



POLYTECH^M
MONTPELLIER

BIOCHIMIE DES PROTEINES

Professeur Jean-Louis CUQ



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

I. INTRODUCTION

Les **protéines**, macromolécules complexes qualifiables de **biopolymères**, sont les plus abondantes des molécules organiques des cellules et constituent souvent plus de 50% du poids sec des êtres vivants. Elles jouent un rôle fondamental dans la structure et les fonctions cellulaires et c'est par elles que l'information génétique s'exprime. Elles sont intimement liées à tous les phénomènes physiologiques d'où leur nom **substances venant en premier** (en grec **protos** signifie **premier**).

Elles sont constituées par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques qui sont des copolymères d'environ une vingtaine d'acides aminés appartenant à la série L. Ces acides aminés sont liés entre eux par des liaisons amides : les **liaisons peptidiques**.

Il existe de nombreuses classifications des protéines qui reposent soit sur leur composition soit sur leurs propriétés (**fonctionnelles** ou **physicochimiques**) soit sur leur forme tridimensionnelle (**conformation**).

1. Terminologie fonction de la composition.

Les protéines appartiennent à une classe de composants organiques du vivant, celle des **Protides**, composés organiques contenant **C H O N** (50, 7, 23, 16 %) et souvent **S** (0 à 3 %).

1.1. Protides non hydrolysables.

ils sont issus des protides hydrolysables dans des conditions bien définies (HCl 6N, 24 h ou plus, 110°C). Il s'agit de monomères : **acides aminés** (19 couramment rencontrés).

Il est bon de mentionner que toutes les protéines sont composées des mêmes acides aminés dont seuls la proportion et l'ordre d'enchaînement varient.

1.2. Protides hydrolysables.

1.2.1. Condensation d'acides aminés.

1) Peptides.

Le terme **oligopeptide** est réservé aux peptides de 10 résidus au plus (dipeptides, tripeptides, tétra, penta etc). Certains sont cycliques (tyrocidine, gramicidine etc).

Le terme **polypeptide** est réservé aux peptides de 100 résidus au plus (poids moléculaire voisin de 10000).

Protéoses : obtenues par hydrolyse partielle des protéines, hydrosolubles, non thermocoagulables, précipitables par une solution de NaCl saturée.

Peptones : obtenues par hydrolyse partielle poussée des protéines, hydrosolubles, non thermocoagulables, non précipitables par une solution de NaCl saturée.

2) Holoprotéides ou protéines simples ou homoprotéines.

Protéine monomérique avec un nombre de monomères qui dépasse 50 à 100.

Protomère s'il s'agit d'une sous-unité d'un système **oligomérique** (plusieurs chaînes polypeptidiques).

La différenciation peptide - protéine est toujours délicate, les peptides pouvant être considérés comme des polymères relativement “courts” qui s’hydratent de façon réversible tandis que les protéines plus longues sont toujours structurées tridimensionnellement de façon unique, les molécules d’eau occupant avec des énergies élevées de liaison des “sites” extrêmement variables. Les structures spatiales des protéines (**conformation**) sont sensibles à l’environnement (chaleur, pH, force ionique, solvants etc.) et changent alors de façon irréversible de forme : **dénaturation**.

1.2.2. Holoprotéides + groupement prosthétique : hétéroprotéides, hétéroprotéines ou protéines conjuguées.

1) Nucléoprotéines : combinaison avec des acides nucléiques : ribosomes 50% d’ARN, virus 50% d’ARN (mosaïque tabac), nucléohistones etc.

2) Lipoprotéines : liaison avec des lipides neutres, du cholestérol, des phospholipides : β lipoprotéines plasmatiques avec 80 % de lipides.

3) Glycoprotéines (4% glucides) et mucoprotéines (>4% glucides): liaison avec un glucide souvent du type polyoside: par hydrolyse libération de sucres aminés comme l’hexosamine et d’acides uroniques. Ex: mucine, orosomucoïde, γ globuline (2 % galactose + hexosamine + mannose et + acide sialique).

4) Phosphoprotéines: sérine et thréonine estérifiées par un groupement phosphate: les caséines des laits avec environ 4% de phosphate.

5) Hémoprotéines avec un groupement prosthétique porphyrinique et un métal souvent Fe (hémoglobine 4%, cytochrome C 4%, catalase 3,1%, myoglobine).

6) Flavoprotéines avec FAD-flavine adénine dinucléotide. Ex: succinate deshydrogénase 2%, D-aminoacide oxydase 2%. Hémoprotéines et flavoprotéines sont qualifiées de chromoprotéines.

7) Métalloprotéines liées à un métal ou un sel. Ex: Cu (céruloplasmine, tyrosine oxydase 0,2 %), Zn (alcool deshydrogénase 0,3 %), Fe(OH)₃ (ferritine 23%), Fe (sidérophiline).

2. Terminologie fonction de la conformation.

La conformation est la forme tridimensionnelle de la protéine dans l’espace (ensemble des structures primaire, secondaires, tertiaires et quaternaires).

La **structure primaire** correspond à l’ordre séquentiel des acides aminés (**résidus**) dans une protéine.

La **structure secondaire** correspond à l’organisation de la chaîne dans l’espace selon un axe privilégié.

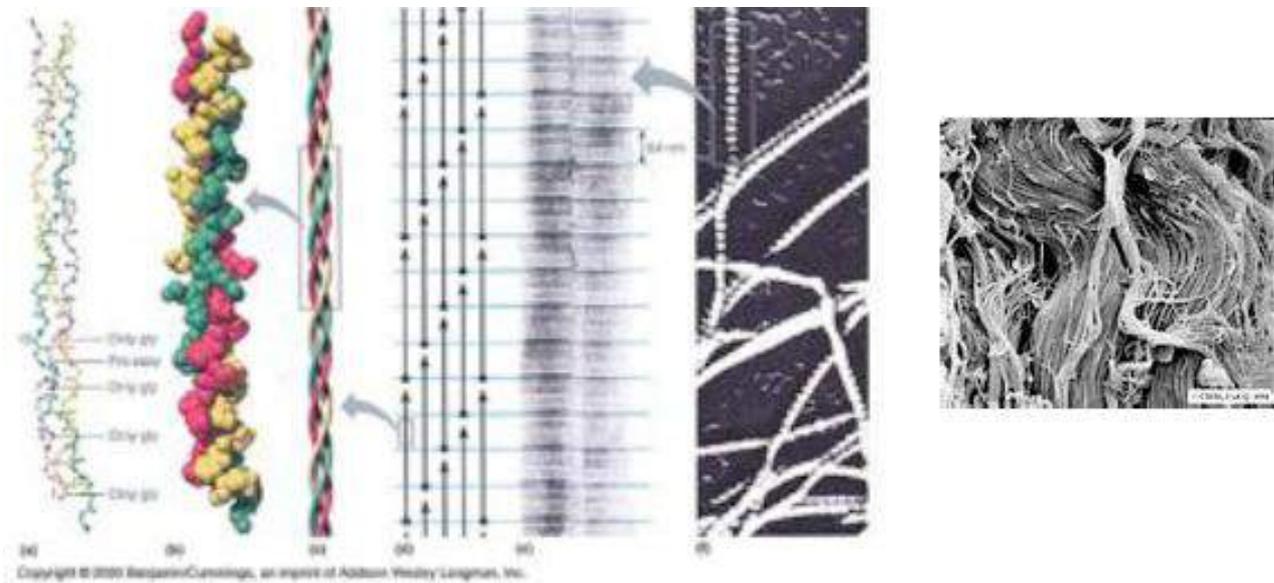
La **structure tertiaire** correspond à l’organisation spatiale de la chaîne polypeptidique selon les trois dimensions.

La **structure quaternaire** est l’arrangement dans l’espace de diverses chaînes liées entre elles par des liaisons non covalentes le plus souvent ou par pont disulfure.

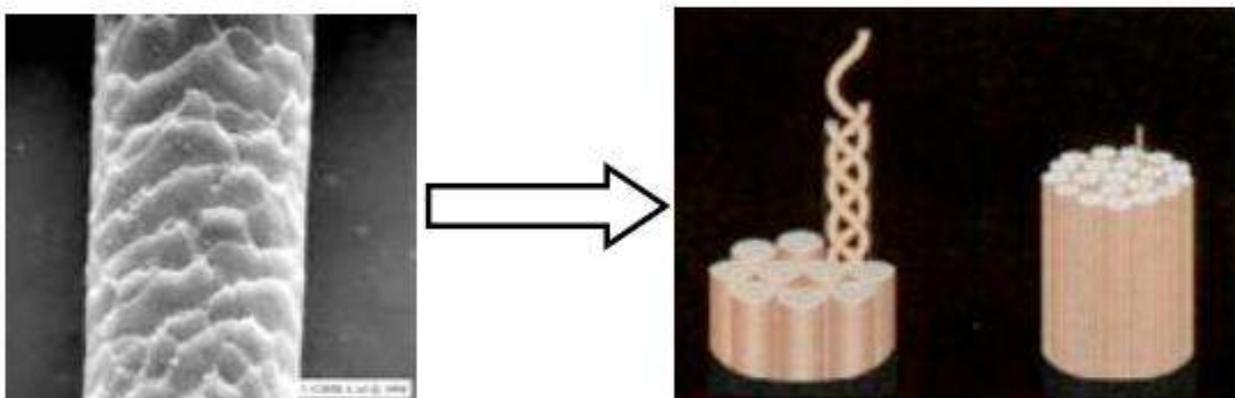
2.1. Les protéines fibreuses.

Elle sont souvent oligomériques, composées de chaînes polypeptidiques assemblées le long d’un axe commun, ce qui conduit à la formation de fibres :

- collagène (tendons, matrice de l'os)

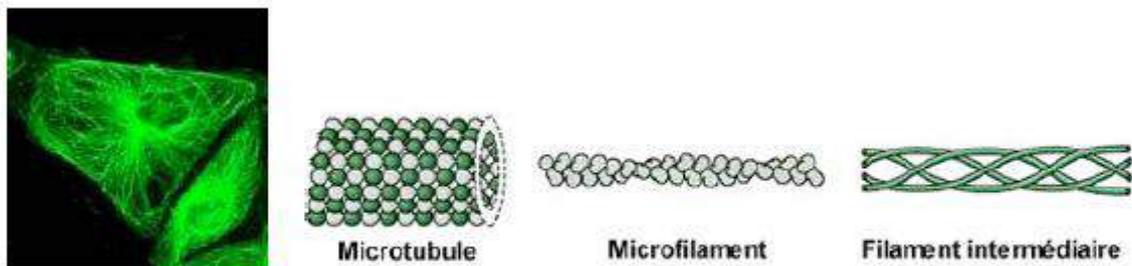


- kératine (du cuir, des cheveux, de la corne, des ongles, des plumes)



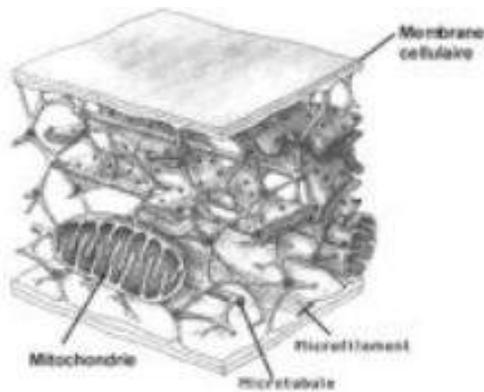
Cheveu (microscope électronique à balayage)

- élastine (tissu élastique)
- cytosquelette avec microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires)



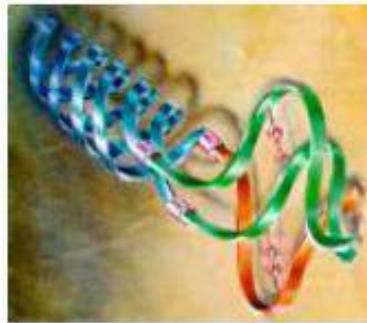
Les microtubules sont de petits tubes creux formés de protéines appelées *tubulines*. Ces tubes se défont et se refont constamment dans la cellule. Les microtubules sont responsables des mouvements des cils et des flagelles de certaines cellules. Les microfilaments, plus petits, sont faits d'une protéine

appelée *actine*. Les microfilaments d'actine sont présents dans toutes les cellules, mais ils sont particulièrement abondants dans les cellules musculaires.



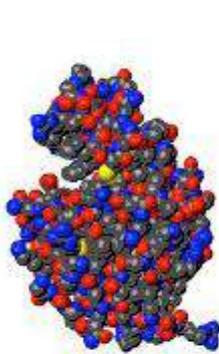
Le cytosquelette forme l'armature de la cellule. Il contribue aussi à rattacher les cellules les unes aux autres. Certaines protéines de la membrane cellulaire sont solidement rattachées au cytosquelette. Les protéines de deux cellules accolées l'une à l'autre peuvent former des liaisons entre elles reliant ainsi les deux cellules.

- fibroïne (ver à soie).

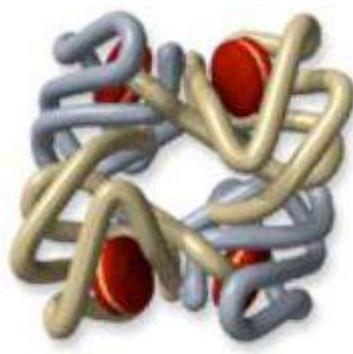


2.2. Les protéines globulaires.

Elles sont des protomères ou des oligomères qui forment dans l'espace des structures sphériques ou ovoïdes. Quelques protéines possèdent à la fois les propriétés des protéines fibreuses et globulaires (actine, fibrinogène).



Lysozyme



Hémoglobine



3. Terminologie basée sur la fonction.

Les protéines présentent une extraordinaire diversité de fonction et peuvent être ainsi classées en trois principales catégories:

3.1. Les protéines de structure.

Ces protéines comme la kératine, le collagène, l'élastine, etc sont présentes dans tous les tissus comme le muscle, l'os, la peau, les organes internes, les membranes cellulaires et organites intracellulaires. Leur fonction dépend de leur structure. Souvent, il s'agit de protéines fibreuses.

3.2. Les protéines à activité biologique.

Dans la nature tous les phénomènes biologiques passent à un moment ou à un autre par des protéines. Il est possible de citer les :

- **Enzymes:** plus de 2000 décrites, activité catalytique spécifique
- **Hormones:** (insuline, somatotrophine, etc)
- **Protéines contractiles et du mouvement:** (myosine, actine, tubuline , etc)
- **Protéines de transport** dans le sang (transferrine, hémoglobine, myoglobine) ou au travers de membranes cellulaires
- **Protéines protectrices:** (Anticorps ou immunoglobulines, fibrinogène, thrombine)
- **Protéines de réserve:** (ovalbumine, glycine, gliadine, zéine)
- **Protéines toxiques:** pour l'homme (toxines botuliniques, staphylococciques, venins de serpents, de scorpion, ricine) ou pour les microorganismes (bactériocines, antibiotiques)
- **Protéines d'identification cellulaire**
- **Protéines anti-nutritionnelles:** (inhibiteur trypsinique du soja, hémagglutinines)
- **Protéines allergènes.**

3.3. Protéines alimentaires.

Il ne s'agit pas d'un groupe unique mais d'un groupe composé de protéines de structure ou biologiquement actives. Il s'agit de protéines savoureuses, digestibles, non toxiques, économiquement utilisables. Elles permettent de satisfaire aux besoins en acides aminés essentiels qui varient en fonction de l'âge et de l'état physiologique. Le déficit protéique actuel est très grand au niveau mondial et plus de 25 % de la population souffre de malnutrition.

4. Terminologie fonction de propriétés physico-chimiques.

Cette classification des protéines en fonction des propriétés physico-chimiques est très ancienne (OSBORNE au début de ce siècle) est surtout appliquée aux **protéines simples**.

4.1. **Albumines** : α lactalbumine, la sérumalbumine bovine, humaine, etc.

4.2. **Globulines** : β lacto-globuline, sérum-globuline, immunoglobulines, etc.

4.3. **Glutélines** : gluténine du blé.

4.4. **Prolamines** : zéine du maïs, gliadine du blé.

4.5. **Albuminoïdes** ou **scléroprotéines**: kératine, collagène; la gélatine est une albuminoïde dénaturée.

4.6. **Histones** : nucléo-histones du thymus.

4.7. **Protamines**: localisées dans les cellules (sturine de l'esturgeon etc).

tableau 1 . Classification des protéines selon Osborne. S : soluble, I insoluble

| PROTEINES | SOLUBILITE | | | | | | | | coagulation thermique | |
|--------------|------------|---|----------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|----------------|-----------------------|------------------|
| | eau | solutions salines diluées (d'acides ou de bases fortes) | solutions salines saturées | acide dilué | base diluée | ammoniaque diluée | éthanol 80% | éthanol absolu | | solvants neutres |
| ALBUMINES | S | S | | | | | | | | ++ |
| GLOBULINES | | S | | | | | | | | ++ |
| GLUTELINES | | | | S | S | S | I | I | I | |
| PROLAMINES | | | | | | | S | I | I | |
| ALBUMINOÏDES | V | | | I | I | I | I | I | I | |
| HISTONES | S | | | S | I | I | | | | - |
| PROTAMINES | S | | | | | S | | | | - |

5. Taille des molécules protéiques.

5.1. Définitions.

Un chapitre est consacré à la détermination de la masse moléculaire des protéines (chapitre V).

La **masse moléculaire** est exprimé en **Dalton**. L'atome ¹²C a une masse de 12 daltons. Le dalton a une masse de 1 g / N = 1 g / 6,02.10²³ soit de 1,663.10⁻²⁴ g.

Le **poids moléculaire** est défini comme le rapport masse de la molécule / douzième de la masse d'un atome de carbone : nombre sans dimension.

La **masse molaire M** est exprimée en g.mole⁻¹ et est numériquement identique à une masse molaire exprimée en Dalton (pour 6,02.10²³ molécules vraies).

5.2. Le poids moléculaire de quelques protéines.

Il varie de 5000 (10000) à plus de 1 000 000. Pour les enzymes, les limites sont de 12000 à 10⁶. La chaîne polypeptidique de la plupart des protéines comprend entre 100 et 300 à 400 résidus (poids moléculaire compris entre 10000 et 40000). La SAB a 550 résidus et la myosine 1800.

| protéine | poids moléculaire | nombre de protomères |
|----------------------------------|-------------------|----------------------|
| insuline | 5 700 | 2 |
| ribonucléase | 12 600 | 1 |
| lysozyme (blanc d'œuf) | 13 900 | 1 |
| myoglobine | 16 900 | 1 |
| chymotrypsinogène | 23 200 | 1 |
| β-lacto-globuline | 35 000 | 2 |
| hémoglobine | 64 500 | 4 |
| Sérum-albumine | 67 500 | 1 |
| hexokinase | 102 000 | 2 |
| aspartate trans-carbamoylase | 310 000 | 12 |
| glutamine synthétase | 592 000 | 12 |
| complexe pyruvate déshydrogénase | 7 000000 | 160 |
| virus de la mosaïque tabac | 4 0 000 000 | 2 130 |
| micelle de caséine | 150 000 000 | 10 000 |

II. PROTEINES - LES ACIDES AMINES CONSTITUTIFS

1. Structure.

Il s'agit des monomères des molécules protéiques comportant au moins un groupe aminé primaire (NH_2) ou secondaire ($-\text{NH}-$) et au moins un groupe carboxylique ($-\text{COOH}$). La fonction amine occupe une position α par rapport au groupe carboxyle. Les acides α aminés ont la structure suivante:



Proline et hydroxyproline ne répondent pas à cette structure générale.

2. Les principaux acides aminés.

Environ 20 acides aminés sont rencontrés dans les hydrolysats de protéines. D'autres plus rares jouent parfois des rôles biologiques importants. L'usage en biochimie leur a attribué un nom commun, généralement à suffixe "**ine**", rappelant l'origine ou l'une des propriétés. Les acides aminés peuvent être classés d'après la structure et les propriétés de leur chaîne latérale, **R**, chaîne qui contribue par ses propriétés physico-chimiques, aux propriétés de la protéine qui les contient (figure 1 et tableau 2).

Parmi les différentes classifications possibles, l'une des plus utilisées repose sur la polarité et les possibilités d'ionisation de cette chaîne.

2.1. Acides aminés à chaîne latérale apolaire.

2.1.1. Chaîne latérale aliphatique.

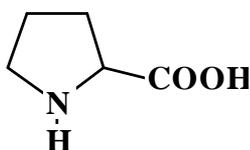
1 - Glycine. Il s'agit du plus simple des acides aminés ($\text{R} = \text{H}$). Son ancienne nomenclature de glycoColle (sucre de colle) rappelle sa saveur sucrée et le fait qu'il a été d'abord isolé d'un hydrolysats de gélatine. Très répandu, commun à la plupart des protéines dans lesquelles il peut être abondant (40 % dans la fibroïne de la soie).

2 - Alanine. C'est le plus simple des acides aminés à 3 atomes de carbone dont on peut faire dériver les autres par substitution d'un ou de deux atomes d'hydrogène du radical R.

3 - Valine, leucine, isoleucine.

Acides aminés communs essentiels à la nutrition de l'homme.

4 - Proline : iminoacide dérivé de la pyrrolidine.



Par sa "rigidité", elle joue un rôle très important dans les structures protéiques.

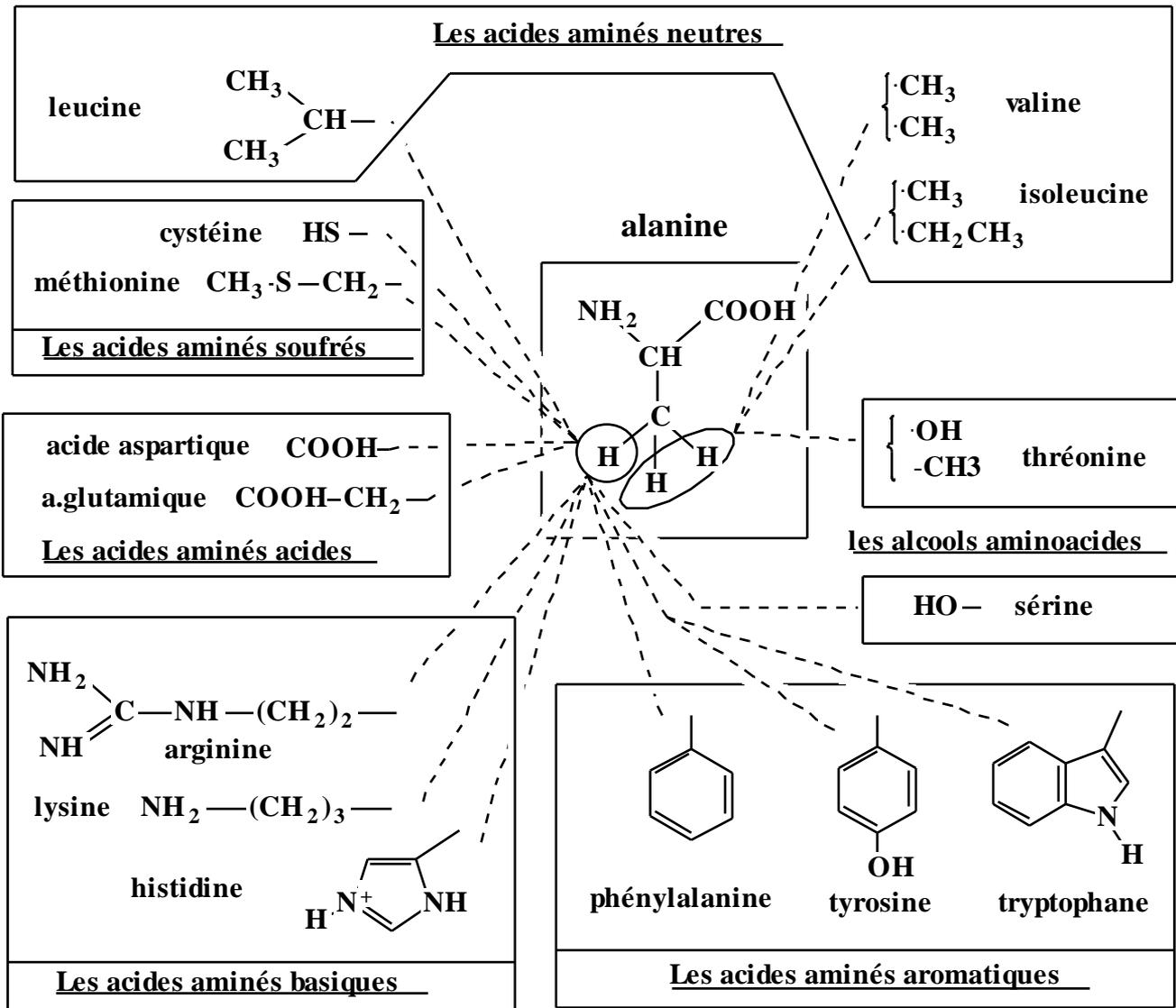
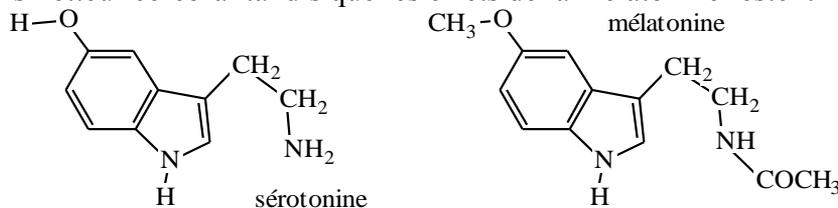


figure 1. Structure des acides aminés par rapport à l’alanine.

2.1.2. Chaîne latérale aromatique.

1 - Phénylalanine (essentielle en nutrition humaine)

2 - Tryptophane : bien que le noyau indole porte un azote au pK_a élevé, il est considéré comme apolaire dans la plupart des protéines dans des conditions “normales” de pH. Certains des dérivés du tryptophane possèdent des activités physiologiques; la sérotonine est un neurotransmetteur cérébral tandis que les effets de la mélatonine restent mal connus.



2.1.3. Chaîne latérale avec un atome de soufre.

- Méthionine. Donneuse de groupement méthyle, elle est essentielle, peu abondante, elle est souvent limitante dans les protéines alimentaires et est très sensible aux réactions d’oxydation.

2.2. Acides aminés à chaîne latérale polaire.

Cette polarité partielle (- δ) ou totale (+ ou -) est liée à la présence de fonctions organiques contenant un hétéroatome d'électronégativité supérieure à celle du carbone et de l'hydrogène (O, S, N).

2.2.1. Chaîne latérale polaire non chargée.

Ces acides aminés qualifiés d'hydrophiles possèdent une chaîne latérale à groupement fonctionnel capable de former des liaisons hydrogène avec des molécules comme l'eau (hydratation) ou avec d'autres résidus polaires ce qui contribue à la structure des molécules protéiques.

1 - Sérine et thréonine (essentielle) possèdent une fonction alcool primaire ou secondaire qui leur permet d'être estérifiées (en particulier par l'acide phosphorique)



Les acides aminés phosphorylés ionisables jouent un rôle fondamental dans la technologie laitière.

2 - Tyrosine.

Elle possède une fonction phénol qui ne s'ionise significativement qu'à des pH très élevés; pH non rencontrés en sciences des aliments ($pK_a \sim 10$).

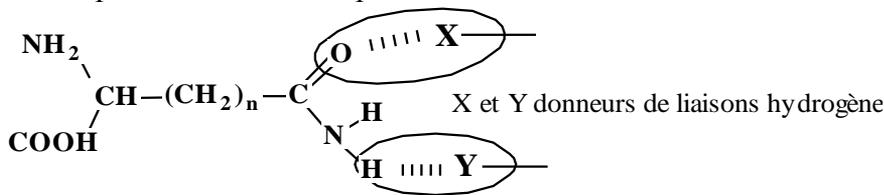
3 - Cystéine.

La fonction thiol R - SH peut participer à la liaison hydrogène, son ionisation n'intervenant également que pour des pH élevés. Par oxydation, deux molécules se condensent en cystine (pont disulfure). Ces ponts covalents jouent un rôle important dans la stabilisation des structures spatiales des protéines.

La cystine est présente dans de nombreux tissus de protection, dans des molécules protéiques fibreuses (kératines). Elle joue également un rôle important dans l'activité de certaines enzymes.

4 - Glutamine et asparagine.

Ces acides aminés possèdent une fonction amide apte, par la présence simultanée d'oxygène et d'azote, à donner deux liaisons hydrogène. Abondantes dans les protéines, elles contribuent à l'établissement de liaisons intra et intermoléculaires de forte énergie cumulée; ces liaisons jouent un rôle déterminant dans les propriétés rhéologiques des pâtes et gels alimentaires. La fonction amide est facilement hydrolysable en milieu acide à des températures voisines de 100°C. Ces acides aminés jouent un rôle important dans le transport et la mise en réserve de l'azote.



2.2.2. Chaîne latérale polaire chargée (ionisable).

Il s'agit de chaînes à groupement carboxylique à caractère acide ou à caractère basique (amine, guanidine, imidazole).

1 - Acides aspartique et glutamique sont chargés négativement à des pH voisins de 7.

2 - Lysine.

Elle est chargée positivement à des pH voisins et inférieurs de 7, elle est essentielle en nutrition humaine et limitante dans de nombreuses protéines d'origine végétale.

3 - Arginine.

Son groupement guanidique peut se combiner à l'acide phosphorique, le dérivé formé étant impliqué dans les phénomènes de contraction musculaire des invertébrés. Elle intervient dans le cycle de l'urée. Facilement décomposée en milieu alcalin en urée et ornithine.

4 - Histidine.

Son noyau imidazole est d'une grande réactivité à cause de sa structure électronique ($pK_a = 6$) et participe à de nombreuses réactions biochimiques et à plusieurs processus physiologiques (contraction musculaire, transmission neuromusculaire).

Les symboles lettres, les poids moléculaires et certaines propriétés des acides aminés sont indiqués dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Acides aminés fréquemment rencontrés dans les protéines

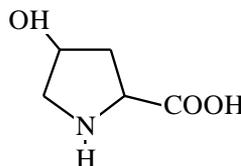
ΔG_o : hydrophobicité de la chaîne latérale Hélice α et feuillet β : S : stabilisant ; D : destructeur ; I : indifférent
Nutrition : E : essentiel ; e : essentiel dans certains cas

| nom | symbole 3 ou 1 lettre | masse molaire | pK_{a1} | pK_{a2} | pK_{aR} | pI | ΔG_o kJ.mole ⁻¹ | codon | hélice feuillet | | nutri- tion |
|------------------|--------------------------|------------------|---------------|-----------------|-----------|-------|---------------------------------------|-------------|--------------------|---|----------------|
| | | | $\alpha COOH$ | αNH_3^+ | α | | | | β | | |
| alanine | ALA , A | 89,1 | 2,35 | 9,69 | | 6,02 | 3,1 | GC(U,C,A,G) | S | I | |
| arginine | ARG , R | 174,2 | 2,17 | 9,04 | 12,48 | 10,76 | 3,1 | AG(A,G) | I | I | e |
| asparagine | ASN , N | 132,1 | 2,02 | 8,80 | | 5,41 | -0,04 | AA(U,C) | D | D | |
| acide aspartique | ASP , D | 133,1 | 2,09 | 9,82 | 3,86 | 2,97 | 2,25 | GA(U,C) | I | I | |
| cystéine | CYS , C | 121,1 | 1,96 | 10,28 | 8,18 | 5,07 | 4,2 | UG(U,C) | I | S | E |
| glutamine | GLN , Q | 146,1 | 2,17 | 9,13 | | 5,65 | -0,4 | CA(A ,G) | S | S | |
| acide glutamique | GLU , E | 147,1 | 2,19 | 9,67 | 4,25 | 3,22 | 2,3 | GA(A,G) | S | D | |
| glycine | GLY , G | 75,1 | 2,34 | 9,78 | | 6,06 | 0 | GG(U,C,A,G) | D | I | |
| histidine | HIS , H | 155,2 | 1,82 | 9,17 | 6,00 | 7,58 | 2,1 | CA(U,C) | S | D | e |
| isoleucine | ILE , I | 131,2 | 2,36 | 9,68 | | 6,02 | 12,4 | AU(U,C,A) | I | S | E |
| leucine | LEU , L | 131,2 | 2,36 | 9,64 | | 6,00 | 10,1 | CU(U,C,A,G) | S | S | E |
| lysine | LYS , K | 146,2 | 2,18 | 8,95 | 10,53 | 9,74 | 6,25 | AA(A,G) | I | D | E |
| méthionine | MET , M | 149,2 | 2,28 | 9,21 | | 5,75 | 5,45 | AUG | S | S | E |
| phénylalanine | PHE , F | 165,2 | 1,83 | 9,24 | | 5,53 | 11,1 | UU(U,C) | S | S | E |
| proline | PRO , P | 115,1 | 1,99 | 10,60 | | 6,30 | 10,85 | CC(U,C,A,G) | D | D | |
| sérine | SER , S | 105,1 | 2,21 | 9,15 | | 5,68 | 0,17 | UC(U,C,A,G) | I | D | |
| thréonine | THR , T | 119,1 | 2,71 | 9,62 | | 6,16 | 1,85 | AC(U,C,A,G) | I | S | E |
| tryptophane | TRP , W | 204,2 | 2,38 | 9,39 | | 5,89 | 12,55 | UGG | S | S | E |
| tyrosine | TYR , Y | 181,2 | 2,30 | 9,11 | 10,07 | 5,65 | 12,0 | UA(U,C) | D | S | E |
| valine | VAL , V | 117,1 | 2,32 | 9,62 | | 5,97 | 7,05 | GU(U,C,A,G) | S | S | E |

3. Acides aminés rares ou occasionnels.

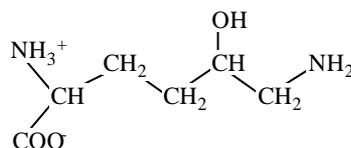
3.1. Acides α -aminés présents dans quelques protéines.

1 - Hydroxyproline.



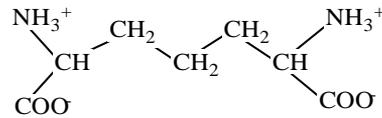
Abondante dans certaines protéines comme le collagène.

2 - 5-hydroxylysine.

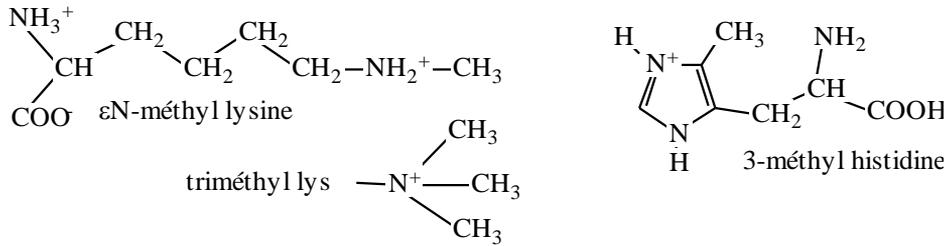


Cet acide aminé est présent à des teneurs élevées dans des protéines comme le collagène (Maillard - vieillissement - rides).

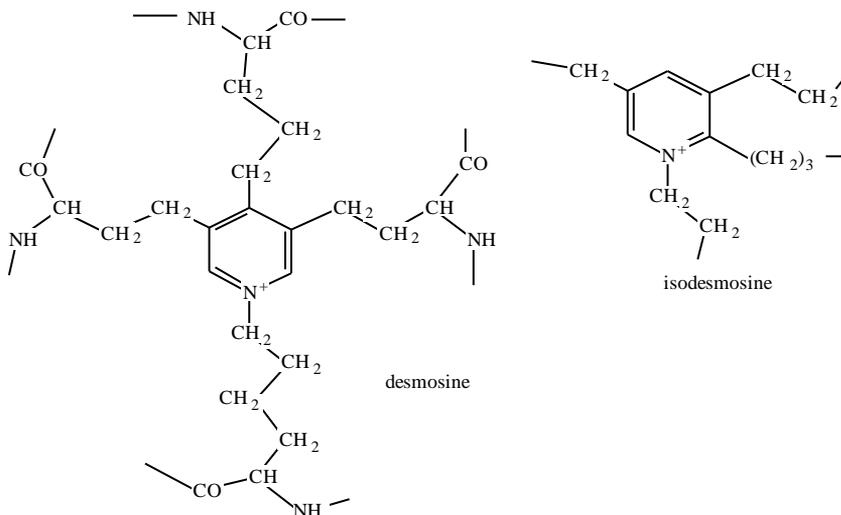
3 - L'acide diaminopimélique est présent dans des protéines microbiennes ou des antibiotiques.



4 - 3-méthyl-histidine, ε-N-méthyl-lysine et ε-N-triméthyl-lysine sont présentes dans les protéines musculaires (viande).



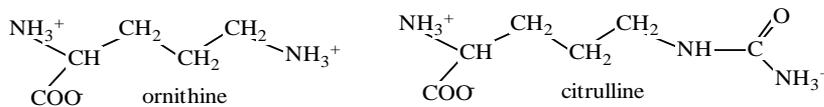
5 - La desmosine et l'isodesmosine de l'élastine résultant de la condensation de 4 résidus lysyls.



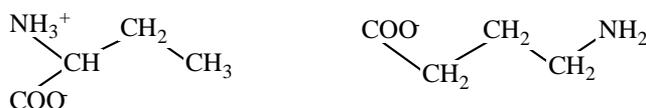
3.2. Acides aminés n'entrant pas dans la composition de protéines.

Plus de 150 acides aminés ont été identifiés dans le monde vivant soit sous forme libre, soit sous forme liée. Le plus souvent, ces acides aminés sous forme libre sont soit des intermédiaires métaboliques importants soit des médiateurs chimiques.

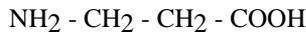
1 - Ornithine et citrulline (cycle de l'urée).



2 - Acides α et γ aminobutyriques.



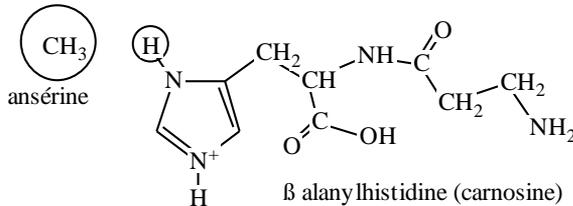
3 - β-alanine.



Il s'agit du produit de décarboxylation de l'acide aspartique chez les microorganismes. Chez les animaux supérieurs elle résulte de la dégradation de l'uracile. Elle participe à l'édification du pantothénate (pas chez l'homme) et de deux peptides abondants dans le tissu musculaire des animaux et de l'homme.

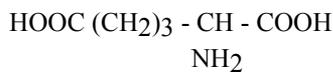
Il existe des dipeptides contenant de la β -aminoalanine importants parmi lesquels :

- la β -alanyl - L- histidine (carnosine)
- la β -alanyl - L - NH - méthylhistidine (ansérine)



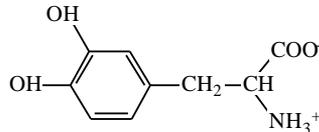
Présents dans l'urine, ils constituent de bons marqueurs de l'alimentation carnée.

4 - Acide α -aminoadipique.

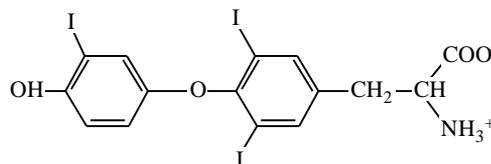


5 - Dihydroxyphénylalanine (DOPA).

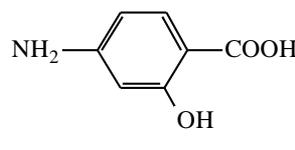
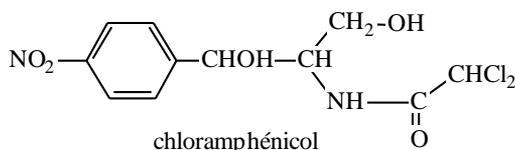
La DOPA est impliquée dans les réactions de mélanogénèse: synthèse de mélanine. Sa déficience au niveau du noyau gris entraîne la maladie de Parkinson.



6 - Thyroxine, hormone thyroïdienne.



7 - Chloramphénicol et acide para aminosalicylique (PAS).



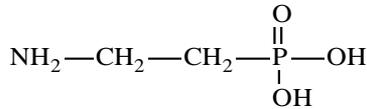
8 - Taurine. NH₂ - CH₂ - CH₂ - SO₃H

Elle est originale parce qu'il s'agit d'un β -amino acide d'une part et d'un acide sulfonique d'autre part. Elle est synthétisée à partir de la cystéine par l'intermédiaire de l'acide cystéique par décarboxylation. Puissant modulateur neuronal et constituant de certains acides biliaires (acide taurocholique), la taurine est partiellement éliminée dans l'urine.

Le cerveau, la rétine, le cœur, le foie, les plaquettes et les lymphocytes possèdent des systèmes de transport actif extra → intracellulaire.

9 - Ciliatine.

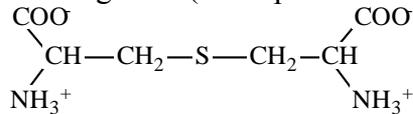
C'est la "première" bioméculé avec une liaison C - P



Isolée de ciliés (*Tetrahymena pyriformis*) cet aminophosphonate est surtout présent chez des mollusques et invertébrés marins. Présente dans les huîtres et moules (une moule en contient plusieurs mg) elle est mal absorbée au niveau intestinal. Le lait et la viande des animaux polygastriques en apportent beaucoup par suite de sa synthèse par des ciliés au niveau du rumen. Elle se retrouve au niveau de l'urine mais aussi stockée sous forme de phosphonolipides au niveau hépatique, rénal et cérébral.

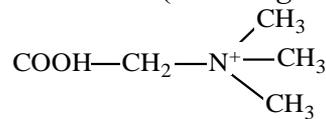
10 - La lanthionine.

Elle est présente dans la chair de la langouste (et les protéines de laine) et dans des bactériocines.



11 - La bêtaïne.

Elle est abondante dans la betterave (*Beta vulgaris*).



4. Stéréochimie.

Du fait de l'atome de C α sp³ asymétrique, tous les acides aminés (sauf la glycine) possèdent deux **stéréoisomères** (figure 2).

Dans les protéines les acides aminés appartiennent à la série L, ce qui ne préjuge pas de leur pouvoir rotatoire d ou l.

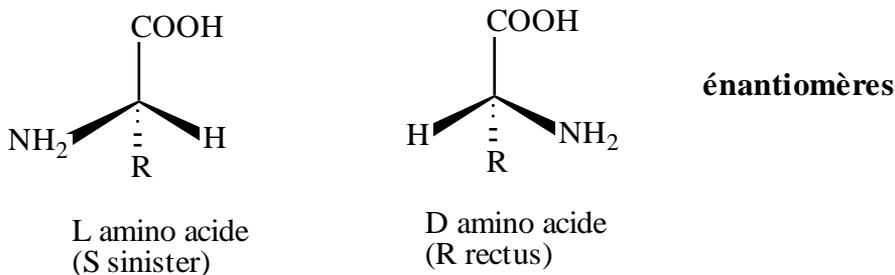


figure 2 . Les stéréoisomères d'acides aminés

Il existe quatre acides aminés constitutifs des protéines qui possèdent deux carbonés asymétriques. Dans ce cas le nombre de stéréoisomères est égal à 2ⁿ soit 4.

Les isomères sont alors qualifiés de **diastéréoisomères**.

C'est le cas de la thréonine, de l'isoleucine, de l'hydroxyproline et del'hydroxylysine. Ces dérivés sont qualifiés de dérivés **allo** (figure3).

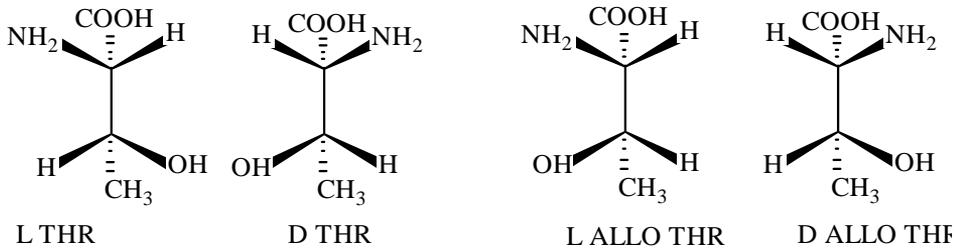


figure 3 . Les diastéréoisomères d'acides aminés

Les ponts disulfure ne sont ni linéaires ni dans un même plan : ils sont à l'origine d'isomères optiques qui imposent des contraintes stériques importantes aux protéines (figure 4).

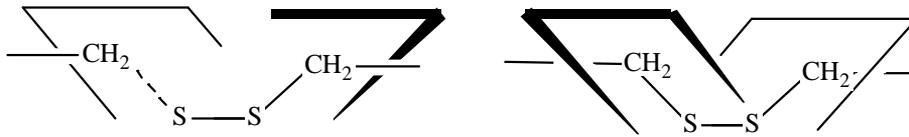


figure 4 . Isomères optiques de la cystine

5. Propriétés physiques.

5.1. Cristallisation.

Les acides aminés sont pour la plupart cristallisables (figure 5) et les cristaux se décomposent avant de fondre.

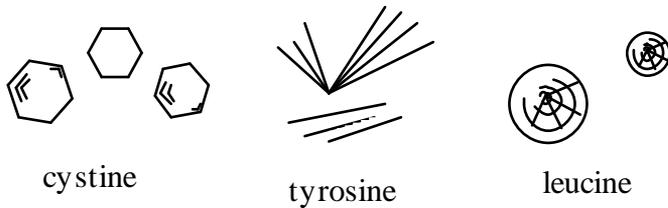


figure 5 . Quelques cristaux d'acides aminés

5.2. Solubilité.

Elle varie en fonction des acides aminés et est fonction de la polarité de la chaîne latérale.

GLY, ALA..... bien solubles

LEU, TYR, CYSTINE..... très peu solubles et cristallisent spontanément dans les hydrolysats digestifs ou bactériens et dans l'urine dès que leur concentration s'élève.

5.3. Pouvoir rotatoire.

En raison de leur carbone asymétrique, tous les acides aminés (sauf la glycine) dévient le plan de la lumière polarisée.

Le **pouvoir rotatoire** α varie avec la température, le pH, la nature du solvant, la force ionique, la concentration de l'acide aminé. Sa mesure est réalisée à partir de la raie D du sodium.

La forme dextrogyre dévie le plan de la lumière polarisée vers la droite et la forme lévogyre vers la gauche. Quand les deux formes sont présentes à égales concentrations dans le mélange qualifié de **racémique**, on n'observe pas d'activité optique.

Mesuré par polarimétrie α , exprimé en degré.cm.mole, est égal à :

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t \cdot l \cdot c$$

équation 1

l est la longueur du trajet lumineux à travers la solution (en dm), c est la concentration (en g/ml) et $[\alpha]_{\lambda}$ une constante appelée *rotation spécifique* qui dépend de la longueur d'onde et de la température t . La rotation molaire $[M]_{\lambda}$ est le produit de la rotation spécifique par le poids moléculaire.

Si la raie D du sodium est utilisée (589 et 589,6 nm) la rotation spécifique est notée $[\alpha]_D^t$

Avec $l = 1$ dm et $C = 1$ g/ml $[\alpha] = [\alpha]_D^{20}$ varie selon l'ionisation de l'acide aminé (figure 6).

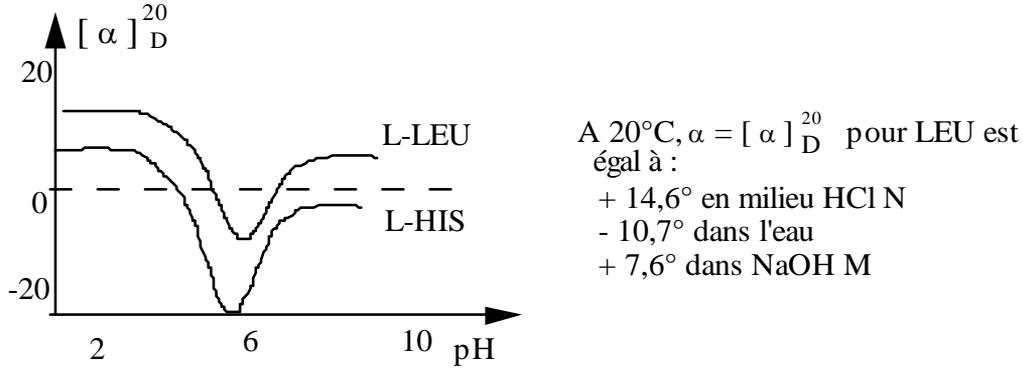


figure 6. Variation du pouvoir rotatoire d'acides aminés en fonction du pH

5.4. Propriétés spectrales.

5.4.1. Absorption UV.

Tous les acides aminés présentent une absorption importante aux longueurs d'onde inférieures à 230 nm. Les acides aminés aromatiques absorbent à 270-280 nm (figure 7, TRP 278-280 nm, TYR 275 nm à pH acide et 280 nm à pH > 10, PHE). Applications au dosage. Filtres solaires anti UV. La cystine absorbe vers 260 nm. La loi de Beer Lambert permet donc leur dosage en UV.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad \text{et} \quad A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad \text{équation 2}$$

ϵ_M coefficient d'absorption molaire (molaire⁻¹.cm⁻¹).

$\epsilon_M = 5600$ (TRP à 280 nm) ; $\epsilon_M = 1400$ (TYR à 275 nm) ; $\epsilon_M = 200$ (PHE à 257 nm) ; $\epsilon_M = 4000$ à 8000 (liaison peptidique à 190 nm) ; $\epsilon_M = 300$ (pont S-S à 250 nm).

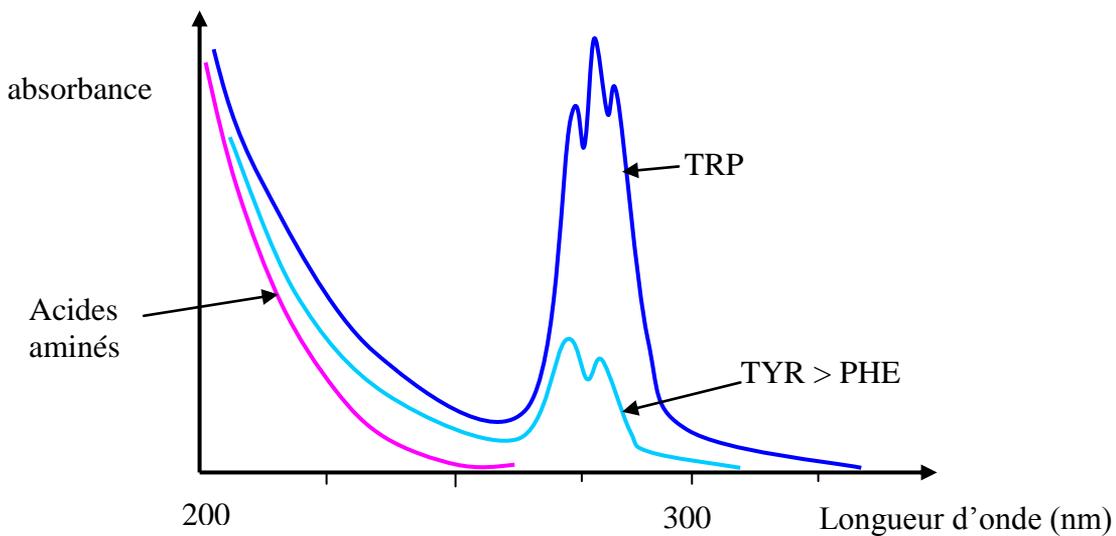


figure 7. Spectres UV des acides aminés

5.4.2. Fluorescence.

Parmi les acides aminés seul le tryptophane, grâce à la structure de son noyau indolique, est fluorescent. Ainsi soumis à un rayonnement à 278 nm il émet une fluorescence à 348 nm (figure 8).

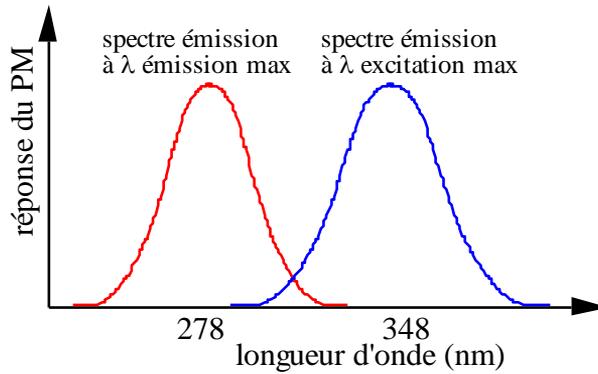


figure 8. Fluorescence du tryptophane (spectres d'émission et d'excitation)

Cette propriété permet de doser le tryptophane et de juger de l'influence de son environnement : des "shifts" se produisent en fonction des groupements fonctionnels au voisinage de cet acide aminé.

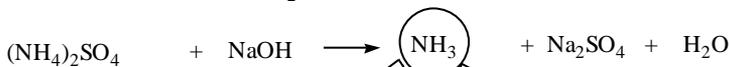
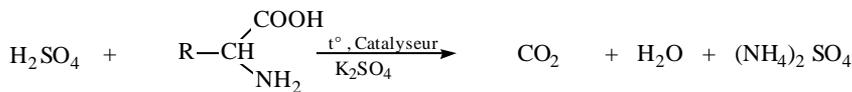
6. Dosage et Propriétés chimiques.

La plupart des méthodes de dosage des acides aminés reposent sur des propriétés des fonctions α aminés ou α carboxyliques qui seront décrites plus loin. Les propriétés chimiques des acides aminés sont nombreuses grâce à la présence au sein d'une même molécule de groupements carboxyle, aminé et de groupements variés sur la chaîne latérale (carboxyle, amine, alcool, amide, phénol, thiol etc). Nous ne décrirons que les plus importantes.

6.1. Dosage des acides aminés totaux.

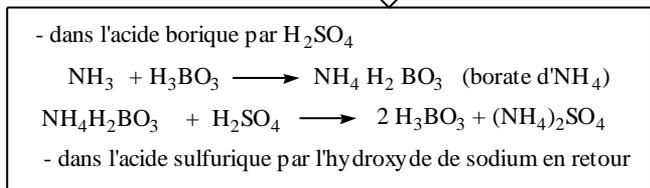
6.1.1. Méthode de Kjeldahl.

Après minéralisation en milieu sulfurique, en présence de peroxyde d'hydrogène, de sulfate de potassium et de catalyseurs (Se, Cu, Hg), l'azote ammoniacal est dosé par acidimétrie ou par colorimétrie. Cette méthode est automatisée et la minéralisation à des températures élevées raccourcit le temps d'analyse à quelques dizaines de minutes . Les réactions impliquées sont les suivantes :



dosé directement
Réactif de Nessler

entraîné par la
vapeur d'eau et dosé



6.2.2. Autres méthodes.

Elles seront décrites plus loin avec les propriétés des fonctions des acides aminés . Elles comprennent par exemple le dosage des groupes NH₂ (méthodes à la ninhydrine, au TNBS, etc.), l'alcalimétrie après et sans addition de formol (Méthode de Sørensen), la méthode de Van Slyke (HNO₂ N₂), la méthode de Folin à l'acide β naphthoquinone sulfonique etc.

6.2. Caractérisation et dosage d'acides aminés sans séparation.

6.2.1. Réactions spécifiques.

Certaines de ces méthodes permettent à la fois l'identification et le dosage sans séparation préalable des acides aminés ; elles portent souvent le nom du chimiste "découvreur":

1. Spectre UV : tryptophane, phénylalanine, tyrosine, cystine.
2. Réaction de **Millon** (nitrate mercurique et mercureux en milieu acide nitreux à chaud) donnant une coloration rouge cerise avec la **tyrosine**.
3. Réaction d'**Uderfriend et Cooper** (α nitroso-β-naphtol) donnant une coloration rouge avec la **tyrosine**.
4. Réaction de **Folin et Ciocalteu** (acide phosphomolybdotungstique) donnant une coloration rouge avec la **tyrosine**.
5. Réaction d'**Adamkiewicz - Hopkins** (acide glyoxylique ou formol du commerce + acide sulfurique concentré) : coloration violette avec le **tryptophane**.
6. Réaction d'**Ehrlich** (para-diméthylaminobenzaldéhyde en milieu acide chlorhydrique concentré): complexe rouge avec le **tryptophane**.
7. Réaction de **Sakaguchi** (α naphtol + hypobromite ou hypochlorite de sodium): coloration rouge orange avec l'**arginine**.
8. Réaction de **Pauly** (acide diazosulfanilique en milieu alcalin): coloration rouge avec l'**histidine**.
9. Réaction **xanthoprotéique** (acide nitrique concentré au point d'ébullition): les réactions de nitration des acides aminés aromatiques (TYR, PHE, TRP) donnent des dérivés jaunes.
10. Le nitroprussiate de sodium dans l'ammoniaque diluée réagit avec la **cystéine** en donnant des dérivés rouges.
12. La réaction de **Sullivan** (1,2 naphthoquinone-4-sulfonate de sodium et l'hydrosulfite de sodium) donne une coloration rouge avec la **cystéine**.
12. Décarboxylation enzymatiques spécifiques (LDC) et dosage du CO₂.
13. D-amino acide oxydases.

6.2.2. Dosage microbiologique.

Il repose sur la mesure de croissance (absorbance à 540 nm) de souches pour lesquelles le L amino acide à doser est un facteur de croissance (par exemple *Leuconostoc mesenteroides* P60 pour la L-lysine).

Le dosage des acides aminés après séparation est le plus pratiqué et permet d’accéder à des résultats particulièrement utiles. Les méthodes seront décrites plus loin. La séparation est réalisée le plus souvent par chromatographie en colonne (soit d’échange ionique soit en phase inverse) et à un degré moindre par chromatographie sur couche mince, sur papier, par chromatographie en phase vapeur ou par électrophorèse (systèmes capillaires).

6.3. Ionisation, propriétés acido-basiques.

Il s’agit d’une propriété essentielle qui conditionne le comportement des acides aminés en solution puis, par généralisation, celui des protéines surtout en fonction du pH du milieu.

6.3.1. Rappels & Définitions.

- le **point isoélectrique** est le pH pour lequel la charge de l’ion dipolaire est nulle.

- le **point isoionique** est le pH pour lequel le nombre de protons libérés par les groupements acides est égal au nombre de protons captés par les groupements basiques. Ces deux points sont confondus quand l’ion dipolaire n’échange que des protons.

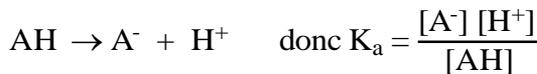
En se plaçant dans des systèmes très dilués nous négligerons les interactions entre les particules en solution.



pour l’eau à 25°C $[H^+] [OH^-] = 10^{-14}$

$$pH = - \log [H^+]$$

Un acide est un composé capable de céder un proton et une base un composé capable de capter un proton.



AH est un acide et A⁻ la base conjuguée : l’ensemble est un couple acide base dans lequel plus l’acide est fort (équilibre déplacé vers la droite) plus la base conjuguée est faible (tableau 3).

tableau 3. Valeurs des Ka et pKa de quelques acides

| Acide | ↔ base | + H ⁺ | Ka | pKa |
|---|--|------------------|-----------------------|--------|
| HCl | Cl ⁻ | “ | > 1 | - |
| H ₂ SO ₄ | HSO ₄ ⁻ | “ | <1 | |
| HSO ₄ | SO ₄ ²⁻ | “ | 3.10 ⁻² | 1,6 |
| H ₃ PO ₄ | H ₂ PO ₄ ⁻ | “ | 10 ⁻² | 2 |
| H ₂ PO ₄ ⁻ | HPO ₄ ²⁻ | “ | 2.10 ⁻⁷ | 6.8 |
| HPO ₄ | PO ₄ ³⁻ | “ | 3,6.10 ⁻¹³ | 12.4 |
| CH ₃ COOH | CH ₃ COO ⁻ | “ | 1,9.10 ⁻⁵ | 4,8 |
| H ₂ CO ₃ | HCO ₃ ⁻ | “ | 3.10 ⁻⁷ | 6,7 |
| HCO ₃ ⁻ | CO ₃ ²⁻ | “ | 6.10 ⁻¹¹ | 10,2 |
| NH ₄ ⁺ | NH ₃ | “ | 10 ⁻¹⁰ | 10 |
| Ø OH | Ø O ⁻ | “ | 10 ^{-7 à 10} | 7 à 10 |
| CH ₃ CH ₂ OH | CH ₃ CH ₂ O ⁻ | “ | 10 ⁻¹⁸ | 18 |

Si $[A^-] = [AH]$ (A demi salification)

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} = [H^+]$$

Le pK_a correspond au pH de demi salification de l'acide faible par une base forte.

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad \text{si on prend} \quad \log K_a = \log [H^+] + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{et} \quad -\log [H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

on obtient

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

équation 3

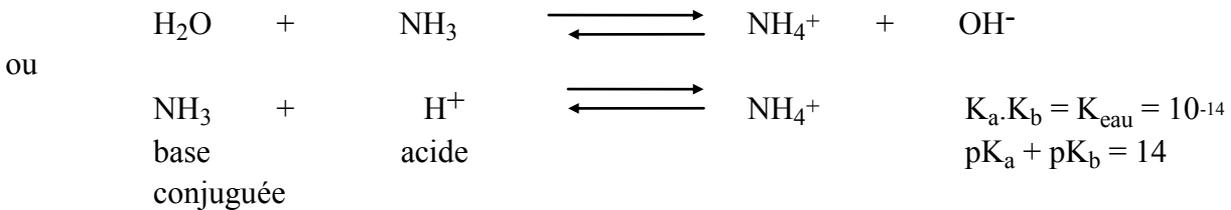
Cette relation permet le calcul approché du pH d'un mélange d'acide faible (AH) et de sa base conjuguée (A⁻) et inversement il est possible de prévoir l'état de dissociation d'un acide faible connaissant le pH de la solution.

Exemples:

-pour $pH = pK_a$ \longrightarrow 50 % AH
 -pour $pH = pK_a - 2$

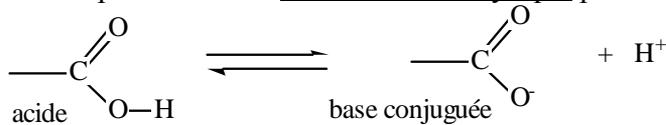
$$\log \frac{[A^-]}{[AH]} = -2 \quad \text{soit} \quad \frac{[A^-]}{[AH]} = \frac{1}{100} \quad \text{soit} \quad [A^-] = 1 \%$$

Pour une constante de dissociation basique K_b

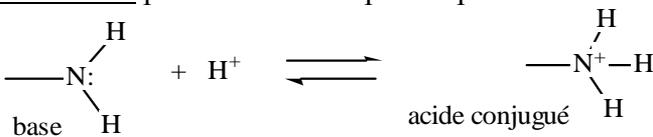


6.3.2. Les deux ionisations des acides aminés.

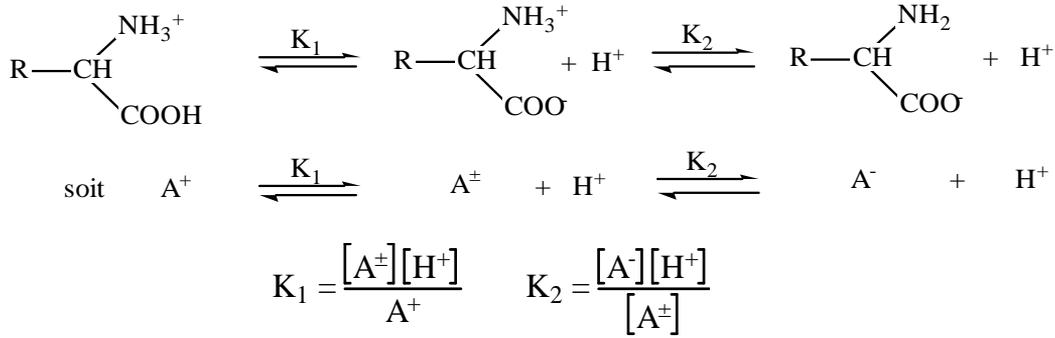
Les acides aminés possèdent une fonction carboxylique protonisable



et une fonction amine pouvant fixer un proton par liaison coordinative



En **solution** un acide aminé peut se présenter sous trois formes (la forme neutre est le **zwitterion**):



ce qui conduit à :

$$K_1 \cdot K_2 = [\text{H}^+]^2 \cdot \frac{[A^-]}{[A^+]}$$

au pHi on a $[A^-] = [A^+]$ d'où $K_1 \cdot K_2 = [\text{H}^+]^2$ soit encore:

$$\text{pHi} = \frac{1}{2} (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

équation 4

Si on représente le pourcentage de dissociation en fonction du pH on a (figure 9):

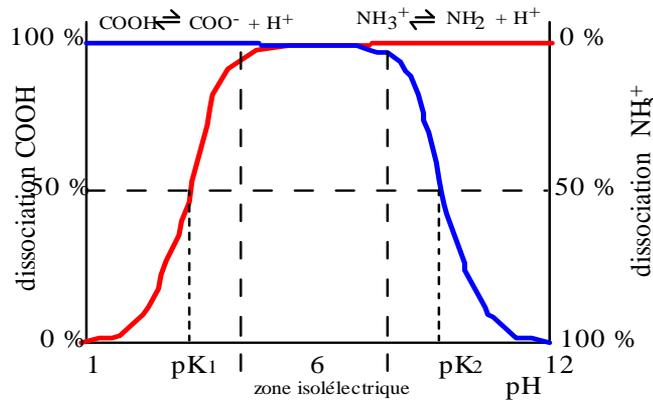


figure 9. Pourcentage d'ionisation des fonctions acides aminés en fonction du pH

La courbe de titrage de la glycine est la suivante (figure 10):

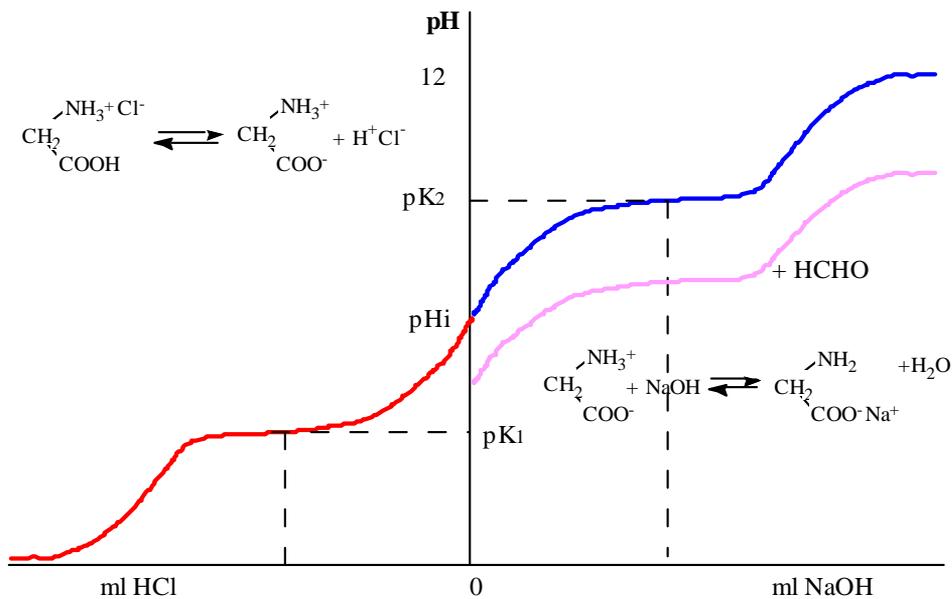


figure 9. Courbe de titrage de la glycine

Tous les acides aminés qui comme la glycine, ne possèdent qu'un COOH et un NH₂ ont leur p*H*_i situé entre 5 et 6,5 et ils sont qualifiés de neutres.

