

LC12-Biomolécules

Leçon par Valentin

Élément imposé : Protéines

Niveau : L3

Prérequis :

- Interactions faibles (VdW, liaisons H) L1
- Groupements protecteurs L1
- Réactivité des amines et acides carboxyliques L1
- Acides aminés L2

Difficultés :

- Mobiliser des connaissances dans un contexte inhabituel
- Nomenclature des Acides aminés à laquelle les élèves ne sont pas familiers : représentation des acides aminés donnée en début de séquence pédagogique
- Visualisation dans l'espace, pour ça on utilise un logiciel de visualisation comme VMD.

Séquence pédagogique

- TP purification des protéines
- résine échangeuse d'ion
- Chromatographie d'exclusion stérique
- Précipitation sélective en faisant varier le pH
- Electrophorèse

Sources : Volhart, Voet, Weil, Stryer p25, OCP Amino Acid and peptide Synthesis, ICO

Obj : Comprendre la structure des protéines, pour mieux comprendre comment les synthétiser introduction à la synthèse peptidique en laboratoire.

Introduction

Les protéines sont des polymères linéaires, synthétisés à partir des 20 α -aminoacides protéiques qui forment des liaisons peptidiques **Protéine** : (IUPAC) : polypeptide avec un poids moléculaire supérieur à 10kDa

En dessous de 10 résidus, on parle de peptide.

C'est très utile de connaître la structure des protéines car

Insuline : <https://www.rcsb.org/structure/1AI0> L'insuline est la première molécule dont la séquence d'AA a été déterminée, ce qui a valu le PN 1958 à Frédéric Sanger.

1 Structure des protéines

Les molécules sont bien plus grandes que celles dont on a l'habitude. Les différents résidus de la protéine s'organisent sur quatre niveaux différents.

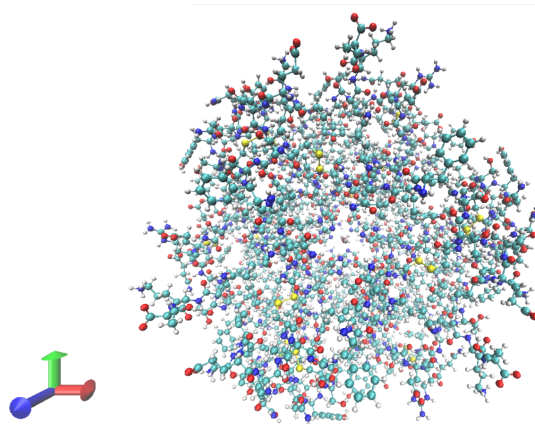


Figure 1: Visualisation de l'hexamère d'insuline par VMD en CPK par atome

1.1 Structure primaire

Un polypeptide est un enchaînement d'acides aminés liés par liaison peptidique qui est la liaison entre un acide carboxylique et une amine. C'est l'autre nom donné aux amides. Une amine est nucléophile et le carbone de l'acide électrophile donc on a une AN puis une élimination d'eau.

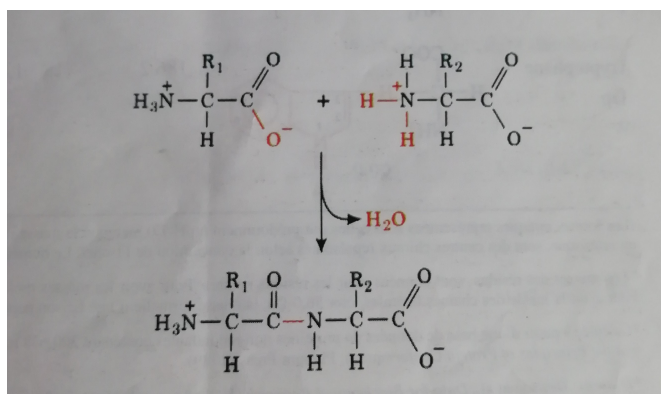


Figure 2: Condensation de deux AA pour former un dipeptide. La liaison peptidique est montrée en rouge (VOET p57)

Cette réaction faite un grand nombre de fois forme un peptide (figure 3).

La structure primaire est alors l'enchaînement des acides aminés dans le polypeptide. Les propriétés de la protéines découlent de cette structure car elle détermine la structure 3D suivante une seule erreur peut mener à la drépanocitose glutamate -> valine en position 6.

