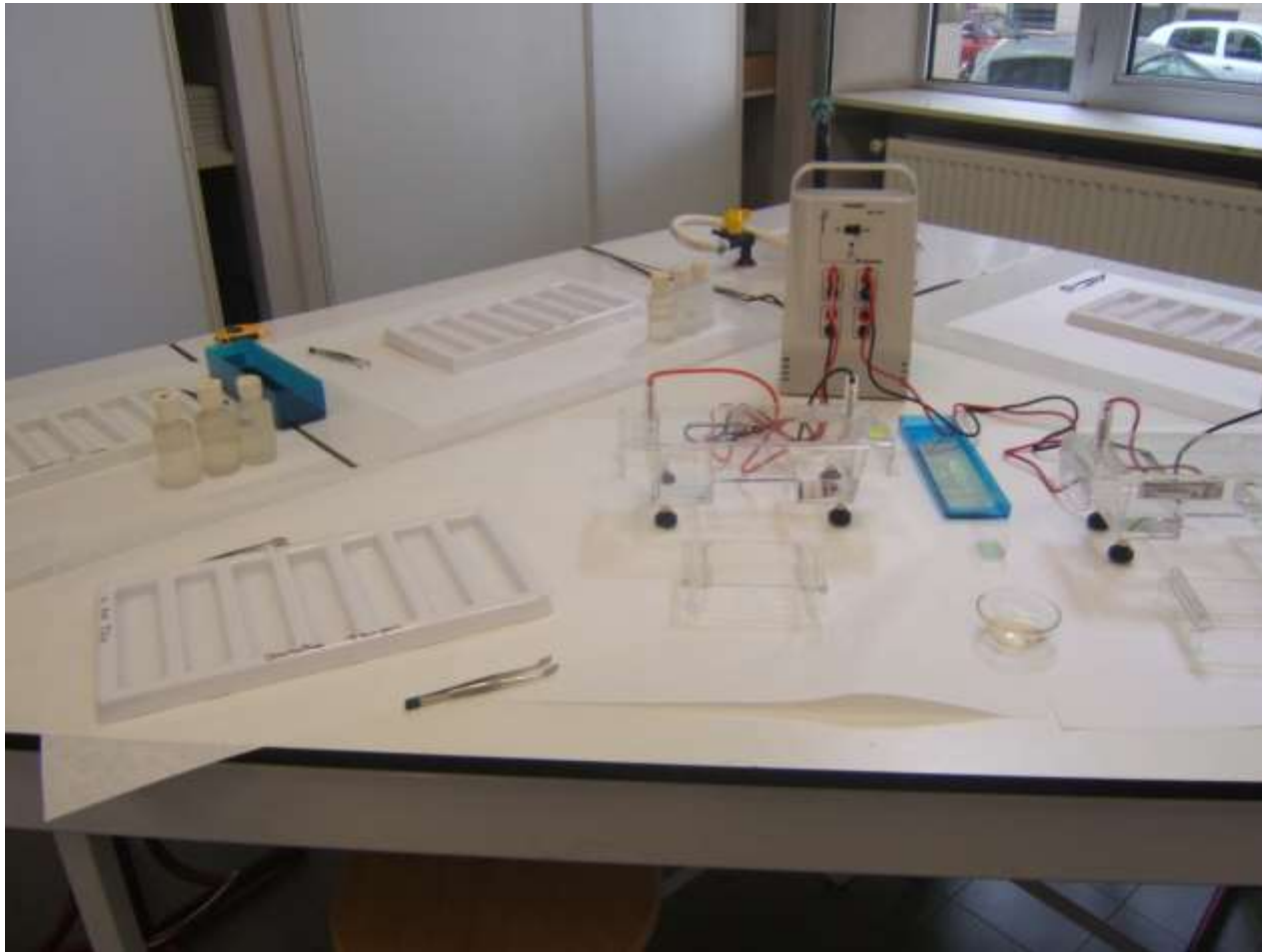
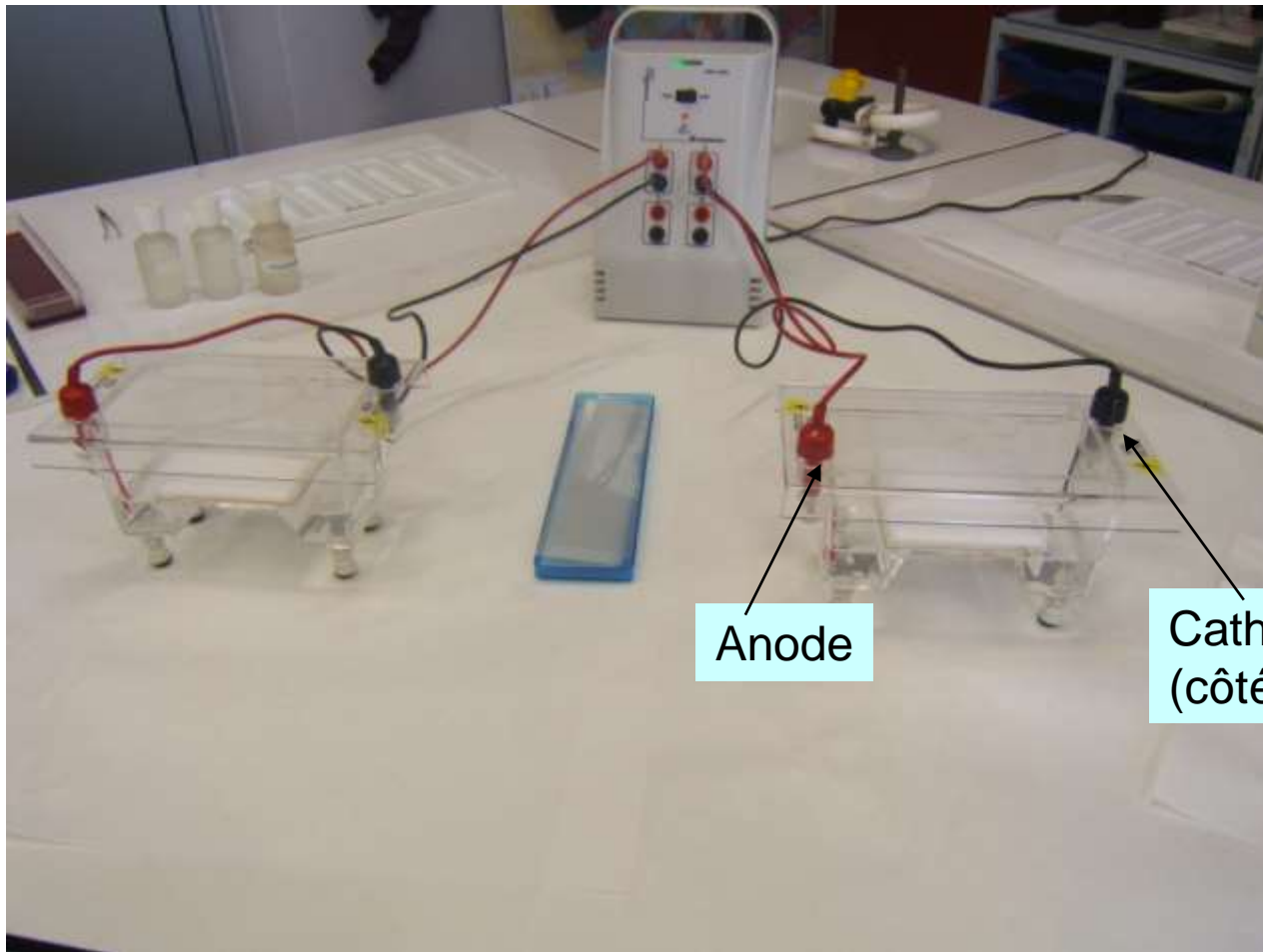


Méthodes d'étude des protéines



Electrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose



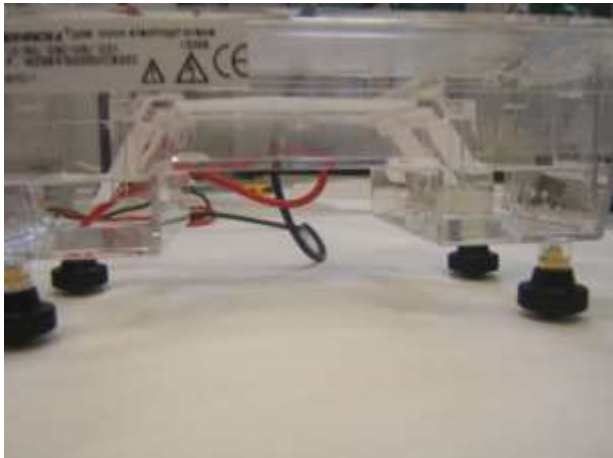
Anode

Cathode
(côté dépôt)

Electrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose



Positionnement des bandes dans la cuve après le dépôt

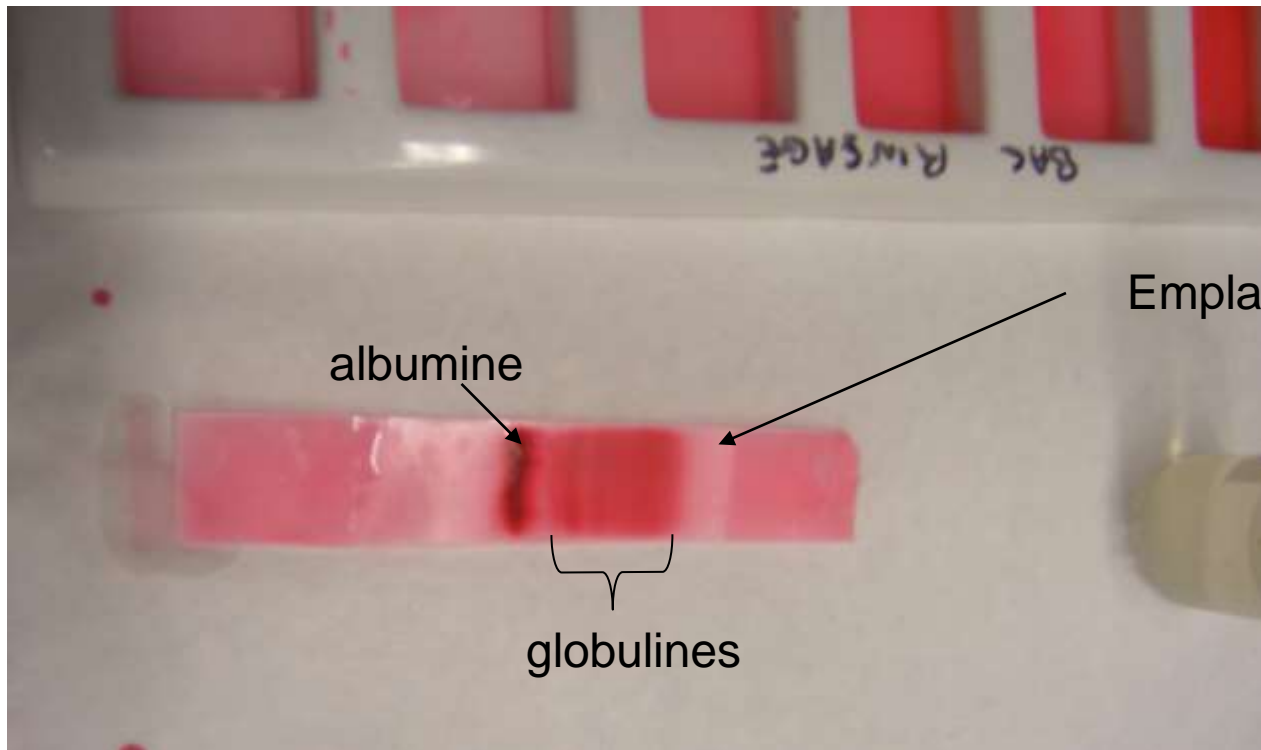


**Migration dans un champ électrique
Les bandes trempent dans le tampon véronal**



Révélation: bains successifs dans l'acide acétique après la coloration au rouge Ponceau