Avec l'acide glutamique il y a 3 dissociations mais pas de zone isoélectrique car p*K*₁ et p*K*₂ sont très voisins (figure 11)

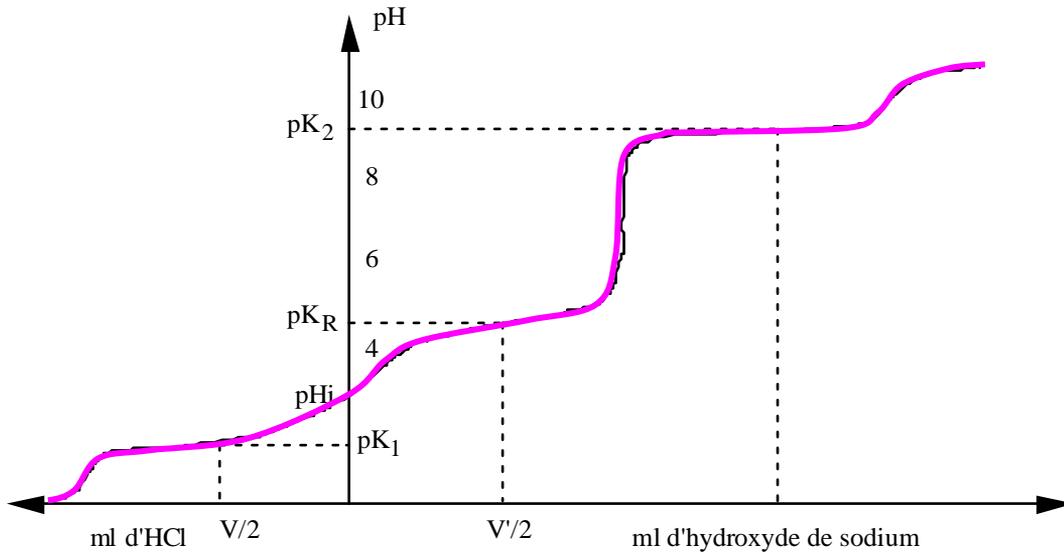
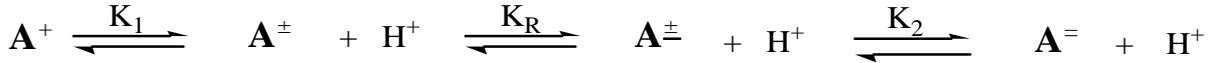


figure 11. Courbe de titrage de l'acide glutamique

$$K_1 = \frac{[A^\pm][H^+]}{[A^+]} \quad K_R = \frac{[A^\pm][H^+]}{[A^\pm]} \quad K_2 = \frac{[A^-][H^+]}{[A^\pm]}$$

au p*H*_i on a autant de charge + que de charges - soit :

$$[A^+] = [A^\pm] + [A^{2-}] / 2 \text{ (puisque une mole amène 2 charges) ; (A}^\pm \text{ a une charge nulle)}$$

Pour que A⁺ existe , il faut que le p*H* soit bas ce qui conduit à p*H* << p*K*₂ soit H⁺ >> K₂

$$\frac{[A^\pm][H^+]}{[K_1]} = \frac{[K_R][A^\pm]}{[H^+]} + \frac{K_2[A^\pm]}{2[H^+]^2} \quad \text{équation 5}$$

A partir de A[±] de l'équation de K_R on tire :

$$[A^\pm] = \frac{K_R[A^\pm]}{[H^+]}$$

On remplace dans le 3ème terme de (équation 5) et on a

$$\frac{[A^\pm][H^+]}{[K_1]} = \frac{[K_R][A^\pm]}{[H^+]} + \frac{K_2 \cdot K_R \cdot [A^\pm]}{2[H^+]^2} \quad \text{soit}$$

$$\frac{[H^+]}{[K_1]} = \frac{[K_R]}{[H^+]} + \frac{K_2 \cdot K_R}{2[H^+]^2}$$

K₂ est égal à 10^{-9,7} et on sait qu'il faut H⁺ >> K₂ ; le terme en / [H⁺]² est négligeable et on a :

$$\frac{[H^+]^+}{K_1} = \frac{K_R}{[H^+]^+} \quad [H^+]^2 = K_R \cdot K_1$$

$$pH_i = \frac{1}{2} (pK_R + pK_1)$$

équation 6

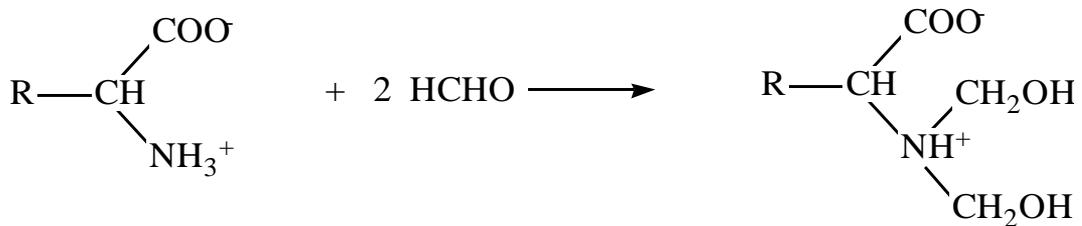
Importance de l'ionisation.

Les acides aminés sont des **ampholytes** qui en fonction du pH environnant se comporteront soit comme des acides faibles (donneurs de protons) soit comme des bases faibles (accepteurs de protons). Dans une solution leur charge sera donc directement liée au pH.

Les acides aminés sont **solubles dans l'eau** et peu solubles dans les solvants organiques.

Pour **doser un acide aminé** il est donc possible de doser soit le carboxyle soit l'amine. L'examen de la courbe de titrage montre qu'en milieu aqueux les points équivalents aux pH extrêmes et les zones de virage sont peu nets.

Le **formol** en excès (méthanal) se fixe sur la fonction amine.



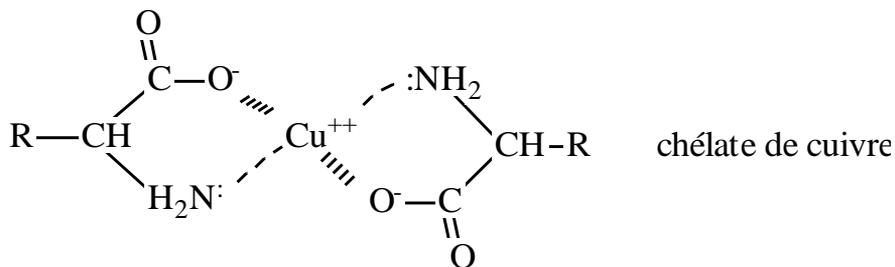
L'amine tertiaire obtenue a un pK_a égal à environ 6,2 ce qui permet le dosage par la soude (formol titration ou méthode de dosage de **Sørensen**). Dans ces conditions le pHi du N-dihydroxyméthyl glycine formé est alors égal à 4,3 et le point équivalent basique à 8 ce qui est détectable facilement en pH-métrie. Certains auteurs attribuent à l'action du formol la formation d'une imine.

En **milieu très acide ou alcalin**, les acides aminés sont **salifiés**.

Les sels alcalins (ex glutamate de sodium) sont en général bien solubles et les mélanges acides aminés-hydroxyde de sodium sont de bons mélanges tampons.

Les sels acides (chlorhydrate de lysine) sont moins solubles et facilement cristallisables (pureté excellente).

Avec les cations bivalents, les acides aminés forment à pH alcalin des **chélates** stables, souvent colorés et peu solubles dans l'eau.



Les **réactions chimiques** caractéristiques des acides aminés sont celles de leurs groupements fonctionnels (α carboxyle, α aminé et chaîne latérale); ces réactions sont utiles dans la biochimie des protéines pour :

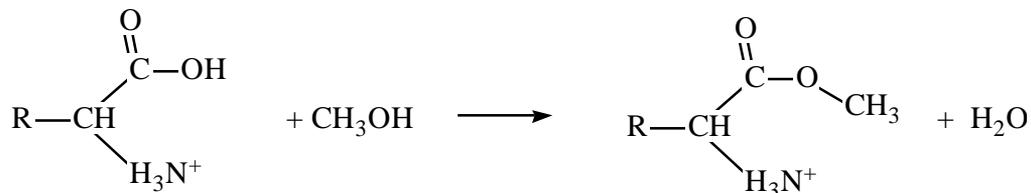
- doser individuellement les acides aminés présents dans des hydrolysats de protéines
- déterminer la séquence
- identifier dans des protéines natives les acides aminés impliqués dans l'expression d'une fonction biologique
- modifier de façon contrôlée des aminoacides
- synthétiser des peptides .

6.4. Propriétés des groupements carboxyles.

6.4.1. Formation de sels en présence de bases.

6.4.2. La fonction acide est estérifiable par des alcools.

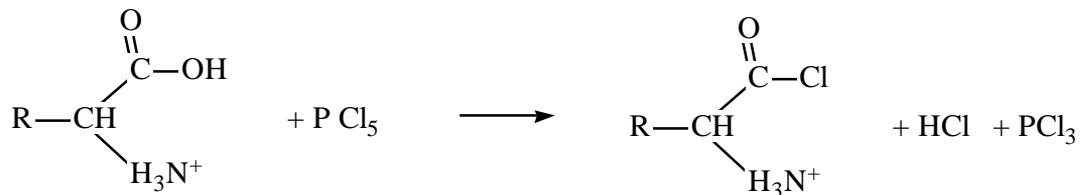
Ainsi les esters méthyliques (obtenus en milieu acide) sont volatils et permettent des dosages par chromatographie en phase vapeur. Les dérivés triméthylsililés ou trifluoroacétylés sont estérifiés par du 1-butanol en milieu acide chlorhydrique.



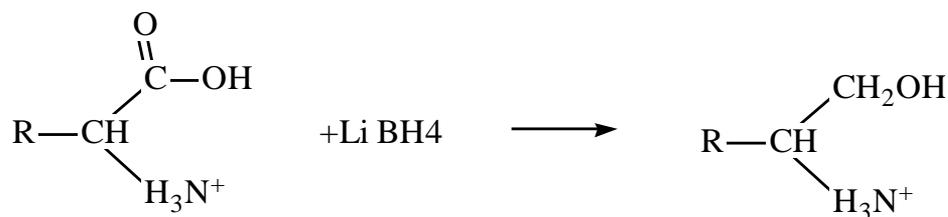
Par ailleurs ces esters sont synthétisés pour protéger les carboxyles au cours de la synthèse chimique des peptides.

6.4.3. En présence de pentachlorure de phosphore ou de chlorure de thionyle (SOCl₂) des chlorures d'acide sont obtenus.

(Il est d'abord nécessaire de protéger le groupement aminé par acétylation).



6.4.4. La fonction COOH peut être réduite en alcool en présence de borohydrure de sodium ou de lithium.



Cette réaction permet l'identification de l'acide aminé C terminal des protéines.

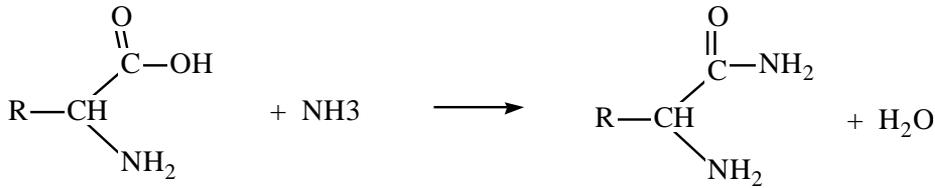
6.4.5. Décarboxylation.

Cette réaction est obtenue par chauffage dans un solvant inerte ou par voie enzymatique stéréospécifique (enzymes tissulaires et bactériennes). La réaction enzymatique est utilisée pour doser de façon sélective un acide aminé dans un mélange (mesure gazométrique du CO₂ dégagé).

In vivo, ces réactions sont importantes, les amines formées étant soit physiologiquement actives soit toxiques (histamine, tryptamine, cadavérine, etc).

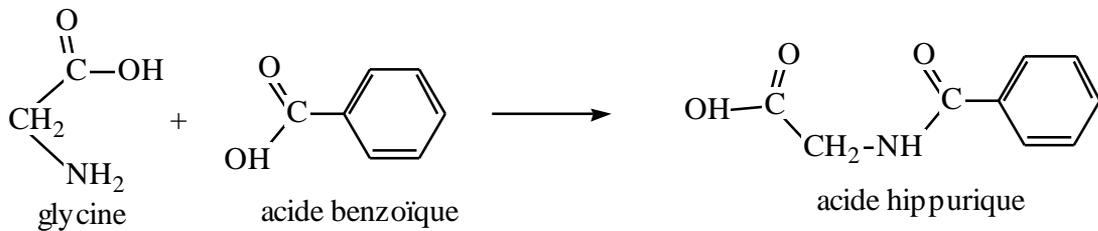
6.4.6. Amidation

Elle peut être réalisée en présence d’ammoniac.

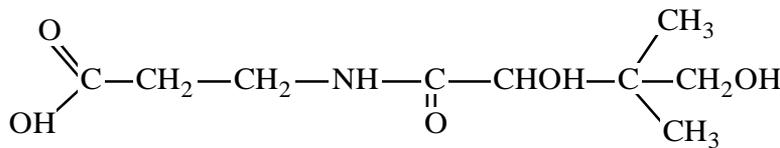


L’**asparagine** et la **glutamine** sont des amides des fonctions β et γ carboxyliques de ASP et GLU respectivement qui sont naturellement présentes dans la plupart des protéines. Leur rôle dans l’établissement de nombreuses liaisons hydrogène coopératives contribue de façon déterminante à la structure de nombreux aliments pâteux ou gélifiés.

L’**acide hippurique** qui est la forme d’élimination de l’acide benzoïque est un amide substitué.



L’**acide pantothénique**, facteur vitaminique du groupe B, est l’amide de la β alanine et de l’acide 1,3-dihydroxy-2-diméthylbutyrique.

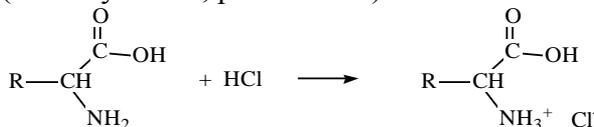


La liaison amide substituée établie entre deux acides aminés, ou liaison peptidique sera décrite plus loin .

6.5. Propriétés de la fonction amine.

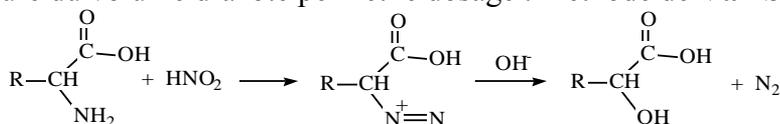
6.5.1. La fonction amine donne avec les acides des sels.

(Chlorhydrates , picrates etc.)

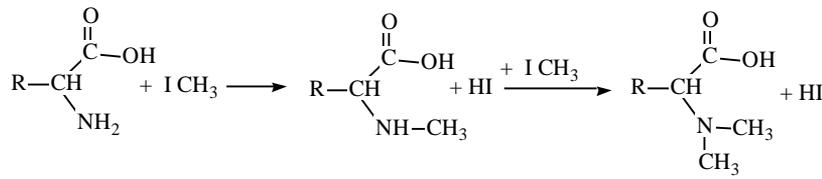


6.5.2. Diazotation par l’acide nitreux .

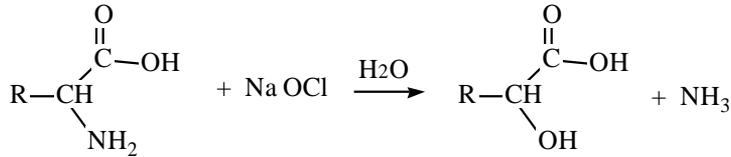
La mesure du volume d’azote permet le dosage : méthode de **Van Slyke**.



6.5.3. Méthylation par l'iodure de méthyle.



6.5.4. Désamination en milieu hypochlorite.

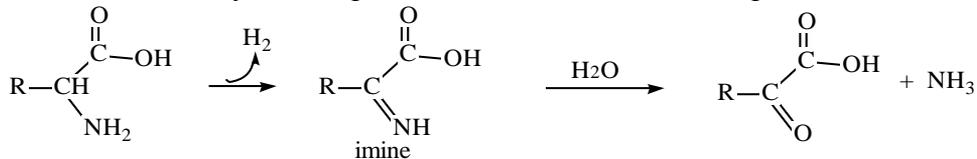


Cette réaction permet le dosage des acides aminés (**méthode de Polonowski**).

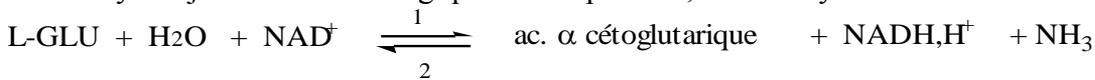
6.5.5. Désamination par voie enzymatique.

Les deux types principaux de désamination sont les suivants :

- désamination oxydative qui conduit à un acide α cétonique selon la réaction suivante :



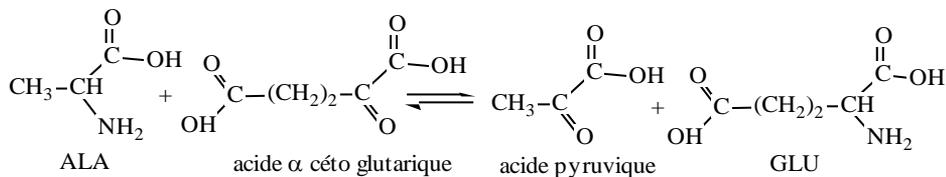
Les enzymes sont stéréospécifiques (aminoacide oxydases). Par exemple la L-glutamate décarboxylase joue un rôle biologique très important ; elle catalyse la réaction suivante:



Dans le sens 1 l'enzyme catalyse la désamination de l'acide glutamique. Dans le sens 2 c'est l'amination réductrice de l'α céto glutarate qui est catalysée.

Les aminoacide-oxydases sont des flavoprotéines auto-oxydables. La L-aminoacide oxydase est une enzyme à FMN, tandis que la D-aminoacide oxydase est une enzyme à FAD. Chez certains organismes vivants l'enzyme est parfois à NADP⁺.

- La transamination est un transfert direct de la fonction amine à un acide α cétonique. Les enzymes impliquées sont des transaminases ou amino-transférases.



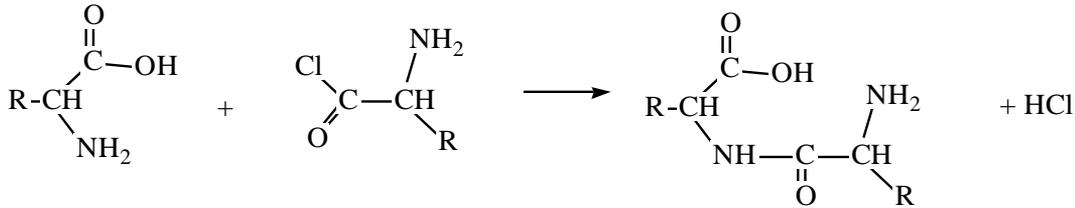
Ces réactions sont impliquées dans les synthèses et les dégradations des acides aminés.

6.5.6. Réactions de condensation.

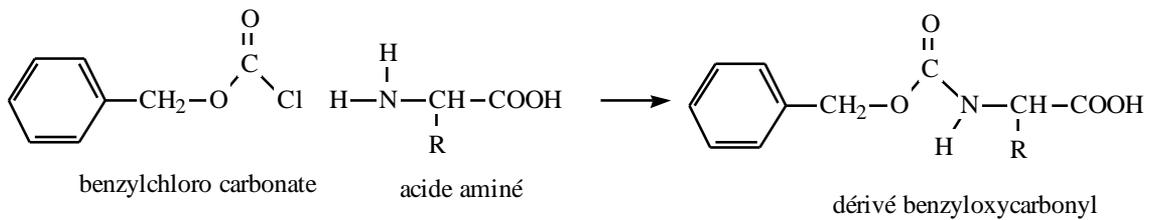
La fonction amine peut réagir avec de nombreux composés pour former des dérivés utilisés dans l'analyse qualitative ou quantitative.

1) liaison avec un chlorure d'acide ou un anhydride d'acide.

Ainsi Fischer a réalisé les premières synthèses peptidiques à partir de chlorures d'acides.



Ce procédé est utilisé pour protéger la fonction aminée au cours de la synthèse chimique de peptides. Ainsi le benzylchlorocarbonate fournit des dérivés benzyloxycarbonyl des acides aminés souvent appelés dérivés carbobenzoxy.

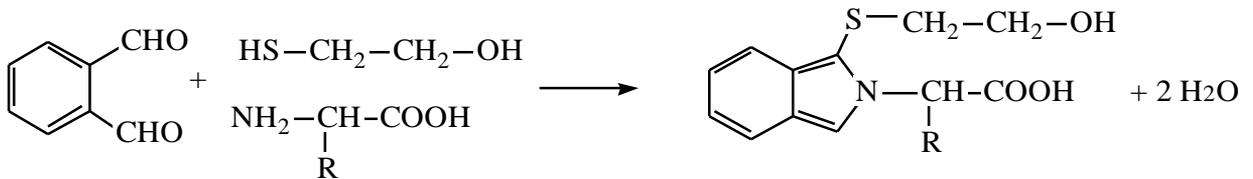


Quand l'acylation est conduite dans des conditions douces, la configuration de l'atome α est conservée.

Il existe aujourd'hui de nombreuses réactions chimiques de modification/détection des acides aminés. La plupart de ces réactions ont les particularités suivantes: elles sont rapides, stœchiométriques, et donnent des dérivés dont certains sont très stables et de détection facile. La sensibilité de détection a été multipliée par un facteur 1000 en comparaison avec la détection "ninhydrine" par l'utilisation de produits donnant avec les acides aminés des dérivés fluorescents.

2) Réaction avec l' O-phtaldialdéhyde (OPA).

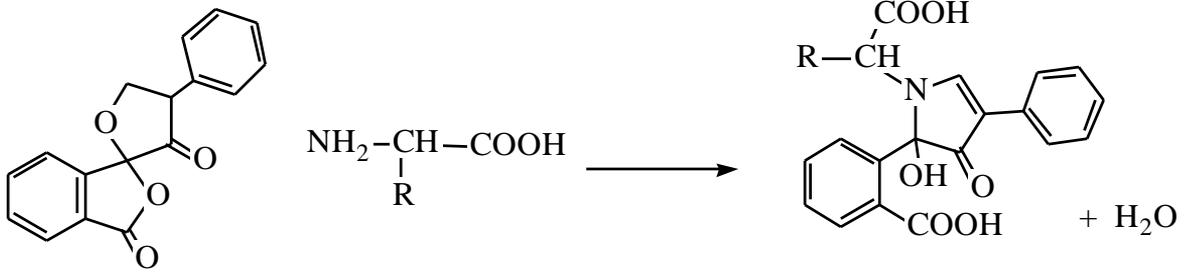
L'OPA réagit à froid, en présence de β mercaptoéthanol et en milieu alcalin avec les acides aminés pour donner des dérivés isoindoliques fluorescents (λ_{ex} = 340 nm, λ_{ém} = 455 nm).



La proline et l'hydroxyproline ne donnant pas directement la réaction, il est nécessaire, pour pouvoir les détecter, de traiter les hydrolysats par de l'hypochlorite de sodium. La stabilité de certains dérivés isoindoliques formés n'est pas très grande ce qui implique donc une analyse extemporanée.

3) Réaction avec la fluorescamine (4-phénylspiro (furan-2(3H),1'-phtalal)-3,3,4 dione).

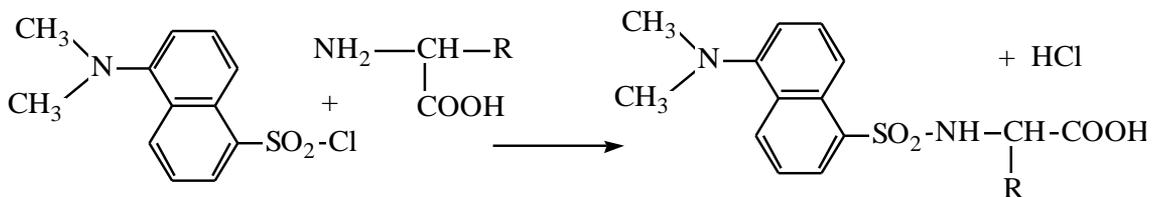
La réaction se fait à température ambiante et est complète entre pH 7 et 9 en environ 1 seconde (λ_{ex} = 390 nm et λ_{ém} = 475 nm).



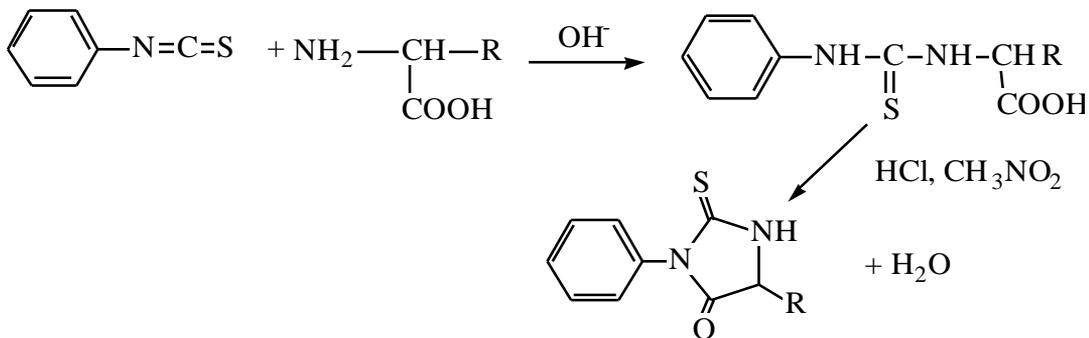
Il s'agit d'une réaction très sensible (seuil de détection voisin de la pmole) qui permet des dosages de quantités d'acides aminés de l'ordre de 0,1 nmole. La fluorescamine ne réagit pas non plus avec les amines secondaires comme la proline ou ses dérivés. Pour réaliser le dosage de ces acides aminés il faut donc les transformer en amines primaires par traitement à l'hypochlorite ou à la N-chloro-succinimide.

4) Réaction avec le chlorure de dansyle.

Ce réactif permet d'obtenir des dérivés sulfamides très fluorescents.

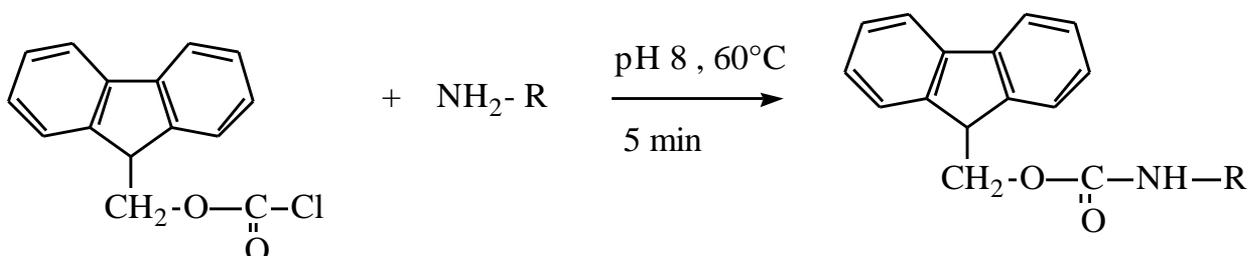


5) Réaction au phényl-isothiocyanate (PITC).

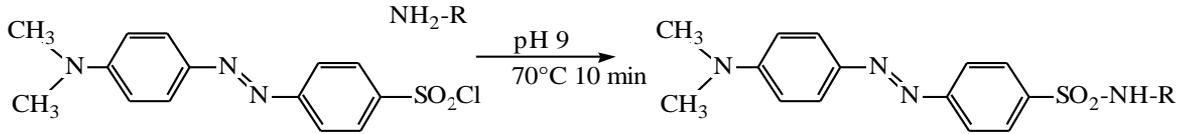


Le phényl-isothiocyanate réagit avec les acides aminés pour former des dérivés facilement détectables dans l'UV. Les phényl-thiocarbamyls (PTC) sont transformables en dérivés phényl-thiohydantoïne (PTH) en milieu chlorhydrique en présence de méthyl-nitrosamine. Cette réaction est utilisée pour déterminer la séquence des protéines (**réaction d'Edman**).

6) Réaction avec le 9,fluorénylméthyl-chloroformate (Fmoc-HCl).

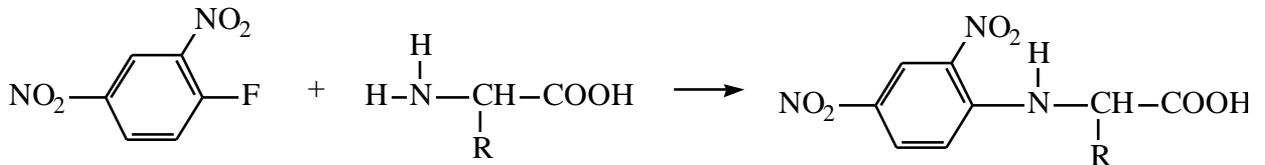


7) Réaction avec le chlorure de dabsyl.

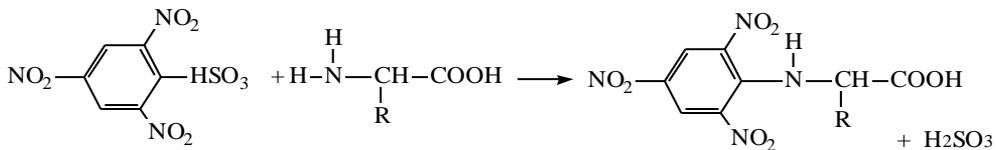


8) Réaction avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (réaction de Sanger).

Ce réactif donne une arylation quantitative avec les amines libres. Les dérivés dinitrophénylés sont colorés en jaune et sont stables à l'hydrolyse acide : ils permettent le dosage de l'acide aminé N terminal mais aussi, dans des conditions adaptées des amines des chaînes latérales (LYS).



9) Réaction avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS).



Cette réaction permet le dosage des acides aminés par leur fonction amine, en particulier au cours du contrôle de réactions d'hydrolyse de protéines.

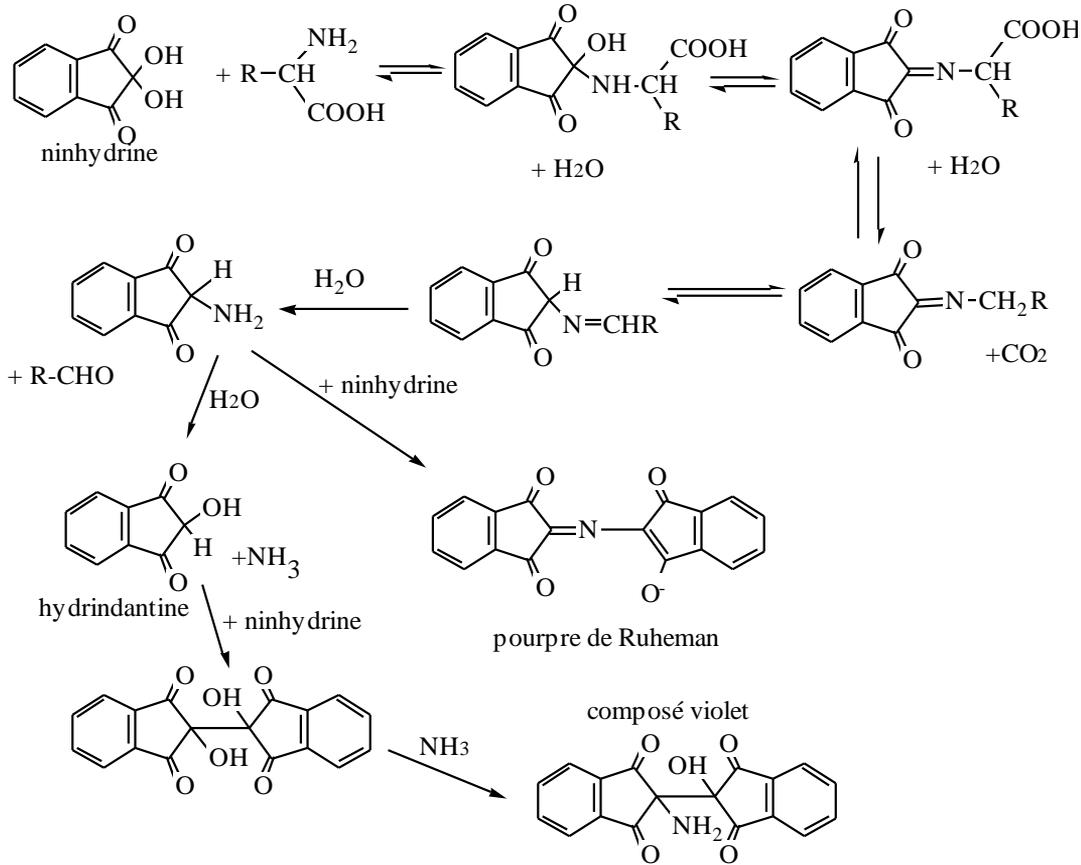
Il existe donc actuellement beaucoup de méthodes de détection fluorimétrique des acides aminés (FMOC, etc). Il s'agit toujours de méthodes très performantes dont le choix est fonction de paramètres comme la stabilité des dérivés formés, la simplicité de mise en oeuvre, le coût etc. Il faut signaler que tous les dérivés décrits (OPA, fluorescamine, dansyl) absorbent dans l'UV, ce qui permet leur détection et leur dosage avec une sensibilité moindre que par la méthode fluorimétrique.

6.6. Réactions liées à la présence simultanée des fonctions aminés et carboxyliques.

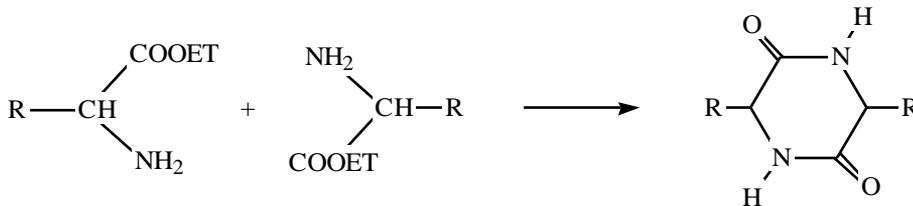
En présence d'oxydants comme le peroxyde d'hydrogène ou l'hypochlorite, les acides aminés sont désaminés et décarboxylés avec formation d'aldéhyde.

La **ninhydrine** ou hydrate de tricétohydrindène permet cette réaction. Il s'agit néanmoins d'un ensemble de réactions complexes. Les composés colorés qui apparaissent à pH 5,5 après traitement thermique sont variables en fonction de l'acide aminé ; ainsi la proline et son dérivé hydroxylé donnent des dérivés jaunes absorbant à 440 nm, tandis que les autres acides aminés donnent des mélanges de chromogènes absorbant surtout à 570 nm.

Cette particularité est mise à profit dans la détection chromatographique des acides aminés au cours de leur séparation / analyse par chromatographie et réaction à la ninhydrine.



Enfin il faut signaler que par chauffage, les esters d'acides aminés donnent des dérivés cycliques de type **dicétopipérazine**:



6.7. Propriétés des chaînes latérales.

De par leur grande diversité fonctionnelle, les groupements des chaînes latérales sont à même de donner de nombreuses réactions.

6.7.1. Les fonctions hydroxyles de SER et THR peuvent être estérifiées.

Les esters phosphoriques de ces acides aminés jouent un rôle très important en technologie laitière, les caséines étant des phosphoprotéines. Ces acides aminés sont oxydés par le périodate de sodium (Na⁺IO₄⁻) en milieu alcalin en aldéhyde, acide glyoxylique, ammoniac et IO₃⁻.

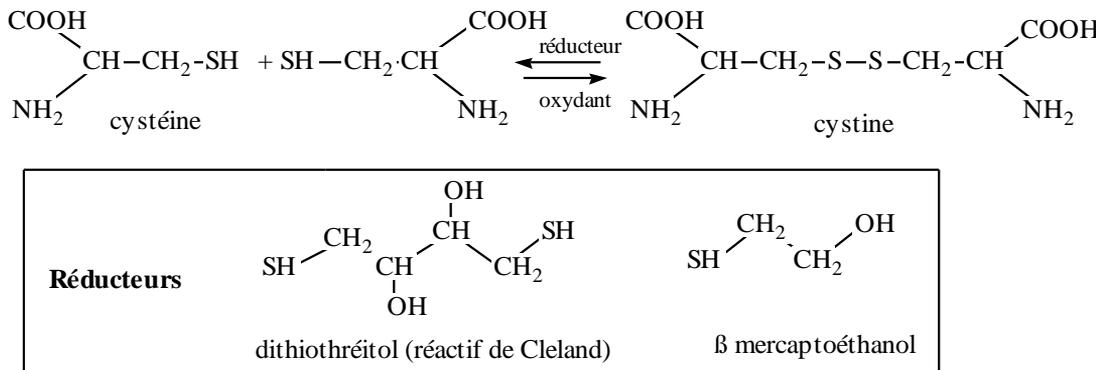
6.7.2. Les chaînes latérales à noyau aromatique.

Elles rendent possible des réactions de substitution. Ainsi les dérivés iodés de la tyrosine sont des constituants des hormones thyroïdiennes et les dérivés nitrés aromatiques sont colorés en jaune (réaction xanthoprotéique).

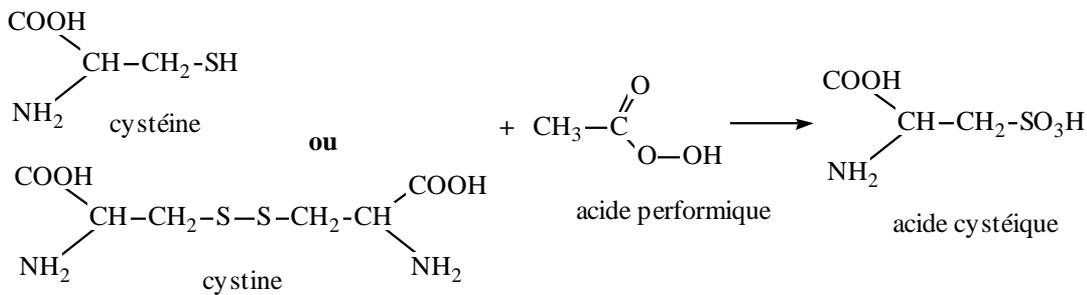
6.7.3. Les fonctions thiols.

Les groupements thiols de la **cystéine** jouent un rôle fondamental dans la structure et donc l'activité biologique des protéines. Ce groupement peut s'oxyder en disulfure en présence d'oxygène atmosphérique, de sels de fer ou d'autres agents d'oxydation douce.

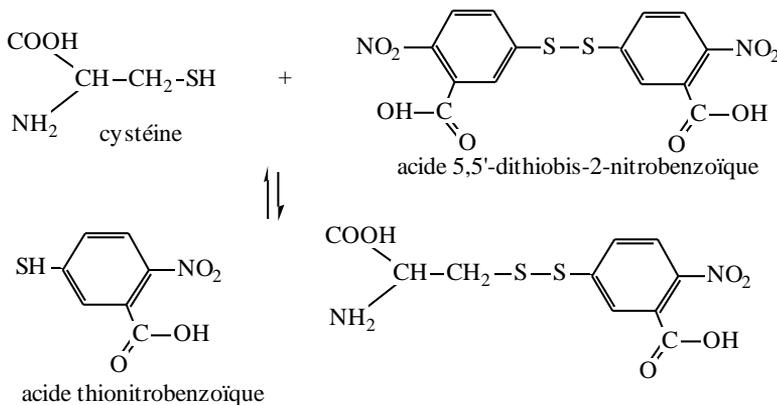
La **cystine** ainsi obtenue résulte donc d'une liaison covalente entre deux molécules de cystéine. Le résidu cystine joue un rôle de **pont disulfure** entre chaînes polypeptidiques intra ou intermoléculaires; ce pont peut être coupé par des réducteurs comme le β mercaptoéthanol avec libération de deux fonctions thiols.



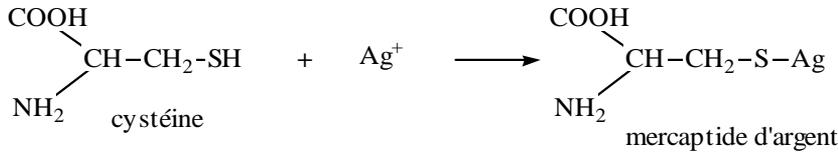
La cystéine ou la cystine sont oxydables en **acide cystéique** stable sous l'action d'un oxydant fort comme l'acide performique.



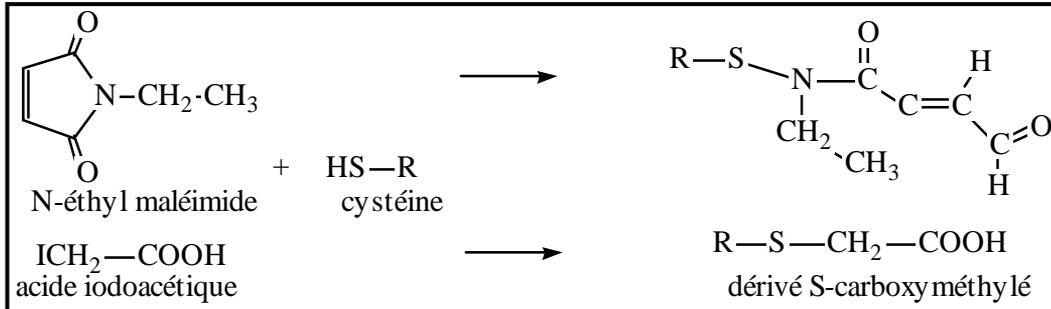
La fonction thiol peut être mesurée par réaction avec l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (**réactif d'Ellman**). L'acide thio-trinitrobenzoïque jaune est dosable à pH 8 à 412 nm.



La fixation de métaux lourds comme Mg²⁺, Ag⁺, Hg⁺ avec formation de mercaptides est une réaction caractéristique de la fonction thiol.



Le N-éthylmaléimide ou l'acide iodoacétique sont des réactifs bloquants de la fonction thiol.



6.7.4. Hydrophobicité et hydrophilicité des chaînes latérales des acides aminés.

Une substance hydrophobe est une substance qui ne donne pas d'interaction avec l'eau et inversement une substance hydrophile est un composé qui donne des interactions avec l'eau (phobie : peur engendrant une fuite).

1) l'hydrophobicité et goût.

Si un composé hydrophobe (sans charge, sans polarité partielle) est mis dans l'eau, les molécules d'eau en s'attirant (liaisons "hydrogène") vont "chasser" ce composé, toutes les molécules chassées constituant alors une phase séparée de l'eau. Le phénomène est qualifié d'hydrophobicité (fuite de l'eau).

Pour évaluer cette propriété "négative" on utilise généralement des solvants dont la polarité est inférieure à celle de l'eau. La variation d'énergie libre de transfert d'une mole de l'acide aminé de la solution aqueuse à une solution éthanolique est exprimée par :

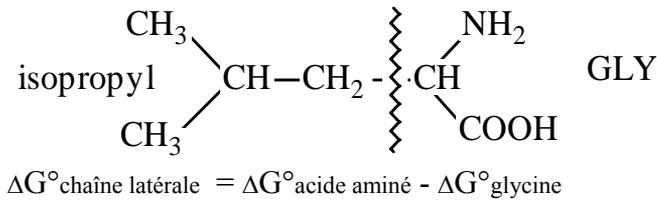
$$\Delta G^\circ = RT \ln \frac{S_{\text{éthanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

où $S_{\text{éthanol}}$ et S_{eau} sont les solubilités de l'acide aminé dans l'éthanol et dans l'eau exprimées en mole.L⁻¹. R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue, les coefficients d'activité sont négligés.

Si la molécule possède une structure complexe, ΔG° est une fonction additive de ses différentes parties.

Ainsi, la leucine peut être subdivisée en deux parties en ce qui concerne son énergie libre de transfert de l'eau vers l'éthanol : une partie avec un "isopropyl" et une autre partie avec un groupement amino-carboxylique, groupement qui est, à un hydrogène près, analogue à la glycine.

Le ΔG° pour la glycine est déterminé par l'équation, le ΔG° pour la leucine également. La différence entre les deux valeurs correspond à l'énergie libre de transfert de la chaîne latérale de leucine.



Compte tenu de la stéréospécificité des récepteurs protéiques du goût, il est observé que la plupart des acides aminés génèrent un goût amer sous forme L et sucré sous forme D (le pouvoir sucrant des D amino acides est souvent supérieur à celui du saccharose). Il semble néanmoins qu'une bonne corrélation existe entre l'hydrophobicité de la chaîne latérale exprimée par ΔG° et la sensation de goût amer (tableau 4).

tableau 4. Hydrophobicité et goût des acides aminés

| | ΔG° J.mole-1 | caractère | goût | seuil de détection (g/l) |
|--------|------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|
| ALA | 3100 | hydrophobe | sucré | 0,6 |
| ARG | 3100 | basique | amer | 0,5 |
| ASN | -40 | polaire non ionisé | acide/sucré | 1 |
| ASP | 2250 | polaire ionisé | acide | 0,03 |
| GLN | -400 | polaire non ionisé | éventé/acide/sucré | 0,5 |
| GLU | 2300 | polaire ionisé | sucré/salé/acide/amer | 0,05 |
| GLY | 0 | polaire non ionis é | sucré | 1,3 |
| HIS | 2100 | basique | amer | 0,2 |
| ILE | 12400 | hydrophobe | amer | 0,9 |
| LEU | 10100 | hydrophobe | amer | 1,9 |
| LYS | 6250 | basique | sucré/amer | 0,5 |
| MET | 5450 | hydrophobe | viande rôtie/amer | 0,3 |
| PHE | 11100 | hydrophobe | amer | 0,9 |
| PRO | 10850 | hydrophobe | amer/sucré | 3 |
| SER | 170 | polaire non ionisé | sucré | 1,5 |
| THR | 1850 | polaire non ionisé | sucré | 2,6 |
| TRP | 12550 | hydrophobe | amer | 0,9 |
| TYR | 12000 | hydrophobe | amer | |
| VAL | 7050 | hydrophobe | amer | 0,4 |
| GLU Na | | polaire ionisé | umami / acide | 0,03 |

* 1/2 cystine

2) Hydrophilicité des acides aminés et des protéines.

L'hydrophilicité des acides aminés libres est d'abord liée à l'ionisation des fonctions α -aminé et α -carboxylique, puis à la présence sur leur chaîne latérale de groupements polaires ionisables (β et γ -COOH, ϵ NH₂, ϕ -OH, R-SH) ou de groupements polaires non ionisables (SER, THR, GLN, ASN). Les pK_a des groupements α et γ carboxyliques des acides aspartique et glutamique sont respectivement égaux à 3,86 et 4,25. A des pH voisins de la neutralité ces groupes sont chargés négativement. Par contre, dans ces conditions les fonctions ϵ -aminés et guanidine de LYS et ARG sont encore chargés positivement, leur pK_a étant de 10,5 et 12,5. L'hydrophilicité liée aux chaînes latérales portant des groupements carboxyliques ou aminés est donc essentiellement fonction du pH du milieu.

7. Séparation et dosage des acides aminés.

Il s'agit d'une analyse de routine à l'heure actuelle mais qui reste encore complexe ; ses premiers metteurs au point (MOORE et STEIN) ont obtenu le prix Nobel. Les intérêts de telles analyses sont très nombreux (nutrition, technologie protéique, biochimie des protéines etc.). L'analyse de la

vingtaine d'acides aminés naturellement présents dans les protéines nécessite d'abord leur séparation puis leur dosage. Les techniques séparatives les plus utilisées sont soit de type chromatographique soit de type électrophorétique.

Les techniques chromatographiques utilisables sont nombreuses :

- Chromatographie en phase vapeur après formation de dérivés volatils.
- Chromatographie en phase liquide avec ses variantes :
 - colonne d'échange d'ions.
 - colonne en phase inverse.
 - couche mince.

Les techniques chromatographiques en colonne sont celles qui sont actuellement les plus utilisées; qualifiées de CLHP (chromatographie liquide haute performance).

7.1. Généralités sur la chromatographie en phase liquide et l'HPLC.

Les phases stationnaires utilisées donnent des interactions variables en intensité avec les différents acides aminés ou leurs dérivés ce qui permet leur séparation. Les principaux paramètres à prendre en considération sont, très rapidement, les suivants :

- le coefficient de distribution

$$K = C_s / C_m \quad \text{équation 7}$$

C_s et C_m étant les concentrations du soluté respectivement dans les phases stationnaires et mobiles.

- le volume et le temps de rétention

$$V_R = t_R \cdot D \quad \text{équation 8}$$

dans laquelle D est le débit et t_R le temps de rétention (figure 12).

On a $D = s \cdot v$ avec s section réduite de la colonne et v vitesse linéaire de la phase mobile.

$s = s' \cdot \epsilon$ ϵ étant la porosité (= V_M / V_t) et s' la section.

$$V_R = V_M + K \cdot V_S \quad \text{équation 9}$$

dans laquelle V_M et V_S sont respectivement les volumes de la phase mobile et de la phase stationnaire.

- le facteur de capacité

$$k' = K \cdot V_S / V_M \quad (\text{équation 10}) \quad k' \text{ est encore égal à } (V_R - V_M) / V_M$$

- le temps de rétention est relié au facteur de capacité par :

$$t_R = t_0 (1 + k') \quad \text{équation 11}$$

- la sélectivité

$$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) = k'_2 / k'_1 \quad \text{équation 12}$$

caractérise la distance entre les sommets de 2 pics

- l'efficacité d'une colonne est caractérisée par son nombre de plateaux théoriques N

$$N = 16 (t_R / \omega)^2, \text{ avec } \omega \text{ largeur du pic à sa base.} \quad \text{équation 13}$$

- la résolution

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (\omega_2 + \omega_1) \quad \text{équation 13}$$

si $\omega_1 = \omega_2$ on a $R_s = 1/4 \cdot (\alpha - 1 / \alpha) \cdot (k'_2 / 1 + k'_2) \cdot N_2$
 La séparation est complète quand $R_s = 1$ (2 % de recouvrement des pics).

- la hauteur équivalente à un plateau théorique.

$$HEPT = L / N \quad \text{où } L \text{ est la longueur de la colonne} \quad \text{équation 14}$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique est reliée au diamètre des particules de la phase stationnaire et à la vitesse de la phase mobile par les relations :

$$\boxed{HEPT = B \cdot d_p^\beta} \quad \text{et} \quad \boxed{HEPT = A \cdot v^n} \quad \text{équations 15 et 16}$$

A et B sont des constantes, d_p est le diamètre des particules, β est voisin de 1,6 et n compris entre 0,2 et 0,6.

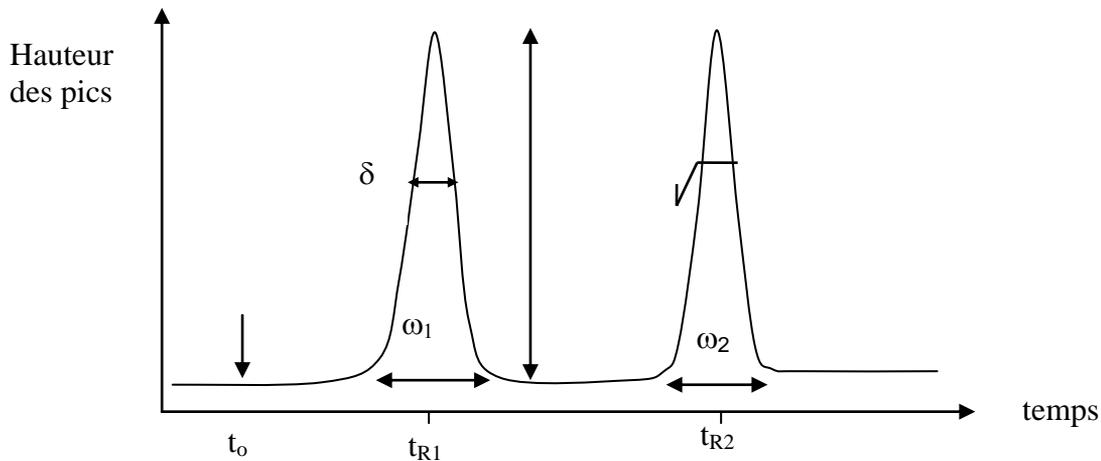


figure 12. Schéma d'un chromatogramme type et paramètres.

La loi de DARCY relie la perte de charge à des paramètres tels que viscosité de la phase mobile (η), longueur de la colonne L, v vitesse linéaire de la phase mobile et à une constante K_0 qui est égale à :

$$\boxed{\Delta P = L.v. \eta / K_0} \quad \text{équation 17}$$

$K_0 = (d_p^2 / 180) \cdot (\epsilon^3 / (1 - \epsilon)^2)$, ϵ est la porosité interstitielle

L'HPLC repose donc sur l'utilisation de phases stationnaires dont le diamètre des particules est inférieur à 10 μm (jusqu'à 1 μm). La perte de charge est alors considérable et voisine, pour des colonnes de 25 cm de longueur, de 300 bars avec des d_p de l'ordre de 5 μm . C'est à partir de l'instant où la technologie des pompes a permis d'atteindre ces pressions tout en travaillant à des débits constants (compris entre 0,5 et 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) que l'HPLC a pris un essor considérable.

La nature chimique des phases stationnaires sera choisie en fonction de la nature des solutés à séparer. Généralement on choisit la nature de la phase stationnaire pour qu'elle soit capable de donner des interactions avec les solutés (ioniques, polaires non ionisées, hydrophobes).

Par exemple la séparation de composés de polarités voisines sera possible sur des phases stationnaires polaires de type silice ou silice greffée polaire (possibilité d'interactions hydrogène par exemple). Dans ce cas l'élution, correspondant à la disparition de ces interactions sera obtenue en utilisant une phase mobile polaire qui donnera des interactions plus "fortes" avec le soluté que celui-ci avec la phase stationnaire.

Dans la chromatographie d'échange d'ions, ce sont des interactions polaires ionisées entre phase stationnaire et soluté qui sont à l'origine de la séparation.

De la même façon, la séparation de solutés hydrophobes sera possible sur des phases stationnaires hydrophobes. Dans ce cas l'élution sera d'autant plus aisée que l'éluant est apolaire et très difficile voire impossible avec de l'eau qui renforce les interactions soluté-phase stationnaire.

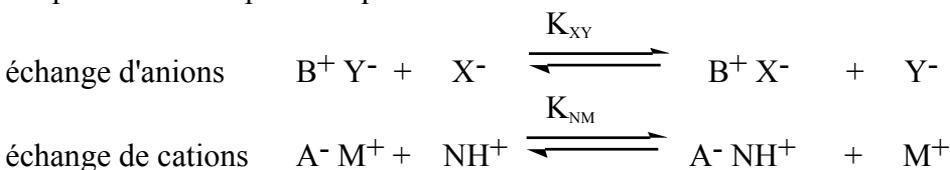
7.2. Chromatographie d'échange ionique et détection post-colonne.

Ce type de chromatographie a été pendant longtemps le seul utilisé pour séparer et doser les acides aminés (sa mise au point a valu à ses concepteurs MOORE et STEIN le prix Nobel). L'élément essentiel dans cette approche analytique est la colonne et sa phase stationnaire.

7.2.1. Généralités sur l'échange ionique.

La **phase stationnaire** est un support insoluble contenant des groupements chargés. Les **solutés** à séparer contenus dans la **phase mobile** sont de signe opposé. Ces derniers peuvent être échangés réversiblement avec d'autres ions de même charge sans aucun changement de la partie insoluble. Les groupes ioniques fixes déterminent le type et la force de l'échangeur. Leur nombre et leur accessibilité en déterminent la capacité.

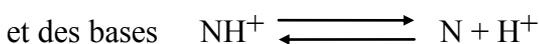
Pour des composés monovalents (ion du soluté et contre-ion) le processus d'échange peut être simplement décrit par les équilibres suivants :



K_{XY} et K_{NM} sont les constantes d'équilibre de la réaction d'échange.

X^- et NH^+ sont les solutés, Y^- et M^+ sont les contre-ions.

B^+ et A^- sont les groupements ionisés fixés sur la phase stationnaire.



Le coefficient de distribution D (rapport des concentrations du soluté chargé dans la phase stationnaire sur la somme des concentrations du soluté chargé et non chargé dans la phase mobile) sera égal à :

$$\begin{aligned} \text{échange d'anions} \quad DX &= \frac{[B^+X^-]}{[X^-] + [HX]} = K_{XY} \frac{[B^+Y^-]}{[Y^-]} \times \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} \quad \text{équation 18} \\ & \frac{[A^-NH^+]}{[A^-M^+]} \quad 1 \end{aligned}$$

échange de cations $DN = \frac{[NH^+][N]}{[NH^+]+[N]} = K_{NM} \frac{[M^+]}{[M^+]} \times \frac{K_a}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}}$ équation 19

D est proportionnel à la constante d'équilibre de l'échange (K_{xy} , K_{mm}) et au nombre de groupes ionisés de la matrice ($[B^+]$, $[A^-]$).

D est inversement proportionnel à la concentration en contre-ion ($[Y^-]$, $[M^+]$) dans la phase mobile. D est fonction du pH et du pKa.

7.2.2. Principaux types de groupements fonctionnels.

Les groupements échangeurs de cations les plus utilisés dans l'analyse des acides aminés sont de type sulfonate ($-SO_3^-$). Les groupements phosphonate ($-PO_3^{2-}$) et carboxylate ($-COO^-$) pour les échangeurs de cations et de type ammonium quaternaire ($-NR_3^+$), tertiaire ($-NHR_2$) ou secondaire ($-NH_2R$) pour les échangeurs d'anions sont potentiellement utilisables.

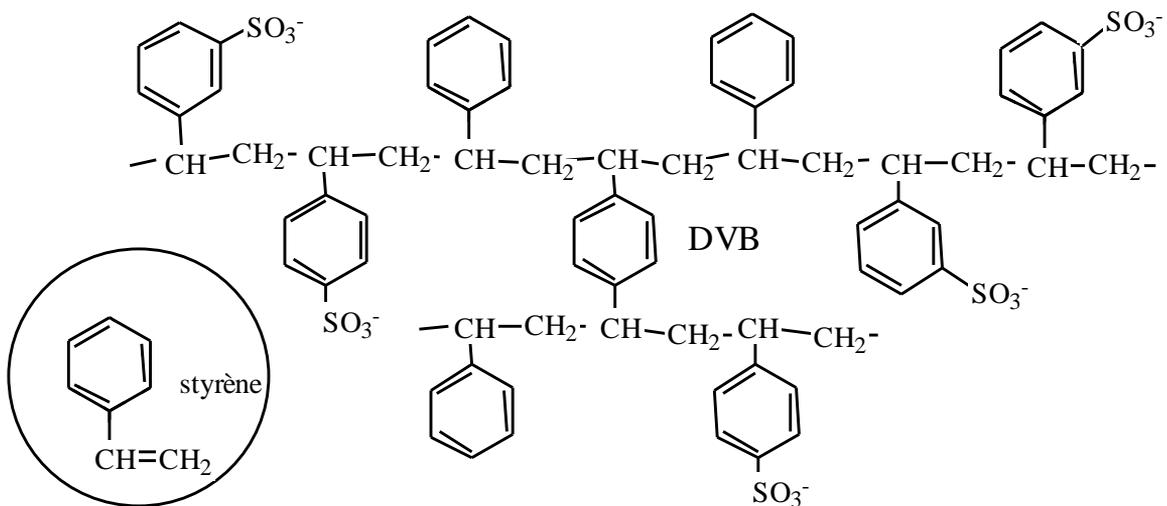
Les groupements de type sulfonate ou ammonium quaternaire sont des échangeurs d'ions forts, les autres des échangeurs faibles.

La fraction chargée d'échangeurs de type sulfonate ou ammonium quaternaire n'est pas influencée dans une zone large de pH, tandis que les échangeurs faibles présentent des variations importantes de leurs ionisations entre pH 4 et 8.

7.2.3. Principaux types de matrice.

Il existe des matrices de type polystyrène ou d'autres polymères organiques, des dextrans, des cellulose et des silices.

Les résines de type polystyrène qui sont les plus utilisées dans l'analyse des acides aminés résultent de la polymérisation de vinylbenzène avec comme agent de pontage du divinylbenzène (DVB 4 à 8 %).



Ces matrices de type polystyrène sont microsphériques et résistantes aux pertes de charges élevées et ce d'autant plus que leur niveau de réticulation est élevé..

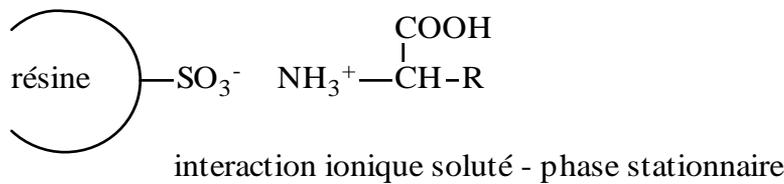
7.2.4. L'éluion en chromatographie d'échange ionique.

1) Influence du pH de la phase mobile.

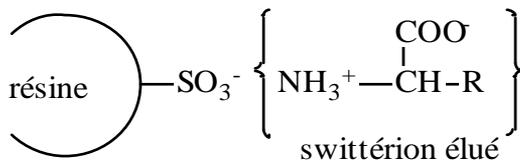
Avec les acides aminés, on utilise une colonne échangeuse de cations de type polystyrène sulfoné pour lesquelles le pKa est voisin de 1,5. Au niveau de la phase mobile, on se place initialement dans des conditions de pH (voisin de 2) pour lesquelles tous les acides aminés sont sous la forme cationique (ci-dessous) et donc retenus.

Après avoir déposé ou injecté automatiquement (vanne rhéodyne à boucle externe ou vanne à boucle interne), les acides aminés sur la colonne, l'élution est obtenue en utilisant une phase mobile constituée par des tampons de pH croissants (système à gradient).

Quand le pH de la phase mobile atteint le pH_i l'acide aminé préalablement "fixé" par liaison ionique à la phase stationnaire (résine- acide aminé $^+$) l'acide aminé se trouvera alors sous forme de swittérion non chargé; non retenu il sera alors élué.



Quand le pH de la phase mobile augmente et atteint le pH_i



2) Influence du type et de la concentration en contre-ion.

La constante d'équilibre de l'échange reflète l'affinité du soluté ionique ou du contre-ion pour l'échangeur. En général les échangeurs d'ions ont une grande affinité pour :

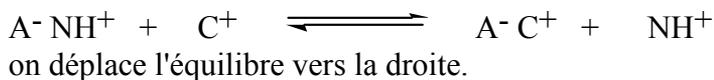
- les ions possédant une forte charge.
- les ions avec un petit volume d'hydratation.

Il est donc possible de classer les ions en fonctions de leur affinité pour l'échangeur, donc de leur "force d'élution". Avec les résines échangeuses de cations de type sulfonate on a :

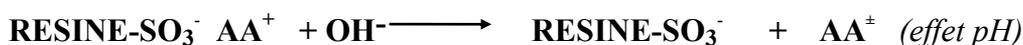
$\text{Ce}^{3+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{U} > \text{O}_2^+ > \text{Ti}^+ > \text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$.

Quand le soluté et le contre ion sont complètement chargés, la pente de la droite $\log D(N \text{ ou } X)$ fonction ($[\text{contre-ion}]$) est en général égale à a/b , avec a valence du soluté, b valence du contre ion.

Quand la concentration en contre-ion augmente (X^-)



Avec les acides aminés et une résine sulfonée les phénomènes principaux mis en jeu sont les suivants :



3) Effet de la température et de solvants organiques

Si on augmente la température de la colonne, la rétention du soluté diminue. De plus la viscosité de la phase mobile diminue ce qui permet d'augmenter le débit.

L'addition de solvants organiques à la phase aqueuse mobile affecte la rétention. En effet, les effets secondaires de la matrice (adsorption hydrophobe très importante dans le cas de polystyrène et perméation) jouent un rôle prépondérant dans la distribution des ions et plus particulièrement des ions organiques. Pour un même pH_i les acides aminés seront élués à un pH donné identique ; leur séparation dépend alors des interactions hydrophobes qu'ils donnent avec la phase stationnaire.

La rétention de l'acide aminé "swittérion" sera d'autant plus grande que son hydrophobicité est élevée. Il est ainsi possible de séparer LEU, ILE et norLEU qui ont le même pH_i ; l'élué très tardive du tryptophane résulte de ce phénomène.

4) Présence d'antioxydants.

La présence d'antioxydants dans les tampons d'élué permet d'éviter l'oxydation de la méthionine. Ainsi, l'élué doit contenir du thiodiglycol ($CH_2OH-CH_2-S-CH_2-CH_2OH$) jusqu'à ce que la méthionine mais aussi la cystine soient éluées (la cystéine est transformée en cystine en présence de ce composé).

5) Réalisation de l'élué.

