

# SEPARATIONS DES ACIDES AMINES

**Les AA constitutifs des protéines, sont libérés par hydrolyse.**

**Un hydrolysate protéique, obtenu après ébullition dans l'acide chlorhydrique (HCl) prolongé (6N) est un mélange d'AA qu'il importe d'identifier et de doser.**

**Les méthodes de séparations les plus utilisées sont:**

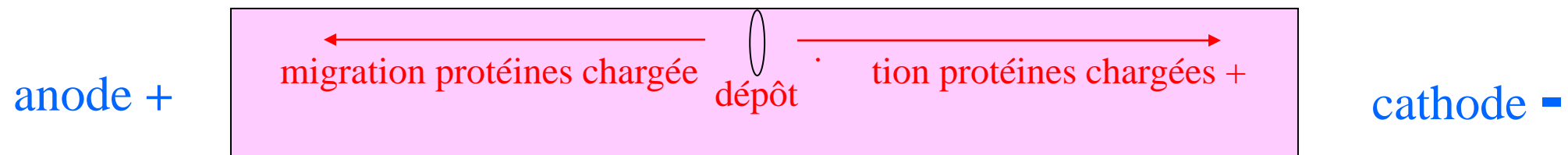
- Méthodes électrophorétiques;**
- Méthodes chromatographiques**
  - 1 / chromatographies de partage;**
  - 2 / chromatographies échangeuses d'ions**

# ELECTROPHORESE

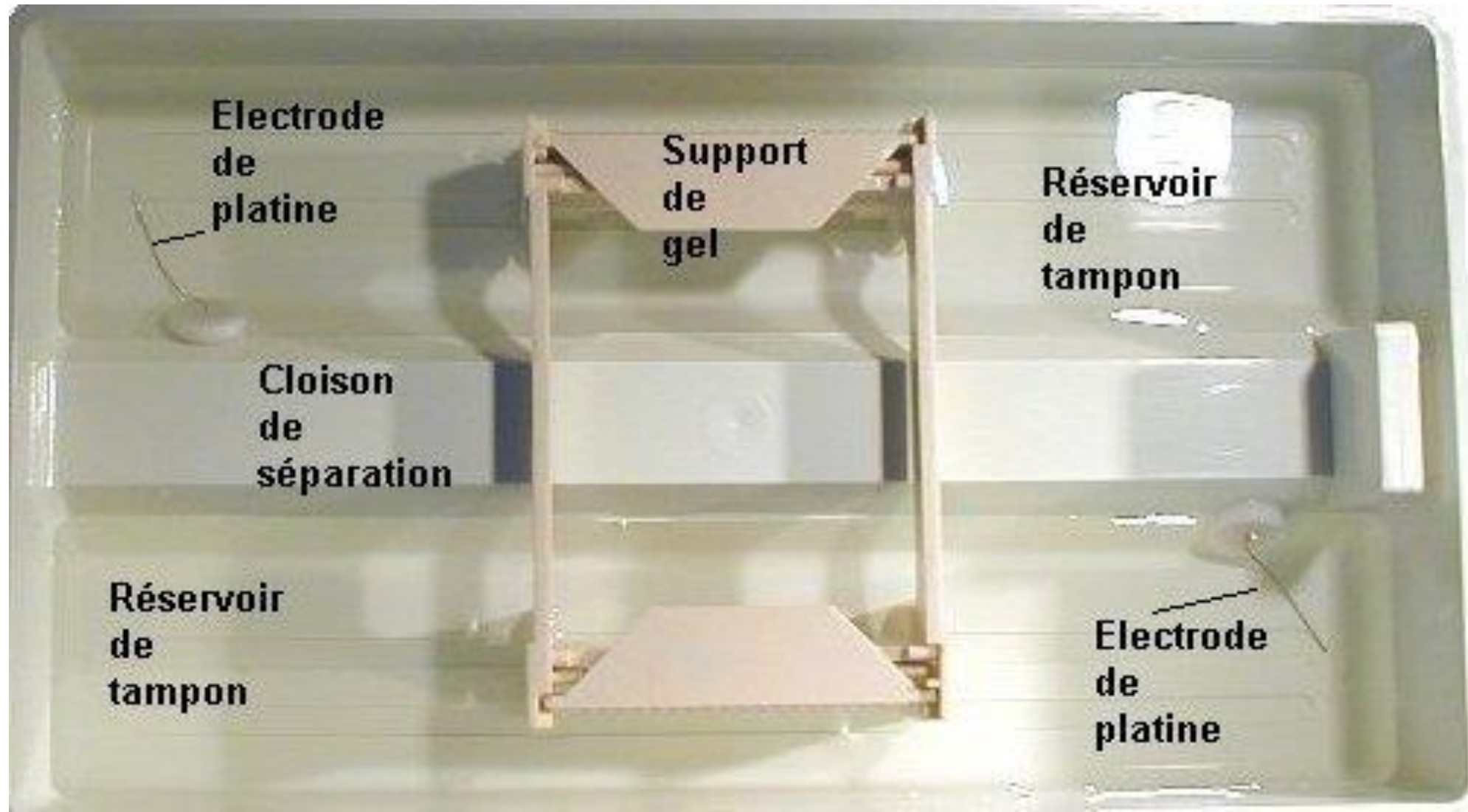
- ▶ L'électrophorèse est une **technique biochimique de séparation** fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.
- ▶ l'électrophorèse est devenue une **technique de routine** dans les laboratoires où on l'utilise pour séparer notamment les protéines et les acides nucléiques.
- ▶ L'électrophorèse des protéines peut être réalisée sur des supports variés, notamment sur **gel de polyacrylamide ou sur gel d'agarose 11**

Deux facteurs vont influencer la migration des protéines: leur **charge et leur taille**. Plus la protéine est chargée plus sa migration sera importante. Au contraire plus la protéine sera grosse moins sa migration sera importante.

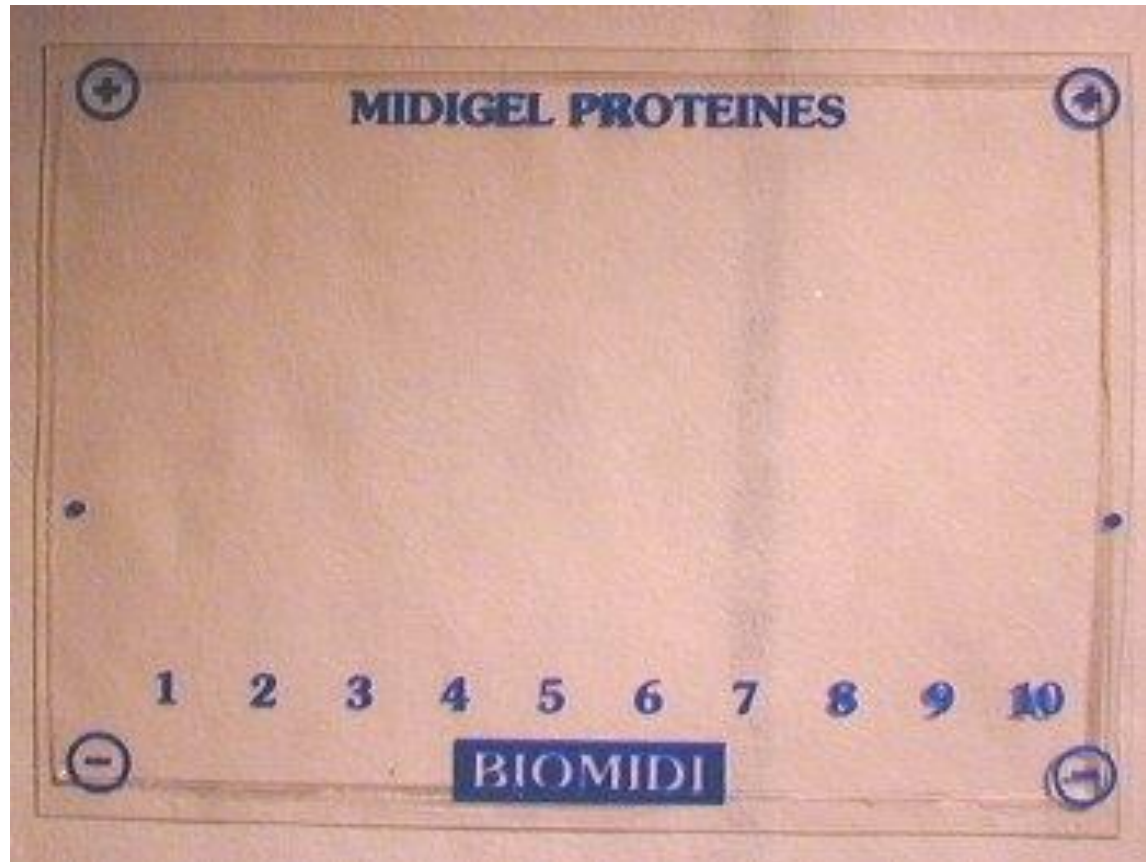
Le sens de migration de la protéine va dépendre de son **pI (point isoélectrique)**. En fonction du pH la protéine sera chargée positivement ou négativement, elle migrera donc vers l'anode (chargée +) ou la cathode (chargée -).



