

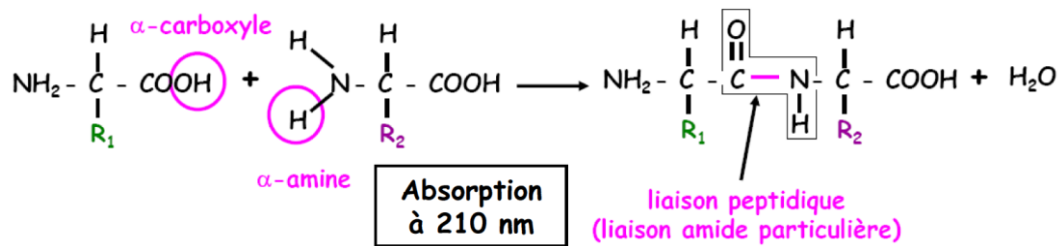
Peptides et protéines

Définition : Enchaînement **séquentiel** et **linéaire** d'AA

Il existe dans les **protéines natives** (protéines dans leur conformation fonctionnelle) quatre niveaux de structure.

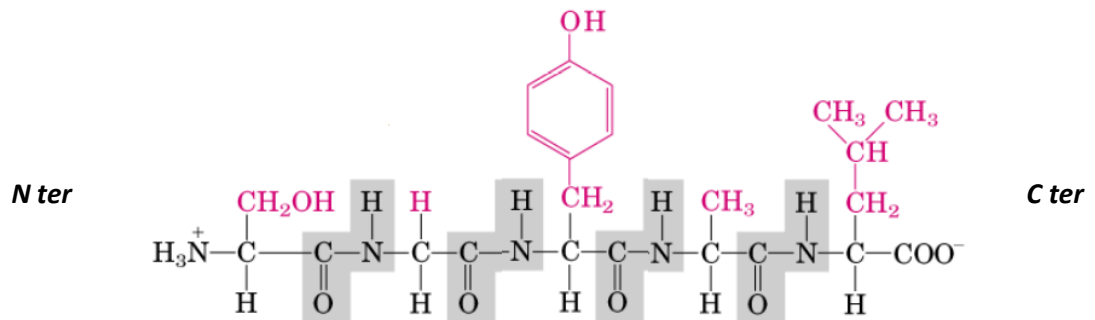
Structure primaire des peptides et des protéines

La liaison peptidique (= liaison plane)



Pentapeptide : SGYAL ou Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu

Sens de lecture : *N terminal* → *C terminal*



La liaison peptidique est rompue par **hydrolyse acide**

Mais **W** → **détruit** (il pourra être dosé après une hydrolyse alcaline)

N → **D**

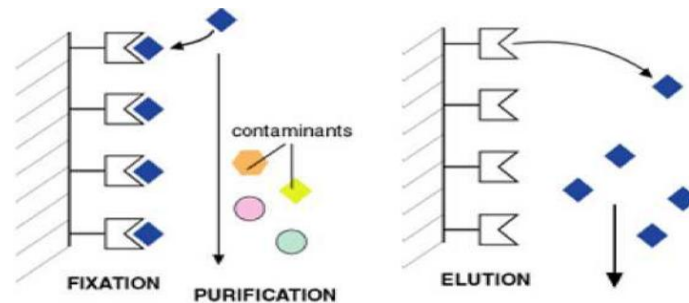
Q → **E**

Notion d'épitope et chromatographie d'affinité

Fixation d'anticorps sur les billes → Rétention des antigènes par reconnaissance des ses **épitopes**

Fixation de récepteurs sur les billes → Rétention du ligand

Elution par variation du pH (car interaction électrostatique entre récepteur et ligand)



La masse moyenne d'un AA dans une chaîne (= résidu d'AA) est d'environ **110 Dalton (Da)**

Exemple de question : « Estimer la molarité d'une solution à 1,5% d'un peptide de 30 AA »

PM moyen d'un AA dans une chaîne : 110 Da (1 mole = 110 g)

PM moyen du peptide : $30 \times 110 \text{ Da} = 3300 \text{ Da} = 3,3 \text{ kDa}$

Solution à 1,5% = $1,5 \text{ g}/100\text{mL} = 15 \text{ g/L}$

Donc dans 1L, il y a $15/3300 = 0,0045$ mole

Réponse : $4,5 \text{ mmol/L} = 4,5 \text{ mM}$

Autre question : « Quel est le PM d'un tétra-peptide de Glycine ? »

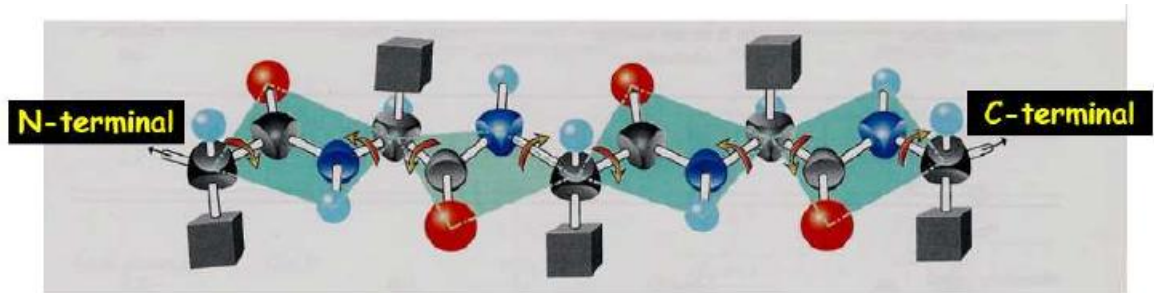
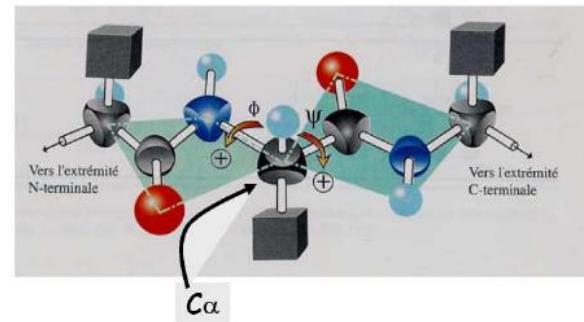
PM glycine = 75 Da

PM du tétra-peptide = $4 \times 75 - 3 \times 18 (H_2O) = 246 \text{ Da}$

Structure secondaire des peptides et des protéines

Propriétés géométriques de la liaison peptidique

- **Liberté de rotation de l'angle ϕ** (phi) entre le $C\alpha$ et l'azote amidique
- **Liberté de rotation de l'angle ψ** (psi) entre le $C\alpha$ et le groupe carbonyle



- **Liberté de rotation entre le carbone et l'azote** : géométrie cis et trans

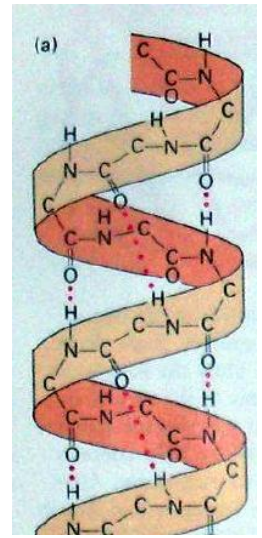


Contraintes supplémentaires

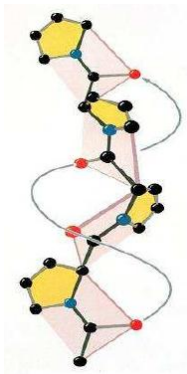
- **Résidu proline** : entraîne un changement d'orientation (tendance à induire des liaisons en cis par rapport aux autres AA)
- **Encombrement stérique** des chaînes latérales
- **Liaisons hydrogènes** impliquant les atomes de la liaison peptidique et les AA portant un groupement OH : permet le maintien des structures II^{aire}
- **Interactions électrostatiques** entre AA chargés

