

Chapitre 7

Méthodes d'analyse et de séparation des peptides et protéines

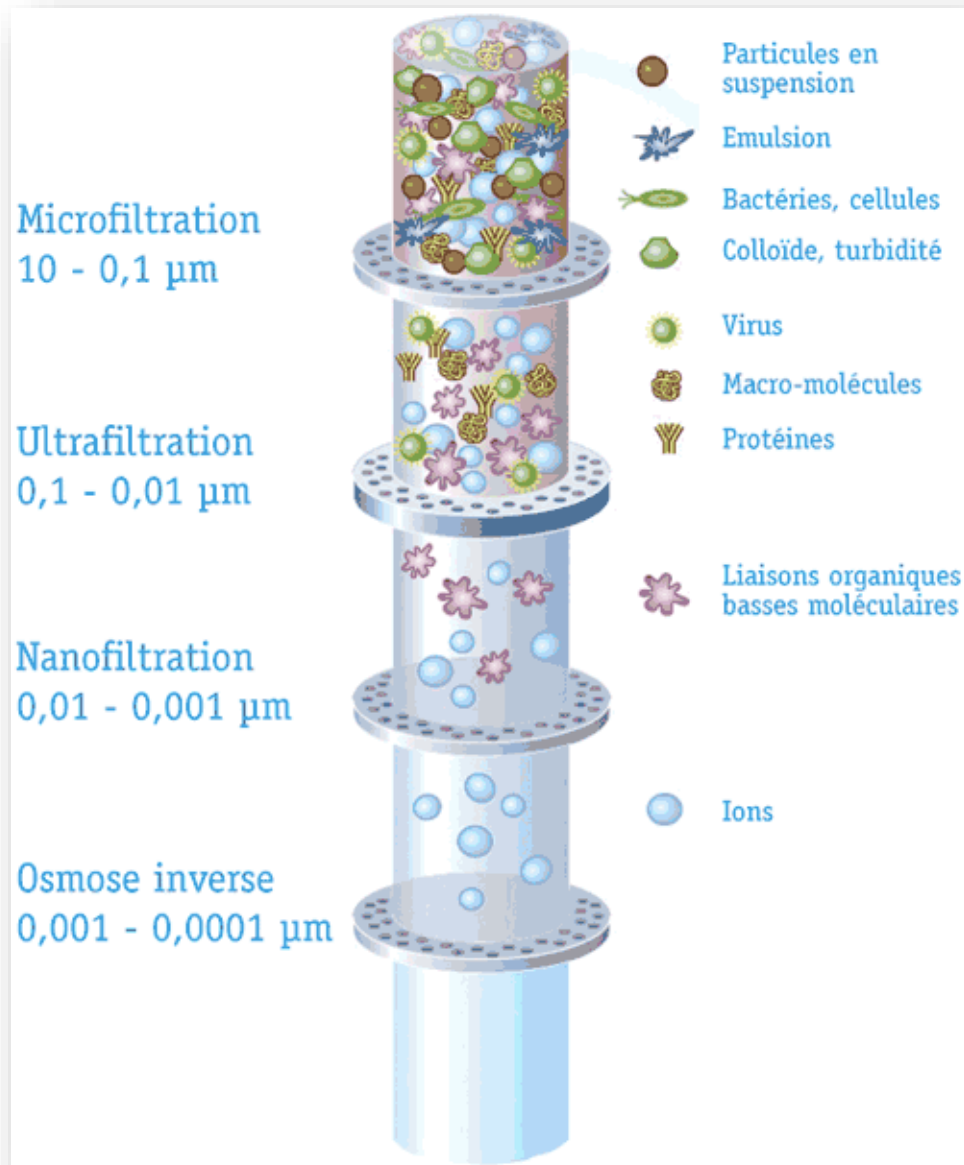
Pr. Michel SEVE

Méthodes d'analyse et de séparation des peptides et des protéines

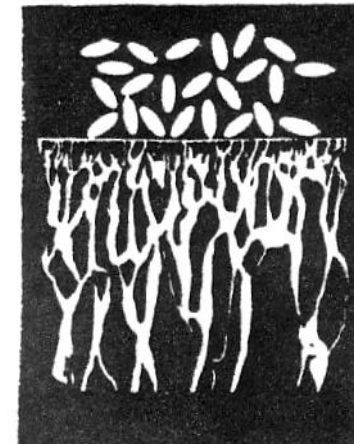
Plan du cours

- 1. Ultrafiltration
- 2. Chromatographies
 - 2.1. Exclusion en gel
 - 2.2. Echange d'ion
 - 2.3. Affinité
- 3. Electrophorèses
- 4. Analyse protéomique
- 5. Détermination structurale

1. Ultrafiltration



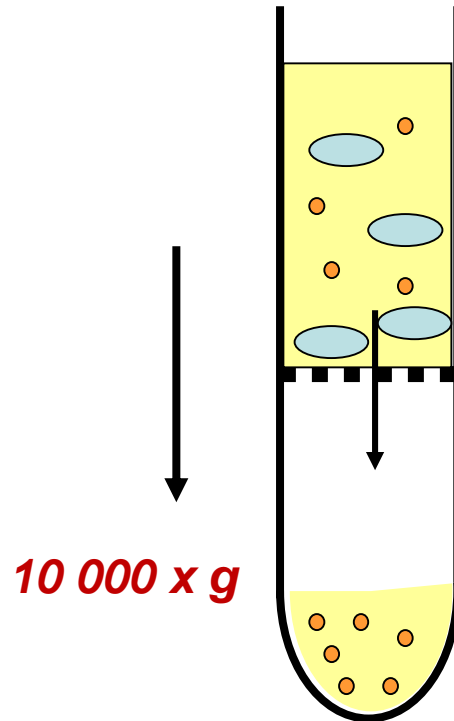
Membrane de type "en profondeur"



