

LES PROTEINES



I) La méthode des bols

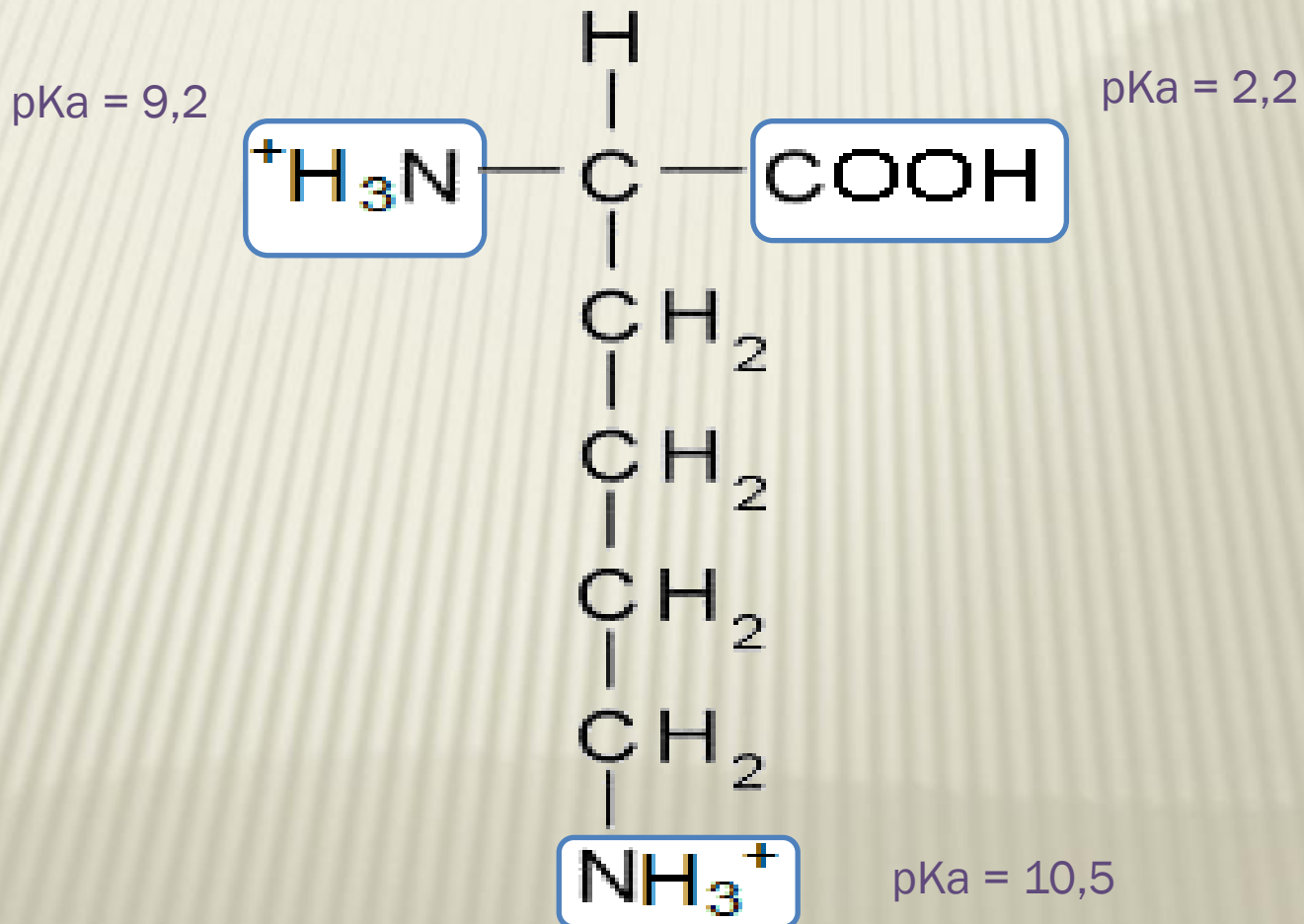
- 1) Généralités
- 2) La méthodes des bols
- 3) Une astuce parmi tant d'autres

II) L'étude des protéines

- 1) Méthode d'étude de la séquence primaire (des AA)
- 2) Méthode de séparation et purification des AA et des protéines

I) LA MÉTHODE DES BOLS

1) Généralités



I) LA MÉTHODE DES BOLS

Soit le couple acido-basique : AH/A^- .

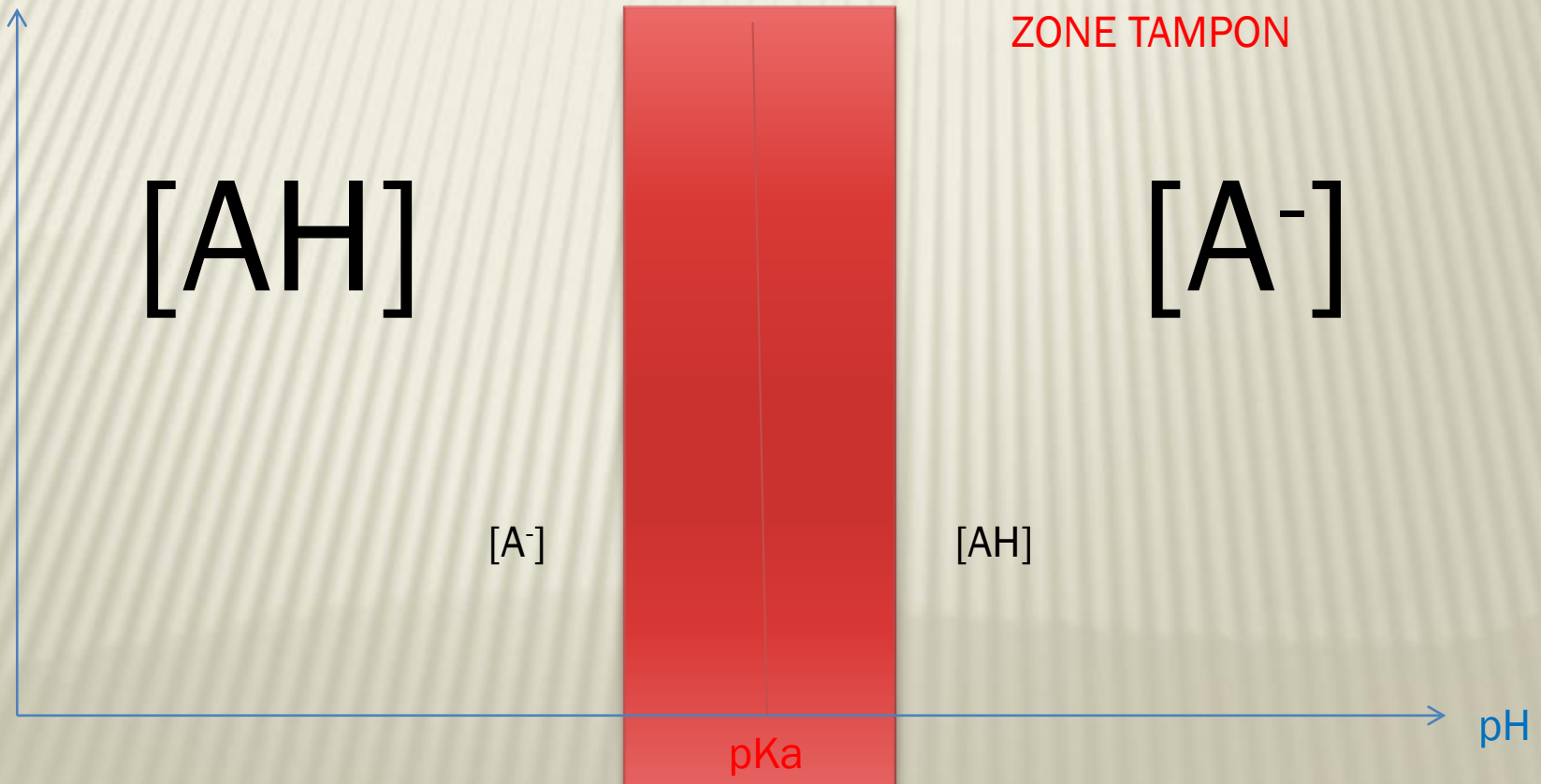
Equation : $A^- + H^+ = AH$

La formule de Henderson-Hasselbalch :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

I) LA MÉTHODE DES BOLS

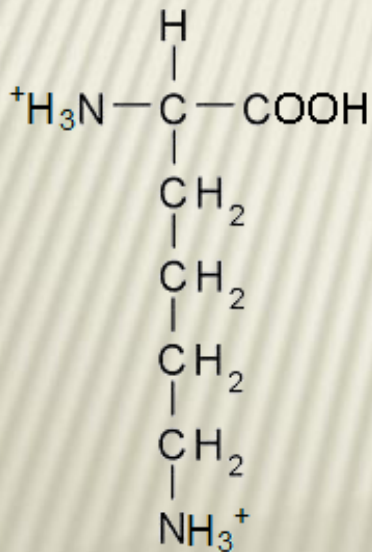
$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$



I) LA MÉTHODE DES BOLS

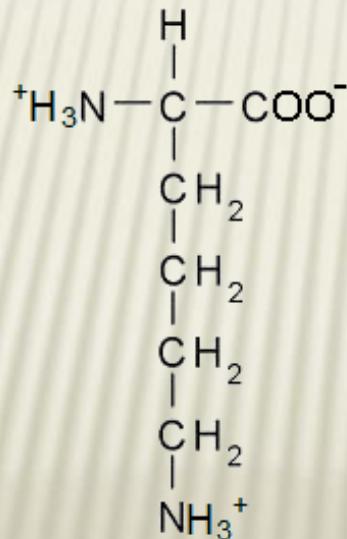
$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

