

I- LES ACIDES AMINES

1. Introduction

Les protéines sont des biomolécules de première importance :

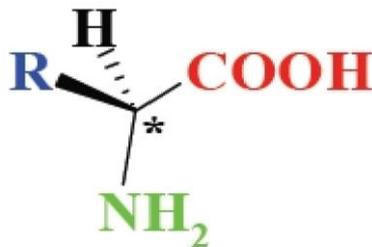
- par leur **présence universelle** dans le monde vivant, seuls des viroïdes en sont dépourvus.
- par leur **abondance cellulaire** : c'est le premier constituant après l'eau (10 fois plus que des glucides)
- par leur **extrême diversité** : elles assurent des fonctions vitales tant structurales que dynamiques et de plus elles sont le support de la spécificité des "espèces."

Elles sont constituées par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques qui sont des copolymères d'environ une vingtaine **d'acides aminés** appartenant à la série L. Ces acides aminés sont liés entre eux par des liaisons amides : les **liaisons peptidiques**. Il existe de nombreuses classifications des protéines qui reposent soit sur leur composition soit sur leurs propriétés (**fonctionnelles** ou **physicochimiques**) soit sur leur forme tridimensionnelle.

I- LES ACIDES AMINES

1- STRUCTURE DES ACIDES AMINES PROTEIQUES

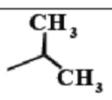
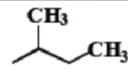
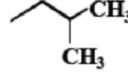
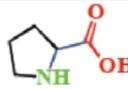
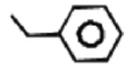
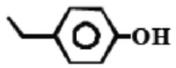
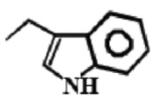
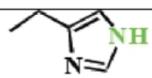
Les acides aminés protéiques sont nommés ainsi parce qu'ils constituent les "briques" permettant d'élaborer les protéines. Ces acides aminés sont au nombre de 20 et possèdent une structure de base identique: la fonction acide est une fonction acide carboxylique portée par le même carbone que la fonction amine comme le montre la figure. La fonction amine est donc en α de la fonction acide d'où leur nom: acides α -aminés ou encore α -aminoacides. On a l'habitude d'utiliser des abréviations à trois lettres ou à une lettre pour cette série de vingt aminoacides.



Chaque acide aminé se distingue de l'autre par son résidu. Ces 20 groupements peuvent être classés en plusieurs catégories (chaque acide aminé est repéré par un code officiel à **1 ou 3 lettres**) :

- Les **5 aliphatiques** la glycine (Gly/G), l'alanine (Ala/A), la valine (Val/V), la leucine (Leu/L) et l'isoleucine (Ile/I). Ils constituent souvent les poches hydrophobes des protéines.
- La **Proline** (Pro/P), dont la fonction amine est secondaire, permet les changements de direction dans les protéines (coudes b).
- Les 3 aromatiques : la phénylalanine (Phe/F), de la tyrosine (Tyr/Y) et du tryptophane (Trp/W).
- Les 2 hydroxylés : la serine (Ser/S) et de la thréonine (Thr/T).
- Les 2 soufrés : la cystéine (Cys/C) et la méthionine (Met/M).
- Les 3 basiques : la lysine (Lys/K), l'histidine (His/H) et l'arginine (Arg/R).
- Les 2 acides carboxyliques : l'acide aspartique (Asp/D) et l'acide glutamique (Glu/E)
- Les 2 amides : l'asparagine (Asn/N) et la glutamine (Gln/Q).

**Les 20 acides aminés protéiques, leur chaîne latérale (résidu R)
et leurs codifications internationales.**

Catégorie	Acide Aminé	Chaîne latérale	Code [3/1 lettre(s)]
Aliphatiques	Glycine	-H	Gly / G
	Alanine	-CH ₃	Ala / A
	Valine		Val / V
	Leucine		Leu / L
	Isoleucine		Ile / I
Amine II^{aire}	Proline	 (formule complète)	Pro / P
Aromatiques	Phénylalanine		Phe / F
	Tyrosine		Tyr / Y
	Tryptophane		Trp / W
Hydroxylés	Serine	-CH ₂ -OH	Ser / S
	Thréonine		Thr / T
Soufrés	Cystéine	-CH ₂ -SH	Cys / C
	Méthionine	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	Met / M
Basiques	Lysine	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Lys / K
	Arginine	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N ^H (NH ₂)=NH	Arg / R
	Histidine		His / H
Acides Carboxyliques	Acide aspartique	-CH ₂ -COOH	Asp / D
	Acide glutamique	-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Glu / E
Amides	Asparagine	-CH ₂ -CONH ₂	Asn / N
	Glutamine	-CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂	Gln / Q

2- QUELQUES FONCTIONS DES ACIDES AMINES PROTEIQUES

L'organisme ne synthétise pas tous Les acides aminés (His, Leu, Ile, Met, Lys, Phe, Thr, Trp, Val) sont dits "essentiels" et doivent être apportés par l'alimentation.

a- Acides aminés essentiels:

Les fonctions des acides aminés essentiels sont nombreuses. Ils peuvent donner naissance à d'autres catégories de molécules. **Le tryptophane** est le précurseur de la **sérotonine** (neurotransmetteur) et du NADH. La décarboxylation de l'histidine a pour produit l'histamine, un puissant vasodilatateur.

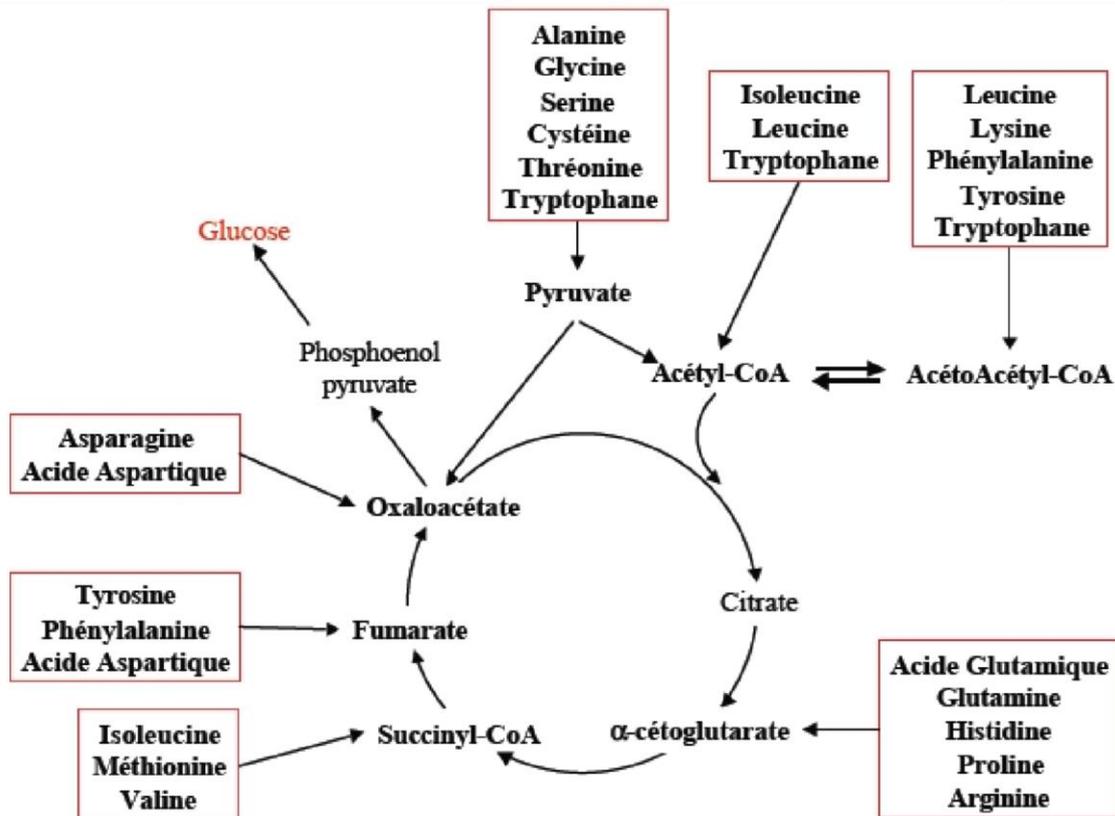
De plus, ils peuvent servir de précurseurs à la biosynthèse d'acides aminés non essentiels. Par exemple, l'histidine peut être convertie en acide glutamique, la phénylalanine peut être oxydée pour donner la tyrosine.

b- Acides aminés non essentiels

Les acides aminés non essentiels peuvent aussi être convertis en d'autres acides aminés non essentiels. L'acide glutamique peut être ainsi transformé en glutamine, proline ou arginine.

De même, ils sont à l'origine de nombreuses autres molécules. **La serine** intervient dans la biosynthèse de **la sphingosine**. **L'acide aspartique** intervient dans la biosynthèse des bases **pyrimidiques et puriques** des nucléotides. **La tyrosine** est à l'origine de **la thyroxine**, hormone thyroïdienne, ou de neurotransmetteurs comme **la dopamine** et **l'épinéphrine**.

Les acides aminés interviennent dans plusieurs cycles vitaux comme le cycle de Krebs.

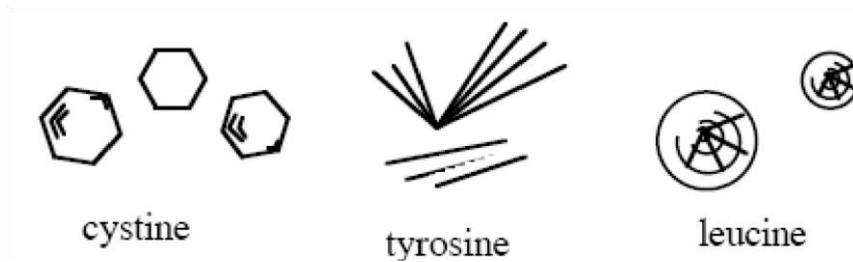


Devenir des acides aminés libres dans l'organisme.

3- Propriétés physiques.

3-1 Cristallisation.

Les acides aminés sont pour la plupart cristallisables et les cristaux se décomposent avant de fondre.



Quelques cristaux d'acides aminés

3-2 Solubilité.

