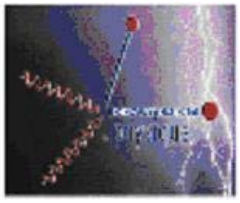
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ-FES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Support de cours de biochimie structurale

PROTEINES

Filière SVI : Module de Biochimie structurale

Semestre 3

Pr. Amale BENZEKRI

Année 2006/2007

Table des matières

I. Les acides aminés

I. 1. Définition

I. 2. Nomenclature et classification des acides aminés en fonction :

* de la structure de leur chaîne latérale

* de leur caractère acide, basique, neutre

* de leur importance nutritionnelle

II. Propriétés des acides aminés

II.1. Propriétés physiques

1.1. Solubilité

1.2. Pouvoir rotatoire

1.3. Projection de Fischer

II. 2. Propriétés physico-chimiques

2.1. Ionisation des acides aminés

2.2. Propriétés spectrales des acides aminés (absorption, fluorescence)

II. 3. Propriétés chimiques

3.1. Propriétés dues au groupement COOH

3.2. Propriétés dues au groupement NH_2

3.3. Propriétés dues au groupement COOH et NH_2

3.4. Propriétés dues aux chaînes latérales

II. 4. Dérivés à usage analytique

II. 5. Etude analytique des acides aminés

5.1. Séparation des acides aminés/ chromatographies et électrophorèses

5.2. Dosage des acides aminés (réaction à la ninhydrine)

III. Les peptides

III.1. Définition

III. 2. Détermination de la structure des peptides

III. 2. 1. Acides aminés N-terminaux

A. Hydrolyses chimiques : réactions de Sanger, Dansylation et Edman

B. Hydrolyses enzymatiques : aminopeptidases

III. 2. 2. Acides aminés C terminaux

A. Hydrolyses chimiques

B. Hydrolyses enzymatiques : carboxypeptidases

III. 2. 3. Acides aminés intra peptidiques

A. Méthodes chimiques : bromure de cyanogène, acide performique, β-mercaptoéthanol, dithiothreitol

A. Méthodes enzymatiques : peptidases (chymotrypsine, trypsine, thermolysine, pepsine)

III. 3. Rôles biologiques de certains peptides

IV. Les protéines

IV. 1. Définition

IV. 2. Structures (primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire)

IV. 3. Classification

IV. 4. Rôles biologiques

IV. 5. Techniques analytiques des protéines

IV. 5. 1. Purification

a. Chromatographie échangeuse d'ions
b. Chromatographie sur gel d'hydroxyapatite
c. Filtration sur gel
d. Chromatographie d'affinité
e. Chromatographie en phase inversée
f. CLHP (chromatographie liquide haute performance)
g. Electrophorèse sur support solide
h. Focalisation isoélectrique
i. Ultracentrifugation

IV. 5. 2. Identification

IV. 5. 3. Dosages

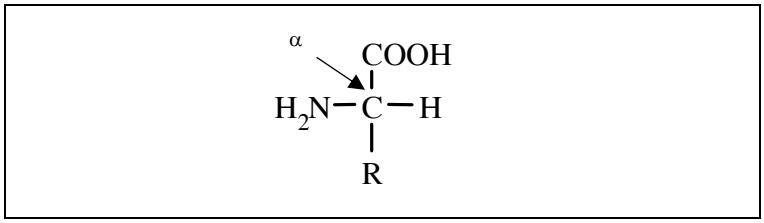
I. Les acides aminés

I. 1. Définition

Les acides aminés (aa) sont les éléments constitutifs des protéines.

Le plus souvent ce sont des acides α-aminés (aminoacides), c'est à dire que la fonction amine primaire ($-NH_2$) est portée par le carbone α (carbone voisin le plus proche portant la fonction acide carboxylique (-COOH). Autrement dit, le COOH et le NH_2 sont portés par le même carbone. Ce carbone porte en plus, un radical R qui différencie les aa entre eux, il est asymétrique c'est-à-dire porteur de 4 groupements chimiques différents sauf pour la glycine (R=H). Les aa des protéines appartiennent tous à la série L.

Il existe plus de 300 aa à l'état naturel, le premier acide α-aminé a été découvert en 1806 : l'Asparagine et le dernier des 20 aa standards en 1938 : la Thréonine. Ces 20 aa participent à la synthèse des protéines de l'organisme vivant. Ils sont également les précurseurs des glucides, de certaines hormones et parfois des lipides.



Les aa différent les uns des autres par leur chaîne latérale R qui varie par :

- leur structure
- leur taille
- leur charge électrique
- leur solubilité dans l'eau.

I. 2. Nomenclature et classification des acides aminés en fonction

Pour la nomenclature (tableau 1) : les 3 premières lettres du nom de chaque aa servent à le designer, exemple Ala : alanine ; Gly : glycine…

Tableau 1 : Acides aminés intervenant dans la synthèse protéique

Aminoacides	Abréviations à 3 lettres	Symbolisation par une lettre	Poids moléculaire	pH isoélectrique
Alanine	Ala	A	89	6.02
Arginine	Arg	R	174	10.80
Asparagine	Asn	N	132	5.41
Acide aspartique	Asp	D	133	3.00
Cystéine	Cys	C	121	5.02
Glutamine	Gln	Q	146	5.65
Acide glutamique	Glu	E	147	3.20
Glycocolle (Glycine)	Gly	G	75	5.97
Histidine	His	H	154	7.59
Isoleucine	Ile	I	131	6.02
Leucine	Leu	L	131	5.98
Lysine	Lys	K	146	9.80
Méthionine	Met	M	149	5.75
Phénylalanine	Phe	F	165	5.48
Proline	Pro	P	115	6.30
Sérine	Ser	S	105	5.68
Thréonine	Thr	T	119	6.53
Tryptophane	Trp	W	204	5.88
Tyrosine	Tyr	Y	181	5.65
Valine	Val	V	117	5.97

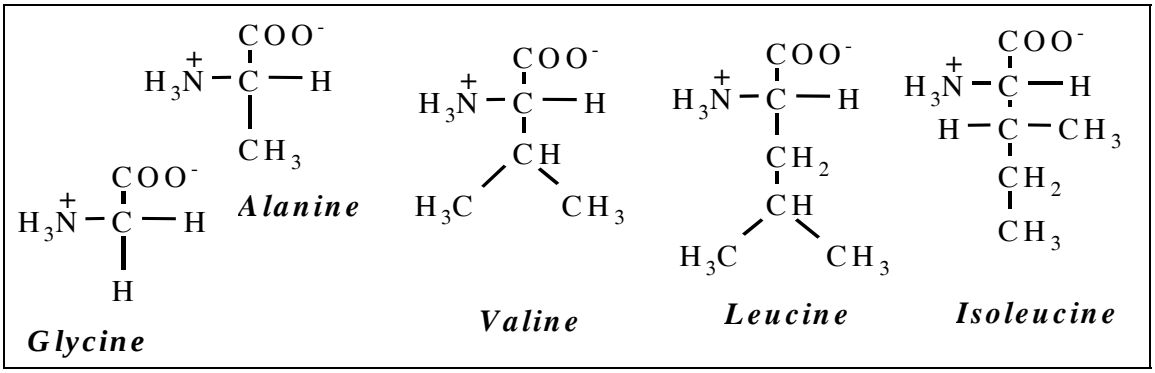
On les désigne par des abréviations de trois lettres et des symboles à une lettre.

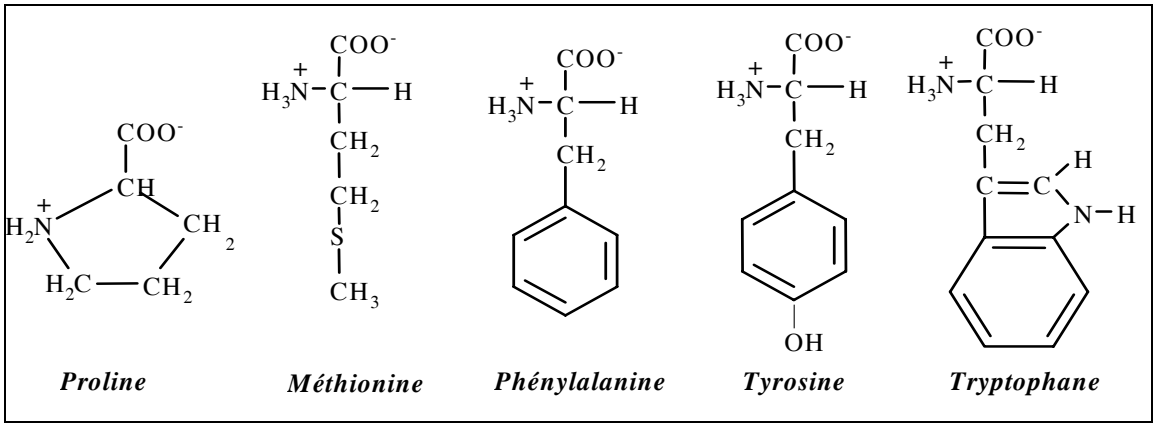
Plusieurs classifications des aa sont possibles en fonction :

de la structure de leur chaîne latérale :

1. Acides aminés à chaînes latérales non polaires (hydrophobes) :

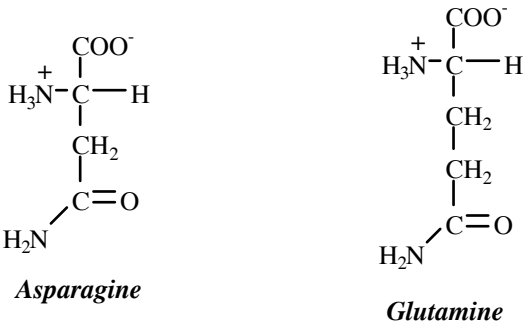
A pH = 7, la fonction carboxylique (-COOH) et la fonction amine ($-NH_2$) sont ionisées.

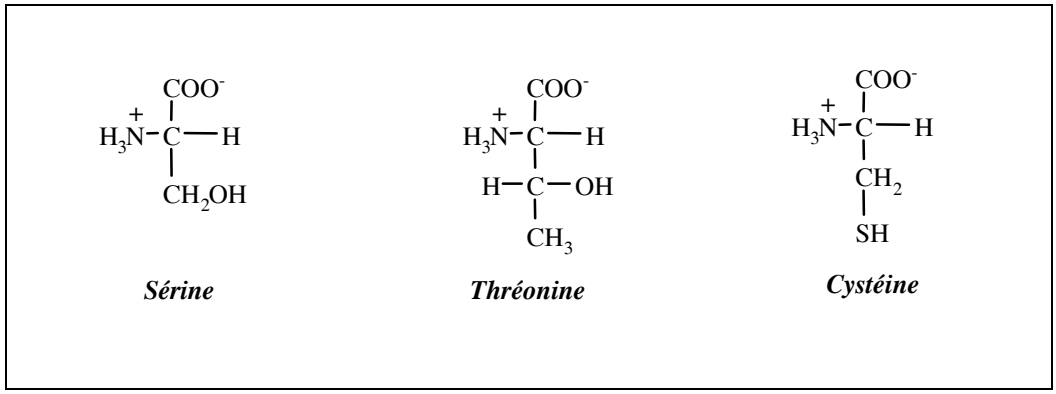




Remarque : les aa tels que la phénylalanine, tyrosine et tryptophane ont une chaîne latérale hydrophobe et aromatique. La tyrosine est à chaîne latérale aromatique et hydroxylée. La méthionine se caractérise par un soufre dans son radical.

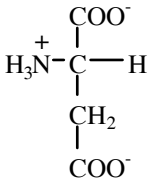
2. Acides aminés à chaînes latérales polaires non chargées à pH=7



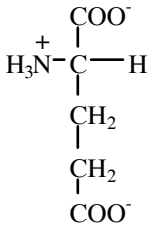


Remarque : Sérine et thréonine ont une chaîne latérale hydroxylée. La cystéine se caractérise par un soufre dans son radical.

3. Acides aminés à chaînes latérales chargées négativement à pH=7

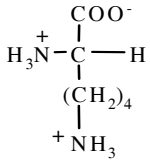


Acide aspartique

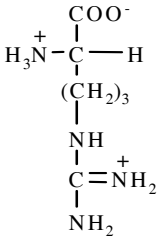


Acide glutamique

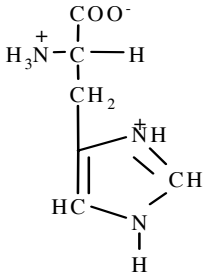
4. Acides aminés à chaînes latérales chargées positivement à pH=7



Lysine



Arginine



Histidine

Remarque : l'histidine possède un radical imidazole.

La différence de solubilité entre les acides aminés est utilisée à des fins analytiques pour les séparer en chromatographie sur couche mince ou sur colonne. Cette solubilité dépend de plus du pH du milieu et de la concentration des ions présents.

de leur caractère acide, basique, neutre

- aa acides : ac aspartique, ac glutamique, proline
- aa neutres : alanine, asparagine, cystéine, glutamine, glycine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, serine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine.
- aa basiques : arginine, histidine, lysine, ornithine.

de leur importance nutritionnelle

Les aa apportés par l'alimentation sont classés en 3 groupes : essentiels, semi-essentiels, non essentiels.

Un aa est dit <u>essentiel</u> lorsque l'organisme est incapable de le synthétiser, il doit donc être apporté par l'alimentation. C'est le cas de l'histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine.

Deux aa sont <u>semi essentiels</u> la cystéine et la tyrosine. Ils sont dis semi essentiels car l'organisme est capable de synthétiser la cystéine à partir de la méthionine et la tyrosine à partir de la phénylalanine, mais leur présence dans l'alimentation réduit le besoin en aa essentiels.