Cependant la structure primaire ne permet pas de prédire la structure 3D, c'est un domaine de recherche très actif (Alpha Fold de google)

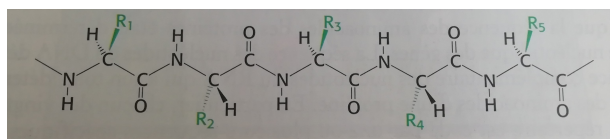


Figure 3: Une chaîne peptidique est alors constituée d'un squelette constant (en noir) et de chaînes latérales variables (en vert). (Stryer p35)

1.2 Structure Secondaire

Cette structure désigne l'arrangement local des atomes du squelette peptidique sans tenir compte des chaînes latérales. Elle vient de la flexibilité des chaînes polypeptidiques.

On peut en effet avoir rotation autour de la liaison C_{α} -N (Φ) ou autour de la liaison C_{α} -C=O (Ψ).

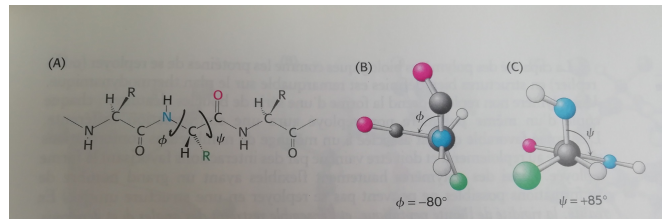


Figure 4: Rotation autour des liaisons (Stryer p39)

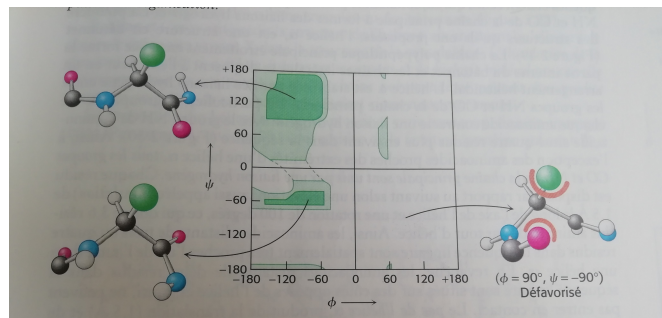


Figure 5: Diagramme de Ramachandran montrant les valeurs de Φ et Ψ . Les zones favorables sont vertes, les valeurs d'angles ne pouvant pas être prises sont représentées en blanc (Stryer p39)

Vient de la formation de liaisons hydrogènes. La chaîne va alors se tordre pour ce mettre en hélice pour mettre en face des aa qui font des liaisons h quatre aa plus tard. Cette hélice α désigne alors une hélice 3,6 car il y a 3,6 AA entre chaque liaison H. Cette hélice est représentée par une hélice.

On a également le **feuillet β** On met alors des feuillets face-à-face.

Image du Stryer p44

On a également des parties non structurées qui sont des pelottes statistiques.

On a cependant ignoré les chaînes latérales.

1.3 Structure tertiaire

Il s'agit de l'organisation spatiale de la protéine dans son intégralité : enroulement des différentes structures secondaires.

Les chaînes latérales sont de différentes natures donc on va pouvoir avoir des interactions ioniques, liaisons H, interaction hydrophobes et des ponts disulfures.

Les AA très éloignés dans la structure primaire sont en interaction dans cette structure. On peut former des cavités dans lesquels on peut avoir de la catalyse dans les enzymes par exemple.

Ponts disulfures également

Importance de la structure tertiaire : maladies à prion.

1.4 Structure quaternaire

Pas toujours présentes mais importantes quand même Association de plusieurs chaînes peptidiques en une seule unité. Mêmes interactions que pour la tertiaire mais entre différentes chaînes. Ainsi, l'hémoglobine est composée de 4 chaînes différentes : deux α et deux β . L'insuline peut se trouver sous forme d'hexamère en présence de zinc sous sa forme commerciale et sous sa forme physiologique de stockage dans le pancréas.

C'est bénéfique car si un bloc a une erreur, on peut le remplacer sans recycler toute la protéine.

