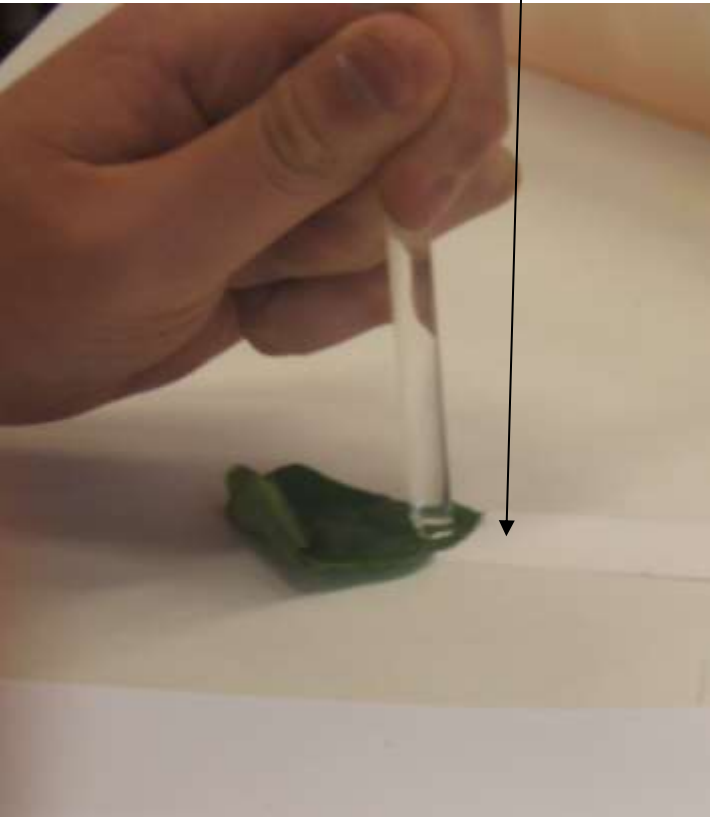


Quelques images du TP électrophorèse, chromatographie

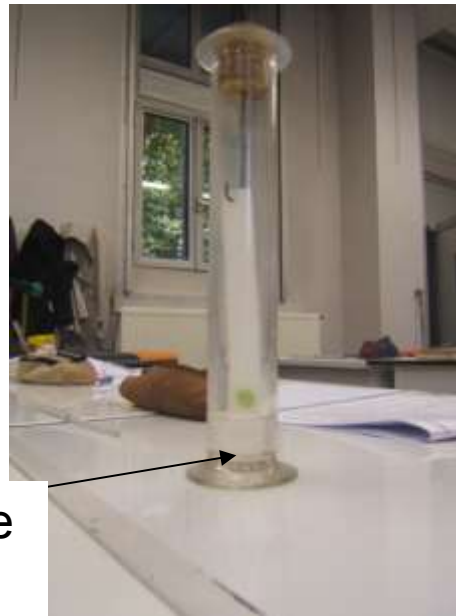


Chromatographie des pigments chlorophylliens

Bandelette de papier Whatmann
Sur laquelle on écrase un morceau de feuille

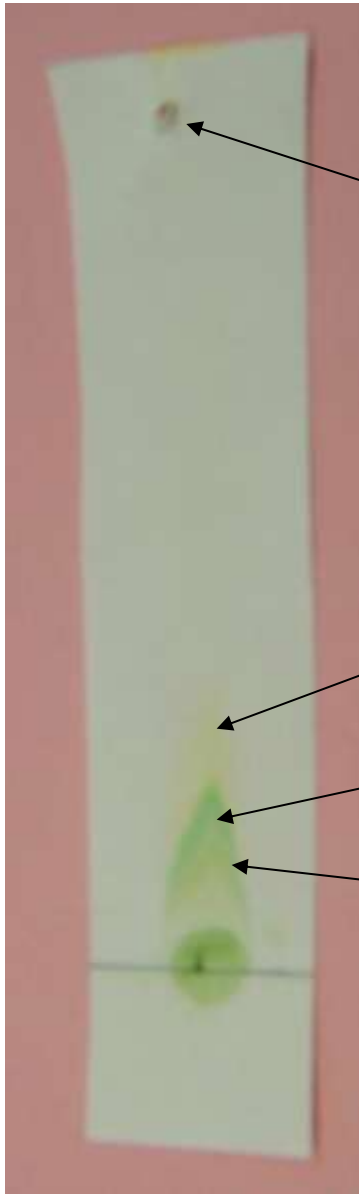


Cache opaque empêchant la photooxydation
des pigments



Fond de l'éprouvette avec solvant mobile
La tache verte ne touche pas le solvant

Résultats après 15 minutes de migration pour l'épinard



Carotènes

Xanthophylles

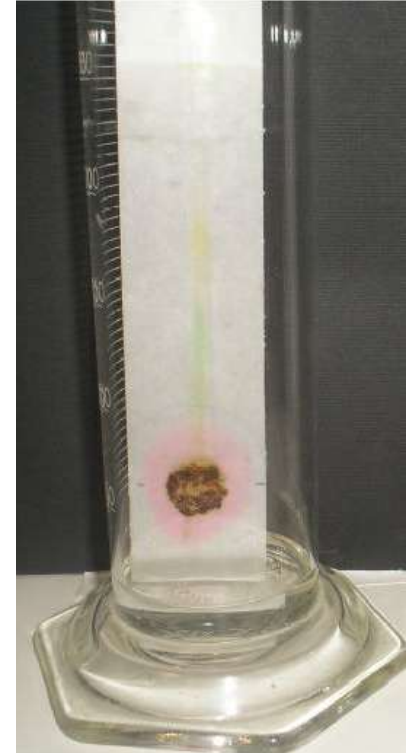
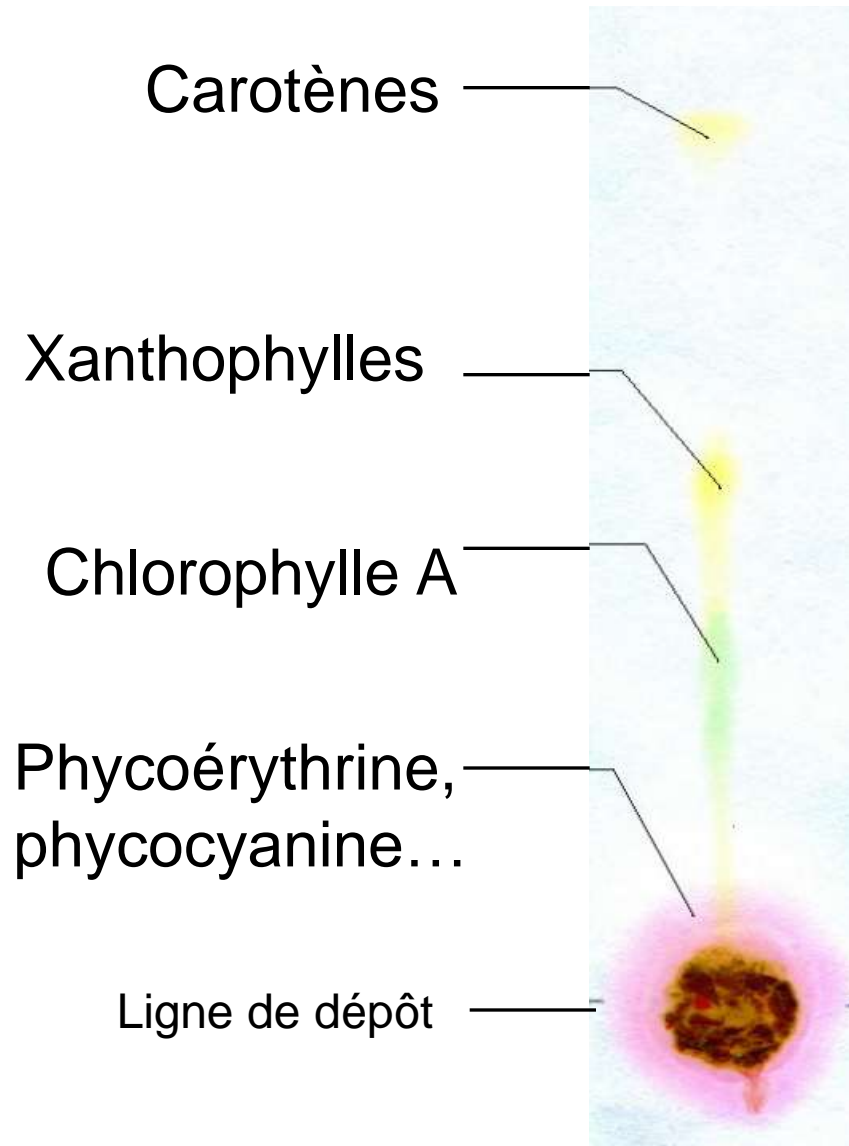
Chlorophylle A

