

COURS DE BIOCHIMIE

Dr Lahouel.z

zakia.lahouel@univ-usto.dz

**Structure et
propriétés physico-
chimiques des
acides aminés,
peptides et
protéines**

Chapitre 4: Structure et propriétés physico-chimiques des acides aminés, peptides et protéines

4.1. Les acides aminés, les peptides, les protéines :

Définition

Un **acide α -aminé** (ou **α -aminoacide**) est une petite molécule organique fondamentale composée de trois parties principales :

- un **groupe amine** (-NH₂),
- un **groupe carboxyle** (-COOH),
- et une **chaîne latérale** (ou **radical R**) qui varie d'un acide aminé à l'autre et détermine ses propriétés chimiques.

Ces trois éléments sont tous **liés au même atome de carbone**, appelé **carbone α** , situé juste à côté du groupe carboxyle — d'où le nom **α -aminoacide**.

Il existe **20 acides aminés naturels** qui servent de **briques élémentaires à toutes les protéines** chez les êtres vivants. Leur combinaison dans différentes séquences forme la diversité structurelle et fonctionnelle des protéines.

De plus, la plupart des acides aminés (sauf la glycine) possèdent un **carbone asymétrique**, ce qui leur confère une **activité optique** (formes D et L), la **forme L** étant celle que l'on retrouve dans les protéines biologiques.

Classification des acides aminés

Les **20 acides aminés naturels** se distinguent selon la **nature chimique de leur chaîne latérale (radical R)**.

Cette chaîne influence leurs **propriétés physico-chimiques** (solubilité, polarité, charge électrique, etc.).

1. Acides aminés apolaires (non polaires ou hydrophobes)

- Leur chaîne latérale est constituée principalement d'atomes de **carbone et d'hydrogène**, donc **non polaire**.
- Ils préfèrent l'intérieur des protéines (zones hydrophobes).
- **Exemples :** Glycine, Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Méthionine, Proline, Phénylalanine, Tryptophane.

2. Acides aminés polaires non chargés

- Leur chaîne latérale contient des **groupes fonctionnels polaires** ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{CONH}_2$).
- Ils peuvent former des **liaisons hydrogène** avec l'eau ou d'autres molécules.
- **Exemples :** Sérine, Thréonine, Tyrosine, Cystéine, Asparagine, Glutamine.

3. Acides aminés acides

- Leur chaîne latérale contient un **groupe carboxyle supplémentaire** ($-\text{COOH}$).
- À pH physiologique, ils sont **chargés négativement**.
- **Exemples :** Acide aspartique (Asp), Acide glutamique (Glu).

4. Acides aminés basiques

- Leur chaîne latérale possède un **groupe amine** capable de capturer un proton.
- À pH physiologique, ils sont **chargés positivement**.
- **Exemples :** Lysine, Arginine, Histidine.

5. Acides aminés aromatiques

- Leur chaîne latérale contient un **cycle aromatique** (structure en anneau).
- Absorbent souvent la **lumière UV ($\approx 280 \text{ nm}$)**, utile pour doser les protéines.
- **Exemples :** Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane.

6. Acides aminés soufrés

- Contiennent un **atome de soufre (S)** dans leur chaîne latérale.
- Peuvent former des **ponts disulfures** (Cys-S-S-Cys) ou participer à des réactions redox.

- **Exemples :** Cystéine, Méthionine.

C. Principales propriétés physiques des acides aminés : l'isomérisation

2. Le carbone α asymétrique

- Tous les **acides aminés protéinogènes** (sauf **la glycine**) possèdent un **carbone α asymétrique**, c'est-à-dire lié à **quatre substituants différents** : **-COOH, -NH₂, -H et -R** (chaîne latérale).
- Ce carbone asymétrique confère à l'acide aminé un **centre chiral**, à l'origine de **deux formes stéréoisomères** possibles : **D** et **L**.

