

Chapitre III: Peptides et protéines

III.1. Généralités

Les peptides et les protéines sont le résultat de l'enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par une liaison covalente qui est en fait une **liaison peptidique** formée par déshydratation entre le groupement amine d'un acide aminé et le groupement carboxyle d'un autre acide aminé. (**Figure.1**). C'est la peptidyltransférase qui assure la liaison peptidique au niveau du ribosome.

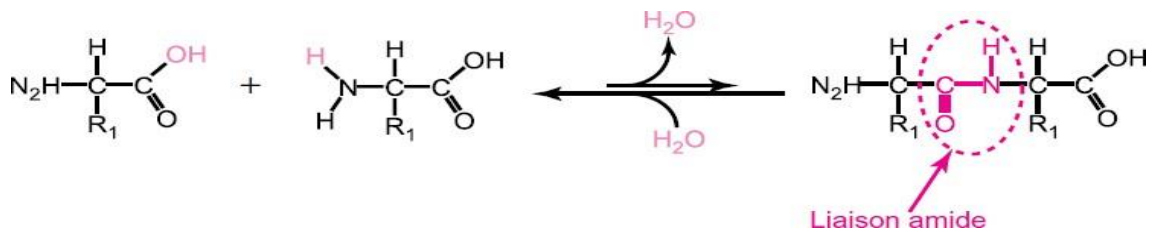


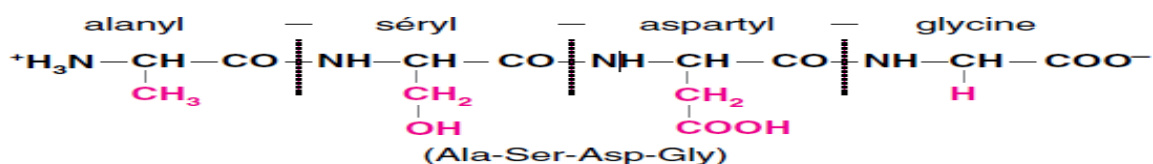
Figure 1. Liaison peptidique entre deux aminoacides.

On distingue, en générale:

- les oligopeptides: dipeptides (formés par l'union de 2 aminoacides), tripeptides (3 aminoacides).
- les polypeptides: à partir des tétrapeptides.
- les protéines sont des polypeptides, mais nous verrons un peu plus loin qu'en plus des liaisons peptidiques unissant les aminoacides, d'autres types d'interactions interviennent pour conférer à la protéine une structure tridimensionnelle.

III.2. Structure primaire

L'enchaînement successif des acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique constitue la structure primaire ou séquence de la protéine. Dans cette structure chaque acide aminé prend le nom de résidu. Une séquence en acides aminés est toujours écrite en partant du résidu N-terminal. Pour décrire la séquence des acides aminés, le suffixe « -yl » est ajouté à tous les résidus, sauf au C-terminal.



III.2.1.Détermination de la structure primaire des chaînes peptidiques

III.2.1.1. Composition en acides aminés

a) Hydrolyse acide

Elle est difficile et lente, plusieurs jours sont nécessaires pour hydrolyser totalement les polypeptides. L'hydrolyse est conduite avec HCl 6N à une T° de 120°C

Les inconvénients de cette méthode sont nombreux :

-destruction totale du tryptophane

- les amides (glutamines et asparagine) sont transformés en acide glutamique et acide aspartique. Il faut déterminer l'ammoniac dans l'hydrolysate pour soustraire l'acide glutamique et l'acide aspartique provenant de leur amide respectif.

-Val, Leu et Ileu présentent des liaisons stériquement encombrées d'où la nécessité de faire plusieurs temps d'hydrolyse 24,48 à 72h.

b) Hydrolyse basique

On utilise la potasse (KOH) 4N à 100°C pendant 6 à 10h. Tous les acides aminés sont racémiques.

Après ces deux hydrolyses les acides aminés sont séparés par chromatographie.

c) Hydrolyse enzymatique

On distingue deux types d'enzymes :

-**Exopeptidase** : qui s'attaquent aux extrémités de la chaîne pour la raccourcir ; il existe deux sortes :

✓ Carboxypeptidases qui attaquent la chaîne par le bout -COOH.

✓ Aminopeptidases qui s'attaquent au bout NH₂.

