

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE D'ALGER 1
FACULTE DE MEDECINE D'ALGER

LES ACIDES AMINES – PEPTIDES – PROTINES

STRUCTURE – PROPRIÉTÉS -METABOLISME

1^{ère} année médecine /2022-2023

Dr .Z. OUABBOU

Maitre assistante en biochimie

CHU .Beni Messous

ou-Zakia @hotmail.fr

CHAPITRE3 : Détermination de la structure primaire des protéines

I-Stratégie générale

II-Techniques de séparation et de purification

III-Fragmentation

1-Détermination de la composition en AA (analyse)

2-Coupures chimiques : CNBr, NBS

3-Coupures enzymatiques

IV-Séquençage

1-Détermination du C-terminal

2-Détermination du N-terminal

3-Dégradation d'Edman

V-Établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.

1- 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 (sous unités)**
- Fragmenter la protéine**
- Hydrolyser la protéine (analyse = composition en Aa).**
- Séquençage de la protéine et identification des Aa aux extrémités Ct et Nt.**
- Réarrangement de la séquence de la protéine.**

2- Les techniques de séparation et de purification

Les diverses techniques pour séparer les polypeptides se base sur sa taille, sa solubilité dans un solvant particulier, sa charge ou son aptitude à se lier à un support.

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

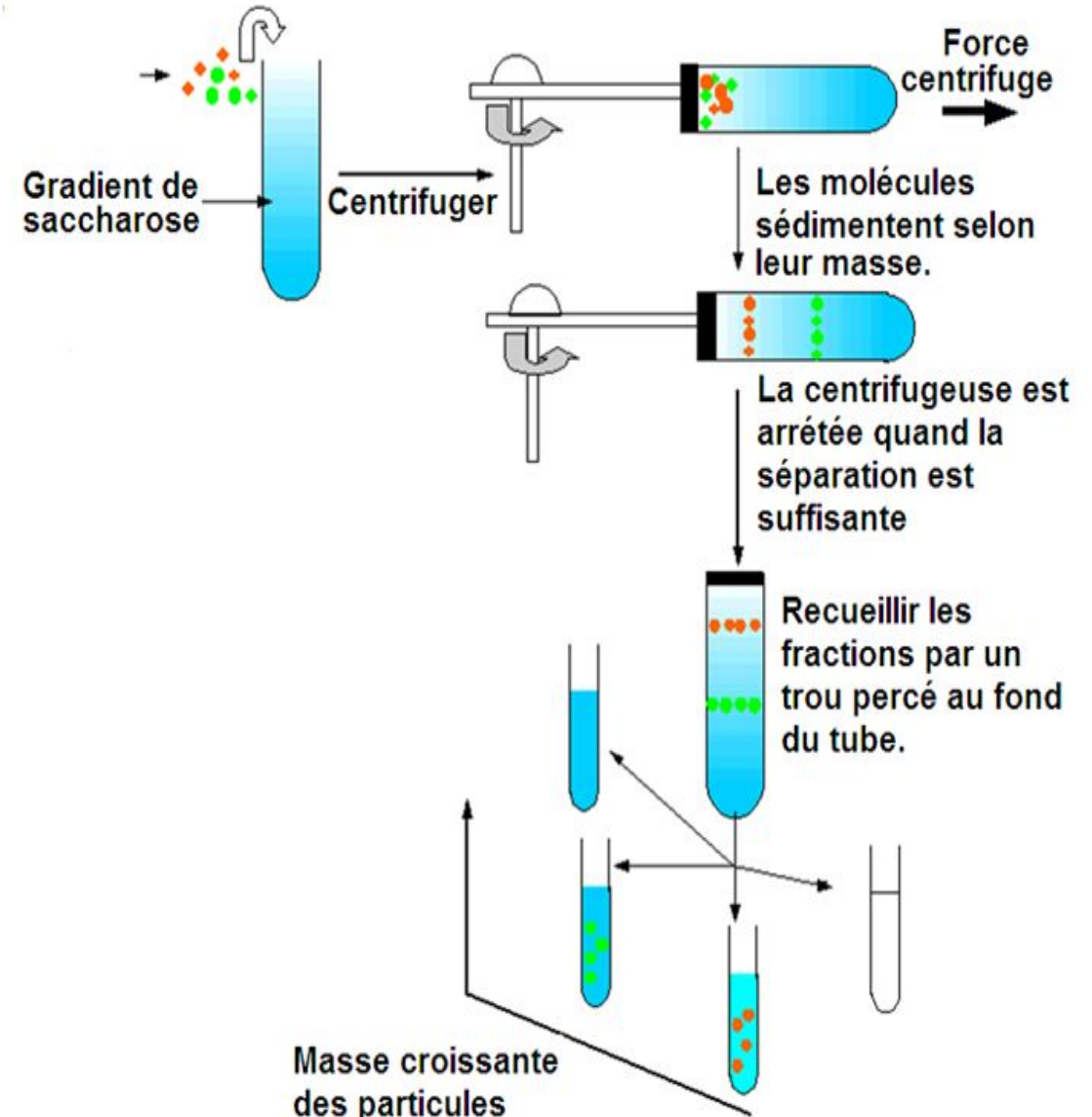
2-1-

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

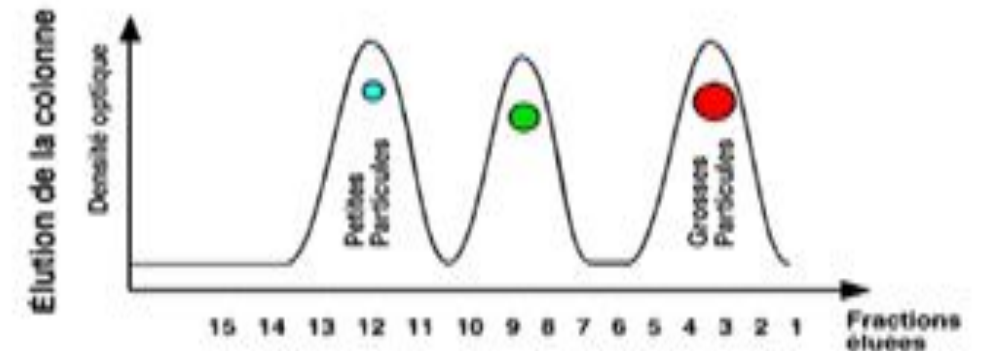
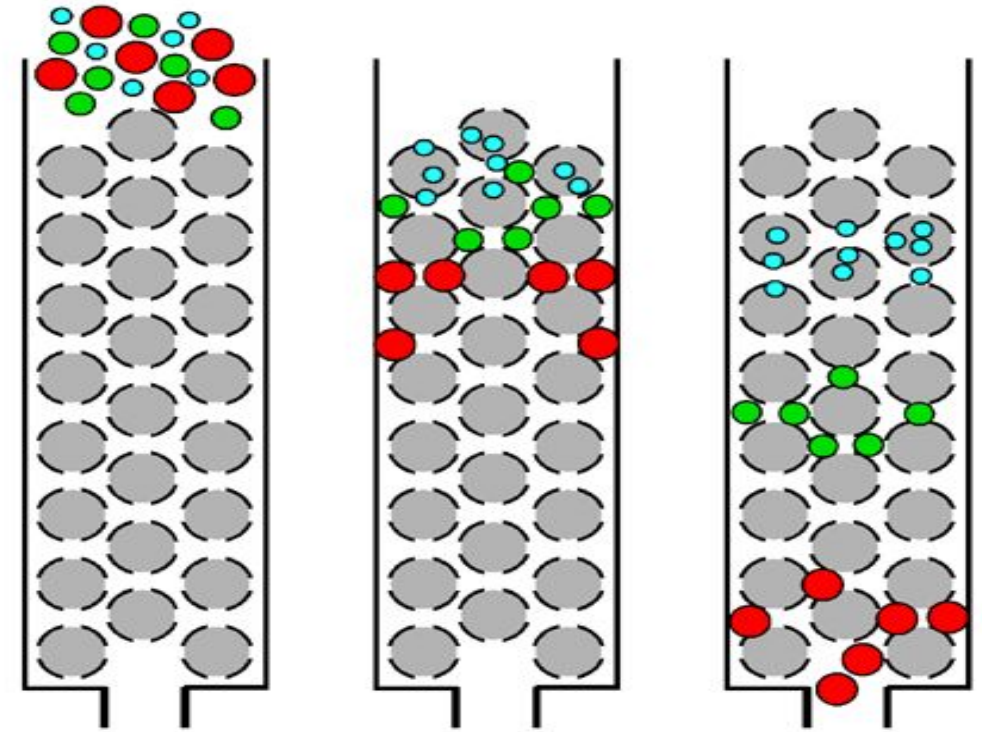
Mélange de protéines de masses différentes



2-2- Chromatographie d'exclusion

Ou chromatographie gel filtration:

- ❑ La séparation est basée sur la taille des protéines
- ❑ 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