# Cuve pour électrophorèse clinique



# Préparation du gel et dépôt des échantillons



Les gels supportés prêts à l'emploi sont constitués d'une mince couche d'agarose coulée sur un support plastique de 100 mm x 75 mm permettant leur manipulation aisée.

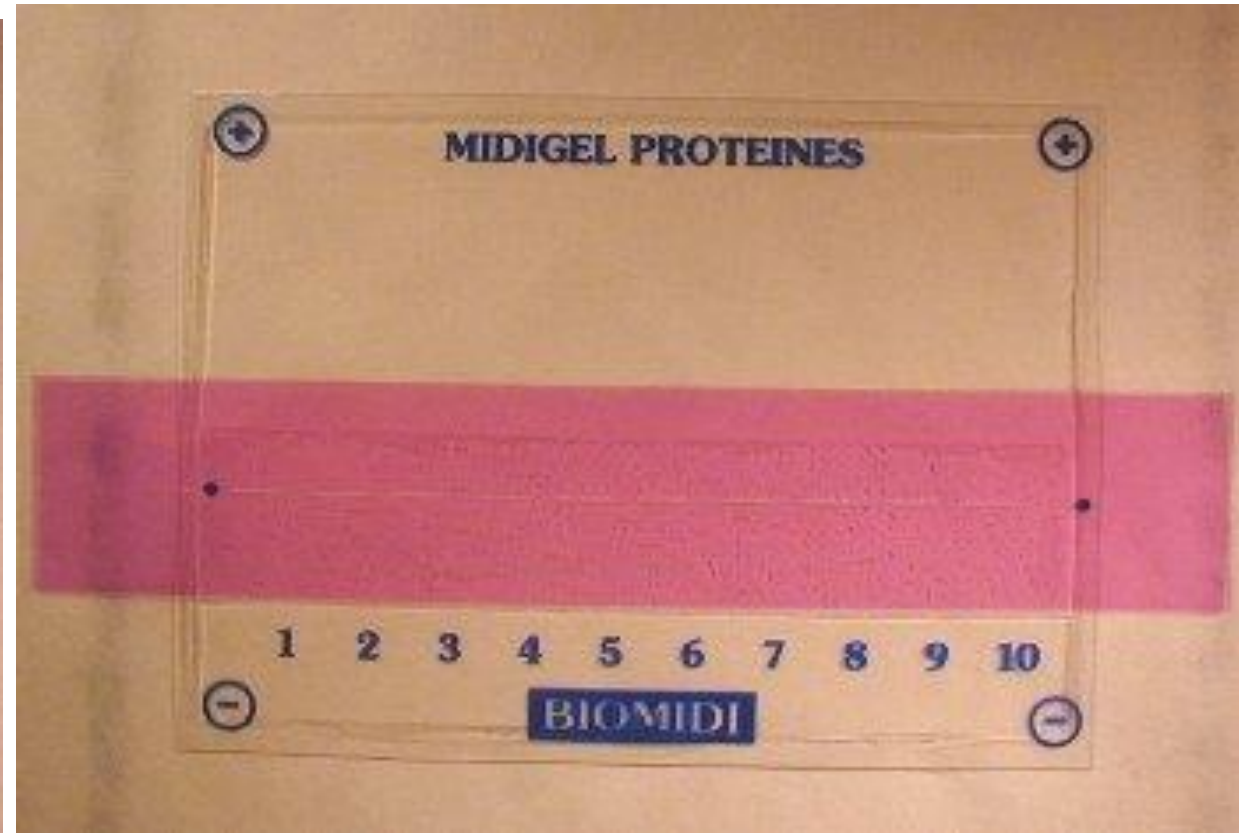


## Essorage de la zone de dépôt



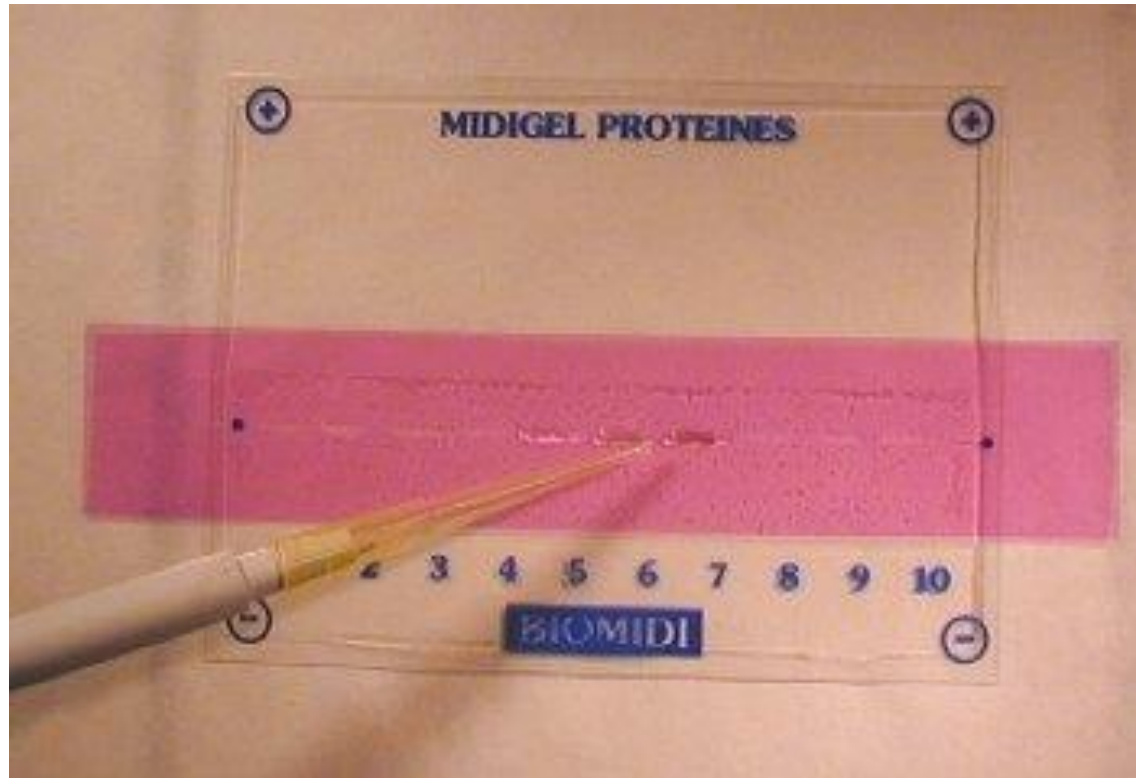
Une fois le gel sorti de son emballage, la zone de dépôt est essorée avec une bande de papier filtre pour faciliter la diffusion des échantillons lors du dépôt.

