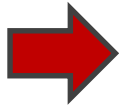


Cours Biochimie I

Leçon 3 : Exploration des protéines et des protéomes



Leçon	Subject	Page en Stryer
1	Introduction en biochimie / classes de biomolécules / aminoacides	4-17 (1.2, 1.3), 25-40 (2.1, 2.2)
2	Composition et structure des protéines	40-59 (2.3-2.6)
3	Exploration des protéines et des protéomes	65-90 (3.1-3.3), 93-101 (3.5, 3.6)
4	Structure de la DNA et RNA	107-119 (4.1-4.3)
5	Explorer les gènes et les génomes	134-144 (5.1, 5.2 premières 3 pages)
6	Synthèse des protéines / expression recombinante	117-119 (4.3), 119-127 (4.4), 142-148 (5.2)

Christian Heinis

christian.heinis@epfl.ch, BCH 5305

Structure des protéines

**Primary
structure**

**Quaternary
structure**

Pro
Ala
Asp
Lys
Thr
Asn
Val
Lys
Ala
Ala
Trp
Gly
Lys
Val

**Secondary
structure**

**Tertiary
structure**

**Amino acid
residues**

Figure 3-23

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Structure des protéines

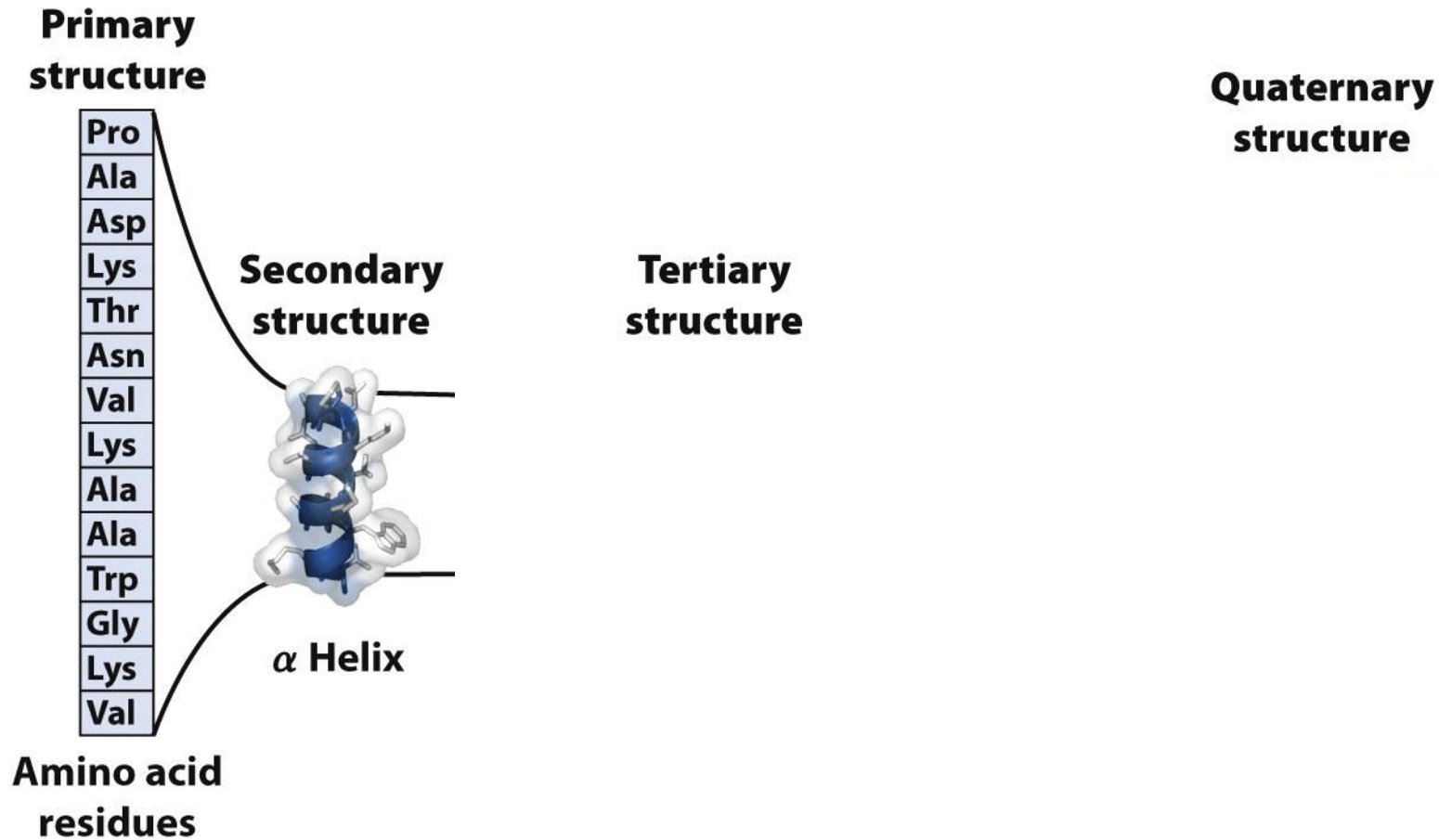


Figure 3-23

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Structure des protéines

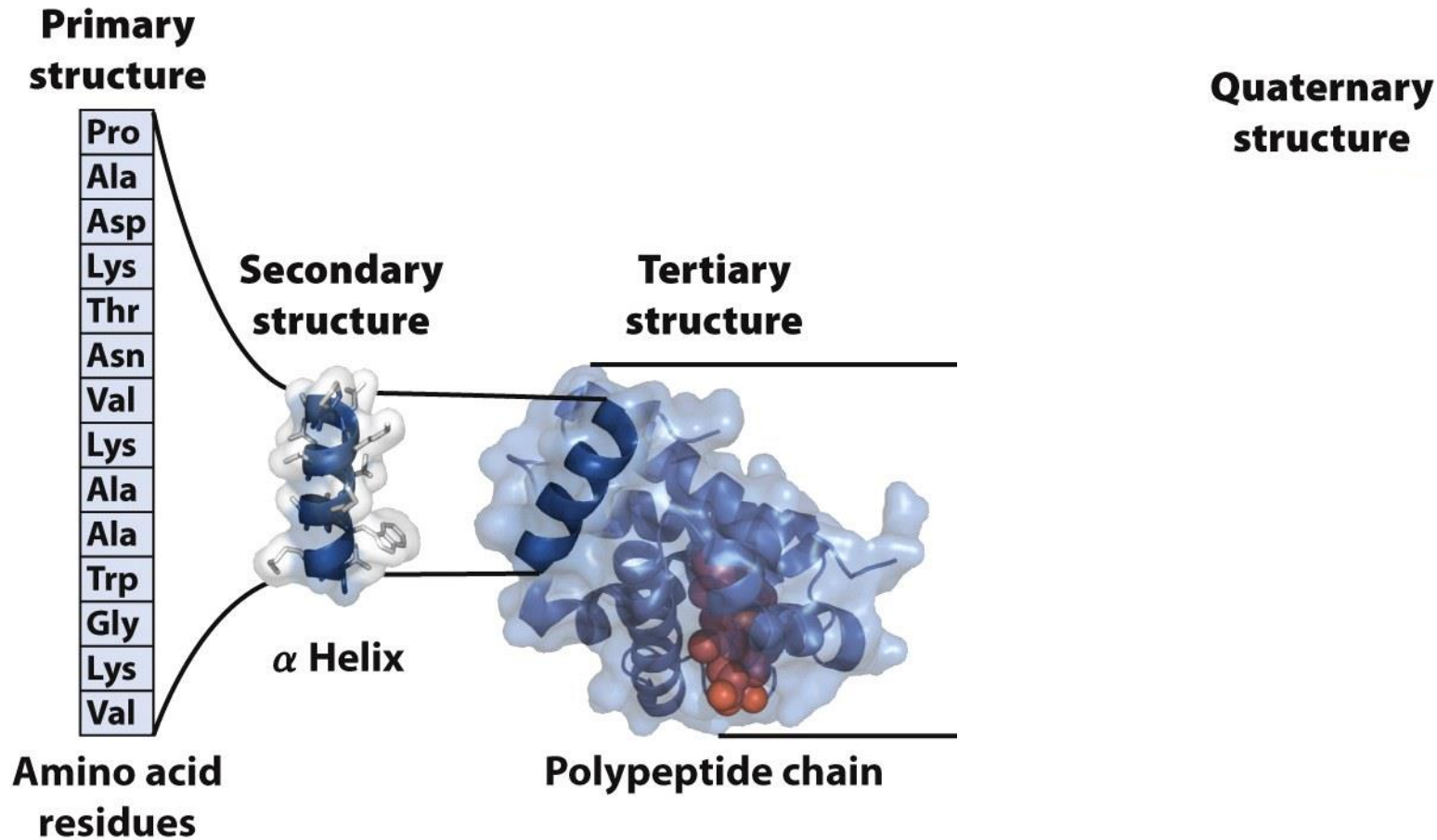


Figure 3-23

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Structure des protéines

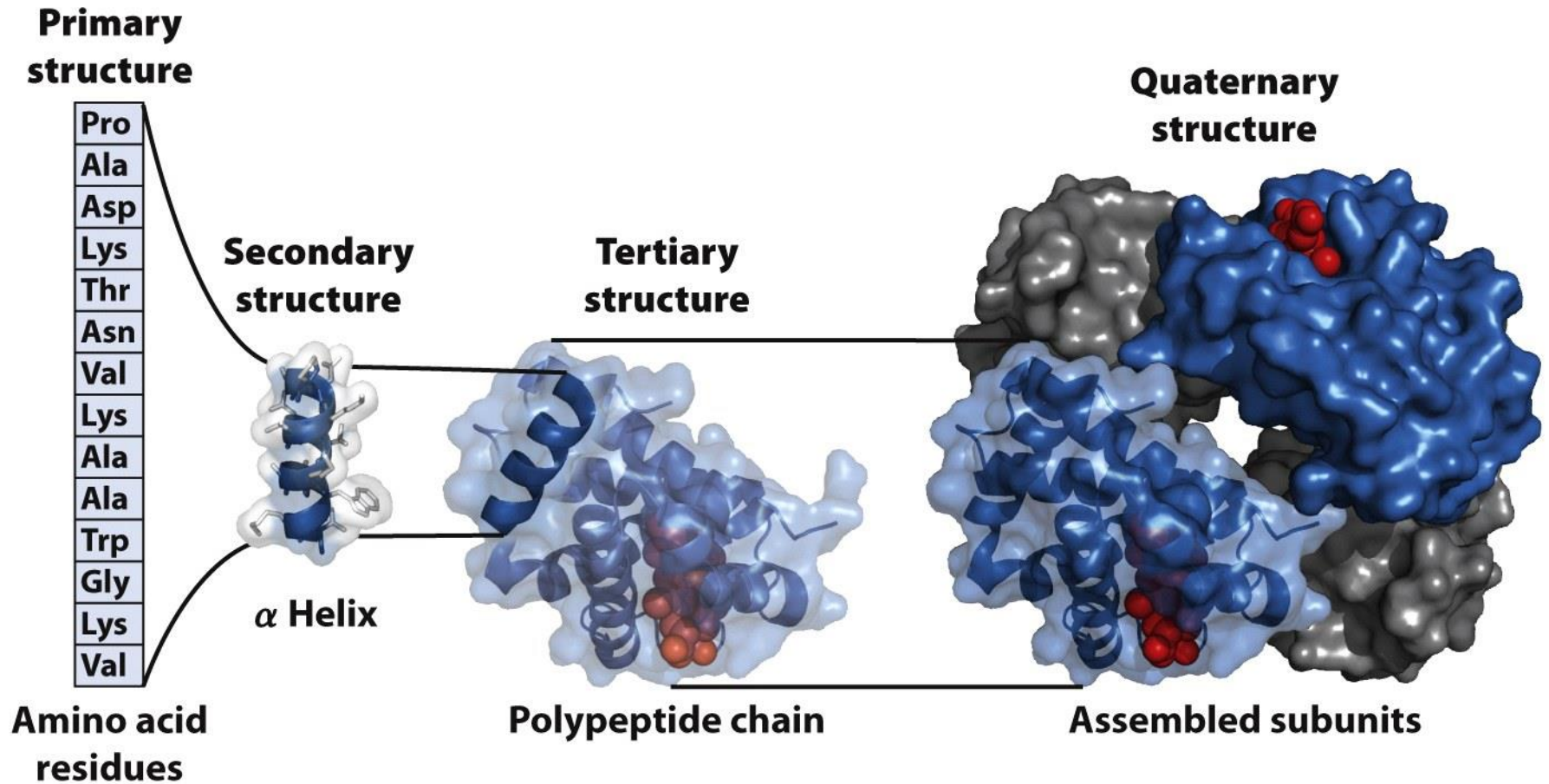


Figure 3-23

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

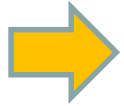
© 2008 W. H. Freeman and Company

Leçon 3

- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - Séquencer des protéines
 - Détection avec des anticorps
 - Spetrométrie de masse
 - Structure tridimensionnelle



Leçon 3



- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - Séquencer des protéines
 - Détection avec des anticorps
 - Spetrométrie de masse
 - Structure tridimensionnelle



Purification des protéines



Ver rond
(*Caenorhabditis elegans*)



Mouche des fruits
(*Drosophila melanogaster*)

*Combien de protéines différentes est-ce qu'il y a
dans un organisme?*

< 1'000

1'000-10'000

10'000-100'000

> 100'000

Diversité des protéines

Organisme:

Nombre de gènes

Ver rond
(*Caenorhabditis elegans*)

19'000



Mouche des fruits
(*Drosophila melanogaster*)

14'000



Humain
(*Homo sapiens*)

25'000

Diversité des protéines

Organisme:

Nombre de gènes

Ver rond
(*Caenorhabditis elegans*)

19'000



Mouche des fruits
(*Drosophila melanogaster*)

14'000



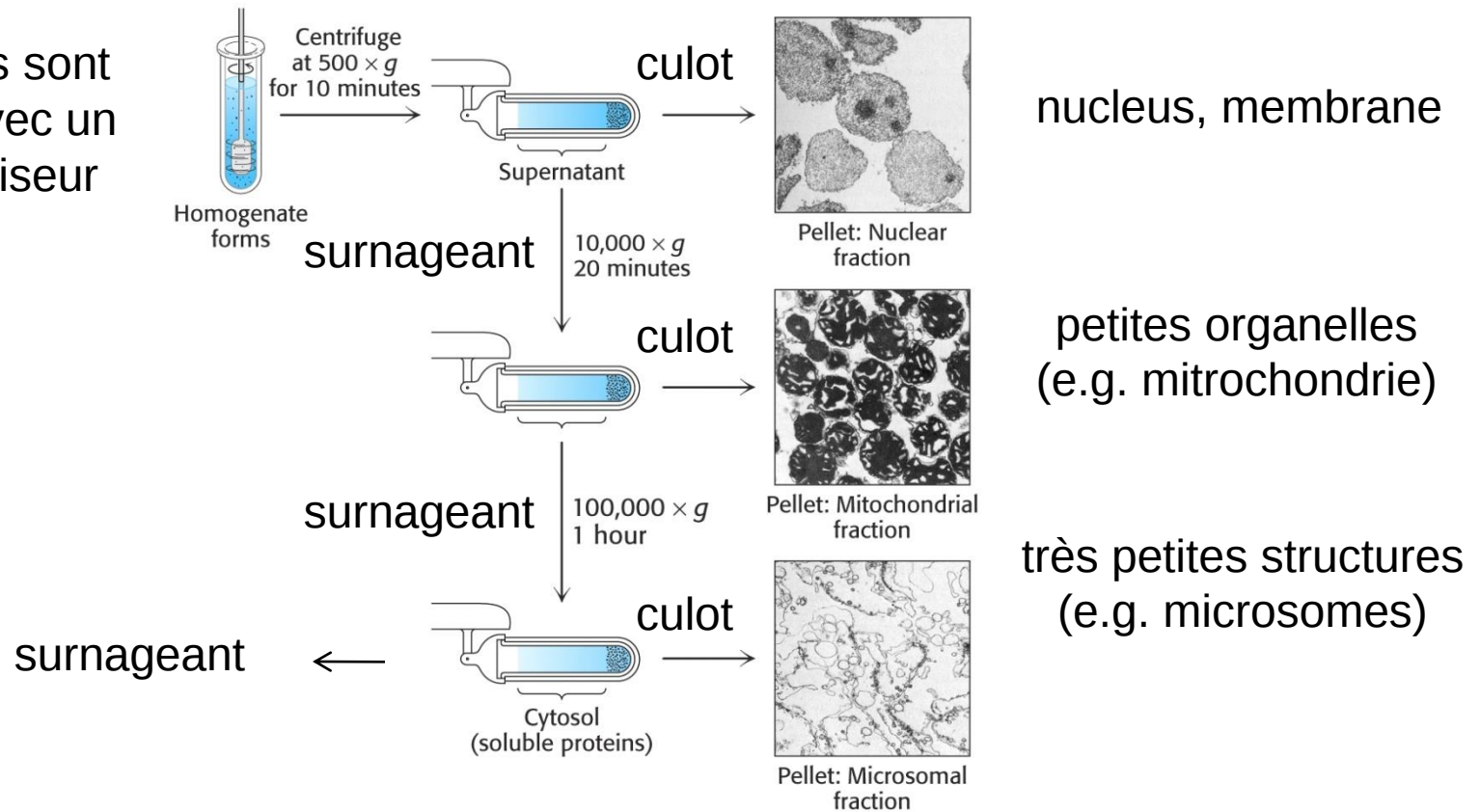
Humain
(*Homo sapiens*)

25'000

*Comment est-ce qu'on peut extraire les protéines
d'un organisme?*

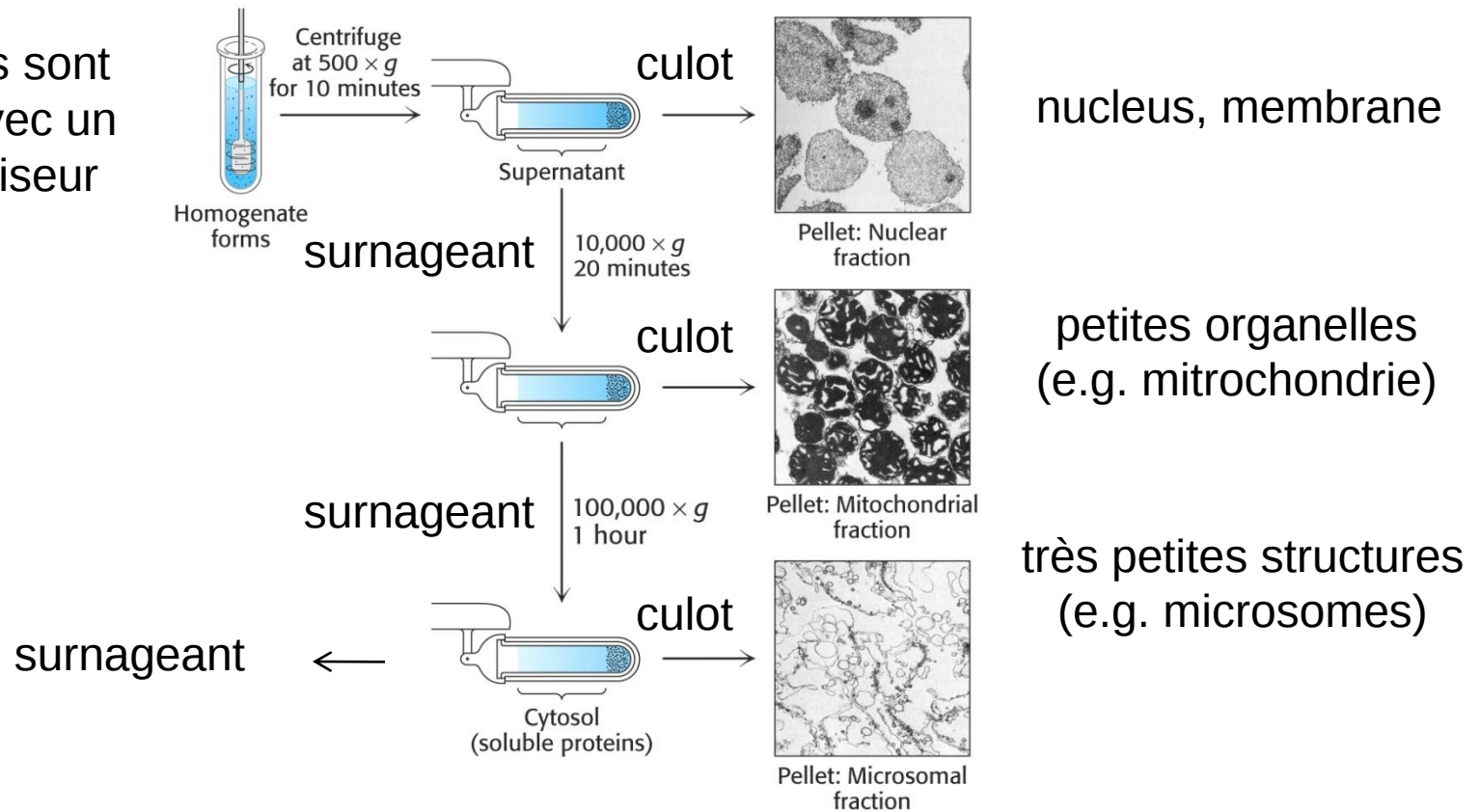
Première étape: extraction de la protéine de la cellule

des cellules sont rompues avec un homogénéiseur



Première étape: extraction de la protéine de la cellule

des cellules sont rompues avec un homogénéiseur



Comment est-ce qu'on peut séparer une protéine spécifique dans un mélange de protéines?

