

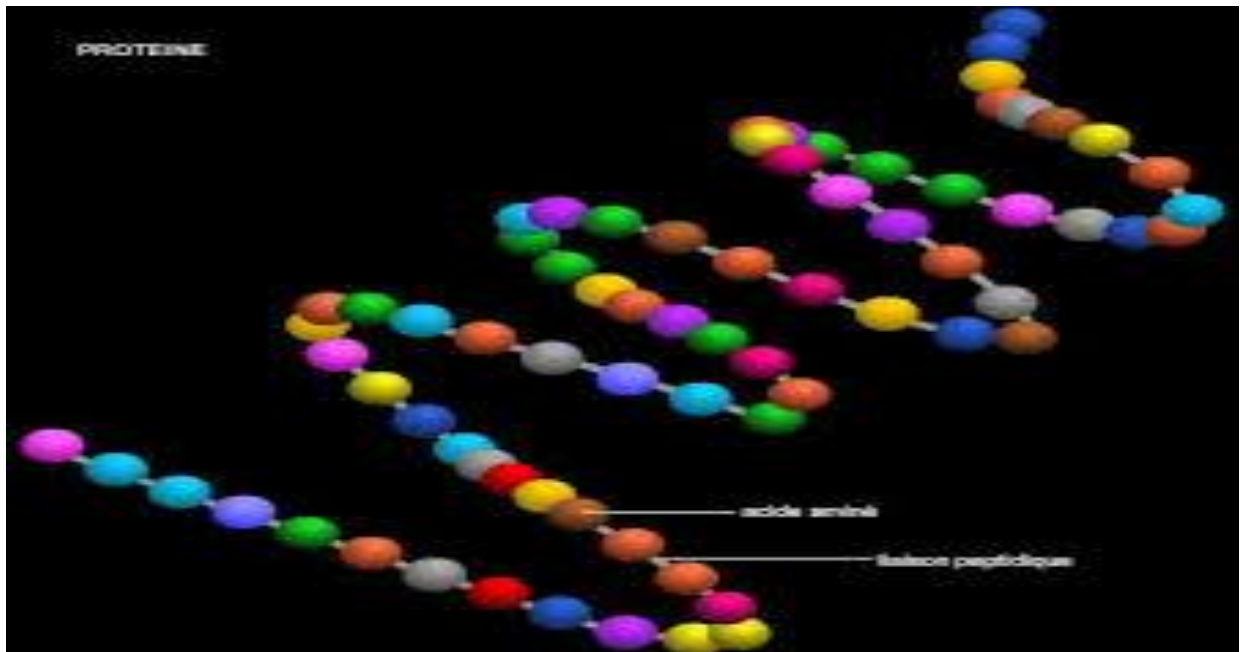
Université Badji-Mokhtar-Annaba
Faculté de Médecine
1^{ère} année Médecine
2019-2020

e-mail : daroui.biochmed.annaba@gmail.com

MODULE : BIOCHIMIE
CHAPITRE 3
LES PROTEINES

Peptides + Protéines

Dr Daroui- Mokaddem H.



Les peptides

Introduction :

Les acides aminés (AA) peuvent se lier par covalence pour former des peptides. Ils peuvent être des hormones, des neurotransmetteurs et même des antibiotiques.

Définition :

Un peptide est constitué d'un enchaînement d'AA, chaque fonction acide d'un AA réagit avec la fonction amine d'un autre et conduit à la formation d'une liaison peptidique.

-Un dipeptide est formé de 2 AA.

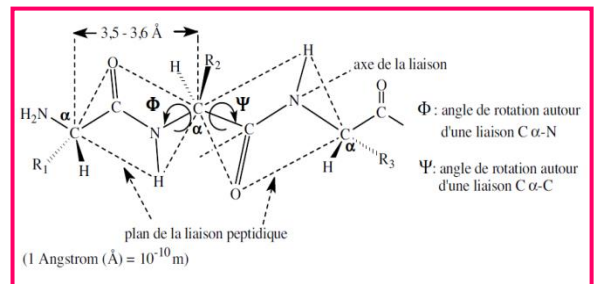
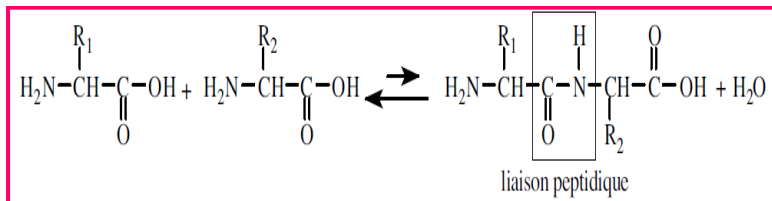
-Un tripeptide est formé de 3 AA.

