

**UNIVERSITE 3 CONSTANTINE**

**FACULTE DE MEDECINE**

**DEPARTEMENT DE MEDECINE**

**I<sup>ERE</sup> ANNEE MEDECINE**

## **PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES PROTEINES**

### **INTRODUCTION.**

#### **I. PROPRIETES ELECTRIQUES.**

1. Caractère amphotère.
2. Variation de la charge nette globale d'une protéine.
3. Estimation du pHi.
4. Mobilité électrophorétique.

#### **II. SOLUBILITE.**

1. Influence du Ph.
2. Influence de la température.
3. Influence des solvants organiques.
4. Influence de la concentration en sels.

#### **III. MASSE ET POIDS MOLECULAIRE.**

1. Filtration sur gel de dextrane.
2. Ultracentrifugation.

#### **IV. DENATURATION DES PROTEINES.**

## INTRODUCTION

Les protéines sont les **molécules actives** de l'organisme, chacune d'elle remplit une fonction dans la vie de ce dernier.

Ces molécules douées de **diverses propriétés physicochimiques** qui leurs caractérisent (*taille, solubilité, charge, affinité de liaisons spécifiques...*).

Grâce à ces propriétés, plusieurs milliers de ces protéines ont pu être **purifiées** dans leur forme native, et cela en soumettant leur mélanges à toute une **série de séparations** basée chacune sur une **propriété différente** afin d'obtenir une protéine pure.

### I. PROPRIETES ELECTRIQUES :

Chaque protéine est porteuse de charge électrique qui provient des AA qui la constituent.

#### I. Caractère amphotère :

- Les acides aminés constituant de chaque protéine sont des ampholytes qui lui confèrent un caractère amphotère.

Ce comportement est déterminé par :

- Les groupements  $\alpha$  amino et  $\alpha$  carboxyliques terminaux qui s'ionisent comme ils le font les acides aminés mais avec des constantes d'ionisation différentes (pK différents).
- La nature ainsi que le nombre des groupements R (chaines latérales) - ionisables de certains acides aminés (Asp, Glu, His..).
- Par contre ; les groupements  $\alpha$ NH<sub>2</sub> et  $\alpha$ COOH restants (pas terminaux) sont unis par covalence pour former des liaisons peptidiques qui ne peuvent s'ioniser et ne contribuent pas à ce caractère.

#### 2. Variation de la charge nette globale d'une protéine :

**En milieu acide :** les groupements dissociés sont les groupes basiques , donc la protéine aura une charge positive (+).

**En milieu basique :** les groupements dissociés sont les groupes acides, donc la charge résultante est négative (-).

Il existe une valeur de pH pour laquelle la charge nette de la protéine est nulle ; c'est le pH isoélectrique (pHi).

#### 3. Estimation du pHi :

La valeur du pHi dépend des signes et du nombre des charges électriques portées par les radicaux R des acides aminés et les extrémités terminales chargées.

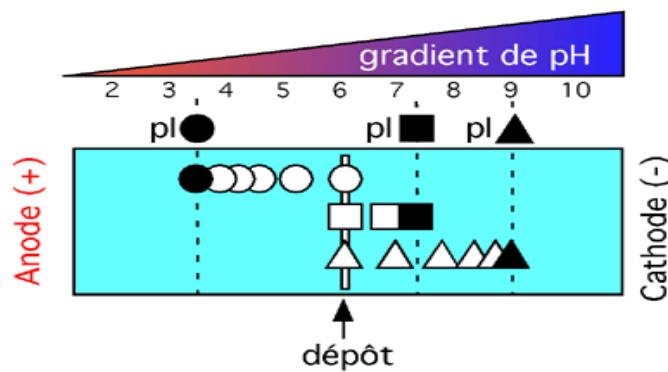
Dans une protéine :

- Si le nombre des groupements acides est supérieur au nombre de groupements basiques : pHi < 7.

- Si le nombre des groupements basiques est supérieur au nombre de groupements acides:  $pHi > 7$ .