3. Isomérie optique

- Les deux formes D et L sont **images l'une de l'autre dans un miroir et non superposables** → ce sont des **énantiomères**.
- Ces deux formes font dévier la lumière polarisée dans **des directions opposées** :
 - **D (dextrogyre)** : dévie la lumière vers la droite.
 - **L (lévogyre)** : dévie la lumière vers la gauche.
- Dans les **protéines naturelles**, **seule la forme L** des acides aminés est présente. Les **acides aminés D** se retrouvent parfois dans les **parois bactériennes** et certains **antibiotiques naturels**.

4. Importance biologique

- L'isomérie influence la **forme tridimensionnelle** des protéines.
- Les enzymes et les récepteurs reconnaissent **uniquement la configuration L**, garantissant une **spécificité biologique stricte**.
- La présence d'acides aminés D dans certains micro-organismes contribue à la **résistance aux enzymes hydrolytiques**.

5. Cas particulier : la glycine

- La **glycine** n'a pas de carbone asymétrique (le radical R = H).

- Elle est **achirale** → n'existe pas sous deux formes optiques.
- Cette particularité rend la glycine **très flexible** dans la structure des protéines.

Propriétés acido-basiques des acides aminés

1. Présence de deux groupes fonctionnels ionisables

Chaque acide aminé (sauf exceptions comme la proline) possède :

- Un **groupe carboxylique** ($-\text{COOH}$) → qui joue le rôle d'un acide (peut libérer un proton H^+ et devient $\alpha\text{-COO}^-$ (forme déproto née chargée négativement),).
- Un **groupe amine** ($-\text{NH}_2$) → qui joue le rôle d'une base (peut capter un proton H^+ et devient $\alpha\text{-NH}_3^+$ (forme protonée chargée positivement)).
- Ainsi, un acide aminé peut **agir à la fois comme un acide et comme une base**, L'aminoacide se trouve ainsi sous forme d'un dipôle, ou zwitterion). C'est un **ampholyte**.

2. Formes ionisées selon le pH du milieu

pH du milieu	Forme principale	Charge nette	Explication
pH acide ($\text{pH} < 2$)	Forme cationique ($-\text{NH}_3^+$ et $-\text{COOH}$)	+1	Les deux groupes sont protonés.
pH neutre (environ 6)	Forme zwitterionique ($-\text{NH}_3^+$ et $-\text{COO}^-$)	0	Le proton du COOH est perdu, mais l'amine reste protonée.
pH basique ($\text{pH} > 9$)	Forme anionique ($-\text{NH}_2$ et $-\text{COO}^-$)	-1	Les deux groupes sont déprotonés.

3. Le zwitterion (ou ion dipolaire)

- C'est la **forme neutre électriquement** de l'acide aminé (charge totale = 0).
- Le groupe $-\text{NH}_3^+$ (positif) compense la charge négative du groupe $-\text{COO}^-$.
- Cette forme est **la plus stable en solution aqueuse** (à pH physiologique $\approx 7,4$).

- Les acides aminés à ce point ne migrent pas dans un champ électrique.

4. Le point isoélectrique (pI)

a. Courbe de titration des α -aminoacides

Les α -aminoacides possèdent au minimum **deux groupements ionisables** :

- un **groupement carboxyle** ($-\text{COOH}$), acide, et
- un **groupement amine** ($-\text{NH}_3^+$), basique.

Certains acides aminés possèdent en plus **un troisième groupement ionisable** dans leur **chaîne latérale (R)**, comme c'est le cas pour l'acide glutamique, la lysine ou l'histidine.

Chaque groupement ionisable est caractérisé par une **valeur de pKa**, qui correspond au **pH auquel il est à moitié dissocié** (autrement dit, quand la moitié du groupement est ionisée).

Ces groupements ionisables réagissent selon le **pH du milieu**, ce qui influence la **charge globale** de l'acide aminé.

b. Principe de la titration

La **titration** (ou titrage) consiste à ajouter progressivement une **base forte** (comme NaOH) ou un **acide fort** à une solution contenant un acide aminé.

On mesure ensuite le **pH en fonction de la quantité de base (ou d'acide)** ajoutée.