-Les peptides contenant peu d'AA sont nommés oligopeptides.

La liaison Peptidique :

Elle est stabilisée par résonance et ne peut subir de libre rotation, propriété très importante dans l'établissement de la conformation tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique d'une protéine.

Les peptides sont nommés dans l'ordre de la séquence de leurs composants en AA N-terminal (portant une fonction NH₂ libre) :



- Les six atomes du groupe peptidique **Cα-CO-NH-Cα** sont coplanaires (situés dans un même plan).

- Les atomes de carbones Cα des AA sont en position trans par rapport à la liaison peptidique. Cette propriété est très importante dans l'établissement de la conformation tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique d'une protéine.

Nomenclature:

Les unités des AA dans un peptide sont habituellement appelées des **résidus**. La lecture d'un peptide commence à gauche par le résidu d'AA qui a son NH₂ libre (extrémité N-terminale) et se termine par le résidu qui a son extrémité COOH libre (Extrémité C-terminale).

-Dans une chaîne peptidique lorsque l'enchaînement des AA est connu, les noms sont séparés par un trait d'union : **EX. Ser-Gly-Tyr-Ala.**

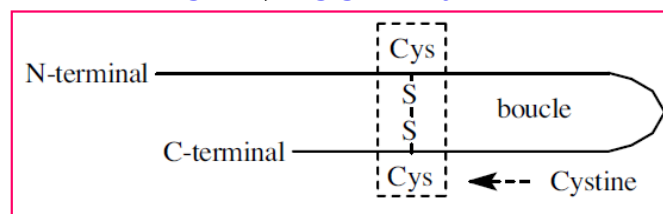
-Lorsque seule la composition en a.a est connue, les noms sont séparés par une virgule :

EX. Ser, Gly, Tyr, Ala.

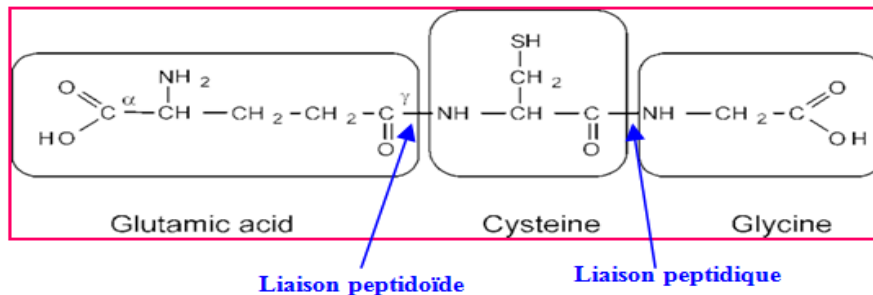
Remarque:

-Les **Peptides** ont une faible dimension, on les différencie des protéines donc par le nombre, la nature et l'ordre dans lesquels les AA qui les composent se succèdent dans la molécule.

-En plus de la liaison peptidique reliant les acides aminés, un deuxième type de liaison covalente se forme entre deux éléments (ou résidus) cystéine, le pont disulfure. Ces liaisons se forment par oxydation d'une fonction thiol (SH) et la réaction est réversible, elle s'ouvre par réduction :



- 1- Dans un peptide, une liaison pseudo-peptidique (liaison peptidoïde) s'engage entre le COOH ou le NH₂ du C α et un autre COOH ou NH₂ du radical ou une autre molécule, **EX.** : Glutathion (NH₂ Glu-Cys-Gly COOH.) :



Propriétés acido-basiques :

Les peptides possèdent les mêmes propriétés acido-basiques que les AA simples. Seules les fonctions aminées et carboxyles situées aux extrémités N et C terminales s'ionisent, en plus de la chaîne latérale si elle possède des groupements ionisables.

Classification des peptides : Il existe 3 principales classes des peptides :

Peptide linéaire : Peptide linéaire avec extrémités N et C-terminales libres.

Peptide cyclique : Peptide sans extrémité, l'extrémité N terminale est reliée par une liaison peptidique à l'extrémité C terminale.

