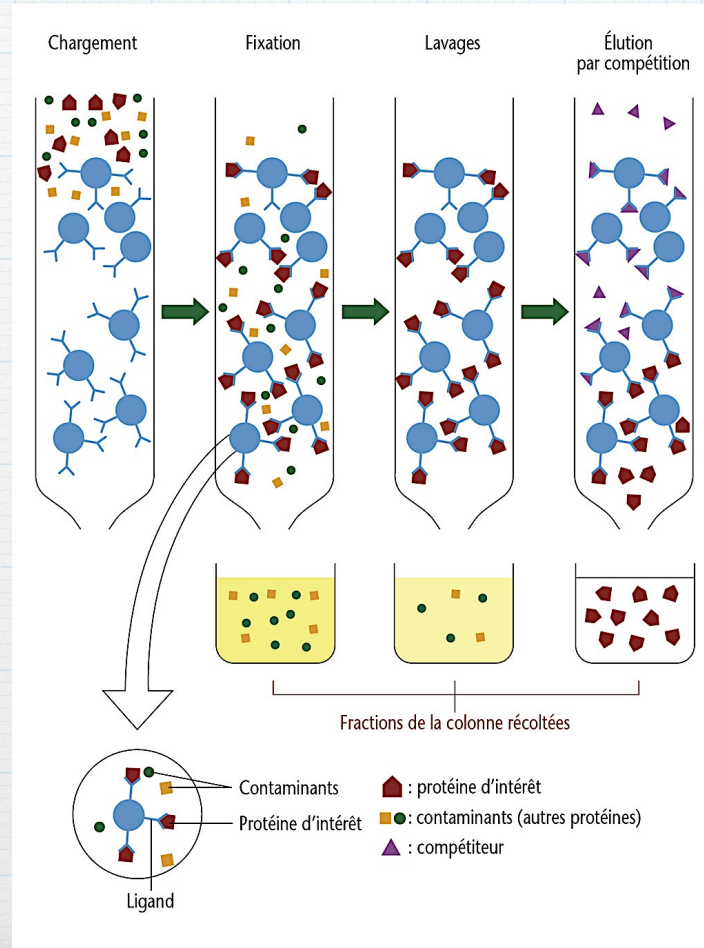


Méthodes d'étude des protéines

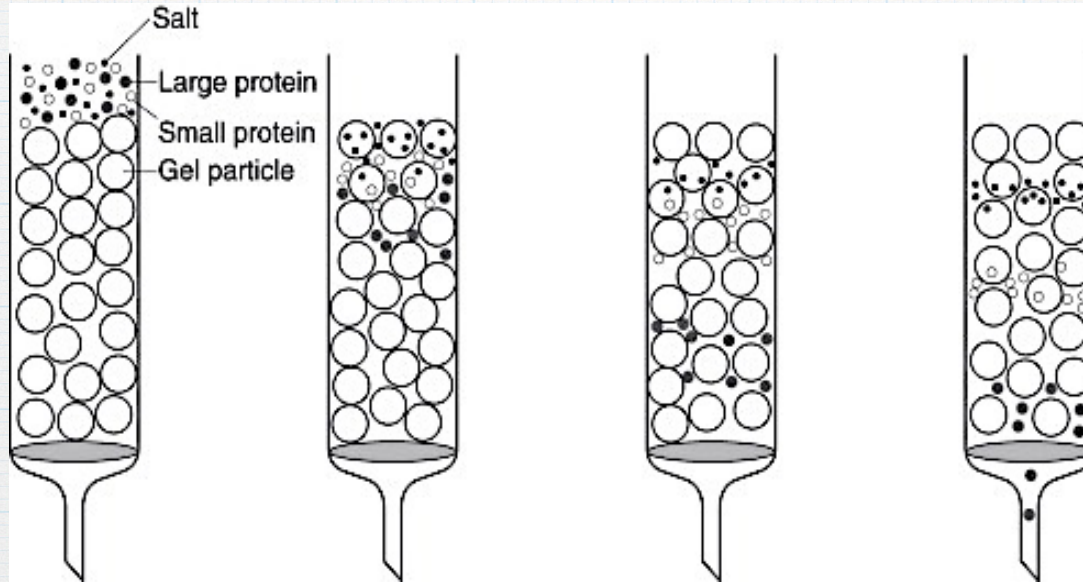
Techniques de base

1. Les chromatographies

Les chromatographies sur colonne



La chromatographie d'exclusion



Les composés les plus gros ne passent pas à travers les pores fins des billes du gel donc sont élués en premier. Plus les molécules sont petites, plus elles traversent de billes et sont ralenties dans leur progression : elles sortent en dernier de la colonne.

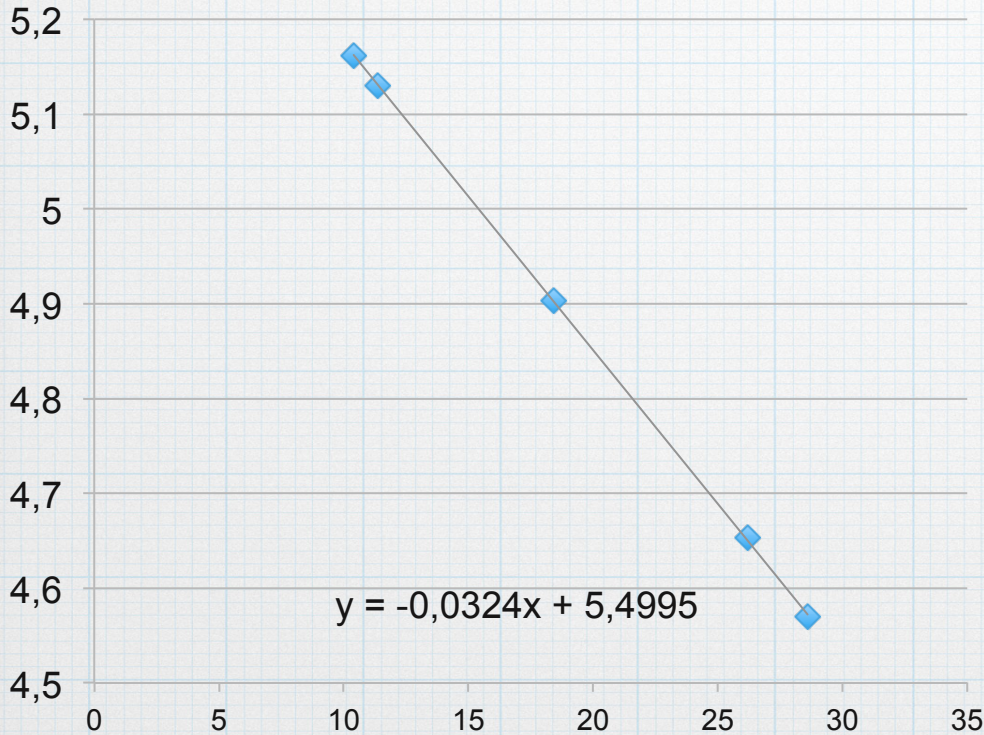
Exercice

Une colonne de gel filtration est étalonnée avec 5 protéines de masse connue. Les temps de rétention obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Masse moléculaire MM (Da)	Log MM	Temps de rétention en min	Volume d'élution en mL
Aldolase	145 000		10,4	52
Lactate déshydrogénase	135 000		11,4	57
Phosphatase alcaline	80 000		18,4	92
Ovalbumine	45 000		26,2	131
Lactoglobuline	37 100		28,6	143

Sachant que la glucokinase présente un temps de rétention de 21 minutes, estimer sa masse moléculaire en Da.

