

Chapitre 3 Propriétés et Analyses des protéines

1. Isolement des protéines

- A. Choix d'une source de protéines
- B. Techniques de solubilisation
- C. Stabilisation des protéines
- D. Détection des protéines
- E. Stratégie générale de purification de protéines

2. Solubilité des protéines

A. Influence de la concentration en sels

B. Influence du pH

3. Separation par chromatographie

A. Chromatographie par échange d'ions

B. Chromatographie par filtration sur gel

C. Chromatographie d'affinité

4. Electrophorèse

A. SDS-PAGE

B. Focalisation isoélectrique

5. Ultracentrifugation

A. Ultracentrifugation préparative

A. Détection des protéines

Lorsqu'on purifie une protéine, on doit pouvoir la mesurer quantitativement et spécifiquement. En conséquence, on doit disposer d'une méthode de dosage spécifique

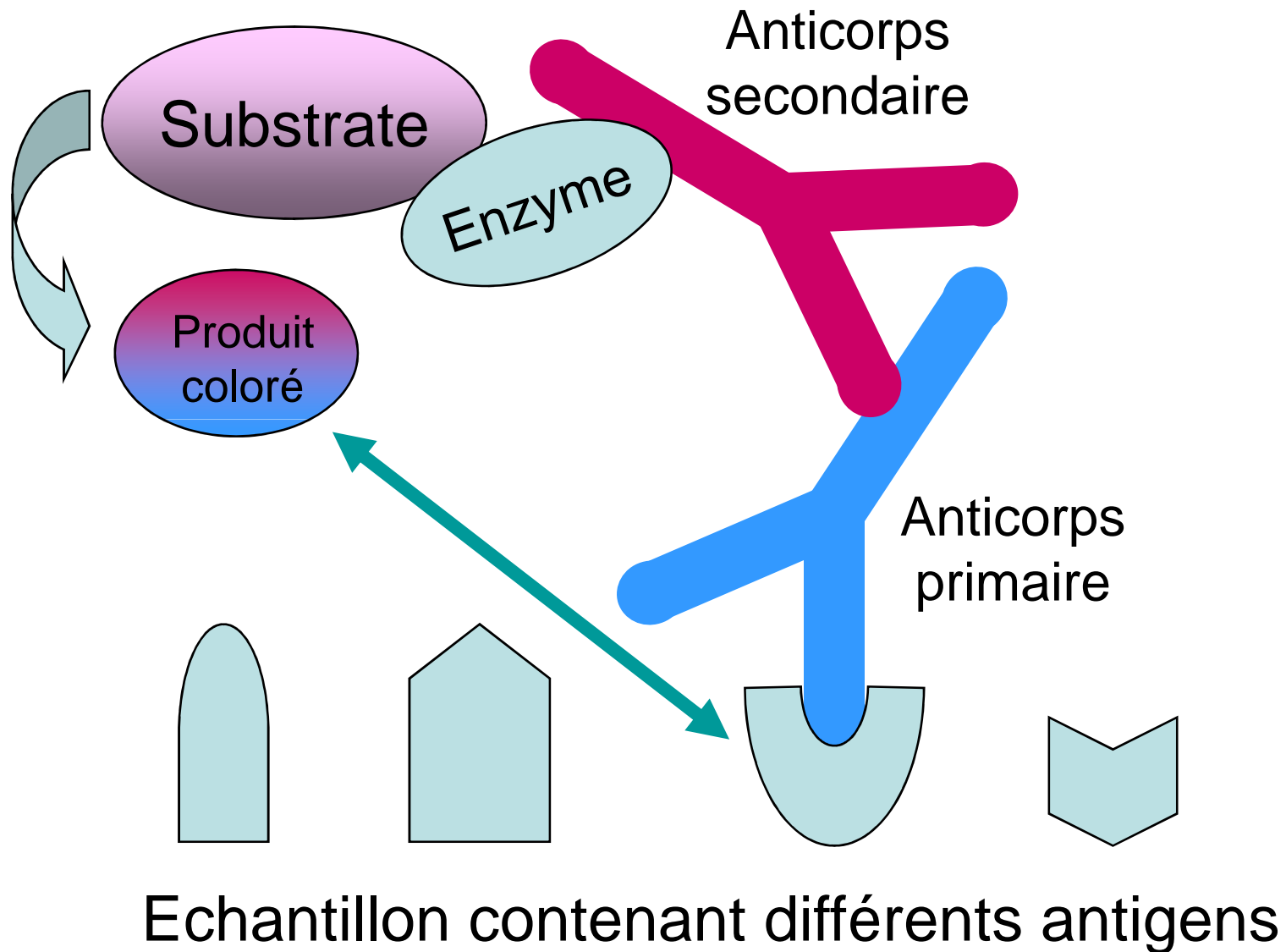
- a. Les dosages de protéines les plus simples s'appliquent aux enzymes - dosage spectrophotométrique, fluorométrique ou radiochimique
- b. On peut détecter des protéines autres que des enzymes en tirant parti de leur propriété de se lier à des molécules spécifiques (ligands) par exemple des récepteurs

c. 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**

On détecte la protéine directement en la faisant précipiter avec ces anticorps ou indirectement par **dosage immunoenzymatique** appelé **ELISA** (**enzyme-linked immunoabsorbent assay**)

Test immunoenzymatique (ELISA)



B. Stratégie générale de purification des protéines

Leurs différentes propriétés physicochimiques et biochimiques sont mises à profit

Caractéristiques

Techniques

• Solubilité

1. Solubilisation/précipitation saline

• Charge ionique

1. Chromatographie par échange d'ions
2. Electrophorèse
3. Focalisation isoélectrique

• Caractère polaire d'adsorption

1. Chromatographie

2. Chromatographie en phase inverse
3. Chromatographie par interactions hydrophobes

B. Stratégie générale de purification des protéines

Leurs différentes propriétés physicochimiques et biochimiques sont mises à profit