Les aa non essentiels sont au nombre de 11, l'organisme est capable de les synthétiser. C'est le cas de l'alanine, arginine, ac.aspartique, asparagine, ac.glutamique, glutamine, citrulline, glycine, ornithine, proline et serine.

II. Propriétés des acides aminés

II.1. Propriétés physiques

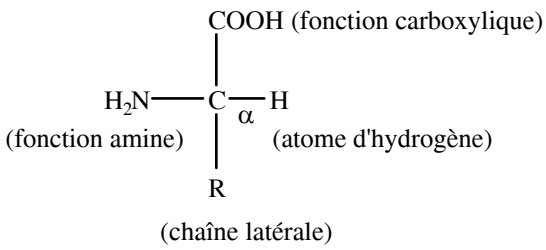
1.1. Solubilité

Les aa sont des solides blancs cristallisés qui se décomposent avant de fondre.

La différence de solubilité entre les acides aminés est utilisée à des fins analytiques pour les séparer en chromatographie sur couche mince ou sur colonne. Cette solubilité dépend de plus du pH du milieu et de la concentration des ions présents.

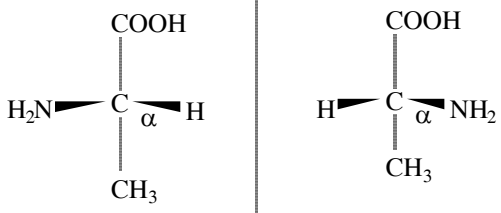
1. 2. Pouvoir rotatoire

A l'exception du glycocolle (glycine), tous les acides aminés ont une activité optique, c'est à dire qu'ils peuvent faire tourner le plan de la lumière polarisée dans une direction ou dans une autre car ils ont un carbone asymétrique. En effet, le carbone α est un centre chiral.



Comme tout composé contenant un centre chiral, les acides aminés existent sous 2 formes isomériques différentes qui sont identiques par les propriétés physiques et chimiques sauf une : la direction dans laquelle ils peuvent faire tourner le plan de la lumière polarisée dans un polarimètre. En raison de la disposition tétraédrique des liaisons de valence autour de l'atome de carbone α, les quatre constituants peuvent avoir 2 dispositions dans l'espace, qui sont images l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables. Ces 2 formes sont appelées isomères optiques, énantiomères ou stéréoisomères (voir support de cours de chimie organique S2 SVI).

1.3. Projection de Fischer



L-Alanine ***D-Alanine***

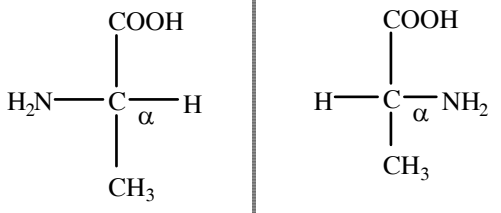
Formules en perspective

<u>Convention de Fischer</u>:

A partir de cette représentation, nous pouvons établir la représentation simplifiée dite de Fischer selon les conventions suivantes :

- Les liaisons horizontales représentent ce qui est en avant du plan et qui passe par le carbone asymétrique (► ◄)
- Les liaisons verticales représentent ce qui est en arrière du plan.
- Dans le cas des acides aminés le COOH doit être positionné en haut et le radical en bas.

<u>On obtient</u> :



L-Alanine ***D-Alanine***

A partir de là, on définit la configuration du carbone par la lettre D ou L, ainsi quand le NH_2 se projette à droite du carbone asymétrique, il s'agit de la D-Alanine, par contre si c'est à gauche c'est la L-Alanine.

Si une solution d'un stéréoisomère d'un acide aminé donné fait tourner le plan de la lumière polarisée vers la gauche (dans le sens inverse des aiguilles d'une montre) il est appelé <u>isomère lévogyre</u> (noté par (-)). L'autre isomère fera tourner le plan de la lumière polarisée vers la droite : <u>isomère dextrogyre</u> (+).

Un mélange équimolaire des formes (-) et (+) : <u>racémique ou racémate</u>, ne fera pas tourner le plan de la lumière polarisée.

A titre d'exemple voici le pouvoir rotatoire spécifique de certains acides aminés.

<u>Aminoacides</u> <u>Pouvoir rotatoire spécifique</u>

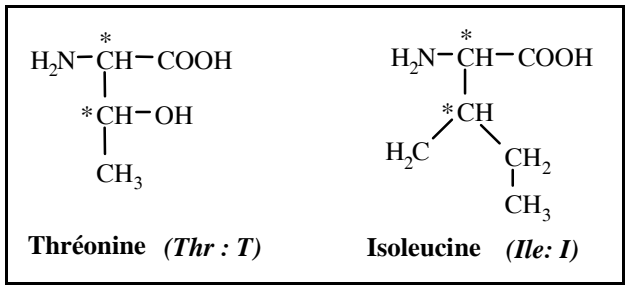
L-alanine	+1,8
L-arginine	+12,5
L-isoleucine	+12,4
L-phénylalanine	-34,5
L-acide glutamique	+12
L-histidine	-38,5
L-lysine	+13,5
L-sérine	-7,5
L-proline	-86,2
L-thréonine	-28,5

Tous les aa naturels ont la configuration L, certains sont lévogyres, d'autres dextrogyres.

Quand un acide aminé possède 2 ou plusieurs centres chiraux on a 2^n stéréoisoméres possibles.

Tous les acides aminés trouvés dans les protéines ont 1 seul centre chiral sauf :

- le glycocolle (glycine) qui n'en possède pas.
- la thréonine et l'isoleucine qui en possèdent 2.

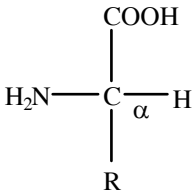


II. 2. Propriétés physico-chimiques

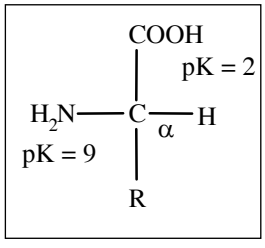
2.1/ Ionisation des acides aminés

En solution aqueuse, les aa sont ionisés et peuvent agir comme des acides ou des bases :

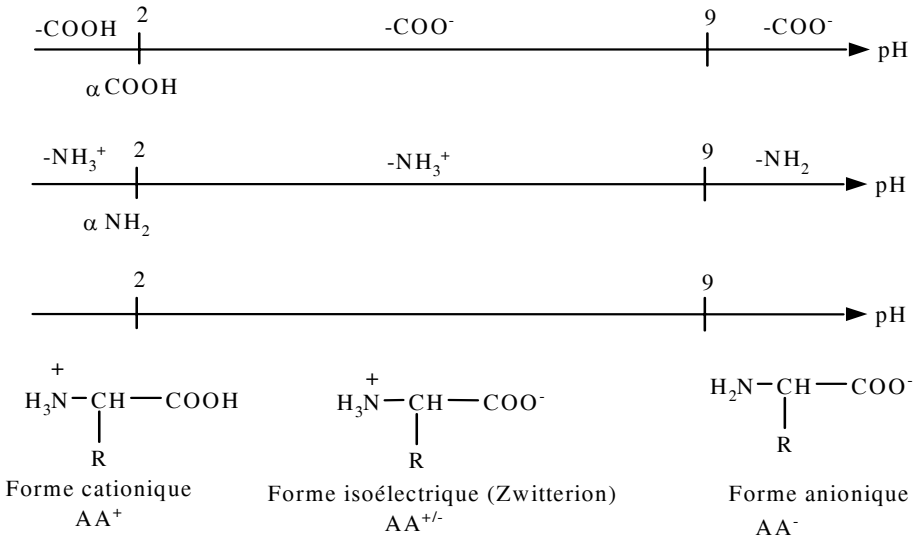
Forme non ionique (théorique n'existe pas dans la réalité)



En réalité les deux fonctions ionisables existent sous différentes formes ioniques en fonction du pH. Ces formes sont définies par les pKa de chacune des fonctions ionisables.

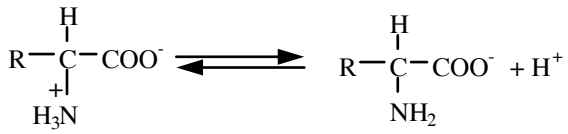


Si l'on étudie les formes des fonctions ionisables en fonction du pH, on obtient :

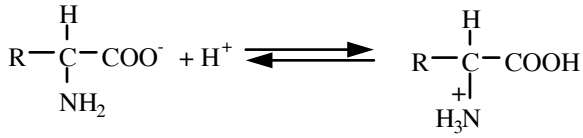


Quand un aa cristallisé est dissous dans l'eau, il se comporte comme un ion polaire qui peut :

- agir comme un acide (donneur de protons)

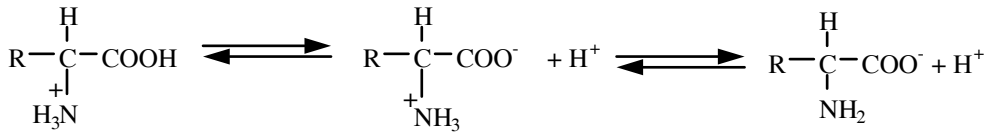


- comme une base (accepteur de protons)



Ces substances ayant cette double propriété sont **des amphotères** (amphi : les deux).

Un aminoacide α simple, comme l'alanine est un acide diprotique quand il est totalement protoné.

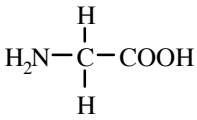


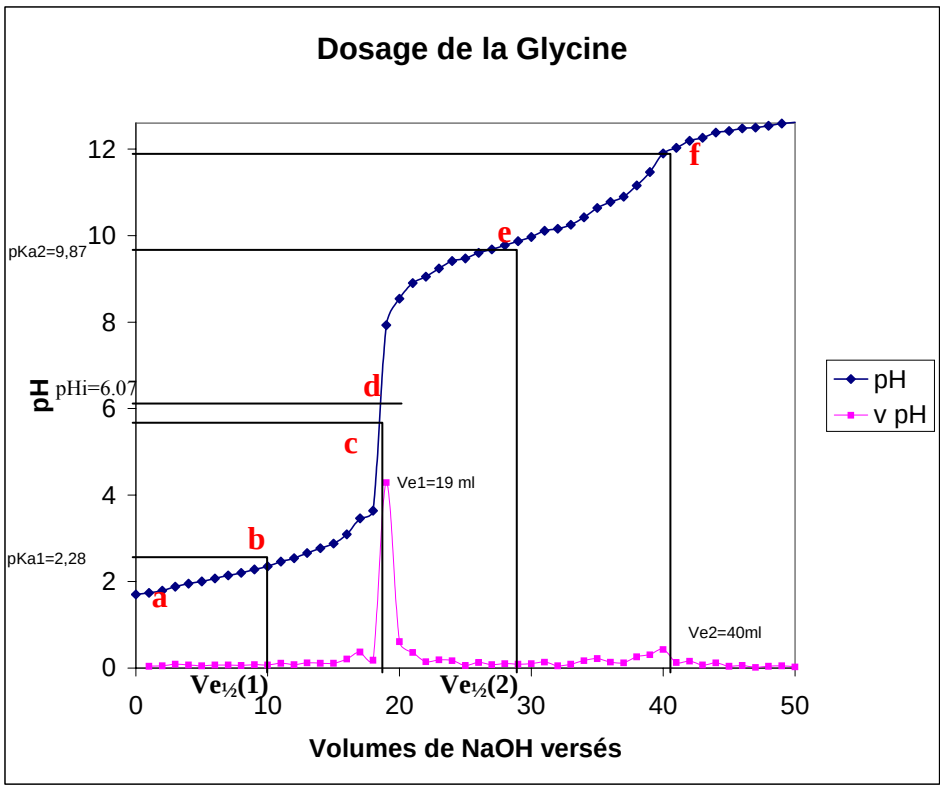
Sous cette forme, les 2 groupes peuvent s'ioniser.

Les aa ont des courbes de titration caractéristiques, ces courbes vont être caractéristiques du nombre de fonctions ionisables. En effet, la plupart des aa possèdent deux fonctions ionisables (aa simple ou diprotique) mais il existe des aa qui possèdent une fonction ionisable supplémentaire au niveau de leur radical (acide aminé triprotique).

CAS D'UN ACIDE AMINE SIMPLE

Exemple : Titration de la glycine 0,1 M





On distingue 2 segments particuliers, correspondant à la libération d'un proton.
Chaque étape ressemble dans sa forme à la courbe de titration d'un acide monoprotique comme l'acide acétique.

1ère étape :

- Au début (a) :

$^{+}NH_3$-CHR-COOH est l'espèce prédominante (forme totalement protonée)

- Au point médian de la 1ère titration (b) :

Au point médian, le COOH perd son proton et on a des concentrations équimolaires de $^{+}NH_3$-CHR-COOH et de $^{+}NH_3$-CHR-COO^{-}

En ce point le pH est égal au pKa du COOH de l'alanine, on se situe à la première ½ équivalence.

- Au point d'équivalence (c) :

Ce point est déterminé par la méthode des tangentes, il permet de déterminer le volume à la première équivalence Ve (1). A partir de ce volume, on détermine le point précèdent en déterminant le volume de la ½ équivalence définit comme étant $Ve_{1/2}(1)=Ve\ (1)/2$

- Au point (pH = 6,02) (d) :

COOH est totalement titré, l'ion dipolaire ou zwitterion est prédominant.

