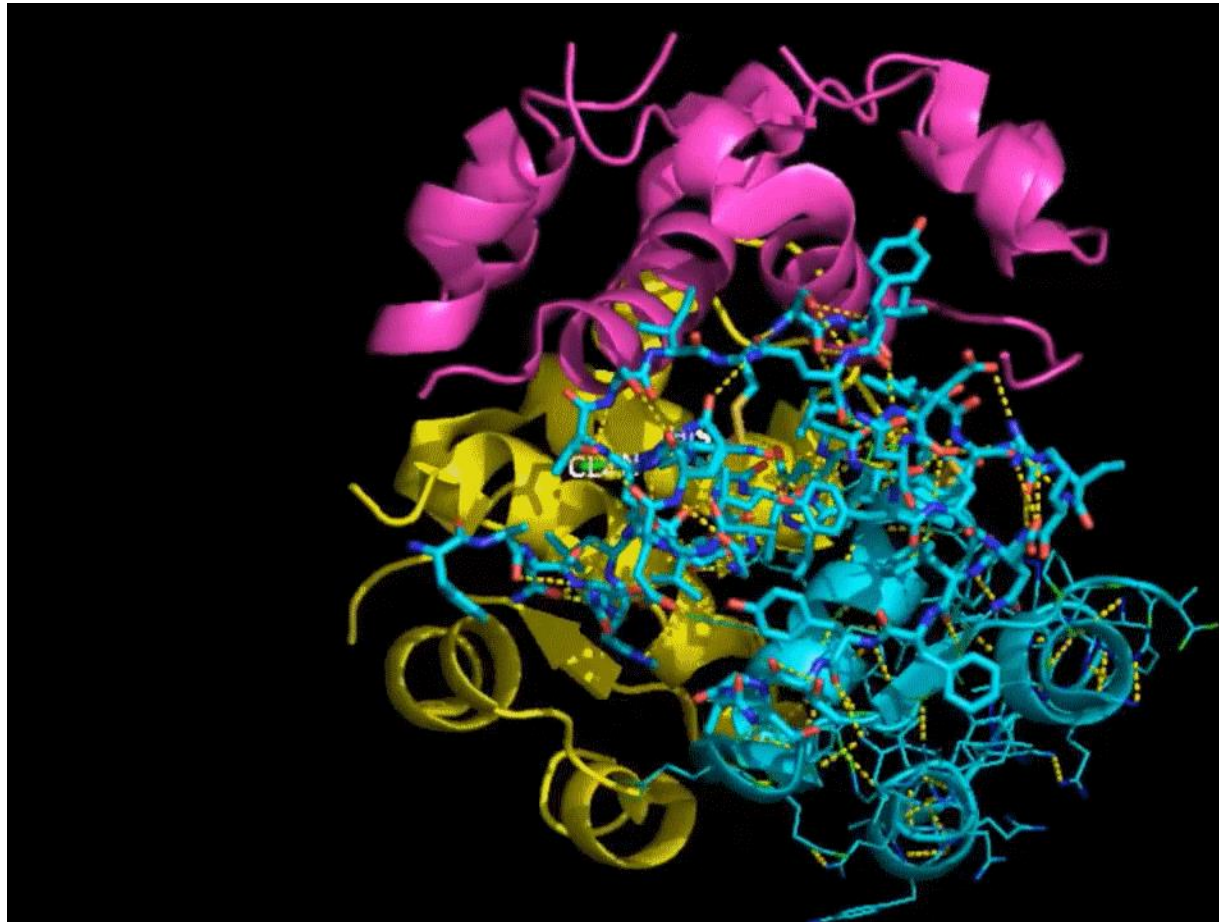


Chapitre 1 : Éléments de biotechnologie

1.2. Peptides synthétiques



Synthèse chimique des peptides

Dans cette section nous décrirons la synthèse chimique des polypeptides à partir d'acides aminés.

La possibilité de fabriquer des polypeptides que l'on ne trouve pas dans la nature offre un intérêt biomédical considérable :

1. Rechercher les propriétés de polypeptides en faisant varier systématiquement leurs chaînes latérales.

2. Synthétiser des polypeptides à propriétés uniques, en particulier des polypeptides ayant des chaînes latérales non standard ou avec des radioéléments incorporés dans des résidus spécifiques.

3. Synthétiser des polypeptides pharmacologiquement actifs qui sont très rares dans la nature ou qui n'existent pas.

L'une des applications les plus prometteuses de la synthèse polypeptidique est la production de vaccins synthétiques.

Les vaccins, qui sont classiquement constitués de virus « tués » (inactivés) ou atténués (« vivants » mais mutés afin de ne pas donner de maladie à l'homme) stimulent le système immunitaire qui synthétise des anticorps dirigés spécifiquement contre ces virus, conférant ainsi l'immunité vis-à-vis d'eux.

L'utilisation de ces vaccins n'est cependant pas sans risque ; les vaccins atténués, par exemple, peuvent retrouver, suite à une mutation, une forme virulente et des vaccins constitués de virus (tués) ont, à plusieurs occasions, entraîné la maladie car ils contenaient des virus « vivants ».

De plus, il est difficile de cultiver des virus en quantité et donc d'en avoir suffisamment pour la production de vaccins.

De tels problèmes seront éliminés si l'on prépare des vaccins à partir de polypeptides synthétiques qui contiennent les séquences en acides aminés des déterminants antigéniques viraux (groupements moléculaires qui stimulent le système immunitaire pour la synthèse d'anticorps dirigés contre eux).

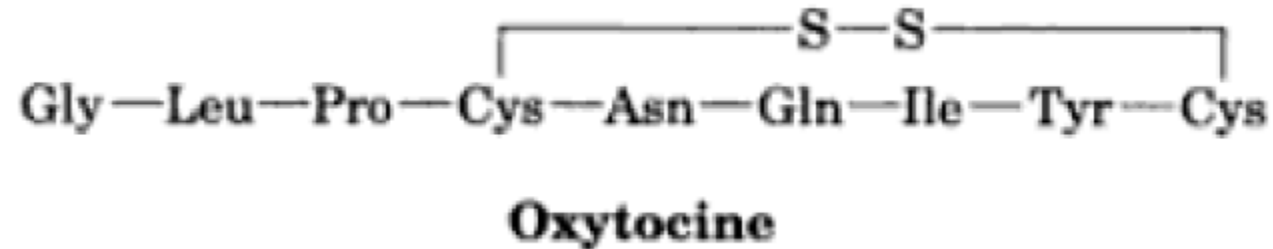
En réalité, plusieurs de ces vaccins synthétiques sont déjà utilisés couramment.

Les premiers polypeptides synthétisés chimiquement ne contenaient qu'un seul type d'acide aminé et pour cette raison on les appelle des **homopolypeptides**. De tels composés comme :

la **polyglycine**, la **polysérine**, et la **polylisine** sont facilement synthétisés par les techniques classiques de la chimie des polymères.

ils ont servi de modèles dans l'étude des propriétés physicochimiques des polypeptides, comme le comportement conformationnel et les interactions avec le milieu aqueux.

La première synthèse chimique d'un **polypeptide** biologiquement actif a été celle de l'hormone ocytocine, un nonapeptide (9 résidus d'acide aminé) par Vincent du Vigneaud en 1953 :



Depuis, des améliorations dans la méthodologie de la synthèse de polypeptides ont permis la synthèse de nombreux polypeptides biologiquement actifs et de plusieurs protéines.

1. Méthodes de synthèse

Les polypeptides sont synthétisés chimiquement en liant par **covalence** (couplage) l'un après l'autre, les acides aminés à l'extrémité de la chaîne polypeptidique en construction.

Imaginez qu'on synthétise un polypeptide depuis son extrémité C-terminale vers son extrémité N-terminale ; cela signifie que la chaîne en formation se termine par un groupement aminé libre.

Imaginez qu'on synthétise un polypeptide depuis son extrémité C-terminale vers son extrémité N-terminale ; cela signifie que la chaîne en formation se termine par un groupement aminé libre.

Donc, le groupement α -aminé de chaque acide aminé que l'on veut incorporer à la chaîne doit être chimiquement protégé (bloqué) sinon il pourrait réagir avec des molécules analogues ainsi qu'avec le groupement aminé N-terminal de la chaîne.

Une fois que le nouvel acide aminé a été couplé, son groupement aminé N-terminal doit être déprotégé (débloqué) afin que la liaison peptidique suivante puisse être formée. Chaque addition d'acide aminé nécessite donc une étape de couplage et une étape de déblocage.

De plus, les chaînes latérales réactives doivent être bloquées pour éviter qu'elles ne participent aux réactions de couplage, puis « débloquées » à la fin de la synthèse.

Les premières synthèses de polypeptides telles que celle de l'ocytocine ont été réalisées entièrement en solution. Les pertes inhérentes à l'isolement et à la purification du produit de la réaction après chacune des nombreuses étapes, expliquent les faibles quantités du polypeptide final obtenues.

Cette difficulté a été contournée astucieusement par **Bruce Merrifield** en 1962. par la mise au point de la synthèse en phase solide **SPPS**.