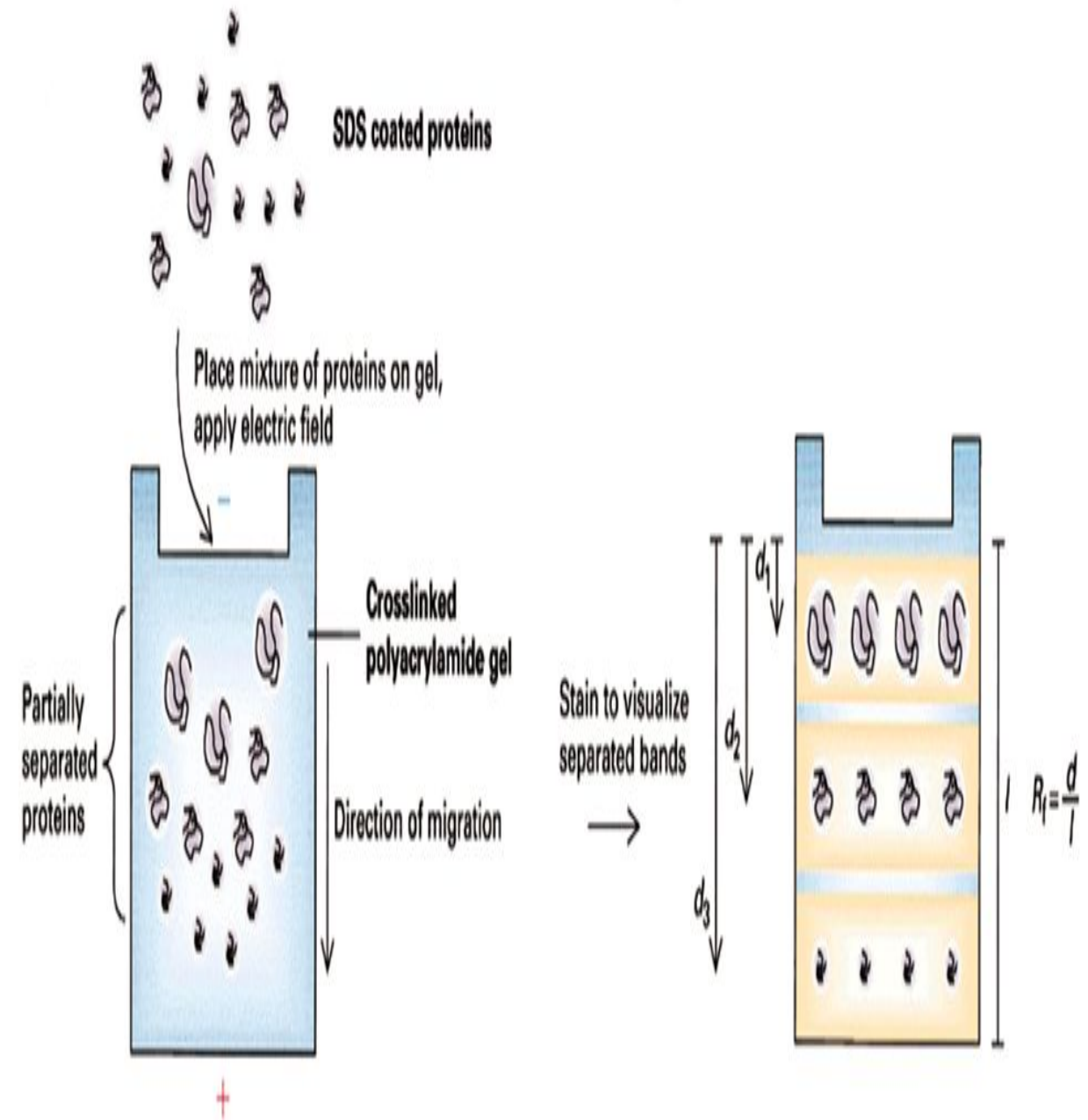


2-3- Chromatographie d'affinité

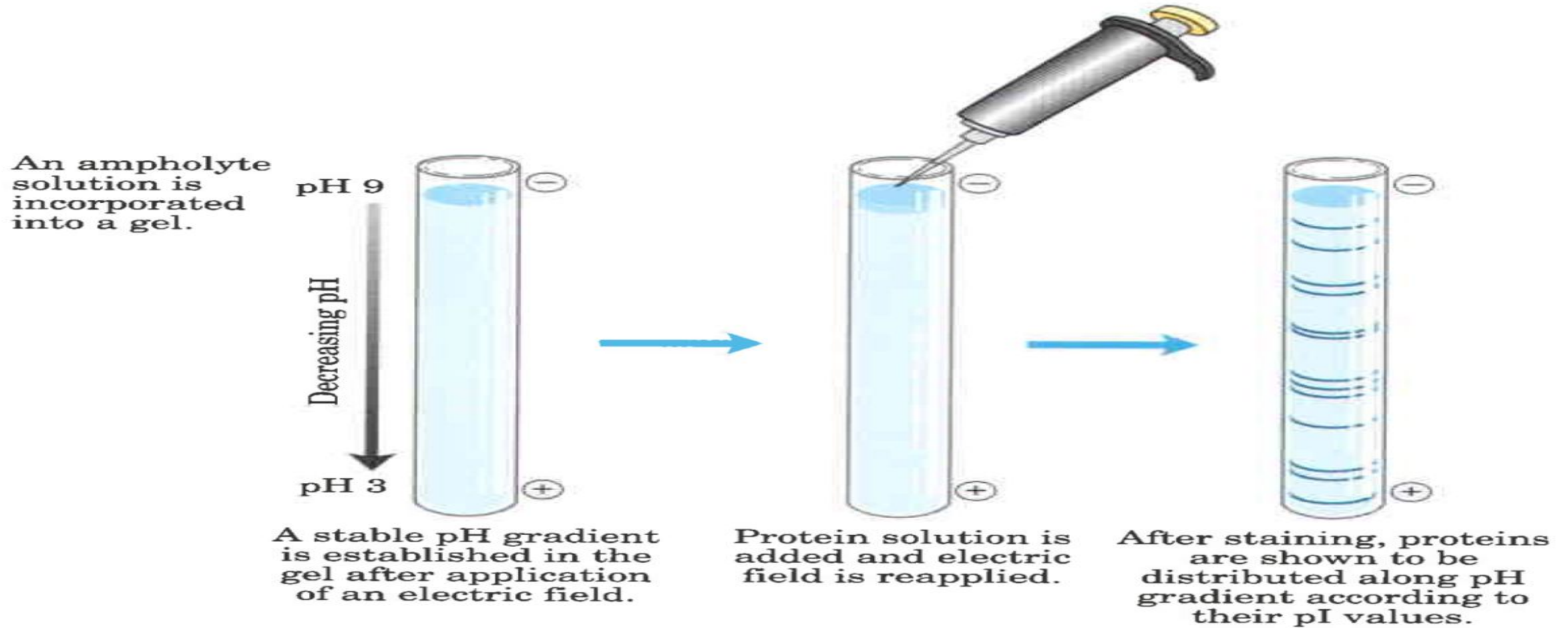
- ❑ Nécessite la reconnaissance de la protéine par un ligand porté par la phase solide
- ❑ Méthode plus efficace que la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par gel filtration.
- ❑ Condition: il faut avoir un ligand pour la protéine recherchée.

2-4- 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



2-5- Focalisation isoélectrique : Séparation basée sur le pHi des protéines.



3- Rupture des ponts disulfures

- ❑ Permet la séparation des chaînes polypeptidiques si elles sont liées par ponts disulfure par le **mercapto-éthanol**
- ❑ Empêche la conformation native qui pourrait résister à l'action des agents protéolytiques

4- Fragmentation

4-1- 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 des liaisons peptidiques
 - Hydrolyse enzymatique
- ❑ L'analyse qualitative et quantitative des acides aminés du mélange obtenu après hydrolyse.

4-1-1- Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

4-1-1-1- Hydrolyse totale acide

□ C'est une hydrolyse totale acide par l'acide chlorhydrique (HCl) à 6 Mol/L, à chaud (110°C), pendant 24 h environ.

□ Inconvénients : cette hydrolyse détruit le Tryptophane et transforme la Glutamine en Glutamate et l'Asparagine en Aspartate.

□ C'est la méthode la plus utilisée, mais, nécessite d'autres méthodes pour compléter les résultats de l'analyse.

4-1-1-2- 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.

4-1-2- Hydrolyse enzymatique

Protéolyse totale par la 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).

Inconvénient : risque de contamination par l'autodégradation des enzymes protéolytiques.

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

3- 3- Coupures intra-chaine peptidique

3- 3- 1- Coupures chimiques

Solution	Lieu de coupure
Bromure de cyanogène (BrCN)	C-terminal des méthionines
N-bromosuccinimide (NBS)	Après Tyr et Trp
Hydroxylamine (NH₂OH)	Liaisons Asparagine-Glycine

3- 3- 2- Coupure enzymatique Endopeptidases

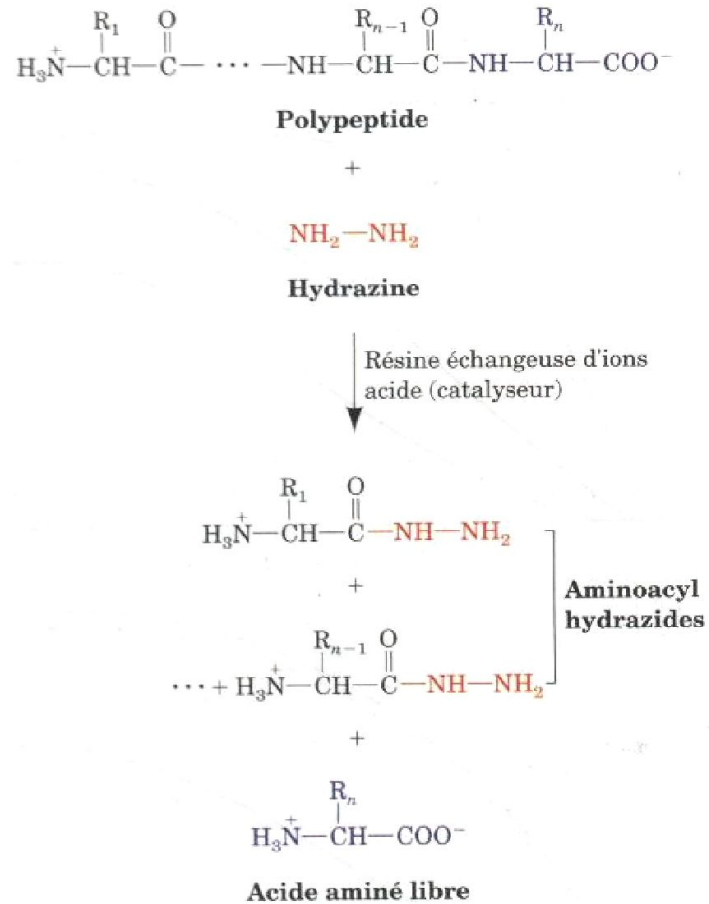
Enzyme	Lieu de coupure
Pepsine	Avant le N des AA aromatique: Phe, Trp, Tyr
Asp N protéase	Avant le N de Asp, cystéine, parfois Glu
Trypsine	Après le C des AA basiques: Lys-Arg
Chymotrypsine	Après le C des A.A. aromatiques: Phe, Tyr, Trp
Endoprotéase V8	Après le C de Glu, parfois de Asp

4- Séquençage

4-1- Détermination des extrémités C-terminal et N-terminal par voie enzymatique

Exopeptidases	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 aminopeptidase	N-ter	Pro
Aminopeptidase	N-ter	Tous

4-2- Détermination du C-terminal par méthode chimique



- Hydrazinololyse : $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$
- 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.