## Mise en place du masque de dépôt

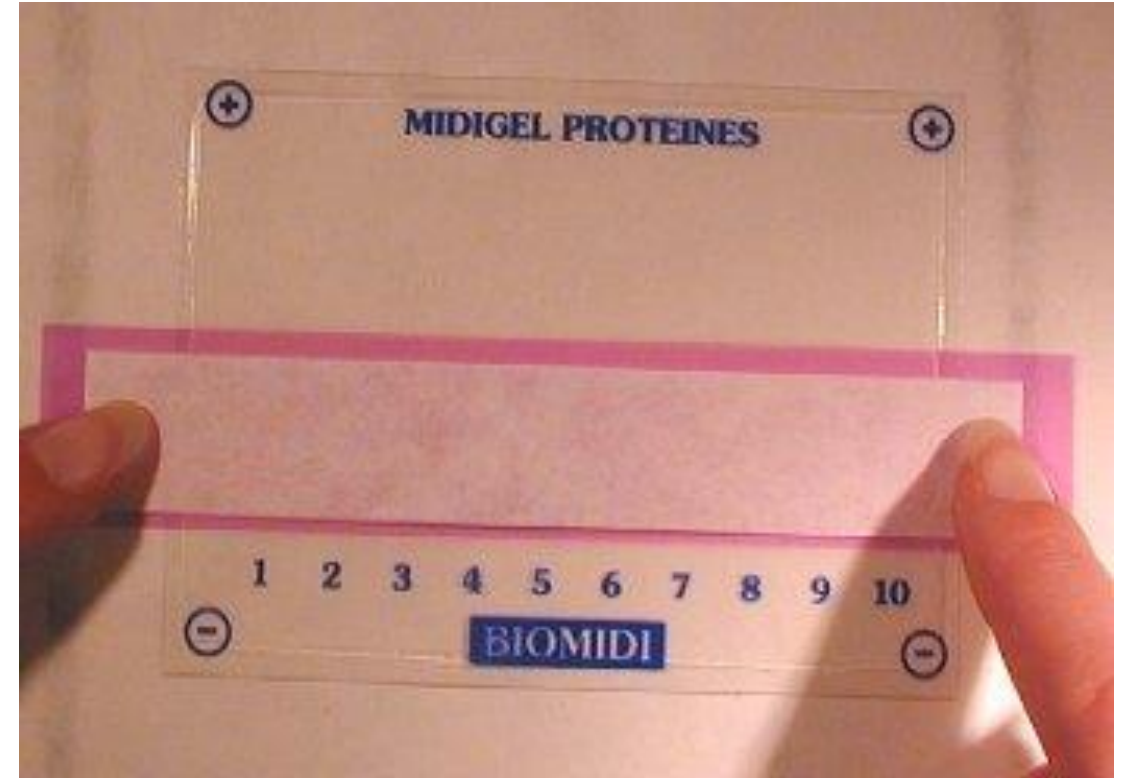


La bande est ensuite retirée et jetée et on dispose à la même place un masque de dépôt formé d'une bande de plastique comportant 10 fentes.

## Dépôt des échantillons    Essorage du liquide en excès



Un volume de 5  $\mu\text{L}$  des échantillons à analyser est déposé sur les fentes et abandonné pendant 5 minutes pour assurer leur diffusion au niveau de la zone de dépôt.



Le liquide non absorbé par le gel est ensuite essoré avec une autre bande de papier filtre et le masque de dépôt est jeté.

# Gel en place dans la cuve





# Phase de migration

- Le gel est alors mis en place dans la cuve et puis après fermeture du couvercle et mise en marche de l'alimentation, la migration des protéines démarre
- La tension appliquée au gel et le temps de migration dépendent de la nature des échantillons à analyser.

# Ensemble du dispositif d'électrophorèse



## Fixation et coloration

- Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est plongé pendant deux minutes dans le fixateur (acide alcool), séché puis plongé pendant trois minutes dans le colorant.
- Une succession de bains dans la solution de décoloration permet ensuite d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées.

# Décoloration du fond



Le gel est ensuite séché ce qui permet de le conserver dans de bonnes conditions.



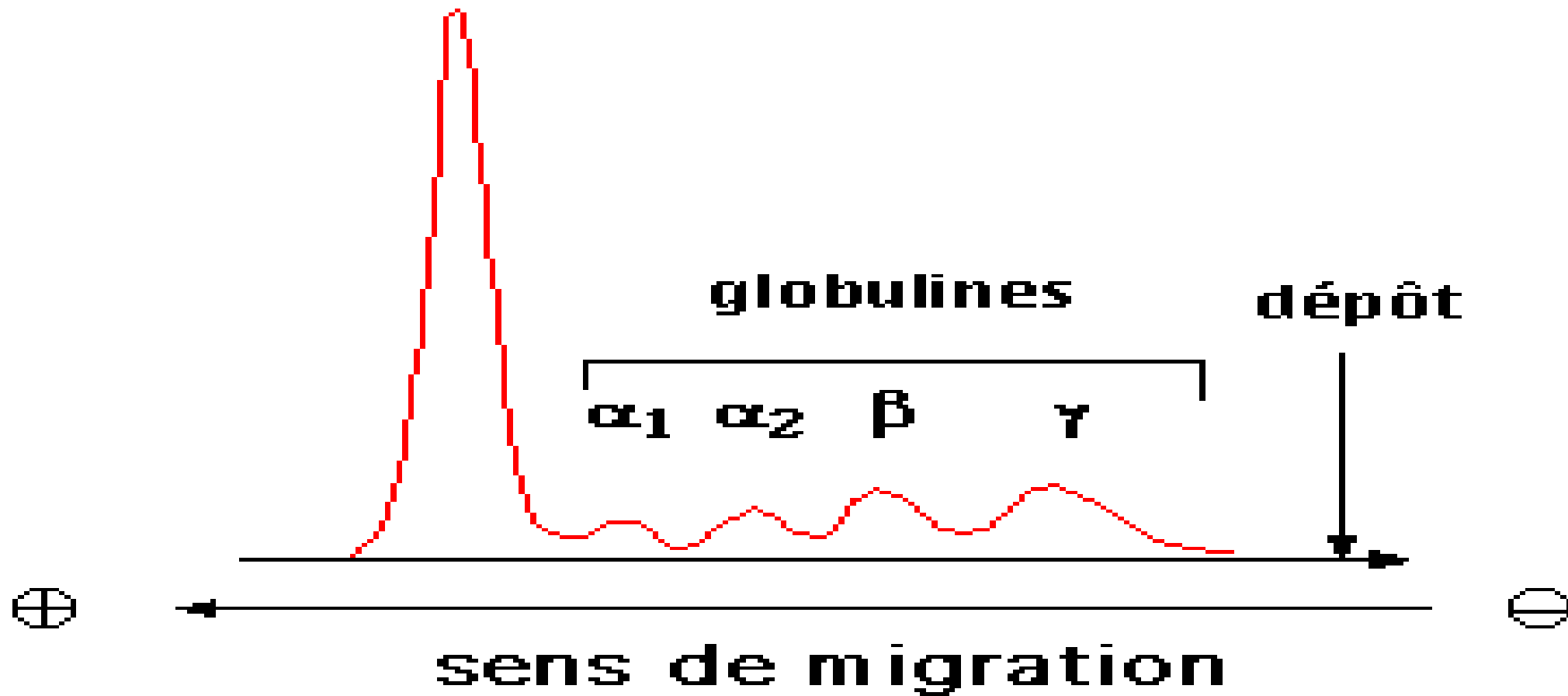


# lecture

- Peut se faire **à l'oeil nu** (analyse qualitative) ou **par densitométrie** (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, **l'intégration** des pics permet une analyse quantitative des fractions.

