

UE 1B :
Biomolécules, génome, bioénergétique,
métabolisme

ACTUALISATION
Fiche de cours n°2

Protéines

- ★ Notion tombée 1 fois au concours
- ★★ Notion tombée 2 fois au concours
- ★★★ Notion tombée 3 fois ou plus au concours

DÉFINITION	
	<ul style="list-style-type: none"> Macromolécule non dialysable contrairement aux peptides <ul style="list-style-type: none"> MM > 10 000 Da
	<ul style="list-style-type: none"> Enchaînements d'AA reliés par des liaisons peptidiques
	<ul style="list-style-type: none"> Tridimensionnelle complexe

CLASSIFICATION SELON LEUR COMPOSITION		
	Composition	<ul style="list-style-type: none"> Acides aminés uniquement
	Exemple	<ul style="list-style-type: none"> Albumine du sérum ou globulines
	Composées de 2 parties	<ul style="list-style-type: none"> Apoprotéine ou partie protéique Groupement prosthétique ou partie non protéique <ul style="list-style-type: none"> Lié de façon covalente ou non à l'apoprotéine
	Exemples	<ul style="list-style-type: none"> Glycoprotéines <ul style="list-style-type: none"> Liaison covalente associant une fraction glucidique à une protéine Lipoprotéines <ul style="list-style-type: none"> Associant une fraction lipidique à une protéine Phosphoprotéines <ul style="list-style-type: none"> Associant un acide phosphorique à la sérine ou à la thréonine majoritairement Chromoprotéines <ul style="list-style-type: none"> Groupement prosthétique entraînant une coloration Exemples : <ul style="list-style-type: none"> Hémoglobine Cytochromes de la chaîne de transport des électrons Rhodopsine : pigment visuel renfermant du rétinol

Classification selon leur composition : HETEROPROTÉINES		
GLYCOPROTÉINES		
	Liaison β -N-glycosidique entre	<ul style="list-style-type: none"> N-acétylglucosamine Fonction amide d'une asparagine
	Liaison α -O-glycosidique entre	<ul style="list-style-type: none"> N-acétylgalactosamine Fonction alcool de SER ou THR
	Reconnaissance	<ul style="list-style-type: none"> Grâce à la diversité de la chaîne glycanique
	Protection	<ul style="list-style-type: none"> Vis-à-vis des enzymes protéolytiques
	Physico-chimique	<ul style="list-style-type: none"> Viscosité élevée <ul style="list-style-type: none"> Exemple : mucine
	Pathologie	<ul style="list-style-type: none"> Désordres congénitaux de la glycosylation : atteintes neurologiques, retards psychomoteurs
	Érythropoïétine (EPO)	<ul style="list-style-type: none"> Protéine à la fois N-glycosylée (x3) et O-glycosylée (x1 sur SER) Sa glycosylation représentant 40 % du poids de la protéine augmente sa $\frac{1}{2}$ vie grâce à une protection contre les dégradations <ul style="list-style-type: none"> La forme non glycosylée est rapidement dégradée Hormone sécrétée par les reins qui stimule la production des globules rouges lors des séjours en montagne Utilisée pour le traitement des anémies Utilisée illicitement pour le dopage <ul style="list-style-type: none"> EPO de synthèse identifiée par spectrométrie de masse sur sa glycosylation différente de celle de l'EPO naturelle

Classification selon leur composition : HETEROPROTÉINES

LIPOPROTÉINES

	Rôle	▪ Transport des lipides dans le sang
	Notion de densité	▪ La densité des lipoprotéines diminue lorsque la proportion de lipides par rapport aux protéines augmente <ul style="list-style-type: none"> ○ LDL : Faible densité ○ HDL : Haute densité
	Rôle	▪ Ancrage des protéines dans la membrane par les acides gras
	N-Myristylation	▪ Liaison amide entre la fonction COOH de l'acide myristique et la fonction amine en N-terminal portée par une GLY ▪ Mise en place dans le REG, présent sur l'enveloppe du VIH
	Palmitoylation	▪ Liaison entre COOH de l'acide palmitique et <ul style="list-style-type: none"> ○ -OH de SER par une liaison ester ○ -SH de CYS par une liaison thioester
	Glypiation	▪ Fixation du lipide complexe glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) <ul style="list-style-type: none"> ○ Liaison amide entre extrémité C-terminale et éthanolamine + phosphate + glycane : oligoside comportant environ 7 oses dont 1 glucosamine + phosphatidylinositol

