

Purification et caractérisation de la sapécine

Sur la base de ses propriétés antibactériennes, c'est-à-dire sa capacité à inhiber la croissance d'une culture bactérienne, la sapécine est purifiée à partir de cellules embryonnaires en culture.

L'activité totale (AT) correspond à l'activité antibactérienne de la sapécine : 1 unité d'activité antibactérienne est la quantité de sapécine qui entraîne 50% d'inhibition de la croissance bactérienne (*Escherichia coli*) par rapport à un contrôle.

$$R (\%) = \frac{\text{AT étape n}}{\text{AT étape 1}}$$

$$\text{AS (UA/mg)} = \frac{\text{AT étape n}}{\text{Q étape n}}$$

$$\text{FP} = \frac{\text{AS étape n}}{\text{AS étape 1}}$$

A partir de 900 mL de milieu de culture, les étapes de purification donnent les résultats suivants.

Etapes	AT (unités arbitraires)	Q protéines (mg)	R (%)	AS (UA/mg)	FP
milieu de culture	6675	3258	100	2	1
chromatographie sur carboxyméthylcellulose	4247	26,8	63,6	158	79
concentration	2912	15,8	43,6	184	92
filtration sur gel	1986	5,3	29,8	375	187,5
chromatographie sur phase reverse	1540	0,53	23,1	2906	1453
R : rendement - AT : activité totale - Q : quantité de protéines - AS : activité spécifique - FP : facteur de purification					

La sapécine est **purifiée** car une forte activité totale (AT) est conservée pour une quantité minime de protéines totales => facteur de purification = **1453**.

A l'échelle moléculaire, aucun corps (hormis les cristaux) ne peut être considéré comme totalement pur. A fortiori les protéines extraites de milieux extrêmement complexes et complexes comme la cellule.

Réponse partie B

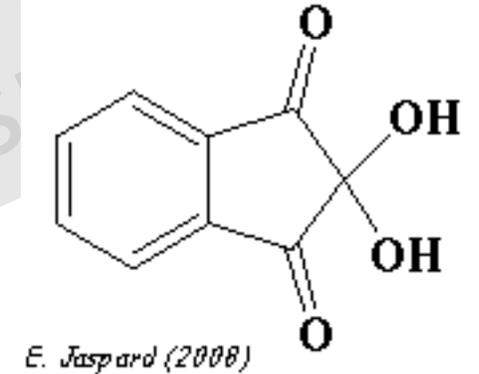
Conditions **d'hydrolyse totale acide** des liaisons peptidiques pour la détermination de la composition minimale en acides aminés.

Les acides aminés sont ensuite :

- séparés par chromatographie d'échange d'ions
- puis quantifiés après dérivation par la ninhydrine (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione)

L'absorbance des dérivés est mesurée à **570 nm**.

Pro ne réagit pas avec la ninhydrine.



Ou les acides aminés sont dérivés au préalable par le phénylthiocyanate (réactif d'Edman / PITC) puis séparés et quantifiés par chromatographie en phase inverse.

Les valeurs obtenues après hydrolyse acide sont **multiples de 7,5**.

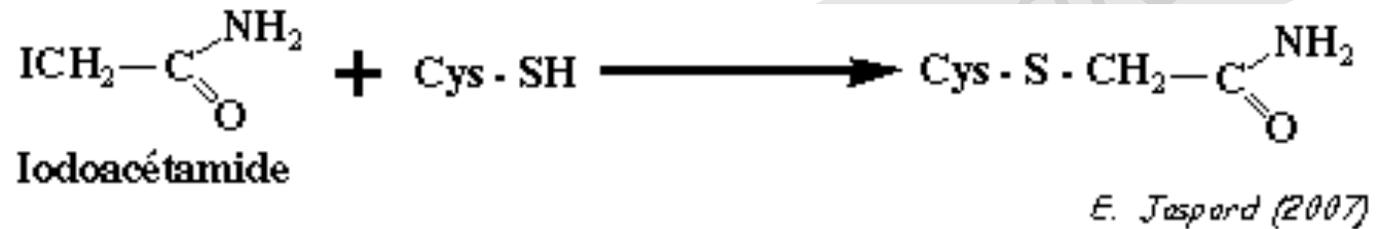
La quantité correspondant à une unité est donc 7,5. En divisant les valeurs par 7,5, on obtient la composition minimale suivante :

L6 / T1 / C6 / E4 / I1 / Asx1 / R4 / S2 / H1 / K2 / G1 / Y2 / A1 / V2 => **34 acides aminés au minimum**