# Tracé densitométrique du protéinogramme d'un sérum humain normal

**albumine**



## METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

- **CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.**
- **CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.**
- **CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.**
- **CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS.**

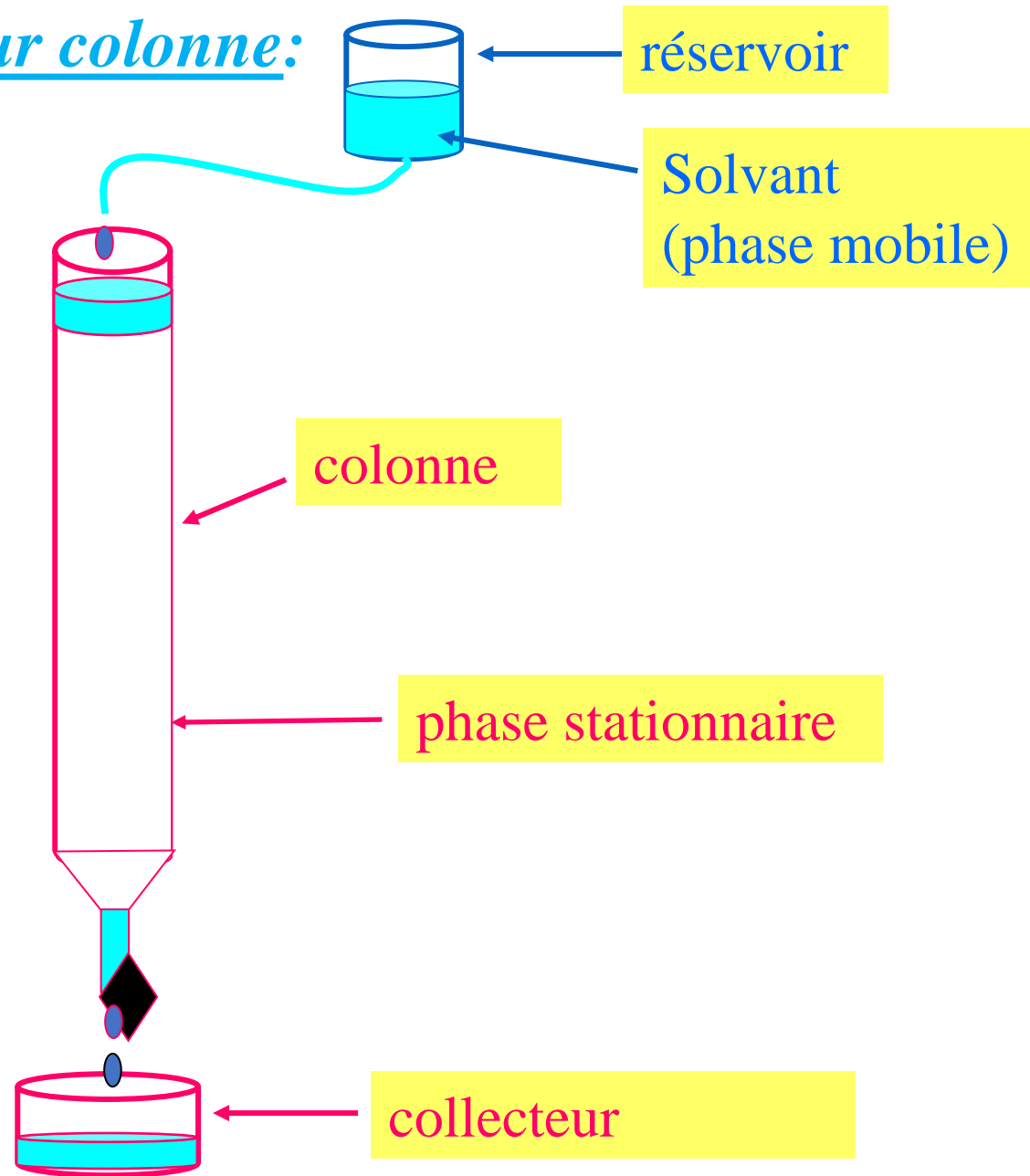
# La purification des protéines

La chromatographie est une technique de **séparation** qui utilise un support qui possède des propriétés **physico-chimiques** particulières.

Ce support va retenir les protéines en fonction de critères variables.

- en fonction de la **charge des protéines**.
- en fonction de leur **affinité** pour des molécules (ligands...).
- en fonction de leur **taille**.

Chromatographie sur colonne:





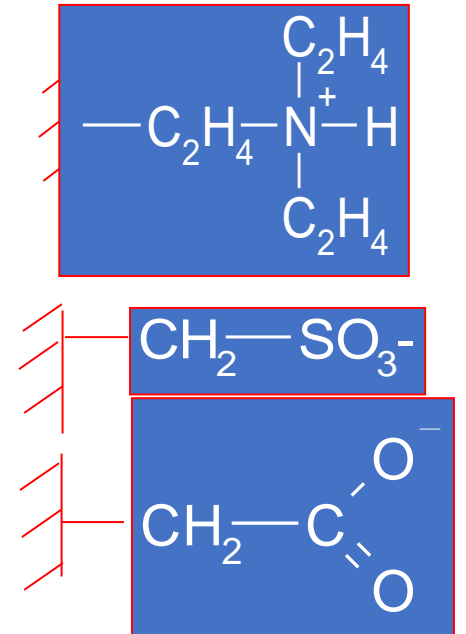
# Chromatographie d'échange d'ions:

La phase stationnaire est composée d'une résine qui peut être

- chargée positivement (*échangeuse d'anions*)

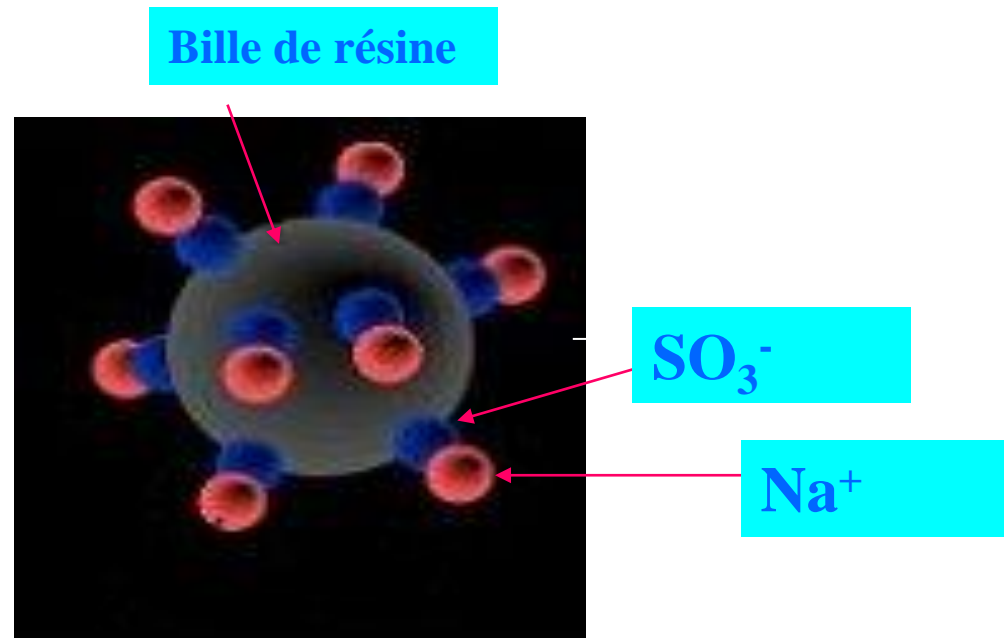
- chargée négativement (*échangeuse de cations*)

- Les interactions molécules-colonne vont dépendre de la charge des molécules. Ces interactions pourront être *modulées par le pH et la force ionique (concentration en sels) du milieu.*