Cela permet d'obtenir la **courbe de titration**, à partir de laquelle on peut déterminer :

1. **Les valeurs de pKa** de chaque groupement ionisable.
2. **Les zones tampons** : ce sont les régions du graphe où le pH varie peu malgré l'ajout d'acide ou de base.

Le pH dans cette zone peut être calculé avec l'**équation de Henderson-Hasselbalch** :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{acid}]}$$

3. **La charge globale nette** de l'acide aminé selon le pH.

Exemple : titration de la glycine

Prenons l'exemple de la **glycine**, l'acide aminé le plus simple :

- **À pH très bas (acide) :**

Tous les groupements sont protonés.

La glycine a une **charge globale de +1**.

- **À $\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}1} = 2,34$:**

Le groupement **carboxyle** ($-\text{COOH}$) perd un proton \rightarrow ($-\text{COO}^-$).

La glycine a une **charge moyenne de $+1/2$** .

- **Au point isoélectrique ($\text{pH}_i \approx 5,97$) :**

Le groupement carboxyle est totalement dissocié, tandis que le groupement amine est encore protoné.

La glycine est alors **sous forme zwitterionique ($\text{NH}_3^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$)**, avec une **charge nette nulle**.

- **À $\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}2} = 9,60$:**

Le groupement **amine** ($-\text{NH}_3^+$) commence à se déprotoner \rightarrow ($-\text{NH}_2$).

La glycine a une **charge moyenne de $-1/2$** .

- **À pH élevé (basique) :**

Tous les groupements sont déprotonés.

La glycine a une **charge nette de -1**.

Exemple 1 : Courbe de titrage de la glycine (Figure 9).

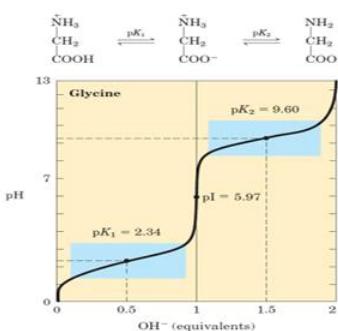


Figure 9 : La courbe de titrage de la glycine.
(D'après Nelson, D.L., and Cox, M.M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, 2017.)

Remarques générales

- Chaque acide aminé possède sa **propre courbe de titration**, dépendant du nombre et de la nature de ses groupements ionisables.
- Pour les acides aminés comme **le glutamate ou l'histidine**, la courbe présente **trois plateaux de dissociation**, correspondant à leurs trois pKa.
- Le **point isoélectrique (pHi)** est le **pH auquel la molécule est électriquement neutre** (charge globale nulle).

Il joue un rôle fondamental dans la **migration des protéines** lors de l'**électrophorèse**.

5. Importance biologique

- Le comportement acido-basique influence la **solubilité**, la **structure**, et la **réactivité** des protéines.
- C'est aussi la base du **principe de séparation électrophorétique** (migration selon la charge au pH donné).

Définition et rôle des protéines

Définition

Les **protéines** sont des **macromolécules biologiques** formées par la **polymérisation d'acides aminés** reliés entre eux par des **liaisons peptidiques**.

Elles sont les **molécules les plus abondantes et les plus fonctionnelles** dans les cellules vivantes.

Chaque protéine possède une **structure tridimensionnelle spécifique** qui détermine sa **fonction biologique**.

Les protéines peuvent être constituées :

- d'une **seule chaîne polypeptidique** (protéines simples)
- ou de **plusieurs chaînes associées** (protéines complexes).

Elles représentent environ **50 à 80 % du poids sec des cellules**, ce qui illustre leur importance vitale.

Composition

Les protéines sont constituées de **20 acides aminés standards** qui diffèrent par la nature de leur **chaîne latérale (R)**.

Ces chaînes latérales influencent :

- la **forme tridimensionnelle** de la protéine,
- sa **solubilité**,
- et sa **réactivité chimique**.