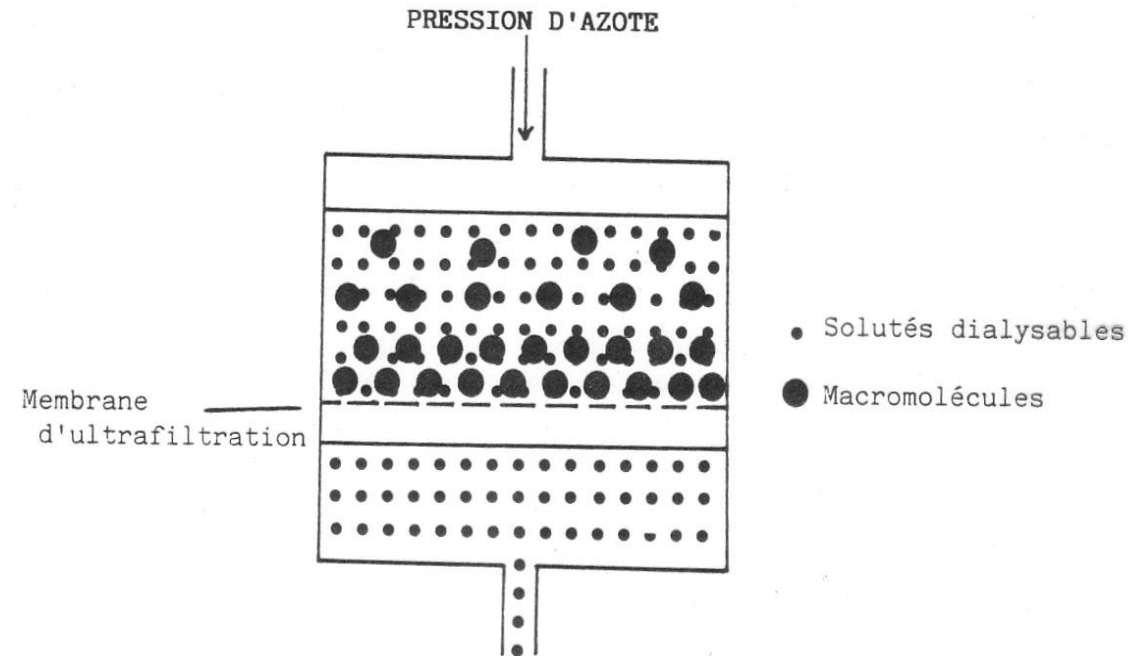
Membrane de type "écran"

Méthodes d'ultrafiltration

Centrifugation

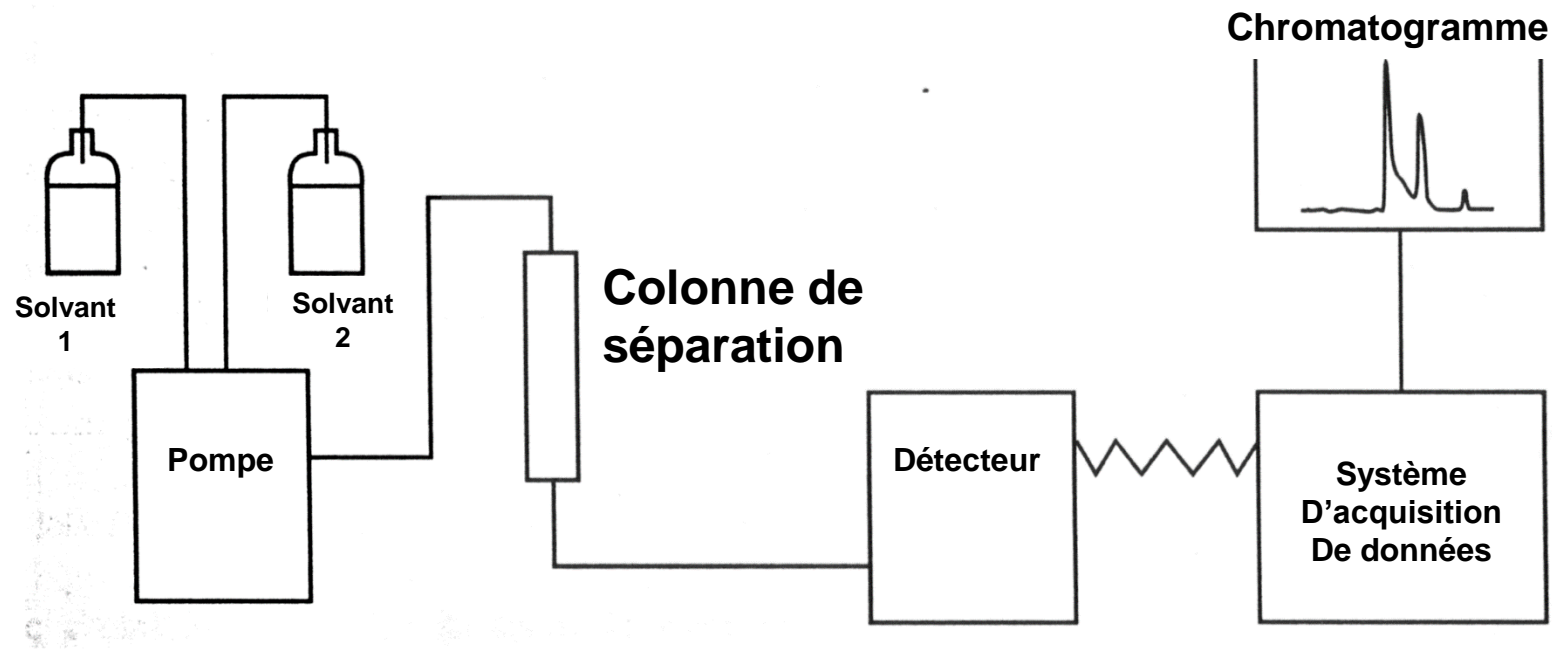


Sous pression

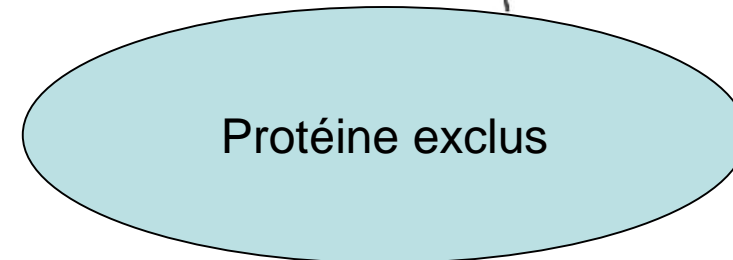
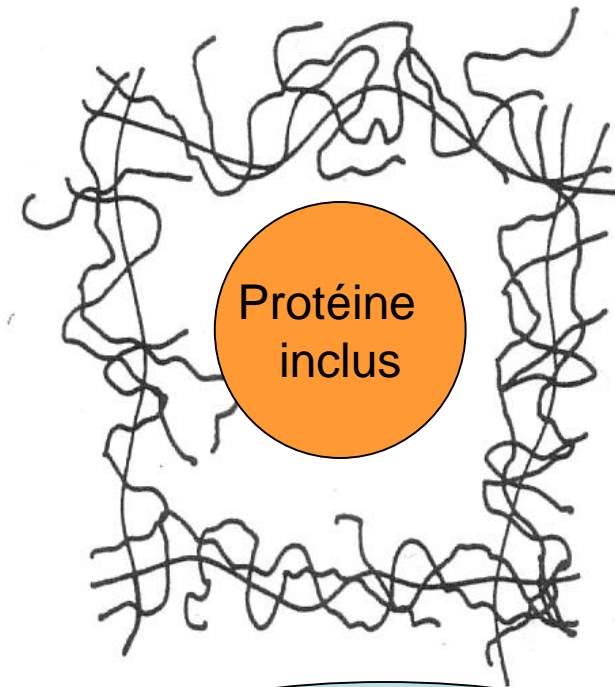
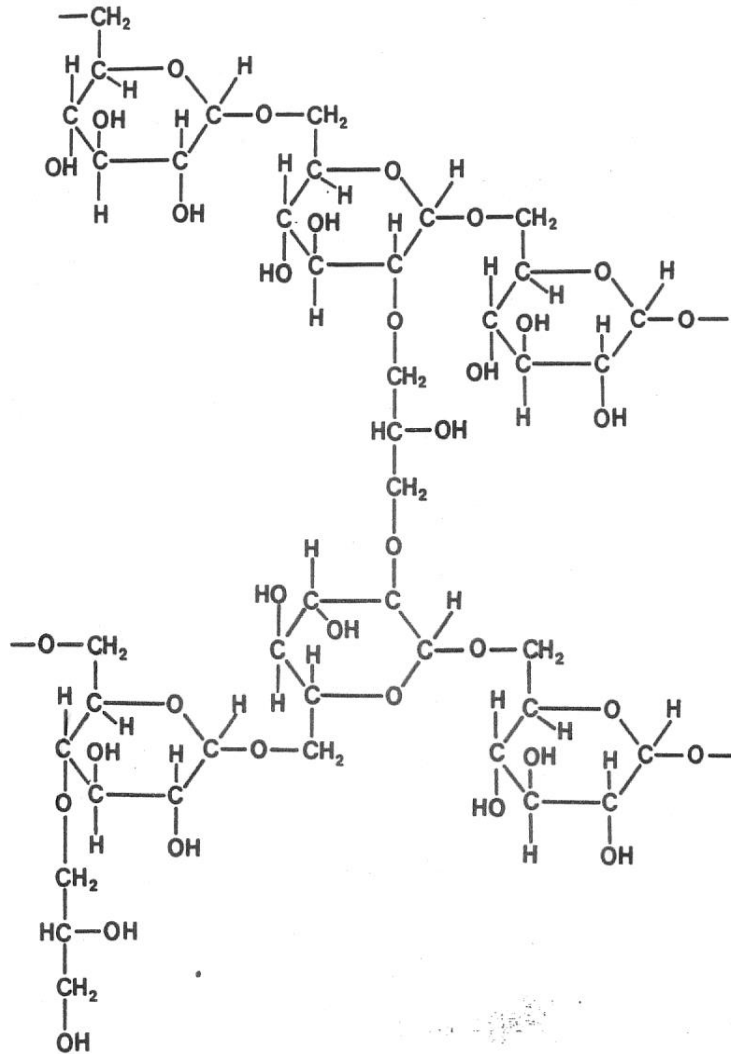