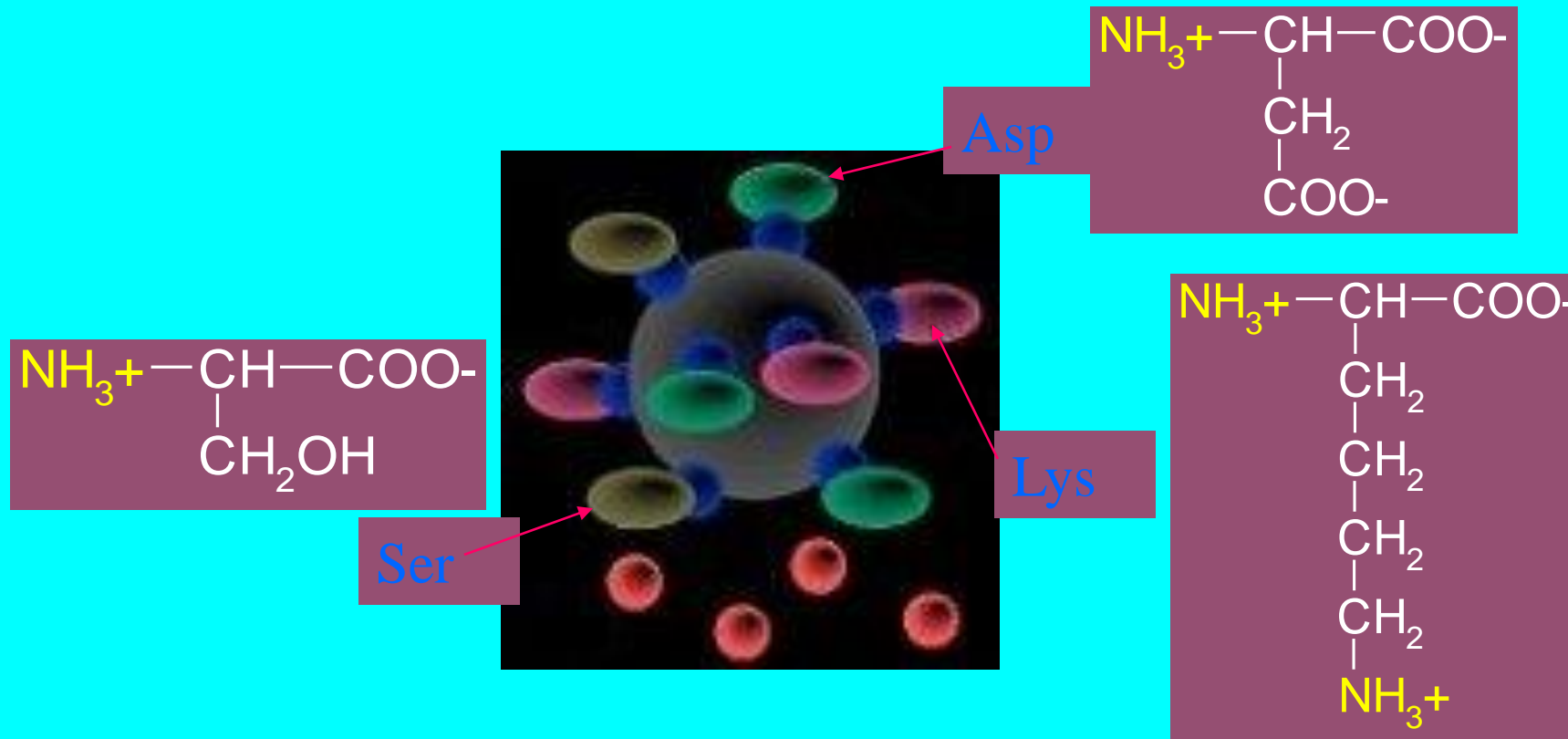
## Exemple d'une purification par échange de cations: séparation de 3 acides aminés Ser, Asp et Lys

- **étape 1**: la colonne (chargée négativement) est équilibrée avec une solution faiblement concentrée en sels.



Les cations de la solution (ici Na<sup>+</sup>) vont se fixer sur les charges négatives de la phase stationnaire.

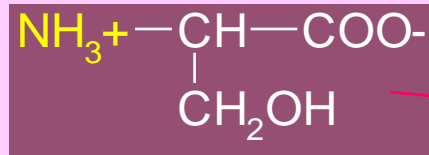
- étape 2: la solution contenant le mélange des molécules à séparer est déposée sur la colonne.



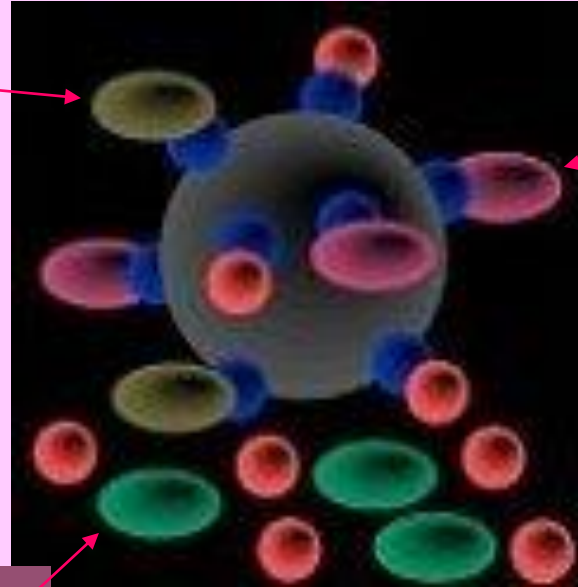
**Ce sont les molécules présentes en plus grande concentration qui se fixent à la colonne.**

**Ici, les groupement chargés positivement vont se fixer à la colonne à la place des ions  $\text{Na}^+$**

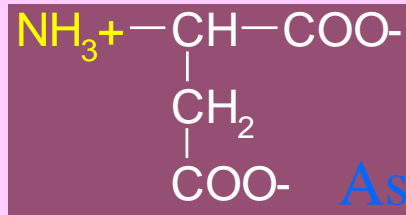
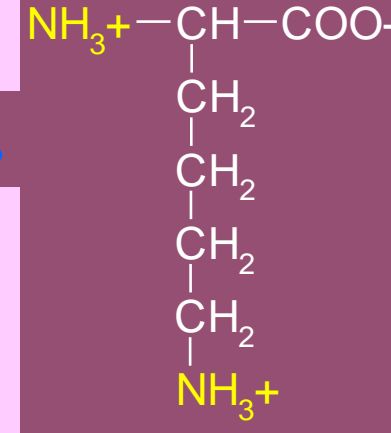
- **étape 3**: On élue (on rince) la colonne avec une solution de NaCl un peu plus concentrée.



Ser



Lys

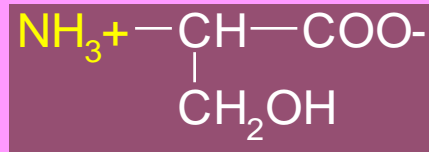


Asp

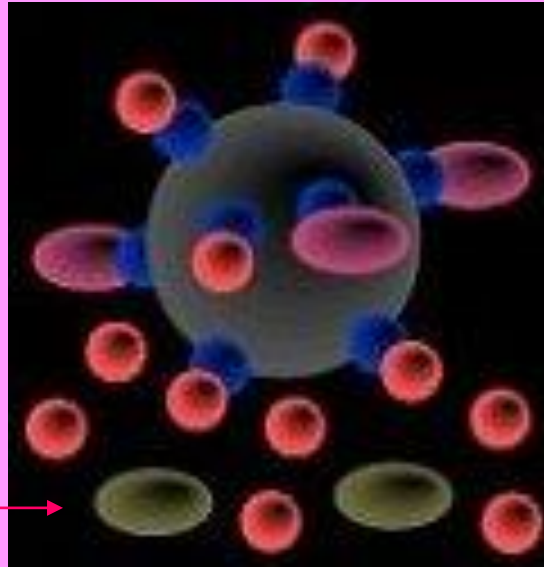
Les ions  $\text{Na}^+$  étant plus nombreux que précédemment ils vont entrer en compétition avec les acides aminés pour se fixer sur la colonne.

Ils vont remplacer tout d'abord les acides aminés les moins positifs.

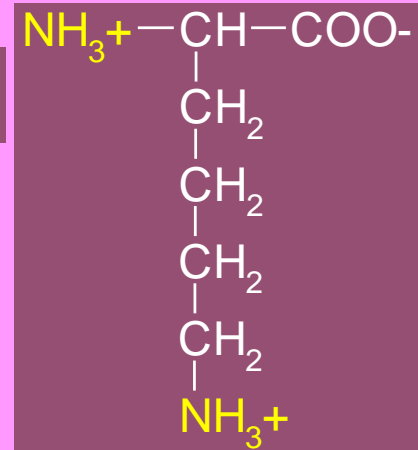
- étape 4: On augmente la concentration en NaCl de l'éluant.