Corrigé



Régression linéaire

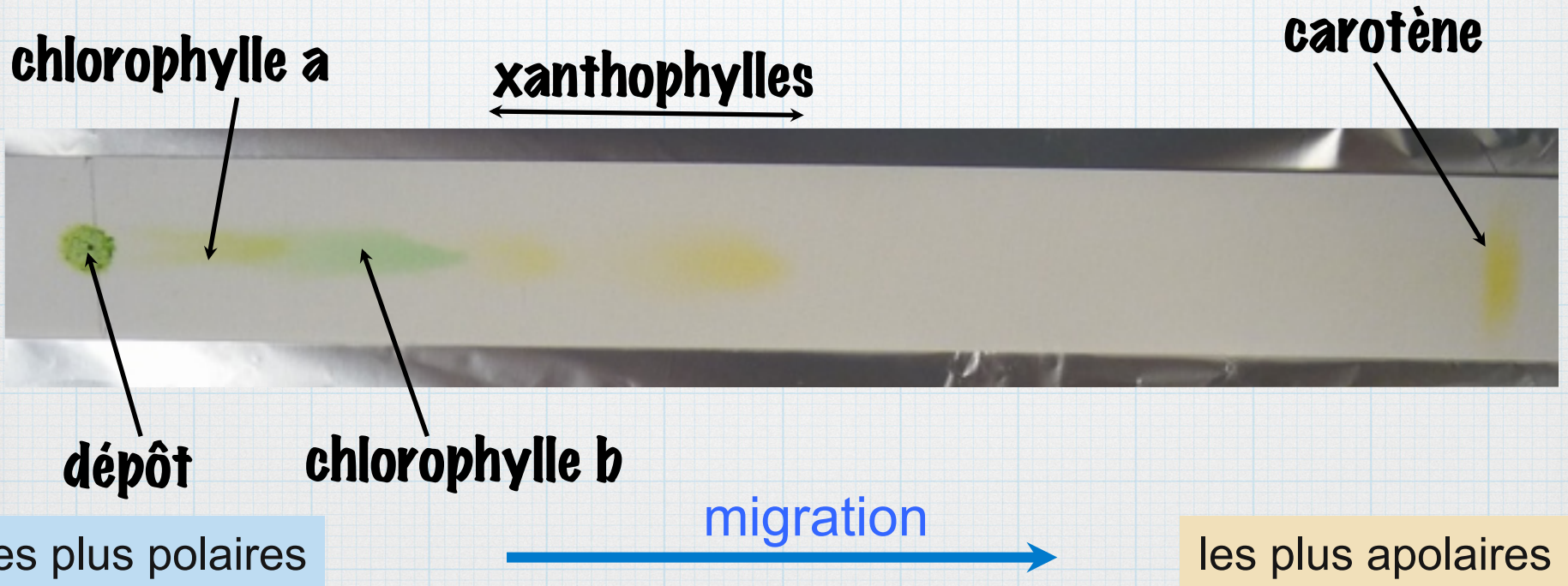
Pour $x = 21$ minutes,
alors $y = 4,8191$
donc $PM = 10^{4,8191}$

$PM = 65\,932$ Da

La masse moléculaire de la
glucokinase est d'environ
66 kDa.

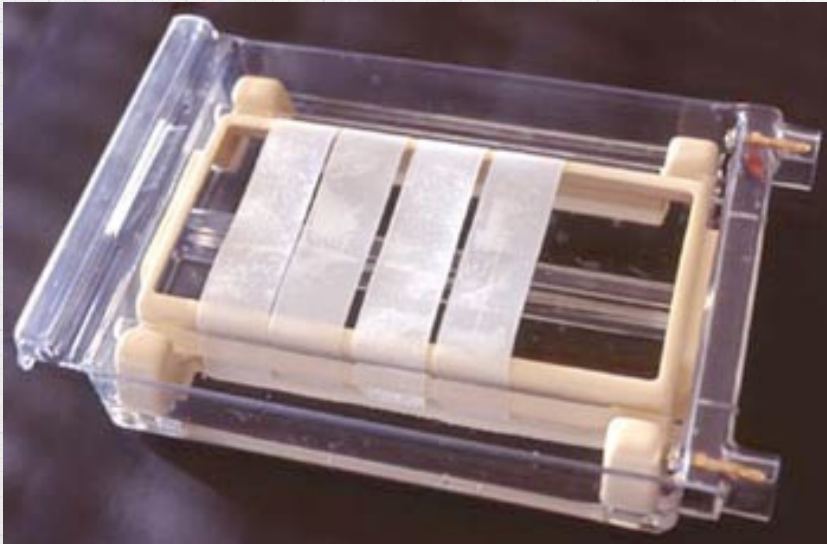
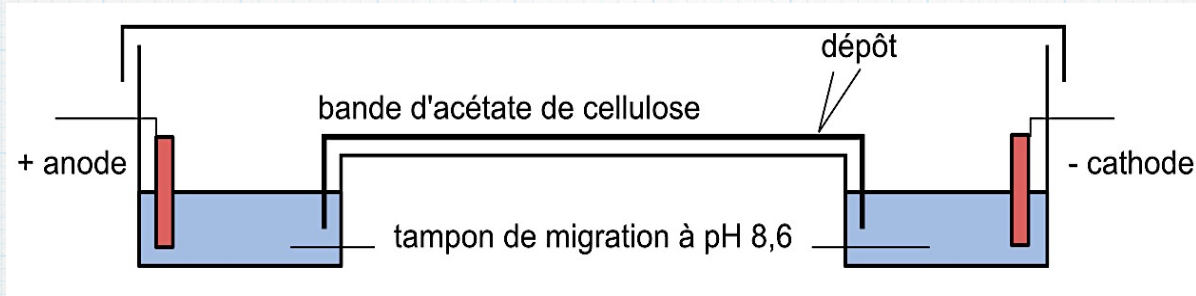
La chromatographie sur couche mince

