

Effet du pH

Le pH est un paramètre physico-chimique qui a une **très forte incidence** sur la **structure** globale et la **conformation** locale des protéines (des macromolécules biologiques en général).

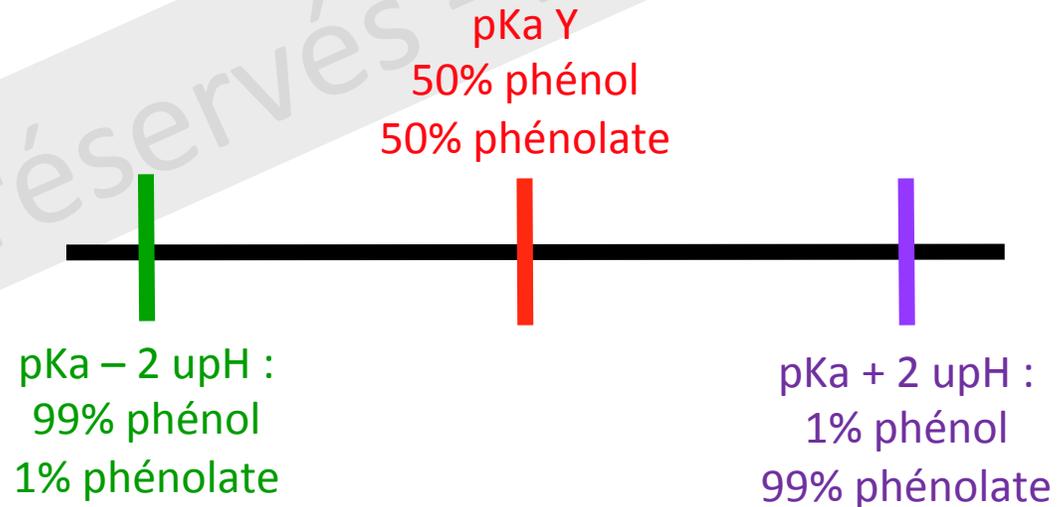
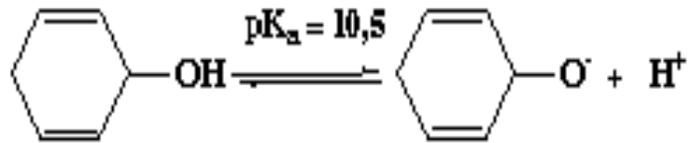
Aux valeurs extrêmes de pH, on a un **excès de charges de même signe** :

- pH acides => charges positives (-COOH et -NH₃⁺)
- pH basiques => charges négatives (-COO⁻ + -NH₂)

Cet excès de charges induit une répulsion électrostatique des acides aminés et donc un dépliement de la chaîne polypeptidique appelé **dénaturation par le pH**.

Absorbance du groupement phénol des Tyr

Le groupement phénol des Tyr s'ionise en ion phénolate (Tyr-O⁻) avec un $pK_a = 9,8$ à $10,5$.
La valeur du pK_a d'ionisation de ce groupement dépend de son environnement, donc du pH du milieu (solvant = surface ou intérieur hydrophobe de la protéine).



A $\lambda = 295 \text{ nm}$, on suit l'absorbance de l'ion phénolate.

Connaissant ϵ_M^{Tyr} , on exprime cette différence d'absorbance en **nombre de Tyr ionisée** avec la relation de Beer-Lambert.

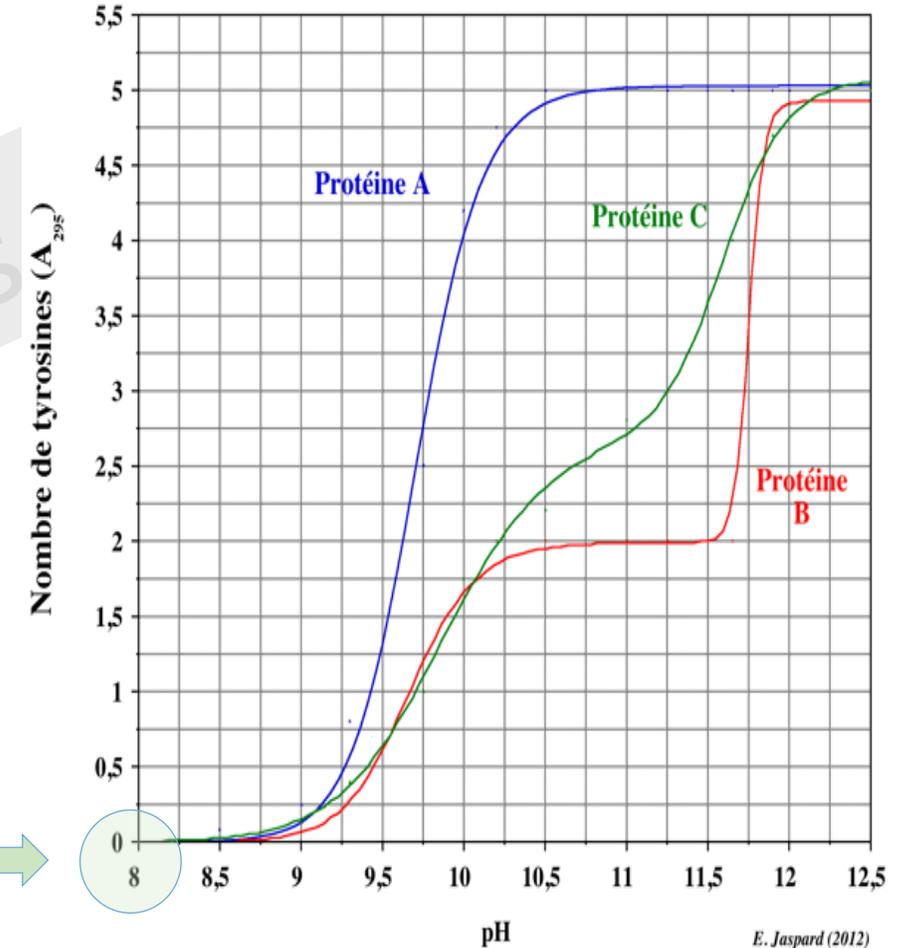
Spectrophotomètre double faisceau

- Une cuve de référence contient la protéine étudiée (A, B ou C) à pH7.
- Une cuve de mesure contient la protéine étudiée (A, B ou C) à chaque valeur de pH étudiée.

On mesure la **différence d'absorbance** (à $\lambda = 295 \text{ nm}$) des **tyrosines** dans leur environnement à pH 7 *versus* à chaque pH étudié.

Exemple : pH référence = 7 et pH mesure = 7

- La protéine étudiée est dans le même environnement physico-chimique dans les 2 cuves : elle a la même structure
- Le microenvironnement des Tyr est donc identique : les Tyr de la protéine dans la cuve de référence absorbent de la même manière les Tyr de la protéine dans la cuve de référence.
- **La différence d'absorbance est nulle.**



Plus une Tyr est enfouie à l'intérieur hydrophobe de la protéine, plus la structure de la protéine doit être **dénaturée par le pH** :

- pour que cette Tyr devienne accessible au solvant donc déprotonable
- donc qu'elle absorbe à $\lambda = 295 \text{ nm}$

