LES PROTEINES

1- ACIDES AMINES:

Constituent l’unité élémentaire des protéines. Ce sont des composés organiques munis d’une fonction carboxylique et d’une fonction amine portées par le même carbone (Cα ).

+H3N-CH-COO- R = chaîne latérale ou radical.

R

Exception pour deux d’entre eux car ils possèdent une fonction imine au lieu de la fonction amine : Proline et Hydroxyproline qui sont appelés imino-acides. Parmi les 150 amino-acides qui existent dans la nature, 20 seulement entrent dans la composition des protéines.

11- Classification actuelle

Classification basée sur la polarité de la chaîne latérale et sur la structure chimique des acides aminés . On distingue 4 grands groupes :

111- Acides aminés apolaires

• *Aliphatiques* :

Glycocolle(Glycine) : **Gly: G** +H3N-CH-COO- Alanine : **Ala: A** +H3N-CH-COO-

9,6 2,34 9,69 2,35

pHi = 5,97 H pHi = 6,02 CH3

Valine: **Val: V**  +H3N-CH-COO- Leucine : **Leu: L** +H3N-CH-COO-

9,62 2,32 9,60 2,36

pHi = 5,97 CH pHi = 5,98 CH2

CH3  CH3  CH

CH3 CH3

Isoleucine: **Ile: I** +H3N-CH-COO- Proline : **Pro: P**

9,68 2,36

pHi = 6,02 CH pHi = 6,30

N+ COO-

CH3 CH2 10,60H2 1,99

CH3

• *Aromatiques* :

Phenylalanine: **Phe: F** +H3N-CH-COO- Tryptophane: **Trp: W** +H3N-CH-COO-

9,13 1,83 9,39 2,38

pHi = 5,48 CH pHi = 5,88 CH2

NH

• *Soufrés* :

Methionine: **Met: M** +H3N-CH-COO-

9,21 2,28

pHi = 5,75 (CH2)2

S

CH3

112- Acides aminés polaires non chargés

• *Possédant une fonction hydroxyle* :

Sérine : **Ser: S** +H3N-CH-COO- Thréonine: **Thr: T** +H3N-CH-COO-

9,15 2,21 10,43 2,63

pHi = 5,68 CH2OH pHi = 6,53 CHOH

CH3

Tyrosine : **Tyr: Y** +H3N-CH-COO-

9,11 2,20

pHi = 5,65 CH2

OH

10,07

• *Possédant un groupement amide* :

Asparagine : **Asn: N**  +H3N-CH-COO- Glutamine: **Gln: Q** +H3N-CH-COO-

8,8 2,02 9,13 2,17

pHi = 5,41 CH2 pHi = 5,65 (CH2)2

CO-NH2 CO-NH2

•*Possédant une fonction thiol* :

Cystéine : **Cys: C**  +H3N-CH-COO-

10,78 1,71

pHi = 5,02 CH2

SH

8,33

113- Acides aminés polaires acides ( avec un COOH supplémentaire ) :

Ces acides aminés sont chargés négativement à pH 6-7.

Acide aspartique: **Asp : D** +H3N-CH-COO- Acide glutamique: **Glu : E** +H3N-CH-COO-

9,82 2,09 9,67 2,19

pHi = 2,98 CH2  pHi = 3,22 (CH2)2

COO- COO-

3,86 4,25

114- Acides aminés polaires basiques ( ayant plus d’une fonction amine ) :

Ces acides aminés sont chargés positivement à pH 6-7.

Lysine : **Lys: K +**H3N-CH-COO- Arginine: **Arg: R** +H3N-CH-COO-

8,95 3,18 9,04 2,17

pHi = 9,74 (CH2)4 pHi = 10,76 (CH2)3

NH3+ NH

10,53

C

H2N NH2+

Histidine: **His: H** +H3N-CH-COO- 12,48

9,17 1,82

pHi = 7,59 CH2

N NH

6

Remarque: sont reportés sur la planche le pK1 (αCOOH) , pK2 (α NH2) et pKr (COOH ou NH2 du radical) ainsi que le pHi de chaque acide aminé.

