

UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1, FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET
DE LA VIE, DEPARTEMENT DE BIOLOGIE APPLIQUEE

STRUCTURE ET FONCTION DES PROTEINES

Master 1 Bioinformatique

Dr. BELLIL ines
2020-2021

Ce cours est destiné aux étudiants de Master 1 en Bioinformatique. Les objectifs du cours sont de prédire les différentes structures des protéines et d'utiliser des logiciels de visualisation et de Docking. Les connaissances préalables recommandées sont : la biochimie des acides aminés et les matrices de score (PAM 250, BLOSUM62, Matrices Physico-chimiques, ...).

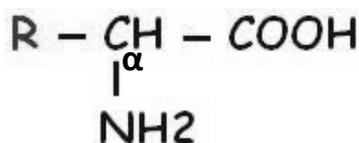
Chapitre 1 : Structure et principales propriétés des acides aminés, peptides et protéines

Introduction

- Le terme de protéine : mot grec « de première importance » ou « qui tient la 1ere place ».
- En effet, c'est des constituants importants des cellules vivantes, tant d'un point de vue quantitatif (plus de la moitié du poids sec de la cellule), que du point de vue qualitatif (protéines structurales, enzymes, défense).
- Toutes les protéines contiennent les 4 éléments : C, H, O et N.
- Beaucoup contiennent du Soufre (S), certaines du Phosphore (P).
- Les protéines sont de grandes molécules, des macromolécules formées par la condensation d'un grand nombre d'unités appelées acides aminés (aa).
- On distingue deux groupes de protéines :
 - Les holoprotéines : constituées uniquement de l'enchaînement des aa.
 - Les hétéroprotéines (protéines conjuguées) : contiennent en plus de l'enchaînement des aa un groupement prosthétique de natures très diverses.

I. Les acides aminés

- Comme leur nom l'indique, c'est de molécules qui comportent un groupement/une fonction acide carboxylique (COOH) et une fonction amine (NH₂).
- Dans le monde des vivants, il existe deux catégories d'aa :
 - 1ere catégorie : 20 α -aminoacides constitutifs de toutes les protéines et les deux fonctions COOH et NH₂ sont portées par le même carbone α .
 - 2eme catégorie : rassemble tous les autres aa qui sont à l'état libre et qui jouent souvent un rôle métabolique ou bien ceux retrouvés dans les petits peptides fabriqués par les microorganismes ou les plantes seulement.
- La première catégorie des aa sauf la proline répond à la formule générale :



- Les 20 aa peuvent jouer également des rôles métaboliques importants en tant que précurseurs d'autres constituants cellulaires.

- Ils peuvent être classés :
 - Selon la nature chimique.
 - Selon le caractère hydrophile ou hydrophobe de leur chaîne latérale R (c'est la classification la plus utilisée).

1. Classification des α -acides aminés

- Les 20 α -aa, leur structure, le code à 3 lettres et le code à une lettre sont présentés dans la figure suivante.

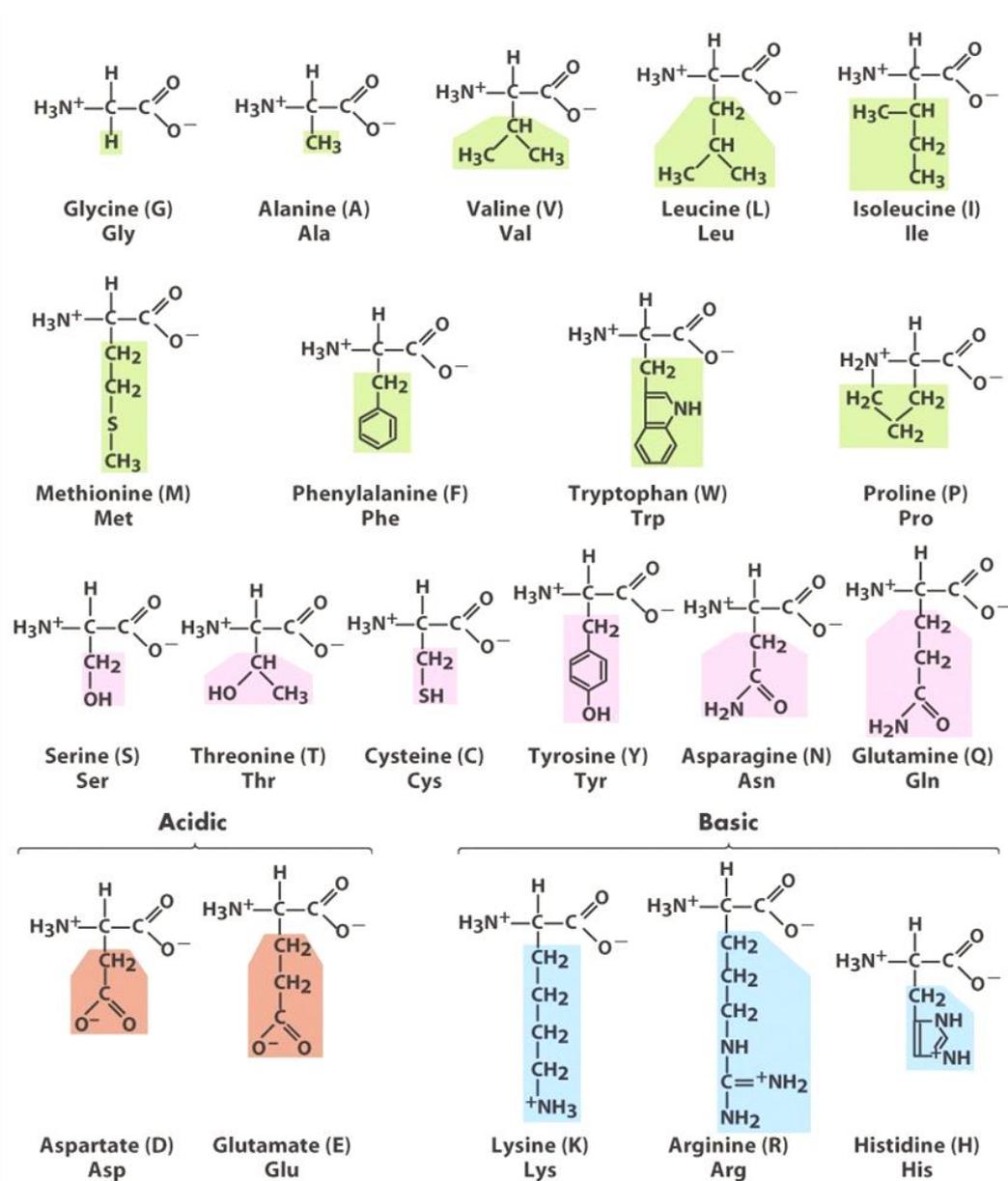


Figure 1. Structure des 20 α -aa ainsi que leurs codes à 3 lettres et 1 lettre.

- Le code à 3 lettres et 1 seule lettre est utilisé dans les banques de données pour ranger dans un minimum d'espace des séquences protéiques qui peuvent contenir plusieurs centaines d'aa.

1.1. Les α -aa non polaires ou hydrophobes

- Ce groupe rassemble les aa à chaîne latérale exclusivement hydrocarbonée, aliphatique ou aromatique.
- Par ordre croissant du nombre de carbone et de complexité structurale : la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine et le tryptophane.
- Malgré que la glycine à un groupement H, elle figure dans ce groupe car la liaison C-H est hydrophobe.
- Il figure également la méthionine dans ce groupe car la liaison C-S n'est pas polaire en chimie.
- La proline se trouve dans ce groupe à cause des groupements méthylènes de son hétérocycle saturé, le seul aa qui a une fonction amine secondaire et N-substituée.

1.2. Les aa polaires ou hydrophiles

A. Chaîne latérale hydrophile neutre

- On trouve dans cette catégorie les aa à chaîne latérale aromatique et aliphatique : la sérine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine et la tyrosine.
- Bien que la liaison C-S est non polaire, la cystéine est classée ici en raison du caractère fortement polaire de la liaison S-H (thiol) et c'est un donneur de H^+ .
- Les groupements thiol de la cystéine et phénol de la tyrosine peuvent s'ioniser négativement par perte d'un H^+ en milieu alcalin. Ils peuvent être classés dans le groupe C.

B. Chaîne latérale hydrophile basique

- Cette catégorie contient deux aa à chaîne latérale aliphatique, la lysine et l'arginine et 1 aa aromatique, l'histidine.
- Les fonctions ϵ -amino et δ -guanido et le noyau hétérocyclique imidazole peuvent chacun s'ioniser positivement par fixation d'un H^+ .

C. Chaîne latérale hydrophile acide

- Dans ce dernier groupe 2 aa aliphatiques, l'aspartate et glutamate dont les groupements β et γ carboxyliques peuvent s'ioniser négativement par perte d'un H^+ .

Cette classification est très utile en termes de structure tridimensionnelle des protéines. En effet les aa à chaîne latérale non polaire ont tendance à s'associer pour donner des liaisons de type Van Der Waals par exclusion des molécules d'eau de leur voisinage spatial. Alors que les aa à chaîne latérale polaire s'associent par liaison hydrogène ou ionique.

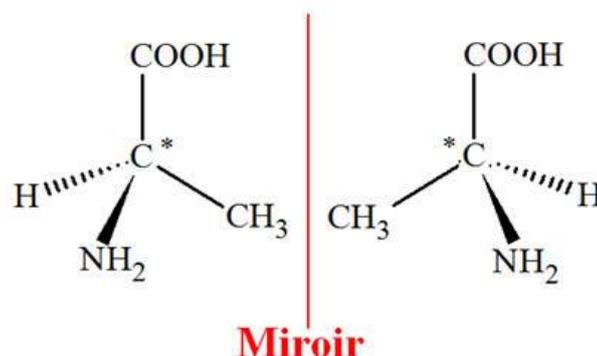
1.3. Autres acides aminés

- A côté de ces 20 α -aa constitutifs de toutes les protéines, on trouve d'autres aa à l'état libre qui jouent un rôle métabolique très important, exemple : l'ornithine et la citrulline dans l'uréogénèse.
- Soit des peptides de petites tailles (moins de 20 aa) synthétisés par les microorganismes ou des plantes.
- Il faut également noter que dans la 2ème catégorie d'aa non constitutifs des protéines, on trouve des aa α -aminés (ornithine) et des aa non α -aminés (β alanine) où les deux fonctions NH_2 et COOH sont portées par des carbones différents.
- Aussi signalons que lors de la synthèse des protéines, ces dernières subissent des modifications post-traductionnelles et donc la chaîne latérale R des aa sera modifiée chimiquement. Exemple : dans le collagène on trouve la proline et la 4-Hydroxyproline.
- Il y a quelques années, on a trouvé dans certaines protéines un nouvel aa, la sélénocystéine : sa structure est celle d'une sérine mais à la place d'un soufre on a un sélénium, on parle alors du 21ème aa.
- Les recherches au laboratoire ont montré qu'il n'existe pas à l'état libre et qu'il était synthétisé enzymatiquement à partir d'une sérine qui a été préalablement fixée sur l'ARNt donc avant la phase traductionnelle et donc l'incorporation de la sélénocystéine dans une protéine constitue une modification pré-traductionnelle.