Le débit de l'élué est fonction de la longueur de la colonne, du diamètre des particules de la phase stationnaire, de la viscosité et de la température (régulée au niveau de la colonne par circulation d'eau ou au moyen d'un "four"). L'élué peut être obtenu :

- au moyen de dispositifs permettant de réaliser des gradients de pH , de force ionique, de concentrations en méthanol ou en thiodiglycol (dispositifs à chambres communicantes).
- au **moyen de systèmes pilotés par ordinateur** dont les gradients d'élués permettent la séparation des acides aminés.
-

Si le gradient est réalisé avant le système de pompage, le système est qualifié de **système à gradient basse pression**.

Une seule pompe suffit alors à l'élué, mais il est nécessaire de bien mélanger les différents élués "primaires" dans des systèmes dont le volume mort peut constituer un handicap.

Si le "gradient" d'élué est réalisé par autant de pompes qu'il y a d'élués primaires (au maximum 3 actuellement), le système est qualifié de **gradient à haute pression**. Les débits des différentes pompes sont réglés électroniquement de telle sorte que la somme de leurs débits respectifs soit égale au débit d'élué choisi. Un schéma de chromatogramme est donné figure 13.

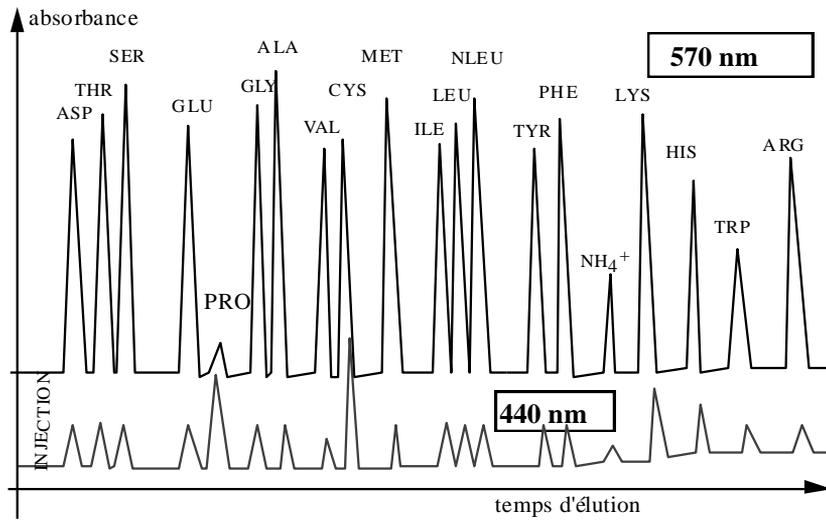


figure 13. Chromatogramme d'acides aminés (échange de cations, réaction post colonne ninhydrine)

7.2.5. Détection colorimétrique en détecteur continu (ninhydrine).

Les acides aminés élués individuellement sont généralement soumis en continu à une réaction colorée permettant leur dosage. Il s'agit le plus souvent dans la chromatographie d'échange ionique de la réaction à la ninhydrine qui est réalisée à pH 5,5 en présence de méthylcellosolve, sous azote et à chaud (cf chapitre II.6.6). Parmi les nombreux dérivés qui se forment certains sont violets, d'autres jaunes ou encore rouges, leur formation dépendant entre autre de la nature de l'acide aminé. La mesure de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde (570 et 440 nm) aide à l' "identification" des acides aminés élués (figure 13).

7.2.6. Autres types de détection post-colonne.

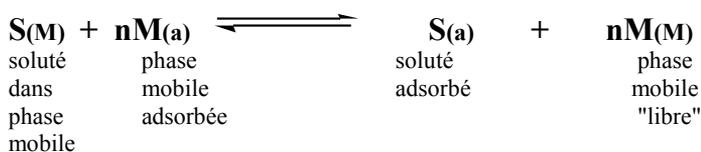
Il existe aujourd'hui de nombreuses réactions chimiques de détection des acides aminés élués d'un système chromatographique donné . La plupart de ces réactions ont les particularités suivantes : elles sont rapides, stœchiométriques et donnent des dérivés dont certains sont très stables et de détection facile . La sensibilité de détection a été multipliée par un facteur 1000 en comparaison avec la détection "ninhydrine" par l'utilisation de produits donnant avec les acides aminés des dérivés fluorescents (cF chapitre 6.5.6).

7.3. Chromatographie en phase inverse après dérivatisation pré-colonne.

Il s'agit de la méthodologie qui s'est le plus développée au cours de ces dernières années et qui permet le dosage des acides aminés rendus hydrophobes par condensation avec des réactifs appropriés et par ailleurs très facilement détectables (par fluorimétrie le plus souvent).

7.3.1. Généralités sur la chromatographie d'adsorption.

SNYDER (Principles of Adsorption Chromatography, M. Dekker, NY, 1968) a traité ce sujet en détail). Le volume de rétention d'un soluté est directement lié à la compétition entre les molécules de solvant M et de soluté S à la surface de l'adsorbant a. On admet généralement que cette surface est recouverte d'une couche monomoléculaire constituée par des molécules de la phase mobile M et de soluté S. L'équilibre d'adsorption et de désorption peut s'écrire :



L'adsorption d'une molécule de soluté $S_{(M)}$ $S_{(a)}$ se traduit par le départ de n molécules de solvants de la surface de l'adsorbant $nM_{(a)} \rightarrow nM_{(M)}$.

L'énergie d'adsorption est donnée par :

$$E_a = E_{S(a)} + n E_{M(M)} - E_{S(M)} - n E_{M(a)} \quad \text{équation 20}$$

Les termes des énergies en solution sont faibles et on a :

$$E_a = E_{S(a)} - n E_{M(a)} \quad \text{équation 21}$$

$E_{S(a)}$ est constante et ne dépend pas du solvant.

$E_{M(a)}$ dépend du solvant et du support mais pas de l'échantillon .

Une équation reliant le facteur de capacité k' du soluté aux propriétés de l'adsorbant a été proposée par SNYDER :

$$\text{Log } k' = \text{Log } V_a + \beta (S^\circ - \epsilon^\circ A_s) + \text{Log } V_s / V_M \quad \text{équation 22}$$

soit

$$\text{Log } k' = A + B\epsilon^\circ$$

V_a : volume de phase mobile adsorbée par gramme d'adsorbant.

β : activité de l'adsorbant (en général comprise entre 0,5 et 0,9).

$S^\circ - \epsilon^\circ A_s$ est lié aux propriétés de l'éluant et du soluté.

S° : énergie libre d'adsorption du soluté par unité de surface d'adsorbant dans des conditions d'activité standard ($\beta = 1$).

A_s : surface occupée sur l'adsorbant par une mole de soluté.

ϵ° : énergie libre d'adsorption des molécules de la phase mobile par unité de surface d'adsorbant.

V_s : volume phase stationnaire.

V_M : volume phase mobile.

$$S^\circ = - \frac{\Delta G^\circ}{2,3 RT}$$

ΔG° : variation d'énergie libre d'adsorption.

R : constante des gaz parfaits.

T : température absolue (°Kelvin).

SNYDER a également décrit une série éluotropique (force éluante d'un solvant) à partir des valeurs de l'énergie libre d'adsorption ϵ° des molécules de solvant sur la surface d'adsorbants polaires comme la silice ou l'alumine (tableau 5).

tableau 5. Série éluotropique de Snyder pour l'alumine ou la silice (x par 0,77)

| ϵ° | | ϵ° | | ϵ° | |
|---------------------|------|-----------------------|------|----------------------|-------|
| n-pentane | 0 | benzène | 0,32 | diméthylsulfoxyde | 0,62 |
| isooctane | 0,01 | bromure d'éthyle | 0,37 | aniline | 0,62 |
| n-heptane | 0,01 | éther éthylique | 0,38 | nitrométhane | 0,64 |
| cyclohexane | 0,04 | chloroforme | 0,40 | acétonitrile | 0,65 |
| cyclopentane | 0,05 | chlorure de méthylène | 0,42 | pyridine | 0,71 |
| sulfure de carbone | 0,15 | tétrahydrofurane | 0,45 | alcool isopropylique | 0,82 |
| CCl4 | 0,18 | méthyl éthylcétone | 0,51 | alcool éthylique | 0,88 |
| chlorure d'amyle | 0,26 | acétone | 0,56 | alcool méthylique | 0,95 |
| éther isopropylique | 0,28 | dioxane | 0,56 | éthylène glycol | 1,11 |
| toluène | 0,29 | acétate d'éthyle | 0,58 | acide acétique | grand |
| chlorobenzène | 0,30 | alcool amylique | 0,69 | eau | grand |

3) Augmentation de k' par modification du soluté.

Elle est soit obtenue par fixation sur un soluté polaire d'un composé apolaire par liaison covalente soit par fixation sur un soluté ionique d'un composé apolaire par liaison ionique (appariement d'ions). C'est la première méthode qui est de plus en plus largement utilisée pour séparer les acides aminés par chromatographie en phase greffée apolaire.

Dans cette méthode on fait réagir le mélange des acides aminés à séparer par des composants comme l'o-phthaldialdéhyde, ou le PITC ou la fluorescamine (cf chapitre II.6.5.6), les dérivés obtenus ont alors des facteurs de capacité beaucoup plus importants que l'acide aminé de départ et il est ainsi possible de réaliser leur séparation (figure14). De plus ces dérivés sont détectables par fluorescence ou par absorption UV, ce qui facilite leur dosage. La limite de détection atteint 10^{-13} g.

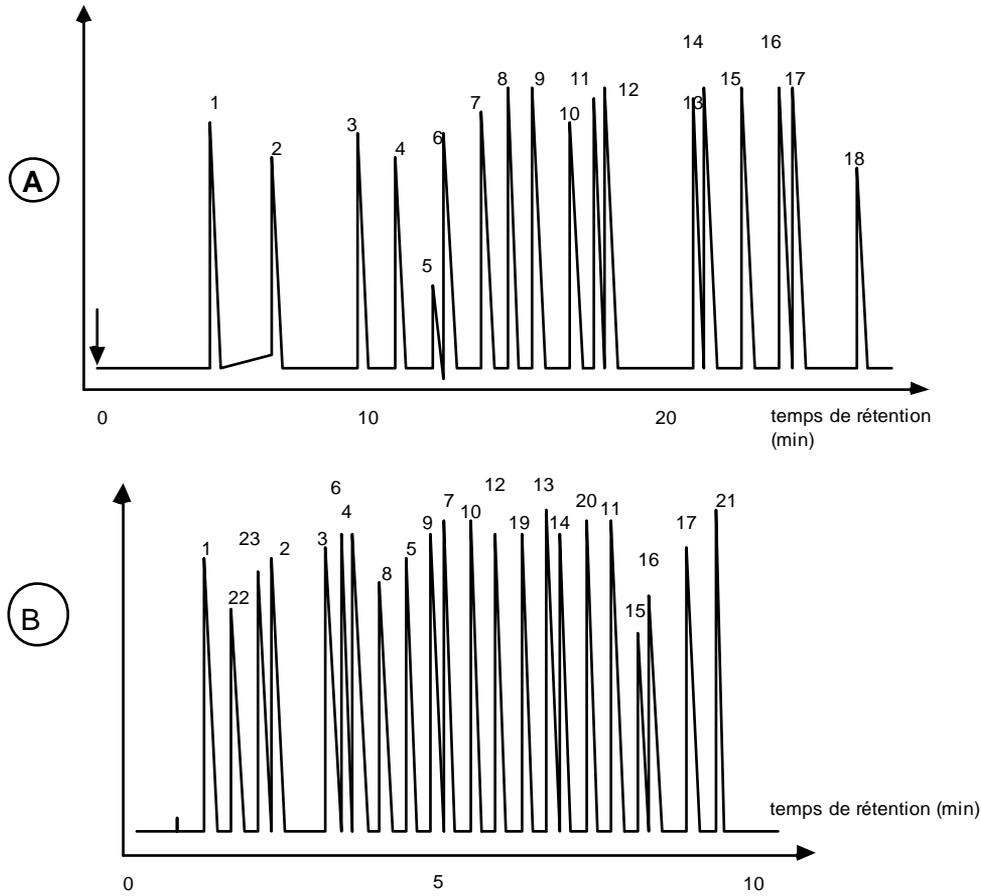


figure 14 Chromatogramme en phase inverse (C18) des dérivés d'acides aminés.

A réactif OPA - dérivés isoindoliques ; détecteur fluorimétrique.

B dérivés PTH.

1.ASP, 2.GLU, 3.ASN, 4.SER, 5.GLN, 6.HIS, 7.GLY, 8.THR, 9.ARG, 10.ALA, 11.acide γ -butyrique, 12.TYR, 13.MET, 14.VAL, 15.PHE, 16.ILE, 17.LEU, 18.LYS, 19.PRO, 20.TRP, 21.NorLEU, 22.acide cystéique, 23.CH₃CYS.

Les avantages et inconvénients des principales méthodes de dérivation des acides aminés sont indiquées dans le Tableau 6.

tableau 6. Comparaison des méthodes d'analyse des acides aminés en phase inverse

| | mode de dérivation | | | |
|---------------|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | dabsyl | PITC | OPA | FMOc |
| amines 2aires | oui | oui | non | oui |
| sensibilité | 5 pmoles UV | 5 pmoles UV | 150 fmoles Fluo | 100 fmoles Fluo |
| stabilité | bonne | moyenne | mauvaise | bonne |
| interférence | | | | |
| du réactif | oui | oui | non | oui |
| automatisable | moyen | mauvais | oui | moyen |

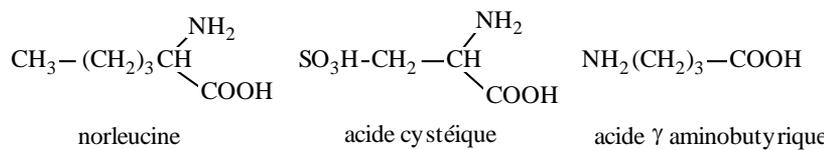
Il existe des possibilités de combinaisons de certaines de ces méthodes. Ainsi la combinaison OPA - FMOC permet d'obtenir après chromatographie en phase inverse et par mesure de l'absorbance à 338 nm tous les acides aminés avec des NH₂ primaires jusqu'à l'éluion de la lysine puis, par lecture à 262 nm l'éluion et la détection de la proline et de l'OH-proline.

7.4. *Étalons internes.*

La présence d'un étalon interne en cours d'analyse permet de corriger les pertes éventuelles qui peuvent se produire. Le choix d'un bon étalon interne doit répondre à certaines exigences :

- il faut que sa structure soit aussi proche que possible des composés analysés. Dans notre cas il doit donc correspondre à un acide aminé non naturel ou inhabituel.
- il doit être stable au cours de l'hydrolyse (appliquée à l'analyse des protéines).
- il doit être élué bien isolément et avec un temps d'éluion voisin de celui des acides aminés à doser.

Parmi les nombreux étalons internes qui répondent à ces exigences on peut indiquer :

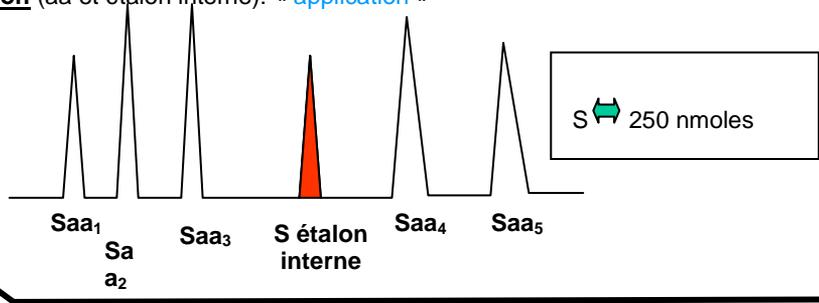


- la norleucine pour l'analyse complète des acides aminés protéiques. Elle est éluée après la leucine et l'isoleucine.
- l'acide cystéique, utilisable comme étalon interne dans le dosage des acides aminés acides.
- l'acide γ amino butyrique, utilisable dans le dosage des acides aminés basiques.

Analyse des acides aminés et étalon interne - STIA 1

Réalisation du chromatogramme étalon (aa et étalon interne): « application »

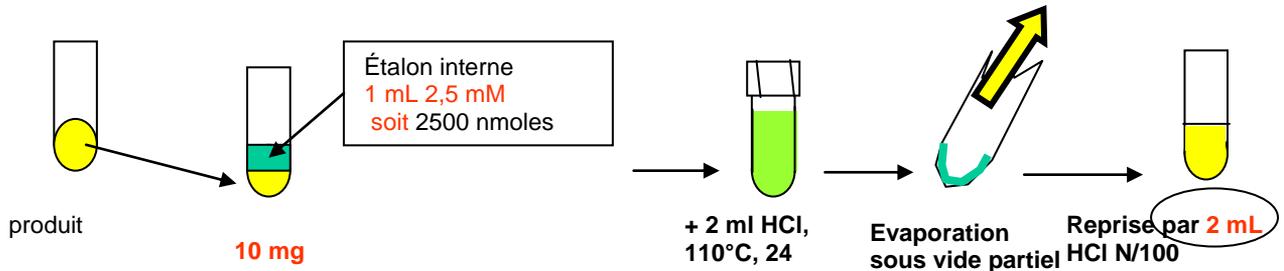
Analyse de **100 mL**
(solution **2,5 mM**)
soit **250 nmoles** par



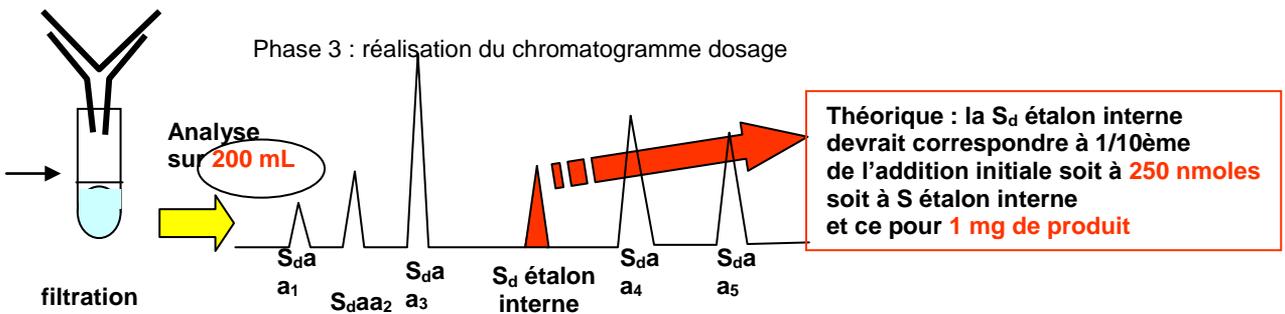
Analyse

Phase 1 : association
+ étalon « application »

Phase 2 : réalisation de l'hydrolyse
et préparation



Phase 3 : réalisation du chromatogramme dosage



Calcul pour l'acide aminé n°1

$$\frac{250 \cdot S_{daa1}}{S_{aa1}} \times \frac{S_{\text{étalon interne}}}{S_{da \text{ étalon interne}}} = \text{nmoles d'aa}_1 \text{ dans les 200 mL analysés}$$

Soit dans 1 mg de produit



III - LES PEPTIDES

Les peptides sont des composés naturels ou de synthèse qui résultent de l'enchaînement par une liaison peptidique d'un nombre limité d'acides aminés (2 à 50). Il existe une nomenclature internationale des peptides, certains d'entre eux possédant cependant un nom propre. Le nom du peptide commence par la **racine du nom** de l'acide aminé dont le groupement **NH₂ libre** est additionnée du suffixe **yl**. Suivent ensuite dans l'ordre la racine du nom additionnée de **yl** des autres acides aminés qualifiés de **résidus**. Le dernier résidu dont la fonction **COOH est libre** garde son nom. Exemple : Valyl - glycyl - tyrosine. L'écriture d'un peptide se fait généralement dans le sens -CO - NH-.

La nomenclature des peptides est possible à partir de leur code 3 lettres , le groupement NH₂ terminal étant symbolisé par H et le groupement COOH par OH. Exemple : H-VAL-GLY-TYR-OH.

1. Structure de la liaison peptidique.

La structure des peptides résulte d'abord de la nature de la liaison peptidique. Cette liaison possède 4 électrons π (2 pour la liaison C=O et 2 du doublet libre de l'atome d'azote). Des orbitales hybrides de résonance s'établissent et la liaison C(O)-N présente un caractère partiel de double liaison (40%) et la liaison C=O un caractère partiel (40%) de liaison simple (σ) (figure 15). La liaison C-N présentant un caractère de double liaison partielle a une longueur raccourcie de 1,47 Å à 1,325 Å (figure 15). Cette structure a été découverte par cristallographie aux rayons X de peptides simples (GLY-GLY).

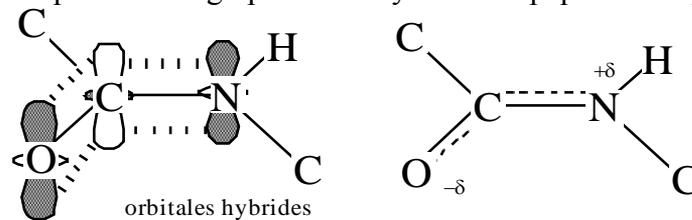


figure 15. Orbitales hybrides et polarité de la liaison peptidique

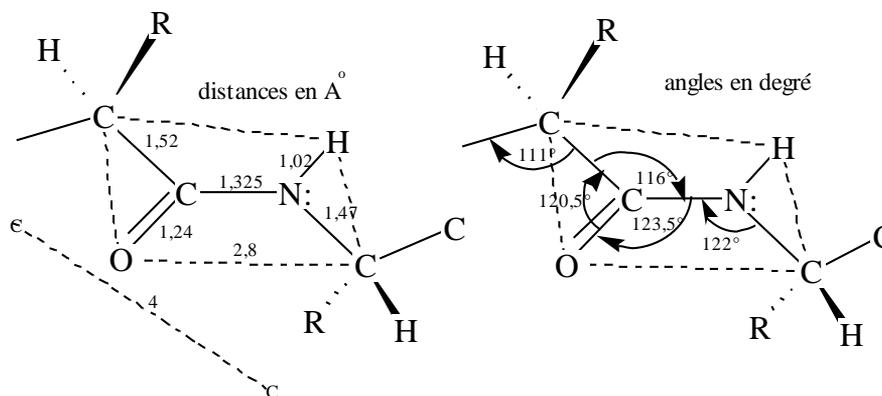


figure 16. Distances et angles de la liaison peptidique.

Il en résulte de nombreuses particularités très importantes dans la structure spatiale des peptides et des protéines .

L'énergie de la liaison peptidique stabilisée par résonance est voisine de 100 kJ.mole⁻¹ .

Les distances inter-atomes C=O et C-N correspondent à des distances hybrides .

La liaison peptidique présente une polarité partielle qui rend l'atome d'hydrogène mobile (figure 15). La liaison peptidique peut ainsi donner des liaisons hydrogène avec d'autres liaisons peptidiques, l'eau, ou des composés susceptibles de donner ce type de liaison. Par ailleurs, entre pH 0 et pH 14, le groupement NH ne se protonera pas.

Enfin la liaison peptidique a une structure telle que les atomes **C, O, N, H** et les deux **C α** sont dans le même plan. La rotation autour de la liaison C-N est impossible et la **configuration trans** pour laquelle les forces de répulsion des deux atomes de carbone sont minimales est donc stabilisée. La chaîne polypeptidique est donc une succession de plans rigides séparés par des C α -HR, les substituants de cet atome de carbone (chaîne latérale) étant dans l'espace situés au sommet d'un tétraèdre (figure 17).

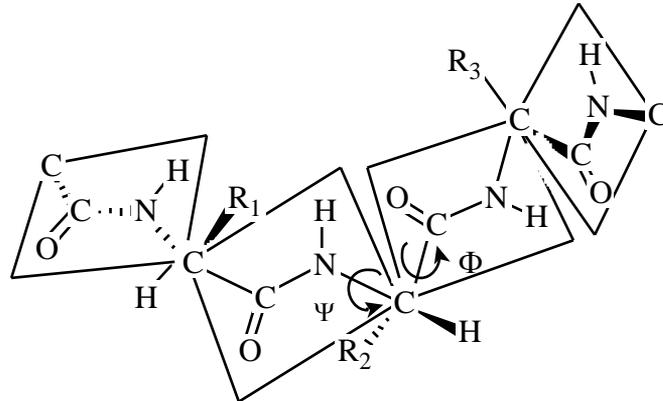
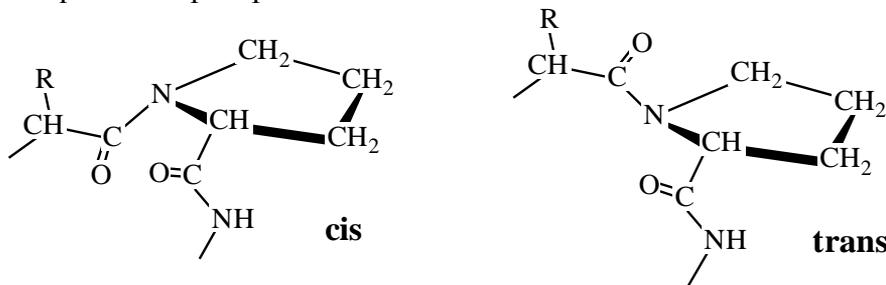


figure 17. Structure spatiale d'une chaîne polypeptidique.

La libre rotation autour des liaisons σ C-C(O) et C-N(H) schématisée par les angles Φ et Ψ permet un grand nombre de **conformations**. La seule variable dans cette structure est liée à la chaîne latérale des résidus d'acides aminés. Le volume ou encombrement stérique de cette chaîne associé à ses propriétés chimiques (groupements ionisables ou non, apolaires etc) conditionnent les angles Φ et Ψ ce qui conduit à une structure spatiale bien définie.

La **proline**, dont la fonction amine est comprise dans un cycle pyrrolidine, constitue une exception. Ce cycle présent dans une liaison introduit une grande rigidité, la rotation σ C-N(H) étant impossible. Deux liaisons cis et trans sont possibles par rapport au plan du cycle, et le plus souvent c'est la configuration cis qui est adoptée par les liaisons aboutissant à ce résidu.



L'analyse structurale d'un peptide comprend donc l'analyse des acides aminés qu'il contient et la détermination de leur **séquence** ou **structure primaire** ou ordre d'enchaînement.

2. Détermination de la composition en acides aminés.

La composition en acides aminés, exprimée en mole par mole de peptide, est généralement déterminée après hydrolyse acide (acide chlorhydrique 6 N, 24 heures, 110°C sous azote) suivie d'une élimination de l'acide par évaporation sous vide partiel. Les acides aminés de l'hydrolysate sont alors analysés par chromatographie liquide haute performance. Dans ces conditions le tryptophane est détruit et des oxydations se produisant au niveau des acides aminés soufrés. Pour analyser la méthionine et la cystine/cystéine, une oxydation performique stabilisant ces acides aminés sous forme de méthionine sulfone et d'acide cystéique est d'abord réalisée. Un peptide est qualifié de **régulier** quand son hydrolyse ne libère que des L-acides aminés. Un peptide est dit **irrégulier** quand l'hydrolyse libère des D-aminoacides ou d'autres radicaux. Ainsi un GLU N-terminal cyclisé en acide pyroglutamique, un GLU impliqué dans une liaison avec sa fonction γ carboxylique (glutathion), une méthylation de HIS ou CYS, une formylation de GLY ou de la fonction α NH₂ de la MET N-terminale, une acétylation

de la fonction αNH_2 terminale etc. sont des exemples de peptides irréguliers, de même que les peptides cycliques.

3. Détermination de la séquence.

La démarche expérimentale utilisée peut se résumer par **“diviser pour vaincre”**.

3.1. Les acides aminés terminaux.

Leur existence et leur nombre permettent de connaître la structure de la chaîne peptidique (linéaire, semi-cyclique, cyclique).

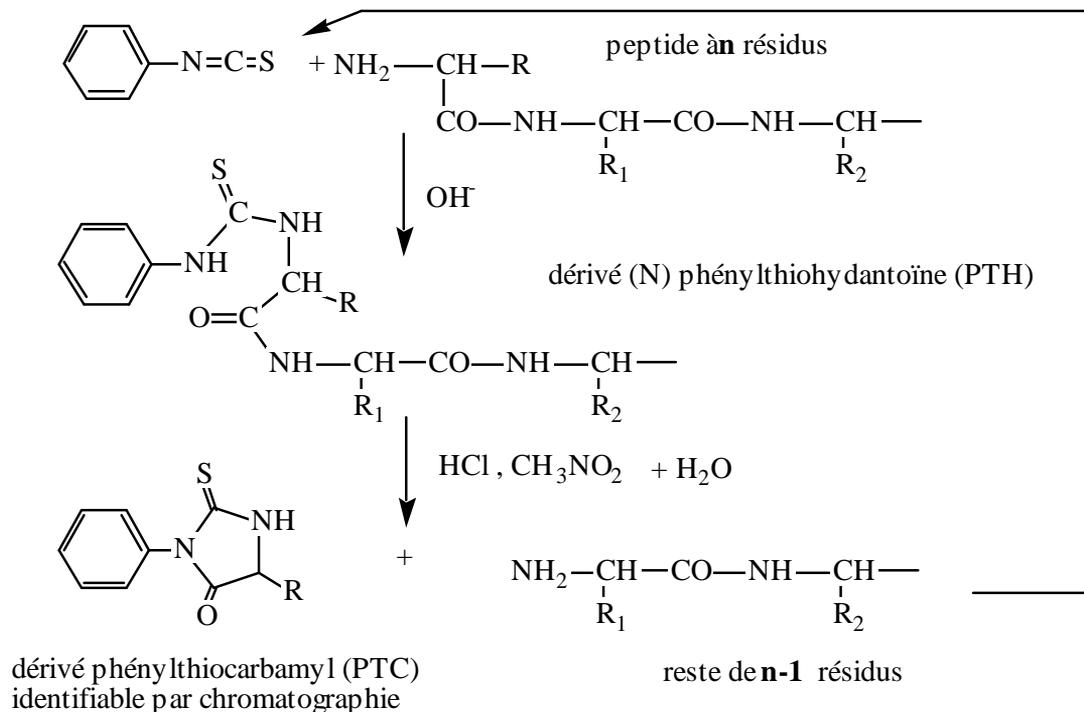
3.1.1. Méthode chimiques.

Elles consistent à traiter le peptide avec un réactif adapté pour former un dérivé stable caractéristique des fonctions C ou N terminales. Ce dérivé est isolé du peptide par hydrolyse puis séparé et dosé.

1) Détermination de l’acide aminé N-terminal.

- La méthode de **Sanger** au 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (cf chapitre II.6.5.6.8.) est réalisée à pH 8 en milieu éthanolique. Le dérivé dinitrophénylé (DNP peptide) généralement insoluble est isolé puis hydrolysé en milieu acide chlorhydrique. Le(s) DNP-acide aminé est extrait par l’ether diéthylique puis analysé par chromatographie. Remarque : les acides aminés basiques réagissent avec leur fonction aminée des chaînes latérales (ϵ DNP-LYS par exemple).

- La méthode d’**Edman** au phényl-isothiocyanate (cf chapitre II.6.5.6.5) permet l’analyse récurrente par l’extrémité N-terminale. Cette méthode est adoptée dans de nombreux systèmes automatisés appelés **séquenceurs** et permet jusqu’à une quinzaine de cycles.

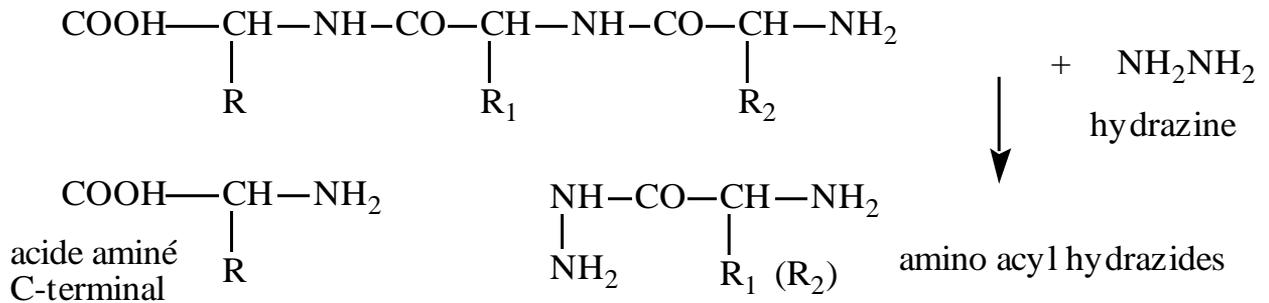


Cette méthode peut s’appliquer à des peptides plus “petits” issus d’une hydrolyse contrôlée du peptide initial. Le **chlorure de dansyle** est également utilisé pour identifier l’acide aminé N-terminal (cf chapitre II.6.5.6.4).

2) Détermination de l'acide aminé C-terminal.

Après **réduction** par le borohydrure de lithium et hydrolyse acide, le dérivé alcool aminé est identifiable par chromatographie (cf chapitre II.6.4.4.).

L'**hydrazinolyse** permet la coupure des liaisons peptidiques avec formation d'hydrazides sauf au niveau du résidu C-terminal qui apparaît sous forme d'acide aminé facilement identifiable.



3.1.2.Méthode enzymatiques.

Elles reposent sur l'utilisation d'exopeptidases qui hydrolysent, selon leur spécificité, la liaison peptidique dans laquelle est impliqué l'acide aminé N ou C terminal. Ainsi les amino-peptidases et les carboxypeptidases hydrolysent les peptides respectivement à partir de leurs extrémités N et C terminales.

1) Amino-peptidases.

La **leucine amino-peptidase** (3.4.11.1) hydrolyse ainsi les liaisons peptidiques à partir du résidu N-terminal (sauf celles dans lesquelles la proline est impliquée). L' amino-peptidase (3.4.11.2) est utilisable de même que la **proline-amino-peptidase** (3.4.11.5) qui est spécifique de la proline.

2) Carboxypeptidases.

- Les **carboxypeptidases A** (3.4.12.2) ou **B** (3.4.12.3) hydrolysent les liaisons peptidiques à partir du résidu C-terminal. La carboxypeptidase A est une métallo-enzyme du suc pancréatique n'hydrolysant pas si l'acide aminé C-terminal est ARG , LYS ou PRO.
- La **carboxypeptidase B** agit sur les ARG et LYS C-terminales.
- La **carboxypeptidase C** (3.4.12.1) détache tous les acides aminés C-terminaux.
- La **proline carboxypeptidase** (3.4.12.4) détache spécifiquement la proline C-terminale.

L'acide aminé N (ou C) terminal est extrait et identifié. L'enzyme pouvant poursuivre son hydrolyse sur le peptide à n-1 résidus, plusieurs cycles peuvent être ainsi réalisés.

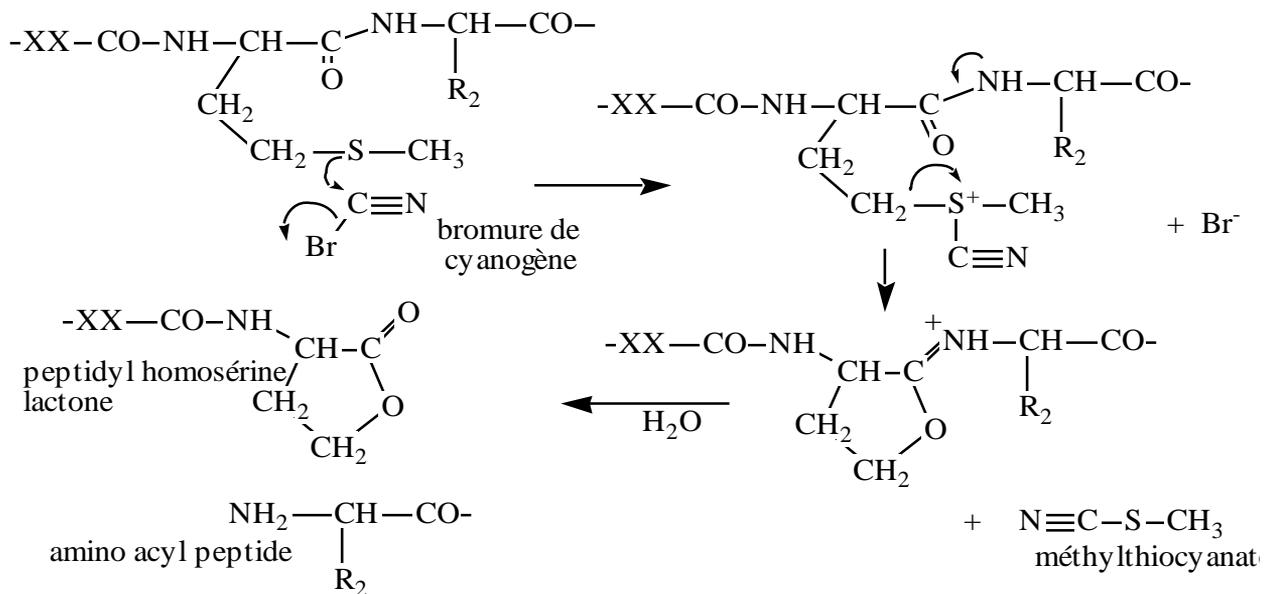
3.2. Les méthodes classiques de séquençage.

Le nombre total de résidus ainsi que les acides aminés N et C terminaux déterminés (ainsi qu'une séquence partielle à partir de l'extrémité N-terminale) étant connus, il faut déterminer leur ordre d'enchaînement. Pour cela, le peptide est clivé au moyen d'**hydrolyses partielles spécifiques** en fragments plus petits qui sont soumis à leur tour à la détermination de leur composition et des résidus N et C terminaux comme décrit dans les chapitres III.3.1 et III.2. Le clivage spécifique peut être effectué par voies chimiques ou enzymatiques.

3.2.1. Méthode chimiques.

Parmi les nombreuses méthodes chimiques utilisables, celle mise au point par Witkop et Gross concerne les résidus de méthionine, la coupure par le **bromure de cyanogène** de la chaîne peptidique n'intervenant que du côté carboxylique de ce résidu de MET.

Un peptide qui contient 2 méthionyls (sauf C terminale) donnera 3 peptides de clivage.

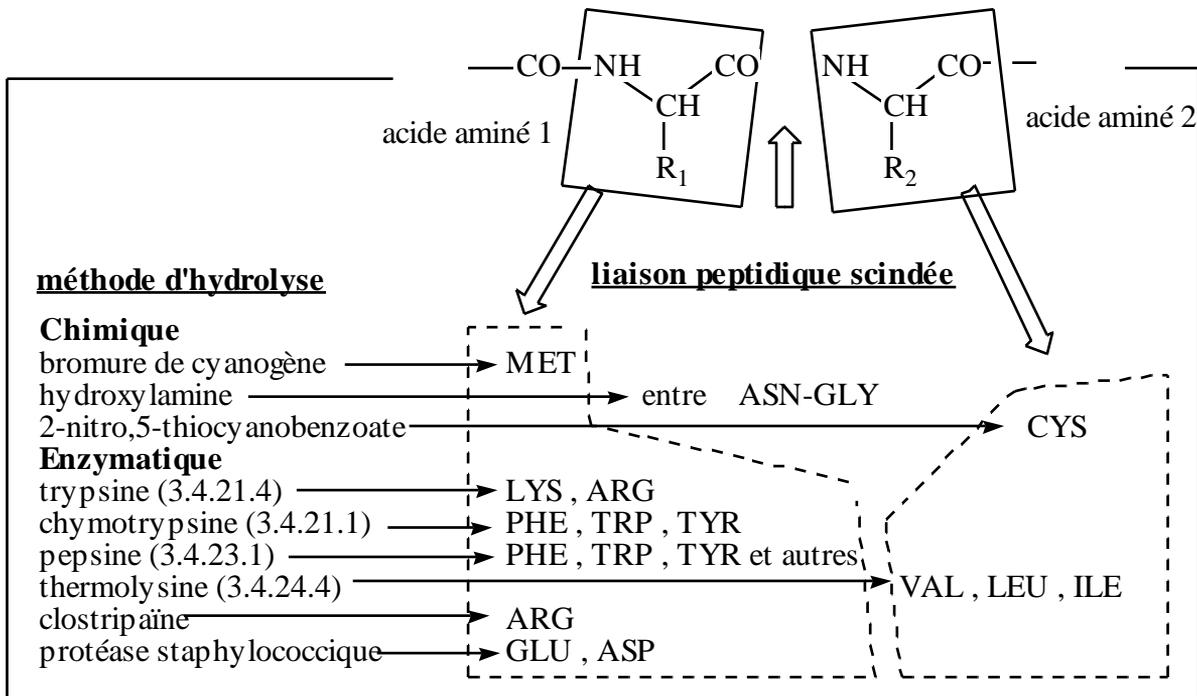


3.2.2. Méthode enzymatiques.

Une des méthodes de choix est une hydrolyse enzymatique par une endo-peptidase d'un lien peptidique dans lequel un acide aminé donné est impliqué, cette hydrolyse pouvant intervenir au niveau de la partie C_α ou N_α du résidu d'acide aminé.

Les peptides obtenus par clivage enzymatique ou chimique sont séparés par des méthodes chromatographiques ou électrophorétiques, leur séquence étant ensuite déterminée par la méthode d'Edman. Les spécificités de quelques protéases utilisées dans le séquençage sont indiquées dans le tableau 7.

tableau 7. Méthodes d'hydrolyse spécifiques de la liaison peptidique.



Les peptides résultant de ces clivages chimiques ou enzymatiques sont ensuite séparés et purifiés. A leur tour ils sont soumis à la détermination de leurs acides aminés C et N-terminaux et à la dégradation d'Edman ou à d'autres hydrolyses sélectives.

L'analyste dispose alors de la séquence de segments et il lui reste à en déterminer l'ordre. Certains de ces segments se recouvrent : **peptides de recouvrement**. C'est l'assemblage des fragments comme un puzzle qui conduit à la séquence.

3.3. Les méthodes automatisées de séquençage.

Ces méthodes sont basées sur la dégradation séquentielle ou récurrente d'Edman. Les séquenceurs permettent de déterminer l'ordre d'enchaînement jusqu'à une quinzaine de résidus. Ce sont souvent des peptides issus d'hydrolyses partielles qui sont soumis à cette opération automatisée.

3.4. Les méthodes de séquençage issues du génie génétique.

Le séquençage de l'ADN est plus facile que celui des peptides (et protéines). Si le fragment d'ADN codant (unité de transcription) pour le peptide (ou la protéine) est isolé, sa séquence sera facilement déterminée. La structure primaire du peptide sera alors déduite à partir du code génétique (cf tableau 2 chapitre II.5.4.2).

Des atlas de séquence sont disponibles aux chercheurs du monde entier. Leur informatisation permet une comparaison rapide des séquences et de remarquables analyses (structure-fonction, évolution).

4. Propriétés des peptides.

4.1. Propriétés physiques.

Elles dépendent de leur masse molaire et de la nature et de la séquence des acides aminés qu'ils contiennent. Généralement, il s'agit de solides de couleur blanche, cristallisables pour la plupart, et plus ou moins solubles dans l'eau. Ils présentent un caractère amphotère et possèdent un point isoélectrique. Par exemple le peptide H-LYS-ALA-HIS-GLU-MET-OH présente une charge nette qui évolue en fonction du pH de la façon suivante (tableau 8):

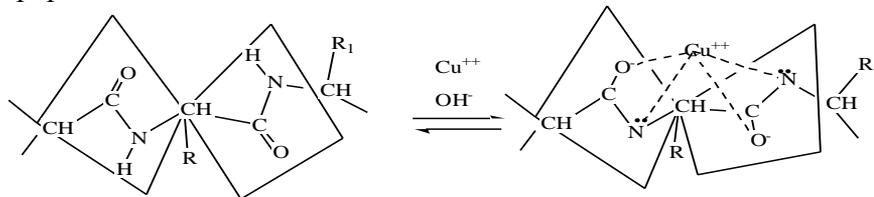
tableau 8. Variations de la charge nette du pentapeptide en fonction du pH

| fonction ionisable | pKa | pH 2,5 | p ^t équiv | pH 4,3 | p ^t équiv | pH 6,0 | p ^t équiv | pH 8,9 | p ^t équiv | pH 10,5 | p ^t équiv |
|---------------------|------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|
| α-COOH | 2,5 | 0,5 - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| γ-COOH | 4,3 | 0 | 0 | 0,5 - | - | - | - | - | - | - | - |
| imidazole | 6,0 | + | + | + | + | 0,5+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α-NH ₂ | 8,9 | + | + | + | + | + | + | 0,5+ | 0 | 0 | 0 |
| ε-NH ₂ | 10,5 | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,5+ | 0 |
| charge nette | | 2,5+ | 2+ | 1,5+ | 1+ | 0,5+ | 0 | 0,5- | 1- | 1,5- | 2- |

Le pHi de ce pentapeptide est égal à (6 + 8,9) / 2 = 7,45.

4.2. Propriétés chimiques.

Elles sont fonction de la nature des acides aminés du peptide. Du fait de la mobilité de l'hydrogène de la liaison peptidique et de la présence d'un doublet d'électrons libres, les peptides donnent en milieu alcalin, des complexes bleus avec les ions cuivriques : **réaction du Biuret**. La réaction n'est positive qu'à partir de tripeptides.



5. Synthèse chimique.

Cette synthèse présente un grand intérêt au plan biologique mais aussi aux plans technologiques. Il est en effet nécessaire d'activer au moins l'un des groupements d'atomes qui participent à la condensation. La difficulté majeure de cette synthèse réside alors dans le fait que les groupements activés nécessaires à la formation de la liaison peptidique réagissent avec certains des groupements fonctionnels non impliqués dans cette liaison (fonctions αNH₂ terminale ou ε NH₂, fonction COOH terminale, etc). Il faut donc protéger certaines fonctions des chaînes latérales pour procéder à la synthèse. Il existe de nombreuses méthode de synthèse comme celle au carbodiimide. La technique de Merrifield en phase solide repose sur la condensation d'acides aminés dont la fonction amine (et latérale si nécessaire) est protégée et la fonction carboxylique activée.

5.1. Activation et préparation des acides aminés.

Les groupements carboxyliques sont activés par formation d'esters méthyliques et les groupements aminés protégés par formation de dérivés benzyloxycarbonyl (cf chapitre II.6.5.6.1). Le groupement εNH₂ est protégé par acétylation, la fonction thiol est estérifiée, la fonction guanidique est nitrée etc.

5.2. Condensation.

Elle est schématisée sur le schéma réactionnel indiqué figure 18.

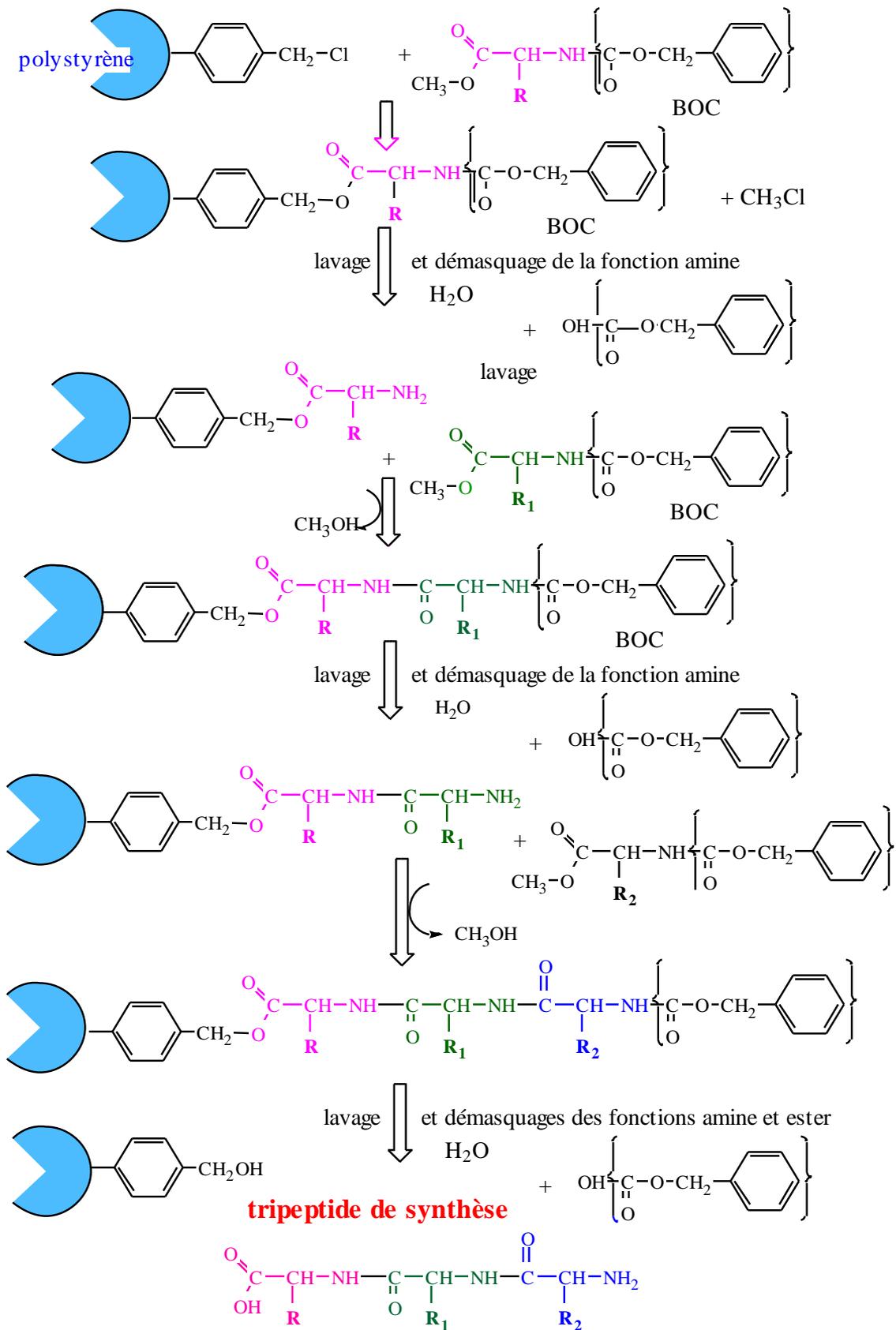


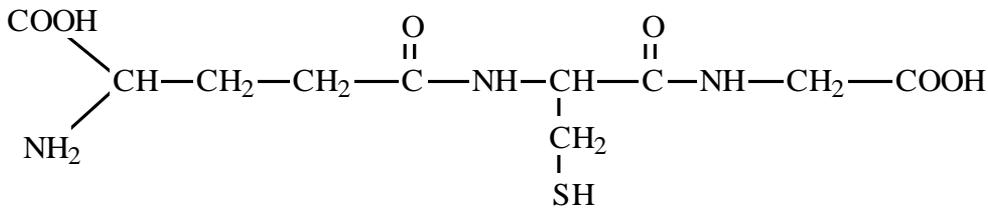
figure 18. Synthèse peptidique en phase solide selon Merrifield

6. Quelques exemples de peptides.

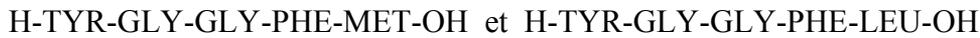
Nous ne citerons que quelques peptides importants en biologie, les peptides à usage “alimentaire” seront décrits dans le chapitre IV.

La **carnosine** et l’**ansérine** (cf chapitre II.3.2.3) sont des dipeptides extraits de la viande (tissu musculaire) qui interviennent dans des réactions de phosphorylation.

Le **glutathion** (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) est un tripeptide cellulaire qui par sa fonction thiol peut être oxydant ou réducteur de façon réversible. Il est plus actif que la cystéine du fait d’une plus grande solubilité et d’une plus grande mobilité de l’hydrogène de la fonction thiol. Il est oxydable par l’oxygène, par le ferricyanure, le 2,6-dichlorophénol indophénol. Il est réduit par le sulfure d’hydrogène, l’hydrogène naissant ou par voie enzymatique.



Hughes isola en 1975 deux **pentapeptides** appelés **méthionine enképhaline** et **leucine enképhaline** impliqués dans l’intégration des sensations douloureuses :



Guillemin isola une **β -endorphine** aussi puissante que la morphine pour calmer la douleur :

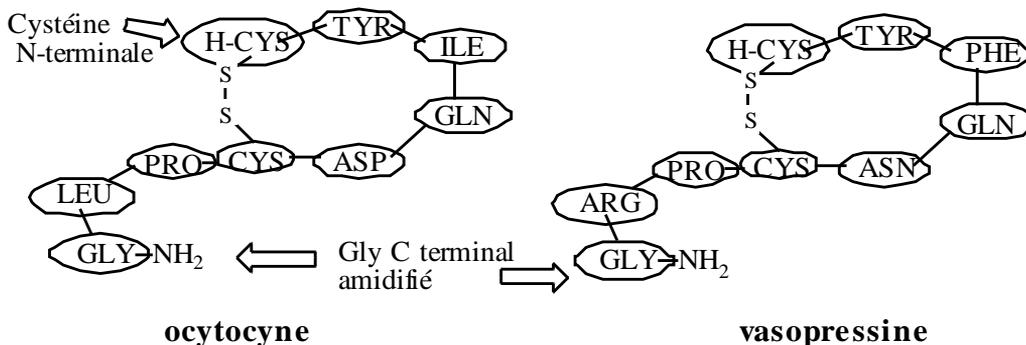


Les peptides hormonaux comme les hormones hypophysaires et pancréatiques sont des nonapeptides semi-cycliques comportant un pont disulfure.

La **vasopressine** et l’**ocytocyne** ont des structures voisines mais les effets physiologiques sont très différents. La vasopressine augmente la pression artérielle et a un effet antidiurétique ; l’ocytocyne provoque des contractions utérines.

La **corticotrophine**, hormone antéhypophysaire adrénocorticotrope (ACTH) contient 39 résidus d’acides aminés. Elle détermine l’hypertrophie de la glande corticosurrénale.

Les structures de l’ocytocyne et de la vasopressine (ADH) sont les suivantes :



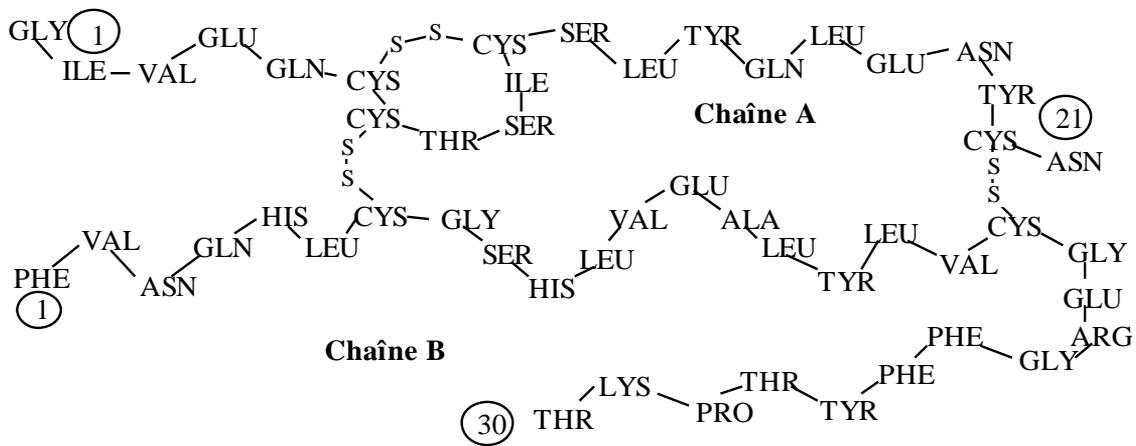
Quelques **hormones hypothalamiques** ont des structures peptidiques. Le **TRF** (thyreostimulin releasing factor) sécrété en cas de froid a la structure suivante :

pyroGLU-HIS-PRO-NH₂ , la proline C terminale est amidifiée.

Le **glucagon** sécrété par les cellules A des îlots de Langerhans du pancréas est un peptide de 29 acides aminés qui agit sur les hépatocytes, les adipocytes et les cellules B des îlots de Langerhans qui sécrètent alors l'insuline. Le glucagon est hyperglycémiant. Sa séquence est la suivante:

H-HIS-SER-GLU-THR-PHE-THR-SER-ASP-TYR-SER-LYS-TYR-LEU-ASP-SER-ARG-ALA-
-GLU-ASP-GLU-ASP-PHE-VAL-GLU-TRP-LEU-MET-ASN-THR-OH

L'**insuline** pancréatique est hypoglycémiante et comporte deux chaînes peptidiques A et B de 21 et 30 résidus réunies par 2 ponts disulfure. Sa masse molaire est de 6000. Elle est considérée comme la première protéine dont la structure a été déterminée.

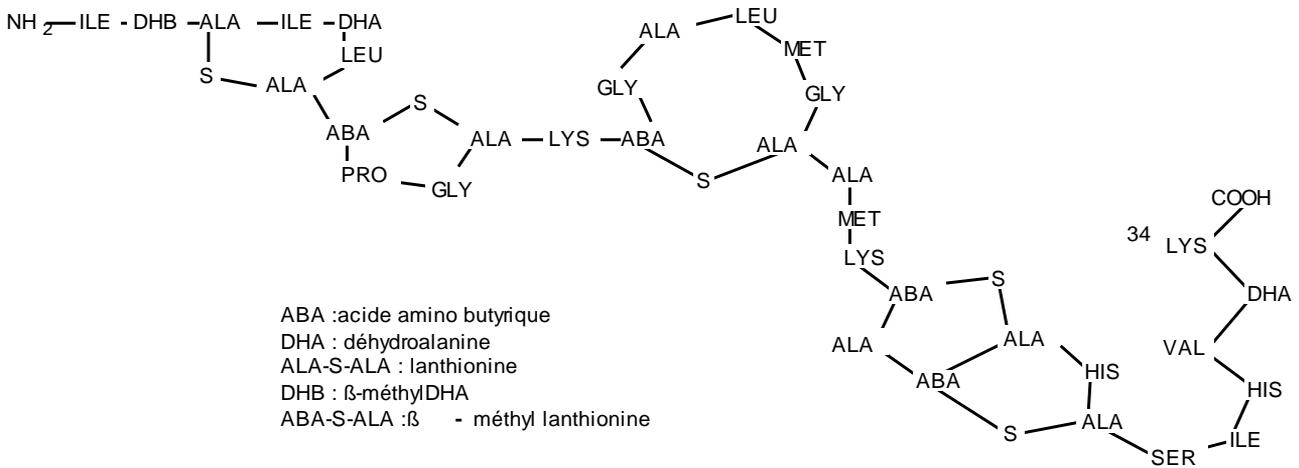


Il existe de nombreux polypeptides à activité **antibiotique**, certains d'entre eux contiennent des acides aminés sous forme D ou "inhabituels" et se trouvent sous forme cyclique. On peut citer la **nisine** et la **subtiline** utilisées en technologie alimentaire dans la conservation de certains produits et les **polymyxines**, la **bacitracine**, la **thyrothricine**.

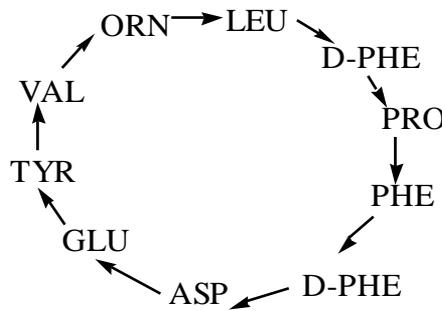
Les **bactériocines** sont synthétisées par des microorganismes pour « s'imposer vis à vis de flores concurrentes ». Ainsi *Pediococcus acidolactici* excrete une pédiocine très active contre *Listeria monocytogenes*.

La **nisine** est active sur les bactéries à Gram positif et sur les spores . Soluble à pH 2, elle précipite à pH 7; elle est stable à la chaleur en milieu acide. Elle provoque la lyse de la membrane cytoplasmique. Produite par *Streptococcus lactis*, elle est utilisée dans la fabrication de certains fromages et en conserverie à des doses voisines de 500 à 5000 UI / g.

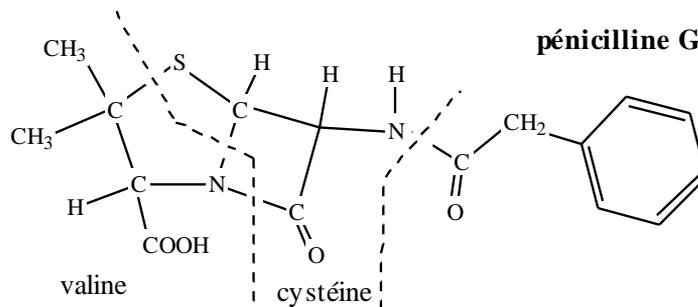
La subtiline est stable de pH 2,5 à 7. Elle est active sur les bactéries à Gram positif et sur quelques bactéries à Gram négatif. Son activité sporostatique la fait utiliser dans l'industrie des conserves. Elle est produite par *Bacillus subtilis*.



La **tyrocidine A** produite par *Bacillus brevis* a une structure cyclique.



Les **pénicillines** comprennent aussi des structures voisines de peptides.



Il existe aussi des **toxines** comme la **phalloïdine** extraite de l'amanite phalloïde qui sont des peptides. Dans ce cas il s'agit d'un heptapeptide cyclique très toxique (la Dose Minima Mortelle est de 50µg pour la souris).

Enfin signalons les **peptides inhibiteurs** : le trypsinogène pancréatique est activé en trypsine par une entérokinase ou par la trypsine après libération d'un hexapeptide. Il en est de même pour le pepsinogène activé en pepsine et le chymotrypsinogène activé en chymotrypsine. Dans le lait la plasmine issue du plasminogène joue un rôle très important .

IV. PRODUCTION ET UTILISATIONS D'ACIDES AMINES ET DE PEPTIDES

Il s'agit là d'un vaste marché où s'affrontent chimie industrielle et biotechnologie. Ainsi les acides aminés sont généralement obtenus soit par voie chimique (méthionine) soit par voie microbiologique (lysine) tandis que les petits peptides sont plus souvent fabriqués par synthèse chimique et les peptides de taille importante par biotechnologie.

Les acides aminés et les peptides jouent un rôle important dans les propriétés fonctionnelles de nos aliments et plus particulièrement au niveau des propriétés organoleptiques (saveur, goût). Ces composés apparaissent naturellement dans certains de nos aliments au cours de l'hydrolyse des protéines liée à des phénomènes de maturation ou d'affinage. La découverte d'acides aminés, de peptides et de dérivés aux goûts marqués (sucré, salé, etc.) permet actuellement le développement d'un nouveau secteur d'activité de l'industrie alimentaire.

Si l'**intérêt industriel** de ces dérivés sapides est très important, leur **rôle nutritionnel** ne l'est pas moins. En effet, ces composés sont utilisables par des consommateurs au métabolisme défaillant (diabète, hypertension, problèmes digestifs, etc.). De tels dérivés contribuent par exemple à assurer par alimentation parentérale les besoins en protéides de personnes malades.

Il faut signaler enfin que certains peptides produits au cours de la digestion possèdent des **activités biologiques** (activité opiacée, immuno-stimulation, hypotenseur, etc.).

Nos connaissances et nos capacités de synthèse s'étant considérablement accrues ces dernières années, il est donc très vraisemblable que les acides aminés et les peptides seront amenés à jouer, dans les années qui viennent, un rôle de plus en plus important en sciences des aliments.

1. Les acides aminés.

1.1. Production.

Actuellement la préparation d'un acide aminé est réalisée à partir d'une protéine naturelle lorsqu'il est abondant dans cette protéine et par ailleurs facile à isoler. Il peut être par ailleurs obtenu par synthèse chimique ou microbiologique. Le plus souvent, la synthèse chimique conduit à des racémiques (mélange à 50% de D et 50% de L), tandis que la synthèse biologique permet l'obtention d'isomères L (ou D). Signalons encore qu'il est possible de marquer la molécule au cours de sa synthèse en incorporant un isotope radioactif (^3H , ^{14}C , ^{18}O) ou lourd (^{13}C , ^{15}N) ce qui présente un grand intérêt analytique en biochimie ou en nutrition.

Certains tissus animaux ou végétaux contiennent un **acide aminé libre** donné à des teneurs élevées, acide aminé qui peut alors être facilement purifié. Par exemple il est possible d'extraire 20 mg de L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) à partir de 1 g de fève.

Jusqu'à ce jour, les acides aminés synthétisés par **voie chimique** sont MET , PHE , SER , THR , TRP , ASN , CYS et GLY. Les méthodes de synthèse chimique classique conduisent à des racémiques, mais des méthodes stéréospécifiques existent déjà et devraient être applicables industriellement dans les prochaines années.

Certains acides aminés comme la L-cystine et la L-tyrosine sont purifiés à partir d'**hydrolysats de protéines**. Ces acides aminés peu hydrosolubles sont facilement séparés d'un hydrolysat acide de

protéine (kératine des cheveux, des poils et phanères, plumes d'oiseaux ou volailles). La L-hydroxyproline est préparée à partir d'un hydrolysat de gélatine. Ces méthodes sont de moins en moins performantes par rapport aux méthodes de production microbiologique.

La **production d'acides aminés par voie fermentaire** est essentiellement liée à la sélection et la disponibilité de souches performantes. La connaissance des voies métaboliques est nécessaire pour maîtriser cette production. L'acide glutamique est ainsi produit par *Corynebacterium glutamicum* ou *Brevibacterium flavum* à partir de mélasses de betterave ou de canne à sucre additionnées de vitamines et d'ammoniaque. Dans ces conditions, 500 g d'acide L-glutamique sont obtenus à partir de 1 kg de saccharose. Des acides aminés comme la L-lysine, la L-isoleucine, la L-thréonine, la L-phénylalanine et la L-tyrosine sont actuellement produits par biotechnologie.

Il existe des méthodes de production des acides aminés par **voie enzymatique**. Ainsi l'acide L-aspartique peut être obtenu par transformation du fumarate d'ammonium (matière première d'origine chimique) en présence d'ammoniac et d'aspartase. Le rendement est voisin de 95%. La L-alanine est obtenue par action de l'aspartate β -décarboxylase sur l'acide L-aspartique ; le tryptophane est synthétisé à partir d'indole, de pyruvate et de tryptophanase. Ces méthodes présentent l'avantage de se prêter à une production continue et l'inconvénient de voir l'activité enzymatique décroître souvent très rapidement dans le milieu.

1.2. Utilisations.

Les acides aminés ont un goût qui dépend essentiellement de leur configuration et de l'hydrophobicité de leur chaîne latérale (cf chapitre II.5.7.4). Généralement seuls les acides aminés à chaîne latérale carboxylique (ASP et GLU) sont **acides** sous forme dissociée, aucun acide aminé libre n'est **salé** (sauf peut être GLU). Certains acides aminés ont un goût **sucré** (GLY , SER , THR) et d'autres un goût **amer** (PHE , TYR , LEU , VAL , ILE).