Résultats pour l'électrophorèse des protéines sériques



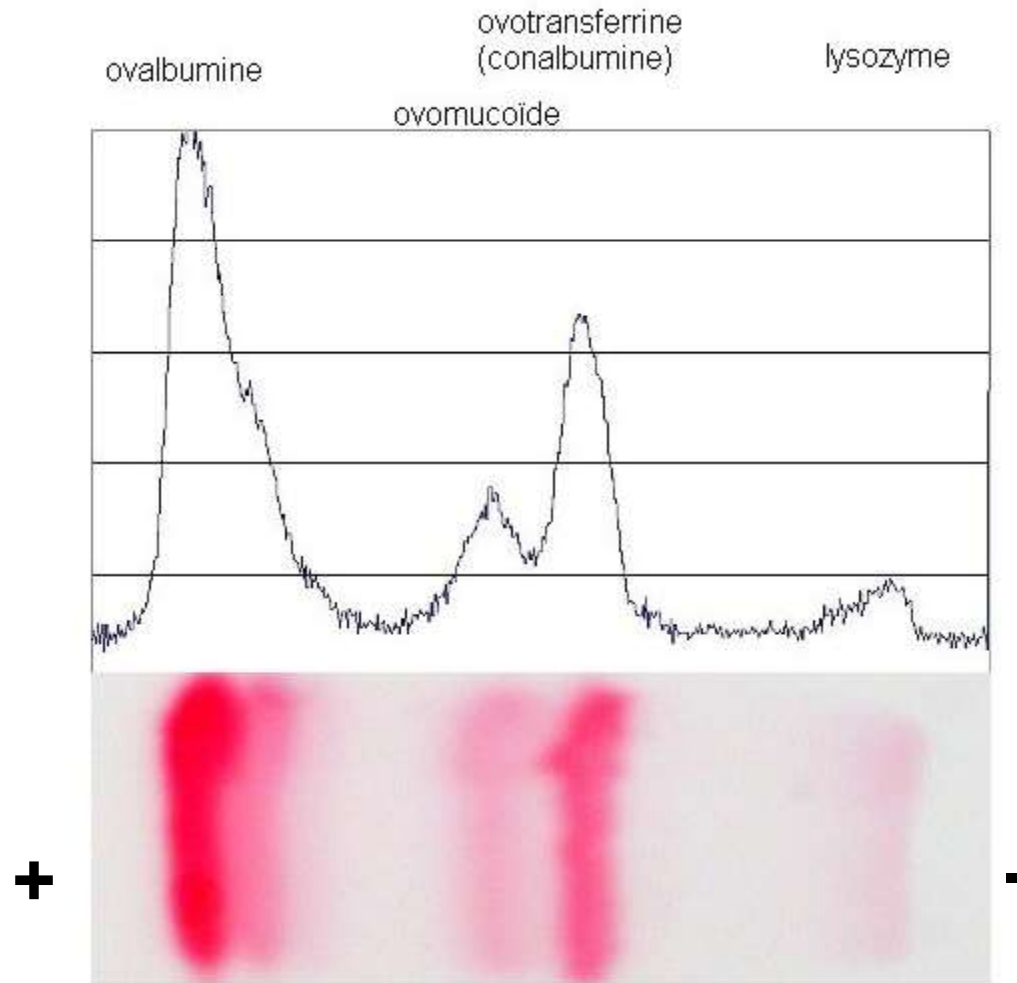
Résultat après révélation

Résultats pour l'électrophorèse des protéines du blanc d'œuf de poule

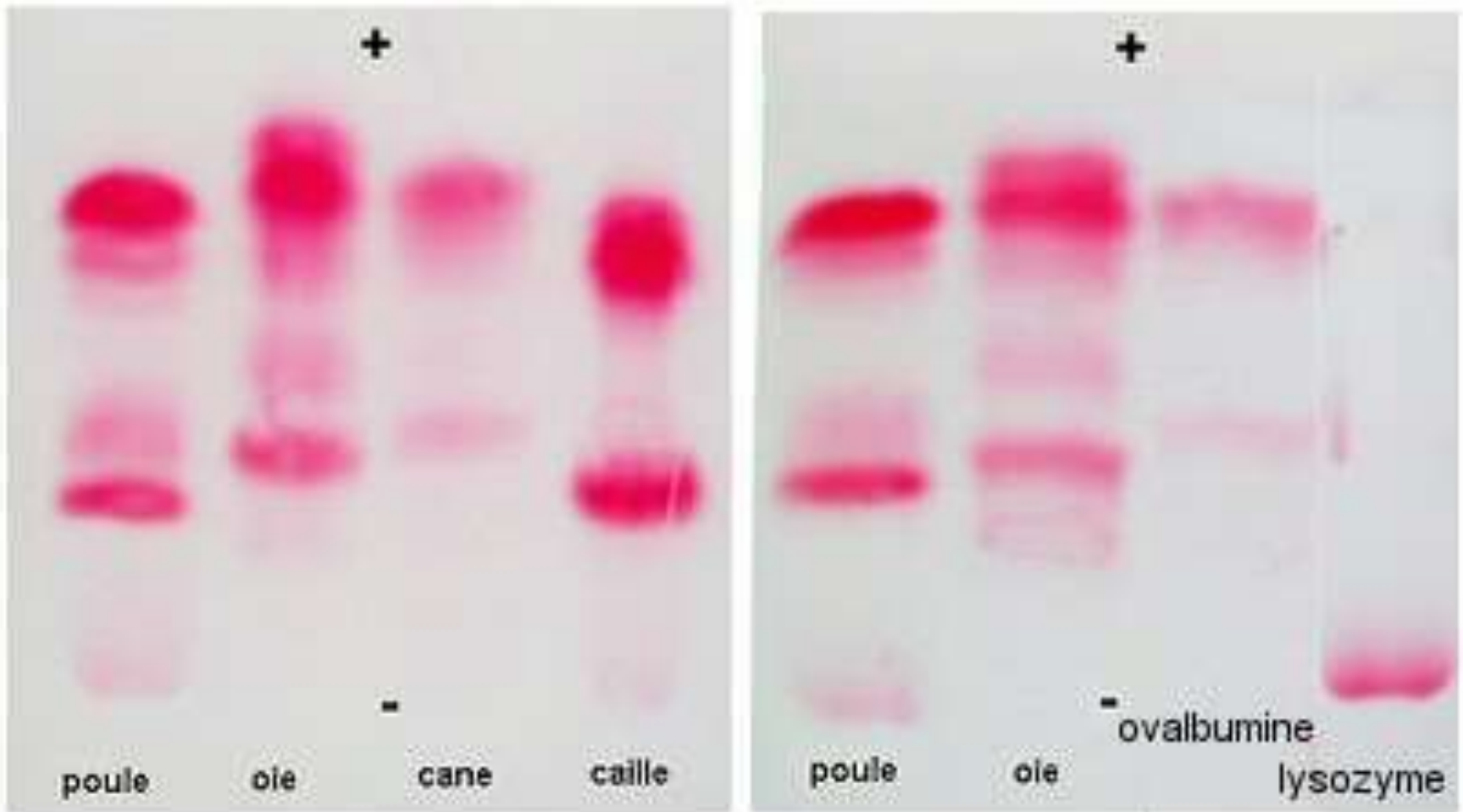
+ Ovalbumine Ovomucoïde Lysozyme -
Ovotransférine



Emplacement du dépôt



Résultats d'une électrophorèse des protéines du blanc d'œuf de poule sur bande d'acétate de cellulose et profil densitométrique correspondant obtenu avec un logiciel de traitement d'images numériques.



Séparation électrophorétique sur acétate de cellulose des protéines du blanc d'œuf d'espèces différentes d'oiseaux.

Dosage d'une protéine (l'ovalbumine) par spectrophotométrie



Spectrophotomètre pour la lumière visible



Spectrophotométrie dans le visible

Les dilutions seront réalisées directement dans les cuves

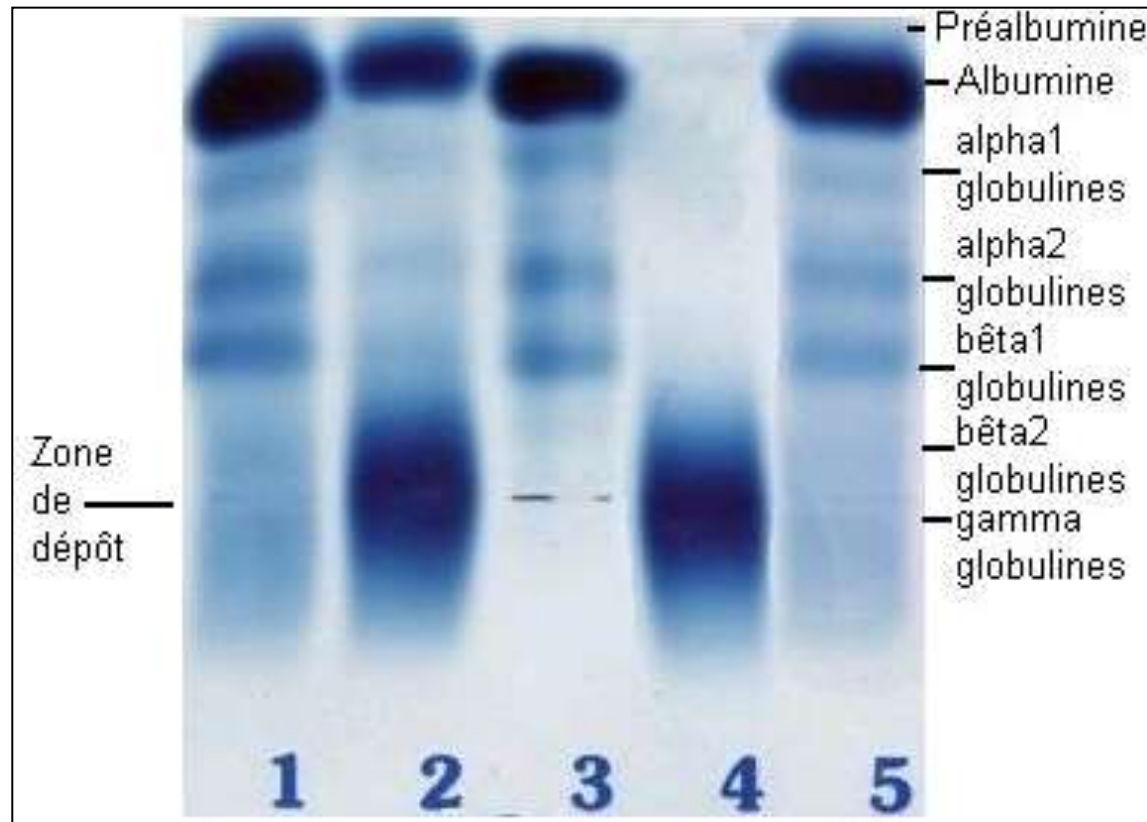
Cuve (2,5 mL par cuve)	0 « blanc »	1	2	3	4	5	Essai 1 dilution au 1/10 de la solution à doser	Essai 2 dilution au 1/5 de la solution à doser
ovalbumine mg/ cuve	0	1	2	3	4	5	?	?
Réactif de Gornall (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Solution mère (mL)								
Eau physiologique (mL)								

Spectrophotométrie dans l'UV

Les dilutions seront réalisées dans des tubes à essai (préparer 10 mL de solution pour chaque tube))

Tube	1	2	3	4	Essai 1 dilution au 1/10 de la solution à doser	Essai 2 dilution au 1/50 de la solution à doser
[ovalbumine] g.L ⁻¹	1	0,5	0,25	0,125		
Volume de solution prélevée dans le tube n-1						
Tampon glycine (mL)						

Exercice I. Analyse de résultats d'électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose : profils électrophorétiques de sérums humain.



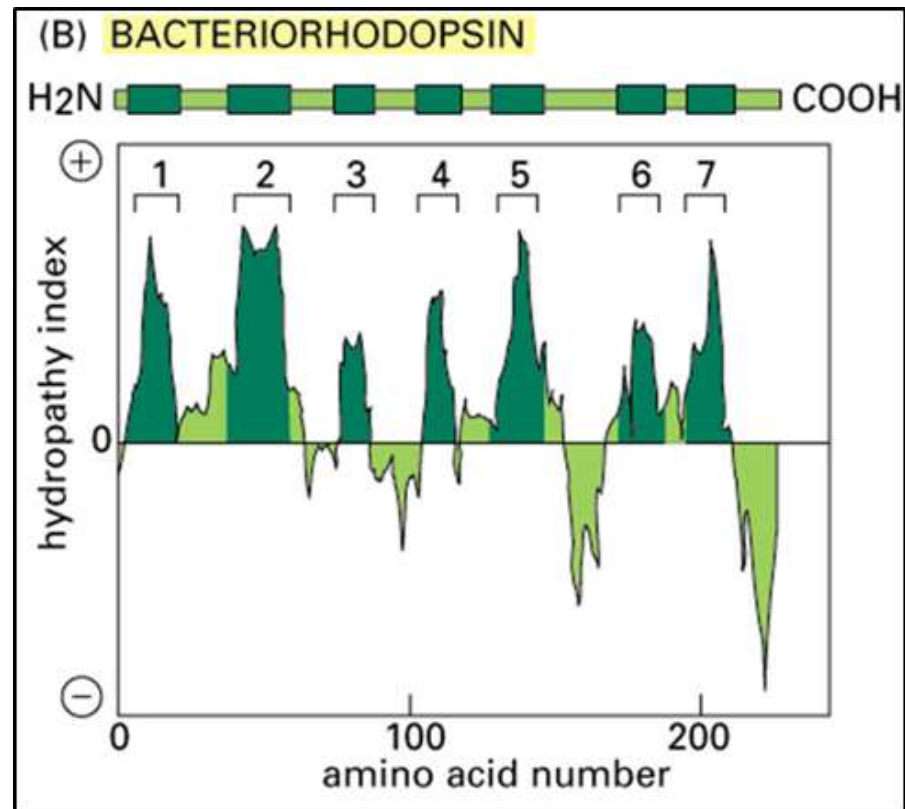
Exercice VI. Etude d'une protéine : la bactériorhodopsine

001 Glu Ala Gln Ile Thr Gly Arg Pro Glu Trp
011 Ile Trp Leu Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met
021 Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys
031 Gly Met Gly Val Ser Asp Pro Asp Ala Lys
041 Lys Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu Val Pro
051 Ala Ile Ala Phe Thr Met Tyr Leu Ser Met
061 Leu Leu Gly Tyr Gly Leu Thr Met Val Pro
071 Phe Gly Gly Glu Gln Asn Pro Ile Tyr Trp
081 Ala Arg Tyr Ala Asp Trp Leu Phe Thr Thr
091 Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Leu
101 Val Asp Ala Asp Gln Gly Thr Ile Leu Ala
111 Leu Val Gly Ala Asx Gly Ile Met Ile Gly
121 Thr Gly Leu Val Gly Ala Leu Thr Lys Val
131 Tyr Ser Tyr Arg Phe Val Trp Trp Ala Ile
141 Ser Thr Ala Ala Met Leu Tyr Ile Leu Tyr
151 Val Leu Phe Phe Gly Phe Thr Ser Lys Ala
161 Glx Ser Met Arg Pro Glu Val Ala Ser Thr
171 Phe Lys Val Leu Arg Asn Val Thr Val Val
181 Leu Trp Ser Ala Tyr Pro Val Val Trp Leu
191 Ile Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ile Val Pro
201 Leu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val
211 Leu Asp Val Ser Ala Lys Val Gly Phe Gly
221 Leu Ile Leu Leu Arg Ser Arg Ala Ile Phe
231 Gly Glu Ala Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala
241 Gly Asp Gly Ala Ala Ala Thr Ser

Document 1. Structure primaire de la bactériorhodopsine.

