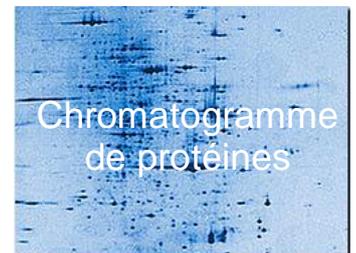


Techniques de séparation, identification et caractérisation des protéines enzymatiques

Pour observer, identifier ou comparer des protéines, plusieurs étapes sont requises :

- | Obtention de l'extrait brut (protéines intracellulaires hétérogènes)
- | Séparation sur gel 2D à partir de deux critères :
 - _ Masse moléculaire
 - _ Charge nette
- | Séquençage des peptides :
 - _ Récupération de la tache contenant la protéine
 - _ Application d'enzymes peptidases dont le mode de fonctionnement est connu (ex : la trypsine qui coupe après Lys et Arg)
 - _ Séparation des peptides obtenus (par chromatographie)
 - _ Mesure du spectre de masse de ceux-ci
- | Comparaison avec la banque de données protéique



à Autres méthodes de reconnaissance des protéines :

- q Fonctions anticorps (= spécifique d'un antigène)
- q Comigration (= migre de la même manière qu'une protéine déjà connue)
- q Microséquénçage
- q Surexpression ou inexpression du gène codant pour la protéine

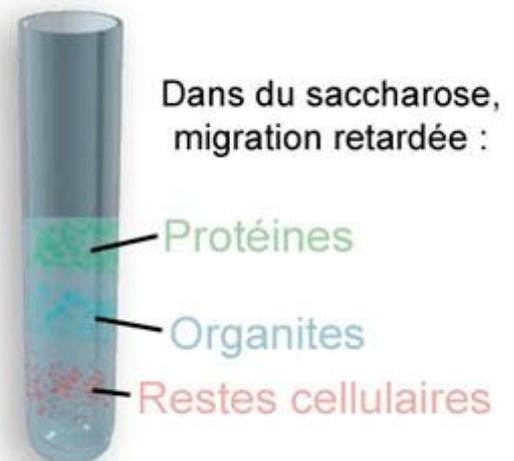
La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse des molécules, qui consiste à ioniser la molécule, puis à faire migrer ses fragments dans un champ électrique. On obtiendra alors son rapport masse/charge. Cette technique est extrêmement précise.

à Technique MALDI : Les peptides sont bombardés par des électrons, qui cassent les liaisons peptidiques et ionisent les acides aminés. On peut alors facilement les séparer grâce à un champ magnétique puis on les laissera cristalliser dans une matrice. Un laser viendra ensuite exciter cette matrice qui répondra en fonction de la présence des acides aminés.

I_ Extrait brut

L'extrait peut provenir de n'importe quel être vivant : micro-organisme, animal, plante, etc ... Dans le cas des bactéries, on pourra les cultiver.

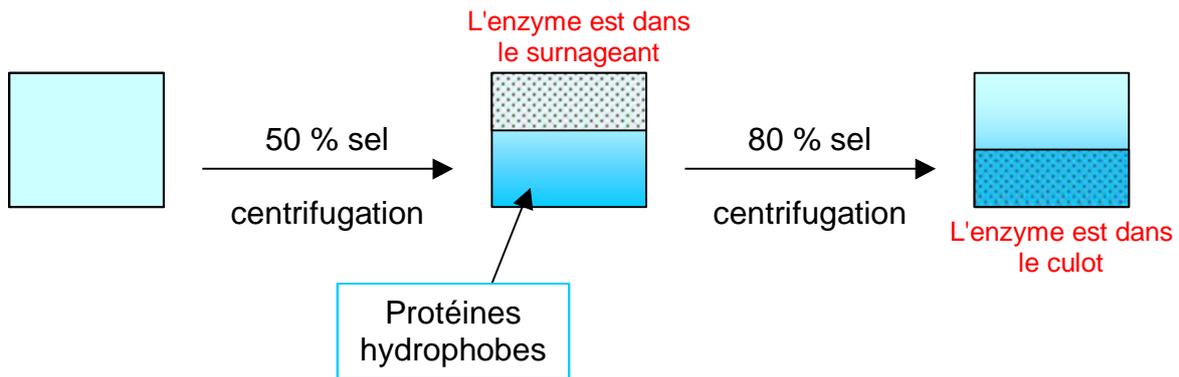
On casse la (les) membrane(s) cellulaire(s) par des méthodes physico-chimiques : ultrasons, détergent, application d'enzymes (lysozymes) ... On sépare les protéines des restes cellulaires par centrifugation.