Pigments photosynthétiques séparés sur bande de cellulose, en solvant apolaire



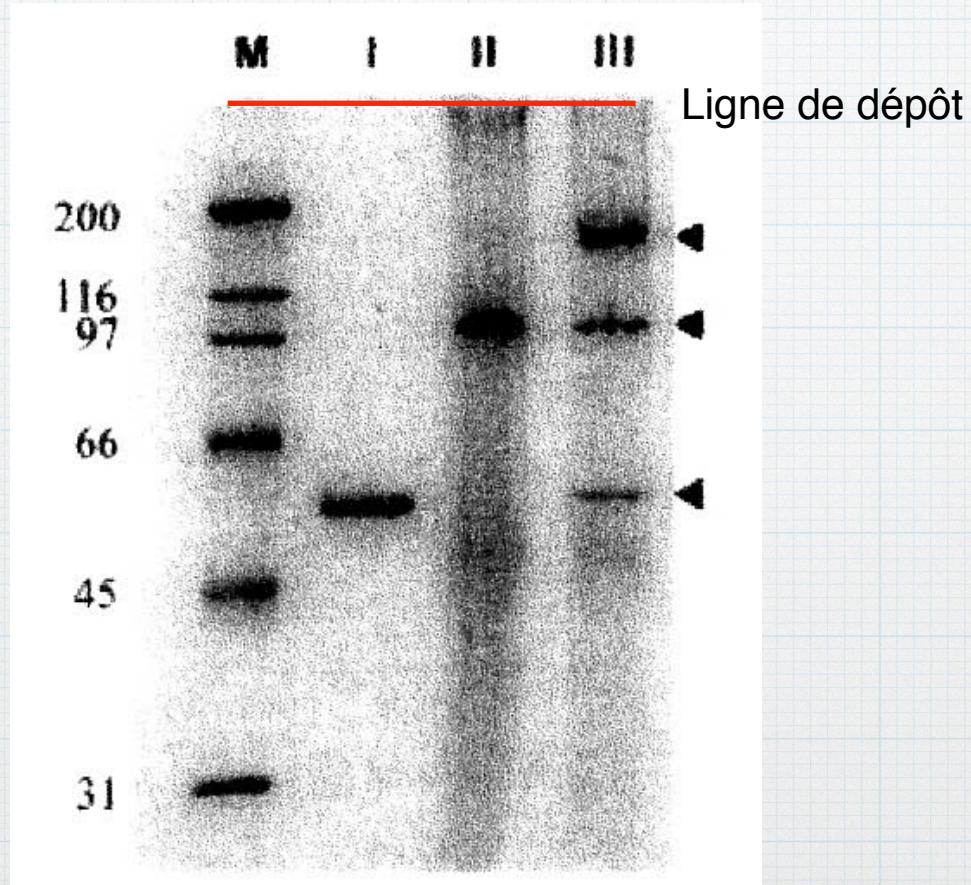
2. Les électrophorèses

Principe



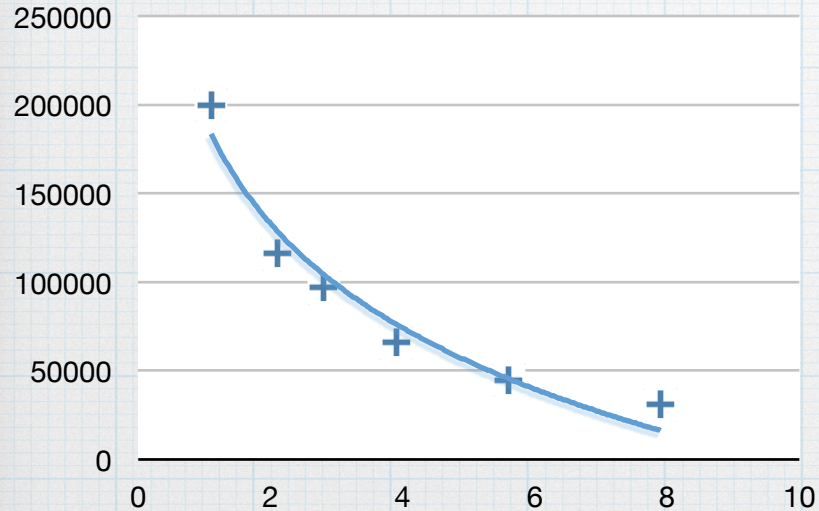
Chargement d'un gel d'agarose

Exercice : ABP, le récepteur d'auxine

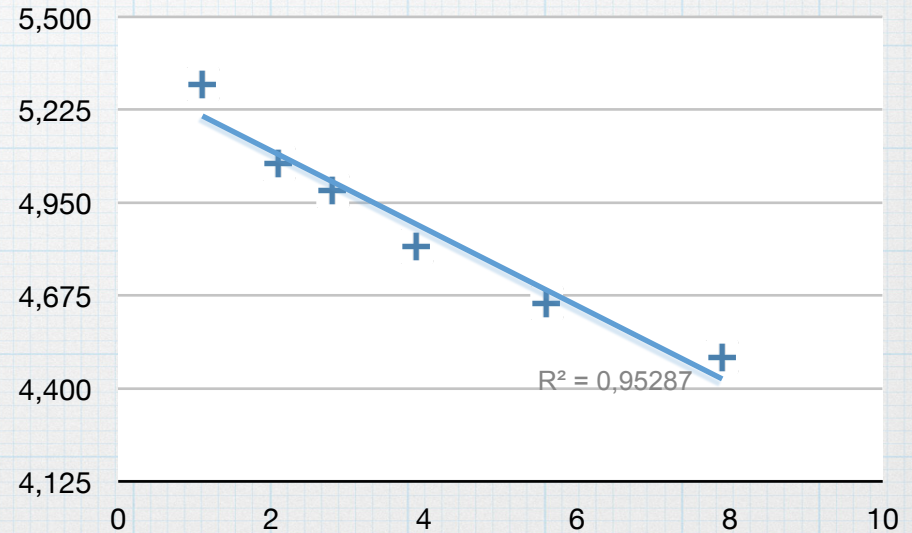


Exercice : ABP, le récepteur d'auxine

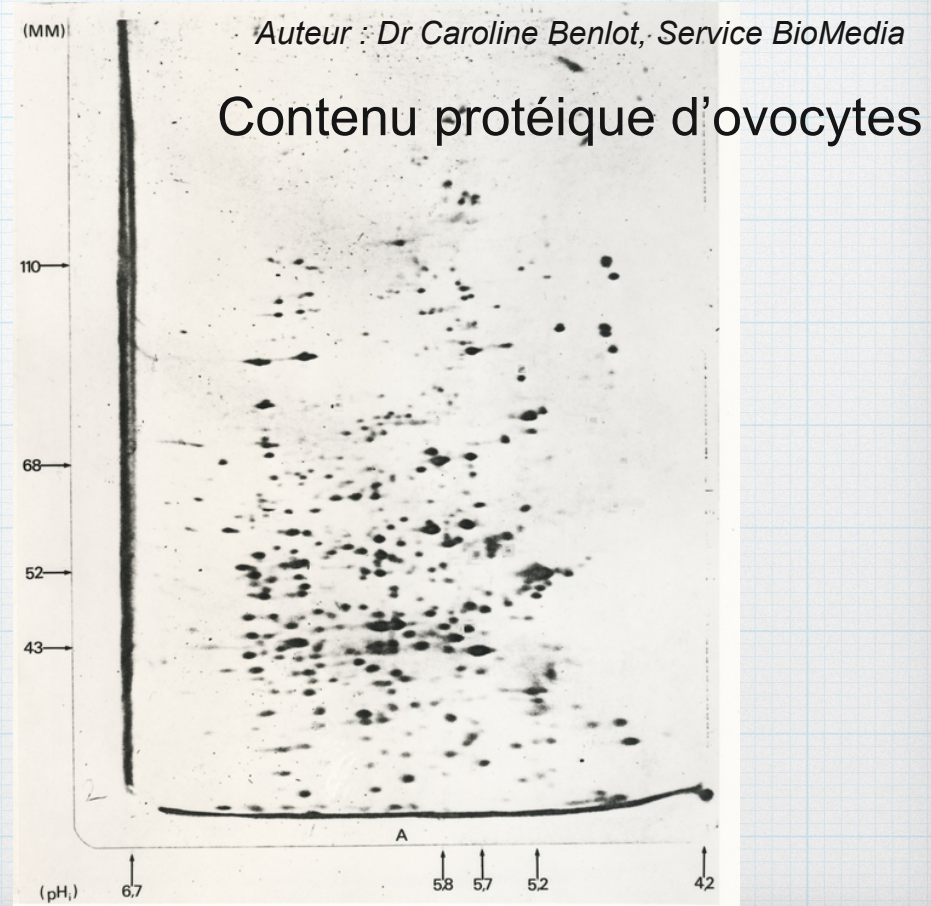
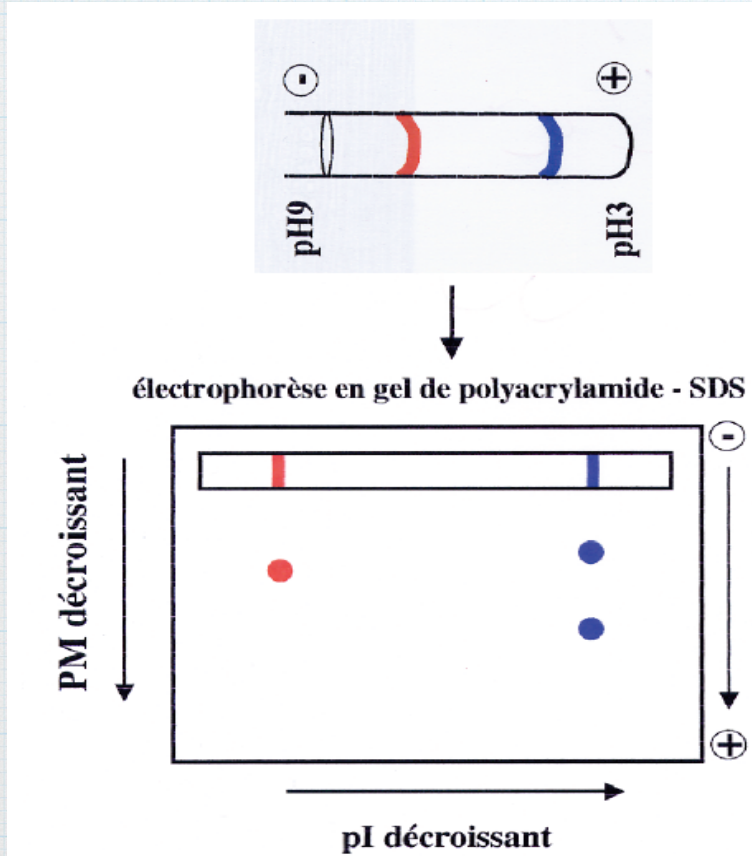
Construction du PM en fonction de la distance de migration



