

TECHNIQUES ET MATERIEL
D'UN
LABORATOIRE DE RECHERCHES SUR LES PROTEINES

B. RIBADEAU-DUMAS

Laboratoire de Recherches sur les protéines
Institut National de la Recherche Agronomique
CNR~~A~~, 78350, Jouy-en-Josas, France

Le biochimiste qui s'intéresse aux protéines d'un organe, d'un tissu, d'un liquide physiologique, d'un aliment etc.. doit souvent, lorsqu'il s'agit d'une étude approfondie, isoler à l'état pur chacune de ces protéines et en analyser toutes les caractéristiques essentielles pour les objectifs qu'il veut atteindre.

Dans cet exposé, nous passerons en revue les techniques et les appareillages courants utilisés pour mener l'étude d'une protéine jusqu'à son terme ultime: la connaissance de sa structure spatiale et, s'il y a lieu, de son activité biologique.

1. PREPARATION DE LA PROTEINE PURIFIEE

1.1. - Techniques analytiques

L'obtention d'une protéine à l'état pur ne peut être accomplie d'une manière satisfaisante que si des techniques analytiques, de préférence rapides, permettent de suivre la progression de la purification à tous les stades. Les techniques les plus utilisées actuellement mettent à profit 3 caractéristiques qui différencient souvent les protéines : leur taille, leur charge et leurs propriétés antigéniques.

1.1.1. Séparation suivant la taille :

La technique la plus employée est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) après réduction et dénaturation par l'urée. Dans ces conditions la migration électrophorétique est proportionnelle au logarithme de la masse moléculaire. Cette technique s'emploie le plus souvent en utilisant des cylindres ou des plaques de gels verticaux. Si elle est très sensible, son pouvoir résolutif n'est pas très élevé. Il peut être accru lorsque l'électrophorèse est pratiquée dans un gradient de concentration en polyacrylamide, pour lequel un équipement spécial est nécessaire (pompe péristaltique et "gradient former"). Les colorants les plus employés pour révéler la position des bandes protéiques sont le bleu de Coomassie et l'Amido black, comme d'ailleurs pour les autres types d'électrophorèse.

1.1.2. Séparation suivant la charge

Les techniques faisant appel à cette propriété des protéines sont beaucoup plus résolutive que la précédente. Il est généralement aisé de distinguer 2 protéines ne différant que d'une unité de charge. Par ailleurs il est rare que 2 protéines aient des charges identiques à deux pH différents.

- Electrophorèse :

Il existe actuellement une multitude de variantes de l'électrophorèse qui s'appliquent aux protéines. Les supports employés le plus souvent sont le polyacrylamide, l'amidon, l'agarose et l'acétate de cellulose. Pour une protéine donnée, les résultats les plus satisfaisants sont obtenus par des électrophorèses à des pH situés assez loin de part et d'autre de son point isoélectrique.

Dans le cas de mélange très complexe, l'électrophorèse bidimensionnelle (à 2 pH différents), ou la combinaison à angle droit de l'électrophorèse et de l'electrofocalisation, sont souvent intéressantes.

- Electrofocalisation :

Cette technique, d'un pouvoir résolutif très élevé, consiste à faire migrer le mélange protéique dans un gradient de pH. Chaque protéine s'immobilise au point où le pH est égal à son point isoélectrique. Le gradient de pH se forme dès le début de l'électrophorèse grâce à l'adjonction au tampon d'électrophorèse d'un mélange de composés de pKs s'étalant sur toute la plage de pH que l'on veut utiliser.

1.1.3. Séparation suivant les propriétés antigéniques

La plupart des protéines, injectées à un animal, entraînent l'apparition d'anticorps dans le sérum sanguin. Il est très rare que tous les anticorps d'une protéine donnée soient identiques à ceux d'une protéine différente. Cette propriété est mise à profit dans les techniques de diffusion et d'immunoélectrophorèse. Lorsque ces techniques sont utilisées pour suivre la purification d'une protéine, on prépare un anticorps dirigé contre tous les composants du mélange complexe de départ.

- Techniques de diffusion

Dans ces techniques, on fait diffuser dans un gel (en tube ou en boîte de Pétri) l'antigène et l'anticorps l'un vers l'autre. On met ainsi à profit la précipitation antigène-anticorps qui se produit lorsque l'antigène et l'anticorps sont en proportions convenables, différentes suivant l'antigène et l'anticorps. On obtient ainsi des lignes de précipitation distinctes pour les différentes protéines du mélange. Ces techniques sont peu résolutive.