12- Propriétés

121- Physiques :

1211- Solubilité

Les acides aminés sont généralement solubles dans l’eau. Leur solubilité dépend de la nature de R, du pH du milieu, de la température et de la concentration en sels.

1212- Pouvoir rotatoire

Tous les acides aminés possèdent un carbone asymétrique ( carbone dont les quatres substituants sont différents ) sauf le glycocolle qui n’en possède pas ou Thr et Ile qui en ont deux. Ils sont donc doués d’une activité optique. Qu’ils soient dextrogyres ou lévogyres, les acides aminés naturels ont une configuration L en général. L’activité optique ou le pouvoir rotatoire spécifique [α ]D20 est donné par la relation de Biot :

[α ]

[α ]D20 = [α ]D20 : exprimé en degré à la température de

C x l 20°C et pour la raie D du sodium (Na).

[α ] : Angle de rotation en degré du plan de

polarisation donné par le polarimètre.

C : concentration de la substance en g/ml.

l : longueur de la cuve en dm.

1213- Spectrales

• Les acides aminés absorbent dans l’UV lointain : longueur d’onde < 220nm.

( λ < 220nm ).

• La Cystine (Cys-Cys) absorbe à 240 nm.

• Phe absorbe à 260 nm.

• Tyr et Trp absorbent à 280 nm, ce qui permet une évaluation quantitative des protéines au spectrophotomètre dans la bande des 280 nm .

122- Chimiques

1221- Caractère amphotère

Du fait de la présence d’au moins une fonction acide et une fonction amine, un acide aminé peut exister sous trois formes selon le pH de la solution aqueuse.

zone acide zone neutre zone basique

-H+ -H+

NH3+-CH-COOH NH3+-CH-COO- NH2-CH-COO-

+H+ +H+

R K1 ou Ka R K2 ou Kb R

On définit ainsi pKa et pKb ( pK1 et pK2 ) qui correspondent respectivement à 50% d’ionisation des fonctions acide et basique et pHi correspondant à 100% de charge globale nulle.

Le pHi est calculé de la façon suivante :



Pour connaître la charge nette d’un acide aminé il suffit de comparer le pH du milieu au pHi de l’acide aminé :

• pH milieu < pHi le milieu est acide l’acide aminé agit comme une base et fixe un proton, il aura une charge globale positive.

• pH milieu > pHi le milieu est basique l’acide aminé agit comme un acide et libère un proton, il aura une charge globale négative.

• pH milieu = pHi l’acide aminé a une charge globale nulle.

1222- Propriétés liées à la fonction COOH :

• *Formation d’amide* :

La liaison peptidique (liaison amide) est une réaction de polymérisation permettant la biosynthèse des protéines.

H2N-CH-COOH + H2N-CH-COOH H2N-CH-CO-HN-CH-COOH

R1  R2 H2O R1  R2

La liaison amide permet également la formation de deux acides aminés dérivés d’acides aminés dicarboxyliques et qui sont l’asparagine (Asn) provenant de l’acide aspartique et la glutamine (Gln) provenant de l’acide glutamique.

•*Formation de sels* :

H2N-CH-COOH + NaOH H2N-CH-COONa + H2O

R R

• *Formation d’alcool* :

H2N-CH-COOH + 2H2 H2N-CH-CH2OH + H2O

R R

•*Formation d’ester* :

H2N-CH-COOH + HO-R’ H2N-CH-COOR’ + H2O

R R

•*Formation d’amine par décarboxylation* :

H2N-CH-COOH R-CH2-NH2 + CO2

R

1223- Propriétés liées à NH2:

• *Formation de la liaison peptidique* (voir çi-dessus)

• *Formation d’imine* (base de Schiff) en présence d’aldéhydes :

HOOC-CH-NH2 + OHC-R’ HOOC-CH-N=CH-R’ + H2O

R R

Exemple d’aldéhyde: le phosphate de pyridoxal (PAL).

C’est une réaction fondamentale dans le métabolisme des acides aminés qui ne peuvent subir de transamination ou de désamination qu’après leur fixation au PAL.

