

## Les peptides / les protéines

On désigne par le terme de **protéome**, l'ensemble des protéines présentes dans l'organisme. Une protéine est le résultat de l'expression du génome à la différence des glucides et des lipides.

Il existe plusieurs milliers de protéines différentes et le nombre de protéines est largement supérieur au nombre de gènes.

Séquençage humain → environ 20 000 gènes

Mais plus de protéines / gènes car :

- épissage alternatif (x2 à 5) soit 50 000 à 100 000 ARN épissés)
- modification postraductionnelle x 50 à 100 soit environ 5 000 000 de protéines (en dehors des protéines du système immunitaire)

Donc protéines >>>>>gènes

- sans compter les réarrangements somatiques (Immunoglobulines et TCR= T Cell Receptor)

Dans l'organisme, les molec. les plus importantes après l'eau (protéines : 18 %)

### Une protéine est un polymère ordonné d'acides aminés.

Ce sont des polymères d'acides aminés. On distingue 2 types de protéines :

- peptides (chaîne courte)
- polypeptides ou protéines (enchaînement de plus de 20 aa).

Ces protéines peuvent correspondre à l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques.

Les protéines jouent un rôle crucial dans presque tous les processus biologiques : catalyse d'une réaction enzymatique, transport, mouvement cellulaire, excitabilité, croissance, différenciation...

\* Protéines solubles : transport et stockage de molécules, Ac, Complément, Coagulation, Enzymes, Hormones, cytokines, messagers intra-cytoplasmiques et facteurs de transcription, fluorescence (GFP)

\* Protéines membranaires : Canaux ioniques, récepteurs d'hormones et de cytokines, récepteurs du système immunitaire, molécule d'adhérence, jonctions cellulaires

Protéines structurales quantitativement très représentées : soutien tissu (ou trame) intra- et extra-cellulaire, protéines contractiles et motrices

Les aa sont liés entre eux par une liaison peptidique (appelée encore liaison amide) qui fait intervenir la fonction COOH en  $\alpha$  et la fonction NH<sub>2</sub> en  $\alpha$  entre 2 aa. On obtient ainsi une longue chaîne polypeptidique formée d'un squelette régulièrement répétitif et de chaînes latérales caractéristiques. L'extrémité aminée est prise comme origine de la chaîne polypeptidique ; on détermine alors une extrémité N-terminale et une extrémité C-terminale.

### - polarisation des extrémités

L'enchaînement est régulier lorsqu'une hydrolyse acide fournit des aa de la série L. Il est irrégulier lorsque le peptide ou la protéine renferme 1 ou plusieurs aa de la série D.

La présence de résidus cystéine (fonction -SH sur la chaîne latérale) permet la formation d'une liaison disulfure (ou pont disulfure). Cette propriété permet d'établir des liaisons intramoléculaires ou intermoléculaires.

**PM moyen d'un aa = 128**

**PM (eau) = 18**

**PM moyen d'un résidu d'aa = 110 = 128 - 18**

**Élimination d'une molécule d'eau à chaque liaison peptidique formée !**

**Si hexapeptide → 5 liaisons peptidiques donc élimination de 5 molécules d'eau.**

**Rigoureusement PM (peptide) = 6 x 110 + 18**

**Mais on peut faire approximation 6 x 110 et donc enlever une molécule d'eau à chaque aa**

## I. Conformation tridimensionnelle.

Une chaîne polypeptidique étirée au hasard ou disposée au hasard est dépourvue d'activité biologique. Sa fonction vient de sa conformation cad l'arrangement 3D des atomes au sein d'une structure.

La séquence en aa est très importante car elle va déterminer la conformation des protéines.

### Détermination de la séquence laire

Peut se faire à partir du gène en utilisant le code génétique.

Peut se faire à partir du mRNA avec la reverse transcriptase → obtention de cDNA → structure laire.

### 11. Structure laire

Correspond à l'enchaînement linéaire des aa liés entre eux par une liaison peptidique.

Cet enchaînement est dicté par la séquence en acide nucléique.

### 12. Structure laire.

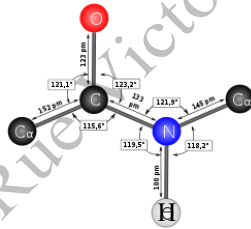
#### 121. Propriété spatiale de la liaison peptidique.