4- 3- Détermination du N-terminal par méthode chimique

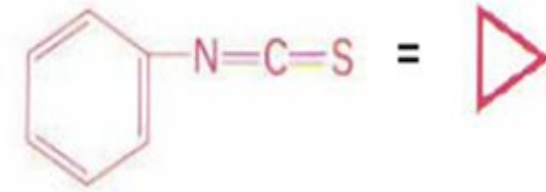
- ❑ Méthode de Sanger (FDNB)
- ❑ Méthode de dansylation
- ❑ Méthode récurrente d'Edman

4- 4- Dégradation d'Edman

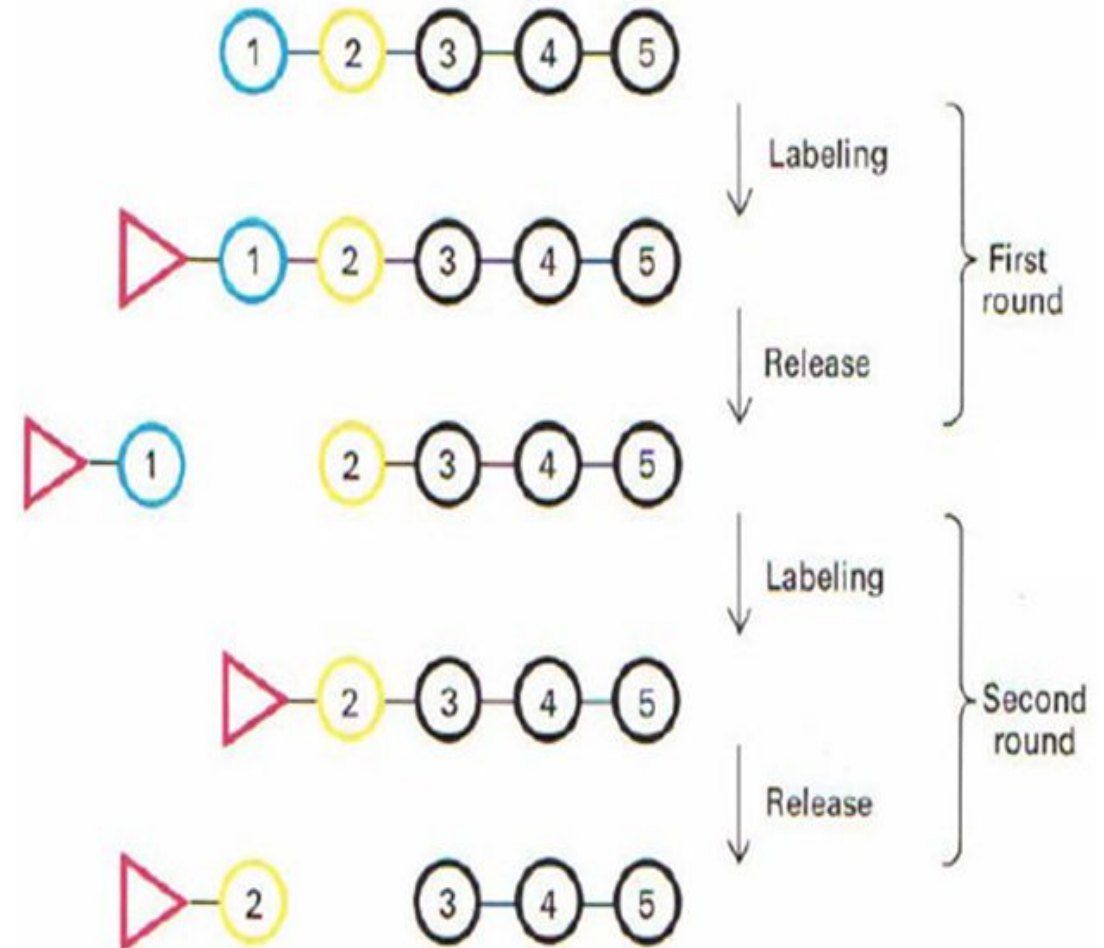
❑ Méthode récurrente d'Edman = analyse séquentielle.

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

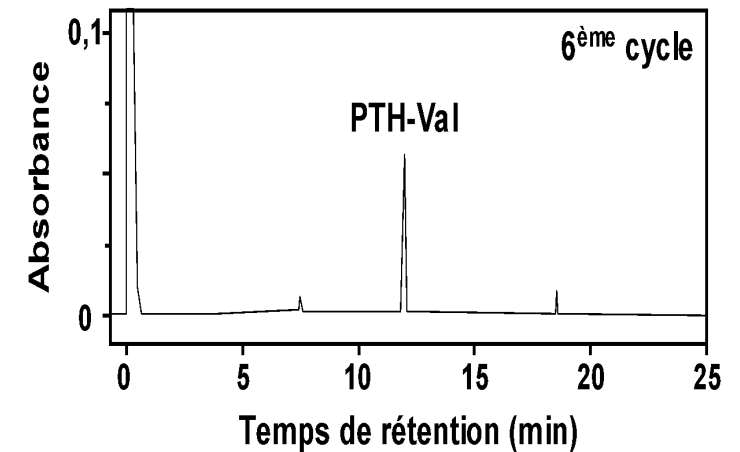
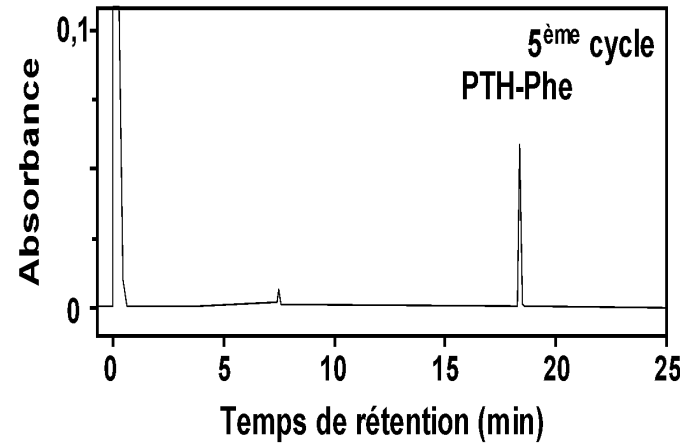
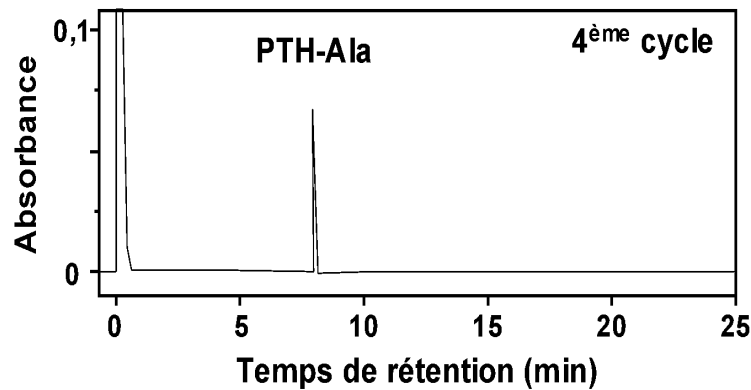
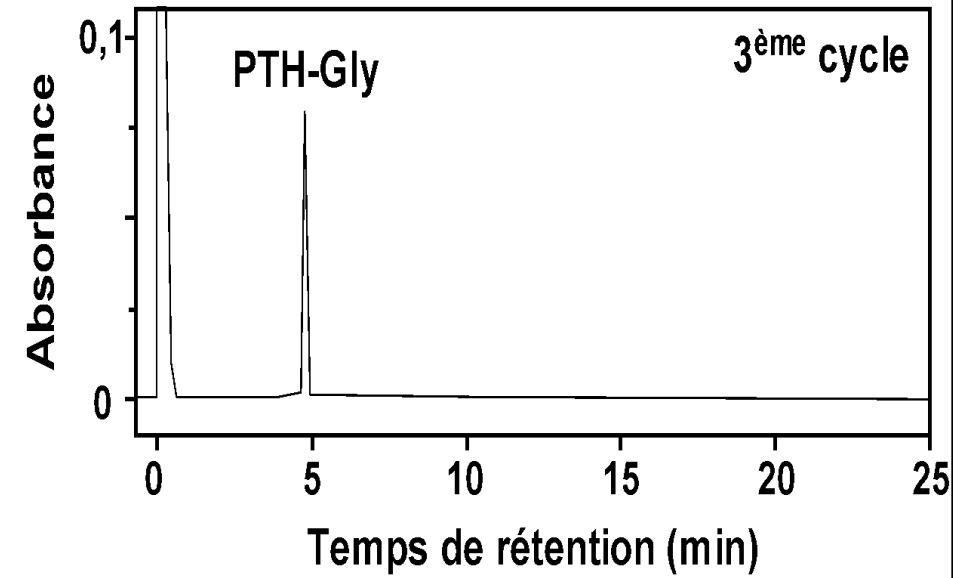
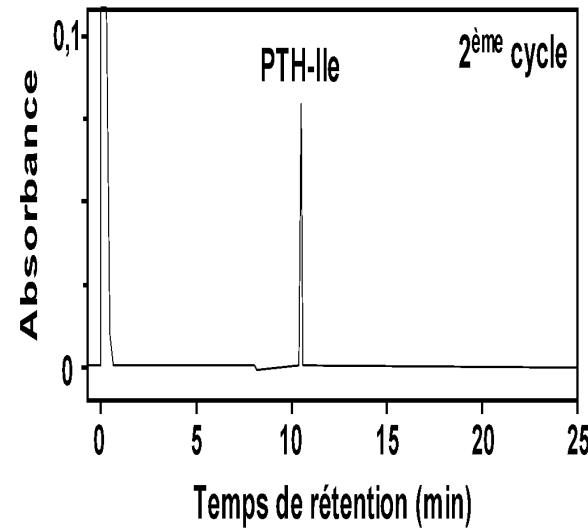
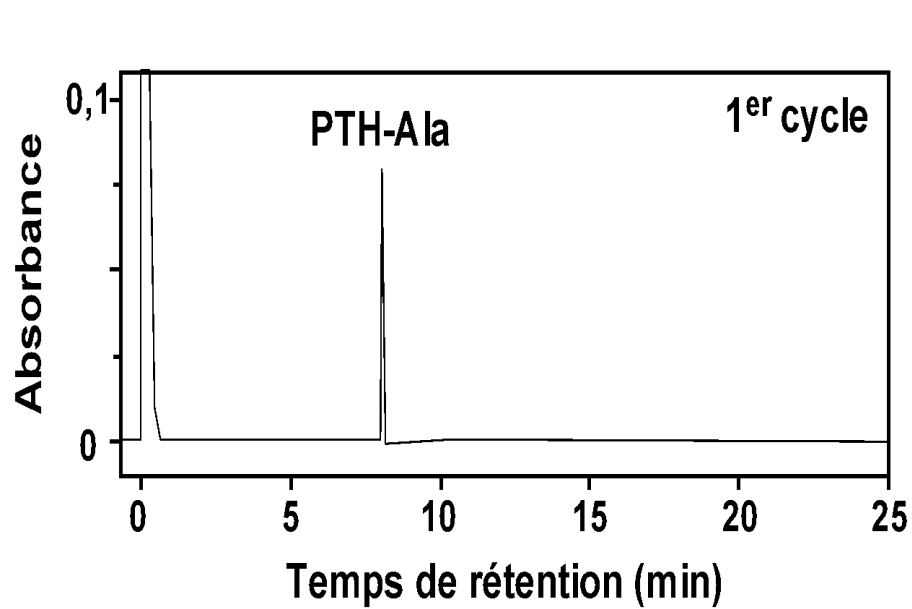
❑ La libération des **PTH-AA** se fait cycle



phényl isothiocyanate (PITC)



