

Protéomique analytique et fonctionnelle

Chapitre IV

Protéomique fonctionnelle

- I. Introduction**
- II. Approches biologiques de mise au point des interactions protéine/protéine**
 - II.1. Approche biochimique**
 - II.1.1. L'immunoprécipitation**
 - II.1.2. La chromatographie**
 - II.2. Approche génétique**
 - II.2.1. Le double hybride**
 - II.3. Approche par immunofluorescence**
 - II.3.1. Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**

I. Introduction

Il existe dans le contexte cellulaire de multiples mécanismes de régulation dont certains résultants d'un réseau complexe d'interactions protéiques.

Les interactions entre protéines sont impliquées dans la plupart des fonctions cellulaires : transport, contraction musculaire, transduction du signal...Des interactions incorrectes sont à l'origine de plusieurs pathologies. La connaissance de ces interactions est nécessaire à la compréhension du fonctionnement cellulaire. En plus, c'est une base essentielle à la conception des médicaments. L'identification des interactions protéine/protéine constitue un champ d'investigation très actif de la protéomique. Leur exploitation utilise différentes techniques, en voici quelques unes :

Approche biochimique

- a) La chromatographie d'affinité
- b) La co-immunoprécipitation

Approche génétique

Le double hybride

Immunofluorescence

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

II. Approches biologiques de mise au point des interactions protéine/protéine

II.1. Approche biochimique

II.1.1. La chromatographie d'affinité

La technique repose sur l'isolation d'un complexe formé par des protéines en interaction. Elle comporte une phase stationnaire (résine/matrice sur la colonne) et une phase liquide (tampon d'élutions).

Principe général de la technique

La technique comporte trois étapes :

- a) Le couplage du ligand (L) sur la matrice (résine)
- b) Adsorption du substrat (S) sur le ligand (S=molécule d'interaction)
- c) Désorption du S par un solvant qui déstabilise l'interaction S-L.

Affinité ?

La séparation se fait car la molécule d'interaction (S) a une affinité d'ordre biologique ou fonctionnelle pour une composante de l'adsorbant et est donc capable de s'y lier de façon stable.

Ex : si on fixe un Ac comme ligand sur la résine, celle-ci acquerra une affinité pour l'Ag correspondant. De la même manière, ligand avec son récepteur, enzyme avec son substrat ou encore hormone et son récepteur.

a) Couplage (coupling)

Se fait dans les conditions natives (sans dénaturation du ligand) pour qu'il garde son affinité (domaine d'interaction). Il existe sur le marché des résines de couplage préparées d'avance sur lesquelles on peut coupler le L choisi. En général les résines utilisées sont : l'agarose, le polyacrylamide, la cellulose, la silice... Le couplage du ligand se fait en quatre étapes :

:

1- Activation du gel (résine) : pour qu'elle puisse faire des liaisons covalentes avec L. la liaison se fait grâce à un spacer afin d'éviter les liaisons non spécifiques du ligand avec la matrice elle-même.

2- Mise en contact de la résine avec L.

3- Déclenchement de la réaction de formation des liaisons covalentes en variant les conditions physicochimiques.

4- Elimination des réactifs résiduels en percolant le gel avec un tampon approprié.

b) Adsorption

Se fait dans des conditions physicochimiques appropriées (pH, force ionique...) où l'équilibre de la réaction tend fortement vers le maintien de l'interaction.

Les molécules sans affinité pour le ligand ne se lieront pas. La colonne est ensuite lavée avec le solvant d'adsorption pour éliminer toutes les molécules non liées.

c) Désorption

Se fait en exposant le complexe Résine/L/S à des conditions qui déstabilisent l'interaction (en changeant les conditions physicochimiques). On peut aussi utiliser un détergeant (Triton, Tween 20) ou un ligand compétitif.

