

# Détermination de la structure primaire des protéines

## Introduction :

Une protéine est une chaîne constituée d'une succession d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques.

L'ordre dans lequel les acides aminés sont unis au sein de cette chaîne représente la structure primaire de la protéine. Le type et l'ordre sont dictés par le génome, et il conditionne par la suite les structures supérieures et la fonction ultérieure de la protéine.

La détermination de la constitution et de l'enchaînement des acides aminés constitutifs des chaînes peptidiques est possible par la mise en œuvre de méthodes enzymatiques et chimiques.

## I- La stratégie générale :

La détermination de la séquence complète en AA d'une protéine et l'ordre de ces AA passe par les étapes suivantes:

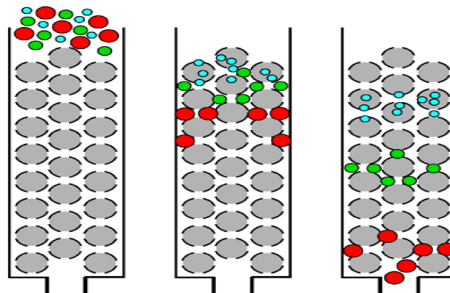
- Extraire, séparer et purifier la protéine.
- Rompre les ponts disulfures, fragmenter la protéine, et hydrolyser la protéine (composition en Aa).
- Séquençage de la protéine et identification des Aa aux extrémités Ct et Nt et établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.

## II- Les méthodes de séparation et de purification des protéines :

Il faut tout d'abord :Extraire, séparer et purifier la protéine.

**1- ultracentrifugation :** Procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge.

**2 -Chromatographie d'exclusion :** Le gel est composé de billes trouées avec des trous de différents diamètres; les petites molécules pénètrent dans les trous et sortent tardivement et les grandes sortent les premières.



## 3- Chromatographie d'affinité :

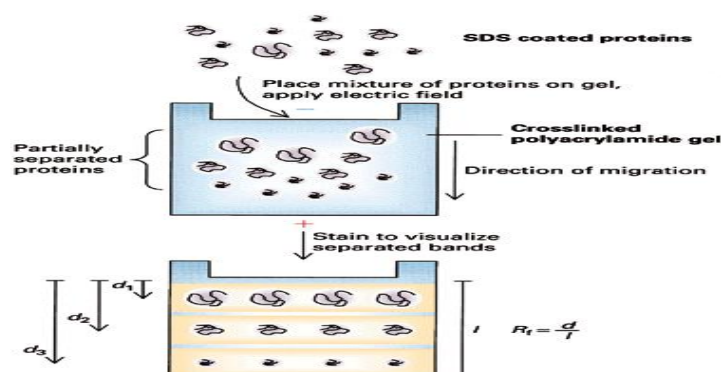
Nécessite la reconnaissance de la protéine par un ligand porté par la phase solide

- Méthode plus efficace que la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par gel filtration.
- Condition: il faut avoir un ligand pour la protéine recherchée.

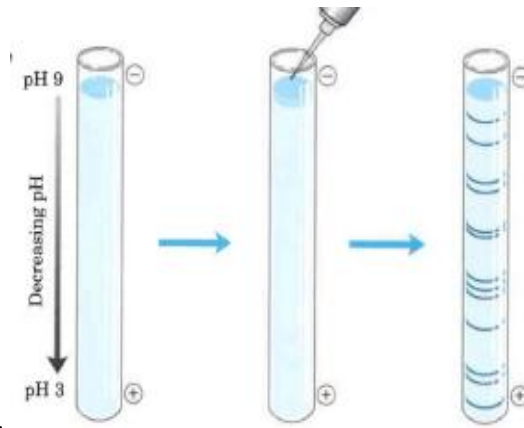
## 4- Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec SDS :

Le Sodium dodécylsulfate(SDS), dénature les protéines.

La séparation dans le PAGE avec SDS est fonction de la masse molaire car toutes les molécules sont chargées de la même façon.