Les acides aminés **umamis** sont sucrés avec un goût de viande ou de bouillon de poule (sels de sodium de GLU et ASP).

L'acide glutamique et ses sels de sodium, de calcium, de potassium etc., sont désignés sous le vocable de **glutamate**. Il s'agit d'un composé naturellement présent dans bon nombre d'aliments comme le lait, les poissons, les viandes, certains légumes. Sous forme libre il joue un rôle déterminant dans la sapidité et donc l'acceptabilité de très nombreux aliments. La tomate, la plupart des champignons et le fromage, dont la teneur est importante, sont utilisés pour leur saveur dans de très nombreuses préparations culinaires.

Le monoglutamate de sodium, par ailleurs un excellent **exhausteur** ou releveur de goût, contribue à l'harmonisation de la flaveur de l'aliment. Il est utilisé dans de très nombreux aliments (soupes, sauces, plats cuisinés, charcuteries, salaisons, etc.) à des teneurs comprises entre 0,1 à 1 % (P/P).

La **glycine** est utilisée en industrie alimentaire mais aussi pour ses propriétés tampons (comprimés d'acide acétyl salicylique). Possédant des propriétés exhaustrices d'arômes, elle possède un goût sucré caractéristique. Elle possède des activités antimicrobiennes qui la font utiliser en industrie fromagère ou charcutière.

La **L-lysine** est produite par fermentation, sa production française annuelle pour 1994 étant d'environ 40 000 T. Acide aminé essentiel en nutrition, elle est utilisée à très grande échelle en alimentation animale avec des taux d'incorporation voisins de 0,5 à 5 % (P/P).

Pratiquement tous les secteurs de production animale l'utilisent (productions porcine, de volailles, de lapins, de veau). Par ailleurs son utilisation dans le secteur alimentation d'animaux domestiques connaît un grand développement. Souvent limitante, son incorporation (supplémentation) permet

d'équilibrer la composition en acides aminés mais aussi de diminuer le taux protéique de l'aliment ou de substituer des protéines de soja par des protéines de céréales (diminution des coûts).

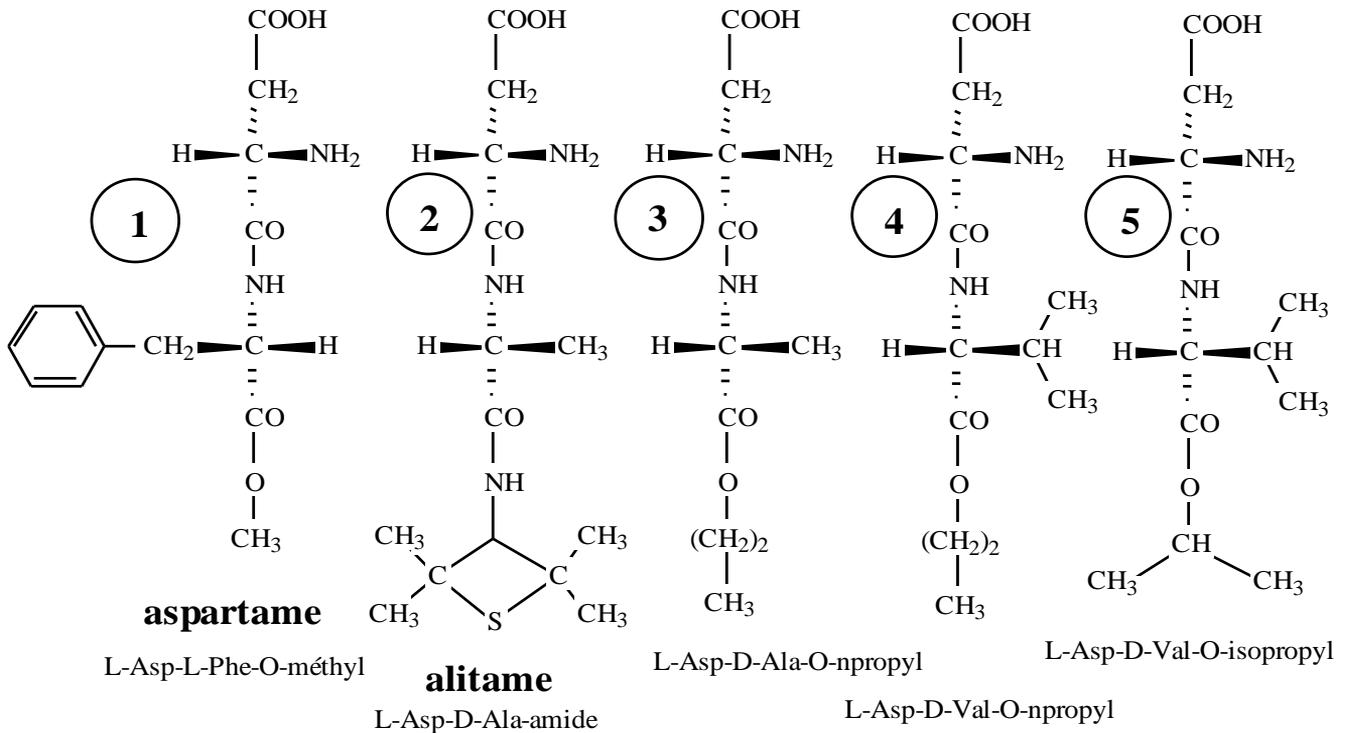
La supplémentation en lysine permet d'augmenter la masse de viandes maigres (satisfaction du consommateur par des viandes moins grasses) et d'obtenir des rendements de croissance élevés. Une telle opération a des conséquences économiques évidentes (excédents céréaliers mieux valorisés) et écologiques (une diminution de 2% de la teneur en protéines du régime de porcins réduit de 25% leurs rejets azotés polluants).

2. Peptides.

Leurs utilisations en alimentation sont très récentes. Il faut signaler ici qu'il existe de nombreux peptides biologiquement actifs qui sont directement issus de protéines alimentaires. De nombreux dipeptides ont des goûts **sucrés** avec souvent un arrière goût amer généralement masqué dans les produits mis à disposition des consommateurs par l'addition de glycine. D'autres ont des goût salés, acides, umami, ou amers.

2.1. Peptides sucrés.

Les cinq dérivés de dipeptides dont la structure est indiquée ci-dessous ont des pouvoirs sucrants respectivement égaux à 200, 2000, 125, 100 et 170 fois celui du saccharose (de 1 à 5).



L'**aspartame** n'est pas stable en milieu aqueux quand la température dépasse 60°C en particulier en milieu acide. La stabilité est maximale à pH 4 et en dessous d'une teneur en eau de 10%. A des pH acides ou de l'ordre de 7 à 8, l'aspartame n'est pas stable (hydrolyse de la liaison ester, cyclisation) et les dérivés formés n'ont plus de pouvoir sucrant.

Il est souvent conseillé d'en surdoser l'addition dans certaines préparations culinaires pour tenir compte de sa destruction partielle. Il faut par ailleurs veiller aux effets de sa consommation chez certaines catégories de consommateurs car il peut engendrer une phénylcétonurie ou encore un urticaire par sa forme cyclisée.

Utilisé dans des préparations "allégées" ou hypocaloriques en substitut du saccharose, il apporte 17 k.J par g. La dose journalière admissible est de 50 mg/kg.

Il semble que sa présence entraîne chez certains sujets, une prise alimentaire plus importante par action indirecte de la phénylalanine sur la sécrétion de cholécystokinine.

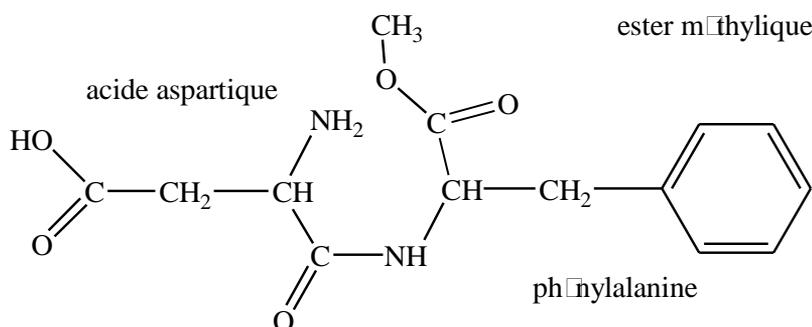
Quelques infos d'actualité concernant l'usage de l'aspartame

C'est au cours de la synthèse d'un produit pour la thérapie des ulcères que l'aspartame a été découvert fortuitement en 1965 par le chimiste J.M. Schlatter. La synthèse industrielle a fait l'objet du brevet US n° 3 492 131.

Il s'agit de l'édulcorant intense le plus employé. La Food and Drug Administration a autorisé son emploi dans les aliments en 1983 (48 FR 31376). Il est codifié **E 951** en Europe. Il a ensuite été commercialisé sous le nom de Nutrasweet, puis Candérel, Pouss-suc, etc.

1 - Structure

Il s'agit d'un dipeptide : L-aspartyl-L-phénylalanine méthyle ester.



La L-phénylalanine (acide aminé essentiel est estérifiée par du méthanol).

Il existe dans l'aspartame moins de 2 % de dicétopipérazine.

2 - Pouvoir sucrant

Le pouvoir sucrant est d'environ 180 à 200 fois supérieur à celui du saccharose.

3 - Propriétés physiques et solubilité

Il s'agit d'une poudre blanche, cristallisée, sans odeur. Le poids moléculaire est égal à 294,3.

Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{22} = 2,3^\circ$ dans HCl N.

La solubilité dans l'eau est pH et température dépendante. Le maximum de solubilité est atteint à pH 2,2 (20 mg/ml à 25°C) ; la solubilité minimale est atteinte au pHi soit à pH 5,2 (13,5 mg/ml à 25°C).

4 - Valeur calorique et exemples d'utilisations

Dans le tableau ci-après sont indiqués comme exemple les kcalories apportées par le saccharose et l'aspartame dans un certain nombre de produits alimentaires.

| aliment | kcal | |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| | saccharose | aspartame |
| limonade | 86 | 4 |
| dessert gélatine | 81 | 10 |
| gâteau chocolat | 150 | 75 |
| boisson au lait | 14 | 7 |
| boisson non alcoolisée | 144 | 1 |

Utilisé pour les diabétiques, pour diminuer les caries, pour perdre du poids ou éviter d'en gagner.

Dans quelques produits alimentaires, les doses de cet additif **E 951** autorisées sont par exemple les suivantes (cf arrêté du 2/10/97, annexe 2 pour plus de détails) :

| Produits | Dose autorisée |
|--|-----------------------|
| Boisson sans alcool à base d'extraits végétaux, d'arômes, de jus de fruits (50 kcal/l max) sans autres sucres | 600 mg / l |
| Laits fermentés, fromages frais | 600 mg / kg |
| Laits aromatisés | 600 mg / L |
| Crèmes desserts, desserts lactés, desserts gélifiés, flans, entremets | 1000 mg / kg |
| Glaces, crèmes glacées, sorbets | 1000 mg / L |
| Produits de confiserie et de chocolaterie | 3000 mg / kg |
| Gommes à mâcher et chewing gums | 6000 mg / kg |
| Produits destinés aux régimes hypocaloriques (à 1000 kcal max) | 100 mg / 100 kcal |

5 - Stabilité

Elle est fonction du temps, de la température, du pH et de l'activité de l'eau (Dziezak, 1986 ; Bell et Labuza, 1991 ; Tsubeli et Labuza, 1991 ; Homler, 1984 ; Graves et Luo, 1987 ; Graves et Luo, 1987 ; Huang *et al.*, 1987 ; Neiderauer, 1998).

La stabilité de l'aspartame à l'**état sec** est excellente ; à 105°C une perte d'environ 5 % traduite par la formation de dicétopipérazine est observée après 100 heures de traitement. A 120°C, une perte de 50% est obtenue au bout de 80 heures de traitement.

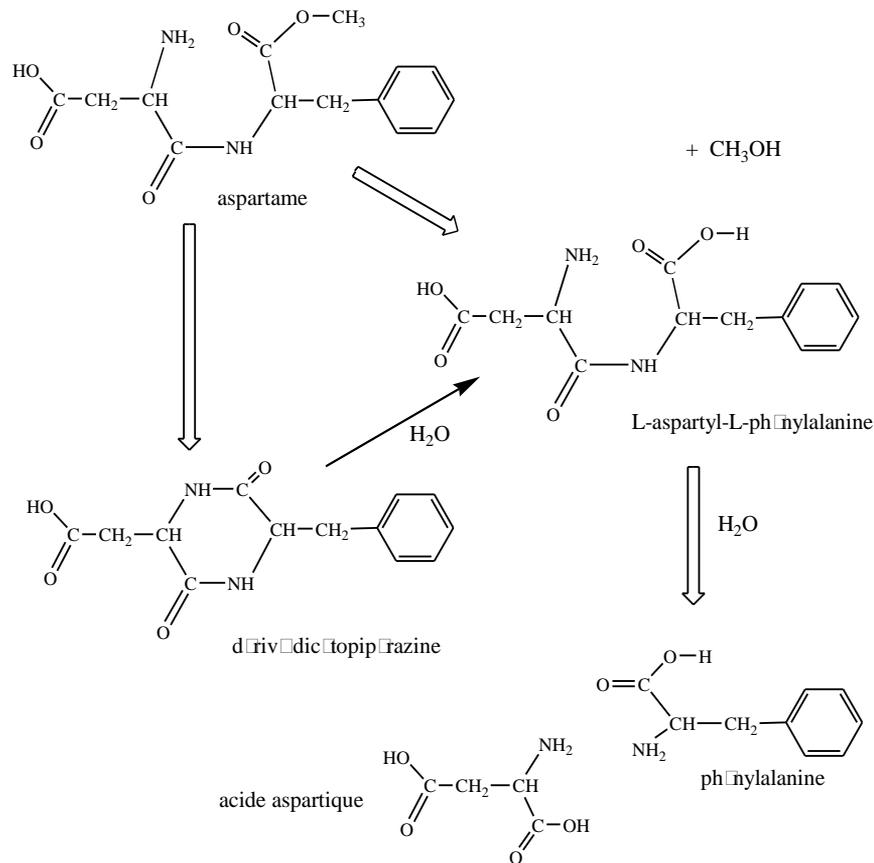
En **milieu hydraté**, les températures élevées induisent des hydrolyses, ce qui rend le produit inutilisable dans les aliments chauffés (cuisson, stérilisation, etc).

La stabilité est bonne entre pH 3 et 5 ; elle est maximale à pH 4,3.

En-dessous de pH 3,4 c'est l'hydrolyse du dipeptide qui est observée.

Au-dessus de pH 5,0 c'est la cyclisation en dicétopipérazine qui intervient.

Dans les deux cas cette transformation se traduit par la perte du pouvoir sucrant.



Dans les **aliments à teneur en eau faible ou intermédiaire** (activités de l'eau comprises entre 0,34 et 0,66), la stabilité maximale est observée à pH 5,0. L'énergie d'activation de la réaction de dégradation est voisine de 30 kcal.mole⁻¹.

Dans les produits à pH compris entre 6 et 7 et pour des températures comprises entre 70 et 100°C, la destruction suit une cinétique d'ordre apparent égal à 1 avec une énergie d'activation d'environ 17 kcal.mole⁻¹. Les augmentations de pH et force ionique se traduisant par une augmentation de la vitesse de dégradation. A ces pH, des pertes significatives sont observées au cours de l'entreposage à 4 et à 30°C (Tsoubeli et Labuza, 1991).

Au cours du chauffage en présence de glucose, l'aspartame donne la réaction de Maillard et 4 bases de Schiff sont formées (Huang *et al.*, 1987).

Dans les boissons non alcoolisées carbonatées, la stabilité de l'aspartame est excellente (> 6 mois à température ambiante).

Dans les produits congelés la stabilité est bonne même dans les zones de pH « sensibles » entre 6 et 7.

6 - Stabilité microbologique

L'aspartame peut être considéré comme stable au plan microbien « alimentaire ».

Il n'est pas caryogène (American Dental Association).

Dans les yaourts (cultures mixtes de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*), il apparaît que la vitesse de dégradation de l'aspartame est liée à la croissance. Il n'apparaît pas de différence entre les deux souches. Globalement, moins de 10 % de perte sont observés après 6 semaines d'entreposage des yaourts à l'état réfrigéré. On considère que l'aspartame est stable dans le yaourt s'il est ajouté après fermentation (Keller *et al.*, 1991).

7 - Pouvoir exhausteur d'arôme

L'aspartame est un exhausteur d'arômes dans produits fabriqués à base de citrons et oranges. Cette interaction est pH dépendante.

8 - Métabolisme

Le métabolisme de l'aspartame est celui des protéines et peptides : il conduit à la libération de phénylalanine, d'acide aspartique et de méthanol. La phénylalanine étant intolérable par certaines catégories de consommateurs (phénylcétonurie), un étiquetage adapté est nécessaire.

L'aspartame est métabolisé comme un nutriment mais sa quantité à utiliser est faible et il peut être considéré comme virtuellement non calorique. Considéré comme un protide, il apporte 4 kcal.g^{-1} .

9 - Evaluation toxicologique de l'aspartame

De très nombreux travaux ont été réalisés pour évaluer les effets biologiques et l'éventuelle toxicité de l'aspartame (Potts *et al*, 1980 ; Bianchi *et al*, 1980 ; Saunfers *et al.*, 1980 ; Lennon *et al*, 1980 ; Aspinall *et al.*, 1980 ; Stegink, 1987 ; Renwick, 1985).

En introduction il faut savoir que la consommation de 19 mg d'aspartame (quantité sucrante d'une tasse de café ou de thé) produit environ 7,6 mg d'aspartate, 9,5 mg de phénylalanine et 1,9 mg de méthanol. En comparaison, un bol de lait (250 ml) produit 528 mg d'acide aspartique, 542 mg de phénylalanine, tandis qu'un verre de jus de tomate génère 47 mg de méthanol soit l'équivalent de 25 boissons sucrées à l'aspartame (Vetsch, 1985).

A ce jour, les travaux scientifiques et médicaux réalisés n'ont jamais permis de suspecter directement de risques toxicologiques.

A la dose de 5 000 mg / kg.jour aucune toxicité n'a été mise en évidence. En administration chronique, il n'a jamais été décrit de pathologie tumorale, de lésion organique et de variation des constantes biologiques.

Aucune action néfaste n'a été mise en évidence chez les rats nouveaux-nés traités ni chez des rats nés de mère traités et traités eux-mêmes jusqu'à 2 ans aux doses de 2 à 4 g / kg.jour. De même les études des pouvoirs mutagène, carcinogène, tératogène ainsi que l'étude de la fertilité se sont révélées négatives tant pour l'aspartame que pour le dérivé dicétopipérazine.

La dose de 5 000 mg / kg.jour s'étant révélée dénuée de toute toxicité, la DJA a été fixée à 40 mg / kg.jour ou encore de 2800 mg d'aspartame par jour pour un adulte de 70 kg (et de 600 mg pour un enfant de trois ans). A pouvoir sucrant équivalent, cette DJA correspond à la consommation de 560 g de saccharose par jour, soit environ 11 fois plus que la consommation moyenne de sucre en France. Rappelons qu'aujourd'hui les ingérés d'aspartame sont considérablement inférieurs à la dose maximale recommandée.

On est donc très en-dessous d'un risque quelconque de toxicité.

Brunner *et al.* (1979) ont montré qu'une consommation d'aspartame (2 à 6 % du régime) pendant 90 jours n'a pas d'effet sur la gestation. Les effets défavorables observés correspondent à ceux d'une ingestion « équivalente » de phénylalanine.

La recherche des éventuels effets cancérigènes de l'aspartame a fait l'objet de nombreuses recherches ; très rapidement métabolisé in vivo en métabolites « naturels » non cancérigènes, l'aspartame n'est pas considéré comme carcinogène.

Shephard *et al* (1994) ont mis en évidence un effet mutagène de l'aspartame après nitrosation, effet par ailleurs très inférieur à celui résultant de la nitrosation d'un tétrapeptide stomacal (CCK ou cholécystokynine).

Les plaintes des consommateurs

Elles résultent souvent d'informations médiatiques mal maîtrisées. Les nombreux et variés effets secondaires ainsi décrits sont apparus au fur et à mesure de son utilisation : troubles gastro-intestinaux (nausées) et surtout neuro-psychiques (troubles de l'humeur : anxiété, irritabilité, dépression ; vertiges, insomnies et céphalées), troubles qui pourraient éventuellement être attribués à ses métabolites : acide aspartique, phénylalanine, méthanol et dérivé dicétopipérazine.

Ces plaintes révèlent aussi que l'aspartame serait impliqué dans des pathologies graves comme la sclérose multiple, le lupus érythémateux, le syndrome de la guerre du golfe, le syndrome de fatigue chronique, et certaines formes de diabète. Dans toutes ces « implications », l'anecdotique est dominant et il n'existe pas de preuves scientifiques mettant en cause l'aspartame.

Il faut néanmoins réagir à ces états de fait. Aux USA, la Food and Drug Administration a examiné les plaintes impliquant l'aspartame depuis 1985 et son analyse montre que l'aspartame n'a jamais pu être mis directement en cause.

D'autres articles mettent en cause le méthanol, cet alcool étant toxique après ingestion de relativement grandes quantités. Il en sera question dans l'analyse des effets des métabolites décrite plus loin.

En 1984, le Center for Disease Control a analysé les plaintes des consommateurs. Après plusieurs mois d'études, il a conclu que la majorité des symptômes avancés sont communs à la population générale. Ainsi les études de plus de 500 plaintes par le Centre of Disease Control d'Atlanta n'a pas permis de corréler l'usage de l'aspartame avec les symptômes décrits (Anonymous, 1986).

En Grande Bretagne, le Committee on Toxicity (COT) a expertisé l'aspartame en 1982 puis en 1992. Il en a conclu à la non toxicité de cet édulcorant peptidique. Le World Health Organisation et la Commission Européenne ont abouti à la même conclusion.

Néanmoins un article de 1996 laisse supposer que la consommation d'aspartame est corrélée avec l'apparition de cancers cérébraux. Cet article, soumis à des experts compétents qui l'ont analysé, émettent de grandes réserves sur la qualité et la rigueur des résultats présentés. Ainsi pour Bradley *et al.* (1997), il apparaît évident, après lecture et analyse de l'article concerné, que l'aspartame n'est pas cancérigène.

Néanmoins, il continue toujours d'apparaître des articles qui sèment le doute sur la sécurité de cet édulcorant.

La Food Standard Agency (FSA) prend en considération tous les articles dédiés à cet additif. Par exemple il s'agit d'expertiser les travaux réalisés au Kings College London qui montreraient que l'aspartame et d'autres composés alimentaires auraient un rôle putatif dans les cancers cérébraux. En réalité, les recherches sur ce thème n'en sont qu'à leur début et ce n'est que bien plus tard que leurs résultats plus étayés devraient être présentés et analysés.

10- Evaluation de l'éventuelle toxicité des métabolites.

Excepté le dérivé dicétopipérazine, les autres composés sont naturellement présents dans les aliments ou formés au cours de la cuisson ou de l'entreposage.

L'**aspartate** est interconverti in vivo en glutamate. Les études réalisées à ce jour n'ont pas montré d'effets toxiques de ces deux dérivés.

La phénylalanine

Dans le cas de malades présentant une phénylcétonurie (maladie génétique qui affecte 1 personne sur 10 000), la phénylalanine acide aminé essentiel, n'est pas « normalement métabolisé ». Elle s'accumule alors dans le sang et le cerveau en y provoquant des dommages. Pour les personnes saines, cet effet n'existe pas même après ingestion d'une dose très importante d'aspartame. Présent au niveau cérébral à haute concentration, la phénylalanine peut perturber le métabolisme des autres acides aminés impliqués dans la biosynthèse de neurotransmetteurs. La phénylalanine inhibe ainsi la biosynthèse de monoamines.

Des essais cliniques réalisés sur des adultes et des enfants (doses de 34 à 1800 mg / kg) pendant 21 semaines n'ont pas mis en évidence de différence de comportement.

Les céphalées représentent 20% des plaintes spontanées d'utilisateurs d'aspartame aux USA (sur 30 000 plaintes en 10 ans). C'est la phénylalanine résultant de l'hydrolyse in vivo qui, ingérée seule, pourrait atteindre plus facilement le cerveau et perturber les transmissions nerveuses voire les régulations hormonales. Le rôle de la phénylalanine dans la phénylcétonurie est par contre bien établi ; cette maladie héréditaire entraîne une déficience intellectuelle sévère : la mention «contient de la phénylalanine est obligatoire sur l'étiquetage.

Le méthanol

Il est libéré par hydrolyse de la liaison ester (dans les boissons gazeuses ou dans le tractus digestif) représente environ 10 % en poids de l'aspartame. Le méthanol est naturellement présent dans les aliments dans les jus de fruits, les pommes de terre cuites, et les boissons alcoolisées ; il s'agit d'un métabolite normal de la digestion de l'homme. Il est métabolisé en formaldéhyde qui est rapidement dégradé en formate.

La consommation d'aspartame à raison de 34 mg / kg.jour ne se traduit pas par une augmentation du formate sanguin ; le formate est éliminé par voie urinaire. Dans ces conditions la concentration en méthanol sanguin est inférieure à 0,4 mg/ 100 ml, limite de détection. Une ingestion de 200 mg / kg se traduit par une méthanolémie de 2,1 mg / 100 ml 8 heures après consommation ; après 24 heures la méthanolémie est nulle.

Le dérivé de la dicétopipérazine.

Produit par chauffage, ce dérivé n'est pas naturellement présent dans nos aliments. Ce composé n'a pas d'effets carcinogènes ou mutagènes. Le dernier risque connue : les allergies imputables à la dicétopipérazine qui apparaît au cours de la décomposition de l'aspartame en milieu acide (jus de fruits, colas)

Les études toxicologiques (aspartame et dicétopipérazine) montrent que ces produits sont dépourvus de toute toxicité, et ce, à des doses de 5 g /kg.jour.

10- Son statut

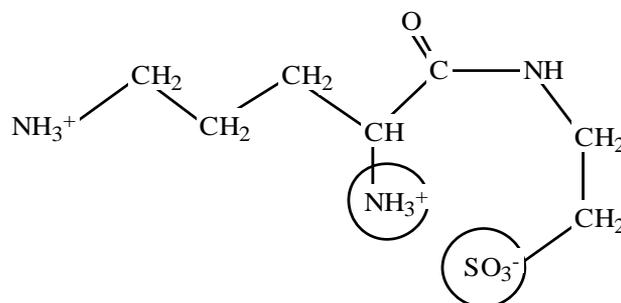
L'étiquetage des produits qui contiennent de l'aspartame doit clairement indiquer sa présence (avec édulcorant ...). Les produits qui contiennent à la fois des « sucres » et des édulcorants doivent porter la mention « avec sucre et édulcorant ». Par ailleurs, les produits qui contiennent de l'aspartame doivent porter l'indication « contient une source de phénylalanine ».

L'alitame, plus stable que l'aspartame, connaît un grand succès. Sa solubilité dans l'eau est très bonne et sa stabilité thermique et aux pH acides est plus grande que celle de l'aspartame.

Le néotame est en phase finale d'autorisation.

2.2. Peptides salés.

Il existe des peptides salés dont le défaut majeur est d'être amers. Parmi ceux-ci l'ornithyl-taurine, qui donne un goût salé en absence d'ions sodium, permettrait de par son utilisation de saler les aliments dans les régimes "sans sel".



2.3. Peptides umamis.

Ce sont des peptides dans lesquels le résidu L-GLU est en position N-terminale et est associé à un acide aminé acide. Il existe cependant des peptides umamis qui ne répondent pas à cette caractéristique

(par exemple SER-PHE). L'hydrolyse des protéines de soja génère un tripeptide GLU-GLU-SER au goût umami marqué.

2.4. Peptides acides.

Ils contiennent un ou plusieurs résidus ASP et/ou GLU dans leur séquence.

2.5. Peptides amers.

Ces peptides contiennent dans la plupart des cas des acides aminés hydrophobes, l'amertume étant plus intense quand le résidu hydrophobe est en position C-terminale et qu'un acide aminé basique est en position N-terminale. Le peptides ARG-PRO est amer et l'octapeptide ARG-ARG-PRO-PRO-PRO-PHE-PHE-PHE très amer.

Les dicétopipérazines (cyclo LEU,TRP ; cyclo GLY,PHE ; cyclo PRO,LEU ; cf chapitre II.6.6) formées au cours de certains traitements technologiques sont respectivement à l'origine de l'amertume d'hydrolysats de caséine, du chocolat ou du saké.

2.6. Peptides "alimentaires" à activité biologique.

Les protéines alimentaires peuvent, en cours de digestion, conduire à la libération de peptides actifs. C'est par la corrélation établie entre le régime alimentaire et certaines maladies psychiques comme la psychose schizophrénique, que cette recherche de peptides actifs a été initiée. De très nombreuses relations structure-fonction ont été établies ; on n'en indiquera que quelques unes (tableau 8).

tableau 8. Origine et relations structure-fonction de peptides alimentaires

| protéine | hydrolyse | peptide | activité |
|-------------------------------|---------------------------|---|---|
| caséine β bovine | multiple | β casomorphine-5 60TYR-PRO-PHE-PRO-GLY ₆₄ β casomorphine-7 60TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-PRO-ILE ₆₆ | analgésie fixation sur le récepteur des opiacées |
| | trypsine | 177ALA-VAL-PRO-TYR-PRO-GLN-ARG ₁₈₃ | inhibition des contractions utérines |
| | trypsine et chymotrypsine | 63PRO-GLY-PRO-ILE-PRO-ASN ₆₈ | augmentation de la résistance à l'infection |
| caséine α ₁ bovine | pepsine | exorphines 90ARG-TYR-LEU-GLY-TYR-LEU-GLU ₉₆ 90ARG-TYR-LEU-GLY-TYR-LEU ₉₅ 91TYR-LEU-GLY-TYR-LEU-GLU ₉₆ | inhibition de l'adénylate cyclase inhibition de contractions musculaires |
| hémoglobine | trypsine et chymotrypsine | hémorphine 4 34TYR-PRO-TRP-THR ₃₇ | fixation sur récepteur opiacé |

Il existe une corrélation entre la consommation de céréales et de lait et des désordres mentaux , la polyarthrite rhumatoïde et la maladie cœliaque. Après élimination de la gliadine du régime les symptômes disparaissent en absence de lait.

2.7. Peptides à activités diverses.

Des peptides riches en P-SER issus des caséines sont d'excellents transporteurs de cations, d'autres sont de puissants anti-thrombotiques ou anti-hypertenseurs.

V. DETERMINATION DES POIDS MOLÉCULAIRES

L'évaluation du poids moléculaire d'une protéine inconnue est une des premières étapes de son identification. Ainsi, en biochimie des protéines, en enzymologie ou encore en technologie des protéines, l'analyste se trouve fréquemment en présence de mélanges protéiques, et la détermination de la masse molaire de chacun des composants du mélange permet un suivi des opérations analytiques ou technologiques, la caractérisation de ces molécules et contribue par ailleurs à la détermination de la qualité ou de la pureté des divers produits obtenus.

Le poids moléculaire de "petits" composés est déterminable par des mesures de **propriétés physico-chimiques** de leur solution comme l'élévation de la température d'ébullition, la diminution du point de congélation, la pression osmotique. Les protéines de poids moléculaire très élevé ne peuvent être mises en solution qu'à des niveaux très dilués. Or il faudrait préparer une solution irréaliste contenant plus de 5 kg/l de protéine de masse moléculaire 100 000 D pour mesurer une diminution de 0,1°C du point de congélation.

Ce sont donc des méthodes mieux adaptées aux macromolécules qui doivent être utilisées. Elles peuvent être classées en deux groupes:

- les **méthodes chimiques** reposant soit sur l'analyse de certains éléments ou acides aminés soit sur la combinaison avec un réactif approprié.
- les méthodes **physicochimiques** qui peuvent être elles-mêmes classées en trois catégories:
 - celles basées sur les propriétés colligatives des solutions qui dépendent surtout du nombre de molécules présentes dans un volume donné (mesure de la pression osmotique, propriétés de films monomoléculaires),
 - celles basées sur le poids réel des molécules présentes (sédimentation à l'équilibre, mesure de la viscosité et de la diffraction de la lumière),
 - celles basées sur le volume hydrodynamique de la molécule protéique (chromatographie et électrophorèse).

La plupart de ces méthodes ne sont applicables qu'à des préparations protéiques pures, seules certaines d'entre elles sont applicables à des mélanges protéiques (sédimentation à l'équilibre, chromatographie et électrophorèse).

1. Définitions.

La **masse moléculaire** est exprimée en **Dalton** (pour une molécule vraie).

John DALTON proposa en 1807 un système de masse atomique dont l'unité est la masse de l'atome d'hydrogène soit $1,663 \cdot 10^{-24}$ g. Aujourd'hui le Dalton comme unité de masse est défini par rapport à l'atome ^{12}C à qui est attribué une masse de 12 Daltons. Le Dalton a donc une masse de $1 \text{ g} / \text{N}$, soit de $1 \text{ g} / 6,02 \cdot 10^{23}$ soit de $1,663 \cdot 10^{-24}$ g.

Le **poids moléculaire** est défini comme le rapport masse de la molécule / douzième de la masse d'un atome de carbone. Il s'agit d'un **nombre sans dimension**.

La **masse molaire M** est la masse de substance contenant autant d'unités élémentaires qu'il y a d'atome dans 12 g de ^{12}C . Elle est exprimée en **g.mole⁻¹** et est numériquement identique à une masse moléculaire exprimée en Dalton (pour $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules vraies).

L'intérêt de l'usage du Dalton est qu'il peut être utilisé pour définir la masse de structures pour lesquelles le terme moléculaire est impropre (par exemple ribosomes, virions).

2. Méthodes chimiques.

2.1. Dosage d'un ou plusieurs composants de la molécule.

Il est possible de déterminer la **masse molaire minimale** d'une protéine pure c'est à dire la masse qu'aurait la molécule si elle ne contenait qu'un atome d'un élément analysé (P, Cu, Fe etc.) ou encore si elle ne contenait qu'un résidu d'un acide aminé considéré, acide aminé généralement choisi en raison de sa très faible contribution à l'édifice protéique .

$$M_{\min} = \frac{M_{\text{constituant}}}{\% \text{ du constituant}} \times 100 \tag{équation 23}$$

Exemple : L'hémoglobine contenant 0,335 g de fer (Fe masse atomique 56), sa masse molaire minimale est égale à : $(56 / 0,335) . 100 = 16\ 700$. En réalité sa masse molaire est de $16\ 700 . 4 = 66\ 800$ car la molécule contient 4 atomes de fer.

Exercice : L'analyse des acides aminés du gluten donne les résultats suivants :

| | |
|----------------------------|--------------|
| TRP | 1,68 g/100 g |
| TYR | 4,50 g/100 g |
| acide β hydroxy glutamique | 1,80 g/100 g |

Quelle est la masse molaire du gluten ?

La **méthode de DELAAGE** (B.B.A., 1968, 168, 573-575) permet le calcul de la masse molaire à partir de la composition en acides aminés . La fonction

$$Y = \sum_i \left(\frac{n_i}{N_i} - 1 \right)^2$$

équation 24

dans laquelle n_i est le nombre de résidus analysés pour une masse molaire arbitraire choisie et N_i le nombre entier de résidus le plus proche de n_i . Le tracé de Y en fonction des diverses masses molaires choisies passe par des minima dont le plus bas correspond à la masse molaire de la protéine (figure 19).

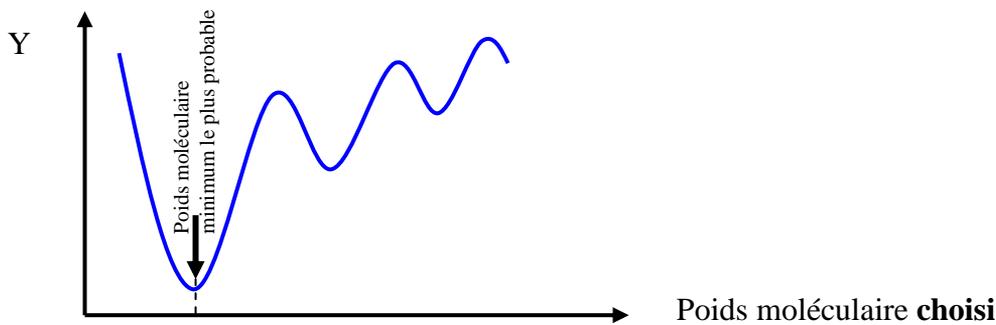


figure 19. Détermination graphique du poids moéculaire par la méthode de Delaage.

Si l'analyse est "exacte", la fonction Y passera par des minima égaux à 0 (masse molaire vraie et ses multiples entiers).

2.2. Combinaison avec un réactif.

Le poids moléculaire minimum est le poids de protéine réagissant avec une molécule-gramme d'un réactif chimique approprié (un acide, une base, un réactif spécifique). Par exemple 1 g d'ovalbumine se combine avec 0,9 mEq d'acide. Le poids moléculaire minimum est de $1 / 0,87 \cdot 10^{-4}$ soit de 1150.

3. Méthodes physico-chimiques ou physiques .

Si le système est **polydisperse** (plusieurs protéines de masses molaires différentes) le poids moléculaire déterminé sera un nombre moyen. Par détermination basée sur les propriétés colligatives des solutions qui dépendent surtout du nombre de molécules on obtient:

$$\overline{M}_n = \sum_i n_i M_i \quad \text{avec} \quad n_i = \frac{N_i}{\sum N_i} \quad \text{soit} \quad \overline{M}_n = \sum_i \frac{N_i M_i}{\sum N_i} \quad \text{équation 25}$$

N_i est le nombre de molécules présentes de la protéine i . M_i est le poids moléculaire de la protéine i .
 P_i est le poids de cette protéine i . n_i est la proportion de molécules de i

Par ailleurs on a : $N_i = \frac{P_i}{M_i}$

Par les méthodes basées sur le poids réel des molécules présentes on obtient :

$$\overline{M}_p = \sum_i \omega_i \cdot M_i \quad \text{avec} \quad \omega_i = \frac{P_i}{\sum P_i} \quad \text{soit} \quad \overline{M}_p = \sum_i \frac{P_i M_i}{\sum P_i} \quad \text{soit} \quad \overline{M}_p = \sum_i \frac{N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad \text{équation 26}$$

Il est possible de calculer en % et dans ces conditions on a :

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i x(\%) \cdot M_i}{100} \quad \text{équation 27}$$

Si on considère un mélange de deux protéines (système polydispersé) constitué de 25 % de protéine de poids moléculaire 25000 et de 75 % de protéine de poids moléculaire 20000 le calcul donne:

$$\overline{M}_n = \frac{25 \cdot 25000 + 75 \cdot 20000}{100} = 21250 \quad \text{et} \quad \overline{M}_p = \frac{25 \cdot (25000)^2 + 75 \cdot (20000)^2}{25 \cdot 25000 + 75 \cdot 20000} = 21470$$

On a $M_p > M_n$ mais par viscosimétrie on obtient souvent $M_p > M_v > M_n$.

En général les protéines en solution constituent un système monodispersé, mais des associations peuvent se produire et la comparaison des masses obtenues par les deux types de méthodes permet de détecter les phénomènes d'association / dissociation.

Parmi les nombreuses méthodes existantes on peut signaler :

3.1. Mesure de la pression osmotique.

Un système composé d'une solution aqueuse de protéine séparée d'un compartiment d'eau par une membrane semi-perméable (perméable à l'eau, imperméable aux protéines) n'est pas en équilibre. L'activité de l'eau dans la solution protéique est inférieure à celle du compartiment eau, et l'eau a donc tendance à traverser la membrane vers la solution de protéine. Il en résulte une différence de pression qui est la pression osmotique (figure 20).

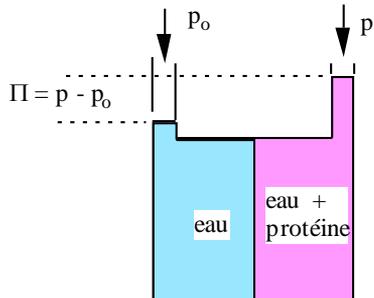


figure 20. Schéma de mesure de la pression osmotique.

Van't Hoff a montré que pour des solutions très diluées on a : $\Pi = C.R.T$ équation 28

Π étant la pression osmotique, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, C la concentration molaire de la solution. Dans le cas d'une solution idéale infiniment diluée on peut écrire:

$$\pi = \frac{C}{M} R T \quad \text{soit} \quad M = \frac{C}{\pi} R T \quad \text{équation 29} \quad (c \text{ est la concentration en } g.l^{-1})$$

Il est donc possible de calculer le poids moléculaire d'un soluté (ou le poids moléculaire moyen d'un mélange) en mesurant Π .

Souvent les valeurs déterminées expérimentalement sont supérieures à celles issues de l'équation 29. En fait Π/c normalement constant et appelé pression osmotique réduite varie en fonction de la concentration. Sa mesure à différentes concentrations permet de construire un graphe Π/c en fonction de c dont l'extrapolation à la valeur de $c = 0$ permet d'accéder à M_m .

Avec les solutions de protéines, l'équilibre de Donnan lié à des transferts de charges complique les phénomènes en modifiant la diffusion des ions au travers de la membrane. Pour le minimiser il est possible de se placer au pH_i , mais alors la solubilité de la protéine est minimale et des agrégats peuvent se former. Par ailleurs l'équilibre n'étant pas instantané, il est fréquent que des agrégats apparaissent au cours de cette phase.

3.2. Sédimentation.

Les ultracentrifugeuses modernes permettent d'atteindre des accélérations supérieures à 500 000 g (la force centrifuge est égale à $F = m \cdot \omega^2 \cdot r$ avec m masse de la substance, ω vitesse angulaire et r rayon de rotation). Dans de tels champs de force les protéines qui ont des densités généralement supérieures à celle de l'eau (1,2 à 1,4) vont sédimenter contre les forces de diffusion qui les maintiennent normalement en solution, forces dépendant entre autre de l'agitation thermique. Les molécules protéiques étant volumineuses, les frottements sont importants et leur diffusion s'opère lentement, les constantes de diffusion des protéines étant une centaine de fois plus faible que celle des ions et des petites molécules organiques. Placées dans un champ gravitationnel intense les protéines se déplacent alors, la **vitesse de sédimentation** étant fonction de nombreux paramètres parmi lesquels on peut citer : la force appliquée, la taille - forme - densité des molécules protéiques, la densité - température - viscosité du solvant (figure 21).

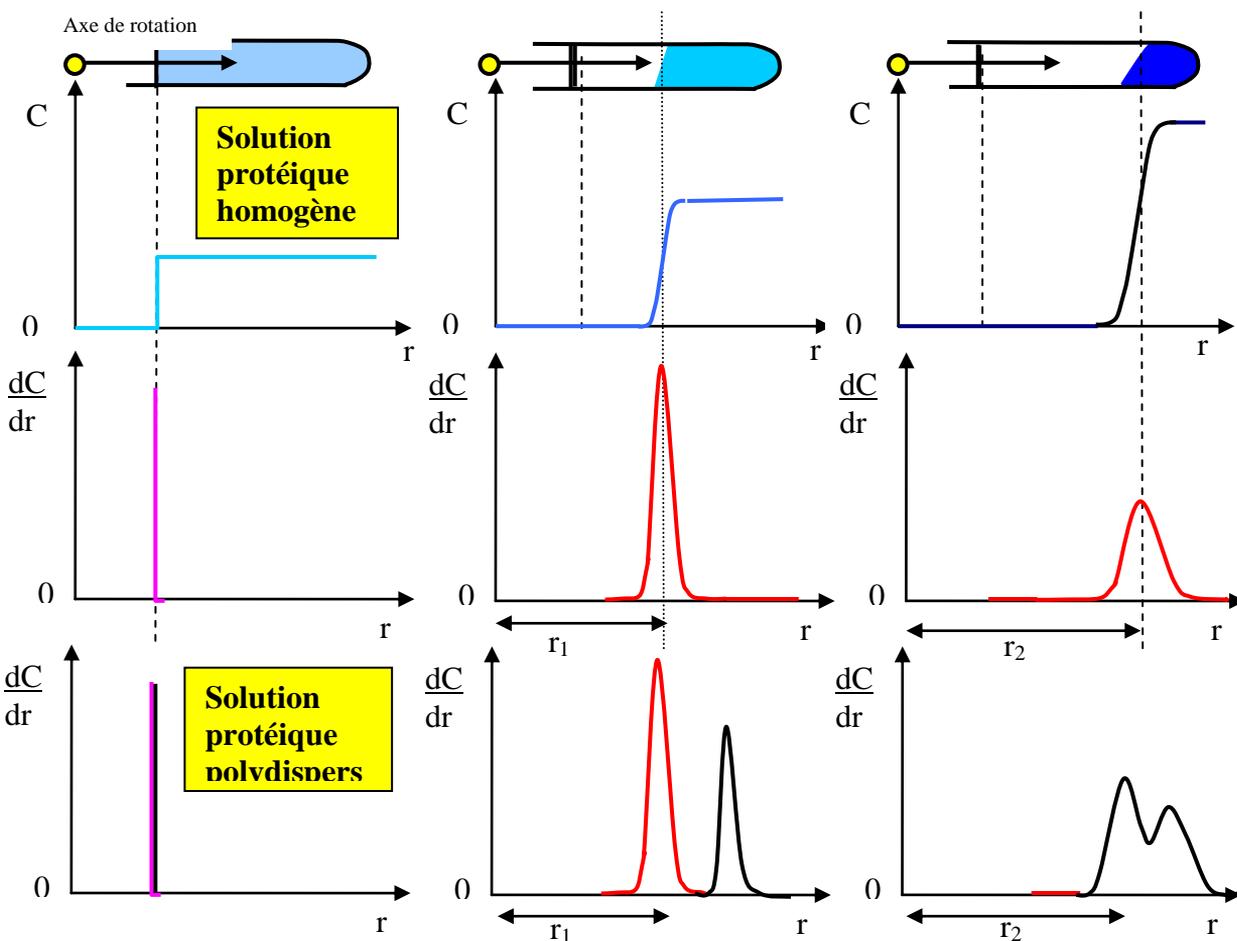


figure 21. Ultracentrifugation d'une solution protéique pure ou d'un mélange.

Svedberg a soumis des molécules protéiques en solution à une ultracentrifugation. Les molécules mises en mouvement sédimenter, le phénomène pouvant être suivi par la mesure des variations

d'indice de réfraction de la solution en fonction de la distance r à l'axe de rotation. Dans le cas d'une solution monodisperse les molécules sédimentent sensiblement avec la même vitesse et il y a formation d'une seule zone dans laquelle la concentration en protéine varie entre 0 et c . Le système optique de mesure permet de suivre le déplacement du pic correspondant aux variations de la dérivée dc / dr . La **vitesse de sédimentation** correspondant à la vitesse de déplacement du pic est égale à :

$$\frac{r_2 - r_1}{t_2 - t_1} \text{ ou } \frac{dr}{dt} \quad \text{équation 30}$$

La **constante de sédimentation** ou **coefficient de sédimentation** s qui représente la vitesse de sédimentation dans un champ unité est égal à :

$$s = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 \cdot r} \quad \text{équation 31} \quad F = m\omega^2 r \quad \text{soit } 1 / \omega^2 r = m / F$$

avec ω : vitesse angulaire en radians par seconde, r distance à l'axe de rotation en cm, t le temps en seconde.

Le coefficient de sédimentation s exprimé en unité Svedberg (= 10^{-13} sec) pour un solvant donné dans des conditions de température données, est une caractéristique d'une protéine. Ce coefficient augmente avec le poids moléculaire mais il ne lui est pas proportionnel car il est influencé par la forme de la particule et les résistances par friction du solvant.

Le calcul du poids moléculaire M requiert la détermination préalable de la constante de diffusion D , de v et de s . La démonstration sera donnée en V.3.4 . On peut écrire :

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s}{D (1 - v \rho)} \quad \text{équation 32}$$

avec R constante des gaz parfaits, T température absolu, s vitesse de sédimentation en unité **Svedberg**, v volume spécifique partiel de la protéine et ρ masse volumique du solvant.

Une méthode de détermination des poids moléculaires plus laborieuse s'effectuant à vitesse moins élevée et ne nécessitant pas la mesure de la constante de diffusion D consiste à trouver les conditions dans lesquelles il y a **équilibre de sédimentation**, la sédimentation compensant la diffusion. Cette méthode n'est applicable qu'à une protéine pure et on peut écrire :

$$M = \frac{2 R \cdot T \cdot \ln \frac{C_2}{C_1}}{\omega^2 (1 - v \cdot \rho) (r_2^2 - r_1^2)} \quad \text{équation 33}$$

dans laquelle C_1 et C_2 sont les concentrations aux distances r_1 et r_2 et ω la vitesse de rotation en radian par seconde. Dans ces conditions le transport du soluté dû à la sédimentation par centrifugation est équilibré par la force de diffusion en retour. La durée de cette méthode longue, l'équilibre étant difficile à atteindre, est améliorable si on effectue des calculs pendant la période où l'équilibre commence à se faire. L'utilisation largement répandue de solutions de densités élevées et proches de celles des protéines (chlorure de césium, saccharose) distribuées en gradient de concentration dans les tubes à centrifuger permet des déterminations relativement rapides des masses molaires. Cette centrifugation en **gradient de densité** est qualifiée de **zonale** quand elle est réalisée dans des tubes préparés au préalable (figure 22).

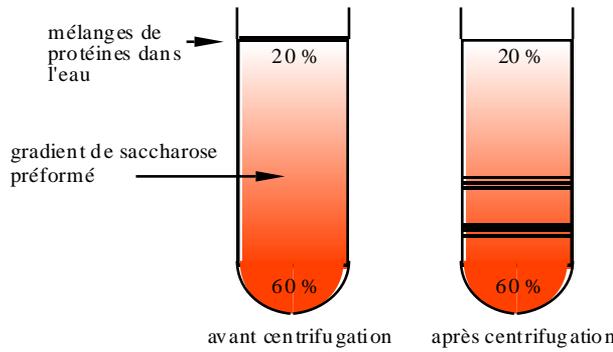


figure 22. Ultracentrifugation en gradient de densité

La centrifugation est arrêtée quand l'équilibre est atteint. La position des bandes protéiques est localisée par des moyens optiques ou par recueil minutieux de fractions du contenu du tube après perçage par sa partie inférieure. Le gradient de densité peut être réalisé en cours de centrifugation : la technique est alors qualifiée d'*isopycnique*.

3.3. Diffusion et coefficient de diffusion.

La diffusion est une conséquence du second principe de la thermodynamique pour lequel tous les processus tendent vers une augmentation d'entropie, c'est à dire de distribution au hasard. La vitesse de diffusion est donnée par la première loi de Fick :

$$\frac{ds}{dt} = - D.A. \frac{dc}{dx} \tag{équation 34}$$

la quantité de soluté ds diffusant à travers la surface A pendant dt est proportionnelle au gradient de concentration dc/dx en ce point. La diffusion s'effectuant vers la zone la moins concentrée, le signe de cette expression est négatif. D , constante de diffusion, s'exprime en $cm^2.sec^{-1}$. D est fonction de la taille, de la forme (il est inversement proportionnel au rayon de la protéine et donc inversement proportionnel à la racine cubique de son poids moléculaire), des résistances de friction dues à la viscosité du solvant.

Le coefficient de diffusion des protéines est déterminé par leur vitesse de migration dans une cellule adaptée (figure 23).

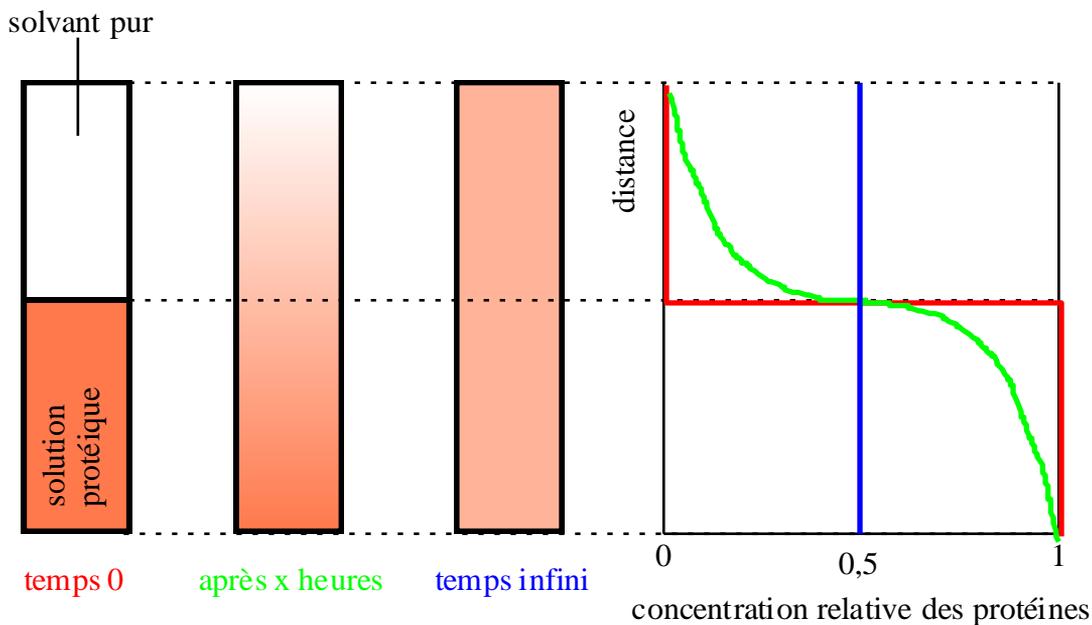


figure 23. Mesure de la diffusion d'une protéine en solution

EINSTEIN a étudié en théorie la diffusion de particules de taille importante et parfaitement sphériques animées de mouvements browniens et a montré que:

$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{f} = \frac{RT}{F} \tag{équation 35}$$

Pour une vitesse de déplacement d'une sphère égale à 1 cm.sec⁻¹ produite par le liquide, f, résistance au déplacement est la force de friction exercée sur une molécule. F est le coefficient de friction molaire et N le nombre d'Avogadro. Par ailleurs la loi de STOCKES donne la résistance au déplacement :

$$f = 6 \zeta \eta r \tag{équation 36}$$

avec η viscosité du liquide et r rayon de la particule sphérique.

Le volume d'une particule sphérique est égal à 4/3 π r³ et celui d'une protéine sphérique à :

volume d'une protéine sphérique : $\frac{M.v}{N}$ d'où $v = \frac{4 \zeta r^3 \cdot N}{3 M}$ et $r = \left(\frac{3 M.v}{4 \zeta \cdot N} \right)^{\frac{1}{3}}$ équation 37.

En combinant les équations 35, 36, 37 on peut écrire :

$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6 \zeta \eta r} = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6 \zeta \eta \sqrt[3]{\frac{3 M.v}{4 \zeta \cdot N}}}$$

équation 38

Les valeurs de D et s pour quelques protéines sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9. Valeurs de D et S pour quelques protéines.

| protéine | Poids moléculaire | coefficient de diffusion D D ₂₀ . 10 ⁷ cm ² s ⁻¹ | coefficient de sédimentation S ₂₀ .10 ¹³ |
|----------------------------|-------------------|---|---|
| cytochrome C | 13370 | 11,4 | 1,17 |
| myoglobine | 16900 | 11,3 | 2,04 |
| chymotrysinogène | 23240 | 9,5 | 2,54 |
| β-lactoglobuline de chèvre | 37100 | 7,48 | 2,85 |
| ovalbumine | 45000 | 7,76 | 3,32 |
| sérum albumine bovine | 68500 | 6,1 | 4,60 |
| hémoglobine humaine | 64500 | 6,9 | 4,46 |
| catalase de foie de cheval | 247500 | 4,1 | 11,3 |
| uréase de fève | 482700 | 3,46 | 18,6 |
| fibrinogène humain | 339700 | 1,98 | 7,63 |
| collagène | 480000 | 0,69 | |
| myosine de morue | 524800 | 1,10 | 6,43 |
| virus de la mosaïque tabac | 40590000 | 0,46 | 198 |

3.4. Calcul du poids moléculaire par sédimentation.

L'équation 37 montre que la seule mesure du coefficient D ne permet pas d'accéder à M, et il faut associer D et s (constante de sédimentation) pour y parvenir.

Une particule de masse M et de volume partiel spécifique v (volume de l'unité de masse) soumise à une force centrifuge dans un milieu de masse volumique ρ a une masse apparente égale à M diminué de la masse de volume de liquide déplacé, soit de M - M.v.ρ = M (1 - v.ρ). Cette particule centrifugée est en fait soumise à une force nette correspondante à :

$$F = M (1 - v.\rho) . \omega^2 r \tag{équation 39}$$

La sédimentation de cette particule est freinée par les frottements avec les molécules de liquide solvant, ces forces étant proportionnelles à la force de friction f et à la vitesse de la particule dr / dt .

Dans ces conditions à chaque instant on peut écrire :

$$M (1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2 r = f \cdot \frac{dr}{dt} \quad \text{équation 40}$$

Apartir de l'équation 35 et pour une mole (N = 1) on a:

$$f = \frac{RT}{D} \text{ ce qui donne } M (1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2 r = \frac{RT}{D} \cdot \frac{dr}{dt} \text{ soit } M = \frac{RT}{M (1 - v \cdot \rho)} \cdot \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r} \quad \text{équation 41}$$

Si on pose

$$s = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r} \quad (\text{équation 31}) \quad \text{on retrouve bien l'équation 32 :} \quad M = \frac{R \cdot T \cdot s}{D (1 - v \rho)}$$

s a la dimension d'un temps (vitesse / accélération) (F = m γ = m ω²r).

Le volume spécifique partiel v est mesuré par picnométrie ou par calcul approximatif à partir de la composition en acides aminés. Sa valeur pour la plupart des protéines est comprise entre 0,7 et 0,75 cm³.g⁻¹ (tableau 10).

tableau 10. Volume spécifique partiel de quelques protéines.

| protéine | v (ml/g) | protéine | v (ml/g) |
|----------------|----------|--------------|----------|
| hémoglobine | 0,750 | myosine | 0,728 |
| ovalbumine | 0,748 | ribonucléase | 0,728 |
| sérum albumine | 0,734 | collagène | 0,695 |
| catalase | 0,730 | lysozyme | 0,688 |

Si on connaît M et s par différentes méthodes, on peut calculer D₀. La comparaison avec la valeur expérimentale de D permet d'estimer la sphéricité de la molécule, donc d'accéder à sa forme ou à son hydratation . Ainsi le rapport D₀ / D = f / f₀ est pour quelques protéines donné dans le tableau 11.

tableau 11. Rapport de friction pour quelques protéines.

| protéine | f / f ₀ | protéine | f / f ₀ |
|------------------|--------------------|--------------|--------------------|
| hémoglobine | 1,14 | myosine | 3,53 |
| ovalbumine | 1,17 | ribonucléase | 1,14 |
| sérum albumine | 1,35 | collagène | 6,8 |
| β-lactoglobuline | 1,25 | fibrinogène | 2,34 |

3.5. La chromatographie d'exclusion.

La **chromatographie d'exclusion**, ou **gel filtration** ou **gel perméation** est fondée sur la "rétention" des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores ; elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores (figure 24).

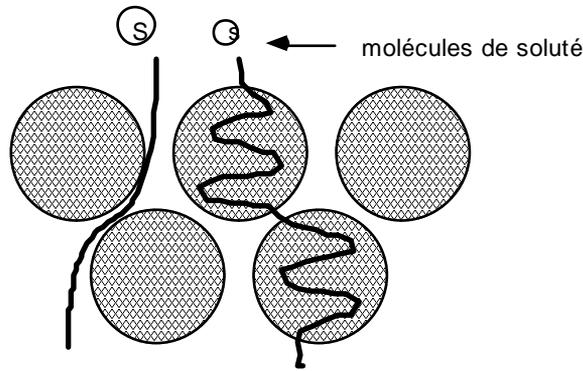


Figure 24. Chromatographie d'exclusion. Schéma de "trajet " d'un soluté de masse molaire élevée (S) et d'un soluté de masse molaire faible (s).

Les grosses molécules sont éluées par un volume V_0 de solvant qui correspond au volume entre les "grains" de la phases stationnaire. Les petites molécules pénètrent dans le réseau du gel et sont éluées par un volume V_t égal au volume total de solvant contenu dans la colonne. La séparation est donc fondée sur la dimension des molécules en solution. Le volume de rétention V_R des molécules X est donné par :

$$V_R = V_0 + K \cdot F \cdot V_i \tag{équation 42}$$

V_0 = volume total de la phase mobile ou volume mort, $V_i = V_t - V_0 - V_{\text{matrice du gel}}$

V_i = volume total de la phase stationnaire.

F est la fraction du volume poreux de la phase stationnaire accessible aux molécules X .

F est compris entre 0 et 1. K coefficient de distribution des molécules X

$K = C_s / C_M$, C_s et C_M étant les concentrations respectives de X dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

Les représentations de V_0 , V_t et $V_t - V_0$ sont schématisées sur la figure 25.

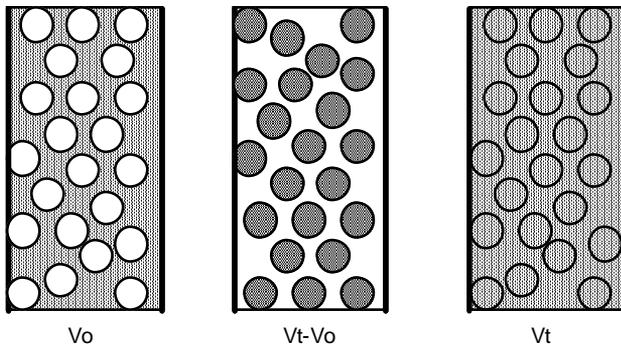


Figure 25. Diagramme représentatif de V_t et V_0

En chromatographie d'exclusion pure K est égal à 1 et on a : $V_R = V_0 + F \cdot V_i$ équation 43

Il y a 2 cas limites importants :

1) $F = 0$ Les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire et on a $V_R = V_0$. Toutes ces molécules émergent ensemble de la colonne après le passage d'un volume de phase mobile égal au volume interstitiel de la colonne.

2) $F = 1$ Tous les pores de la phases stationnaire sont accessibles aux molécules considérées et on a $V_R = V_0 + V_i$.

Entre les deux limites, V_R varie linéairement en fonction de la fraction du volume poreux accessible. Ainsi, à chaque valeur de V_R correspond théoriquement une taille de molécule elle-même proportionnelle à la masse molaire (figure 26).

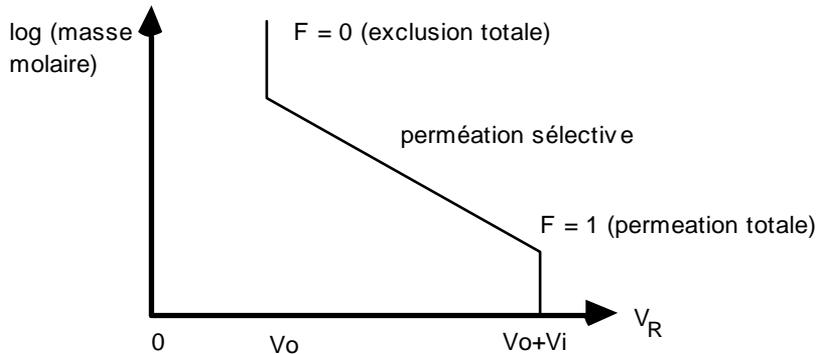


Figure 26 : Relation entre la taille ou la masse molaire et le volume de rétention

Si $V_R > V_t$ cela implique $K > 1$: il se superpose alors un autre mécanisme de rétention (adsorption - échange d'ions). Quand $K = 1$, les isothermes sont des droites et les pics sont des courbes de Gauss parfaites. Tous les constituants du mélange chromatographié sont élués dans un volume inférieur à V_t .

$$V_R = V_0 + F V_i \text{ donc}$$

$$F = \frac{V_R - V_0}{V_i} \text{ avec } V_i = V_t - V_0 - V_{\text{matrice du gel}}$$

En pratique on remplace V_i par $V_t - V_0$; on obtient alors :

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0} \tag{équation 44}$$

K_{av} est la fraction du volume du gel stationnaire accessible (available) où diffuse une molécule donnée.

Pour des composés de densité et de forme moléculaire identiques, il existe une relation sigmoïdale entre les valeurs de leur K_{av} et le logarithme de leur masse molaire. Ces courbes présentent dans une partie importante, une relation linéaire entre K_{av} et $\log MM$ (figure 27) ; cette relation est du type :

$$K_{av} = A \log (\eta \cdot M) + B$$

équation 45

avec A et B sont des constantes η viscosité intrinsèque (ml.g⁻¹).

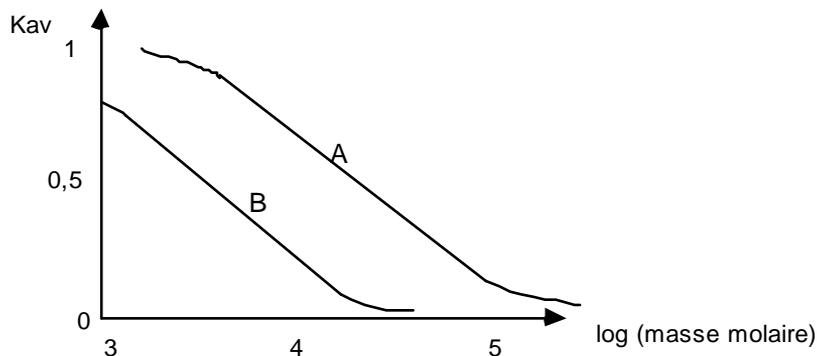


Figure 27. Variation du K_{av} en fonction du logarithme de la masse molaire
 A gel à "grande" taille" de pores, faible réticulation
 B gel à "moyenne" taille de pores, réticulation plus élevée.

