

Protéomique

Electrophorèse de protéines

Réf :117275

Kit étude de la mucoviscidose Électrophorèse de la protéine CFTR

Français – p 1

Version: 5210

1 Contexte scientifique : du gène CFTR à la protéine

La mucoviscidose est une maladie génétique grave qui provoque un épaissement anormal des sécrétions corporelles, comme le mucus. Ce trouble affecte principalement les poumons et le système digestif, mais peut aussi toucher d'autres organes. Elle est causée par des mutations du gène CFTR, qui code pour une protéine transmembranaire du même nom. Cette protéine joue un rôle essentiel dans le transport des ions à travers les membranes cellulaires.

Plus de 2000 mutations du gène CFTR ont été identifiées. Certaines sont fréquentes, d'autres très rares ou spécifiques à certaines populations. Aujourd'hui, la mucoviscidose est détectée systématiquement à la naissance. Les personnes atteintes ou porteuses d'une mutation peuvent bénéficier d'un accompagnement génétique, et dans certains cas, un diagnostic prénatal ou pré-implantatoire est proposé.

La recherche se concentre encore aujourd'hui sur la compréhension du rôle de chaque mutation, de leur effet sur la fonction de la protéine CFTR, et sur le développement de traitements adaptés à chaque profil génétique.

Ce TP propose de modéliser l'étude d'une mutation du gène CFTR à travers une approche expérimentale simple mais très utilisée en biologie : **l'électrophorèse des protéines**. Cette technique permet de séparer les protéines selon leur taille et leur charge, et de visualiser leur présence ou leur absence dans différents compartiments de la cellule.

Ce TP peut être réalisé seul, ou bien en complément du kit « Dépistage génétique de la mucoviscidose par électrophorèse d'ADN » (réf. 117 227), qui simule un diagnostic prénatal chez des parents à risque.

C'est également le premier TP d'électrophorèse protéique utilisant la fluorescence, ce qui permet une lecture plus précise et plus sensible des résultats.

1.1 La protéine CFTR

La protéine CFTR (pour Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) est présente à la surface des cellules qui forment les tissus épithéliaux (comme ceux des voies respiratoires ou de l'intestin). Elle est intégrée dans la membrane de ces cellules, plus précisément sur la face appelée surface apicale, qui est en contact avec l'extérieur de l'organe.

Cette protéine, composée de 1480 acides aminés pour une masse de 170 kDa, agit comme un canal permettant le passage d'ions chlore (Cl^-) et sodium (Na^+). Son bon fonctionnement est essentiel pour maintenir une bonne hydratation des sécrétions comme le mucus.

En cas de mutation du gène CFTR, la protéine peut être mal formée, mal transportée ou inefficace. Il existe différentes formes mutées de la protéine, responsables de symptômes plus ou moins graves selon les cas. Les chercheurs s'intéressent donc de près à la nature précise des mutations : selon leur effet sur la synthèse ou le fonctionnement de la protéine, les traitements proposés peuvent être différents. Une mutation ne signifie pas toujours l'absence complète de la protéine : dans certains cas, elle est bien produite mais moins efficace, ou mal localisée dans la cellule. Cela explique pourquoi les symptômes varient d'un patient à l'autre.

1.2 Lien avec le gène CFTR

Voici des exemples de mutation CFTR connus et leurs impacts.

1.2.1 Mutation $\Delta F508$

Cette mutation très commune témoigne du défaut de maturation par séquestration dans le réticulum endoplasmique.

Nature et localisation : $\Delta F508$ est une délétion d'une phénylalanine en position 508, située dans le premier domaine de liaison aux nucléotides (NBD1) de CFTR.

Impact : Cette délétion perturbe la structure locale de NBD1 et, surtout, les interactions inter domaines nécessaires à l'assemblage correct de la protéine. Le repliement est anormal, la protéine est reconnue comme mal conformée, retenue dans le réticulum endoplasmique, et dégradée rapidement par le protéasome.

Conséquences : Très peu de CFTR $\Delta F508$ atteint la membrane plasmique, et ceux qui y parviennent présentent une instabilité thermique et un dysfonctionnement du canal.

Phénotype : sévère classique de mucoviscidose, avec insuffisance pancréatique, infections pulmonaires chroniques, et complications multi systémiques (Ward & Kopito, 1994; Thibodeau et al., 2010; Wang et al., 2011).