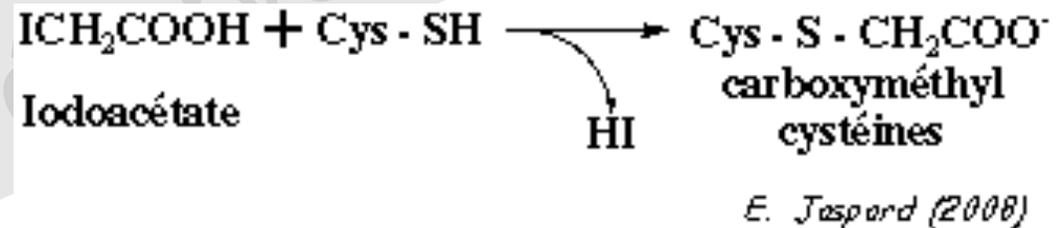
Réponse partie C

L'iodoacétamide et l'iodoacétate sont des réactifs des groupements **thiols** (-SH).

L'**iodoacétamide** ne change pas la charge.



L'**iodoacétate** introduit une charge négative par -SH dérivé.



Il est capital de séparer les dérivés par électrophorèse en conditions **natives** afin que les différentes formes du polypeptide migrent uniquement en fonction de leurs **charges nettes** respectives.

Plus le polypeptide est chargé **négativement**, moins il migre : c'est le traitement au iodoacétate radioactif 100% => **piste 5** des gels A et B.

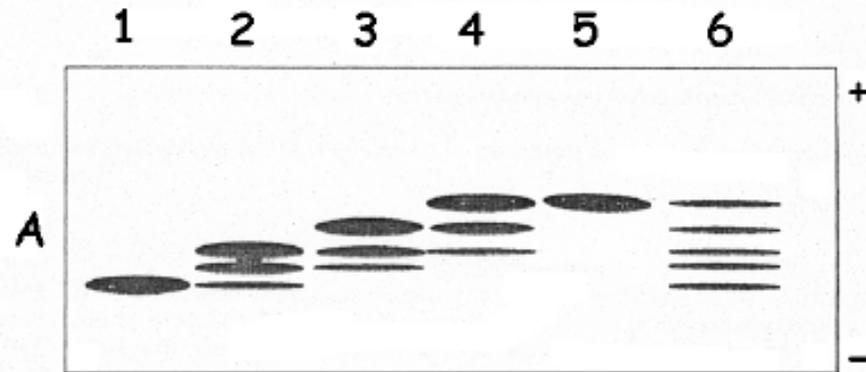
Réponse partie C

Le dithiothréitol (DTT) réduit les ponts disulfures : **toutes les Cys sont accessibles aux réactifs.**

L'iodoacétamide et l'iodoacétate étant radioactifs, **les Cys qui réagissent sont marquées au ^{14}C .**
La radioactivité impressionne le film aux endroits où migrent les différentes formes du polypeptide.

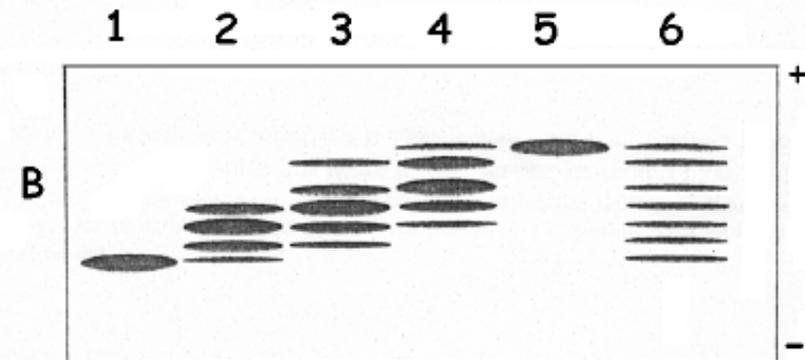
Gel A : le polypeptide purifié est non réduit.

Seules les **Cys libres** sont marquées par l'un et l'autre des deux réactifs.



Gel B : le polypeptide purifié est d'abord traité par le DTT.

Toutes les Cys sont marquées.



