

*UE1 : Biomolécules (1) : Acides aminés et protéines*

## Chapitre 7

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

Professeur Michel SEVE

Année universitaire 2011/2012

Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés.

# Méthodes de séparation et d'analyse des protéines

- Ultrafiltration
- Chromatographie
  - Exclusion en gel
  - Echange d'ion
  - Affinité
- Electrophorèse
- Protéomique
- Cristallographie

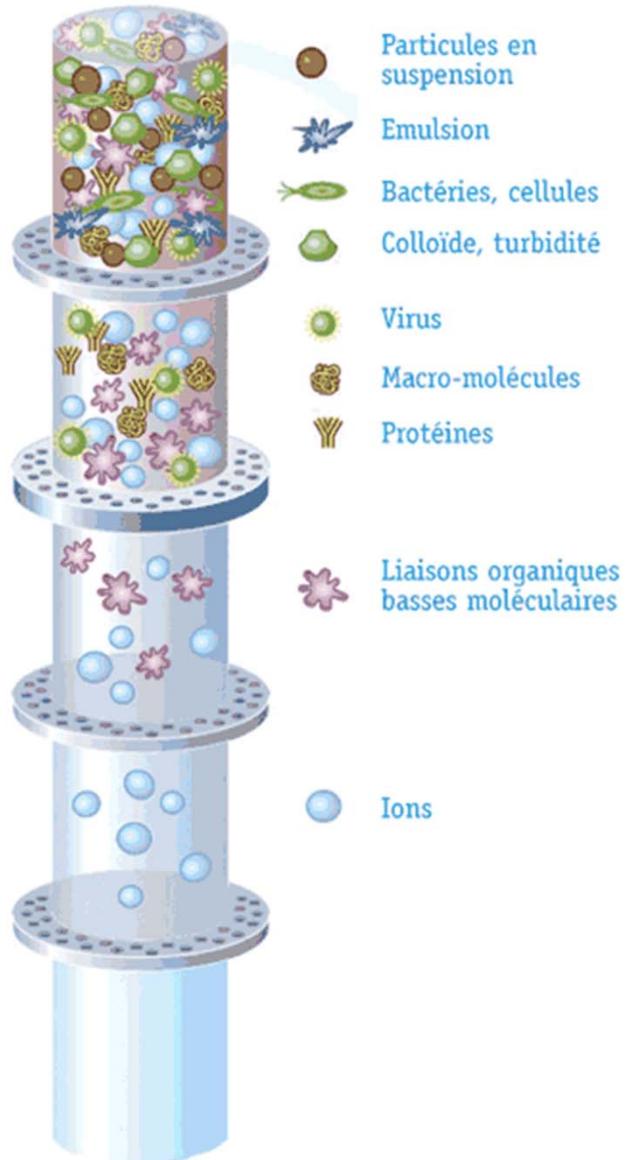
# Ultrafiltration

Microfiltration  
10 - 0,1  $\mu\text{m}$

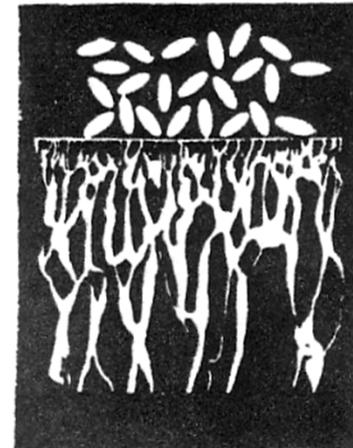
Ultrafiltration  
0,1 - 0,01  $\mu\text{m}$

Nanofiltration  
0,01 - 0,001  $\mu\text{m}$

Osmose inverse  
0,001 - 0,0001  $\mu\text{m}$



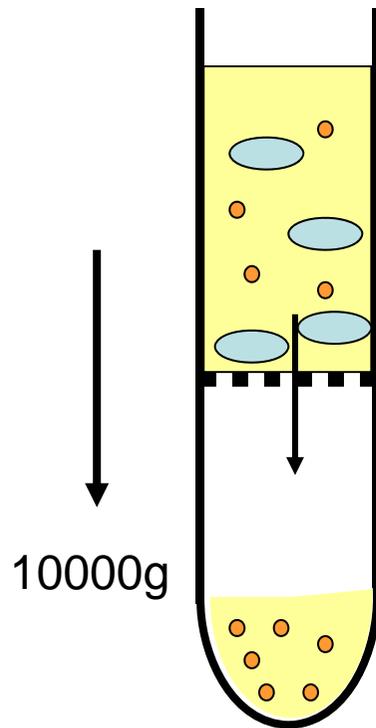
Membrane de type "en profondeur"



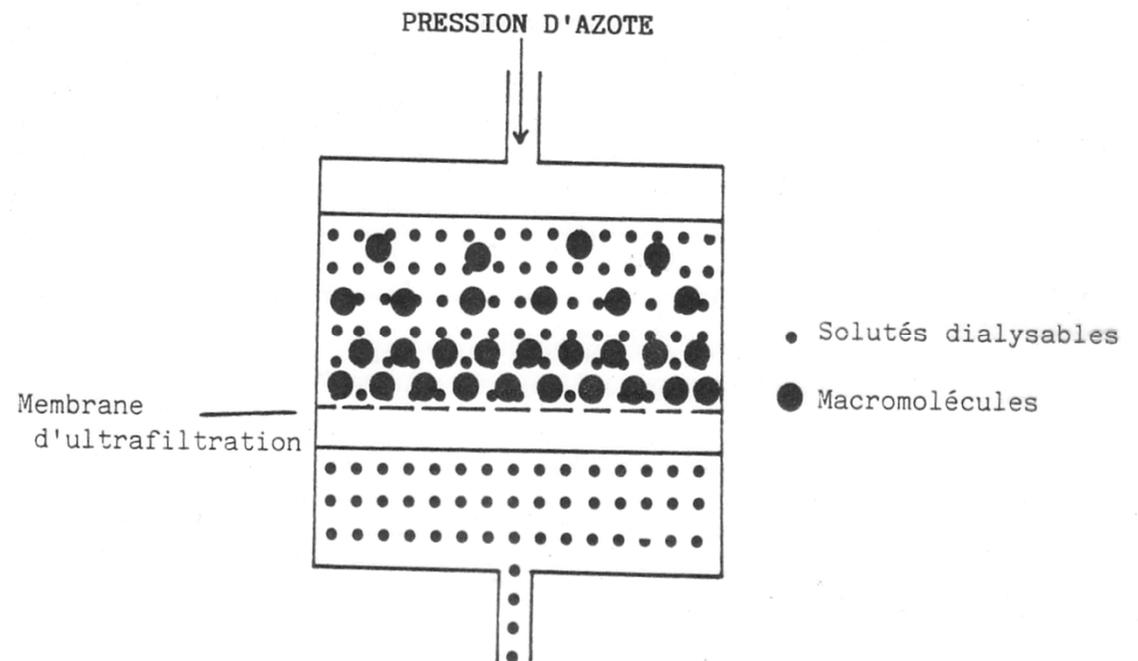
Membrane de type "écran"