L'hélice α

- Angle entre 2 liaisons peptidiques = 100° soit 3,6 AA par tour
- Pas de l'hélice (distance entre 2 tours) = 0,54 nm
- Longueur d'un AA = 0,15 nm
- Chaînes latérales situées à l'extérieur
- Stabilité assurés par des liaisons hydrogènes (environ 4 par tour tous les 4 AA) et des liaisons électrostatiques
- Généralement, on ne trouve pas de proline au sein des hélices α
- Souvent des hélices droites



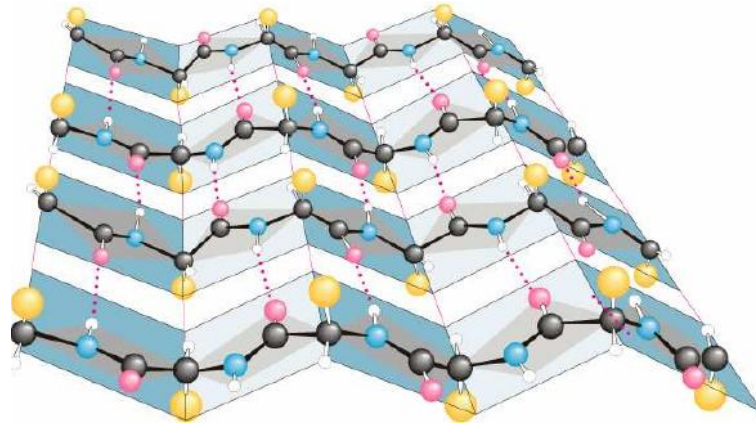
Hélice de polyproline (hélice gauche au pas allongé)



Hélice gauche et droite

Feuillet β plissé

- Angle entre 2 AA = 160°
- Distance entre 2 AA = 0,35 nm
- Distance entre 2 feuillets = 0,7 nm
- Chaînes latérales situées successivement en-dessus et en-dessous du feuillet
- Stabilité entre 2 chaînes assurée par des liaisons hydrogènes

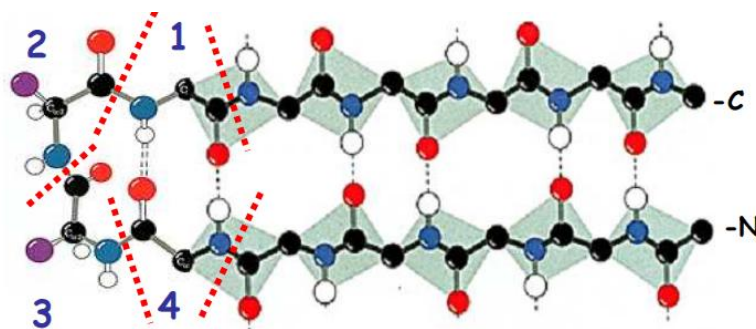


Feuillet β parallèle

Feuillet anti parallèle

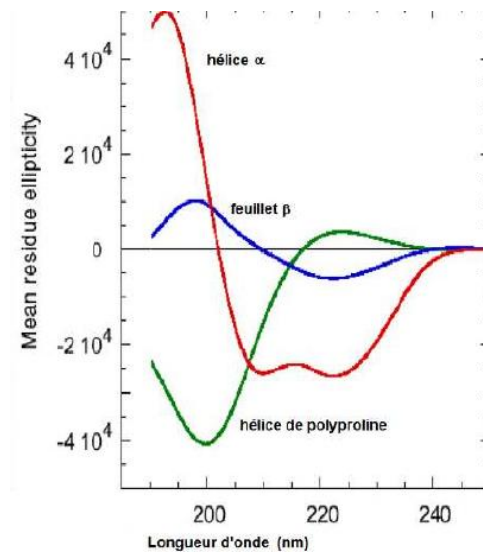
Coude β

- Associé à un feuillet anti parallèle
- Constitué de 4 AA (souvent Proline) avec un encombrement stérique faible (Gly, Ser)
- Stabilité assurée par des liaisons hydrogènes entre le 1^{er} et le 4^{ème} AA



Méthodes biophysiques d'étude des structures secondaires

- **Spectrométrie IR** : absorption d'énergie différente entre hélice et feuillet (donne une idée sur le pourcentage de ces structures)
- **Dichroïsme circulaire** : absorption différente de la lumière polarisée

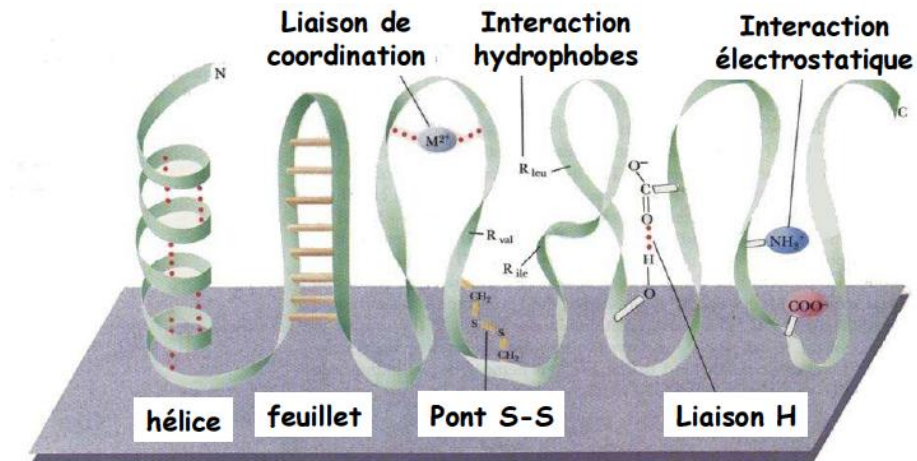


Structure tertiaire

= **Structure fonctionnelle** des protéines natives (protéines n'ayant pas de structure IV^{aire})

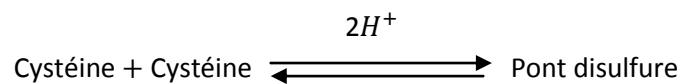
Toutes les protéines possèdent une structure tertiaire (et non tous les peptides)

Forces impliquées dans le maintien de la structure III^{aire}



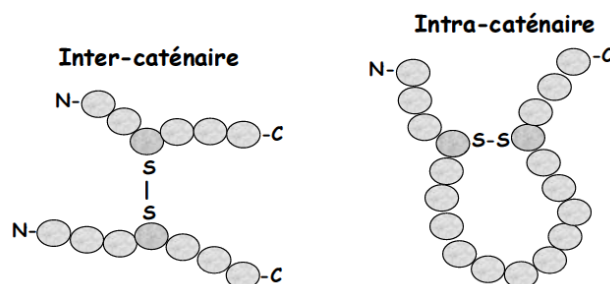
Il existe une **relation entre la structure et la fonction** (ex : enzyme / substrat)

Les ponts disulfures



Agent réducteur : **β -mercaptoéthanol**

Permet de rompre les ponts



Les **protéines chaperonnes** aident au repliement des protéines et à la création de ponts disulfures

Exemple : *protéine disulfide isomérase* (modification des ponts disulfures)

Les ponts disulfures sont rarement présent dans les protéines cytoplasmiques (cytoplasme = milieu réducteur)

Méthodes biophysiques d'étude des structures tertiaires

- **RMN** : reconstitution en 3D de la protéine

La protéine doit être présente en grande quantité, pure et soluble

- Limitation de taille de la protéine : faible PM (<100 kDa)

