



Faculté de médecine d'Alger
Département de médecine dentaire
Année universitaire 2022/2023



Les peptides et protéines

partie 3

Dr Kemache.A
Cours de 1 ère année médecine dentaire

7. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES STRUCTURES DES PROTÉINES

TECHNIQUES D'ÉTUDE DES STRUCTURES DES PROTÉINES

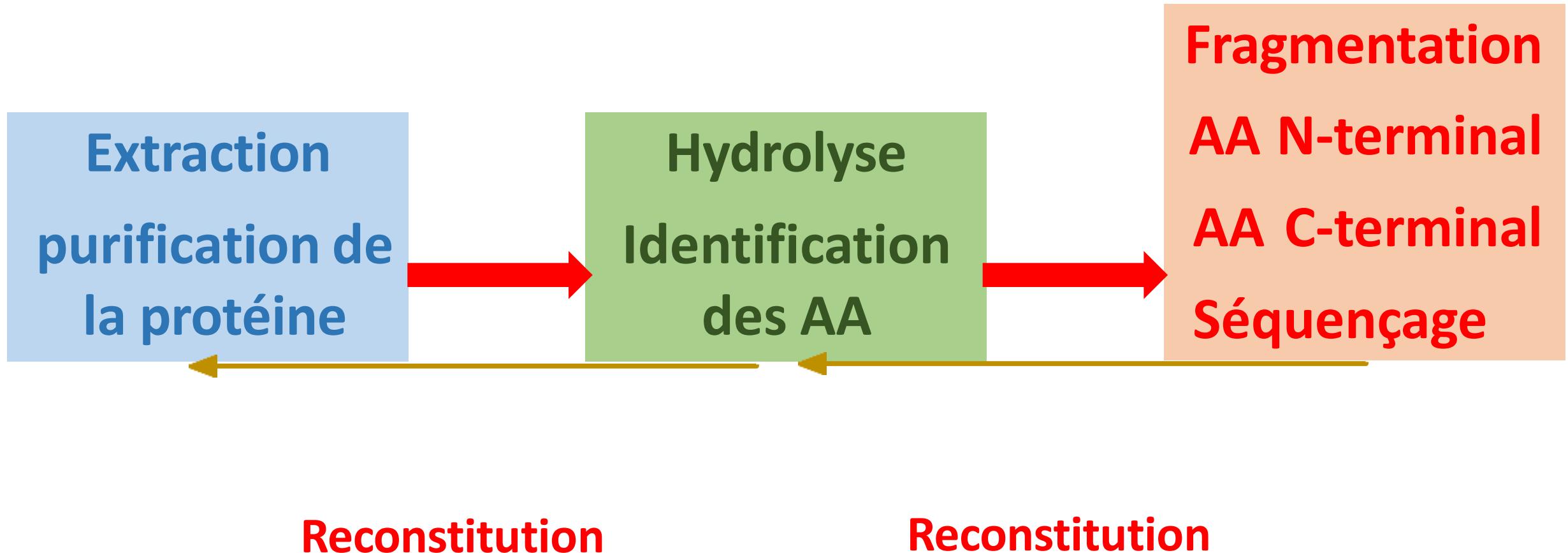
Les méthodes les plus importantes pour la détermination des 4 types de structures des protéines sont:

Structure	Méthode
<i>Primaire</i>	<i>Séquençage</i>
<i>Secondaire</i>	<i>Dichroïsme circulaire, RMN, Diffraction</i>
<i>Tertiaire</i>	<i>RMN, Diffraction des Rayons X</i>
<i>Quaternaire</i>	<i>Résonnance Magnétique Nucléaire, Diffraction</i>

8. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES (SÉQUENÇAGE DES PROTÉINES)

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

I- Stratégie générale



I- Stratégie générale

La détermination de la séquence complète en AA et l'ordre dans lequel sont liés ses AA passe par plusieurs étapes :

- 1. Extraire, séparer et purifier la protéine.**
- 2. Rompre les ponts disulfures (sous unités), hydrolyser la protéine, puis analyse des AA libérés = composition en Aa).**
- 3. Fragmentation de la protéine, identification des Aa aux extrémités Ct et Nt et séquençage des fragments.**
- 4. Reconstitution de la structure primaire de la protéine à partir des fragments séquencés.**

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

II- Techniques de séparation et de purification des protéines

Les diverses techniques pour séparer les protéines se basent sur sa **taille (poids moléculaire)**, **sa densité**, **sa solubilité** dans un solvant particulier, sa **charge** ou son **aptitude à se lier à un support** (son affinité pour un support donné).

Paramètre	Technique
Densité	Ultracentrifugation
Solubilité	Précipitation au sulfate d'ammonium
Taille	Filtration sur gel , SDS- PAGE
Charge	Chromatographie d'échange d'ions, électrophorèse, isofocalisation.
Affinité	Chromatographie d'affinité