La liaison peptidique est une liaison plane (mésomérie).

Du fait du phénomène de mésomérie les liaisons -C=O et C-N possèdent une longueur de liaison intermédiaire entre une simple et une double liaison.

La liaison peptidique a été définie comme une unité rigide et plane.

Il existe un grand degré de liberté de rotation autour des liaisons de chaque côté de la liaison peptidique engendrant une isomérisation cis/trans pour les 2 carbones alpha.



Dans les peptides naturels, on trouve surtout une configuration trans pour la liaison CONH en raison de l'encombrement stérique sauf dans un cas où une proline est engagée dans la liaison.

Les 2 carbones alpha, le C, l'O, l'N et l'H de la liaison peptidique sont coplanaires.

#### 122. La liaison hydrogène

est une force intermoléculaire / une liaison non covalente.

Elle se forme entre un atome d'H et un doublet électronique non partagé d'un atome d'O ou d'N dans les cas des protéines.

Cette liaison est mise en jeu lors de la formation de la structure laire des protéines.

#### 123. L'hélice alpha.

La chaîne peptidique est enroulée selon un pas hélicoïdal.

Cette hélice (plus stable) est stabilisée par des liaisons hydrogène entre le N-H et le C=O de la chaîne principale distant de 3 résidus d'aa (résidu = aa qui se trouve dans une chaîne polypeptidique qui a perdu une molécule d'eau).

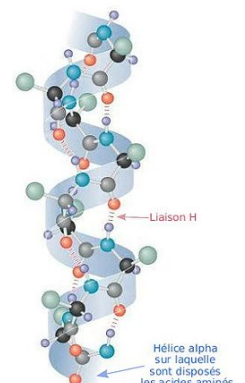
Tous les résidus sont ainsi reliés.

Le pas de l'hélice est de 5,4 angströms.

On compte 18 résidus sur 5 tours d'hélice donc 3,6 résidus par tour d'hélice.

Une hélice alpha est obtenue avec des aa d'une même série.

L'introduction d'un aa de la série D entraîne l'interruption de l'hélice alpha.



Le sens de l'hélice peut être gauche ou droite (la majeure partie).  
La présence de proline ou glycine va entraîner la formation de coude.

Si Poly-lys : qd les chaînes latérales sont chargés positivement à  $\text{pH} < 10,5$ , les hélices alpha sont déstabilisées.

Si Poly-asp : qd les chaînes latérales sont chargés négativement à  $\text{pH} > 4$ , les hélices alpha sont déstabilisées.

→ **Les liaisons électrostatiques sont plus fortes que les liaisons H donc hélices alpha déstabilisées.**

EX :

\* L'alpha-kératine dans les cheveux ou les poils

\* Collagène : triple hélice de collagène

1/3 de la masse des protéines de vertébrés  
contient des séquences répétées Gly-pro-X-Gly

#### 124. Le feuillet bêta.

Cette structure est presque totalement étirée.

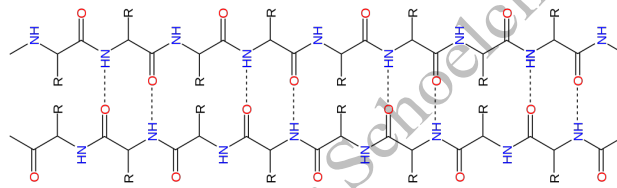
Elle s'établit entre deux segments de la protéine.

Elle est maintenue par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre le NH et le C=O de deux segments.

Il existe deux types de feuillet plissé bêta :

- Feuillet parallèle lorsque les chaînes vont dans le même sens
- Feuillet antiparallèle lorsque les chaînes sont en sens opposé.

Les feuillets plissés bêta peuvent exister à l'intérieur d'une chaîne protéique, mais aussi entre 2 chaînes protéiques.



#### **13. La structure tertiaire.**

Il s'agit du repliement spécifique des hélices alpha et des feuillets bêta. Les parties entre les hélices et les feuillets sont appelées des loops (coudes).

Le compactage de ces structures permet d'adopter une structure globulaire.

C'est le cas des protéines solubles dans l'eau : les aa hydrophiles (aa polaires) sont retrouvés à la surface et les aa hydrophobes (apolaires) dans le cœur.