Exemple de profil d'HPLC : après dégradation par la méthode d'Edman, nous avons les résultats ci-dessous :



La séquence est: A – I – G – A – F – V

5- Détermination de la séquence en AA

- ❑ C'est l'établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.
- ❑ Les fragments protéolytiques sont séparés par l'HPLC et séquencer ainsi l'un après l'autre par la méthode d'Edman après identification des extrémités C et N terminales.
- ❑ La séquence du polypeptide original est obtenue en 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:

CNBr
fragments

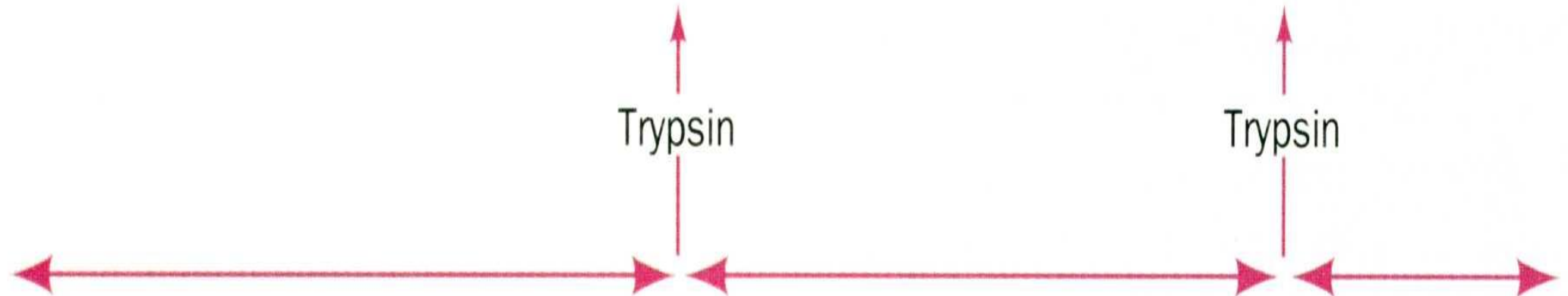


Phe-Trp-Met-Gly-Ala-Lys-Leu-Pro-Met-Asp-Gly-Arg-Cys-Ala-Gln

Trypsin

Trypsin

Trypsin
fragments

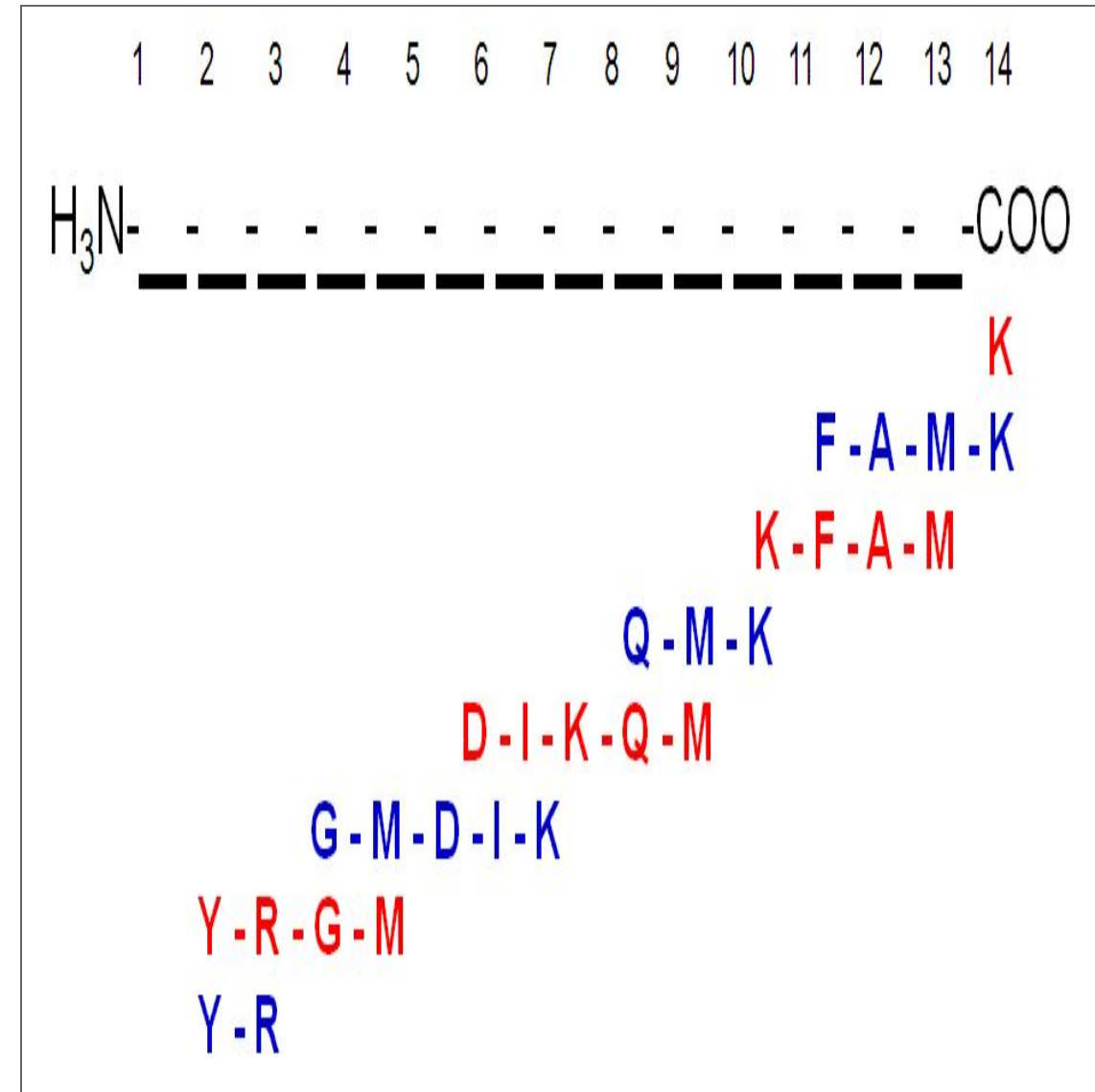


❑ **Exemple** : un peptide de 14 AA. En N terminal= Tyrosine Y, en C terminal = Lysine K

❑ Après hydrolyse acide complète, les AA suivants ont été retrouvés: D; A; G; I; R; K; Y; Q; M; F;

❑ **1-** on utilise le CNBr qui hydrolyse spécifiquement après Met (M – X) et analyse séquentielle d'Edman: on obtient : D - I - K - Q - M; K; K - F - A - M; Y - R - G - M

❑ **2-** on utilise la trypsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques après des résidus chargés positivement (K, R) et analyse séquentielle d'Edman



Séquence peptidique = Y - R - G - M - D - I - K - Q - M - K - F - A - M - K

CHAPITRE4 : Métabolisme des acides aminés

1- Introduction

Le métabolisme des AA comprend 02 processus complémentaires:

- **Le catabolisme (dégradation):** qui a lieu en 02 temps:

- ❑ Enlèvement du groupement aminé et son élimination sous forme d'urée (Foie) de NH_4^+ (Rein)
- ❑ Catabolisme du squelette carboné.

- **L'anabolisme:** utilisant des intermédiaires métaboliques comme substrats de biosynthèse des AA.

Les AA sont utilisés pour la synthèse des protéines et comme précurseurs de molécules bioactives.

2- Catabolisme des Acides aminés

- ❑ Le catabolisme ou dégradation des acides aminés s'accompagne toujours de **l'enlèvement de l'azote aminé** (c'est la 1^{ère} réaction catabolique).
- ❑ **Le squelette carboné** restant, appelé **acide α -cétonique** (ce n'est pas un AA), est à son tour dégradé en intermédiaires.
- ❑ On parle de dégradation irréversible.
- ❑ Le catabolisme des AA permet de fournir:
 - De l'énergie à l'organisme à partir du squelette carboné (fourniture directe via le cycle de Krebs).
 - Du NH_2 servant à la synthèse d'acides aminés ou à être éliminer.

2- 1- Élimination du NH_2 des AA

L'enlèvement de l'azote aminé se fait soit par:

- ❑ **Transamination:** commune à tous les AA sauf la lysine.
- ❑ **Désamination oxydative:** le glutamate.
- ❑ **Désamination non oxydative:** la sérine, cystéine et la thréonine.

Cela conduit à la production d'un composé toxique pour le système nerveux central: l'ammoniac (NH_3).

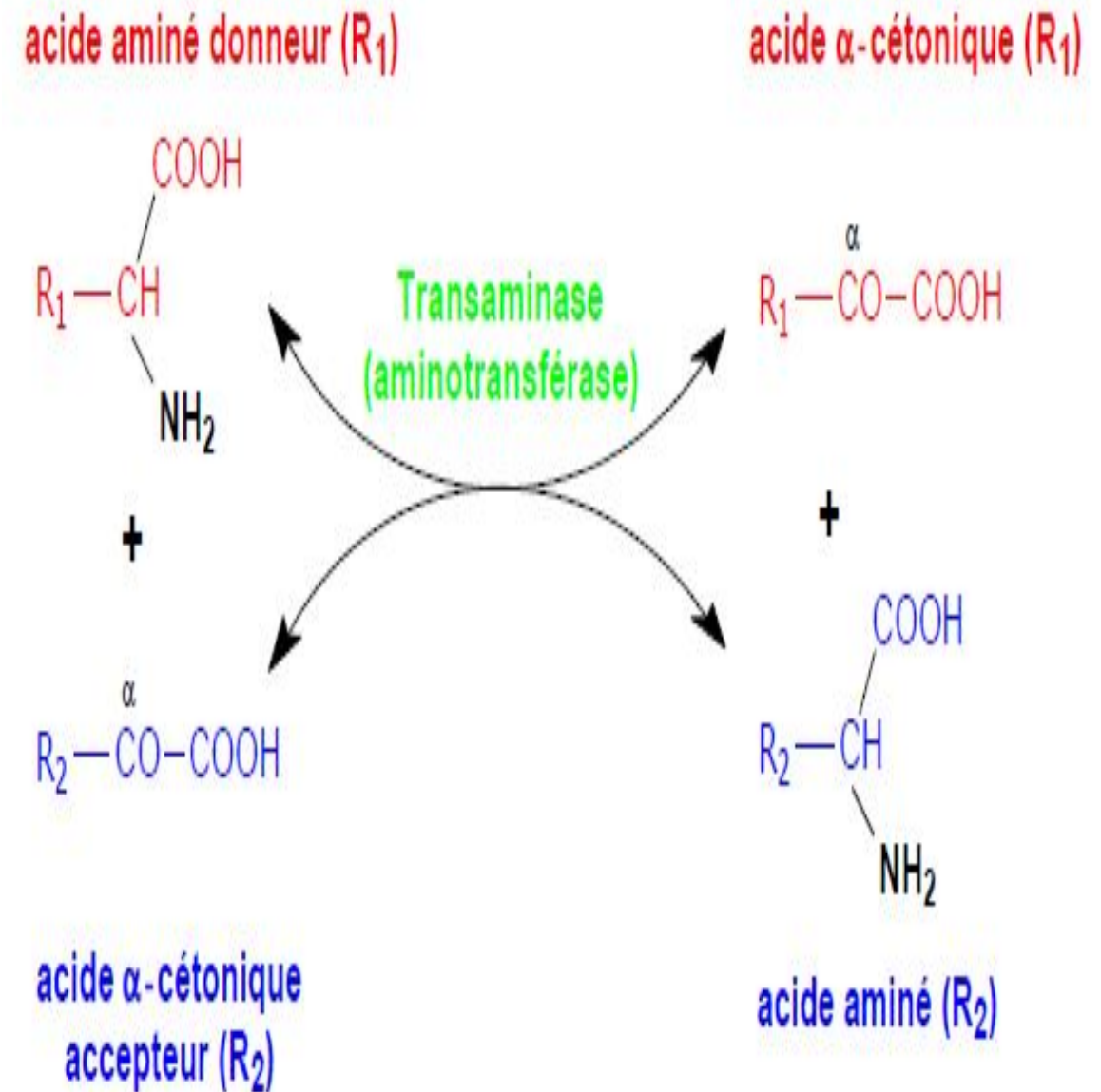
- ❑ Celui-ci est éliminé (systèmes de détoxication) de l'organisme
 - Sous forme d'urée (uréogénèse= voie majeure hépatique qui représente 4/5 de l'azote éliminé) ou
 - Sous forme de NH_4^+ (l'ammoniogénèse rénale= forme mineure: 1/5).

