

Protéomique analytique et fonctionnelle

Chapitre II

Protéomique analytique

I. Electrophorèse 1D (SDS-PAGE) et western blotting (WB)

I.1. SDS-PAGE

I.1.1. Les étapes du SDS-PAGE

I.1.2. Extraction à partir d'une culture cellulaire

I.1.3. Séparation sur gel de polyacrylamide

I.1.4. Principe de l'isotachophorèse

I.1.5. Principe de la séparation (électrophorèse de zone monophasique)

I.2. La structure du gel de polyacrylamide

I.2.1. La composition chimique du gel

I.2.2. Les étapes de préparation du gel de polyacrylamide et migration

I.3. Western blotting (WB)

I.3.1. Transfert des protéines dans une membrane de nitrocellulose

I.3.2. Blocage des sites d'interactions non spécifiques

I.3.3. Marquage immunologique

I.3.4. Révélation ECL (enhanced chemiluminescence)

II. Electrophorèse 1D (SDS-PAGE) et western blotting (WB)

I.1. SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique utilisée en biochimie pour la séparation, le dosage et l'identification des protéines. La séparation se fait en fonction de la taille (PM).

I.1.1. Les étapes du SDS-PAGE

Première étape

- **Extraction et dosage des protéines totales** contenues dans les cellules ou le tissu.
- **Séparation des protéines** grâce à une électrophorèse, c'est-à-dire un déplacement des particules soumises à un champ électrique. Ceci s'effectue sur un support chimique (le gel de polyacrylamide). On voit alors les protéines se déplacer (*migrer*) à une distance en relation directe *avec leur poids moléculaire*. C'est-à-dire que plus le poids moléculaire est faible, plus la protéine migre loin.

Deuxième étape (western blotting)

- Les protéines séparées sont **transférées** sur une membrane de nitrocellulose.

Troisième étape

- **Mise en évidence des protéines** grâce à un marquage immunologique d'anticorps couplé à une enzyme sur la membrane de nitrocellulose.

I.1.2. Extraction à partir d'une culture cellulaire

Se fait avec un tampon de lyse, le lysat cellulaire est centrifugé, le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées grâce à une courbe étalon établie à partir de concentrations croissantes en Albumine de sérum bovin (BSA) (**figure 1**).

Tableau I: Gamme de concentrations de la BSA utilisées pour la courbe étalon.

								Echantillon
BSA (mg/ml)	0mg/ml	0.2 mg/ml	0.75 mg/ml	1 mg/ml	1.25 mg/ml	1.5mg/ml	2mg/ml	?
DO (655nm)	0,085	0,113	0,207	0,21	0,245	0,27	0,321	0,200

$$X = Y - 0,0954 / 0,1178$$

$$\rightarrow X = 0,88 \text{ mg/mL}$$

On dépose 10 μ g de protéines/puits.

Chaque puits peut contenir un volume maximal de 30 μ L.

$$0,88 \text{ mg/mL}$$

$$= 880 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$$

$$10 \mu\text{g} \rightarrow X$$

$$X = 11,36 \mu\text{L} \text{ à déposer dans le puits}$$

Donc, l'extraction est une étape déterminante. Il faut avoir une bonne concentration pour pallier le problème du volume à déposer.

I.1.3. Séparation sur gel de polyacrylamide

Caractéristiques générales du gel

Le système utilisé pour le SDS-PAGE comprend deux modes successifs de migration électrophorétique :

a. Une isotachophorèse (gel de concentration) (stacking gel)

Ce type d'électrophorèse permet de pallier les problèmes liés aux faibles quantités de protéines et aux volumes parfois non négligeables déposés dans les puits. On réalise donc une étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention d'une zone protéiques très fine dans le gel de concentration, qui migrera dans le gel de séparation.

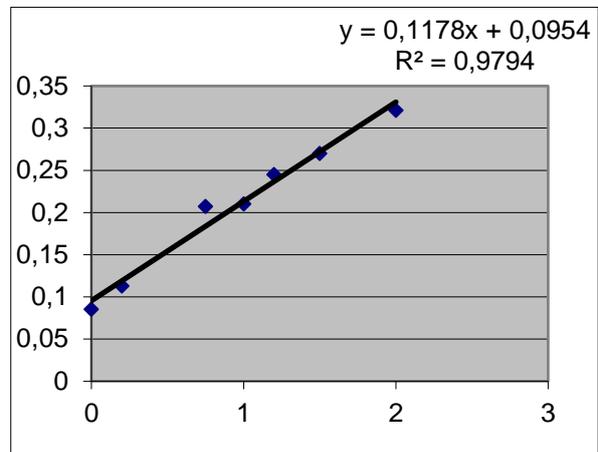


Figure 1 : Courbe étalon BSA.

b. **Une électrophorèse de zone monophasique (gel de séparation) (resolving gel)**

Le passage du gel de concentration au gel de séparation se fait avec un changement de pH et par une augmentation de concentration du gel en acrylamide.

Caractéristiques moléculaires

La porosité du gel (mise au point du taux de réticulation)

- ➔ dépend du poids d'acrylamide et de bis contenu dans 100mL. Le gel de concentration est de 4%, et le gel de séparation est entre 7 et 15 % suivant la taille des protéines que l'on veut séparer (**tableau I**).

Tableau II : Pourcentage d'acrylamide en fonction du PM des protéines à séparer.

Poids moléculaire (KDa)	Acrylamide (%)
10 - 40	15 - 20
40 - 100	10 - 15
100 - 300	5 - 10
300 - 500	5
> 500	2 - 5

La séparation des protéines en fonction de leurs tailles et non de leur charge est due à la présence du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui confère une charge négative aux protéines ; Les conditions d'incubation des protéines avec le SDS sont telles que chaque espèce protéique adsorbe environ 1.4g de SDS par gramme de protéine, soit une molécule de SDS pour 2 acides aminés, l'adsorption se fait grâce à la chaîne aliphatique du SDS (**figure 2-A**). La présence de ce détergent anionique hautement chargé dénature la chaîne protéique, qui se déroule alors en pelote statistique et masque complètement ses charges naturelles en la recouvrant uniformément. La charge électrique propre à chaque molécule devient alors négligeable. C'est ainsi que chaque protéine acquiert une densité de charge identique (**figure 2-B**).

