

TECHNIQUES D'ANALYSES DES PROTEINES. Master BIOCHIMIE

Prof. MERGHEM R.

Plan du cours

Introduction, Généralités sur les protéines et Rappels :

Chapitre 1. Les acides aminés et les protéines

1. Structure des acides aminés
2. Structure des protéines
3. Structure primaire, structure secondaire, tertiaire et quaternaire

Chapitre 2. Techniques d'études des protéines :

Etude de la séquence des protéines

Méthodes chimiques et enzymatiques

Exercices

Chapitre 3. Techniques de purification des protéines :

Chromatographie gel filtration sur Séphadex LH20.

Echangeuse d'ion et d'affinité

Chapitre 4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou autres méthodes modernes

SDS-PAGE, Western Blot etc ...

Chapitre 5. Spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines.

Exercices

Chapitre 1. Les acides aminés et les protéines

Introduction et généralités sur les acides aminés et les protéines

1. Classification et structure des acides aminés
2. Structure des protéines
3. Structure primaire, structure secondaire, tertiaire et quaternaire

Introduction et généralités et rappels :

Les protéines sont considérés comme des biomolécules très important :

- **sur le plan quantitatif** : les protéines représentent 55 à 85% du poids sec. C'est donc après l'eau le principal constituant de l'organisme ;
- **sur le plan qualitatif**, ils jouent plusieurs rôles structuraux ou fonctionnels.

Le rôle structural :

- support mécanique et de soutien des tissus : cas du collagène, protéine la plus abondante de l'organisme, qui entre dans la composition des matériaux extracellulaires du tissu conjonctif ;
- rôle de support mécanique à l'échelle cellulaire : cas des protéines du cytosquelette (actine, tubuline) responsable de la forme des cellules.

Le rôle fonctionnel :

Les protéines assurent de nombreux rôles fonctionnels vitaux :

- rôle de catalyseur biochimique, les enzymes sont des protéines, transporteur sanguin, médiateur chimique, rôle de mouvement (actine-myosine)...

Définition

Les protéines sont des composés organiques constitués de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, auxquels s'ajoute parfois le soufre.

La protéine est composée d'une séquence d'acides aminés (20) reliés par des liaisons peptidiques.

La séquence détermine la structure primaire de la protéine, la configuration de la chaîne peptidique dans l'espace détermine les structures secondaires et tertiaires, l'association de plusieurs chaînes peptidiques détermine la structure quaternaire.

La taille d'une protéine est extrêmement variable de quelques centaines à plusieurs millions de kilo-daltons. 1 dalton = $1,68 \cdot 10^{-27}$ Kg.

Malgré ces structures et fonctions très variables, toutes les protéines ont en commun une propriété, leur renouvellement permanent.

Vu leur importance physiologique et étant donné qu'ils ne peuvent pas être stockés de façon significative, toute carence alimentaire en protéines risque d'entraîner de graves dysfonctionnement de l'organisme.

1. Classification et structure des acides aminés.

Les acides aminés ou aminoacides sont des molécules qui possèdent :

- une fonction acide carboxylique. COOH
- une fonction amine NH_2

Ces 2 fonctions sont portées par un même atome de carbone le carbone α ou C_2 .

Ils diffèrent par la nature de la chaîne latérale R (radical).

Une l'exception de la proline qui est un acide α iminé, sa fonction amine secondaire est incluse dans un cycle. Il existe plus de 300 AA on a :

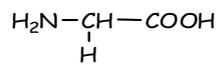
- les AA Standards : sont au nombre de 20 ce sont des constituants des protéines naturelles.
- les AA non standards : exemple : ornithine, citrulline ...

Ils peuvent être classés : - **selon la structure de la chaîne latérale**

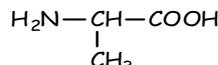
- a - Aliphatique : -hydrocarbonée 5 AA : glycocolle, alanine, valine, leucine, isoleucine
 - à fonction alcool 2AA : sérine, thréonine.
 - à fonction soufrée 2AA : cystéine, méthionine
 - à fonction acide et amide correspondante 4AA : Ac aspartique, Asparagine, Ac glutamique, Glutamine
 - à fonction basique 3AA : lysine, arginine, histidine.
- b - cyclique :
 - Aromatique 3 AA : phénylalanine, tyrosine, tryptophane.
 - hétérocycle 2 AA : proline et l'hydroxyProline.

Classification des aminoacides.

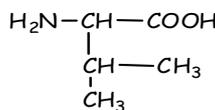
A. Aminoacides aliphatiques à chaîne hydrocarbonée.



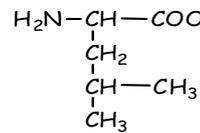
1. Glycine (Gly)



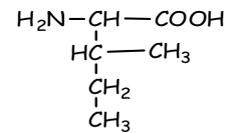
2. Alanine (Ala)



3. Valine (Val)

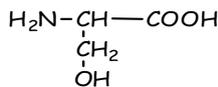


4. Leucine (Leu).

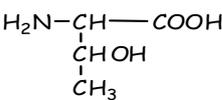


5. Isoleucine (Ile).

B. Aminoacides hydroxylés.

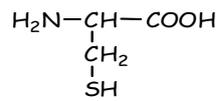


Sérine (Ser).

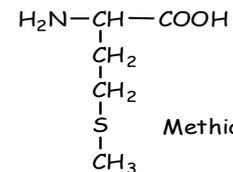


Thréonine (Thr)

C. Aminoacides soufrés.

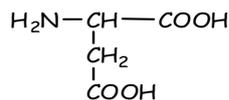


Cystéine (Cys)

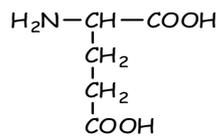


Méthionine (Met)

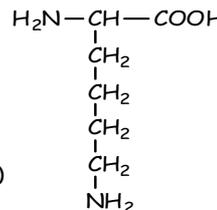
D. Aminoacides dicarboxyliques .



Acide aspartique (Asp)

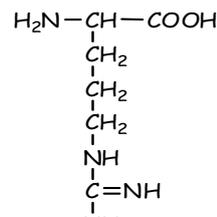


Acide glutamique (Glu)

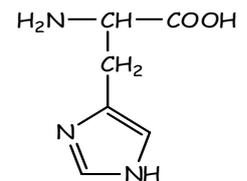


Lysine (Lys)

E. Aminoacides basiques

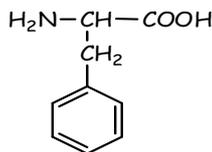


Arginine (Arg)

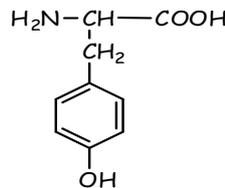


Histidine (His)

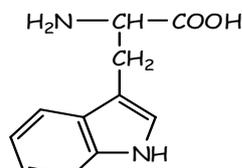
F. Aminoacides aromatiques cycliques



Phénylalanine (Phe)

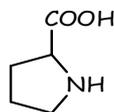


Tyrosine (Tyr)

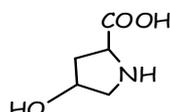


Tryptophane (Trp)

G. Aminoacides hétérocycliques.



Proline (Pro).



Hydroxyproline (OH Pro).

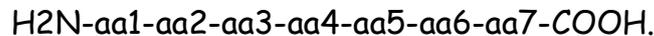
2. Structure de Protéines :

2.1. La liaison peptidique

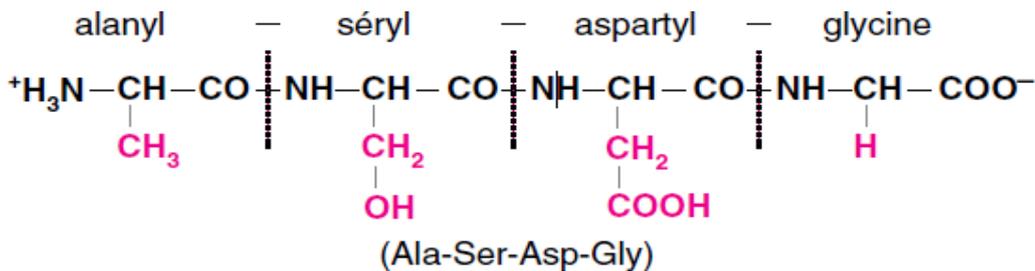
Généralement, les protéines sont formées d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques, le groupe aminé de chaque acide aminé se lie au groupe acide de l'acide aminé suivant. Cette liaison s'appelle la liaison peptidique. Cette synthèse s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau. L'union de deux acides aminés donne un dipeptide ; celle de trois acides aminés, un tripeptide. Les molécules formées de plusieurs acides aminés sont des protéines.