Rôles biologiques des protéines

1. Rôle structural :

- Les protéines assurent la **structure mécanique** et la **résistance** des tissus biologiques.
- Exemples :
 - **Collagène** : donne la rigidité et la force aux tendons, os, et cartilage.
 - **Kératine** : composant principal des cheveux, ongles et peau.

2. Rôle enzymatique :

- Les **enzymes** sont des protéines qui **accélèrent les réactions chimiques** dans les cellules.
- Exemple : **amylase, ADN polymérase, pepsine**.

3. Rôle de transport :

- Certaines protéines transportent des substances vitales :
 - **Hémoglobine** transporte l'oxygène dans le sang.
 - **Albumine** transporte les acides gras et hormones.

4. Rôle de défense :

- Les **anticorps (immunoglobulines)** sont des protéines qui reconnaissent et neutralisent les agents pathogènes.

5. Rôle hormonal et de régulation :

- Certaines protéines agissent comme **hormones** ou **régulateurs métaboliques**.
- Exemple : **insuline** (régulation du glucose).

6. Rôle contractile et moteur :

- Les protéines comme **l'actine** et **la myosine** permettent la **contraction musculaire**.

7. Rôle de réserve :

- Certaines protéines servent de **réserve d'acides aminés** (ex. : **ovalbumine** dans l'œuf).

En résumé

Les protéines jouent un rôle **essentiel et polyvalent** : elles assurent la **structure**, la **catalyse**, la **communication**, le **transport**, et la **protection** dans tous les organismes vivants.

Leur **structure détermine leur fonction**, d'où l'importance de comprendre leurs **différents niveaux d'organisation** (primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire).

Liaison peptidique : définition et caractéristiques

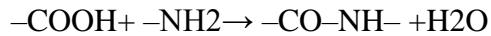
1. Formation (réaction de condensation)

La **liaison peptidique** est une **liaison covalente** qui unit deux acides aminés entre eux pour former un **dipeptide**.

Elle se forme par une **réaction de condensation** (ou déshydratation) entre :

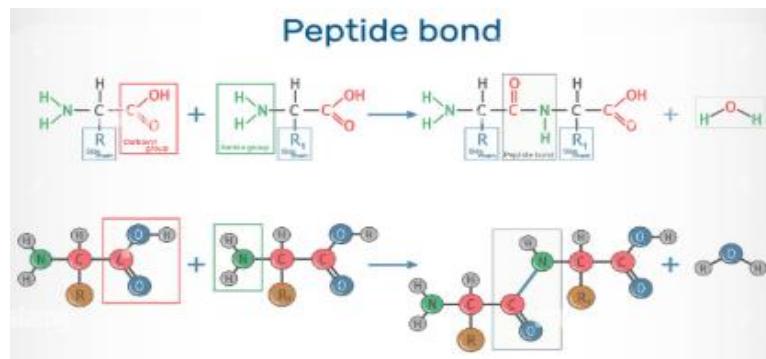
- le **groupement carboxyle** (**-COOH**) du premier acide aminé, et
- le **groupement amine** (**-NH₂**) du second.

Au cours de cette réaction, une **molécule d'eau (H₂O)** est éliminée :



Cette liaison **-CO-NH-** est appelée **liaison peptidique**, et le produit obtenu est un **dipeptide**.

La réaction peut se poursuivre pour former des **polypeptides** ou des **protéines**.



2. Structure et propriétés de la liaison peptidique

- La liaison peptidique a un **caractère partiellement double**, car les électrons du doublet libre de l'azote peuvent se délocaliser vers le groupement carbonyle.
→ Cela donne un **plan rigide** au niveau de la liaison.
→ Les atomes **C, O, N et H** impliqués se trouvent dans le **même plan**.
- Cette **rigidité** empêche toute rotation libre autour de la liaison C–N.
Cependant, il existe une **rotation possible** autour des liaisons adjacentes **C α –N** et **C α –C**, ce qui permet à la chaîne polypeptidique de se replier et de former des structures secondaires (hélice α , feuillet β).
- La **liaison peptidique** est donc **stable**, **plane**, et **polarisée** (car le groupement carbonyle est légèrement négatif et le groupement amine légèrement positif).