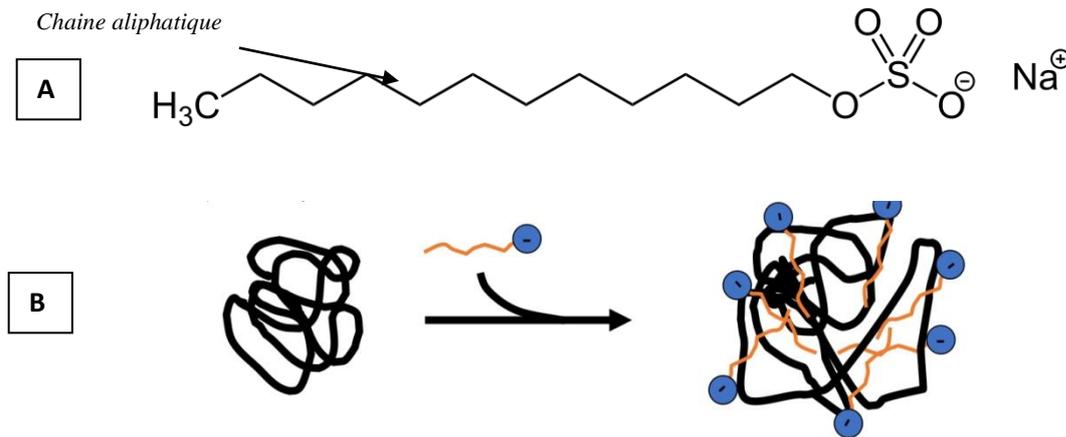


Figure 2 : **A)** La structure chimique du SDS. **B)** protéine recouverte de SDS ayant une charge globale négative.

I.1.4. Principe de l'isotachophorèse

Lorsqu'une solution contenant différents électrolytes est soumise à l'action d'un champ électrique, on assiste dans un premier temps à un phénomène de déplacement des molécules ionisées vers leur électrode respective.

- ➔ Les anions, chargés négativement, se dirigent vers l'électrode positive,
- ➔ Les cations, chargés positivement, se dirigent vers l'électrode négative.

La force électrique qui s'exerce sur chaque espèce moléculaire dépend de la valeur de leur charge effective qui, pour un électrolyte faible ou un amphotère, dépend du pH du milieu.

Mobilité relative d'un ion

Notion d'unité électrophorétique de base.

Si on représente deux phases électrolytiques contenant des ions A (arrière-garde) et des ions B (pilotes), tous deux chargés négativement, ils migreront sous l'effet du champ électrique vers l'anode.

- A et B étant au départ séparés, on appelle la limite (frontière artificielle) les séparant la limite AB (**figure 3**).

- Dans la phase A il n'y a pas de constituant B et dans la phase B il n'y a pas de constituant A. Soit V_A la vitesse de migration de A et V_B la vitesse de migration de B.

Trois cas de figures sont possibles:

$V_A > V_B$: les ions A vont sans cesse rattraper les ions B et les dépasser. La frontière AB va disparaître.

$V_A < V_B$: les ions A, moins mobiles, sont derrière, ils ne peuvent donc pas rattraper les ions B qui sont plus mobiles. Il n'est pas possible qu'un vide d'ions puisse se créer, ceci se traduirait par une rupture du courant électrique.

La seule possibilité est que la frontière AB se déplace tout en continuant à séparer les 2 phases. Les deux espèces ioniques A et B migrent donc à la même vitesse.

Pour avoir **$V_A = V_B$** , il faut jouer sur:

La mobilité de l'ion μ

Le champ électrique E

$$V = \mu * E$$

$$\mu_A < \mu_B$$

$$E_A > E_B$$

$$V_A = V_B$$

Imaginons le montage de la **figure 4** très proche de celui du gel de polyacrylamide.

Q: Ions d'arrière grade

T: Ions pilotes

$$\mu_Q < \mu_A < \mu_B < \mu_T$$

$$E_Q > E_A > E_B > E_T$$

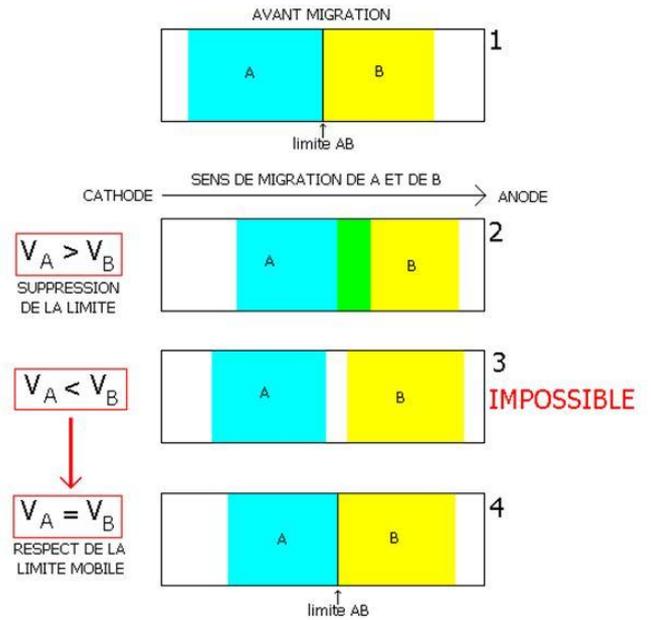


Figure 3 : Mobilité relative d'un ion.