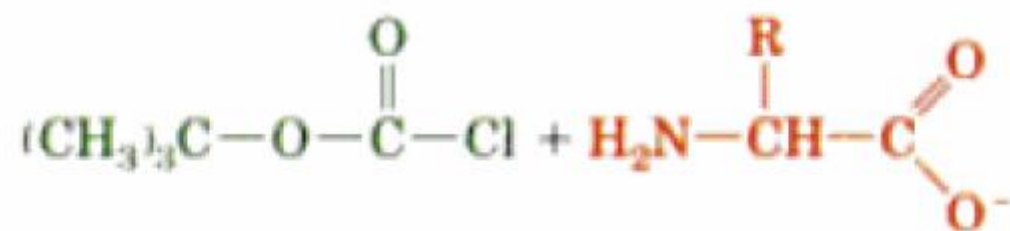
Selon cette méthode, la chaîne polypeptidique en formation est ancrée par covalence, généralement par son extrémité **C-terminal**. à un support solide insoluble tel que des billes de résine en polystyrène.

Puis les acides aminés convenablement **bloqués** et les réactifs sont ajoutés dans un **ordre approprié**. Cela permet la récupération quantitative et la purification des produits intermédiaires par simple filtration et lavage des billes.

Lorsque les chaînes polypeptidiques sont synthétisées par addition d'acides aminés vers leur extrémité **N-terminale** (sens opposé à celui de la **biosynthèse** des protéines). le groupement α -aminé de chaque acide aminé ajouté successivement doit être protégé chimiquement pendant la réaction de couplage.

À cet effet. on utilise souvent le groupement **tert-butyloxy-carbonyl (Boc)**.

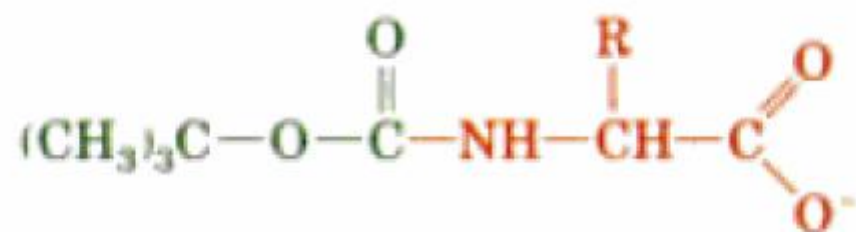
Ou encore le groupement **9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)**.



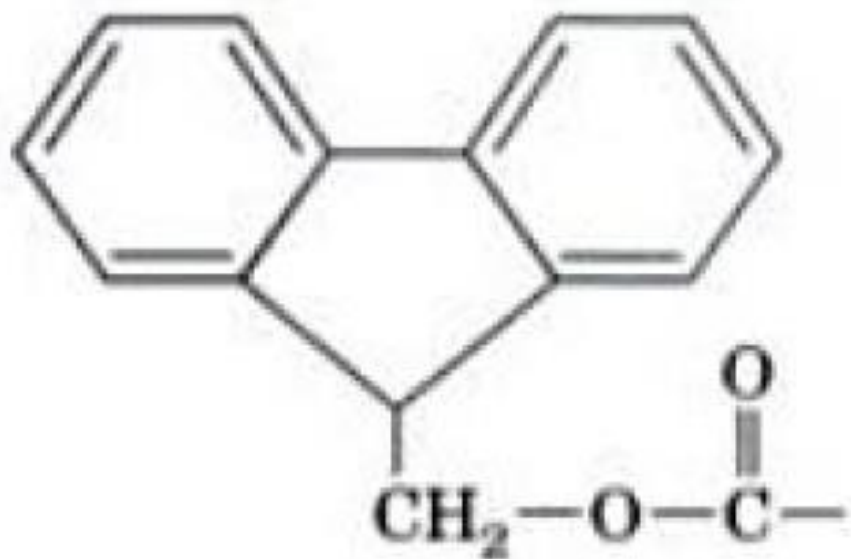
**Chlorure de
t-butyloxycarbonyl**

α -Aminoacide

HCl



Boc-aminoacide

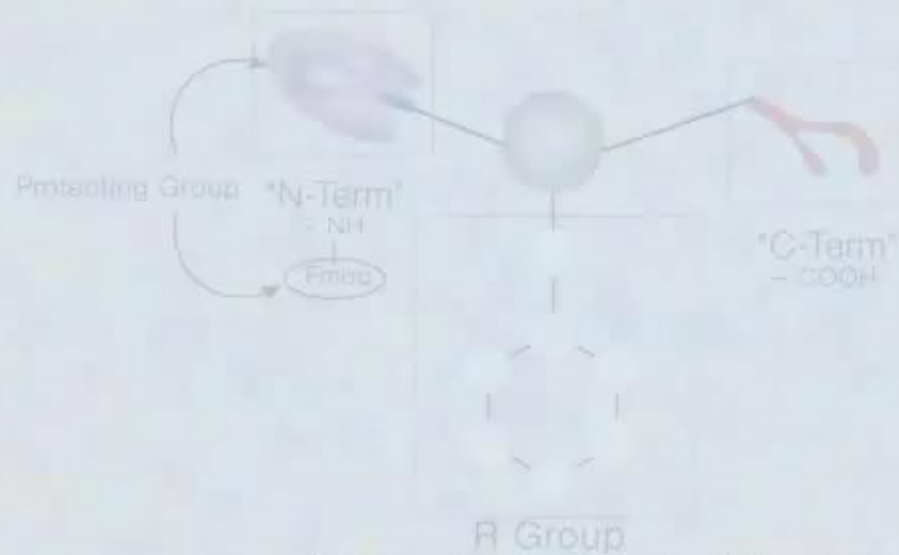


Groupement 9-fluoréylméthoxycarbonyl
(**Fmoc**)

Comme ces deux groupements subissent des réactions analogues, nous ne parlerons que du groupement **Boc**.