2.2. Structure primaire des protéines

La structure primaire des protéines est représentée par la séquence d'acides aminés qui se lient de manière à former une chaîne polypeptidique.



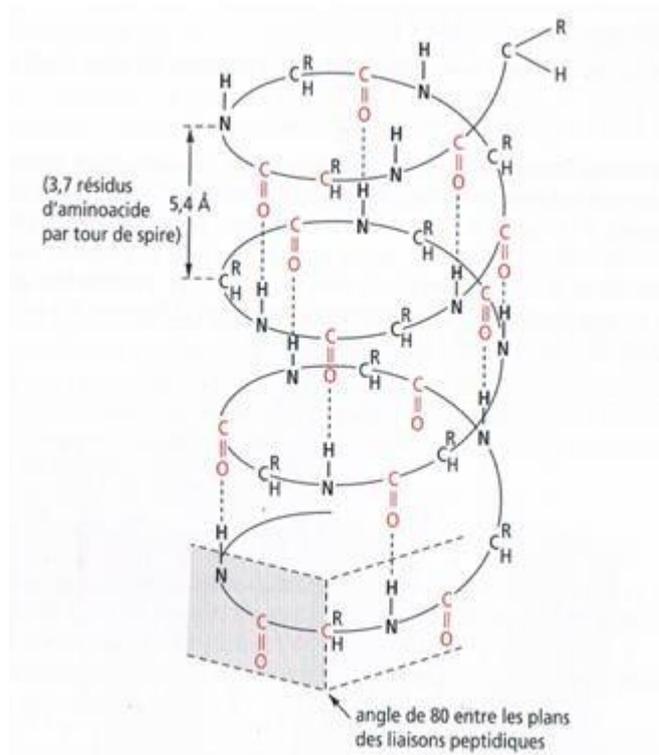
Exemple de structure primaire :



2.3. Structure tridimensionnelle des protéines

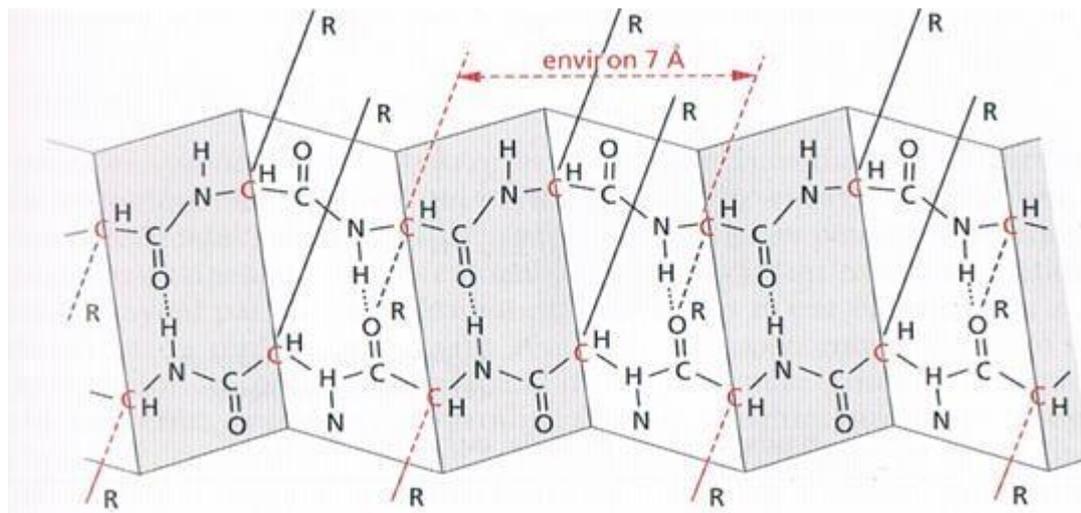
2.3.1. Structure secondaire :

Les protéines n'existent pas sous forme de chaînes linéaires d'acides aminés : elles se tordent et se replient sur elles-mêmes. C'est leur structure secondaire. La structure secondaire la plus courante est celle de l'hélice alpha (α). Dans l'hélice alpha, la chaîne primaire s'enroule sur elle-même puis est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupes NH et CO, à tous les quatre acides aminés environ.

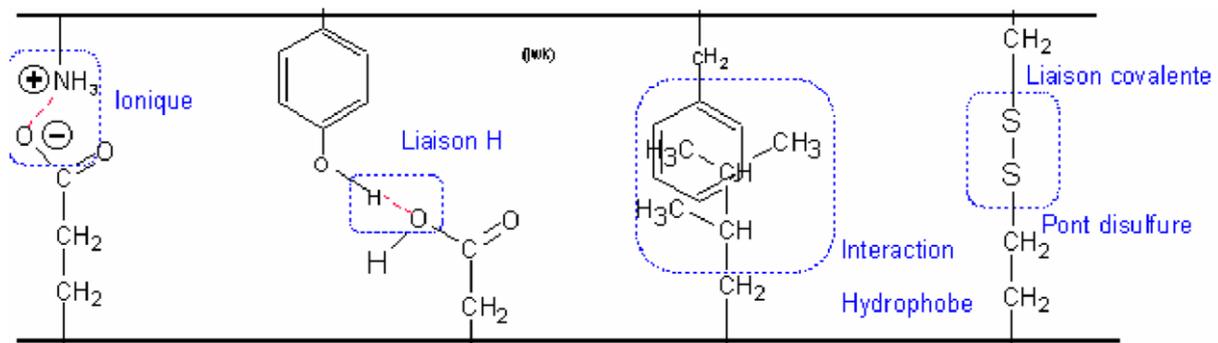


Le feuillet plissé bêta (β) est une autre structure secondaire, où les chaînes polypeptidiques primaires ne s'enroulent pas mais se lient côte à côte au moyen de liaisons hydrogène et forment une sorte d'échelle pliante.

Dans ce type de structure secondaire, les liaisons hydrogène peuvent unir différentes parties d'une même chaîne qui s'est repliée sur elle-même en accordéon ou encore différentes chaînes polypeptidiques.



Dans les hélices alpha, les liaisons hydrogène unissent toujours différentes parties d'une même chaîne. Une chaîne polypeptidique peut présenter les deux types de structure secondaire.



Liaisons secondaires interatomiques dans une protéine

2.3.2. Structures tertiaire et quaternaire

Un grand nombre de protéines possèdent une structure tertiaire, une structure très spécifique formée à partir de la structure secondaire. Dans une structure tertiaire, des régions hélicoïdales ou plissées de la chaîne polypeptidique se replient les unes sur les autres et forment une molécule en forme de boule, ou molécule globulaire. La structure tertiaire est maintenue par des liaisons (covalentes, hydrogène ...) entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

La structure quaternaire correspond à l'association spécifique de plusieurs chaînes peptidiques en une unité d'ordre supérieur seule capable d'assurer complètement les fonctions biologiques. L'hémoglobine possède une structure quaternaire.

NB. Les réactions et d'autres figures seront données pendant le cours en présentiel.

Chapitre 2. Techniques d'études des séquences des protéines.

Rappels sur le catabolisme des protéines

1. Etude de la structure primaire des protéines
2. Fragmentation des chaînes peptidiques
3. Séparation de plusieurs chaînes peptidiques
4. Exercices

Rappels sur le catabolisme des protéines (protéolyse)

Les protéines sont catabolisées en acides aminés par des enzymes protéolytiques, appelés protéases.

Ces enzymes ont une spécificité plus ou moins grande vis-à-vis de la position de la liaison peptidique dans la chaîne et / ou de la nature des acides aminés engagés dans cette liaison.

Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne,

Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques en bout de chaîne,

Les protéines sont catabolisées en acides aminés et peptides. Les enzymes protéolytiques, synthétisés par les cellules exocrines de l'appareil digestif, sous la forme de pro enzymes inactifs sont :

- sécrétés par l'estomac : la pepsine ;
- sécrétés par le pancréas : la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et des carboxypeptidases ;
- sécrétés par l'intestin grêle : des aminopeptidases.