Dans le cœur hydrophobe, on trouve généralement le site actif de la protéine qui comprend quelques aa polaires chargés.

Ces aa vont être capables d'interagir avec le ligand voire le substrat ou même le coenzyme (par exemple le PALP = phosphate de pyridoxal).

Au stade du compactage, on définit la notion de protomère ou monomère protéique.

#### 131. Le pont disulfure.

Liaison covalente forte qui s'établit entre deux résidus cystéines pouvant appartenir à la même chaîne polypeptidique ou à deux chaînes polypeptidiques différentes.

#### 132. Les liaisons hydrophobes

Les aa hydrophobes ne peuvent pas former de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau.

Ils ont tendance à se rapprocher et établir entre eux des liaisons faibles de type Van der Waals.

#### 133. Les liaisons ioniques-Les liaisons électrostatiques

Liaisons non covalentes / entre un radical chargé + et un radical chargé -.

Toutes ces interactions permettent de lier 2 parties d'une même chaîne.

#### 14. Structure IVaire.

Plusieurs chaînes polypeptidiques (plusieurs structures IIIaires / protomères / monomères/ sous-unités) peuvent s'associer de manière spécifique.

L'association de protomères donne des oligomères.

Cette association s'établit grâce à l'établissement de liaisons faibles (citées précédemment) voire fortes avec des ponts disulfures.

Les protomères associés peuvent être différents ou identiques.

## II. Production d'une protéine fonctionnelle.

ADN → ARN → Protéine

Après leur traduction les protéines subissent un certain nombre de modifications post-traductionnelle.

#### 21. Le repliement en structure 3D.

Le repliement est essentiel pour les fonctions biologiques des protéines :

Reconnaissance enzyme/ substrat, hormone / récepteur...

La structure 3D est dépendante de la séquence en aa et est fonction du pH, de la température, de la force ionique, de la présence de solvant organique

Donc de l'environnement.

Le repliement se réalise grâce à des enzymes :

- une liaison X-pro se replie plus rapidement en présence d'une peptidylprolylisomérases.
- les protéines chaperones facilitent un repliement correct de la protéine.

#### 22. Formation de pont disulfure.

#### 23. Perte du peptide signal et maturation par protéolyse des précurseurs des molécules actives.

Exemple : insuline

Elle est synthétisée sous forme d'une préproinsuline qui va être associée à la membrane par un peptide signal.

Ce peptide n'est pas organisé. 3 ponts disulfures se forment entre des résidus cys éloignés de la protéine : proinsuline.

Le peptide signal est éliminé par protéolyse ce qui donne l'insuline.

#### 24. Modifications des résidus d'aa.

- Glycosylation : fixation de sucres sur une chaîne polypeptidique réalisée par des enzymes = glycosyltransférases. Il existe 2 types de glycosylations : O-glycosylation (ser/thr/(Tyr non cité → à vérifier) et N-glycosylation (asn + gln)
- Glycation : fixation de glucose sur la lysine en général (pas besoin d'enzyme !)  
Mécanisme plus lent  
Exemple de l'hémoglobine glyquée dans le suivi du diabète  
Pas d'aa spécifié (donc la lysine n'a pas été citée → A vérifier)
- Phosphorylation des chaînes latérales de ser / tyr et thr : apport d'une charge négative induisant des modifications de la structure 3D → activation ou désactivation des protéines.
- Amidification du C-term : COOH → CONH<sub>2</sub>.
- Acylation
- Formylation : fixation d'un groupement aldéhyde.
- Méthylation, isoprénylation, hydroxylation, acétalisation, isomérisation (D en L), cyclisation.

#### 25. Polymorphisme

Nous sommes tous différents car nous avons des protéines exprimées avec de petites variations

Polymorphisme → mutations qui peuvent être rares et anormales et qui conduisent à un phénotype plus ou moins délétère (voire létal). Ces mutations peuvent être également neutres, silencieuses.

Certaines mutations ne se voient pas mais quand il y a une exposition à un pathogène, la réaction peut être diminuée.

### Hémoglobinopathie

HbS : mutation la plus fréquente dans le monde.

