

Fractionnement et séparation des acides aminés

Méthodes les plus utilisées sont:

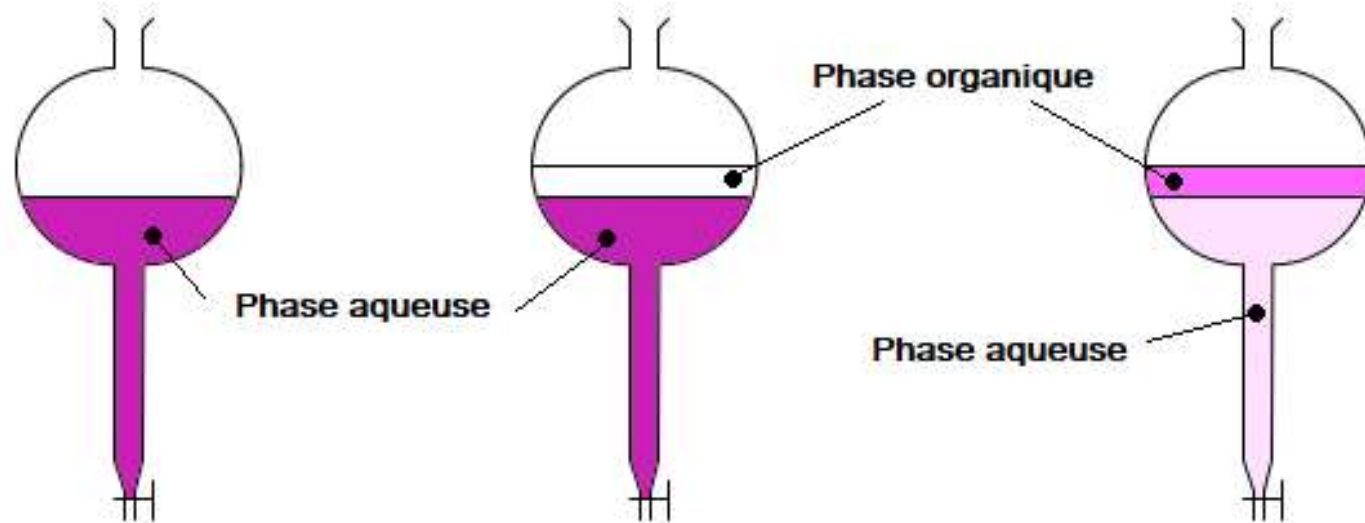
- la chromatographie
- l'électrophorèse

1-Chromatographie de partage

Principe de la chromatographie: consiste à séparer les constituants d'un mélange en fonction de leurs propriétés physico-chimiques qui conduisent à une différence de migration, d'adsorption ou de solubilité entre deux phases une phase dite stationnaire et une phase dite phase mobile

Cette chromatographie a fait appel au début à la différence de solubilité d'une substance entre deux liquides non miscibles (eau et hexane):chromatographie liquide-liquide

extraction par ampoule à décanter



L'ampoule à décanter contient du diiode dissous dans de l'eau. C'est la phase aqueuse.

1

On ajoute à l'ampoule du cyclohexane qui est un solvant organique qui ne se mélange pas à l'eau.

2

Après agitation le diiode est passé de la phase aqueuse à la phase organique. Toutefois, il en reste toujours un peu dans la phase aqueuse.

3

Il en résulte un coefficient de partage
 $K = [C]_{org} / [C]_{acq}$

a-Chromatographie sur papier

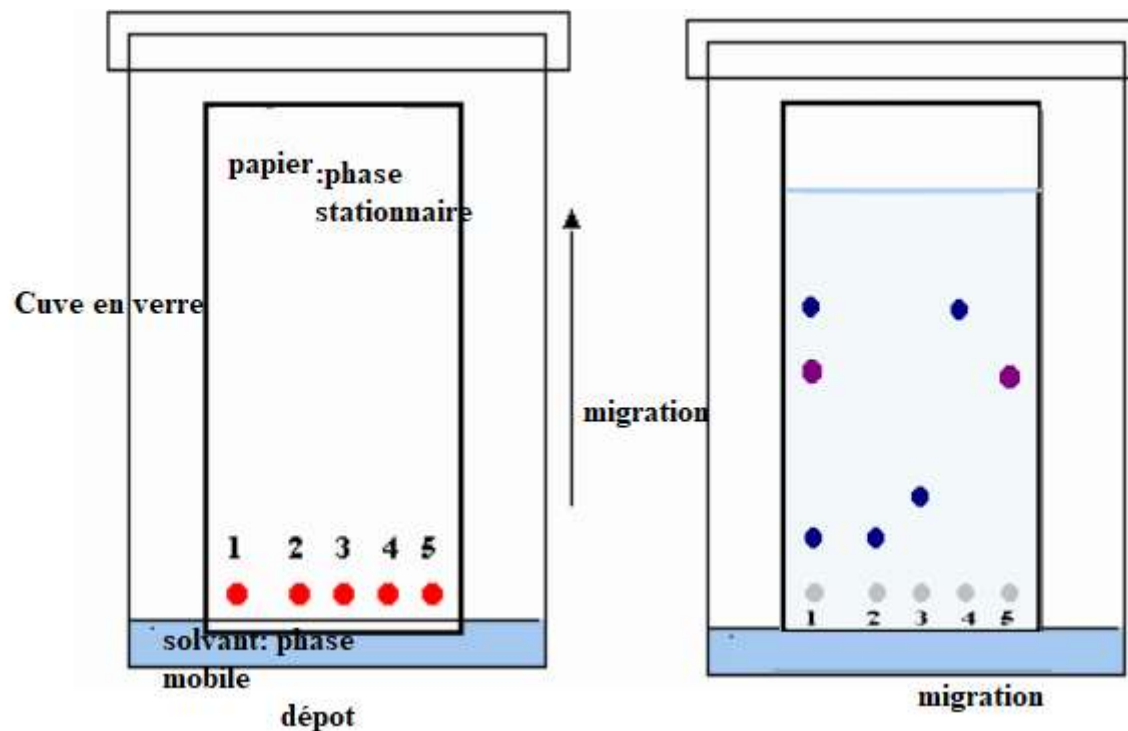
Consiste à remplacer l'une des 2 phases liquides par le papier ou autre support inerte. La phase mobile est un solvant organique ou mélange de solvants, se déplace par gravité ou ascension capillaire tout au long du papier

Actuellement on parle le plus souvent de CCM: chromatographie sur couche mince (plaques en verre ou en plastique imprégnées par de la silice: vente dans le commerce)

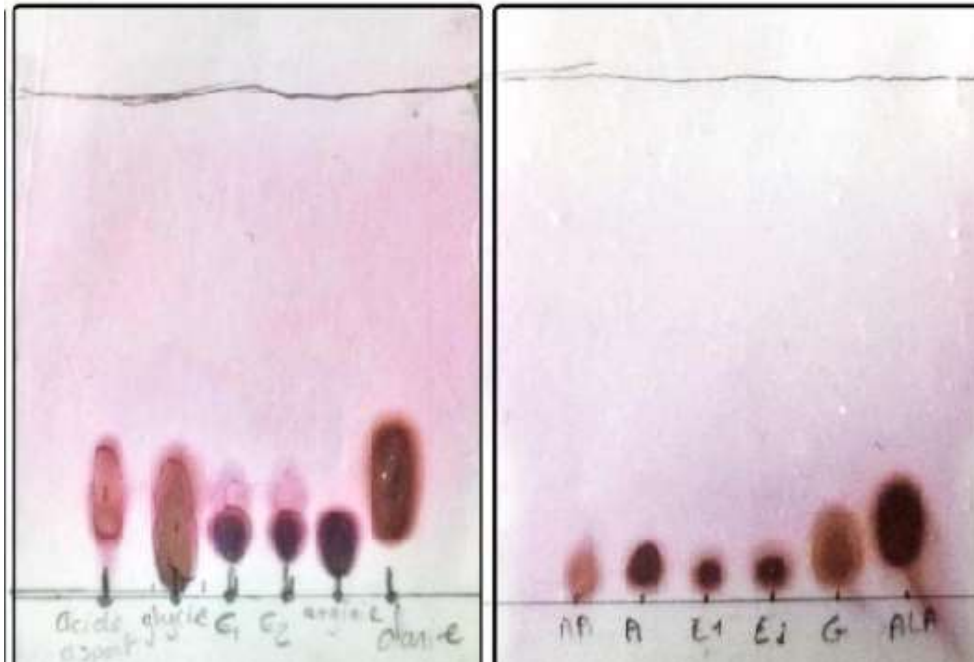
Chromatographie des acides aminés

3 étapes: T.P AA

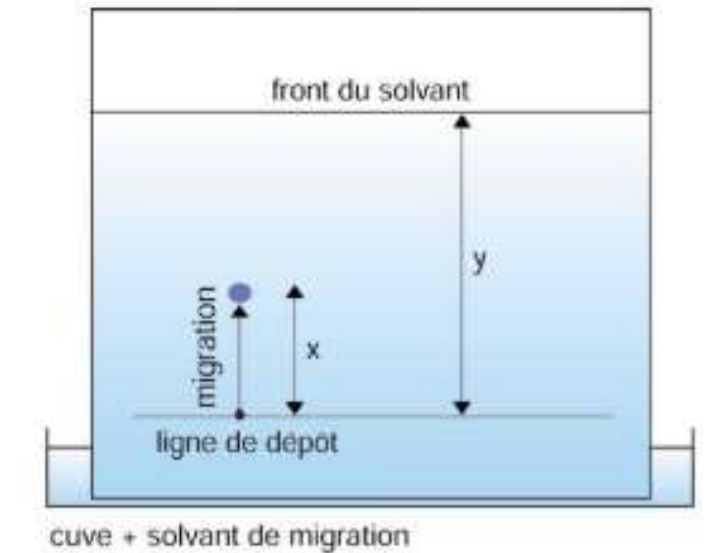
- dépôt de l'échantillon
- développement ou migration
- révélation ou visualisation



Révélation: réaction avec la ninhydrine



Et on définit R_F: Rapport frontal



$$R_F = \frac{x}{y}$$

X: distance parcourue par l'acide aminé

Y: distance parcourue par le solvant

b-Chromatographie sur colonne

c'est une chromatographie d'adsorption

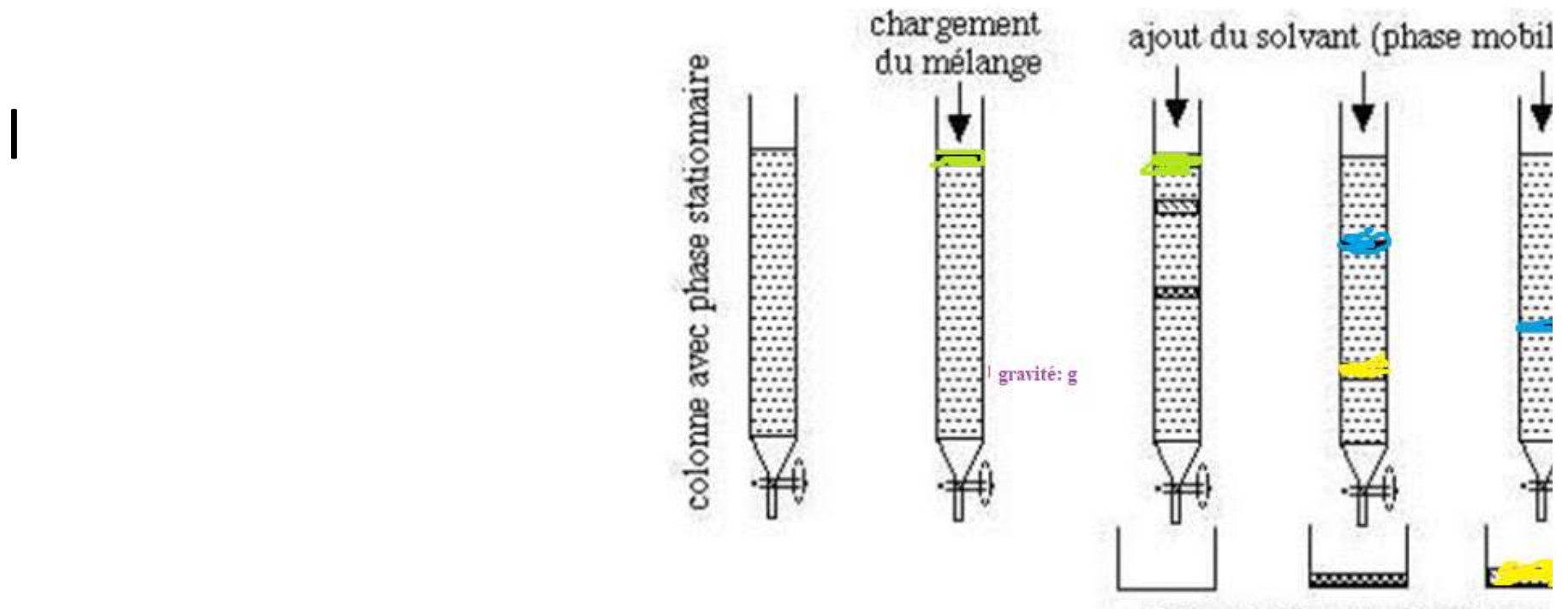
-la phase stationnaire est une colonne en verre ou remplie d'un gel ou résine inerte comme la silice, craie.....

