

PEPTIDES

I. Peptides, Généralités

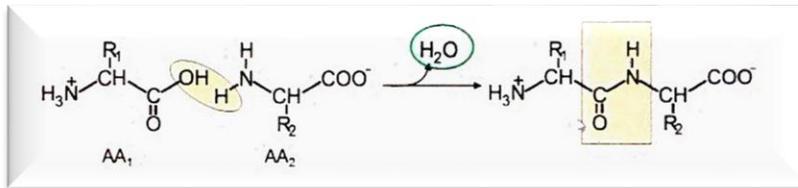
a) La liaison Peptidique

Les peptides et protéines sont des enchainements d'AA lié par la liaison peptidique.

La liaison peptidique résulte de la réaction d'**amidification du carboxyle du 1^{er} AA par le groupement aminé du suivant** (c'est une *liaison covalente forte*).

La formation du dipeptide s'accompagne de la **formation d'une molécule d'eau**.

Il s'agit d'un polymère linéaire d'AA unis par une liaison dite peptidique.



La liaison résulte de l'amidification du **carboxyle du 1^{er} AA** par le groupement **aminé du 2^{ème}**.

→ C'est une réaction **complexe**.

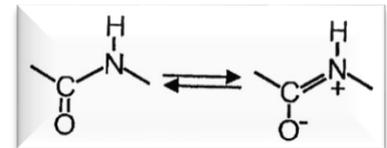
Cette réaction est **endergonique**, elle ne se fera pas seule, elle a besoin d'énergie.

Elle nécessite l'**activation du carboxyle COOH** qui peut se faire de façon chimique in vitro ou in vivo (*au moment de la traduction*).

La synthèse des liaisons peptidiques est contrôlée de manière enzymatique qui se déroule dans le ribosome à partir de l'ARNm.

La liaison peptidique est **stabilisée par résonance** (*caractère partiel de double liaison*). En effet les électrons du groupe carbonyle et du doublet électronique libre de l'azote sont très proches, cette résonance de ces électrons donnent aux groupes peptidiques des structures intermédiaires entre 2 formes mésomères ; elle possède alors un caractère partiel de double liaison, on a donc une longueur intermédiaire entre une simple et une double liaison.

→ Délocalisation d'électron, qui résonne entre CO et CN.



La résonance est un facteur de **stabilisation** de la liaison.

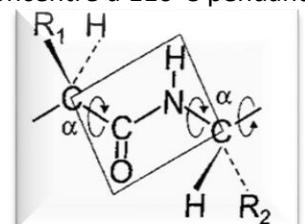
La liaison peptidique est **très stable**, d'où la stabilité des peptides et protéines.

Elle est également **rigide** du fait de la double liaison.

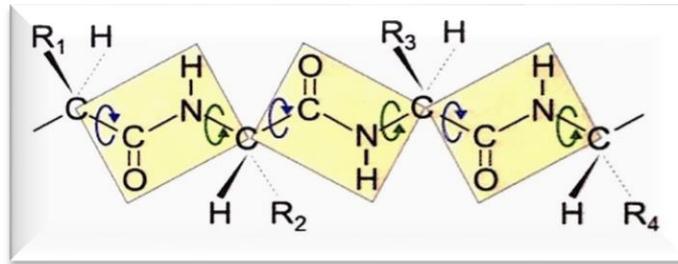
La liaison peptidique est polaire en raison de l'électronégativité de l'oxygène et de la charge positive portée par l'azote. Une fois formée cette liaison est très stable : son hydrolyse spontanée est quasiment nulle et inexistante. L'hydrolyse de cette liaison nécessite des conditions drastiques à savoir : de l'acide chloridrique très concentré à 110°C pendant 24h.

Elles peuvent également cassées par protéolyse par des peptidases (enzymes).

Les 6 atomes sont dans le même plan (coplanaire), La liaison est **plane**.



Chaque plan contient les atomes C-alpha, C-O de l'AA N-1 et les atomes N et H de l'AA N. C'est l'effet de résonance peptidique qui stabilise cette conformation planaire.

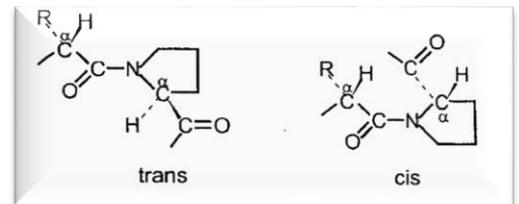


Les radicaux R se retrouvent alternés de part et d'autre de la liaison peptidique.

2 configurations possibles : cis et trans.

La liaison peptidique est **toujours trans**

(Sauf parfois avec la proline qui peut avoir une position cis).

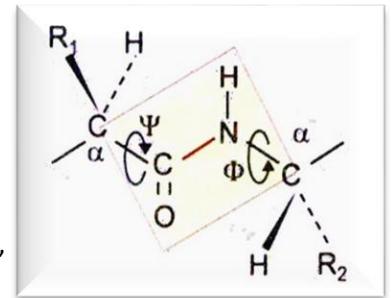


Pour une liaison trans le carbone-alpha de part et d'autre de la liaison peptidique est plus favorable sur le plan énergétique. On a un encombrement stérique dans les formes cis.

La proline peut être trans ou cis.

