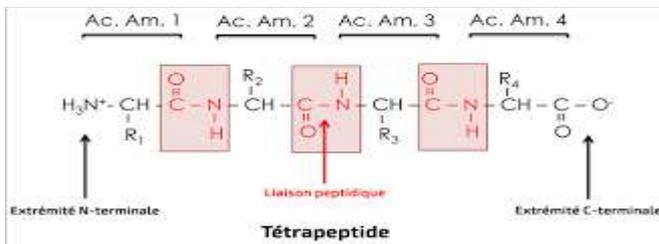


D-PRECIPITATION DES PROTEINES

D1-Les protéines

Les protéines sont des macromolécules biologiques. Ce sont des molécules organiques les plus abondantes dans les cellules, elles en constituent souvent plus de 50% du poids sec. Elles jouent un rôle primordial dans la structure et la fonction cellulaire et constituent le mode d'expression majeur de l'information génétique portée par l'ADN (acide désoxyribonucléique).

Les Protéines sont des biopolymères, molécules formées par la condensations (par liaison covalente = liaison amide= liaison peptidique) en nombre et nature variable d'une vingtaine d'acides aminés de la série L ; Cette condensation est « programmée » par l'information codée dans l'ADN (gène) et produit une chaîne polypeptidique dont la séquence (nombre, nature et ordre d'enchaînement) d'acides aminés est spécifique (structure primaire) et répond à la règle fondamentale de la biologie moléculaire : un gène /une chaîne polypeptidique.



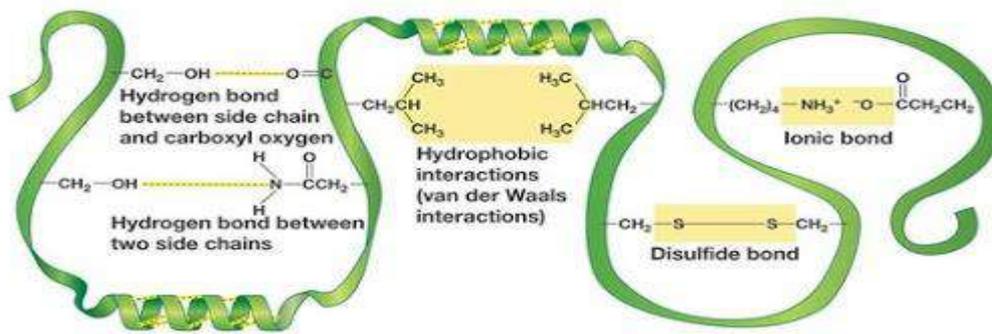
Une protéine peut être constituée par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes. Dans tous les cas, la ou les chaînes polypeptidiques, caractérisées chacune par sa structure primaire, ne sont pas stables en solution aqueuse (milieu naturel des protéines) dans leur état d'extension maximale, ce qui provoque leur repliement ou réorganisation spatiale en vue d'atteindre un état thermodynamique stable (d'énergie minimale), correspondant le plus souvent à leur état, ou conformation, dite native et fonctionnelle.

Le processus de repliement des chaînes polypeptidiques, comme leur éventuelle association, est un processus hiérarchisé qui obéit à un déterminisme double : génétique (la structure primaire) et physicochimique (interactions avec le milieu environnant).

Ainsi, une chaîne polypeptidique, en fonction de sa structure primaire (définie par le gène correspondant), des contraintes (physiques) aux rotations imposées par la liaison peptidique et par l'existence de possibilités (chimiques) de formation de ponts (liaisons) hydrogène entre les substituants des liaisons peptidiques voisines, cette chaîne polypeptidique adopte une réorganisation spatiale « locale » en hélice α ou en feuillet β , appelée structure secondaire. Une chaîne polypeptidique peut comporter une ou plusieurs structures secondaires du même type ou de différents types ; Ces structures secondaires peuvent se réorganiser en structures tertiaires grâce à l'interaction (liaison H, Van der Waals, ioniques...) entre différentes parties de la chaîne polypeptidique.

Plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes, ayant acquis une structure tertiaire, peuvent s'associer en une protéine multi (ou oligo)mérique caractérisée par sa structure quaternaire.

Une protéine est normalement active avec le niveau structural tertiaire ou quaternaire.