Cette méthode est rapide et ne nécessite pas une purification poussée. Il faut néanmoins éviter les oxydations des résidus de cystéine en se plaçant en milieu réducteur ou en "protégeant" les fonctions

thiol. Certaines protéines donnant des interactions avec la matrice ou des protéines complexes complexées

Différents types de gel existent actuellement :

on distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seul ce dernier peut être utilisé avec des vitesses de phase mobile élevées (FPLC par ex.).

a) Gels mous : ce sont des polymères à faible taux de pontage pour lesquels le gonflement est important. Il s'agit le plus souvent de dextrane rendu insoluble dans l'eau par réaction à l'épichlorhydrine. La résistance mécanique augmente avec le taux de réticulation tandis que le diamètre des pores diminue. Il existe des gels dont le polymère est du polyacrylamide et des gels mixtes composés d'acrylamide et de dextrans. L'agent de pontage est le N-N'-méthylène bisacrylamide. L'alcoylation des polymères de dextrane conduit à des gels stables en présence de solvants organiques ce qui permet le fractionnement des substances insolubles dans l'eau (LH). Ces gels sont vendus sous forme de grains secs et doivent être mis à gonfler avant utilisation dans une colonne.

b) Gels semi-rigides

- polystyrène . Ce type de gel possède des propriétés remarquables et ne gonfle pratiquement pas. Il peut être utilisé dans la plupart des solvants sauf : l'eau, les alcools, l'acétone, l'acide formique. Il est utilisable en haute pression.
- gel d'acétate de polyvinyle.
- gels mixtes (dextrane-acrylamide) à taux de réticulation élevé.

c) Gels rigides : ils sont constitués par des silices poreuses ou des verres poreux. Les colonnes HPLC du type TSK (FPLC : fast protein liquid chromatography) correspondent à des phases stationnaires de ce type poreuses, mais résistantes aux déformations mécaniques et donc utilisables sous des débits et pression élevés. Les analyses demandent alors une dizaine de minutes.

3.6. L'électrophorèse.

C'est TISELIUS qui le premier, en 1937, réalisa la première électrophorèse en veine libre. Il est ainsi possible de réaliser la séparation de protéines globulaires en fonction de leurs vitesses de migration dans un champ électrique (figure 28).

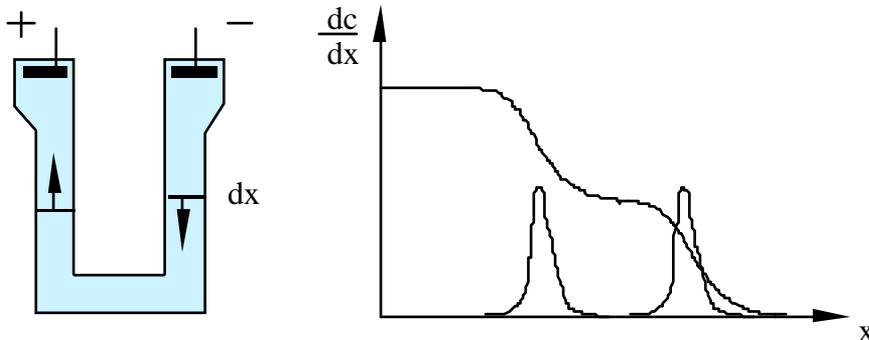


figure 28. Chromatographie en veine liquide

La cellule réalisée en tube de quartz contient la solution de protéine en milieu tamponné dans lequel plongent les électrodes. Les protéines chargées négativement par exemple migrent vers la cathode et le front de migration est détecté par mesure des variations de l'indice de réfraction. La mobilité électrique U de la protéine est égale au rapport de sa vitesse de migration sur l'intensité du champ électrique appliqué.

$$U = \frac{V}{E}$$

U en cm²/volt.s

équation 46

Pour les protéines U est compris entre 10⁻¹ et 10⁻⁴ cm² / volt.s et pour la plupart des ions entre 5 et 10. Un mélange de protéines de mobilités électrophorétiques différentes engendrera plusieurs fronts. Cette méthode difficile à utiliser est largement supplantée par les méthodes sur support (papier, acétate de cellulose, gels d'amidon ou de polyacrylamide) dans lesquelles le déplacement de la molécule est freiné par les forces de friction proportionnellement à sa vitesse, son rayon et à la viscosité du milieu. Il est possible de contrôler ce coefficient en maîtrisant sa porosité.

Dans le cas des **gels de polyacrylamide** formés par copolymérisation d'acrylamide (monomère) et de N,N'-méthylène bisacrylamide (agent de pontage ou de réticulation) on définit deux indices T (%) et (C%) qui caractérisent la densité ou la réticulation du gel.

$$T (\%) = \frac{\text{g acrylamide} + \text{g bisacrylamide}}{\text{volume (ml)}} \cdot 100 \quad \text{et} \quad C (\%) = \frac{\text{g bisacrylamide}}{\text{g acrylamide} + \text{g bisacrylamide}} \cdot 100$$

équations 47

Les facteurs gouvernant la porosité sont complexes, l'augmentation du pourcentage de bisacrylamide (ou agent de réticulation) contribuant à sa diminution jusqu'à 5% puis cette porosité augmente avec le pourcentage de bisacrylamide (figure 29).

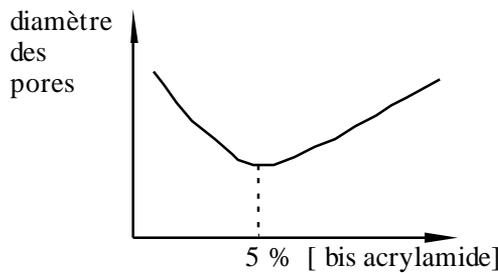


figure 29. Variation de la porosité d'un gel de polyacrylamide en fonction de [bisacrylamide]

La structure chimique d'un gel de polyacrylamide est schématisée sur la figure 30.

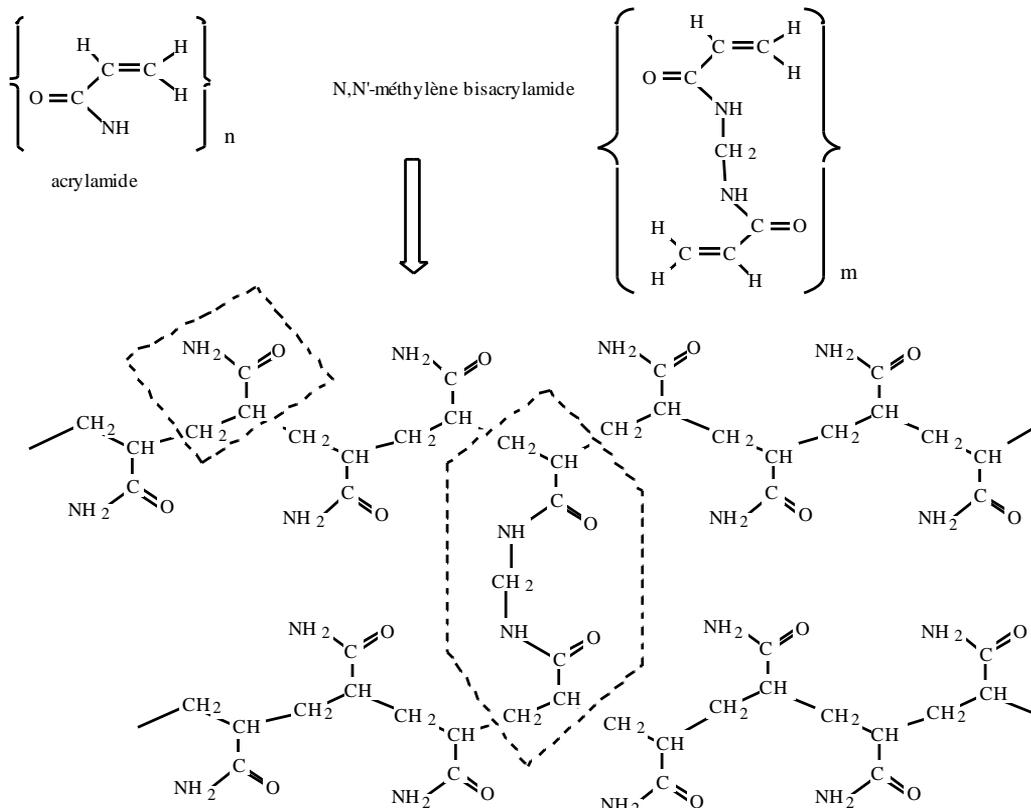


figure 30. Structure chimique d'un gel d'acrylamide.

La loi empirique de FERGUSON relie U à T :

$$\ln U = - K_R \cdot T + \ln U_0$$

équation 48

U_0 correspond à la mobilité pour $T = 0$ soit pour une électrophorèse en veine liquide. K_R est un coefficient de retard proportionnel au rayon de Stokes. La mobilité est souvent exprimée par le R_f qui est défini par :

$$R_f = \frac{\text{distance de migration de la protéine}}{\text{longueur du gel avant coloration}} \times \frac{\text{longueur du gel après coloration}}{\text{distance de migration du colorant}}$$

équation 49

La loi de FERGUSON devient alors :

$$\ln R_f = - K_R \cdot T + \ln R_{f0}$$

équation 50

Il est possible de séparer des protéines de mêmes masses moléculaires et de charges différentes comme les iso-enzymes (figure 31,a) ou des protéines de masses moléculaires différentes mais de charge identique pour lesquelles R_{f0} est le même (figure 31b).

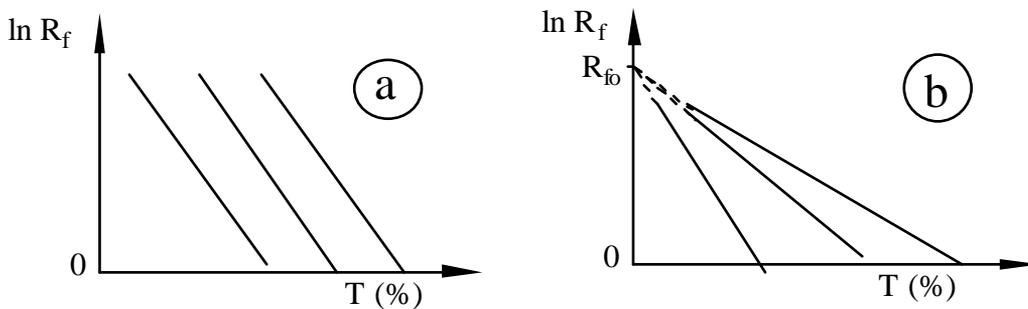


figure 31. Variations de la mobilité électrophorétique en fonction des protéines

L'électrophorèse en milieu dénaturant.

Pour déterminer les poids moléculaires par électrophorèse c'est la méthode **SDS-PAGE** (Sodium Dodécyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) qui est la plus largement utilisée. Cette méthode s'affranchit des variations de mobilité liées à la charge et passe d'abord par un traitement de l'échantillon à chaud en présence de β -mercaptoéthanol et de SDS. Au cours de ce traitement, les ponts disulfure sont réduits et les protéines dénaturées chargées négativement par le SDS. Le SDS (détergent de structure $CH_3 - (CH_2)_{11} - O-SO_3^-$) donne des interactions hydrophobes avec les protéines qui en fixent en moyenne 1,4 g / g (cette valeur est fonction de la température, de l'état réduit ou non, de la force ionique). La protéine devient alors un polyanion étiré dont la longueur est proportionnelle à sa masse moléculaire. Par dichroïsme circulaire il a été montré que des zones en α hélice existent encore dans la protéine traitée.

Dans ces conditions la mobilité électrophorétique est alors proportionnelle à la masse moléculaire de la protéine quand le rapport charge / masse est le même et que leur forme sont identiques.

Deux principales approches sont ainsi utilisables pour déterminer la masse moléculaire:

- gel d'acrylamide simple: reporter le R_f en fonction du $\log M$ (figure 33a).
- gel en gradient de polyacrylamide: reporter le $\log(\%T)$ en fonction du $\log M$.

Leur séparation sous l'effet d'un champ électrique (tube ou plaque) est suivie d'une fixation-coloration (au noir amide ou au bleu de Coomassie par exemple en milieu méthanol/acide

acétique/eau) puis d’une décoloration. La mesure densitométrique des bandes colorées permet de déterminer leur R_f .

Dans l’électrophorèse “**simple**” un marqueur de mobilité élevée (colorant comme le bleu de bromophénol) est utilisé pour maîtriser la migration qui est stoppée quand ce colorant atteint la limite du gel (figure 33a).

Dans l’électrophorèse en **gradient de densité**, la migration s’arrête quand la protéine chargée atteint une valeur de T pour laquelle la vitesse de migration est égale à 0 (figure 33b). Il n’est alors pas utile de contrôler le temps de migration et les bandes ont tendance à se re-concentrer à la valeur de T correspondante à $U = 0$ ce qui rend plus facile et plus précise la mesure de R_f (figure 32).

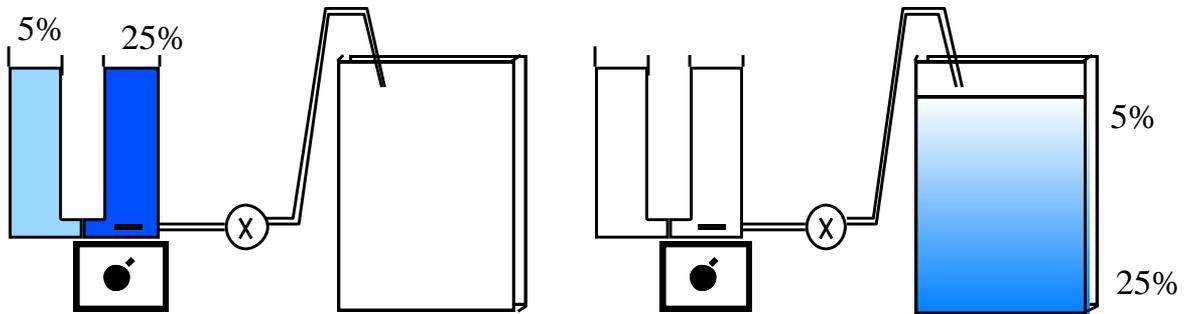


figure 32. Schéma de préparation de gel en gradient de densité en plaque .

Pour tenir compte des nombreux paramètres mal contrôlés de la migration, une comparaison avec une courbe d’étalonnage obtenue avec des protéines de masses moléculaires connues est toujours réalisée. Il est alors possible de déterminer la masse moléculaire des protéines analysées (figure 33).

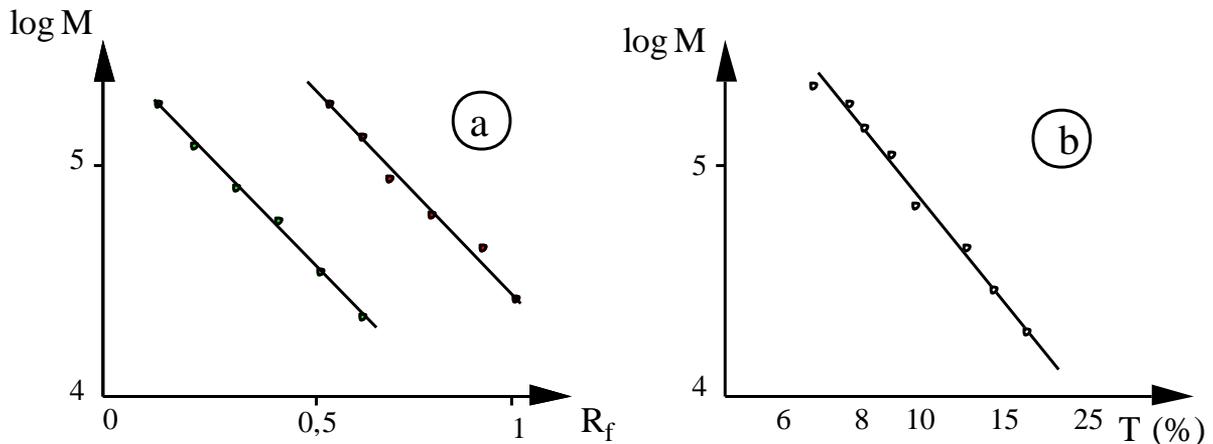


figure 33. Détermination de la masse moléculaire en électrophorèse en gel de polyacrylamide
a : pour deux valeurs de T

3.7. Autres méthodes de détermination des masses moléculaires.

3.7.1. Diffraction de la lumière.

Quand la lumière traverse une solution protéique, elle est diffractée dans toutes les directions et l’intensité de la lumière transmise I est inférieure à l’intensité de la lumière incidente I_0 . Si la lumière incidente est monochromatique, la presque totalité de lumière diffractée a la même longueur d’onde (diffraction Rayleigh). Seule une petite partie a des longueurs d’onde différentes par suite de l’énergie communiquée aux molécules (vibration et rotation surtout), on parle alors d’effet Raman.

Quand la lumière passe dans la solution protéique, son trajet est bien visible à cause de la diffraction (effet Tyndall).

La fraction de lumière diffractée augmente avec la taille et le nombre des molécules protéiques. On peut définir la diffraction par τ ou turbidité :

$$I = I_0 \cdot e^{-\tau l} \quad \text{équation 51}$$

I et I_0 sont les intensités des lumières incidentes et transmises, l la longueur du trajet optique.

Il a été démontré que τ est reliée au poids moléculaire par la relation :

$$\tau = \frac{32 \xi^3 \cdot n_0^2 \left(\frac{n - n_0}{c}\right)^2}{3 \lambda^4 \cdot N} \cdot c M \quad \text{équation 52}$$

soit $\tau = K \cdot c \cdot M$ équation 53

avec M poids moléculaire, λ la longueur d'onde, n et n_0 les indices de réfraction de la solution et du solvant, c la concentration de la protéine et N nombre d'Avogadro. Cette équation est applicable quand la protéine a des dimensions inférieures d'environ 20 fois ou plus de la longueur d'onde incidente. Il est possible par un choix judicieux de la longueur d'onde et de l'angle de mesure d'avoir des informations sur les dimensions de la protéine (ellipsoïde, sphère, etc.).

3.7.2. Viscosité.

Il s'agit d'une méthode de détermination du poids moléculaire surtout empirique. La valeur trouvée est notée M_v qui se rapproche beaucoup plus de M_p que de M_n (équations 26 et 27). La mesure est réalisable soit par la méthode du flux capillaire qui est basée sur la loi de Poiseuille (mesure de la vitesse d'écoulement dans un tube capillaire sous une pression donnée : viscosimètre d'Ostwald) soit par la méthode du flux concentrique (viscosimètre à deux cylindres coaxiaux).

La viscosité spécifique η_{sp} est définie par :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_r - 1 \quad \text{équation 54}$$

avec η viscosité de la solution protéique et η_0 viscosité de l'eau.

Pour des particules sphériques et des solutions très diluées, EINSTEIN donne l'équation :

$$\eta_r = 1 + 2,5 \phi \quad \text{équation 55}$$

dans laquelle ϕ est la fraction volumique de la protéine, c'est à dire le rapport du volume occupé par les molécules protéiques et du volume total. Avec n molécules de volume v dans un volume total V , ϕ sera égal à $n \cdot v / V$. Si n est connu on peut calculer le volume occupé par chaque molécule, donc son degré d'hydratation.

STANDINGER propose une loi permettant d'évaluer M à partir de η_{sp} :

$$M = \frac{\eta_{sp}}{c \cdot K_m} \quad \text{équation 56}$$

dans laquelle K_m est une constante caractéristique de la protéine et c la concentration.

VI - CONFORMATION DES PROTEINES

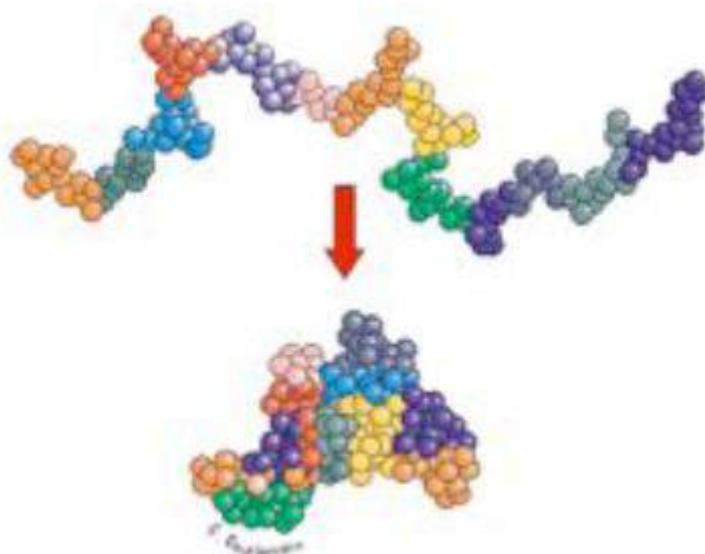
La structure primaire d'une protéine correspondant à la séquence d'enchaînement de ses acides aminés, qualifiés alors de **résidus** d'acides aminés, est déterminée par des méthodes classiques de biochimie. Ces méthodes, décrites pour les peptides, ne seront pas reprises ici (cf chapitre III). La structure primaire ne permet pas (ou peu) d'accéder à la forme de la molécule dans l'espace, forme souvent nécessaire à l'activité de la molécule. La chaîne polypeptidique adopte une structure spatiale ou conformation qui est unique et constante pour une protéine donnée. Les structures secondaires, tertiaires et quaternaires permettent de définir la conformation.

Les **structures secondaires** sont les formes que prennent des parties de la chaîne polypeptidique dans l'espace selon un axe principal à la suite d'interactions entre résidus d'acides aminés proches dans la séquence.

La **structure tertiaire**, caractéristique unique à chaque protéine, correspond à l'organisation spatiale de l'ensemble de la molécule et résulte d'interactions entre résidus d'acides aminés éloignés ou entre des zones déjà organisées en structures secondaires.

La **structure quaternaire** résulte d'associations de molécules protéiques identiques ou différentes (monomères) par des liaisons hydrogène, hydrophobes, ioniques ou par pont disulfure conduisant à un édifice oligomérique complexe (submicelles de caséine par exemple).

De par la structure et les propriétés de la liaison peptidique décrites dans le chapitre III, un nombre infini de conformations, en particulier sous l'effet de l'agitation thermique, pourrait être attendu par suite de la rotation autour des angles ϕ et ψ . En réalité les protéines adoptent, dans des conditions environnantes bien définies et souvent étroites (pH, force ionique, température), une seule et unique conformation. Cette conformation généralement obtenue dans les conditions de la biosynthèse est qualifiée de **conformation native**. La chaîne en se repliant (repliement) adopte une structure unique.



Du fait de sa structure, la liaison peptidique est à même de donner des liaisons hydrogène avec d'autres liaisons peptidiques (figure 34). La structure secondaire qui en résulte n'a d'existence que si les plans ne s'écartent pas de plus de 30° , la distance entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène d'un groupe amide interdisant alors l'établissement d'une liaison hydrogène.

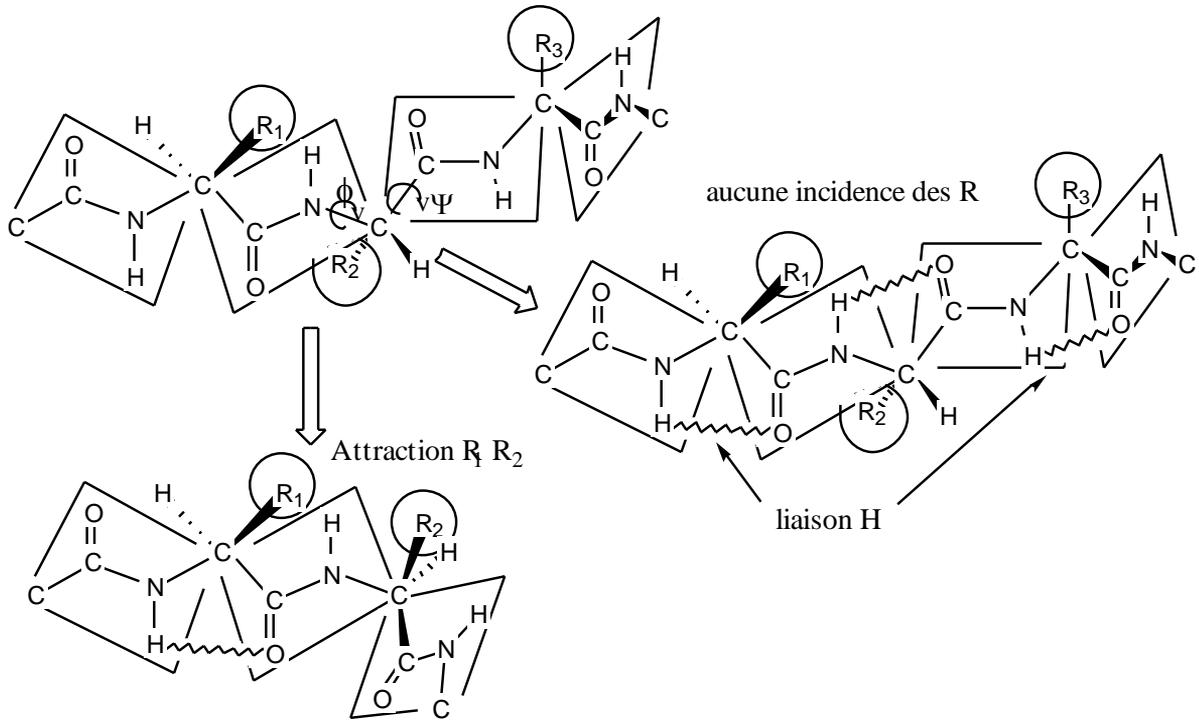


figure 34. Structure secondaire des protéines.

La seule variable dans cette structure est apportée par la chaîne latérale des résidus d’acides aminés. Le “volume”, ou encombrement stérique, de cette chaîne latérale associé à ses propriétés chimiques (présence de groupements polaires ionisables ou non, de groupements apolaires etc) conditionne les angles ϕ et ψ , ce qui conduit à des structures secondaires puis tertiaires bien définies.

S’il n’existe qu’une forme générale bien définie au niveau d’une protéine donnée, cela résulte des conditions de sa synthèse séquentielle. Il ne faut pas cependant perdre de vue que ce sont des modifications légères de conformation qui sont à l’origine de la plupart des propriétés des protéines (contractiles, enzymatiques, etc.) et que ce sont des modifications plus ou moins importantes de cette structure (**dynamique des protéines**) qui conditionnent beaucoup des propriétés de nos protéines alimentaires (texturation, tendreté, émulsification, formation de mousse etc.).

In vivo, cette synthèse commence par l’acide aminé N-terminal, le “sens” de biosynthèse de ces polypeptides étant donc \rightarrow -CO \rightarrow NH- au niveau des ribosomes. Sur un plan conceptuel cette biosynthèse peut se schématiser de la façon suivante (figure 35).

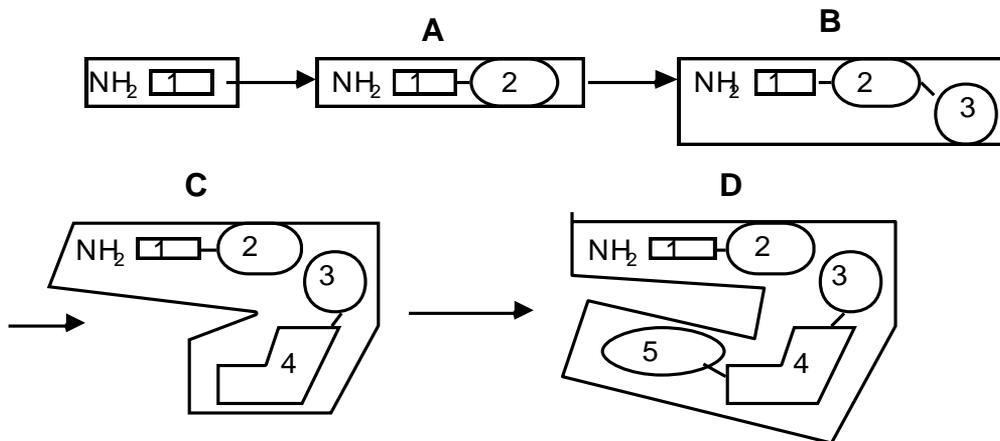
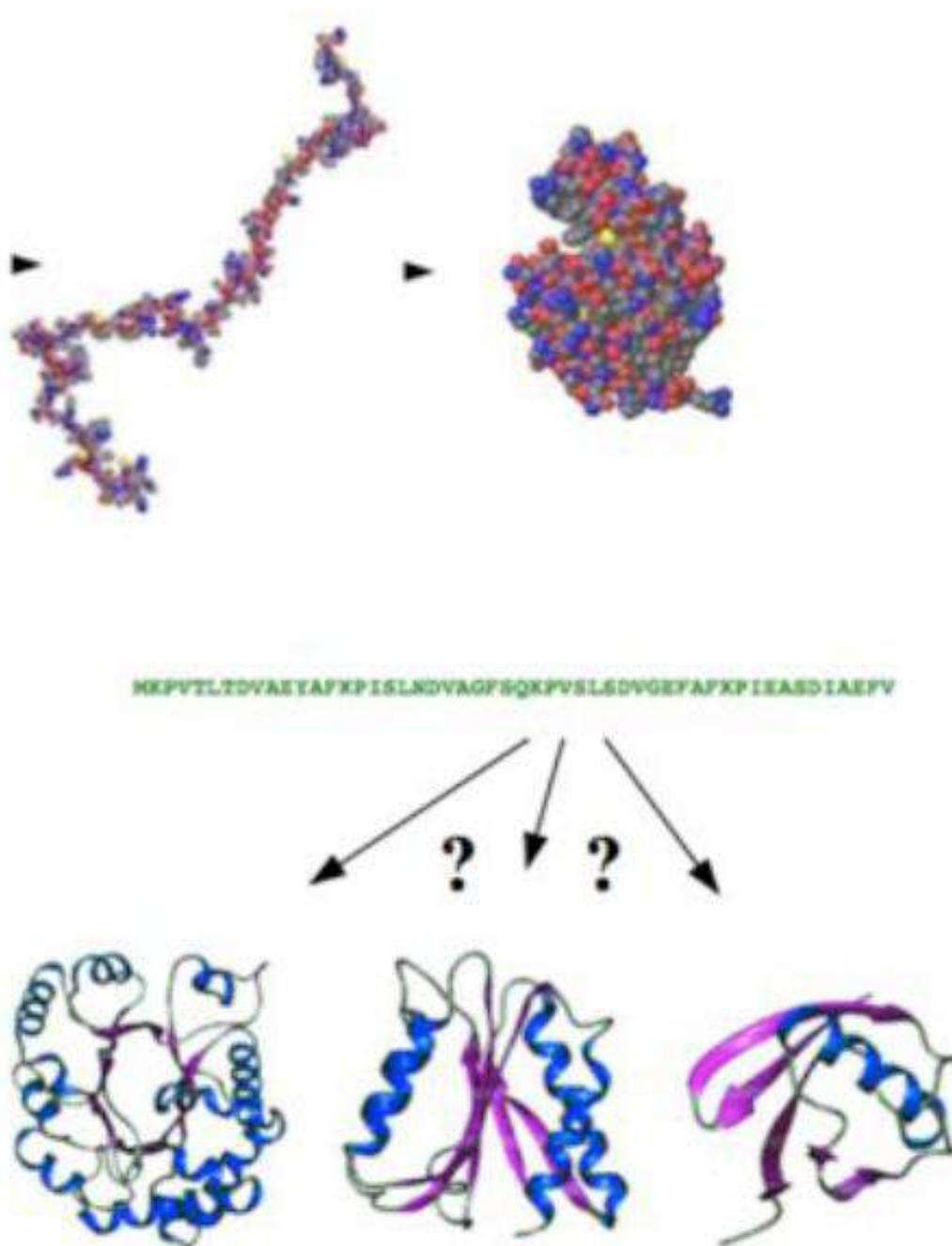


figure 35. Schéma de la synthèse séquentielle “structurée” d’une protéine

Dans ce schéma le premier acide aminé impliqué dans la synthèse (N terminal) s’associe à l’acide aminé n° 2 et la conformation du dipeptide dépend des propriétés des chaînes latérales de 1 et 2. Quand le troisième acide aminé s’associe au dipeptide, la position de sa chaîne latérale dépendra beaucoup du n°2 mais aussi du dipeptide 1-2 dans son ensemble et ainsi de suite.

Quand le nombre d’acides aminés engagés est élevé (polypeptide), la rotation permise au niveau des C α peut alors laisser des interactions se produire entre chaînes latérales éloignées. Sur un plan thermodynamique, c’est le système le plus stable en milieu aqueux aux température, pH et force ionique du milieu de la synthèse qui correspondra alors à la forme native.

Le **repliement des protéines** est un phénomène très complexe qui fait aujourd’hui l’objet de très nombreux travaux de recherche.



Pendant longtemps on a pensé que les protéines accédaient à une structure spatiale précise du seul fait de l’environnement et de leur structure propre. Or, toutes conditions étant égales par ailleurs, il s’avère parfois que plusieurs structures tridimensionnelles sont thermodynamiquement et stériquement possibles. C’est la découverte de **protéines chaperons** qui permet de comprendre alors l’unicité de la structure tridimensionnelle d’une protéine donnée.

La découverte des protéines chaperons est liée à celle des protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP) et plus généralement à celle des protéines de stress (modification de la force ionique, du pH, addition de solvants etc). Ainsi les HSP 60 et 70 d’*Escherichia coli* ou l’HSC de stress (heat shock cognate) sont capables de se fixer de façon réversible aux protéines en empêchant leur dépliement sous l’effet de modifications du milieu ou encore en empêchant que les protéines “stressées” n’interragissent entre elles avec formation d’agrégats souvent irréversibles.

Une protéine chaperon en se fixant réversiblement sur une protéine donnée n’autorise pas cette dernière à adopter une conformation “inactive” ou à interagir avec d’autres protéines. D’autres protéines chaperons ne permettent, par leur fixation, qu’une conformation sur toutes celles qui sont thermodynamiquement et stériquement permises. Les protéines chaperons de classe I (comme l’HSP 70, l’HSC 70) reconnaissent de courtes zones hydrophobes constituées d’environ 7 à 10 résidus d’acides aminés.

Ces protéines rendent possible le passage au travers des membranes cellulaires (mitochondriales, réticulum endoplasmique) sous une forme qui est obligatoirement dépliée. Après franchissement de la membrane, la suppression de leurs interactions avec la protéines chaperonnée permet alors à cette dernière d’adopter sa conformation (figure 36).

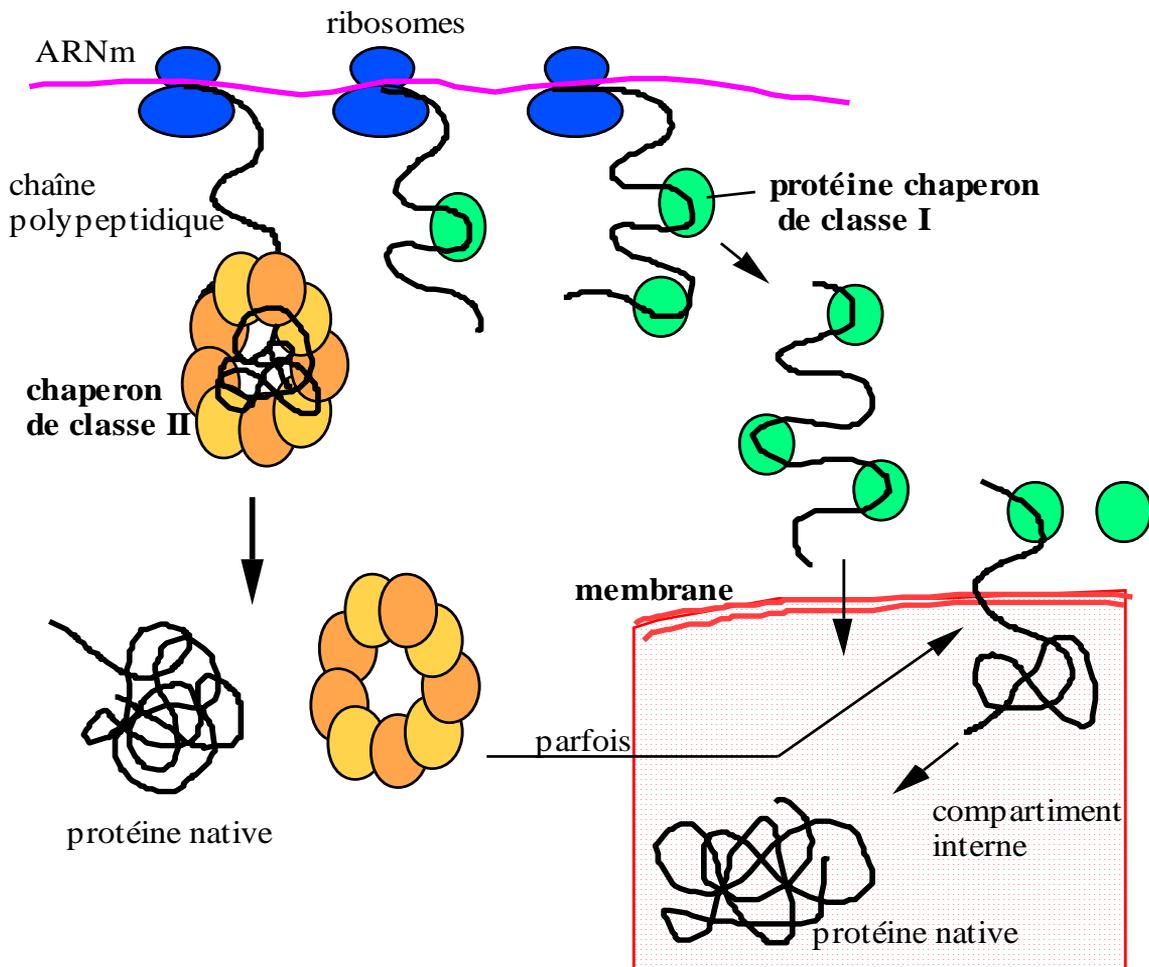
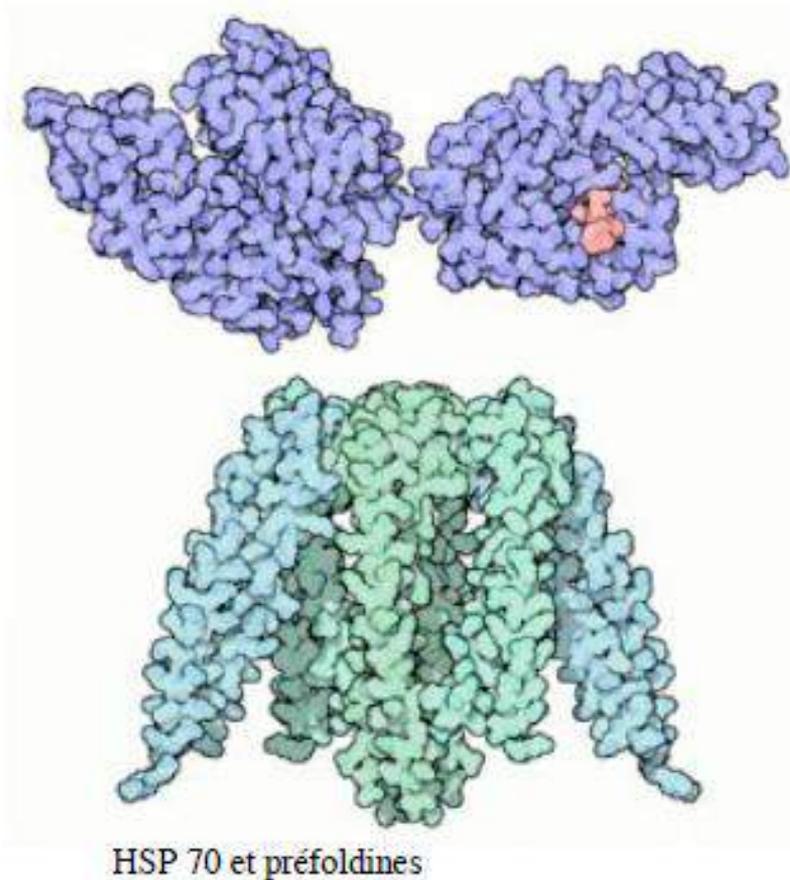
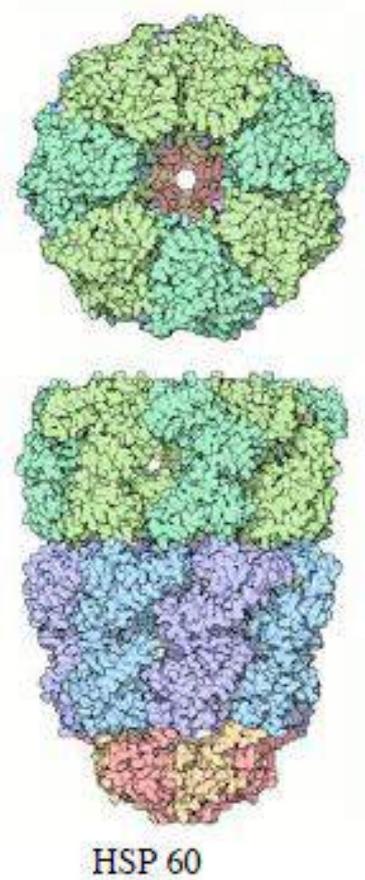


figure 36. Conformation des protéines et protéines chaperons.



HSP 70 et préfoldines



HSP 60

Les protéines chaperons de classe II qui assurent le repliement des protéines (**chaperonines** comme Gro E2 , Gro ES chez *Escherichia coli* , TCP1 chez les mammifères). Ce sont surtout par des contraintes stériques que ces protéines assistent le repliement. L'hydrolyse d'ATP apporte l'énergie nécessaire à la protéine chaperon.

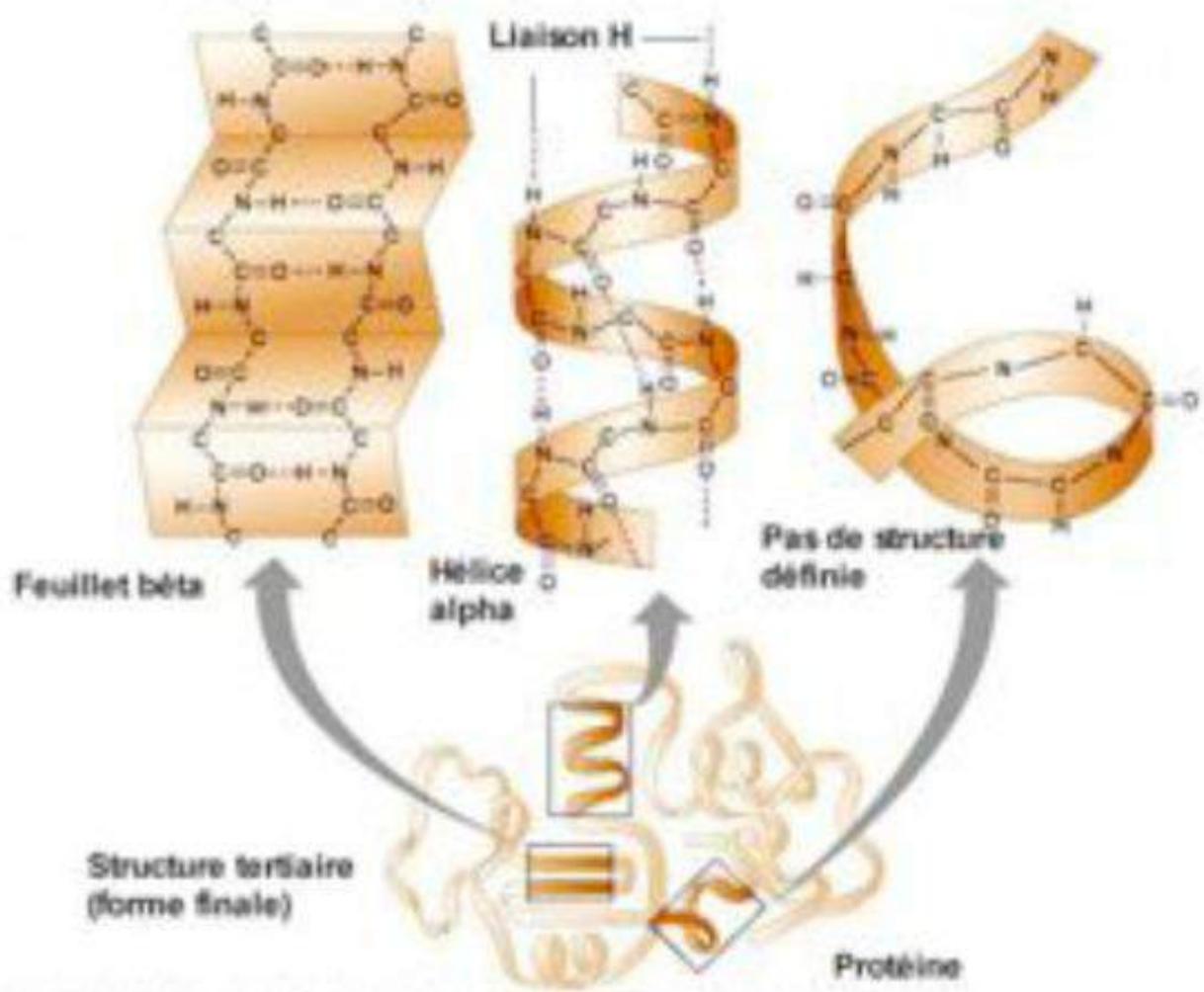
La Proteinaceous infectious particles (**PRION**) isolée en 1982 par PRUSINER résulte d'une transition $\alpha \rightarrow \beta$ intervenant au niveau de la protéine intraneuronale cérébrale PrPc (253 résidus d'acides aminés). La protéine 4 α devient 2 α - 2 β . Elle s'accumule dans le cytoplasme neuronal en un gel spongieux : encéphalite spongiforme bovine (ESB) et maladie de Creutzfeldt Jacob chez l'humain.

1. Principales structures spatiales des protéines.

C'est par la connaissance de la structure de la liaison peptidique et par diffraction aux rayons X de quelques protéines cristallisées, que PAULING et COREY ont conclu, en 1951, à l'existence dans la structure spatiale de deux principaux types d'organisation au niveau des structures secondaires : l'hélice α et le feuillet β .

1.1. Structures secondaires.

Il s'agit de structures rencontrées avec des fréquences très variables dans la plupart des protéines. Schématiquement il s'agit de structures organisées selon un axe principal.



1.1.1. L'hélice α .

L'hélice α est une structure stable qui possède 3,6 résidus d'acide aminés L par tour, les chaînes latérales se plaçant à l'extérieur de l'hélice dont le pas est de 54 nm (figure 37). Deux liaisons hydrogène successives entre les H de la fonction NH et l'O de la fonction C = O de la liaison peptidique dans la structure délimitent 13 atomes : **l'hélice α est donc une hélice 3,6₁₃**. Tous les carbonyles sont orientés presque parallèlement à l'axe vers l'aval de la séquence, les H-N sont orientés vers l'amont ; il en résulte la formation de liaisons hydrogène pratiquement dans l'axe, ce qui génère une structure compacte et "solide". Les dipôles de la liaison peptidiques sont orientés dans le même sens ce qui contribue également à la stabilisation de cette structure. Cette structure implique généralement de 10 à 14 résidus et est souvent schématisée par un cylindre. De par sa "densité", l'hélice α n'engendre pas de liaisons avec d'autres molécules (eau par exemple) et donc sa solubilité ou

sa dissociation dans l'eau est faible. C'est cette structure qui est dominante dans de nombreuses protéines de structure plus ou moins fibreuse.

Par contre, sa déstabilisation par chauffage en milieu aqueux, induisant le "débobinage" ou dépliement, conduit à des polypeptides généralement solubles.

La proline, en raison de sa structure pyrrolinique, ne s'intègre pas dans cette hélice ce qui rend sa formation impossible.

Il en est de même avec des acides aminés dont les chaînes latérales possèdent une charge ou un volume incompatible avec cette structure secondaire.

* Ainsi la polylysine et le polyacide glutamique ne donnent une hélice α que pour des pH où le groupement ionisable de la chaîne latérale n'est pas chargé (pH > 11 pour la lysine et pH < 4 pour l'acide glutamique). Dans ces cas c'est la répulsion électrostatique des chaînes latérales qui rend impossible la formation de l'hélice α , la chaîne polypeptidique prenant une structure en pelote statistique pour laquelle les groupes chargés sont éloignés au maximum et l'énergie libre électrostatique répulsive minimale.

* Avec la polyisoleucine, c'est l'encombrement stérique de la chaîne latérale qui inhibe la formation de l'hélice.

A côté de ces principales conformations, il existe d'autres structures secondaires telles que les hélices **310**, **M**, **α** , **polyproline I** ou **II**. Dans le collagène c'est la structure polyproline II qui est dominante. Cette protéine du tissu conjonctif (peau, tendon, os) est la plus abondante chez les animaux. En milieu aqueux, sous l'action de la chaleur elle se transforme en gélatine.

Les acides aminés sont classables en fonction de leur aptitude à former ou à rompre l'hélice α (chapitre II, tableau 2).

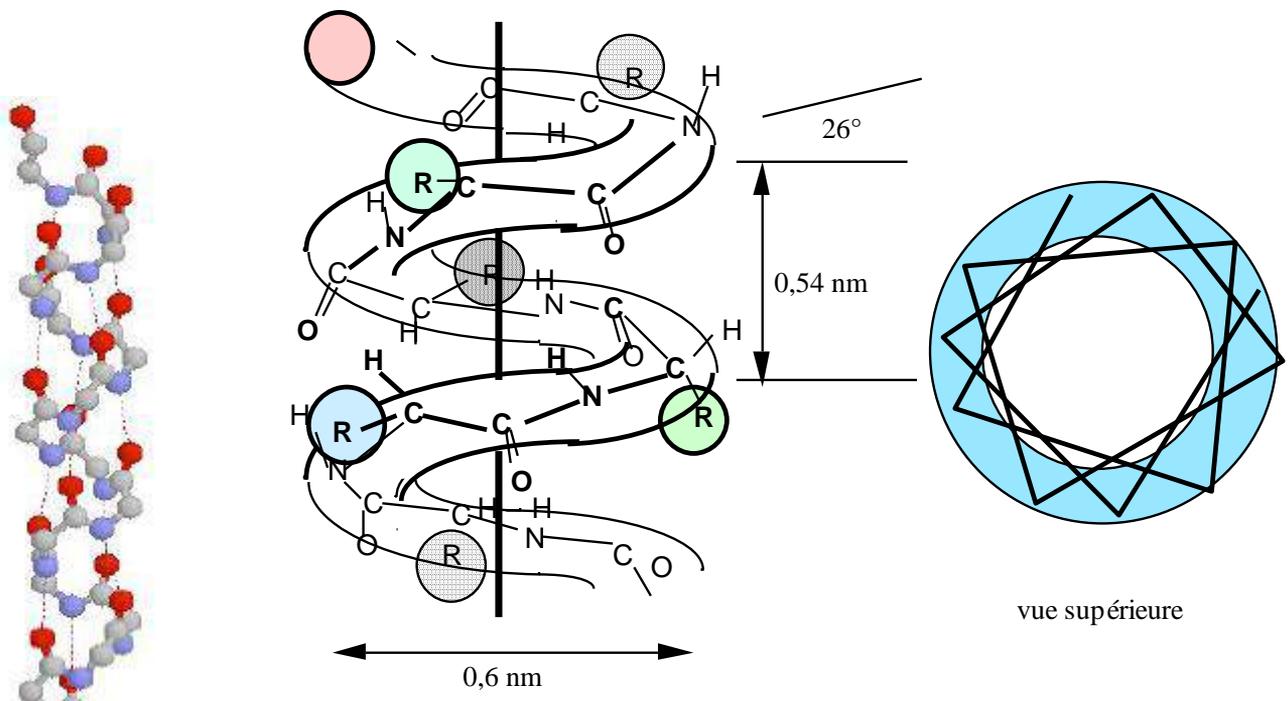


figure 37. Schéma d'une hélice α avec pas à droite

1.1.2. Les feuillets β .

Les **feuillets β** (feuillets plissés) correspondent à une structure en zig zag étirée. Souvent la destruction de liaisons hydrogène d'une hélice α par la chaleur en milieu aqueux conduit à la formation de feuillets. Les chaînes parallèles ou antiparallèles (2, 3 ou quelquefois 4) sont liées par des liaisons hydrogène (figure 38) qui peuvent être détruites par chauffage en milieu aqueux.

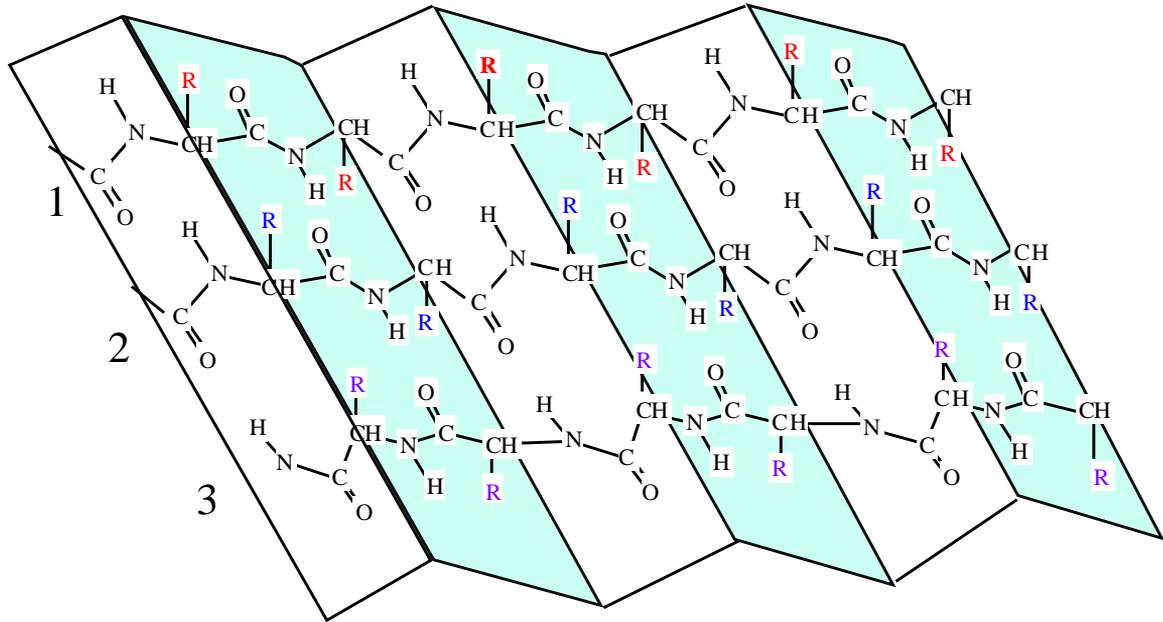


figure 38. Structure en feuillets plissés β parallèles (1 et 2) et antiparallèles (2 et 3)

Cette structure se retrouve par exemple avec des protéines fibreuses (fibroïne de la soie). Les feuillets β prédits également par Pauling ne sont pas plats mais vrillés (figure 39).

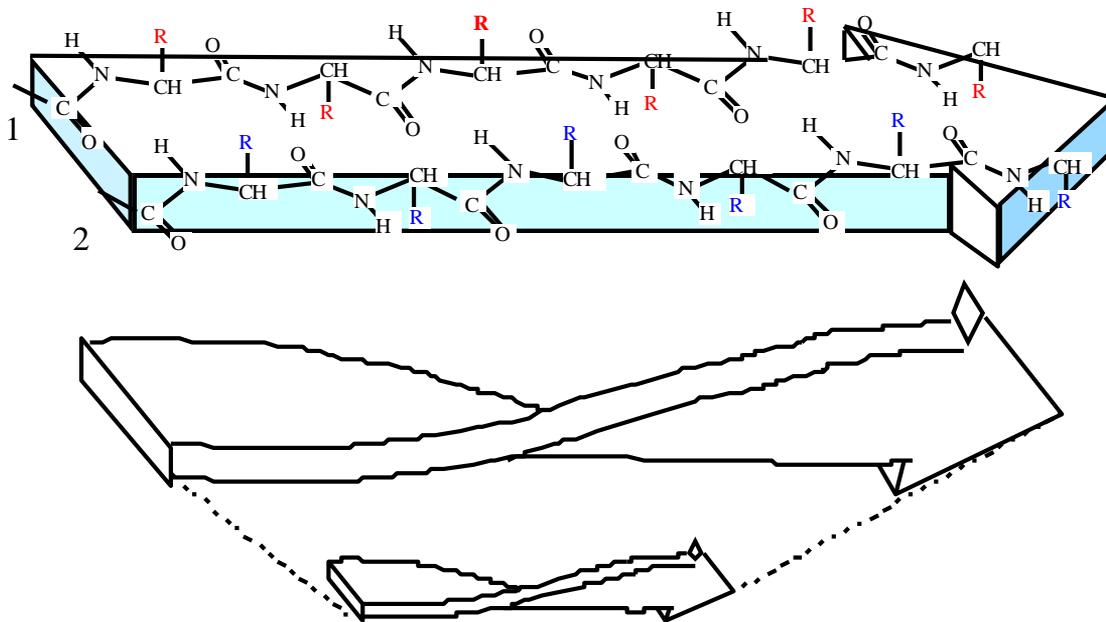


figure 39. Schéma et représentation des structures twistées (vrillée) des feuillets β

1.1.3. Courbure β .

Il existe une conformation β qui permet aux chaînes de se replier sur elles-mêmes, une liaison hydrogène assurant la stabilisation (figure 40).

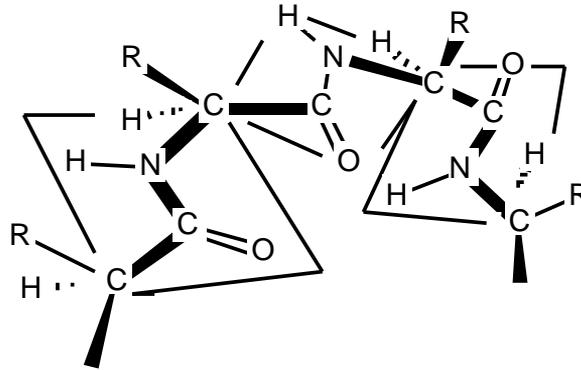


Figure 40. Courbure β ou conformation β

Il existe enfin dans la plupart des protéines des zones à structure non définie et sans axe de symétrie : **pelote statistique**.

Ces structures secondaires sont souvent schématisées par des cylindres pour les hélices et par des plans fléchés pour les feuillets (figure 41).

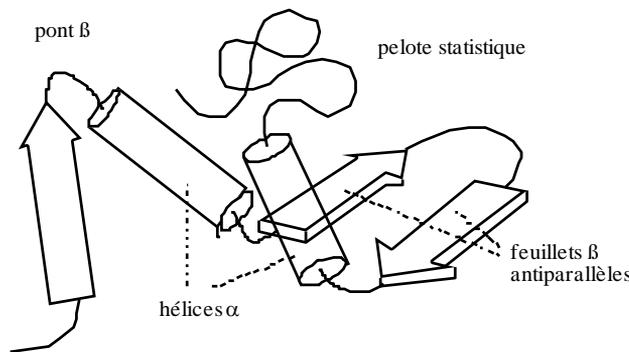


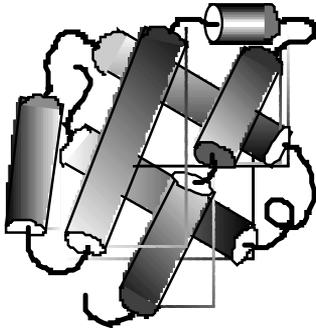
figure 41. Schéma représentatif des structures secondaires

1.2. Structures tertiaires

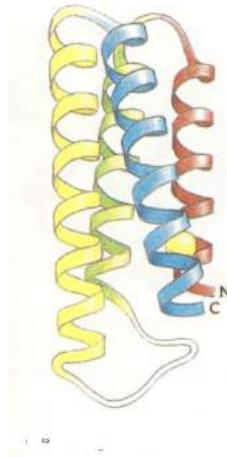
La structure tertiaire est la structure spatiale qu'adopte une protéine présentant des zones à structures secondaires bien définies (hélice α , feuille β , courbures β) est fonction de son environnement (température, μ , solvant, pH). En milieu aqueux les résidus d'acides aminés hydrophobes sont pour la plupart d'entre eux localisés vers l'intérieur de la molécule tandis que les acides aminés polaires sont plus représentés en surface. Des distributions anisotropiques de charges ou de groupements polaires ou hydrophobes peuvent contribuer à conférer à la protéine une fonction donnée. Dans tous les cas, la conformation que prend la protéine est obtenue pour un niveau énergétique minimum.

Actuellement il est possible de décrire des classes ou des types de structures tertiaires en fonction de la prédominance et de la distribution dans la molécule (ou même une zone structurée d'une partie de la molécule) de structures secondaires en hélice α ou en feuillets β (figure 42). Les protéines dans de très nombreux cas présentent une structure tertiaire "sphérique ou ovoïde".

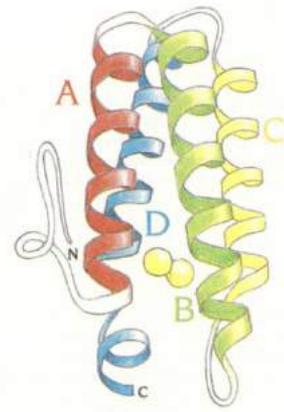
Structures de type α



sous-unité de l'hémoglobine

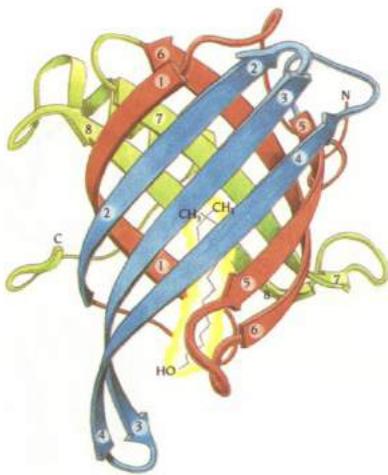


cytochrome b 562

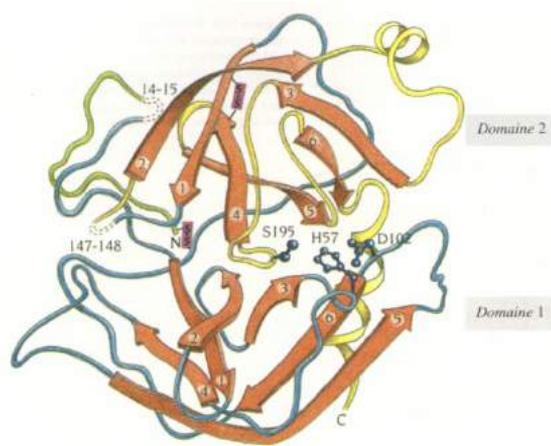


myoémérythrine

Structure de type β

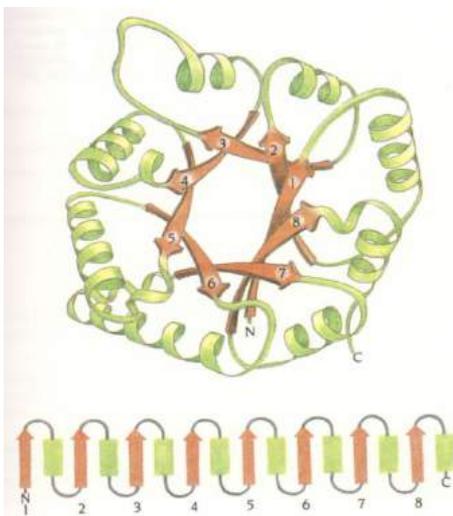


Retinol binding protein

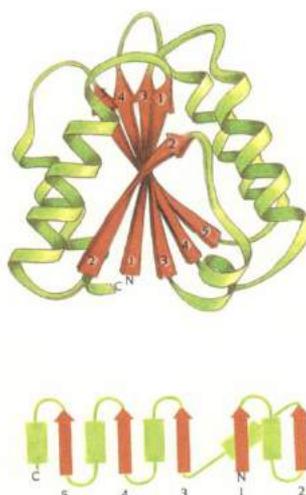


Chymotrypsine (β anti parallèles)

Structure α / β



triose-phosphate isomérase



flavodoxine



adénylate kynase

Figure 42. Schéma de quelques classes de structures tertiaires

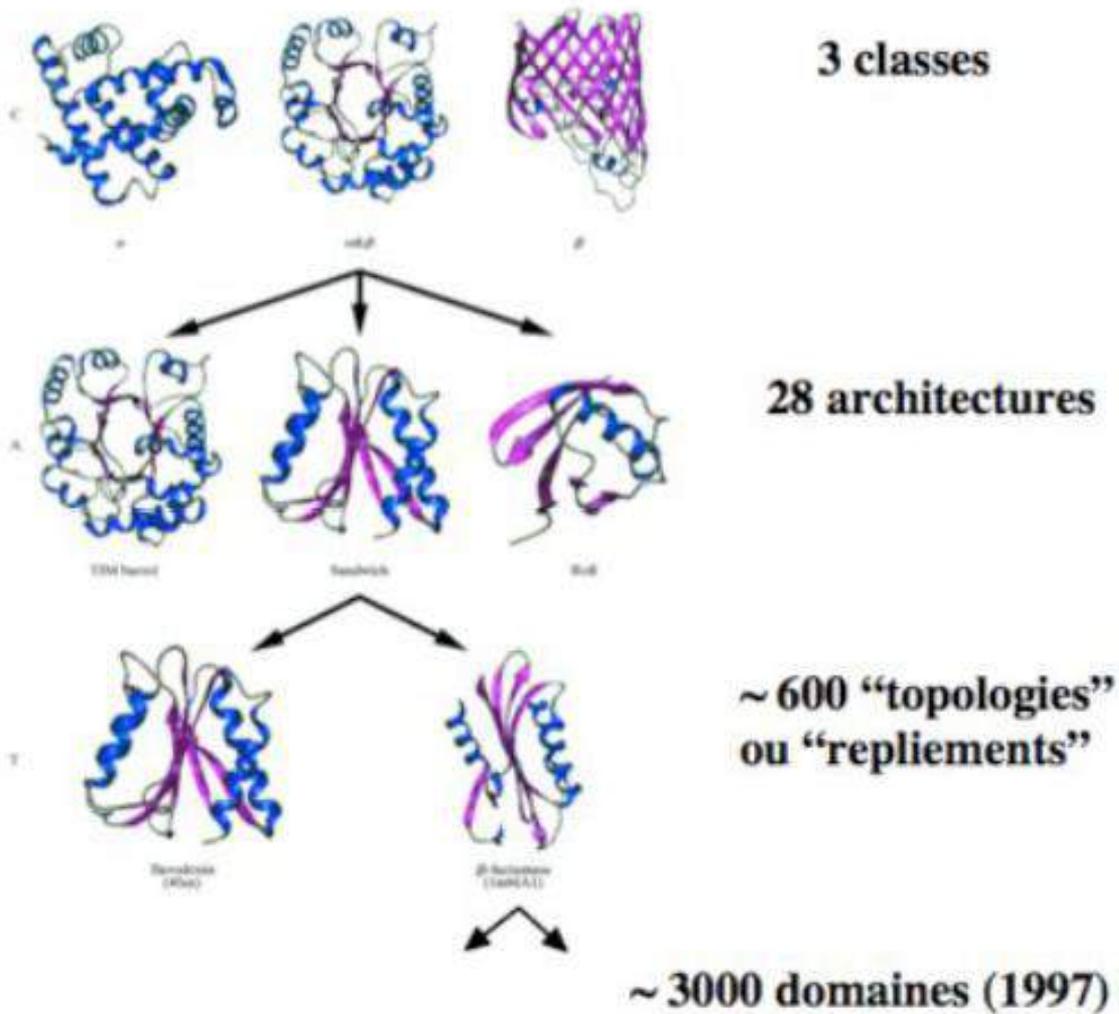


figure 43. Images “stéréoscopiques” de protéines et topologies

Les progrès réalisés en informatique au niveau de l’imagerie moléculaire permettent de visualiser dans l’espace de nombreuses molécules protéiques.