10% des prolines sont en configuration cis.

La position trans ou cis permet le repliement de la protéine.



Virage en épingle à cheveu (coude) se retrouve uniquement au niveau d'une proline CIS,

Permettant des plis dans les chaînes polypeptidiques.

La liaison peptidique est plane et rigide mais il y a une liberté de rotation autour des liaisons pour le peptide.

La liaison peptidique ne peut pas tourner.

Mais les liaisons N-Cα (angle φ) et Cα-C (angle ψ) ont une **rotation libre**.

Pour une chaîne, chaque liaison peptidique est dans le même plan,

Mais **toutes les liaisons ne sont pas dans le même plan les unes par rapport aux autres**.

Les groupements latéraux tournent autour de la liaison **peptidique** : **orientations différentes**

En théorie il y a pour une chaîne polypeptidique un grand nombre de configuration possible mais en réalité, les interactions intermoléculaires vont stabiliser la chaîne et seul peu de configurations seront en réalité possibles/stables

→ Les carbones α sont les points d'articulation de la chaîne polypeptidique

La rotation va être **stabilisée** par les **groupements latéraux** qui vont engager des liaisons qui vont commander la structure de la protéine.

b) Classification

1. Selon le nombre d'AA :

- ◆ **Oligopeptides** : 2 – 10 AA = moins de 10 AA (on parle aussi de résidus) **généralement non codé par un gène et sont produit par synthèse chimique.**

Les dipeptides auront 2 peptides liés par une liaison peptidique. Même raisonnement pour les tripeptides jusqu'aux décapeptides.

Exemple d'un dipeptide méthylé : **Aspartame** : (aspartylphenylalaninemethylester ; ce nom n'est pas à retenir) (édulcorant 200 fois plus puissant que saccharose) = Asp, Phe

Ocytocine (nonapeptide) sécrétée par l'hypophyse : stimule les contractions utérines (lors de l'accouchement) et agit lors de la lactation. Possède un pont disulfure. N'a pas de groupement C terminale : il est annihilé. C'est un résidu glycine-amide. **Rôle biologique de protection.**

◆ **Polypeptides : > 10 AA** → n-peptide

- **Fraction active de l'ACTH** : 24-peptide (24 AA) = tétracosapeptide. Syn (Tétracosacide = synacthène® → dans le but de diagnostic et le suivi les traitements en particulier pour suivre la sortie des traitements prolongés par des corticoïdes) Hormone hypophysaire (39 AA) dont le rôle principal est de synthétiser les hormones stéroïdes.
- **Insuline** : c'est un peptide pas une protéine (monomère 6000 Da (51 AA) ; hexamère 36 000 Da) hormone peptidique. C'est une hormone hypoglycémiante. (La limite de 10 000 varie donc selon les usages.)

◆ **Protéines : > 100 AA** (PM > 10 000)

- **Myoglobine** : monomère PM = 17 000 petite protéine, 153 AA. Impliqué dans le transport intracellulaire de l'oxygène dans le muscle.
- **Hémoglobine** (>500 AA) PM > 60 000 grosse protéine
Elles font parties d'une grande famille appelée globine.

2. Selon leur composition :

- Holoprotéines : AA uniquement
- Hétéroprotéines : AA + autre groupement (prosthétique). Elles peuvent être classées suivant la nature chimique de leur groupement prosthétique.

Classe de protéines	Groupement prosthétique	Exemples
Glycoprotéines	Oligosaccharides	Immunoglobulines
Nucléoprotéines	Acides nucléiques	histones
Chromoprotéines	hème	Hémoglobine
Phosphoprotéines	Phosphate	caséine
Métalloprotéines	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺	Aconitase, Ferritine, Céruloplasmine, Métalloenzymes, Calmoduline, Catalase, uréase
Lipoprotéines	lipides	HDL, LDL, ..

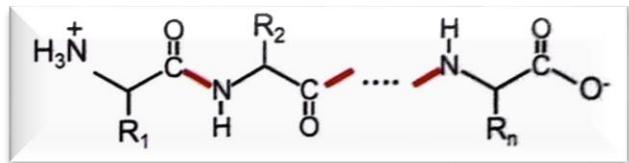
3. Selon leur forme globale :

- ✓ Les protéines globulaires :
 - Rapport axial (= rapport de la dimension la plus grande sur la dimension la plus petite) < 10 : sphéroïde ou sphérique
 - Soluble dans l'eau (les AA apolaires seront en profondeur tandis que les polaires seront en surface).
 - Présente une grande variété d'activité biologique : Albumine (circulante), myoglobuline, enzymes, hormones, anticorps
 - Présente une grande variété de fonctions : Solubles, membranaires, récepteurs, canaux, protéines d'adhésion, cytosolique(calmoduline)

- ✓ Les protéines fibreuses :
 - Rapport axial > 10 : filiformes
 - Chaîne polypeptidique, allongées, enroulées autour d'un axe
 - Insoluble dans l'eau
 - Souvent extracellulaire
 - Fonctions structurales et protectrices
 - 2 catégories :
 - kératine : protéines qui constituent les ongles, les cheveux...
 - collagène : principal composant de la partie fibreuse des os, des cartilages, des tendons et du derme

- ✓ Les protéines mixtes :
 - Mi-globulaires-mi fibreuses (myosine)

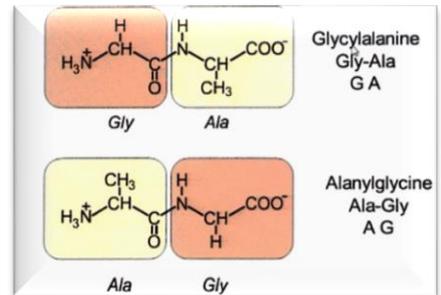
c) Nomenclature



Par convention on écrit toujours **à gauche** avec le n°1 l'AA dont l'amino est libre :
 → C'est l'**extrémité N-Terminale**.