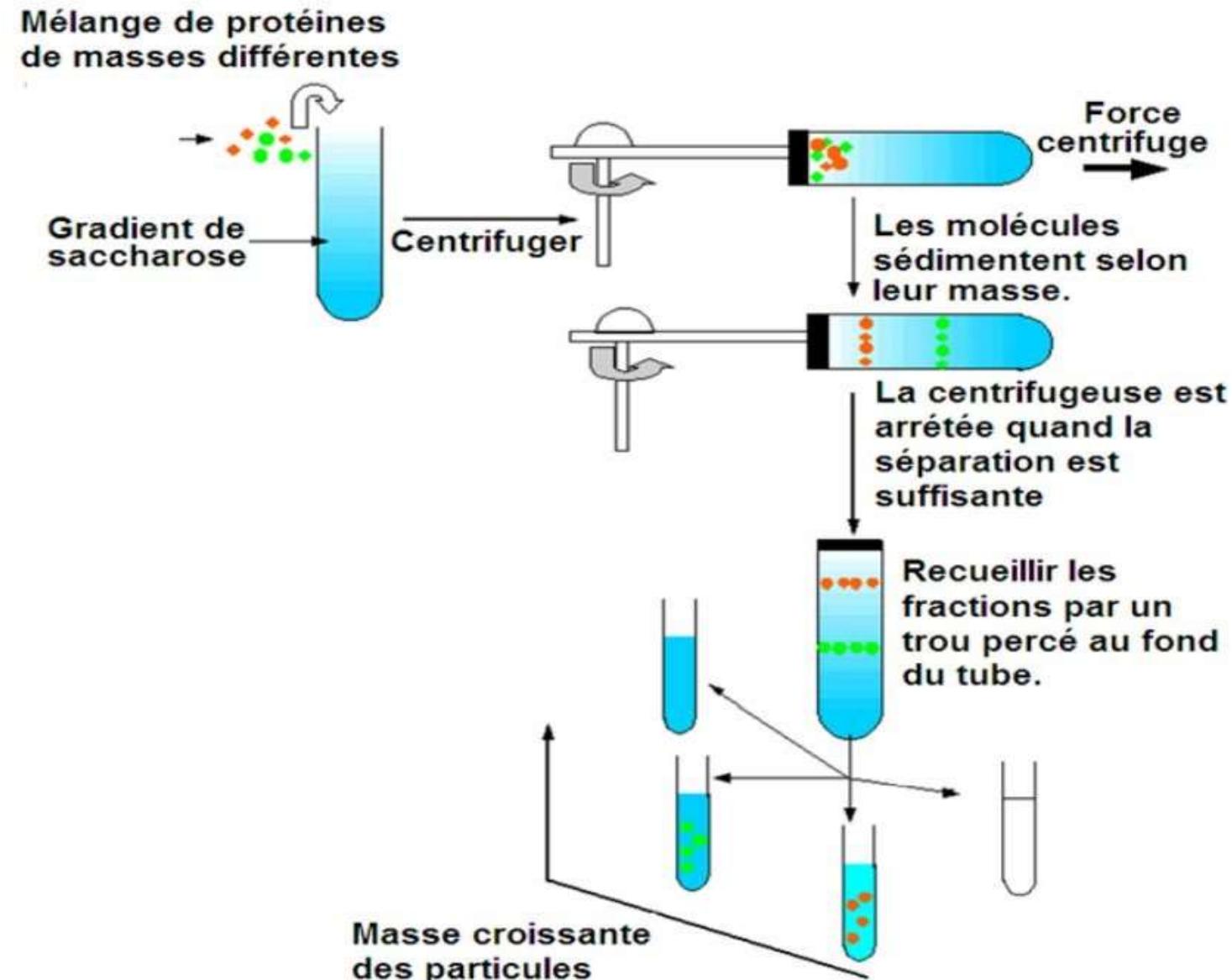
DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

II- Techniques de séparation et de purification des protéines

Ultracentrifugation

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

L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée **centrifugeuse**



DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

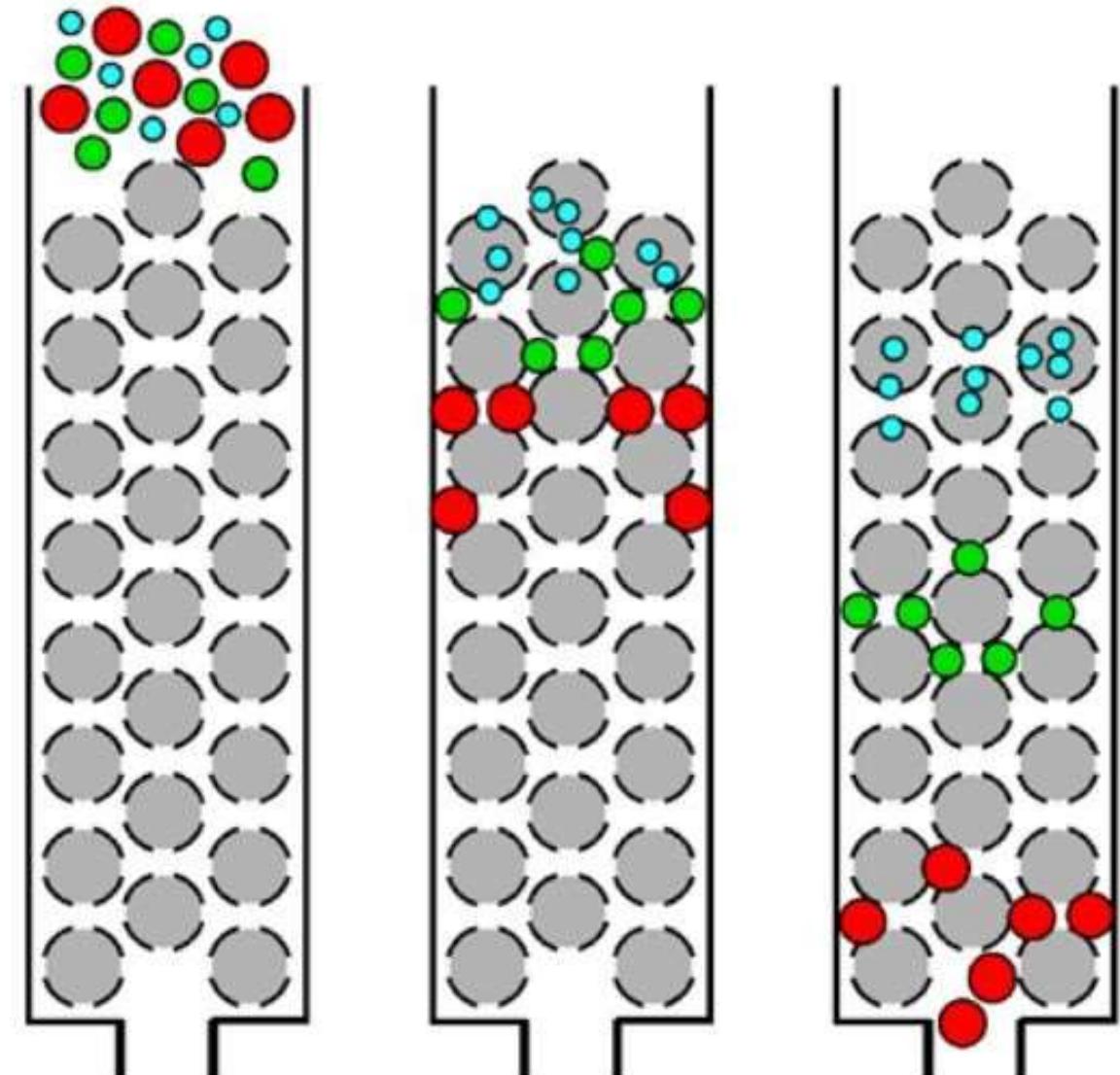
II- Techniques de séparation et de purification des protéines

Chromatographie d'exclusion :

Ou chromatographie **gel**

filtration: la séparation est basée sur **la taille des protéines**.

Le gel est composé de billes avec des **orifices de différents diamètres**; les petites molécules **pénètrent** dans les trous et sortent **tardivement** et les grandes sont **exclus** et **sortent (éluées) les premières**.



DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

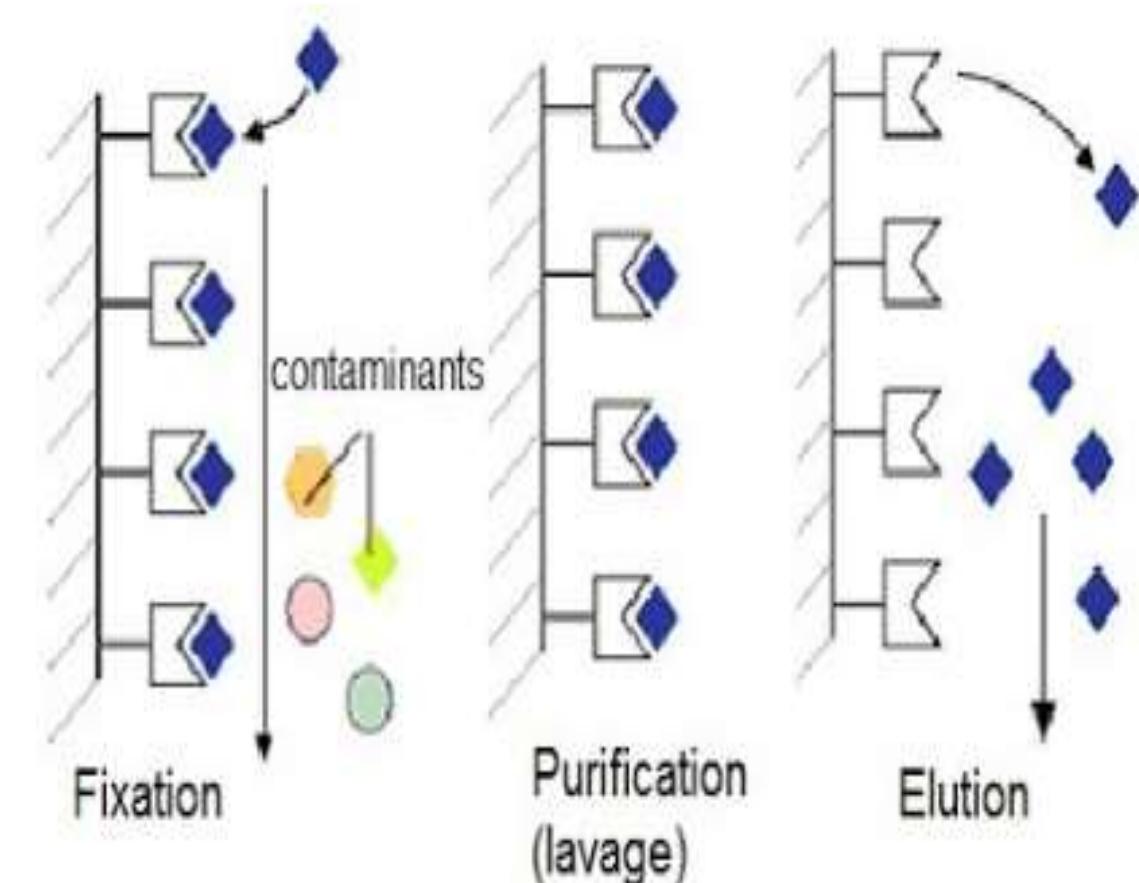
II- Techniques de séparation et de purification des protéines

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 spécifique pour la protéine recherchée**.



Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

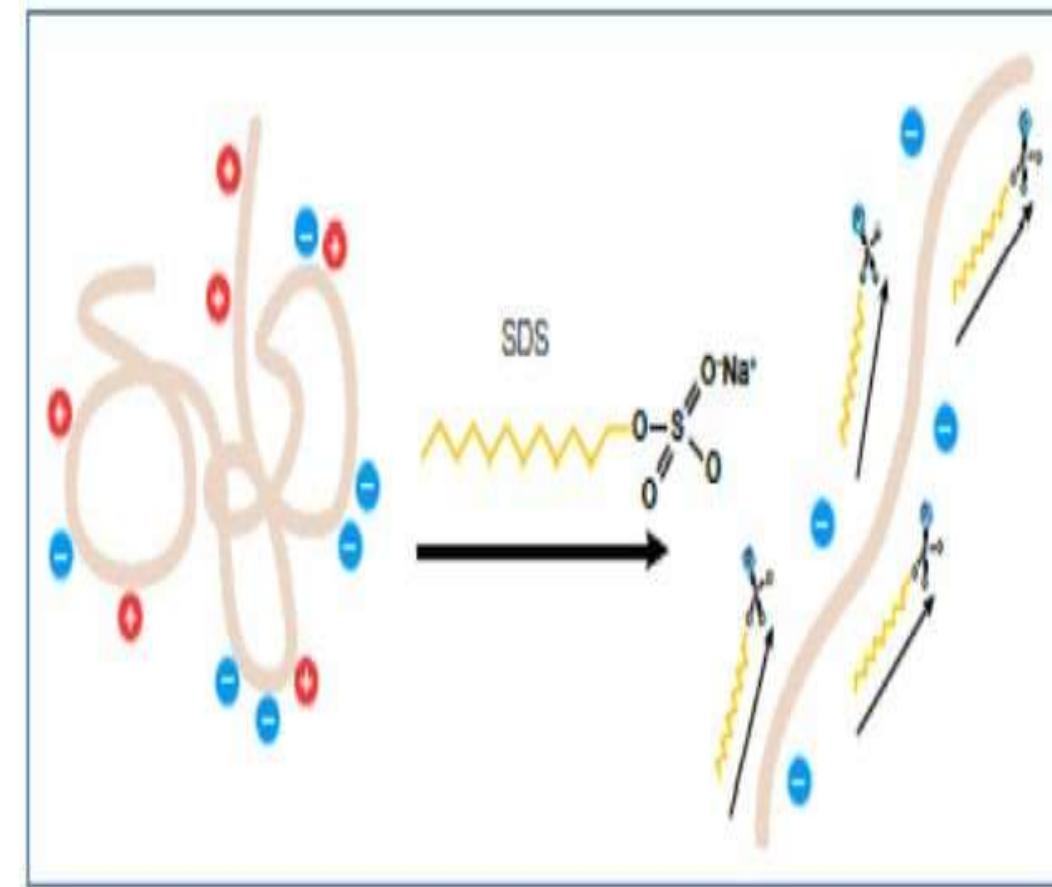
II- Techniques de séparation et de purification des protéines