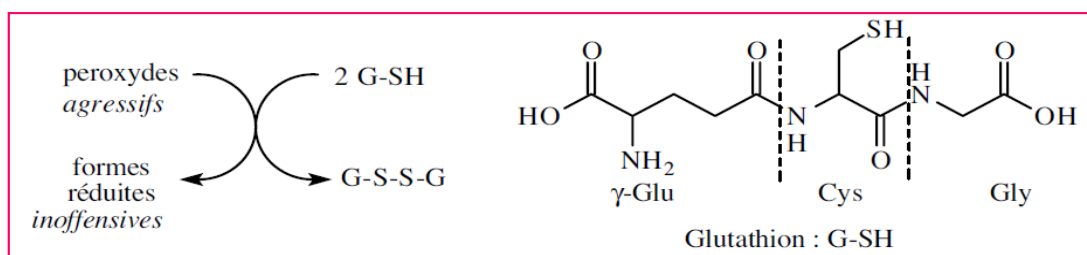
Ex. : Gramicidine S (10 AA, présence d'acides aminés de la série D). Cette molécule d'origine bactérienne présentant une activité antibiotique :

Peptide semi - cyclique : Molécule avec une seule extrémité, une extrémité forme une liaison peptidique avec un radical de la chaîne d'acides aminés.

Ex. : **Bacitracine A**, molécule d'origine bactérienne, présentant une activité antibiotique (12AA, présence d'ornithine et d'une liaison peptidoïde.).

Les peptides d'intérêt biologique:

Peptides à rôle physico-chimique : Le glutathion (tripeptide γ Glu-Cys-Gly : liaison de Glu par le carbonyle γ), antioxydant puissant qui joue un rôle central dans la défense cellulaire contre le dioxygène et ses dérivés actifs. C'est un couple Red-Ox très efficace contre les peroxydes :



Peptides hormonaux : L'hypothalamus contient des neurones, à fonction endocrine, qui sécrètent 2 nonapeptides à activité hormonale :

- l'**ocytocine** qui déclenche les contractions des muscles lisses (utérus pour l'accouchement, glande mammaire pour l'éjection du lait).
- la **vasopressine** : effet antidiurétique au niveau du rein (action hypertensive comme médicament).
- l'**insuline**, polypeptide pancréatique formé de deux chaînes (21 et 30 AA) qui régule le métabolisme du glucose (hypoglycémie).
- le **glucagon**, polypeptide de 29 AA, qui provoque une augmentation de la glycémie (hyperglycémie).

Peptides antibiotiques : Certains micro-organismes synthétisent des peptides inhibiteurs de la synthèse protéique, qui sont des "armes" de défense et de colonisation. Ces peptides sont cycliques et qui intègrent des dérivés d'AA ou des AA de la série D, propriétés qui les protègent des dégradations protéolytiques.

Peptides bactériens : On peut isoler de différentes souches de *Bacillus* :

- la famille des **tyrocidines**, décapeptides cycliques comprenant une D-Phe et l'ornithine (homologue à 5 carbones de la lysine).
- la **bacitracine A** est un peptide à 12 aminoacides dont trois sont de la série D (Glu, Asn, Phe) et dont un est l'ornithine (dérivé d'AA).

Peptides fongiques : La moisissure *Penicillium* produit la **pénicilline** qui est un dipeptide de deux dérivés d'AA.

Peptides immunomodulateurs : Le champignon micromycète *Tolypocladium* sécrète des métabolites secondaires sous forme de peptides antifongiques : les **cyclosporines**, qui sont des immunosuppresseurs utilisés dans les transplantations d'organes.

LES PROTEINES

Introduction :

Les protéines sont des macromolécules de poids moléculaire très élevé, par hydrolyse elles produisent des AA. Seulement 20 types d'AA sont rencontrés lors de l'hydrolyse des protéines. Les protéines possédant diverses fonctions importantes, la plus importante et la plus grande classe de protéines sur le plan biologique est celle des enzymes.

Composition et classification :

- **Selon leur composition**, les protéines peuvent appartenir à deux groupes différents : Les holoprotéines et les hétéroprotéines.

Holoprotéines : Ne fournissent par hydrolyse acide que des AA simples.

Hétéroprotéines : Libèrent en plus des AA d'autres composés organiques ou inorganiques. La partie non protéique est appelée groupement prosthétique. Selon la nature de ce groupement, on distingue les lipoprotéines et les chromoprotéines.