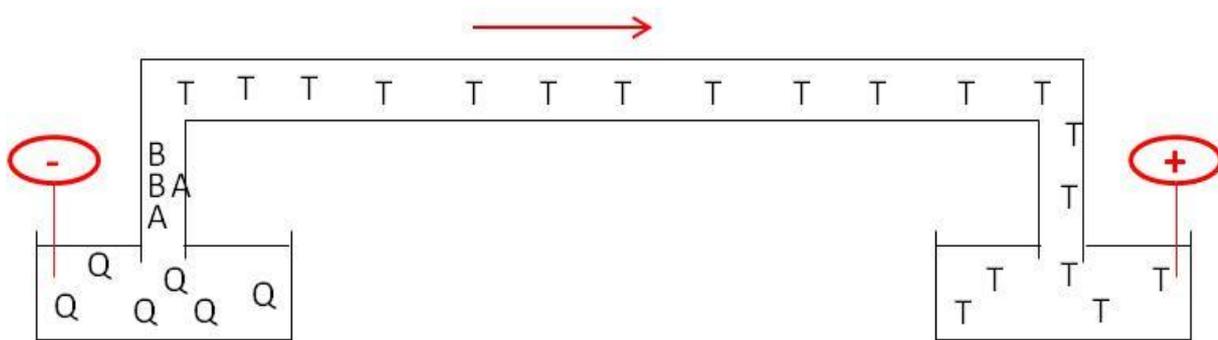


Figure 4 : Migration d'anions dans un montage similaire au gel de polyacrylamide.

Le système électrolytique est non homogène

Les ions Q et T vont migrer à la même vitesse $V_Q = V_T$ / $\mu_Q \cdot E_Q = \mu_T \cdot E_T$ car le champ élevé dans le domaine de Q va compenser la faible mobilité, de même que le faible champ dans le domaine de T va réduire leur forte mobilité.

Les ions intermédiaires A et B vont se séparer petit à petit. Les ions B se regrouperont devant A ainsi le champ électrique dans la zone du mélange devient non homogène $E_A > E_B$. La valeur du champ électrique dans chaque zone va compenser exactement les différences de mobilité et finalement tous les ions sont triés et migrent à la même vitesse, on appelle ça **le train d'ions**.

On a donc l'égalité suivante:

$$V_Q = V_A = V_B = V_T \text{ car:}$$

$$\mu_Q \cdot E_Q = \mu_A \cdot E_A = \mu_B \cdot E_B = \mu_T \cdot E_T$$

Si un ion venait à sortir de son domaine (par diffusion) il y est forcément ramené puisqu'il passe dans une zone de champs plus élevé ou plus faible.

Exemple: Si A passe dans la zone de Q:

$$\begin{array}{ccc} EA & \longrightarrow & EQ \\ \mu_A & & \mu_Q \end{array}$$

Le gel de concentration a pour but de concentrer le dépôt fait dans le puits en une fine bande de protéines, ce qui permet de mettre un volume relativement grand sans perte de résolution.

- ⇒ L'isotachophorèse utilise le fait que le complexe **protéines-SDS** ait une mobilité électrophorétique intermédiaire entre les **ions glycinate** (du tampon d'électrophorèse) et les ions **chlorure** (dans le gel). Les ions glycinate sont donc les ions d'arrière gardes (A) (faible mobilité à cause du pH qui est de 6.8) et les ions chlorure, les ions pilotes (B).
- ⇒ Ceci induit la formation de 2 limites mobiles : une entre l'ion d'arrière garde et le complexe SDS-protéines et une entre SDS-protéines et l'ion pilote.
- ⇒ Il y aura ensuite formation d'autres limites mobiles séparant les différentes protéines classées selon leurs mobilités. Les plus lentes seront côté ion d'arrière garde et les plus rapides côté ion pilote. Une fois les composés ioniques " rangés " selon leur ordre de mobilité (on parle alors de pile ou d'empilement) la concentration molaire des protéines devient du même ordre de grandeur que celle établie pour les tampons pilotes et d'arrière garde. Ce qui correspond à une concentration massique de protéines de l'ordre de 10 à 100 mg/mL.
- ⇒ Comme la quantité de complexe protéines-SDS est faible, il va se concentrer en une bande très fine entre les ions chlorures et les ions glycinates. Une fois cette pile formée, elle continuera à migrer jusqu'au gel de séparation où l'on aura un changement de caractéristiques du milieu donc de migration des différents ions.

Le changement de caractéristiques pendant le passage dans le gel de séparation se fait à deux niveaux :

- ⇒ Le gel de séparation est plus réticulé, la porosité est diminuée et donc sert de tamis moléculaire, sans pour autant freiner les ions de petites tailles du tampon d'arrière garde (glycinate).
- ⇒ Le gel de séparation a un pH différent, il est basique (*pH=8.8, le gel de concentration étant à 6.8*) ceci ne fait pas varier la mobilité des protéines mais augmente la mobilité des ions glycinate d'arrière garde qui sont complètement ionisés à ce pH (**figure 7**).

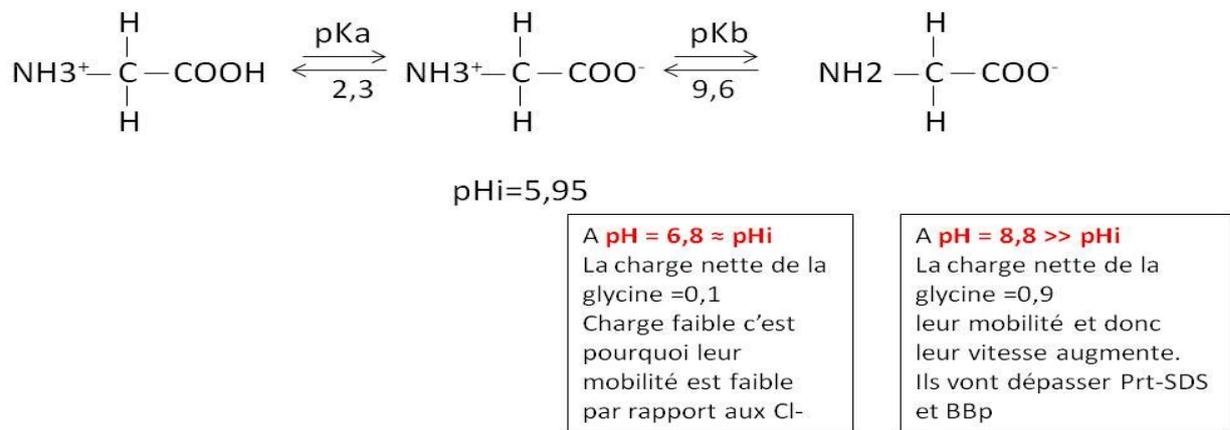


Figure 7 : Ionisation des ions glycinates en fonction du pH.