Caractéristiques

Techniques

• Taille moléculaire

1. Dialyse et ultrafiltration
2. Electrophorèse en gel
3. Chromatographie par filtration sur gel

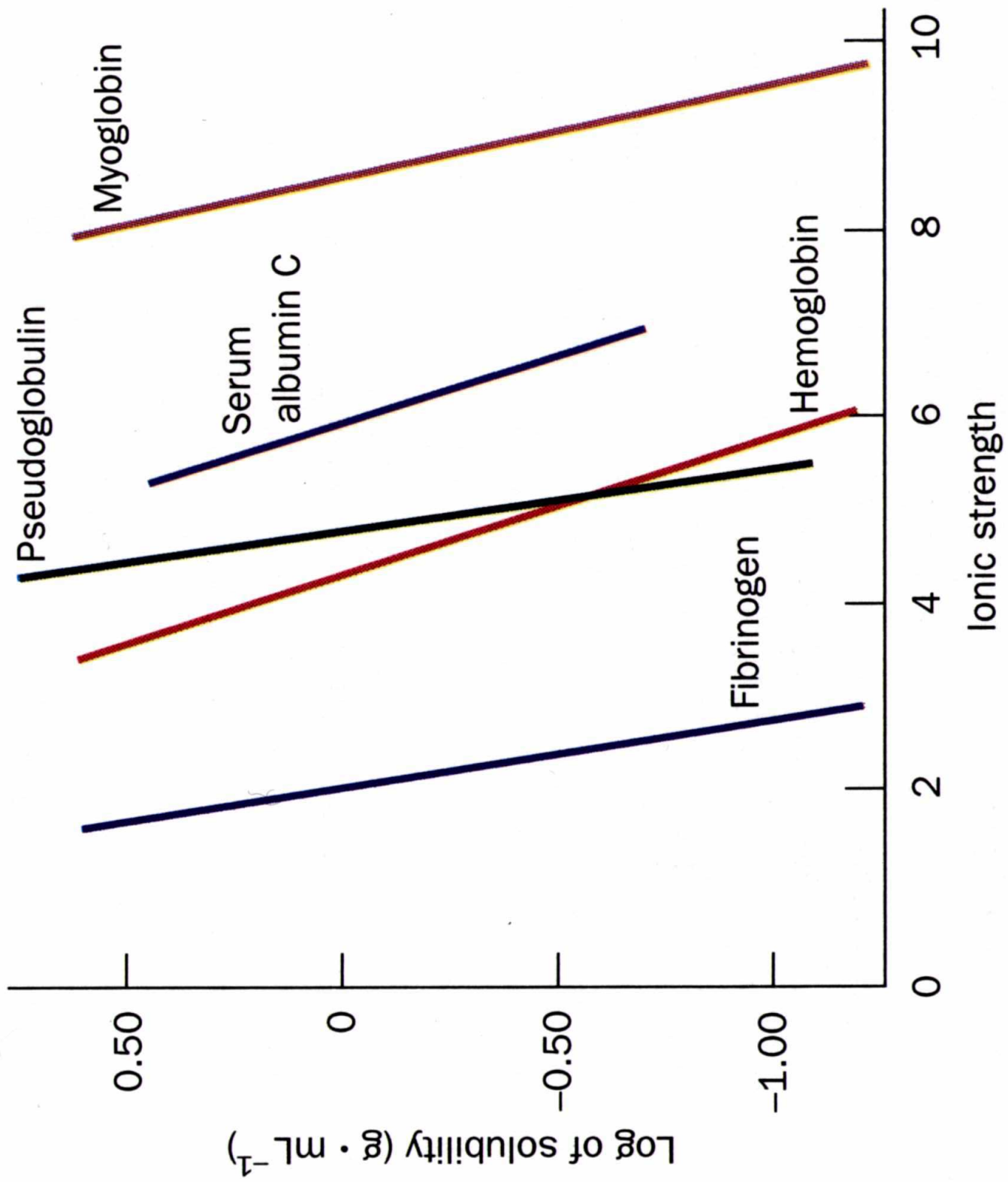
• Spécificité de liaison

1. Chromatographie d'affinité

2 SOLUBILITE DES PROTEINES

A. Influence de la concentration en sels

La solubilité d'une protéine à faible force ionique augmente généralement avec la concentration en sel, appelé "**salting in**" (solubilisation saline) Pour des forces ioniques élevées, la solubilité des protéines diminue, appelé "**salting out**" (précipitation saline)



B. Influence du pH

La solubilité d'une protéine est au minimum quand $\text{pH} = \text{pI}$. Cette propriété est l'origine d'une méthode de purification des protéines appelé **précipitation isoélectrique**

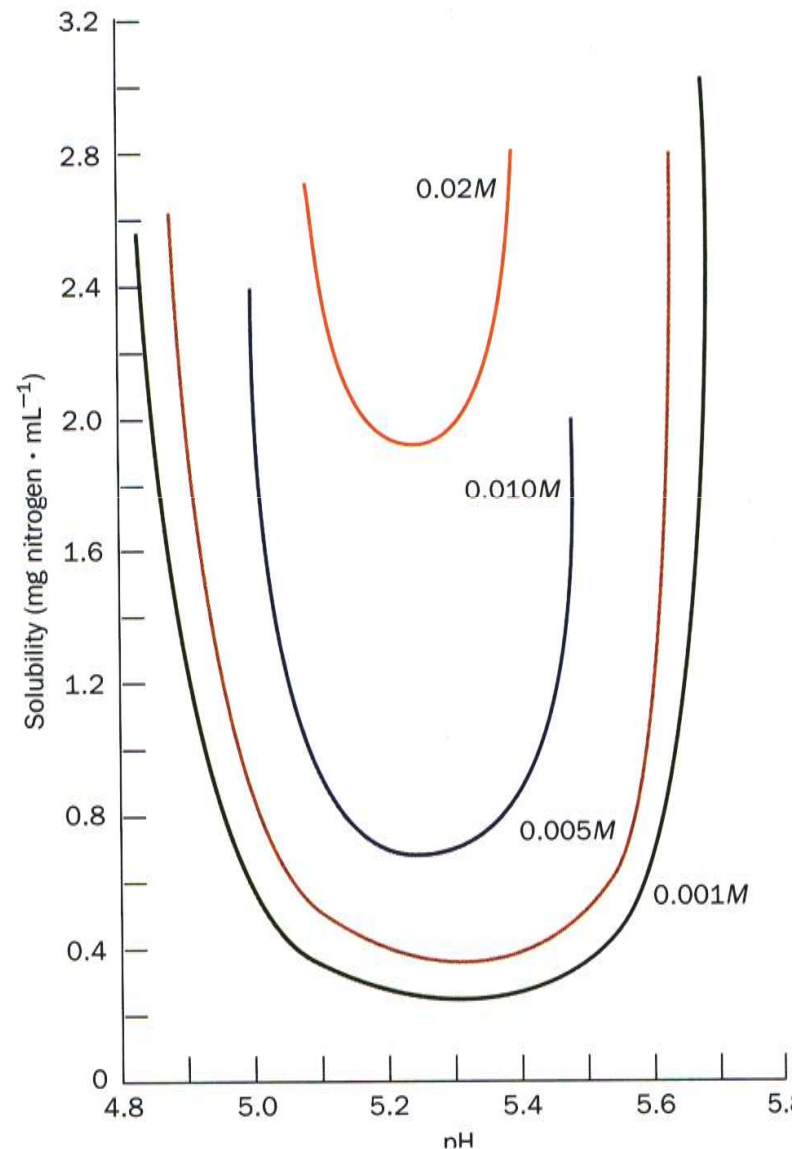


TABLE 5-1. THE ISOELECTRIC POINTS OF SEVERAL COMMON PROTEINS

| Protein | Isoelectric pH |
|-----------------------------|-----------------------|
| Pepsin | <1.0 |
| Ovalbumin (hen) | 4.6 |
| Serum albumin (human) | 4.9 |
| Tropomyosin | 5.1 |
| Insulin (bovine) | 5.4 |
| Fibrinogen (human) | 5.8 |
| γ -Globulin (human) | 6.6 |
| Collagen | 6.6 |
| Myoglobin (horse) | 7.0 |
| Hemoglobin (human) | 7.1 |
| Ribonuclease A (bovine) | 7.8 |
| Cytochrome <i>c</i> (horse) | 10.6 |
| Histone (bovine) | 10.8 |
| Lysozyme (hen) | 11.0 |
| Salmine (salmon) | 12.1 |

3 SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE

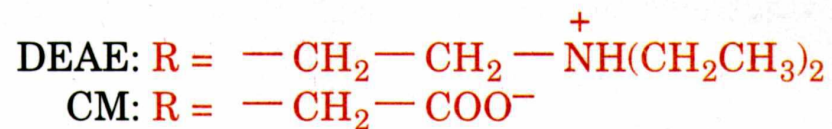
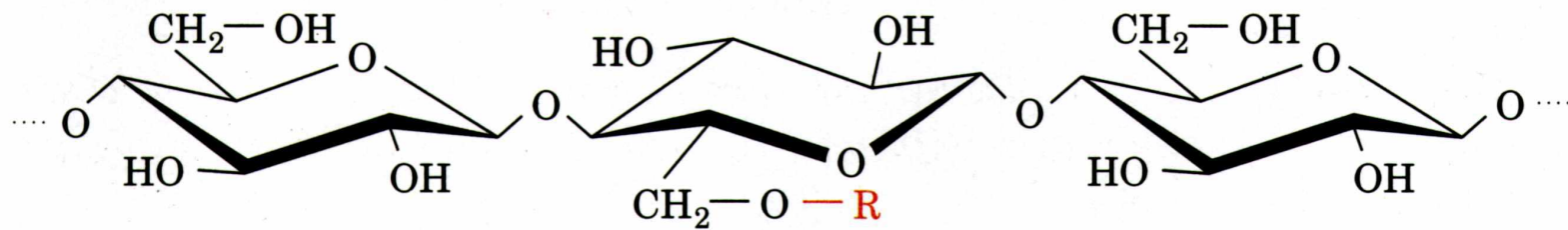
La solution de protéines dissout dans la **phase mobile** est filtrée à travers d'une colonne constituée d'un support solide poreux: la **phase stationnaire**

Les interactions des différentes protéines avec la phase stationnaire ralentissent plus ou moins leur migration à travers le support

Si la force de rétention est de nature ionique, la technique de séparation est appelée **chromatographie par échange d'ions**

A. Chromatographie par échange d'ions

Dans le processus d'échange d'ions, les ions liés électrostatiquement à un support insoluble et chimiquement inerte sont remplacés de manière réversible par des ions en solution:



Chromatographie sur échangeurs d'anions

Principe :

une protéine a - une charge positive aux $\text{pH} < \text{pI}$
- une charge négative aux $\text{pH} > \text{pI}$