2. Principales propriétés physiques des acides aminés

2.1.L'isomérisation optique

- Tous les aa sauf la glycine (H) ont un carbone asymétrique.
- Donc chaque aa peut s'écrire de 2 isomères optiques ou énantiomères : l'un est miroir de l'autre (figure 2).



L

D

Figure 2. Les isomères optiques d'un aa.

- L'un est l'image de l'autre dans un miroir et ne sont pas superposables.
- Donc pour chaque aa, on a un isomère D et un isomère L, c'ad les aa de la série D (NH₂ à droite) et les aa de la série L (NH₂ à gauche).
- Tous les aa des protéines sont de la série L.

2.2. Absorption dans l'UV

- Les aa absorbent dans les longueurs d'ondes < à 230 nm, autres absorbent entre 250 et 300 nm.
- L'absorption est en raison de la présence dans la chaîne R de chromophores tels que le noyau phényle (Tyrosine) ou le noyau indole (Tryptophane) permettant ainsi le dosage spectrophotométrique des protéines.

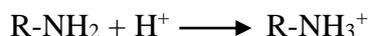
2.3. Ionisation

- Tous les aa possèdent 2 groupes ionisables le COOH et l'amine NH₂ donc ils sont amphotères.

- Le groupement carboxyle d'aa peut céder un proton et il apparait un anion :



- Le groupement amine peut fixer un proton et former un cation:



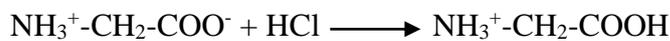
- C'est deux réactions de dissociation correspondent à des équilibres de sorte que les formes ionisés et non ionisés existant en solution dépendent de la concentration en H⁺.
- Et puisque il y a des équilibres donc il y a des constantes de dissociation K₁ et K₂ correspondant aux deux équilibres :

$$K_1 = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-COOH}]} \text{ et } K_2 = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

- Les constantes K₁ et K₂ varient d'une substance à l'autre mais le plus souvent pour un carboxyle le K₁ est de l'ordre de 10⁻⁴ à 10⁻⁶ et le K₂ pour une amine est entre 10⁻⁸ et 10⁻¹⁰.
- Connaissant la valeur de K₁ et K₂, on peut pour chaque concentration en [H⁺] c à d pour chaque pH, calculer le pourcentage des molécules ionisées.

- On voit qu'on peut passer par un pH où les molécules d'aa sont sous la forme dipolaire (zwitterion) et où la charge nette de la molécule est nulle, c'est le pHi : point isoionique ou isoélectrique de l'aa.
- A ce pH, sa solubilité est minimale et il ne migre pas si on le place dans un champ électrique.
- Donc on peut aisément étudier la dissociation des différentes fonctions polaires d'un aa en ajoutant à la solution du HCl ou NaOH et en mesurant le pH après chaque addition.
- On peut donc tracer des courbes de titration, dont l'aspect sera différent selon qu'il s'agit d'un aa neutre, acide ou basique.

A. Titration d'un acide aminé neutre



- La figure suivante représente la titration d'un acide amine par un acide et par une base.

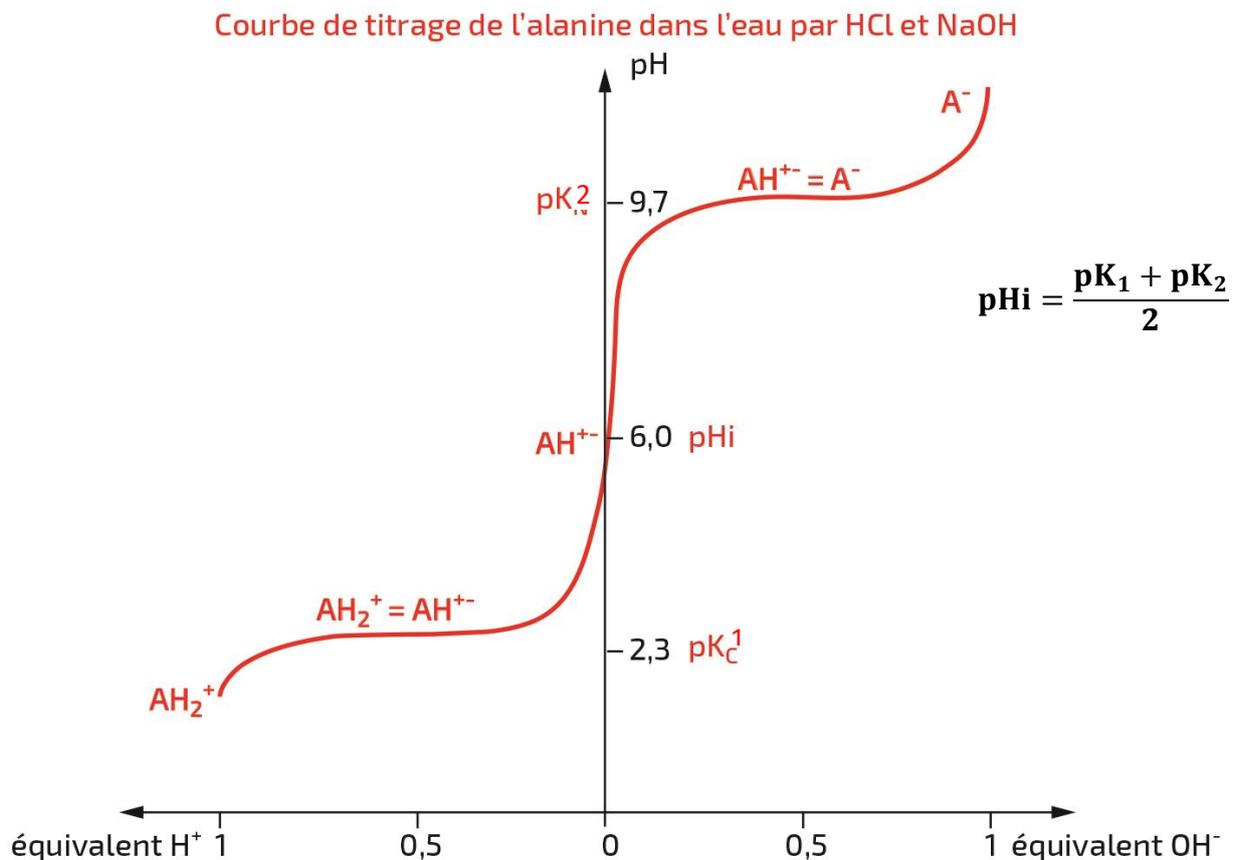
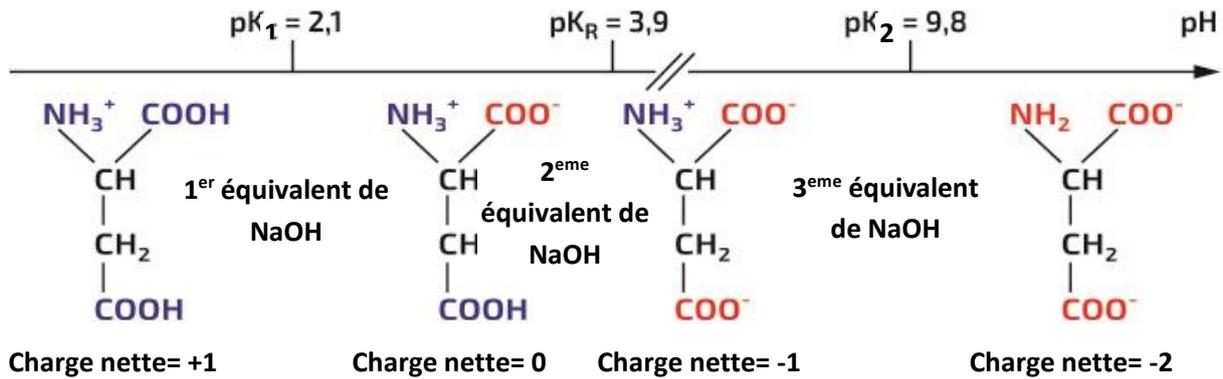


Figure 4. Courbe de titration d'un acide aminé neutre.

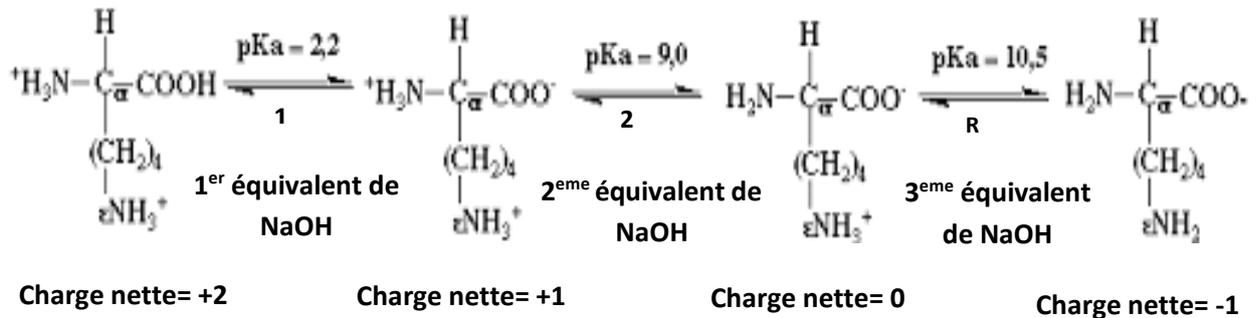
B. Titration d'un acide aminé dicarboxylique



- A pH = pK₁ = 2,1 : il y a autant de molécules avec une charge +1 et charge 0.
- A pH = pK_R = 3.9 : il y a autant de molécules de charge 0 et de charge -1.
- A pH = pK₂ = 9.8 : il y a autant de molécules de charge -1 et de charge -2.
-

$$pHi = \frac{pK_1 + pK_R}{2} = 2.9$$

C. Titration d'un acide aminé basique



$$pHi = \frac{pK_2 + pK_R}{2} = 9.7$$

Exemple : Si on a un mélange d'aa à pH = 6 on aura :

- Les aa neutres : zwitterion : a⁺ = a⁻
- Les aa acides : Asp : +a⁻² (charge nette -1)
- Les aa basiques : Arg : +²a⁻¹ (charge nette +1)

Donc on peut séparer les aa en fonction de leur charge par électrophorèse et chromatographie.

