Les principales informations à déterminer sur une protéine :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Localisation | Rôle | Quantité |

Aussi : les protéines avec lesquelles elle interagit,

Protéine de fusion (ou chimérique) combinaison de séquences de gènes pour former une protéine chimérique.

Attention l’utilisation d’une protéine chimérique nécessite de réaliser une contrôle pour vérifier qu’elle a un comportement proche de la protéine endogène.

Protéine e ménage protéine dont le niveau d’expression ne varie pas entre les conditions expérimentales et souvent entre les types cellulaires. Les protéines de ménages les plus utilisées sont, la tubuline.

Tampons :

## La localisation

La localisation d’une protéine peut être détecter :

* En utilisant une protéine chimérique fluorescence pour identifier la localisation d’une protéine.
* En isolant les organites cellulaires (noyau, mitochondries…) puis en vérifiant la présence de la protéine.
* En utilisation des anticorps.

## Supprimer l’expression d’une protéine

Pour supprimer la présence d’une protéine, il est possible d’avoir recours à :

* L’utilisation un individu mutant avec un gène KO codant pour la protéine d’intérêt.
* De l’ARN interfèrent qui s’hybride avec l’ARNm de la protéine d’intérêt. Il empêche sa synthèse par les ribosomes et conduit à sa destruction.

## Dénaturer une protéine

Pour dénaturer (déplier) une protéine, il faut utiliser deux types de substances :

* Des agents réducteurs qui suppriment les ponts disulfures (e.g. DTT, beta-mercaptoéthanol).
* Des dénaturants de suppriment les liaisons non covalentes de type hydrogène ou Van der Vaal.

Dénaturant couramment utilisé SDS, urée,

## Concentration des protéines

### Méthode par absorbance (peu précise)

La concentration des protéines peut être mesurer en déterminant l’absorption des noyau phénol du tryptophane et de tyrosines à la longueur d’onde 280nm.

### Méthode de Bradford (gamme de BSA colorée au bleu de Coomassie)

La quantité de protéines est déterminée par une gamme de BSA, les protéines sont colorées avec du bleu de Coomassie. Le colorant réagit avec l’arginine, l’histidine et la lysine

Le dosage se fait à 595 nm.

Attention incompatible avec le SDS (même à faible concentration), la présence de lipides, et d’acides nucléiques.

### Méthode BioCinchoninic acid Assay (BCA)

Dosage colorimétrique des protéines 562 nm. La réaction se fait par la réaction de réduction du cuivre Cu2+ en Cu+. Plus les protéines sont concentrées plus la couleur vire du bleu vers le gris.

Attention incompatible avec des agents réducteurs et chélatants.

## Chromatographie

La chromatographie est un ensemble de méthodes qui permet de séparer les protéines en fonction de leurs propriétés chimiques. Il existe quatre types de chromatographie :

* d’exclusion qui sépare en fonction de la taille et de la forme appelé poids moléculaire en kDa.
* D’affinité qui filtre par affinité avec un ligand. Les composés se détachent progressivement (élués).
* D’échange d’ions. Des billes chargées retiennent les molécules par leur charge. Elles sont ensuite éluées progressivement par leur charge.
* Sur couche mince.

Rmq : il existe une chromatographie qui utilise des anticorps à la place des ions.

### Chromatographie d’exclusion

Les molécules passent dans des billes percées. Plus la molécule est grosse plus vite elle sortira. On a une relation linéaire entre log de la taille en fonction du volume élué.

volume d’élution des plus grosses molécules, celles qui ne peuvent pas entrer dans les billes.

Ka coefficient de partage : .

### Chromatographie d’échanges d’ions

Les protéines sont mises dans une colonne échangeuse avec des billes qui possèdent une charge opposée à la protéine d’intérêt. Les protéines sont détachées progressivement par plusieurs lavages (le solvant est appelé analyte). Il casse les interactions faibles càd de type :

|  |  |
| --- | --- |
| Hydrogènes | Van Deer Val |

## Électrophorèse

Il existe plusieurs types d’électrophorèse :

* En gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium (PAGE-SDS). Ce dernier sert, avec le pH, à la linéariser les protéines.
* Par focalisation isoélectrique (IEF) sépare par la charge électrique.