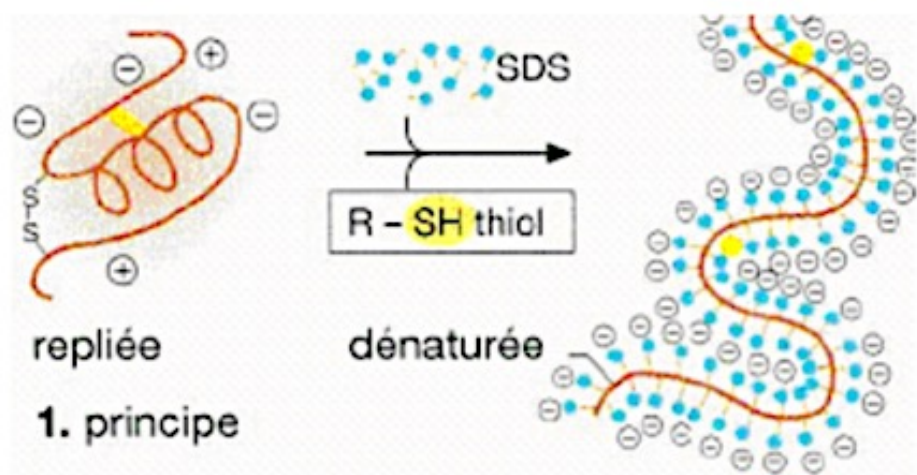
Construction de Log(PM) en fonction de la distance de migration



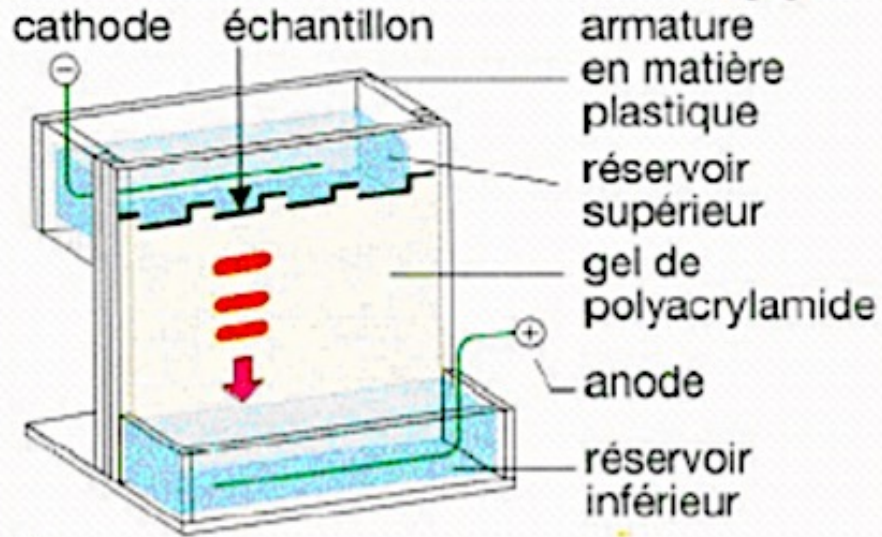
L'électrophorèse à deux dimensions



Électrophorèse SDS-PAGE



1. principe



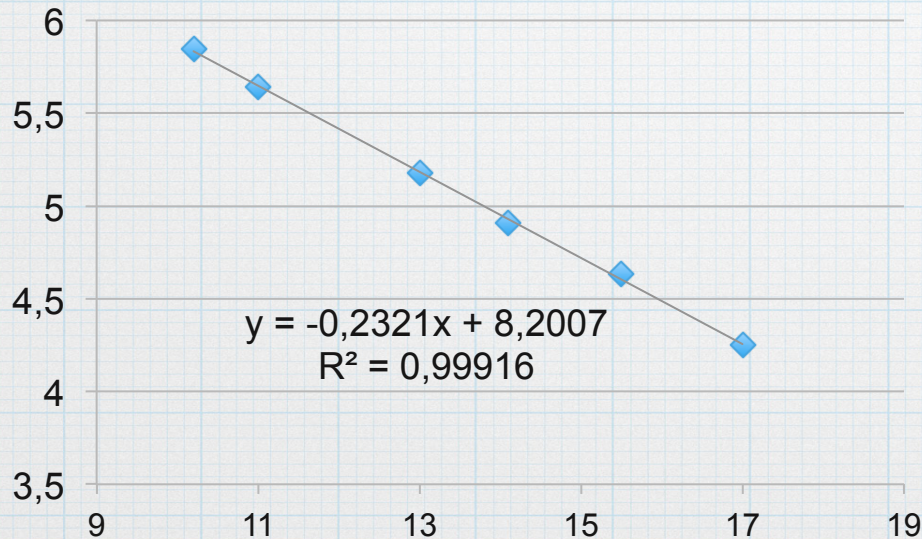
2. appareil

Exercice : la RubisCO

<https://www.lsbio.com/proteins/>

MM (Da)	T _R	MM (Da)	T _R	MM (Da)	T _R
699 000	10,2	150 000	13	43 000	15,5
440 000	11	81 000	14,1	17 700	17

Calibration de la colonne de chromatographie d'exclusion

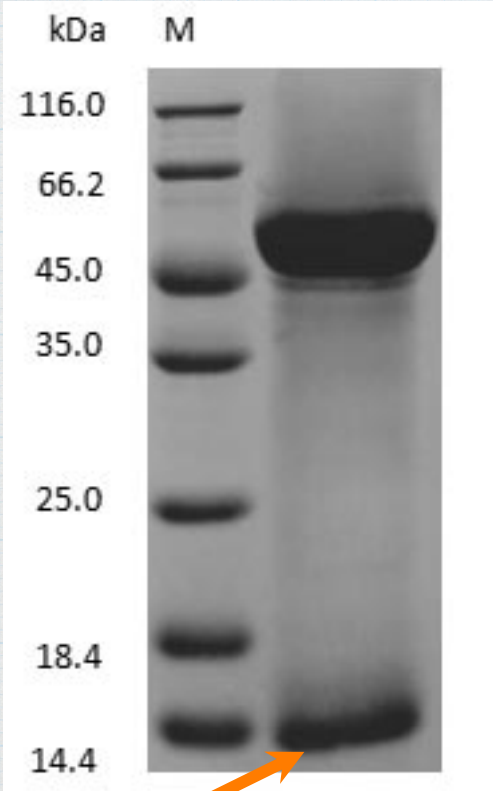


Pour $x = 10,8$ minutes,
alors $y = 5,69402$
donc $PM = 10^{5,69402}$

$PM = 494\,433\text{ Da}$

Exercice : la RubisCO

<https://www.lsbio.com/proteins/>



Deux bandes sont observées : la protéine aurait une structure IV avec deux types de sous-unités : une légère L et une lourde H.

