

Les protéines et les acides aminés

Ce sont les biomolécules les plus abondantes car elles représentent 50 % du poids sec d'une cellule.

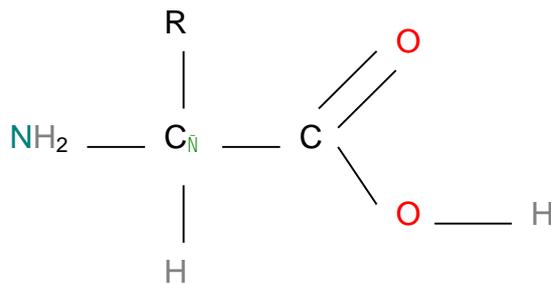
Elles sont aussi très diverses :

- Z Catalyseurs et régulateurs des voies métaboliques
 - Z Rôle constitutif passif ou actif
 - Z Rôle de défense ou d'attaque
 - Z Nutritives
- Etc ...

Ce sont des molécules linéaires constituées par l'association de plusieurs acides aminés. On dit que ce sont des polymères d'acides aminés.

I Les acides aminés

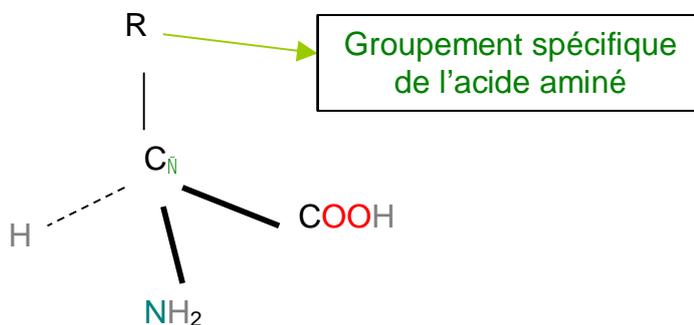
Il existe 20 acides aminés classiques différents.
Les acides aminés sont des \bar{N} -aminoacides :



Exception : La proline qui a une série de carbones entre l'amine et l'hydrogène.

A. Caractéristiques structurales communes

Les acides aminés ont un carbone \bar{N} tétraédrique lié à un groupement carboxyle COOH, un groupement amine primaire NH₂ et un atome d'hydrogène.

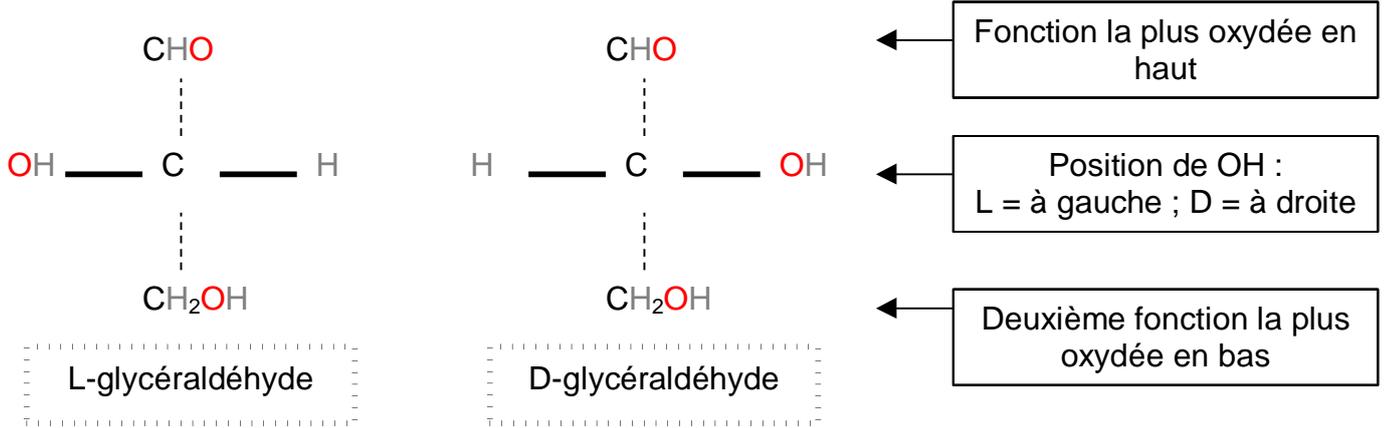


Si R est différent de H, le carbone \bar{N} est chiral. On a donc deux molécules énantiomères.

Ce sont des molécules optiquement actives. Les molécules énantiomères font tourner la plan de la lumière dans des sens opposés.

1) Système D/L : Configuration de Fischer

Exemple du glycéraldéhyde :



Pour un acide aminé : $\text{CHO} = \text{COOH}$; $\text{CH}_2\text{OH} = \text{R}$; $\text{OH} = \text{NH}_2$

Dans la nature : Les acides aminés protéiques ont tous la configuration L (sauf Gly qui n'a pas de carbone asymétrique).

Mais cela pose un problème lorsqu'il y a plusieurs carbones asymétriques.