+2



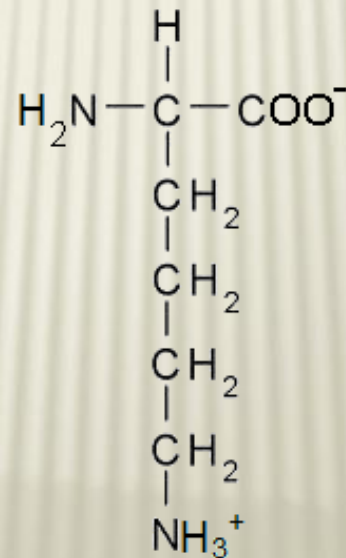
pKa = 2,2

+1



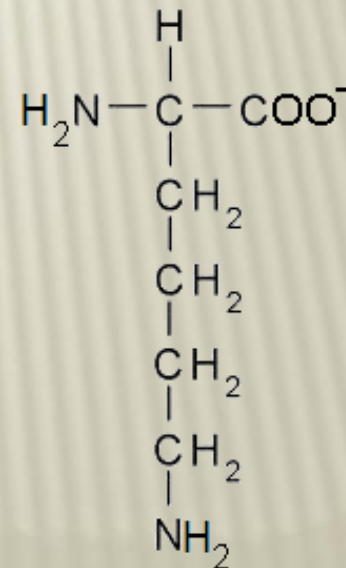
pKa = 9,2

0



pKa = 10,5

-1



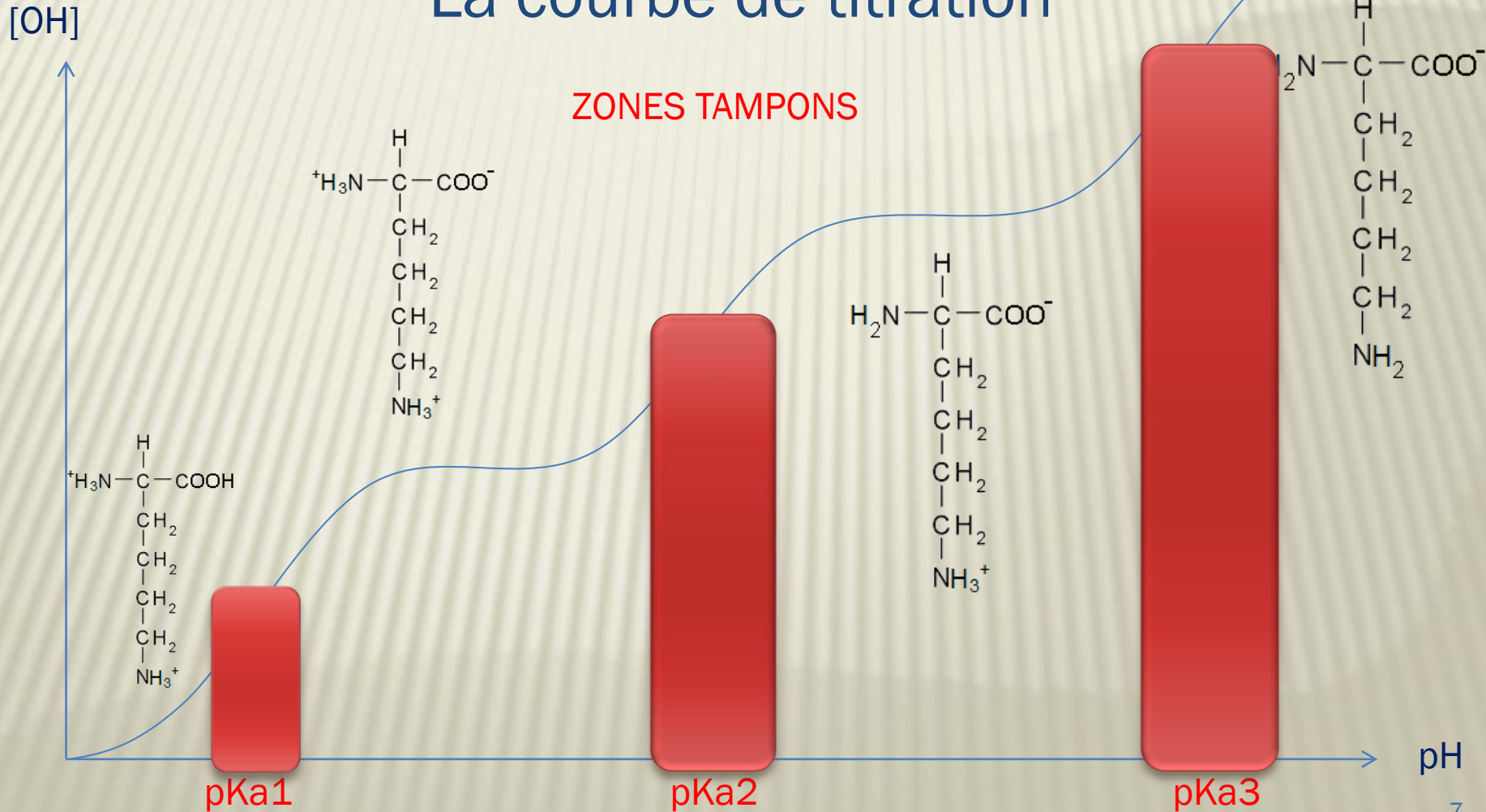
Calcule du pHi de la Lysine. La charge de la Lysine est nulle entre :

le $pK_a = 9,2$ et $pK_a = 10,5$

Donc son $pH_i = (9,2 + 10,5) / 2 = 9,85$

I) LA MÉTHODE DES BOLS

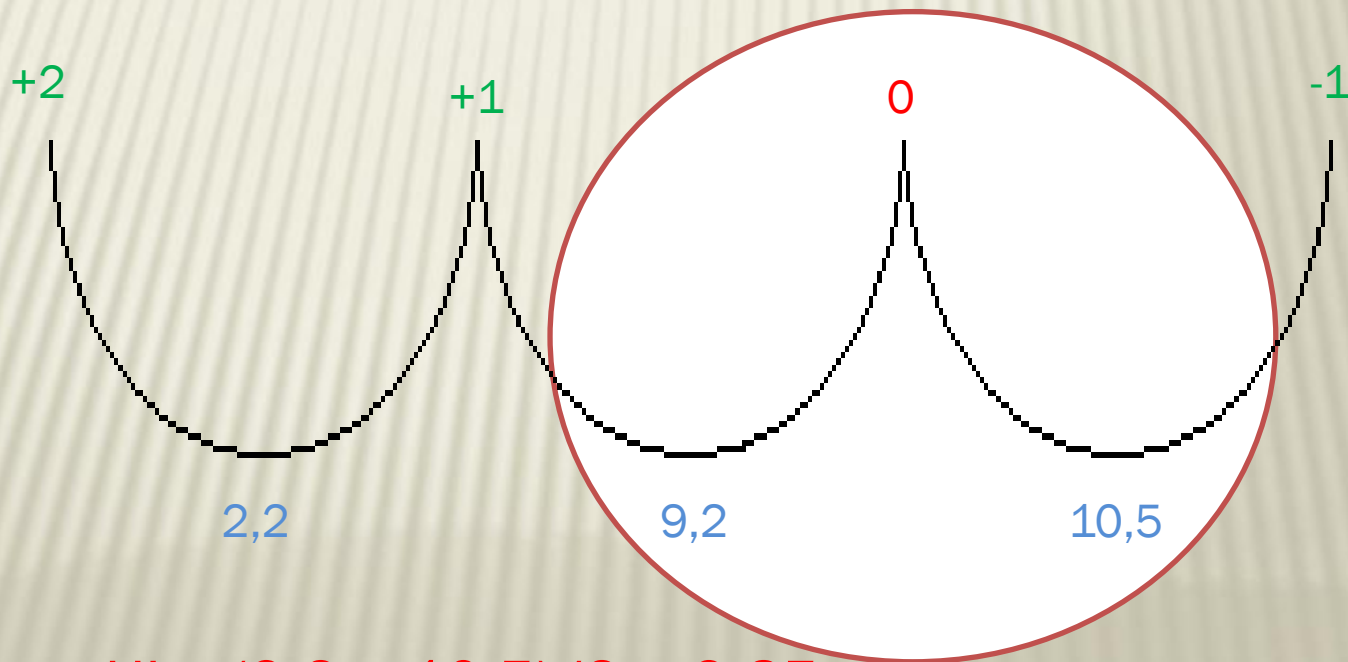
La courbe de titration



I) LA MÉTHODE DES BOLS

2) La méthodes des bols

- Pour la lysine (pour un acide aminé)



$$pH_i = (9,2 + 10,5)/2 = 9,85$$

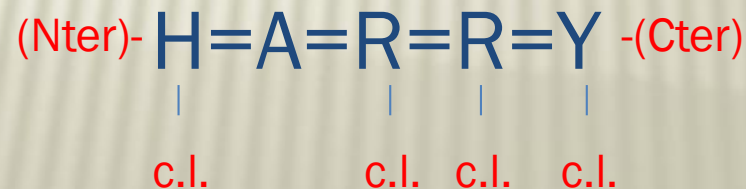
I) LA MÉTHODE DES BOLS

- Pour une protéine :

1- Le principe est le même.