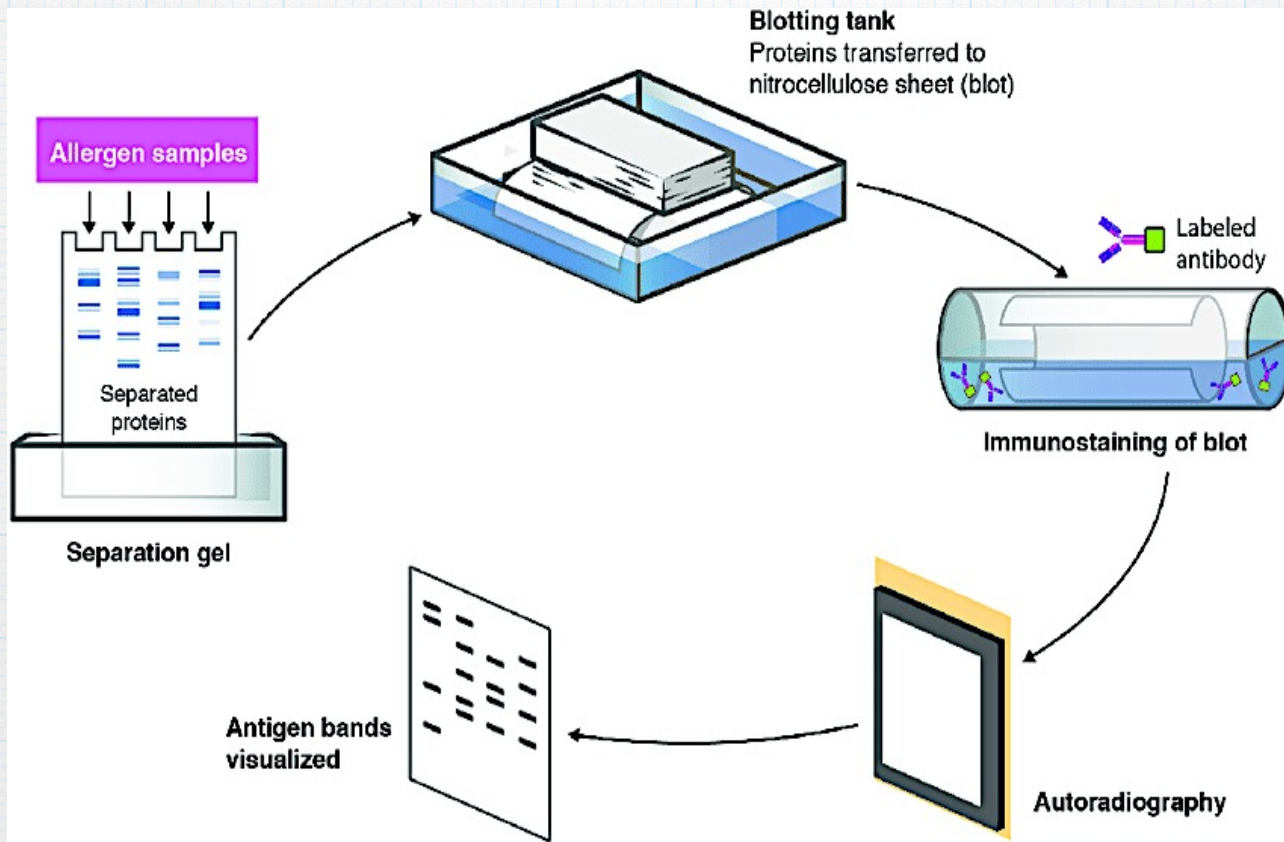
La sous-unité H représente entre 45 et 50 kDa.
La sous-unité L représente environ 15 kDa.

Il y a autant d'exemplaires de chaque sous-unités.
Un dimère représente entre 60 et 75 kDa. L'enzyme totale pèse environ 495 kDa.

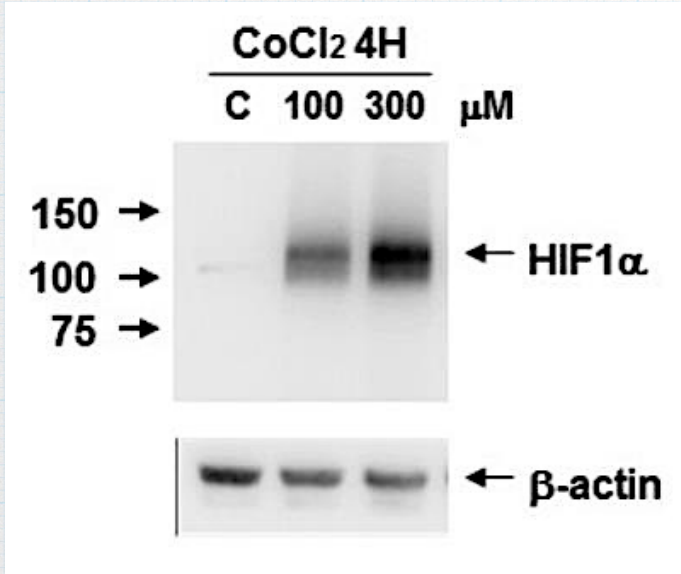
=> Hypothèse de 8 dimères L_8H_8

bande moins colorée pour L car la protéine, plus petite, fixe moins de colorant

Le Western blot



Exercice : l'hypoxie



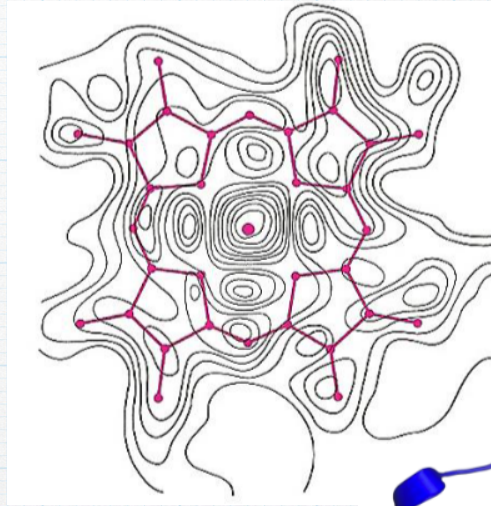
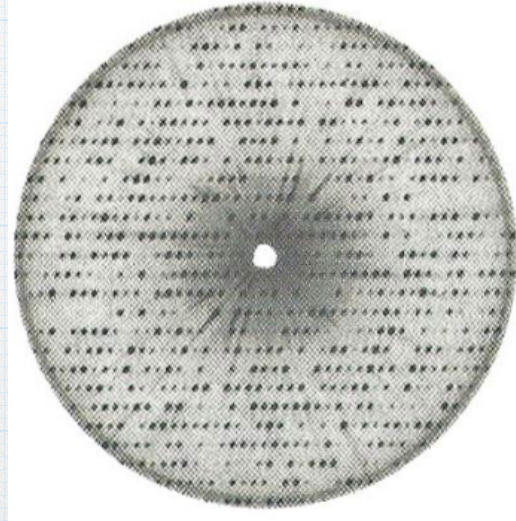
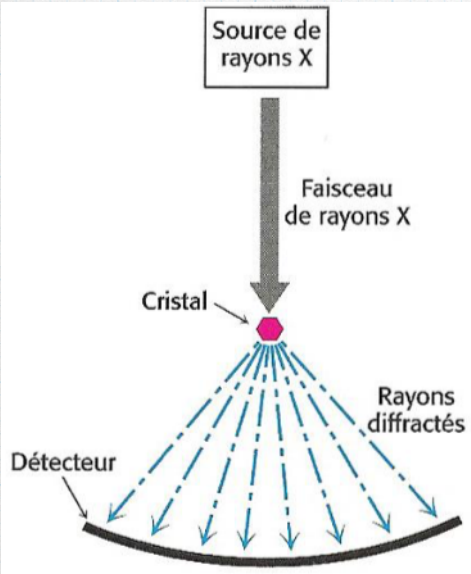
La β -actine est une protéine de référence dont on sait qu'elle n'est pas affectée par le traitement expérimental (le chlorure de cobalt). Elle est retrouvée en même quantité dans les cellules et dans les 3 conditions étudiées ici. Cela permet de s'assurer que les éventuelles différences observées pour la protéine d'intérêt (HIF1 α) ne sont pas dues au fait qu'on aurait pris des quantités différentes de protéines totales entre les différentes conditions par exemple mais bien dues au chlorure de cobalt.

HIF1 α est produite par les cellules cancéreuses en cas d'hypoxie.