Peptides are made by joining amino acids together



Amino Acids . The building blocks

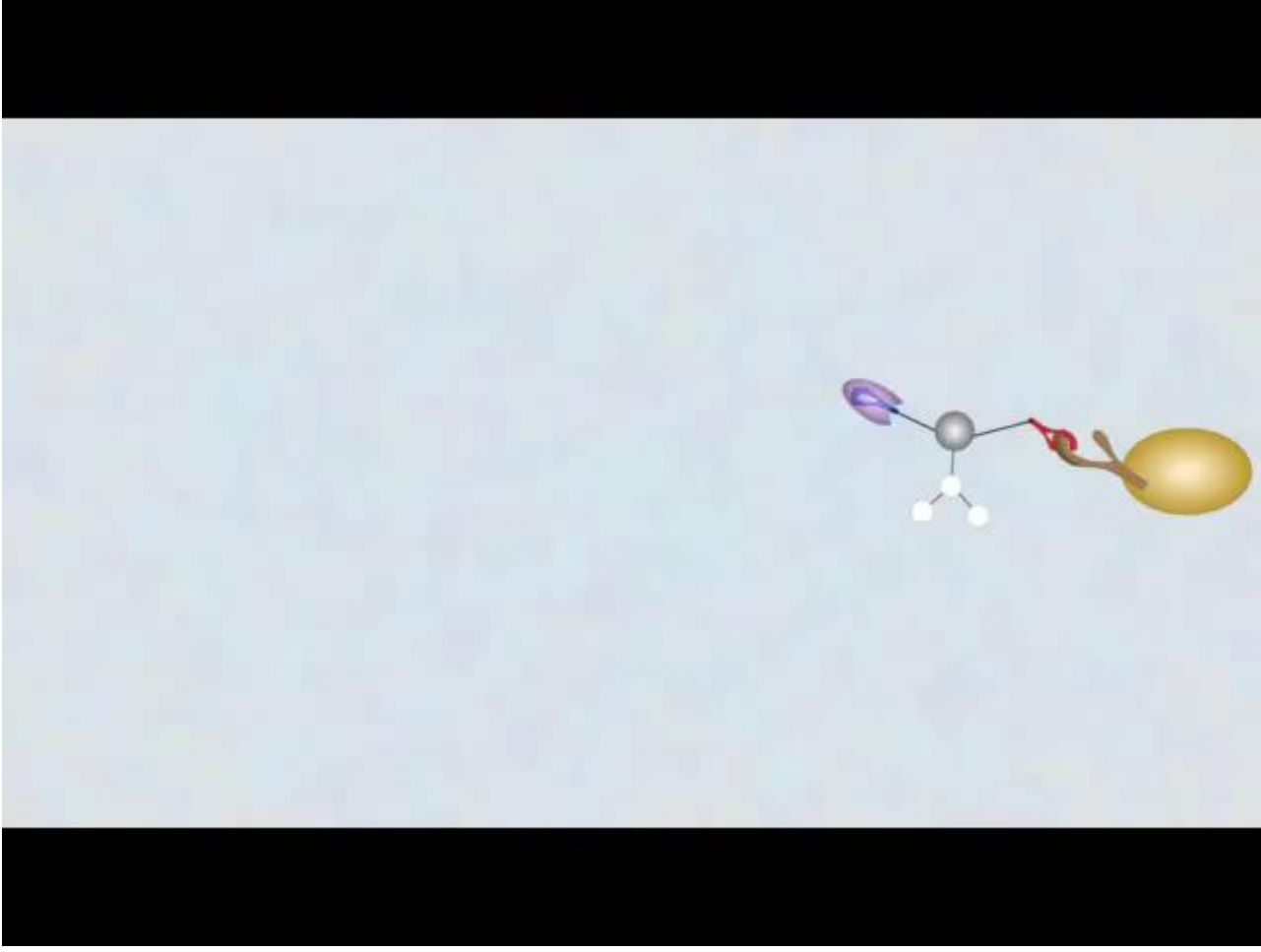
Protecting group

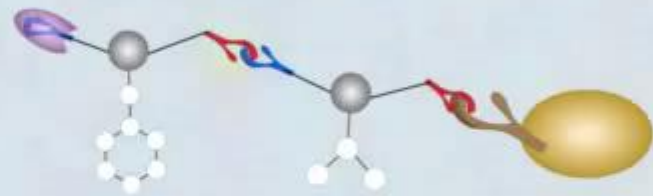


Functional group

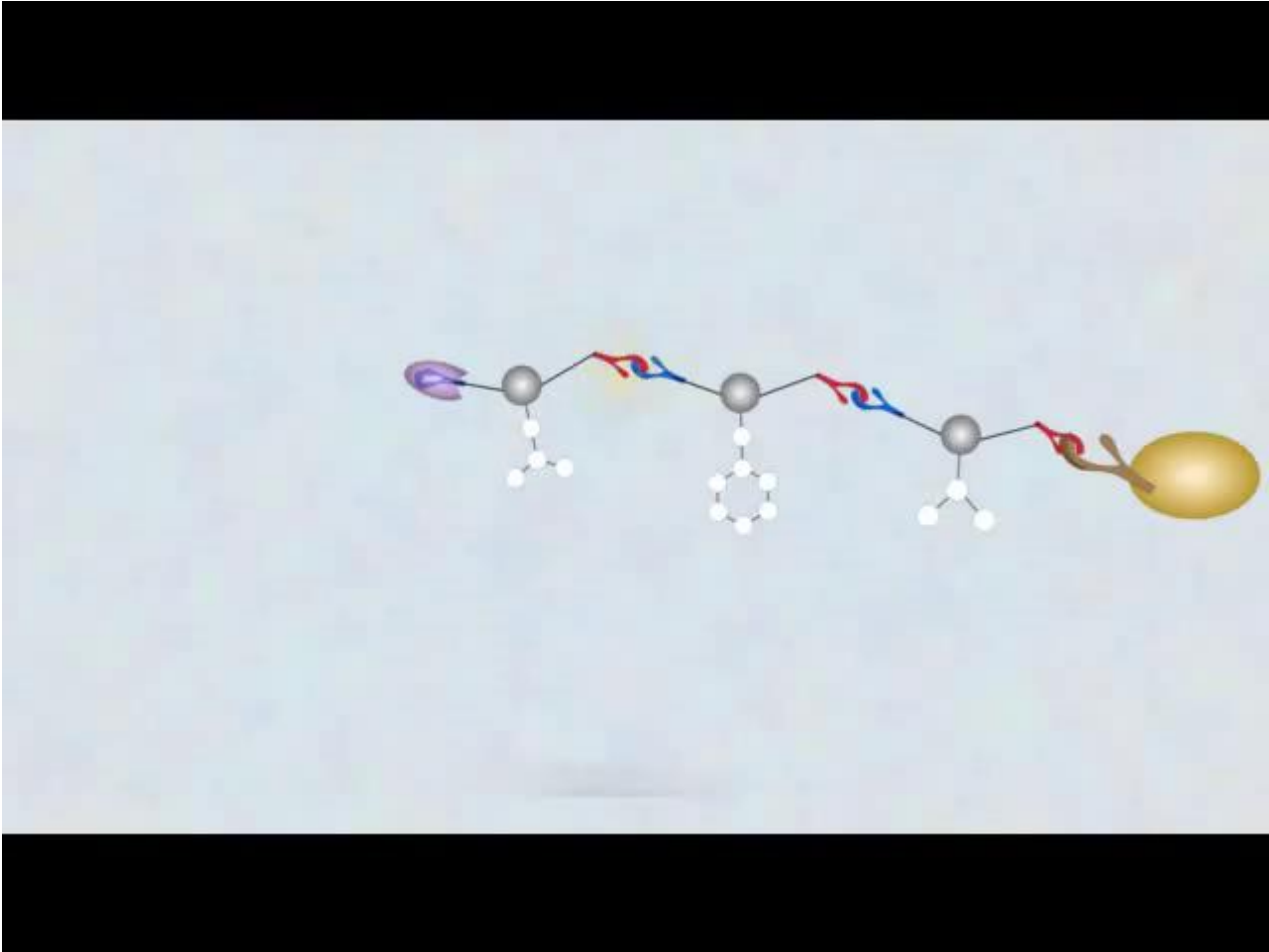
n solvent

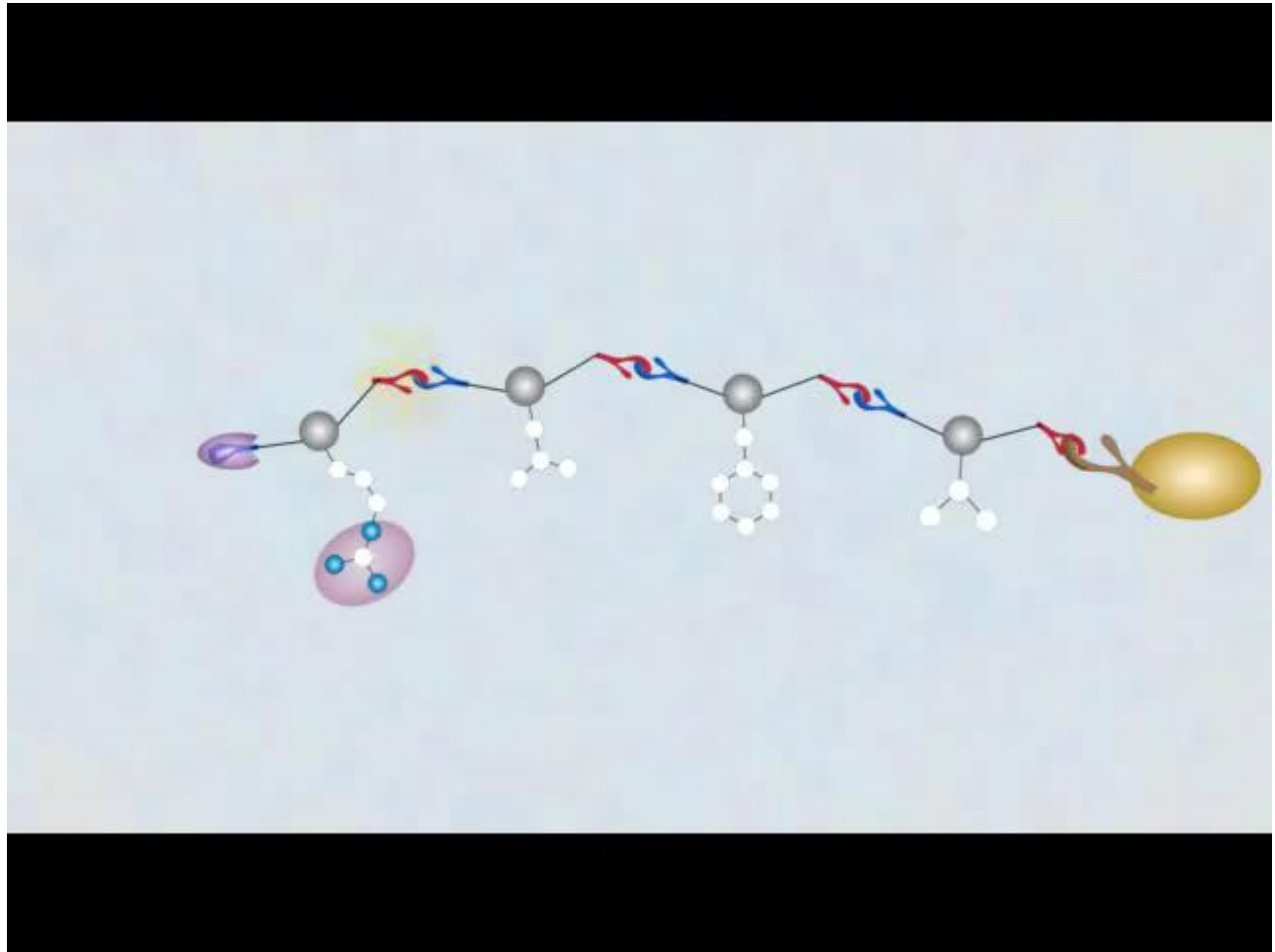




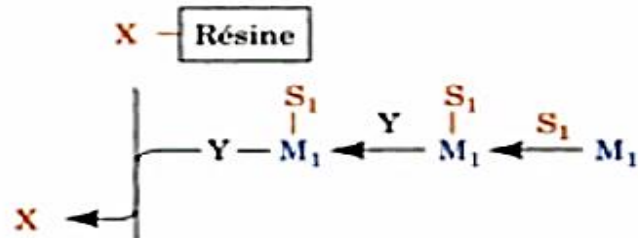


Coupling

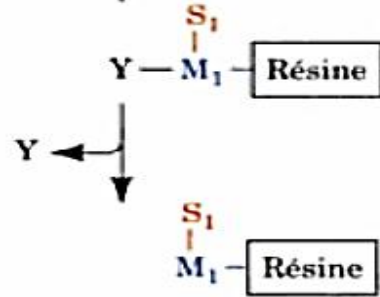




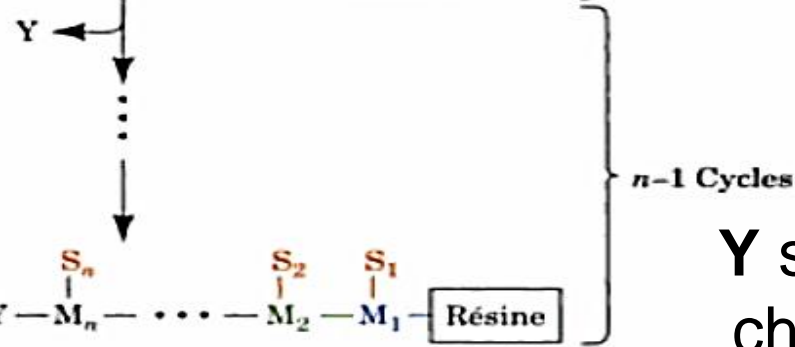
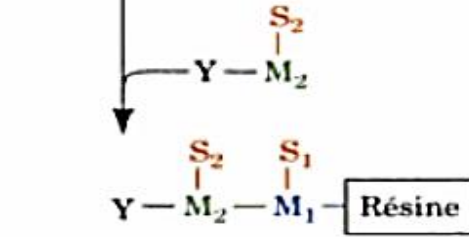
Couplage au support