II Purification

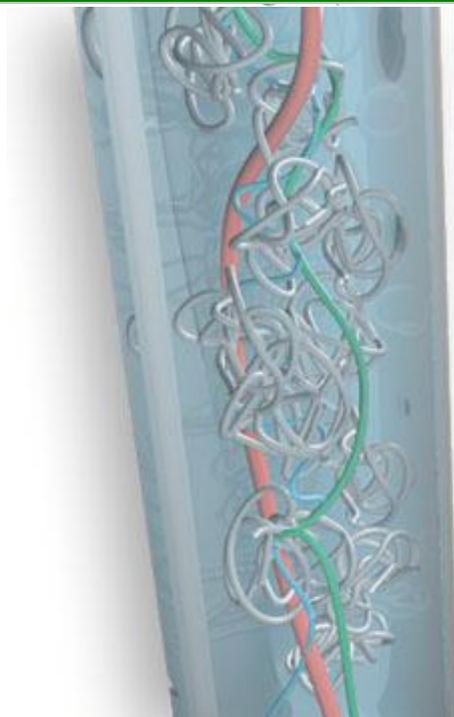
On fait précipiter des protéines dans l'eau, avec du sulfate d'ammonium. Les protéines hydrophobes vont ainsi précipiter. En augmentant peu à peu la concentration des sels, on ne garde dans le culot que les molécules ayant une hydrophobie comprise entre plusieurs valeurs.

On teste dans quel partie (le surnageant ou le culot) se trouve l'enzyme qui nous intéresse. Pour cela, on la teste avec un marqueur et on observe dans quelle partie se trouve l'enzyme. Il ne reste plus qu'à récupérer le culot contenant l'enzyme ainsi plus concentrée.



III Chromatographies

A. Filtration sur gel (en fonction des masses moléculaires)



- Grosse molécule**
 V_0 son trajet n'est pas perturbé
(volume mort)
- Notre molécule**
 V_1 son trajet est un peu perturbé
- Petite molécule**
 V_e son trajet est très perturbé
(volume d'éluion)

Cette filtration s'effectue dans des petites billes d'acrylamide et d'agarose. Un appareil va ensuite mesurer à quel moment les protéines vont arriver au bout du tube (où un collecteur va prendre chaque échantillon séparément).

En traçant une droite prenant en compte les valeurs de deux autres protéines du mélange dont la masse moléculaire est connue, on va pouvoir obtenir celle de notre enzyme recherchée.

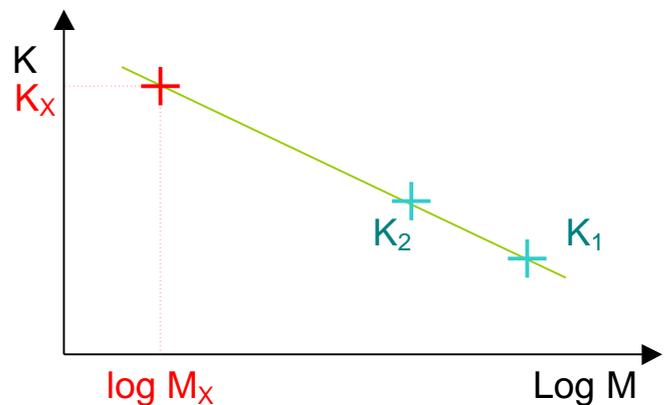
Remarque : Le gel utilisé fera varier les volumes mort et d'élution, il faudra donc en choisir un qui contiendra l'échelle de volumes des 3 protéines.