2- On ne compte que les couples acido-basiques des AA en Nter et Cter de la protéine ainsi que les couples sur les chaînes latérales CAR **les liaisons peptidiques ne sont plus ionisables.**

Ex :



c.l. = chaîne latérale

I) LA MÉTHODE DES BOLS

A savoir avant de faire la méthodes des bols :

- 1) Connaître les chaînes latérales des aa
- 2) Connaître les charges des chaînes latérales à pH très très acide :
 - aa polaires non chargés (CY) = 0
 - aa acides (DE) = 0
 - aa basiques (HKR) = +1

I) LA MÉTHODE DES BOLS

3) Une astuce parmi tant d'autre

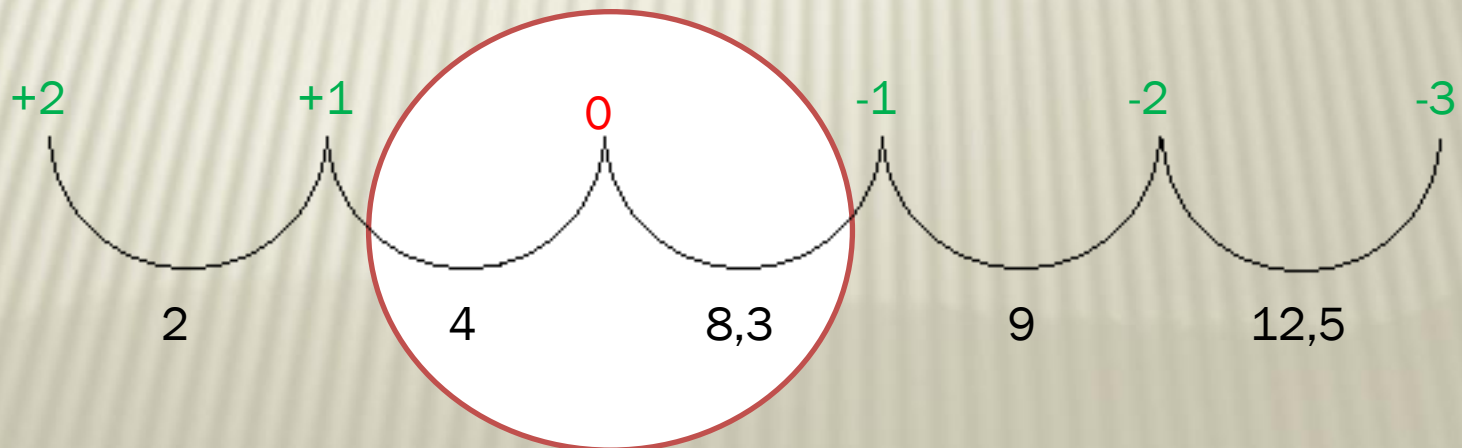
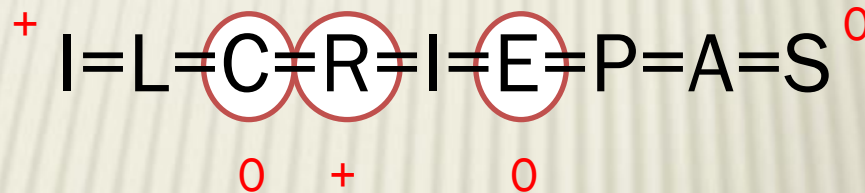
Soit la protéine ILCRIEPAS, calculez le pHi.

Données :

$$pK_r(R) = 12,5$$

$$pK_r(E) = 4$$

$$pK_r(C) = 8,3$$



$$pH_i = (4 + 8,3) / 2 = 6,15$$

I) LA MÉTHODE DES BOLS



Si il y a plusieurs fois le même aa avec un pKa sur sa chaîne latérale : on enlèvera plusieurs charges d'un coup (égale au nombre de répétition de l'aa considéré).

I) LA MÉTHODE DES BOLS

Tableau à connaître à pH physiologique (pH = 7,3)

Symbole	Pka	Charge à pH physiologique
D	3.9	-
E	4.3	-
H	6	0
C	8.3	0
Y	10.1	0
K	10.5	+
R	12.5	+

I) EXEMPLES

1) PEPTIDE

2) PANYNIE

3) HAPPY

4) DANNETTE

5) CATAMARAN

Données :

Glutamate : 2/4/9

Aspartate : 2/3,5/9

Tyrosine : 2/10/9

Cystéine : 2/8/9

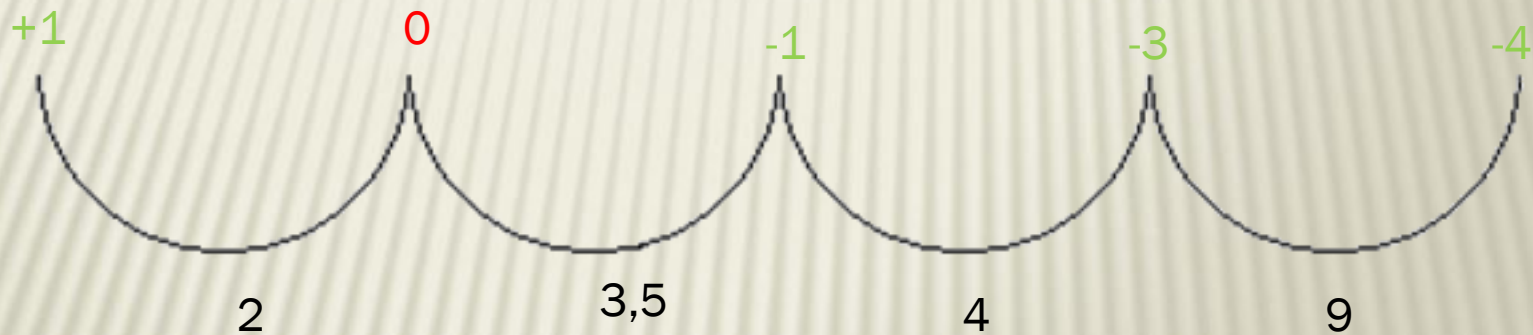
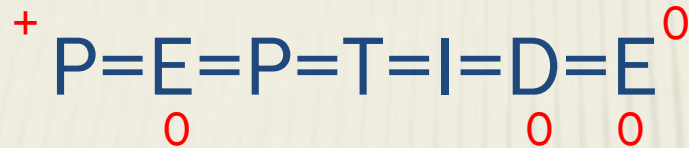
Histidine : 2/6/9

Arginine : 2/9/12,5

Calculez le pHi de chaque peptide et dire si le peptide migre vers l'anode ou la cathode à pH physio.

I) EXEMPLES

1)

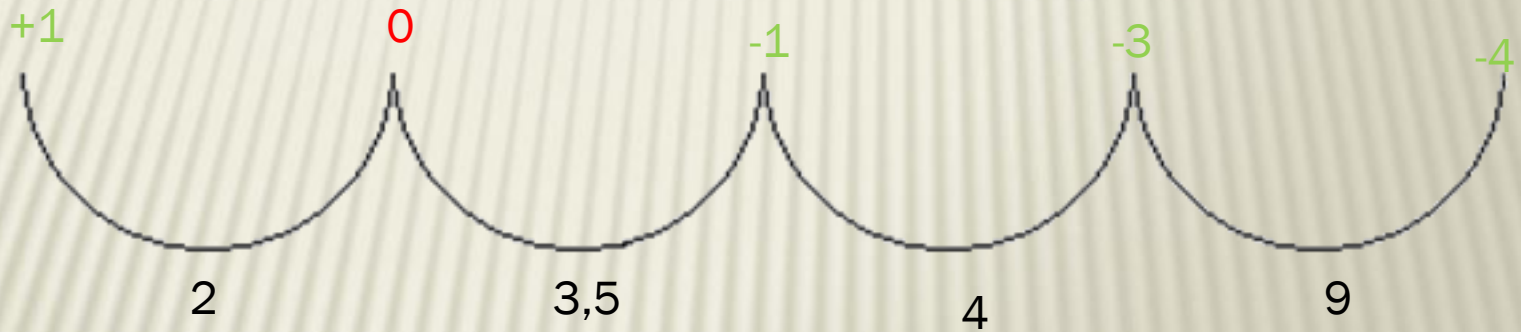
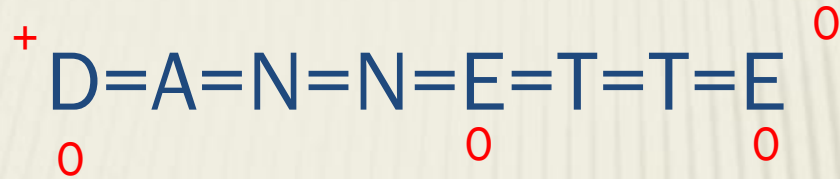


$$\text{pHi} = (2 + 3,5) / 2 = 2,75$$

Anode

I) EXEMPLES

4)