Méthodes pour la purification des protéines

Méthode:

Chromatographie par gel-filtration

Chromatographie par échange d'ions

Chromatographie d'affinité

Principe de séparation:

Taille

Charge

Affinité spécifique

Méthodes pour la purification des protéines

Méthode:

Chromatographie par gel-filtration

Chromatographie par échange d'ions

Chromatographie d'affinité

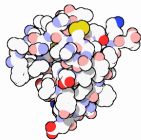
Principe de séparation:

Taille

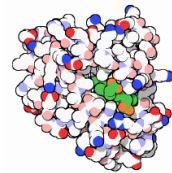
Charge

Affinité spécifique

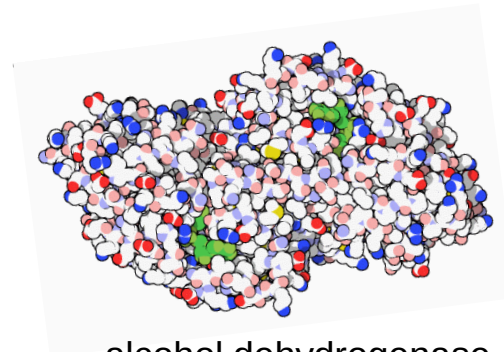
Exemple:



lysozyme



myoglobin



alcohol dehydrogenase

Méthodes pour la purification des protéines

Méthode:

Chromatographie par gel-filtration

Chromatographie par échange d'ions

Chromatographie d'affinité

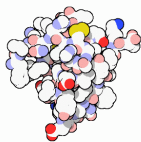
Principe de séparation:

Taille

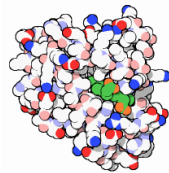
Charge

Affinité spécifique

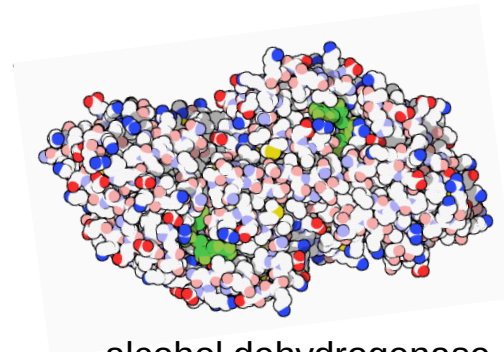
Exemple:



lysozyme



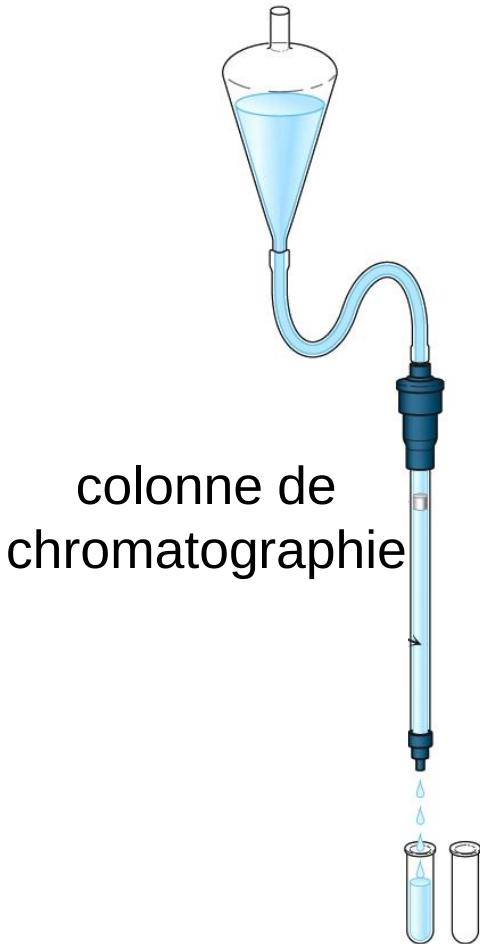
myoglobin



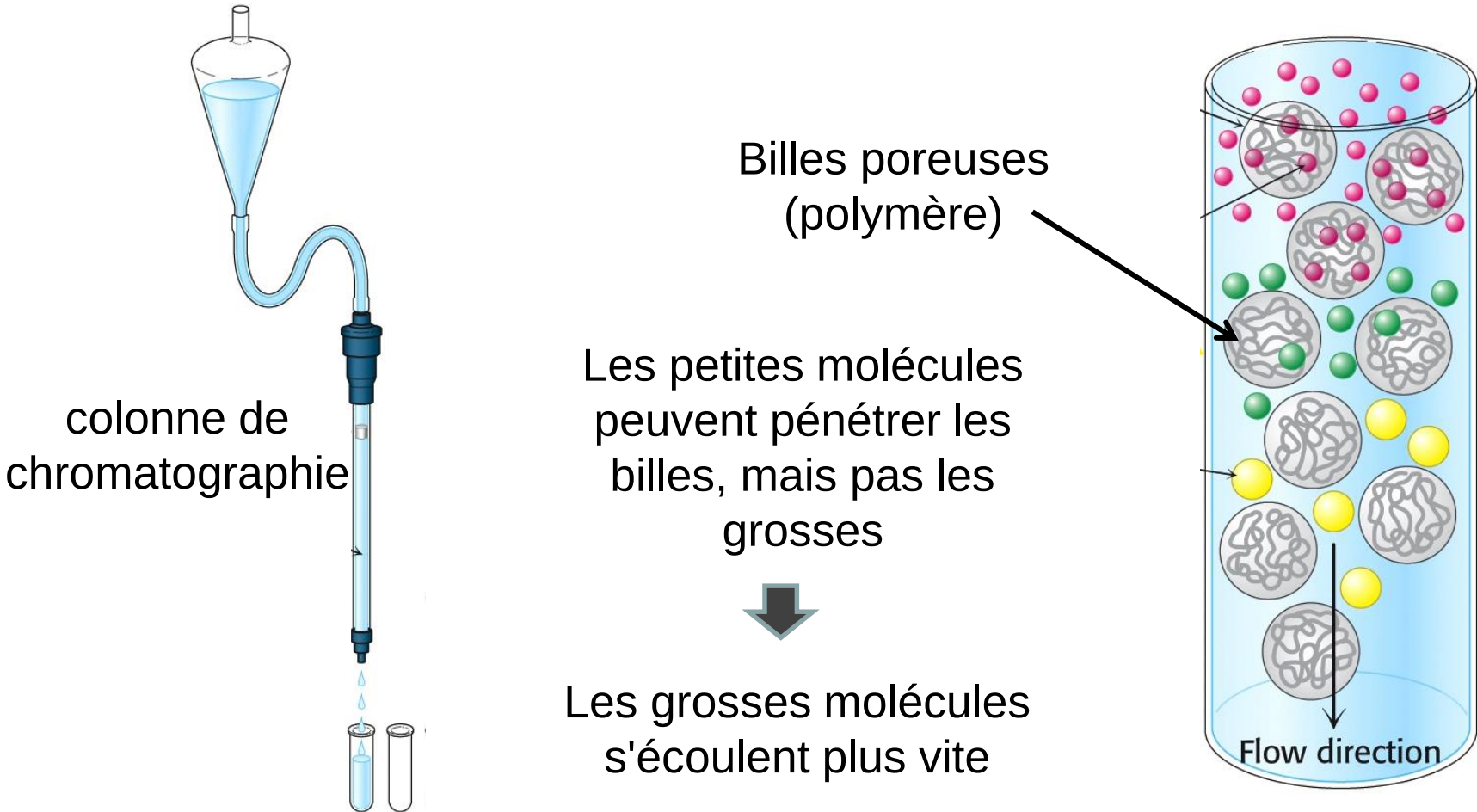
alcohol dehydrogenase

→ Séparation des protéines basé sur la taille

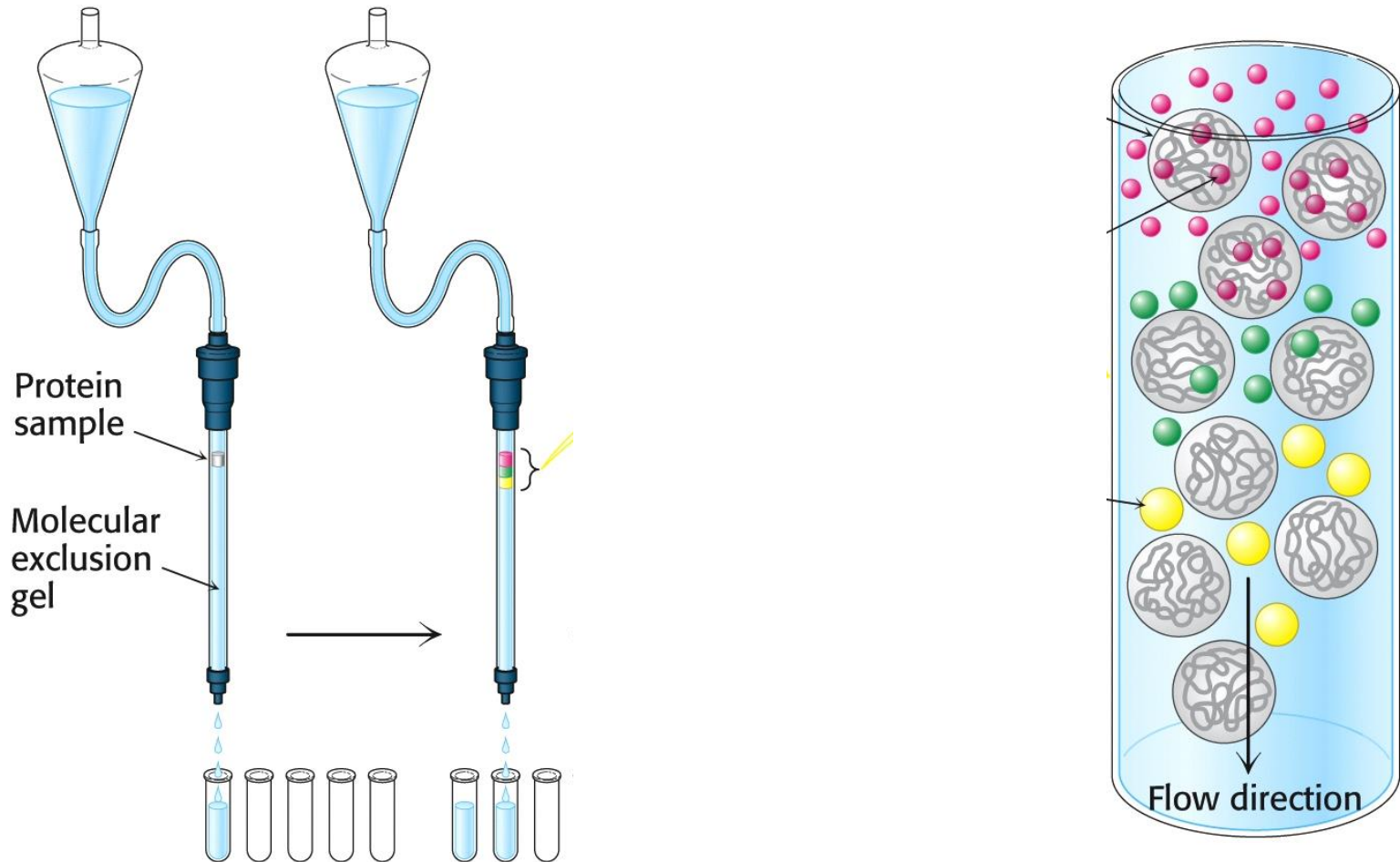
Chromatographie par gel-filtration: séparations fondée sur la taille des protéines



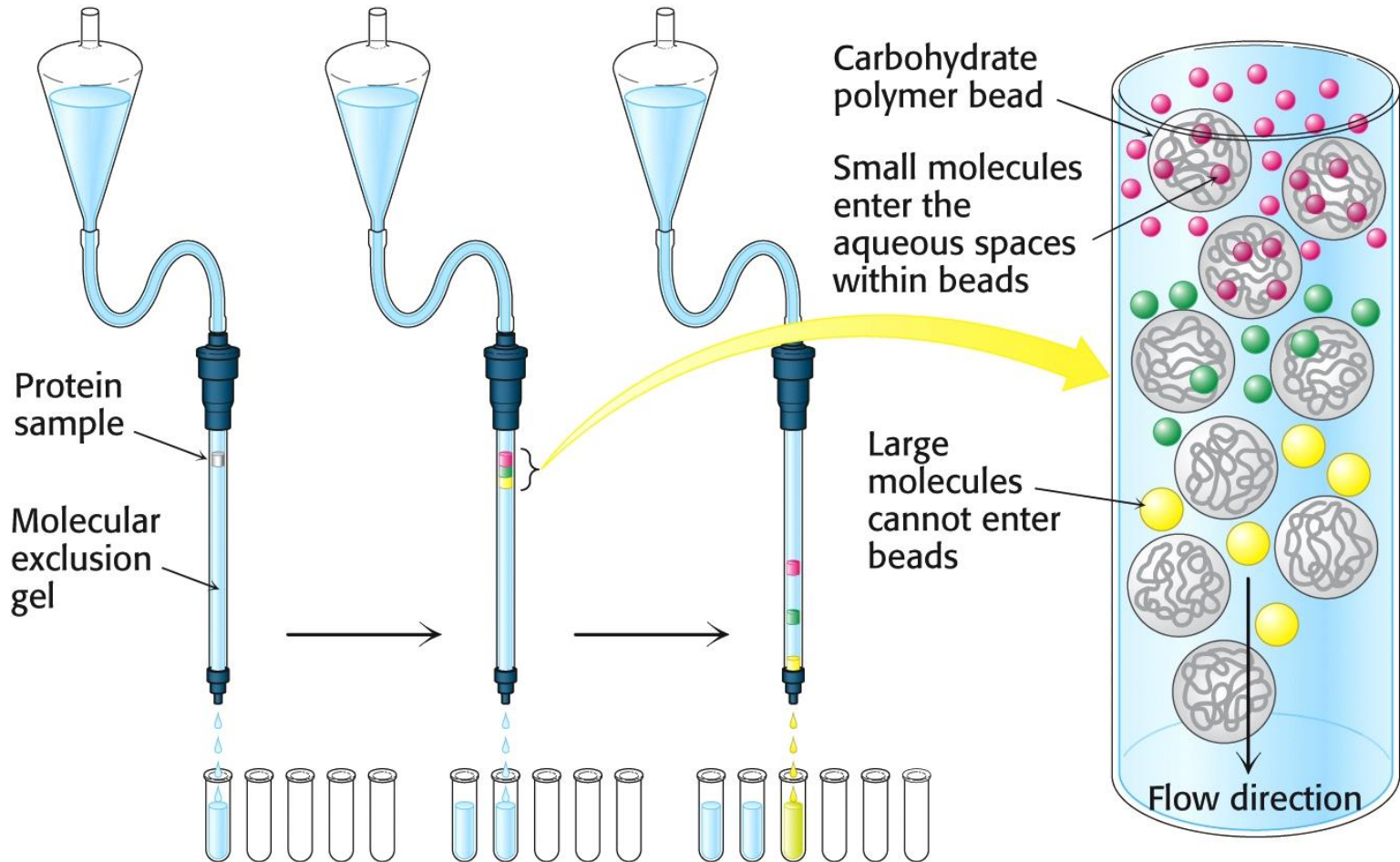
Chromatographie par gel-filtration: séparations fondée sur la taille des protéines



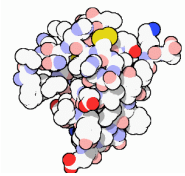
Chromatographie par gel-filtration: séparations fondée sur la taille des protéines



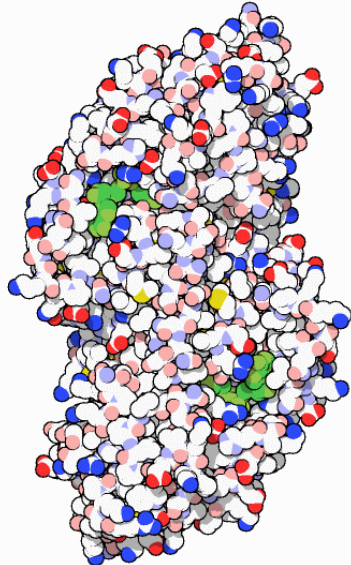
Chromatographie par gel-filtration: séparations fondée sur la taille des protéines



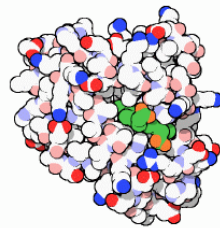
Chromatographie par gel-filtration: séparations fondée sur la taille des protéines



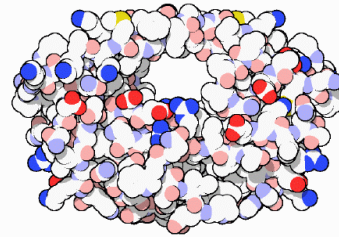
1
lysozyme



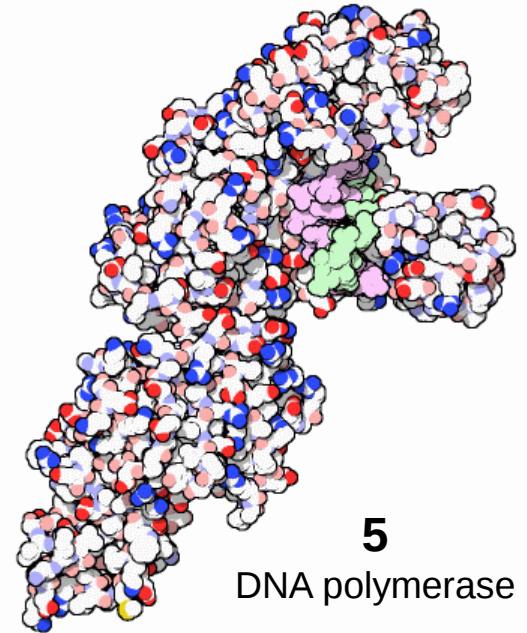
2
Alcohol dehydrogenase



3
myoglobin



4
HIV protease



5
DNA polymerase

Quelle protéine migre la plus vite?

Méthodes pour la purification des protéines

Méthode:

Chromatographie par gel-filtration

 Chromatographie par échange d'ions

Chromatographie d'affinité

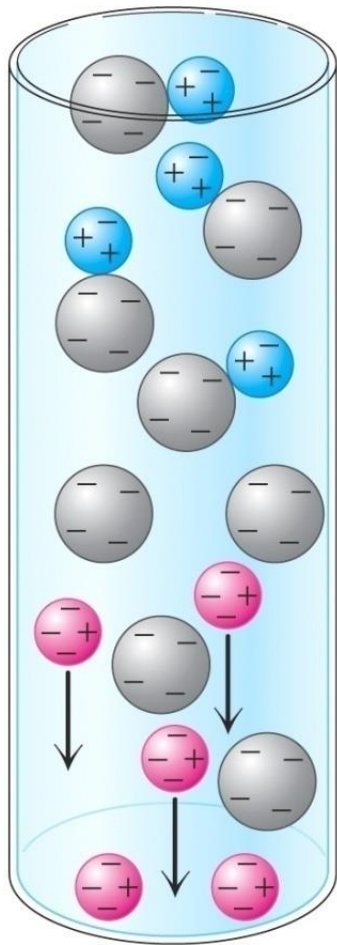
Principe de séparation:

Taille

Charge

Affinité spécifique

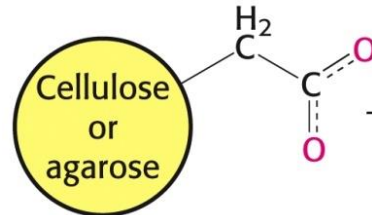
Chromatographie par échange d'ions



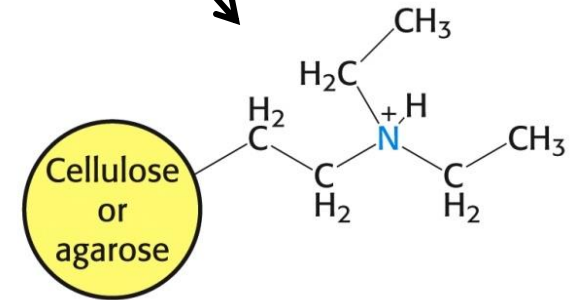
Positively charged protein binds to negatively charged bead

Negatively charged protein flows through

Billes avec des groupes chargés



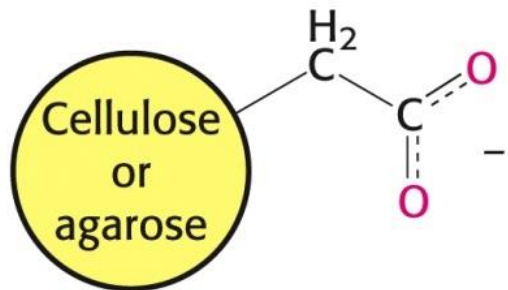
Carboxymethyl (CM) group
(ionized form)



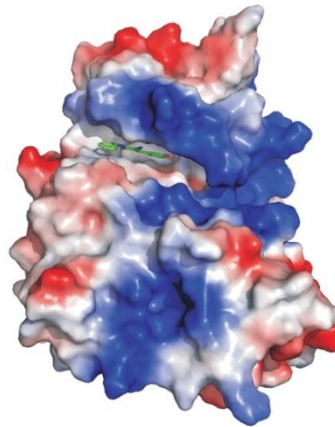
Diethylaminoethyl (DEAE) group
(protonated form)

Les protéines sont séparées sur la base de leur charge globale

Chromatographie par échange d'ions



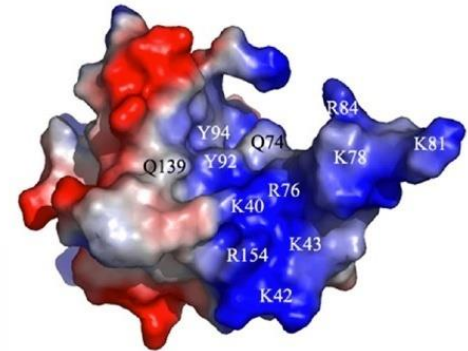
**Carboxymethyl
(CM) group
(ionized form)**



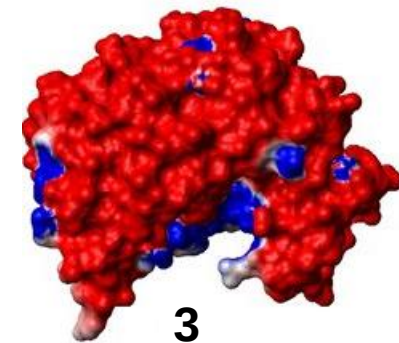
1

Aminoacides chargés positivement: bleu

Aminoacides chargés négativement: rouge



2



3

Quelle protéine migre la plus vite?

Méthodes pour la purification des protéines

Méthode:

Chromatographie par gel-filtration

Chromatographie par échange d'ions

 Chromatographie d'affinité

Principe de séparation:

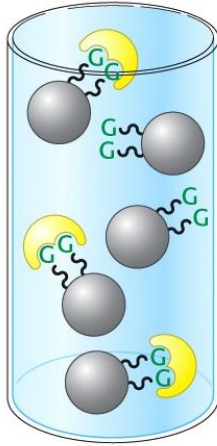
Taille

Charge

Affinité spécifique

Chromatographie d'affinité

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads

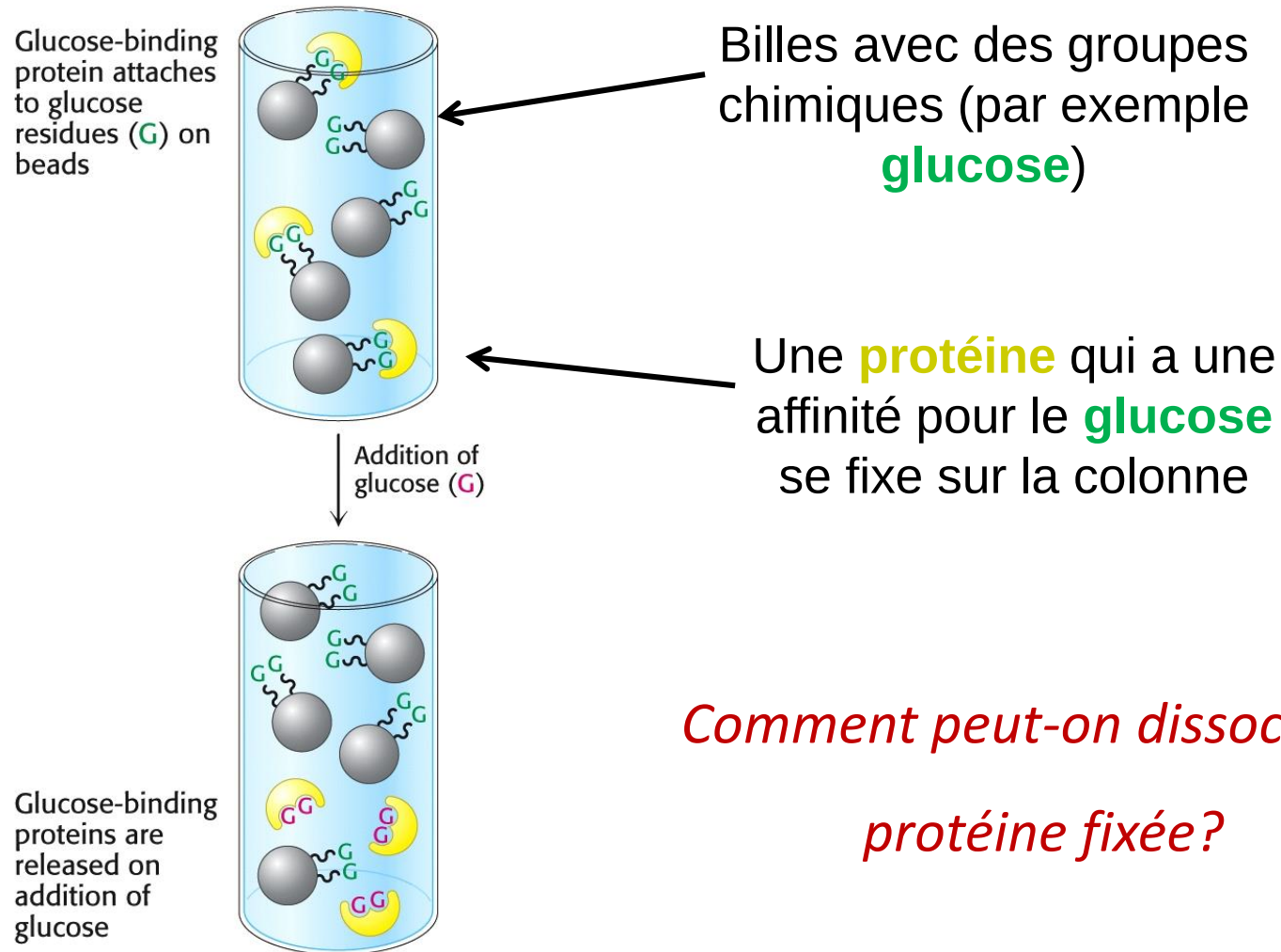


Billes avec des groupes chimiques (par exemple **glucose**)

Une **protéine** qui a une affinité pour le **glucose** se fixe sur la colonne

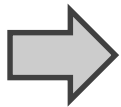
Comment peut-on dissocier la protéine fixée?