1. Etude de la structure primaire d'une protéine :

La détermination de la structure des chaînes peptidiques met en jeu des agents chimiques et des enzymes. Pour connaître la séquence des acides aminés il faut d'abord déterminer les acides aminés N- et C- terminaux, puis l'ordre d'enchaînement des autres acides aminés.

Les tableaux 1 et 2 donnent les principales méthodes utilisées.

Tableau 1. Détermination de l'acide aminé en position N-terminale.

Méthodes chimiques	Réactions
<p>Sanger par le dinitro-fluoro benzene</p> <p>DNFB + aa → DNP-aa</p>	<p>puis hydrolyse</p> <p>+ Les autres acides aminés</p> <p>DNP Aa</p>
<p>EDMAN ou méthodes par récurrence par le phényl-isothiocyanate</p> <p>PTHo + aa → PTH-aa</p>	<p>cyclisation-libération</p> <p>phénylthiodantoine Aa</p> <p>reste de la chaîne</p>
<p>Dansyl ou chlorure de diméthyl amino 1- sulfonyl 5-naphtalène</p>	<p>Tous les autres Aa non modifiés et un 1er Dansyl-amino acide fluorescent</p> <p>PUIS HYDROLYSE</p>
<p>Méthodes enzymatiques :</p> <p>Amino-peptidase N terminal</p>	<p>-Enzyme spécifique qui hydrolyse la liaison peptidique impliquant l'acide aminé N-terminale</p> <p>ACIDE AMINÉ N-TERMINAL LIBÉRÉ LE PREMIER</p> <p>AMINOPEPTIDASE</p>

Tableau 2. Détermination de l'acide aminé en position C-terminale.

	Méthodes	Réactions
Acide aminé C-terminale	Méthodes chimiques	<p><u>Traitement par LiBH₄</u></p> <p>LiBH₄ ou NaBH₄ réduit la fonction carboxylique en fonction alcool primaire</p> $\begin{array}{ccc} \text{--- NH-CH-COOH} & \xrightarrow[\text{ET}]{\text{LiBH}_4} & \text{Rn-CH-CH}_2\text{OH} \\ & & \\ \text{Rn} & & \text{NH}_2 \end{array}$ <p>+ AUTRES ACIDES AMINÉS NON REDUITS</p>
		<p><u>Hydrazinolyse</u></p> $\text{H}_2\text{N-CH-CO} \text{---} \text{NH-CH-CO} \text{---} \text{NH-CH-COOH}$ <p style="text-align: center;"> R₁ R₂ R₃</p> <p>+ n (NH₂ - NH₂) formation d'hydrazides n-1 (H₂N-CH-CO-NH-NH₂) + l'acide aminé C-terminale libre</p>
	Méthodes enzymatiques	<p>La carboxypeptidase A : Elle coupe les liaisons C-terminales sauf celles du glycine et des acides aminés basiques à condition que le (Rn-1) ne soit pas une proline.</p> <p>La carboxypeptidase B : Elle libère les acides aminés basiques à condition que (Rn-1) ne soit pas une proline.</p>

2. Fragmentation des chaînes peptidiques

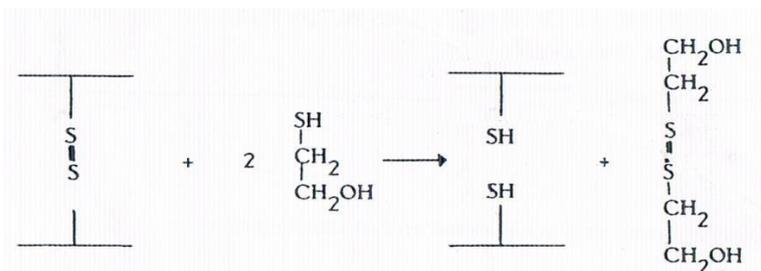
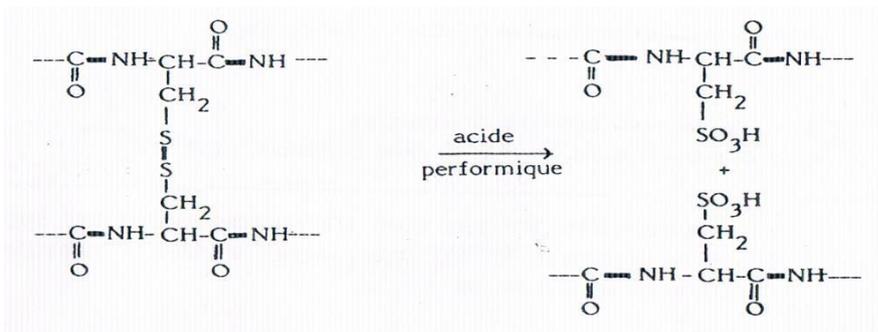
Si la chaîne peptidique est trop longue, il faut au préalable la fragmenter en chaînes plus courtes qui seront analysées séparément (tableau 3).

Tableau 3. Fragmentation des chaînes peptidique.

Enzymes	Spécificité
Chymotrypsine	Elle attaque spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le -CO- d'un acide aminé aromatique.
Coupe après Phe, Tyr, Trp.	$\text{--- NH-CH-CO} \begin{array}{c} \updownarrow \\ \text{---} \end{array} \text{NH-CH-CO ---}$ $\begin{array}{c} \\ R_1 \end{array} \qquad \begin{array}{c} \\ R_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$R_1 = \text{Phe, Tyr, Trp}$</p>
Pepsine	Spécificité plus faible, elle coupe la liaison peptidique impliquant le -NH- d'un acide aminé aromatique.
	$\text{--- NH-CH-CO} \begin{array}{c} \updownarrow \\ \text{---} \end{array} \text{NH-CH-CO ---}$ $\begin{array}{c} \\ R_1 \end{array} \qquad \begin{array}{c} \\ R_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$R_2 = \text{Phe, Tyr, Trp}$</p>
BrCN	Coupe la liaison peptidique impliquant le -CO- d'une Met et transforme le résidu Met en HSL (homosérine lactone).

3. Séparation de plusieurs chaînes peptidiques

Fréquemment les chaînes peptidiques sont unies entre elles par des points disulfures. Les liaisons disulfures sont scindées par des agents oxydants.



On utilise aussi des agents réducteurs tels que le β mercaptoéthano

4. Exercices sur l'étude de la séquence des protéines

1/ On désire déterminer la séquence d'un décapeptide dont la composition est la suivante : Asp ; Val ; Gly 2 ; Tyr ; Ile ; Cys ; Arg ; Leu ; Ala. La méthode d'Edman donne Gly, puis Leu et ensuite un acide aminé soufré. La carboxypeptidase libère Ala. L'hydrolyse trypsique donne un tétrapeptide basique et un hexapeptide. La chymotrypsine hydrolyse de l'hexapeptide et donne un dipeptide qui possède un acide aminé à 2 carbones asymétriques et un tétrapeptide donnant un DNP-acide aminé acide par la méthode de Sanger puis DNP-Val. Donner la séquence de ce peptide.

Réponse :

2/ L'analyse en acides aminés d'un oligopeptide formé de 7 acides aminés donne : Asp ; Leu ; Lys ; Met₂ ; Phe ; Tyr. Le traitement avec la trypsine n'a aucun effet apparent. La dégradation Edman donne Phe. Un traitement avec la chymotrypsine donne un acide aminé libre, un dipeptide et un tétrapeptide. La composition en acides aminés du tétrapeptide est Leu, Lys et Met₂. Le bromure de cyanogène donne un tétrapeptide, un dipeptide, une lysine. Donner la séquence de l'oligopeptide.

Réponse :

Chapitre 3. Techniques de purification des protéines.

Techniques fondamentales utilisées pour étudier les protéines

1. Introduction et généralités sur la chromatographie
2. Chromatographie par filtration sur gel
3. Chromatographie par échange d'ions
4. Chromatographie par interactions hydrophobes
5. Chromatographie par affinité
6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)
7. Dosage global des protéines

Techniques fondamentales utilisées pour étudier les protéines.

1. Introduction et généralités sur la chromatographie

Le terme chromatographie désigne un ensemble de techniques de séparation qui reposent sur l'affinité différentielle des molécules d'un mélange pour une phase stationnaire ou matrice, solide et une phase mobile, liquide ou gazeuse.

Dans le cas des protéines, le mélange est déposé au sommet de la phase stationnaire contenue dans une colonne. La phase mobile, un éluant, traverse la phase stationnaire et entraîne progressivement les molécules vers le bas de la colonne où l'effluent est collecté en différentes fractions qui sont ensuite analysées.