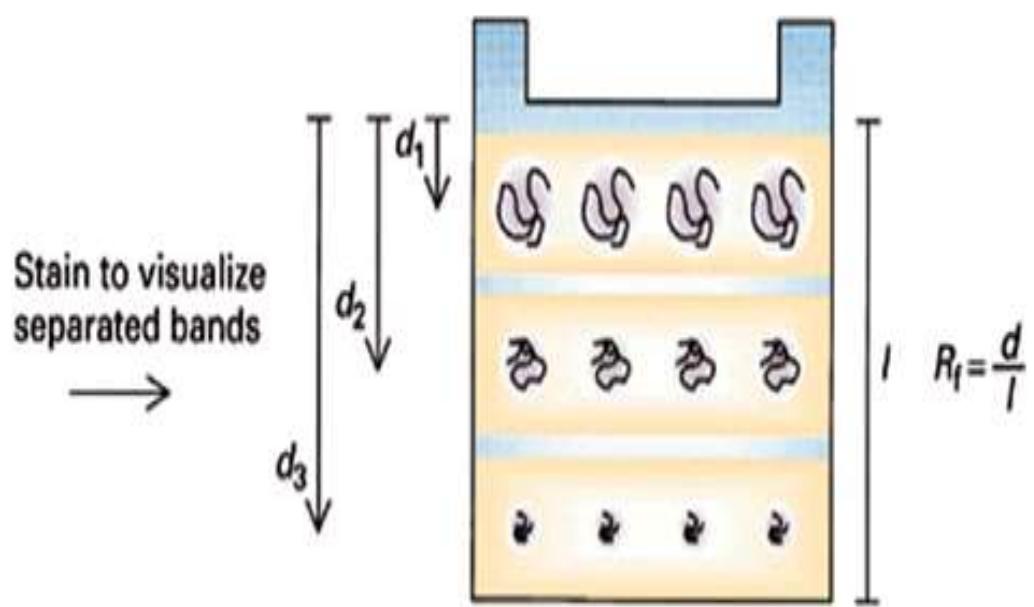
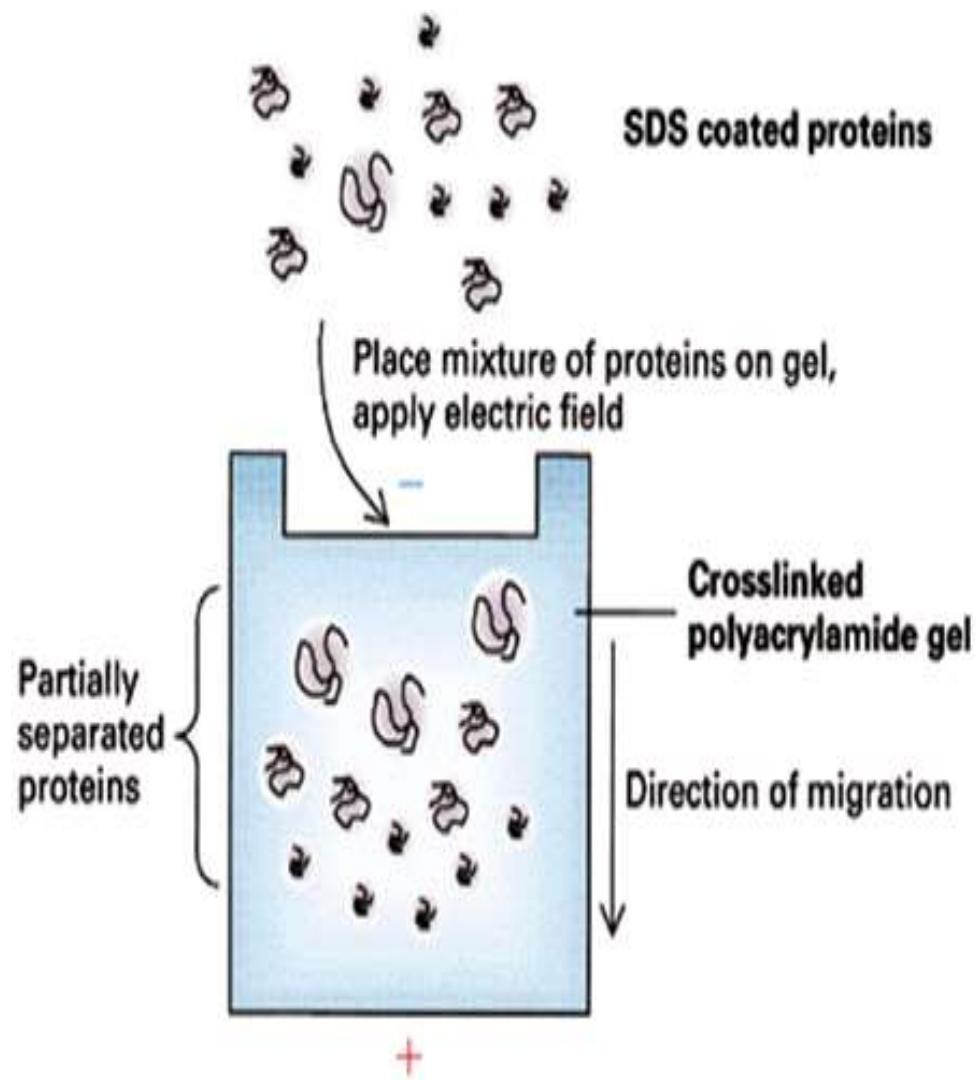
Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec SDS (Sodium dodécylsulfate)

Le polyacrylamide est **tamis moléculaire** permettant la séparation des protéines en fonction de **leur masse moléculaire** (taille).

Le Sodium dodécylsulfate (SDS), dénature les protéines et leur **procure toutes la même charge négative**.