Application en protéomique

Il s'agit là d'isoler un complexe formé par des protéines en interaction

- La protéine d'interaction est fusionnée avec une étiquette et fixée sur un support solide (billes) (L).
- La résine (billes) est incubée avec l'extrait cellulaire.
- Les protéines ayant de l'affinité pour Protéine/étiquette entrent en interaction avec elle formant le complexe protéine/étiquette/protéine de l'extrait cellulaire.
- Le complexe est ensuite libéré par coupure enzymatique et soumis à une électrophorèse 2D.

- Les protéines sont identifiées par spectrométrie de masse (**figure 1**).

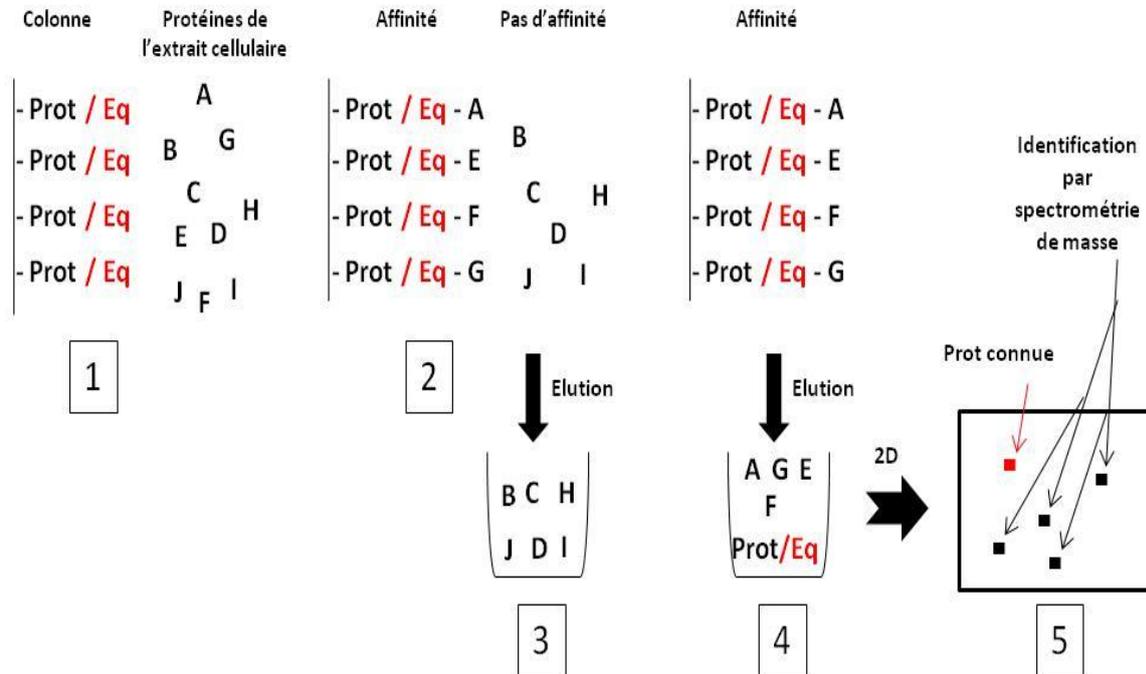


Figure 1 : Etapes de la chromatographie d'affinité appliquée à la protéomique.

II.1.2. La co-immunoprécipitation

C'est une technique de sédimentation d'une protéine en particulier par les billes de sépharose (polymère d'agarose). Si on peut faire sédimenter une protéine, on peut le faire pour un complexe protéique.

On aimerait savoir si A interagit avec B, on fait exprimer les protéines A et B par des vecteurs suivant le schéma de la **figure 2**.