2éme étape :

- Au point médian de la 2ème titration (e) :

Au point médian obtenu, on a des concentrations équimolaires de $^{+}NH_3$-CHR-COO^{-} et de NH_2-CHR-COO^{-}

En ce point le pH est égal au pKa du NH_3^{+} de l'alanine, on se situe à la deuxième ½ équivalence.

- Au point d'équivalence (f) :

Ce point est déterminé par la méthode des tangentes, il permet de déterminer le volume à la deuxième équivalence Ve (2). A partir de ce volume, on détermine le point précèdent en déterminant le volume de la ½ équivalence définit comme étant $Ve_{1/2}(2)=[Ve\ (2)-Ve\ (1)]/2$

En conclusion :

De cette courbe de titration on peut tirer les informations suivantes :

- La courbe de titration donne une mesure quantitative des pKa des 2 groupements fonctionnels qui s'ionisent : COOH (pK_1=2,34) et NH_3^{+} (pk_2=9,69).

- Cet acide aminé possède 2 zones de pouvoir tampon :

- l'une est la partie relativement plate de la courbe centrée autour de pK_1=2,34
- l'autre est située entre pH = 8,7 et pH = 10,7.

Donc l'alanine n'est pas un bon tampon au pH des liquides intracellulaires ou du sang (pH = 7,4).

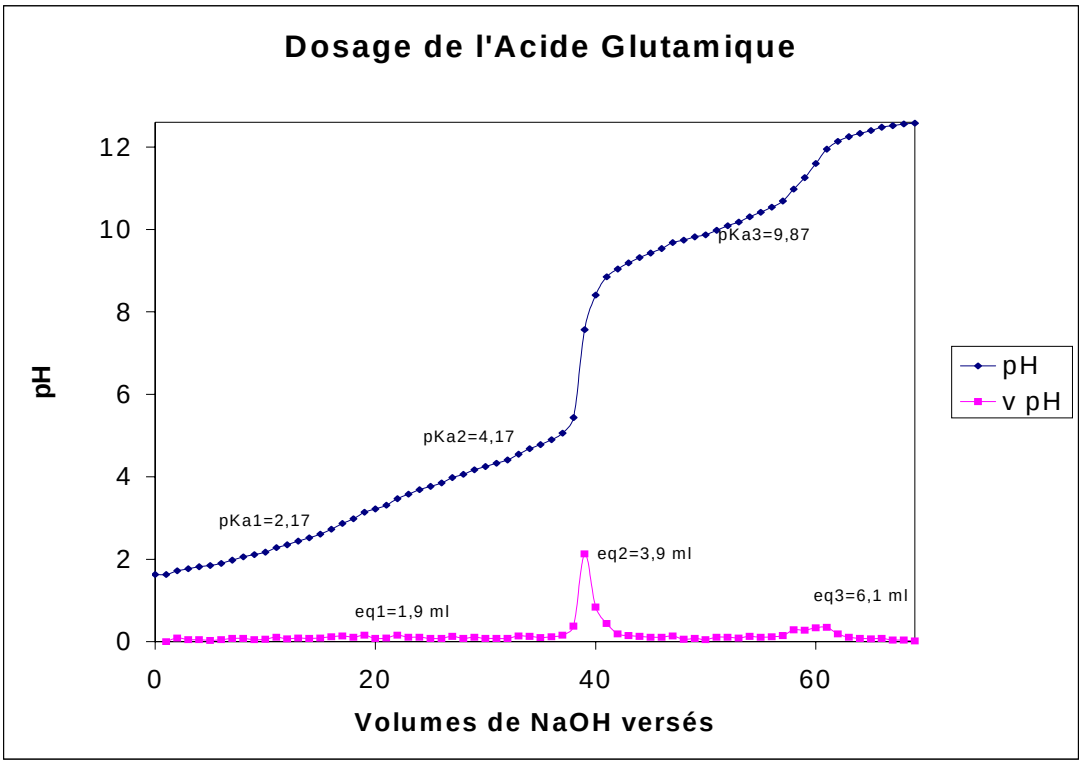
Rappels : Une solution tampon est une solution capable d'absorber une certaine quantité d'acide ou de base sans entraîner une forte variation de pH.
Une solution tampon est un mélange d'acide faible et de sa base conjuguée (acide faible en solution) ou de base faible et de son acide conjugué (base faible en solution). Il existe une large gamme de solutions tampon.

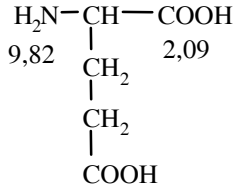
En résumé :

- **Si pH < pH_i,** l'alanine a une charge positive nette, c'est un **c**ation. Il migre vers l'électrode négative (**c**athode) dans un champ électrique.
- **à pH= 1** : on a la forme [NH_3^+-CHR-COOH] prédominante, charge positive nette = 1
- **à pH = 2,34** : [NH_3^+-CHR-COO^-] et [NH_3^+-CHR-COOH] sont en quantité équimolaire, charge électrique nette = 0,5.
- **A pH = pHi = 6,02** : on a la forme [NH_3^+-CHR-COO^-] prédominante, charge positive nette = 0
- **Si pH > pH_i,** l'alanine a une charge négative nette, c'est un **a**nion. Il migre vers l'électrode positive (**a**node) dans un champ électrique.
- **à pH = 8,7** : [NH_3^+-CHR-COO^-] et [NH_2-CHR-COO^-] en quantité équimolaire, charge électrique nette = - 0,5.
- **à pH = 12** : on a la forme [NH_2-CHR-COO^-] prédominante, charge positive nette= - 1

CAS D'UN ACIDE AMINE TRIPROTIQUE

Exemple : Titration de l'acide glutamique et de l'Histidine 0,1 M





Glu a 2 COOH et 1 NH_2. Le pH_i = 3,22 qui est la moyenne des pK' des 2 COOH
pK'_R : pK' de la chaîne latérale.

Une application sur le % des formes ioniques d'un aa à pH donné est réalisée en TD (équation d'Henderson Hasselbach)

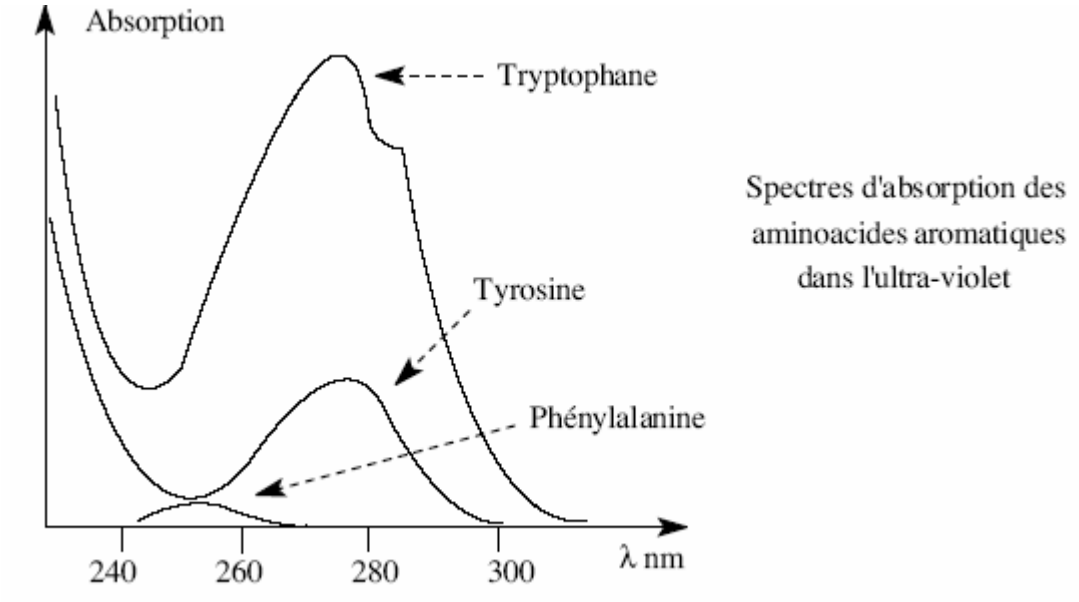
2.2/ Propriétés spectrales des acides aminés

a) Absorption

Alors qu'aucun des 20 aa trouvés dans les protéines n'absorbe la lumière dans le visible, trois aminoacides aromatiques (Trp, Tyr, Phe) absorbent fortement dans l'UV.

Le Trp pour son noyau indole (λ=280 nm) ; Tyr pour son noyau phénol (λ=275 nm) ; Phe pour son noyau phényle (λ=280 nm).

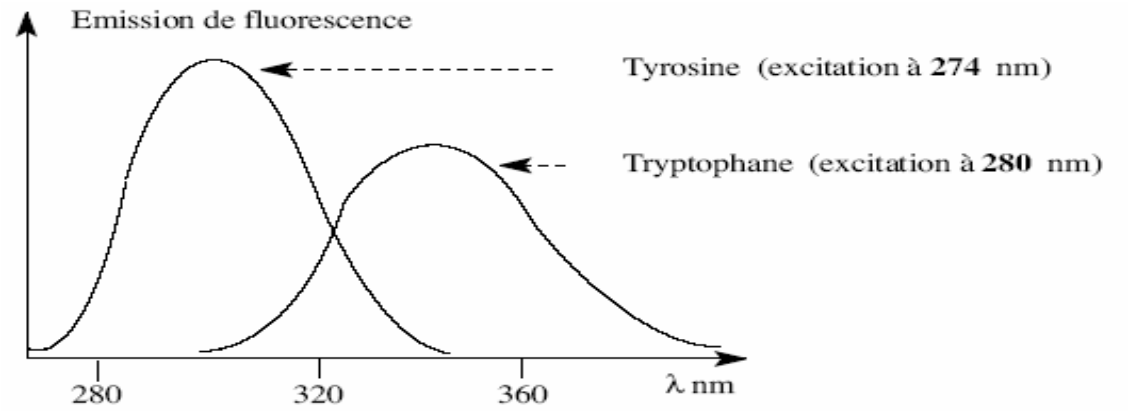
Ceci permet de doser les aa aromatiques et les protéines par spectrophotométrie à 280 nm (méthode non dénaturante).



Spectres d'absorption des aminoacides aromatiques dans l'ultra-violet

b) Fluorescence

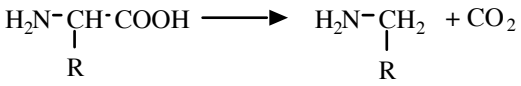
Certaines molécules, lorsqu'elles sont excitées par une lumière incidente à une longueur d'onde où elles absorbent ce rayonnement émettent une lumière de longueur d'onde plus grande : c'est le phénomène de fluorescence qui est maximum pour une longueur d'onde égale à leur maximum d'absorption.



II.3- Propriétés chimiques des acides aminés :

3.1/ Propriétés dues au -COOH :

* Perte du COOH par décarboxylation chimique ou enzymatique



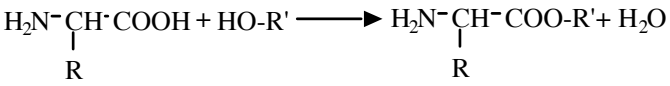
Cette décarboxylation peut se faire par :

- voie chimique : chauffage de l'aa dans une solution inerte.
- Voie enzymatique : sous l'action d'enzymes, les décarboxylases.

Certaines amines formées ont des propriétés biologiques particulières :

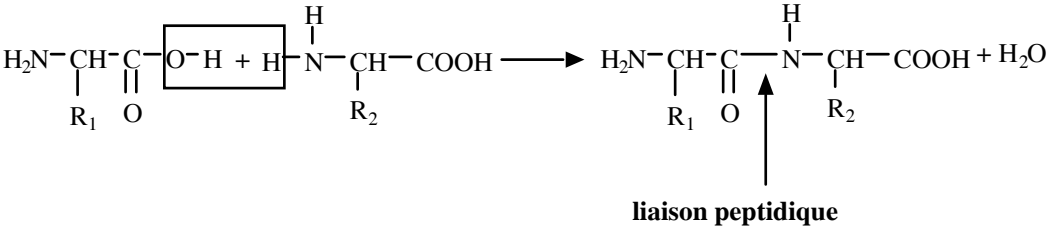
- Histamine dérivée de l'Histidine qui intervient dans les phénomènes d'allergies.
- Cadavérine dérivé de la lysine qui donne la raideur cadavérique.
- Putrécine qui intervient dans le phénomène de décomposition des cadavres.

* Estérification (lors de la synthèse peptidique chimique, on protège le COOH).



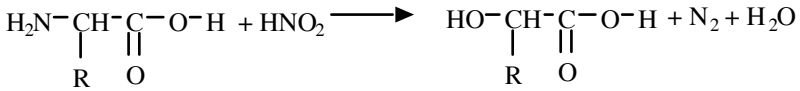
Les esters d'acides aminés sont des liquides distillables sous pression réduite. On réalise des esters méthyliques, éthyliques, …

*Amidification lors de la formation de la liaison peptidique



3.2/ Propriétés dues au NH_2

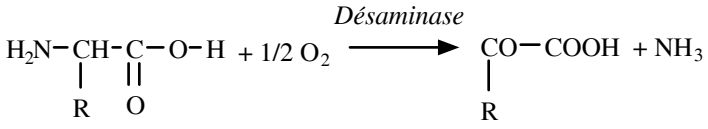
- Désamination chimique



dosable par gazomètrie (Méthode de Van Slyke)

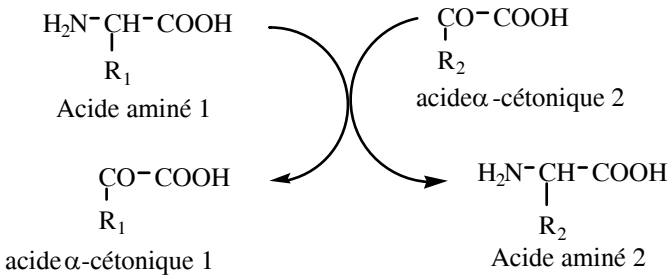
L'azote N_2 est libéré sous forme de gaz et est proportionnel à la quantité d'acide aminé présent dans le milieu. Il est quantifiable par gazométrie.