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



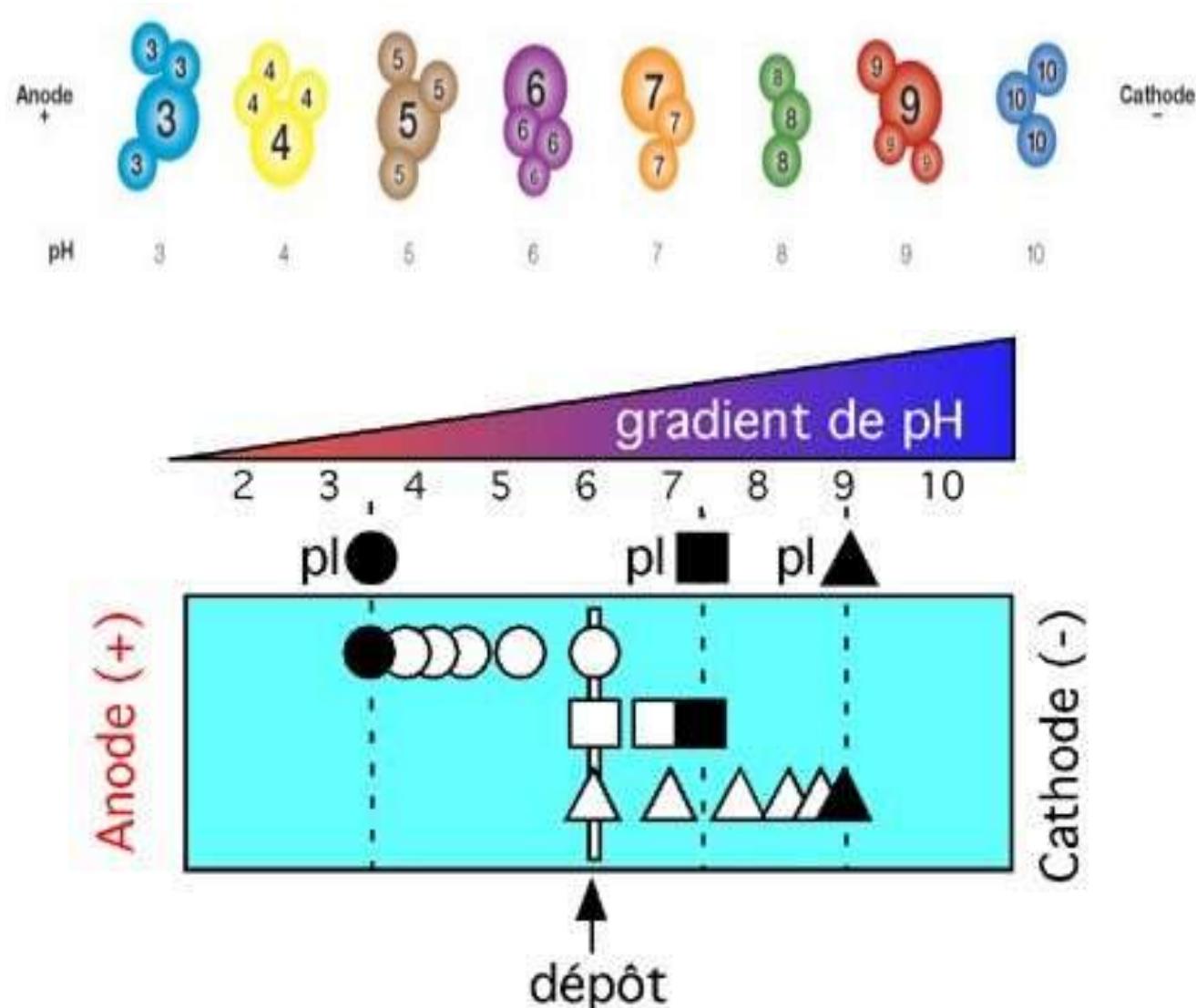


DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

II. Techniques de séparation et de purification des protéines

Isoélectrofocalisation

- La migration est effectuée dans un **gradient de pH**; chaque protéine migre jusqu'à l'endroit où **le pH est égal à son pHi**.
- Le gradient de pH est généré par des **ampholytes**, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication.



DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

III- Détermination de la composition en acides aminés

Définition: c'est l'identification des acides aminés constitutifs d'une protéine ou d'un peptide.

Cette étape comporte :

La rupture de la séquence peptidique par hydrolyse des liaisons peptidiques.

- **Hydrolyse chimique**
- **Hydrolyse enzymatique**

L'analyse qualitative et quantitative des acides aminés du mélange obtenu après hydrolyse.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

III- Détermination de la composition en acides aminés

A- Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

▪ Hydrolyse totale acide

- Par **HCl à 6 Mol/L**, à chaud (110°C), pendant 24 h environ.
- Inconvénients : 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.

▪ Hydrolyse totale alcaline

- Par **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 limitée à la détermination de la teneur en Tryptophane.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

III- Détermination de la composition en acides aminés

B- Hydrolyse enzymatique des liaisons peptidiques

Protéolyse **totale** en utilisant des enzymes particulières

Pronase : mélange de protéases extraits 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.**

Inconvénient : risque de contamination par l'auto-dégradation des enzymes protéolytiques.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

III- Détermination de la composition en acides aminés

C- 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**).

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV- Fragmentation et séquençage des fragments de la protéine

A- Fragmentation

Consiste à séparer les sous unités de la protéine en **rompant les ponts disulfures** puis à **couper** la structure primaire de la protéine en de petits fragments **au niveau d'AA connus.**

Intérêt : faciliter le séquençage complet de la protéine

le séquençage d'Edman ne peut être utilisé que sur des petits fragments de 40 à 60 AA.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV. Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