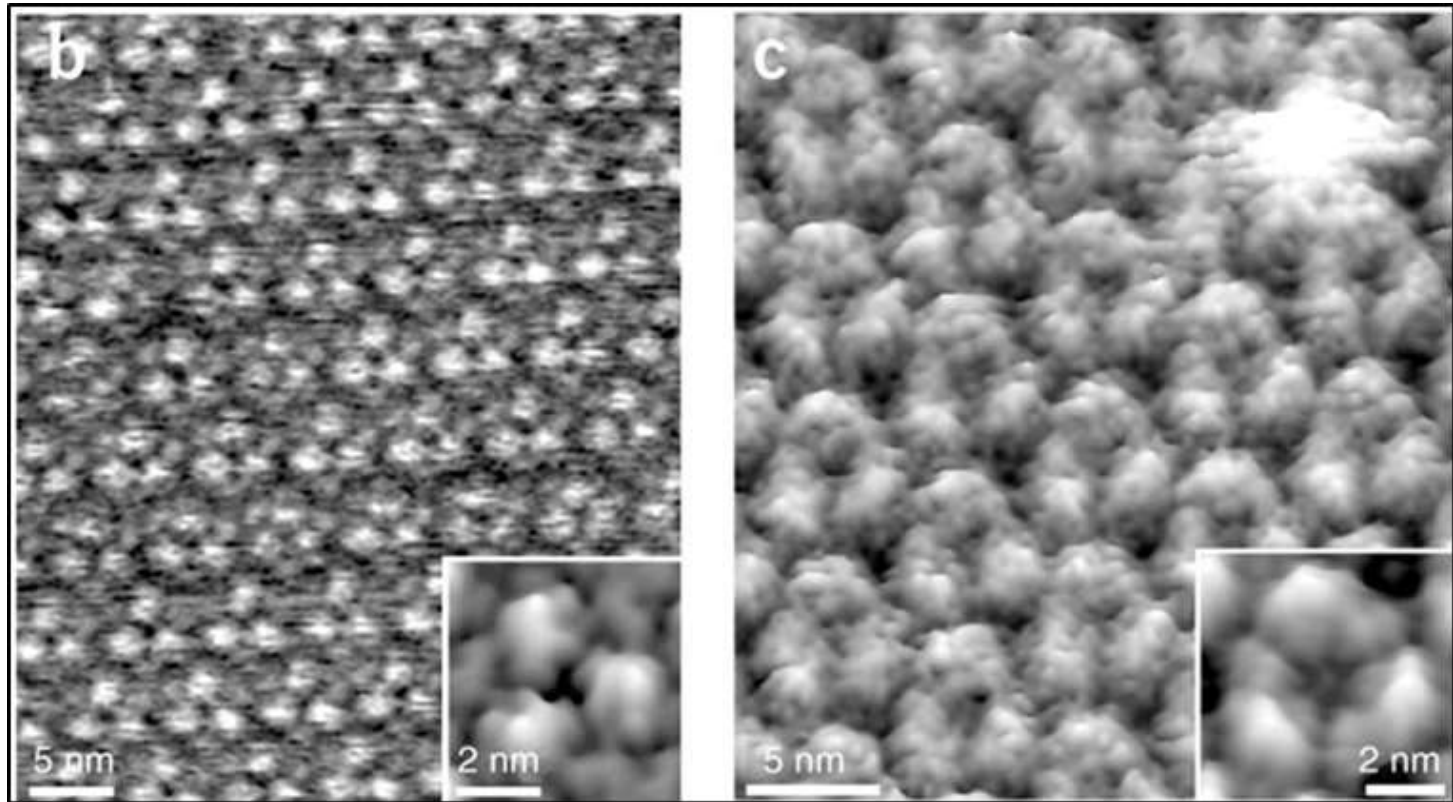
La bactériorhodopsine est une molécule que l'on trouve chez certaines archées vivant dans des eaux salées, comme *Halobacterium salinarum*.

[Source : H. Gobind Khorana, Gerhard E. Gerber, Walter C. Herlihy, Christopher P. Gray, Robert J. Anderedd, Kayoro Nihei et Klaus Biemann, « *Amino acid sequence of bacteriorhodopsin* », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 76, No. 10, pp. 5046-5050, Octobre 1979].



Document 2. Profil d'hydropathie de la bactériorhodopsine.

[Source : « *Molecular biology of the cell* ». 4th ed. B Alberts, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter . 2002. New York: Garland Science.]



Document 3. Observation en microscopie électronique à haute résolution de la membrane plasmique de *Halobacterium salinarum*.

b. Face extracellulaire.

c. Face cytoplasmique.

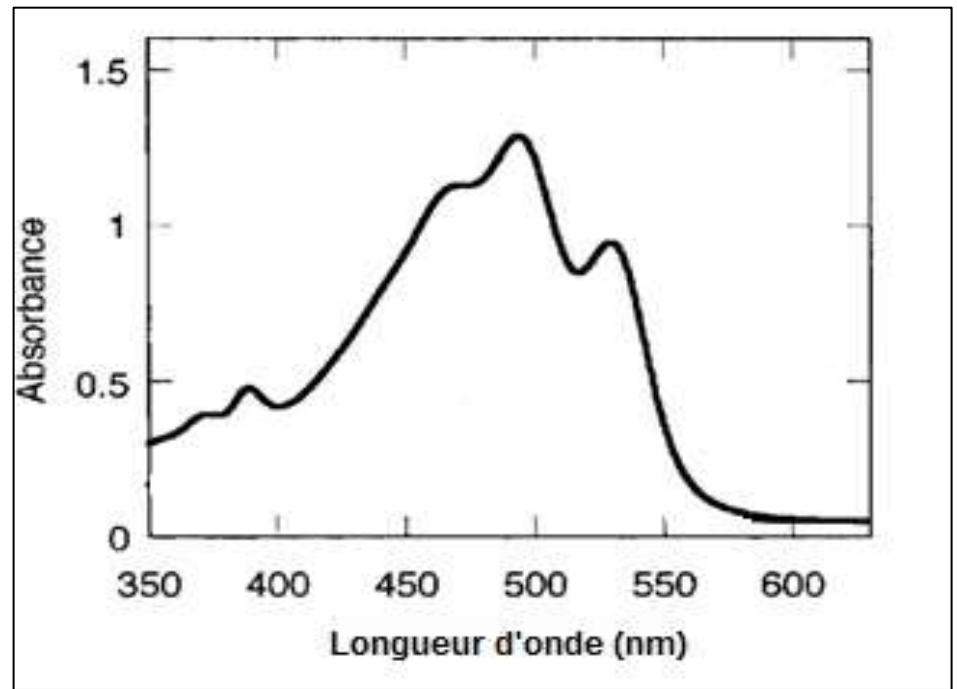
Les structures observées résultent de l'assemblage de trimères, rassemblés en plus grand nombre en structure appelées « îlots pourpres »

[Source : « Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins ». Daniel J Müller & Andreas Engel. Nature Protocols 2, 2191 - 2197 (2007)].

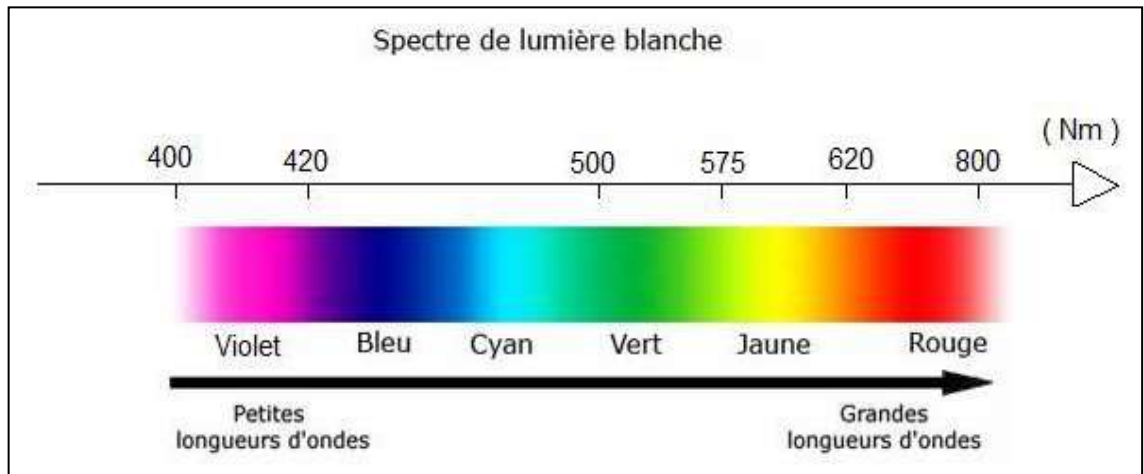


Document 4. Aspect d'une culture de *Halobacterium salinarum* dans une boîte de Petri. La couleur pourpre des colonies de cellules est due à la couleur de la membrane des cellules.

[Source : <http://www.didier-pol.net/3halobact.htm>].



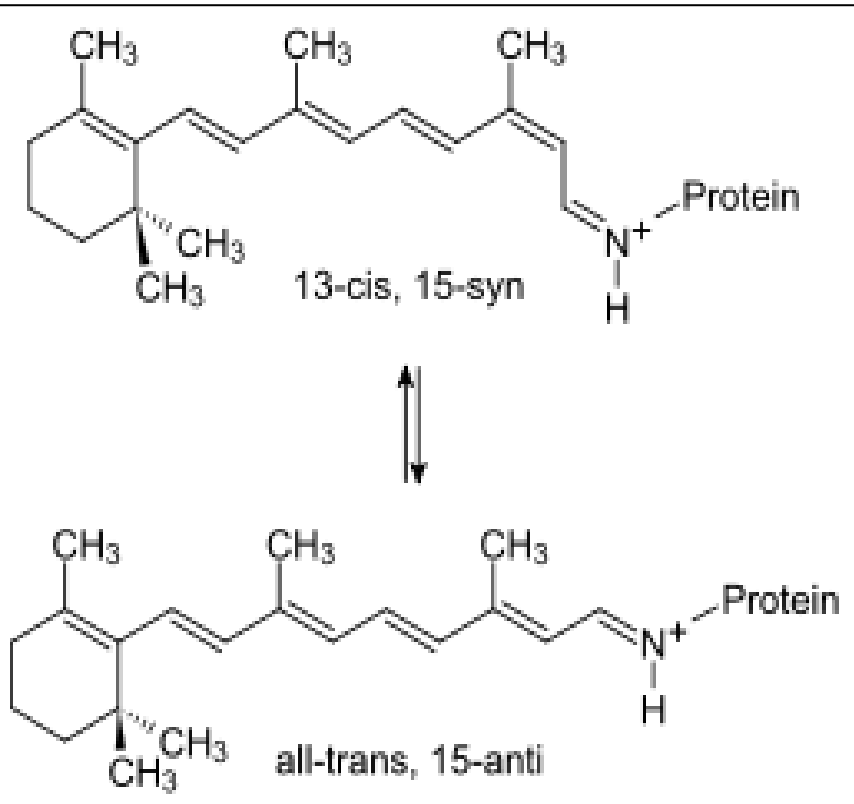
Document 5a. Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine [Source : researchgate.net].