Chromatographie d'affinité



- Purification des protéines

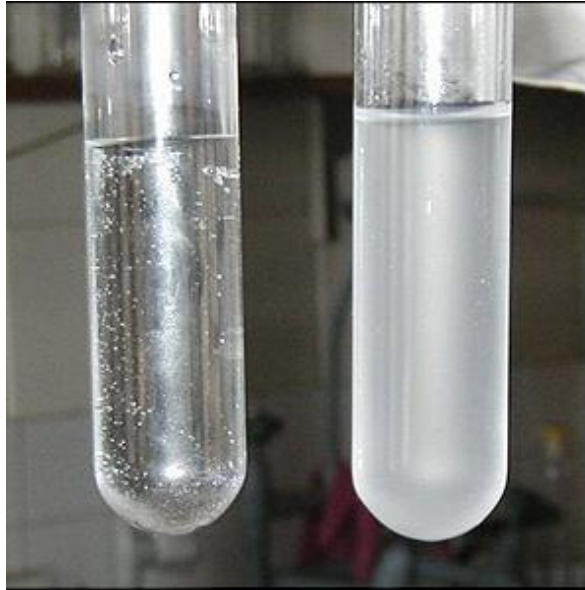
- Chromatographie par gel filtration
- Chromatographie par échange d'ions
- Chromatographie d'affinité



- L'analyse des protéines

- Mesurer la concentration
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
- Séquencer des protéines
- Détection avec des anticorps
- Spectrométrie de masse
- Structure tridimensionnelle

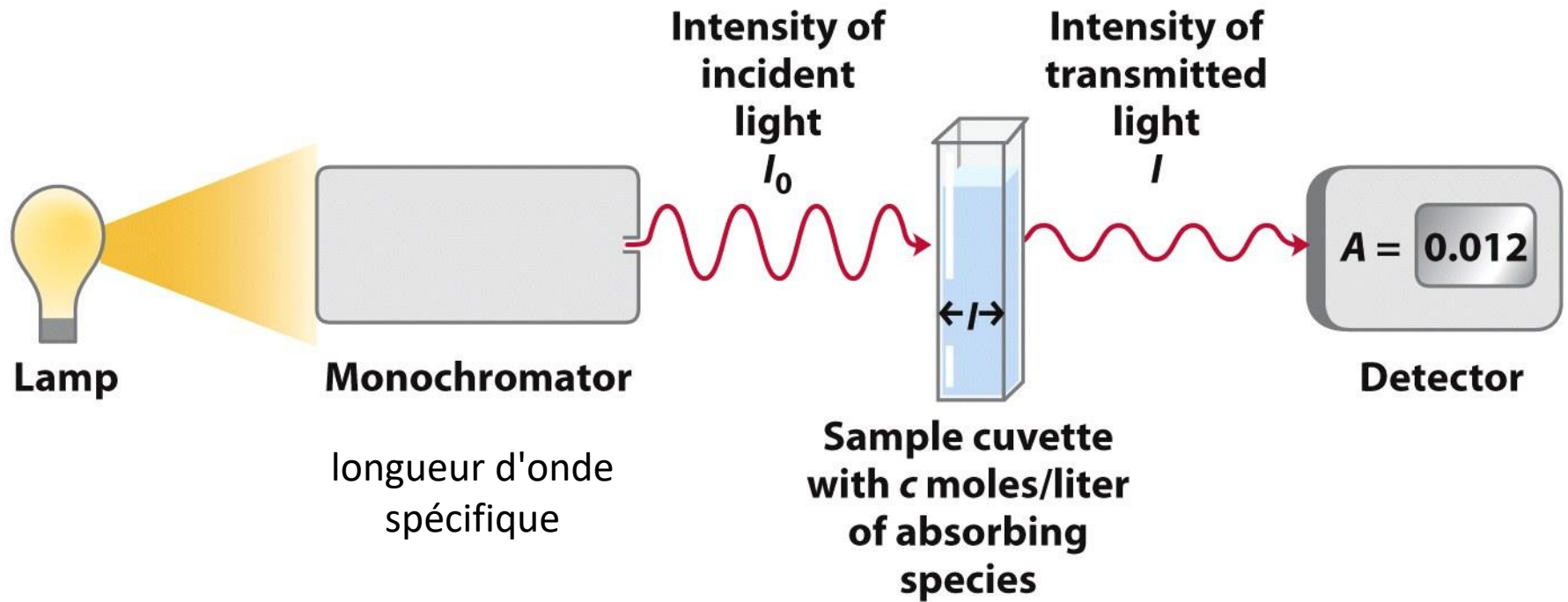
Mesurer la concentration



solutions avec protéine

*Comment peut-on mesurer la concentration
d'une protéine?*

Mesurer la concentration



Box 3-1 figure 1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

La loi de Beer-Lambert

absorption

intensité de la lumière sortante

coefficient d'extinction

diamètre de l'éprouvette

$$E = -\lg \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

intensité de la lumière incidente

concentration

The diagram illustrates the Beer-Lambert law equation: $E = -\lg \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d$. It includes several labels with arrows pointing to specific parts of the equation: 'absorption' points to E ; 'intensité de la lumière sortante' points to I_1 ; 'intensité de la lumière incidente' points to I_0 ; 'coefficient d'extinction' points to ϵ ; 'concentration' points to c ; and 'diamètre de l'éprouvette' points to d .

La loi de Beer-Lambert

absorption
↓
 E

intensité de la lumière sortante
↓
 I_1

intensité de la lumière incidente
↑
 I_0

coefficient d'extinction
↙
 ϵ

concentration
↑
 c

diamètre de l'éprouvette
↘
 d

peut être mesuré

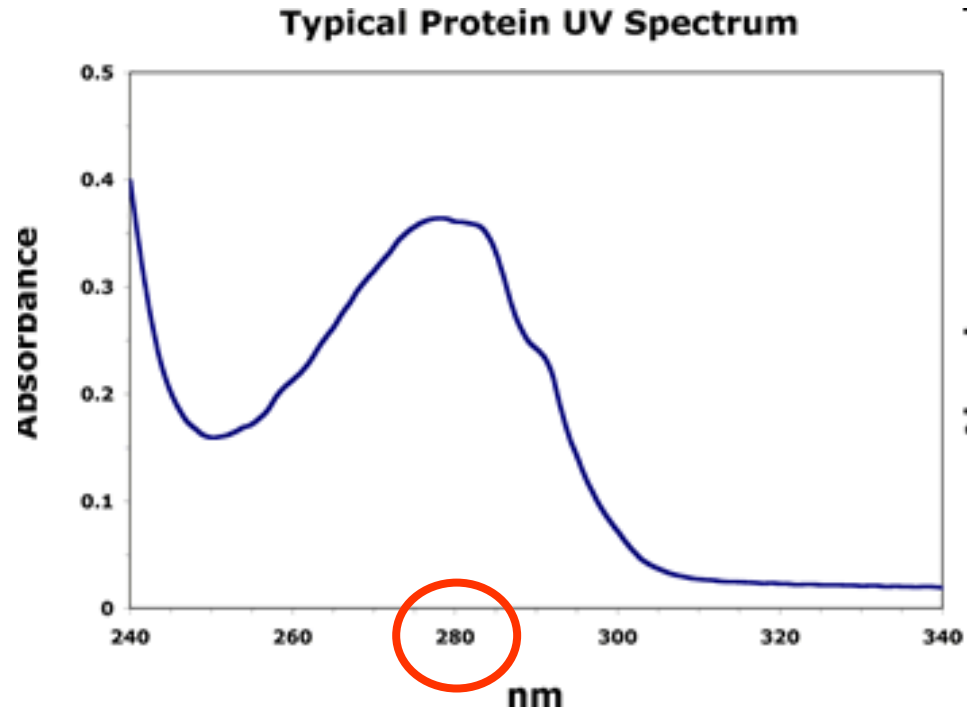
valeur spécifique pour chaque protéine

1 cm

?

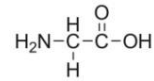
$$E = -\lg \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Un spectre d'absorption

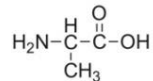


Quels sont les aminoacides qui absorbent le plus fort la lumière à une longueur d'onde de 280 nm?

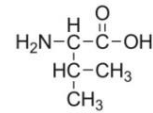
Coefficient d'extinction des aminoacides



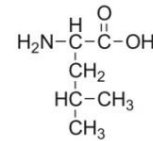
Glycine (Gly, G)



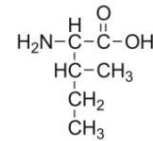
Alanine (Ala, A)



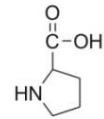
Valine (Val, V)



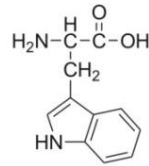
Leucine (Leu, L)



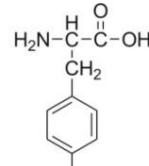
Isoleucine (Ile, I)



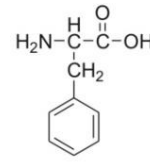
Proline (Pro, P)



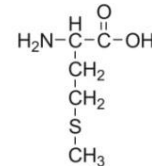
Tryptophane (Trp, W)



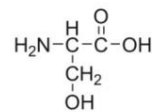
Tyrosine (Tyr, Y)



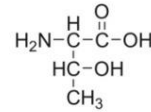
Phenylalanine (Phe, F)



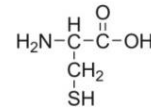
Methionine (Met, M)



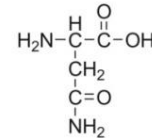
Serine (Ser, S)



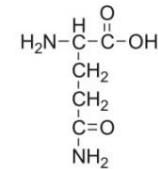
Threonine (Thr, T)



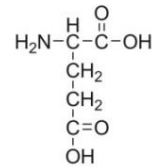
Cysteine (Cys, C)



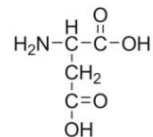
Asparagine (Asn, N)



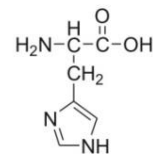
Glutamine (Glu, Q)



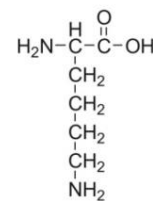
Acide glutamique (Glu, E)



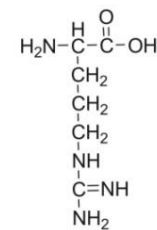
Acide aspartique (Asp, D)



Histidine (His, H)

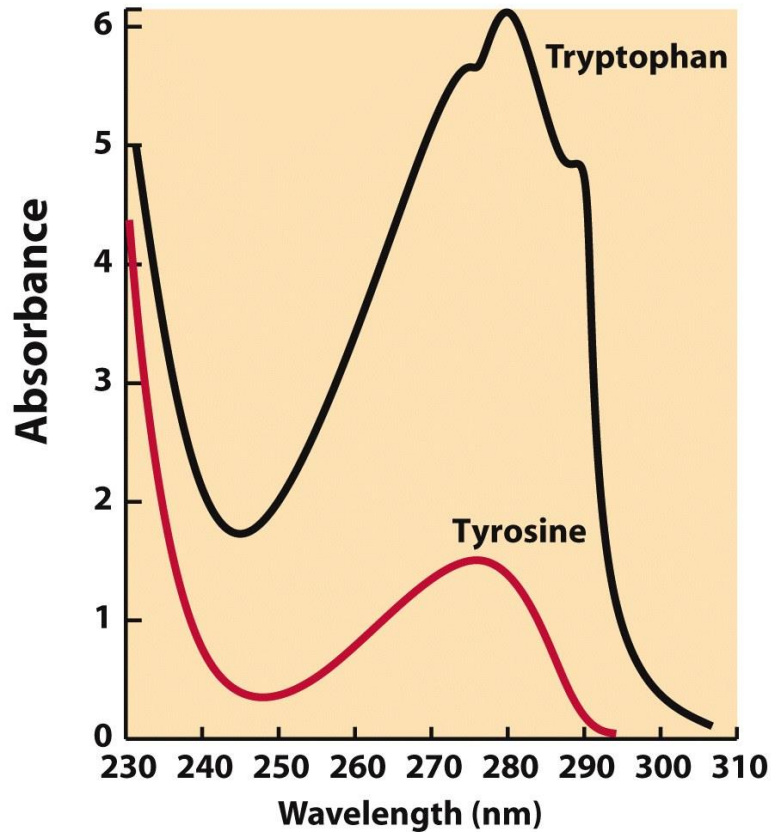


Lysine (Lys, K)



Arginine (Arg, R)

Coefficient d'extinction des aminoacides



Aminoacide:

Coefficient
d'extinction (ϵ):

Tryptophane

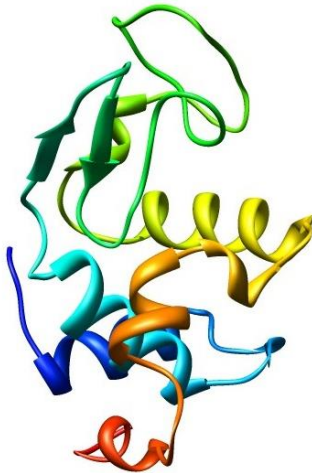
$5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Tyrosine

$1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Figure 3-6
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Calcul d'un coefficient d'extinction



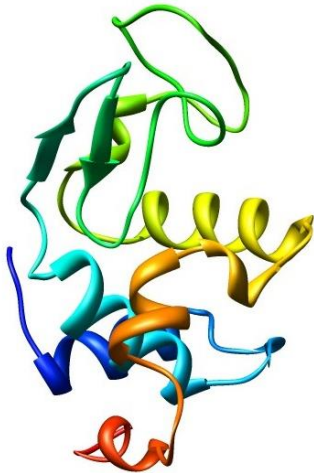
structure de la lysozyme

MKALIILGFLFLSVAVQGKVFERCELARTL
KKLGLDG **Y**KGVSLAN **W**LCLTK **W**ESS **Y**NT
KATN **Y**NPSSESTD **Y**GIFQINSK **W****W**CNDG
KTPNAVDGCHVSCSELMENDIAKAVACA
KHIVSEQGITAW **W****W**KSHCRDHDVSS **Y**VQ
GCTL

séquence primaire de la lysozyme

*Comment est-ce qu'on peut calculer le coefficient d'extinction
de la lysozyme?*

Calcul d'un coefficient d'extinction



structure de la lysozyme

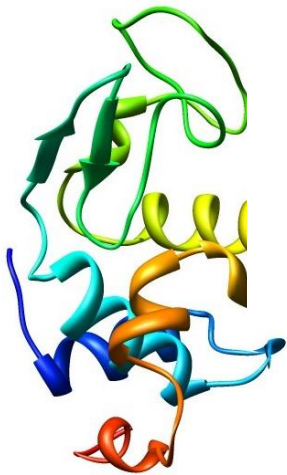
MKALIILGFLFLSVAVQGKVFERCELARTL
KKLGLDG **Y**KGVSLAN **W**LCLTK **W**ESS **Y**NT
KATN **Y**NPSSESTD **Y**GIFQINSK **W****W**CNDG
KTPNAVDGCHVSCSELMENDIAKAVACA
KHIVSEQGITA **W****W**KSHCRDHDVSS **Y**VQ
GCTL

séquence primaire de la lysozyme

$$\begin{aligned}\varepsilon(\text{lysozyme}) &= 6 \times \varepsilon(\text{tryptophane}) + 5 \times \varepsilon(\text{tyrosine}) \\ &= 6 \times 5500 + 5 \times 1490 \\ &= 40450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\end{aligned}$$

Mesurer la concentration de la lysozyme

*Dans une solution aqueuse avec la protéine **lysozyme** on a mesuré une absorption de 0.65. Quelle est la concentration de la protéine?*



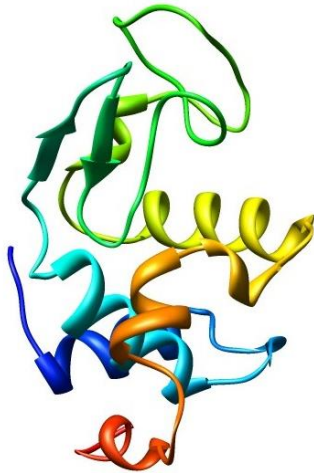
structure de la lysozyme

$$E = \epsilon_{\lambda} \cdot \overset{?}{c} \cdot d$$

Diamètre de la cuvette = 1cm

$\epsilon(\text{lysozyme}) = 40450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Mesurer la concentration de la lysozyme



structure de la lysozyme

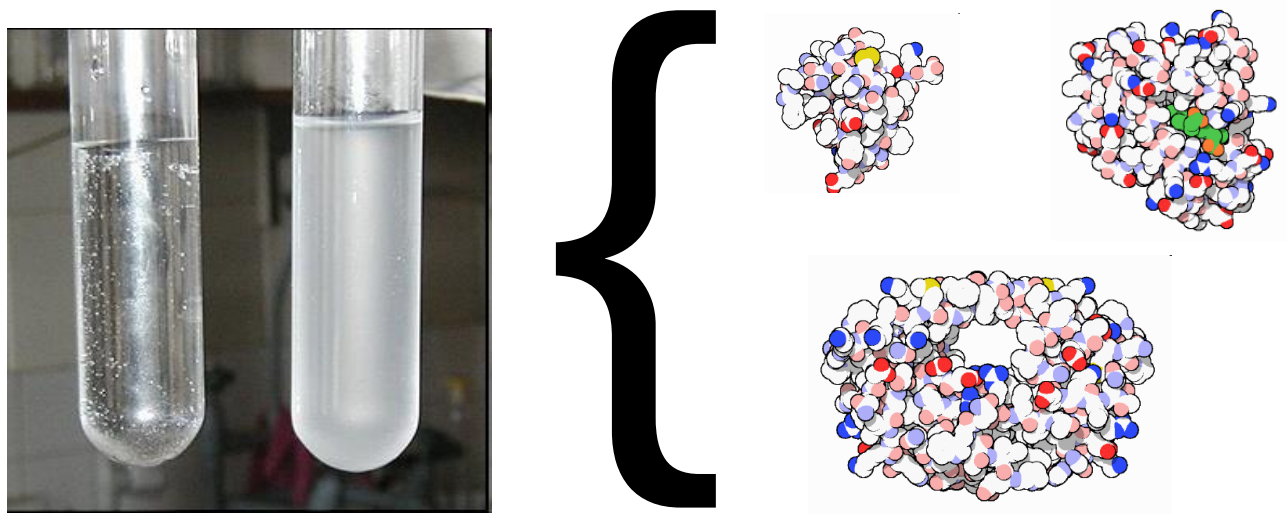
$$E = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Diagram illustrating the Beer-Lambert law equation $E = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$. Arrows point from the variables to their values: E is 0.65, ϵ_{λ} is 40450 M⁻¹cm⁻¹, and d is 1cm. The concentration c is circled in red with a red question mark above it, indicating it is the unknown to be determined.

$$\epsilon(\text{lysozyme}) = 40450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$c = \frac{E}{\epsilon_{\lambda} \cdot d} = \frac{0.65}{40450 \cdot 1} = 1.6 \cdot 10^{-5} \text{ M} = 16 \mu\text{M}$$

Analyser plusieurs protéines dans un échantillon

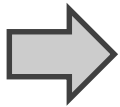


Comment peut-on voir si on a une ou plusieurs protéines dans une éprouvette?