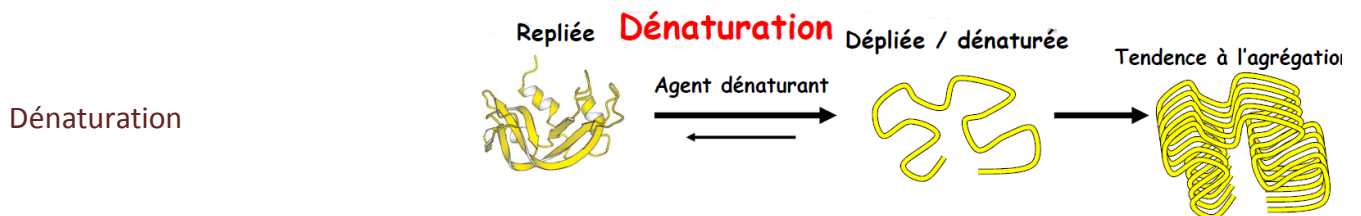
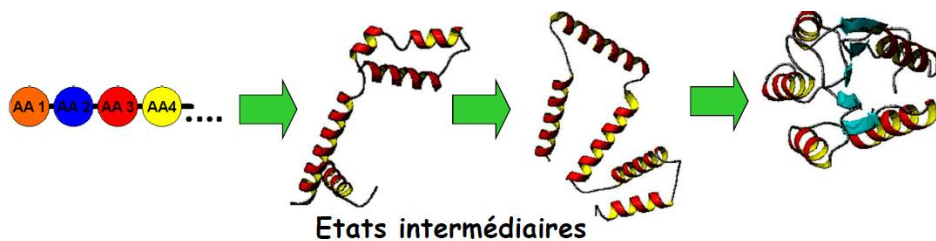
- **Cristallographie** : diffraction des rayons X

Pas de limitation de taille, peut donner une idée sur les interactions entre 2 protéines

Le repliement des protéines

Interactions hydrophobes au centre de la structure des protéines globulaires = **cœur hydrophobe**

Repliement très rapide aidé par des **protéines chaperonnes**



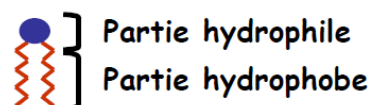
Perte de la structure tertiaire et donc **perte de la fonction**

Agent dénaturants :

- **La chaleur** : modification des liaisons hydrogènes
- **Des pH extrêmes** : modification de la charge des protéines et des interactions électrostatiques
- **Des solvants miscibles** (alcool, acétone) : modification des interactions hydrophobes
- **Des agents chaotropiques** (urée) : modification des interactions hydrophobes, dénaturation sans modif. de la charge
- **Des détergents** : anioniques (SDS), cationiques, zwitterioniques, non ioniques (Triton)
Permettent d'éviter l'agrégation après dénaturation

Exemple de détergent : le sarkosyl

Structure des détergents



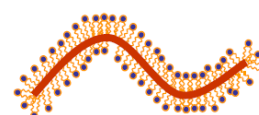
Protéines natives
Repliement
physiologique



Protéines dénaturées
Forme linéaire instable



Protéines dénaturées
stabilisées

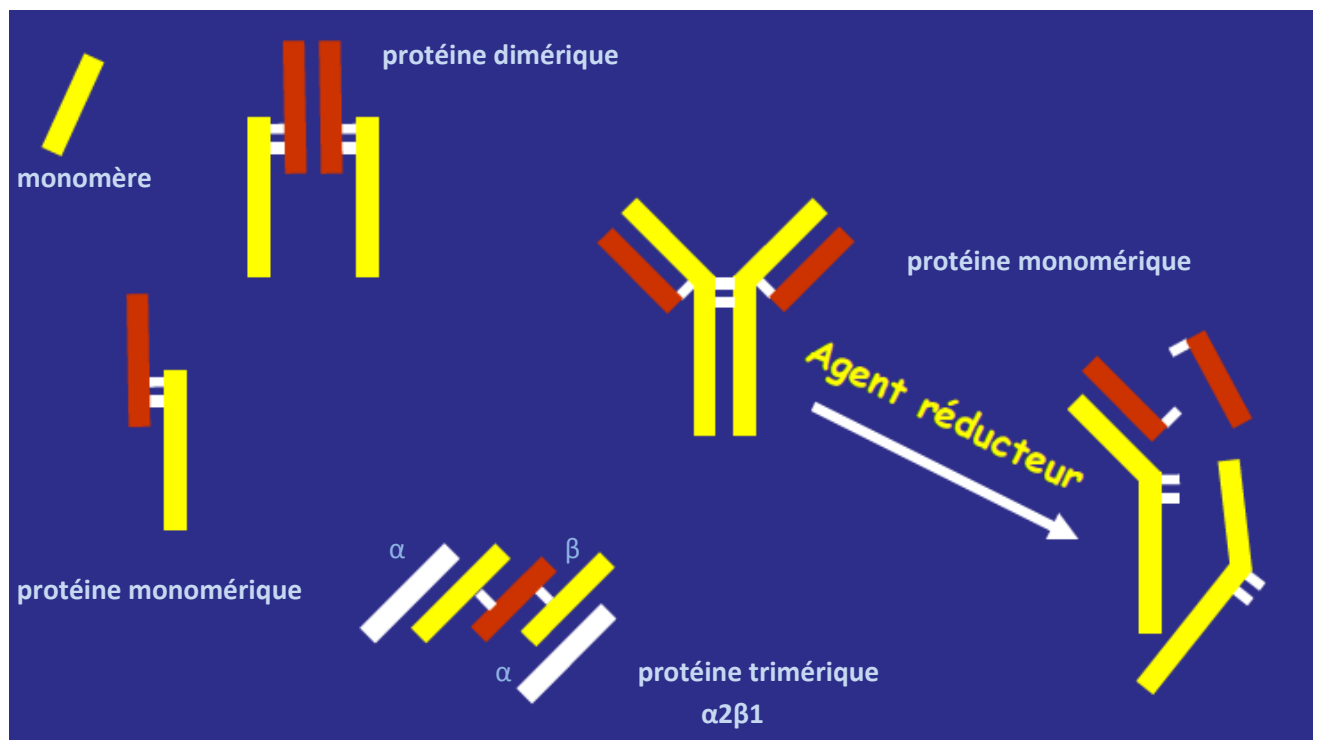
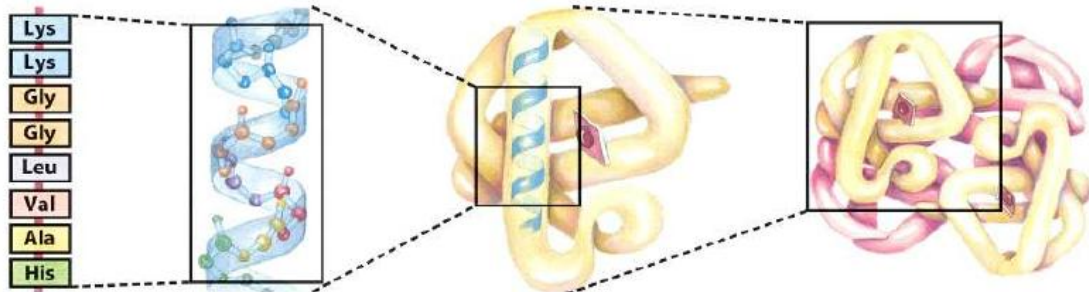


SDS

Structure quaternaire

Toutes les protéines ne possèdent pas une structure quaternaire

Monomères liés entre eux par des liaisons non-covalentes



Electrophorèse et chromatographie

Electrophorèse

Utilisation d'un gel, situé entre 2 plaques, constitué d'un polymère d'acrylamide

La migration des protéines à travers ce gel se fait grâce à un champ électrique

Ce gel forme un maillage dense qui peut varier selon le pourcentage d'acrylamide qu'il contient