1.2.2 Mutations dans les hélices transmembranaires (TM1) : G85E et G91R

Impact : Introduction de résidus chargés dans une région hydrophobe perturbant la structure tertiaire sans modifier la topologie membranaire.

Conséquence : Blocage de la maturation, accumulation de la forme immature, dégradation rapide dans le réticulum endoplasmique.

Phénotype : Formes sévères de mucoviscidose, comparables à $\Delta F508$ (Xiong et al., 1997).

1.2.3 Mutations dans les boucles cytoplasmiques N-terminales (CL1 et CL2) : G178R, E193K

Impact : Ralentissement de la maturation, rétention partielle dans le réticulum endoplasmique, altération de la fonction du canal (diminution de la probabilité d'ouverture).

Phénotype : Variable mais souvent sévère (Seibert et al., 1997).

1.2.4 Mutation G480C (région cytoplasmique)

Impact : Défaut de trafic intracellulaire, absence de glycosylation complexe, séquestration dans le réticulum endoplasmique.

Fonction : Canal fonctionnel si exprimé hors du contexte réticulum endoplasmique.

Phénotype : Sévère, dû à la séquestration (Smit et al., 1995).

2 Objectifs du kit

2.1 Étude de l'impact de mutations sur la protéine CFTR

Cette activité propose une simulation de test de diagnostic visant à étudier l'effet de différentes mutations du gène **CFTR**, responsable de la mucoviscidose.

Le kit fournit, pour trois individus, des **fractions cellulaires purifiées** contenant la protéine CFTR isolée. Deux compartiments cellulaires sont analysés séparément :

- **Le réticulum endoplasmique (RE)** : lieu de synthèse des protéines ;
- **Le cytosol** : zone de maturation et de transit vers la membrane plasmique, où la protéine CFTR agit comme **canal ionique**.

Les trois individus étudiés sont :

- Un **individu sain** (sans mutation),
- Un **individu porteur de la mutation $\Delta F508$** , la plus fréquente dans la mucoviscidose,
- Un **patient porteur d'une mutation inconnue**, dont on cherche à déterminer l'impact.

2.2 Principe du test

La **mutation $\Delta F508$** correspond à la **délétion d'une phénylalanine en position 508**, empêchant la protéine d'atteindre la membrane plasmique. Elle reste alors bloquée dans le réticulum endoplasmique.

L'analyse repose sur deux critères :

1. **La taille de la protéine CFTR**, pour vérifier sa bonne synthèse.
2. **Sa localisation intracellulaire**, en comparant sa présence dans le cytosol et dans le RE.

Ces éléments sont révélés par une **électrophorèse sur gel**, technique permettant de séparer les protéines selon leur taille (en kDa) et de visualiser leur répartition dans les compartiments cellulaires.

Pour simplifier la lecture, on considère ici que **seule la protéine CFTR** est présente dans les échantillons.

2.3 Démarche expérimentale

On compare trois profils électrophorétiques :

- **Individu sain** : protéine CFTR correctement synthétisée et adressée à la membrane.
- **Individu $\Delta F508$** : protéine bloquée dans le RE.
- **Patient inconnu** : mutation à caractériser selon le profil observé.

Chaque individu est représenté par deux échantillons : un du **cytosol** et un extrait du **RE**.

La comparaison de ces profils permet d'évaluer **l'effet de la mutation sur la production et la localisation** de la protéine.

2.4 Le principe de l'électrophorèse de protéines sur gel

L'électrophorèse permet de séparer les protéines en fonction de leur taille (masse moléculaire) et de leur charge.

En milieu légèrement basique, les protéines sont chargées électriquement. Placées dans un gel et soumises à un champ électrique, elles migrent à des vitesses différentes selon leur structure : les plus petites et les plus chargées migrent plus vite que les grosses ou faiblement chargées.

Pour rendre cette migration plus lisible et uniquement dépendante de la taille, on utilise souvent un détergent anionique, le SDS (dodécylsulfate de sodium). Il dénature les protéines (elles perdent leur forme) et leur donne une charge négative proportionnelle à leur longueur. Ainsi, toutes les protéines ont une charge comparable, et leur séparation repose uniquement sur leur taille : les plus petites migrent plus loin dans le gel.

