

- Exemples

- o Lectines vont reconnaître des glycoprotéines
- o Protéine A de staphylocoque : fixe les anticorps
- o Substrats pour certaines enzymes si affinité élevée

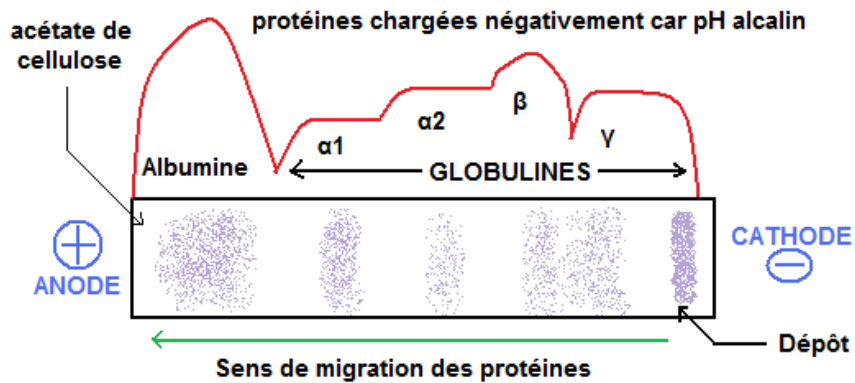
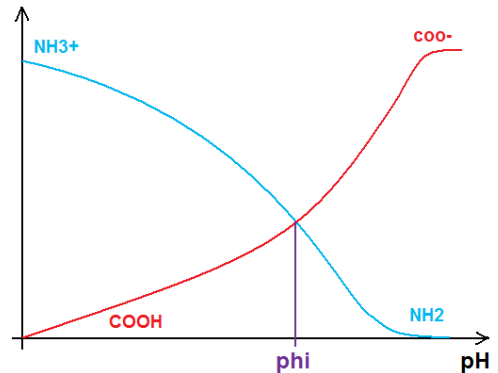
- On débute l'expérience avec une phase mobile de faible force ionique, afin que la protéine puisse établir de façon optimale ses liaisons faibles avec son ligand
- En augmentant la force ionique, on va casser les liaisons faibles, de façon progressive, ce qui permettra d'estimer la force des liaisons entre une protéine et son ligand
- En une seule étape, cette technique est capable de purifier une protéine dans un complexe



III – Les électrophorèses

A – Electrophorèse sur acetate de cellulose ou gel d'agarose

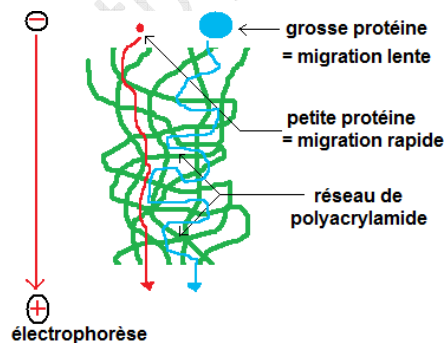
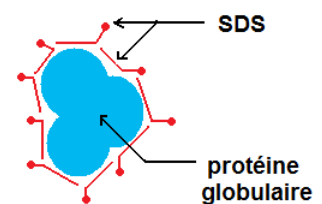
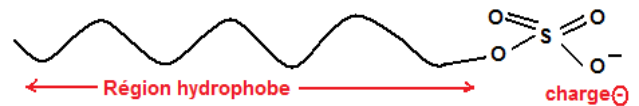
- Différenciation via la charge électrique de la protéine
- Le pHi est le pH auquel la protéine est neutre électriquement parlant
- On colore ensuite par le bleu de Coomassie
- D'autres colorations spécifiques sont possibles
 - o Lipides pour les lipoprotéines
 - o Anticorps contre une chaîne particulière d'immunoglobulines (Ig)



- Exemple : électrophorèse des protéines sériques
 - o γ : immunoglobulines de types IgG, IgA et IgM

B – Page – SDS (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis – Sodium DodécylSulfate)