3. Principales propriétés chimiques des acides aminés

- Les aa ont des propriétés chimiques conférées par le groupement COOH et NH₂ ou le R.

3.1. Réactions dues à la présence du COOH

A. Formation des sels

- Cette propriété est utilisée pour titrer les aa.
- Les aa sont titrés par un acide (HCl) ou par une base (NaOH).



B. La décarboxylation

- Elle peut être réalisée en laboratoire
- Elle se fait naturellement dans les cellules vivantes lors du métabolisme des aa (quand la cellule a besoin d'un COOH dans une réaction donnée, il y a des enzymes qui viennent le récupérer d'un aa).

3.2. Réactions dues à la présence du NH₂

A. N-alkylation et la N-arylation

- Les H du groupement aminé peuvent être remplacés par des radicaux :
 - Aliphatiques : le plus simple est le CH₃ et on obtiendra des dérivés N-méthylés, N-diméthylés, N-triméthylés et il s'agit de la **N-alkylation**.
 - Aromatiques : tels que les dérivés dinitrophényles (DNP) que l'on utilise pour la détermination de l'aa N-terminal des protéines et il s'agit de la **N-arylation** (figure 5).

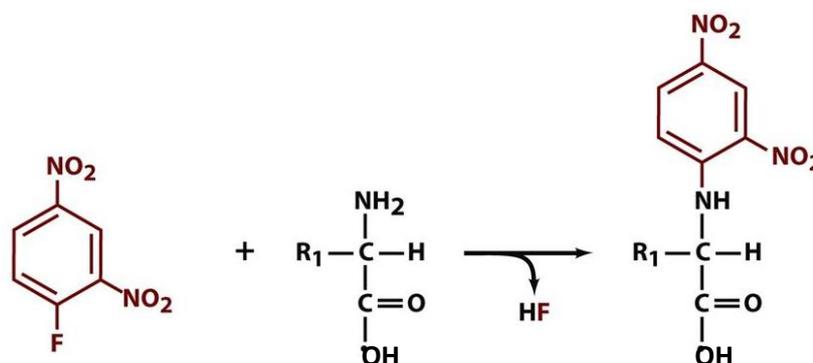


Figure 5 . Exemple de la N-arylation.

B. N-acylation

- Le groupement amine de l'aa peut se combiner avec les radicaux formyle, acétyle et carbobenzoxy, qui vont le bloquer (blocage temporaire au laboratoire par exemple).
- Pour éliminer le blocage :
 - Formyle et acétyle : facilement hydrolysable.
 - Carbobenzoxy : éliminé par hydrogénation.
- *In vivo*, on connaît les dérivés N-acétylés et N-benzoylés de la glycine formés lors du processus de la détoxication. On connaît également la N-formyl-méthionine qui joue un rôle important dans l'initiation de la biosynthèse des protéines chez les bactéries et dans les organites.

C. Action du formol

- Le formol ou formaldéhyde ou méthanol réagit sur le NH₂ des aa dans des températures ordinaires et à pH neutre pour former des dérivés dihydroxyméthylés.
- Ces dérivés sont des amines tertiaires et non plus primaires.
- Ce sont des bases plus faibles dont le pK est plus bas.

D. Action de l'acide nitreux

- L'acide nitreux (HNO₂) réagit sur les groupements NH₂ en libérant de l'azote (figure 6)..

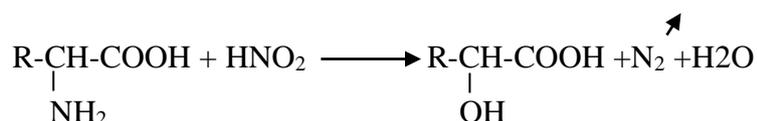


Figure 6. Formation d'acide hydroxylé et dégagement d'azote par action de l'acide nitreux sur un acide aminé.

E. La désamination

- La désamination et la transamination sont des réactions qui provoquent la disparition du groupement aminé.
- C'est des réactions enzymatiques très importantes dans le métabolisme azoté.

3.3. Réaction nécessitant la présence simultanée d'un carboxyle et d'une amine sur le carbone α

A. Réaction à la ninhydrine

- Cette réaction comporte plusieurs étapes (figure 7).

- La ninhydrine oxydée est réduite en ninhydrine réduite (perte de OH) en produisant une molécule d'H₂O (OH de la ninhydrine + H de l'aa).
- L'aa perd alors son H et devient acide iminé qui est par la suite hydrolysé (prend une molécule d'eau) pour devenir un α cétoacide et libérant le NH₃, puis il est décarboxylé pour former un aldéhyde.
- La ninhydrine réduite réagit avec la ninhydrine oxydée et le NH₃ pour former un produit bleu violet pour les amines primaire et jaune pour les amines secondaires.

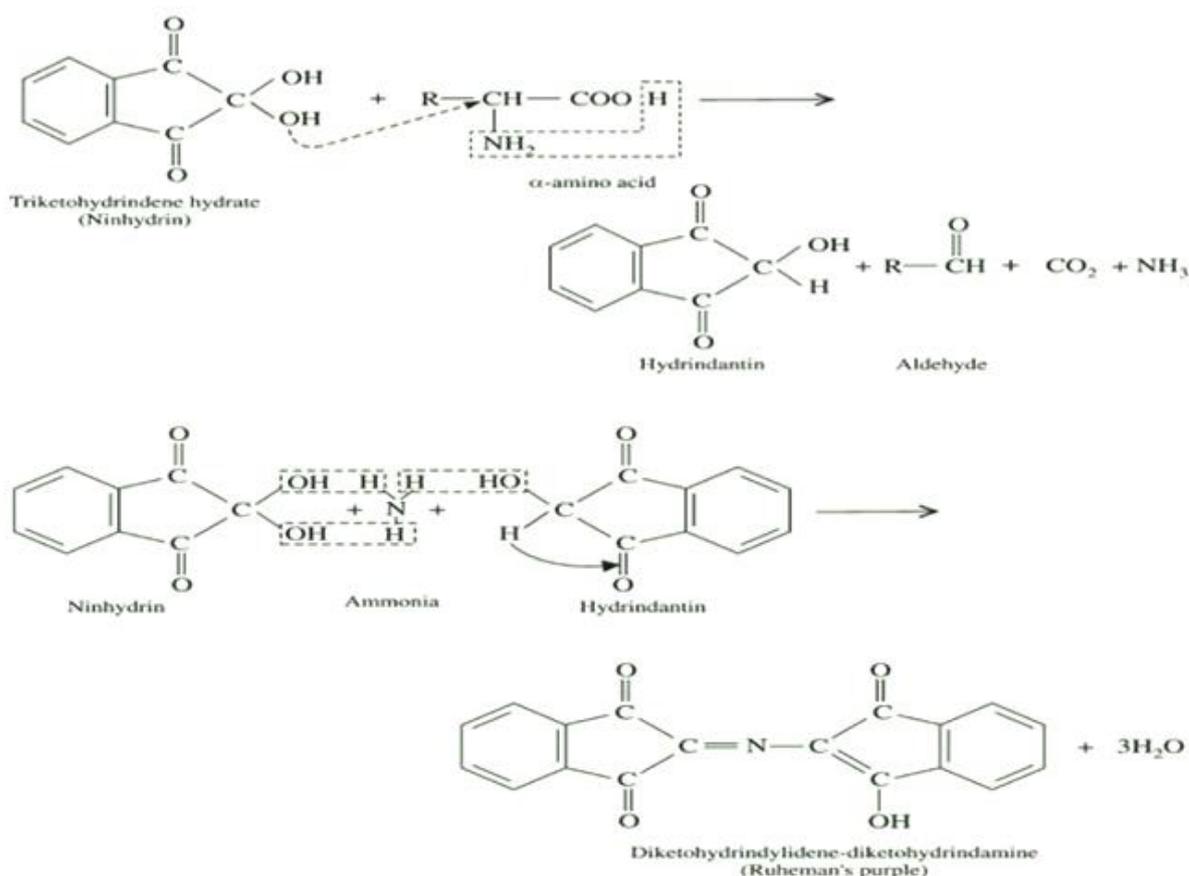
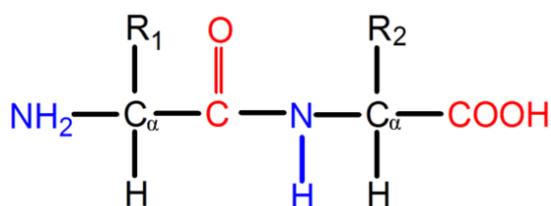


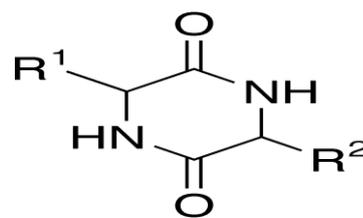
Figure 7. Réaction des acides aminés avec la ninhydrine.