2) Système R/S

On regarde de manière à cacher le H, puis on compte d'après l'ordre de priorité :

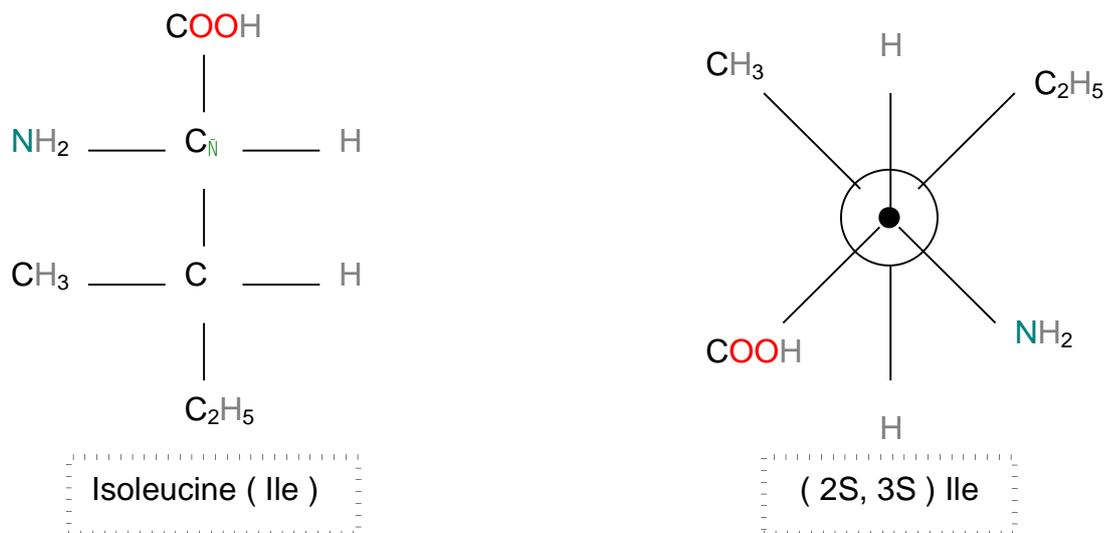
- _ Numéro atomique élevé
- _ Nombre élevé d'atomes

Cas des acides aminés :

- _ COOH est toujours prioritaire à R è configuration S
- à Sauf Cys qui est R au niveau de C_α

À deux carbones asymétriques :

On établit une projection de Newman suivant l'axe $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$.



B. Caractéristiques des chaînes latérales et classification

Classement :

Considérer la polarité de la chaîne latérale
à 3 groupes principaux

- R non-polaire ou hydrophobe
 - à aliphatique
 - à aromatique
- R polaire non-chargé
- R polaire chargé
 - à acide COO^- à $\text{pH} = 7$
 - à basique NH_3^+ à $\text{pH} = 7$

(Les AA représentés sont à connaître)

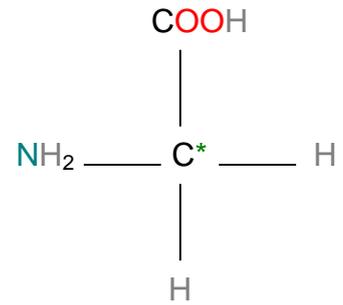
1. Acides aminés non-polaires

à 8 Aliphatiques :

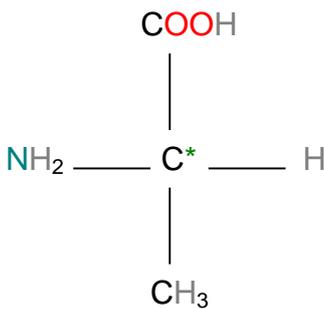
- 4 linéaires : Ala, Val, Leu, Ile
- 1 cyclique : Pro
- 1 atome soufre : Met

à 2 aromatiques : Phe, Trp

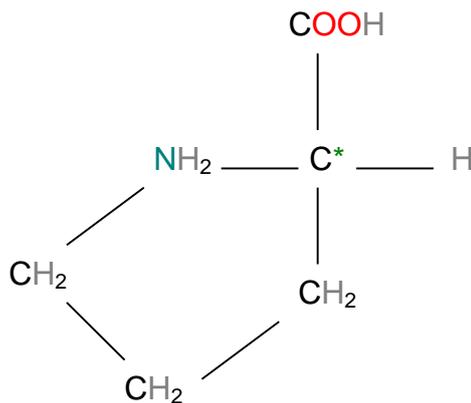
L-Glycine ou glycolle (Gly, G)



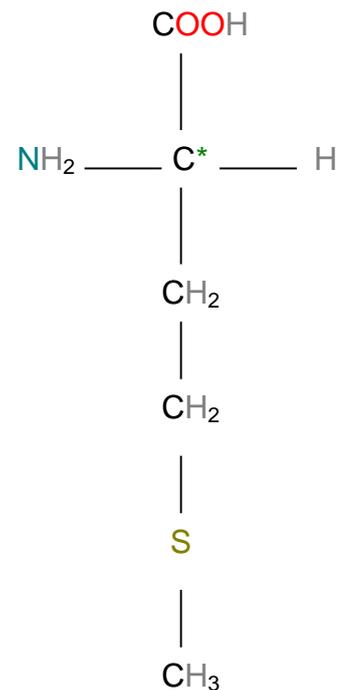
L-Alanine (Ala, A)



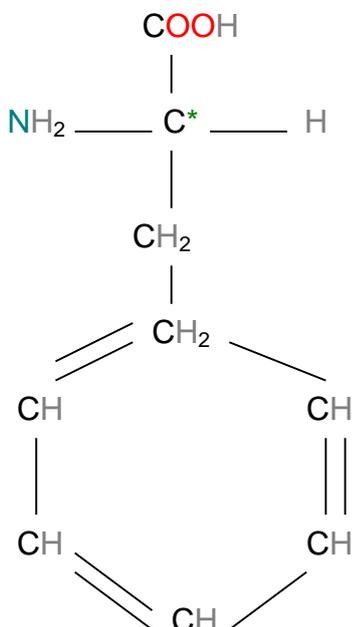
L-Proline (Pro, P)



L-Méthionine (Met, M)



L-Phénylalanine (Phe, F)



2. Acides aminés polaires non-chargés

Ils possèdent un groupe hydroxyle, amide, thiol
R peut former une liaison hydrogène avec l'eau (sauf Gly).

Cas particulier : Gly

à pas de C* , Gly ne peut pas former de liaison hydrogène.