1.3. Structures quaternaires ou supramoléculaires.

Il s’agit d’une organisation spatiale d’assemblages de molécules protéiques dans une structure tertiaire donnée par des liaisons ionique, hydrogène, hydrophobe ou par pont disulfure. Cet assemblage symétrique ou non est en général constitué par un nombre limité de sous-unités (**monomères**) identiques ou non. L’entité moléculaire, dont la masse molaire peut dépasser plusieurs millions, possède des propriétés souvent remarquables; chaque association a une structure souvent unique et contribue à la fonction biologique:

- protéines fibreuses en super hélice constituées de monomères en structure hélicoïdale (*tropocollagène de 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre formé de 3 monomères en hélice α avec pas à droite*)
- protéines fibreuse et globulaires (*myosine constituée de deux monomères avec zones continues en hélice α et zone terminale en pelote statistique*)
- protéines fibreuses en double hélice constituées de monomères globulaires (*monomères de G actine associés en F actine dont deux chaînes en hélice forment un filament*)

-protéines globulaires constituées par l'assemblage de sous-unités de structures non fibreuses (*glycinine du soja - micelle de caséine - etc*).

Quand la zone de fixation est la même pour tous les protomères, l'association est qualifiée d'**isologue** et quand le domaine de fixation est différent l'association est qualifiée d'**hétérologue** (figure 44).

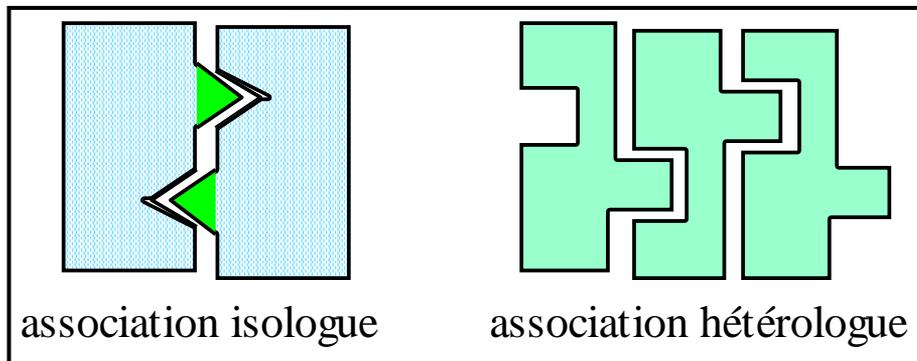


figure 44. Associations entre sous-unités protéiques

Ces arrangements impliquent des systèmes symétriques autour d'un axe ou plus complexes avec plusieurs axes de symétrie (figure 45).

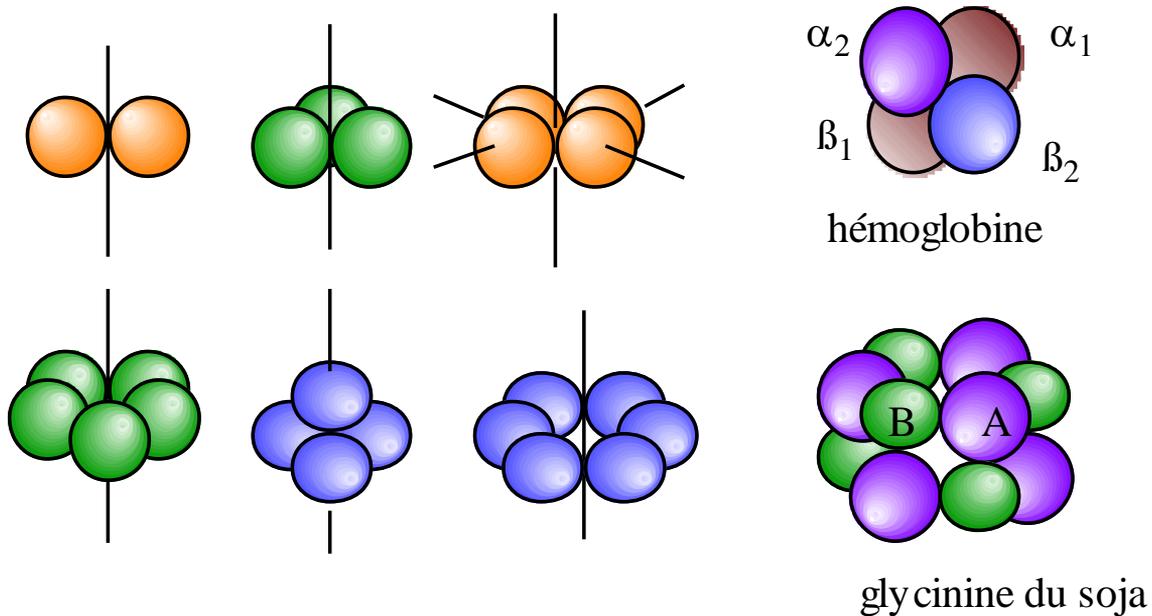


figure 45. Structures quaternaires types et exemples

2. Moyens d'études de ces structures .

Rappelons que la détermination de la structure primaire requiert des hydrolyses enzymatiques ménagées ou des hydrolyses chimiques spécifiques (BrCN et met par exemple) suivies du dosage des acides aminés totaux et des parties N terminales (méthodes de Sanger ou d'Edman) ou C terminale (cf chapitre III).

Il existe de nombreux moyens d'étude des structures protéiques classés en méthodes physiques, chimiques ou biologiques .

2.1. Méthodes physiques.

Ces méthodes sont applicables soit à des protéines cristallisées soit à des protéines en solution soit à des protéines préalablement traitées et déshydratées.

2.1.1. Microscopie.

La **microscopie électronique** permet d'obtenir des images des structures quaternaires ou de réseaux protéiques (gels , pâtes etc). Les observations par **transmission** sont réalisées sur des échantillons 'fixés' au glutaraldéhyde (3% , 3 h), rincés, fixés au tétraoxyde d'osmium (2% , 2 h), rincés puis déshydratés dans des solutions éthanol / eau (50/50, 80/20 puis 90/10, éthanol pur). Les échantillons sont inclus dans des milieux (70°C, 2 jours). Des coupes réalisées à l'ultra-microtome sont "colorées" à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant observation microscopique.

Pour les observations par **balayage**, les échantillons déshydratés au point critique sont préalablement couverts de platine et d'or. Les observations effectuées après ces traitements peuvent ne pas correspondre à la conformation native. Il existe des microscopes électroniques équipés de platines à congélation qui permettent des observations sans fixation préalable. L'observation après cryofracture de l'échantillon congelé dans l'azote liquide permet l'observation de zones de moindre résistance.

Il existe des techniques de microscopie électronique qui permettent l'observation sans déshydratation préalable. Il s'agit essentiellement de la **microscopie à platine froide** réfrigérée par de l'azote liquide et la **microscopie environnementale**.

La **microscopie à effet tunnel** permet d'obtenir des images de macromolécules protéiques comme les immunoglobulines.

2.1.2. Les méthodes spectrales.

Les protéines absorbent et émettent des radiations dans la zone UV. L'absorbance résulte des propriétés des liaisons peptidiques, des acides aminés aromatiques et des ponts disulfure. Dans ce cas l'énergie lumineuse induit un passage des électrons d'un état stable à un état excité. Les phénomènes de fluorescence sont liés à la présence des acides aminés aromatiques. Quelques protéines possèdent des co-facteurs absorbant dans le visible. Enfin si une structure dissymétrique est présente, la lumière polarisée à droite ou à gauche n'est pas absorbée avec la même intensité (dichroïsme circulaire).

Les propriétés spectrales des protéines dépendent donc de leur composition en acides aminés mais aussi de l'environnement de ces acides aminés ; des informations sur les structures secondaire et tertiaire et leurs modifications peuvent être obtenues à partir de ces propriétés spectrales. Le dichroïsme circulaire dans la région des amides permet d'analyser les structures secondaires, tandis que l'absorbance et la fluorescence des résidus d'acides aminés aromatiques est directement liée à leur environnement.

La mesure de l'absorbance d'une protéine native en utilisant comme référence la même protéine mais à l'état dénaturé conduit à des spectres différentiels (figure 46,a) avec :

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Delta A}{c \cdot l}$$

ΔA étant la différence d'absorbance entre les formes natives et dénaturées, c la concentration et l la longueur du trajet optique

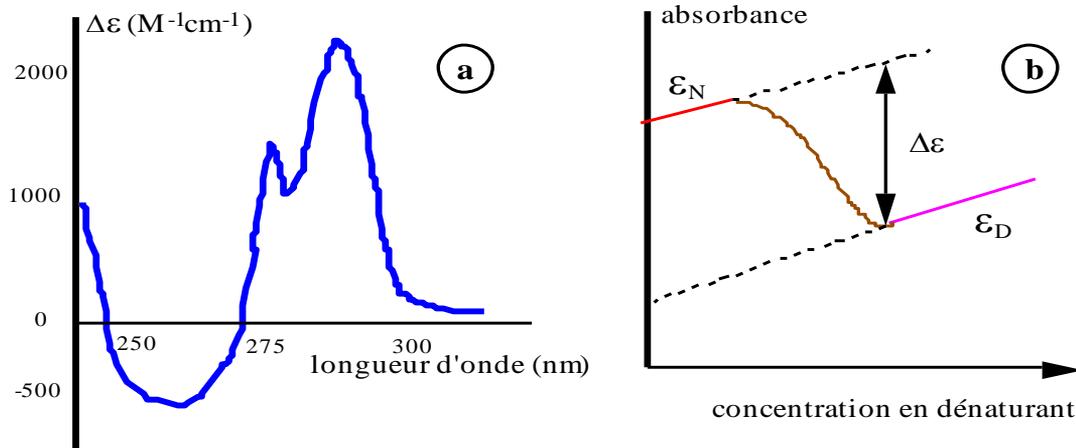


figure 46. Spectre différentiel et variation d'absorbance d'une protéine native et dénaturée

Par ailleurs, l'absorbance de la forme native et celle de la forme dénaturée augmentent avec la concentration en dénaturant (figure 46 b).

La **fluorimétrie** permet d'évaluer l'environnement et la mobilité de chaînes latérales très fluorescentes comme celle du tryptophane.

Le **dichroïsme circulaire** (figure 47) mesure l'absorption inégale de la lumière polarisée circulairement à droite et à gauche; la différence d'absorption ($\Delta A = A_L - A_R$) très faible exige un appareillage très sensible (dans l'UV aux environs de 200 nm cette différence est de l'ordre de 0,0001 quand l'absorbance de la molécule en solution est égale à 1).

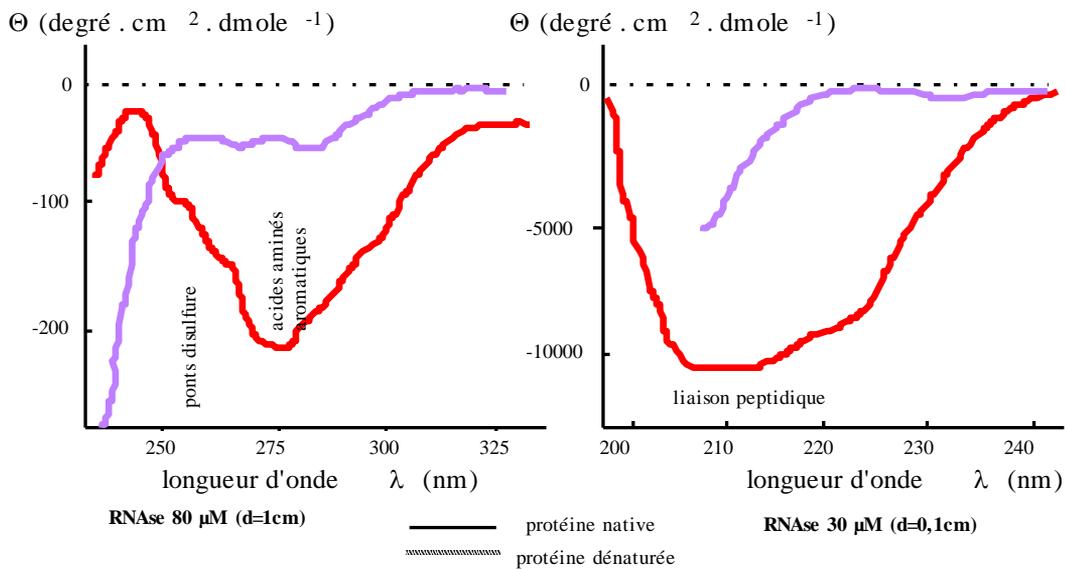


figure 47. Spectres CD d'une protéine native et dénaturée.

Une protéine donne généralement 3 bandes en dichroïsme circulaire. La première entre 170 et 250 nm est liée aux liaisons peptidiques et permet l'évaluation de l' α -hélicité, la seconde voisine de 250 est caractéristique des ponts disulfure et la troisième voisine de 270-285 nm est liée aux résidus d'acides aminés aromatiques. Ces bandes sont influencées par l'environnement et permettent une estimation de la structure native "globale" de la protéine .

Les résultats des mesures sont aussi exprimés en ellipticité Θ_{obs} (m.degré). Le coefficient d'extinction molaire dichroïque $\Delta\varepsilon$ est égal à :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad \text{équation 56}$$

L'ellipticité molaire Θ_M est reliée au coefficient d'extinction molaire dichroïque $\Delta\varepsilon$ par :

$$\Theta_M = \Delta\varepsilon \cdot 3000 \quad \text{équation 57}$$

Les unités sont différentes ; $\Delta\varepsilon$ est l'absorbance différentielle d'une solution 1 mole.L⁻¹ dans une cuve de 1 cm de trajet et Θ_M est la rotation en degrés d'une solution à 1 d mole / cm³ dans une cuve de 1 cm de trajet .

On démontre que :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{A_L - A_R}{c \cdot d} \quad \text{et} \quad \Theta_M = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{c \cdot d} \quad \text{équation 58}$$

c est la concentration en mole.L⁻¹, d la longueur du trajet optique en cm, M le poids moléculaire de la protéine.

Quand les chaînes polypeptidiques ont plus de 10 résidus, leur rotation optique n'est pas une simple fonction additive des rotations de chaque résidu. Dans les protéines cette rotation est plus dextrogyre que la somme des rotations individuelles. Ce pouvoir de dextrorotation est maximal avec des hélices α . La capacité de dévier le plan de lumière polarisée résulte de l'asymétrie moléculaire (C avec 4 substituants différents). Cependant, dans les protéines cette propriété résulte de la présence de carbones mais aussi de l'asymétrie apportée par l'enroulement en hélice α (pas à gauche ou à droite). Le pouvoir rotatoire avant et après dénaturation (forme native et forme déroulée) permet d'estimer le degré approximatif d'enroulement en hélice α .

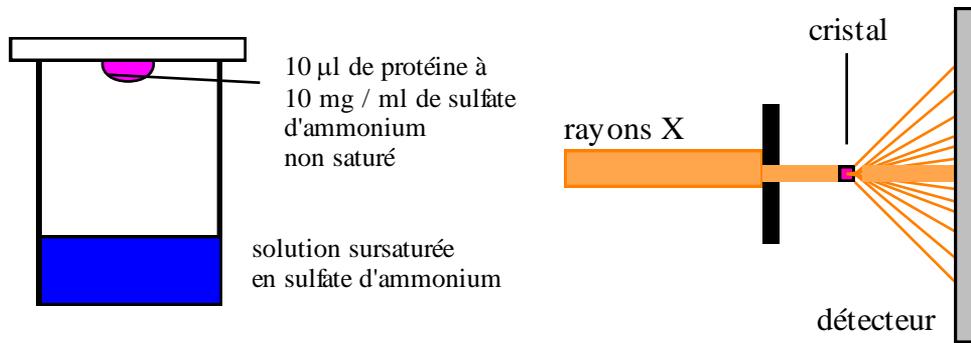
Pour déterminer les différentes contributions des structures secondaires dans une protéine donnée, on suppose que le spectre CD dans la zone des liaisons peptidiques peut être représenté par une combinaison linéaire des contributions des différents éléments impliqués dans les structures secondaires:

$$\Theta_M(\lambda) = f_\alpha \cdot \Theta_{M\alpha}(\lambda) + f_\beta \cdot \Theta_{M\beta}(\lambda) + f_t \cdot \Theta_{Mt}(\lambda) + f_n \cdot \Theta_{Mn}(\lambda) \quad \text{équation 59}$$

f_i sont les fractions respectives des éléments structuraux de type hélice α (α), feuillet β (β), pont β (t) et non régulière (n).

La **spectroscopie aux rayons X**, applicable aux protéines cristallisables (pures ou avec des solutés) est la technique qui donne le plus de renseignements sur la structure spatiale. La diffusion et la diffraction des rayons X sont d'autant plus grandes que la densité électronique des atomes est élevée. Le très grand nombre d'atomes dans la molécule donne des spectres très complexes. Le diagramme de diffraction des rayons X de la myoglobine cristallisée (qui contient environ 2500 atomes, MM de 16700) présente 25000 réflexions dont l'analyse a conduit à la détermination de la première structure tertiaire.

La cristallisation des protéines est obtenue par la méthode de la goutte pendante :



Lorsqu'un faisceau de rayons X est focalisé sur un cristal protéique, il est réfléchi par les noyaux de masse suffisante (C, O, N, P, S) et subit une série de diffractions dépendant de la position de ces atomes. L'étude des intensités de diffraction permet de déterminer la structure. Avec les protéines il est souvent nécessaire d'introduire des atomes ou groupements d'atomes qui diffractent beaucoup (métaux lourds comme Pt Cl₄ sur les résidus de méthionine) sans pour autant modifier la conformation. Selon la résolution obtenue, exprimée en Å on obtient :

- à 5 Å la silhouette de la molécule
- entre 2 et 4 Å la disposition spatiale de la chaîne polypeptidique
- entre 1,5 et 2 Å la position individuelle des atomes constitutifs.

Les améliorations et progrès réalisés aux sources de rayons X, aux équipements de collecte des données, aux traitements informatiques des données en particulier au niveau du graphisme, ont permis d'améliorer la résolution et la rapidité des analyses.

Le **synchrotron SOLEIL** à Saclay qui va être mis en service permettra de déterminer les structures tridimensionnelles des protéines avec une très grande résolution.



La ***diffusion de neutrons*** permet de donner une image du volume de la molécule.

La ***spectroscopie Raman*** renseigne sur les modes de vibration et de rotation des molécules protéiques. Applicable à des études de structure elle permet également l'étude de la fixation d'ions à ces macromolécules.

2.1.3. Les méthodes “nucléaires et électroniques”.

La résonance magnétique nucléaire RMN

Les noyaux de certains atomes comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ont un moment magnétique ou spin. L'environnement chimique de ces noyaux peut être examiné par RMN et les distances inter-atomiques évaluées. Il est alors possible d'en déduire un modèle tridimensionnel. La RMN permet la localisation des protons dans les protéines, d'en déterminer le nombre et la disposition. Cette technique permet de déterminer des couplages par liaison covalente et des couplages dipolaires si $d < 0,5 \text{ nm}$. (effets COSY et NOESY) et donc de situer des repliements.

L'effet NOESY (spectroscopie d'effet Overhauser nucléaire) se manifeste entre 0,2 et 0,5 nm et révèle des interactions entre deux atomes d'hydrogène proches dans l'espace même s'ils appartiennent à des résidus différents.

L'effet COSY (spectroscopie de corrélation) révèle les interactions entre deux atomes d'hydrogène reliés de façon covalente par l'intermédiaire d'un ou deux atomes différents. Les spectres bidimensionnels sont interprétés par la méthode de l'attribution séquentielle. Chaque acide aminé possède un spectre COSY caractéristique (couplage scalaire). Les contraintes de distances sont utilisées pour déduire la structure possible de la protéine.

La RMN transformée de Fourier (2D, 3D, et 4D) permet d'accéder à la structure des protéines en solution et de comparer ainsi les résultats obtenus avec ceux issus des cristaux (RX). Initialement, seules la structure des petites protéines (poids moléculaire inférieur à 12000) était étudiable par cette méthode. Pour les protéines de poids moléculaire plus important il était nécessaire de fabriquer des protéines uniformément enrichies en ^{13}C ou ^{15}N par recombinaison. L'utilisation des méthodes 3D et 4D permettent de travailler avec des protéines de poids moléculaire supérieur à 30000. Cette approche d'analyse structurale présente l'avantage de pouvoir étudier des phénomènes dynamiques de modifications structurales (fixation d'un ligand, dénaturation thermique etc.).

La **ESR** (*electron spin resonance*) ou **RPE** (*résonance paramagnétique électronique*) permet d'évaluer la diffusivité rotationnelle (ou fréquence de ré-orientation-Drot) qui est un paramètre étroitement relié à la diffusion translationnelle (D_{trans} - sous l'influence d'un gradient de concentration) et permet d'estimer la mobilité de traceurs et de solutés au sein de molécules protéiques. La méthode par sondage de spin utilise des sondes paramagnétiques appelées marqueurs de spin telles que le 4-hydroxy,2-2-6-6-tétraméthylpipéridinooxyl qualifié de tempol.

2.1.4. Les méthodes “thermodynamiques”.

La **calorimétrie différentielle à balayage** (*ATD : analyse thermique différentielle*) permet d'évaluer la température de dénaturation des protéines (pic endothermique) mais aussi la quantité d'énergie qu'il faut amener à la protéine pour la dénaturer. En effet les modifications de conformation des protéines s'accompagnent d'une variation de son niveau d'énergie. Ces changements se manifestent soit par une absorption de chaleur (réaction endothermique) soit par une libération de chaleur (réaction exothermique) et s'accompagnent par une variation d'enthalpie.

Pour la mesure, la protéine en solution est chauffée graduellement ($^{\circ}\text{C} / \text{temps}$) et la température est contrôlée. Le flux de chaleur différentiel entre l'échantillon et une référence est enregistré. La surface des thermogrammes permet d'évaluer la variation d'enthalpie associée aux transitions d'état induites par la température. La dérive de la ligne de base correspond aux capacités calorifiques différentes des formes natives et dénaturées. L'enthalpie de dénaturation est fonction de la vitesse de chauffage imposée. Le pic endothermique proportionnel à l'enthalpie est égal à :

$\Delta H = k \cdot A/M$ avec ΔH variation d'enthalpie, k coefficient de calibration ($J.m^{-2}$) et M molarité de la solution protéique.

Les variations de $\Delta H/\Delta t$ en fonction de la température sont schématisées sur la figure 48.

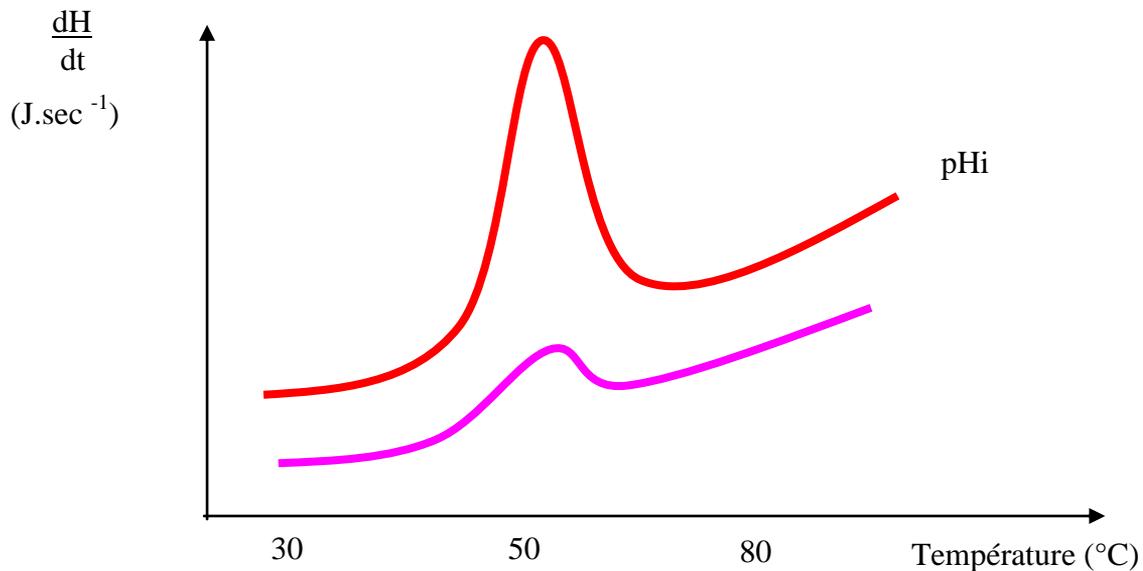


figure 48 . Thermogramme d'une protéine à différents pH

Dans l'exemple donné il apparaît que l'énergie à amener à la protéine pour la dénaturer (déplissement maximum, réaction endothermique) est plus faible quand la molécule est partiellement "débobinée" sous l'effet du pH (surface sous la courbe); la température de transition est abaissée de la même façon.

2.1.5. Les méthodes basées sur la charge et le volume et /ou la forme.

L'**électrophorèse** en milieu dénaturant (SDS-PAGE) est une technique analytique permettant de déterminer le poids moléculaire ainsi que le nombre de sous-unités dans une structure quaternaire.

Associée à un blocage spécifique et modulé des fonctions thiols ou aminées elle permet de compter ces groupements. Ainsi si on fait réagir la protéine avec des quantités croissantes d'un agent "bloquant" des fonctions amines comme l'anhydride succinique (figure 49) et si l'électrophorèse est réalisée à un pH pour lequel seules ces fonctions amines sont protonées, la migration électrophorétique (R_e) vers l'anode sera d'autant plus élevée que la charge nette positive de la protéine sera grande (figure 50).

Le nombre de bandes comptées correspond alors au nombre de fonctions aminées (α et ϵ). La détermination du nombre de fonctions thiol se fait après réduction et S-carboxy-méthylation (SH devient $S-CH_2-COO^-$); dans ces conditions la charge nette négative de la protéine augmente en fonction du nombre de sites réactifs à $pH > pK_a$ de l'acide greffé .

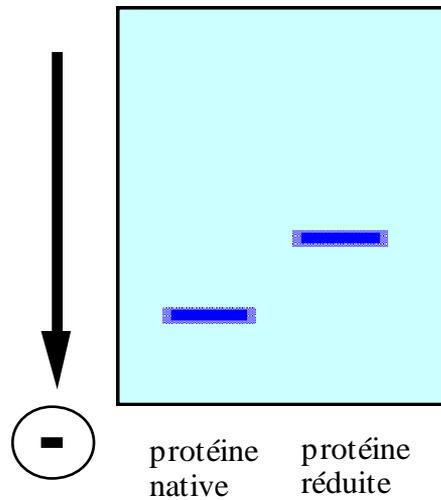


figure 51. Electrophorèse non dénaturante d'une protéine native et réduite

L'électrophorèse à gradient transverse permet une interprétation simple des variations de mobilité d'une protéine (figure 52).

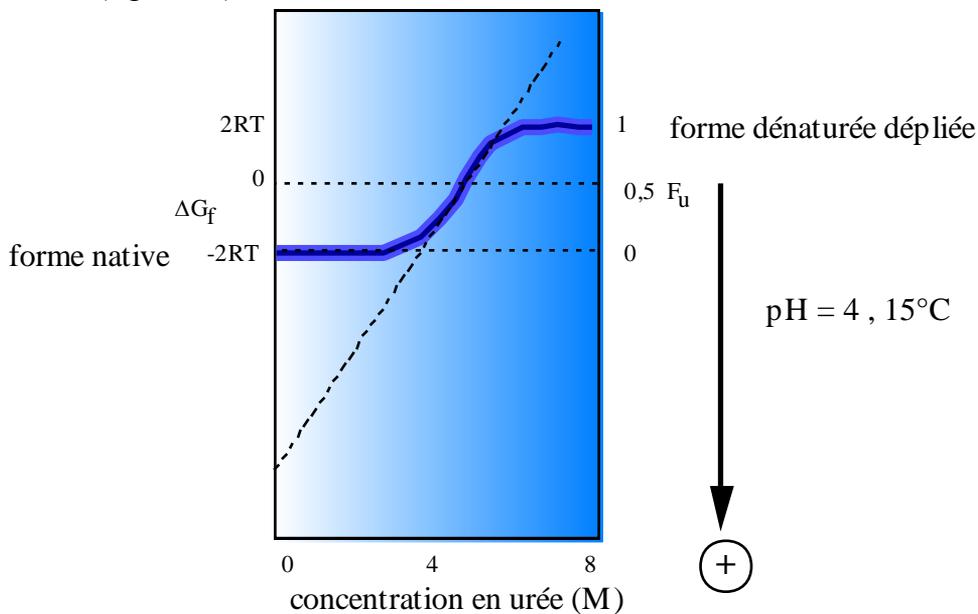


figure 52 . Electrophorèse en gradient transverse d'urée.

La protéine est déposée au sommet du gel à gradient transverse puis soumise à une électrophorèse vers la cathode à pH 4 et 15°C. La mobilité de la protéine (M) à chaque concentration en urée indique la fraction de protéine dépliée (Fu) comme schématisé à droite de la figure. Au voisinage du point de transition pour lequel Fu = 0,5 la stabilité nette de l'état replié (ou natif) ΔGf est égale à 0. On a :

$$F_u = \frac{[D]}{[D] + [N]} \text{ soit } F_u = \frac{(M - M_N)}{(M_D - M_N)} \text{ et } \Delta G_f = - RT \ln \frac{N}{D} \quad \text{équation 60}$$

Fu est approximativement une fonction linéaire de la concentration en urée. La stabilité nette en absence de dénaturant est ainsi estimée par extrapolation de ΔGf à partir de la tangente au point d'inflexion de la région de transition vers la concentration 0 en urée. Les zones en plateau des états natifs et dénaturés correspondent à des valeurs de ΔGf respectivement égales à 2RT et -2RT.

L'isotachophorèse permet, quant à elle de mesurer le pHi de la protéine.

Certaines **méthodes chromatographiques** utilisant des phases stationnaires polaires, apolaires ou “spécifiques” (Chromatographie d’affinité) contribuent à l’étude des structures protéiques et de leurs évolutions.

2.2. Méthodes chimiques.

Certaines de ces méthodes reposent sur la *détermination de propriétés hydrophiles ou hydrophobes* de surface des molécules protéiques en utilisant respectivement des sondes ou des phases stationnaires en chromatographie qui sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes.

L’évaluation du nombre de sites hydrophobes peut être corrélée avec certaines des propriétés fonctionnelles et en particulier avec le comportement des protéines aux interfaces (mousses, émulsions).

Le principe de ces méthodes est le suivant : lorsqu'une protéine en solution est mise au contact d'un composé hydrophobe, celui-ci va se fixer sur les sites, la constante d'association étant d'autant plus élevée que le site est hydrophobe. L’étude classique de cette interaction protéine-ligand qui nécessite l’évaluation du ligand libre et du ligand lié peut se faire par dialyse à l’équilibre, par partage liquide-liquide, par chromatographie d’exclusion.

Parmi les sondes (ligands) les plus utilisées on peut signaler **l'acide cis-parinarique**, l'acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (**ANS**) ou le **rétinol**.

Ces composés deviennent fluorescents lorsqu'ils se fixent sur les sites hydrophobes des protéines. La mesure de fluorescence, proportionnelle au nombre de molécules de ligand fixé, permet, par la méthode de Scatchard ou de Klotz, d'estimer le nombre de sites.

On peut aussi estimer **l'hydrophobicité de surface** d'une protéine par chromatographie avec des phases stationnaires apolaires (RPC : reversed phase chromatography). Le facteur de capacité sera d'autant plus élevé que la molécule possèdera des zones hydrophobes importantes et de forte énergie.

Il est possible de déterminer le nombre de sites hydrophiles "ionisables" en surface en utilisant des composants qui sont capables de donner des liaisons ioniques avec les groupements chargés des chaînes latérales. Le plus souvent il s'agit de composés colorés porteurs soit de groupements sulfonés (SO_3^-) soit des groupements aminés (R-NH_3^+). Le traitement des données se fait par la méthode de Scatchard ou de Klotz. Il faut remarquer ici que la formation d'un COOH à partir d'un COO^- (par diminution du pH en dessous du pKa) se traduira par une diminution de l'hydrophilicité ou inversement par une augmentation de l'hydrophobicité.

2.3. Méthodes biologiques.

Ces méthodes sont basées sur la réaction antigène anticorps

Rappelons qu'un anticorps est une immunoglobuline (glycoprotéine) produite par des une réaction complexe schématisée sur la figure 53. Il existe de nombreux clones de lymphocytes B activés par le même antigène initial (et donc de plasmocytes producteurs d'anticorps) car les fragments de cet antigène hydrolysé par les macrophages et présentés à ces lymphocytes B peuvent être différents. Un lymphocyte donné reconnaît un seul antigène et le plasmocyte résultant de sa transformation produit un seul type d'anticorps. C'est le "mélange" de clones de lymphocytes B qui conduit in vivo à la production d'un mélange d'anticorps (*anticorps polyclonaux*).

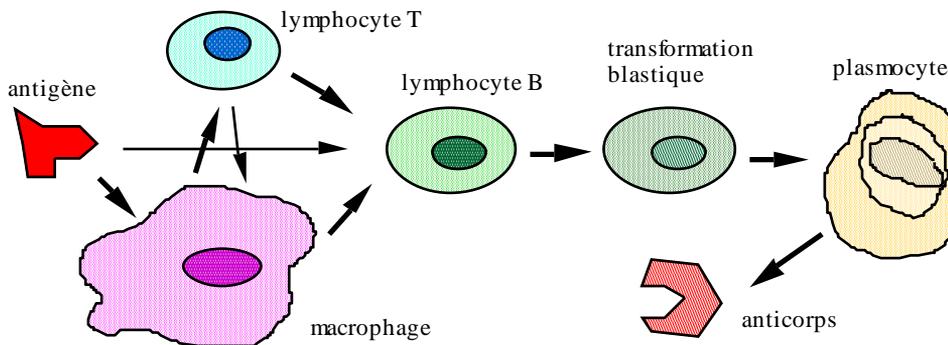


figure 53 . Schéma de la biosynthèse d'anticorps

La fusion d'un lymphocyte producteur d'anticorps et d'une cellule myélomateuse engendre un hybridome qui se multiplie indéfiniment et fournit un seul type d'anticorps : *anticorps monoclonal* qui est très spécifique et possède une constante d'association élevée.

Connaître la structure antigénique d'une protéine permet d'évaluer sa conformation. Une molécule protéique possède deux types *déterminants antigéniques (épitopes)* :

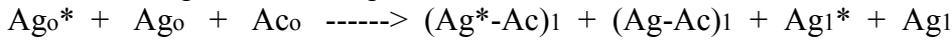
- des sites continus ou séquentiels attribués à une succession d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique
- des sites discontinus ou conformationnels attribués à la proximité dans l'espace de résidus non voisins sur la séquence.

Le plus souvent les anticorps obtenus (injections répétées à l'animal en association avec l'adjuvant de Freund et récupération des sérums stabilisés contre la protéolyse par le PMSF ou fluorure de phénylméthylsulfonyl) contre les protéines natives sont spécifiques de sites conformationnels. On sait que l'épitope doit contenir au moins 6 à 7 résidus d'acides aminés dont certains doivent être basiques.

L'étude de la réaction antigène anticorps s'effectue :

- par *diffusion simple*
- en milieu liquide pour la détermination du titre (l'antigène marqué à l'iode radioactif est incubé avec le sérum et ses dilutions ; après précipitation du complexe Ag-Ac au sulfate d'ammonium 1,3 M , on mesure la radioactivité du culot ; le rapport de la radioactivité du culot à la radioactivité totale B/T est reporté en fonction du logarithme de la dilution de l'immunsérum. La courbe obtenue a la forme d'une sigmoïde. La concentration en immunsérum pour laquelle on a $B/T = 0,5$, c'est à dire pour laquelle l'immunsérum fixe 50 % de la protéine, correspond au titre de cet immunsérum).
- par *radioimmunologie* dont le principe est le suivant :
Une quantité fixe d'antigène marqué (Ag^*) liée à une quantité fixe d'anticorps (Ac) est déplacée par une quantité variable d'un antigène "froid" (Ag). Lors de l'addition de quantités croissantes de

protéine (Ag) à une quantité fixe du complexe protéine* - Ac, la protéine (Ag) déplace une quantité croissante de protéine*. On peut écrire :



En nombre de moles on a :

$$Ag_o^* = (Ag^*-Ac)_1 + Ag_1^* \quad \text{et} \quad Ag_o = (Ag - Ac)_1 + Ag_1$$

Pour $Ag_o = 0$ on a $(Ag^*-Ac)_1 = B_o$ et $(Ag-Ac)_1 = 0$ et $Ag_1 = 0$

Pour $Ag_o > 0$ on a $(Ag^*-Ac)_1 = B$

Une courbe d'étalonnage donnant la valeur de B/B_o en fonction des quantités connues de protéine ajoutée permet le dosage de quantités inconnues de protéine. Par ailleurs, il est possible de substituer la protéine native par une forme dénaturée. Si la protéine a subi des modifications de conformation affectant un ou plusieurs de ses épitopes, son affinité pour les anticorps sera modifiée et la courbe B/B_o ne sera plus superposable à la courbe de référence.

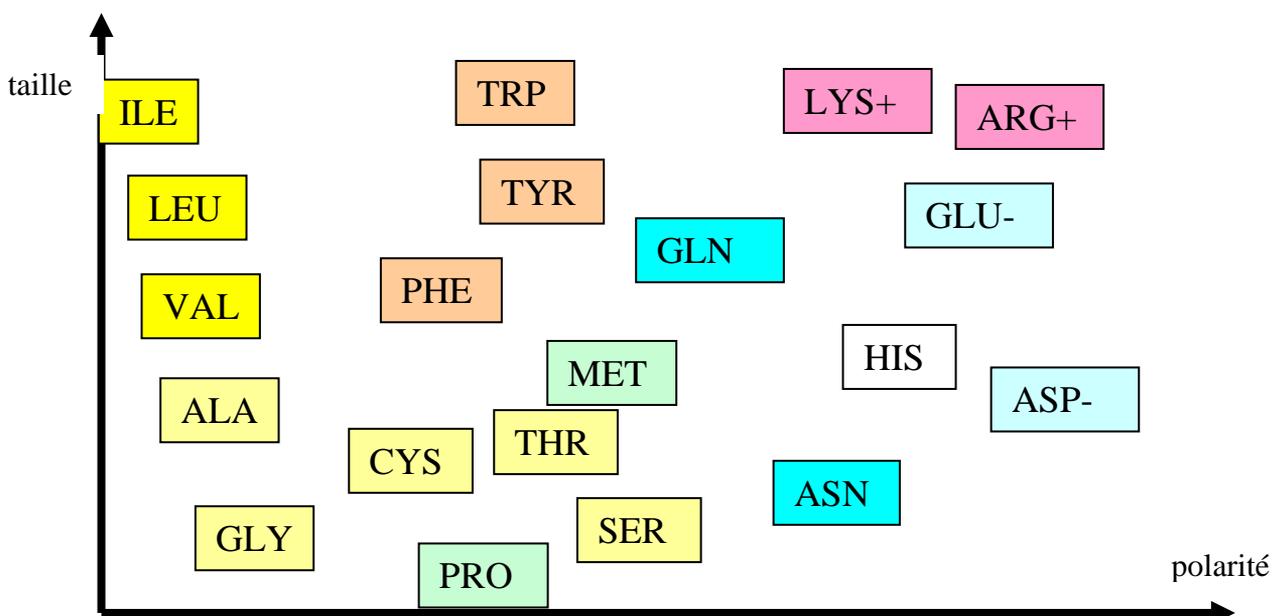
2.4. Méthodes prédictives.

Ces méthodes se développent très rapidement du fait des progrès de l'informatique et des méthodes modernes de la biochimie et de la biologie moléculaire. Ces méthodes théoriques reposent sur la connaissance des séquences nucléotidiques, permettent d'une part la construction de séquences d'acides aminés et d'autre part de discerner leur signification, prédisent les structures secondaires et certaines propriétés comme les zones à réponse antigénique, et enfin corrélient structure et fonction. Ces méthodes sont de plus en plus "mathématisées".

Le problème du repliement : le paradoxe de Levinthal..Pour un peptide d'une trentaine d'acides aminés le nombre de conformations possibles – le repliement- est égal ou supérieur de $N = 10^{100}$. Le force motrice du repliement est l'effet hydrophobe tandis que les interactions électrostatiques gouvernent la reconnaissance moléculaire.

Les protéines ont tendance à enfouir les chaînes latérales hydrophobes en leur cœur.

Les 20 acides aminés possèdent des caractéristiques physico-chimiques et structurales bien connues.



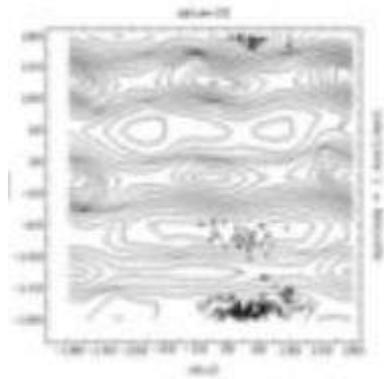
Les chaînes latérales sont flexibles et ont des angles de torsion multiples (orientation préférentielle de la chaîne latérale conduit à une structure spatiale bien définie appelée **rotamère**).

On peut calculer une fonction d'énergie empirique pour modéliser :

$$U = \sum_{\text{liaisons}} k_b (b - b_o) + \sum_{\text{angles}} k_a (a - b_o) + \sum_{\text{torsions}} \left[1 + \cos(nt - \tau) \right] + \sum_{ij} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right]$$

Van der Waals Coulomb

On peut caractériser une surface d'énergie comme ci-contre, en fonction de nombreux paramètres comme les valeurs de Φ et de Ψ



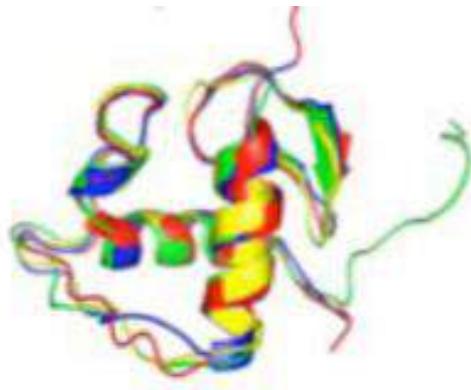
2.4.1. Recherche des régions codantes pour une protéine donnée dans le génôme.

Il existe pour cela des méthodes informatisées (STADEN R., 1985, Genetic Engineering, Setlow and Hollaender Edrs, Plenum Press, Vol 7, p.67, London ; STORMO G.D., 1987, Nucleic acid and protein sequence analysis- A practical approach, Bishop and Rawlings Edrs, IRL Press, Oxford. Logiciel RASMOL, bases de données comme <http://www.swissprot>).

Pour un acide aminé donné, les codons varient avec l'espèce mais aussi avec la protéine.

2.4.2. Alignement des séquences d'acides aminés.

Quand une séquence est déterminée, il faut rechercher si elle n'a pas déjà été décrite dans une protéine connue. En cas d'**homologie**, il est probable que la conformation soit la même ou très voisine. On procède par **alignement** des séquences. La conservation de la séquence se traduit par une conservation de la structure 3D.



2.4.3. Prédiction des structures secondaires.

Trois principaux types de réponses sont attendues de ces méthodes :

- description des structures secondaires typiques (hélice α , feuillet β , ponts β et pelote). La méthode « **réseau de neurones** » permet cette prédiction
- description des hélices trans-membranaires
- position des sites antigéniques.

Depuis 1984, les méthodes utilisées sont classées en méthodes probabilistiques ou probabilistes, méthodes physico-chimiques et méthodes basées sur des informations théoriques.

La méthode des pionniers CHOU et FASMAN (1978) est essentiellement probabiliste ou statistique. Ainsi la fréquence de participation d'un résidu d'acide aminé donné à une structure secondaire type est estimée à partir de banques de données. Par exemple si avec 10 protéines contenant 4000 résidus d'acides aminés, 1500 sont impliqués dans les hélices α , et si ces 10 protéines contiennent 400 résidus d'alanine dont 220 sont impliqués dans les structures hélices α , la probabilité qu'a l'alanine de participer à l'hélices α est égale à :

$$P_{\alpha}(\text{ALA}) = \frac{\frac{220}{400}}{\frac{1500}{4000}} = 1,46$$

et comme P_{α} est supérieur à 1, le résidu est qualifié de formateur ou stabilisant de la structure secondaire (ici l'hélice α). Il est qualifié de destructeur si P_{α} est inférieur à 1 (cf tableau 2, p.8).

La méthode de LIM (1974) est un exemple d'approche physico-chimique. Elle est basée sur les propriétés polaires et apolaires des résidus le long de la séquence. Dans une hélice α la rotation est d'environ 100° entre résidus ; la position spatiale des chaînes latérales de ces résidus quand la protéine est en milieu aqueux varie en fonction de leur polarité. Il en est de même pour les structures tertiaires dans lesquelles les zones hydrophobes seront localisées préférentiellement vers le cœur de la molécule (figure 54).

Les développements les plus récents sont liés à l'amélioration des techniques premières, les structures tertiaires étant ainsi obtenues par des répétitions de motifs de base (structure α/β par exemple). Les banques de données deviennent de plus en plus fournies et performantes :

Google propose des accès nombreux

BISANCE : Base Informatique pour la Séquence des Acides Nucléiques des Chercheurs Européens ,
CITI 2, 45 rue des Saint Pères , 75270 Paris

PIR : Protein Identification Resource, National Biomedical Research Foundation, Georgetown
University, 3900 Reservoir Road NW, Washington DC 20007, USA

Protein Data Bank : Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory, Upton NY 11973 USA.

Les derniers progrès dans la prédiction des structures secondaires et tertiaires reposent sur l'utilisation des techniques d'intelligence artificielle. Ecrits en langage LISP, ces techniques hiérarchisent les structures les plus probables.

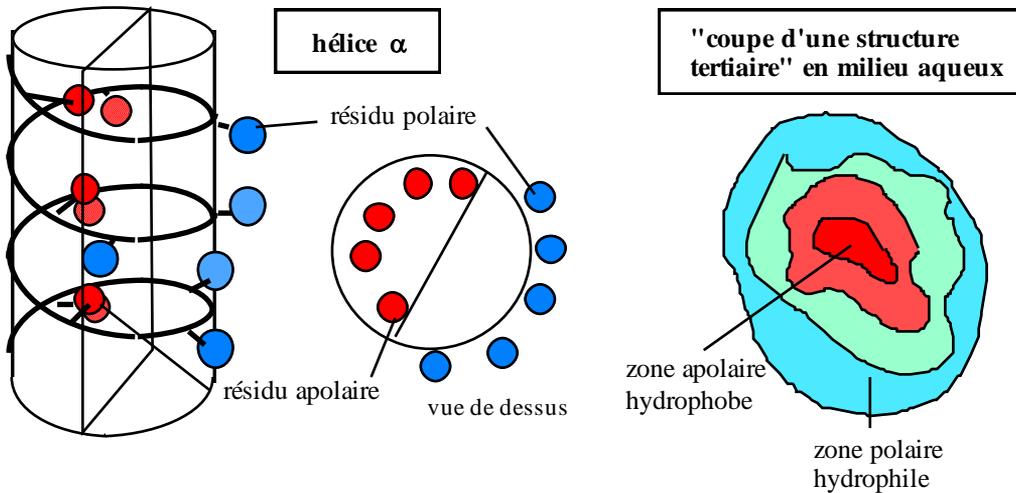


figure 54. Disposition probable des chaînes latérales dans une hélice α et dans une structure tertiaire.

Les prédiction de sites antigéniques reposent sur l’hydrophilicité de la séquence et la probabilité de retrouver ces zones à l’extérieur de la molécule, ces zones étant donc accessibles aux anticorps

3. Interactions impliquées dans la conformation des protéines.

La connaissance de ces interactions permet de maîtriser la conformation et ses évolutions. Ceci est particulièrement important en technologie enzymatique , en technologie des viandes, en technologie laitière ou encore en technologie des protéines d’origine végétale. De par leur structure, ce sont les **chaînes latérales** qui sont à l’origine de l’établissement d’**interactions** contribuant à la **structure spatiale** et donc aux **propriétés** de la protéine.

3.1. Prise en compte des contraintes stériques.

Les contraintes stériques sont liées aux degrés de liberté de rotation ϕ et ψ des liaisons peptidiques qui peuvent prendre toutes les valeurs comprises entre 180° et -180° (figure 55). Cependant la nature de R (ionisation, volume, hydrophobicité, hydrophilicité) va impliquer des répulsions des R ou des attractions se traduisant par un rapprochement ou un éloignement maximum et donc par des angles ϕ et ψ bien définis pour deux résidus donnés.

Pour les résidus de glycine les zones de conformations permises sont importantes et symétriques tandis que pour les résidus d’alanine les degrés de libertés de ϕ et ψ sont plus faibles (figure 55).

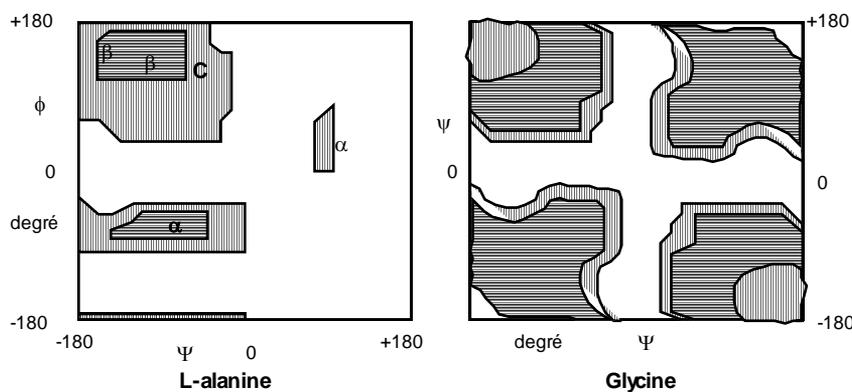


Figure 55. Diagramme de Ramachandran. Conformations stables (=) ou limites (III) des conformations permises. β_P et β_A : feuillets plissés parallèles et antiparallèles ; α_R et α_L : α hélices à pas à droite et à gauche ; C : structure type collagène.

Cependant le diagramme de Ramachandran ne donne que les conformations possibles sans déterminer celle qui sera adoptée en raison de sa plus grande stabilité. Pour obtenir cette structure il est nécessaire de prendre en compte les divers potentiels énergétiques mis en jeu en fonction de ϕ et ψ . Les méthodes d'évaluation existantes actuellement sont encore empiriques et utilisent des méthodes statistiques et analytiques souvent très sophistiquées.

Dans cette approche il est tenu compte des rayons de Van der Waals qui sont respectivement égaux à : -C : 1,87Å , H : 1Å , =C : 1,76Å , N : 1,65Å , O : 1,4Å , S : 1,85Å , P : 1,7Å .

Pour estimer la structure, la prise en compte des contraintes stériques doit être associée à des contraintes de polarité qui rendent possibles ou non certaines conformations mais aussi à de nombreuses autres considérations.

Les liaisons intramoléculaires susceptibles de s'établir et de contribuer à la structure tertiaire sont nombreuses : il s'agit de **liaisons covalentes** d'énergie élevée (ponts disulfure) ou de liaisons de plus faible énergie mais en nombre beaucoup plus élevé (**liaisons ioniques**, **liaisons dipolaires**, **interactions de Van der Waals**, **liaisons hydrogène**, **interactions hydrophobes**). Dans ce dernier cas les phénomènes de coopérativité conduisent à des zones stabilisées par des énergies élevées. Ces interactions sont schématisées dans le tableau 12.

Les interactions avec le solvant, le plus souvent l'eau, sont à prendre en considération.

3.2. Les interactions de Van der Waals.

Il s'agit d'interactions attractives et répulsives entre groupes d'atomes quels qu'ils soient dont la distance r est fonction de ϕ et ψ et dérivent du potentiel :

$$U_{k,l}(\phi_i, \psi_i) = a_{k,l} / r^{m_{k,l}} - C_{k,l} / r^{6_{k,l}} \quad m \text{ compris entre } 9 \text{ et } 12$$

$a_{k,l}$ et $c_{k,l}$ sont des constantes caractéristiques des groupes d'atomes k et l . La représentation $u_{k,l} = f(r_{k,l})$ montre qu'il n'y a pas d'interaction quand k et l sont éloignés. Les forces qui dérivent de ce potentiel deviennent attractives puis très fortement répulsives quand r diminue. La distance moyenne pour laquelle ces forces sont attractives est comprise entre 0,2 et 0,5 nm.

Ces interactions de Van der Waals contribuent surtout à la stabilisation des structures internes des protéines et peut-être à leur précipitation quand la sphère de solvation diminue par augmentation de la force ionique ou encore quand les effets répulsifs de type électrostatique sont minimisés (par exemple au pHi).

Ces interactions attractives diminuent quand la température augmente ; le relargage des protéines sera donc favorisé par abaissement de la température. L'énergie mise en jeu est de l'ordre de 1 à 10 kJ.mole⁻¹.

3.3. Les interactions dipolaires.

Les dipôles permanents que constituent certains résidus d'acides aminés (SER, THR, TYR, CYS, MET) et les liaisons peptidiques qui ont une valeur de 3,7 debyes contribuent à l'orientation de la chaîne polypeptidique, les degrés de liberté étant conditionnés par ϕ et ψ . L'énergie d'interaction entre deux dipôles séparés de d est donnée par :

$$U_{\text{dip}} = \frac{\mu_k \cdot \mu_l}{\epsilon \cdot x^3} - \frac{3(\mu_k \cdot x)(\mu_l \cdot d)}{\epsilon \cdot x^5}$$

où x est la magnitude scalaire de d et ϵ la constante diélectrique.

U_{dip} peut être évalué en attribuant une charge partielle aux atomes des dipôles et en calculant l'énergie électrostatique par la somme des interactions du type Coulomb :

$$U_{dip} = \frac{\sum_{q,k,l} q_k \cdot q_l}{\epsilon \cdot d_{k,l}}$$

dans laquelle q_k et q_l sont les charges partielles de k et l et $d_{k,l}$ leur distance. q_k et q_l prennent les valeurs de $-0,28, +0,28, -0,39$ et $+0,39$ e pour N, H, O et C respectivement, ϵ a une valeur comprise entre 2 et 5.

Les énergies de ces interactions sont comprises entre 1 et 10 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$.

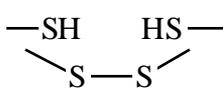
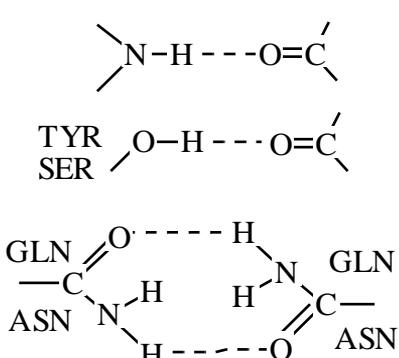
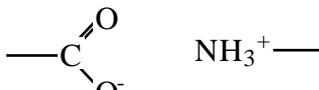
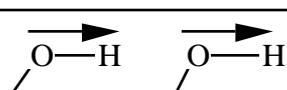
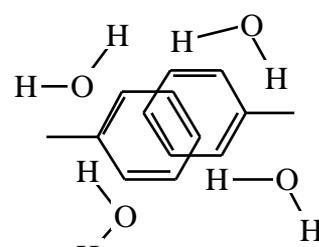
| Liaison ou interaction | énergie ($\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$) | distance (nm) | représentation chimique | diminuée par | renforcée par |
|--|--|---------------|--|---|----------------------------|
| covalente pont disulfure | 320 - 380 | 0,1 à 0,2 |  | réducteurs sulfites | |
| pont hydrogène | 8 - 40 | 0,2 à 0,3 |  | eau urée guanidine détergents chaleur | froid |
| ioniques attractives ou répulsives | 35 - 90 | 0,2 à 0,3 |  | eau, sels pH, chaleur | froid ions divalents |
| dipolaires | 1 à 10 | 0,2 à 0,4 |  | chaleur | froid |
| apolaire (Van der Waals) | 1 à 10 | 0,2 à 0,5 |  | chaleur, détergents solvants | froid |
| hydrophobe | 4 à 12 | 0,3 à 0,5 |  | froid détergents solvants | chaleur |

tableau 12 . Liaisons impliquées dans la structure spatiale des protéines.

3.4. Les interactions ioniques (électrostatiques).

Elles sont essentiellement dues aux groupements ionisables des chaînes latérales et se traduisent par des répulsions ou des attractions selon le signe. Dépendantes du pH elles contribuent à la stabilisation des structures spatiales (2 aire ou 3 aire) et aux échanges avec l'environnement .

Les groupements β et γ carboxyliques des acides aspartique et glutamique et le α COOH de l'acide aminé C terminal sont susceptibles d'être porteurs de charges négatives; les groupements ϵ NH₂ de la lysine, α NH₂ de l'acide aminé N-terminal, guanidine de l'arginine ou imidazole de l'histidine peuvent être porteurs de charges positives. L'énergie de la liaison ionique mise en jeu est de la forme:

$$U_i = - \frac{Z_k \cdot e_k \cdot Z_l \cdot e_l}{e \cdot r_{k,l}} \cdot \frac{a_{k,l}}{r_{k,l}^m}$$

r_{kl} est la distance entre k et l. La force qui dérive du potentiel $a_{k,l} / r_{k,l}^m$ est répulsive (m compris entre 9 et 12) ; cette force résulte de l'impossibilité de pénétration de deux atomes ou ions en-dessous de leur rayon atomique (rayon de Van der Waals). La force attractive ou répulsive ionique a une énergie de liaison comprise entre 40 et 85 KJ.mole⁻¹. Ces interactions affectent entre autre la solubilité, et les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines .

C'est le *pH du milieu et la présence de sels qui sont le facteur de "contrôle" le plus important* de ces liaisons. En raison des interactions qu'ils donnent avec l'eau, les groupes ioniques sont souvent situés en milieu aqueux à l'extérieur des protéines et ces groupes sont impliqués dans l'équilibre acido-basique. Les courbes de titrage des protéines sont très complexes car les groupements ionisables sont nombreux et peuvent représenter jusqu'à 30 à 50 % du nombre total de résidus ; de plus l'ionisation d'un groupement donné dépend de son environnement, le pK_a pouvant alors varier de plus ou moins 1. Au cours du titrage d'une protéine de sa forme - vers la forme +, il existe un pH pour lequel le nombre total de + est égal au nombre total de -, c'est le pHi (**point isoélectrique**), pH pour lequel la charge globale est égale à 0.

La présence d'ions peut entraîner des modifications importantes de ces interactions de même que la proximité d'autres groupements ionisés ou non . *L'augmentation de la force ionique au pHi améliore la solubilité en réduisant les attractions électrostatiques intermoléculaires* .

3.5. Liaisons par pont hydrogène.

Ces liaisons sont mises en évidence par spectroscopie IR, Raman ou par RMN. Ce type de liaison s'établit entre un atome électronégatif possédant au moins un doublet électronique (O, N, S) et un atome d'hydrogène lui-même lié à un atome électronégatif. Dans les protéines ces ponts se forment par exemple entre l'O du C = O d'une liaison peptidique et l'hydrogène du NH d'une autre liaison peptidique. La distance - O ... H - est d'environ 0,2 nm. Dans les protéines ces liaisons se forment entre amide et carbonyle (ASN-GLN), phénol et carbonyle (TYR - ASN ou GLN), carbonyle et hydroxyl (ASP-GLU-SER). L'énergie de ces liaisons est de l'ordre de 10 à 40 kJ.mole⁻¹ et varie en fonction de l'électronégativité et de l'environnement.

Ces liaisons jouent un rôle déterminant dans la stabilisation de structures secondaires (hélice α , feuillets β) et tertiaires.

Les protéines, par les groupements polaires non ionisés des chaînes latérales des résidus d'acides aminés situés en surface, peuvent former avec les molécules d'eau de nombreux ponts hydrogène, ce qui contribue à la structure et à la solubilité. L'eau peut entrer en compétition avec des liaisons H "peptidiques", ce qui peut déstabiliser la molécule. Il faut néanmoins retenir que la biosynthèse de la macromolécule protéique a lieu en milieu aqueux : il s'établit alors un équilibre entre l'eau et la protéine et c'est sous sa forme hydratée qu'il faut envisager sa fonctionnalité *in vivo* .

Ces liaisons sont détruites par la chaleur, l'urée, le chlorure de guanidine.

3.6. Interactions hydrophobes.

La structure native d'une protéine est fonction du solvant dans lequel elle se trouve. Ainsi l'addition d'1 mole d'urée à 10 moles d'eau permet de modifier complètement la conformation d'une protéine native **avec adoption de structures désorganisées. Par ailleurs, il est possible d'induire la formation de structures plus ordonnées dans des solvants dont la capacité à former des liaisons hydrogène est inférieure à l'eau** (par ex. le 2-chloroéthanol).

L'hydrophobicité des chaînes latérales des résidus d'acides aminés est liée à une structure chimique apolaire telle qu'aucune interaction (sauf les interactions de Van der Waals) ne peut se produire avec des molécules polaires comme l'eau. Ces chaînes latérales qui "fuient" l'eau se trouvent donc souvent regroupées dans des zones hydrophobes internes. En présence d'urée, l'affinité des chaînes latérales apolaires pour l'intérieur de la molécule diminue de quelques centaines de joule. L'énergie libre de transfert d'une mole de chaîne latérale de l'eau vers une solution d'urée 8 M est négative et égale à - 0,3, - 1,59, - 2,93 et - 3,05 kJ.mole⁻¹ respectivement pour l'alanine, la leucine, la phénylalanine et le tryptophane. Comme les résidus apolaires représentent environ 50 % de l'ensemble des résidus d'une protéine, l'urée induit donc des modifications importantes de la conformation. L'énergie de ces interactions, voisine de 3 à 13 kJ.mole⁻¹ augmente avec la température en milieu aqueux .

3.7. Ponts disulfure.

Ces ponts formés par oxydation de deux résidus de cystéine permettent la stabilisation des conformations protéiques et limitent leur nombre.

Dans une protéine possédant n résidus de cystéine, le nombre de combinaisons aptes à former des points est C₂ⁿ. Si n est pair le premier pont disulfure a n - 1 possibilités de se former, le second n - 3, etc... et le nombre de ponts possibles est N = (n - 1) (n - 3) (n - 5) ... (1). Bien qu'il existe de nombreuses possibilités, un seul arrangement est souvent possible.

Ainsi quand la ribonucléase est dénaturée par le β-mercaptoéthanol, les 4 ponts disulfure initiaux se reforment (à pH 8 et à l'air) alors qu'il existe 105 possibilités de formation de ponts S-S (N = 7.5.3.1); l'activité biologique de la molécule réapparaît. Cependant si la réoxydation (élimination du β-mercaptoéthanol) est réalisée en milieu urée 8 M, l'élimination ultérieure de l'urée conduit à l'obtention d'un ensemble de structures dont l'activité n'est égale qu'à 1 % de l'activité initiale.

Ceci est en bon accord avec la prédiction des possibilités de formation des ponts car 1 seule structure sur les 105 possibles correspond à la protéine native active.

Dans d'autres systèmes protéiques, des réactions d'échange peuvent se produire. Ces réactions affectent les propriétés des molécules. Si elles se produisent entre molécules différentes, des modifications des propriétés rhéologiques importantes apparaissent alors. Ainsi la viscosité et l'aptitude à gélifier de solutions protéiques sont étroitement liées à ces échanges de ponts disulfure.

Ces liaisons covalentes, dont l'énergie est élevée (320 - 385 kJ.mole⁻¹) ne sont ni linéaires ni dans un même plan (figure 4, chapitre II) et sont à l'origine d'isomères optiques. Leur présence impose des contraintes importantes à la structure protéique et il est difficile de modifier la conformation de protéines contenant de nombreux ponts disulfure en particulier par chauffage.

Après réduction de ces ponts, certains sites hydrophiles (et hydrophobes) peuvent devenir accessibles à l'environnement solvant, ce qui se traduira par une augmentation de la solubilité.

Les réducteurs puissants, comme le dithiothréitol ou le β-mercaptoéthanol, ne sont pas utilisables dans la préparation de protéines alimentaires en raison de leur toxicité. Pour rompre des ponts disulfure dans le but d'augmenter la solubilité d'une protéine alimentaire, il est possible d'utiliser les sulfites qui donnent des S-sulfonates (-S-SO₃-), ou encore de rajouter des réducteurs comme la cystéine .

VII - EXTRACTION & PURIFICATION DES PROTEINES

1. Objectifs de l'extraction & purification.

Jusqu'aux environs des années 1980 il était exceptionnel d'extraire et purifier des protéines à usage alimentaire exception faite des molécules possédant des activités enzymatiques, hormonales ou encore pharmacologiques.

Si quelques produits d'usage courant sont disponibles à l'état quasiment pur (saccharose, chlorure de sodium) ou dans un état correspondant à un mélange de composés aux propriétés communes (huiles, margarines, etc), il existe encore de nos jours certaines réticences à consommer des préparations protéiques purifiées.