HbC : mutation  $\beta 6\text{glu} \rightarrow \text{lys cad}$  **E6K**

## 26. Synthèse des polypeptides

**Biologique :** - physiologique (ADN  $\rightarrow$  ARN  $\rightarrow$  protéine)  
- par génie génétique (ADN transfecté - ARNm-protéine recombinante) permet de produire des bio-médicaments (hormone de croissance /érythropoïétine) MAIS pb de glycosylation (les bactéries ne glycosylent pas / si la protéine a besoin d'être glycosylée pour être active, il faut utiliser des cellules eucaryotes)

**Synthèse chimique :** de petits peptides (15 à 20 aa)

Utilisation d'agents protecteurs pour orienter une réaction des fonctions N et C terminales, et des fonctions des chaînes latérales) avant synthèse de la liaison peptidique.

## 27. Protéinopathies

Agrégation "pathologique" suite à des protéines mutées, altération de l'environnement, inflammation...  
 $\rightarrow$  Structure tridimensionnelle altérée

Ex : \* Maladies à prions

Protéine PrPC (physio) ; Si elle adopte une conformation anormale riche en feuillets  $\beta$ , elle s'appelle PrPSc

PrPSc induit la transformation de prPC en PrPSc

Ce sont des modifications qui induisent l'agrégation et entraîne une accumulation cérébrale  $\rightarrow$  neuro-dégénérescence

\* Maladie d'Alzheimer

Protéine  $\beta$ -amyloïde qui s'agrège dans le cerveau

## 28. Notion de domaines

Parties de chaînes polypeptidiques particulières (20 à 300 aa) qui représentent des unités structurales et fonctionnelles particulières

Cela caractérise des protéines particulières (notion de chef de file) :

- domaine homologue aux Ig
- domaine homologue à la fibronectine
- domaine WSXWS (W : trp / S : ser) et CC conservées dans les récepteurs des cytokines
- Domaine SH<sub>2</sub>....

## 29. Méthodes d'étude de la structure 3D

Diffraction aux rayons X (après cristallisation)

RMN (en solution) si PM < 20 000 D

$\rightarrow$  nouvelles disciplines qui modélisent et prédisent le structure 3D par analogie

Mutagenèse dirigée

Ex : les immunoglobulines

2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées par des ponts disulfures .

Les régions variables voire hypervariables reconnaissent les Ag.

## III. Classification des protéines

### 31. En fonction de la forme

- **fibreuses ou fibrillaires** : constituées de fibres ou fibrilles par polymérisation de monomères souvent du à un enchaînement identique de séquences d'aa.

Riche en aa apolaires  $\rightarrow$  prot. quasi insolubles.

Peu diverses mais très abondantes

Ex : collagène, élastine, kératine.

- **globulaires** : essentielles, peu abondantes mais très diverses, forme sphérique et solubles.  
Ex : immunoglobulines, enzymes, albumine

### 32. En fonction de la composition

- **holoprotéines** : que des aa.
- **hétéroprotéines** : une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (apoprotéine) + une partie non protéique (groupement prosthétique lié par liaison covalente).  
Groupe très varié
- \* Phosphoprotéines (transduction du signal / stockage de phosphore)
- \* Métalloprotéines (fixe 1 ou plusieurs atomes de Fe, Mn, Cu, Mg, Co Zn) / le métal joue un rôle structural dans la conformation de la molec. et catalytique au niveau de l'activité enzymatique.  
Liaisons entre les deux parfois purement ionique.
- \* Glycoprotéines :  
Protéine liée à un sucre (glucose) : protéine glyquée  
Protéine liée à une chaîne glucidique ramifiée : protéine glycosylée
- \* Lipoprotéines : liée à un groupement lipidique par liaison covalente ou Van Der Waals
- \* Chromoprotéines : colorées en raison de la présence d'un métal (Fe, Cu,...) au sein d'un groupement prosthétique (Ex : myoglobine, hémoglobine)

### IV. Mise en évidence des fonctions biologiques

#### Etudes *in vitro*

- Modèles acellulaires
- Modèles cellulaires avec des cellules "fraîches" en culture primaire ou des cellules immortalisées

#### Etudes *in vivo*

- Induction ou blocage de synthèse
- Apport exogène de la protéine
- Transgéniques avec des modèles KO (expression détruite d'un gène) ou modèles Kin (hyper-expression d'un gène d'une même espèce ou non, voire d'un règne différent)

### V. Méthodes d'études

#### 51. Propriétés chimiques des protéines :

##### - Caractère amphotère

On rappellera ici que le caractère amphotère est la propriété de posséder des groupements acido-basique pouvant se comporter à la fois comme une base ou comme un acide. Une protéine possède, en général, une extrémité N term et Cterm + des chaînes latérales conférant à une protéine un caractère amphotère.

