

# Protéomique -Principes de base -

Dr ADOUI F.

INATAA, Université des Frères Mentouri, Constantine

## **Contenu du cours**

### **1<sup>er</sup> Chapitre : Les protéines**

I. Synthèse

II. Composition et structure

II.1. Unité de base des protéines : Les acides aminés

II.2. Structure des protéines

### **2<sup>ème</sup> Chapitre : La protéomique ; étapes de l'analyse protéomique et techniques employées.**

I. Différentes étapes de l'analyse protéomique

I.1. Extraction des protéines

I.2. Purification des protéines

I.2.1. Techniques mises en œuvre en purification (fractionnement, enrichissement et élimination de contaminants)

I.2.1.1. Etapes initiales : précipitation fractionnée, dialyse et ultrafiltration

I.2.1.2. Techniques chromatographiques : principes

I.3. Dosage des protéines : principes

I.3.1. Mesure de l'absorbance à l'ultraviolet (UV)

I.3.2. Dosage par colorimétrie

I.4. Méthodes d'analyse des protéines

I.4.1. Electrophorèse : principe

I.4.1.1. Electrophorèse en conditions dénaturante : SDS-PAGE

I.4.1.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2DE)

I.4.2. Chromatographie liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI)

I.4.3. Spectrométrie de masse

I.4.3.1. La technique de la désorption laser assistée par matrice

I.4.3.2. La technique de l'ionisation Electrospray-Ionspray

I.4.3.3. Analyse de la séquence des protéines par fragmentation (MS/MS)

II. Approches protéomiques en biotechnologie alimentaire. Exemples.

## 1<sup>er</sup> Chapitre : Les protéines ; synthèse, composition et structure

Les **protéines**, macromolécules complexes qualifiables de **biopolymères**, sont les plus abondantes des molécules organiques des cellules et constituent souvent plus de 50% du poids sec des êtres vivants. Elles jouent un rôle fondamental dans la structure et les fonctions cellulaires et c'est par elles que l'information génétique s'exprime (Tableau 1). Elles sont intimement liées à tous les phénomènes physiologiques d'où leur nom **substances venant en premier** (en grec **protos** signifie **premier**).

Elles sont constituées par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques qui sont des copolymères d'environ une vingtaine d'acides aminés appartenant à la série L. Ces acides aminés sont liés entre eux par des liaisons amides : les **liaisons peptidiques**.

**Tableau 1** : exemples de fonctions assurées par les protéines

Fonctions	Exemple de protéine
Structure	Le <b>collagène</b> est une protéine fibreuse de la peau qui lui procure sa solidité et sa résistance.
Mouvement	L' <b>actine</b> est une protéine qui permet aux cellules musculaires de se contracter et de faire bouger les muscles.
Catalyse	L' <b>amylase</b> est une protéine présente dans la salive qui permet de digérer l'amidon, entre autres. Les protéines de cette catégorie portent le nom d'enzymes.
Réserve	La <b>caséine</b> est une protéine du lait qui constitue une réserve d'acides aminés nécessaires au développement des jeunes mammifères.
Transport	L' <b>hémoglobine</b> est une protéine qui transporte le dioxygène dans le sang.
Communication et régulation	L' <b>insuline</b> est une hormone protéine qui régule le taux de glucose dans le sang et permet son entrée dans les cellules après un repas.
Reconnaissance et signalisation	Les <b>anticorps</b> sont des protéines qui reconnaissent les corps étrangers et déclenchent les réactions de défense immunitaire de l'organisme.

Il n'existe que 20 acides aminés qui peuvent entrer dans la composition des protéines. C'est donc la séquence de ces acides aminés de chaque protéine qui détermine sa structure et sa fonction.

Pour former une protéine, les acides aminés se lient entre eux par une **liaison covalente** qui résulte de l'association du groupement amine (NH<sub>2</sub>) d'un résidu avec le groupement acide carboxylique (COOH) du résidu suivant. C'est une réaction de condensation qui libère d'une part le **dipeptide** formé par l'association des acides aminés et d'autre part une molécule d'eau.

## I. Synthèse des protéines

**La synthèse des protéines** est le processus de fabrication des protéines à partir de l'information portée par les gènes. En d'autres termes, il s'agit de l'acte par lequel une cellule assemble des acides aminés ensemble afin de former des protéines, selon l'information contenue dans l'ADN.

Au niveau du ribosome, situé à la surface du réticulum endoplasmique, la cellule synthétise les protéines à l'extérieur du noyau, donc dans le cytoplasme. Cependant, comme les chromosomes ne peuvent sortir du noyau, la cellule doit trouver le moyen d'exporter l'information contenue dans les gènes dans le cytoplasme. Pour ce faire, la cellule doit transcrire l'information de l'ADN dans une autre molécule qui va jouer le rôle de messenger : il s'agit de l'**acide ribonucléique messenger (ARNm)**. Lorsque cette molécule est dans le cytoplasme, les ribosomes vont traduire l'information qu'elle contient pour ensuite former les protéines.

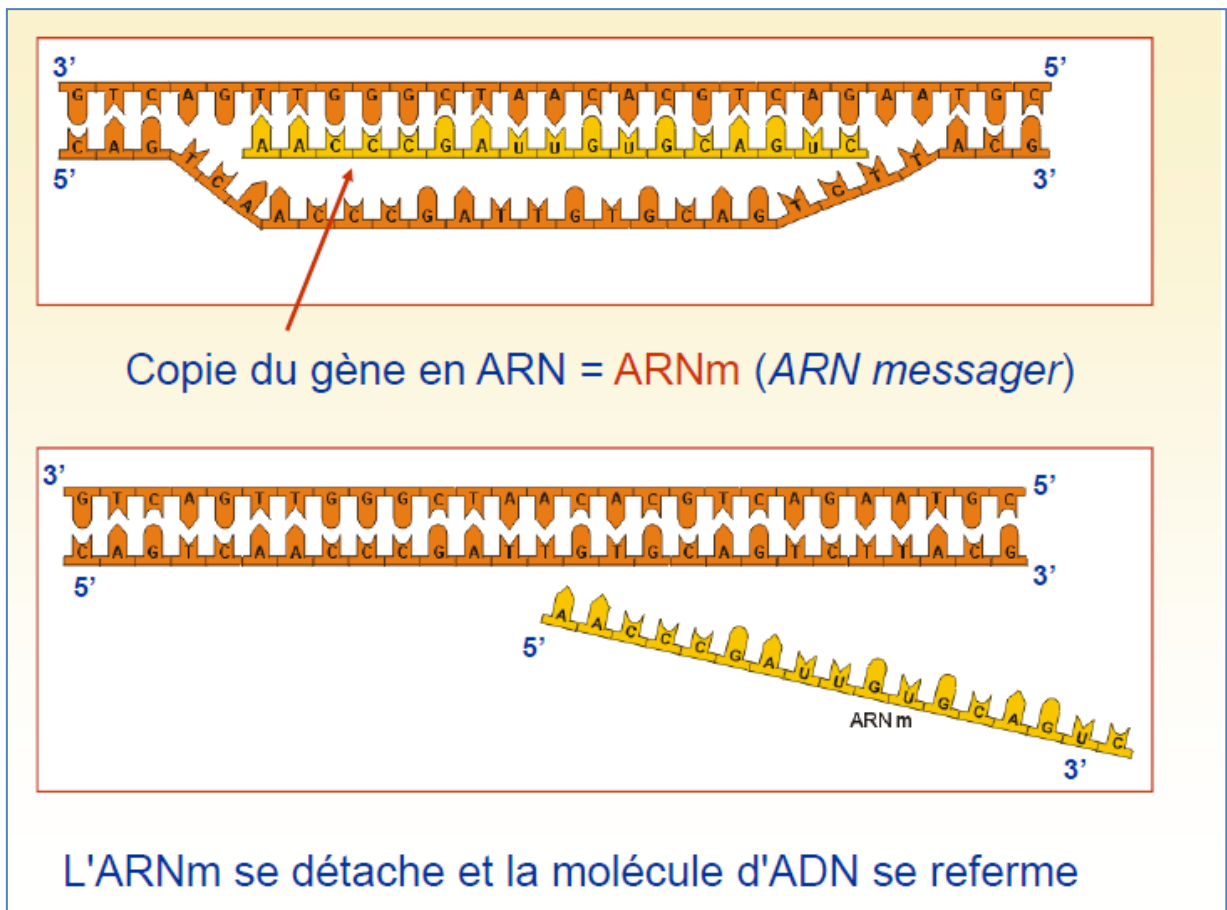
Ainsi, la synthèse des protéines résulte de l'expression de l'information génétique. La séquence en nucléotides d'un gène, portée par une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN), code la séquence en acides aminés d'une protéine donnée. Elle se déroule au sein de la cellule en deux étapes : la transcription et la traduction.

- **Transcription**

La transcription d'un gène est la copie de sa séquence en nucléotides, située sur un des deux brins de la molécule d'ADN, en Acide RiboNucléique messenger (ARNm), molécule dont la séquence porte alors la même information génétique que le gène transcrit. Elle se déroule dans le noyau de la cellule (figure 1).

- **L'ARN messenger**

L'ARNm est la molécule intermédiaire entre l'information génétique, localisée dans le noyau chez les eucaryotes, et les protéines synthétisées dans le cytoplasme de la cellule. L'ARNm est un acide nucléique comme l'ADN, mais il présente plusieurs différences : il est formé d'une seule chaîne de nucléotides dont le sucre est le ribose (on parle alors de ribonucléotide) ; et la base azotée uracile (U) remplace la thymine (T).



**Figure 1** : Schéma de l'étape de transcription

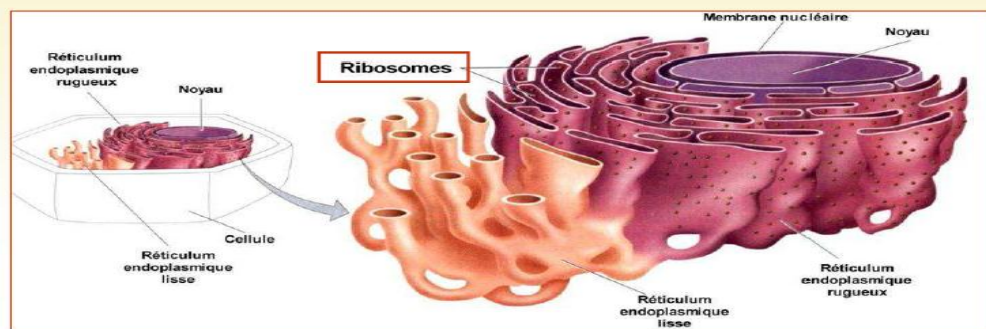
- **Mécanisme de la transcription**

La transcription repose sur la complémentarité des bases. L'enzyme ARN polymérase, en se déplaçant à l'intérieur de la double hélice d'ADN, catalyse l'assemblage de ribonucléotides, formant l'ARN messenger, selon la séquence complémentaire du gène transcrit. Exemple : la séquence ATGCAT d'un brin d'ADN sera transcrite, sous forme d'ARNm, en séquence UACGUA.

- **Traduction**

La traduction est le "décodage" de l'information génétique portée par l'ARNm en une protéine. Ce mécanisme repose sur le code génétique. Elle a lieu dans le cytoplasme. Dans cette étape interviennent les ARN messagers en provenance du noyau, les ribosomes, et les acides aminés puisés par la cellule dans son environnement (figure 2).

La synthèse de la protéine (assemblage des acides aminés) se fait au niveau des **ribosomes**



**Figure 2 : Le noyau cellulaire**

- **Le code génétique**

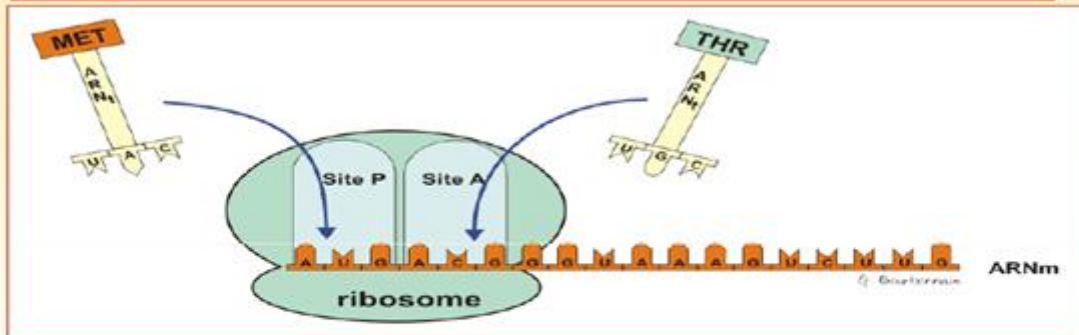
Ce code établit la correspondance entre trois nucléotides successifs appelés triplet ou codon de l'ARN messager et un des vingt acides aminés entrant dans la composition des protéines. Le code génétique est universel : il est le même chez tous les êtres vivants. Un codon correspond à un seul acide aminé.

- **Mécanisme de la traduction**

La traduction débute toujours par le codon d'initiation AUG qui correspond à l'acide aminé méthionine. Les ribosomes, complexes moléculaires du cytoplasme, "avancent" le long de la molécule d'ARNm et "enchaînent" les acides aminés selon l'ordre dans lequel se succèdent les codons correspondants : c'est l'élongation, la protéine se fabrique. Lorsque le ribosome rencontre l'un des codons STOP, la traduction s'arrête : c'est la terminaison. La protéine est synthétisée (figure 3, A et B). La séquence complète, une fois terminée, la protéine passe dans le réticulum endoplasmique où elle prend sa forme définitive (figure 4).