3. Représentation

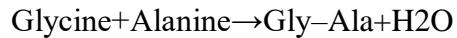
Une **chaîne polypeptidique** possède deux extrémités :

- une extrémité **N-terminale** (**-NH₂**) libre,
- une extrémité **C-terminale** (**-COOH**) libre.

La séquence d'un peptide s'écrit toujours **de l'extrémité N vers l'extrémité C**

4. Exemple

Exemple : formation d'un **dipeptide Gly-Ala**



Les propriétés électriques des peptides

Elles dépendent de la présence de groupements ionisables situés sur les extrémités ($-\text{NH}_3^+$ et $-\text{COO}^-$) et sur certaines chaînes latérales d'acides aminés.

Comme les acides aminés libres, les peptides peuvent donc **porter une charge globale positive, négative ou nulle, selon le pH du milieu.**

- À un **pH acide**, le peptide est **globalement positif** (protonation des groupes fonctionnels).
- À un **pH basique**, il devient **négatif** (déprotonation).
- À un **pH particulier appelé pH isoélectrique (pHi)**, la somme des charges positives et négatives est **égale à zéro**, et le peptide **ne migre plus dans un champ électrique**.

Cette propriété est très utile pour la **séparation des peptides et des protéines**, notamment par **électrophorèse**, où la migration dépend de la charge électrique nette.

Les protéines, une fois synthétisées, ne sont pas de simples chaînes linéaires d'acides aminés. Elles se replient et s'organisent dans l'espace pour adopter une **structure tridimensionnelle stable et fonctionnelle**, appelée **structure native**.

Cette organisation se déroule selon **quatre niveaux hiérarchiques** :

- **La structure primaire** : la séquence linéaire des acides aminés.
- **La structure secondaire** : les premiers replis locaux (hélices α , feuillets β).
- **La structure tertiaire** : le repliement global de la chaîne polypeptidique.
- **La structure quaternaire** : l'association de plusieurs sous-unités protéiques.

Chaque niveau d'organisation joue un rôle essentiel dans la **fonction biologique** de la protéine. Toute altération de cette structure peut entraîner une **perte d'activité** ou une **dénaturation**.

Structure des protéines

Structure primaire

La **structure primaire** correspond à la **séquence linéaire d'acides aminés** dans une protéine, reliés entre eux par des **liaisons peptidiques**.

Cette séquence est **unique pour chaque protéine** et détermine **toutes les structures supérieures** (secondaire, tertiaire et quaternaire).

Liaison peptidique :

- C'est une **liaison covalente** entre le **groupe carboxyle** (-COOH) d'un acide aminé et le **groupe amine** (-NH₂) du suivant.
 - Elle se forme par **condensation** (libération d'une molécule d'eau).
 - La liaison peptidique est **plane et rigide** à cause du caractère partiellement double de la liaison C–N, ce qui limite la rotation.
- ✓ **Rôle :** La structure primaire détermine la **forme tridimensionnelle finale** et donc la **fonction biologique** de la protéine.

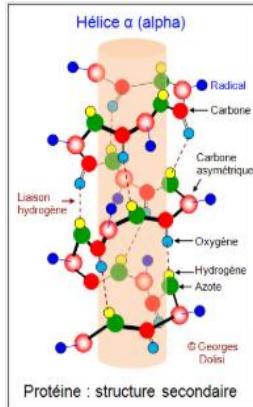
Structure secondaire

La **structure secondaire** résulte de l'organisation spatiale locale de la chaîne polypeptidique grâce à des **liaisons hydrogène** entre les groupements –CO et –NH du squelette.

Elle comprend principalement deux motifs réguliers :

► Hélice α (alpha-helix)

- C'est une **structure hélicoïdale droite** (comme un ressort).
 - Stabilisée par des **liaisons hydrogène intrachâîne** : chaque –CO d'un acide aminé forme une liaison H avec le –NH du 4^e acide aminé suivant.
 - Les **chaînes latérales R** sont orientées vers **l'extérieur** de l'hélice.
- ✓ Très fréquente dans les protéines globulaires (ex. myoglobine).