$$\text{pHi} = (2 + 3,5) / 2 = 2,75$$

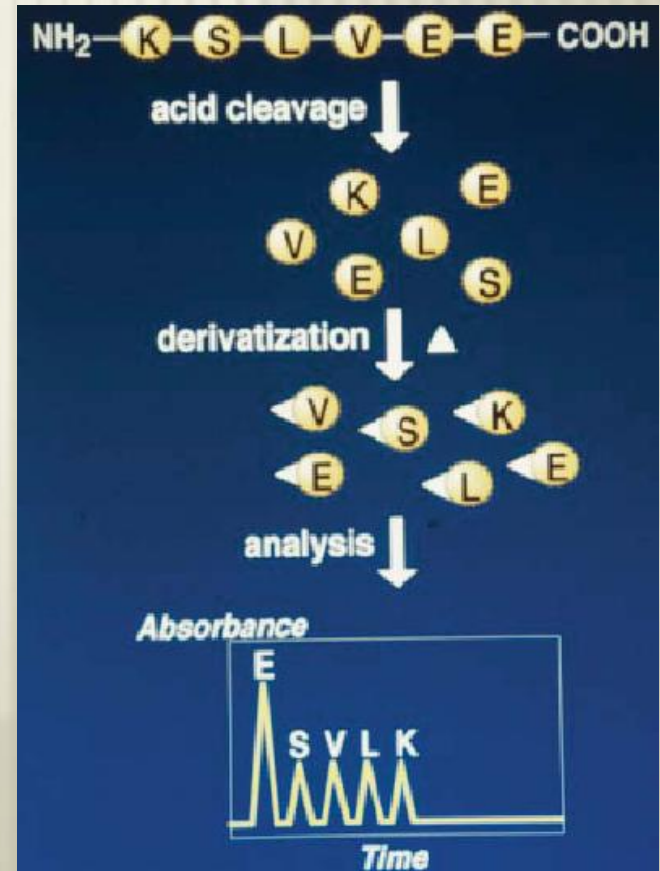
Anode

II) L'ÉTUDE DES PROTÉINES

1) Méthode d'étude de la séquence primaire

a) Sans détermination de la séquence

- Clivage acide (Hydrolyse chimique)
- Identification des AA
- Dénombrement des AA
- Pas de détermination de la séquence



II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

b) Avec détermination de la séquence

- ✓ *Chimiquement*
 - Etude de la séquence Nter : PITC
 - Etude de la séquence Cter : Hidrazinolyse
 - Bromure de cyanogène

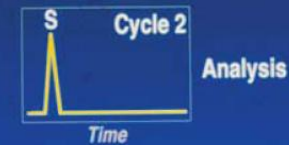
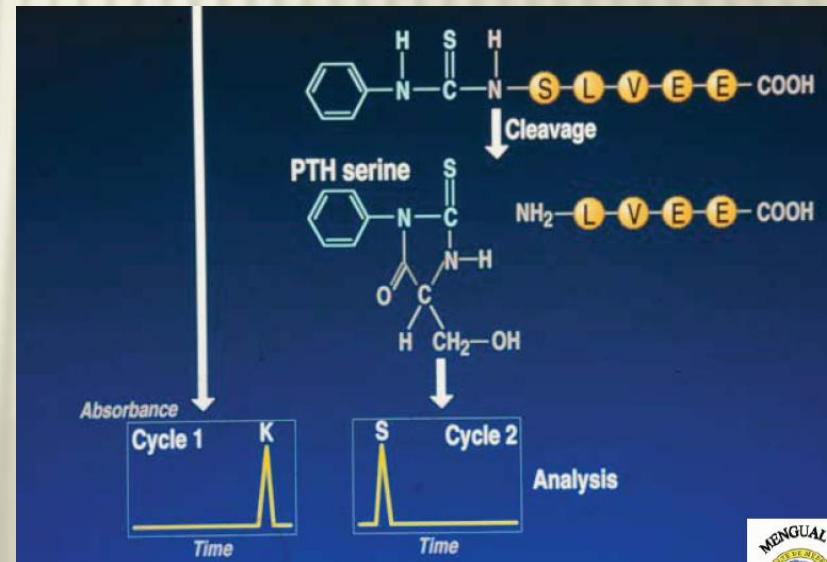
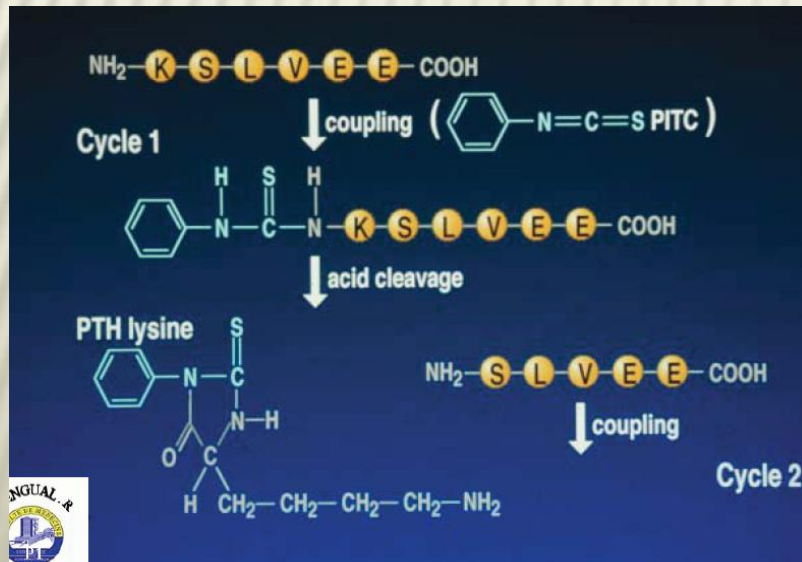
- ✓ *Enzymatiquement*
 - Les endopeptidases et exopeptidases

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Chimiquement

▪ Etude de l'extrémité Nter (méthode d'Edman)

On utilise du PITC (phénylisothiocyanate) qui se fixe sur l'extrémité Nter de la protéine (qui correspond à la terminaison N de l'AA en Nter de la protéine)

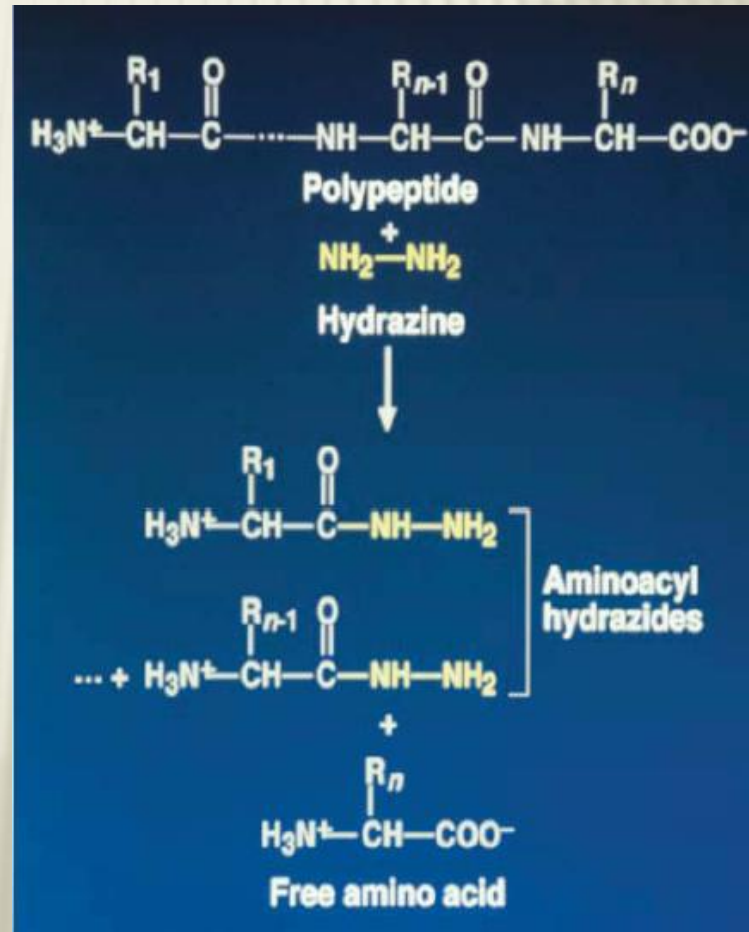


II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

▪ Etude de l'extrémité Cter (Hydrazinolyse)

On utilise de l'hydrazine qui se fixe sur l'extrémité Cter de l'aa en Cter de la protéine.