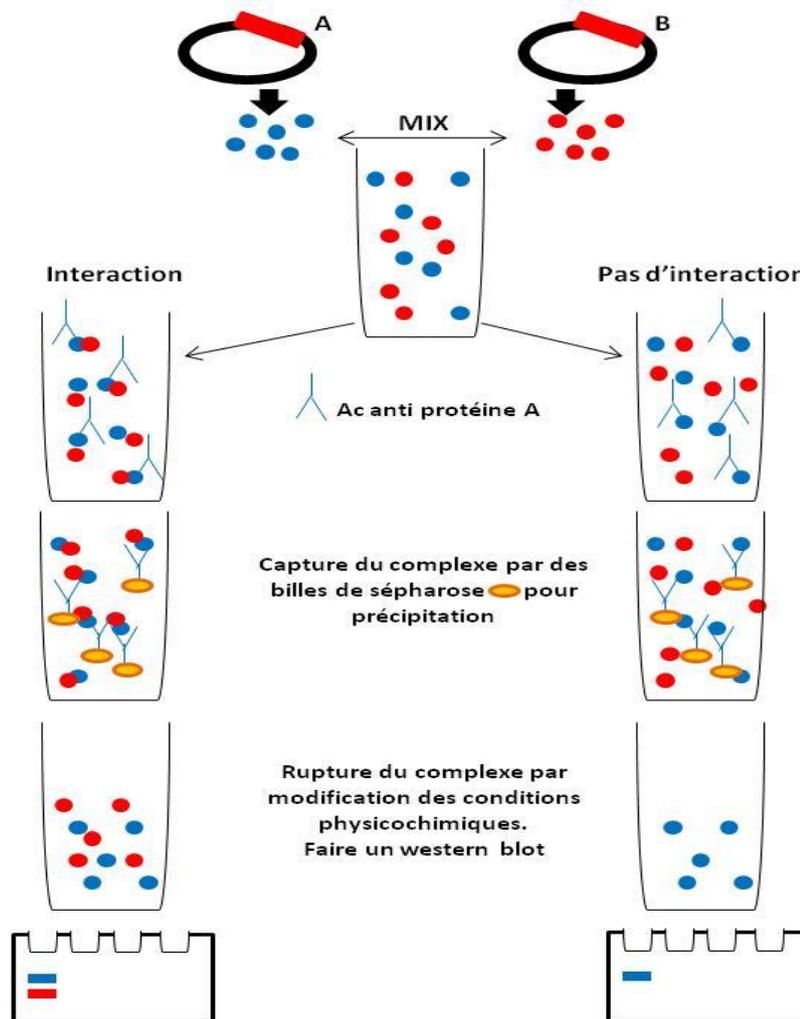


Figure 2 : Etapes de la co-immunoprécipitation.

II.2. Approche génétique

II.2.1. Le double hybride

La technique est basée sur la reconstruction d'un activateur transcriptionnel par interaction protéique et repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes ne nécessite que deux domaines.

- ⇒ Domaine d'interaction avec l'ADN (DLA)
- ⇒ Domaine d'activation (DA)

DLA se fixe sur son domaine de liaison à l'ADN, interagit avec DA. Le complexe DLA/DA induit la transcription. Lorsque DLA et DA sont séparés, ils n'induisent plus la transcription.

Pourquoi double hybride ???

Dans ce système, lorsqu'on cherche à mettre en évidence une éventuelle interaction entre la prot A et la prot B, on crée des hybrides génétiques de ces protéines par génétique.

- ⇒ La protéine A est fusionnée avec DLA (APPAT)
- ⇒ La protéine B est fusionnée avec DA (CIBLE)
- DLA va se lier au promoteur, si la protéine B a de l'affinité pour la protéine A, le facteur de transcription va être reconstitué et y'aura transcription. Sinon, y'aura pas de transcription du gène rapporteur. Même si les protéines A et B dans leurs contexte naturel n'ont rien avoir avec l'expression des gènes.
- Le gène rapporteur utilisé dans le double hybride est le LacZ codant la β Galactosidase.
- LacZ est sous le control du facteur de transcription Gal 4.
- Gal 4 se fixe sur le promoteur Gal.

Voici les différents cas de figures (**figure 3**).