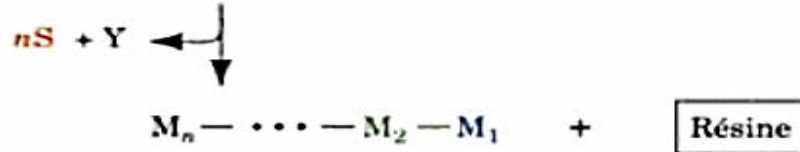
Déblocage de la chaîne principale



Couplage de l'acide aminé (formation de la liaison peptidique)



Libération du peptide et déblocage des chaînes latérales



Un cycle

$n-1$ Cycles

Suite des réactions pour la synthèse d'un polypeptide en phase solide. Le symbole **M**, correspond au n-ième résidu d'acide aminé qui doit être ajouté au polypeptide.

S, est le groupement protecteur de sa chaîne latérale.

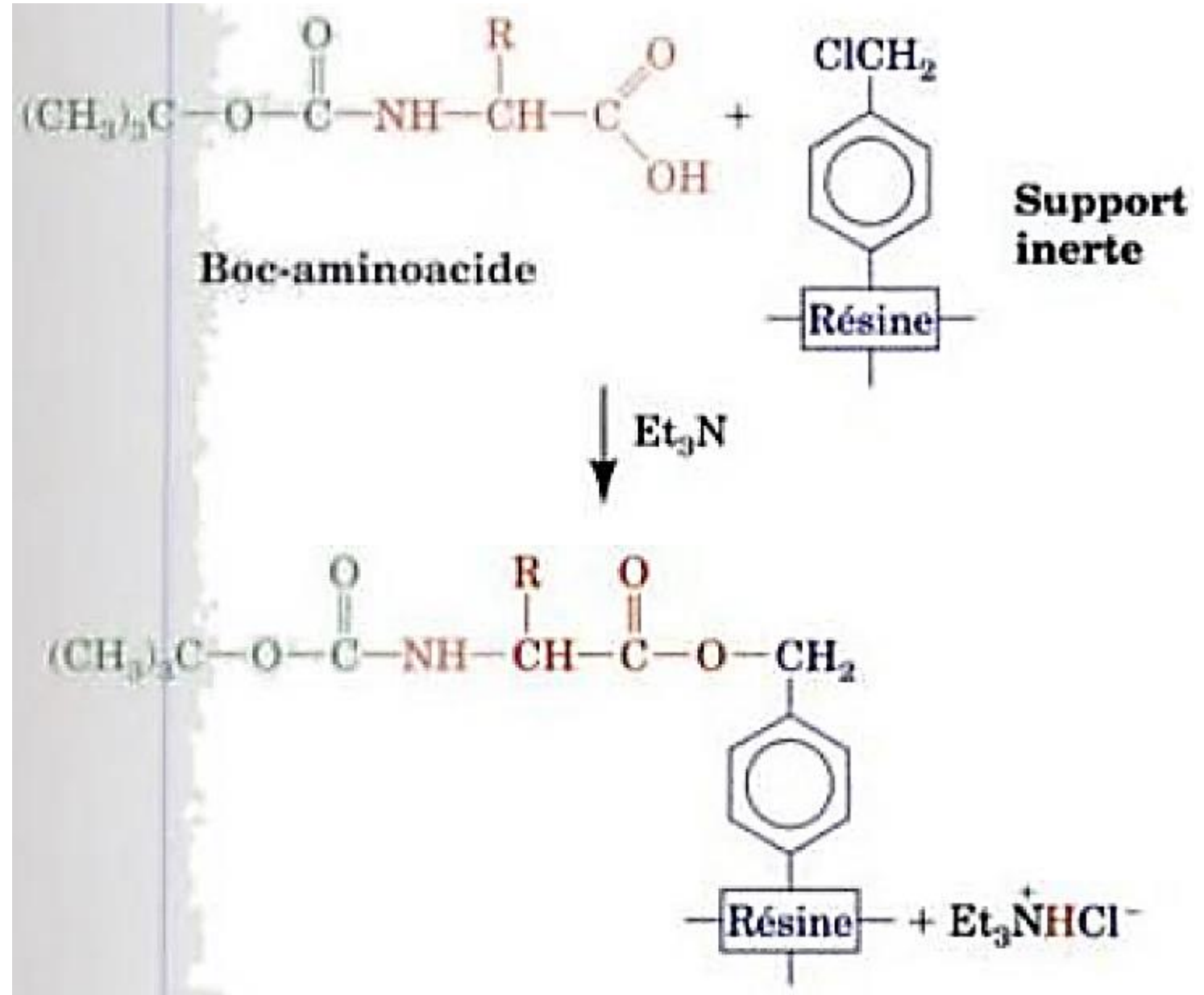
Y symbolise le groupement protecteur de la chaîne principale. Les réaction spécifiques sont discutées dans le teste.

1.1. Ancrage de la chaîne au support inerte

La première étape de la **SPPS** consiste à **coupler l'acide aminé C-terminal** au support solide.

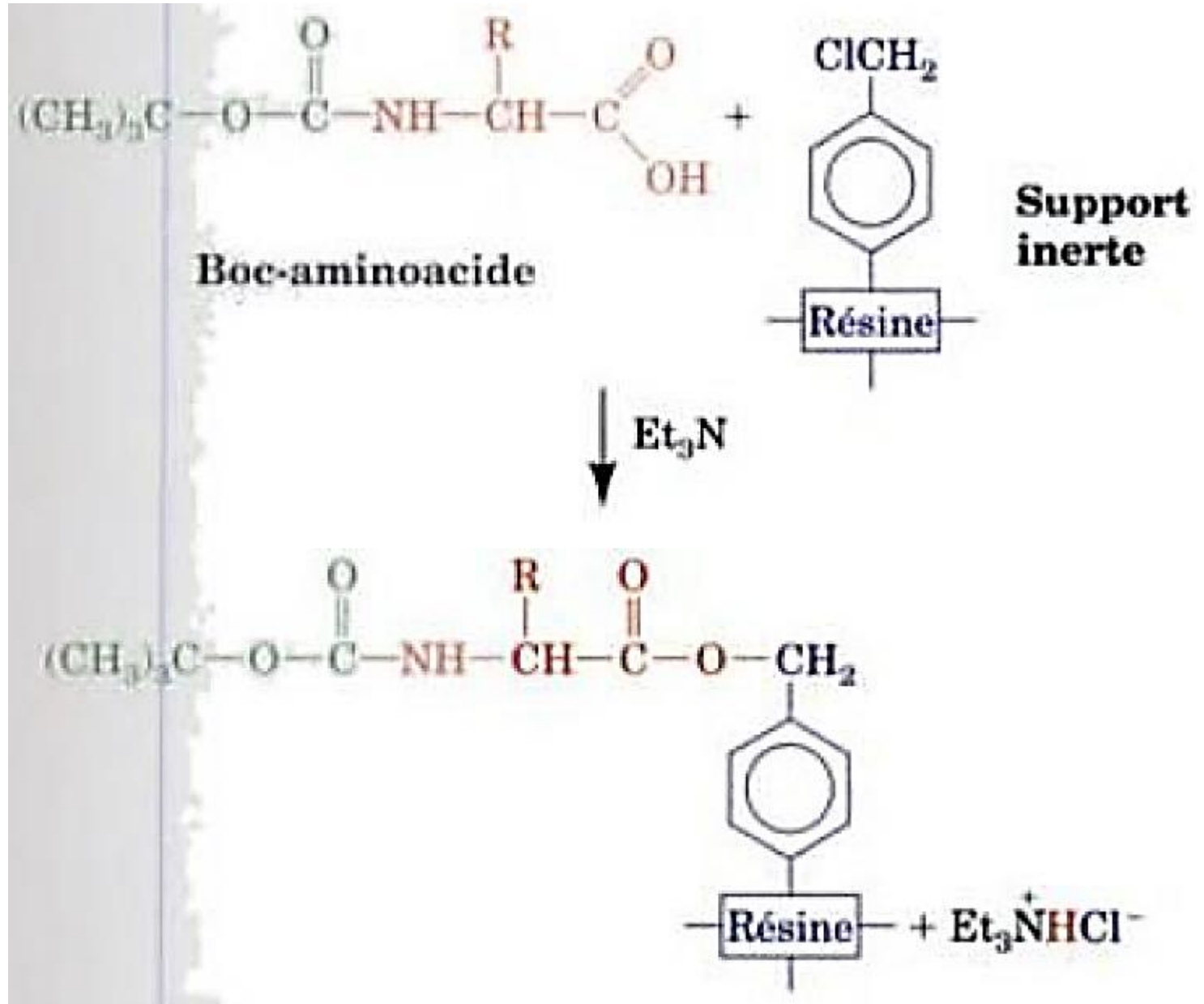
Le support le plus souvent utilisé est une résine en **polystyrène** réticulé sur laquelle sont greffés des groupements **chlorométhyle**.