-La phase mobile est un solvant organique ou mélange de solvants

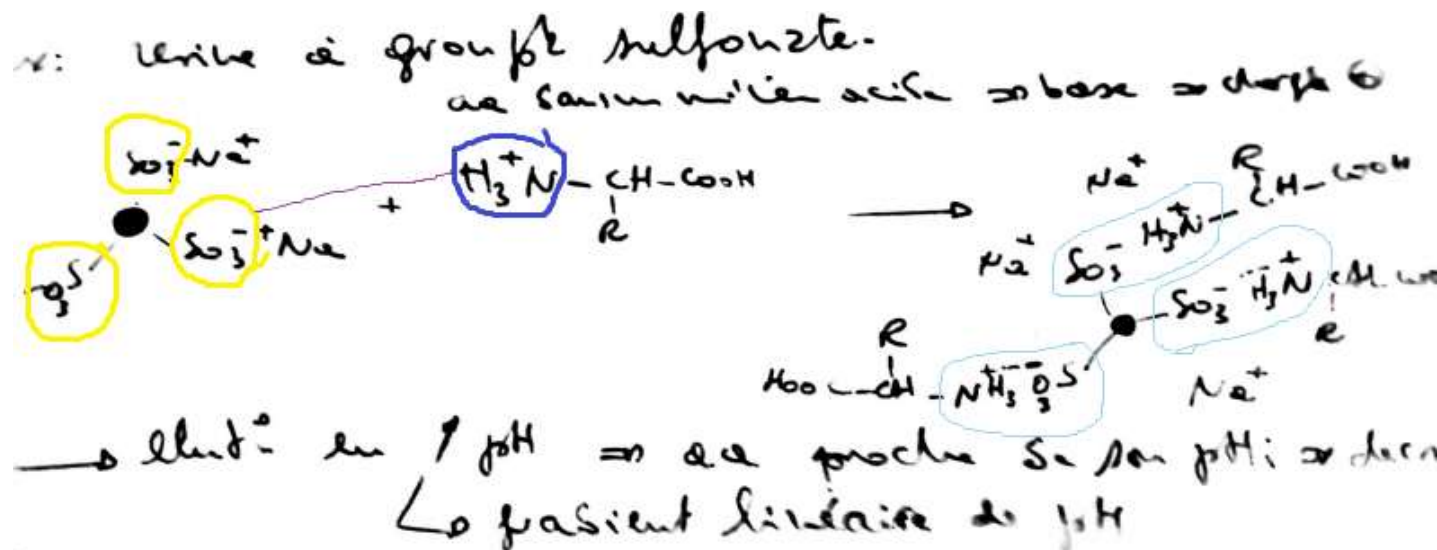
produits sans affinité sortent les premiers

-avec affinité: adsorption

AA: mise en évidence par la ninhydrine 570nm



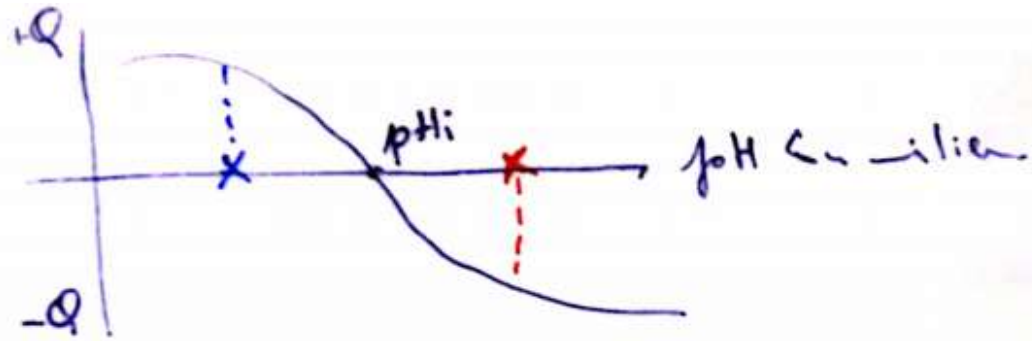
- c-chromatographie échange d'ion
c'est la plus utilisée pour la séparation des AA
-la phase stationnaire est une résine possédant soit chargé + ou chargé -:
échangeurs d'ions
*résine chargées – anionique: échangeuse de cations
*résine chargée + cationique: échangeuse d'anions
- Les AA chargés peuvent donc faire des liaisons électrostatiques avec la résine chargée de sens opposé
- Comment séparer: rupture de cette liaison



4 - Électrophorèse.

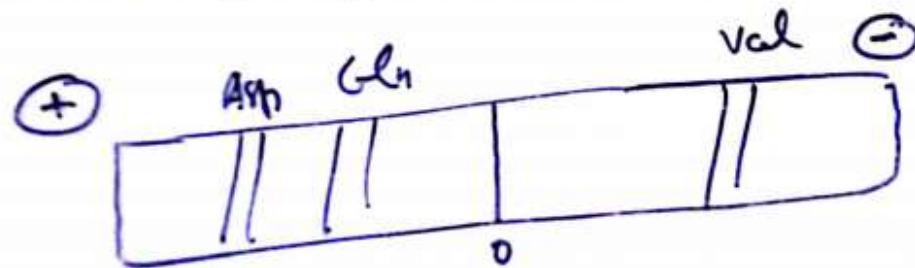
méthode de séparation de divers sels sous l'effet d'un pH donné et placée dans un champ \vec{E} . Les sels se déplacent vers l'anode ou vers la cathode selon leur charge et migrent vers la cathode pour les anions.

ex. électrophorèse sur papier de nitrocellulose.



Asp. Gln $pH_i < 4 \Rightarrow \text{red } x \Rightarrow \text{charge netto } \ominus \Rightarrow \text{negative}$
 $pH = 4$

Val Leu $pH_i > 4 \Rightarrow \text{blue } x \Rightarrow \text{charge netto } \oplus \Rightarrow \text{positive}$



$pH = pHi$
 \Rightarrow isoelectric

Activer

Chapitre II

ETude g^{le} de Proteines.

Objectif:

- 1/ Reconnaître la composition a.a et leur séquence dans une structure protéique. Ceci définit ce qu'on appelle la structure I^{aire}, d'une P⁺.
- 2/ l'arrangement tridimensionnel de la séquence I^{aire} ce qui constitue la structure spatiale de la P⁺.
cette structure spatiale est la résultante d'un ou plusieurs niveaux d'organisation connus sous les noms suivants:
 - structure I^{aire}
 - " II^{aire}
 - " III^{aire}
 - " IV^{aire}

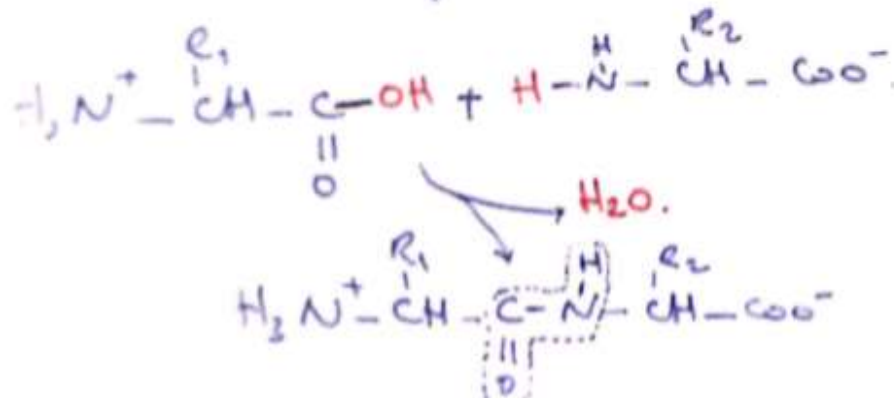
I Structure primaire.

Asp et conv. de

Elle est constituée par la succession des acides aminés par la liaison peptidique (covalente) dans la chaîne polypeptidique.

✓ Liaison peptidique

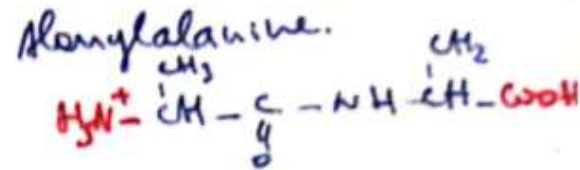
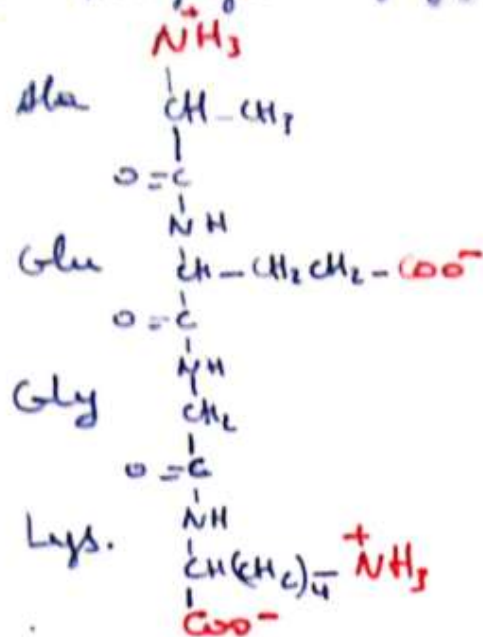
Liaison formée par la liaison de 2 a.a.
Elle met en jeu les atomes C, H, O et N



Liaison peptidique:
Liaison amide substituée

Libération d'une molécule
d'eau

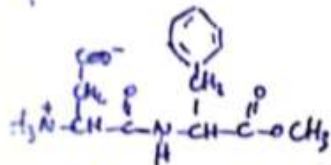
ex: Glutyl-L-phenylalanyl-glycyl-L-lysine.



Peptides ont une fonction biologique.

ex: Hormone corticotrope 29 résidus

petit peptide ayant un effet biologique: Aspartame[®]



L-Aspartyl-phenylalanyl methyl ester

Synthétisé et commercialisé.

Glutathion:
Antioxydant puissant

ionisation des peptides

3/ Ionisation des peptides.

Le peptide ne contient qu'un $\text{groupement d'amino libre}$ et un $\text{groupement d'acide libre}$. ils n'ont pas le $\text{groupement carboxyle}$ libre.

Le $\text{groupement d'acide}$ et le $\text{groupement d'amino}$ se lient par une liaison covalente pour former la liaison peptidique. Ils ne contribuent pas au comportement acido-basique du peptide. Cependant le groupement R de certains acides peut agir sur le comportement acido-basique du peptide. C'est pourquoi les courbes de titrage, pH :

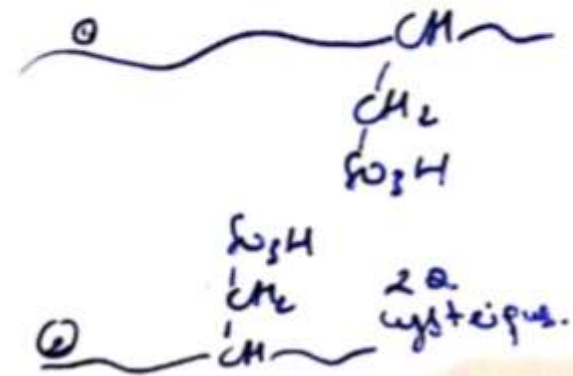
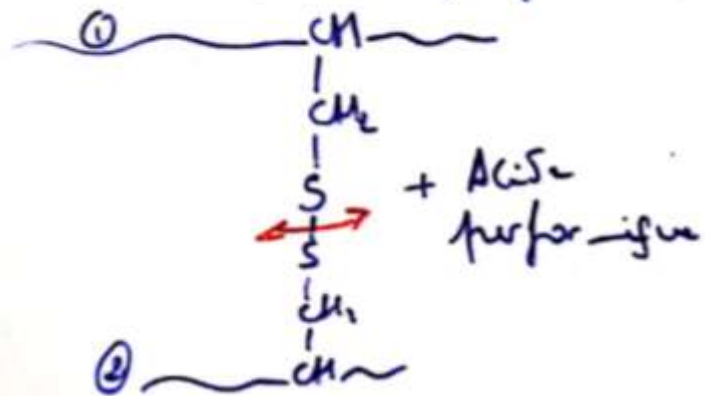
1- Séparation des chaînes.

Pour déterminer la structure 1° de D-oligomères
sans \Rightarrow dissociation des chaînes polypeptidiques.

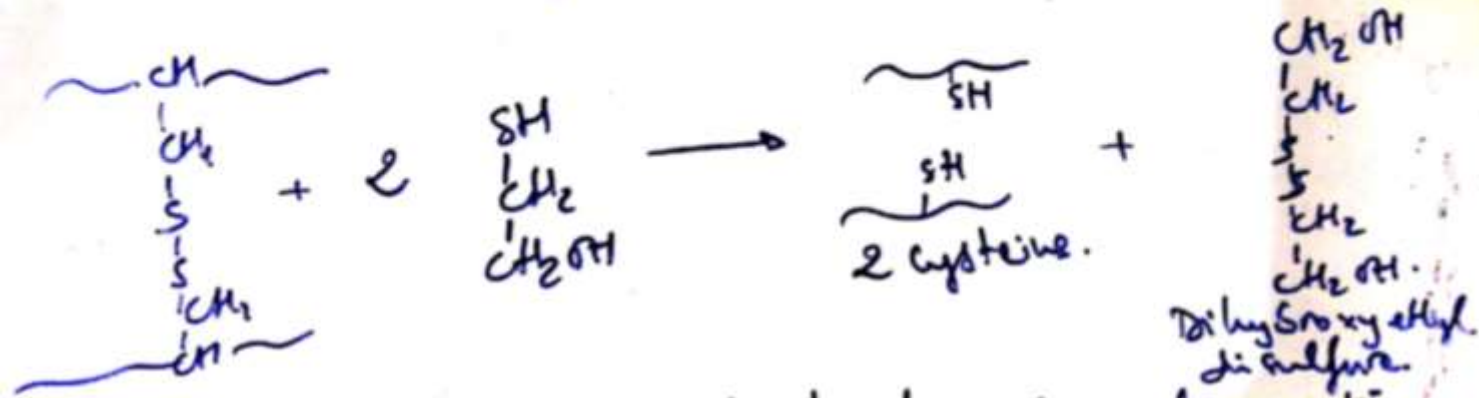
* Si la liaison est de type faible entre les chaînes
 \Rightarrow on provoque la dissociation par des $[urea]^+$, act:
des acides ou des bases, ou par chauffage de T° .

* Si la liaison est de type covalente $-S-S-$ \Rightarrow on
provoque la dissociation par oxydation ou réduction de
ponts disulfures.

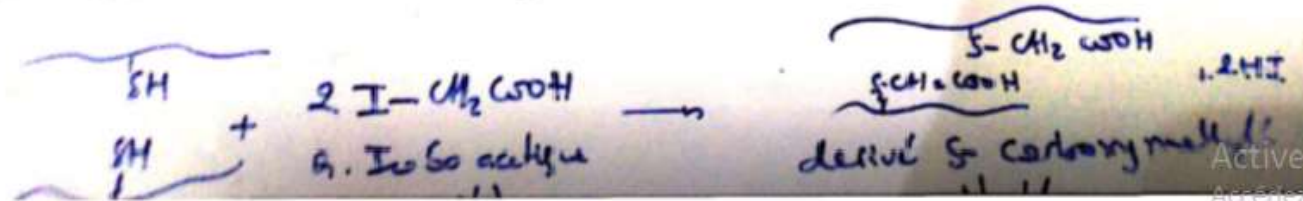
- oxydation perfer-ique



- Reduct.: Agent reducteur: β -mercaptoethanol



Inconvénient: phénomène d'interchange \Rightarrow reforme 2^e des ponts. \Rightarrow il ne faut pas arrêter la réaction à ce moment \Rightarrow on fait une carboxy-éthyle (oxydant), et on fait de reducteur et carboxy-éthyle de l'hydrogène.



2/ Composition en acides aminés.

Le hydrolyse acide totale est utilisée pour rompre les liaisons peptidiques.

- Hydrolysat est préparé comme suit: hydrolyse acide sans HCl 6N, T: 100-110°C / 24-48 h.
→ * Trp est détruit.

* Asn et Gln sont converties en Asp et Glu.

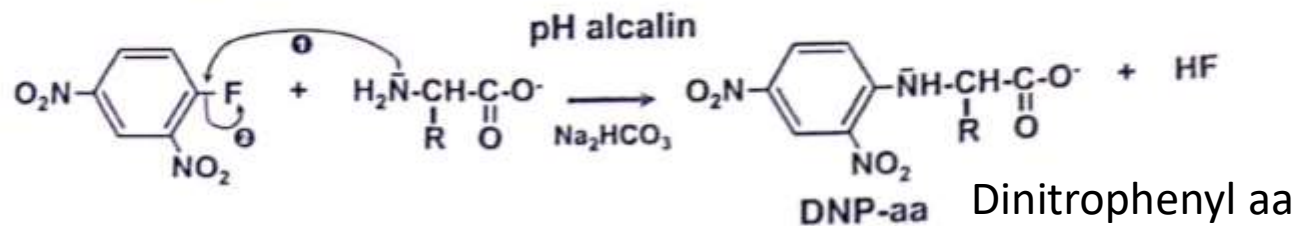
- Hydrolyse ménagée sans NaOH 2-4N / 4-8 h.