I.1.5. Principe de la séparation (électrophorèse de zone monophasique)

- ⇒ La vitesse de migration des complexes protéines-SDS sera diminuée, car ils devront traverser les pores du gel. La vitesse de migration des ions glycinates sera augmentée dans le gel de séparation, car le pH est de 8.8 → ions glycinates ont une pleine charge négative (**figure 6**).
- ⇒ Etant constamment dépassées par les ions d'arrière gardes, les protéines migrent donc dans les conditions des électrophorèses de zones pour lesquelles les protéines sont moins rapides que les ions porteurs. Dès lors que les protéines se font dépasser par les ions glycinates, la mobilité électrophorétique des ions chlorures n'a plus d'intérêt dans le principe de la séparation des protéines. Comme les complexes protéines-SDS ont la même charge par unité de longueur (une molécule de SDS pour 2 acides aminés), ils traversent le gel de séparation sous le champ électrique avec la même mobilité. Cependant, comme ils passent au travers d'un gel de séparation, avec des pores relativement petits, les différents complexes protéines-SDS se séparent grâce aux propriétés du tamis moléculaire du gel. Les petites protéines vont vite car elles passent facilement dans les pores du gel, mais les grosses protéines sont retardées par friction avec le polymère. Le bleu de bromophénol, contenu dans le tampon de l'échantillon, n'est absolument pas retardé et indique donc le front de migration électrophorétique. Quand le colorant atteint le bas du gel, l'électrophorèse est terminée.

I.2. La structure du gel de polyacrylamide

I.2.1. La composition chimique du gel

Le gel est composé de :

- H₂O
- Mélange d'acrylamide (acrylamide + bis acrylamide) (**figure 8-A**)
- Tampon de gel Tris-HCl (pH=8,8 pour le gel de séparation et 6,8 pour le gel de concentration)
- Sodium dodécyl sulfate (SDS⁻)
- NNN'N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED)
- Amonium persulfate (APS).

- ⇒ L'acrylamide et bis acrylamide se polymérisent en longue chaîne,
- ⇒ La polymérisation est initiée par l'addition de l'APS et de TEMED.
- ⇒ Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre R (**figure 8-B**).
- ⇒ Les radicaux libres vont réagir sur les monomères d'acrylamide et de bis acrylamide et entraîner une réaction de polymérisation par ouverture de la double liaison des dérivés acryliques
- ⇒ La polymérisation continue jusqu' ce qu'il n'y ait plus de monomères d'acrylamide (M) libre (**figure 8-C**)
- ⇒ En utilisant un bon rapport entre acrylamide et bis acrylamide on obtient des pores (mailles) plus au moins petits permettant le tamisage des protéines (**figure 8-D**).

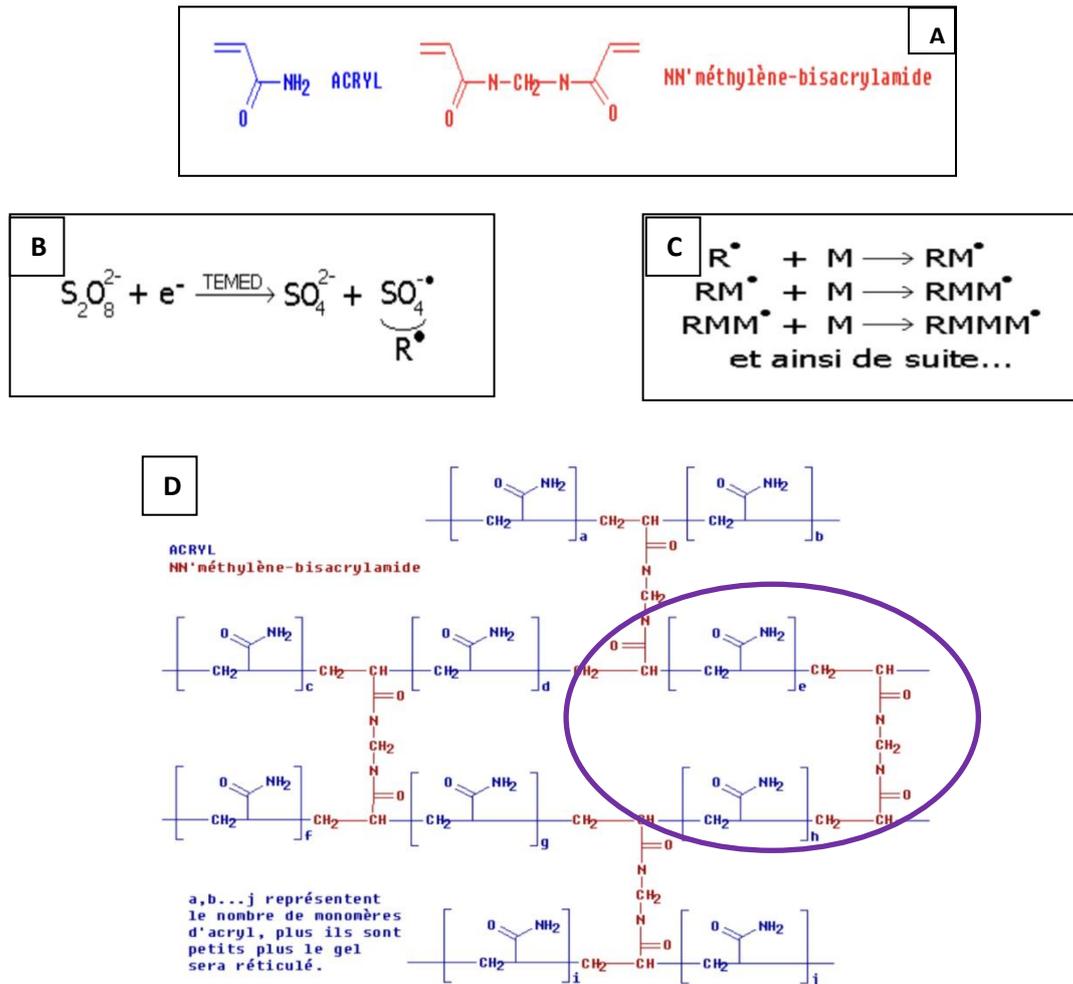


Figure 8 : Structuration du gel de polyacrylamide. **A)** Monomères acrylamide et bis acrylamide. **B)** Décomposition des ions persulfate par le TEMED. **C)** Réaction en chaîne de polymérisation. **D)** Structure finale du polymère et taille des mailles.