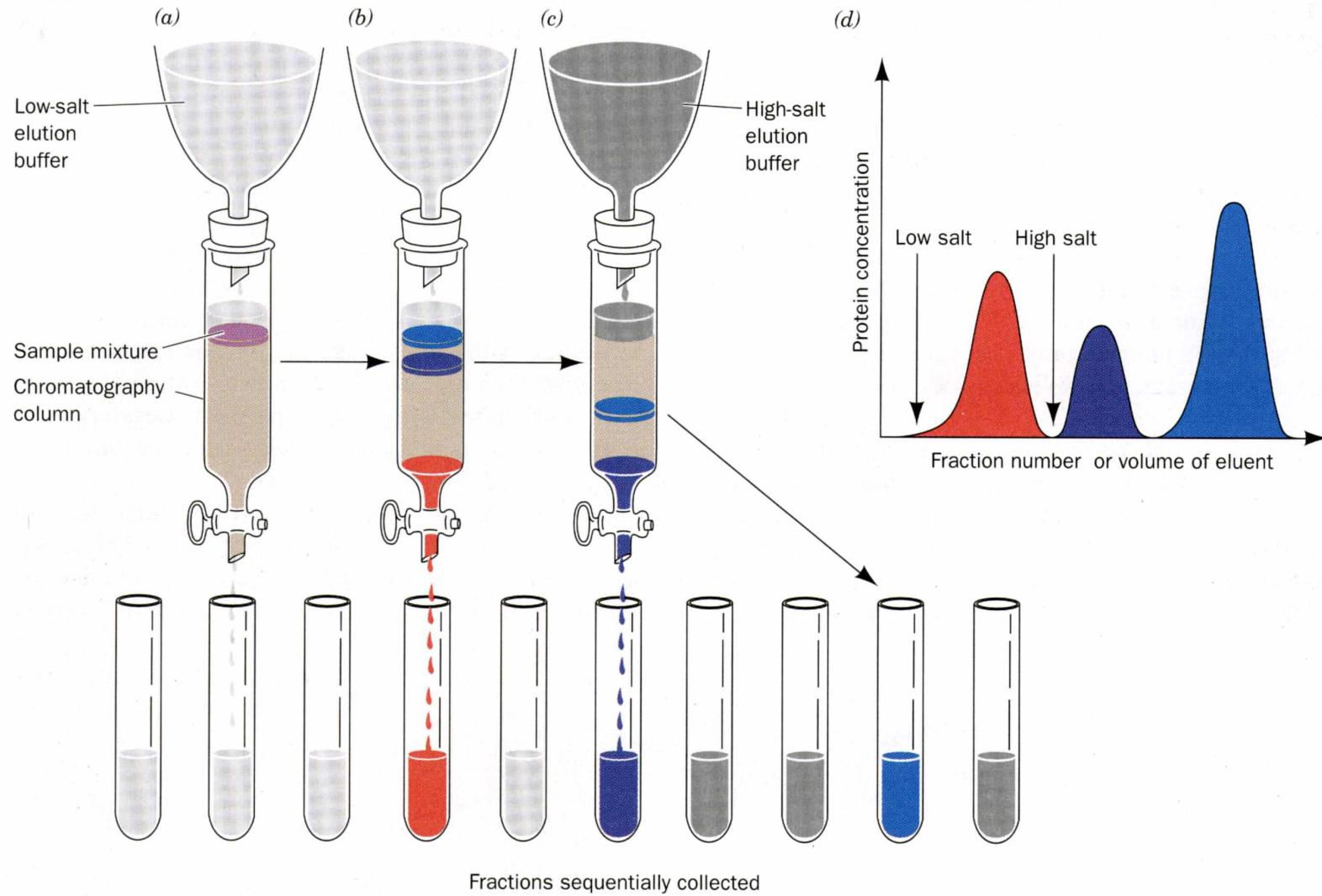
Elle peut donc être retenue sur un échangeur de cations ou un échangeur d'anions, suivant le cas

Elle peut alors être éluée par passage d'un tampon contenant du sel en quantités croissantes

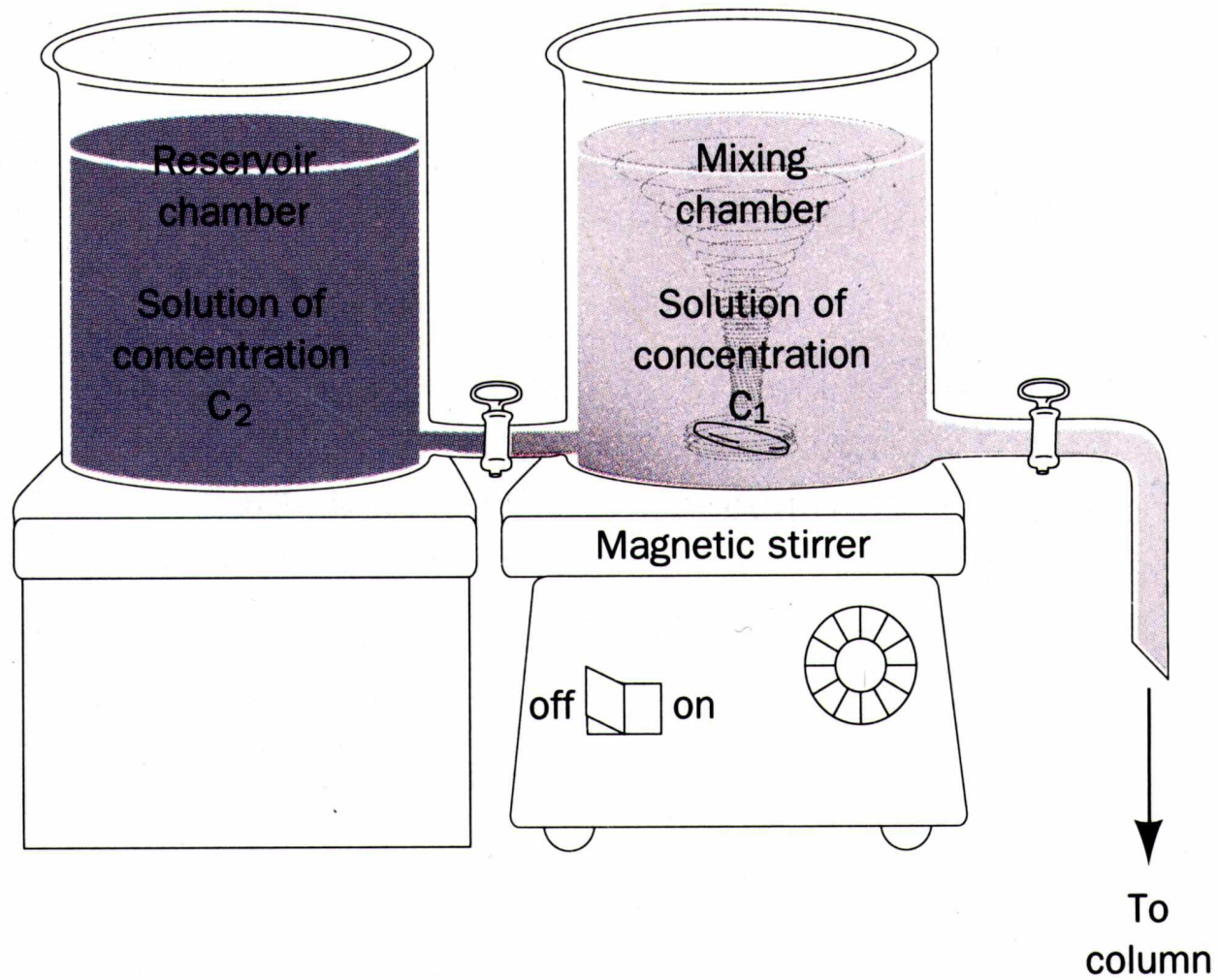
Echangeur d'anions = gel porteur de charges fixes positives