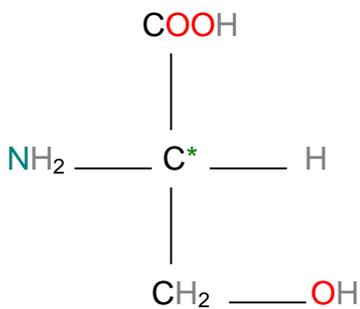
_ Fonction alcool :

Primaire : Ser

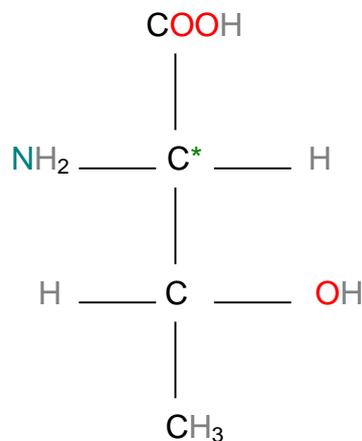
Secondaire : Thr

Tertiaire : Tyr

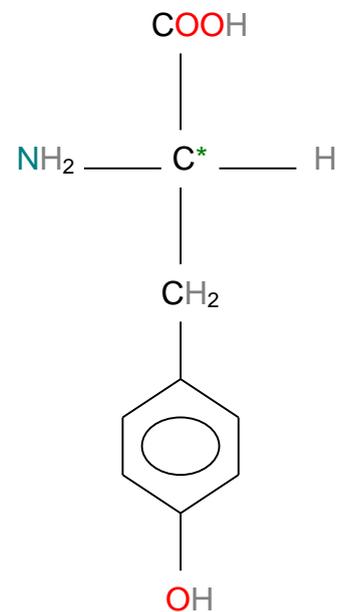
L-Sérine (Ser, S)



L-Thréonine (Thr, T)

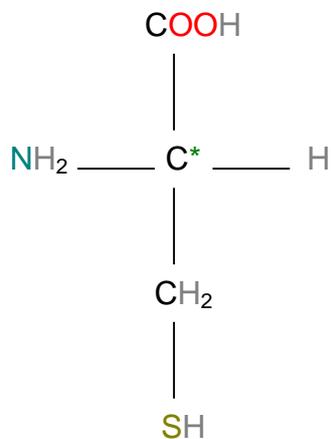


L-Tyrosine (Tyr, S)



_ Fonction thiol : Cys

L-Cystéine (Cys, C)



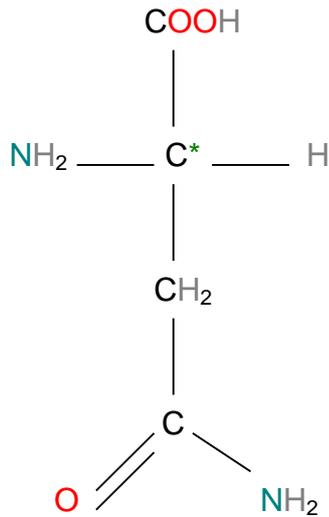
La cystéine est le seul acide aminé qui peut former un dimère, la cystine.

è Stabilise les structures tridimensionnelles

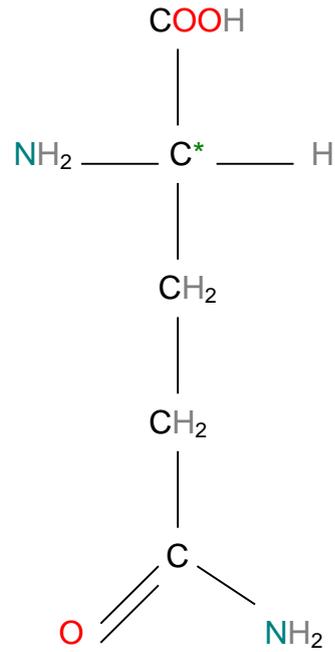
à Présente dans beaucoup de protéines

_ Fonction amide : Asn, Gln

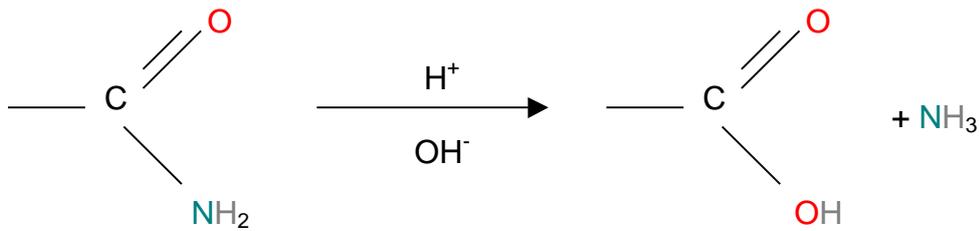
L-Asparagine (Asn, N)



L-Glutamine (Gln, Q)



Réaction spécifique :

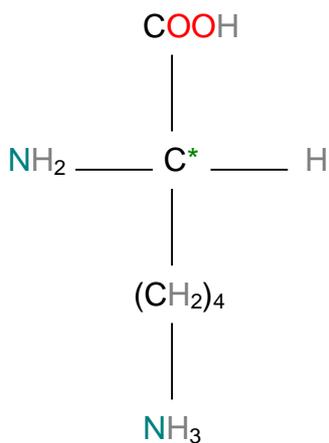


3. Acides aminés polaires chargés

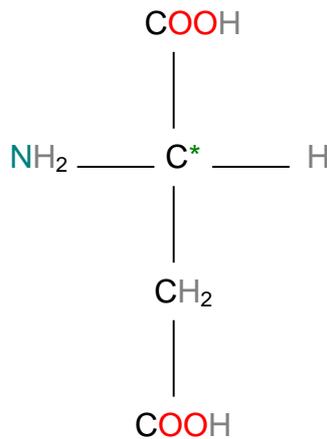
_ basiques : Lys, Arg, His

_ acides : Asp, Glu

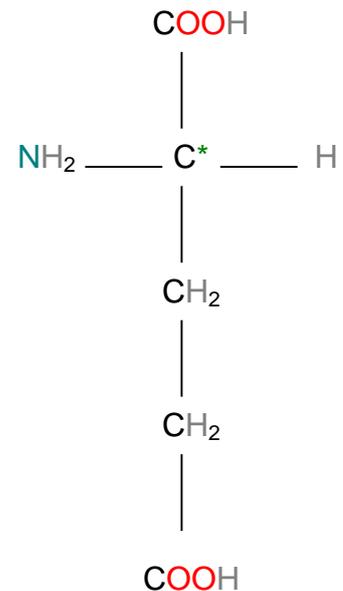
L-Lysine (Lys, K)