B. Liaison amide substituée en deux α-acides aminés

- Une liaison amide ou liaison peptidique (CO-NH) peut s'établir entre 2 aa, l' α-COOH du premier étant lié au α-NH₂ de l'autre.
- La liaison amide unit les aa dans les peptides et les protéines.
- Si la liaison amide implique un COOH ou un NH₂ situé dans une autre position (β-COOH, γ-COOH, ε-NH₂), on parle de liaison peptidoïde. **Exemple** : la liaison entre le glutamate et la cystéine dans le glutathion.
- On peut obtenir au laboratoire des dicétopipérazines ou dipeptides cycliques.



dipeptide



dicétopipérazine

3.4. Propriétés des chaînes latérales R

- Dans la mesure où la quasi-totalité des α -COOH et des α -NH₂ sont engagés dans des liaisons peptidiques, il est évident que ce sont essentiellement les chaînes latérales qui confèrent leurs propriétés chimiques aux protéines.
- La réactivité des ces chaînes latérales est le plus souvent atténuée par des encombrements stériques ou par leur participation à la configuration tridimensionnelles des protéines.
- Les principales propriétés de ces chaînes latérales sont :
 - Les hydroxyles alcooliques (OH) : peuvent être estérifiés par l'acide phosphorique (exemple : phosphosérine) ou peuvent être acylés (l'OH de la tyrosine par exemple).
 - Le noyau aromatique : permet des réactions de substitution (exemple : dérivés iodés de la tyrosine qui constituent les hormones thyroïdiennes).
 - Les groupements thiols de la cystéine : peuvent être oxydés (exemple ; le système cys-cys : $\text{R-SH} \leftrightarrow \text{R-S-S-R}$, qui est un pont disulfure important pour la structure tridimensionnelle).
 - L'hydrogène du groupement SH qui est mobile : il est susceptible d'être substitué par des radicaux acyle formant des thioesters $\text{R-S-CO-R}'$ qui sont important en biochimie (exemple : les dérivés S-acylés du CO-A).

II. Structure primaire des peptides et des protéines

- Les peptides et les protéines sont formés par des enchainements d'aa liés entre eux par des liaisons peptidiques (liaison amide).
- Les peptides sont divisés en :
 - Oligopeptides : dipeptides (2 aa), tripeptides (3 aa).
 - Polypeptides : tétrapeptides jusqu'à 100 aa .
- Les protéines sont des polypeptides de plus de 100 aa et un poids moléculaire de plus de 10000 Da (ne dialyse pas à travers le cellophane).

- Lorsque on isole un peptide ou protéine et on veut la déterminer et la connaître, il faut voir :
 - La nature de ses aa : la composition ;
 - L'ordre de ses aa : la séquence.

1. Composition en acides aminés

1.1. Hydrolyse des protéines

- Pour hydrolyser les protéines et rompre la liaison peptidique, on utilise :
 - Les acides (hydrolyse acide) : c'est la plus utilisée avec du HCl 6N à 105°C dans un tube scellé sous vide et sous azote avec une concentration faible en protéines (0.5 à 1%) pendant 24h. l'inconvénient de cette hydrolyse est la transformation des aa glutamine et asparagine en glutamate et aspartate plus formation de NH_3^+
 - Les bases (hydrolyse alcaline) : cette hydrolyse présente un inconvénient et provoque des modifications et des remaniements de structure de certains aa.
 - Les enzymes protéolytiques : l'inconvénient est que il y aura pas d'hydrolyse complète.

1.2. Analyse des acides aminés

- Au départ, on a d'abord cherché à utiliser des méthodes spécifiques pour chaque aa, soit colorimétriques soit enzymatiques.
- Toutes ont été abandonnées à cause de leur faible spécificité ou de leur faible sensibilité par rapport aux techniques modernes de séparation chromatographique des aa.
- Les techniques modernes ont une parfaite reproductibilité à une sensibilité très élevée.
- Elles ont l'avantage de bien se prêter à une complète automatisation.
- Trois types de chromatographie sont utilisés :

A. Chromatographie par échange d'ions

- Cette méthode permet de séparer les aa en 3 groupes :
 - Les aa acides : retenus par les résines échangeuses d'anions (DOWEX2) qui sont souvent polyaminées (donc résine +).

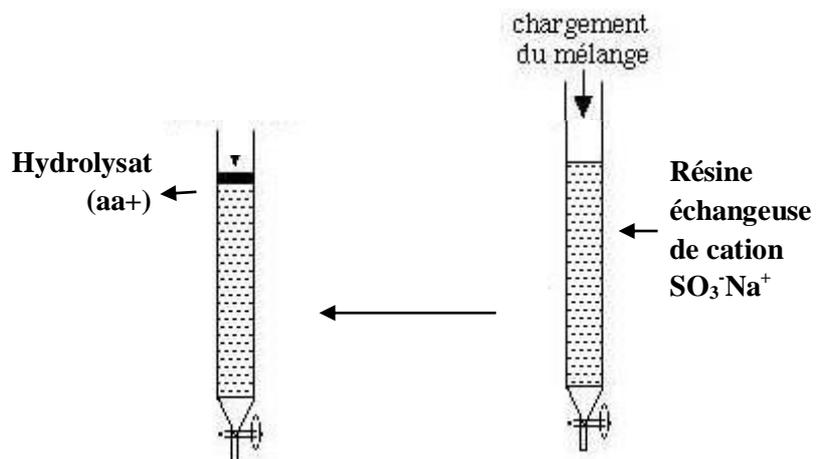


- Les aa basiques : retenus par les résines échangeuses de cations (DOWEX50) qui sont souvent des résines polysulfonées (donc résine -).

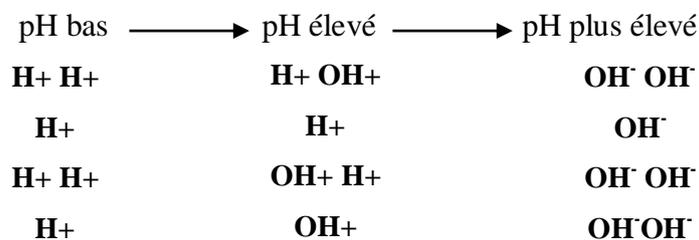
$$\text{Résine-SO}_3^- \text{Na}^+ + \text{R-NH}_3^+ \longrightarrow \text{Résine-SO}_3^- \text{NH}_3^+ \text{-R} + \text{Na}^+$$
- Les aa neutres : ne sont retenus par aucune de ces résines.

-Exemple : STEIN et MOORE ont réalisé un fractionnement complet des aa à l'aide d'une résine échangeuse de cation (polystyrène sulfoné $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$) à un pH bas (acide) où tous les aa sont chargés (+) et sont sous forme ($\text{NH}_3^+ \text{-R}$) de cation, donc ils restent en haut de la colonne et forment une seule bande mince même si le volume de l'hydrolysate est important.

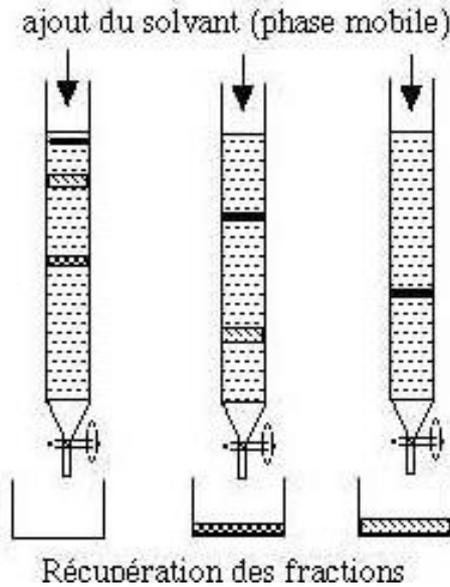
Protéines/peptides $\xrightarrow[\text{HCl 6N } 105^\circ \text{ -24h}]{\text{Hydrolyse acide}}$ Hydrolysate $\xrightarrow{\text{à pH acide}}$ Hydrolysate (aa^+ , NH_3^+)
 (+, -, et 0)



- On réalise un gradient d'éluion où le pH et les forces ioniques augmentent progressivement :



- donc au fur et à mesure que le pH augmente, les aa fixés à la résine par les NH_3^+ vont arriver à leur pK_1 puis au pHi et ils commencent à se détacher l'un après l'autre et sortent de la colonne.



- Les aa sont élués selon leur degré d'ionisation, en pics bien séparés qui font l'objet d'un dosage colorimétrique à l'aide de la ninhydrine.
- L'ensemble peut être automatisé et permettre l'analyse qualitative et quantitative d'un hydrolysate protéique (figure 8)

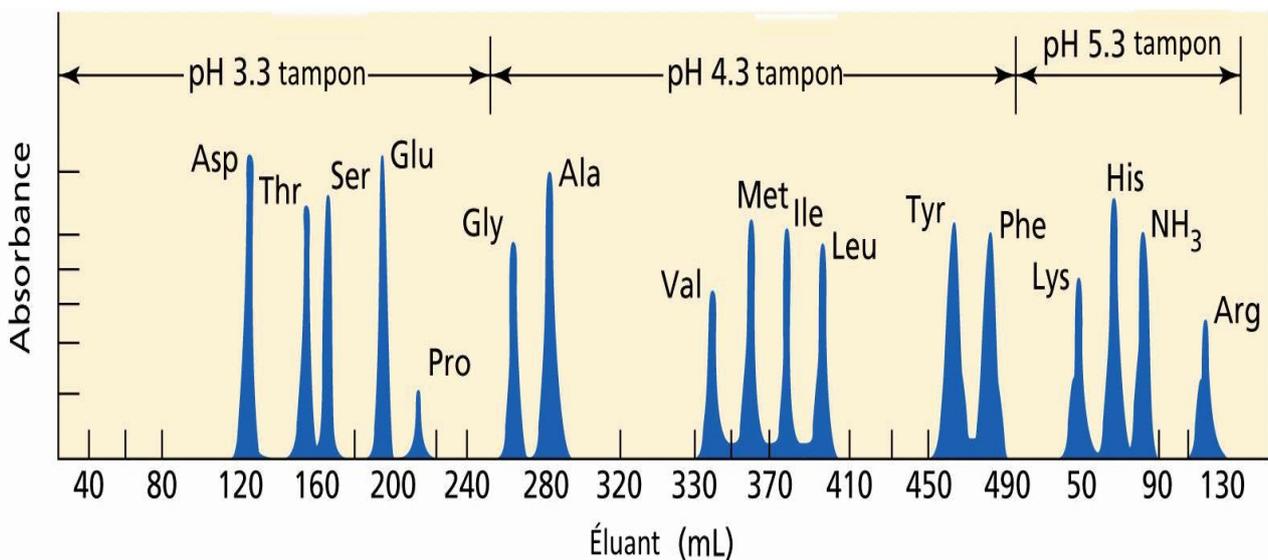


Figure 8. Dosage des acides aminés. La détection se fait en mesurant l'absorbance avec une longueur d'onde appropriée.

