

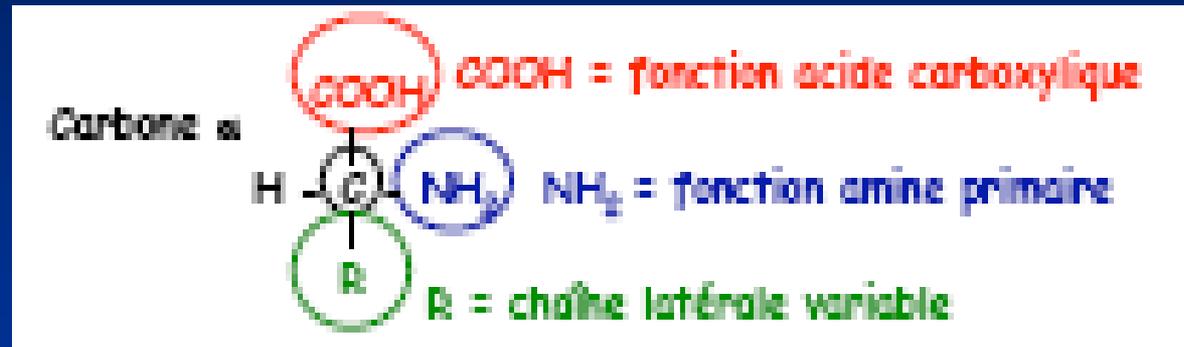
Chapitre3: Les protéines

I. LES ACIDES AMINES

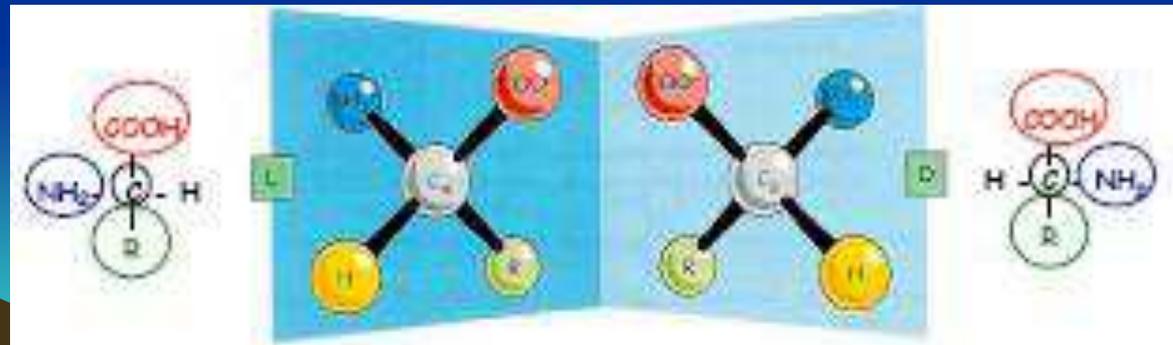
[www.facebook.com/ DomaineSNV/](http://www.facebook.com/DomaineSNV/)

1. Définition

- La structure commune de (presque) tous les acides aminés peut s'écrire :



- Le carbone α est asymétrique. Il existe donc deux stéréoisomères.



- La masse de chaque aa dépend de la chaîne latérale. La masse moyenne est d'environ 120 Da.
- Les protéines ne contiennent que des L acides aminés.

2. Classification des acides aminés

WWW.SNV18.CU.CC /
SNV_LMD@HOTMAIL.COM / ISLAM

- Il existe **20** acides aminés naturels entrant dans la composition des protéines. On peut répartir les acides aminés selon la nature de leur chaîne latérale en 3 classes:

acides aminés apolaires	à chaîne aliphatique : glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, méthionine, proline à chaîne aromatique : phénylalanine, tryptophane
acides aminés polaires neutres	à fonction alcool : sérine, thréonine, tyrosine à fonction soufrée : cystéine à fonction amide : glutamine, asparagine
acides aminés polaires ionisables	à fonction acide : acide glutamique, acide aspartique à fonction basique : histidine, lysine, arginine

Acide aminé essentiel = non synthétisé par l'homme

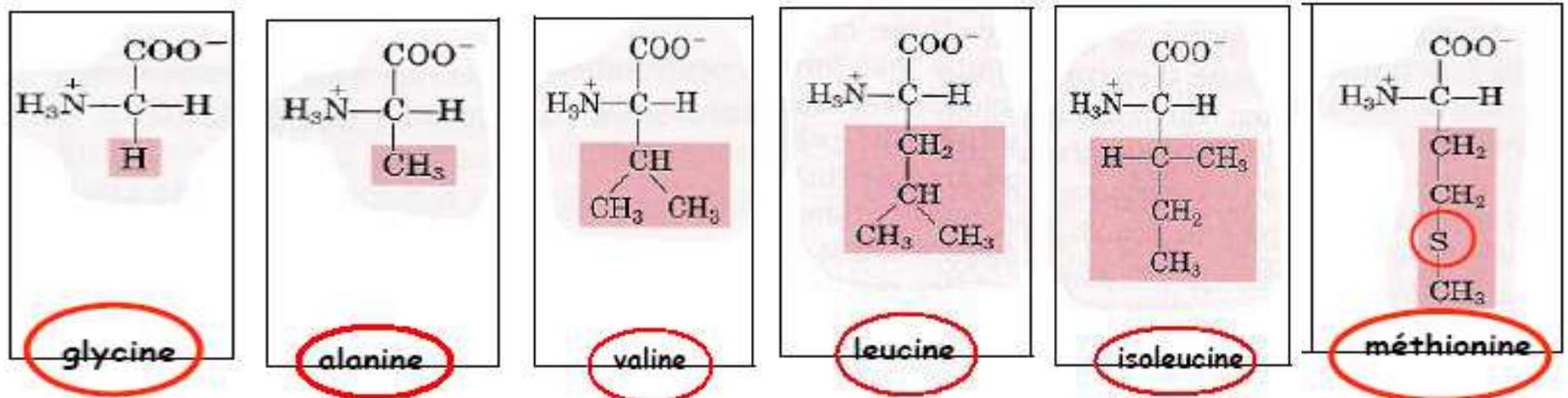
• Il existe des codes à trois ou une lettre extrêmement utilisés pour les séquences protéiques.

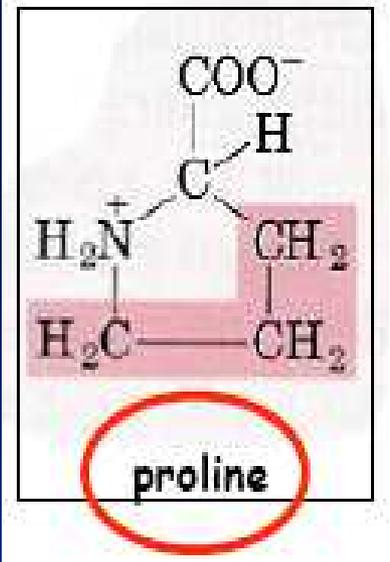
glycine, Gly, G	méthionine, Met, M	Cystéine, Cys, C	phénylalanine, Phe, F
alanine, Ala, A	Proline, Pro, P	glutamine, Gln, Q	Tryptophane, Trp, W
valine, Val, V	sérine, Ser, S	Asparagine, Asn, N	histidine, His, H
leucine, Leu, L	thréonine, Thr, T	acide glutamique, Glu, E	lysine, Lys, K
isoleucine, Ileu, I	Tyrosine, Tyr, Y	acide aspartique, Asp, D	Arginine, Arg, R

3. Propriétés spécifiques des acides aminés

3.1. Acides aminés apolaires:

à chaîne aliphatique

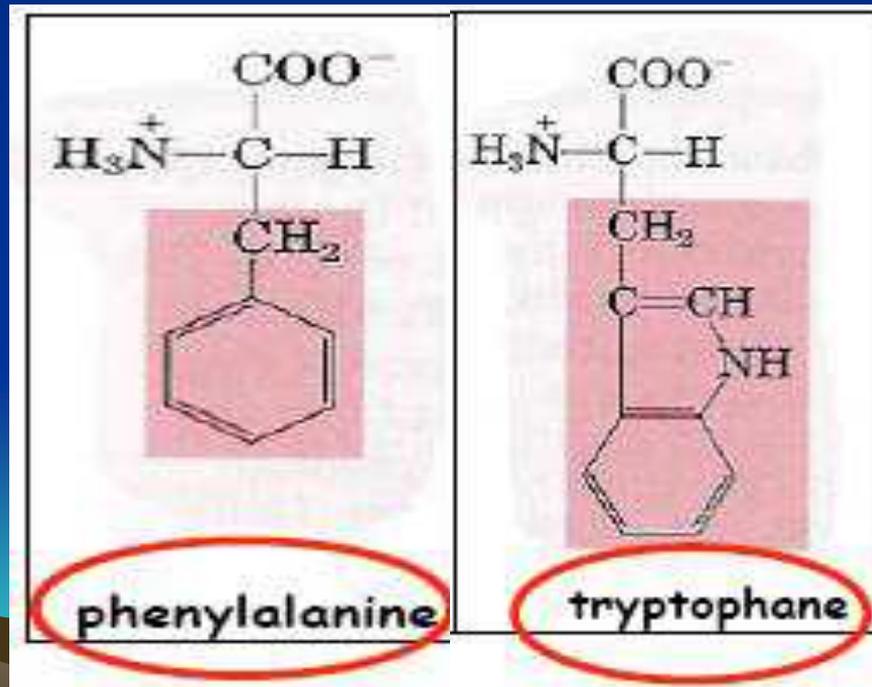




Remarques:

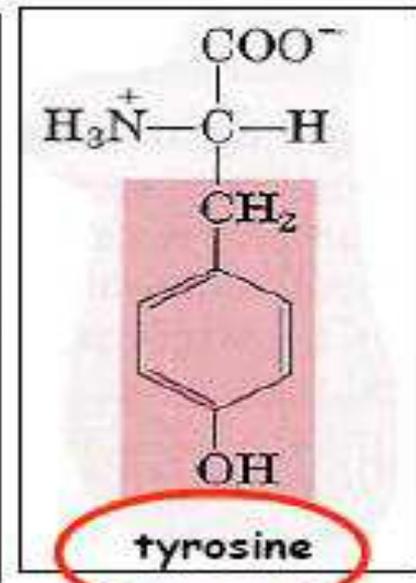
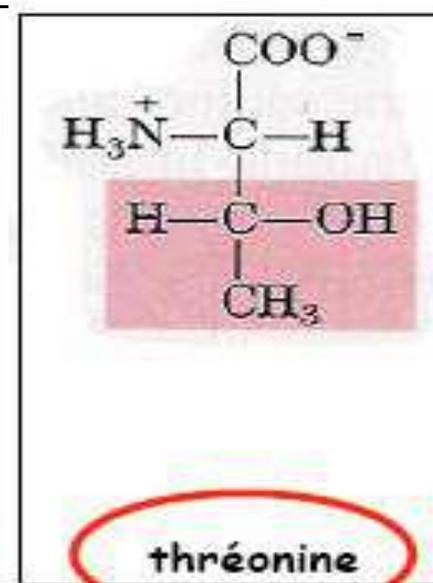
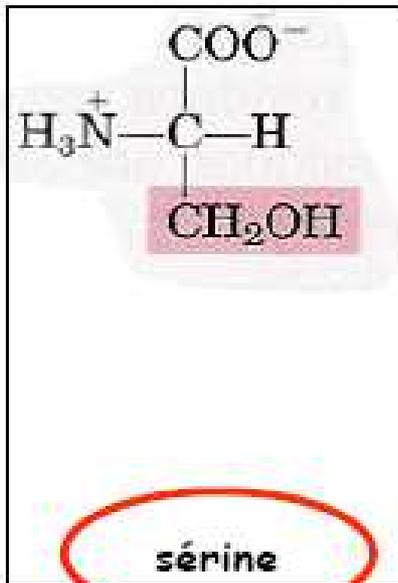
- La glycine n'a pas de C asymétrique.
- La proline possède une chaîne latérale liée à la fois au C et à l'azote.

