

**UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF 1**

**FACULTE DE MEDECINE**

**MODULE DE BIOCHIMIE**

**STRUCTURALE**

# CHAP I LES PROTEINES

## AMINOACIDES, PEPTIDES, PROTEINES STRUCTURE ET PRINCIPALES PROPRIETES

► *Professeur Docteur BENZIDANE NADIA  
Vve DJENANE*

# ***PLAN DU COURS DE BIOCHIMIE***

## ***LES AMINO ACIDES***

- ▶ ***Introduction***
- ▶ ***Importance biomédicale***
- ▶ ***I) Définition***
- ▶ ***II) Importance biologique***
- ▶ ***III) Classification des aminoacides***
- ▶ ***IV) Propriétés des acides aminés***
  - ***A) Propriétés physiques***
  - ***1) Solubilité***
  - ***2) Les aminoacides D et L***
  - ***3 ) Pouvoir rotatoire***
  - ***4) Activité spectrales***
  - ***5) Caractère amphotère***
  - ***B) Propriétés chimiques***

- B1) Propriétés chimiques dues à la présence du groupement carboxyl [COOH]
- B2) Propriétés chimiques dues à la présence du groupement amine [NH2]
- V) Principales méthodes d'études des aminoacides
- A) *Réactions colorés des aminoacides*
- B) *Répartition des aminoacides*
- C) *Séparation des aminoacides*
  - C1) *Méthodes électrophorétiques*
  - C2) *Méthodes Chromatographiques*

# **INTRODUCTION**

**Les protéines occupent une place importante dans le monde vivant.**

*Elles jouent un rôle fondamental dans l'établissement de la structure et dans le fonctionnement cellulaire, car elles sont les instruments moléculaires grâce auxquels l'information génétique peut s'exprimer.*

*Les protéines sont synthétisées à partir de monomères : les acides aminés.*

**La plupart contiennent dans les proportions variables les mêmes 20 α L aminoacides, qui accomplissent des fonctions spécifiques pour la protéine et contribuent à augmenter la diversité biologique.**

Les types α L aminoacides, l'ordre dans lequel ils sont assemblés et leurs relations spatiales dictent les structures tridimensionnelles et les propriétés biologiques des protéines

**Dans notre corps, les protéines, se renouvellent sans cesse, à raison d'au moins 250 à 300 g par jours !**

**Il est donc nécessaire de fournir chaque jour à notre organisme une quantité de protéines d'origine alimentaire suffisamment importante pour permettre de compenser ces pertes protéiques.**

Dix acides aminés L-α sont essentiels, étant donné que ni l'homme, ni les autres animaux supérieurs ne sont en mesure de synthétiser ces acides aminés en quantités suffisantes pour assurer la croissance dans la petite enfance ou pour préserver la santé chez l'adulte.

Sous la forme de protéines les acides aminés accomplissent une multitude de fonctions essentielles à la vie (structurales, hormonales et catalytiques.....).

Des défauts génétiques dans le métabolisme des acides aminés peuvent conduire à des maladies sévères, non traités à des défauts génétiques relativement rares du catabolisme des acides aminés conduisant aussi à des retards mentaux et une mort prématuée.

Les désordres dans la capacité à transporter des acides aminés spécifiques au sein des cellules peuvent conduire à des défauts et des maladies génétiques,

ayant pour résultat généralement l'excrétion dans l'urine de quantités accrues d'un, ou de plusieurs, acides aminés ils sont souvent mentionnés sous le terme **d'aminoaciduries**.

*En plus, de leur rôle structural dans les protéines, les acides aminés L et leurs dérivés participent à des fonctions intracellulaires aussi variées que la transmission nerveuse, la régulation de la croissance cellulaire, la biosynthèse des porphyrines, des purines, des pyrimidines et de l'urée.*

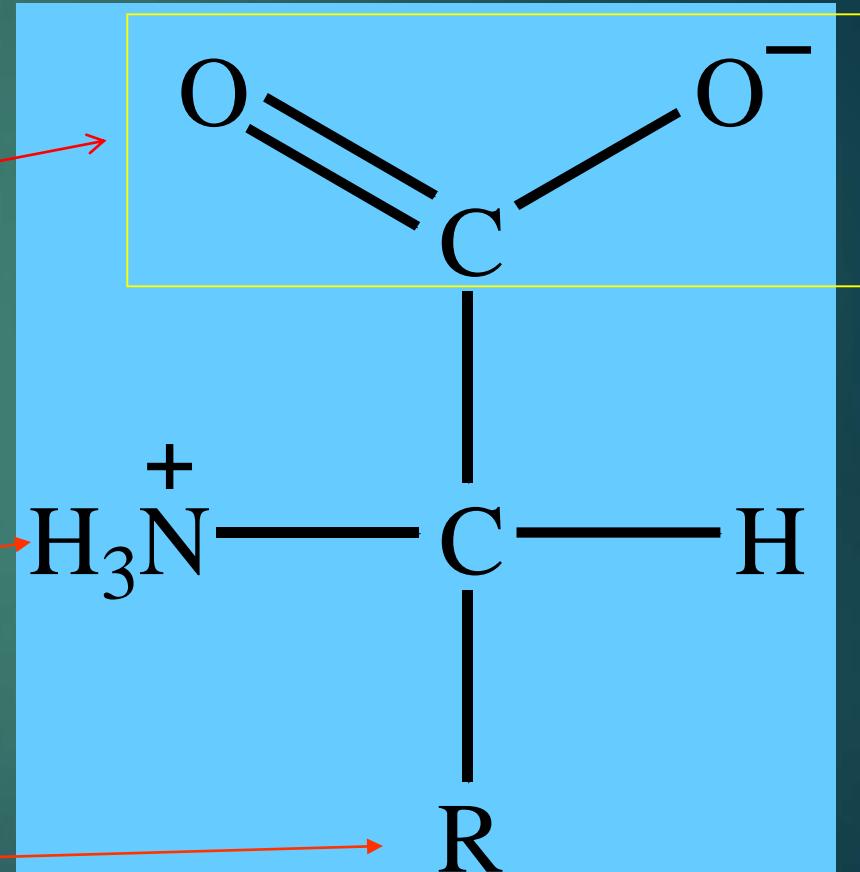
*La phosphorylation et la déphosphorylation des acides aminés sérine, thréonine et tyrosine jouent un rôle crucial dans les voies de transduction des signaux au moyen desquels les cellules communiquent avec leur environnement et y répondent*

# Les acides aminés, éléments de construction des protéines

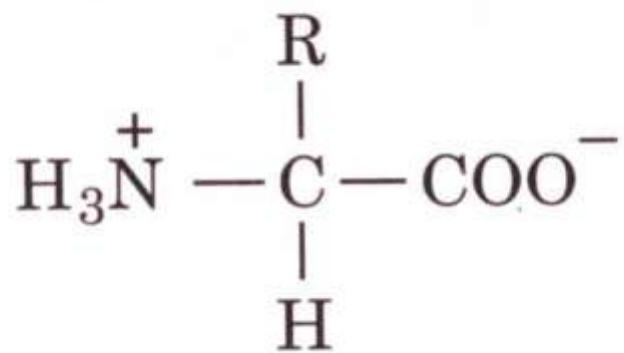
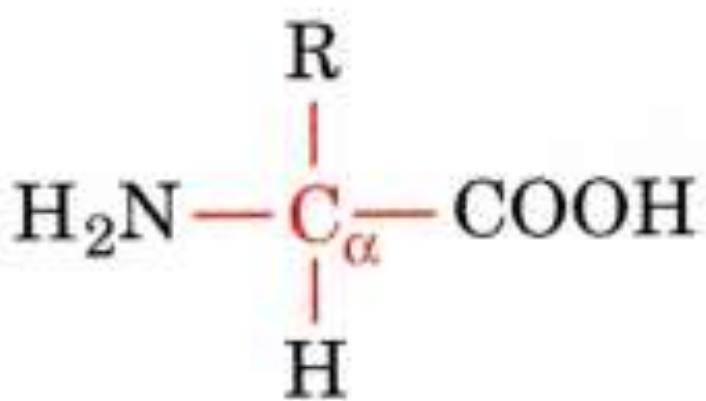
- La base de la diversité des protéines à partir de 20 acides aminés
  - Capacité de polymérisation.
  - Caractéristique acido-basique.
  - Variété des chaînes latérales.
  - Chiralité des molécules.

## *Structure générale d'un acide aminé*

- *Fonction carboxylique*
- **Fonction amine**
- **Chaîne latérale**



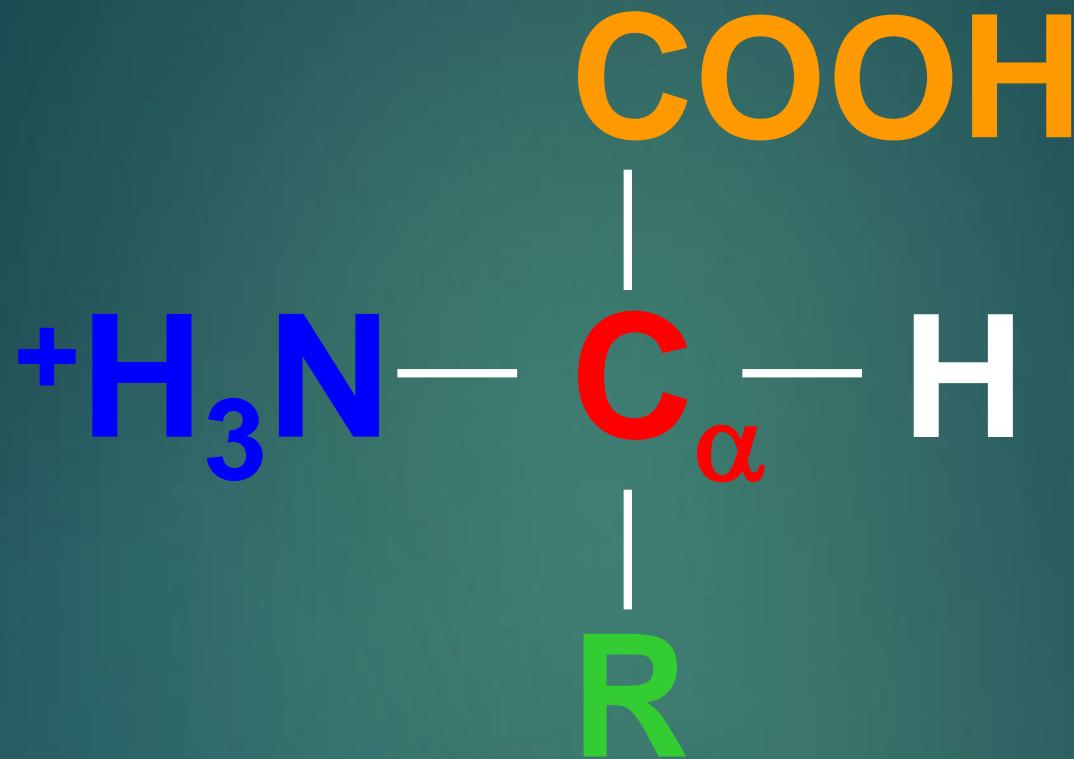
# *Structure générale des $\alpha$ -acides aminés*



*Structure générale théorique:*  
N'existe pas en réalité

*Forme zwitterionique:* présente  
aux valeurs de pH physiologique

# ACIDES AMINES - PROTEINES



A pH faible cette forme **protonée** de l'acide aminé est prépondérante.

# **CLASSIFICATION**

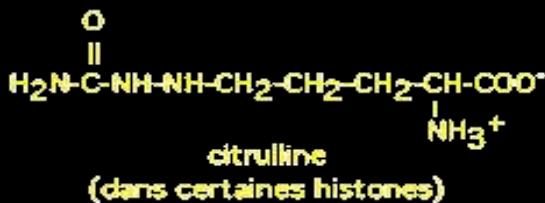
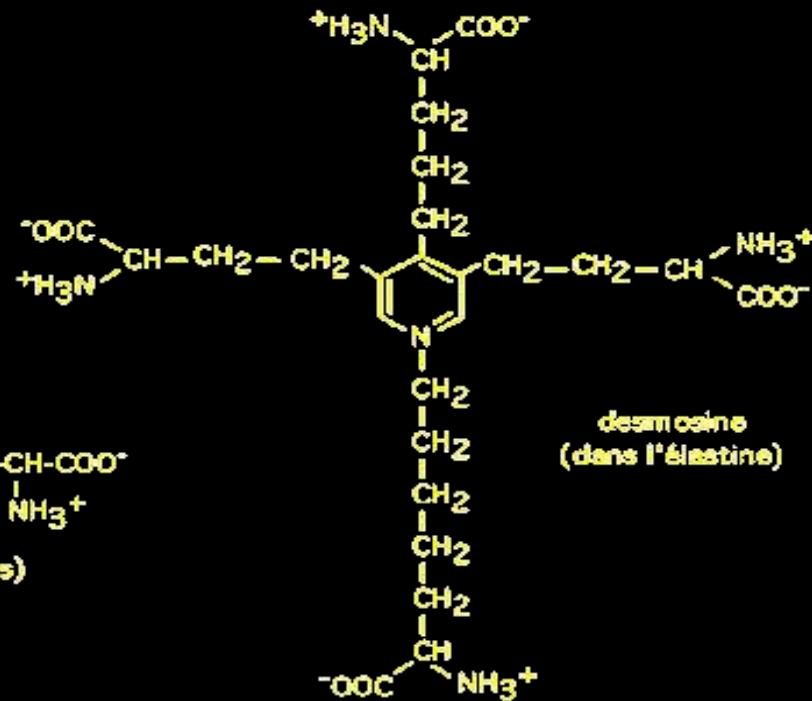
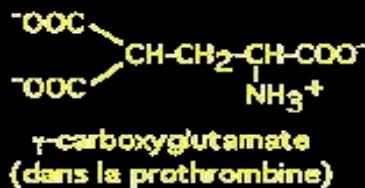
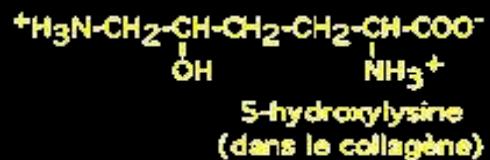
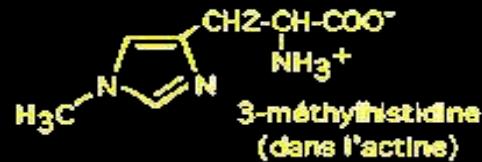
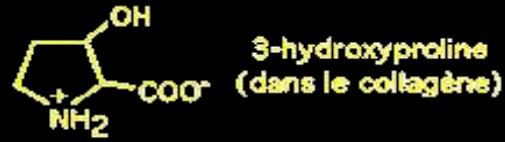
*. Les acides aminés sont en général classés d'après les propriétés de la chaîne latérale en quatre groupes : acide, basique, hydrophile (polaire) et hydrophobe (apolaire).*

**Vingt acides aminés différents ont été identifiés dans les protéines, ce sont les acides aminés standards.**

Symbole	Code 3 lettres	Nom
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Aspartate
E	Glu	Glutamate
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine

I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

# Certains acides aminés ne se retrouvent pas dans les protéines, et certains acides aminés protéiques subissent des modifications post-traductionnelles.

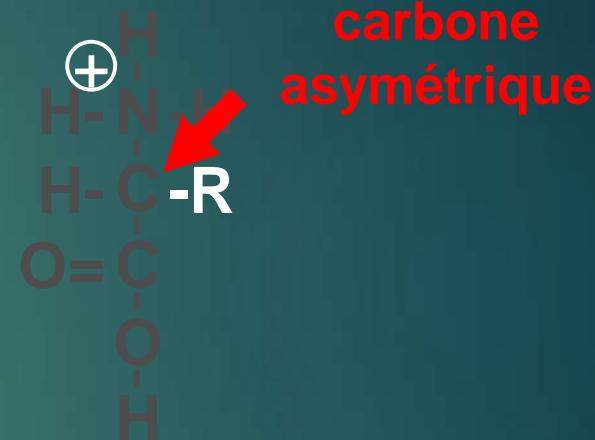


# Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire		polaire non chargé		basique	acide



L'acide aminé est la brique de base des protéines

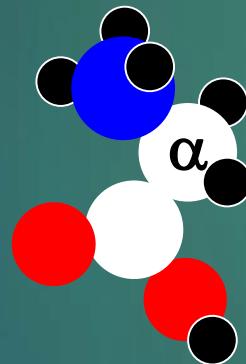


## Chaîne latérale R

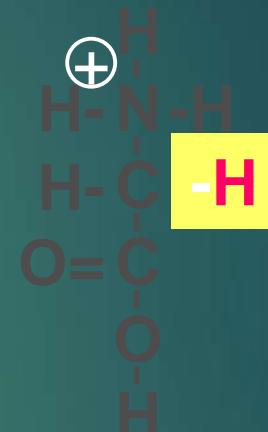
GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire
polaire non chargé
basique
acide

glycine (G)



L'acide aminé est la brique de base des protéines

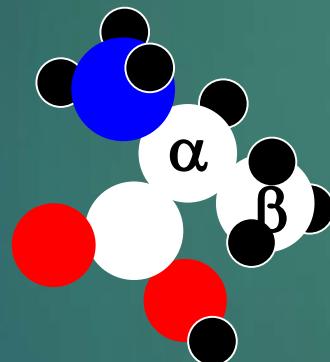


ACIDE AMINE A CHAINE ALPHATIQUE HYDROCARBONEE LINEAIRE.

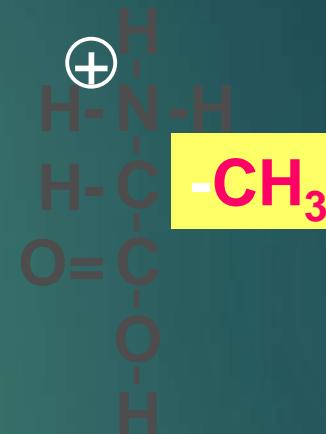


# Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		
<b>alanine (A)</b>					



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALPHATIQUE HYDROCARBONEE ET LINEAIRE.



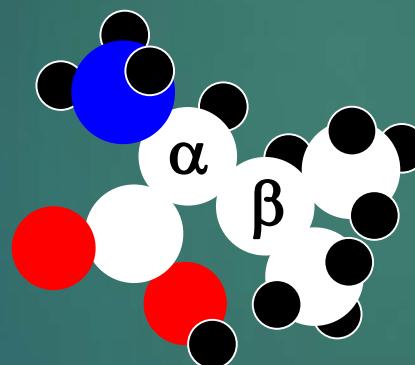
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

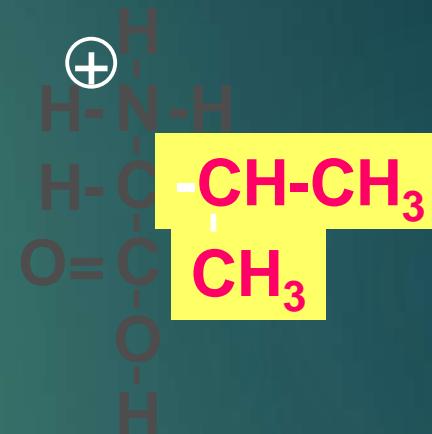
non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

valine (V)

acide aminé essentiel



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE HYDROCARBONEE ET RAMIFIEE.



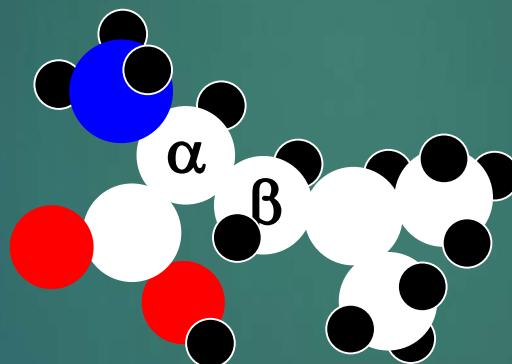
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

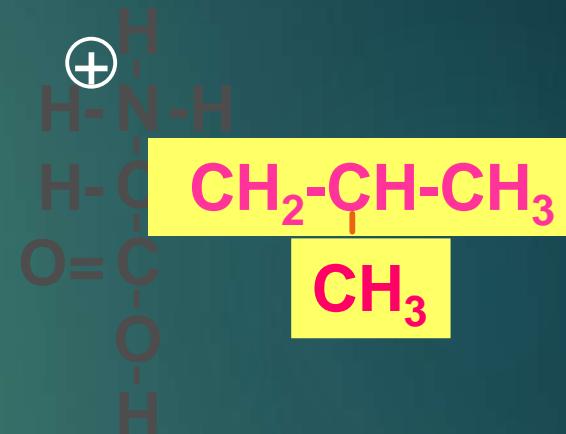
non-polaire
polaire non chargé
basique
acide

leucine (L)

acide aminé essentiel



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE HYDROCARBONEE ET RAMIFIEE.



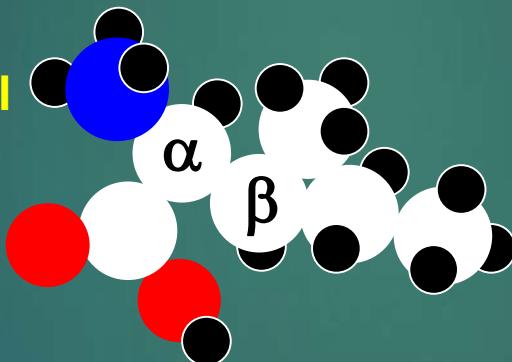
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	<b>ILE</b>	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

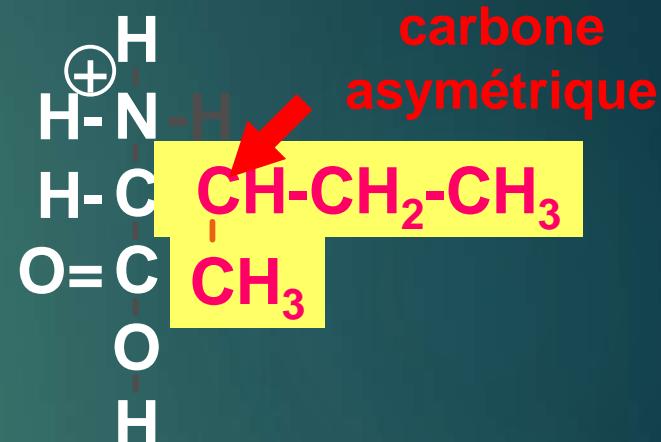
non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

isoleucine (I)

acide aminé essentiel



L'acide aminé est la brique de base des protéines



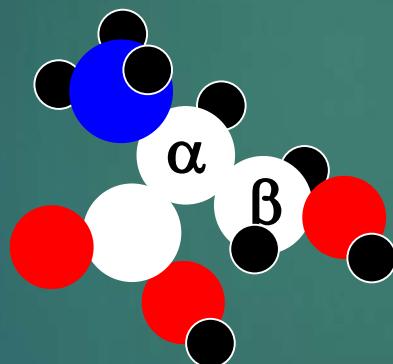
ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE HYDROCARBONEE ET RAMIFIEE.



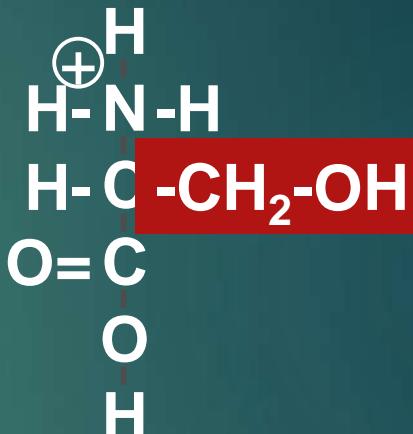
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

sérine (S)



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ALCOOL.



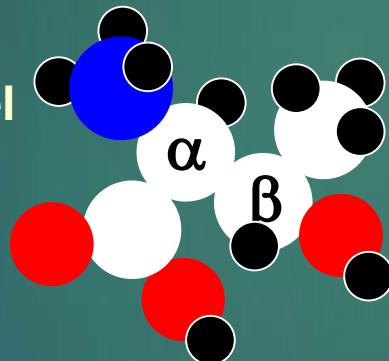
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

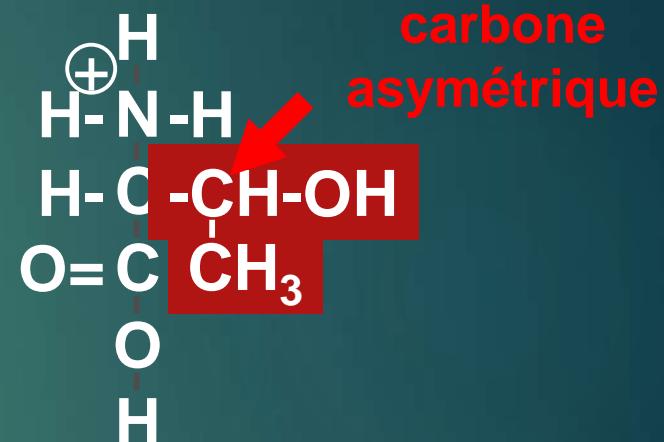
non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

thréonine (T)

acide aminé essentiel



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ALCOOL.

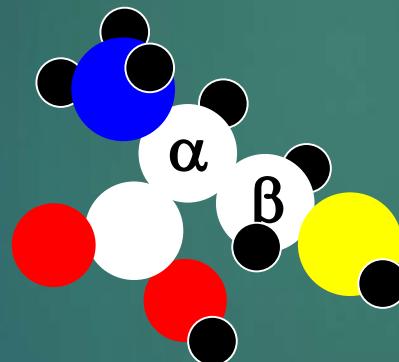


# Chaîne latérale R

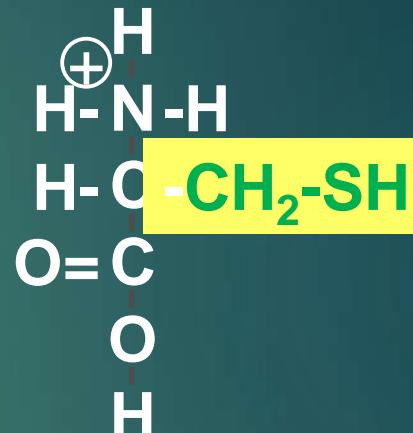
GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

cystéine (C)



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION SOUFRE.

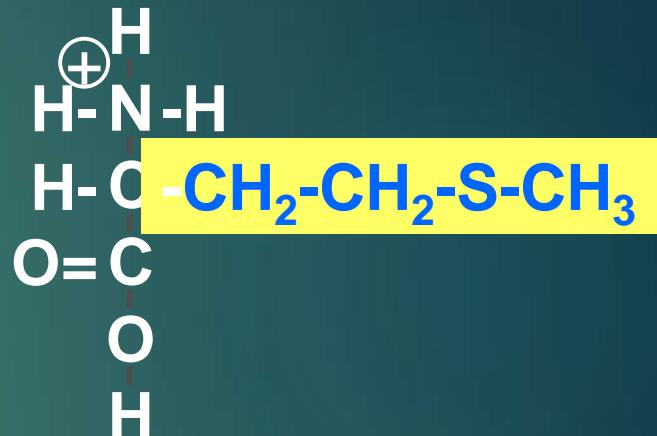
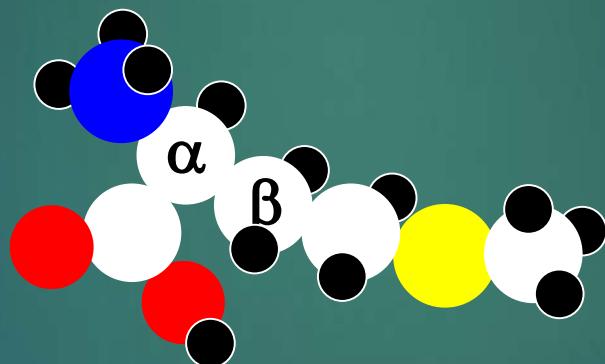


## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

méthionine (M)

acide aminé essentiel



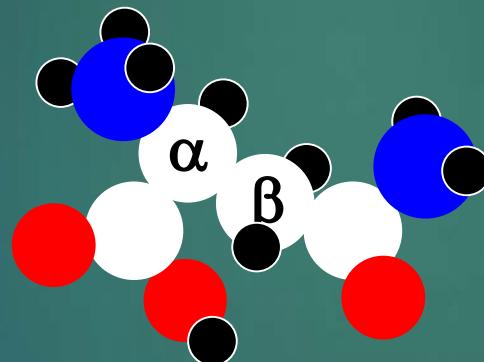
ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION SOUFRE.



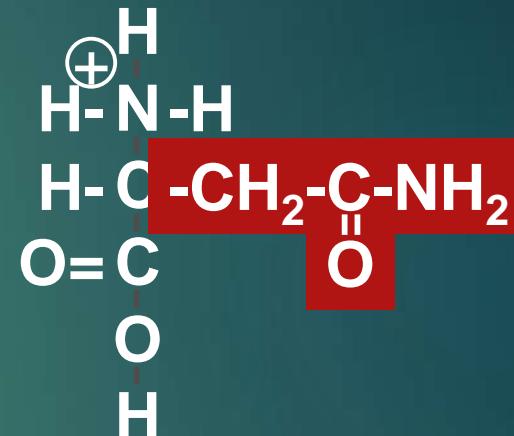
# Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

asparagine (N)



L'acide aminé est la brique de base des protéines



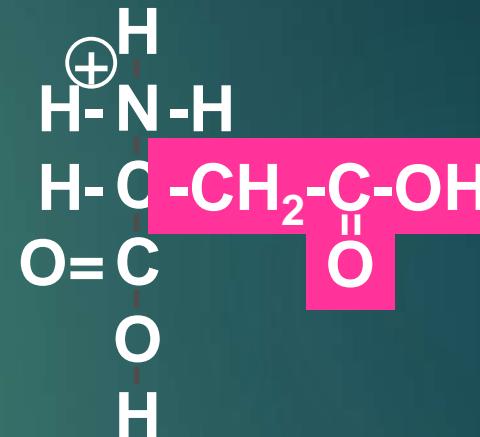
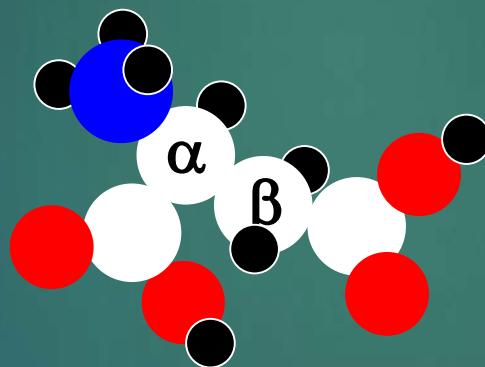
ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ACIDE.



# Chaîne latérale R L'acide aminé est la brique de base des protéines

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

aspartate (D)



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ACIDE.

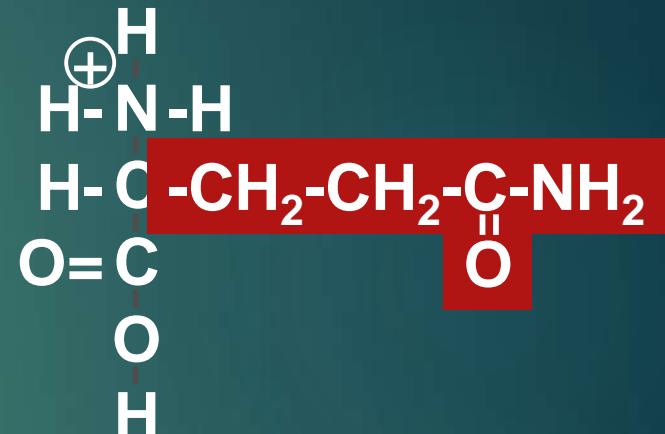
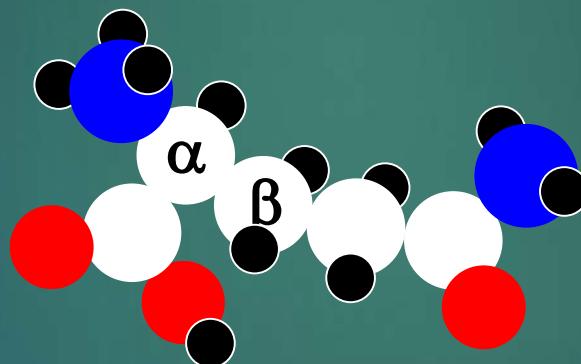


## Chaîne latérale R

L'acide aminé est la brique de base des protéines

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

glutamine (Q)



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ACIDE.

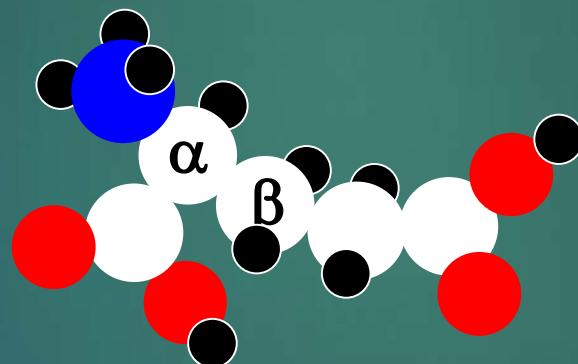


## Chaîne latérale R

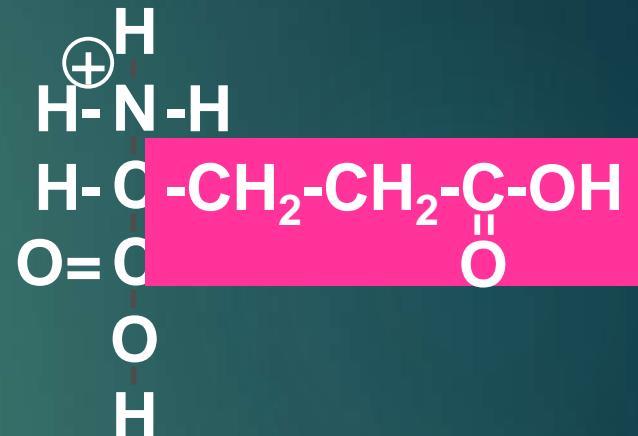
GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

glutamate (E)



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE ET A FONCTION ACIDE.



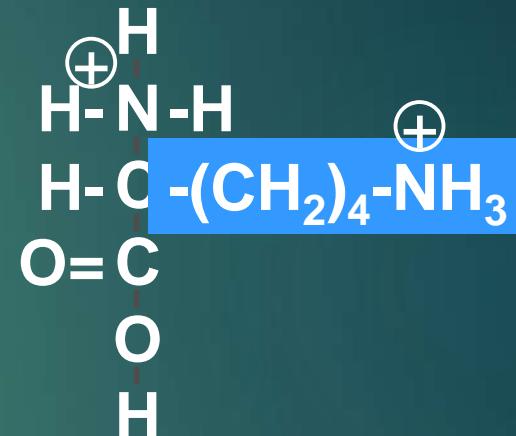
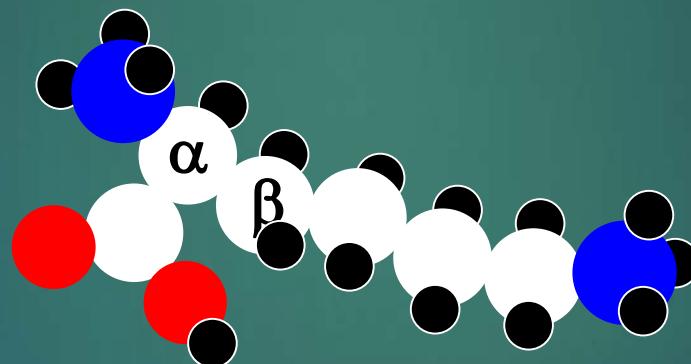
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

lysine (K)

acide aminé essentiel



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE A FONCTION BASIQUE.



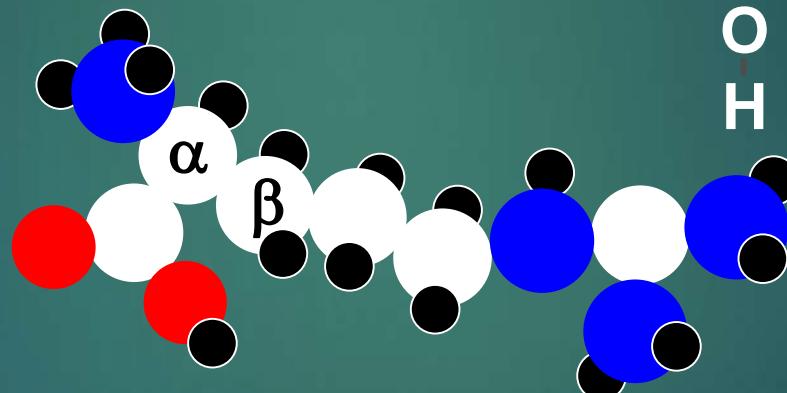
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

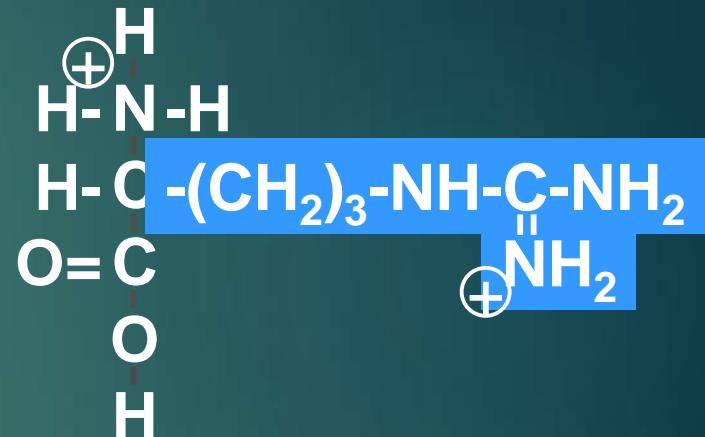
non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

arginine (R)

Semi-essentiels



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A CHAINE ALIPHATIQUE A FONCTION BASIQUE.



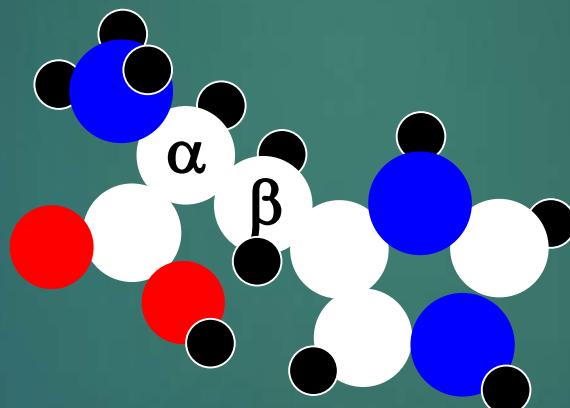
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

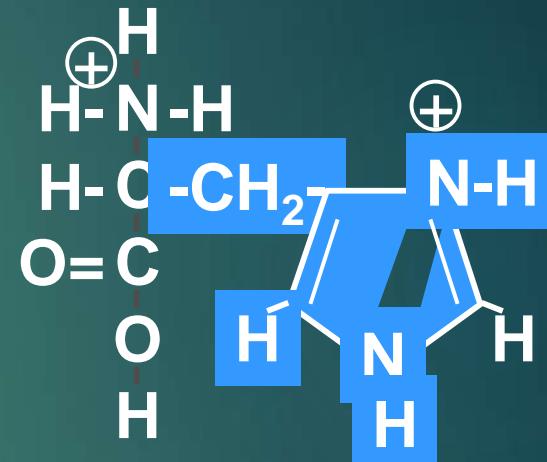
non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

histidine (H)

Semi-essentiels



L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE A NOYAU IMIDAZOL A FONCTION BASIQUE.

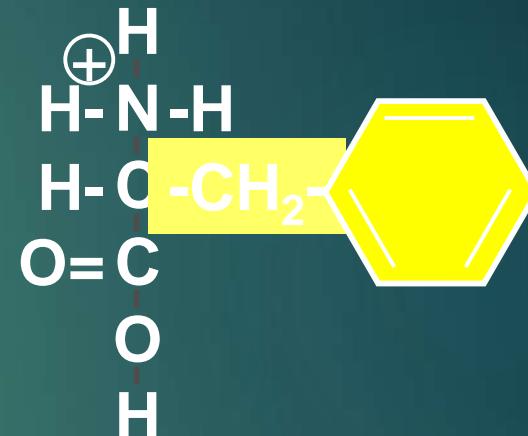
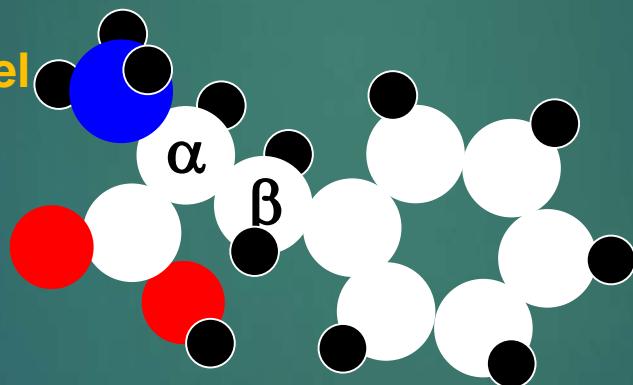


## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

phénylalanine (F)

acide aminé essentiel



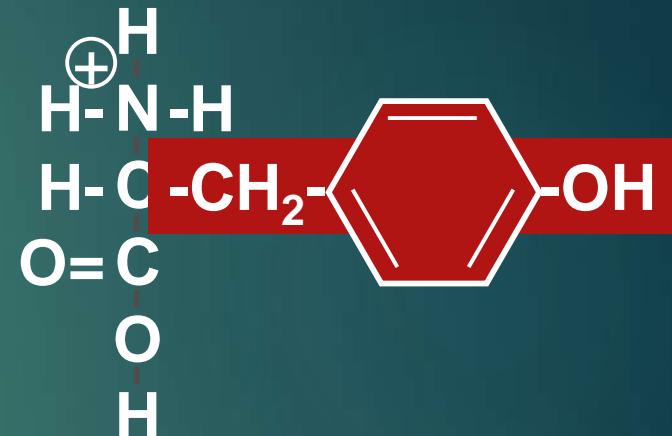
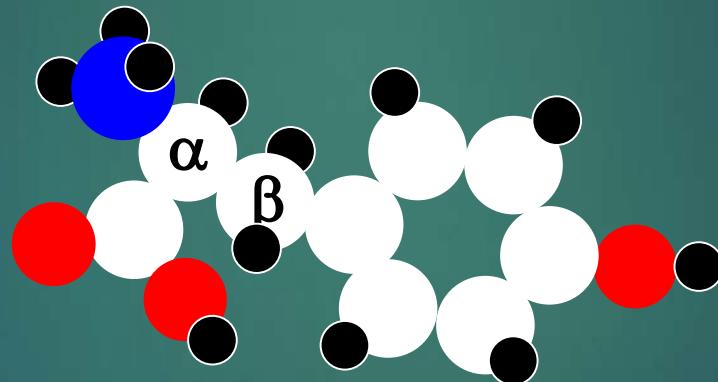
ACIDE AMINE A CHAINE CYCLIQUE ET AROMATIQUE.



# Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		
non-polaire	polaire non chargé	basique	acide		

tyrosine (Y)



ACIDE AMINE A CHAINE CYCLIQUE ET AROMATIQUE.



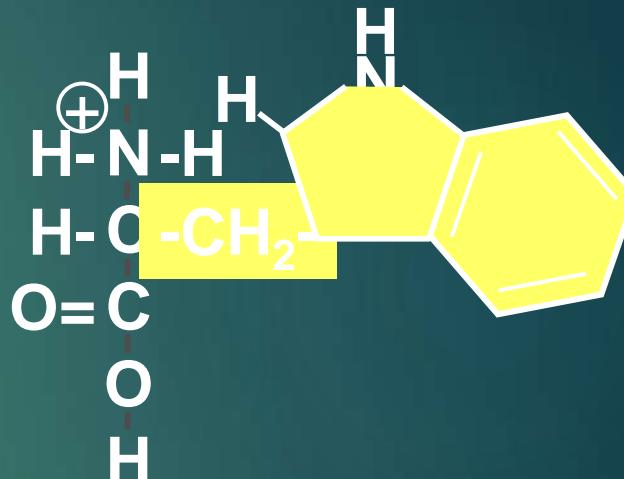
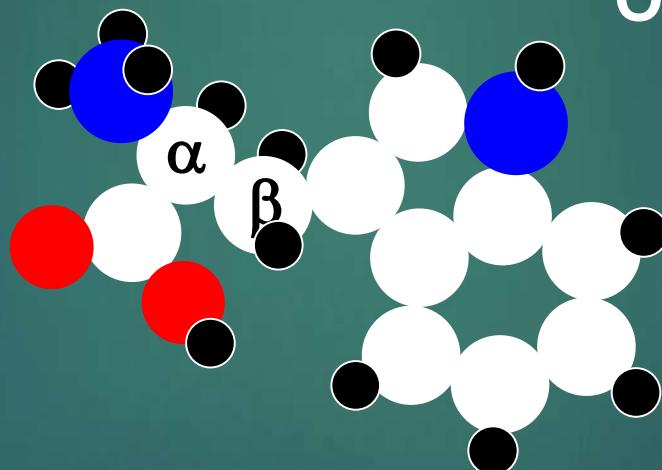
## Chaîne latérale R

GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire  
 polaire non chargé  
 basique  
 acide

tryptophane (W)

acide aminé essentiel



ACIDE AMINE A CHAINE CYCLIQUE ET AROMATIQUE.

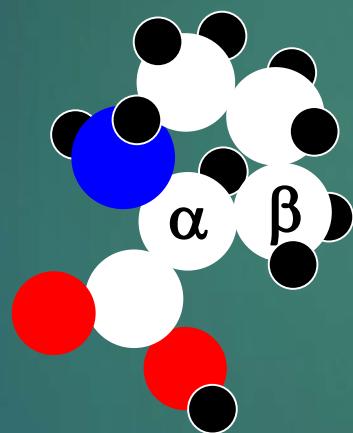


## Chaîne latérale R

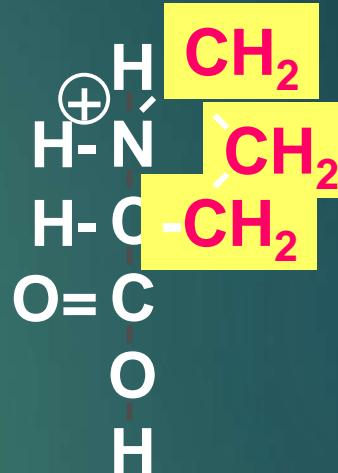
GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	PRO
SER	THR	CYS	MET	ASN	GLN
PHE	TYR	TRP	LYS		
ARG	HIS	ASP	GLU		

non-polaire    polaire non chargé    basique    acide

proline (P)



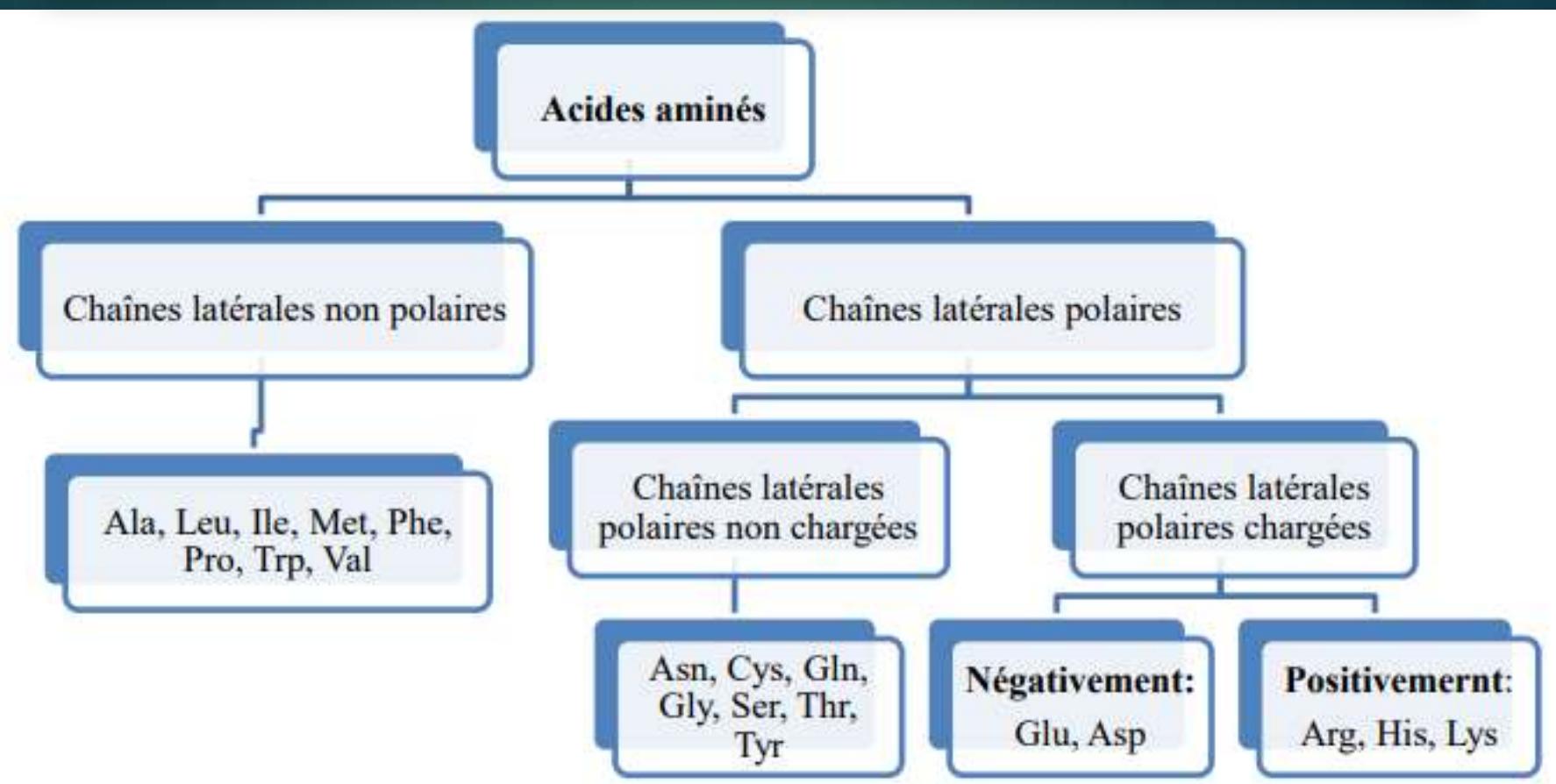
L'acide aminé est la brique de base des protéines



ACIDE AMINE HETEROCYCLIQUE



# **Classification des acides aminés selon la polarité de la chaîne latérale**



## *Classification des acides aminés selon la polarité de la chaîne latérale*

- **Acides aminés non polaires ou hydrophobes**
  - **Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro**
- **Acides aminés neutres (non chargés) mais polaires**
  - **Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr**
- **Acides aminés acides** (chargés (-) à pH > 3)
  - **Asp, Glu**
- **Acides aminés basiques** (chargés (+) à pH physiol.)
  - **Lys, Arg, His**

## *Classification des acides aminés selon leur importance alimentaire:*

- *Les acides aminés essentiels:*  
valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, méthionine, thréonine, Histidine (essentielle pour les nourrissons), lysine, arginine (semi-essentielle).
- *Les acides aminés non-essentiels:*  
glycine, alanine, proline, serine, cystéine, tyrosine, asparagine, glutamine, acide asparagique, acide glutamique.

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	pI	pK <sub>1</sub> (-COOH)	pK <sub>2</sub> (-NH <sub>2</sub> )	pK <sub>R</sub> (-R)
<u>Alanine</u>	A	Ala	89.09	6.01	2.35	9.87	
<u>Arginine</u>	R	Arg	174.20	10.76	1.82	8.99	12.48
<u>Asparagine</u>	N	Asn	132.12	5.41	2.14	8.72	
<u>Aspartate</u>	D	Asp	133.10	2.85	1.99	9.90	3.90
<u>Cystéine</u>	C	Cys	121.16	5.05	1.92	10.70	8.18
<u>Glutamate</u>	E	Glu	147.13	3.15	2.10	9.47	4.07
<u>Glutamine</u>	Q	Gln	146.15	5.65	2.17	9.13	
<u>Glycine</u>	G	Gly	75.07	6.06	2.35	9.78	
<u>Histidine</u>	H	His	155.16	7.60	1.80	9.33	6.04
<u>Isoleucine</u>	I	Ile	131.17	6.05	2.32	9.76	
<u>Leucine</u>	L	Leu	131.17	6.01	2.33	9.74	
<u>Lysine</u>	K	Lys	146.19	9.60	2.16	9.06	10.54
<u>Méthionine</u>	M	Met	149.21	5.74	2.13	9.28	
<u>Phénylalanine</u>	F	Phe	165.19	5.49	2.20	9.31	
<u>Proline</u>	P	Pro	115.13	6.30	1.95	10.64	
<u>Sérine</u>	S	Ser	105.09	5.68	2.19	9.21	
<u>Thréonine</u>	T	Thr	119.12	5.60	2.09	9.10	
<u>Tryptophane</u>	W	Trp	201.22	5.99	2.16	9.11	

# **PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES**

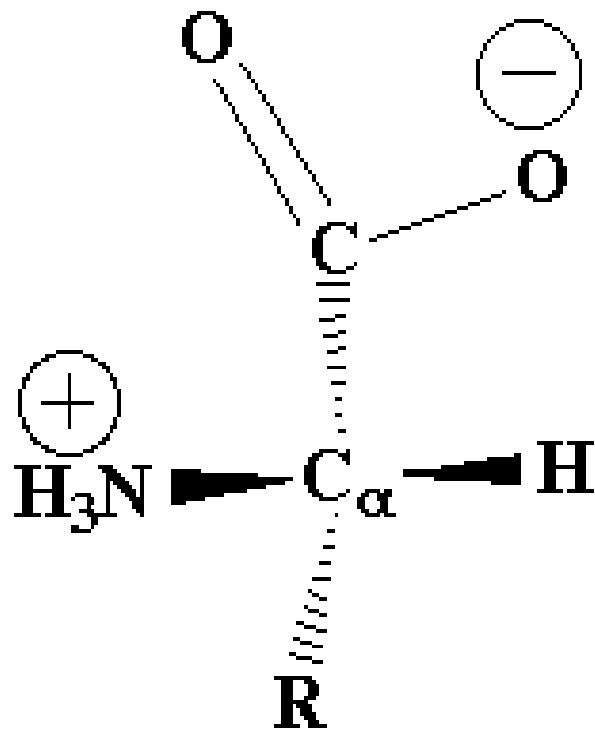
# **STEREOCHIMIE DES ACIDES AMINES**

- ▶ Les acides aminés, à l'exception du glycocolle, sont doués d'activité optique, c'est-à-dire qu'ils dévient le plan de la lumière polarisée.
- ▶ Cette activité optique signe la présence dans la molécule d'acide aminé d'au moins un atome de carbone substitué asymétriquement (Ca). c'est donc un centre chiral dont la conformation définira les stéréo-isomères, isomères optiques à pouvoir rotatoire spécifique opposé.
- ▶ chaque acide aminé aura donc deux isomères optiques.
- ▶ Pour les acides aminés qui possèdent plus d'un carbone asymétrique, on aura  $2^n$  isomères optiques
- ▶ (  $n$ : nombre de carbones asymétriques).

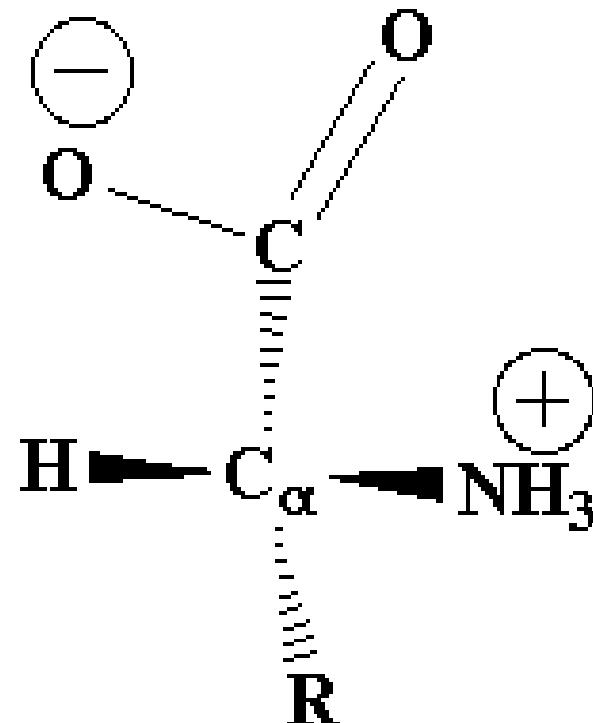
# LA SERIE D ET L

- ▶ Il existe deux isomères de configurations, **le D-amino acide et le L-amino acide, selon que le groupement aminé porté par Ca est à droite ou à gauche de la chaîne carbonée.**
- ▶ D et L amino acide sont l'image l'un de l'autre par rapport à un miroir. les deux stéréo-isomères sont dits les **énantiomères.**
- ▶ **Seuls les L-acides aminés sont présents dans les protéines naturels.**

**Le carbone  $\alpha$  est sauf exception chiral et il existe donc des énantiomères : L et D.**



acide aminé L

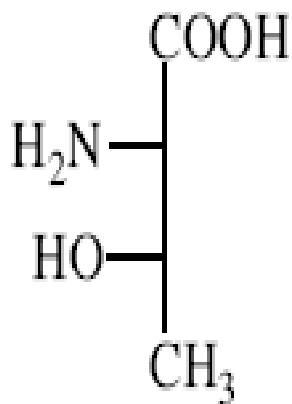
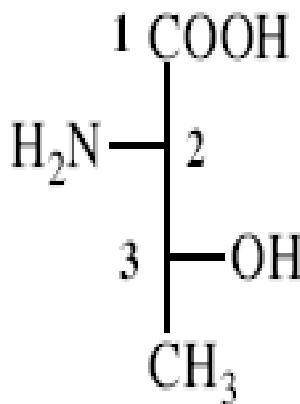


acide aminé D

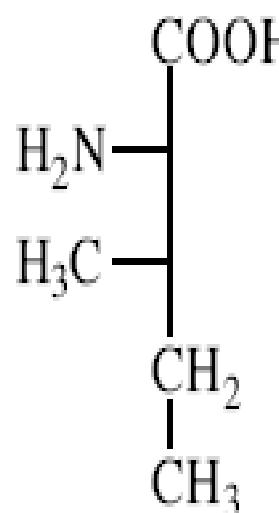
R = chaîne latérale

## Cas d'acides aminés ayant un deuxième centre chiral

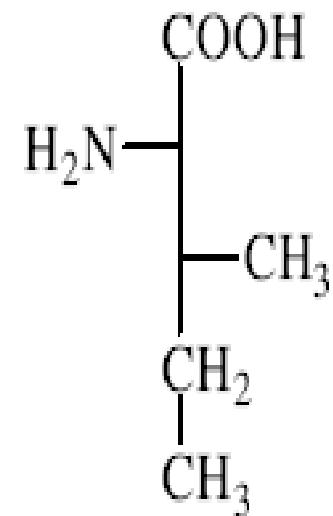
Le carbone 3 ( $\beta$ ) de la thréonine et de l'isoleucine est aussi un centre chiral : leur énantiomère (L) existera sous deux formes épimères. On affecte le préfixe "**allo**" à l'épimère que l'on ne trouve pas dans les protéines :



L-Thréonine



L-Isoleucine



L-allo-Isoleucine

# IONISATION DES ACIDES AMINES

# Acide et base

Un acide est un composé susceptible de céder un proton H<sup>+</sup> [donneur de proton(s)].



en milieu basique La fonction acide s'ionise en libérant un proton, la base du milieu bloque l'ionisation du groupement amine. L'acide aminé se trouve sous forme d'anion.

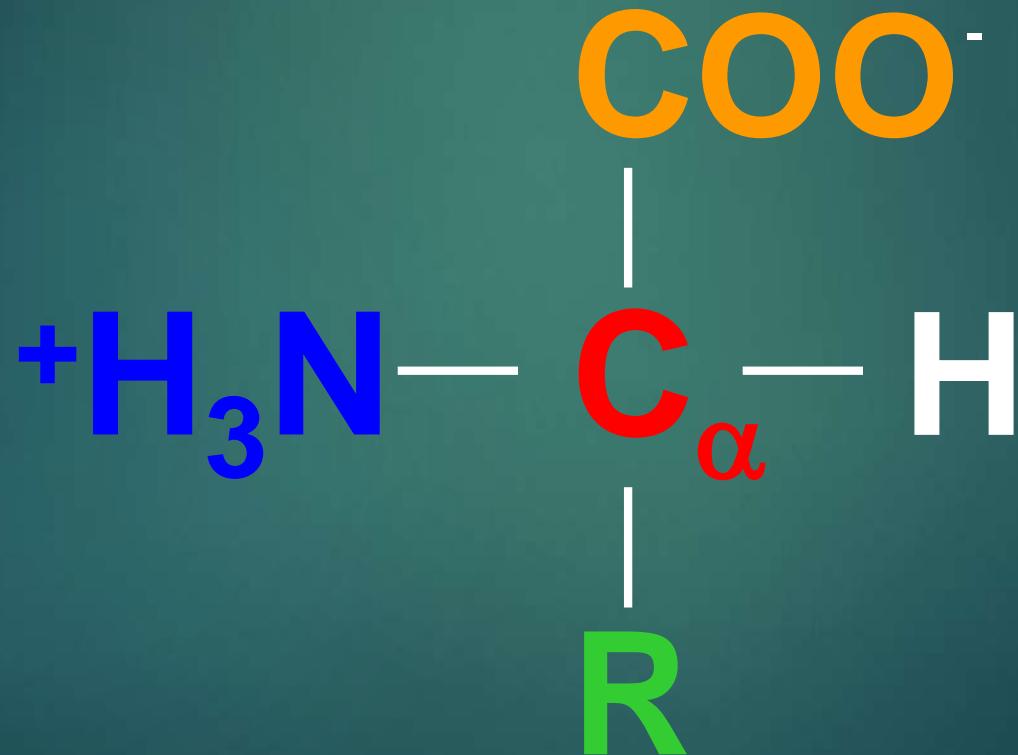
Une base est un composé susceptible de capter un proton H<sup>+</sup> - [accepteur de proton(s)].



en milieu acide : La fonction amine s'ionise en captant un proton et la dissociation du carboxyl est inhibée. *L'acide aminé se trouve sous forme de cation.*

- ▶ Les acides aminés possèdent au moins deux groupement ionisables, le groupement COOH et le groupement NH<sub>2</sub> primaires ( ils sont amphotères).

*Les aminoacides en solution à pH neutre se trouvent sous forme d'ions dipolaires ou zwitterion.*



# L'état d'ionisation d'un aminoacide dépend du pH du milieu.

fonction  
acide

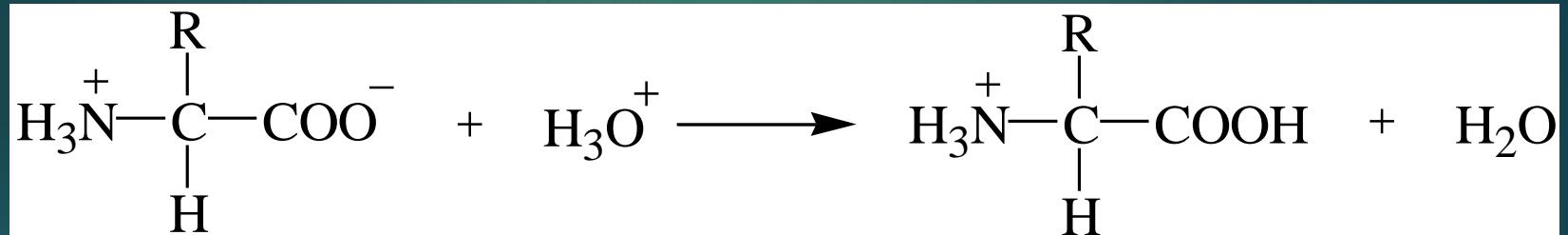


fonction  
amine



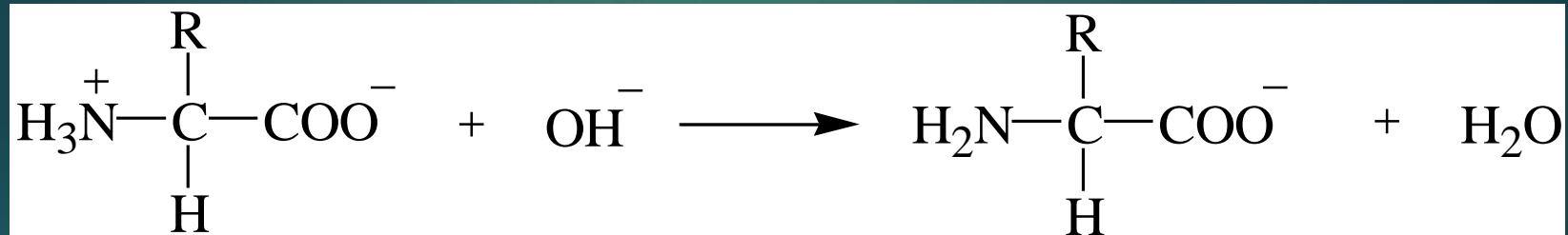
Cette fonction est dite *basique* puisqu'elle ne libère son proton que pour de faibles concentrations de H<sup>+</sup> dans le milieu.

# Les zwitterions en milieu acide



- Le groupement  $-\text{COO}^-$  acquière un proton
- Charge globale de l'acide aminé **positive = CATION**

# Les zwitterions en milieu basique



- Suite à l ajout d une base plus forte que  $\text{NH}_3$  comme  $\text{NaOH}$ 
  - Le groupement  $-\text{NH}_3^+$  donne son proton
  - Charge globale de l acide aminé **négative = ANION**

# Constante d'équilibre

fonction  
acide



Constante d'équilibre

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]}$$

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_a} \times \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]}$$

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K_a} + \log \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]}$$

Équation  
d'Henderson-  
Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]}$$

## Constante d'équilibre

fonction  
amine



## Constante d'équilibre

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]}$$

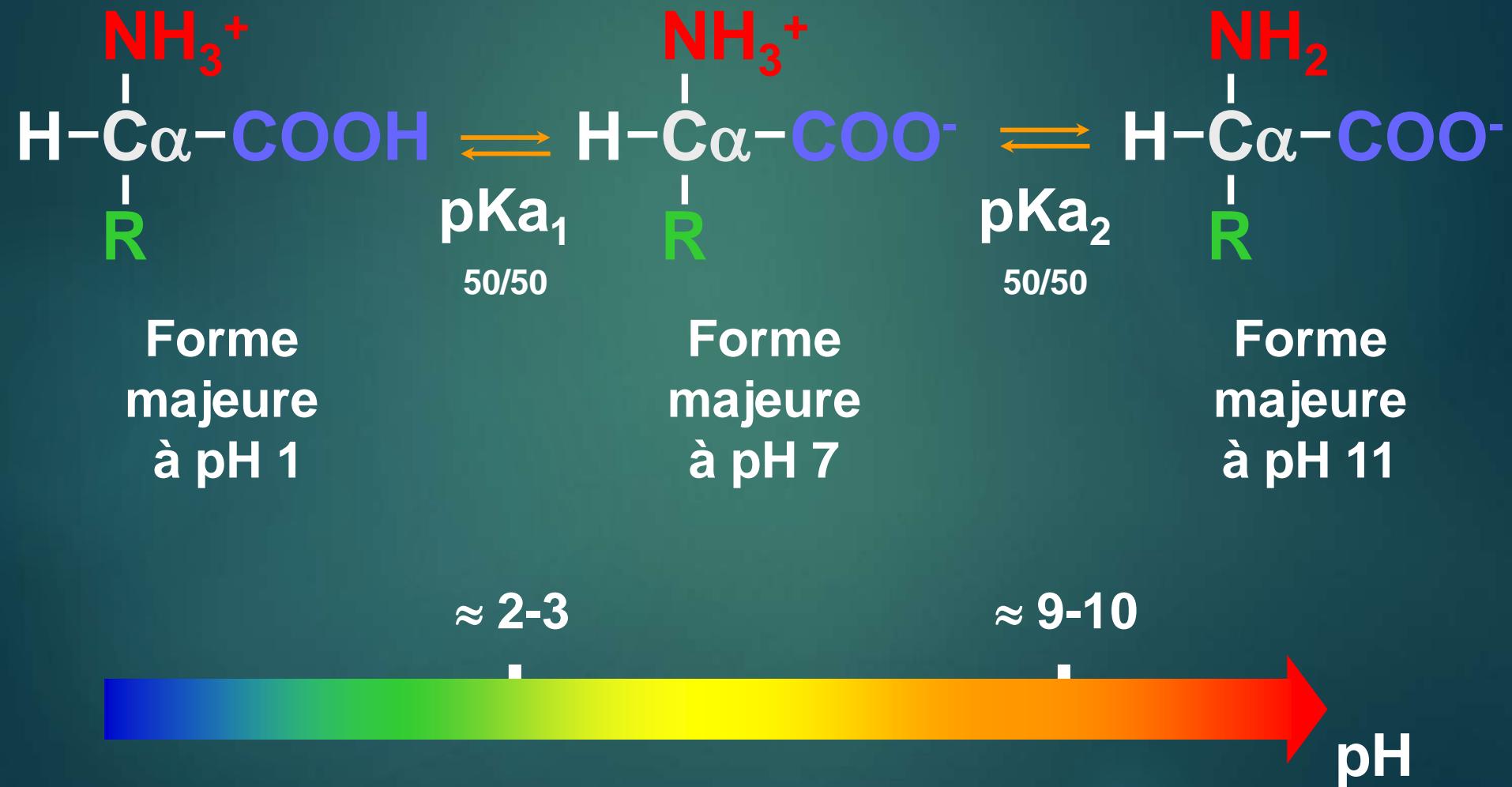
$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_a} \times \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]}$$

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K_a} + \log \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]}$$

Équation  
d'Henderson-  
Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]}$$

- En allant du PH très acide au PH alcalin:



- L'acide aminé perd successivement deux protons(diacide); il se caractérise par deux constantes d'ionisations et par conséquent deux PK( PK1 et PK2).
- Le PK1 est compris entre PH2 et PH3, il correspond à la dissociation du groupement COOH.
- Le PK2 est au voisinage de PH10, il correspond à la dissociation du groupement NH3.
- Entre ces deux PK se situe le point isoélectrique ou Phi pour le quel les charges + et – sont en équilibre: la charge globale est égale à 0.
- Au Phi , la charge de l'acide aminé est nulle; lorsqu'il est placé dans un champ électrique, il ne migre pas.
- Si  $\text{PH} < \text{Phi}$  : l'acide aminé est chargé positivement et il migre vers la cathode.
- Si  $\text{PH}>\text{Phi}$  : l'acide aminé est chargé négativement et il migre vers l'anode.

$$pHi = \frac{PK1 + PK2}{2}$$

En cas d'un acide aminé acide ou basique: troisième PK qui correspond au PK du groupement radical (**PKr**) ou (**PK3**).

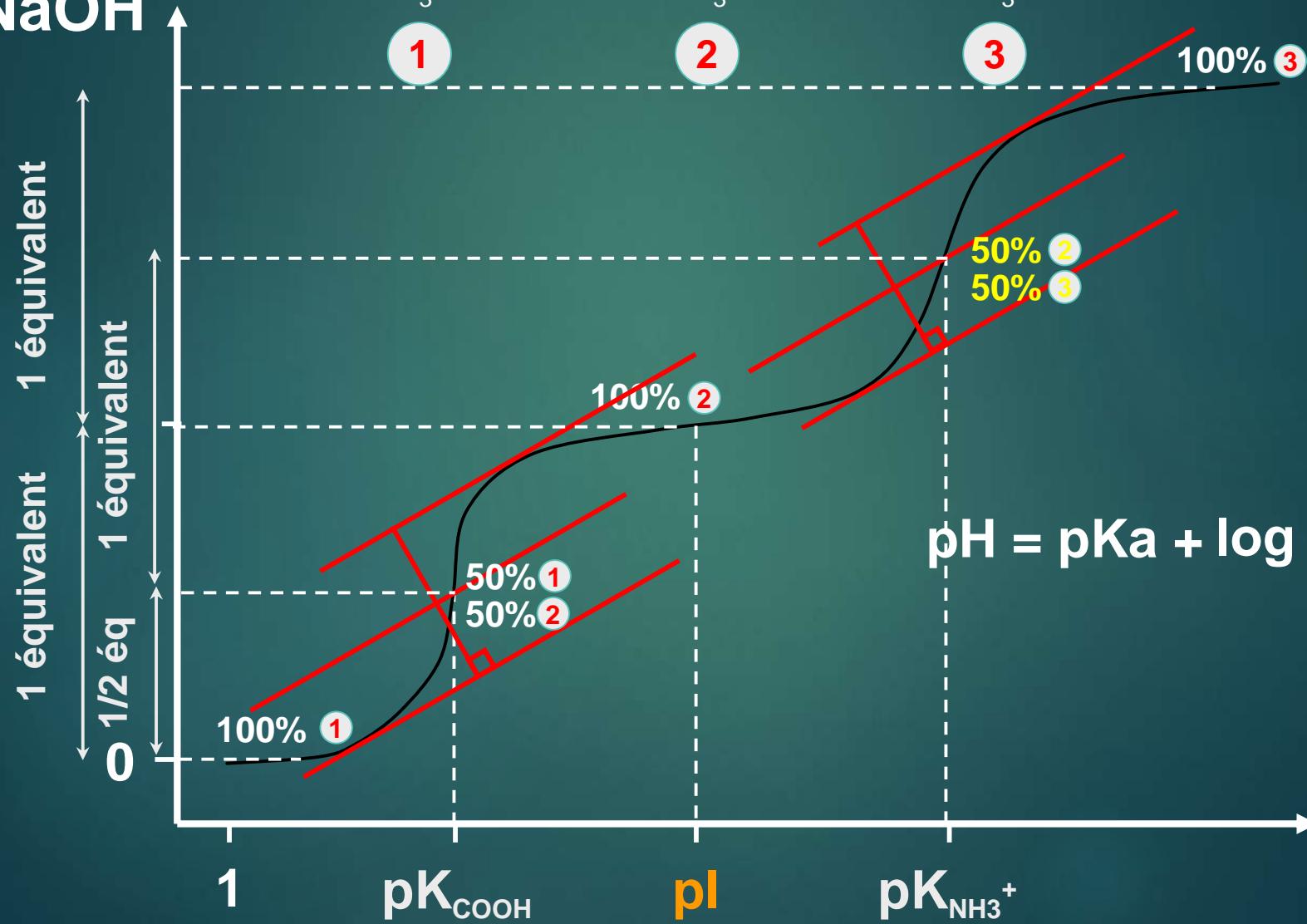
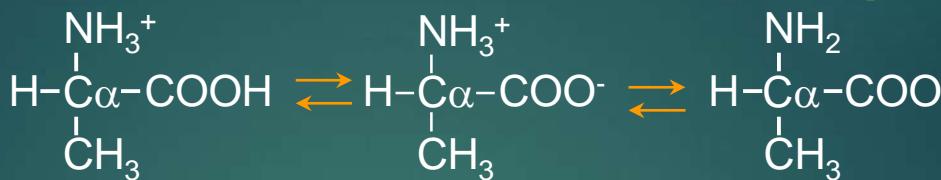
Si c'est un **acide** EX: acide apartique:  $pHi = PK1 + PKr / 2$

Si c'est une **base** EX: lysine, arginine:  $pHi = PK2+PKr / 2$

Exemple : alanine

Comment déterminer expérimentalement ces valeurs de pKa ?

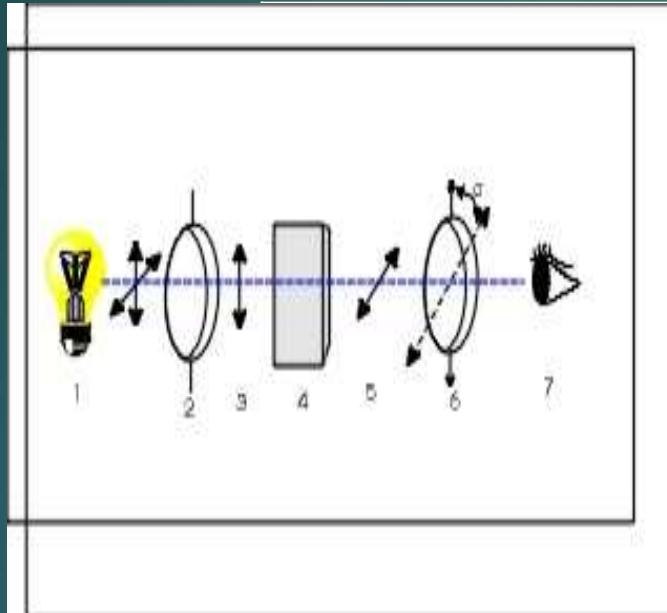
Volume  
NaOH





Pouvoir rotatoire

**Deux énantiomères ont mêmes propriétés physiques et chimiques mais diffèrent par leurs propriétés biologiques, par leur activité optique par leur action sur la lumière polarisée : Schéma d'un polarimètre :**



1. Lampe au sodium
2. Prisme de Nicol
3. Lumière polarisée plane
4. Cellule contenant l'échantillon
5. Rotation du plan
6. Analyseur
7. Oculaire

**Ces molécules placées dans le faisceau d'une lumière polarisée plane provoquent la rotation du plan de polarisation.**

- **Si la rotation a lieu dans le sens d'une aiguille d'une montre (droite) la molécule est dextrogyre noté (+) .**
- **Si la rotation s'effectue en sens inverse, (gauche): il est lévogyre noté (-).**

**L'appartenance à la série ne définit pas le sens du pouvoir rotatoire (acide L glutamique + 12° et acide D glutamique – 12° L-Leucine -11° et D-Leucine +11; L-Alanine +1,8° et D-Alanine -1,8°.**

**L'importance et le sens de rotation dépendent de la nature de la chaîne latérale, la température, la longueur d'onde de la lumière polarisée utilisée pour la mesure et le pH de la solution.**

L'activité optique des composés organiques est mesurée au moyen d'un polarimètre et selon la loi de Biot :

$$J = [J]_D \cdot l \cdot C$$

J est l'angle mesuré expérimentalement

l est la longueur de la cellule en dm

C est la concentration de la substance en

g/cm<sup>3</sup>

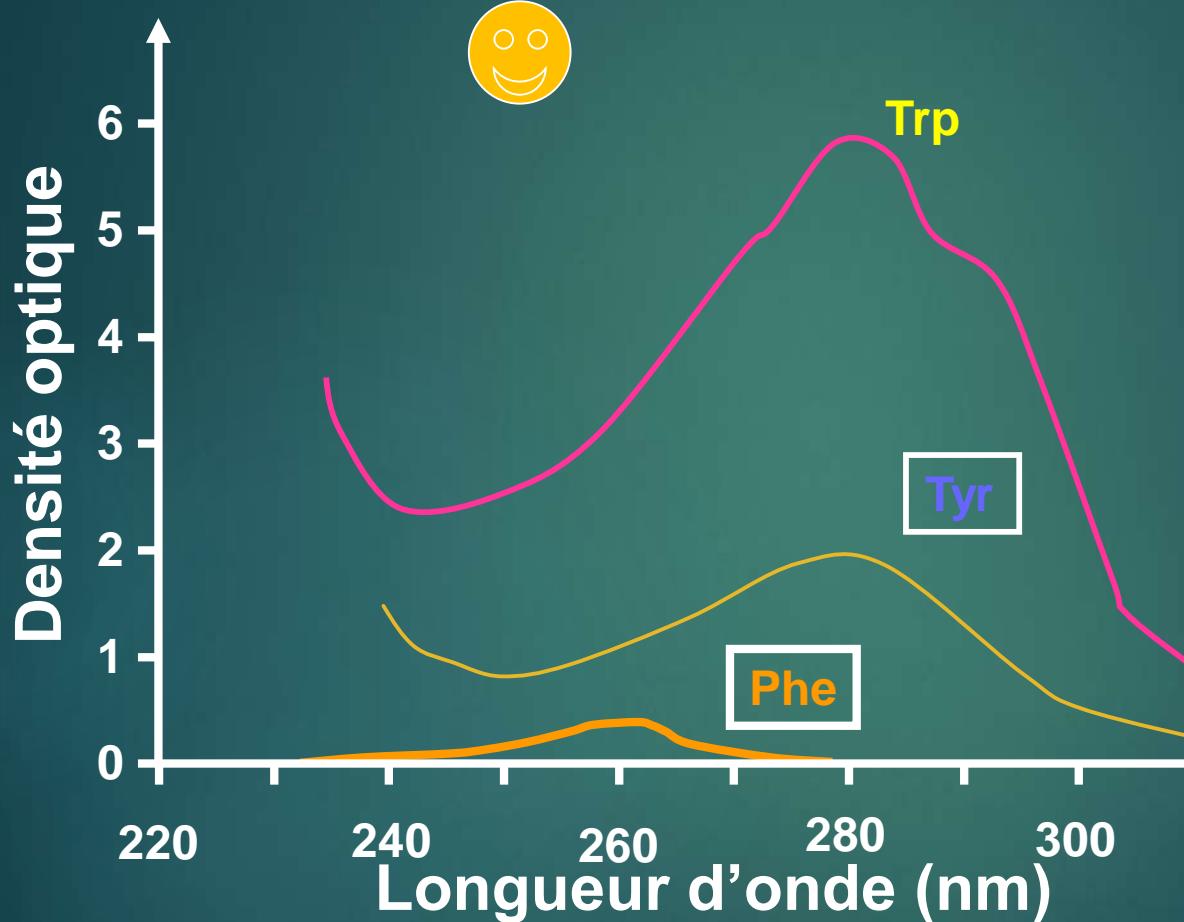
[J]<sub>0</sub> est le pouvoir rotatoire spécifique d'un composé chiral, à une t°C bien déterminée et pour une longueur d'onde correspondante à la raie du sodium à 589,3 nm.

# PROPRIETES SPECTRALES

- les aminoacides **n'absorbent pas la lumière visible**, leurs solutions sont incolores.
- Les acides aminés aromatiques absorbent dans **l'U.V.** entre 260 et 280 nm. Au dessus de 260 nm, la plus grande partie de l'absorption ultraviolette des protéines provient de leur teneur en **tryptophane** et parfois en tyrosine
- **La phénylalanine absorbe dans la bande des 260 nm.**
- **La tyrosine et la tryptophane ont un maximum d'absorption vers 280 nm.**

# ABSORPTION U.V.-visible

Solutions de tryptophane, tyrosine et phénylalanine à 1 mM



	$\lambda_{\text{max}} (\text{nm})$	$\epsilon (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
Trp	278	5600
Tyr	275	1340
Phe	258	195
Cys	248	345
S-S		
-C-NH-	< 200	
= O		
His	211	

On détecte très souvent la présence de protéines dans un milieu par mesure de la D.O. à 280 nm.

# **SOLUBILITE**

La plupart des acides aminés subissent facilement la solvatation par les solvants polaires tels que l'eau, ou l'alcool. Faible dans les solvant organiques -le double groupement fonctionnel commun qui peut s'ioniser et donc favoriser la dissolution

- les propriétés de la chaîne latérale qui peut avoir un caractère plus ou moins polaire ou apolaire. : la solubilité augmente si ce radical R est porteur de fonctions polaires ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$ ) ou hydrophiles ( $\text{OH}$ ).

# **POINT DE FUSION**

- Le point de fusion est élevé > 200°C .

# **PROPRIETES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES**

# **PROPRIETES CHIMIQUES LIEES AU GROUPEMENT COOH**

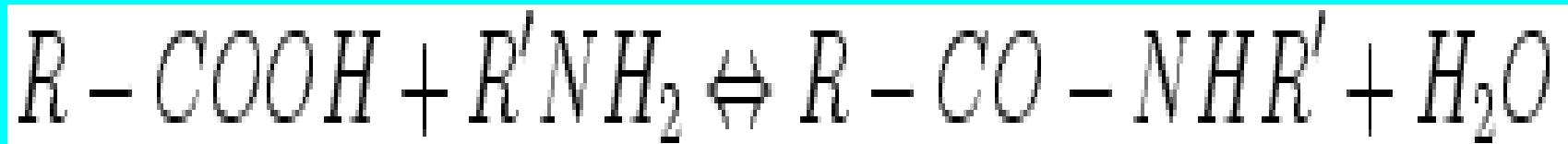
# ESTERIFICATION

- ▶ Par un alcool en présence d'un acide fort.