A droite, l'AA dont le **carboxyle est libre** : → C'est l'**extrémité C-Terminale**.
 C'est aussi le sens de la synthèse peptidique.

Un acide aminé engagé dans une liaison peptidique est appelé résidu.



La dénomination officielle est :

Le **radical** + « **yl** » pour le premier amino acide et le dernier porte son nom entier.

Ex = Glycine + alanine → Glycylalanine // Gly-Ala // G A

Attention: Ala-Gly → Alanylglycine n'est PAS le même peptide bien que composé des mêmes aminoacides.

Usage courant : Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (code à 3 lettres) ou DRVYIHPF (code à 1 lettre) ou **Angiotensine II**
 Pour des polypeptides ou protéines, on ne peut pas utiliser la dénomination officielle.

Il faut connaître le code à 1 lettre car c'est celui qu'on utilise pour analyser des séquences.

(NB : certains acides aminés commencent par la même lettre comme Aspartate et Arginine mais vont avoir un code à 1 lettre différent afin qu'ils ne soient pas confondus. C'est pourquoi le prof souligne qu'il est important de connaître le code à 1 lettre).

Structure primaire : correspond à l'ordre dans lequel les AA sont unis les uns aux autres ainsi qu'à l'emplacement de toutes les liaisons disulfures.

Elle est codée dans les gènes et peut présenter des modifications d'une espèce à l'autre mais aussi dans une même espèce.

Comme dans la séquence primaire de l'insuline où il existe 2 ponts disulfures (un intra-chaîne et un inter-chaîne)

En bio-informatique on utilise l'alignement séquentiel (représentation de deux ou plusieurs séquences l'une sous l'autre pour faire ressortir les régions homologues dans les séquences). Ces alignements sont réalisés par des programmes informatiques dont le but est de maximiser le nombre de coïncidences entre AA entre différentes séquences.

Nécessite l'introduction de trous. Les trous peuvent correspondre à des délétions ou des insertions d'AA dans la séquence. Utile pour identifier des sites fonctionnels ou catalytique, par exemple.

Ils permettent également de **prédire** la ou les fonction(s) d'une protéine.

En cas d'alignement multiple au sein d'une famille de protéine : permet d'établir une phylogénie entre elles.

Le SARS-CoV-2 présente la **protéine spike**, qui est composée de 2 sous unités, S1 et S2. La sous unité S1 présente une séquence RBD qui est indispensable à la liaison du virus aux cellules.

II. Peptides

a) Propriété physico-chimique des Amines

1) Caractère Amphotère et pouvoir tampon :

Les peptides possèdent les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les acides aminés simples ; ils sont amphotères et possèdent un pouvoir tampon.

Selon leur pH, il y a ionisation des :

- Extrémités N et C terminales
- Certains groupements latéraux ionisables
 - Caractère amphotère
 - Pouvoir tampon

Groupes polaires au sein des chaînes peptidiques : groupes terminaux et chaînes latérales des acides glutamiques et aspartique, lysine, arginine, histidine, cystéine, tyrosine.

Il existe un pH pour laquelle la charge nette des peptides et des protéines est nulle = pHi

Les peptides et les protéines ont donc des **pH isoélectriques variés** :

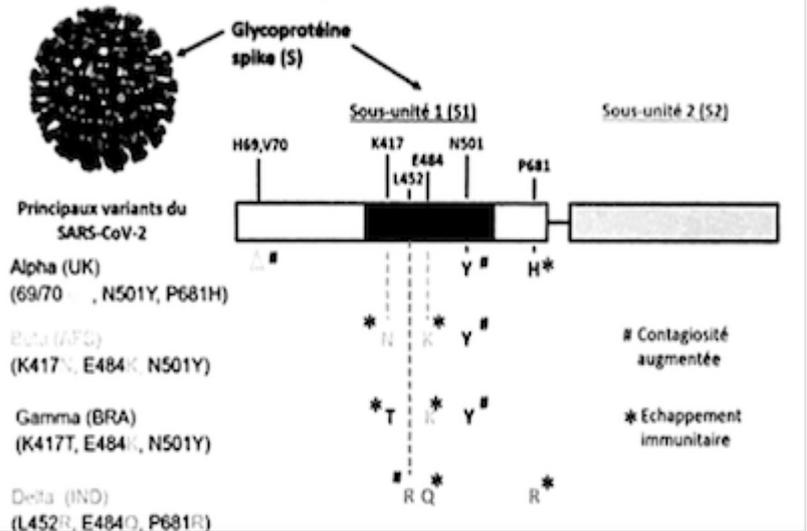
pHi dépend des signes, du nombre de charges électriques portés par les AA et extrémités terminales chargés.