à chaîne aromatique

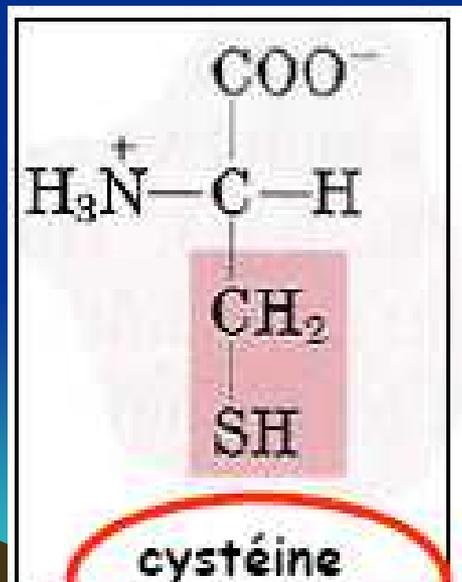


3.2. Acides aminés polaires neutres

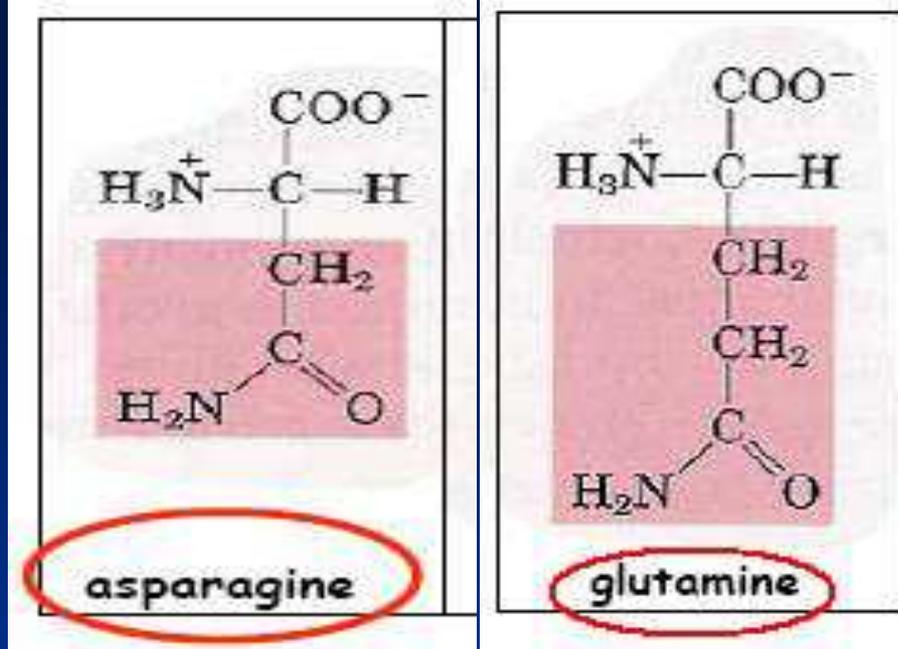
à fonction alcool



À fonction soufrée

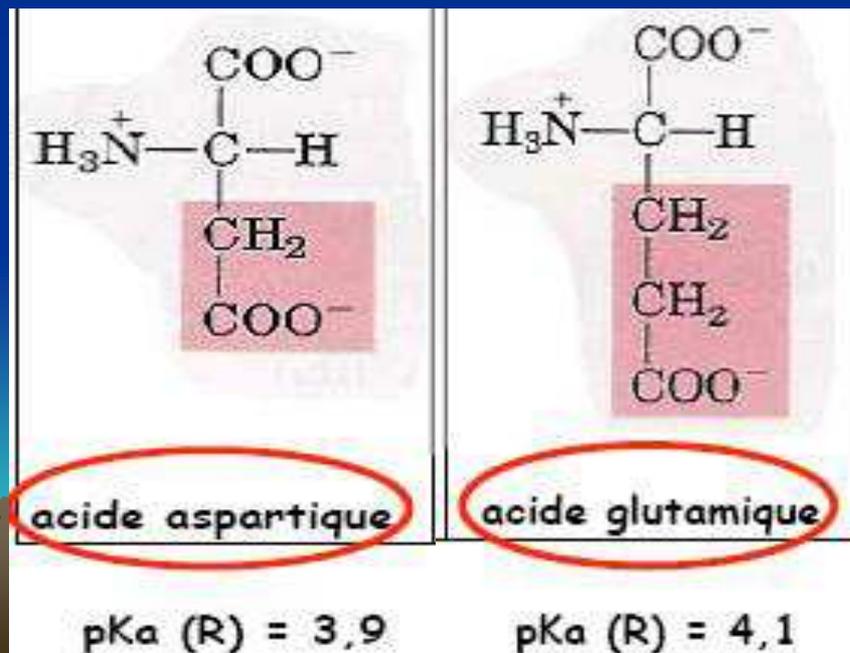


À fonction amide

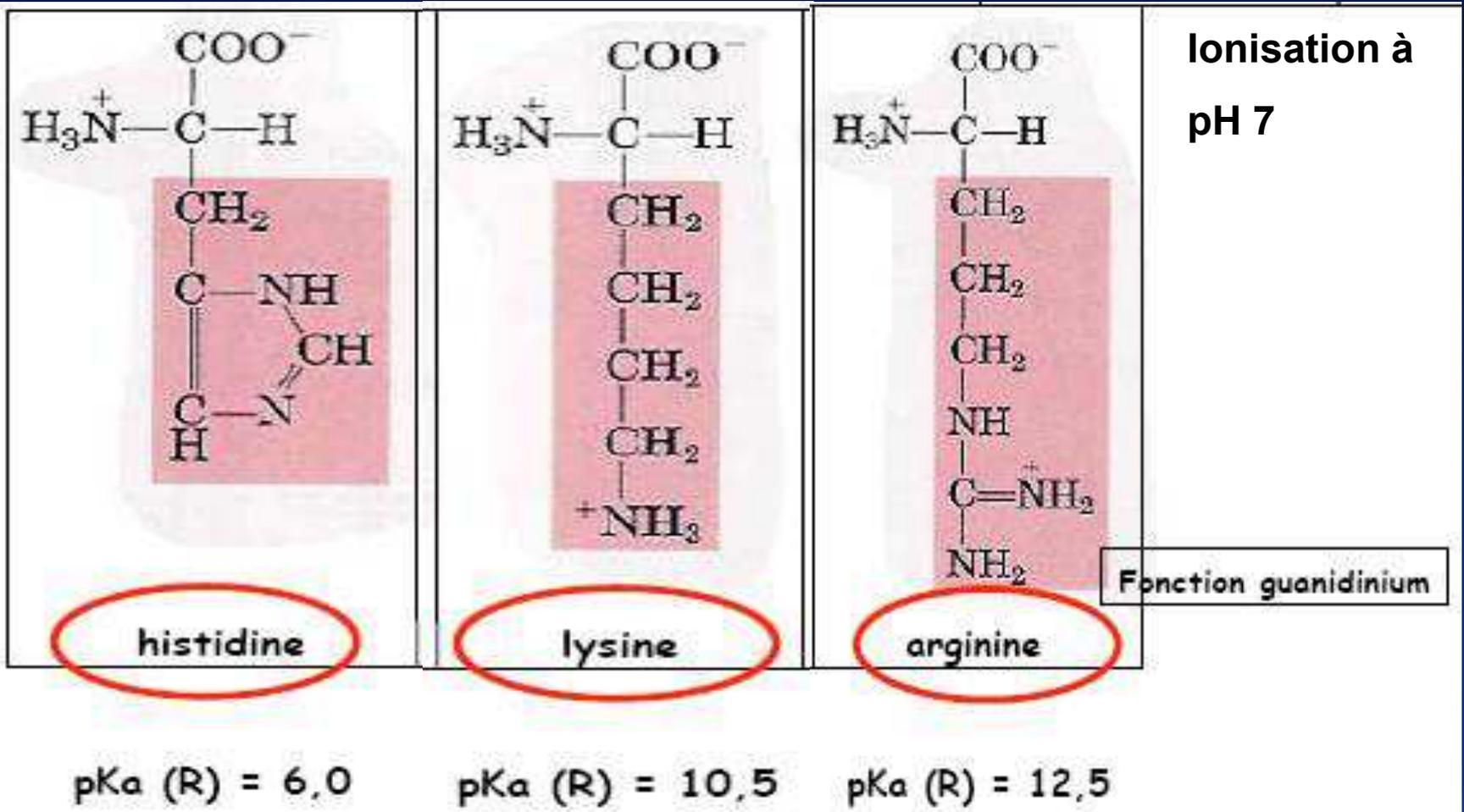


3.3. Acides aminés polaires ionisables

À fonction acide

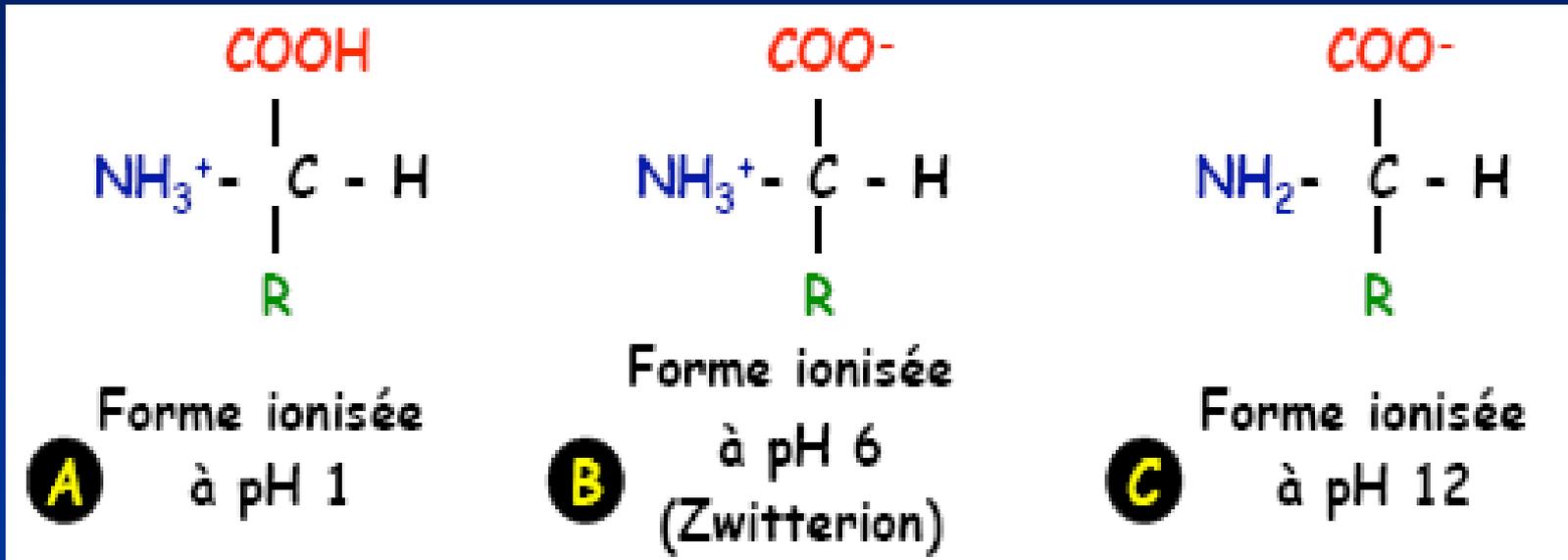


Ionisation à
pH7



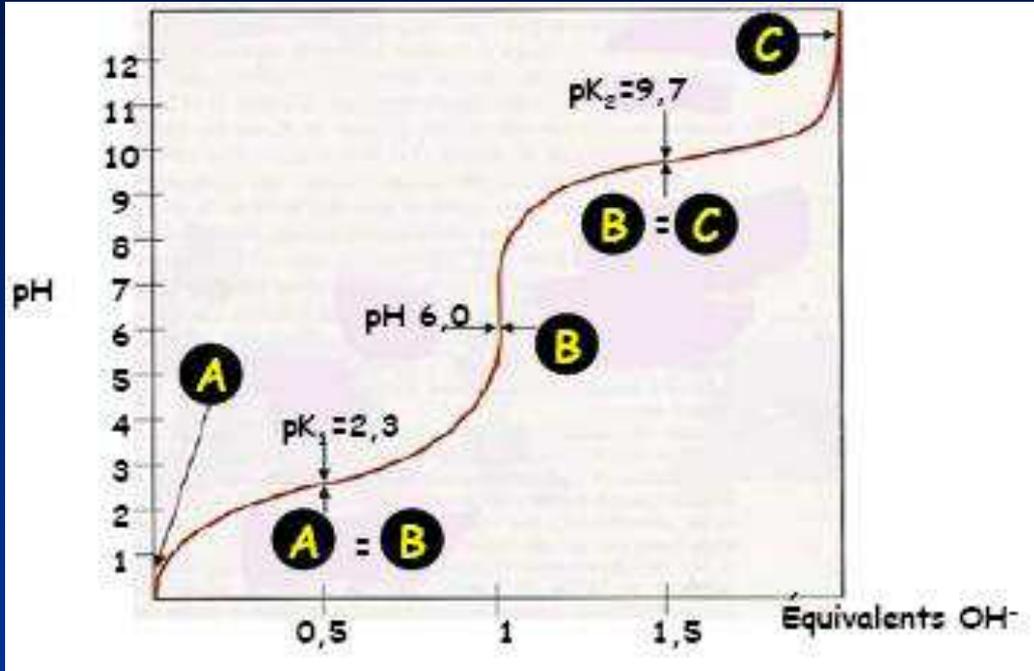
4. Propriétés ioniques des acides aminés

- En solution **aqueuse** (=dans tout système biologique), les acides aminés sont **ionisés**. L'état d'ionisation dépend du pH environnant.

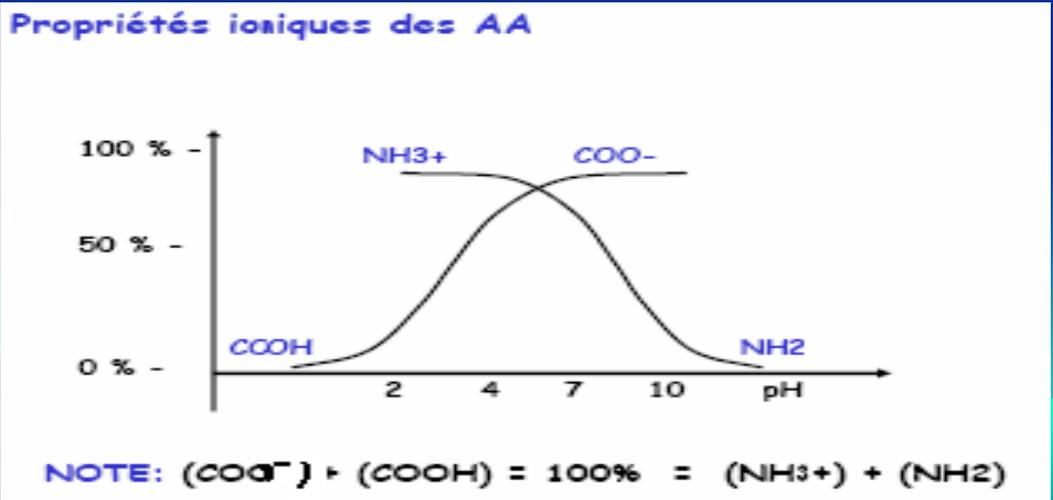


• La titration d'un acide aminé

On peut **titrer** un acide aminé et déterminer les pK des fonctions **carboxylique** et **amine**



la courbe de titration d'un aa



- Équation d'Henderson-Hasselbalch

- On a la réaction: $AH \rightarrow A^- + H^+$ tel que $K_a = [A^-][H^+] / [AH]$

- Isolons le paramètre $[H^+]$: $[H^+] = K_a[AH] / [A^-]$

- Prenons le logarithme: $\log [H^+] = \log K_a + \log ([AH] / [A^-])$

Ou

$$\log (1 / [H^+]) = \log (1 / K_a) + \log ([A^-] / [AH])$$

- Or, de même que $pH = \log (1 / [H^+])$, le $pK_a = \log (1 / K_a)$

Ainsi,

$$pH = pK_a + \log ([A^-] / [AH])$$

Équation d'Henderson-Hasselbalch

pour une fonction carboxylique: $pH = pK_a + \log COO^- / COOH$

pour une fonction amine: $pH = pK_b + \log NH_2 / NH_3^+$

- si $(NH_2) = (NH_3^+) \rightarrow pH = pK_b + \log (1) = pK_b$
donc : $pK_b = pH$ de 1/2 dissociation

- si $(COO^-) = (COOH) \rightarrow pH = pK_a + \log (1) = pK_a$
donc : $pK_a = pH$ de 1/2 dissociation

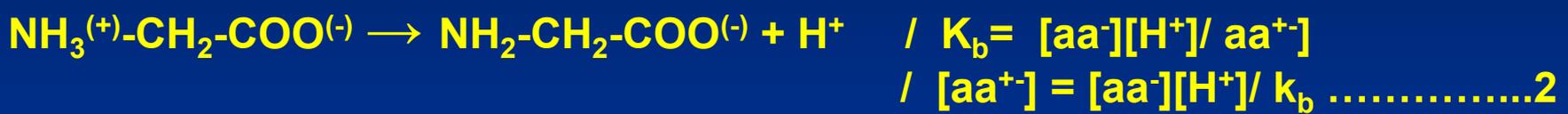
• Le pH isoélectrique d'un acide aminé

Un acide aminé simple, mono-aminé et mono-carboxylique tel que la glycine (G) :

NH₂-CH₂-COOH est un diacide dans sa forme pleinement protonée :



Il peut donner deux protons durant sa titration avec une base :



Remplaçons l'équation 2 dans l'équation 1 on obtient:

K_a = [aa⁻][H⁺] / k_b . [H⁺] / [aa⁺]

à pH_i les charge (-) = (+) → [aa⁻] = [aa⁺]

K_aK_b = [H⁺]² → pK_a+pK_b = 2 pH_i

pH_i = pK_a+pK_b / 2

Exemple de la lysine et l'ac.glutamique à R ionisable:

Il y a 4 formes ionisées différentes. Le point isoélectrique se calcule par la moyenne algébrique des pKa des fonctions ionisables de part et d'autre de la forme de charge nulle.