à On effectue la filtration sur gel de plusieurs composés dont on connaît la masse molaire plus la protéine dont on veut la connaître :

Substance	Masse moléculaire	Volume d'élution	Constante K_{av}
Bleu dextran	2 000 000	$V_0 = 45$ mL	
Lactoglobuline	340 000	$V_t = 132$ mL	
Fibrinogène	230 000	$V_1 = 60$ mL	$K_1 = 0,17$
Catalase	19 000	$V_2 = 73$ mL	$K_2 = 0,32$
Protéine X	?	$V_X = 113$ mL	$K_X = 0,78$

$$\text{Où } K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

On trace alors la droite $K_{av} = f(\log M)$, qui nous permet alors d'obtenir la masse molaire de X. Ici, $M_X = 50\,000$ Da.

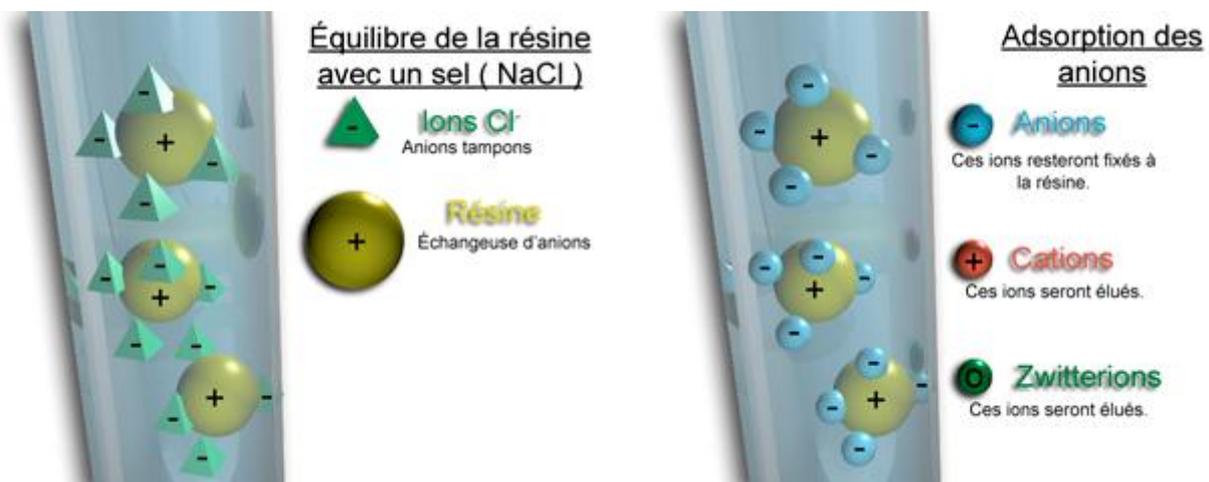


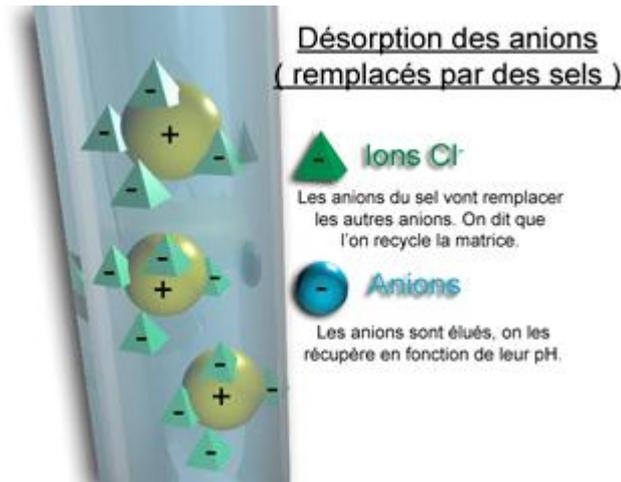
B. Échange d'ions (en fonction des charges nettes)

Il existe deux types de matrice :

- q Échangeuses d'anions qui fixent les anions, telle que la DEAE-cellulose
- q Échangeuses de cations qui fixent les cations, comme la CM-cellulose.