• *Désamination oxydative* (en présence de déshydrogénases) :

R-CH-COOH R-C-COOH R-CO-COOH + NH3

NH2 H2 NH H2O Acide α cétonique

• *Réactions colorées caractéristiques* :

•⮞ Réaction avec la ninhydrine : décarboxylation et désamination entraînant la formation de pourpre de Ruhemann .

O O O

Acide aminé

OH N

OH

O O OH

Réactif Pourpre de Ruhemann

Le pourpre de Ruhemann est un dérivé bleu violet ( jaune pour Pro) qui sert à détecter la présence d’un acide aminé. L’intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d’acide aminé présente.

•⮞ Réaction de dansylation :

CH3  CH3 CH3 CH3

N N

R

+ H2N-CH-COOH

R

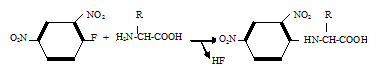
HCl

SO2Cl SO2-HN-CH-COOH

Chlorure de dansyle dansyl-amino-acide

Le dansyl-aa est un dérivé fluorescent permettant l’identification de l’acide aminé N-terminal des chaînes peptidiques, la réaction est très sensible.

•⮞ Réaction de Sanger :



Dinitro-fluoro-benzène (DNFB) Dinitrophényl-aa (DNP-aa)

Le DNP-aa est un dérivé jaune. La réaction permet l’identification de l’acide aminé N-terminal.

•⮞ Réaction d’Edman :

R

N C S + H2N-CH-COOH R CH C O

HN N

C

S

Phénylisothiocyanate (PTC) Phénylthiohydantoine-aa (PTH-aa)

(cyclique en milieu acide)

Le PTH-aa est un dérivé jaune. Cette réaction permet la libération et l’identification de l’acide aminé N-terminal. Elle permet le séquençage des peptides : c’est une méthode récurrente.

1224- Propriétés particulières des fonctions présentes sur le radical

Les fonctions présentes au niveau des chaînes latérales telles SH, OH, noyau imidazole, groupement guanidinium…participent à de nombreuses réactions biologiques des protéines : structure, catalyse enzymatique, réaction récepteur-hormone, réaction antigène-anticorps etc….

2- LES PEPTIDES :

21- Définition et structure

Les peptides résultent de l’association de deux ou plusieurs acides aminés réalisée par réaction entre la fonction α COOH d’un acide aminé et la fonction α NH2 d’un autre amino-acide après libération d’eau. :

H2N-CH-COOH + H2N-CH-COOH H2N-CH-CO-HN-CH-COOH + H2O

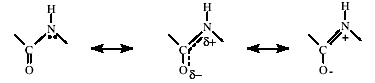
R1  R2 R1 R2

22- Propriétés de la liaison peptidique (-CO-NH-)

La liaison -CO-NH- est intermédiaire entre la simple et la double liaison en raison de la délocalisation des électrons, ce qui lui confère une certaine rigidité empêchant la libre rotation entre C et N. Les six atomes de la liaison sont dans un même plan : liaison plane.

Les carbones α (Cα) sont en position trans par rapport à la liaison C-N.

C’est cette liaison qui détermine la structure dans l’espace des protéines



23- Les chaînes peptidiques et leur nomenclature

Les chaînes peptidiques sont vectorisées : les liaisons peptidiques attachent les acides aminés dans un ordre spécifique. Les conventions sont les suivantes :

- les aminoacides engagés dans une chaîne peptidique sont appelés **résidus**. Leur nom est celui de l'aminoacide auquel on ajoute le suffixe **yl** sauf pour le dernier résidu.

- les deux aminoacides aux extrémités de la chaîne sont appelés : **N-terminal** pour celui qui a sa fonction α-aminée libre et **C-terminal** pour celui qui a sa fonction α-COOH libre

- on numérote les aminoacides en écrivant l'enchaînement de gauche à droite à partir de l'extrémité N-terminal.