Le couplage à la résine se fait par la réaction suivante :



Et₃N ou triéthylamine **N(CH₂CH₃)₃**
intervient comme activateur

Se combiner avec l'acide
chlorhydrique généré (formant un
sel, le chlorhydrate de
triéthylammonium)

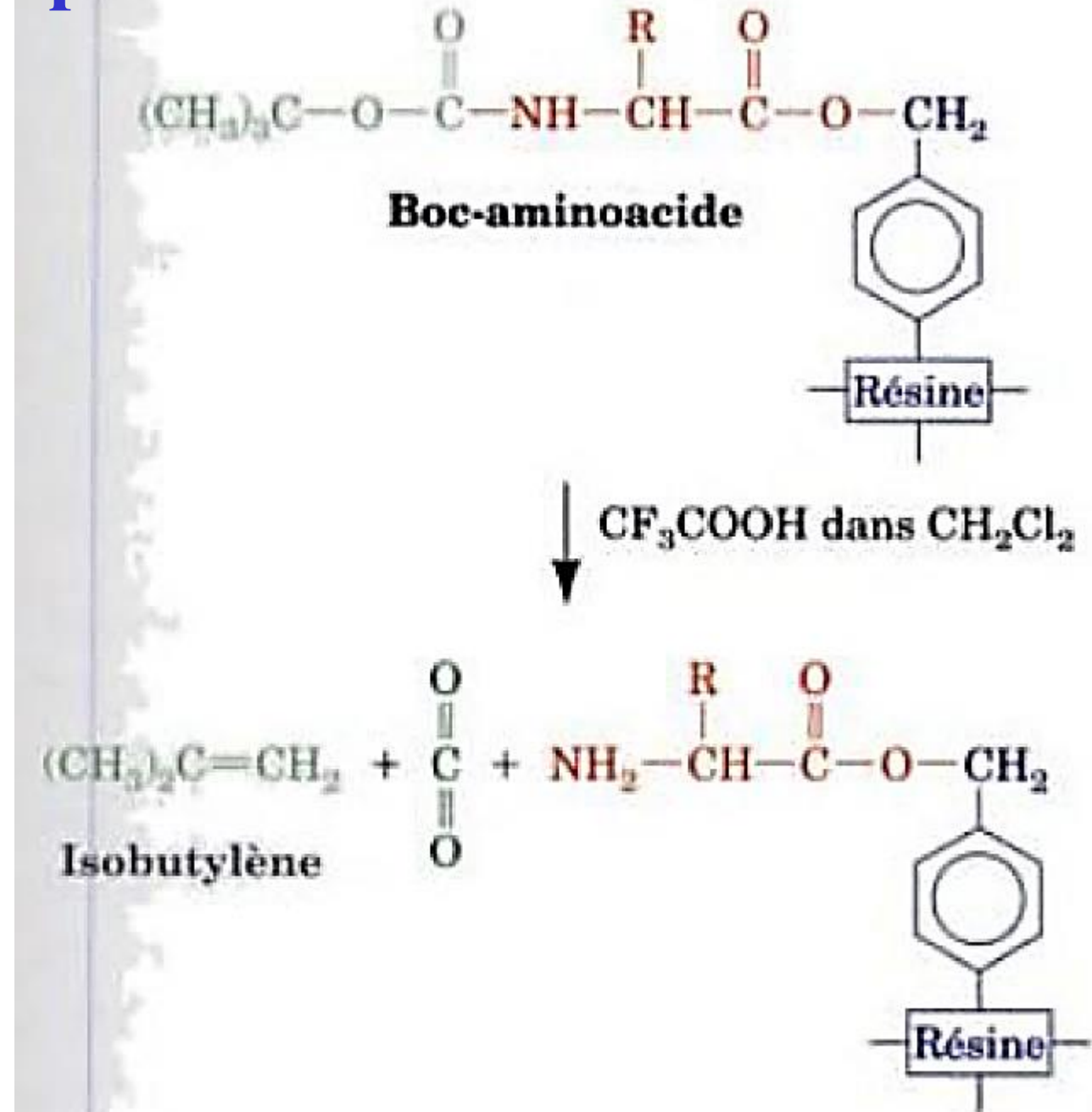


1.2. Déblocage du groupement amine de l'AA

La résine couplée à l'acide aminé est filtrée et lavée. Le groupement amine est alors **débloqué** par traitement avec un **acide anhydre** comme l'acide **trifluoroacétique**.

Qui n'affecte pas la **liaison ester alkylbenzyle** à la résine support.

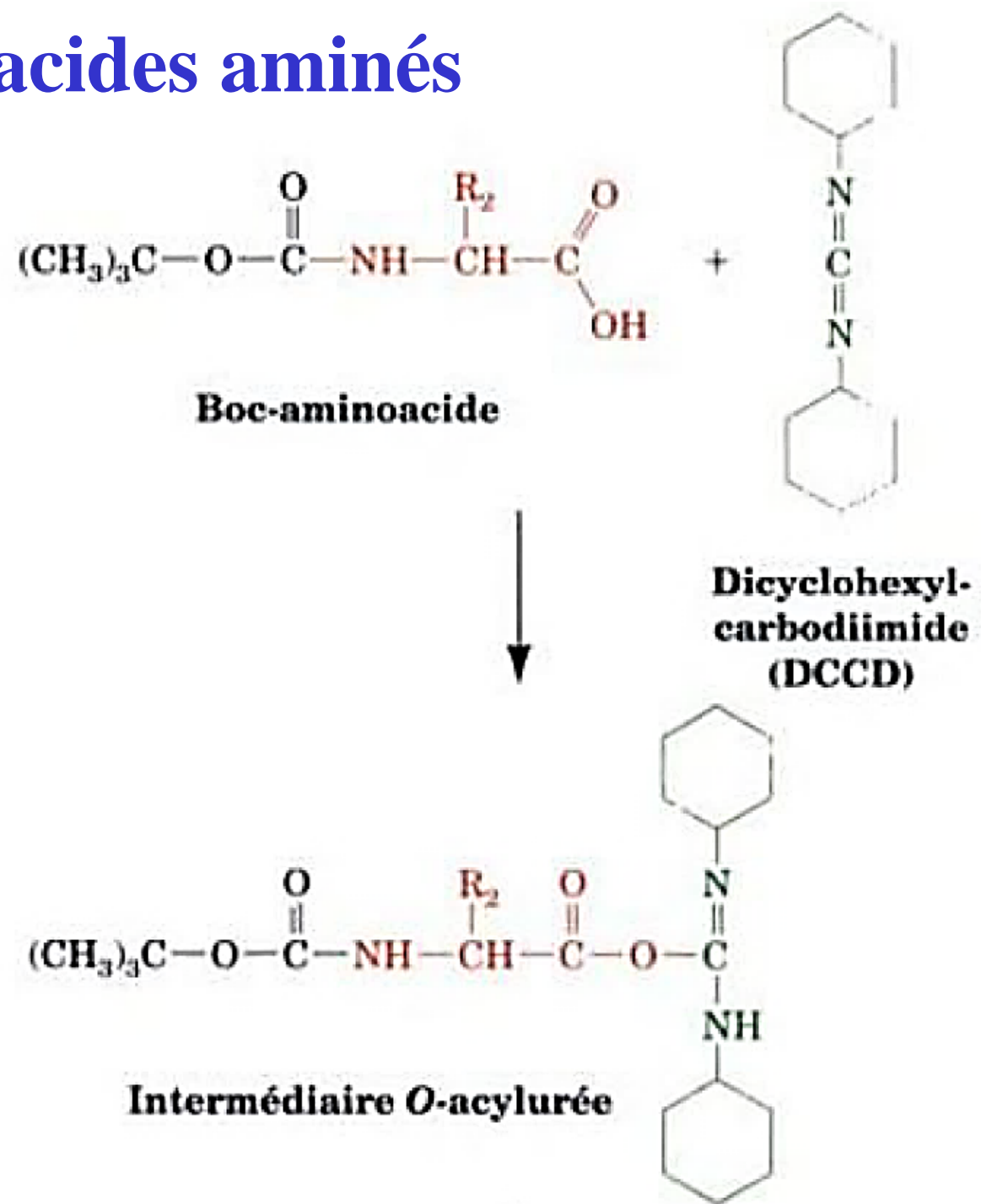
Le dichlorométhane (CH₂CL₂) : solvant efficace sur de nombreux produits organiques



1.3. Couplage des acides aminés

La réaction qui permet de coupler deux acides aminés par une liaison peptidique est endergonique et doit donc être activée pour avoir un rendement significatif.