B. Chromatographie en phase gazeuse

- Il s'agit d'une méthode plus récente de séparation complète des aa.
- Les aa sont rendus d'abord volatiles par modification chimique de leurs fonctions polaires :
 - Méthylation des fonctions OH, NH₂, phénol.
 - Estérification des fonctions COOH.
- Ils sont alors séparés par passage à travers une colonne capillaire (2mm de long/0.1 mm de diamètre) dont l'intérieur est recouvert d'un film liquide.
- La colonne est chauffée à des températures comprises entre 100 et 200°C.
- Les aa sont partiellement solubles dans la phase liquide stationnaire non volatile et partiellement vaporisés.
- Ils seront entraînés par un gaz vecteur (phase mobile), à des vitesses différentes qui sont fonction de leur solubilité respective dans le film liquide stationnaire.
- Il s'agit d'une chromatographie de partage liquide-gaz.

C. Chromatographie d'adsorption HPLC

- Il s'agit de la plus récente, qui est une chromatographie d'adsorption de type liquide-solide à très haute résolution comme sous le nom chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Les aa sont transformés en dérivés aromatiques par réaction avec un réactif chimique (par exemple celui d'Edman).
- Ils sont adsorbés sur une colonne de silice microgranulaire dont les groupements OH sont substitués par de longues chaînes hydrocarbonées à 18 Carbones.
- Cette phase hydrophobe retient les dérivés d'aa en fonction d'hydrophobie de la chaîne latérale (Radical R).
- L'élution des aa se fait dans des solvants à base d'H₂O et d'acétonitrile.
- Le dosage des aa s'effectue par spectrophotométrie dans l'UV.

2. Séquence des acides aminés

2.1.Détermination des acides aminés terminaux

- Généralement à partir de là on commence l'étude des séquences car la détermination est souvent relativement facile mais aussi parce que le nombre de groupements terminaux

donne une idée ou une information sur la forme de la molécule polypeptidique et sur le nombre de chaîne constituant la molécule.

- En effet :
 - Une chaîne cyclique : pas de groupement terminal.
 - Une chaîne semi-cyclique : un groupement terminal.
 - Une chaîne linéaire : 2 groupements terminaux.
 - Deux chaînes linéaires : 4 groupements terminaux.

2.1.1. Détermination des groupements α -aminés terminaux libres

- Un certain nombre de méthodes ont été employées, mais on verra 3 : deux méthodes chimiques et une méthode enzymatique.

A. Méthode des Dinitrophényl-aminoacides de Sanger

- On a vu lors de l'étude des propriétés chimiques des aa que le groupement NH_2 peut se condenser avec le Dinitrofluorobenzène.
- Il s'agit du groupement N-terminal ou de l'extrémité N-terminal, on obtient alors un Dinitrophénylpolypeptide (Figure 9).
- On fait une hydrolyse acide par HCl, on obtient tous les aa libres + l'aa N-terminal sous forme de DNP-aa qui est facilement identifiable par chromatographie sur support solide (papier ou couche mince).

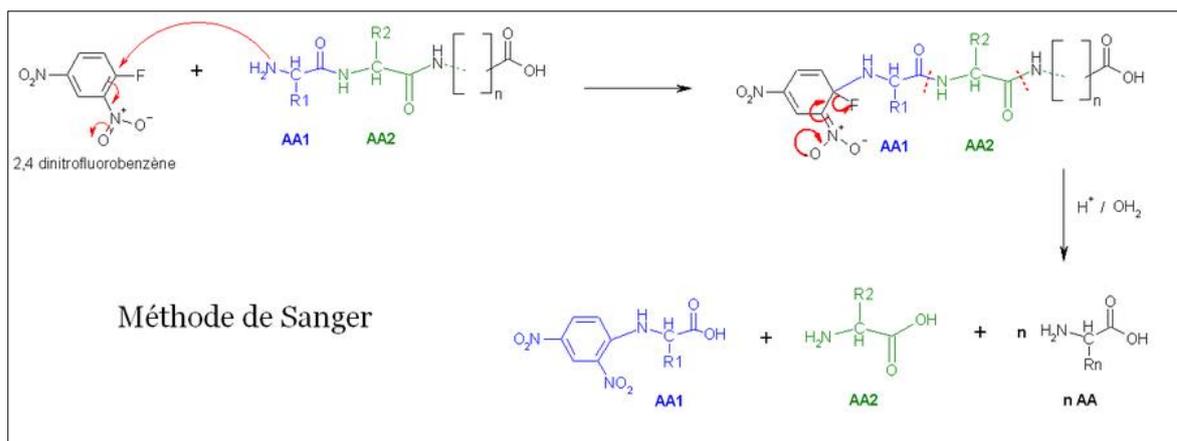


Figure 9 : Séquençage des aa par la méthode du Dinitrofluorobenzène.

- On peut également utiliser le Chlorure de 1-diméthyl- α -aminonaphtalène 5-sulfonyle ou Chlorure de Dansyle et obtenir après hydrolyse un Dansyl-aa décelable par sa fluorescence jaune (même principe et 100 fois plus sensible) (figure 10).

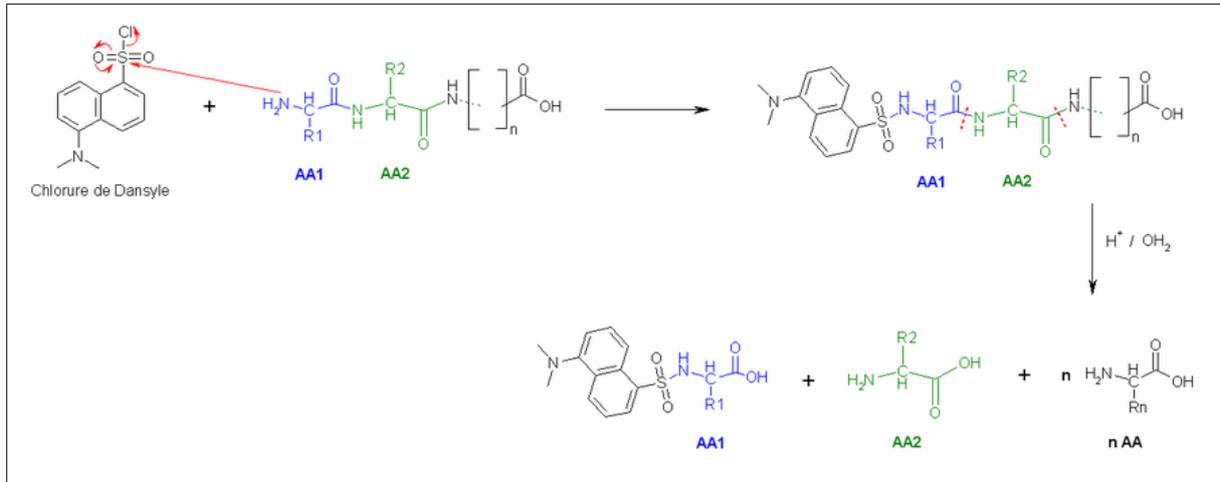


Figure 10. Chlorure de 1-diméthyl- α -aminonaphtalène 5-sulfonyle ou Chlorure de Dansyle.

B. La méthode de Phénylthiohydantoïne d'Edman

- Le principe de cette méthode est sur la figure 11.

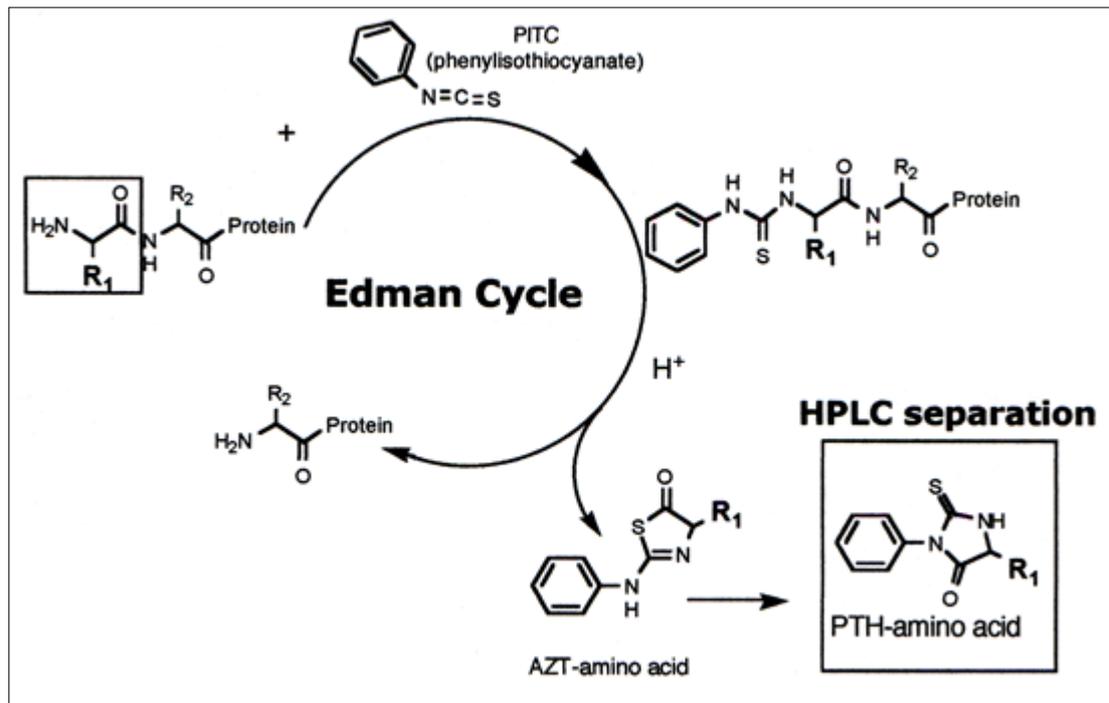


Figure 11. Réaction d'Edman pour l'identification des aa N-terminaux.

- Il se forme la phénylthiohydantoïne de l'aa N-terminal que l'on peut séparer et identifier par chromatographie.
- Contrairement à la méthode de Sanger où une hydrolyse totale de la chaîne polypeptidique est nécessaire, la chaîne est ici simplement amputée de son résidu N-

terminal car en milieu acide, la liaison peptidique n°1 est rendue fragile par la substitution avec le réactif de sorte qu'elle se rompt en libérant la phénylthiohydantoïne que l'on peut identifier par chromatographie.