La solubilité des aminoacides dans l'eau (de un gramme à une centaine par litre) va dépendre essentiellement de deux facteurs :

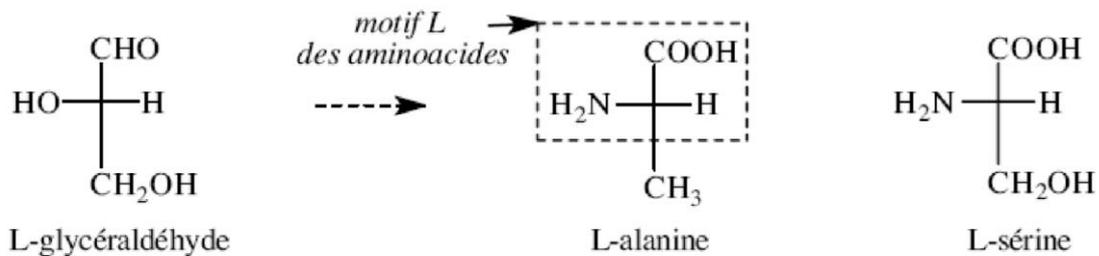
- le double groupement fonctionnel commun qui peut s'ioniser et donc favoriser la dissolution
- la chaîne latérale qui peut avoir un caractère plus ou moins polaire ou apolaire. La solubilité dans les solvants organiques est faible de quelques mg/L et encore moins dans les solvants plus apolaires. En présence de deux phases liquides (éthanol/eau), les aminoacides se répartissent dans les deux phases avec des coefficients de partage spécifique : cette propriété est utilisée pour les classer.

GLY, ALA..... bien solubles

LEU, TYR, CYSTINE..... très peu solubles et cristallisent spontanément dans les hydrolysats digestifs ou bactériens et dans l'urine dès que leur concentration s'élève.

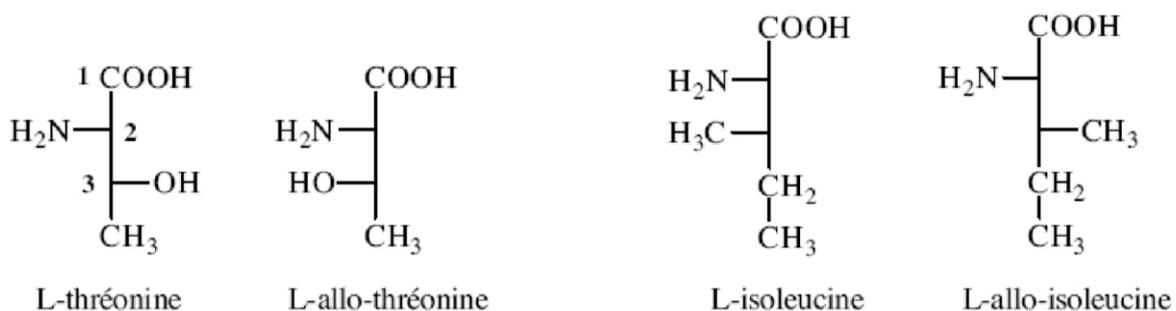
3-3 La chiralité

A l'exception de la glycine, le carbone α porte quatre substituants différents : c'est donc un centre chiral dont la conformation définira les stéréoisomères, isomères optiques ou énantiomères.



Les acides aminés des protéines appartiennent tous à la série L. Comme pour les oses, aucune prédiction du pouvoir rotatoire ne peut être faite : un aminoacide de la série L peut être lévogyre ou dextrogyre.

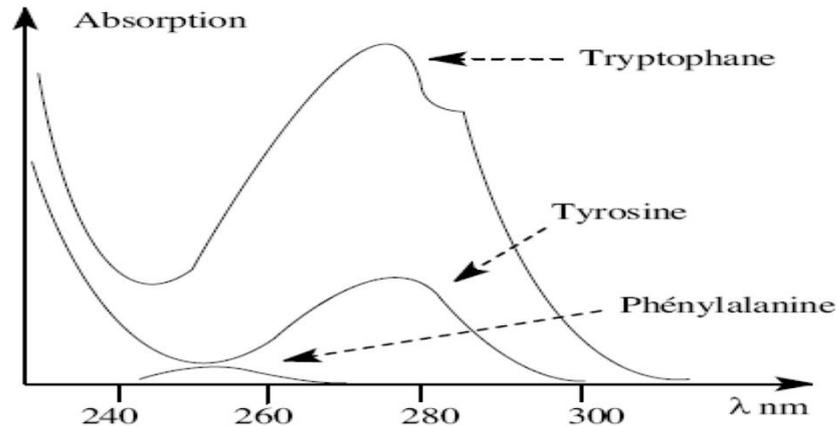
Cas d'acides aminés ayant un deuxième centre chiral : Le carbone 3 de la thréonine et de l'isoleucine est aussi un centre chiral : leur énantiomère (L) existera sous deux formes épimères. On affecte le préfixe "allo" à l'épimère que l'on ne trouve pas dans les protéines :



3-4 Absorption et fluorescence

a- Absorption

- les aminoacides n'absorbent pas la lumière visible, leurs solutions sont incolores.
- les chaînes latérales aromatiques des aminoacides ont des spectres d'absorption caractéristiques dans l'ultraviolet :



Spectres d'absorption des aminoacides aromatiques dans l'ultra-violet

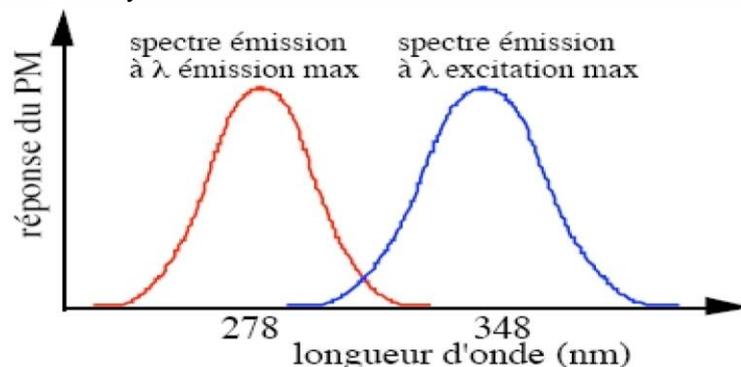
Tous les acides aminés présentent une absorption importante aux longueurs d'onde inférieures à 230 nm. Les acides aminés aromatiques (TRP 280 nm, TYR 275 nm, PHE 257nm). Applications au dosage. La loi de Beer Lambert permet donc leur dosage en UV.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \text{ et } A = \log (I_0 / I)$$

ϵ coefficient d'absorption molaire (molaire \cdot l \cdot cm $^{-1}$).

b- Fluorescence.

Parmi les acides aminés seul le tryptophane, grâce à la structure de son noyau indolique, est fluorescent. Ainsi soumis à un rayonnement à 278 nm il émet une fluorescence à 348 nm.

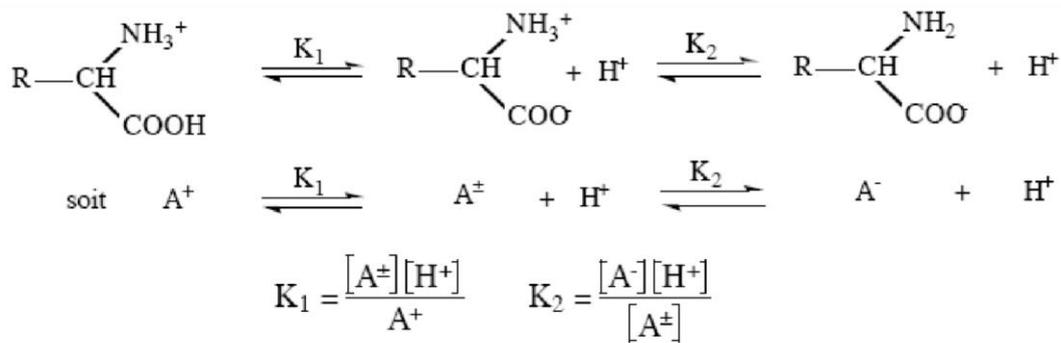


3-5 Ionisation

a- Fonctions primaires

Nous appellerons fonctions primaires la fonction acide carboxylique et la fonction amine portées par le carbone chiral.

- le **point isoélectrique** est le pH pour lequel la charge de l'ion dipolaire est nulle.



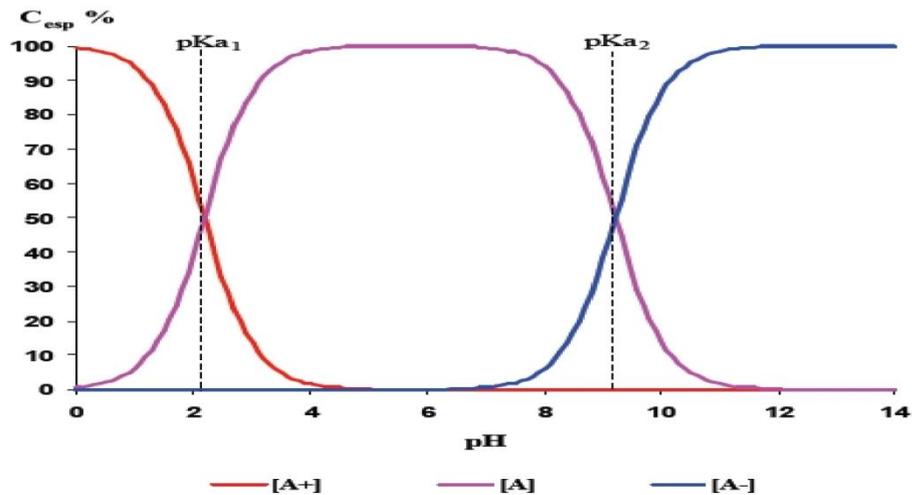
ce qui conduit à :

$$K_1 \cdot K_2 = [\text{H}^+]^2 \cdot \frac{[A^-]}{[A^+]}$$

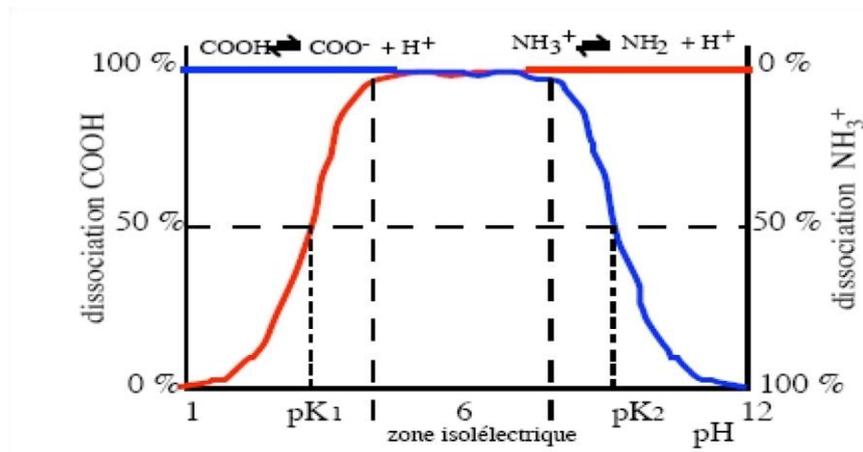
au pHi on a $[A^-] = [A^+]$ d'où $K_1 \cdot K_2 = [\text{H}^+]^2$ soit encore:

$$\text{pH}_i = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2)$$

La concentration en chaque espèce est donc fonction du pH des solutions et peut être représentée sous forme de courbe où il est alors facile de visualiser quelle espèce est majoritaire pour un pH donné.