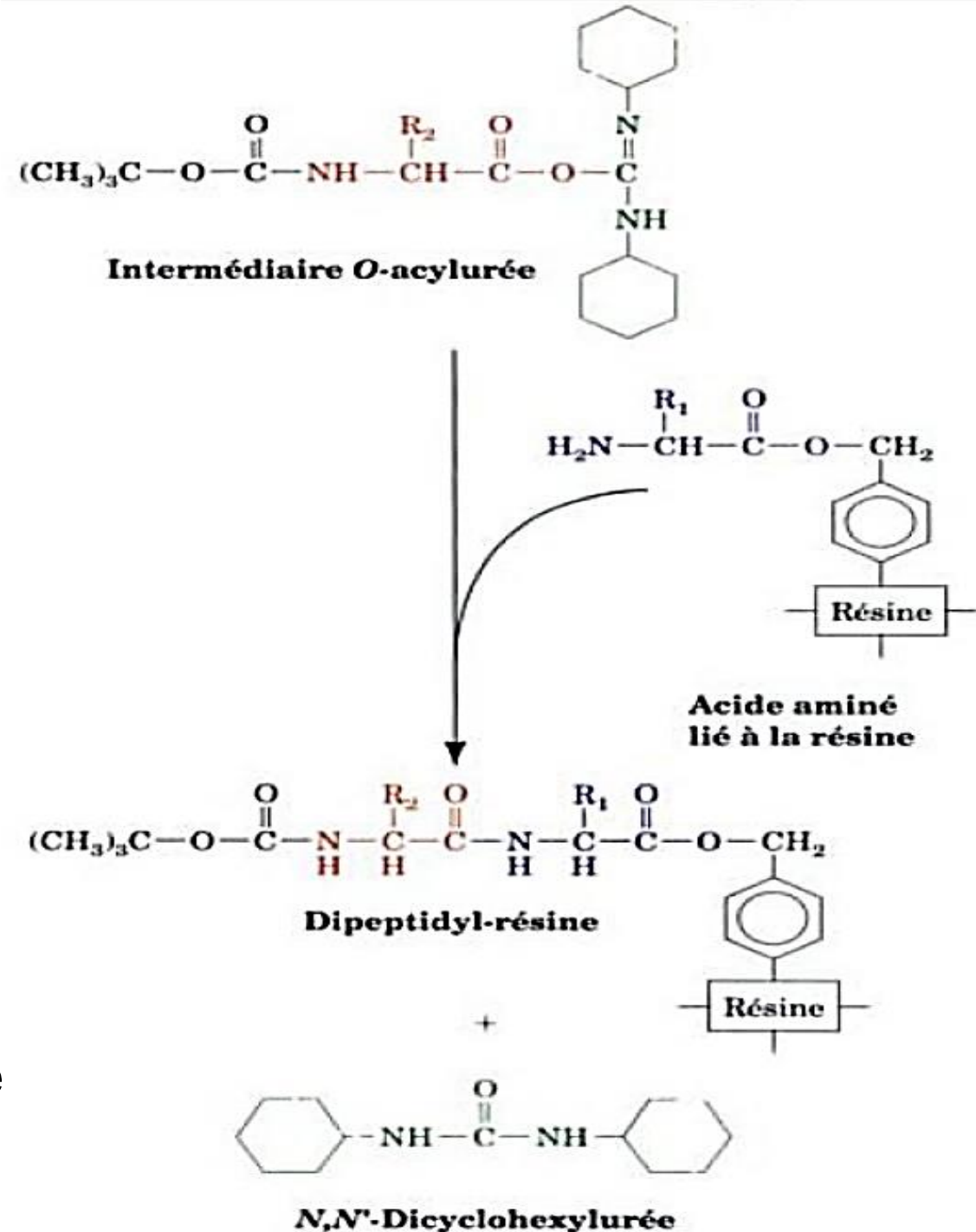
L'agent activateur le plus souvent utilisé est une **carbodiimide (R-N=C=N-R')** comme le **dicyclo-hexylcarbodiimide (DCCD)**.



L'intermédiaire *O*-acyluréé qui résulte de la réaction entre le dicyclo-hexylcarbodiimide (**DCCD**) et le **groupement carboxyle** du dérivé protégé **Boc-acide aminé** réagit facilement avec l'acide aminé lié à la résine pour former avec un haut rendement la liaison peptidique souhaitée.

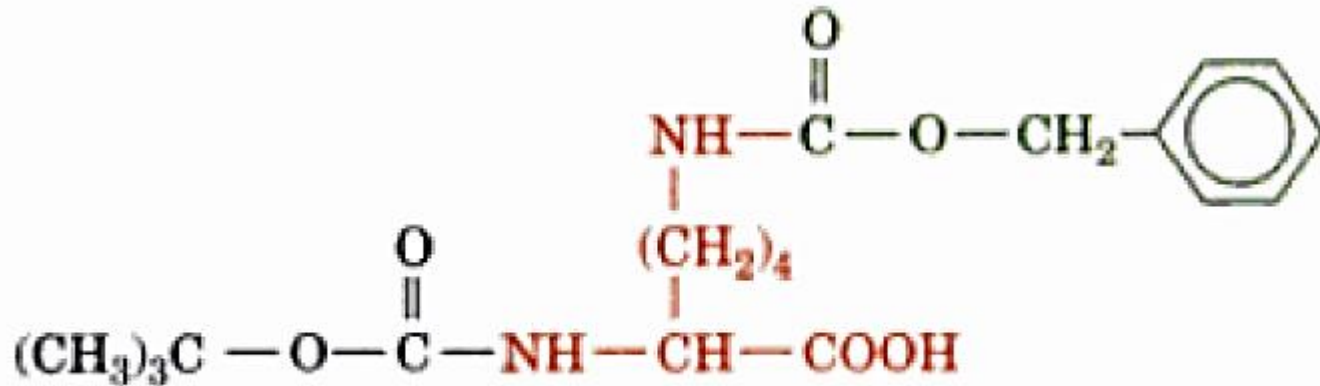
En alternant successivement les réactions de **déblocage** et de **couplage** on peut ainsi synthétiser un **polypeptide** de séquence voulue.

La nature **répétitive** de ces opérations a permis **d'automatiser** facilement la méthode **SPPS**.

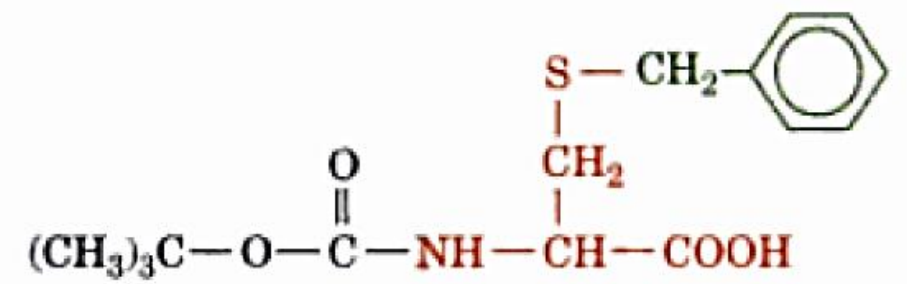


Pendant la synthèse peptidique, beaucoup de **chaînes latérales** doivent être protégées pour éviter qu'elles ne réagissent avec le **réactif de couplage**.

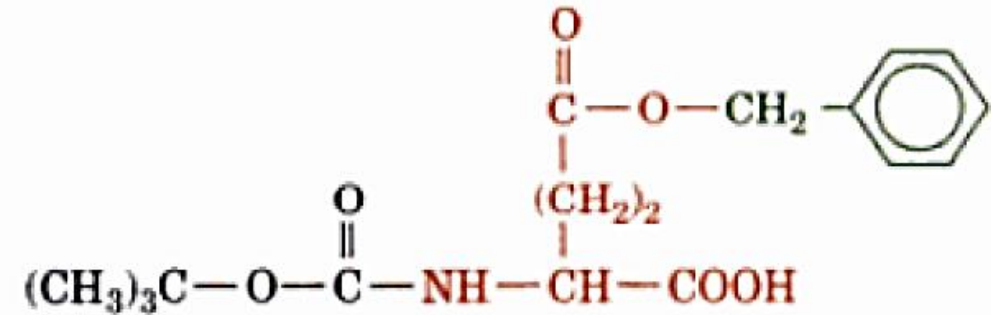
Bien qu'il existe de nombreux **groupements de blocage**, le groupement **benzyle** est le plus souvent utilisé.