2. Les chromatographies

- 2.1. Chromatographie sur gel
- 2.2. Chromatographie d'échange d'ions
- 2.3. Chromatographie d'affinité



2.1. Chromatographie d'exclusion sur gel



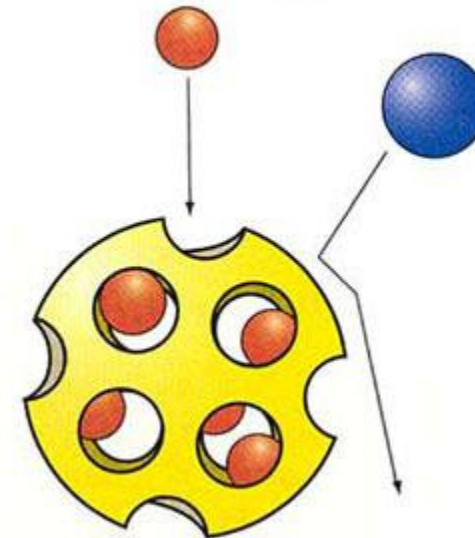
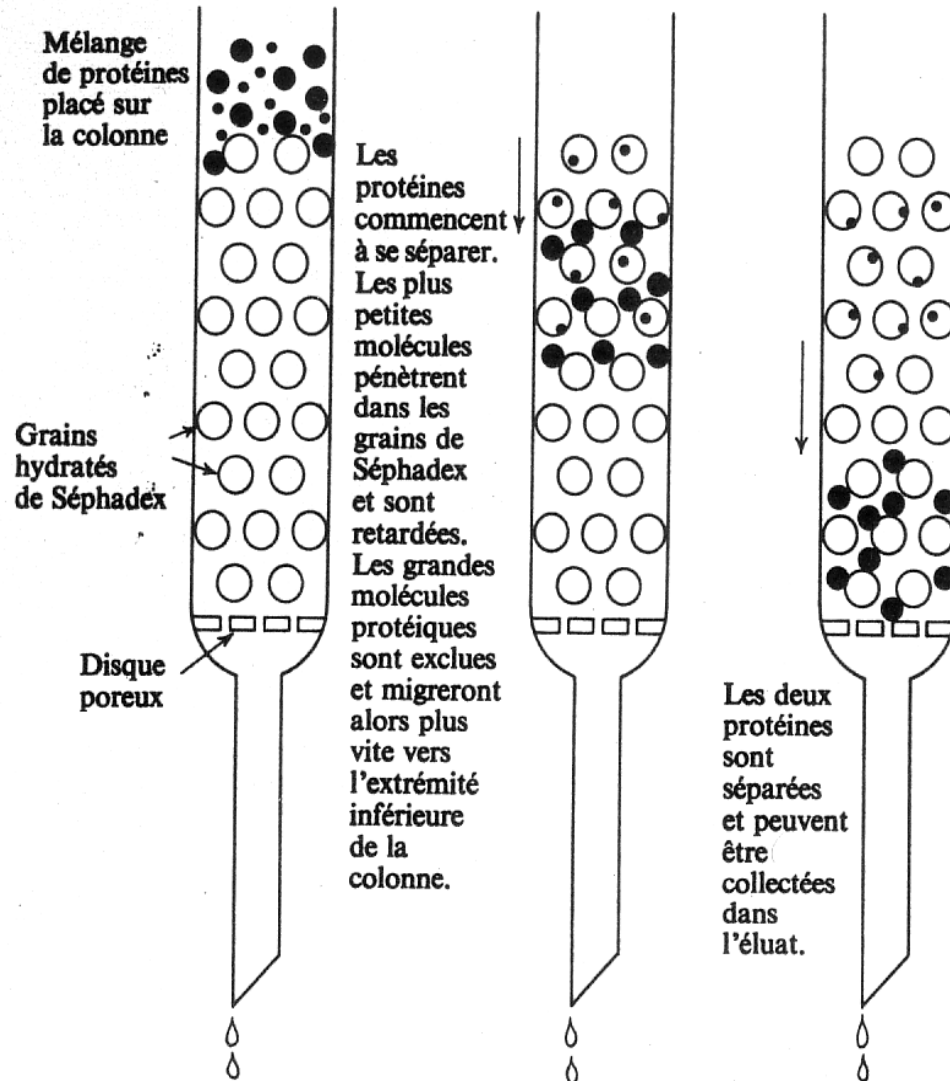
Les différents supports sur gel

	Zone de fractionnement
P2	100-1800
P4	800-4000
P10	1000-6000
P30	1500-20000
P60	2500-40000
P100	5000-100 000
P150	15000-150 000
P200	30000-200 000
P300	60000-400 000
A 1.5M	10000-1500 000
A 5M	10000-5000 000
A 150M	1000000-150 000 000