On distingue trois types de peptides :

- peptide formé d'une seule chaîne (monocaténaire) et linéaire



- peptide formé d'une seule chaîne (monocaténaire) et cyclique



Une liaison covalente (pont S-S) intra-chaîne est présente et réalisée par l'oxydation de deux fonctions thiol de deux cystéines

- peptide formé de plusieurs chaînes (polycaténaire)



Une liaison covalente (pont S-S) inter-chaînes est présente et réalisée par l'oxydation de deux fonctions thiol de deux cystéines appartenant à deux chaînes peptidiques différentes

24-. Détermination de la structure d'un peptide

La détermination de la structure primaire d'un peptide est conduite en deux étapes :

1) détermination de la composition en aminoacides

2) détermination de l'ordre des enchaînements des résidus

Ces deux étapes ont comme point commun l'hydrolyse de la liaison peptidique.

241- Hydrolyse de la liaison peptidique

La liaison peptidique est très stable, son hydrolyse spontanée est quasiment nulle.

**Hydrolyse chimique complète**

L'action de l'acide chlorhydrique (HCl) 6M sur un peptide, à ébullition pendant au moins 24 heures, aboutit à un hydrolysatcontenant les aminoacides avec toutefois les restrictions suivantes :

- l'aminoacide acide tryptophane est entièrement détruit

- les amides (Asn, Gln) sont hydrolysées en ammoniac et acides correspondants (Asp, Glu)

- certains aminoacides (Tyr, Ser, Thr) peuvent être partiellement détruits (un temps d'hydrolyse plus faible permet de résoudre le problème).

**Hydrolyse chimique spécifique**

Certains réactifs hydrolysent une liaison peptidique avec une spécificité sur un des aminoacides participant à la liaison :

- le bromure de cyanogène (BrCN) hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxyle de la méthionine : cette dernière devient alors un résidu C-terminal transformé en résidu homosérine lactone

- le 2-nitro-5-thiocyanobenzoate (NTCB) hydrolyse la liaison peptidique du côté amine de la cystéine.

**Hydrolyse enzymatique**

L'hydrolyse des liaisons peptidiques peut être réalisée par des enzymes protéolytiques (ou **protéases** ou encore peptidases) qui sont des hydrolases. La spécificité principale de ce groupe d'enzymes est l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

Leur spécificité secondaire permet de les classer en deux groupes :

- **exopeptidase**

L'enzyme n'hydrolyse que la première liaison peptidique (aminopeptidase) ou la dernière liaison peptidique (carboxypeptidase) en libérant l'aminoacide terminal. Bien évidemment, le processus recommence sur le peptide amputé d'un aminoacide (un temps d'hydrolyse court permet de libérer un seul aminoacide).



Certaines exopeptidases ont des spécificités secondaires particulières. Exemples :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Type** | **Nom** | **Source** | **Particularité** |
| Aminopeptidase | Leucine aminopeptidase | Rein de porc | -sauf Pro |
| Aminopeptidase M | Rein de porc |  |
| Aminopeptidase K | Moisissure | -autres que basiques  -arrêtée par Pro |
| Carboxypeptidase | Carboxypeptidase A | Pancréas de bœuf | -autres que basiques  -arrêtée par Pro |
| Carboxypeptidase B | Pancréas de bœuf |  |
| Carboxypeptidase C | Feuille de citronnier |  |
| Carboxypeptidase P | Moisissure | -sauf Ser et Gly |

- **endopeptidase**

L'enzyme hydrolyse des liaisons peptidiques internes entre deux aminoacides i, (i+1). Il peut être spécifique du résidu en position i ou (i+1). L'hydrolyse d'un peptide par une

endopeptidase donnera plusieurs fragments peptidiques : si on a **m** coupures (m liaisons peptidiques hydrolysées), le peptide sera dégradé en (**m+1**) fragments peptidiques.



Exemples d'endopeptidases avec leurs spécificités :

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Enzyme | Source | Résidu i | Résidu (i+1) | Particularité |
| Trypsine | Pancréas de bœuf | Arg, Lys |  | Sauf (i+1) = Pro |
| Chymotrypsine | Pancréas de bœuf | Phe, Tyr, Trp |  |  |
| Sa protéase | *Staphylococcus auréus* | Asp, Glu |  |  |
| Fin protéase | *Flavobacterium meningosepticum* | Pro |  |  |
| Thermolysine | *Bacillus thermoproteolyticus* |  | Ala, Val, Leu, Ile, Met |  |

Remarque : on peut dire que la thermolysine est une endopeptidase spécifique des aminoacides Ala, Val, Leu, Ile, Met avec une coupure du côté amino de la liaison peptidique.