- Différenciation via la taille de la molécule
- SDS : sodium dodécylsulfate : $C_{12}H_{25}NaO_4S$
- Le SDS
 - o Masque la charge propre de la protéine
 - o La densité de charges négatives amenées par le SDS est identique pour toutes les protéines
 - o Il en est de même pour l'hydrophilie grâce à la longue queue hydrophobe



- o Au final on a plus que des protéines hydrophobes, et négatives : la distinction se fait donc par la taille sans interférences possibles
- o Le SDS dénature des protéines et sépare les sous-unités liées par des liaisons non covalentes
 - Note : dans une filtration sur gel, les protéines ne sont pas accrochées mais ralenties !

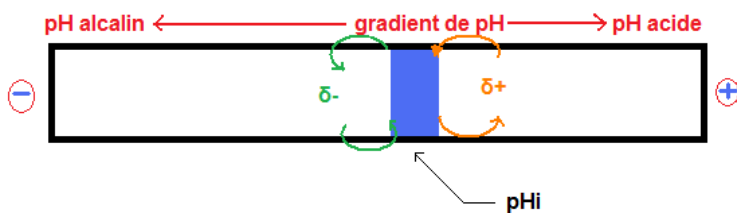


Le II et le III de ce cours sont vraiment à savoir PAR CŒUR, ils valent très cher au concours !
Les questions sont souvent vicieuses qui plus est...

C – Western Blot

- Une des méthodes de révélation concernant les protéines
- Spécifique en utilisant des anticorps marqués
- 3 étapes
 - o Electrophorèse (souvent sur gel de polyacrylamide)
 - o Transfert par capillarité sur une membrane de nylon
 - o Puis sur un film photographique avec révélation par des anticorps marqués
 - Pour ce faire : incubation membrane + anticorps
 - Puis autoradiographie (cf. cours de biocell cycle cellulaire)

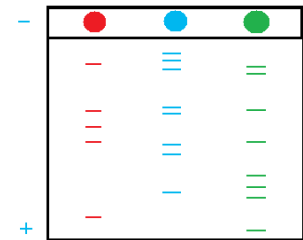
D – Focalisation isoélectrique : IEF



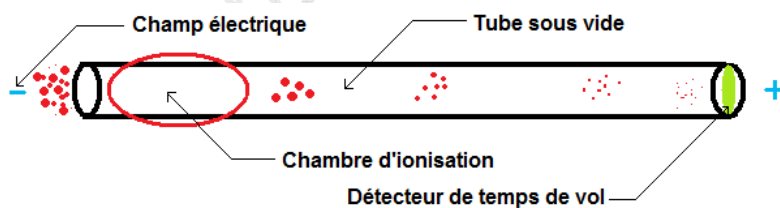
- La protéine s'immobilise dans la région du gel où le pH = pHi
- Cette technique abolit la diffusion = focalisation

E – Electrophorèse bidimensionnelle

- 1^{er} temps : IEF : pHi de la protéine
- 2^{ème} temps : SDS-PAGE : taille de la protéine
- Méthode très résolutive : approche globale pour analyser des mélanges très complexes de protéines : c'est l'analyse du protéome



- o Electrophorèse bidimensionnelle
- o Découpage d'une tâche : identification de la protéine (spectromètre de masse)



- o Séparation de la masse extrêmement précise : au dalton près

IV – Détermination de la structure 3D

- Diffraction aux rayons X
 - o Limitation : il faut un cristal : d'où problème pour les protéines de membranes qui ont une partie hydrophobe



Ce cours est un peu dense, car beaucoup de techniques nouvelles doivent être assimilées. Faites des tableaux pour vous aider, ainsi que pas mal d'annales et n'hésitez pas à tanner les profs d'ED ☺ Bon courage !

Ce document, ainsi que l'intégralité des cours de P1, sont disponibles gratuitement à l'adresse suivante : <http://coursp1bichat-larib.weebly.com>