→ Analyse est effectuée par chromatographie. S'ensuit
⇒ obtention de résultats d'acides sans la chaîne.

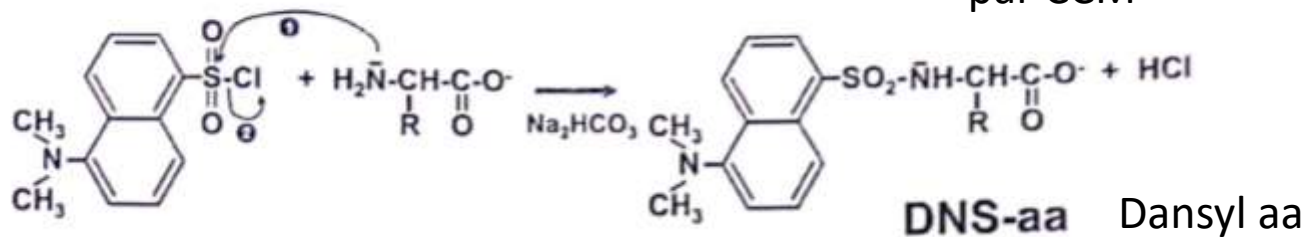
3. Détermination de l'extrémité Nt

but: déterminer l'aa en position Nt. deux méthodes sont utilisées: Méthode chimique et enzymatique.

1-méthode de Sanger : DNFB ou 2,4 dinitrofluorobenzène

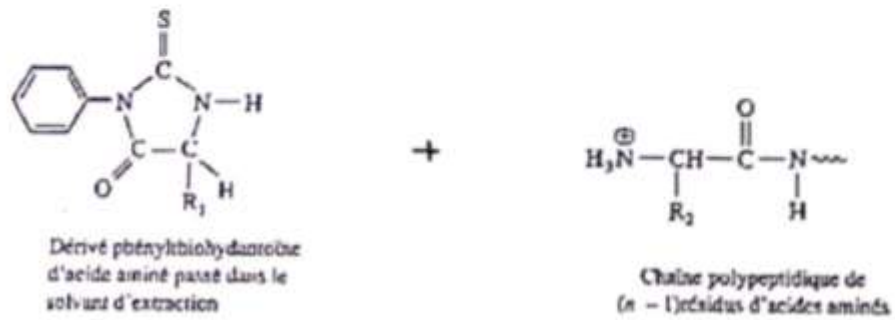
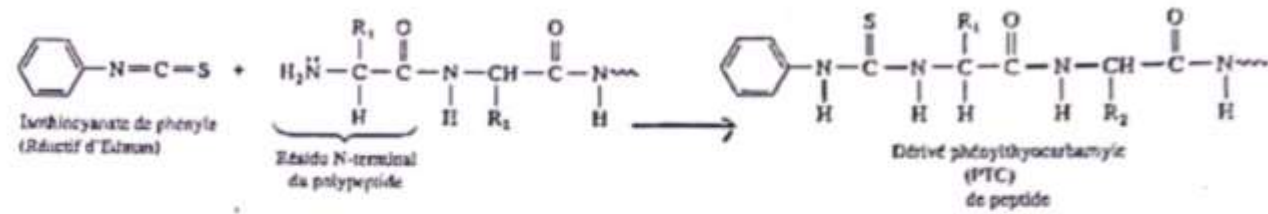


2-Dansylation : chlorure de dansyl



Hydrolyse acide: DNP et DNS aa détectés par CCM

3-Dégradation d'Edman : PITC : phénylisothiocyanate



Méthode à l'origine de la fabrication du séquenceur d'AA

δ - Méthase enzymatique

Ce sont des exopeptidases agissant sur l'ext. N^e
et sont appelées : Aminopeptidases. (AetN.)

rupture séquentielle, à chaque pas \rightarrow libération d'un aa
 \Rightarrow étonnement après 5-6 aa.

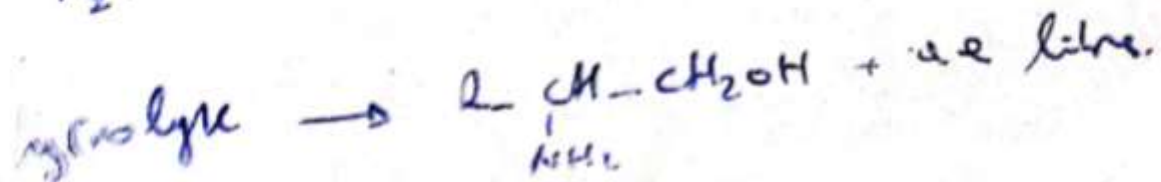
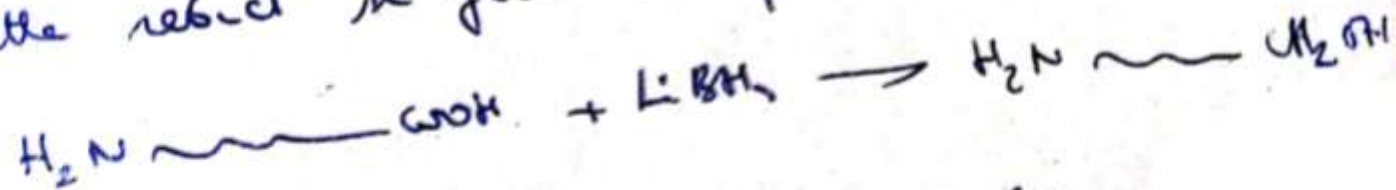
4/ Détermination du C-terminel.

a. Réduction du C.

réductⁿ de l'aa de C. en un alcool 2-aminé.

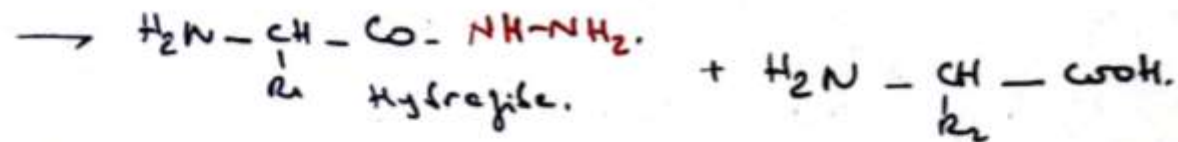
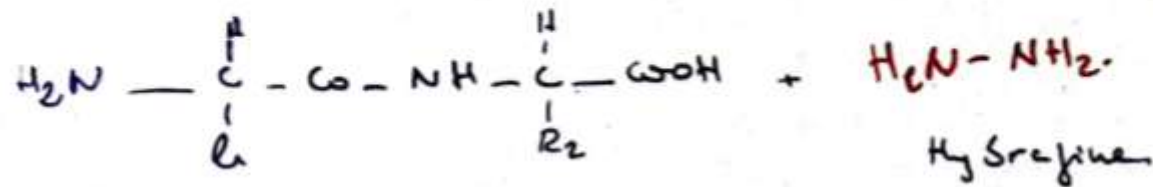
réductⁿ de la fonction COOH en CH₂OH

cette réductⁿ se fait en présence de LiBH₄.



6. Réact° avec l'hydrazine.

* Hydrazinolyse ou react° d'Alcaborg.



avec hydrazine en excès

→ transforme tous les aa en hydrazide (sauf ceux de la leucine pept). à l'exception de l'aa Cx qui ne réagit pas.

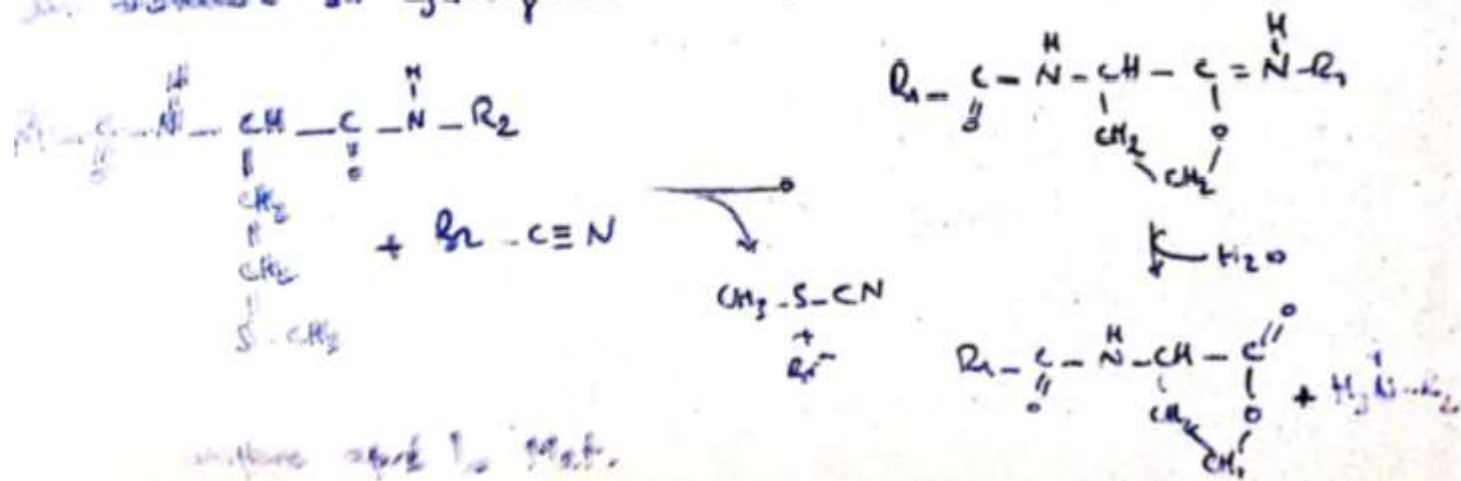
C- Méthode enzymatique

= des exopeptidases (protéases) spécifiques de l'aa ayant
un COOH libre (C-ter). C'est des carboxypeptidases
carboxypeptidase A et B.

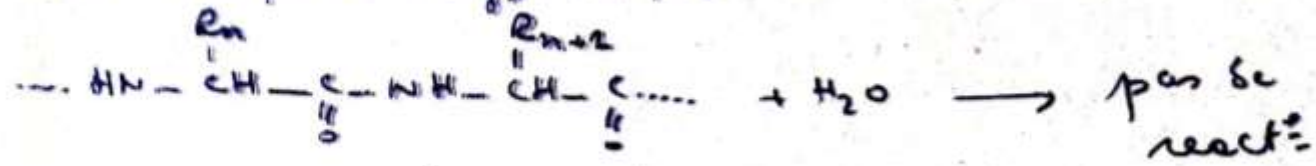
5- Comparaison spécifique à l'intérieur de chaîne

Hand hebt: Cigna.

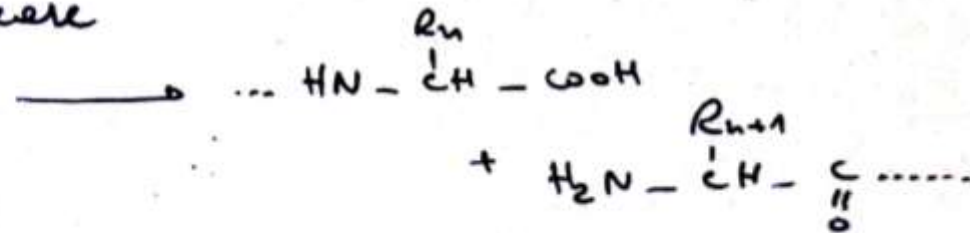
2. Compare chaque react: basé sur la react:
 la cinétique, avec la sensibilité de Methanobrevibacter



b. Coupage enzymatique.



+ protéase



le point de coupage est spécifique.

- La trypsi.

Enzyme digestive produite par le pancréas coupe les liaisons peptidiques au niveau du carboxyle des résidus de Lysine ou d'arginine (a.a. basiques).

Active
Accédez

$R_n = \text{Lys} \downarrow ; \text{Arg} \downarrow$

- La chymotrypsine

Enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau du carboxyle des résidus aromatiques.

$R_n = \text{Phe} \downarrow ; \text{Trp} \downarrow ; \text{Tyr} \downarrow$

Enzyme staphylococcique.

$R_n = \text{Asp} \downarrow ; \text{Glu} \downarrow$

- La carboxypeptidase A : Elle coupe les liaisons C-terminales sauf celles du glyco-colle et des acides aminés basiques à condition que le (R_n-1) ne soit pas une proline.
- La carboxypeptidase B : Elle libère les acides aminés basiques à condition que (R_n-1) ne soit pas une proline.
- La pepsine et la papaine : sont peu spécifiques et sont surtout utilisés comme endopeptidase.

Structure Tridimensionnelle

La structure primaire, 1^{er} niveau d'organisation architectural d'une protéine est constitué par l'enchainement des résidus d'AA en séquence linéaire formant la chaîne polypeptidique. Mais, cette chaîne ne reste jamais à l'état linéaire. En effet, les forces d'attraction et de répulsion des groupements en présence des chaînes latérales des AA chargés obligent la forme linéaire à se replier selon les trois dimensions de l'espace.