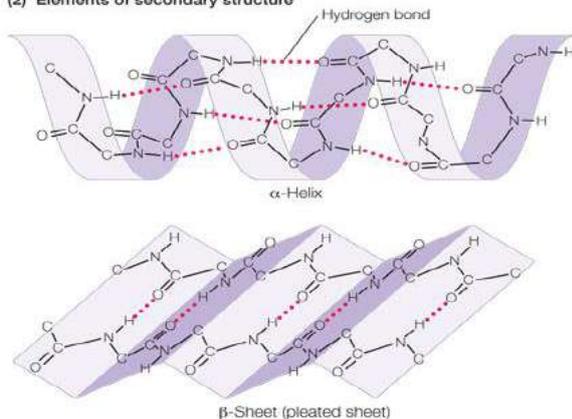


A noter que le seul type de liaison covalente participant à la stabilisation de la structure tridimensionnelle (3D) des protéines est le **pont (liaison) disulfure**, ce dernier est normalement spécifié dans ce qu'on appelle la **structure covalente** d'une chaîne polypeptidique, à la différence de la **structure primaire** qui ne tient compte que des liaisons peptidiques. La structure 3D des protéines, ou **conformation native** (fonctionnelle), est donc essentiellement stabilisée par des interactions (électrostatiques) faibles **intramoléculaires**, identiques à celles existantes entre molécules d'un état condensé de la matière.

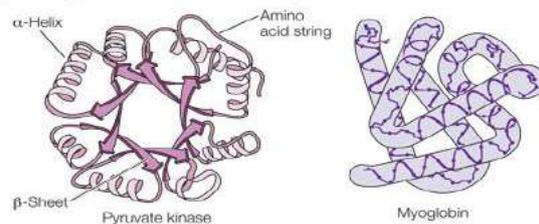
(1) Primary structure



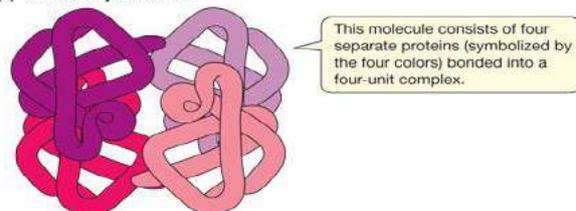
(2) Elements of secondary structure



(3) Tertiary structure drawn in two ways

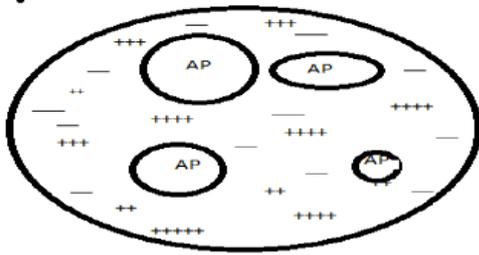


(4) Quaternary structure



Lors du processus de repliement d'une protéine en milieu aqueux, l'interaction des chaînes latérales des résidus aminoacyles constitutifs entre eux et avec les molécules d'eau, fait que la majorité des chaînes latérales hydrophobes se trouvent confinées à l'intérieur du globule protéique, en l'absence de molécules d'eau et en interaction entre elles par des forces de LONDON (Van Der Waals), alors que les chaînes latérales hydrophiles se trouvent rejetés (en majorité) à la surface du globule protéique au contact des molécules d'eau et autre co-solutés polaires. Certaines contraintes (physiques) stériques compliquent cependant cette situation idéale, si bien que la surface du globule protéique obtenu se présente en réalité sous forme d'une mosaïque constituée de pages

polaires(hydrophiles) et de plages apolaires (hydrophobes) ; L'abondance relative de ces plages polaires et apolaires dépend de la localisation cellulaire de la protéine et de sa fonction.



La structure « électrique » de la surface protéique, i.e la nature des chaînes latérales des résidus aminoacyl de surface, conditionne en grande partie la charge électrique nette de la protéine et sa polarité et par conséquent sa solubilité dans son milieu environnant aqueux et sa fonctionnalité

D-2-SOLUBILITE DES PROTEINES

La solubilité des protéines dépend de la taille de la protéine et de sa structure, de sa polarité et des paramètres physicochimiques du solvant. La solubilité d'une protéine peut donc être modulée en modifiant les propriétés électriques de la protéine par modification des paramètres physicochimiques du solvant.

Si l'on se limite à un solvant aqueux, la solubilité d'une protéine sera fonction de :

- interactions polaires avec le solvant aqueux
- interactions ioniques avec les ions (sels) en solution
- interactions électrostatiques (attractives et répulsives) entre molécules de protéines

Toutes ces interactions vont dépendre de la température (agitation thermique dispersive), le pH du milieu (ionisation des groupements acidobasique sur la protéine), de sa force ionique (sels) et de sa constante diélectrique (pouvoir de d'amortissement des forces attractives entre charges de signes opposés).