Selon le type de matrice, les molécules de protéines sont retenues et retardées par la colonne en fonction de paramètres physico-chimiques variés : taille, charge électrique, hydrophobicité de la surface ou affinité pour des ligands déterminés.

Cette technique chromatographique est également nommée chromatographie par exclusion ou chromatographie par tamisage moléculaire.

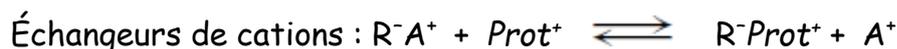
Dans cette technique, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne de gel constitué de billes de porosité définie. Ces billes sont constituées de dextran (polymère de glucose), d'agarose (polymère de dérivés du galactose) de Séphadex LH20, ou de polyacrylamide.

2. Chromatographie par filtration sur gel

Les molécules de petite taille (petites protéines et polypeptides) pénètrent dans les billes et sont donc retardées, alors que les molécules de taille supérieure à celle des pores ne pénètrent pas dans les billes et traversent donc plus rapidement la colonne. Les gels utilisés : Gel de Séphadex LH20.

3. Chromatographie par échange d'ions

Dans cette chromatographie, la matrice (cellulose, polystyrène, agarose, dextrane) contient des groupes ionisés qui fixent des ions de charge opposée (A^+ , B^-) présents dans la solution ; ces ions pourront être échangés avec des protéines. On distingue les échangeurs d'anions (matrice R chargée positivement) et les échangeurs de cations (matrice chargée négativement) :



Les protéines se fixent à la matrice en fonction de leur affinité pour les groupes ionisés.

La colonne est ensuite lavée avec un tampon (tampon d'élution), qui entraîne en premier lieu les protéines les plus faiblement liées à l'échangeur. Les protéines les plus fortement liées seront libérées en dernier ou resteront fixées sur la

matrice. On réussit en général à libérer l'ensemble des protéines fixées en faisant varier le pH du tampon d'élution ou en augmentant progressivement sa force ionique.

4. Chromatographie par interactions hydrophobes

Cette méthode met à profit l'existence de zones hydrophobes discrètes à la surface des protéines. La matrice contenue dans la colonne contient des groupes apolaires (groupes phényle ou méthyle $-CH_3$) qui peuvent retenir les protéines en s'associant à leurs régions hydrophobes.

Cette interaction est d'autant plus forte que la force ionique est élevée. Aussi, et à l'inverse de la chromatographie d'échange d'ions, la colonne hydrophobe est éluée par un tampon de force ionique décroissante, ce qui a pour effet d'affaiblir progressivement l'interaction hydrophobe entre les protéines et la matrice.

En principe, les protéines contenant peu de zones hydrophobes à leur périphérie sont éluées en premier, les protéines les plus hydrophobes sont éluées en dernier.

5. Chromatographie par affinité

Dans cette technique, les protéines sont séparées en fonction de leur affinité pour un groupement (analogue de substrat, anticorps spécifique, lectine, etc.) greffé sur la matrice. La protéine d'intérêt est éluée de la colonne par déplacement avec un analogue de la structure ou molécule reconnue par le groupement lié.

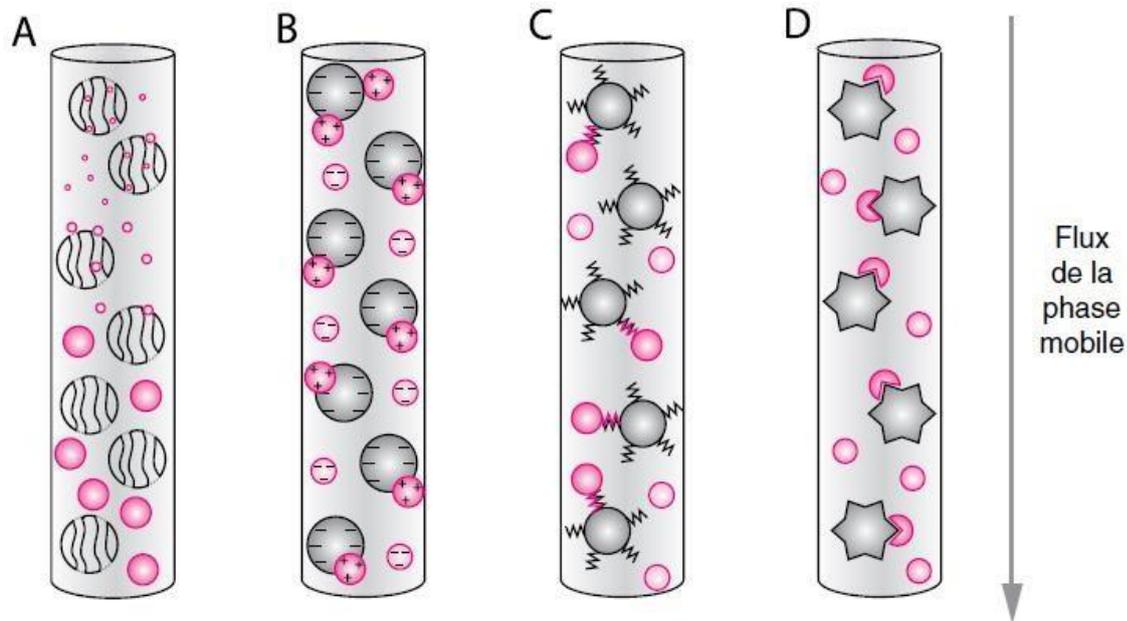


Figure 1. Différents types de chromatographie.

- (A) **Chromatographie par filtration sur gel.** Les protéines (disques roses) de taille supérieure au diamètre des pores ne sont pas retardées par la matrice (disques gris).
- (B) **Chromatographie par échange d'ions.** Les protéines (disques roses) chargées positivement sont retenues par la matrice (disques gris) chargée négativement.
- (C) **Chromatographie par interactions hydrophobes.** Les protéines (disques roses) les plus hydrophobes sont retenues par la matrice (disques gris), elle-même hydrophobe.
- (D) **Chromatographie par affinité.** Les protéines (disques roses) les plus affines sont retenues par la matrice (disques gris) sur laquelle est greffé le ligand spécifique de la protéine d'intérêt.

6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'HPLC est une méthode de séparation des molécules au sein d'un mélange complexe. Elle repose sur un phénomène de rétention dépendant d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Le système est composé :

1. d'un réservoir de phase mobile (solvant) également appelé « éluant » qui va entraîner l'échantillon à analyser dans le système. Plusieurs éluants peuvent être utilisés pour réaliser des gradients d'éluant.
2. d'une pompe permettant de travailler en mode isocratique avec 100% de la même phase mobile injecté tout au long de l'analyse ou en mode gradient avec des variations de concentrations des éluants. Le débit de cette pompe est de l'ordre de quelques μL à plusieurs mL/min.
3. d'une vanne d'injection qui permet d'injecter toujours le même volume d'échantillon. Son volume varie en fonction de la colonne et de la concentration supposée des composés à analyser.
4. d'une colonne inerte en inox ou en verre contenant la phase stationnaire.
5. d'un détecteur (type spectrophotomètre UV-V) qui détecte les molécules
6. d'un enregistreur qui enregistre les chromatogrammes.
7. Un réservoir de récupération.