Ser



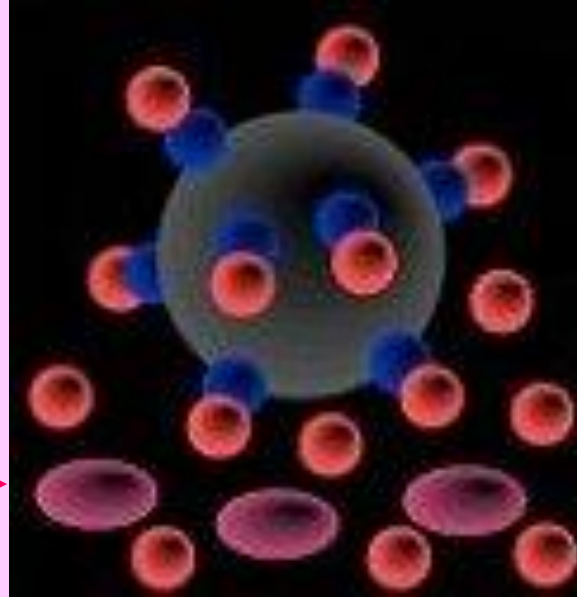
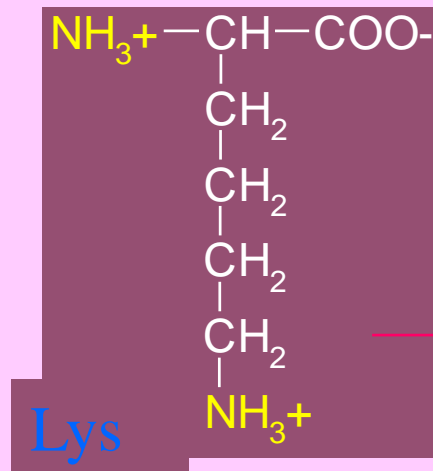
Lys



La concentration en  $\text{Na}^+$  étant plus forte, seuls les acides aminés les plus chargés vont rester fixés à la colonne.

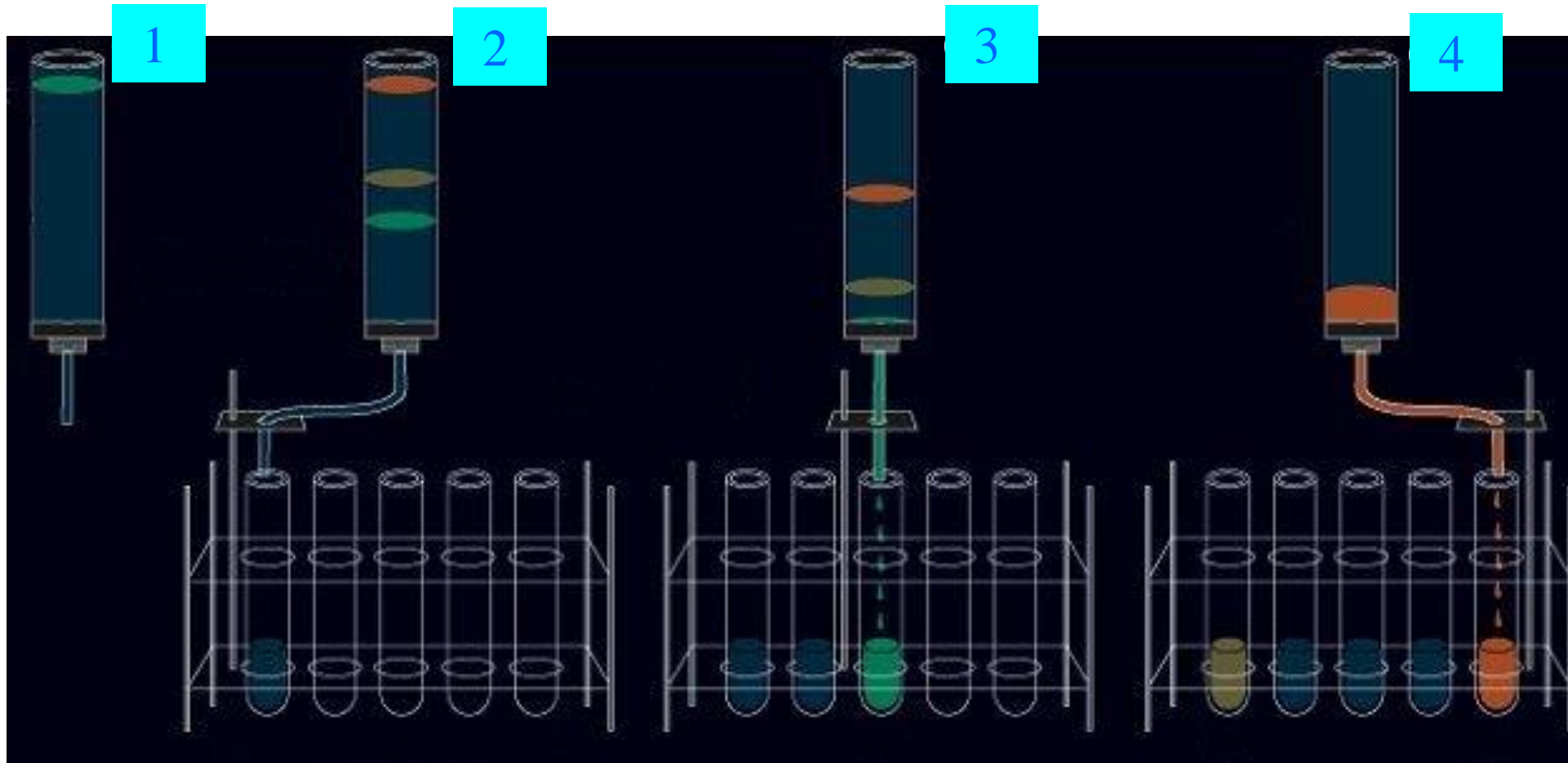


- étape 5: On augmente encore la concentration en NaCl de l'éluant.



Les ions  $\text{Na}^+$  sont en large excès, ils vont remplacer toutes les molécules qui étaient encore sur la colonne.

On a rincé la colonne avec **un gradient de concentration** en NaCl



**1-2: On dépose le mélange, les molécules les plus chargées se fixent tout de suite alors que les moins chargées se fixent plus bas.**

**3-4: On rince la colonne avec une solution de NaCl de concentration croissante. On décroche successivement les différentes molécules.**