- Purification des protéines

- L'analyse des protéines

- Mesurer la concentration



- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

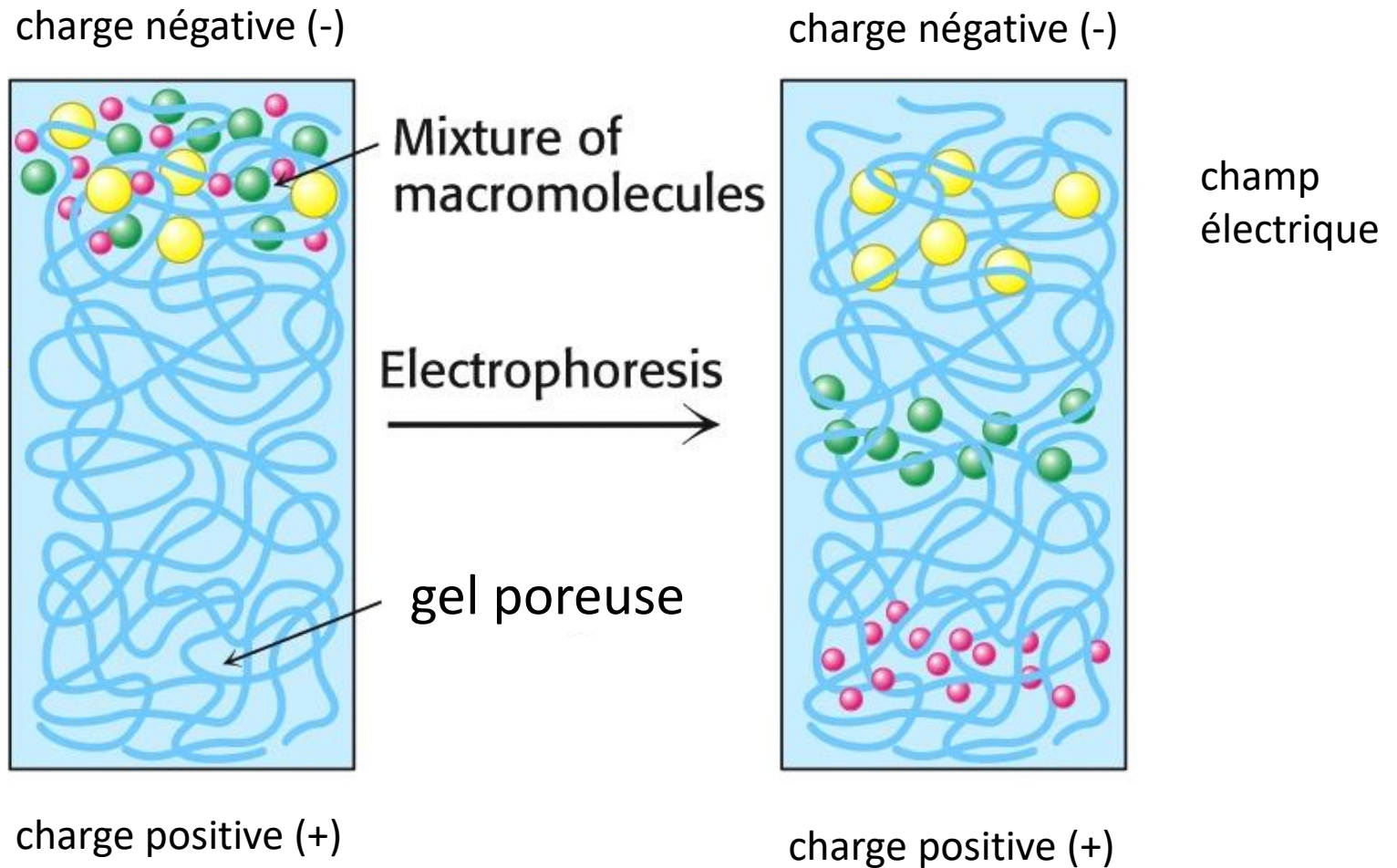
- Séquencer des protéines

- Détection avec des anticorps

- Spectrométrie de masse

- Structure tridimensionnelle

Électrophorèse sur gel



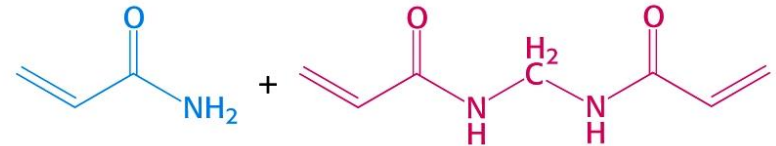
Méthode la plus importante pour déterminer la composition d'un échantillon de protéine

Gel de polyacrylamide ('filet de pêche')

Fine plaque de polyacrylamide



Un gel de polyacrylamide est chimiquement inerte et peut être préparé par polymérisation d'acrylamide



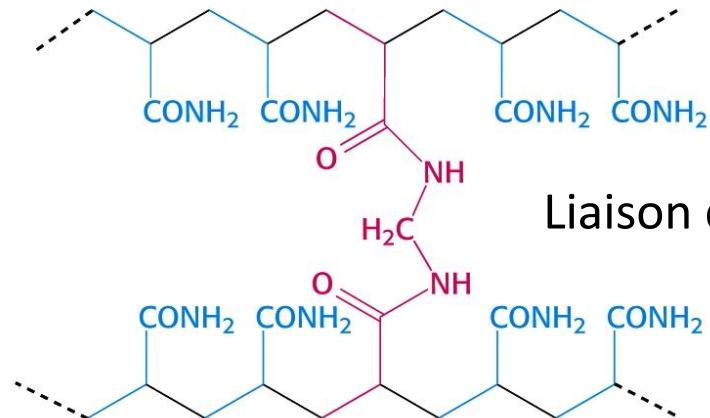
acrylamide

bisacrylamide

réaction de
polymérisation

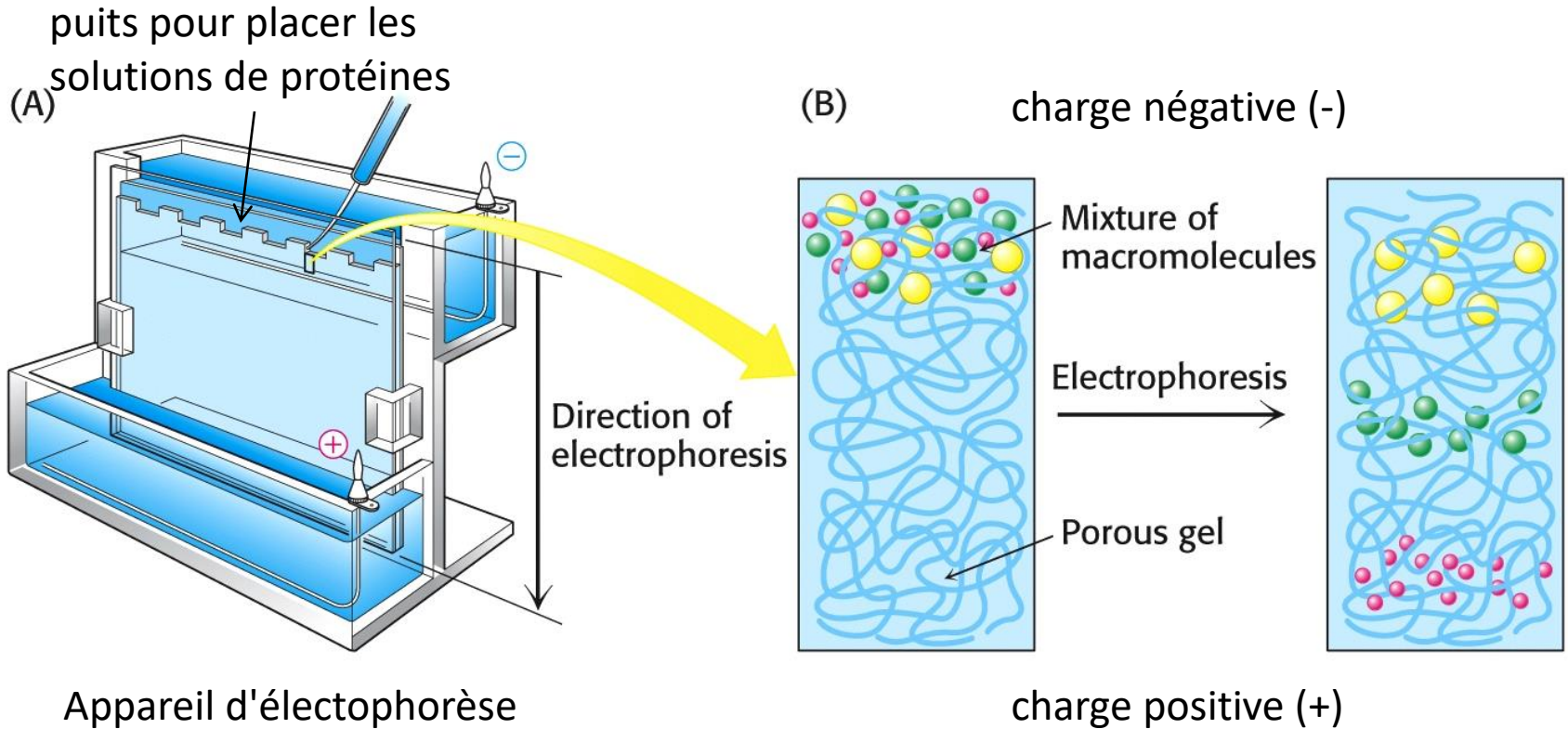


initiée par
un radical

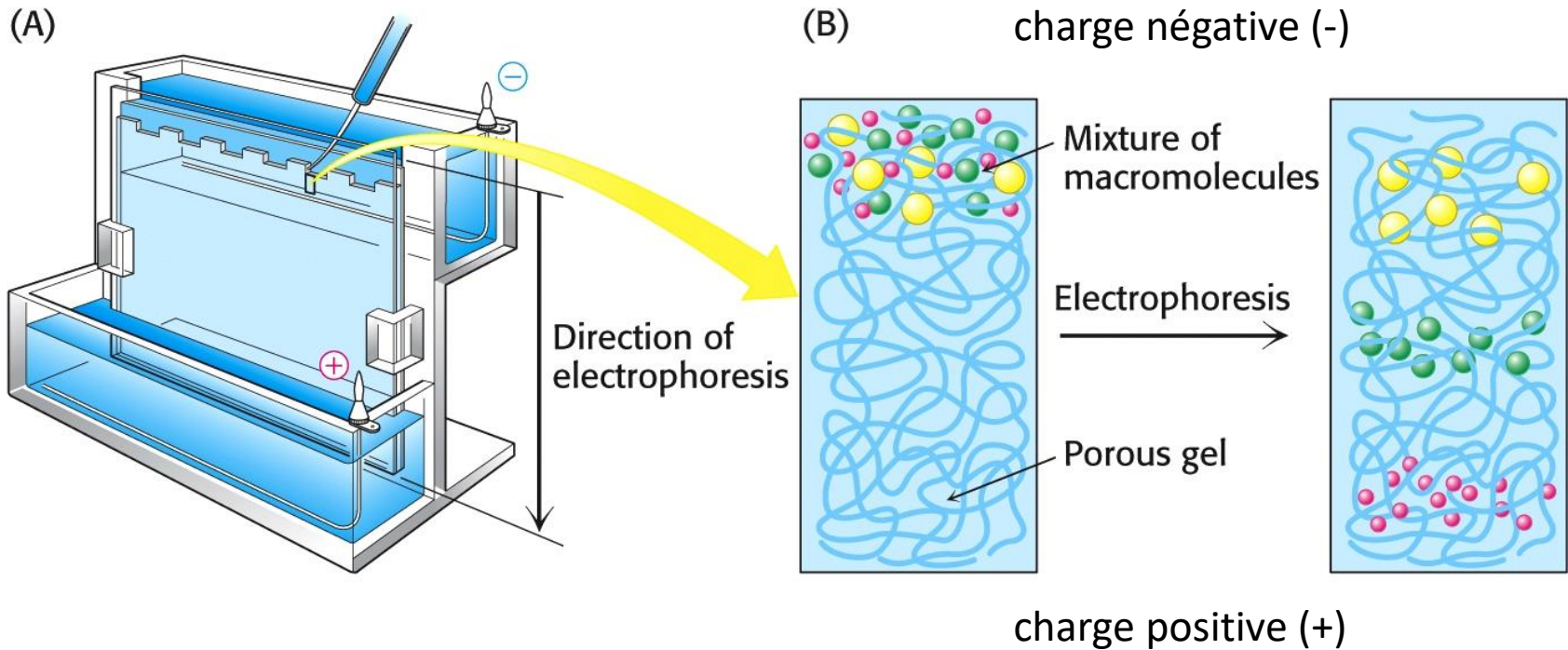


Liaison croisée

Électrophorèse sur gel



Électrophorèse sur gel (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis)



$$v = Ez/f$$

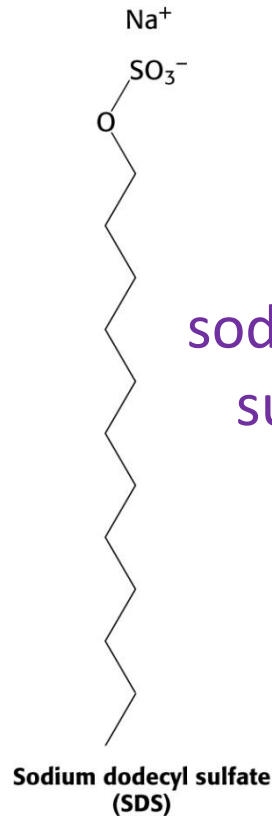
v: vitesse de migration

E: force électrique

z: charge nette de la protéine

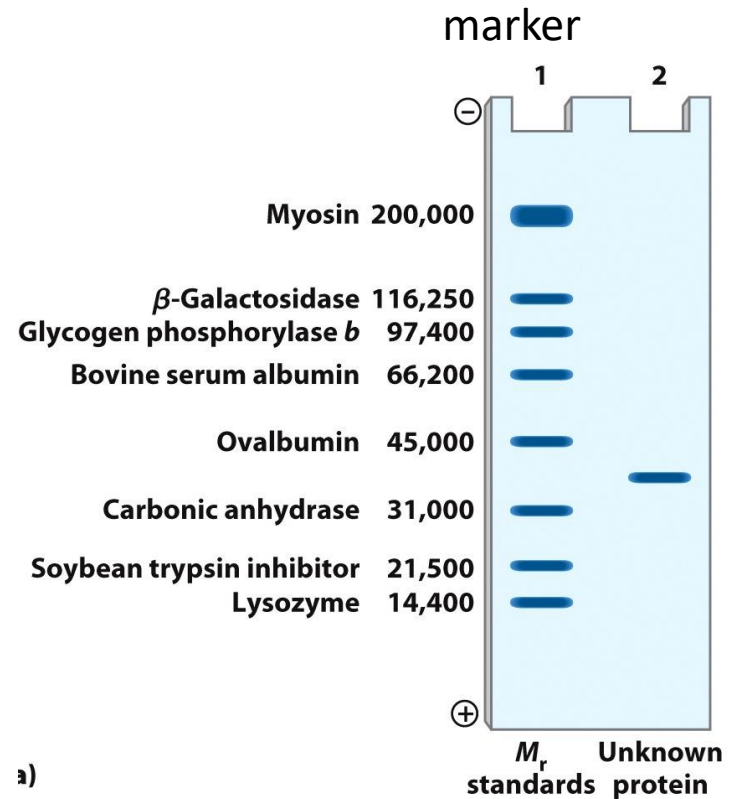
f: coefficient de friction (taille de la protéine, gel)

SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis



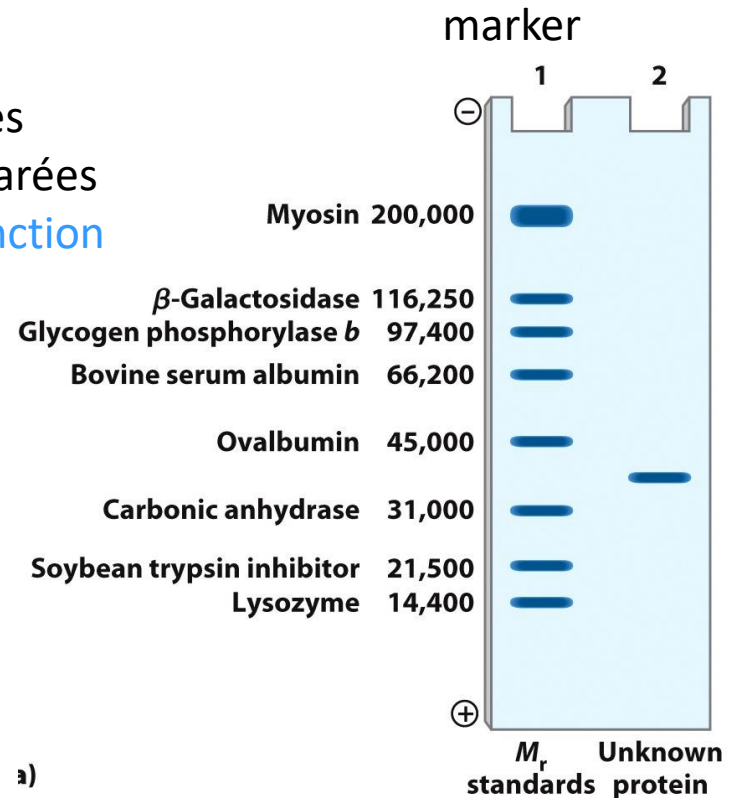
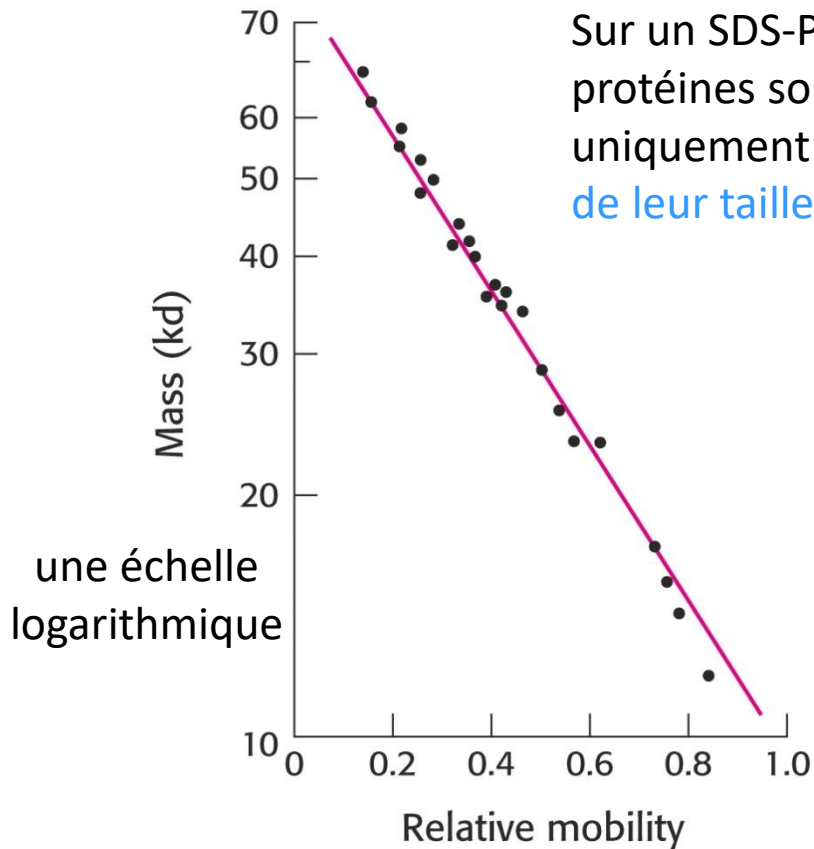
- Les molécules de SDS se lient aux protéines (interaction non-covalente)
- Environ 1 molécule SDS par 2 aminoacides
- Les protéines sont dénaturées
- Toutes les protéines sont chargées négativement

La mobilité dans le SDS-PAGE est proportionnelle au logarithme de leur **masse**

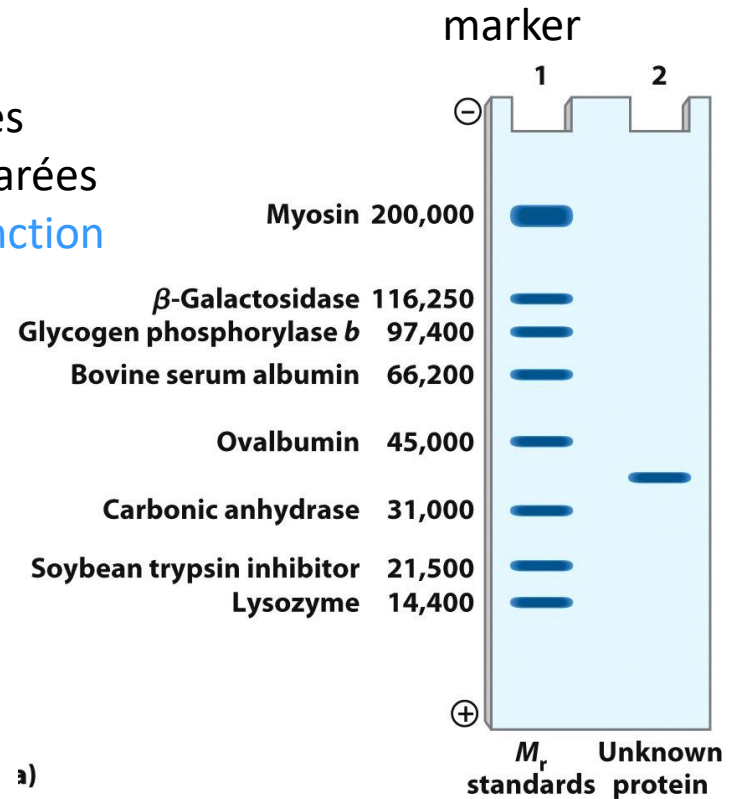
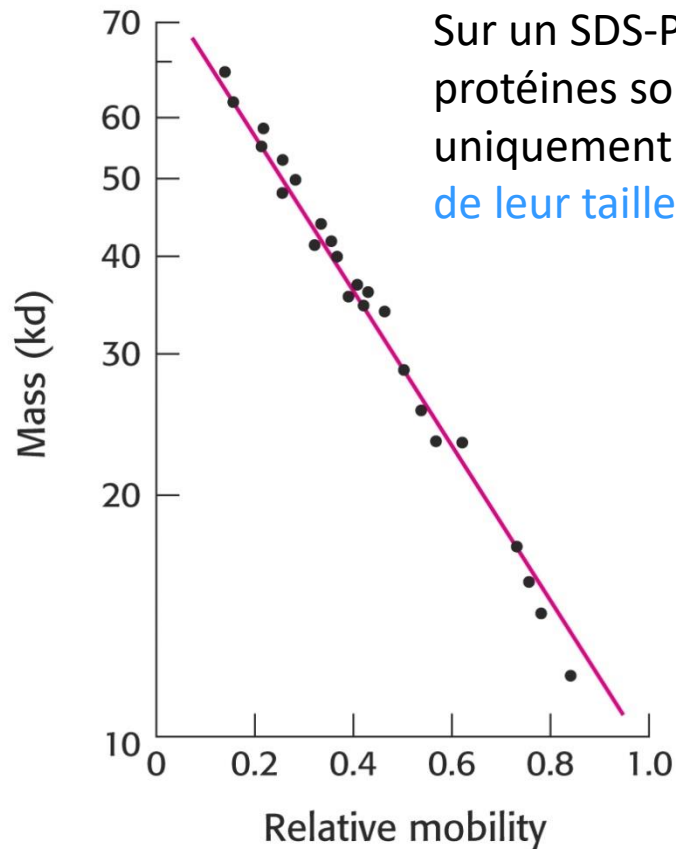


a)

La mobilité dans le SDS-PAGE est proportionnelle au logarithme de leur **masse**

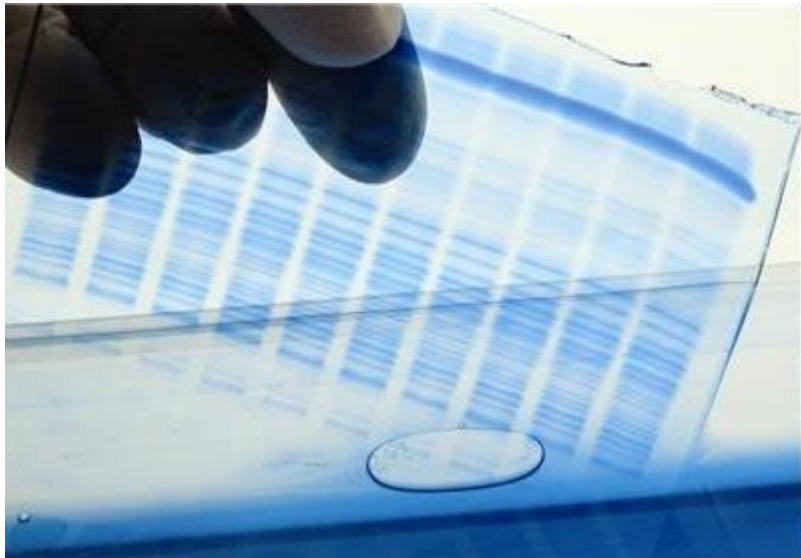


La mobilité dans le SDS-PAGE est proportionnelle au logarithme de leur **masse**



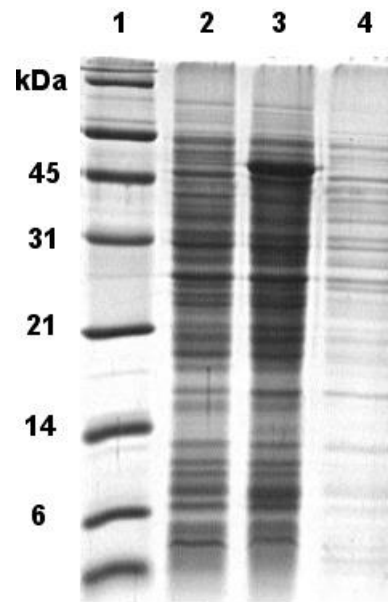
*Comment peut-on visualiser
une protéine?*

Coloration des protéines après électrophorèse en utilisant du bleu de Coomassie



- Une quantité de 0.1 μg de protéine peut être détectée
- Des protéines avec une différence de masse de 2% peuvent être séparées (e.g. 50 et 51 kDa; 10 aminoacides)

Electrophorèse avec beaucoup de protéines différentes



*Comment pourrait-on améliorer la résolution des protéines
sur un gel SDS-PAGE?*

Électrophorèse en deux dimensions d'un échantillon de bactérie *Escherichia coli* (E. coli)