# Méthodes d'ultrafiltration

**centrifugation**



**Sous pression**

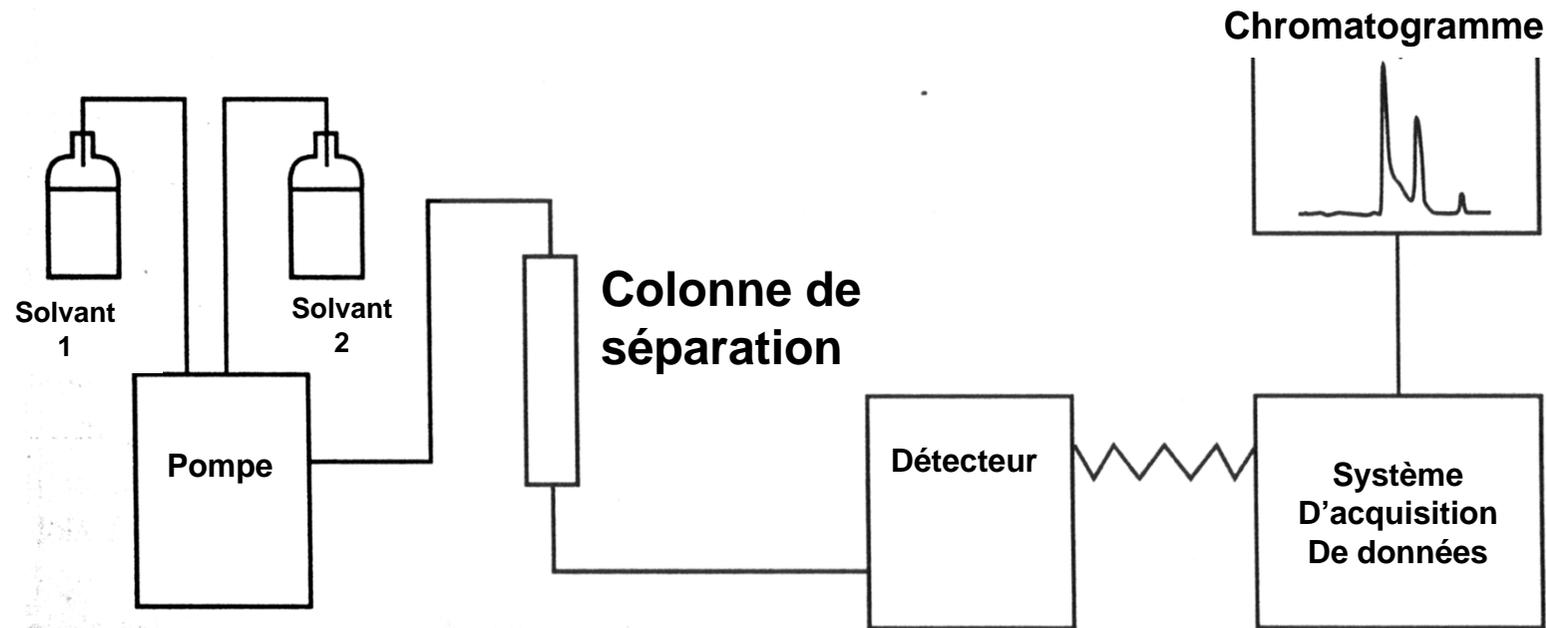


# CHROMATOGRAPHIES

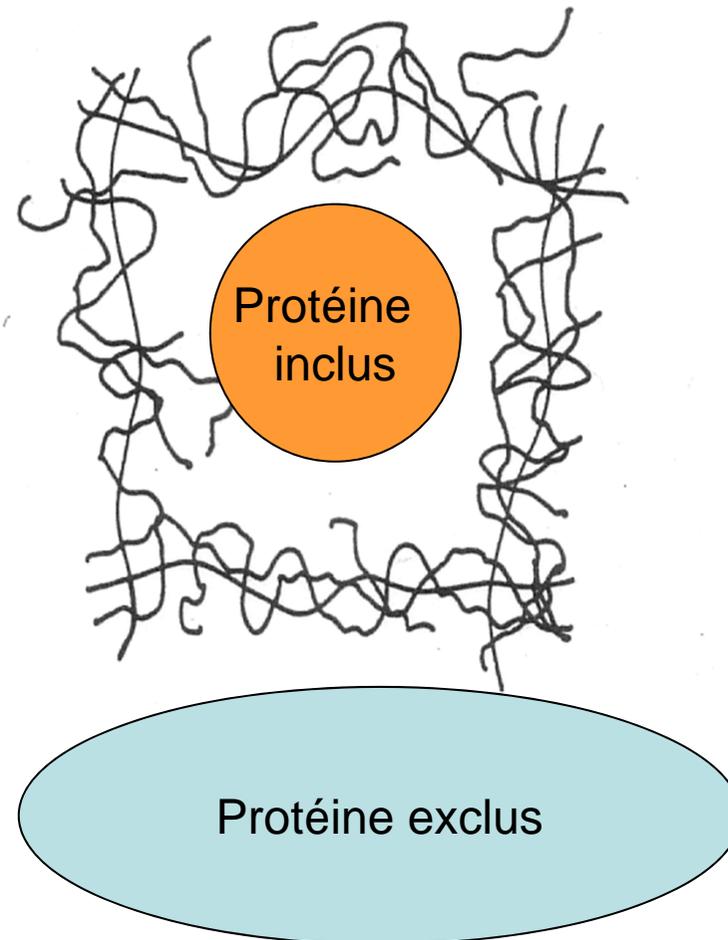
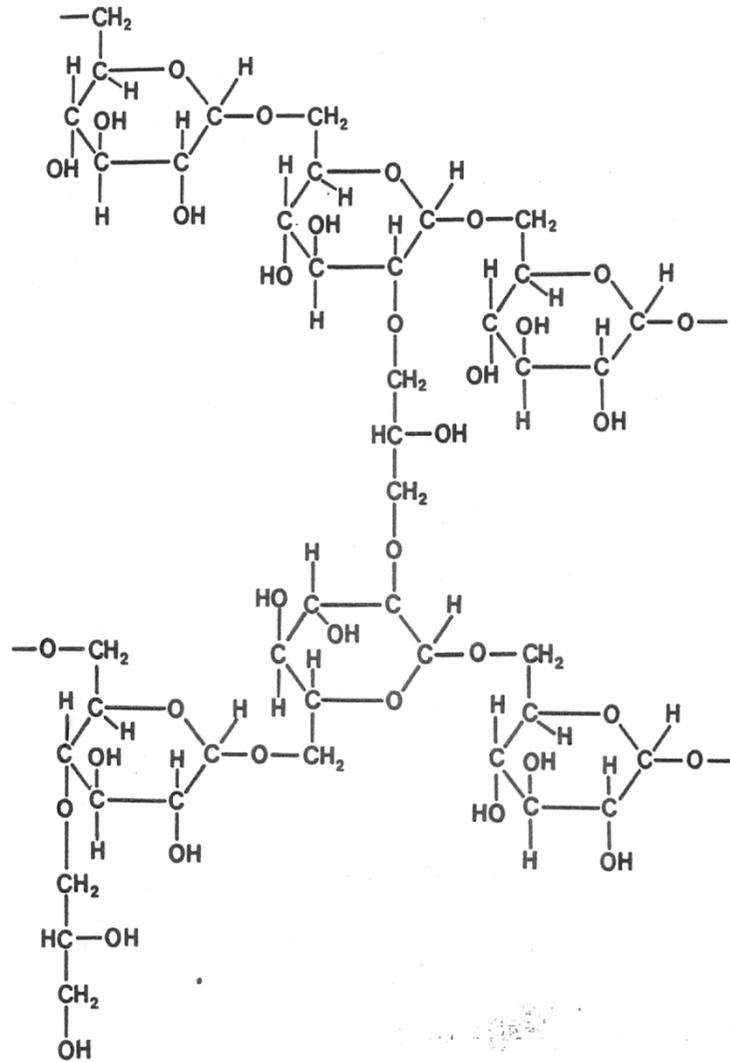