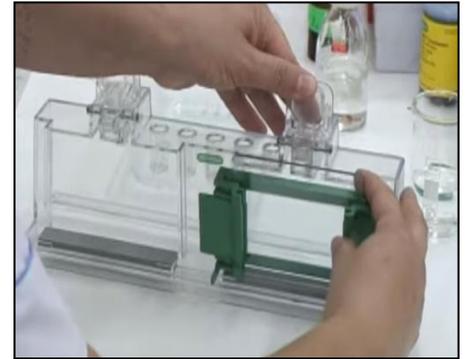
I.2.2. Les étapes de préparation du gel de polyacrylamide et migration



1) les plaques en verre sont bien nettoyées



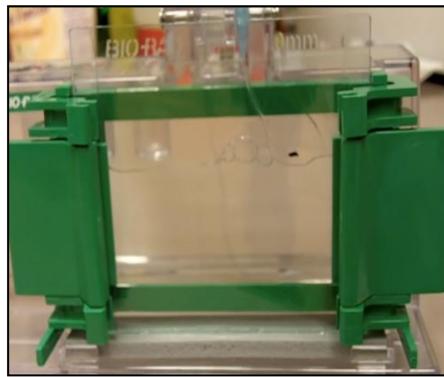
2) Les plaques en verre sont placées sur leur support puis serrées.



3) Le support des plaques est fixé verticalement.



4) Le gel de séparation est préparé en mélangeant les constituants dans un bécher. L'APS et le TEMED sont rajoutés en dernier. (Tris-HCl à pH 8,8)



5) Le gel de séparation est immédiatement coulé entre les plaques en verre à l'aide d'une micropipette (environ $\frac{3}{4}$ de la plaque).



6) Le gel est tassé avec de l'eau pour éliminer toutes les bulles et pour avoir une surface parfaitement horizontale. La polymérisation dure 45 min.



7) L'eau est éliminée avec du papier absorbant.



8) Le gel de concentration est préparé en mélangeant les constituants dans un bécher. L'APS et le TEMED sont rajoutés en dernier. (Tris-HCl à pH 6,8)



9) Le gel de concentration est coulé à l'aide d'une micropipette.



10) Le peigne est immédiatement placé, la polymérisation dure 45 minutes



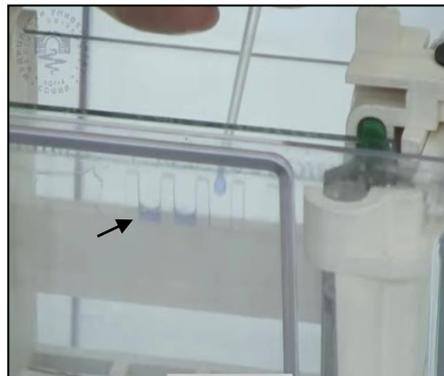
11) Le peigne est délicatement enlevé . Le gel est prêt.



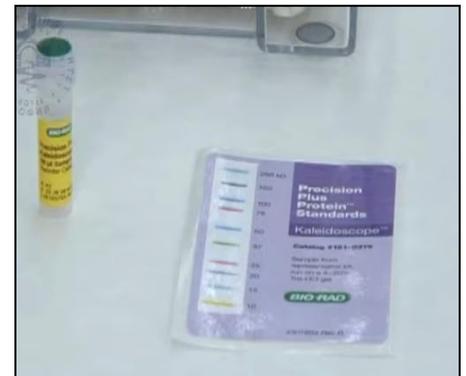
12) Les plaques contenant le gel sont placées dans la cuve d'électrophorèse.



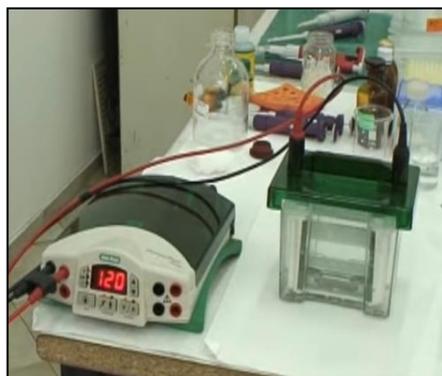
13) La cuve est remplie avec le tampon de migration (TGS = Tris/Glycine/SDS)



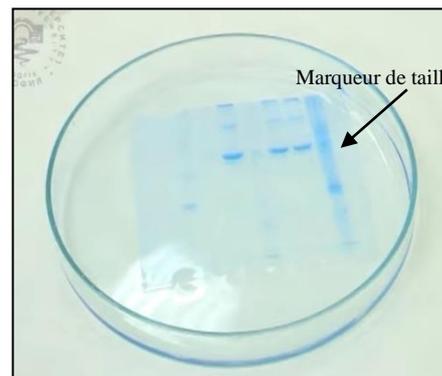
14) la même quantité de protéine est déposée dans les puits à l'aide d'une micropipette.



15) Le marqueur de taille est déposé dans le premier puits.



16) La cuve est branchée à un générateur électrique sous voltage et ampérage appropriés pour la migration des protéines.



17) Le gel est délicatement prélevé des plaques et les bandes protéiques sont mises en évidence grâce à une coloration au bleu de coomassie ou au rouge ponceau.

Arrivé à cette étape, le SDS-PAGE est terminé. Si nous désirons identifier une protéine particulière, nous devons procéder à un immunomarquage et donc à un western blotting.