- 5% [acrylamide] : étude des protéines de haut PM
- 20% [acrylamide] : étude des protéines de faible PM

Electrophorèse monodimensionnelle 1D

- **Electrophorèse en condition native**

Migration des protéines sans dénaturation, selon leur charge

On part d'un pH haut ($> pI$) donc protéines chargées négativement

Peu utilisé pour étude de la taille car influence de la charge importante

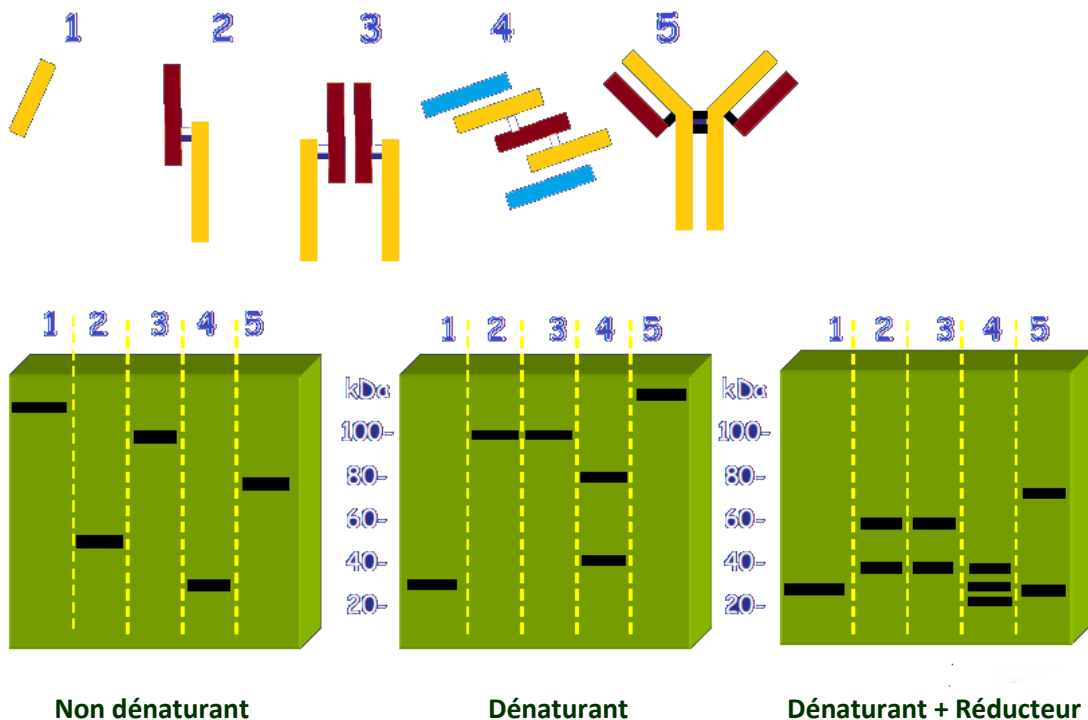
- **Electrophorèse en condition dénaturante**

Utilisation d'un agent dénaturant (SDS \rightarrow donne une charge globale de la protéine négative)

Coloration des protéines :

- Bleu de Coomassie
- Méthode au nitrate d'argent

Ajout d'un agent réducteur (ex : β -mercaptoéthanol)

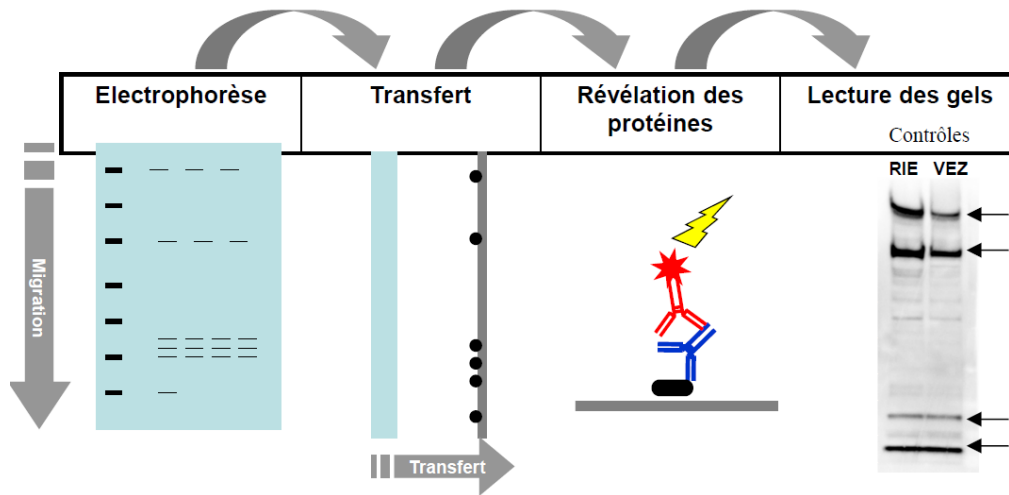


Test du Western Blot

- 1^{ère} étape : Electrophorèse en condition dénaturante
- 2^{ème} étape : Transfert

Application d'un champ électrique (déplacement des protéines sur une membrane)

- 3^{ème} étape : Révélation des protéines par immuno-marquage
- 4^{ème} étape : Lecture des gels



Application : Myopathie de Duchenne

Elle est en rapport avec un **déficit complet de la dystrophine** qui permet aux muscles de résister à l'effort : sans elle, les fibres musculaires dégénèrent.

La maladie peut toucher tous les muscles dont le muscle cardiaque

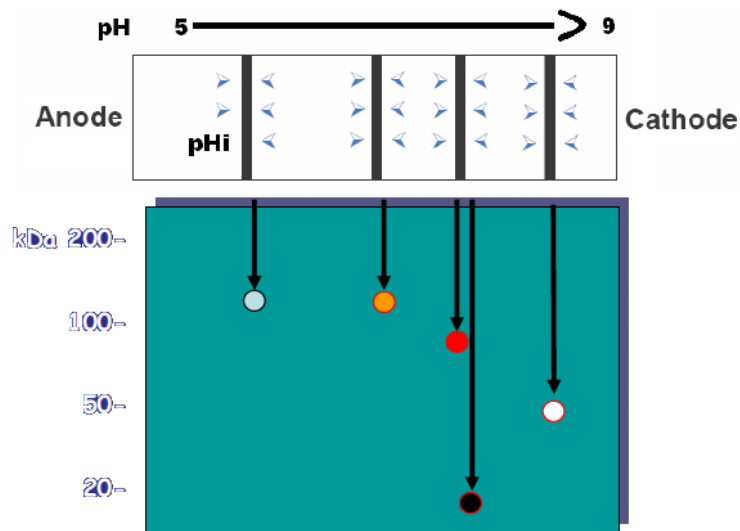
Electrophorèse bidimensionnelle 2D

- 1^{ère} dimension : **Isoélectrofocalisation (IEF)**

Etablissement d'un gradient de pH dans un gel → Focalisation de la protéine au niveau de son pHi

- 2^{ème} dimension : **Electrophorèse dénaturante** avec ou sans réducteurs

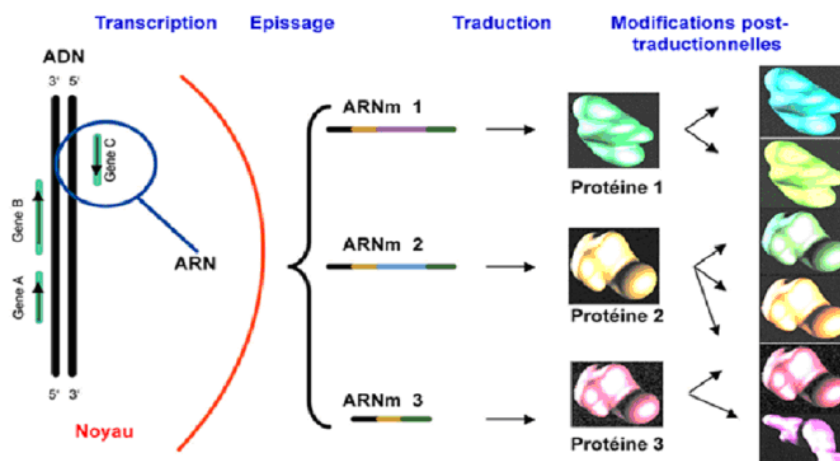
Séparation des protéines en fonction de leur PM



La protéomique

Le protéome représente l'ensemble des protéines dans un échantillon (prélèvement biologique, cellule, tissu) à un moment donné et dans des conditions déterminées. En présence d'une pathologie, le protéome est variable.