La purification des protéines est réalisée:

- pour **étudier** les structures, la ou les fonctions et leurs interrelations. Dans ce cas, une petite quantité de protéine est suffisante mais sa pureté doit être la meilleure possible
- pour des **utilisations industrielles** et en particulier en technologie alimentaire. Dans ce cas la pureté ne joue qu'un rôle secondaire par rapport aux coûts de production et aux besoins. Les objectifs de l'extraction sont alors d'ordre fonctionnel, organoleptique, nutritionnel ou encore économique.

Le **choix des sources de protéines** à extraire & purifier dépend du but à atteindre.

L'extraction des protéines de sous-produits d'industries agroalimentaires comme les laiteries, les abattoirs, les amidonneries, les féculeries, les brasseries, les huileries, les distilleries, les sucreries etc répond à la fois à un souci de protection de l'environnement par maîtrise des rejets et à un souci de récupération de protéines "nobles" potentiellement intéressantes aux plans de leurs propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles par exemple.

Pour améliorer la valeur nutritionnelle de sources de protéines végétales il faut souvent les séparer de facteurs toxiques ou antinutritionnels (lectines, fibres, polyphénols, etc).

L'amélioration des qualités organoleptiques requiert par exemple, pour l'acceptabilité, la maîtrise de la couleur (vert et chlorophylles, rouge et hémoglobine etc) ou du goût et des arômes (amertume, odeur d'herbe etc).

La meilleure utilisation de productions alimentaires en court-circuitant certaines transformations protéines-protéines inutiles et de très mauvais rendement, ce qui assurerait une meilleure disponibilité au niveau mondial en particulier.

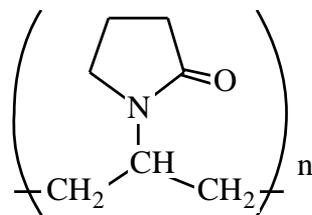
Pour les protéines à activité enzymatique, la source choisie sera celle dans laquelle la protéine est la plus abondante et la plus stable. Cette source sera, si possible, d'une grande disponibilité et d'un coût le plus bas possible. Quand cela est possible on utilise des cellules pro ou eucaryotes susceptibles d'être cultivées (bactéries, levures, moisissures, cellules végétales ou animales). D'organes animaux sont extraites trypsine, rénine (présure), pepsine et d'organes végétaux papaïne, broméline, ficine, actinidine. Le génie génétique permet d'obtenir des protéines recombinantes qui sont souvent exprimées en grandes quantités dans des cellules microbiennes faciles à cultiver. Il arrive parfois que ces protéines ne soient pas excrétées ou se retrouvent sous une forme insoluble en milieu aqueux (*Escherichia coli*). Quand elles sont excrétées (*Bacillus subtilis*) la physiologie de la bactérie est moins connue et la bactérie plus difficile à contrôler. *Saccharomyces cerevisiae* n'excrète que de petits peptides. Les modifications post-transcriptionnelles comme la glycosylation ne sont pas effectuées par les microorganismes. Les cultures de cellules animales (cellules d'insectes et de baculovirus) permettent d'exprimer bon nombre de gènes avec modifications post-transcriptionnelles.

Les enzymes à purifier sont par exemple des protéases utilisées dans l'industrie des détergents, des amylases hydrolysant l'amidon ou des pectinases hydrolysant les composés pectiques. Dans le cas de

protéines à activité enzymatique ou aux propriétés fonctionnelles recherchées, il est fondamental de les produire à l'état natif pour que la préparation présente une activité "technologique" ou pour les enzymes une activité spécifique aussi élevée que possible.

Souvent, la structure native des protéines d'un produit végétal ou animal est altérée au cours de l'extraction par les conditions adoptées (température, traitements mécaniques et/ ou chimiques, etc.) mais aussi par le contact avec des protéases soit naturellement présentes (trypsine, actinidine du kiwi, papaïne de la papaye, broméline de l'ananas) soit libérées et mises en contact des protéines à extraire par le traitement (cathepsines, etc). Pour minimiser ces modifications défavorables il est possible de maîtriser la concentration locale excessive en composés dénaturants divers au cours de leur addition, de contrôler la température (aux températures inférieures à 10°C l'activité des protéases est réduite) et le pH (les pH extrêmes sont des facteurs de dénaturation), d'utiliser des inhibiteurs de protéases comme *leupeptine* : N acétyl-LEU-LEU-ARG-al, *antipaine* : (S)-1-carboxy-2phényléthyl carbanoyl-ARG-VAL-ARG-al, *chymostatine* : PHE-(Cap)-LEU-PHE-al, ces inhibiteurs étant ensuite éliminés par les propriétés de leur fonction aldéhydrique).

Pour extraire les protéines intracellulaires il faut souvent détruire par des moyens physiques ou chimiques les membranes et parois cellulaires imperméables aux macromolécules. Les protéines membranaires ne seront extractibles qu'en présence de détergents ou de solvants organiques. La paroi pecto-cellulosique des cellules végétales les rend plus proche dans leur comportement des cellules microbiennes que des cellules animales. Par ailleurs les cellules végétales contiennent des acides organiques et des polyphénols oxydables par des polyphénol-oxydases en quinones susceptibles de réagir avec les protéines (tannage du cuir) et de se polymériser en tanins (tanins condensés très réactifs avec les protéines). La perte d'activité ou de valeur nutritionnelle, la diminution du rendement d'extraction requièrent soit une élimination des phénols par adsorption sur des résines soit une inhibition des activités polyphénol-oxydasiques ou une élimination des quinones par des réducteurs ou par condensation (polyamide, poly-caprolactone, polyéthylène, polyvinyl-pyrrolidone; cette dernière est la plus utilisée sous forme insoluble sous la dénomination de Polyclar AT).



Les effets inhibiteurs des acides peuvent être minimisés par le solvant qui doit imposer un pH par son pouvoir tampon.

2. Méthodes d'extraction des protéines.

De par leur structure native complexe, leur hétérogénéité, leurs associations avec d'autres composants cellulaires, les protéines sont les bio-polymères les plus difficiles à extraire.

L'extractibilité de protéines dans un environnement donné dépend d'abord de leur localisation et de leur solubilité en milieu aqueux, de leur dénaturabilité qui correspond à des modifications de leur conformation avec comme conséquence fréquente une diminution de solubilité et une perte d'activité. Elle est également fonction de la taille et de la forme de la molécule, de sa polarité etc.

Le schéma général de l'extraction purification des protéines (figure 56) est fonction de la matière première et plus particulièrement de sa teneur en eau.

Dans les **méthodes d'extraction négatives**, la (ou les) protéine est maintenue dans la matière première de laquelle on extrait divers composés, le résidu s'enrichissant alors relativement en

protéines. Cette méthode ne permet pas d’atteindre des taux de purification élevés car la protéine reste associée à de nombreuses substances; le produit obtenu est un concentrat.

Dans les **méthodes d’extraction positives**, la (ou les) protéine est extraite, par mise en solution le plus souvent, de la matière première puis séparée des composants qui l’ont accompagnée. Ces méthodes permettent d’atteindre des taux de pureté très grands, le produit obtenu étant un isolat.

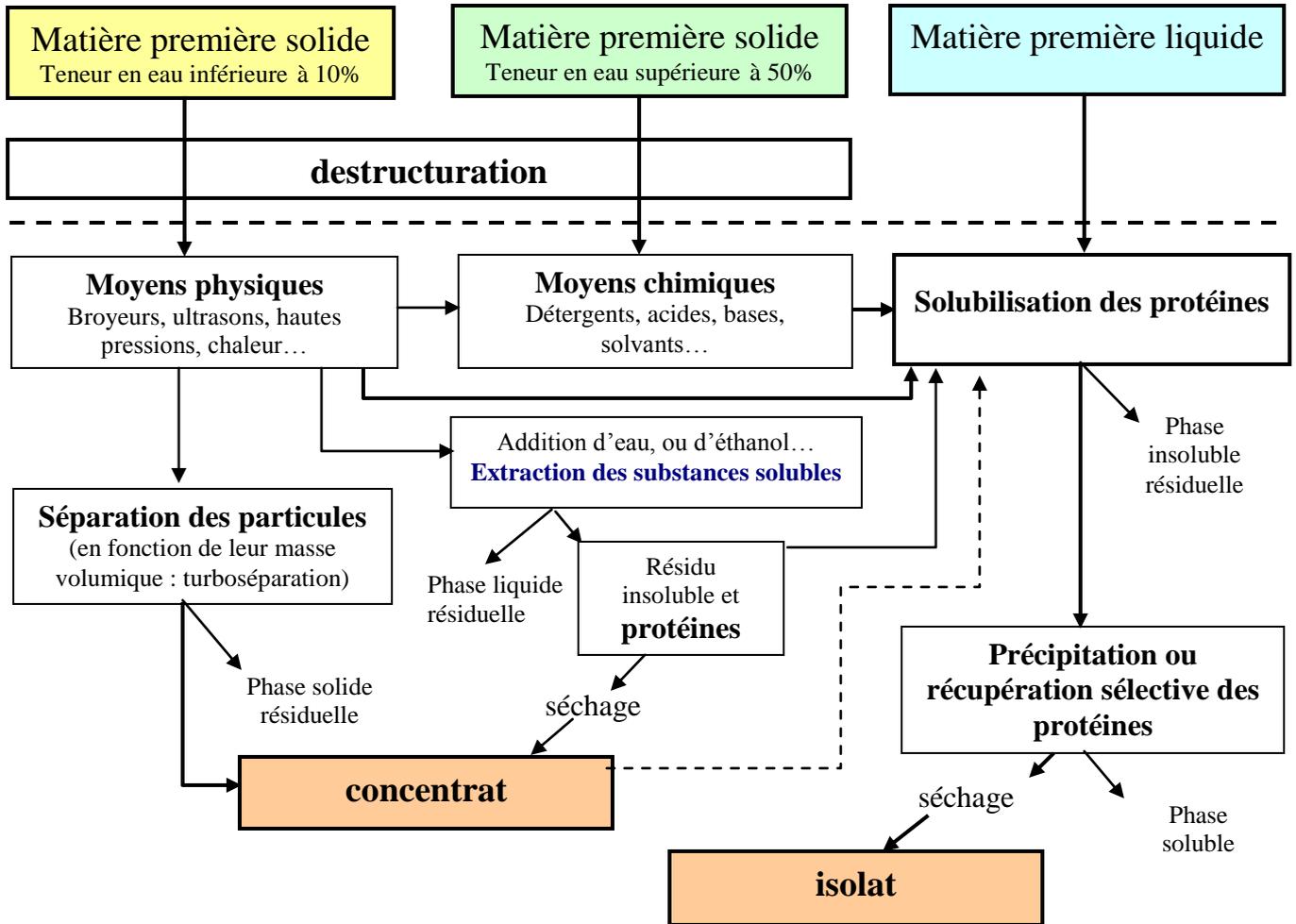


figure 56. Schéma des grandes voies d’extraction des protéines

Le rendement d’extraction R ($R = \text{masse de protéine extraites} / \text{masse de protéines totales}$) est souvent plus faible pour les produits d’origine végétale que pour les produits d’origine animale.

La sélectivité caractérise le degré de pureté et d’homogénéité.

Le coût d’extraction dépend entre autre du rendement (à pondérer du temps d’extraction : masse extraite par unité de temps) et de la concentration de l’extrait.

3. Les procédés de déstructuration.

Ils permettent la délocalisation des protéines à extraire. Appliqués à des produits à faible teneur en eau ils augmentent le rapport surface / volume ce qui permet de meilleurs rendements d'extraction solide / liquide par la suite.

3.1. Traitements de déstructuration physique.

Les traitements de déstructuration physique sont nombreux : concassage, agitation, broyage, hachage, pressage, mouture, pulvérisation. Les technologies sont toujours adaptées aux propriétés de la matière première à traiter.

Au **laboratoire** cette opération est généralement réalisée en phase liquide.

Les **broyeurs** utilisés (Ultraturrax, Waring blender) sont des systèmes mécaniques plus ou moins sophistiqués, souvent à couteaux, qui peuvent être facilement réfrigérés.

Le passage par une poudre acétonique (résidu déshydraté résultant du broyage du tissu à basse température et de son traitement à -15°C par de l'acétone anhydre) donne des résidus délipidés enrichis en protéines et peptides avec parfois une dénaturation et une perte d'activité.

Les cellules bactériennes et levuriennes sont résistantes au broyage et il faut les déstructurer en présence de billes de verre ou de sable avec risques de pertes par adsorption.

L'**agitation** de la matière première additionnée d'un abrasif avec une fréquence élevée donne de bons résultats, la chaleur dégagée au cours de l'opération étant éliminée par refroidissement dans du CO₂ solide (neige carbonique).

Les parois cellulaires peuvent être fragilisées par des cycles congélation / décongélation.

Les pertes de charges subies par un liquide soumis à une pression élevée (500 bars et plus) puis brutalement ramené à pression atmosphérique permettent de rompre des cellules. Il en est de même avec certains procédés pour lesquels le liquide est projeté sur une paroi métallique avec une vitesse élevée (homogénéisateur).

L'**extrusion** de la matière première sous forme de pâte congelée produit, du fait des cisaillements, les rupture des parois cellulaires.

Les **ultra-sons** (20 kHz et plus) appliqués aux solutions produisent un phénomène de cavitation gazeuse, c'est à dire des zones de raréfaction gazeuse et de compression qui se déplacent rapidement. Les bulles gazeuses peuvent même coalescer et générer une onde de choc. La production de chaleur, de radicaux libres et d'ions peut conduire à une dénaturation des protéines, d'où la nécessité de refroidissement et d'opérer par des séquence de traitement de courte durée suivies d'une période de repos de quelques minutes.

Les **traitements thermiques** (50 à 140°C pendant des durées variables) permettent de fragiliser certaines structures, de fluidiser une phase (fonte des graisses), de solidifier une phase (coagulation presque toujours dénaturante et irréversible des protéines), de déshydrater dans certaines conditions (séchage, concentration) et enfin de pasteuriser, blanchir ou stériliser la matière traitée.

3.2. Traitements de déstructuration chimique.

Ces traitements sont nombreux et génèrent souvent des modifications de conformation.

Les traitements en milieu alcalin ou acide, pH éloignés du pHi, chargent négativement ou positivement les protéines, augmentant ainsi leur solubilité dans la phase aqueuse.

La force ionique modifie aussi la solubilité des protéines (effets de salting in ou de salting out).

Les détergents dissociant protéines et lipides provoquent souvent une dénaturation.

Certains solvants (acétone, toluène) favorisent l'autolyse cellulaire.

3.2. Traitements enzymatiques.

Il s'agit d'une méthode douce et sélective de déstructuration des parois cellulaires. L'activation des enzymes hydrolytiques endogènes est utilisable (autolyse), mais il y a risque de protéolyse.

Pour les bactéries Gram + , on peut utiliser le lysozyme du blanc d'œuf qui catalyse l'hydrolyse des liaisons β 1-4 glycosidiques des peptidoglycanes de la paroi. Dans le cas des levures on utilise des polysaccharidases d'origine fongique ou d'escargot (*Helix pomatia*).

4. Optimisation de la solubilisation.

De nombreux facteurs principaux souvent non indépendants sont à prendre à considération. Dans le cas de solubilisation de protéines destinées à être consommées dans notre alimentation, ils font l'objet d'une approche expérimentale basée sur la mise en place de plans d'expérience.

Parmi les plus importants on peut signaler le rapport solide/solvant, la granulométrie, le mode d'agitation, la température, le temps, le pH, la force ionique, la constante diélectrique, la présence de cations bivalents, etc.

5. Purification & concentration & récupération des protéines solubilisées.

La précipitation des protéines est un bon moyen de concentration qui engendre, selon les méthodes utilisées, des dénaturations réversibles ou non. Elle dépend essentiellement de facteurs qui sont :

- la nature, la polarité et la température du solvant
- la charge de la protéine directement liée au pH
- la conformation et le degré d'hydratation
- la présence de composés non protéiques (sels, oses, lipides).

5.1. Précipitation enzymatique.

La coagulation des caséines du lait par la **présure** est une des étapes de purification de caséinates, la phase liquide exsudant spontanément après tranchage et égouttage.

La coagulation du fibrinogène du sang par la thrombine est une séparation des hématies du sérum liquide.

5.2. Précipitation isoélectrique.

La solubilité d'une protéine est minimale à son pHi ce qui ne préjuge pas de sa précipitation. Les courbes de la solubilité en fonction du pH sont en forme de U et dépendent entre autre de la force ionique (figure 57).

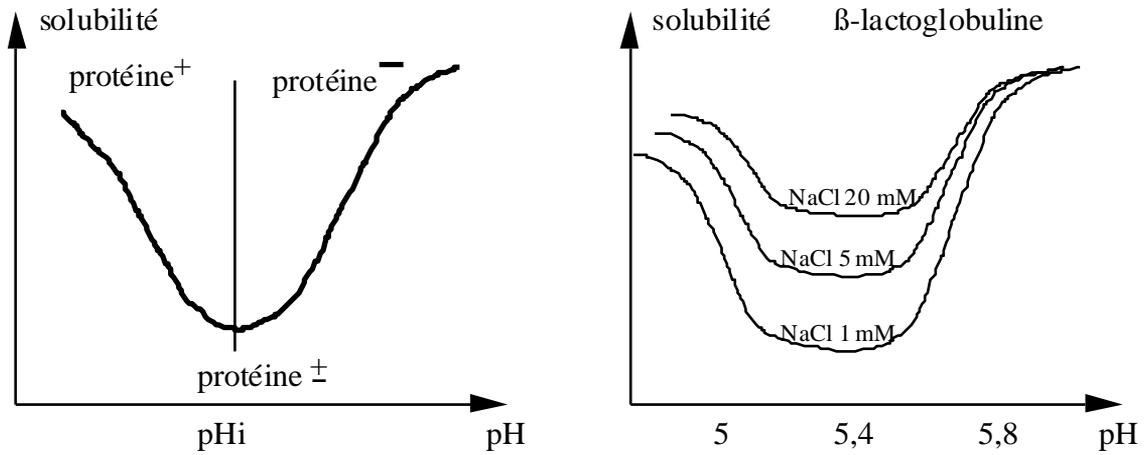


figure 57. Courbes de solubilité des protéines en fonction du pH.

Néanmoins, une protéine préalablement dénaturée par la chaleur ou un traitement en milieu très acide précipite avec un rendement très élevé à son pHi. Ce procédé est utilisé en laiterie pour récupérer les protéines sériques dans le caillé (procédé Centriwhey). La dénaturation thermique souvent irréversible génère des protéines aux propriétés fonctionnelles limitées.

5.3. Précipitation par augmentation de la force ionique.

Rappelons que les albumines sont solubles en phase aqueuse et que les globulines ne sont solubles qu'en présence de sels. La force ionique est définie par :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2$$

avec c concentration molaire en ion i et z valence de l'ion i.

(exemple : une solution molaire de Na Cl a une force ionique de 1 , de K2SO4 de 3)

La solubilité des protéines suit la loi de KIRKWOOD :

$$\log S = \log S_0 + B \sqrt{\mu} - A \cdot \mu$$

dans laquelle S est la solubilité,

S₀ la solubilité à force ionique nulle (dans l'eau),

A une constante indépendante de la température qui dépend du rayon de la molécule, de la nature du sel, de la constante diélectrique et de la température et

B une constante fonction de la température, de la nature du sel et de la constante diélectrique.

Souvent B>A ce qui conduit une augmentation de log S en fonction de μ aux faibles forces ioniques (effet de salting in) et à une diminution de log S aux fortes forces ioniques (effet de salting out) comme schématisé sur la figure 58.

Ces effets, qualifiés de réciroques, varient avec les ions ; plus un ion aura une charge et un volume importants et plus il fixera de molécules d'eau qui ne seront plus solvantes, l'effet de salting out étant alors élevé. Cette série est qualifiée de série d'HOFMEISTER ou de série lyotropique ou chaotropique. Classés en fonction de leurs effets croissants en salting out elle est la suivante :

trichloracétate > citrate > HPO₄²⁻ > SO₄²⁻ > tartrate > SCN⁻ > ClO₄⁻ > NO₃⁻ > acétate > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > OH⁻ > F⁻

Al⁺⁺⁺ > OH₃⁺ > Ba⁺⁺ > Sr⁺⁺ > Ca⁺⁺ > Mg⁺⁺ > NH₄⁺ > K⁺ > Na⁺ > H⁺ > Li⁺

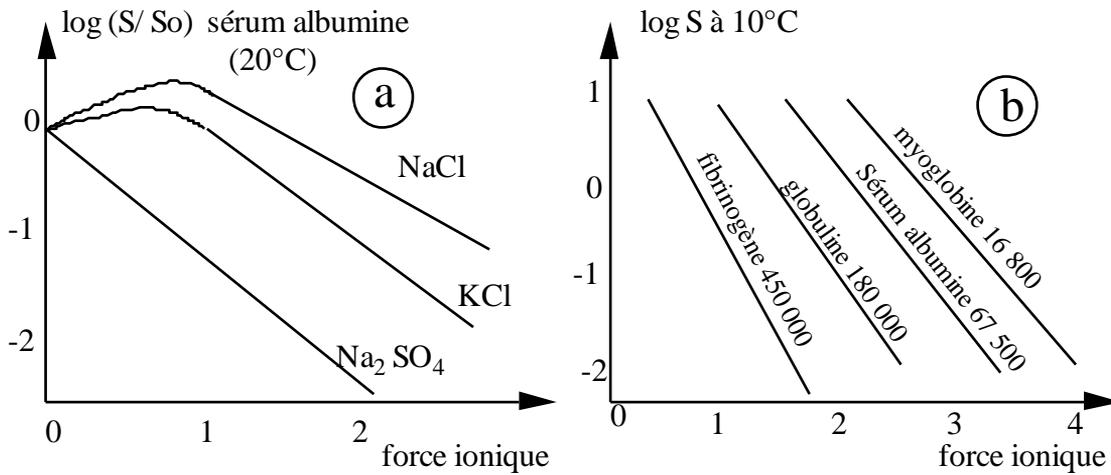


figure 58. a- Variations de la solubilité de la sérum albumine en fonction de la force ionique et de la nature du sel
 b- Variations de la solubilité en fonction de la force ionique $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ à pH 6,9.

Par ailleurs, plus le poids moléculaire de la protéine est élevé et plus sa précipitabilité pour une même force ionique est élevée (précipitation fractionnée). Dans la pratique c'est le sulfate d'ammonium qui est utilisé (solution saturée 4 M de densité 1,235) en milieu légèrement tamponné (50 mM).

5.4. Précipitation par diminution de la constante diélectrique.

L'urée ou le chlorure de guanidine augmentent D (D = 80 avec l'eau et 130 avec une solution 6M d'urée) diminuent l'intensité des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires et donc favorisent la solubilité des protéines chargées par augmentation des forces répulsives des molécules régies par la loi de COULOMB :

$$f = \frac{1}{D} \cdot \frac{q \cdot q'}{d^2}$$

Les solvants qui diminuent D diminuent la solubilité (diméthylsulfoxyde D = 49, diméthylformamide D = 37, méthanol D = 33, éthanol D = 24, acétone D = 21, benzène D = 2,3 et hexane D = 2).

5.5. Coprécipitation par adsorption.

Les polyéthylène glycols (PEG) de poids moléculaire compris entre 6000 et 20000 permettent de fractionner les protéines du sang à différents pH (4,6 6 et 7). Ils donnent de très nombreuses liaisons hydrogène avec les protéines.

L'acide polyacrylique permet d'obtenir à partir du lactosérum des protéines aux propriétés fonctionnelles comparables à celles du blanc d'œuf.

La poly-vinylpyrrolidone, les tanins, le poly-uronate, la carboxy-méthyl-cellulose, les alginates sont des polymères qui forment des complexes avec les protéines permettant leur récupération.

Les poly-phosphates (hexaméthaphosphate) et le chlorure ferrique (et la plupart des sels de métaux lourds malheureusement non utilisables en technologie alimentaire en raison de leur toxicité) sont d'excellents agents de précipitation des protéines.

5.6. L'ultrafiltration.

Il s'agit d'une méthode de concentration / séparation des macromolécules biologiques basée sur leurs différences de taille et de forme qui utilise des membranes semi-perméables (tamisage moléculaire). En fonction des dimensions des particules à séparer et donc de leur diamètre on peut décrire :

- la filtration jusqu'à 1000 nm (mulsion de globules gras, bactéries)
- la micro-filtration entre 1000 et 100 nm (virus, micelles de caséine)
- la nano-filtration entre 100 et 10 nm (virus, micelles)

- l'ultra-filtration entre 10 et 1 nm (protéines, hormones, vitamines)
- l'osmose inverse jusqu'à 0,1 nm (molécules organiques simples et ions).

Deux phases sont obtenues : un rétenant composé d'un concentré de molécules les plus volumineuses et un filtrat ou perméat contenant les molécules les plus petites qui sont à la même concentration que dans le rétenant (figure 59).

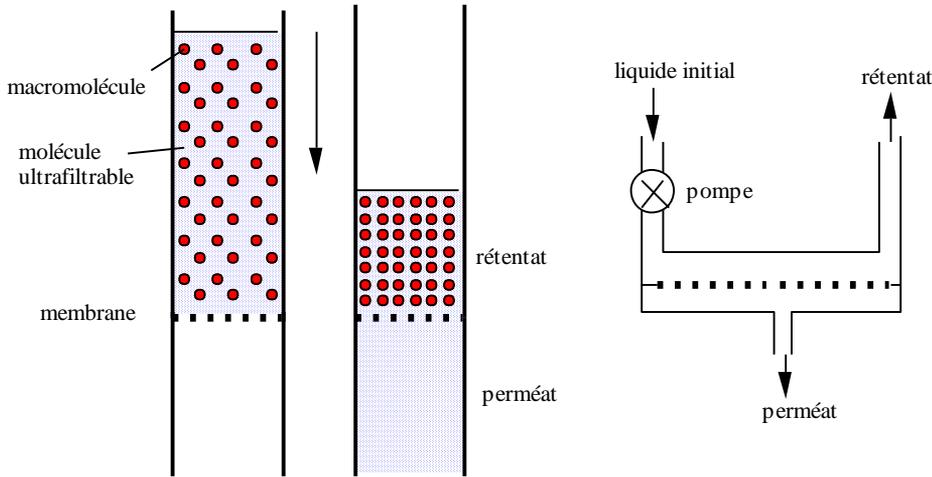


figure 59. Schéma de principe d'une ultrafiltration

Les membranes sont soit planes et le flux de filtration leur est perpendiculaire soit tubulaires et le flux est tangentiel. Les supports sont soit organiques (cellulose, acétate de cellulose, poly-carbonates et autres polymères dont les protéines) soit minéraux (alumine, céramique, oxyde de zirconium etc). Ces derniers sont plus résistants aux pertes de charge et aux agents chimiques de nettoyage.

La rétention dépend du diamètre moyen des pores mais aussi des dimensions et de la conformation des molécules. Le débit de filtration dépend de nombreux facteurs et les interactions entre protéines concentrées à la surface de la membrane et avec la membrane génère la formation d'une couche de polarisation qui modifie les propriétés et les performances du système. Cet effet de polarisation limite à 250 - 350 g / l la limite de concentration du rétenant. L'élimination de solutés dans le perméat requiert alors l'addition d'eau (diafiltration : débit d'eau = débit de perméat) pour rester en-dessous des concentrations limites.

L'ultrafiltration destinée à la purification des protéines n'est utilisée à l'échelle industrielle que pour le lactosérum, les extraits végétaux sans autres polymères, le sang. L'élimination de l'eau est possible grâce à l'emploi de membranes à porosité très faible : osmose inverse.

Au laboratoire de nombreuses membranes (planes ou fibres creuses) en polymères organiques sont disponibles et proposées avec des seuils de coupure précis.

| XM 300 | XM 100 | XM 50 | PM 30 | PM 10 |
|-------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| fibrinogène 300 000 | globuline 7S 64 000 | hémoglobine 64 000 | ovalbumine 45 000 | pepsine 35 000 |
| apoferritine 480 000 | 160 000 | Sérum albumine 67 000 | myoglobine 17 800 | insuline 6000 |
| | | | | peptides |

5.7. Méthodes basées sur la structure et les propriétés des protéines.

Ces méthodes sont essentiellement basées sur les propriétés de surface des molécules protéiques et concernent leur charge, leur polarité, leur apolarité, la présence de groupements particuliers. En effet,

seule la surface des protéines permet des échanges facilement réversibles avec le milieu environnant sans modification par trop défavorable de conformation, ce qui permet leur purification.

5.7.1. Méthodes basées sur la taille et la forme : chromatographie d'exclusion.

Le principe de cette méthode est indiquée dans le chapitre V.3.5. Pour les éléments de théorie plus généraux voir le chapitre II.7.1.

Il s'agit d'une méthode intéressante pour purifier des protéines car :

- elle est peu dénaturante.
- elle n'induit pas de modification de milieu en cours d'opération ; l'eau, facilement éliminable par séchage ou lyophilisation par exemple, peut être utilisée comme phase éluante.
- la récupération des activités enzymatiques est excellente.

A l'échelle industrielle les colonnes utilisées en série ou en parallèle ont 15 cm de haut, 37 cm de diamètre et leur volume total est de 16 l. Cinq unités de ce type en série donnent la même résolution qu'une colonne de 75 cm de longueur.

Les polymères les plus utilisés dans ce type de séparation sont indiqués dans la tableau 13.

| nom commercial | polymère | pH : domaine d'emploi | stabilité (temp. °C) | stabilité | |
|----------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------------|
| | | | | solvants | sels chaotropiques I = instable |
| Séphadex | dextrane | 2 | 120 | biodégradable | |
| Séphacryl | dextrane/acrylamide | 2 - 11 | 120 | stable | |
| Sépharose | agarose | 4 - 9 | 40 | instable , urée I | |
| Sépharose CL | agarose réticulé | 3 - 14 | 120 | stable | |
| Ultrogel A | agarose | 4 - 9 | 40 | sels I, urée I, solvants I | |
| Ultrogel ACA | agarose/poly acrylamide | 3 - 10 | 40 | biodégradable | |
| Biogel A | agarose | 4 - 9 | 40 | sels I, urée I, solvants I | |
| Biogel P | polyacrylamide | 2 - 10 | 120 | solvants I, oxydants I | |
| Fractogel TSK | polyéther réticulé | 1 - 14 | 120 | stable | |

tableau 13. Matrices utilisables en gel filtration.

Les gels les plus utilisés sont des agaroses, des polyacrylamides ou des gels mixtes.

Le choix de la matrice pour purifier une protéine repose sur plusieurs facteurs :

- la gamme de poids moléculaires à séparer. Si les protéines sont exclues totalement, la méthode permet leur dessalage.
- la résolution. Toutes conditions étant égales par ailleurs les granulométries les plus fines donneront une meilleure résolution mais avec un débit plus faible (granulométrie souvent exprimée en mesh avec 400 mesh = 37 µm, 100 mesh = 149 µm et 10 mesh = 2 mm). Les gels rigides peu déformables sont utilisables en HPLC et FPLC (fast protein liquid chromatography).
- stabilité aux hydrolyses d'origine microbienne, aux solvants, à l'urée et à certains sels.

5.7.2. Méthodes basées sur la charge. Echange d'ions.

Ces méthodes sont surtout représentées par les échanges d'ions en batch ou en colonne. Autour de leur pHi les protéines sont chargées soit positivement soit négativement et sont donc échangeables au niveau d'une phase stationnaire le plus souvent solide et porteuse de charges de signe opposé (figure 60).

- Si elles sont chargées positivement ($pH < pHi$), elles seront échangeables avec un support chargé négativement et la chromatographie est qualifiée de chromatographie d'échange de cations.
- Si elles sont chargées négativement ($pH > pHi$), elles seront échangeables avec un support chargé positivement et la chromatographie est qualifiée de chromatographie d'échange d'anions.

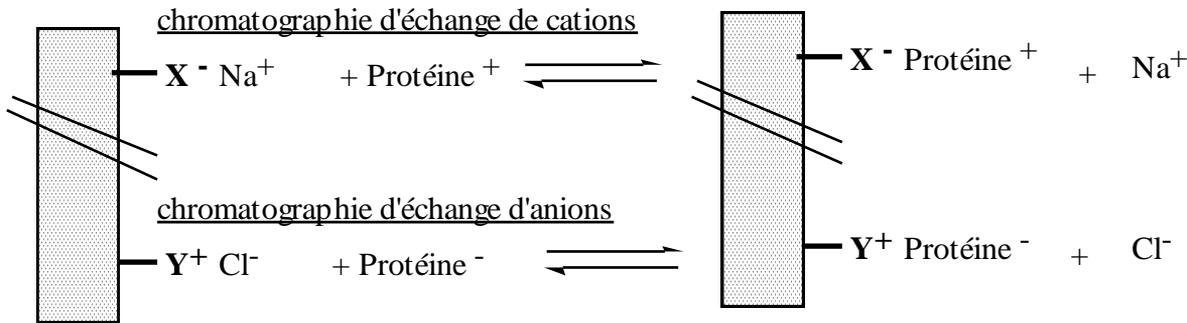


figure 60. Schéma des échanges d'ions dans la purification d'une protéine

Les protéines fixées par liaison ionique à la phase stationnaire seront éluées sélectivement soit par variation de pH soit surtout par variation de la concentration en contre-ion (ion de même charge que la protéine). Par exemple une protéine de charge nette +4 sera éluée avec une concentration en ion sodium plus faible que celle requise pour éluer une protéine de charge nette de +10. Toutes conditions étant égales par ailleurs, l'affinité des contre-ions varie avec leur charge et leur taille et suit sensiblement la série d'Hofmeister (cf chapitre VII.5.3).

a) Choix de la matrice.

Ce choix porte d'abord sur la nature de la matrice de la phase stationnaire souvent constituée par un polymère organique (cellulose, agarose, dextrans, polyacrylate, polystyrène, poly-éther etc) ou minéral portant sur un "bras" organique une fonction ionisable. Polystyrènes hautement réticulés et surtout silices greffées (TSK) peu déformables sont utilisables en chromatographie liquide haute performance.

b) Choix du groupement fonctionnel.

Le choix porte ensuite sur la nature du groupement fonctionnel (ionogène) impliqué dans l'échange d'ion et selon la valeur de son pKa on définit les échangeurs forts ou faibles.

Les échangeurs forts (de cations ou d'anions) restent ionisés dans une très large gamme de pH, donc en général dans l'intervalle de pH utilisé pour purifier la protéine.

Les échangeurs faibles ne restent par contre ionisés que dans une gamme restreinte de pH (figure 61).

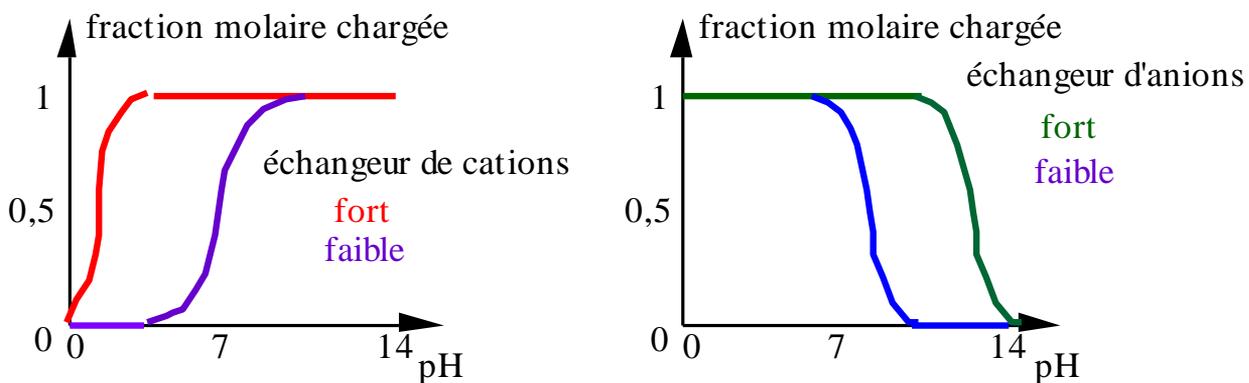


figure 61. Variation de la charge des échangeurs d'ions forts et faibles en fonction du pH

Les principaux groupes fonctionnels échangeurs d'ions utilisés pour purifier les protéines sont indiqués dans le tableau 14.

| échangeur d'anions | nom | abréviation |
|--|------------------------------------|-------------|
| <u>forts</u> | | |
| -CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃ | triméthylaminométhyl | TAM |
| -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃ | triéthylaminoéthyl | TEAE |
| -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ - CH ₂ -CH(OH)CH ₃ | diéthyl-2-hydroxypropyl-aminoéthyl | QAE |
| <u>faibles</u> | | |
| -C ₂ H ₄ N ⁺ H ₃ | aminoéthyl | AE |
| -C ₂ H ₄ N ⁺ H(C ₂ H ₅) ₂ | diéthylaminoéthyl | DEAE |
| échangeur de cations | nom | abréviation |
| <u>forts</u> | | |
| -SO ₃ ⁻ | sulfo | S |
| -CH ₂ -SO ₃ ⁻ | sulfométhyl | SM |
| -C ₃ H ₆ -SO ₃ ⁻ | sulfopropyl | SP |
| <u>faibles</u> | | |
| -COO ⁻ | carboxy | C |
| -CH ₂ COO ⁻ | carboxyméthyl | CM |

tableau 14. Groupements échangeurs d'ions utilisés pour la purification des protéines.

Pour caractériser au mieux le système on donne le nom du groupement impliqué associé au nom de la matrice par exemple DEAE-cellulose, CM-cellulose, polystyrène sulfoné etc.

Le choix du groupement fonctionnel à utiliser dépend entre autre de la stabilité de la protéine en fonction de la force ionique et du pH. Si la protéine est plus stable sous forme cationique on utilisera un échangeur de cations et inversement. Par exemple l' α -amylase est stable au-dessus de pH 6 ce qui conduit à utiliser un échangeur d'anions pour la purifier (figure 62).

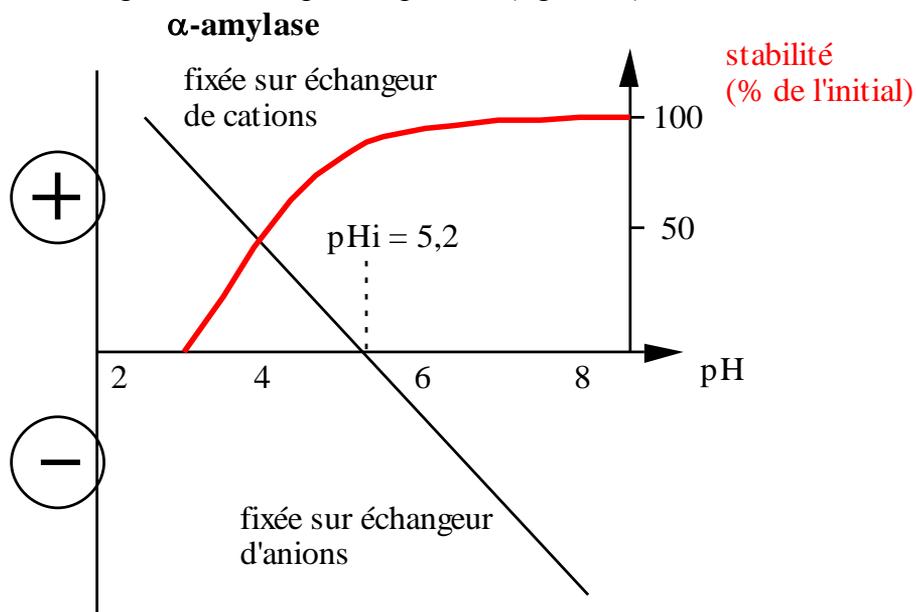


figure 62. Charge et stabilité de l' α -amylase en fonction du pH.

c) Modalités de la séparation.

Il est fréquent de purifier une protéine donnée par une séquence chromatographie d'échange d'anions / chromatographie d'échange de cations.

Le point isoélectrique peut être déterminé par focalisation isoélectrique. Les protéines migrent sous l'effet d'un champ électrique dans un milieu tamponné en gradient par des ampholines; quand elles atteignent la zone correspondante à leurs pHi respectifs leurs vitesses de migration s'annulent et leurs localisations dans les ampholines correspondent à leurs pHi.

La séparation par échange d'ions peut être réalisée en batch ou sur colonne, l'éluion étant réalisée soit de façon statique discontinue avec un petit volume d'éluant de forte force ionique, soit de façon dynamique par un flux constant d'éluant.

Dans un système donné il existe trois possibilités d'éluion :

- isocratique (la composition de la phase éluante est constante)
- par paliers (la composition de la phase éluante est discontinue et croissante (par ex en force ionique))
- en gradient . Dans ce cas généralement contrôlé par des systèmes informatisés (couplage pompes-micro-ordinateur), la composition de la phase mobile (pH et force ionique) varie dans le temps linéairement ou avec un autre mode (exponentiel, partiellement continue puis linéaire etc).

d) Applications en sciences des aliments.

A l'échelle industrielle deux procédés sont actuellement utilisés:

- le **procédé Sphérosil** (Rhône Poulenc) dans lequel une silice est porteuse des groupements fonctionnels échangeurs d'ions. Il s'agit d'une technique résolutive permettant d'atteindre de bons niveaux de purification. Il est utilisé pour la purification des protéines du lactosérum, du soja et reste potentiellement utilisable pour purifier les protéines du colza, de luzerne, et de pommes de terre.

- le **procédé Vistec**. Il utilise des celluloses échangeuses d'anions faibles.

L'inconvénient majeur de ces procédés réside dans la présence dans l'éluat d'ions participant à l'échange et aussi de la nécessité d'utiliser les deux types d'échanges (anions et cations) pour les échantillons de pH voisins de la neutralité.

5.7.3. Méthodes basées sur la charge. Chromato-focalisation.

Il s'agit d'une méthode hybride entre l'échange d'ions et l'électro-focalisation.

En électro-focalisation les protéines sont séparées sous l'effet d'un champ électrique dans une matrice gélifiée présentant un gradient de pH.

En échange d'ions les protéines sont à un moment donné (à une force ionique et un pH déterminés) liées à un échangeur insoluble puis éluées grâce à un gradient de pH et/ou de force ionique.

En chromatofocalisation (figure 63) le gradient de pH est obtenu en introduisant dans une colonne préalablement équilibrée à un pH donné (per exemple 9) un tampon de pH différent (par exemple 7).

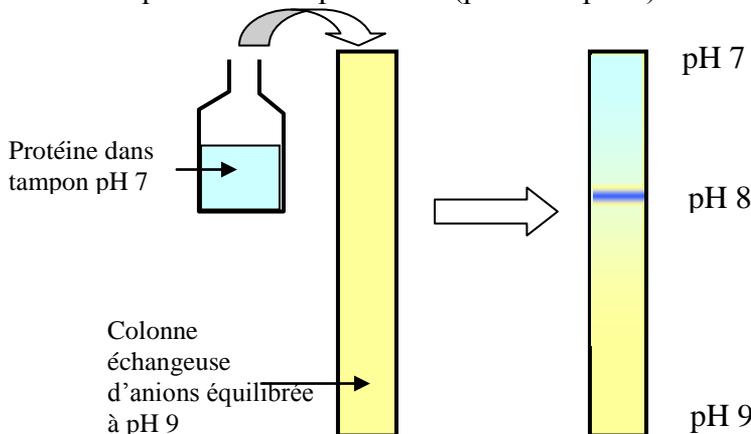


figure 63 . Schéma du principe de la chromatofocalisation .

Si la protéine en milieu tamponné de pH 7 et de pHi = 8 est introduite dans une colonne préalablement équilibrée à pH 9, la protéine migrera et son pH environnant augmentera sous l'effet du pH colonne. Quand elle atteindra un pH juste supérieur à son pHi, sa charge négative lui permettra de se lier à la matrice chargée positivement. Quand le tampon pH 7 continuera de migrer dans la colonne une diminution de pH interviendra et la protéine chargée positivement à pH < à son pHi migrera jusqu'à ce qu'elle atteigne un pH supérieur à son pHi et ainsi de suite. La protéine est éluée à un pH très proche de son pHi.

Au cours de l'opération il se produit une focalisation car les protéines migrent dans la colonne avec une vitesse inférieure à celle de la phase mobile et les protéines sont arrêtées et concentrées au pH égal à leur pHi.

On utilise en général des poly-tampons constitués par des mélanges d'une grand nombre d'acides aliphatiques, des copolymères de glycine etc.

5.7.4. Méthodes basées sur l'hydrophobicité de surface.

Il s'agit de chromatographie en phase inverse (cf chapitre II.7.3.2). La protéine donne des interactions hydrophobes avec une phase stationnaire apolaire par les chaînes latérales des résidus d'acides aminés apolaires positionnées en surface (figure 64).

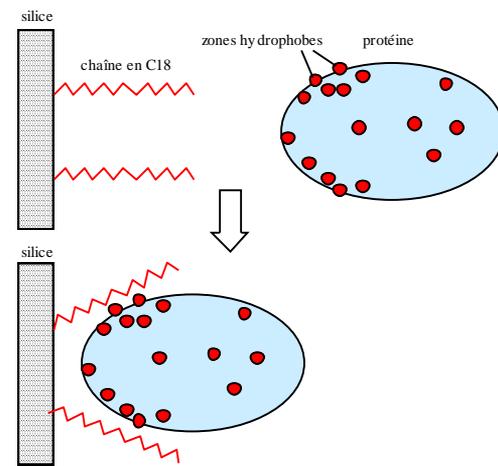
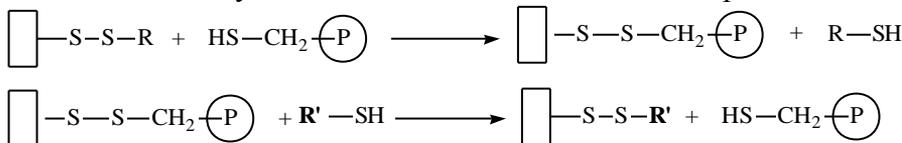


figure 64. Chromatographie hydrophobe d'une protéine .

Les groupements utilisables sont des C18 (octadécyl), C8 (octyl), phényl, etc. L'éluion est réalisée par addition d'un tensioactif non ionique (Triton X100 par exemple), par addition d'éthylène glycol qui diminue la polarité, par variation de pH. Ces méthodes sont surtout utilisées à l'échelle du laboratoire.

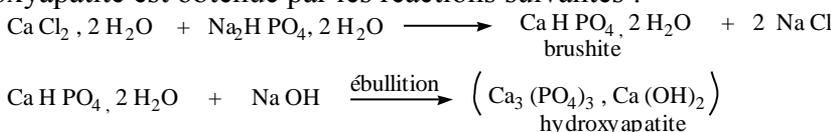
5.7.5. Méthodes basées sur l'établissement de liaisons covalentes.

Il s'agit surtout d'une chromatographie dans laquelle des échanges thiols - ponts disulfure permettent des purifications de protéines aptes à donner de tels échanges. L'éluion est réalisée par réduction du pont disulfure au moyens de réducteurs comme le β-mercapto-éthanol ou le dithiothréitol.



5.7.6. Chromatographie sur hydroxyapatite.

L'hydroxyapatite est obtenue par les réactions suivantes :



L'adsorption des protéines fait intervenir des ions Ca^{++} et PO_4^{3-} présents à la surface des cristaux. Ainsi les phosphoprotéines ont une grande affinité pour l'hydroxyapatite (phosphoprotéine du jaune d'œuf, α et β lipovitellines, phosvitine).

5.7.7. Chromatographie par chélation.

L'adsorption entre la protéine à isoler et la matrice intervient par l'intermédiaire de liaisons de coordination entre des ions métalliques retenus par des résines. Avec les protéines ce sont les résidus his, trp et cys de surface qui sont à même de donner ce type de liaison.

5.7.8. Chromatographie d'affinité.

Découverte en 1910 lors de l'adsorption sélective d'amylase sur un amidon insoluble, elle est basée sur la reconnaissance spécifique de deux molécules :

- enzyme & substrat
- enzyme & inhibiteur compétitif
- antigène & anticorps
- hormone & récepteur
- glycoprotéine & lectine

Les liaisons impliquées sont multiples en nombre et en nature (liaisons ioniques, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes essentiellement) mais restent parfaitement localisées dans l'espace. Ainsi l'énergie échangée est élevée ce qui conduit à une constante d'association élevée (affinité élevée).

Le ligand immobilisé sur une phase stationnaire fixe est généralement situé au sommet d'un bras pour faciliter le positionnement spatial et donc les interactions avec la molécule affine (figure 65).

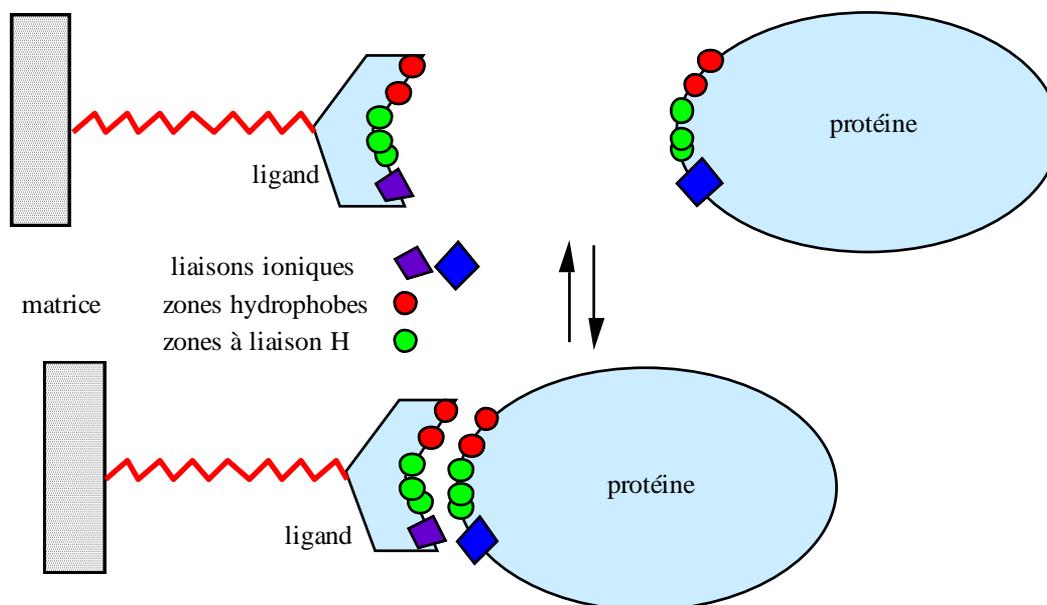


figure 65. Schéma d'une équilibre entre ligand et protéine en chromatographie d'affinité.

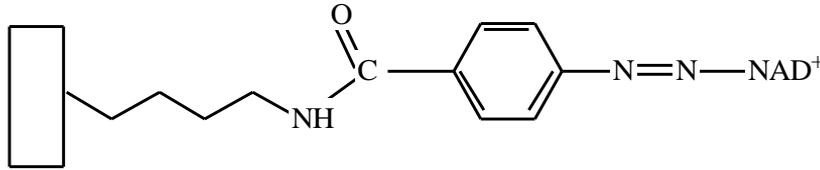
a) Le choix du ligand.

• *Spécificité*

Idéalement un ligand ne devrait reconnaître qu'une seule protéine à purifier. Souvent d'autres protéines que celle visée donnent un certain nombre d'interactions avec le ligand mais avec une énergie échangée plus faible.

Par exemple l' α -chymotrypsine se lie aux deux énantiomères de l'ester méthylique du tryptophane, l'ester D non hydrolysable par l'enzyme constituant donc un ligand potentiel pour la purification de l'enzyme.

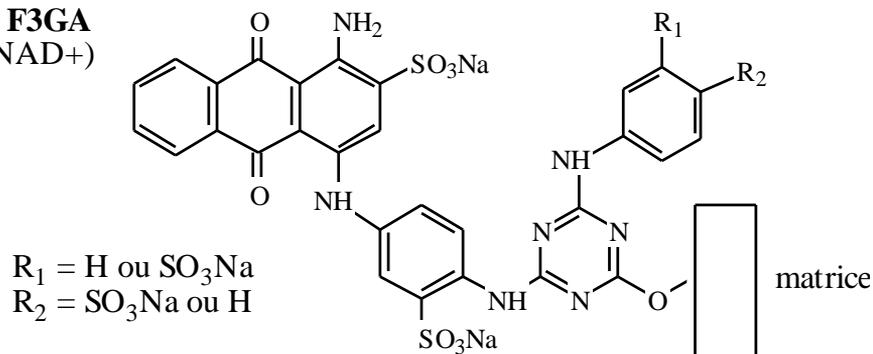
La fixation du NAD^+ sur une matrice insoluble permet la fixation des déshydrogénases qui utilisent l'enzyme pour fonctionner. Ce ligand est qualifié de "général".



Ces enzymes ainsi que les kinases, qui ont l'ATP comme cofacteur, peuvent être purifiées en fixant de l'AMP 5' à une matrice insoluble.

Il existe des "pseudo-ligands" qui sont des substances mimétiques. Ainsi les colorants dérivés de triazines polysulfonés (bleu Cibacron 3GA ou HE3B spécifiques respectifs du NAD^+ et de NADP^+) se lient spécifiquement aux enzymes à NAD^+ qui ont une conformation particulière qualifiée de "pli dinucléotidique".

bleu Cibacron F3GA
(spécifique du NAD^+)



Les lectines sont des glycoprotéines d'origine végétale ou présentes chez certains mollusques capables d'agglutiner spécifiquement les érythrocytes humains (agglutinines). Constituées généralement de 4 protomères identiques reconnaissant le même glucide soit de 4 protomères identiques 2 à 4 reconnaissant plusieurs glucides (tableau 15).

| lectine | poids moléculaire | nombre de sous-unités | spécificité |
|-------------------------|---|------------------------------|---|
| concanavaleine A (conA) | 55000 à pH<5,6 110000 entre 5,7 et 7 | 2 4 | mannose et glucose |
| lectine de lentille | 49000 | 2 | mannose, glucose |
| lectine de soja | 120000 | 4 | N-acétyl glucosamine galactose |
| lectine de germe de blé | 36000 | 2 | N-acétyl glucosamine |
| lectine d'escargot | 79000 | 6 | N-acétyl glucosamine N-acétyl galactosamina D-galactose |

tableau 15. Propriétés de quelques lectines

• Réversibilité

Le ligand doit former avec la protéine à purifier un complexe réversible avec une constante d'association suffisamment élevée pour éviter l'effet lavage de l'éluant.

$$K_A = \frac{[Li \cdot P]}{[Li] \cdot [P]}$$

La dissociation doit être réalisable dans des conditions suffisamment douces pour ne pas induire de dénaturation des protéines. L'éluion peut être sélective avec un éluant compétitif (*NAD⁺ pour éluer les protéines liées à NAD, à l'ATP ou au bleu Cibacron*) ou être obtenue par des variations de conformation induites par le pH ou la force ionique (figure 66).

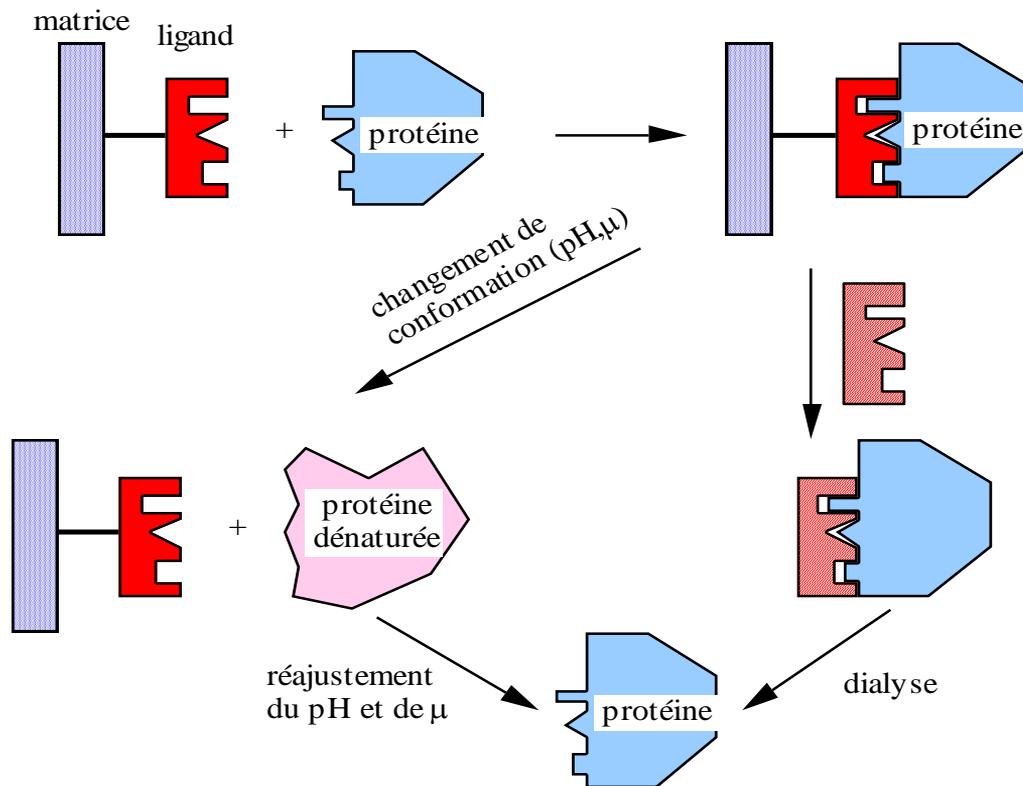


figure 66. Chromatographie d'affinité des protéines.

• Stabilité

Le ligand doit être stable dans les conditions adoptées.

• Taille

Le ligand doit comporter des groupements susceptibles d'interagir de façon spécifique (localisation dans l'espace) avec les groupements correspondants de la protéine à purifier. Trop volumineux, ils perdent rapidement leur spécificité.

b) Choix de la matrice.

Rigide, elle doit néanmoins être de porosité élevée pour permettre un accès satisfaisant aux macromolécules protéiques. Elle doit être stable dans les conditions de couplage et de régénération. L'agarose réticulé est une matrice répondant à ces exigences tout comme les gels TSK, les gels à base d'acrylate, d'acrylamide, d'hydroxyméthyl-méthyl-acrylate etc.

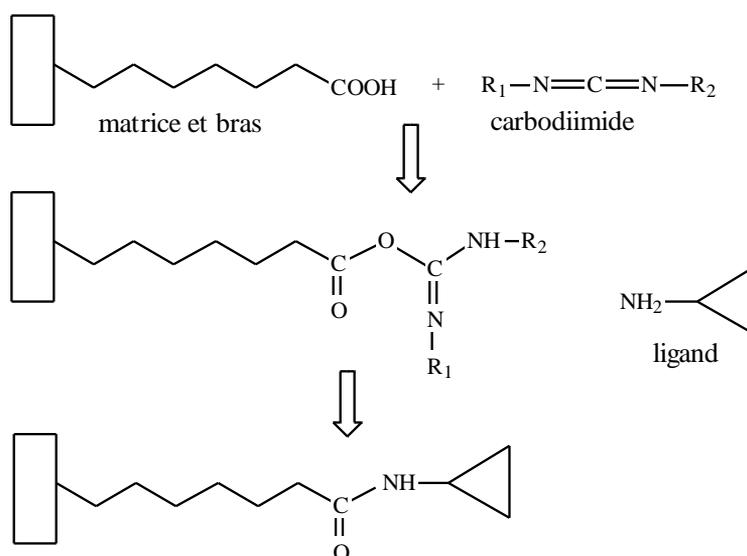
Il existe des gels mixtes composés de copolymères.

c) Choix du bras espaceur.

Le bras, généralement composé d'une chaîne aliphatique à 6 ou 10 C, comporte un groupement susceptible d'être activé pour accepter le ligand (NH₂, COOH).

d) Couplage.

Il existe de nombreuses méthodes de couplage, la plus ancienne étant celle au carbo-diimide.



6. Détermination de la pureté de la protéine isolée.

Il n'existe pas de moyens directs d'estimation de la pureté. La cristallisation d'une protéine, permettant son analyse aux rayons X par exemple et critère de pureté, est parfois possible dans certaines conditions de force ionique de pH et de température. En règle générale les composés susceptibles de "contaminer" la préparation protéique sont facilement éliminés par les techniques de purification utilisées. Les méthodes d'évaluation de la pureté des protéines les plus communes sont indiquées dans le tableau 16.

| méthode | fractionnante | récupération | quantité | facilité | coût | propriété évaluée |
|---------------------|---------------|--------------|----------|----------|------|---------------------|
| Electrophorèse | | | | | | |
| gel dénaturant | + | ± | ng - µg | + | + | longueur chène |
| gel natif | + | + | ng - µg | + | + | taille / charge |
| électrofocalisation | + | + | ng - µg | + | ± | pHi |
| Chromatographie | | | | | | |
| gel perméation | + | + | µg | + | + | taille |
| échange d'ions | + | + | µg | + | + | charge nette |
| affinité | + | + | µg | - | ± | liens spécifiques |
| Sédimentation | | | | | | |
| vitesse | + | + | µg | + | ± | masse / taille |
| équilibre | ± | + | µg | ± | - | masse - association |
| Composition | - | - | µg - mg | ± | ± | composants |
| Activité | - | - | µg - mg | ± | + | site actif |

tableau 16. Méthodes d'évaluation de la pureté des préparations protéiques.

VIII - DENATURATION

1. Dénaturation et changements de conformation

La conformation native de la plupart des protéines est fragile et peut être modifiée par des traitements mécaniques, physiques (irradiation, chaleur) ou chimiques (pH, sels, solvants, réactifs etc.). Ces changements qui affectent les structures quaternaires, tertiaires et secondaires sont complexes, parfois fugaces et dépendent d’abord des quantités d’énergie mises en jeu .

Ce sont en général les liaisons de plus faible énergie qui “cassent” les premières . Les ponts β qui ne sont stabilisés que par 2 liaisons hydrogène sont par exemple facilement ouverts et les zones en hélice α qu’ils rapprochaient se retrouvent alors éloignées sans que la structure secondaire bien stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogène soit modifiée. Le “déroulement” qui se produit est ensuite suivi par des déstructurations de zones en feuilletts β et en hélice α , le stade ultime de la dénaturation correspondant souvent à une structure “déroulée” au sein de laquelle peuvent ou non subsister des zones interactives à niveau énergétique élevé. Chaque protéine présentera une forme dénaturée donnée pour un agent dénaturant donné (par exemple en milieu aqueux la chaleur augmente les interactions hydrophobes intra et inter-protéiques, alors qu’en milieu éthanolique elle les diminue).

Minimiser la dénaturation, et plus particulièrement les phénomènes irréversibles, est un but recherché en analyse au laboratoire mais aussi dans la production d’enzymes ou de protéines actives en bioréacteurs ou encore dans la production de protéines à usage alimentaire.

2. Dénaturation réversible ou irréversible.

Les forces impliquées dans la stabilisation de la conformation d’une protéine donnée sont de faible énergie (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, forces de Van der Waals, liaisons ioniques), les ponts disulfure de forte énergie étant parfois impliqués par des réactions d’oxydo-réduction. Sous l’action d’agents dénaturants, ces forces sont minimisées puis rompues, ce qui induit un changement de forme par déplissement. La réaction implique une coopérativité de “rupture”, beaucoup d’états conformationnels intermédiaires pouvant être décrits. La différence nette entre les énergies libres des formes natives et dénaturées voisine de 20 à 90 kJ.mole⁻¹, ce qui ne représente que la rupture de quelques liaisons hydrogène par exemple.

L’état natif initial est caractérisable de même que l’état (ou un état donné avec un dénaturant donné) dénaturé à 100%. Dans certaines circonstances la réaction entre protéine native et dénaturée (déplissée) est réversible (figure 67).

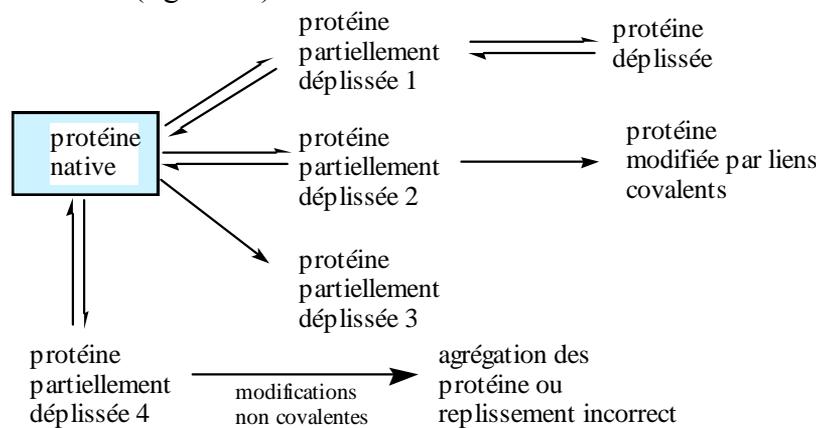
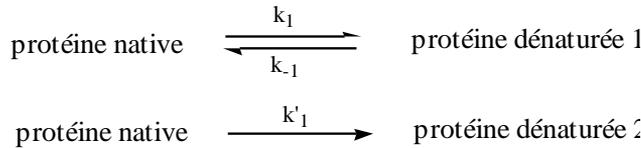


figure 67. Les changements de conformation des protéines (déplissement-dénaturation)

Il faut donc retenir que la structure modifiée par un traitement qualifié de dénaturant variera avec la protéine mais surtout l’agent dénaturant. Schématiquement et en ne considérant que l’état initial et un

état final dénaturé donné, on peut écrire :



L'équation de vitesse est la suivante :

$$\frac{d[P_N]}{dt} = k_1 [P_N] - k_{-1}[P_D]$$

et la constante d'équilibre est :

$$K = \frac{[P_N]}{[P_D]}$$

Les principaux paramètres thermodynamiques de la dénaturation sont complexes :

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K \quad \Delta H^{\circ} = -R \frac{\delta (\ln K)}{\left(\delta \left(\frac{1}{T} \right) \right)_p} \quad \Delta C_p^{\circ} = \frac{\delta \Delta H^{\circ}}{(\delta T)_p} \quad \Delta S^{\circ} = \frac{\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ}}{T}$$

avec T température absolue, R constante des gaz parfaits, ΔG° variation d'énergie libre standard (différence entre l'énergie libre du système natif et l'énergie libre du même système après dénaturation), ΔH° la variation d'enthalpie à pression constante, ΔS° la variation d'entropie, ΔC_p° la variation de capacité calorifique à pression constante. L'augmentation d'enthalpie ΔH° au cours du déplissement peut indiquer que la forme native possède une énergie libre plus faible que la forme dénaturée. L'augmentation d'entropie ΔS° est liée au désordre accompagnant le déplissement et l'augmentation de ΔC_p° correspond au transfert des groupes apolaires des chaînes latérales des acides aminés vers l'environnement aqueux.