I Mécanisme :





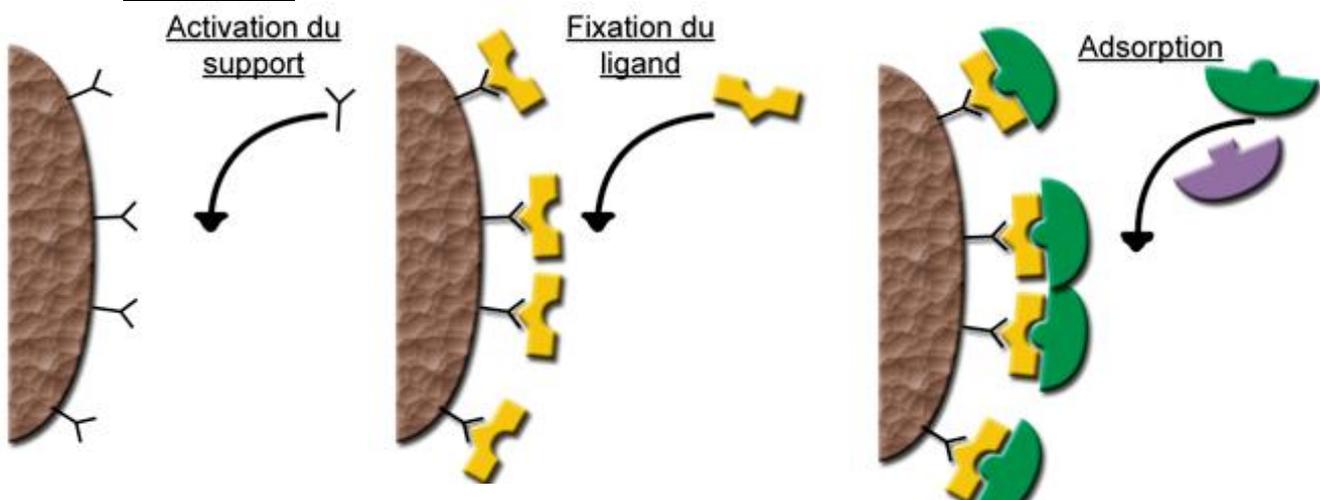
Remarques : _ Pour que l'échangeur d'ions soit porteur de charges, il faut bien choisir le pH (acide pour une charge négative et inversement)

_ En fonction de la concentration de sel donnée pendant la désorption, on peut tour à tour récupérer les différents anions fixés en fonction de leur charge nette. On peut aussi les séparer en faisant varier le pH.

C. Chromatographie d'affinité (en fonction de la biospécificité)

Cette chromatographie peut par exemple exploiter la reconnaissance anticorps/antigène.

I Mécanisme :



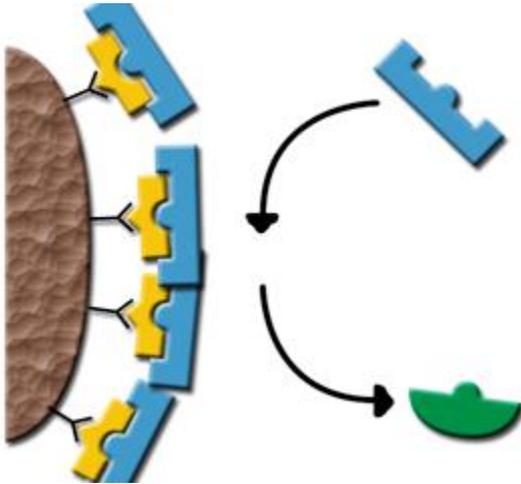
à Désorption :

q Non spécifique :
Modification de la forme Puis retransformation de la protéine

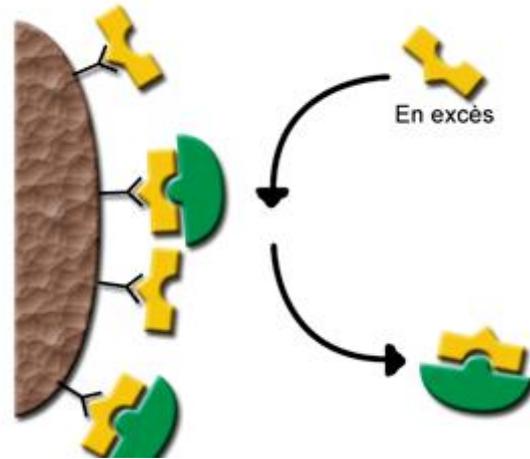


q Spécifique :