Son étude est appelée « protéomique ». Elle permet, par exemple, de diagnostiquer certaines maladies suite à une électrophorèse afin de localiser différentes protéines.

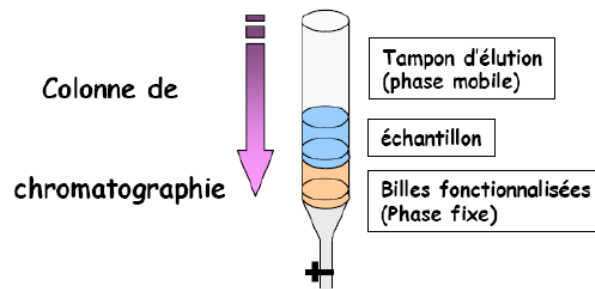


Chromatographie

Permet de séparer des protéines et des AA

Utilisation de colonnes chromatographiques comprenant :

- **Une phase mobile** : liquide d'éluion
- **Une phase fixe** : billes fonctionnalisées avec pour but de retenir les protéines au sein de la colonne



Il existe différents types de chromatographie selon la phase fixe

Chromatographies ioniques ou par échange d'ions

Chromatographie cationique (résine cationique) : pH bas puis éluion avec tampon de pH croissant

- Elution des protéines par ordre croissant des pHi

Chromatographie anionique (résine anionique) : pH haut puis éluion avec tampon de pH décroissant

- Elution des protéines par ordre décroissant des pHi

Possibilité de colorer les AA avec la ninhydrine

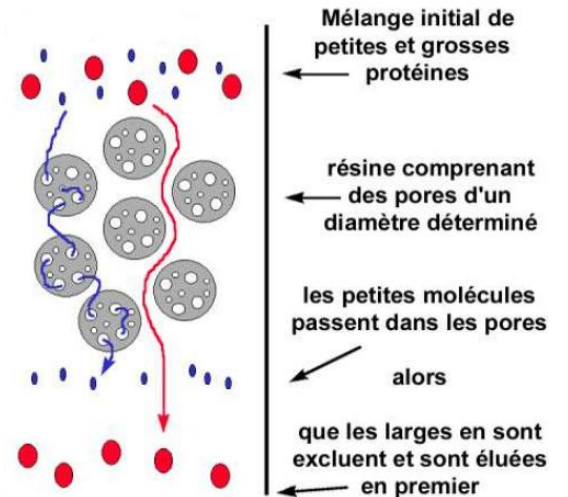
Observation par spectrophotométrie (à 280 nm) des protéines à la sortie de la colonne

Chromatographie d'exclusion ou gel filtration

Mesure du **volume d'éluion** : Volume nécessaire pour faire sortir les protéines

- Faible volume pour les grosses protéines
- Fort volume pour les petites protéines

Indépendant de la charge et de la dénaturation → Possibilité d'utiliser des protéines natives



Chromatographies HPLC / hydrophobe

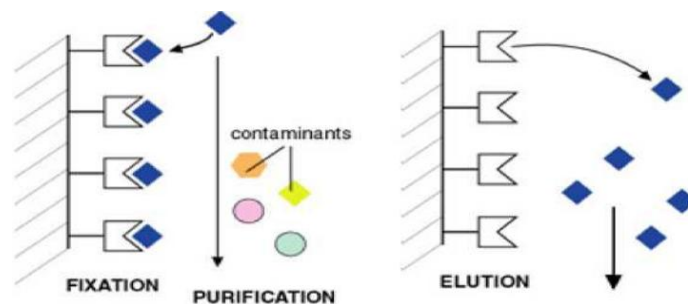
Colonnes utilisées à très hautes pressions et avec des billes de très faible diamètre
Utilisation de colonnes hydrophobes : Fixation de composés aliphatiques, aromatiques

- Passage des composés hydrophiles

Chromatographie d'affinité

Fixation d'anticorps sur les billes → Rétention des antigènes

Fixation de récepteurs sur les billes → Rétention du ligand



Modifications post-traductionnelles

Acétylation

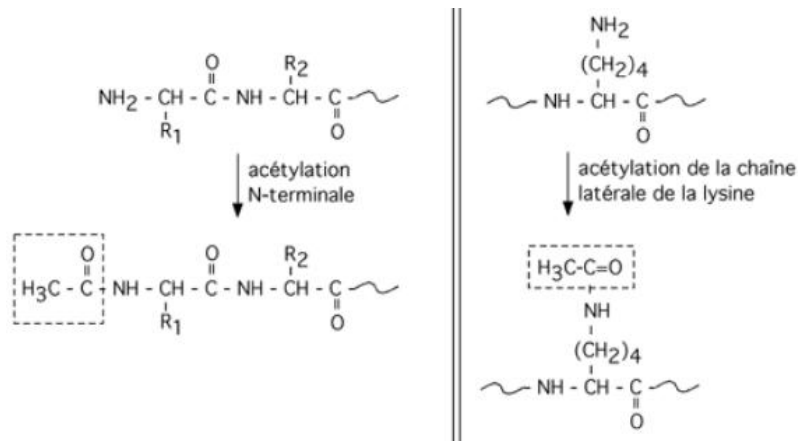
Acétylation au niveau **N-terminal** ou sur la **Lysine**

Réalisée par des **acétyltransférases**

Réversible par action des **déacétylases**

L'acétylation de plusieurs Lysines des histones modifie leur association à l'ADN chargé (-)

- Rôle dans la régulation de l'expression des gènes

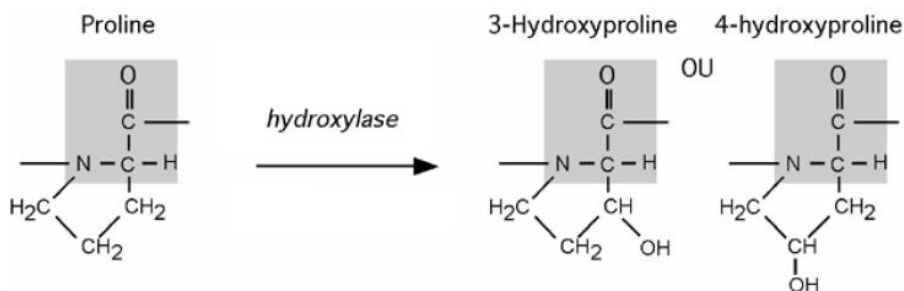


Hydroxylation

Ajout d'un groupement -OH sur une protéine

Hydroxylation de la **Lysine** (en position 5) ou de la **Proline**

Rôle dans la structure des protéines (*ex : stabilisation du collagène*)