# AMIDIFICATION

- **Le carboxyle peut former des amides avec les amines.**



- **Asparagine et glutamine sont** deux exemples de dérivés physiologiques formés suivant cette réaction.

# **DECARBOXYLATION**

- Cette réaction est présente dans les organismes vivants pour produire à partir des aminoacides des dérivés (**amines biologiques**) qui peuvent être des **précurseurs** d'autres molécules et ce par des **décarboxylases** spécifiques.



*Peut être utilisé pour le dosage des acides aminés par la mesure du CO<sub>2</sub> dégagé*

# *Quelques produits de décarboxylation d'aminoacides*

Aminoacide	Amine	Localisation ou rôle
<b>Acide aspartique</b>	α-alanine β-alanine	<b>dans les protéines dans le coenzyme A</b>
<b>Cystéine</b>	mercaptoéthylamine	<b>dans le coenzyme A</b>
<b>Acide glutamique</b>	Acide γ-aminobutyrique	<b>Médiateur du système nerveux central</b>
<b>Histidine</b>	histamine	<b>Action hypotensive</b>
<b>3,4-dihydroxy- Phénylalanine (DOPA)</b>	dopamine	<b>Précureur de l'adrénaline (hormone)</b>
<b>Sérine</b>	éthanolamine	<b>Dans les phosphatides</b>
<b>5-hydroxy-tryptophane</b>	<b>sérotonine</b>	<b>Hormone tissulaire vasoconstrictrice</b>

**Principales amines biogènes**

## ► Action d'une base sur COOH.

### FORMATION DE SELS

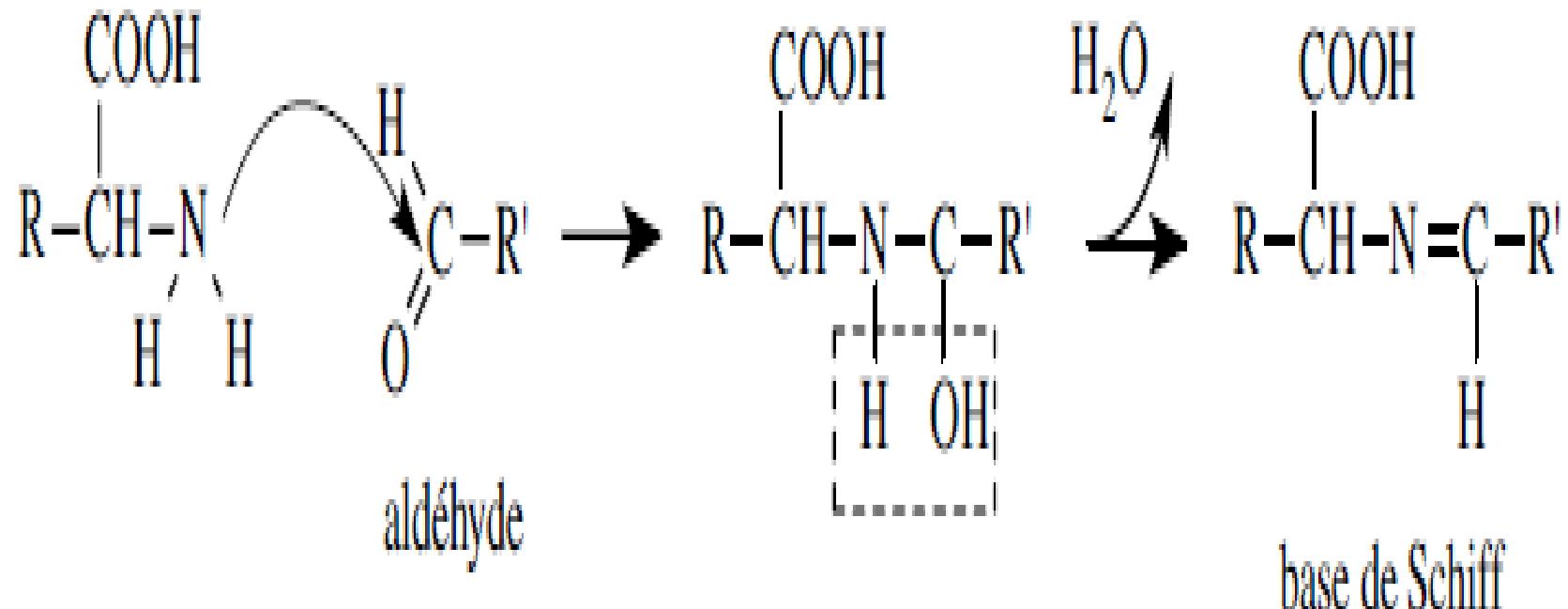


## **PROPRIETES CHIMIQUES LIEES AU GROUPEMENT NH<sub>2</sub>**

# ***ADDITION DE CARBONYLE***

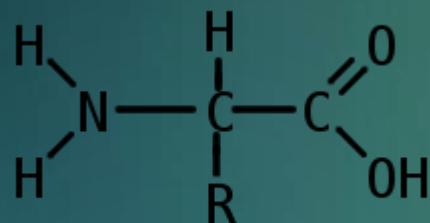
Les fonctions *α-aminés* des aminoacides réagissent réversiblement avec les *aldéhydes* pour donner des bases de Schiff qui apparaissent très souvent comme intermédiaires dans des réactions enzymatiques impliquant les aminoacides.

La proline qui contient une fonction amine secondaire ne réagit pas avec les aldéhydes.



# **DESAMINATION**

## ► **Par l'acide nitreux HNO<sub>2</sub>**



+ HNO<sub>2</sub>

**ACIDE NITREUX**

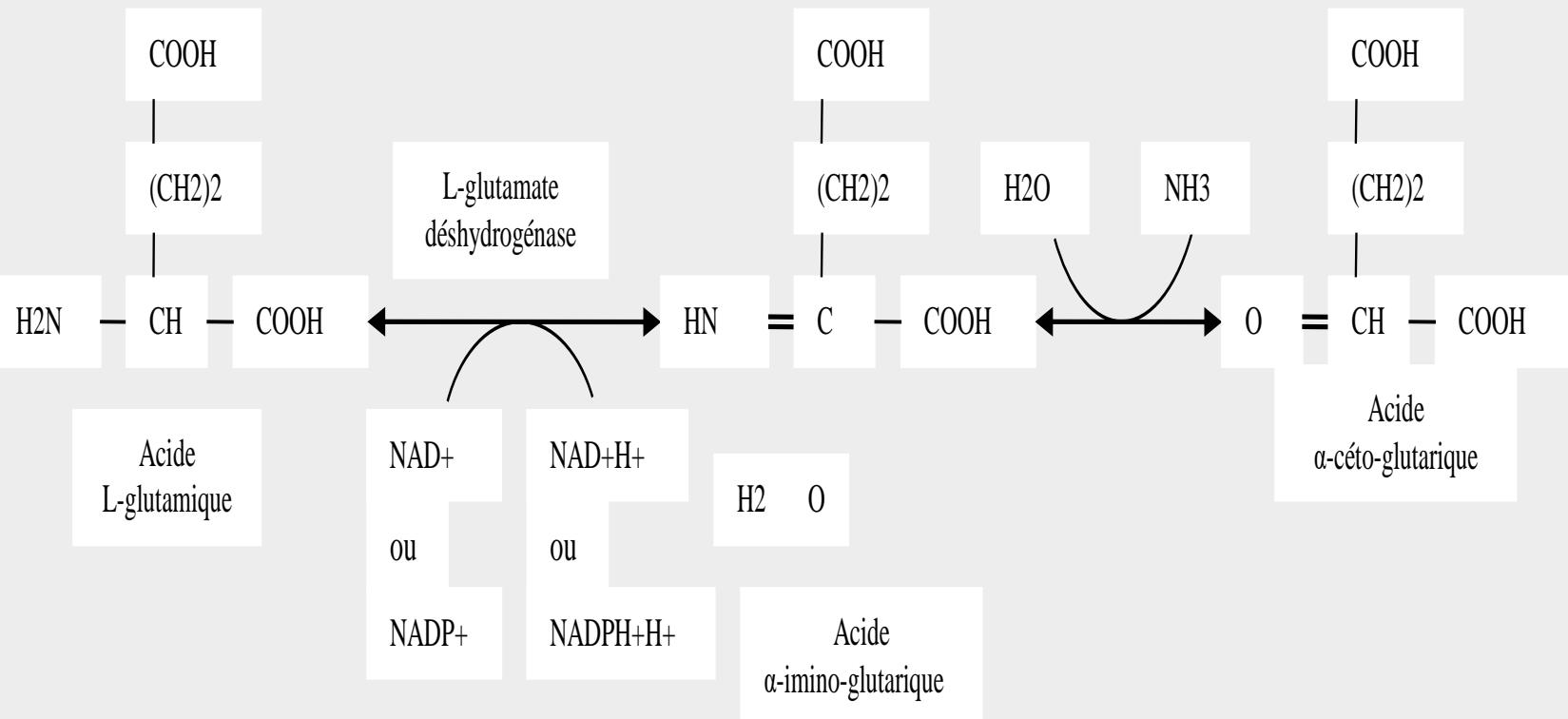


**ACIDE AMINE**

**ACIDE ALCOOL**

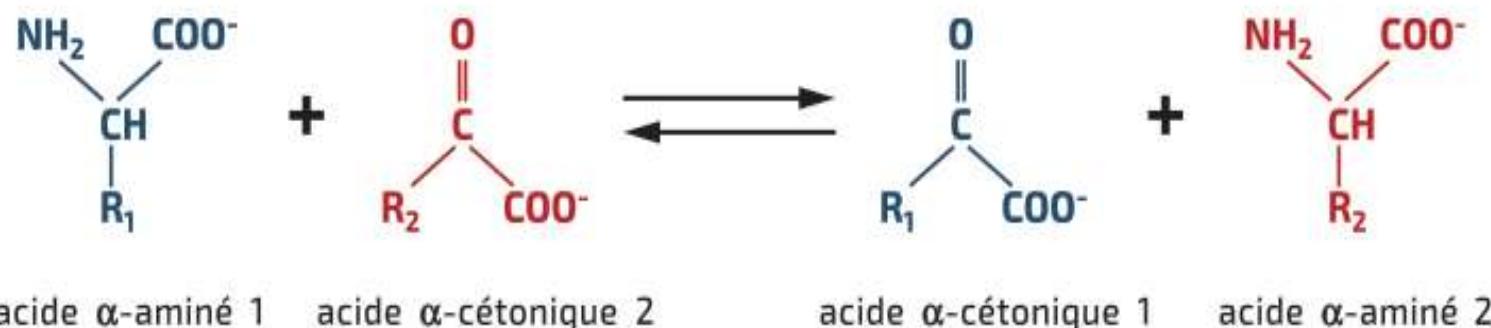
**DOSAGE DES ACIDES AMINES PAR LA MESURE DU N<sub>2</sub> DEGAGE:  
METHODE DE VAN SLYKE**

# *La désamination oxydative Ce processus a lieu en deux étapes.*



# *Les réactions de transamination*

Les réactions de transamination, catalysées par des aminotransférases, assurent les échanges d'azote entre les acides aminés et les acides  $\alpha$ -cétoniques : l'acide aminé, donneur du groupement amine, devient un acide  $\alpha$ -cétonique tandis que l'acide  $\alpha$ -cétonique accepteur devient un acide  $\alpha$ -aminé.



# ACTION DE LA NINHYDRINE

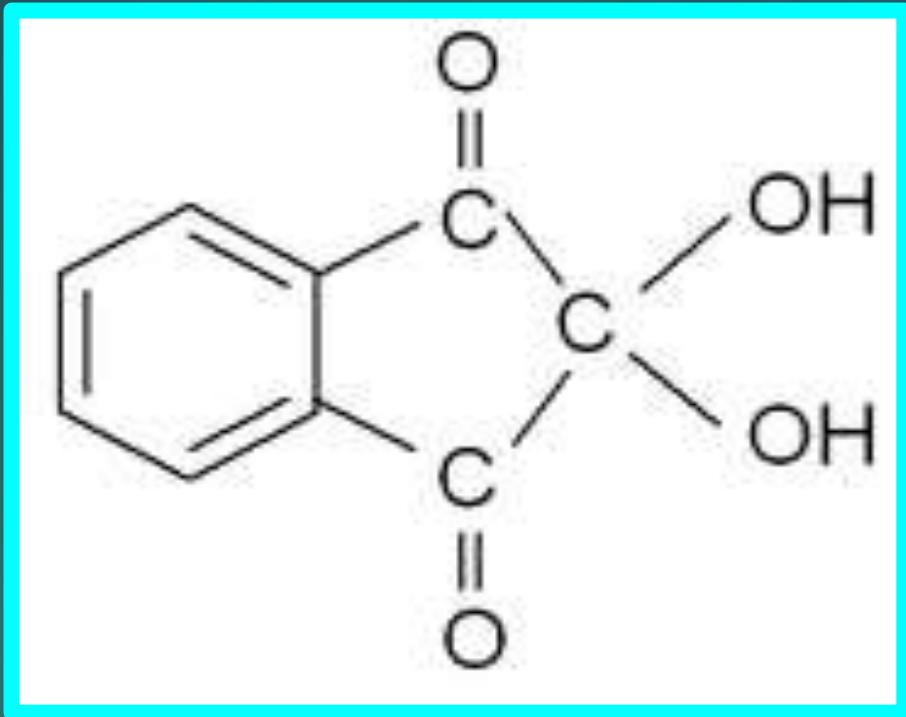
## ► *Décarboxylation et Désamination oxydative:*

Certains oxydants attaquent l'acide aminé et réalisent

Une **désamination** associée à une décarboxylation.

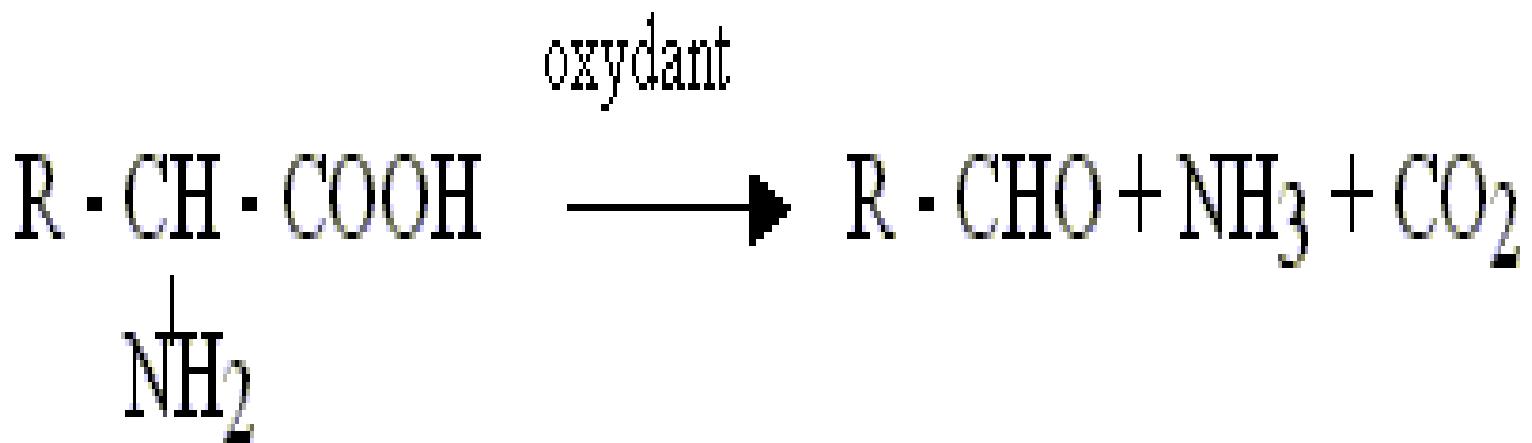
La réaction **avec la ninhydrine** est l'une des plus connue et utilisée, elle aboutit à un **chromophore violet pour les amines Primaires(570nm) ou jaune pour les amines secondaires (440nm).**

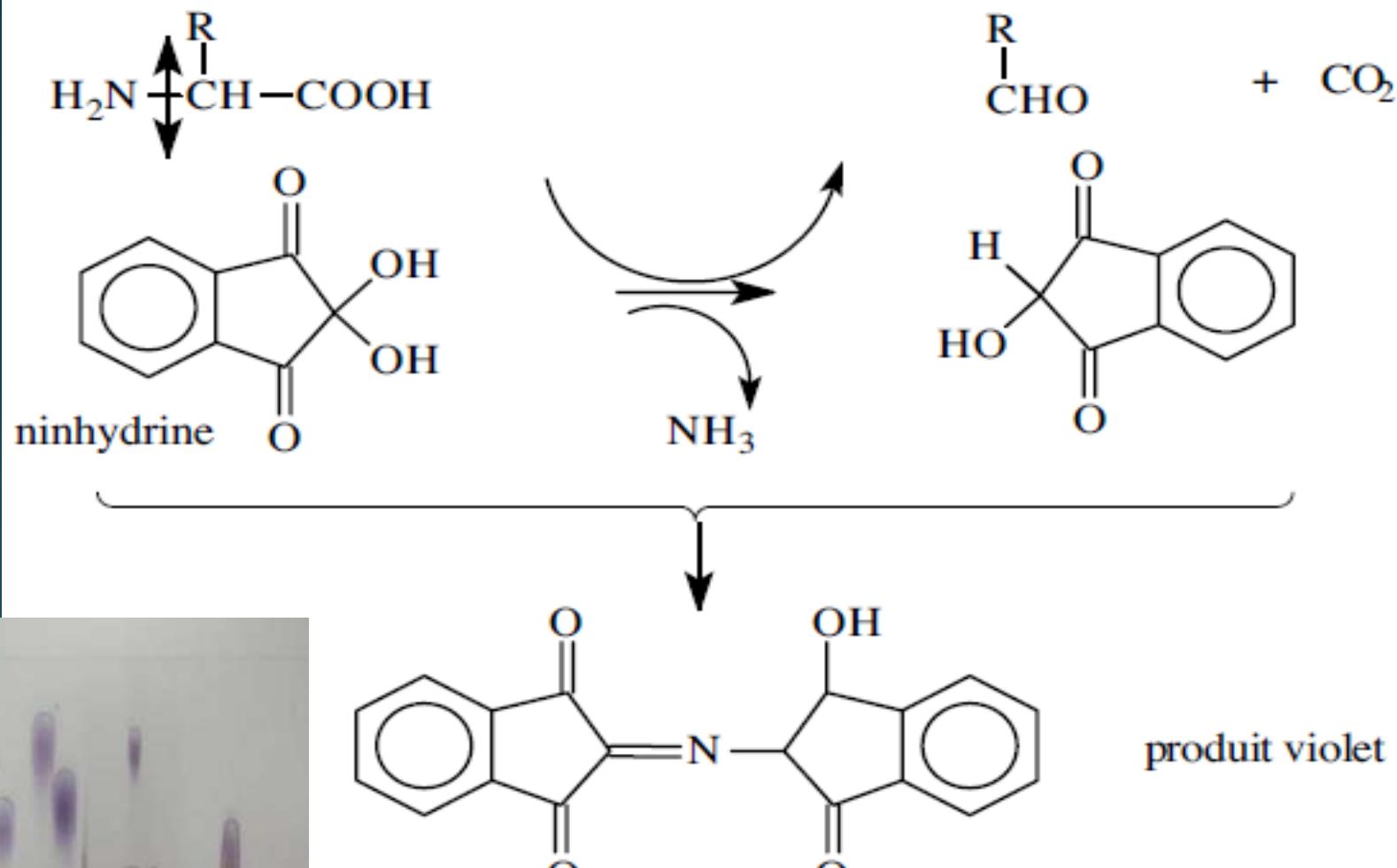
Non spécifique : d'autres composés ayant des groupements amines libres : glucosamine, peptides et protéines.



La ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione);  
composé aromatique utilisé comme révélateur  
des acides aminés

Au cours de la réaction il y a production de CO<sub>2</sub>, de NH<sub>3</sub> et d'un aldéhyde ayant un atome de carbone de moins que l'acide aminé dont il provient, avec formation de ninhydrine réduite (HYDRINDANTINE).





## Méthodes spécifiques

Elles permettent d'identifier et de doser spécifiquement certains AA grâce à leur chaîne latérale sans avoir recours à une séparation préalable des AA

### **Identification de la cystéine et de la cystine.**

Le groupement thiol peut être mis en évidence par la nitroprussiate de sodium en milieu ammoniacal donnant une couleur rouge: **Réaction de Brandt.**

**Identification de la tyrosine par la réaction de Millon, de l'arginine par la réaction de Sakaguchi, de l'histidine par la réaction de Pauly, du tryptophane par la réaction d'Ehrlich.**

# SEPARATIONS DES ACIDES AMINES

**Les AA constitutifs des protéines, sont libérés par hydrolyse.**

**Un hydrolysat protéique, obtenu après ébullition dans l'acide chlorhydrique (HCl) prolongé (6N) est un mélange d'AA qu'il importe d'identifier et de doser.**

**Les méthodes de séparations les plus utilisées sont:**

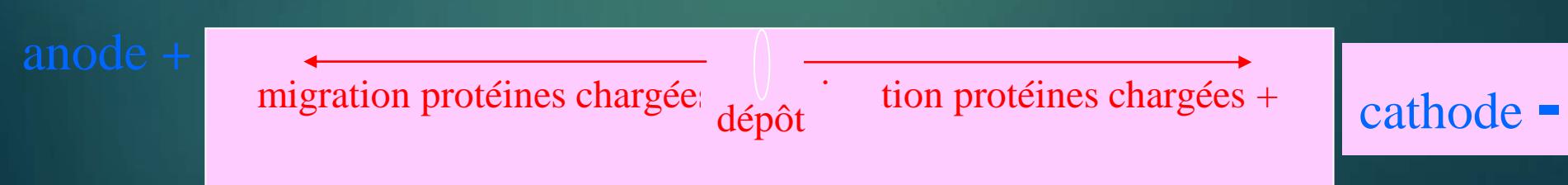
- Méthodes électrophorétiques;**
- Méthodes chromatographiques**  
1 / chromatographies de partage;  
2 / chromatographies échangeuses d'ions

# ELECTROPHORESE

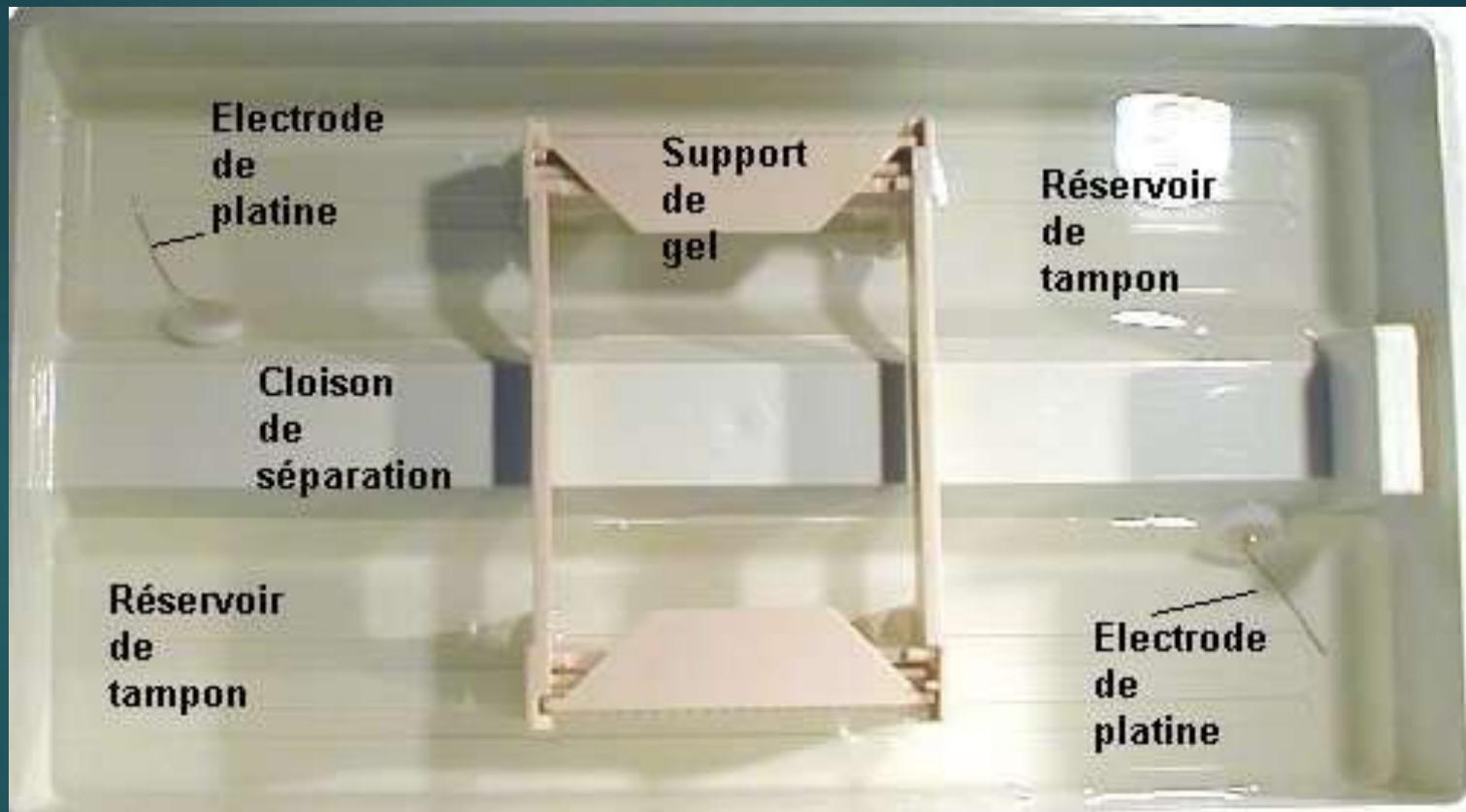
- ▶ L'électrophorèse est une **technique biochimique de séparation** fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.
- ▶ l'électrophorèse est devenue une **technique de routine** dans les laboratoires où on l'utilise pour séparer notamment les protéines et les acides nucléiques.
- ▶ L'électrophorèse des protéines peut être réalisée sur des supports variés, notamment sur **gel de polyacrylamide ou sur gel d'agarose 11**

Deux facteurs vont influencer la migration des protéines: leur **charge et leur taille**. Plus la protéine est chargée plus sa migration sera importante. Au contraire plus la protéine sera grosse moins sa migration sera importante.

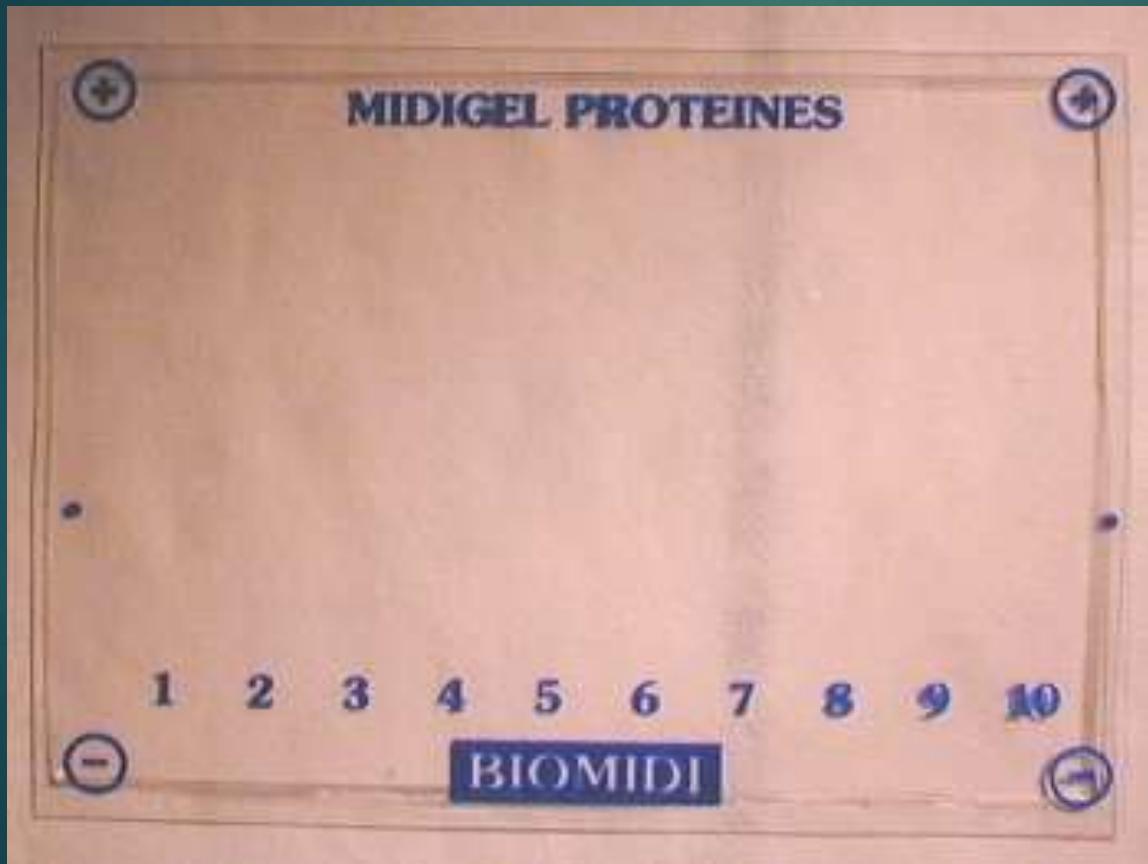
Le sens de migration de la protéine va dépendre de son pl (**point isoélectrique**). En fonction du pH la protéine sera chargée positivement ou négativement, elle migrera donc vers l'anode (chargée +) ou la cathode (chargée -).



# Cuve pour électrophorèse clinique



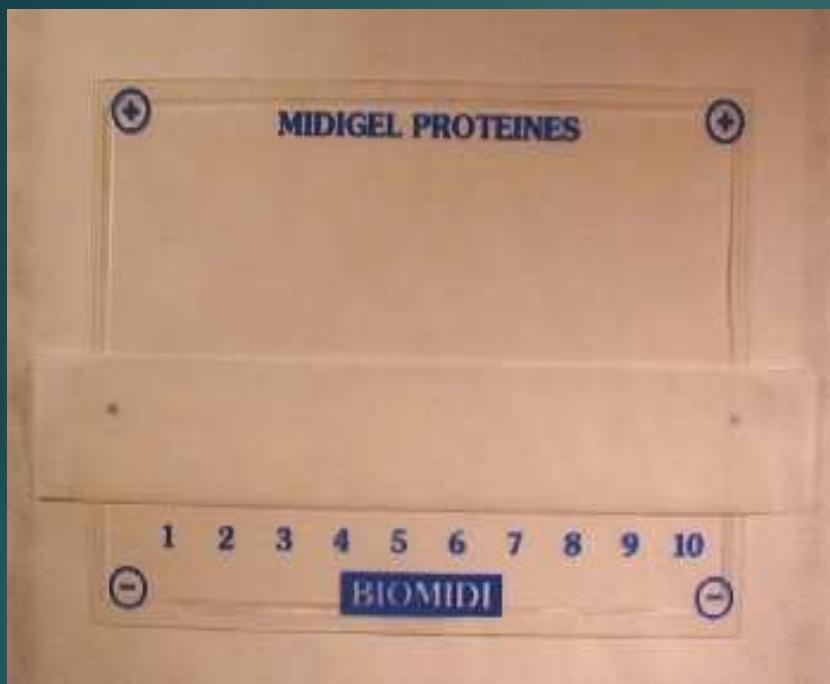
# Préparation du gel et dépôt des échantillons



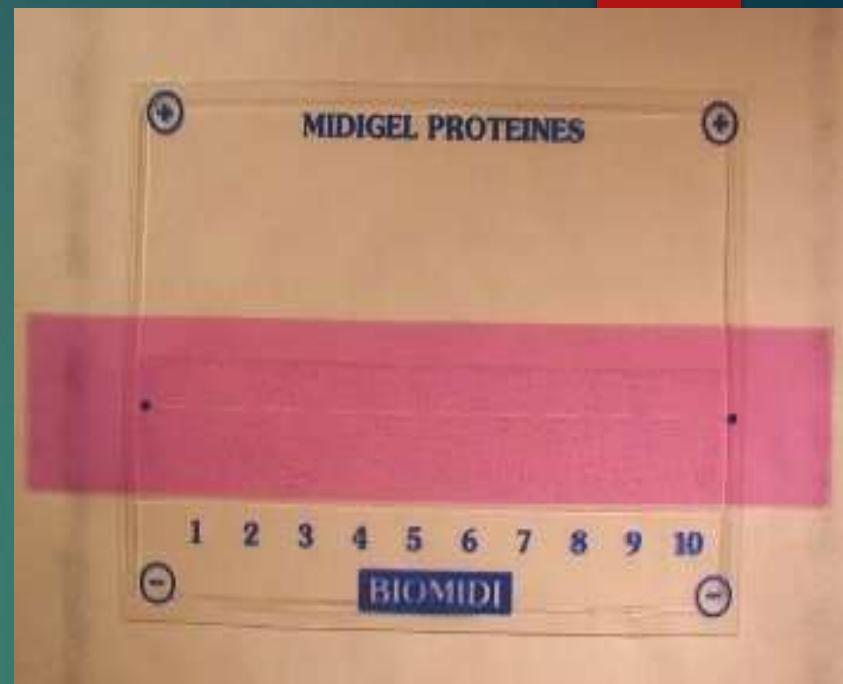
Les gels supportés prêts à l'emploi sont constitués d'une mince couche d'agarose coulée sur un support plastique de 100 mm x 75 mm permettant leur manipulation aisée.

# Mise en place du masque de dépôt

## Essorage de la zone de dépôt



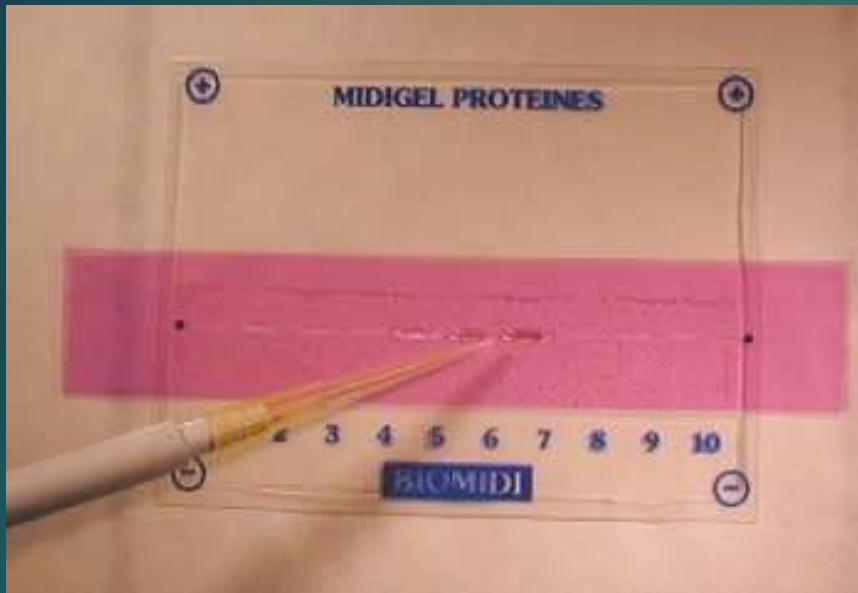
Une fois le gel sorti de son emballage, la zone de dépôt est essorée avec une bande de papier filtre pour faciliter la diffusion des échantillons lors du dépôt.



La bande est ensuite retirée et jetée et on dispose à la même place un masque de dépôt formé d'une bande de plastique comportant 10 fentes.

## Dépôt des échantillons

## Essorage du liquide en excès



Un volume de 5  $\mu\text{L}$  des échantillons à analyser est déposé sur les fentes et abandonné pendant 5 minutes pour assurer leur diffusion au niveau de la zone de dépôt.

Le liquide non absorbé par le gel est ensuite essoré avec une autre bande de papier filtre et le masque de dépôt est jeté.

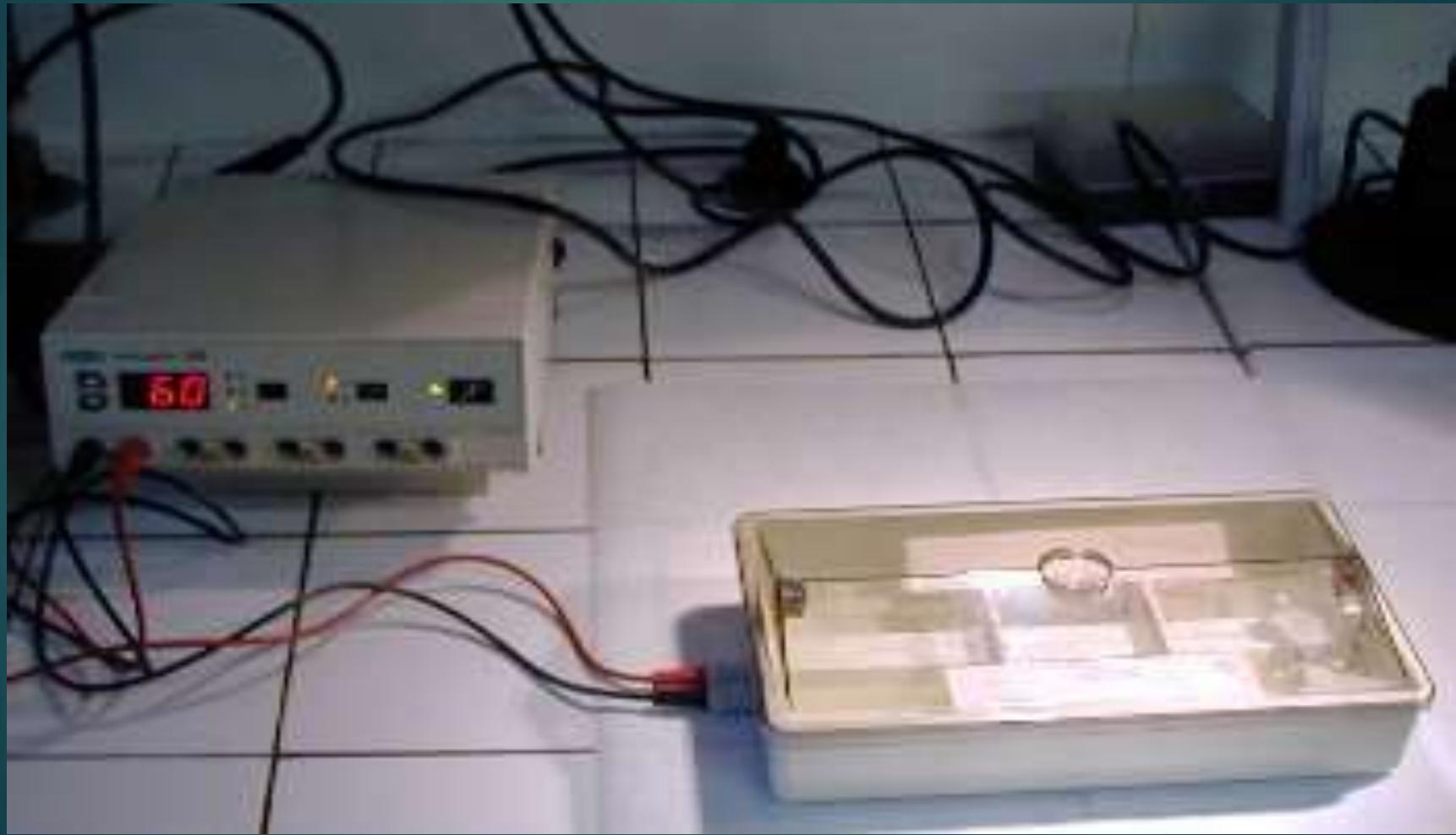
# Gel en place dans la cuve



# Phase de migration

- Le gel est alors mis en place dans la cuve et puis après fermeture du couvercle et mise en marche de l'alimentation, la migration des protéines démarre
- La tension appliquée au gel et le temps de migration dépendent de la nature des échantillons à analyser.