_ Insertion d'un compétiteur



_ Insertion du ligand en excès



Remarque : La protéine étant une molécule volumineuse, pour qu'elle ait plus de chances de s'accrocher au ligand, on associe à l'anticorps une chaîne carbonée qui va donner une certaine liberté de mouvement au ligand pour s'accrocher à la protéine



IV Bilan de la purification

	Masse protéique (mg)	Activité enzymatique (UE)	Activité spécifique (UE.mg ⁻¹)	Rendement (%)	Degré de purification (fois)
Extrait brut	2 000	10 000	5	100	1
Augmentation de la concentration	800	8 000	10	80	2
Séparation sur les masses	200	7 000	35	70	7
Séparation sur les charges	40	6 000	150	60	30
Séparation sur l'affinité	5	5 000	1 000	50	200

- à Pour mesurer la masse protéique, on effectue un dosage (de Biuret par exemple)
- à On peut aussi mesurer par dosage (du substrat, des produits ...) l'activité enzymatique
- à Activité spécifique = activité enzymatique / masse protéique
- à Le rendement symbolise la quantité de la protéine qui nous intéresse par rapport à l'extrait de départ
- à Le degré de purification donne le nombre de fois que l'extrait est plus pur par rapport à l'original

V Vérification de la pureté de la protéine

A. Taille moléculaire

On vérifie sa taille moléculaire par une électrophorèse en présence de SDS-page. Celui-ci est un détergeant anionique, qui va rendre toutes les molécules sous la même forme ionique ; elles ne vont alors migrer qu'en fonction de leur taille. Le détergeant peut parfois séparer les sous-unités protéiques.

À une certaine distance de migration correspond alors une certaine masse molaire. Cette méthode est malheureusement peu sensible, il faut une forte concentration de protéines pour obtenir un résultat correct. De plus, la résolution est très mauvaise, les taches sont parfois trop proches pour être différenciées.

B. Charge nette

On effectue une électrofocalisation, qui correspond à une électrophorèse avec un gradient de pH préétabli sur le gel. Ainsi les molécules vont migrer et s'arrêter là où le pH correspond à leur pK_A , puisqu'elles vont y perdre leurs charges.

À une certaine distance de migration correspond un certain pK_A . Cette méthode est très sensible et offre une excellente résolution.

C. Séquence en acides aminés

I Préparation :

On détruit la structure tertiaire de la protéine afin d'obtenir une séquence plus ou moins linéaire. Pour ce faire, on détruit les ponts disulfures et on sépare les sous-unités grâce à un réducteur.

I Détermination des différents acides aminés constitutifs :

On effectue une hydrolyse acide (HCl pendant 24 h), ce qui a pour effet de séparer les acides aminés, mais aussi de détruire les Trp et d'effacer les différences entre Asp et Asn et Glu et Gln.

I Séquençage :

Par l'intermédiaire d'endopeptidases, on crée des fragments de la protéine :

- q Trypsine : coupe après Lys et Arg
- q Chymotrypsine : coupe après Phe, Tyr et Trp
- q Bromure de cyanogène : coupe après Met

On effectue ensuite la réaction d'Edman, qui identifie successivement depuis la partie N-ter les différents acides aminés. Ils sont tour à tour substitués sur une molécule de PITC que l'on ajoute petit à petit.