- Pepsine pHi = 1 très acide, comporte des AA acides
- Albumine sérique pHi = 4.9 acide
- Hémoglobine pHi = 6.8 neutre
- Cytochrome C pHi = 10.6 basique, beaucoup d'AA basique

I. Peptides- généralités

C. Nomenclature

> Séquence / structure primaire



Isoélectrique (=mesure dans un environnement salin) et **Isoionique** (= mesure dans l'eau pur) → plutôt théorique

Si le nombre de groupement acide > groupement basique : $pH_i < 7$

Si le nombre de groupements acides < groupement basique : $pH_i > 7$

Ce caractère amphotère est utile pour séparer les peptides et les protéines par électrophorèse. Ici on parle donc de pH isoélectrique car on solubilise les protéines dans des solutions ioniques. Grâce au caractère amphotère, on pourra séparer les protéines par **électrophorèse**.

La mobilité électrophorétique est fonction de la charge nette de la protéine et de son PM. *Auront des mobilités différentes si on les soumet à un champ électrique.*

2) Propriétés Chimiques

Ce sont les propriétés dû :

- Aux **groupements latéraux accessibles** (*dirigé vers l'extérieur*). Ce sont essentiellement les radicaux R qui vont conférer leurs propriétés chimiques aux protéines. La réactivité de ces radicaux est souvent atténuée par les encombrements ou leur participation à des configurations tridimensionnelles des protéines. La réactivité du radical conditionne in vivo les modifications post-traductionnelles. Selon la nature du radical, une protéine peut par exemple s'associer à des motifs glucidiques pour former des glycoprotéines. Elles peuvent également être phosphorylées sur les résidus sérine, thréonines ou tyrosines. Ces phosphorylations sont d'ailleurs très importantes pour réguler l'activité de la protéine.
- Aux **fonctions N et C terminales** qui ont des propriétés chimiques utiles pour déterminer des séquences peptidiques

3) Absorption UV

- Absorption à **280 nm** (*si contient Trp, Tyr, Phe*)
- **Absorption spécifique** entre **180 et 230 nm** grâce aux liaisons peptidiques ce qui n'est pas très utile car beaucoup de molécule absorbent à cette longueur d'onde. Il **sera utile pour doser des protéines**.

4) Réaction Colorée

Utilisée pour le dosage spectrophotométrique des peptides et des protéines puisque Les peptides et holoprotéines sont incolores tout comme les acides aminés. Pour les doser en spectrophotométrie, on va utiliser différentes techniques.

a) Réaction du Biuret :

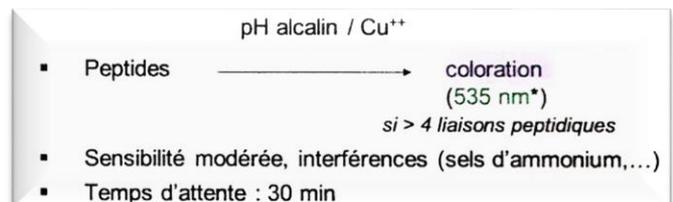
En milieu alcalin avec des ions cuivre Cu^{2+} coloration bleue.

Les ions cuivre se lient aux atomes d'azote des liaisons peptidiques en pH alcalin produisant un complexe mauve avec une absorption maximale à 535 nm. L'intensité de la coloration sera proportionnelle à la quantité de protéines.

Pour les peptides qui ont + de 4 liaisons peptidiques.

→ On a une coloration **violette**

Cette méthode dose les liaisons peptidiques plutôt qu'un AA en particulier : toutes les protéines sont à égalité devant ce dosage, quel que soit leur composition. Par ailleurs, elle nécessite la présence d'au moins 4 liaisons peptidiques donc les dipeptides et les tripeptides ne peuvent pas être dosés.

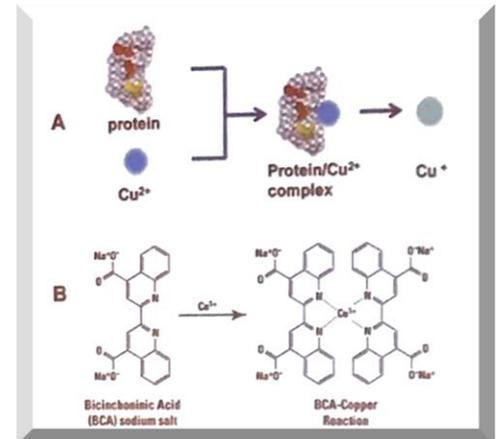


Elle n'est **pas très sensible** et **longue** (*temps d'attente 30mn*) et souffre de nombreuse **interférence**.

b) Méthode BCA

Mise au point après la méthode biuret sur laquelle elle est basée. Elle est donc basée sur du cuivre + une molécule BCA.