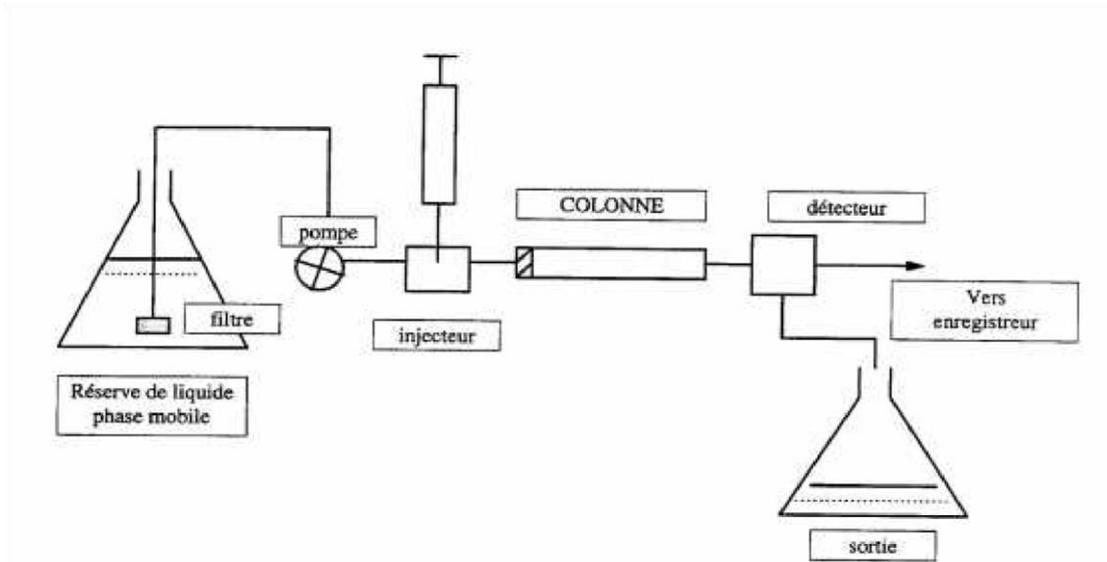


Figure 2 : Schéma des différents composants d'une HPLC.

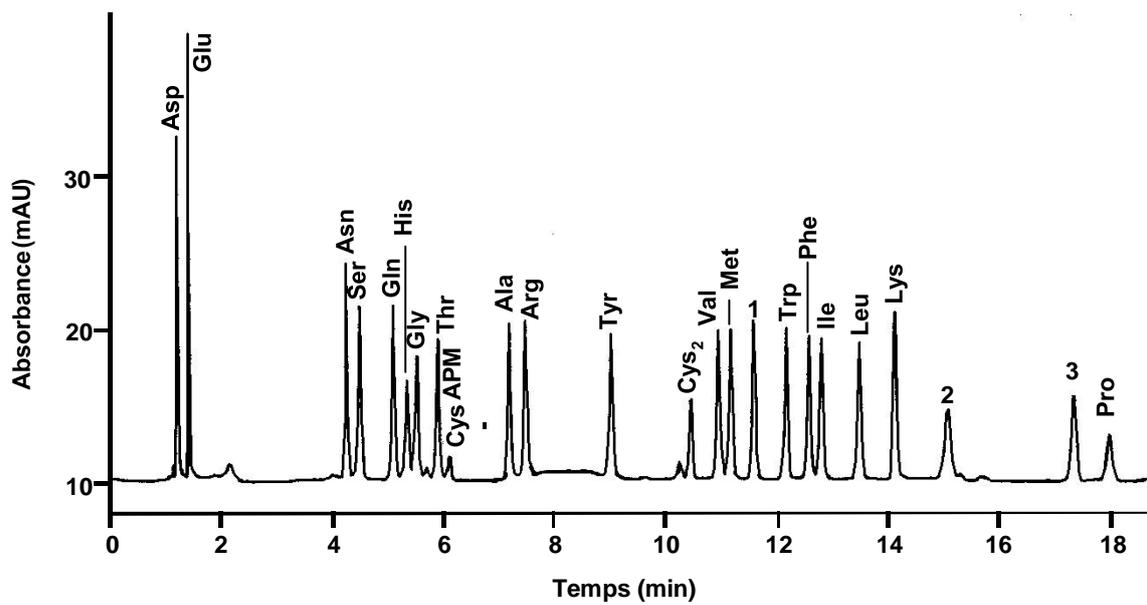


Figure 3 : Un chromatogramme d'acides aminés constitutifs d'une protéine.

7 ; Dosage global des protéines

Spectrophotométrie UV à 280nm : La spectrophotométrie n'est utile que pour les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) mais d'autres substances peuvent absorber à 280nm.

Réaction du biuret : Les protéines sont placées en milieu alcalin Cu^{2+} formant un complexe violet proportionnel à la quantité de protéines. C'est en fait les liaisons peptidiques qui sont dosées dans cette technique.

Technique de Lowry : La technique de Lowry, très sensible, ne dose que la tyrosine.

Colorations spécifiques :

- La coloration dénature les protéines.
 - Divers colorants comme le noir amide, le bleu de Bromophénol, le rouge ponceau, le bleu de Coomassie se fixent aux protéines.
 - Généralement la coloration est effectuée pour révéler les résultats d'une électrophorèse.
-

Chapitre 4. L'électrophorèse des protéines et des acides aminés : l'essentiel

Introduction et généralités :

1. Principe :
2. Electrophorèse sur papier
3. Electrophorèse sur gel SDS -PAGE.
4. L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel (2DPAGE)

Introduction et généralités

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique.

Les molécules se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge nette z , à une vitesse v proportionnelle à cette charge.

Cette technique permet, entre autre, de :

- déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective
- d'évaluer le degré de purification d'une protéine
- de séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps)
- de séparer des protéines sur des gels bi-dimensionnels (technique de départ en protéomique), selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation) puis masse molaire.

Applications principales : biochimie et biologie moléculaire. Séparation des protéines et des acides nucléiques

1.Principe :

Le principe repose sur la migration de molécules chargées (perte de neutralité électrique) dissoutes ou en suspension dans un solvant, sous l'effet d'un champ électrique

- Champ électrique : générateur de courant continu
- Support du champ : tampon conduisant le courant d'un pôle à l'autre

En fonction des caractéristiques propres des molécules et des conditions d'électrophorèse la vitesse de migration est différente pour les molécules chargées et permet leur séparation les unes des autres.

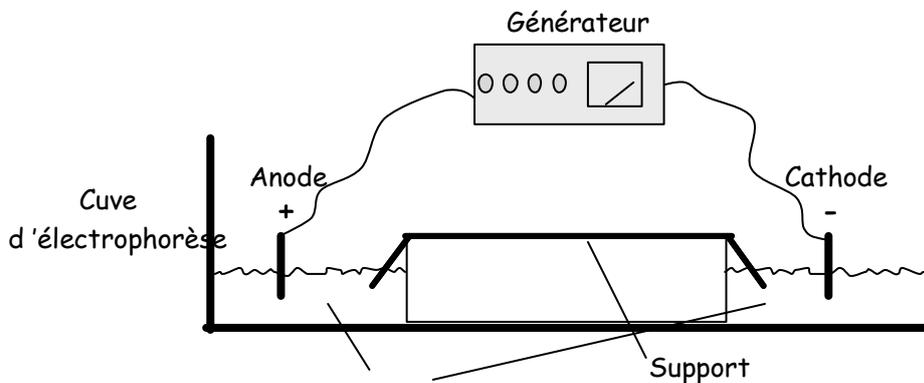
Cation : chargé +. Attiré lors de l'électrolyse par la cathode (ou électrode négative)

Anion : chargé -. Attiré lors de l'électrolyse par l'anode (ou électrode positive)

3. Electrophorèse sur papier

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.



Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

La migration des molécules principalement en fonction de la charge globale, et en conditions non dénaturantes. Cette technique permet de :

- Séparation des petites molécules (acides aminés ou petits peptides)
- coloration des protéines (rouge Ponceau)
- analyse densité optique des bandes
- Intensité coloration proportionnelle concentration protéines ou acides aminés.

3. Electrophorèse sur gel : SDS-PAGE.

Les électrophorèses sont réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée) SDS-PAGE.

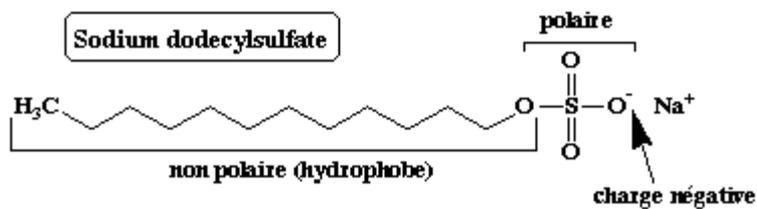
("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE)

Principe :

On fait bouillir un mélange de protéines en présence :

- d'un agent réducteur : le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.

- d'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques.



E. Jaspard (2006)

En conséquence :

- les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native
- les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme monomérique (structure primaire)

Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

C'est un gel, obtenu par polymérisation :

- d'acrylamide qui forme des chaînes
- et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide

Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. En conséquence : plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer.

