Détermination de la structure primaire des protéines

Introduction:

Une protéine est une chaine 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 chaine 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'enchainement des acides aminés constitutifs des chaines 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:

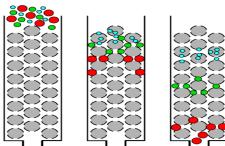
- •Extraire, séparer et purifier la protéine.
- •Rompre les ponts disulfures, fragmenter la protéine, et hydrolyser la protéine (composition en Aa).
- •Séquençage de la protéine et identification des Aa aux extrémités Ct et Nt et établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.

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 premiéres.



3- Chromatographie d'affinité:

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

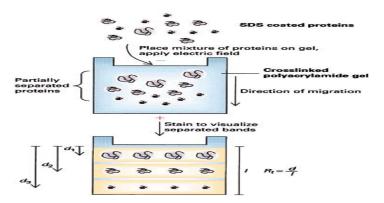
- •Méthode plus efficace que la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par gel filtration.
- •Condition: il faut avoir un ligand pour la protéine recherchée.

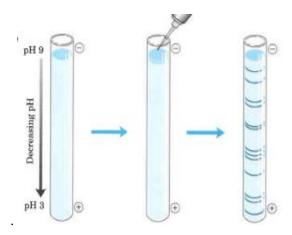
4- Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec

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

$$\begin{array}{c} O \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \mathrm{SH} \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ \downarrow \\ \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{NH} - \mathrm{CH} - \mathrm{C} - \cdots \\ - \mathrm{CH}_2 \\ \parallel \\ \cdots - \mathrm{CH}_2 \\ \cdots$$

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-chaines 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 (NH2OH)	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
Pepsine	Suc gastrique	Avant NH2 des AA aromatique : (Phe,Trp,Tyr) sauf si Pro à gauche	NH2-CH-CO-NH-CH-CO- R1 Phe R3 Trp
Chymotrypsine	Suc pancréatique	Après COOH des AA aromatiques : (Phe,Trp,Tyr) sauf si Pro à droite	NH2-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-R1 Phe R3 Trp Tyr R2
Trypsine	Suc pancréatique	Après COOH des AA basiques (Lys,Arg) sauf si Pro à droite	NH2-CH-CO-NH-CH-CO R1 Lys R3

IV-Le séquençage :

A- La détermination des acides aminés terminaux : par méthode enzymatique : (exopeptidases) :

L'aminopeptidase et la carboxypeptidase rompent respectivement les liaisons voisines des acides aminés N-terminal (le seul NH₂ 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
Caboxypeptidase B	aa en C teminal basiques	HN-OH-CO-NH-CH-COFNH-CH-COO
Carboxypeptidase C	tous les aa	HN-CH-CO-NH-CH-COOH + HN-CH-COO R3 R2 R3 AA C-Term

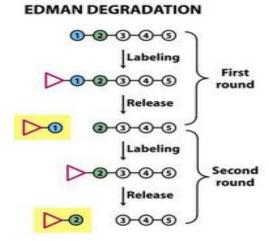
B- La détermination des acides aminés terminaux : par méthode chimique :

1-de l'acide aminé N-terminal :

a-l'analyse de la séquence - analyse récurrente d'Edman :

elle nécessite l'isothiocyanate de phényl (ITCP). Ce composé va s'associer à la fonction aminée d'un résidu amino-terminal. Un dérivé cyclique est alors formé et va se détacher du peptide. C'est ce dérivé qui va être identifié. On est donc à peptide n-1. Il est apparu un nouvel aminoacide terminal qui va à son tour être associé à un ITCP...

Est une méthode qui permet à elle seule le séquençage de peptides constitués de 40 à 60 résidus d'AA.



b-la méthode de Sanger : (DNFB) :le peptide est traité par le 1-fluoro 2,4-dinitrobenzène

le groupement amine –NH2 de l'acide aminé N-terminal se substitue à l'atome de fluor sur le noyau aromatique du DNFB formant un peptide dinitrophénylé.

Puis une hydrolyse acide totale est réalisée :rupture de toutes les liaisons peptidiques, sauf la liaison entre la fonction 2,4 dinitrophényl et la fonction amine de l'acide aminé N-terminal qui reste stable(DNP-aa) d'où son identification par chromatographie.

- **c -Méthode de dansylation :** utilisant le chlorure de l'acide 1-diméthylamino-naphtalène-5-sulfonique(chlorure de dansyle)
 - Réaction entre la fonction α-aminé et le chlorure de dansyle => dansyle peptide (dérivé sulfonamide **fluorescent**).
 - Après hydrolyse acide de ce dernier, on identifie par chromatographie le dansyl-aa (fluorescent en UV) et un hydrolysat (aa libres).

2-la détermination du résidu C-terminal :

- Méthode chimique : Hydrazinolyse
- -Traitement du peptide par l'hydrazine à 100°C.
- -Toutes les liaisons peptidiques sont rompues, et tous les résidus sont transformés en hydrazides.
- -Seul le résidu C-terminal dont le groupement COOH libre :

n'est pas attaqué et se retrouve sous forme d'acide aminé libre, facile à isoler et à identifier.

V- Détermination de la séquence protéique en aa:

- On connait 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.

<u>NB:</u>

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

• Structure primaire : le Séquençage

• Structure secondaire: Dichroisme circulaire, RMN, Diffraction

• Structure tertiaire: RMN, Diffraction des Rayons X

• Structure quaternaire: Résonnance Magnétique Nucléaire, Diffraction