2 La synthèse peptidique en chimie

Méthode chimique parallèle du ribosome : fil rouge comparateur.

2.1 Enjeu de sélectivité

Quatre dimères possibles en partant de deux AA et beaucoup de trimères, polymères (Vol p1235) $H-Gly-OH + H-Ala-OH \longrightarrow H-Gly-Ala-OH + H_2O$

La réaction n'est donc pas sélective et les produits possibles sont similaires donc difficiles à séparer. On doit donc mettre en place une stratégie de synthèse.

On travaille alors avec des groupements protecteurs tandis que le ribosome n'en a pas besoin car il est directif.

On peut alors choisir de protéger l'amine ou l'acide carboxylique.

Pour l'amine, on utilise le carbobenzoxy (Cbz, Vollhardt p1235) qui se déprotège par une hydrogénolyse.

On peut également utiliser le Boc et le fmoc, qui forment des carbamates moins réactifs. On retrouve d'ailleurs le Boc dans les réactifs commerciaux.

Les carbamates sont déprotégés dans des conditions acides douces qui laissent intacte la liaison peptidique.

Pour l'acide, on forme un ester méthylique ou éthylique, lysé en conditions basiques.

On protégera de même les chaînes latérales (ICO p684)

2.2 Enjeu de réactivité

On peut alors protéger les deux extrémités d'un AA, ce qui nous permet de résoudre le problème de sélectivité. Cependant, les groupements protecteurs sont sensibles aux conditions acides et basiques et à pH neutre, l'AA a une forme de zwitterion. L'amine et l'acide carboxylique sont alors désactivés.

Il faut donc activer la fonction acide carboxylique non protégée.

On utilise pour ça le DCC.

On a beaucoup de réactifs à cause du principe de le Chattelier. On veut améliorer le rendement et éviter les délétion (manque d'un AA dans le peptide).

On doit alors impérativement séparer les AA en excès avant de passer aux étapes suivantes. Les produits étant similaires, on préfère une stratégie qui permet une séparation physique.

2.3 Synthèse supportée

synthèse solide de Merrifield (PN 1984) génie de la méthode : on filtre avec un fritté ce qui évite la chromatographie.

On croît ici du C vers le N-ter. le ribosome fait lui croître de N vers C.

Ainsi, avec un appareil automatisé, on peut synthétiser totalement chacune des chaînes de l'insuline en quelques jours

VOET p136 : cependant, si on considère une synthèse d'un polypeptide de 101 résidus, avec un rendement pour chaque étape de 98%, on obtient un rendement de 2%.

Bien que révolutionnaire, on préfère à cette synthèse la biosynthèse par génie génétique dès lors qu'on souhaite coupler un grand nombre de résidus et qu'on ne souhaite pas utiliser d'autres AA que les 20 naturels.

Conclusion

La structure des protéines repose sur de très nombreuses interactions à différentes échelles et il est donc important de connaître la composition pour contrôler sa structure.

On a vu ici une méthode pour assembler des acides aminés dans l'ordre de la structure primaire, mais une telle méthode présente des limites en ce qu'elle ne permet qu'un faible rendement et n'offre que peu de solutions pour contrôler le repliement une fois la structure primaire constituée.

Au cours de ce cours, on a pu voir que les structures tertiaires et quaternaires forment des cavités qui peuvent être des sites actifs. Pour la prochaine fois, on s'intéressera aux cofacteurs.

Question :

- Quelle stéréodescription pour l'alanine ? R pour le vivant. Autres descriptions ? On se met en représentation de Fischer et on fait L et D : carbone le plus oxydé en Haut. On écrirait alors HO-Gly-H.
- Liaison peptidique ou amide ? En L1 amide mais en L3 on précise que c'est pareil.
- Pelote statistique ? Terme utilisé en polymère. Comment on fait pour que la protéine ait la bonne forme ? On a des protéines chaperonnes pour aider au repliement.
- Type de rendement pour la synthèse peptidique ? De l'ordre de 95% Pour un peptide long on fait des puissances. Pour augmenter le rendement on augmente la concentration du peptide qu'on veut ajouter.
- Commentaires sur l'acide fluorhydrique ? Jamais fait par les élèves car les ions F⁻ attaquent le calcium des os. On a du glucomate de calcium à côté alors.