Acide-L-aspartique (Asp, D)



Acide-L-glutamique (Glu, E)



C. Propriétés acido-basiques

Les acides aminés ont deux ou trois fonctions ionisables, ce sont donc des donneurs et des récepteurs de protons, ce qui en fait des acides et des bases.

à Ce sont des molécules ampholytes (= base & acide)

à Certaines chaînes latérales peuvent s'ioniser.

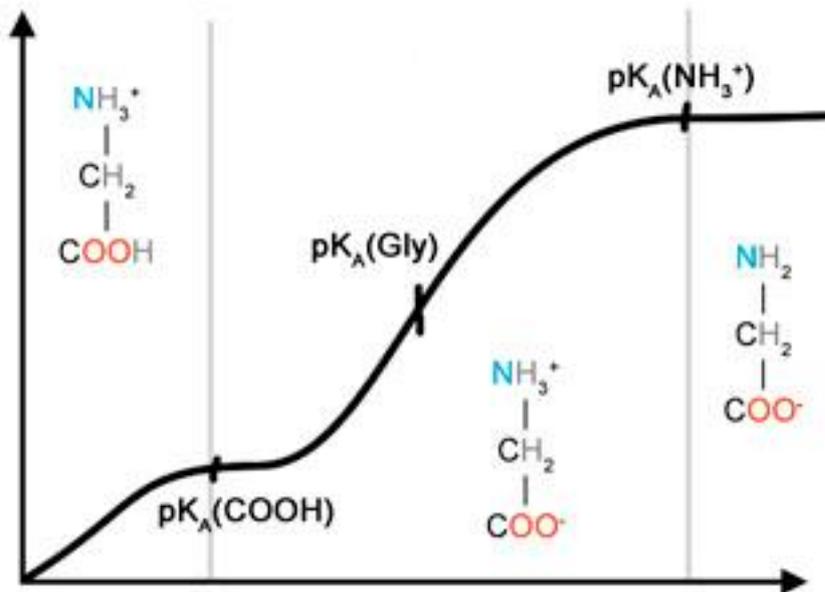
à Équation de Handerson-Hasselback :

$$\text{pH} = \text{pK}_A + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

Lorsque $\text{pH} = \text{pK}_A$: 50 % est ionisé, 50 % est non dissocié

Courbe de titration : ajout de OH^-

Ex : Gly



Gly a une **forme dipolaire complètement ionisée** mais **sous charge électrique nette neutre** à **point isoélectrique** à pH isoélectrique.

$$pI = (\text{pK}_{A1} + \text{pK}_{A2}) / 2 = 5,97$$

Intérêts de la titration :

_ valeurs des pK_A des fonctions ionisables

_ zones de pouvoir tampon = zones où le pH varie faiblement = zones de pK_A

Applications de pI :

à mobilité électrophorétique :

_ à $\text{pH} = pI$, AA neutre è ne migre pas

_ à $\text{pH} < pI$, AA positif è migre vers la cathode

_ à $\text{pH} > pI$, AA négatif è migre vers l'anode

Aussi, plus le pH est éloigné de pI, plus la charge augmente et donc plus la distance parcourue lors de la migration est grande.

à chromatographie d'échanges ioniques

C'est un tube rempli de particules de petite tailles portant des groupements s'ionisant en fonction du pH.

D. Absorption de la lumière

Elle est due à l'absorption par les électrons de l'énergie véhiculée par la radiation électromagnétique pour effectuer une transition vers un état énergétique (une orbitales) de plus haute énergie.

à Les acides aminés aromatiques (= cycliques) absorbent les rayonnements dans le proche ultraviolet ($\lambda > 240 \text{ nm}$) tandis que les autres acides aminés n'absorbent pas dans cet intervalle.

Ex : Phe : $\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$
 Trp : $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$

E. Réactions chimiques caractéristiques

Elles vont dépendre des groupements fonctionnels disponibles.

à Les groupements \bar{N} -carboxyliques et \bar{N} -aminés ont une réactivité similaire quelque soit l'acide aminé.

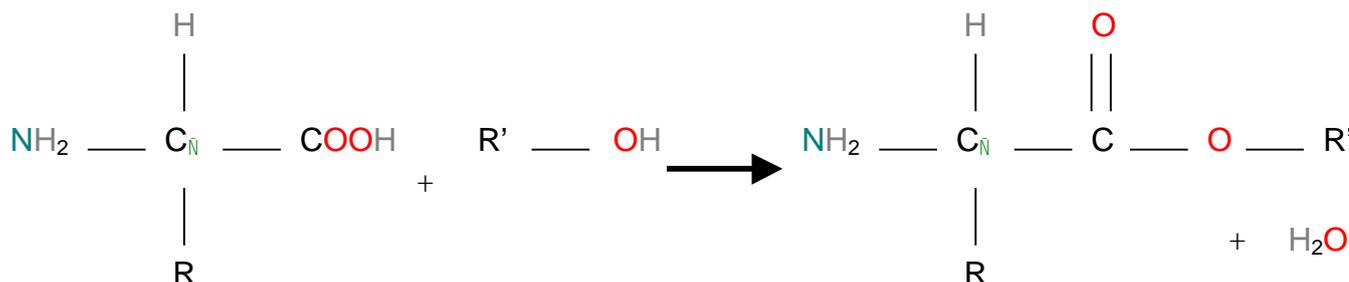
à Les chaînes latérales ont des activités diverses, qui leur donnent des possibilités de modifications spécifiques (par les enzymes).