Echangeur de cations = gel porteur de charges fixes négatives

Chromatographie d'échanges d'ions avec élution par paliers



Dispositif pour créer un gradient de concentration linéaire



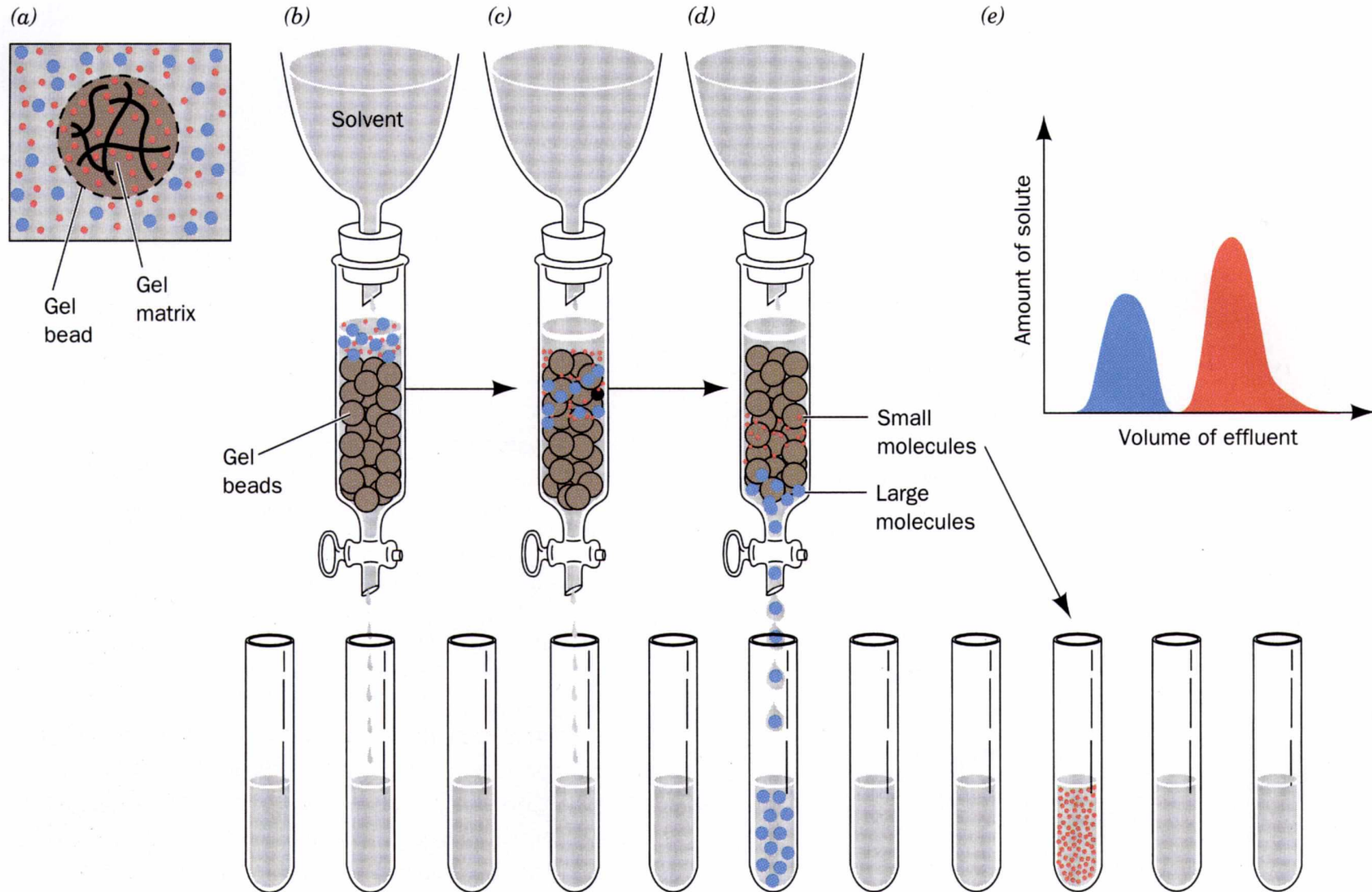
B. *Chromatographie par filtration sur gel*

Dans la *chromatographie par filtration sur gel*, appelée également *chromatographie par exclusion* ou par *tamisage moléculaire*, les protéines sont séparées selon leur taille et leur forme

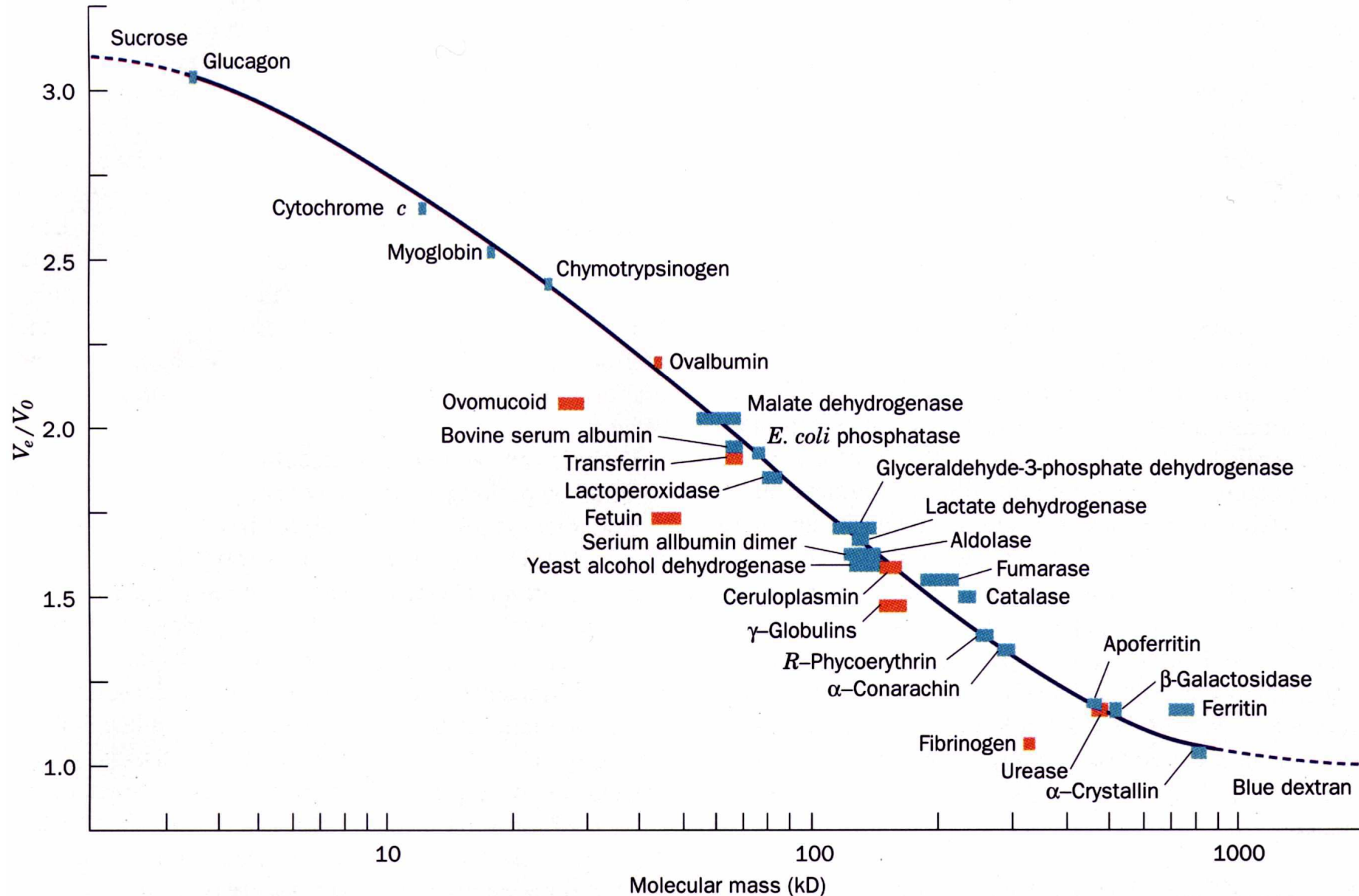
- a. La plupart des gels sont constitués de dextran (Sephadex), d'agarose ou de polyacrylamide

La filtration sur gel est souvent utilisée pour "dessaler" une solution protéique. Ainsi, on peut éliminer le sulfate d'ammonium d'une protéine qui a été précipitée par ce sel

Chromatographie par filtration sur gel



b. La chromatographie par filtration sur gel peut servir à estimer les masses moléculaires

