



**UNIVERSITÉ ORAN1**

**AHMED BENBELLA**

**FACULTÉ DE MÉDECINE**

**MODULE DE BIOCHIMIE**

**1<sup>ère</sup> Année de Médecine**

**Biochimie Structurale et Métabolique**

**Chapitre 3 : LES PROTEINES**

**Séquençage des protéines**

**Dr M. Nachi**

**Année Universitaire 2018-2019**

~~~~~

## PLAN

- I. Introduction**
- II. Détermination de la composition en aminoacides**
- III. Détermination de l'ordre des enchaînements des résidus**
- IV. la dégradation récurrente d'Edman**
- V. Dégradation des peptides en fragments**
- VI. Séquençage des protéines ayant plusieurs chaînes polypeptidiques**

## I. Introduction

Le séquençage des protéines est destiné à connaître le nombre, la nature chimique et l'ordre de l'enchaînement de tous les résidus d'acides aminés.

On commence par déterminer la structure primaire d'un peptide qui est conduite en deux étapes :

1. La détermination de la composition en aminoacides
2. La détermination de l'ordre de l'enchaînement des résidus.

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

## II. Détermination de la composition en aminoacides

La composition brute en acides aminés peut être déterminée:

- Par hydrolyse chimique complète (HCl 6N, 105°C pendant 24 h): rupture des liaisons peptidiques aboutissant à un hydrolysate. Le mélange obtenu est ensuite analysé par chromatographie sur une résine échangeuse d'ions ( Qualitative et Quantitative) .