Chlorophylle B

Résultats après 30 minutes de migration pour l'algue rouge



Résultats pour l'épinard

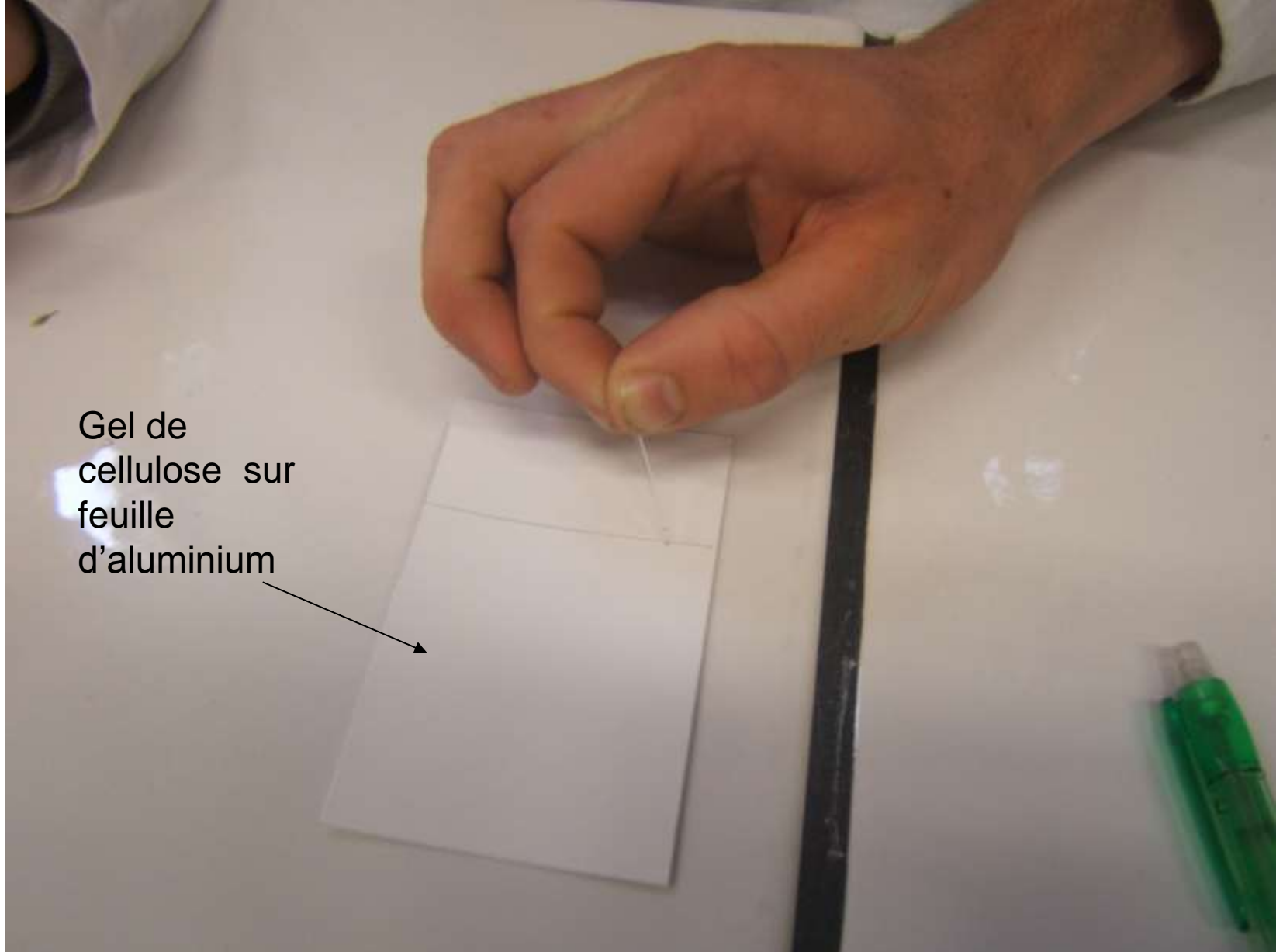


Résultats après 30 minutes de migration pour l'algue rouge avec un autre solvant

Solvant utilisé :
Eau saturée en sel
+ 1/6 éthanol

Ligne de dépôt ———

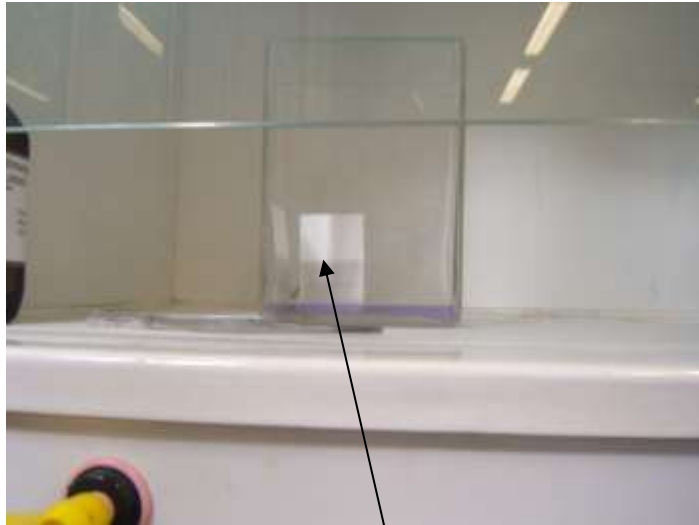




Gel de
cellulose sur
feuille
d'aluminium

Chromatographie des acides aminés: phase de dépôt

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice

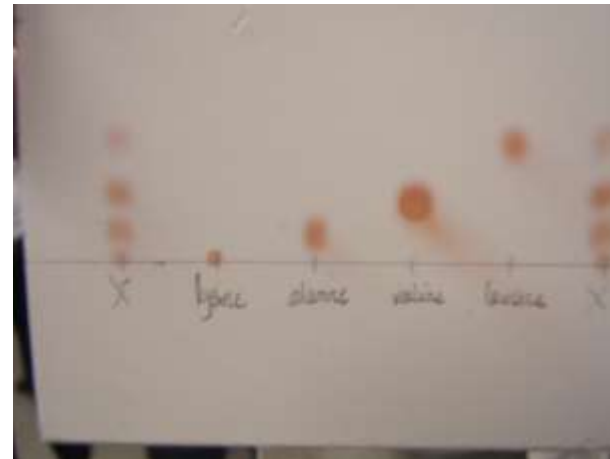


La migration

Front de migration du solvant

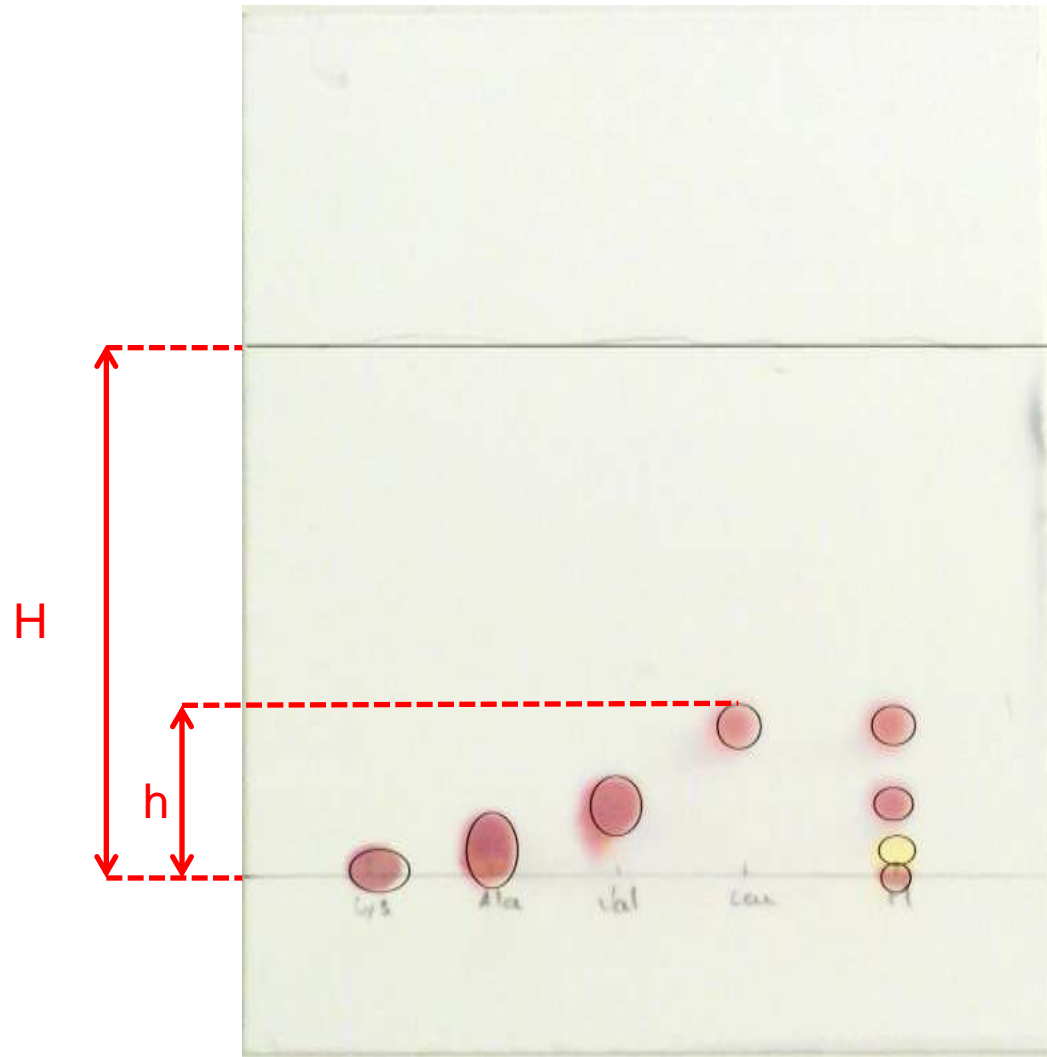


Le séchage
Après bain à la
Ninhydrine



Les tâches des différents acides aminés sont apparues

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice : résultats



Calcul du rapport frontal pour la leucine :

$$R_f = h / H$$

$$R_f = 2,29 / 7,05 \\ = 0,32$$



Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre	Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre
Alanine	ala	A	Leucine	leu	L
Arginine	arg	R	Lysine	lys	K
Asparagine	asn	N	Méthionine	met	M
Acide aspartique	asp	D	Phénylalanine	phe	F
Cystéine	cys	C	Proline	pro	P
Glutamine	gln	Q	Sérine	ser	S
Acide glutamique	glu	E	Thréonine	thr	T
Glycine	gly	G	Tryptophane	trp	W
Histidine	his	H	Tyrosine	tyr	Y
Isoleucine	ile	I	Valine	val	V

**Chromatographie sur gel de silice
de dix-neufs acides aminés protéinogènes
H A K M C I V F D S G P R E N Y Q W T**

Résultat d'une chromatographie de sucres sur gel de silice

G : glucose

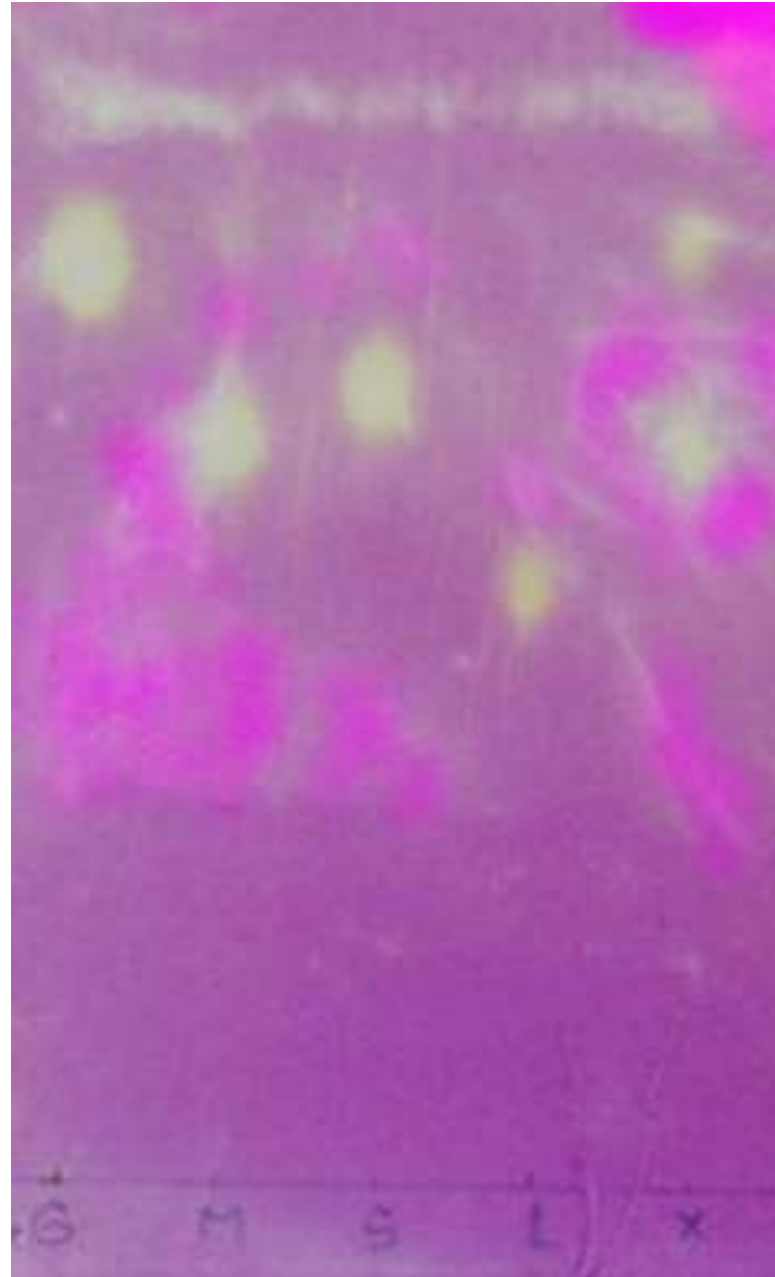
M : maltose

S : saccharose

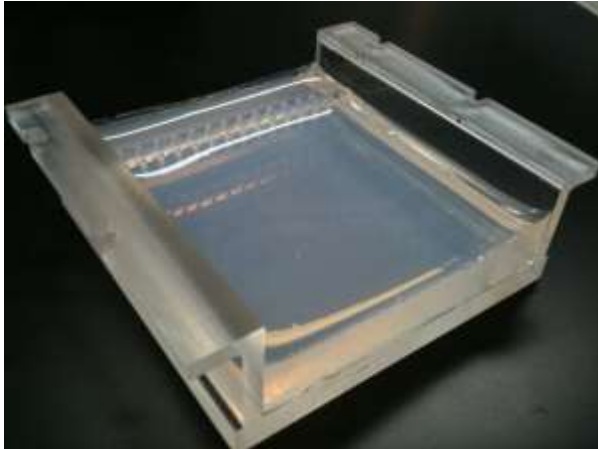
L : lactose

X : mélange à identifier

Chaque tache jaune matérialise un sucre : elle correspond à la réduction du permanganate par une fonction alcool des sucres