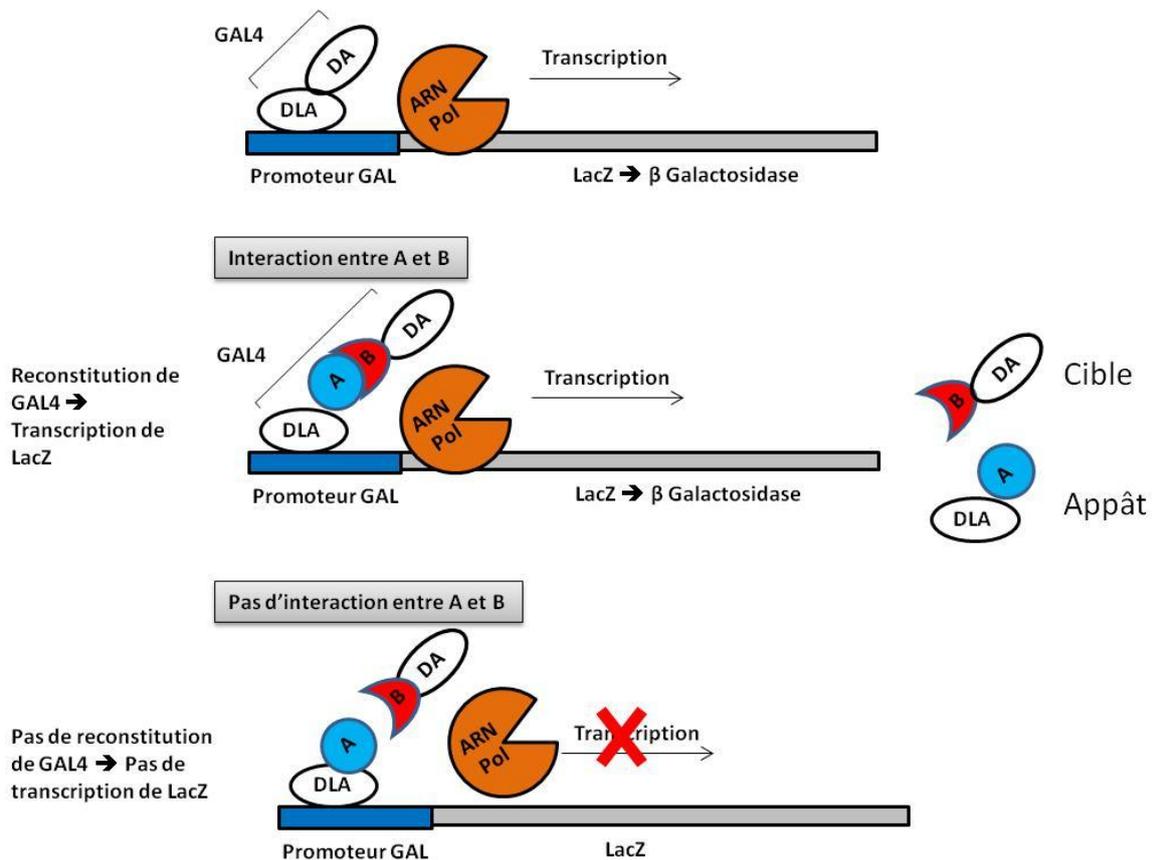


Figure 3 : Le double hybride.

Révélation :

L'expression du gène LacZ est mise en évidence par le substrat de la β Galactosidase qui est le X Gal. Coloration bleu (**figure 4**).