- Désamination enzymatique



acide αcétonique

DESAMINATION OXYDATIVE



TRANSAMINATION

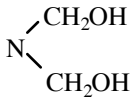
<u>Il en existe deux types au niveau métabolique</u> :

- la désamination est liée à une oxydation : désamination oxydative.

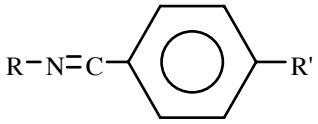
- la désamination non liée à une oxydation : transamination qui correspond au transfert d'un groupement aminé d'un acide aminé à un acide α-cétonique.

- Réaction avec les aldéhydes

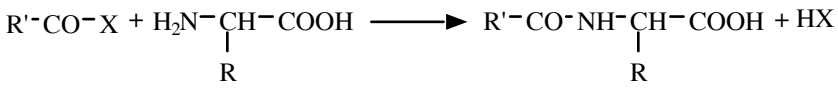
- Par exemple avec le formol, on a formation d'un dérivé dimethylol



- Avec les aldéhydes aromatiques, on obtient des bases de Schiff (fonction imine)

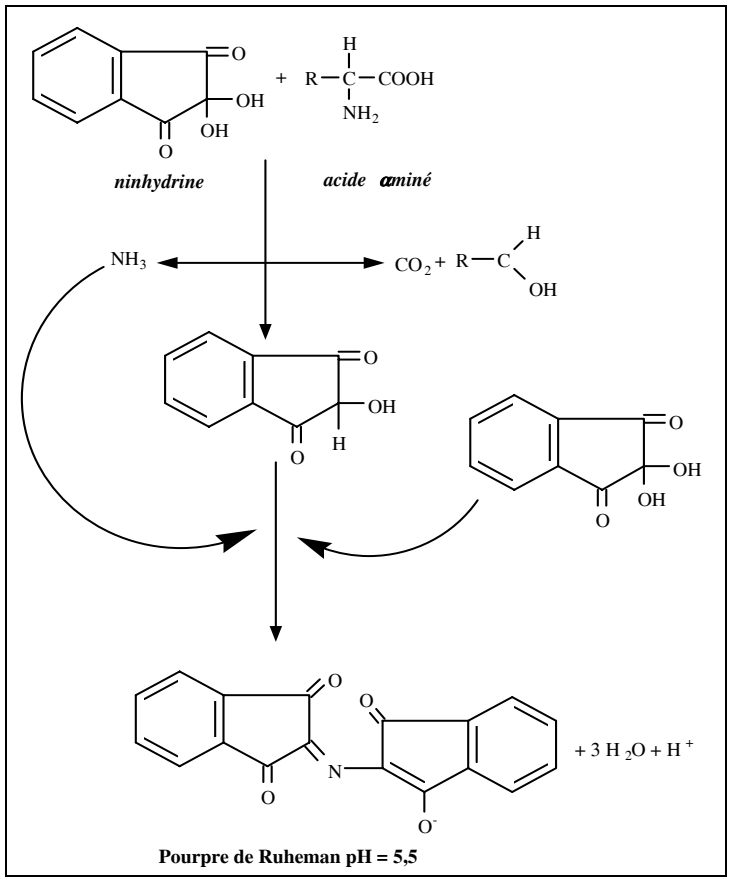


- réaction avec les dérivés acylés



3.3/ Propriétés des aux -COOH et NH_2 :

La réaction de décarboxylation et de désamination avec la ninhydrine est l'une des plus connues et utilisée, elle aboutit à un produit violet pour les amines primaires et à un autre dérivé de couleur jaune pour les amines secondaires. L'aa est complètement dégradé. Cette réaction est utilisée pour détecter et mesurer quantitativement des aa en petites quantités.



L'intensité de la coloration produite est utilisée pour mesurer colorimétriquement la concentration des aa.

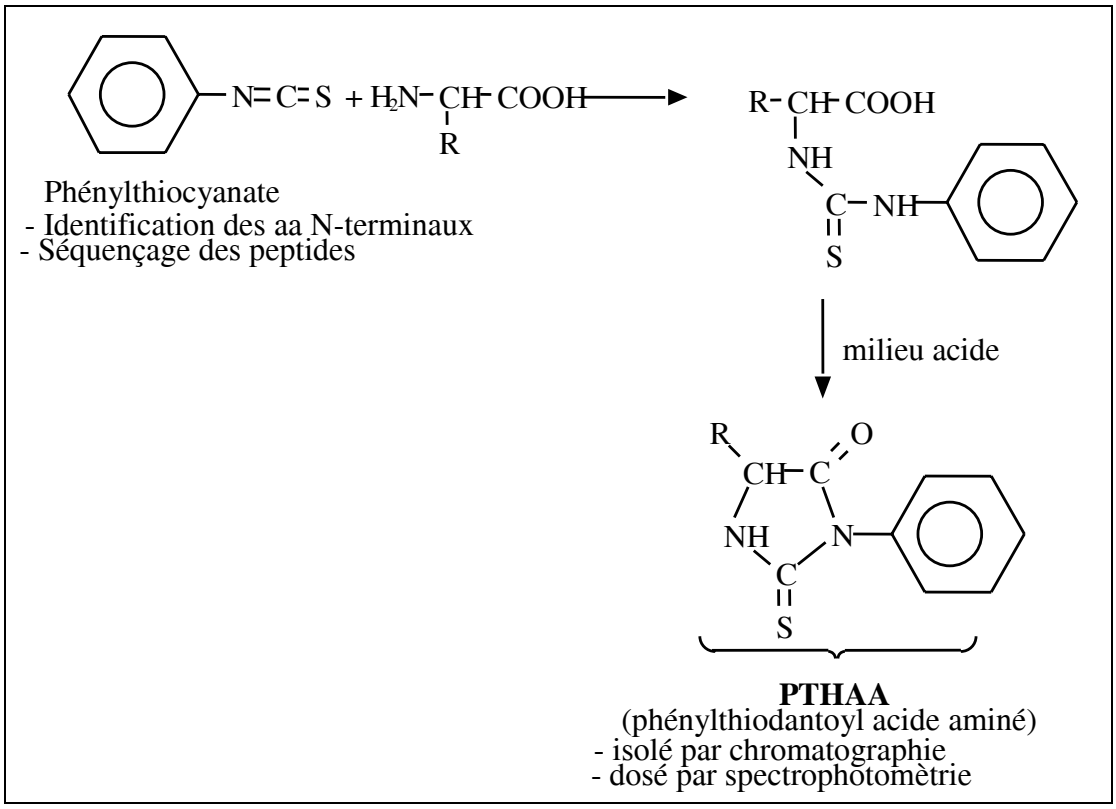
La proline et l'hydroxyproline donnent à la différence des autres aa une coloration jaune. Cette propriété est également de révéler les chromatogrammes.

3.4/ Propriétés des chaînes latérales

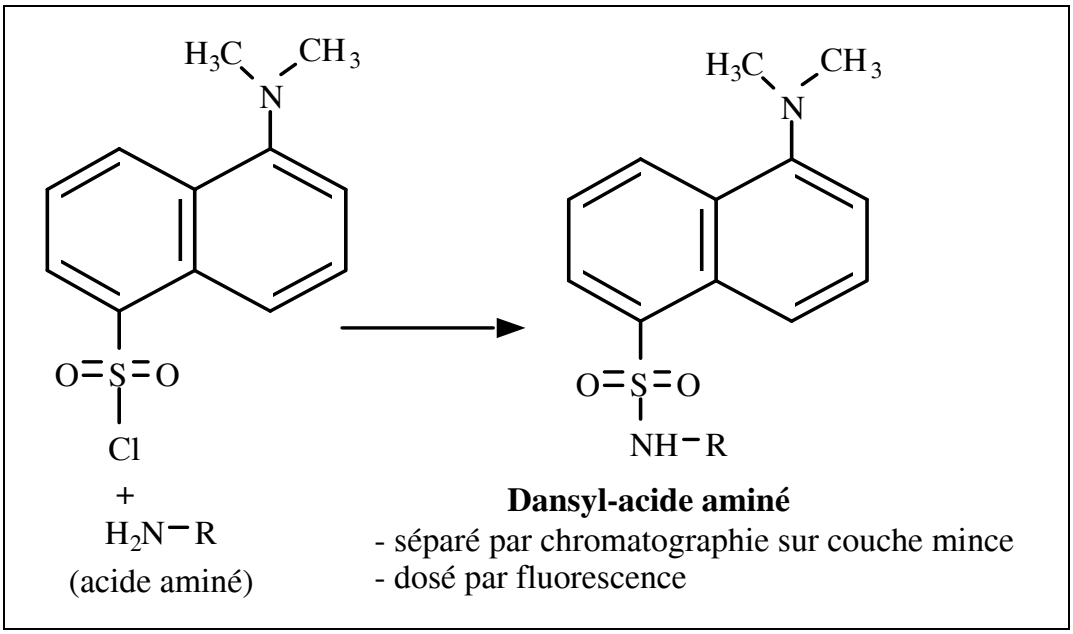
- Il existe des réactions spécifiques aux divers groupements chimiques des chaînes latérales (guanidyl, thiol, alcool, etc...)
- Il existe des réactions colorées spécifiques :
  - réaction de Sakaguchi (guanidyl de Arg, voir TP S3)
  - réaction de Folin (phényle des acides aminés aromatiques)

II.4/ Dérivés à usage analytique :

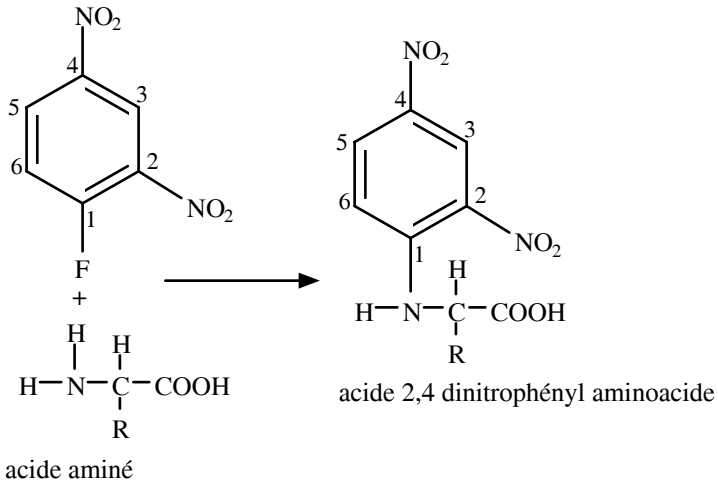
- **PTC** (Phénylisothiocyanate) : Réactif d'Edman



- **Chlorure de dansyle** (Chlorure de l'acide 1-diméthyl aminonaphtalène 5-sulfonique)



- **FDNB** (1-fluoro 2,4-dinitrobenzène) : Réactif de Sanger



Ce dérivé est identifié par chromatographie et dosé par spectrophotométrie.

Il existe également d'autres composés comme la fluorescamine ou le réactif de Roth qui donnent des composés fluorescents et qui réagissent avec le NH_2 des acides aminés.

II.5/ Etude analytique des acides aminés

L'analyse des acides aminés comprend :

- la séparation des acides aminés
- le dosage des acides aminés en solution pure ou dans un mélange.

5.1/ Séparation des acides aminés

Il existe deux grandes techniques de fractionnement des acides aminés en solution :

- la chromatographie
- l'électrophorèse

- La chromatographie

Pour les acides aminés, on peut mettre en œuvre :

- les chromatographies de surface :
- sur papier
- sur couche mince
- les chromatographies sur colonne
- les chromatographies en phase gazeuse (CPG)

La technique la plus employée est celle des chromatographies sur colonne. Les principales utilisées sont l'échangeuse d'ions, le partage en phase inverse et l'interaction hydrophobe. Ces techniques sont mises en œuvre à basse pression et à haute pression.

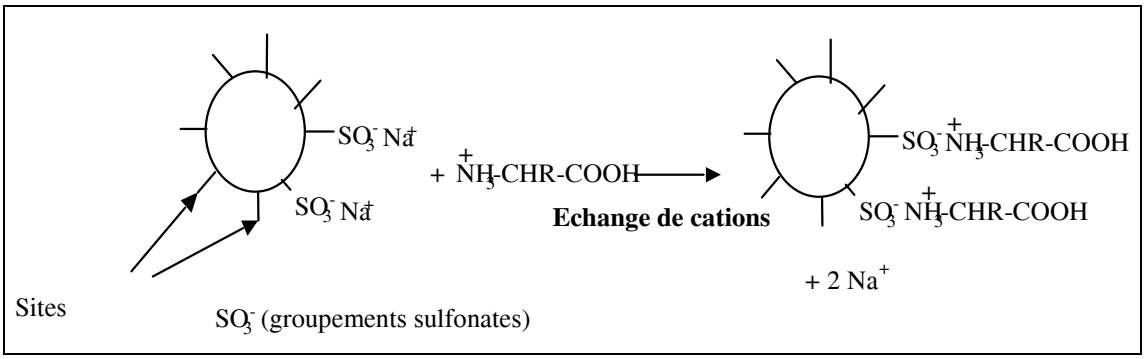
Exemple de la chromatographie d'échange ionique :

C'est le procédé le plus utilisé pour séparer, identifier et quantifier chaque aa dans un mélange. Elle est basée sur les différences de comportement acido-basique des aa.