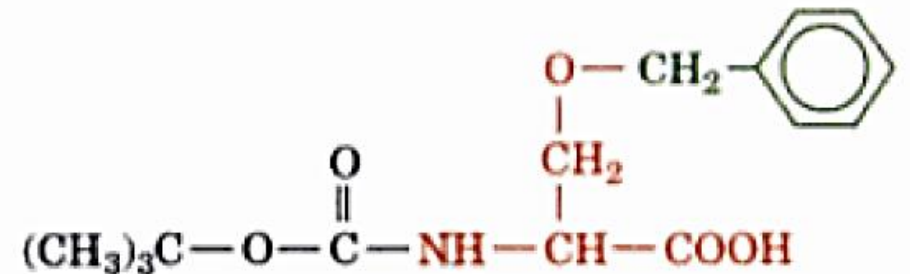
Boc, N^ε-benzyloxycarbonyl-Lys



Boc, S-benzyl-Cys



Boc-Glu, γ-Benzyl ester



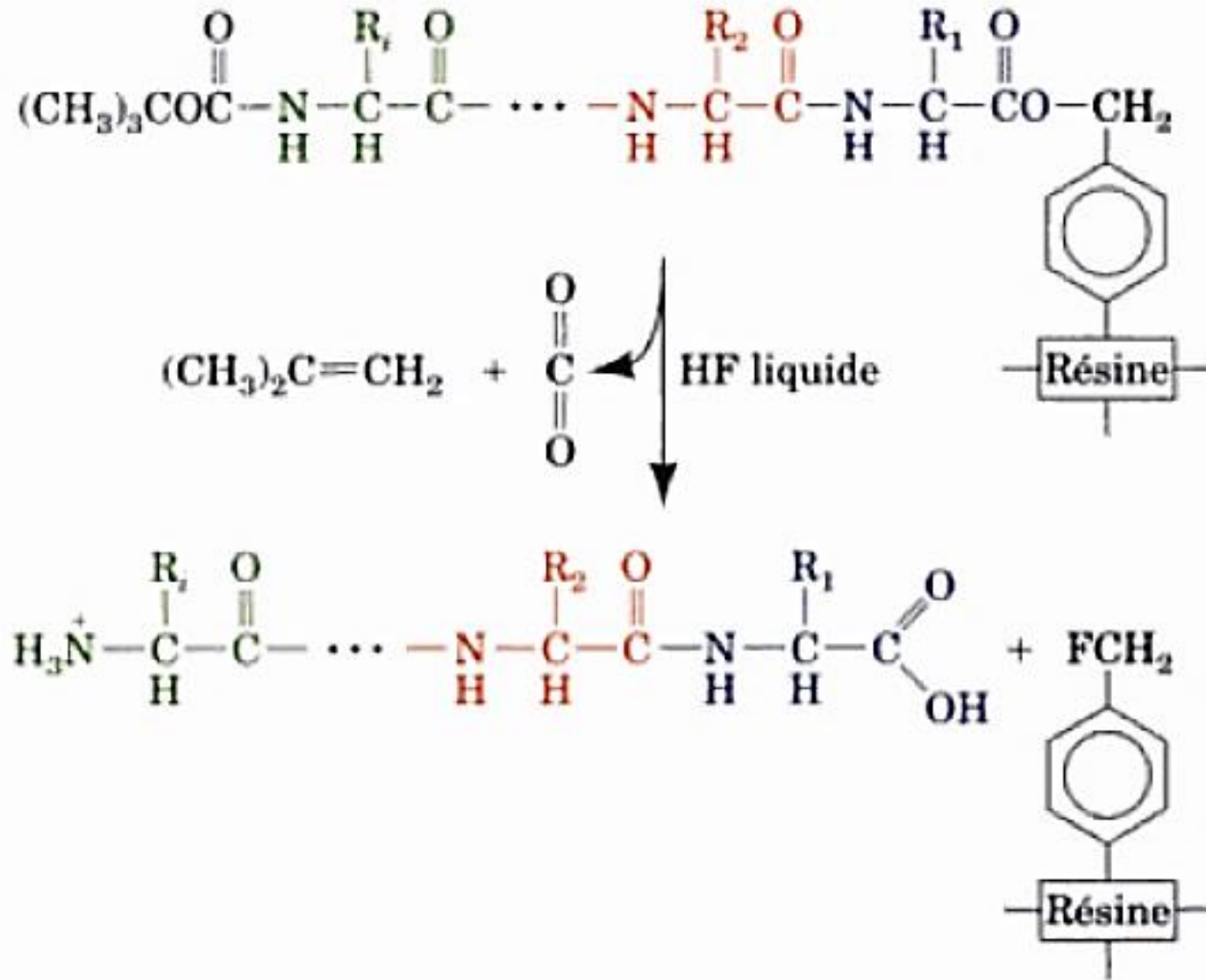
Boc, O-benzyl-Ser

1.4. Détachement du polypeptide de la résine

La dernière étape de la **SPPS** est la libération du polypeptide de son support solide.

La liaison **benzyle ester** qui unit l'extrémité **C-terminale** du polypeptide à la résine peut être rompue par action de l'**acide fluorhydrique** liquide.

Le groupement **Boc** lie à l'extrémité **N-terminale** du polypeptide, ainsi que les groupements **benzyle** qui protègent les **chaînes latérales**, sont aussi enlevés par ce traitement.



Difficultés et perspectives

Les étapes dont nous venons de tracer les grandes lignes semblent simples, mais elles ne le sont qu'en apparence. Une des **principales difficultés** de l'ensemble du procédé est son **faible rendement**.

Voyons pour quelles raisons. La synthèse d'une chaîne polypeptidique à n liaisons peptidiques demande, au minimum, $2n$ étapes réactionnelles - **une pour le couplage** et une pour **le déblocage de chaque résidu**.

Si l'on veut **synthétiser** un **polypeptide** de la taille d'une **protéine** avec un **rendement suffisant**, il faut que chaque réaction soit pratiquement quantitative sinon le rendement final sera fortement diminué.

Un problème annexe se posera une fois le **polypeptide synthétique détaché** : il devra être **purifié**.

Cette étape peut être difficile en raison d'un nombre **non négligeable de réactions incomplètes** et/ou de **réactions secondaires** qui se feront durant la synthèse, d'où la formation d'une série **de composés très proches du polypeptide de grande taille**.

Cette **purification** est toutefois grandement facilitée par les techniques de **HPLC**.

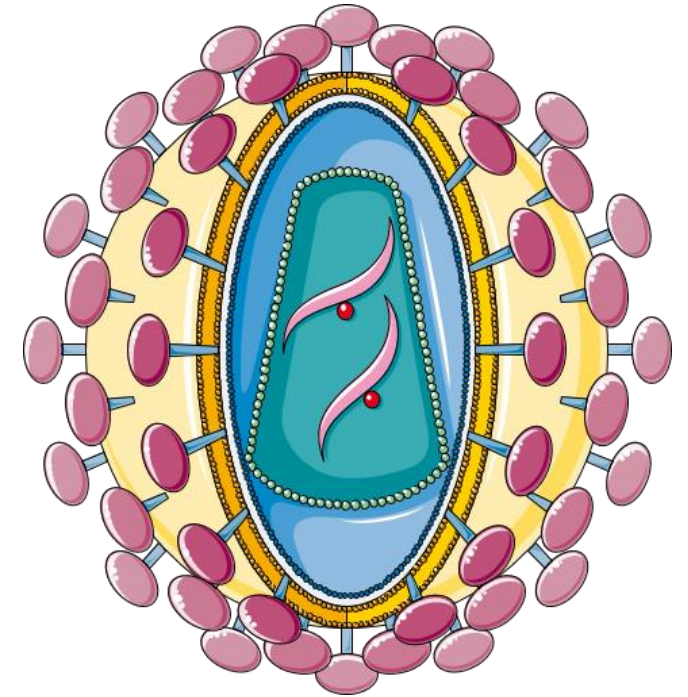
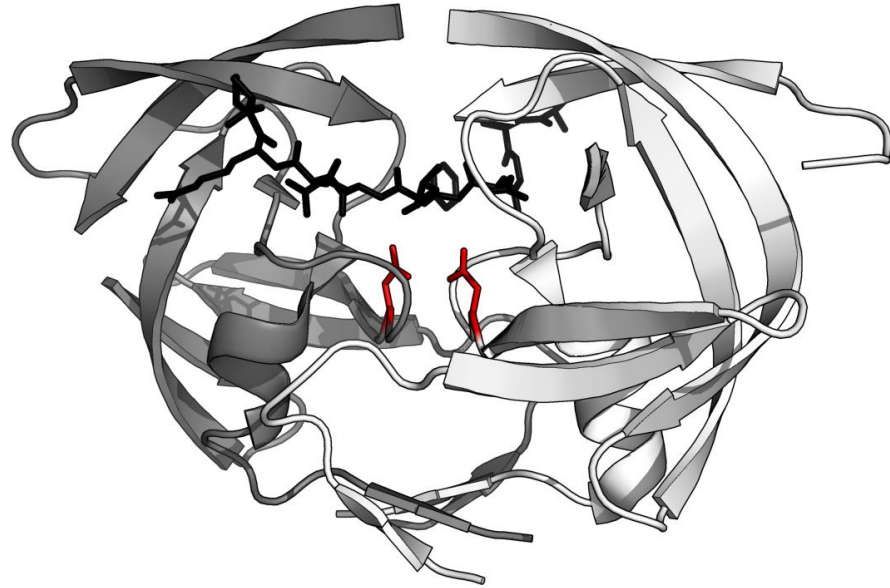
la qualité des composés intermédiaires et des produits finis peut être déterminée facilement par **spectrométrie de masse**.

En utilisant la **SPPS automatisée**, **MERRILIED** a synthétisé l'hormone **bradykinine** (un nonapeptide) avec un rendement de 85 % :

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Bradykinine

Cependant, ce n'est qu'en **1988** grâce à des progrès continus dans l'amélioration des rendements de réactions (> 99.5 % en moyenne) et dans l'élimination de réactions secondaires, qu'on a pu synthétiser des polypeptides d'environ 100 résidus de bonne qualité.

Ainsi, **Stephen Kent** a synthétisé la protéase de **HIV** (99 résidus) [enzyme indispensable à la maturation du virus de l'immunodéficience humaine (HIV, ou virus du SIDA)]



Avec un tel **rendement** et une telle **pureté**, qu'après renaturation (la protéase s'est repliée pour prendre sa conformation native) elle présentait **une activité biologique totale**. De plus, cette protéine synthétique a été **crystallisée** et sa structure par **rayons X** s'est révélée identique à celle de la **protéase HIV naturelle**.

Kent a aussi synthétisé la **protéase HIV** à partir de **D-amino acides** et a vérifié **expérimentalement**, pour la première fois, qu'une telle protéine présente la **chiralité opposée** à celle de sa contre-partie biologique.