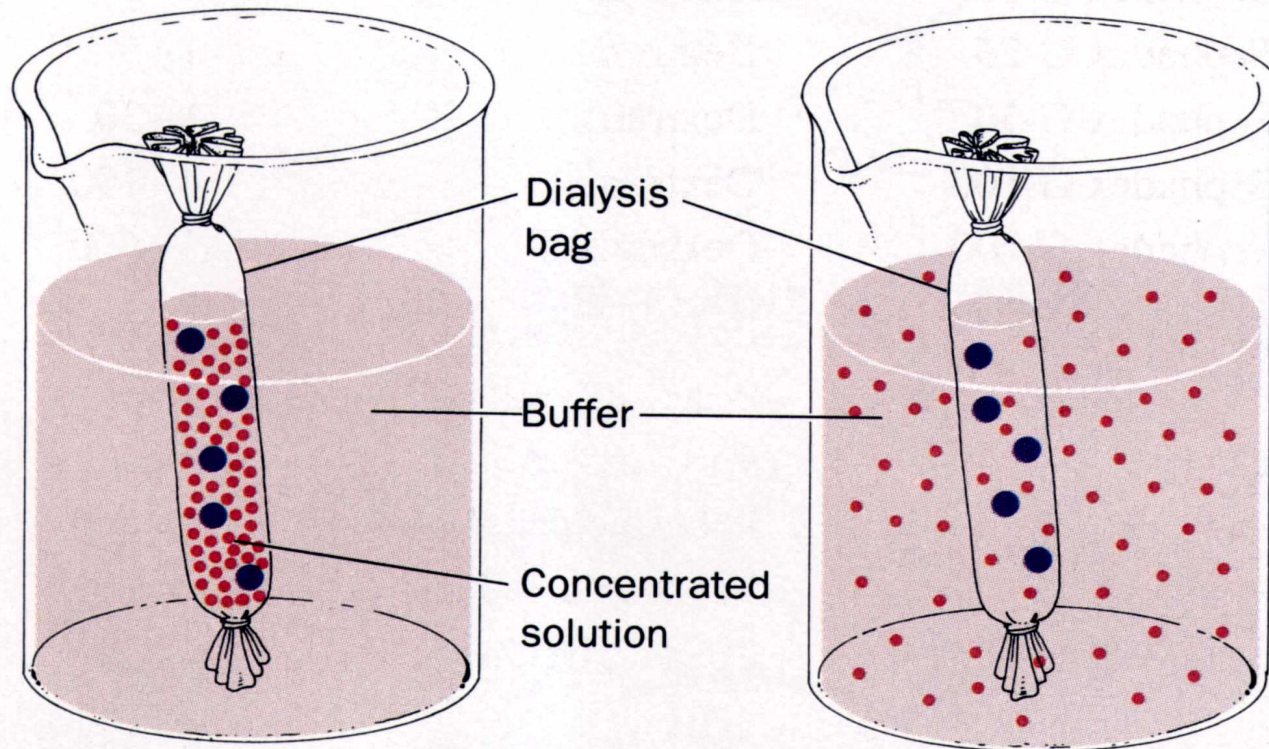


c. La dialyse est une forme de filtration moléculaire

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semipermeables dont les pores ont une taille inférieure aux macromolécules

(a) At start of dialysis

(b) At equilibrium



C. Chromatographie d'affinité

Dans la **chromatographie d'affinité**, un **ligand** qui se lie spécifiquement à la protéine est fixé par covalence à une matrice inerte et poreuse

Quand une solution protéique traverse ce matériel, la protéine d'intérêt se lie au ligand immobilisé, tandis que les autres sortent de la colonne. On peut récupérer la protéine désirée sous forme très pure en modifiant les conditions d'élution de sorte que la protéine se détache de la matrice chromatographique

Chromatographie d'affinité

Principe :

Repose sur la relative spécificité d'interaction d'une protéine pour certains ligands

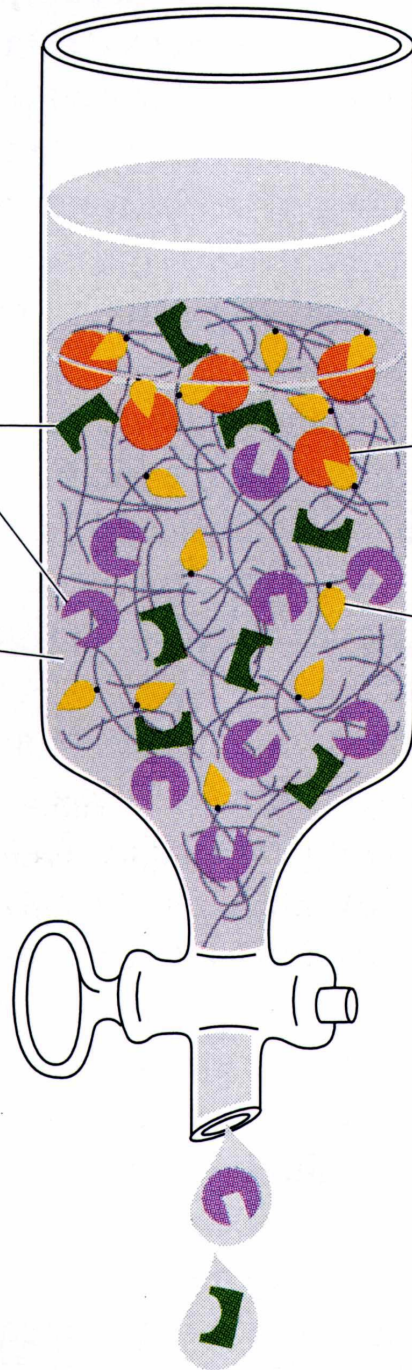
Exemple : affinité de l'hexokinase pour l'ATP

La protéine s'adsorbe sur un gel sur lequel le ligand est fixé de façon covalente

Elle est ensuite éluée en lavant avec un milieu contenant du ligand non fixé (ou en augmentant la concentration en sels, ou en changeant le pH)

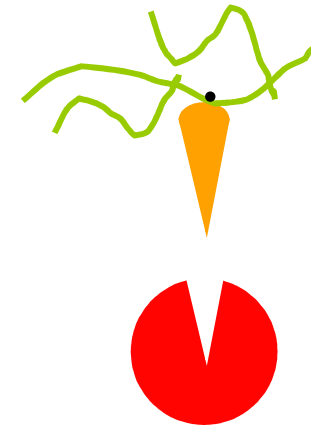
Macromolécules
with differing
ligand-binding
sites

Solid resin
matrix



Specific binding
of molecule to
matrix ligand

Matrix-anchored
ligand



Ligand fixé
à la matrice

Protéine ayant
de l'affinité pour
le ligand



Autres
protéines

4 ELECTROPHORESE

Séparation de solutés chargés par migration dans un champ électrique

- la migration dépend:
 - de la charge de la protéine
 - de sa taille
 - du support (gel plus ou moins réticulé, papier)
- dans la focalisation isoélectrique (électrophorèse dans gradient de pH)
migration dépend uniquement du pI
- dans l'électrophorèse "SDS-PAGE"* , la vitesse de migration dépend
 - de la taille de sous-unité (protéine dénaturée)
 - du degré de réticulation du gel

* Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

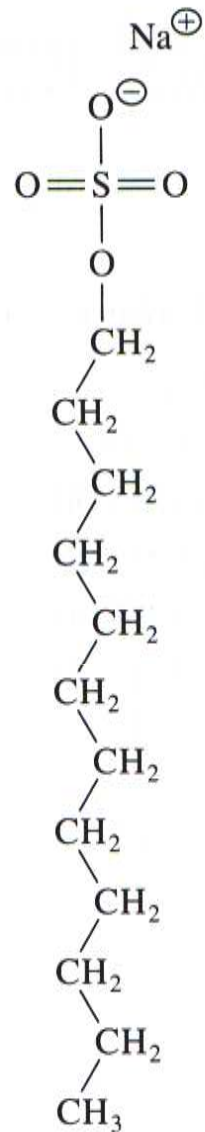


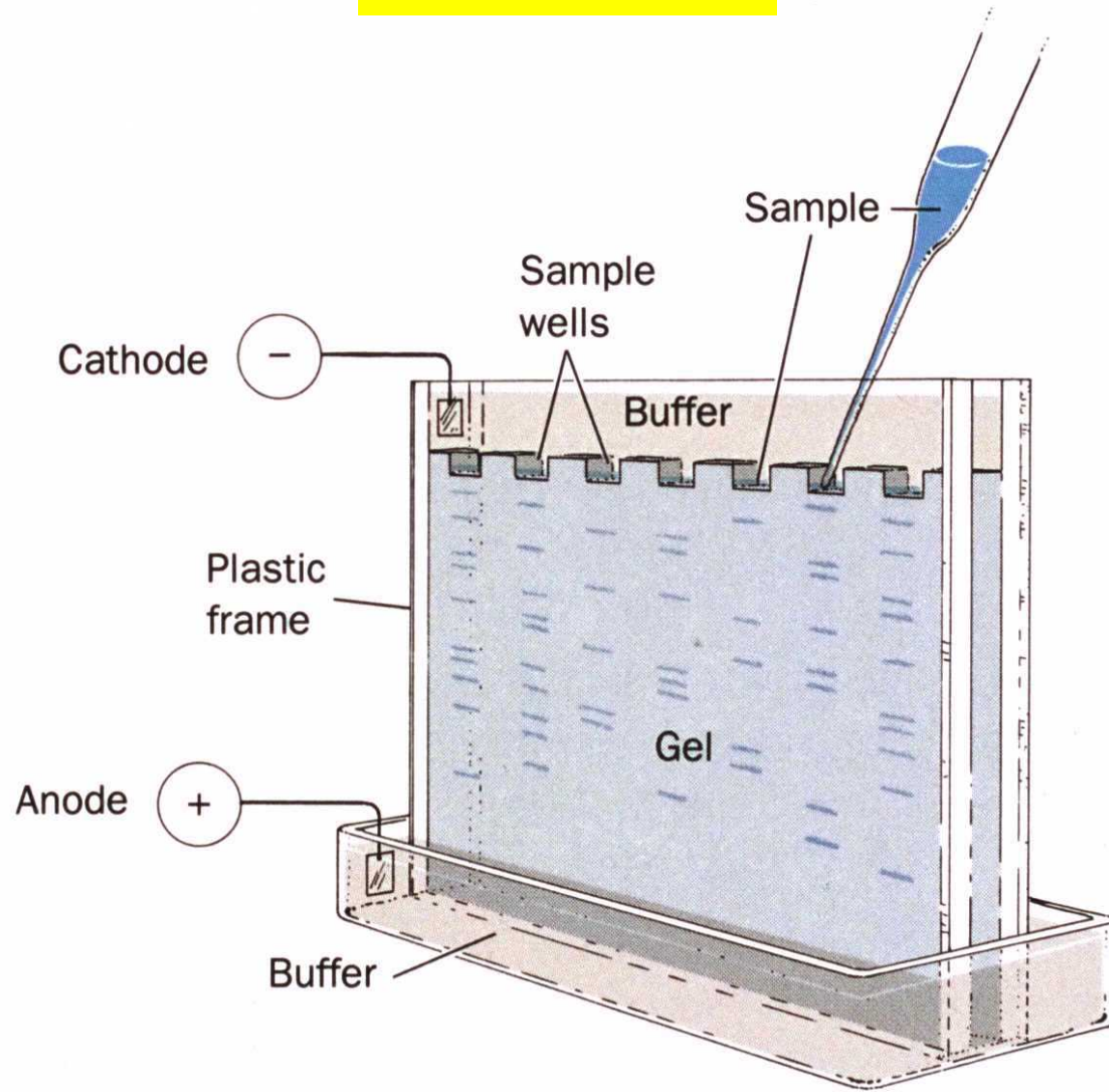
Figure 2.8 ▲
Sodium dodecyl sulfate (SDS), a synthetic detergent.

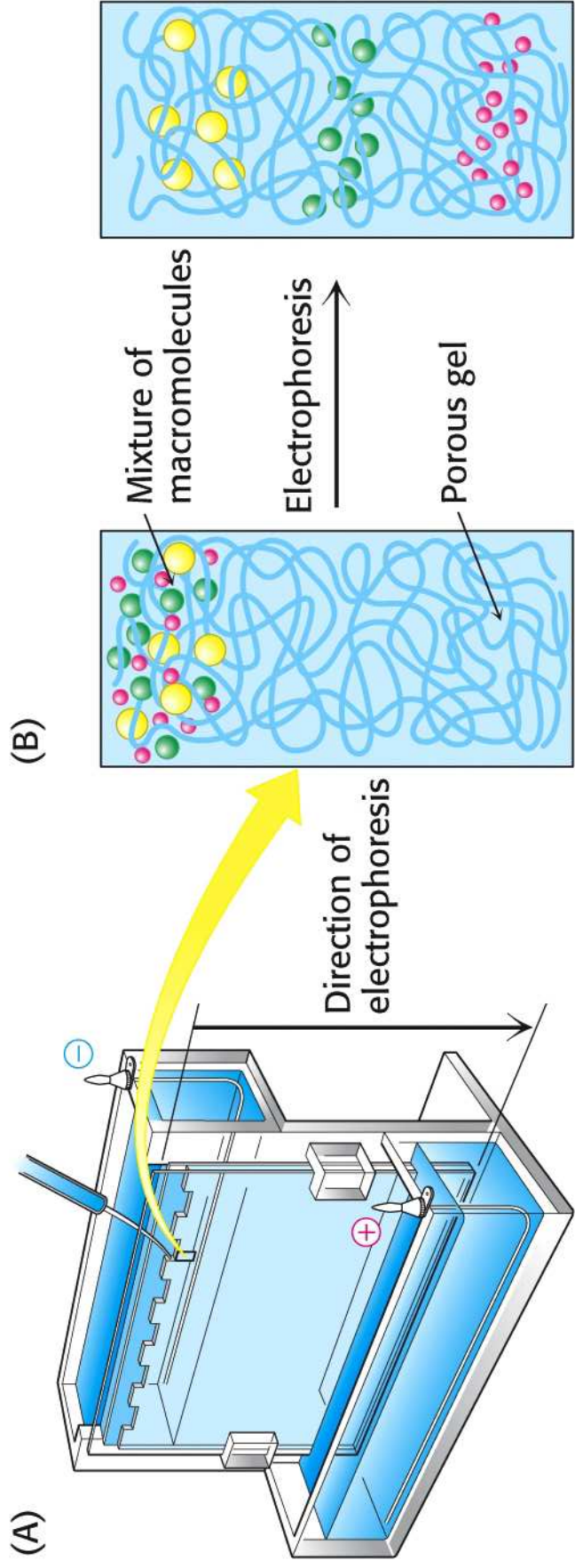
A. SDS-PAGE

Le SDS se lie très fortement aux protéines en leur conférant une forme de bâtonnet. Les protéines lient environ une molécule de SDS pour deux résidus d'acides aminés