Donc cette organisation spatiale ou tridimensionnelle comprend trois niveaux:

- Structure secondaire: organisation selon des motifs répétitifs réguliers
- structure tertiaire: repliement de la chaîne de façon précise
- structure quaternaire: association de plusieurs chaînes ayant chacune une structure III^{aire}

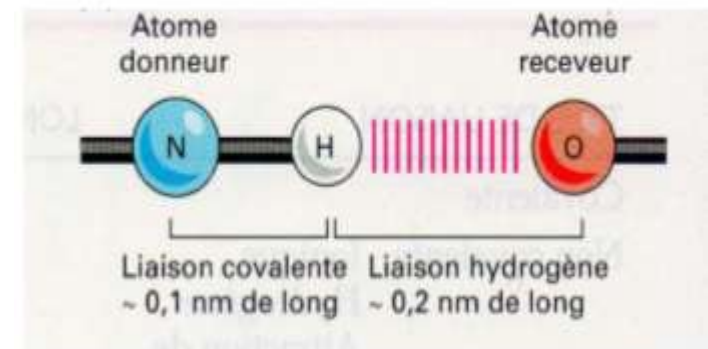
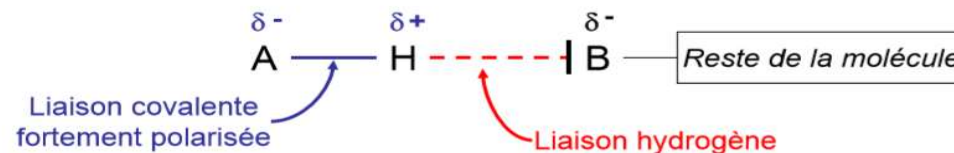
En plus des liaisons covalente qui lient les atomes entre elles
 Dans les macromolécules biologiques comme les protéines, il existe
 des interactions moléculaires non covalentes facilement réversibles
 qui stabilisent ces structures. Ce sont les liaisons dites faibles énergie
 4 principaux types: liaison H, liaison ionique, liaison hydrophobe et
 Van der Waals

TYPE DE LIAISON		LONGUEUR (nm)	FORCE (kcal/mole)	
			Dans le vide	Dans l'eau
Covalente		0,15	90	90
Non covalente	Ionique	0,25	80	3
	Hydrogène	0,30	4	1
	Attraction de van der Waals (par atome)	0,35	0,1	0,1

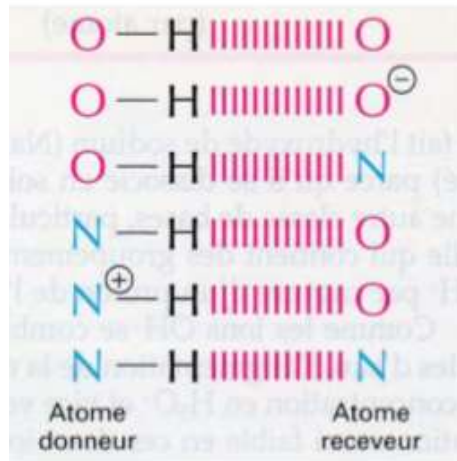
A-Les liaisons hydrogènes

Se forment entre molécules polaires

Normalement un atome H forme une liaison covalente qu'avec un autre atome. Cependant un atome H lié de façon covalente avec un autre atome peut former une liaison additionnelle: liaison H: une association faible entre un atome électronégatif (accepteur) et un atome d'H lié de façon covalente à un autre atome (donneur)

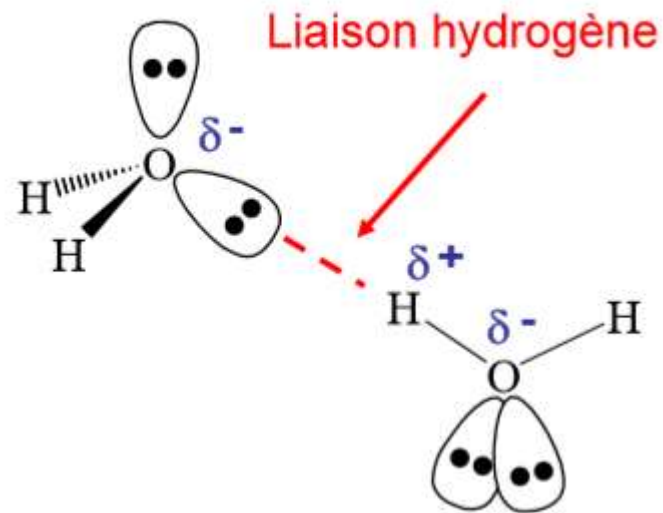


L'accepteur (O ou N) doit avoir des e- libres qui attirent la charge +



Énergie de liaison:
3 à 7 kcal/mole

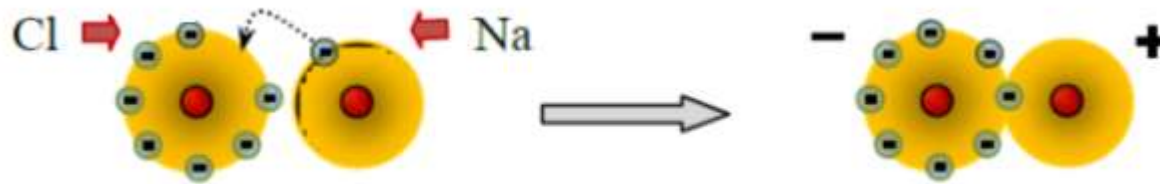
l'eau est polaire, solvate (dissoudre)
facilement et rapidement les molécules
polaires comme les sucres: nombre élevé
de liaison H entre OH ou CO des sucres
avec la molécule eau



B-Les liaisons électrostatiques ou ioniques

Se forment entre molécules chargées

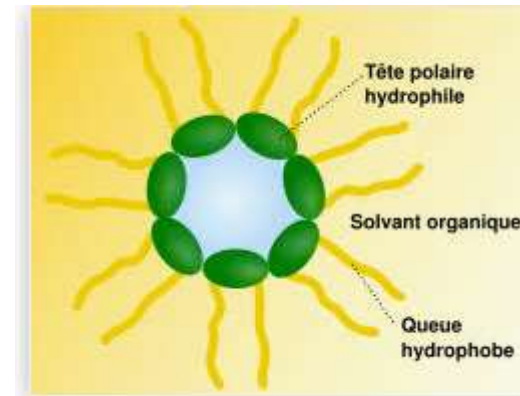
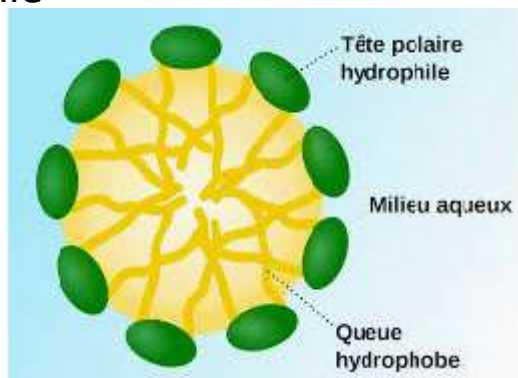
Exemple : Le chlorure de sodium NaCl (Sel de cuisine) : $\text{Na}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{NaCl}$



C-Les interactions hydrophobes

sont la conséquence de la très forte tendance des molécules d'eau à exclure les groupements et les molécules non polaires

Solvant organique + eau: aucune miscibilité: aucune interaction n'est favorable avec l'eau micelle



D-Les interactions de Van der Waals

Les forces de Van der Waals résultent de l'interaction entre les nuages électroniques des atomes ou molécules non chargées très proches les uns des autres. Il en résulte une influence entre les nuages et formation de dipôles qui par la suite s'attirent entre eux

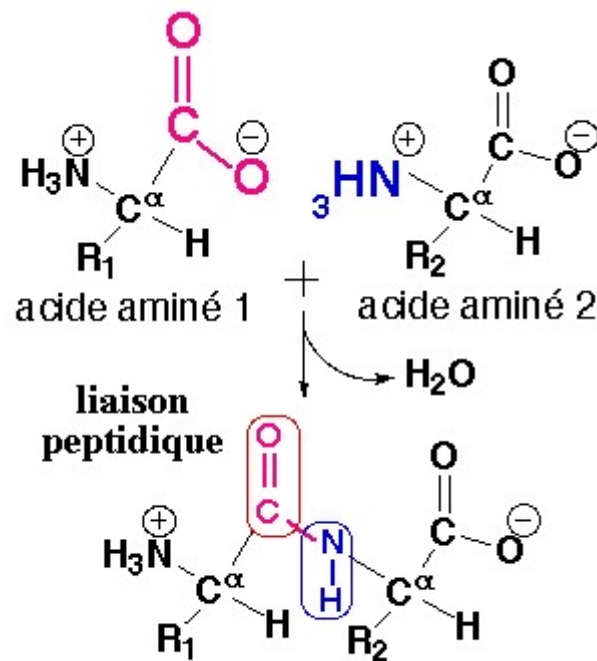
Dépendent de la distance inter-atomique et sont Faibles et moins spécifiques (1 kcal/mole)

Atome	Rayon de la liaison covalente (Å)	Rayons de van der Waals (Å)
H	0,30	1,2
C	0,77	2,0
N	0,70	1,5
O	0,66	1,4
P	1,10	1,9
S	1,04	1,8

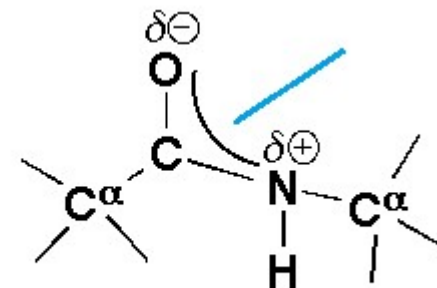
4- Structure secondaire

4-1-motif peptidique

La liaison qui unit 2 acides aminés consécutifs s'appelle la liaison peptidique. Les 2 acides aminés sont alors appelés résidus d'acide aminé. L'oxygène carbonyle porte une charge partielle négative et l'azote une charge partielle positive : tous deux peuvent former une liaison hydrogène.



E. Jaspard (2005)

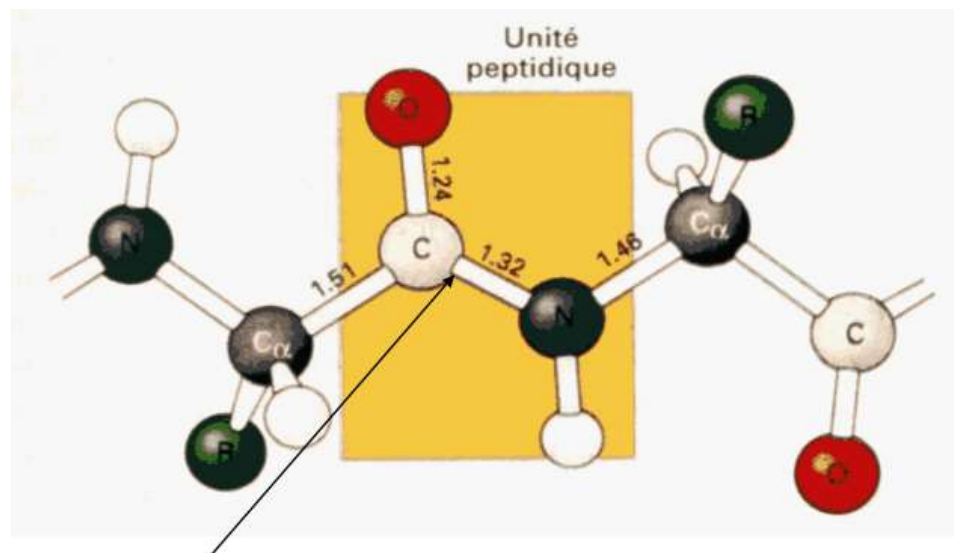


E. jaspard (2005)

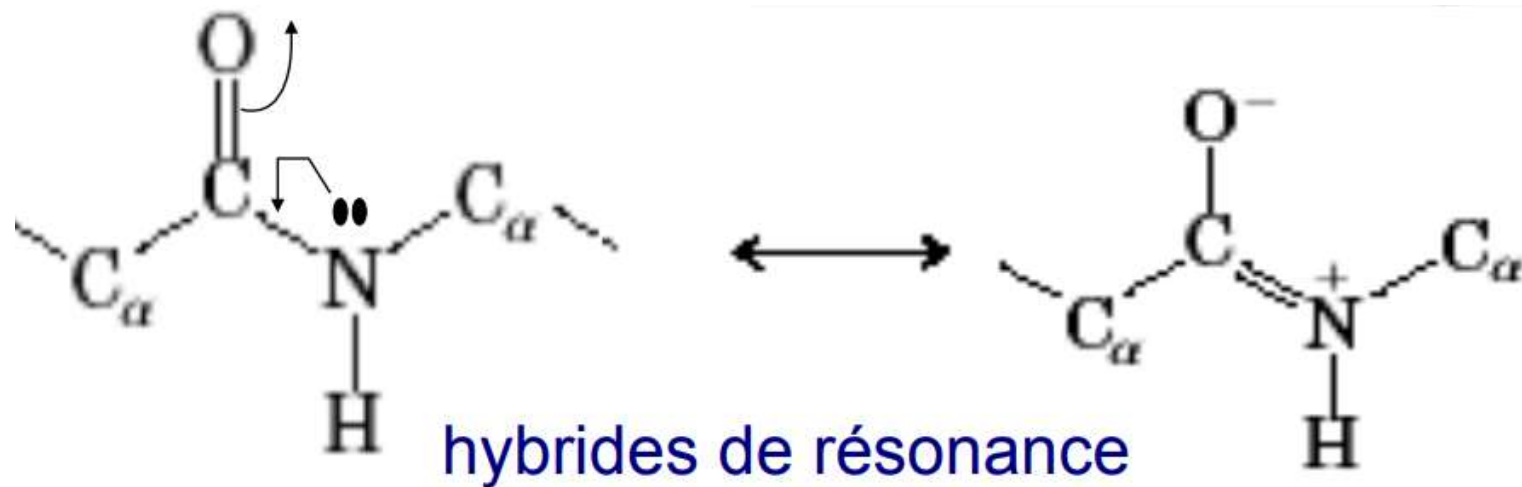
- Travaux de Pauling et Corey:
Les C α des AA adjacents sont séparés par 3 liaisons covalentes disposées comme suit: C α —C—N—C α

Diffraction rayon X: La liaison du carbone du carbonyle avec l'azote (amide) dans la liaison peptidique (1,33 Å) est plus courte que la liaison amide simple C-N

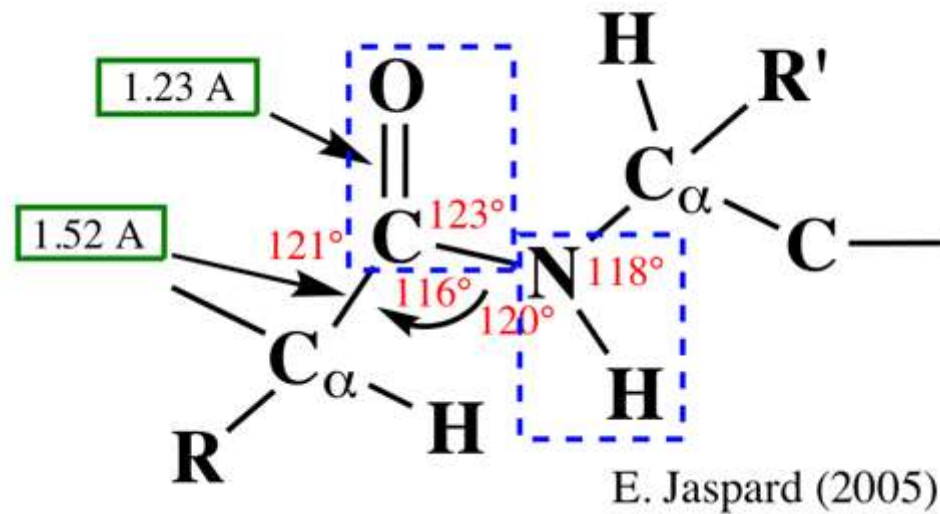
les atomes associés à la liaison peptidiques sont dans un même plan: coplanaires. H et O en position trans



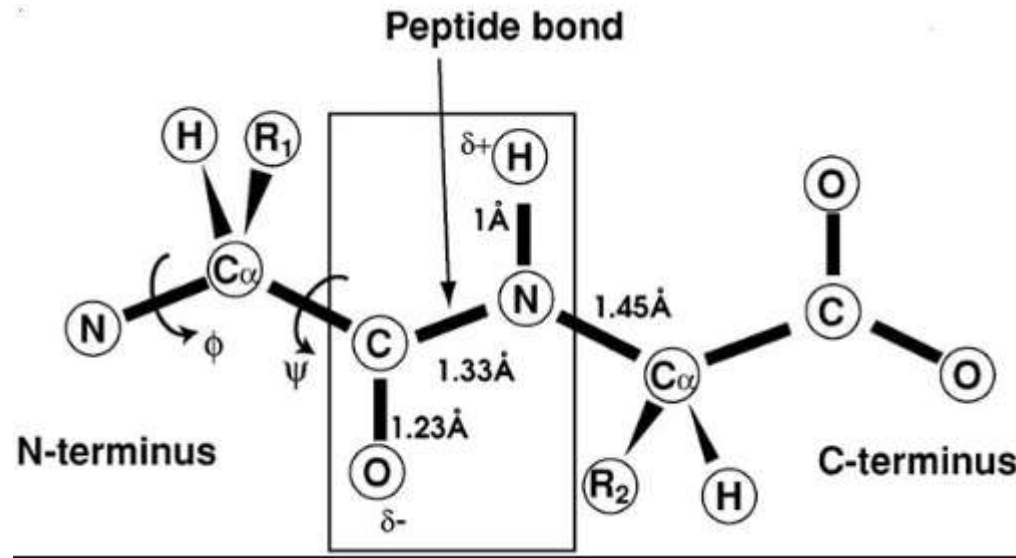
Ceci est dû aux résonances ou bien partage partiel de 2 paires d'électrons entre le carbonyle et l'azote de l'amide
la liaison peptidique entre le C et le N possède un caractère partiel de double liaison



Pauling: Ce caractère partiel de double liaison empêche toute rotation dans la liaison C-N et donc le squelette d'une chaîne polypeptidique peut être représenté comme une série de plans rigides séparés par des groupements -CH(R)
La rotation est autorisée autour liaisons C α -C et N-C α .