Les autres enzymes sont spécifiques des aminoacides indiqués avec une coupure du côté carboxyle de la liaison peptidique.

242- Détermination de la séquence

La détermination de la structure primaire d'un peptide obéit en général à la stratégie suivante :

2421- Identification des aminoacides terminaux

- l'extrémité N : on utilise en général le chlorure de dansyl et après hydrolyse chimique complète du peptide, on identifie le dansyl-aminoacide (voir paragraphe 2.3.2). La présence de lysine dans le peptide va perturber cette méthode puisque la chaîne latérale de ce résidu porte un groupe

- NH2 qui réagira avec le DNS-Cl.

- l'extrémité C : on utilise en général une dégradation limitée à l'aide des carboxypeptidases

2422- Résolution des problèmes

- l'absence d'aminoacide terminal indiquera que ceux-ci ont été modifiés et sont sûrement cycliques ou semi-cycliques

- la présence de ponts disulfure intra-chaîne posera des problèmes quant à la composition en aminoacide. La réduction de ceux-ci par un thiol, suivie d'une alkylation supprimera les problèmes

- la présence de plusieurs groupements N et C-terminaux indiquera que le peptide est formé de plusieurs chaînes liées par des ponts disulfure. La réduction de ceux-ci par un thiol, suivie d'une alkylation, séparera les différentes chaînes.

2423- Dégradation des peptides en fragments

En utilisant les différentes méthodes de coupure de liaisons peptidiques qui fragmentent le peptide et en répétant l'étape 1 (identification des aminoacides terminaux), on peut positionner certains aminoacides dans la séquence. En répétant le processus 3 et 1 de manière itérative sur chacun des fragments, on peut arriver à la détermination complète de la structure primaire du peptide original.

243- Détermination de la séquence : la dégradation récurrente d'Edman

On a vu au paragraphe 2.3.2 la réaction d'Edman avec l'aminoacide terminal : formation d'un PTC-peptide à pH 9. Par un changement de pH (légèrement acide), il y a cyclisation et libération d'un dérivé PTH-aminoacide et d'un peptide amputé de son aminoacide N-terminal.

En répétant ces cycles :

- action du PTC à pH 9 pour donner un PTC-peptide

- puis libération du PTH-aminoacide par passage à un pH acide, et du peptide (n-1) amputé du côté N-terminal, on a, à chaque cycle, la libération de l'aminoacide suivant dans la séquence du peptide original.

Des appareils (séquenceur) sont capables d'effecteur ces cycles automatiquement. Toutefois l'analyse est techniquement limitée à des séquences dont le nombre d'aminoacides est inférieur à 200.

Avec cette technique, il faudra résoudre le problème d'aminoacides qui sont cyclisés sur l'aminoacide N-terminal.

244- Détermination de la séquence : technique récente

On utilise de plus en plus la spectrométrie de masse(déviation d'une particule chargée dans un champ électrique). Un spectromètre de masse est un appareil capable de mesurer avec grande précision le rapport masse/charge électrique de molécules.

Cette technique comporte deux étapes :

- le bombardement d'un peptide par des atomes "rapides" d'un gaz rare (argon ou xénon) produit l'espèce peptidique ionique (PH)+isolée du milieu par un premier spectromètre,

- l'ion peptidique est ensuite bombardé par des atomes neutres d'hélium qui provoquent des ruptures à partir des deux extrémités. Une série de fragments est obtenue, et ces derniers sont soumis à une analyse par un second spectromètre de masse.

Les résultats sont analysés et un traitement informatique reconstitue la séquence primaire.

Cette technique ne peut analyser que des peptides d'environ 30 aminoacides, il faudra dans le cas de peptides de nombre d'aminoacides supérieur les fragmenter.