La maîtrise, la compréhension et la modulation de la solubilité d'une protéine peut servir plusieurs objectifs :

- biochimiques : formulation de médicaments à base de protéines hautement concentrées
- médicaux : compréhension (pour éventuelle modulation) de la pathogénicité de certaines maladies telles que l'Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob ou Parkinson
- biotechnologiques : la production et purification de protéines recombinantes
- analytiques : préparation d'échantillon biologiques déprotéinisés lors de la purification et/ou le dosage d'autres molécules (acides nucléiques, métabolites.....).

Dans les deux premiers cas, c'est l'augmentation de la solubilité qui est recherchée alors que dans les deux derniers cas c'est la diminution de la solubilité, donc la précipitation, qui est recherchée.

D-3-PRECIPITATION DES PROTEINES

Comme indiqué plus haut, la précipitation des protéines peut avoir deux objectifs opposés : éliminer les protéines d'un échantillon ou alors récupérer les protéines et éliminer le reste des composants de la matrice.

Dans le premier cas, les protéines sont traitées par des conditions physicochimiques extrêmes, qui provoquent une perte irréversible de la structure tridimensionnelle (native et active) de la protéine, c'est la dénaturation des protéines, ce qui permet d'obtenir un agrégat solide (un précipitât) de protéine (sous forme de ce qu'on appelle pelote statistique) inactive ; Le précipitât est ensuite éliminé (écarté) par centrifugation ou filtration.

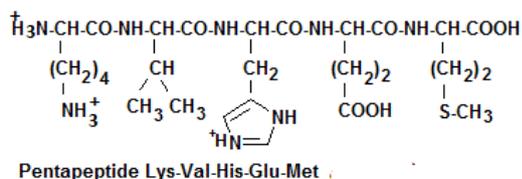
Dans le deuxième cas, l'objectif pourrait être d'obtenir des protéines inactives pour, entre d'autres objectifs, quantifier (doser) les protéines totales dans un échantillon, pour déterminer leur structure primaire ou leur poids moléculaire ; Ces déterminations ne nécessitent pas d'avoir une protéine biologiquement active et peuvent être effectuées après un traitement drastique (dénaturant) des dites protéines. Cela n'est pas le cas si le but de la précipitation est d'avoir une protéine active, et le procédé utilisé pour précipiter la protéine doit être réversible, c'est-à-dire que la protéine précipitée doit garder sa structure 3D native ou du moins que sa dénaturation partielle soit réversible (renaturation) moyennant une modification des conditions du milieu.

Remarque : Dans tous les cas la précipitation d'une protéine à partir d'une solution, tout comme l'extraction par le solvant ou en phase solide, correspond à une opération de transfert d'un soluté (dans ce cas une protéine) à partir d'une phase initiale liquide vers une phase non miscible, dans ce cas solide (= précipitât), avec la particularité que à la différence de l'extraction par le solvant ou la SPE, la phase solide réceptrice (le précipitât) est, au départ, virtuelle est apparait au fur et à mesure de l'opération.

3-1-Précipitation isoélectrique des protéines

Les protéines sont des polyacides amphotères, les chaînes latérales des résidus aminoacyles ionisables (Glu, Asp, Lys, Arg, His) contribuent aux caractères acidobasiques de la protéine et à sa charge électrique nette à un pH expérimental donné ; Ces paramètres déterminent la solubilité de la protéine en fonction du pH.

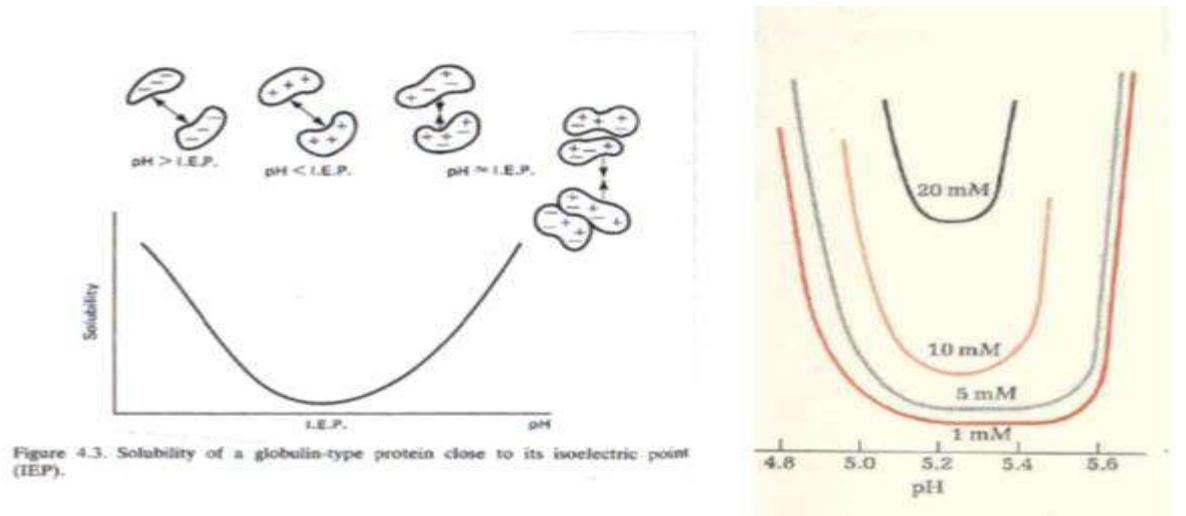
Exemple : Si on considère un peptide comme exemple de polyacide