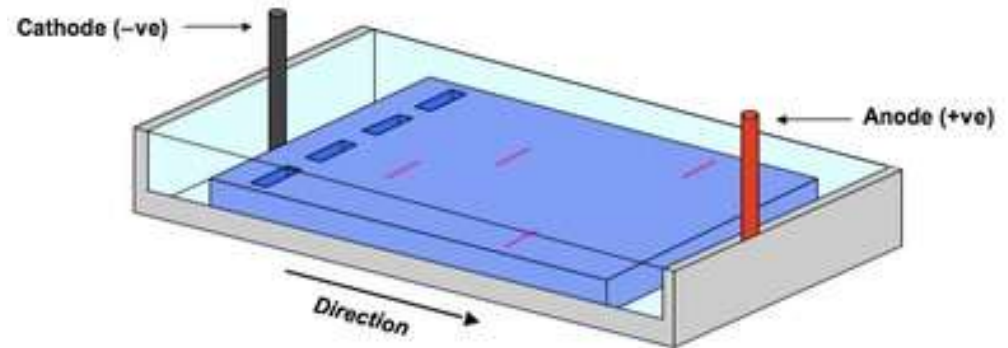


Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : dispositif expérimental



A gauche :
le support = gel
d'agarose

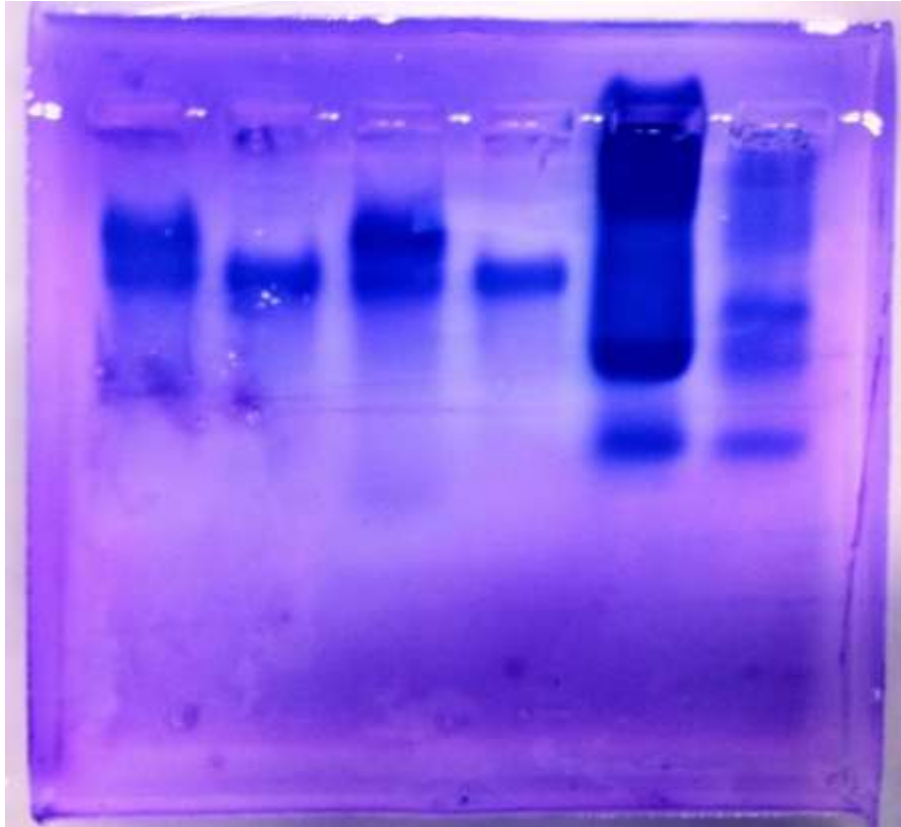
A droite : réalisation
des dépôts dans les
puits



Le générateur permet d'appliquer une tension aux bornes de la plaque d'agarose.
Les protéines chargées - (en raison du tampon utilisé) migrent vers l'anode chargée +.

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : résultats

A B C D E F



A et C : glucose oxydase non dénaturée

→ *deux bandes*

B et D : glucose oxydase dénaturée

→ *une seule bande*

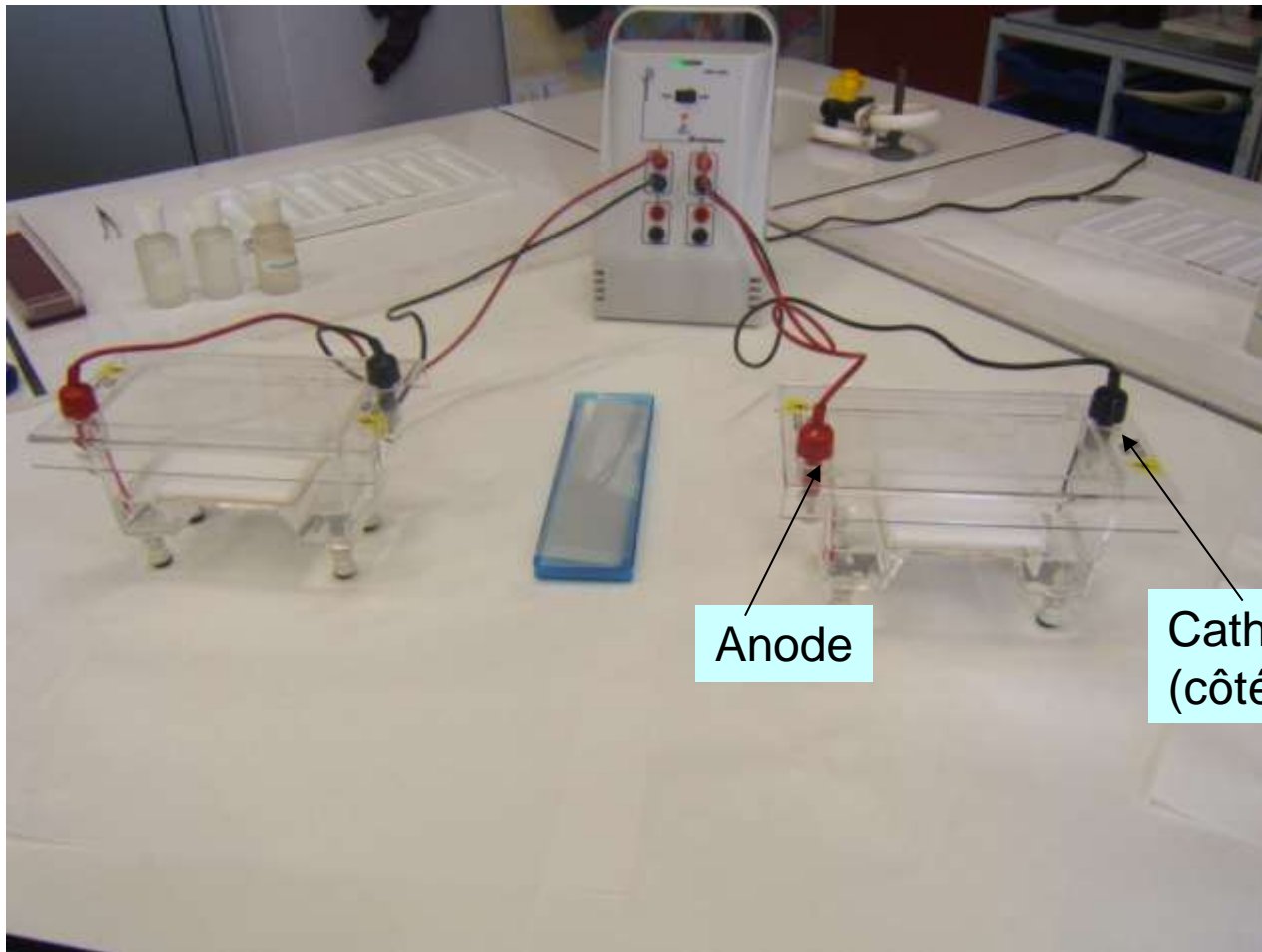
Ccl : protéine à structure quaternaire, avec sous-unités de même masse.

La 2^e bande obtenue en conditions non dénaturantes est un « artefact » (protéine partiellement dénaturée, bien qu'il n'y ait pas eu de traitement dénaturant)

E : sérum de cheval non dénaturé

F : sérum de cheval dénaturé

Electrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose



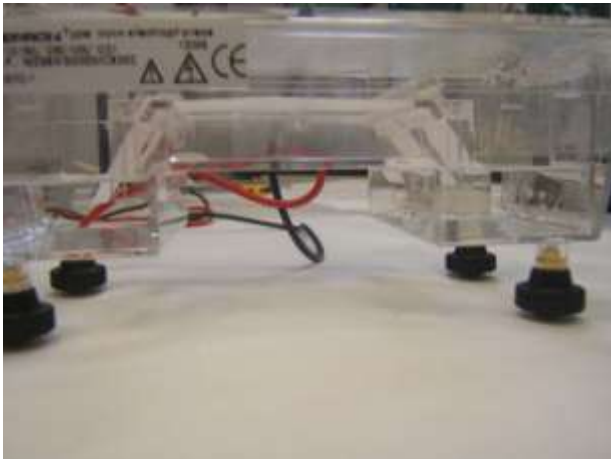
Anode

Cathode
(côté dépôt)

Electrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose



Positionnement des bandes dans la cuve après le dépôt

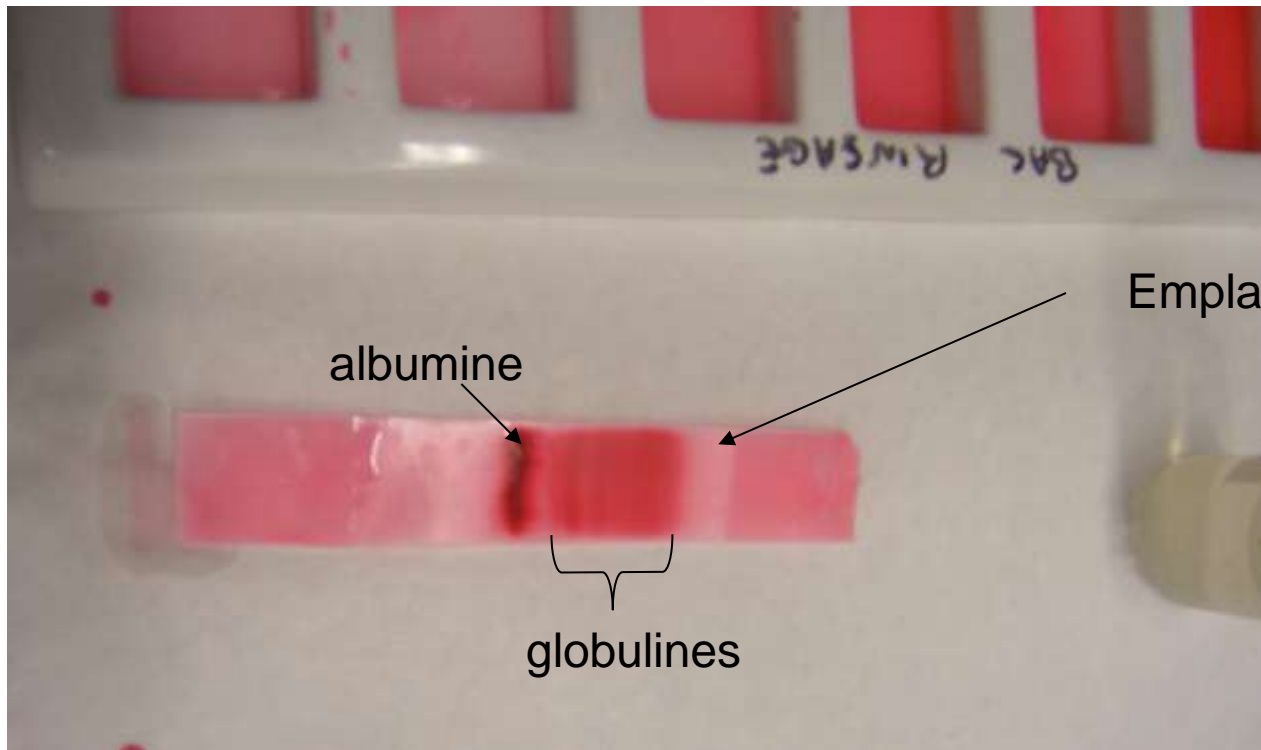


**Migration dans un champ électrique
Les bandes trempent dans le tampon véronal**



Révélation: bains successifs dans l'acide acétique après la coloration au rouge Ponceau