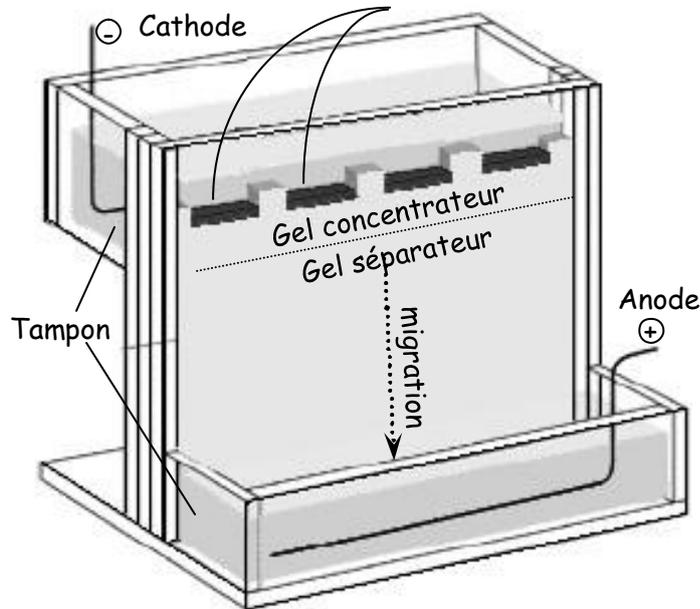
Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques.

Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits. La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes allant de 20 μ L à 200 μ L d'échantillon de protéines à séparer.

Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse.

Du tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique.

Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits.



La séparation des molécules s'effectue selon leur ratio charge / masse moléculaire.

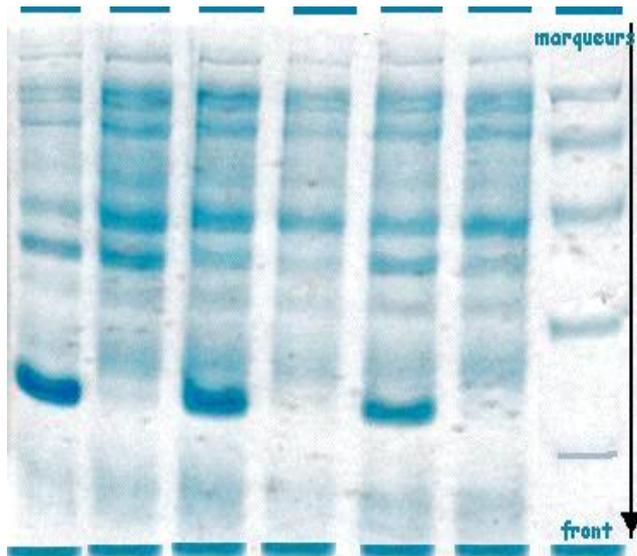
Elle est fonction également de la taille des pores et de la concentration du gel.

Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique.

Les protéines sont révélées par une coloration avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible).

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration).

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).



Exemple de marqueurs : myosine (205 kDa) - β galactosidase (116 kDa) - albumine (66 kDa). - ovalbumine (45kDa)

4. L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel (-2DPAGE)

a. Principe

La stratégie la plus courante est de séparer dans un premier temps les protéines par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (ou 2D - PAGE - "two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis").

En effet, du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur masse molaire et leur charge nette à un pH donné. Cette valeur est caractérisée par le point isoélectrique ou pI.

Les protéines ont :

- des pI qui s'échelonnent de 2 (glucose-1-phospho-D-mannosylglycoprotéine phosphodiesterase) à 12 (cathepsine G)
- des masses molaires de 5 kDa à 590 kDa (calossine - 5322 acides aminés !)

L'une des difficultés majeures de la séparation est de trouver des conditions d'électrophorèse qui couvrent de telles gammes de propriétés physico-chimiques. La séparation se fait en deux temps.

1ère dimension : une isoélectrofocalisation (IEF) où les polypeptides migrent jusqu'à un pH égal à leur pI. La séparation selon la charge utilisait auparavant des ampholytes pour obtenir un gradient de pH.

On utilise aussi des gradients de pH immobilisés (IPG), formés avec des immobilines.

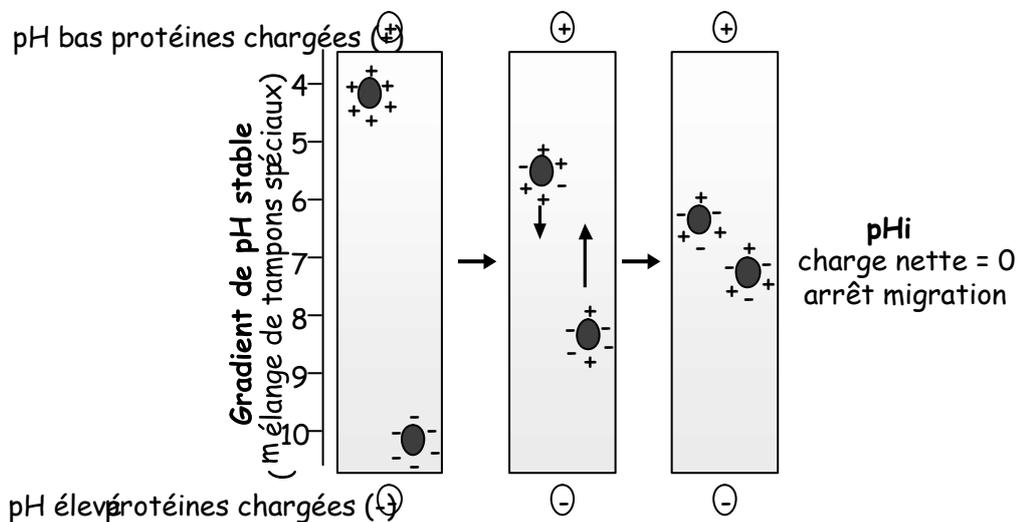
2ème dimension : une séparation selon la masse molaire est un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (sodium dodécyl sulfate ou SDS et réduction des ponts disulfure).

Ces deux électrophorèses sont effectuées de manière perpendiculaire l'une par rapport à l'autre.

b. Les méthodes de révélation des protéines :

Coloration des gels pour la révélation des protéines au Bleu de coomassie ou nitrate d'argent :

Première dimension :

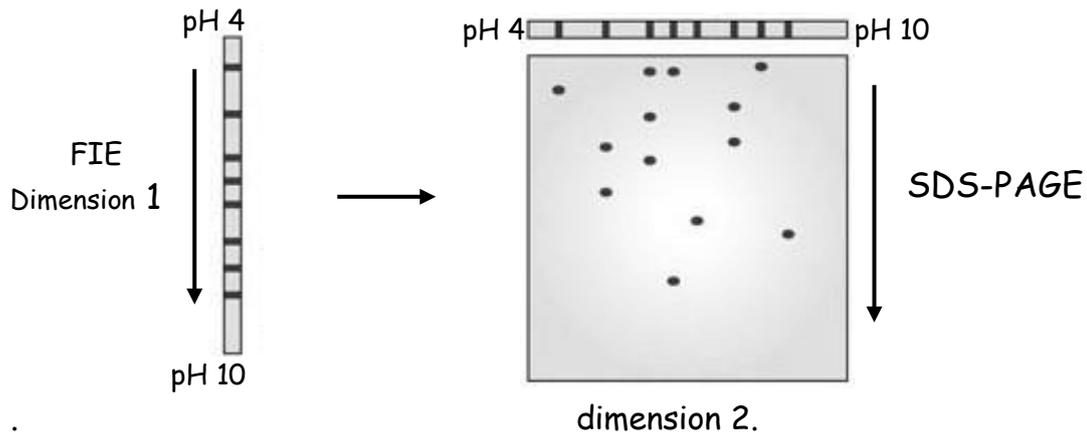


Les protéines migrent vers la position du gradient = pHi et s'y immobilisent

Dimension 2

Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE

Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction perpendiculaire.



Applications : "Blotting ou effet buvard. C'est la réalisation d'une réplique exacte de gels sur des membranes, suivie d'une détection spécifique

Analyse d'ADN (**Southern Blot**), d'ARN (**Northern Blot**) et de protéines (**Western Blot**)

- **Séparation** ADN, ARN ou protéines par **électrophorèse**
- **Transfert** : réplique du gel sur une membrane
- **Révélation** des molécules d'intérêt
- **Quantification** des molécules d'intérêt

- membranes de transfert : **Nitrocellulose : la plus utilisée**

WESTERN BLOT : Détection spécifique d'espèces protéiques rares

Le *western blot* (également appelé transfert de protéines ou buvardage de western ou encore technique des immuno-empreintes), est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique (sérum ou autre extrait ou homogénat tissulaire) à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter. Le western blot permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe. C'est l'une des techniques analytiques de transfert sur membrane utilisées en biochimie et en biologie moléculaire.