-**Endopeptidases** : rompent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la chaîne, la pepsine, trypsine et chymotrypsine sont d'origine animale et la papaïne est d'origine végétale.

La pepsine s'attaque aux liaisons proches de la tyrosine et la phénylalanine.

La trypsine s'attaque aux liaisons proches de l'arginine et de la lysine.

La papaïne (latex du palmier), utilisée dans l'industrie, elle remplace l'hydrolyse acide car elle conserve le tryptophane.

III.2.1.2.Détermination des extrémités N et C terminales

Pour connaître la séquence des acides aminés il faut d'abord déterminer les acides aminés N- et C- terminaux, puis l'ordre d'enchaînement des autres acides aminés.

Les tableaux 1 et 2 donnent les principales méthodes utilisées.

Tableau 1. Détermination de l'acide aminé en position N-terminale.

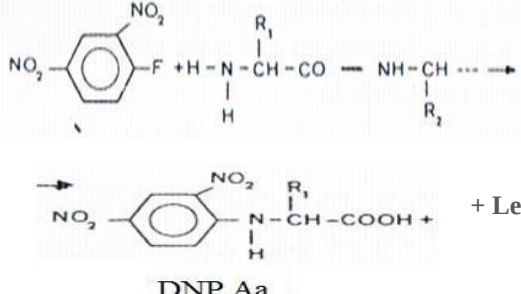
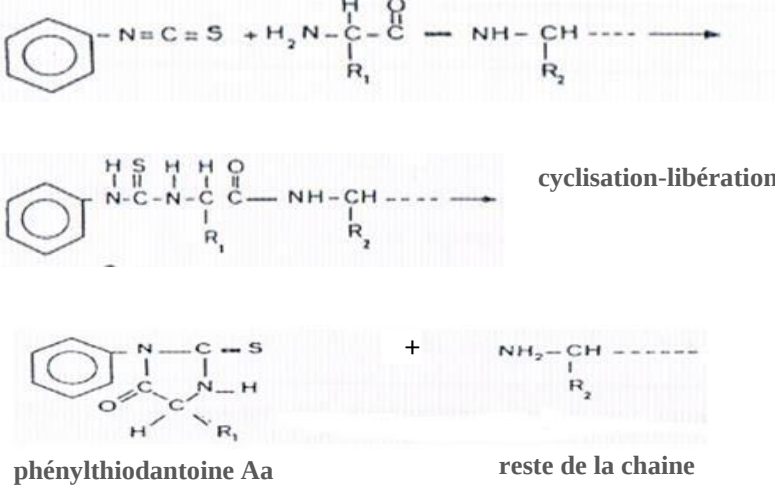
Méthodes	Réactions
Sanger par le dinitro-fluoro benzene	 puis hydrolyse + Les autres acides aminés DNP Aa
EDMAN ou méthodes par récurrence par le phényl-isothiocyanate	 cyclisation-libération phénylthiodantoine Aa reste de la chaîne
Dansyl ou chlorure de diméthyl amino 1-sulfonyl 5-naphtalène	 Tous les autres Aa non modifiés et un Dansyl-amino acide fluorescent PUIS HYDROLYSE
Amino-peptidase	-Enzyme spécifique qui hydrolyse la liaison peptidique impliquant l'acide aminé N-terminale  ACIDE AMINÉ N-TERMINAL LIBÉRÉ LE PREMIER

Tableau 2. Détermination de l'acide aminé en position C-terminale.

	Méthodes	Réactions
Acide aminé C-terminale	Méthodes chimiques	<u>Traitement par LiBH₄</u> LiBH₄ ou NaBH₄ réduit la fonction carboxylique en fonction alcool primaire $\begin{array}{ccc} \text{--- NH-CH-COOH} & \xrightarrow[\text{ET HYDROLYSE}]{\text{Li BH}_4} & \text{Rn-CH-CH}_2\text{OH} \\ & & \\ \text{Rn} & & \text{NH}_2 \end{array}$ + AUTRES ACIDES AMINÉS NON REDUITS
		<u>Hydrazinolyse</u> $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\text{CO} \text{ --- } \text{NH}-\underset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{CO} \text{ --- } \text{NH}-\underset{\text{R}_3}{\text{CH}}-\text{COOH}$ + n (NH₂ - NH₂) → formation d'hydrazides n-1 (H₂N-CH-CO-NH-NH₂) + l'acide aminé C-terminale libre
	Méthodes enzymatiques	- La carboxypeptidase A : Elle coupe les liaisons C-terminales sauf celles du glycolle et des acides aminés basiques - La carboxypeptidase B : Elle libère les acides aminés basiques - La pepsine et la papaine : sont peu spécifiques et sont surtout utilisés comme endopeptidase.