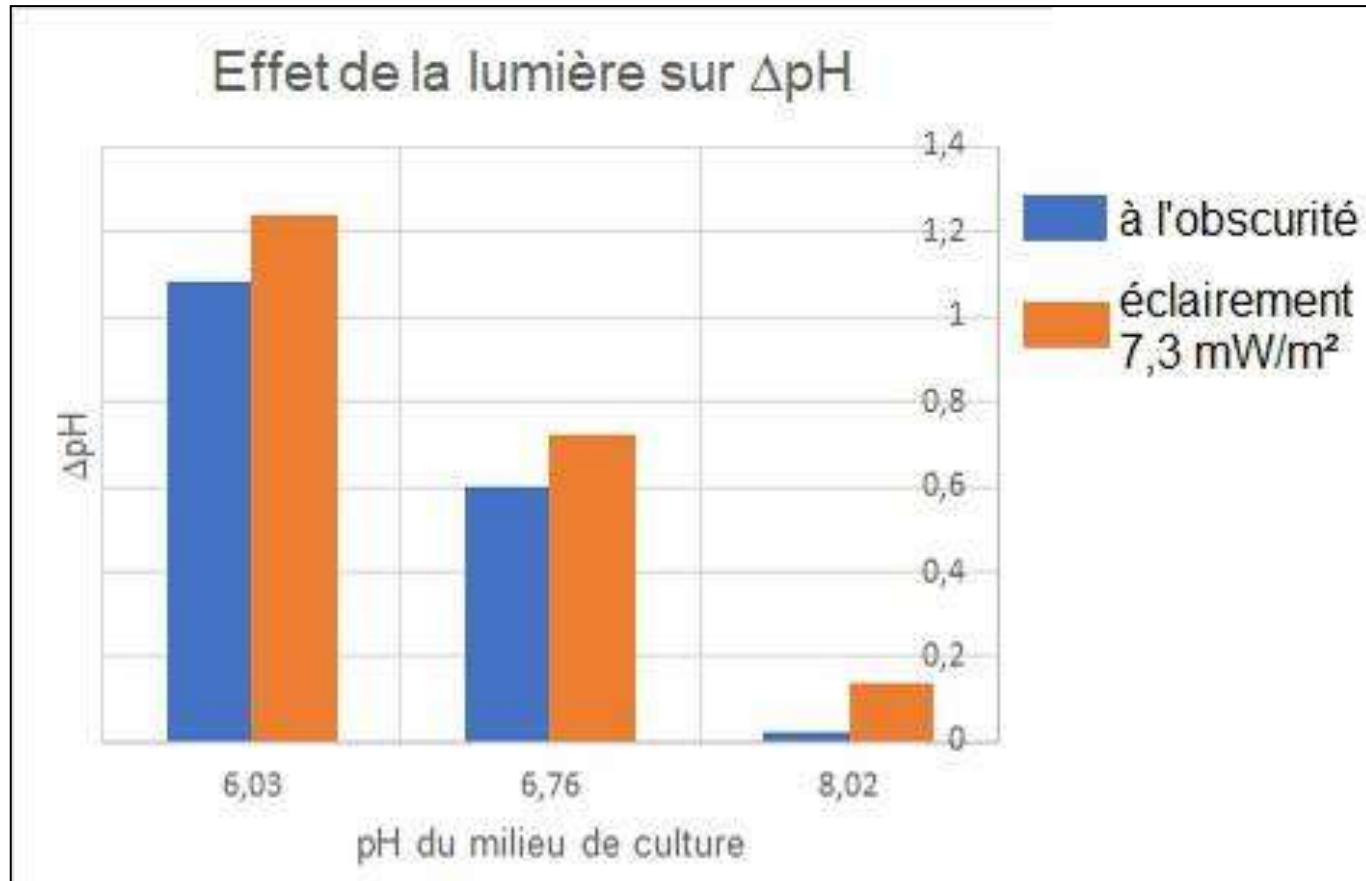


Document 5b. Spectre de la lumière blanche.

Document 6. Le rétinol et ses deux conformations.

Le rétinol est lié à la bactériorhodopsine par liaison covalente avec la lysine 216. Sous l'effet de certaines longueurs d'ondes, cette molécule change de conformation et passe de la forme all-trans protonée à la forme 13-cis protonée. La forme 13-cis protonée du rétinol devient alors capable de céder un proton (lié au N^+) au résidu aspartate 85. Le rétinol 13-cis est alors reprotoné à partir d'un proton porté par le résidu aspartate 96 de la bactériorhodopsine, puis retrouve sa conformation all-trans. Le résidu aspartate 85 expulse son proton vers l'extérieur de la cellule en direction du résidu arginine 82. Le résidu aspartate 96 récupère un proton de l'intérieur de la cellule.





Document 7. Effet de la lumière sur le gradient de pH entre le cytosol et le milieu extérieur chez *Halobacterium salinarum*.

Les mesures sont réalisées pour trois milieux de pH différent.

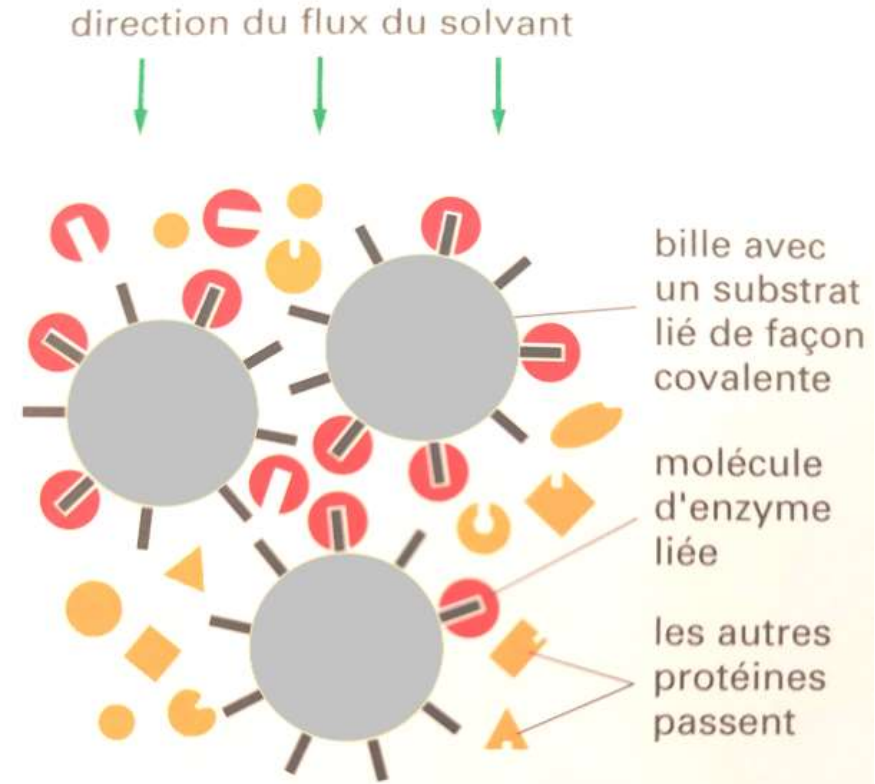
Les bactéries sont soit maintenues à l'obscurité, soit éclairées pendant 15 minutes. Le gradient de pH ($\text{pH}_{\text{int}} - \text{pH}_{\text{ext}}$) est alors déterminé.

[D'après : « Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in *H. halobium* ». H. Michel et D. Oesterhelt et W. Stoeckenius, FEBS Lett.1976 Jun 1;65(2):175-8].

Exercice VIII. Purification d'une protéine par chromatographie d'affinité : Ara h1

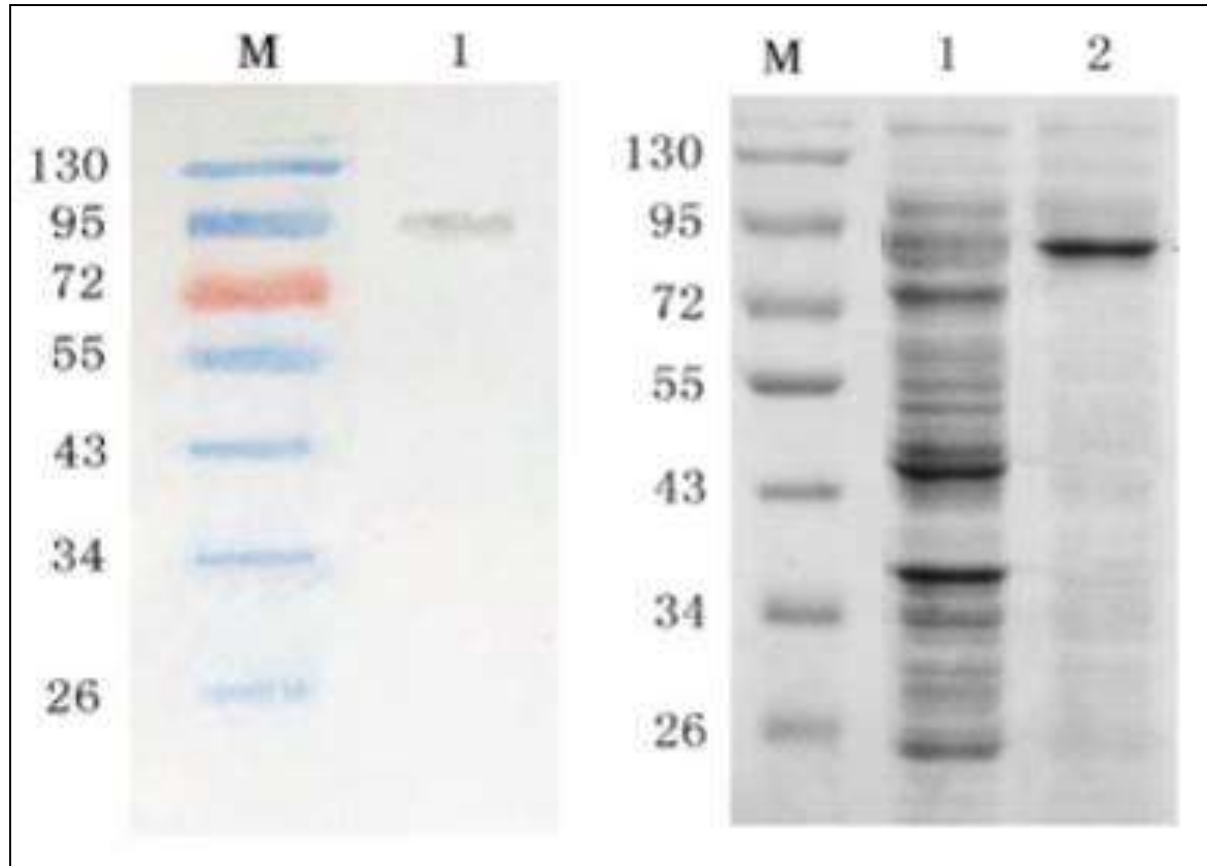
Document 1. Principe de la chromatographie d'affinité.

- phase stationnaire : support (silice, polymère) sur lequel on a greffé une molécule qui présente une affinité sélective pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler.
- Ces constituants vont être retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués.
- Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluer les substances intéressantes.



<https://videos.univ-grenoble-alpes.fr/video/0851-la-boite-a-techniques-chromatographie-daffinite/>

Document 2. Analyse par western blot des protéines extraites de cacahuètes.



A gauche :

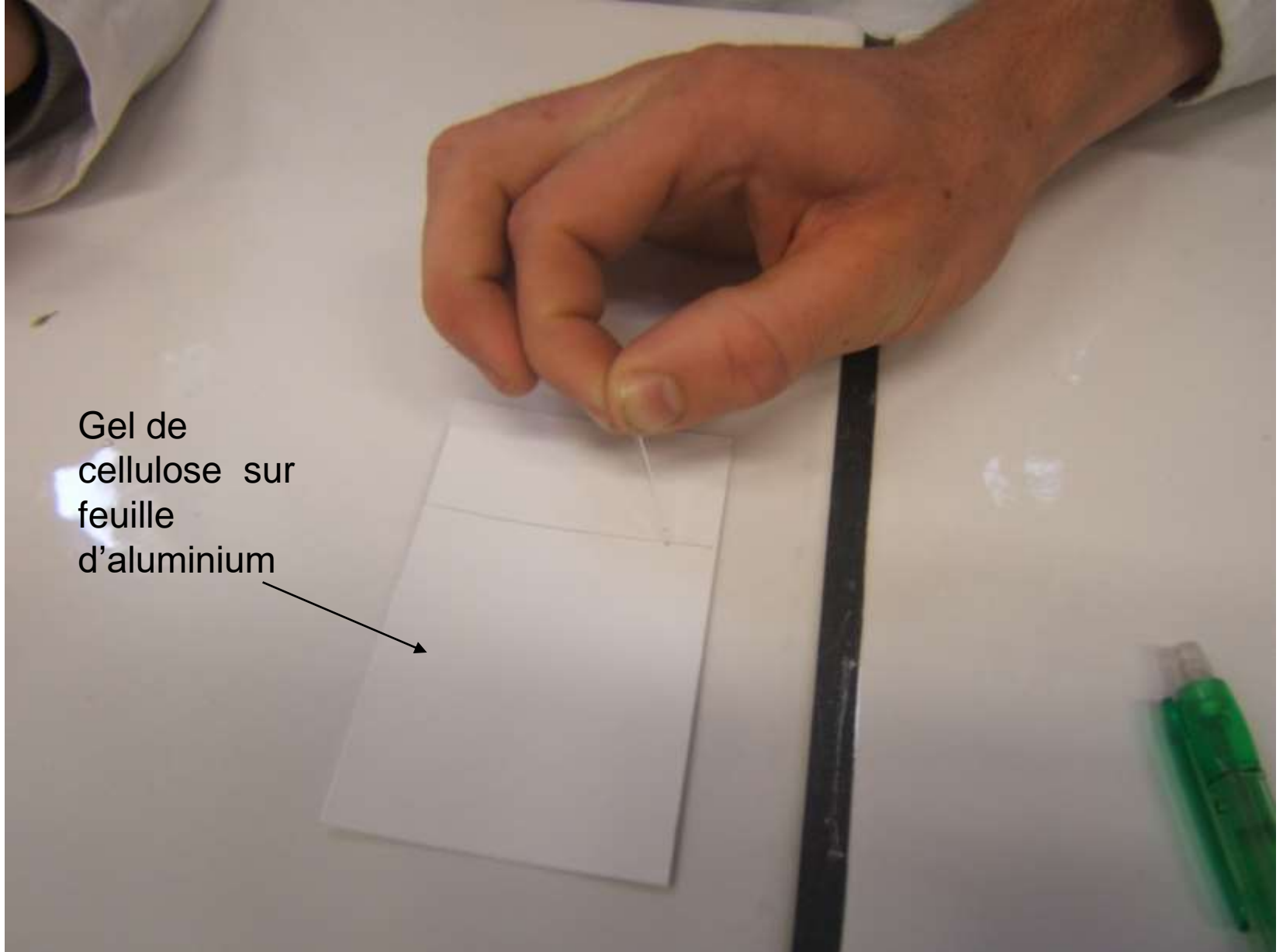
M : marqueurs de taille colorés

1 : surnageant non purifié, détection de Ara h1 par anticorps spécifiques

A droite : M : marqueurs de taille

1 : surnageant non purifié

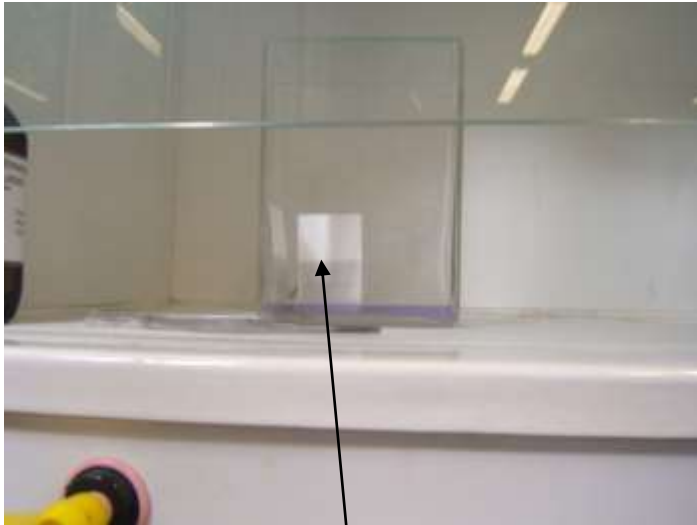
2 : surnageant purifié après chromatographie d'affinité