Répartition (C_{esp} en %) des formes ioniques (A^+ = cationique, A^\pm = zwitterionique, A^- =anionique) de la serine en fonction du pH de la solution ($\text{p}K_a$ de la serine).



Le pka correspond au ph de demi-ionisation de l'acide faible par une base forte



Si $[A^-] = [AH]$ (A demi salification)

$$K_a = \frac{[AH][H^+]}{[AH]} = [H^+]$$

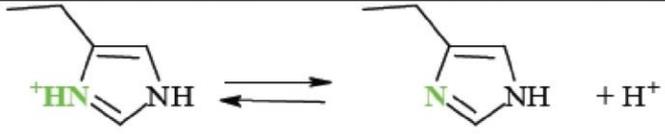
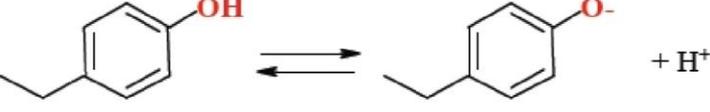
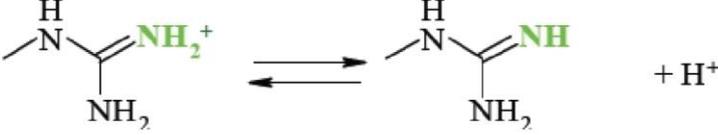
$$K_a = [A^-][H^+]/[AH] \quad \log K_a = \log [H^+] + \log A^-/AH$$

$$\log [H^+] = -\log K_a + \log A^-/AH$$

$$\mathbf{pH = pKa + \log[A^-]/[AH]}$$

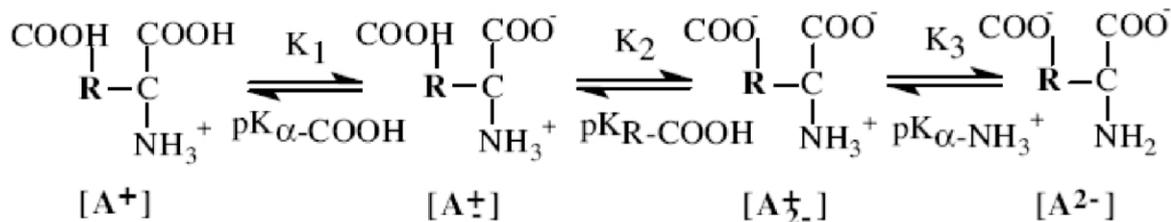
b- Chaînes latérales ionisables

Sept acides aminés, présentés dans le tableau, ont une chaîne latérale capable de s'ioniser.

Acide aminé	Dissociation
Asp, Glu	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$
His	
Cys	$-\text{CH}_2-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{CH}_2-\text{S}^- + \text{H}^+$
Tyr	
Lys	$-\text{[CH}_2\text{]}_4-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{[CH}_2\text{]}_4-\text{NH}_2 + \text{H}^+$
Arg	

Aminoacides à chaîne latérale comportant une fonction acide

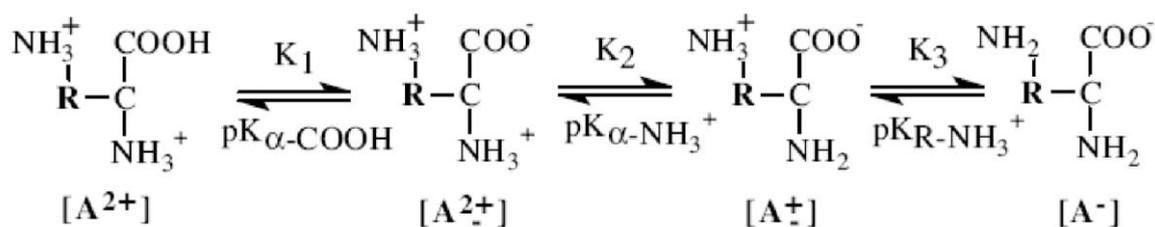
(le pK du COOH de la chaîne latérale est plus élevé que le pK du α-COOH et plus faible que le pK de l'α-amine) :



$$\text{pH}_i = \frac{1}{2}(\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

Aminoacides à chaîne latérale comportant une fonction base

(le pK de la fonction α-amine est plus faible que celui de la fonction R-amine) :



nom	syn 3 ou 1 lettre	pI = $\frac{\text{pK}_2 + \text{pK}_3}{2}$		pK _{a2} αCOOH	pK _{aR} αNH ₃ ⁺	pI
		moindre	αCOOH			
alanine	ALA, A	89,1	2,35	9,69		6,02
arginine	ARG, R	174,2	2,17	9,04	12,48	10,76
asparagine	ASN, N	132,1	2,02	8,80		5,41
acide aspartique	ASP, D	133,1	2,09	9,82	3,86	2,97
cystéine	CYS, C	121,1	1,96	10,28	8,18	5,07
glutamine	GLN, Q	146,1	2,17	9,13		5,65
acide glutamique	GLU, E	147,1	2,19	9,67	4,25	3,22
glycine	GLY, G	75,1	2,34	9,78		6,06
histidine	HIS, H	155,2	1,82	9,17	6,00	7,58
isoleucine	ILE, I	131,2	2,36	9,68		6,02
leucine	LEU, L	131,2	2,36	9,64		6,00
lysine	LYS, K	146,2	2,18	8,95	10,53	9,74
méthionine	MET, M	149,2	2,28	9,21		5,75
phénylalanine	PHE, F	165,2	1,83	9,24		5,53
proline	PRO, P	115,1	1,99	10,60		6,30
sérine	SER, S	105,1	2,21	9,15		5,68
thréonine	THR, T	119,1	2,71	9,62		6,16
tryptophane	TRP, W	204,2	2,38	9,39		5,89
tyrosine	TYR, Y	181,2	2,30	9,11	10,07	5,65
valine	VAL, V	117,1	2,32	9,62		5,97

$$A = \log P_{\text{alcane}} - \log P_{\text{aa}}$$

3-6 Polarité :

La polarité (A) des acides aminés peut être estimée par calcul

Le log P_{alcane} est relié à son volume moléculaire (V) par l'équation

$$\text{LogP}_{\text{alcane}} = 3,087 \cdot 10^{-2} V + 0,386$$

Acides Aminés	Δ
Glycine	5,1
Alanine	5,7
Cystéine	6,0
Serine	6,1
Valine, Leucine, Proline	6,2
Isoleucine	6,3
Thréonine	6,4
Méthionine	6,6
Phénylalanine	6,7
Acide aspartique	7,2
Tryptophane, Asparagine	7,3
Glutamine, Histidine	7,4
Tyrosine	7,5
Acide glutamique	7,6
Lysine	8,7
Arginine	9,1

Classement des 20 acides aminés protéiques par polarité croissante. à

4-Propriétés chimiques

Les **réactions chimiques** caractéristiques des acides aminés sont celles de leurs groupements fonctionnels (α carboxyle, α aminé et chaîne latérale); ces réactions sont utiles dans la biochimie des protéines pour :

- doser individuellement les acides aminés présents dans des hydrolysats de protéines
- déterminer la séquence
- identifier dans des protéines natives les acides aminés impliqués dans l'expression d'une fonction biologique
- modifier de façon contrôlée des aminoacides - synthétiser des peptides.

4-1. Propriétés des groupements carboxyles.

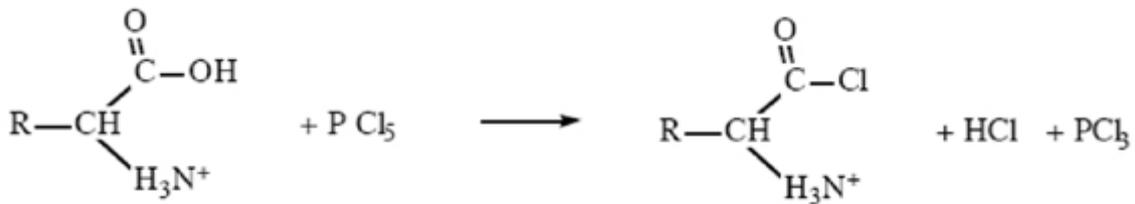
a- Formation de sels en présence de bases.

La fonction acide est estérifiable par des alcools. Ainsi les esters méthyliques (obtenus en milieu acide) sont volatils et permettent des dosages par chromatographie en phase gazeuse.



b- En présence de pentachlorure de phosphore ou de chlorure de thionyle (SOCl₂) des chlorures d'acide sont obtenus.

Il est d'abord nécessaire de protéger le groupement aminé par acétylation.



La fonction COOH peut être réduite en alcool en présence de borohydrure de sodium ou de lithium

Cette réaction permet l'identification de l'acide aminé C terminal des protéines.

c- Décarboxylation.



Quelques produits de décarboxylation d'acides aminés :

- **sérine** : produit de décarboxylation : éthanolamine qui est le précurseur de la choline des phospholipides

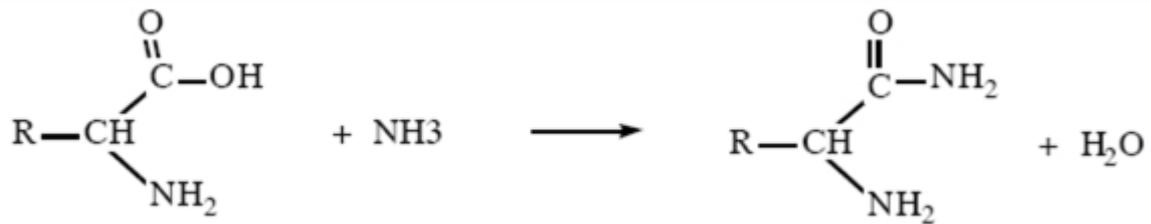
- **histidine** : produit de décarboxylation : histamine qui est un vasodilatateur intervenant dans les réactions d'allergie ou d'inflammation

- **acide glutamique** : produit de décarboxylation : 4-aminobutanoïque ou "GABA" qui est un neurotransmetteur.

In vivo, ces réactions sont importantes, les amines formées étant soit physiologiquement actives soit toxiques (histamine, tryptamine, cadavérine, etc).

d- Amidation

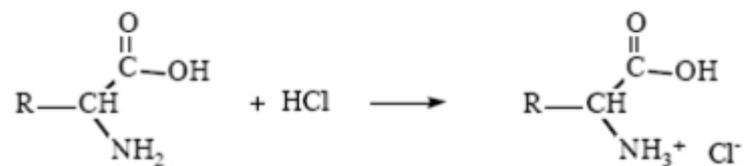
Elle peut être réalisée en présence d'ammoniac.



L'asparagine et la glutamine sont des amides des fonctions β et γ carboxyliques d'ASP et GLU respectivement qui sont naturellement présentes dans la plupart des protéines. Leur rôle dans l'établissement de nombreuses liaisons hydrogène coopératives contribue de façon déterminante à la structure de nombreux aliments pâteux ou gélifiés.

