

SDS-PAGE et Western-blot – Fiche Technique

SDS-PAGE – Fiche Technique

La migration des protéines dans un gel de polyacrylamide, peut être influencée par trois paramètres :

- la charge qui est fonction de leur composition en résidus acides ou basiques, et du pH environnant ;
- la conformation qui dépend de leur repliement dans l'espace ; les protéines peuvent présenter des structures plus ou moins encombrantes, ce qui va ralentir leur progression au sein du gel ;
- la taille, et donc la masse, liée au nombre d'acides aminés et leurs éventuelles modifications post-traductionnelles.

Le **SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)** permet de s'affranchir des deux premiers paramètres et permet donc de séparer les différentes protéines uniquement en fonction de leur taille. Donc attention, il s'agit là d'une électrophorèse en conditions dénaturantes, d'une part en raison de la présence de SDS et d'autre part du chauffage à 100°C des échantillons avant leur dépôt sur gel.

Création d'un gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'acrylamide qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bis-acrylamide qui forme des ponts entre ces chaînes quand un agent polymérisant, le persulfate d'ammonium, est ajouté. Le persulfate d'ammonium produit des radicaux libres et ceci plus rapidement en présence de l'activateur TEMED. On obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées. Le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire : les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses. Les gels de polyacrylamide sont des gels de faible porosité qui permettent de séparer la plupart des protéines de 5 à 200 kDa ou des acides nucléiques de 5 à 2000 pb.

Cas du SDS-PAGE – Rôles du SDS

Le SDS-PAGE contient en plus du sodium dodécyl sulfate ou SDS. Ce détergent anionique a deux rôles :

- d'une part, il détruit la structure spatiale des protéines, la queue hydrophobe du SDS s'associant aux radicaux hydrophobes des protéines (affranchissement de la conformation des protéines) ;
- d'autre part, il permet de charger toutes les protéines de la même façon c'est-à-dire négativement, ceci quelle que soit leur charge d'origine et avec le même rapport charge / masse ; en effet, à saturation, il y a environ 1,4 g de SDS / g de polypeptide, soit en moyenne une molécule de SDS pour 2 acides aminés : la charge intrinsèque de la protéine devient donc négligeable devant les charges négatives apportées par le SDS (affranchissement de la charge des protéines).

Par conséquent, la séparation électrophorétique en SDS-PAGE est alors uniquement fonction de la masse molaire. Ainsi, l'expérimentateur peut déterminer la masse molaire (MM) des différents polypeptides en se référant à la mobilité de polypeptides de MM connues (marqueurs de MM). Ce gel est dit dénaturant.

Western-blot – Fiche Technique

But :

Le western-blot est l'équivalent pour les protéines du northern-blot pour les ARN. Ainsi, le western-blot a pour but de visualiser une espèce particulière de protéine au sein d'un extrait cellulaire, afin d'en connaître sa taille et son niveau d'**accumulation**.

Principe :

Les protéines présentes dans l'échantillon sont séparées en fonction de leur taille en utilisant la technique du **SDS-PAGE**, puis transférées sur une membrane qui sera donc la réplique du profil électrophorétique obtenu sur gel. La révélation de la protéine étudiée s'effectue grâce à des anticorps dirigés contre cette protéine. L'abondance relative de la protéine cible se traduira par un signal plus ou moins intense et large.

Limites :

1) Il s'agit d'une expérience **semi-quantitative**. Tout comme le northern-blot, le western-blot donne accès à une quantité relative, c'est-à-dire propre à l'échantillon. Pour pouvoir comparer différents échantillons entre eux, il faut normaliser les dépôts grâce à un **témoin de charge** (voir son rôle et utilisation à la fin de cette fiche).

2) Le western-blot donne accès à **l'accumulation** d'une protéine précise, c'est-à-dire à la somme de sa synthèse et de sa stabilité. Par conséquent, l'analyse d'un western ne reflète pas directement le taux de synthèse de la protéine, la demi-vie de cette protéine intervient également.

Attention : Ici le taux de synthèse d'une protéine n'est pas synonyme uniquement de taux de traduction. En effet, en dehors de toute information sur le taux d'accumulation de l'ARNm correspondant, l'augmentation du taux de synthèse d'une protéine donnée peut refléter plusieurs phénomènes : augmentation du taux de traduction de son ARNm (régulation traductionnelle) ; augmentation du taux d'accumulation de son ARNm (régulation sur le taux de transcription et/ou sur la stabilité de l'ARNm) ; superposition de ces différents processus. Donc prudence au niveau des conclusions

Étapes de réalisation :

Les différentes étapes d'un western-blot sont décrites ci-dessous.

1) Extraction des protéines :

Cette extraction est en général réalisée en utilisant des conditions dénaturantes, en présence de SDS. Les ponts disulfures internes à une chaîne polypeptidique ou reliant covalamment plusieurs polypeptides sont détruits par des agents réducteurs comme le DTT ou le β -mercaptoéthanol.

2) Dénaturation des protéines :

Même si l'extraction est réalisée dans des conditions dénaturantes, les échantillons sont chauffés entre 3 et 5 min à 100°C pour parfaire la dénaturation.

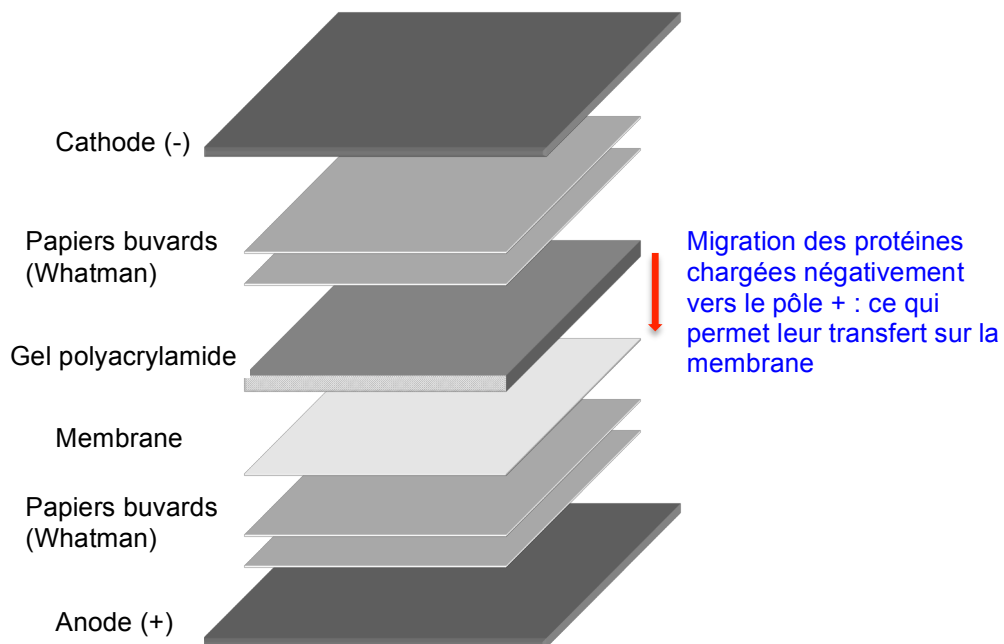
3) Migration et visualisation des protéines totales :

Pour répondre aux finalités du western, le gel de migration doit correspondre à un **SDS-PAGE**, puisque lui seul permet la séparation des protéines uniquement en fonction de leur taille.

Après migration, le gel peut être coloré au **bleu de Coomassie** afin de visualiser d'une part la qualité de la migration et d'autre part la quantité de protéines déposées par puits (équivalent de la photo UV du gel de northern-blot ou de Southern-blot en présence de BET).

4) Transfert sur membrane :

Après décoloration, le contenu du gel est ensuite directement transféré sur une membrane de nitrocellulose, en utilisant une méthode d'électro-transfert. On applique un champ électrique qui va permettre de transférer les protéines du gel chargées négativement vers une membrane qui, étant chargée positivement va les fixer sur la face en contact avec le gel.



5) Détection de la protéine d'intérêt :

L'étape suivante consiste à détecter la protéine d'intérêt sur la membrane en utilisant un **anticorps** dirigé contre elle. Classiquement, cette étape de révélation s'effectue en deux temps, avec l'utilisation de deux anticorps différents (voir schéma ci dessous).

- Dans un premier temps, la membrane est mise en contact avec l'**anticorps primaire** (Ac I), chargé de reconnaître la protéine d'intérêt.

- Après lavage pour éliminer les Ac I non fixés de façon spécifique, un second anticorps est utilisé : l'**anticorps secondaire (Ac II)**. Cet Ac II est dirigé contre les Ac I (si les Ac I ont par exemple été obtenus par immunisation d'un lapin avec notre protéine d'intérêt, il suffit d'injecter des IgG de lapin à une autres espèce — par exemple une souris —, qui fabriquera alors des Ac anti-anticorps de lapin). Ces Ac II vont jouer deux rôles : un rôle de détection car ils sont liés (on dit « conjugués ») à une enzyme qui sera utilisée pour révéler leur position et par conséquent celle de l'Ac I fixé sur la protéine d'intérêt et un rôle d'amplification du signal car plusieurs exemplaires de l'Ac II peuvent se fixer sur une molécule d'Ac I.