III.2.1.3. Fragmentation des chaînes peptidiques

Si la chaîne peptidique est trop longue, il faut au préalable la fragmenter en chaînes plus courtes qui seront analysées séparément (tableau 3).

Tableau 3. Fragmentation des chaines peptidique.

Réactifs	Spécificité
Trypsine	Elle coupe spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le –CO– d’un maillon correspondant à un acide aminé basique. $\text{--- NH-CH(R}_1\text{)-CO} \xrightarrow{\quad} \text{NH-CH(R}_2\text{)-CO ---}$ R₁= Lys ou Arg
Chymotrypsine	Elle attaque spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le –CO– d’un maillon correspondant à un acide aminé aromatique. $\text{--- NH-CH(R}_1\text{)-CO} \xrightarrow{\quad} \text{NH-CH(R}_2\text{)-CO ---}$ R₁= Phe, Tyr, Trp
Pepsine	Spécificité plus faible, elle coupe la liaison peptidique impliquant le –NH– d’un maillon correspondant à un acide aminé aromatique. $\text{--- NH-CH(R}_1\text{)-CO} \xrightarrow{\quad} \text{NH-CH(R}_2\text{)-CO ---}$ R₂= Phe, Tyr, Trp
BrCN	Coupe la liaison peptidique impliquant le –CO– d’une Met et transforme le résidu Met en HSL (homosérine lactone).

III.3. Structure secondaire

C’est l’organisation de la chaîne polypeptidique dans l’espace par intervention des liaisons Hydrogène entre éléments constitutifs proches. Cette structure due à la répétition d’un motif structural de base.

On distingue en générale deux types principaux de structure secondaire : l’état étiré (feuillets plissés β) et l’état hélicoïdal (hélice α).

a. ETAT étiré ou structure en feuillets plissés β

Les protéines fibreuses possèdent ce type de conformation, schématisé à la **figure 2**. On voit deux chaînes polypeptidiques antiparallèles, unies par des liaisons hydrogène interchaînes. Les atomes de la liaison peptidique sont situés dans un même plan, mais les carbones α appartiennent simultanément à deux plans différents.

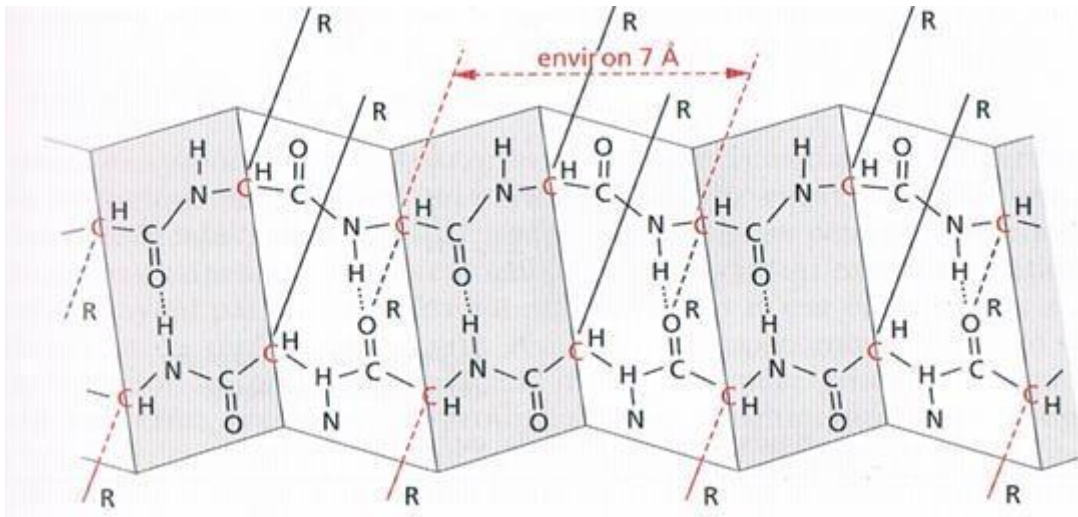


Figure 2. État étiré ou structure en feuillets plissés.

b. Etat hélicoïdal ou hélice α

L'hélice α est représentée à la **figure 3**. On voit que la chaîne peptidique est maintenue dans cette configuration hélicoïdale grâce à des liaisons hydrogène intrachaîne. L'hélice comporte 3,7 résidus d'acide aminé par tour de spire. Les liaisons peptidiques forment entre eux un angle de 80° environ. Les chaînes latérales sont dirigées vers l'extérieur et peuvent réagir entre elles ou avec le milieu.