Gel de
cellulose sur
feuille
d'aluminium

Chromatographie des acides aminés: phase de dépôt

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice

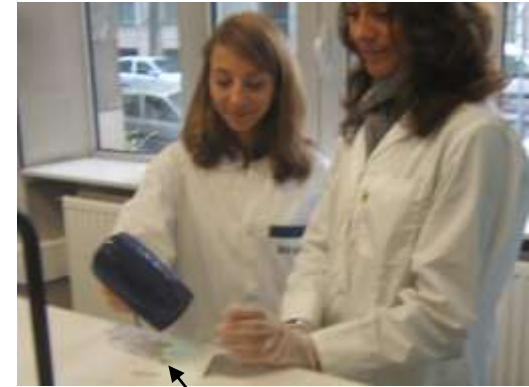


La migration

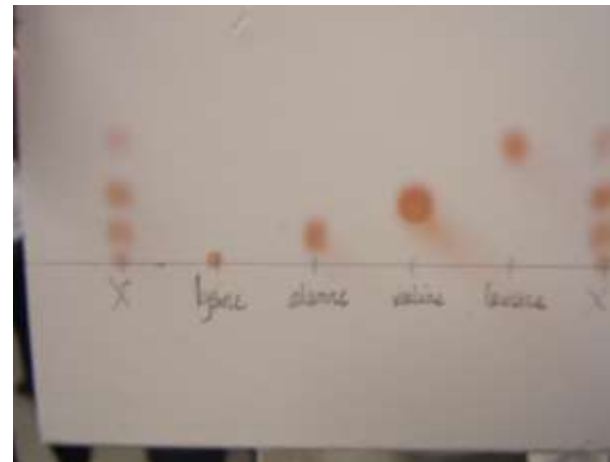
Front de migration du solvant

Solvant :

70% butanol,
18 % acide acétique,
12 % eau

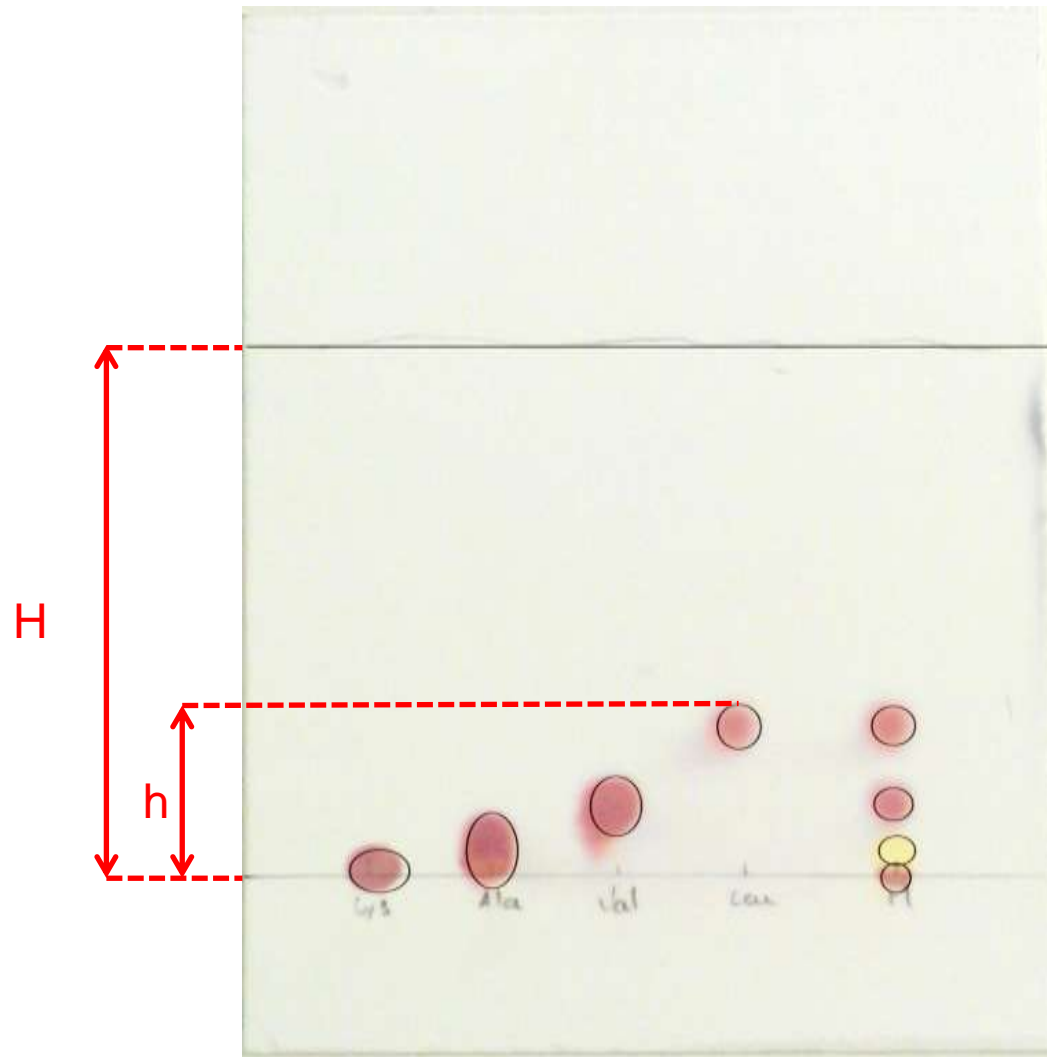


Le séchage
Après bain à la
Ninhydrine



Les tâches des différents acides aminés sont apparues

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice : résultats



Calcul du rapport frontal pour la leucine :

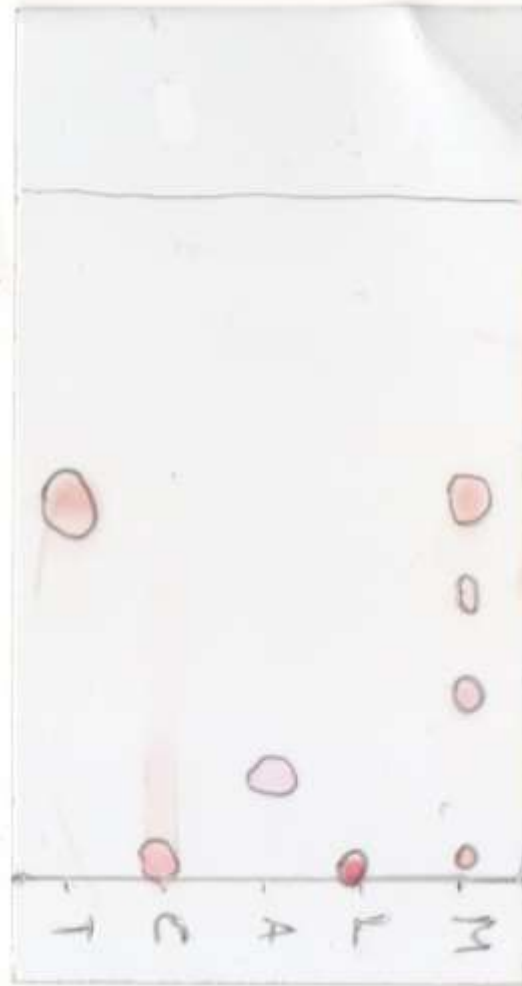
$$R_f = h / H$$

$$R_f = 2,29 / 7,05 \\ = 0,32$$

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice : résultats



ALA SER GLY VAL MM



TYR CYS ASP LYS MM



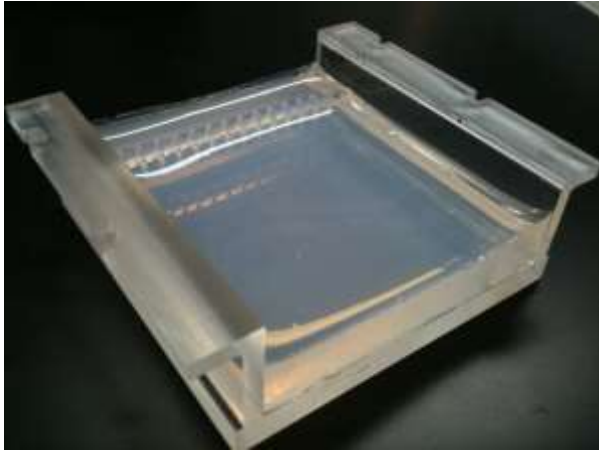
LEU ALA VAL LYS MM



Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre	Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre
Alanine	ala	A	Leucine	leu	L
Arginine	arg	R	Lysine	lys	K
Asparagine	asn	N	Méthionine	met	M
Acide aspartique	asp	D	Phénylalanine	phe	F
Cystéine	cys	C	Proline	pro	P
Glutamine	gln	Q	Sérine	ser	S
Acide glutamique	glu	E	Thréonine	thr	T
Glycine	gly	G	Tryptophane	trp	W
Histidine	his	H	Tyrosine	tyr	Y
Isoleucine	ile	I	Valine	val	V

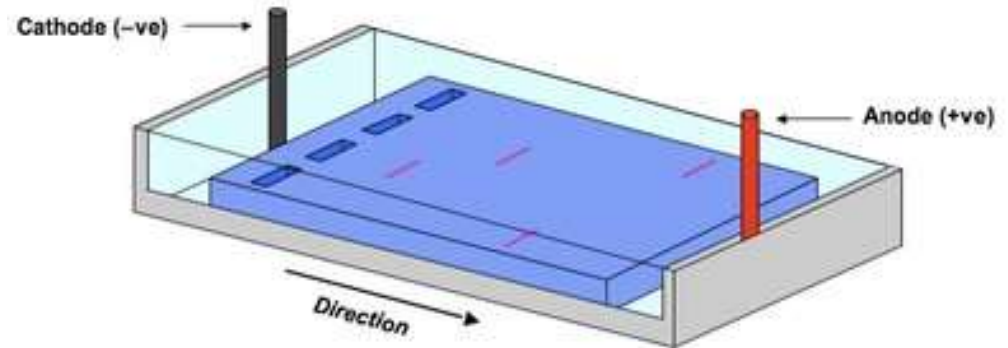
**Chromatographie sur gel de silice
de dix-neufs acides aminés protéinogènes
H A K M C I V F D S G P R E N Y Q W T**

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : dispositif expérimental



A gauche :
le support = gel
d'agarose

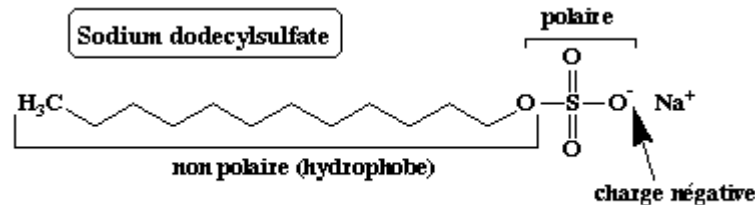
A droite : réalisation
des dépôts dans les
puits



Le générateur permet d'appliquer une tension aux bornes de la plaque d'agarose.
Les protéines chargées - (en raison du tampon utilisé) migrent vers l'anode chargée +.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (non réalisée en TP)

Technique utilisant un gel de polyacrylamide fortement réticulé à travers lequel les protéines migrent. La taille des pores du gel peut-être ajustée de façon à ce qu'elle soit assez petite pour retarder la migration des molécules protéiques voulues. Les protéines sont dans une solution contenant un détergent puissant, chargé négativement : le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate).