Séphadex
Bio-gel
Sépharose
Ultrogel
Bioglass
Bio-Beads

(Ces valeurs ne sont pas à apprendre par cœur)

Principe de la chromatographie d'exclusion sur gel



2.2. Chromatographie d'échange d'ions

Les résines: sépharose, séphacryl
celluloses substituées

Les groupements:

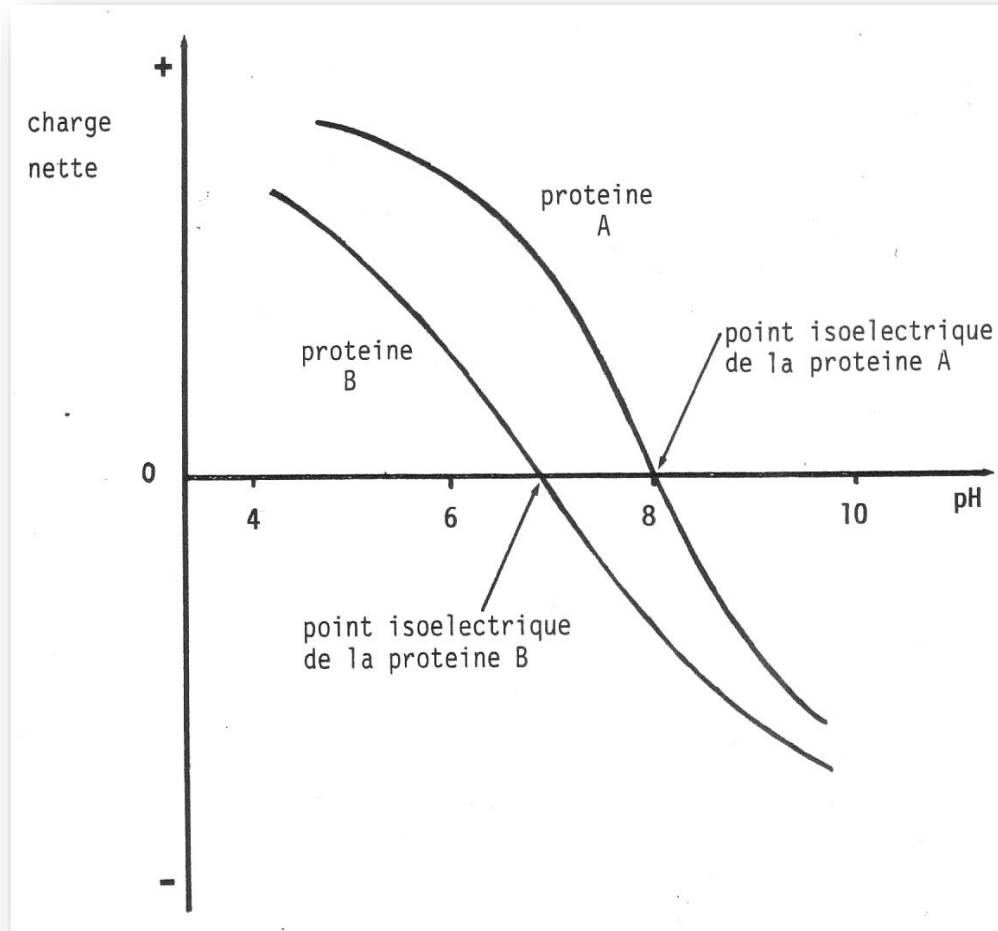
chargés négativement (échange de cation)

- sulfoniques
- carboxyliques
- phosphates
- sulfoéthyl

chargés positivement (échange d'anions)

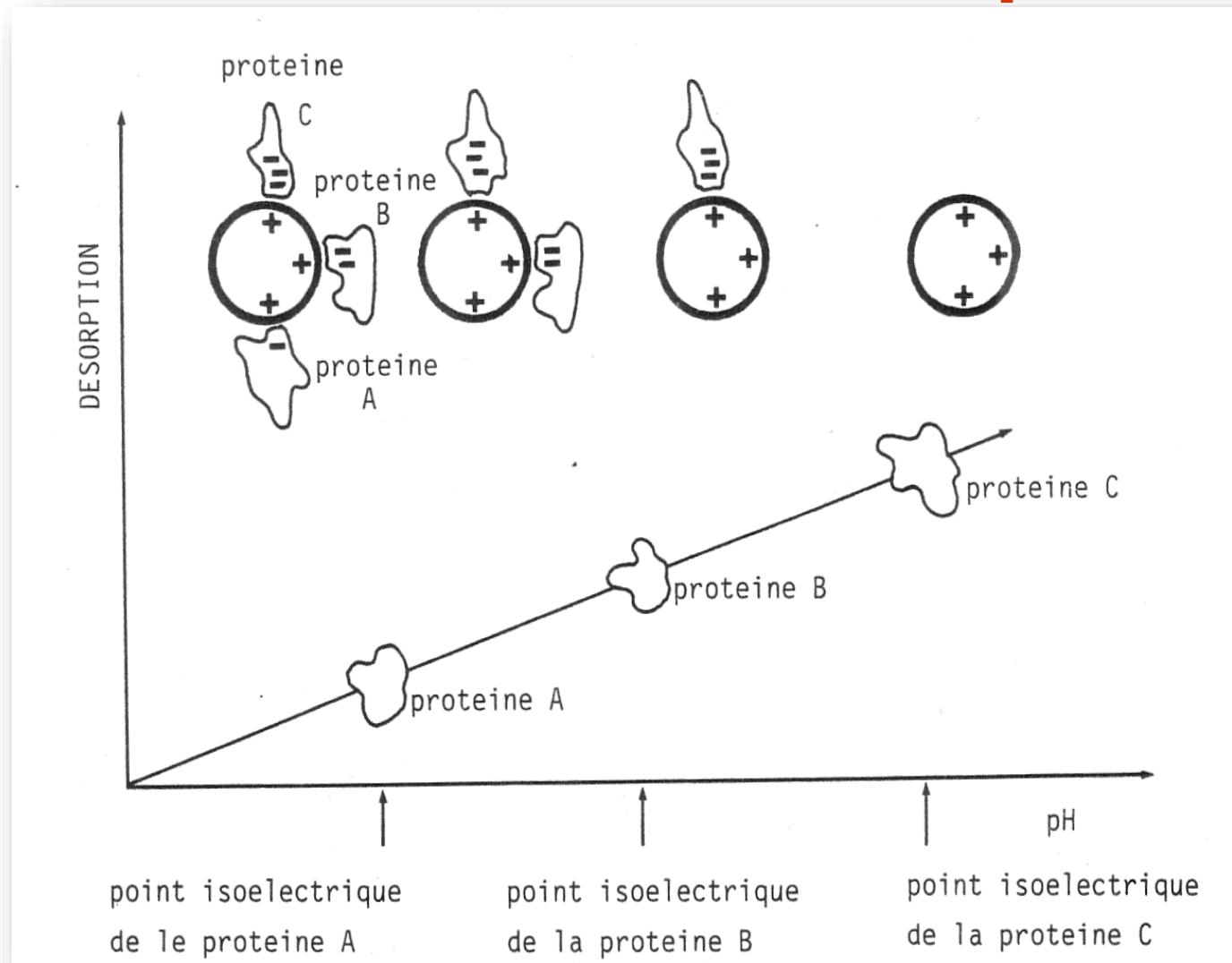
- diéthylaminoéthyl (DEAE)
- aminoéthyl
- triméthylamine