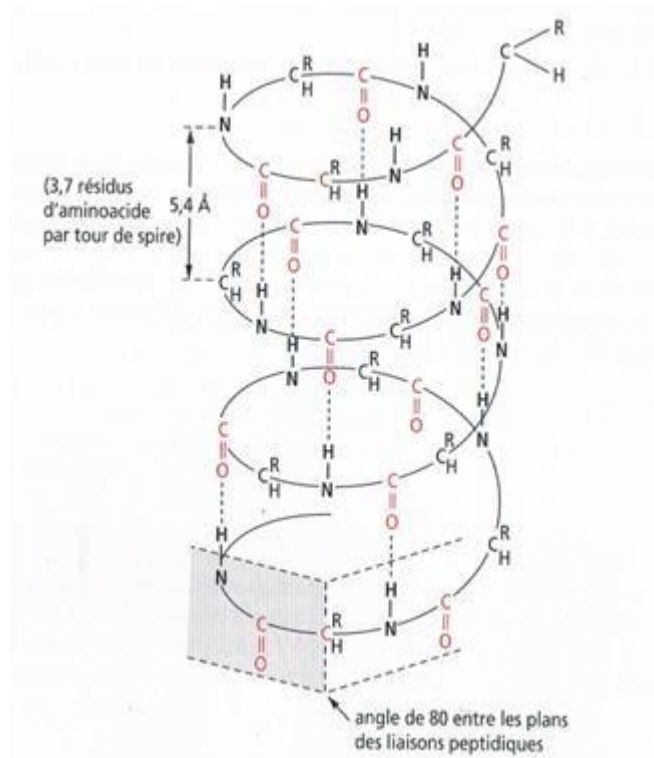


Figure 3. État hélicoïdal ou hélice α .

III.4. Structure tertiaire

C'est une structure tridimensionnelle compacte due au repliement et à l'enroulement de la chaîne polypeptidique sur elle-même par suite d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène, hydrophobes ou covalentes (ponts disulfures). Les chaînes latérales polaires des acides aminés se trouveront à la surface et hydratées, alors que les chaînes latérales non polaires (hydrophobes) seront dirigées vers l'intérieur, protégées du contact de l'eau. La **figure 4** schématise la structure tridimensionnelle de la myoglobine d'après des études effectuées par diffraction aux rayons X.

La structure tertiaire a une importance considérable chez les protéines douées d'activité biologique (enzymes).

Elle détermine la notion du site actif chez les enzymes.

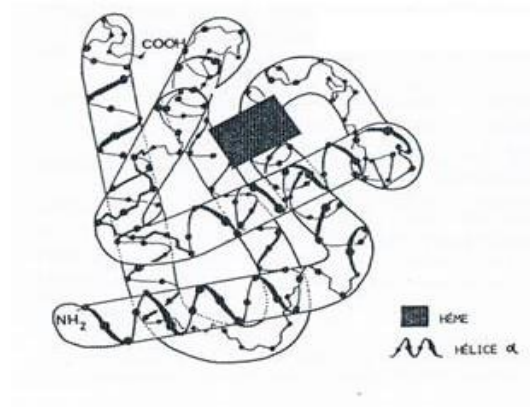


Figure 4. Structure tertiaire de la myoglobine.

III.5. Structure quaternaire (dans le cas de protéines formées de plusieurs sous- unités):

C'est l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques stabilisées par des liaisons de faible énergie (liaisons électrostatique, hydrogène ou hydrophobes) ou plus rarement des liaisons covalentes (ponts disulfures).