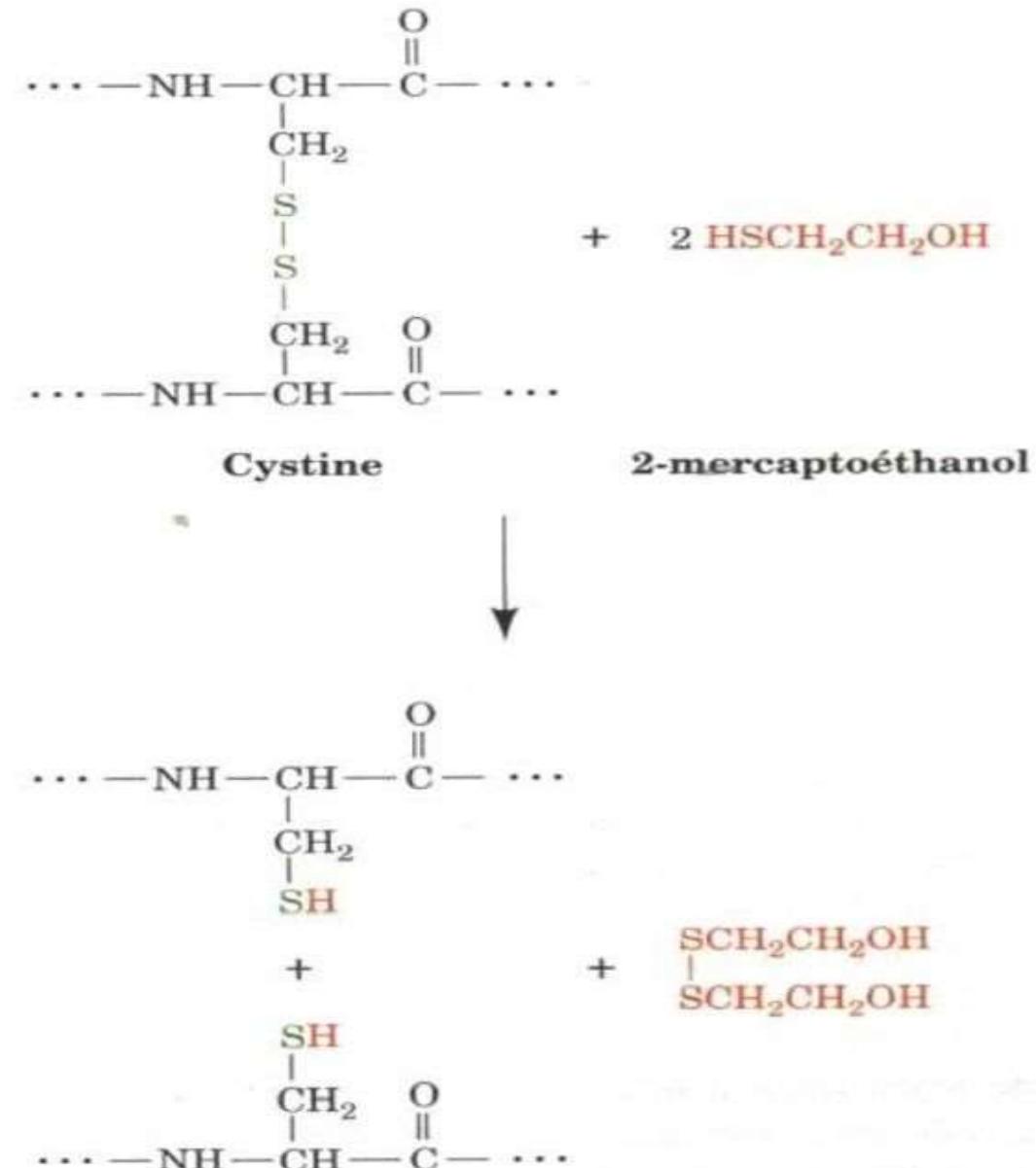
A- Fragmentation

- Rupture des ponts disulfures

En utilisant le : **2-mercaptopropanol**

Permet la séparation des chaînes polypeptidiques si elles sont liées par des ponts disulfures.

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



DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV. Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

A- Fragmentation

- Coupure intra chaîne chimique

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

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV. Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

A- Fragmentation

- Coupure intra chaîne enzymatique (endopeptidases)

Nom d'enzyme	Origine	Lieu de coupures	coupure
Pepsine	Suc gastrique	Avant NH ₂ des AA aromatique : (Phe,Trp,Tyr) sauf si Pro à gauche	$\text{NH}_2\text{-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-}$ R1 R2 Phe Trp Tyr R3
Chymotrypsine	Suc pancréatique	Après COOH des AA aromatiques : (Phe,Trp,Tyr) sauf si Pro à droite	$\text{NH}_2\text{-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-}$ R1 R2 Phe Trp Tyr R3
Trypsine	Suc pancréatique	Après COOH des AA basiques (Lys,Arg) sauf si Pro à droite	$\text{NH}_2\text{-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-}$ R1 R2 Lys Arg R3

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV- Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

A- Fragmentation

Après différentes coupures chimiques ou enzymatiques :

Les fragments protéolytiques sont **séparés**.

Leurs extrémités **C-terminales et N-terminales sont ensuite identifiées**.

Enfin leur séquence établie **par la méthode d'Edman**.

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV. Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

A. Identification des extrémités C-terminale et N-terminale par méthode enzymatique (exopeptidase)

	Extrémité attaquée	spécificité
Carboxypeptidase A	C-ter	Arg, Lys, Pro
Carboxypeptidase B	C-ter	Arg, Lys
Carboxypeptidase C	C-ter	Tous
Carboxypeptidase Y	C-ter	Tous sauf la gly
Leucine amino peptidase	N-ter	Pro
Aminopeptidase	N-ter	Tous

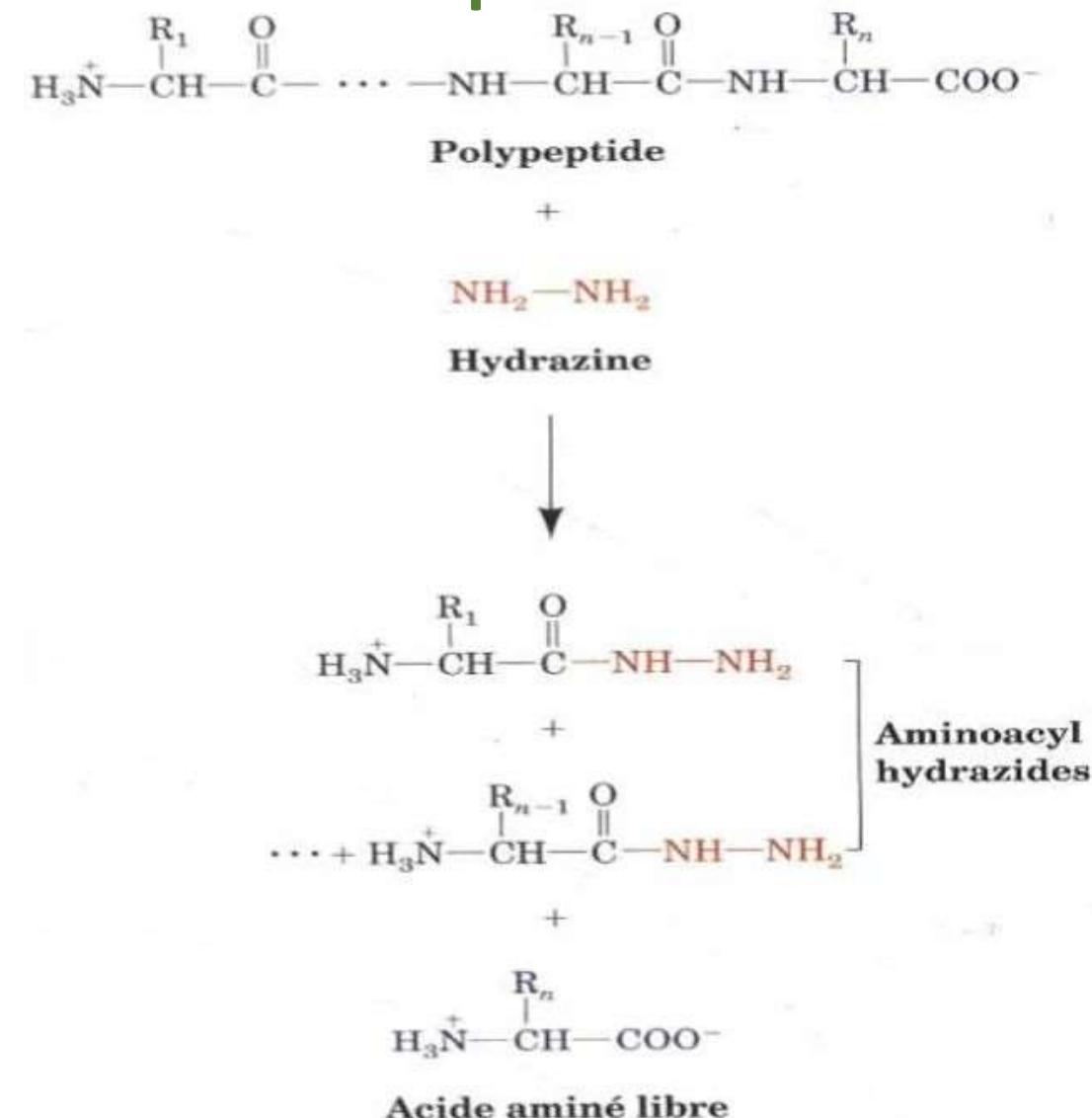
DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV- Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