EX1: Le pH_i de la lysine

$$pH_i = pK_2 + pK_3 / 2$$

EX2: Le pH_i de l'acide aspartique

$$pH_i = pK_1 + pK_2 / 2$$

Intérêts de la titration :

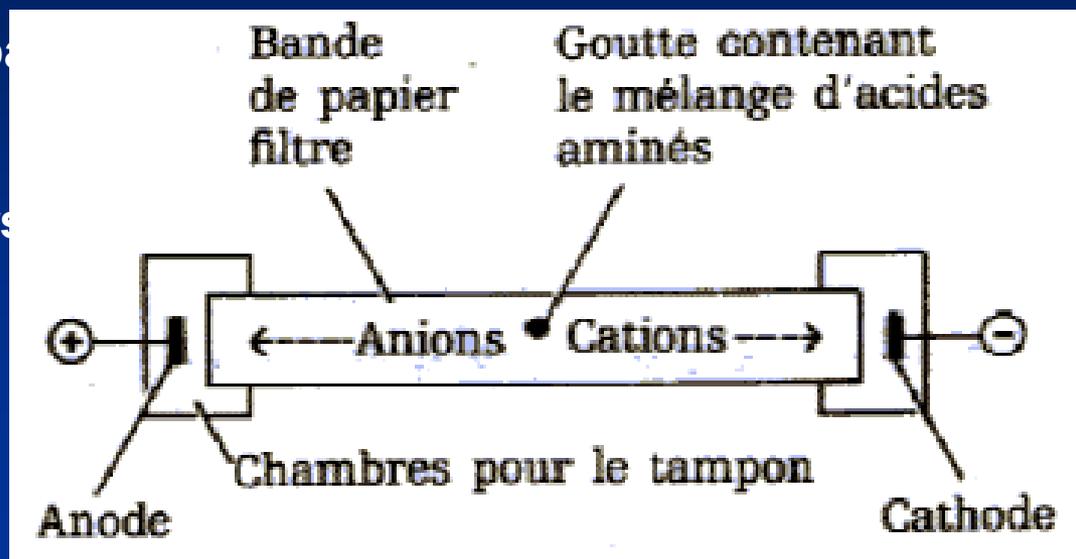
- valeurs des pKA des fonctions ionisables
- zones de pouvoir tampon = zones où le pH varie faiblement = zones de pKA

Séparation des aa p_{Hi} :

@ La mobilité électrophorétique :

- à $pH = p_{Hi}$, AA neutre et ne migre pas
- à $pH < p_{Hi}$, AA positif et migre vers la cathode
- à $pH > p_{Hi}$, AA négatif et migre vers l'anode

Aussi, plus le **pH** est éloigné de **p_{Hi}** plus la charge augmente et donc plus la distance parcourue lors de la migration est grande.

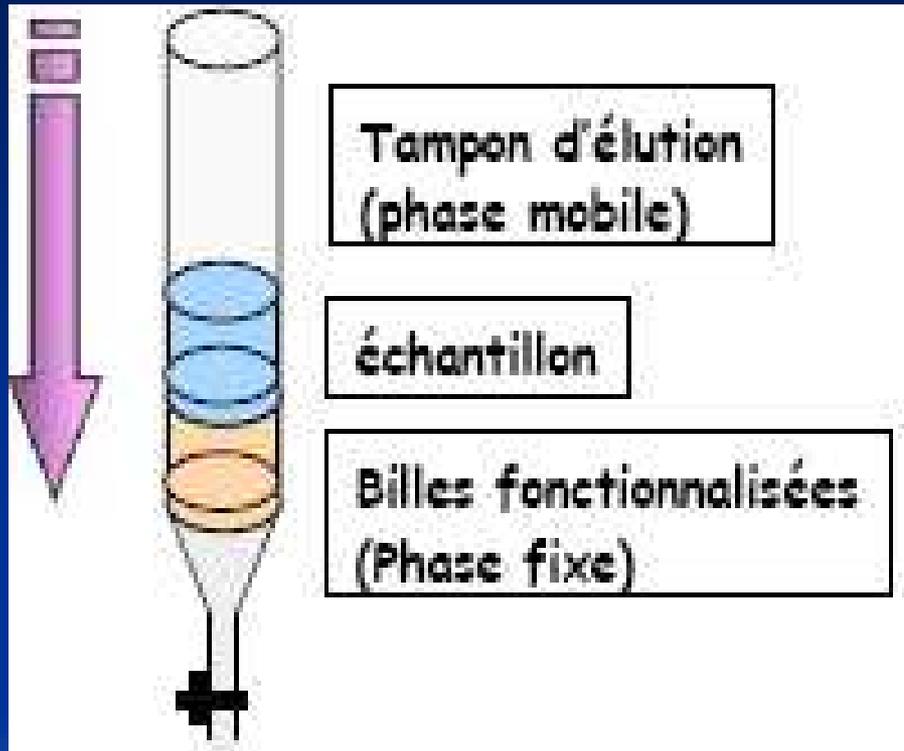


@ Là chromatographie d'échanges ioniques:

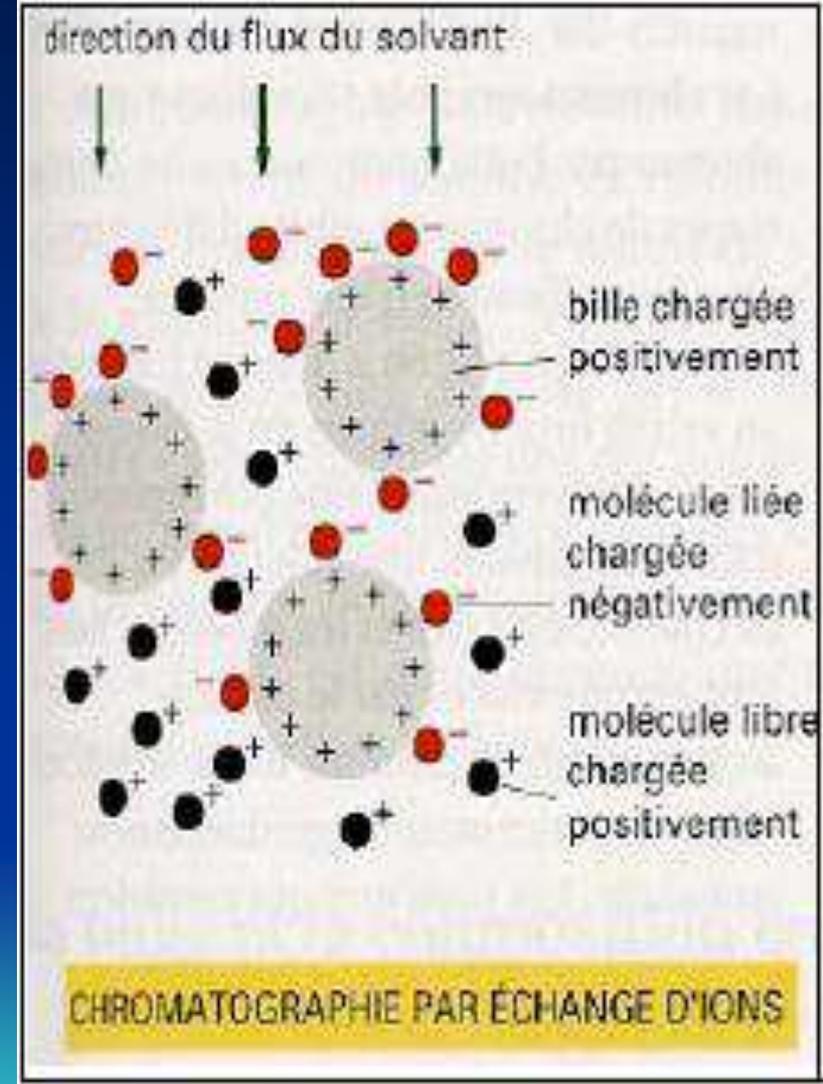
C'est un tube rempli de particules de petite tailles portant des groupements s'ionisant en fonction du pH.

@ La chromatographie d'échanges ioniques:

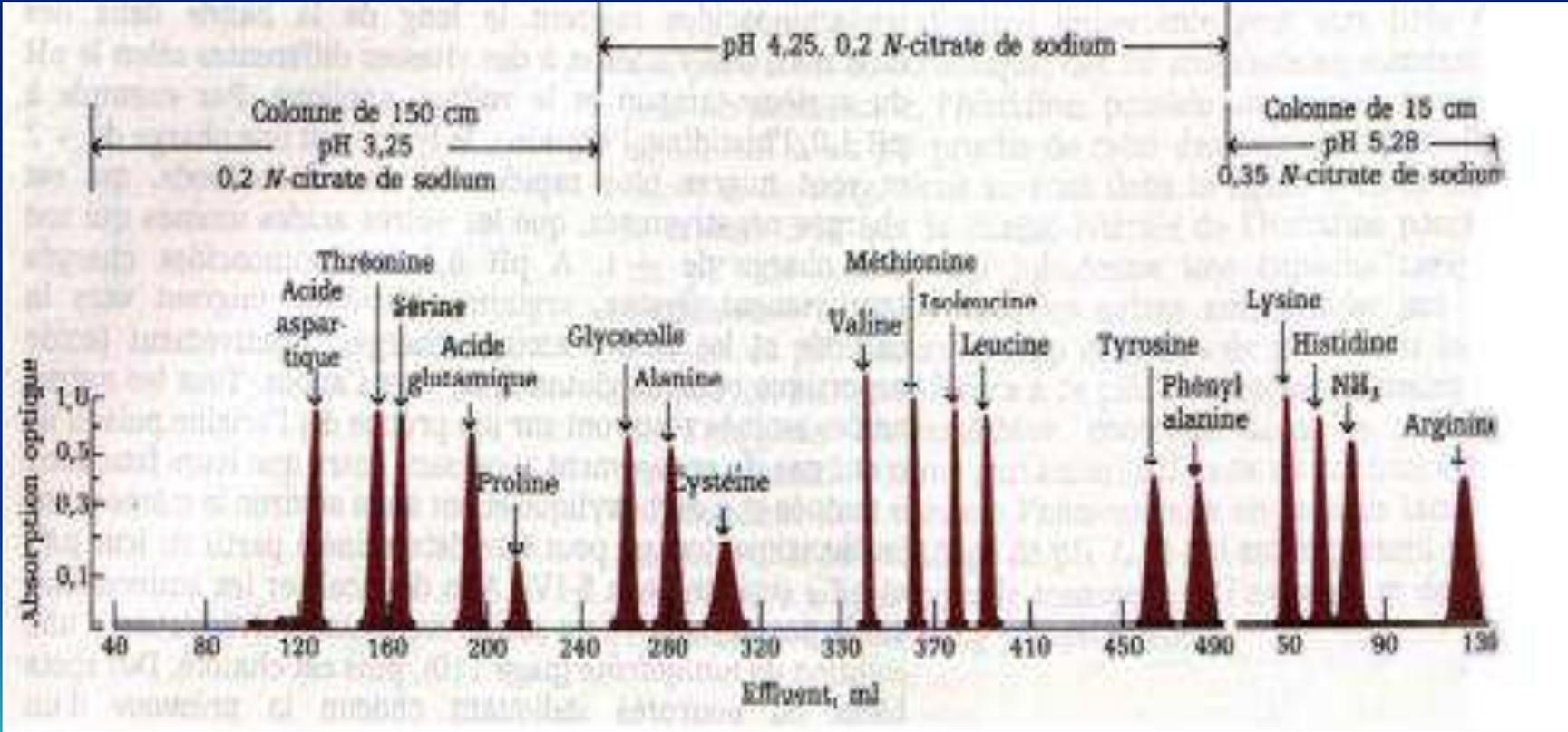
C'est un tube rempli de particules (billes de gel) de petite tailles portant des groupements s'ionisant en fonction du pH.



Séparation selon la charge



- En sortie de colonne, on fait une réaction colorée (ninhydrine) pour doser les acides aminés par spectrophotométrie.
- L'ordre d'élution est fonction du pHi.



5. PROPRIETES CHIMIQUES

Lorsque l'acide aminé est libre, il a au moins deux groupements fonctionnels sur le même carbone α et pour certains un troisième sur la chaîne latérale.

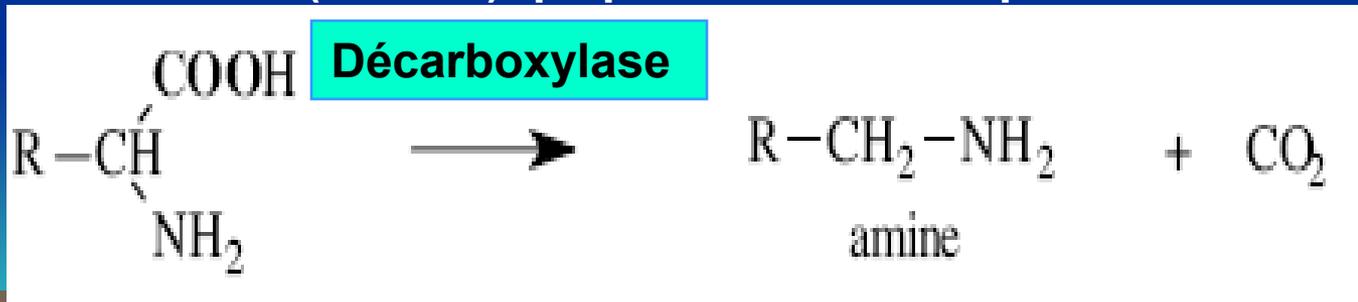
a. Propriétés liées au groupement COOH:

1. Estérification par les alcools:

- AA + Alcool \rightarrow éther, pour faciliter leur séparation par CPG
- AA + P_i \rightarrow AA-P, aa activé lors de la synthèse des pep

2. Décarboxylation:

Cette réaction est présente dans les organismes vivants pour produire à partir des aminoacides des dérivés (amines) qui peuvent être des précurseurs d'autres molécules.