I.3. Western blotting (WB)

I.3.1. Transfert des protéines dans une membrane de nitrocellulose

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont séparées mais restent " emprisonnées " dans le gel de polyacrylamide. Pour diminuer les quantités et donc les coûts d'anticorps à ajouter pour révéler les protéines, il faut sortir les protéines du gel. Les différentes protéines contenues dans le gel seront adsorbées sur un support immobilisant (membrane de nitrocellulose) (**figure 9**). La formation de l'empreinte se dit **blot** en anglais d'où le nom **western blot**, western n'étant qu'un jeu de mot en rapport avec la technique initiale du Southern blot se faisant avec de l'ADN.

Caractéristiques de la membrane de nitrocellulose :

- Charge de la matrice : négative
- Liaison des protéines par force hydrophobe et électrostatique
- Avantages : hautes capacité, coût faible
- Inconvénient : fragile

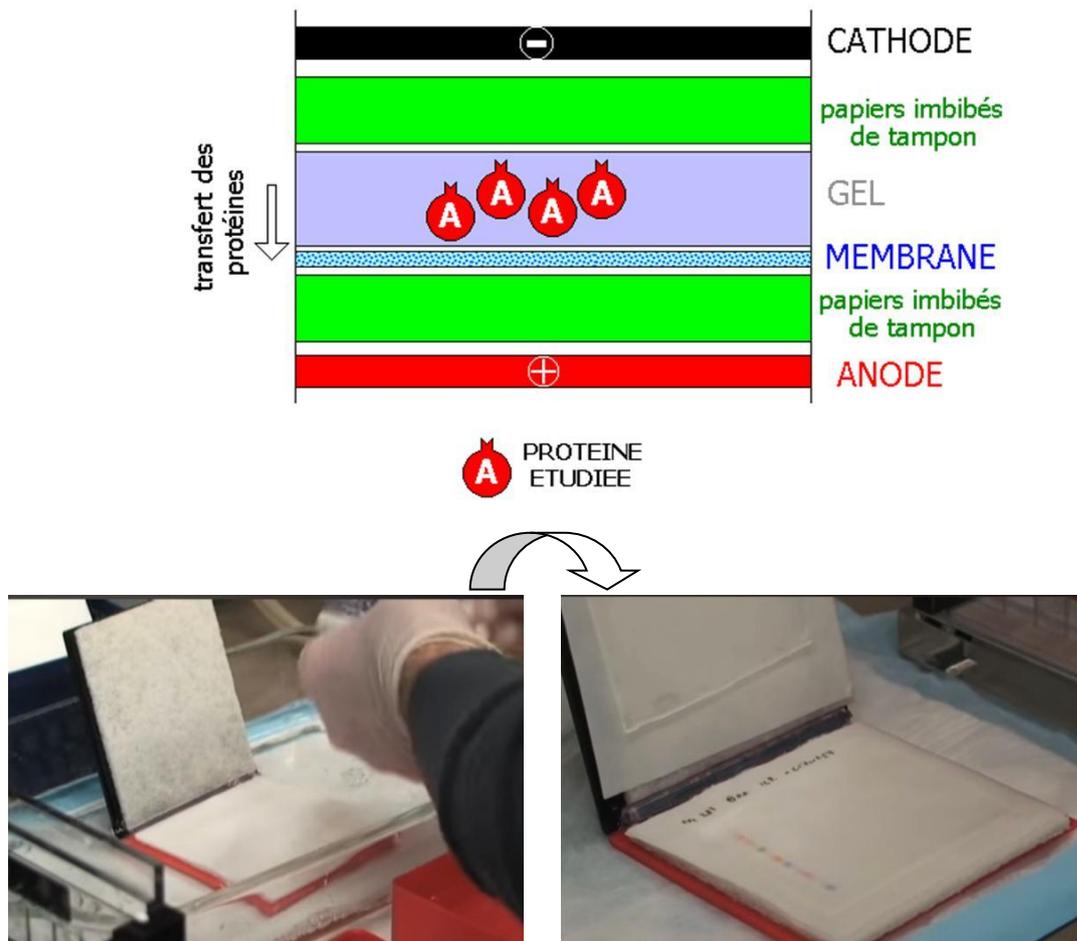


Figure 9 : La méthode du transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose.

- ⇒ Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS et donc sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de la cathode vers l'anode. A la petite différence qu'ici, les électrodes sont de part et d'autre du gel et non pas dans le plan du gel.
- ⇒ La capacité de la matrice à lier les protéines est principalement déterminée par le caractère de la membrane, mais aussi par la composition du tampon de transfert. Le méthanol enlève le SDS fixé sur les protéines, il favorise par conséquent leur adsorption sur la membrane chargée négativement par exposition de leurs domaines hydrophobes mais il réduit l'efficacité de l'éluion en diminuant la taille des pores.

I.3.2. Blocage des sites d'interactions non spécifiques

Le blocage des sites non spécifiques se fait par incubation de la membrane de nitrocellulose avec une solution de BSA ou de lait. La BSA ou la Caséine contenue dans le lait se fixe à la membrane empêchant ainsi toute interaction non spécifique des anticorps (utilisés dans l'étape suivante) avec la membrane (**figure 10**).

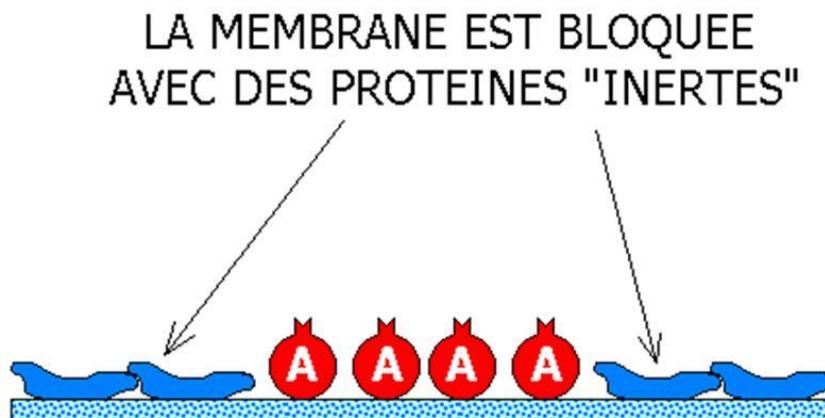


Figure 10 : Blocage des sites non spécifiques de fixation sur la membrane de nitrocellulose.