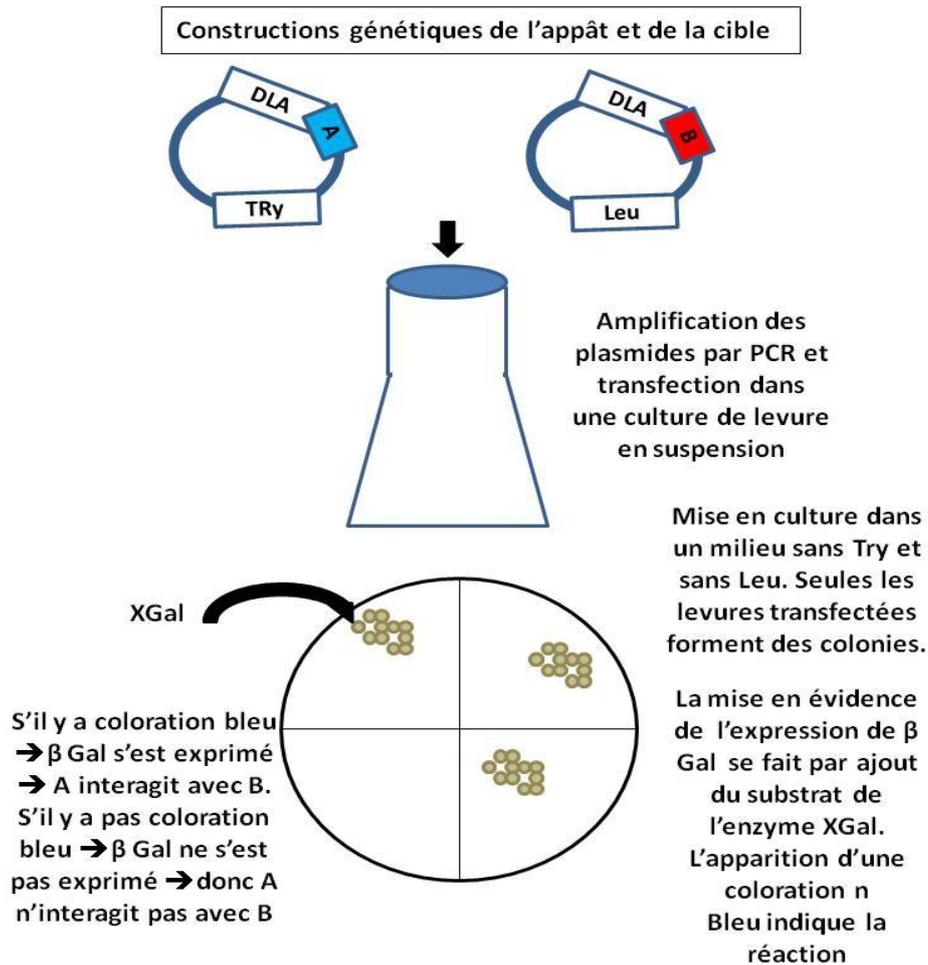


Figure 4 : Etapes de la méthode du double hybride.

II.3. Immunofluorescence

II.3.1. Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

On peut par FRET détecter la proximité de deux molécules fluorescentes

- ⇒ La première est excitée à une longueur d'onde λ_1 et émet à λ_2 .
- ⇒ La deuxième molécule est excitée à λ_2 et émet à λ_3 (**figure 5**).

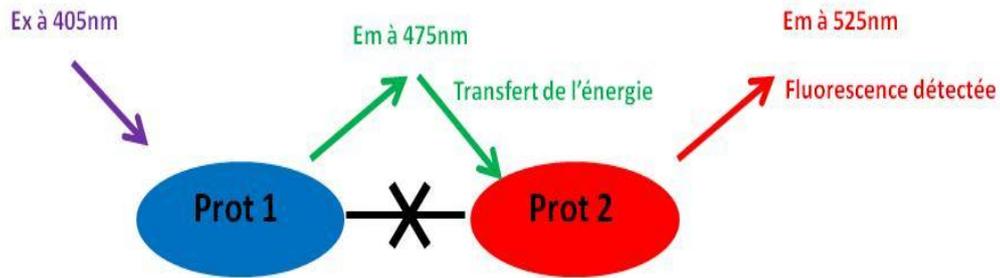


Figure 5 : Transfert d'énergie dans le FRET.