- Techniques d'immunoélectrophorèse

La résolution des techniques de diffusion est considérablement accrue lorsqu'on procède d'abord à une électrophorèse, qui sépare les protéines suivant leur charge, puis à une diffusion dans la direction perpendiculaire. La résolution est encore accrue, et la technique peut devenir quantitative, lorsque l'électrophorèse est suivie d'une seconde électrophorèse perpendiculaire dans un gel contenant l'anticorps. Dans ces conditions, chaque composant donne naissance à un pic formé par le complexe AG.AC.

1.2. Techniques préparatives

1.2.1. Isolement de la fraction protéique

Le mélange complexe à étudier contient souvent des glucides, des lipides, des acides nucléiques, des composés de faible masses moléculaires qu'il faut éliminer.

- Centrifugation

La centrifugation permet souvent d'éliminer les lipides et les particules (granules glucidiques, débris de membranes, organites cellulaires etc..)

- Précipitation ou solubilisation sélective

Les lipides peuvent être extraits par des solvants organiques, les glucides par l'éthanol ; il est souvent possible de précipiter sélectivement les protéines par modification du pH, de la force ionique ou de la température.

- Les petites molécules sont facilement éliminées par dialyse, osmose inverse ou tamisage moléculaire. Différentes techniques permettent d'éliminer l'eau, dont la plus répandue en biochimie des protéines est la lyophilisation que l'on utilise souvent après concentration par ultrafiltration.

1.2.2. Séparation des protéines

Aux techniques anciennes de précipitation fractionnée par les sels ou les solvants miscibles à l'eau, techniques toujours utilisées, se sont ajoutées des techniques qui séparent les protéines suivant leur taille, leur charge, leurs propriétés antigéniques, ou certaines autres propriétés spécifiques.

- Séparation suivant la taille

. L'ultracentrifugation est très utilisée, particulièrement en gradient de densité, lorsque la masse moléculaire des impuretés à éliminer est assez éloignée de celle du composant à purifier.

. Le tamisage moléculaire en colonne, sur dextrans ou polymères synthétiques réticulés, est d'un emploi courant. Il peut être utilisé à grande échelle.

- Séparation suivant la charge

. L'électrophorèse est ici peu employée, car les quantités que l'on peut traiter par cette technique sont faibles.

. Par contre, il est fait usage intensivement de la chromatographie d'échange d'ions, en général sur colonne. Dans le cas des protéines, les échangeurs polysaccharidiques (celluloses ou dextrans substituées) donnent les meilleurs résultats, car ils ne conduisent pas en général aux fixations irréversibles ou aux dénaturations qui se produisent assez souvent avec les résines synthétiques.

Les groupements chargés qui sont le plus souvent fixés aux polysaccharides sont : $-N^+$, $-NH_3^+$, $-COO^-$, SO_3^- .

. L'électrofocalisation préparative, en colonne liquide verticale, s'utilise avec succès mais ne permet pas de traiter de grosses quantités.

- Séparation suivant les propriétés antigéniques :

Il s'agit de la chromatographie d'affinité, dans laquelle un anticorps spécifique de la protéine à isoler est fixé d'une manière covalente à un support tel que le Sepharose. Ainsi, lorsque le produit préparé est placé dans une colonne et que le mélange de protéines passe à travers la colonne, seul l'antigène spécifique reste fixé et peut être élué, après lavage, par modification de la force ionique par exemple.

- Séparation suivant d'autres propriétés spécifiques : on parle souvent là aussi de chromatographies d'affinité car le principe en est identique. A un support tel que le Sepharose, on fixe d'une manière covalente un réactif qui se fixe spécifiquement à la protéine à extraire (analogue de substrat pour un enzyme, groupements thiols pour une protéine comportant des groupements SH, etc...). L'éluion est réalisée suivant un procédé propre à chacune des interactions mises en jeu dans la liaison entre la protéine et le réactif.

2. ETUDE D'UNE PROTEINE PURIFIEE

Cette étude, par toute une série d'étapes, tend à élucider la structure tridimensionnelle de la protéine et, s'il y a lieu, le mécanisme de son activité biologique.

2.1. Détermination de la masse moléculaire

Si les "techniques physiques" (ultracentrifugation analytique, diffusion de la lumière, pression osmotique) sont encore utilisées, des techniques plus simples, plus rapides, et nécessitant un appareillage moins coûteux sont d'un usage courant actuellement : électrophorèse en présence de SDS, tamisage moléculaire (le volume d'élution est proportionnel au logarithme de la masse moléculaire).