E. Jaspard (2006)

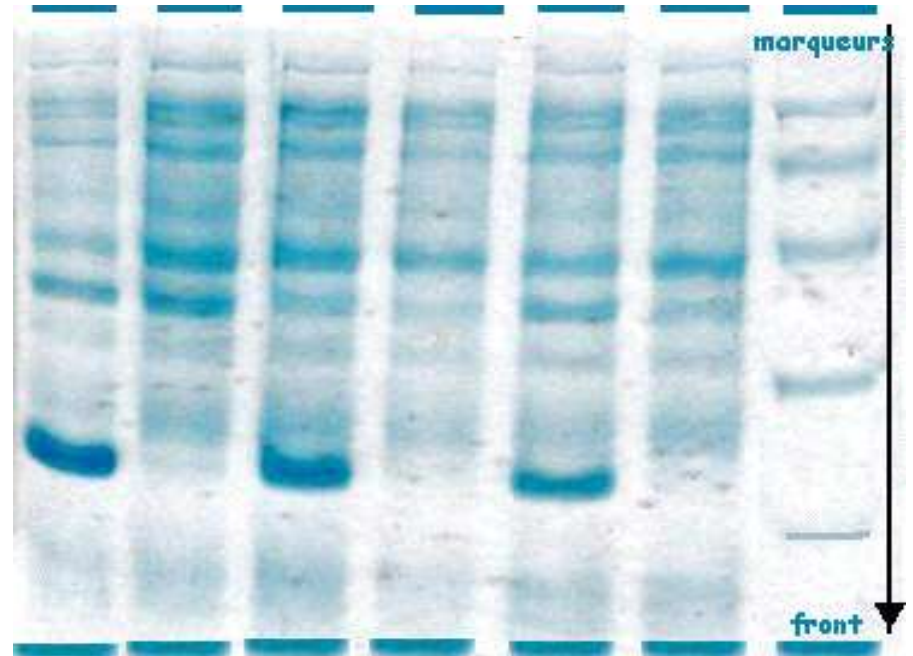
Du fait que le détergent se lie aux régions hydrophobes de la molécule protéique, provoquant leur déroulement en chaînes polypeptidiques allongées, les molécules protéiques sont libérées de leurs associations avec d'autres molécules protéiques ou lipidiques, et rendu aisément solubles dans la solution du détergent. (ajout de Mercaptoéthanol pour rompre les ponts S-S).

Chaque protéine fixe un grand nombre de molécules de détergent chargées négativement (masquant la charge de la protéine), et provoque sa migration vers l'électrode positive lorsqu'on applique une tension. Les protéines de même taille tendent à se comporter de façon identique tandis que les protéines de plus grande taille (avec un plus grand nombre de charges négatives) seront soumises à de plus grandes forces électriques et aussi à une plus forte accélération.

Un mélange complexe de protéines est donc fractionné en une série de bandes protéiques disposées par ordre de poids moléculaire.

Détermination de la masse molaire d'une protéine

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration). La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).



Exemple de marqueurs :

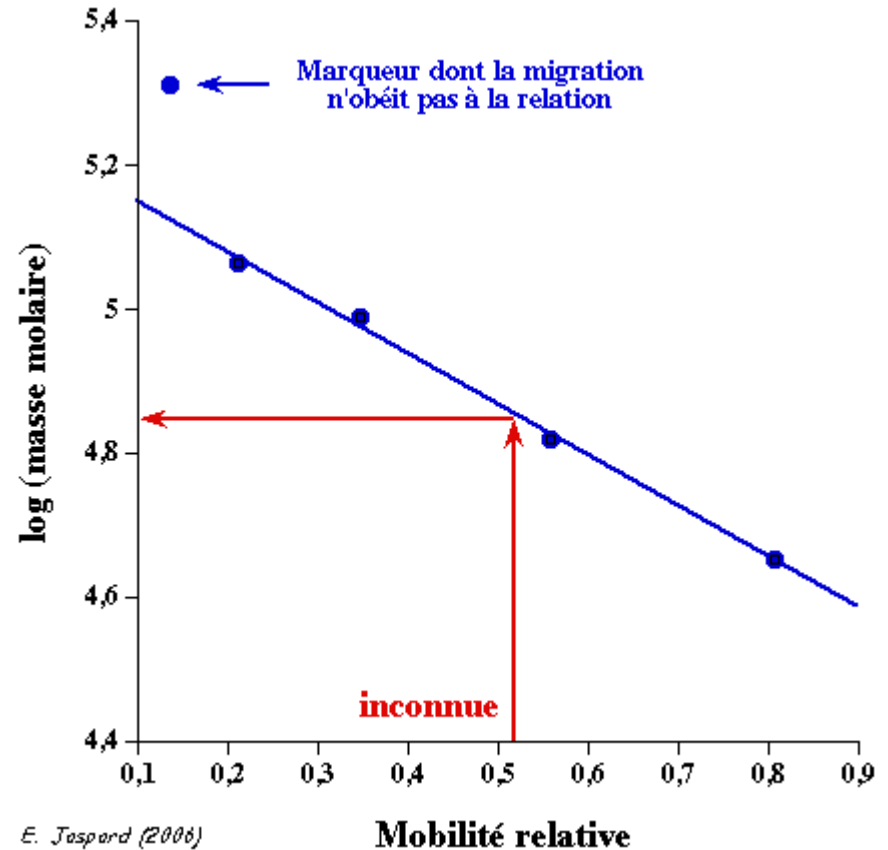
- myosine (205 kDa)
- β galactosidase (116 kDa)
- phosphorylase β (97,4 kDa)
- albumine (66 kDa)
- ovalbumine (45 kDa)
- anhydrase carbonic(29 kDa)

Exemple de résultats d'une électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Source : E. Jaspard (2004)

Détermination de la masse molaire d'une protéine

La droite : $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$ permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue



La mobilité relative est le rapport :

distance de migration d'une bande

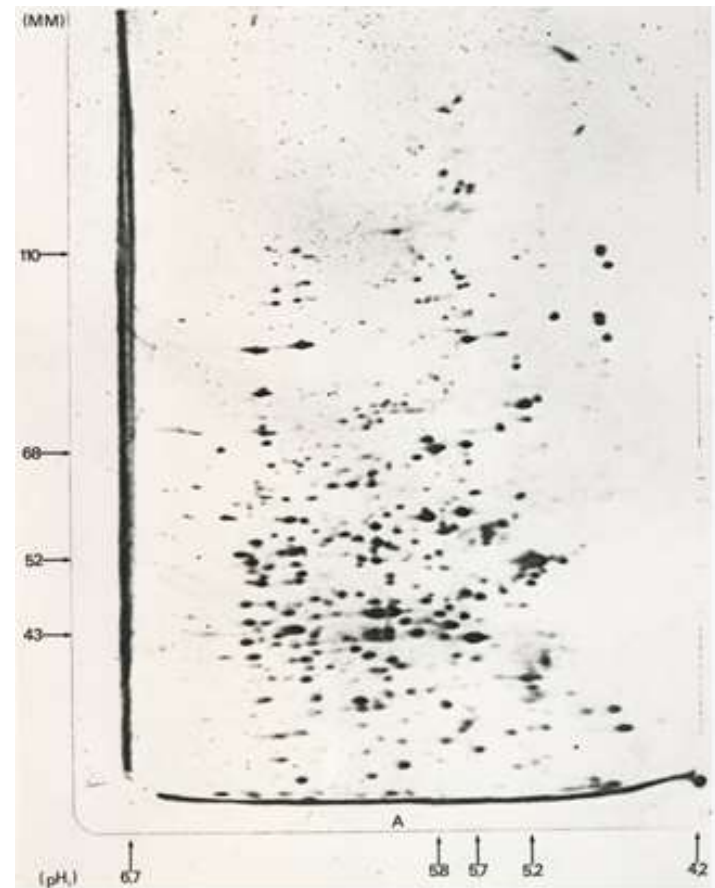
distance de migration du front de migration

Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est une technique permettant de séparer des mélanges plus ou moins complexes de protéines en conditions dénaturantes. Le principe de la séparation repose sur la combinaison :

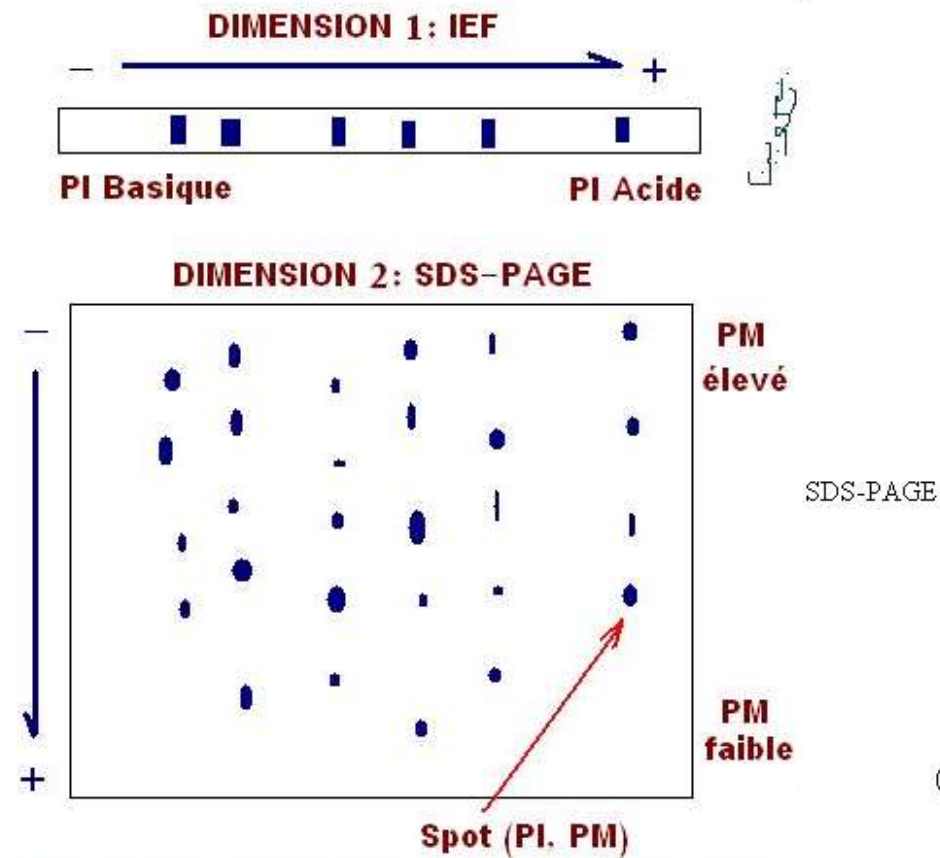
- d'une migration sur SDS – PAGE (séparation selon la masse moléculaire), et
- d'une isoélectrofocalisation (séparation selon leur point isoélectrique pHi).

Plusieurs centaines de protéines peuvent ainsi être individualisées à partir d'un mélange.

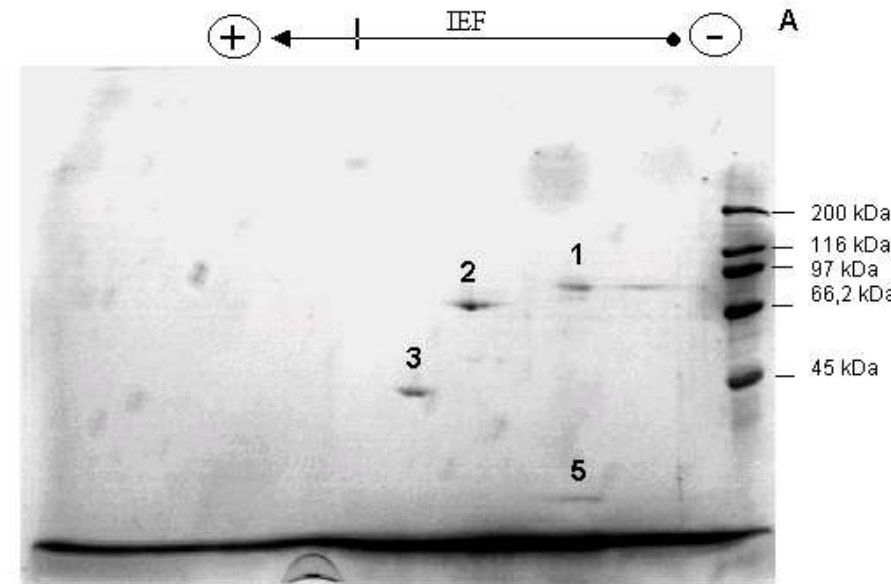
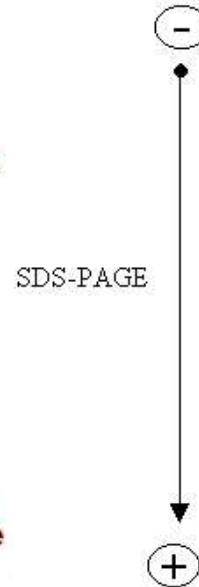


Analyse de protéines totales d'ovocytes sur un gel bidimensionnel

Révélation par autoradiographie : les protéines produites par l'ovocyte ont été marquées au moment de leur synthèse par l'utilisation de méthionine³⁵S. L'axe des abscisses donne le pHi, l'axe des ordonnées la MM apparente.