VI Propriétés cinétiques des enzymes

A. Cinétique Michaelienne

Soit la réaction :



à dans les conditions de Michaelis, c'est-à-dire :

- aux conditions initiales ($P = 0$)
- $[S] \gg [E]_0$ (où $[E]_0 = [E] + [ES]$), de manière à ce que $k_{-2} = 0$

On applique l'AEQS : ES est un intermédiaire réactionnel, alors :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \Rightarrow k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

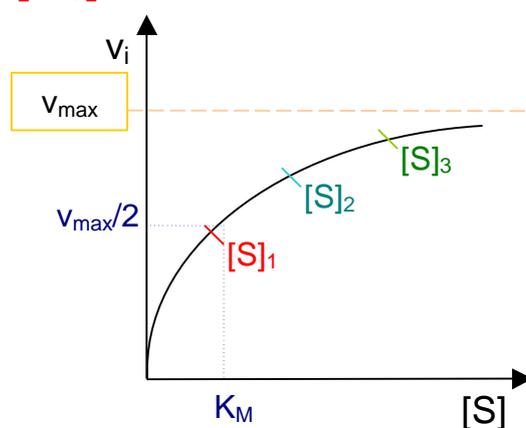
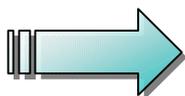
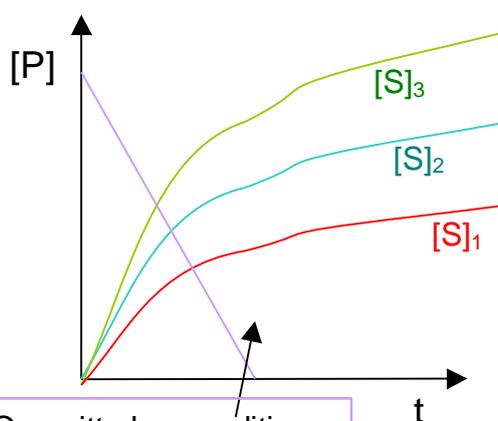
$$\Leftrightarrow \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M$$

où K_M est la constante de Michaelis

à Le coefficient de dissociation de l'enzyme est k_{-1}/k_1 ; cependant on observe que $K_M \neq k_{-1}/k_1$, on dit alors que K_M est la constante de dissociation apparente.

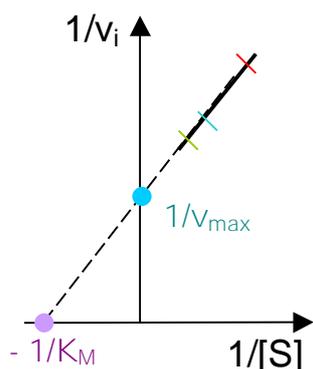
à On définit alors la vitesse initiale : $v_i = k_2[ES]$

et la vitesse maximale de l'enzyme : $v_{max} = k_2[E_0]$



On quitte les conditions de Michaelis : $[S] \gg [E]_0$

! Méthode de détermination de K_M :
Tracer $1/v_i = f(1/[S])$:



B. Unités internationales pour les vitesses enzymatiques

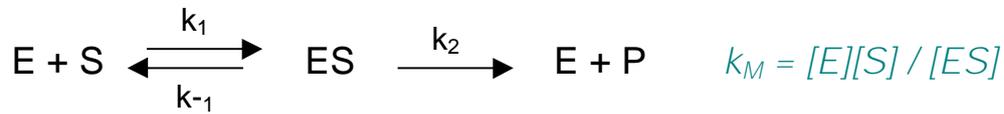
La mesure de l'activité enzymatique doit d'effectuer dans des conditions précises : pH et température définis, conditions de Michaelis. On définit alors l'UI, la quantité d'enzyme capable de transférer une micromole de substrat pendant une minute : $1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$

L'activité spécifique A_S se compte alors en $\text{UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ et l'activité spécifique molaire A_{SM} en $\text{UI} \cdot \text{mol}^{-1}$ ou en min^{-1} .

C. Inhibition

Un inhibiteur est une molécule se liant à l'enzyme (un ligand) et qui n'est pas transformée. Sa fixation entraîne le ralentissement ou l'arrêt d'une ou plusieurs fonctions de l'enzyme.

I Cinétique :



I Compétition :

On distingue alors deux cas :

q Inhibition compétitive : le substrat et l'inhibiteur se lient sur le même site

$$K'_M = K_M * (1 + [I] / K_I)$$

q Inhibition non compétitive : le substrat et l'inhibiteur se lient à des sites différents

$$1 / v'_{\max} = 1 / v_{\max} * (1 + [I] / K_I)$$