6) Révélation :

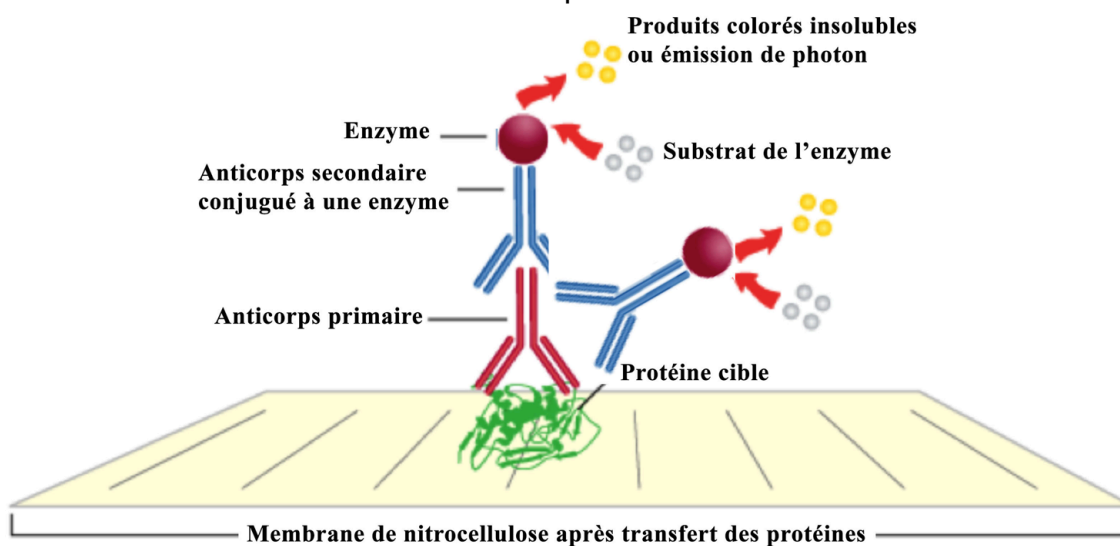
La position de l'Ac II, donc celle de l'Ac I fixé sur la protéine d'intérêt sera révélée grâce à l'enzyme qui lui est conjuguée. Après un second lavage, là encore destiné à éliminer les Ac II fixés de façon non spécifique, les substrats de l'enzyme sont ajoutés dans une solution tampon adéquate afin que la réaction enzymatique se produise.

Deux grands types d'enzyme sont utilisés :

- soit une enzyme dont la réaction aboutit à la libération de photons (cas de la peroxydase du Raifort en présence de luminol), auquel cas la révélation se fera en utilisant un film photographique (dit aussi chemiluminescent) ou une caméra ;

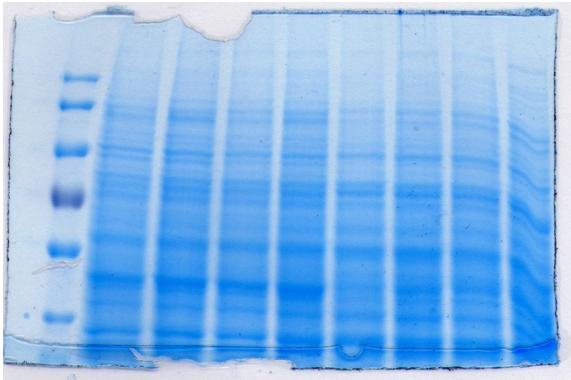
- soit une enzyme dont la réaction aboutit à la production de produits insolubles et chromogènes auquel cas la coloration apparaît directement sur la membrane (exemple avec la phosphatase alcaline en présence de BCIP et de NBT).

Schéma : Détection et révélation d'une protéine donnée

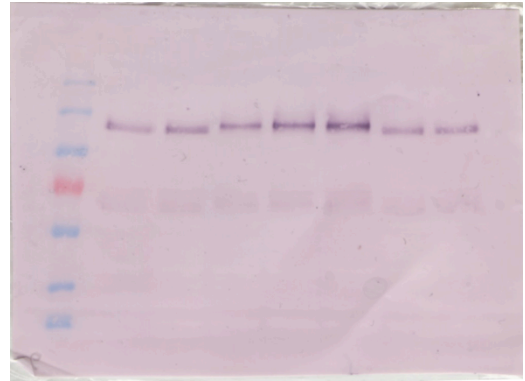


Exemples :

SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie



Membrane après révélation



Révélation sur la membrane de la phosphatase alcaline en présence de BCIP et de NBT

Utilisation du témoin de charge :

Si le western-blot est utilisé à des fins semi-quantitatives, c'est-à-dire dans le but de suivre le taux d'accumulation de la protéine étudiée, il faut absolument avoir recours à un **témoin de charge**. En effet, de la même façon que pour un northern-blot, pour pouvoir comparer l'intensité des signaux entre les différentes pistes, il faut normaliser les différents dépôts de protéines de chaque puits. Pour cela, il faut utiliser sur la même membrane un second Ac primaire qui va révéler une protéine dont on sait qu'elle est exprimée et accumulée de façon constitutive dans les conditions de l'étude (ou dans les différentes cellules utilisées). Par exemple, chez les eucaryotes, la révélation de l'actine peut servir de témoin de charge. Comme pour le northern-blot, il faudra avant toute analyse effectuer une étape de normalisation.

La fiche western-blot-Application vous montre comment analyser un résultat de western-blot.