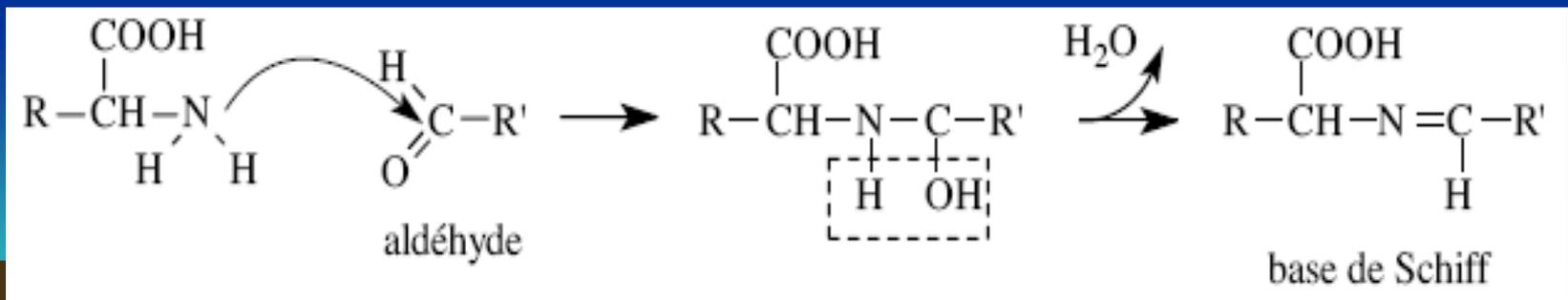
- Sérine → éthanol amine (pour phospholipide)
- Histidine → Histamine (vasodilatateur intervient dans l'inflammation et l'allergie)
- Acide glutamique → 4-aminobutanoïque ou (GABA), (neurotransmetteur)

b. Propriétés liées à la fonction amine (α-aminé)

1. Addition de carbonyle:

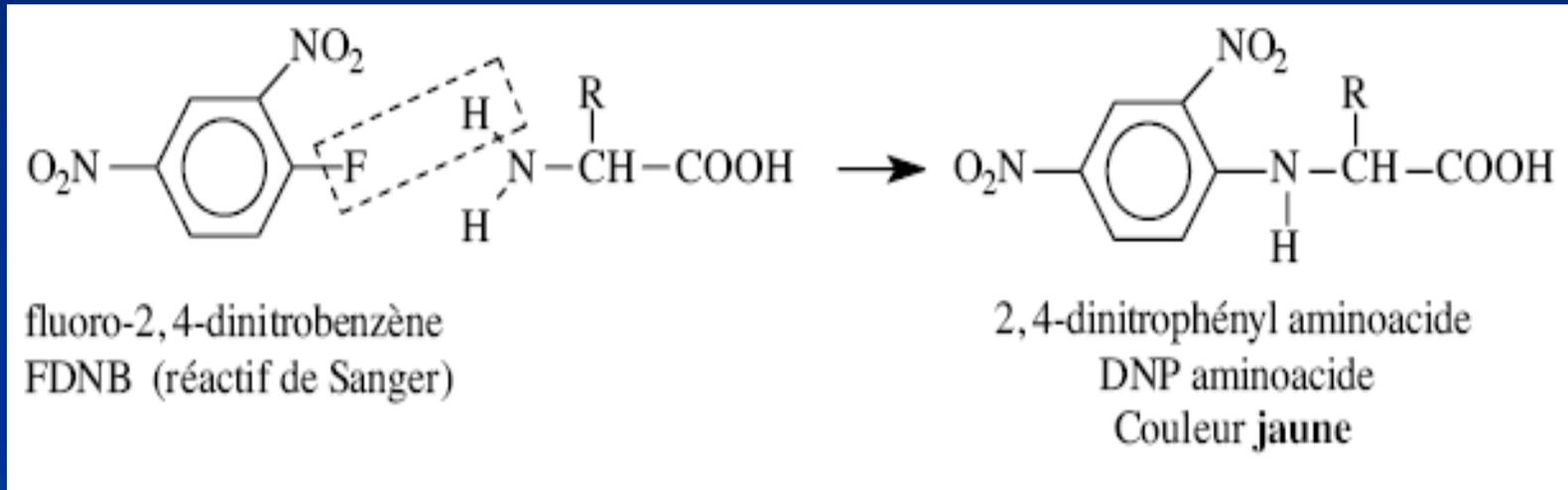
+ Les fonctions α-aminés des aminoacides réagissent réversiblement avec les aldéhydes pour donner des bases de Schiff qui sont relativement labiles, sauf la proline qui n'a pas une α-amine primaire.

+ Un des moyens très sensibles de détection des aminoacides utilise cette réaction : l'aldéhyde utilisé est le 1, 2-dialdéhyde benzénique. Le produit d'addition est très **fluorescent**.



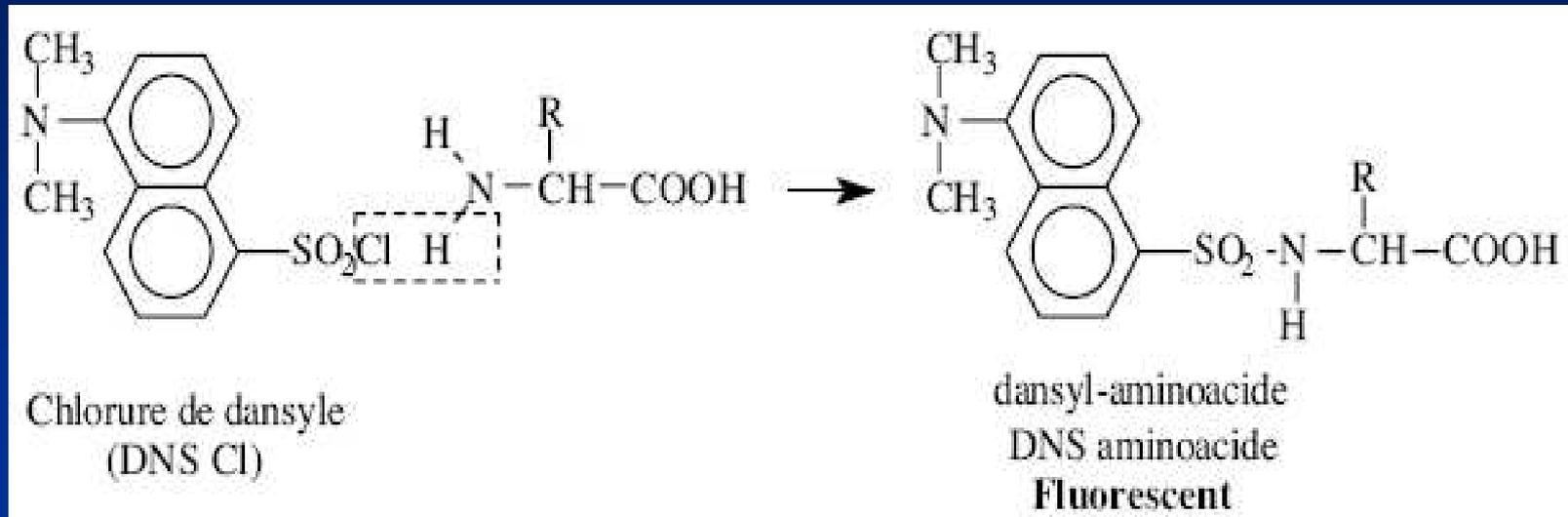
2. Arylation (méthode de Sanger)

Cette réaction à l'aide d'un dérivé aromatique activé a permis à Frederik SANGER (1953) d'établir la première structure primaire d'une protéine : **l'insuline**.



3. Acylation:

Le réactif de Sanger a été supplanté par un réactif donnant un produit plus stable et fluorescent permettant une plus grande sensibilité dans la détection : c'est le **chlorure de dansyle** (1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonyl).

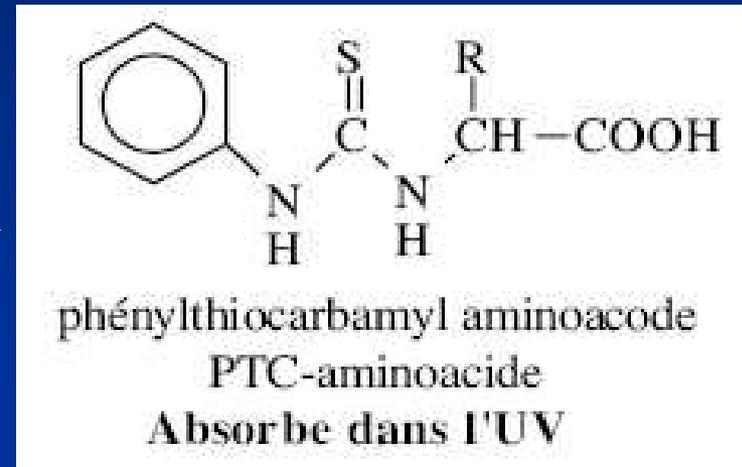
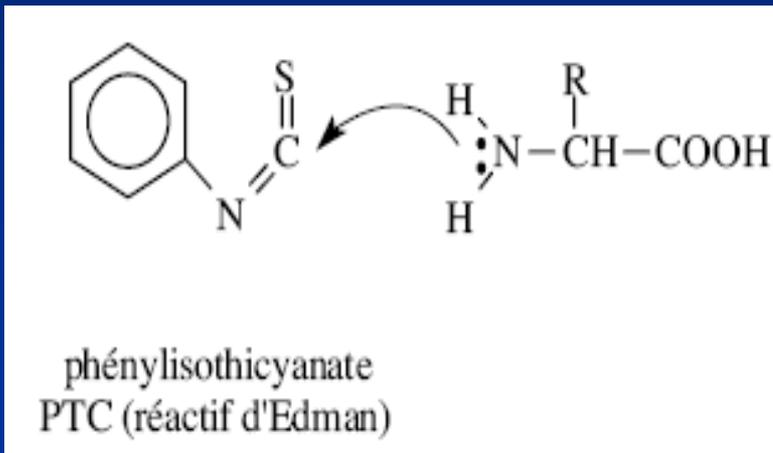


Remarque:

Dans les cellules, après leur biosynthèse, nombreuses sont les protéines qui subissent une acylation sur leur extrémité - NH₂ par l'acide acétique "activé", dans le but de protéger leur structure sinon le N-terminal est très réactive.

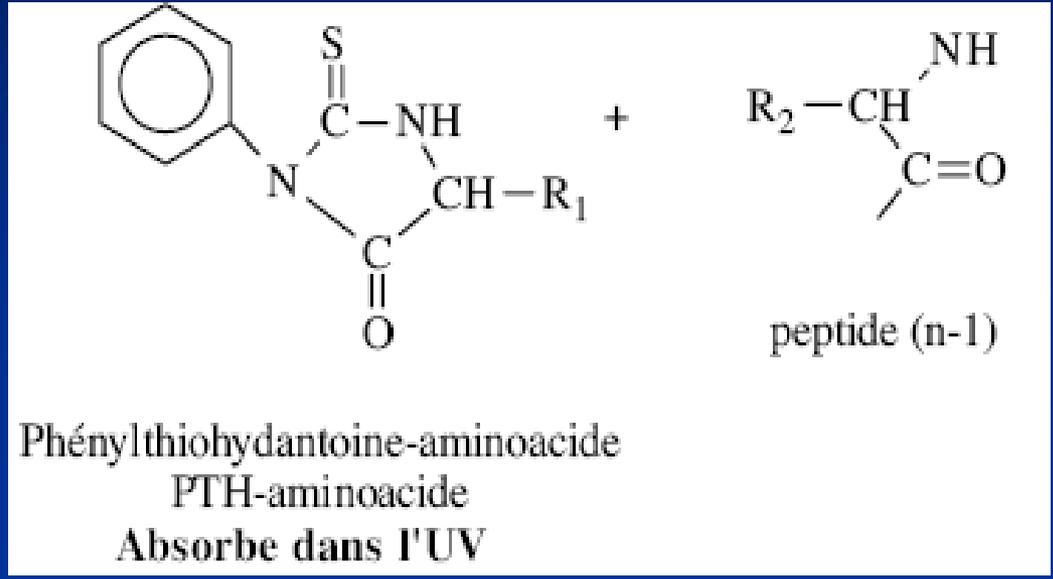
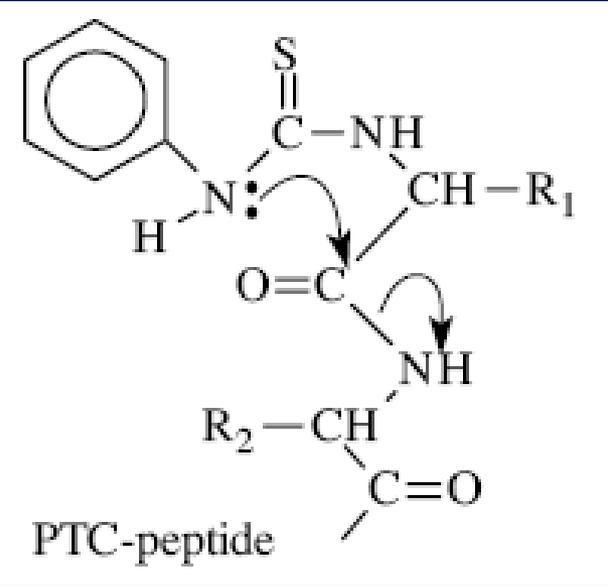
4. Carbamylation (méthode d'Edman)

- La carbamylation avec le phénylthiocyanate (PTC), à un pH basique de 9, donne des dérivés qui absorbent dans l'ultraviolet et facilement séparable par chromatographie.
- la réaction avec l'acide aminé terminal d'une protéine libre le dérivé d'addition et une protéine amputée de son acide aminé N-terminal : en itérant le processus, la détermination de la structure primaire de la protéine sera possible (dégradation récurrente d'Edman).



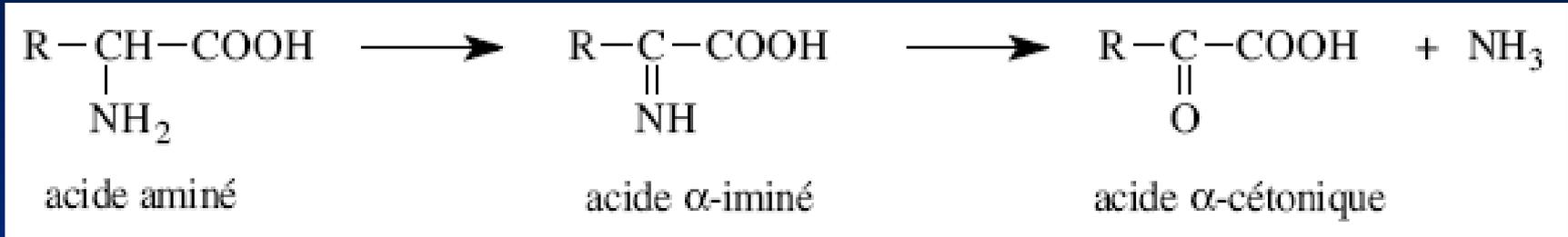
- Dans le cas d'un peptide de n acides aminés, le PTC-peptide va subir une cyclisation et une coupure à un pH légèrement acide, libérant un phénylthiohydantoïne-acide identifiable (PTH-acide), qui absorbe dans l'UV, et un peptide de (n-1) acides aminés.

- Dans le cas d'un peptide de n aminoacides, le PTC-peptide va subir une cyclisation et une coupure à un pH légèrement acide, libérant un phénylthiohydantoine-aminoacide identifiable (PTH-aminoacide), qui absorbe dans l'UV, et un peptide de (n-1) aminoacides.