3. Modélisations moléculaires

La cristallographie aux rayons X

Un spectre de diffraction
(ici myoglobine)

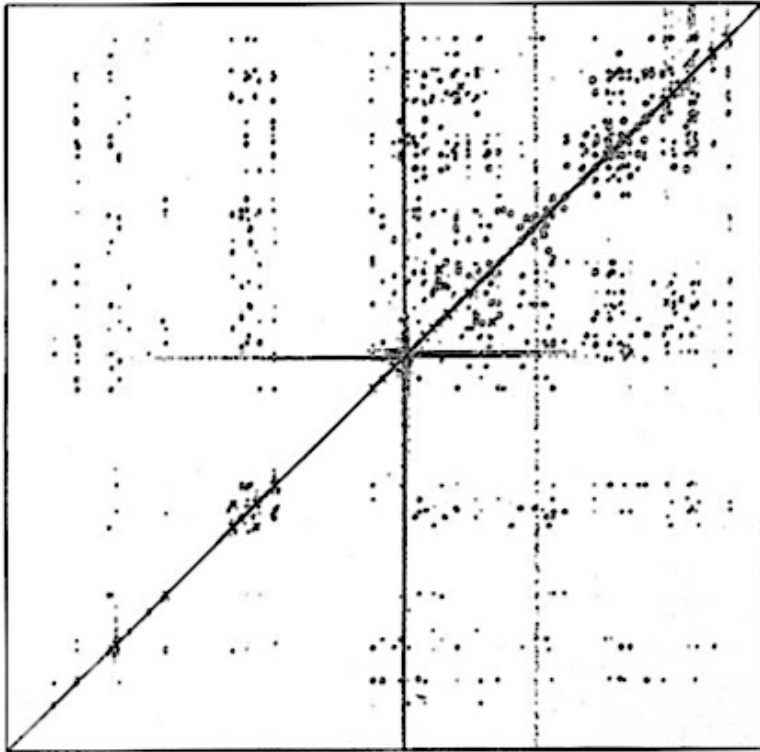


Première analyse : profil de densité électronique

Deuxième niveau d'interprétation : la structure 3D



La spectroscopie RMN

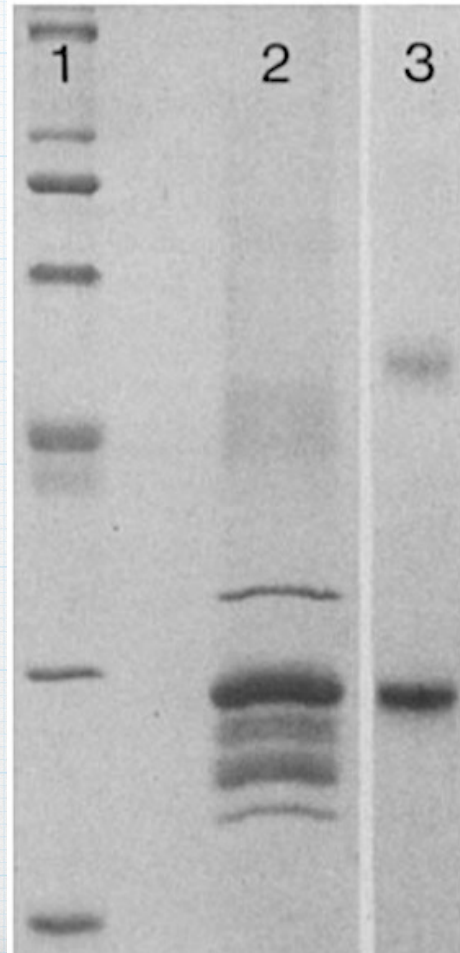


Spectroscopie RMN. (A) Un exemple de données obtenues par un appareil de RMN. Ce spectre obtenu en RMN bidimensionnelle dérive du domaine C-terminal de l'enzyme cellulase. Les points représentent des interactions entre les atomes d'hydrogène qui sont de proches voisins dans la protéine et donc reflètent la distance qui les sépare. Des calculs informatiques complexes, en conjonction avec la connaissance de la séquence en acides aminés de la protéine, permettent d'en extraire une structure compatible possible. (B) Dix structures de l'enzyme, qui satisfont toutes également aux contraintes de distances, sont représentées superposées les unes sur les autres, ce qui donne une bonne indication de la structure tridimensionnelle probable. (Dû à l'obligeance de P. Kraulis.)

(B)

Exercice : les connexines

myosine (200 kDa) –
phosphorylase A (95 kDa) –
serumalbumine bovine (68 kDa) –
gamma-globuline (50 kDa) –
actine (43 kDa) –
aldolase (40 kDa) –
anhydrase carbonique (29 kDa) –
RNase (13 kDa) –

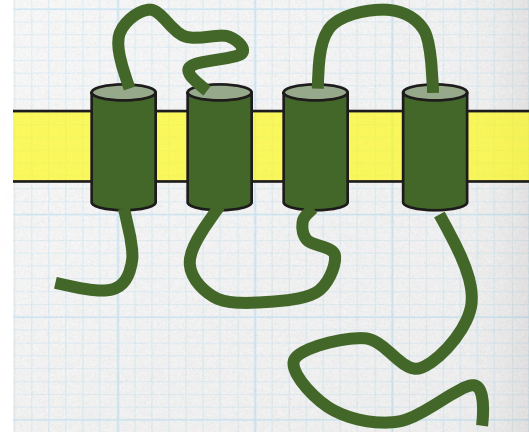
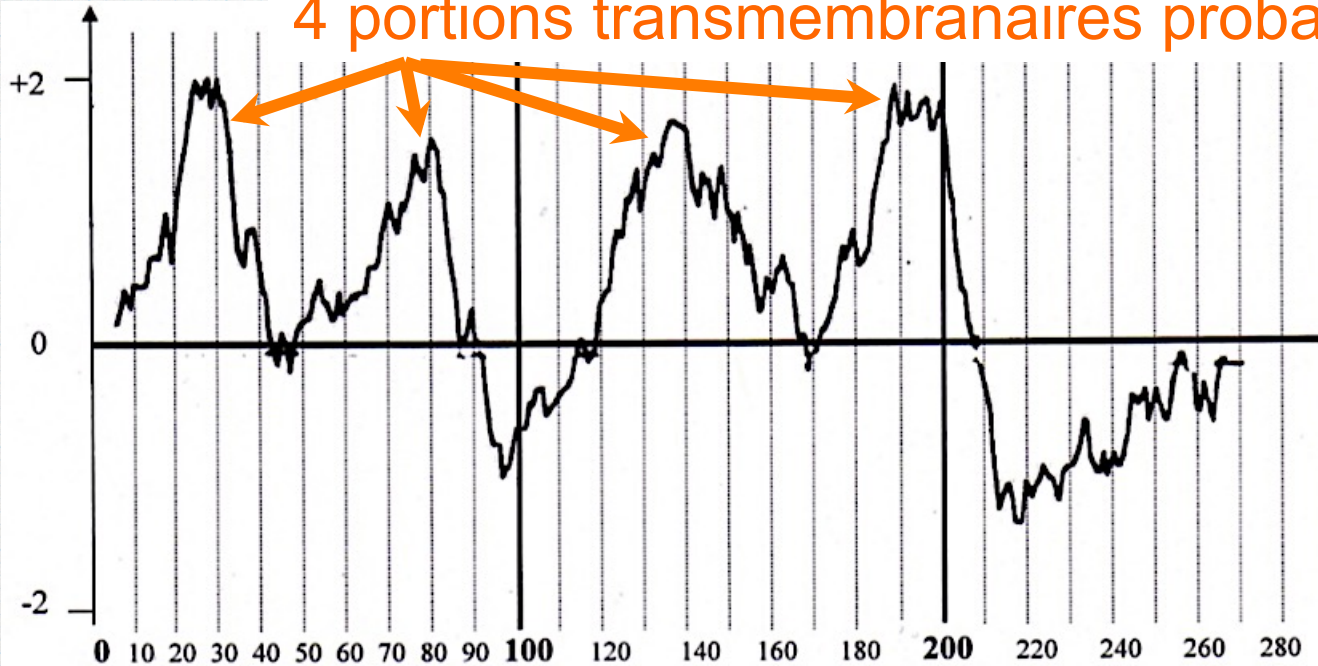