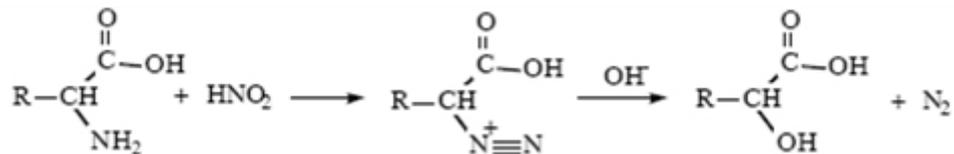
4-2 Propriétés de la fonction amine.

a- Formation de sels.

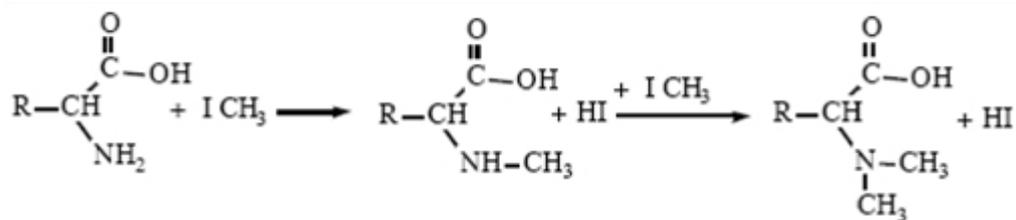


b- Diazotation par l'acide nitreux .

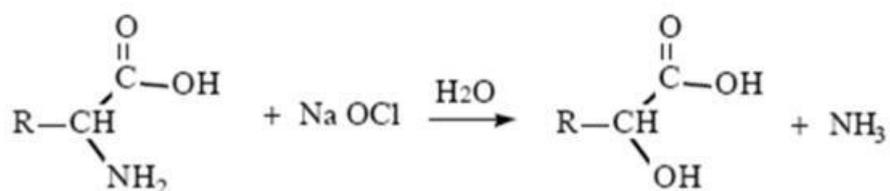
La mesure du volume d'azote permet le dosage : méthode de **Van Slyke**



c- Méthylation par l'iodure de méthyle



d- Désamination en milieu hypochlorite

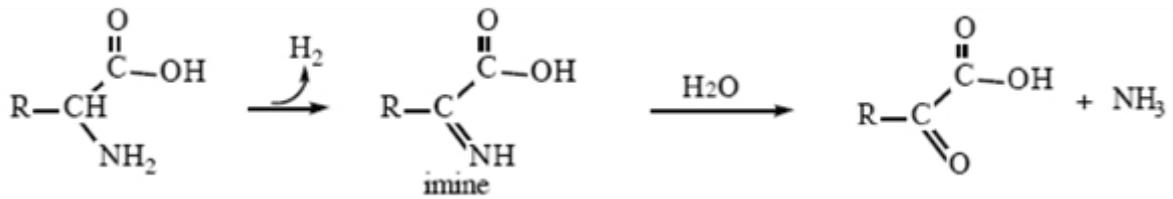


Cette réaction permet le dosage des acides aminés (méthode de Polonowski).

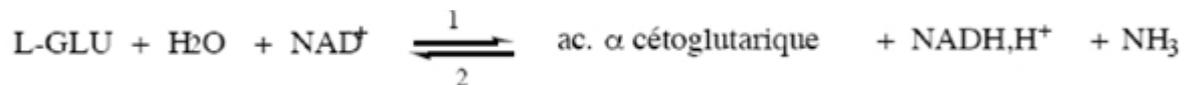
e- Désamination par voie enzymatique.

Les deux types principaux de désamination sont les suivants :

- **désamination oxydative** qui conduit à un acide α cétonique selon la réaction suivante

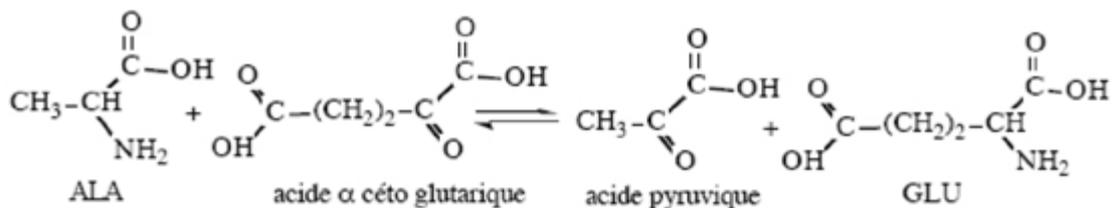


Les enzymes sont stéréospécifiques (aminoacide oxydases). Par exemple la L- glutamate décarboxylase joue un rôle biologique très important ; elle catalyse la réaction suivante:



Dans le sens 1 l'enzyme catalyse la désamination de l'acide glutamique. Dans le sens 2 c'est l'amination réductrice de l'α céto glutarate qui est catalysée.

- **La transamination** est un transfert direct de la fonction amine à un acide α cétonique. Les enzymes impliquées sont des transaminases ou amino-transférases.

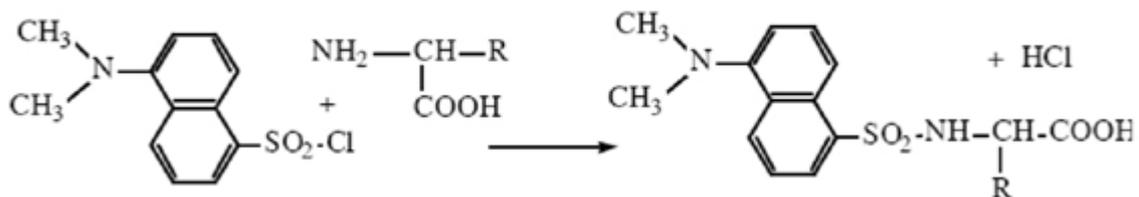


Ces réactions sont impliquées dans les synthèses et les dégradations des acides aminés

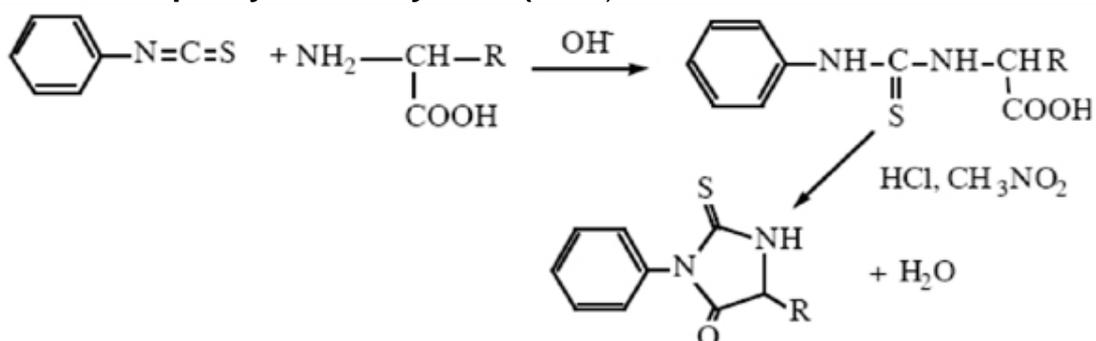
f- Réactions de condensation.

- **Réaction avec le chlorure de dansyle.**

Ce réactif permet d'obtenir des dérivés sulfamides très fluorescents.



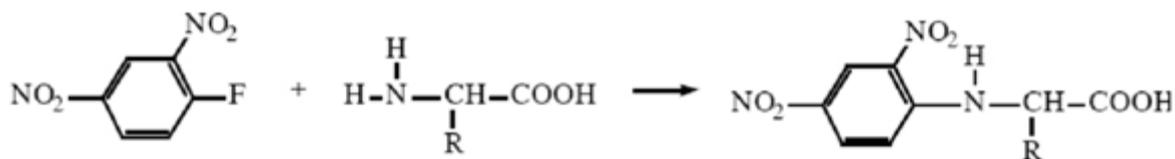
- **Réaction au phényl-isothiocyanate (PITC).**



Le phényl-isothiocyanate réagit avec les acides aminés pour former des dérivés facilement détectables dans l'UV. Les phényl-thiocarbamyls (PTC) sont transformables en dérivés phényl-thiohydantoïne (PTH) en milieu chlorhydrique en présence de méthyl-nitrosamine. Cette réaction est utilisée pour déterminer la séquence des protéines (**réaction d'Edman**).

- **Réaction avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (réaction de Sanger).**

Ce réactif donne une arylation quantitative avec les amines libres. Les dérivés dinitrophénylés sont colorés en jaune et sont stables à l'hydrolyse acide : ils permettent le dosage de l'acide aminé N terminal mais aussi, dans des conditions adaptées des amines des chaînes latérales (LYS).

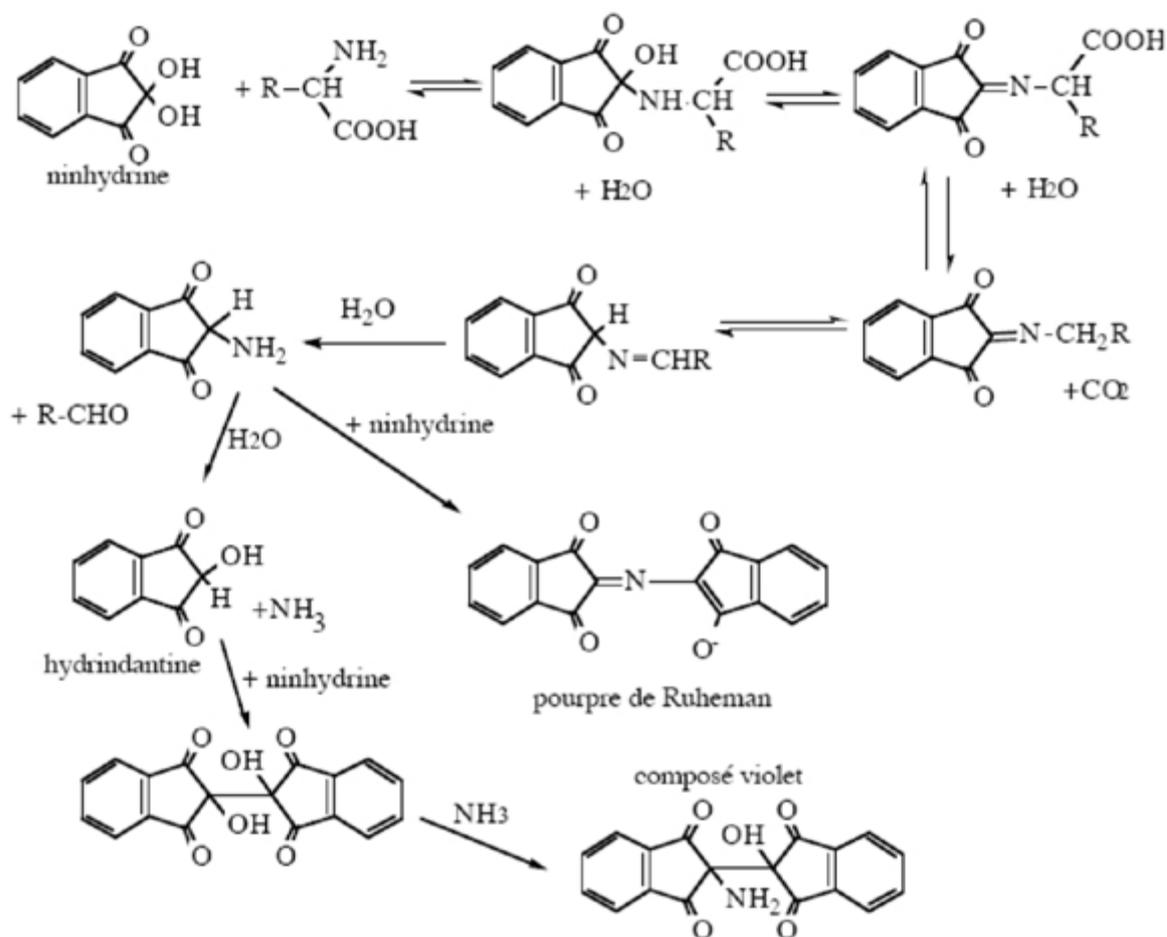


4-3 Réactions liées à la présence simultanée de fonctions aminées et carboxyliques.