## Ensemble du dispositif d'électrophorèse



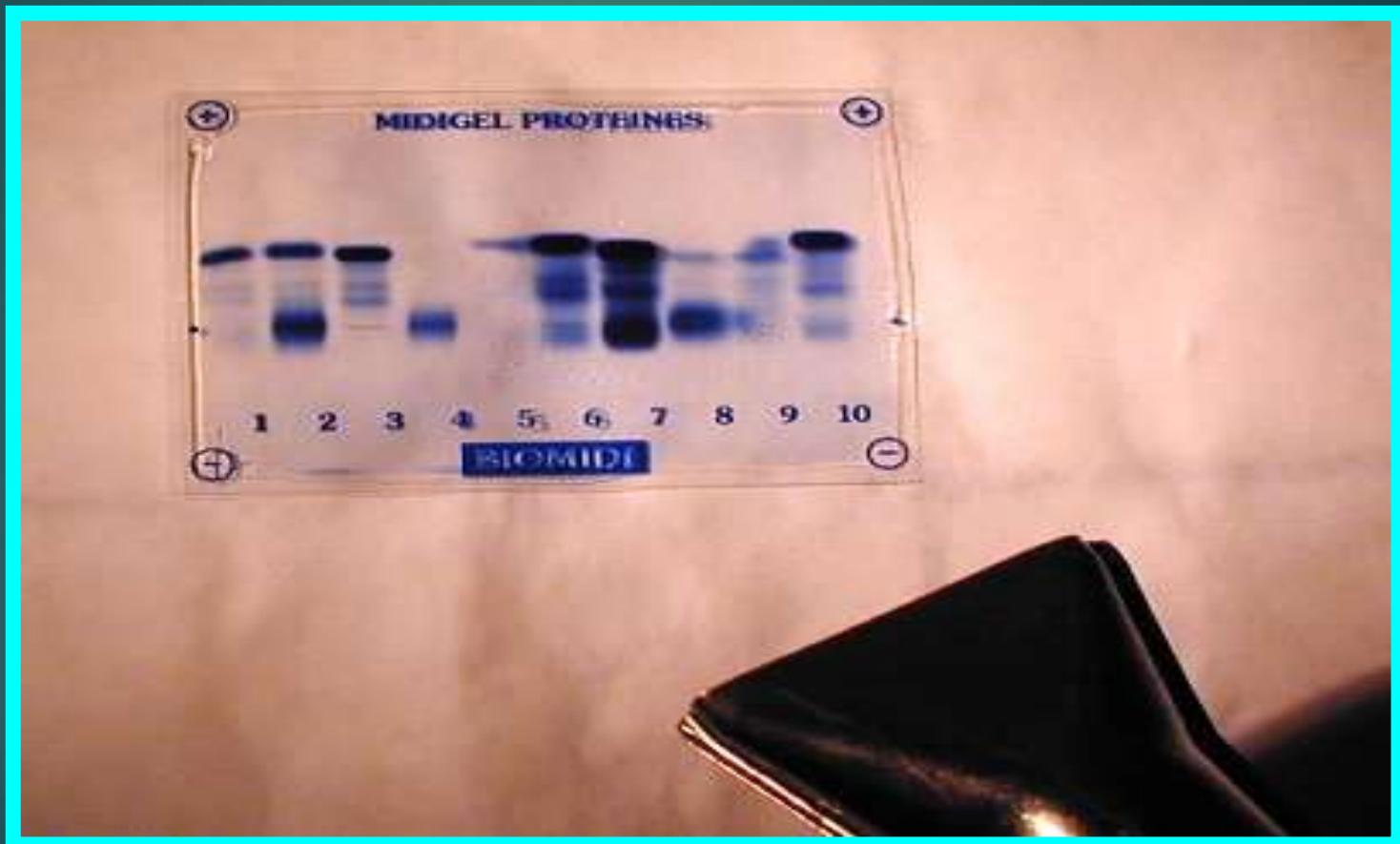
# Fixation et coloration

- Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est plongé pendant deux minutes dans le fixateur (acide alcool), séché puis plongé pendant trois minutes dans le colorant.
- Une succession de bains dans la solution de décoloration permet ensuite d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées.

# Décoloration du fond



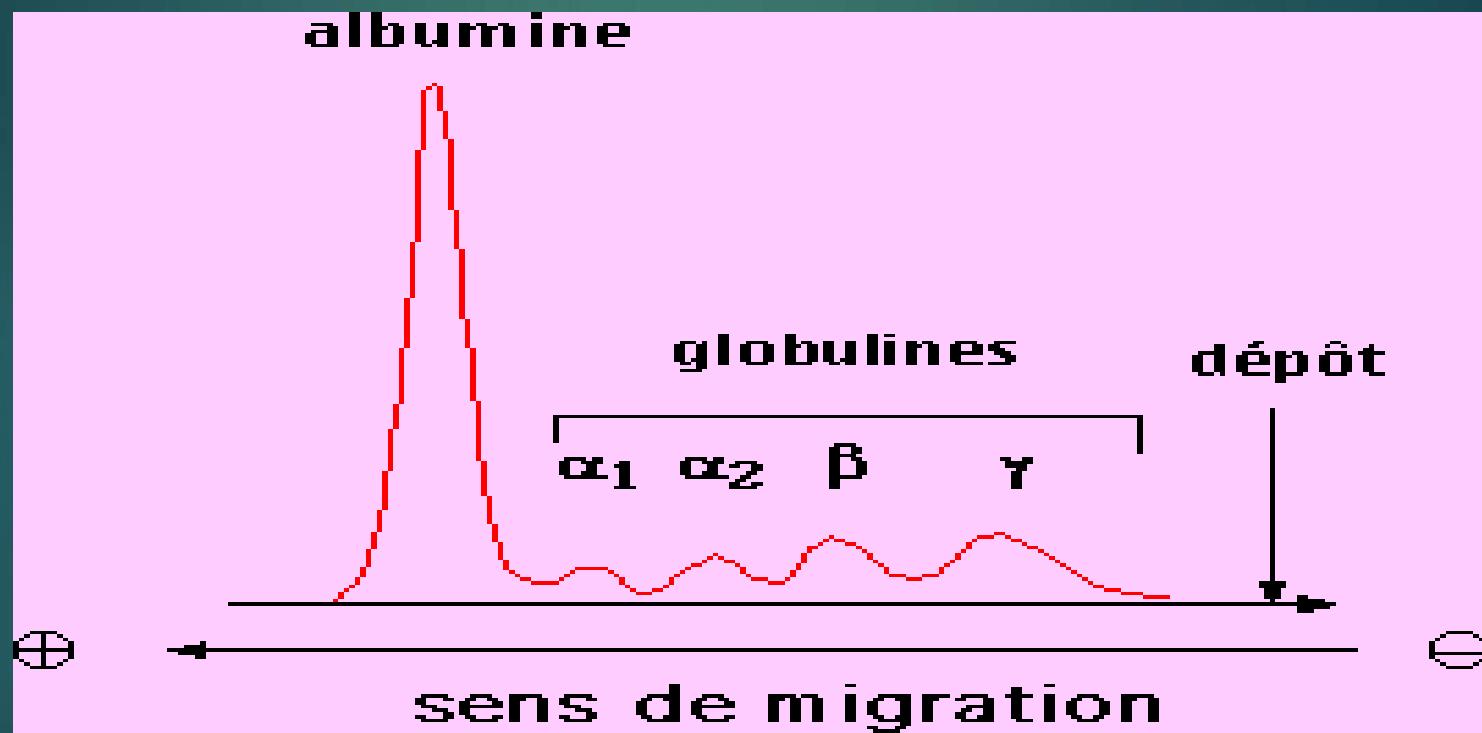
Le gel est ensuite séché ce qui permet de le conserver dans de bonnes conditions.



# lecture

- peut se faire à l'oeil nu (analyse qualitative) ou par densitométrie (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, l'intégration des pics permet une analyse quantitative des fractions.

# Tracé densitométrique du protéinogramme d'un sérum humain normal



## METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

- ▶ CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.
- ▶ CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.
- ▶ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.
- ▶ CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS.

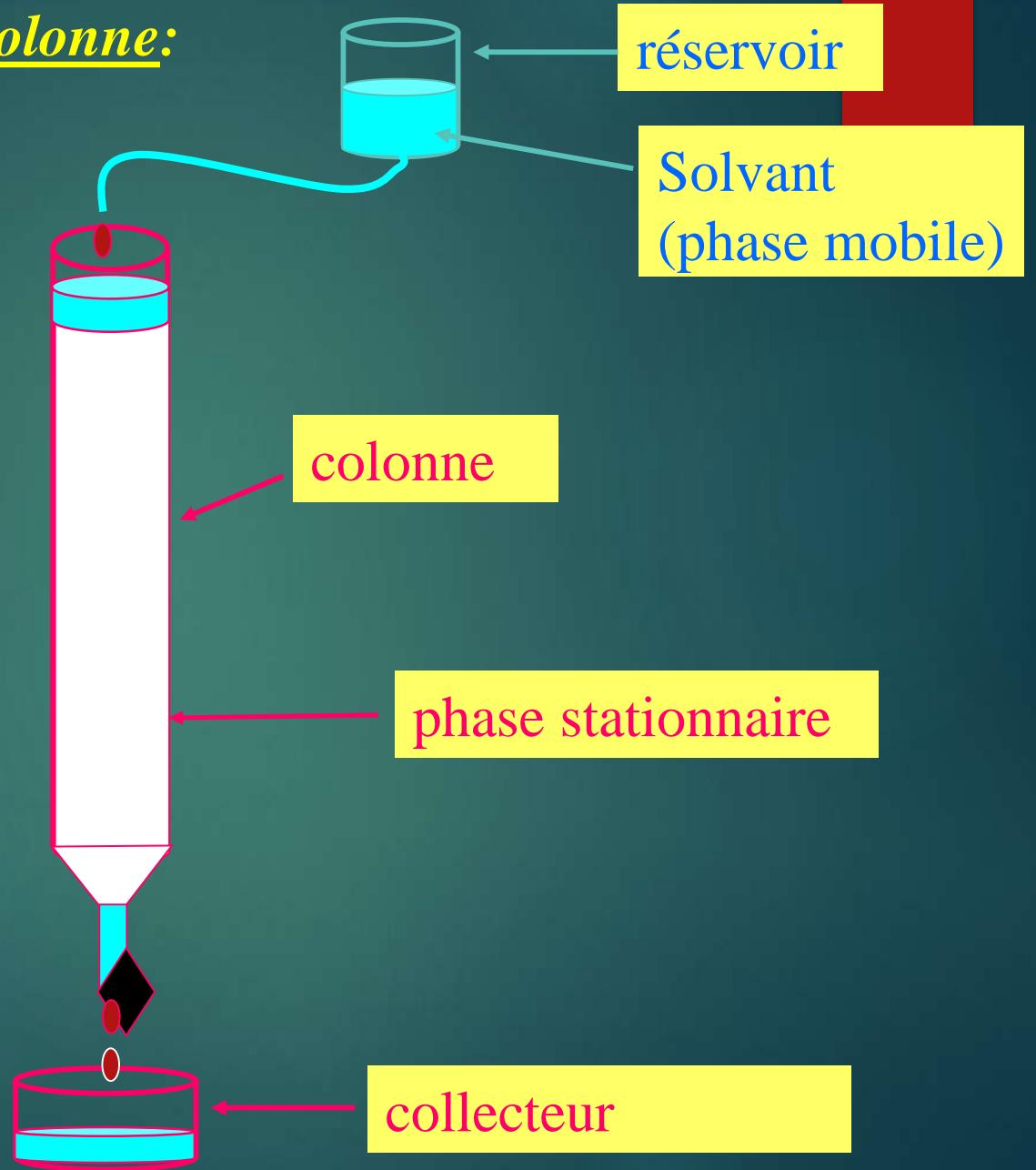
# La purification des protéines

La chromatographie est une technique de **séparation** qui utilise un support qui possède des propriétés **physico-chimiques** particulières.

Ce support va retenir les protéines en fonction de critères variables.

- en fonction de la **charge des protéines**.
- en fonction de leur **affinité** pour des molécules (ligands...).
- en fonction de leur **taille**.

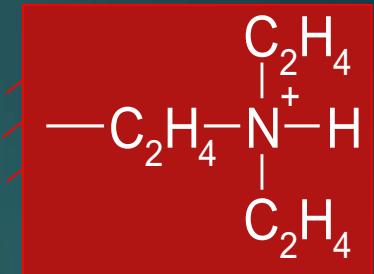
## Chromatographie sur colonne:



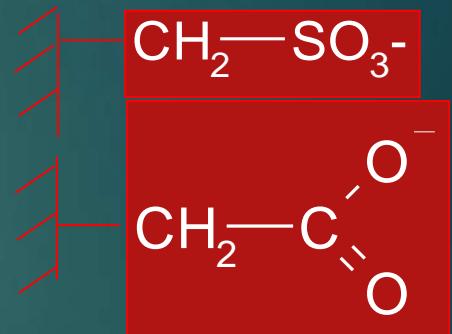
## Chromatographie d'échange d'ions:

La phase stationnaire est composée d'une résine qui peut être

- chargée positivement (*échangeuse d'anions*)



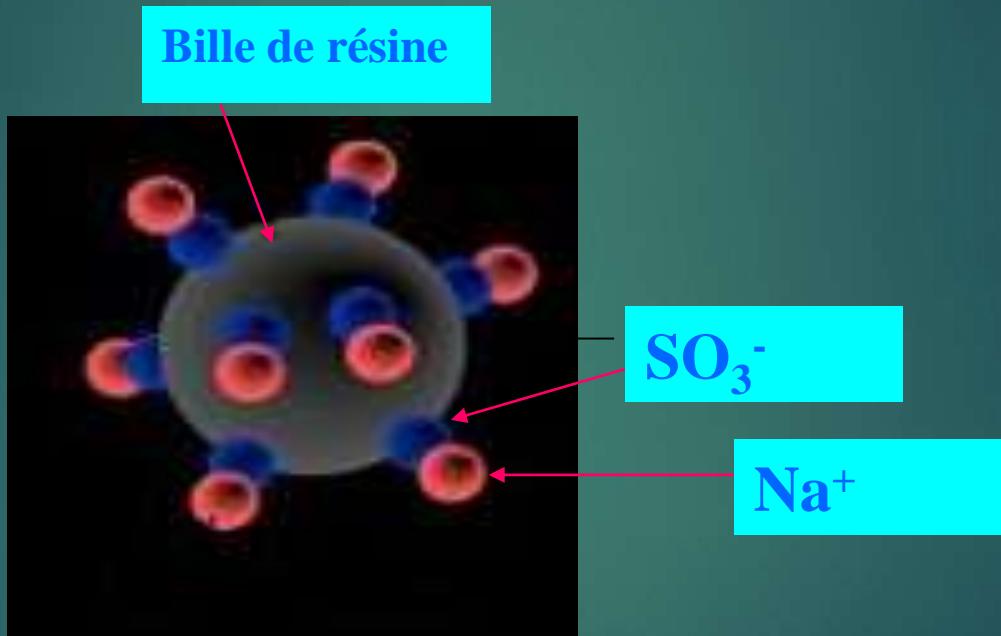
-chargée négativement (*échangeuse de cations*)



-Les interactions molécules-colonne vont dépendre de la charge des molécules. Ces interactions pourront être *modulées par le pH et la force ionique (concentration en sels) du milieu.*

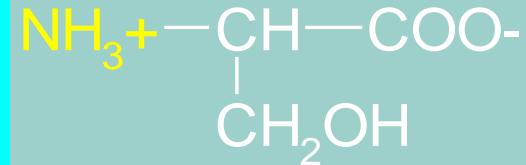
## ***Exemple d'une purification par échange de cations: séparation de 3 acides aminés Ser, Asp et Lys***

- **étape 1:** la colonne (chargée négativement) est équilibrée avec une solution faiblement concentrée en sels.

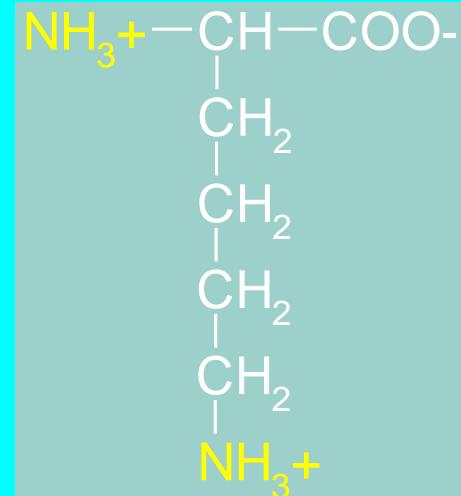
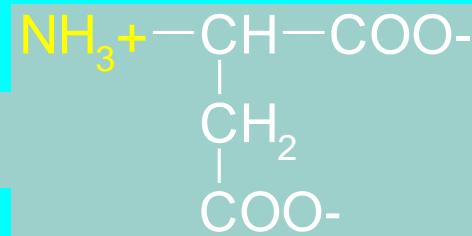
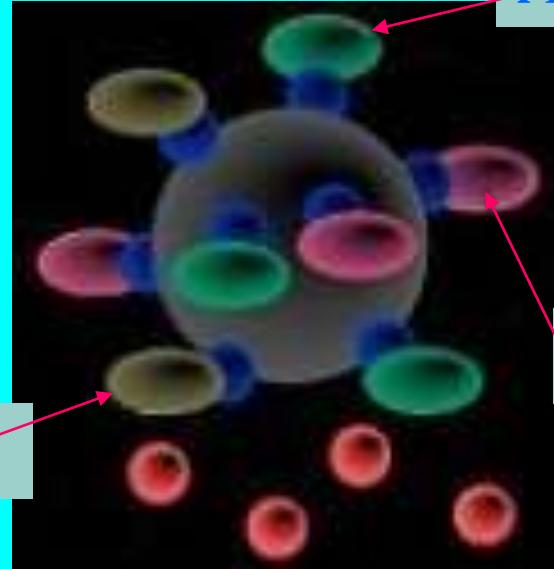


Les cations de la solution (ici  $\text{Na}^+$ ) vont se fixer sur les charges négatives de la phase stationnaire.

- étape 2: la solution contenant le mélange des molécules à séparer est déposée sur la colonne.



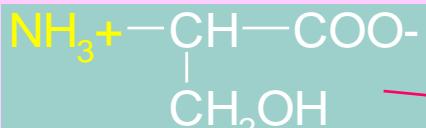
Ser



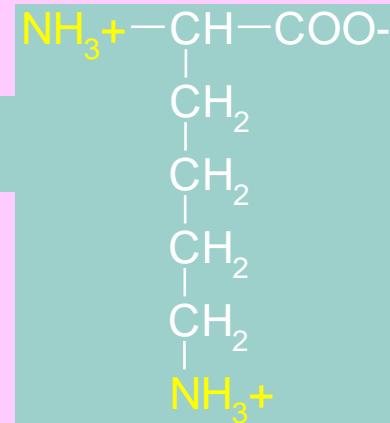
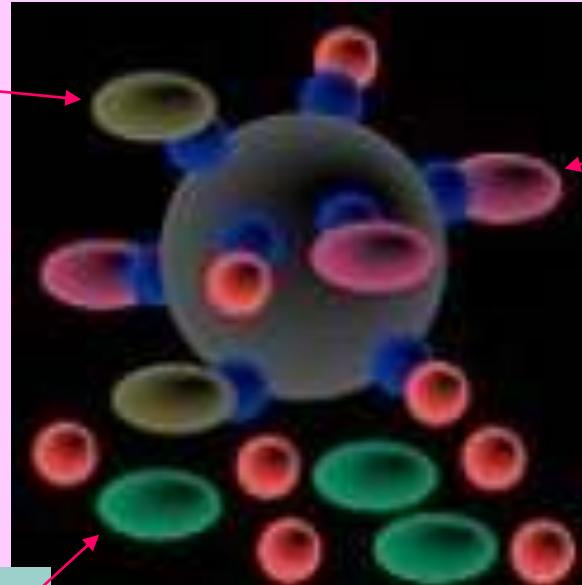
Ce sont les molécules présentes en plus grande concentration qui se fixent à la colonne.

Ici, les groupement chargés positivement vont se fixer à la colonne à la place des ions  $\text{Na}^+$

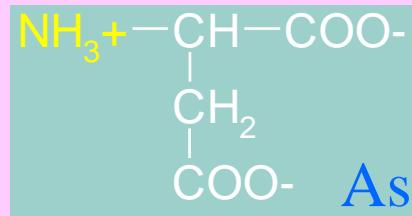
- étape 3: On élue (on rince) la colonne avec une solution de NaCl un peu plus concentrée.



Ser



Lys

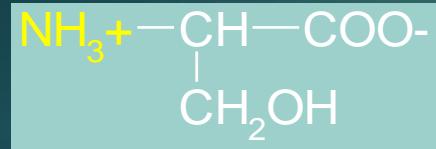


Asp

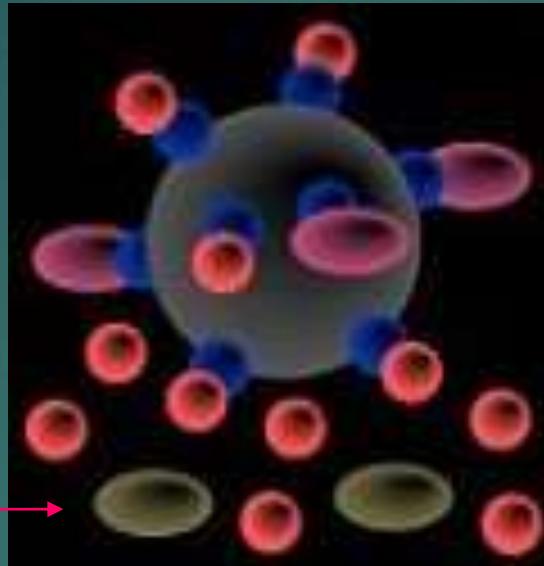
Les ions  $\text{Na}^+$  étant plus nombreux que précédemment ils vont entrer en compétition avec les acides aminés pour se fixer sur la colonne.

Ils vont remplacer tout d'abord les acides aminés les moins positifs.

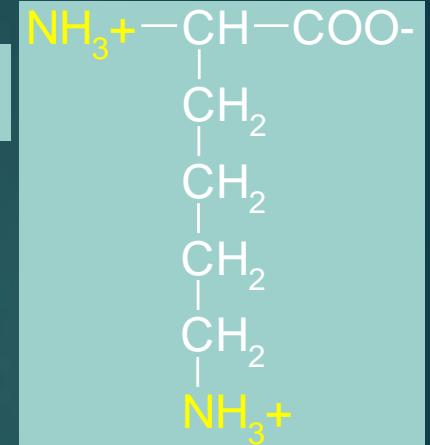
- étape 4: On augmente la concentration en NaCl de l'éluant.



Ser

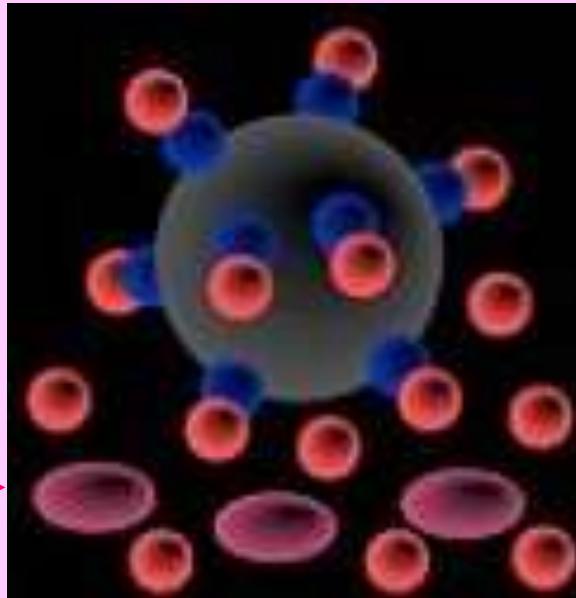
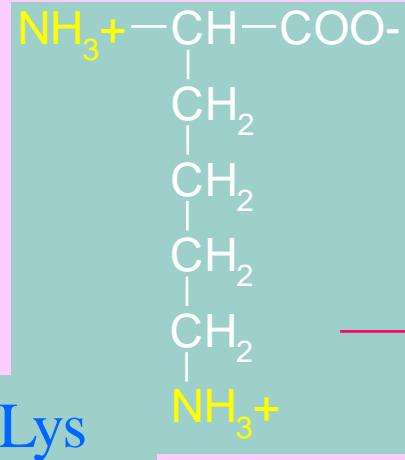


Lys



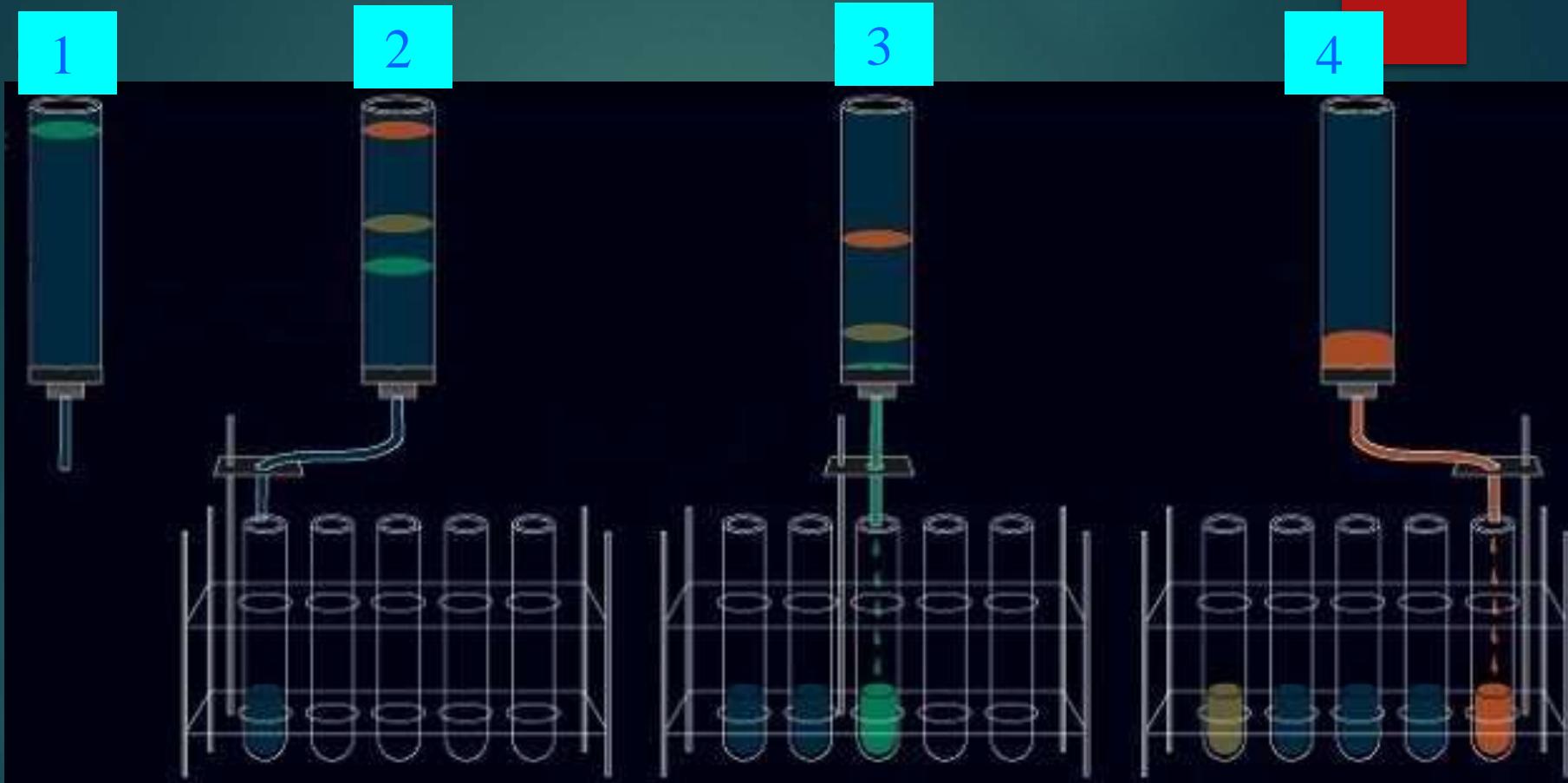
La concentration en  $\text{Na}^+$  étant plus forte, seuls les acides aminés les plus chargés vont rester fixés à la colonne.

- étape 5: On augmente encore la concentration en NaCl de l'éluant.



Les ions  $\text{Na}^+$  sont en large excès, ils vont remplacer toutes les molécules qui étaient encore sur la colonne.

On a rincé la colonne avec **un gradient de concentration** en NaCl



1-2: On dépose le mélange, les molécules les plus chargées se fixent tout de suite alors que les moins chargées se fixent plus bas.

3-4: On rince la colonne avec une solution de NaCl de concentration croissante. On décroche successivement les différentes molécules.

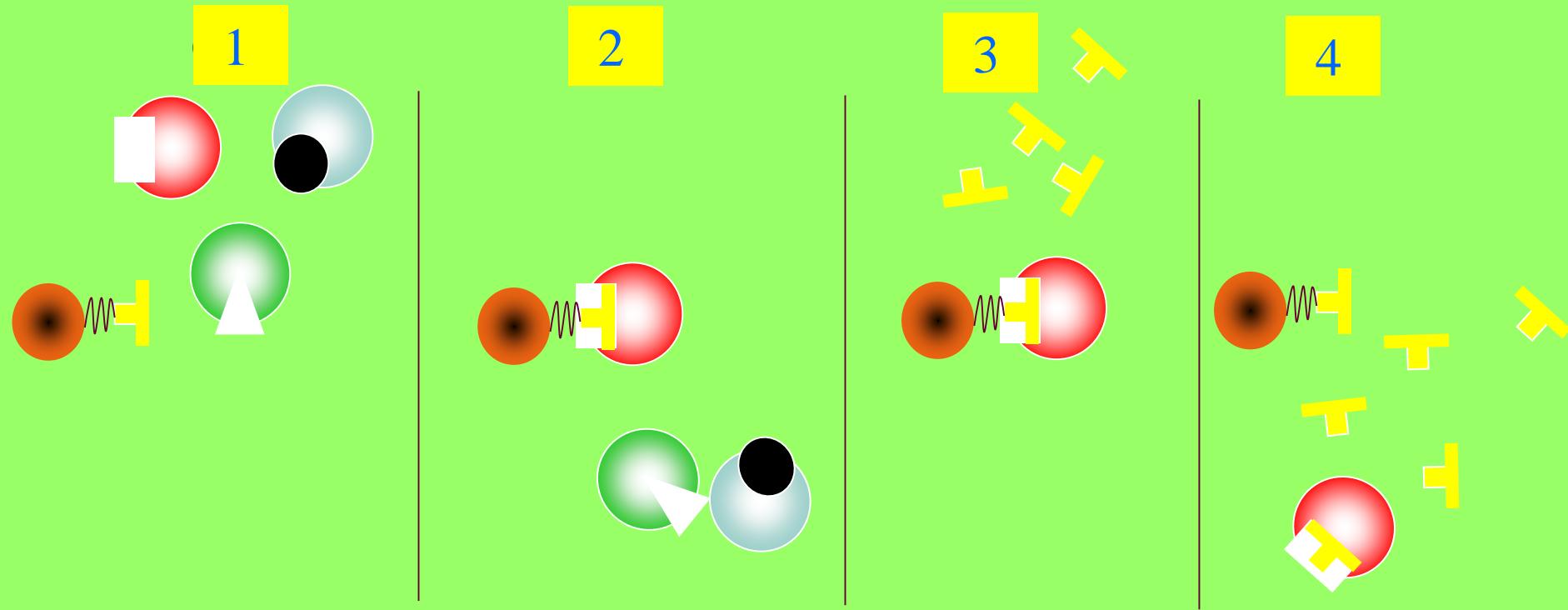
Dans l'exemple précédent on a modifié la force ionique de l'éluant pour décrocher les différents acides aminés.

On aurait également pu modifier le pH de l'éluant et garder une concentration en NaCl constante.

En fonction de leur pKa respectifs les acides aminés auraient changé de charge et se seraient décrochés de la colonne.

Le principe est strictement le même pour une protéine.

Chromatographie d'affinité: On greffe sur la colonne une molécule qui interagit de façon spécifique avec la protéine que l'on veut purifier.



**1-2:** Quand on met le mélange sur la colonne, seule la protéine qui peut interagir avec le ligand se fixe.

**3-4:** Pour décrocher la protéine de la colonne, on élue avec une solution contenant le ligand.

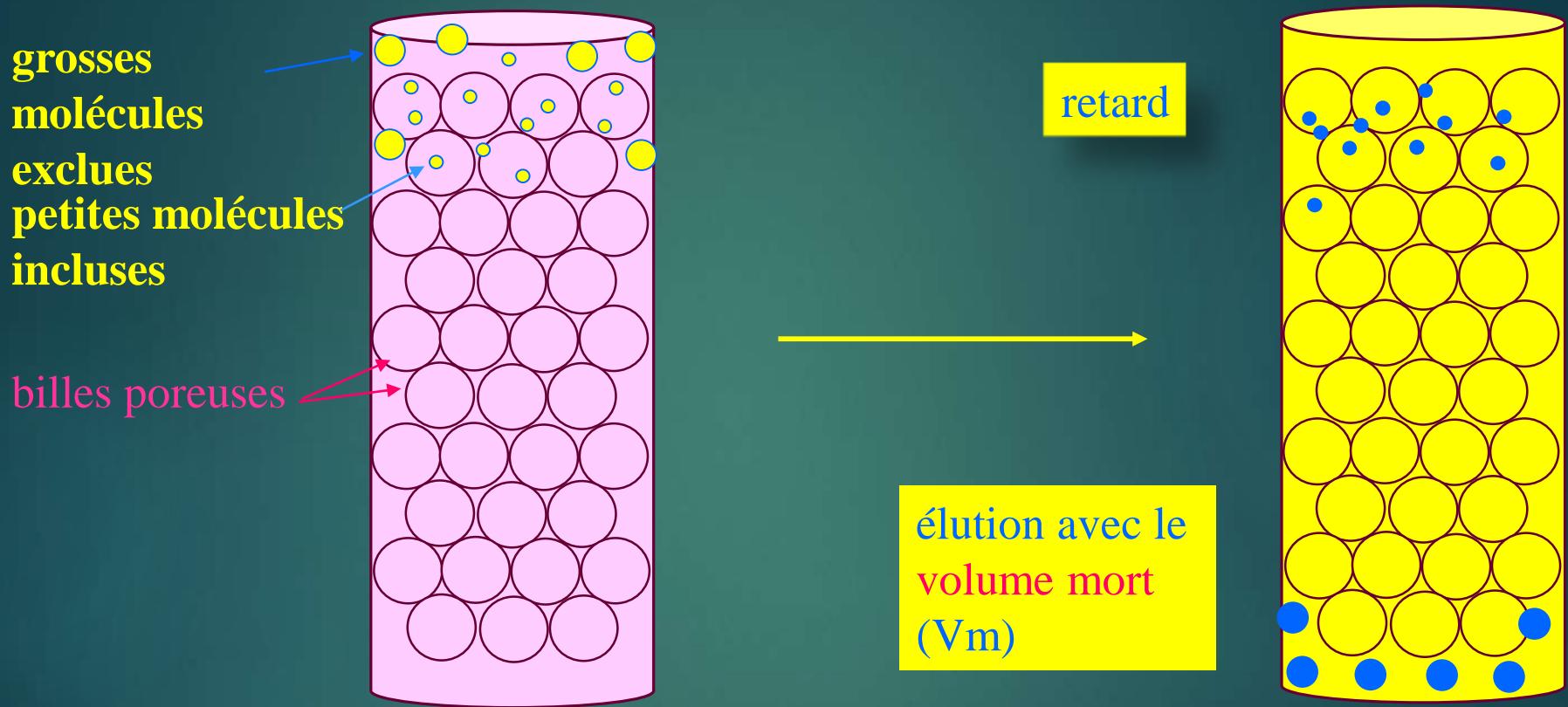
## Chromatographie de perméation sur gel (ou d'exclusion):

On parle aussi de **tamisage moléculaire** car cette technique sépare les protéines **en fonction de leur taille.**

**La colonne est remplie de billes poreuses. Les petites molécules pourront passer par ces pores et entrer dans les billes alors que les grosses molécules en seront exclues.**

**Les petites molécules vont donc « perdre du temps » dans les billes alors que les grosses molécules vont très vite traverser la colonne.**

## Chromatographie de perméation sur gel



Avec ce type de chromatographie, il n'y a pas d'interactions directes entre la phase stationnaire et les molécules.

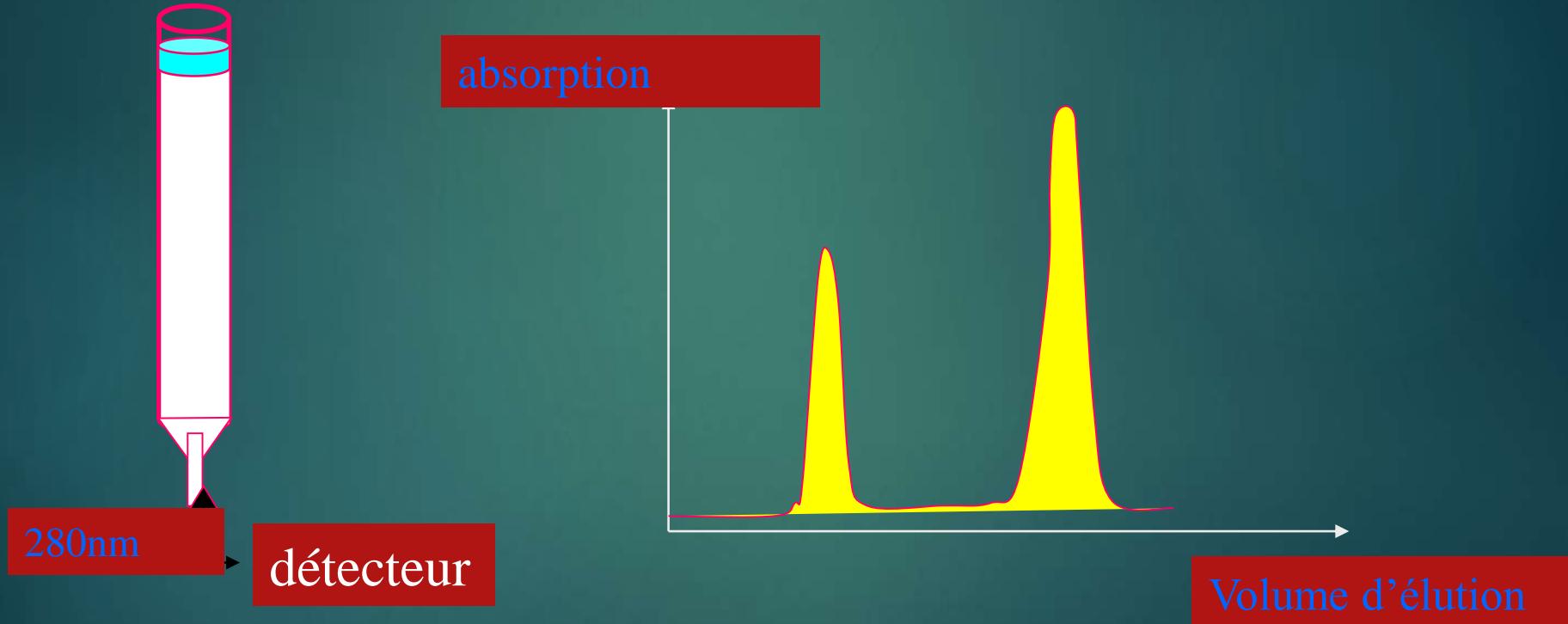
**Ce sont les molécules les plus grosses qui migrent le plus vite.**

## Détection des protéines:

On utilise les propriétés d'absorption de la lumières des acides aminés aromatiques.

Ces acides aminés absorbent la lumière à **280 nm**

On pourra ainsi détecter la sortie de toutes les protéines de la colonne.



Pour savoir où se trouve la protéine recherchée il faudra doser son activité

# LES PEPTIDES

**I) Définition**

**II) Importance biomédicale**

**III) Structure des peptides**

**La liaison peptidique**

**IV) Propriétés acidobasique des peptides**

**V) Etudes des séquences peptidiques**

**A) Clivage des ponts disulfures et séparations des chaînes peptidiques**

**B) Détermination de la composition en AA d'une chaîne polypeptidique**

**C) Détermination de la séquence peptidique**

**a) Identification de l'AA N terminal**

**b) Identification de l'AA C terminal**

**c) Hydrolyse partielle des chaînes peptidiques**

**VI) Etude de quelques peptides d'intérêt biologique**

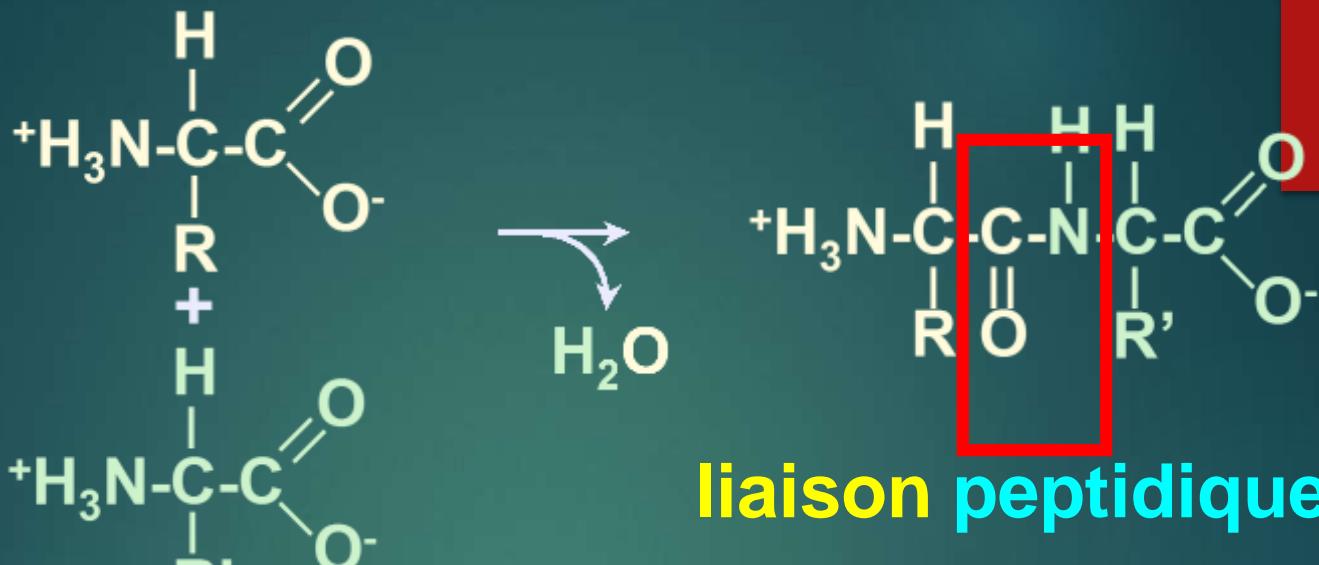
**A) Les oligopeptides**

**B) Les polypeptides**

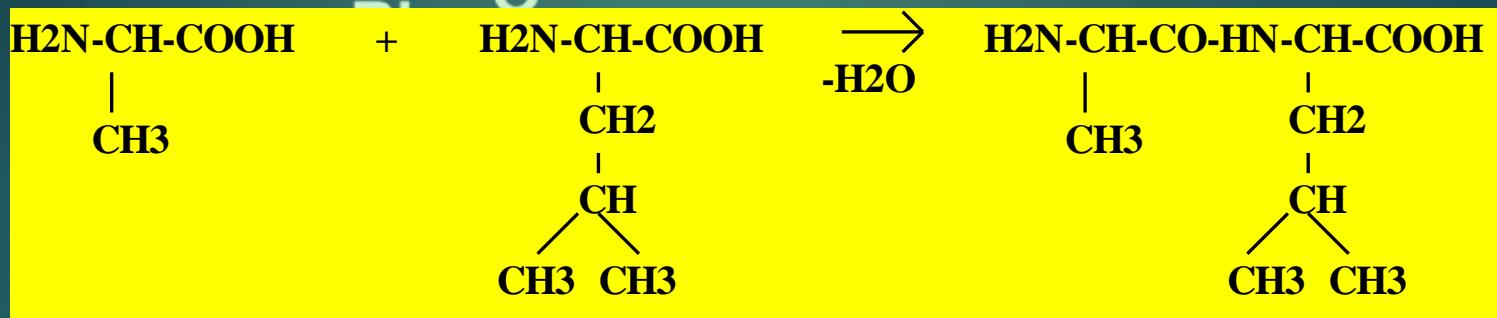
# DEFINITION

## LIAISON PEPTIDIQUE

La réaction du groupe  $\alpha$ -carboxylique d'un acide aminé avec le groupe  $\alpha$  -aminé d'un autre acide aminé permet à ces deux amino-acides de s'unir par formation d'une amide secondaire. cette liaison, encadrée par deux [-CH-],s'appelle **liaison peptidique** car elle permet la formation d'un peptide: dipeptide avec deux amino-acides, tripeptide avec trois, polypeptide avec plus que quatre. Un acide aminé engagé dans une chaîne peptidique s'appelle un résidu; il porte le nom de l'acide aminé dont il dérive, additionné du suffixe **-yl**: **résidus lysyl, tyrosyl, alanyl, etc.**



**liaison peptidique**



Alanyl-Leucine.