A pH acide les bases faibles NH₂ sont protonisées en NH₃ et les acides faibles COOH sont aussi protonisés. Au fur et à mesure que le pH augmente ces groupements libèrent leur proton ; Donc au départ le peptide est sous forme P³⁺

$P^{3+} \leftrightarrow P^{2+} \leftrightarrow P^{1+} \leftrightarrow P^0 \leftrightarrow P^{1-}$ les peptides P^{2+} , P^{1+} , P^0 et P^{1-} sont amphotères et peuvent se comporter en acide ou en base.

Le profil de solubilité en fonction du pH varie en fonction de la protéine et se présente généralement comme suit :



Comme signalé plus haut, une protéine possède plusieurs groupements ionisables qui, en fonction de leur pK respectifs et du pH du milieu, seront porteurs de charges électriques positives ou négatives ; Pour chaque protéine, il existe une valeur du pH expérimental pour laquelle la protéine est porteuse d'autant de charges positives que négatives, c'est le **pH isoélectrique** de la protéine (pI ou pHi). En deçà du pHi (gauche du schéma) la majorité de ces groupements est protonisé (captent un proton) et seront de charge neutre ou positive et la protéine est globalement de charge positive. Au-delà du pHi la majorité des groupements est déprotonisée (libération de proton) et ces groupements seront électriquement neutres ou porteur d'une charge négative, la protéine sera globalement chargée négativement.

La variation de la solubilité en fonction du pH expérimental reflète donc la prépondérance, de part et d'autre du pHi , des forces de répulsions électrostatiques entre molécules de protéines de charge électrique de même signe, ce qui augmente la solubilité ; Ces interactions répulsives sont minimales au niveau du pHi et la solubilité diminue. Ce phénomène est appelé précipitation isoélectrique et permet, à priori, de purifier une protéine en amenant le pH expérimental au pHi de la protéine, cependant, dans un mélange de protéines, des interactions hétérogènes perturbent la spécificité de la précipitation et des agrégats hétérogènes de protéines sont formés par précipitation

(Rem. Struct.I, 3D, charg.elec)

La précipitation isoélectrique peut être améliorée par ajout modéré de sels dans le milieu. (Schéma)

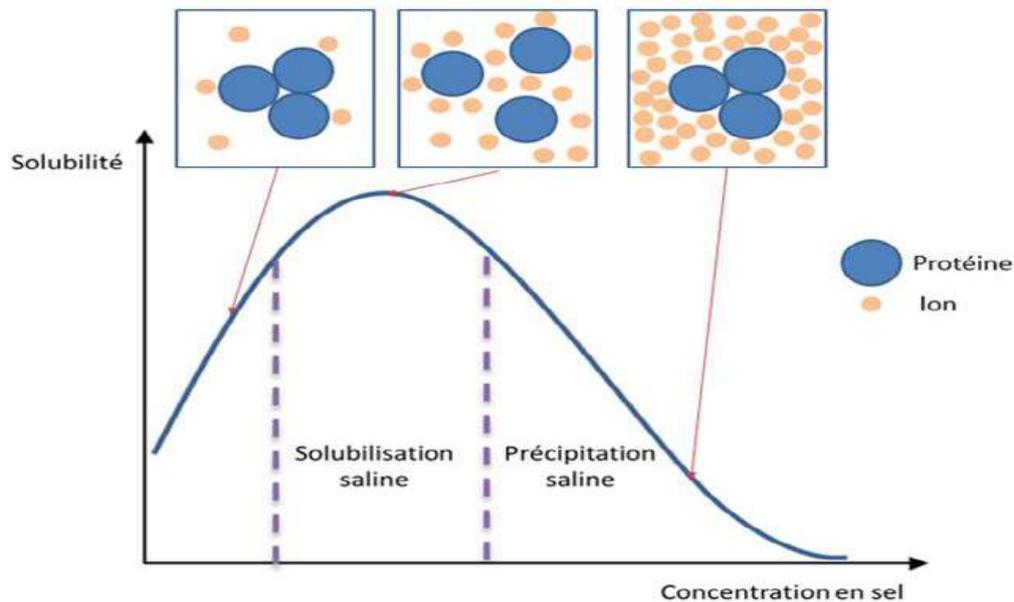
3-2-Précipitation par les sels

La solubilité d'une protéine en solution aqueuse dépend de la concentration en sels dissous, c'est-à-dire de la force ionique