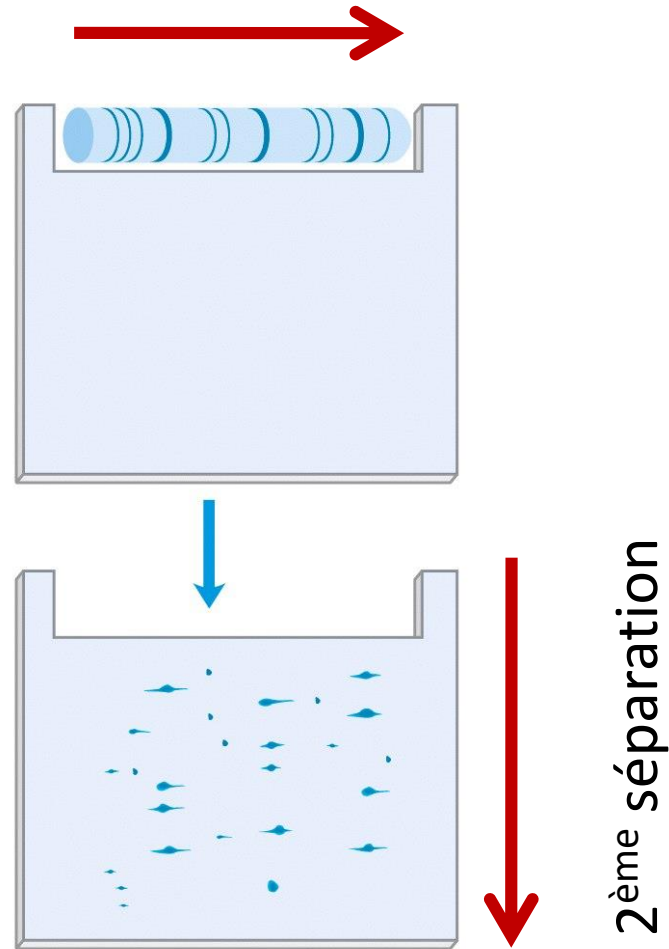
1^{ère} séparation

2^{ème} séparation



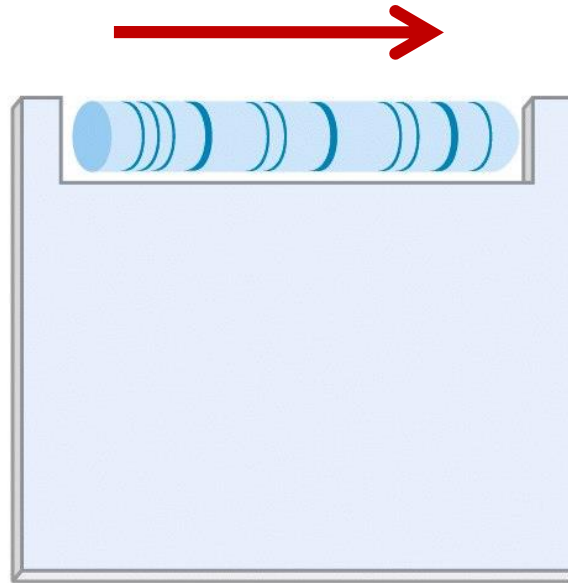
1^{ère} séparation

*Avec quelle propriété
physique pourrait-on
séparer les protéines
dans la deuxième
dimension?*



1^{ère} séparation

**Isoelectric focusing
gel is placed on SDS
polyacrylamide gel.**

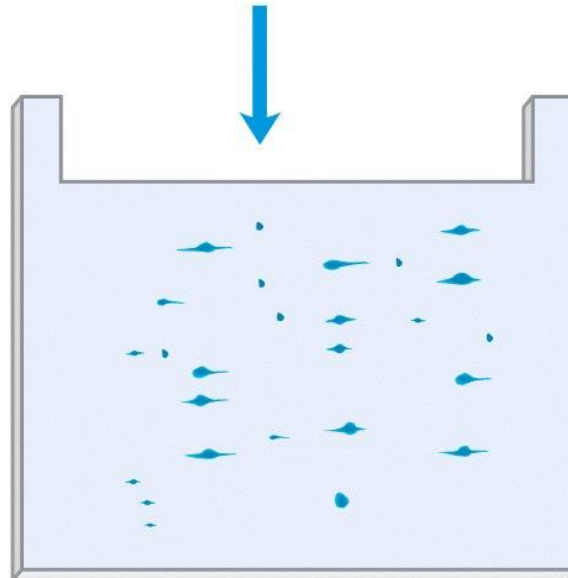


Séparé sur la base
du point isoélectrique

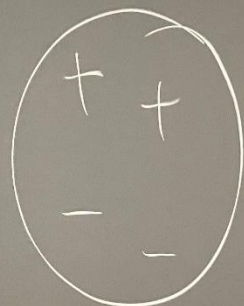
*Quel est le point
isoélectrique?*

Séparé sur la base
de la taille

**Second
dimension**
**SDS polyacrylamide
gel electrophoresis**



2^{ème} séparation



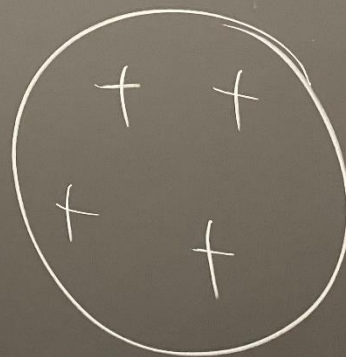
pH 7



pH 10



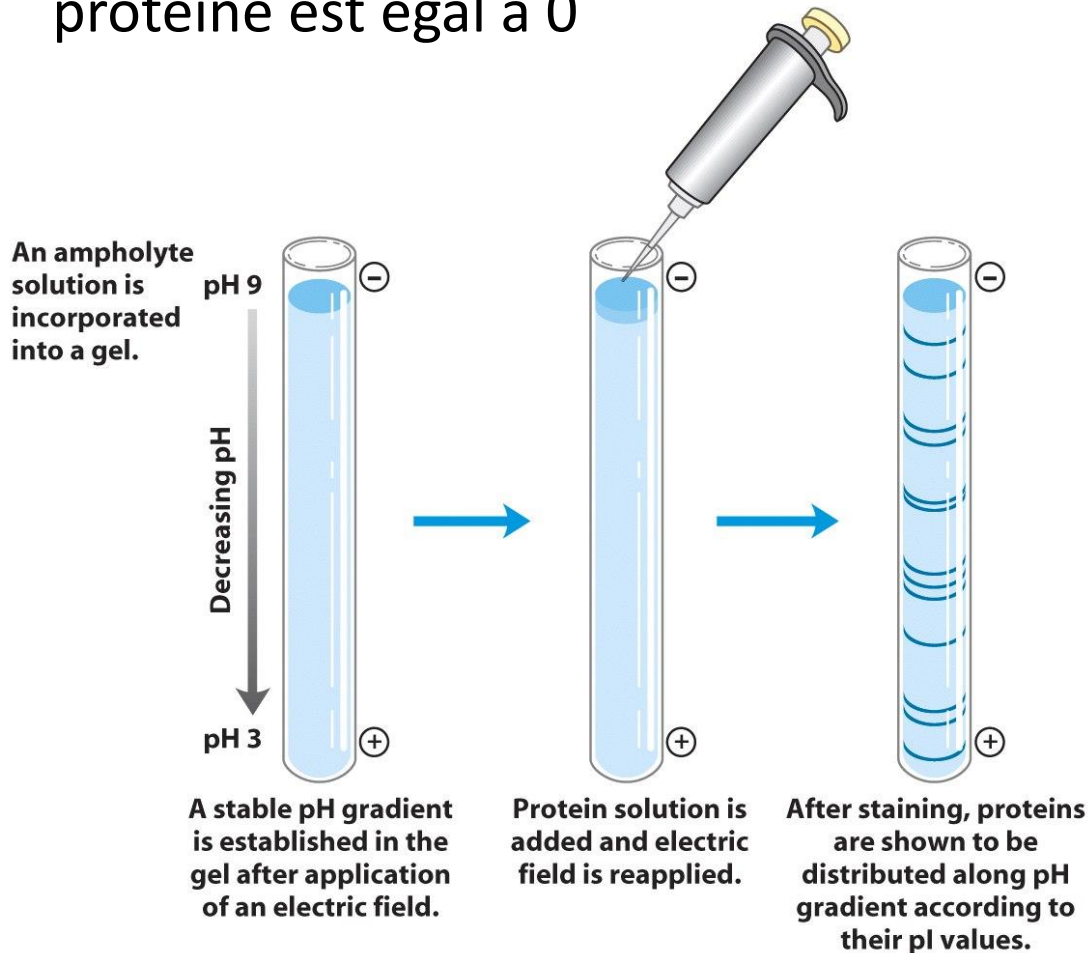
pH 2



pI =

Focalisation isoélectrique

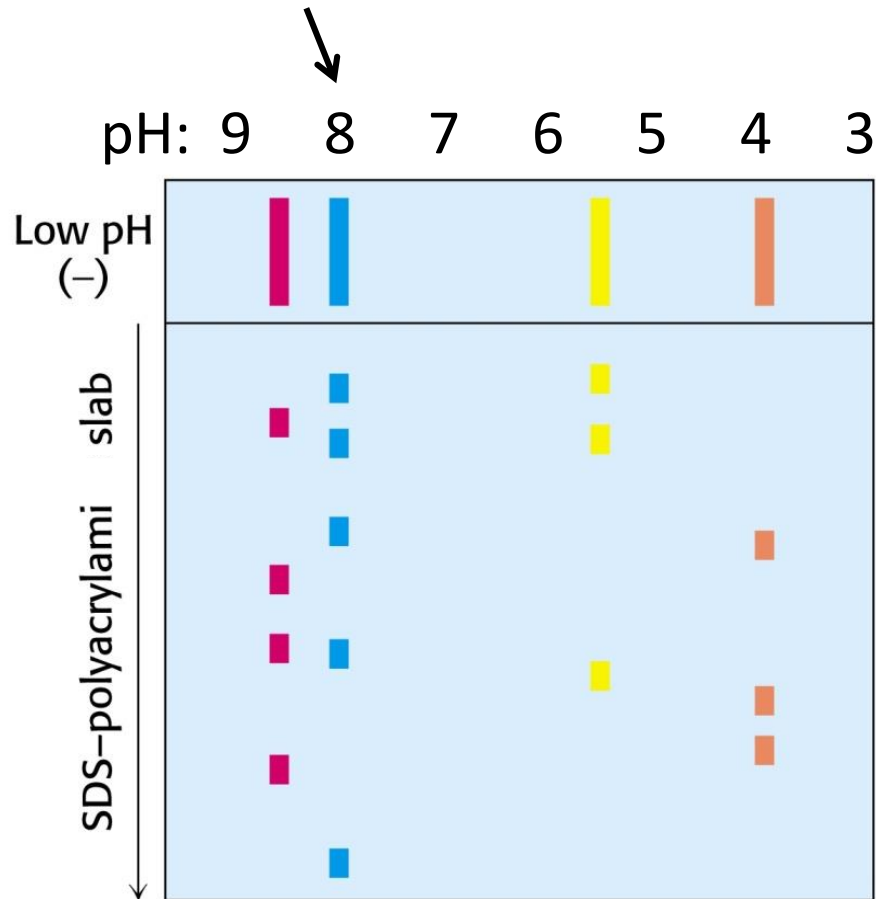
Le point isoélectrique (pI) est le pH auquel la charge globale d'une protéine est égal à 0



- Un gel avec un gradient de pH est préparé
- Les protéines migrent dans un champ électrique et s'arrêtent dans la région où leur charge globale est égale à 0.

Focalisation isoélectrique

protéines avec le même point
isoélectrique, pI (p.ex. $pI = 8$)



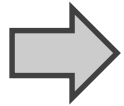
Électrophorèse en deux dimensions d'un échantillon de bactérie *Escherichia coli* (E. coli)

1^{ère} séparation (point isoélectrique)

2^{ème} séparation (taille)

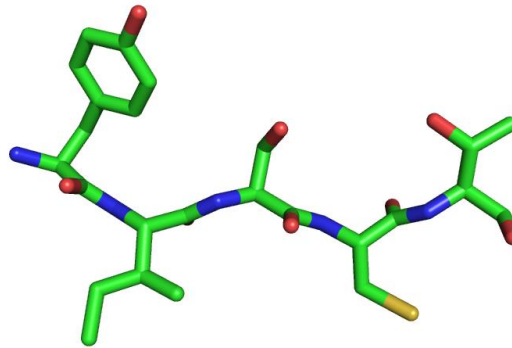


- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration → quantifier une protéine pure
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide → analyser des protéines dans un mélange



- Séquencer des peptides et protéines
- Détection avec des anticorps
- Spectrométrie de masse
- Structure tridimensionnelle

Séquençage des protéines



Tyr-Ile-Ser-Cys-Thr

*Comment pourrait-on déterminer la composition en
aminoacides d'un peptide ou d'une protéine?*

Composition en aminoacides d'un peptide

1. Hydrolyse du peptide
avec de l'acide chlorhydrique
(HCl, 6 M), 100°C, 24 h
2. Séparation des
aminoacides par
chromatographie
liquide à haute
pression (HPLC)

Tyr-Leu-Ser-Cys-Thr

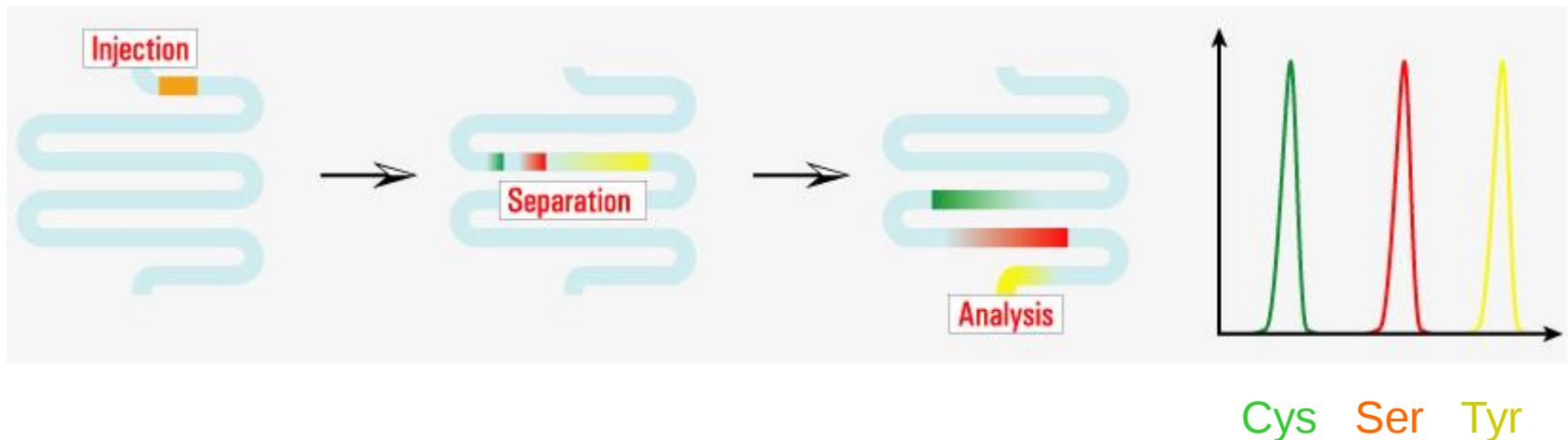


Tyr Leu Ser
 Cys Thr

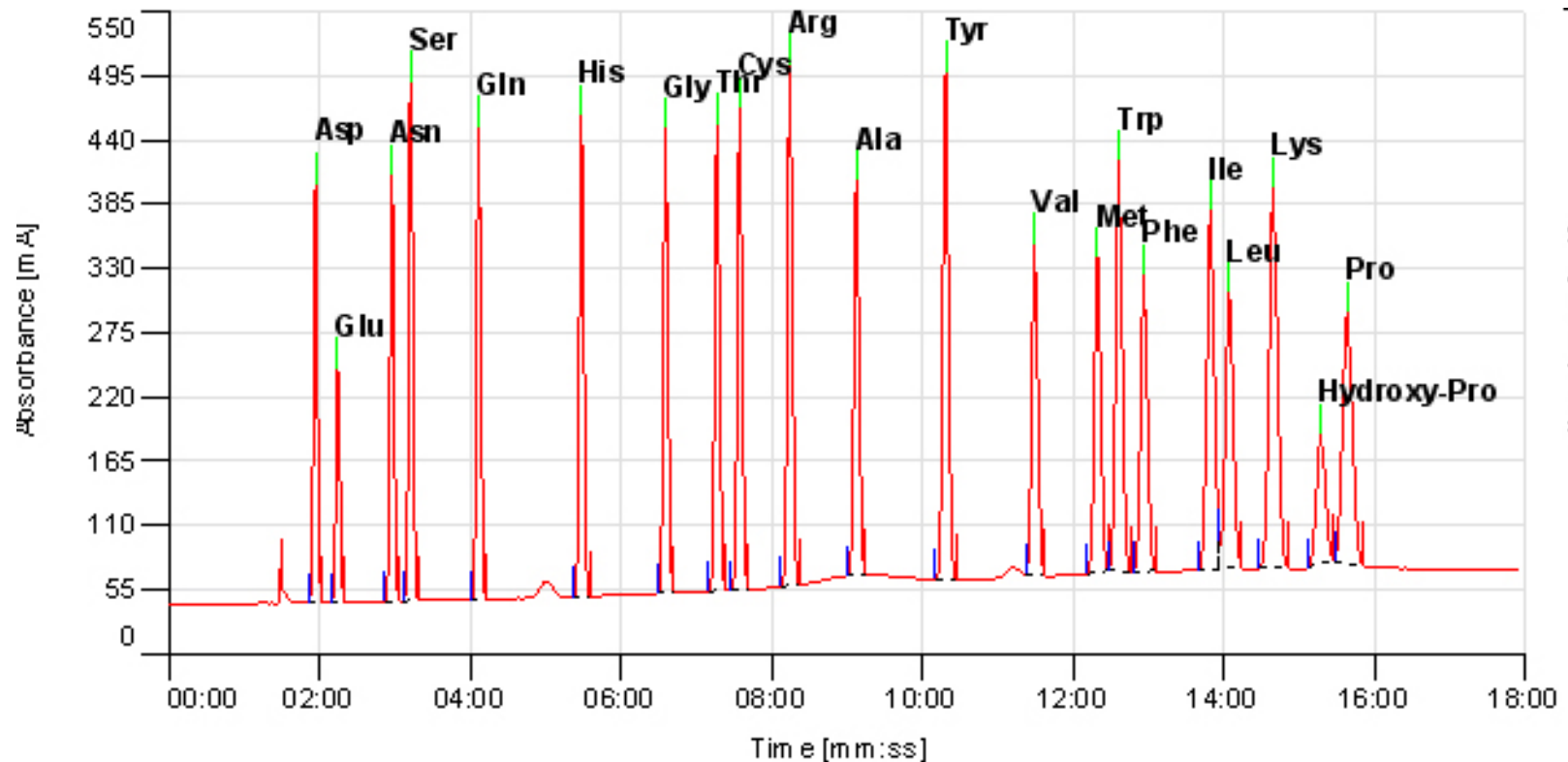


Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

- Séparation des aminoacides avec une colonne
- L'identité d'un aminoacide est révélée par le temps d'élution

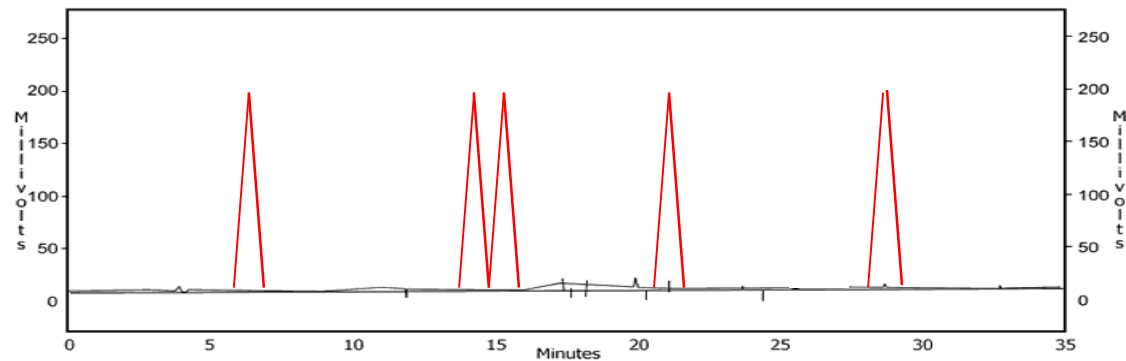
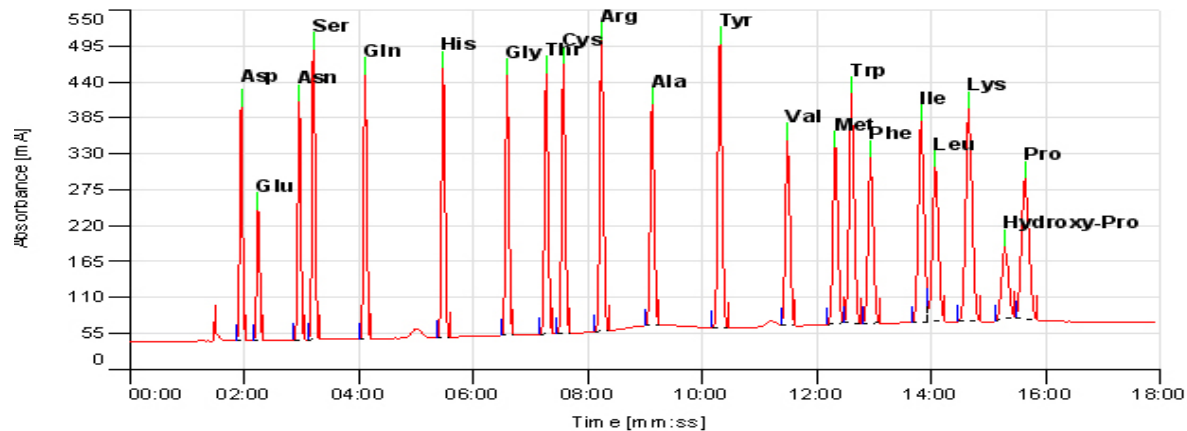


Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

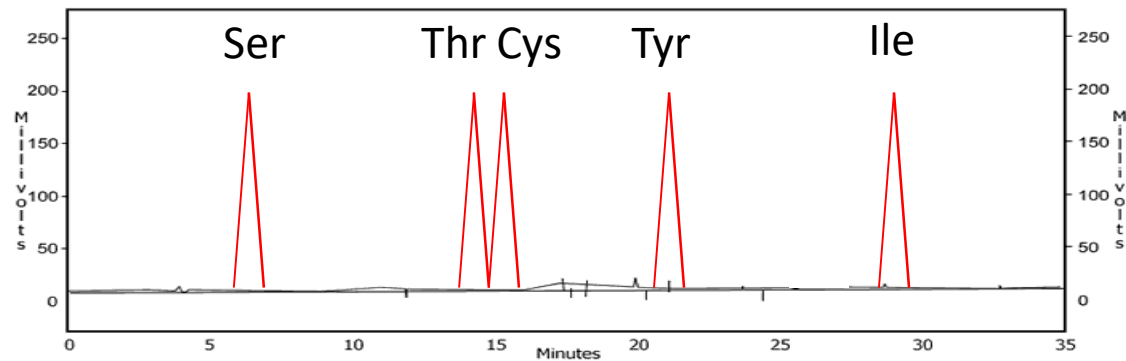
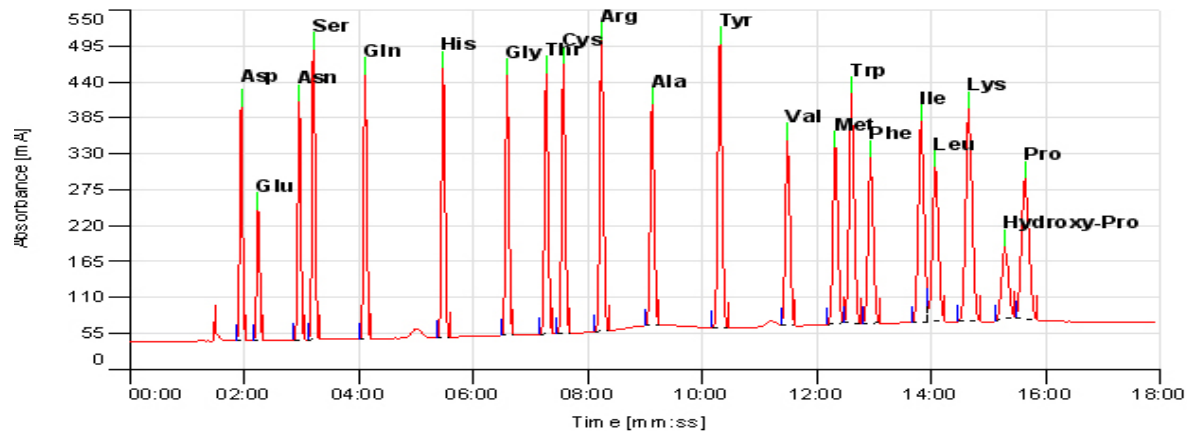


temps d'élution

Les aminoacides peuvent être identifiés par HPLC



Les aminoacides peuvent être identifiés par HPLC



Séquence des protéines

Tyr
Leu
Ser
Thr
Cys



Tyr-Ile-Ser-Cys-Thr
Ile-Tyr-Ser-Cys-Thr
Ser-Ile-Tyr-Cys-Thr
Cys-Ile-Ser-Tyr-Thr
Thr-Ile-Ser-Cys-Tyr
.....