Le caractère partiellement double de la liaison peptidique empêche la rotation autour de la liaison C-N.



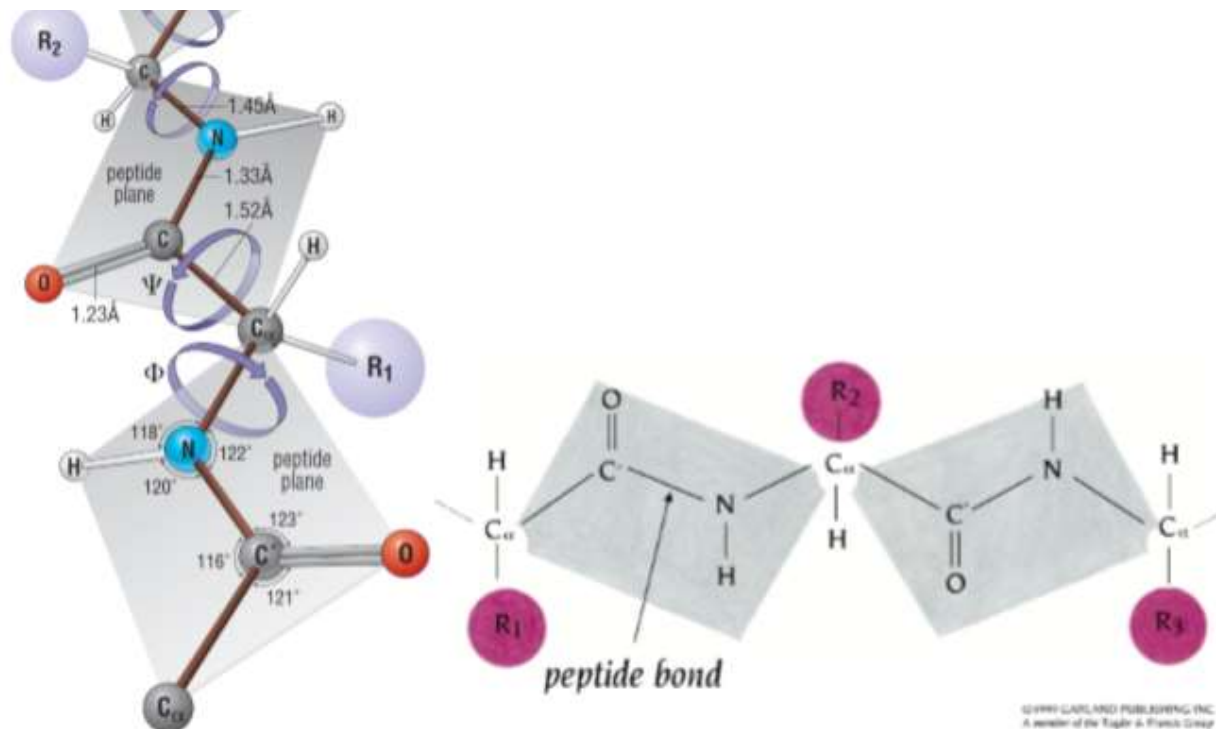
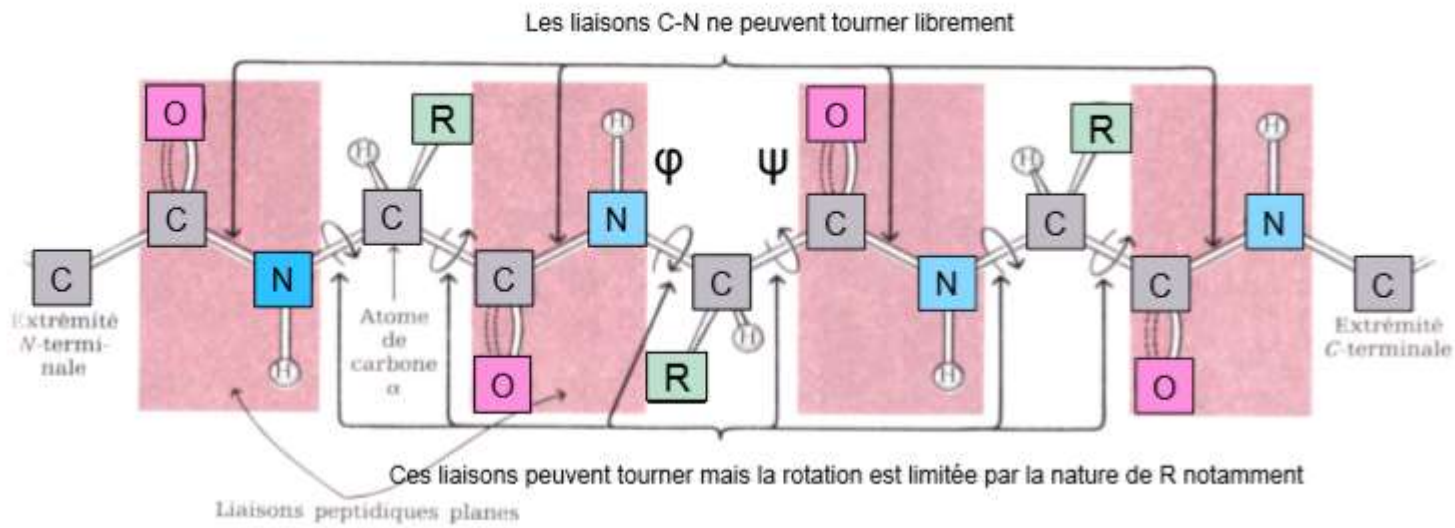
La structure secondaire de la liaison peptidique est déterminée par 2 angles de torsion :

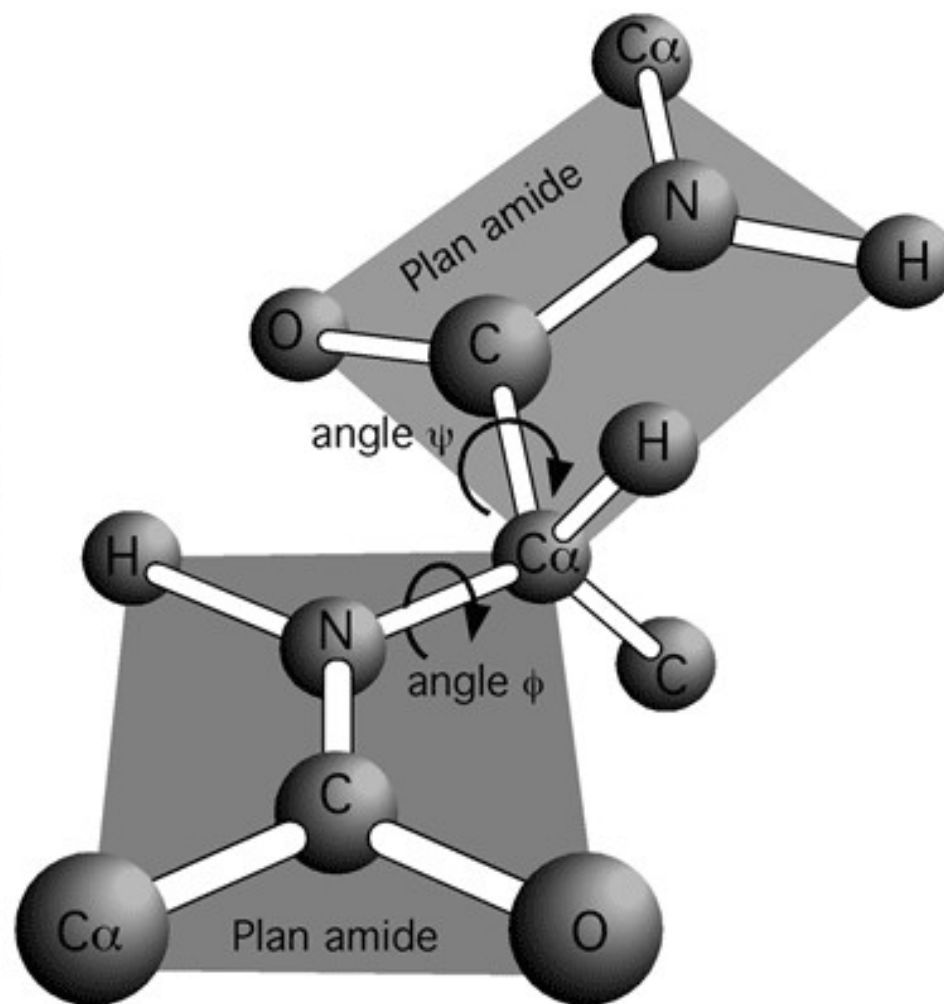
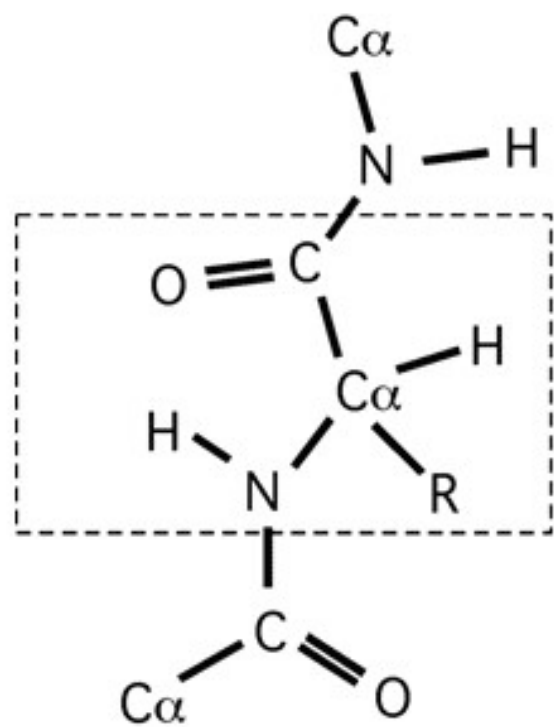
Par convention

Rotation autour de $C_\alpha-C$: angle Ψ (psi)

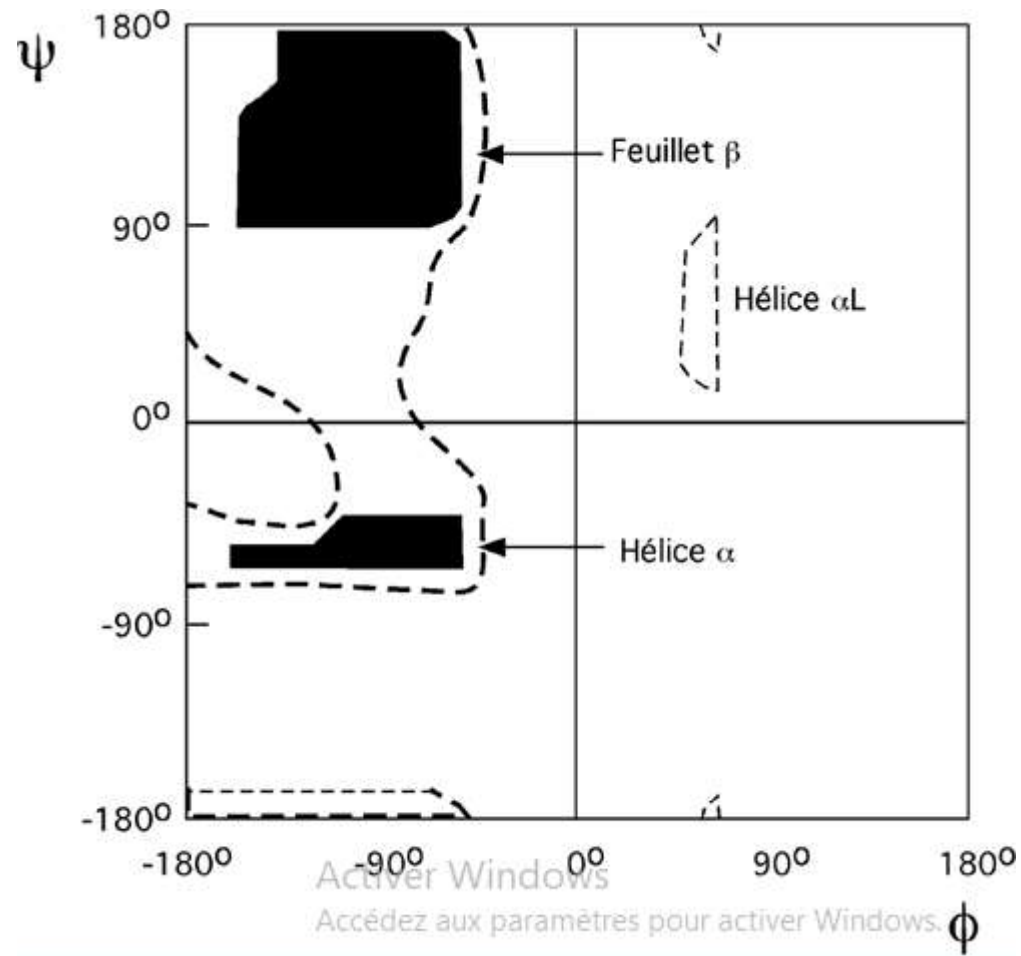
Rotation autour de $N-C_\alpha$: angle Φ (phi)

la possibilité de rotation des plans polypeptidiques autour de ces deux angles définit dans la pratique la structure secondaire II et donc toute structure II est définie ou décrite par les 2 angles Ψ et Φ