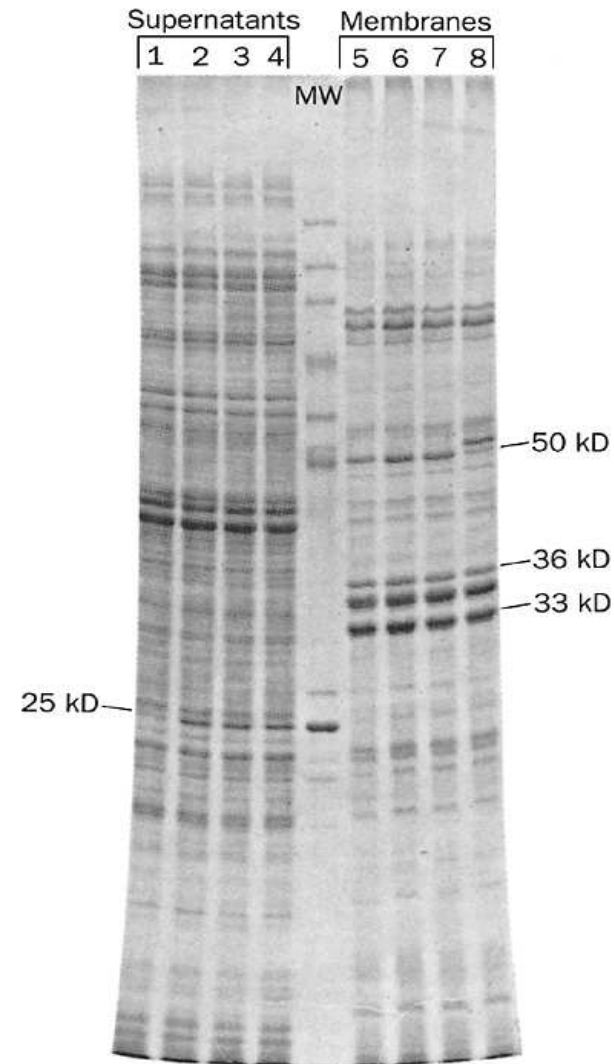
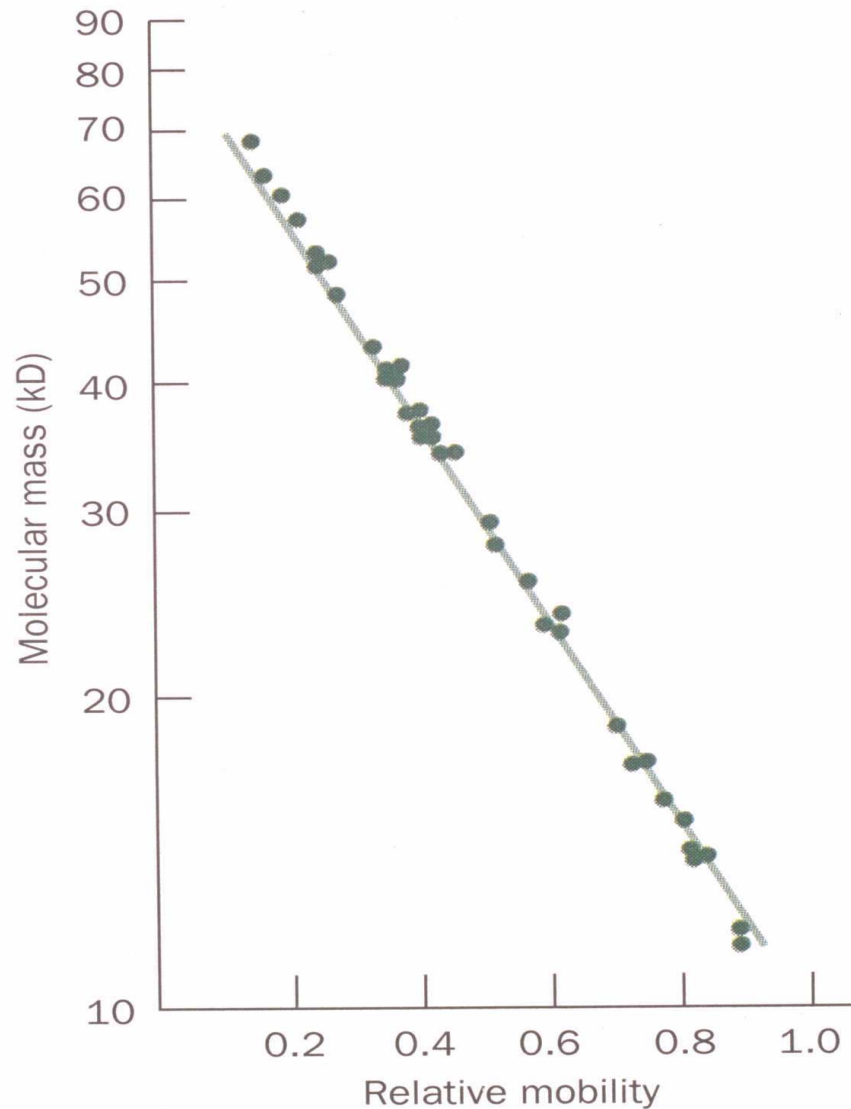
La forte charge négative apportée par le SDS masque la charge intrinsèque de la protéine. Par conséquent, l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide contenant du SDS (**SDS-PAGE**) les sépare en fonction de leur masse moléculaire et leur taille.

SDS-PAGE





Relation logarithmique entre la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique relative en SDS-PAGE

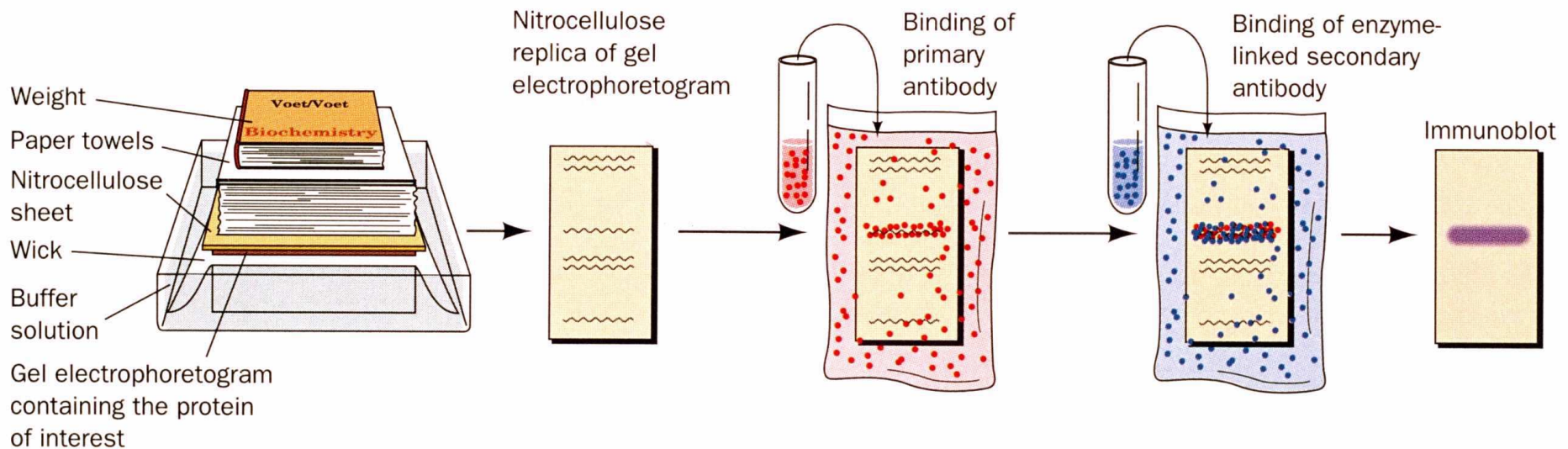


Courtesy of Giovanna F. Ames, University of California at Berkeley.

"Western blot" = "immunoempreinte"

Révélation d'une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique

- 1 Perform gel electrophoresis on a sample containing the protein of interest
- 2 Blot the proteins from the gel onto nitrocellulose
- 3 Block the unoccupied binding sites on the nitrocellulose with casein
- 4 Incubate with rabbit antibody of interest
- 5 Wash and incubate with an enzyme-linked goat anti-rabbit antibody
- 6 Assay the linked enzyme with a colorimetric reaction

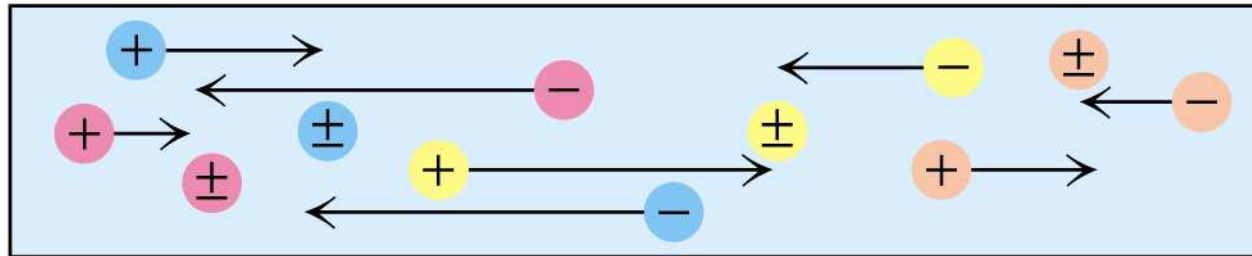


B. Focalisation isoélectrique

Si un mélange de protéines est soumis à une électrophorèse dans une matrice ayant un gradient de pH et dont le pH augmente lentement de l'anode vers la cathode, chaque protéine va migrer jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son point isoélectrique:

(A)

Low pH
(-)



High pH
(+)