Ce  $pHi$  peut être estimé expérimentalement par l'**isoélectrofocalisation** dont le principe est le suivant :

- Placée dans un champ électrique dans un tampon ayant un gradient de pH stable : la protéine va migrer en fonction de sa charge et s'arrête à l'endroit où le pH est égale à son  $pHi$ .
- Cette méthode permet de séparer aisément des protéines dont les différences de charge sont de l'ordre de 0,01.



#### 4. Mobilité électrophorétique :

- La **mobilité électrophorétique** est fonction de la **charge nette** de la protéine et son **PM**.
- Les **techniques électrophorétiques** exploitent la possibilité de **séparer les molécules** qui ont des **mobilités électrophorétiques différentes** dans un champ électrique.
- La différence de mobilité dans un support sous l'influence d'un **champ électrique** et dans un **milieu tamponné** se traduit par une **migration différente**.

##### ▪ L'ELECTROPHORESE :

Elle s'effectue en trois étapes :

#### 1. Dépôt de l'échantillon sur le support : gel ou acétate de cellulose ;

#### 2. Migration des protéines sous l'influence du champ électrique ;

- les protéines dont le *pH isoélectrique est inférieur au pH* du milieu sont *chargées négativement* et migrent vers le pôle positif (anode).
- les protéines dont le *pHi est supérieur au pH* de migration migreront vers la *cathode*.
- les protéines dont le *pHi est égal au pH* de migration *restent au point de dépôt*.

#### 3. La dernière étape est la « révélation », c'est-à-dire la coloration des protéines sur leur support.

## II. SOLUBILITE :

La solubilité des protéines dans leur solvant naturel, solution saline isotonique, dépend de leur structure tertiaire.

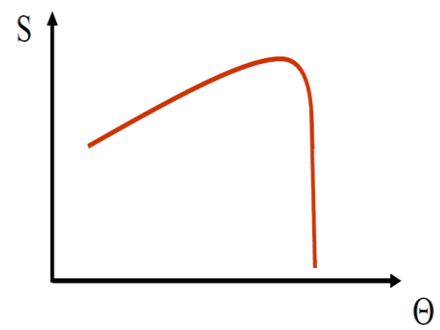
La solubilité peut être influencée par divers facteurs. Importance +++ pour l'extraction et la purification d'une protéine

- Température.
- pH.
- Constante diélectrique.
- Force ionique.

### 1. Influence de la température.

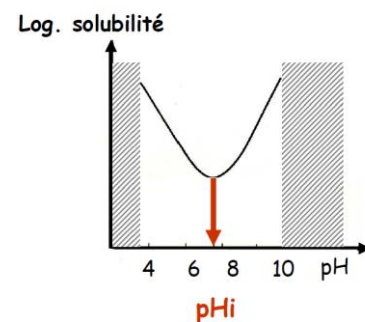
Une élévation modérée (entre 0 et +40°C) augmente légèrement la solubilité **MAIS**, une élévation plus forte de la température induit une dénaturation.

Précipitation par thermo-coagulation



### 2. Influence du pH :

- La solubilité d'une protéine est **minimale** au voisinage de son pH Isoélectrique par suite d'un maximum d'attractions électrostatiques entre les protéines ce qui favorise le relargage.
- L'absence de charge électrique supprime les forces de répulsions inter-moléculaires => Formation d'agrégats insolubles.

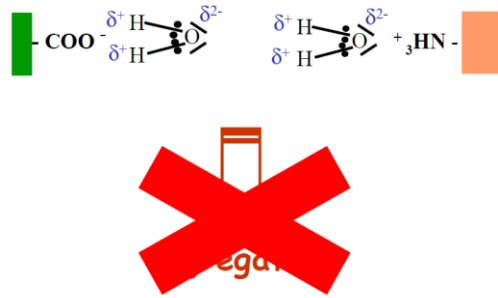


### 3. Influence des solvants organiques :

La constante diélectrique d'un solvant détermine l'influence du solvant sur les interactions électrostatiques inter-protéines.

L'eau est un solvant de forte constante diélectrique.

Les molécules d'eau (dipôles) => diminution des interactions électrostatiques (mélange) => diminue la tendance à l'agrégation (effet solubilisant).