2- 1- 1- Transamination

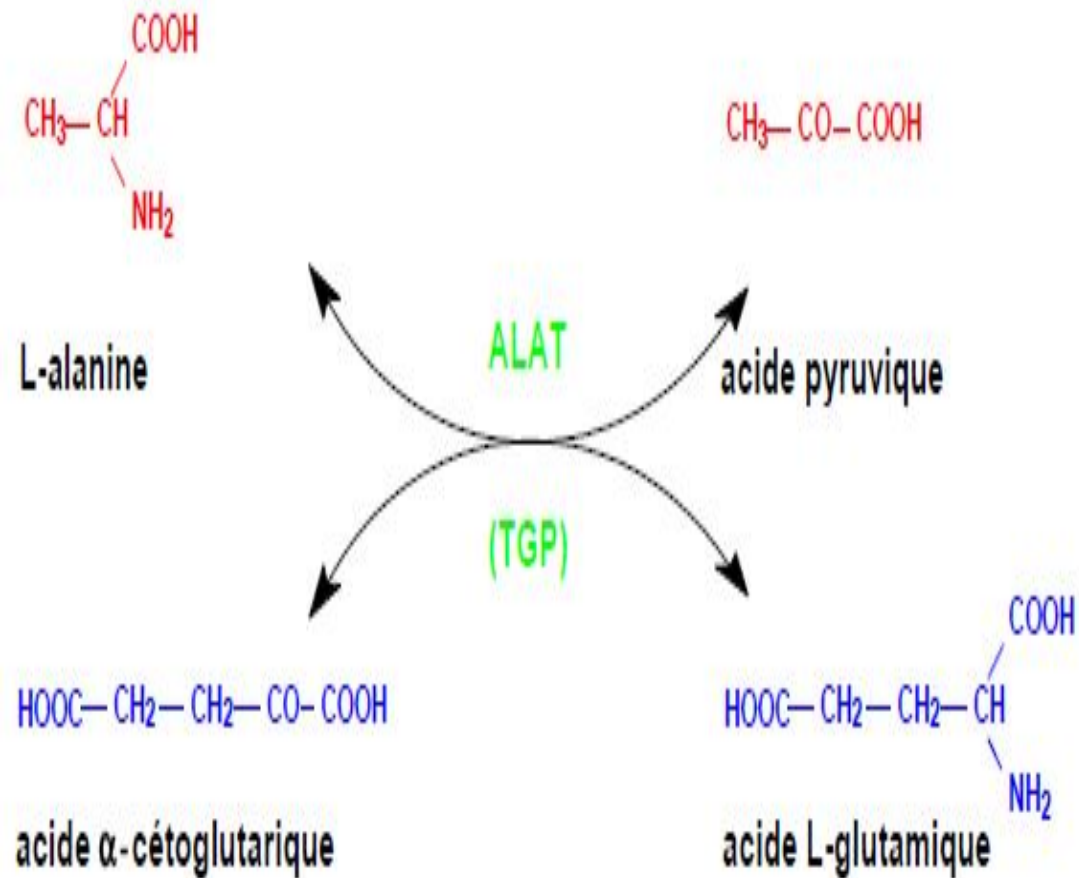
❑ C'est le **transfert d'une fonction amine en position α** d'un acide aminé 1 **sur une fonction cétone en position α** d'un Acide α cétonique 2.

❑ Ce transfert de groupements aminés va permettre la formation **d'un acide aminé 2** et **d'un acide α cétonique 1**.

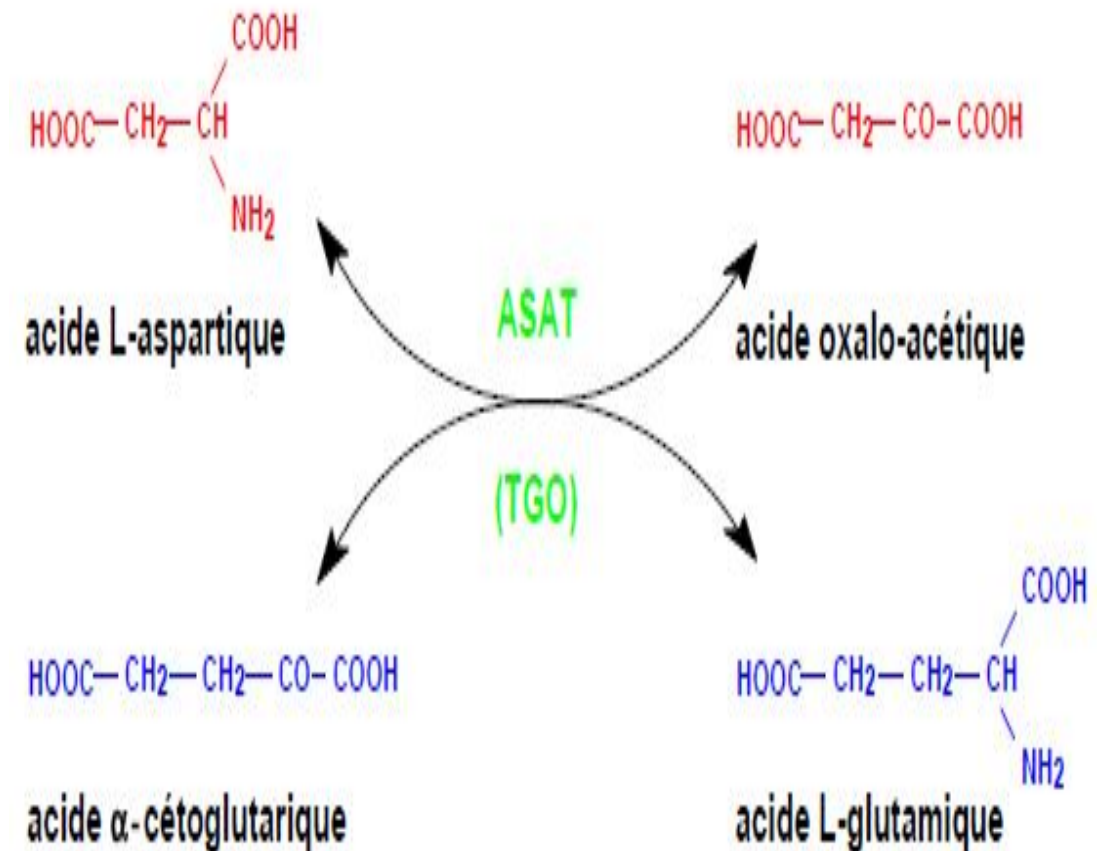
❑ Parmi les transaminases, 2 sont importantes



Alanine aminotransférase (ALAT) ou Transaminase Glutamo-Pyruvique (TGP).