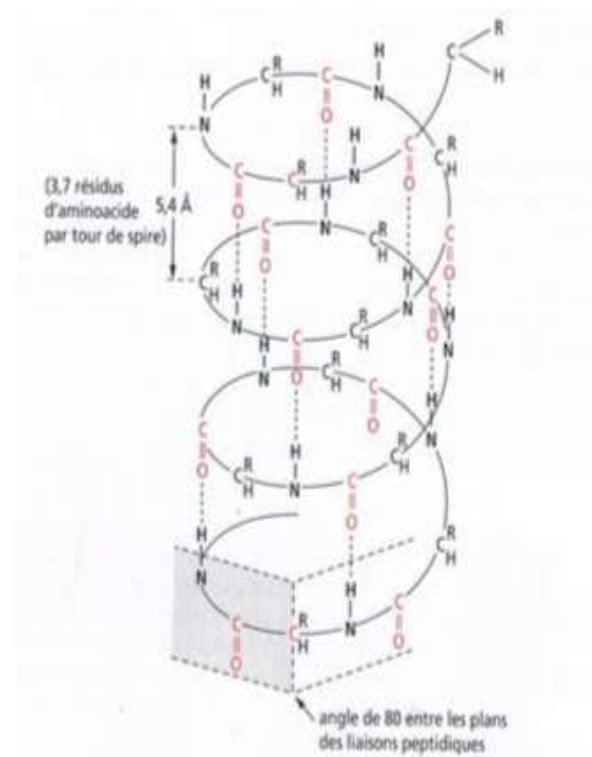


G.N. Ramachandran a établi un rapport entre Ψ/Φ qui donnera la possibilité d'existence des différents AA dans une structure

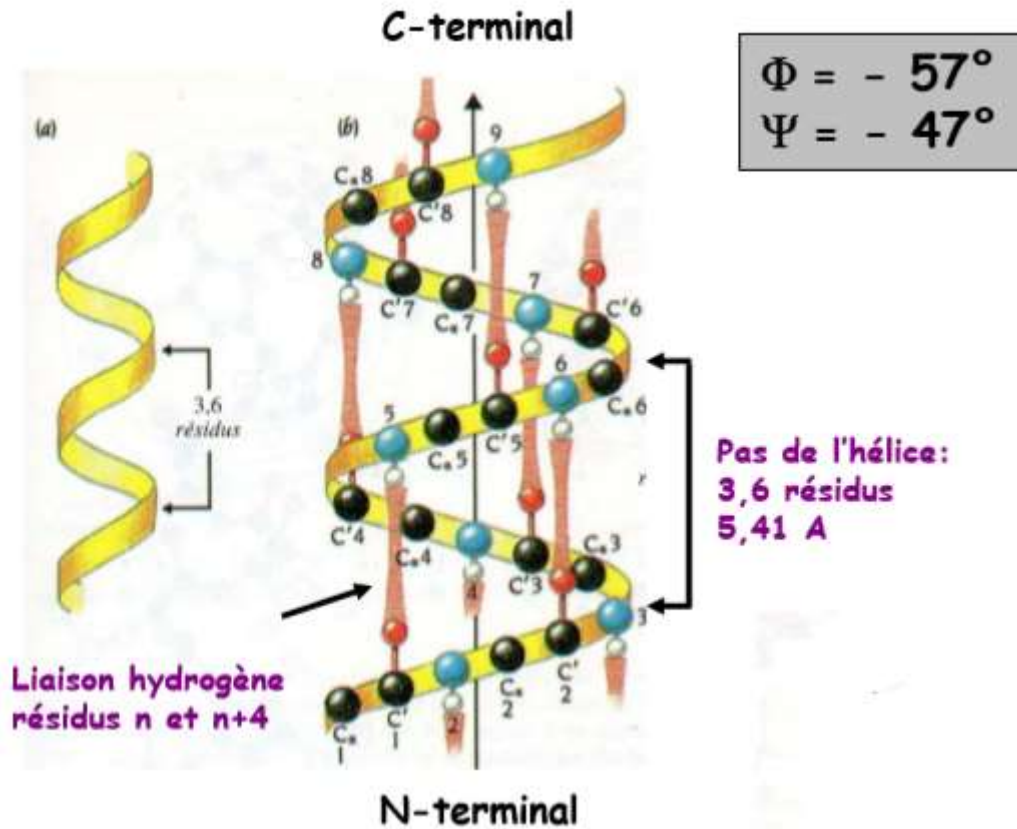


4-2 structure II aire hélicoïdale

Ashury étudia la kératine des cheveux par cristallographie: les spectres montrent la répétition d'unités de structure de façon régulière et toute les 0,45nm. Paulig montra par la suite que la protéine se replie dans l'espace et conçoit le modèle de l'hélice α

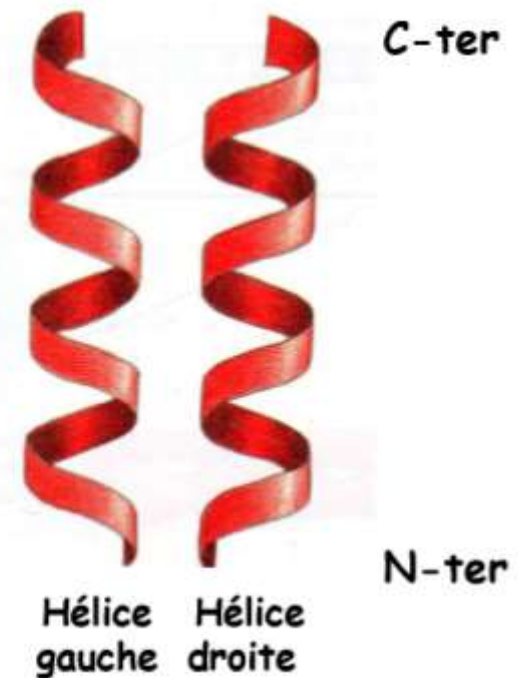


- Le squelette polypeptidique est extrêmement enroulé autour de l'axe longitudinal
- Les radicaux de AA sont à l'extérieur de l'hélice
- Le tour ou pas de l'hélice=0,45 nm
- Chaque pas contient 3,6 résidus d'AA
- L'hélice est stabilisée par les liaisons H qui sont // à l'axe.
- Les liaisons H se font entre l'atome d'H attaché à l'atome N électro-négatif de chaque liaison peptidique et l'atome d'O² du carbonyle électro-négatif du 4^{ème} AA de l'hélice: formation de plusieurs liaisons qui vont stabiliser la structure
- le pas est à droite. De rare cas avec pas à gauche



Conformation
des AA dans une
hélice
Poly lys poly Asp
Pro rare

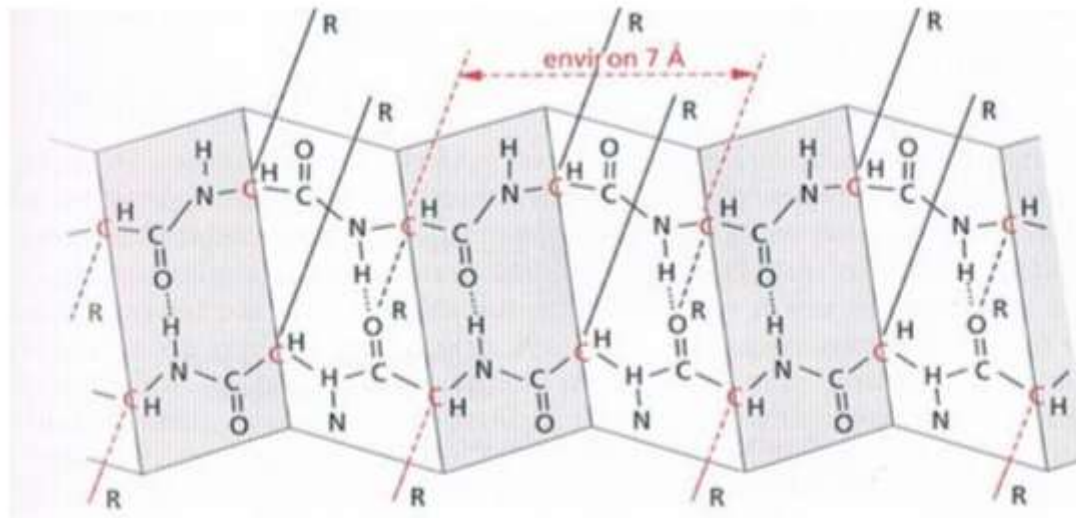
L'hélice droite est la
structure secondaire la
plus répandue.
L'hélice gauche est très
rare dans les protéines



4-3 Structure II aire en feuillet plissé

Pauling et Corey ont mis en évidence un 2eme type de structure répétitive: conformation β

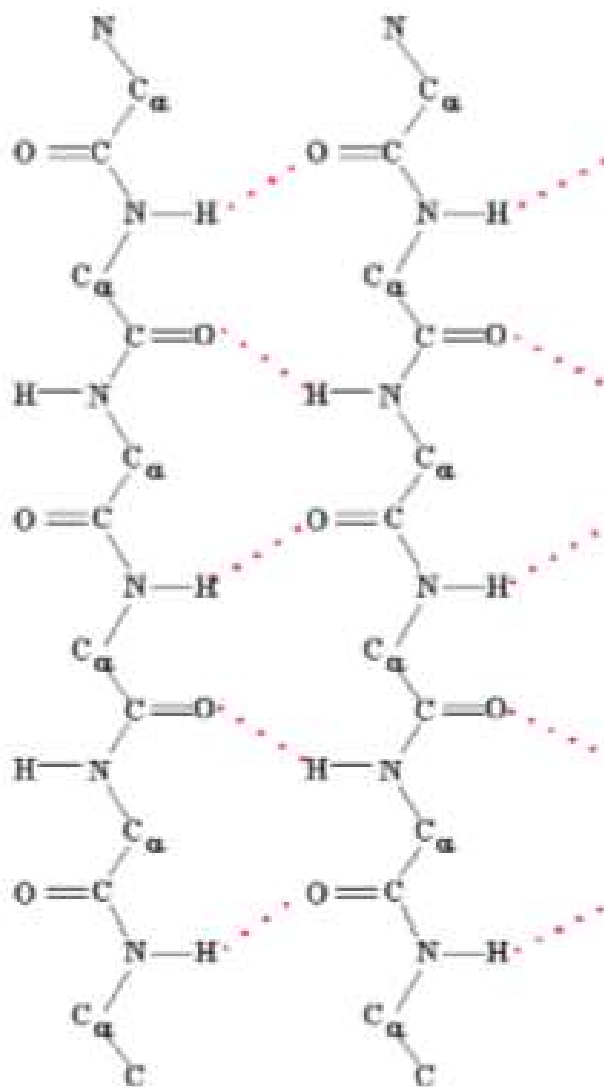
Le squelette s'étend en zigzag: les plans peptidiques ressemblent à des plis



Les liaisons H sont \perp à l'axe

Les liaisons H sont soit intrachaine ou interchaines

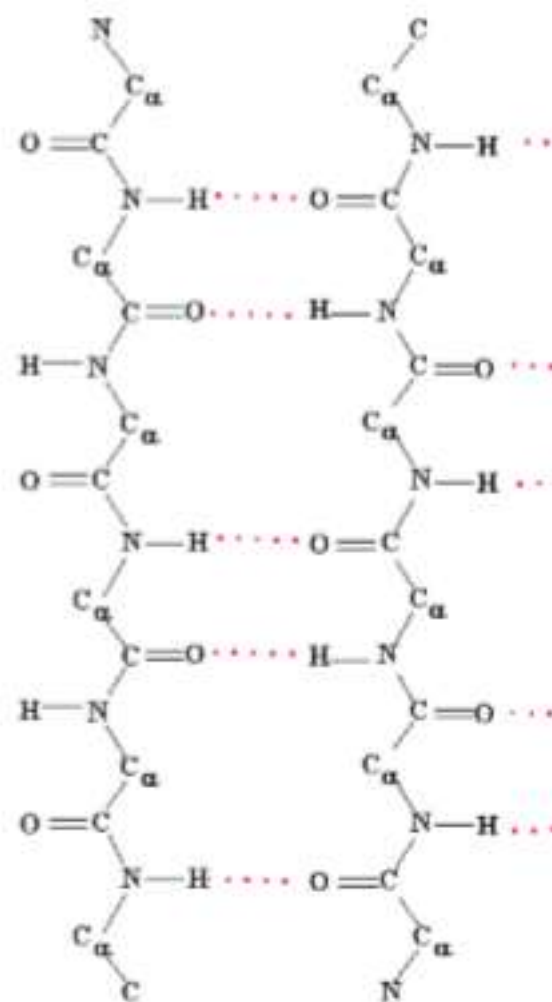
Les R des AA sont soit en haut soit en bas



Structure //

$$\Phi = -119^\circ$$

$$\Psi = +113^\circ$$



Structure anti //

$$\Phi = -139^\circ$$

$$\Psi = +135^\circ$$

5-structure tertiaire III

C'est une structure tridimensionnelle compacte due au repliement et à l'enroulement de la chaîne polypeptidique sur elle-même par suite d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène, hydrophobes ou covalentes (ponts disulfures) : les AA qui se trouvent éloignés dans la séquence vont interagir entre eux pour donner une structure globulaire ramassée ayant une fonction biologique

La perte de la structure tertiaire par des agents dénaturants: perte de la fonction

Les chaînes latérales polaires des acides aminés se trouveront à la surface et hydratées, alors que les chaînes latérales non polaires (hydrophobes) seront dirigées vers l'intérieur, protégées du contact de l'eau

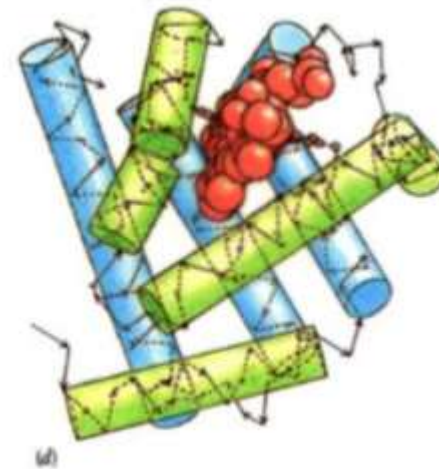
Ex la myoglobine:

C'est une protéine du muscle, transport d'O₂, possède un hème
8 segments d'hélice α (23 AA)

70% des AA se trouvent en hélice α interrompus par des coudes

Les AA hydrophobes sont à l'intérieur de la molécule et forment
le cœur dense hydrophobe typique: place seulement à 4
molécules d'eau

Coudes: Pro



6-Structure Quaternaires IV

Correspond à l'association spécifique de plusieurs chaînes peptidiques ayant chacune une structure tertiaire, stabilisées par des liaisons de faible énergie; en une seule unité.