Charge des protéines

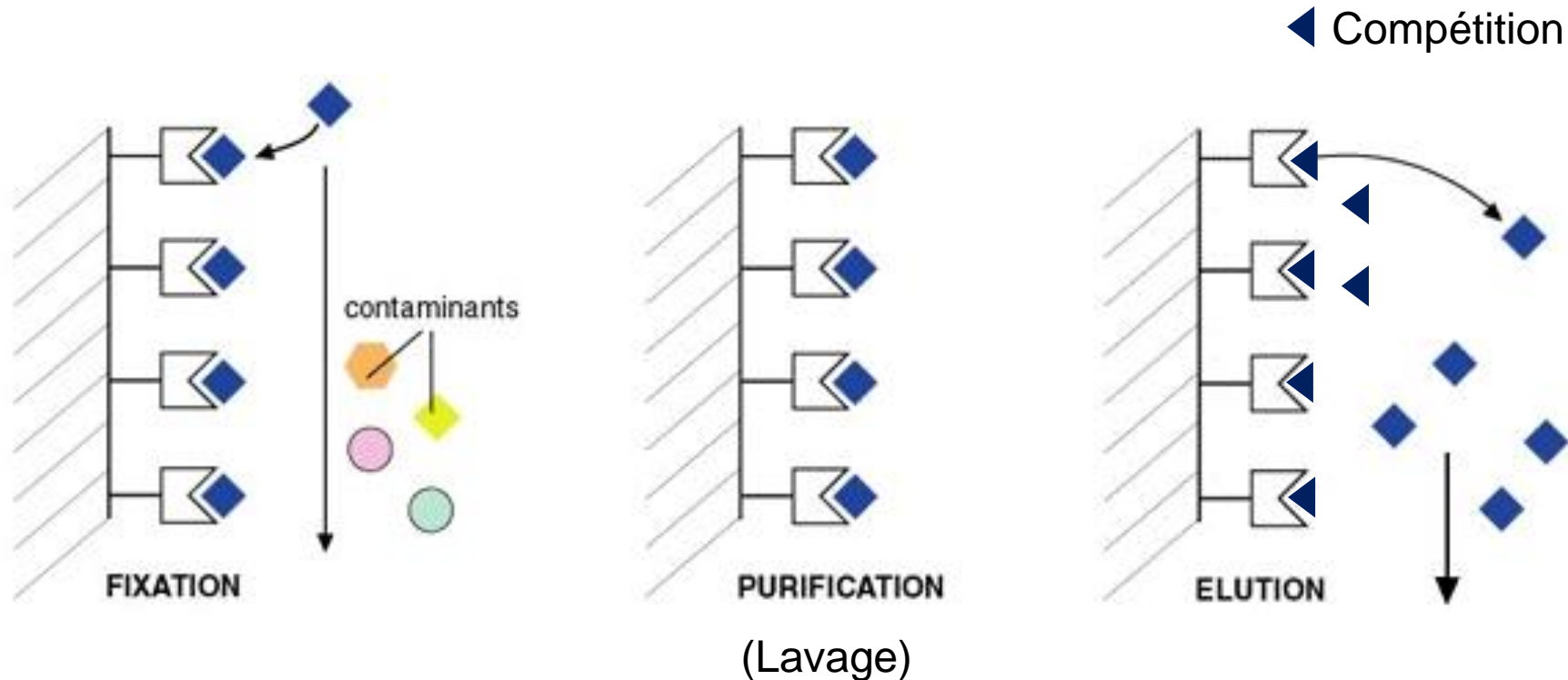


- Les protéines ont des charges variables en fonction du pH
- Chaque protéine en fonction de sa séquence primaire présente une courbe particulière
- Chaque protéine a un point isoélectrique défini

Désorption sélective des protéines en fonction du pH



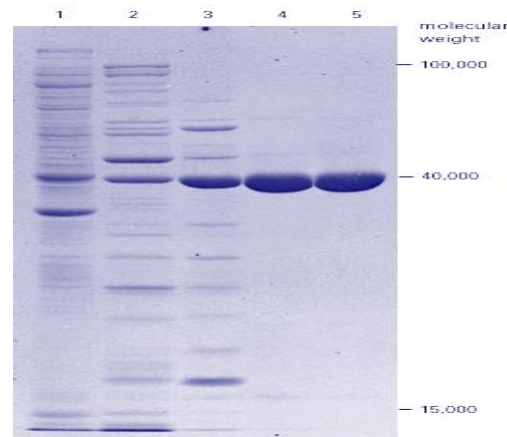
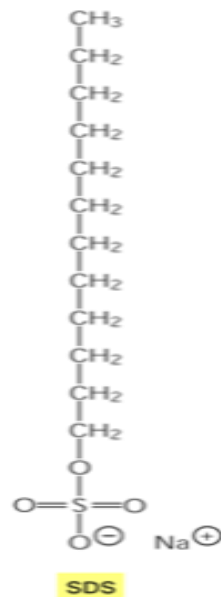
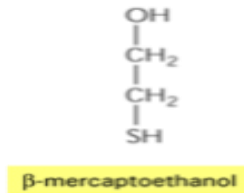
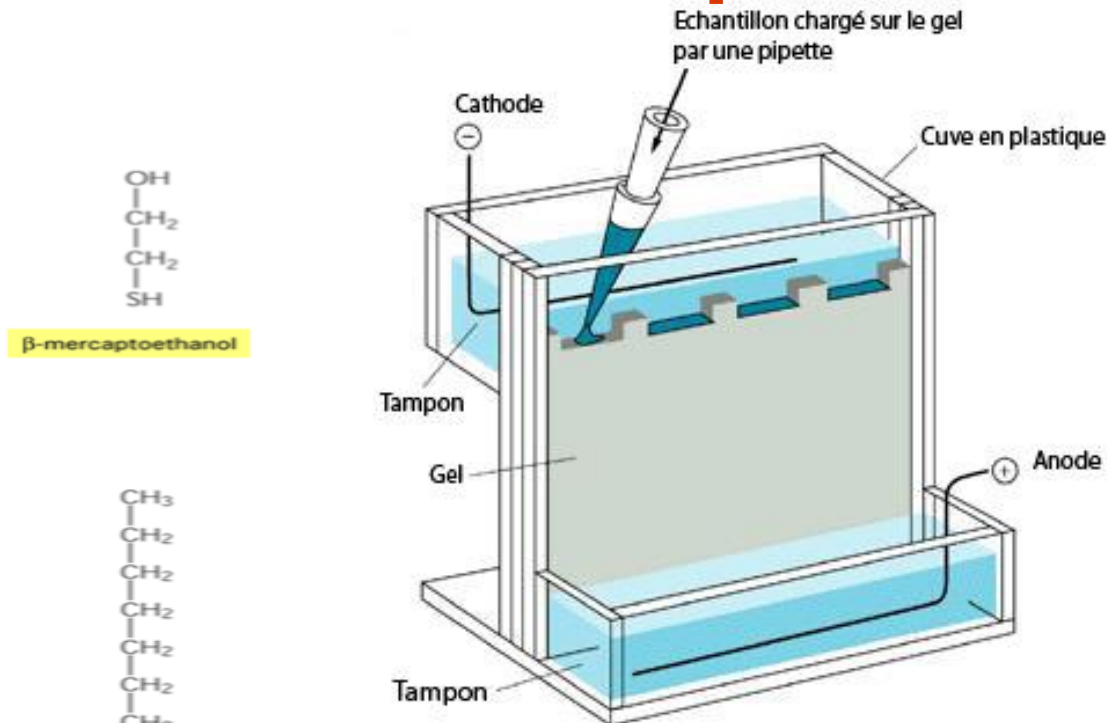
2.3. Chromatographie d'affinité