En présence d'oxydants comme le peroxyde d'hydrogène ou l'hypochlorite, les acides aminés sont désaminés et décarboxylés avec formation d'aldéhyde.

La **ninhydrine** permet cette réaction; ainsi la proline et son dérivé hydroxylé donnent des dérivés **jaunes** absorbant à 440 nm, tandis que les autres acides aminés donnent des mélanges de chromogène (**violet**) absorbant surtout à 570 nm.

Cette particularité est mise à profit dans la détection chromatographique des acides aminés au cours de leur séparation / analyse par chromatographie et réaction à la ninhydrine



4-4. Propriétés des chaînes latérales.

De par leur grande diversité fonctionnelle, les groupements des chaînes latérales sont à même de donner de nombreuses réactions.

a- Les fonctions hydroxyles de SER et THR peuvent être estérifiées.

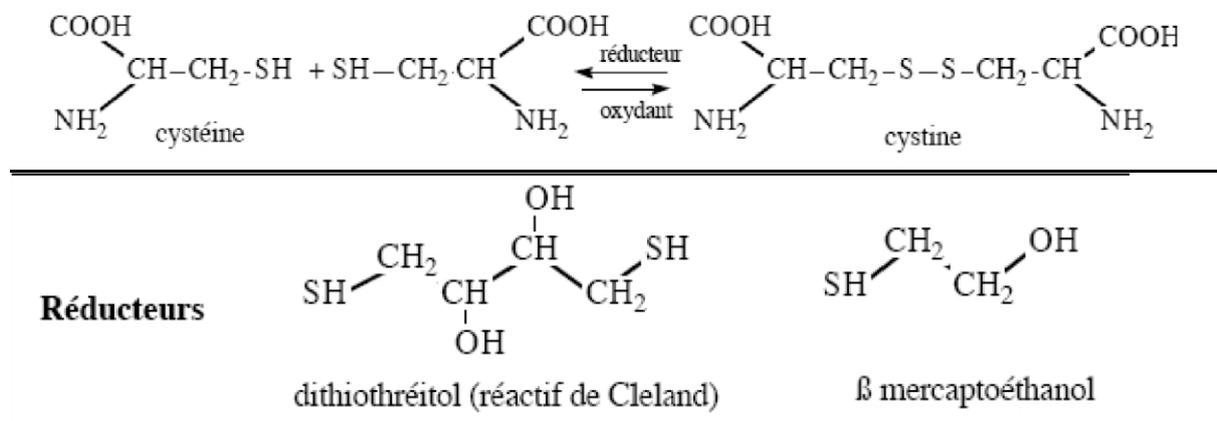
Les esters phosphoriques de ces acides aminés jouent un rôle très important en technologie laitière, les caséines étant des phosphoprotéines.

b- Les chaînes latérales à noyau aromatique.

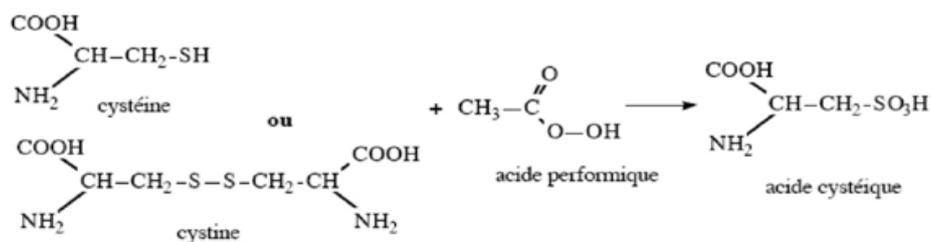
Elles rendent possible des réactions de substitution. Ainsi les dérivés iodés de la tyrosine sont des constituants des hormones thyroïdiennes et les dérivés nitrés aromatiques sont colorés en jaune (réaction xanthoprotéique).

c- Les fonctions thiols.

Les groupements thiols de la **cystéine** jouent un rôle fondamental dans la structure et donc l'activité biologique des protéines. Ce groupement peut s'oxyder en disulfure : la **cystine** .. Le résidu cystine joue un rôle de **pont disulfure** entre chaînes polypeptidiques intra ou intermoléculaires; ce pont peut être coupé par des réducteurs comme le β mercaptoéthanol avec libération de deux fonctions thiols



La cystéine ou la cystine sont oxydables en **acide cystéique** stable sous l'action d'un oxydant fort comme l'acide performique.



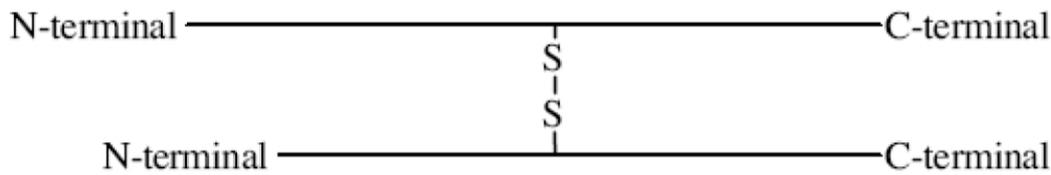
5. Séparation et dosage des acides aminés.

Il s'agit d'une analyse de routine à l'heure actuelle mais qui reste encore complexe ; ses premiers metteurs au point (MOORE et STEIN) ont obtenu le prix Nobel. Les intérêts de telles analyses sont très nombreux (nutrition, technologie protéique, biochimie des protéines etc.). L'analyse de la vingtaine d'acides aminés naturellement présents dans les protéines nécessite d'abord leur séparation puis leur dosage. Les techniques séparatives les plus utilisées sont soit de type chromatographique soit de type électrophorétique.

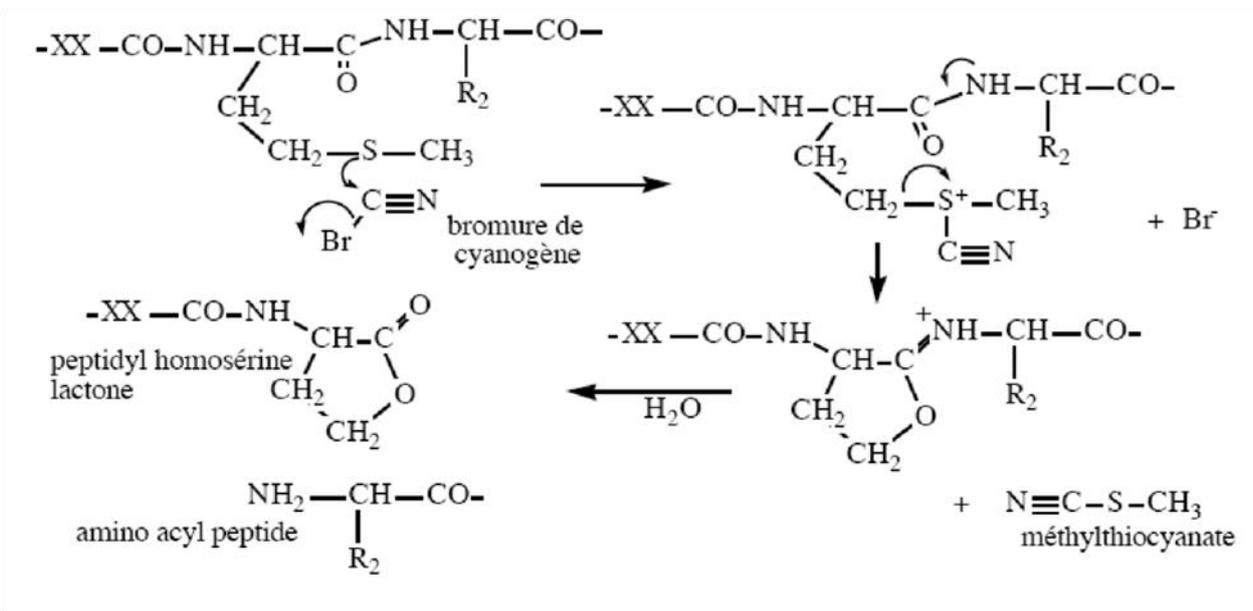
Les techniques chromatographiques utilisables sont nombreuses :

- Chromatographie en phase vapeur après formation de dérivés volatils.
- Chromatographie en phase liquide avec ses variantes :
 - colonne d'échange d'ions.
 - colonne en phase inverse.
 - couche mince.

Les techniques chromatographiques en colonne sont celles qui sont actuellement les plus utilisées; qualifiées de CLHP (chromatographie liquide haute performance).



Pont disulfure inter-chaînes



3- Détermination de la structure d'un peptide

La détermination de la structure primaire d'un peptide est conduite en deux étapes :

- **détermination de la composition en aminoacides**
- **détermination de l'ordre des enchaînements des résidus**

Ces deux étapes ont comme point commun l'hydrolyse de la liaison peptidique.

3-1. Hydrolyse de la liaison peptidique

a-Hydrolyse chimique complète (Composition globale en AA) L'action de l'acide chlorhydrique (HCl) 6M sur un peptide, à ébullition pendant au moins 24 heures, aboutit à un **hydrolysate** contenant les aminoacides avec toutefois les restrictions suivantes :

- l'acide aminé tryptophane est entièrement détruit
- les amides (Asn, Gln) sont hydrolysés en ammoniac et acides correspondants (Asp, Glu)
- certains aminoacides (Tyr, Ser, Thr) peuvent être partiellement détruits (un temps d'hydrolyse plus faible permet de résoudre le problème).

