

Fiches descriptives: **Expression et Structure des protéines**

Introduction:

Dans ce document vous trouverez plusieurs fiches descriptives de techniques utilisées lors de l'étude de l'expression et de la structure de protéines.

Chaque fiche est représentée par une page et décrit une technique du thème, elles sont composées de son principe/fonctionnement, de ses avantages ainsi que de ses limites. Elles peuvent inclure un schéma et/ou d'exemples.

Pour finir vous trouverez le contenu des sources utilisées afin d'aboutir à ces fiches.

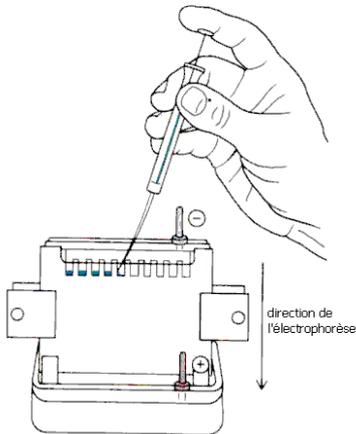
Sommaire

1.	Électrophorèse 1D.....	P.3
2.	Électrophorèse 2D.....	P.4
3.	Western blot.....	P.5
4.	Protéomique.....	P.6
5.	Cristallographie.....	P.7
6.	Bibliographie.....	P.8

Fiche 1.1: Électrophorèse 1D

L'**électrophorèse** est une technique sur gel, utilisées principalement en biologie et qui existe sous plusieurs dimensions (mono- et bi- dimensionnelle).

- **L'électrophorèse monodimensionnelle**



Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leurs **poinds moléculaire** sous l'effet d'un champ électrique, (molécules chargées positivement ou négativement). Ce déplacement d'ion ce fait en fonction de la charge électrique des protéines. Les ions ont des vitesses de migration différentes, c'est pourquoi ils se séparent les uns des autres. Les molécules cationiques (+) migrent vers la cathode (-) et les molécules anioniques (-) se déplacent vers l'anode (+).

Figure 1: Dépôt d'échantillon d'électrophorèse

Le gel de l'électrophorèse (auquel on applique ce champ électrique), a le rôle de séparer les différentes molécules selon leurs tailles. Les protéines les plus "petites" migreront plus loin que les plus "grosses"

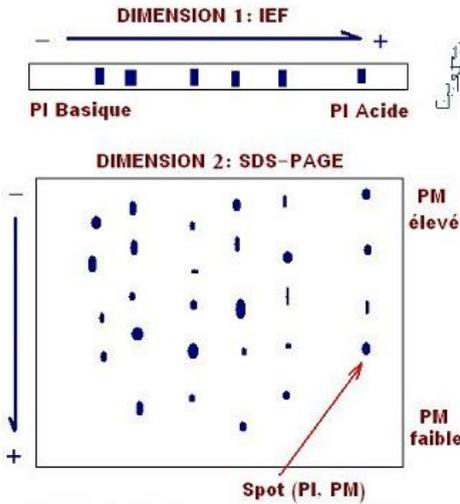
Exemples

- L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des molécules de très grande taille, utilisée principalement pour l'ADN ou l'ARN
- L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer des molécules plus petites : protéines, peptides et des fragments d'acides nucléiques.

Les avantages	Les limites
Traitement simultané de plusieurs échantillons en même temps.	Peu sensible (difficiles à séparer des protéines de même taille)
Détermination des poids moléculaires	

Fiche 1.2: Électrophorèse 2D

- L'électrophorèse bidimensionnelle



Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de deux propriétés différentes : la **charge électrique** et le **poids moléculaire**.

Dans la **première dimension**, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH continu (étape appelée **isoélectrofocalisation (IEF)**). Au cours de cette étape, les protéines migrent dans le gel jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur point isoélectrique (pI) (où leur charge globale devient nulle).

Figure 2: Electrophorèse 2D

Dans la **deuxième dimension**, les protéines sont séparées par la technique **SDS-Page** (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). La résolution s'effectue sur un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate (SDS).

Par le gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées par tamisage moléculaire, de la même manière que pour l'électrophorèse 1D. Plus le gel de deuxième dimension est grand, plus la résolution (et donc le nombre de spots séparés) augmente.

