**Chapitre 05 : Dosage des protéines**

**Introduction**

Constituants fondamentaux des organismes vivants, les protéines sont des polymères formés de l’enchaînement d’acides aminés (20 au total, tous de série L) liés par des liaisons covalentes : les liaisons peptidiques.

Ces protéines sont des molécules de haut poids moléculaire, la plupart sont comprises entre 25 000 D et 150 000 D, certaines possèdent des poids moléculaires plus bas ou beaucoup plus élevés.

1. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la cohésion des structures morphologiques et dans le fonctionnement cellulaire. On citera pour mémoire, quelques grands groupes de protéines : Les enzymes (catalyseurs biologiques, responsables de la plupart des réactions chimiques de la cellule).
2. Les anticorps (responsables de la défense des organismes supérieurs, ils forment, dans le sang, des complexes avec les corps étrangers).
3. Les protéines de stockage.
4. Les protéines de transport.
5. Les hormones (certaines hormones sont de nature protéiques).
6. Les histones (liées à l’ADN, elles participent au contrôle de l’expression génétiques).
7. Les protéines de structure et de soutien.

En fonction de leur composition, on distingue :

1. Les holoprotéines : contenant uniquement des acides aminés.
2. Les hétéroprotéines : formées d’une chaîne polypeptidique associée à un groupement prosthétique, (composé non protéique : lipide, acide nucléique, glucide ect…).

Suivant leur structure on distingue :

1. Les protéines fibreuses : de forme allongée, peu solubles, très résistantes, elles entrent dans la composition des tissus de soutien.
2. Les protéines globulaires : de forme compacte, solubles, elles jouent un rôle dynamique dans la cellule.
3. Une protéine peut être formée d’une seule chaîne polypeptidique (monomère) ou de plusieurs chaines polypeptidiques (polymère : dimère, trimère, tétramère,…).
4. **Dosage des protéines par détermination de l’azote organique total (Méthode de Kejdahl)**

La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments. La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s’effectue en trois étapes:

**Étape 1:** Digestion ou minéralisation de l’échantillon

Pendant l’étape de la digestion, l’azote protéique est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l’acide sulfurique concentré à haute température, en présence d’un catalyseur et d’un sel:

1. l’acide sulfurique concentré a pour but d’oxyder la matière organique et de transformer l’azote protéique en ammoniac NH3. Il sert également à piéger l’ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d’ammonium, par action de la base avec l’acide:
2. l’addition du sel K2SO4 a pour but d’élever le point d’ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.
3. le catalyseur utilisé peut être Hg (HgO), Cu (CuSO4) ou Se.

**Étape 2:** Distillation de l’ammoniac

Avant de distiller l’ammoniac à la vapeur d’eau, on doit libérer l’ammoniac sous la forme du sel (NH4)2SO4 par l’addition d’une solution concentrée de NaOH en excès:

L’ammoniac est ensuite distillé par la vapeur d’eau et piégée dans une solution d’acide borique. L’ammoniac réagit avec l’acide borique pour former des sels borates d’ammonium:

**Étape 3:** Titrage de l’ammoniac

L’ammoniac sous la forme de borates d’ammonium est titré directement à l’aide d’une solution standardisée d’acide, tel HCl ou H2SO4, et d’un indicateur:

- On fait un blanc en mettant tous les réactifs sauf l’échantillon, pour soustraire l’ammoniac contenu dans les réactifs de l’ammoniac contenu dans l’échantillon.

**Le % de protéines dans l’échantillon est obtenu en multipliant le % d’azote par un facteur F dépendant du type d’aliment analysé**.

Le tableau suivant montre les principaux facteurs utilisés avec la méthode Kjeldahl.

|  |  |
| --- | --- |
|  **Aliment**  | **Facteur**  |
| farine de blé  | 5,70  |
| pain  | 5,70  |
| produits laitiers  | 6,38  |
| amandes  | 5,18  |
| arachides  | 5,46  |
| noix du Brésil  | 5,46  |
| autres noix  | 5,30  |
| facteur général  | 6,25  |

Pour les aliments dont on ne connaît pas la protéine principale ou qui sont préparés avec des ingrédients contenant plusieurs types de protéines, on utilise le facteur général de 6,25.