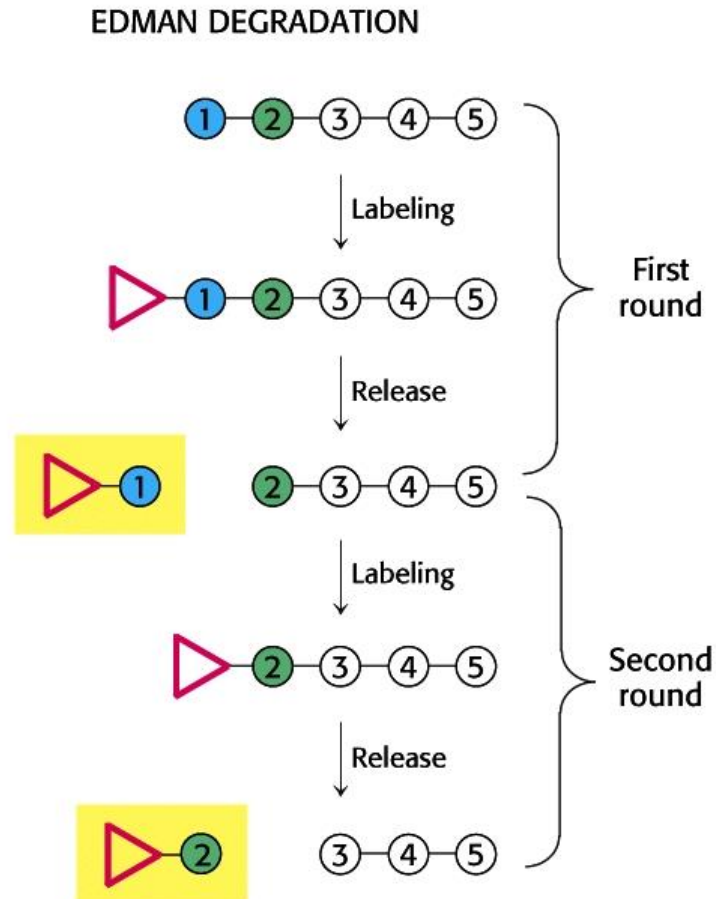
*Comment pourrait-on déterminer la séquence
d'acides aminés d'un peptide ou d'une protéine?*

Dégradation de Edman (Pehr Edman)



- Biochimiste de Suède
- En 1950, il avait développé une méthode pour déterminer les séquences des protéines

Dégradation de Edman (Pehr Edman)

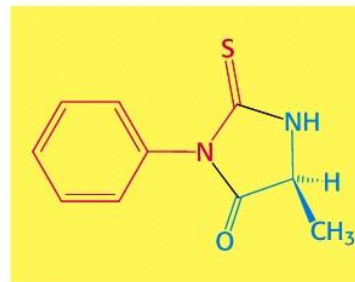
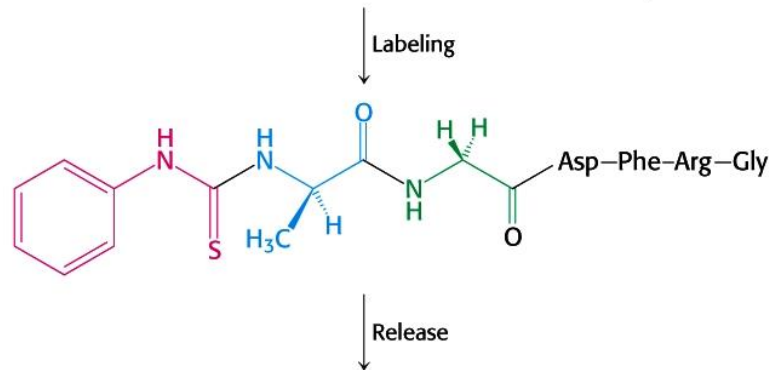
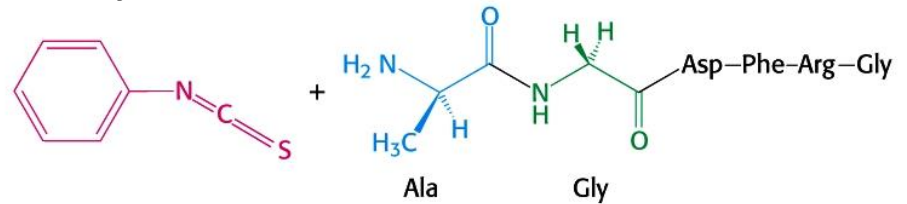
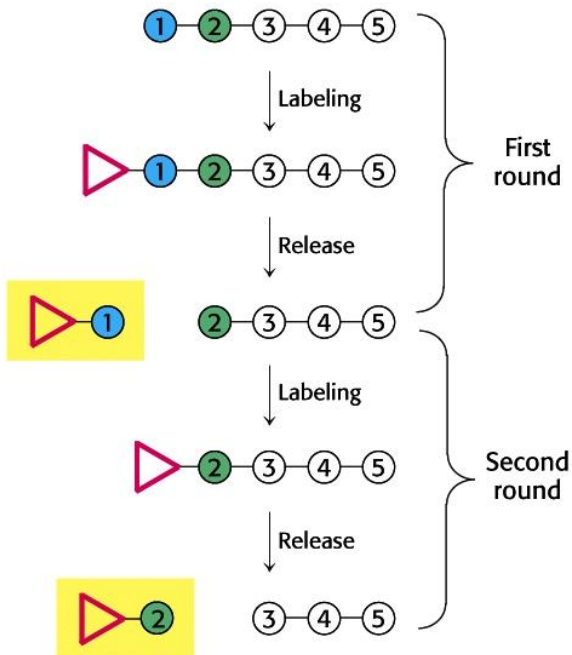


- Le résidu N-terminal est marqué
- Le résidu marqué est séparé
- L'identité du résidu est analysé par HPLC (chromatographie à haute pression)

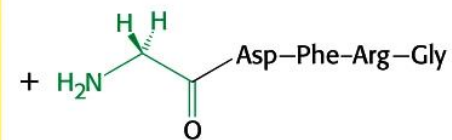
Dégradation de Edman

isothiocyanate

EDMAN DEGRADATION

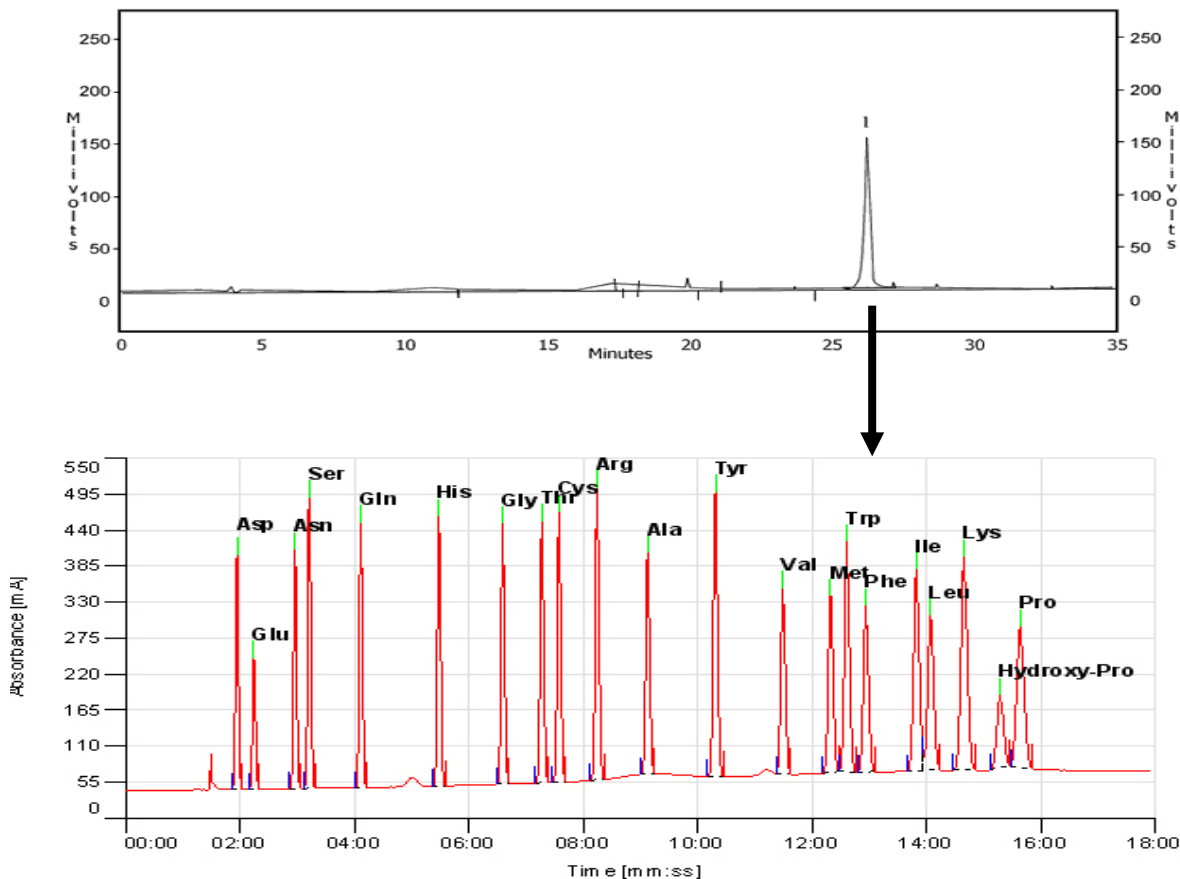


aminoacide
libéré



peptide amputé
d'un aminoacide

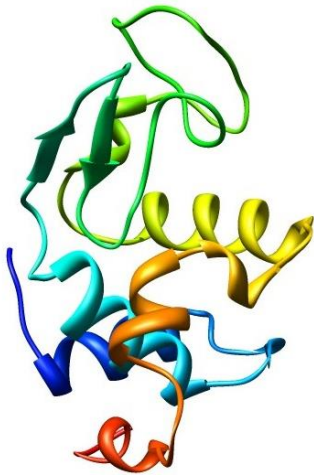
**Les aminoacides libérés peuvent être identifiés par
(chromatographie liquide à haute pression) HPLC**



Phenylalanine

Séquençage des protéines entières

*Peut-on séquencer des protéines entières par la
méthode Edman?*



structure de lysozyme

MKALIILGFLFLSVAVQGKVFERCELARTL
KKLGLDGYKGVSLANWLCCLKWESSYNT
KATNYPSSSESTDYGIFQINSKWWCNDG
KTPNAVDGCHVSCSELMENDIAKAVACA
KHIVSEQGITAWVWKSHCRDHDVSSYVQ
GCTL

séquence primaire de lysozyme

Séquençage des protéines entières

*Peut-on séquencer des protéines entières par la
méthode Edman?*

Environ 50 aminoacides peuvent être séquencés

Limitation:

Dans chaque étape, seulement environ 98% des protéines libèrent le résidu N-terminal

→ La proportion des aminoacides libérés 'correctement' après 60 tours est de 0.3 (= seulement 30%)

Cliver des protéines sur des aminoacides spécifiques

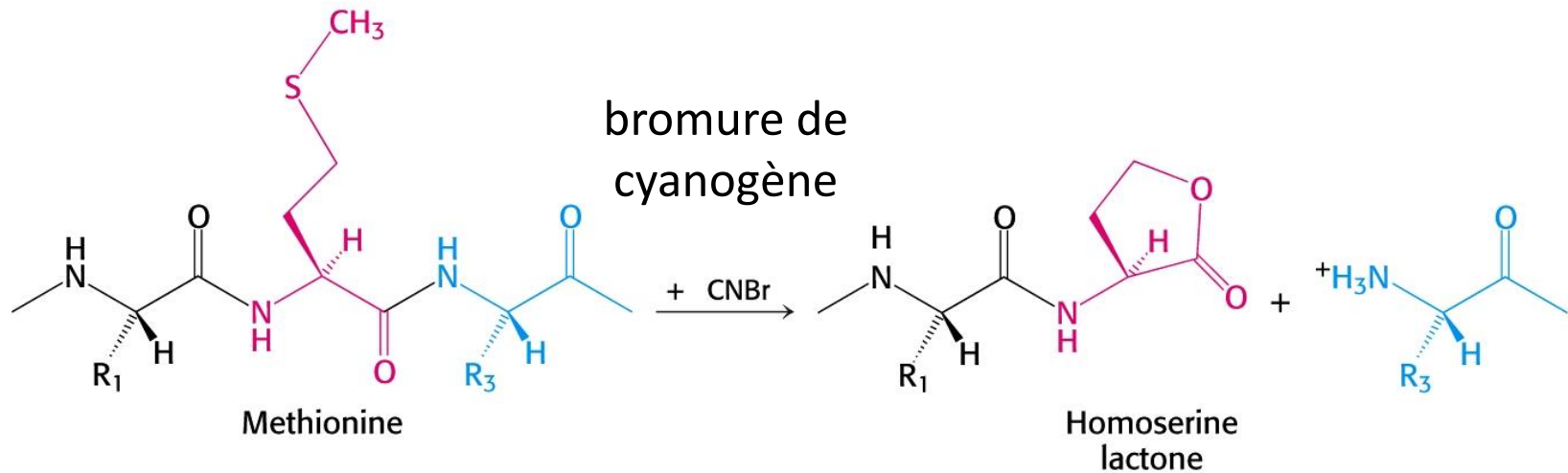
MKALIILGFLFLSVAVQGKVFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWL
CLTKWESSYNTKATNYPSSSESTDYGIFQINSKWWCNDGKTPNAVD
GCHVSCSELMENDIAKAVACAKHIVSEQGITAWVWKSHCRDHDVSS
YVQGCTL



ALIILGFLFLSVAVQGK
VFERCELARLGLDGYK
GVSLANWLCLTKWESSYNTK
ATNYPSSSESTDYGIFQINSK
WWCNDGK
TPNAVDGCHVSCSELMENDIAK
AVACAKHIVSEQGITAWVWK
SHCRDHDVSSYVQGCTL

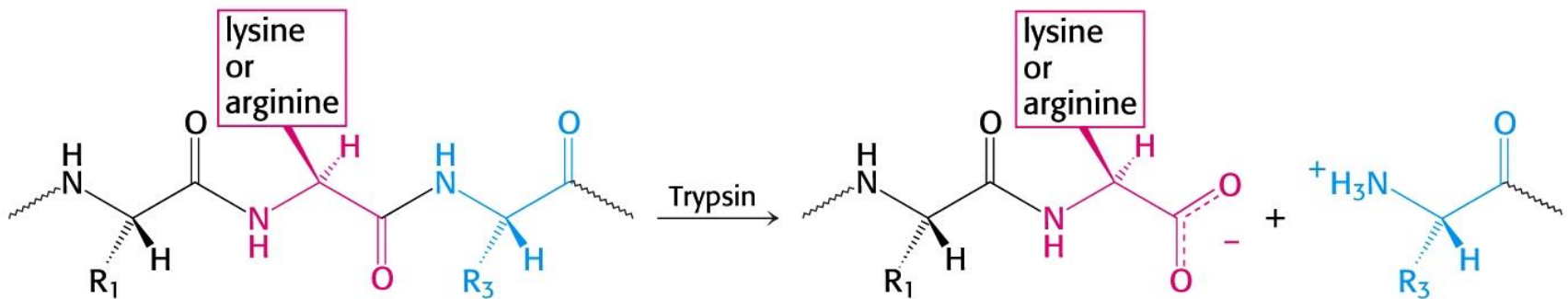
Cliver des protéines sur des aminoacides spécifiques

Méthode chimique



Cliver des protéines sur des aminoacides spécifiques

Méthode enzymatique en utilisant des protéases (p.ex. trypsin)



Exemple: Clivage de la protéine lysozyme avec de la trypsine

MKALIILGFLFLSVAVQGGKVFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWL
CLTKWESSYNTKATNYPSSSESTDYGIFQINSKWWCNDGKTPNAV
DGCHVSCSELMENDIAKAVACAKHIVSEQGITAWVWKSHCRDHDV
SSYVQGCTL



MK
ALIILGFLFLSVAVQGGK
VFERCELAR
TLK
K
LGLDGYK
GVSLANWLCCLK
WESSYNTK

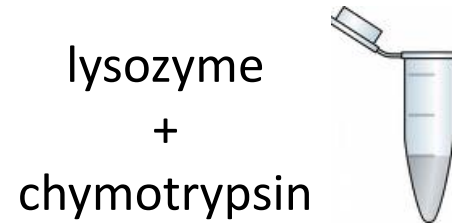
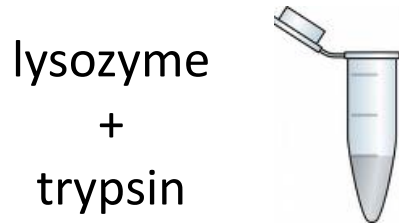
ATNYPSSSESTDYGIFQINSK
WWCNDGK
TPNAVDGCHVSCSELMENDIAK
AVACAK
HIVSEQGITAWVWK
SHCR
DHDVSSYVQGCTL

Comment est-ce qu'on pourrait établir l'ordre de ces segments?

Exemple de séquençage

La protéine lysozyme est clivée en deux réactions séparées:

- trypsine
- chymotrypsine (clive les polypeptides après les aminoacides Phe, Trp, Tyr)



Deux groupes de segments peptidiques sont obtenus

Exemple de séquençage

Clivé avec trypsin:

M**K**
ALIILGFLFLSVAVQG**K**
VFERCEL**R**
TL**K**
K
LGLDGY**K**
GVSLANWLCLT**K**
WESSYNT**K**
ATNYPSSSESTDYGIFQI
NS**K**
WWCNDG**K**
TPNAVDGCHVSCSELMEN
NDIA**K**
AVACA**K**
HIVSEQGITAWVW**K**
SHC**R**
DHDVSSYVQGCTL

Clivé avec chymotrypsin:

MKALIILG**F**
LFLSVAVQGV**F**
ERCELARTLKKLGLDG**Y**
KGVSLAN**W**
LCLTK**W**
ESS**Y**
NTKATN**Y**
NPSSESTD**Y**
GI**F**
QINSK**W**
W
CNDGKTPNAVDGCHVSCSELMENDIAK
AVACAKHIVSEQGITAW**W**
V**W**
KSHCRDHDVSS**Y**
VQGCTL

Assemblage des segments peptidiques

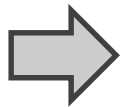
MK ALIILGFLFLSVAVQGK VFERCELAR TLK K LGLDGYK
MKALIILGF LF LSVAVQGKV F ERCELARTLKKLGLDGY Y

GVSLANWLCLTK WESSYNTK ATNYPNPSSESTDY GIFQINSK
KGVSLANW LCLTKW ESSY NTKATNY NPSSESTDY GIF

WWCNDGK TPNAVDGCHVSCSELMENDIAK AVACAK
QINSKW W CNDGKTPNAVDGCHVSCSELMENDIAKAVACAKHIVSEQGITAW W

HIVSEQGITAWVK SHCR DHDVSSYVQGCTL
VW KSHCRDHDVSSY VQGCTL

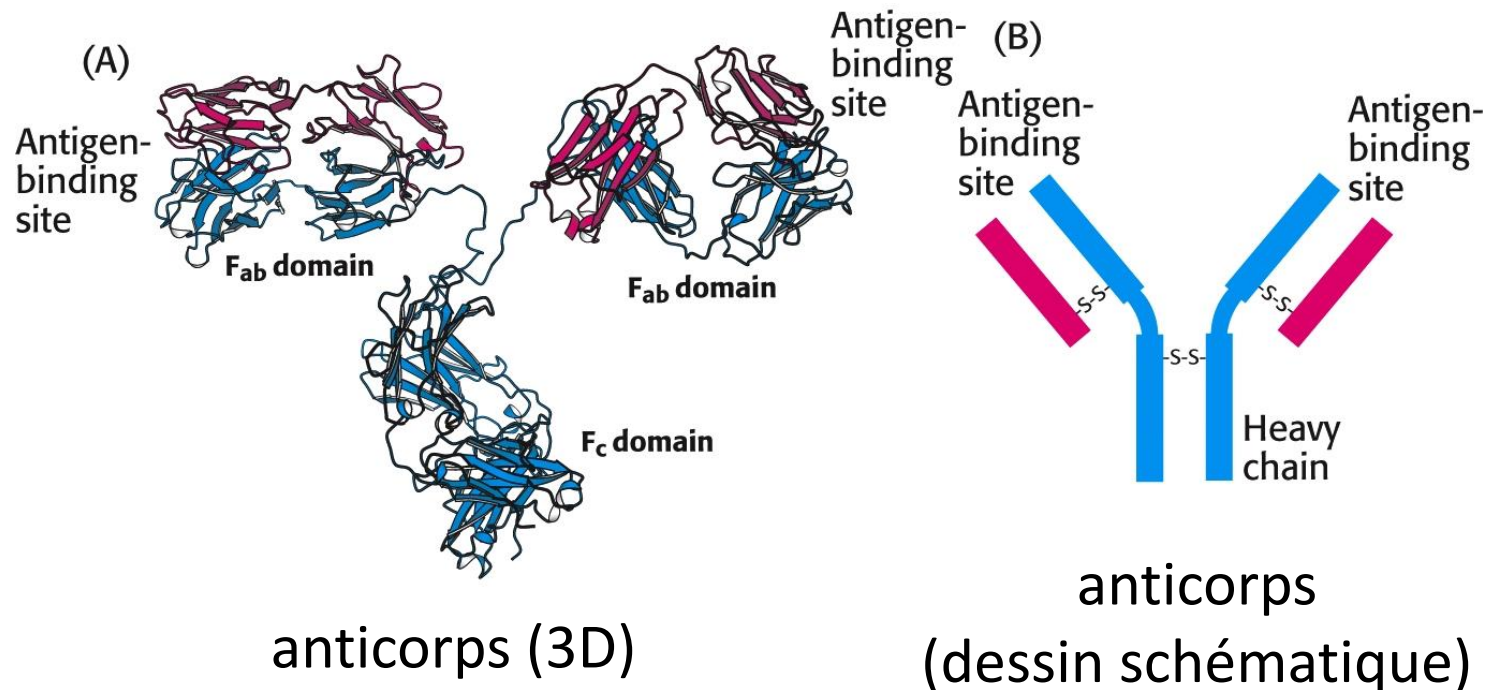
- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration → quantifier une protéine pure
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide → analyser des protéines dans un mélange
 - Séquencer des protéines → analyser la séquence primaire