- **Selon leur forme**, elles peuvent être divisées en deux grandes catégories : Fibreuses et Globulaires

Protéines fibreuses : ont des rapports axiaux : (Longueur/Largeur) supérieur à 10.

Elles sont insolubles dans l'eau et allongées avec des chaînes polypeptidiques étendues le long d'un axe. La plus part des protéines fibreuses ont un rôle structural ou de protection.

Parmi les protéines fibreuses deux catégories prédominent : Les kératines et Les collagènes.

***Les kératines :**

- **Les kératines α** : Constituent les ongles, la corne, les cheveux, la laine et la peau.

- **Les kératines β** : Constituants des fibres des araignées, du vers à soie, des écailles et des griffes des oiseaux et des reptiles.

***Les collagènes :** Chez l'homme le collagène est le principal composant de la trame fibreuse des os, des cartilages, des tendons, de l'œil et du derme.

Protéines globulaires: Rapport axial de 3 à 4.

Formées de chaînes polypeptidiques étroitement enroulées en une structure compacte, sphérique ou globulaire. Ces protéines sont habituellement solubles dans les systèmes aqueux et diffusent rapidement, la plus part ont une fonction dynamique, EX : Enzymes, protéines de transport, les anticorps...etc.

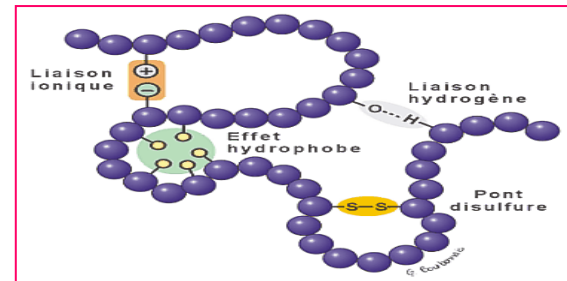
Liaisons intervenant dans la structure spatiale des protéines:

Liaison disulfure (ou pont disulfure) : Liaison forte qui s'établit entre les fonctions thiols de deux cystéines, appartenant soit à la même chaîne peptidique (pont intra-chaîne), soit à deux chaînes différentes (pont inter-chaînes).

Liaison ionique (ou saline) : Liaison non covalente (donc plus faible) qui s'établit entre un radical chargé positivement ($-NH_3^+$ ou $=NH_2^+$ par ex.) et un radical chargé négativement ($-COO^-$ par ex.), liant ainsi soit deux parties d'une même chaîne peptidique soit deux chaînes différentes.

Liaison hydrogène : Liaison non covalente, qui se forme entre un atome d'hydrogène lié à un azote ou à un oxygène et un doublet électronique non partagé d'un autre azote ou d'un autre oxygène.

Liaison hydrophobe : Un certain nombre d'AA ont une chaîne latérale hydrophobe non polaire (Ala, Val, Leu, Ile, Phe.). Ces chaînes latérales ainsi repoussées ont tendance à se rapprocher, ce qui permet ainsi des interactions entre différentes parties d'une chaîne peptidique (ces interactions sont de type forces de van der Waals).



Conformation des chaînes polypeptidiques:

Structure primaire: Elle correspond à l'ordre dans lequel les AA sont unis les uns aux autres, ainsi que l'emplacement de toutes les liaisons disulfure. Elle est codée dans les gènes et peut présenter des modifications d'une espèce à l'autre et dans une même espèce.

Structure secondaire : Elle est due à la formation de liaisons hydrogène entre les constituants de la liaison peptidique elle-même. On distingue deux types principaux de structure :

Structure de type α (état hélicoïdal ou hélice α) :

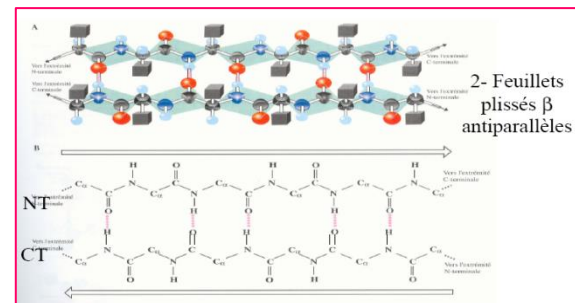
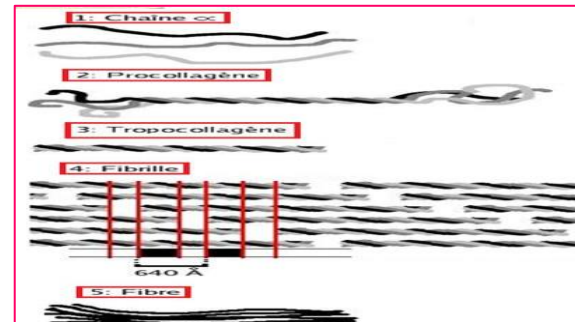
Tous les CO et tous les NH sont impliqués dans ces liaisons hydrogène.