Chromatographie sur gel

Chromatographie d'échange d'ions

Chromatographie d'affinité



# Chromatographie d'exclusion sur gel

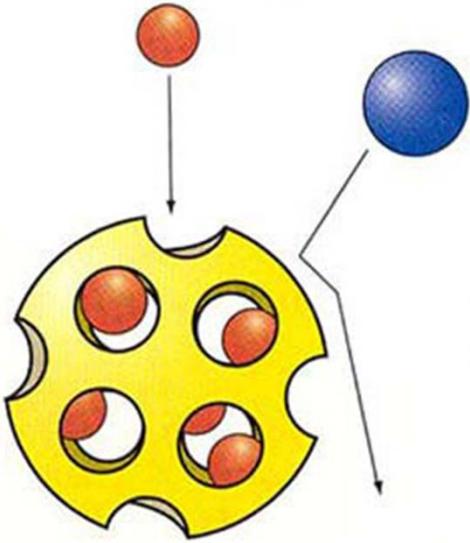
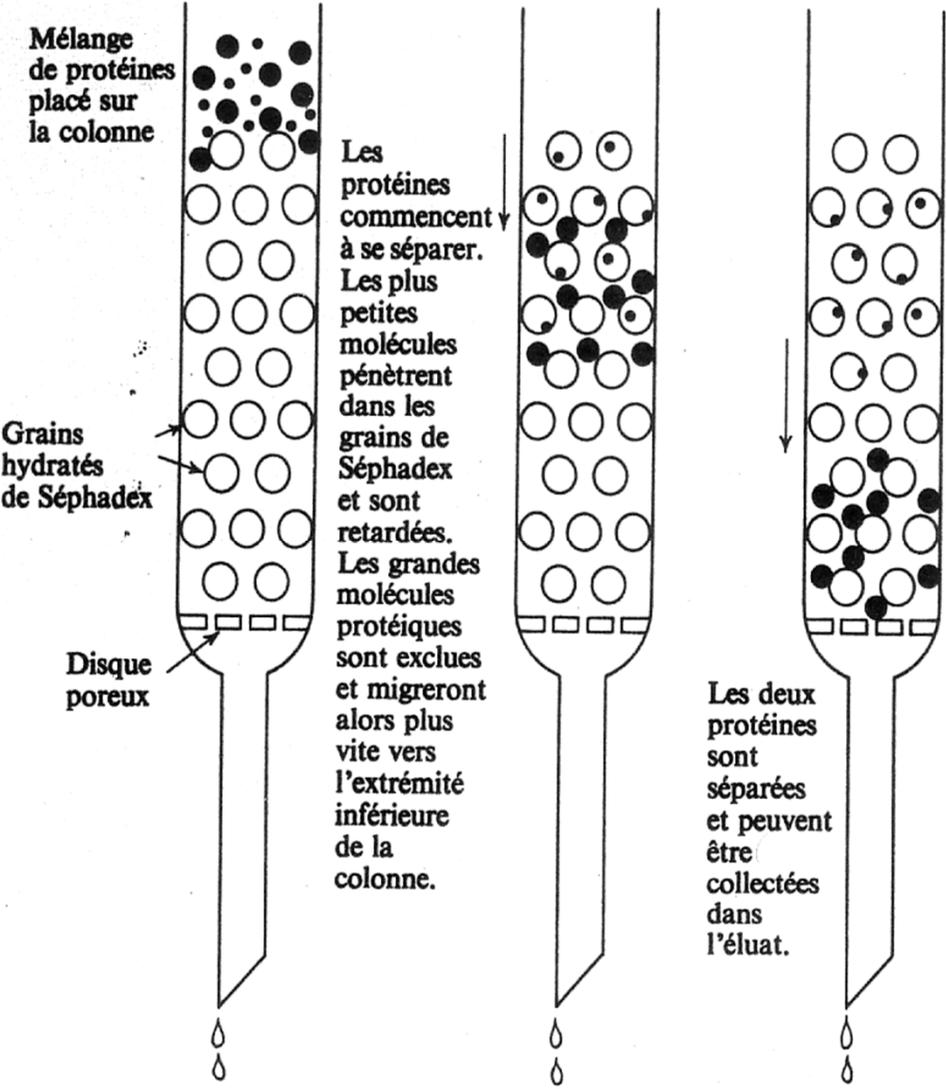