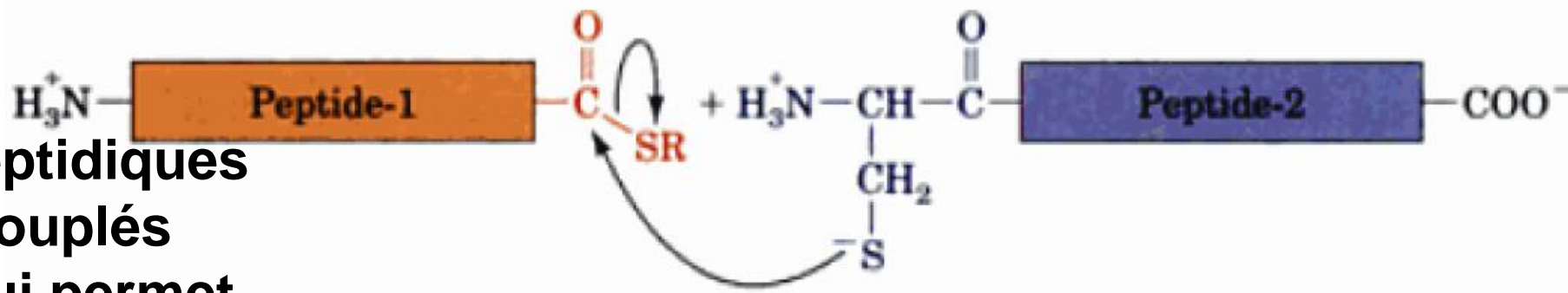
Cette **protéase** de D-amino acides catalyse l'hydrolyse de son polypeptide « cible » formé de **D-aminoacides**, mais non celle du polypeptide « cible » formé de **L-aminoacides** comme le fait la **protéase HIV naturelle**.

En dépit de ce qui précède, l'accumulation, sur la résine, de produits dérivés, limite à environ 60 résidus la taille des polypeptides qui peuvent être synthétisés en routine par SPPS.

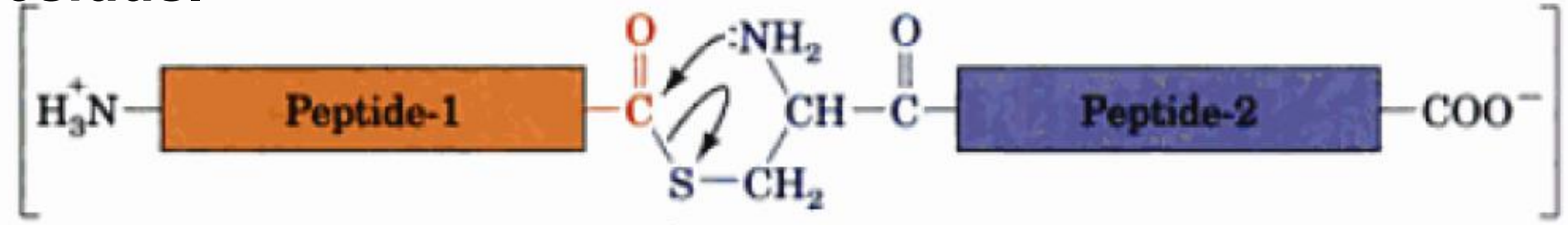
Kent a toutefois permis d'aller plus loin en mettant au point la technique de ligation chimique native.

Ici, deux peptides sont réunis par liaison peptidique pour donner un polypeptide dont la longueur peut atteindre 120 résidus.

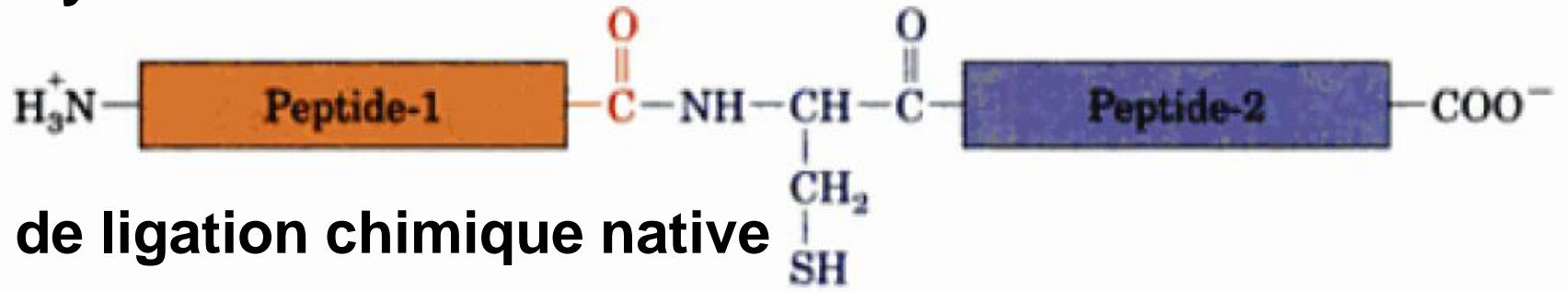
Plusieurs segments peptidiques peuvent ainsi être couplés successivement, ce qui permet d'espérer la synthèse chimique de polypeptides comportant plusieurs centaines de résidus.



$-SR + H^+$



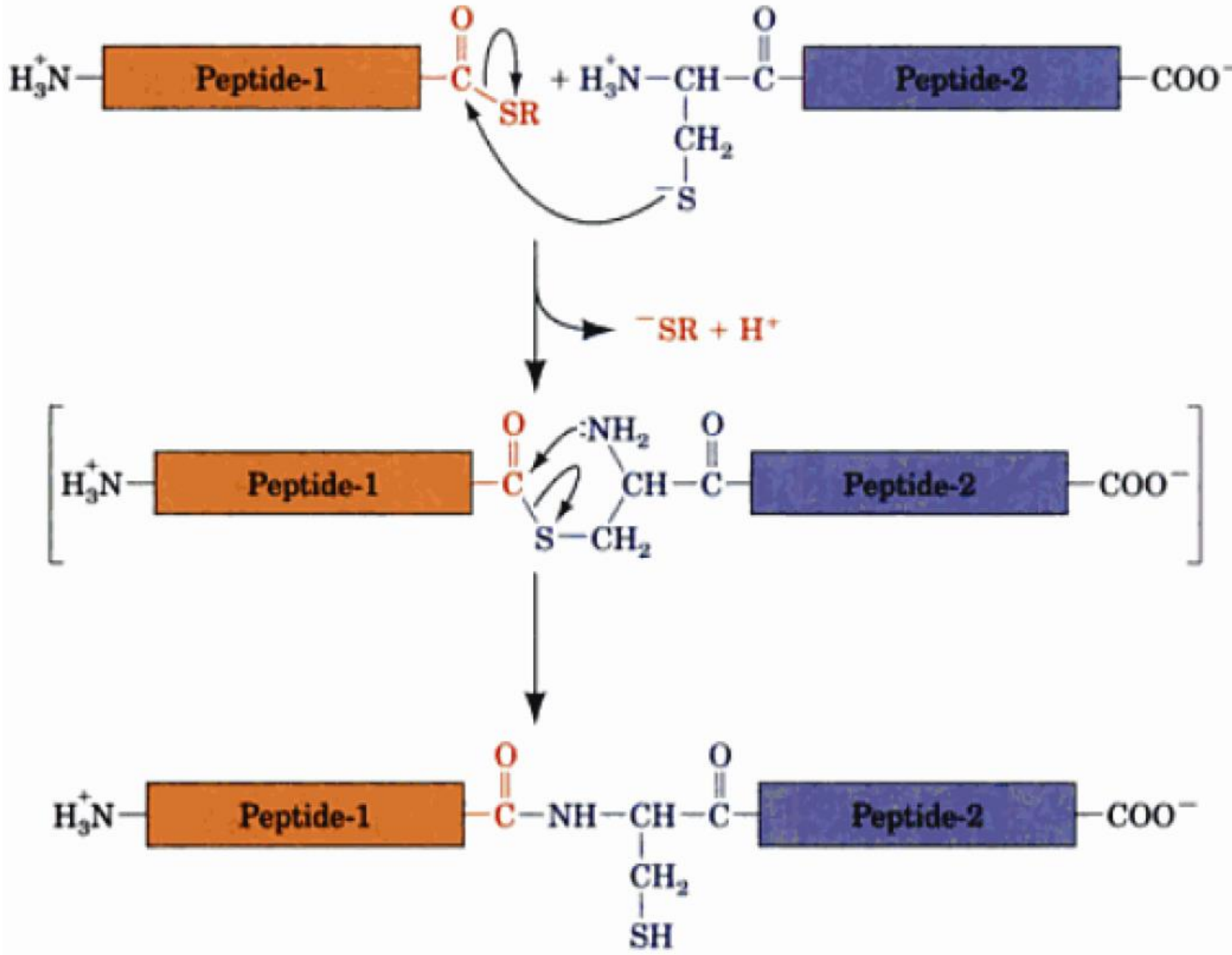
Bien sûr, cette technique exige que chaque liaison peptidique ainsi formée ait un résidu Cys du côté C-terminal.



La réaction de ligation chimique native

Le Peptide 1 possède un groupement C-terminal thioester (R est un groupement alkylé) et l'extrémité N-terminale du Peptide 2 est une Cys.

La réaction, qui se déroule en solution aqueuse à pH 7, commence par l'attaque nucléophile du groupement Thiol du résidu Cys du Peptide 2 sur le groupement thioester du Peptide 1 pour donner, dans un réaction d'échange de thiols.



La réaction de ligation chimique native

un nouveau groupement thioester. Cet intermédiaire (représenté entre crochet) subit une attaque nucléophile intermoléculaire rapide pour donner une liaison peptidique native au site de ligation.