B- Détermination de l'AA C-terminal par méthode chimique

Par Hydrazinolyse : en utilisant l'hydrazine H₂N-NH₂

L'hydrazine à 100°C attaque toutes les liaisons peptidiques et donne des **dérivés hydrazide** d'acide sauf pour l'acide aminé C-terminal qui reste normal.



DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

IV- Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

B- Détermination de l'AA N-terminal par méthode chimique

Par :

1. Méthode de Sanger (FDNB).
2. Méthode de dansylation.
3. Méthode récurrente d'Edman.

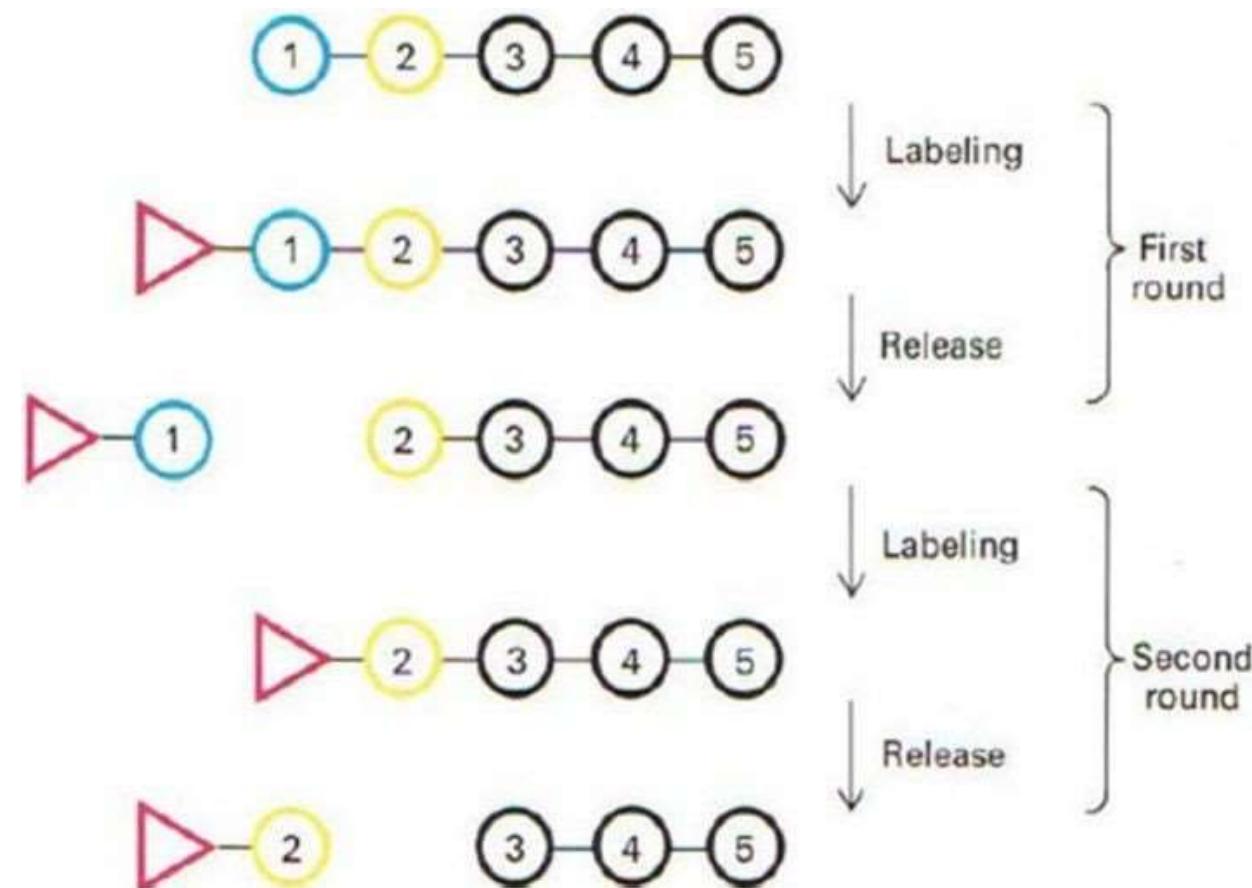
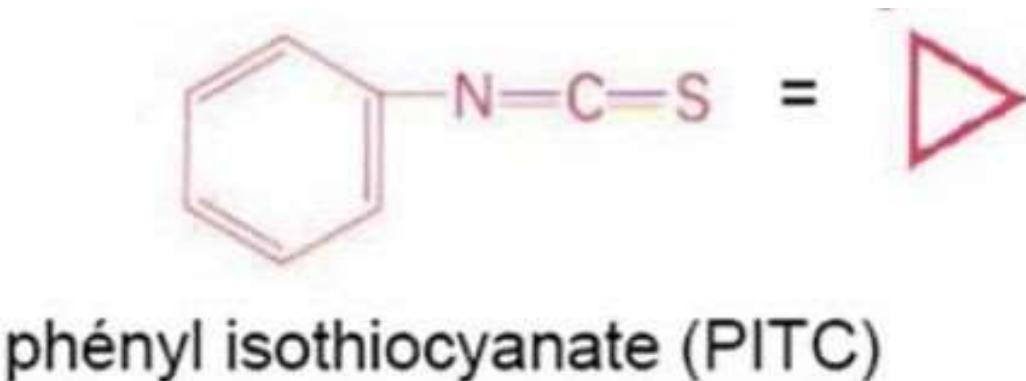
DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