- Très sensible
- Rapide
- Compatible avec les détergents qui sont souvent utilisés pour extraire les protéines à partir des tissus ou de cellules.
- Complexe pourpre : absorbance maximale à 562 nm



c) Méthode BRADFORD

C'est la plus utilisée :

- Colorant : **bleu de Coomassie** (*qui est rouge au départ*) qui se lie à l'arginine et dans une moindre mesure à l'histidine et les acides aminés aromatiques (Trpn, Tyr, Phe)
- En présence de protéine et en **milieu acide**, il se forme un complexe Coomassie/Protéine qui lui est **bleu** (*on pourra le doser en spectrophotométrie*)
- Méthode plus sensible que les 2 précédentes
- Simple à mettre en œuvre et rapide (*5mn*)
- Les AA, peptides et protéines avec un bas PM (< 3 000 Da) ne sont pas détectées
- Ces colorants dénaturent la protéine : ils leur font perdre leurs fonctions biologiques
- D'autres colorants sont utilisés comme le noir Amyde, le rouge Ponceau, **bleu de bromophénol**

Attention à ne pas confondre les différentes méthodes pour les peptides et pour les AA. Bradford et Lowry sont une coloration des peptides et non des AA

d) Analyse : Établissement de la Structure Primaire

On établit la **structure primaire : la séquence des AA**.

Il faut d'abord isoler la protéine :

Étape préalable → purification (*chromatographie...*)

L'analyse ou l'établissement de la séquence d'un acide aminé inconnu comporte 2 étapes principales :

1) Détermination de la composition en AA

→ Quels AA et dans quelles proportions ?

2) Détermination de la séquence

→ Dans quel ordre ? D'abord les aa N et C terminaux puis les aa intrachâînes

1. Détermination de la composition en AA :

❖ **Hydrolyse** (pour couper les liaisons peptidiques)

Dans des conditions « sévères »

Les molécules d'eau sont nécessaires pour reformer les groupements carboxyles et aminés des résidus engagés dans les liaisons peptidiques.

Il existe plusieurs types d'hydrolyse **ou enzymatique**.

Hydrolyse ACIDE

- ✓ HCl 6N, 110°C, 24h ou plus
- ✓ **Détruit Trp** (sauf si travail sous atmosphère saturée N₂)
- ✓ **Conversion : désamination de Gln et Asn qui deviennent Glu et Asp** (on a libération d'ions NH₄⁺ lors de cette désamination)
On a donc **Glx** (Glu+Glu venant de Gln) et **Asx** (Asp+Asp venant de Asn)
- ✓ **Les ponts SS ne sont pas coupés** → les cystines sont conservées si les cystéines sont engagées dans 1 ou plusieurs pont disulfures.
Si on connaît le nombre de cystine, on peut donc savoir combien il y avait de pont S – S.

Hydrolyse ALCALINE ou basique

Elle pose plus de problèmes que l'hydrolyse acide. Utilisée dans des cas spéciaux.

- ✓ NaOH 2-4N, 6h, 100°C
- ✓ **Dégradation de Arg, Thr, Cys, Ser**
- ✓ **D'autres résidus sont dé-annihilés / racélysée.**

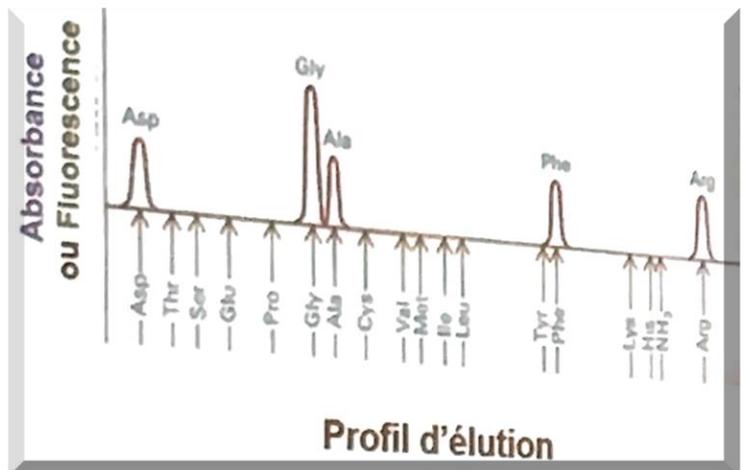
❖ **Analyse qualitative et quantitative des AA**

Chromatographie par échange d'ions (cation) (Stein et Moore : en milieu acide) réalisée après l'hydrolyse.

Les acides aminés sont identifiés selon leur forme de rétention et quantifié selon leur profil d'éluion. On peut utiliser la ninhydrine ou le chlorure de Dansyl (fluorescence).

Très sensible

On a la quantité de chaque AA présent dans le mélange en pourcentage mais on ne sait pas dans quel ordre



2. Identification des résidus N et C terminaux :

❖ Résidu N-TERM :

- Méthode de Sanger au DNFB (2,4-déinitrofluorobenzène) qui reconnaît seulement les fonctions alpha-aminées. Cela va nous donner un dinitrophényl-peptides
- Réaction avec le chlorure de Dansyl : même principe que la méthode de Sanger, on obtient seulement des acides aminés terminaux dansylés
- Réaction d’Edman (analyse séquentielle)
 - ⇒ Séquençage de peptides constitutifs de 40 à 60 résidus
- Méthode enzymatique : qui utilisent des exopeptidases qui sont des aminopeptidases (on ne développera pas plus sur ces méthodes incluant les aminopeptidases) Très peu utilisé et pas très spécifique.