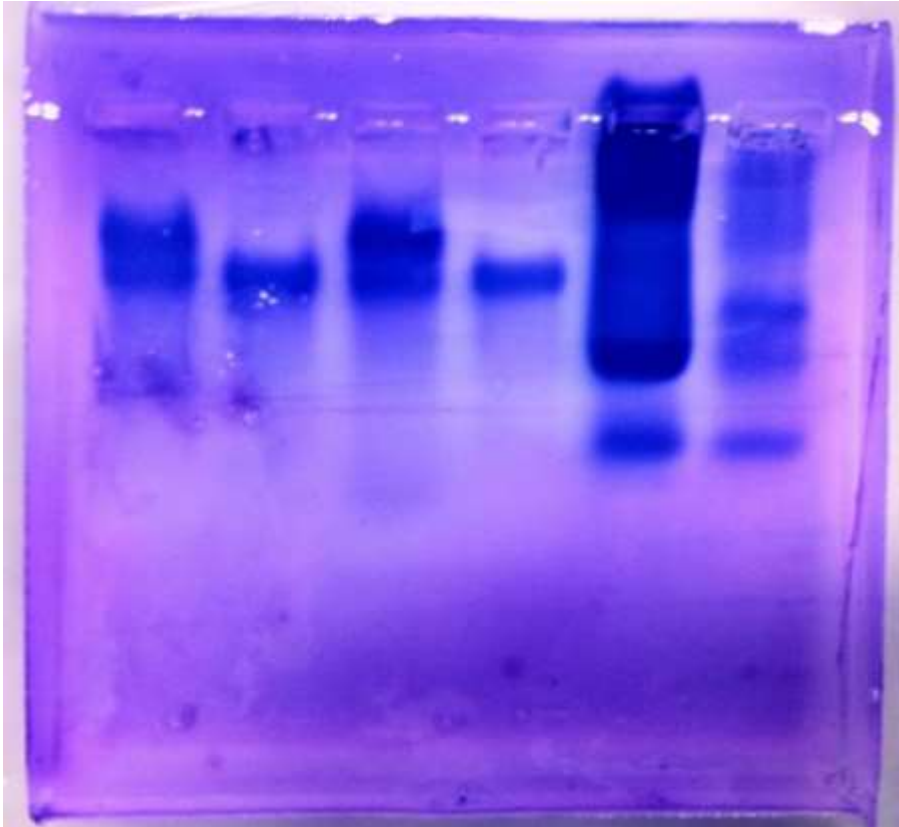
ELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION



L'association de ces deux paramètres, à la fois caractéristiques d'une protéine donnée mais également indépendants l'un de l'autre, confère à cette technique un très grand pouvoir résolutif puisqu'elle permet de séparer et de visualiser simultanément plusieurs milliers d'espèces protéiques issues de mélanges complexes.

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : résultats

A B C D E F



A et C : glucose oxydase non dénaturée

→ *Nb bandes?*

B et D : glucose oxydase dénaturée

→ *Nb bandes ?*

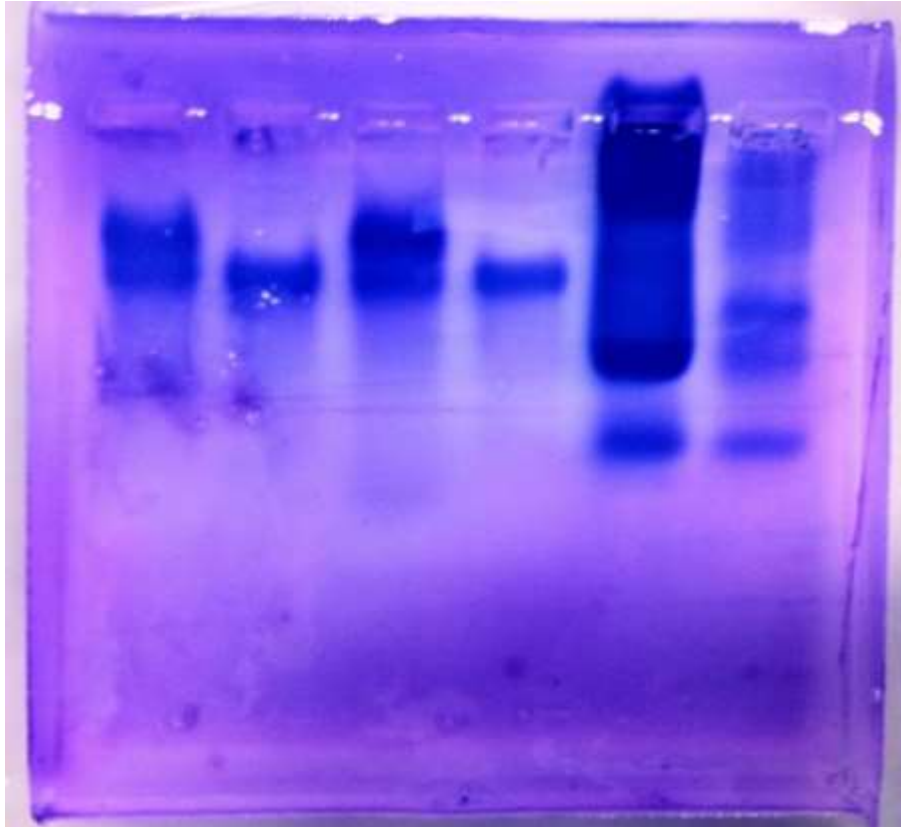
Ccl : ???

E : sérum de cheval non dénaturé

F : sérum de cheval dénaturé

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : résultats

A B C D E F



A et C : glucose oxydase non dénaturée

→ *deux bandes*

B et D : glucose oxydase dénaturée

→ *une seule bande*

Ccl : protéine à structure quaternaire, avec sous-unités de même masse.

La 2^e bande obtenue en conditions non dénaturantes est un « artefact » (protéine partiellement dénaturée, bien qu'il n'y ait pas eu de traitement dénaturant)

E : sérum de cheval non dénaturé

F : sérum de cheval dénaturé

Résultat d'une chromatographie de sucres sur gel de silice

G : glucose

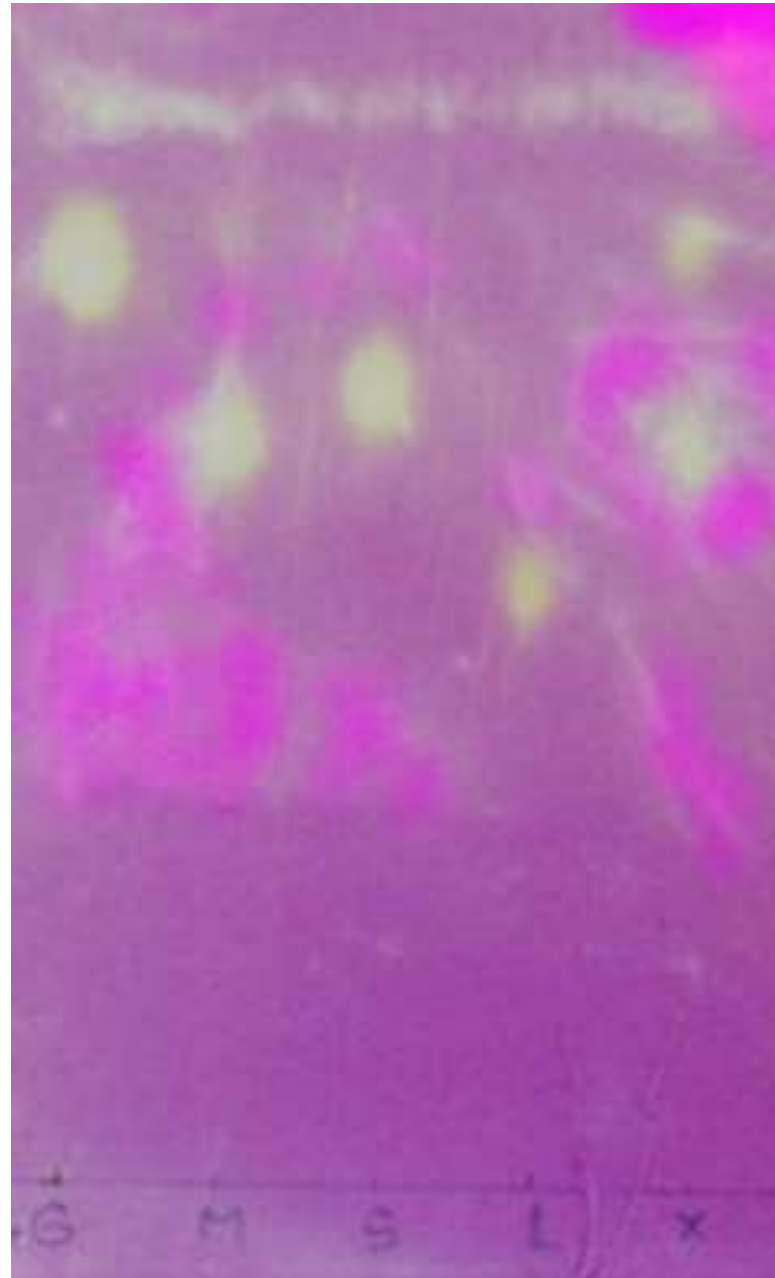
M : maltose

S : saccharose

L : lactose

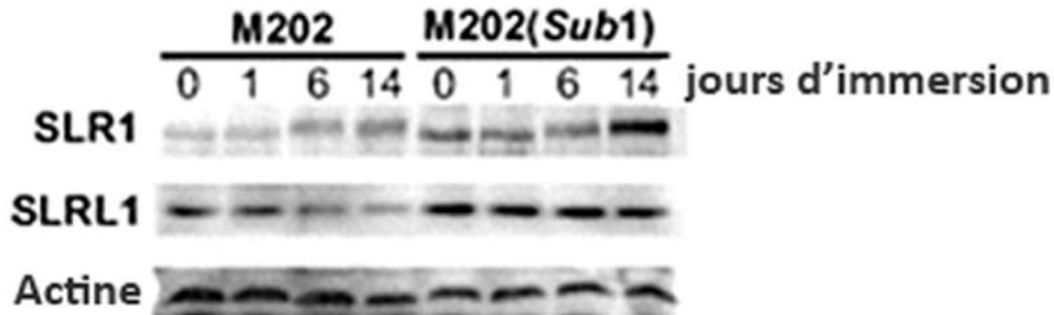
X : mélange à identifier

Chaque tache jaune matérialise un sucre : elle correspond à la réduction du permanganate par une fonction alcool des sucres



Exercice II. Analyse de résultats de western blot : modalités de résistance à l'immersion de riz non flottant.

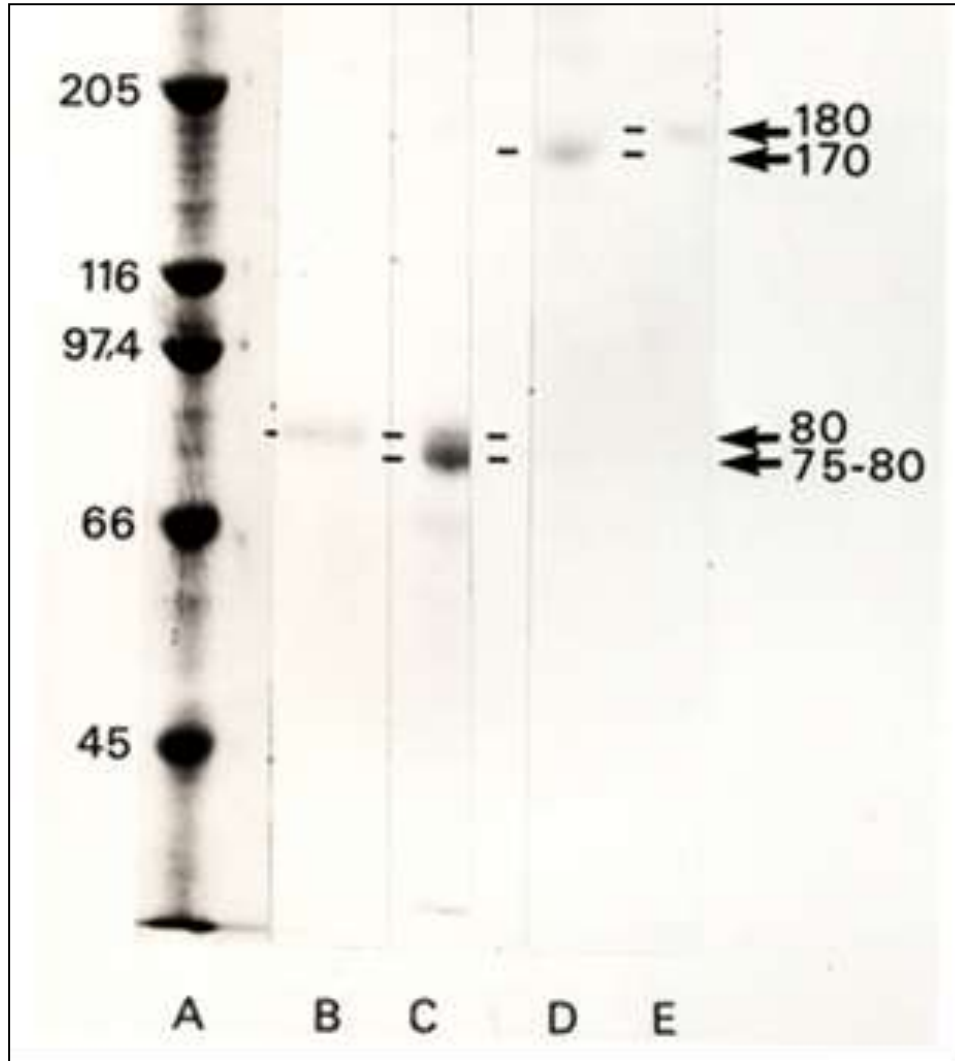
Effets de l'immersion sur deux variétés de riz. Les plants ont été immergés pendant 7 jours (photo de gauche) ou 14 jours (photo de droite) puis sortis de l'eau et photographiés 7 jours après.