Les avantages	Les limites
Traitement simultané de plusieurs échantillons en même temps.	Dépend de la préparation des échantillons (*)
Détermination des poids moléculaires	Première séparation délicate
Détermination de la charge électrique	

(*) Certaines préparations d'échantillons biologiques nécessitent une solubilisation des protéines pour empêcher leur aggrégation et leur dégradation.

Fiche 2 : "Western blot"

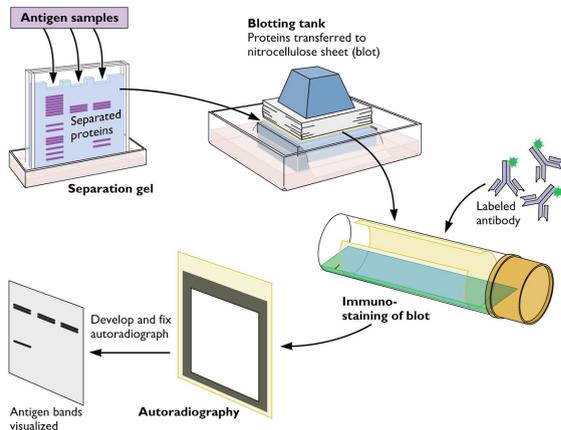


Figure 1: Grandes étapes du "western blot"

Le "western blot" est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon à l'aide d'anticorps (dirigés contre les protéines que l'on souhaite détecter). Cette technique se déroule en 3 étapes distinctes (**électrophorèse, transfert et révélation**). Certaines sources affirment que le Western blot ne correspond qu'aux étapes suivants le transfert des protéines.

Mais dans la plupart des cas, quand on parle de Western blot on fait référence à l'ensemble des étapes citées ci dessus..

La **première étape** consiste à "dérouler" et à séparer les protéines de l'échantillon, selon leurs taille, grâce à une électrophorèse monodimensionnelle (voir fiche 1.1).

La **deuxième étape** (première étape du Western blot) consiste à transférer protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose (support solide ayant la propriété d'accrocher les protéines de façon non spécifique).

La **troisième étape** consiste à mettre en évidence les protéines grâce à des anticorps spécifique. Pour ce faire il faut marquer la membrane nitrocellulose avec des anticorps spécifique de la protéines d'intérêt. Les anticorps primaires vont être reconnus par un anticorps secondaire qui, lui est conjugué à de la couleur, de la radioactivité ou une enzyme (pour faire suivre une réaction enzymatique colorée). Les anticorps sans liaison spécifique sont éliminés par lavage à l'aide de tampons contenant un détergent.

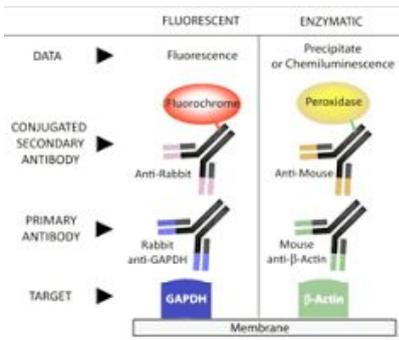


Figure 2: Etape 3 du "Western blot"

L'analyse du Western blot est ensuite réalisée à l'aide de différents systèmes d'imagerie (par ex., luminescence, réaction colorante, autoradiographique).

Le western blot permet ainsi de visualiser la présence de protéines dans un mélange complexe.

Les avantages	Les limites
Rapide	Optimisation des conditions expérimentales
Séparation protéique selon la taille, charge et/ou conformation	Nécessite d'avoir des anticorps spécifique

Fiche 3 : Protéomique

La **protéomique** est un terme générique qui désigne une étude non ciblée au niveau protéique (l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme) à un moment donné et sous des conditions données.

La protéomique est l'étude et l'analyse à grande échelle d'une ou de plusieurs protéine. On analyse généralement leurs structures, fonctions, activité, quantité et les interactions moléculaires.

