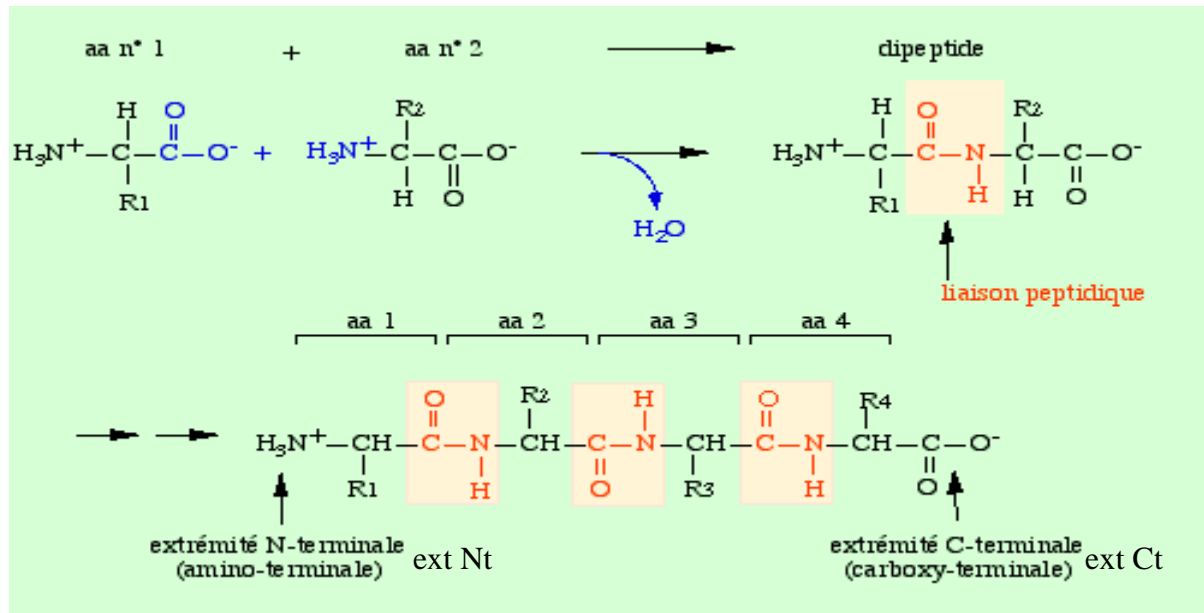


Peptides et Protéines:

Les chaînes peptidiques sont constituées par la combinaison covalente des aminoacides par une **liaison peptidique**. Cette liaison se fait entre les groupes αCOOH et αNH_2 de deux aminoacides avec élimination d'eau.



1. Orientation et nomenclature de la chaîne peptidique :

Le peptide est nommé en indiquant en premier l'aa de l'ext Nt puis les autres dans l'ordre où ils se suivent. Les aa incorporés dans une protéine sont appelés résidu et on les désigne en ajoutant le suffixe yl sauf pour l'aa Ct. On numérote les aminoacides en écrivant l'enchaînement de gauche à droite à partir de l'extrémité Nt.

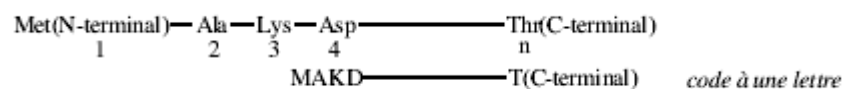
2. Classification :

2.1. Classification en fonction du nombre d'aa :

- Oligopeptides : dipeptide (2aa) et tripeptide (3aa). Ne réagissent pas au biuret.
- Polypeptides : à partir du tétrapeptide, donnent une réaction positive au biuret.
- Protéines : à partir d'une 100ème d'aa.