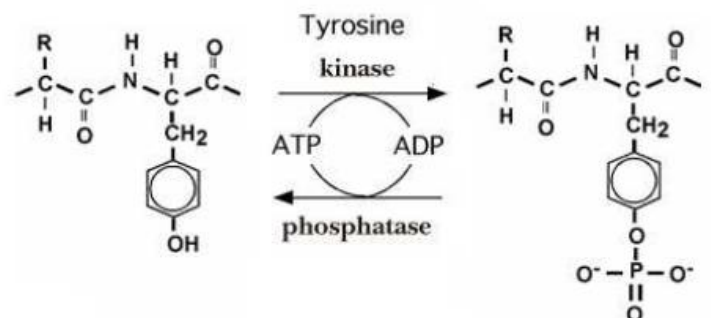


Phosphorylation (S, T, Y)

Permet l'activation ou l'inhibition d'enzymes

Possibilité d'autophosphorylation des kinases

Retrouvé dans les mécanismes de signalisation cellulaire (cascade de signalisation)



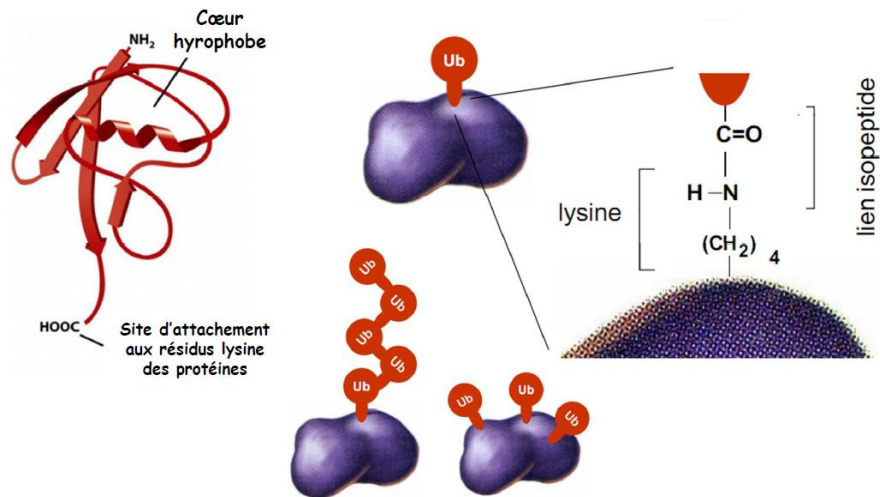
Ubiquitylation

Ajout de l'ubiquitine sur une **Lysine** de façon covalente (lien isopeptidique)

Ubiquitine : protéine très conservée entre les eucaryotes, possibilité de polyubiquitylations

Fonction : permet de tagger une protéine pour ensuite la dégrader dans le protéasome

On rencontre ce phénomène dans le système de contrôle de qualité du repliement des protéines



Glycosylation

Fixation d'un glucide de façon covalente sur une protéine

- **N-glycosylation** sur **Asparagine**

Séquence consensus : N-X-T et N-X-S (avec X non Proline)

- **O-glycosylation** sur **Sérine** ou **Thréonine**

Une **holoprotéine** est une protéine uniquement constituée d'AA (polypeptide) par opposition à une **hétéroprotéine** qui comprend une partie protéique appelée **apoprotéine** et d'une partie non protéique appelée groupement **prostétique**.

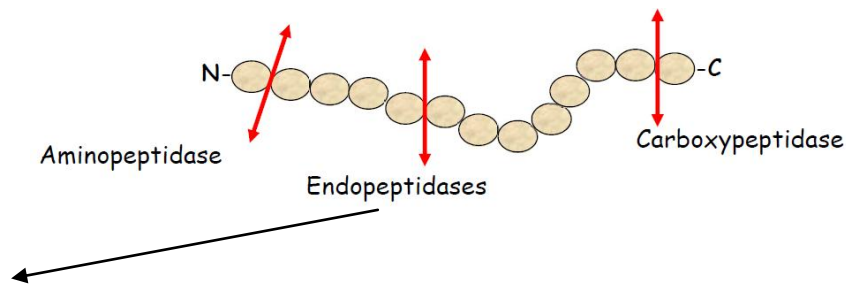
Ancre lipidiques

- **Myristoylation** : Ajout d'un AG à 14C sur une Glycine N-terminale
- **Palmitoylation** : Ajout d'un AG à 16C sur une Cystéine non terminale
- **Ancre GPI** (Glycosyl-phosphatidylinositol)

Clivages

Hydrolyse spécifique des liaisons peptidiques

Rôle dans la maturation protéolytique des peptides et des protéines



La **Trypsine** clive après les **AA basiques** Lys (K) et Arg (R)

(l'AA suivant ne doit pas être une Proline)

La **Chymotrypsine** clive après les **AA aromatiques** (W, Y, F)

(l'AA suivant ne doit pas être une Proline)

Le **Bromure de Cyanogène** coupe après les AA **Méthionine**

Méthode biophysique de détection des peptides : La **spectrométrie de masse**

Permet de mesurer la masse des peptides

Principe : ionisation des peptides (charge +) et mesure de leur temps de vol

- Plus ils ont un PM faible, plus leur temps de vol est faible

Il existe une relation entre la composition du peptide et son PM

Il existe une **méthode de séquençage des AA en spectrométrie de masse**

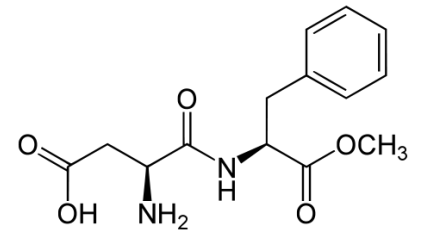
Principe : on élimine à chaque fois un AA et on compare la masse du nouveau peptide avec le peptide précédant ce qui donne le PM de l'AA sortant

Exemples de peptides

Aspartame

Méthylester du dipeptide DF

Edulcorant (goût sucré fort), à éviter dans les cas de phénylcétonurie

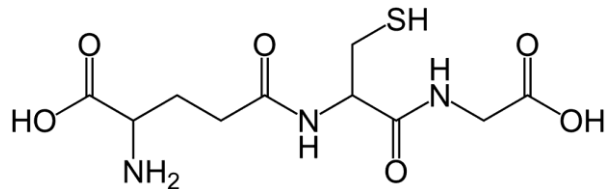


Gluthation ou γ glutamyl-cystéyl-glycine

Présent en grande quantité dans les cellules, notamment dans le cytoplasme

Liaison au niveau du C γ de E (liaison isopeptidique)

Joue un rôle dans la **protection contre le stress oxydant** (production de radicaux libres)



Hepcidine

Peptide de 25 AA dans sa forme classique issue de la maturation d'une chaîne polypeptidique plus longue

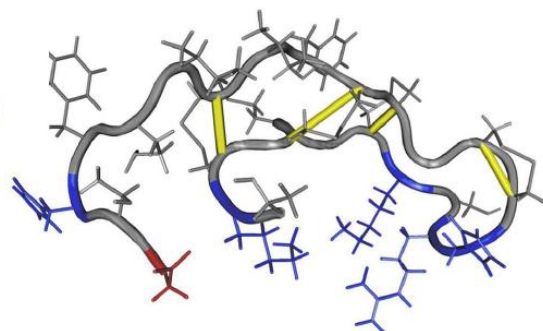
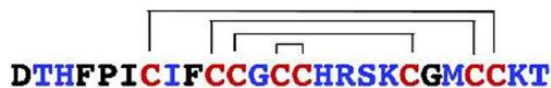
Joue un rôle important dans le métabolisme du fer car elle permet :

- Diminution de l'absorption de fer au niveau intestinal
- Diminution de la sécrétion de fer par les macrophages

Une mutation de cette hepcidine peut entraîner des hémochromatoses (anomalies dans le métabolisme du fer → surcharge en fer)