* La valeur du % d’azote obtenue par la méthode Kjeldahl n’est pas une valeur exacte du contenu d’azote protéique dans l’échantillon, car l’azote des acides aminés libres, des acides nucléiques, des sucres aminés, etc ..., y est inclus.
* La valeur du % de protéines n’est pas non plus une valeur exacte, car le facteur utilisé tient compte uniquement de la principale protéine contenue dans l’aliment.
* Lorsqu’on rapporte les résultats, on doit indiquer que les valeurs sont obtenues par la méthode Kjeldahl, en mentionnant le facteur utilisé.
1. **Méthodes colorimétriques de dosage des protéines**

Pour déterminer la concentration totale de protéines dans un mélange complexe par spectrophotométrie d’absorption, des méthodes colorimétriques sont souvent employées. Ces méthodes sont basées sur la réaction d’agents chromophores avec les liaisons peptidiques ou avec certains acides aminés des protéines. Cette réaction donne naissance à une coloration (dans le visible) dont l’intensité est directement proportionnelle à la concentration de la protéine. Les méthodes colorimétriques les plus utilisées pour doser les protéines sont celles de biuret, lowry et bradford.

* 1. **Méthode colorimétrique de dosage par la réaction de biuret**

En milieu alcalin, les ions cuivriques se lient par coordination aux atomes d'azote des liaisons peptidiques des peptides et protéines. La couleur rose du complexe formé se superpose à la couleur bleue de la solution cuivrique. La coloration obtenue est violacée. Le dosage est réalisé en ajoutant le réactif de biuret, composé de cuivre (réactif de gornall, composé de : sulfate de cuivre, qui donne la coloration bleu du réactif due aux ions cuivre ; solution d'hydroxyde de sodium (soude), qui rend le milieu basiqu; tartrate double de sodium et de potassium, qui chélate (piège) les ions cu2+ et évite leur précipitation en milieu basique sous forme d'hydroxyde de cuivre Cu(OH)2 insoluble et iodure de potassium, pour éviter la réduction des ions cuivriques avant le dosage. En milieu alcalin, les ions cuivriques se lient par coordination aux atomes d'azote des liaisons peptidiques des peptides et protéines.



Ce complexe est d'autant plus violet (ou mauve) que la concentration en protéines est élevée. La longueur d'onde d'absorption du complexe est 540 nm. Un temps d’attente d’environ 30 min est nécessaire pour le développement de la couleur.

La méthode de biuret est utilisée pour des concentrations en protéines comprises entre 1 mg/ml et 20 mg/ml. L’ammoniac et certaines amines peuvent interférer avec ce dosage ex : Tampon tris, sels d’ammonium sulfate. Cette méthode n’est pas non plus utilisable pour le dosage des glycoprotéines. Ceci rappelle la réaction de la liqueur de fehling utilisée dans l'identification des sucres réducteurs et qui, elle aussi, utilise le cuivre. C'est pour cela qu'on recommande une déprotéinisation préalable à l'identification des sucres réducteurs d'une solution.

**2.2. Méthode colorimétrique de dosage de folin-ciocalteu**

Cette technique a été développée par folin, ciocâlteu et denis. Ce dosage utilise le réactif de folin (mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l’acide phosphorique et de l’acide chlorhydrique) qui réagit spécifiquement avec les acides [aminés aromatiques](http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-cycliques.html). Il donne une coloration bleue qui absorbe la lumière à une longueur d'onde égale à 750 nm. La méthode de folin-ciocalteu est utilisée pour le dosage des protéines avec des concentrations comprises entre 0,1 mg/ml et 1 mg/ml.

* 1. **Dosage des protéines par la méthode de lowry principe**

Le réactif de folin (acides phosphotungstique et phosphomolybdique) fut proposé en 1922 par wu pour le dosage des protéines, car il donne une coloration bleue avec certains acides aminés tels que la tyrosine (tyr), le tryptophane (trp) et la cystéine (cys). En 1951, lowry et ses collaborateurs rendirent le dosage plus sensible et moins tributaire de la teneur en tyrosine et tryptophane en effectuant d'abord un prétraitement cupro-alcalin des protéines à doser, s'inspirant de l'ancienne méthode de biuret (complexation du cuivre avec les liaisons peptidiques donnant une coloration violette absorbant la lumière à 540 nm). Les ions cu+ et les radicaux du trp, tyr et cys réduisent le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique (couleur jaune) contenu dans le réactif folin-ciocalteau, produisant ainsi une couleur bleue