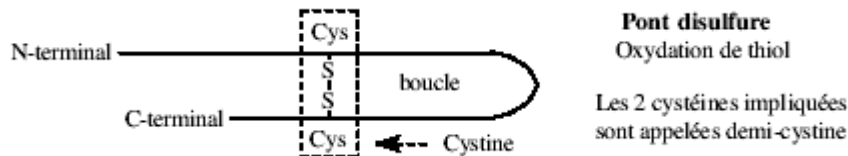
2.2. Classification en fonction de la structure :

- Peptides linéaires formé d'une seule chaîne (monocaténaire): Ext Nt et Ct libres

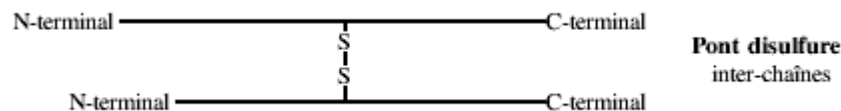


- Peptide ramifié : il y a branchement d'un ou plusieurs aa sur le groupement COOH du radical d'un aa dicarboxylique (ωCOOH) ou le groupement ϵNH_2 de la Lys.
- Peptide cyclique : pas d'extrémité Nt et Ct.

Peptide semi cyclique formé d'une seule chaîne (monocaténaire): n'ayant qu'une extrémité libre N ou C ou les deux. Une liaison covalente (pont S-S) intra-chaîne est présente et réalisée par l'oxydation de deux fonctions thiol de deux cystéines



- Peptide formé de plusieurs chaînes (polycaténaire). Une liaison covalente (pont S-S) inter chaînes est présente et réalisée par l'oxydation de deux fonctions thiol de deux cystéines appartenant à deux chaînes peptidiques différentes



2.3. Classification en fonction de la composition :

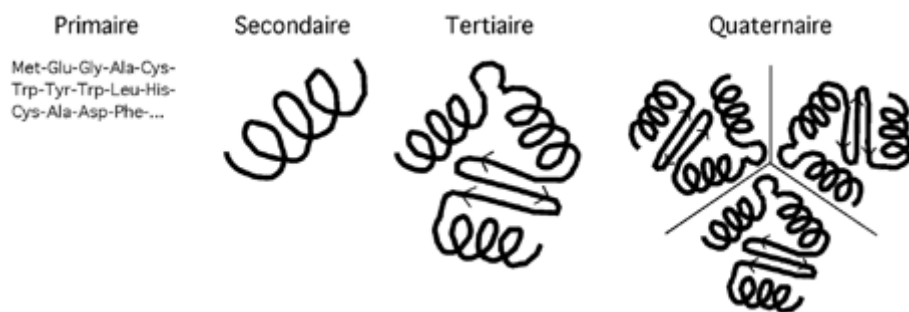
- Holoprotéines : constituées que d'aa
- Hétéroprotéines : partie protéique associée à un groupement prosthétique non protéique tel que : phosphoprotéines et glycoprotéines.

2.4. Classification en fonction de la forme :

- Protéines fibreuses : ou scléroprotéines, elles sont constituées de fibres et sont pratiquement insolubles. Ex : fibroïne de la soie, collagène du tissu conjonctif, kératine de la peau et phanères (cheveux, poils, ongles, cornes, plumes, etc)
- Protéines globulaires : ou sphéroprotéines en raison de leur forme sphérique elles sont en général plus facilement solubles tel que les albumines et globulines.

3. Etude structurale :

On distingue quatre niveaux structuraux chez les protéines, de la structure primaire à la structure quaternaire.



- (1) Structure primaire : *ordre des acides aminés* le long de la chaîne polypeptidique.
- (2) Structure secondaire : *repliement local* des acides aminés en hélices, en feuillets, ou en d'autres formes similaires.
- (3) Structure tertiaire : *agencement stable dans l'espace* de ces hélices et feuillets.
- (4) Structure quaternaire : *agencement des sous unités* entre elles, quand la protéine est constituée de plusieurs sous unités indépendantes (comme l'est par exemple l'hémoglobine).

3.1. Structure primaire :

La structure I^{aire} d'un peptide ou d'une protéine est représentée par la composition et la séquence de ses aa constitutifs.

3.1.1. Détermination des aa constitutifs :

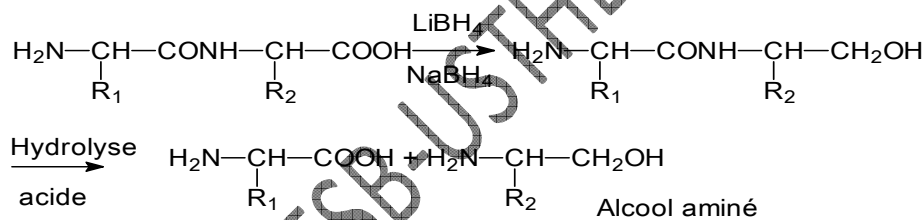
- Hydrolyse acide totale : L'action de l'acide chlorhydrique (HCl) 6N sur un peptide, à ébullition pendant au moins 24 heures, aboutit à l'hydrolyse des liaisons peptidiques libérant les aa. Le Trp est entièrement détruit, l'Asn, Gln sont hydrolysées en Asp et Glu
- Hydrolyse basique totale : Elle se fait avec du NaOH 2 à 4 N pendant 6h, la plus part des aa sont racémisés (autant de série D que de série L) et il y a destruction de la Cys, Ser et Thr.