Elle est parfois utilisée comme un outil de diagnostic complémentaire pour mettre en évidence une protéine particulière (protéine virale, par exemple) dans le sérum d'un patient.

Chapitre 5. Spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines.

Introduction et généralités :

1. La détection par spectrométrie de masse SM.
2. Structure d'un spectromètre de masse. SM
3. Principe d'un spectromètre de masse.
4. Les différents composants du spectromètre de masse SM.
5. Utilisation
6. Exemple d'un spectre de masse
7. Exercices.

Introduction et généralités :

Les protéines constituent avec les polysaccharides et les acides nucléiques une des trois classes de biopolymères intervenant dans la structure et dans le fonctionnement de tous les organismes vivants.

L'hydrolyse totale des protéines conduit aux acides aminés qui les caractérisent. Parmi les acides aminés isolés du règne vivant, une vingtaine seulement sont des constituants des protéines natives. Huit sont nécessaires à l'espèce humaine car nos cellules ne peuvent les synthétiser (Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, Isl). Ils sont essentiels et doivent être présents dans l'alimentation ; les douze autres acides aminés sont synthétisés dans les cellules à partir de substances plus simples contenant carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre.

1. La détection par spectrométrie de masse SM.

La spectrométrie de masse est une technique physique **d'analyse** permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine... le temps de détection est très rapide.

La spectrométrie de masse est d'abord une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules.

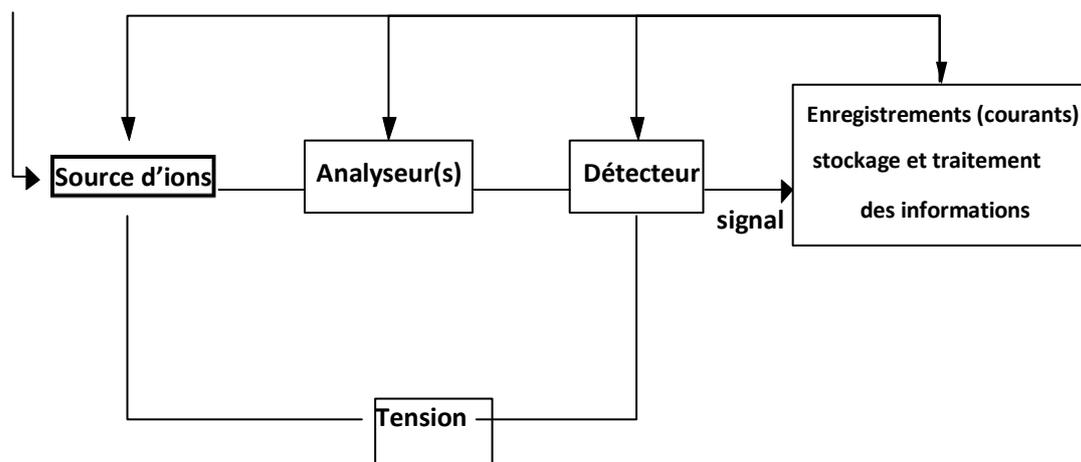
2. Structure d'un spectromètre de masse. SM

Le spectromètre de masse, comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z , où m représente la masse et z la valence (ou m/q , q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Les différents composants d'un spectromètre de masse. SM.

Echantillon



3. Principe d'un spectromètre de masse.

Fondamentalement, un spectromètre de masse contient 5 parties :

- Introduction de l'échantillon
- une source de production d'ions,
- un système analyseur des rapports masse sur charge (m/z),

- un détecteur,
- Un système de traitement, stockage de données (microinformatique) est associé au spectromètre pour gérer les signaux résultants de l'analyse et imposer un rétrocontrôle de l'appareil.

4. Les différents composants du spectromètre de masse SM.

Le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...).

La source d'ionisation : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe plusieurs sources d'ionisation, nous ne citerons que quelques sources d'ionisations.

- L'ionisation électronique (EI),
- l'ionisation chimique (CI)
- Le bombardement par atomes rapides (FAB),
- Electrospray ionisation ESI ou L'électronébulisation.

L'analyseur : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Il comporte un système comprenant un secteur magnétique couplé à un secteur électrique qui permet de terminer le temps de vol (TOF), de chaque ion.

Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Le détecteur et système de traitement : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

5. Utilisation

Un spectromètre de masse permet de réaliser les fonctions suivantes :

Identification des molécules : un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec le contenu de banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Analyse structurale : Les ions moléculaires peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse : dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. Comme les fragmentations respectent des lois précises, l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des molécules ionisées.

Quantification : Un spectromètre de masse possède un détecteur très sensible permettant de faire une quantification fiable des molécules ionisées. (Densité optique ou Intensité relative).

La source d'ionisation

Les ionisations EI et CI, qui nécessitent un certain niveau de vide, sont préférentiellement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (la CI fonctionnant à partir d'une source EI). En revanche, les deux sources à pression atmosphérique (electrospray et APCI) dites à « ionisation douce », sont principalement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide.

L'ionisation électronique (EI)

Source d'ionisation électronique. Des électrons émis par un filament rencontrent les molécules qui entrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule M , la transformant en un ion radical M^{\bullet} . Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'EI conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

L'ionisation chimique (CI)

Source d'ionisation chimique. En plus du dispositif EI ci-dessus, un gaz réactif est introduit dans la source et ionisé par impact électronique. S'ensuit une série de réactions qui donne naissance à des ions pouvant réagir avec les molécules

d'analyte arrivant dans la source. Ce type de réactions ions-molécules produit principalement (en mode positif) des ions $[MH]^+$, et $[M+\text{adduit}+H]^+$, permettant ainsi d'accéder à la masse moléculaire de la molécule à analyser. Le [méthane](#), l'[isobutane](#) et l'[ammoniac](#) sont parmi les gaz d'ionisation chimique les plus utilisés.

L'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB).

Elle permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'ionisation est effectuée par expulsion en phase vapeur des ions contenus dans un échantillon liquide à la suite d'un bombardement d'atomes rapides (Ar ou Xe). Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable et la masse moléculaire est facile à déterminer.

Electrospray ionisation (ESI) ou électronébulisation

C'est une ionisation douce. Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé.

Sous l'effet du champ électrique et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation.

Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant.

En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

L'analyseur

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions.

- Ils permettent la dispersion des ions, grâce aux instruments à secteur magnétique ou électrique
- Ils permettent la séparation des ions, en fonction de la masse moléculaire et le temps de vol ou Time Of Flight (TOF) lié avec la vitesse de vol.
- Ils permettent la transmission des ions traversant un champ magnétique ou électrodynamique ;

L'analyseur à temps de vol consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol.

L'analyseur à secteur magnétique

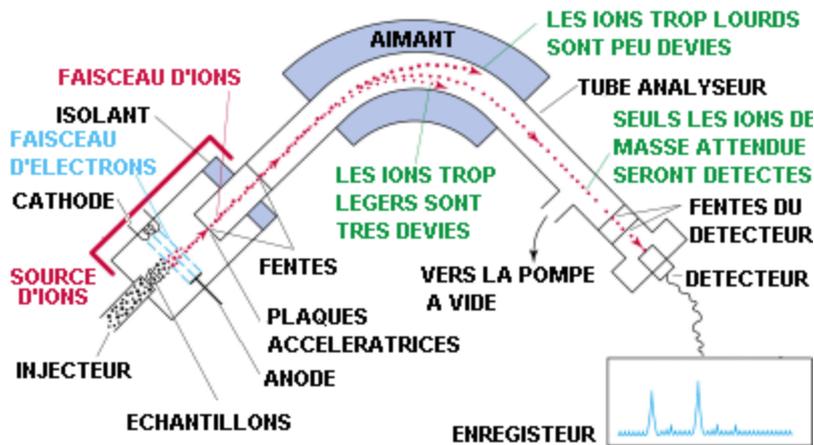


Schéma de la structure d'un spectromètre de masse.

Le détecteur

Comme les analyseurs et les sources d'ionisation, il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions.