Libération d'un acide aminé LIBRE
(ancien AA en Cter de la protéine)

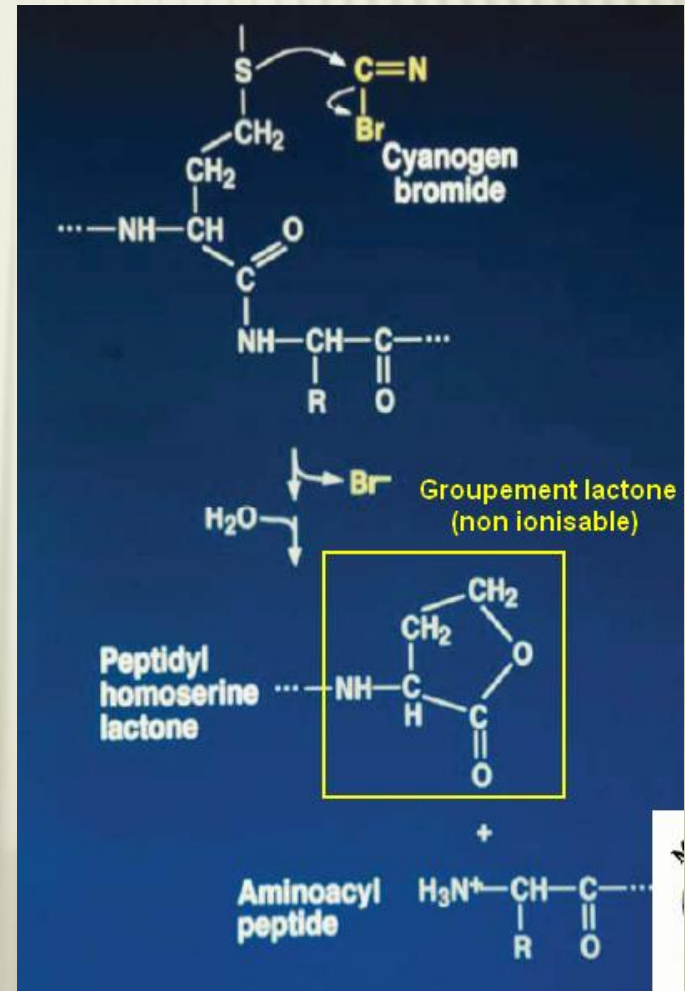


II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

■ Bromure de cyanogène

Coupe à droite des M

La formation du cycle lactone en Nter des méthionines fait qu'on ne comptera plus le pKa(Cter de la M) lors d'un calcul de pHi



II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

Exercice

Calculez le pHi des protéines formées après
clivage au bromure de cyanogène de la
protéine : CARMEN

Données

Arginine : 2/9/12,5

Cystéine : 2/8/9

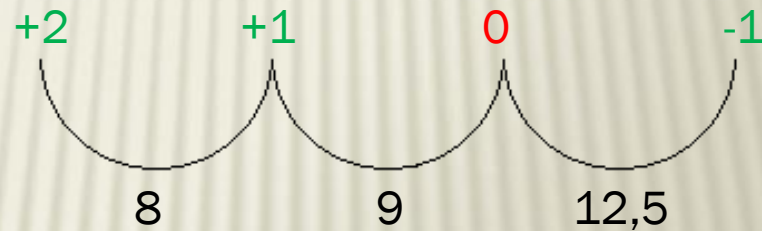
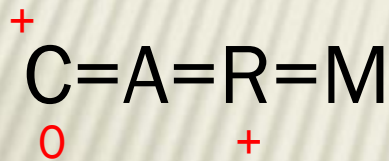
Glutamate : 2/4/9

Les autres : 2/9

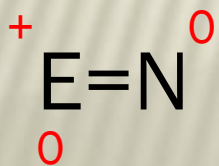
II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

Après clivage au bromure de cyanogène on obtient :

CARM et EN



$$\text{pHi} = (9+12,5)/2 = 10,75$$

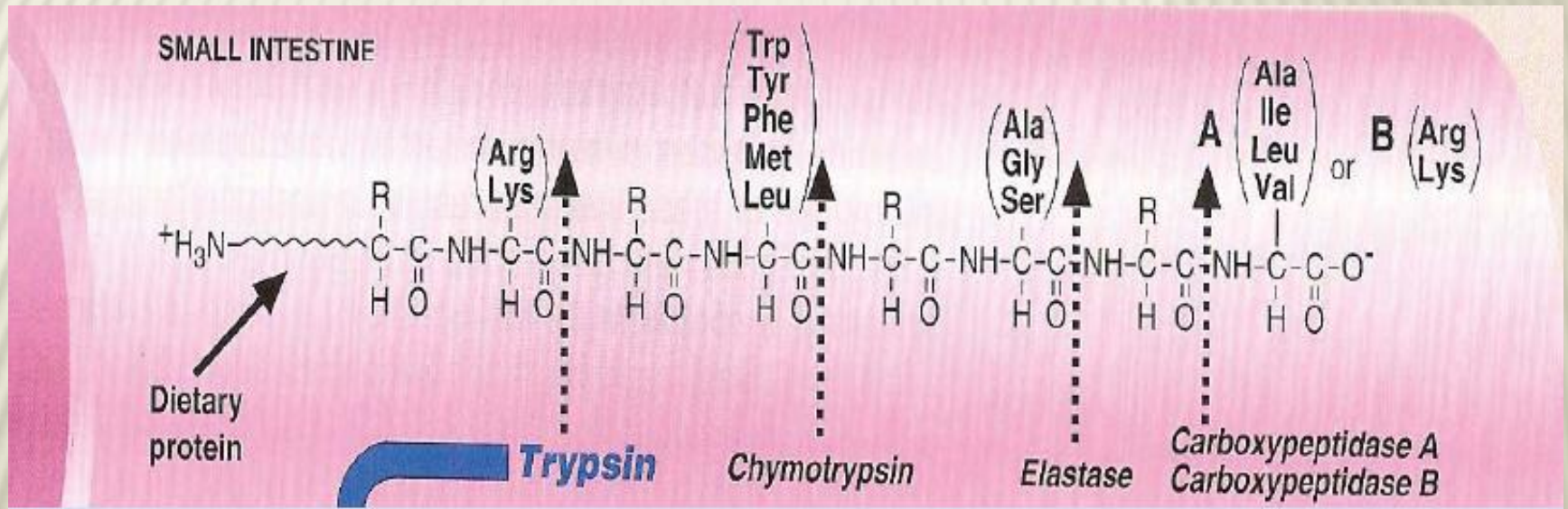


$$\text{pHi} = (2+4)/2 = 3$$

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

- ✓ Enzymatiquement
 - Les Endopeptidases : enzymes qui coupent à l'intérieur de la protéine
 - Les Exopeptidases : enzymes qui coupent en Cter et/ou Nter de la protéine
 - Ex : les carboxypeptidases qui coupent en Cter

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES



II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

On peut aussi utiliser les ARNm pour retrouver la séquence primaire des protéines

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

2) Méthode de séparation et de purification des AA et des protéines

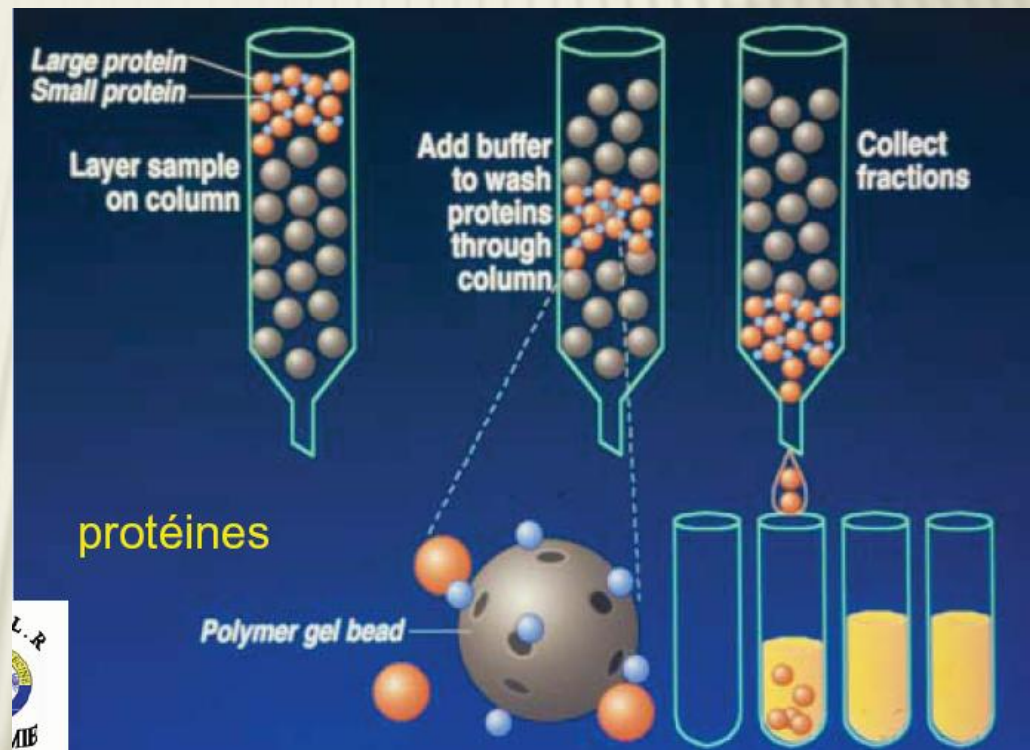
- ✓ Séparation en fonction de la taille
- ✓ La colonne échangeuse d'ions
- ✓ Par le caractère immunogène des protéines
- ✓ Par chromatographie d'affinité
- ✓ Electrophorèse sur gel d'acrylamide
- ✓ Electrophorèse bidimensionnelle
- ✓ Spectrométrie de masse des protéines

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Séparation par la taille

Spécifique des protéines

Chromatographie par
exclusion d'un gel



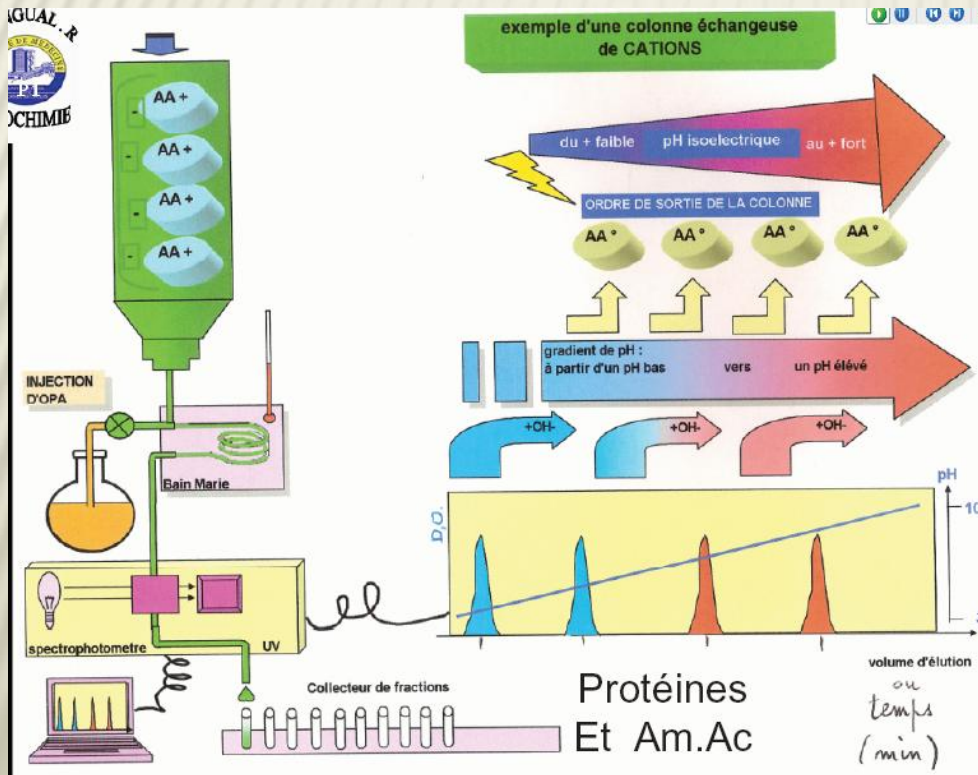
Les billes à l'intérieur de la colonne sont d'une certaine taille :
- Les protéines trop grosses ne peuvent pas s'y accrocher et sont éluées

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ La colonne échangeuse d'ion

Protéines et AA

- De cations



- Les billes sont chargées « - »

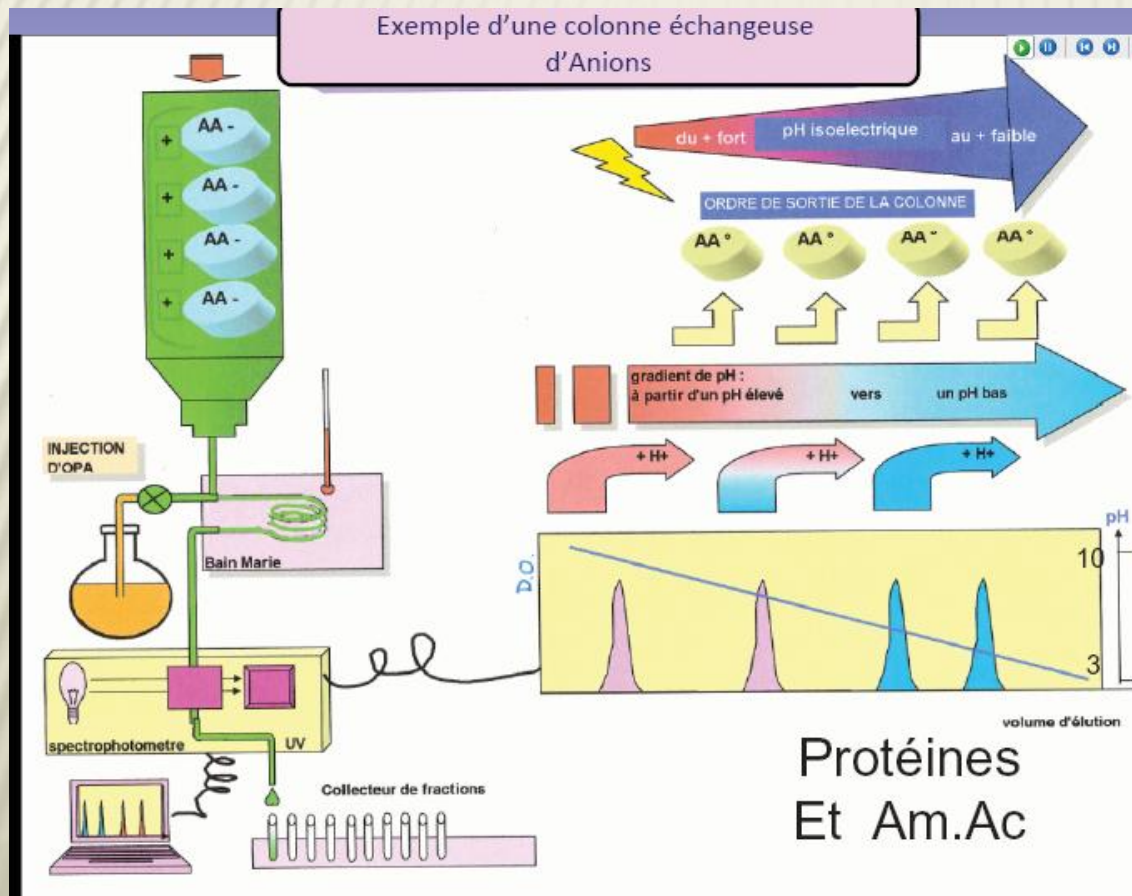
- Au départ le pH est acide (il faut des cations)

- On augmente petit à petit le pH (en ajoutant du OH⁻)

- Les premiers AA à être élués sont ceux au pHi le plus faible

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ D'anions



- Les billes sont chargées « + »
- Au départ le pH est élevé (il faut des anions)
- On diminue petit à petit le pH (on ajoute des H⁺)
- Les premiers AA à être élués sont ceux au pHi les plus élevés

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

On peut toujours utiliser du NaCl si on veut éluier d'un coup tous les AA encore accrochés aux billes par compétition des ions avec les AA :

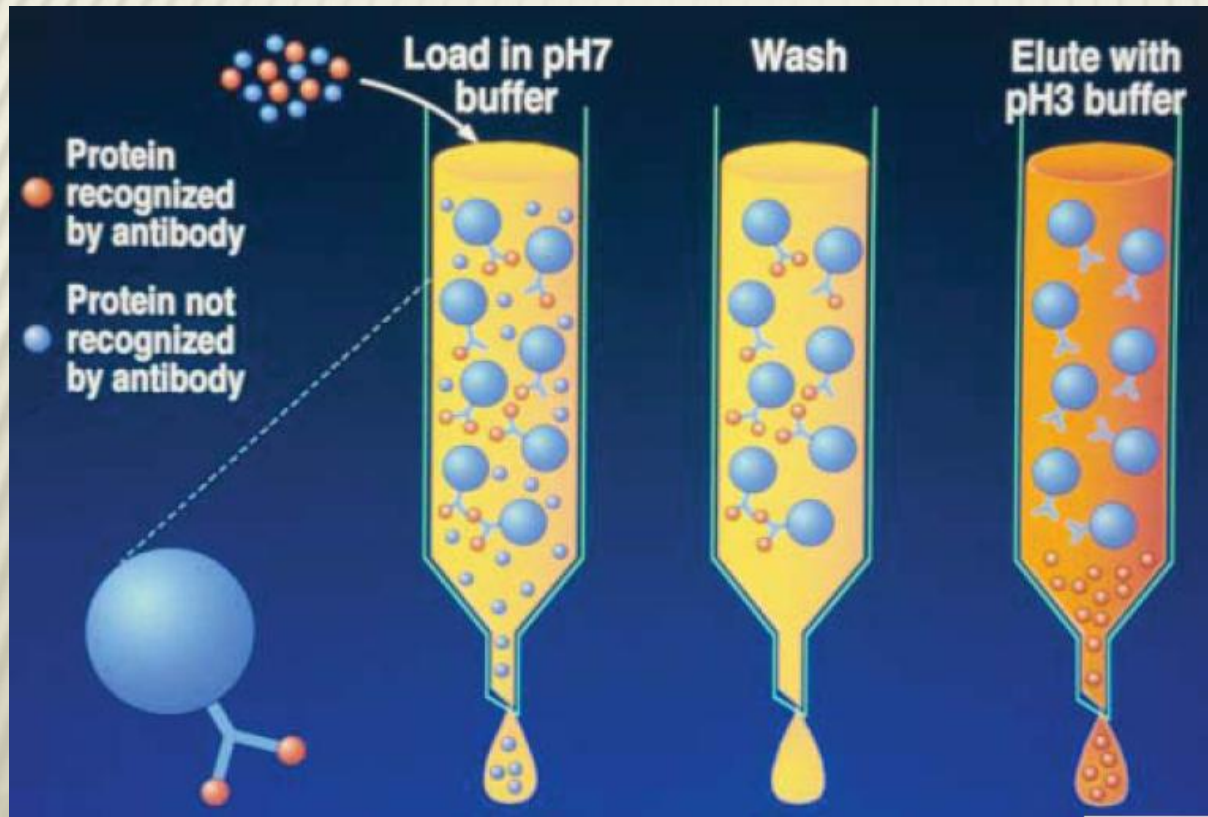
- Na⁺ (colonne échangeuse de cation)
- Cl⁻ (colonne échangeuse d'anion)

On passe ensuite les AA récoltés au spectromètre de masse pour les identifier.

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Par le caractère immunogène des protéines

Spécifique des protéines



On utilise des billes liées à des Ac.

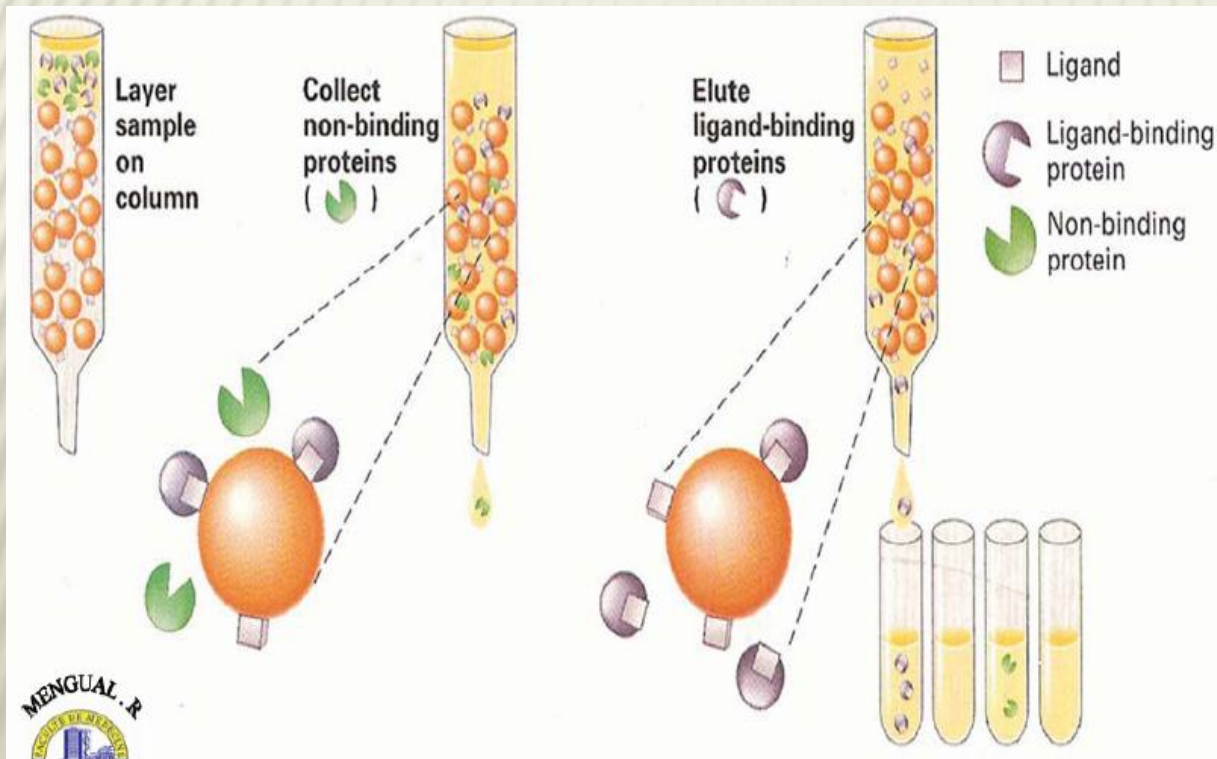
Les antigènes des protéines reconnus par les Ac. Elles se fixent aux billes les autres sont éluées.

Pour éluer les protéines fixées aux Ac on baisse le pH à 3 car la liaison Ac-Ag ne peut plus se faire à pH aussi acide.

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Par chromatographie d'affinité

Applicable aux protéines



Chromatographie basée sur le système ligand/récepteur

On peut purifier aussi bien le substrat que le récepteur

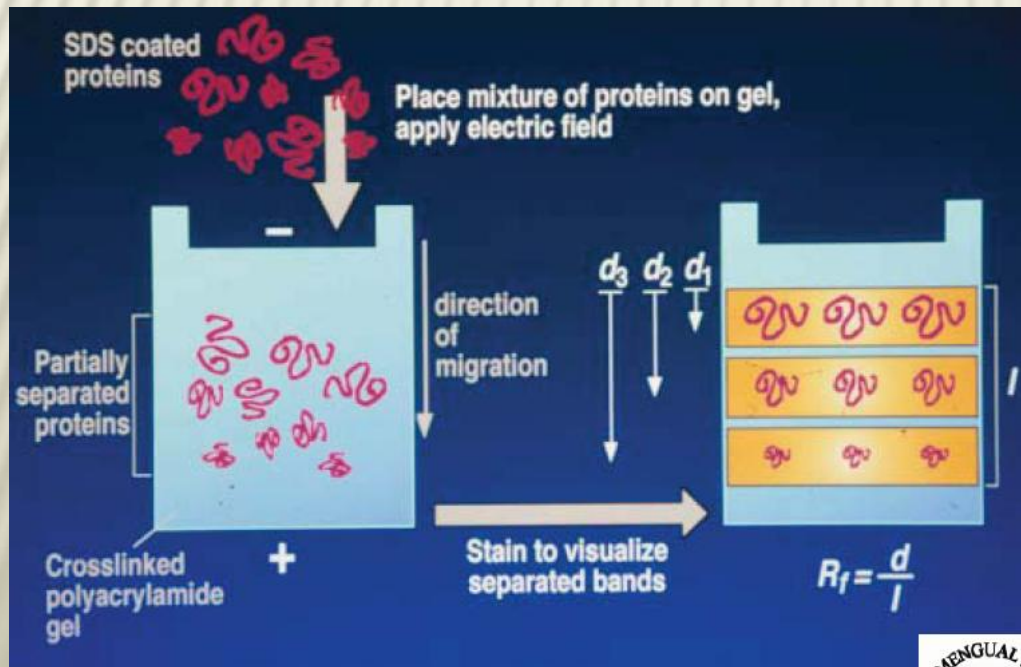
II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Electrophorèse sur gel d'acrylamide

Spécifique aux protéines

On chauffe les protéines au SDS et au mercaptoéthanol : réduction des ponts disulfures, les protéines se chargent négativement proportionnellement à leur poids moléculaire.

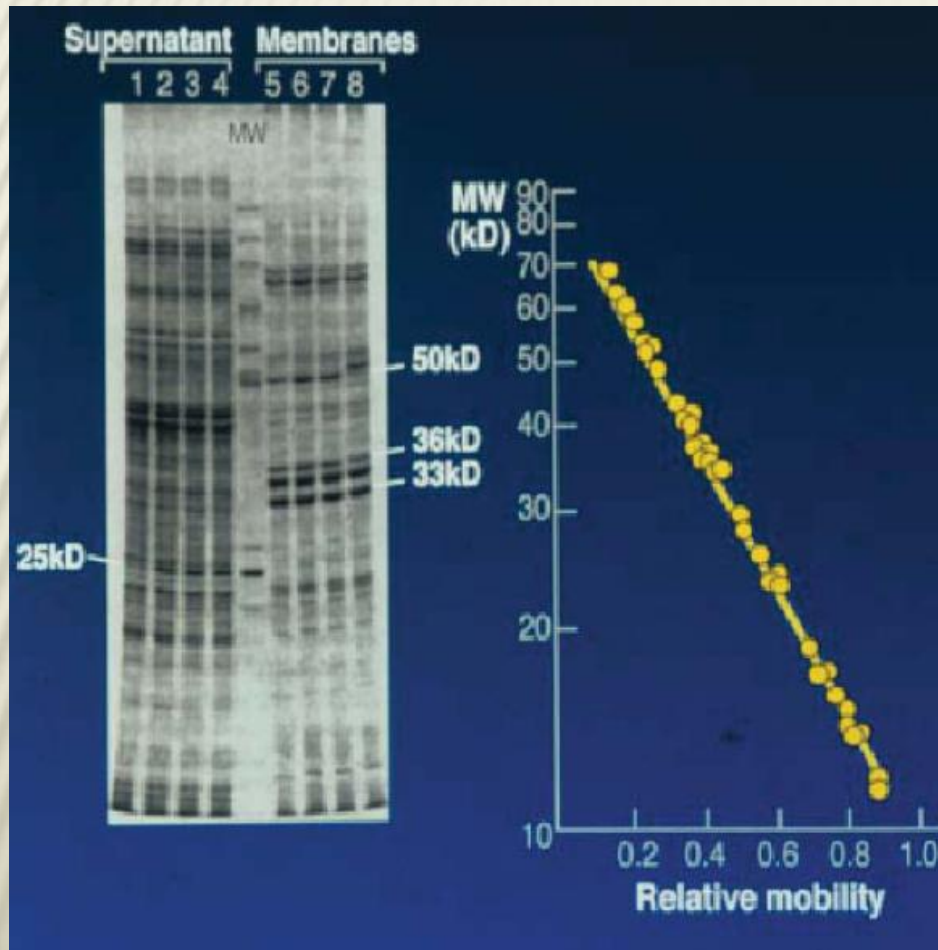
On les dépose dans une cuve en plastique avec un courant électrique.