3.1.2. Détermination des aa terminaux :

- COOH terminal

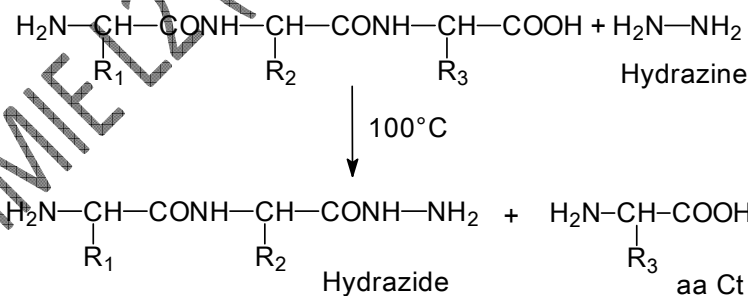
- ✓ *Méthodes enzymatiques* : la carboxypeptidase hydrolyse la liaison peptidique ou est engagé l'aa Ct, méthode récurante mais pas au delà de quelques aa.
- ✓ *Méthodes chimiques* :

- Réduction par le NaBH₄ ou le LiBH₄ ⇒ -COOH en CH₂OH



L'alcool aminé est identifié par chromatographie

- Hydrazine :



- NH₂ terminal

- ✓ *Méthodes enzymatiques* : l'aminopeptidase hydrolyse la liaison peptidique ou est engagé l'aa Nt, sauf dans le cas de la proline, méthode récurante mais pas au delà de qq aa

Remarques : l'aminopeptidase et la carboxypeptidase sont des exopeptidases car coupent à l'extrémité des chaînes.

- ✓ *Méthodes chimiques* :

- Méthode de Sanger : Le DiNitroFluoroBenzène (DNFB) se lie avec le groupement Nt et donne du DNB-aaNt (DiNitoPhenyl aaNt)
- Le chlorure de dansyl permet d'identifier le dansyl-aminoacide Nt

- La dégradation récurrente d'Edman: la PhénylIsoThiocyanate (PITC) détache l'aa Nt sous forme de PhénylThioHydanthoine (PTH-aa), méthode récurrente sur laquelle est basé le séquençage des protéines par les automates.

3.1.3. Fragmentation de la chaîne peptidique

- ✓ *Méthodes enzymatiques* : on utilise des endopeptidases qui coupent à l'intérieur de la protéine
 - Trypsine : coupe après Lys, Arg
 - Chymotrypsine : coupe après aa aromatiques, Tyr, Trp et Phe
 - Pepsine : coupe avant Phe et Tyr
 - Thermolysine: coupe avant Val, Leu et Ile
- ✓ *Méthodes chimiques* :
 - le bromure de cyanogène (BrCN) réagit spécifiquement avec la Met et coupe après son COOH.
- ✓ *Rupture des pont dissulfures* : souvent des chaînes peptidiques sont unies entre elles par des ponts disulfures. La rupture de ces ponts permet d'isoler chaque chaîne.
 - Oxydation par l'acide performique
 - Réduction par le β mercaptoéthanol