Piste 2 : 5 protéines associées dans les jonctions gap

Piste 3 : la connexine représente une masse moléculaire de 26 à 28 kDa environ

Exercice : les connexines

4 portions transmembranaires probables



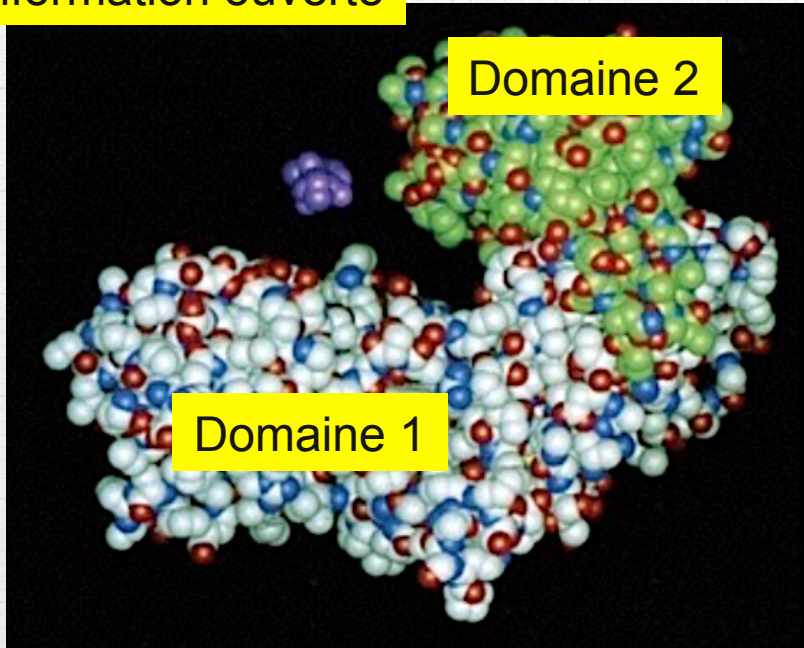
Préférence des
acides aminés =
hélices ?
Orientation
inconnue

Il y a 270 acides aminés auquel on a attribué un indice d'hydropathie : il y a donc 275 acides aminés. La masse totale est donc évaluée à 27,5 kDa.

4. Analyse fonctionnelle des protéines

Exercice : l'hexokinase

Conformation ouverte



Conformation fermée
Rotation de 12°

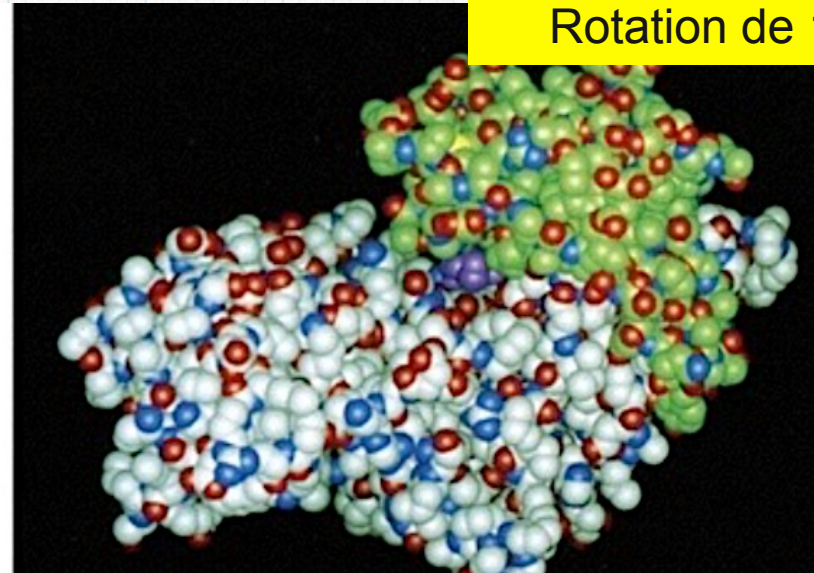
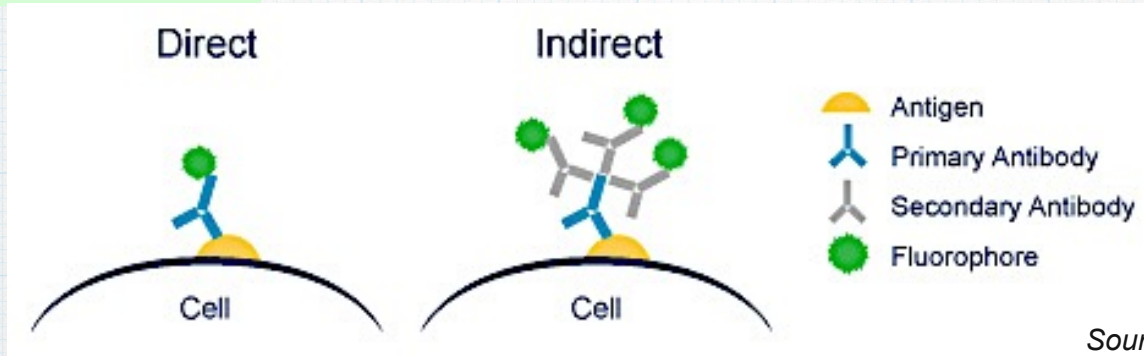


Figure 1 – modèle tridimensionnel de l'hexokinase en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de son substrat, le glucose, visible en violet
(Source : Kuser et al, Wiley Online Library, 2008)

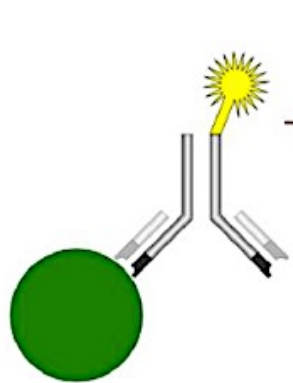
L'immunomarquage

Immunofluorescence



Source : M. Bouchene – Pharmacours

3 techniques d'immunomarquages



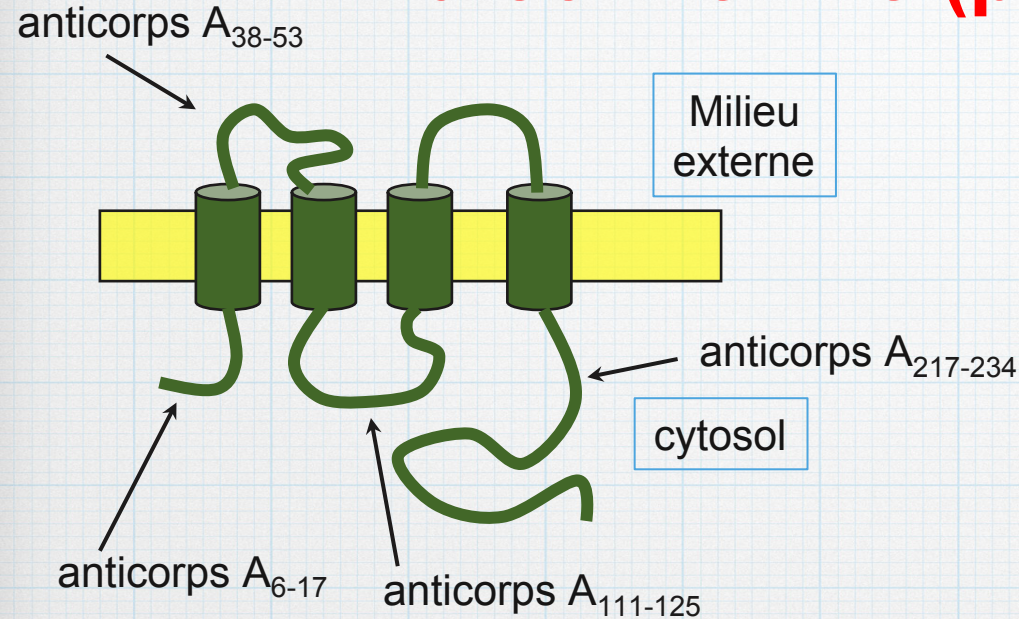
Radio-isotopes: émission d'un rayonnement