Les protéines forment alors des bandes visibles après coloration. Chaque bande correspond à des protéines de même taille. Pour faciliter l'analyse, on travaille ici sur des fractions purifiées, contenant uniquement la protéine CFTR.

La taille attendue de la protéine CFTR est d'environ 170 kDa (kilo daltons).

2.5 Intérêt du TP

Bien que simplifiée, cette expérience repose sur des principes réels utilisés en laboratoire.

Elle permet d'illustrer concrètement :

- L'impact d'une mutation sur la fonction d'une protéine,
- La relation entre **gène, protéine et phénotype**,
- Et l'intérêt des techniques de **séparation moléculaire** comme l'électrophorèse.

3 Contenu du kit & matériel complémentaire

Le kit se compose des éléments suivants :

- 1 flacon de solution tampon pour électrophorèse de 250 ml (4X)
- 1 flacon de colorant fluorescent pour protéine de 60 ml (EZfluor)
- 2 microtubes contenant chacun 0,8 g d'agarose
- 2 sachets contenant chacun :
 - 1 microtube contenant 0,1g de protéines concentrées
 - 6 microtubes contenant chacun 100 μ l de tampon de charge et correspondant à chaque condition de l'expérience
- 2 pipettes Pasteur de 3 ml

Afin de réaliser l'entièreté de la manipulation vous aurez besoin du matériel complémentaire ci-dessous (nous fournis) :

- Cuve à électrophorèse (nous vous recommandons un système tout-en-un de type phorEasy réf. 708150)
- Micropipette 2-20 μ l
- Boîte de Pétri

4 Protocole expérimental

4.1 Schéma expérimental

Le kit est conçu pour deux demi-groupe de TP. Pour chaque demi-groupe, vous avez suffisamment de réactifs pour réaliser 5 électrophorèses au format phorEasy. Les 6 conditions expérimentales différentes pourront donc être déposées 5 fois par demi-groupe. Nous vous recommandons de déposer dans la même électrophorèse les 6 conditions expérimentales différentes et de répéter ce plan de dépôts dans les autres électrophorèses.

4.2 Étapes à réaliser en amont du TP

4.2.1 Préparation du tampon pour électrophorèse 1X

Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (gel + tampon migration).

Verser le contenu du flacon de tampon pour électrophorèse 4X dans 750 ml d'eau distillée, bien mélanger.

Le tampon doit IMPÉRATIVEMENT être placé au frais avant le TP.

** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TE 1 X à préparer doit être adapté.*

4.2.2 Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1 %

Verser 15 mL de tampon pour électrophorèse 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.

Peser 0,15g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon.

Mettre l'erlenmeyer contenant le tampon et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).

S'assurer que la solution est parfaitement translucide.

Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à grandes dents.

Préparez autant de gel que nécessaire sachant que vous pouvez déposer jusqu'à 8 échantillons par gel.

4.2.3 Préparation des échantillons protéiques

6 aliquots sont à préparer, chacun représentant une des conditions de l'analyse suivant la répartition suivante :

- **Tube 1** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction cytosolique d'un individu sain
- **Tube 2** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction du réticulum endoplasmique d'un individu sain
- **Tube 3** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction cytosolique d'un individu atteint de la mucoviscidose par la mutation $\Delta 508$
- **Tube 4** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction du réticulum endoplasmique d'un individu atteint de la mucoviscidose par la mutation $\Delta 508$
- **Tube 5** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction cytosolique d'un patient mystère
- **Tube 6** : extrait de la protéine CFTR issue de la fraction du réticulum endoplasmique d'un patient mystère

Commencez par préparer la solution mère de protéine CFTR (simulée) :

- Ajouter 1 ml de tampon dilué 1X dans le tube contenant l'extrait protéique
- Vortexer jusqu'à totale dissolution de l'extrait protéique

Préparez ensuite les 6 aliquots correspondants aux 6 conditions de l'analyse en respectant les volumes dans le tableau ci-dessous.