- C'est l'aa n°2 qui devient le N-terminal ou maintient la position N-terminal et o peut faire agir une autre molécule du réactif d'Edman et ainsi de suite.
- Cette méthode permet de déterminer un certain nombre d'aa et elle a été même automatisée dans un appareil appelé séquenceur.

C. Dégradation enzymatique à l'aide de l'aminopeptidase

- Cette enzyme hydrolyse la liaison peptidique où est engagé l'aa N-terminal.
- Après avoir détaché le 1^{er} aa, elle va ensuite passer au 2eme aa qui se trouve à son tour porteur de la fonction NH2 terminale et ainsi de suite.

2.1.2. Détermination des groupements α-carboxyliques terminaux libres

Nous mentionnons dans cette partie une méthode chimique et une méthode enzymatique.

A. L'hydrazinolyse

- Si l'on traite une protéine par l'hydrazine à 100°C, toutes les liaisons peptidiques sont rompues et tous les résidus sont transformés en hydrazides sauf le résidu COOH terminal (C-terminal) que l'on retrouve sous forme d'aa libre, facile à isoler et à identifier (figure 12).

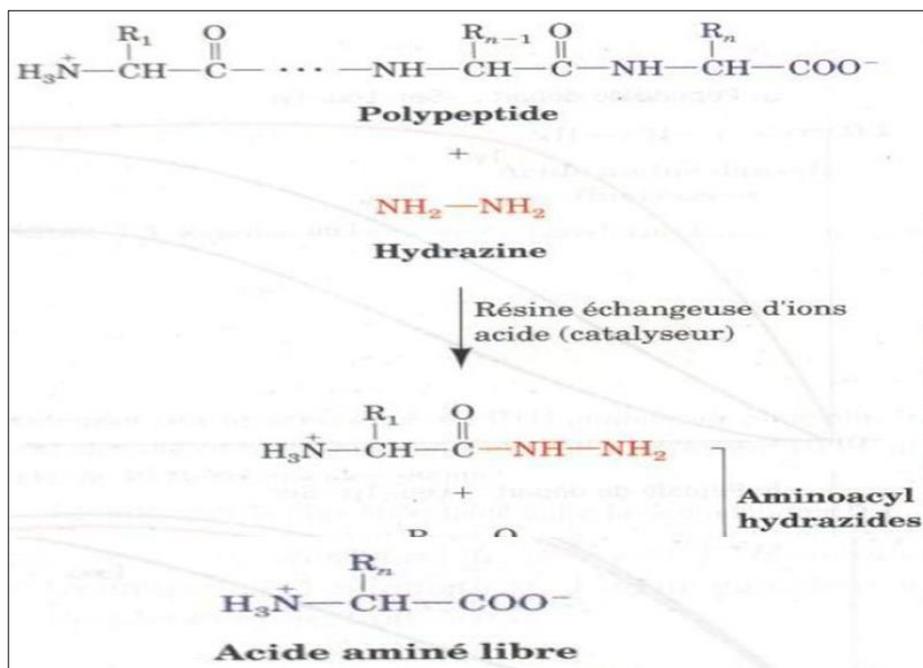


Figure 12. Réaction de l'Hydrazinolyse pour la détermination de l'aa C-terminal.

B. Dégradation enzymatique à l'aide d'une carboxypeptidase

- Elle consiste à faire agir une carboxypeptidase qui hydrolyse la liaison où est engagée l'aa C-terminal et ainsi de suite.
- Une fois que celle-ci est détachée, elle passe au 2eme aa C-terminal.
- Les enzymes sont bonnes dans le cas où on a une seule chaîne peptidique. S'il existe deux chaînes par exemple, elle peut s'attaquer simultanément aux deux chaînes et on ne sait plus d'où provient l'aa.

III. Les peptides

1. Classification

- Les peptides (moins de 100 aa) se subdivisent en deux groupes :
 - Les oligopeptides (nombre inférieur à 4 aa)
 - Les polypeptides (nombre supérieur ou égal à 4 aa)
- Ils sont formés par différents aa mais on peut trouver les homopeptides (triglycine-polyphénylalanine,...etc).
- Selon leur structure, on peut trouver :
 - Les peptides linéaires : les groupements NH_2 et COOH sont libres à chacun des extrémités.
 - Les peptides ramifiés : le branchement d'un ou plusieurs aa sur la chaîne peptidique linéaire se fait soit par le groupement $\omega\text{-COOH}$ d'un aa dicarboxylique, soit par le groupement $\varepsilon\text{-NH}_2$ de la lysine.
 - Les peptides cycliques : ils n'ont ni extrémité N-terminal ni extrémité C-terminal.
 - Les peptides semi-cycliques : avec une seule extrémité, lorsque il n'y a que la N-terminal, l' $\alpha\text{-COOH}$ du dernier aa est lié à l' $\varepsilon\text{-NH}_2$ d'une lysine endopeptidique, inversement lorsque il y a qu'un C-terminal, l' $\alpha\text{-NH}_2$ du 1^{er} aa est lié à un $\omega\text{-COOH}$ d'un aa dicarboxylique endopeptidique.

2. Nomenclature

- Un aa incorporé dans une chaîne peptidique perd un H (du NH_2) et un OH (du COOH) ou l'un des deux seulement si c'est un aa terminal et donc il sera appelé « résidu » qui veut dire que les fonctions amine et carboxyle ne sont pas libres sauf pour les aa N et C-terminaux.

- Donc l'aa ou résidu sera désigné en ajoutant le suffixe « yl » à la racine du nom (exemple : glycyL-séryL-tyrosyl...).
- On indique en 1^{er} l'aa N-terminal puis les autres dans l'ordre où ils se suivent en ajoutant le suffixe « yl » sauf pour l'aa C-terminal inchangé. Exemple : alanyl-valyl-phénylalanyl-isoleucine (Ala-Val-Phe-Ile ou A-V-F-I).

3. Etude de quelques peptides ayant une importance biologique

- Exposés pour les étudiants.

Chapitre 2 : Les protéines

I. Conformation tridimensionnelle des protéines

- Les protéines sont formées de longues chaînes polypeptidiques.
- Ceci constitue la structure primaire des protéines.
- Mais en réalité, chaque protéine a une structure tridimensionnelle, une conformation qui lui est propre, établie et maintenue par d'autres types de liaisons que les liaisons peptidiques.
- On dit que la protéine native a une structure secondaire, tertiaire et même quaternaire dans certains cas.

1. Liaisons intervenant dans la structure spatiale des protéines

1.1. Liaison disulfure (ou pont disulfure)

- C'est une liaison covalente (forte) qui s'établit entre 2 résidus de cystéines (figure 13) appartenant soit à la même chaîne peptidique, soit à deux chaînes différentes (Insuline).

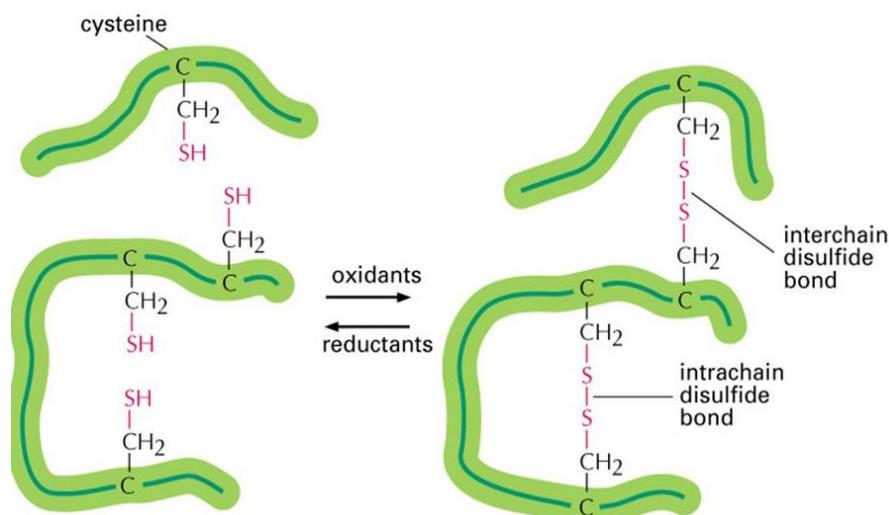


Figure 13. Liaison disulfure entre deux résidus de cystéines.

1.2. Liaison ionique

- C'est une liaison électrovalentielle, non covalente (donc plus faible), qui s'établit entre un radical chargé (+) ($-\text{NH}_3^+$, ou une $=\text{NH}_2^+$) et un radical chargé (-) ($-\text{COO}^-$), liant ainsi soit deux parties d'une même chaîne, soit deux chaînes différentes (figure 14).
- Ce genre d'interaction permet même la liaison entre deux molécules différentes par exemple : acide nucléique et protéine positive (Histones).

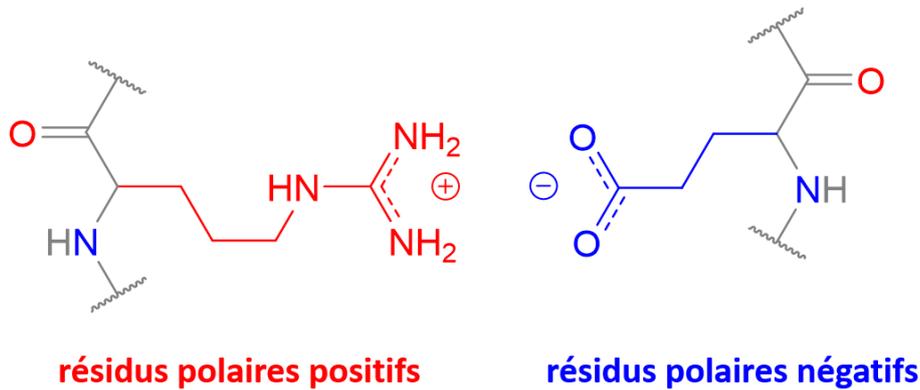


Figure 14. Liaison ionique entre résidus de charges opposées

1.3. Liaison hydrogène

- Ce type de liaison non covalente, se forme lorsque sont à proximité l'un de l'autre, d'une part un atome d'hydrogène lié à un azote ou à un oxygène, et d'autre part un doublet électronique non partagé d'un autre azote ou d'un autre oxygène.
- Ces liaisons peuvent s'établir :
 - Entre les C=O et les N-H des liaisons peptidiques
 - Entre les radicaux des résidus d'aa.
- Elle peut être soit intra chaîne soit inter chaîne (figure 15).