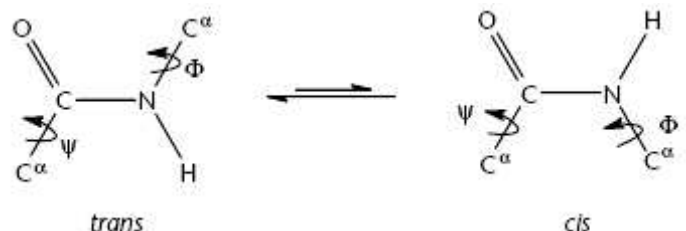
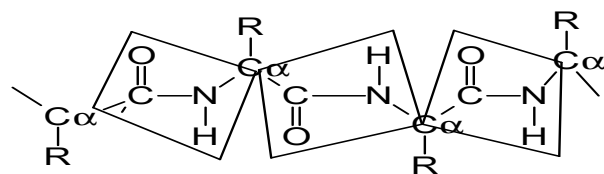
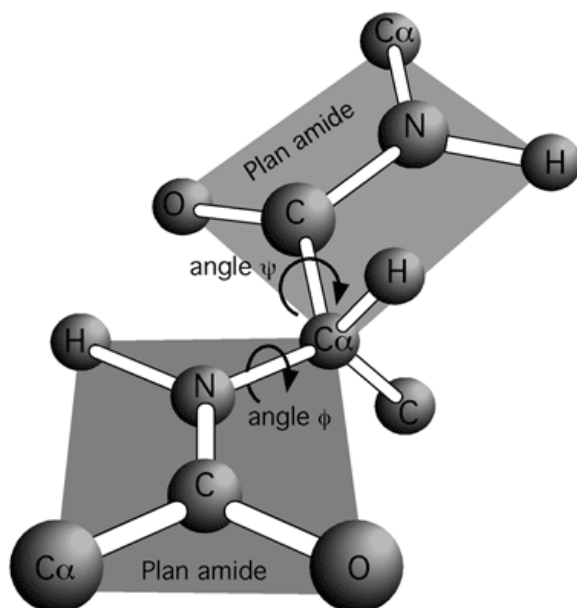
Remarque : la séquence des aa d'un peptide ou d'une protéine est déterminée génétiquement. Cette séquence conditionne la formation de structures tridimensionnelles ainsi que le caractère fonctionnelle de la protéine.

3.2. Structure secondaire :

La structure secondaire correspond à un arrangement régulier des acides aminés selon un axe.

3.2.1. Propriétés spatiales de la liaison peptidique :

La liaison peptidique possède un caractère de double liaison ce qui implique que tous les atomes ($C\alpha$, C, O, N, H et $C'\alpha$) soient coplanaires :



De plus la liaison peptidique peut être en conformation *Cis* ou *trans*. Cette dernière est généralement plus stable car elle positionne les chaînes latérales loin l'une de l'autre. Qui plus est, les ribosomes synthétisent tous les liens peptidiques en *trans*.

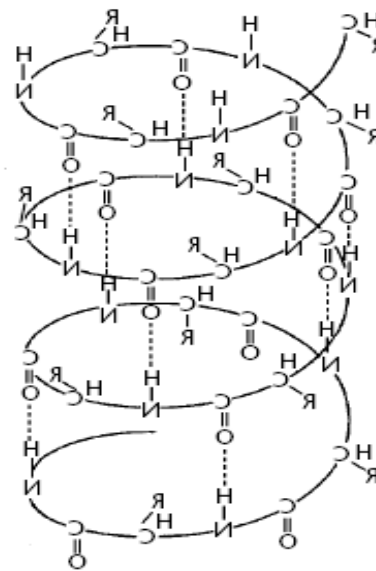
Il existe deux types principaux de structure secondaire grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes entre l'hydrogène d'un groupement aminé -NH et l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O.

3.2.2. L'hélice α (état hélicoïdal):

Elle est caractérisée par l'enroulement des liaisons peptidiques autour d'un axe. Cet enroulement se fait vers la droite (hélice droite). L'hélice s'élève de 0,15 nm par résidu et de 0,54nm à chaque tour. Elle compte 3,6 résidus par tour.

Les radicaux se retrouvent à la périphérie. Cette structure est stabilisée des ponts hydrogènes établis entre l'hydrogène d'un groupement aminé -NH et l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O situé quatre résidus plus loin.