I.3.3. Marquage immunologique

La membrane est incubée avec une solution d'anticorps primaire spécifique à la protéine recherchée. La protéine joue alors le rôle d'antigène face à l'anticorps. Une fois le complexe antigène-anticorps formé, il faut le détecter. Cette étape se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) qui détecte les emplacements où des anticorps primaires se sont fixés sur des antigènes ancrés à la membrane. L'anticorps secondaire n'a pas besoin d'être aussi spécifique que l'anticorps primaire, mais on le choisit en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (souvent IgG) de l'espèce animale d'où provient l'anticorps primaire (**figure 11**).

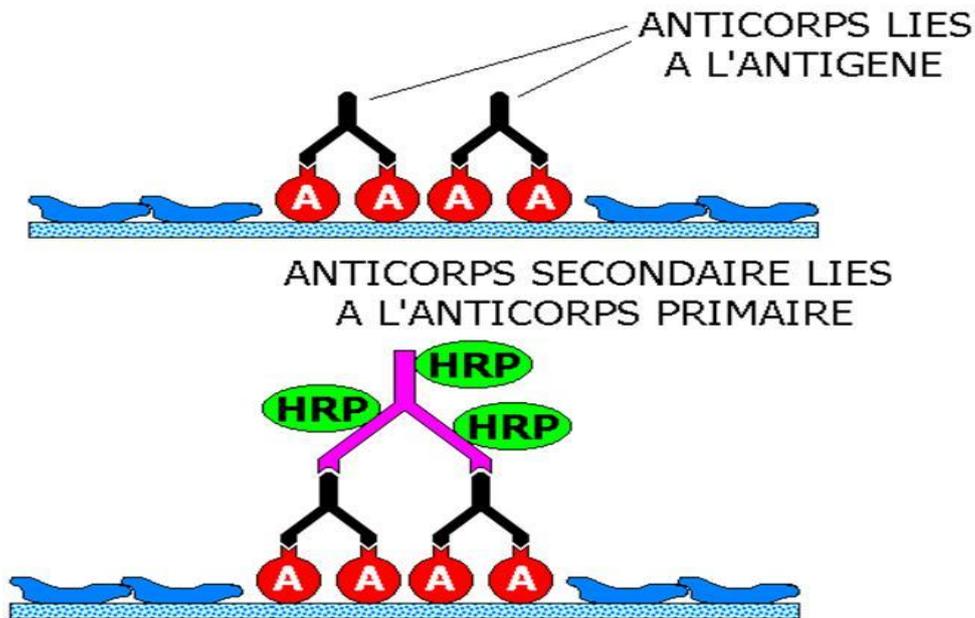


Figure 11 : Détection de la protéine recherchée par immunomarquage.

I.3.4. Révélation ECL (enhanced chemiluminescence)

La luminescence est l'émission de lumière résultant d'une dissipation d'énergie à partir d'une substance à l'état excité. De nos jours, Enhanced Chemiluminescence ou ECL constitue la méthode de détection la plus sensible pour l'analyse du western blotting. Elle consiste en l'excitation d'une substance par une réaction chimique.

Dans cette méthode la membrane de nitrocellulose est incubée pendant trois minutes à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs du kit ECL (**figure 12-A**) à raison de $125 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ environ.

- ⇒ L'anticorps secondaire est conjugué (lié de manière covalente) à l'enzyme Horse Radish Peroxidase (HRP). L'activité enzymatique de la HRP sera détectée grâce à une méthode de chimiluminescence pour trouver la position des complexes antigène-anticorps (**figure 12-B**).
- ⇒ L'HRP catalyse l'oxydation du luminol (composant du kit de détection) dans des conditions alcalines (**figure 12-C**).
- ⇒ Le luminol à l'état excité, retourne à l'état fondamental en émettant une lumière. Après élimination de l'excès de solution, la membrane est enveloppée dans un film plastique transparent (**figure 13-A**) et la lumière émise est détectée par l'un des deux procédés :

- 1- Sur un film photographique : développé dans une chambre noire (méthode classique) (**figure 13-A**).
- 2- Dans un appareil de luminescence (Luminescence analyser System) : (méthode moderne). La membrane est placée dans l'enceinte de l'appareil. Le temps de révélation est mis au point en fonction de l'apparition des bandes en prenant en compte le phénomène de saturation (**figure 13-B**).