La détermination quantitative des résidus N- et C- terminaux, de la composition en acides aminés sont d'une aide précieuse pour la détermination exacte de la masse moléculaire.

2.2. Composition en acides aminés

La connaissance de la composition en acides aminés est pratiquement indispensable à l'élucidation de la structure primaire. Elle nécessite au préalable, s'il y a lieu, la séparation des différentes chaînes qui peuvent constituer la protéine, chaînes qui peuvent être liées de manière covalente ou non covalente. Dans le second cas, des réactifs tels que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine sont d'un emploi courant. Dans le premier cas, les chaînes sont généralement reliées par des ponts disulfures qu'il est aisé de rompre à l'aide d'un agent réducteur tel que le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol. Les différentes chaînes doivent être ensuite isolées et leurs compositions en acides aminés déterminées séparément.

- Hydrolyse :

Une hydrolyse est nécessaire pour séparer tous les résidus d'acides aminés qui constituent la chaîne peptidique. L'hydrolyse acide, par HCl 5,7N à 110° sous vide pendant des temps variables (24 à 96 H) est la technique la plus courante. Elle a l'inconvénient de détruire totalement le tryptophane, partiellement la cystéine et la cystine, la sérine et la thréonine.

On a utilisé récemment des acides sulfoniques pour remplacer HCl (par ex. l'acide mercaptoéthane sulfonique) qui ne détruisent pas le tryptophane lorsque l'on n'a pas affaire à une glycoprotéine.

La cystine et la cystéine sont le plus souvent transformés en un dérivé stable (S-carboxyméthylcystéine, S-aminoéthylcystéine, acide cystéique) avant hydrolyse.

La sérine et la thréonine peuvent être dosées d'une manière satisfaisante en utilisant 3 temps d'hydrolyse (24, 48 et 96h. par ex.) et en extrapolant les valeurs trouvées par dosage au temps zéro d'hydrolyse. Ce procédé est également utilisé pour doser l'ammoniaque (pour déterminer le nombre de résidus amidés) et parfois pour le dosage de la méthionine et de la tyrosine qui sont souvent partiellement détruites.

La rupture des liaisons unissant la valine à l'isoleucine ou ces 2 acides aminés entre eux nécessite un temps d'hydrolyse d'au moins 96h.

Après hydrolyse, l'acide chlorhydrique est généralement éliminé sous pression réduite. Dans le cas d'utilisation d'un acide sulfonique, non volatil, il est nécessaire de diluer l'hydrolysate et de le neutraliser partiellement avant de l'analyser.

La quantité à analyser est estimée par électrophorèse sur papier sous haute tension, à pH 1,9, et révélation à la ninhydrine. Une bonne expérience permet de déduire de l'intensité des tâches la quantité à appliquer sur l'analyseur d'acides aminés.

- Dosage des acides aminés

Les performances des analyseurs d'acides aminés se sont considérablement accrues depuis la mise au point de la technique d'analyse par Moore et Stein, bien que le principe (séparation sur polystyrène sulfoné et révélation à la ninhydrine) soit toujours pratiquement identique. Les améliorations ont porté surtout sur le pouvoir résolutif (utilisation de grains de résine sphériques de plus en plus fins, de colonnes de diamètre de plus en plus étroit), la stabilité de la ligne de base, la vitesse d'analyse (débits plus élevés, colonnes plus courtes) et la sensibilité (liée au pouvoir résolutif, pouvant être accrue par la substitution de réactifs fluorescents, fluorescamine ou O phtalaldéhyde à la ninhydrine). L'emploi de résines à grains très fins et l'augmentation du débit ont introduit une technologie nouvelle, celle des analyseurs haute-pression qui nécessitent des injecteurs, des colonnes et des pompes spéciaux.

La chromatographie en phase gazeuse commence à être utilisée pour le dosage des acides aminés. Elle nécessite leur modification chimique pour les rendre plus volatils et est encore loin de concurrencer la chromatographie liquide.

2.3. Détermination de la structure primaire

La détermination de l'enchaînement des acides aminés d'une chaîne peptidique est encore actuellement une opération très longue. La technique de base est la dégradation récurrente d'Edman qui consiste à fixer à l'acide aminé N-terminal le phénylisothiocyanate, à effectuer une cyclisation, un clivage et une conversion qui libère l'acide aminé N-terminal sous forme de PTH-acide aminé. Celui-ci est identifié, et la réaction est répétée sur la protéine ou le peptide restant.