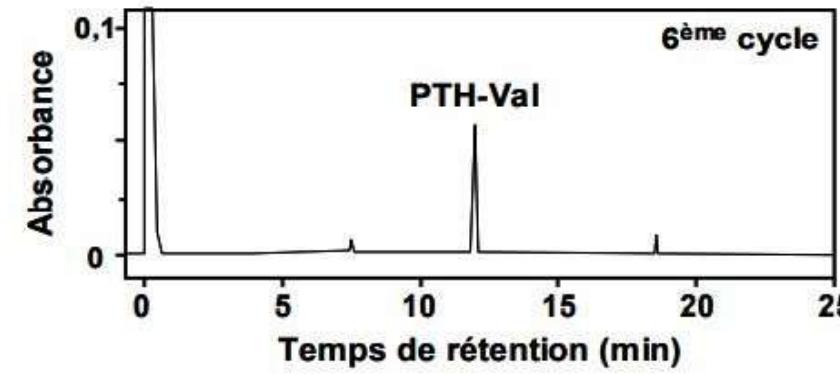
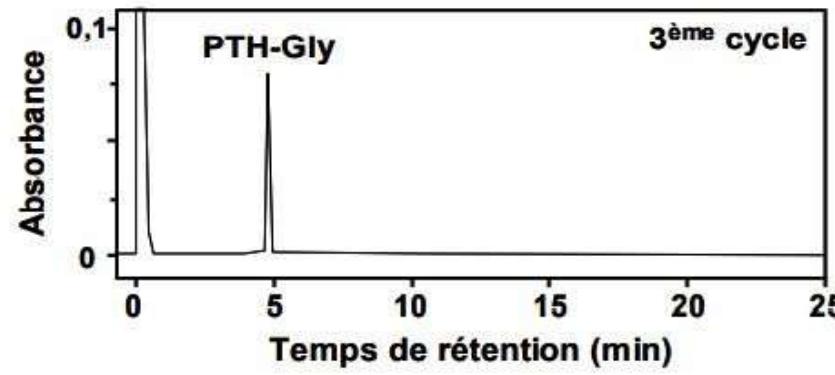
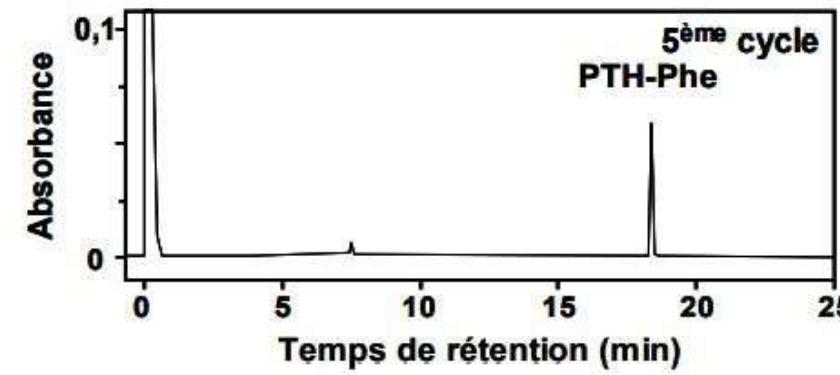
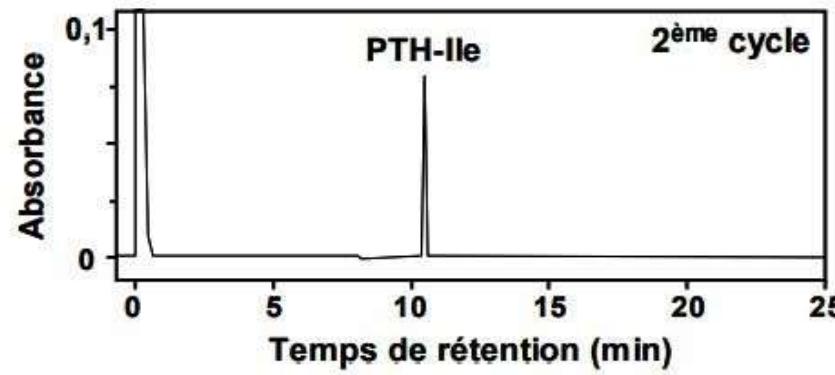
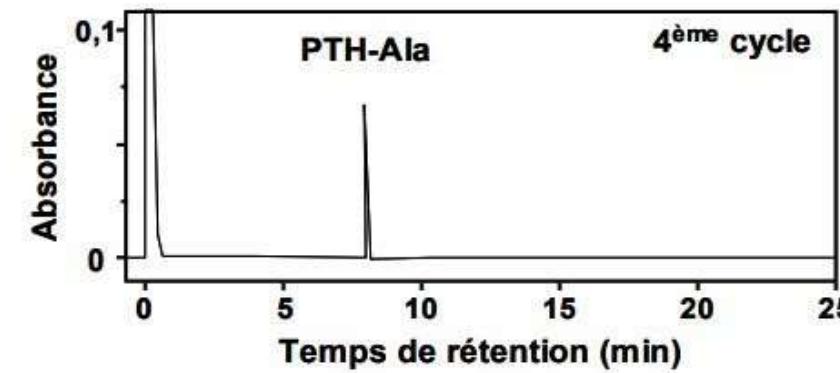
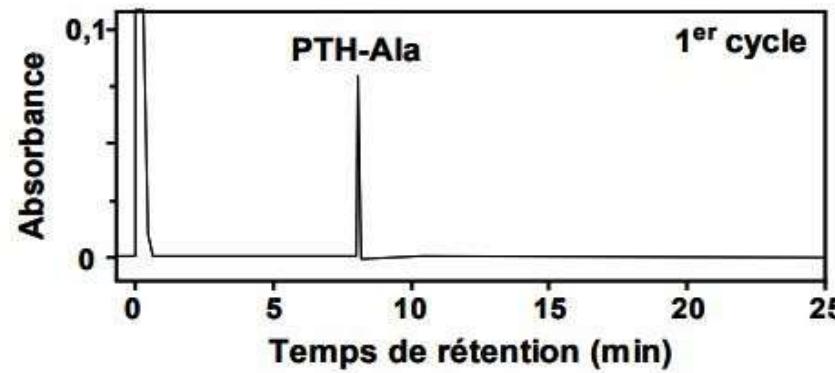
IV- Fragmentation et séquençage des fragments de la protéines

B- Détermination de la séquence des fragments par la dégradation récurrente d'Edman = analyse séquentielle

Cela permet le séquençage de peptides constitués de 40 à 60 résidus d'AA.

La détection des **PTH-AA** se fait par **HPLC**





N-term A-I-G-A-F-V...

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTÉINES

V. Reconstitution et détermination de la séquence globale de la protéine

Détermination complète de la structure primaire (types d'acides aminés et leurs ordre) de la protéine

Obtenue en :

- **Intégrant** l'ensemble des informations obtenues lors des traitements précédents.
- Comparant les séquences en AA d'une série de fragments peptidiques avec celles **d'une deuxième** série dont les sites d'hydrolyse recouvrent ceux de la première série.