CLASSIFICATION SUIVANT LEUR CONFORMATION TRIDIMENSIONNELLE

	▪ Forme plus ou moins sphérique ou ovoïde ▪ Très souvent solubles ▪ Exemples : <ul style="list-style-type: none"> ○ Albumine du sérum ○ Histones de l'ADN
	▪ Insolubles <ul style="list-style-type: none"> ○ Exemples : <ul style="list-style-type: none"> – Kératine β – Collagène – Fibrine ▪ Solubles <ul style="list-style-type: none"> ○ Exemples : <ul style="list-style-type: none"> – Myosine, actine, troponine et tropomyosine des muscles – Tubuline des cytosquelettes – Fibrinogène

CLASSIFICATION SUIVANT LEUR FONCTION

	▪ Protéines d'adhésion ou fibronectines
	▪ Actine, myosine du muscle
	▪ Caséine du lait
	▪ Hormones
	▪ Facteurs de croissances
	▪ Réponse aux hormones
	▪ Hémoglobine : transport O ₂
	▪ Transferrine : transport Fe
	▪ Très diverses
	▪ Anticorps
	▪ Anti-enzymes : protection contre un emballement enzymatique

ORGANISATION STRUCTURALE	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enchaînement des acides aminés ⚡ déterminé par : <ul style="list-style-type: none"> ○ Séquence protéique ○ Séquence nucléotidique du gène
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Premier degré de repliement de la chaîne peptidique <ul style="list-style-type: none"> ○ Dû à la formation de liaisons hydrogènes H entre l'oxygène du groupement carbonyle CO et l'hydrogène du groupement amine NH₂
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Second degré de repliement ▪ Ensemble de structures secondaires donnant la forme 3D caractéristique de la protéine ou conformation <ul style="list-style-type: none"> ○ Liaisons faibles mises en jeu : <ul style="list-style-type: none"> – Forces de Van der Waals – Interactions hydrophobes – Liaison hydrogène ⚡ ○ Liaisons covalentes ⚡ fortes <ul style="list-style-type: none"> – Pont disulfures ▪ Organisation en domaines (fixation du Ca²⁺, réponse aux facteurs de croissance) identiques entre les protéines
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Seulement si association de plusieurs chaînes polypeptidiques ⚡ appelées sous-unités <ul style="list-style-type: none"> ⊖ Sous-unités stabilisées le plus souvent par des liaisons faibles et exceptionnellement des liaisons covalentes telles que les ponts S-S ○ Homodimères si sous-unités identiques ○ Hétérodimères si sous-unités différentes <ul style="list-style-type: none"> – Exemple : Hémoglobine ou Hb = hétérotétramère

ORGANISATION STRUCTURALE LES STRUCTURES SECONDAIRES		
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 3,6 résidus par tour ⚡ de spire ou hélice <ul style="list-style-type: none"> ○ Chaque O d'un CO forme une liaison H avec H du 4^{ème} résidu plus loin dans la chaîne ▪ Chaînes latérales R toujours situées à l'extérieur de l'hélice ▪ Pas d'espace libre à l'intérieur de l'hélice pour chaînes latérales
	Stabilisation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Liaisons H intrachaines ou intracaténares ⚡
	Particularité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absence de PRO ⚡ car pas de H sur son azote donc incompatible avec l'existence d'une hélice α.
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Surenroulement de 3 hélices qui ont : <ul style="list-style-type: none"> ○ 3 résidus par tour ○ Enroulement gauche imposé par la séquence GLY-PRO-OH-PRO
	Stabilisation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Liaisons H interchaines ou intercaténares entre les hélices <ul style="list-style-type: none"> ○ Étirement beaucoup plus important que hélice α donc pas de liaison H intracaténaire
	2 familles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parallèles : même orientation des chaînes ▪ Antiparallèles : chaînes orientées de façon opposée
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> ▪ En zigzag présentant des plis au niveau des Cα ⚡ ▪ Chaînes latérales positionnées alternativement au-dessus et au-dessous du plan du feuillet
	Stabilisation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Liaisons H ⚡ interchaines