Fluorochrome: émission d'une fluorescence

Enzymes: catalyse de la formation d'un produit coloré

Source : Faculté de médecine Teliidjii

La connexine (partie 2)



Marquage de portions extramembranaires (donc hydrophiles)

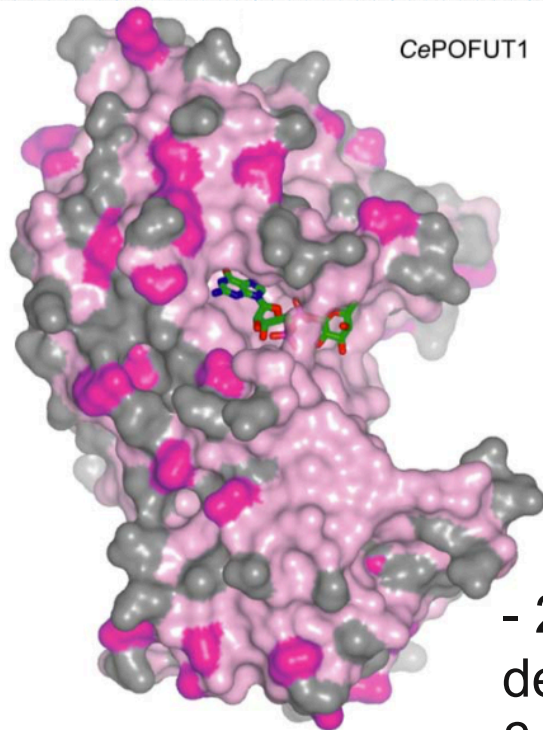
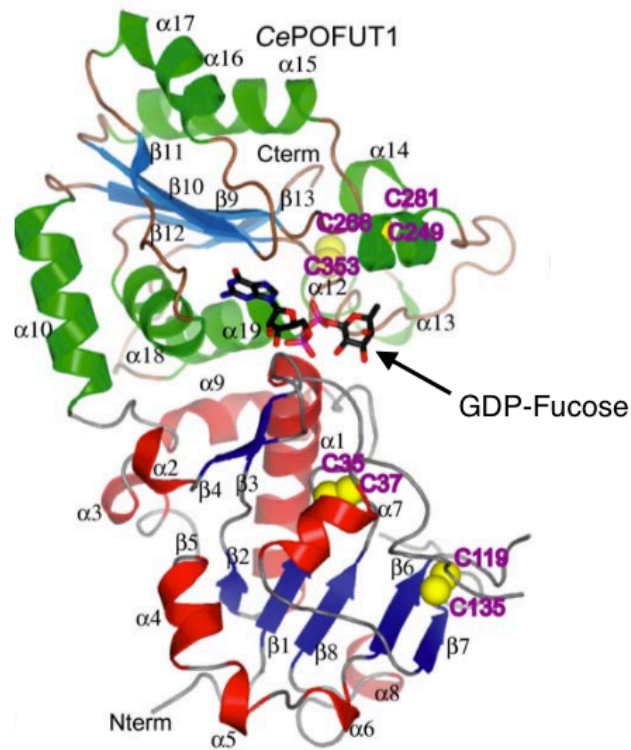
Lot 1 = témoin

Lot 2 = membranes externes serrées donc séquence inaccessible aux anticorps

Lot 3 = les deux côtés sont accessibles aux anticorps

Séquences accessibles seulement si on sépare les membranes avec les anticorps A_{38-53} => cette séquence est externe.

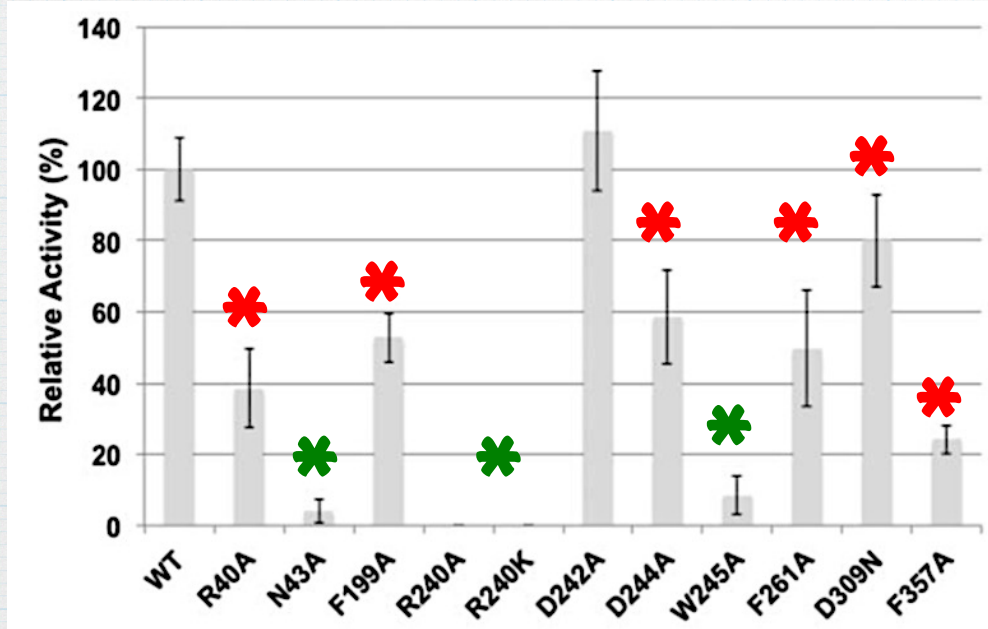
Exercice : mutagenèse dirigée de POFUT1



Substrats = fucose et séquence avec un acide aminé portant une fonction OH comme la sérine.

- 2 domaines comportant des hélices α et des brins β liés en feuillet.
- une poche en creux

Exercice : mutagenèse dirigée de POFUT1



Arginine R40

Asparagine N43 avec NH_3^+

Phénylalanine F199

Arginine R240 avec NH_3^+

Aspartate D244

Tryptophane W245 volumineux

Phénylalanine F261

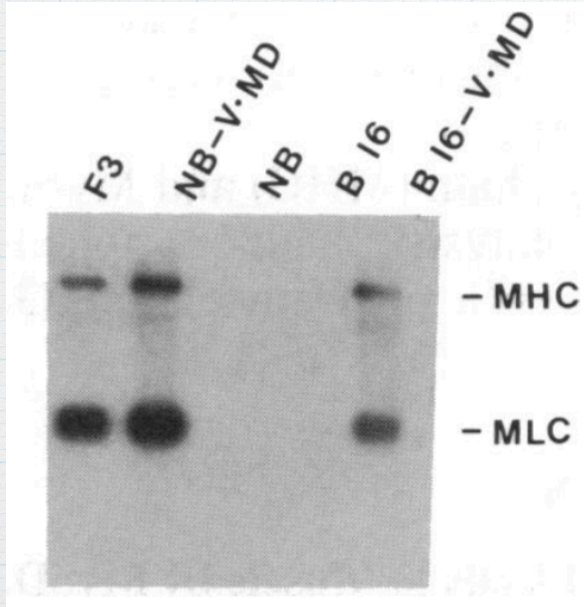
Aspartate D309

Phénylalanine F357

* Acides aminés catalytiques probables

* Probablement site de liaison

Exercice : transgénèse



Le gène *a* (dont le vrai nom est *myoD*) oriente le devenir des cellules embryonnaires en cellule musculaire. C'est un gène du développement.

Son absence n'a pas de conséquence : il existe un autre gène (*myf5*) qui s'exprime en parallèle et assure le même rôle d'inducteur.

F3 = myoblaste ; *NB* = neuroblaste ; *NB - V.MD* = neuroblaste transfecté avec le gène *A* ; *B16* = mélanocyte du derme ; *B16 - V.MD* = mélanocyte transfecté avec le gène *A*.