- Cette méthode conduit à la destruction du tryptophane et la transformation des amides aminés (Asn, Gln) en ammoniac et acides correspondants (Asp, Glu).
- Hydrolyse alcaline par chauffage: Elle se fait en utilisant de **l'hydroxyde de sodium (NaOH)** à 4 mol/L à chaud (110°C) pendant 4 à 8h environ : détruit la Sérine, l'Arginine, la Thréonine et la Cystéine. Utilisation limitée à la détermination de la teneur en Tryptophane.
- L'hydrolyse peut aussi être réalisée par voie enzymatique (protéases), mais on n'obtient généralement que des polypeptides, et non les acides aminés eux-mêmes.

### III. Détermination de l'ordre des enchaînements des résidus

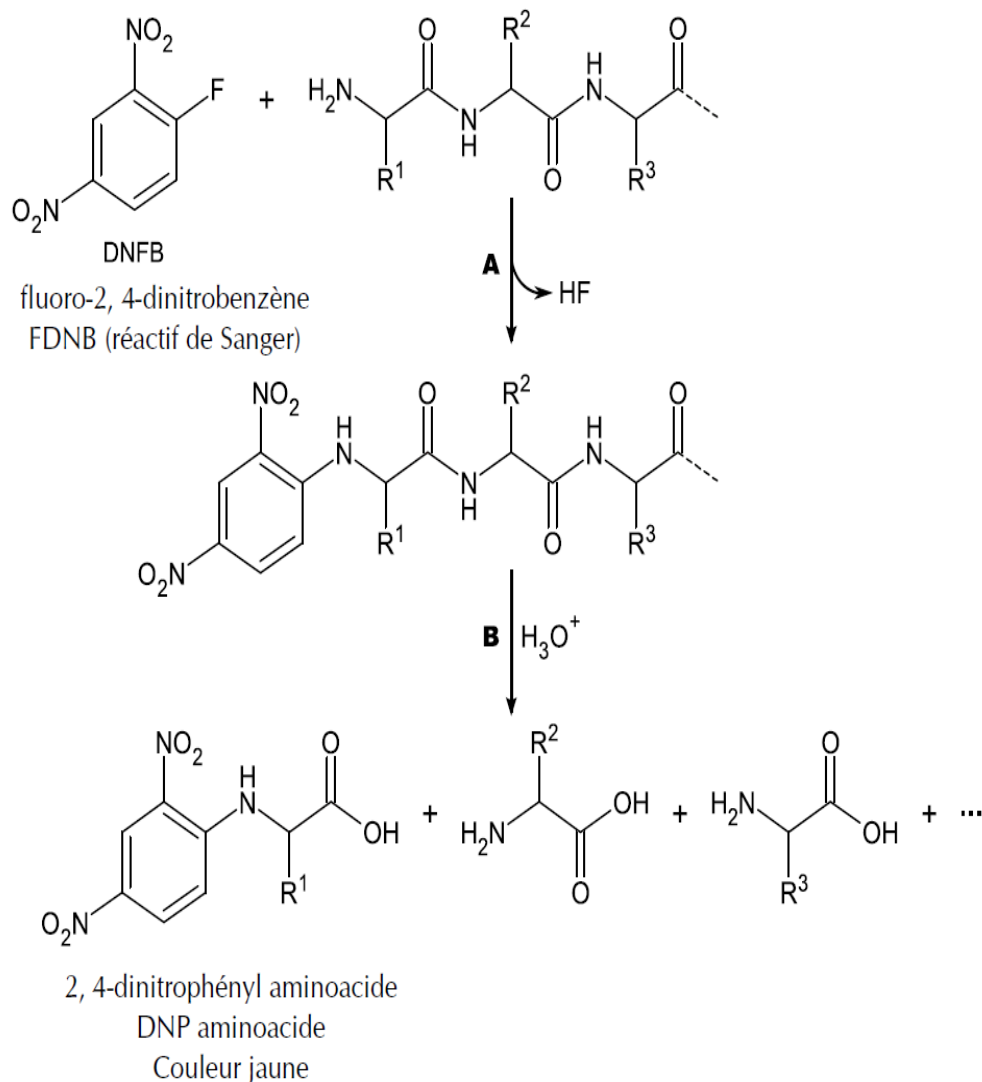
#### ➤ Identification des aminoacides N-terminaux

##### a. Méthode de Sanger (FDNB)

Le DNFB forme, avec la fonction N terminale, un dérivé (peptide dinitrophénylé) avec libération d'acide fluorhydrique.

L'hydrolyse de la protéine libère ensuite les acides aminés dont l'aa N terminal sous forme de  $\alpha$  dinitrophenyl aminoacide de couleur jaune : qui peut être identifié par chromatographie ou électrophorèse, et dosé par spectrophotométrie à 360nm.

La présence de lysine dans le peptide va perturber cette méthode puisque la chaîne latérale de ce résidu porte un groupe  $-NH_2$  qui réagira avec le DNFB.

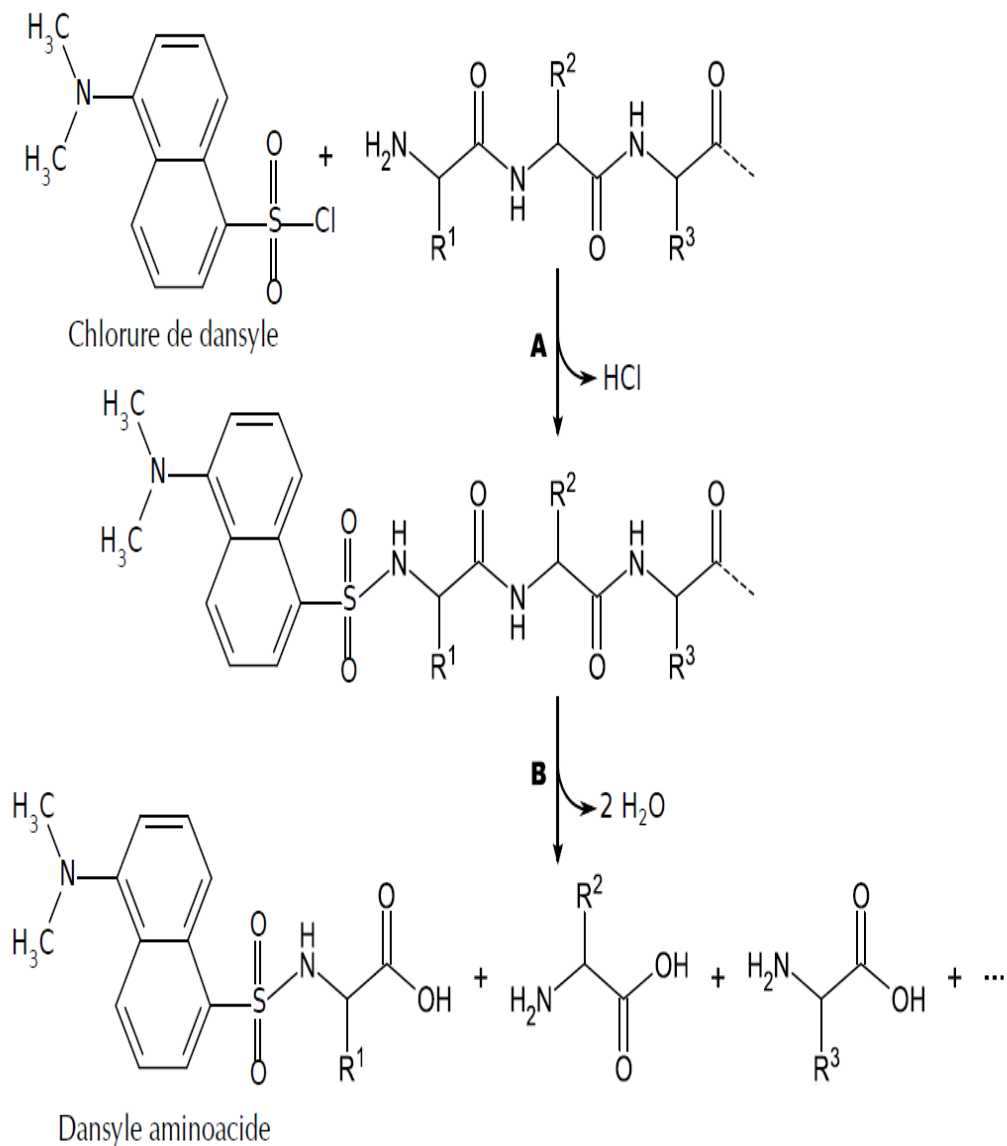


## b. Méthode de dansylation (chlorure de dansyl )

Le chlorure de 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonyle (DANS) réagit avec le NH<sub>2</sub> terminal et donne un dérivé (dansyl-amino-acide) décelable par sa fluorescence jaune. La réaction est 100 fois plus sensible: composé sulfonamide très fluorescent permettant une plus grande sensibilité dans la détection.

Peut être Utilisée pour doser les acides aminés par chromatographie haute performance ( HPLC).

La présence de lysine dans le peptide va perturber cette méthode puisque la chaîne latérale de ce résidu porte un groupe -NH<sub>2</sub> qui réagira avec le DNS-Cl.



### c. Méthode enzymatique (Exopeptidases /Aminopeptidases)

L'enzyme n'hydrolyse que la première liaison peptidique. En suivant la Cinétique de libération on peut déterminer l'Ordre de l'enchaînement des acides aminés mais la méthode est non précise: problème d'affinité enzyme - substrat.

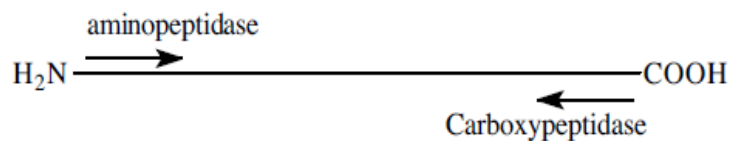
**Ex : Leucine aminopeptidase hydrolyse les liaisons N.t de tous les AcA sauf Proline.**

#### ➤ Identification des aminoacides C-terminaux

### I. Méthode enzymatique (Carboxy-peptidases)

L'enzyme n'hydrolyse que la dernière liaison peptidique.

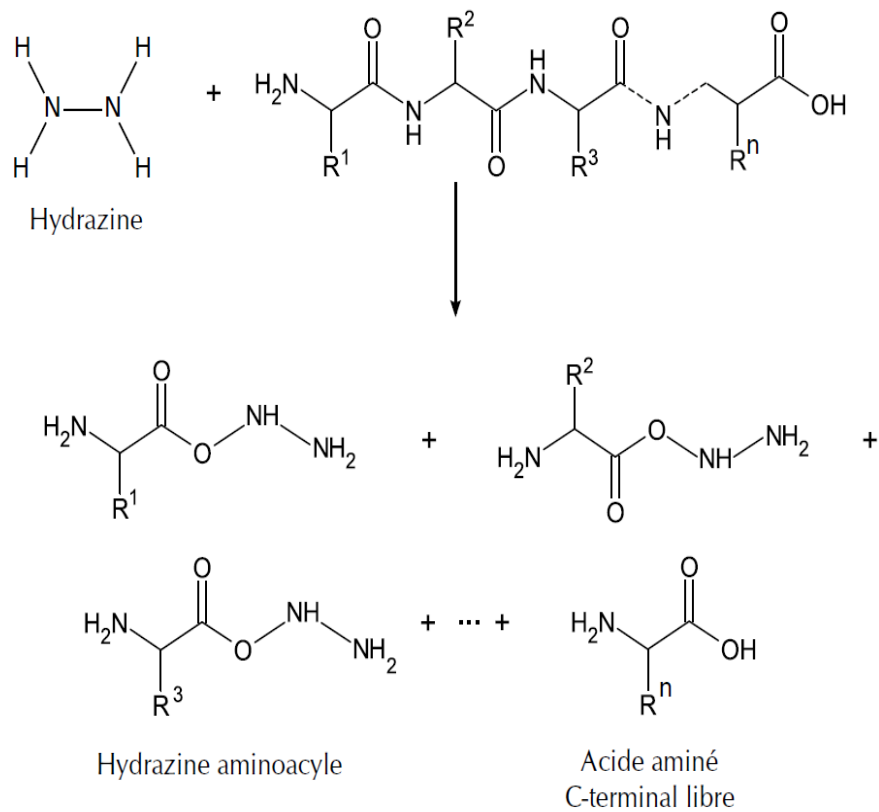
- La Carboxy-peptidase A ( la plus utilisée): extraite du pancréas : attaque les liaisons Ct sauf celle du glycolle et AcA basique .
- La Carboxy-peptidase B : extraite du pancréas : attaque les liaisons Ct des AcA basiques .



### II. Hydrazinolyse

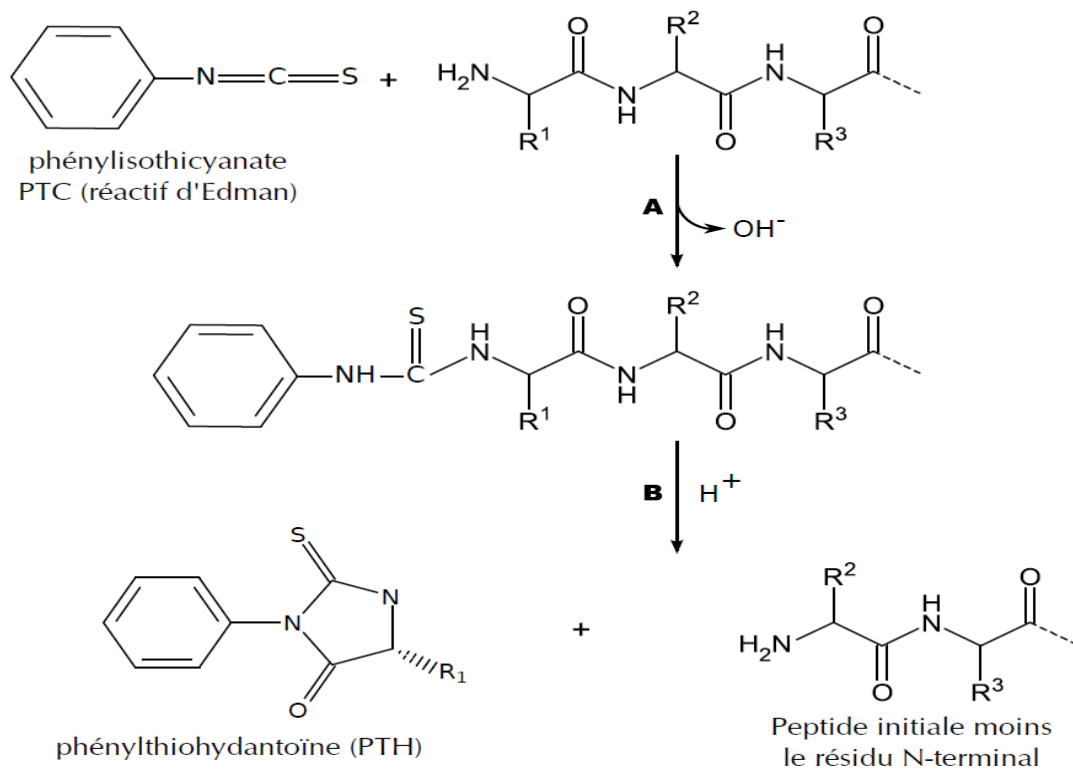
Un traitement à l'hydrazine ( $H_2N-NH_2$ ) à  $100^\circ C$  hydrolyse toutes les liaisons peptidiques, et libère tous les acides aminés sous forme d'hydrazides sauf l'aa en position C terminal, qui se présente comme un aa libre normal. Il est alors facile à isoler et à identifier.

Nécessite moins d'une micromole de peptide mais ne permet de déterminer qu'un seul résidu Ct .



#### IV. la dégradation récurrente d'Edman

- Le phénylthioisocyanate donne une phénylthiodantoïne avec l'acide N-terminal .
- Formation d'un PTC-peptide à pH 9, puis par un changement de pH (légèrement acide), il y a cyclisation et libération d'un dérivé PTH-aminoacide et d'un peptide amputé de son aminoacide N-terminal.
- En répétant ces cycles : action du PTC à pH 9 pour donner un PTC-peptide puis libération du PTH-aminoacide par passage à un pH acide, et du peptide (n-1) amputé du côté N-terminal, on a, à chaque cycle, la libération de l'aminoacide suivant dans la séquence du peptide original. L'acide aminé peut être isolé et identifié par chromatographie.



## V. Dégradation des peptides en fragments

### ✓ Hydrolyse chimique spécifique:

- le bromure de cyanogène ( $\text{BrCN}$ ) hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxyle de la méthionine .
- le 2-nitro-5-thiocyanobenzoate (NTCB) hydrolyse la liaison peptidique du côté amine de la cystéine.
- Hydroxylamine( $\text{NH}_2\text{OH}$ ): coupe entre Asn-Gly.
- N-Bromosuccinimide: hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxyle de la Tyrosine et Tryptophane.

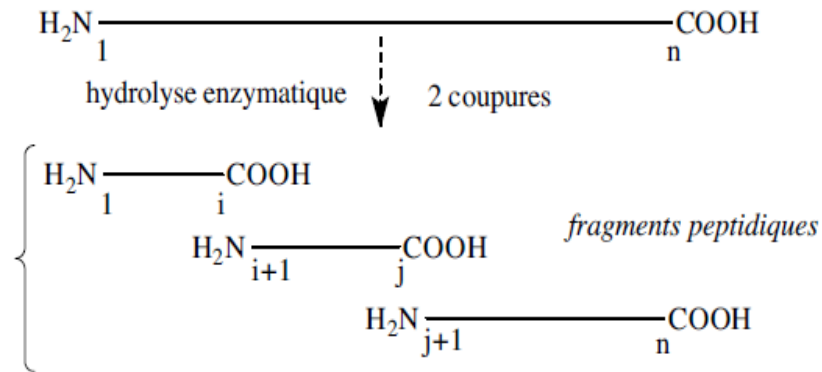
### ✓ Hydrolyse enzymatique : endo-peptidases

L'enzyme hydrolyse des liaisons peptidiques internes entre deux aminoacides  $i$ ,  $(i+1)$ .

Il peut être spécifique du résidu en position  $i$  ou  $(i+1)$ .



L'hydrolyse d'un peptide par une endopeptidase donnera plusieurs fragments peptidiques : si on a m coupures (m liaisons peptidiques hydrolysées), le peptide sera dégradé en (m+1) fragments peptidiques.



| Enzyme           | Coté N-t        | Coté C-t        | Particularité      |
|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Trypsine         |                 | Lys et Arg      | Sauf si Pro en N-t |
| Chymotrypsine    |                 | Tyr, Try et Phe |                    |
| Protéase stapylo |                 | Asp et Glu      |                    |
| Pepsine          | Tyr, Try et Phe |                 |                    |
| clostriparine    |                 | Arg             |                    |
| Thermolysine     | Leu, Ile et Val |                 |                    |

## VI. Séquençage des protéines ayant plusieurs chaines polypeptidiques

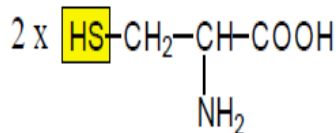
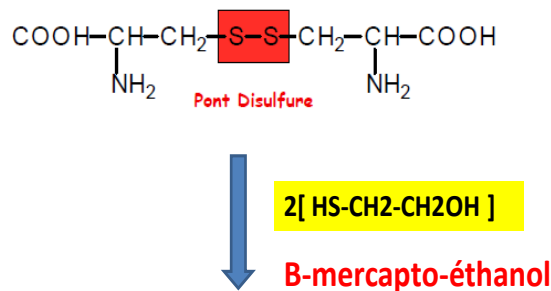
Dans certains cas, on a affaire à une protéine ayant plus d'une seule chaîne polypeptidique. Lorsque c'est le cas, elles sont souvent unies par des liaisons non-covalentes (liaisons H, forces de Van der WAALS, liaisons hydrophobes). On peut donc les séparer en utilisant des solutions

d'urée ou le chlorhydrate de guanidine.

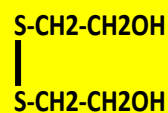
Les chaînes polypeptidiques sont également réunies par des liaisons covalentes, en particulier des ponts disulfure. Il faut soit réduire ces ponts par un agent réducteur comme le 2-mercaptoéthanol ou les oxyder par l'acide performique.

Ensuite, il faut isoler chaque chaîne en utilisant une méthode adéquate. On peut alors déterminer sa séquence en acides aminés .

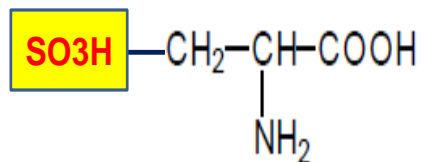
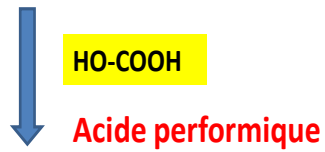
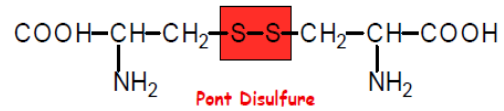
#### Réduction par le B-mercapto-éthanol



**Deux cystéine**



- ✚ **Oxydation par l'acide performique** : transforme la Cystéine et la cystine en acide Cystéique. Peut être Utilisée pour déterminer la position des liaisons disulfures(Technique d'électrophorèse diagonale) .



Deux Acides cystéique