La liaison peptidique est très stable (> ester).

L'hydrolyse nécessite des conditions drastiques :  
HCl 6N, 120°C, 24h-72h.

La formule d'un peptide s'écrit, en commençant à partir de la gauche, par le résidu ayant son groupe aminé libre.

Le dernier résidu à droite est donc celui dont le groupe carboxylique est libre.

Si la liaison peptidique implique un COOH ou un NH<sub>2</sub> situé dans une autre position ( $\beta$  COOH,  $\gamma$  COOH,  $\epsilon$  NH<sub>2</sub>) on parle de **liaison peptidoïde**.

## **II) IMPORTANCE BIOMEDICALE**

L'intérêt est considérable surtout en endocrinologie. De nombreux hormones sont des peptides qui peuvent être administrés à des patients pour corriger leur déficit (insuline). Certains peptides agissent au niveau du système nerveux, comme neurotransmetteurs.

Certains antibiotiques sont des peptides comme la valinomycine et la gramicidine A. D'autres peuvent être des agents antitumoraux c'est le cas de la bléomycine. Le dipeptide aspartame sert d'agent édulcorant dans de nombreuses boissons.

La synthèse chimique rapide et la technologie de l'ADN recombinant ont facilité la synthèse de quantités d'hormones peptidiques .

# SENS DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE

- La séquence est orientée en partant de l'acide aminé N-terminal (**extrémité NH<sub>2</sub>**) vers le C-terminal (**extrémité COOH**) qui correspond au sens de la synthèse des protéines.

### III) PROPRIETES SPATIALES DE LA LIAISON PEPTIDIQUE

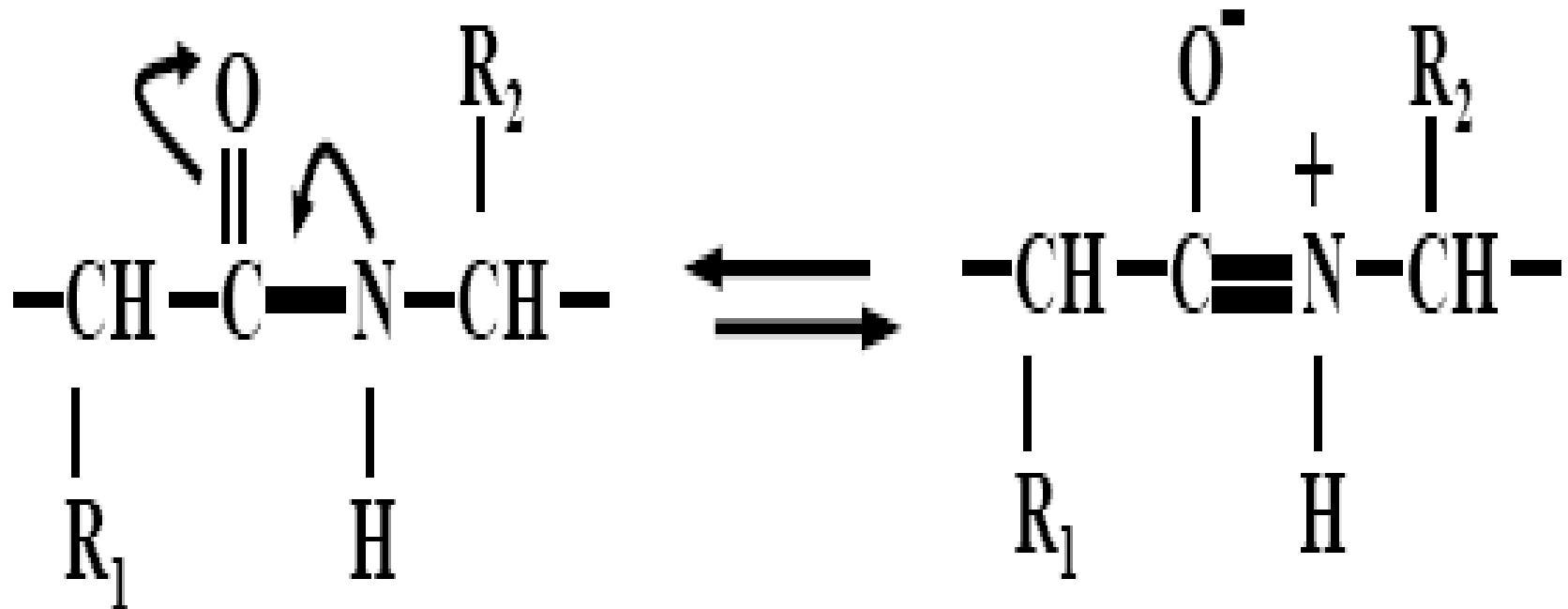
La liaison peptidique peut , en fait s'écrire de deux façons (formes mésomères)

Les électrons du groupe carbonyle et le doublet électronique libre de l'azote sont très proches. La résonance de ces électrons donne au groupe peptidique des structures intermédiaires entre deux formes mésomères.

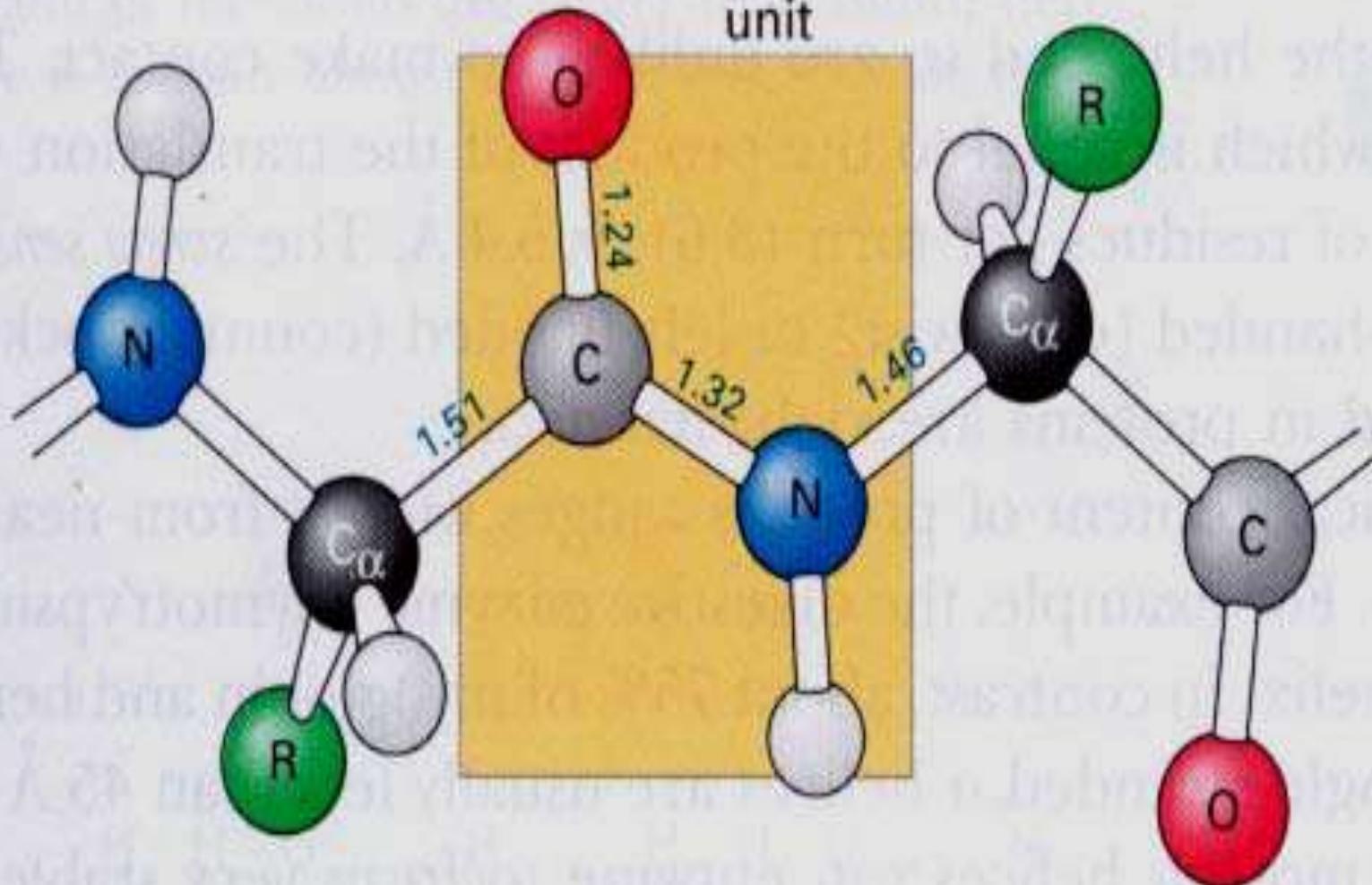
- Dans des études par des rayons X de peptides cristallisés, PAULING et COREY ont trouvé que:  
La liaison du carbone carbonyle avec l'azote dans la liaison peptidique  
**(1,32 Å )**  
est plus courte que la liaison simple C-N (**1,49 Å**) mais plus longue qu'une liaison double C=N classique (**1,27 Å**).

Cela s'explique par le fait que cette liaison peut se trouver sous deux formes de résonances : 70% sous forme simple et à 30% sous forme double.

Ce caractère de double liaison entraîne une certaine rigidité et empêche la libre rotation.



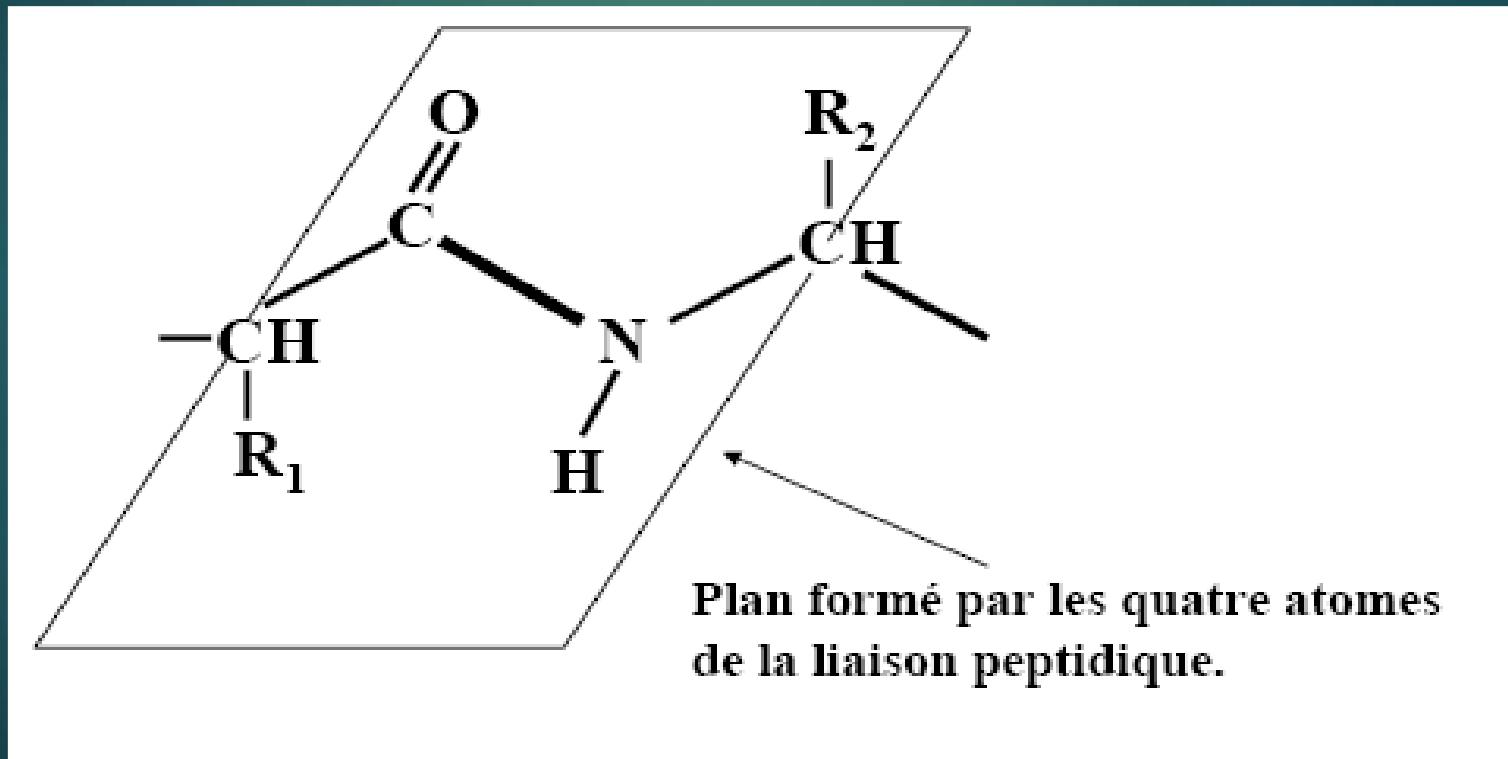
Peptide unit



la configuration trans est la plus stable car minimisation de l'encombrement stérique des résidus.

**Le caractère partiellement double de la liaison peptidique empêche la rotation autour de la liaison C-N. (entre l'atome de carbone du carbonyle et l'atome d'azote de l'unité peptidique).**

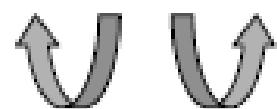
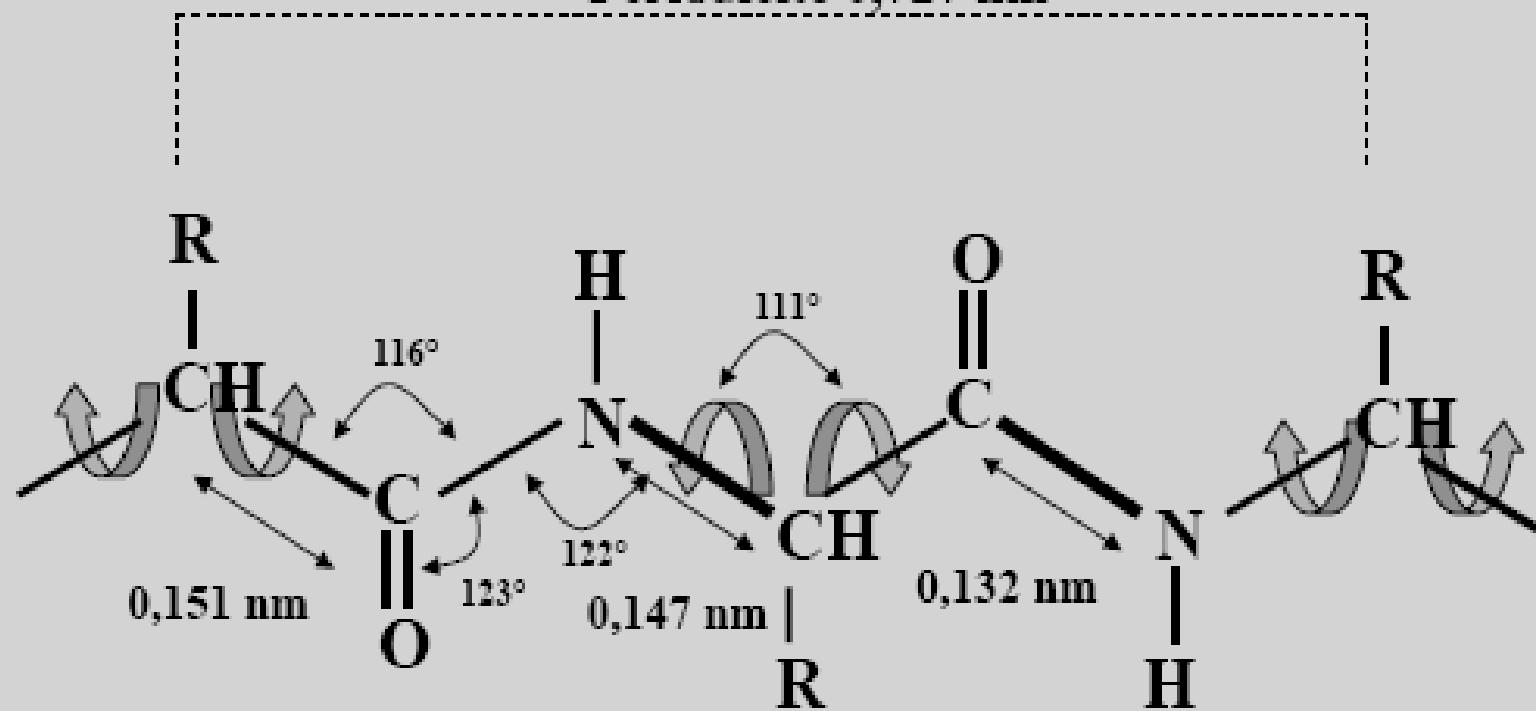
**Il existe cependant une liberté de rotation autour des liaisons C $\alpha$ -C et N-C $\alpha$ .**



## Les propriétés de la liaison peptidique

- Elle possède le caractère d'une double liaison ce qui implique que tous les atomes (  $\text{C}\alpha$ , C, O,N ,H et  $\text{C}\alpha'$ ) sont coplanaires ( situés dans le même plan).
- Il existe une possibilité d'isomérie cis-trans pour les 2 carbones  $\text{C}\alpha_n$  et  $\text{C}\alpha_{n+1}$  par rapport à cette liaison. Dans les peptides et dans les protéines naturelles on trouve essentiellement la configuration trans.
- La chaîne principale qui constitue le squelette est en zig zag
- Il existe une possibilité de rotation autour de  $\text{C}\alpha+1\text{-N}$  (angle  $\phi$ ) et  $\text{C}\alpha+1\text{-C}$  ( angle  $\psi$ ).
- Elle est très stable et rigide .

Périodicité 0,727 nm



Possibilités de rotation autour des carbones  $\alpha$



Liaisons peptidiques, rotations impossibles.

## IV) PROPRIETES ACIDO-BASIQUES DES PEPTIDES

De nombreux petits peptides ont été obtenus à l'état pur sous forme cristalline. Ils ont des points de fusion élevé.

Aucune des fonctions  $\alpha$ -carboxyliques et  $\alpha$ -aminées combinées dans les liaisons peptidiques ne pouvant s'ioniser dans la zone de pH 0 à 14, le comportement acido-basique des peptides est dû à la fonction -aminée libre de l'acide N-terminal, à la fonction -carboxylique libre de l'acide C-terminal et à celles des chaînes latérales capables de s'ioniser.

## V) ETUDE DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

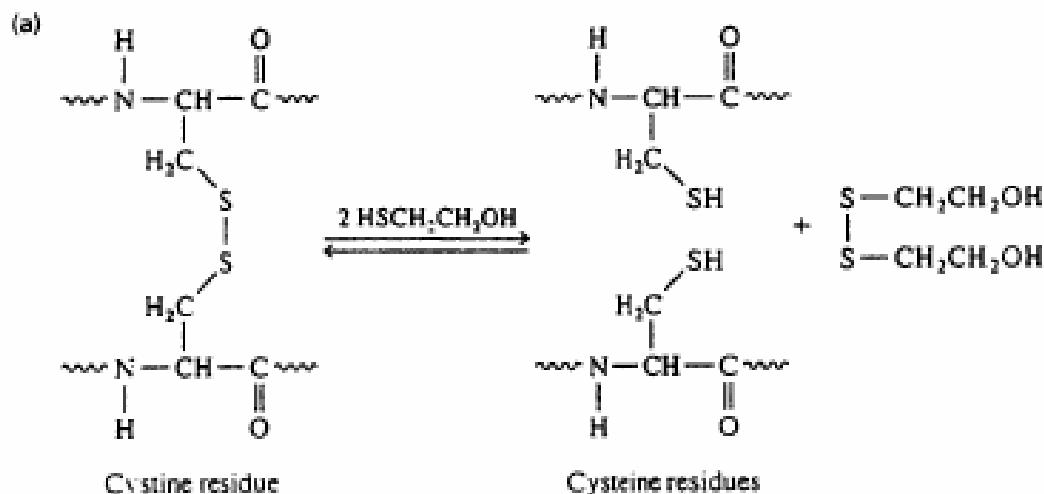
La détermination de la nature exacte, des proportions de chacun des AA constitutifs et de l'ordre de leur enchaînement dans un peptide ou une protéine donné nécessite en premier lieu le clivage des liaisons covalentes.

### A/ CLIVAGE DES PONTS DISULFURES ET SEPARATION DES CHAINES PEPTIDIQUES

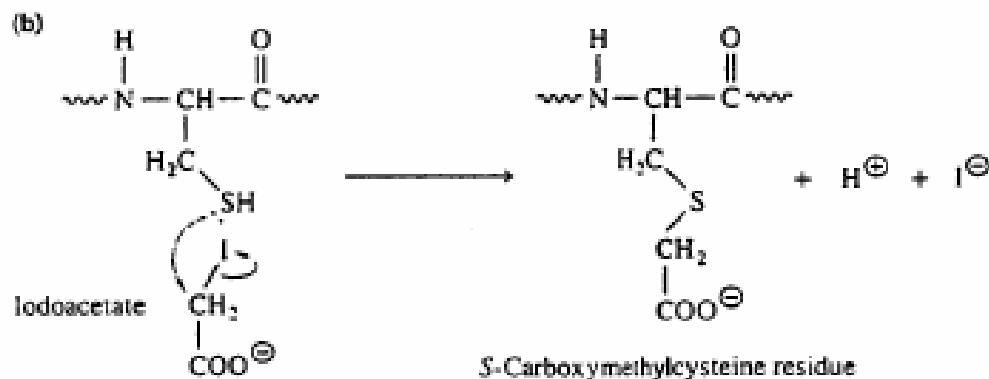
La structure covalente des peptides représente des ponts disulfures qui peuvent s'établir entre les chaînes dans le cas de molécules pluripeptidiques. Ces liaisons disulfure sont engagées entre deux demi-résidus de cystine. La dissociation de cette liaison se fait par :

## Scission de ponts disulfures au $\beta$ -mercaptoéthanol et substitution par l'iодоacéate.

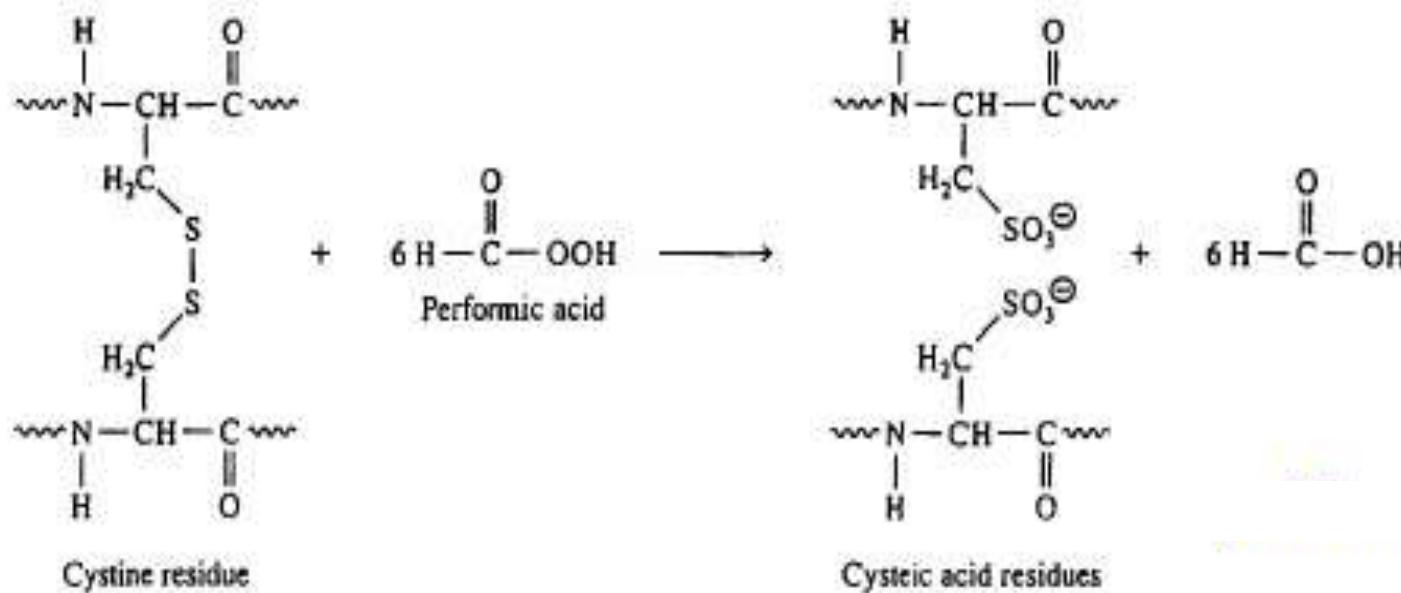
(a) En présence de  $\beta$ -mercaptopropanol, la protéine échange avec celui-ci ses groupes SS; chaque cystine est réduite en deux cystéines et 2 molécules de  $\beta$ -mercaptopropanol sont oxydées en disulfure.



(b) La protéine réduite est alors traitée par l'iodoacétate, un agent alkylant qui convertit les résidus cystéines libres en S-carboxyméthylcystéine. Ainsi substitués, les sulfhydryles sont soustraits à la réoxydation en SS.



**Scission et substitution des ponts disulfures par l'acide performique. HCOOOH scinde les ponts SS des protéines et prévient leur reformation en transformant le résidu cystine en deux résidus d'acide cystéique.**

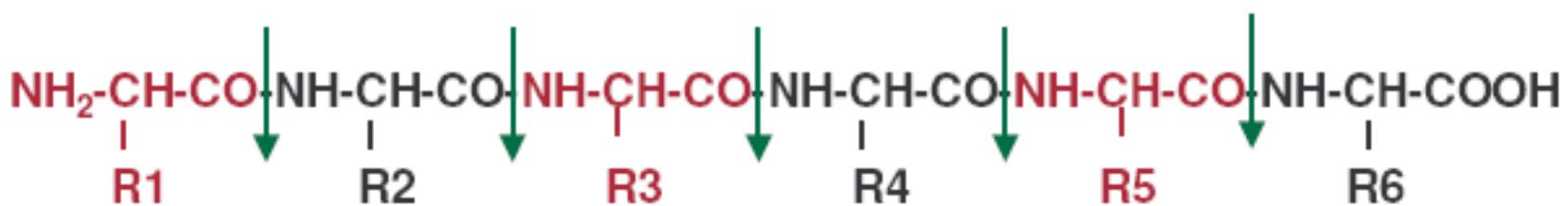


## B) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN AA D'UNE CHAINE PEPTIDIQUE

### Hydrolyse des liaisons peptidiques

La rupture des liaisons peptidiques qui permet d'obtenir les amino-acides à l'état libre, est réalisée par action, soit d'un acide fort à chaud, soit d'enzymes protéolytiques. On utilise l'acide chlorhydrique 6N à 120°, en ampoules scellés sous vide, pendant des périodes variant de 24 à 72 heures.

Les résidus de la glutamine et de l'asparagine sont transformés en acide glutamique et aspartique avec libération d'ammoniac.



## **C) DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE**

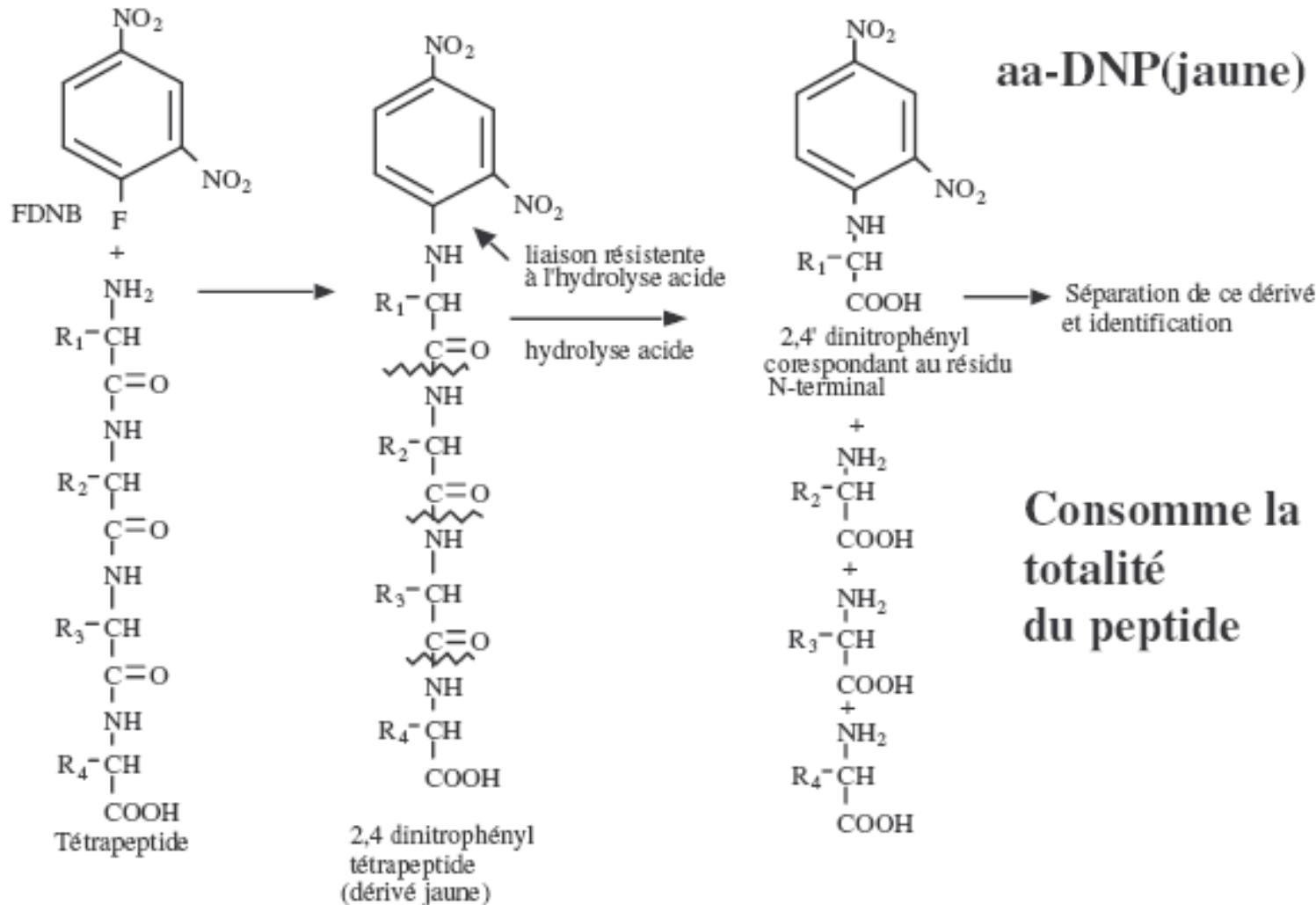
Pour connaître la séquence en AA il faut d'abord déterminer les AA N et C—terminaux, puis l'ordre d'enchaînement des autres AA.

### **C1) IDENTIFICATION DE ACIDE AMINE N—TERMINALE**

**METHODES CHIMIQUES** Trois méthodes sont utiles:

\* **ACTION DU 1 FLUORO- 2,4-DINITROBENZENE** Le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) réagit avec les fonctions aminés libres et en particulier la fonction aminée terminale pour former un peptide dinitrophénylé. Une hydrolyse acide totale de la chaîne peptidique libère les composés dinitrophénylés dont l'-dinitrophényl-amino-acide (DNPA), correspondant à l'acide aminé N-terminale, que l'on peut extraire par l'éther , identifier par chromatographie sur papier, et doser spectrophotométriquement grâce à sa couleur jaune.

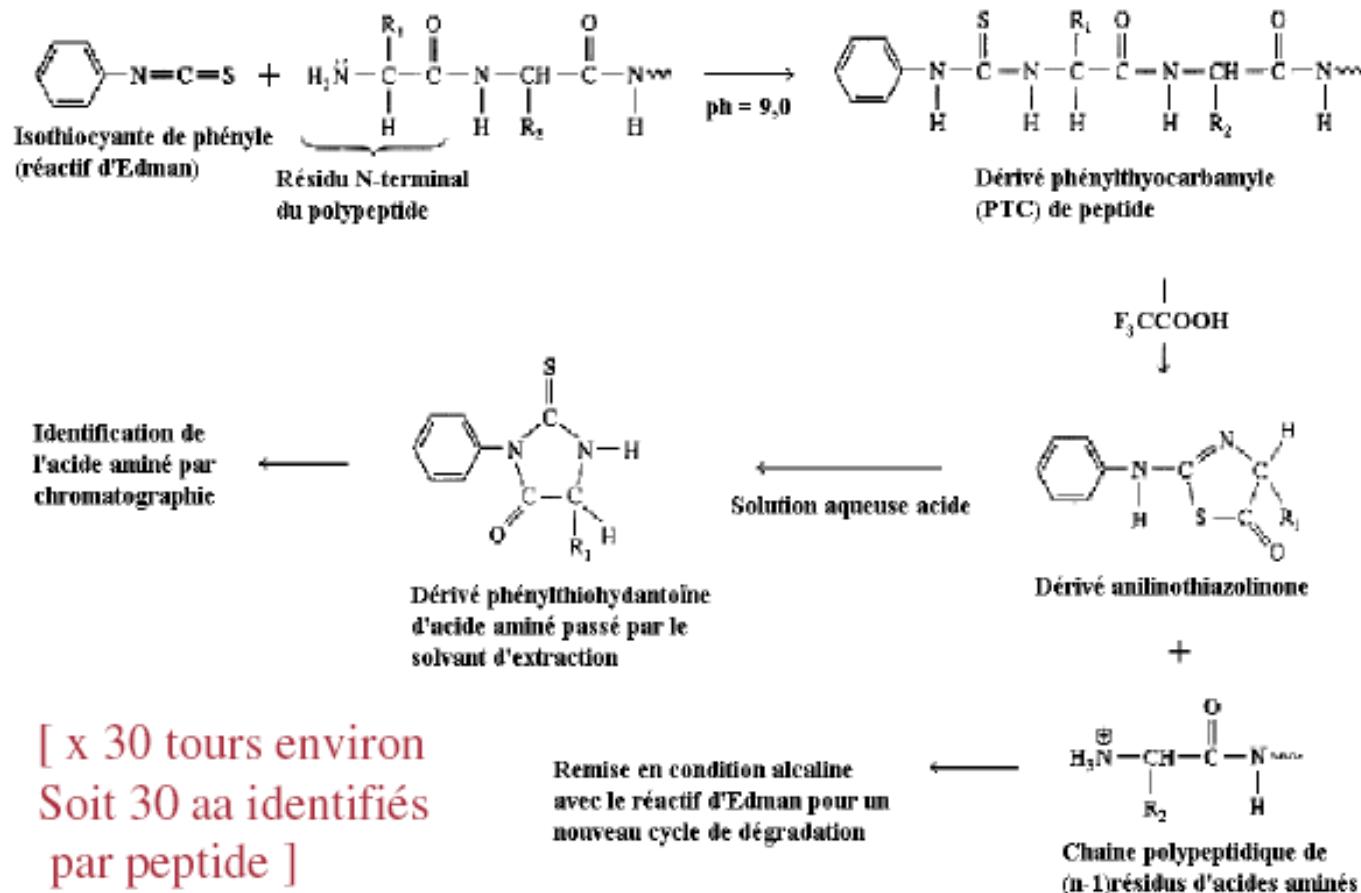
## méthode de Sanger



**Consomme la totalité du peptide**

## \* ACTION DU PHENYLISOTHIOCYANATE (méthode réccurrente)

### méthode d'Edman

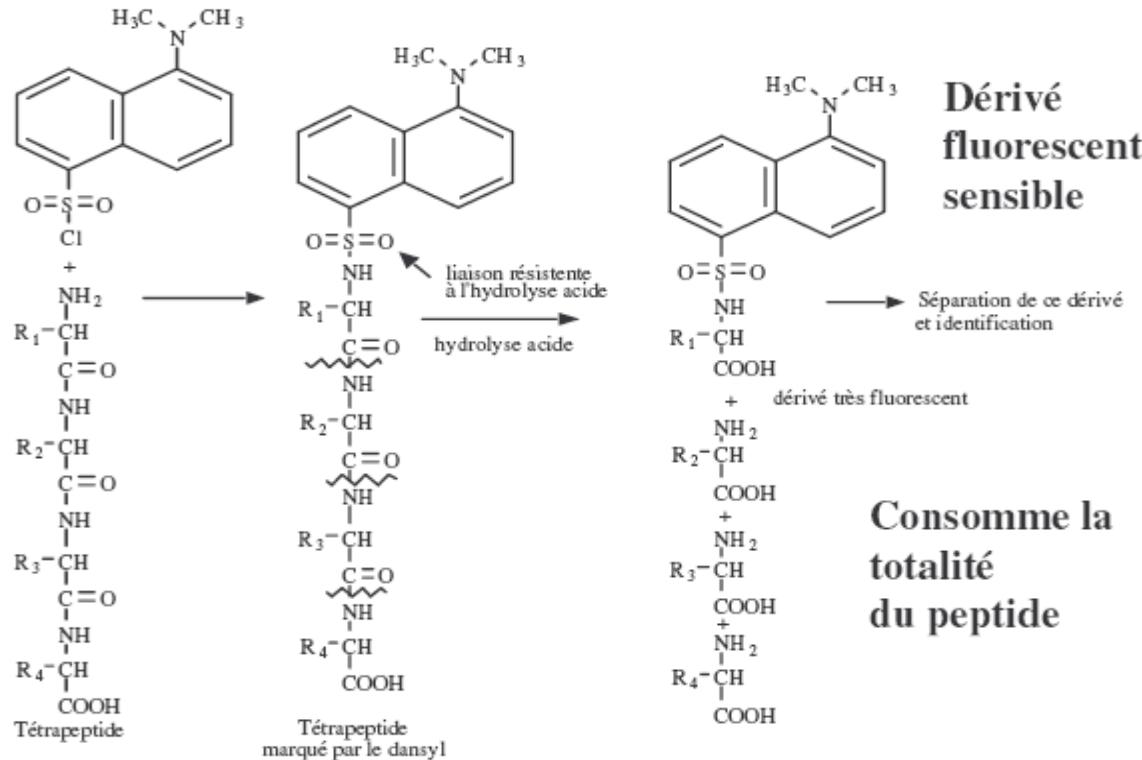


La carbamylation avec le phénylisothiocyanate (PTC), à un pH basique de 9, donne des dérivés qui absorbent dans l'ultraviolet et facilement séparable par chromatographie. De plus la réaction avec l'acide aminé terminal d'une protéine libère le dérivé d'addition et une protéine amputée de son aminoacide N-terminal

## \* DANSYLATION DES AMINOACIDES

Le chlorure de l'acide 1-diméthylamino-naphtalène-5-sulfonique (ou chlorure de dansyle) réagit très facilement avec les fonctions aminées et conduit à des dérivés sulfonamides très fluorescents après hydrolyse du dansyl peptide dansyl.

### Méthode du chlorure de dansyle



L'intérêt fondamental des trois dernières réactions réside en leur très large utilisation dans la détermination de La structure primaire des protéines.

### METHODES ENZYMATIQUES

L'hydrolyse enzymatique complète d'une chaîne peptidique est longue et difficile. Les enzymes présentent une certaine spécificité dans l'attaque des liaisons peptidiques; ils sont surtout utilisés pour des hydrolyses partielles des chaînes peptidiques.

Il existe des exopeptidases, qui catalysent spécifiquement la libération des résidus terminaux d'une chaîne peptidique: la présence d'une fonction  $\alpha$ -aminée ou d'une fonction  $\alpha$ -carboxylique libre est nécessaire à leur activité.