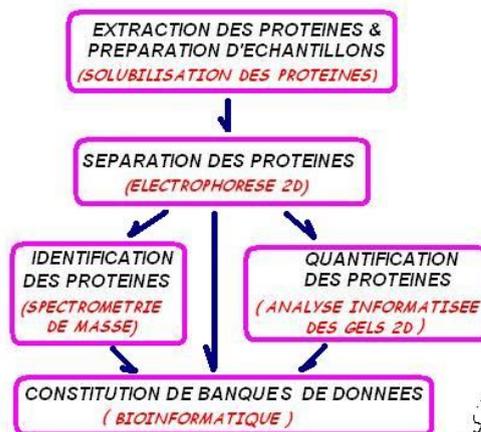


Figure 1: Les grandes étapes de la protéomique

La spectrométrie de masse qui est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse.



Figure 2: Structure d'un spectromètre de masse.

Les avantages	Les limites
Permet de comparer les profils protéique globaux entre différents états	Appareillage coûteux
	Expertise nécessaire (techniques)

Fiche 4 : Cristallographie

La **cristallographie** est une méthode expérimentale la plus utilisée pour déterminer la structure 3D des macromolécules. La cristallographie se consacre à l'étude des substances cristallines à l'échelle atomique.

Les propriétés physico-chimiques d'un cristal sont légèrement liées à l'arrangement spatial des atomes dans la matière.

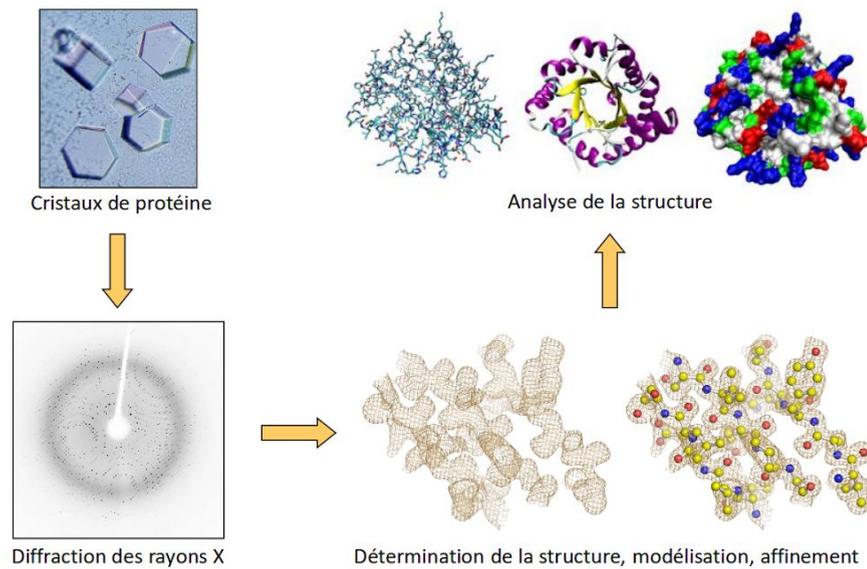


Figure 1: Grandes étapes de la cristallographie

Les avantages	Les limites
Haute résolution	Si les cristaux ne diffractent pas assez
	d'obtenir des cristaux adéquats pour l'analyse cristallographique

Bibliographie

- Electrophorèse 1D et 2D
 - Wikipedia: <https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se>
 - Cours de biochimie - Nancy: <http://www.cours-de-biochimie.fr/western-blot.php>
 - Planet et vie: <https://planet-vie.ens.fr/content/electrophorese>
 - Biotechnologie electrophorèse: <http://www.technobio.fr/article-21737522.html>
- Western blot
 - Wikipedia: https://fr.wikipedia.org/wiki/Western_blot
 - Larousse: <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/Western-Blot/17033>
 - Cours de biochimie - Nancy: <http://www.cours-de-biochimie.fr/western-blot.php>
 - <http://www.anticorps-enligne.fr>
- Proteomique
 - Wikipédia: https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie_de_masse
 - Cours de chiara (L2)
 - Cours: https://sciences.univ-amu.fr/files/coursl2_20fevrier2013_r_lebrun.pdf
- Cristallographie
 - Cours: <http://cge2014.impmc.upmc.fr/ppt/BioCrys-Guimaraes.pdf>
 - <http://www.takween.com/techniques/proteomique.html>