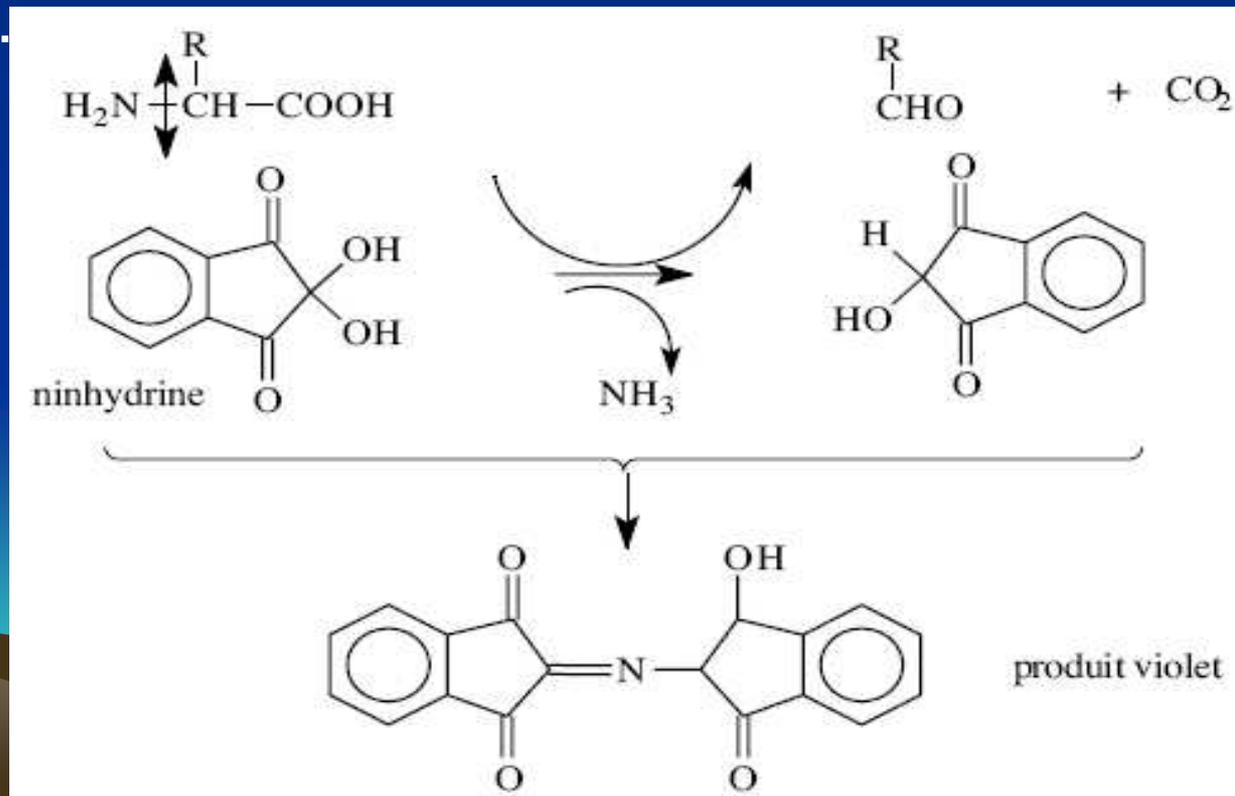


5. Désamination

- Les aa subissent une désamination avec oxydation qui produit un acide α -cétoniques



- La réaction avec la ninhydrine est l'une des plus connue et utilisée, elle aboutit à un produit violet pour les amines primaires et à un autre dérivé de couleur jaune pour les amines secondaires.

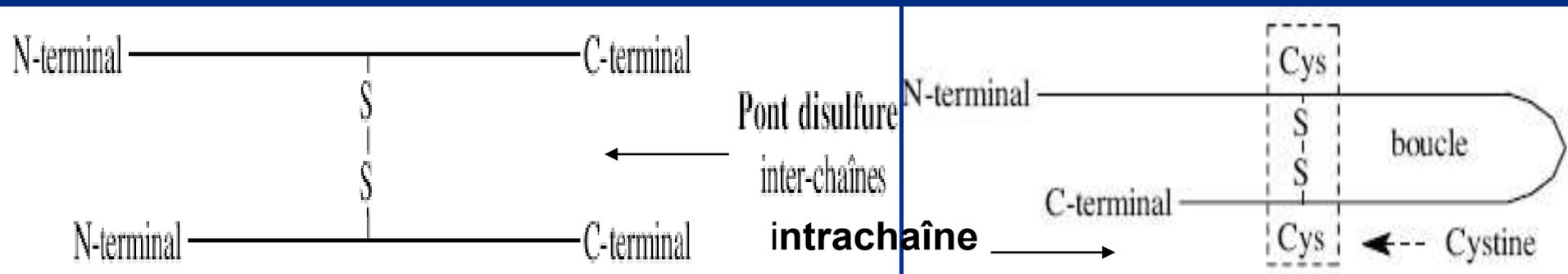


C. Propriétés liés aux groupes latéraux

Les groupes latéraux réactifs des aminoacides sont :

- **les carboxyles et amines** : ils sont de réactivité identique à celles des groupes α
- **les chaînes latérales** contenant du **soufre**, des groupes **imidazole** ou **aromatique** autre que le phényle inerte.

Ex₁: Le groupe **thiol** de la **cystéine** est très réactif : son oxydation permet la formation des **ponts disulfures** que l'on trouve dans les protéines (pont **intra-chaîne** ou **intra- chaînes** polypeptidiques).



EX₂: Les chaînes latérales **alcools** et **amides**

Ces groupes sont peu réactifs :

- la sérine intervient dans des mécanismes de catalyse enzymatique
- la sérine, la thréonine et la tyrosine sont des sites potentiels de phosphorylation
- la sérine, la thréonine et l'asparagine sont des sites potentiels de O et N-glycosylations
- l'hydroxyle de la tyrosine donne au noyau phényle une réactivité assez forte.

2. LES PEPTIDE

1. Définition

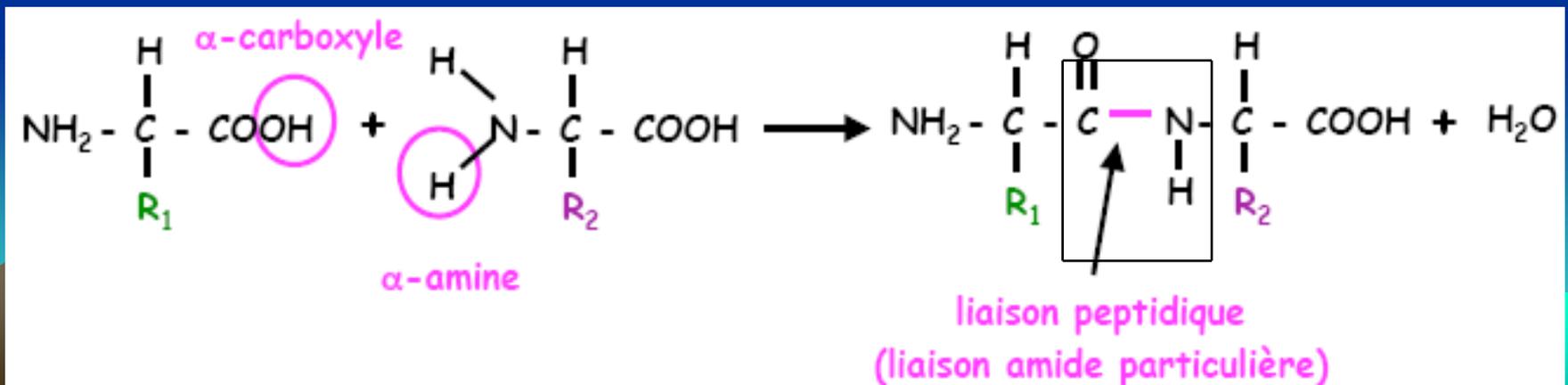
Un peptide c'est le produit de la **polymérisation** covalente des aminoacides par une **liaison peptidique**. Les peptides diffèrent par le nombre, la nature et l'ordre des aminoacides.

- **peptide** : enchaînement d'un nombre d'acide aminé inférieur à 50. Parmi ceux-ci, on parle d'oligopeptide pour un nombre d'acides aminés inférieur à 10 et de polypeptide pour un nombre supérieur à 10.

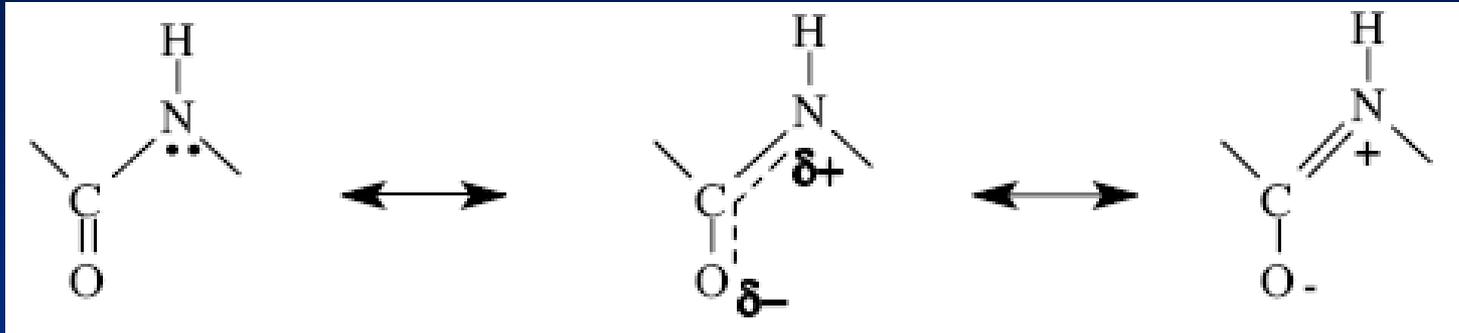
- **protéine** : enchaînement d'un nombre d'acides aminés au-delà de 50.

1. La liaison peptidique

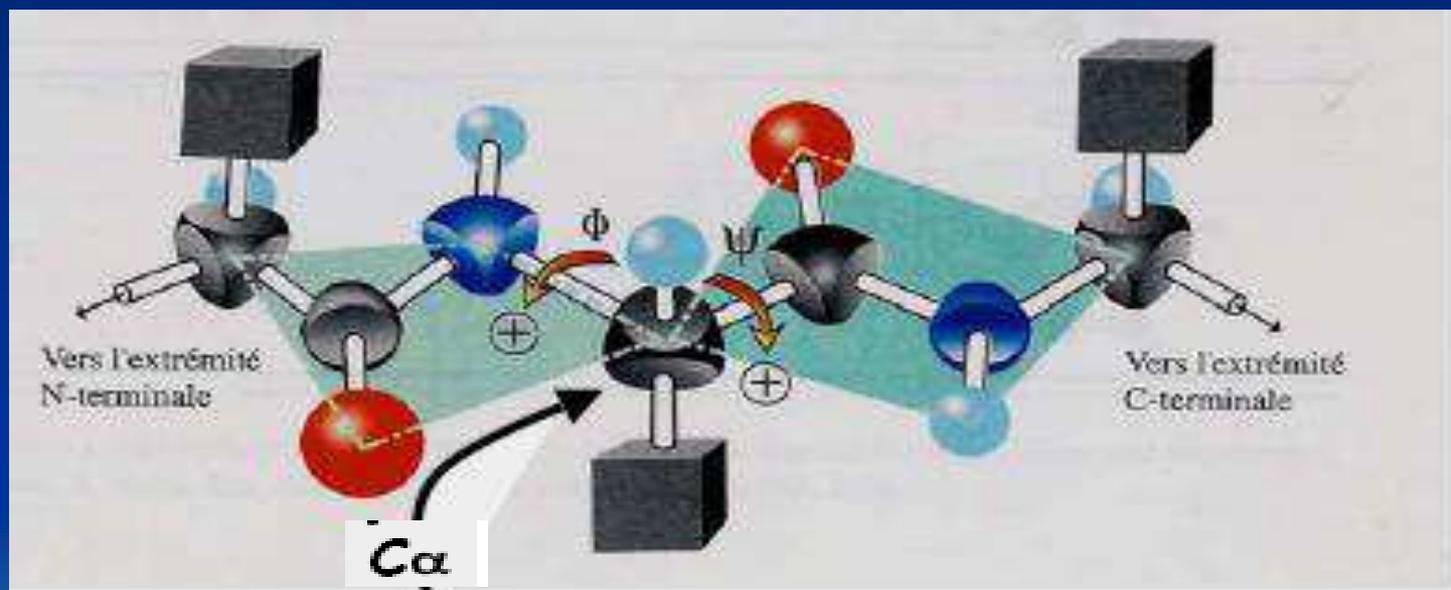
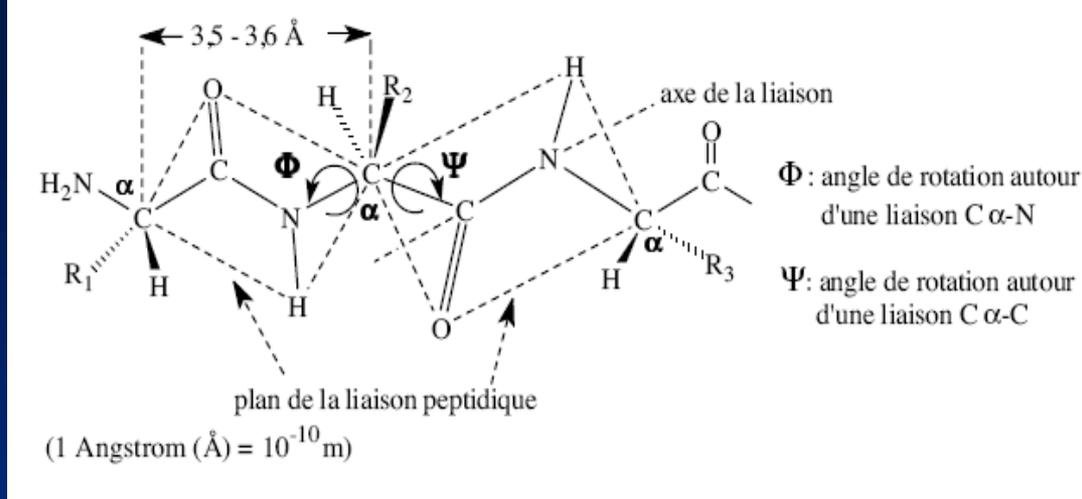
La liaison peptidique est le **ciment** de base de toutes les structures protéiques, est une liaison **covalente** qui se forme par condensation du groupe **α-carboxyle** (acide) d'un acide aminé avec le groupe **α-aminé** d'un autre acide aminé et élimination d'eau.



- Dans cette liaison les électrons π du groupe **carbonyle** et le **doublet électronique** libre de **l'azote** sont très proches. La résonance de ces électrons donne au groupe peptidique des structures intermédiaires entre deux formes mésomères.



- Cette liaison est intermédiaire entre une simple et une double liaison qui implique les propriétés suivantes :
 1. la structure du groupe peptidique est rigide : les 6 atomes sont coplanaires. Les angles des liaisons pour le carbone et pour l'azote avec leurs substituants sont de 120° .
 2. les 2 carbones $C\alpha$ se placent de part et d'autre du pont C-N dans la configuration trans la plus favorable thermodynamiquement.
 3. de part et d'autre de cette structure rigide, les rotations des groupes des liaisons $C\alpha-N$ et $C\alpha-C$ sont libres et seulement limitées par l'encombrement stérique.
 4. Les atomes d'oxygène et d'hydrogène d'une liaison peptidique sont d'excellents accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène.