# Les différents supports sur gel

	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**

# Principe de la chromatographie d'exclusion sur gel



# Chromatographie d'échange d'ions

**Les résines: sépharose, séphacryl  
celluloses substituées**

**Les groupements:**

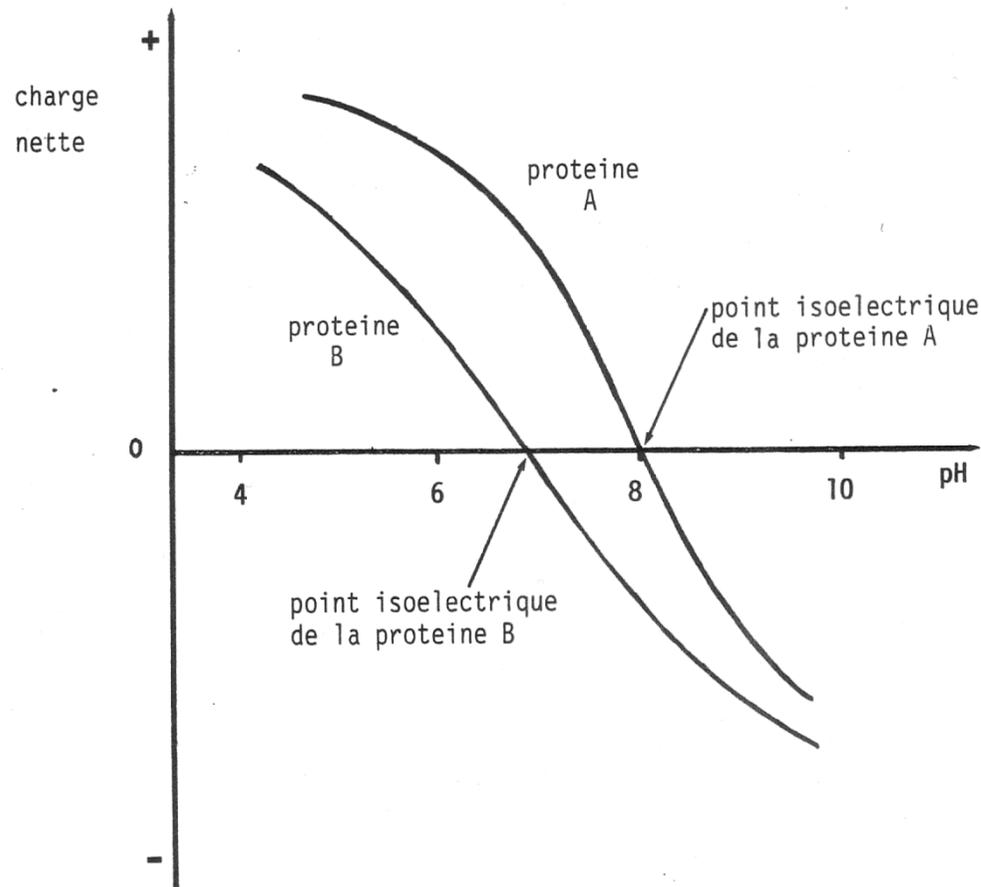
**chargés négativement (échange de cations)**