Deux hélices α ou plus peuvent s'enrouler pour former un câble, ces enroulements super-hélicoïdaux sont rencontrés dans différentes protéines, **EX.** : La kératine des cheveux, la myosine et la tropomyosine du muscle, la kératine de la peau et la fibrine des caillots sanguins. L'hélice peut être droite ou gauche, la droite est plus stable que la gauche. La proline est généralement la cause de coude.

Structure de type β (structure en feuillets plissés) :

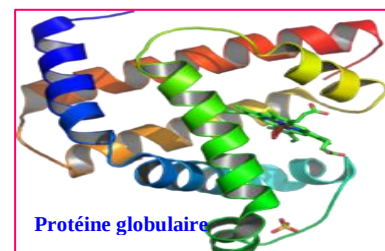
La chaîne polypeptidique est presque totalement étirée au lieu d'être étroitement enroulée comme dans l'hélice. Le feuillet plissé est stabilisé par des liaisons hydrogène entre les groupes NH et CO de brins polypeptidiques différents.

Les brins adjacents peuvent être de même sens (feuillets β parallèles) ou de sens opposé (feuillet antiparallèle), **EX.** : la fibroïne de la soie est constituée de faisceaux de feuillets antiparallèles.



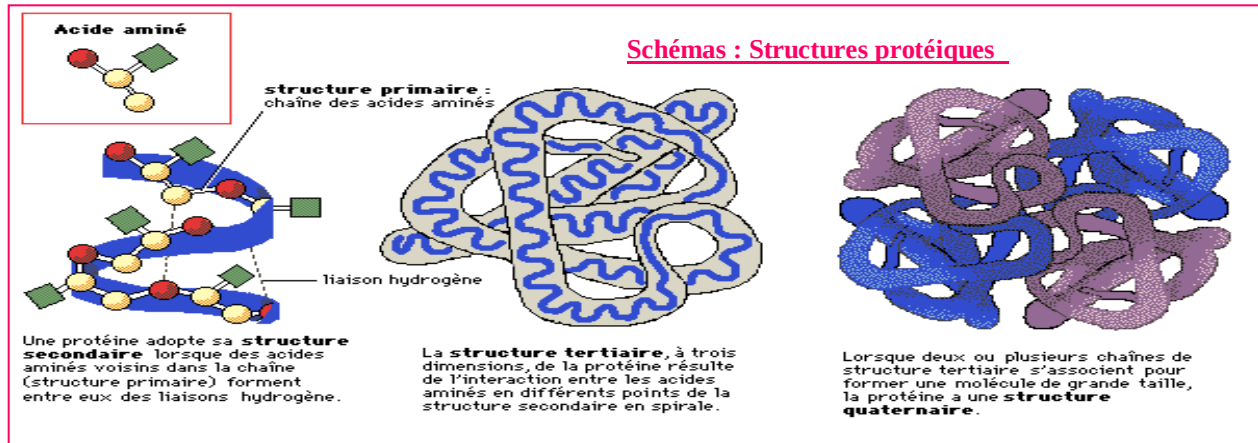
Structure tertiaire : Elle désigne la façon dont les chaînes polypeptidiques sont enroulées et courbées dans les trois dimensions pour former les structures compactes et extrêmement enroulées des protéines : c'est la conformation tridimensionnelle complète du polypeptide, stabilisée par des interactions de type non covalente (électrostatique, interactions hydrophobe) et des ponts disulfures.

Les protéines globulaires, qui constituent la plus part des protéines biologiquement actives possèdent cette structure tertiaire ; elles peuvent être constituées de plusieurs



chaînes, mais peuvent aussi ne comporter qu'une seule chaîne polypeptidique ayant par endroits des zones en hélice α . Les chaînes latérales polaires sont souvent groupées en surface.