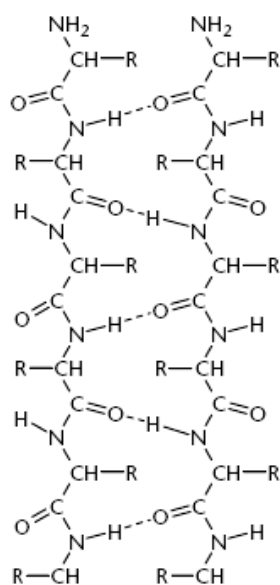
Ce sont des liaisons faibles mais leur nombre est important d'où stabilité de l'hélice. Les chaînes latérales des résidus dans une hélice α pointent à l'extérieur de la structure. L'hélice α peut être déstabilisée par des aa à R chargé volumineux, R ayant des groupements susceptibles d'établir des pont disulfure et Pro ou HydroxyPro (qui cassent la chaîne)



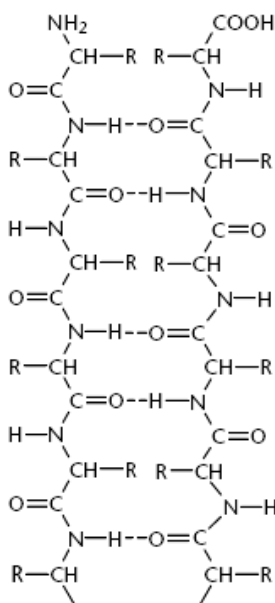
3.2.3. Feuillet plissé β :

C'est une structure de grande stabilité où 2 chaînes peptidiques ou 2 parties de la même chaîne s'unissent par des liaisons hydrogènes (inter caténares et intra caténares respectivement). On parle de feuillets β parallèles quand les chaînes vont dans le même sens et d'antiparallèles quand elles vont dans des directions opposées.

Feuillets β parallèles



Feuillets β antiparallèles



Cette structure concerne les protéines fibreuses tel que la fibroïne de la soie. Les feuillets β sont représentés par des flèches, l'hélice α est représentée par une spirale.

3.3. Structure tertiaire :

La structure tertiaire d'une protéine fait référence à l'organisation dans l'espace de ses structures secondaires. La structure en 3D adoptée par tous ces feuillets et toutes ces hélices est la structure tertiaire de la protéine native (protéine mature).

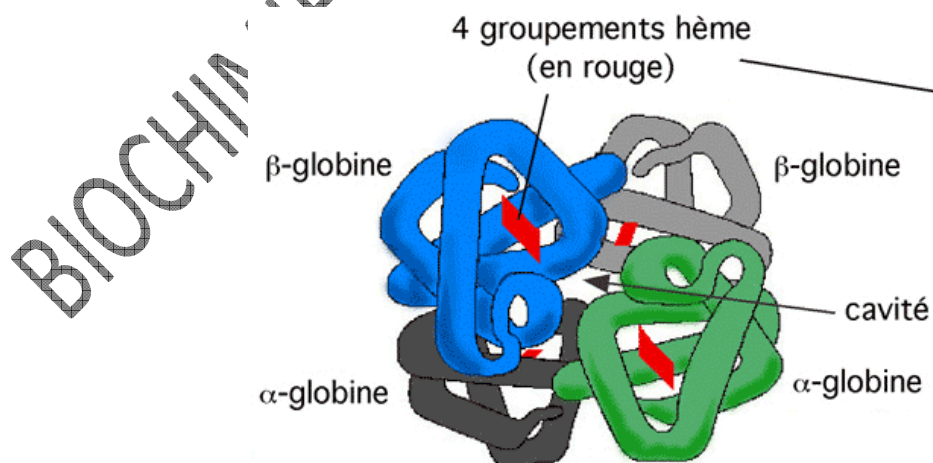
C'est une combinaison d'hélice et de feuillets reliées par des boucles de longueurs très variables : de 1 à 12 résidus (voire jusqu'à 22) avec le plus fréquemment 1, 3, 4 ou 7 résidus. On distingue 4 types de combinaisons : tout α , tout β , $\alpha+\beta$ et α/β . Les boucles qui relient 2 brins β antiparallèles sont dites en "épingle à cheveux".

La structure III^{aire} des protéines a une importance capitale pour l'activité des protéines. En effet les résidus d'aa très éloignés dans la séquence peuvent se trouver très proches après les divers repliements et former ainsi des régions indispensables au fonctionnement de la protéine (ex site actif des enzymes).

Dans le cas des protéines globulaires les aa apolaires auront tendance à être repoussés vers l'intérieur de la molécule et former une zone hydrophobe interne tandis que les aa polaires ont tendance à être exposés à la surface de la protéine.