1) Réactions du groupement carboxylique

Ils peuvent être estérifiés ou amidés.

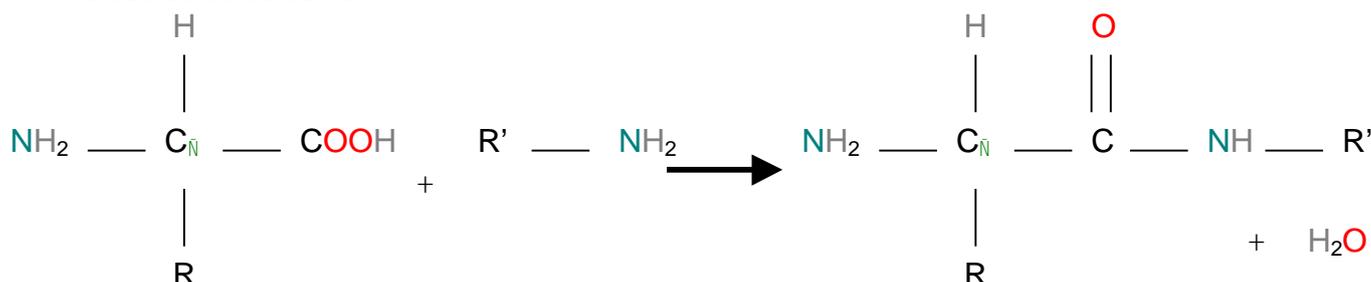
Estérification

Acide carboxylique + alcool à ester + eau



Amidation

Acide carboxylique + amine à amide + eau

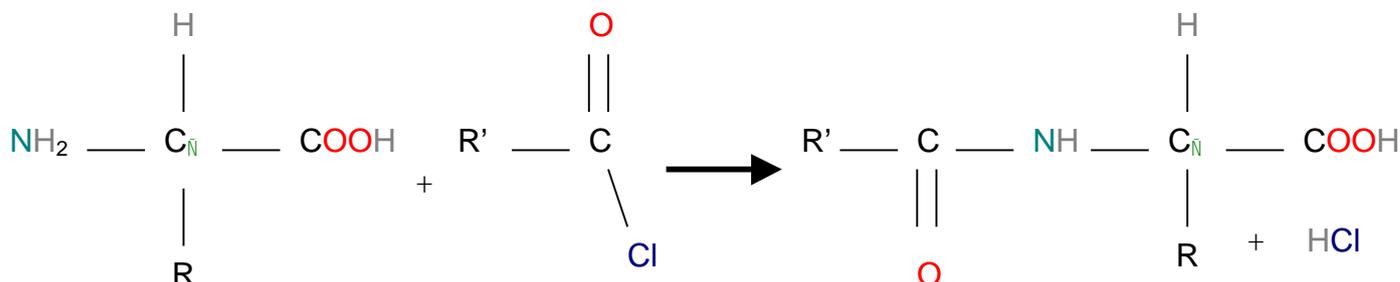


2) Réactions du groupement amine

Ils peuvent être acylés ou formylés.

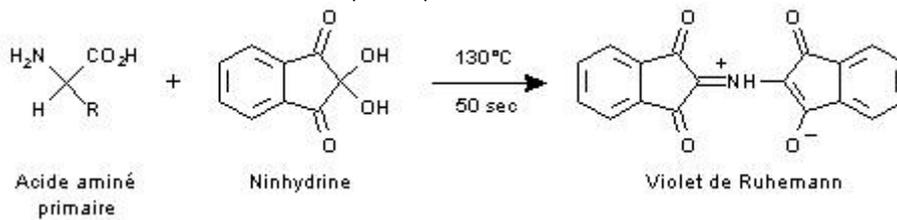
Acylation

amine + chlorure d'acide à amide + acide chlorhydrique



3) Réaction avec la ninhydrine

Le chauffage à 130°C des acides aminés en présence de ninhydrine conduit à la condensation de deux molécules de ninhydrine reliées par un atome d'azote venant de l'acide aminé. C'est le pourpre de Ruhemann.



C'est un composé violet absorbant à 570 nm. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration de l'acide aminé. Un dosage est donc possible.

4) Réactions spécifiques de la chaîne latérale

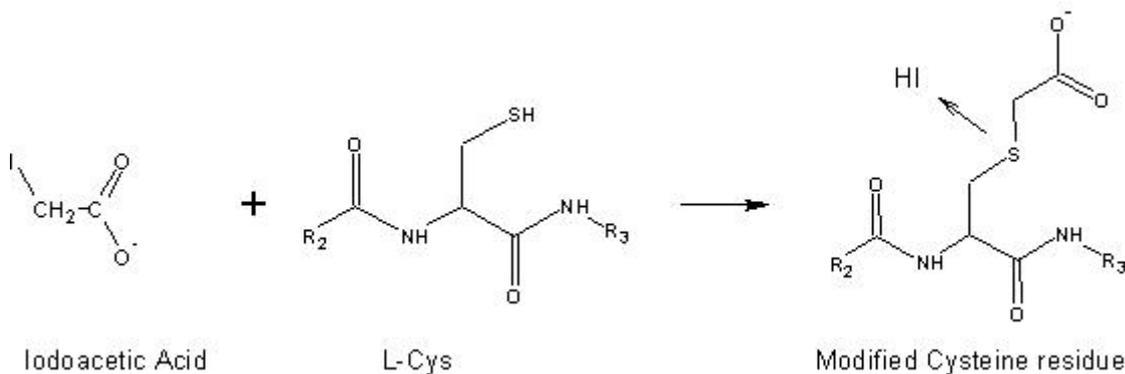
à Identification des acides aminés fonctionnels de sites actifs d'enzymes.