### 5- Focalisation isoélectrique : Séparation basée sur le pHi des protéines



## III-La fragmentation :

### A-La détermination de la composition brute en aa:

#### 1- Hydrolyse chimique :

**a- Hydrolyse totale acide:** A chaud, on réalise une **hydrolyse acide** par l'HCl 6Mol/L pendant 24 heures environs. Les aminoacides sont libérés par rupture des liaisons peptidiques.

Cette méthode **détruit le tryptophane** et **transforme la Glutamine en Glutamate** et **l'Asparagine en Aspartate**.

–Méthode la plus utilisée, mais, nécessite d'autres méthodes pour compléter les résultats de l'analyse.

La solution obtenue est étudiée en chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

Le résultat paraît sous forme de pourcentage d'acides aminés.

#### b- Hydrolyse totale alcaline

- Elle se fait par de la soude (NaOH) à 4 Mol/L à chaud (110°C) pendant 4 à 8 heures environ.
- Inconvénients: détruit la Sérine, l'Arginine, la Thréonine et la Cystéine,
- **Utilisation limité à la détermination de la teneur en Tryptophane**

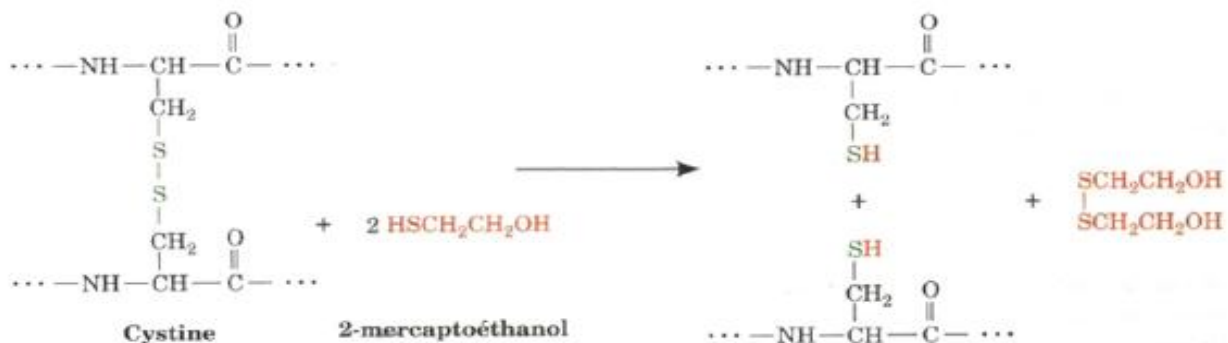
#### 2- Hydrolyse enzymatique : Protéolyse totale.

- Pronase= mélange de protéases extrait de Streptomyces griseus.
- Intérêt: Détermination de la teneur en Asparagine, en Glutamine et en Tryptophane d'un peptide,( acides aminés détruits par les méthodes chimiques plus sévères)

#### Analyse qualitative et quantitative des acides aminés du mélange obtenu après hydrolyse :

- Comporte une séparation des acides aminés par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, suivie du dosage de chaque acide aminé par la réaction colorée à la ninhydrine.
- Ceci donne la composition qualitative et quantitative du peptide (Identification des acides aminés et de leur nombre).

### B- Rupture des ponts disulfures : par le 2-mercaptoéthanol



Permet la séparation des chaînes polypeptidiques si elles sont liées par des ponts disulfure par le mercapto-éthanol

•Empêche la conformation native qui pourrait résister à l'action des agents protéolytiques

## C- Coupures intra-chainées peptidiques : Clivage en peptides plus petits :

### 1- Coupure chimique:

Solution	Lieu de coupure
Bromure de cyanogène (BrCN)	C-terminal des méthionines
N-bromosuccinimide (NBS)	Après Tyr et Trp
Hydroxylamine (NH <sub>2</sub> OH)	Liaisons Asparagine-Glycine

### 2- Coupure enzymatique : utilisation d'endopeptidases

Divers enzymes protéolytiques ont une spécificité d'action étroite qui permet des coupures très localisées dans les séquences peptidiques. Ce sont des endopeptidases.