- Le transfert (et donc l'interaction des deux protéines) est détecté par l'émission de lumière à 525nm.
- Pour qu'il y ait transfert, les molécules doivent être séparées par 10 à 100Å et le spectre d'émission du donneur doit chevaucher le spectre d'absorption de l'accepteur (**figure 6**).

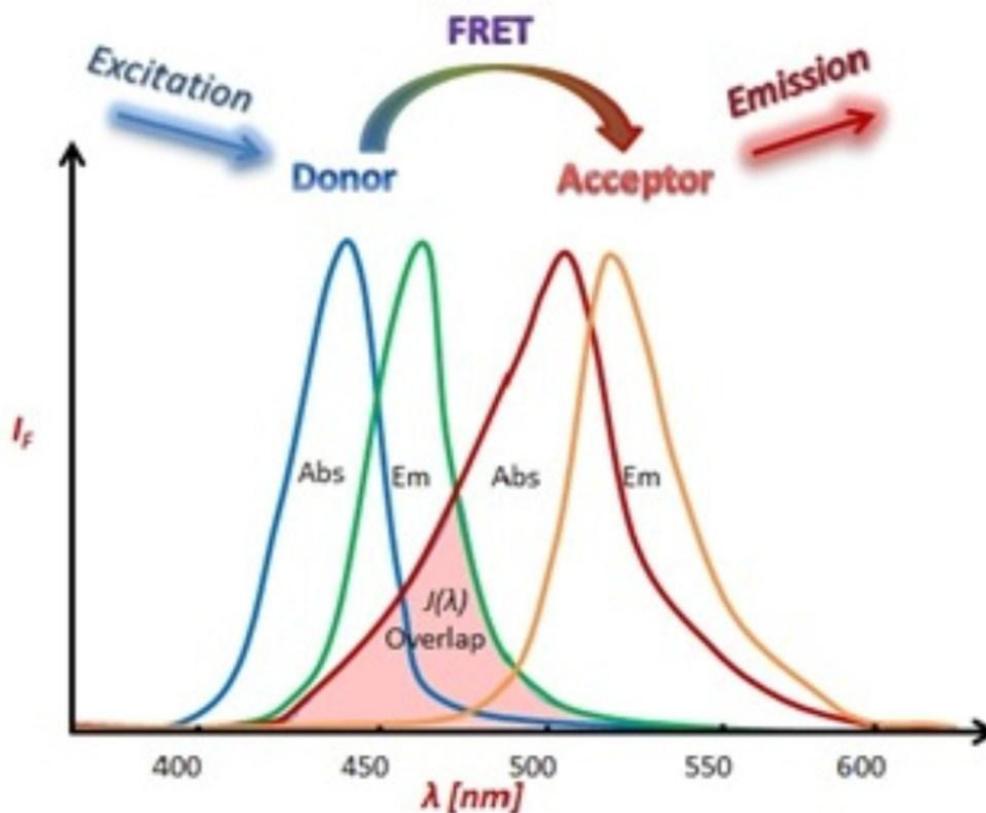


Figure 6 : Spectre d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur dans le FRET.

Les protéines A et B sont préalablement marquées par des fluorophores M1 et M2 suivant le protocole de marquage immunofluorescent direct ou indirect (**figure 7**).

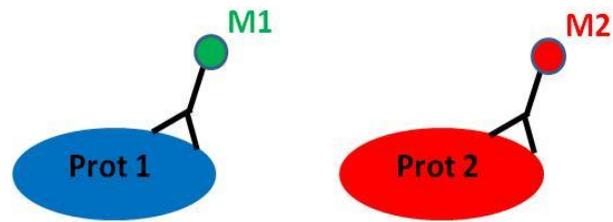


Figure 7 : Marquage immunofluorescent direct des protéines 1 et 2.