

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

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

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

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

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

CLASSIFICATION SUIVANT LEUR FONCTION	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Protéines d'adhésion ou fibronectines</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Actine, myosine du muscle</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caséine du lait</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hormones</li> <li>▪ Facteurs de croissances</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Réponse aux hormones</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hémoglobine : transport O<sub>2</sub></li> <li>▪ <b>Transferrine : transport Fe</b></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Très diverses</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anticorps</li> <li>▪ Anti-enzymes : protection contre un emballement enzymatique</li> </ul>

ORGANISATION STRUCTURALE	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enchainement des acides aminés <math>\textcircled{O}</math> déterminé par :           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Séquence protéique</li> <li>○ Séquence nucléotidique du gène</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Premier degré de repliement de la chaîne peptidique           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dû à la formation de liaisons hydrogènes H entre l'oxygène du groupement carbonyle CO et l'hydrogène du groupement amine NH<sub>2</sub></li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Second degré de repliement</li> <li>▪ Ensemble de structures secondaires donnant la forme 3D caractéristique de la protéine ou conformation</li> <li>○ Liaisons faibles mises en jeu :           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Forces de Van der Waal</li> <li>– Interactions hydrophobes</li> <li>– Liaison hydrogène <math>\textcircled{O}</math> <math>\textcircled{O}</math></li> </ul> </li> <li>○ Liaisons covalentes <math>\textcircled{O}</math> fortes           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Pont disulfures</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Organisation en domaines (fixation du Ca<sup>2+</sup>, réponse aux facteurs de croissance) identiques entre les protéines</b></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Seulement si association de plusieurs chaînes polypeptidiques <math>\textcircled{O}</math> <math>\textcircled{O}</math> appelées sous-unités           <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Sous-unités stabilisées le plus souvent par des liaisons faibles <b>et exceptionnellement des liaisons covalentes telles que les ponts S-S</b></li> </ul> </li> <li>○ Homodimères si sous-unités identiques</li> <li>○ Hétérodimères si sous-unités différentes           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Exemple : Hémoglobine ou Hb = <b>hétérotétramère</b></li> </ul> </li> </ul>

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

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

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

ORGANISATION STRUCTURALE ACQUISITION DE LA STRUCTURE 3D	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Déterminée par la séquence <b> primaire</b></li> <li>■ Confère l'activité biologique de la protéine</li> <li>■ Dénaturée par la chaleur de façon réversible en chauffant doucement           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Perte de son activité temporairement qui est récupérée par une baisse douce de la température</li> <li>○ Exemple : dénaturation/renaturation de l'ARNase</li> </ul> </li> <li>■ 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"> <li>○ Perte définitive de la fonction de la protéine</li> <li>○ Exemple : albumine du blanc d'œuf</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 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"> <li>○ 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</li> </ul> </li> <li>■ Peuvent aider au passage à travers les membranes           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2 chaperons replient et déplient la protéine de chaque côté de la membrane</li> </ul> </li> </ul>

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

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

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

Principales méthodes d'études : ELECTROPHORÈSE <b>MODES DE RÉVÉLATION</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coloration de <b>toutes</b> les protéines</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ De moins en moins utilisé</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Principe en 3 étapes :           <ol style="list-style-type: none"> <li>1 - Protéines séparées sur un gel d'acrylamide-SDS</li> <li>2 - Transfert sur une feuille de polymère qui sera incubée avec l'anticorps spécifique, couplé à un marquage</li> <li>3 - Film sera ensuite révélé pour identifier la protéine d'intérêt : <b>1 seule bande révélée</b></li> </ol> </li> <li>▪ <b>Permet l'identification et la quantification des protéines</b></li> </ul>

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

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

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

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

## PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES

### CARACTÈRE AMPHOTÈRE DES PROTÉINES

	<b>Selon la charge globale des protéine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chaque protéine possède un pH<sub>i</sub>, pH à laquelle la protéine est neutre</li> <li>▪ Les protéines comme les peptides possèdent des <b>chaines latérales ionisables</b></li> <li>▪ Dans un tampon à pH donné           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Les protéines chargées (+) migrent vers le pôle (-) </li> <li>○ Les protéines chargées (-) migrent vers le pôle (+) </li> <li>○ Les protéines dont le pH<sub>i</sub> est égal au pH ne migrent pas car elles ont une charge nulle </li> </ul> </li> </ul>
	<b>Exemples des protéines du sérum</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dans un tampon à pH légèrement alcalin environ 8,6</li> <li>▪ L'<b>albumine</b> a le pH<sub>i</sub> le plus faible : c'est celle qui est la plus chargée négativement à pH 8,6 : elle migre le plus loin vers le pôle (+) </li> </ul> <p style="text-align: center;">           Tampon pH 8,6       </p> <p style="text-align: center;"> &lt;img alt="Isoelectric focusing gel diagram showing protein bands for serum proteins at pH</p>

## PURIFICATIONS DES PROTÉINES

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Utile à des fins de recherche</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ On utilise comme <b>source</b> un extrait de tissu, organe... broyé et homogénéisé, le plus riche en protéine d'intérêt possible</li> <li>▪ On réalise alors une <b>série d'étapes</b> de purification qui inclut différentes méthodes comme les chromatographies, le but étant d'obtenir la protéine la <b>plus pure possible</b></li> <li>▪ La purification est facilitée lorsqu'on peut <b>doser une activité biologique</b> associée à la protéine d'intérêt : cas des enzymes</li> <li>▪ À chaque étape de purification, on collecte <b>différentes fractions</b>, 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</li> </ul>

## PURIFICATIONS DES PROTÉINES

### DEFINITIONS

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quantité de substrat ou de produit transformé par unité de temps</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\mu\text{mol}</math> de S ou P/minute</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activité totale par mg de protéines totales</li> </ul>	$\frac{\text{Activité}}{\text{mg de protéines}}$
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enrichissement en protéines</li> <li>▪ Égal à 1 au départ par définition et augmente au fur et à mesure des étapes</li> </ul>	$\frac{\text{As après purification}}{\text{As avant purification}}$
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Exprimé en pourcentage</li> <li>▪ À chaque étape, le rendement diminue</li> </ul>	$\frac{\text{Activité totale après purification}}{\text{Activité totale avant purification}}$

## PURIFICATIONS DES PROTÉINES

### CRITÈRES DE PURETÉ D'UNE PROTÉINE

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1<sup>ère</sup> migration : Gel de polyacrylamide <b>dénaturant avec SDS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évaluation de la purification après migration et coloration du gel d'électrophorèse</li> <li>○ Protéine supposée pure si une seule bande est observée à confirmer avec une 2<sup>ème</sup> migration</li> </ul> </li> <li>▪ 2<sup>ème</sup> migration : <b>Gel sans SDS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Migration selon la charge</li> <li>○ 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</li> </ul> </li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Révélation de la protéine d'intérêt grâce à une interaction spécifique avec un anticorps selon la technique de <b>Western Blot</b></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Exemple : activité enzymatique si la protéine à purifier est une enzyme ou une autre activité biologique</li> </ul>