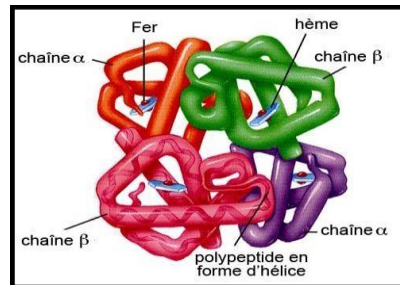


Figure 5. Structure quaternaire de l'hémoglobine, tétramère formée de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β .

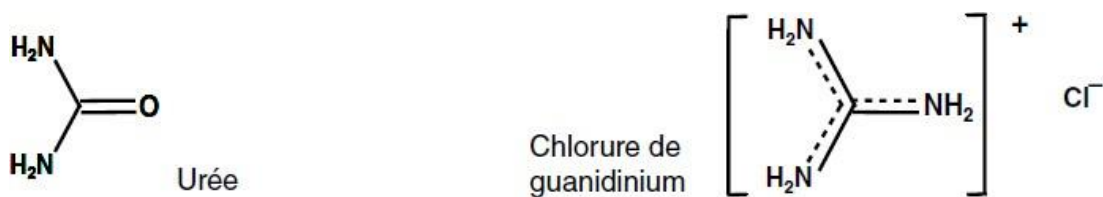
IV. Dénaturation des protéines

La dénaturation est une *désorganisation* de la structure interne (structures secondaire, tertiaire, quaternaire) des édifices protéique sans rupture de liaison peptidique, ce qui la différencie de l'hydrolyse.

Des facteurs physiques ou chimiques qui influencent ces interactions peuvent faire évoluer une protéine d'un état « natif » fonctionnel vers un état « dénaturé » non fonctionnel.

De nombreux paramètres peuvent entrer en jeu, mais trois facteurs sont particulièrement importants : la température, le pH, et la présence éventuelle d'agents dénaturants.

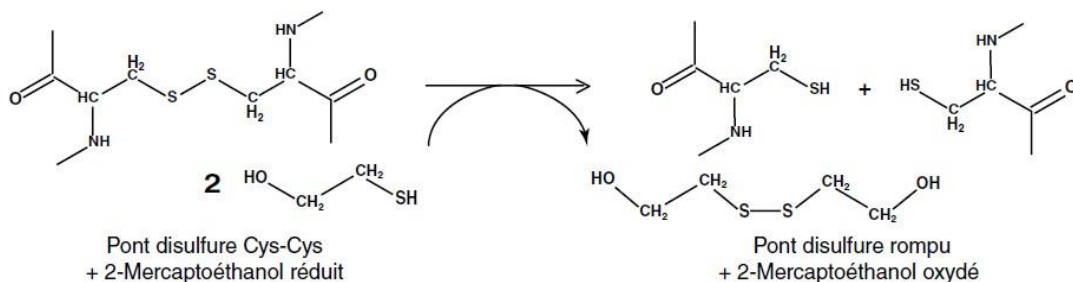
- la chaleur entraîne une perturbation des liaisons hydrogène et provoque la coagulation des protéines (c'est le cas de l'ovalbumine lors de la cuisson du blanc d'œuf). La plupart des protéines sont dénaturées vers 45°C.
- un pH très acide ou très alcalin dénature les protéines par perturbation des liaisons ioniques. L'acidité gastrique permet une dénaturation des protéines alimentaires, ce qui facilite leur digestion par la pepsine.
- Les *agents chaotropiques* comme l'urée ou le chlorure de guanidinium. Utilisés à des concentrations élevées (6 à 8 mol.L⁻¹), ils désorganisent la structure de l'eau, disloquent les liaisons hydrogène, affaiblissent les interactions hydrophobes et augmentent la solubilité de tous les groupements, polaires ou apolaires.



- Les **thiols** comme le **2-mercaptoéthanol** (ou β-mercaptoéthanol) ou le dithiothréitol (DTT).



Ces thiols réduisent les ponts disulfures formés entre des paires de résidus cystéine :



- Les *détergents* comme le **dodécylsulfate de sodium** (SDS, ou laurylsulfate de sodium). La chaîne carbonée du SDS s'associe avec les chaînes latérales apolaires (Leucine, Valine, Phénylalanine, etc.) et la partie ionisée (sulfonate chargé négativement) entre en contact avec le milieu aqueux. Ce détergent désorganise l'intérieur hydrophobe des protéines et donc déstabilise l'ensemble de la structure protéique.