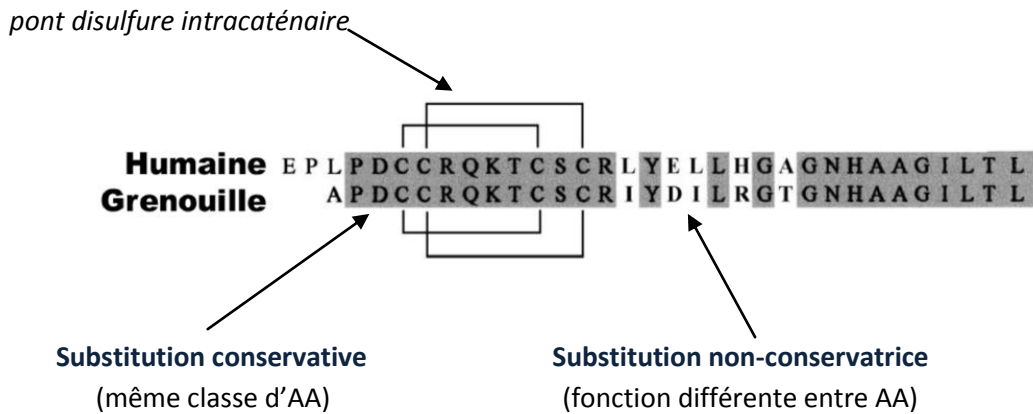
Dans les cas d'anémies, on observe une diminution de l'hepcidine pour la synthèse de l'hémoglobine

Ce peptide possède 4 ponts disulfures intra-caténaires



Orexine / Hypocrétine

Peptide important dans les états de veille et de sommeil
Synthétisé au niveau du SNC par des neurones spécialisés
Un arrêt de la synthèse de ce peptide entraîne la narcolepsie
Peptide à 2 ponts disulfures intra-caténares

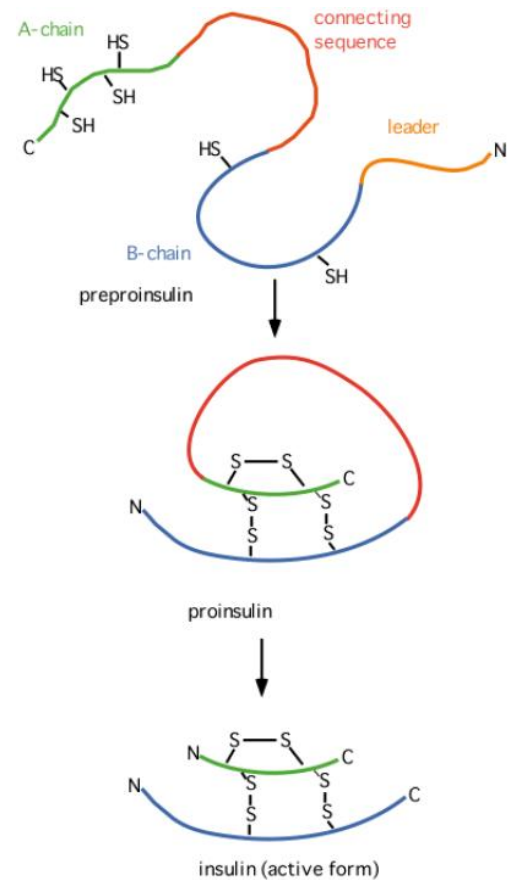


Insuline

Hormone hypoglycémiante sécrétée les cellules β des îlots de Langerhans du le pancréas
Impliqué dans le diabète de type I (déficit de synthèse de l'insuline) et de type II (anomalie des récepteurs de l'insuline)

Insuline active

Deux chaînes polypeptidiques A (20 AA) et B (31 AA) liées par 2 ponts disulfures inter-caténares et 1 pont intra-caténaire dans la chaîne A



Exemples de protéines

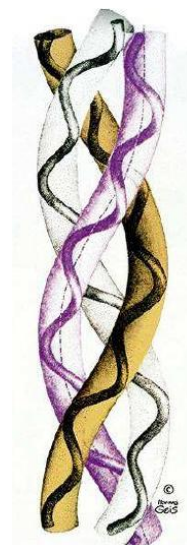
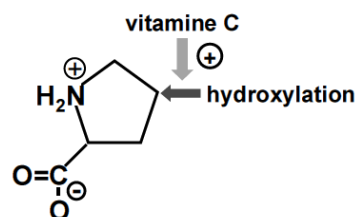
Collagène

- *Structure I^{aire}* : composée principalement de Glycine (1AA/3), Proline (1AA/8) et Hydroxyproline (1AA/10)
- *Structure II^{aire}* : Hélice gauche à pas allongé
- *Structure IV^{aire}* : Super hélice droite, 3 monomères qui s'enroulent avec liaisons H
 - Grande résistance

Protéine de structure dans la peau et l'os

Pathologie : Scorbut

Carence en Vit. C → Proline non hydroxylée → Collagène altéré



Maladie d'Ehlers Danlos : mutation du collagène

Hyperlaxité de la peau, des ligaments, des articulations

Immunoglobuline G ou Anticorps

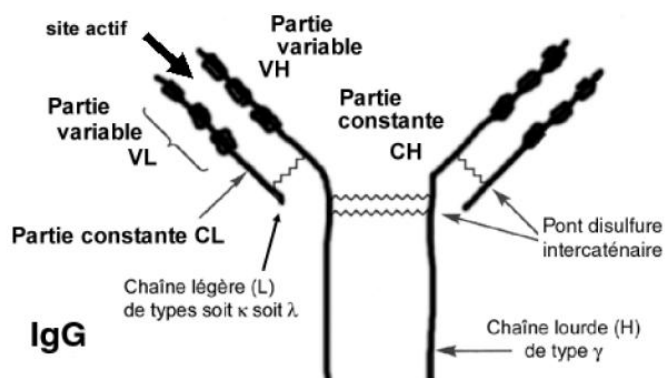
Représente 80% des immunoglobulines, jouent un rôle dans la défense immunitaire

Elles sont capables de reconnaître des antigènes

Se sont des protéines monomériques constituées de 4 chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures inter-caténaux :

- 2 chaînes légères (L) avec une partie variable et une partie constante
- 2 chaînes lourdes (H) avec une partie variable et une partie constante

Les parties variables possèdent des ponts disulfures intra-caténaux et permettent la reconnaissance antigène / anticorps



Epitope = Partie d'un antigène reconnue par un anticorps

Hémoglobine A

- *Structure I^{aire}* : hétéroprotéine constituée d'une partie apoprotéique et d'une partie prostétique (l'hème)
- *Structure II^{aire}* : 8 hélices α , pas de ponts disulfures
- *Structure IV^{aire}* : 4 monomères (protéine tétramérique)

Hb A : $\alpha 2\beta 2$ à 97% chez l'adulte

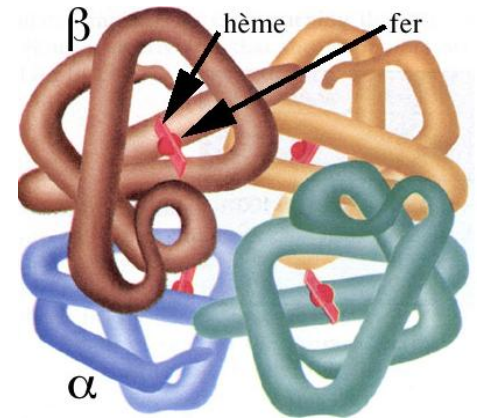
Hb F : $\alpha 2\gamma 2$ à 80% chez le fœtus

Différente forme d'Hg car affinité différente avec l'oxygène

Pathologie: Drépanocytose

Anémie falciforme : aspect en fosse des GR (mutation Glu \rightarrow Val)