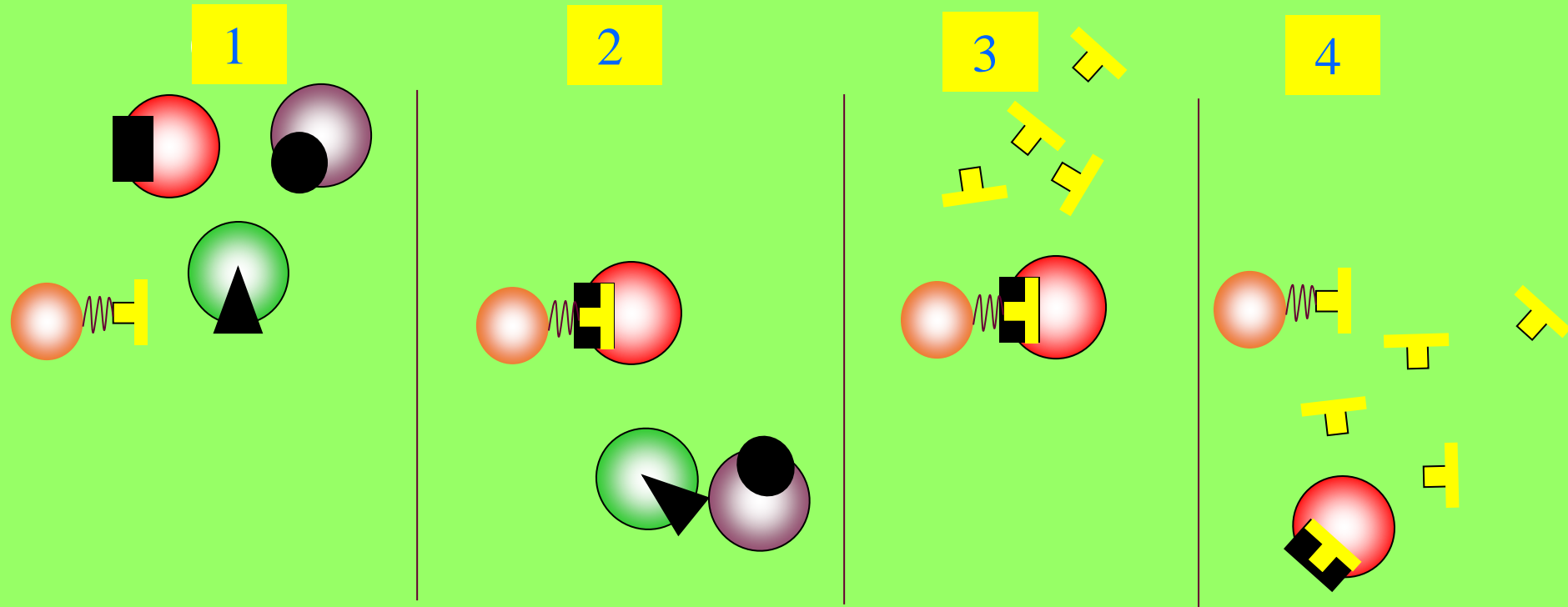
Dans l'exemple précédent on a modifié la force ionique de l'éluant pour décrocher les différents acides aminés.

On aurait également pu modifier le pH de l'éluant et garder une concentration en NaCl constante.

En fonction de leur pKa respectifs les acides aminés auraient changé de charge et se seraient décrochés de la colonne.

Le principe est strictement le même pour une protéine.

Chromatographie d'affinité: On greffe sur la colonne une molécule qui interagit de façon spécifique avec la protéine que l'on veut purifier.



1-2: Quand on met le mélange sur la colonne, seule la protéine qui peut interagir avec le ligand se fixe.

3-4: Pour décrocher la protéine de la colonne, on élue avec une solution contenant le ligand.

# LES PEPTIDES

**I) Définition**

**II) Importance biomédicale**

**III) Structure des peptides**

**La liaison peptidique**

**IV) Propriétés acidobasique des peptides**

**V) Etudes des séquences peptidiques**

**A) Clivage des ponts disulfures et séparations des chaînes peptidiques**

**B) Détermination de la composition en AA d'une chaîne polypeptidique**

**C) Détermination de la séquence peptidique**

**a) Identification de l'AA N terminal**

**b) Identification de l'AA C terminal**

**c) Hydrolyse partielle des chaînes peptidiques**

**VI) Etude de quelques peptides d'intérêt biologique**

**A) Les oligopeptides**

**B) Les polypeptides**

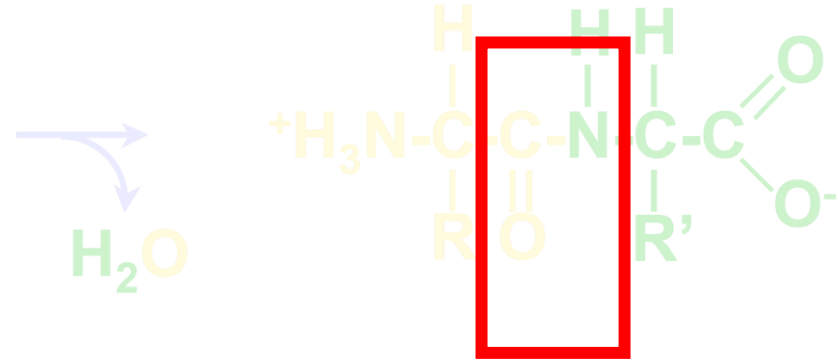
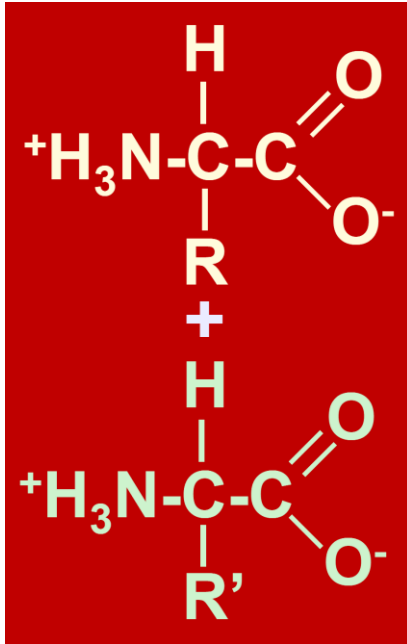
## DEFINITION

### LIAISON PEPTIDIQUE

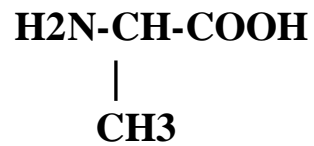
La réaction du groupe  $\alpha$ -carboxylique d'un acide aminé avec le groupe  $\alpha$ -aminé d'un autre acide aminé permet à ces deux amino-acides de s'unir par formation d'une amide secondaire. Cette liaison, encadrée par deux [-CH-], s'appelle liaison peptidique car elle permet la formation d'un peptide:

dipeptide avec deux amino-acides, tripeptide avec trois, polypeptide avec plus que quatre. Un acide aminé engagé dans une chaîne peptidique s'appelle un résidu; il porte le nom de l'acide aminé dont il dérive, additionné du suffixe **-yl: résidus lysyl, tyrosyl, alanyl, etc.**

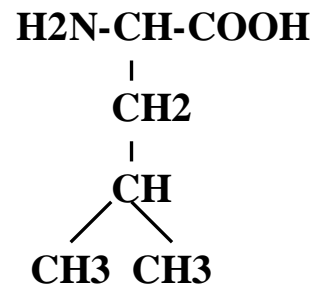




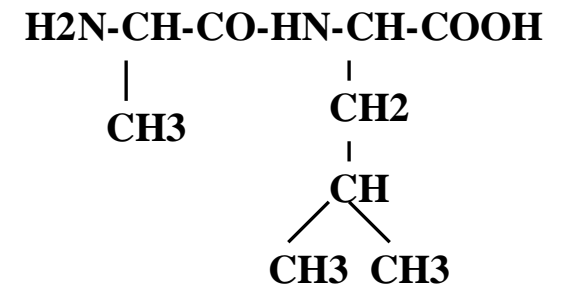
**liaison peptidique**



+



$\xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}}$



Alanyl-Leucine.

**La liaison peptidique est très stable (> ester).**

**L'hydrolyse nécessite des conditions drastiques :**

**HCl 6N, 120°C, 24h-72h.**

La formule d'un peptide s'écrit, en commençant à partir de la gauche, par le résidu ayant son groupe aminé libre.

Le dernier résidu à droite est donc celui dont le groupe carboxylique est libre.

Si la liaison peptidique implique un COOH ou un NH<sub>2</sub> situé dans une autre position ( $\beta$  COOH,  $\gamma$  COOH,  $\varepsilon$  NH<sub>2</sub>) on parle de liaison peptidoïde.

## II) IMPORTANCE BIOMEDICALE

L'intérêt est considérable surtout en endocrinologie. De nombreux hormones sont des peptides qui peuvent être administrés à des patients pour corriger leur déficit (insuline). Certains peptides agissent au niveau du système nerveux, comme neurotransmetteurs.

Certains antibiotiques sont des peptides comme la valinomycine et la gramicidine A. D'autres peuvent être des agents antitumoraux c'est le cas de la bléomycine. Le dipeptide aspartame sert d'agent édulcorant dans de nombreuses boissons.

La synthèse chimique rapide et la technologie de l'ADN recombinant ont facilité la synthèse de quantités d'hormones peptidiques .