Les protéines migrent vers l'anode chargée « + »

Les protéines les plus petites migrent le plus loin

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

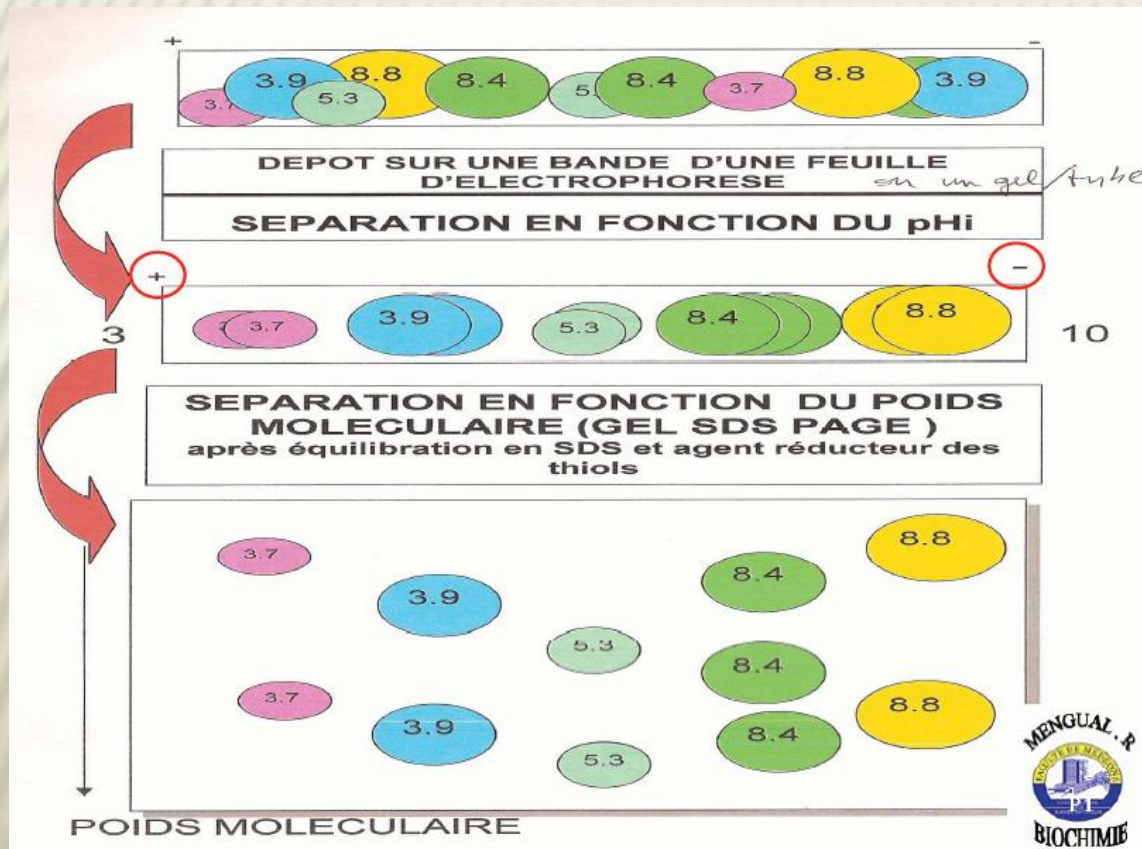


A la fin on obtient une électrophorèse :

- MW (moléculaire weight) est une ligne témoin pour connaître les poids moléculaires
- On peut dessiner une courbe de la masse moléculaire en fonction de la mobilité relative qui nous permettra d'identifier les protéines.

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

✓ Electrophorèse bidimensionnelle Spécifique aux protéines



On sépare les protéines en fonction de leur pHi et ensuite de leur poids moléculaire

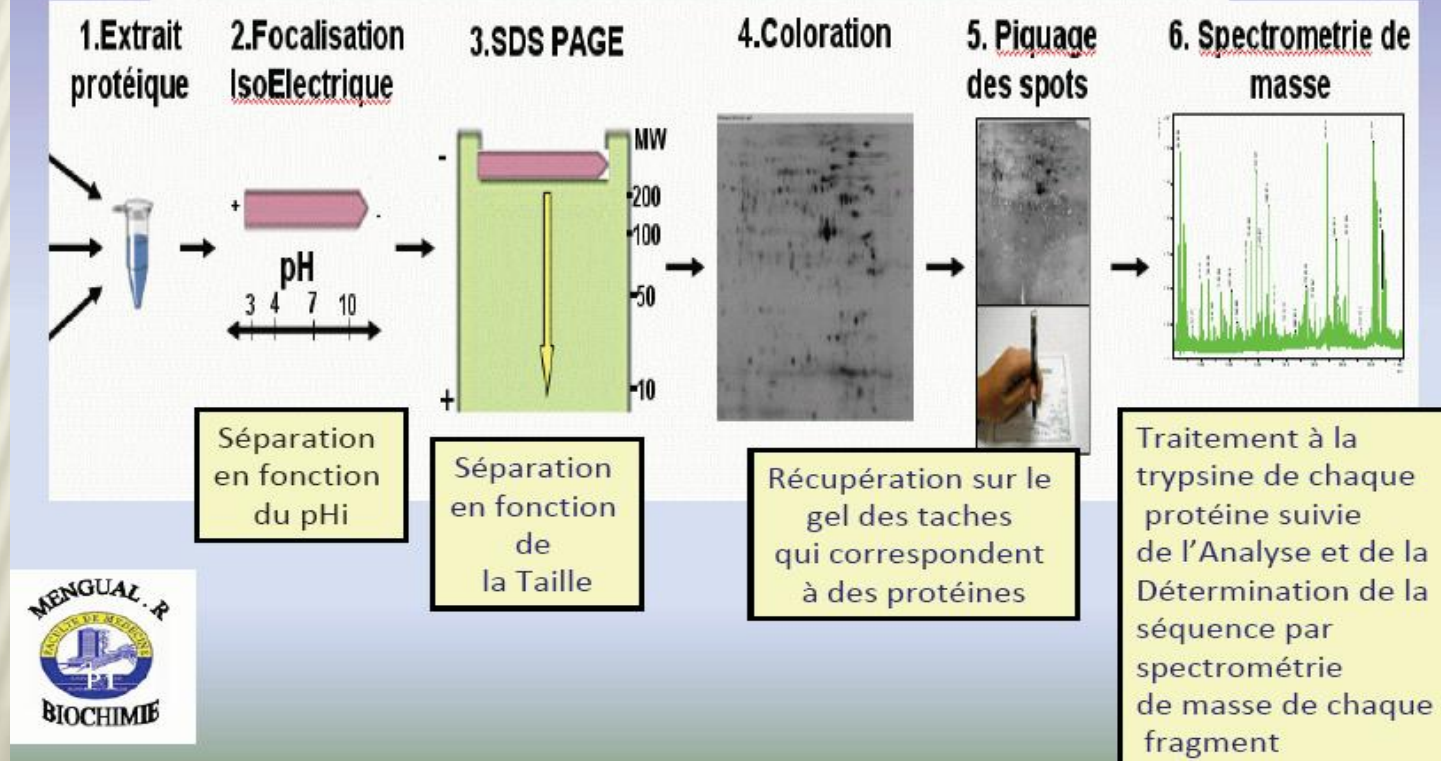
Séparation par les pHi :
- L'anode sera du côté des pHi les plus faibles

- La cathode sera du côté des pHi les plus élevés

Séparation par le poids moléculaire comme la technique sur gel d'acrylamide

II) MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROTÉINES

Electrophorèse bi-dimensionnelle : 2DE Schéma général



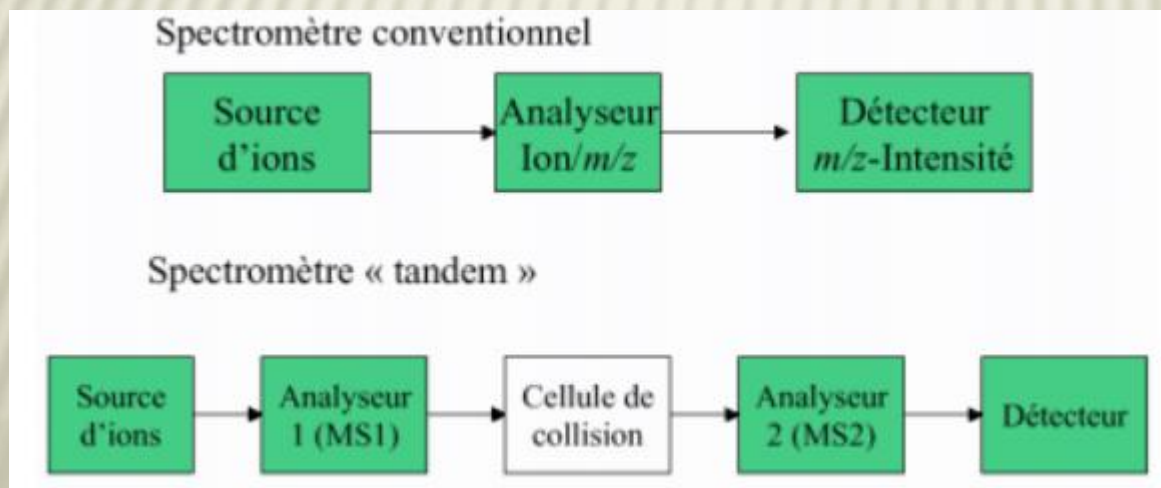
II) MÉTHODE D'ÉTUDES DES PROTÉINES

✓ Spectrométrie de masse des protéines

La spectrométrie de masse peut s'appliquer aux protéines ou aux AA.

Aux protéines on peut utiliser la spectrométrie de masse MS/MS ou en tandem :

- On vaporise et on fragmente des protéines pour obtenir leur séquence



Juste pour expliquer le principe :

- On fait une première spectrométrie sur la protéine parent

- Puis après collision la protéine parent se scinde en fragments

- Fragments qui subiront aussi une spectrométrie de masse