Substrat
Antigène
Metal
Sucre
Hormone

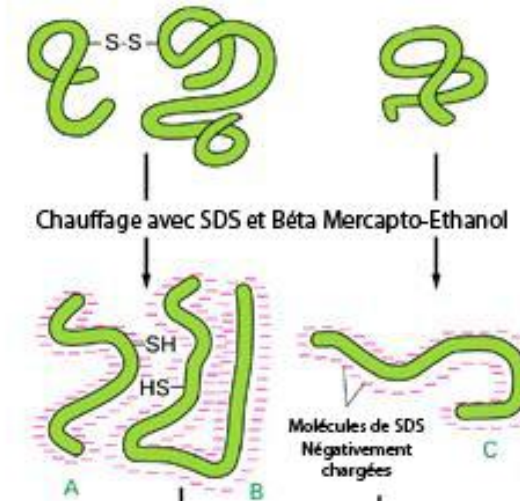
Enzyme
Anticorps
Metalloprotéine
Lectine
Récepteur

3. Electrophorèse SDS-PAGE

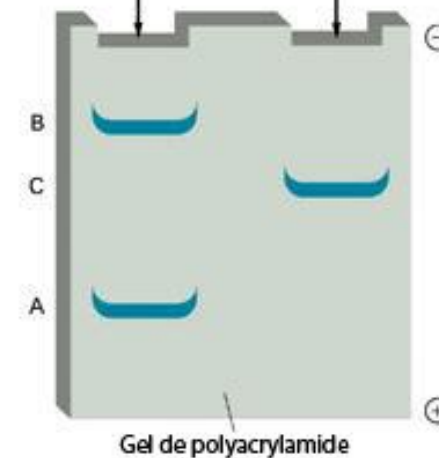


Protéine avec 2 sous-unités, A et B, liées par un pont disulfure

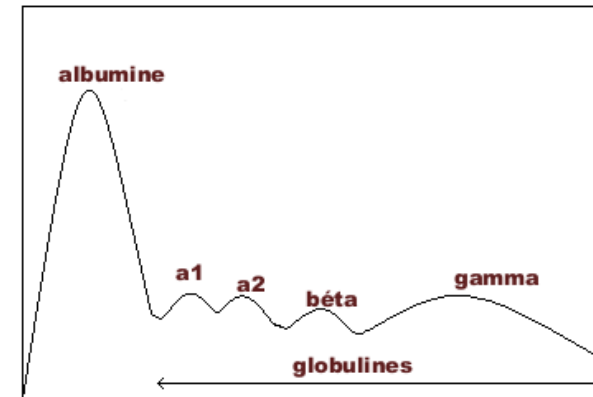
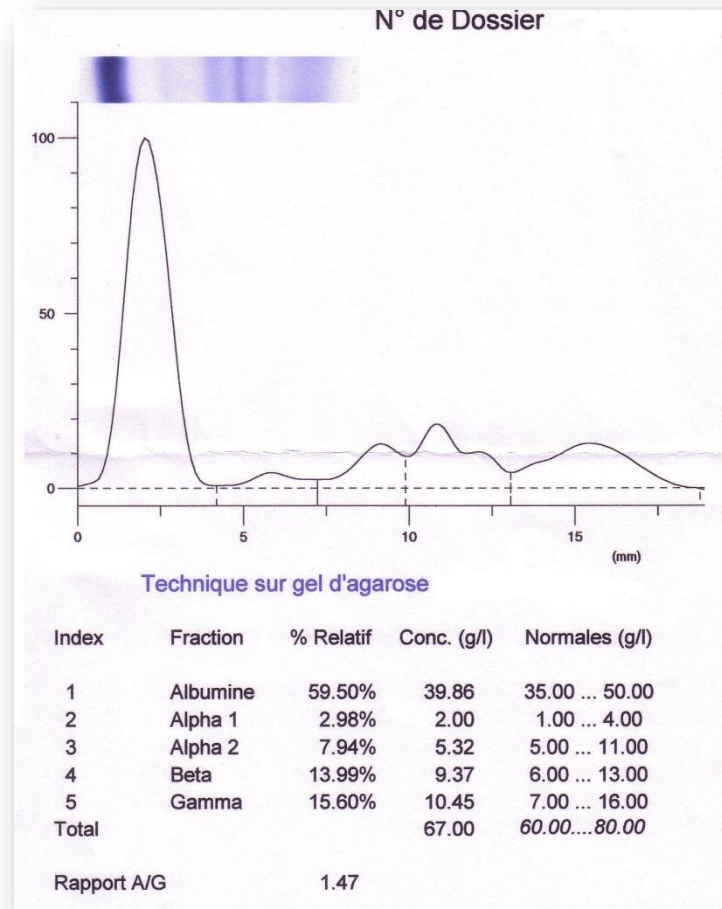
Protéine formée d'une seule sous-unité



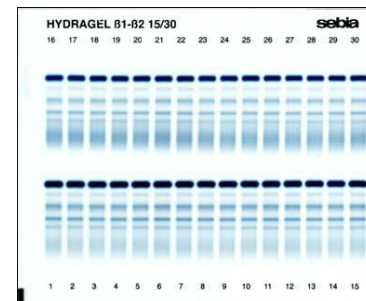
Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide



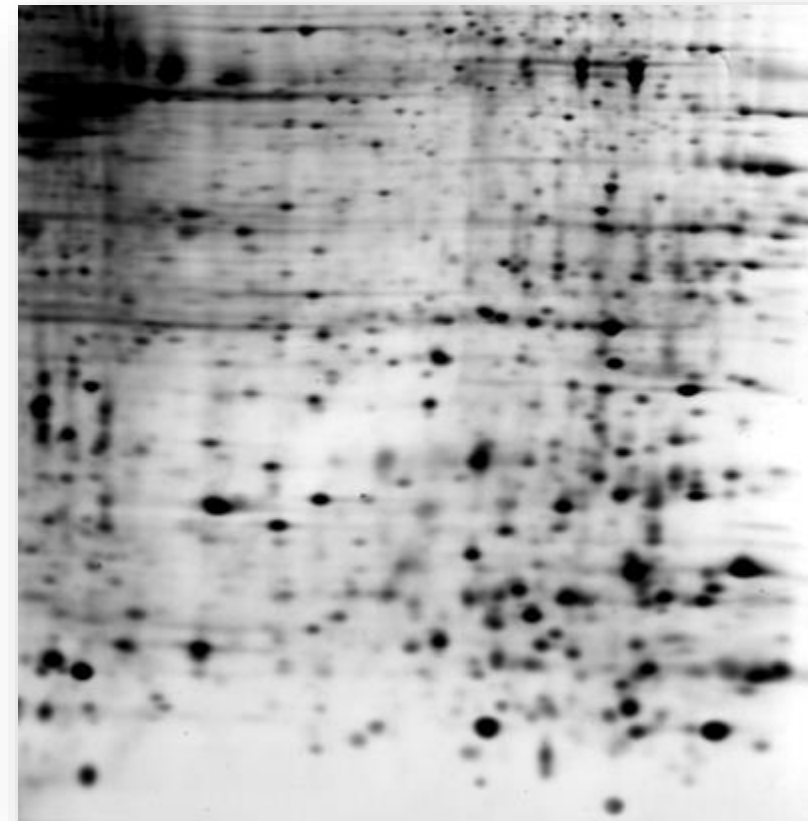
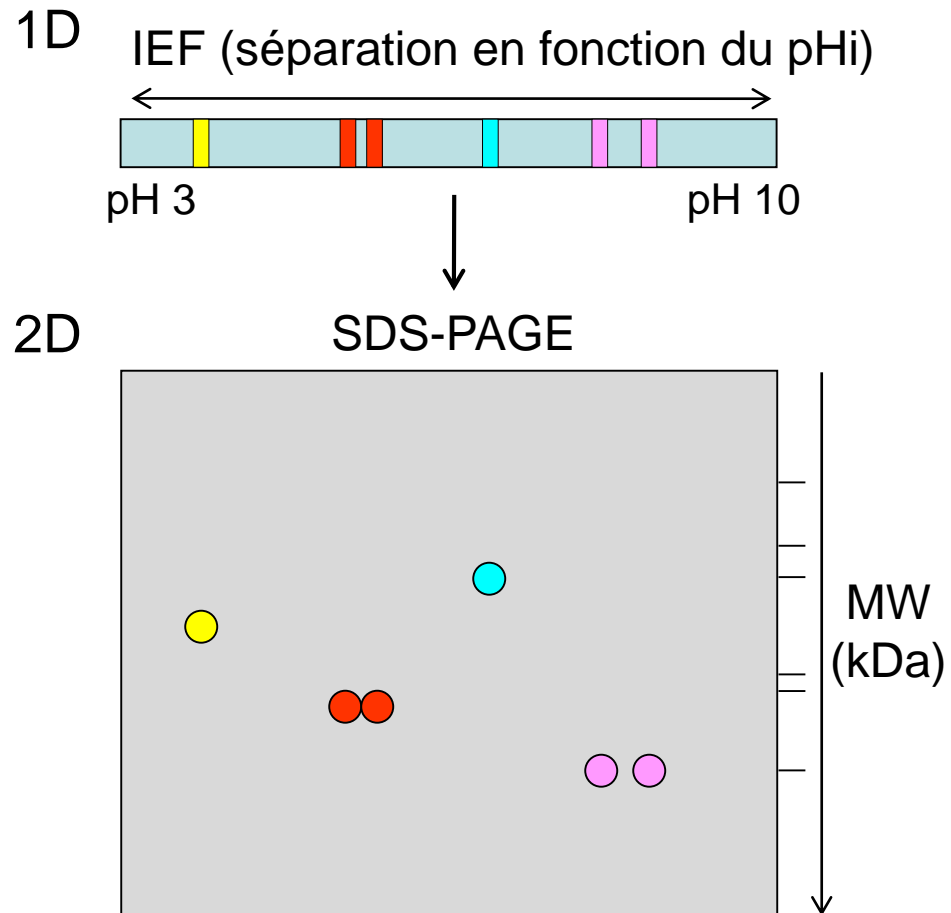
Electrophorèse non dénaturante: Analyse des protéines plasmatiques



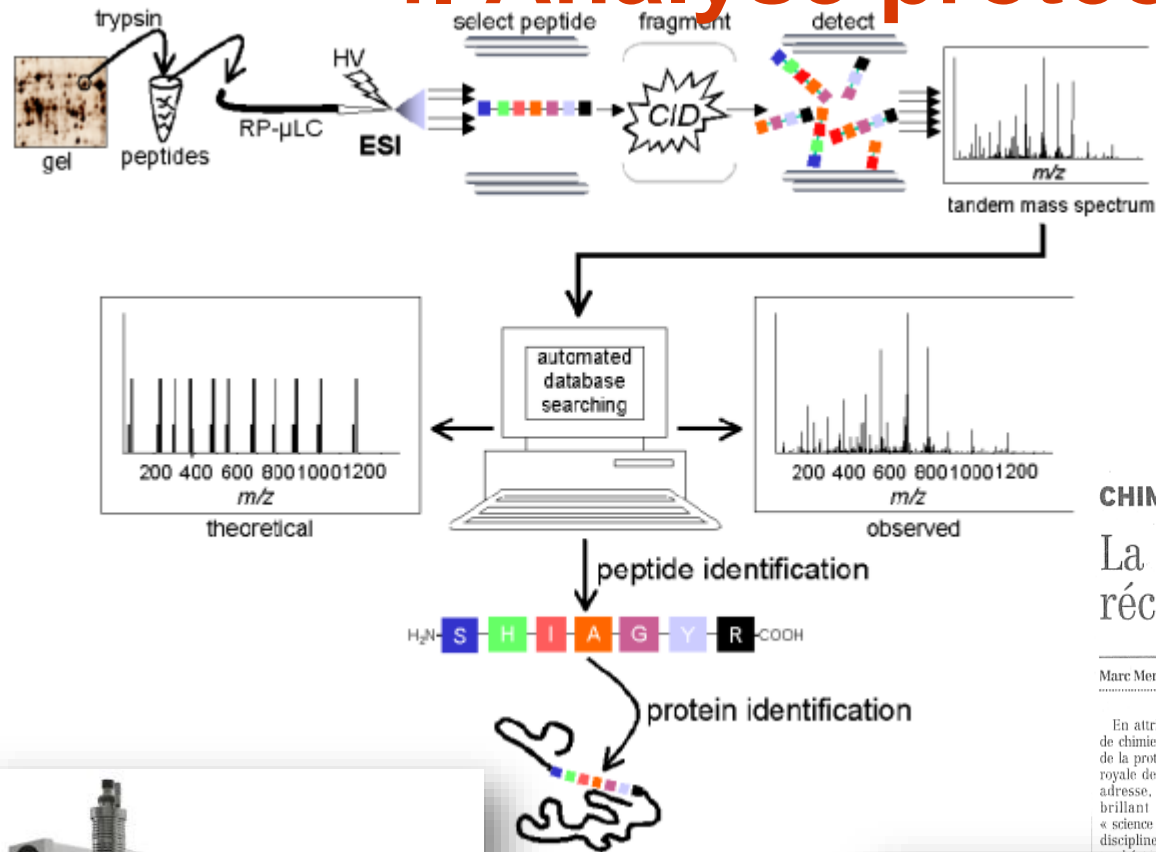
Profil électrophorétique classique
Des protéines plasmatiques