➤ Le feuillet plissé β

Le **feuillet plissé β** correspond à une organisation en **zigzag** de la chaîne polypeptidique. Cette structure est **stabilisée par des liaisons hydrogènes** formées entre les atomes des **liaisons peptidiques** de deux segments polypeptidiques voisins appelés **brins β** . Ces brins peuvent être **parallèles** (tous orientés dans la même direction) ou **antiparallèles** (orientés en sens opposé). Les **chaînes latérales** des acides aminés s’alternent de part et d’autre du plan du feuillet, ce qui donne à la structure un aspect **plissé**. Ce type de structure est très stable et fréquemment rencontré dans de nombreuses protéines fibreuses et globulaires.

4.2.3. Le coude β (ou β -turn)

Le **coude β** est une courte portion de la chaîne polypeptidique qui permet un **changement de direction brusque** de la chaîne.

Il relie souvent deux brins β adjacents dans un feuillet plissé.

Le coude β comprend **quatre résidus d’acides aminés** ; parmi eux, **la glycine** (petite et flexible) et **la proline** (rigide et favorisant la courbure) sont très fréquentes.

Ce type de structure est très courant dans les protéines globulaires, car il permet un **repliement compact** de la molécule.

4.3. Structure tertiaire

La **structure tertiaire** correspond à la **conformation tridimensionnelle complète** d'une chaîne polypeptidique.

Elle résulte du **repliement** de la structure secondaire (hélices α , feuillets β et coudes β) en une forme **globulaire compacte**.

La stabilité de cette structure repose sur différentes **interactions entre les chaînes latérales (R)** des acides aminés :

- **Liaisons hydrogène** entre groupements polaires,
- **Interactions ioniques** entre acides aminés chargés,
- **Interactions hydrophobes** entre résidus non polaires,
- **Forces de Van der Waals**,
- Et parfois, **liaisons covalentes** (comme les **ponts disulfures** entre cystéines).

Cette structure détermine les **propriétés fonctionnelles** et la **spécificité biologique** de la protéine.

4.4. Structure quaternaire

Certaines protéines sont constituées non pas d'une seule, mais de **plusieurs chaînes polypeptidiques** appelées **sous-unités**.

Ces sous-unités s'associent entre elles par des **liaisons non covalentes** (et parfois covalentes) pour former une **structure quaternaire**.

Chaque sous-unité conserve sa propre structure tertiaire, mais l'ensemble forme une **protéine fonctionnelle** unique.

L'exemple typique est l'**hémoglobine**, composée de **quatre sous-unités** associées

Classification des protéines (après les propriétés physico-chimiques)

1. Selon la composition chimique

Protéines simples (holoprotéines) → Constituées **uniquement d'acides aminés**.

Elles donnent uniquement des **acides aminés** lors de l'hydrolyse. **Exemples :**

- **Albumines** (solubles dans l'eau, coagulent à la chaleur)

- **Globulines** (insolubles dans l'eau, solubles dans les solutions salines)
- **Kératines, collagène, fibroïne** (protéines fibreuses insolubles)

Protéines conjuguées (hétéroprotéines) → Composées d'une **partie protéique (apoprotéine)** et d'une **partie non protéique (groupe prosthétique)**.

Type	Groupe prosthétique	Exemple	Fonction
Glycoprotéine	Glucide	Immunoglobulines	Reconnaissance cellulaire
Lipoprotéine	Lipide	HDL, LDL	Transport des lipides
Chromoprotéine	Pigment	Hémoglobine	Transport d'O ₂
Métalloprotéine	Ion métallique	Ferritine	Stockage de fer
Phosphoprotéine	Groupement phosphate	Caséine du lait	Nutrition

2. Selon la forme

1. **Fibreuses** : structure allongée, insolubles, rôle structural
(kératine, collagène, élastine)

Molécules **allongées ou filamenteuses**, peu solubles, à rôle **structurel**.