Tube	Échantillon	Volume de tampon de charge (déjà présent dans les tubes)	Volume de solution mère à ajouter
1	Fraction cytosolique d'un individu sain	100 μ l	20 μ l
2	Fraction réticulum endoplasmique d'un individu sain	100 μ l	20 μ l
3	Fraction cytosolique d'un individu muté $\Delta 508$	100 μ l	0 μ l
4	Fraction réticulum endoplasmique d'un individu muté $\Delta 508$	100 μ l	160 μ l
5	Fraction cytosolique du patient mystère	100 μ l	5 μ l
6	Fraction réticulum du patient mystère	100 μ l	80 μ l

4.3 Étape à réaliser lors du TP

4.3.1 Dépôts des échantillons dans les puits du gel

À l'aide d'une micropipette chaque élève va venir déposer 20 μ L de protéines par puit. Nous vous recommandons de déposer sur un gel l'ensemble des 6 conditions dans l'ordre indiqué ci-dessus. Ainsi, lors de la migration, les résultats seront plus faciles à interpréter.

4.3.2 Migration

La durée de migration varie en fonction des systèmes d'électrophorèse. Nous recommandons d'utiliser un système compact tout en un du type phorEasy (réf. 708150). Avec un système de ce type, la migration dure environ 20 minutes.

4.3.3 Révélation

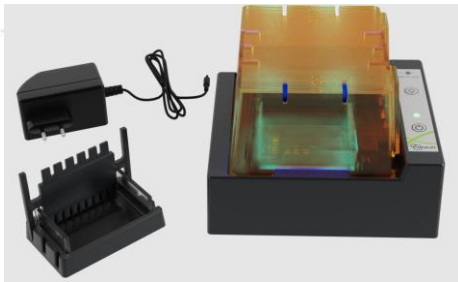
Lorsque la migration est terminée vous allez pouvoir passer à l'étape de la révélation. Pour cela, remplir une boîte de pétri du tampon de coloration. Faites glisser délicatement votre gel dans la boîte de pétri et assurez-vous que le gel est bien recouvert du tampon. Laissez le gel dans ce bain de coloration pendant 15 minutes.

4.3.4 Lecture

Replacer le gel dans la cuve d'électrophorèse, mettez le capot et allumer l'éclairage. Les bandes de migration apparaissent.

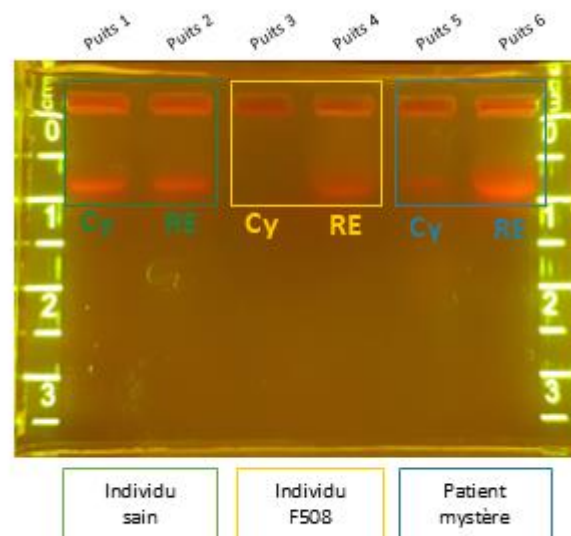
5 Résultats et exploitations

Les fragments sont visibles sous-forme de bandes dont l'épaisseur et la distance de migration sont en fonction de leur masse en Dalton (Da), proportionnelle à leur longueur et leur constitution en acides aminés.



phor**Easy**

Les résultats sont analysés en observant les bandes de protéines visibles après électrophorèse. Ces bandes reflètent la taille (masse moléculaire) et la présence ou non de la protéine CFTR dans les différentes fractions cellulaires. Une lecture séquentielle par puits permet d'interpréter la distribution de CFTR dans chaque cas.