(cu+ + (f-c)ox ---> **cu2+**  + (f-c)red)

Remarque: en général, l'absorbance est mesurée à des longueurs d'ondes entre 500 nm et 750 nm où 500 nm est considérée pour le dosage de fortes concentrations en protéines, alors que 750 nm est adoptée pour le dosage de faibles concentrations en protéines.
Le traitement cupro-alcalin rappelle la réaction de biuret, utilisée uniquement quand les concentrations en protéines sont élevées (1-20 mg/ml). Cependant, la méthode de lowry permet de déterminer les concentrations en protéines comprises entre 0,05 mg/ml et 0,1 mg/ml. Un temps d’incubation d’environ 30 min est nécessaire pour le développement de la couleur bleue. Les interférents avec ce dosage sont: k+, mg2+, EDTA, phénols, détergents, agents réducteurs.

* 1. **Méthode colorimétrique de dosage de bradford**

Bradford, m. en 1976 a proposé le bleu de coomassie (brilliant blue g-250) comme réactif qui réagit (dans des conditions de pH acide) avec l'[arginine (arg)](http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-basiques.html#arginine) et, dans une moinde mesure, avec l'[histidine (his)](http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-basiques.html#histidine), la [lysine (lys)](http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-basiques.html#lysine) et les acides [aminés aromatiques](http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-cycliques.html). Le bleu de coomassie se lie aux protéines par des interactions non-covalentes (ponts hydrogène, interactions hydrophobes et interactions ioniques). Sa longueur d’absorption maximale augmente de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). Le dosage est peu influencé par la présence d'autres molécules, sauf les détergents et les bases fortes. Détection de protéine de 1 µg/ml à 1,5 mg/ml.



* 1. **Méthode de dosage basée sur la mesure directe de l'absorbance des résidus d'acides aminés chromophores : trp, tyr et phe**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Acide aminé** | **Lamda max (nm)** | **Coeff. d’extinction molaire (m-1 .cm-1)** |
| **Tyr à pH = 13** | 293-297 | 2350 |
| **Tyr à pH = 07** | 273-277 | 1350 |
| **Trp** | 277-280 | 5600 |
| **Phe** | 267 | 90 |

A des pH alcalins, le [groupement phénol (radical R, pk3 = 10,07) des tyrosines](http://www.takween.com/qcm-acides-amines-ionisation.html#reponse_5) (Tyr) est ionisé en ion phénolate. Cette ionisation induit une augmentation du coefficient d'extinction molaire avec un décalage de la longueur d'onde d'absorbance maximale (lambda = 293 - 297 nm). De ce fait, à des pH alcalins, on mesure essentiellement l'absorbance des Tyr.

A pH 7 (neutre), on mesure essentiellement l'absorbance des triptophanes (Trp) à 277 nm. Le groupement phénol des phénylalanines (Phe) contribue très peu à l'absorbance globale des protéines.

1. **Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium (relargage)**

La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium permet de les fractionner selon leur solubilité. Cette méthode consiste à ajouter une quantité de sulfate d'ammonium dans la solution des protéines de façon à arriver à un degré (%) de saturation précis (à la température et au pH de travail). Il s'agit bien du pourcentage de saturation (donné par des tables) et non pas du pourcentage de concentration. Grâce à la centrifugation, on peut collecter (dans le culôt) les protéines précipitées et on élimine (dans le surnageant) les protéines encore solubles au degré de saturation en sulfate d'ammonium défini (protéines contaminantes). Pour déterminer la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter on utilise un tableau de saturation.

1. **Dosage des acides aminés par des méthodes chromatographiques**

Le terme chromatographie désigne un ensemble de techniques de séparation qui reposent sur l’affinité différentielle des molécules d’un mélange pour une phase stationnaire ou matrice, solide et une phase mobile, liquide ou gazeuse.

Dans le cas des protéines, le mélange est déposé au sommet de la phase stationnaire contenue dans une colonne. La phase mobile, un éluant, traverse la phase stationnaire et entraîne progressivement les molécules vers le bas de la colonne où l’effluent est collecté en différentes fractions qui sont ensuite analysées. Selon le type de matrice, les molécules de protéines sont retenues et retardées par la colonne en fonction de paramètres physico-chimiques variés : taille, charge électrique, hydrophobicité de la surface ou affinité pour des ligands déterminés.