L'introduction, par Edman, de Sequenators en phase liquide a rendu la plupart des opérations automatiques, permettant de plus un meilleur rendement à chaque cycle de dégradation. Dans les cas favorables l'enchaînement de 40 à 50 résidus peut ainsi être déterminé directement sur la protéine. Bien entendu, la réaction n'est pas possible lorsque le groupement aminé N-terminal est bloqué (N-acétylé, N-formylé ou cyclisé sous forme d'acide pyroglutamique). Souvent, également, pour des raisons variées, parfois inexplicables la dégradation ne dépasse pas quelques cycles.

Plus récemment ont été introduits par Laursen les Sequenators en phase solide qui sont utilisés pour déterminer la séquence de peptides relativement courts. La technique consiste à fixer d'une manière covalente le peptide à une résine par son extrémité C-terminale et à effectuer la dégradation classique d'Edman. Dans un cas, comme dans l'autre, cette dégradation fait appel à des lavages répétés du peptide ou de la protéine par des solvants organiques qui éliminent les produits de la réaction et récupèrent le PTH acide aminé. En phase liquide, et lorsqu'on a affaire à un peptide court d'hydrophobicité élevée, ces lavages entraînent des pertes importantes dues à la solubilisation du peptide dans ces solvants. La dégradation en phase solide élimine ce problème, mais en pose d'autres, notamment celui de la fixation du peptide à la résine qui doit se faire avec un bon rendement.

En tout état de cause les méthodes actuelles ne permettent de déterminer, sur une protéine intacte, que la séquence de 40 à 50 résidus N-terminaux et celle de quelques résidus de l'extrémité C-terminale, généralement par l'emploi de carboxypeptidases. Il est donc nécessaire de scinder la protéine en fragments de moins de 40 à 50 résidus, dont la séquence complète peut être déterminée directement. Mais il faut ensuite déterminer l'enchaînement de ces différents peptides. Pratiquement l'on procède par étapes : la protéine est scindée en un nombre de fragments aussi faible sur lesquels sont étudiés les extrémités N et C-terminales. Si le nombre des fragments est égal ou inférieur à 3 leur enchaînement peut être déduit automatiquement. Si leur nombre est supérieur, un 2ème agent de clivage, de spécificité différente est employé sur la protéine. L'analyse des fragments permet en général l'enchaînement de la première série de peptides. Chaque fragment, de l'une ou l'autre série, est traité de même par d'autres agents de clivages. On obtient ainsi des peptides de plus en plus courts, dont l'enchaînement est déterminé au fur et à mesure, et dont la taille permet finalement l'élucidation directe de la séquence.

Les agents de clivage, par ordre de spécificité décroissant sont les suivants :

- BNPS-scatole : coupure au niveau du carbonyle des résidus tryptophanyles
- Bromure de cyanogène : coupure au niveau du carbonyle des résidus méthionyles
- Trypsine : coupure au niveau du carbonyle des résidus Arg et Lys
- Protéase de *S. aureus* : coupure au niveau du carbonyle des résidus Glutamyles
- Thermolysine: coupure au niveau du groupement amide des résidus aromatiques et certains acides aminés hydrophobes (Ile, Leu, Ala, Val, Met)
- Chymotrypsine: coupure au niveau du carbonyle des résidus aromatiques et acides aminés hydrophobes (Leu, Met)
- Pepsine : coupure préférentielle de part et d'autre des résidus aromatiques. Moins spécifique que les précédents.
- Papaïne : peu spécifique
- Subtilisine, pronase : très peu spécifiques etc...

On voit facilement qu'une détermination de séquence nécessite l'isolement (et la détermination de la composition en acides aminés) d'un grand nombre de peptides. Les techniques de fractionnement sont similaires à celles employées pour les protéines : tamisage moléculaire et échange d'ions auxquelles il faut ajouter l'électrophorèse sur papier sous haute tension, et la chromatographie sur papier. Les chromatographies d'échange d'ions pour les peptides de taille faible ou moyenne, sont généralement pratiquées sur résines échangeuses, alors que les gros peptides sont traités comme des protéines.

Pour le fractionnement des peptides de taille ^{faible} ou moyenne, dialysables, on évite l'emploi de tampons inorganiques difficiles à éliminer par la suite. On leur préfère des tampons volatils, souvent à base d'acétate de pyridine.