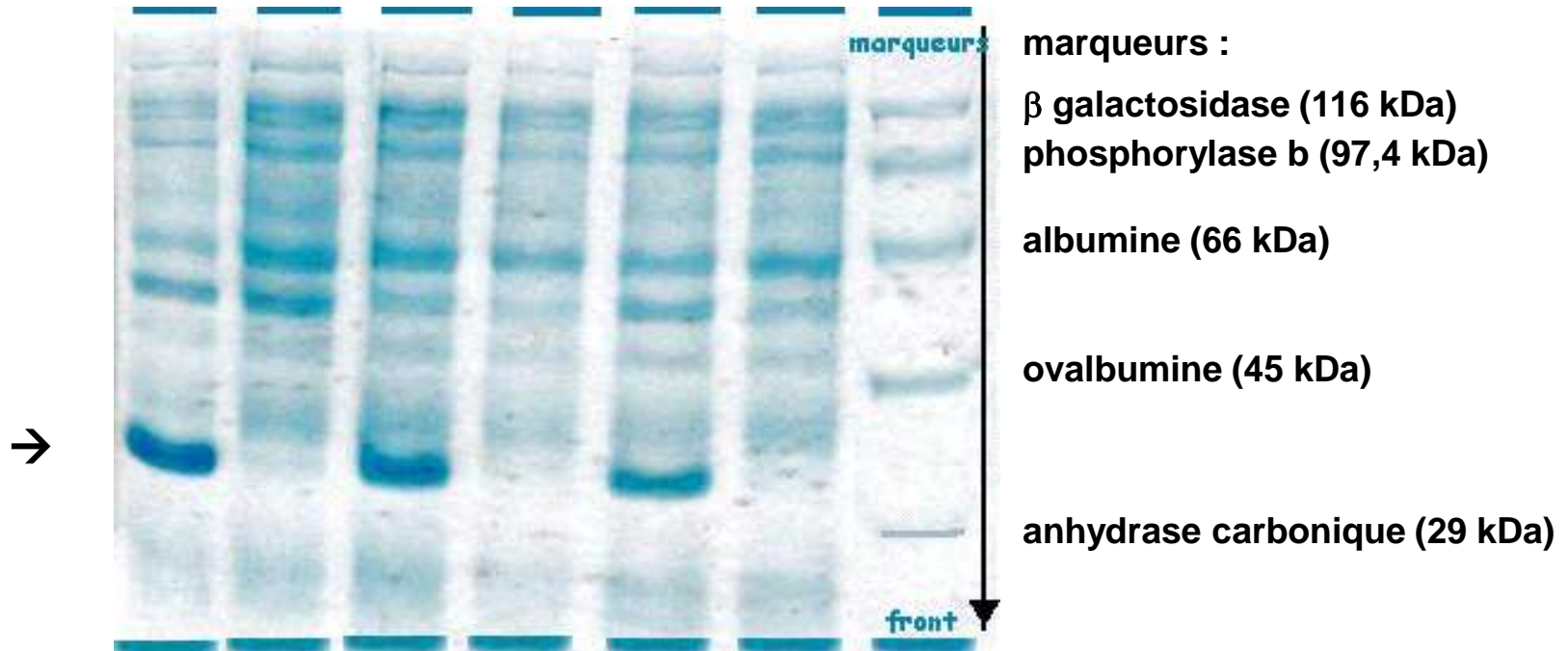
Résultats de western blot de protéines isolées à partir de plants de riz immergés.

Des plants de riz de variétés M202 et M202(*sub1*) sont immergés pendant une durée variable, au bout de laquelle on a isolé des protéines à partir de leurs tiges. 5 μ g de protéines isolées ont migré dans un gel SDS-PAGE 10 %, ce gel a été transféré sur une feuille de nitrocellulose, qui a été hybridée avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines SLR1, SLRL1 et actine (analyse par western blot).

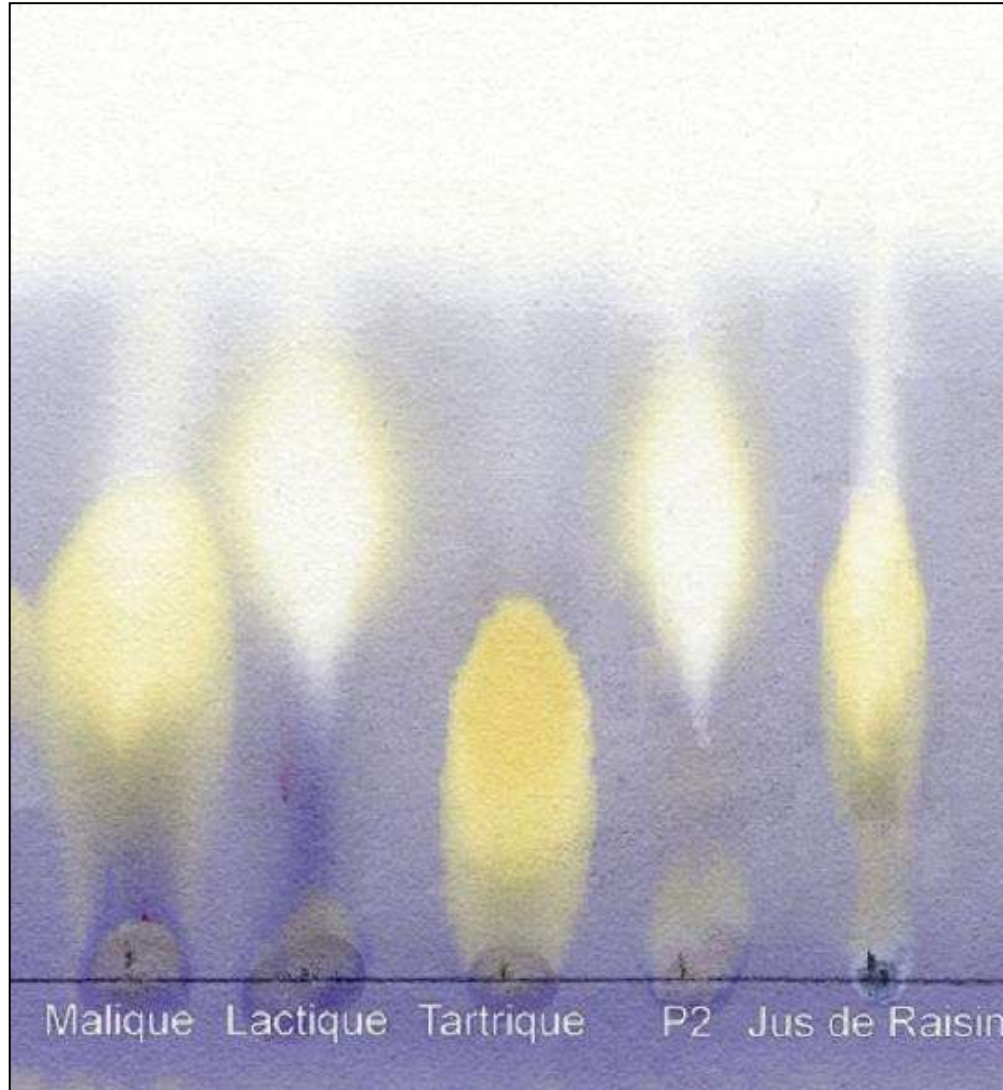
Exercice III. Analyse de résultats d'électrophorèse en conditions native et dénaturante, exemple de la DBH.



Exercice IV. Détermination de la masse moléculaire d'une protéine à partir de résultats d'électrophorèse (PAGE)



Exercice V. Analyse de résultats de chromatographie, cas de la transformation du jus de raisin.



Exercice VII. Etude d'une protéine : le lysozyme.

Document 1. Séquence peptidique du lysozyme (après maturation de la protéine).

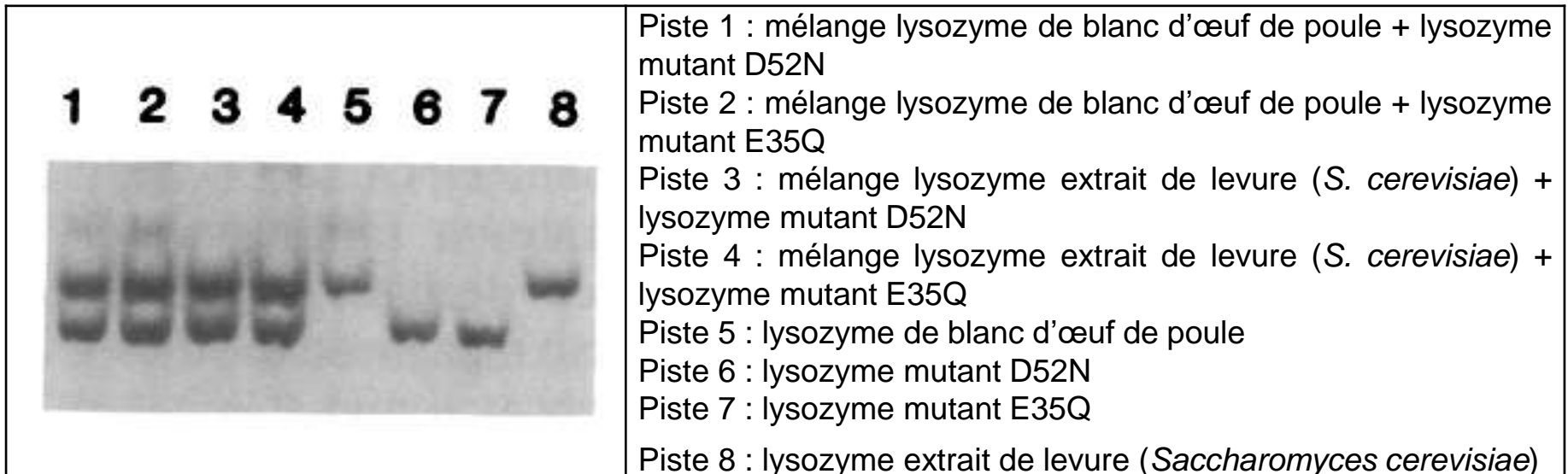
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1SF7_A]

Les acides aminés sont indiqués ici par leur code à une lettre (voir tableau des acides aminés en annexe).

```
1   KVFGRCELAA   AMKRHGLDNY   RGYSLGNWVC   AAKFESNFNT   QATNRNTDGS   TDYGILQINS
61  RWWCNDGRTP   GSRNLCNIPC   SALLSSDITA   SVNCAKKIVS   DGNGMNAWVA   WRNRCKGTDV
121 QAWIRGCRL
```

Document 2. Résultats de PAGE

- lysozyme mutant D52N (l'acide aminé D en position 52 est remplacé par N),
- lysozyme mutant E35Q (l'acide aminé E en position 35 est remplacé par Q).
- lysozymes de type sauvage de blanc d'œuf de poule et de levure.

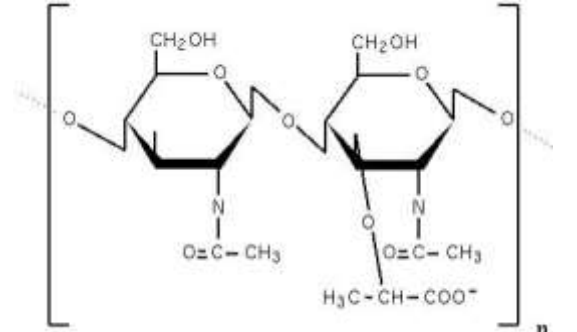
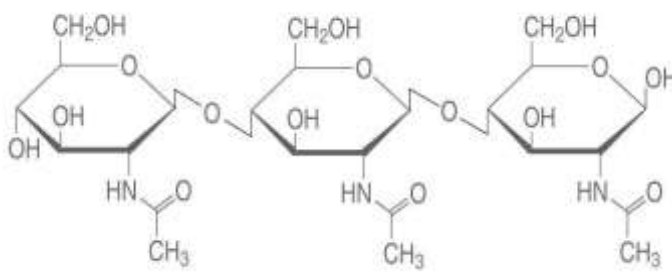


Document 3. **Activité bactériolytique des lysozymes mutés et sauvages.**

Enzyme étudiée	Activité spécifique comparée à celle du lysozyme extrait de <i>S. cerevisiae</i> (%)
lysozyme extrait de levure (<i>S. cerevisiae</i>)	100
lysozyme de blanc d'œuf de poule	116 ± 2
lysozyme mutant D52N	5,5 ± 2,5
lysozyme mutant E35Q	0,4 ± 0,1

100 µL de solution de lysozyme sont ajoutés à une suspension de *M. luteus* en milieu à pH 6,2 et maintenues à une température de 30 °C. L'absorbance à 450 nm est suivie pendant au moins 2 minutes. La mesure de la vitesse initiale de décroissance de l'absorbance permet de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme (= nb de mol de substrat transformé / mol d'enzyme et par minute).

Document 4. Cinétique de la réaction d'hydrolyse catalysée par le lysozyme.

Structure du motif diosidique du peptidoglycane	(GlcNAc) ₃
 <p>N-acétyl-glucosamine acide N-acétyl-muramique</p>	

Enzyme étudiée	Kd des complexes lysozyme – (GlcNAc) ₃
lysozyme extrait de levure (<i>S. cerevisiae</i>)	7,5 ± 0,4
lysozyme de blanc d'œuf de poule	8,6 ± 1,0
lysozyme mutant D52N	4,1 ± 0,4
lysozyme mutant E35Q	13,4 ± 0,9

Du fait de sa structure comportant des cycles, le (GlcNAc)₃ est une molécule excitable par la lumière (à 280 nm) et réémet de la lumière (à 316 nm) lors de son retour à l'état stable : c'est la fluorescence. En conséquence, la fluorimétrie permet de déterminer la concentration en (GlcNAc)₃ libre dans la solution, et par suite de déterminer la constante de dissociation Kd.