- La liberté de rotation de l'angle Φ (phi) autour de la liaison entre le C α et l'azote amidique
- La liberté de rotation de l'angle Ψ (psi) autour de la liaison entre le C α et le groupe carbonyle

Terminologie

- Les acides aminés liés sont des "résidus d'acides aminés"
- l'aa portant le groupement NH_2 est dit "N-terminal"
- L'aa portant le groupement COOH est dit "C-terminal"
- Par convention d'écriture, on met le N-terminal à gauche et le C-terminal à droite
- Exemple d'un tétra-peptide:

NH_2 -Ala - Thr - Phe - Leu – COOH

alanyl-thréonyl-phénylalanyl-leucine

3. Détermination de la structure d'un peptide

La détermination de la structure primaire d'un peptide est conduite en deux étapes :

- 1) détermination de la composition en aminoacides
- 2) détermination de l'ordre des enchaînements des résidus.

Ces deux étapes ont comme point commun l'hydrolyse de la liaison peptidique.

a. Hydrolyse de la liaison peptidique

La liaison peptidique est très stable, son hydrolyse spontanée est quasiment nulle.

@ Hydrolyse chimique complète:

_ L'action de l'acide chlorhydrique (HCl) 6M sur un peptide, à ébullition pendant au moins 24 heures, aboutit à un hydrolysats contenant les aminoacides

- Le **tryptophane** est entièrement détruit avec cette hydrolyse acide.
- Les amides (**Asn, Gln**) sont hydrolysées en ammoniac et acides correspondants (**Asp, Glu**).
- Certains aminoacides (**Tyr, Ser, Thr**) peuvent être partiellement détruits (un temp d'hydrolyse plus faible permet de résoudre le problème).

@ Hydrolyse chimique spécifique:

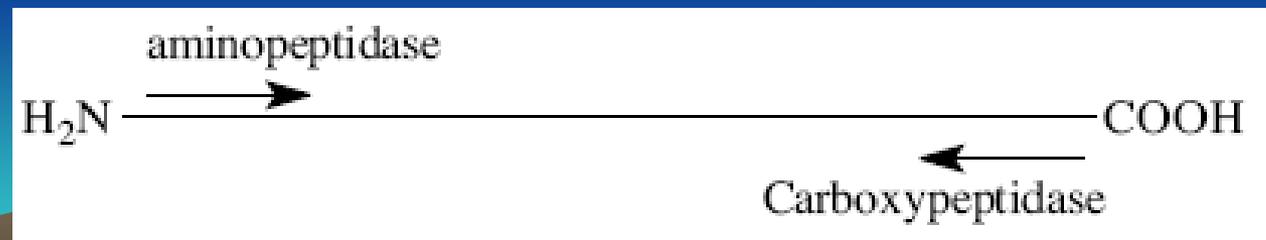
Certains réactifs hydrolysent une liaison peptidique avec une spécificité sur un des aminoacides participant à la liaison:

- Le bromure de cyanogène (**BrCN**) hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxyle de la méthionine : cette dernière devient alors un résidu C-terminal transformé en résidu homosérine lactone.
- Le 2-nitro-5-thiocyanobenzoate (**NTCB**) hydrolyse la liaison peptidique du côté amine de la cystéine.

@ Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse des liaisons peptidiques peut être réalisée par des enzymes protéolytiques, protéases. On les classe en deux groupes :

- **Exopeptidase**: L'enzyme n'hydrolyse que la première liaison peptidique (aminopeptidase) ou la dernière liaison peptidique (carboxypeptidase) en libérant l'acide aminé terminal.



-Endopeptidase

L'enzyme hydrolyse des liaisons peptidiques internes entre deux aminoacides i , ($i+1$). Il peut être spécifique du résidu en position i ou ($i+1$). L'hydrolyse d'un peptide par une **endopeptidase** donnera plusieurs fragments peptidiques : si on a m coupures (m liaisons peptidiques hydrolysées), le peptide sera dégradé en ($m+1$) fragments peptidiques.

Exemples d'endopeptidases avec leurs spécificités:

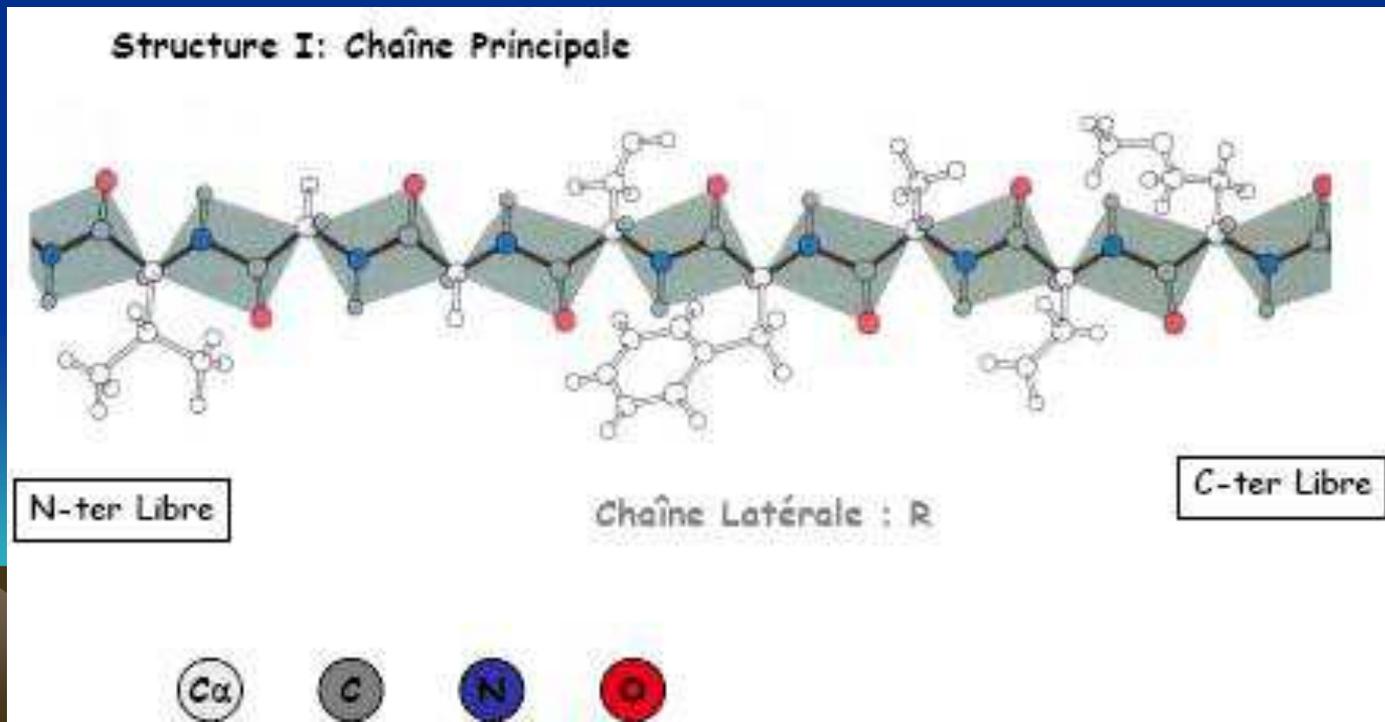
Enzyme	Source	résidu i	résidu ($i+1$)	particularité
trypsine (après P _{aa})	pancréas de boeuf	Arg, Lys		sauf ($i+1$) = Pro
chymotrypsine	pancréas de boeuf	Phe, Tyr, Trp		
Sa protéase	<i>Staphylococcus aureus</i>	Asp, Glu		
Fm protéase	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Pro		
thermolysine avant P_{aa}	<i>Bacillus thermoprotéolyticus</i>		Ala, Val, Leu Ile, Met	

3. LES PROTEINES

3.1. La structure des protéines: De l'aa à la macromolécule

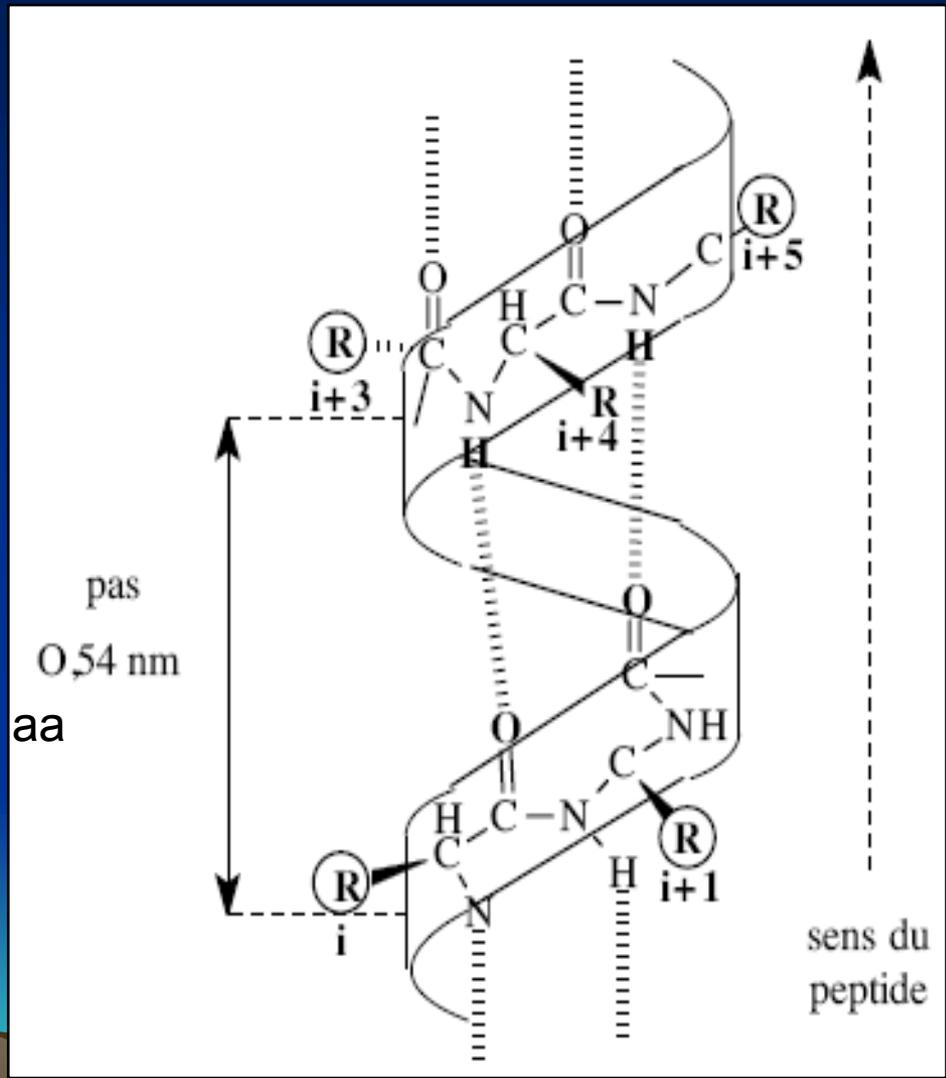
@ Structure primaire: Elle est définie par la composition et l'enchaînement des aminoacides dans une seule chaîne (monocaténaire).

- La séquence des acides aminés (structure primaire) détermine la structure tridimensionnelle.
- La séquence des acides aminés (structure primaire) est déterminée par les gènes.
- Une structure primaire donnée conduit à une structure tridimensionnelle donnée

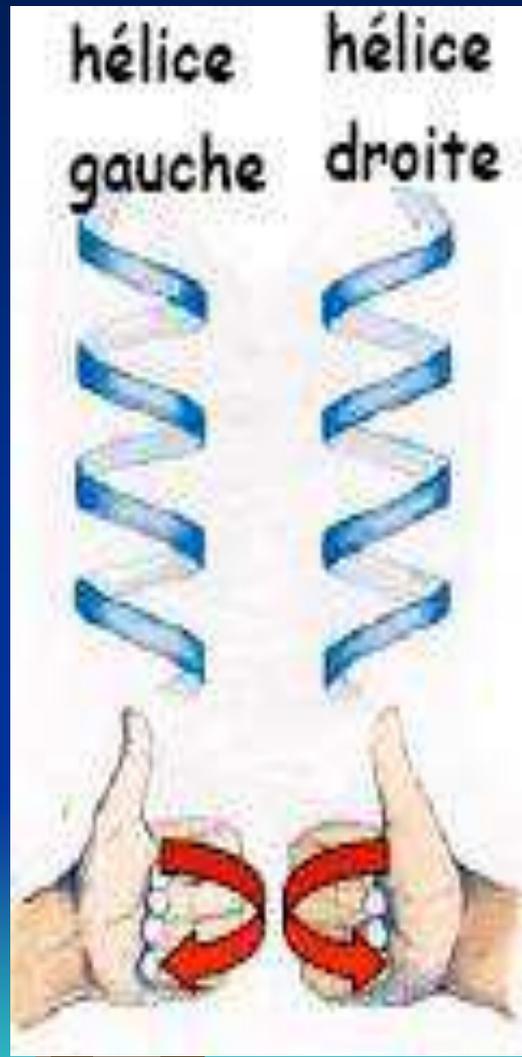


@ Structure secondaire:

1. Structure en Hélice α :



et 3.6 aa

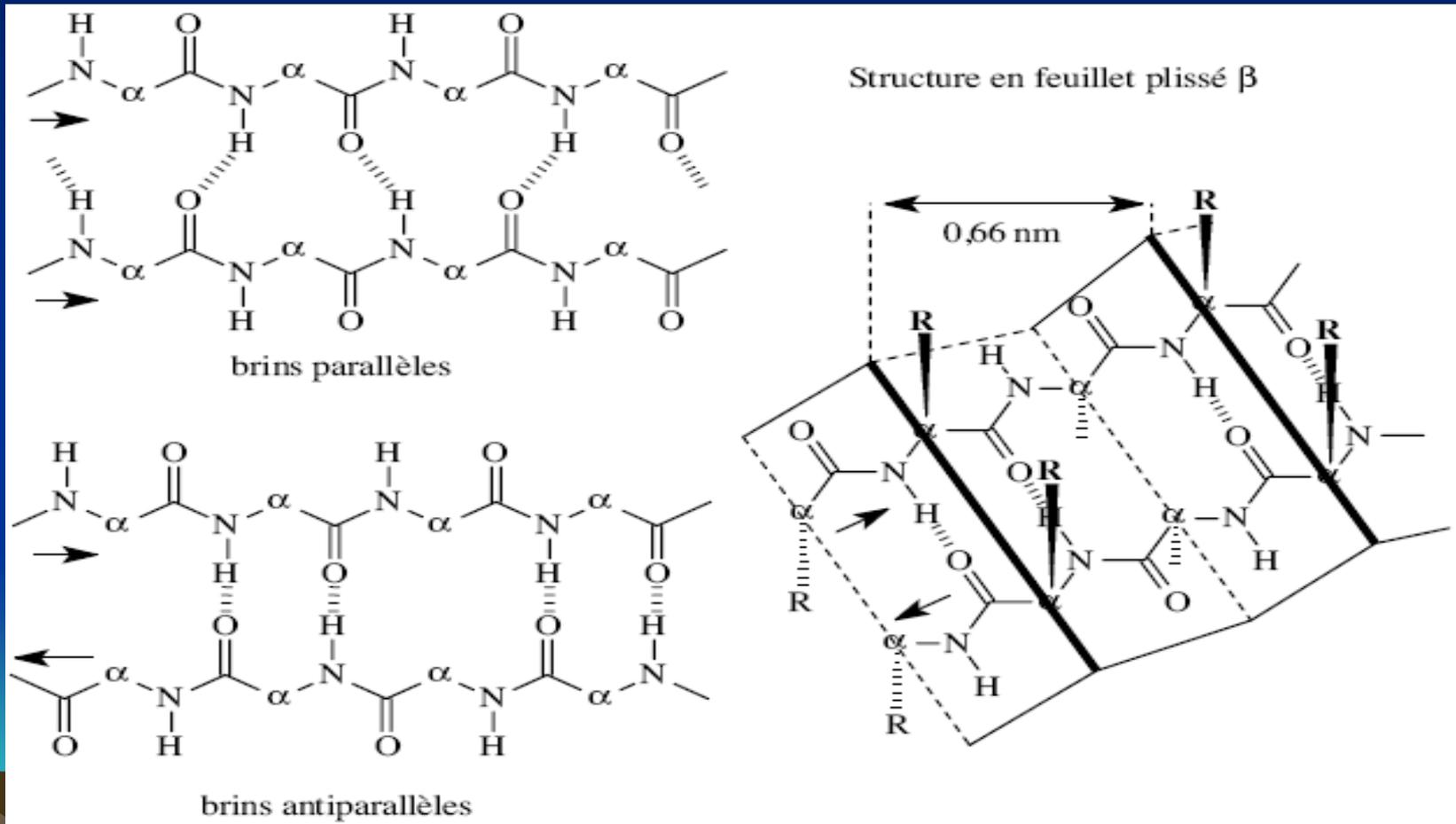


Caractéristiques d'une hélice alpha:

1. Structure répétitive et compacte
2. Stabilisée par les liaisons hydrogène de l'atome d'oxygène (C=O d'une liaison peptidique i avec l'atome d'hydrogène (N-H) de la liaison peptidique ($i+4$).
3. Les radicaux des résidus sont à l'extérieur de l'hélice, ce qui minimise les encombrements stériques.
4. les plans des liaisons peptidiques sont parallèles à l'axe de l'hélice et forment le squelette de l'hélice.
5. la liaison hydrogène C=O-----N-H, d'une longueur de 0,286 nm, est presque parallèle à l'axe de l'hélice.
6. Certains résidus déstabilisent l'hélice par la présence de charge dans leurs chaînes latérales (Asp, Glu, Arg et Lys).
7. La proline est un point de rupture d'une hélice pour deux raisons :
 - il n'existe pas de NH pour une liaison hydrogène
 - le cycle rigide pyrrolidone engagé dans la liaison peptidique bloque la rotation, détruisant la continuité de l'hélice.

2. Structure en Feuillet β

Les **liaisons hydrogène** des atomes d'oxygène (**C=O**) et d'hydrogène (**N-H**) d'une **liaison peptidique** se répètent non plus sur une portion continue de la chaîne peptidique mais entre des segments différents qui peuvent appartenir à la même chaîne ou à des chaînes différentes. Cela implique que nous pourrions avoir une structure en **feuillet β plissé**.

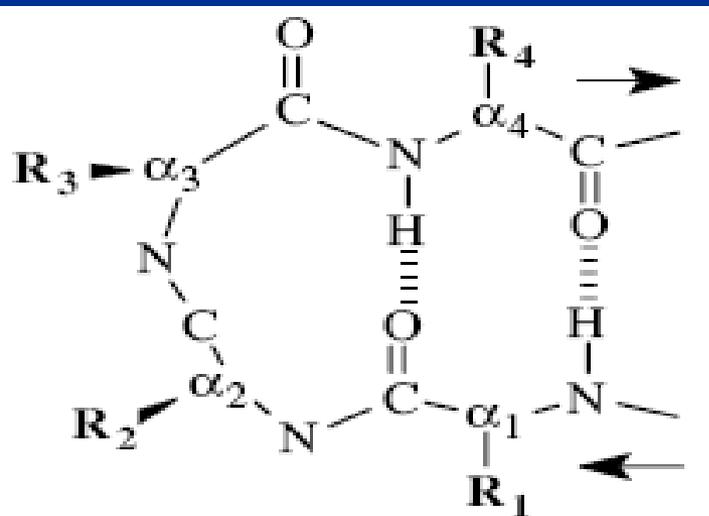


3. Le coude

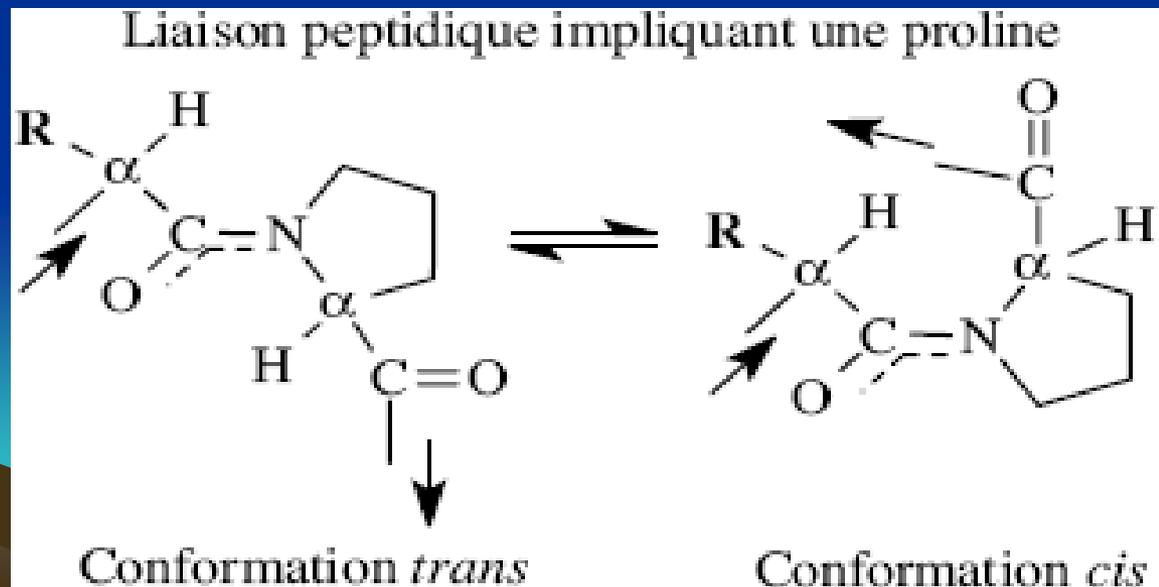
Certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans des conformations périodiques. Toutefois leurs structures sont semblables par le fait qu'elles imposent un changement brusque de direction de 180° : on les appelle **coude ou tour β** .

Cette structure peut être réalisée de différentes manières, toutefois on peut dire :

- c'est un court segment peptidique de 2 à 4 résidus
- une ou deux liaisons hydrogène se forment entre le premier et le dernier résidu du coude
- la configuration de la proline est telle qu'elle provoque un changement de direction et peut donc être presque à elle seule un coude.
- La lettre β rappelle qu'ils sont indispensables pour des feuilletts de chaînes anti-parallèles.



Coude β à 4 résidus



4. La pelote statistique

Certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans des conformations périodiques comme l' α -hélice ou le feuillet plissé β .

@ Structure tertiaire

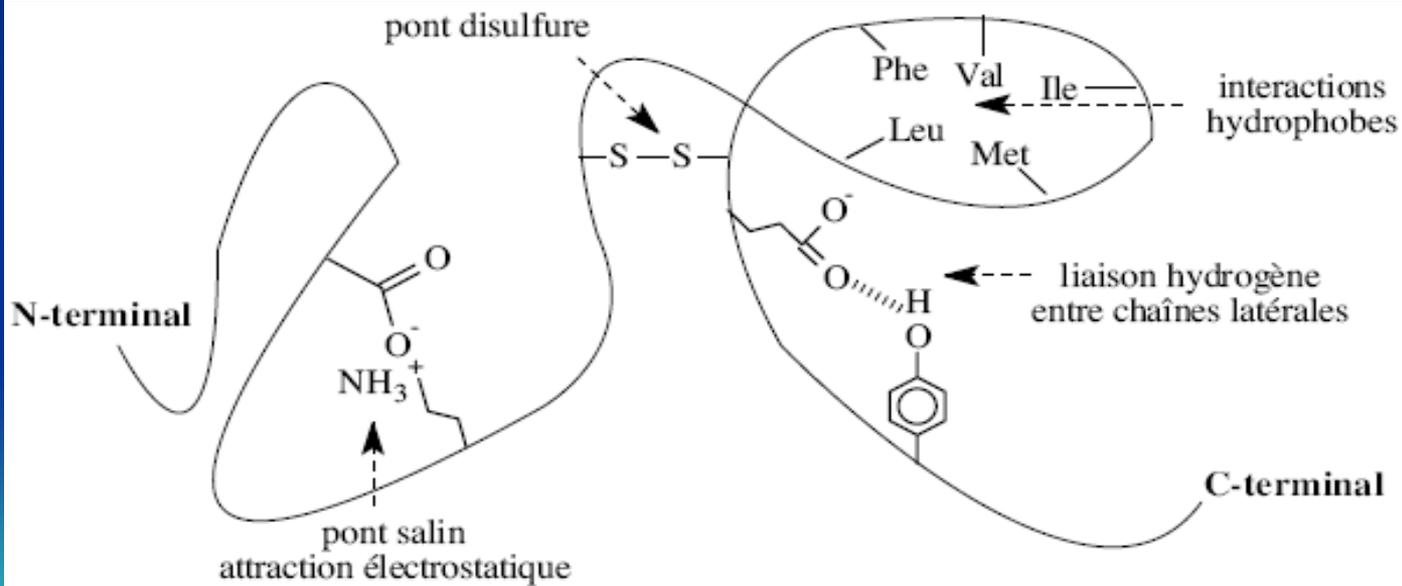
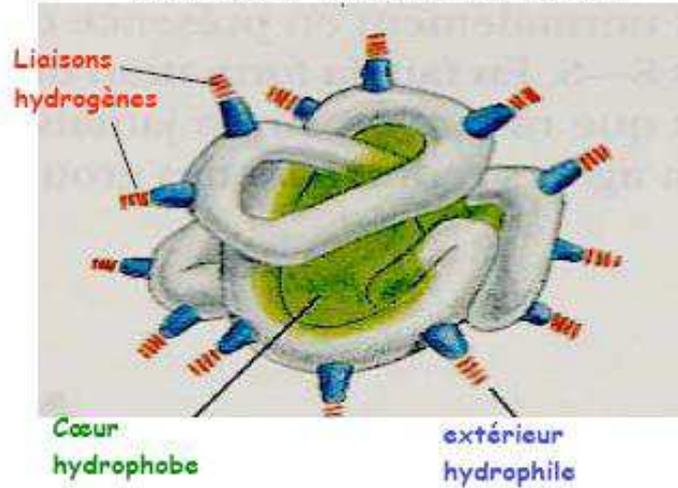
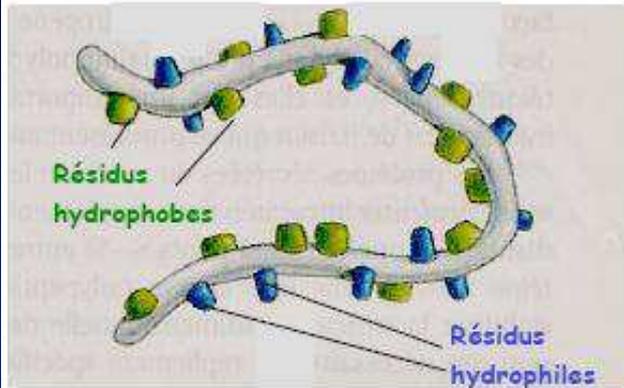
L'arrangement spatial des structures secondaires locales aboutit à une forme globale spécifique de la protéine maintenue par des interactions qui peuvent être de nature différente :

- Liaison covalente : pont disulfure
- Liaisons ioniques entre groupements chargés de signe opposé (pont salin) et entre dipôles permanents faisant une liaison hydrogène, le cas le plus répandu
- Attractions hydrophobes (force de Van der Waals entre groupes apolaires subissant des forces de répulsion par l'eau, ce qui favorise leur rapprochement)
- Interactions des chaînes latérales des résidus avec le solvant : dans l'eau, les chaînes latérales polaires pourront être exposées au solvant, alors que les chaînes latérales apolaires auront tendance à "s'enfouir" dans des poches hydrophobes de la protéine.

structure primaire



structure tridimensionnelle



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

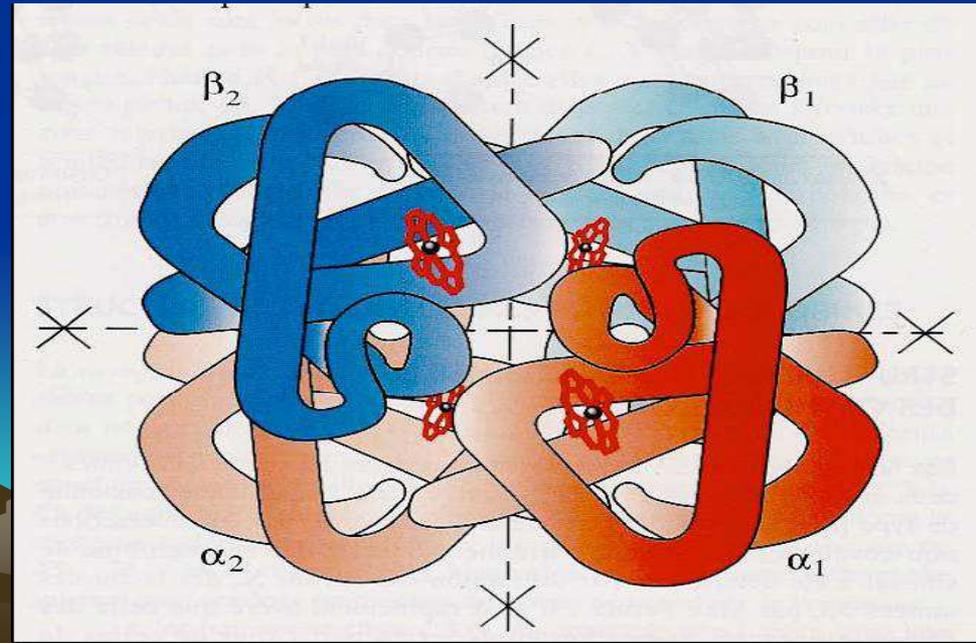
Caractéristiques de la structure tertiaire:

- Cette structure **tertiaire** est le paramètre fondamental dont dépend l'**expression de ses fonctions biologiques** qu'elles soient **structurales** ou **dynamiques** (protéines des membranes ou du cytosquelette ou etc, récepteurs, enzymes,..)
- Cette structure est très dépendante des **interactions** que nous venons de décrire.
- Ces **interactions** subissent l'influence du milieu dans lequel elles se trouvent (solvant, température, pH, force ionique, agents détruisant ces interactions, etc).
- La **conformation native** de la protéine est la structure tertiaire qui correspond à celle qui exprime sa **fonction biologique** dans les **conditions physiologiques**.
- Un traitement détruisant cette structure qui a pour conséquence de supprimer sa fonction est appelé **dénaturation** : elle aboutit à un état plus **désorganisé** de la molécule.
- Il existe deux grands types de protéines sur le plan structural:
 - + **Protéines fibreuses**: Kératine (torsade de dimères en **hélice α**) et **feuillets β plissés**
 - + **Protéines globulaires**: Elles peuvent comprendre des motifs de structure **α -hélice ou feuillets plissés β** .