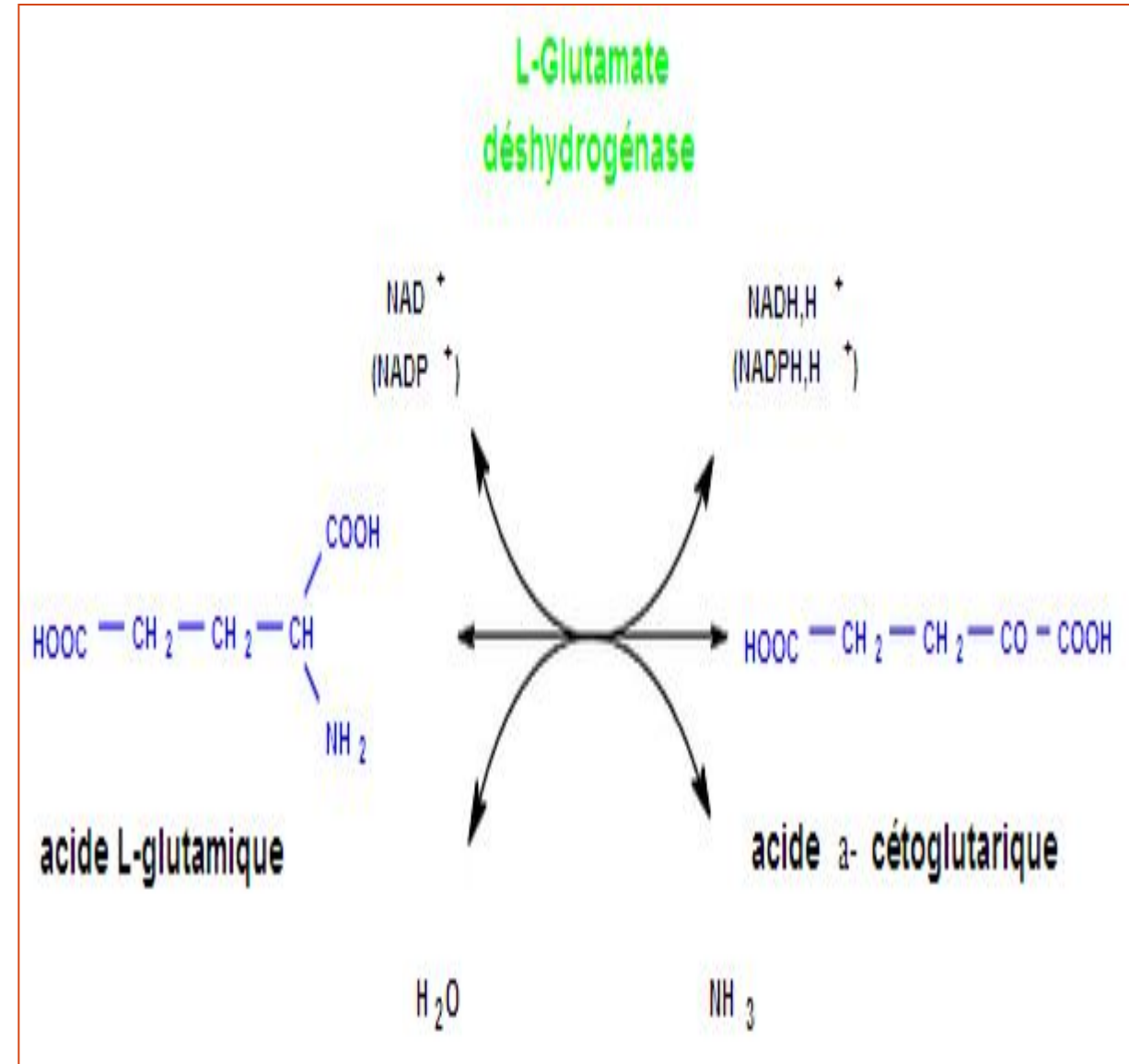


Aspartate amino-transférase (ASAT) ou Transaminase Glutamo-Oxalo-acétique (TGO)



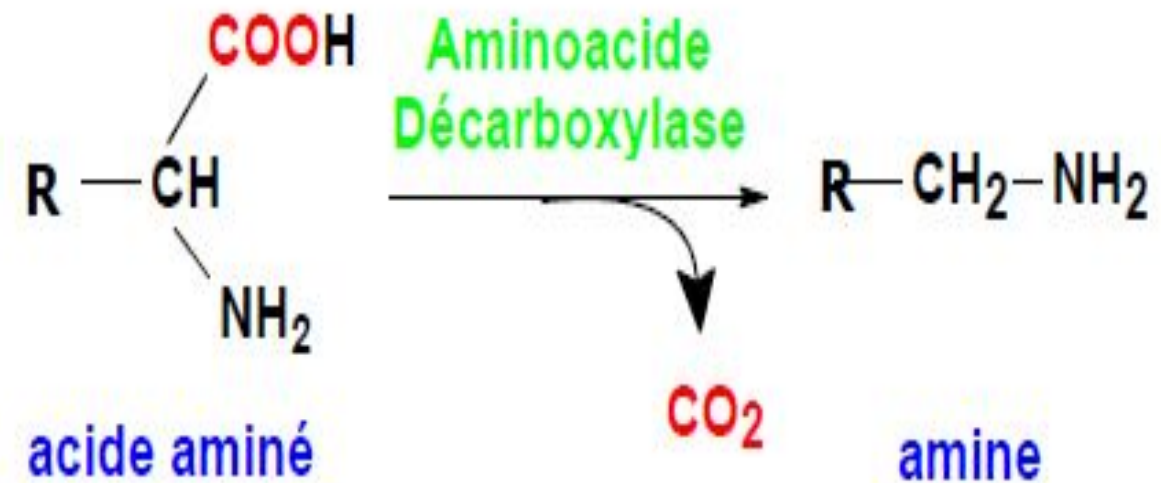
2- 1- 2- Désamination oxydative

C'est la libération du groupement NH_3 à partir du glutamate sous l'action de la Glutamate déshydrogénase avec formation de l'acide α céto glutarique.

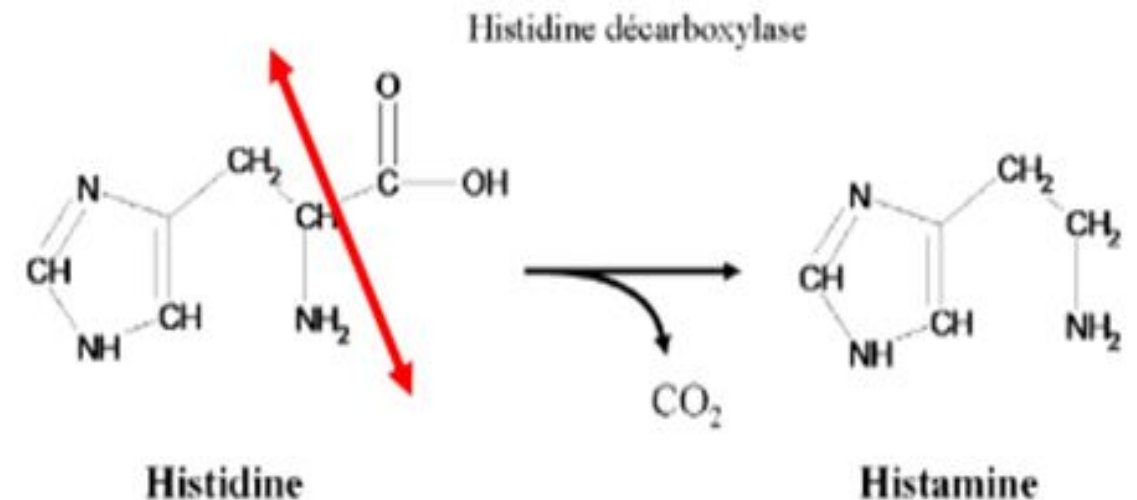


2- 2- Décarboxylation

C'est la libération du CO_2 par une décarboxylase, on obtient une amine



Exemple



2- 3- Catabolisme du squelette carboné

Conduit à la formation de 07 composés intermédiaires qui peuvent empruntés des voies métaboliques différentes.

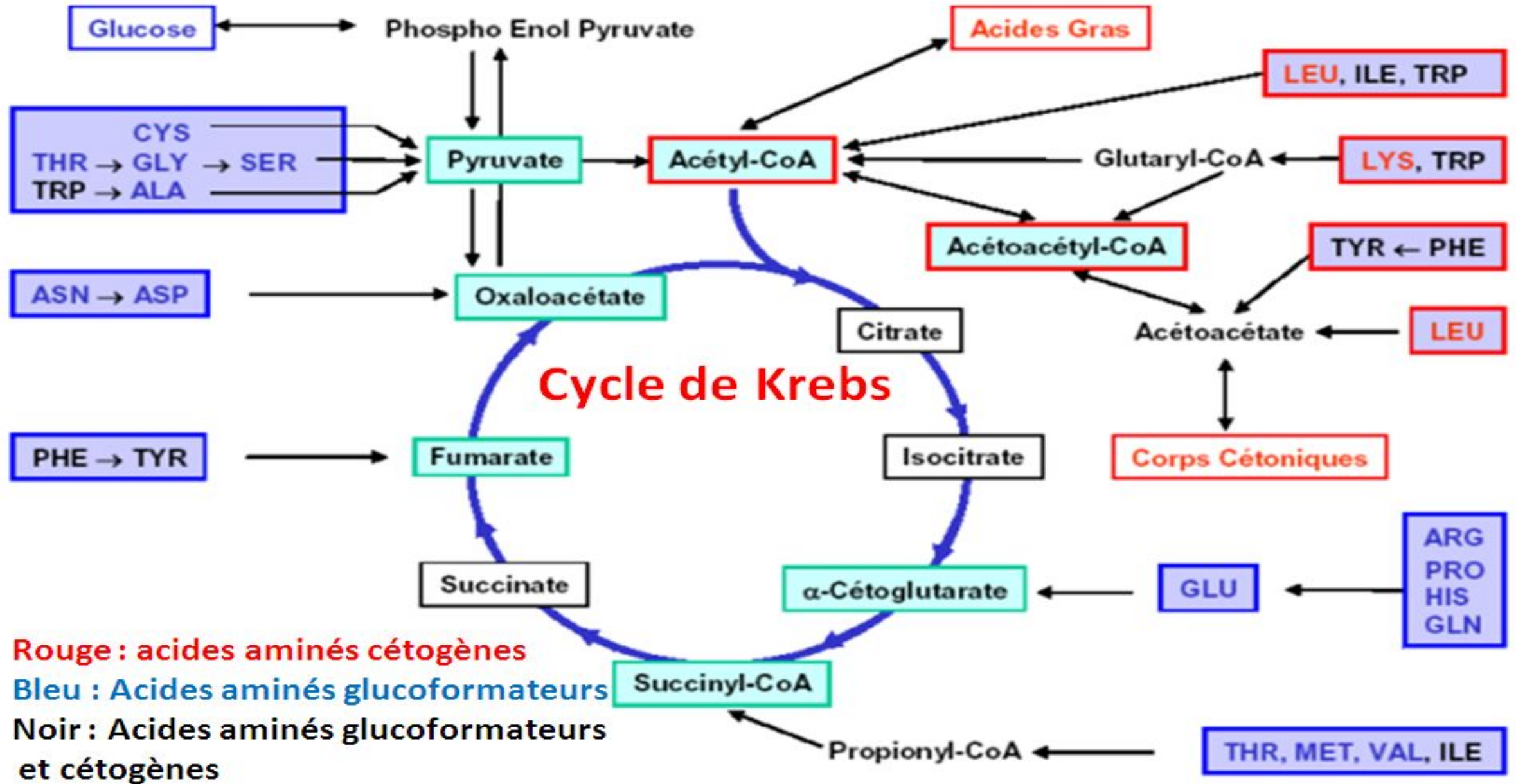
1- l' α -cétoglutarate, l'oxaloacétate, le fumarate, le succinyl-CoA (Intermédiaire du cycle de Krebs) et le pyruvate.

Ces composés peuvent être utilisés pour la synthèse du glucose et les AA qui leur donnent naissance sont dits glucoformateurs.

2- l'acétoacétyl- CoA et l'acétyl- CoA

Ces composés peuvent être utilisés pour la synthèse des corps cétoniques et les AA qui leur donnent naissance sont dits cétogènes.