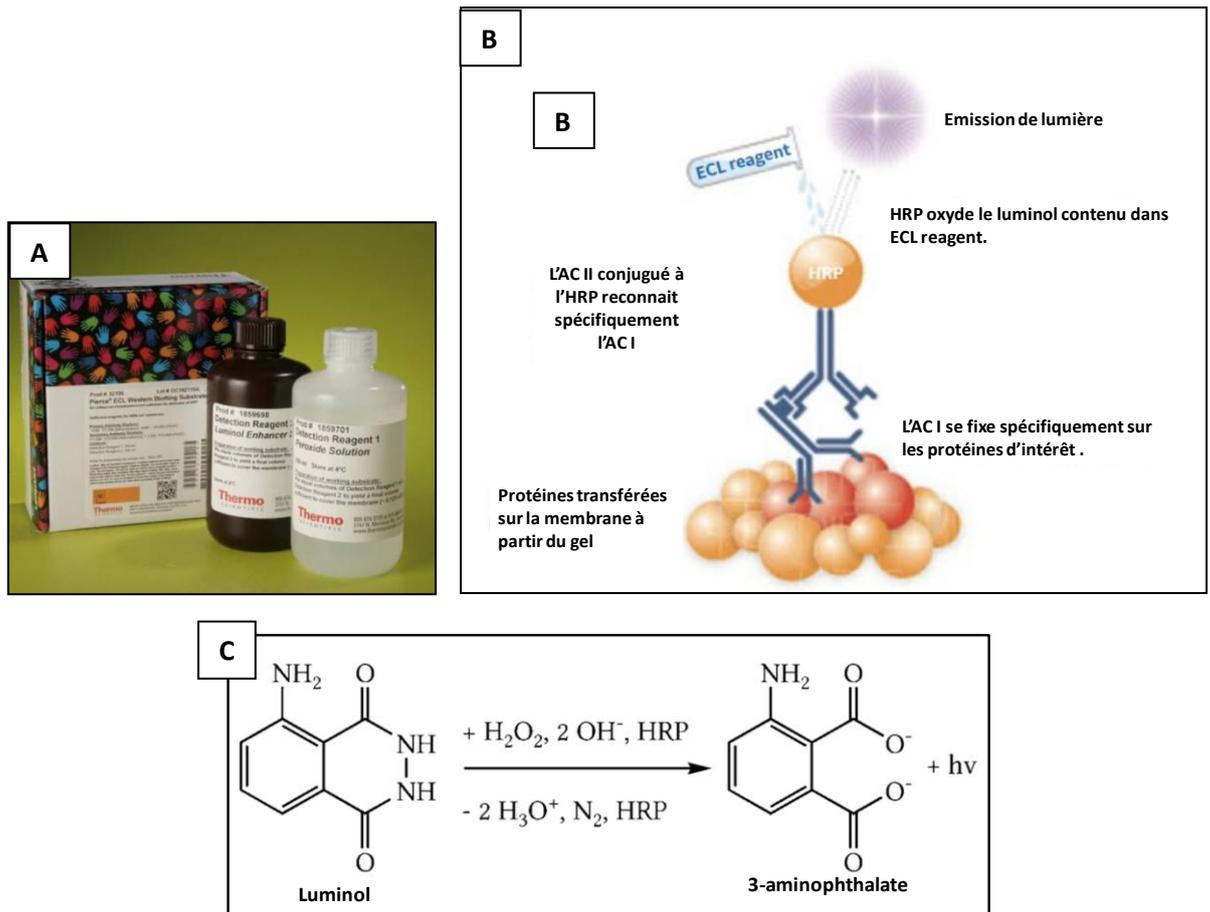


Figure 12 : **A)** Kit ECL composé de deux réactifs ; le réactif de détection du peroxyde (HRP) et le réactif de détection du luminol. **B)** Principe de la technique de révélation ECL. **C)** oxydation du luminol par le HRP.

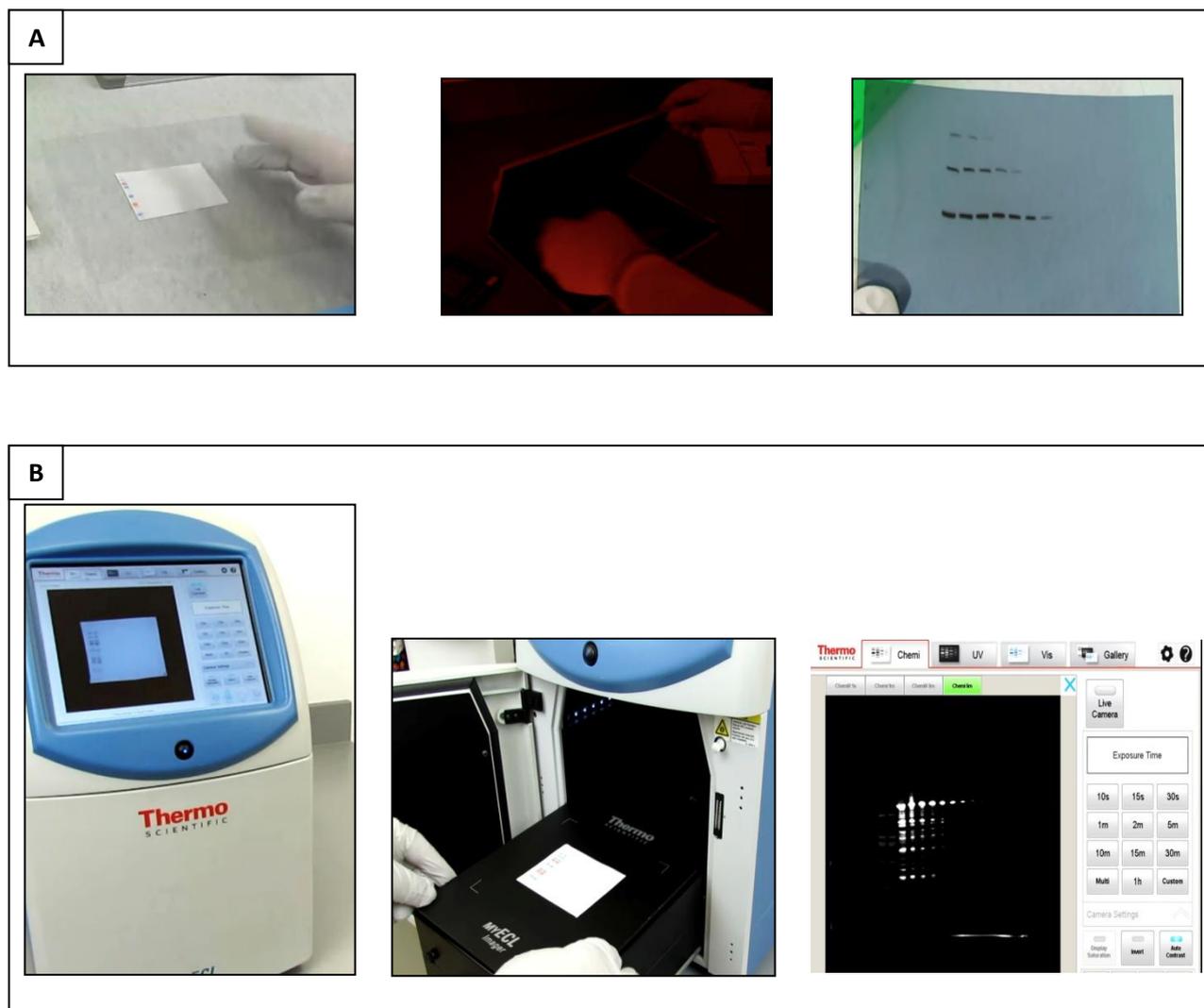


Figure 13 : A) Révélation des bandes protéiques sur un film photographique. B) Révélation des bandes protéiques dans le « Luminescence analyser System ».