Nom d'enzyme	Origine	Lieu de coupures	coupure
<b>Pepsine</b>	Suc gastrique	Avant NH <sub>2</sub> des AA aromatique : (Phe, Trp, Tyr) sauf si Pro à gauche	$\text{NH}_2\text{-CH(R}_1\text{)-CO-NH-CH(R}_2\text{)-CO-NH-CH(R}_3\text{)-CO-}$
<b>Chymotrypsine</b>	Suc pancréatique	Après COOH des AA aromatiques : (Phe, Trp, Tyr) sauf si Pro à droite	$\text{NH}_2\text{-CH(R}_1\text{)-CO-NH-CH(R}_2\text{)-CO-NH-CH(R}_3\text{)-CO-}$
<b>Trypsine</b>	Suc pancréatique	Après COOH des AA basiques (Lys, Arg) sauf si Pro à droite	$\text{NH}_2\text{-CH(R}_1\text{)-CO-NH-CH(R}_2\text{)-CO-NH-CH(R}_3\text{)-CO-}$

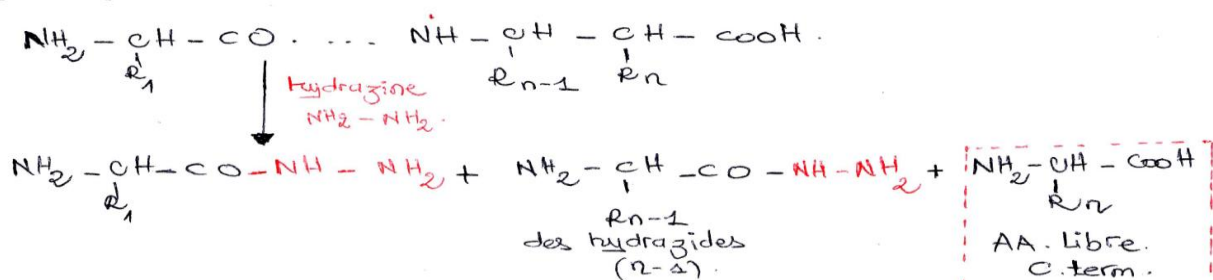
## IV-Le séquençage :

### A- La détermination des acides aminés terminaux : par méthode enzymatique : (exo-peptidases) :

L'aminopeptidase et la carboxypeptidase rompent respectivement les liaisons voisines des acides aminés N-terminal (le seul NH<sub>2</sub> libre de la chaîne) et C-terminal (dernier acide aminé de la chaîne).

Les deux acides aminés sont identifiés en chromatographie d'échanges d'ions.

Enzyme	Coupure	Réaction
<b>Carboxypeptidase B</b>	aa en C terminal basiques	$\text{H}_2\text{N-CH(R}_1\text{)-CO-NH-CH(R}_2\text{)-CO-NH-CH(R}_3\text{)-COOH}$
<b>Carboxypeptidase C</b>	tous les aa	$\text{H}_2\text{N-CH(R}_1\text{)-CO-NH-CH(R}_2\text{)-COOH} + \text{H}_2\text{N-CH(R}_3\text{)-COOH}$



## V- Détermination de la séquence protéique en aa:

- On connaît donc les 2 acides aminés terminaux et des analyses des recouvrements de séquence des familles de peptides étudiés par la méthode récurrente d'Edman.
- *La séquence est déterminée en étudiant les chevauchements des séquences partielles obtenues.*

### NB :

Les méthodes les plus importantes pour la détermination des 4 types de structures des protéines sont :

- **Structure *primaire* :** le *Séquençage*
- **Structure *secondaire* :** *Dichroïsme circulaire, RMN, Diffraction*
- **Structure *tertiaire* :** *RMN, Diffraction des Rayons X*
- **Structure *quaternaire* :** *Résonnance Magnétique Nucléaire, Diffraction*