3- LES PROTEINES :

La structure des protéines est une organisation hiérarchisée comportant plusieurs degrés de complexité croissante : structure primaire, st. secondaire, st. tertiaire et st. quaternaire.

On distingue, du point de vue structure, deux groupes de protéines : les protéines fibreuses et les protéines globulaires.

31- Protéines fibreuses

311- Structure primaire

Correspond à l’enchaînement linéaire spécifique des α amino-acides d’une protéine reliés entre eux par la seule liaison peptidique et codé par le génome. Cette structure est très importante puisque c’est elle qui conditionne les autres structures et qui détermine la fonction de la protéine.

312- Structure secondaire

3121- Hélice α

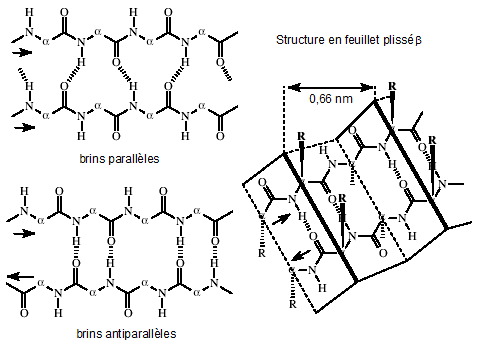
Sous l’influence des forces attractives et répulsives nombreuses se manifestant le long de la chaîne d’acides aminés, la protéine évolue rapidement en une structure tridimentionnelle. Dans un premier temps les nombreux groupements CO et NH présents le long de la chaîne vont contracter des liaisons H ( hydrogène ) et entrainer l’enroulement de la chaîne en une conformation hélicoidale dont la plus caractéristique est l’hélice α, ex : la kératine α ( cheveux, ongles etc…). Sous l’action de la chaleur humide la kératine α s’étire pour donner la kératine β.



**Schéma de l’hélice α**

3122- Feuillets plissés β

Résultent également des liaisons H , mais dans ce cas elles s’établissent entre des chaînes polypeptidiques voisines plutôt qu’à l’intérieur d’une même chaîne comme dans les hélices α., ex : la fibroine de soie.



**Schéma du feuillet plissé β**

Il existe deux variétés de feuillets plissés β :

٠ *Le feuillet plissé β parallèle* dans lequel les chaînes polypeptidiques sont dirigées dans le même sens.

٠ *Le feuillet plissé β anti-parallèle* dans lequel les chaînes polypeptidiques sont dirigées en sens inverse l’une par rapport à l’autre.

3123- Coude

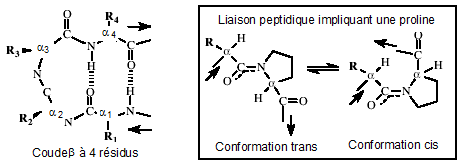
Certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans des conformations périodiques. Toutefois leurs structures sont semblables par le fait qu'elles imposent un changement brusque de direction de 180°: on les appelle coude ou tour β (β turn). La lettre β rappelle qu'ils sont indispensables pour des feuillets de chaînes anti-parallèles.

Cette structure peut être réalisée de différentes manières, toutefois on peut dire :

- c'est un court segment peptidique de 2 à 4 résidus

- une ou deux liaisons hydrogène se forment entre le premier et le dernier résidu du coude

- la configuration de la proline est telle qu'elle provoque un changement de direction et peut donc être presque à elle seule un coude.



Dans le coude à 4 résidus, les résidus R2 et R3 avec des chaînes latérales portant des charges favoriseront une telle structure (chaînes latérales à l'extérieur et interagissant avec l'eau). Les résidus R1 et R4 avec des chaînes latérales de faible encombrement stérique favoriseront cette structure.

3124- Pelote statistique

Certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans des conformations périodiques comme l'α-hélice ou le feuillet plissé β : leur forme irrégulière est qualifiée de pelote statistique(random coil). Cette structure n'est pas pour autant inorganisée, elle obéit aux contraintes locales de voisinage.