Electrophorèse 2D



4. Analyse protéomique



CHIMIE Trois lauréats se partagent le prix Nobel de chimie 2002

La science des protéines récompensée par le Nobel

Marc Mennessier

En attribuant le prix Nobel de chimie 2002 à trois soldats de la protéomique, l'Académie royale des sciences de Suède adresse, du même coup, un brillant satisfecit à cette « science des protéines », une discipline émergente aux re-



L'Américain Fenn, le Japonais Tanaka et le Suisse Wüthrich, trois soldats de la protéomique. (Photo AFP.)

En attribuant le prix Nobel de chimie 2002 à trois soldats de la protéomique, l'Académie royale des sciences de Suède adresse, du même coup, un brillant satisfecit à cette « science des protéines », une discipline émergente aux re-

connaître dans des délais très brefs la nature – saine ou pathologique – de protéines prélevées sur des patients et, par conséquent, de dépister certains cancers à un stade précoce.

Sur un plan plus fondamental, les méthodes qu'ils ont mis au point aident les biologistes à mieux comprendre le fonctionnement des cellules mais aussi leurs dérèglements et les moyens d'y remédier par la mise au point de nouveaux médicaments.

pour avoir su adapter la spectrométrie de masse à l'étude des macromolécules biologiques. Cette méthode, couramment utilisée, se limitait jusqu'alors aux molécules de petite taille.

En 1988, l'Américain et le Japonais ont trouvé, chacun de leur côté, le moyen de faire sauter ce verrou : l'un en recourant à l'« ionisation électrospray » l'autre en faisant appel à la « désorption laser douce ».

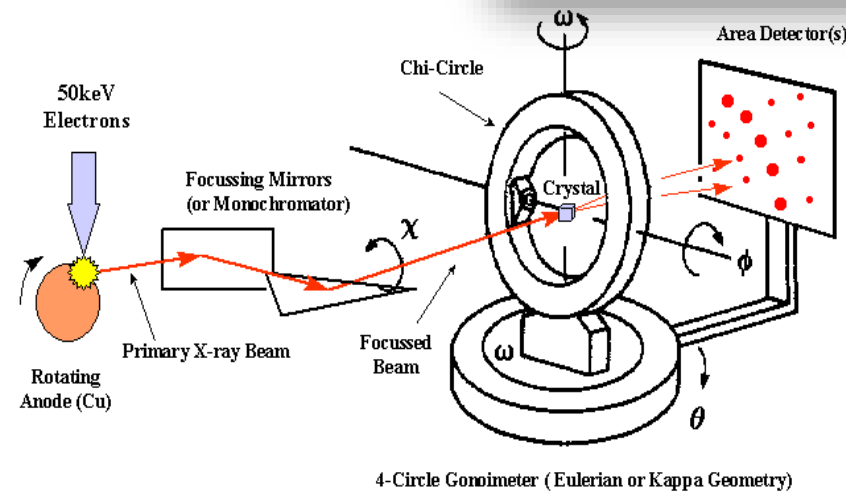
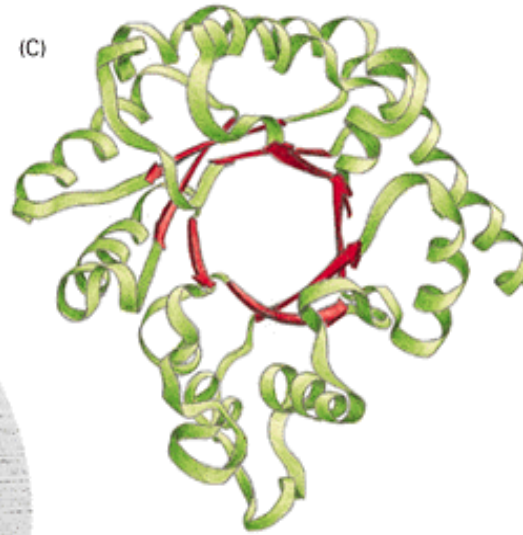
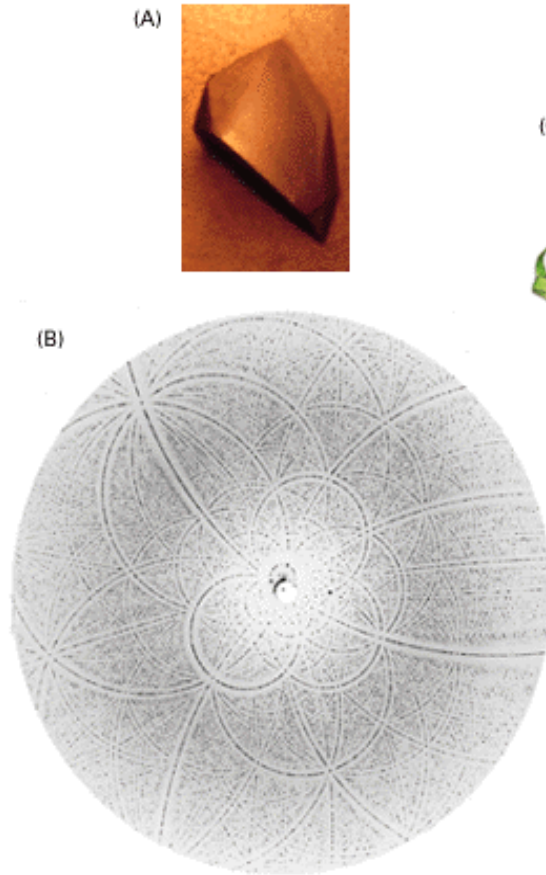
Avec Hideki Shirakawa en 2000, Ryoji Noyori en 2001 et Koichi Tanaka aujourd'hui, c'est la troisième fois consécutive qu'un Japonais reçoit le prix Nobel de chimie. Si l'on ajoute la physique, attribuée

continue à ce décryptage en développant, selon les termes

Le professeur John Fenn, 85 ans, de la Virginia Com-

Quelques années plus tôt, Kurt Wüthrich, 64 ans, profes-

5. Etude de la structure cristallisée par diffraction de rayons X



Éléments majeurs à retenir...

- Savoir définir les principales techniques d'analyse des protéines
 - *Ultrafiltration, chromatographies, électrophorèses*
- Comprendre et savoir expliquer les principes physico-chimiques des différentes techniques
- Connaitre la définition de méthodes d'analyse plus complexe des protéines
 - *Protéomique, Analyse structurale*



Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'Université Grenoble Alpes (UGA).

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Grenoble Alpes (UGA), et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.