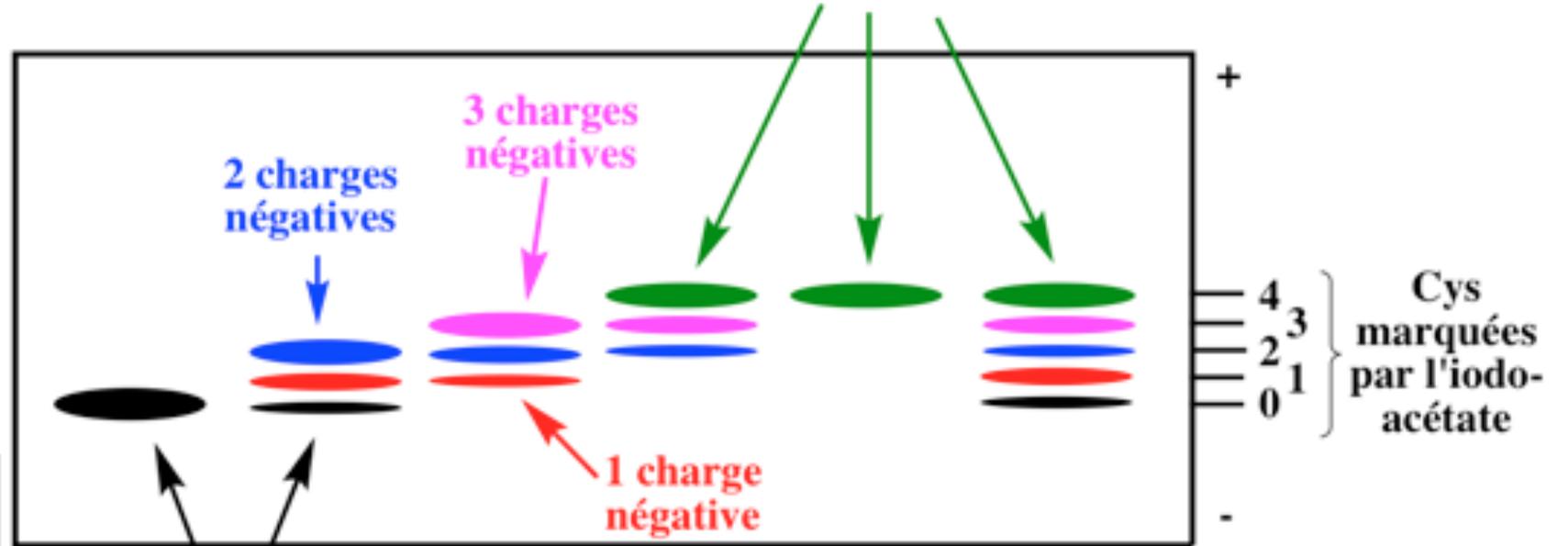
Interprétation de la figure du gel natif A

A 66% d'iodoacétamide, il existe des polypeptides totalement marqués par l'iodoacétate.

Inversement, à 66% d'iodoacétate, il existe des polypeptides totalement marqués par l'iodoacétamide.

Mais on ne peut pas visualiser de bandes car ces polypeptides sont à l'état de trace.

Totalement chargé = 4 charges négatives :
 $\text{Cys1-CH}_2\text{COO}^- / \text{Cys2-CH}_2\text{COO}^- / \text{Cys3-CH}_2\text{COO}^- / \text{Cys4-CH}_2\text{COO}^-$



pas de charge négative
 iodoacétamide 66% : le marquage n'est pas total
 $\implies \text{Cys1-SH} / \text{Cys2-CO-NH}_2 / \text{Cys3-CO-NH}_2 / \text{Cys4-CO-NH}_2$

Traitement	piste	polypeptide natif - gel A	polypeptide réduit - gel B
iodoacétamide radioactif 100%	1	1 bande qui migre le plus loin : le polypeptide est non chargé 1 forme => toutes les Cys sont sous la forme Cys-CO-NH ₂ La bande piste 1 - gel A migre aussi loin que la bande piste 1 - gel B.	
Iodoacétamide 66% iodoacétate 33%	2	3 bandes = 3 formes variables du polypeptide selon le pourcentage respectif iodoacétamide - iodoacétate.	4 bandes = 4 formes du polypeptide => 0 à 3 Cys marquées par l'iodoacétate
Iodoacétamide 50% iodoacétate 50%	3		5 bandes = 5 formes du polypeptide => 0 à 4 Cys marquées par l'iodoacétate
Iodoacétamide 33% iodoacétate 66%	4		
iodoacétate radioactif 100%	5	1 bande qui migre le moins loin : le polypeptide est totalemment chargé négativement 1 forme => toutes les Cys sont sous la forme Cys-CH ₂ COO ⁻ La bande piste 5 - gel A migre plus loin que la bande piste 5 - gel B donc le polypeptide natif est moins négatif que le polypeptide réduit.	
mélange : tous les dépôts des pistes 1 à 5	6	5 bandes = 5 formes du polypeptide	7 bandes = 7 formes du polypeptide => 0 à 6 Cys marquées par l'iodoacétate

Conclusions

Le polypeptide natif et non traité par les réactifs radioactifs migre exactement comme la bande 1 du gel A ou du gel B : **la sapécine est un monomère.**

Une bande apparaît dans la piste 1 du gel B et sept bandes apparaissent dans la piste 6 du gel B : **la sapécine contient 6 cystéines.**

Deux bandes additionnelles apparaissent dans la piste 6 du gel B par rapport à la piste 6 du gel A. La réduction par le DTT révèle 2 Cys supplémentaires : il y a **1 pont disulfure.**