## Mécanisme de la traduction

A



Le brin d'ARNm s'attache au ribosome.  
En fait, il s'attache d'abord à la petite unité. C'est à ce moment que la grosse unité vient se fixer. Donc, les deux unités ne s'assemblent que lorsque l'ARNm se fixe à la petite unité.

Deux ARNt peuvent se fixer par leur anticodon sur l'ARNm au niveau du ribosome (un sur la zone appelée site P et l'autre sur la zone appelée site A).

B

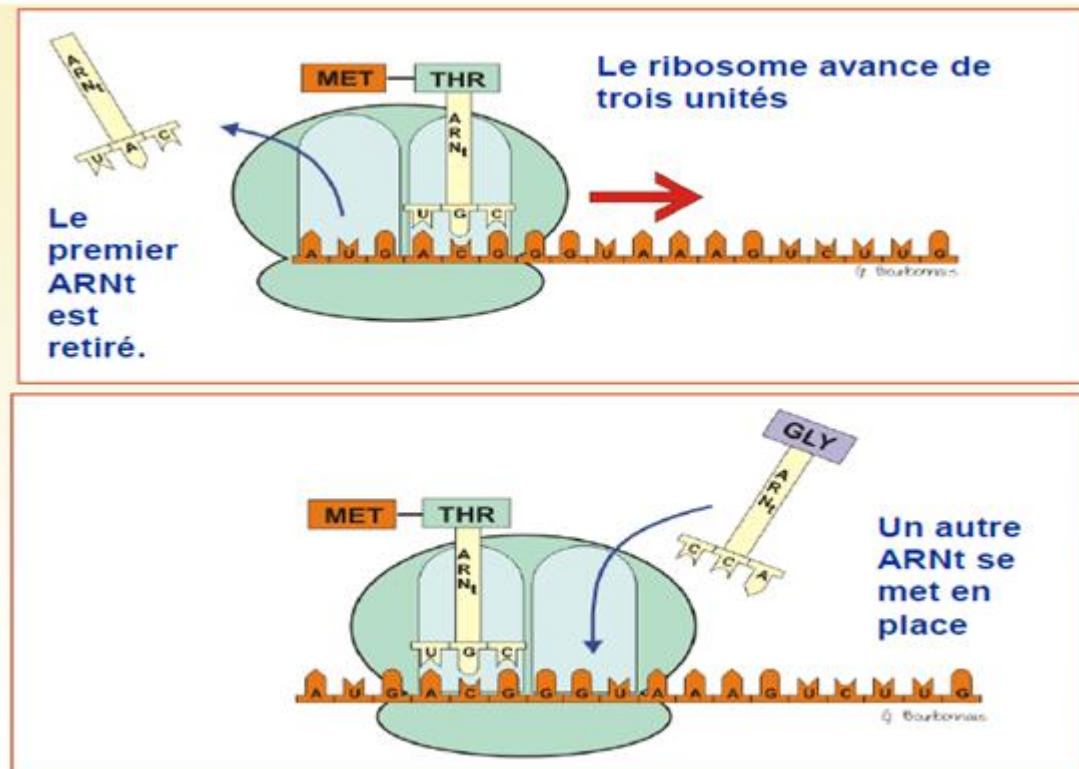
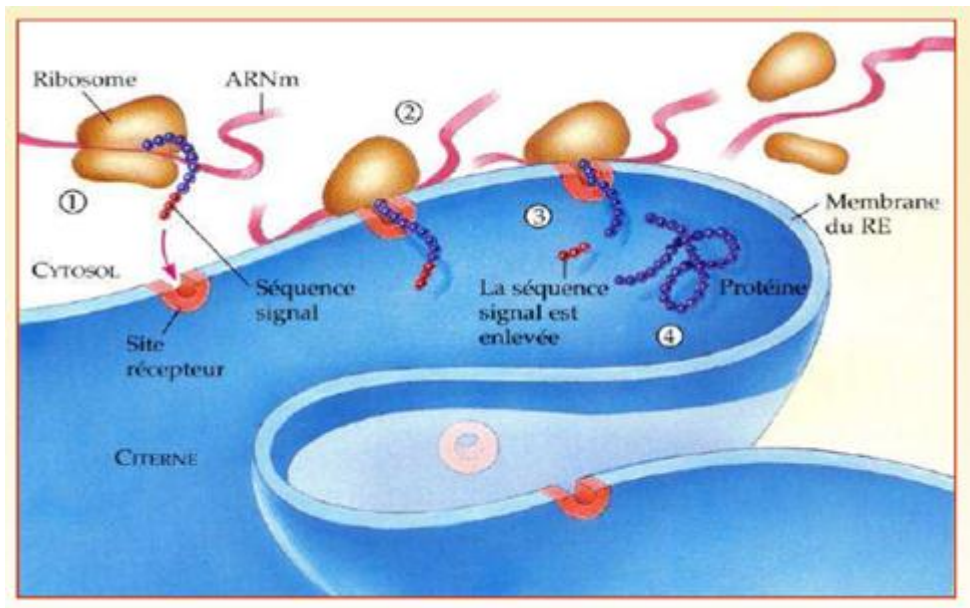


Figure 3 : Schéma du mécanisme de la traduction





**Figure 4 :** Schéma de l'étape de la finition de la synthèse des protéine

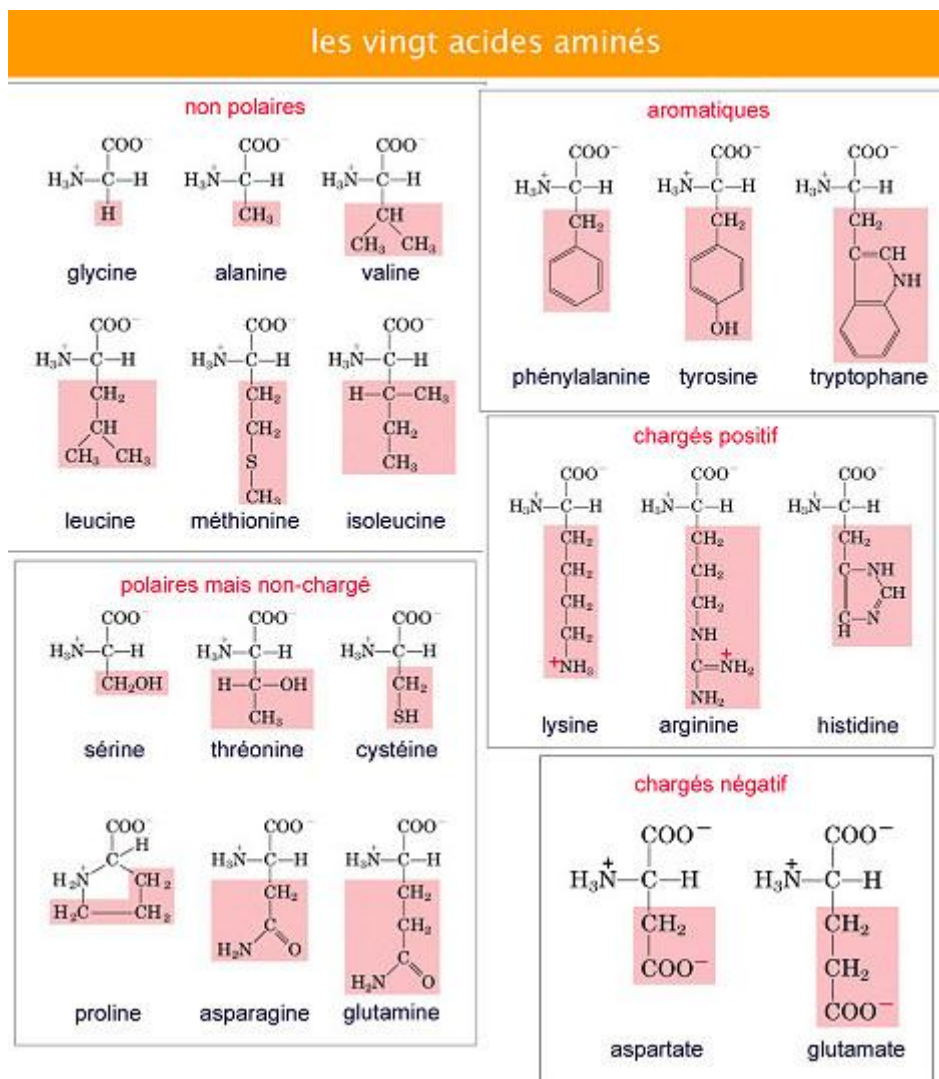
## II. Composition des protéines

### II.1. Unité de base des protéines : Les acides aminés

Les protéines appartiennent à une classe de composants organiques du vivant, celle des **Protides**, composés organiques contenant **C H O N** (50, 7, 23, 16 %) et souvent **S** (0 à 3 %).

Les acides aminés sont les unités de base des protéines, s'agit de monomères ; protides non hydrolysables (issus des protides hydrolysables dans des conditions bien définies ; HCl 6N, 24 h ou plus, 110°C).

Bien que dans la nature, il existe plus de 100 acides aminés, seulement une vingtaine sont essentiels. Dans les cellules, les acides aminés peuvent être à l'état libre ou sous forme de peptides ou de protéines. Les acides aminés ont tous la même structure de base : une fonction amine (-NH<sub>2</sub>) et fonction acide carboxylique (-COOH). Le radical (R) est une chaîne de carbone qui varie d'un acide aminé à l'autre (figure 5), (Tableau 2). Les acides aminés sont classés selon les propriétés de cette chaîne latérale en quatre groupes : acide, basique, hydrophile (polaire) et hydrophobe (apolaire).



**Figure 5 : principaux acides aminés**

- Les groupements  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $=\text{CH}-$  ont un caractère hydrophobe. Les acides aminés neutres accroissent l'hydrophobicité et ceci d'autant plus que la chaîne est plus longue ; dans l'ordre décroissant, on a : Trp, Phe, Ile, Leu, Pro, Val, Met, Ala. L'hydrophobicité moyenne d'une protéine est exprimée en kJoules par résidu. Les cycles et les chaînes aliphatiques sont bien entendu plus hydrophobes que les chaînes chargées ioniquement. Ces différences joueront un rôle dans les structures supérieures des protéines. Plus un résidu est hydrophobique, plus il a tendance à se "cacher" du milieu aqueux environnant, et favorise des interactions hydrophobiques au cœur des protéines globulaires (ce qui aide à en stabiliser la structure).

**Tableau 2 : Codes des acides aminés et leurs poids moléculaires**

Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Poids (en g/mol)
alanine	Ala	A	89,1
arginine	Arg	R	174,2
asparagine	Asn	N	132,1
aspartate	Asp	D	133,1
cystéine	Cys	C	121,2
glutamate	Glu	E	147,1
glutamine	Gln	Q	146,2
glycine	Gly	G	75,1
histidine	His	H	155,2
isoleucine	Ile	I	131,2
leucine	Leu	L	131,2
lysine	Lys	K	146,2
méthionine	Met	M	149,2
phénylalanine	Phe	F	165,2
proline	Pro	P	115,1
sérine	Ser	S	105,1
thréonine	Thr	T	119,1
tryptophane	Trp	W	204,2
tyrosine	Tyr	Y	181,2
valine	Val	V	117,1

- Les groupements polaires, non dissociés, tels que  $\text{-OH}$  (Ser, Thr, Tyr),  $\text{-SH}$  (Cys) et  $\text{-CO-NH}_2$  (Asn, Gln) peuvent former des liaisons hydrogène, notamment avec l'eau, d'où leur caractère hydrophile. La cystéine apporte une autre possibilité de liaison, du fait de son oxydabilité ; il se forme une molécule de cystine avec une liaison  $\text{-S-S-}$  entre deux Cys appartenant soit à la même molécule, soit à deux molécules protéiques distinctes.

- Les groupements dissociables, tels que  $-\text{COOH}$  (Asp, Glu) et  $-\text{NH}_2$  ou  $-\text{NH}$  (Lys, Arg, His), accentuent le caractère hydrophile et influent sur le pHi des protéines. Ils perdent ou acceptent un proton ( $\text{H}^+$ ).
- Les trois acides aminés possédant un cycle aromatique absorbent le rayonnement ultraviolet, avec un maximum aux longueurs d'ondes suivantes : Phe à 257nm, Tyr à 275nm et Trp à 278nm. Ces propriétés ont reçu des applications analytiques.

## II.2. Structure des protéines

Il n'y a pas de limite supérieure précise à la taille d'une protéine (elle peut dépasser le million). Les protéines contiennent généralement plus de 100 acides aminés. Les molécules plus petites sont appelées oligopeptide (moins de 20 acides aminés) ou polypeptide (20 à 100). L'ordre des acides aminés d'une protéine est donné par le génome et constitue la structure primaire.

La conformation est la forme tridimensionnelle de la protéine dans l'espace (ensemble des structures primaire, secondaires, tertiaires et quaternaires).

La **structure primaire** correspond à l'ordre séquentiel des acides aminés (**résidus**) dans une protéine.

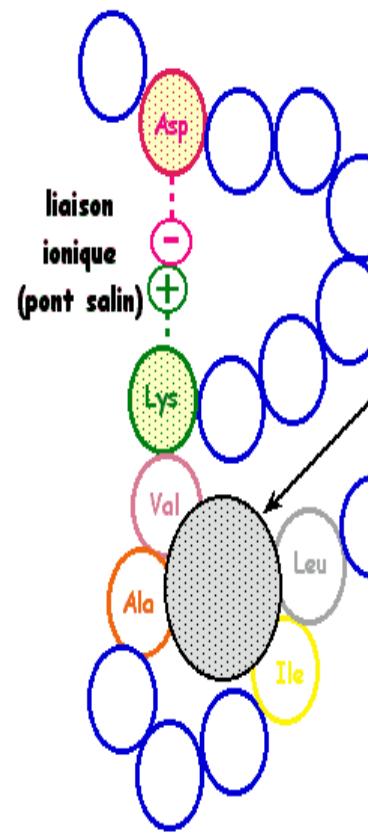
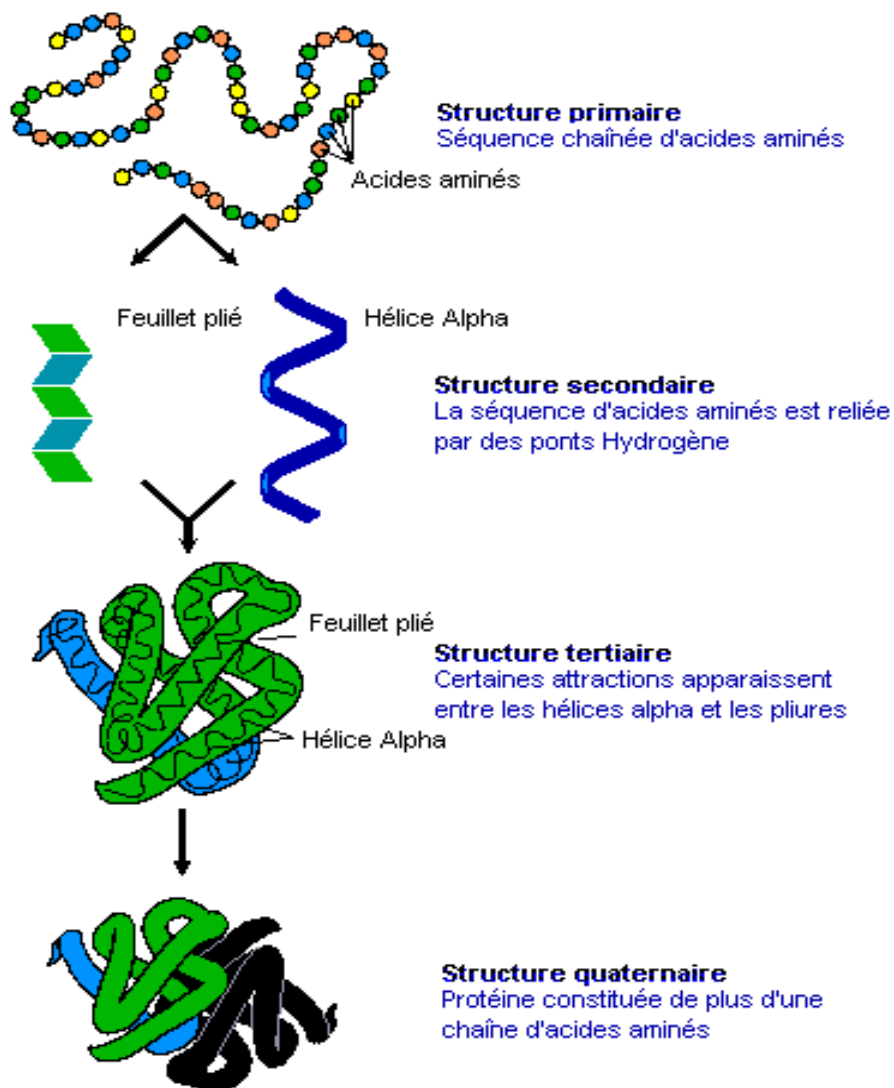
La **structure secondaire** correspond à l'organisation de la chaîne dans l'espace selon un axe privilégié.

La **structure tertiaire** correspond à l'organisation spatiale de la chaîne polypeptidique selon les trois dimensions.

La **structure quaternaire** est l'arrangement dans l'espace de diverses chaînes liées entre elles par des liaisons non covalentes le plus souvent ou par pont disulfure.

La juxtaposition d'acides aminés reliés par la liaison peptidique correspond à leur structure primaire. C'est ainsi que l'on représente linéairement sa séquence. La structure secondaire est la conformation prise par la chaîne polypeptidique, stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupes de l'ossature et non des chaînes latérales. La liaison qui est importante ici s'établit entre H de  $-\text{NH}-$  et O de  $\text{C}=\text{O}$  donnant naissance à une forme de feuillet  $\beta$  ou d'hélice  $\alpha$ . Cette dernière est à prendre en compte lors des études d'interaction de la protéine, ainsi que la structure tertiaire qui correspond aux repliements des feuillets et des

hélices en fonction de leurs alternances. Une quatrième et dernière structure définit la possibilité d'une protéine à former des polymères avec une protéine identique (homomère) ou différente (hétéromère) (figure 6).



E. Jaspard (2005)

Les quatre niveaux de structure d'une protéine

Interactions  
l'origine  
protéiques.

Figure 6 : représentation des niveaux de structure des protéines

## 2<sup>ème</sup> Chapitre : La protéomique ; étapes de l'analyse protéomique et techniques employées.

La protéomique consiste à **étudier l'ensemble des protéines** d'un organisme, d'un fluide biologique, d'un organe, d'une cellule ou même d'un compartiment cellulaire. Cet ensemble de protéines est nommé « protéome ». Ce terme a été suggéré pour la première fois, en 1994, par Marc Wilkins, lors du premier congrès de Sienne sur la protéomique, pour répondre à la nécessité d'une nouvelle terminologie qui reflète l'intérêt croissant pour l'étude de l'ensemble de protéines exprimé par un génome.

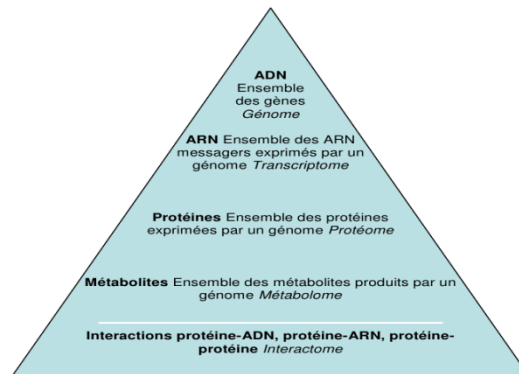
En effet, le protéome est une entité dynamique et complexe. Au sein de chaque cellule, le contenu de protéines se modifie en permanence en fonction des conditions intra ou extra cellulaires ; étapes du cycle cellulaire, de la différenciation, de la réponse à différents signaux biologiques ou physiques et de l'état physiopathologique. De plus, par le biais de réarrangements qui modifient ses fonctions biologiques, un même gène peut donner naissance à plusieurs protéines. Le protéome contient donc un nombre beaucoup plus important de protéines que le génome ne contient de gènes.

Il existe différents types d'analyse protéomique, toute fois, On peut distinguer de façon conceptuelle deux grands types : la protéomique descriptive et la protéomique fonctionnelle. Dans le premier cas, celui de la protéomique descriptive, la protéomique s'attache à identifier les protéines extraites d'une culture cellulaire, d'un tissu ou d'un fluide biologique, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leurs modifications post-traductionnelles. Elle peut également permettre de quantifier les variations de leur taux d'expression en fonction du temps, de leur environnement, de leur état de développement, de leur état physiologique et pathologique, de l'espèce d'origine. Elle étudie aussi les interactions que les protéines ont avec d'autres protéines, avec l'ADN ou l'ARN, avec des substances.

La protéomique fonctionnelle étudie les fonctions de chaque protéine, et les molécules qui au sein de la cellule s'associent aux protéines d'intérêt ; elle met en évidence, également, les différentes modifications structurales responsable des modifications d'activité.

Le suffixe "**-omique**" est de nos jours appliqué à toutes les causes pour désigner l'étude de systèmes à grande échelle. Ainsi, l'étude du génome entier est connu sous le nom de **génomique**, celles d'un grand nombre de protéines est de venu la **protéomique**, ou encore

**l'interactomique** (étude des interactions), ou à la **transcriptomique** (étude de l'ARNm) (figure 7).



**Figure 7 : Schéma des sciences omiques**

## **I. Les différentes étapes de l'analyse protéomique**

### **I.1.Extraction des protéines**

L'étape la plus délicate et la plus limitante, est la phase d'extraction des protéines. Cette extraction reste assez simple dans le cas d'un liquide biologique ; cela devient d'emblée beaucoup plus délicat dans le cas d'un tissu. Beaucoup de protéines sont en effet hydrophobes et donc difficiles à extraire, ce qui est également le cas de protéines très fortement ancrées à des structures cellulaires. Il est alors fait appel à des solutions d'extraction associant des agents chaotropes, des détergents neutres et des réducteurs. De plus, l'addition d'anti-protéases permet de réduire la dégradation des protéines lors de cette phase d'extraction.

Cette étape implique typiquement plusieurs techniques telles que la centrifugation, la microfiltration et la lyse cellulaire.

Les principales approches de lyse des cellules font appelent au choc osmotique (peut suffire à briser la membrane cellulaire de cellules fragiles). Une certaine action mécanique peut aussi être ajoutée au processus: un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères. Pour les cellules de plantes, de levures ou les bactéries, toute approche "douce" devra tenir compte de la présence d'une paroi cellulaire très résistante ; les protoplastes de telles cellules seront préparés en traitant ces dernières avec des enzymes (telle la lyticase) qui détruiront la paroi sans briser la membrane plasmique. Finalement, dans tous les cas, une méthode brutale peut aussi être utilisée. Le traitement aux ultrasons, une lyse

mécanique utilisant des billes de verre ou une presse Aminco-French, comme les cycles de congélation/décongélation, sont tous des moyens envisageables.

L'extraction s'effectuera dans une solution tampon, Le tampon de lyse répondra à certaines exigences expérimentales. Il devrait avoir un fort pouvoir tampon, car le contenu des cellules peut être à un pH inapproprié. Les enzymes lysosomiques, par exemple, libérés de leur enveloppe et dans un milieu à pH acide, sont susceptibles de détruire les autres protéines cellulaires. L'ajout des inhibiteurs de protéases au tampon doit, aussi, être envisagé (Tableau 3).

Alors que l'intérieur des cellules est un environnement réducteur (à cause entre autres de toute cette glutathione), l'atmosphère dans laquelle nous vivons est au contraire oxydante (elle est riche en oxygène). La protéine devra être protégée d'une oxydation excessive : c'est pourquoi un agent réducteur comme la glutathione, l'acide ascorbique, le beta-mercaptoethanol ou le dithiothreitol (DTT) pourra être ajouté au tampon. On retrouve souvent du glycérol dans la composition des tampons. Il stabilise les interactions protéine-protéine.

**Tableau 3 :** Exemple de quelques inhibiteurs de protéases employés durant l'extraction des protéines.

Inhibiteurs	Cible
PMSF	Toutes les sérine protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaine, etc).
AEBSF	Toutes les sérine protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaine, etc). Plus soluble et moins toxique que son prédécesseur, le PMSF.
EDTA et EGTA	métalloprotéases (métal comme cofacteur)
Benzamidine	sérine protéases
Pepstatin A	protéases aspartiques comme la cathepsine D, la rénine, la pepsine et les protéases d'HIV.
Leupeptin	sérine- (trypsine, plasmine, kallikréine porcine) et cystéine-protéases (papaine, cathepsine B). N'inhibe pas la thrombine ni la chymotrypsine.
Aprotinin	sérine protéases, mais pas la thrombine ou le facteur X.
Chymostatin	sérine protéases avec une spécificité de type chymotrypsine (chymotrypsine, chymases, cathepsine G et des cystéine protéases comme les cathepsines B, H et L.
Antipain	Inhibe la papaine, la trypsine et la plasmine jusqu'à un certain point. Plus spécifique pour la trypsine et la papaine que ne l'est la leupeptine.



## I.2. Purification des protéines

L'identification d'une protéine ou bien l'étude de sa structure et de ces fonctions biologiques nécessitent que cette protéine soit à l'état pur d'où l'intérêt de l'étape de purification en protéomique.

La purification des protéines est une série de processus successifs de simplification du mélange complexe initial, retrait des déchets cellulaires (membranes, organites), élimination du matériel génétique, élimination ou conservation de certaines protéines en fonction de leurs caractéristiques chimiques (taille, charge électrique, affinité), isolation par affinité spécifique de la protéine d'intérêt.

### I.2.1. Techniques mises en œuvre en purification (fractionnement, enrichissement et élimination de contaminants)

Les différences de propriétés physico-chimiques et biochimiques des protéines (formes, masses moléculaires, charges ioniques, hydrophobicité et solubilité...) sont mises à profit pour les séparer, l'isoler et les purifier (tableau 4).

**Tableau 4 :** propriétés physico-chimiques et biochimiques mises en œuvre dans la purification et exemples de techniques correspondantes

Caractéristiques	Techniques
•Solubilité	1. Solubilisation/précipitation saline
•Charge ionique	1. Chromatographie par échange d'ions 2. Electrophorèse 3. Focalisation isoélectrique
•Caractère polaire	1. Chromatographie d'adsorption 2. Chromatographie en phase inverse 3. Chromatographie par interactions hydrophobes
•Taille moléculaire	1. Dialyse et ultrafiltration 2. Electrophorèse en gel 3. Chromatographie par filtration sur gel
•Spécificité de liaison	1. Chromatographie d'affinité

### **I.2.1.1. Etapes initiales : précipitation fractionnée, dialyse et ultrafiltration**

#### **A. Précipitation aux sels**

Les protéines, sauf celles intégrées dans les membranes cellulaires, sont d'autant plus solubles en solution aqueuse qu'elles sont hydratées. Cette coque d'hydratation les empêche de s'agréger ensemble. Une trop grande agrégation les fait précipiter puisque la solvation de ces agrégats est proportionnellement moins grande que celle des protéines individuelles. En ajoutant des produits déshydratants qui compétitionnent avec les protéines pour l'eau d'hydratation, on peut donc provoquer la précipitation des protéines. Se superposant à ce phénomène, les conditions ioniques d'une solution affectent aussi la solubilité des protéines.

En effet, si les protéines sont électriquement chargées de la même façon, elles auront tendance à se repousser, donc à ne pas s'agréger. Au contraire, si elles sont électriquement neutres, cette répulsion disparaît, et l'aggrégation devient possible. Ce phénomène est utilisé soit en jouant sur le pH de la solution ou avec des électrolytes.

Les électrolytes employés ici sont des sels très solubles en milieu aqueux. Les cations peuvent neutraliser les charges négatives des chaînes latérales des acides aminés et les anions neutralisent les charges positives. Ces protéines neutralisées ne se repousseront plus, elles pourront s'agréger en complexes de solubilité substantiellement réduite pouvant facilement précipiter. Au point isoélectrique (pI) les protéines sont également neutres. En amenant le pH au pH isoélectrique de certaines protéines, on peut donc aussi précipiter celles-ci. Dans les deux cas, pH ou électrolytes, les protéines ne précipiteront pas toutes en même temps puisque leur pI ou le nombre et la nature de leurs charges ne sont pas identiques. La plupart des électrolytes combinent à la fois la déshydratation et la neutralisation des protéines

- **Précipitation totale**

Comme son nom l'indique les méthodes de précipitation totale des protéines visent à éliminer l'ensemble des protéines d'une solution. Ce résultat s'obtient par des conditions plutôt draconiennes qui le plus souvent, dénaturent irréversiblement les protéines. La précipitation totale est utilisée pour séparer les protéines des autres petites molécules contaminants, acides aminés, sucres, etc..., ou, quelquefois, des autres macromolécules. Cette approche est donc incompatible à des procédures visant à récupérer une protéine intacte et fonctionnelle. La précipitation au sulfate de zinc ou au tungstate de sodium est un exemple de précipitation

totale. Le sulfate de zinc (ou le sulfate de cadmium) en présence d'une base forte (NaOH ou  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) est un précipitant efficace. C'est une technique cependant un peu complexe, particulièrement si on utilise le  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  qui doit être conservé à l'abri de l'air. Une autre méthode de même type utilise du tungstate de sodium en présence d'un acide fort ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

- **Précipitation différentielle**

La précipitation différentielle, ou précipitation fractionnée, est beaucoup plus douce que la précipitation totale et préserve généralement l'intégrité fonctionnelle des protéines. C'est donc une approche très fréquemment utilisée comme étape dans l'isolement des protéines. Elle est basée sur le fait que les conditions ioniques ou de pH qui rendent les protéines insolubles varient pour chaque espèce de protéine. On peut donc ajuster les concentrations de l'électrolyte ou le pH pour isoler la protéine désirée.

Généralement la stratégie est très simple. Dans un premier temps on amène la concentration de l'électrolyte ou le pH à un niveau un peu inférieur à celui de la protéine d'intérêt. Les protéines insolubles dans ces conditions peuvent donc être éliminées, par exemple par centrifugation. La solution contenant les protéines non précipitées, incluant la protéine d'intérêt est récupérée. On ajoute une quantité d'électrolyte ou on ajuste le pH de façon à ce que cette protéine devienne insoluble. On peut alors récupérer la protéine d'intérêt qui a précipité. Cette protéine est alors débarrassée de beaucoup de protéines contaminants. Celles qui sont moins solubles que les protéines ont été éliminées dans le premier précipité, celles qui le sont plus solubles, sont restées dans le deuxième surnageant.

L'électrolyte le plus employé pour la précipitation différentielle est le sulfate d'ammonium. Ce sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et compétitionne efficacement avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines pour les neutraliser. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives.

Les protéines ont une solubilité minimale au point isoionique (valeur du pH pour laquelle la charge nette est nulle). Utilisant cette propriété et les variations de solubilité en fonction de la force ionique, on peut séparer des protéines de point isoélectrique différent. Il

est également possible de réaliser un fractionnement par les solvants organiques (éthanol, acétone, polyéthylène-glycol).

La précipitation saline, comme indiqué ci-dessus, utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité: neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et compétitionner avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sort de solution et précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de *salting-out*.

Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

La série de Hofmeister ci-dessous décrit les effets relatifs de différents ions sur la précipitation des protéines ou la promotion de leurs interactions hydrophobiques. (L'anion phosphate et le cation ammonium sont les plus efficaces pour précipiter les protéines; l'anion chlorate et le cation  $\text{Ca}^{2+}$  sont au contraire les plus efficaces pour les remettre en solution. Notez que ce ne sont pas toutes les combinaisons de ces ions qui donnent un sel soluble).

précipitation	$\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$	Chaotropique
(salting out)	$\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	(salting in)

Le tableau ci-dessous donne les quantités de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà) (Figure 8).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

**Figure 8 :** Saturation du sulfate d'ammonium à 0°C (Dawson et coll., 1986).

## B. Dialyse

La méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse. Dans une dialyse, les protéines dans une concentration de sels donnée sont séparées d'une solution à la concentration en sels différente par une membrane poreuse. Les pores de cette membrane peuvent avoir différentes tailles; certaines membranes ne laisseront passer que des ions alors que d'autres laisseront même passer de petites protéines (jusqu'à des poids moléculaires de 50 000 Da).

Les sels auront tendance à équilibrer leur concentration de part et d'autre de la membrane. En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on changera rapidement la teneur en sels de celle-ci en la même que celle du tampon de dialyse. Afin d'accélérer le processus, le tampon de dialyse est remplacé par du tampon neuf.

À l'inverse, on peut utiliser des agents hygroscopiques pour concentrer les protéines dans un sac à dialyse sans en changer la concentration en sels: il faut alors utiliser un tampon de dialyse de même composition que le tampon se trouvant dans le tube, mais contenant un agent comme le polyéthylèneglycol (ou PEG, un gros polymère hygroscopique) de taille supérieure à la porosité de la membrane. Le PEG ne pourra pas entrer dans le tube mais il attirera l'eau qui s'y trouve hors du tube, concentrant du même coup les protéines.

### **C. Centrifugation (ultracentrifugation)**

La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux liquides soit de particules solides en suspension dans un liquide. Elle permet la séparation des cellules, organites et macromolécules biologiques. Le dispositif comporte un moteur faisant tourner un axe auquel sont fixés des tubes contenant les solutions à clarifier. La vitesse de sédimentation est proportionnelle à l'intensité du champ centrifuge. Le résultat d'une centrifugation est l'obtention de deux fractions : le sédiment ou culot (solide, au fond du tube), le surnageant (fraction liquide). Une sédimentation de 600 à 1000xg pendant 10 minutes, dite "simple", permet par exemple d'extraire du sang total les hématies et leucocytes dans le culot, et le plasma en surnageant. Une centrifugation de 15000xg permettra la sédimentation d'organites comme les mitochondries. Pour les molécules plus petites telles que les ribosomes, réticulum endoplasmique, il faut monter à 100 000xg, le surnageant sera alors le cytosol.

### **D. Procèdes membranaires**

La filtration membranaire est basée sur l'application d'un gradient de force motrice qui permet le transfert d'un solvant à travers une membrane dont la taille des pores assure la rétention de solutés. Les procédés de séparation par membrane sont utilisés pour séparer soit molécules ou ions en solution (osmose inverse, ultrafiltration, électrodialyse) soit des particules ou des micro-organismes en suspension dans un liquide (microfiltration et ultrafiltration).

- **Microfiltration (MF)**

La microfiltration est la filtration à travers une membrane micro-poreuse avec des pores individualisés. Elle permet de traiter des fluides contenant des matières en suspension et des particules microniques dont la taille est comprise entre 0,1 à 10 µm (levures, bactéries colloïdes). Les pressions utilisées sont généralement comprises entre 0,1 et 5 bars. Ce procédé est généralement utilisé pour la clarification des solutions.

- **Ultrafiltration (UF)**

Parmi les techniques de séparation des mélanges peptidiques à l'échelle industrielle, l'ultrafiltration est la mieux adaptée puisqu'elle permet une concentration sélective des peptides en fonction de leur taille.

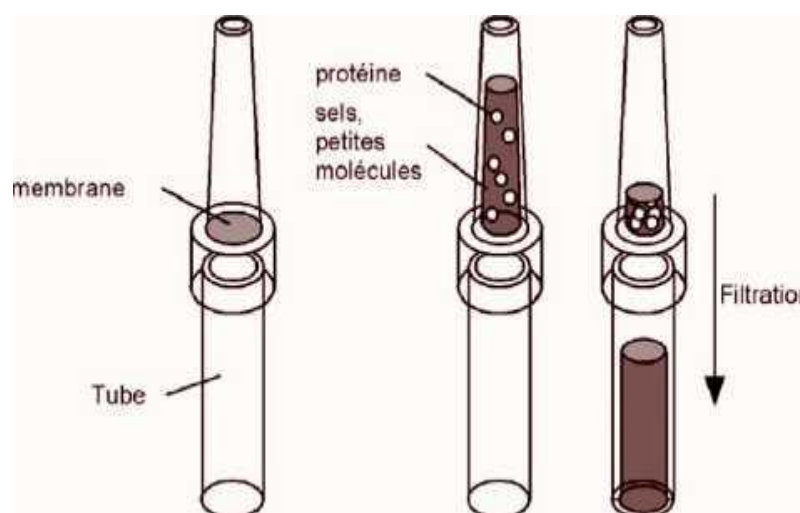
L'ultrafiltration (UF) est un procédé de séparation soluté /solvant. C'est une technique membranaire au même titre que la microfiltration ou l'osmose inverse. Cependant, elles se différencient par la taille des particules séparées et les conditions de travail. La taille des molécules ou des groupes de molécules retenus par membrane d'UF va de 0,002 à 0,1 µm. Les constituants arrêtés peuvent être des bactéries, des macromolécules synthétiques ou naturelles, des agrégats moléculaires ou des particules issues de divers procédés. Ils pourront alors être recyclés plutôt que mise en décharge. L'ultrafiltration peut également être considérée comme une technique de concentration à moindre coût énergétique. Les membranes ne sont pas des filtres par leur nature et par leur mode de fonctionnement. Le filtre retient toutes les particules de taille supérieure à sa porosité. Sa perte de charge augmente par colmatage ce qui a pour effet de "forcer" les passages restant et finalement il laisse passer des particules qu'il devrait normalement retenir. Il faut alors le remplacer.

Une membrane évolue différemment. Bien sûr, le débit de filtration diminue, car les particules accumulées à sa surface créent une résistance supplémentaire. Mais en revanche la qualité du filtrat évolue beaucoup moins vite que dans le cas d'un filtre. Lorsque le flux est devenu trop bas, un simple nettoyage de membrane suffit pour lui redonner ses qualités initiales.

Autre différence entre les filtres et les membranes, le sens de l'écoulement du fluide à traiter. Pour les membranes, il est toujours tangentiel alors qu'il est le plus souvent frontal pour les filtres.

Une membrane d'ultrafiltration est caractérisée par deux paramètres ; la perméabilité qui présente le débit d'ultrafiltrat qui est fourni par  $1 \text{ m}^2$  de membrane (l'unité est le  $\text{l/m}^2/\text{h}$ ) et par le seuil de coupure (cut-off) qui indique la taille à partir de laquelle les molécules seront entièrement retenues. Le seuil de coupure est une masse moléculaire (ex : seuil 15000, signifie que toutes les molécules dont la masse moléculaire est supérieur à 15 000 seront retenues à 100%). L'ultrafiltration est un procédé peuvent fonctionner en régime discontinu, continu, en mode frontal ou avec une circulation tangentiel. Le mode tangentiel est le plus largement utilisé (figure 9).

Ces membranes sont le plus souvent vendues sous forme d'unités de filtration (vous en avez peut-être déjà rencontrées sous le nom de colonne Centricon), qui consistent en un tube dont la partie inférieure est séparée de la partie supérieure par la membrane. Les protéines sont déposées dans la partie supérieure du tube, et reposent sur la membrane; le tube est alors centrifugé à basse vitesse pour forcer le liquide et les petites molécules à traverser cette dernière sous le coup de la gravité. Les protéines, trop grosses, ne peuvent pas passer et restent dans la partie supérieure; on peut ensuite soit les diluer avec un nouveau tampon et recentrifuger (c'est une bonne technique de lavage) ou récupérer les protéines concentrées. Il faut bien sûr ne pas centrifuger si longtemps que tout le liquide ait traversé la membrane.



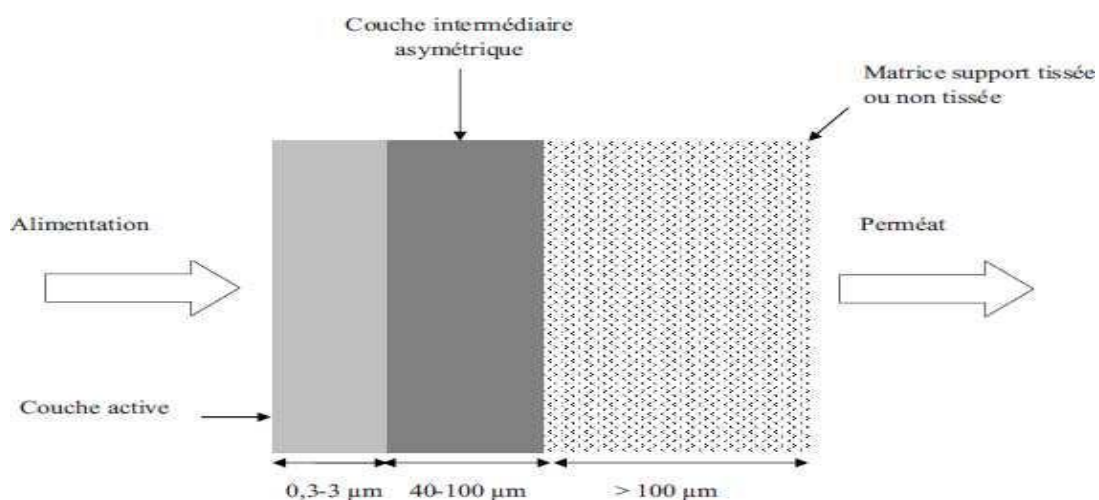
**Figure 9 :** Schéma d'une membrane semi-perméable d'ultrafiltration.



- **Nanofiltration (NF)**

Elle a été décrite pour la première fois dans les années quatre-vingt. Le champ d'application de la nanofiltration se situe entre ceux de l'osmose inverse et l'ultrafiltration. Actuellement, elle se différencie radicalement des techniques d'osmose inverse et d'ultrafiltration grâce aux nouvelles membranes mise en œuvre. Ces dernières possèdent leurs propres caractéristiques, présentant une structure microporeuse avec des pores de diamètre inférieur à 2 nm et un matériau membranaire qui, dans la plupart des cas, porte des charges ioniques superficielles.

La nanofiltration est systématiquement utilisée en configuration tangentielle. Elle met en œuvre des pressions transmembranaires comprises entre 5 et 30 bars. Le transfert de matière repose sur plusieurs mécanismes de séparation concurrents de nature chimique, électrique et physique. Ce sont à la fois les dimensions des pores, et la charge des groupements ionisés ou ionisables qui limitent le passage des substances sous l'action de la force motrice de transfert (gradient de pression, essentiellement hydrostatique). De manière générale, il est admis que les problèmes de colmatage sont moins sensibles en nanofiltration qu'en ultrafiltration (figure 10).



**Figure 10 :** schéma de la structure multicouche d'une membrane de nanofiltration.

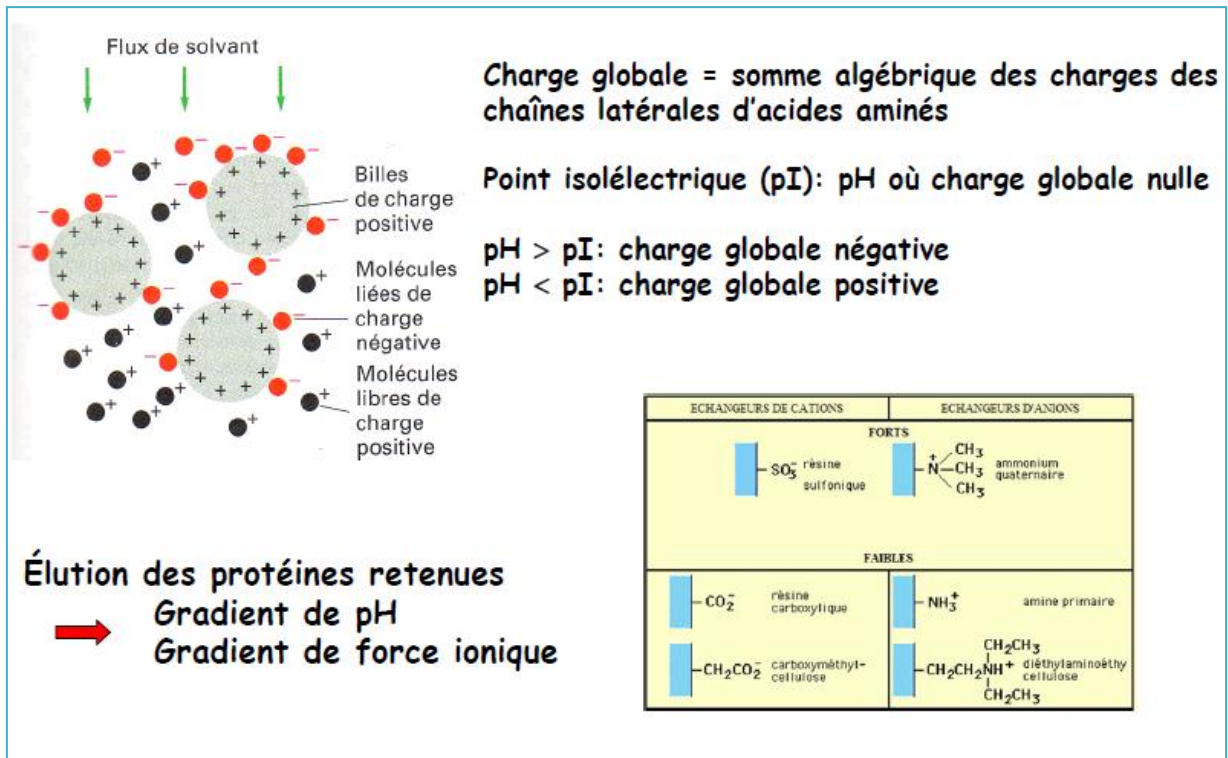
- **Electrodialyse**

L'électrodialyse est une technique qui assure l'extraction des ions contenus dans une solution. L'appareil qui l'effectue, un électrodialyseur, est composé de nombreux compartiments séparés par des membranes alternativement anioniques et cationiques. Lors de l'action du champ électrique, la membrane anionique autorise le passage des anions et la membrane cationique autorise le passage des cations. Les cations sortent du premier compartiment en franchissant la membrane cationique et sont bloqués dans le deuxième compartiment par la membrane anionique. Les anions sortent aussi du premier compartiment en franchissant la membrane anionique et sont bloqués dans le deuxième compartiment par la membrane cationique. Le premier compartiment à sa concentration en sel dissous qui diminue, c'est un compartiment de dilution. Le deuxième compartiment augmente en sels dissout, c'est un compartiment de concentration. Donc un compartiment en dilution le suivant est en concentration et ainsi de suite. Une électrode à chaque extrémité de l'appareil assure le passage du courant. A la fin du traitement on récupère à la fois de l'eau douce et du saumure, L'électrodialyse est actuellement appliquée pour la séparation de peptides de faible poids moléculaire.

### **I.2.1.2. Techniques chromatographiques**

#### **A. chromatographie par échange d'ions**

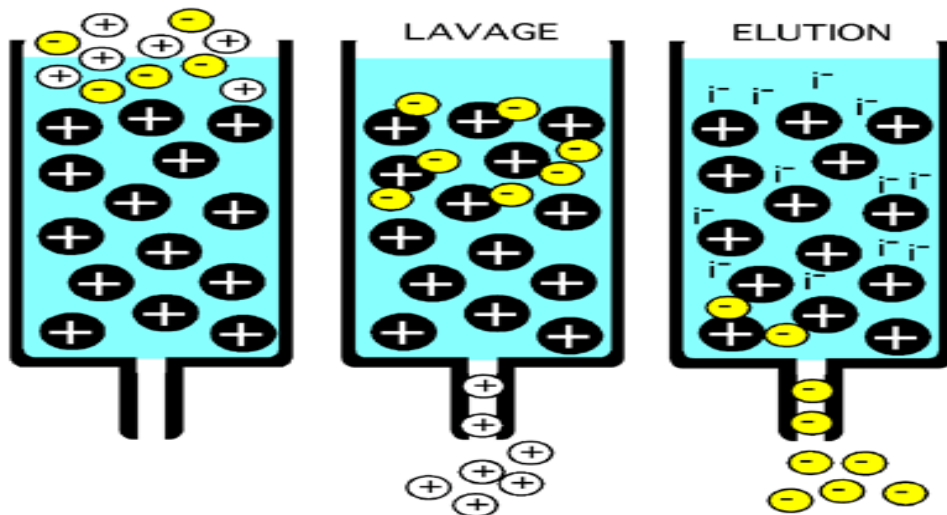
Dans une colonne à échange d'ions, les protéines s'adsorbent par affinité électrostatique à des groupements chargés de la résine. Une résine portant des groupements positifs est dite "échangeuse d'anions", parce que des ions négatifs ou les groupements acides d'une protéine peuvent interagir avec. Une résine portant des groupements négatifs est dite "échangeuse de cations" parce que ce sont des cations ou les groupements basiques d'une protéine qui interagissent avec elle. En effet, les ions liés électrostatiquement à un support insoluble et chimiquement inerte sont remplacés de manière réversible par des ions en solution (figure 11).



**Figure 11 :** Représentation du principe de séparation sur une colonne de chromatographie à échange d'ions.

Les protéines sont élues d'une telle résine en augmentant progressivement la force ionique du tampon d'élution, ou en changeant le pH de telle façon que la protéine soit moins chargée (figure 12). Un gradient salin permet de séparer les protéines selon leur degré de charge positive ou négative à un certain pH et est une étape de choix dans une purification.

En outre, il est possible de favoriser l'interaction de la protéine avec la résine choisie, on aura avantage à jouer avec le pH de la solution tampon qui circule dans la colonne. Pour une résine échangeuse de cations (monoS ou phosphocellulose, par exemple), on voudra optimiser la charge *positive* de la protéine et donc travailler à un pH plus bas, formation des groupements  $\text{NH}_3^+$  et  $\text{COOH}$  plutôt que  $\text{NH}_2$  et  $\text{COO}^-$ . Un tampon HEPES à pH 7,5 serait approprié. À l'inverse, pour une résine échangeuse d'anions (monoQ ou DEAE), on utilisera plutôt un tampon basique comme le Tris à pH 8,2, pour favoriser la formation de groupements  $\text{COO}^-$  et de réduire la présence de groupements  $\text{NH}_3^+$ .



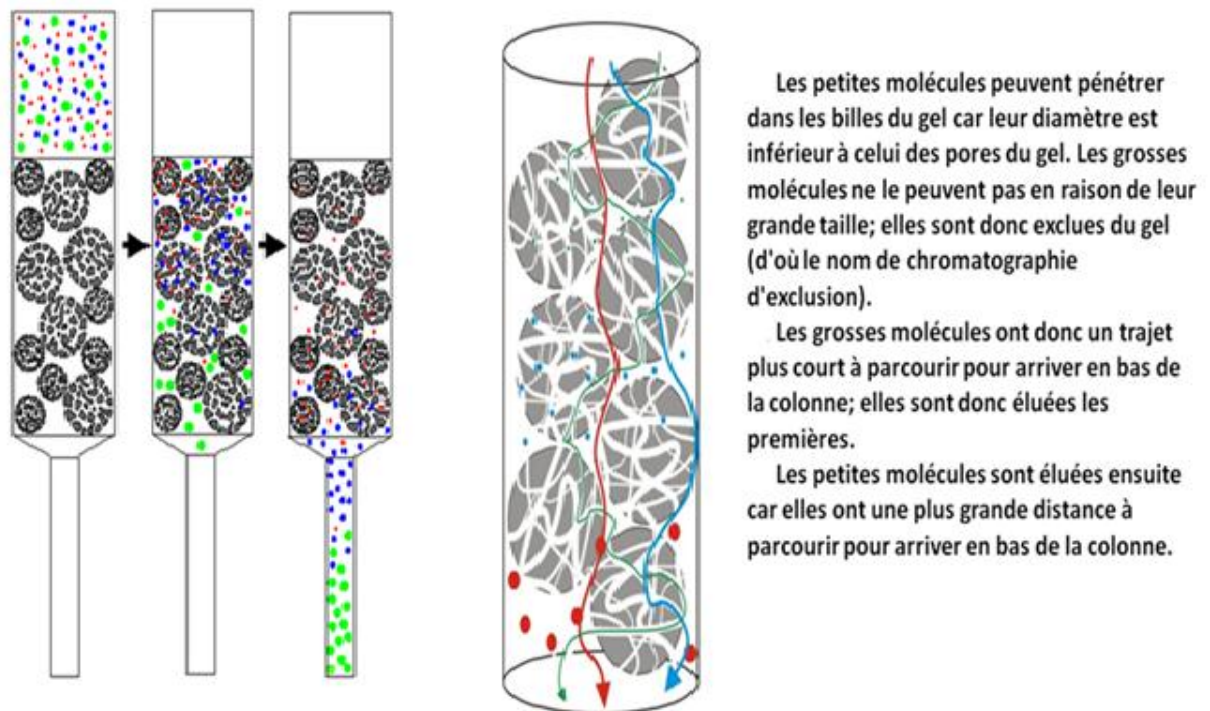
**Figure 12 :** Représentation schématisée de l'ordre d'élution des molécules dans un échangeur d'ions.

## B. Chromatographie par exclusion moléculaire

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée filtration sur gel ou tamisage moléculaire. Cette technique est apparue en 1959 avec un produit nouveau : le Sephadex.

Le Sephadex est un **gel de dextrane** (polymère de glucose  $\alpha$ -1-6 produit par *Leuconostoc mesenteroïdes*), auquel on fait subir une réticulation. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine consistant en billes creuses et poreuses. La taille des pores de ces billes est telle que certaines protéines (petites) peuvent entrer et sortir librement ; que certaines (plus ou moins grosses) peuvent essayer d'entrer mais avec plus ou moins de succès, alors que d'autres (trop grosses) ne peuvent pas entrer du tout et passent tout droit (figure 13).



**Figure 13 :** Représentation schématisée du passage de la phase mobile à travers la phase stationnaire en chromatographie d'exclusion : les lignes fléchées en rouge, bleu et vert représentent le parcours des molécules de grosse, moyenne et petite taille, respectivement à travers la phase stationnaire

Cette technique est très efficace mais nécessite une haute concentration et un faible volume de matériel de départ parce que les protéines ont tendance à s'étaler le long de la colonne, ce qui réduit la qualité de leur séparation si elle n'y entrent pas relativement toutes en même temps. Différents types de gels sont disponibles dont le choix est fonction de la taille des protéines à séparer (Tableau 5).

Cette colonne peut aussi être utilisée pour dessaler un échantillon. La forme d'une colonne de filtration devrait être étroite et longue pour une meilleure séparation. La filtration sur gel se fait avec un tampon dont la nature ne change pas pendant la séparation, à l'inverse de ce qui se passe dans une chromatographie d'échange d'ions.

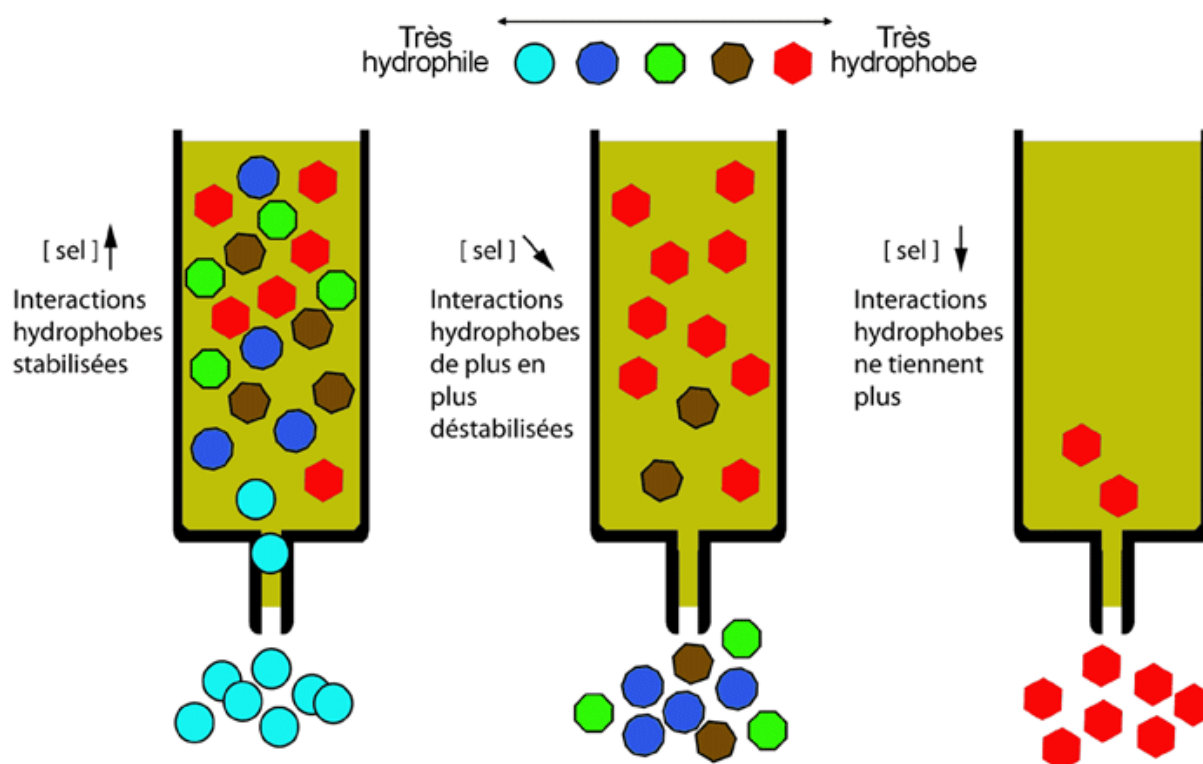
**Tableau 5 :** exemple de type de résines employées en chromatographie d'exclusion moléculaire

Nom de la résine	Capacité de fractionnement (en Da)
<i>type dextran</i>	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1 000- 5 000
Sephadex G-75	3 000- 70 000
Sephadex G-200	5 000- 800 000
<i>type polyacrylamide</i>	
Bio-gel P2	200- 2 000
Bio-gel P6	1 000- 6 000
Bio-gel P-150	15 000- 150 000
Bio-gel P-300	60 000- 400 000
<i>type agarose</i>	
Sepharose 2B	2 000 000- 25 000 000
Sepharose 4B	300 000- 3 000 000
Bio-gel A-0,5M	30 000- 500 000
Bio-gel A-15M	30 000- 15 000 000
Bio-gel A-150M	5 000 000- 150 000 000

### C. Chromatographie d'interactions hydrophobes

En solution, les protéines à caractère hydrophobe cherchent davantage à s'associer entre elles qu'à s'hydrater avec les molécules d'eau. Des résines portant des groupements hydrophobiques (cycliques ou aliphatiques) permettent de retenir de telles protéines sur une colonne. À l'inverse de ce qui se passe sur une colonne de chromatographie par échange d'ions, une colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe est chargée à haute force ionique (qui favorise les interactions hydrophobes) et est éluée avec un gradient de sel à la baisse. Grâce à cela, on peut faire passer un échantillon frais élué (avec une haute concentration en sel) d'une colonne d'échange d'ions directement sur une colonne d'interaction hydrophobe, sans avoir à dialyser ou diluer (figure 14).

Les résines les plus utilisées pour ce type de chromatographie sont l'octyl- et le phényl-sépharose.



**Figure 14 :** Représentation schématisée de la séparation des protéines en chromatographie d'interaction hydrophobe.

### I.3. Dosage des protéines : principes

#### I.3.1. Mesure de l'absorbance à l'ultraviolet (UV)

Les acides aminés aromatiques absorbent la lumière dans l'UV. Le maximum d'absorption a lieu à 280 nm. En outre, la liaison peptidique montre un maximum d'absorbance à 215 nm. En mesurant, ainsi, l'absorbance, la concentration d'une protéine peut être calculée.

#### I.3.2. Dosage par colorimétrie

##### I.3.2.1. Méthode de Biuret

En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins deux liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de la protéine (absorbance à 540 nm).

### **I.3.2.2. Dosage au bleu de coomassie (BRADFORD, 1976).**

C'est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés H K et R Y W et F). Une fois lié aux protéines sa couleur vire du rouge vers le bleu montrant une absorbance maximale à 595 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à de concentrations, inférieures à 20 µg/mL.

### **I.3.2.3. Méthode de Lowry**

Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu.

La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm.

La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant une protéine de concentration connue.

## **I.4. Méthodes d'analyse des protéines**

### **I.4.1. Electrophorèse : principe**

Il s'agit d'une séparation de solutés chargés par migration dans un champ électrique. La migration dépend de la charge de la protéine, de sa taille et du degré de réticulation du gel.

- Pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ), dite aussi l'électrophorèse en conditions dénaturante, où toutes les protéines sont chargées négativement, la vitesse de migration dépend du **PM uniquement**.
- Dans la focalisation isoélectrique la migration se fait selon **le point isoélectrique (PI)**.

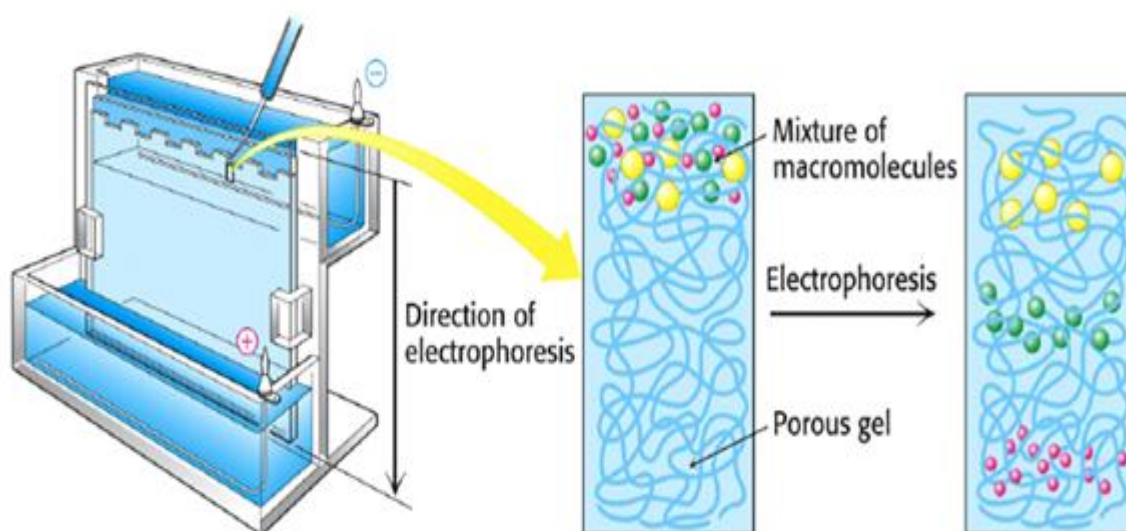
#### **I.4.1.1. Electrophorèse en conditions dénaturante : SDS-PAGE**



La forte charge négative apportée par le **SDS** (sodium dodecyl sulfate ; détergent synthétique) masque la charge naturelle de la protéine. Par conséquent, l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide contenant de SDS les sépare en fonction de leur masse moléculaire, par effet de filtration sur gel (maillage moléculaire du gel de polyacrylamide) (figure 15).

L'électrophorèse en conditions dénaturantes nécessite, ainsi, une préparation préalable de l'échantillon à analyser : la dénaturation.

Les protéines sont mélangées à SDS et au  $\beta$ -mercaptoéthanol. Ce dernier réduit les ponts inter et intramoléculaire, la réaction est favorisée par un chauffage entre 70 à 90°C (pendant 3 à 5 min).



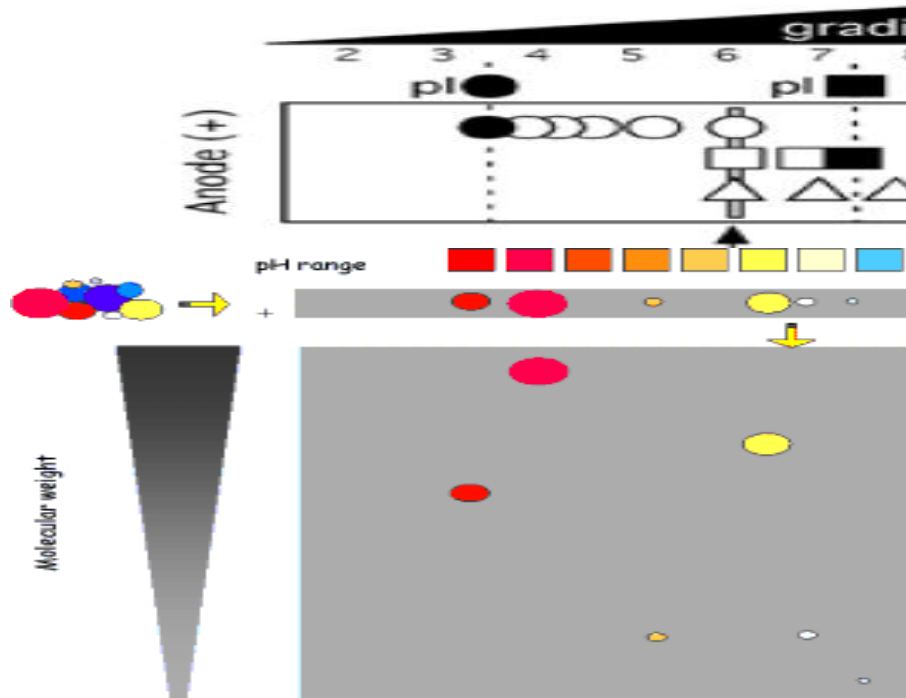
**Figure 15:** Migration des protéines en fonction de leur PM.

#### **I.4.1.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2DE)**

Pour cette type d'électrophorèse les protéines sont séparées selon de plans, une première séparation selon le point isoélectrique ( $P_i$ ) : focalisation isoélectrique suivie par une deuxième séparation en fonction le poids moléculaire.

## 1<sup>ère</sup> dimension

## 2<sup>ème</sup>

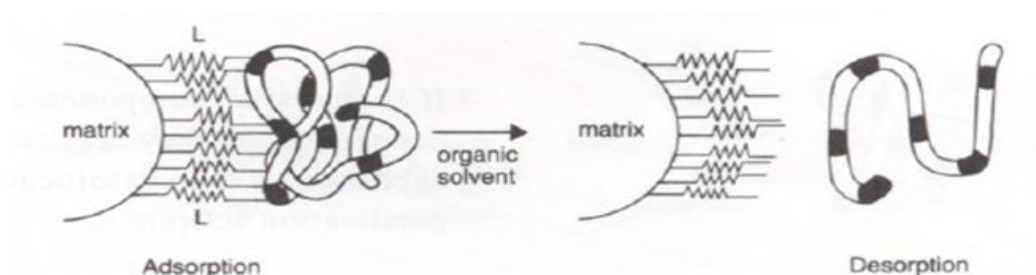


### **I.4.2. Chromatographie liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI)**

Chromatographie liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI) (RP-HPLC de l'anglais Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur différence d'affinité pour une phase stationnaire apolaire et une phase mobile plus au moins polaire.

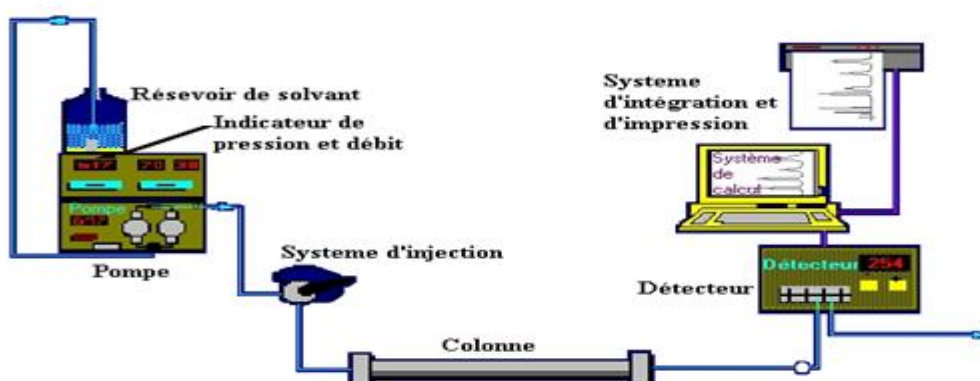
La phase mobile est composée d'un mélange entre un solvant aqueux (acides carboxyliques perfluorés, acide trifluoroacétique (TFA) et heptafluorobutyrique, HFBA) et organique. (l'acétonitrile et méthanol le plus souvent) en proportion variable. La phase stationnaire est constituée de particules sphériques de silice poreuse greffées par des chaînes alkylées, aliphatique, (C4, C8 ou C18) qui confèrent à la phase stationnaire un caractère très hydrophobe.

Quant la phase mobile est très polaire (donc peu hydrophobe), les molécules hydrophobes vont établir des interactions hydrophobes avec la phase stationnaire et ainsi être adsorbées. La concentration en solvant organique dans la phase stationnaire est alors augmentée, graduellement, pour atteindre une hydrophobicité plus élevée que celle de la phase stationnaire provoquant la désorption et l'élution des molécules hydrophobes (figure 16).



**Figure16:** schéma de la phase d'adsorption et de désorption des protéines sur une colonne de CLHP-PI

L'analyse en CLHP-PI est réalisée grâce à un système automatique constitué d'un contrôleur de gradient à barrette de pompe, un injecteur automatique et un détecteur à barrette de diode et un dégazeur en ligne. Le détecteur permet la mesure de l'absorbance aux longueurs d'ondes allant de 400-900 nm, cependant la lecture de l'absorbance à 215nm permet la visualisation des liaisons peptidiques au sein des protéines ou bien d'un peptide. Avant injection, les échantillons sont filtrés à travers un filtre d'acétate de cellulose 0,2  $\mu\text{m}$ . Un logiciel est utilisé pour tracer, d'acquérir et d'analyser des données chromatographiques figure 17



**Figure 17 :** schéma de principe d'une chaîne de CLHP

### I.4.3. Spectrométrie de masse

L'étude des protéines a connu un essor spectaculaire au cours des années 1990, avec l'avènement d'appareils de spectrométrie de masse compatibles avec l'analyse de ces grosses molécules, et cela par le développement de la technique d'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) par Karas et Hillenkamp (1988) et par l'invention de la technique d'ionisation électrospray (ESI) en 1989. Cette dernière a valu le prix Nobel de chimie en 2002, pour moitié conjointement, à John Fenn et Koichi Tanaka "pour le développement de méthodes de désorption-ionisation douces pour l'analyse par spectrométrie de masse des macromolécules biologiques" et pour l'autre moitié à Kurt Wüthrich "pour le développement de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire pour l'identification de la structure tridimensionnelle des macromolécules en solution". Tous les trois ont ainsi contribué à développer des méthodes d'identification et d'analyse structurale de macromolécules biologiques, telles que les protéines.

Jusque-là, les scientifiques utilisaient une méthode chimique qui nécessitait de purifier des quantités importantes de chaque protéine avant de pouvoir en déterminer la séquence en acides aminés. Aujourd'hui, les spectromètres de masse permettent d'analyser des échantillons biologiques complexes, pouvant contenir des milliers de protéines, dont certaines présentes en faible quantité. Elle est employée dans l'étude structurale des protéines et peptides, pour la

vérification fine d'une séquence, la localisation de certaines modifications post-traductionnelles, les études de changement de conformation et de repliement.

La spectrométrie de masse consiste à identifier des molécules en fonction de la mesure précise de leur masse. En plus, pour identifier la séquence d'une protéine donnée, il faut d'abord digérer les protéines de l'échantillon à étudier grâce à protéases (trypsine le plus souvent), afin d'obtenir des fragments protéiques qui sont solubles dans la solution qui est injectée dans le spectromètre de masse. Ces peptides sont ensuite fragmentés par la machine. Les masses de chaque peptide et des fragments sont mesurées. Elles permettent d'identifier les peptides contenus dans l'échantillon, en comparant les données expérimentales aux données déjà existantes dans des banques.

Les données sont restituées sous une forme que l'on peut comparer à un puzzle. C'est aux scientifiques de reconstituer le puzzle pour retrouver l'identité des protéines qui étaient présentes dans l'échantillon. Ce travail est bien sûr facilité par des logiciels informatiques de plus en plus performants et des bases de données de plus en plus riches.

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode de mesure des rapports masse sur charge ( $m/z$ ) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentation.

Plusieurs informations sur le composé traité peuvent être obtenues :

- ✓ Sa masse moléculaire ;
- ✓ La masse des fragments de ce composé ;
- ✓ une appréciation quantitative de ce composé.

L'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon est constituée d'une série d'opérations successives : les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil. Ces ions formés sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur, et terminent leur course sur un détecteur. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur.

Un spectromètre de masse est toujours composé de cinq parties :

Une **chambre d'introduction** dans laquelle l'introduction de l'échantillon peut se faire directement avec une seringue et un pousse-seringue ou par couplage à la chromatographie liquide haute-performance lorsque la technique utilisée le permet.

Une **source**, appelée également chambre d'ionisation et de volatilisation, au niveau du quelle l'échantillon à analyser passe à l'état gazeux (vaporisation/sublimation/désorption), suivie par une ionisation des molécules et la décomposition des ions. Plusieurs méthodes d'ionisation existent, le choix de celle-ci est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyses souhaitées.

Les molécules ionisées sont entraînées vers **l'analyseur** (appelé également chambre de séparation) ou niveau du quel les ions sont séparés en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ) sous l'effet d'un champ magnétique et/ou électrique.

Les ions ainsi triés, arrivent au niveau du **détecteur**, constitué d'un collecteur d'ions et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplificateur des signaux associés aux ions de différentes masses. Les ions viennent heurter un multiplicateur et l'énergie amplifiée est transcrite en un signal électrique, l'intensité du signal étant proportionnelle au nombre d'ions.

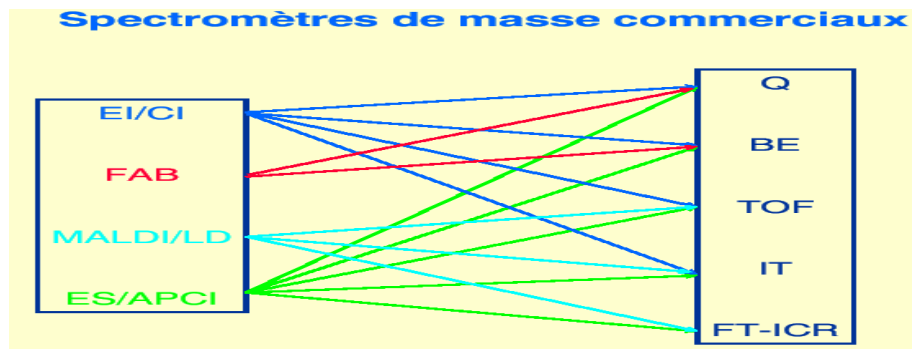
La dernière partie de l'appareil correspond à un **enregistreur**, permettant l'acquisition des données, qui est faite par un microprocesseur nécessitant une interface. Le rôle de celui-ci est de transcrire sous forme digitale les signaux analogiques. Les données issues de cette conversion sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur pour le traitement.

Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépend de la nature de l'échantillon à analyser et du type de données souhaitées.

Les sources d'ions, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil.

Sources d'ionisation	
Ionisation EI (Electronical Impact)	Petites molécules volatiles et non thermosensibles
Ionisation CI (Chemical Ionisation)	
Ionisation FAB (Fast Atom Bombardment)	molécules < 6000 Da
Ionisation LSI (Liquid Secondary Ion)	
Ionisation LD (Laser Desorption)	Biomolécules (1 300 kDa) et complexes non-covalents
Ionisation ES (electrospray)	
Ionisation MALDI (Matrix Assited Laser Desorption Ionisation)	

Analyseurs		
Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadrupôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Trappe ionique	5 000	6 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	1 000 000	4 000



L'analyseur en temps de vol est facilement compatible avec une source de type MALDI alors que les sources ESI sont compatibles avec les analyseurs quadrupole et trappe ionique.

Spectrométrie de masse appliquée au biomolécules :



#### I.4.3.1. La technique de la désorption laser assistée par matrice

La technique de désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF) permet de travailler sur une grande gamme de masses (moins de 1kDa à plusieurs centaines de kDa) avec

une bonne précision de mesure de masse et une mise en œuvre relativement simple ainsi qu'une grande rapidité d'analyse.

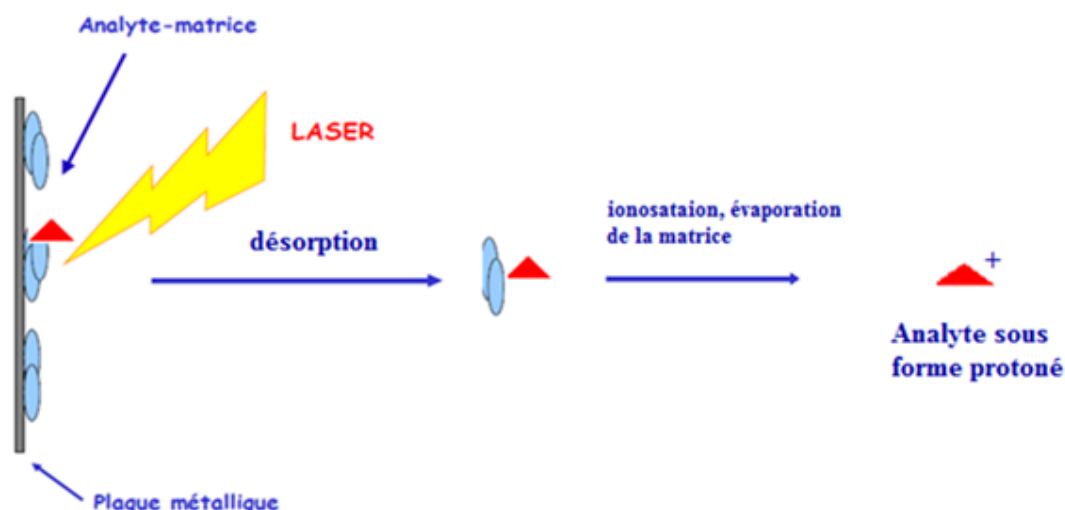
La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (U.V.) ou l'infrarouge (I.R) pour désorber et ioniser un mélange matrice /échantillon co-cristallisé sur une surface métallique (appelée cible). L'énergie est restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma pour former des ions mono ou dichargés de type  $[M+nH]^{n+}$  (figure 18). Les ions formés sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre appelée lentille d'extraction.

L'analyse en MALDI nécessite une première étape de co-cristallisation d'une faible quantité de l'échantillon avec une grande quantité de matrice, sur une surface métallique appelée cible, généralement, en métal inoxydable conducteur et traité en surface de manière à être chimiquement inerte par rapport à l'échantillon.