à Marquage des protéines

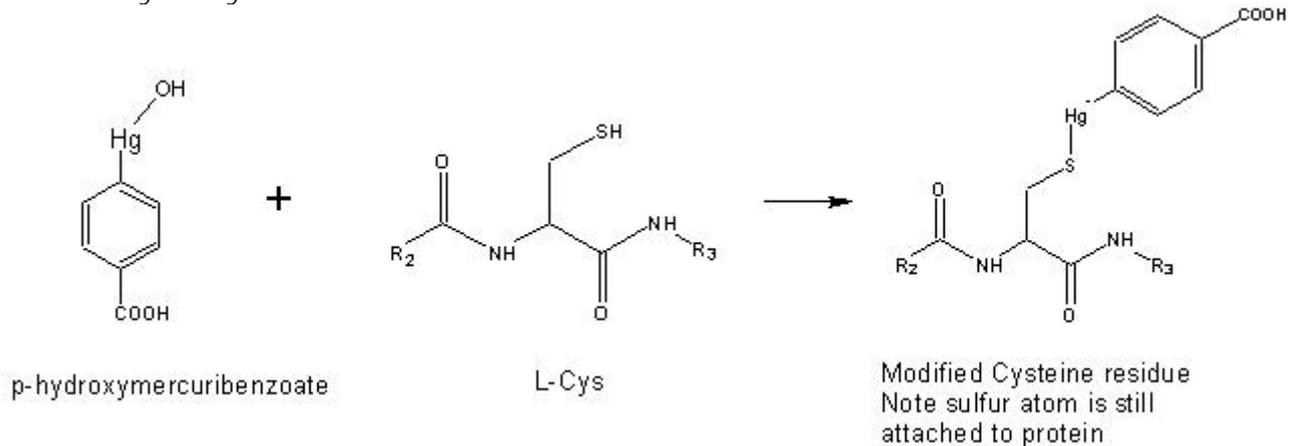
a) Cystéine

Elle possède une fonction thiol ($-\text{SH}$) qui offre de nombreuses réactions réversibles ou irréversibles.

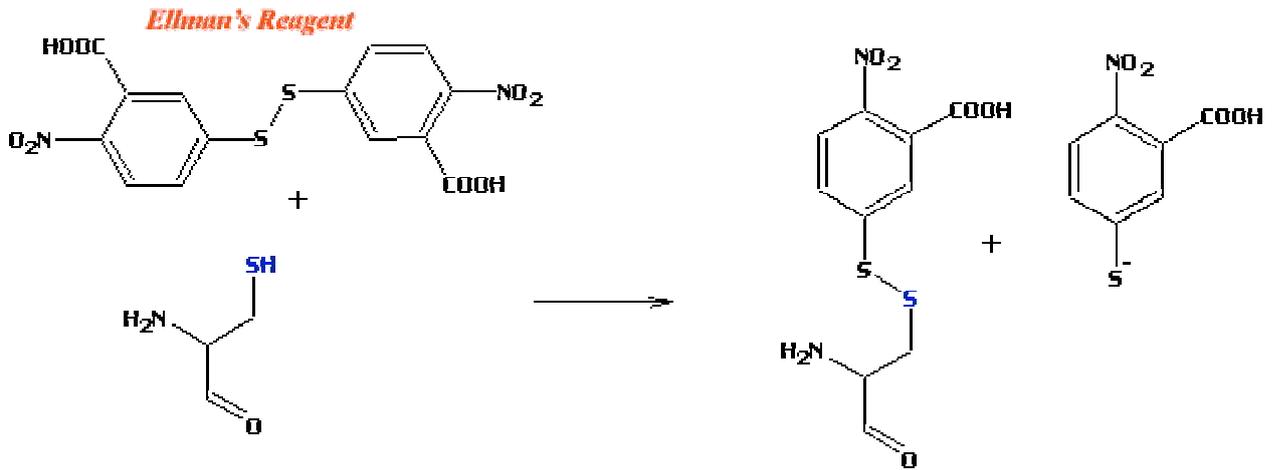
Z Iodoacétate



Z Parahydroxy-mercuribenzoate



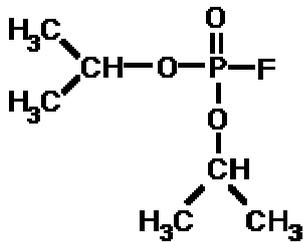
Z Réactif d'Ellman



b) Sérine

Elle possède une fonction alcool primaire (R—OH)

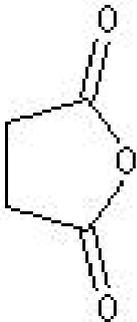
Z Diisopropyl fluorophosphate



c) Lysine

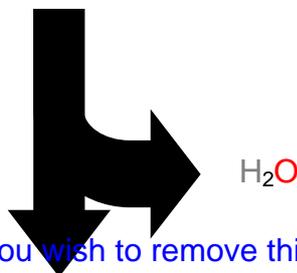
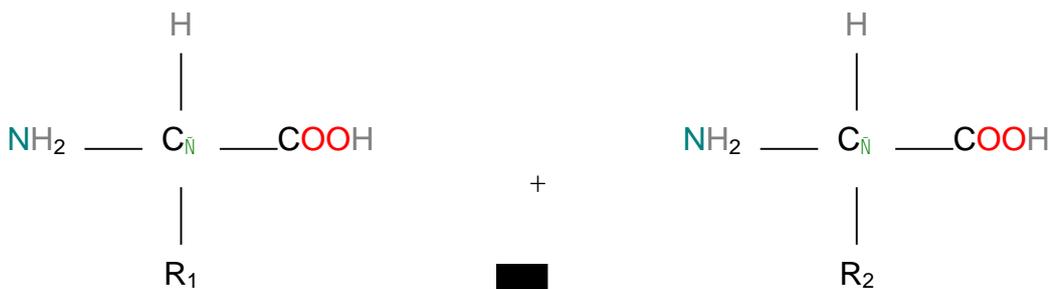
Elle possède une deuxième fonction amine (—NH₂) dans sa chaîne latérale.