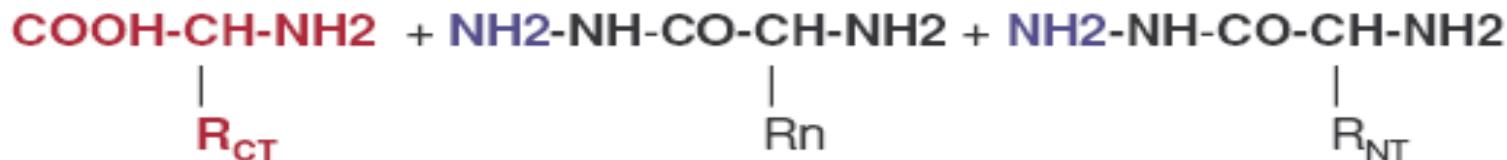
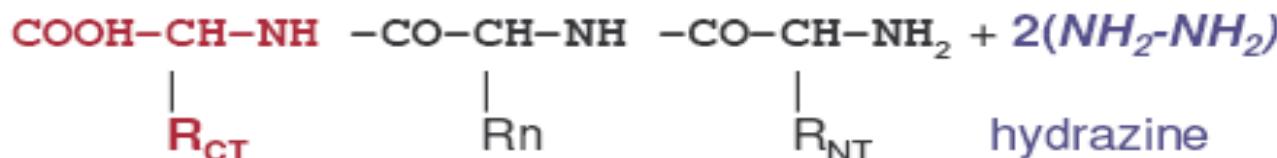
L'action de ces enzymes est continue, chaque AA libéré démasquant un nouveau AA terminal qui sera à son tour détaché. Une aminopeptidase, nommée Leucineaminopeptidase (LAP), bien qu'elle ne soit pas spécifique de cet AA, détache tous les AA N terminaux sauf la proline qui sera libérée par une *prolinase*.

## C2) IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE C TERMINAL

### **METHODES CHIMIQUES**

La plus satisfaisante est hydrazinolyse qui consiste à traiter le peptide par l'hydrazine à 100°. Les liaisons peptidiques sont rompues et les acides aminés apparaissent sous forme d'hydrazides

#### Hydrazinolyse



seul l'  $\text{aa}_{\text{CT}}$  est un acide aminé libre

$\text{aa}_{\text{CT}}$  est purifié et identifié

## *METHODES ENZYMATIQUES*

On peut également utiliser des carboxypeptidases qui coupent l'extrémité C-terminale, il en existe plusieurs types: Il en existe plusieurs de ces enzymes de spécificités variées, par exemple parmi les carboxypeptidases, on trouve :

- . La carboxypeptidase A, clive l'acide aminé C-terminal lorsque celui-ci est acide (**Asp et Glu**) ou **neutre**.
- . La carboxypeptidase B, clive l'acide aminé C-terminal lorsque **celui-ci** est basique (**Arginine** ou **Lysine**)
- .
- . La carboxypeptidase Y à spectre large.
- . La **prolidase** spécifique de proline.

### C3) HYDROLYSE PARTIELLE DES CHAINES PEPTIDIQUES

**Hydrolyse des séquences peptidiques intra chaînes:** Si la chaîne peptidique est trop longue, il est important de réaliser des coupures en des points précis de la chaîne.

Deux méthodes sont utilisables

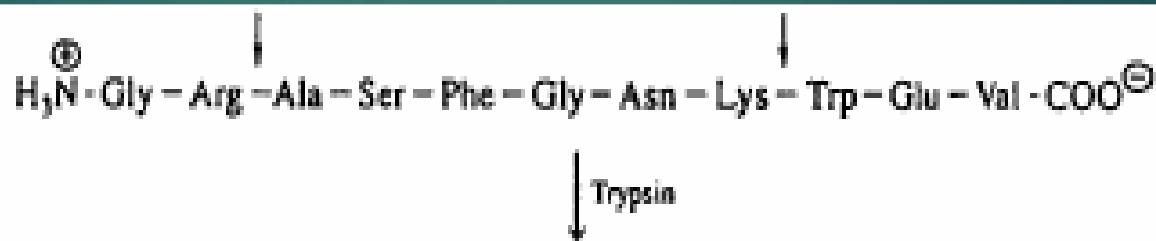
#### **METHODES ENZYMATIQUES**

Ce sont des endopeptidases à spécificité d'action étroite qui permet des coupures très localisées.

**Pepsine** = enzyme gastrique, attaque spécifiquement les liaisons peptidiques qui incluent le –NH- de la phe, tyr et trp et à monstre degré leu, asp et glu sauf si Pro est à gauche.

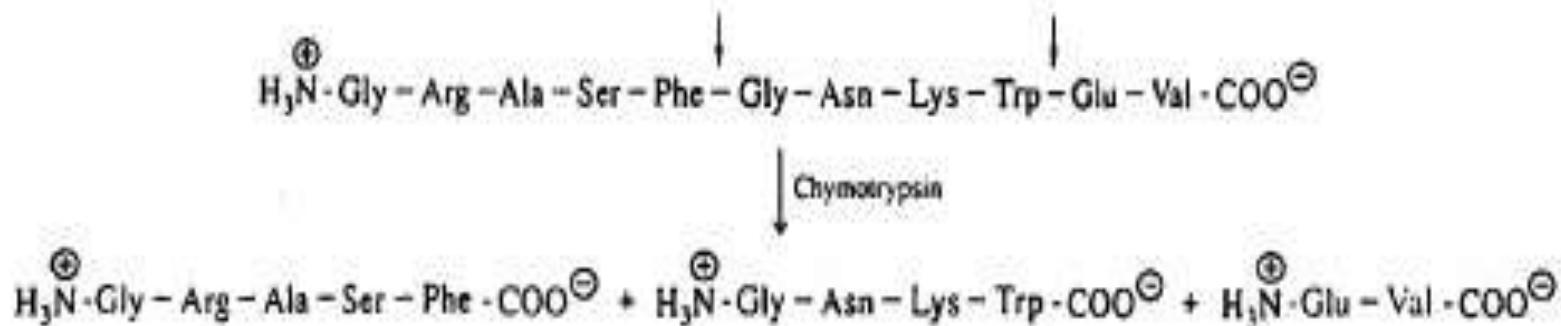
**Trypsine** = enzyme pancréatique, attaque spécifiquement les liaisons peptidiques qui incluent le carboxyle de la lysine ou de l'arginine sauf si Rn+1=Pro.

(a)



**Chymotrypsine** = élaborée également par le pancréas, attaque les liaisons auxquelles participe, le carboxyle d'un amino-acide aromatique (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) sauf si  $R_n+1 = \text{Pro}$

(b)



**Thermolysine** = spécifique des aa hydrophobes coupure de type N avant **Leu**, **Ile**, **Val** sauf si  $R_{n-1} = \text{Pro}$

**Protéinase V8** = spécifique des aa acides coupure type C après **Asp**, **Glu** sauf si  $R_{n+1} = \text{Pro}$

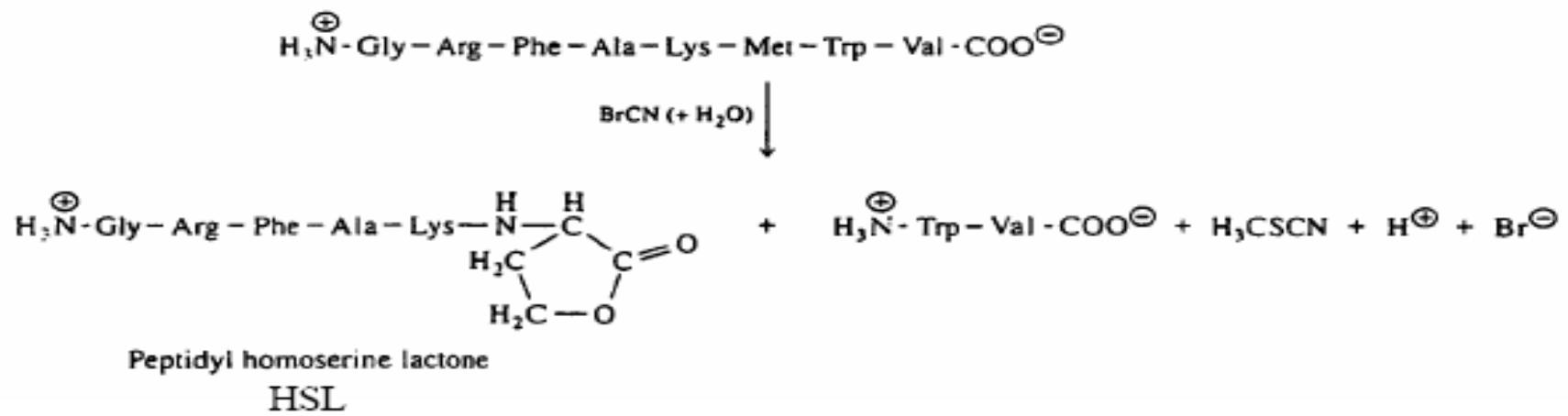
*En milieu carbonate d'ammonium après **Glu** seulement.*

**Clostripaine** = spécifique de l'arginine coupure type C.

## **METHODES CHIMIQUES**

### \* **Au bromure de cyanogène**

Scission de la chaîne protéique avec le bromure de cyanogène.  
Le bromure de cyanogène scinde les chaînes poly-peptidiques du côté C-terminal des résidus méthionine. Une peptidylhomosérine-lactone est produite par l'action de BrCN sur le peptide.



\* **Au 2 nitro 5 thiocyanobenzoate** spécifique de la cystéine coupure type NH.

## **VI) ETUDE DE QUELQUES PEPTIDES D'INTERET BIOLOGIQUE**

Mises à part les peptides identifiés dans les produits d'hydrolyse partielle des protéines, on trouve dans la matière vivante de nombreux peptides ne dérivant pas des protéines. Ces peptides diffèrent par leur structure. Par exemple: le glutathion tripeptide trouvé dans toutes les cellules des animaux supérieurs.

### **A. LES OLIGOPEPTIDES**

#### **1) Dipeptide**

**Carnosine :  $\beta$  alanyl histidine (constituant du muscle)**

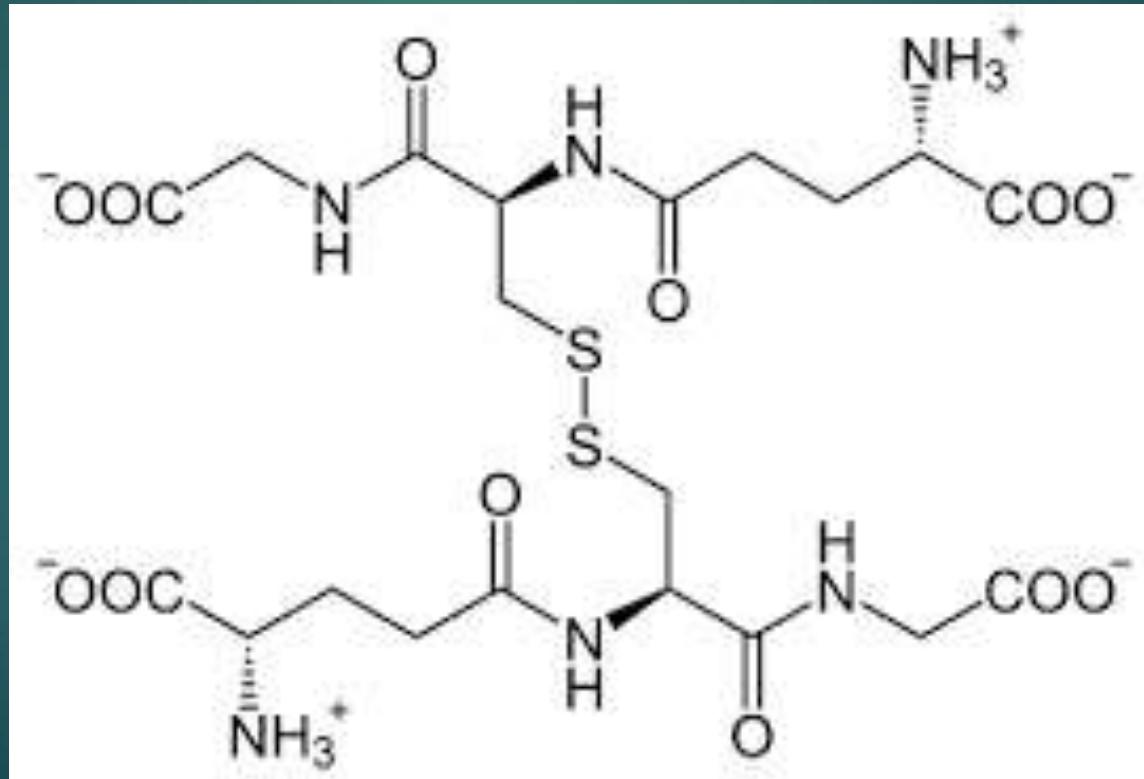
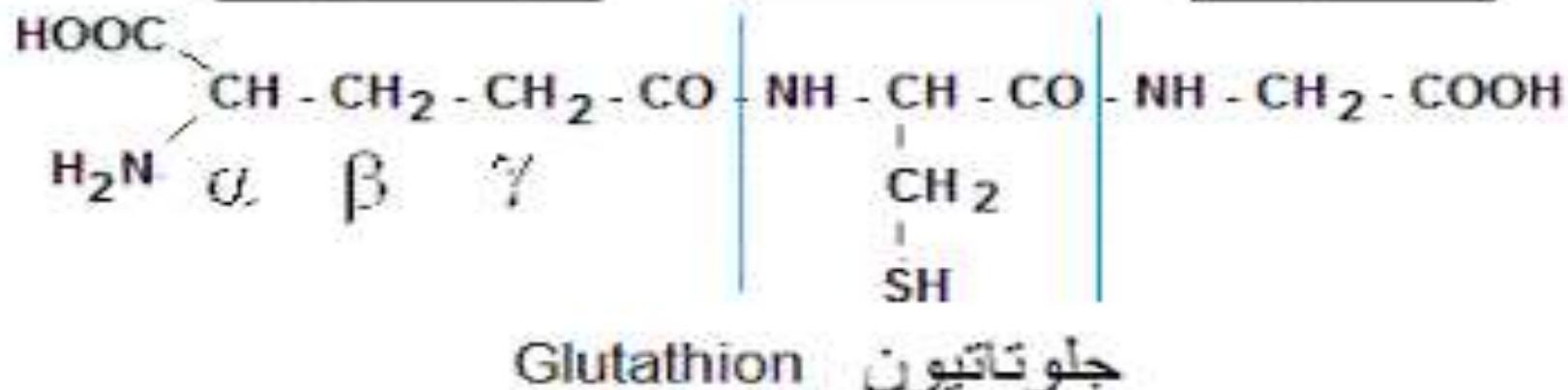
#### **2) Tripeptide *Le glutathion* : $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine**

Il existe sous la forme réduite et oxydée ce qui lui permet de jouer un rôle dans certaines réactions d'oxydoréduction .

$\gamma$ -glutamyl

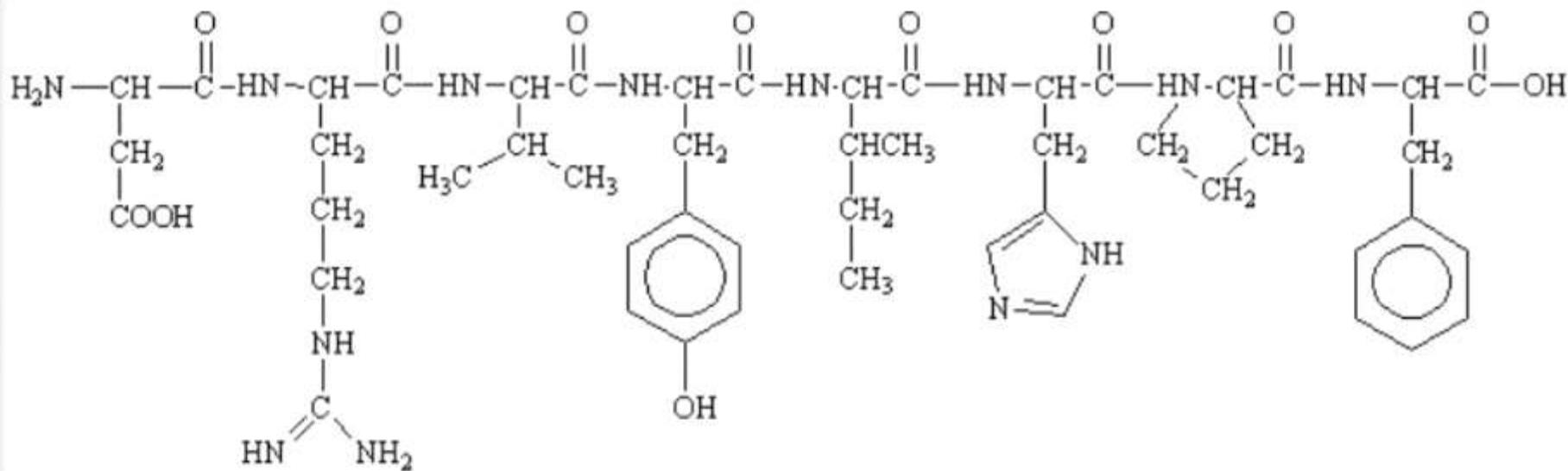
Cysteinyl

Glycine



**3) Octapeptide comme *l'angiotensine II*** une hormone du sang qui régule la pression sanguine.

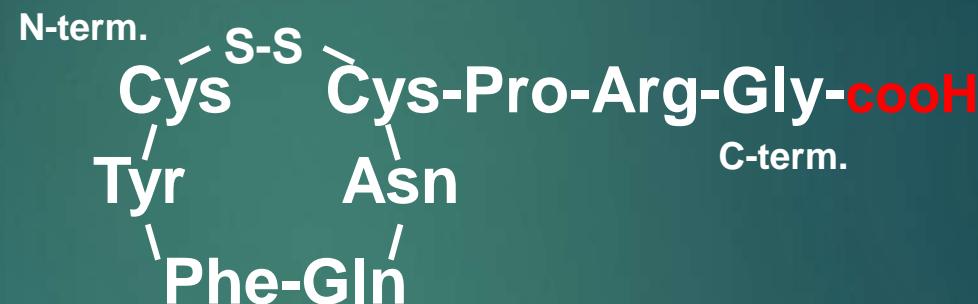
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe



Certains peptides possèdent une activité hormonale, par exemple: les hormones post-hypophysaires ocytocine et vasopressine. De nombreux antibiotiques sont des peptides ou des dérivés de peptides, par exemple: gramicidine.

**4) Ocytocine et la vasopressine ADH:** Hormones de structure très voisine, fabriquée par la post-hypophyse. L'ocytocine stimule la contraction du muscle utérin alors que la vasopressine augmente la pression sanguine et a une action antidiurétique

### Vasopressine



### Ocytocine



## 5) L'hormone adrénocorticotrope ou ACTH : Hormone de l'anté-hypophyse qui stimule la synthèse et la sécrétion des hormones stéroïdes par la cortico-surrénale.

H—Ser — Tyr — Ser — Met — Glu — His — Phe — Arg — Trp — Gly —

— Lys — Pro — Val — Gly — Lys — Lys — Arg — Arg — Pro — Val —

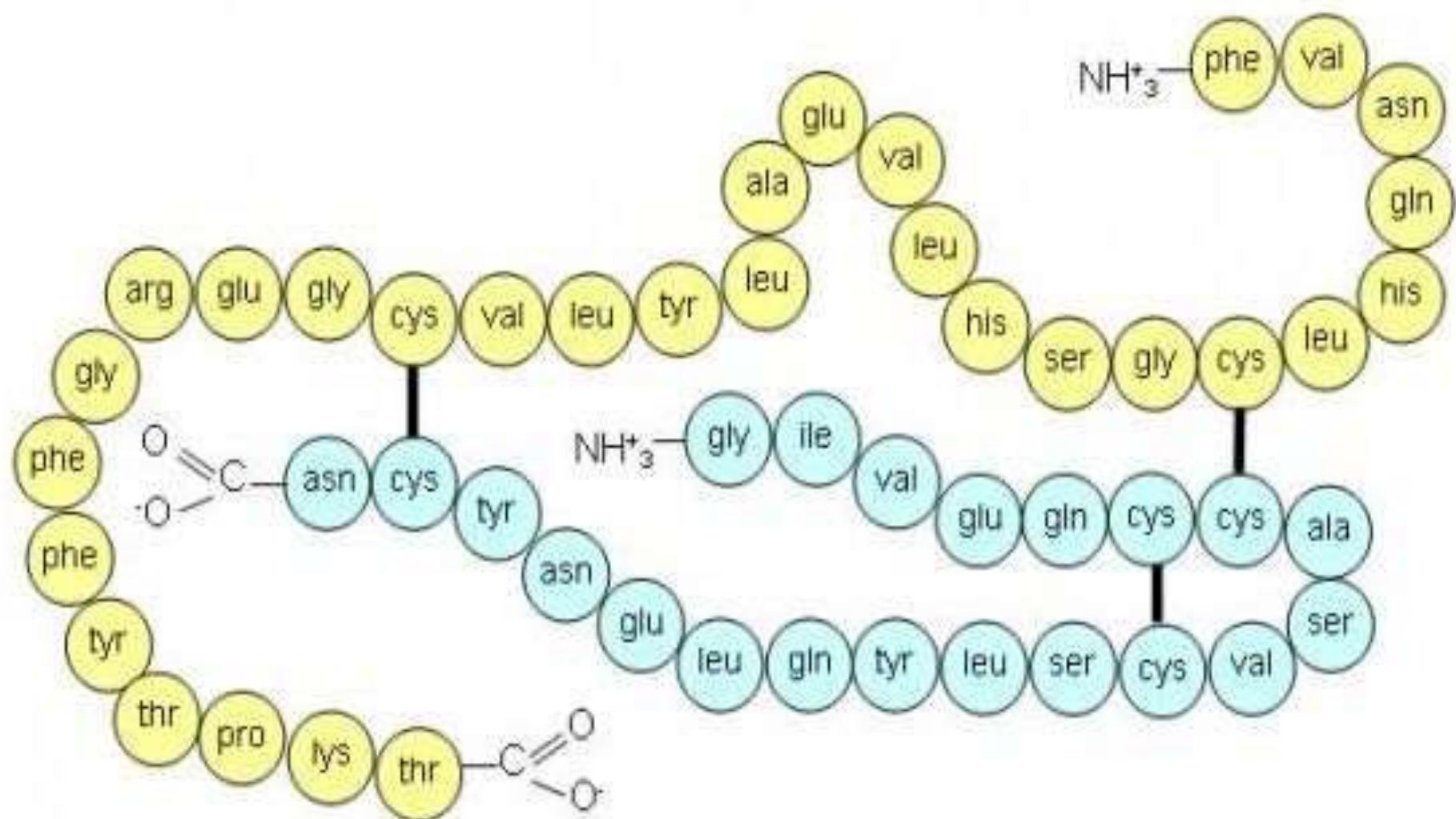
— Lys — Val — Tyr — Pro — Asn — Gly — Ala — Glu — Asp — Glu —

— Ser — Ala — Glu — Ala — Phe — Pro — Leu — Glu — Phe — OH

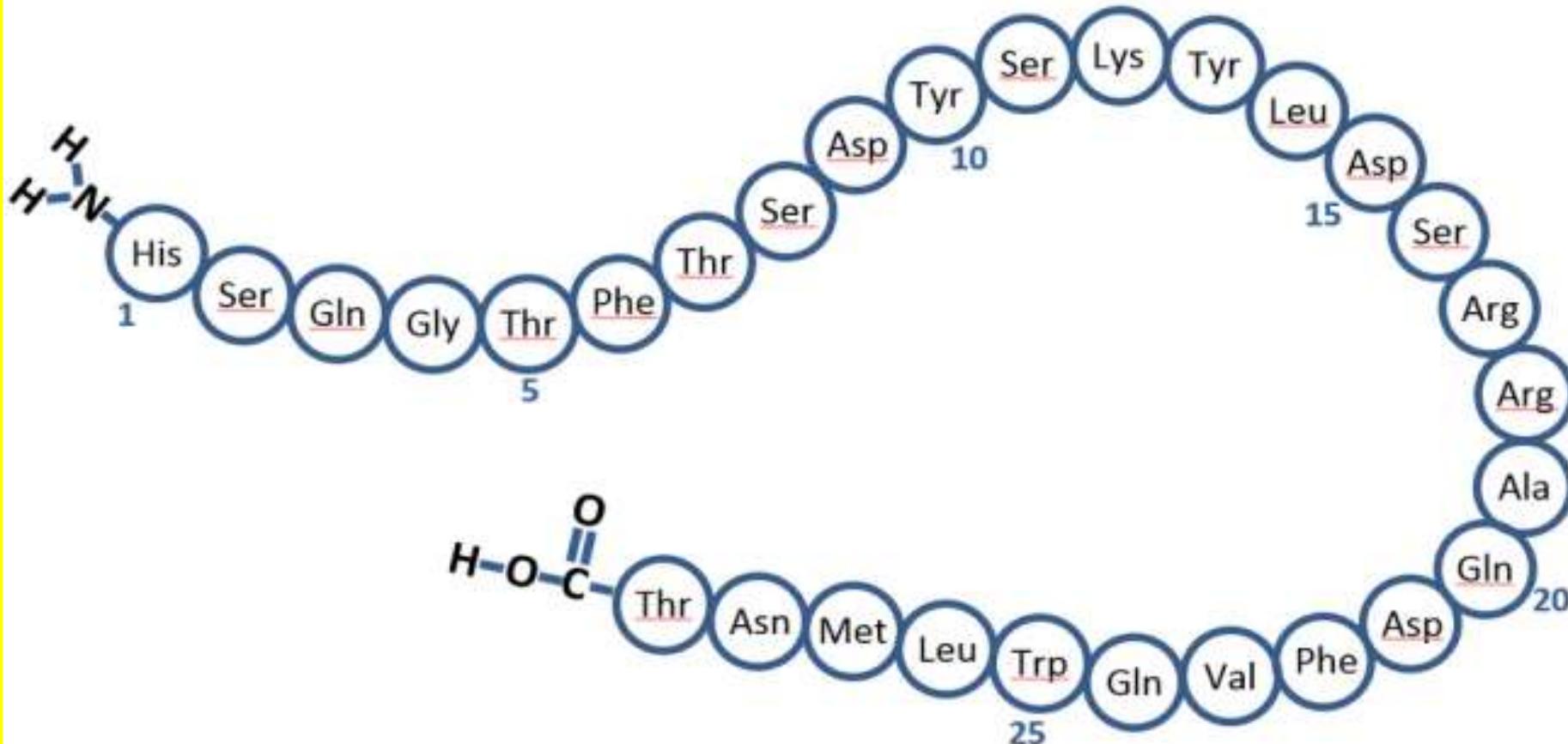


**6) L'insuline** : Hormone hypoglycémiant secrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de langerhans. dès que le taux de glucose dans le sang (glycémie) dépasse  $6 \cdot 10^{-3}$  M.

Son effet est hypoglycémiant : elle favorise le retour de la glycémie à la valeur basale de  $5 \cdot 10^{-3}$  M. La structure de l'insuline a été la première structure polypeptidique connue grâce aux travaux de Sanger. L'insuline comporte 2 chaînes : la chaîne A de 21 a.a et la chaîne B de 30 a.a. Il y a 3 ponts disulfures : 2 interchaînes (A7/B7 et A20/B19) et un intrachaîne(A6/A11).

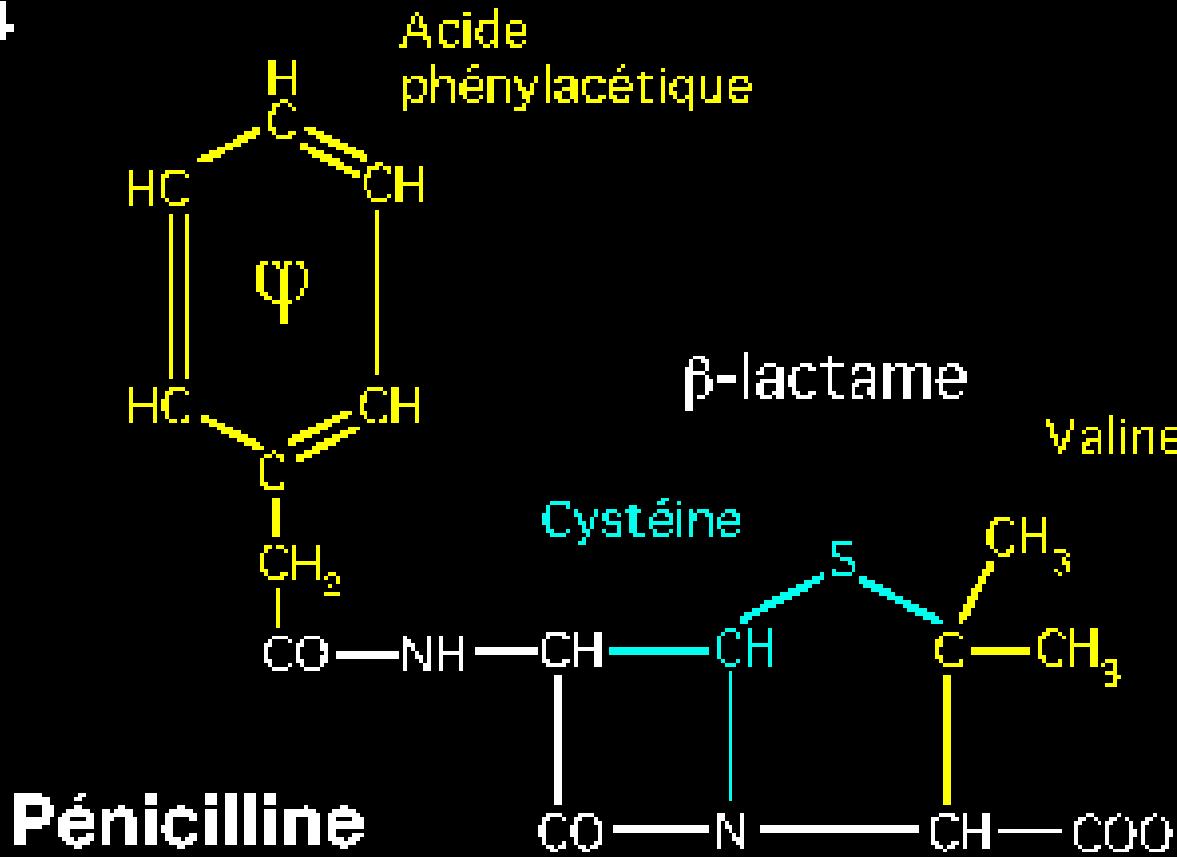


• 7) Le glucagon est un peptide de 29 acides aminés. Sécrété par le pancréas (cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans), dès que le taux de glucose dans le sang (glycémie) est inférieur à  $4 \cdot 10^{-3}$  M. Son effet est hyperglycémiant : il favorise le retour de la glycémie à la valeur basale de  $5 \cdot 10^{-3}$  M.



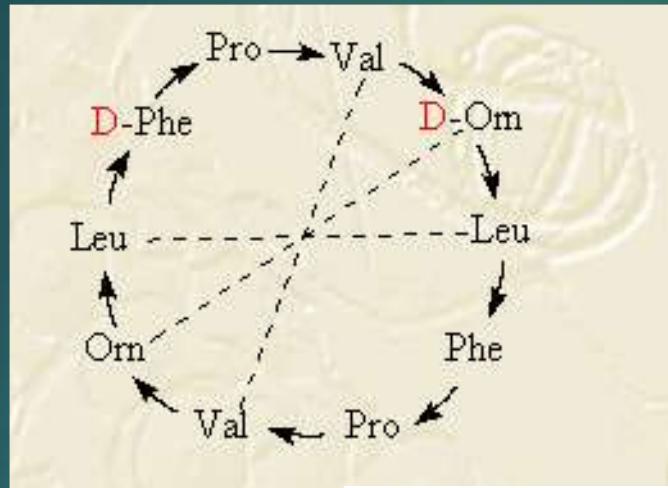
8) La pénicilline est un tripeptide produit par un champignon *Penicillium chrysogenum*, qui a été le premier antibiotique naturel découvert par Fleming.

344

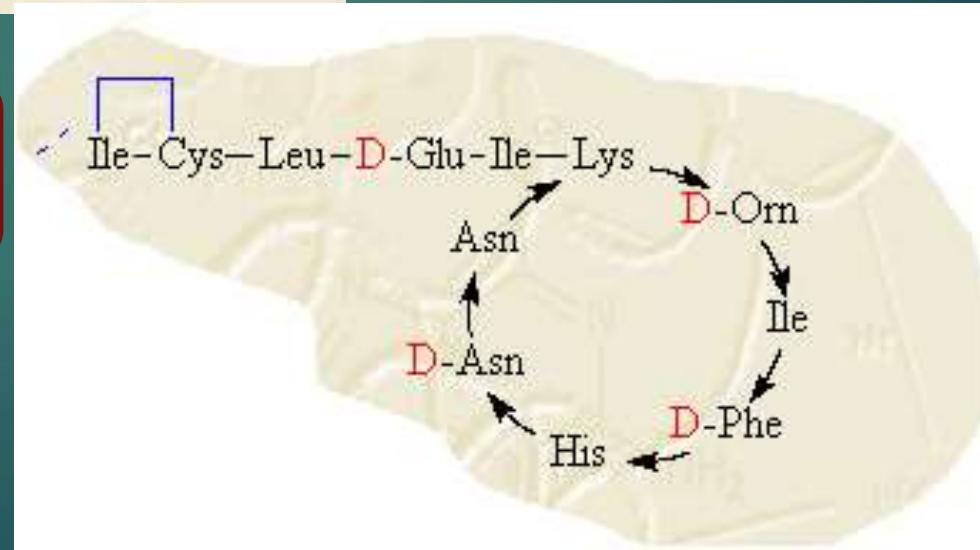


## 9) La Gramicidine:

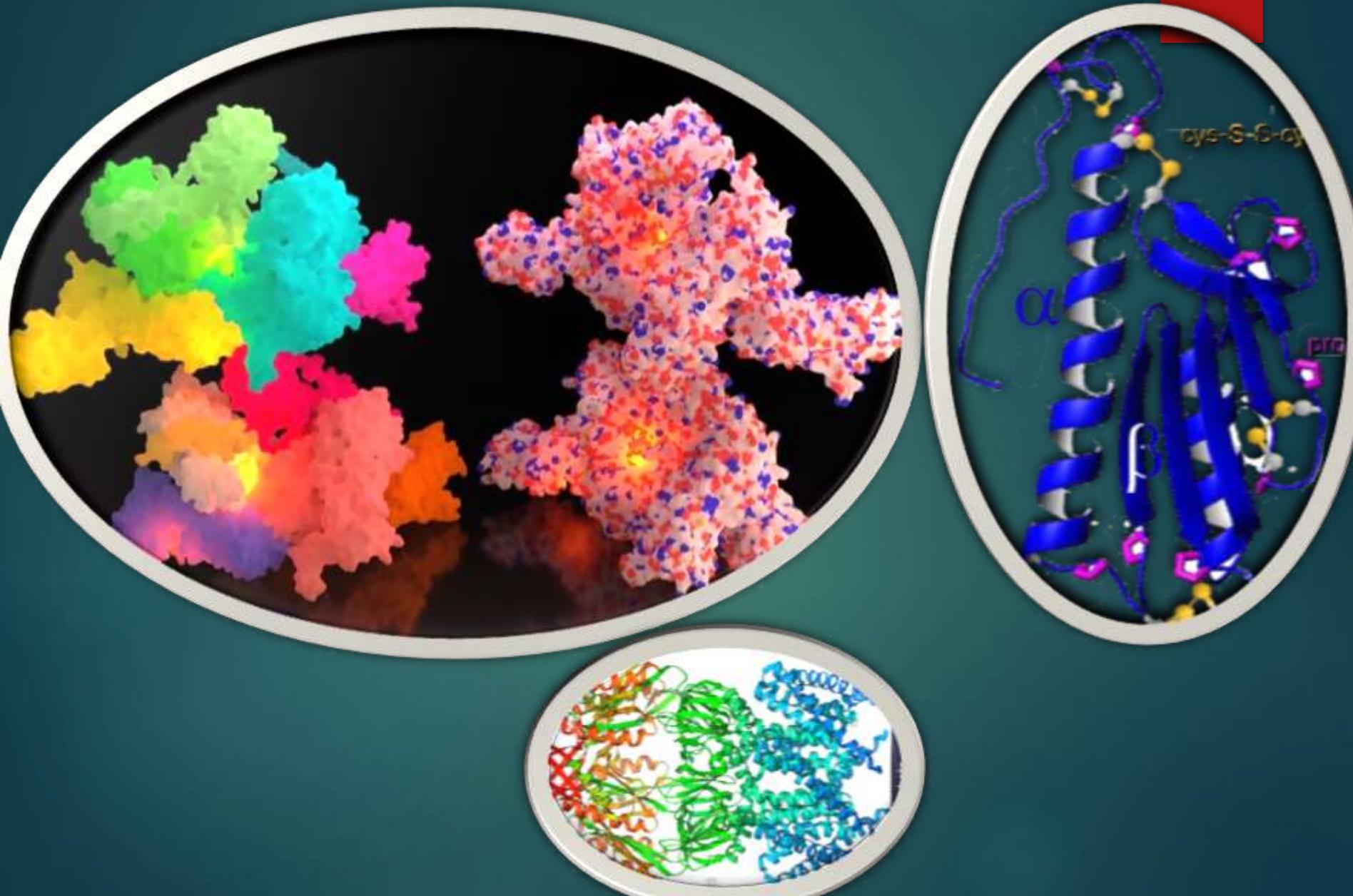
Peptide ayant une activité antibiotique.



Bacitracine



# ►Partie III LES PROTEINES



## **Partie III LES PROTEINES**

**I) Introduction**

**II) Importance biomédicale**

**III) Fonctions des protéines**

**IV) Classification des protéines**

**V) Les quatre niveaux de structure des protéines**

**Liaisons stabilisatrices des structure**

**Les protéines globulaires**

- Myoglobine
- Hémoglobine

**Les protéines fibreuses**

\* Les kératines

\* Les collagènes

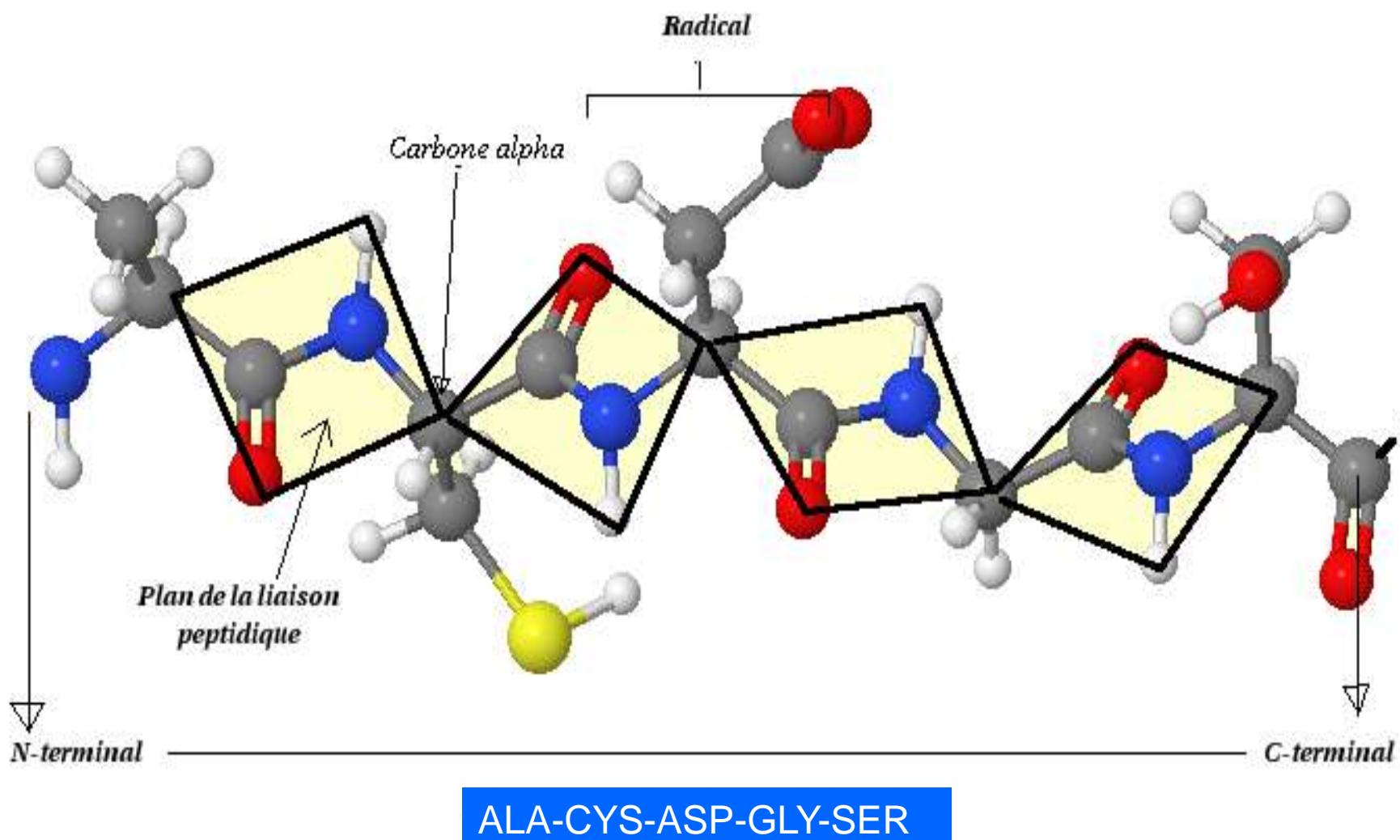
**I) Dénaturation des protéines**

**II) Principales propriétés des protéines**

# EVOLUTION TRIDIMENTIONNELLE DES PROTEINES

# STRUCTURE PRIMAIRE

- ▶ Correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés. La séquence est donnée en partant de l'acide aminé N-terminal (extrémité NH<sub>2</sub>) vers le C terminal (extrémité COOH) qui correspond au sens de la synthèse des protéines.



- Mais sous l'influence des forces **attractives ou répulsives** qui se manifestent tout au long de la chaîne linéaire d'acides aminés, la protéine ne conserve pas cette structure initiale et subit très vite une évolution tridimensionnelle en **structure secondaire, tertiaire et quaternaire**.
- Cette évolution tridimensionnelle conduira finalement à une conformation spatiale bien définie: **la protéine native**.