Les détecteurs sont des compteurs et amplificateurs signaux des ions, ils permettent de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Ils fournissent des informations sur le temps d'arrivée des ions au détecteur et leur intensité.

Le système informatique :

C'est au système informatique qui détermine la masse sur charge (m/z) en fonction du temps d'arrivée au détecteur et les paramètres de l'analyseur.

6. Exemple d'un spectre de masse d'une protéine x.

Il faut d'abord connaître la masse molaire de chaque élément du tableau des éléments périodiques. Tableau de Mendeliev

La masse monoisotopique, la masse atomique, masse du résidu d'acide aminé.

Les acides aminés sont composés essentiellement de :

Carbone : C	Hydrogène : H	Oxygène : O
Azote : N	Phosphore : P	Souffre : S .
Sodium : Na⁺	Potassium : K⁺	Ion Ammonium NH₄⁺

A chacun de ces éléments correspond une masse atomique.

Connaissant la formule brute d'une molécule, on peut donc calculer la masse chimique.

Par exemple, l'alanine ($\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}\text{NH}_2$), soit $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$

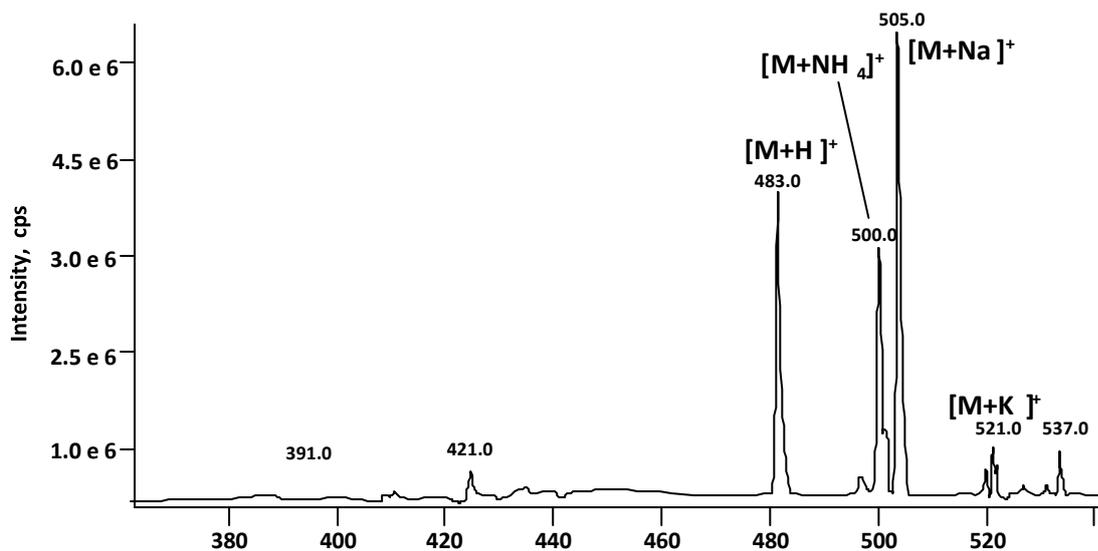
$$= (3 \times 12,01115) + (7 \times 1,00797) + (1 \times 14,0067) + (2 \times 15,9994)$$

$$= 89,09474 \text{ Da}$$

L'unité de masse (u) est appelée dalton (Da) pour une masse chimique.

Elle est définie comme 1/12 de la masse d'un atome de carbone 12 :

$$1\text{u} = 1\text{Da} = 1,660540 \times 10^{-27} \text{ kg}$$



Spectre de masse en mode positif M+H⁺ (M=482).

- *Le pic à m/z=505 (M+23) correspond à l'ion adduit [M+Na]⁺.*

- La masse moléculaire est confirmée par la présence d'un adduit $[M+K]^+$ à $m/z=521 (M+39)$ et
- En acidifiant la solution avec $HCOOH$, l'ion $[M+H]^+$ apparaît sur le spectre ainsi que l'ion $[M+NH_4]^+$

En mode positif, l'obtention de l'ion $[M+H]^+$ par transfert d'un proton sur la molécule de masse M sera majoritairement recherchée. Cet ion est en effet le plus facile à interpréter.

Très souvent aussi, la présence d'ions "adduits" peut être observée avec les cations de métaux alcalins (Na^+ , K^+) ou encore avec l'ion ammonium (NH_4^+).

7. Exercices :

Structure chimique des Acides aminés.

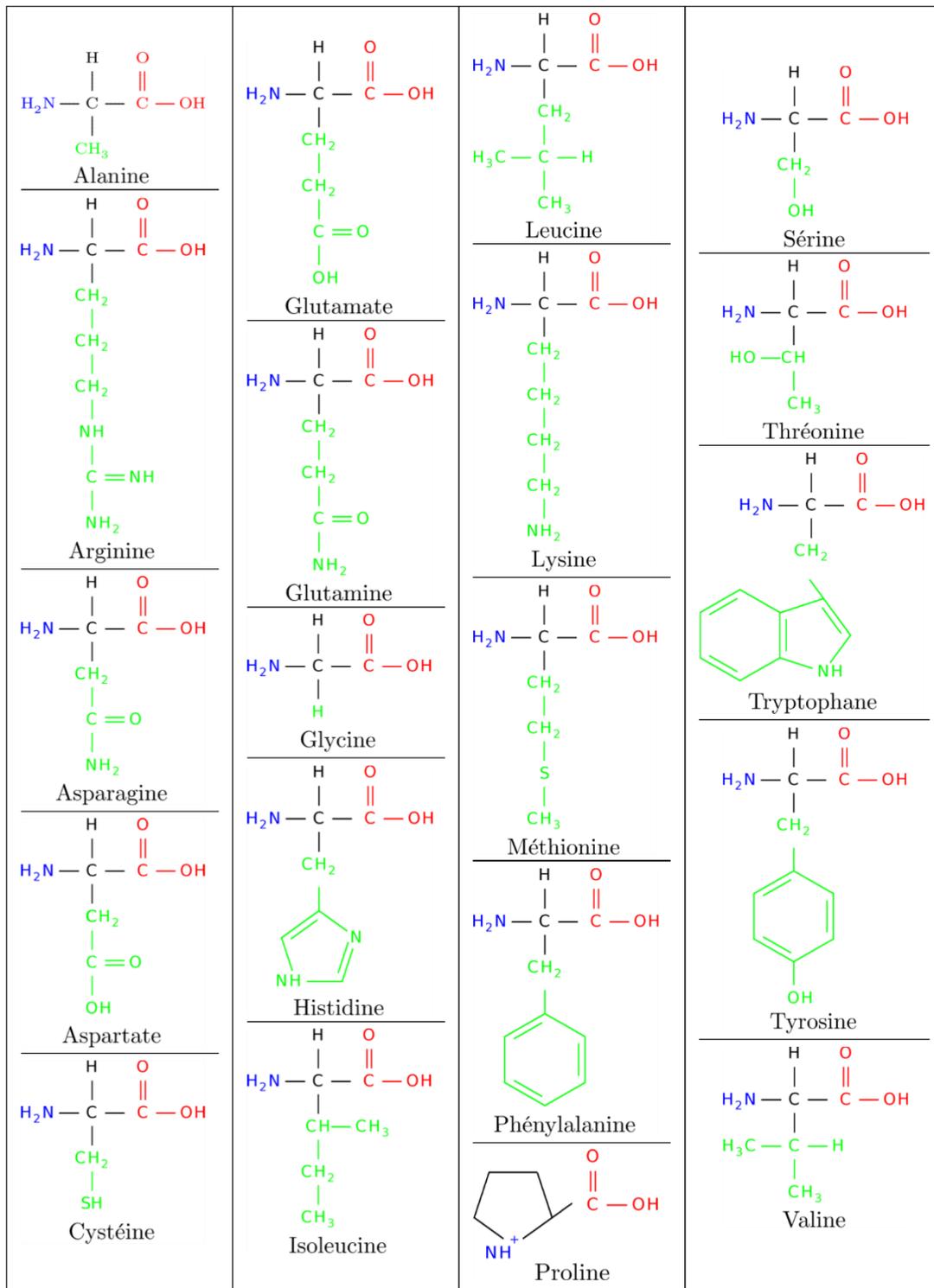


Tableau - Dénomination, code et masse monoisotopique des acides aminés.

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

Soit une protéine : Ala-gly-leu.

Donner son spectre de masse possible.