Certains AA sont glucoformateurs et cétogènes car ils donnent naissance aux intermédiaires nécessaires à la synthèse du glucose et des corps cétoniques



Rouge : acides aminés cétoogènes

Bleu : Acides aminés glucoformateurs

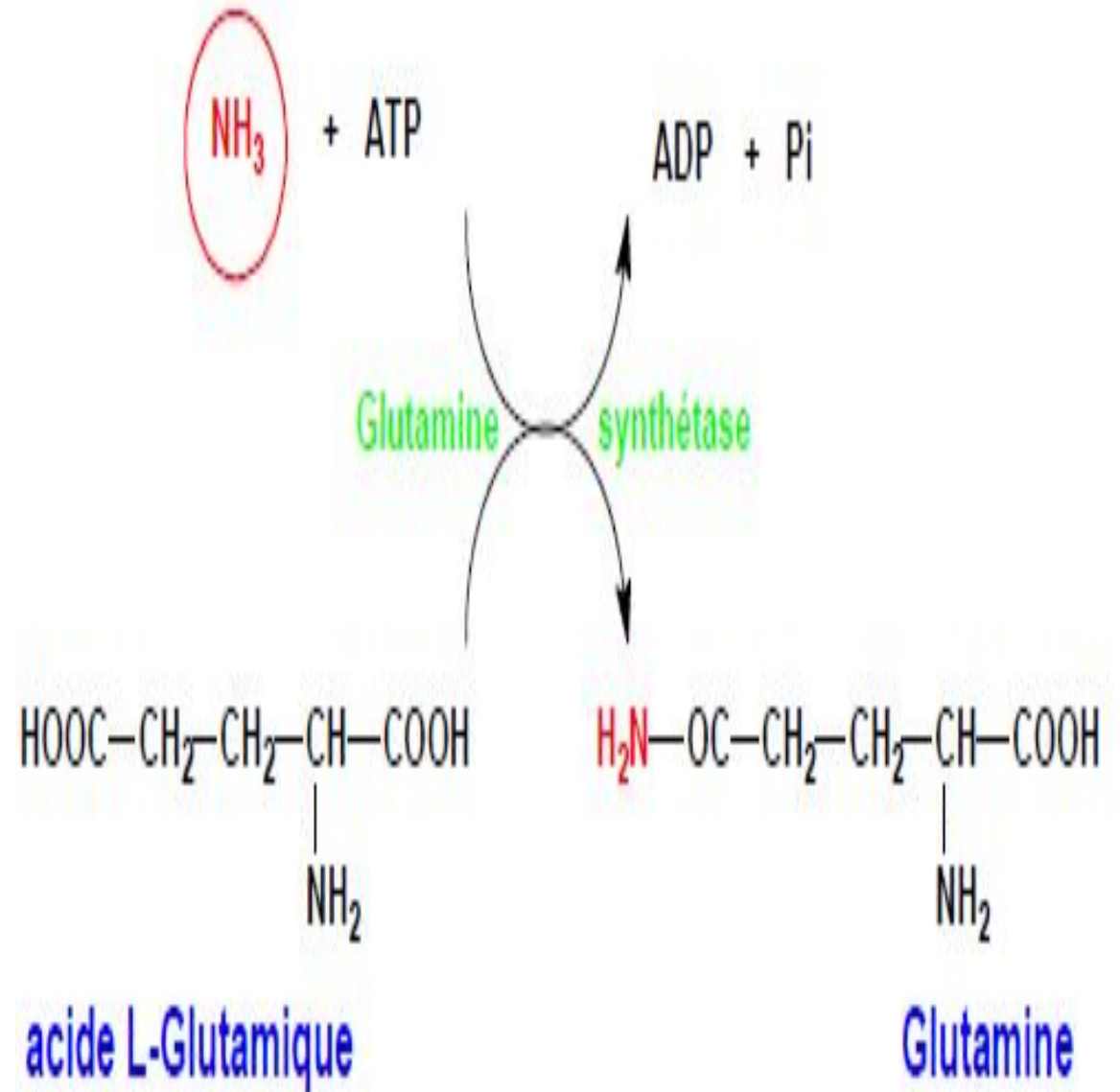
Noir : Acides aminés glucoformateurs et cétoogènes

Remarque :

- ❑ L'ammoniac NH_3 est un composé toxique. Il est formé dans les tissus périphériques (et le foie) à partir des AA par une série de réactions de transamination et de désamination. Il est également produit par les bactéries dans l'intestin.
- ❑ Il se déplace vers le foie et vers le rein, principalement sous la forme de glutamine (et d'alanine) pour être éliminé.
- ❑ Le transporteur d'azote entre les différents organes = glutamine

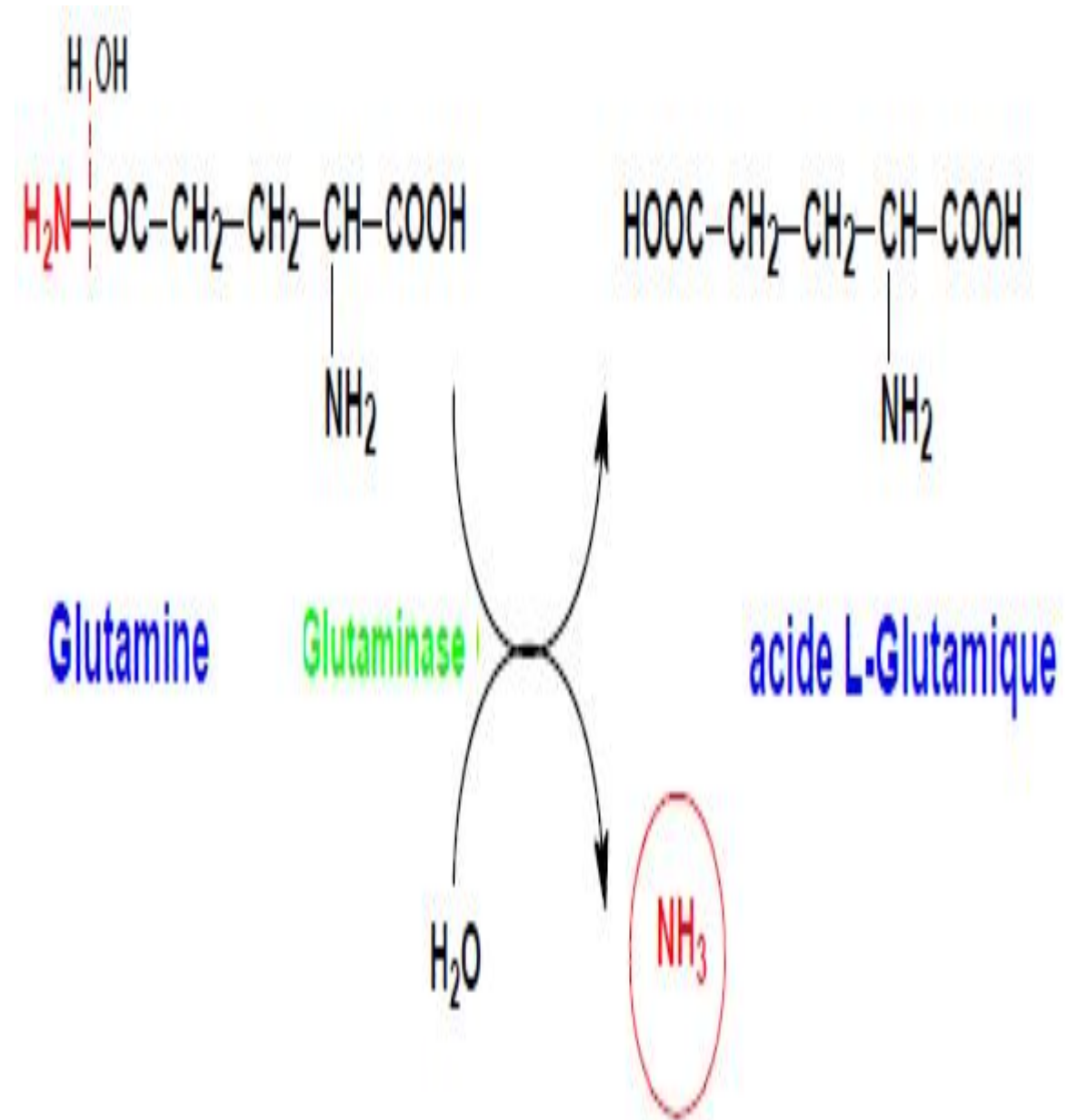
2- 4- Synthèse de la glutamine (Glutaminogénèse)

- ❑ Se déroule au niveau des tissus périphérique
- ❑ C'est la synthèse de la glutamine à partir du glutamate via **la glutamine synthétase cytosolique**



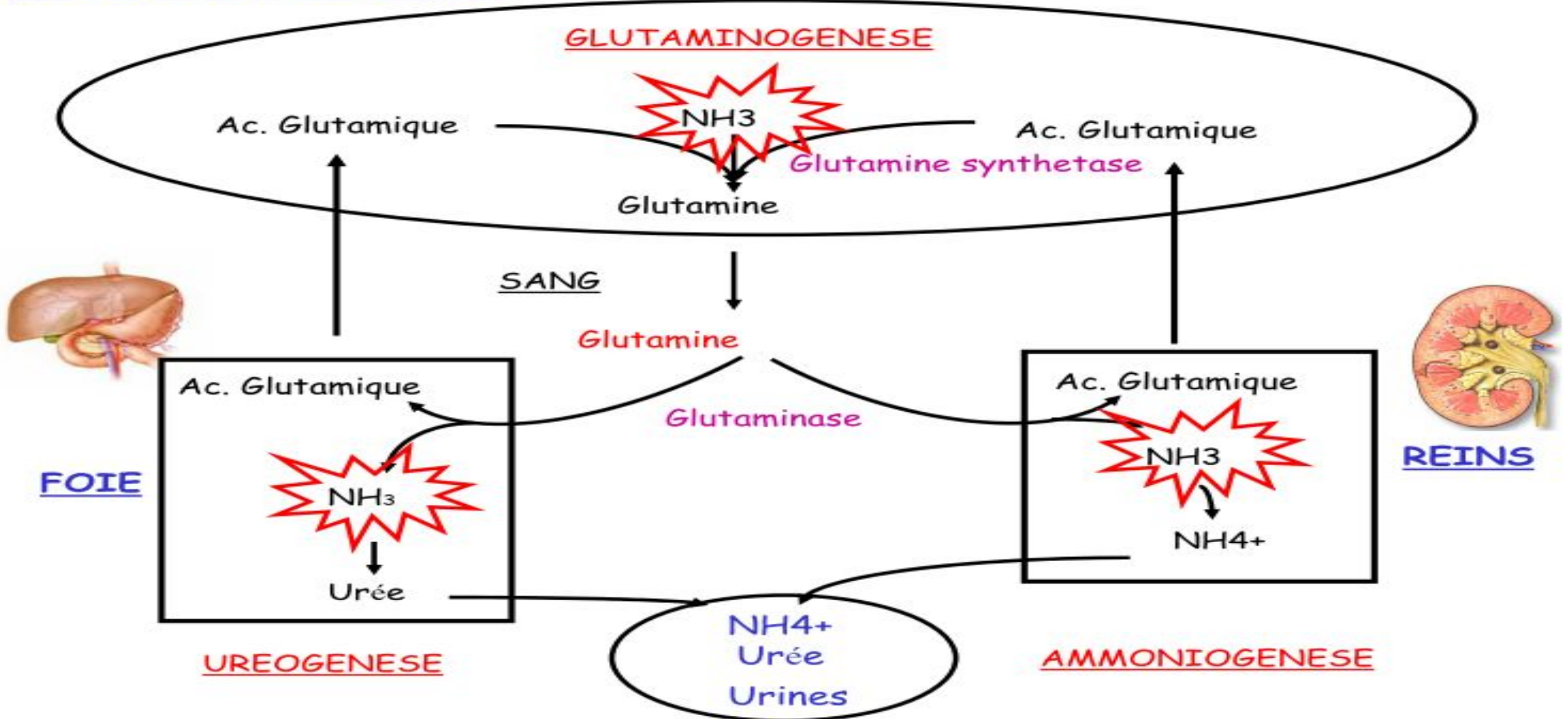
2- 5- Hydrolyse de la glutamine

- ❑ La glutamine formée passe dans la circulation sanguine et va dans les **reins** et **le foie**
- ❑ Dans ces organes, il y a reformation du glutamate à partir de la glutamine, sous l'action