Elles présentent souvent une **structure secondaire répétitive** (hélices α , feuillets β).

Exemples :

- **Kératine** (cheveux, ongles)
 - **Collagène** (tissus conjonctifs)
 - **Élastine** (parois artérielles)
2. **Globulaires** : structure compacte, solubles, rôle fonctionnel
(enzymes, hormones, anticorps)

Molécules **sphériques ou compactes, solubles dans l'eau ou les solutions salines**.

Elles assurent des fonctions **dynamiques et métaboliques**.

Exemples :

- **Enzymes**
- **Anticorps**
- **Hormones protéiques** (insuline)
- **Hémoglobine**

3. Selon la fonction biologique

Type de protéine	Fonction principale	Exemples
Enzymes	Catalyse biochimique	Amylase, pepsine
Structurales	Soutien, résistance	Collagène, kératine
Transport	Transport de molécules	Hémoglobine, albumine
Hormones	Régulation métabolique	Insuline, glucagon
Défense	Immunité	Anticorps
Motrices	Mouvement	Actine, myosine
Réserve	Stockage	Caséine, ferritine

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES

1. Solubilité des protéines

Définition :

La solubilité est la capacité d'une protéine à se dissoudre dans un solvant aqueux.

a. Facteurs influençant la solubilité :

- **pH :**
 - Chaque protéine possède un **point isoélectrique (pI)** où sa charge nette est nulle → **solubilité minimale**.
 - En milieu acide ($pH < pI$) → protéines chargées positivement.
 - En milieu basique ($pH > pI$) → protéines chargées négativement.
- **Force ionique (effet du sel) :**
 - À faible concentration de sel → **salting-in** : améliore la solubilité (ions interagissent avec les charges des protéines).
 - À forte concentration → **salting-out** : précipitation (compétition entre les sels et les protéines pour l'eau).
- **Température :**
 - Une chaleur excessive peut provoquer la dénaturation → perte de solubilité.
- **Nature du solvant :**

- Solvants organiques, urée, ou détergents peuvent perturber les interactions hydrophobes → diminution de la solubilité.

Type de solvant / agent	Effet sur les interactions hydrophobes	Conséquence sur la solubilité
Eau (polaire)	Stabilise les interactions hydrophobes internes	Bonne solubilité
Solvant organique (éthanol, acétone...)	Perturbe les interactions hydrophobes et la couche d'hydratation	Diminution → précipitation
Urée (forte concentration)	Casse les liaisons H et dénature la protéine	Diminution de la solubilité native
Détergents	Perturbent ou stabilisent les zones hydrophobes	Variable : solubilisation ou précipitation selon le cas

b. Application expérimentale :

- **Précipitation au sulfate d'ammonium** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pour fractionner les protéines selon leur solubilité.

3. Comportement électrophorétique des protéines

Principe :

L'électrophorèse permet la migration des protéines dans un champ électrique selon leur **charge, taille et forme**.

a. Électrophorèse native :

- La protéine conserve sa structure native.
- La migration dépend de la **charge nette** (fonction du pH par rapport au pI).

b. Électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) :

- Utilise le **Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)** → dénature la protéine et lui confère une charge négative uniforme.
- La migration dépend uniquement de la **taille (poids moléculaire)**.
- Permet d'estimer la masse moléculaire et de vérifier la pureté.

c. Autres techniques :

- **Électrophorèse bidimensionnelle** : séparation selon le pI puis selon la masse.

- **Isoélectrofocalisation** : migration des protéines jusqu'à leur pI dans un gradient de pH.

3. Dénaturation des protéines

Définition :

Perte de la structure tridimensionnelle (tertiaire et secondaire) **sans rupture des liaisons peptidiques**.

a. Agents dénaturants :

- **Physiques :**
 - Chaleur (ex : cuisson de l'œuf → albumine précipite)
 - Rayonnement UV
- **Chimiques :**
 - pH extrêmes
 - Solvants organiques
 - Urée, guanidine
 - Détergents (SDS)
 - Agents oxydants/réducteurs (β -mercaptoéthanol casse les ponts disulfures)

b. Conséquences :

- Perte d'activité biologique.
- Précipitation (perte de solubilité).
- Modification du comportement électrophorétique.
- Parfois réversible (renaturation possible si conditions douces).

