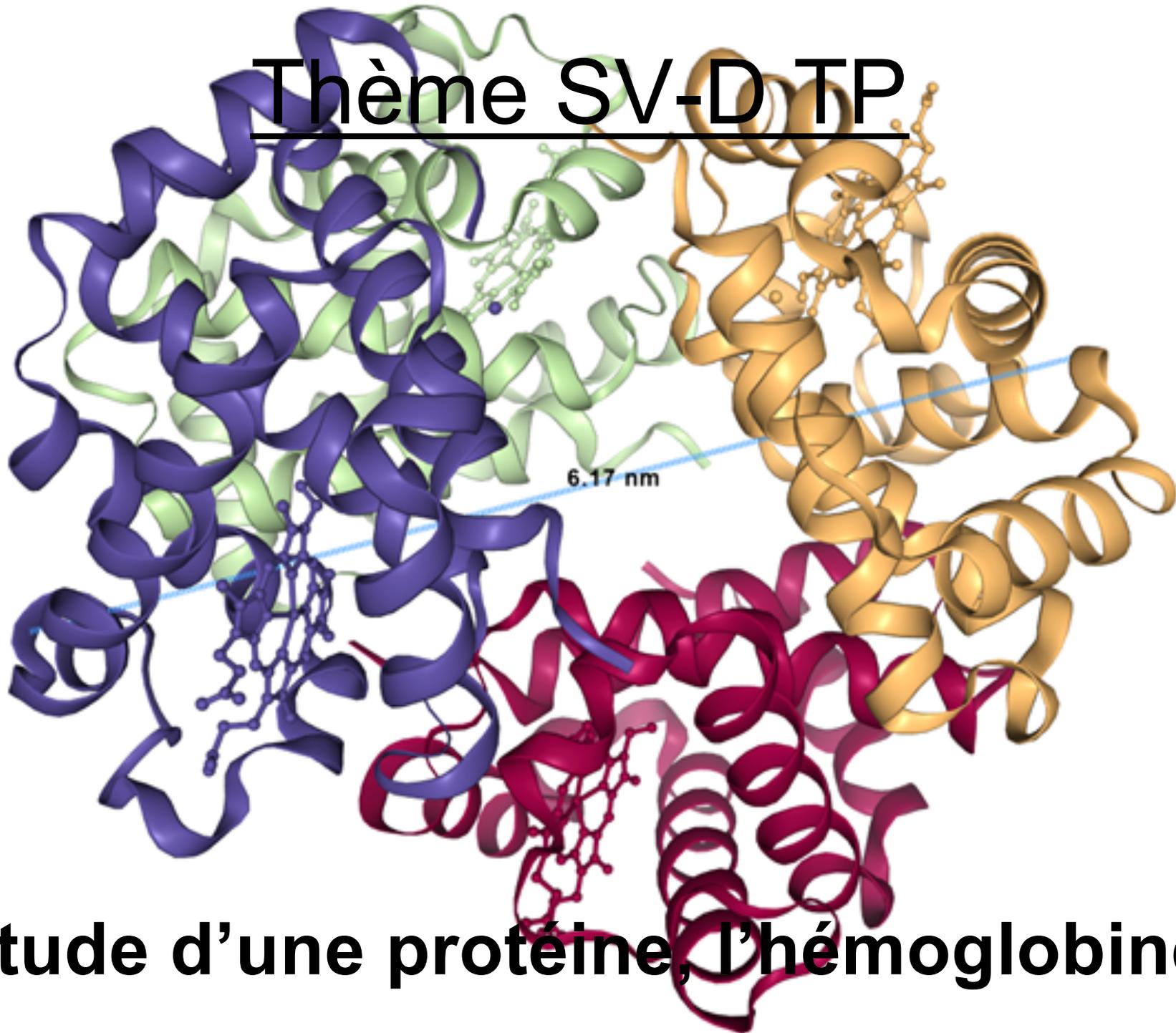


Thème SV-D TP



Etude d'une protéine, l'hémoglobine

Hemolysis



Normal
red blood cell
(erythrocyte)



Spherocyte
(erythrocytes that
are sphere-shaped)



Rupturing of erythrocyte,
and the release of contents
into blood plasma

SEPARATION DE PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIES

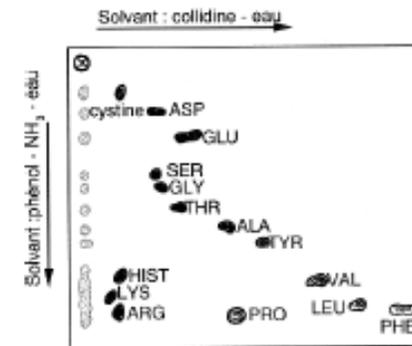
Principe général de la chromatographie : La chromatographie repose sur l'entraînement différentiel des constituants d'un mélange par une phase mobile (= éluant), le long d'une phase stationnaire (= phase fixe).

La technique de **chromatographie sur papier** s'applique aussi aux protéines, et permet de séparer efficacement des acides aminés et des oligopeptides.

Lorsque des molécules ont des profils de migration superposés en une dimension, on peut effectuer une chromatographie dans les **2 dimensions** pour les séparer plus finement.

On utilise alors deux solvants différents :

- Première chromatographie dans une direction avec un premier solvant
- Deuxième chromatographie en tournant la feuille de 90° avec un deuxième solvant.



Séparation d'un mélange d'acides aminés issus de l'hydrolyse d'une protéine. Point de dépôt : en haut à gauche.

Chromatographie sur colonne :

L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne contenant une **matrice solide poreuse = phase stationnaire** (ex : microbilles de cellulose) immergée dans un solvant.

Du solvant (**phase mobile**) est continuellement ajouté au sommet de la colonne, l'éluant est collecté dans des tubes à essais en bas de colonne (fractions d'éluion). Les divers composants de l'échantillon sont plus ou moins retenus sur la phase stationnaire en fonction de leur charge, de leur taille ou de leur affinité pour un substrat : les composants se déplacent donc à des vitesses différentes dans la colonne et sont ainsi fractionnés.

Quelques exemples de chromatographies :

• Chromatographie par filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion

Les microbilles placées dans la colonne sont poreuses. Les petites protéines pourront passer par l'intérieur de ces microbilles tandis que les grosses protéines sont exclues des billes et passeront plus rapidement à travers la colonne. Les protéines récupérées dans les premiers extraits sont celles de plus grosse masse, et on récupère progressivement les différentes protéines du mélange par masse molaire décroissante.

• Chromatographie par échange d'ions

Les microbilles utilisées sont chargées +.

Les protéines ou acides aminés sont mis au contact des billes dans un tampon de très haut pH, dans lequel ils sont chargés : les protéines ou acides aminés se lient donc aux billes par interactions électrostatiques.

Le pH du tampon d'éluion qui circule dans la colonne est progressivement abaissé, et les protéines ou acides aminés sont progressivement élués en fonction de leur pHi.

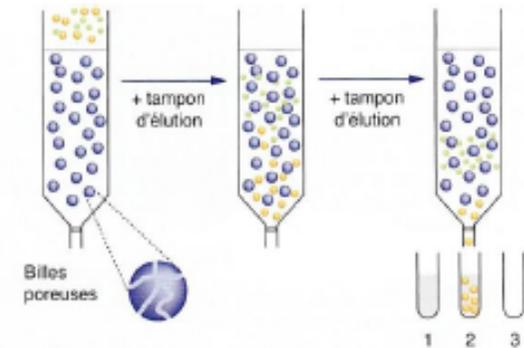
Les différents extraits récupérés contiennent donc des protéines différentes aux différents pHi.

• Chromatographie d'affinité

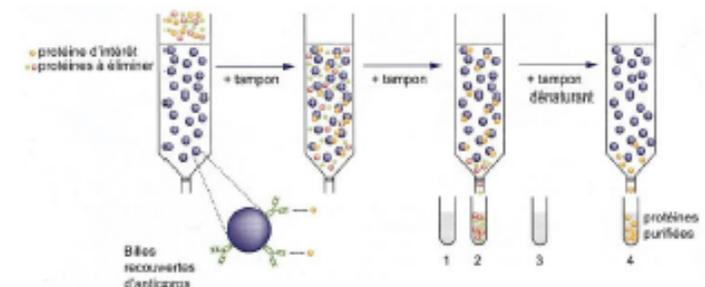
Les microbilles utilisées sont recouvertes d'une molécule « ligand » (substrat d'une enzyme, anticorps, récepteur). Les protéines interagissant avec le ligand sont retenues dans la colonne.

Une fois la colonne lavée, elle ne contiendra plus que des protéines complémentaires du ligand. On pourra ensuite récupérer ces protéines en faisant circuler un tampon d'éluion (haute salinité ou pH différent) qui décroche les protéines.

Rq : La méthode d'**HPLC** (chromatographie liquide à haute performance) consiste à faire passer la phase mobile sur la colonne avec de fortes pressions. Cette méthode, rapide et sensible, permet d'augmenter le pouvoir de séparation par rapport à d'autres techniques de chromatographie

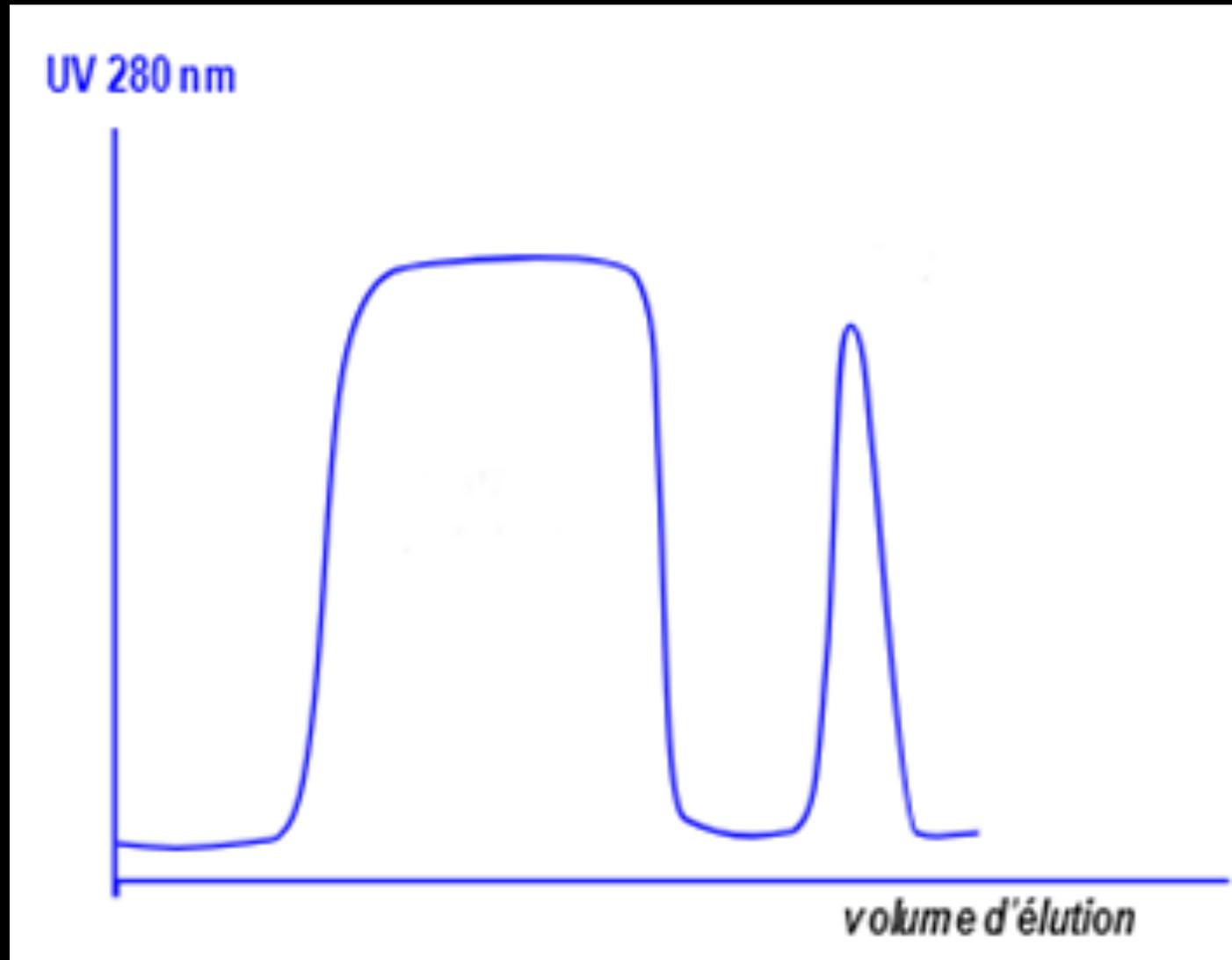


Chromatographie par filtration sur gel

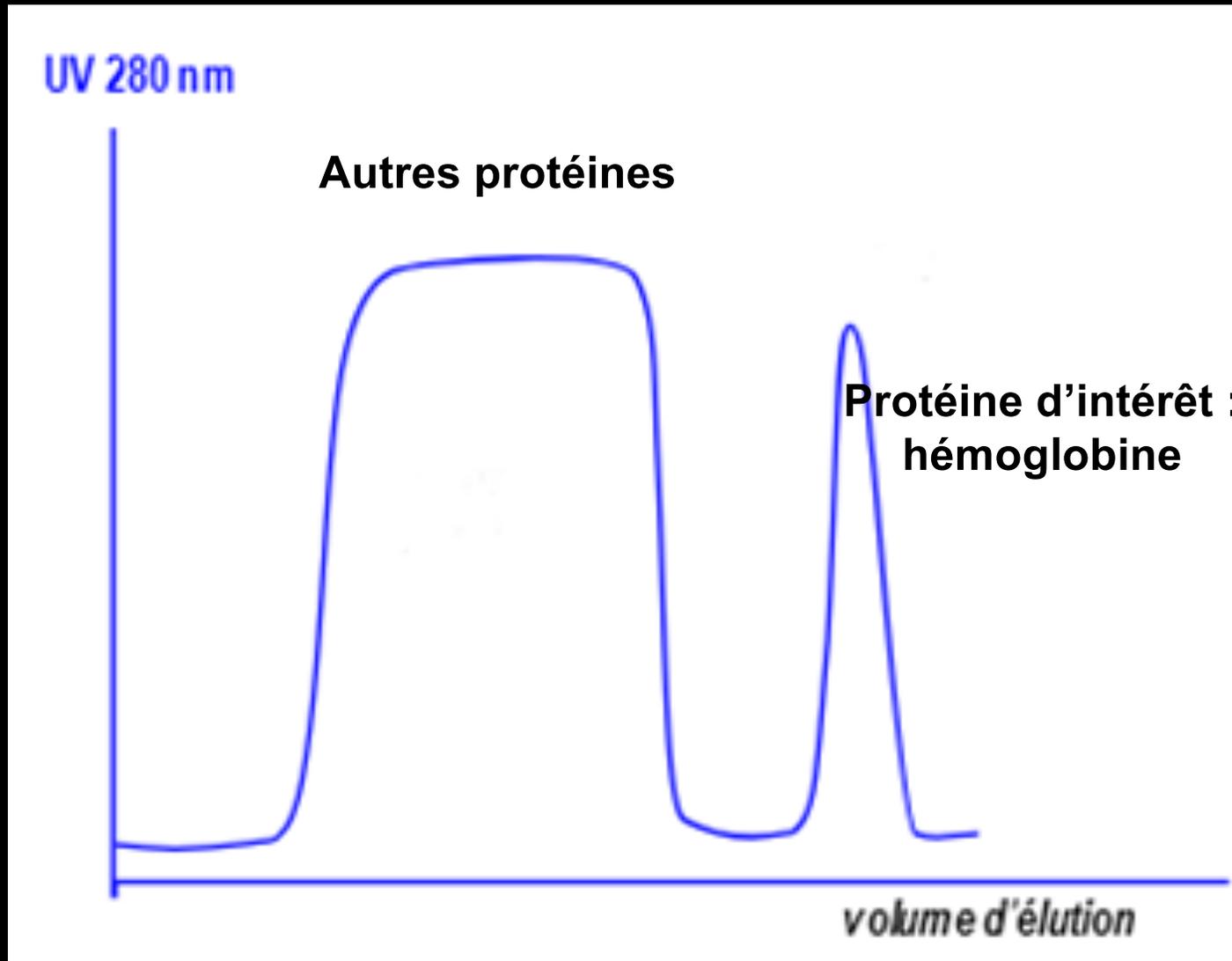


Chromatographie d'affinité

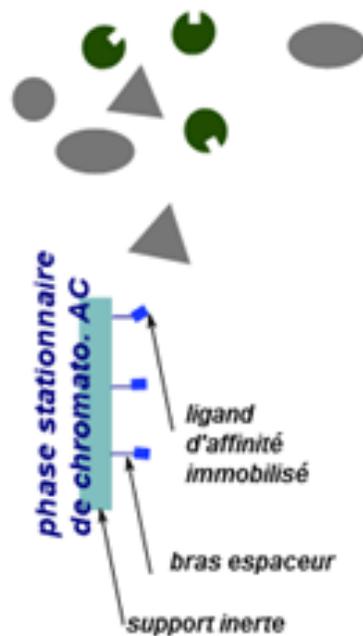
Profil d'élution d'une chromatographie d'affinité



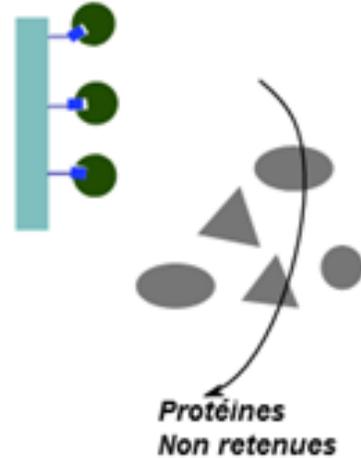
Profil d'élution d'une chromatographie d'affinité



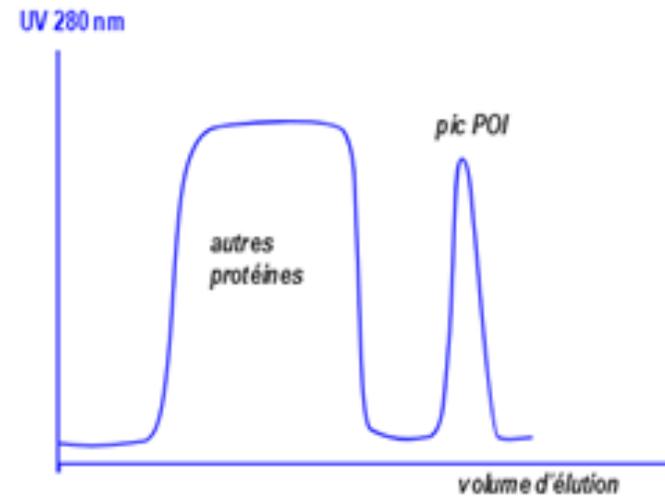
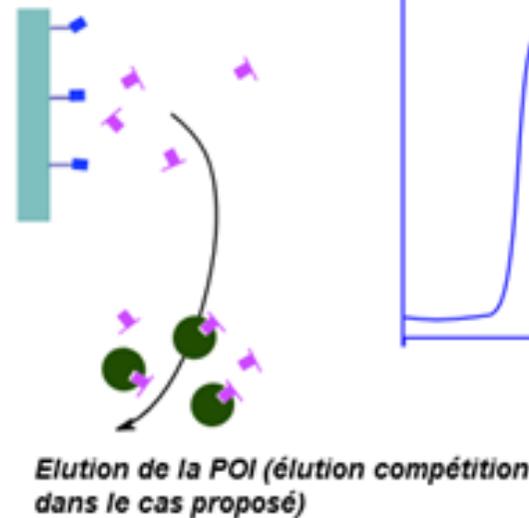
Protéine d'intérêt = POI = 

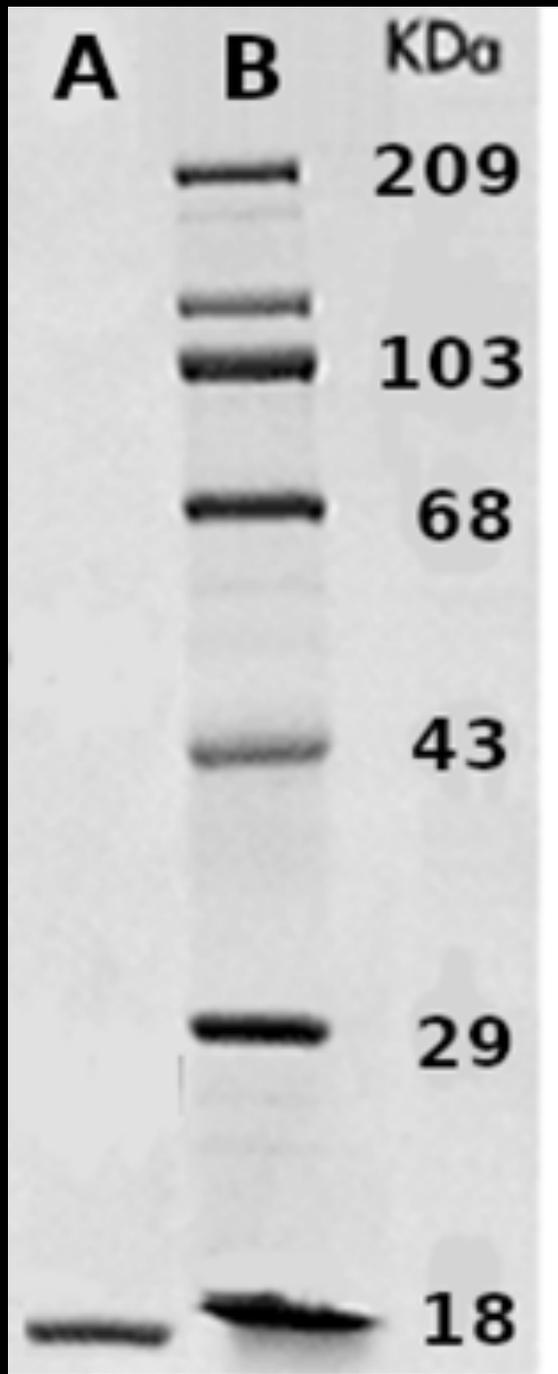


Phase 1
Conditions de tampon qui conduisent idéalement à la rétention de la seule POI par interaction biospécifique avec L immobilisé



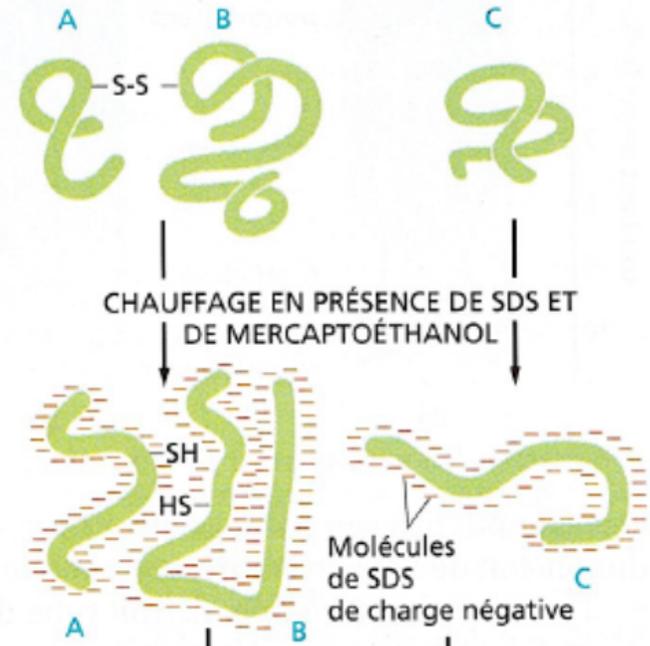
Phase 2
Elution de la POI, par compétition ou par changement des conditions physico-chimiques de phase mobile



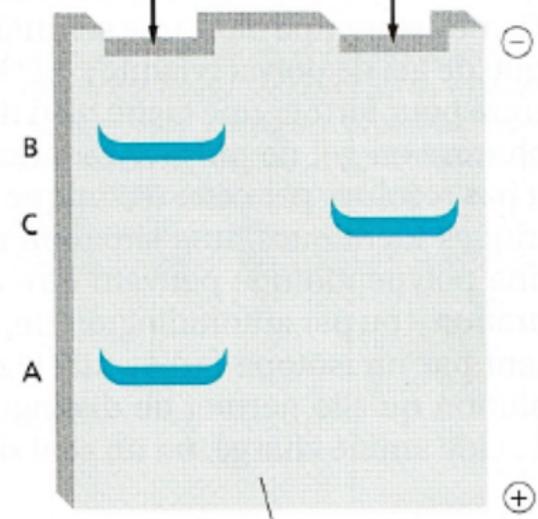


Protéine avec deux sous-unités, A et B, réunies par un pont disulfure

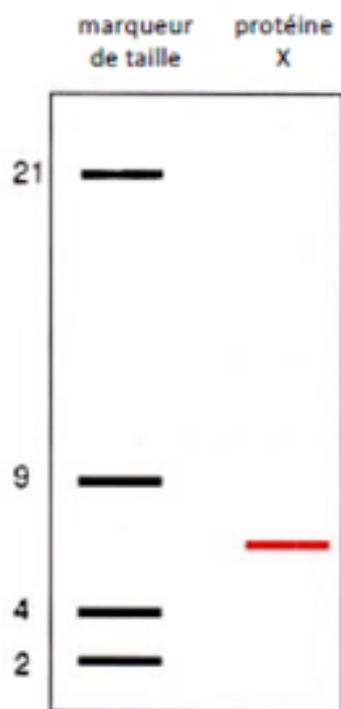
Sous-unité protéique seule



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

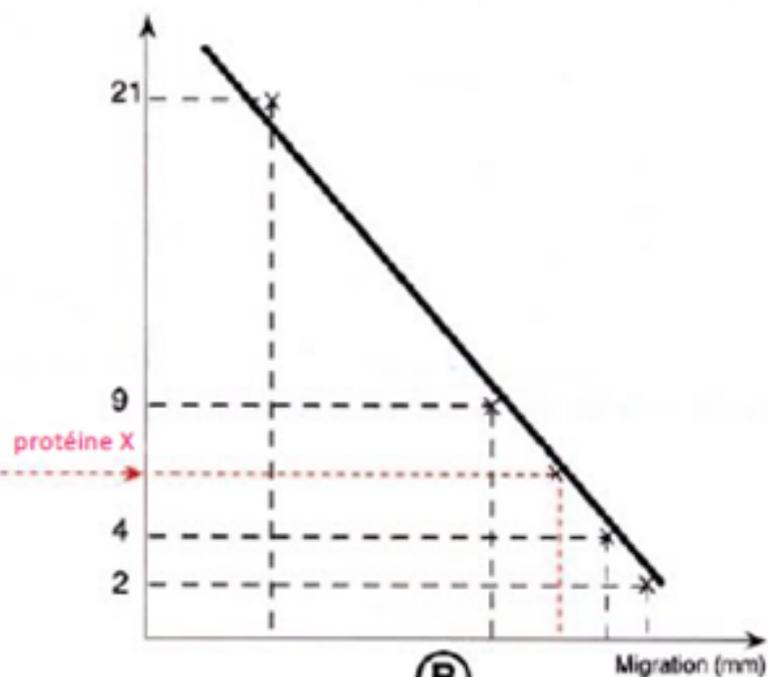


Plaque de gel de polyacrylamide



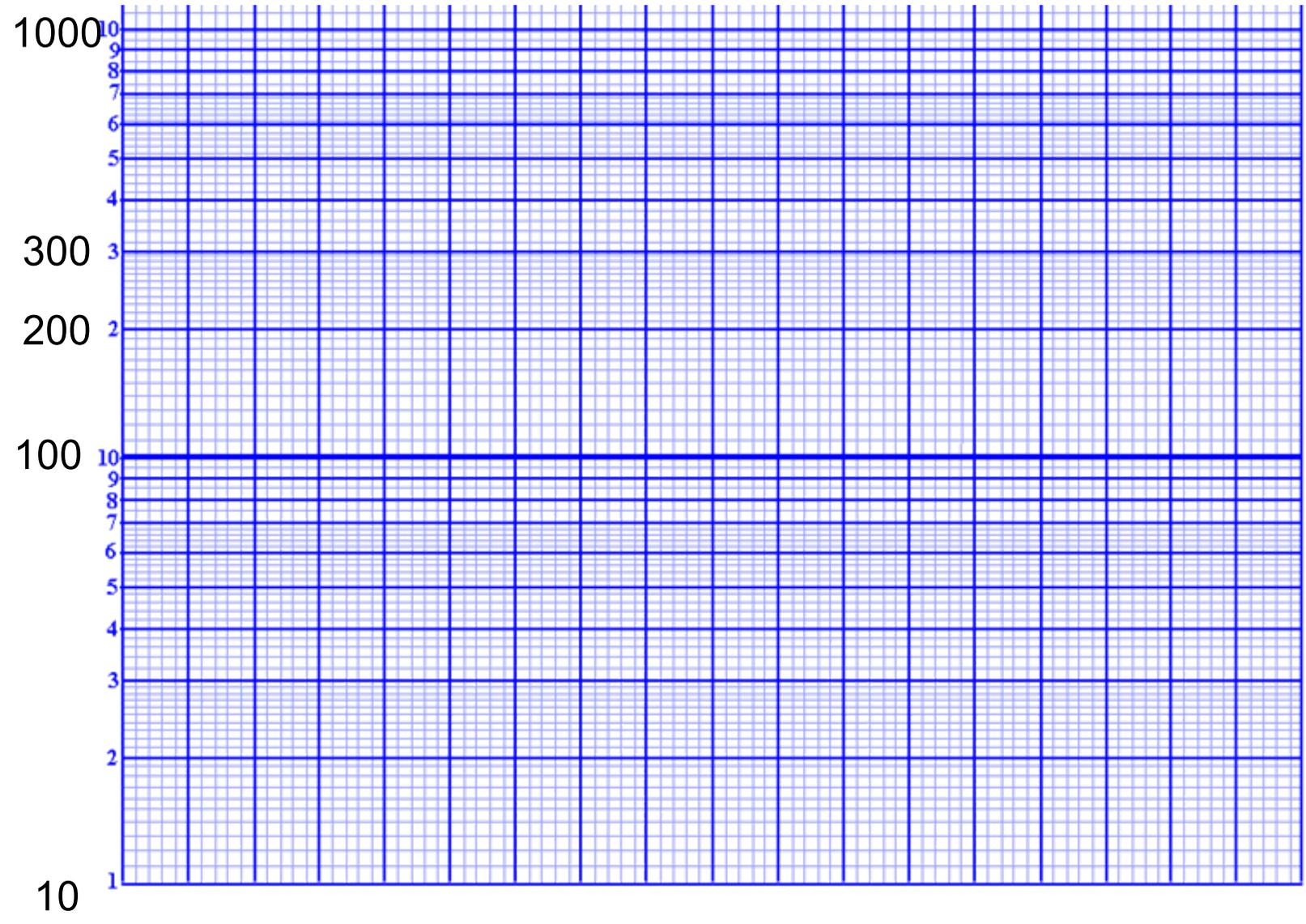
(A)

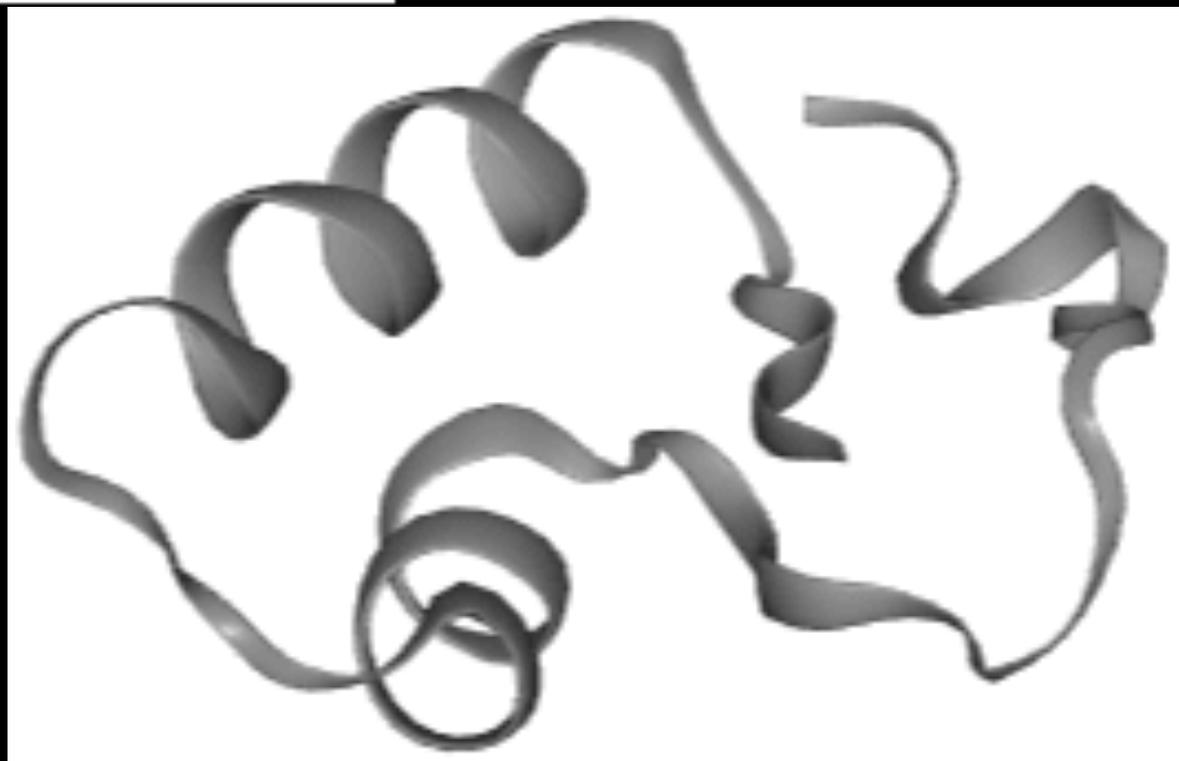
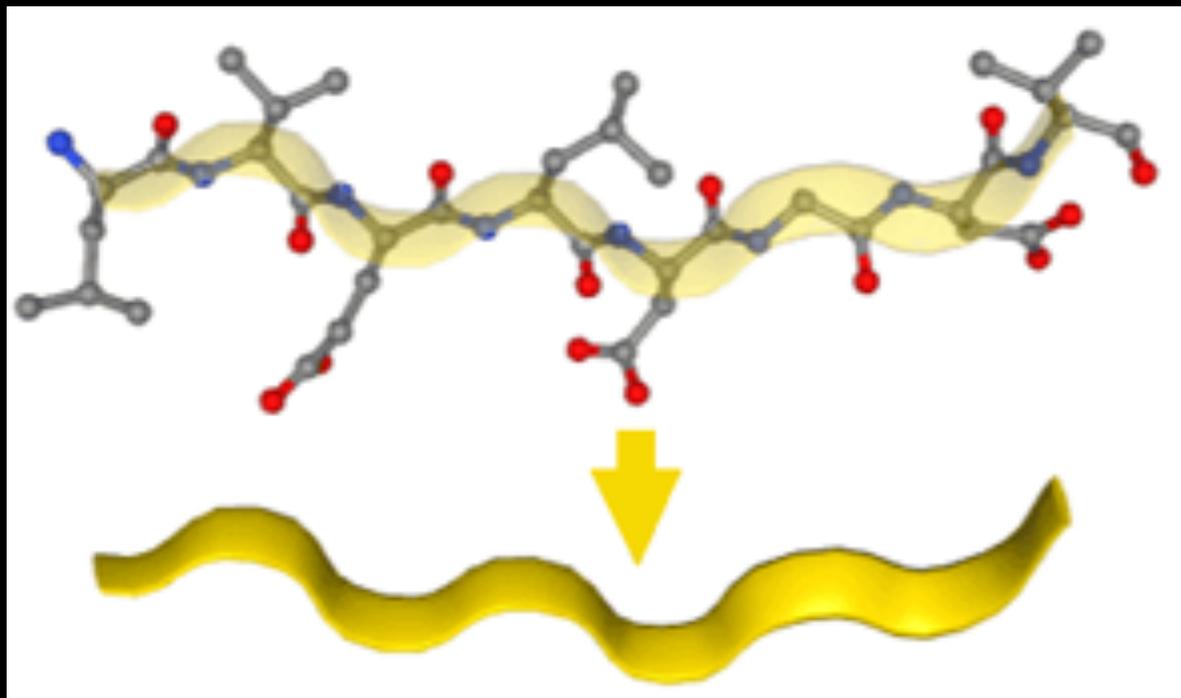
Poids en kD
(échelle log)

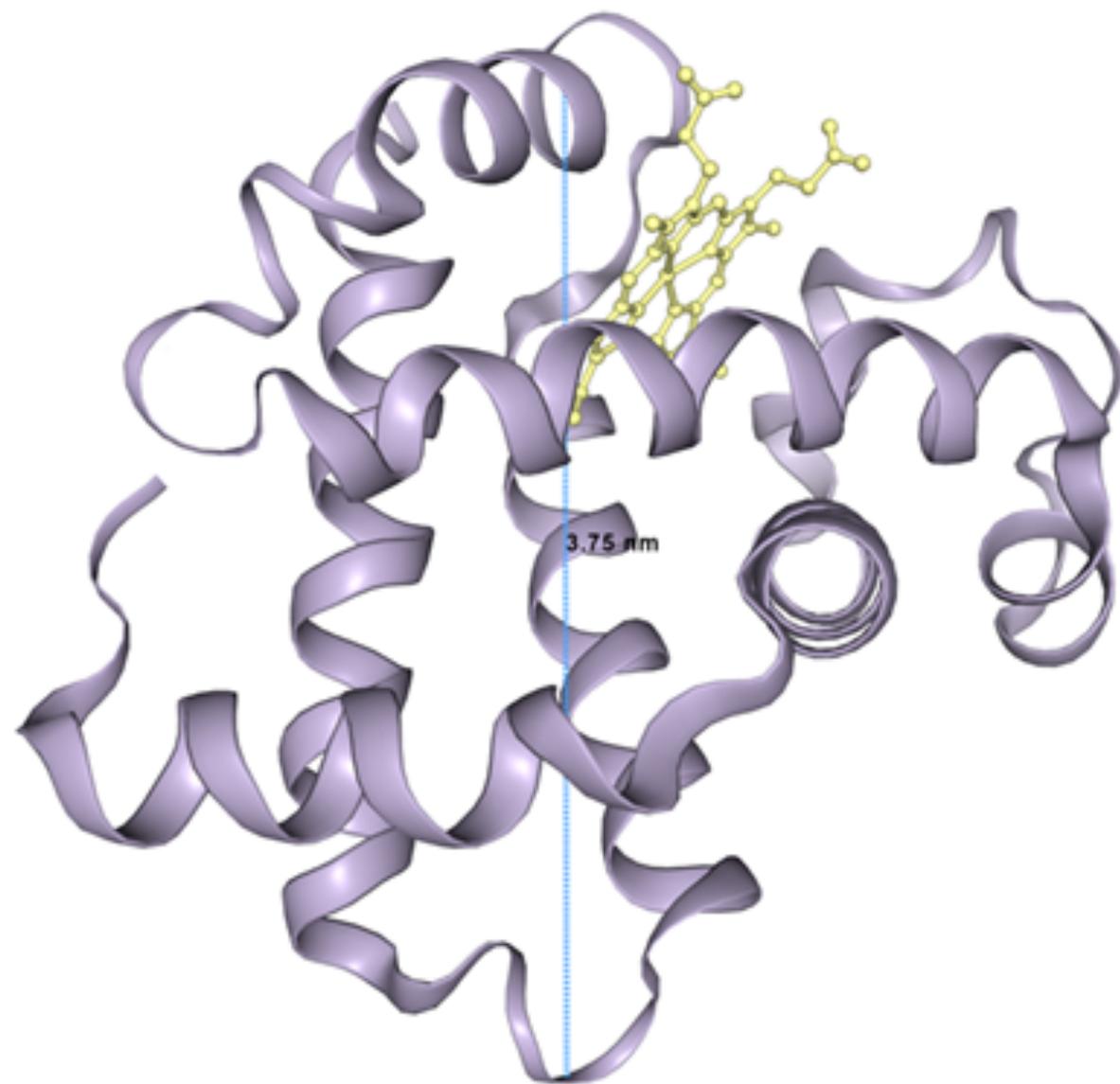


(B)

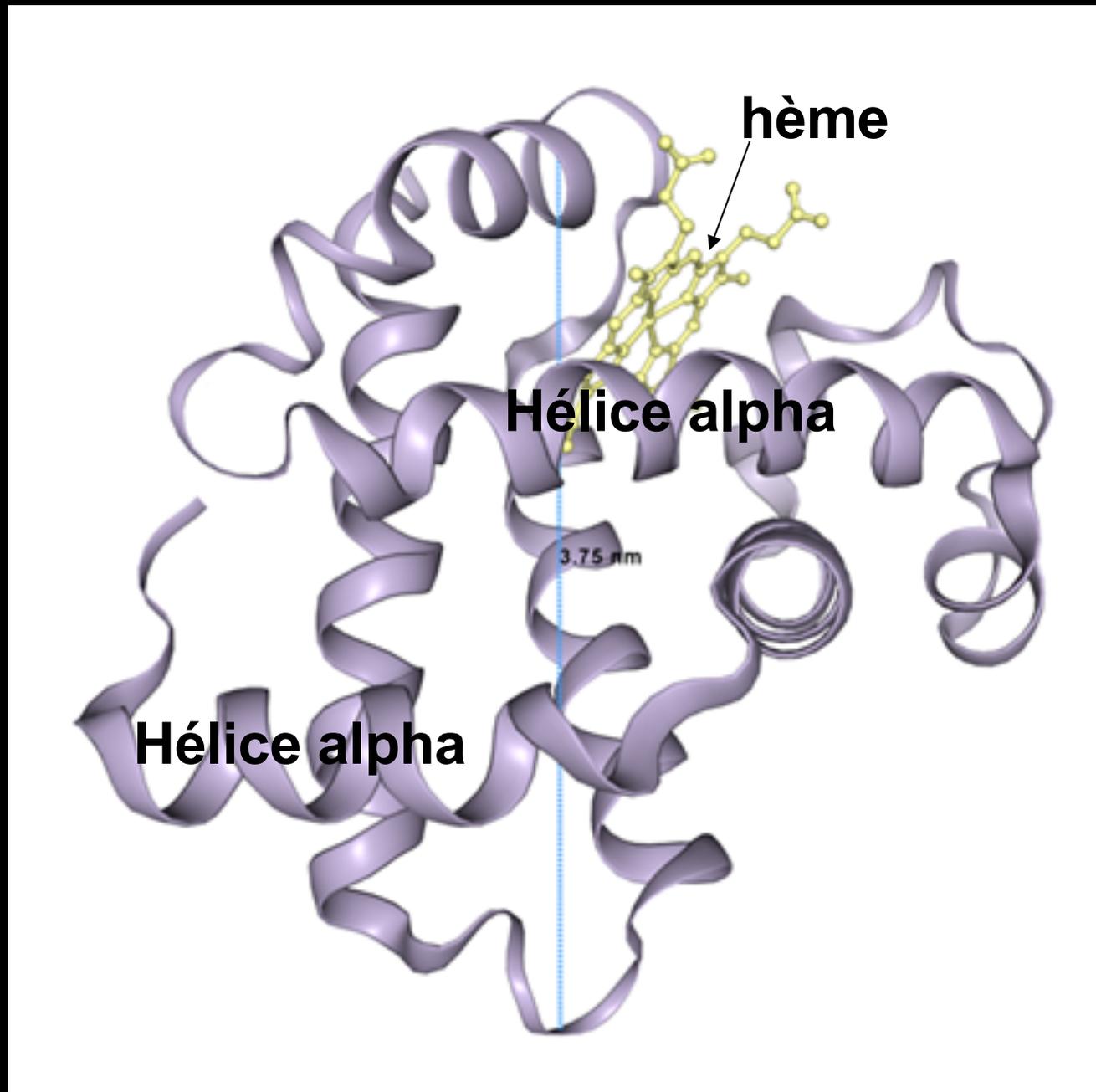
la masse des protéines et leur distance de migration suit une loi de type:
 $\log(\text{masse}) = A - B(\text{distance de migration})$

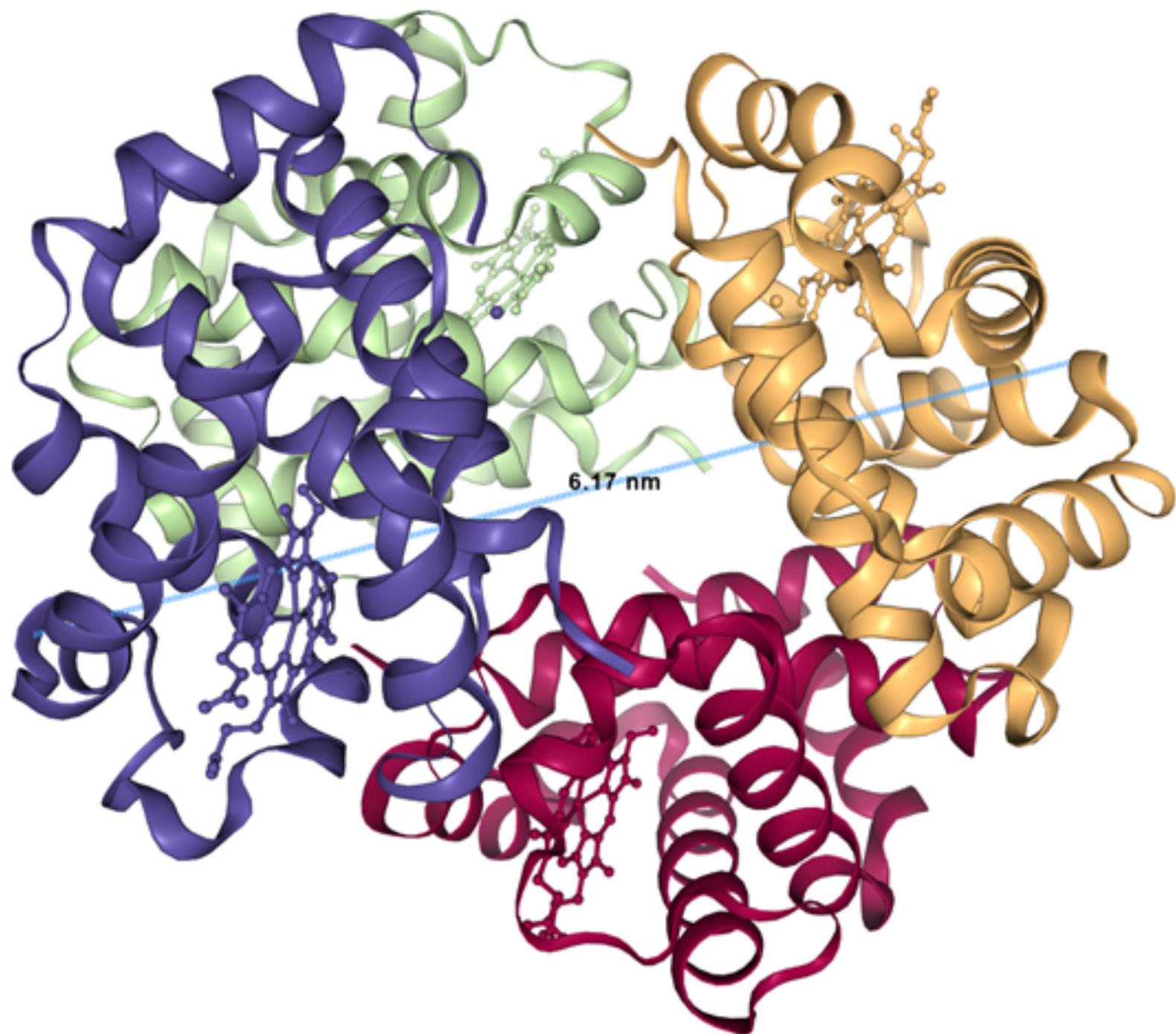




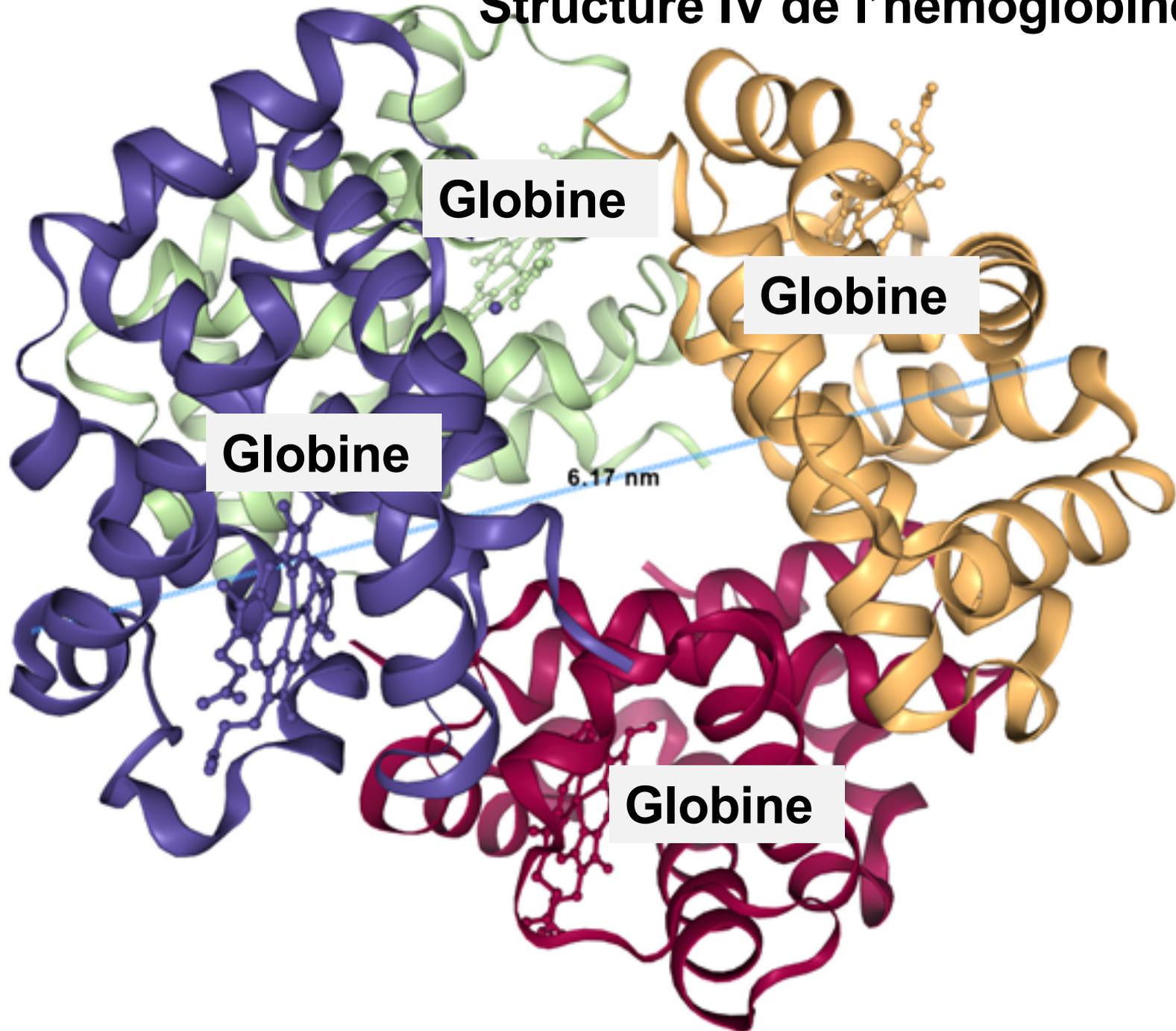


Structure III d'une globine : protéine en conformation globulaire

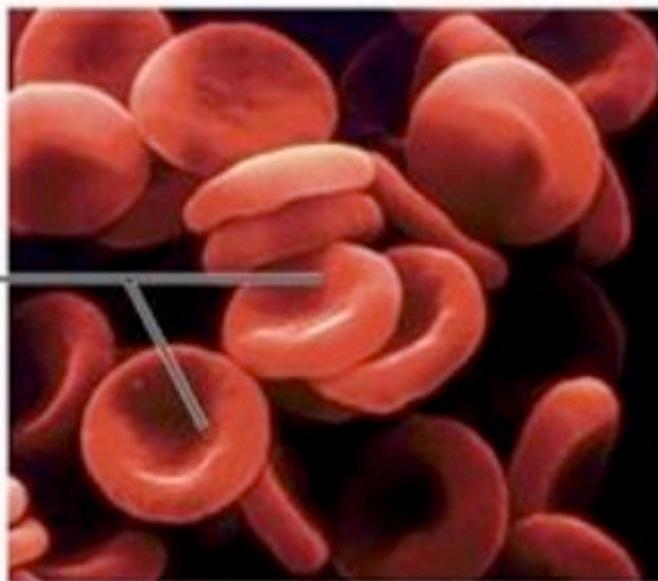




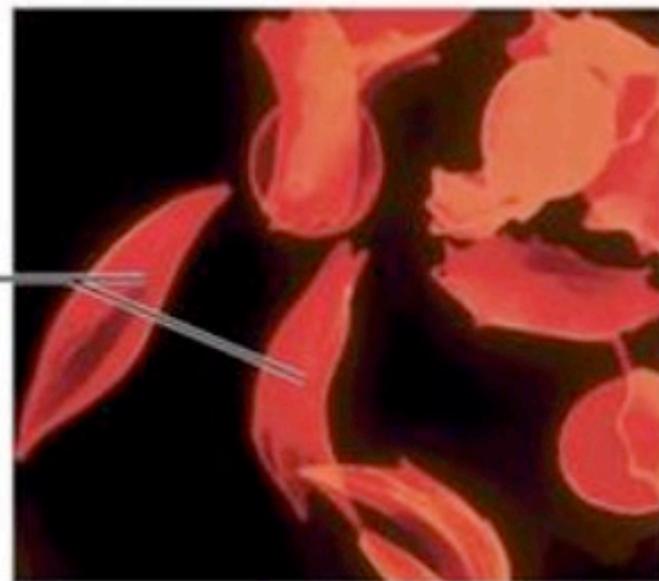
Structure IV de l'hémoglobine



Normal
red blood
cells

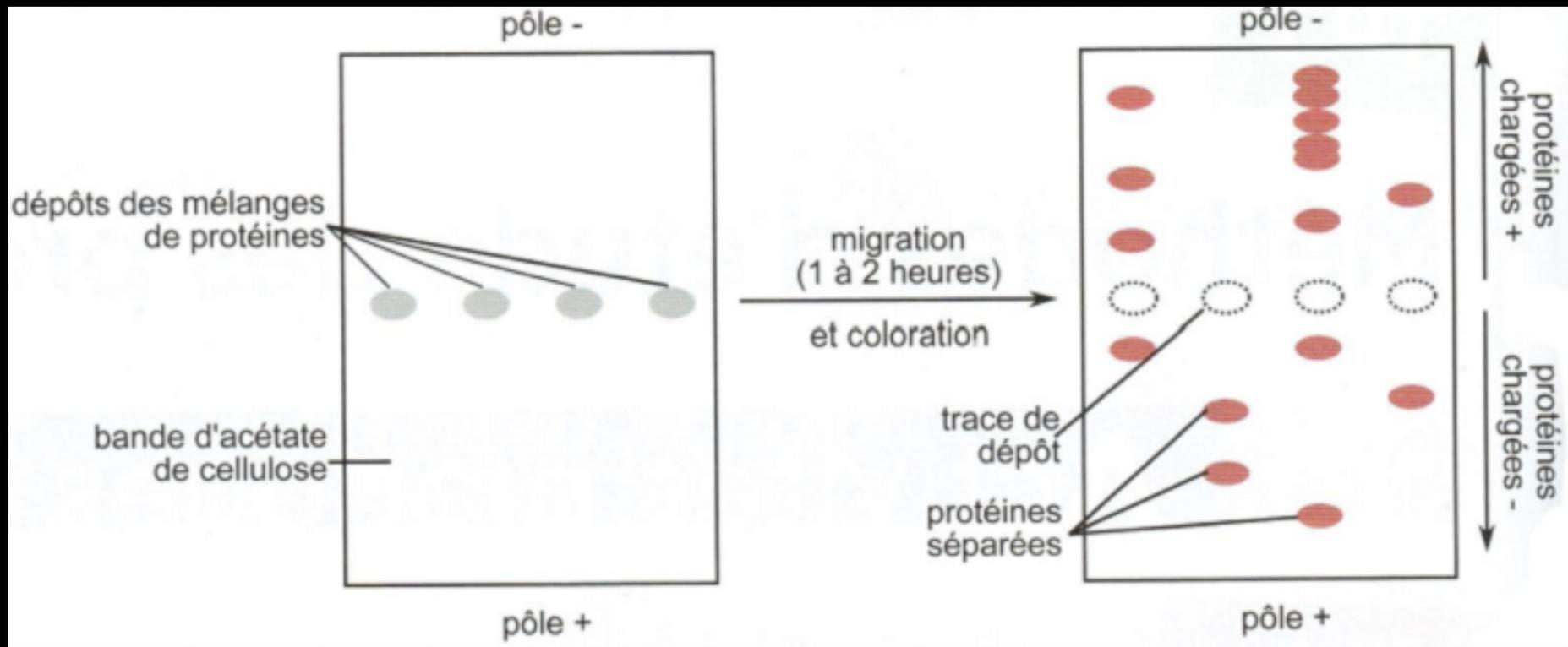


Sickled
red blood
cells



Electrophorèse en conditions natives

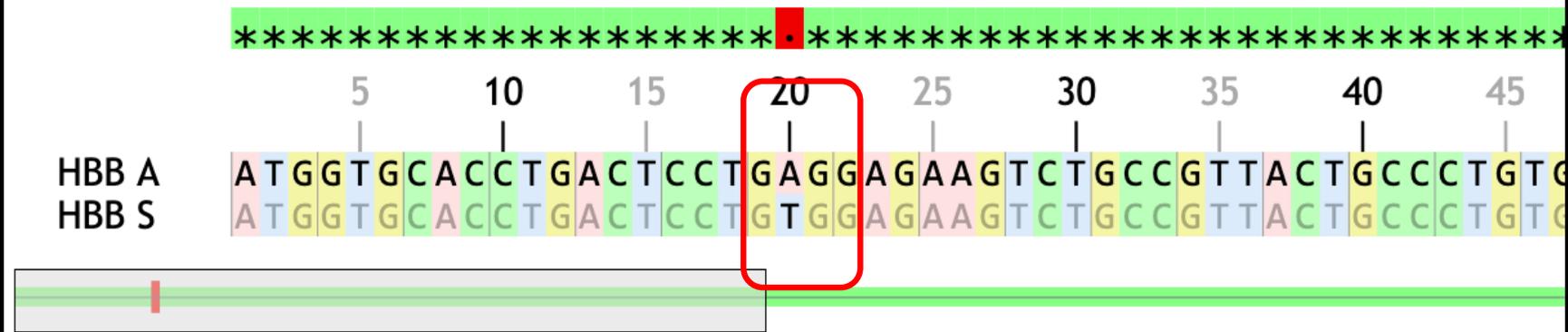




Alignement de séquences sur Geniegen2

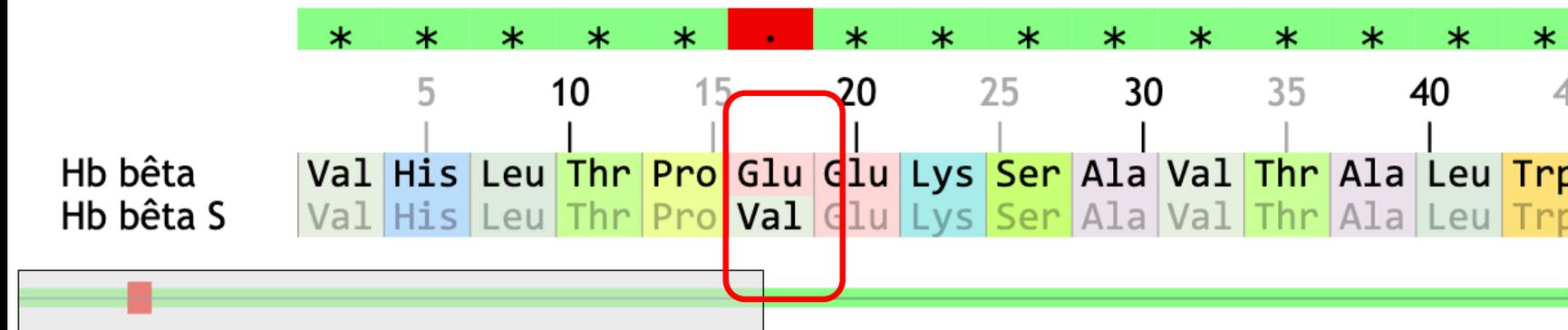
Séquences alignées

un _ représente un gap (absence d'un nucléotide)

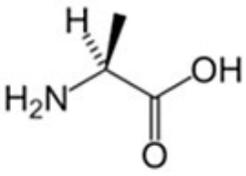
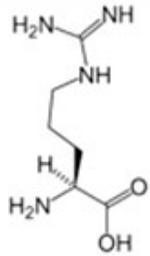
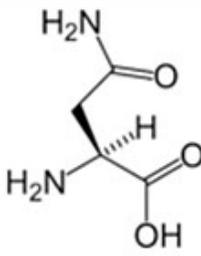
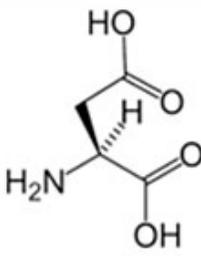
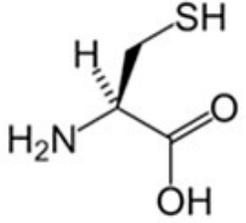
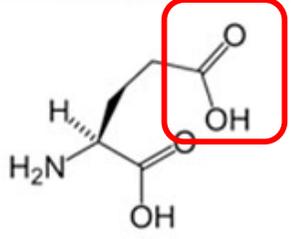
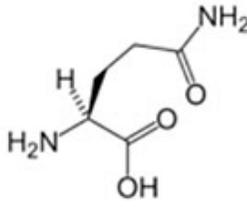
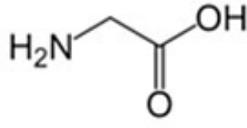
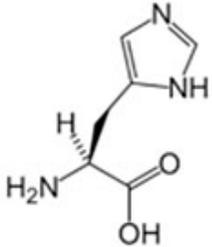
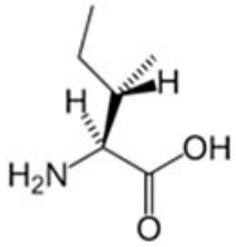
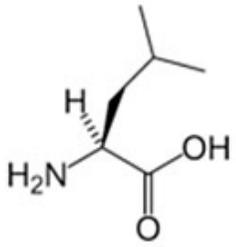
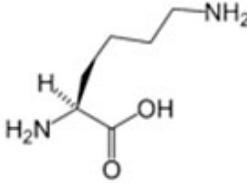
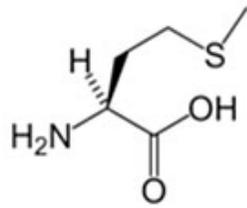
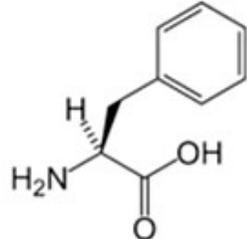
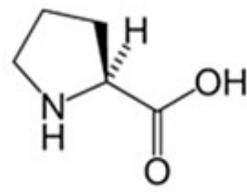
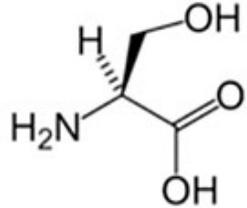
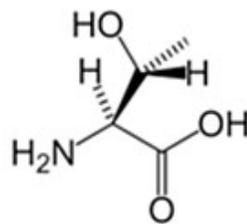
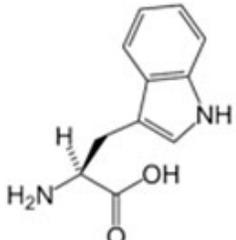
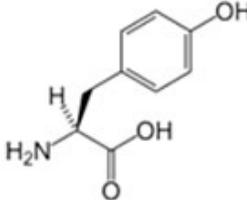
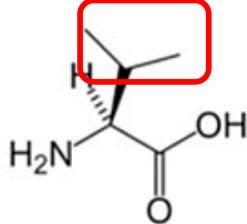


Séquences alignées

un _ représente un gap (absence d'un acide aminé)



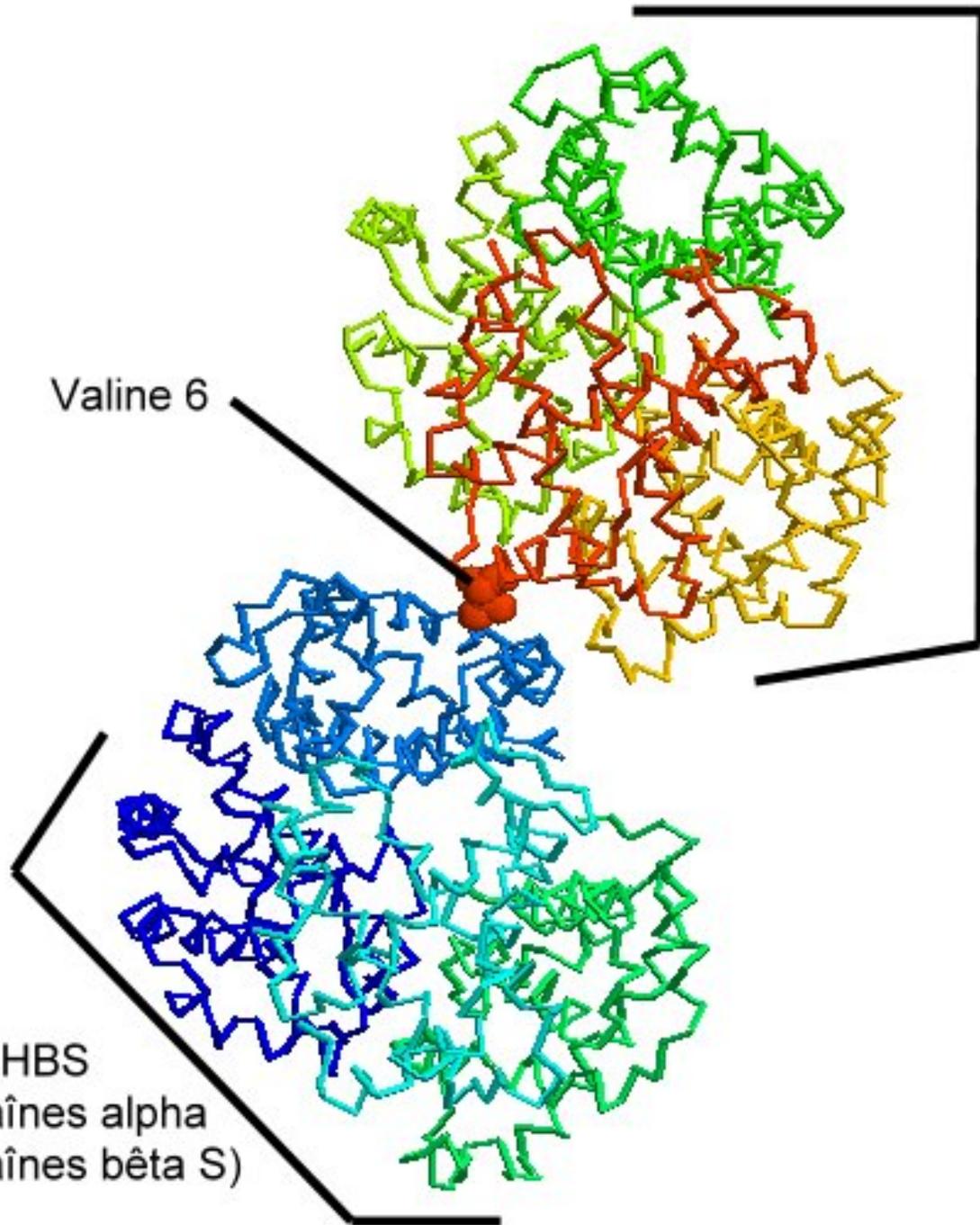
Nom	Code		pKa de la chaîne latérale	Poids Moléculaire
Alanine	ALA	A	-	89,09
Arginine	ARG	R	12,5	174,20
Asparagine	ASN	N	-	132,12
Acide Aspartique	ASP	D	3,9	133,10
Cystéine	CYS	C	8,3	121,15
Glutamine	GLN	Q	-	146,15
Acide Glutamique	GLU	E	4,2	147,13
Glycine	GLY	G	-	75,07
Histidine	HIS	H	6,0	155,16
Isoleucine	ILE	I	-	131,17
Leucine	LEU	L	-	131,17
Lysine	LYS	K	10,0	146,19
Méthionine	MET	M	-	149,21
Phénylalanine	PHE	F	-	165,19
Proline	PRO	P	-	115,13
Sérine	SER	S	-	105,09
Thréonine	THR	T	-	119,12
Tryptophane	TRP	W	-	204,23
Tyrosine	TYR	Y	10,1	181,19
Valine	VAL	V	-	117,15

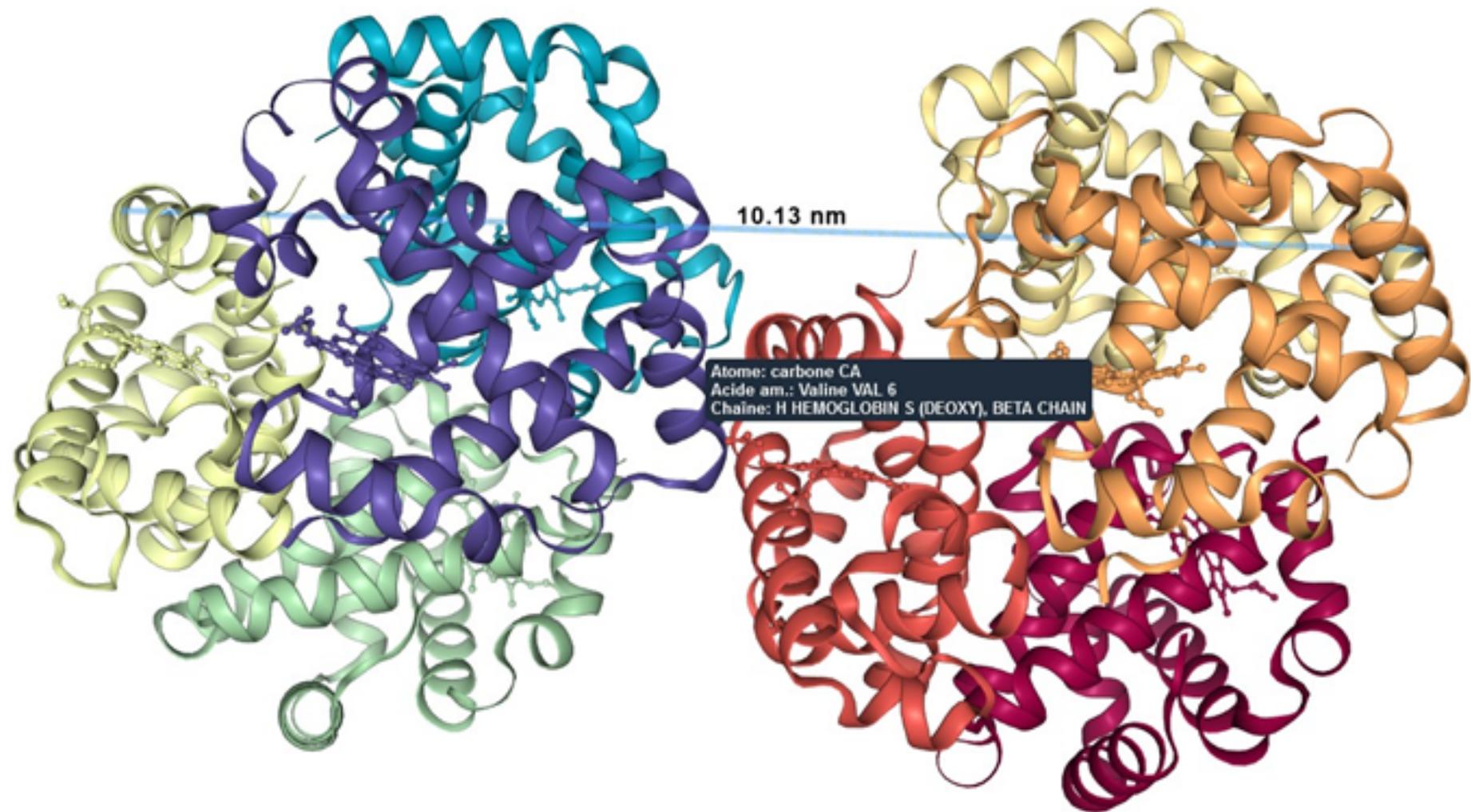
			
			
			
			
			

Valine 6

HBS
(2 chaînes alpha
et 2 chaînes bêta S)

HBS
(2 chaînes alpha
et 2 chaînes bêta S)





LibMol

à propos de Libmol - Conditions générales

< Fichiers Commandes **Séquence** Surface >

Sélectionner à partir des séquences des différentes chaînes

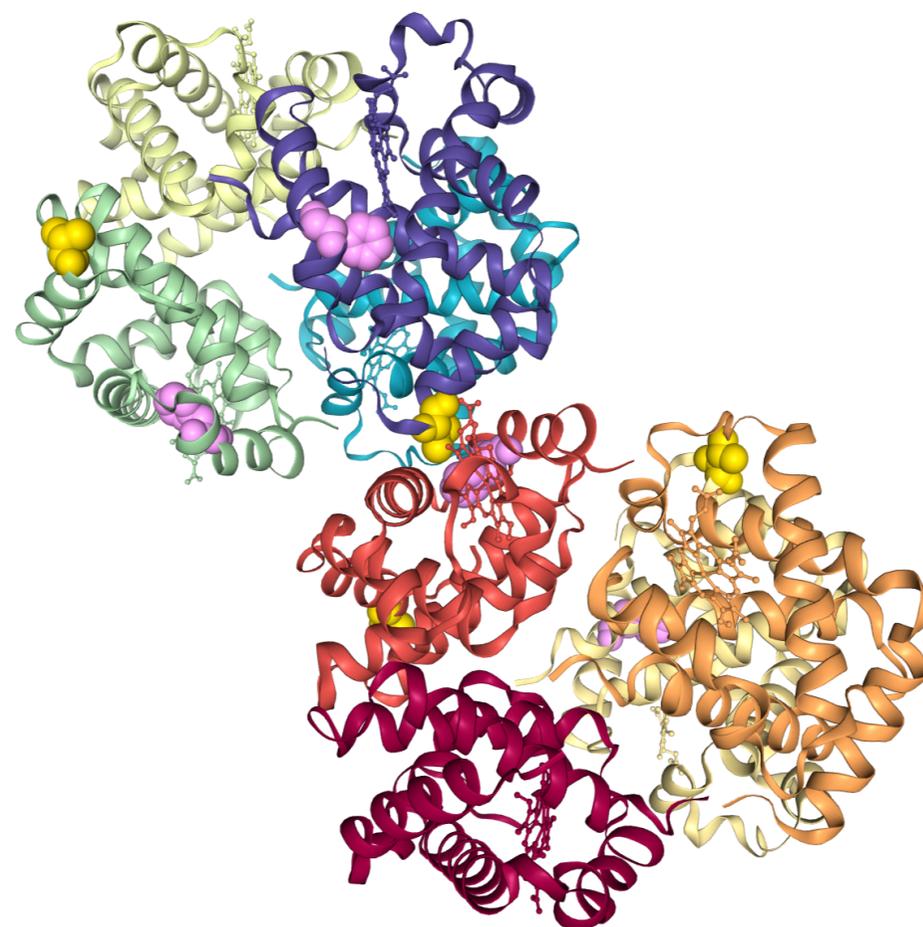
A	B	C	D	E	F	G	H
VAL	ASP	VAL	ASP	VAL	ASP	VAL	ASP
ASP	GLY	ASP	GLY	ASP	GLY	ASP	GLY
ASP	LEU	ASP	LEU	ASP	LEU	ASP	LEU
MET	ALA	MET	ALA	MET	ALA	MET	ALA
PRO	HIS	PRO	HIS	PRO	HIS	PRO	HIS
ASN	LEU	ASN	LEU	ASN	LEU	ASN	LEU
ALA	ASP	ALA	ASP	ALA	ASP	ALA	ASP
LEU	ASN	LEU	ASN	LEU	ASN	LEU	ASN
SER	LEU	SER	LEU	SER	LEU	SER	LEU
ALA	LYS	ALA	LYS	ALA	LYS	ALA	LYS
LEU	GLY	LEU	GLY	LEU	GLY	LEU	GLY
SER	THR	SER	THR	SER	THR	SER	THR
ASP	PHE	ASP	PHE	ASP	PHE	ASP	PHE
LEU	ALA	LEU	ALA	LEU	ALA	LEU	ALA
HIS	THR	HIS	THR	HIS	THR	HIS	THR
ALA	LEU	ALA	LEU	ALA	LEU	ALA	LEU
HIS	SER	HIS	SER	HIS	SER	HIS	SER

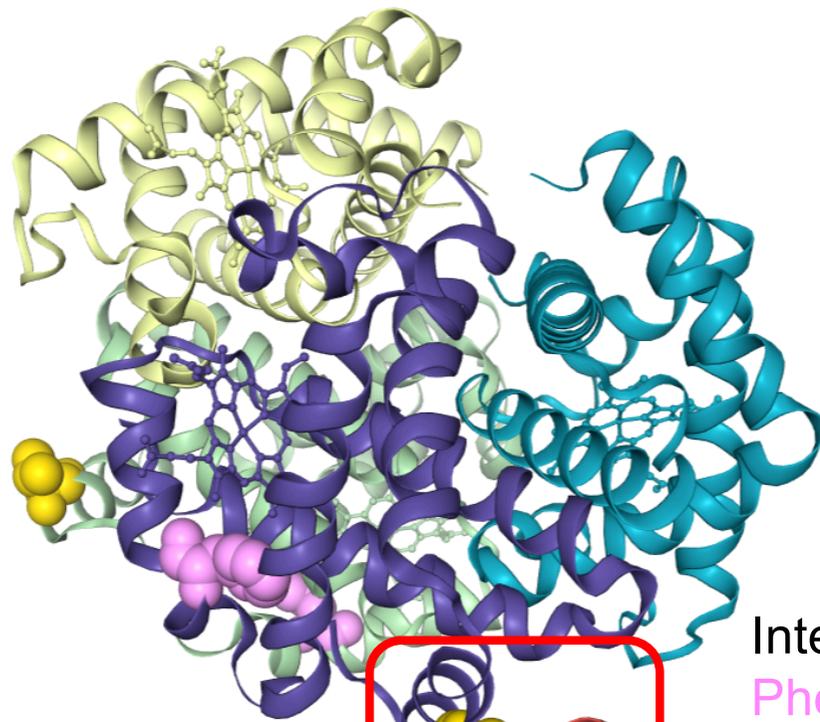
Tout Aucun Inverser

Sphères Boules et bâtonnets Masquer/Montrer

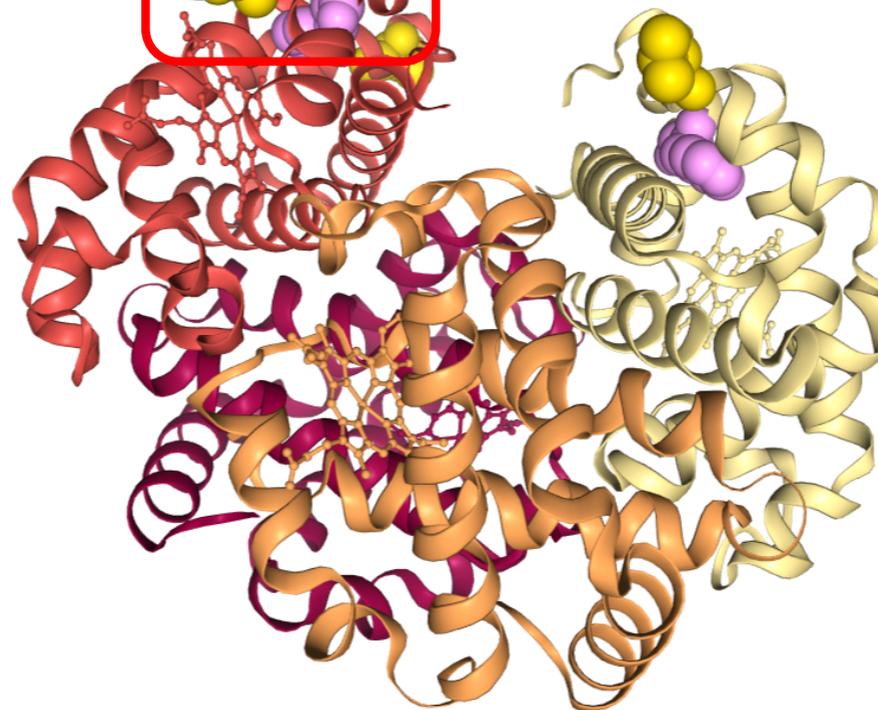


2HBS Dimère d'hémoglobine drépanocytaire désoxygénée





Interaction Valine 6
Phenylalanine 85



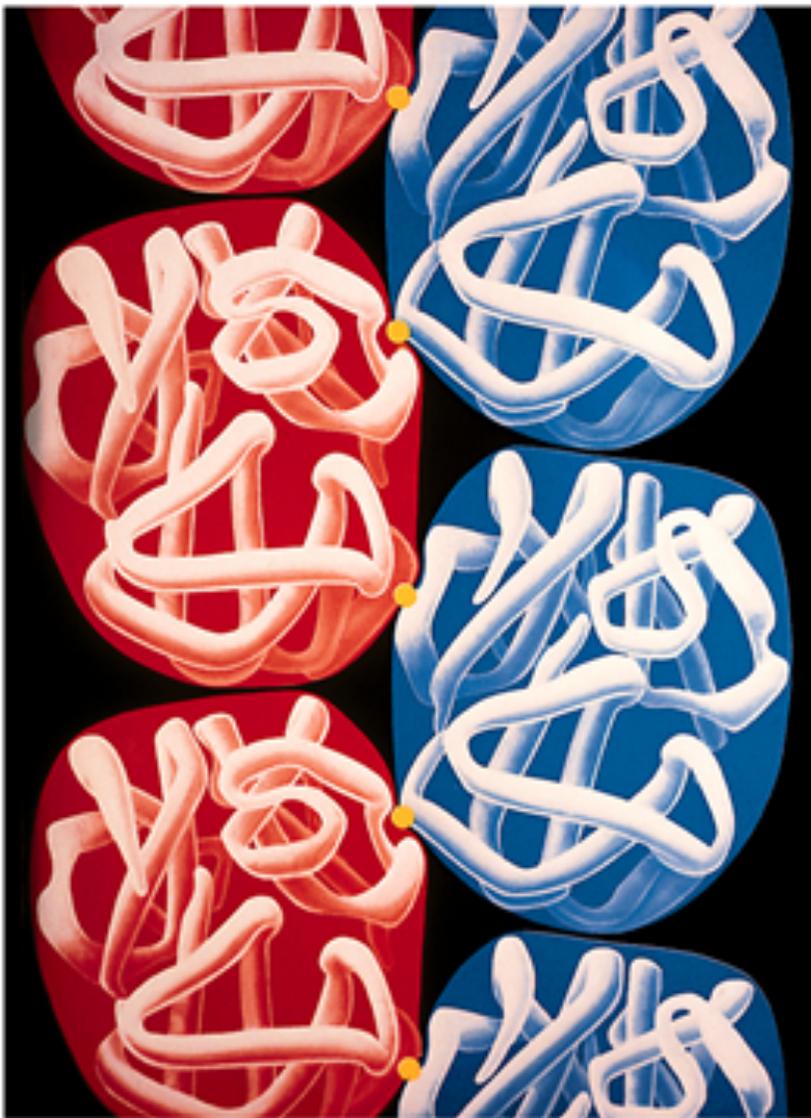
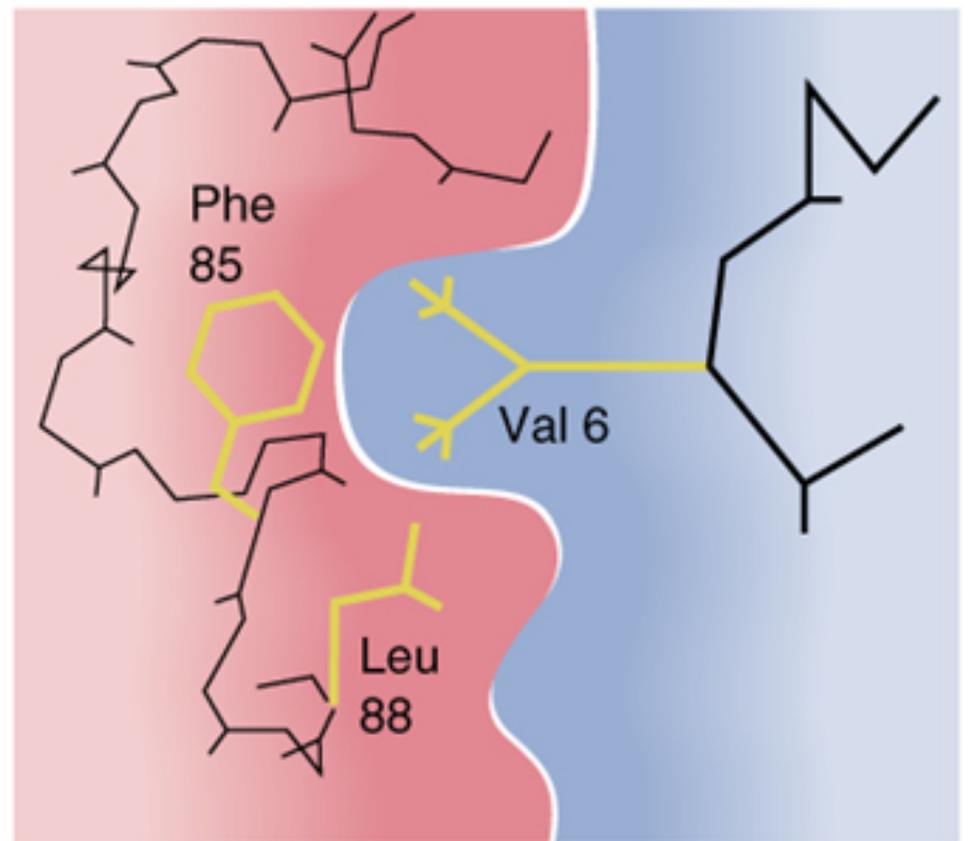
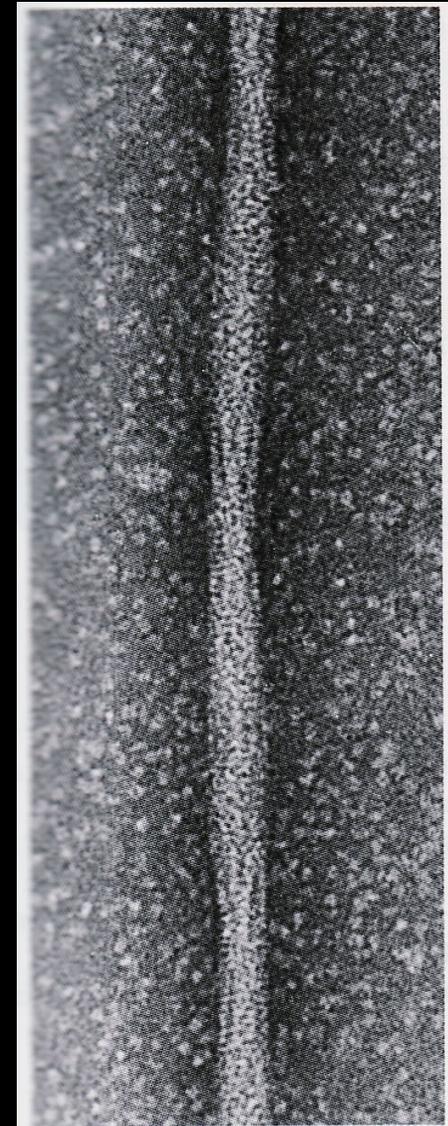
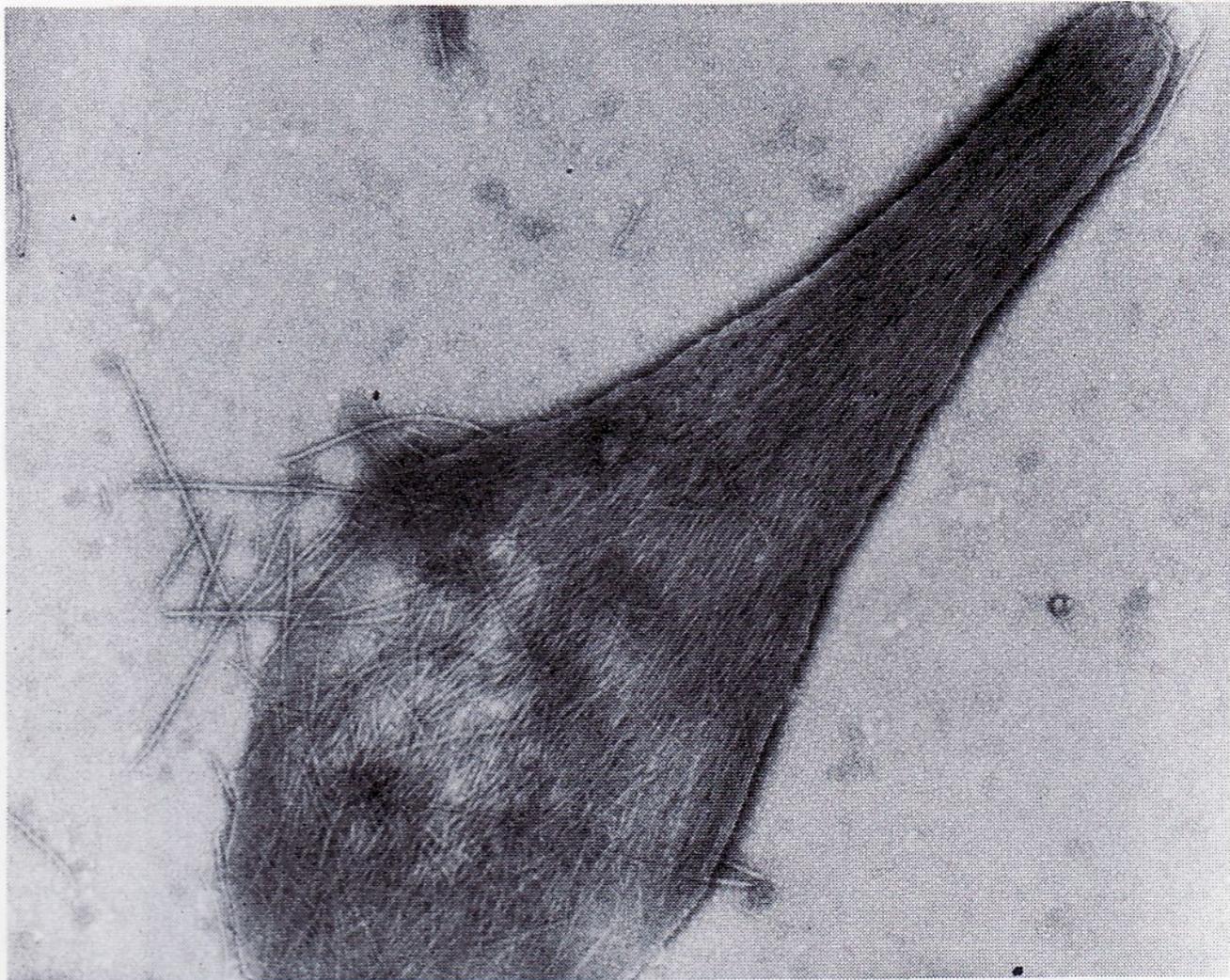


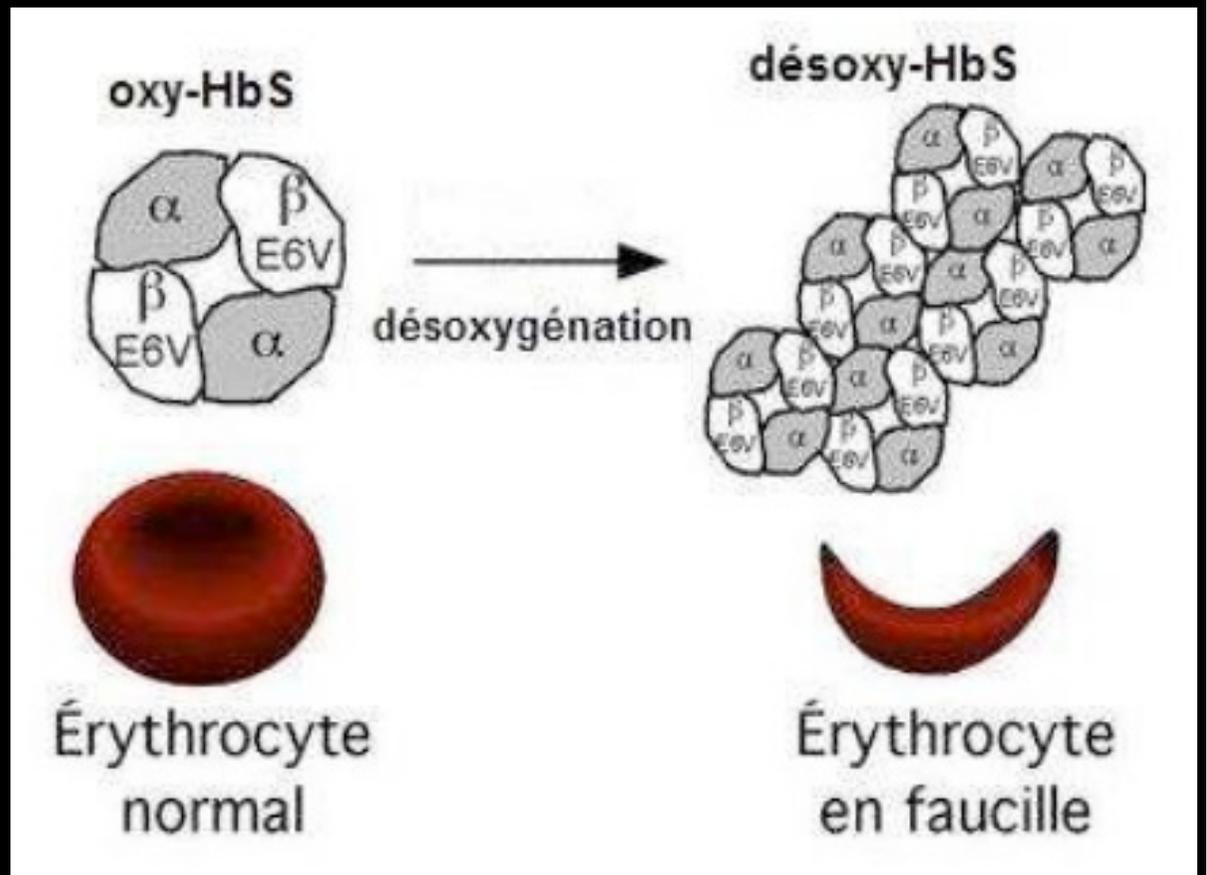
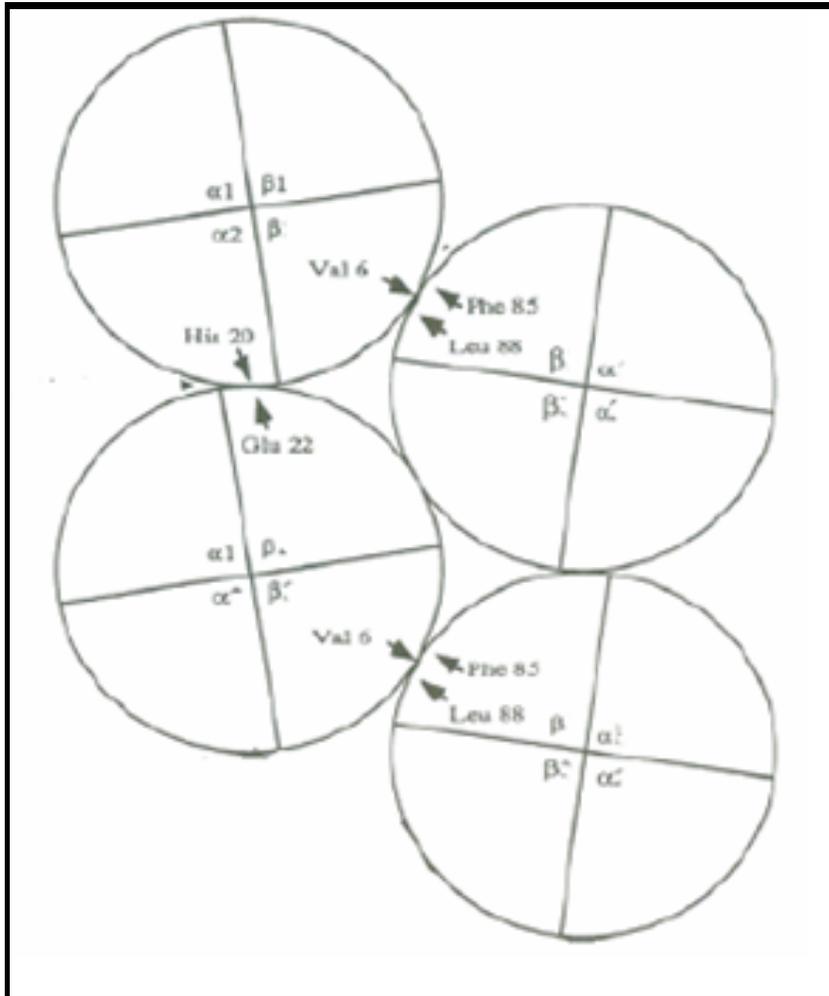
Figure copyrighted © by Irving Geis.

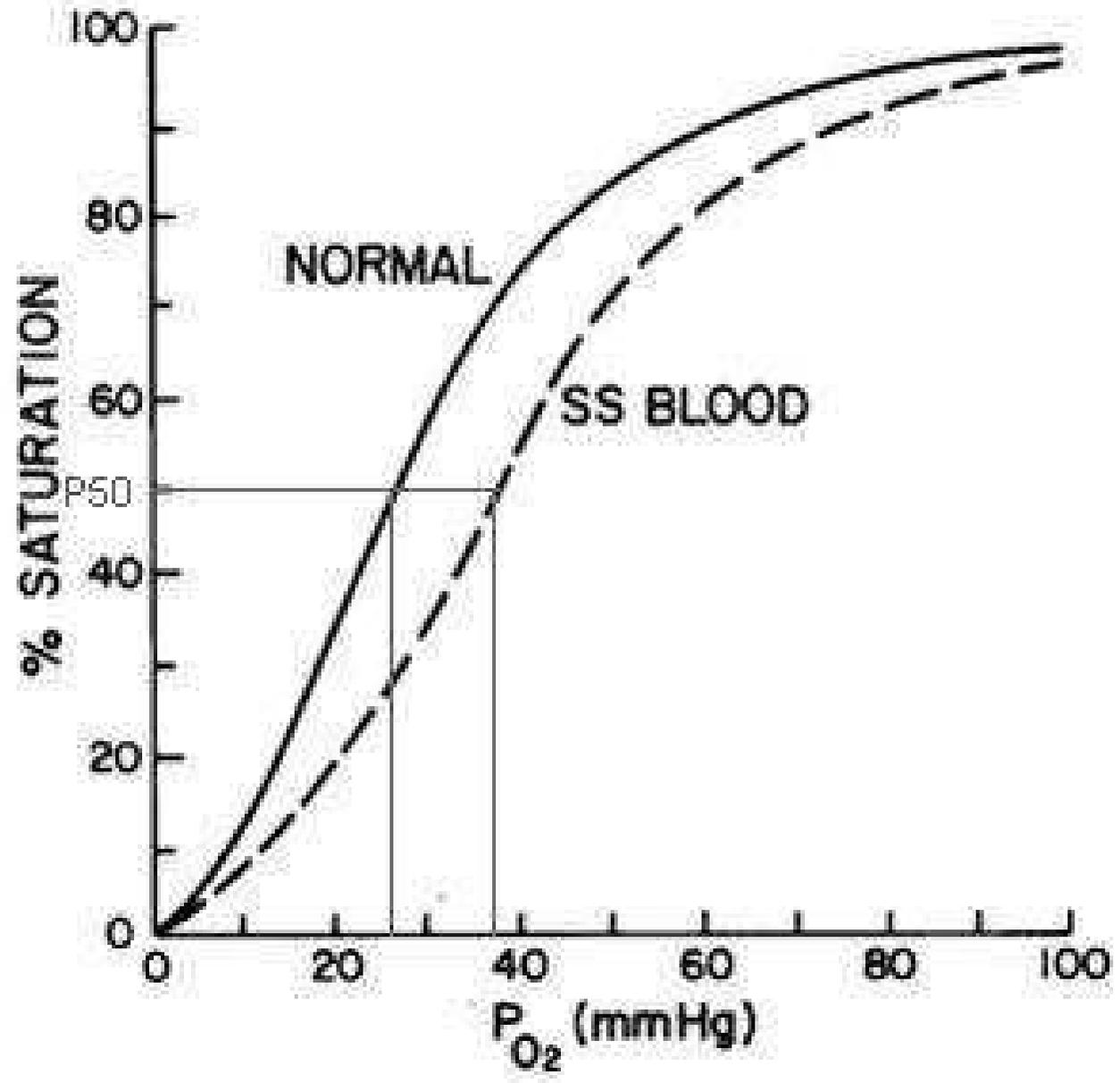


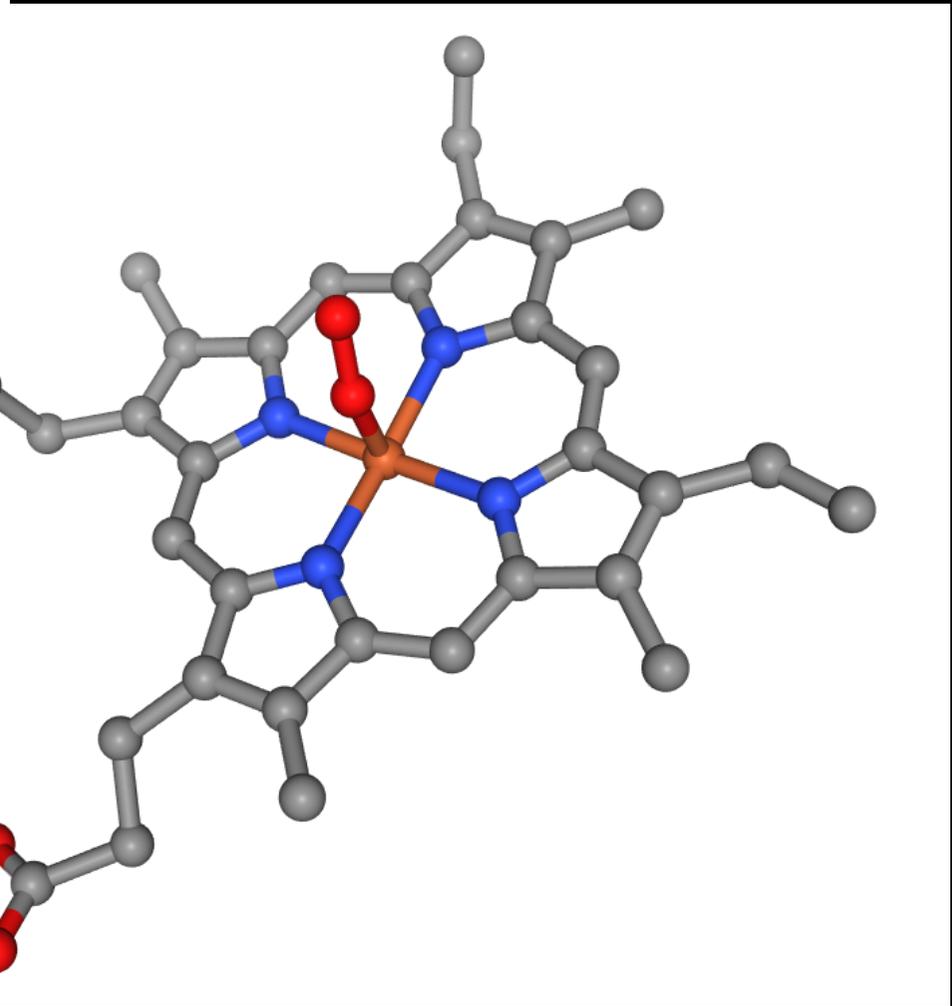
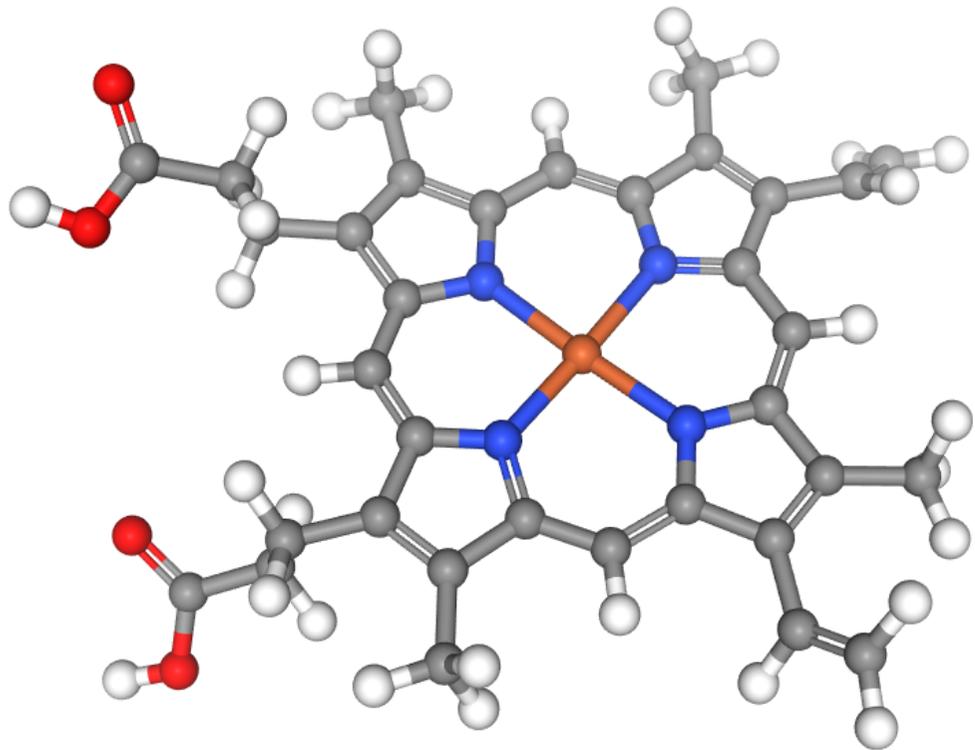
(b)

Figure copyrighted by Irving Geis.
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

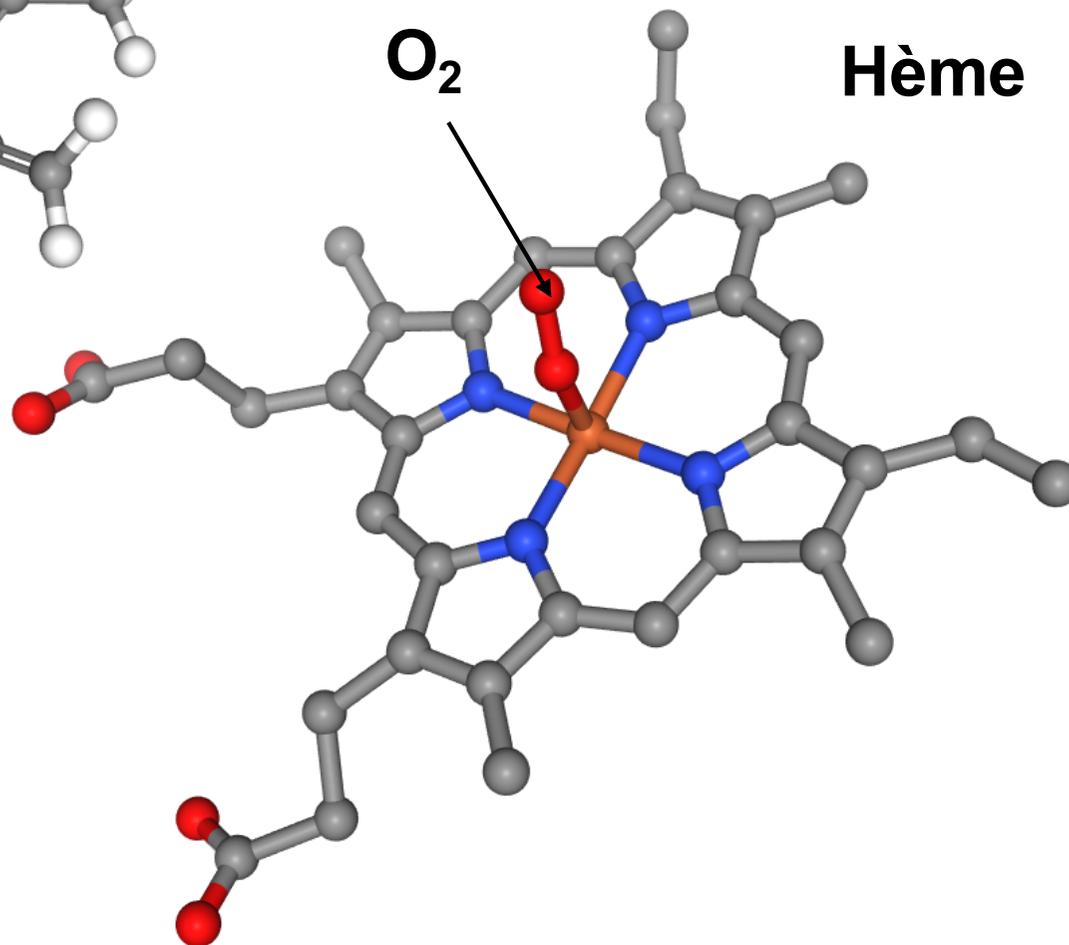
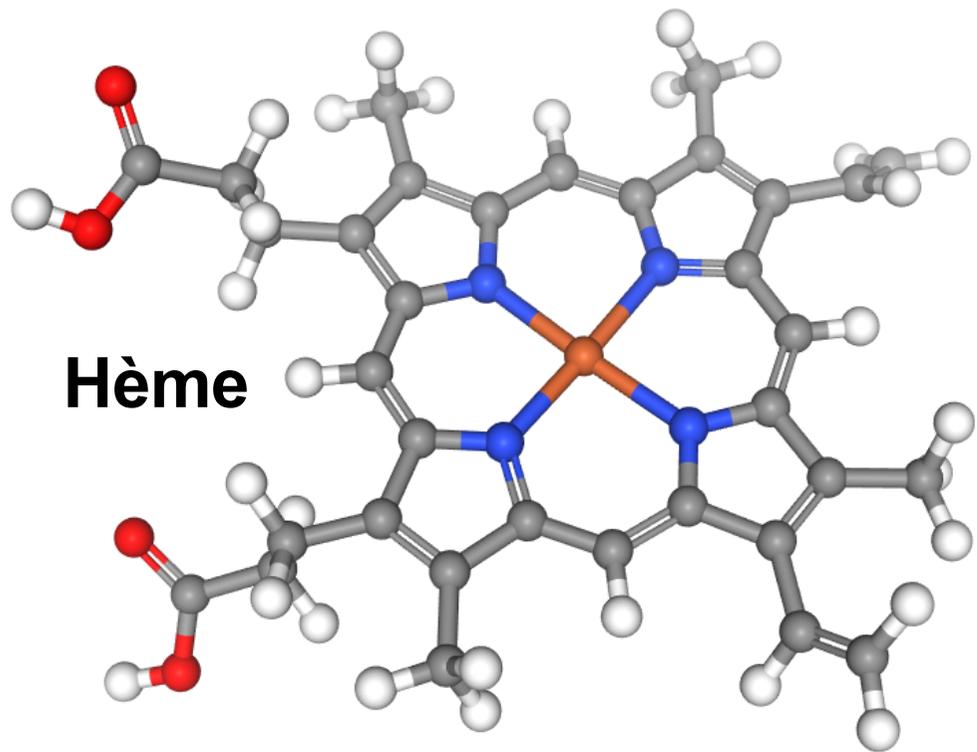




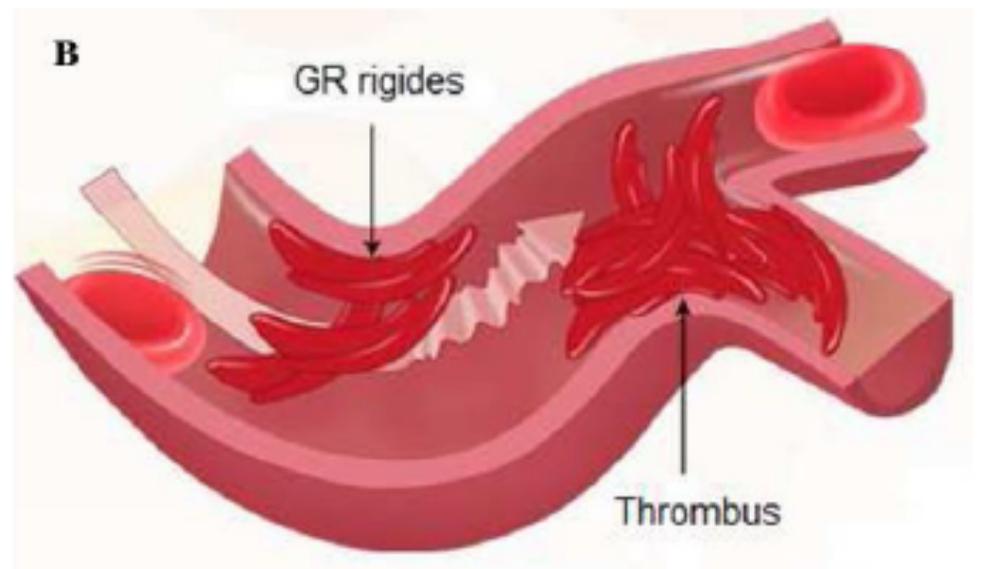
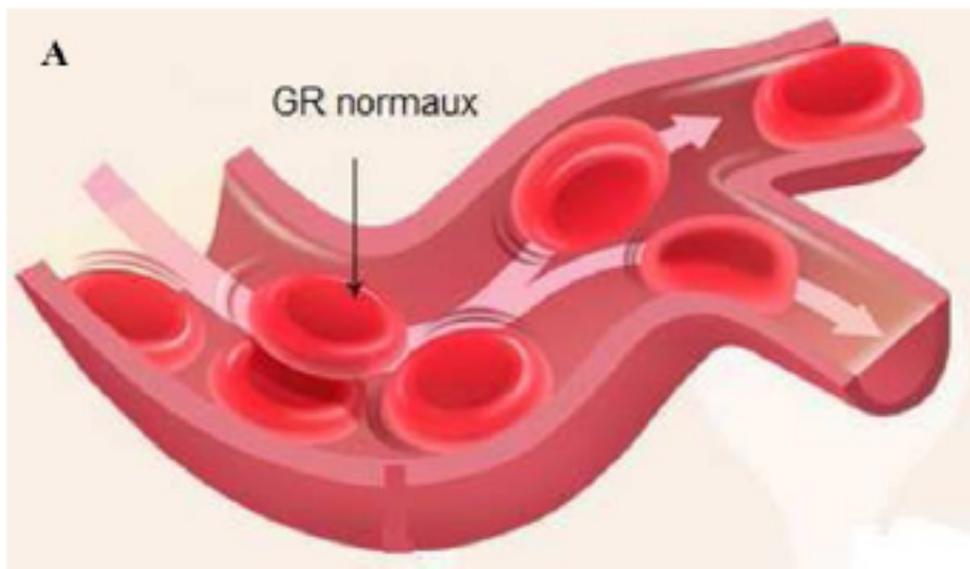


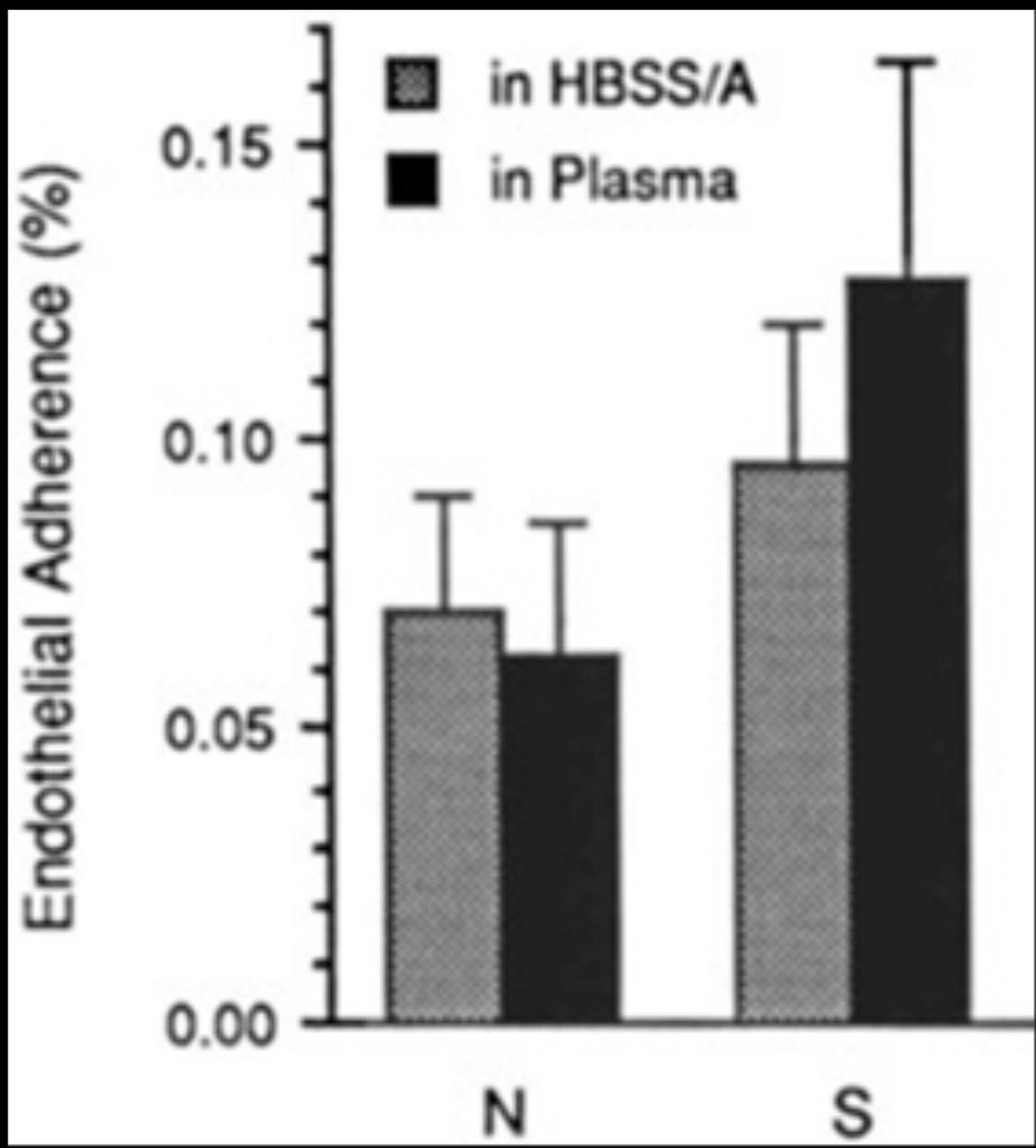


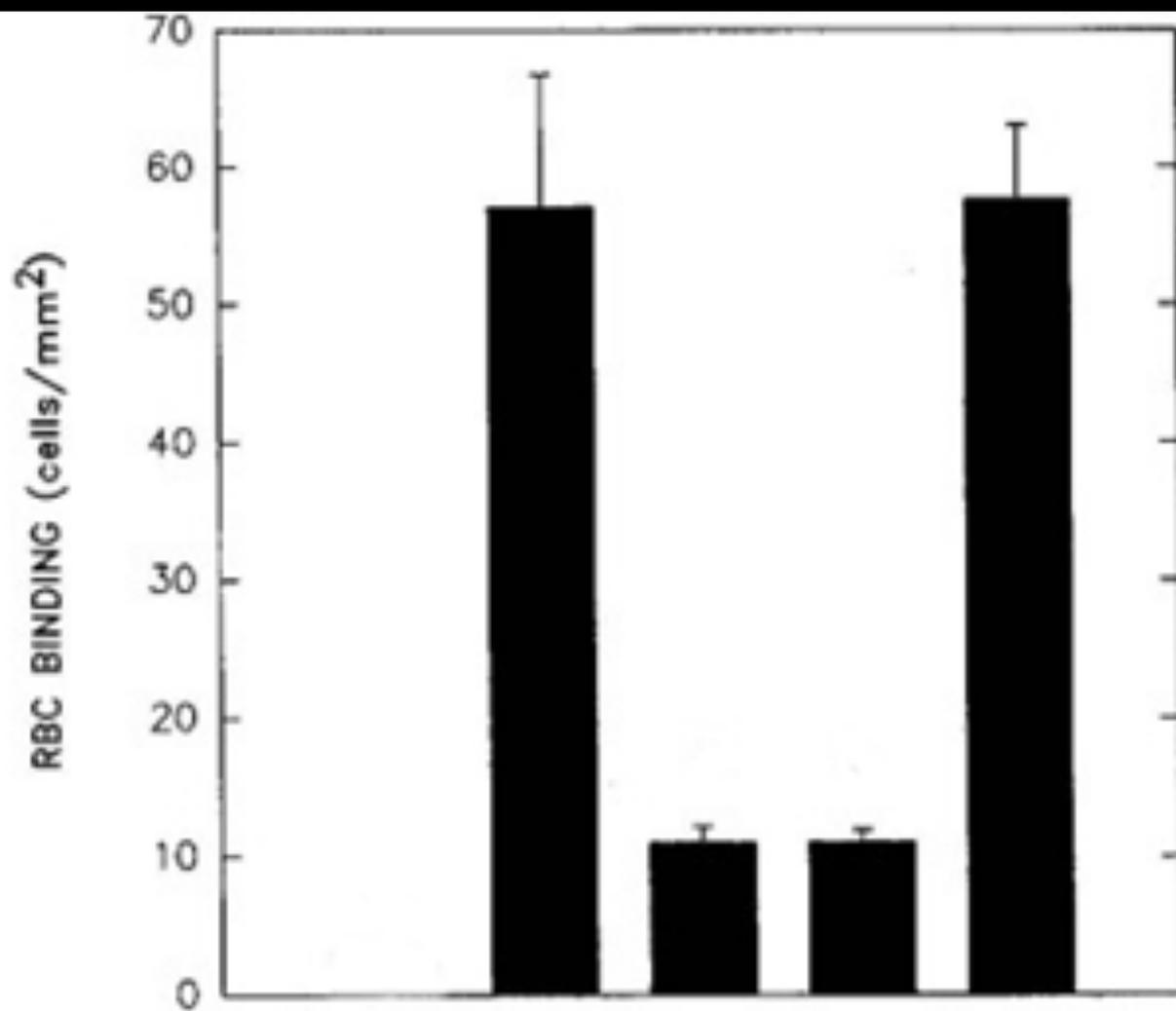
Symbole	Code couleur	Atome
C		Carbone
H		Hydrogène
O		Oxygène
N		Azote
S		Soufre
Fe		Fer



Symbole	Code couleur	Atome
C		Carbone
H		Hydrogène
O		Oxygène
N		Azote
S		Soufre
Fe		Fer

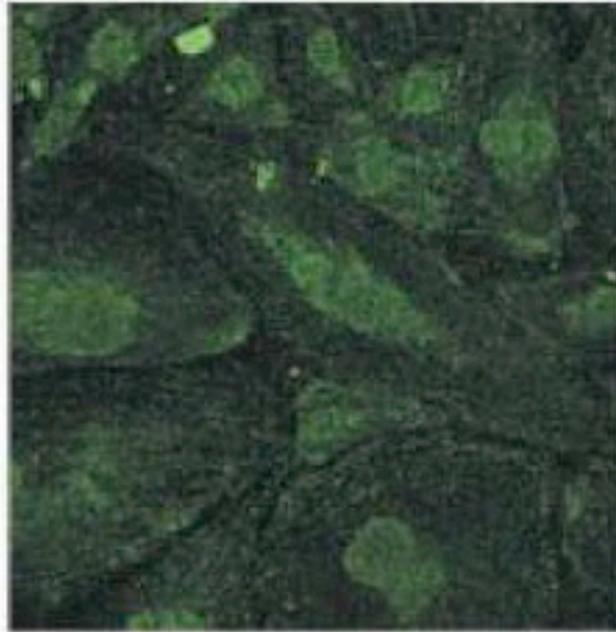




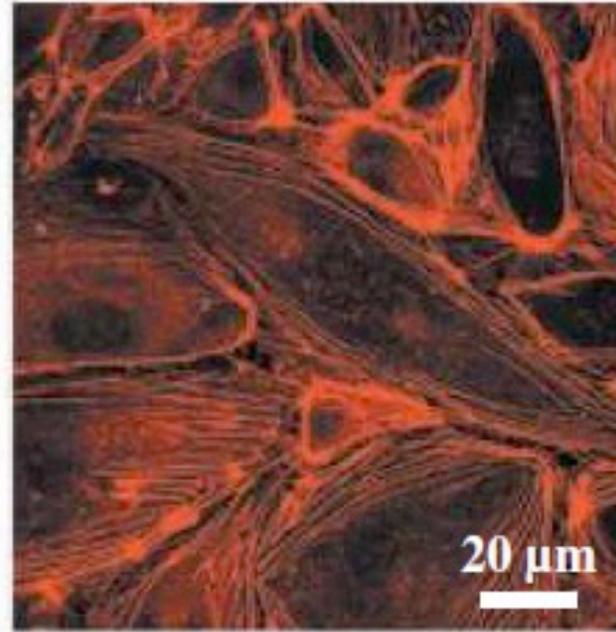


Anti-VCAM-1	+
Anti-α4	+
Anti-ICAM-1	+

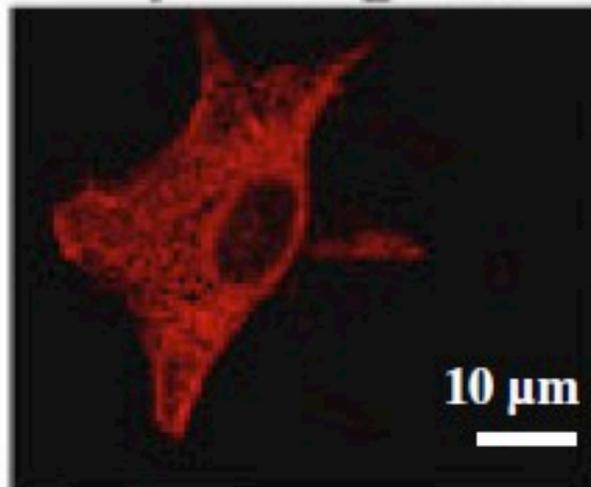
VCAM-1

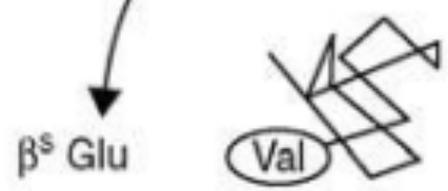
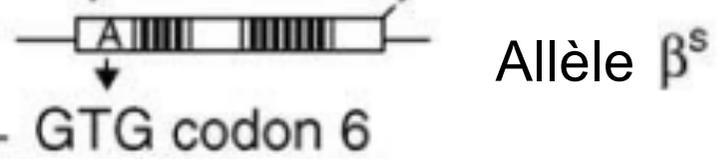
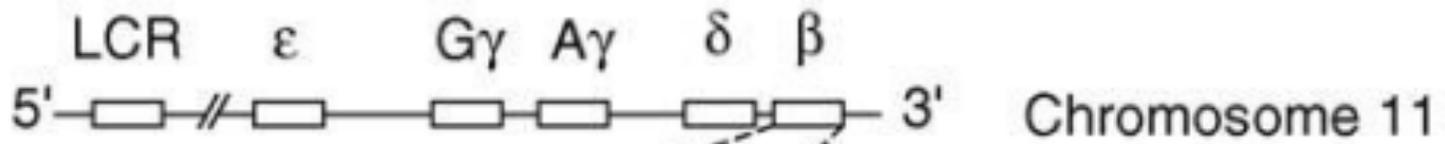


F-Actin

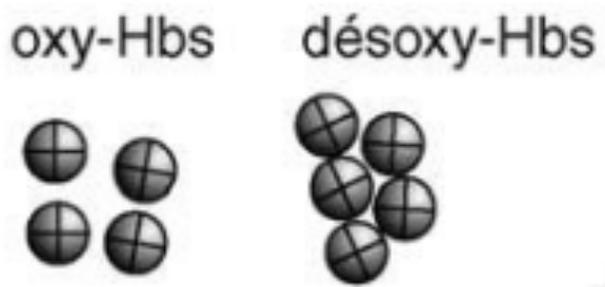


β 1 integrin





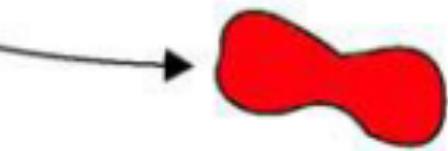
Chaîne de globine β^s



Polymérisation

Vaso-occlusion

Falciformation
déformation
rigidification
fragilisation



Globule rouge



Anémie
hémolytique

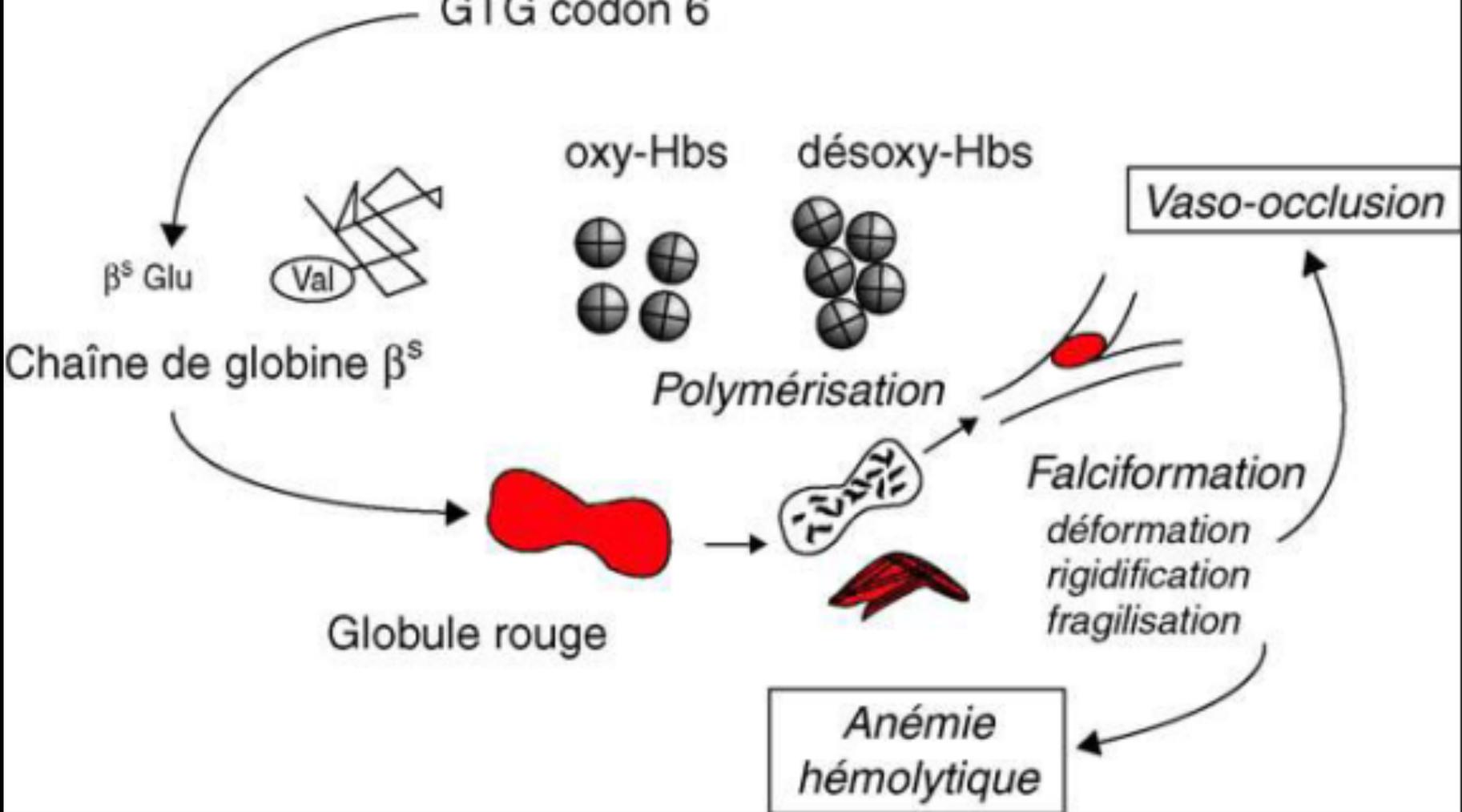
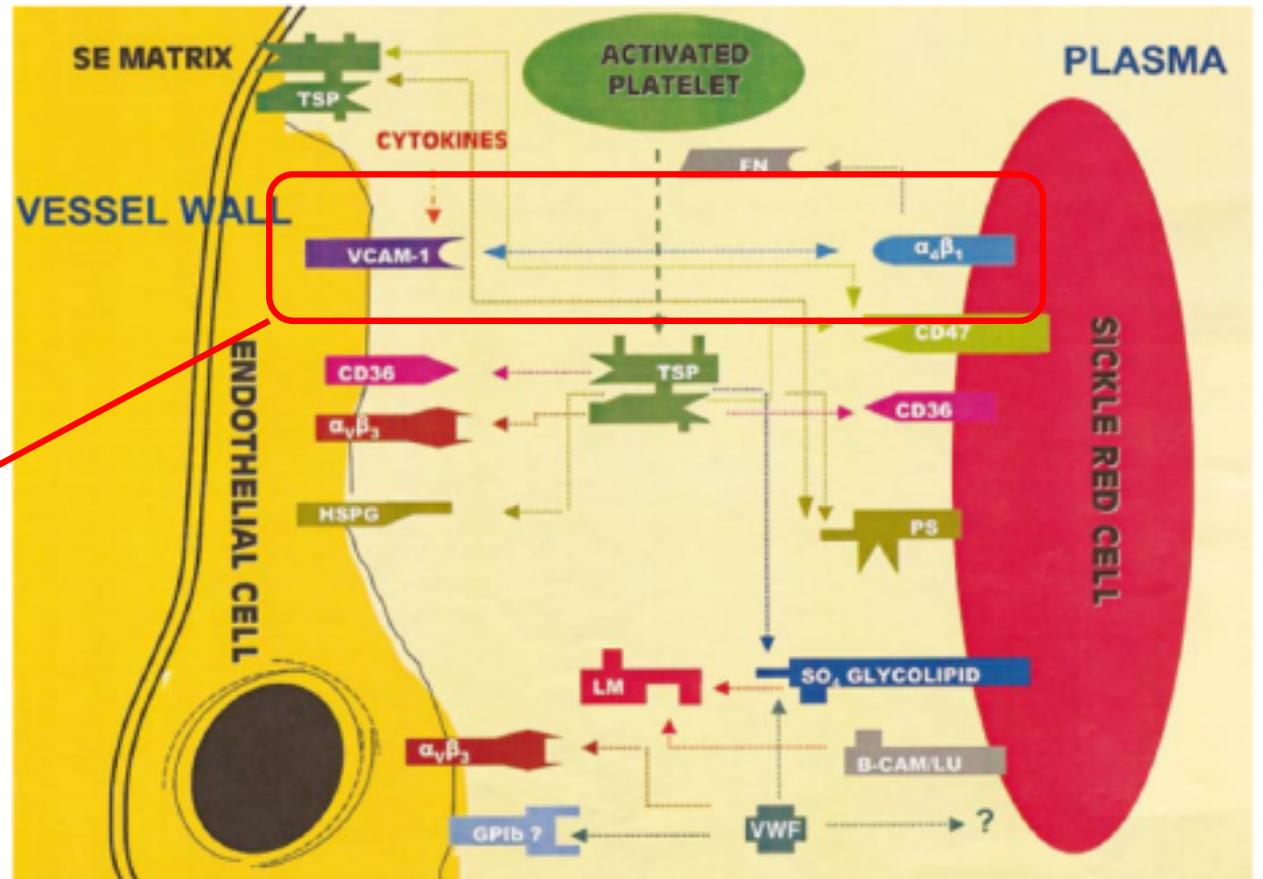
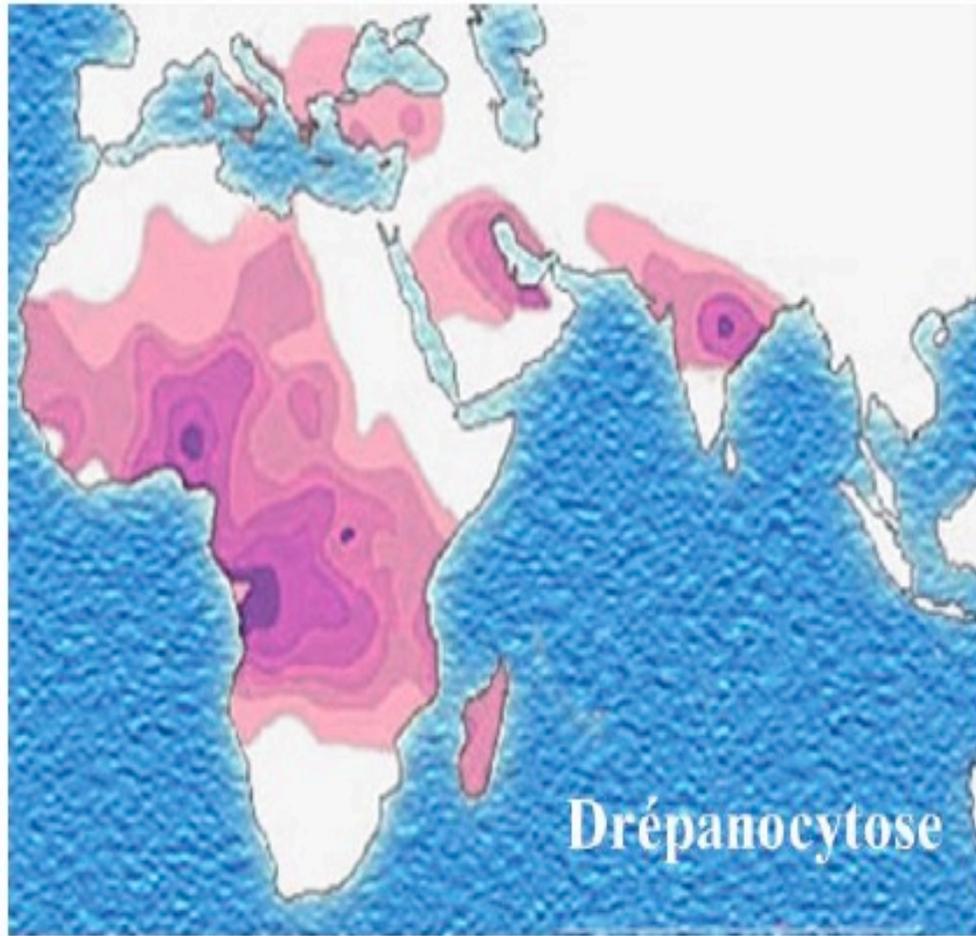


Figure 7. Adhesive interactions between sickle RBCs and endothelium or plasma proteins. PS indicates phosphatidylserine; GP1b, glycoprotein 1b; $\alpha_4\beta_1$, integrin receptor VLA-4; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; $\alpha_v\beta_3$, integrin vitronectin receptor; B-CAM/LU, basal cell adhesion molecule/Lutheran protein; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; SO_4 glycolipid, sulfated glycolipid; TSP, thrombospondin; FN, fibronectin; VWF, von Willebrand factor; LM, laminin; and SE matrix, subendothelial matrix. CD47 is also known as the integrin-associated protein or IAP.



Interaction intégrine-VCAM



APPROCHE HISTORIQUE DE L'IDENTIFICATION DE LA MUTATION À L'ORIGINE DE LA DREPANOCYTOSE