La colonne de chromatographie est un long tube rempli d'une résine synthétique sur laquelle est fixée des groupements chargés :

- Une résine avec des groupements anioniques est **un échangeur de cations**.
- Une résine avec des groupements cationiques est **un échangeur d'anions**.

On utilise pour la séparation des aa, généralement une résine échangeuse de cations



* à pH = 3, la plupart des aa sont sous forme de cations, mais diffèrent par leur degré d'ionisation.

A pH = 3, on place un mélange d'aa au sommet de la colonne.

Ex : les aa (His, Lys, Arg) déplacent en premier Na^+ et seront solidement fixés.

Les aa (Glu, Asp) seront les moins fixés.

Les aa seront ensuite élués par changement de pH. Ces aa sont ensuite collectés à la sortie de la colonne puis analysés.

- l'électrophorèse

Cette technique sépare les aa selon leur charge électrique.

1- Une solution aqueuse d'un mélange d'aa est placée sur un gel d'électrophorèse

2- On applique un champ électrique de haut voltage à ce gel placé dans une solution tampon.

3- A cause de leur différent pHi, les aa migrent dans des directions et des vitesses différentes selon le pH du système tampon et le type de gel.

4- Pour établir leur localisation caractéristique, des échantillons d'aa témoins sont traités dans les mêmes conditions.

5.2/ Dosage des acides aminés

Les aa peuvent être quantifiés par :

- Colorimétrie : les aa peuvent être identifiés grâce à des réactions colorées spécifiques des chaînes latérales.
- Fluorimètrie
- spectrophotométrie : les aa aromatiques (Tyr, Phe, Trp) sont dosés à 280 nm.
- La méthode de Van Slyke : dosage du N_2 libéré

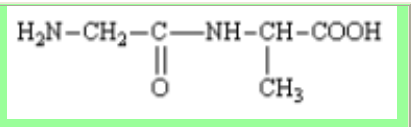
III. Les peptides

III.1. Définition

Les peptides sont des polymères d'aa reliés entre eux par une **liaison peptidique**, c'est à dire la formation d'une amide entre la fonction acide d'un premier aa et la fonction amine d'un deuxième. Les peptides sont des protéines de faible dimension, on fixe la limite de façon arbitraire à une masse molaire de 10 000 pour les peptides, tandis que celle des protéines peut atteindre des dizaines de millions.

Peptides ou protéines, on les différencie donc par le nombre, la nature et l'ordre dans lesquels les aa qui les composent se succèdent dans la molécule.

Par convention, les peptides s'écrivent avec l'acide aminé N-terminal (qui a le groupement -NH_2 libre) à gauche et l'acide aminé C-terminal (qui a le groupe -COOH libre) à droite.

Ainsi Gly-Ala signifie :	

On distingue 3 types de peptides :

- Peptide formé <u>d'une seule chaîne</u> (monocaténaire) et <u>linéaire</u>.
- Peptide formé <u>d'une seule chaîne</u> (monocaténaire) et <u>cyclique</u>, une liaison covalente **intra-chaîne** (pont S-S) est présente et réalisée par l'oxydation de 2 fonctions thiol de 2 cystéines
- Peptide formé <u>de plusieurs chaînes</u> (polycaténaire), une liaison covalente (pont S-S) **inter-chaîne** est présente et réalisée par l'oxydation de 2 fonctions thiol de 2 cystéines appartenant à 2 chaînes peptidiques différentes.

III. 2. Détermination de la structure des peptides

Les peptides sont les plus simples car ils ne posent pas un problème dans la détermination de l'enchaînement des aa qui les composent. Il s'agit de déterminer d'abord la nature et la masse de chacun des aa les composant. Ensuite il convient de déterminer l'ordre (la séquence) dans lequel ces acides sont reliés.

Le premier problème est relativement simple et les analyseurs sont maintenant automatisés.

1- Le peptide est d'abord réduit, ou oxydé, afin d'éliminer les liaisons disulfures.

Les dérivés obtenus sont ensuite séparés par différentes techniques.

La Dialyse ou séparation à travers une membrane semi-perméable selon la taille des fractions.

La Chromatographie d'exclusion, sépare elle aussi selon la taille des molécules, mais de façon continue.

La chromatographie sur résines échangeuse d'ion, sépare selon la charge portée par les molécules.

L'Electrophorèse sépare elle aussi selon la charge selon un procédé de transport par le courant sur un milieu électrolyte poreux.

2- Les peptides ainsi purifiés sont hydrolysés par une solution d'acide dilué (HCl 6N, 110°C, 24h). Les liaisons amides sont rompues et les aa libérés. Ils sont analysés qualitativement et quantitativement par chromatographie liquide sur une colonne de résine échangeuse d'ion polysufonatée. La phase éluante est une solution acide dont le pH évolue graduellement de 3 à 6. La détection est réalisée par un spectrophotomètre visible par ajout de ninhydrine à l'éluant.

Remarques :

1. L'acide chlorhydrique (HCl) 6M sur un peptide, à ébullition pendant au moins 24 heures, aboutit à un hydrolysat contenant les aa avec les restrictions suivantes :

§. L'aa Trp est entièrement détruit.

§. Les amides (Asn, Gln) sont hydrolysés en ammoniac et acides correspondants (Asp, Glu).

§. Certains aa (Tyr, Ser, Thr) peuvent être partiellement détruits.

2. La soude concentrée sur un peptide, à 120°C conduit à la destruction de tous les aa sauf le Trp. Cette technique permet de vérifier la présence de cet aa dans la chaîne peptidique.

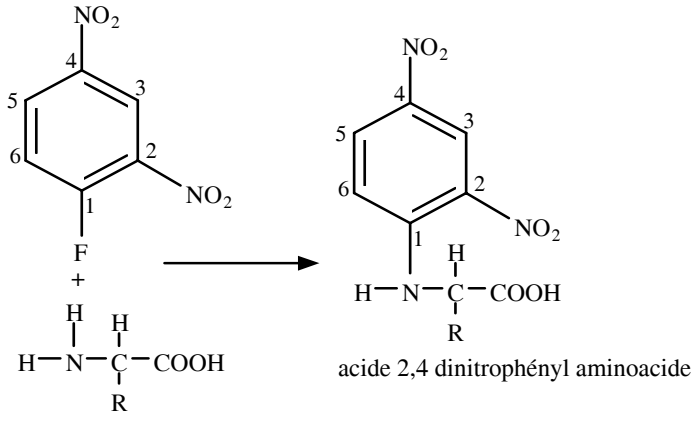
III. 2. 1. Acides aminés N-terminaux

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

A. Hydrolyses chimiques : réactions de Sanger, Edman et Dansylation

Celle de Sanger (1953, détermination de la structure de l'insuline, prix Nobel chimie 1958), et celle d'Edman qui utilise le phénylisothiocyanate.

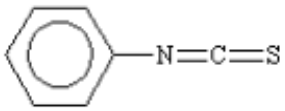
1. La dégradation de Sanger utilise le 1-Fluoro-2,4dinitrobenzène (FDNB) comme réactif. Ce composé favorise une substitution nucléophile aromatique par addition élimination par le caractère fortement attracteur des substituants du benzène.



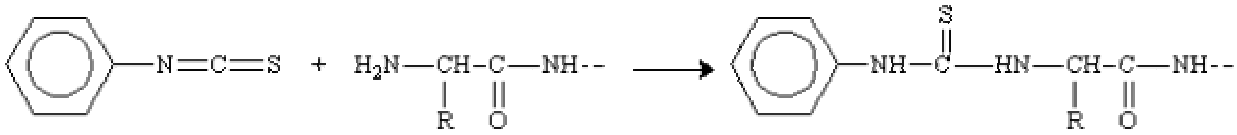
On récupère ainsi le dernier acide aminé de la chaîne. Cette réaction a ouvert la voie de l'analyse, mais le reste de la chaîne n'est plus relié et l'information sur sa structure est perdue.

La méthode suivante permet l'analyse de toute la séquence.

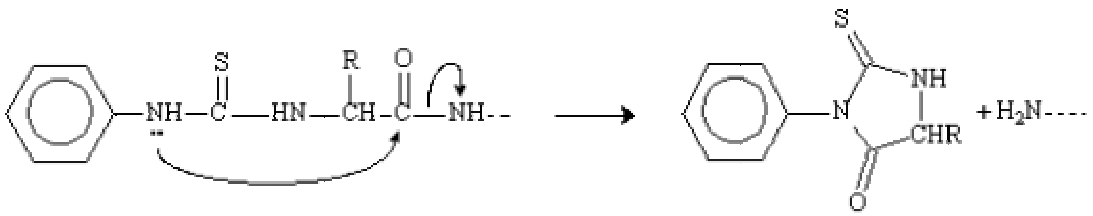
2. La dégradation d'Edman fait appel à un autre réactif l'isothiocyanate de phényle (PITC).



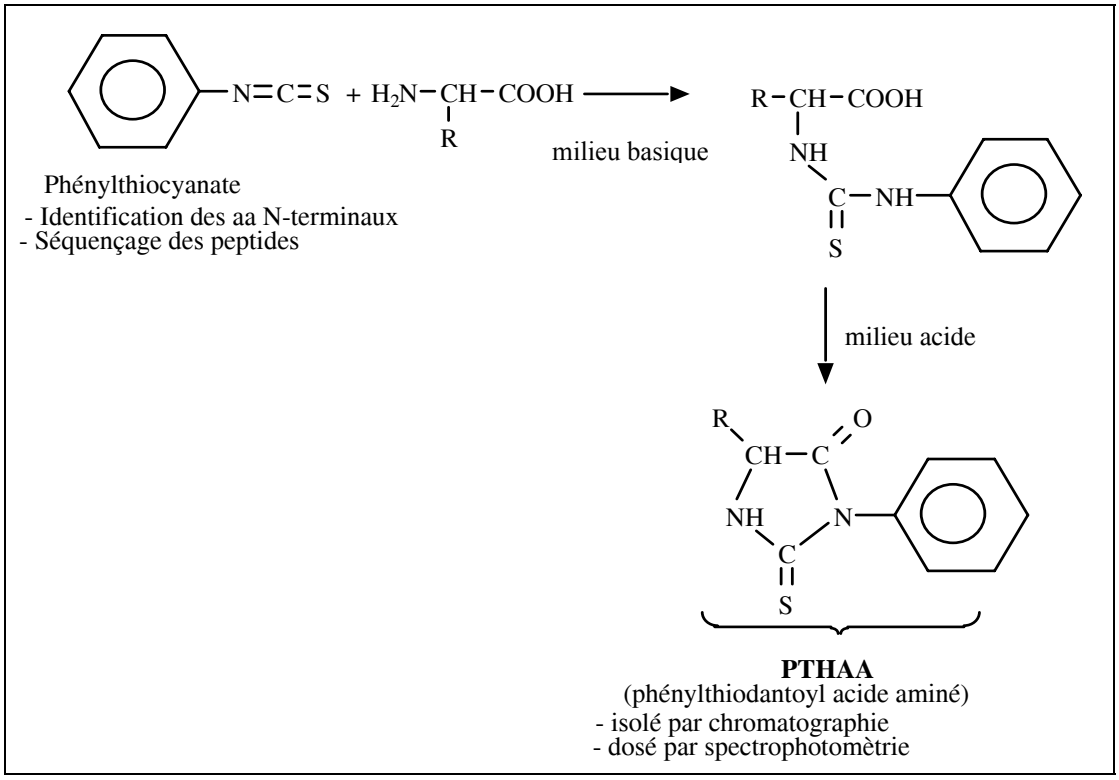
Cette fonction isothiocyanate très sensible aux nucléophiles conduit à une thiourée, par addition du NH sur la double liaison N=C.



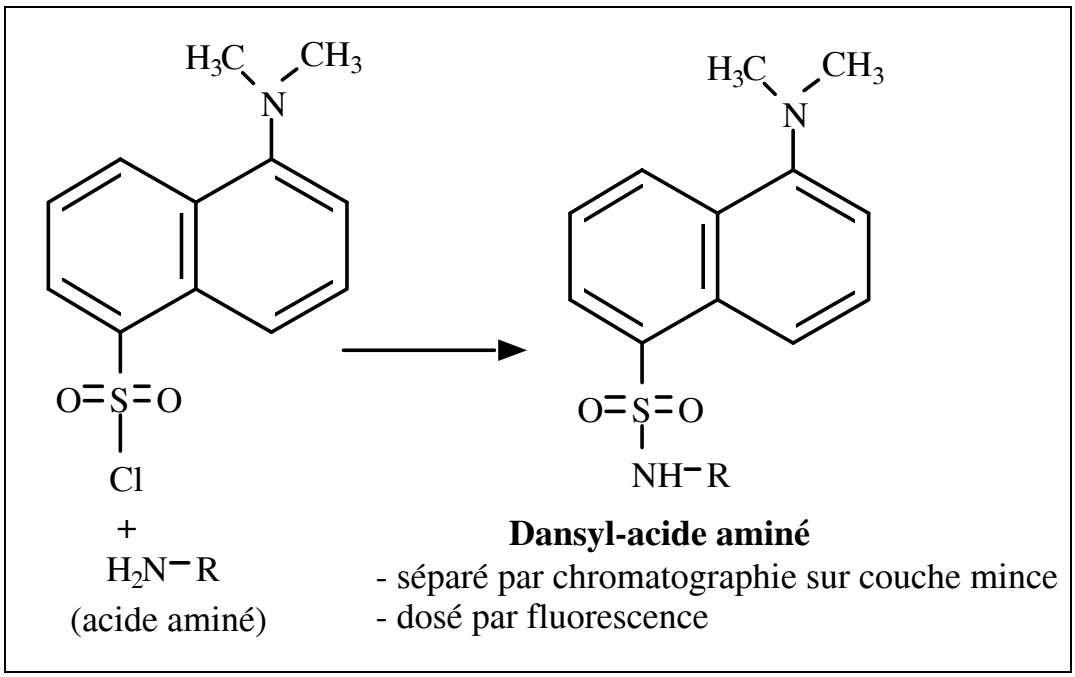
Ce composé se cyclise en cycle à 5 éléments par attaque du doublet de l'azote fixée sur le cycle aromatique sur le carbonyle de l'amide. Cela entraîne la rupture d'une seule liaison peptidique et permet de répéter l'opération, on peut former un PTH-aminoacide avec le 2ème puis le 3ème, en dégradant séquentiellement la protéine ou le polypeptide. On peut déterminer la nature de tous les aa en partant de l'extrémité N terminale. Ce procédé a pu être automatisé et autorise en routine des séquençages de 20 acides aminés.