II. SÉPARATION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

1. Objectif

Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un mélange complexe (cellule, tissu, plasma...) en conservant son activité.

2. Méthodes de séparation selon les propriétés

a. Selon la solubilité

- **Précipitation fractionnée** : (ex : au sulfate d'ammonium)
- Permet une purification grossière.

b. Selon la charge électrique

- **Électrophorèse** : qualitative, analytique.
- **Chromatographie d'échange d'ions** :
 - Utilise une colonne contenant des résines chargées (cationiques ou anioniques).

- Les protéines se fixent selon leur charge (pH par rapport au pI).

c. Selon la taille

- **Chromatographie de filtration sur gel (exclusion stérique) :**
 - Les grandes molécules sortent en premier (ne pénètrent pas les pores du gel).
 - Petites molécules pénètrent dans les pores → sortent plus tard.

d. Selon l'affinité spécifique

- **Chromatographie d'affinité :**
 - Basée sur la reconnaissance spécifique ligand-protéine (enzyme-substrat, anticorps-antigène).
 - Très sélective → permet une purification très efficace.

e. Selon la densité

- **Ultracentrifugation différentielle ou isopycnique :**
 - Séparation selon la taille et la densité dans un gradient (ex : sucrose).

3. Étapes typiques d'une purification

1. Extraction (lyse cellulaire, centrifugation).
2. Précipitation (ex : au sel).
3. Chromatographie (échange d'ions, filtration, affinité).
4. Vérification de la pureté (SDS-PAGE).
5. Dosage protéique (méthode de Lowry, Bradford ou Biuret).

Préparation de l'extrait brut (extraction) (Etape 1 de purification)

But :

Libérer les protéines du matériel biologique (cellules, tissus, bactéries, etc.) tout en préservant leur activité.

Étapes :

1. **Lyse cellulaire :**
 - Briser les membranes pour libérer le contenu cellulaire.
 - Méthodes :
 - **Mécaniques** : broyage, sonication, homogénéisation, pression French.
 - **Chimiques** : détergents doux (Triton X-100, SDS...).
 - **Enzymatiques** : lysozyme, protéases spécifiques.
2. **Tampon d'extraction :**
 - Maintient le **pH optimal**, la **force ionique**, et empêche la dénaturation.
 - Souvent contient :

- un **tampon** (Tris, phosphate...),
- un **agent réducteur** (DTT, β -mercaptopropanol),
- des **inhibiteurs de protéases** (pour éviter la dégradation).

3. Centrifugation :

- Élimine les **débris cellulaires insolubles** (pellet).
- Le **supernatant** contient les **protéines solubles**.

Résultat : **extrait brut**, contenant toutes les protéines de la cellule.

III. CONCLUSION ET SYNTHÈSE

- Les protéines possèdent des propriétés physico-chimiques qui déterminent leur comportement en solution.
- Le pH, la température et les agents chimiques peuvent altérer leur structure (dénaturation).
- Ces propriétés sont exploitées pour **les séparer et les purifier**.
- La maîtrise de ces techniques est essentielle pour la recherche en biochimie, biotechnologie et médecine.

Séparation des protéines

- Plusieurs techniques sont utilisées selon les **propriétés physico-chimiques** :

Principe	Technique	Basée sur...	Exemple
Solubilité	Précipitation au sulfate d'ammonium	pI, hydrophobicité	Fractionnement des protéines
Charge	Électrophorèse, chromatographie ionique	pI, charge nette	Séparation d'enzymes
Taille	Chromatographie de gel filtration	Poids moléculaire	Séparation d'oligomères
Affinité	Chromatographie d'affinité	Interaction spécifique	Purification d'anticorps