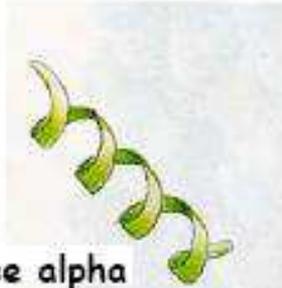
@ Structure quaternaire

C'est l'organisation des protomères qui définit la structure quaternaire d'une protéine formée de multimères. Il faut savoir ce qui suit:

- **l'association ou la dissociation** des **protomères** permettent à ces protéines d'avoir des fonctions de signalisation ou de contrôle (l'enzyme protéine-kinase dépendante de l'AMP cyclique)
- **l'interaction entre les protomères** (sous-unités) est un moyen très précis de régulation : phénomène coopératif de fixation de ligands, enzymes allostériques, récepteurs membranaires
- **les isoformes** des protéines : elles ont les mêmes fonctions, toutefois leur structure est dépendante du tissu soit au niveau du nombre de **protomères** dans l'association soit une **différence au niveau du protomère**.



Structure secondaire

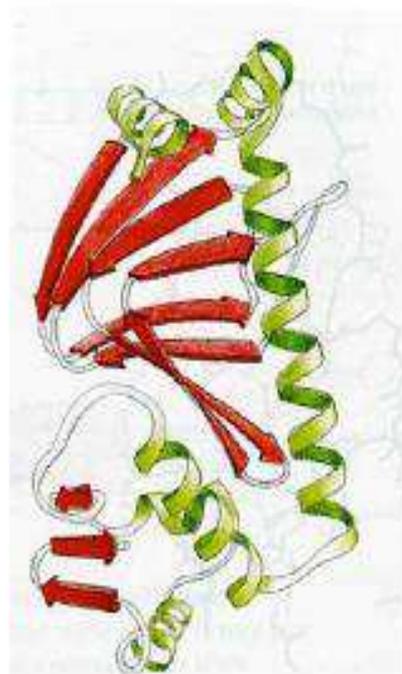


coude

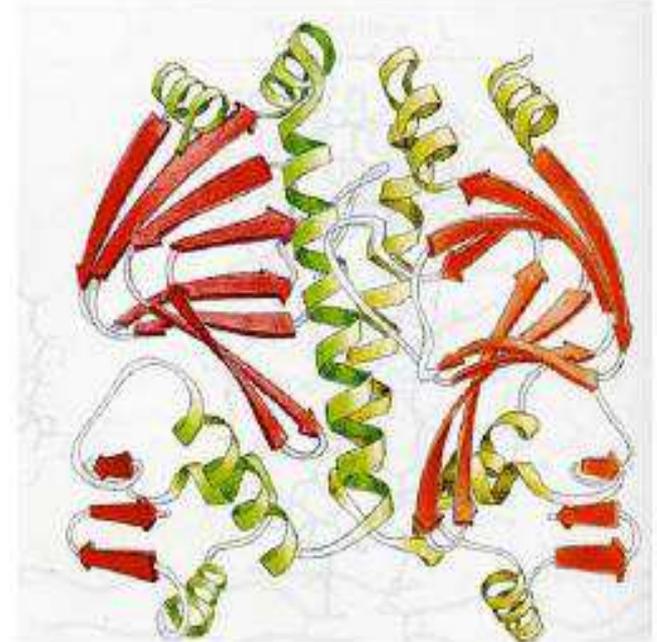


Feuillet bêta

Structure tertiaire



Structure quaternaire ...



... les motifs structuraux
de base :
hélice alpha, feuillet bêta,
tours et coudes

... l'organisation interne
d'une protéine monomérique
(ou d'une sous-unité)

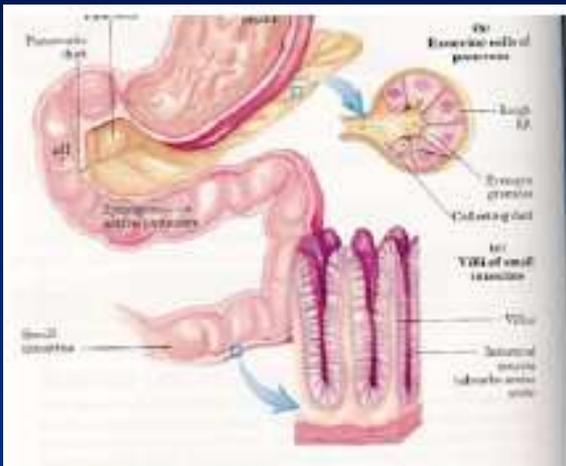
... l'organisation complexe
d'une protéine multimérique
(au moins dimérique) :

3.2. Rôles et Etude des protéines:

3.2.1. Rôles:

- Les protéines : premières actrices du monde vivant, Il n'existe pratiquement pas de processus biologique non régi par une/des protéine(s).
- Comprendre le fonctionnement d'une protéine, c'est donc comprendre in fine la logique du vivant.
- Les protéines assurent l'ensemble des fonctions suivantes du vivant:
 1. Créer et maintenir une structure Les protéines du cytosquelette
Les protéines des tissus de soutien.
 2. Reconnaître et se défendre Les immunoglobulines
 3. Transporter les molécules.
 4. Transformer: Les enzymes catalysent l'essentiel des réactions chimiques du vivant.
 5. Bouger-se déplacer:
 - @ Les protéines à fonction motrice.
 - @ Les protéines des mouvements intracellulaires.
 - @ Informer-signalier.
 - @ Les récepteurs et leurs ligands
 - @ Les «interrupteurs moléculaires».

3.2.2. Étude des protéines:



Exemple : on s'intéresse à la **chymotrypsine**, enzyme pancréatique sécrétée dans le tube digestif, responsable d'une étape de digestion des protéines alimentaires. On dispose d'une méthode de mesure de l'activité de l'enzyme qui va permettre de suivre l'ensemble du processus

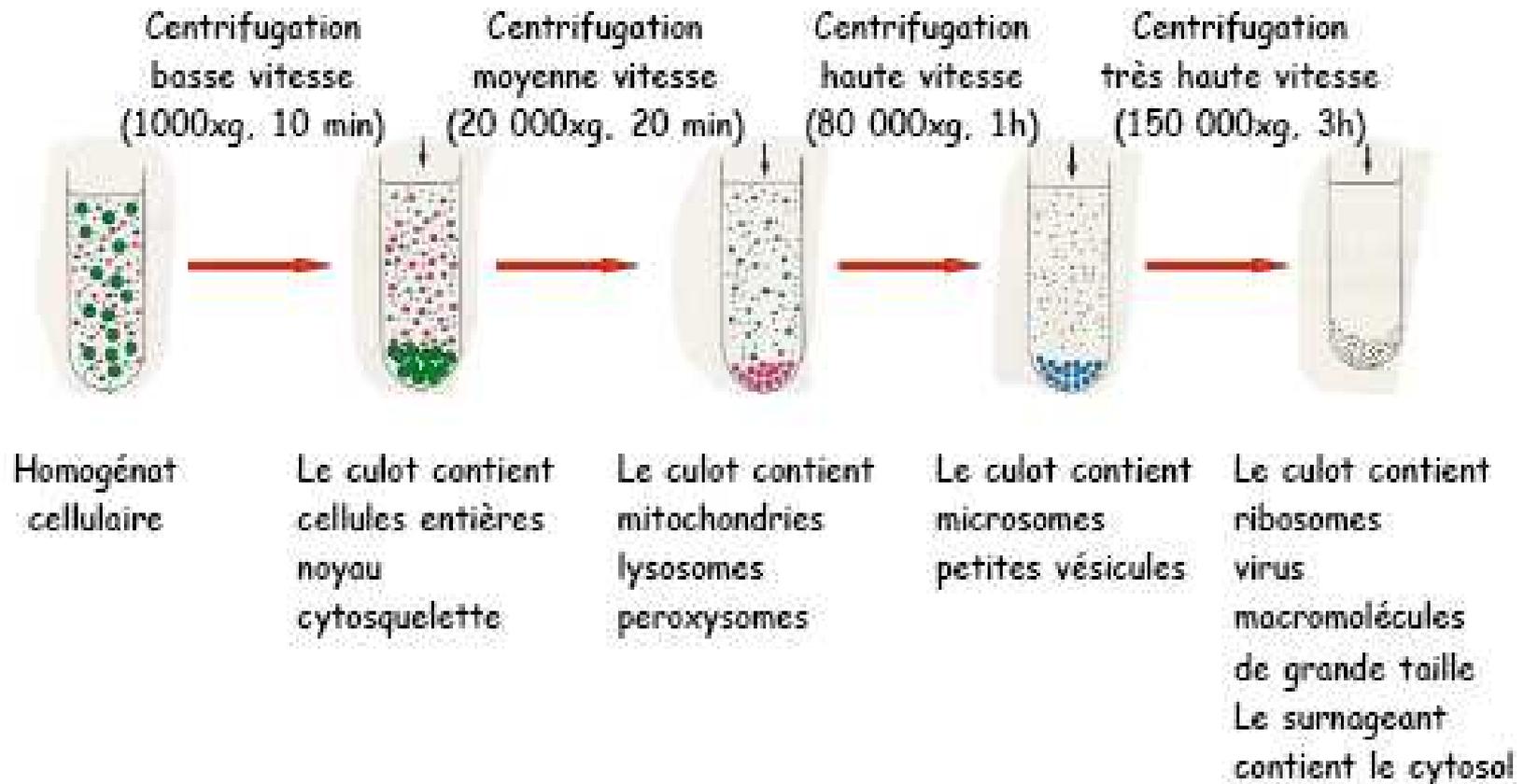
Les étapes à suivre seront :

- isoler le tissu pancréatique ou collecter les sécrétions
- isoler l'organe (RER) par centrifugations différentielles et ultracentrifugation
- extraire les protéines totales
- séparer les protéines par chromatographie et électrophorèse
- isoler et purifier l'enzyme par affinité
- découper la protéine en petites unités (peptides)
- analyser la composition chimique des peptides (acides aminés)
- déterminer la séquence de la protéine entière
- étudier la structure 3D de la protéine
- déduire son mécanisme d'action

Méthode de centrifugation différentielle

➤ isoler le tissu pancréatique ou collecter les sécrétions

➤ isoler l'organite (RER; Reticulum Endoplasmique) par centrifugation différentielle



@ Une protéine soluble dans un solvant peut perdre sa solubilité en ajoutant des sels à son milieu (le sel d'ammonium), et à concentration donnée une cette protéine peut être **relargée** par sa solution et précipiter au fond, **le salting out**. **Le salting in** c'est plutôt l'inverse

@ Même phénomène se passe avec les solvants organiques et à un pH équivalent à pH_i de cette protéine.

Charge globale d'une protéine et point isoélectrique:

@ Une protéine porte des charges positives et négatives au niveau des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. Ces charges dépendent du **pH** de la solution et leur somme algébrique définit **la charge globale de la protéine**.

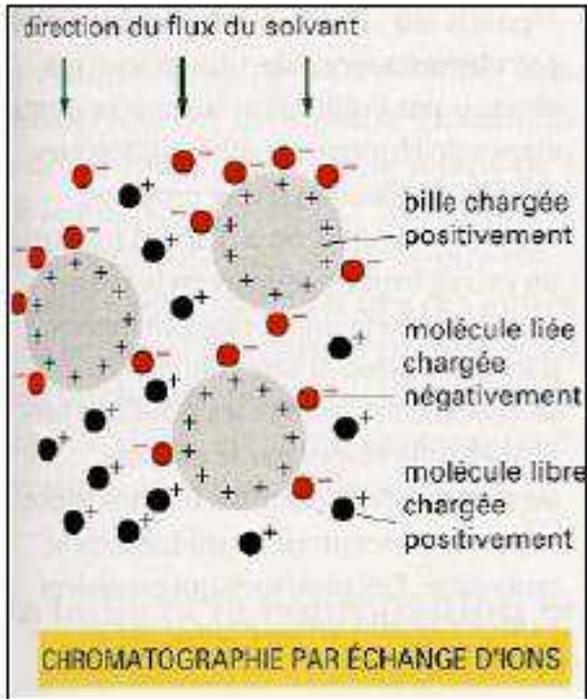
@ Il existe toujours un **pH** pour lequel le nombre de **charges positives portées par une protéine est égale au nombre de charges négatives**: la charge globale est alors nulle. Ce pH s'appelle **le point isoélectrique** de la protéine (pI). C'est la base de la séparation des protéines

Méthode chromatographiques:

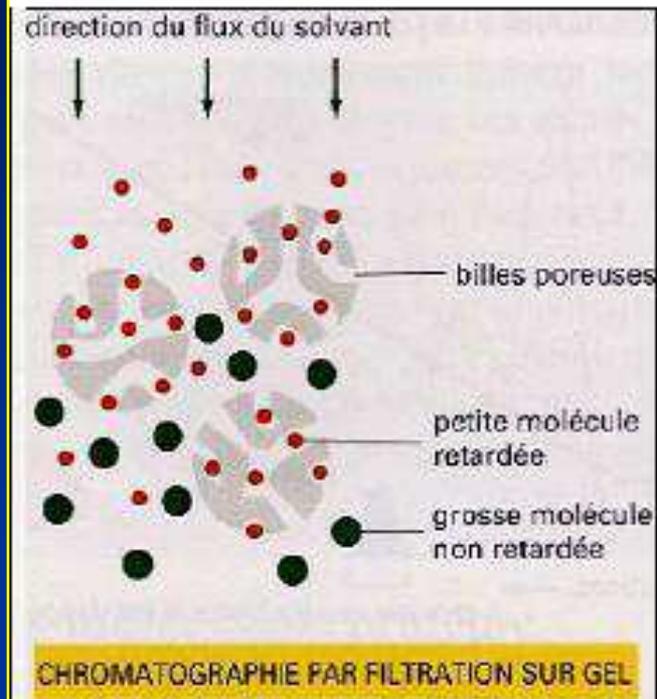
Séparer les protéines par chromatographie grâce à leur migration différentielle à travers un système composé de deux phases, une phase fixe et une phase mobile.

On peut ainsi séparer les protéines en utilisant leurs différences
de taille,
de charge
d'adsorption spécifique

Séparation selon la charge



Séparation selon la taille



Séparation par adsorption spécifique