**4.1. Chromatographie par filtration sur gel**:

Cette technique chromatographique est également nommée chromatographie par exclusion ou chromatographie par tamisage moléculaire. Dans cette technique, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. L’échantillon est déposé au sommet d’une colonne de gel constitué de billes de porosité définie. Ces billes sont constituées de dextran (polymère de glucose), d’agarose (polymère de dérivés du galactose) ou de polyacrylamide. Les molécules de petite taille (petites protéines et polypeptides) pénètrent dans les billes et sont donc retardées, alors que les molécules de taille supérieure à celle des pores ne pénètrent pas dans les billes et traversent donc plus rapidement la colonne.

**4.2. Chromatographie par échange d’ions :**

Dans cette chromatographie, la matrice (cellulose, polystyrène, agarose, dextran) contient des groupes ionisés qui fixent des ions de charge opposée (A+ , B– ) présents dans la solution ; ces ions pourront être échangés avec des protéines. On distingue les échangeurs d’anions (matrice R chargée positivement) et les échangeurs de cations (matrice chargée négativement) :

* Échangeurs d’anions : R+B – + Prot R + Prot – + B –
* Échangeurs de cations : R–A + + Prot+ R Prot+ + A +

Les protéines se fixent à la matrice en fonction de leur affinité pour les groupes ionisés. La colonne est ensuite lavée avec un tampon (tampon d’élution), qui entraine en premier lieu les protéines les plus faiblement liées à l’échangeur. Les protéines les plus fortement liées seront libérées en dernier ou resteront fixées sur la matrice. On réussit en général à libérer l’ensemble des protéines fixées en faisant varier le pH du tampon d’élution ou en augmentant progressivement sa force ionique.

* 1. **Chromatographie par interactions hydrophobes :**

Cette méthode met à profit l’existence de zones hydrophobes discrètes à la surface des protéines. La matrice contenue dans la colonne contient des groupes apolaires (groupes phényl) qui peuvent retenir les protéines en s’associant à leurs régions hydrophobes. Cette interaction est d’autant plus forte que la force ionique est élevée. Aussi, et à l’inverse de la chromatographie d’échange d’ions, la colonne hydrophobe est éluée par un tampon de force ionique décroissante, ce qui a pour effet d’affaiblir progressivement l’interaction hydrophobe entre les protéines et la matrice. En principe, les protéines contenant peu de zones hydrophobes à leur périphérie sont éluées en premier, les protéines les plus hydrophobes sont éluées en dernier

* 1. **Chromatographie par affinité :**

Dans cette technique, les protéines sont séparées en fonction de leur affinité pour un groupement (analogue de substrat, anticorps spécifique, lectine, etc.) greffé sur la matrice. La protéine d’intérêt est éluée de la colonne par déplacement avec un analogue de la structure ou molécule reconnue par le groupement lié.



**Figure : Différent type de chromatographie.**

**(A) Chromatographie par filtration sur gel.** Les protéines (disques roses) de taille supérieure au diamètre des pores ne sont pas retardées par la matrice (disques gris).

**(B) Chromatographie par échange d’ions.** Les protéines (disques roses) chargées positivement sont retenues par la matrice (disques gris) chargée négativement.

**(C) Chromatographie par interactions hydrophobes.** Les protéines (disques roses) les plus hydrophobes sont retenues par la matrice (disques gris), elle-même hydrophobe.

**(D) Chromatographie par affinité**. Les protéines (disques roses) les plus affines sont retenues par la matrice (disques gris) sur laquelle est greffé le ligand spécifique de la protéine d’intérêt.

**5. Electrophorèse:**

Les acides aminés en milieu aqueux sont présents sous forme d’espèces ioniques chargées différemment selon le pH du tampon dans lequel ils sont solubilisés. Si on dépose au milieu d’une bande de papier un mélange d’acides aminés et si on applique un champ électrique aux extrémités. Selon leurs charges, au pH du tampon considéré, ils migreront vers le pôle + ou vers le pôle –



**Figure : Exemple de l’électrophorèse d’un mélange d’alanine, d’acide aspartique, et de lysine à pH6.**