Agrégation des Hg qui entraîne une déformation des GR

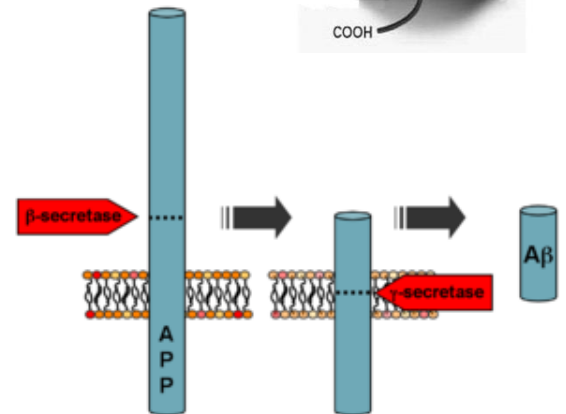
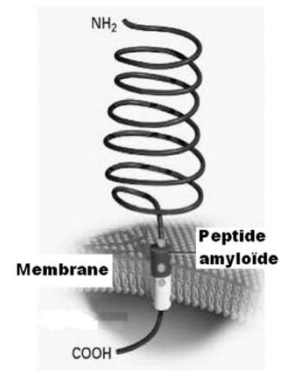


Chez les personnes atteintes de drépanocytose, le paludisme est inhibé

Le précurseur de la protéine amyloïde

Protéine transmembranaire : NH_2 côté extracellulaire et $COOH$ côté intracellulaire

- β sécrétase : libération de la forme soluble sAPP
- γ sécrétase : libération du peptide $A\beta$ (inséré dans la bicouche lipidique) puis agrégation au niveau du SNC



Maladie d'Alzheimer

Agrégation du peptide $A\beta$ au niveau du SNC pour former des plaques amyloïde

Développement d'inhibiteurs des sécrétases et de vaccin contre la maladie d'Alzheimer (anticorps dirigés contre les peptides $A\beta$)

Mutation favorisant la production du peptide $A\beta$: Trisomie 21 car gène codant pour la protéine amyloïde situé sur le chromosome 21

Diagnostic : Diminution du peptide $A\alpha$ dans le LCR (car agrégation dans le cerveau)

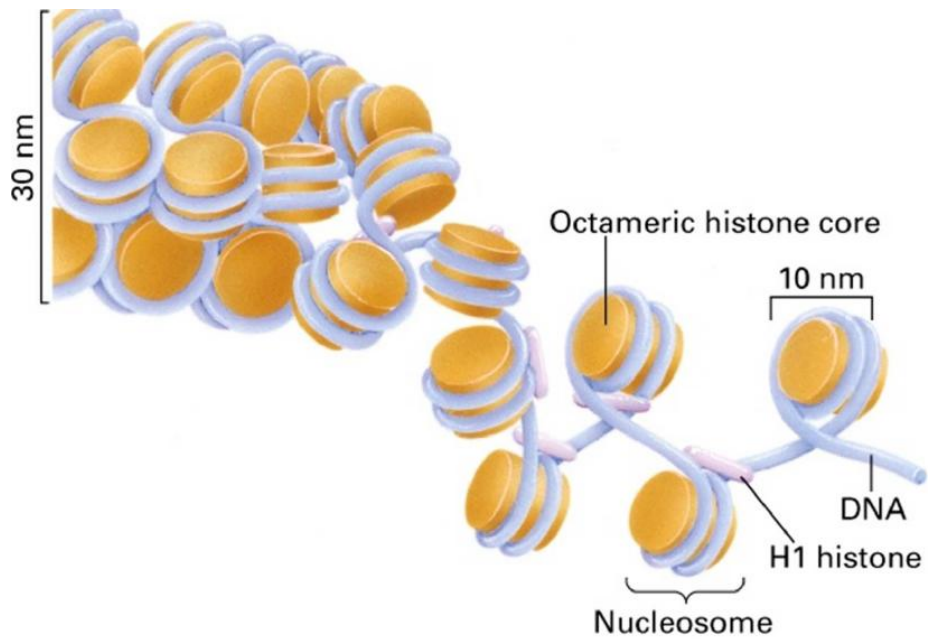
Les histones

Protéines avec un fort pourcentage en Lysine et en Arginine

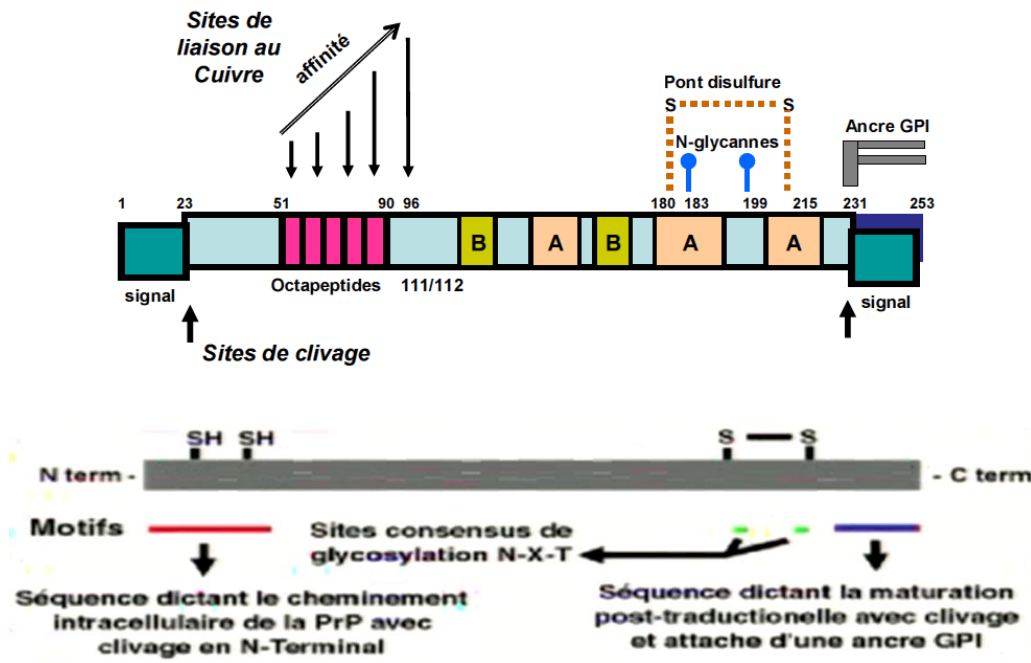
Il existe plusieurs types d'histones

Association octamérique permettant l'enroulement de l'ADN autour de celle-ci

Elles sont l'objet de nombreuses modif. post-traductionnelles qui ont un rôle dans la régulation de l'expression des gènes

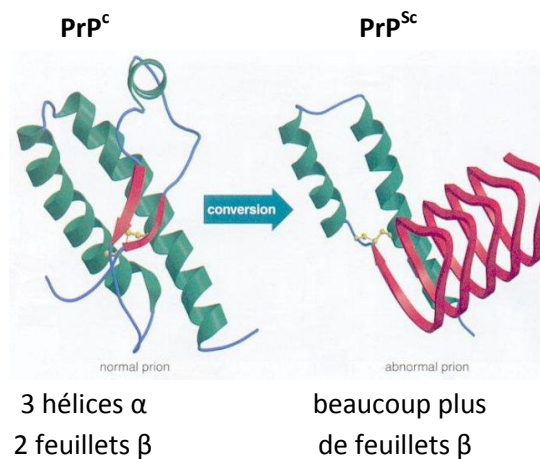


Protéine Prion



Maladies à prion

Modification de la structure 3D de la protéine → Agrégation de la protéine prion dans le SNC
 Les protéines anormales entraînent la conversion des protéines normales



- **Maladie « de la vache folle »** chez l'animal
- **Maladie de Creutzfeldt Jakob** chez l'être humain