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2$$

Où C_i représente la concentration de chaque ion i et Z_i^2 correspond à la charge électrique de l'ion i .

La solubilité des protéines varie en fonction de la nature des ions en solution, de leur concentration et de leur charge électrique ; En général le profil de solubilité se présente comme suit



a-Salting in

Dans l'intervalle de concentration en sels allant de 0 à 0,5 M, la solubilité de la protéine augmente avec la force ionique (concentration en sels) : c'est le Salting in (solubilisation) ; Dans ces conditions les ions salins (en quantité modérée) se lient avec les charges électriques de signe opposé sur la surface protéique, ce qui favorise l'hydratation (l'adsorption de molécules d'eau, formation d'une coque d'hydratation) de la protéine et diminue les interactions attractives entre molécules de protéines.

Signalons (voir schéma) que la solubilité de la protéine diminue à faibles concentrations en sels, cela se produit lorsque le milieu aqueux est dilué ou lorsque la solution protéique est dialysée contre un tampon hypotonique. Cela pourrait être intéressant pour précipiter notre protéine d'intérêt ou alors des protéines interférentes au cours d'un processus de purification.

b-Salting out ou relargage

L'augmentation excessive de la force ionique provoque une diminution de la solubilité et la précipitation des protéines ; Ce phénomène est appelé **salting out** ou **relargage** et consiste en fait en une **exclusion** des protéines de leur environnement aqueux.

C'est un procédé facile, peu coûteux et très utilisé, tout à fait au début des protocoles de purification des protéines ; Il permet non seulement l'élimination éventuelle d'interférents de toutes sortes (protéines et autres molécules) mais aussi d'éliminer l'excès de solvant et d'obtenir la protéine à l'état concentré.

Le salting out résulte lorsque les ions salins en excès séquestrent la majorité des molécules d'eau, privant ainsi la protéine de sa coque d'hydratation ; Cela conduit au démasquage des plages apolaires à la surface des molécules de protéines, plages qui vont avoir tendance à s'associer entre elles par des interactions hydrophobes (LONDON) conduisant à l'agglutination des protéines.

Le salting out est donc largement dépendant de la richesse de la surface protéique en plages Hydrophobes, richesse qui augmente généralement avec la taille de la protéine.

Le sel le plus utilisé pour le salting out des protéines est le sulfate d'ammonium, car il est un précipitant assez fort, très soluble dans l'eau, peu cher et ne dénature pas les protéines ; les protéines précipitées par le sulfate d'ammonium peuvent être re-solubilisées dans un tampon adéquat et retrouvent leur conformation native

3-3-Précipitation par les solvants organiques

L'addition d'un solvant organique miscible avec l'eau , comme l'éthanol ou l'acétone, diminue la solubilité des protéines ; Cela est dû à la diminution de la constante diélectrique du milieu et donc de son pouvoir de s'opposer aux forces attractives(F) entre charges électriques de signes opposés portées par les molécules de protéines.

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q \cdot q'}{r^2}$$

Où ϵ est la constante diélectrique du milieu (elle est à 25°C de 78,5 pour H₂O, 24,3 pour l'éthanol, 33 pour le méthanol)

Par ailleurs la miscibilité du solvant organique avec l'eau est due à la formation d'interactions polaires entre les molécules de solvant organique (polaire) et molécules d'eau, ce qui conduit à un appauvrissement de la coque d'hydratation de la protéine d'où son exclusion/relargage du milieu aqueux, et donc sa précipitation.

Comme pour le relargage par les sels , la précipitation ou l'exclusion des protéines par ajout de solvant organique est d'autant plus facile que la taille de la protéine augmente

3-4-Precipitation par les polymers inertes

Les polymères hygroscopiques tels que le polyethylene glycol (PEG, HOCH₂(CH₂OCH₂)_nCH₂OH) sont des composés très hydrophiles , qui lorsqu'ils sont ajoutés à une solution protéique provoque l'exclusion et la précipitation des protéines par un mécanisme analogue à celui d'un excès de sels.

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