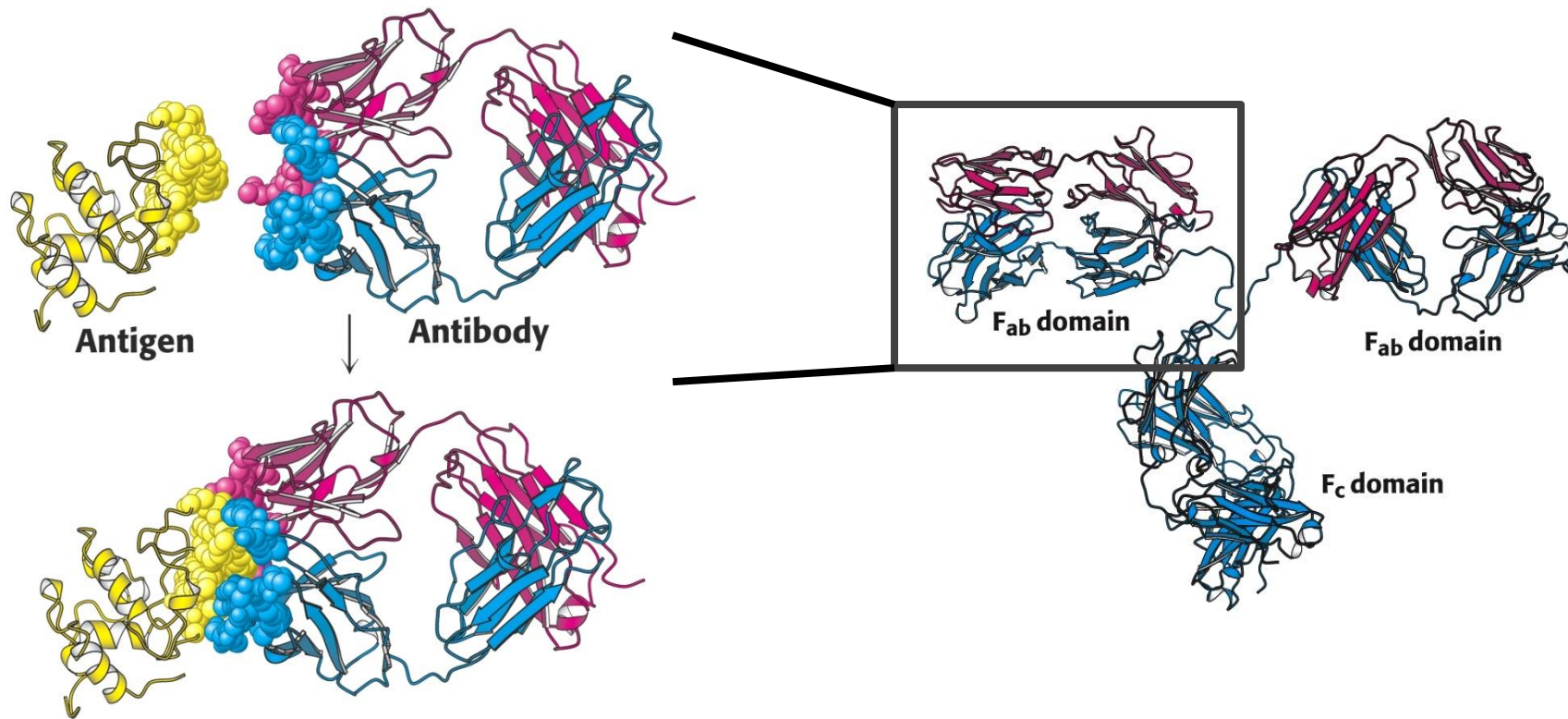
- Détection avec des anticorps
- Spetrométrie de masse
- Structure tridimensionnelle

Méthodes pour détecter des protéines basées sur des anticorps

Anticorps = protéines synthétisées par un animal en réponse à l'introduction d'une substance étrangère

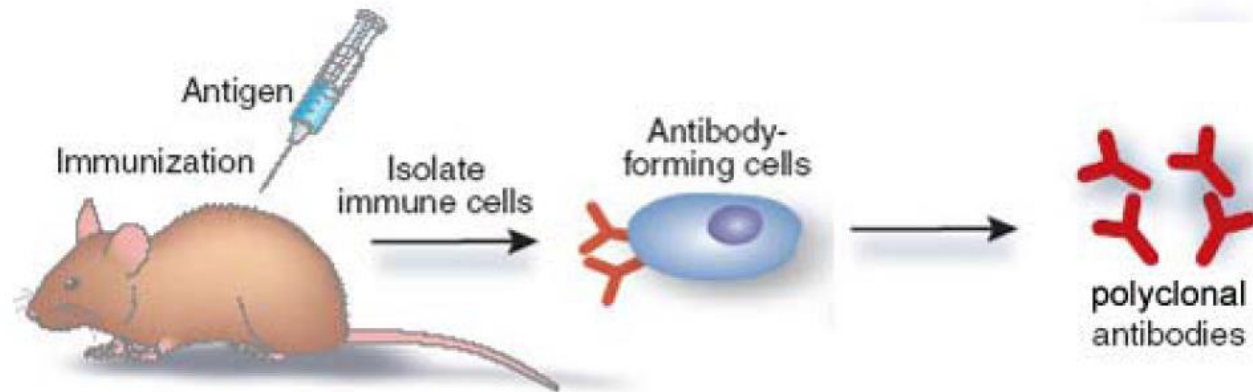


Les anticorps ont une affinité spécifique pour des protéines (= **antigens**)



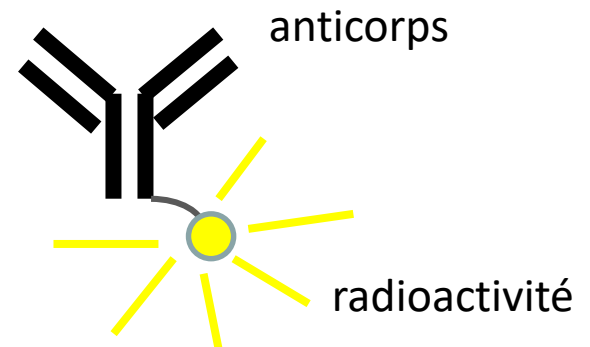
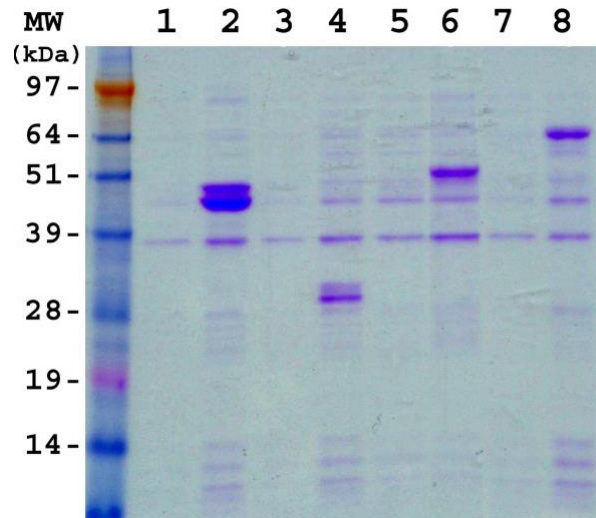
Le site d'un antigène qui est reconnu par un anticorps est appelé épitope

Génération d'anticorps

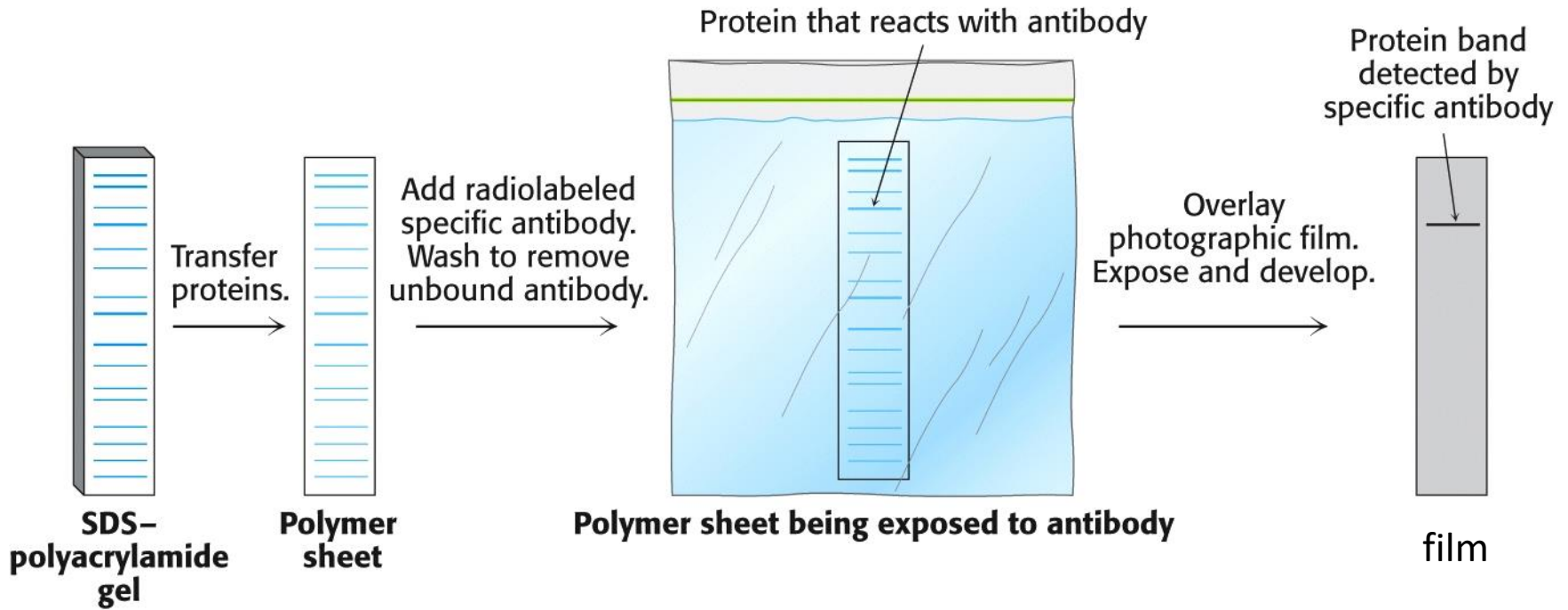


Exemple d'une application d'anticorps: Western blot

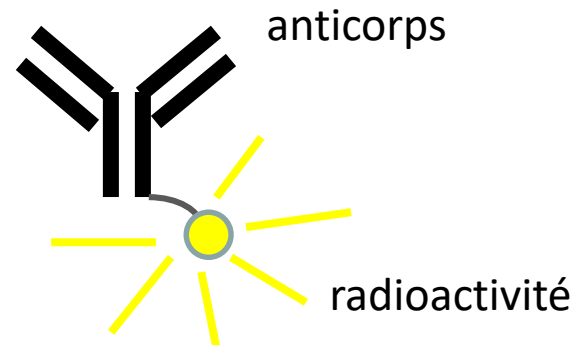
Avec la méthode du 'Western blot' on peut identifier des protéines spécifiques sur un gel polyacrylamide



Application des anticorps exemple 1: Wester blot



transfère des protéines
sur une feuille



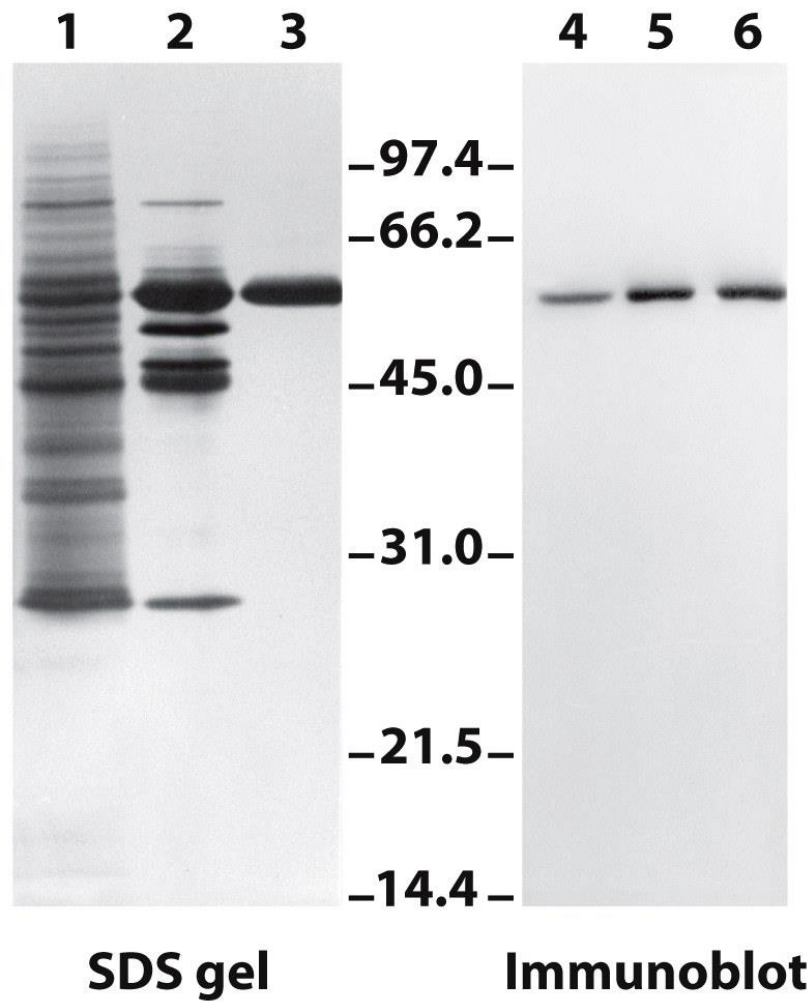
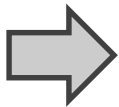


Figure 5-26c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - Séquencer des protéines
 - Détection avec des anticorps

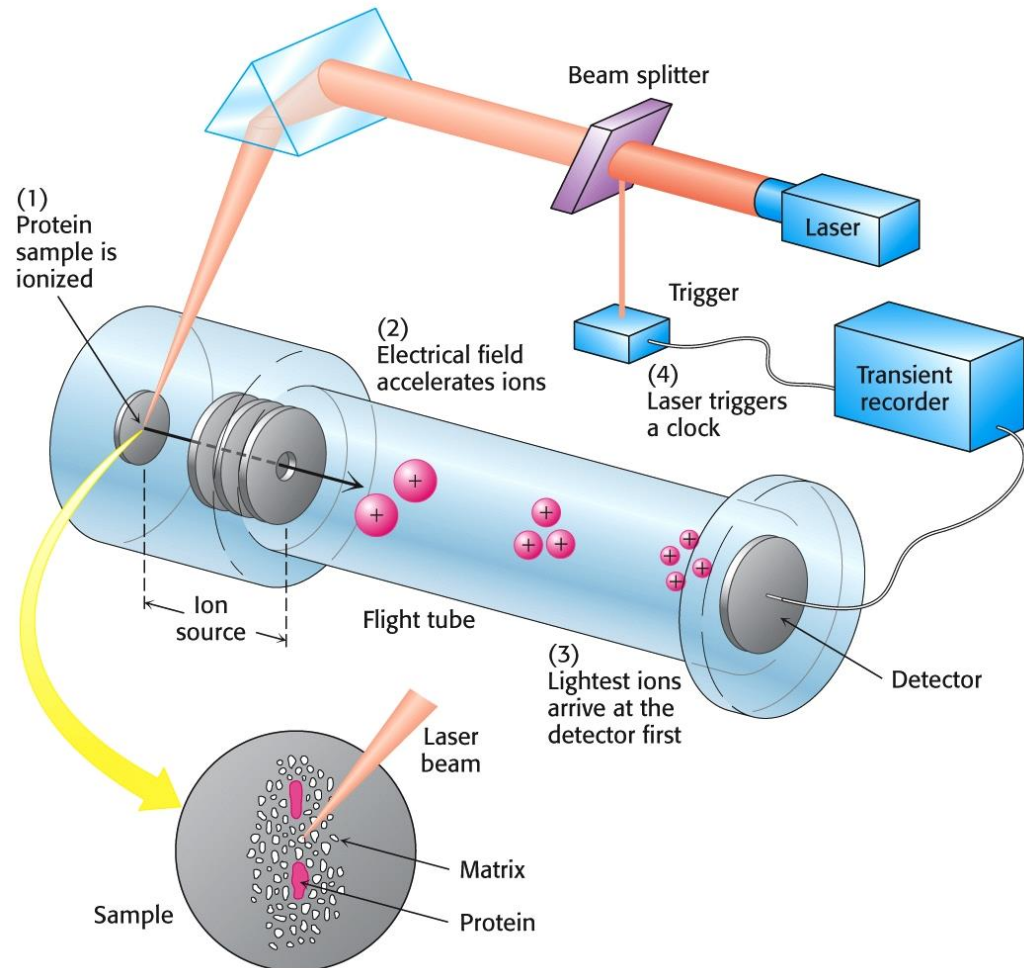


- Spetrométrie de masse

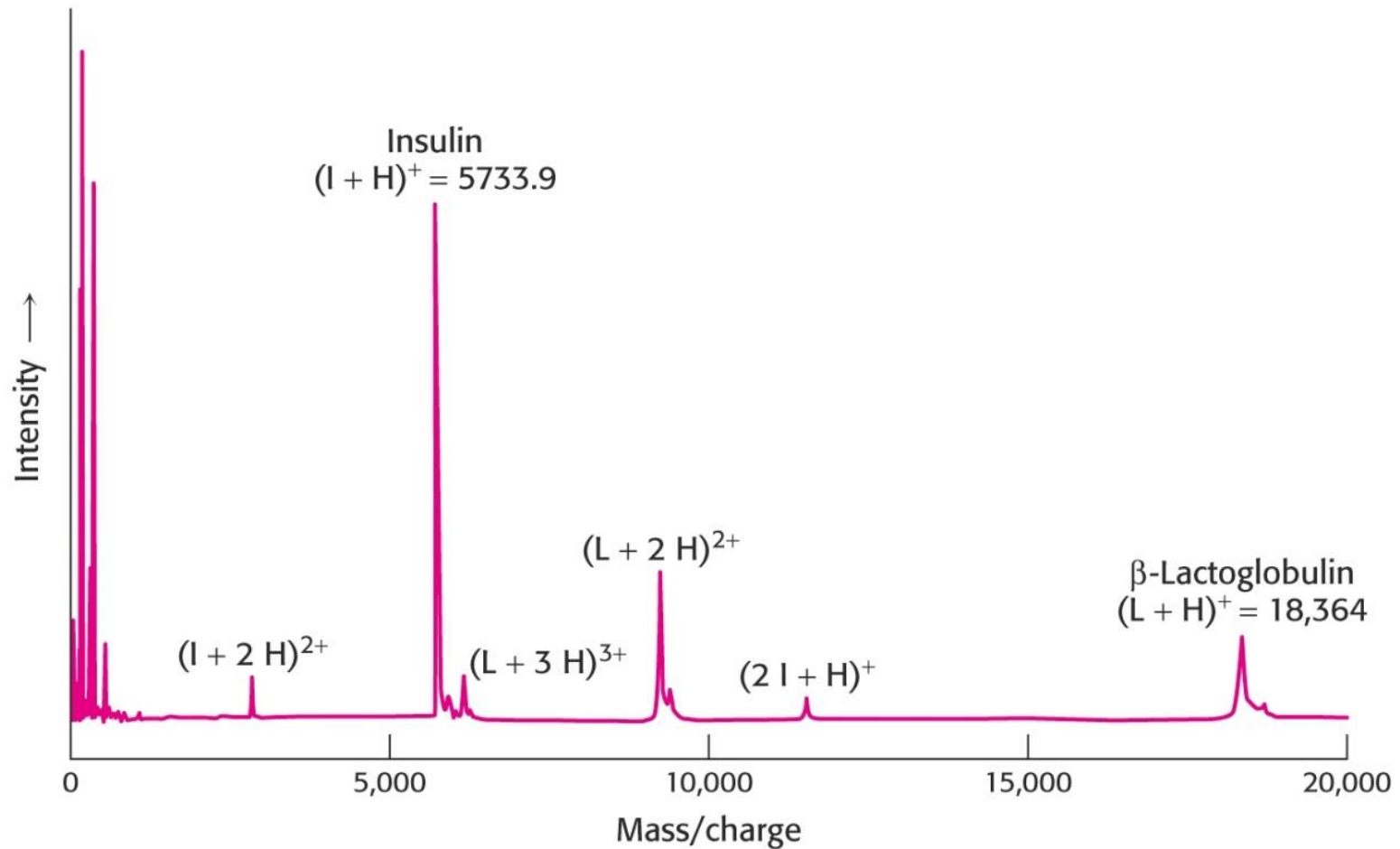
- Structure tridimensionnelle

Spetrométrie de masse

Matrix-assisted laser
desorption-ionization
time of flight;
MALDI-TOF



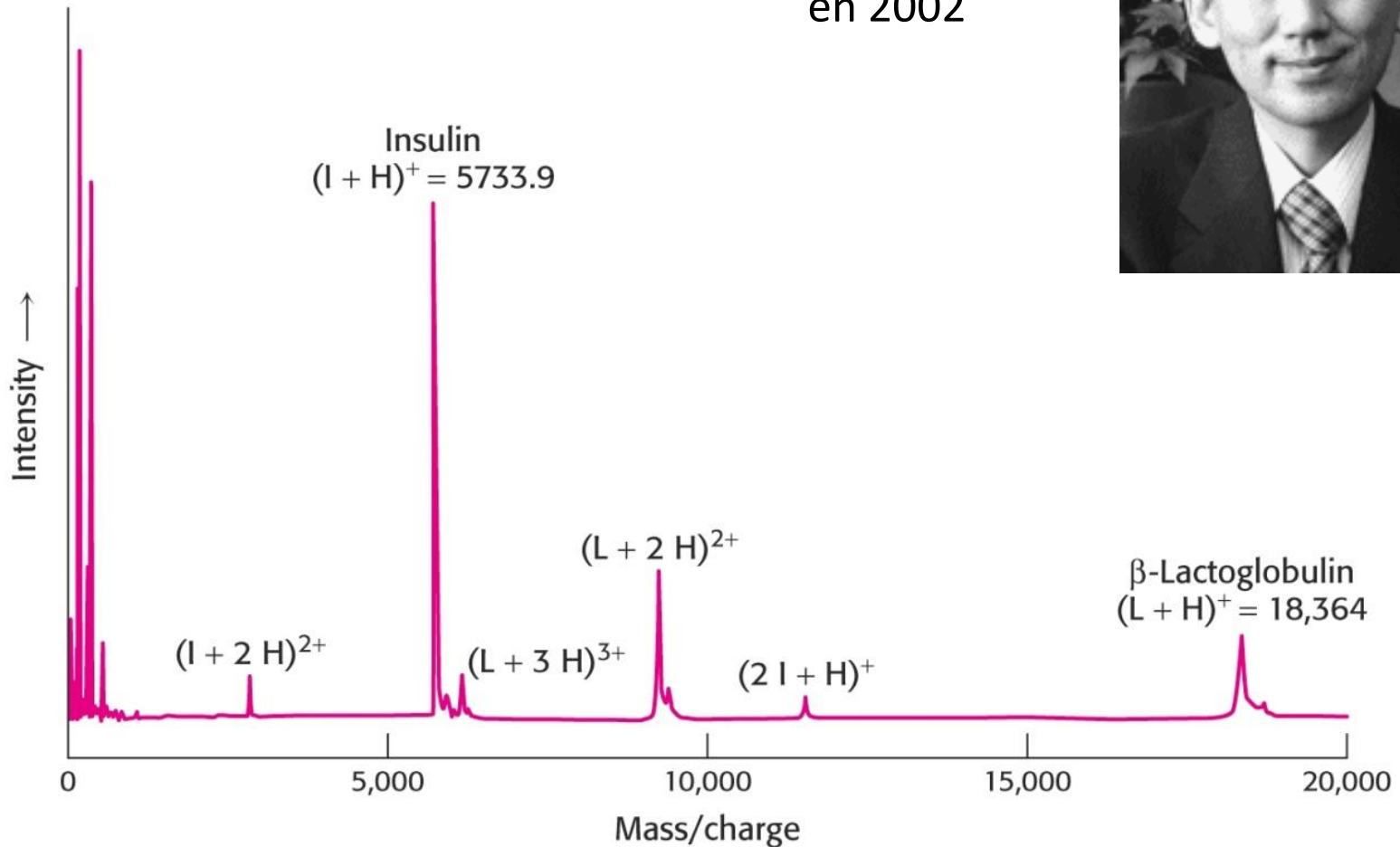
Exemple de MALDI-TOF



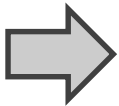
Exemple de MALDI-TOF

Koichi Tanaka

Prix Nobel
en 2002



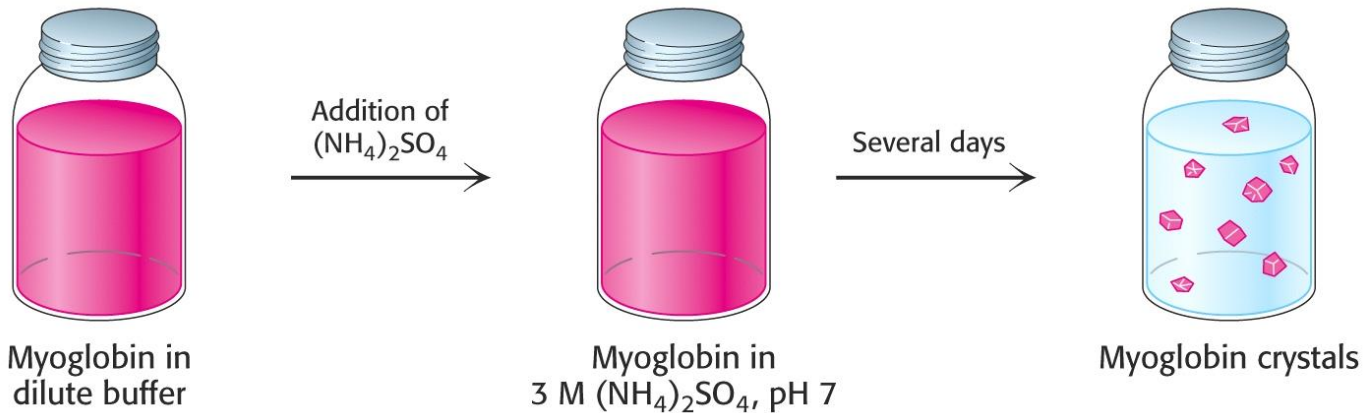
- Purification des protéines
- L'analyse des protéines
 - Mesurer la concentration
 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - Séquencer des protéines
 - Détection avec des anticorps
 - Spéctrométrie de masse
 - Structure tridimensionnelle