Les améliorations les plus remarquables dans le domaine des études de séquence ont porté sur l'appareillage (Sequanators), sur l'utilisation des appareils automatiques pour la dégradation de courts peptides (séquence en phase solide ; en phase liquide avec modification chimique du peptide, spectromètre de masse), sur l'identification des PTH-acides aminés. Dans ce domaine, les techniques de chromatographie sur couche mince gardent leur intérêt bien qu'elles ne soient pas quantitatives. Leur ont été adjoint la chromatographie en phase gazeuse, et plus récemment, la chromatographie liquide haute pression qui semble être la technique d'avenir.

2.4. Structure secondaire

Par structure secondaire on entend l'organisation régulière de tous ou partie de la chaîne peptidique, les structures régulières les plus fréquentes étant l'hélice α et la structures β . Les techniques physiques qui permettent d'étudier la structure secondaire des protéines ne donnent en fait que des informations très limitées et souvent sujettes à caution.

Elles peuvent indiquer essentiellement le pourcentage de la longueur de la chaîne qui se trouve en hélice α , en structure β ou en pelote statistique.

Les 3 techniques essentielles utilisées dans ce domaine sont :

- la spectrophotométrie dans l'UV lointain (180 à 230 nm), correspondant à la région d'absorption des liaisons peptidiques ;
- la spectropolarimétrie
- le dichroïsme circulaire

Il faut souligner que ces techniques et l'appareillage afférent sont peut être plus intéressants dans l'étude des variations de conformation des protéines que dans celle de la structure secondaire.

2.5. Structures tertiaire et quaternaire

La structure tertiaire d'une chaîne peptidique correspond à sa structure tridimensionnelle, dictée par la structure primaire, alors que la structure quaternaire correspond à l'assemblage tridimensionnel de plusieurs chaînes peptidiques qui interagissent entre elles.

La seule méthode existant actuellement pour l'étude de ces structures est la diffraction des rayons X qui nécessite l'obtention de la protéine à l'état cristallisé. Elle a été appliquée maintenant à un nombre important de protéines (une cinquantaine) dont la structure tertiaire est maintenant connue à une résolution de 2 Å ou moins.

De récents développements permettent d'éviter la technique des remplacements isomorphes (fixation d'un métal lourd dans la molécule). L'obtention de dérivés isomorphes était souvent difficile et pouvait constituer le facteur limitant de la technique.

3. TECHNIQUES PARTICULIERES

La détermination de la structure tertiaire ou quaternaire ne représente pas une fin en soi. Elle a généralement pour objet l'élucidation d'un mécanisme biochimique (mécanisme d'action des enzymes, des hormones, des transporteurs d'oxygène ou de fer etc...). Elle n'est heureusement que rarement nécessaire.

Nous ne pouvons bien entendu pas ici détailler toutes les techniques utilisées dans les laboratoires qui étudient les protéines sous tel ou tel aspect, et ne citerons que quelques exemples :

- les études concernant les modifications de structure des protéines sous l'effet de divers agents utilisent les techniques citées ci-dessus (spectrophotométrie dans l'UV lointain, spectropolarimétrie, dichroïsme circulaire), ainsi que la spectrophotométrie de différence, la méthode de "perturbation de solvant", la spectrophotométrie d'émission (fluorescence) etc...

- les études de cinétique enzymatique utilisent beaucoup la spectrophotométrie, souvent associée à des techniques permettant d'apprécier les réactions rapides (stop flow, température jump, pressure jump etc...).

- l'étude du métabolisme des protéines fait souvent appel aux traceurs radioactifs et à l'appareillage qui s'y rapporte (scintillation liquide, radioautographie etc...).

4. CONCLUSION

Les années fastes où les laboratoires s'équipaient d'un matériel disproportionné au regard des problèmes qu'ils avaient à résoudre sont passées en France. Et c'est peut-être un bien car ceci impose au chercheur une étude critique du matériel existant sur le marché et de ses besoins. Suivant les cas il n'est pas toujours nécessaire qu'un laboratoire de recherches sur les protéines dispose d'un analyseur d'acides aminés, d'un Sequenator, ou d'une ultracentrifugeuse analytique. A mon sens, si l'appareillage rend l'inappréciables services, seuls les hommes sont essentiels à la Recherche, et le développement d'une équipe doit précéder celui de son équipement.