Cette unité seule capable d'assurer complètement la fonction biologique

Assemblage de 2 ou plusieurs chaînes polypeptidiques

Polypeptides identiques ou différents Homo- Hétéromère

Assemblage se fait de façon spécifique et selon une certaine symétrie conditionnant (régulation) l'activité de la protéine

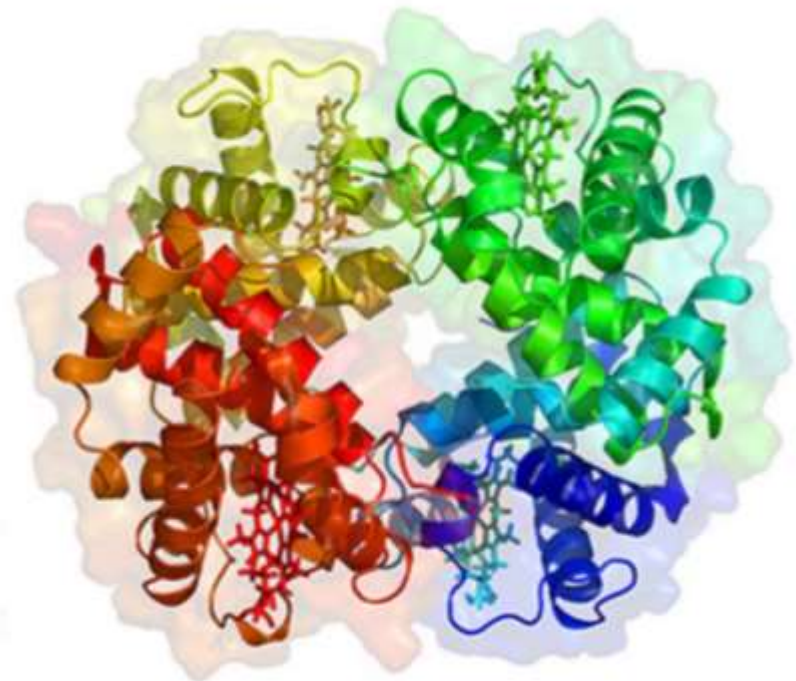
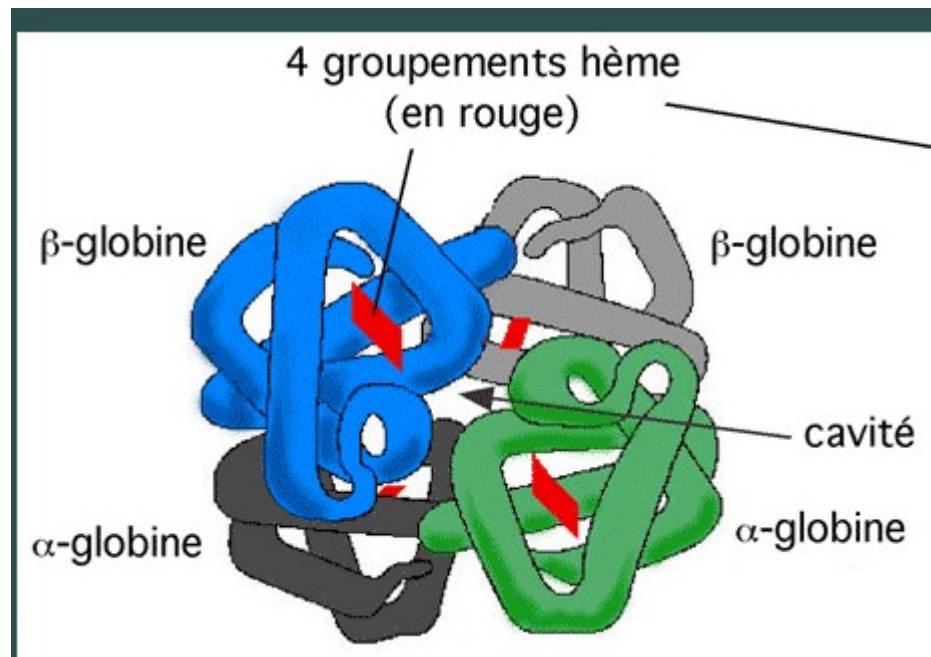
Exemples de structures quaternaires «L'hémoglobine»

Protéine: 4 monomères (2 α et 2 β) ou chaîne polypeptidique ayant chacune un hème

α : 141 AA et β : 146AA

α et β contiennent plusieurs hélices et ressemblent à la myoglobine

Rx: peu de contact entre les 2 α ou les 2 β . Il existe de nombreux ^points de contacts entre les α et les β

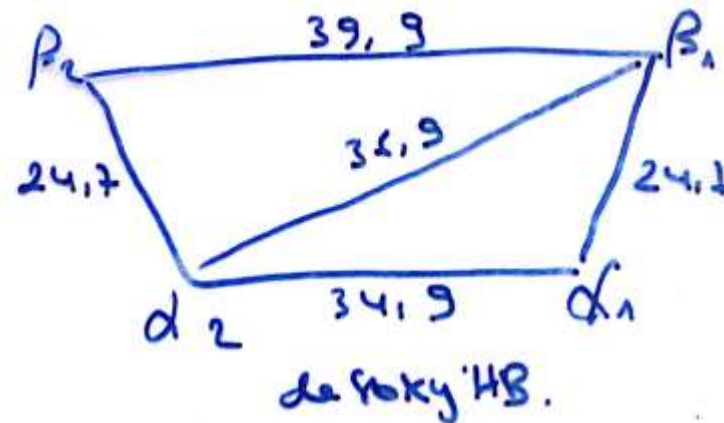
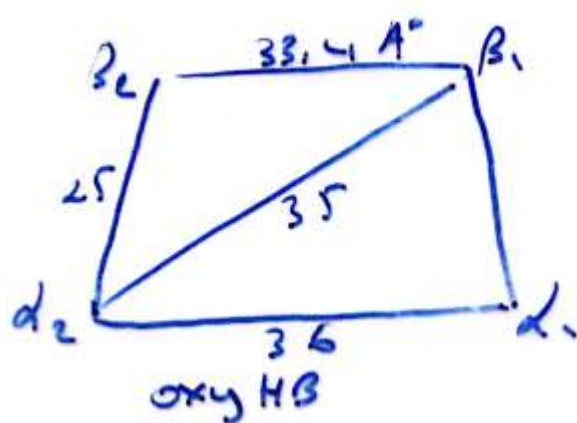


Une fois une sous-unité fixe l'O₂ elle communique cette information aux autres sous unités restantes grâce à des interactions au niveau des interfaces des sous unités. Les sous unités répondent en augmentant leur affinité à l'O₂

Le passage de la forme HB(O₂)₄ à la forme HB s'accompagne d'une déformation de la molécule: éloignement des chaînes

La protéine existe sous deux formes, la forme T (pour tendue) qui a une faible affinité pour l'oxygène et la forme R (pour relaxée) de haute affinité.

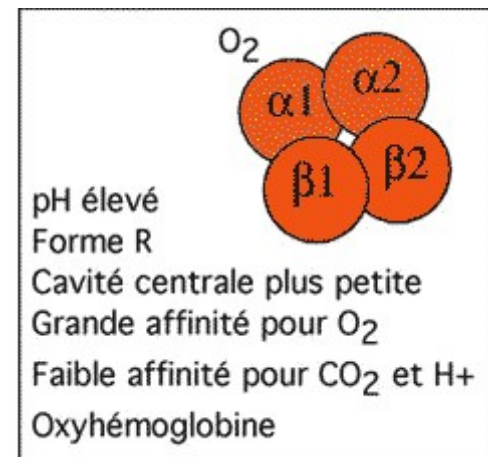
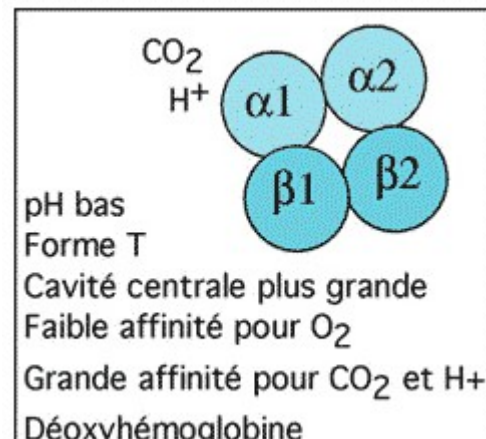
Ces deux formes existent en un équilibre rapide qui dépend du pH ambiant et de la présence d'oxygène.



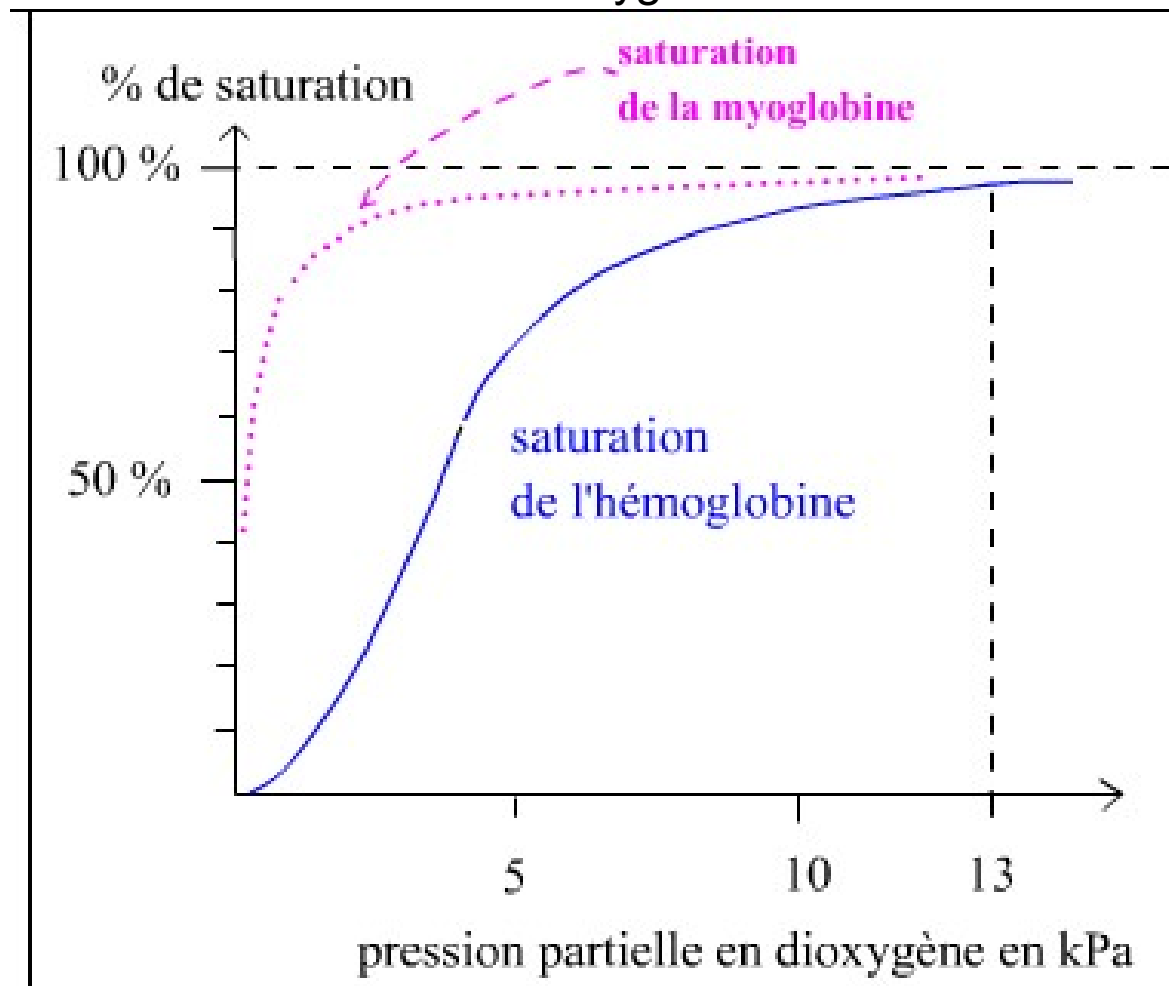
- À pH élevé et en présence d'oxygène, la forme R est privilégiée (et l'hémoglobine cherche donc à capturer de l'oxygène);
- à pH bas et quand l'oxygène est rare, la forme T est privilégiée et l'hémoglobine relâche l'oxygène.

-

Lors d'une transition de T vers R, les sous-unités $\alpha 1$ - $\beta 1$ se rapprochent des sous-unités $\alpha 2$ - $\beta 2$, réduisant la taille de la cavité centrale entre les sous-unités.



La figure montre la fonction de saturation de l'hémoglobine. Elle est comparée à celle de la myoglobine. la myoglobine est une protéine des cellules musculaires. Elle leur assure un stockage de dioxygène. la myoglobine est monomérique, formée par une chaîne polypeptidique de structure très voisine de celles des chaînes α et β de l'hémoglobine et cette chaîne polypeptidique est associée à un hème. La myoglobine lie évidemment le dioxygène.



Pour l'hémoglobine (Hb): 100% de saturation signifie 4 O₂ par Hb α₂β₂ . Pour la myoglobine (Mb) : 100% de saturation signifie 1 O₂ pour une Mb.
la courbe de saturation de Mb est une hyperbole classique. La courbe de saturation de Hb possède une allure sigmoïde. Cette allure est due à un effet coopératif (allostérie).

Chapitre V

Etude des protéines

1-Absorption: spectrophotomètre

$DO = \epsilon l C$ à 280nm

Mise en évidence

A cause des liaison C=O, les protéines absorbent à 210 nm

A cause de la présence des AA aromatiques surtout la Trp, les protéines absorbent à 280nm (plus utilisée)

Dosage

Réactions colorimétriques: dosage ou estimation précise de la teneur en protéines. Méthode de Biuret avec absorbance à 540 nm (g de protéines)(voir TP). Méthode de Lowry (Fo750 nm) (mg)



2-Influence de la force ionique μ

Force exercée par la concentration en électrolytes (sels)

$$= \frac{1}{2} \cdot \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

Z: charge de l'ion et C sa concentration

Deux phénomènes accompagnent l'effet de μ : salting in et salting out

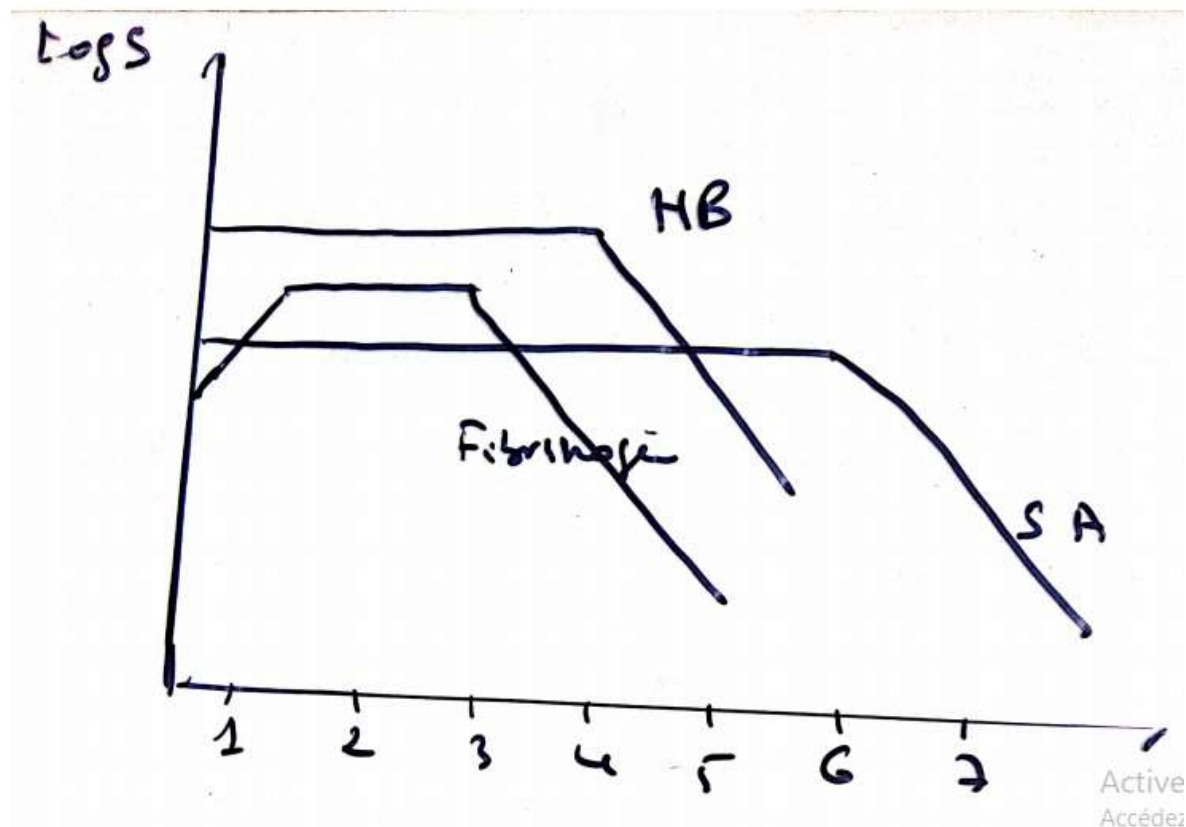
La majorité des protéines dans un milieu aqueux sont solubles en présence d'une faible force ionique appelé "salting in" ou effet dissolvant (solubilisation saline)