L'aa N-terminal est fixé dans une phénylthiohydantoïne, séparable aisément du milieu et pouvant être facilement identifiée.



3. La méthode au chlorure de dansyle (Chlorure de l'acide 1-diméthyl aminonaphtalène 5-sulfonique). Il se forme un dansyl-aminoacide très fluorescent, donc facile à identifier à très faible concentration.



B. Hydrolyses enzymatique : aminopeptidases

§. Leucine aminopeptidase coupe tous les aa (série L) du côté N-terminal sauf proline.

§. Proline aminopeptidase (iminopetidase) coupe proline du côté N-terminal.

§. Aminopeptidase coupe tous les aa (série L) du côté N-terminal.

III. 2. 2. Acides aminés C-terminaux

A. Hydrolyses chimiques :

§. Hydrazinolyse

L'hydrazine NH_2-NH_2 coupe toutes les liaisons peptidiques en les transformant en hydrazides à l'exception de l'aa C-terminal qui reste sous forme libre.

§. Traitement par le brohydrure de Lithium ($LiBH_4$)

Le traitement d'un peptide par $LiBH_4$ est une réaction de réduction de la fonction carboxylique de l'aa C-terminal, suivi d'une hydrolyse complète et cet aa C-terminal sera identifié en tant que amino-alcool.

B. Hydrolyses enzymatiques

Elles sont assurées par les carboxypeptidases (exopeptidases). Il existe plusieurs carboxypeptidases dont 2 sont importantes : A et B. La réaction de ces carboxypeptidases avec la liaison peptidique du C-terminal est dépendante de plusieurs facteurs, stériques et électrostatiques.

- l'α carboxyle de l'aa terminal doit être libre.
- L'aa C-terminal doit être de la série L.
- La nature des résidus des 2 aa participant à la liaison peptidique C-terminale influence l'action de ces enzymes.

***** l'action de la carboxypeptidase **A** est bloquée par l'arginine, lysine ou proline s'ils sont placés en avant dernier du polypeptide.

***** Un effet identique mais moins important peut être observé pour les résidus aspartique ou glutamique.

***** Pour la carboxypeptidase **B** : elle agit spécifiquement sur les peptides ayant une lysine, arginine ou ornithine comme aa C-terminal.

III. 2. 3. Acides aminés intra peptidiques

A. Méthodes chimiques

1. le bromure de cyanogène, CNBr, coupe le polypeptide au niveau des carboxyles de la méthionine.

2. l'acide performique, le β mercaptoéthanol et le dithiothreitol sont des produits chimiques qui hydrolysent les ponts disulfures.

B. Méthodes enzymatiques

***** La trypsine coupe la molécule au niveau du carbonyle de la lysine et de l'arginine, sauf si aa à droite est une proline.

***** la chymotrypsine coupe la molécule essentiellement au niveau du carbonyle d'un aa aromatique : phénylalanine, tyrosine ou tryptophane, sauf si a droite il y a une proline.

***** La thermolysine coupe la molécule au niveau de l'extrémité N de l'aa : leucine, isoleucine ou valine, sauf si aa à gauche est une proline.

***** La pepsine coupe la molécule au niveau de l'extrémité N de l'aa : phénylalanine, tyrosine, tryptophane, leucine, acide aspartique ou acide glutamique, sauf si aa à gauche est une proline.

Remarques :

1. L'absence d'aa terminal indiquera que ceux-ci ont été modifiés et sont sûrement cycliques ou semi-cycliques.

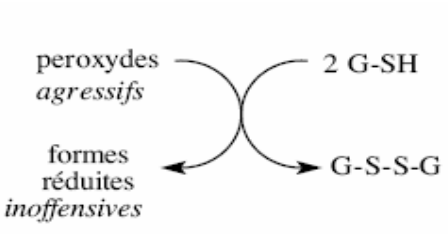
2. La présence de plusieurs groupements N et C-terminaux indiquera que le peptide est formé de plusieurs chaînes liées par des ponts désulfure.

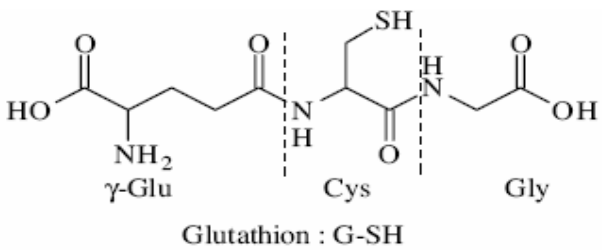
3. La présence de ponts disulfure intra-chaîne posera des problèmes quant à la composition en aa.

Pour (2 et 3) une réduction du peptide par un thiol suivie d'une alkylation supprimera les problèmes.

III. 3. Rôles biologiques de certains peptides

***** Le glutathion est un tripeptide (γ-glutamyl-cystéinyl-glycine) qui joue un rôle central très important dans le mécanisme de défense cellulaire contre le dioxygène et ses dérivés actifs (rôle physico-chimique). C'est un couple Red-Ox très efficace contre les peroxydes :





Glutathion : G-SH

***** L'α-corticotropine est un tripeptide (leucyl-glutamyl-phénylalanine) est une hormone synthétisée par les cellules corticotropes de l'anté-hypophyse. D'autres peptides à rôle médiateur ou antibiotique seront étudiés en TD.

IV. Les protéines

IV. 1. Définition

Les **protéines** sont les constituants de la matière vivante animale, muscle, peau, cheveux etc. Mais aussi elles participent aux différents processus de la vie, transport de l'oxygène respiratoire, déterminisme génétique, système de défense immunologique.

Les protéines sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par une **liaison peptidique**, c'est à dire la formation d'un amide entre la fonction acide d'un premier aa et la fonction amine d'un deuxième. Les **peptides** sont des protéines de faible dimension, on fixe la limite de façon arbitraire à une masse molaire de 10 000 pour les peptides, tandis que celle des protéines peut atteindre des dizaines de millions.

Peptides ou protéines, on les différencie donc par le nombre, la nature et l'ordre dans lesquels les aa qui les composent se succèdent dans la molécule. La structure d'une protéine conditionne aussi sa fonction.

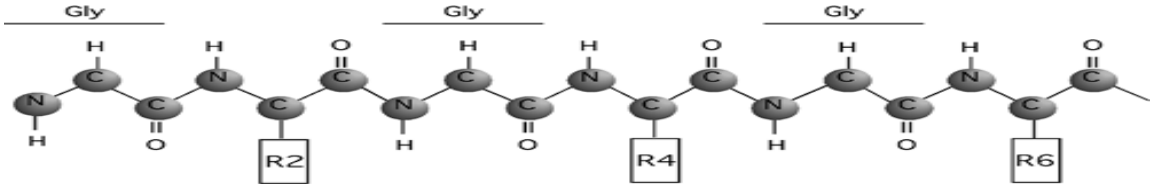
Les protéines, peptides de plus de 50-100 aa, sont classés en 2 groupes principaux :

- Les **holoprotéines** qui ne sont constituées que d'aminoacides
- Les **hétéroprotéines** qui contiennent :
    - un **groupe prosthétique** minéral, métallique ou organique
    - une partie glucidique liée de manière covalente : **glycoprotéines**
    - une partie lipidique liée de manière covalente : **lipoprotéines**

IV. 2. Structures (primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire)

IV. 2. 1. Structure primaire

Les aa constitutifs d'une chaîne polypeptidique sont réunis par une liaison peptididique covalente. Leur enchaînement constitue une séquence linéaire représentée depuis l'extrémité N-terminale (c'est-à-dire l'acide aminé qui a un groupe α-aminé libre) jusqu'à l'extrémité C-terminale (l'acide aminé qui a un groupe α-carboxyle libre).



IV. 2. 2. Structure secondaire

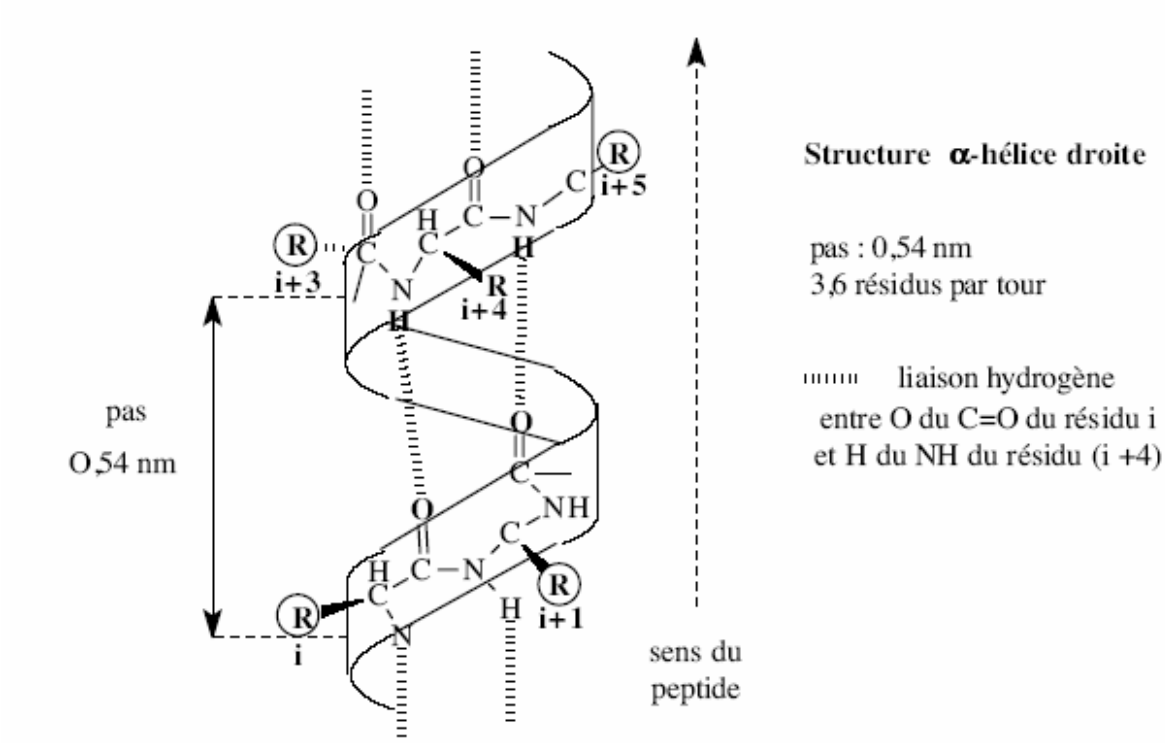
C'est l'arrangement dans l'espace, de fragments courts de séquences en 4 grands types de formes. Les liaisons hydrogènes peuvent se former entre les atomes d'oxygène (C=O) et d'hydrogène (N-H) d'une liaison peptidique. –C=O…..H-N-

Il existe 2 types de structure secondaire :

1. la structure hélicoïdale : hélice α

Le degré de torsion des angles Cα est le même sur tout le polypeptide.