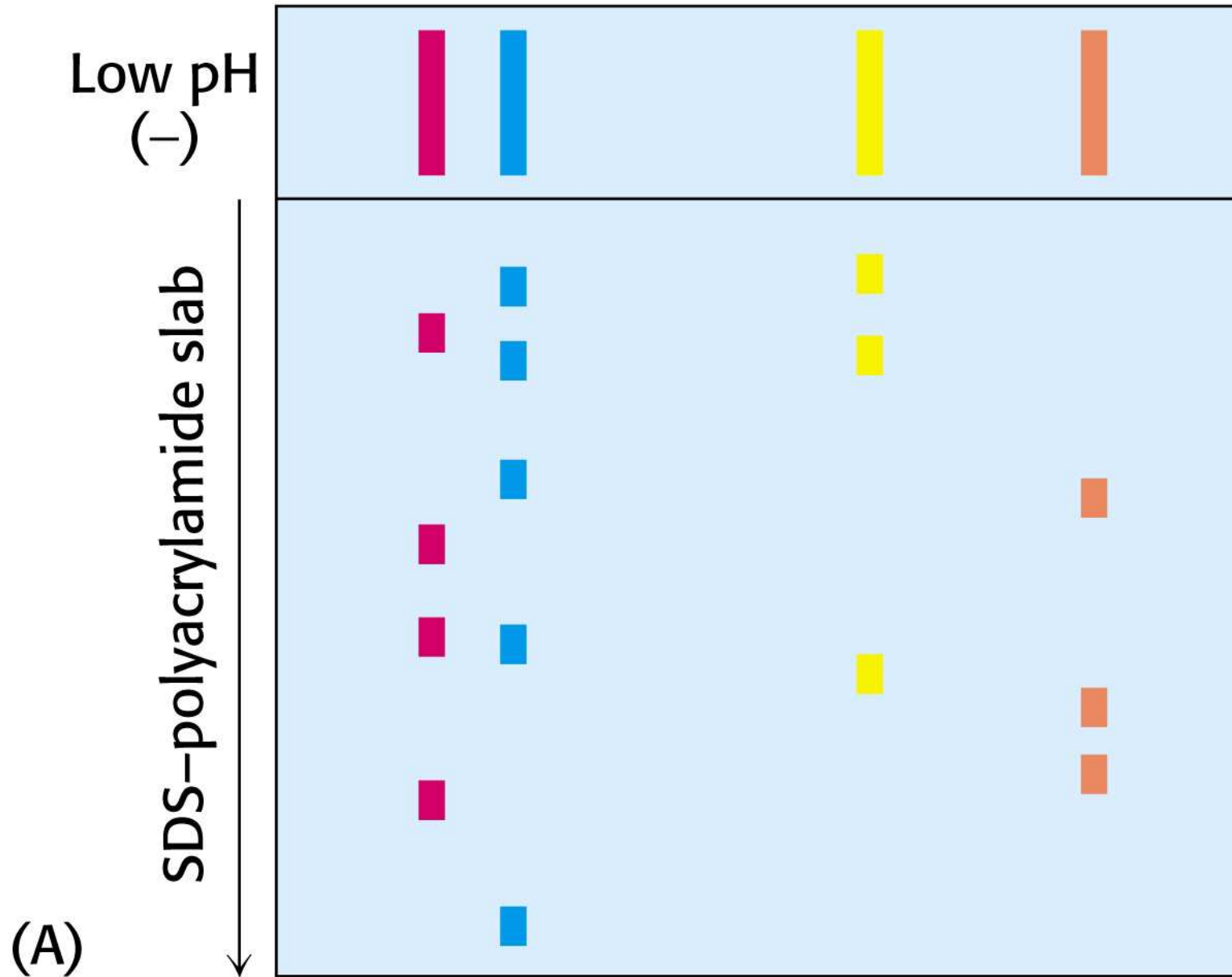
(B)

Low pH
(-)



High pH
(+)

Electrophorèse sur gel en deux dimensions (électrophorèse 2D)

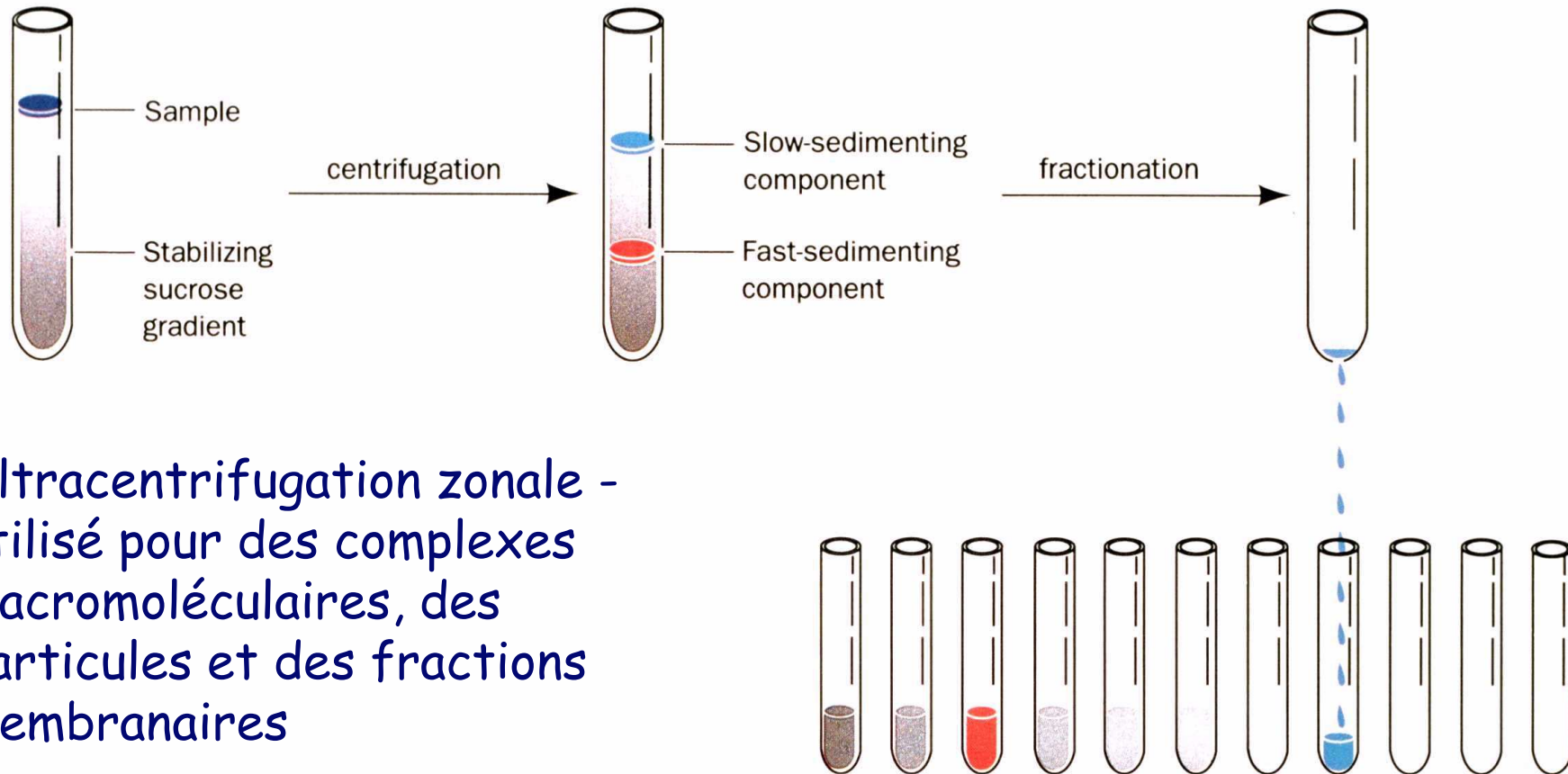


5 ULTRACENTRIFUGATION

L'ultracentrifugeuse, mis au point par The Svedberg en 1923, peut atteindre des vitesses de rotation de 80000 rpm (au-delà de 120 000 g) et permet la sédimentation de macromolécules. La masse d'une particule peut être calculée à partir de son coefficient de sédimentation, analogue à la mobilité électrophorétique vue dans le paragraphe précédent mais en unités **Svedberg (S)**

A. Ultracentrifugation préparative

Dans l'**ultracentrifugation zonale**, une suspension protéique est soigneusement déposée au-dessus d'un **gradient de densité** de saccharose ou du chlorure de césium . Au cours de la centrifugation, chaque particule traverse le gradient en fonction de son coefficient de sédimentation:



Ultracentrifugation zonale -
utilisé pour des complexes
macromoléculaires, des
particules et des fractions
membranaires