# **STRUCTURE SECONDAIRE**

- Correspond à un arrangement régulier des acides aminés selon un axe. Il existe deux types principaux de structure secondaire:
  - \* **HELICE a.**
  - \* **FEUILLET B.**

# HELICE a

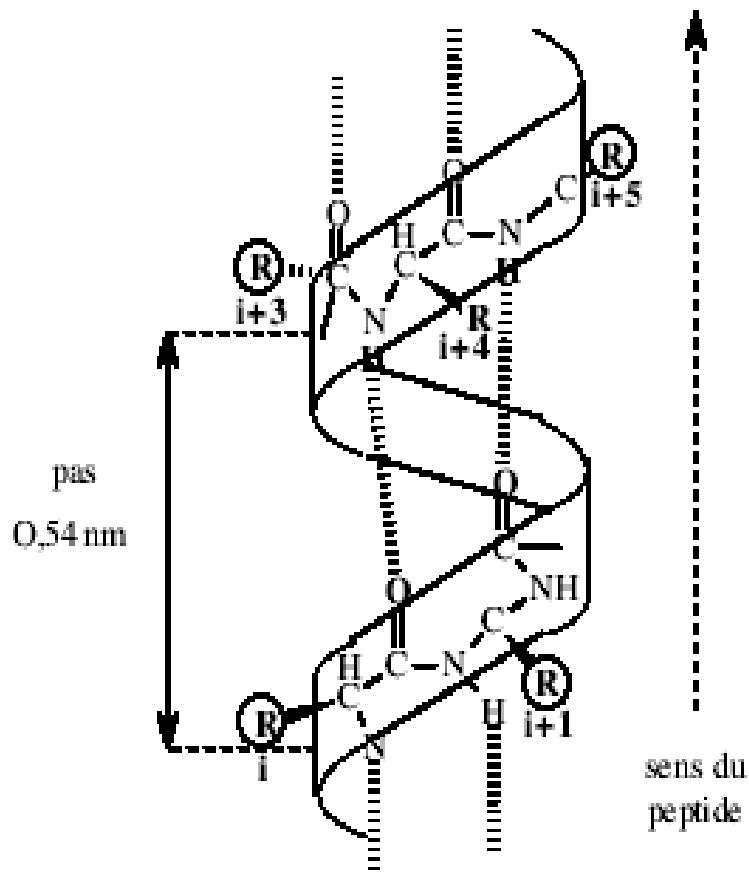
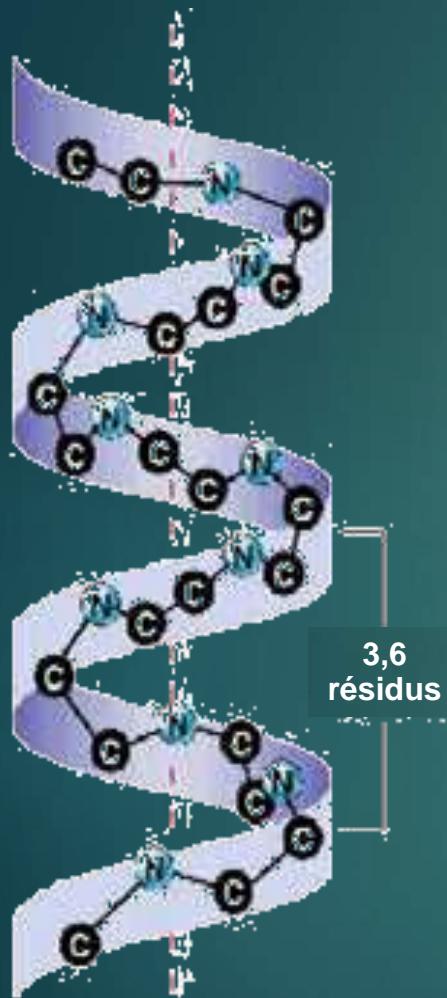
- elle est caractérisée par l'enroulement des liaisons peptidiques autour **d'un axe (arrangement hélicoïdal)**.

Cet enroulement se fait vers la droite qui est privilégié par la configuration L des aminoacides (**hélice droite**) et comporte 3,6 résidus par tour (chaque résidu est disposé par rapport au suivant selon une translation de 1,5Å le long de l'axe de l'hélice et une rotation de 100°).

- Les résidus se retrouvent à la périphérie ce qui minimise les encombrements stériques. Cette structure est stabilisée par des **liaisons hydrogènes** (la liaison hydrogène est de 2,8Å de long) entre les groupements CO et NH de 2 liaisons peptidiques superposées (le groupe CO de chaque acide aminé est lié par liaison hydrogène au groupe NH de l'acide aminé qui est situé quatre résidus plus loin dans la séquence linéaire).

## Caractéristiques de l'hélice :

- pas : 0,54 nm par tour
- nb de résidus par tour : 3,6
- translation par résidu : 0,15 nm
- diamètre de l'hélice : 0,50 nm
- angles dièdre :  $\phi = -57^\circ$  et  $\psi = -47^\circ$
- la liaison hydrogène C=O-----N-H, d'une longueur de 0,286 nm, est presque parallèle à l'axe de l'hélice



## Structure $\alpha$ -hélice droite

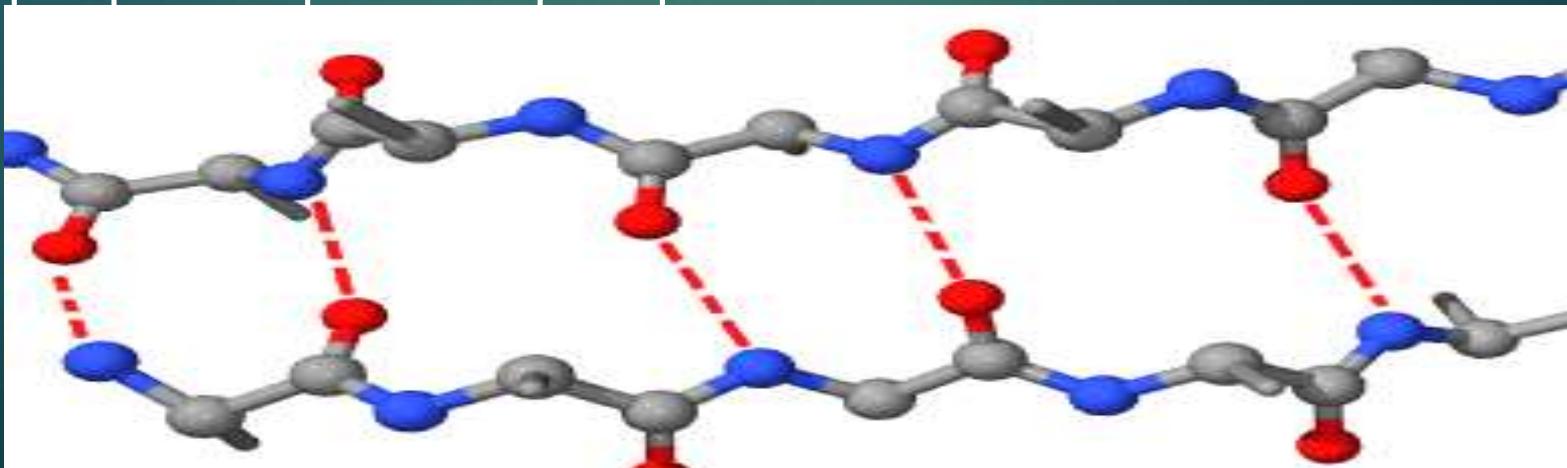
pas : 0,54 nm  
3,6 résidus par tour

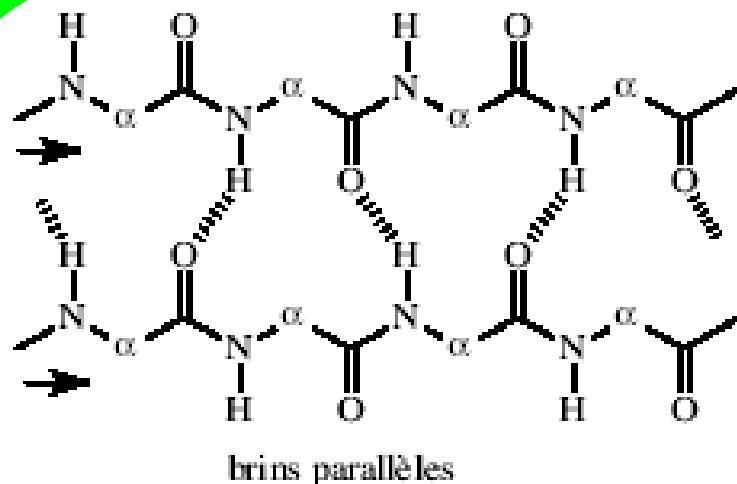
■■■■ liaison hydrogène  
entre O du C=O du résidu  $i$   
et H du NH du résidu  $(i+4)$

# FEUILLET $\beta$ (PLISSE)

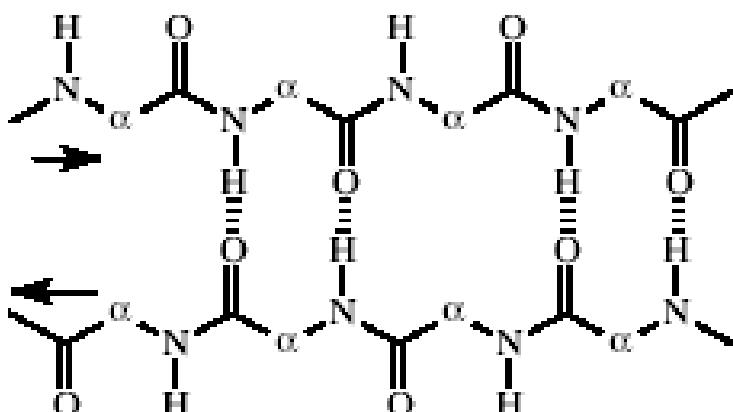
C'est une structure à plat, étirée et étalée.

- les 2 chaînes sont disposées parallèlement l'une à l'autre et orientées soit en sens inverse ( $Nt \rightarrow Ct/Ct \rightarrow Nt$ ) (**antiparallèle**) soit dans le même sens (**parallèles**).
- Les Chaînes sont reliées entre elles par des liaisons hydrogènes (intra ou inter chaines) entre les CO et les NH de deux liaisons peptidiques superposées.



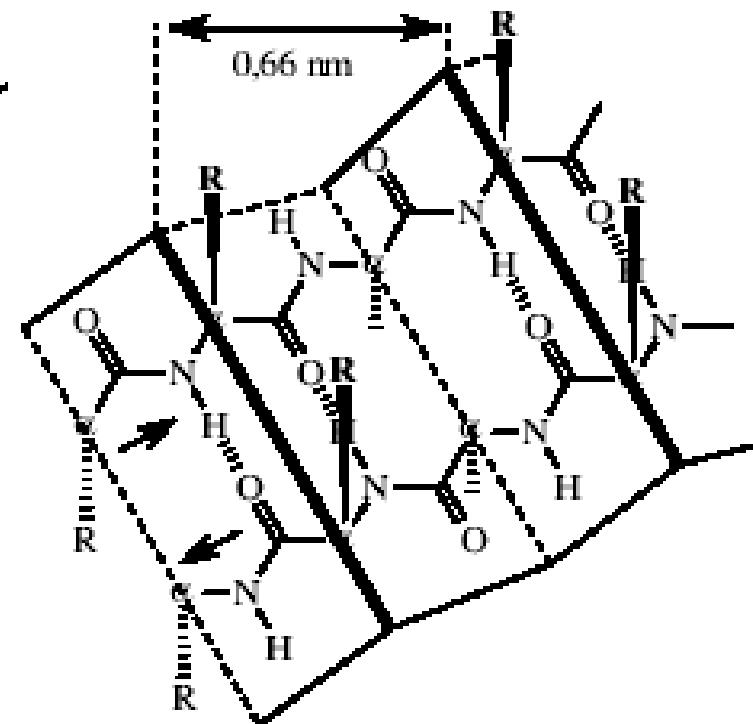


brins parallèles



brins antiparallèles

Structure en feuillet plissé  $\beta$



# STRUCTURE TERTIAIRE

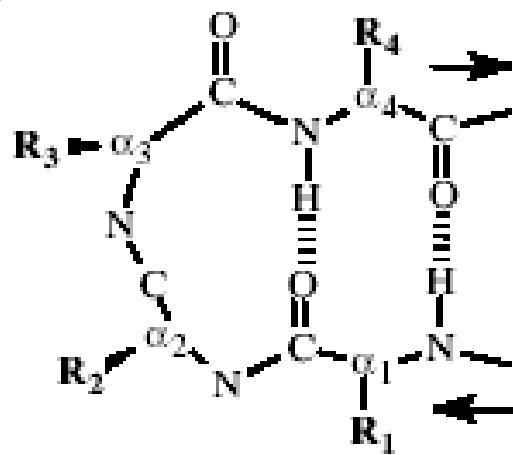
- C'est le résultat de l'assemblage des formes élémentaires de type a ou B selon les trois direction de l'espace et par le pliage des chaines. le tout étant stabilisé par des **interactions de type non covalents (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes, liaisons de vanderwaals) et des ponts disulfures.**
- On a quatres types de motifs: le tout a, le tout  $\beta$ , l'a/B et l'a+B .

La structure tertiaire d'une protéine globulaire se présente comme une succession de régions ordonnées, soit en hélice a, soit en feuillet B, réunis par des zones non ordonnées appelées coudes.

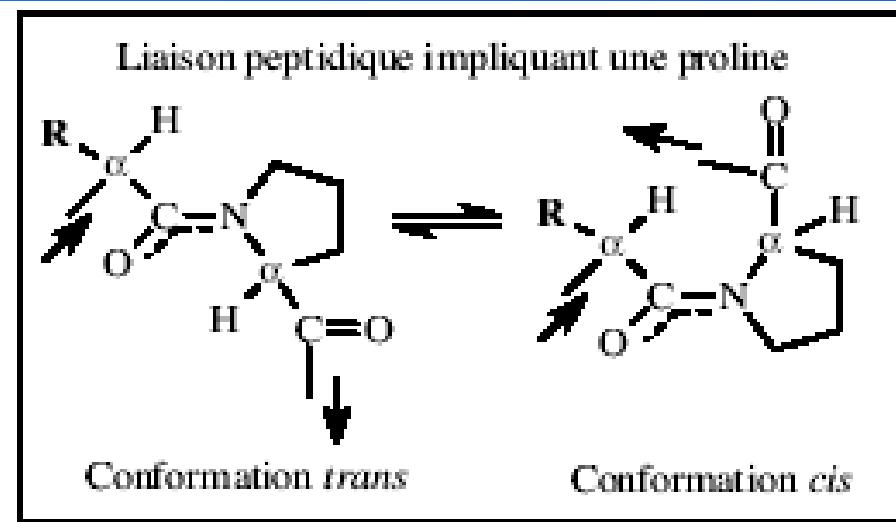
C'est un court segment peptidique de 2 à 4 résidus.

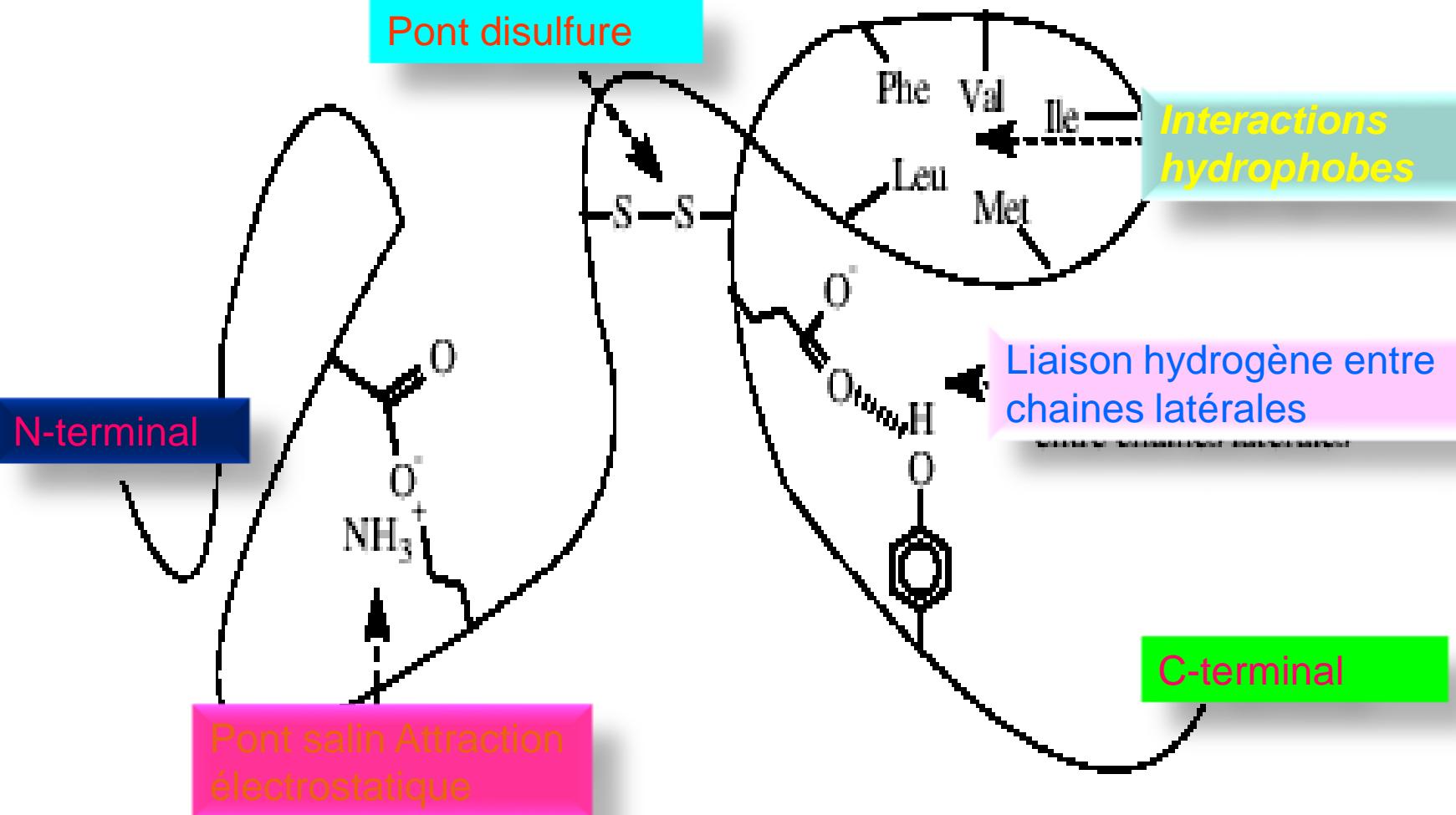
Une ou deux liaisons hydrogènes se forment entre le premier et le dernier résidu du coude.

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

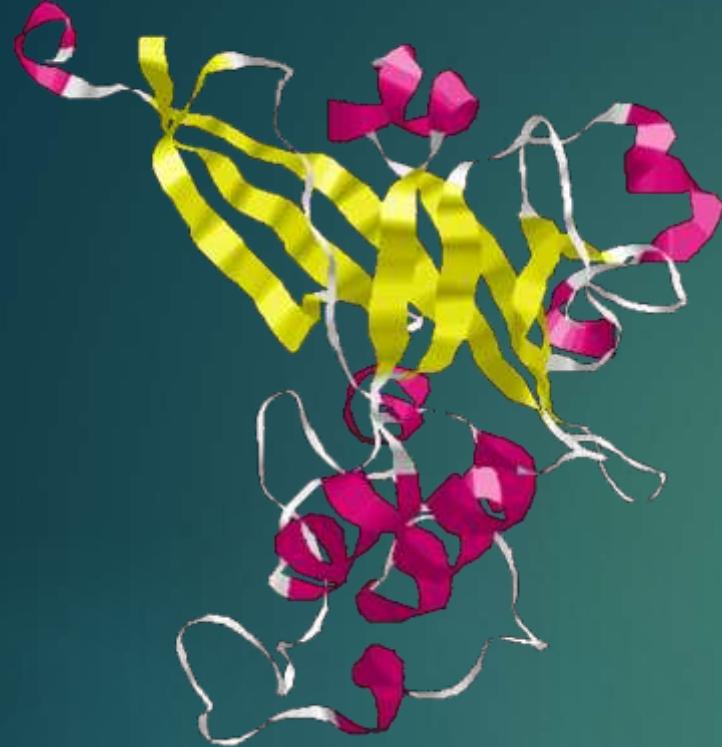


Coude β à 4 résidus

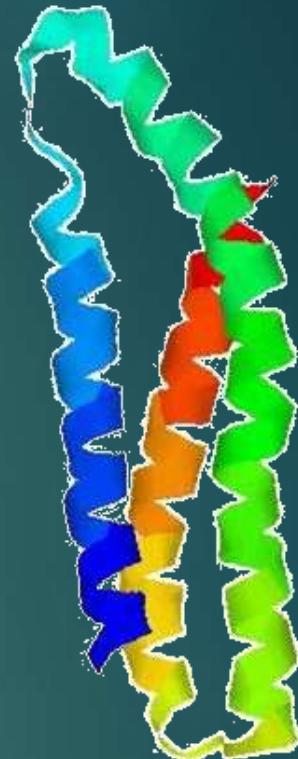




Les liaisons ou interactions entre chaînes latérales des résidus impliquées dans la structure tertiaire des protéines



$\alpha/\beta$



Tout  $\alpha$

► De plus pour ce type de structure (structure globulaire), les résidus d'acides aminés apolaires qui se trouvaient très éloignés les uns des autres dans la séquence vont se trouver très proches en raison des repliement et se trouver ainsi préférentiellement au centre de la structure où ils peuvent s'associer par liaisons hydrophobes de Kauzmann (Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Trp) et créer ainsi une région indispensables au fonctionnement de la protéine(site actif des enzymes   Zone hydrophobe interne qui assure en grande partie la stabilité générale de la molécule ). Tandis que les résidus polaires ou ioniques se situent à la périphérie où ils peuvent s'associer entre eux par liaison hydrogène ou ionique, ou encore avec l'eau par liaison hydrogène et divers composés protéiniques ou non grâce à leurs chaînes latérales polaires:

\* Les metaux : -le fer dans la catalase et peroxydase.

-le zinc dans la glutamate déshydrogénase du foie et la phosphatase alcaline.

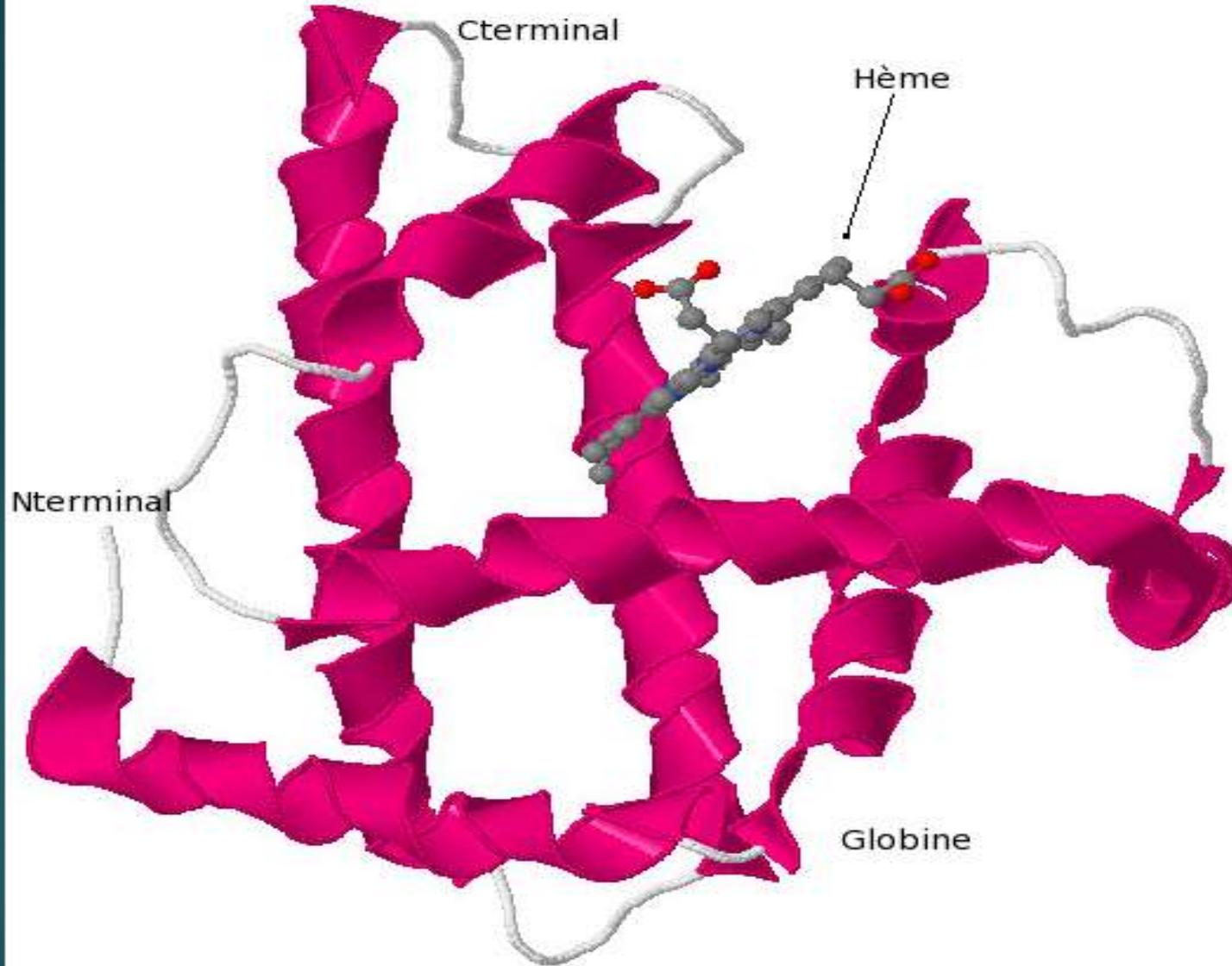
\* Coenzyme: dans le cas des enzymes qui fonctionnent avec un coenzyme spécifique.

L'ensemble forme ce qu'on appelle un PELETON.

**Une structure tertiaire n'est pas une structure figée : elle peut se modifier**

se tordre, se déformer sous l'effet de la fixation d'une molécule (ligand)

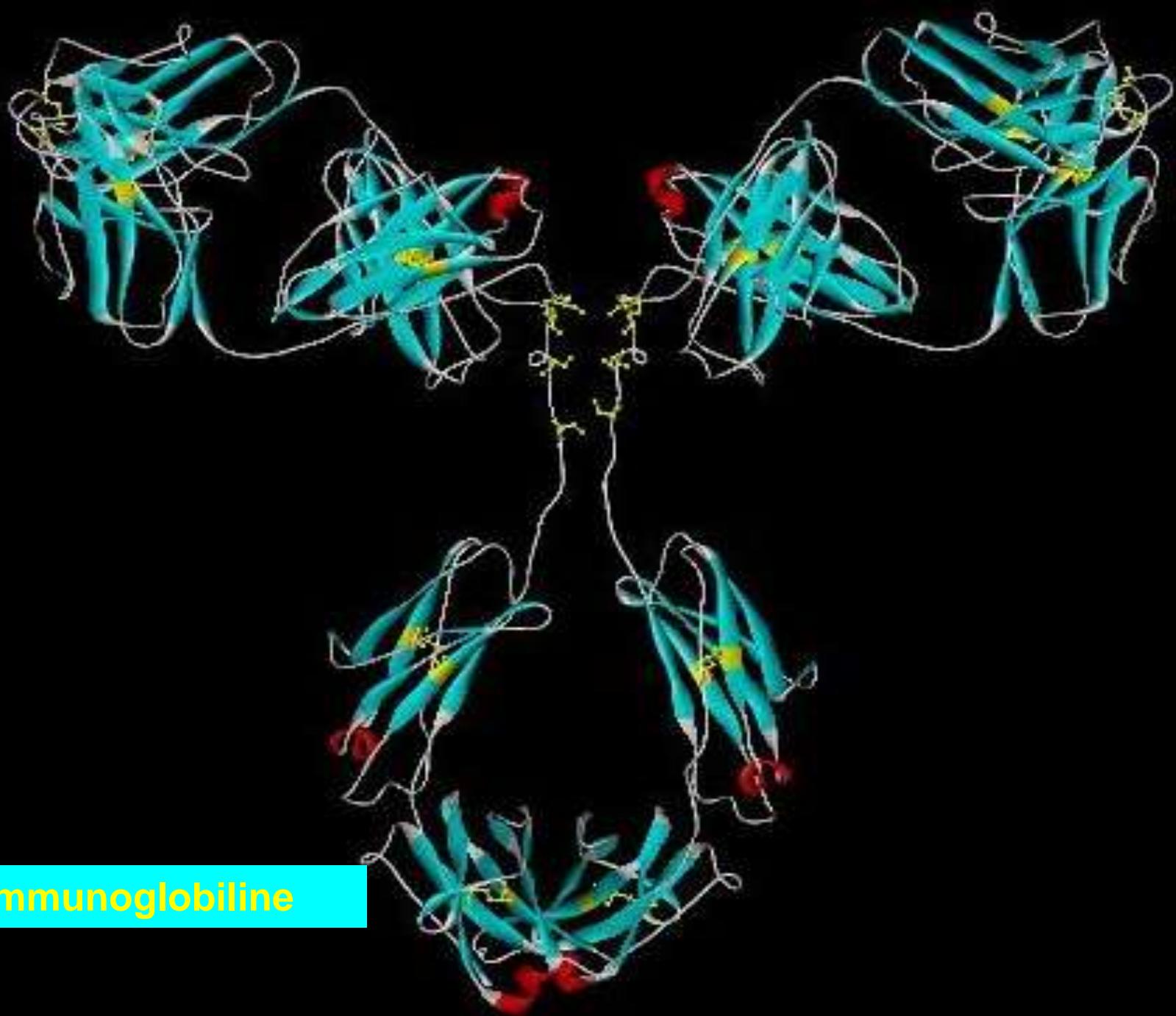
ou sous l'effet de la variation d'un paramètre physico-chimique (pH, température etc.....).



## Structure de la myoglobine



DNA polymérase



Immunoglobiline

# STRUCTURE QUATERNIAIRE

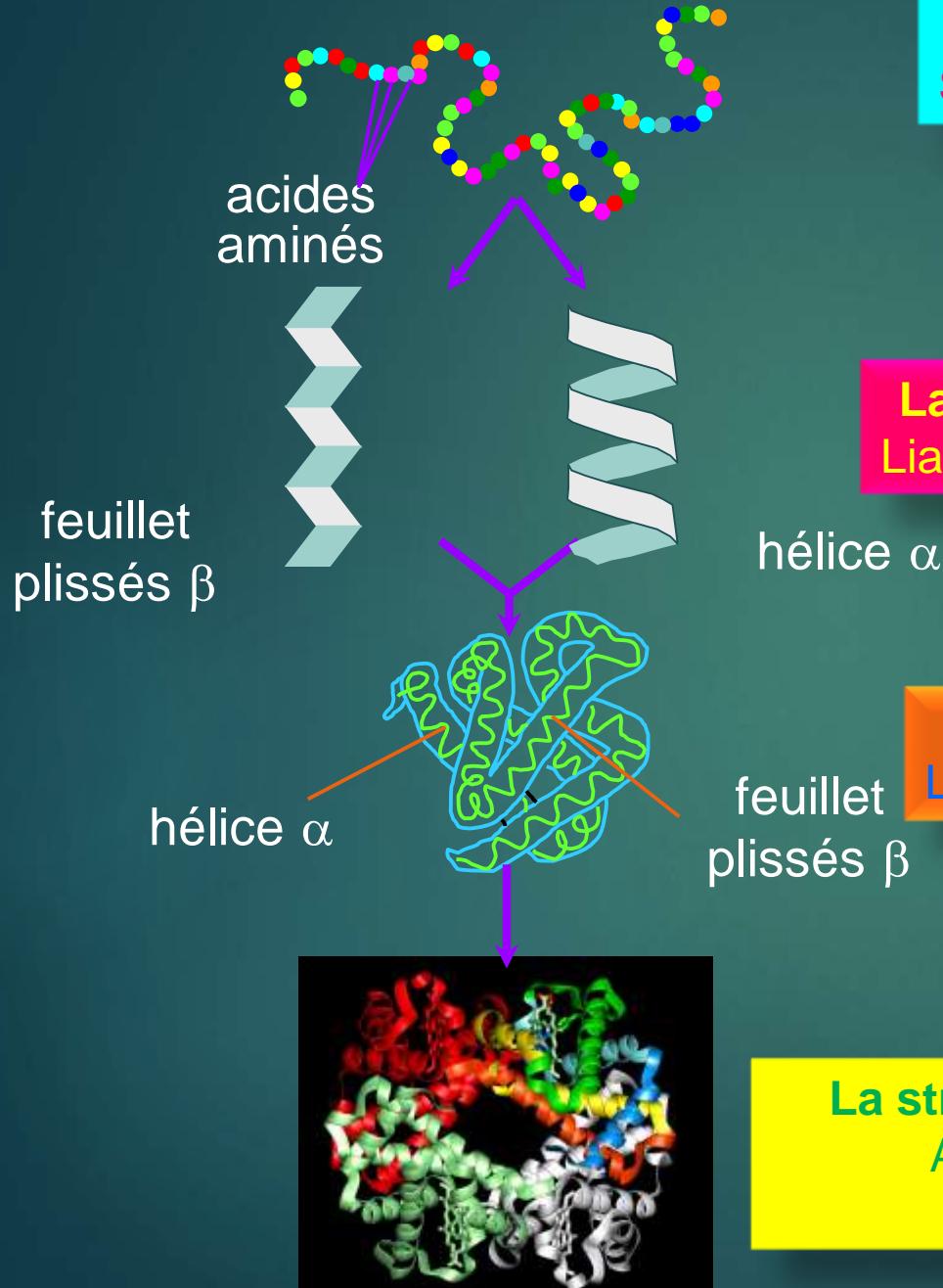
- ▶ C'est l'association de plusieurs chaînes peptidiques identiques ou non pour donner un complexe stable et actif.
- ▶ Les chaînes qui constituent ce complexe sont des **protomères** ou sous-unités, chacune ayant une structure tertiaire définie.
- ▶ L'association des différentes chaînes se fait via des **liaisons faibles** et parfois aussi via des ponts disulfures.



## ATTENTION

Toutes les protéines n'ont pas nécessairement de **structure IV<sup>aire</sup>**.

- ▶ La structure quaternaire n'est pas une organisation immuable: c'est un état d'équilibre entre l'association et la dissociation partielle des protomères, cet état d'équilibre est soumis à l'action des facteurs extérieurs à la molécule appelés facteurs allostériques.
- ▶ On parle de transitions allostériques entre la forme « relachée » ou forme R inactive et la forme « tendue » ou forme T active modification de la conformation.



**La structure primaire de la protéine :**  
Séquence de la chaîne d'acides aminés

**La structure secondaire de la protéine :**  
Liaisons hydrogène entre les acides aminés

hélice  $\alpha$

**La structure tertiaire de la protéine :**  
Liaisons entre les structures secondaires

feuillet  
plissés  $\beta$

**La structure quaternaire de la protéine :**  
Association de plusieurs chaînes polypeptidiques

# HEMOGLOBINE

- ▶ L'hémoglobine est le pigment respiratoire responsable chez l'homme, les animaux supérieurs, et divers invertébrés du transport de l'oxygène depuis le milieu extérieur jusqu'au niveau cellulaire. Ce rôle est du à sa capacité de former avec l'oxygène une combinaison chimique facilement dissociable.
- ▶ L'hémoglobine résulte de l'union d'une fraction non protéinique appelée Hème avec une fraction protéinique dite Globine.



## LA GLOBINE

Est l'association de quatre chaines polypeptidiques.

Il existe différents types de chaines polypeptidiques rencontrées dans l'hémoglobine humaine qui diffèrent par le nombre des acides aminés et la nature des acides aminés N-terminaux: chaines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et les chaînes  $\xi$ (embryonnaires).

- ➡ HEMOGLOBINE A1: principale hémoglobine de l'adulte: 2chaines $\alpha$ + 2chaines $\beta$
- ➡ HEMOGLOBINE A2: **2%** hémoglobine de l'adulte: 2 chaines $\alpha$  + 2chaines  $\gamma$
- ➡ HEMOGLOBINE F : 2 chaines $\alpha$  + 2chaines  $\gamma$



## HEME

C'est une porphyrine, structure tétrapyrolique centrée sur un atome de fer.

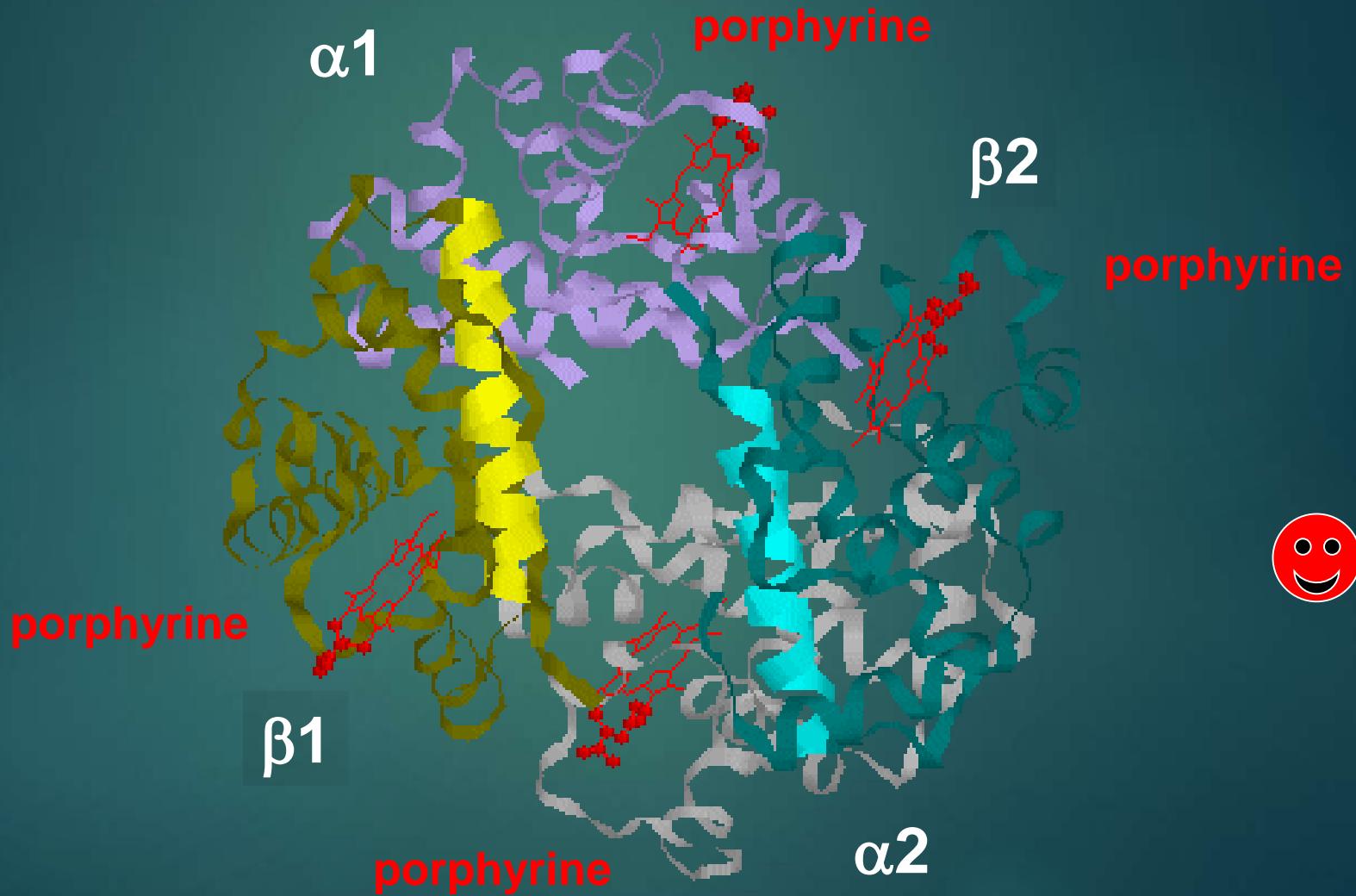
Chaque chaîne est unie à une molécule d'hème par l'intermédiaire de son atome de fer, et donc il existe 04 sites de liaison à l'oxygène dans une molécule.

Le fer a six liaisons de coordinance:

- quatre liaisons avec 4 atomes d'azote du noyau tétrapyrolique de la porphyrine.
- La cinquième liaison avec l'atome d'azote du résidu histidyl proximal (en 63) de chaîne polypeptidique.
- La sixième liaison reste disponible pour s'unir soit à l'oxygène (oxyhémoglobine), à l'eau ou à l'oxyde de carbone (CO) dont l'affinité pour l'hème est 150 fois plus importante que celle de l'oxygène.

- Au total deux chaines  $\alpha$ , deux chaines  $\beta$  et quatre noyaux porphyriniques avec quatre atomes de fer s'associent en structure tridimensionnelle.

## Hémoglobine humaine ( $\alpha_2\beta_2$ )



# CLASSIFICATION

## N

PROTEINES FIBREUSES

# INTRODUCTION

- Elles sont également appelées **scléroprotéines**.
- Elles ont une forme allongée.
- Elles sont pratiquement insolubles (riches en Ac A Hydrophobe).
- On remarque l'absence de coude  $\beta$  dans leur structure.
- Il s'agit essentiellement de **protéines de structure**.
- résistance et/ou élasticité.

# STRUCTURE

## TYPE $\alpha$

- ▶ Kératine naturelles.
- ▶ Myosine.
- ▶ Fibrinogène.

## TYPE $\beta$

- ▶ Fibroïne de la soie.
- ▶ Par étirement de 30% de la Kératine.

\* Le pas de l'hélice est de 510 pm.

# EVOLUTION

- ▶ Enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super hélice pour donner ensuite des cordages résistants.
- ▶ EX: Kératine a et le collagène

# PROTEINES FIBREUSES

EXEMPLES

# KERATINE a

- **Cheveux, la laine, les plumes, les ongles, les griffes, les écailles.....ect.**
- **Riche en AA Hydrophobe: Phe, Ile,Val et Ala.**
- **La résistance de la Kératine a est amplifiée par l'enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super hélice.**

# LE COLLAGENE

Le collagène est très répandu dans le règne animal. C'est la **principale** protéine des tissus conjonctifs (tendons , cartilage et la cornée de l'oeil) et du squelette des vertébrés.