- sulfoniques
- carboxyliques
- phosphates
- sulfoéthyl

**chargés positivement (échange d'anions)**

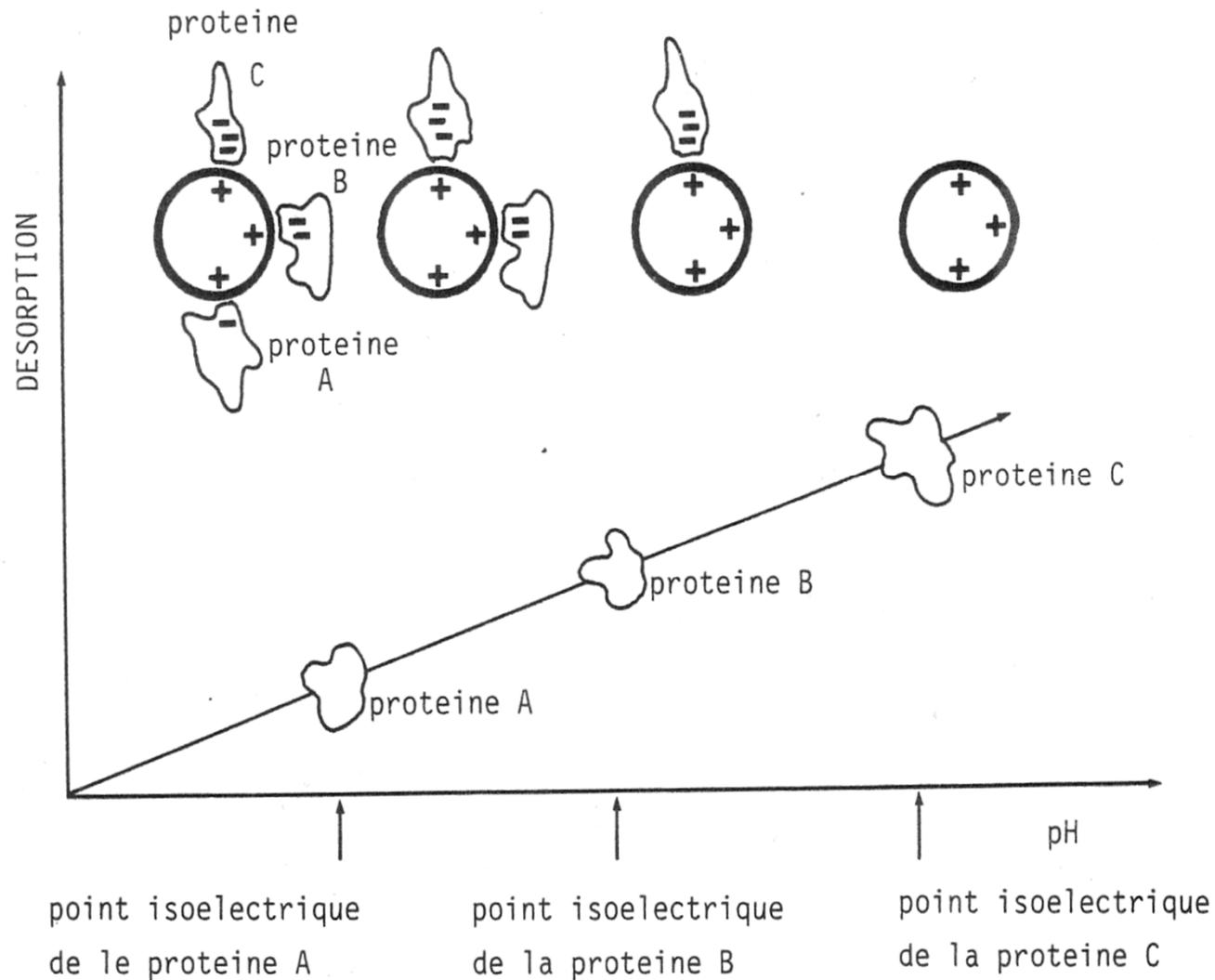
- diéthylaminoéthyl (DEAE)
- aminoéthyl
- triméthylamine

# Charge des protéines

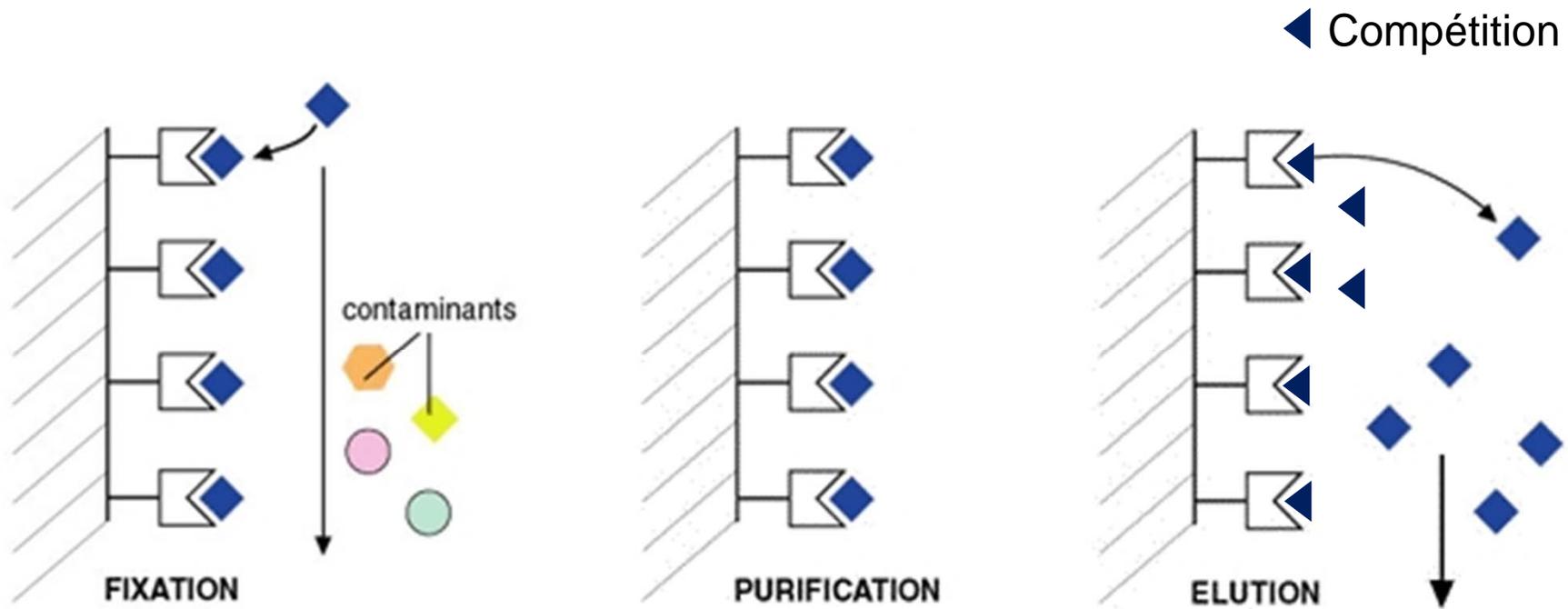


- Les protéines ont des charges variables en fonction du pH
- Chaque protéine en fonction de sa séquence primaire présente une courbe particulière
- Chaque protéine a un point isoélectrique défini