Calcul du pHi : prise en compte des extrémités N et C-term et les chaînes latérales qd elles sont ionisables.

Ex : ala-lys-val-glu

	3	4	8	10,5
( $\alpha$ COOH)glu	-	-	-	-
( $\gamma$ COOH)glu	0	-	-	-
( $\alpha$ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )ala	+	+	0	0
( $\epsilon$ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )lys	+	+	+	0

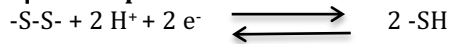
pHi = 6

##### - Absorption dans les UV

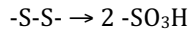
Les protéines absorbent dans les UV à 220-230 nm mais les résidus aromatiques (Trp, Phe, et Tyr), grâce à la présence d'électrons  $\pi$ , absorbent à 280 nm. Cette propriété peut permettre l'évaluation de la concentration de la protéine en solution

- **Urée (ou guanidine hydrochloride)** : dissociation des chaînes maintenues par des liaisons non covalentes, réversible.

-  **$\beta$ -mercaptoéthanol ou dithiothréitol (DTT)** : rupture **réversible** des ponts disulfures.



- **l'acide performique** : rupture **irréversible** des ponts disulfures.



#### - Hydrolyse chimique

Cette hydrolyse s'effectue avec de l'HCl 6M, à 110°C, pendant 24 heures. Elle est alors totale. Il faut remarquer que le résidu Trp est détruit et que les résidus Asn et Gln sont transformés en Asp et Glu et libère des ions ammonium ou dégagement de diazote.

### 52. Détermination de la structure laire

#### - Hydrolyse chimique :

\* Hydrolyse acide : détermination de la composition en aa

\* hydrolyse par le bromure de cyanogène (BrCN) hydrolyse la liaison peptidique à droite de la Met (côté COOH).

#### - Hydrolyse enzymatique

Cette hydrolyse s'effectue avec des peptidases. Ces enzymes sont spécifiques :

- **aminopeptidases** : hydrolyse récurrente (ne s'arrête pas) de l'aa N-term sauf si pro.

- **carboxypeptidases** : hydrolyse récurrente de l'aa C-term

- carboxypeptidases A : coupent toutes les liaisons sauf Lys et Arg et pro

- carboxypeptidases B : libèrent uniquement Lys ou Arg

- **prolinase** : libère pro en N-ter

- **prolidase** : libère pro en C-ter

- **endopeptidases** : hydrolyse à l'intérieur de la chaîne

- Trypsine (enz du suc gastrique) : coupure à droite de Lys et Arg.

- Chymotrypsine (enzyme du suc pancréatique) : coupure à droite des aa aromatiques.

#### - Identification du N-term

##### \* Réaction avec le dinitrofluorobenzène : réaction de Sanger

Cette réaction est utilisée pour déterminer l'aa N-term. La fonction amine primaire libre réagit avec le dinitrofluorobenzène (DNFB). On obtient un dinitrophénylpeptide (DNPaa). Cette liaison est plus stable que la liaison peptidique. Après hydrolyse par HCl, on obtient un mélange d'aa dont l'aa N-term-DNP facilement identifiable par chromatographie sur papier. Cette réaction est non récurrente.

##### \* Réaction avec le phénylthiocyanate: réaction d'Edman

Elle permet également de mettre en évidence les aa N-term sous forme de PTH-aa (phénylthiohydantoïne-aa). Cette réaction est récurrente car elle ne nécessite pas l'hydrolyse acide totale de la protéine mais une hydrolyse diluée pour libérer le pTH-aa N-term identifiable. Cette technique peut être automatisée pour déterminer ainsi la séquence en aa d'un peptide.

#### - Identification du C-term : Réaction avec l'hydrazine : l'hydrazinolyse

L'hydrazine, à 100°C, rompt les liaisons peptidiques et transforme les aa en hydrazides sauf l'aa C-term qui est libre et facilement identifiable.