❖ Résidu C-TERM :

- Méthode chimique : l’hydrazinolyse = elle consiste à traiter le peptide par l’hydrazine à 90°C-100°C en condition légèrement acide pour une durée variant de 20h à 100h. Les liaisons peptidiques sont rompues et les aminoacides apparaissent sous forme d’hydrazine amino-acyles sauf l’acide aminé en C-terminal qui est libre.
- Méthode enzymatique : carboxypeptidases de différentes origines comme les carboxypeptidases A et B d’origine pancréatiques. Ces carboxypeptidases sont résistantes aux coupures ou la coupure se fait très lentement.

ENZYME	SPECIFICITE	COMMENTAIRE
A	Aromatique Aliphatique Hydrophobe	Arg, Lys, Pro non libérés
B	Très efficace pour Lys et Arg	Seulement si avant de donner aa n’est pas Pro
C	Moins spécifique que A et B	Taux de libération assez uniforme
Y	Tous (même la Pro)	Gly et Asp libérés lentement

Les résultats ne sont interprétables que dans le cas où on a qu’une seule chaîne polypeptidique.

3. Détermination de la Séquence → Séquençage

a) Fragmentation préalable des Peptides de grande taille, puis Séparation (Chromatographie)

On parle de peptides de grandes tailles, lorsqu'il y a + de 40 – 50 résidus, puis séparation (chromatographie)

Elle ne donne la séquence que pour des peptides relativement courts (40-50 AA)

Si on a affaire à une protéine plus longue on va la découper en fragment mais pas n'importe où (< à 40-50 résidus) puis séparation par chromatographie.

On utilise plusieurs méthodes de découpages qui ne coupent pas au même endroit.

✓ CHIMIQUE :

▪ Bromure de cyanogène

Il coupe spécifiquement la liaison engageant le carboxyle de Met ($M-X \rightarrow$ à droite de la méthionine). En général il y a peu de méthionine dans une protéine ce qui induit un nombre limité de coupures au cyanogène

✓ ENZYMATIQUE

On a recours à des endopeptidases qui coupent la liaison à l'intérieur d'un peptide (*gastriques ou pancréatiques*)

▪ Pepsine

C'est une enzyme gastrique → elle agit donc en milieu **ACIDE** (elle coupe à gauche de F, Y, W) $X-FYW$

Elle coupe spécifiquement la liaison engageant l'amine d'un AA aromatique (Phe, Tyr, Trp)

Inactive si proline avant

▪ Trypsine

C'est une enzyme pancréatique → milieu **BASIQUE** (à droite de R, K) $RK-X$

Elle coupe spécifiquement la liaison engageant le carboxyle de Arg ou Lys, **sauf si proline avant Arg ou Lys**

▪ Chymotrypsine

C'est une enzyme pancréatique → milieu **BASIQUE** (à droite de F, Y, W) $FYW-X$

Elle **coupe**/hydrolyse la liaison engageant le carboxyle d'un AA aromatique

Inactive si proline après

On remarque que ces 3 enzymes sont inactives si une proline est engagée dans la liaison peptidique.

D'autres endopeptidases peuvent être utilisées comme la thermolysine ou la protéinase K (beaucoup moins utilisées). Ce sont des protéases avec une spécificité très larges. → **pas à retenir car elles sont très peu utilisées**

Les protéines résistent souvent à l'action des protéases lorsqu'elles sont sous leur forme native. Il est donc nécessaire d'utiliser des agents dénaturants qui vont désorganiser la structure 3D de la protéine comme le chlorure de Guanidium (6 mol/L) ou l'urée (8 mol/L). On dilue ensuite l'agent dénaturant jusqu'à une concentration de 1M (molaire) afin que la protéine reste dénaturée mais que la protéase puisse faire son activité.

Les fragments sont séparés par chromatographie

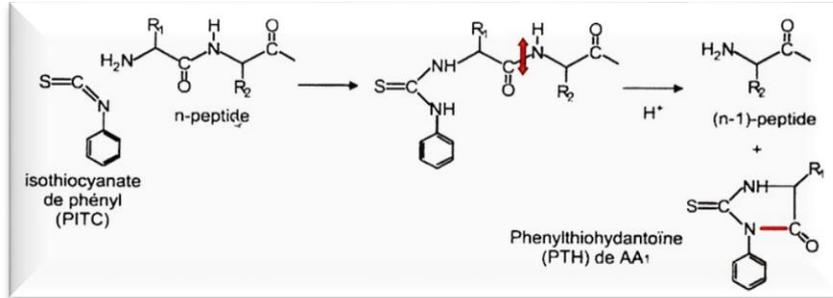
Pour savoir dans quel ordre on a recours à la méthode récurrente d'Edman

b) Séquençage : Méthode Récurrente d'Edman en 1949 (non détaillée en cours)

◆ **Méthode récurrente et automatisable**

Récurrente c'est qu'elle va toute seule s'appliquer à la suivante puis la suivante etc...

- **Détermination de la séquence N-terminale = (40 à 50 Résidus)**



En présence de PITC (*isothiocyanate de phényl*), affaiblissement de la liaison peptidique qui va spontanément se couper. L'AA en position N-terrest spécifiquement coupé par l'acide tri-fluoroacétique.

Il se reforme une autre liaison Amide,

On obtient le cycle à cinq liaisons.

La **détermination de la séquence** est obtenue après différente fragmentation sur le même peptide,

Il suffit d'identifier le PTH des AA dans l'ordre dans lequel ils étaient dans le peptide pour obtenir la séquence. Cette méthode est **répétée autant de fois qu'il y a d'AA dans le peptide**.