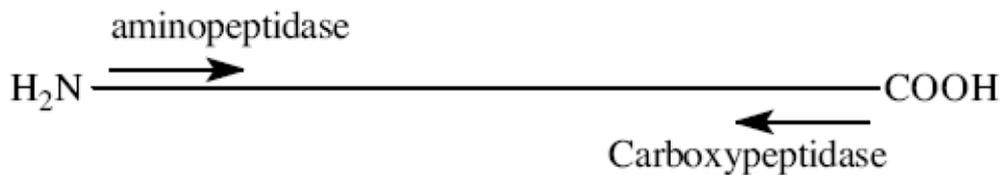
b-Hydrolyse chimique spécifique

- **le bromure de cyanogène (BrCN)** hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxyle de la méthionine : cette dernière devient alors un résidu C-terminal transformé en résidu homoserine lactone.
- **le 2-nitro-5-thiocyanobenzoate (NTCB)** hydrolyse la liaison peptidique du côté amine de la cystéine.

c-Hydrolyse enzymatiques.

➤ exopeptidases

Elles reposent sur l'utilisation d'exopeptidases qui hydrolysent, selon leur spécificité, la liaison peptidique dans laquelle est impliqué l'acide aminé N ou C terminal. Ainsi les aminopeptidases et les carboxypeptidases hydrolysent les peptides respectivement à partir de leurs extrémités N et C terminales.



➤ **Aminopeptidases.**

Les **aminopeptidases** hydrolysent ainsi les liaisons peptidiques à partir du résidu N-terminal (sauf celles dans lesquelles la proline est impliquée).

la **prolineamino-peptidase** est spécifique de la proline.

➤ **Carboxypeptidases.**

Les **carboxypeptidases A** ou **B** hydrolysent les liaisons peptidiques à partir du résidu C-terminal. La carboxypeptidase A est une métallo-enzyme du suc pancréatique n'hydrolysant pas si l'acide aminé C-terminal est ARG, LYS ou PRO.

❖ La **carboxypeptidase B** agit sur les ARG et LYS C-terminales.

❖ La **carboxypeptidase C** détache tous les acides aminés C-terminaux.

❖ La **proline carboxypeptidase** détache spécifiquement la proline C-terminale.

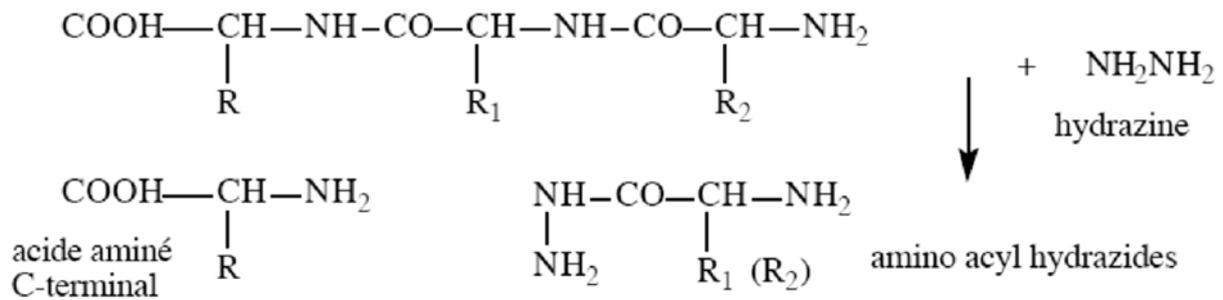
L'acide aminé N (ou C) terminal est extrait et identifié. L'enzyme pouvant poursuivre son hydrolyse sur le peptide à n-1 résidus, plusieurs cycles peuvent être ainsi réalisés.

➤ **Endopeptidases**

Une des méthodes de choix est une hydrolyse enzymatique par une endopeptidase d'un lien peptidique dans lequel un acide aminé donné est impliqué, cette hydrolyse pouvant intervenir au niveau de la partie C α ou N α du résidu d'acide aminé. Les peptides obtenus par clivage enzymatique ou chimique sont séparés par des méthodes chromatographiques ou électrophorétiques, leur séquence étant ensuite déterminée par la méthode d'Edman. Les spécificités de quelques protéases utilisées dans le séquençage sont indiquées dans le tableau .

Coupure entre résidu R_{n-1} et R_n

Enzyme	Specificity
<i>Endopeptidases</i>	
Trypsin	$R_{n-1} = \text{Arg, Lys}$ $R_n \neq \text{Pro}$
Pepsin	$R_n = \text{Leu, Phe, Trp, Tyr, Val}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Chymotrypsin	$R_{n-1} = \text{Phe, Trp, Tyr}$ $R_n \neq \text{Pro}$
Endopeptidase GluC	$R_{n-1} = \text{Glu}$
<i>Exopeptidases</i>	
Leucine aminopeptidase	$R_1 \neq \text{Pro}$
Aminopeptidase M	all N-terminal residues
Carboxypeptidase A	$R_n \neq \text{Arg, Lys, Pro}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase B	$R_n = \text{Arg, Lys}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase C	all C-terminal residues



• **L'hydrazinolyse** permet la coupure des liaisons peptidiques avec formation d'hydrazides sauf au niveau du résidu C-terminal qui apparaît sous forme d'acide aminé facilement identifiable.

3.3 Les méthodes automatisées de séquençage.

Ces méthodes sont basées sur la dégradation séquentielle ou récurrente d'Edman. Les séquenceurs permettent de déterminer l'ordre d'enchaînement jusqu'à une quinzaine de résidus. Ce sont souvent des peptides issus d'hydrolyses partielles qui sont soumis à cette opération automatisée.

3.4 Les méthodes de séquençage issues du génie génétique.

Le séquençage de l'ADN est plus facile que celui des peptides (et protéines). Si le fragment d'ADN codant (unité de transcription) pour le peptide (ou la protéine) est isolé, sa séquence sera facilement déterminée. La structure primaire du peptide sera alors déduite à partir du code génétique.

fonction ionisable	pKa	pH 2,5	p ^t équiv	pH 4,3	p ^t équiv	pH 6,0	p ^t équiv	pH 8,9	p ^t équiv	pH 10,5	p ^t équiv
α-COOH	2,5	0,5 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-COOH	4,3	0	0	0,5 -	-	-	-	-	-	-	-
imidazole	6,0	+	+	+	+	0,5+	0	0	0	0	0
α-NH ₂	8,9	+	+	+	+	+	+	0,5+	0	0	0
ε-NH ₂	10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	0,5+	0
charge nette		2,5+	2+	1,5+	1+	0,5+	0	0,5-	1-	1,5-	2-

Des atlas de séquence sont disponibles aux chercheurs du monde entier. Leur informatisation permet une comparaison rapide des séquences et de remarquables analyses (structure-fonction, évolution).

4. Propriétés des peptides.

4.1. Propriétés physiques.

Elles dépendent de leur masse molaire et de la nature et de la séquence des acides aminés qu'ils contiennent. Généralement, il s'agit de solides de couleur blanche, cristallisables pour la plupart, et plus ou moins solubles dans l'eau. Ils présentent un caractère amphotère et possèdent un point isoélectrique. Par exemple le peptide HLYS-ALA-HIS-GLU-MET-OH présente une charge nette qui évolue en fonction du pH de la façon suivante :

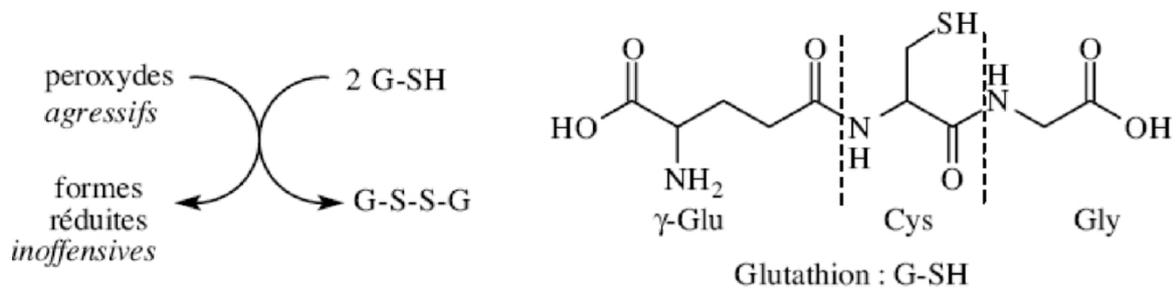
Le pHi de ce pentapeptide est égal à $(6 + 8,9) / 2 = 7,45$.

4.2. Les peptides d'intérêt biologique

Les peptides participent à la structure de membranes comme éléments de construction, jouent des rôles importants dans des activités biologiques. En voici quelques exemples :

a-Peptides à rôle physico-chimique

Le glutathion (tripeptide γGlu-Cys-Gly : liaison de Glu par le carbonyle γ) joue un rôle central dans la défense cellulaire comme antioxydant.



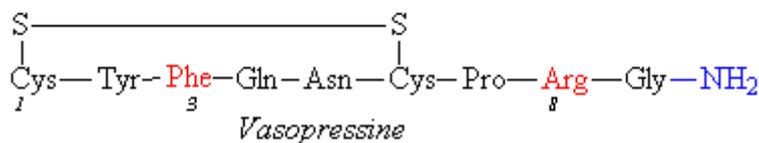
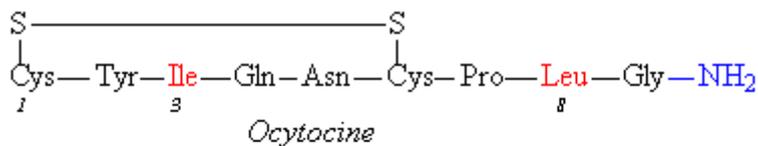
Citons un peptide synthétique très employé comme édulcorant : l'aspartame. C'est un dipeptide dont l'extrémité COOH est estérifiée : aspartyl-phénylalanilméthylester.

b-Peptides à activité de médiateur

Les peptides hormonaux

➤ Hormones Hypophysaires:

- l'**ocytocine** qui déclenche les contractions des muscles lisses (utérus pour l'accouchement, glande mammaire pour la réjection du lait)
- la **vasopressine** : effet antidiurétique au niveau du rein (action hypertensive comme médicament):

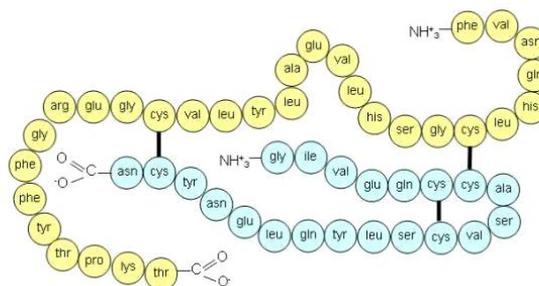


Vasopressine - Hormones Hypothalamiques:

La somatostatine: 2 chaînes, une de 14 AA l'autre de 28 AA. Elle a une action inhibitrice sur plusieurs hormones dont l'insuline et le glucagon.