Résultats pour l'électrophorèse des protéines sériques



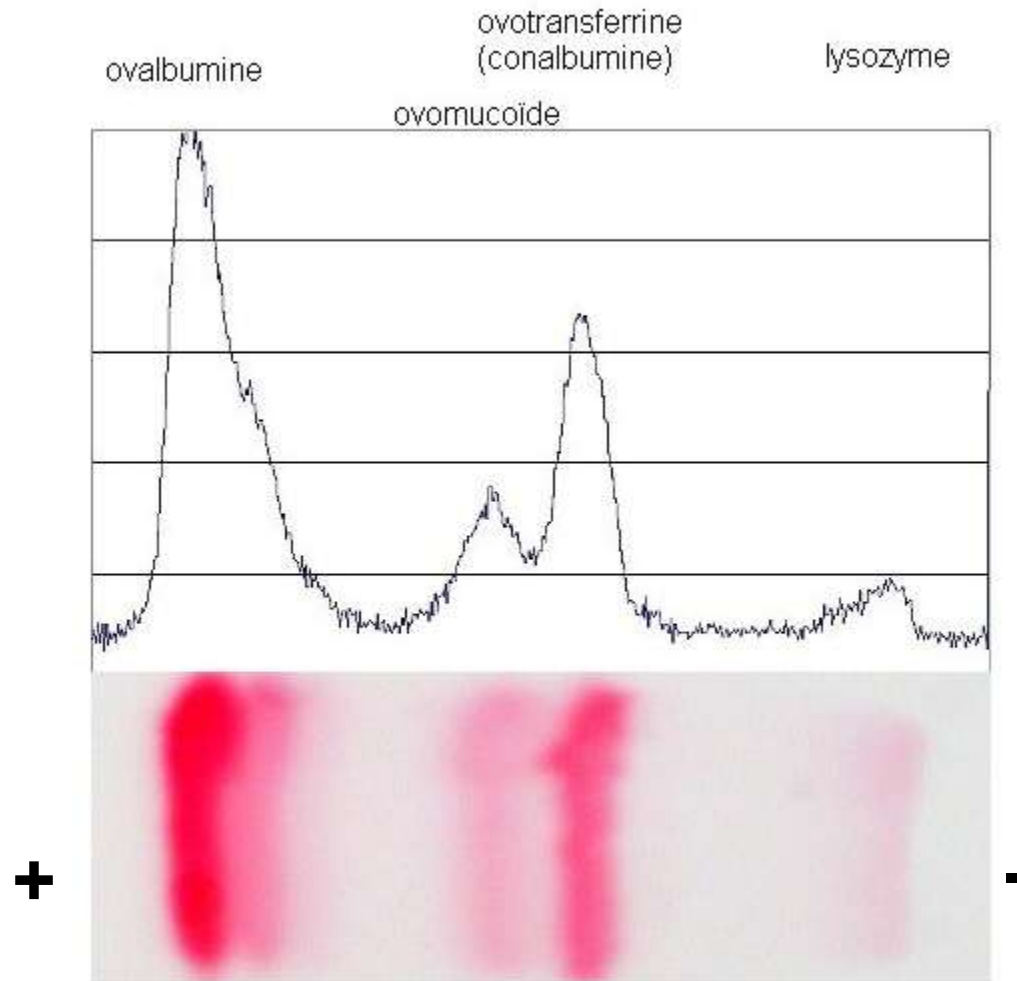
Résultat après révélation

Résultats pour l'électrophorèse des protéines du blanc d'œuf de poule

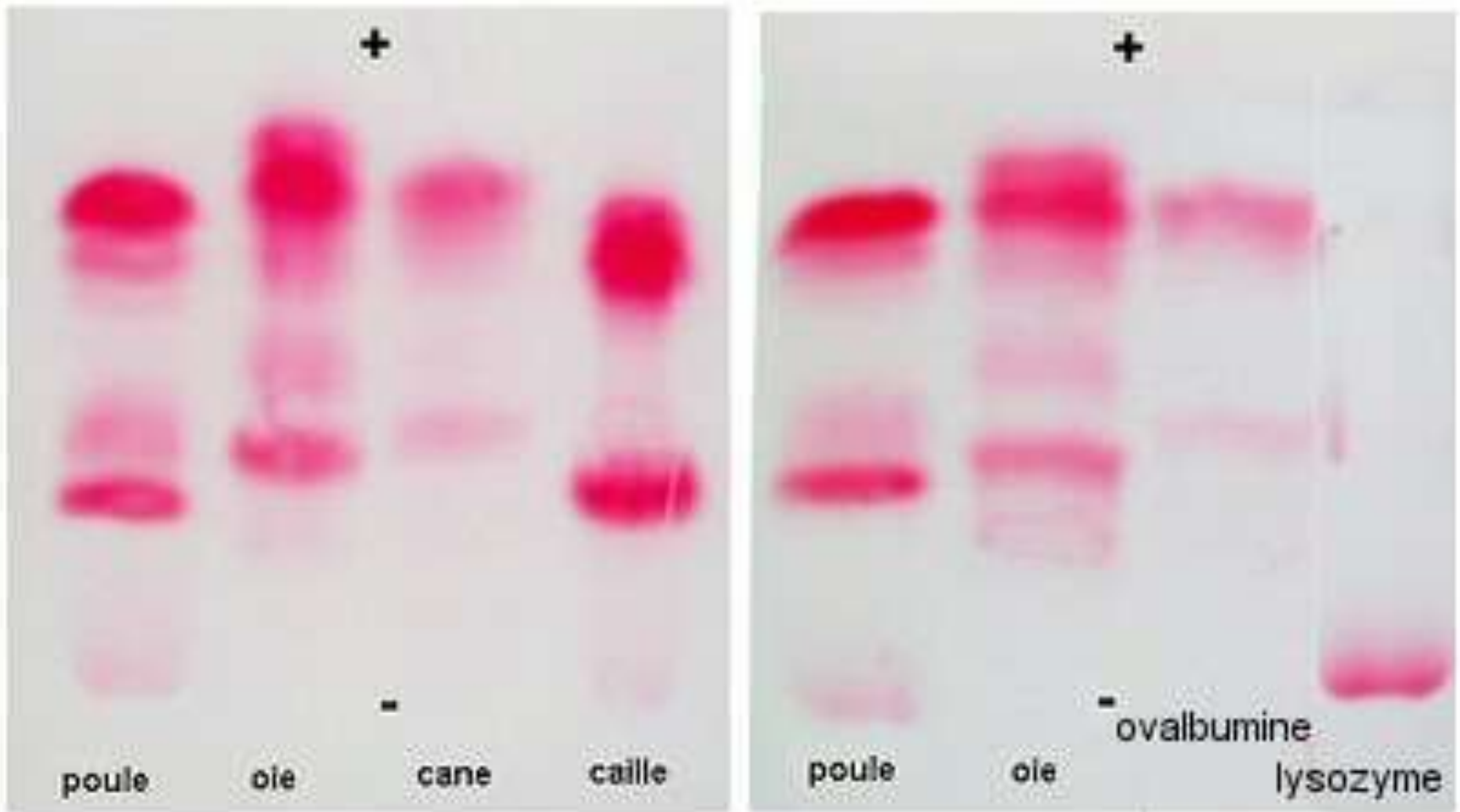
+ Ovalbumine Ovomucoïde Lysozyme -
Ovotransférine



Emplacement du dépôt



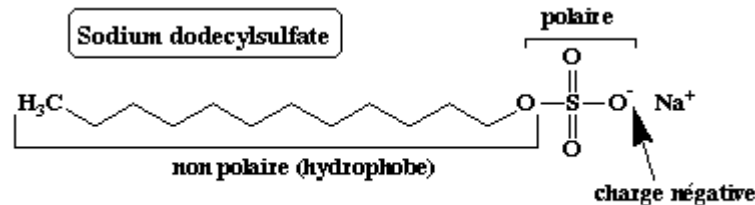
Résultats d'une électrophorèse des protéines du blanc d'œuf de poule sur bande d'acétate de cellulose et profil densitométrique correspondant obtenu avec un logiciel de traitement d'images numériques.



Séparation électrophorétique sur acétate de cellulose des protéines du blanc d'œuf d'espèces différentes d'oiseaux.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (non réalisée en TP)

Technique utilisant un gel de polyacrylamide fortement réticulé à travers lequel les protéines migrent. La taille des pores du gel peut-être ajustée de façon à ce qu'elle soit assez petite pour retarder la migration des molécules protéiques voulues. Les protéines sont dans une solution contenant un détergent puissant, chargé négativement : le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate).



E. Jaspard (2006)

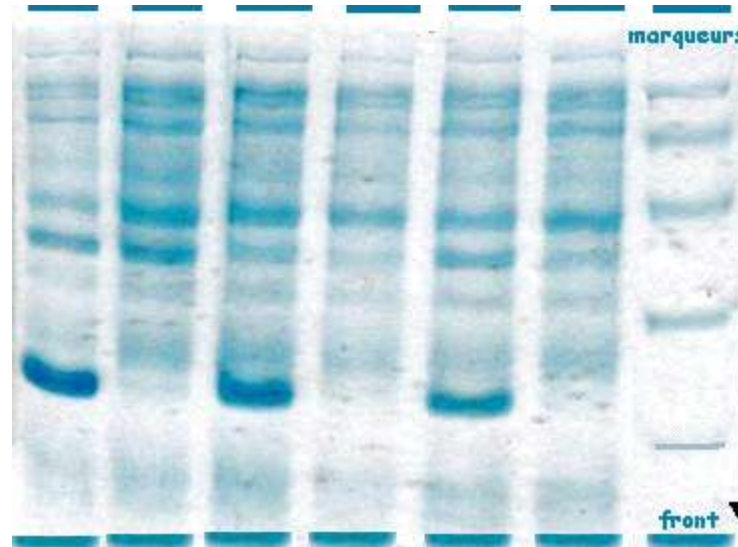
Du fait que le détergent se lie aux régions hydrophobes de la molécule protéique, provoquant leur déroulement en chaînes polypeptidiques allongées, les molécules protéiques sont libérées de leurs associations avec d'autres molécules protéiques ou lipidiques, et rendu aisément solubles dans la solution du détergent. (ajout de Mercaptoéthanol pour rompre les ponts S-S).

Chaque protéine fixe un grand nombre de molécules de détergent chargées négativement (masquant la charge de la protéine), et provoque sa migration vers l'électrode positive lorsqu'on applique une tension. Les protéines de même taille tendent à se comporter de façon identique tandis que les protéines de plus grande taille (avec un plus grand nombre de charges négatives) seront soumises à de plus grandes forces électriques et aussi à une plus forte accélération.

Un mélange complexe de protéines est donc fractionné en une série de bandes protéiques disposées par ordre de poids moléculaire.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

Un exemple de résultat



La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).

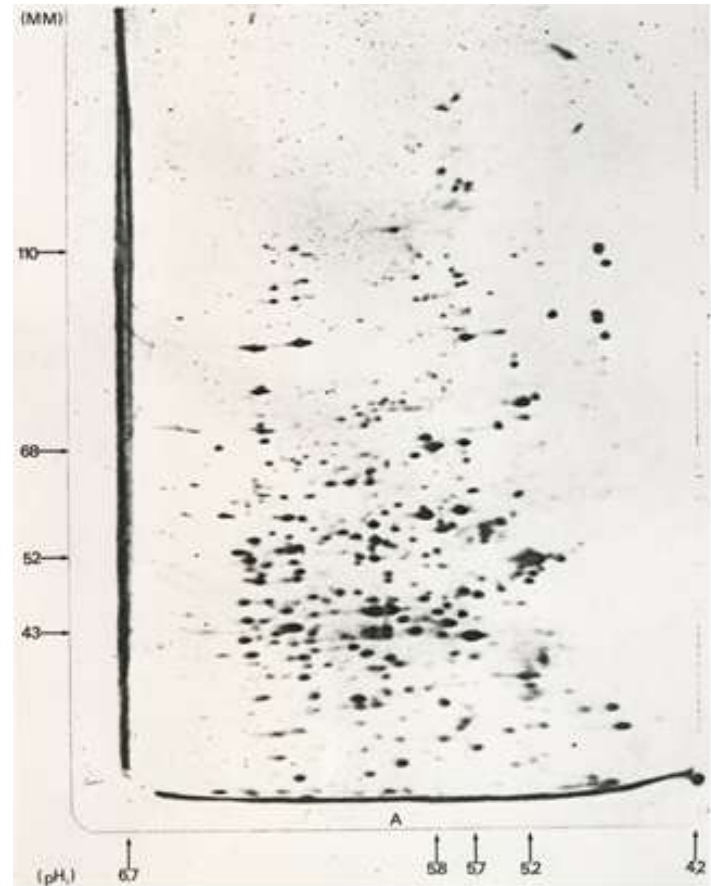
Exemple de marqueurs :
myosine (205 kDa)
b galactosidase (116 kDa)
phosphorylase b (97,4 kDa)
albumine (66 kDa)
ovalbumine (45 kDa)
anhydrase carbonic(29 kDa)

Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est une technique permettant de séparer des mélanges plus ou moins complexes de protéines en conditions dénaturantes. Le principe de la séparation repose sur la combinaison :

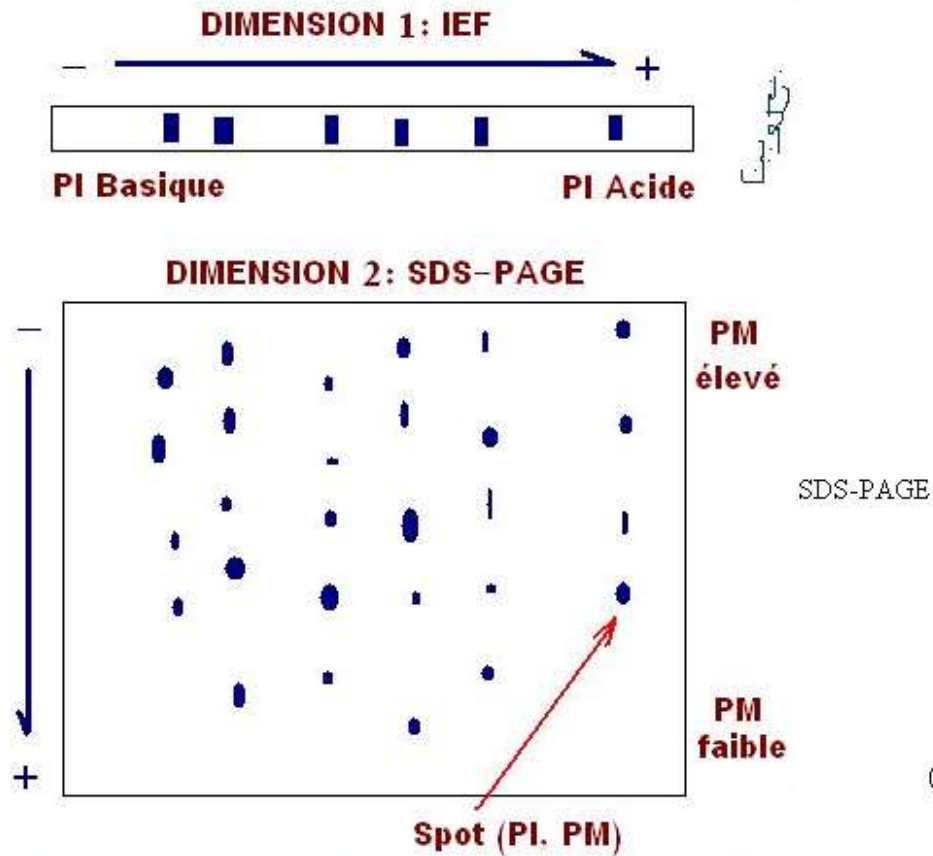
- d'une migration sur SDS – PAGE (séparation selon la masse moléculaire), et
- d'une isoélectrofocalisation (séparation selon leur point isoélectrique pHi).

Plusieurs centaines de protéines peuvent ainsi être individualisées à partir d'un mélange.



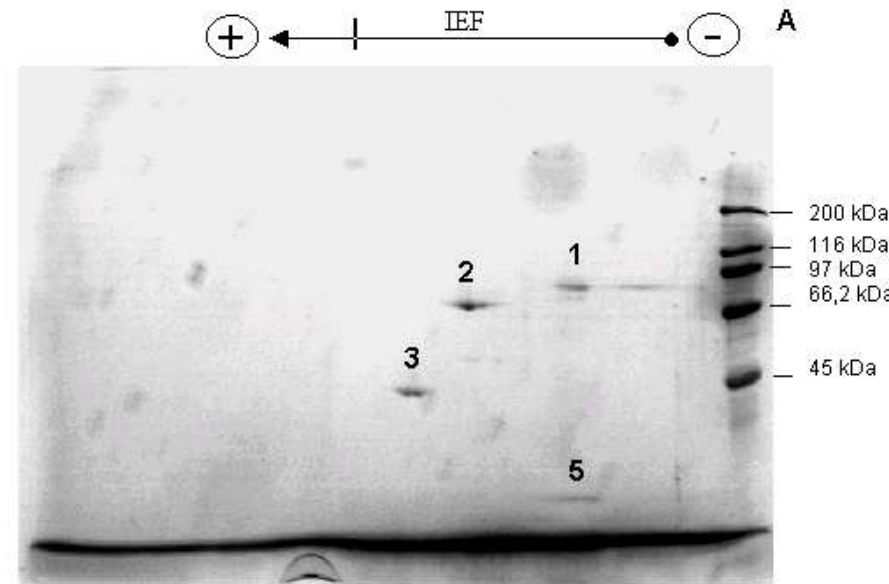
Analyse de protéines totales d'ovocytes sur un gel bidimensionnel

Révélation par autoradiographie : les protéines produites par l'ovocyte ont été marquées au moment de leur synthèse par l'utilisation de méthionine³⁵S. L'axe des abscisses donne le pHi, l'axe des ordonnées la MM apparente.



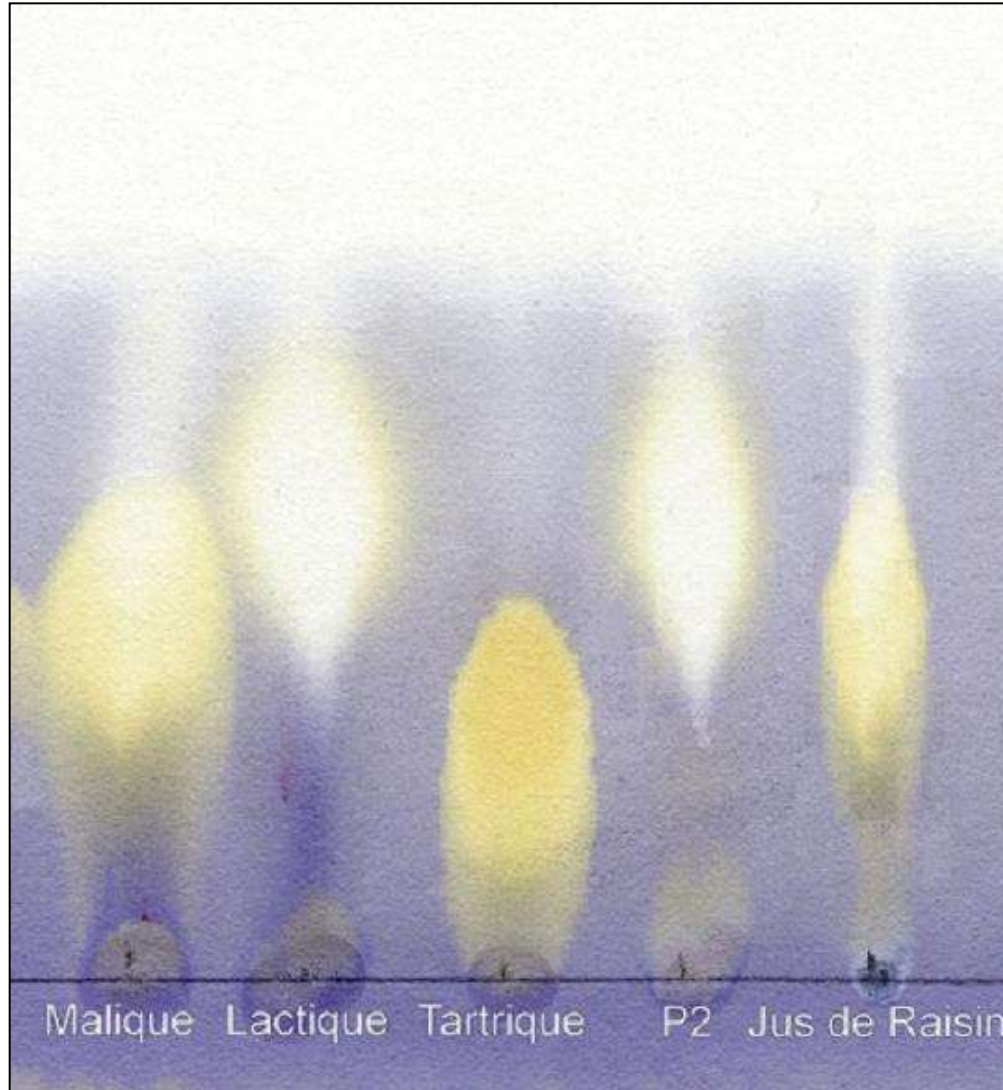
ELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION

SDS-PAGE

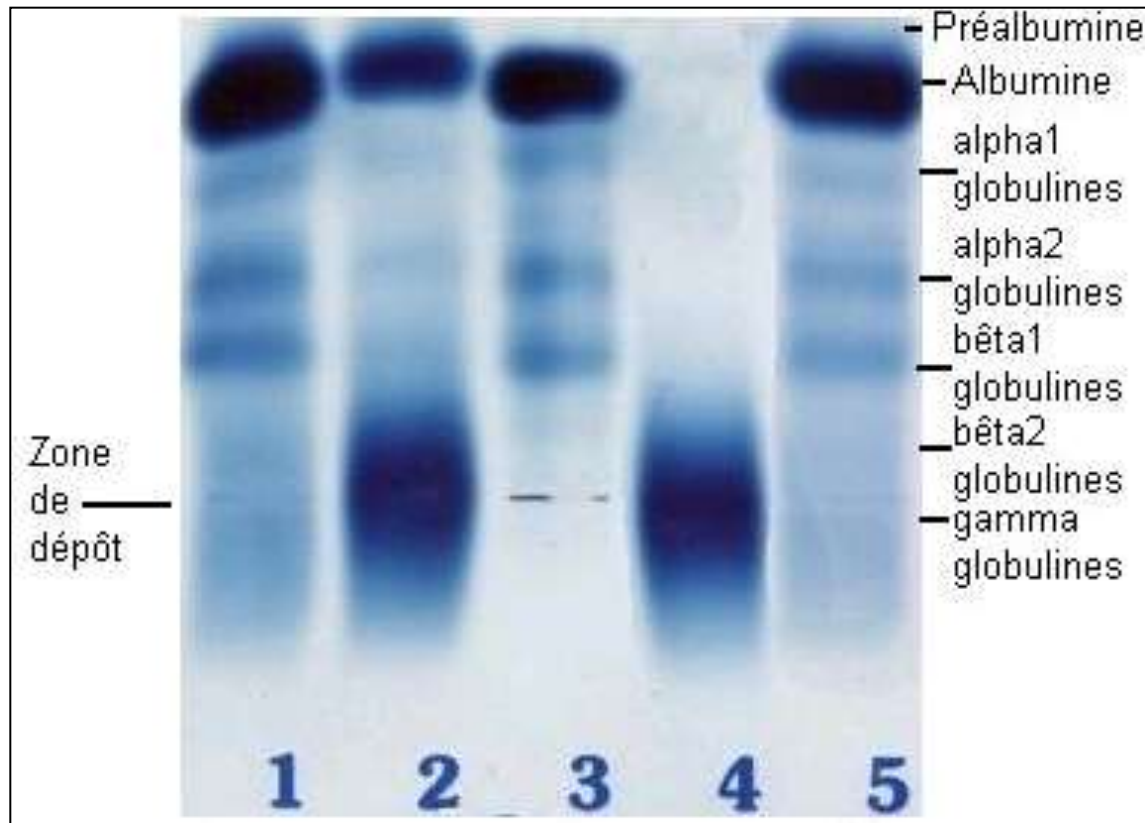


L'association de ces deux paramètres, à la fois caractéristiques d'une protéine donnée mais également indépendants l'un de l'autre, confère à cette technique un très grand pouvoir résolutif puisqu'elle permet de séparer et de visualiser simultanément plusieurs milliers d'espèces protéiques issues de mélanges complexes.

Exercice a. Analyse de résultats de chromatographie, cas de la transformation du jus de raisin.

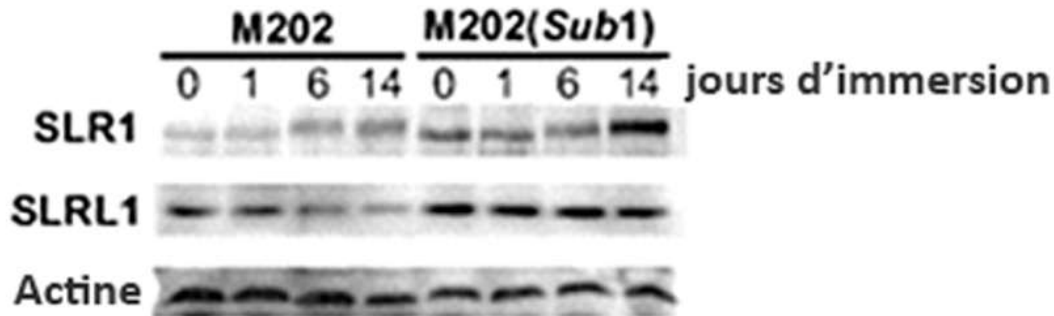
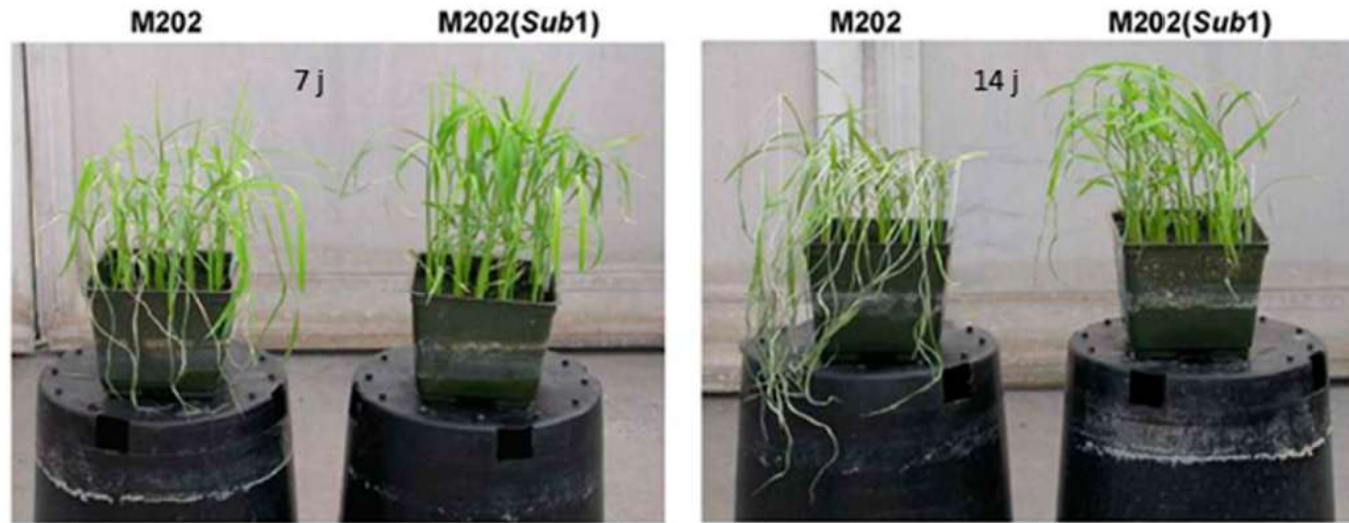


Exercice b. Analyse de résultats d'électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose : profils électrophorétiques de sérums humain.



Exercice c. Analyse de résultats de western blot : modalités de résistance à l'immersion de riz non flottant.

Effets de l'immersion sur deux variétés de riz. Les plants ont été immergés pendant 7 jours (photo de gauche) ou 14 jours (photo de droite) puis sortis de l'eau et photographiés 7 jours après.



Résultats de western blot de protéines isolées à partir de plants de riz immergés.

Des plants de riz de variétés M202 et M202(*sub1*) sont immergés pendant une durée variable, au bout de laquelle on a isolé des protéines à partir de leurs tiges. 5µg de protéines isolées ont migré dans un gel SDS-PAGE 10 %, ce gel a été transféré sur une feuille de nitrocellulose, qui a été hybridée avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines SLR1, SLRL1 et actine (analyse par western blot).

Exercice d. Analyse de résultats d'électrophorèse en conditions native et dénaturante, exemple de la DBH.