On va voir les PTH de AA sortir les uns après les autres.

→ C'est une méthode maintenant automatisée.

Ça marche bien au début, mais au bout de 50 AA, ça ne marche plus.

Le PTH AA va être identifié par chromatographie. La chaîne polypeptidique reste intacte et peut être récupéré et soumise à un nouveau traitement avec le PITC.

Les ponts disulfures bloquent le réactif.

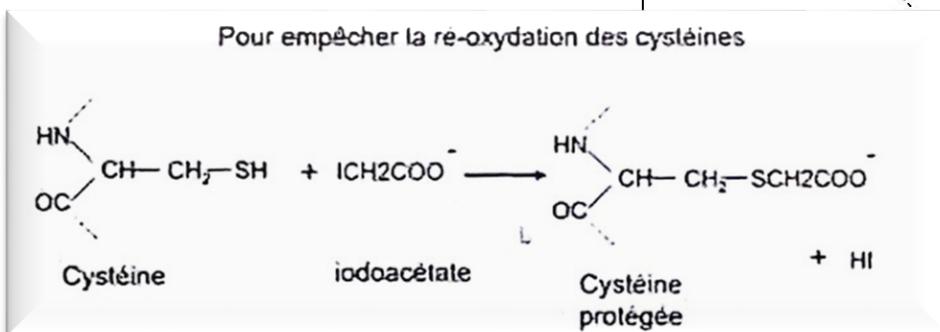
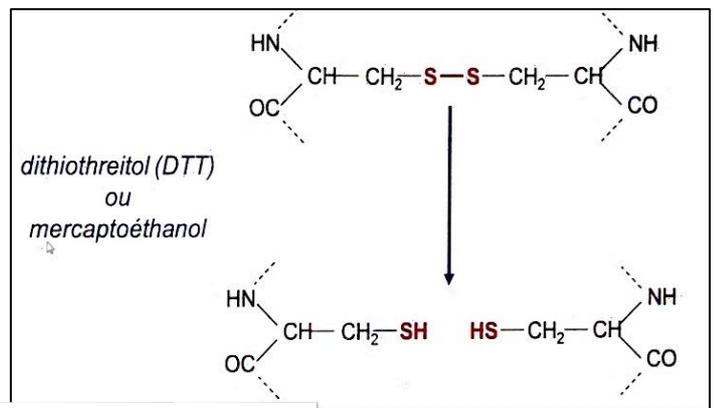
Le rendement diminue au bout de 30-40 AA

c) Coupure des Ponts S-S

Les ponts disulfures doivent être coupés avant le séquençage.

Le **DTT** (*dithiothreitol*) ou **mercaptoéthanol** coupe les points SS mais **pas les liaisons peptidiques**.

Pour empêcher la reformation des ponts s-s on utilise l'acide-iodoacétique ce qui empêche la réoxydation des cystéines.



d) Ordonnement des Fragments

→ Reconstitution **par recouvrement**

Exemple : Séquence : AVFRDYEKSV

His : 7,9

On ne connaît pas le peptide, seulement les fragments

Problème :

Dans quel ordre on les met ?

Exemple : Ala-Val-Phe-Arg-Asp-Tyr-Glu-Lys-Ser-Val (AVFRDYEKSV)

Enzyme	Fragment	
Pepsine	Ala-Val Phe-Arg-Asp Tyr-Glu-Lys-Ser-Val	AV FRD YEKSV
Ct	<i>Ala - Val - Phe</i> ↓ <i>Arg - Asp - Tyr</i> ↓ <i>Glu - Lys - Ser - Val</i>	
Trypsine	Ala-Val-Phe-Arg Asp - Tyr - Glu - Lys Ser - Val	AVFR DYEK SV

On aligne les différents fragments et on va déterminer la séquence peptidique par rapport aux différents points de connexion qu'on a entre ces différents fragments. Ça nous donne un fragment entier par recouvrement.



Edmann a automatisé la réaction qui porte son nom en créant en 1967 le premier séquenceur de protéine. Il a évolué au cours du temps.

Il a gagné :

- Sensibilité : facteur 1000
- Temps de cycle : facteur 3

Aujourd'hui, les séquenceurs sont couplés à une chromatographie HPLC qui permet d'obtenir les différents pics d'AA.

✓ Synthèse des peptides :

Pourquoi recréer des protéines ?

Prix Nobel 1965 : Richard Fedman

« Ce que je ne peux pas créer, je ne le comprends pas » donc pour comprendre les protéines on les crée. En synthétisant les protéines de leur choix les scientifiques peuvent mieux les étudier.

3 façons de synthétiser :

- Purifiées à partir d'un tissu
- Synthèse chimique direct (méthode de Merrifield, 1960 ->synthèse peptidique sur support solide)
- Génie génétique (avec des bactéries)

Correction QCM 2018

Parmi les propositions suivantes quelle est, ou quelles sont, la ou les propositions exactes :

A – Val, Met et Pro sont des aminoacides à 5 carbones.

B – Un acide alpha-aminé est dit dextrogyre quand il dévie la lumière polarisée vers la gauche de l'axe de polarisation.