# Désorption sélective des protéines en fonction du pH



# Chromatographie d'affinité

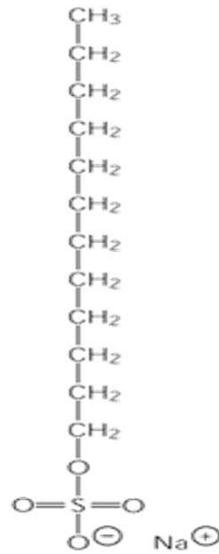
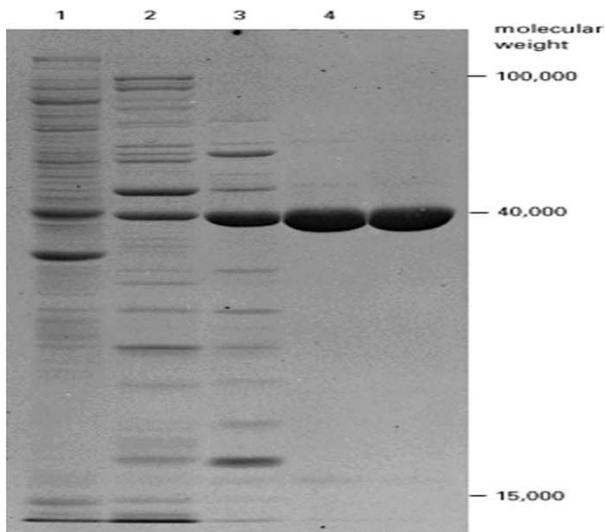
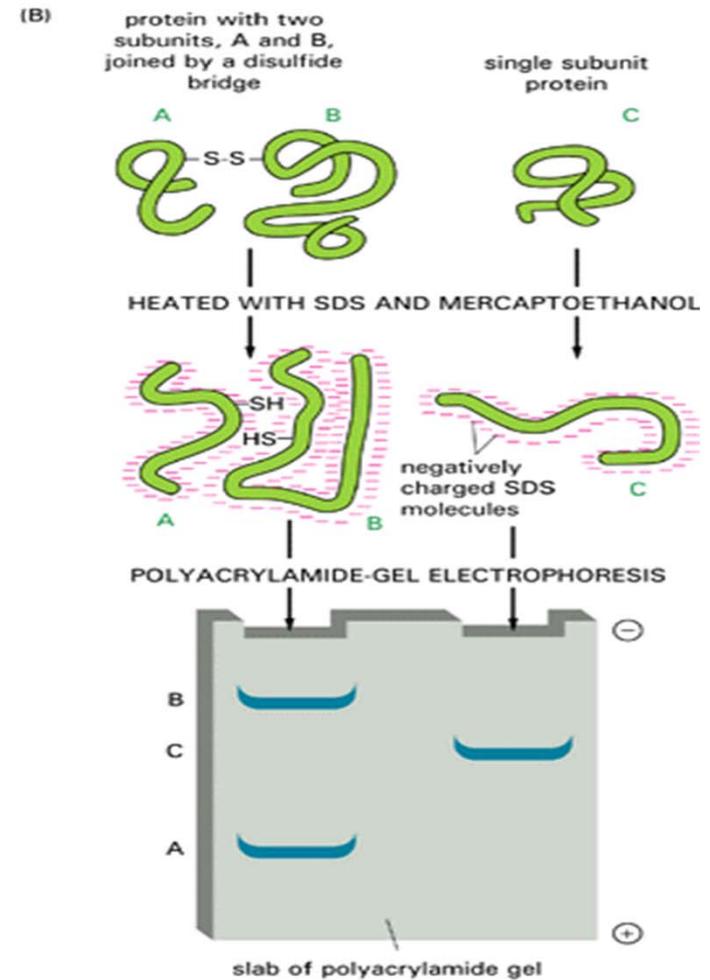
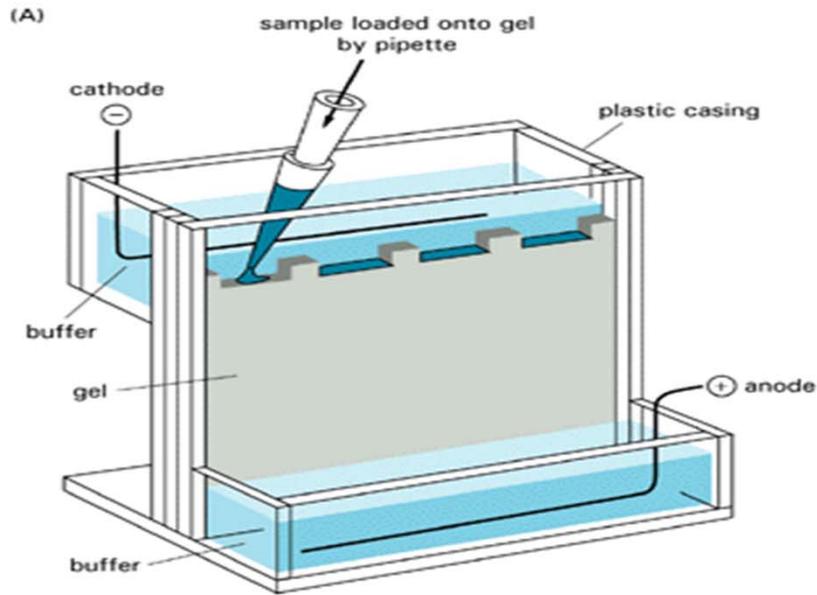


**Substrat**  
**Antigène**  
**Metal**  
**Sucre**  
**Hormone**

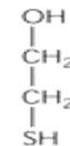
**Enzyme**  
**Anticorps**  
**Metalloprotéine**  
**Lectine**  
**Récepteur**

(Lavage)

# Électrophorèse SDS page

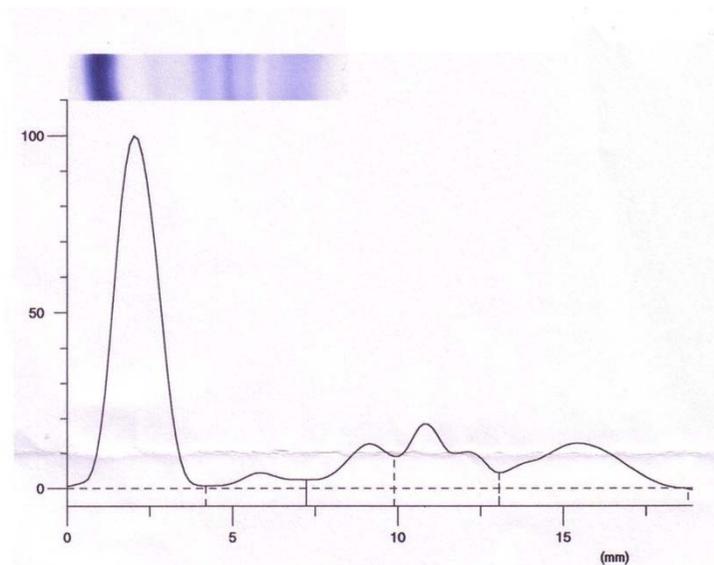


SDS



β-mercaptoethanol

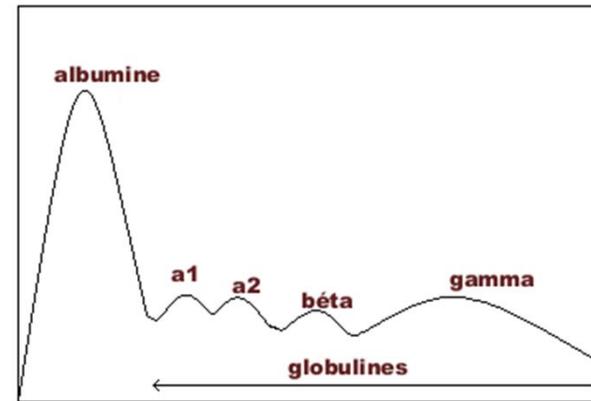
# Electrophorèse non dénaturante: Analyse des protéines plasmatiques



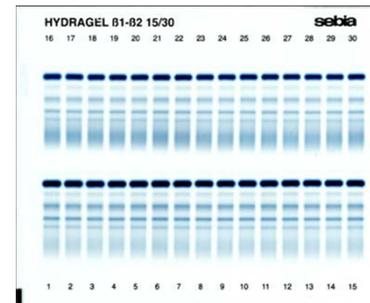
Technique sur gel d'agarose

Index	Fraction	% Relatif	Conc. (g/l)	Normales (g/l)
1	Albumine	59.50%	39.86	35.00 ... 50.00
2	Alpha 1	2.98%	2.00	1.00 ... 4.00
3	Alpha 2	7.94%	5.32	5.00 ... 11.00
4	Beta	13.99%	9.37	6.00 ... 13.00
5	Gamma	15.60%	10.45	7.00 ... 16.00
Total			67.00	60.00...80.00