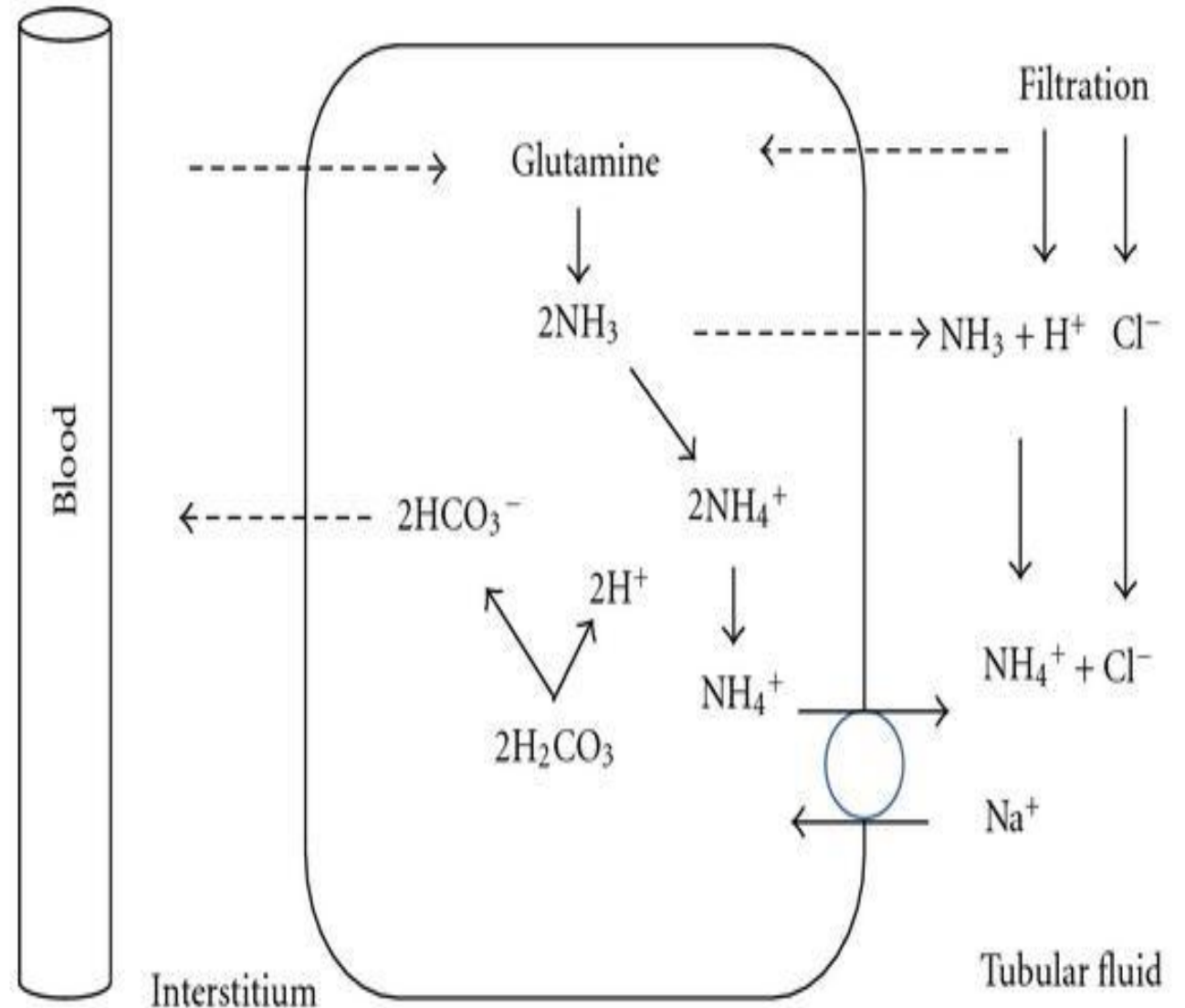
Glutamine transporteur d'azote

TISSUS PERIPHERIQUES



2- 6- L'ammoniogénès e

Dans le rein, le NH_3 libéré à partir de la glutamine va s'associer avec des H^+ pour former l'ion ammonium (NH_4^+) qui sera éliminé dans les



2- 7- Le cycle de l'urée ou uréogénèse

Au niveau du foie, le NH_3 libéré à partir de la glutamine est pris en charge par le cycle de l'urée = uréogénèse.

Le cycle de l'urée est la voie préférentielle de l'élimination de l'azote en excès.

En effet, on retrouve deux atomes d'azote par molécules d'urée.

L'urée n'a aucune fonction physiologique.

Le cycle de l'urée est fortement consommateur en énergie.

C'est un cycle qui fait intervenir en particulier les AA suivants:

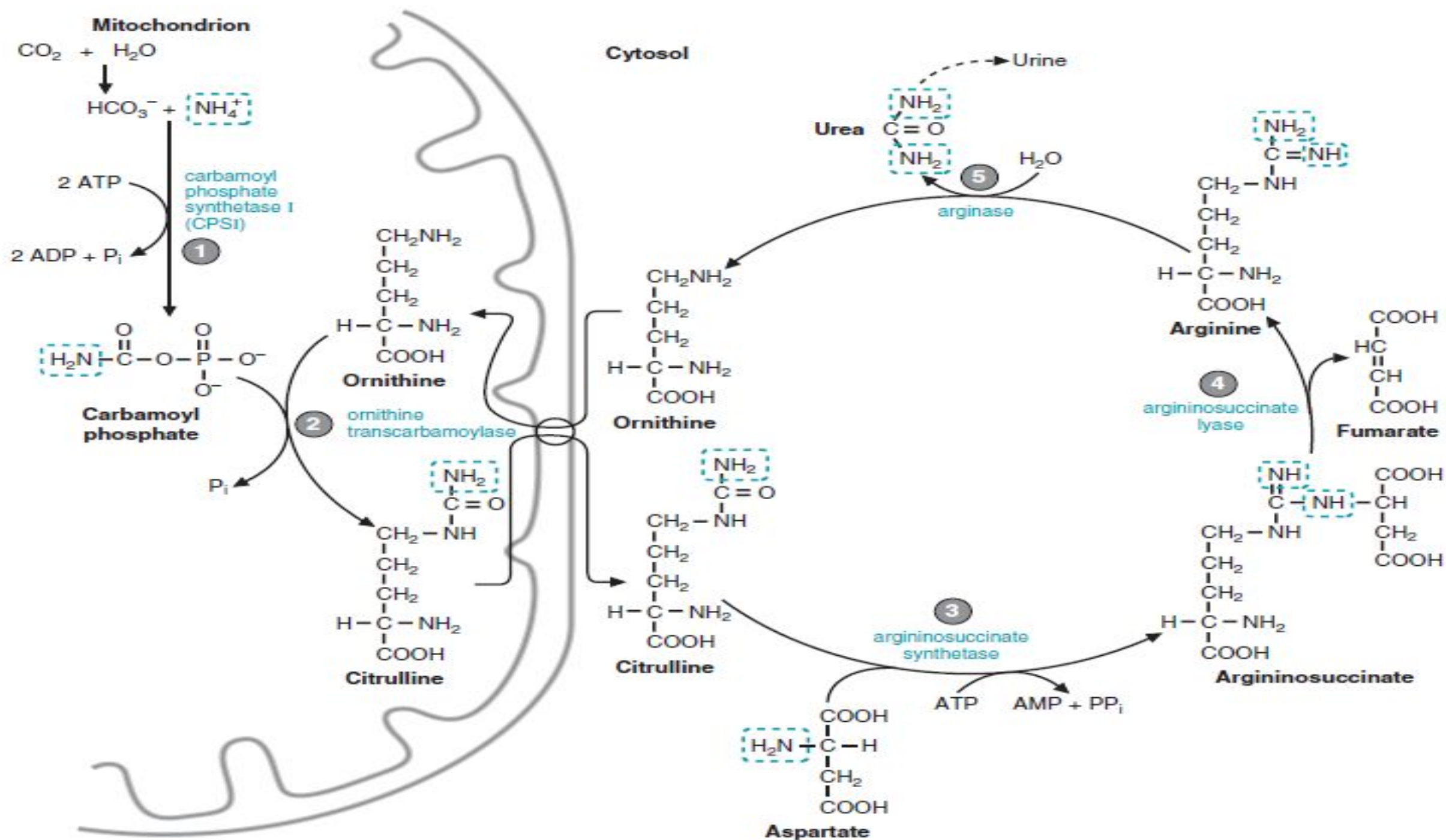
Dans la mitochondrie, le bicarbonate (HCO_3^-) réagit avec du NH_4^+ et aboutit à la synthèse d'une molécule appelée le carbamylphosphate.

Cette réaction est effectuée par la carbamylphosphate synthétase et nécessite de l'énergie (consommation de 2 ATP).

Le carbamylphosphate en présence d'ornithine transcarbamylase va donner de la citrulline.

La citrulline sort de la mitochondrie. Dans le cytoplasme, la citrulline interagit avec l'aspartate pour donner l'argininosuccinate sous l'action de l'argininosuccinate synthétase (avec consommation d'1 ATP).

L'argininosuccinate va être scindé en fumarate et arginine sous l'action de



Bilan de la synthèse de l'urée.

- ❑ $\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + 3 \text{ ATP} + \text{Asp} + 2 \text{ H}_2\text{O} \text{ -----} \rightarrow$
 $\text{URÉE} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} + \text{AMP} + \text{PPi} + \text{fumarate}$
- ