

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de BMC
Master1 Biochimie de la Nutrition

Module / Semestre 2

Analyse protéomique

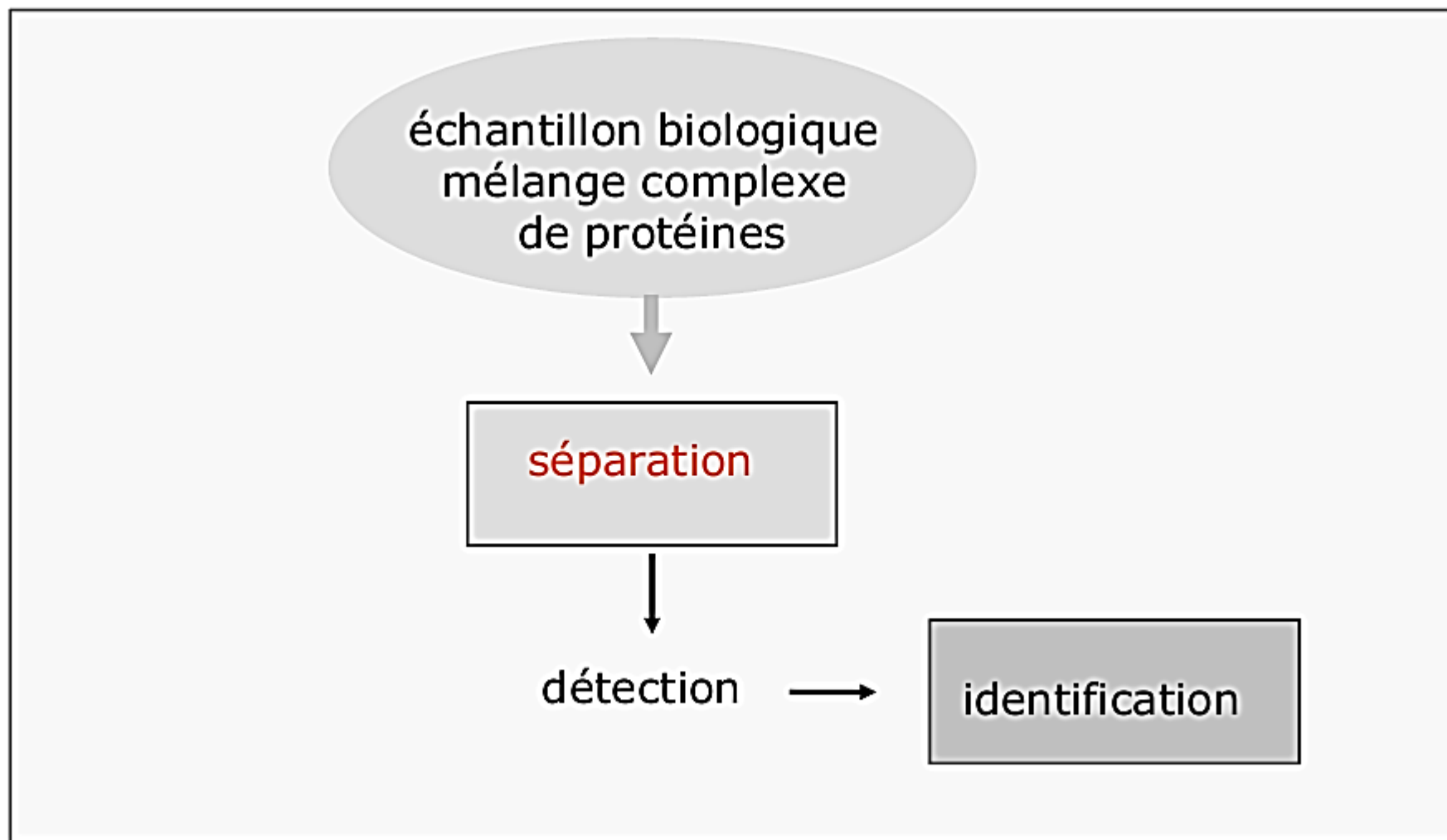
Crédit: 4

Coefficient: 2

➤ **Chapitre 3:**

Techniques de séparation de protéines

Les techniques de séparation



ELECTROPHORESE SUR GEL

- Résolution très supérieure aux techniques de chromatographies pour l'analyse des protéines
- Possibilité d'une analyse quantitative
- Très bon interfaçage avec les techniques de spectrométrie de masse

Définition et principe général

électrophorèse → migration de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique.

Les supports de migration

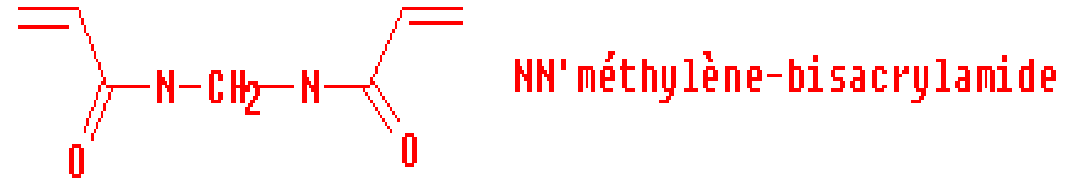
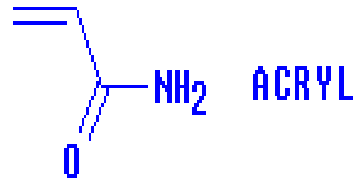
Il existe différents supports

- électrophorèse en veine liquide
- électrophorèse sur papier
- électrophorèse sur gels (agarose, polyacrylamide...).

Depuis les 60' (Raymond and Weintraub, 1959), les gels de **polyacrylamide** sont le plus fréquemment utilisés pour la séparation des protéines

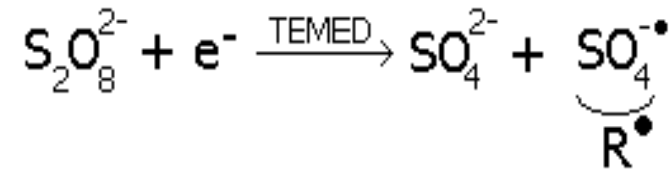
La structure du gel polyacrylamide

- formules des monomères



L'acrylamide se polymérise en longue chaîne et, de temps en temps, une molécule de bis acrylamide est incorporée dans le polymère.

- initiation de la polymérisation

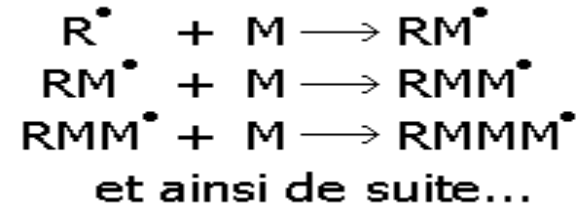


La polymérisation de l'acrylamide est un exemple de catalyse par radicaux libres initiée par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine).

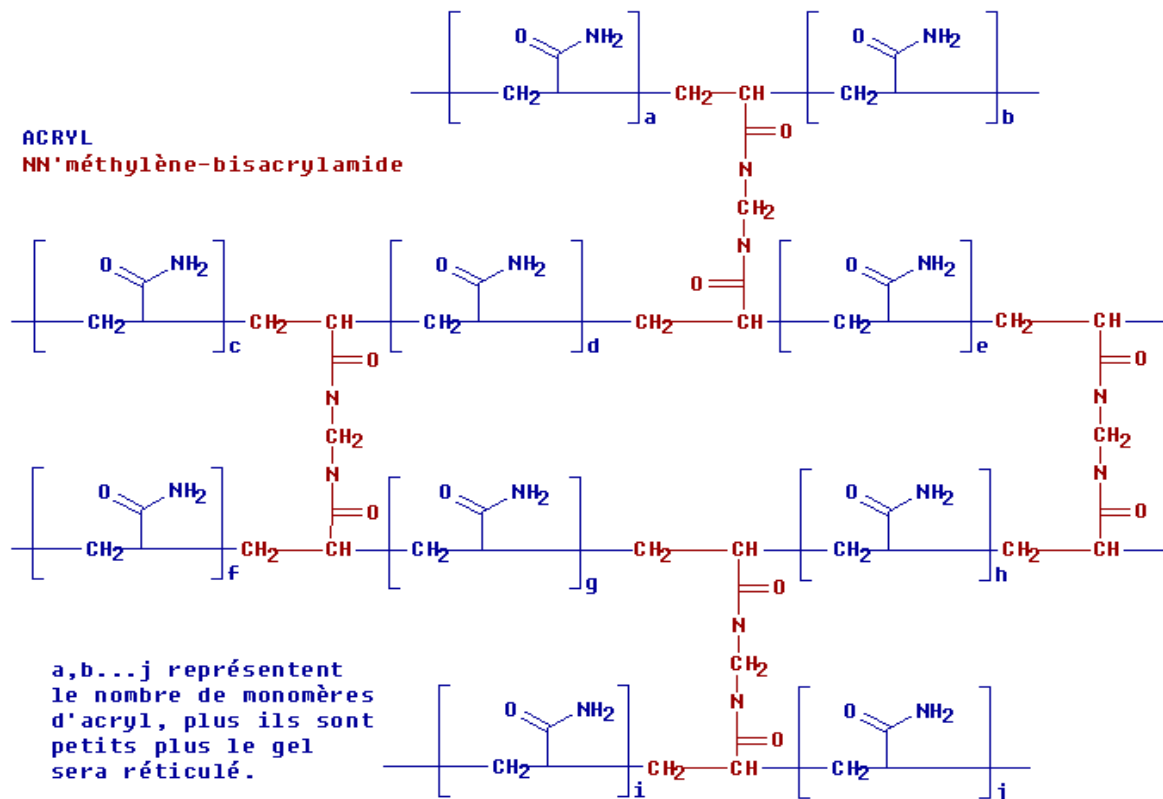
Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre R[•] (molécule avec un électron seul).

La structure du gel d'électrophorèse

- réaction de polymérisation



Les radicaux libres R^\bullet vont ensuite réagir sur les monomères d'acrylamide et de M-bisacrylamide et entraîner une réaction de polymérisation par ouverture de la double liaison des dérivés acryliques

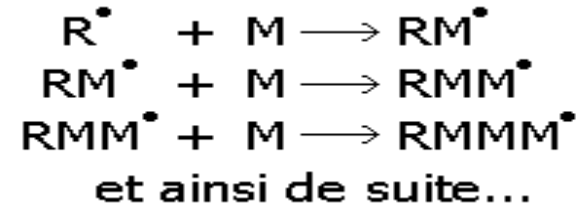


La polymérisation continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de monomère d'acrylamide (M) libre.

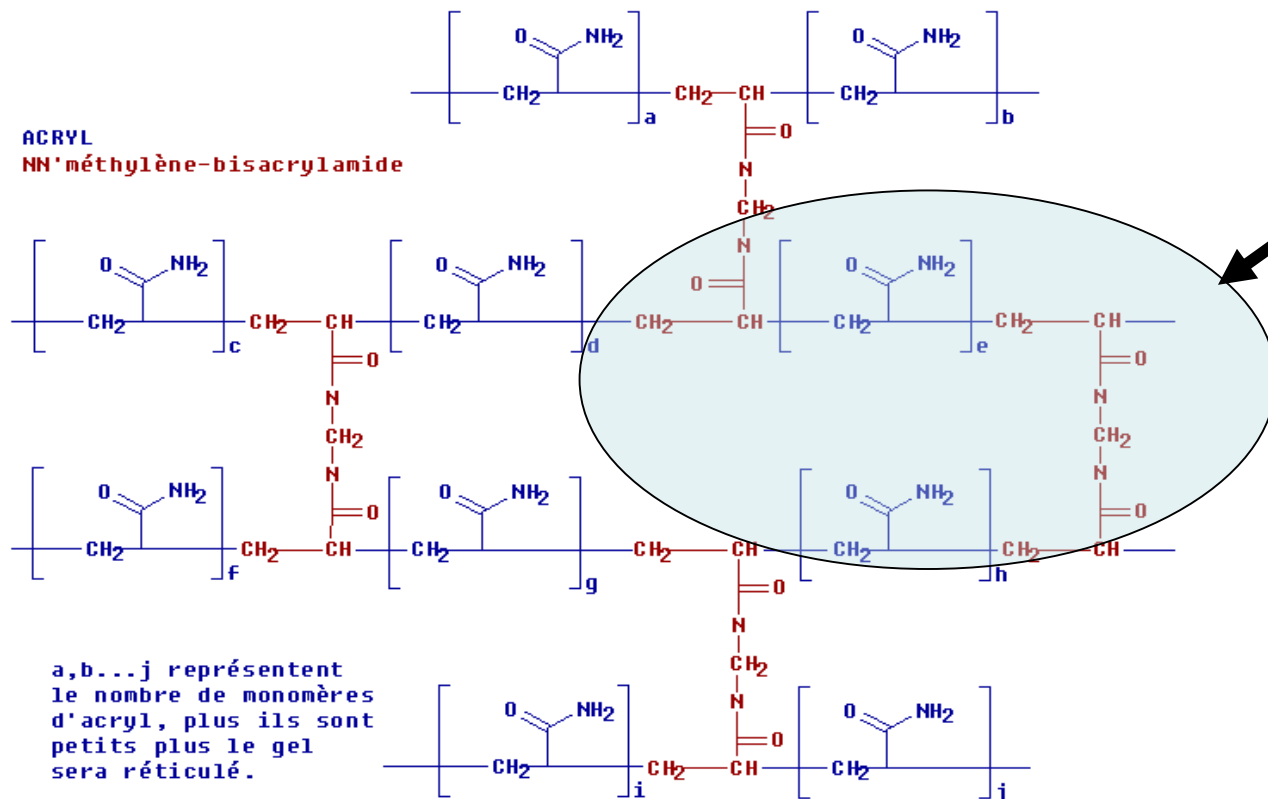
Cette polymérisation incorpore des molécules de bis acrylamide comme des molécules d'acrylamide, ceci ne change rien à la réaction de polymérisation en elle-même, mais permet de lier deux polymères d'acrylamide entre eux.

La structure du gel d'électrophorèse

- réaction de polymérisation



Les radicaux libres R^\bullet vont ensuite réagir sur les monomères d'acrylamide et de M-bisacrylamide et entraîner une réaction de polymérisation par ouverture de la double liaison des dérivés acryliques

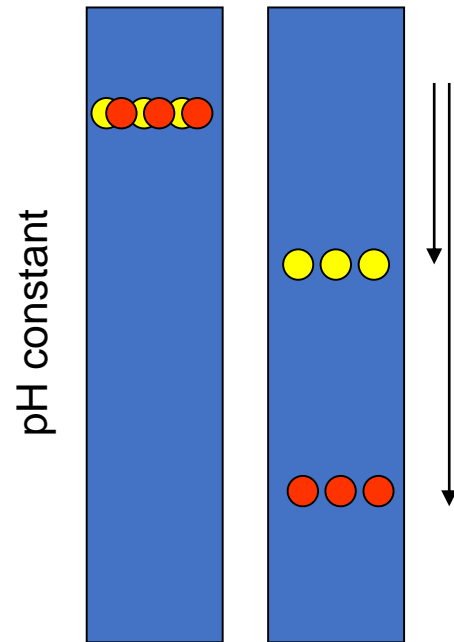


En utilisant un bon rapport entre bisacrylamide et acrylamide on obtient des pores de la taille des protéines

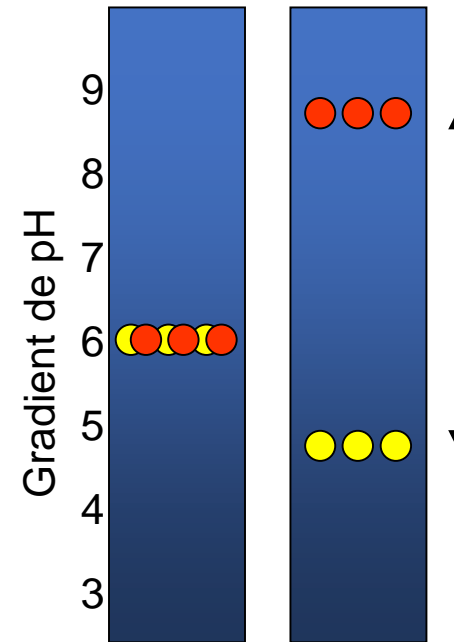
Effet de tamisage

Deux méthodes électrophorétiques en protéomique

Electrophorèse de zone



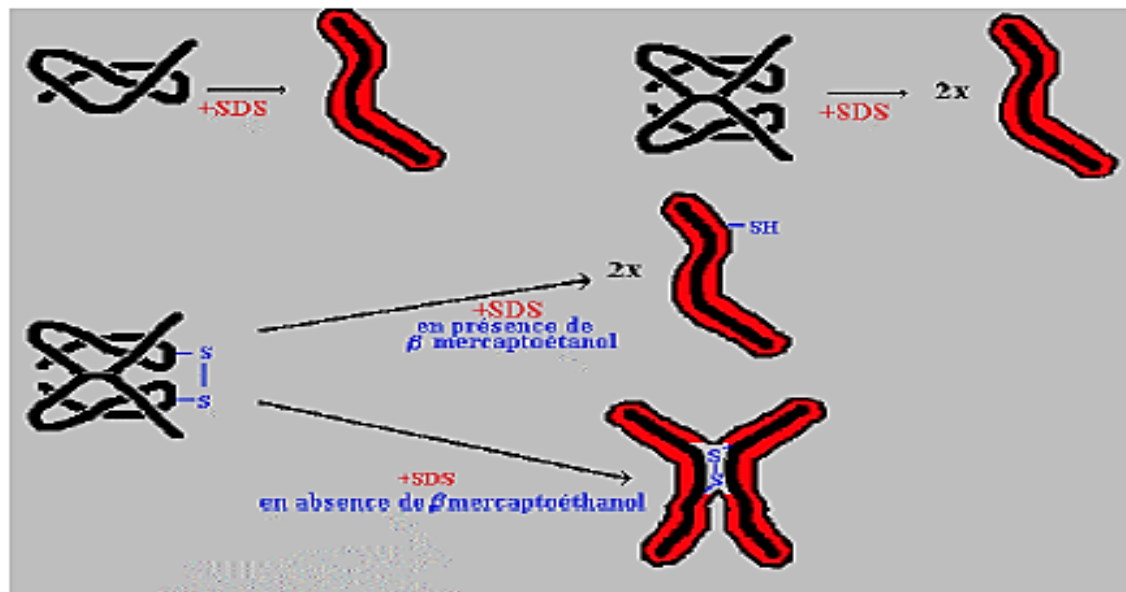
Focalisation isoélectrique



Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour séparer des protéines :

- **natives** (migration en fonction de leur **taille** et **charge** sous **forme** repliée)
- **dénaturées** par le **SDS** associé au **β -mercaptoéthanol** (coupe les ponts S-S) pour donner des bâtonnets de 18Å de diamètre, dont la charge négative et la longueur sont proportionnelles à la masse moléculaire de la partie polypeptidique.



- SDS = charge -
- se fixe aux protéines (masque leur charge)
- 1.4 g SDS /g protéine

la charge est proportionnelle à la masse

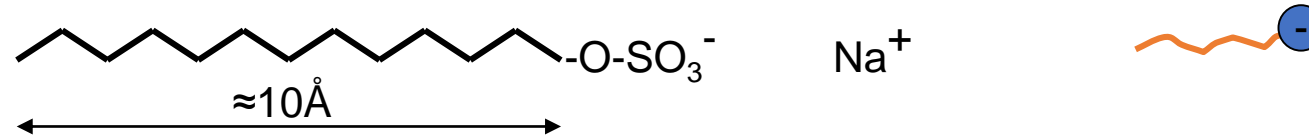
- les charges - se repoussent

↓
même forme de bâtonnet

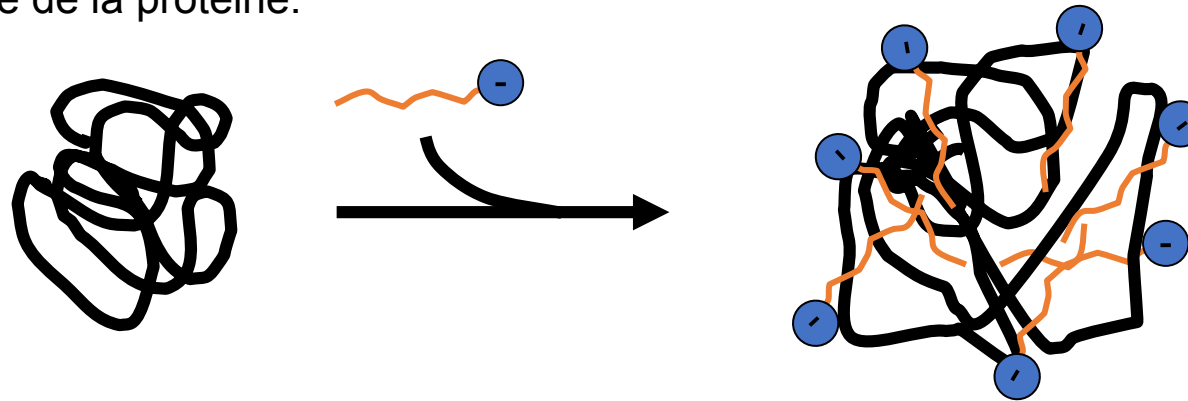
Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Deux paramètres :

- Utilisation du SDS
- Séparation selon la masse (effet de tamisage)



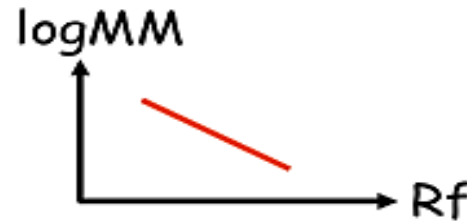
Le SDS est un tensioactif anionique qui a la particularité de se lier aux protéines indépendamment de leur séquence à la concentration de 1,4 g de SDS / g de protéine. Ainsi il permet, en général, de s'affranchir de la charge de la protéine.



La charge négative importante portée par ces polypeptides dénaturés conduit à une répulsion électrostatique ce qui abolit toutes interactions secondaires. Cette charge négative permet aussi la solubilisation des protéines hydrophobes comme les protéines membranaires.

Electrophorèse SDS-PAGE
(Sodium Dodecylsulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

- La migration des protéines (vers le +) sera fonction de leur taille (\Leftrightarrow masse) et de la réticulation du gel.
- Il existe une relation linéaire entre la distance relative de migration ($R_f = d_{\text{prot}} / d_{\text{totale}}$) et le log de la masse moléculaire des protéines dénaturées par le SDS.



- Avec une courbe d'étalonnage on peut donc déterminer la masse moléculaire des protéines.

La technique SDS-PAGE permet de séparer les protéines selon la masse moléculaire et d'évaluer celle-ci.

Préparation des échantillons pour les électrophorèses SDS

Méthode de LAEMMLI 1970

- Chauffer l'échantillon biologique en présence de SDS et d'agent réducteur (pour casser les ponts disulfures) dans un milieu tamponné

Le chauffage de l'échantillon en présence de SDS permet d'accélérer la dénaturation et de favoriser la fixation uniforme du SDS

Cette dénaturation accélérée permet d'inactiver les activités lytiques (protéases, phosphatases, glycosidases)

- Les agents qui interfèrent lors de la préparation des échantillons

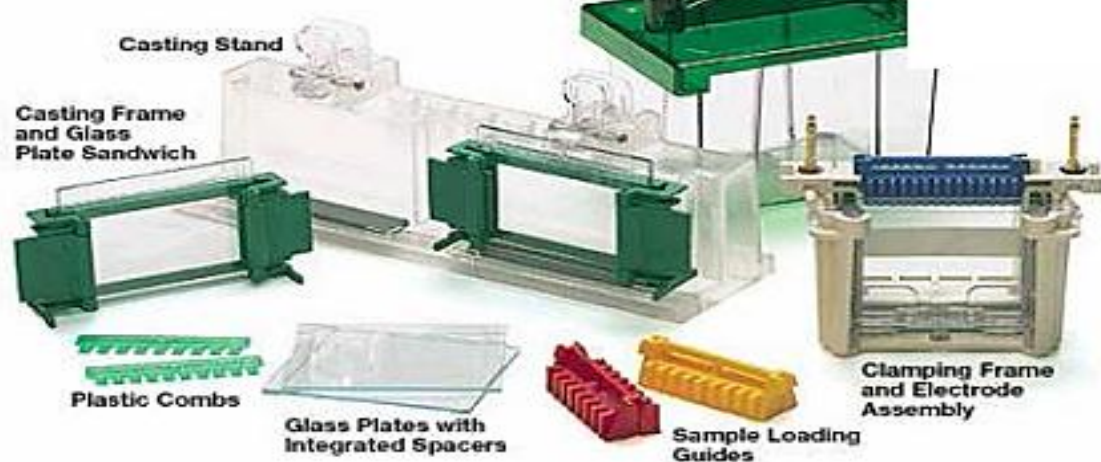
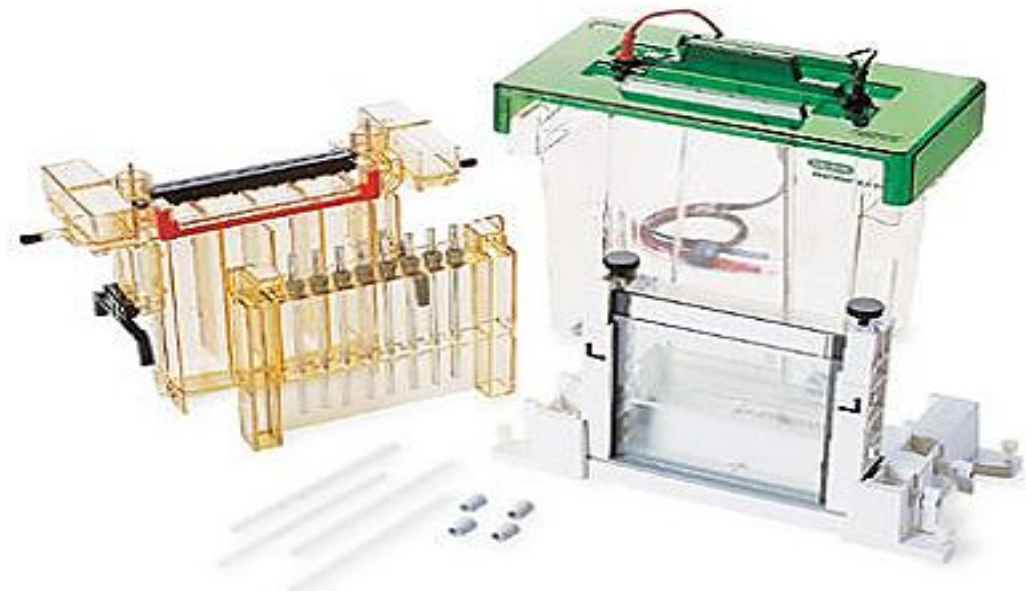
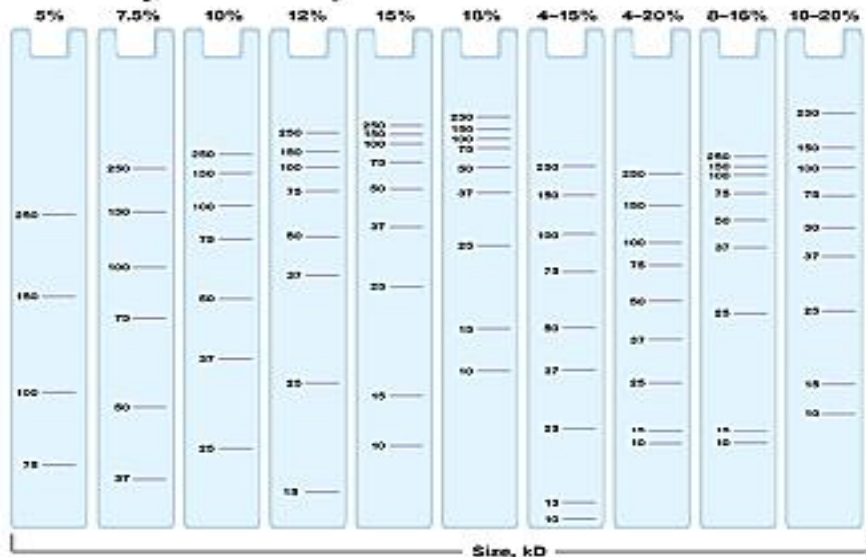
-Les lipides forment des micelles mixtes avec le SDS et ainsi entrent en compétition avec les protéines pour la liaison du SDS

-Les acides nucléiques augmentent la viscosité de l'échantillon et ont tendance à boucher les pores du gel (traitement avec nucléase avant la solubilisation)

-Le KCl à forte molarité fait précipiter le SDS

Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

En pratique



Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

avantages

- facilité de mise en œuvre
- rapidité (1H-4H, -12H)
- reproductibilité (taille des mailles, gels pré-coulés, tampons commerciaux)
- prix de revient (matériel et consommables)
- modularité (dimension des gels, réticulation variable en fonction de la taille de la protéine d'intérêt)

limites

La séparation n'est optimale que dans un intervalle de taille réduit :

- pour un gel donné (ex: 20-150 kDa)
- d'une manière générale (3 kDa-300 kDa)
- petites protéines, grosses protéines, protéines glycosylées, protéines de taille proches ou identiques, ...

La focalisation isoélectrique (IEF)

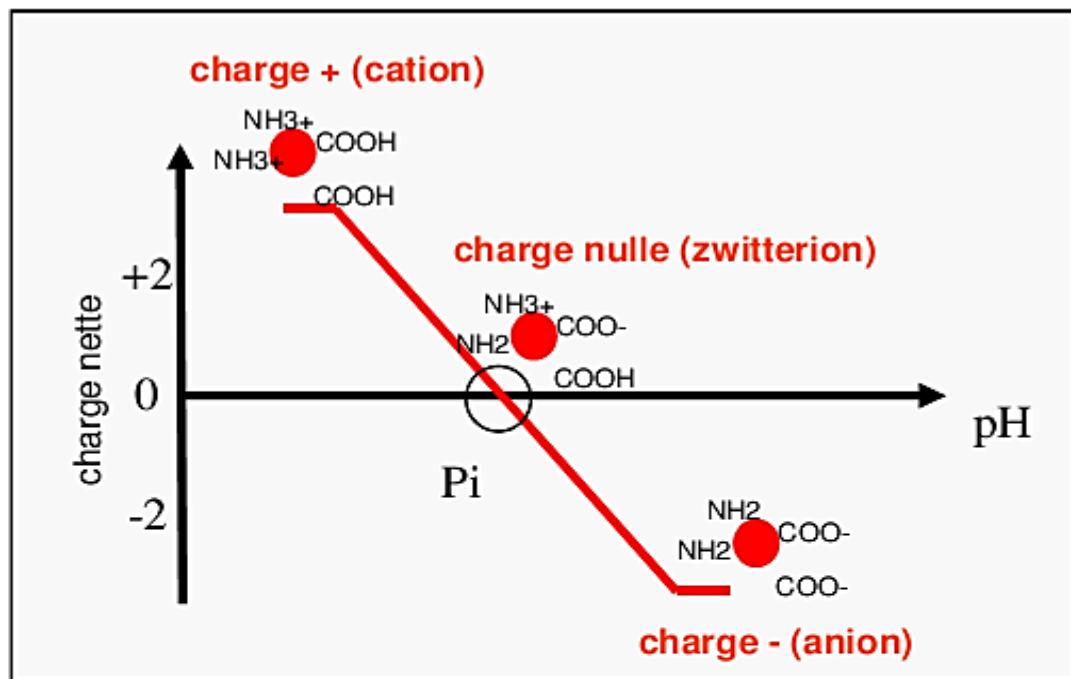
- Séparation en fonction du pI (pH auquel la charge de la protéine est nulle)
- Tout changement qui affecte la charge de la protéine (acides aminés chargés, modifications post-traductionnelles,...) sera détectable par cette technologie
- Tout additif qui pourrait modifier la charge de la protéine est à proscrire :
 - détergents chargés
 - pH extrêmes qui hydrolysent les Asn et les Gln

La focalisation isoélectrique repose dans l'établissement d'un gradient de pH stable dans lequel les protéines migrent jusqu'à atteindre leur pI.

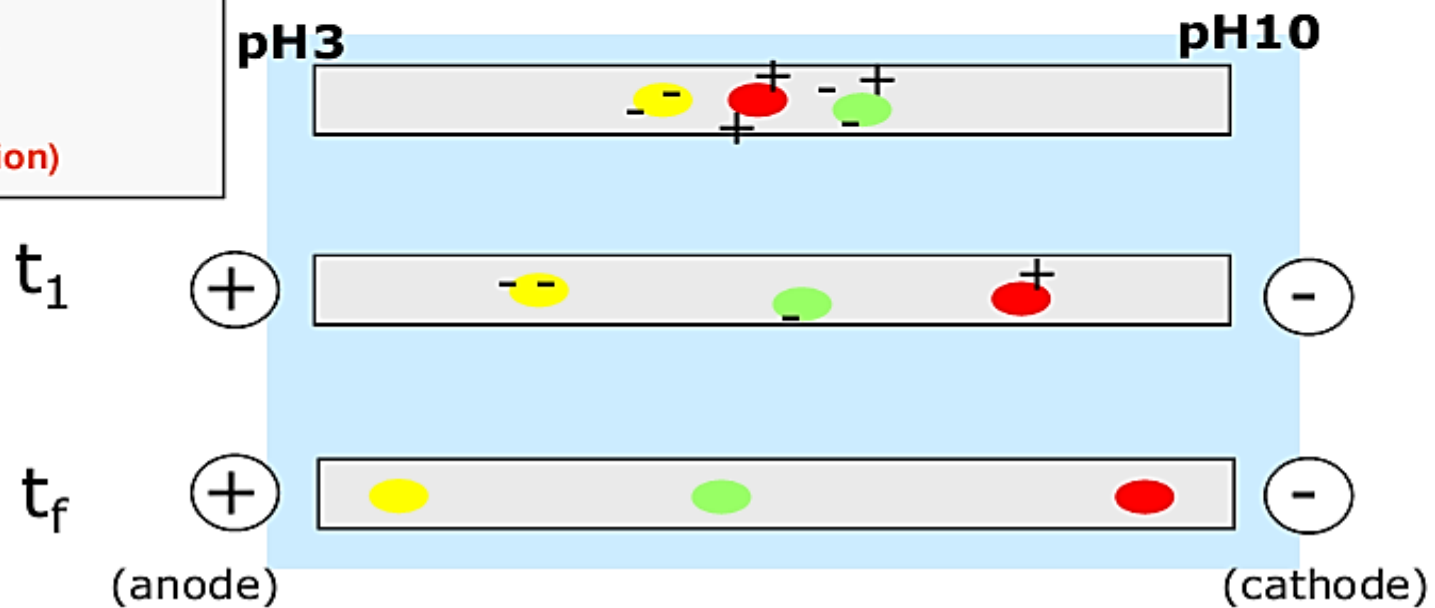
Cette stabilité du gradient peut être obtenue

- soit par immobilisation covalente (gradient de pH immobilisé)
- soit au moyen de stabilisateur (ampholytes porteurs)

La focalisation isoélectrique (IEF)



- Les protéines: molécules amphothères
- $P_i = \text{pH}$ où la charge nette est 0



La focalisation isoélectrique (IEF)

➤ Gradient de pH par ampholytes porteurs

Ampholyte : tout composé chimique qui a un point isoélectrique et un pouvoir tampon à son pI

Glu, Asp, His, Lys, Arg sont des ampholytes

Les ampholytes porteurs commerciaux sont des composés polyacides-polyaminés obtenus soit par greffage de groupes acides sur une polyamine soit par polymérisation d'acides aminés

Les ampholytes porteurs commerciaux sont des mélanges ce qui pose un problème majeur de reproductibilité d'un lot à lot

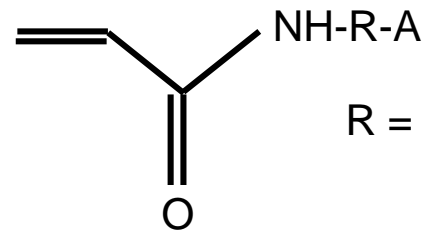
Gradient sujets au phénomène de dérive cathodique c'est-à-dire que la partie basique du gradient disparaît au cours du temps de migration

La focalisation isoélectrique (IEF)

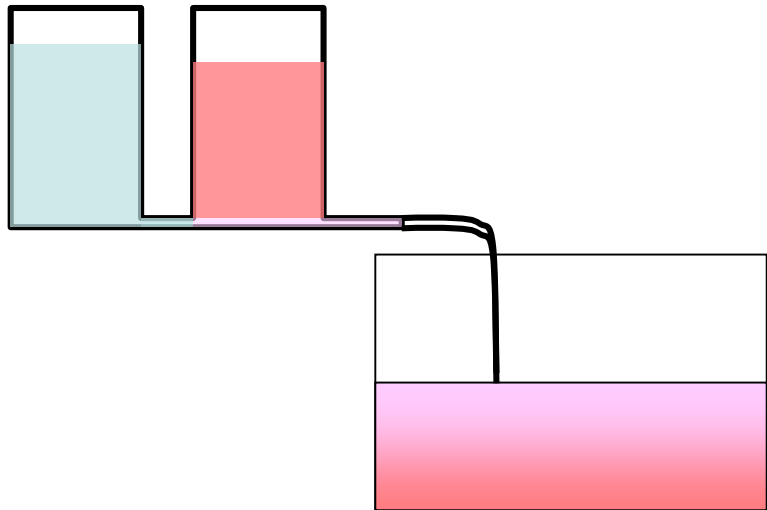
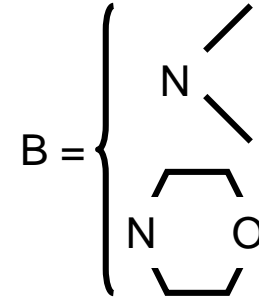
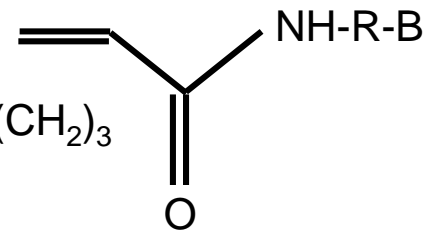
➤ Gradient de pH Immobilisés IPG

Le gradient de pH est obtenu par copolymérisation d'acrylamide, de bis-acrylamide et de monomères fonctionnalisés comportant un squelette acrylamide et soit un groupe acide faible soit un groupe base faible

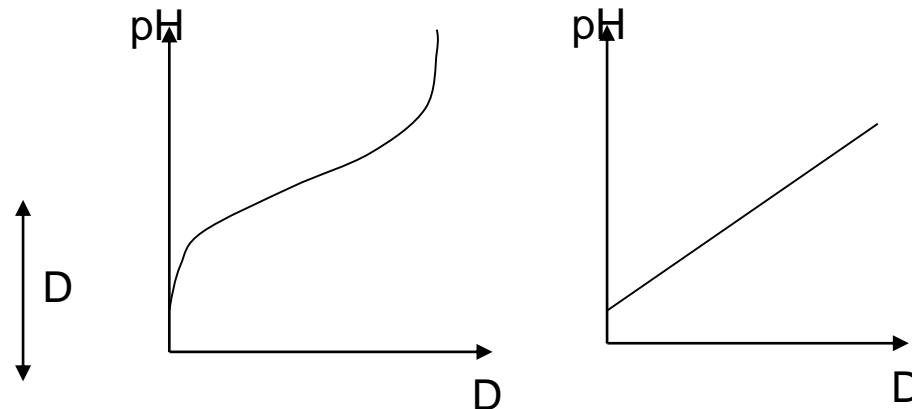
A = SO_3H ou COOH



R = CH_2 à $(\text{CH}_2)_3$

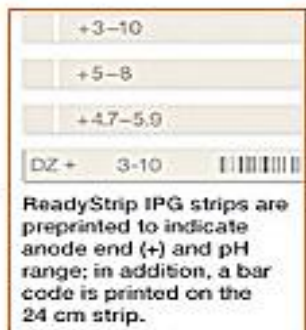


Ce type de gradient n'est pas affecté par le phénomène de dérive cathodique

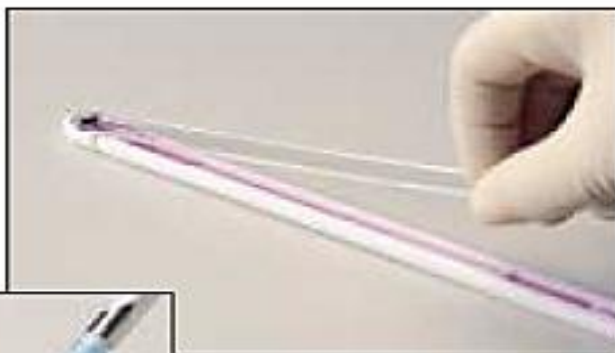


l'isoélectrofocalisation (IEF)

En pratique



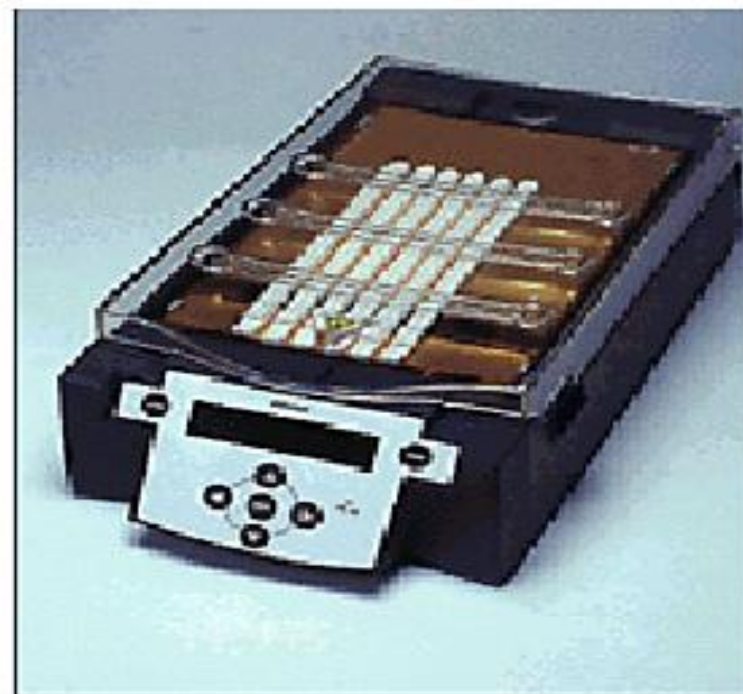
Languettes (strip) couvertes d'un gel d'acrylamide dans lequel un gradient de pH est établi par le mélange de groupements acide et base faibles co-polymérisés avec le monomère.



7. Place cover on strip holder.



6. Carefully apply IPG Cover Fluid along entire length of IPG strip.



Préparation des échantillons pour la focalisation électrique

- Deux contraintes principales
 - Respecter la charge des protéines
 - Travailler à basse force ionique

- La charge d'une protéine est faible et diminue au fur et à mesure qu'elle se rapproche de sa zone de pl. Ceci implique l'utilisation de champs électrique important 100 à 300 V par cm pendant plus de 10 heures. Dans ces conditions de migration, la présence de sels induit un effet joule énorme.

Préparation des échantillons pour la focalisation électrique

- Pour dénaturer, réduire et solubiliser les protéines l'échantillon biologique contient :
 - un agent réducteur des ponts disulfures
 - un chaotrope neutre (urée ou mélange d'urée et de thiourée) à forte concentration
 - un surfactant électriquement neutre
 - un système de tampon à faible concentration
 - des ampholytes porteurs à faible concentration pour solubiliser les protéines et lisser la conductivité des gradients de pH immobilisés
 - éventuellement de la spermine pour précipiter les acides nucléiques

- Comme on ne peut pas utiliser de SDS
 - Les protéases sont actives même en présence d'urée
 - Certaines protéines ne sont pas solubilisées (protéines membranaires).
 - Aujourd'hui certains détergents non ioniques sont très utilisés mais en présence du chaotrope ils sont moins efficace.

l'isoélectrofocalisation (IEF)

- **avantages**

- séparation par la charge
- reproductibilité (IPG) relativement bonne

- **limites**

- durée
- grosses protéines, protéines hydrophobes, protéines acides, protéines basiques

Electrophorèse bidimensionnelle

La technique idéale des protéines pour une analyse protéomique permettrait

- Séparation de toutes les formes protéiques d'une cellule complexe
- Rendement d'extraction quantitatif
- Détection quantitative, linéaire
- Compatible avec les analyses en aval

Electrophorèse bidimensionnelle permet de séparer

- Les protéines majeures
- Les protéines solubles
- Les protéines dont la masse est supérieure à 15000 et inférieure à 120000
- Les protéines dont le pI varie entre 5 et 8

Optimisation en cours

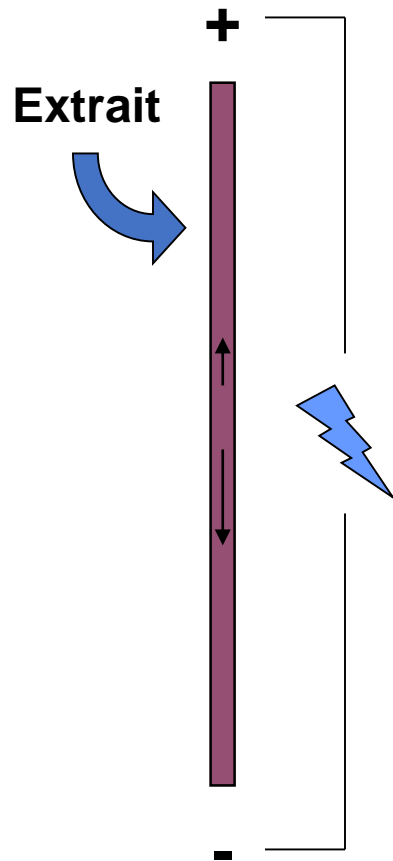
gamme de pH de 2 à 12

Détection sensible, linéaire et homogène

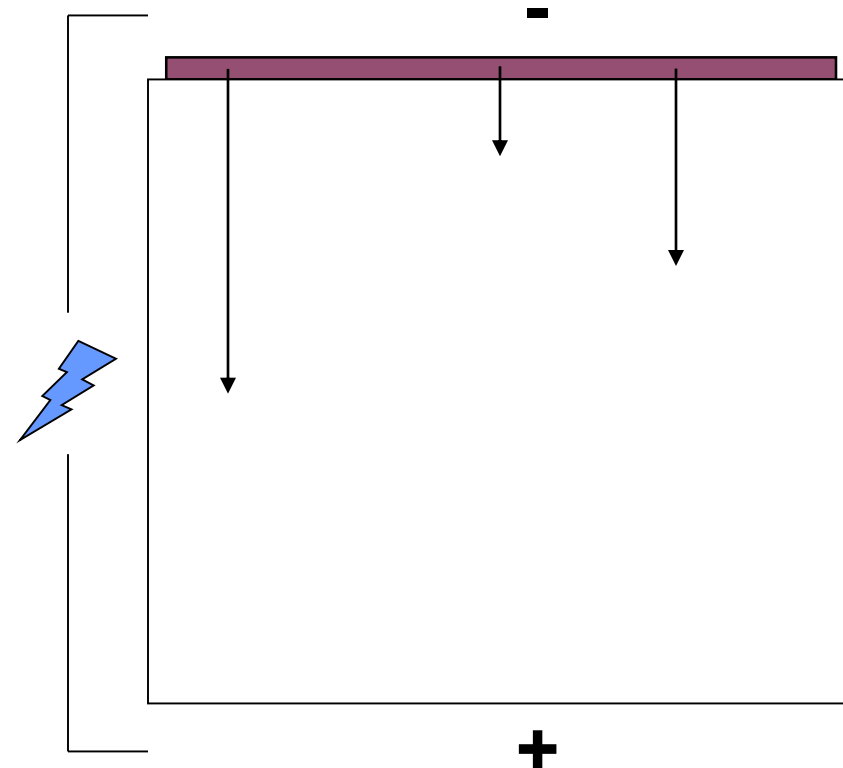
Electrophorèse bidimensionnelle

Technique développée par O'Farrell en 1975,
Combine 2 séparations séquentielles des protéines en gel de polyacrylamide (20 x 20 x 0,1 cm).

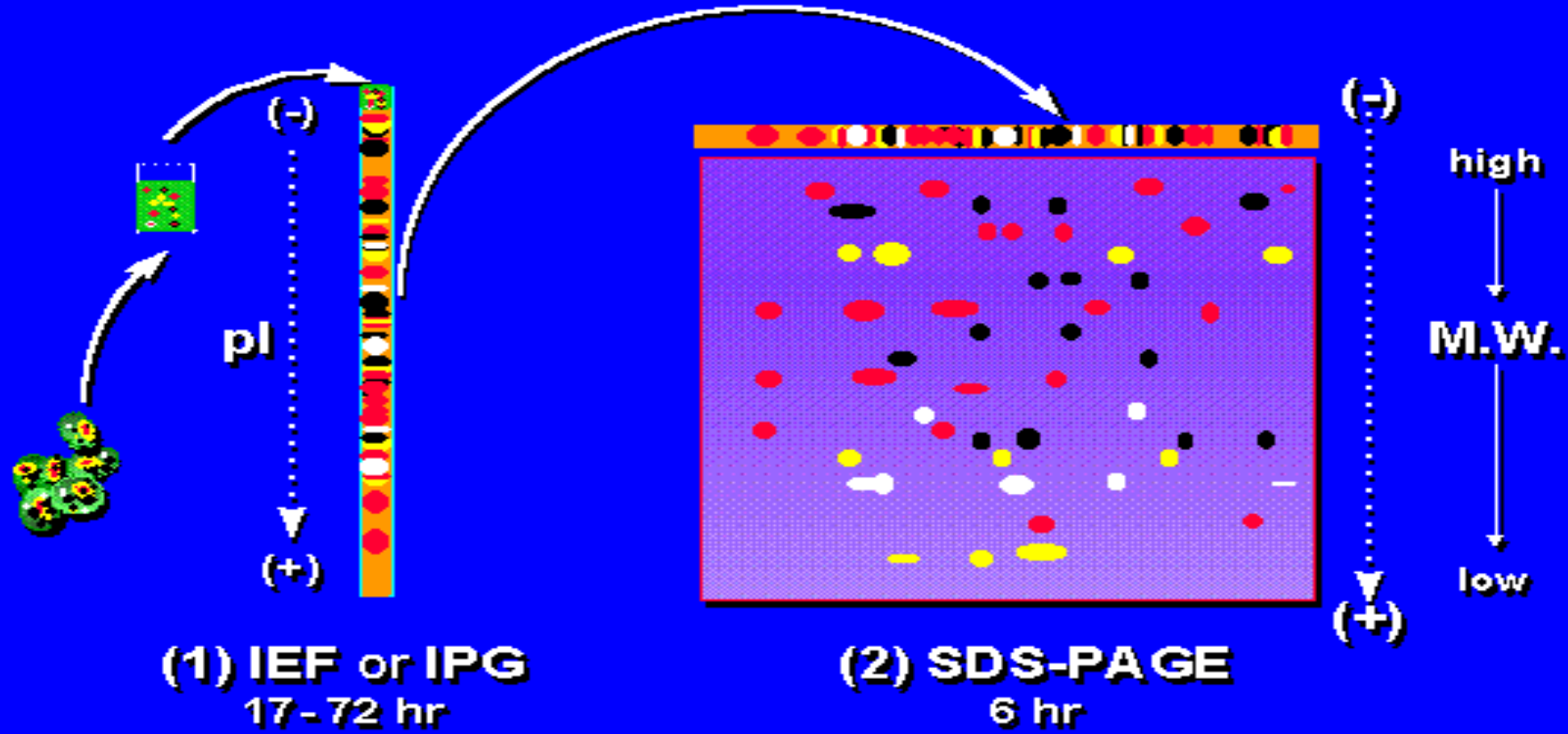
1ere séparation (charge)



2eme séparation (masse)



Two Dimensional Electrophoresis



Electrophorèse bidimensionnelle

Le gel de polyacrylamide est incubé dans une solution qui colore les protéines.

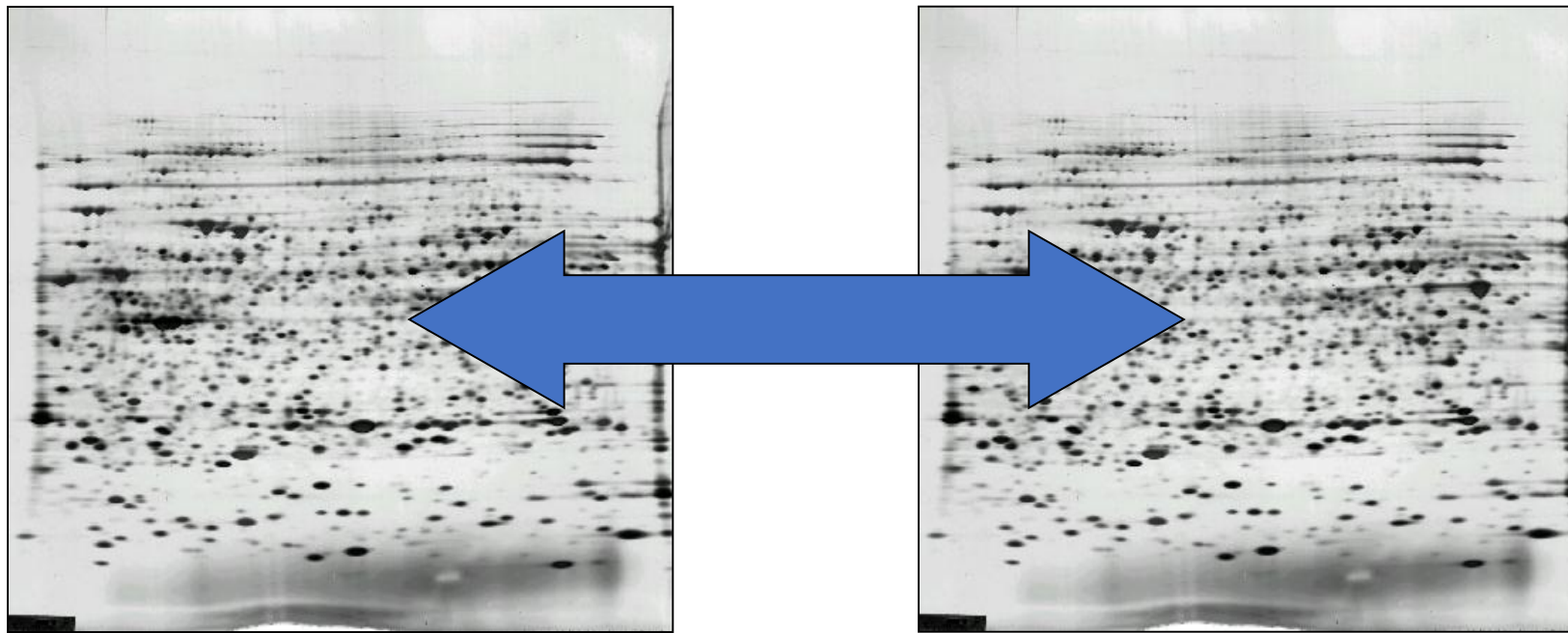


Chaque « tache » sur le gel représente une protéine.

Plus la « tache » est grosse et foncée, plus la protéine est abondante.

Electrophorèse bidimensionnelle

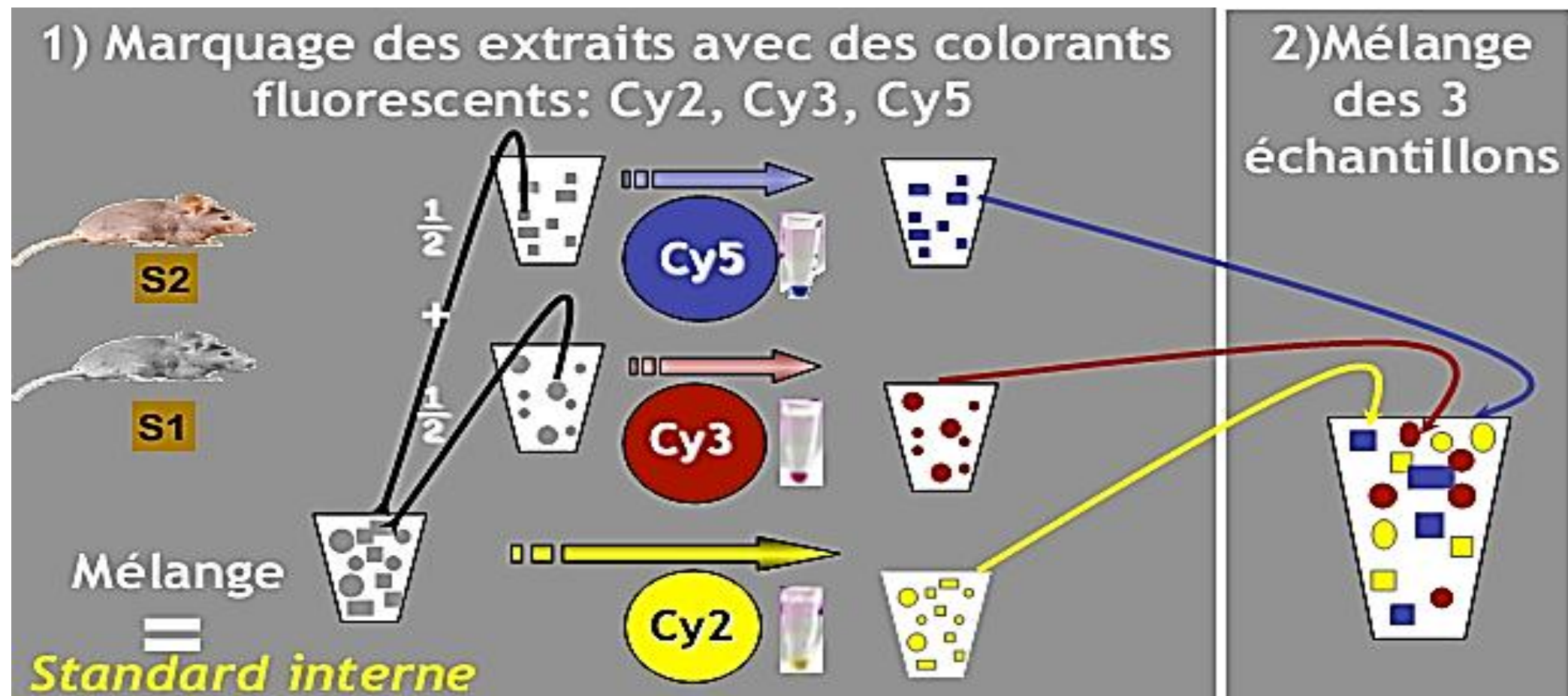
Application : comparer les gels dans différentes conditions (cellules normales vs cellules cancéreuses par exemple) pour trouver des différences de quantité de protéine et/ou des absences de protéines.



cellules normales

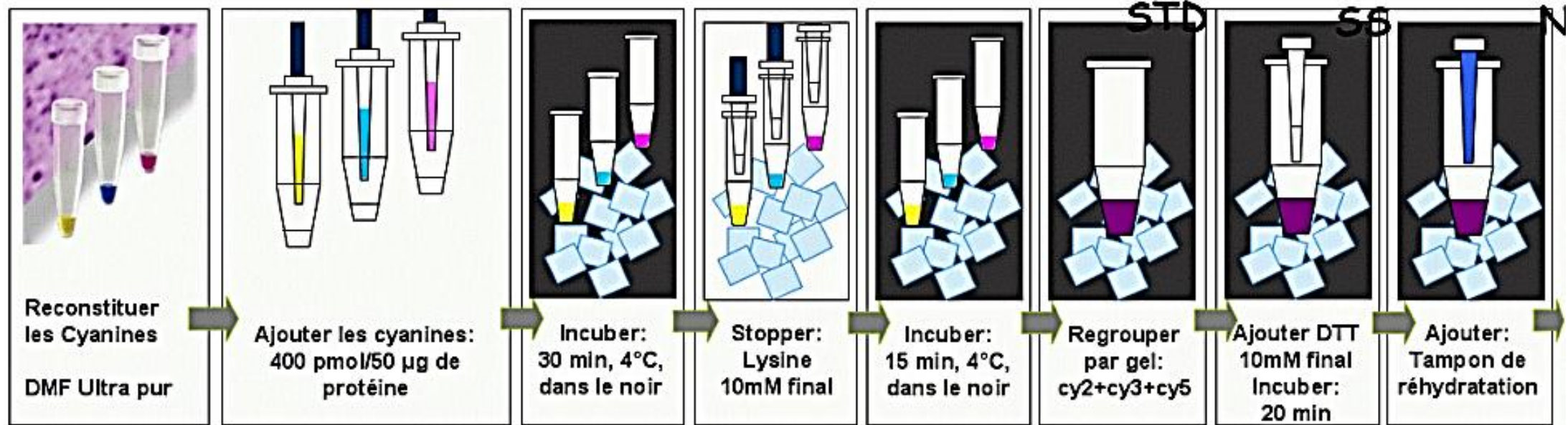
cellules cancéreuses

Concept de la 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DiGE)



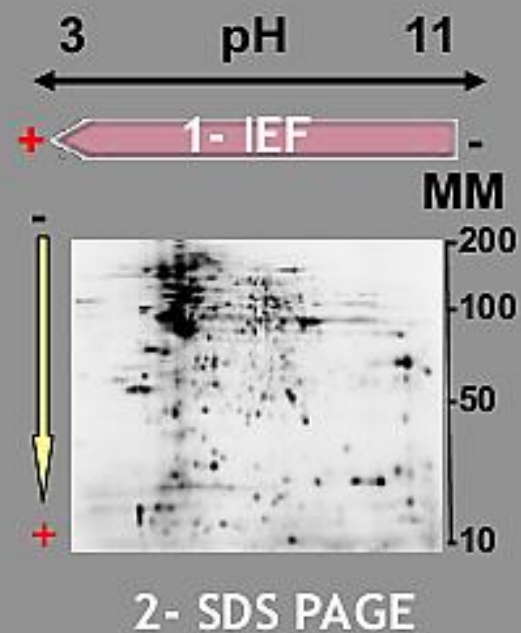
Concept de la 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DiGE)

Marquage DiGE - En pratique

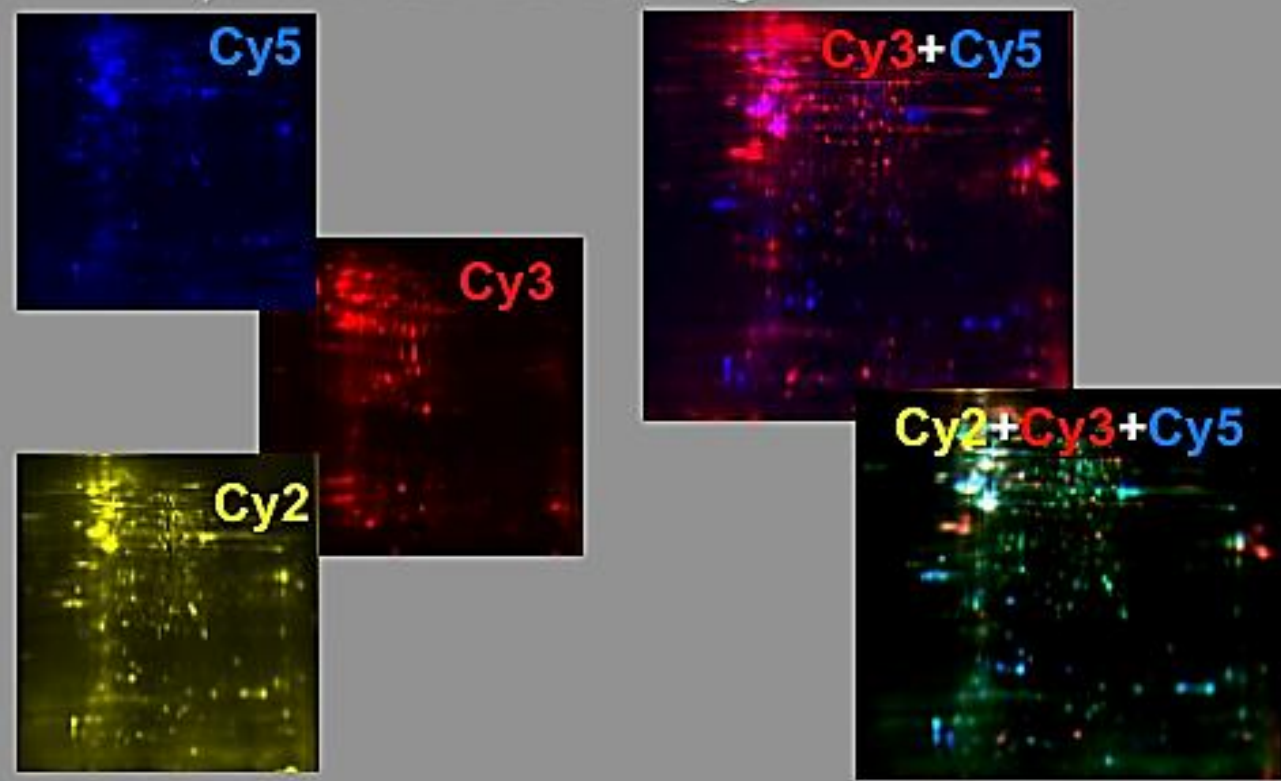


Concept de la 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DiGE)

3) Séparation 2-DE

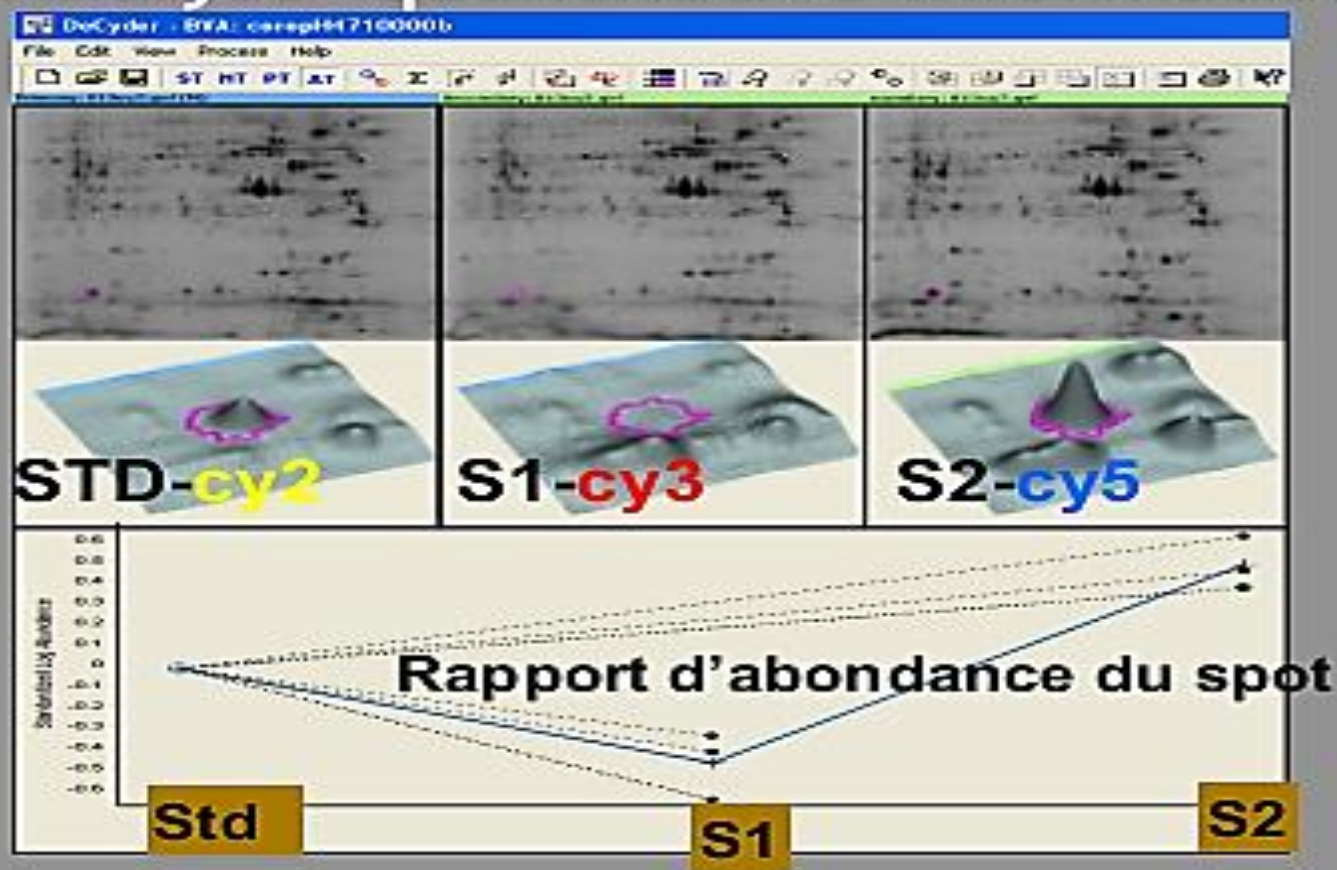


4) Scan sur les 3 longueurs d'onde



Concept de la 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DiGE)

5) Analyse quantitative informatisée



Détection après électrophorèse

7 grandes contraintes

1. Compatibilité avec le milieu gélosé
2. Sensibilité
3. Reproductibilité
4. Uniformité (réponse semblable d'une protéine à l'autre)
5. Linéarité de réponse (pour les analyses quantitatives)
6. Universalité (utilisable pour tout type d'échantillon)
7. Compatibilité avec les technologies qui se trouvent en aval de l'électrophorèse

Détection après électrophorèse (suite)

Détection basée sur la radioactivité

- Très sensible (jusqu'à 200 fg de protéine)
- Problème de sécurité
- Marquage in vivo avec des acides aminés radioactifs
- Marquage in vitro après extraction des protéines modifie le pI
- Le marquage trace est délicat

Détection après électrophorèse (suite)

Détection par absorption de la lumière (coloration)

Colorants historiques : Noir d'amidon, Vert rapide, Violet de Coomassie (peu sensible)

Bleu de Coomassie

Détection jusqu'à 500 ng de protéine
Gamme linéaire faible (1 ordre de grandeur)

Bleu de Coomassie colloïdal

Détection jusqu'à 100 ng de protéine
Gamme linéaire faible (1 ordre de grandeur)
Homogénéité excellente

Précipitation différentielle par des sels de métaux lourds : imidazole -Zinc

Coloration négative
Détection 10 ng de protéine
Homogénéité fiable
Gamme linéaire insignifiante

Coloration positive avec des ions métalliques : argent

Très sensible jusqu'à 1 ng de protéine
Gamme linéaire faible (1 ordre de grandeur)

Détection après électrophorèse (suite)

Détection par émission de la lumière (fluorescence)

Complexes organométalliques fluorescents de l'euporium et du ruthénium (SyproRose® et SyproRuby®)

Détection 10 ng de protéine
Gamme linéaire excellente (3 ordre de grandeur)
Homogénéité moyenne

Marquage fluorescent covalent Cy3, Cy5

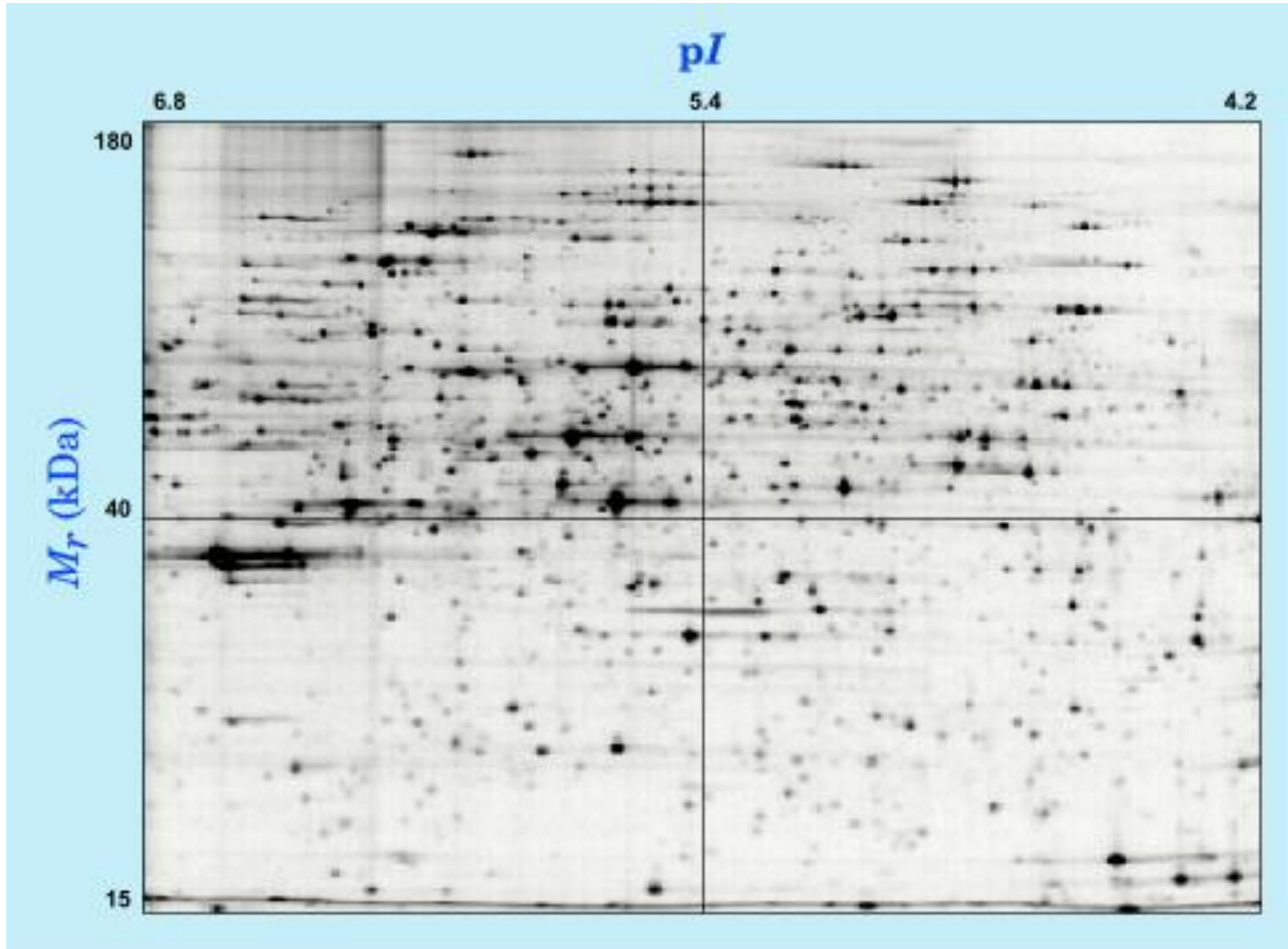
Coloration au Deep Purple

Détection 10 ng de protéine
Gamme linéaire excellente (3 ordre de grandeur)
Homogénéité excellente

Méthodes de détection des protéines sur gel

gel stain	sensitivity	MS compatibility	linear range
radioactive	< 1 ng	no	wide
Coomassie Blue	30-100 ng	yes	wide
Silver	1ng	yes, if...	limited
Zinc-Imidazole	10-20 ng	yes	limited
SYPRO Ruby	1 ng	yes	very wide

levure



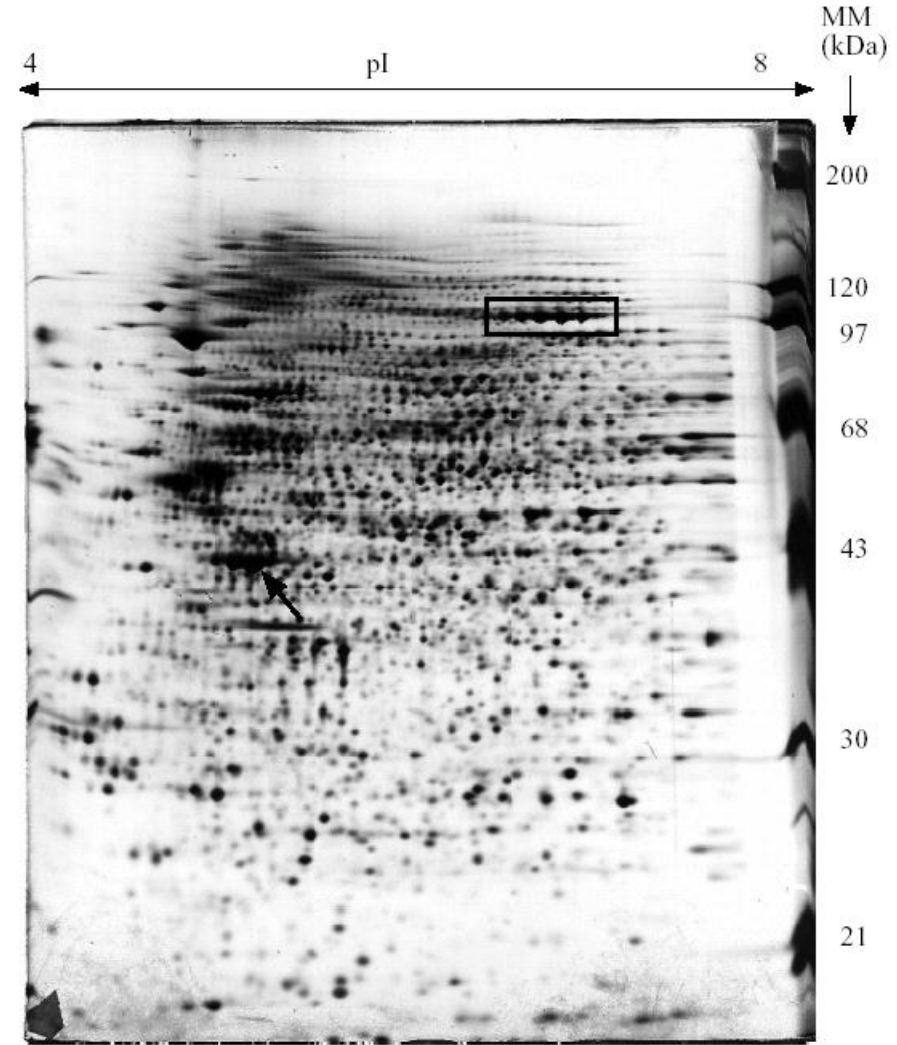
Hélian Boucherie IBGC CNRS Bordeaux

Mégagamétophyte du pin maritime



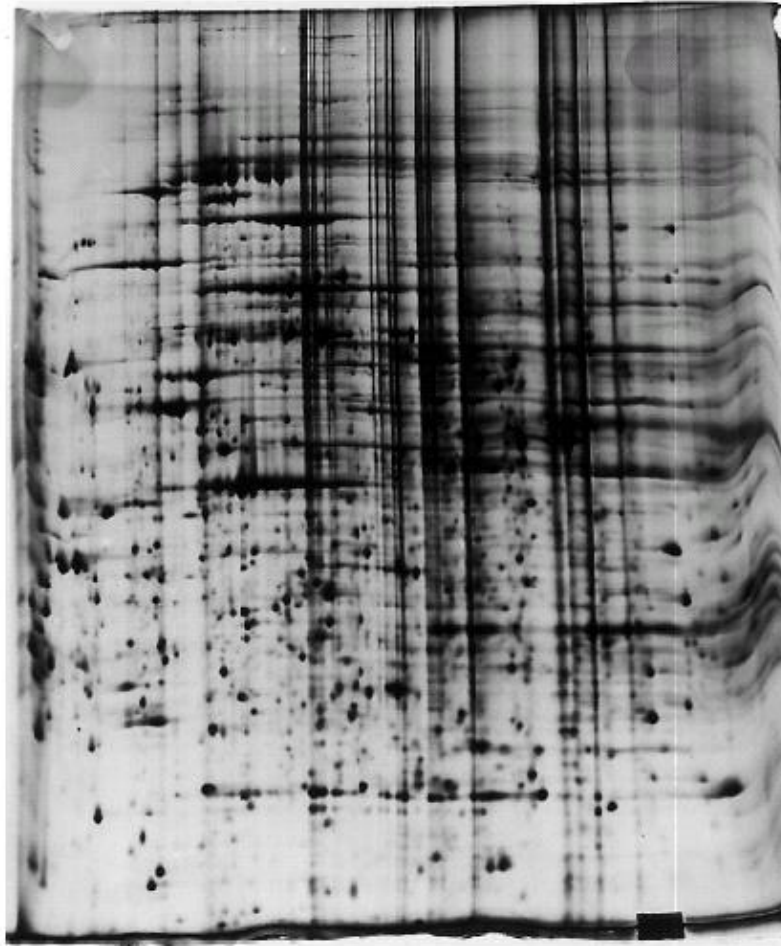
Christophe Plomion INRA Pierroton Bordeaux

Cellule humaine en culture (lymphoblaste)



Thierry Rabilloud CEA Grenoble

Effet des acides nucléiques

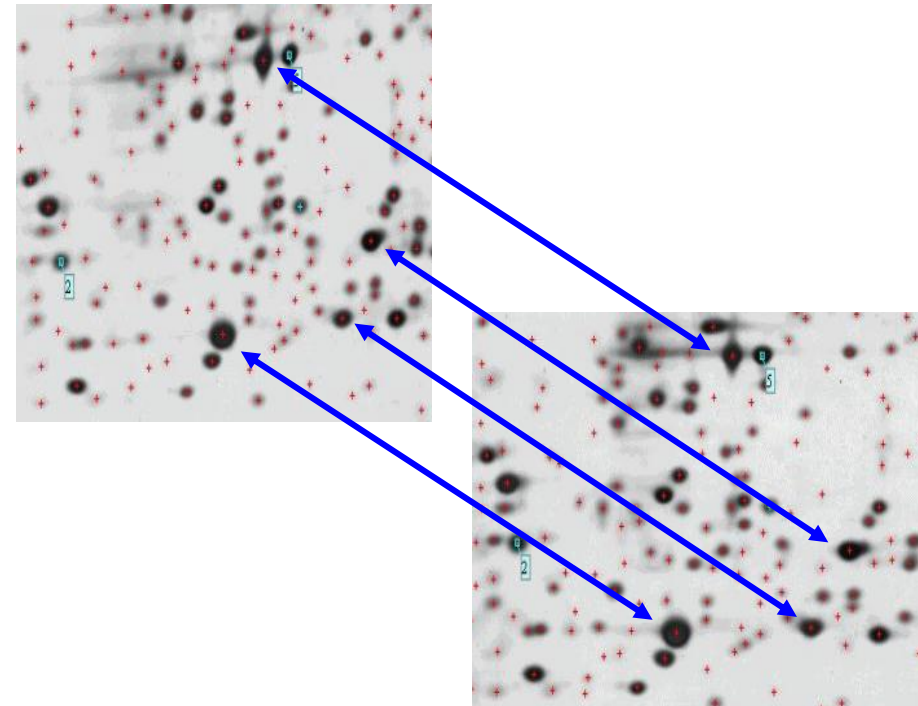
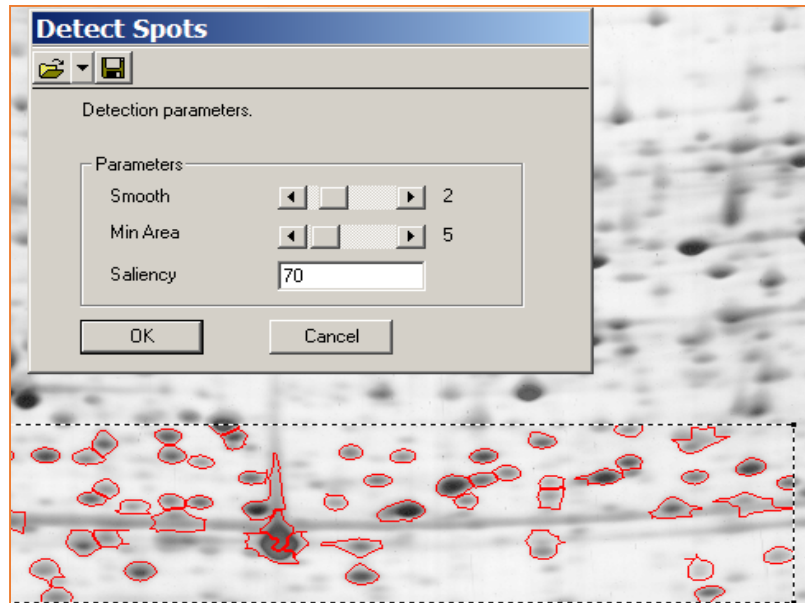


Logiciel d'analyse d'images

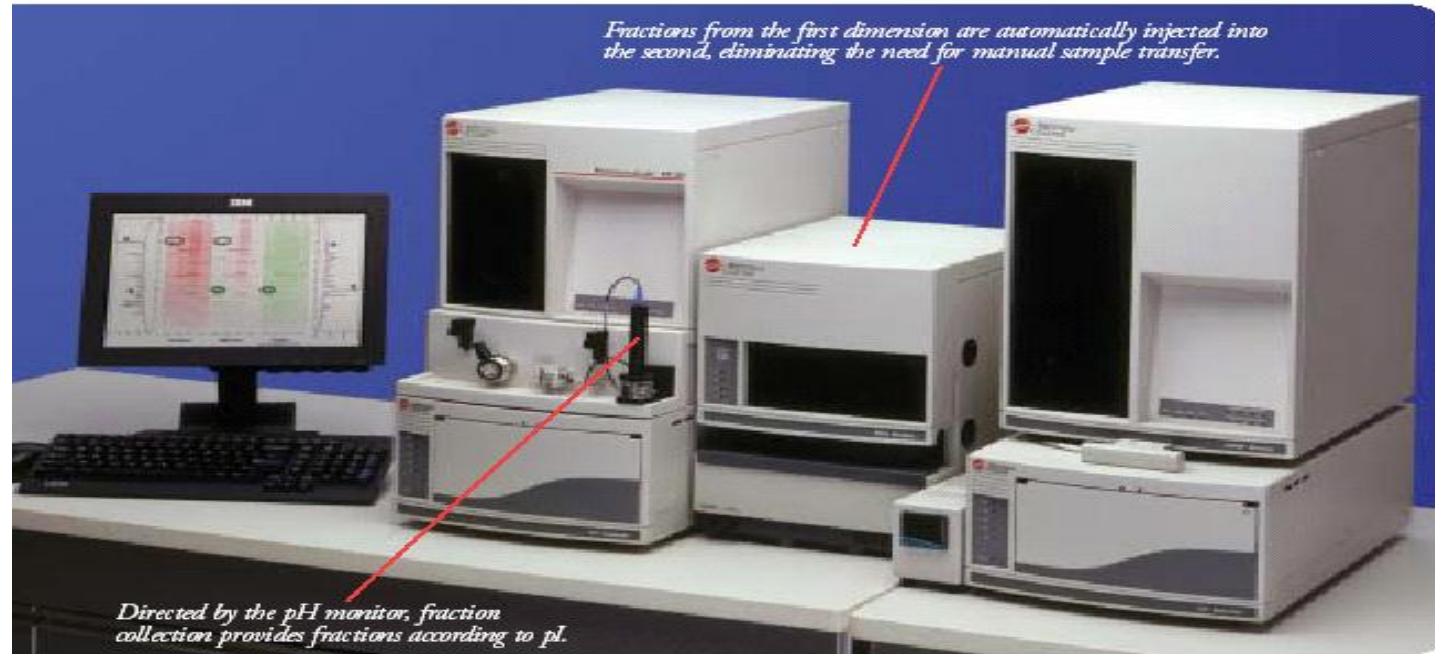
Après numérisation, détection automatique des protéines dans l'image du gel

Quantification : mesure de l'intensité en niveaux de gris des protéines

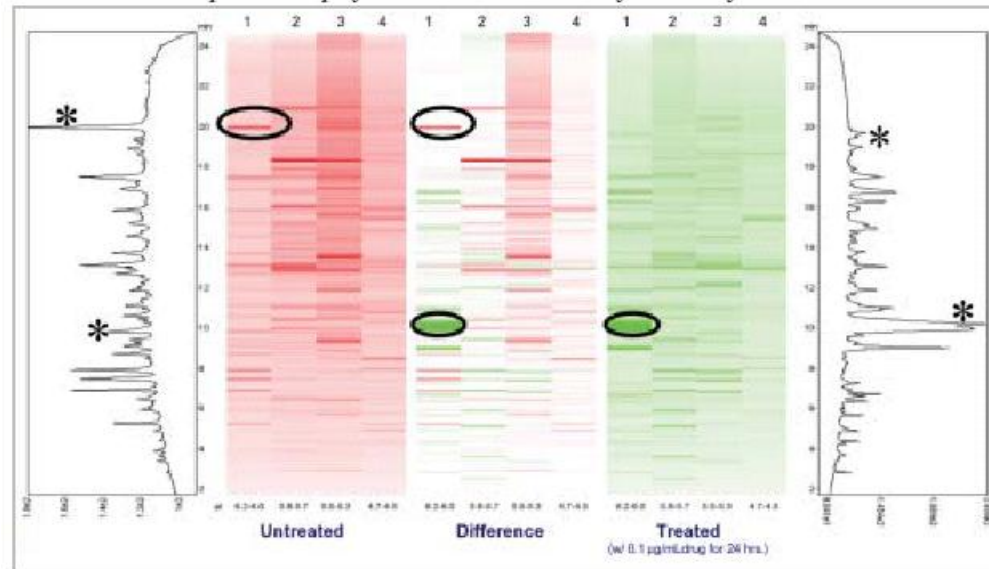
Matching : un algorithme d'appariement compare les gels 2 à 2 pour trouver les taches qui représentent la même protéine dans les 2 gels



PROTEOMELAB[®] PF 2D
 PROTEIN FRACTIONATION SYSTEM

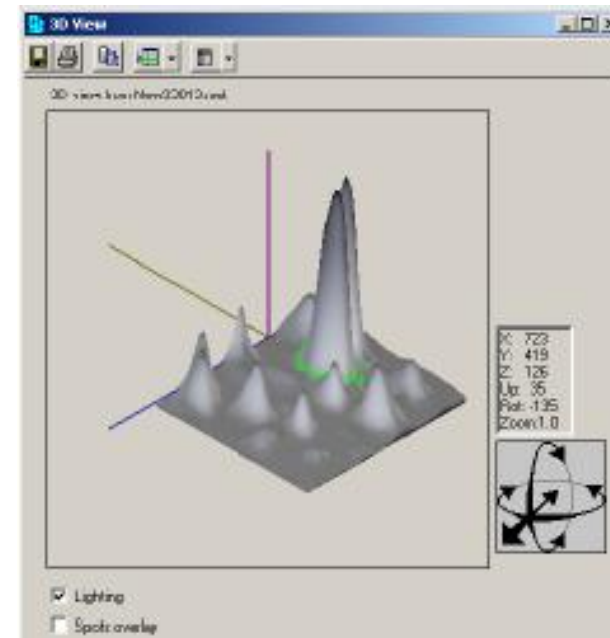
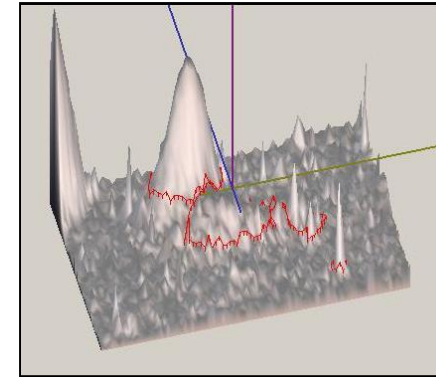
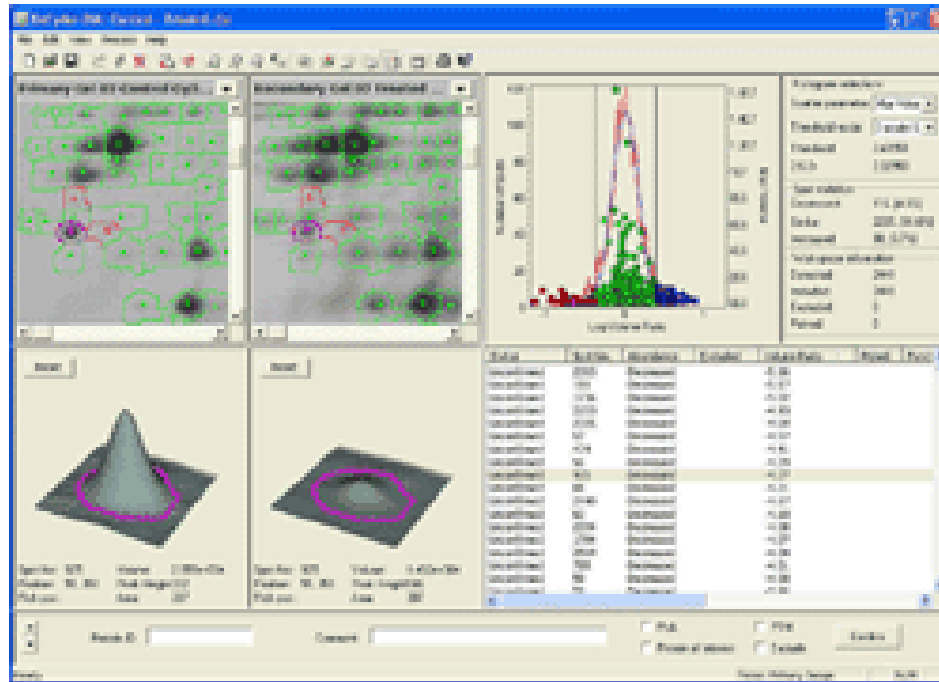


Partial pI/UV map of colon cancer cell line before and after treatment.



Logiciel d'analyse d'images

Outils de visualisation 3D pour mieux voir les « taches »
Aide pour vérifier la détection faite par le logiciel



Logiciel d'analyse d'images

But : repérer les variations d'expression des protéines et les valider par des tests statistiques.