Structure quaternaire : C'est l'association de plusieurs monomères, les liaisons qui unissent ces sous unités sont des liaisons non covalentes, **EX.:** L'hémoglobine, elle contient 4 sous unités (structure tétramérique). La plus part des enzymes cellulaires sont des oligomères constitués par l'association de petit nombre de sous unités identiques.



Principales propriétés des protéines:

Solubilité des protéines :

Un certain nombre de facteurs peuvent influencer la solubilité des protéines :

Influence du pH : La solubilité d'une protéine est minimale au voisinage du PH isoélectrique.

Pour la majorité des protéines

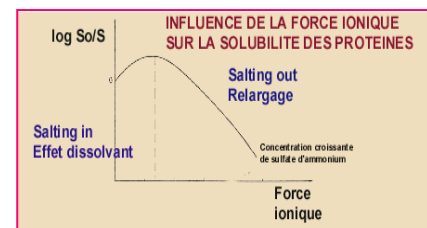
Influence de la force ionique : Les sels neutres interviennent en fonction de leur concentration et de la charge des ions, on définit la force ionique molaire **U** par la relation suivante :

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

C : concentration molaire de chaque ion et **Z** : sa valence

A faible force ionique, on observe un effet dissolvant (Salting-in) tandis qu'à force ionique élevée au contraire on assiste au relargage, c'est à d la précipitation des molécules protéiques (**Salting-out**) .

Les ions du milieu en quantité énorme par rapport aux forces ioniques de la protéine, entrent en compétition avec celle-ci et entraînent sa déshydratation.



Influence des solvants organiques : Les protéines sont insolubles dans les solvants organiques :

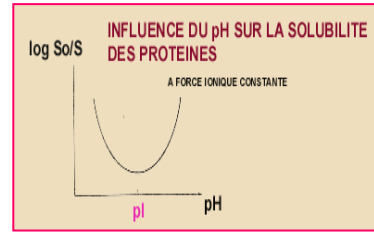
L'éthanol, le méthanol et l'acétone peuvent être utilisés pour précipiter les protéines, on peut éviter la dénaturation en opérant à très basse température (4°C).

Dénaturation des protéines :

La conformation tridimensionnelle (Structure primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire) est le propre d'une protéine native, cette conformation peut être bouleversée, désorganisée sans que soit rompue la moindre liaison peptidique par rupture uniquement des liaisons qui permettaient à l'édifice de maintenir sa conformation dans l'espace : C'est ce qu'on appelle la dénaturation.

La dénaturation peut être réversible ou irréversible. Elle peut être provoquée par toute une variété d'agents physiques ou chimiques :

- La chaleur: La coagulation de l'ovalbumine du blanc d'œuf est un exemple bien connu de la dénaturation.
- Les variations de PH : Certains acides (nitrique, trichloacétique perchlorique, etc.....)
- Les détergents.
- Les solvants organiques.
- Les solutions d'urée ou de guanidine.
- La simple dilution ou la simple agitation peuvent aussi provoquer la dénaturation des protéines.



Caractère amphotère des protéines :

Constituées par des ampholytes (les aminoacides), les protéines possèdent un caractère amphotère. En effet si les groupes aminés et carboxyliques sont impliqués dans la liaison peptidique. Il existe encore des groupes polaires : les groupes terminaux et les chaînes latérales des acides glutamiques et aspartiques de la lysine, de l'histidine, de l'arginine, de la cystéine et de la tyrosine.

Stratégie générale du séquençage d'une protéine :

La détermination de la composition en AA et la séquence (l'ordre des AA) d'une protéine passe par les étapes suivantes:

- Extraire, séparer et purifier la protéine.
- Fragmenter la protéine en polypeptides, rompre les ponts disulfures puis une hydrolyse acide pour déterminer la composition en AA.
- Déterminer la séquence en AA (AA des extrémités N-terminale et C-terminale + AA intrachaines).

Les techniques de séparation et de purification

Ces techniques sont basées sur la taille, la solubilité dans un solvant particulier, la charge ou l'aptitude de la protéine à se lier à un support.

Paramètre	Technique
Densité	Ultracentrifugation
Solubilité	Précipitation au sulfate d'ammonium
Charge	Electrophorèse, chromatographie d'échange d'ions, isofocalisation.
Taille	Filtration sur gel
Affinité	Chromatographie d'affinité

Ultracentrifugation: Procédé de **séparation** des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse.