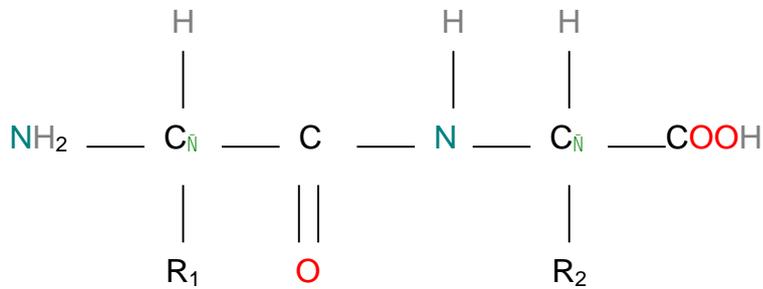
Z Anhydride succinique



5) Liaisons peptidiques

Liaison covalente mettant en jeu la fonction —COOH d'un acide aminé et fonction —NH₂ de l'acide aminé suivant. C'est une liaison amide, appelée **liaison peptidique**.





Le groupement N-aminé (—NH₂) agit comme un nucléophile déplaçant le groupement hydroxyde (—OH) de l'acide aminé 1.

h On ne peut pas deviner à l'avance la position des groupements.

a) Synthèse chimique

à Activation chimique du groupement —COOH è —OH facilement éliminé.

Il existe de nombreuses synthèses. Toutes sont complexes et ont un rendement supérieur à 95 %. Le rendement global diminue beaucoup avec le nombre d'acides aminés.

La synthèse s'effectue à partir de l'acide aminé en C-ter (le dernier) jusqu'à l'acide aminé en N-ter (le premier).

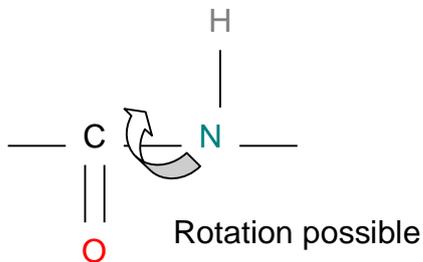
b) Synthèse cellulaire

La synthèse s'effectue à partir de l'acide aminé en N-ter jusqu'à l'acide aminé en C-ter.

Grâce à plusieurs liaisons successives avec un ARNt au sein d'un ribosome, une chaîne polypeptidique est synthétisée par traduction des codons d'ARNm.

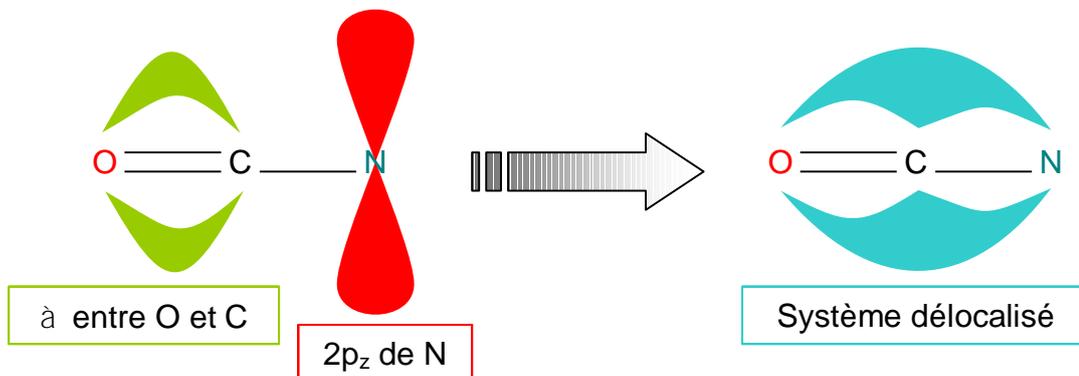
c) Caractéristiques structurales

Liaison axiale covalente "banale" :



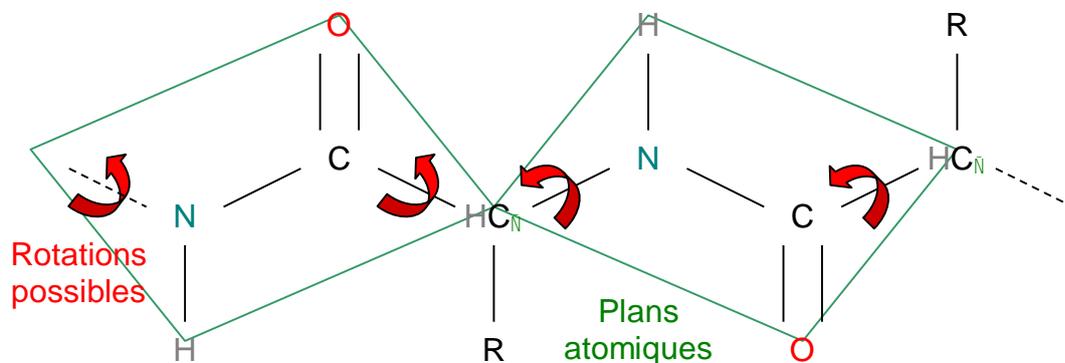
Seulement, en mesurant la longueur de cette liaison (0,132 nm), on remarque qu'elle est intermédiaire entre une liaison σ (0,147 nm) et une liaison π (0,125 nm).