Le collagène forme des **fibrilles** qui résistent à la traction.

La molécule de collagène est constituée de 3 chaînes peptidiques, dont **deux au moins sont les mêmes dans tous les différents collagènes.**

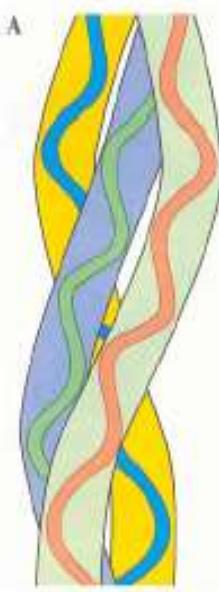
Ce sont des cylindres d'environ 3 x 1000 acides aminés, de 280 nm de longueur et 1,4 nm de diamètre, avec une **masse moléculaire proche de 300 kDa.**

La séquence du collagène comporte **des séries de triplets** où la glycine occupe la même position. Des zones polaires séparent ces séquences :

Gly-Ala-Pro   Gly-Pro-Ala   Gly-Pro-Pro(OH)

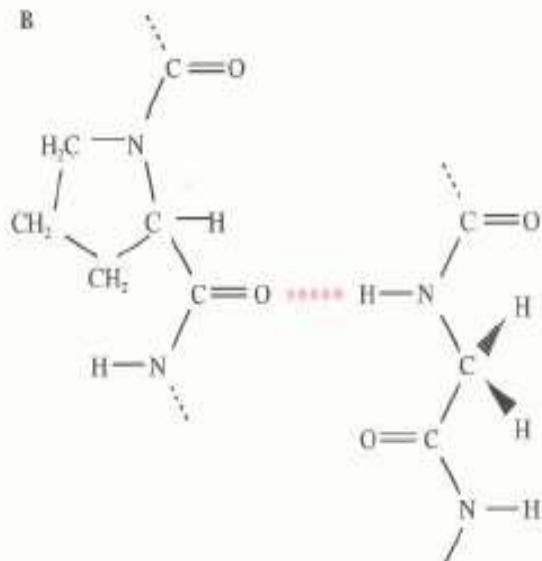
Les résidus de Pro et Pro(OH) imposent **une conformation hélicoïdale** (droite), avec un triplet dans chaque spire, sans liaison hydrogène.

La structure spatiale est complétée par la formation d'une **triple hélice (Tropocollagène)** grâce, cette fois-ci, à l'établissement de liaisons H inter-chaînes nombreuses, et aussi à la présence de glycine, qui se trouve à l'intérieur de la triple hélice.



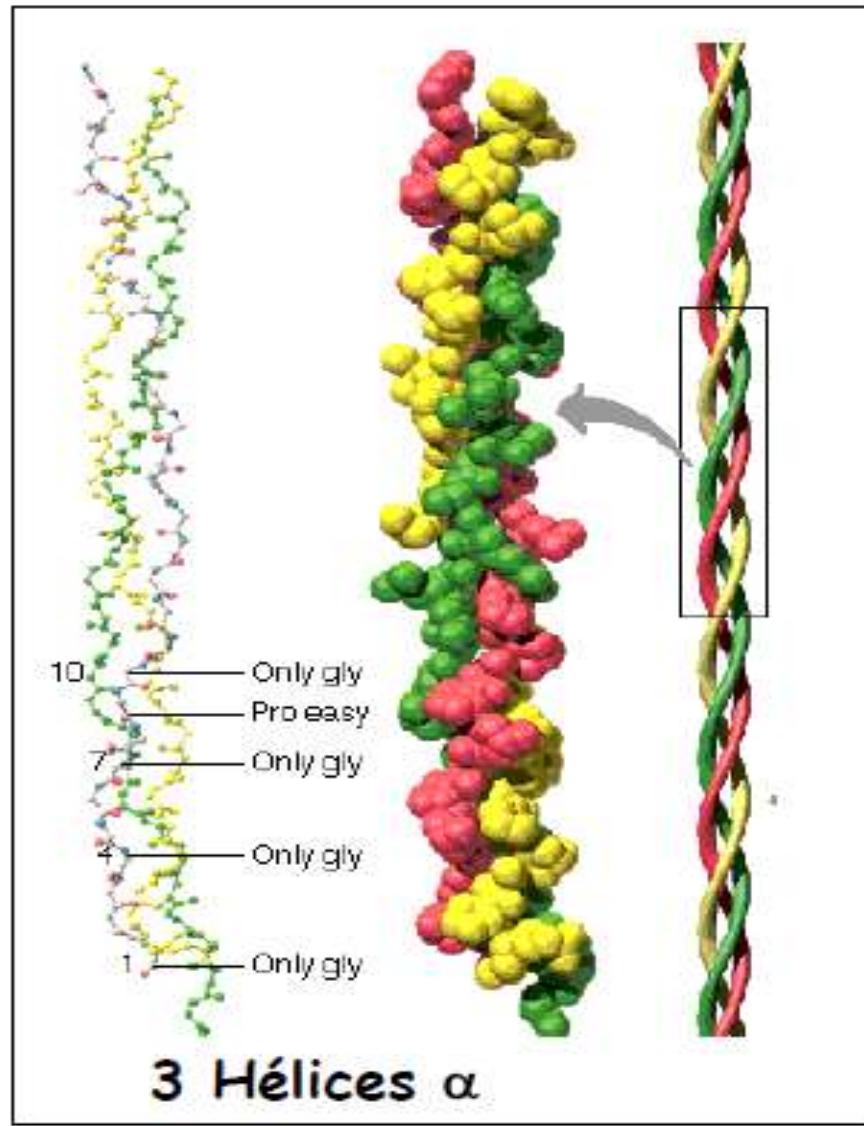
Pro

Gly

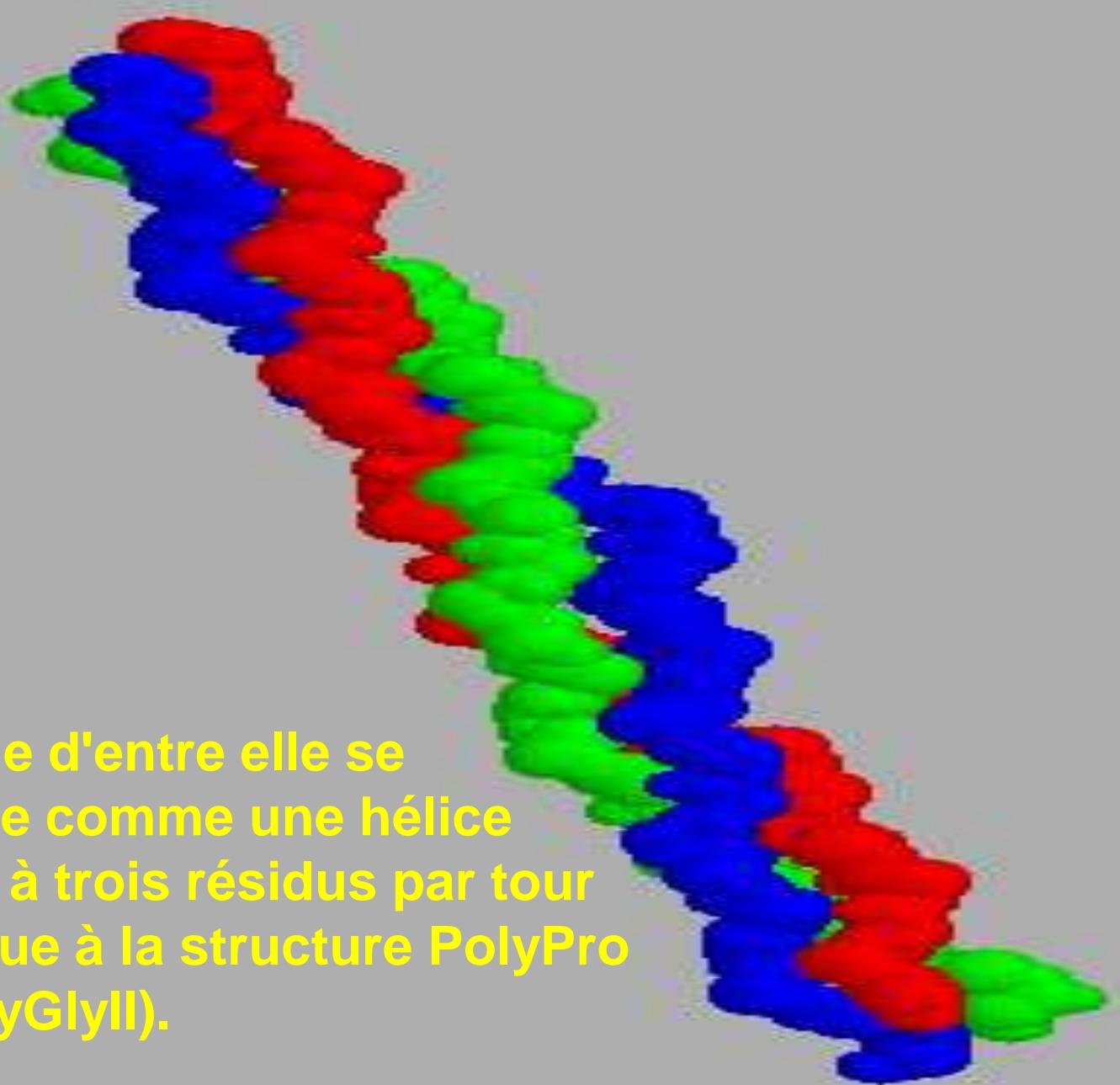


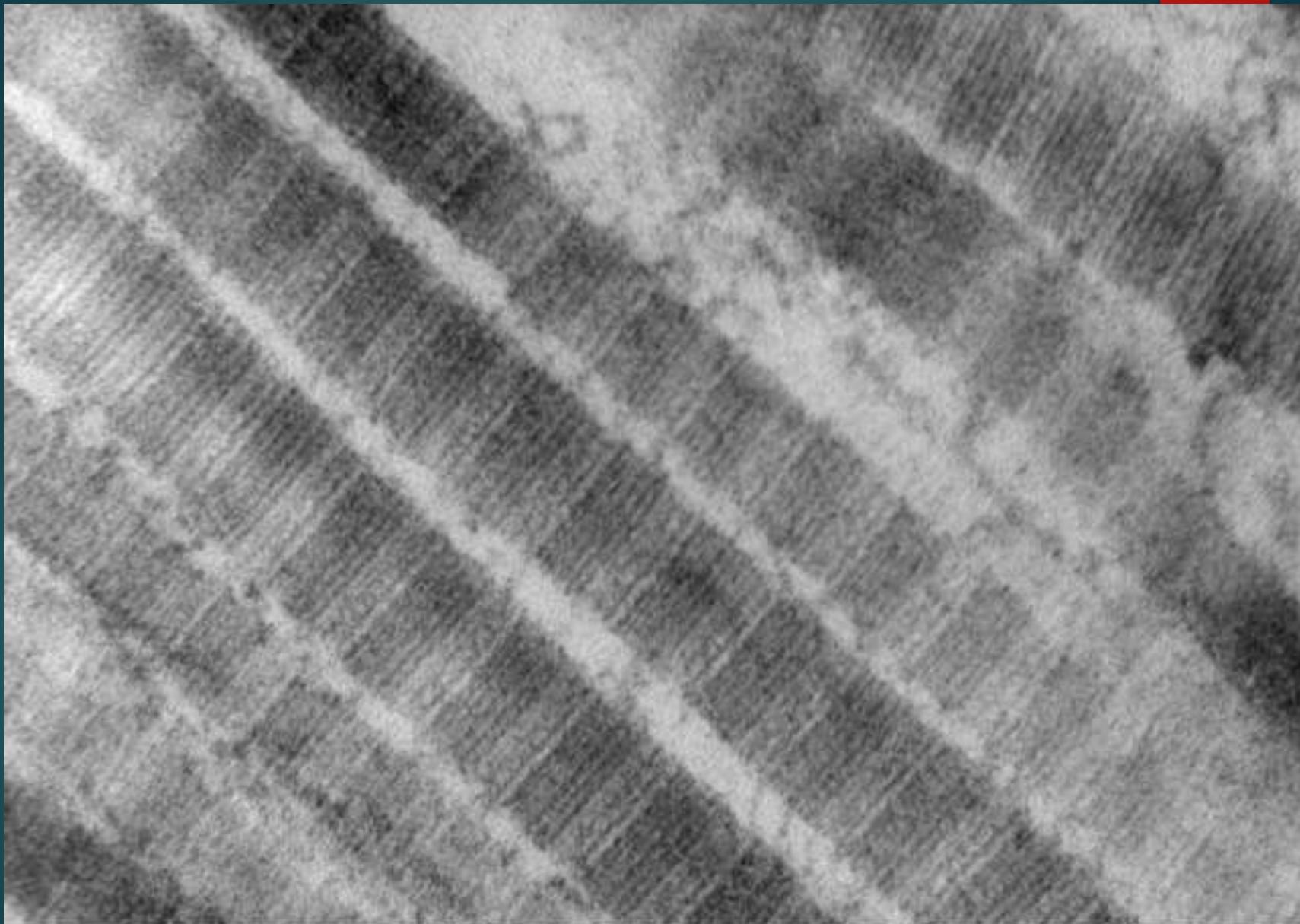
- Triple hélice droite stabilisée par des liaisons Hydrogènes interchaînes Pro-CO.....HN-Gly
- Chaque hélice s'enroule à gauche
- Trois résidus par tour, imposé par les séquences répétitives Gly-X-Y
- X et Y = Pro ou 4-hydroxyproline, soit  $\frac{1}{4}$  des résidus du collagène

## Enroulement Hélicoïdal



**Chacune d'entre elle se présente comme une hélice gauche à trois résidus par tour (anologue à la structure PolyPro II et polyGlyII).**





50 nm

11LungTEM

1/7/0 REMF

# Fabrication du collagène

1: Chaîne  $\alpha$



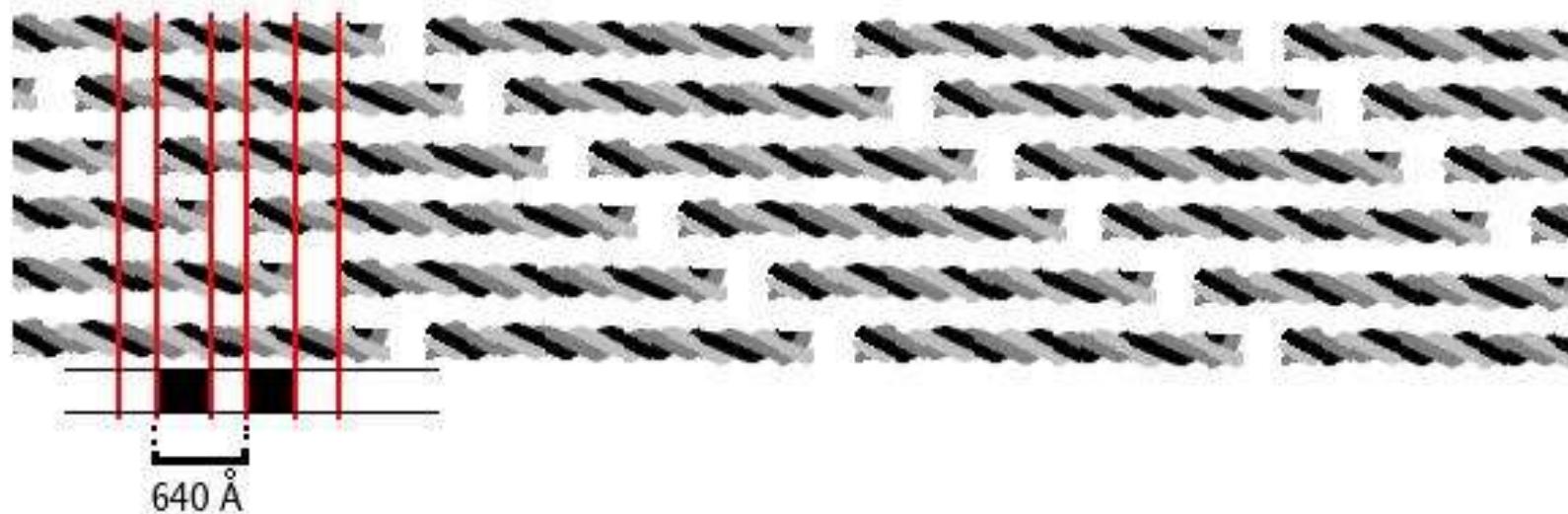
2: Procollagène



3: Tropocollagène



4: Fibrille



5: Fibre

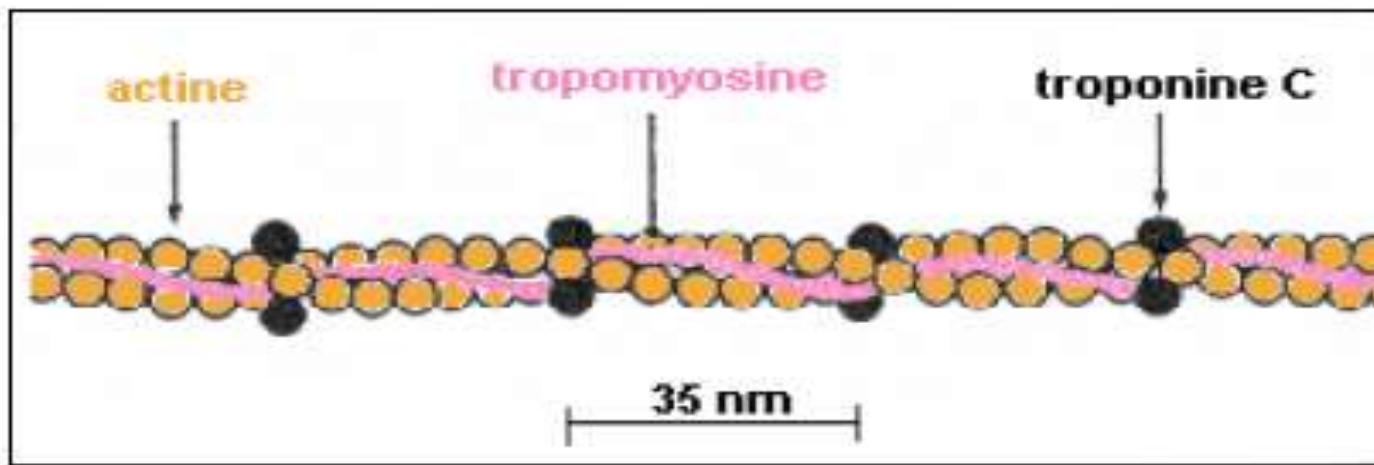
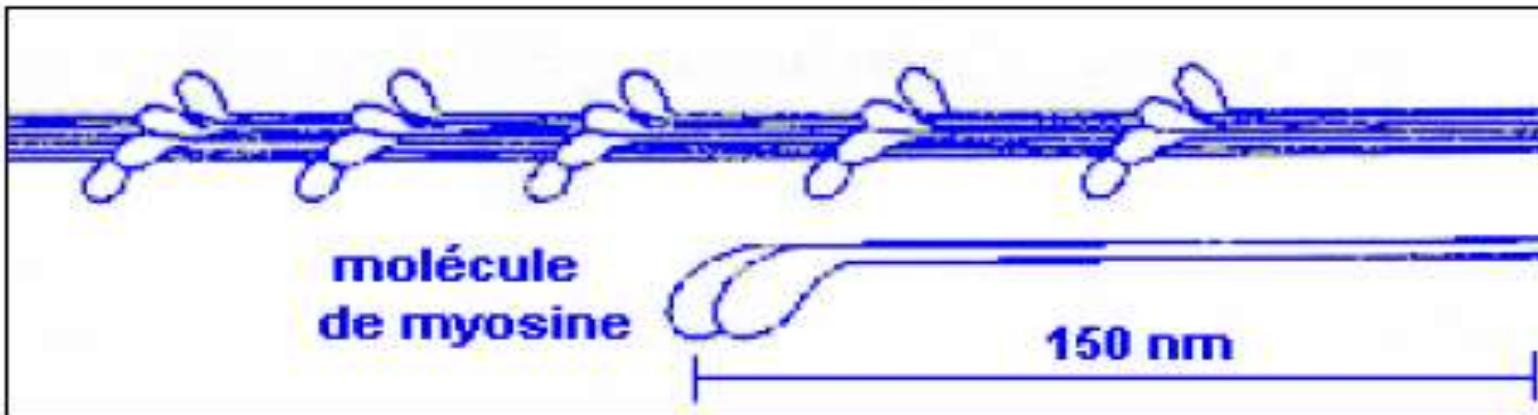


# ELASTINE

- ▶ Retrouvé dans le tissu conjonctif élastique dont l'unité de base est la tropoélastine.
- ▶ Riche en Gly-Ala et surtout en résidus Lys.

# MYOSINE/TROPOMYOSINE

- ▶ Protéines fibrillaires responsables de la contraction musculaire.



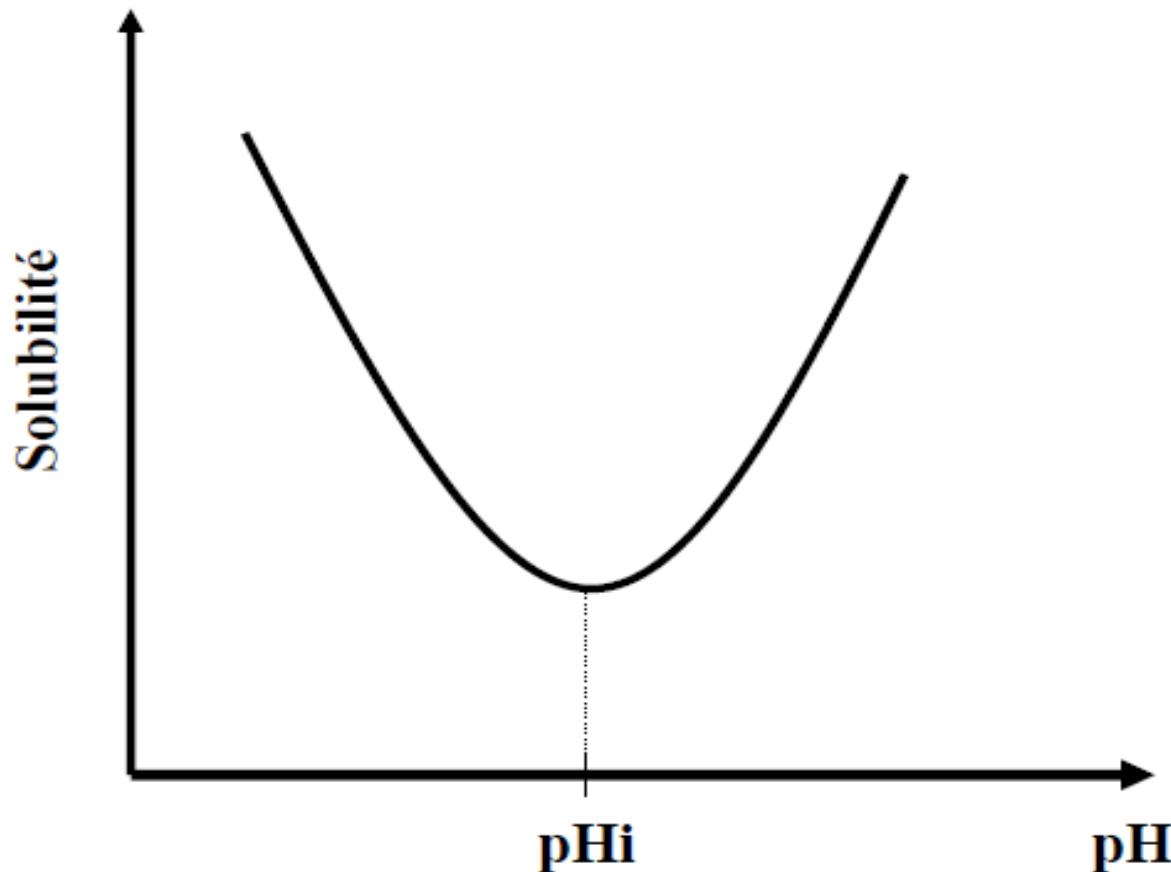


# **SOLUBILITE**

# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DU PH

**La solubilité d'une protéine est minimum pour une valeur de pH égale à son phi, car à ce pH la protéine se comporte comme une molécule neutre et ses possibilités d'interaction avec l'eau par le biais de liaisons hydrogènes sont donc minimum.**

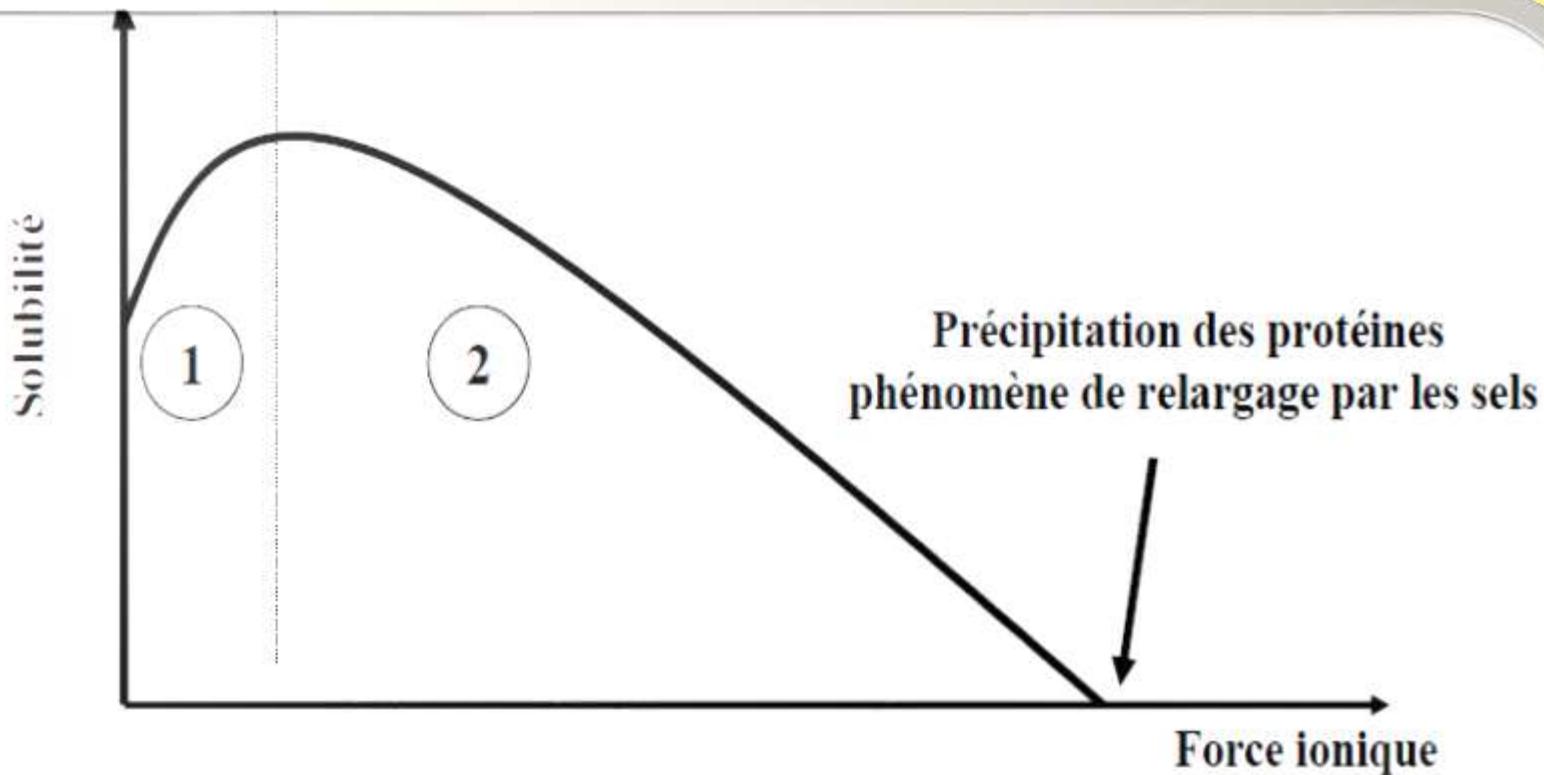


# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

- Les sels interviennent à la fois par leur charges et leur concentrations.
  - $U = \frac{1}{2} \epsilon c.z^2$
- \*C: concentration de chaque ion.  
\*Z: valence de chaque ion.

Les protéines sont solubles à faible force ionique, alors qu'à force ionique élevée (concentration en sels augmente) les protéines précipitent : c'est l'effet de **relargage**: utilisé dans les techniques de précipitation par les sels: **sulfate d'ammonium**.



- 1 **Phase 1 :** effet dissolvant (salting in), l'augmentation de la force ionique stimule le caractère polaire de la protéine qui peut ainsi plus facilement réagir avec l'eau
- 2 **Phase 2 :** phénomène de relargage par les sels (salting out), la solubilisation des sels présents en forte concentration mobilise les molécules d'eau qui sont ainsi retirés de leur contact avec la protéine. On observe rapidement la précipitation des protéines présentes

## **EXPLOITATION DU PHÉNOMÈNE DE RELARGAGE PAR LES SELS**

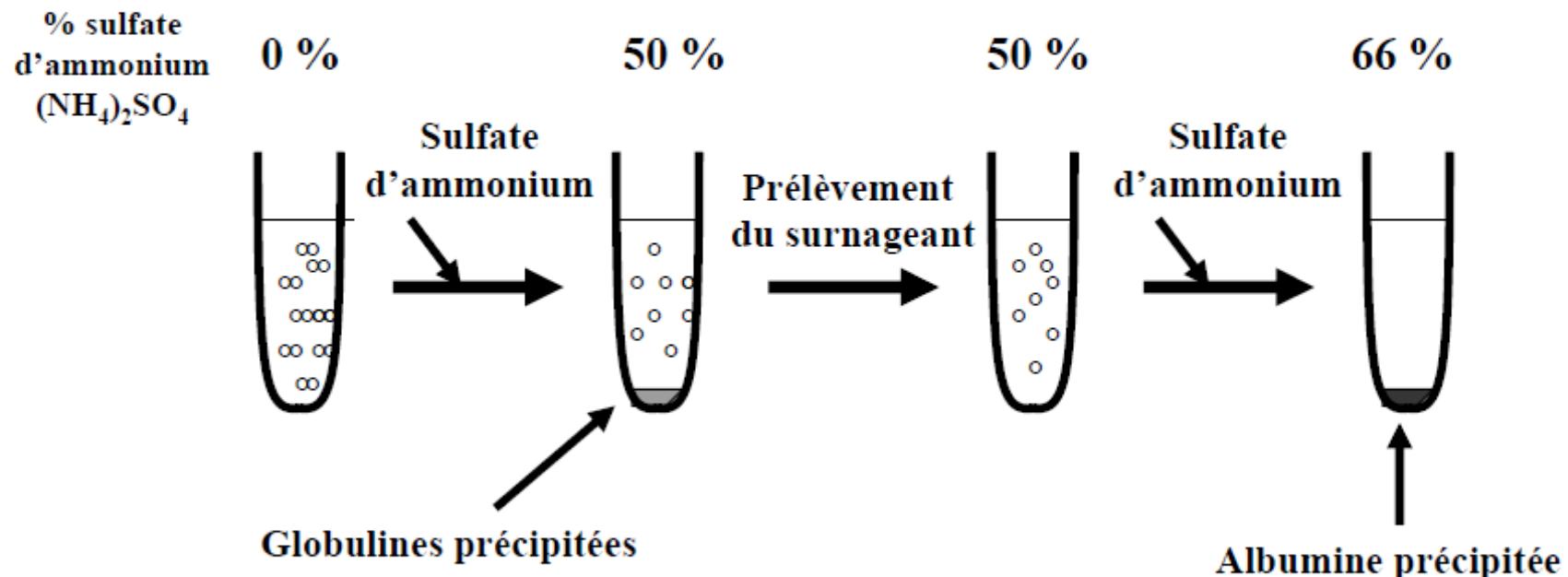
**Plus une molécule est polaire, plus la force ionique devra être importante pour observer le phénomène de relargage par les sels.**

**Pour une force ionique donnée, certaines protéines pourront être encore solubles alors que d'autres auront déjà été précipitées.**

**Ce principe est couramment utilisé lors des premières étapes de purification d'une protéine pour séparer rapidement et à moindre coût les protéines des autres composants présents dans le milieu.**

**Il est également envisageable d'exploiter le phénomène de relargage par les sels afin de séparer des protéines.**

## Séparation des globulines et de l'albumine du sérum de bovin par précipitation au sulfate d'ammonium



- **Albumine**
- **Globulines**

# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

- L'élévation thermique est un facteur de dénaturation des protéines et par conséquent de leur précipitation.
- En dessous de 40°, la T° favorise la solubilité de certaines protéines.
- La dénaturation d'une protéine correspond à la destruction des liaisons qui maintiennent en place les niveaux de structure quaternaires (s'il y a lieu), tertiaires et secondaires.
- La protéine se présente sous une configuration désordonnée, seule la structure primaire n'est pas perturbée. En conséquence, la protéine n'est plus sous sa forme native et a donc perdu son activité biologique.
- Suivant les facteurs de dénaturation, le processus peut être réversible ou irréversible.

# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES

- **Les protéines sont insolubles.**
- **Augmentent les forces d'attraction et facilitent ainsi l'agrégation des protéines entre elles.**

# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DES DETERGENTS

- Pénètrent dans le cœur des protéines et perturbe les interactions hydrophobes.
- **le désoxycholate de sodium** qui facilite le passage en solution de certaines protéines enzymatiques.

# **SOLUBILITE**

INFLUENCE DES AGENTS CHIMIQUES

**Urée et Guanidine:**

**Facilitent la pénétration de l'eau dans les protéines, ce qui perturbe  
les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes.**

**$\beta$  Mercaptoéthanol entraîne la rupture des ponts disulfures.**

**L'acide trichloracétique à 5% provoque la précipitation des protéines.**

# **CARACTERE AMPHOTERE**

**Les protéines possèdent au moins deux fonctions à caractère acido-basique (extrémités N et C terminales), elles ont donc un caractère amphotère.**

**La charge globale d'une protéine sera fonction du bilan des charges présentes sur chaque site acido-basique.**

**Cette charge globale pourra être positive, nulle ou négative.**

**La protéine pourra, en fonction du pH du milieu dans lequel elle se trouve, se comporter comme un cation, comme une molécule neutre ou comme un anion.**

**Le pH où 100 % de la protéine est sous forme globalement neutre (forme zwitterion) correspond au pHi de la protéine.**

**Lorsque le pH est inférieur au pHi, la forme majoritaire de la protéine est la forme cation.**

**Lorsque le pH est supérieur au pHi de la protéine la forme majoritaire de la protéine est la forme anion.**

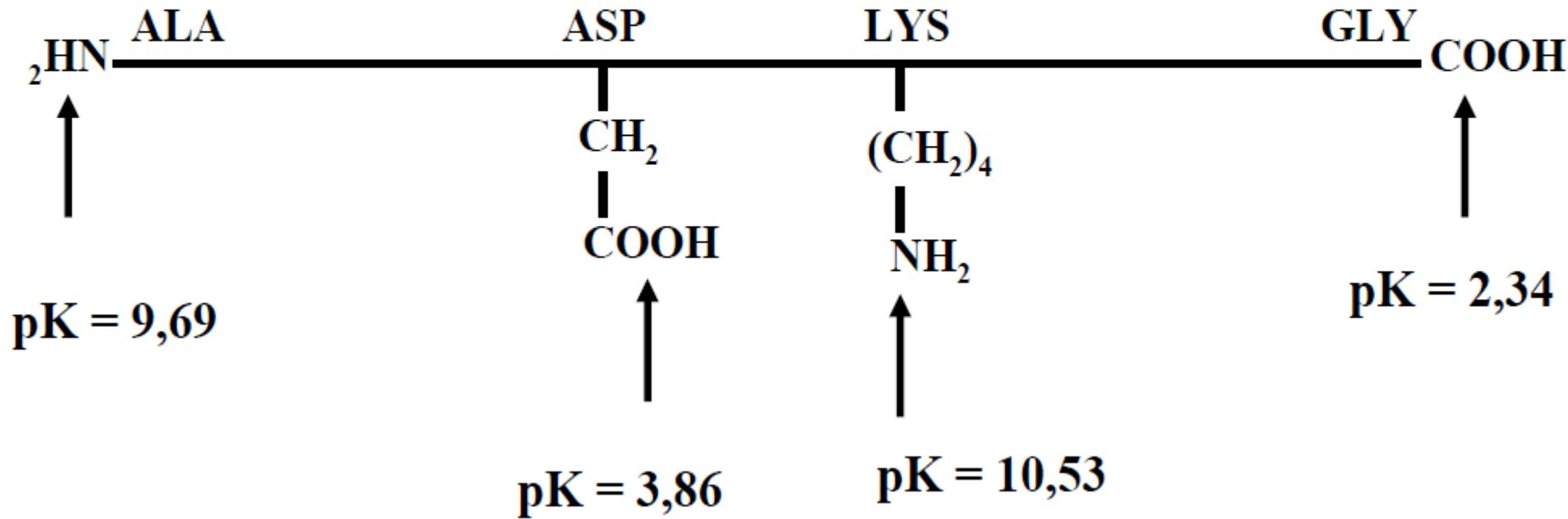
# **ESTIMATION DU PHi D'UNE PROTÉINE**

**Le pH<sub>i</sub> d'une protéine dépend du pKa de chaque fonction acido-basique.**

**Sachant que le pH<sub>i</sub> correspond au pH où la protéine est entièrement sous la forme **zwitterion**, on peut facilement estimer sa valeur par une équation du type:**

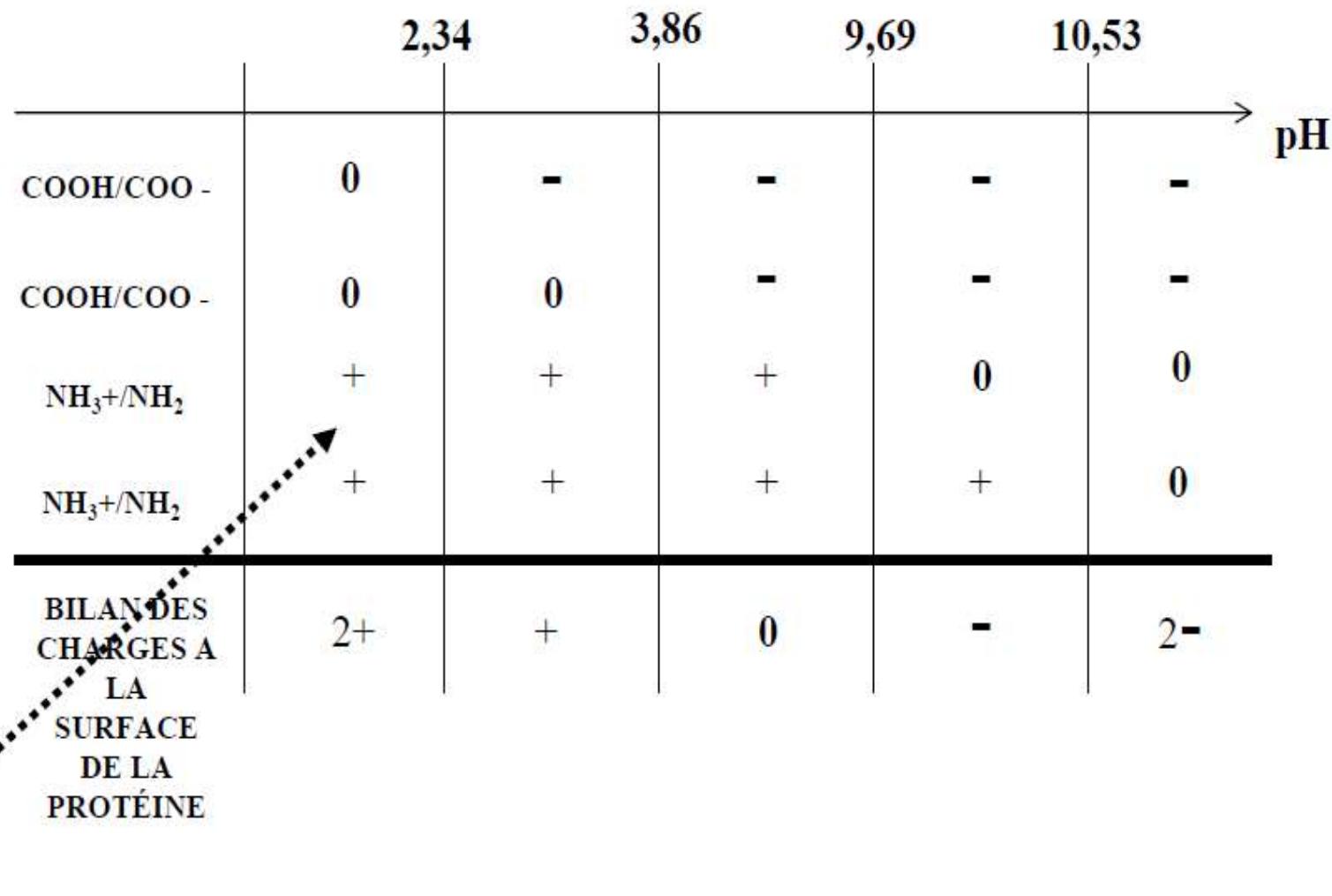
**pH<sub>i</sub> = 1/2 (pKa<sub>1</sub> + pKa<sub>2</sub>) avec pKa<sub>1</sub> et pKa<sub>2</sub> correspondant aux pKa des couples acidobasiques impliqués dans la formation de la forme **zwitterion**.**

## Représentation schématique de la protéine considérée



## Valeurs des différents pK

Couples acido-basiques dans  
l'ordre croissant de leur pK



Charges apportées par la forme chimique prédominante

**Le bilan des charges montre que la forme zwitterion (charge globale de la protéine égale à 0) est majoritaire entre pH 3,86 et pH 9,69.**

**On aura une valeur proche de 100 % de forme zwitterion entre ces deux pH.**

**On peut donc estimer le pHi de cette protéine à :**

$$\text{pHi} \approx 1/2 (3,86 + 9,69) \approx 6,775$$