Chromatographie par gel filtration: Ou chromatographie par exclusion de taille, des billes sphériques et poreuses de gel remplissent une colonne de chromatographie. Le diamètre des pores des billes est variable. La **séparation** est basée sur la taille des protéines. Les petites molécules pénètrent dans les différents pores des billes et sortent tardivement. Les grosses molécules ne rentrent pas dans les billes et sont exclues en premier de la colonne.

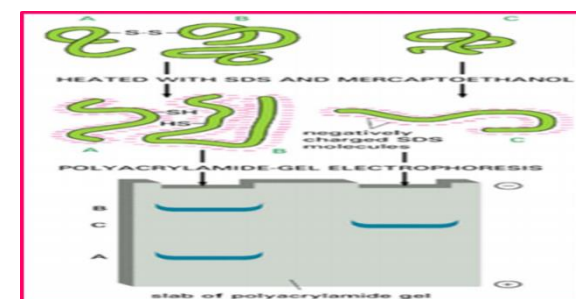
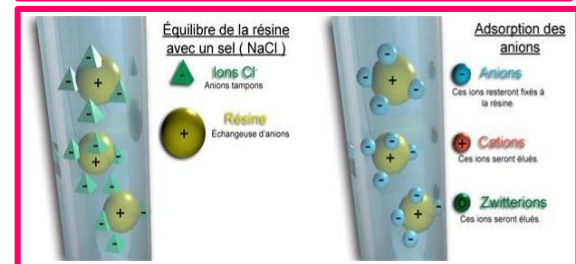
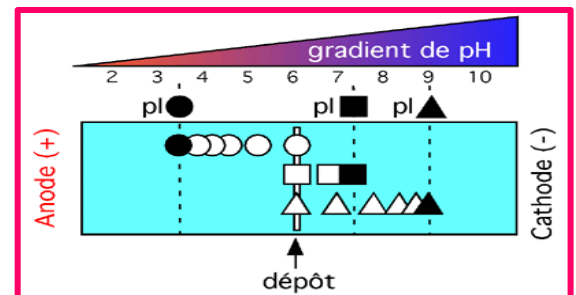
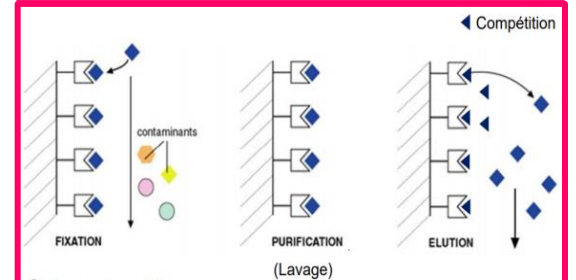
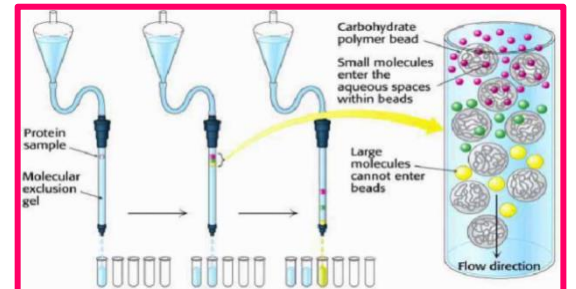
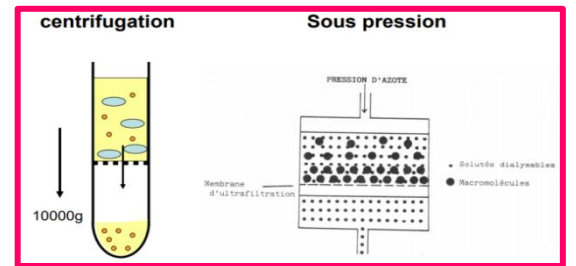
Chromatographie d'affinité:

Isoler une protéine ayant une affinité particulière pour un ligand solide. Au cours de la chromatographie, la protéine sera fixée au ligand et sera retenue sur la colonne. Un simple lavage récupère les protéines contaminantes non fixées.

Électrofocalisation: Correspond à une électrophorèse avec un gradient de pH préétabli sur le gel. Ainsi les molécules vont migrer et s'arrêter là où le pH correspond à leur pHi, puisqu'elles vont y perdre leurs charges. À une certaine distance de migration correspond un certain pHi. Cette méthode est très sensible et offre une excellente résolution.