à Il y a une délocalisation des orbitales :



Conséquences :

- q Les six atomes de la liaison peptidique sont dans le même plan
- q La rotation autour de la liaison entre C et N est impossible
- q Le squelette d'une chaîne polypeptidique est constitué d'une série de plans rigides séparés par les groupes méthylènes substitués $-\text{C}_\text{N}\text{HR}-$



- q Polarité de la liaison peptidique : charge positive sur N et négative sur O, la liaison peptidique est un dipôle permanent

III_ Structure primaire

La structure primaire est l'enchaînement ou la séquence d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques en prenant compte de la localisation des ponts disulfures.

On oriente la chaîne à partir du N-ter (extrémité $\text{N}-\text{NH}_2$) jusqu'au C-ter (extrémité $\text{N}-\text{COOH}$).

Intérêts de la connaissance de la structure primaire :

- | Identifier une protéine à partir d'un morceau de la séquence (établir une banque de données)
- | Comparer une même protéine issue de différentes espèce (phylogénie)
- | Rechercher des résidus importants (résidus essentiels à la fonction des enzymes)
- | Mutations de quelques acides aminés (pathologies)
- | Prédiction de la structure spatiale (logiciels de modélisation)

Stratégie de détermination de la structure primaire :

- q Préparation de la protéine : _ Déterminer le nombre de sous-unités
_ Rompre les ponts disulfures
(_ Déterminer leur composition en acides aminés)
- q Séquençage : _ Identifier les résidus N-ter et C-ter
_ Fragmenter les sous-unités
_ Purifier (= séparer) les fragments
_ Séquencer
- q Reconstitution : _ Recouvrir les peptides provenant des différentes coupures

A. Détermination des sous-unités

Identifier le nombre d'acides aminés N-ter afin de déterminer le nombre de sous-unités.

Ex : Insuline à 1 Phe et 1 Gly à 2 chaînes polypeptidiques

1) Réactifs de Songer : dinitrofluorobenzène (= DNFB)

à Réagit avec $-NH_2$

à Donne une couleur jaune intense facilement repérable par chromatographie

j Le DNFB peut réagir avec les $-NH_2$ des chaînes latérales

2) Chlorure de dansyl

à Réagit avec les fonctions amines primaires (y compris des chaînes latérales)

B. Coupure des ponts disulfures

Objectifs : _ Séparer les chaînes

_ Déstabiliser la conformation native (pour permettre l'action des protéases).

è Utilisation de réactifs chimiques :

- 2-mercapto-éthanol : CH_2OH-CH_2-SH
- dithiothéitol

C. Hydrolyse et composition en acides aminés

Objectifs : _ Connaître le nombre de chaque type d'acide aminé dans le peptide

è Pour cela, il faut couper toutes les liaisons peptidiques. On utilise l'hydrolyse en milieu acide (préférable car moins destructrice) ou basique

è Hydrolyse en milieu acide

_ Protéine solubilisée dans HCl

_ Chauffage à $110^\circ C$ pendant 10h puis attente pendant 24h ou plus

_ Variabilité : _ Résistance des liaisons peptidiques impliquant des acides aminés aliphatiques

_ Dégradation progressive des acides aminés à fonction $-OH$

_ Destruction complète de Trp

Liaisons amides : elles s'hydrolysent, on ne peut plus différencier Gln de Glu et Asn de Asp.

è Hydrolyse en milieu alcalin

_ Protéine solubilisée dans NaOH

_ Chauffage à $110^\circ C$ pendant 4 à 8h

_ Permet de déterminer Trp

_ Destruction de Cys, Ser, Thr, Arg

_ Désamination ou racémisation de divers acides aminés

Analyse des acides aminés :

On obtient la composition quantitative grâce à un analyseur.

D. Séquence : extrémités N-ter et C-ter

On peut utiliser du DNFB ou du chlorure de dansyl, mais aussi des enzymes.

1) Aminopeptidases à trouve le N-ter

Leucine aminopeptidase : tous les peptides sauf Pro

Aminopeptidase M : tous les résidus N-ter libres

2) Carboxypeptidases à trouve le C-ter

Carboxypeptidase A : tous sauf Pro, Arg, Lys en dernier et Pro en avant-dernier

Carboxypeptidase B : que si Arg ou Lys en dernier et sauf si Pro en avant-dernier

Carboxypeptidase C

3) Identification de l'acide aminé C-ter par modification chimique

Réaction d'Edman : traitement par hydrazine ($\text{NH}_2\text{—NH}_2$)

à Coupe tous les acides aminés et les ramifie sauf le C-ter qui peut alors être identifié.

Réduction de $-\text{COOH}$:

à Tous les acides aminés sont libres sauf le C-ter ramifié

j Réduction de la chaîne latérale de Asp et Glu

E. Séquence N-ter : dégradation d'Edman

L'acide aminé N-ter est marqué chimiquement puis libéré mais sans détruire le reste de la protéine. On peut recommencer le cycle 20 à 50 fois. Une méthode automatisée existe grâce à un séquenceur.

à rapide : un résidu toutes les 30 minutes

à sensible : 50 μmol de protéine suffisent

à Proline : sa présence augmente la durée de 50%

F. Séquence : fragmentation de la chaîne par hydrolyse spécifique

Le séquençage direct ne s'effectue qu'avec des polypeptides de moins de 40 résidus (sinon, c'est trop long).

à On découpe la molécule et on croise les résultats.

1) Trypsine

à Coupe après Lys et Arg sauf si Pro est après.

C'est une enzyme très spécifique, elle est très utilisée.

2) Chymotrypsine

à Coupe après Phe, Tyr, Trp, Leu

Spécificités différentes de la trypsine, des recouvrements sont possibles.

3) Clivage chimique

_ Bromure de cyanogène (CNBr)

à Coupe Met