3.4. Structure quaternaire :

Il existe des protéines complexes formées de plusieurs chaînes polypeptidiques. L'assemblage de ces chaînes ou sous unités entre elles constitue la structure quaternaire de la protéine. Les sous unités appelées monomères ou protomères s'associent pour former un oligomère (formé d'un nombre restreint de protomères de 2 à 12). Cette association est stabilisée par des liaisons faibles (jamais de liaisons covalentes). Ex : hémoglobine

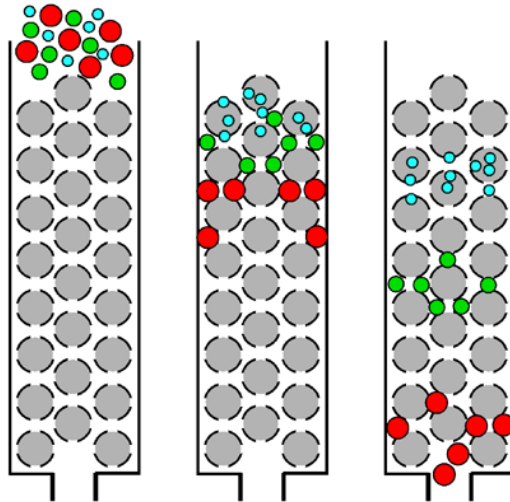


4. Techniques de séparation en fonction de la Masse moléculaire (Chromatographie d'exclusion moléculaire - gel filtration - tamisage moléculaire):

C'est la séparation des protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine constituée de billes

creuses et poreuses. La taille des pores de ces billes est telle que les petites protéines peuvent entrer et sortir, que les protéines de taille moyenne peuvent essayer d'entrer mais avec plus ou moins de succès, alors que les grosses ne peuvent pas entrer du tout et passent tout droit, on dit qu'elles sont exclues (d'où le nom de la technique).

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.



4.1.1. Techniques de séparation en fonction de la charge :

- ✓ Chromatographie échangeuse d'ion (voir aa)
- ✓ Electrophorèse sur gel ou sur papier (voir aa)

✓ SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*, soit en français **électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium**.

Cette méthode de séparation, par rapport à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) classique, est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de SDS. Dans ce gel dénaturant, on retrouve ce SDS qui se lie aux protéines, empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaires.

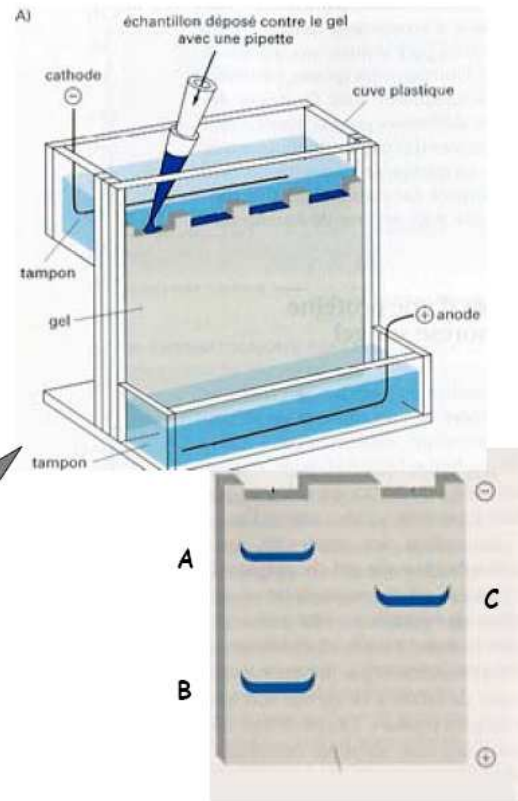
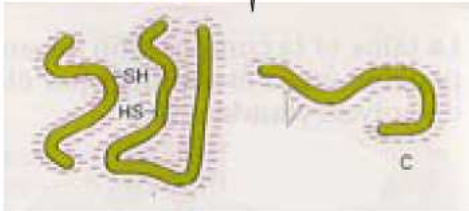
Électrophorèse (SDS-PAGE)

Électrophorèse mono-dimensionnelle

Protéine avec 2 sous-unités (A et B) Protéine simple (C)



Coupage des ponts disulfure covalents (β -mercapto-éthanol) traitement par le SDS (sodium dodécyl sulfate)



BIOCHIMIE L2 (FSB-US)