Chromatographie échangeuse d'ions: En fonction des charges nettes, Il existe deux types de matrice: Échangeuses d'anions qui fixent les anions, telle que la DEAE-cellulose. Échangeuses de cations qui fixent les cations, comme la CM-cellulose. Pour cet exemple, on peut varier le pH pour récupérer tour à tour les différents anions fixés en fonction de leur charge nette.

Électrophorèse SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide PAGE avec SDS: Sodium Dodécylsulfate (SDS) qui détruit les structures quaternaires et tertiaires des protéines. La séparation est fonction de la masse molaire car toutes les protéines vont être chargées négativement. Cette électrophorèse est effectuée en présence d'un agent réducteur: le β -mercaptoéthanol (coupure du pont disulfure).



Méthodes d'étude d'une protéine de séquence inconnue :

Elles permettent la détermination de la **composition** et la **séquence** en AA d'une protéine.

-On déroule la structure tertiaire de la protéine afin d'obtenir une séquence plus ou moins linéaire: on détruit les ponts disulfures et on sépare les sous-unités grâce à un réducteur.

-On effectue une hydrolyse acide et à chaud (HCl 6 N à 105° pendant 24 à 72 heures) pour séparer et déterminer les différents types d'AA constitutifs des polypeptides formant la protéine. L'hydrolyse acide coupe les liaisons peptidiques, détruit le Trp et ne distingue pas entre (Asp et Asn) et (Glu et Gln) avec libération d'ammoniac. Signalons qu'à l'inverse, l'hydrolyse alcaline par chauffage conduit à la destruction de tous les AA excepté le Trp.

-On détermine la séquence en AA en deux étapes :

Détermination des AA N et C terminaux.

Détermination des AA intra-chaines.

Extrémité N terminale: L'AA N-Terminal est mis en évidence par des méthodes chimiques et enzymatiques :

Réaction de Sanger : 2,4 dinitrofluorobenzène (DNFB) + les fonctions α -aminées des AA donne le 2,4 dinitrophényl-peptide (dérivés jaunes). Lorsque ces derniers composés sont soumis à une hydrolyse avec HCl 6 N, toutes les liaisons peptidiques sont hydrolysées mais la liaison entre la fonction 2,4-DNFB et la fonction amine de l'acide aminé N-terminal reste stable d'où l'identification de cet AA.

Réaction d'Edman: Le phénylisothiocyanate (PITC) réagit avec la fonction aminée N-terminal pour donner un complexe qui, après action d'un acide dans des conditions douces libère une phénylthiohydantoïne. Le grand avantage de la méthode d'Edman est que la chaîne polypeptidique reste intacte et peut être récupérée et soumise à un autre traitement avec le PITC.

Aminopeptidase : Exopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques au niveau du CO de tous les AA N-Terminaux ayant un NH_2 libre.

Prolinase : Spécifique de la proline, libère celle-ci lorsqu'elle se trouve à l'extrémité N-terminale.

Extrémité C-Terminale :

L'hydrazinolyse : Consiste à traiter le peptide par l'hydrazine à 100°C, les liaisons peptidiques sont rompues et les acides aminés apparaissent sous forme d'hydrazides sauf l'AA C-Terminal dont le groupement carboxylique libre n'est pas attaqué.

La carboxypeptidase A : Extraite du pancréas, elle attaque les liaisons C-terminales, sauf celles de la glycine et les AA basiques (lysine, Arginine et Histidine).

La carboxypeptidases: Spécifique de la lysine, arginine et histidine.

La prolidase : Spécifique de la proline si celle-ci se trouve à l'extrémité C-terminal

Détermination des AA intra chaînes : Elle est réalisée par différentes méthodes :

-Le bromure de cyanogène (CNBR) est le plus utilisé, il provoque la rupture de la liaison peptidique lorsque le CO est attaché à la méthionine.

-le mercaptoéthanol : clive le pont disulfure.

-Les endopeptidase :

La trypsine : Enzyme pancréatique qui coupe spécifiquement du côté CO de lysine ou arginine à condition qu'ils ne soient pas suivis d'une proline

La chymotrypsine : Elle hydrolyse la liaison peptidique lorsque le CO est apporté par tyrosine tryptophane et phénylalanine à condition qu'ils ne soient pas suivis d'une proline.

La thermolysine : Elle coupe la liaison peptidique lorsque le NH est apporté par leucine et isoleucine à condition qu'ils ne soient pas précédés d'une proline.