## SENS DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE

- **La séquence est orientée en partant de l'acide aminé N-terminal (extrémité NH<sub>2</sub>) vers le C-terminal (extrémité COOH) qui correspond au sens de la synthèse des protéines.**

### III) PROPRIETES SPATIALES DE LA LIAISON PEPTIDIQUE

La liaison peptidique peut , en fait s'écrire de deux façons (formes mésomères)

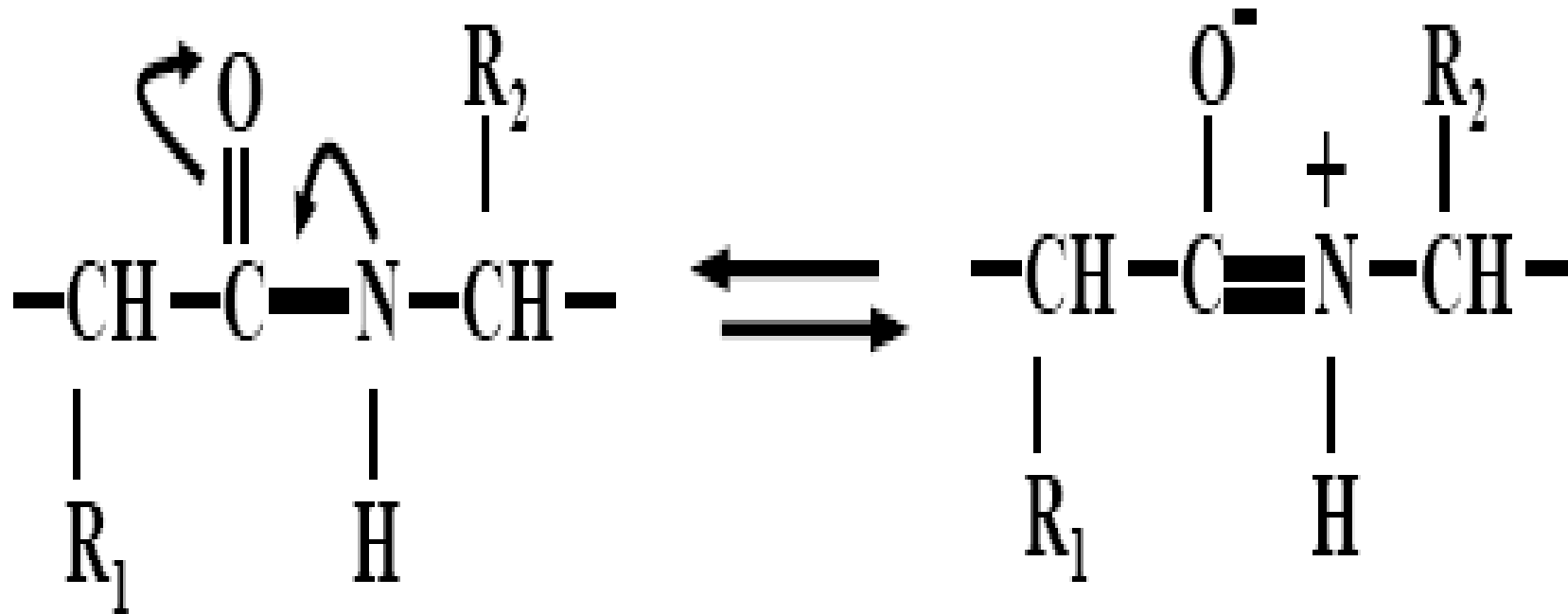
Les électrons du groupe carbonyle et le doublet électronique libre de l'azote sont très proches. La résonance de ces électrons donne au groupe peptidique des structures intermédiaires entre deux formes mésomères.

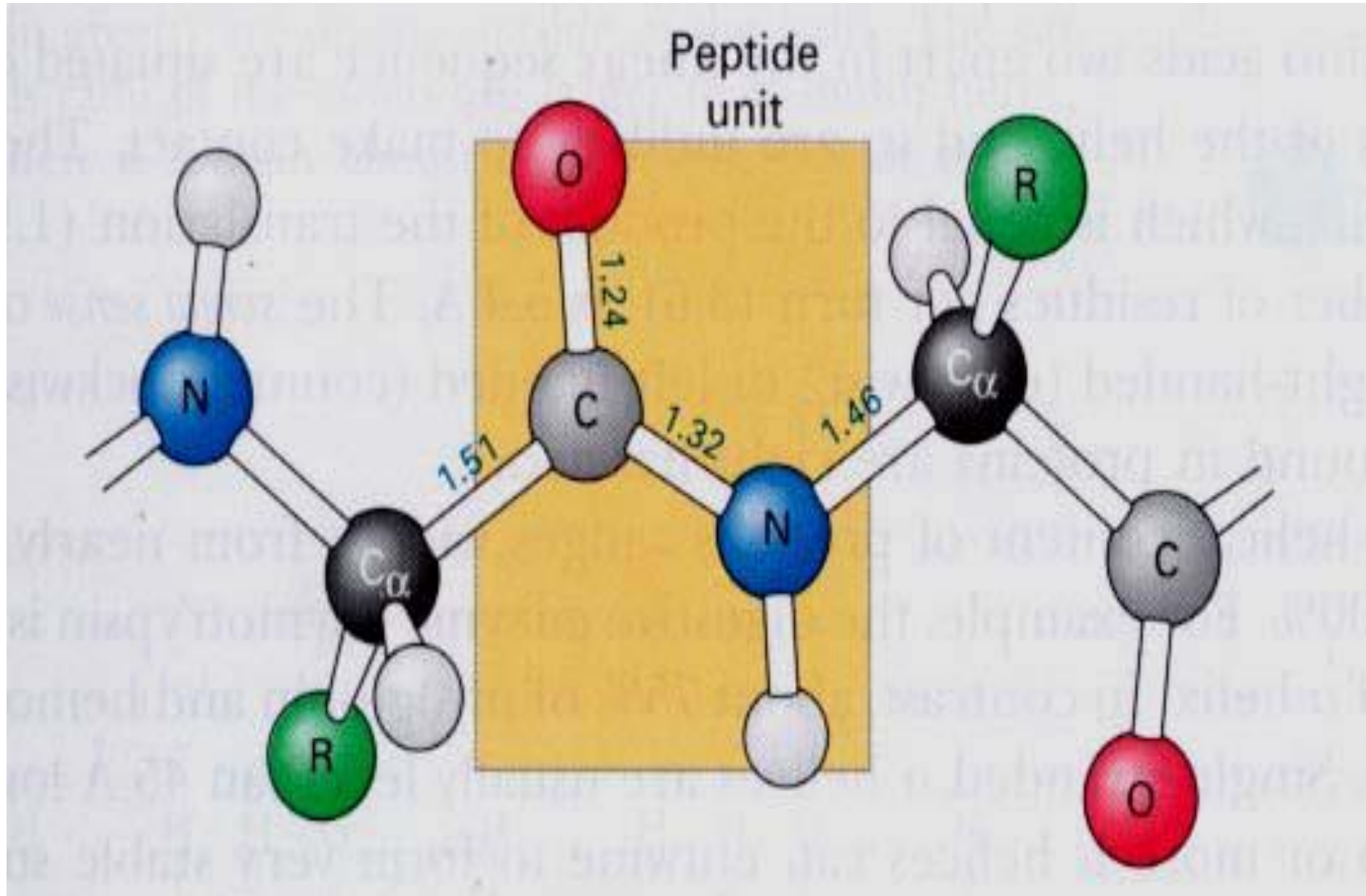
- Dans des études par des rayons X de peptides cristallisés, **PAULING** et **COREY** ont trouvé que:

La liaison du carbone carbonyle avec l'azote dans la liaison peptidique  
(1,32 Å )  
est plus courte que la liaison simple C-N (1,49 Å) mais plus longue  
qu'une liaison double C=N classique (1,27 Å).

Cela s'explique par le fait que cette liaison peut se trouver sous deux formes de résonances : 70% sous forme simple et à 30% sous forme double.

Ce caractère de double liaison entraîne une certaine rigidité et empêche la libre rotation.





la configuration trans est la plus stable car minimisation de l'encombrement stérique des résidus.