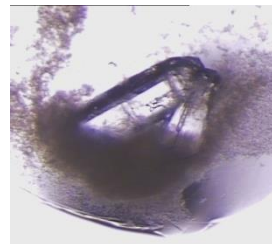
Structure tridimensionnelle d'une protéine

Cristallographie par rayons X

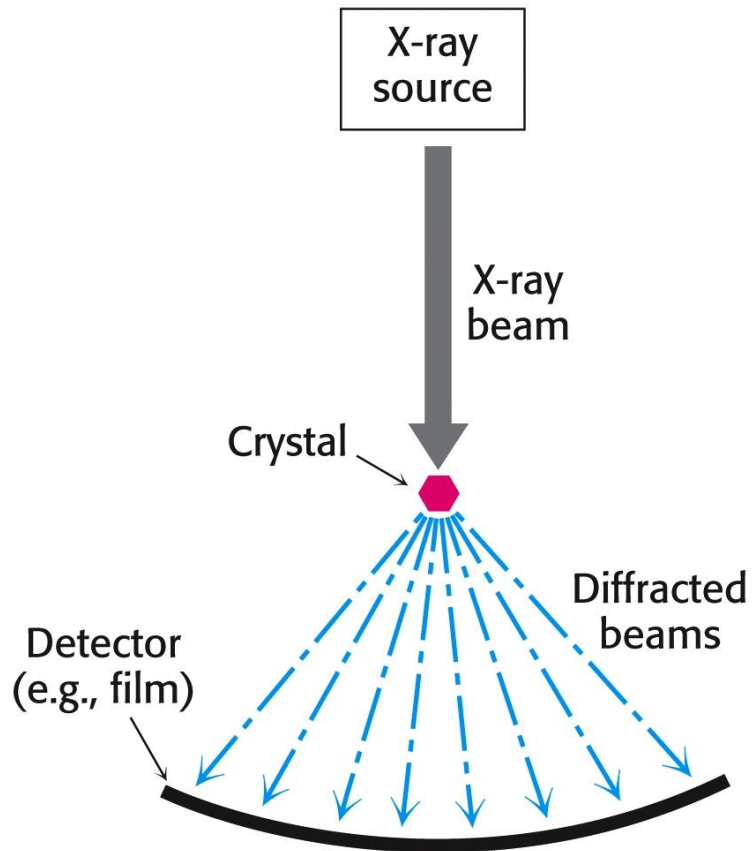
Première étape: obtenir des cristaux



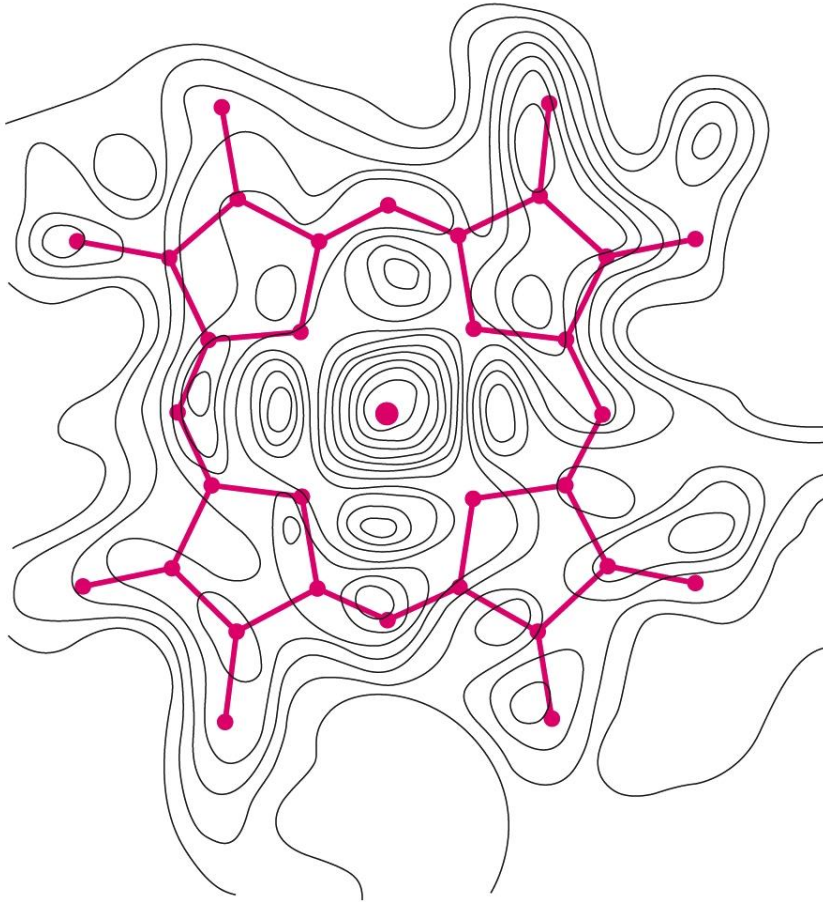
Cristaux de myoglobine



Deuxième étape: diffraction des rayons X par le cristal

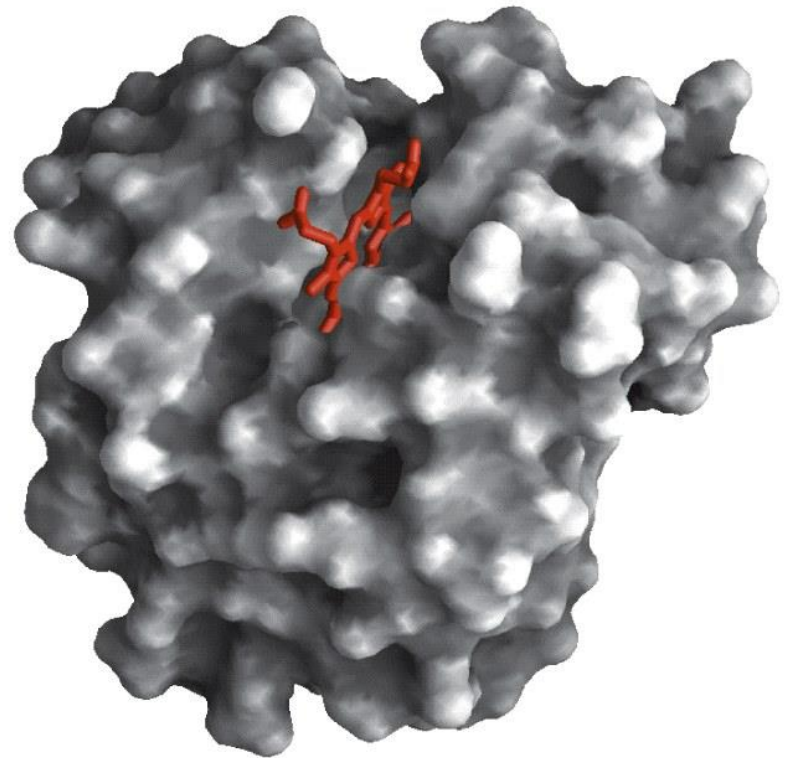
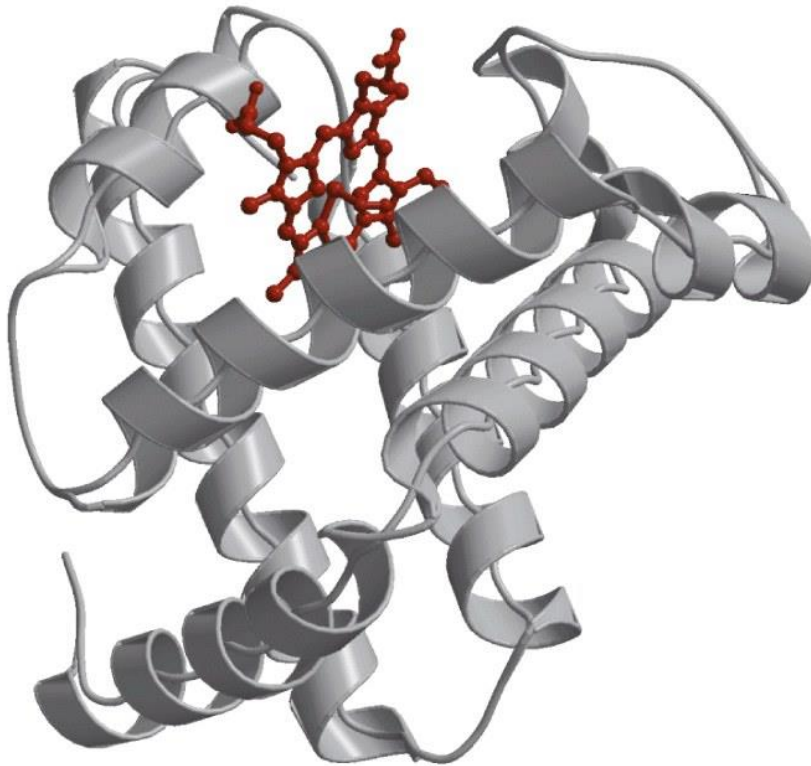


Troisième étape: calcul d'une carte de densité électronique

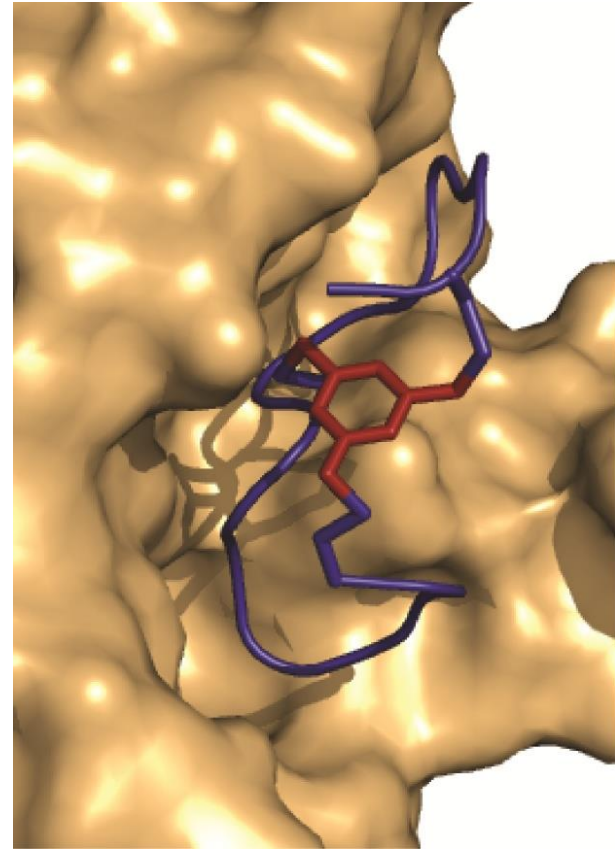
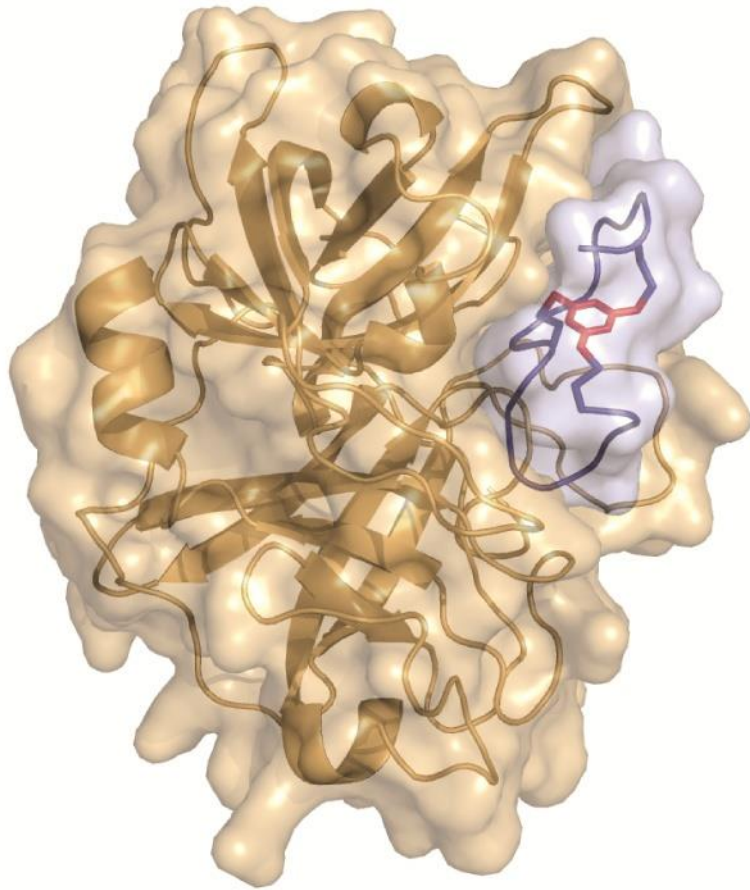


Section de la
carte de densité
électronique de
la myoglobine

La structure de la myoglobine



La structure d'une protéase avec un inhibiteur peptidique



L'analyse des protéines

- Mesurer la concentration
 - quantifier une protéine pure
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - analyser des protéines dans un mélange
- Séquencer des protéines
 - analyser la séquence primaire
- Détection avec des anticorps
 - identifier des protéines spécifiques dans un mélange
- Spectrométrie de masse
 - déterminer la masse moléculaire d'une protéine
- Cristallographie par rayon X
 - Structure tridimensionnelle

Questions?

Questions qu'on ma demandé par e-mail / via Zoom:

Est-ce qu'on doit apprendre pour l'examen....

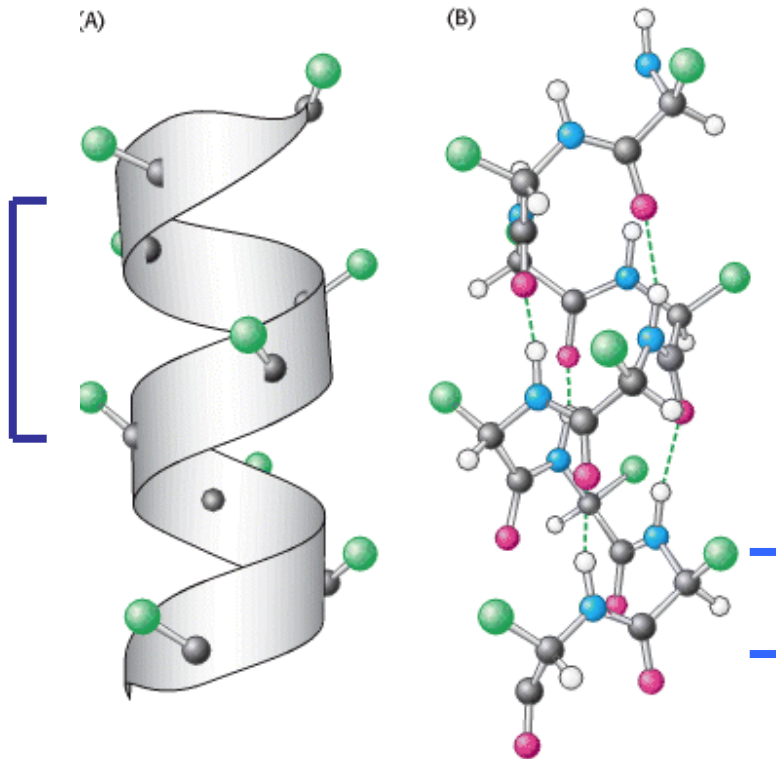
Liste des groupes fonctionnels ionisables des 20 aminoacides

TABLE 3.1 Typical pK_a values of ionizable groups in proteins

Group	Acid $\rightleftharpoons$ Base	Typical pK_a^*
Terminal α -carboxyl group	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---O-H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C}^- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	3.1
Aspartic acid Glutamic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---O-H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C}^- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	4.1
Histidine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N}^+ \text{---} \\ // \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{N-H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{N} \\ // \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{N-H} \end{array}$	6.0
Terminal α -amino group	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N}^+ \text{---} \\ \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N} \text{---} \\ \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	8.0
Cysteine	$\text{---S-H} \rightleftharpoons \text{---S}^-$	8.3
Tyrosine	$\begin{array}{c} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---O-H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---O}^- \end{array}$	10.9
Lysine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N}^+ \text{---} \\ \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N} \text{---} \\ \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	10.8
Arginine	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{N}^+ \text{---C} \text{---N-H} \\ // \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{N-H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{N} \text{---C} \text{---N-H} \\ // \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{N-H} \end{array}$	12.5

* pK_a values depend on temperature, ionic strength, and the microenvironment of the ionizable group.

Quelques paramètres de l'hélice α



- 3.6 aminoacides par tour d'hélice
- La longueur d'un résidu, mesurée le long de l'axe de l'hélice, est de 1.5 Å
- Pas de l'hélice 5.4 Å

La probabilité de trouver un certain aminoacide dans une certaine structure secondaire

TABLE 3.3 Relative frequencies of amino acid residues in secondary structures

Amino acid	α helix	β sheet	Turn
Ala	1.29	0.90	0.78
Cys	1.11	0.74	0.80
Leu	1.30	1.02	0.59
Met	1.47	0.97	0.39
Glu	1.44	0.75	1.00
Gln	1.27	0.80	0.97
His	1.22	1.08	0.69
Lys	1.23	0.77	0.96
Val	0.91	1.49	0.47
Ile	0.97	1.45	0.51
Phe	1.07	1.32	0.58
Tyr	0.72	1.25	1.05
Trp	0.99	1.14	0.75
Thr	0.82	1.21	1.03
Gly	0.56	0.92	1.64
Ser	0.82	0.95	1.33
Asp	1.04	0.72	1.41
Asn	0.90	0.76	1.28
Pro	0.52	0.64	1.91
Arg	0.96	0.99	0.88

hélice α

feuillet β

coude

alanine

glutamate

leucine

valine

isoleucine

glycine

arginine

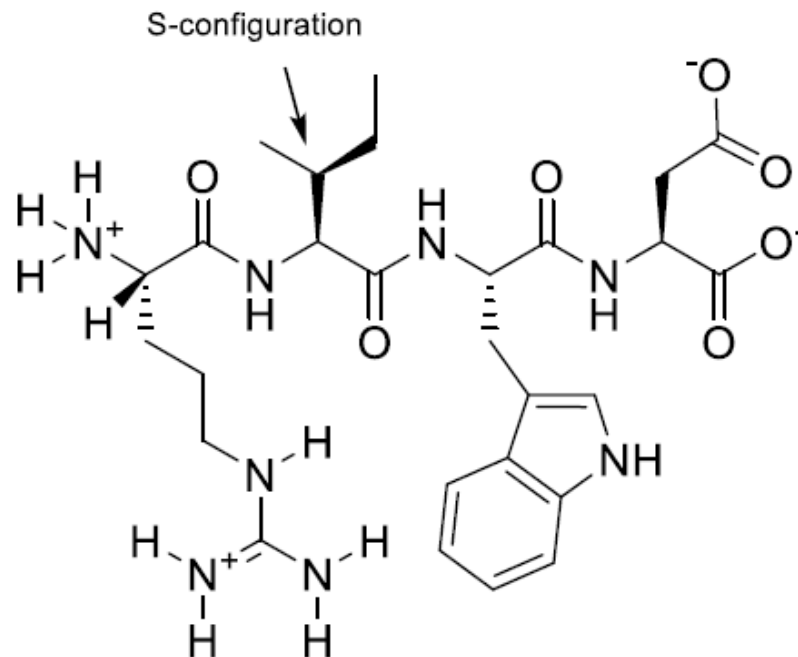
proline

Note: The amino acids are grouped according to their preference for α helices (top group), β sheets (second group), or turns (third group). Arginine shows no significant preference for any of the structures.

After T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2d ed. (W. H. Freeman and Company, 1992), p. 256.

Série 2

Question 1



Série 2

Question 2

Une hélice: $120/2 = 60$ kDa

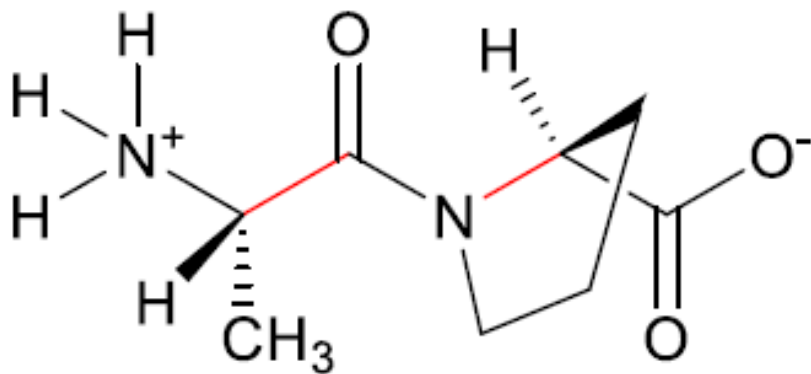
$60'000/110$ Da = 545.45 aa

$545 * 1.5 \text{ \AA} = 817.5 \text{ \AA}$

➔ Longueur ~ 82 nm

Série 2

Question 3



Série 2

Question 4

hélice α

Série 1

Question 5

lysozyme:

5 x hélices α , 2 x chaînes β

protéine fluorescente verte:

11 x chaînes β (et 4 petits hélices α)

myoglobine:

8 x hélices α

calmoduline:

7 x hélices α (et 4 petits chaînes β)