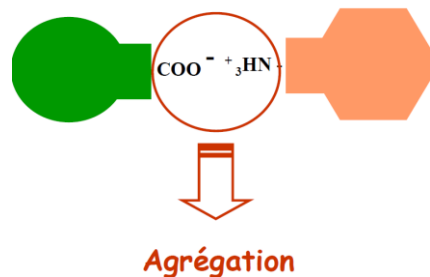
A l'inverse :

Si on ajoute de l'**éthanol ou de l'acétone** (constante diélectrique **faible**)

=> ↑interactions électrostatiques,

=> **Formation d'agrégats insolubles.**

Les **solvants organiques à faible constante diélectrique et miscibles à l'eau** (éthanol, acétone) sont d'excellents **agents de précipitation des protéines.**



#### 4. Force ionique

L'effet des **sels neutres** sur la solubilité des protéines dépend de la **force ionique  $\mu$**  de la solution, c'est à dire de la **concentration** et de la **charge** des ions.

##### a. Force ionique faible => Solubilisation

L'extraction des protéines d'un lysat cellulaire est favorisée par l'utilisation d'une solution de chlorure de sodium à faible concentration (0,1 M ;  $I = 0,1$ ) plutôt que d'eau pure.

##### b. Force ionique élevée => Insolubilisation (relargage par les sels)

Les fortes concentrations d'ions minéraux diminuent la disponibilité des molécules d'eau dans la solution => diminution de l'hydratation des protéines et augmentation des interactions hydrophobes => précipitation. Application à la purification des protéines.



### Application du relargage par les sels : « fractionnement de mélanges protéiques »

Toutes les protéines ne précipitent pas à la même force ionique.

=> **Fractionnement** de mélanges protéiques par **augmentation** progressive de la **force ionique**.

Sels d'ions divalents, très solubles dans l'eau (**sulfate d'ammonium**, solution saturée à 0°C = 4 M).

ex. Séparation des protéines du sérum sanguin en deux fractions :

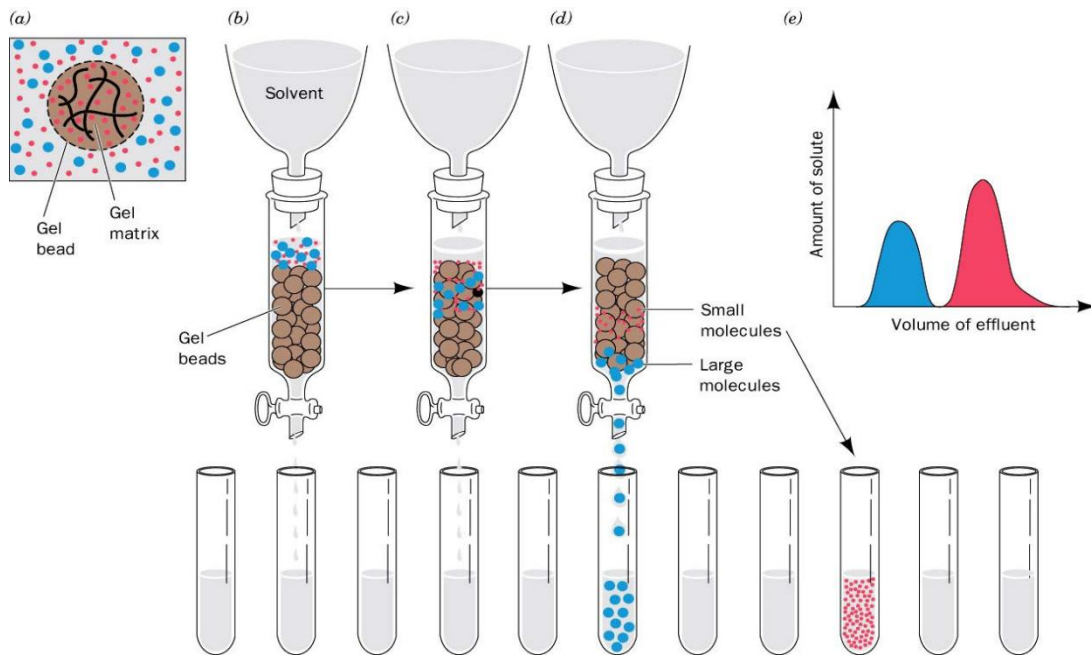
- **globulines**, précipitées à 50% de la saturation,
- **albumine**, restant en solution.