Rapport A/G 1.47

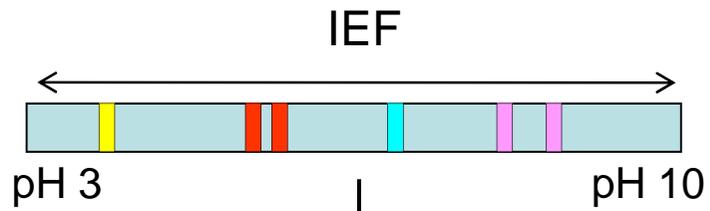


Profil électrophorétique classique  
Des protéines plasmatiques



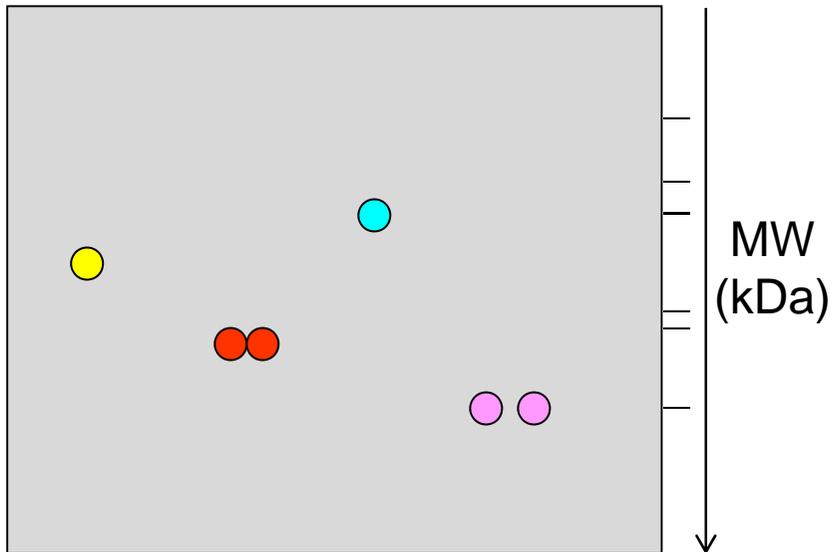
# Electrophorèse 2D

1D

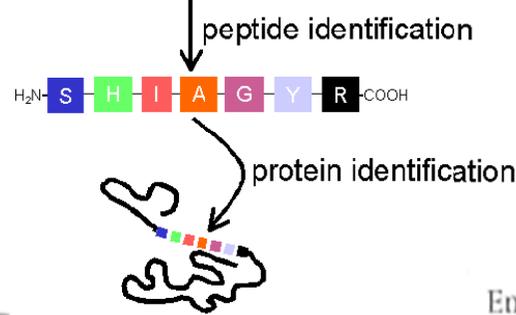
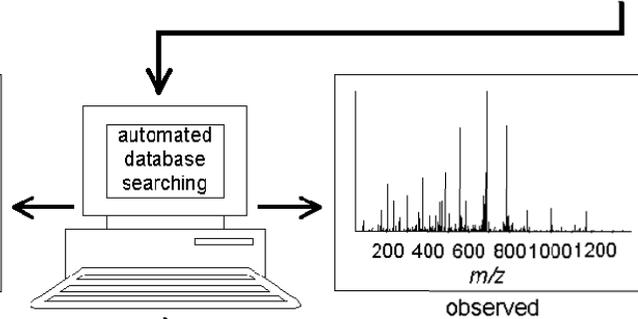
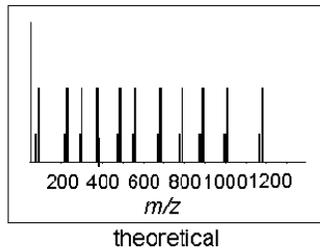
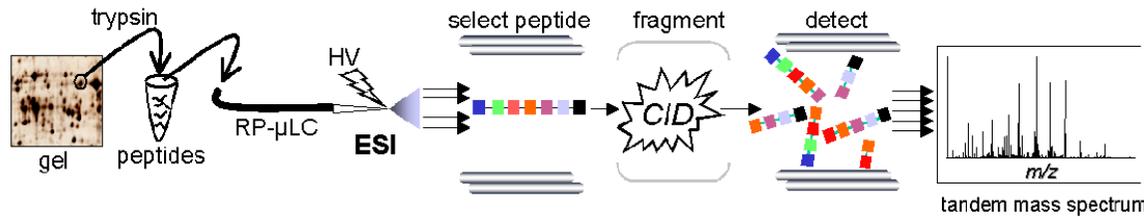


2D

SDS-PAGE



# 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-

continue à ce décryptage en développant, selon les termes

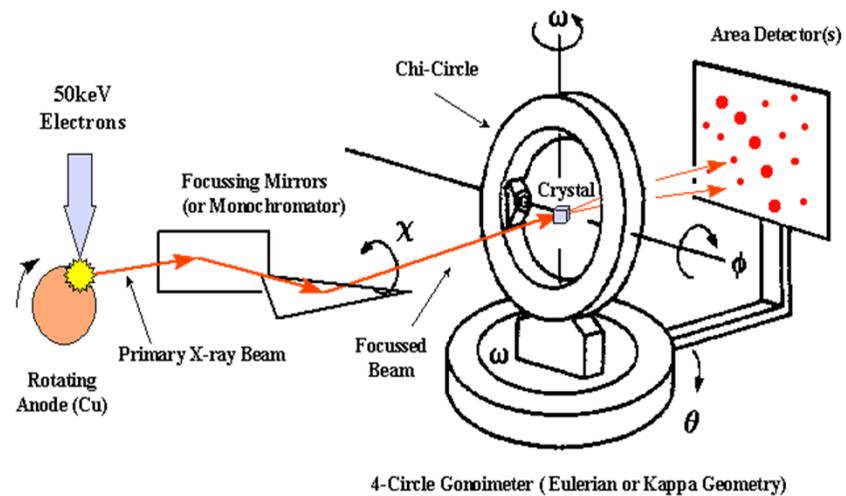
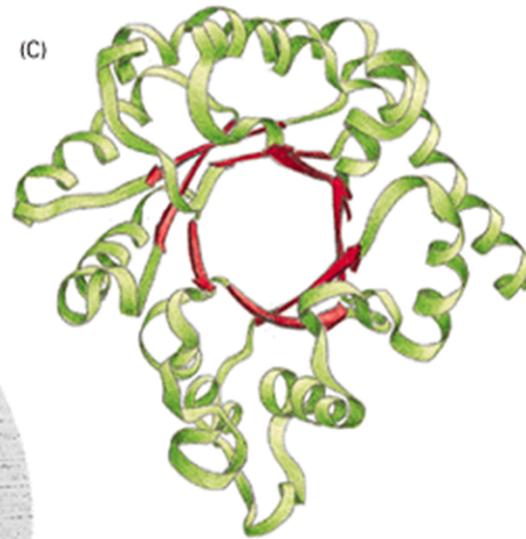
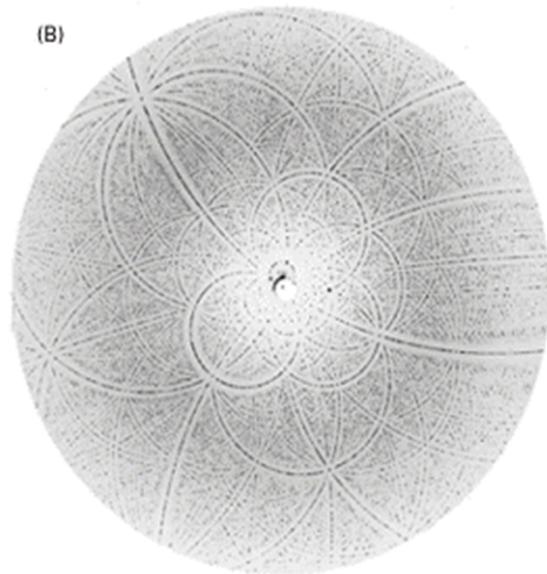
ef- de te. mt ro- 36- 35- g. is- re ies 30- u- ne les ri- ais urt mt

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

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

gnétique nucléaire ou RMN. Grâce à ses travaux, cette technique permet aujourd'hui d'étudier la structure tridimensionnelle des protéines (qui dans de nombreux cas détermine leur fonction) en solution, c'est-à-dire dans un milieu proche de leur environnement cellulaire. 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

# Etude de la structure cristallisée par diffraction de rayons X



# Mentions légales

L'ensemble de cette œuvre relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle, littéraire et artistique ou toute autre loi applicable.

Tous les droits de reproduction, adaptation, transformation, transcription ou traduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Cette œuvre est interdite 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 Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1 et ses affiliés.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.