L’électrophorèse 2D consiste à réaliser une séparation :

|  |  |
| --- | --- |
| en fonction du point isoélectrique (IEF) en faisant un gradient de pH sur gel. | par la taille. |

Un tampon de charge laemmli est ajouté aux protéines pour suivre le front de migration.

## Révélation des protéines

Pour révéler la présence de protéines, il est possible de les colorer par :

|  |  |
| --- | --- |
| Bleu de Coomassie (non spécifique) | Anticorps (spécifique) |

Épitope région de fixation de l’anticorps.

## Purification de protéines

Facteur de purification activité spécifique de l’étape par rapport à celle de départ.

### Isoler une protéine d’intérêt

Un anticorps dirigé vers une des protéines est associé à des billes d’agarose. La solution composée des billes et des enzymes sont centrifugées. Le complexe, plus lourd, se retrouve au fond du tube.

## Spectrométrie de masse

La spectrométrie permet de :

* Quantifier une protéine.
* Inventaire des protéines présentes.

## Identification d’une protéine d’intérêt

Il existe deux méthodes principales pour identifier une protéine d’intérêt :

|  |  |
| --- | --- |
| Immunoessaie | Western blot |

Attention ces méthodes permettent de réaliser une quantification mais elles ont tendance à

### Westernblot

Le Westernblot est une méthode combinatoire :

1. Électrophorèse sur gel.
2. Transfert sur une membrane.
3. Coloration de la protéine d’intérêt grâce à des anticorps.

Il existe deux types de migration sans différence notable.

|  |  |
| --- | --- |
| Semi sec | Humide |

### Immunoessaie

Immunoessaie ou technique immuno-enzymatique (appelé aussi ELISA) permet de déterminer la présence et la quantification. Cette méthode s'appuie sur la reconnaissance entre un anticorps et un antigène.

Avantage : test simple, facile d'emploi et peu coûteux

Inconvénients : ça réalisation dépend des anticorps disponibles sur le marché.

## Mesurer l’activité d’une enzyme

Comparer la concentration au départ et à la fin soit du :

|  |  |
| --- | --- |
| Apparition du produit | Disparition du substrat |

Activité spécifique activité totale de la protéine étudiée par rapport à la quantité de protéines présente.

Rendement activité de la protéine de l’étape par rapport à l’activité de départ.

## Exemples d’utilisation de l’analyse par spectrométrie

Identification de

Protéine identifier grâce aux anticorps

1. Fixation de la protéine d’intérêt en condition qui favorise les interactions avec les protéines associés.
2. Détachement et analyse protéines associées.

Un groupe (pool) sélectionne les protéines d’intérêt par leur interaction avec

Les principaux problèmes de l’analyse protéique sont que :

* Le nombre de type de protéines différents.
* La grande variabilité dans les volumes entre les protéines. Leur quantité peut variée de l’ordre de 106.
* Les interactions avec les autres molécules :
  + Les modifications post traductionnelles.
  + Les autres protéines notamment dans le cadre de la formation de complexes protéiques.

Rmq : Il peut être également intéressant de connaître la localisation des protéines et leur conformation.

1. Fragmentation et purification.

Définir la question pour adapter le protocole technique (le choix de la chromatographie illustre particulièrement ce fait). Grâce aux différences de propriétés chimique

## Réduction et alkylation

Il peut être intéressant de linéariser une protéine et d’empêcher la formation de ponts disulfures entre les cystéines. Pour se faire, on a généralement recours à :

* Un réducteur (DTT agent fort qui peut altérer les chaines peptidiques) ou TECP agent faible).
* Une substance qui réagit avec les atomes de souffres comme l’iodoacétamide qui provoque une alkylation.