### III. POIDS ET MASSE MOLECULAIRE

- Le poids moléculaire d'une protéine est évidemment une des caractéristiques fondamentales.
- Il peut varier de moins de 10 000 pour les petites à plus de  $10^6$  pour celles avec de très longues chaînes polypeptidiques.
- Diverses méthodes sont utilisées pour déterminer le poids moléculaire ; les principales sont :

#### I. Filtration sur gel de dextrane:

- Les gels de dextrane utilisés sont des polyosides comportant un nombre variable de liaisons croisées lesquelles déterminent un degré de porosité.
- La pénétration des macromolécules dans ces gels est plus ou moins facile selon leur taille. Les plus grosses molécules, exclues du gel, sortiront les premières de la colonne tandis que les plus petites seront retardées et sortiront en dernier.
- On a pu calibrer des colonnes de gel de dextrane en y faisant passer des molécules de M.M. connue ce qui permet de déterminer la M.M de molécules inconnues.

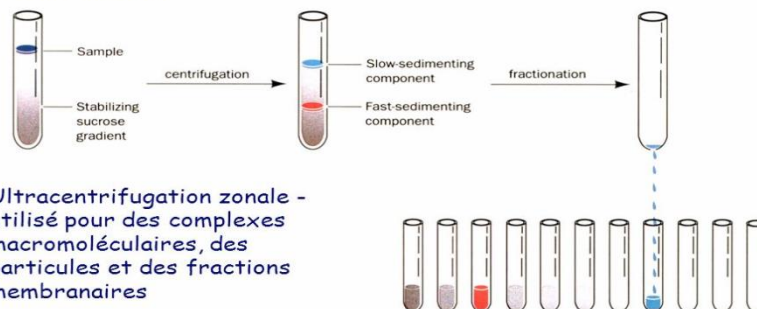


**2. Ultracentrifugation :**

- Les protéines commencent à sédimenter lorsqu'elles sont l'objet d'une accélération considérable.
- L'ultracentrifugation peut atteindre des vitesses de rotation de 80 000 rpm (révolution/min) ce qui crée un champ de centrifugation > à 600 000g
- Les molécules protéiques en solution, soumises à une centrifugation à grande vitesse (60 000 tours / minute), sédimenteront en fonction de leur densité.
- La **masse moléculaire** (symbole **m**), doit être exprimée en daltons (symbole : Da). ex. : Albumine  $m = 67\ 000\ Da$  (67 kDa).

**A. Ultracentrifugation préparative**

Dans l'**ultracentrifugation zonale**, une suspension protéique est soigneusement déposée au-dessus d'un **gradient de densité** de saccharose. Au cours de la centrifugation, chaque particule traverse le gradient en fonction de son coefficient de sédimentation:



Ultracentrifugation zonale - utilisée pour des complexes macromoléculaires, des particules et des fractions membranaires

**IV. Dénaturation des protéines :**

- La dénaturation correspond à une perte d'activité biologique d'une protéine due à une altération de sa conformation native.

- **Agents dénaturants** : tous les facteurs capables d'entraîner la *rupture des liaisons hydrogènes et hydrophobes.*
- La dénaturation *n'altère pas la structure primaire* de la protéine : les liaisons peptidiques sont conservées.
- Si les modifications structurales sont **discrètes**, la dénaturation peut être **réversible**.
- Si la protéine est **incapable de reprendre** la conformation native la dénaturation est **Irréversible**.
  - Critères de dénaturation d'une protéine :
    - **Perte d'activité** biologique,
    - **Insolubilisation** de la protéine due à l'agrégation en amas,
    - **Elévation de la viscosité** des solutions protéiques.