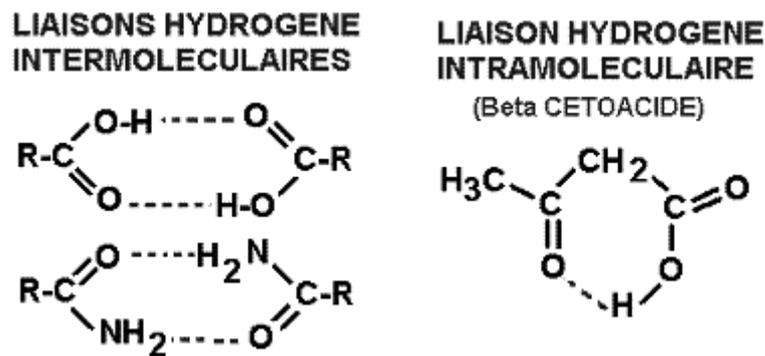


Figure 15. Liaison hydrogène intra et inter chaîne.

1.4. Liaison hydrophobe

- Un certain nombre d'aa ont une chaîne latérale hydrophobe, non polaire (Ala, Leu, Ile, Phe), qui ne forme pas de liaison hydrogène avec les molécules d'eau.
- Ces chaînes latérales repoussées ont tendance à se rapprocher, ce qui permet ainsi les interactions entre différentes parties d'une chaîne peptidique.
- Les interactions sont de type forces de Van Der Waals (figure 16).

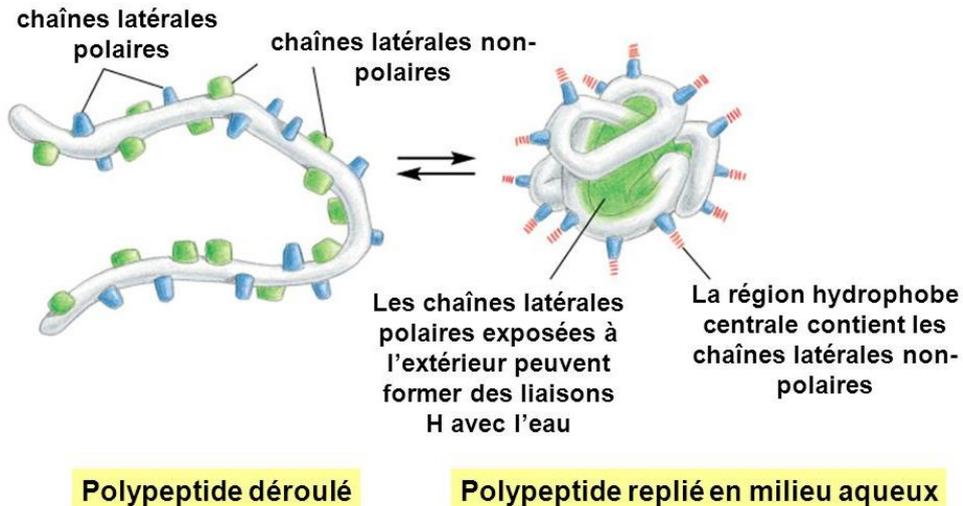
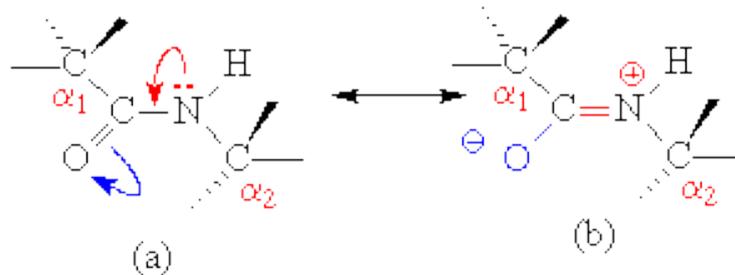


Figure 16. Participation de la liaison hydrophobe au repliement des protéines.

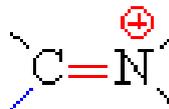
2. Propriétés spatiales de la liaison peptidique

- La liaison peptidique est formée par une réaction de condensation (élimination d'une molécule d'eau) entre le groupe α -COOH d'un aa et la fonction α -NH₂ d'un autre aa.
- La distance entre NH et CO de la liaison peptidique est de 1.32 Å, ce qui correspond dans une certaine mesure à une double liaison.
- La liaison peptidique est plane et rigide.
- La liaison peptidique peut s'écrire de deux façons (formes mésomères) (figure 17).



Figures 17. Les différentes formes mésomères de la liaison peptidique.

- Elle possède donc un caractère de double liaison =, ce qui implique donc que tous les atomes figurant sur la figure 17 (C_{α_1} , C, N, O, H et C_{α_2}) soient coplanaires.
- En outre, il existe une possibilité d'isomérisation Cis-Trans pour les deux carbones C_{α_1} et C_{α_2} par rapport à cette liaison.



- Dans les peptides et les protéines naturels, on trouve essentiellement la configuration plane Trans.

- Chaque plan comprend 6 atomes.
- Les plans sont articulés entre eux autour des carbones par libre rotation (figure 18):
 - Angle phi (ϕ , C α -N).
 - Angle psi (Ψ , C α -C) du même aa.
- Ces angles sont définis par la position relative des 4 atomes de la chaîne principale.
- Les angles qui sont dans le sens horaire ont une valeur positive et les angles qui sont dans le sens antihoraire ont une valeur négative.
- Les angles de rotation se situent entre -180° et $+180^\circ$.

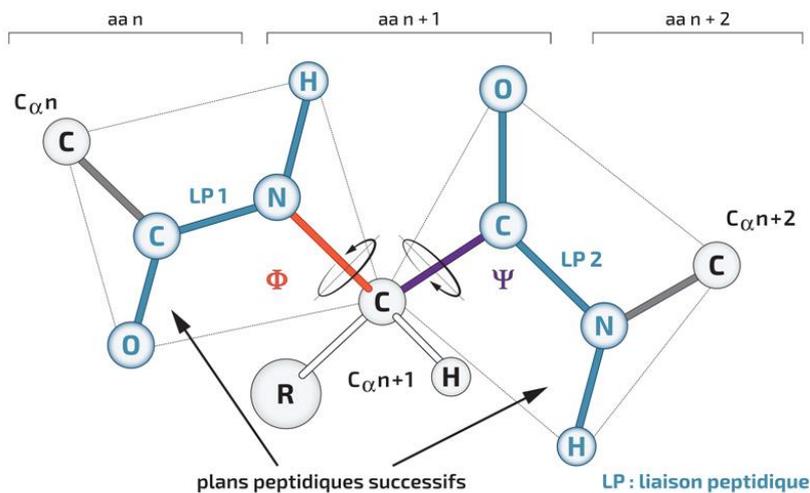


Figure 18. Agencement spatiale de la liaison peptidique.

- Par convention le premier aa porte le NH₂ libre (extrémité N-terminale du peptide) et le dernier le COOH libre (extrémité C-terminale).
- Le peptide ou la protéine se lit et s'écrit de gauche à droite
- Les chaînes radicalaires se positionnent alternativement au-dessus et au dessous du plan formé par le squelette peptidique selon une isomérie du type Trans (figure 19).

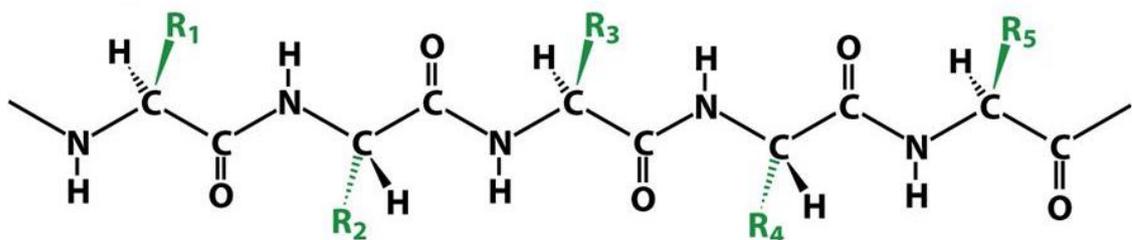


Figure 19. Positionnement des chaînes radicalaires dans ne protéines ou un peptide.

3. Structure primaire des protéines

- La succession des aa d'une protéine forme la structure primaire (figure 20).
- Les liaisons peptidiques sont doc à la base de la structure primaire, mais ce ne sont pas les seules liaisons.
- En effet les protéines sont formées de plusieurs chaines polypeptidiques différentes.
- Ces chaines sont unies entre elles par des liaisons secondaires, en particulier des liaisons hydrogènes et par des ponts S-S. ces ponts disulfures provoquent des distorsions des chaines polypeptidiques.

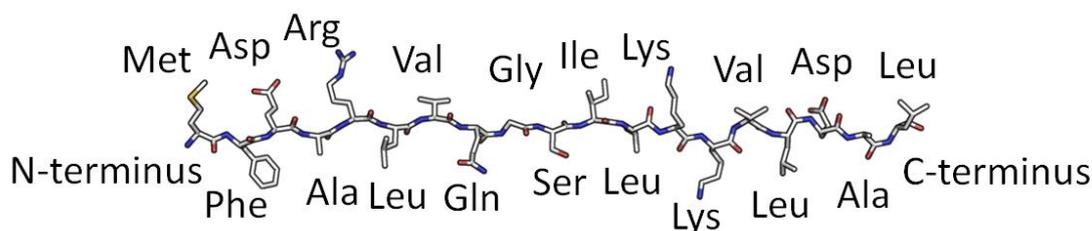


Figure 20. Structure primaire d'une protéine.

4. Structure secondaire des protéines

- C'est l'analyse des diagrammes en diffraction des rayons X qui a fourni les données pour cette étude structurale.
- Les chaines latérales des aa formant la chaîne polypeptidique jouent un rôle important dans l'établissement de la structure secondaire (hydrophobe, hydrophile, charge, encombrement stérique).
- On distingue en général deux types principaux de structure secondaire ordonnée : l'état étiré (feuillet β) et l'état hélicoïdal (hélice α).
- Ces structures sont stabilisées par l'établissement de liaisons hydrogènes entre groupe C=O et N-H des liaisons peptidiques.
- Toutes les liaisons peptidiques contribuent au maintien de la structure secondaire.