L'agrégation est un mécanisme impliqué dans nombre de dénaturations. Ce phénomène est souvent utilisé pour former des gels ou des précipités (ovalbumine). Quand elle se produit à chaud en milieu aqueux elle résulte des interactions qui s'établissent entre les résidus d'acides aminés démasqués dans une première phase.

3. Facteurs à l'origine de la dénaturation irréversible.

Parmi les nombreux agents de dénaturation physiques ou chimiques on peut signaler :

3.1. La chaleur.

C'est en technologie alimentaire le plus important facteur de dénaturation. Elle conduit par agitation (et en milieu aqueux) d'abord à des ruptures de liaisons hydrogène, puis de liaisons ioniques puis plus rarement de ponts disulfure. Jusqu'aux environs de 80-95°C et en fonction du temps de traitement, les liaisons hydrophobes sont renforcées et ce d'autant plus facilement que le démasquage de résidus apolaires internes dans la structure native augmente leur potentialité d'établissements intermoléculaires.

Ces effets sont largement dépendants de la nature et la concentration de la protéine, de la force ionique et de la nature des sels et du pH.

A partir de 90 - 100°C il se produit des réactions modifiant la structure primaire :

- désamidation (GLN et ASN). *Le temps pour désamider 50% des ASN dans le peptide ASN-GLY est de 34 h à 37°C et de 12 min à 100°C.*
- hydrolyse des ponts peptidiques impliquant ASP. *Le temps pour hydrolyser 50% de la liaison ASP-PRO est de 10 min à 100°C en milieu HCl 0,015 M et de 24 h pour la liaison ¹²¹APS-PRO à pH 4 et 90°C.*

- oxydation des résidus de cystéine
- échange de ponts disulfure
- réaction de Maillard en présence de glucides réducteurs, etc.

Il peut se produire des désulfurations mais il arrive souvent que des ponts S-S inter ou intramoléculaires se forment au cours du chauffage par échanges irréversibles et ce à partir de 60-70°C. La polymérisation désordonnée qui en résulte conduit à une diminution de la solubilité (BSA, β -lactoglobuline). Une gélification, précédée par une forte augmentation de la viscosité peut être observée dans certains cas.

La vitesse de dénaturation dépend de la température et avec les protéines cette vitesse est multipliée par environ 600 quand la température augmente de 10°C au voisinage de la température pour laquelle il se produit une dénaturation .

L'eau favorise certaines dénaturations, en particulier celles mettant en jeu des liaisons hydrogène ; il se produit une cassure intramoléculaire et l'eau vient réagir avec les deux résidus d'acides aminés initialement impliqués dans la liaison, les empêchant ainsi de la reformer.

En absence d'eau, les protéines sont moins sensibles à la dénaturation thermique car une liaison coupée aura tendance à se reformer spontanément.

Signalons enfin que sous l'effet de la chaleur il peut se former des ponts covalents inter ou intramoléculaires (lysinoalanyl, β -aspartyl-lysyl, γ -glutamyl-lysyl etc). Pour les protéines globulaires, la dénaturation se traduit généralement par une augmentation de la surface interfaciale et une augmentation des interactions protéine-eau et donc de la capacité de rétention d'eau. Par exemple, pour l' α -chymotrypsine la surface passe de 10^{-16} m² à $3,6 \cdot 10^{-16}$ m² après dénaturation tandis que la quantité d'eau liée (eau de structure - eau interfaciale) passe de 0,37 à 0,42 g/g.

L'énergie d'activation peut être calculée à partir de la loi d'Arrhénius. Les énergies d'activation sont généralement élevées (150 à 1000 KJ.mole⁻¹) au cours de la dénaturation par la chaleur car le nombre de liaisons à rompre est très élevé bien qu'elles soient de faible énergie à cause de leur coopérativité.

3.2.Le froid

Il peut provoquer des changements de conformation réversibles ou irréversibles par renforcement de l'énergie de stabilisation des liaisons hydrogène et création de liaisons intermoléculaires. Dans ce cas il n'y a pas déroulement mais agrégation et précipitation.

Ce sont les protéines possédant un rapport acides aminés apolaires / acides aminés polaires élevé qui sont généralement les plus sensibles au froid, les interactions hydrophobes diminuant avec la température.

Les agents poly-hydroxylés (glycérol, éthylène-glycol, oses et diholosides, polyols) sont de bons cryo-protecteurs.

Les phénomènes associés aux basses températures comme la formation de glace ou l'augmentation de concentration en solutés dans les phases liquides non congelées engendrent parfois une baisse de solubilité ; cela revient à augmenter fortement la force ionique. Défavorable pour certaines protéines (oeuf), ce phénomène est mis à profit pour texturer des protéines : cryo-texturation (kori tofu).

Le facteur pH est toujours associé aux diminutions de température dans les modifications de conformation. Ainsi le pH d'un tampon phosphate passe de 7 à 3,5 au cours de la congélation ce qui induit une dénaturation acide.

Par ailleurs des réactions d'oxydation, surtout des thiols, peuvent intervenir du fait que la teneur en oxygène dans un milieu congelé sont plus de 1200 fois plus élevées qu'à 0°C.

3.3. *Les traitements mécaniques .*

En présence d'eau, ces traitements peuvent "casser" hélices et feuillets et surtout les ponts β .

L'agitation induit parfois des changements de conformation.

Les contraintes de cisaillement liées par exemple au passage forcé au travers de filtres et membranes induit des démasquages de groupements hydrophobes.

Les **hautes pressions** ($P > 2000$ bars) sont suffisamment énergétiques pour rompre des liaisons de faible énergie (hydrophobe, hydrogène, Van der Waals). Elles sont donc capables de rompre simultanément par contrainte mécanique des liens sur lesquels les solvants ou la chaleur ont un effet "sélectif". Des protéines oligomériques sont dissociées en protomères dans ces conditions.

Les **ultra-sons** créent des micro-bulles par dégazage qui gonflent et fusionnent violemment (cavitation). Il en résulte des contraintes de cisaillement et la formation de radicaux libres dénaturants sur les protéines.

3.4. *Le "positionnement "d'une protéine à une interface.*

Le "positionnement "d'une protéine à une interface *eau / fluide hydrophobe* (huile, air etc.) qui permet par exemple de stabiliser des émulsions ou des mousses provoque une distribution anisotrope des résidus d'acides aminés dans les deux phases et donc une modification de conformation par rapport à la forme native. C'est la distribution des résidus apolaires et polaires (regroupés en zones bien définies) qui assurera ou non ces pouvoirs à la protéine.

On qualifie de "train" les zones hydrophobes ou hydrophiles de la protéine qui se positionnent à l'interface.

3.5. *Protéolyse et autolyse.*

Les réactions impliquées modifient la structure primaire.

3.6. *Agents chimiques.*

De nombreux agents chimiques peuvent engendrer des dénaturations, certains agents étant même qualifiés de dénaturants.

Les acides et les bases modifient l'ionisation de certaines chaînes latérales et donc les interactions ioniques stabilisant les structures. Il en résulte, selon les protéines et les conditions, des dénaturations irréversibles ou non.

La plupart des métaux divalents en se fixant sur les protéines au niveau de deux groupements SH intermoléculaires entraînent des modifications de conformations (il y a création et non destruction de liaisons). Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} donnent des mercaptides avec les thiols.

Les sels diminuent l'activité de l'eau et possèdent des effets chaotropiques qui dénaturent les protéines dans des conditions données de concentration, température, etc (cf chapitre VII.5.3).

Les agents chélatants comme l'EDTA peuvent complexer des cations impliqués dans la structure protéique. Souvent cette dénaturation est réversible.

La plupart des solvants organiques donne des interactions avec les groupements hydrophobes qui sont ainsi “démasqués”; une dénaturation s’en suit alors. Certaines enzymes fonctionnent aussi bien dans l’eau que dans certains solvants, la spécificité étant parfois profondément modifiée dans ces conditions.

Le diméthyl-sulfoxyde ou le diméthyl-formamide à faibles concentrations protègent la conformation de nombreuses protéines.

Le chloro-2-éthanol augmente l’ α -hélicité.

Des composés en solution comme l’urée (4 à 8 M), ou le dodécyl sulfate de sodium (1%) donnent avec les protéines des interactions respectivement avec les liaisons hydrogène et hydrophobe, ce qui modifie profondément la structure spatiale des protéines. Ces composés sont qualifiés de **dénaturants**.

4. Contrôle et minimisation de la dénaturation.

Il s’agit de conserver, au cours d’opérations de purification ou autres, certaines des propriétés catalytiques ou fonctionnelles de la protéine .

Ainsi l’addition de composés poly-hydroxylés (polyéthylène glycol) ou de sels permet de stabiliser dans des conditions bien définies la conformation d’une protéine donnée.

L’activité de l’eau joue un rôle très important dans la dénaturation : ainsi la gliadine est dénaturée en 1 heure à 60°C en milieu d’activité d’eau égale à 0,24 tandis que dans les mêmes conditions, elle ne sera dénaturée qu’à 70°C en milieu d’activité d’eau égale à 0,18.

L’immobilisation d’enzymes sur des supports fixes contribue parfois à leur assurer une grande stabilité vis à vis d’agents ou de conditions dénaturants.

Enfin il existe toute une stratégie de stabilisation basée sur des modifications chimiques impliquées dans la structure tridimensionnelle.

La maladie de la vache folle et la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jacob

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) affectent de très nombreuses espèces de mammifères. Il s'agit d'affections dégénératives irréversibles des neurones du système nerveux central. La forme la plus anciennement connue de la maladie est la **tremblante du mouton** (scrapie en anglais). Les premières descriptions remontent en 1730. Il a été montré en 1936 que cette maladie était **transmissible** d'un animal à l'autre par **injection**. En 1950, par cette même démarche, il a été montré qu'elle pouvait franchir la barrière d'espèce : du mouton vers la chèvre, le rat, le hamster et la souris).

Cependant le passage de la forme ovine de la maladie vers l'homme n'a jamais été constaté.

L'encéphalite spongiforme bovine (E.S.B.) et la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jacob

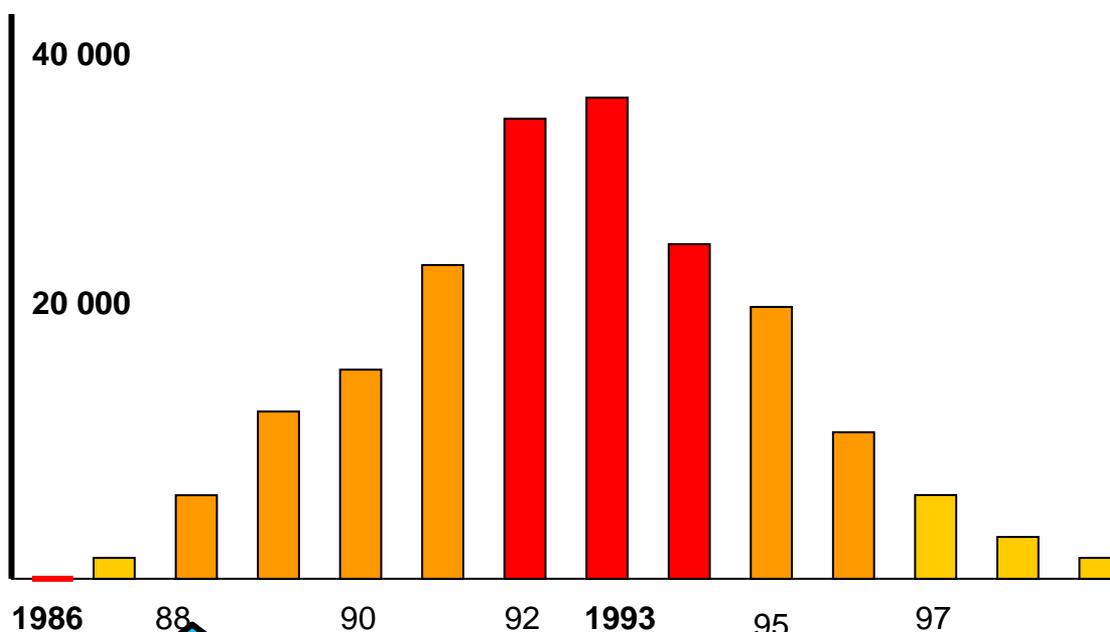
La variante de la MJC (vMCJ) est issue de la maladie de la vache folle En février 2001 : 100 cas en Europe, 3 en France.

Evolution de la maladie de la vache folle

Avant 1985 la maladie n'existait pas. Les vaches laitières sont les plus exposées (alimentation)

Nombre de cas 1986 : 60 vaches atteintes, 1987 : 600 , 1988 : 3 000, 1992 : 37 280 1993 : 37 500 1994 : 26 000 1995 : 20 000 1996 : 9 000 1999 : 2270 2000 : 1258

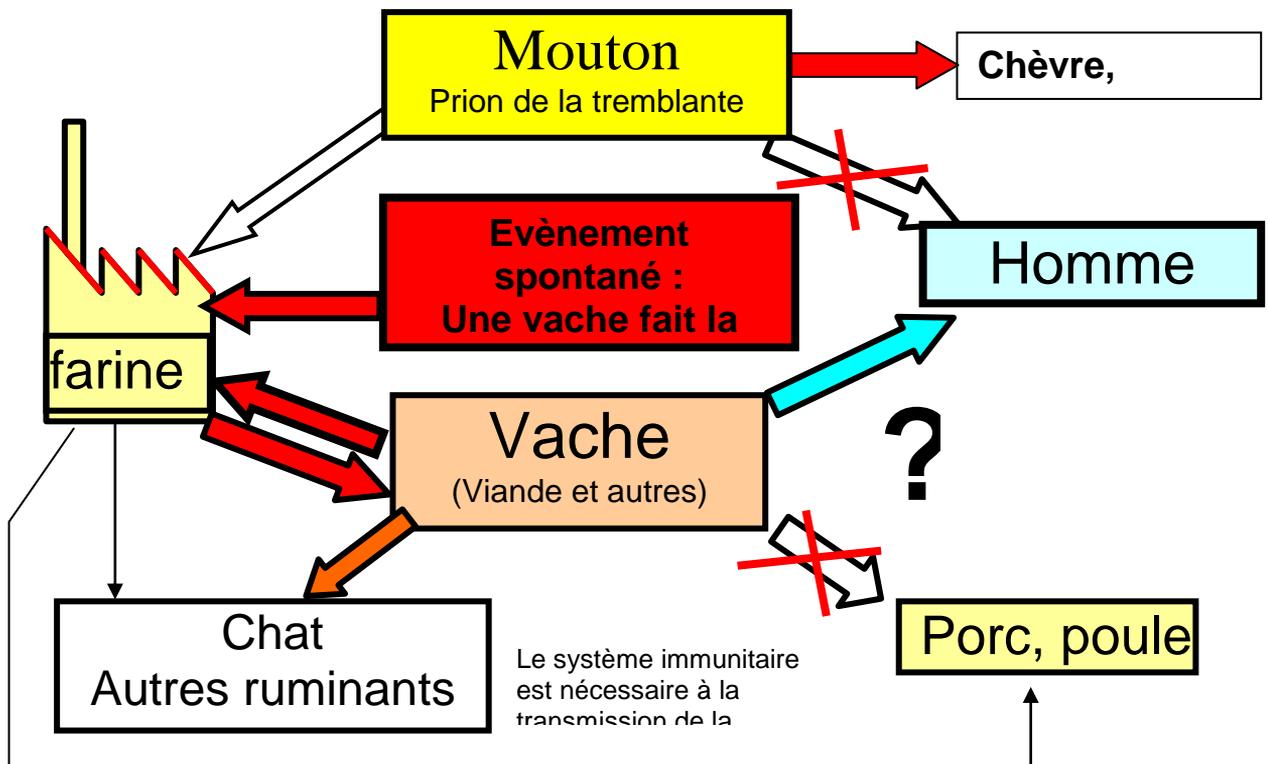
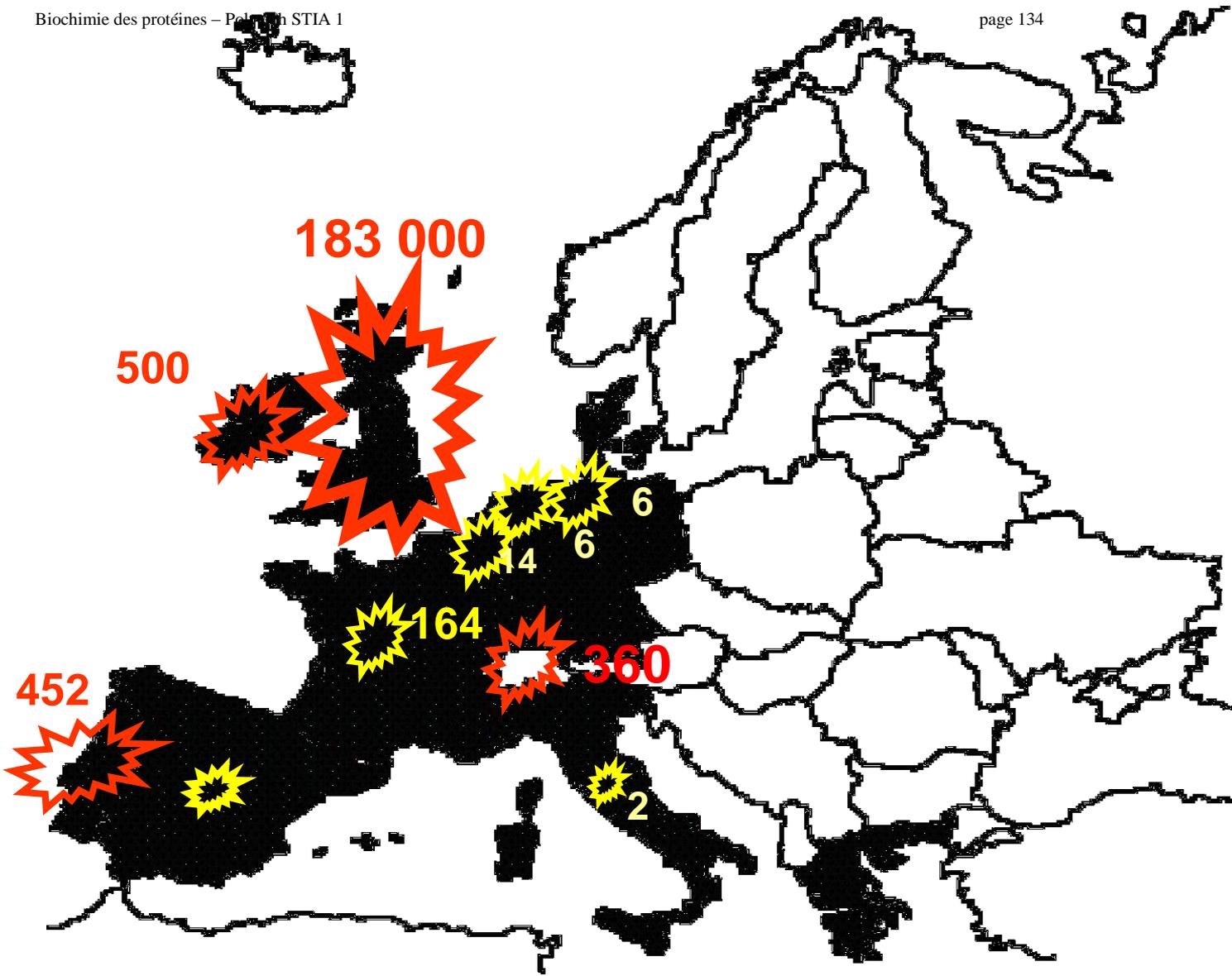
En 2001, le total des cas depuis son apparition est d'environ 185 000



Février 1985 : 1^{er} cas d'ESB en GB
Juillet 1988 : interdiction des farines
Décembre 1990 : interdiction d'importation des farines de viandes bovines pour les bovins en FR.
Juillet 1990 : interdiction des farines animales pour les bovins en FR.
Février 1991 : premier cas d'ESB en FR.
Mars 1991 : premier cas **NAIF** (né après interdiction des farines).
Mars 1996 : En GB 10 personnes font la vMCJ : passage de l'ESB à l'homme ; embargo sur le bœuf britannique dans le reste de l'Europe.
Juillet 2000 : 4 décès dans le village de Queniborough en GB.
Août 2000 : 79 cas (70 morts) du vMCJ en GB, 2 à 4 supposés en FR). Pr Anderson de l'Université d'Oxford : estimation de 136 000 cas (à venir en GB).
Fin de l'épidémie 2005 ?

Juillet 88 : interdiction des farines animales pour les ruminants en GB (contaminantes contenant des carcasses de mouton malades atteints de

Février 1985 : premier cas d'ESB en GB.



L'agent responsable : le PRION (PRoteinaceous Infectiosity ONLY)

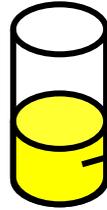
(Stanley PRUSINER le découvre en 1982, Prix Nobel 1997)

Il semble n'y avoir aucune transmission horizontale directe de vache à vache ; de vache à veau elle est peu probable.

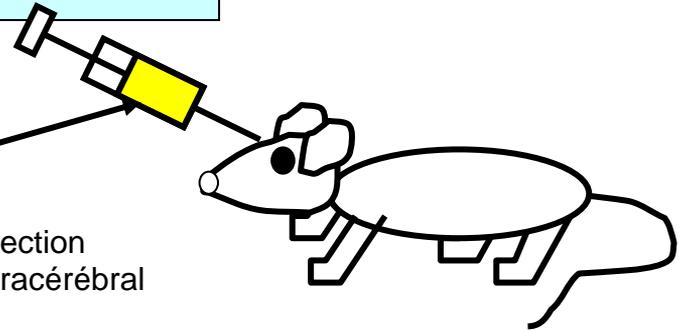
Presque tous les animaux auxquels on a tenté de transmettre la maladie par injection intracérébrale l'ont faite. La souris fait sa maladie après injection de broyat de cervelles infectées (1 an d'incubation puis mort). **Le lapin est insensible***, le porc et le mouton peu sensibles. (Si on traite au préalable les cervelles par des dénaturants, ou des protéases comme la protéinase K, ou le SDS avant injection : on inactive).

Mise en évidence du pouvoir infectieux

Cervele Animal malade



Injection intracérébrale



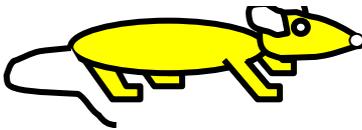
Les organes infectés sont le cerveau, la rate, l'iléon, la moelle épinière et les organes lymphoïdes comme les ganglions mésentériques.

Aucune transmission n'a été possible à ce jour à partir de tissu musculaire (viande).

(l'incubation est supérieure à la durée de vie de l'animal)

Mise en évidence du pouvoir hautement infectieux de PrPsc Expérience de WEISSMANN.

Souris malade

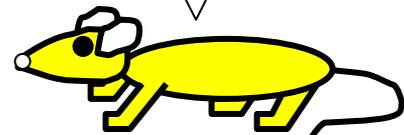
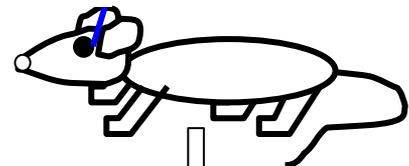


Un fil d'acier est placé quelques minutes au contact d'un cerveau de souris infecté

30 min

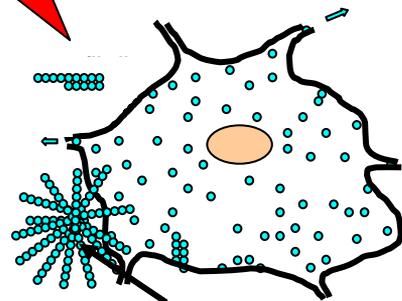
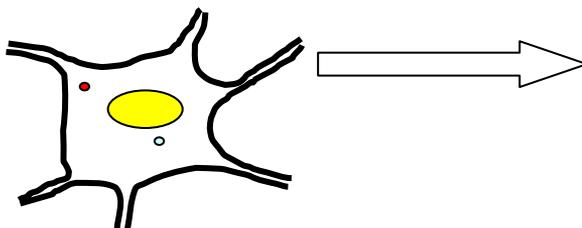


Souris saine

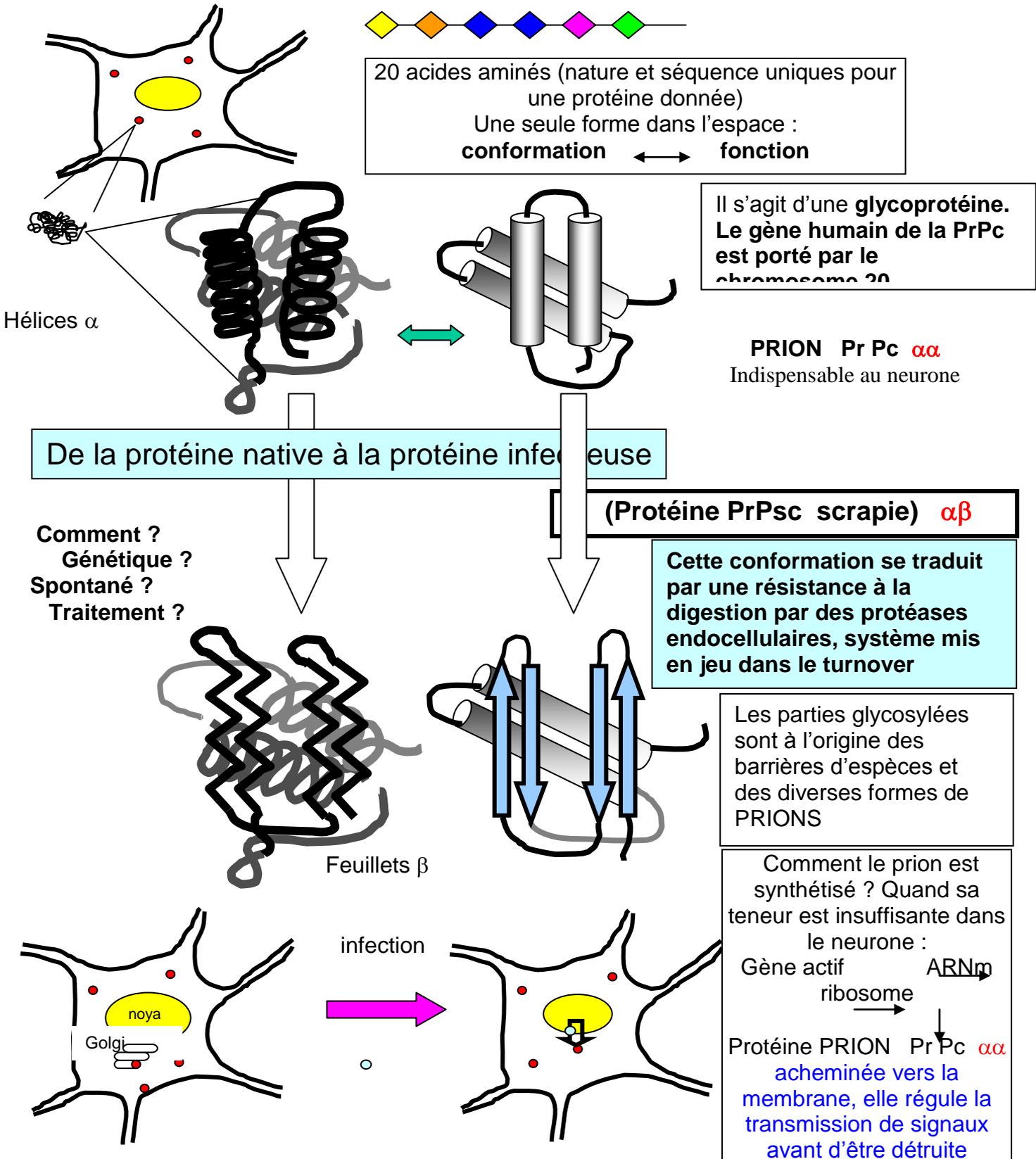


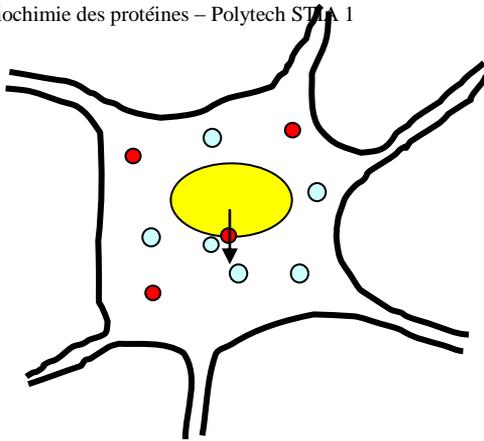
Souris malade

Le fil d'acier placé au contact d'une culture de neurones provoque la transformation de la PrPc en PrPsc (ou PrPres : Présistant aux protéases). La contamination s'étend ensuite à toute la culture même si la fil a été retiré.



Il existe naturellement dans les neurones une **protéine de 253 acides aminés (PrPc)** dont la structure, déterminée par Kurt Wüthrich) est conservée dans l'évolution, ce qui traduit son importance. Elle est indispensable à la vie fonctionnelle du neurone. Cette protéine intervient dans les rythmes circadiens, dans la transmission de l'influx nerveux (acide γ -amino butyrique). Haute affinité pour le cuivre et rôle antioxydant.

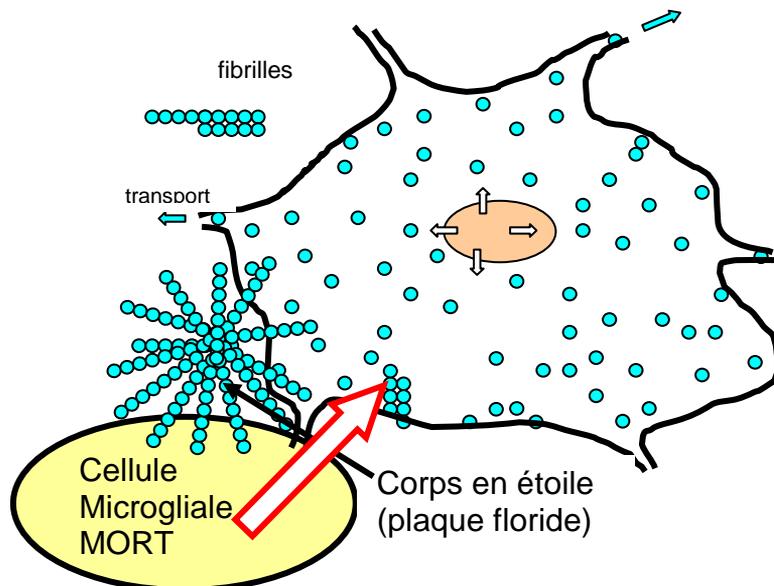
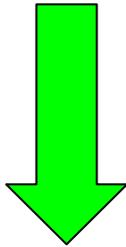




Que se passe-t-il si une molécule Protéine PrPsc (scrapie) $\alpha\beta$ est présente au moment de cette synthèse ?

Cette protéine joue le rôle d'un **chaperon** (peut-être existe-t-il une protéine **chaperonne X** ?) et impose à la nouvelle protéine fabriquée une conformation $\alpha\beta$ au lieu de la conformation $\alpha\alpha$ fonctionnelle.

La protéine $\alpha\beta$ n'étant pas fonctionnelle, le neurone réagit en « lançant » une nouvelle synthèse ; au contact des deux chaperonnes présentes la protéine synthétisée est du type $\alpha\beta$. Le neurone lance une autre synthèse réaction en chaîne qui se traduit par l'accumulation dans le cytoplasme du neurone de la protéine $\alpha\beta$ non fonctionnelle, et ce d'autant qu'elle n'est pas hydrolysable par les protéases endocellulaires. Cette protéine adsorbe de l'eau (comme la plupart des protéines) et le neurone gonfle (aspect d'éponge). Les protéines PrPcs s'associent en pseudo-cristaux (plaques amyloïdes)



La cellule perd sa fonctionnalité, éclate et libère des PrPsc qui envahissent les cellules voisines : troubles de l'équilibre, du comportement et mort : ESB (vache) ou **maladie de Creutzfeldt Jacob** chez l'homme.

Quelques caractéristiques de résistance exceptionnelle de cette protéines

PATTISON et MILLSON, en 1961, ont mis en évidence l'existence de différentes « souches » du scrapie. La résistance exceptionnelle de l'agent du scrapie est découverte en 1954. Les prions résistent à toutes les méthodes conventionnelles d'inactivation des virus :

- résistance en température sèche énorme (160°C 24 heures et même 360°C 1 heure).
- un traitement par le formaldéhyde à 10 % est inefficace

La décontamination peut être obtenue :

- par autoclavage à 132 °C pendant 1h30
- par traitement à l'hypochlorite de sodium pendant 1h30 à 20°C
- par exposition brève dans l'hydroxyde de sodium M à 100°C.

La maladie de Creutzfeldt Jacob et sa variante vMCJ

La tremblante du mouton est connue depuis 1730, l'encéphalopathie du cerf depuis 1967, la maladie de Creutzfeldt- Jacob depuis 1920.

. La **maladie de Creutzfeldt Jacob** affecte les personnes âgées (65 ans en moyenne)
La maladie de Creutzfeldt Jacob a une origine :

5 % génétique (elle est transmissible : mutation se traduisant par la substitution de l'acide glutamique 200 par une lysine et une transition □□).

10 % infectieuse ou iatrogène (par l'hormone de croissance, 11% de génotype met/met du codon 129)

85 % sporadique (68 % de porteurs du génotype du codon 129 met/met)

La maladie se traduit par une démence suivie d'une perte de coordination ou l'inverse. Elle entraîne une mort irrévocable.

. La maladie existe dans les populations de papouasie (**kuru**) qui pratiquaient le cannibalisme. C'est Carleton GAJDUSEK (prix Nobel en 1976) qui dans les années 50-60 a montré que l'origine infectieuse de la maladie était liée au cannibalisme. Les pratiques funéraires impliquaient que le cerveau des morts soit mangé. On situe le début de l'épidémie de kuru vers 1900, peut-être à la suite de l'ingestion du cerveau d'un malade atteint d'une forme sporadique de la **maladie de Creutzfeldt Jacob** (MCJ). Le cannibalisme a été interdit en 1957 et la maladie a presque totalement disparu depuis.

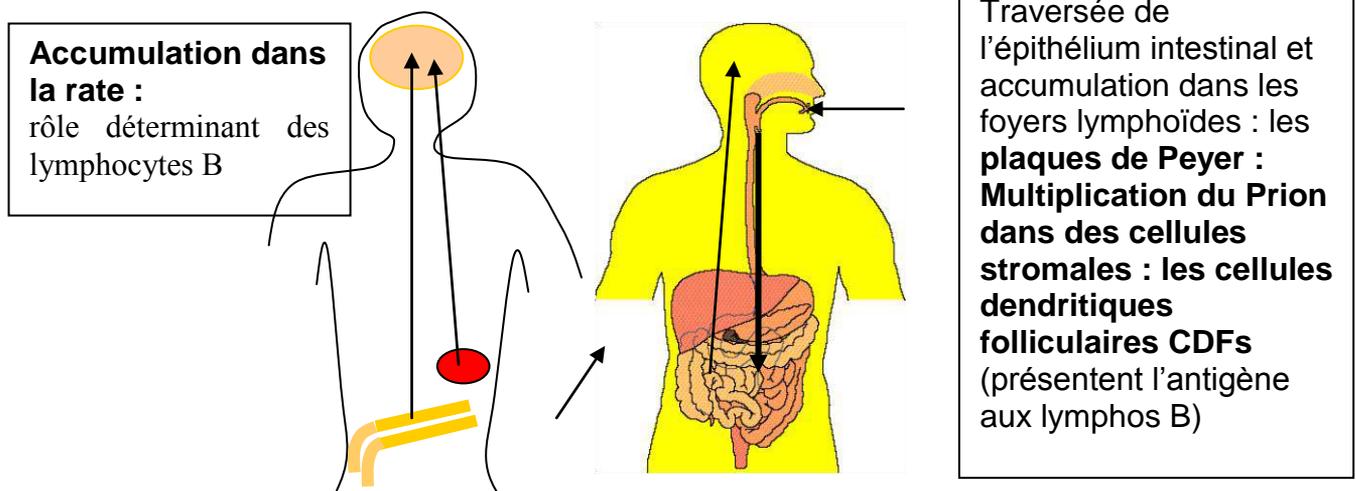
. Il existe la **maladie de Gertsmann-Straüssler-Scheinker** qui est liée à une mutation du gène PrP : les symptômes sont les mêmes mais la maladie se développe plus lentement.

. **L'insomnie fatale familiale** est aussi liée à une mutation du gène PrP ; elle s'achève dans la démence.

. La **variante de la maladie de Creutzfeldt Jacob** affecte des personnes plus jeunes (29 ans en moyenne). Il s'agit de la forme la plus courante des Encéphalites Spongiformes Transmissibles (EST). **Dans 100 % des cas le génotype du codon 129 est met/met.**

Transmission de la variante de la MCJ

Le plus souvent par voie orale ; le temps d'incubation s'étend sur plusieurs années au cours desquelles l'agent infectieux passe de l'intestin au cerveau.



En Europe, entre 1996 et 1999, 1550 cas de maladies de Creutzfeldt Jacob sont recensés (nouveau variant et classique).

Le taux de mortalité est de 1 à 2 cas par million d'habitant : il s'agit donc d'une maladie rare.

La quasi totalité des cas (96 %) recensés correspondent à la maladie de Creutzfeldt Jacob classique qui existe et qui est connue depuis de très nombreuses années :

Certains des **cas sporadiques** pourraient être des variants de l'agent de l'ESB. Or il s'avère que les Pays très exposés (Grande Bretagne), exposés (France) ou non exposés (Canada et Australie) ont une même fréquence de cas sporadiques.

Sur les 1550 cas sporadiques, moins d'une centaine sont des variants de l'ESB (vMCJ) ; depuis le début des enquêtes et jusqu'en début 2001, 86 sujets britanniques ont succombé à la vMCJ et la maladie est en cours d'évolution chez 8 autres personnes. Ce variant y représente 17 % de l'ensemble des maladies de Creutzfeldt Jacob.

Pour la France on a enregistré entre 1996 et 1999 380 cas de maladie de Creutzfeldt Jacob dont trois cas lié au variant ESB (3 cas / an à Montpellier).

Le **tableau clinique** de la vMCJ est différent de celui de la MCJ classique : les sujets atteints sont jeunes et le temps d'évolution de la maladie est plus long ; elle commence par des désordres psychiatriques suivis par des troubles sensoriels, puis par l'ataxie (difficulté de coordination des mouvements) et la démence. Dans le cerveau, les analyses anatomo-pathologiques montrent des plaques amyloïdes entourées de vacuoles qui n'existent pas dans la MCJ mais qui se retrouvent dans l'ESB ou la maladie de Kuru. Leur localisation est particulière.

L'origine de la contamination (?) remonterait à 10 ou 15 ans. C'est donc l'épidémie bovine qui expliquerait les cas survenus depuis 1996 et qui sont liés au variant ESB (entre 1988 et 1999 l'ESB bovine représente 160 000 cas en GB, 332 en Suisse, 367 au Portugal, 80 en France).

Relation entre mode d'alimentation et la maladie

Il semble n'exister aucune différence entre les habitudes alimentaires des personnes touchées par le variant ESB de la maladie de Creutzfeldt Jacob et celles des personnes saines.

La **voie d'infection est l'ingestion de « viande » provenant d'animaux malades ou en période d'incubation**. Le muscle ne semble pas contenir de quantités détectables de l'agent infectieux, mais les steaks hachés de basse qualité peuvent provenir de la viande séparée mécaniquement (VSM) des carcasses. Dans ce cas, la moelle épinière, les ganglions lymphatiques et les ganglions rachidiens, riches en particules infectieuses, sont arrachés des os et mélangés à la viande rouge. L'intestin grêle qui concentre l'agent infectieux est utilisé dans la fabrication de certaines saucisses et pourrait être un vecteur de l'infection. Il n'est pas exclu que certains produits pharmaceutiques et cosmétiques puissent être contaminants (gélatine).

Les malades n'ont pas consommé des quantités plus importantes de viande bovine ou de produits à base de viande pouvant contenir des produits à risque. Néanmoins l'incubation étant peut être de 15 ans (entre 5 et 30 ans....), il est très difficile de faire une enquête à posteriori.

Le risque est vraisemblablement lié à la dose infectante (100 000 molécules = 1 dose infectieuse ???) mais aussi à des facteurs mal connus de susceptibilité à la maladie qui dépendent des individus.

On ne connaît ni la durée d'incubation , ni la dose infectante, ni l'infectivité des tissus bovins ingérés, ni l'efficacité des mesures d'interdiction de consommation de certains organes bovins, ni la susceptibilité individuelle.

Estimation du nombre de cas à venir : c'est quasiment et raisonnablement impossible.

En GB, si l'incubation est égale à 20 ans : 110 cas à venir mais si elle est de 60 ans : 6 000 à 130 000 cas attendus.

**Il y a au 12 novembre 2000 en Europe 85 cas probables de variant ESB de la maladie de C.J.
En France dans la même période 2 cas confirmés, 1 probable.**

Les moyens de diagnostic de la MCJ ont progressé en 1997

(test de recherche de la protéine 14.33 après ponction lombaire, cette protéine traduisant la mort neuronale ; la nouvelle forme de la MCJ ne répond pas toujours à ce test). Une personne dépistée ne se verra proposer aucun traitement.

Néanmoins aujourd'hui seule l'autopsie et la biopsie permettent de montrer les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie mais aussi de vérifier la nature du PRION (Type ESB ou autre).

Les modèles expérimentaux pour l'étude des maladies à Prions

Les souris transgéniques constituent un des modèles les plus importants.

La tremblante du mouton est un autre modèle.

L'utilisation de singes – le lémurien *Microcebus murinus* – a permis de démontrer d'une manière indirecte l'infection par voie orale des primates par du cerveau de bœuf atteint par l'ESB (N. BONS, EPHE UM II)

L'intérêt des essais sur des cultures in vitro est souligné par S. LEHMANN.

En 1990 épidémie d'ESF (encéphalite spongiforme féline) liée à la consommation de leurs pâtées avec des produits carnés d'origine bovine : d'où l'idée que les victimes humaines de la variante de la MCJ ont été contaminées par voie alimentaire.

Le rôle des britanniques

Les Scientifiques britanniques ont recommandé en 1988 l'exclusion des farines animales de l'alimentation du bétail : cette recommandation a été considérée alors comme une mesure disproportionnée dont les conséquences économiques seraient insupportables. C'est pourquoi les farines infectées ont continué à être utilisées en Angleterre et exportées notamment pour nourrir les porcs et les volailles. Jusqu'en 1991 on n'a pas compris que l'usage des farines aggraverait l'épidémie ; il en a résulté plus de 45 000 cas d'ESB nouveaux en Grande-Bretagne.

En 1995 les français ont consommé 110 000 tonnes de viande bovine britannique (sur un total de 1,6 millions de tonne) et importé 200 000 veaux.

En 1989, la Grande Bretagne a interdit la consommation des abats pour l'homme.

Entre 1988 et 1996, elle a exporté 75 000 tonnes d'abats de bovins (contre 4 000 tonnes entre 78 et 87) dont 48 000 tonnes pour la France.

Entre 80 et 96 l'exposition des français a été 20 fois plus faible que celle de la population anglaise.

Des touristes ont consommé en GB, entre 88 et 89 (10 000 cas d'ESB) des organes à risques et aucun cas de

Peut-on aujourd'hui manger de la viande ?

Les niveaux d'**infectiosité** détectés sont les suivants :

Elevé : **cerveille, moelle épinière**

Faible : **rate, amygdales, ganglions lymphatiques, iléon, colon proximal**

Très faible : nerf sciatique, hypophyse, surrénales, colon distal, muqueuse nasale

Minimale : liquide céphalo-rachidien, thymus (ris), moelle osseuse, foie, poumon, pancréas

Non détectable : **muscles**, cœur, glande mammaire, lait, caillot sanguin, sérum, fèces, rein, thyroïde, glande salivaire, ovaire, testicules, utérus.

Evidence : il faut interdire la consommation des parties infectantes : **cerveille, iléon (central)** dans la fabrication de charcuteries, thymus, yeux, moelle épinière.

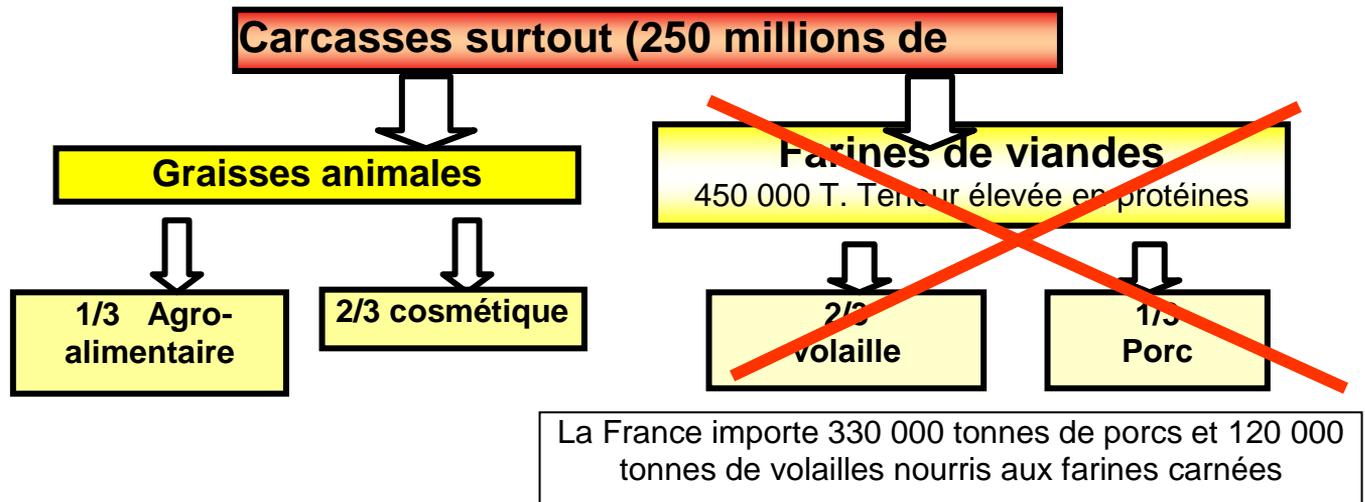
Le muscle, principal composant du beefsteak, ne semble pas porteur de l'infection.

Conseil : ne pas introduire dans la chaîne alimentaire de bovins de plus de trente mois. Compte-tenu de la durée d'incubation, le veau ne présente pas les signes de la maladie de même que les bœufs destinés à la boucherie tandis que les vaches laitières (plus âgées, nourries aux farines) sont les plus affectées.

Des animaux atteints ne présentant pas les signes visibles de la maladie peuvent passer dans l'alimentation humaine. Le test employé permet de détecter un animal malade 4 mois avant l'apparition des premiers symptômes. Avant cette période (entre le moment de l'infection et le 32^{ème} mois) le test est aléatoire et la vache atteinte passera dans l'alimentation.

Eviter des produits qui contiennent des Viandes Séparées Mécaniquement (VSM) qui proviennent des colonnes vertébrales (lasagnes, raviolis..).

Depuis que l'homme est éleveur et agriculteur, les restes animaux étaient utilisés pour l'alimentation des animaux. Cette pratique « domestique » dans laquelle un animal malade était souvent utilisé comme source de nutriments en élevage restait à l'échelle de la ferme. L'utilisation des farines à l'échelle industrielle date des années 1900-1920. Les protéines de viandes résiduelles de l'équarrissage (50 % de vache, 30 % de mouton) étaient jusqu'en **1980** « dégraissées » en discontinu par des **solvants organiques** (hexane, dichloroéthane) qui étaient éliminés des graisses par la chaleur.



A partir de 1980, le dégraissage est réalisé par pression à chaud en continu sans solvant organique (pas d'effet défavorable potentiellement liés aux solvants, augmentation de la productivité).

Les écossais qui ont conservé la méthode au solvant (hexane) font consommer ces farines aux vaches : pas d'ESB.

Que faire aujourd'hui ?

Il faut éradiquer l'agent de l'ESB pour que la variante de la maladie de Creutzfeldt Jacob devienne très rare, mais chronique du XXI^{ème} siècle.

Pour cela il faut absolument éliminer le plus rapidement possible les animaux malades et procéder à des abattages massifs (même si cela coûte cher – plus de 1,5 MF pour un troupeau de 100 bêtes - et prend du temps. *Ces coûts comprennent l'indemnisation de l'éleveur mais aussi les frais annexes de traitement d'élimination des animaux.* Pour détecter l'ESB c'est le test suisse Prionics (distribué en France par AES) qui a été choisi (son coût est élevé et voisin de 400 F). C'est l'AFSSA qui confirme.

Au laboratoire le pouvoir infectieux est détruit après chauffage à 133°C pendant 20 minutes (utiliser à bon escient). *La cuisson de la viande n'atteint pas ces températures.*

Interdire l'usage des FVO de mammifères (farines de viande et d'os) en alimentation animale (bovins, caprins, animaux domestiques ... mais aussi volailles, cochons, poissons).

En France les crédits de recherche atteignent en 2001 210 MF.

Un GIS (groupement d'intérêt scientifique) sur les maladies à PRIONS vient d'être créé en février 2001.

Montpellier II accueillera une animalerie ESB en 2002 et les Labos Biorad ont décidé d'implanter déjà un module ESB sur le site.

Pourquoi les farines animales « dégraissées » avec des solvants chlorés ou non n'avaient-elles jamais déclenché d'ESB ?

Au laboratoire le chloro-2-éthanol permet la transition $\beta \rightarrow \alpha$; il est probable que les solvants chlorés utilisés jusqu'en 1978 – 80 aient réalisé la transformation de la protéine PrP^{Sc} $\alpha\beta$ en protéine Prion $\alpha\alpha$ ce qui se traduirait alors par l'inactivation de la particule active.

L'utilisation des solvants a été arrêtée pour leurs risques d'explosion, nutritionnels et toxiques

| |
|---------------------------|
| TABLE DES MATIERES |
|---------------------------|

| | |
|---|-----------|
| I - Introduction | 1 |
| 1) Terminologie fonction de la composition | 1 |
| 1-1. Protides non hydrolysables | 1 |
| 1- 2. Protides hydrolysables | 1 |
| 1-2-1- Condensation d'acides aminés : | |
| 1)-peptides oligopeptide, polypeptide, protéoses, peptones | 1 |
| 2)-holoprotéides ou protéines simples ou homoprotéines, protomère, oligomère | 1 |
| 1-2-2- Holoprotéides + groupement prosthétique : hétéroprotéides ou hétéroprotéines ou protéines conjuguées. Nucléoprotéines, lipoprotéines, glycoprotéines, phosphoprotéines, hémoprotéines, flavoprotéines, chromoprotéines, métalloprotéines | 2 |
| 2) Terminologie fonction de la conformation | 2 |
| Conformation, structure primaire, structure secondaire, structure tertiaire, structure quaternaire | 2 |
| 2-1. Les protéines fibreuses | 4 |
| 2-2. Les protéines globulaires | |
| 3) Terminologie basée sur la fonction | 5 |
| 3-1. Les protéines de structure | |
| 3-2. Les protéines à activité biologique : Enzymes, Hormone, Protéines contractiles, de transport, protectrices, de réserve, toxiques, anti-nutritionnelles, allergènes | 5 |
| 3-3. Protéines alimentaires | 5 |
| 4) Terminologie fonction de propriétés physico-chimiques | 5 |
| 4-1. Albumines | |
| 4-2. Globulines | |
| 4-3. Glutélines | |
| 4-4. Prolamines | |
| 4-5. Albuminoïdes ou scléroprotéines | |
| 4-6. Histones | |
| 4-7. Protamines | |
| 5) Taille des molécules protéiques | 6 |
| 5-1. Définitions : poids moléculaire, masse molaire | |
| 5-2. Le poids moléculaire de quelques protéines | |
| II -Protéines : Les acides aminés constitutifs | 7 |
| 1. Structure. | 7 |
| 2. Les principaux acides aminés. | 7 |
| 2.1. Acides aminés à chaîne latérale apolaire. | 7 |
| 2.1.1. Chaîne latérale aliphatique. | |
| 2.1.2. Chaîne latérale aromatique. | |
| 2.1.3. Chaîne latérale avec un atome de soufre. | |
| 2.2. Acides aminés à chaîne latérale polaire. | 9 |
| 2.2.1. Chaîne latérale polaire non chargée. | |
| 2.2.2. Chaîne latérale polaire chargée (ionisable). | |
| 3 . Acides aminés rares ou occasionnels. | 10 |
| 3.1. Acides α -aminés présents dans quelques protéines. | |
| 3.2. Acides aminés n'entrant pas dans la composition de protéines. | |
| 4. Stéréochimie. | 13 |
| 5. Propriétés physiques. | 14 |
| 5.1. Cristallisation. | |
| 5.2. Solubilité. | |
| 5.3. Pouvoir rotatoire. | 14 |
| 5.4. Propriétés spectrales. | 15 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4.1. Absorption UV. | |
| 5.4.2. Fluorescence. | |
| 6. Dosage et Propriétés chimiques. | 16 |
| 6.1. Dosage des acides aminés totaux. | |
| 6.1.1. Méthode de Kjeldahl. | |
| 6.2.2. Autres méthodes. | |
| 6.2. Caractérisation et dosage d'acides aminés sans séparation. | 17 |
| 6.2.1. Réactions spécifiques. | |
| 6.2.2. Dosage microbiologique. | |
| 6.3. Ionisation, propriétés acido-basiques. | 18 |
| 6.3.1. Rappels & Définitions. Importance de l'ionisation. | |
| 6.3.2. Les deux ionisations des acides aminés. | |
| 6.4. Propriétés des groupements carboxyles. | 23 |
| 6.4.1. Formation de sels en présence de bases. | |
| 6.4.2. La fonction acide est estérifiable par des alcools. | |
| 6.4.3. En présence de pentachlorure de phosphore ou de chlorure de thionyle (SOCl ₂) | |
| 6.4.4. La fonction COOH peut être réduite en alcool en présence de borohydrure de Na | |
| 6.4.5. Décarboxylation. | |
| 6.4.6. Amidation | |
| 6.5. Propriétés de la fonction amine. | 25 |
| 6.5.1. La fonction amine donne avec les acides des sels. | |
| 6.5.2. Diazotation par l'acide nitreux . | |
| 6.5.3. Méthylation par l'iodure de méthyle. | |
| 6.5.4. Désamination en milieu hypochlorite. | |
| 6.5.5. Désamination par voie enzymatique. | |
| 6.5.6. Réactions de condensation. | |
| 1) liaison avec un chlorure d'acide ou un anhydride d'acide. | |
| 2) Réaction avec l' O-phtaldialdéhyde (OPA). | |
| 3) Réaction avec la fluorescamine (4-phénylspiro (furan-2(3H),1'-phtalal)-3,34 dione). | |
| 4) Réaction avec le chlorure de dansyle. | |
| 5) Réaction au phénylisothiocyanate (PITC). | |
| 6) Réaction avec le 9,fluorénylméthyl-chloroformate (Fmoc-HCl). | |
| 7) Réaction avec le chlorure de dansyl. | |
| 8) Réaction avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (réaction de Sanger). | |
| 9) Réaction avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS). | |
| 6.6. Réactions liées à la présence simultanée des fonctions aminés et carboxyliques. | 28 |
| 6.7. Propriétés des chaînes latérales. | 29 |
| 6.7.1. Les fonctions hydroxyles de SER et THR peuvent être estérifiées. | |
| 6.7.2. Les chaînes latérales à noyau aromatique. | |
| 6.7.3. Les fonctions thiols. | |
| 6.7.4. Hydrophobicité et hydrophilicité des chaînes latérales des acides aminés. | |
| 1) l'hydrophobicité et goût. | |
| 2) Hydrophilicité des acides aminés et des protéines. | |
| 7. Séparation et dosage des acides aminés. | 32 |
| 7.1. Généralités sur la chromatographie en phase liquide et l'HPLC. | 33 |
| Coefficient de distribution, volume et le temps de rétention, Facteur de capacité, Temps de rétention | |
| Sélectivité, Efficacité, Résolution, Hauteur équivalente à un plateau théorique. | |
| 7.2. Chromatographie d'échange ionique et détection post-colonne. | 35 |
| 7.2.1. Généralités sur l'échange ionique. | 35 |
| 7.2.2. Principaux types de groupements fonctionnels. | 35 |
| 7.2.3. Principaux types de matrice. | 36 |
| 7.2.4. L'éluion en chromatographie d'échange ionique. | 36 |
| 1) Influence du pH de la phase mobile. | |
| 2) Influence du type et de la concentration en contre-ion. | |
| 3) Effet de la température et de solvants organiques. | |
| 4) Présence d'antioxydants. | |
| 5) Réalisation de l'éluion. | |
| 7.2.5. Détection colorimétrique en détecteur continu (ninhydrine). | 38 |
| 7.2.6. Autres types de détection post-colonne. | 38 |
| 7.3. Chromatographie en phase inverse après dérivatisation pré-colonne. | 39 |
| 7.3.1. Généralités sur la chromatographie d'adsorption. | 39 |
| 7.3.2. La chromatographie en phase inverse. | 40 |
| 1) mécanisme de rétention. | |

- 2) Influence de la phase mobile.
 - 3) Augmentation de k' par modification du soluté.
- 7.4. Etalons internes.

42

III - Les peptides 44

1. Structure de la liaison peptidique. 44

2. Détermination de la composition en acides aminés. 45

3. Détermination de la séquence. 46

3.1. Les acides aminés terminaux. 46

3.1.1. Méthode chimiques. 46

1) Détermination de l'acide aminé N-terminal. 46

2) Détermination de l'acide aminé C-terminal. 46

3.1.2. Méthode enzymatiques. 47

1) Aminopeptidases.

2) Carboxypeptidases.

3.2. Les méthodes classiques de séquençage. 48

3.2.1. Méthode chimiques. 48

3.2.2. Méthode enzymatiques. 48

3.3. Les méthodes automatisées de séquençage. 49

3.4. Les méthodes de séquençage issues du génie génétique. 49

4. Propriétés des peptides. 50

4.1. Propriétés physique

4.2. Propriétés chimiques.

5. Synthèse chimique. 50

5.1. Activation et préparation des acides aminés.

5.2. Condensation.

6. Quelques exemples de peptides. 52

La carnosine et l'ansérine. Le glutathion, les pentapeptides (méthionine enképhaline et leucine enképhaline) β -endorphine, vasopressine et l'ocytocine, la corticotrophine, hormones hypothalamiques, TRF
 Insuline, nisine, subtiline, polymyxines, bacitracine, thyrothricine, tyrocidine A, pénicillines
 Toxines (phalloïdine), peptides inhibiteurs

IV - Production et utilisations d'acides aminés et de peptides 55

1. Les acides aminés. 55

1.1. Production. 55

Hydrolysats de protéines

Production d'acides aminés par voie fermentaire par voie enzymatique

1.2. Utilisations. (acides, amers, umamis) - Glutamate, glycine, L-lysine 56

2. Peptides. 57

2.1. Peptides sucrés. (aspartame, alitame) 57

2.2. Peptides salés 63

2.3. Peptides umamis.

2.4. Peptides acides.

2.5. Peptides amers.

2.6. Peptides "alimentaires" à activité biologique. 64

2.7. Peptides à activités diverses. 64

V. Détermination des poids moléculaires 65

1. Définitions La masse moléculaire, le poids moléculaire, la masse molaire. 65

2. Méthodes chimiques. 66

2.1. Dosage d'un ou plusieurs composants de la molécule.

2.2. Combinaison avec un réactif.

| | |
|---|------------|
| 3. Méthodes physico-chimiques ou physiques. | 67 |
| 3.1. Mesure de la pression osmotique. | 67 |
| gradient de densité | 68 |
| 3.3. Diffusion et coefficient de diffusion. | 70 |
| 3.4. Calcul du poids moléculaire par sédimentation. | 71 |
| 3.5. La chromatographie d'exclusion ou gel filtration ou gel perméation | 72 |
| Principe, différents types de gel (gels mous, semi-rigides, gels rigides) | |
| 3.6. L'électrophorèse (Principe, l'électrophorèse en milieu dénaturant, SDS-PAGE, électrophorèse "simple en gradient de densité) | 75 |
| 3.7. Autres méthodes de détermination des masses moléculaires. | 78 |
| 3.7.1. Diffraction de la lumière. | 78 |
| 3.7.2. Viscosité. | 79 |
| | |
| VI - Conformation des protéines | 80 |
| Les structures secondaires, tertiaires, quaternaires, conformation native. (dynamique des protéines), protéines chaperons, le PRION | |
| | |
| 1. Principales structures spatiales des protéines. | 85 |
| 1.1. Structures secondaires. | 85 |
| 1.1.1. L'hélice α . (L'hélice α hélice 3_6 , 3_{10} , M, polyproline I ou II.) | 85 |
| 1.1.2. Les feuilletts β . | 87 |
| 1.1.3. Courbure β . | 87 |
| Pelote statistique. | 88 |
| 1.2. Structures tertiaires. | 88 |
| Structures de type α , Structure de type β , Structure α / β | |
| 1.3. Structures quaternaires ou supramoléculaires. | 90 |
| | |
| 2. Moyens d'études de ces structures. | 92 |
| 2.1. Méthodes physiques. | 92 |
| 2.1.1. Microscopie (électronique, transmission, balayage, microscopie à platine froide, environnementale, effet tunnel) | 92 |
| 2.1.2. Les méthodes spectrales. | 92 |
| UV, fluorimétrie, dichroïsme circulaire, spectroscopie aux rayons X, diffusion de neutrons, spectroscopie Raman | |
| 2.1.3. Les méthodes "nucléaires et électroniques". | 95 |
| La résonance magnétique nucléaire, la ESR ou RPE | |
| 2.1.4. Les méthodes "thermodynamiques", la calorimétrie différentielle à balayage. | 96 |
| 2.1.5. Les méthodes basées sur la charge et le volume et /ou la forme. | 97 |
| L'électrophorèse en milieu dénaturant (SDS-PAGE) | |
| L'électrophorèse en gel non dénaturant | |
| L'isotachophorèse. | |
| Chromatographies. | |
| 2.2. Méthodes chimiques. | 99 |
| Acide cis-parinarique, acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (ANS), rétinol. Hydrophobicité de surface | |
| 2.3. Méthodes biologiques. | 100 |
| 2.4. Méthodes prédictives. | 101 |
| 2.4.1. Recherche des régions codantes pour une protéine donnée dans le génôme. | |
| 2.4.2. Alignement des séquences d'acides aminés. | |
| 2.4.3. Prédiction des structures secondaires. | |
| | |
| 3. Interactions impliquées dans la conformation des protéines. | 104 |
| 3.1. Prise en compte des contraintes stériques. | 104 |
| 3.2. Les interactions de Van der Waals. | 105 |
| 3.3. Les interactions dipolaires. | 105 |
| 3.4. Les interactions ioniques (électrostatiques). | 106 |
| 3.5. Liaisons par pont hydrogène. | 107 |
| 3.6. Interactions hydrophobes. | 107 |
| 3.7. Ponts disulfure. | 108 |
| | |
| VII - Extraction & purification des protéines | 109 |
| | |
| 1. Objectifs de l'extraction & purification. | 109 |

| | |
|---|----------------|
| 2. Méthodes d'extraction des protéines. | 110 |
| Méthodes d'extraction négatives, méthodes d'extraction positives | |
| Le rendement d'extraction , la sélectivité, le coût d'extraction | |
| 3. Les procédés de destructuration. | 111 |
| 3.1. Traitements de destructuration physique. | 112 |
| 3.1. Traitements de destructuration chimique. | 112 |
| 3.2. Traitements enzymatiques. | 113 |
| 4. Optimisation de la solubilisation. | 113 |
| 5. Purification & concentration & récupération des protéines solubilisées. | 113 |
| 5.1. Précipitation enzymatique. | 113 |
| 5.2. Précipitation isoélectrique. | 113 |
| 5.3. Précipitation par augmentation de la force ionique. | 114 |
| 5.4. Précipitation par diminution de la constante diélectrique. | 115 |
| 5.5. Coprécipitation par adsorption. | 115 |
| 5.6. L'ultrafiltration. | 115 |
| 5.7. Méthodes basées sur la structure et les propriétés des protéines. | 116 |
| 5.7.1. Méthodes basées sur la taille et la forme : chromatographie d'exclusion | 116 |
| 5.7.2. Méthodes basées sur la charge. Echange d'ions. | 117 |
| a) Choix de la matrice. | |
| b) Choix du groupement fonctionnel. | |
| c) Modalités de la séparation. | |
| d) Applications en sciences des aliments. | |
| 5.7.3. Méthodes basées sur la charge. Chromatofocalisation | 120 |
| 5.7.4. Méthodes basées sur l'hydrophobicité de surface. | 121 |
| 5.7.5. Méthodes basées sur l'établissement de liaisons covalentes. | 121 |
| 5.7.6. Chromatographie sur hydroxyapatite. | 121 |
| 5.7.7. Chromatographie par chélation. | 122 |
| 5.7.8. Chromatographie d'affinité. | 122 |
| a) Le choix du ligand. | |
| b) Choix de la matrice. | |
| c) Choix du bras espaceur. | |
| d) Couplage. | |
| 6. Détermination de la pureté de la protéine isolée. | 125 |
| VIII - Dénaturation | 126 |
| 1. Dénaturation et changements de conformation | 126 |
| 2. Dénaturation réversible ou irréversible. | 126 |
| 3. Facteurs à l'origine de la dénaturation irréversible. | 127 |
| 3.1. La chaleur. | 127 |
| 3.2. Le froid. | 128 |
| 3.3. Les traitements mécaniques (hautes pressions, ultra-sons) | 129 |
| 3.4. Le "positionnement "d'une protéine à une interface. | 129 |
| 3.5. Protéolyse et autolyse. | 129 |
| 3.6. Agents chimiques. | 129 |
| Acides, bases, métaux divalents, agents chélatants, solvants organiques, urée, le dodécyl sulfate de sodium | |
| 4. Contrôle et minimisation de la dénaturation. | 130 |
| Annexe : La maladie de la vache folle et la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jacob | 9 pages |