➤ Hormones Pancréatiques:

- l'**insuline**, polypeptide formé de deux chaînes (une de 21 et une de 30 aminoacides), qui régule le métabolisme du glucose (hypoglycémie)



- le **glucagon**, peptide de 29 aminoacides, qui provoque une augmentation de la glycémie (hyperglycémie)
- la muqueuse duodénale produit la **sécrétine**, peptide de 27 aminoacides, qui stimule le pancréas exocrine au cours de la digestion

➤ Les neuropeptides

Ce sont deux familles de molécules, ligands de récepteurs cérébraux : la famille des **enképhalines** et la famille des **endorphines**. Ces molécules participent au contrôle de la douleur. Elles contiennent le même tétra peptide N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe).

➤ *Les peptides vasomoteurs*

• **Peptides vasoconstricteurs :**

- l'**angiotensine II** est un octapeptide
- les **endothélines**, dont la production est localisée dans le tissu pulmonaire sont des peptides de 21 aminoacides,

• **Peptides vasodilatateurs :**

- l'oreillette du coeur sécrète une famille de **peptides natriurétiques atriaux** (ANP) qui agissent au niveau rénal en augmentant la sécrétion d'ions Na⁺ et dans la diurèse (élimination d'eau) : chez l'homme, l'α-ANP est un polypeptide de 28 aminoacides.
- la **bradykinine** est un hypotenseur libéré lors d'une réaction inflammatoire.

• **Les molécules de l'inflammation**

Une agression tissulaire déclenche une réaction de défense d'abord locale : c'est la réaction inflammatoire dont les manifestations sont douleur, chaleur, rougeur et oedème provoqués par des molécules vasodilatatrices

- les amines: **histamine** et **sérotonine**, produits de décarboxylation de l'histidine pour l'histamine et de l'hydroxytryptophane pour la sérotonine
- une famille de peptides : les **kinines** dont le prototype est la bradykinine qui est un nonapeptide. Le venin de guêpe contient un décapeptide : la glycyl-bradykinine.

• **Peptides antibiotiques**

Certains micro-organismes synthétisent des peptides, inhibiteurs de la synthèse protéique, qui sont des "armes" de défense et de colonisation. Ce sont des peptides cycliques et qui intègrent des aminoacides D ou non-standard, propriétés qui les protègent des dégradations protéolytiques.

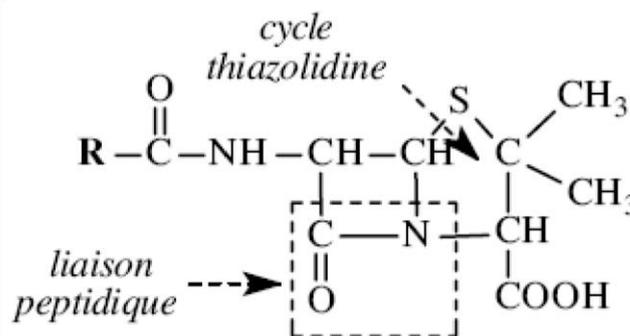
• **Les peptides bactériens**

On peut isoler de différentes souches de *Bacillus* :

- la famille des **tyrocidines**, décapeptides cycliques comprenant une D-Phe et l'ornithine (homologue à 5 carbones de la lysine)
- la **bacitracine A** est un peptide à 12 aminoacides dont trois appartiennent à la série D (Glu, Asn, Phe) et dont un est un dérivé, l'ornithine.

- **Les peptides fongiques**

La moisissure *Penicillium* produit la **pénicilline** qui est un dipeptide de deux dérivés d'acides aminés :



Pénicilline R dépend de la souche de *Penicillium*

Structure des protéines

Les protéines, peptides de plus de 50-100 aminoacides, sont classées en deux groupes principaux :

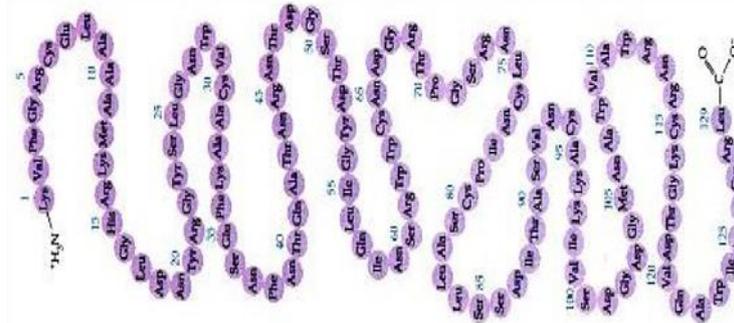
- les **holoprotéines** qui ne sont constituées que d'acides aminés - les **hétéroprotéines** qui contiennent :
 - un **groupe prosthétique** minéral, métallique ou organique
 - une partie glucidique liée de manière covalente : **glycoprotéines**
 - une partie lipidique liée de manière covalente : **lipoprotéines**

Les caractéristiques spatiales des protéines sont la clé de leurs fonctions. La structure des protéines est définie à plusieurs niveaux :

- structure **primaire** : composition et séquence des aminoacides
- structure **secondaire** : c'est une structure locale qui rend compte de l'organisation spécifique d'un fragment d'acides aminés consécutifs dans l'espace
- structure **tertiaire** : c'est l'organisation spatiale complète des structures locales de la molécule
- structure **quaternaire** : c'est l'organisation de protéines oligomériques qui sont des assemblages non covalent de sous-unités (protomères)

1- Structure **primaire**

Toutes les protéines sont formées d'une succession d'acides aminés liés les uns aux autres dans un ordre précis. Le lysozyme illustré ci-contre, par exemple, est formé de l'union de **129 acides aminés**. Le premier est la lysine, le second, la valine, le troisième, la phénylalanine ... et le dernier, le 129e, la leucine. La **séquence** des acides aminés d'une protéine (quel acide aminé est le premier, le second, le troisième, ..., le dernier) constitue ce qu'on appelle la **structure primaire** de la protéine



Quatre grands types d'interactions interviennent dans le repliement de la chaîne:

- **L'effet hydrophobe**

Les acides aminés dont les radicaux sont hydrophobes ont plus d'affinité entre eux qu'avec les molécules d'eau entourant la protéine. La chaîne a donc tendance à se replier de façon à les regrouper entre eux au centre de la molécule, sans contact direct avec l'eau.

Inversement, les acides aminés hydrophiles ont tendance à se disposer à la périphérie de façon à être en contact avec l'eau.

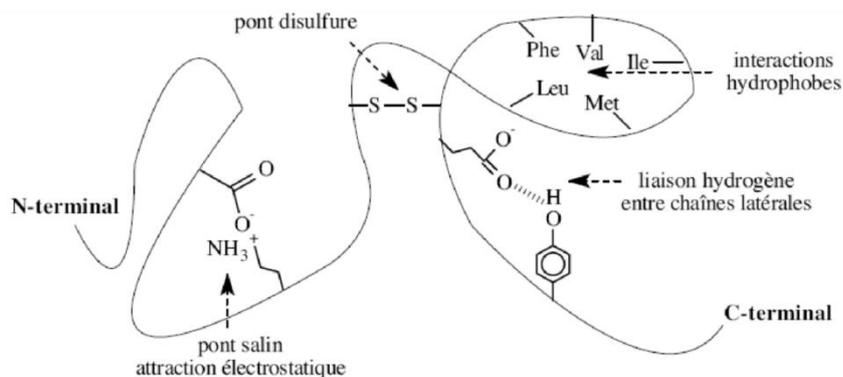
- **Les liaisons ioniques**

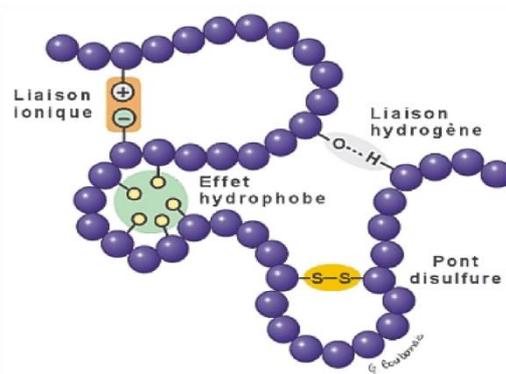
Les radicaux qui s'ionisent positivement forment des liaisons ioniques avec ceux qui s'ionisent négativement.

- **Les liaisons hydrogène**

- **Les ponts disulfures**

Deux des 20 acides aminés ont des radicaux contenant un atome de **soufre**. C'est le cas de la **cystéine**. Deux cystéines peuvent former une liaison covalente entre elles par l'intermédiaire de l'atome de soufre de leur radical. Cette liaison covalente peut relier deux cystéines éloignées l'une de l'autre sur la chaîne.

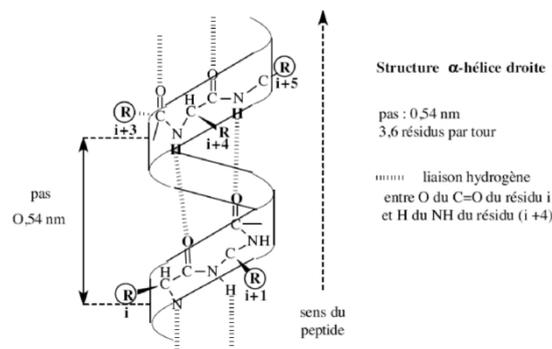




2-Structure secondaire

2-1 L'hélice alpha

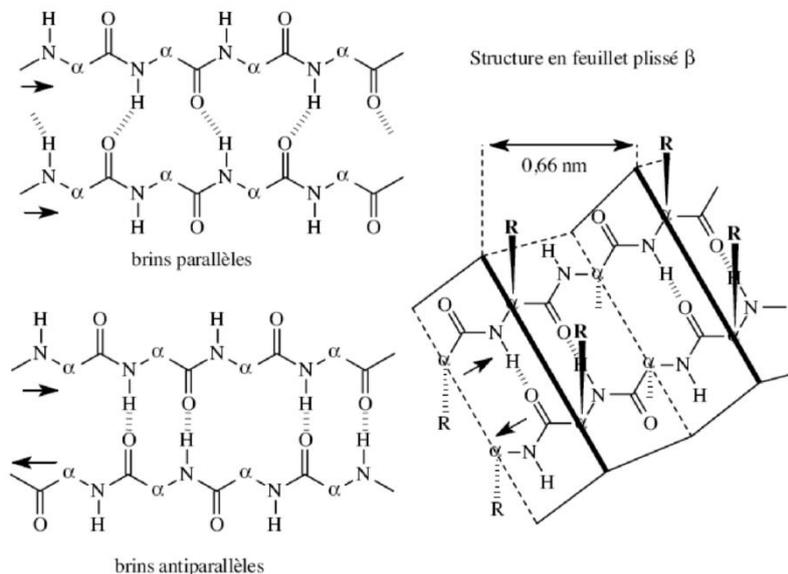
Cette forme hélicoïdale résulte de la formation de ponts hydrogène entre le groupement C=O du *nième* résidu d'aa et le groupement N-H de (n+4)*ième* résidu. Chaque tour complet de la spirale est constitué d'environ 3.6 résidus d'acide aminé pour assurer l'alignement des groupements C=O (pointant vers le bas) et N-H (pointant vers le haut). Les groupements latéraux «R» sont orientés vers l'extérieur, perpendiculairement à l'axe de la spirale.