Exemple

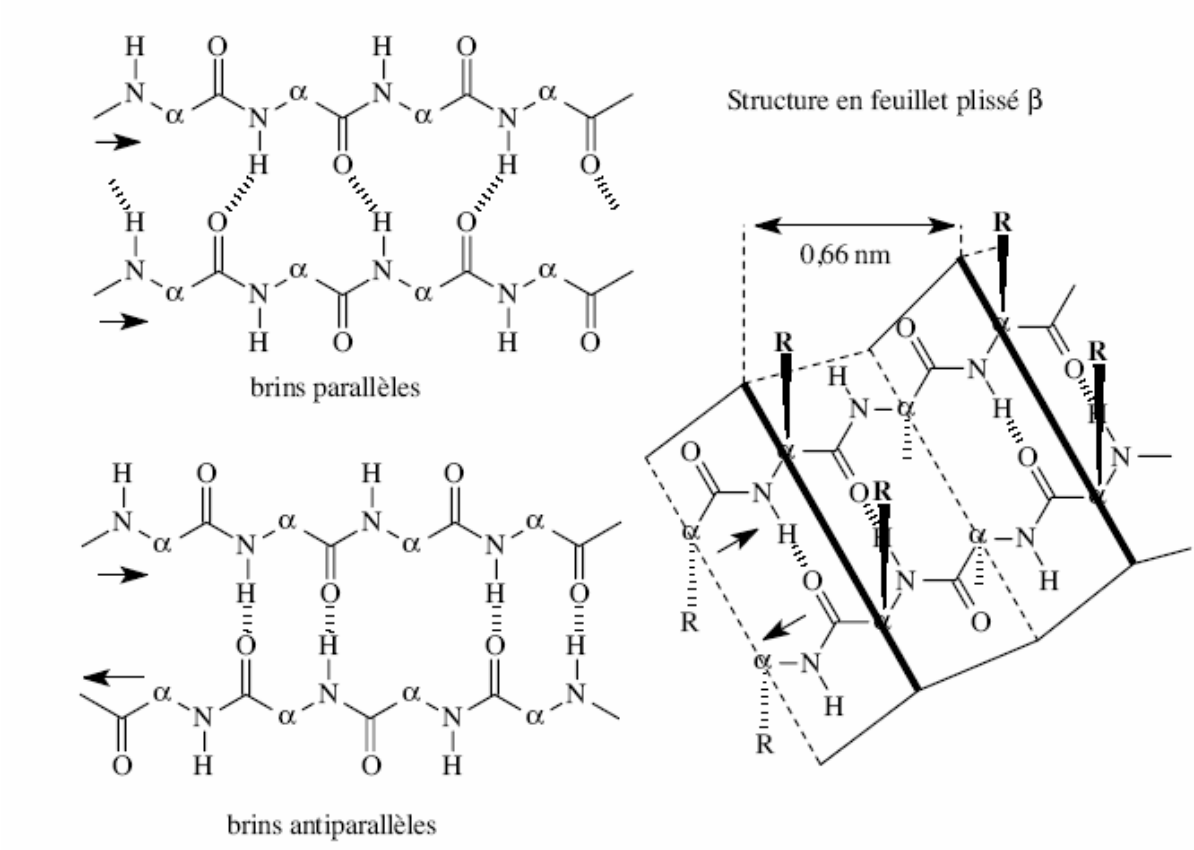


Exemples d'hélice α: protéine du muscle, de la peau, élastine du tissu conjonctif. Ces protéines ont une configuration droite par opposition à la gauche qui se caractérise par une abondance de résidus pyrolyles, tyrosyles, aspartyles et glycyles dans la structure primaire comme le collagène riche en glycine et en proline.

2. Feuillet plissé β

La configuration en feuillet plissé β est crée par la liaison hydrogène entre la paire d'électrons de l'oxygène (C=O) et l'hydrogène (N-H) d'un groupe situé sur une autre chaîne peptidique. Le feuillet β peut être

- antiparallèle : les 2 chaînes polypeptidiques s'orientent dans le sens opposé
- parallèle : les 2 chaînes s'étendent dans le même sens.

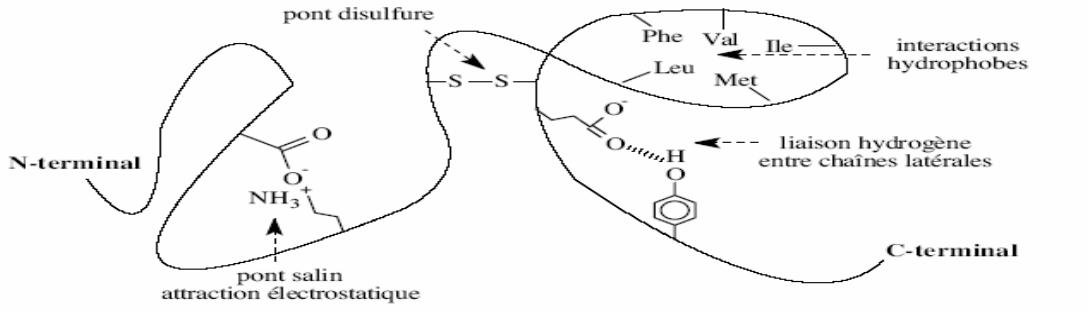


Quelques protéines seulement présentent une structure où prédomine essentiellement l'hélice α ou le feuillet β. La plupart des protéines (globulaires surtout) contiennent ces 2 structures et des segments repliés de façon ordonnée ou aléatoire.

IV. 2. 3. Structure tertiaire

L'arrangement spatial des structures secondaires locales conduit à une forme globale spécifique de la protéine maintenue par des interactions qui peuvent être :

- Des liaisons covalentes : pont disulfure
- Des liaisons ioniques entre groupes chargés de signe opposés (pont salin)
- Des liaisons hydrogène
- Des liaisons hydrophobes



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

La conformation **native** de la protéine est la structure tertiaire qui lui confère sa fonction biologique dans les conditions physiologiques. La dénaturation de la protéine (traitement détruisant la structure tertiaire) aboutit à un état désorganisé de la molécule.

Deux grands types de protéines :

***** fibreuses : agrégats ordonnés de protéines sous une unique conformation (hélice α ou feuillet β)

***** globulaires : elles peuvent comprendre des motifs de structure hélice α ou feuillet β

IV. 2. 4. Structure quaternaire

Les protéines d'un PM supérieur à 100 kDa sont pratiquement constituées de sous-unités (protomères), associés en structure tridimensionnelle spécifique, maintenue par des liaisons secondaires (oligomère). Cette structure sous-unitaire est appelée structure quaternaire.

***** Association-dissociation des protomères ⟶ fonction signalisation ou contrôle

***** Interaction entre protomères ⟶ régulation des protéines allostériques

***** Les isoformes ⟶ même fonction dans un même tissu

L'hémoglobine, 2 sous-unités α et 2 sous-unités β, est un dimère de protomères αβ.

IV. 4. Rôles biologiques

Elles jouent souvent un rôle primordial dans divers processus vitaux (enzymes, hormones, protéines globulaires comme l'hémoglobine, l'albumine, déterminisme génétique, etc.)

IV. 5. Techniques analytiques des protéines

IV. 5. 1. Purification

Les protéines d'un fluide biologique (albumine du sérum sanguin, fibrinogène du plasma) peuvent être directement étudiées en tant que soluté. Pour les protéines tissulaires, un extrait est réalisé par un traitement mécanique réduisant le tissu en une suspension dans un solvant aqueux. Les pH choisis et les forces ioniques des solvants à chaque étape de la purification devront respecter leurs propriétés et éviter leur dénaturation (voir cours et TP Biochimie S5). Des modifications, par paliers, de la force ionique du solvant (avec le sulfate d'ammonium par exemple) peuvent être utilisées pour fractionner les différentes protéines de l'extrait. A chaque palier, l'extrait est centrifugé, donnant un surnageant contenant les protéines solubles et un précipité composé de protéines insolubles à cette force ionique. Les protéines fractionnées dans ces 2 phases sont alors étudiées.

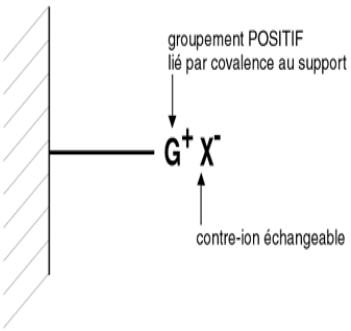
Les méthodes de fractionnement sont choisies sur la base des propriétés spécifiques des protéines d'un mélange : charge, taille moléculaire, capacité à interagir avec la matrice solide d'un support chromatographique…Un ensemble de méthodes permet la séparation de chaque protéine du mélange en fonction de leurs propriétés.

a. Chromatographie échangeuse d'ions

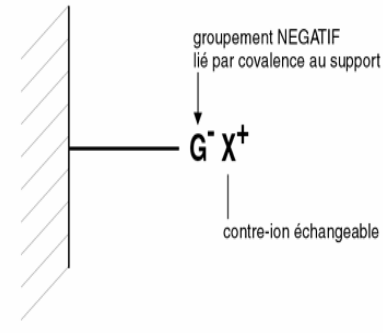
Les protéines sont des polyélectrolytes : selon le pH du milieu, leur ionisation nette leur confèrera un caractère anionique ou cationique plus ou moins marqué. Elles seront ainsi capables d'interagir électrostatiquement avec des ions de charges opposées. Un échange s'établit entre les protéines et les ions de même charge vis-à-vis des contre-ions présents en solution. L'affinité relative des différentes protéines d'un mélange pour les charges portées par un support solide (cellulose auquel a été fixée des groupements ionisables) permettra leur fractionnement.

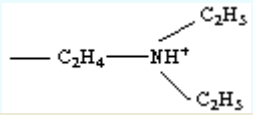
La technique la plus courante est la chromatographie sur colonne contenant la phase stationnaire chargée, une phase mobile de solvant permettant l'élution des différentes fractions en fonction d'une concentration donnée en contre-ions. Les propriétés physicochimiques de cette phase peuvent être modifiées pour améliorer la séparation : gradients de pH et de force ionique. Le repérage du contenu en protéine des fractions chromatographiques collectées dans des tubes se fait par absorbance ultraviolette à des longueurs d'ondes caractéristiques des aa aromatiques, fluorescence ou indice de réfraction.

Résine échangeuse d'anions (anionique) :



Résine échangeuse de cations (cationique) :



positive : résines échangeuses d'anions qui fixent des molécules chargées négativement : ---R^+...M^-		**négative : résines échangeuses de cations** qui fixent des molécules chargées positivement : ---R^-...M^+	
nature de la fonction ionisable : ---R^+		**nature de la fonction ionisable : ---R^-**	
base forte	**base faible**	**acide fort**	**acide faible**
ammonium quaternaire : ---NR_3^+ exemple : triméthylammonium ---$N(CH_3)_3^+$	**forme protonnée d'une amine I, II ou III :** ---NHR_2^+ exemple : diéthylaminoéthylammonium 	**exemple : sulfonate** ---SO_3^-	**exemple : carboxyméthyl** ---$O-CH_2-CO_2^-$

b. Chromatographie sur gel d'hydroxyapatite

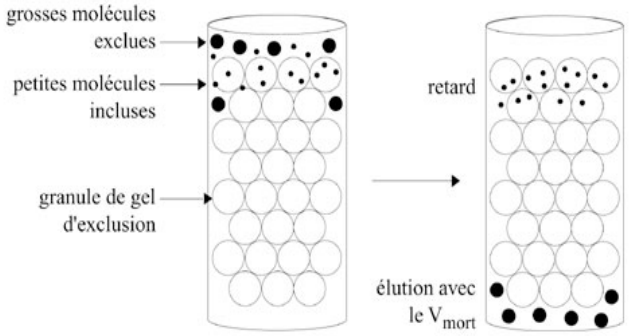
La phase stationnaire est le gel d'hydroxyapatite. Après une étape d'absorption des protéines sur le gel, leur élution sélective est réalisée par l'application à la colonne d'un gradient de force ionique sous la forme de phosphates. Cette élution sélective est due aux variations d'interactions entre groupes cationiques des protéines et ions PO_4^{3-} du gel et celles entre groupes anioniques et ions Ca^{2+} du gel.

c. Filtration sur gel

Ce type de chromatographie est encore appelé : tamisage moléculaire ou gel-filtration.

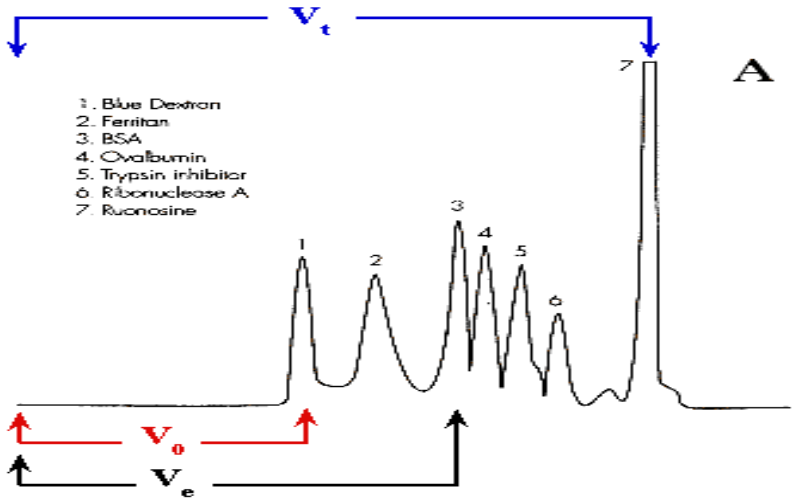
Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur **taille** et de leur **forme**. On utilise pour cela des granules de gel poreux (phase stationnaire).

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, **au niveau du volume mort (V_m ou V_0)**. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire.