### 53. Méthodes d'étude analytique et préparative.

#### Méthodes de fractionnement - purification - caractérisation des protéines (liés aux propriétés physico-chimiques)

- Chromatographies
- Gel filtration
- Echange d'ions

Rem : Qd élution avec variation de pH  $\rightarrow$  chromatofocalisation.

- Affinité
- Hydrophobe (longue chaîne carbonée fixée sur support, élution par solvant organique)

- Electrophorèse
  - De zone (+/- qualitatif et quantitatif)
  - SDS-PAGE (PM)
  - Isoélectrofocalisation (pHi)
  - Electrophorèse bi-dimensionnelle
  - Western blot
- Ultracentrifugation
- Précipitation fractionnée
  - Sels (sulfate d'ammonium)
  - Solvants organique
- Dialyse

### Quelques techniques plus en détails...

#### - Technique de chromatographie :

\* **échangeuses d'ions** : voir aa

\* **gel filtration** : Permet de séparer les protéines selon leur PM (poids moléculaire).

Colonne de chromatographie remplie d'un polymère de polyosides (gel) qui peut être assimilé à des billes de porosité variable mais déterminé formant un tamis moléculaire.

Les protéines de taille importante ne sont pas ralenties : elles ne pénètrent pas à l'intérieur des billes / elles restent à l'extérieur.

Les protéines de petite taille sont ralenties et pénètrent dès qu'elles le peuvent dans une bille.

Les protéines de taille intermédiaire se distribuent entre l'intérieur et l'extérieur des billes de gel.

Ordre de l'élution = protéines de grand PM – PM moyen – petit PM

Détermination du PM par représentation graphique  $\log PM = f(\text{Volume d'élution})$

#### \* **Chromatographie d'affinité** :

Méthode de purification d'une protéine X dans un mélange.

Colonne de chromatographie contenant une phase solide sur laquelle sont fixés des Ac antiprotéine X.

Dépôt du mélange au sommet de la colonne / Fixation de la protéine X sur la phase solide / Lavage /

Elution de la protéine X par modification du pH ou de la force ionique.

#### - Technique d'électrophorèse

\* **Electrophorèse de zone** : voir aa

\* **SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Migration en fonction du PM

SDS : Détergent polyanionique / confère une charge globalement négative à la protéine.

Le gel forme des mailles au travers desquelles les protéines migrent.

Plus la protéine a un PM élevé, moins elle migre.

Détermination du PM par représentation graphique  $\log PM = f(\text{Distance de migration})$

#### \* **Western Blot : SDS-PAGE + identification spécifique d'une protéine X**

SDS-PAGE / transfert sur membrane de cellulose / incubation avec Ac antiprotéine X de lapin par ex./ lavage / incubation avec Ac anti-lapin sur lequel est greffé un enzyme / lavage / incubation avec le substrat de l'enzyme (produit coloré par exemple) / Révélation de la protéine.

## VI. Les dosages et les détections

**61. Les protéines totales** en g/L et non en Molarité ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) car différentes protéines et donc différents PM

\* **Réaction du Biuret ( $> 1\text{g.L}^{-1}$ )**

en milieu alcalin

la liaison peptidique réagit avec du  $\text{CuSO}_4$  pour aboutir à une coloration violette.

Mesure l'absorbance à 550/560 nm au spectrophotomètre.



**\* Réaction de Lowry**

La sensibilité est de  $> 10 \text{ mg.L}^{-1}$   
Le réactif réagit avec tyr et trp → coloration jaune

**\* Mesure de l'absorption dans les UV à 280 nm**

Mesure par l'intermédiaire des aa aromatiques.

**62. Les protéines spécifiques**

Ces dosages sont basés sur les propriétés biologiques (enzymes, complément, les hormones) et sur les propriétés physico-chimiques.

**\* Immuno-électrophorèse :**

Electrophorèse couplée à la détection des protéines par des anticorps monoclonaux.

**\* Immunonéphélométrie :** mesure du trouble formé par le complexe Ag-Ac monoclonal à l'aide d'un laser.  
sensibilité ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  → A vérifier cette année)

**\* ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay :**

Réaction enzymatique couplé à la détection de protéines par les anticorps monoclonaux.  
Conc. proportionnelle à l'absorbance ou DO  
( $1 \text{ ng.L}^{-1}$  ou  $1 \text{ pg/mL}$  → A vérifier)

IPECO-57/59 Rue Victor Schoelcher-36000 Poitiers