ORGANISATION STRUCTURALE LES STRUCTURES SECONDAIRES		
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> 2 à 20 résidus qui relient les autres structures secondaires entre elles <ul style="list-style-type: none"> Les boucles de 4 résidus sont appelés coudes
	Organisation	<ul style="list-style-type: none"> Boucles situées à la surface de la protéine car souvent polaires, chargées et électrophiles : reconnaissance antigénique Hélices α et feuillets β situés à l'intérieur de la protéine assurant sa stabilité
	Cas particulier	<ul style="list-style-type: none"> Regroupements de quelques éléments de structure secondaire : petit ensemble donnant naissance à un motif structural
	Exemple : Motif en doigt de gant	<ul style="list-style-type: none"> Appelé aussi Doigt à zinc Atome de zinc central relié par des liaisons de coordination soit à : <ul style="list-style-type: none"> 4 CYS : Doigt de gant C4 2 CYS et 2 HIS : Doigt de gant C2-H2 Motif principal des facteurs de transcription <ul style="list-style-type: none"> Forme permettant de se fixer dans le sillon de l'ADN pour modifier le message génique
Régions non organisées	Pelote statistique	/

Organisation structurale : LES STRUCTURES TERTIAIRES EXEMPLES DES PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES		
	Fonction	<ul style="list-style-type: none"> Protéine incluse dans la bicouche lipidique du globule rouge GR
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> Hélices α contenant ≈ 20 résidus apolaires Partie N-terminale extracellulaire <ul style="list-style-type: none"> Contient résidus glycosylés importants pour la reconnaissance du ligand Partie C-terminale intracellulaire <ul style="list-style-type: none"> Résidus chargés acides ou basiques permettant l'accomplissement de la fonction de la protéine
	Fonction	<ul style="list-style-type: none"> Changement de conformation du récepteur en réponse à la liaison du ligand Activation des protéines G
	Structure	<ul style="list-style-type: none"> 7 Hélices qui traversent la membrane

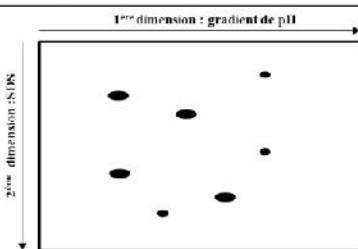
ORGANISATION STRUCTURALE ACQUISITION DE LA STRUCTURE 3D	
	<ul style="list-style-type: none"> Déterminée par la séquence primaire Confère l'activité biologique de la protéine Dénaturée par la chaleur de façon réversible en chauffant doucement <ul style="list-style-type: none"> Perte de son activité temporairement qui est récupérée par une baisse douce de la température Exemple : dénaturation/renaturation de l'ARNase Dénaturée de façon irréversible par des facteurs physiques ou chimiques comme les UV, une forte variation de chaleur ou de pH <ul style="list-style-type: none"> Perte définitive de la fonction de la protéine Exemple : albumine du blanc d'œuf
	<ul style="list-style-type: none"> Peuvent accompagner le repliement correct de la protéine au cours ou à la fin de la biosynthèse des protéines <ul style="list-style-type: none"> Les chaperons se fixent transitoirement sur les zones hydrophobes des protéines en cours de repliement pour éviter des interactions non souhaitées avec d'autres protéines pouvant conduire à une agrégation Peuvent aider au passage à travers les membranes <ul style="list-style-type: none"> 2 chaperons replient et déplient la protéine de chaque côté de la membrane

Organisation structurale : ACQUISITION DE LA STRUCTURE 3D EFFET PATHOGENE DE LA PROTEINE DU PRION		
	Protéine normale PrP ^c	<ul style="list-style-type: none"> Présente dans les neurones Ancrée à la membrane par glypiation Forte proportion d'hélices α et très peu de feuillets β
	Protéine pathologique PrP ^{sc}	<ul style="list-style-type: none"> Même structure primaire que PrP^c Structure tertiaire diffère de PrP^c avec beaucoup plus de feuillets β Protéine auto-chaperon qui va rendre le repliement anormal sur les protéines prions naissants de proche en proche : conformation anormale Processus irréversible Formation d'agrégats résistants aux protéases Destruction progressive du SNC
	Maladies neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> Tremblante du mouton ou scrapie Encéphalopathie spongiforme bovine Maladie de Creutzfeldt-Jacob

PRINCIPALES METHODES D'ETUDES ÉLECTROPHORÈSE	
	<ul style="list-style-type: none"> Migration de molécules chargées dans un champ électrique <ul style="list-style-type: none"> Séparation des protéines sur différents supports
	<ul style="list-style-type: none"> Horizontale : <ul style="list-style-type: none"> Support agarose Support papier filtre ou acétate de cellulose Verticale : <ul style="list-style-type: none"> Support polyacrylamide

Principales méthodes d'études : ELECTROPHORÈSE SUPPORTS		
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Selon la charge des protéines ⚡
	Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> Composés de réticulations moléculaires <ul style="list-style-type: none"> La migration des grosses molécules est sélectivement retardée Les plus petites molécules vont migrer les plus vite = tamis moléculaire Contrôle de la taille des réticulations par la concentration du gel
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Selon la charge et la taille des protéines
	Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> Le SDS (dodécylsulfate de sodium) est un agent dénaturant anionique <ul style="list-style-type: none"> Se lie très fortement aux protéines Apporte de très nombreuses charges négatives de façon uniforme qui masquent les charges intrinsèques des protéines
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Selon la taille ⚡ ou masse moléculaire des protéines

Principales méthodes d'études : ELECTROPHORÈSE	
MODES DE RÉVÉLATION	
	<ul style="list-style-type: none"> Coloration de toutes les protéines
	<ul style="list-style-type: none"> De moins en moins utilisé
	<ul style="list-style-type: none"> Principe en 3 étapes : <ol style="list-style-type: none"> Protéines séparées sur un gel d'acrylamide-SDS Transfert sur une feuille de polymère qui sera incubée avec l'anticorps spécifique, couplé à un marquage Film sera ensuite révélé pour identifier la protéine d'intérêt : 1 seule bande révélée Permet l'identification et la quantification des protéines

Principales méthodes d'études : ELECTROPHORÈSE	
BIDIMENSIONNELLE	
	<ul style="list-style-type: none"> Augmenter la résolution pour séparer un mélange de protéines complexes 1^{ère} dimension sépare les protéines en fonction de la charge ⚡ selon un gradient de pH <ul style="list-style-type: none"> Chaque protéine migre jusqu'au pH égal au pHi de la protéine : focalisation isoélectrique ⚡ 2^{ème} dimension sur gel acrylamide + SDS <ul style="list-style-type: none"> Séparation en fonction de la taille de la protéine
	<ul style="list-style-type: none"> Empreintes peptidiques = PMF : gel avec plein de tâches dont chaque tâche correspond à une protéine <ul style="list-style-type: none"> Prélèvement de chaque tâche qui subit une protéolyse puis qui est analysée par spectrométrie de masse : cela permet d'avoir la séquence des peptides Comparaison des peptides théoriquement obtenus à partir des données du génome : cela permet une identification et un séquençage des protéines Utilisé pour la protéomique soit l'identification de l'ensemble des protéines pouvant être fabriquées dans une cellule dans diverses conditions
	<p>1^{ère} dimension : gradient de pH →</p>  <p>2^{ème} dimension : SDS ↓</p>

PRINCIPALES MÉTHODE D'ÉTUDES		
SPECTROMÉTRIE DE MASSE		
	Utilisation	<ul style="list-style-type: none"> Détermination de la masse d'un peptide avec une précision telle qu'elle permet un séquençage
	Principe	<ul style="list-style-type: none"> Ionisation des protéines par rayon laser <ul style="list-style-type: none"> Énergie apportée par ionisation permet d'éjecter les macromolécules chargées sous forme de gaz Le détecteur reçoit les impacts identifiés par des pics sur le spectre Mesure du rapport entre la masse et la charge du peptide ⚡
	Exemple	<ul style="list-style-type: none"> Mise en évidence des protéines du lait Mise en évidence des modifications post-traductionnelles
	Principe	<ul style="list-style-type: none"> Couplage de 2 spectrométries de masse <ul style="list-style-type: none"> 1^{ère} sépare les différents peptides Peptides désintégrés en plus petits peptides par un bombardement d'hélium 2^{ème} donne la séquence finale du peptide

PRINCIPALES METHODES D'ETUDES CHROMATOGRAPHIES		
	Support	<ul style="list-style-type: none"> Colonne remplie de matière poreuse constituée de petites billes Seules les petites molécules entrent à l'intérieur des billes
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Selon la taille des protéines ☹ Les grosses protéines sont exclues du gel et donc toutes éluées en premier de la colonne : c'est un tamis moléculaire inversé La capacité d'exclusion du gel est la masse moléculaire minimale incapable de rentrer dans les granules du gel
	Support	<ul style="list-style-type: none"> Colonne sur laquelle est fixée une molécule spécifique telle qu'un anticorps Passage ensuite de la protéine d'intérêt telle qu'un antigène Élimination d'abord des molécules non fixées à la colonne Élution de la protéine d'intérêt en dernier
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Repose sur des interactions spécifiques entre 2 molécules
	Exemples	<ul style="list-style-type: none"> Fixation d'un anticorps sur la colonne pour purifier un antigène Fixation d'un substrat (ou un analogue du substrat) pour purifier une enzyme Fixation d'une séquence d'ADN pour purifier une protéine se fixant à l'ADN : facteurs de transcription
	Support	<ul style="list-style-type: none"> Résine échangeuse d'anions <ul style="list-style-type: none"> Support fixe composé de cellulose chargé (+) Accroche les protéines chargées (-) Protéines chargées (+) éluées en premier Résine échangeuse de cations <ul style="list-style-type: none"> Support fixe composé de cellulose chargée (-) Accroche les protéines chargées (+) Protéines chargées (-) éluées en premier
	Séparation	<ul style="list-style-type: none"> Repose sur la différence de charge globale ☹ des protéines soient les liaisons ioniques entre les protéines et la colonne

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE (MM)		
	Avec SDS	<ul style="list-style-type: none"> Détermination de la MM des sous-unités des protéines Comparaison des protéines étudiées à des marqueurs de taille connue Distance de migration est fonction linéaire inverse du logarithme de la masse moléculaire ☹
	Sans SDS	<ul style="list-style-type: none"> Détermination de la forme native de la protéine
	Avec SDS	<ul style="list-style-type: none"> Détermination de la taille des sous-unités de la protéine ☹
	En présence d'agents réducteurs comme le β-mercaptoéthanol	<ul style="list-style-type: none"> Coupent les ponts disulfures ☹☹☹ Comparaison des volumes d'élution des protéines étudiées à ceux des marqueurs de taille connue Le volume d'élution est fonction linéaire inverse d'élution du logarithme de la masse moléculaire ☹

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES
CARACTÈRE AMPHOTÈRE DES PROTÉINES

	<p>Selon la charge globale des protéine</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaque protéine possède un pH_i, pH à laquelle la protéine est neutre ▪ Les protéines comme les peptides possèdent des chaines latérales ionisables ▪ Dans un tampon à pH donné <ul style="list-style-type: none"> ○ Les protéines chargées (+) migrent vers le pôle (-) ⚡ ○ Les protéines chargées (-) migrent vers le pôle (+) ⚡ ○ Les protéines dont le pH_i est égal au pH ne migrent pas car elles ont une charge nulle ⚡
	<p>Exemples des protéines du sérum</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dans un tampon à pH légèrement alcalin environ 8,6 ▪ L'albumine a le pH_i le plus faible : c'est celle qui est la plus chargée négativement à pH 8,6 : elle migre le plus loin vers le pôle (+) ⚡ <div style="text-align: center;"> </div> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Technique utilisée dans le diagnostic de pathologies dans lesquelles ce profil peut être altéré

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES
MÉTHODES DE DOSAGE

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Méthode globale ▪ Repose sur l'absorption spécifique à 280 nm de TYR et TRP ▪ Peu précise car elle dépend de la teneur en acides aminés aromatiques de la protéine
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Méthode globale plus sensible ▪ Coloration au Biuret ou au bleu de Coomassie
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Repose sur l'utilisation d'un anticorps spécifique d'un antigène à doser ▪ Utilisé pour les protéines présentes en faible concentration (hormones)

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES
SOLUBILITÉ : PARAMÈTRES INFLUENÇANTS

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Plus les résidus polaires sont nombreux plus la solubilité de la protéine est importante
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acide aminé hydrophile augmentant la solubilité de la protéine
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Les protéines globulaires sont plus solubles que les protéines fibrillaires <ul style="list-style-type: none"> ○ Les protéines fibrillaires s'associent entre elles en chassant l'eau : diminution de la solubilité
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solubilité minimale pour $pH = pH_i$ ⚡
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ En augmentant la concentration en sels, la solubilité de la protéine augmente dans un premier temps, car les ions se fixent sur la protéine et augmentent sa charge donc sa solubilité ▪ À de plus fortes concentrations en sels, la solubilité des protéines diminue : précipitation à cause de la compétition entre les ions et les protéines pour se lier à l'eau

PURIFICATIONS DES PROTÉINES

- Utile à des fins de **recherche**
- On utilise comme **source** un extrait de tissu, organe... broyé et homogénéisé, le plus riche en protéine d'intérêt possible
- On réalise alors une **série d'étapes** de purification qui inclut différentes méthodes comme les chromatographies, le but étant d'obtenir la protéine **la plus pure possible**
- La purification est facilitée lorsqu'**on peut doser une activité biologique** associée à la protéine d'intérêt : cas des enzymes
- À chaque étape de purification, on collecte **différentes fractions**, comme des éluions par exemple pour les chromatographies, dont on ne conserve pour les étapes suivantes que celles contenant la protéine d'intérêt, c'est-à-dire présentant l'activité dosée par exemple

PURIFICATIONS DES PROTÉINES
DEFINITIONS

	▪ Quantité de substrat ou de produit transformé par unité de temps	
	▪ μmol de S ou P/minute	
	▪ Activité totale par mg de protéines totales	$\frac{\text{Activité}}{\text{mg de protéines}}$ ★★
	▪ Enrichissement en protéines ▪ Égal à 1 au départ par définition et augmente au fur et à mesure des étapes	$\frac{\text{As après purification}}{\text{As avant purification}}$ ★★
	▪ Exprimé en pourcentage ▪ À chaque étape, le rendement diminue	$\frac{\text{Activité totale après purification}}{\text{Activité totale avant purification}}$ ★★

PURIFICATIONS DES PROTÉINES
CRITÈRES DE PURETÉ D'UNE PROTÉINE

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1^{ère} migration : Gel de polyacrylamide dénaturant avec SDS <ul style="list-style-type: none"> ○ Évaluation de la purification après migration et coloration du gel d'électrophorèse ○ Protéine supposée pure si une seule bande est observée à confirmer avec une 2^{ème} migration ▪ 2^{ème} migration : Gel sans SDS <ul style="list-style-type: none"> ○ Migration selon la charge ○ On s'assure ainsi que la protéine d'intérêt n'a pas été purifiée en même temps qu'une autre protéine de même masse moléculaire
	▪ Révélation de la protéine d'intérêt grâce à une interaction spécifique avec un anticorps selon la technique de Western Blot
	▪ Exemple : activité enzymatique si la protéine à purifier est une enzyme ou une autre activité biologique