La matrice va permettre d'isoler les molécules de l'échantillon les unes des autres pour éviter la formation de complexes de taille trop importante, minimiser la dégradation de l'échantillon par absorption de l'énergie du faisceau laser incident et améliorer le rendement d'ionisation. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice ce qui provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon. Le choix de la matrice dépend de la nature des molécules à ioniser, et de plusieurs facteurs : elle doit former des cristaux incluant l'analyte, être soluble dans les solvants utilisées pour les macromolécules à analyser ; absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé.

L'analyseur en temps de vol (TOF pour " Time Of Flight") sépare les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans un tube de vol. Le mode d'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés pour lesquels l'analyseur TOF offre une gamme de masses théoriquement illimitée.





**Figure 18 :** Schéma du principe de l'ionisation en MALDI

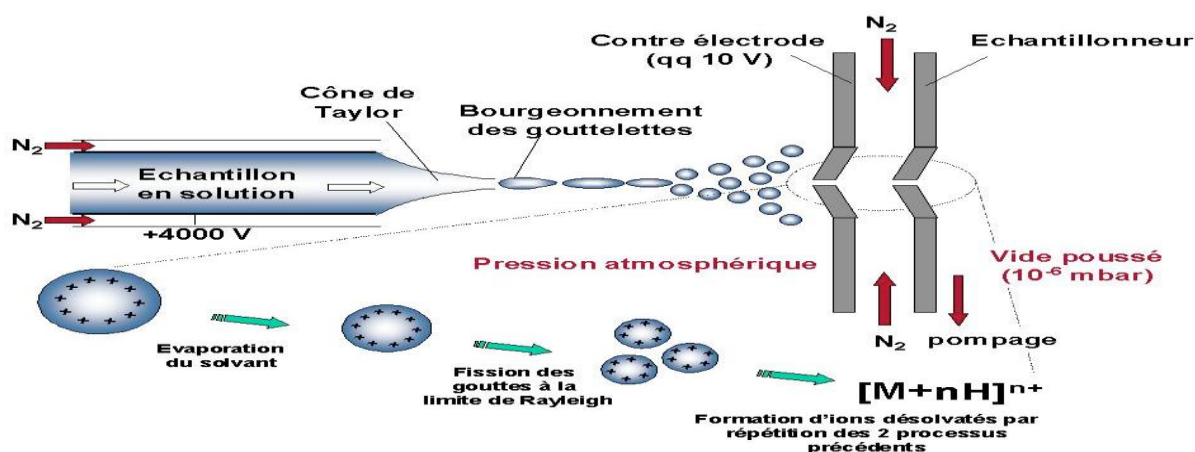
#### **I.4.3.2. La technique de l'ionisation Electrospray-Ionspray**

L'électrospray permet d'obtenir des ions en phase gazeuse à partir d'ions en solution, à pression atmosphérique. Ce qui permet l'analyse de mélanges directement en solution et de couvrir une gamme de masse assez large, en générant des espèces multichargées provenant des molécules. Avec l'arrivée en continu des échantillons en solution, l'électrospray peut être couplé avec la chromatographie liquide haute performance (LC/MS) ou avec l'électrophorèse capillaire (CZE/MS).

Cette technique se définit par l'application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire dans le quel coule un débit faible (environ 1-10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Le champ électrique provoque une accumulation de charge à la surface du liquide, formant un faisceau de gouttes situées à l'extrémité du capillaire, qui vont se briser pour former des gouttelettes de plus en plus petites contenant l'espèce à analyser. Un gaz de nébulisation (mélange  $\text{O}_2/\text{N}_2$ , 20/80) est injecté également au niveau du capillaire, pour aider à la formation du spray).

L'Ionspray consiste à injecter de façon coaxiale au capillaire un débit du gaz de nébulisation. Ce flux va aider à la formation du spray. Cela implique une désolvatation plus rapide et une possibilité de travailler avec des débits plus importants (1 à 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Les

gouttelettes chargées et désolvatées, sont ensuite séchées par un flux d'azote chauffé circulant à contre courant, entraînant une série d'éclatement de la goutte et des ions en phase gazeuse sont finalement produits. La production de gouttelettes à partir de l'électrolyte en solution, fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de tailles plus petites, puis émission des ions désolvatés en phase gazeuse (figure 19).

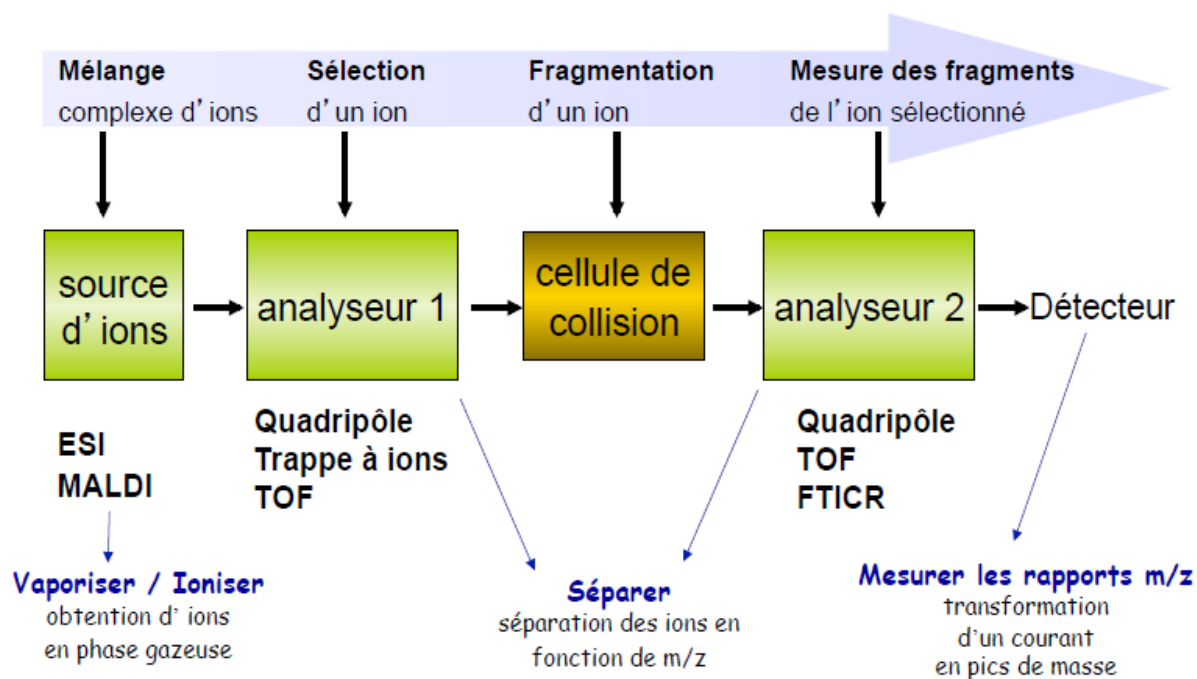


**Figure19** : Schéma du principe de l'Ionspray.

#### I.4.3.3. Analyse de la séquence des protéines par fragmentation (MS/MS)

Cette technique permet d'identifier la séquence d'une protéine ou d'un peptide par des opérations successive de mesure de la masse, une fragmentation des molécules analysées et une deuxième mesure de la masse des fragments obtenus (MS/MS).

Pour cela les spectromètres employés renferment deux analyseurs alternés par une cellule de collision, dans laquelle les ions sortant du premier analyseur, se brisent par collision à l'aide d'un gaz inerte comme l'azote  $N_2$ . Et d'une énergie de collision. Les fragments obtenus passent par un deuxième analyseur avant de passer du détecteur (figure 20).



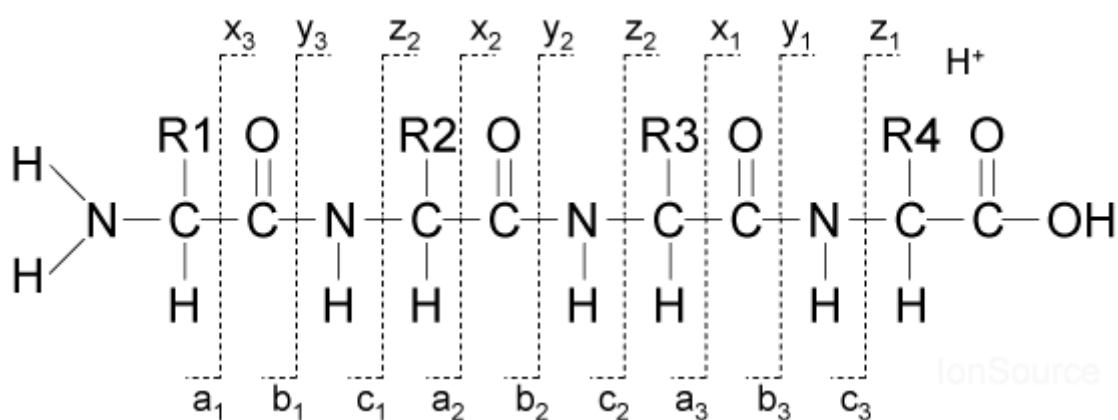
**Figure 21:** Schéma du principe du spectromètre en MS/MS.

Les peptides se fragmentent toujours de la même façon, essentiellement au niveau des liaisons peptidiques selon une nomenclature établie par Roepstorff et Fohlman en 1984 et Biemann en 1990. Plusieurs types de fragments existent : les fragments N-terminaux et C-terminaux, les fragments internes et les pertes de chaînes latérales.

Les fragments N-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la N-terminale du peptide : les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types a, b, c et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type d. Quant aux fragments C-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la C-terminale du peptide : les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types x, y, z et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type v et w. Ces fragments sont notés avec un indice qui précise le nombre de résidus portés par l'ion fragments. Les spectres de fragmentations peptidiques à basse énergie donnent majoritairement des ions de série y et b. Ainsi deux clivages consécutifs induisent la formation

d'ions fragments dont la différence de masse équivaut à la masse moléculaire caractéristique d'un acide aminé (figure 21).

Il existe cependant des ambiguïtés lors de l'interprétation des résultats des spectres de fragmentation. Tels que la distinction des AA isobares (Leu, Ileu), de masse très proche (Lysine et Glutamine) et certaines combinaisons de résidus de masse égale à celle d'un autre résidu. Cela nécessite de distinguer les AA par l'étude de la fragmentation de leur chaînes latérales (ions de série d) par spectrométrie de masse en Tandem à haute énergie.



**Figure 22 :** Schéma théorique de la fragmentation d'un peptide (Roepstorff P et Fohlman J., 1984)

## REFERENCES

1. Alais C. et Linden G.(2003). Biochimie alimentaire. 5<sup>ème</sup> édition. Dunod. Paris. 245P.
2. Audigie.X. et Zoszain.Y. 1991. Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Paris. 363p.
3. Berthillier.A. 1972. La chromatographie et ses applications. Edition Dunod- Paris. p133-143.

4. Branden.C et Tooze.J. 1996. Introduction à la structure des protéines. De Boeck Université, ISBN 2-8041-2109-7.
5. Frere.JM et Gerday.C.1981. Les méthodes de purification et d'analyse des protéines. Edition Masson, Paris. p44-67.
6. Fenn J. B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., et Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, 1989, vol., 246, p. 64-71.
7. Harris. E.L.V et Angal.S. 1989. Proteine purification methodes ; a pratical approche. Oxford university press. IRL press UK.
8. HumphreyJ., Keller G. (2001). Procédés de séparation : technique, sélection dimensionnement. Ed Dunod, Paris:352 p.
9. Karas M. et Hillenkamp F. (1989). UV laser matrix desorption/ ionosation mass spectrometry of proteins in the 100000dalton range. Int.J.Mass spectrum.Ion.Proc., vol. 92, p. 231-242.
10. Mann M., et Wilm M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. Trends Biochem. Sci., 1995, p. 219-224.
11. Petsko G. A, Ringe D.,. Sanlaville C, Charmot D. (2008), Structure et fonction des protéines. Edition De Boeck Supérieur, Bruxelles . 212 p.
12. Piot M., Maubois J.,Schaegis P., Veyre R.1984. Microfiltration en flux tangentiel des lactosérums de fromagerie. Le Lait Pp 64 :102-120.
13. Piot J.M., Guillochon D., et Thomas D. Size-exclusion and hugh-performance liquid chromatography separation of peptides from peptic hemoglobin hydrolysate obtained by ultrafiltration. Chromatographia., 1988, vol. 25, p. 307-312.
14. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom. 1984 Nov;11(11):601.
15. Carla Soler, j. Rubert and J. Manes (2013) Mass Spectrometry Applications. In. Proteomics on foods principles and applications. Ed. Toldra F. et Nollet L.M.L (2013), ed. Springer London, p.83-100, 589P.
16. Wilson K, Walker J. 1994. Principles and techniques of practical biochemistry (4e Ed) Cambridge University Press.Oxford.420 p.

17. Zavitsanos P. et goetz H. (1991). The practical application of diode array UV-visible detectors to high-performance liquid chromatography analysis of peptides and proteins. High performance liquid chromatography of peptides and proteins, Ed. Mant C.T. et Hodges R.S.. CRC Press, Boca Raton, FL, p.553-562.
18. Zeman. L. J. et Zydney.A.L. 1996. Microfiltration and ultrafiltration : principles and application. Taylor and francis edition.UK.