4.1.L'hélice α

- La plupart des protéines ont des régions possédant une structure en hélice α que l'on peut imaginer aisément comme un enroulement autour d'un cylindre imaginaire, formant une spirale régulière.
- L'hélice est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les groupes C=O et N-H distants de 4 résidus dans la séquence primaire (figure .
- Le pas de l'hélice α est de 5.4\AA et correspond à la hauteur entre 2 spires et 3.6 restes d'aa ou résidus.

- La période est la distance (27\AA) séparant 2 résidus se retrouvant exactement dans la même position, ce qui se produit tous les 18 résidus soit cinq tours de spires.
- La structure en hélice est favorisée par les aa à chaînes latérales volumineuses qui sont orientées vers l'extérieur par rapport à l'axe de l'hélice.
- La proline est défavorable à l'hélice α .

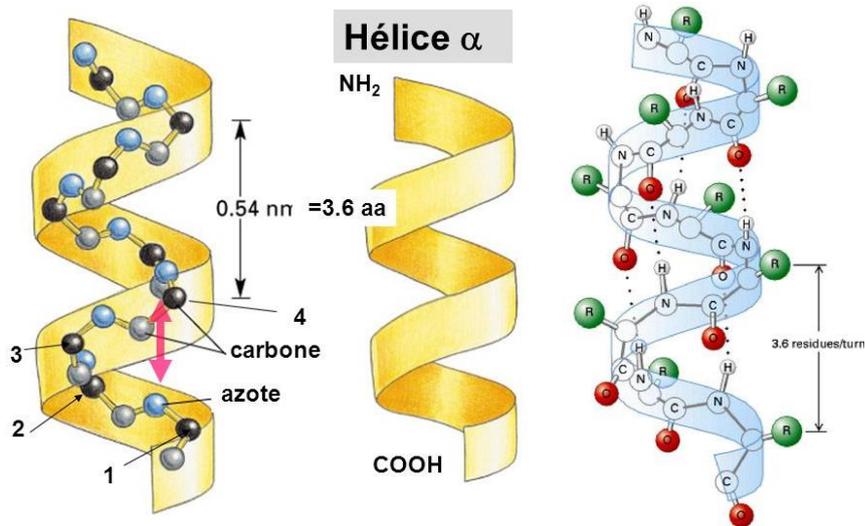


Figure 21. Structure ordonnée en hélice α d'une protéine.

4.2. Brin et feuillet β

- D'autres protéines ou régions de protéines ont une conformation β qui est une structure en feuillets successifs formant un angle entre eux.
- Cette structure est également stabilisée par des liaisons hydrogènes.
- Le brin β est une structure étirée
- Les chaînes latérales sont situées alternativement au-dessus et en-dessous du plan formé par le squelette peptidique (figure 22)..
- La période est la distance séparant 2 radicaux situés en cis. Elle est d'environ 7\AA .

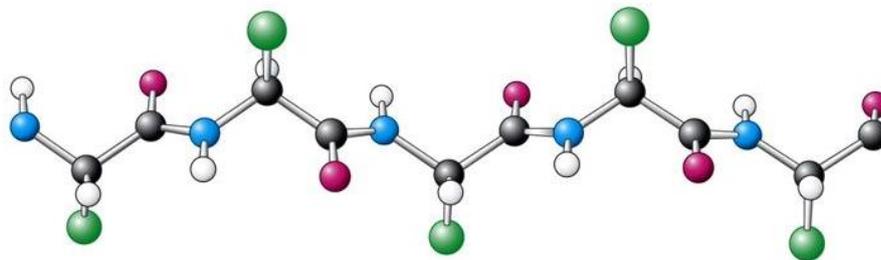


Figure 22. Structure étirée en zig-zag du brin β

- Le feuillet plissé β correspond à deux brins β adjacents s'alignant pour former un feuillet.
- Les liaisons hydrogènes entre les groupes CO=NH des 2 brins stabilisent la structure.
- Il existe (figure 23) :
 - Les feuillets β antiparallèles : les chaînes peptidiques sont orientées en sens opposé.
 - Les feuillets β parallèles : les chaînes peptidiques sont orientées dans le même sens.
- Les feuillets β antiparallèles sont plus stables que les feuillets β parallèles.
- La structure en feuillet β est favorisée par les aa à chaînes radicalaires courtes.
- La proline est défavorable à la formation de feuillet β .

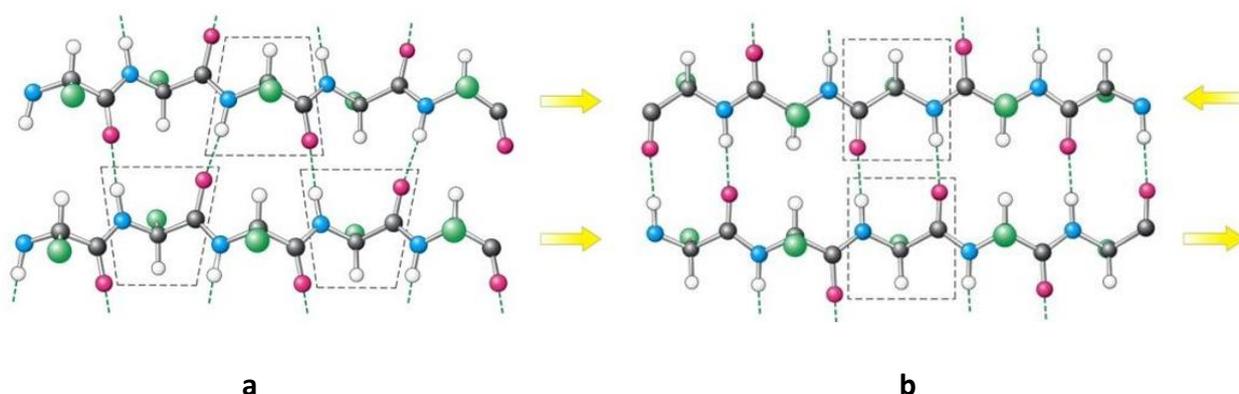


Figure 23. Structure en feuillets β (a) parallèles et (b) antiparallèles.

4.3. Les coudes

- En dehors des hélices α ou des feuillets β , des séquences courtes en aa adoptent des structures désordonnées formant des coudes (figure 24).
- On distingue :
 - Les tours : 2 à 4 aa connectant 2 brins β antiparallèles.
 - Les boucles : en général une dizaine de résidus qui relie des feuillets β , ou un feuillet β et une hélice α . Généralement situées à la surface, les boucles forment des sites d'interactions moléculaires (fixation d'Ag ou un ligand par exemple)
- Les enchainements d'hélices α et /ou de brins β par les tours et les boucles forment des superstructures secondaires.

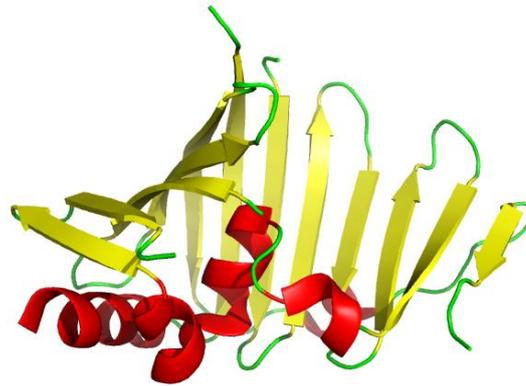


Figure 24. Structures désordonnées connectant les structures secondaires ordonnées.

5. La structure tertiaire

- Les protéines contiennent des régions formées d'hélice α , des feuillets β , des régions sous structures rigides (des coudes), des repliements souvent dus à la présence de la proline (figure 25).
- La structure spatiale complète d'une protéine est sa structure tertiaire. La détermination de celle-ci met en jeu des méthodes physiques et plus particulièrement la méthode de diffraction aux rayons X.
- C'est la configuration globale d'une protéine après repliement des régions en hélice α et en feuillet β sur elles mêmes (figure 25).

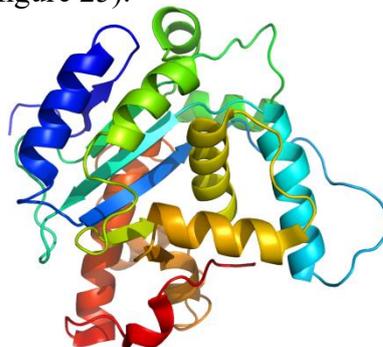


Figure 25. Structure tertiaire d'une protéine.

- La structure tridimensionnelle est nécessaire aux propriétés biologiques des protéines. Elle est imposée par la séquence en aa.

- Les protéines peuvent avoir une structure globulaire (prédominance d'hélice α) ou fibreuse (prédominance de feuillet β).
- Dans l'ensemble, les aa à groupement hydrophobe sont localisés dans l'intérieur de la molécule, les liaisons hydrophobes participent ainsi de manière importante à la stabilité de la structure.
- Les groupements hydrophiles sont situés à la surface de la molécule.
- Les autres liaisons faibles interviennent également, liaisons hydrogènes et liaisons électrostatiques.
- En général, la structure tertiaire est influencée par 4 types d'interactions (liaisons de faibles énergies).
- Les ponts disulfures stabilisent la structure tertiaire de la protéine.

6. La structure quaternaire

- Cette structure concerne certaines protéines composées de plusieurs chaînes polypeptidiques, ou sous unités, associées entre elles par des liaisons faibles (figure 26).
- Les sous unités peuvent être identiques ou différentes ayant chacune une structure primaire et secondaire.

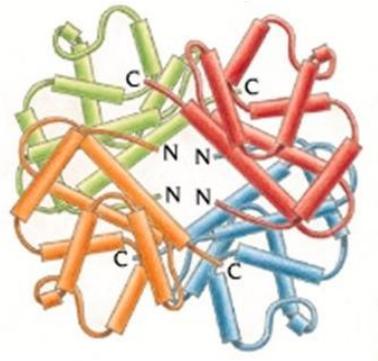


Figure 26. La structure quaternaire d'une protéine.