- **Puits 1 - Fraction cytosolique d'un individu sain** : présence d'une bande nette, indiquant que la protéine CFTR est correctement adressée à sa zone d'activité.
- **Puits 2 - Fraction du réticulum endoplasmique (RE) d'un individu sain** : bande visible au même niveau que dans le cytosol. Cela montre que la protéine est bien synthétisée dans le RE, puis adressée vers le cytosol (et la membrane). Les intensités similaires entre les deux fractions sont compatibles avec une protéine fonctionnelle et bien maturée.
- **Puits 3 - Fraction cytosolique d'un individu muté $\Delta F508$** : aucune bande détectable. Cela signifie que la protéine n'a pas atteint sa localisation fonctionnelle, elle n'est pas adressée à la membrane plasmique.
- **Puits 4 - Fraction du réticulum endoplasmique (RE) d'un individu muté $\Delta F508$** : bande très intense, indiquant que la protéine est bien synthétisée, mais reste bloquée dans le RE. Ce blocage est typique de la mutation $\Delta F508$, qui entraîne un repliement anormal de CFTR. La cellule empêche alors son export, ce qui empêche la protéine de remplir son rôle.
- **Puits 5 - Fraction cytosolique du patient mystère** : bande présente, mais moins intense que chez le sujet sain. Cela suggère un adressage partiel ou une instabilité accrue de la protéine une fois sortie du RE.

- **Puits 6 – Fraction du réticulum endoplasmique (RE) du patient mystère** : bande visible, légèrement plus marquée que chez l'individu sain, mais moins intense que pour l'individu muté $\Delta F508$. Cela indique que la protéine est partiellement retenue dans le RE, ou que sa production est moins efficace.

Cette expérience illustre les conséquences cellulaires de différentes mutations du gène *CFTR*, à travers l'analyse de la taille et de la localisation intracellulaire de la protéine.

Chez un individu sain, la protéine CFTR est correctement synthétisée, maturée et acheminée vers sa zone fonctionnelle.

Chez l'individu porteur de la mutation $\Delta F508$, la protéine, bien que produite, présente une conformation anormale. Elle reste alors bloquée dans le réticulum endoplasmique et ne peut exercer sa fonction.

Chez le « patient mystère », porteur d'une mutation à identifier, la CFTR semble partiellement fonctionnelle : elle est synthétisée et atteint partiellement le cytosol, mais en quantité limitée. Cette observation suggère une instabilité de la protéine, une dégradation prématurée ou un défaut de production. Un phénotype alternatif pourrait d'ailleurs être mis en évidence lors du test de Guthrie.

Ainsi, cette approche permet d'observer directement, tant sur le plan visuel que fonctionnel, l'impact de mutations génétiques sur une protéine clé. Elle offre une compréhension concrète des mécanismes à l'origine de maladies génétiques telles que la mucoviscidose, et illustre l'intérêt de l'électrophorèse comme outil essentiel du diagnostic biologique.

6 Bibliographie

Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*. 1994 Oct 14;269(41):25710-8. PMID: 7523390.

Thibodeau PH, Richardson JM 3rd, Wang W, Millen L, Watson J, Mendoza JL, Du K, Fischman S, Senderowitz H, Lukacs GL, Kirk K, Thomas PJ. The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem*. 2010 Nov 12;285(46):35825-35. doi: 10.1074/jbc.M110.131623. Epub 2010 Jul 28. PMID: 20667826; PMCID: PMC2975206.

Wang W, Okeyo GO, Tao B, Hong JS, Kirk KL. Thermally unstable gating of the most common cystic fibrosis mutant channel ($\Delta F508$): "rescue" by suppressor mutations in nucleotide binding domain 1 and by constitutive mutations in the cytosolic loops. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9;286(49):41937-41948. doi: 10.1074/jbc.M111.296061. Epub 2011 Sep 30. PMID: 21965669; PMCID: PMC3234985.

Xiong X, Bragin A, Widdicombe JH, Cohn J, Skach WR. Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):1079-88. doi: 10.1172/JCI119618. PMID: 9276724; PMCID: PMC508282.

Seibert FS, Jia Y, Mathews CJ, Hanrahan JW, Riordan JR, Loo TW, Clarke DM. Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel. *Biochemistry*. 1997 Sep 30;36(39):11966-74. doi: 10.1021/bi9712652. PMID: 9305991.

Smit LS, Strong TV, Wilkinson DJ, Macek M Jr, Mansoura MK, Wood DL, Cole JL, Cutting GR, Cohn JA, Dawson DC, et al. Missense mutation (G480C) in the CFTR gene associated with protein mislocalization but normal chloride channel activity. Hum Mol Genet. 1995 Feb;4(2):269-73. doi: 10.1093/hmg/4.2.269. PMID: 7757078.

7 Assistance Technique

Pour tous renseignements, contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** prix d'un appel local, non surtaxé*