C – Le chlorure de dansyl réagit avec le groupement alpha-aminé des acides aminés.

D – Lors d'une ionophorèse à pH 4,0 l'histidine (pHi = 6.0) migre vers l'anode.

E – Lors d'une chromatographie par la méthode de Stein et Moore à Ph 3,5, l'acide aspartique est élué (sort) avant la lysine.

ACE

Parmi les propositions suivantes quelle est, ou quelles sont, la ou les propositions exactes :

A – La formation de la liaison peptidique est exergonique.

B – Le peptide qui s'écrit A C R V Y N comprend une Asparagine à son extrémité C-terminale.

C – La méthode de Bradford utilise le bleu de Coomassie pour doser les protéines.

D – Le bromure de cyanogène (BrCN) provoque la rupture de la liaison peptidique de côté N-terminale d'un résidu de méthionine.

E – La synthèse chimique des peptides selon la méthode de Merrifield se réalise en phase liquide.

BC

INDICATIONS DU PROF :

Il faut connaître les formules développées des 20 AA standards

Le tryptophane a un noyau indol

Le 21^e AA n'est pas à retenir. Il faut retenir qu'il y a 20 AA (pas de piège là-dessus)

Pas de piège par rapport à « aminé » « iminé » mais il faut savoir que la proline est un acide alpha-iminé

Connaître les AA essentiels, semi-essentiels et non essentiels

Connaître les valeurs des pk1 et pk2 mais pas les pK ni les pHi

Inutile d'apprendre les formules développées des AA non constitutifs ni celles des composés chimiques utilisés pour mettre en évidence les AA ou les protéines mais il faut au moins connaître les acronymes (ex : DNF)

REPONSES AUX QUESTIONS 2018 :

La cellulose sert à la fois en électrophorèse et pour la chromatographie sur papier

L'histidine a bien un noyau aromatique en revanche ce n'est pas le cas de la proline

Les ponts S-S sont bien entre 2 cystéines

Tout ce qui a été rajouté sur les AA standards est à connaître mais il ne faut pas « se noyer dans les détails »

Le GABA et le GABA carboxy-glutamate dérive du Glutamate

L'alanine ne fait pas partie des AA essentiels chez l'homme

Les groupements ionisables de Tyr et Cys n'interviennent pas dans le calcul du pHi

La biothylation (modification post-traductionnelle) est l'ajout

d'un groupement biothine des protéines

La glutamine, la glycine et l'aspartate sont des précurseurs des bases puriques

Cathode et anode :

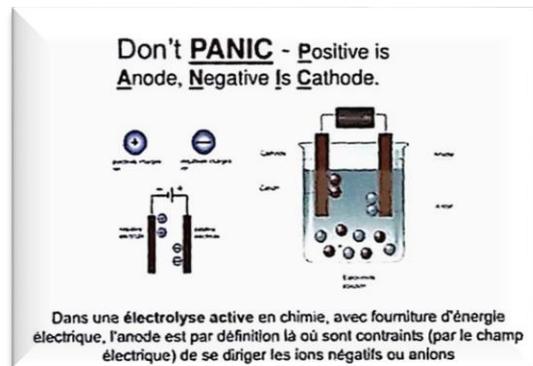
Anions migrent vers l'anode chargée positivement (+)

Cations migrent vers la cathode chargée négativement (-)

⇒ Va migrer suivant le pH !

pH < pHi : se comporte comme un cation → cathode

pH > pHi : se comporte comme un anion → anode



Inversion de polarité lorsqu'on a à faire à une pile qui va générer un courant électrique.

La méthionine a bien 5C

Tous les AA libres sont ionisables : soit par un groupement R pour les groupements R ionisables soit la fonction NH₂ en alpha ou COOH en alpha

⇒ Ils sont ionisables selon le pH utilisé

A savoir : formule développée des AA alpha mais pas celles des autres (non alpha, ...)

Les AA non constitutifs sont présents chez l'Homme

Bases puriques et pyrimidique : bases ACTG (bases au niveau de l'ADN)

L'histidine n'absorbe pas à 280 nm (pas présent dans les exemples)

Les valeurs de pK et pHi ne sont pas connaitre mais il faut tout de même connaitre Pk1 et Pk2 des groupements alpha-NH₂ (env. 1) et COOH (env. 9)

Il faut connaître lesquels sont acides et lesquels sont basiques

Les exemples de la ionophorese sont justes

$pHi = (Pk1+pK2)/2$ → Valable pour les groupements R non ionisables et il faut voir pour les autres où se situe la forme Zwitterion

Solubilité à pH acide → CYSTINE et non cystéine

Le glutamate est l'acide du glutamine → Glutamine est la forme amide du glutamate

L'aspartate est l'acide de l'asparagine → L'asparagine est l'amide de l'aspartate

La résine de chromatographie par échange d'ion est cationique dans notre cas mais il existe des résines anioniques

Histidine : est aromatique mais est plutôt classée dans les AA basique

ERREUR : erreur sur une diapo du cours : sur la formule développée de l'acide alpha-epsilon-diamino caproïque (lysine), le carbone bêta est lié à 1 seul hydrogène et non pas 2 (mais le prof a dit que cette formule n'était de toute façon pas à connaître)

homocystéine c'est une dé méthylation (on enlève un méthyl) et non une décarboxylation.