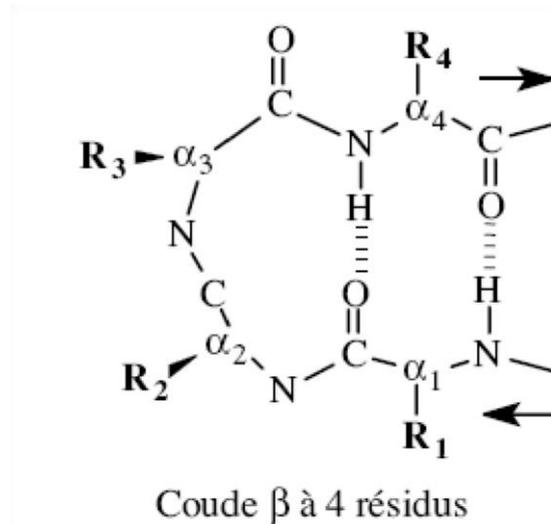
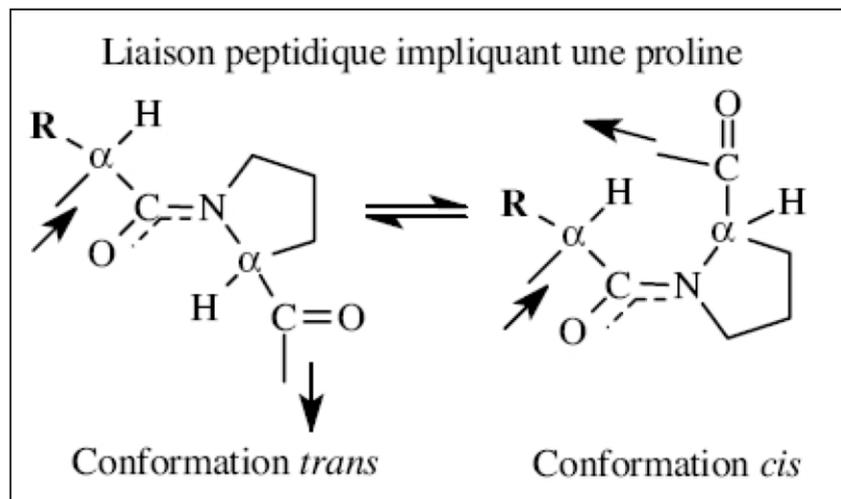


2-2 Le feuillet bêta

Dans un feuillet bêta, il se forme des liaisons hydrogène entre certains segments de la chaîne disposés parallèlement les uns par rapport aux autres. L'ensemble forme comme une membrane plissée.

Dans un feuillet plissé β, deux chaînes peptidiques sont pliées et alignées l'une à côté de l'autre. Le repliement β des chaînes peptidiques est favorisé dans le cas d'acides aminés portant des petits groupements latéraux «R» non chargés. Les chaînes peptidiques sont maintenues par des ponts hydrogène. Les groupements latéraux «R» sont orientés vers l'extérieur, pointant vers le haut et le bas de chaque feuillet. Les chaînes adjacentes peuvent être alignées, soient dans la même direction (plis parallèle β) ou dans des directions opposées (plis anti-parallèle β).

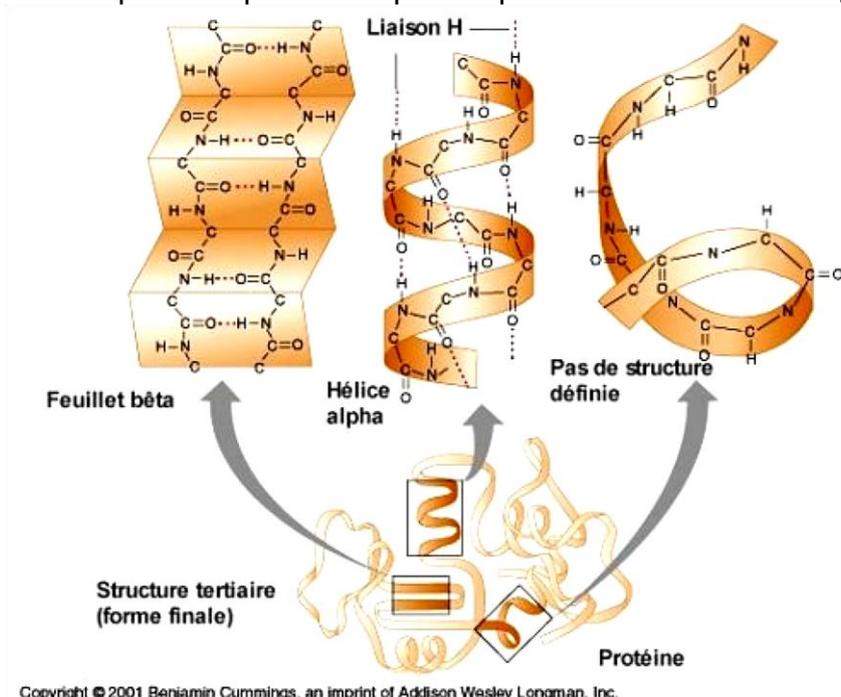




3- Structure tertiaire

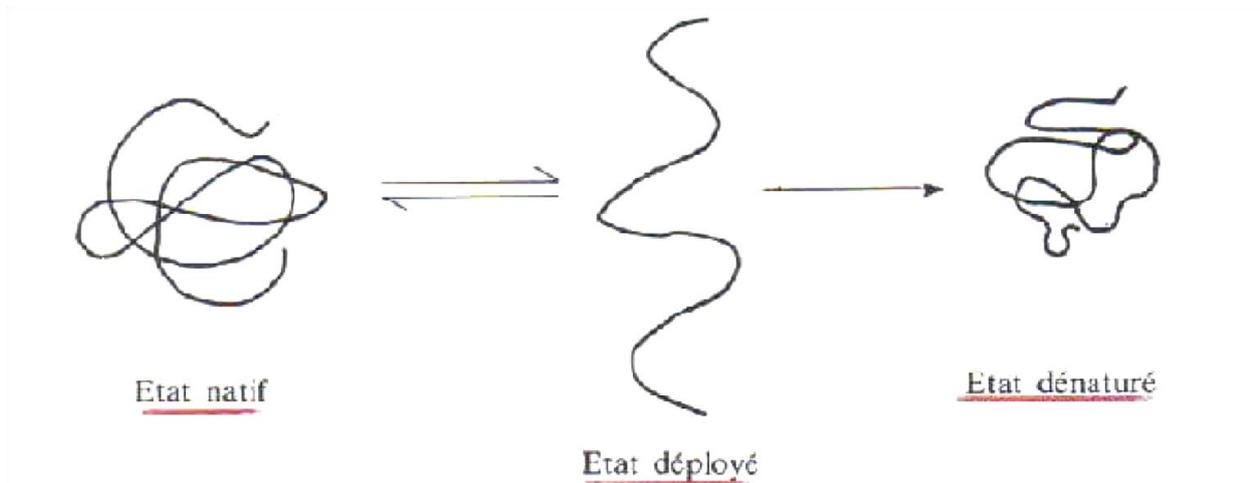
Une protéine est donc faite d'hélices alpha et de feuillets bêta reliés par des segments qui n'ont pas de structure secondaire particulière. La forme finale de la chaîne d'acides aminés, c'est à dire la structure tridimensionnelle (3D) finale qu'adopte la chaîne d'acides aminés, constitue la **structure tertiaire** de la protéine.

Elle inclut la relation entre les différents domaines (hélice α et feuillets plissés β) formés par la structure secondaire de la protéine et les interactions des groupements latéraux «R». La structure 3-D est thermodynamiquement stable dans un domaine restreint de température, pH et force ionique. Au-delà de ce domaine une protéine peut se déplier et perdre son activité biologique (dénaturation).



Structure : les fibres protéiques

1. **Mouvement**
2. **Transport de substances dans le sang**



3. **Transport de substances à travers la membrane des cellules**
4. **Hormones**
5. **Identification des cellules**
6. **Défense : les anticorps**
7. **Enzymes**

5. Dénaturation des protéines

Les protéines fibreuses sont plus stables que les protéines globulaires. Leur fragilité rend les protéines vulnérables à de nombreux facteurs chimiques et physiques, comme l'acidité et la chaleur, qui peuvent les dénaturer ou en provoquer la rupture. La dénaturation d'une protéine comprend 2 étapes : quand elle se déplie et perd sa forme spécifique, on dit qu'elle est **déployée**, la suppression de l'agent dénaturant permet sa renaturation. La deuxième étape de la dénaturation consiste en un passage de l'état *déployé* en un état **dénaturé** par établissement de liaisons secondaires non spécifiques. La dénaturation est alors un processus *irréversible*.

5-1 Conséquences de la dénaturation: Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine

La dénaturation provoque les modifications suivantes :

- **la perte des propriétés biologiques spécifiques** : enzymatiques, hormonales, de transport et immunologiques ;

- **la diminution de la solubilité** résulte de modifications dans la distribution des groupements polaires apolaires.

5-1-1 Agents dénaturants

Parmi les agents dénaturants, on peut citer :

- **les agents physiques** : les radiations ultraviolettes, les ultrasons et la température.

L'élévation de la température entraîne une agitation thermique (élève l'énergie de vibration et de rotation des liaisons entre atomes des molécules dissoutes) ce qui conduit à des mouvements intramoléculaires à l'origine de la rupture des interactions faibles qui stabilisent la conformation de la protéine.

- **les agents chimiques**

- **les variations du pH**

- **les détergents anioniques et cationiques**. A titre d'exemple, le détergent Sodium

Dodécyl Sulfate (ou SDS dont la "queue hydrocarbonée" établit des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales des résidus d'acides aminés apolaires) forme un complexe protéine-détergent ionisé en surface (groupement sulfate) dans lequel la chaîne polypeptidique est globalement déployée.

Enfin, il faut noter que cette dénaturation des protéines, sans modification de leur composition chimique, qui entraîne la perte de leurs propriétés biologiques est recherchée dans les techniques de désinfection et de stérilisation. Les techniques physiques de stérilisation, les antiseptiques et les désinfectants sont souvent des agents dénaturants entraînant la mort des microorganismes.