3125- Collagène

Un troisième type de structure secondaire est le collagène qui est un câble à trois hélices. Le collagène est la protéine la plus abondante des vertébrés, c’est le principal constituant des tissus conjonctifs tels l’os, les dents, les tendons etc…

32- Protéines globulaires

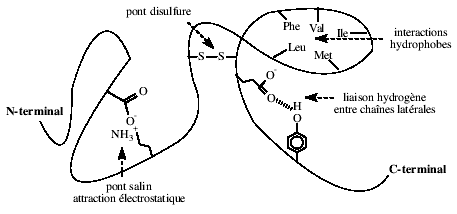
Se présentent comme des molécules sphéroides compactes, ex : enzymes, protéines de transport récepteurs…En plus des structures, primaire et secondaire, les protéines globulaires évoluent en une structure tertiaire et parfois quaternaire.

321- Structure tertiaire

Elle est obtenue par repliement de la chaîne sur elle-même résultant d’interactions de type :

* + Liaisons S-S ou ponts disulfures (liaison covalente)
  + Liaisons H
  + Liaisons électrostatiques (ioniques)
  + Interactions hydrophobes.

A ce stade la protéine se présente sous la forme d’une sphère (globule) avec, à la surface, les groupements polaires et, à l’intérieur, les groupements apolaires formant ainsi une zone interne hydrophobe, ex : la myoglobine.



**Schéma d’une structure tertiaire**

322**-** Structure quaternaire

Plusieurs chaînes polypeptidiques (monomères ou protomères) peuvent s’associer de manière spécifique et former une molécule polymérique comportant un axe de symétrie. Les monomères sont unis par des liaisons faibles (ionique, hydrogène, hydrophobe) mais jamais par des liaisons covalentes, ex : l’hémoglobine qui est formée par l’association de quatre chaînes identiques deux à deux.

4- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES :

41- Solubilité

Les protéines sont généralement solubles dans l’eau. Certains facteurs favorisent la solubilité des protéines alors que d’autres la défavorisent :

• *Influence des électrolytes minéraux :*

A faible concentration un sel augmente la solubilité d’une protéine (salting-in effect ou effet dissolvant).

A forte concentration le même sel diminue la solubilité de la protéine (salting-out effect ou effet de relargage).

• *Influence du pH* :

La solubilité d’une protéine est minimale au voisinage de son pHi. Elle augmente de part et d’autre.

• *Influence des solvants organiques :*

L’éthanol, le méthanol et l’acétone sont des solvants organiques neutres, ils sont utilisés pour précipiter les protéines à condition que le la température soit inférieure ou égale à –5°C afin d’aviter la dénaturation.

• *Influence de la température :*

La solubilité des protéines augmente de 0 à 40°C. Au delà elle diminue car les protéines deviennent instables et se dénaturent.

42- Caractères amphotères des protéines

Les chaînes latérales de certains acides aminés comportent des groupements ionisables tels OH, COOH, NH2 …qui confèrent aux protéines un caractère amphotère.

Lorsque le pH du milieu varie, ces groupements s’ionisent en fonction de leur pK et la protéine peut exister sous trois formes différentes :

pH milieu < pHi pH milieu = pHi pH milieu > pHi

Protéine (+) Protéine (0) Protéine (-)

Cette propriété permet l’utilisation des différentes techniques de séparation des protéines selon la charge.

43- Méthode de détermination du PM d’une protéine

Différentes méthodes peuvent être utilisées :

• *Dialyse et ultrafiltration* :

La méthode est basée sur le principe de la diffusion à travers une membrane semi-perméable laissant passer l ‘eau et les sels minéraux sans laisser passer les protéines.

• *Ultracentrifugation* :

Ce procédé utilise des centrifugeuses pouvant tourner à grande vitesse allant jusqu’à 60 000 tours/minute. (champ de gravitation de 500 000 g et plus). A cette vitesse les protéines sédimentent en fonction de leur densité. On détermine ainsi une constante de sédimentation S caractéristique d’une protéine donnée exprimée en unité Svedberg (1 U.S = 10-13 cm/s/unité de champ ou dyne/g). Les protéines ont une S comprise entre 1 et 200. Le poids moléculaire (P.M) d’une protéine est donné par l’équation de Svedberg :

S x f x N S: constante de sédimentation

P.M = f: coefficient de friction

1 – V x ρ N: nombre d’Avogadro

V: volume partiel spécifique de la protéine(cm3/g)

ρ : densité du milieu de centrifugation (g/cm3)

• *Filtration sur gel (chromatographie d’exclusion moléculaire)* :

Passant à travers une colonne remplie d’un gel (de dextrane ou d’acrylamide) les grosses molécules, exclues du gel, sortiront les premières tandis que les plus petites, pouvant pénétrer dans les mailles (ou les pores) du gel, sont retardées et sortiront en dernier. Il existe une relation linéaire entre le logarithme du P.M et le volume d’élution.

• *Diffusion de la lumière* :

Une solution de protéine traversée par un faisceau lumineux diffuse latéralement une partie de la lumière : effet Tyndall. Cette diffusion est fonction du nombre et de la taille des protéines, donc en relation avec le P.M.

• *Pression osmotique* :

Il existe une relation entre la pression osmotique d’une solution protéique et le P.M de cette protéine selon l’équation de Van’t hoff :

R x T x C R : constante des gaz parfaits = 0,082 l.atm/mole.K

P.M = = 8,32 107 ergs/mole.K.

π T : température en Kelvin

C : concentration en g/l

π : pression osmotique en atmosphère (atm)

• *Composition chimique* :

Toute protéine doit contenir au minimum une molécule de son groupement prosthétique ou au minimum une molécule de chacun de ses acides aminés constitutifs. Le poids d’une protéine contenant une de ces molécules correspond au poids moléculaire minimum (P.M min) :

Poids atomique de l’élément x 1 x 100

P.M min =

% de l’élément dans la protéine

P.M réel = P.M min x n n: nombre d’atomes de l’élément.

5- ISOLEMENT, FRACTIONNEMENT ET DOSAGE DES PROTEINES :

51- L’isolement, la séparation et la purification des protéines

Sont des opérations difficiles à effectuer en raison du nombre très élevé de protéines ayant des structures chimiques voisines mais également de leur sensibilité aux agents dénaturants.

Les méthodes les plus utilisées sont :

• La dialyse

• La précipitation par les sels neutres (relargage)

• La précipitation par les solvants organiques à basse température

• Les différentes techniques chromatographiques : exclusion moléculaire, échange d’ions, couche mince ….

• L’électrophorèse

• L’ultracentrifugation etc…

52- Dosage

Plusieurs méthodes permettent l’évaluation quantitative des protéines dont les plus importantes sont :

● *Réaction du Biuret* :

On ajoute à la solution protéique une solution fortement alcaline de sulfate de cuivre. Il se forme un complexe entre l’ion cuivrique et les liaisons peptidiques des protéines avec apparition d’une coloration violette (il faut au moins 4 acides aminés). Le dosage est réalisé en mesurant l’intensité de la coloration par spectrophotométrie à 540 nm.

● *Méthode de Lowry* :

Elle est très utilisée. La coloration bleue développée par les protéines est attribuée à l’action du réactif de Folin principalement avec les groupements phénoliques de la tyrosine, également avec le tryptophane et à un degré moindre avec la cystéine et l’histidine. Elle est plus sensible que la méthode du Biuret mais il faut un calibrage préalable avec la protéine pure, l’intensité de la coloration variant d’une protéine à une autre pour un même poids due à la variation du pourcentage d’acides aminés aromatiques dans la protéine.

● *Méthode au bleu de Coomassie* :

Le bleu de Coomassie, brun-orange en milieu acide, prend une coloration bleue intense en présence de protéines.

● *Absorption dans l’U.V* :

Les protéines possèdent une bande d’absorption à 280 nm par suite de l’absorption de la tyrosine et du tryptophane dans cette région du spectre. Cette propriété est mise à profit pour estimer la concentration en protéines des solutions.

● *Autres méthodes* :

Il existe plusieurs autres méthodes plus récentes et plus sensibles telles les méthodes immunologiques, radio-immunologiques, immuno-enzymatiques, etc…