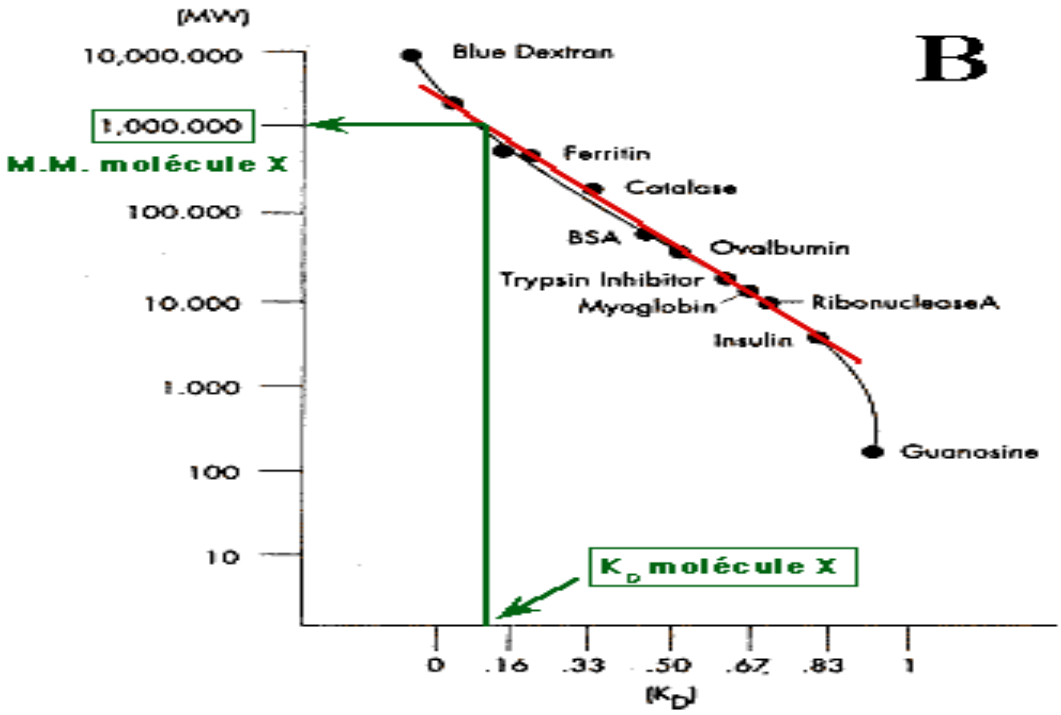


On peut représenter les résultats en portant le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution : log MM = f (V_e).

- Un mélange de molécules (appelées *standard*) de masse molaire connue est séparé par chromatographie de filtration sur gel (pics d'élution 1 à 7).
- Chaque pic est caractérisé par un volume d'élution V_e.
- Le volume d'exclusion du gel (V_0) est le volume d'élution d'une molécule NON retardée, ici le bleu dextran.
- Le volume total du gel (V_t) est la somme du volume des billes et du volume externe aux billes. Il est donné par le volume d'élution d'une molécule qui diffuse totalement dans les billes (donc totalement retardée), ici la ruonosine.



- On définit le coefficient de partition : $K_D = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$
- On trace la droite étalon : log (masse molaire) = f (K_D) (*ou masse molaire = f(K_D) sur une échelle semi-logarithmique, comme représentéé ici*).
- La partie linéaire de cette droite (en rouge) permet de déterminer la masse molaire d'une molécule X dont le volume d'élution a été mesuré dans les mêmes conditions, en reportant son K_D.



Les supports les plus courants pour cette chromatographie : les dextrans, polymères de glucose (séphadex), d'agarose (polymère de D-galactose et 3,6 anhydro-L-galactose) et le polyacrylamide, dont le degré de réticulation permettent le fractionnement des protéines par intervalles sélectifs de masses moléculaires.

d. Chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est porteuse de ligands (anticorps spécifique, antigène, lectine…) capables d'interagir spécifiquement et de façon réversible avec une protéine d'un mélange. Dans une 1ère étape, il y'a fixation des protéines sur leur ligands spécifiques, celles qui ne se sont pas fixées passent puis dans une 2ème étape les protéines fixées seront éluées par changement de pH ou de la force ionique du milieu.

e. Chromatographie en phase inversée

La phase stationnaire est composée de molécules non polaires (la silice), la phase mobile est un liquide **polaire** réalisé à partir d'un tampon aqueux et d'un solvant organique miscible. La technique permet la séparation des protéines sur la base de hydrophobicité.

f. CLHP (chromatographie liquide haute performance)

Toutes les chromatographies citées plus haut peuvent être réalisées dans des appareils spéciaux.

Les colonnes de CLHP contiennent une phase stationnaire très empaquetée minimisant les espaces libres et fournissant une concentration importante de groupes actifs. L'élution est réalisée par une phase mobile sous pression élevée. On réduit ainsi les forces de diffusion et le temps opératoire.

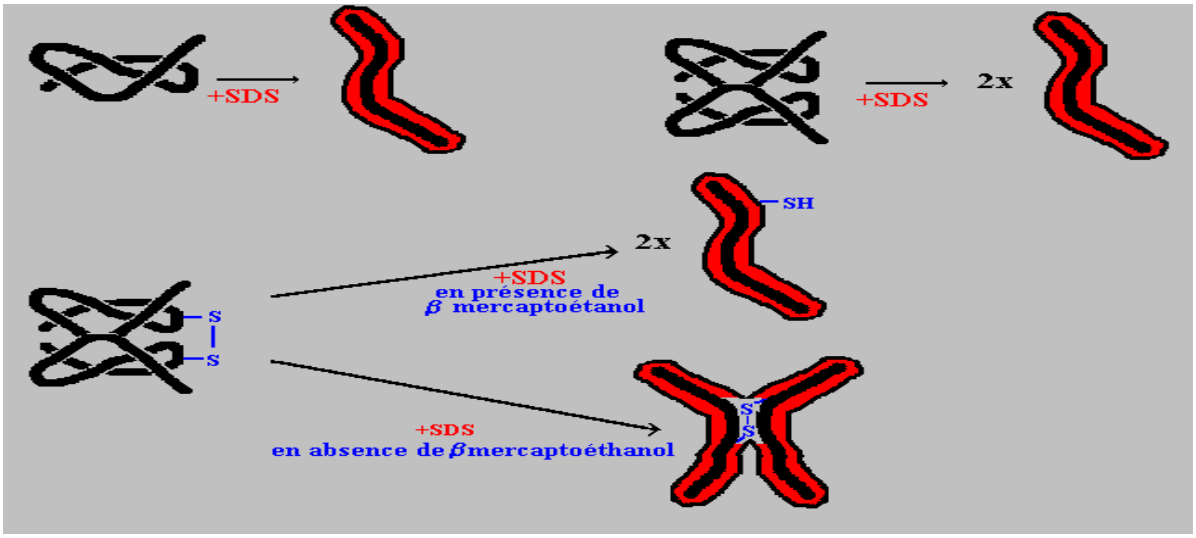
g. Electrophorèse sur support solide

Migration de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. La particule atteint très rapidement une vitesse limite v= qE/f avec q: charge de la particule; E: champ électrique; f: coefficient de frottement particule/solvant. Ce coefficient dépend de la charge, taille et forme de l'ion mis en solution dans une solution caractéristique et de concentration déterminée.

Le support solide peut être un gel de polyarylamide, d'agarose ou de dextran de porosité spécifique. La migration électrophorétique des protéines est inversement proportionnelle à leur taille moléculaire et dépendra du support solide dans lequel se réalisera la séparation (exemple : support acrylamide pour séparer des protéines de 10 à 20 kDa). Le milieu d'électrophorèse peut contenir un détergent (SDS : sodium dodécyl sulfate : interagit avec les chaînes latérales hydrophobes des aa) et les protéines peuvent subir un traitement par le β-mercaptoéthanol (coupe les ponts disulfures) suivi d'un chauffage à 100°C. Ces traitements permettront une dénaturation complète des protéines et on obtient un rapport du nombre de charges négatives pratiquement constant pour toutes les protéines. La mobilité électrophorétique d'une protéine peut être calculée en divisant la valeur de sa migration lors d'une életrophorèse par celle obtenue par une petite protéine référence. La mobilité électrophorétique μ est fonction du logarithme de la masse moléculaire :

$\mu = f(\log M)$. En portant sur un graphique μ de protéines de masse moléculaires connues en fonction de leur masse moléculaire on pourra déterminer celle-ci pour une protéine quelconque.

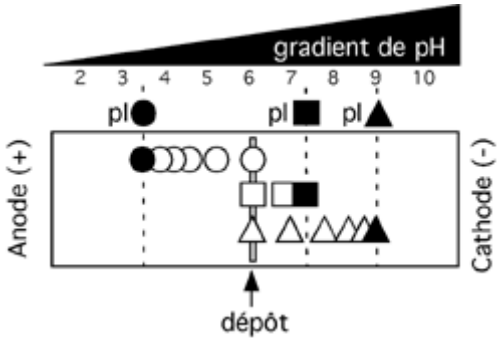
Remarque : le SDS rompt les structures quaternaires des protéines multimériques et permet la séparation de leurs sous-unités selon leurs tailles respectives.



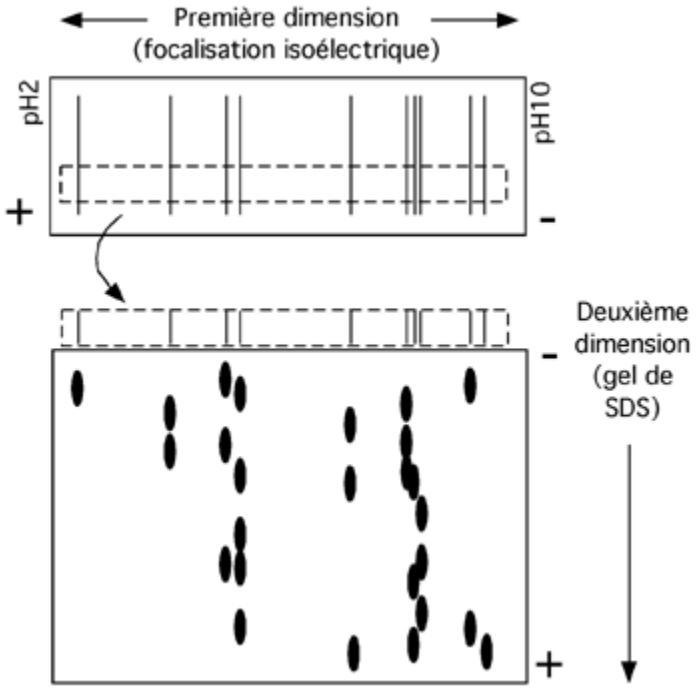
h. Focalisation isoélectrique

Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur pI.

On peut créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certains nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines. carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de pI. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pI. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pI couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pI.



On peut combiner la séparation isoélectrique avec la séparation selon le poids moléculaire que permet le gel de SDS. Cette combinaison est appelé "gel 2D", pour *deux dimensions*.



Après l'électrofocalisation, une bande longitudinale contenant toutes les protéines séparées est coupée du gel. Cette bande ne doit pas être trop large pour que les résultats de l'étape suivante ne soient pas trop flous. Elle va servir de "puits", si l'on peut dire, pour un gel SDS, ainsi que décrit dans la figure ci-dessous. Observez que chaque bande du gel d'électrofocalisation peut contenir plusieurs protéines de poids moléculaire différent. Si on effectuait le processus à l'envers, c'est à dire si on faisait courir un gel de SDS avant de soumettre une de ses pistes à la focalisation isoélectrique, on verrait que plusieurs protéines de même poids moléculaire ont des pI très différents. Le gel 2D est très utilisé dans les analyses protéomiques parce qu'il sépare les protéines selon deux

paramètres distincts et permet l'étude d'un plus grand nombre d'entre elles en même temps.

i. Ultracentrifugation

* en gradient de saccharose (de zone)

Principe : ***séparer des macromolécules selon leur poids moléculaire et/ou leur forme*** dans une *solution de centrifugation* sous l'effet d'un champ gravitationnel intense (lors de rotations dans une centrifugeuse). En effet la distance de migration en un temps donné est fonction du PM et de la forme de la macromolécule. *La solution de centrifugation* est souvent un gradient de concentration de saccharose. Il permet de stabiliser la séparation des molécules au cours puis à la fin de l'ultracentrifugation. Ici, la mesure de la vitesse de migration d'une particule donnée permet de déterminer sa constante de sédimentation (S) qui est liée à **la forme et au PM** de la particule étudiée.

* en gradient de chlorure de césium

Deux techniques sont largement utilisées dans les laboratoires pour ***séparer les molécules selon leur densité*** : la centrifugation en gradient continu et la centrifugation en gradient discontinu (voir TD).

IV. 5. 2. Identification

La protéine dont les ponts disulfure auront été coupés est soumise à différents modes d'hydrolyse enzymatique (trypsine, chymotrypsine, thermolysine…) ou chimique, par le bromure de cyanogène qui coupe la chaîne au niveau des résidus méthionyle. Les peptides qui en résultent de ces hydrolyses sont séparés par chromatographie et électrophorèse. Ils sont élués sélectivement et analysés (voir analyse des peptides).

IV. 5. 3. Dosages

De nombreuses méthodes ont été mises au point. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon, etc.

Absorption à 280 nm : Le tryptophane absorbe fortement à 280 nm. Il est donc possible de doser les protéines en mesurant l'A_{280}. L'absorption à cette longueur d'onde dépend principalement du nombre de tryptophanes dans le mélange protéique. Une solution contenant 1 mg de protéines/ml a une A_{280} de l'ordre de 0.5 à 2.0. On peut donc déterminer assez précisément la concentration de ces protéines en appliquant la relation de Beer-Lambert.

Méthode du biuret

Cette méthode a été développée par Gornall et al (1949) qui ont appliqué la réaction du biuret pour obtenir une méthode quantitative de dosage des protéines. Cette réaction du biuret est la formation d'un complexe pourpre entre le biuret (NH_2-CO-NH-CO-NH_2) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe de coordination résultant absorbe fortement dans le bleu. Même si cette méthode est peu sensible (1-5 mg/ml) elle est relativement rapide.

Méthode de Lowry

Cette méthode a été développée par Lowry et al (1951) qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde ! Encore aujourd'hui on publie de nouvelles variantes de cette méthode. La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité. Elle peut atteindre 1µg à 1.5 mg/ml. La zone de linéarité de la réaction est cependant étroite et il faut utiliser la portion linéaire de la courbe qui correspond à l'absorption de l'inconnu.

Méthode du bleu de Coomassie

Bradford et al (1976) ont développée une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu acide ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. C'est une méthode très sensible (2-5 µg/ml) et très rapide.