Pour des forces ioniques élevées, la solubilité des protéines diminue et devient minimale, appelé "salting out" ou relargage (précipitation saline): les protéines se dénaturent et précipitent: les protéines perdent leur propriété de solubilité (Voir TP)

et on définit la solubilité par la relation

$$\log S = \beta - k \mu$$

But: provoquer la précipitation des protéines à différentes forces ioniques afin de les séparer (TP séparation des globuline par le sulfate d'ammonium)



3-Propriétés électrolytiques

Selon le milieu acide ou base: les protéines sont chargées

Séparation par électrophorèse: gel de polyacrylamide en présence du SDS: détermination de la MM

4-electrofocalisation

Electrophorèse sur gradient pH: pHi des protéines

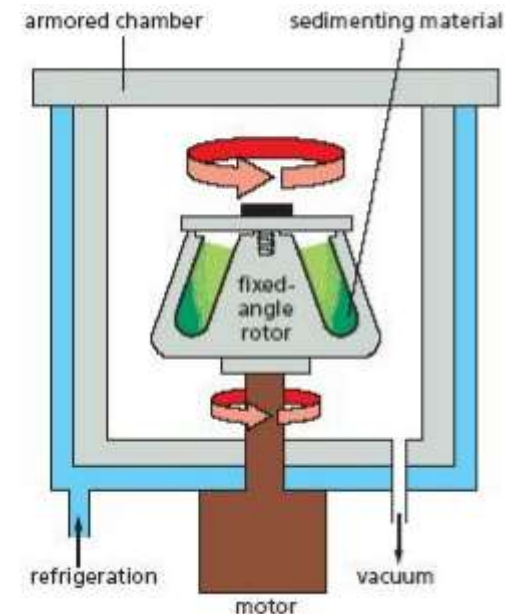
5-Sédimentation

Correspond au déplacement des protéines dans un champ gravitationnel généré par des ultracentrifugeuses 10^5g

Vitesse de déplacement des particules proportionnelle à

- la force gravitationnelle à laquelle la particule est soumise
- la masse de la particule
- et on déduit le coefficient ou constante de sédimentation
- coefficient de sédimentation s en unités Svedberg (S) qui est le rapport entre vitesse de la particule et accélération due à la force centrifuge :
 $s = v/w^2r$ ou $s = dr/dt \cdot 1/w^2r$ ou r est la distance à l'axe de rotation, w la vitesse angulaire en rad/sec et t le temps en seconde

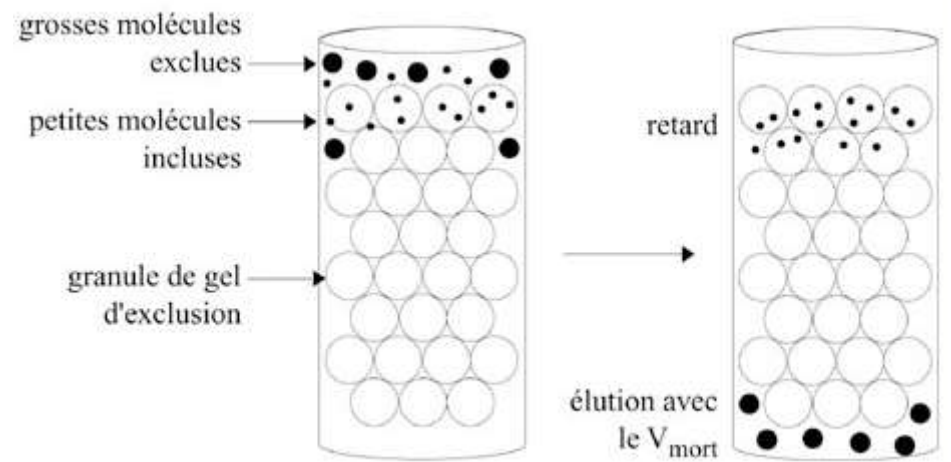
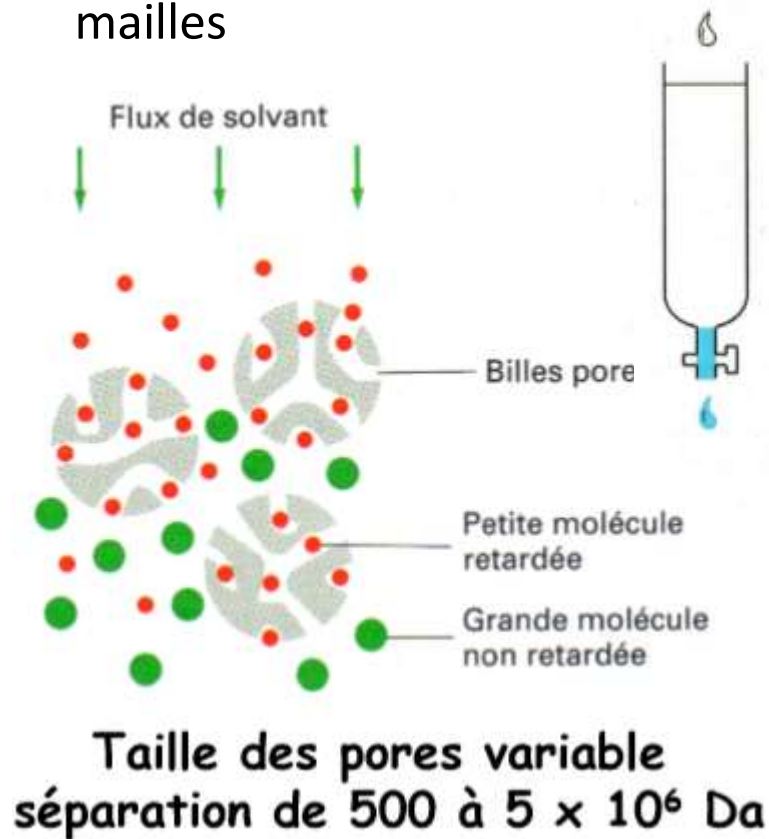
Cyt c: 1,71 s	13 370D
Myo! 2;04 s	19 990 D
HB: 4,46 s	64 500 D



6-Tamissage moléculaire

C'est une chromatographie dite aussi d'exclusion ou gel filtration. Comme son nom l'indique, elle sépare les protéines selon leur taille.

Elle se fait sur une colonne remplie d'un gel dit de Sephadex qui possède des mailles



Les grosses molécules sortent les premières car elles glissent et ne pénètrent pas dans les mailles du gel

Les petites empreint le chemin des mailles et se retardent

Autre but: déterminer la masse d'une protéine inconnue X

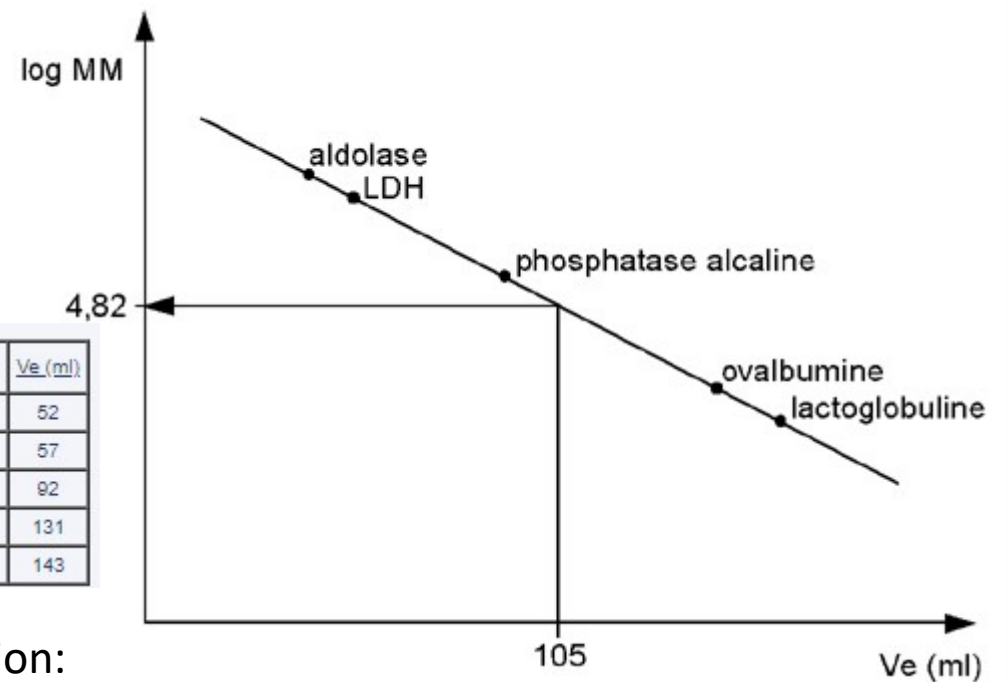
Chromatographie de X en présence de protéines A,B,C et D dont les masse sont connues

Tracer la courbe $\text{Log MM} = f(V_e)$ sur papier millimétré

Repérer le volume où sort X

Extrapoler sur log MM et lire Log MM_x

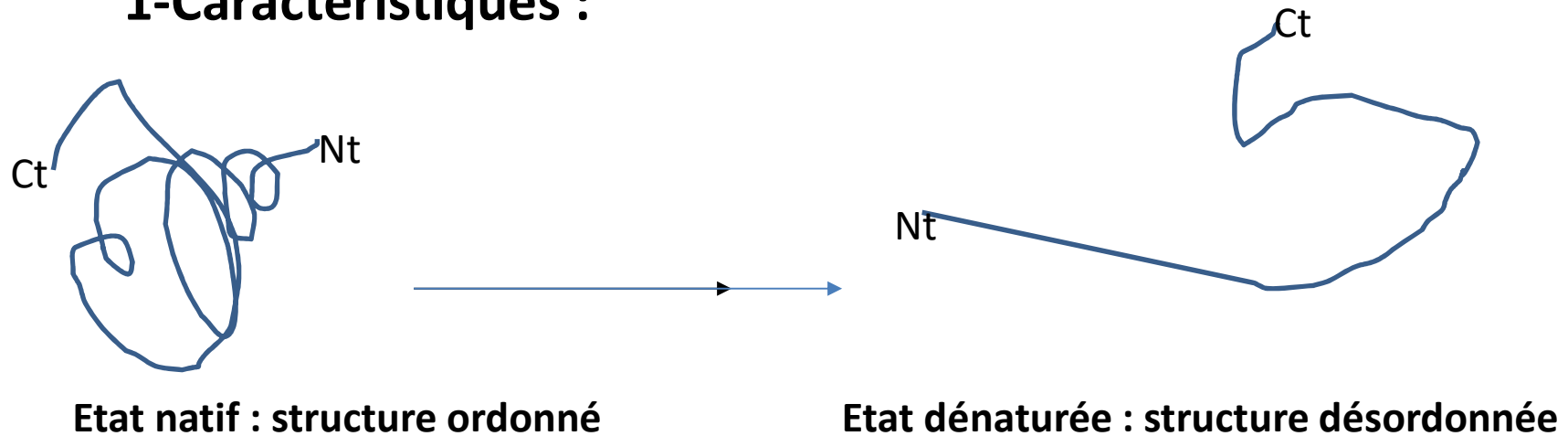
	MM	<u>Log_MM</u>	tr (min)	<u>Ve (ml)</u>
Aldolase	145000	5,16	10,4	52
Lactate déshydrogénase	135000	5,13	11,4	57
Phosphatase alcaline	80000	4,9	18,4	92
Ovalbumine	45000	4,65	26,2	131
Lactoglobuline	37100	4,57	28,6	143



La protéine X a un volume élution:
105. estimer sa MM

III. Dénaturation

1-Caractéristiques :



On peut retrouver l'état natif en enlevant l'agent dénaturant: transconformation:
dénaturation réversible

Dénaturation : - Formation d'agrégats: les molécules précipitent: ex omelette
-Perte d'activité biologique.

2) Agents dénaturants :

a – Température agit sur les interaction : H et Van Der Waals

b- pH (acide et base) agit sur : l'Asp, Glu, Lys, Arg, Nt et Ct: charges + ou – supplémentaires: rupture des liaisons ioniques

c- Solvants organiques : agissent sur les liaisons hydrophobes

d- urée et sel de guanidine: agissent sur les liaisons H. peuvent établir des liaisons H avec la liaison peptidique

e- détergents: neutres, ou ioniques (+ou -): SDS

Queues[↑] hydrophobes agissent sur les liaisons hydrophobes et les têtes chargées sur les liaisons ioniques

f : Agents réducteurs : β mercaptoéthanol: destruction des ponts disulfures

Classification des ..

Différents types de classification sont proposées, les plus utilisés sont :

-Classification en fonction de la forme.

* Protéines fibreuses : protéines insolubles qui ont un rôle de protection ou de structure , contiennent des chaînes polypeptidiques généralement associées en structure II.

- Protéines globulaires : protéines solubles, de forme globulaire. (± ronde)

-Classification en fonction de la composition.

- Holoprotéines : contiennent exclusivement des , protéines simples ex
ribonucléase

*Hétéroprotéines: en plus des chaînes polypeptidiques, ces Protéines comportent dans leurs structures une partie non protéique: groupement prosthétiques

Classe	Groupement prosthétique
Lipoprotéine	Lipide
Glycoprotéine	Glucides
Phosphoprotéine	phosphate
Hémoprotéine	Hème
Flavoprotéine	Nucléotide flavinique
Métalloprotéine	Fer , zinc, Cu, Mo, Se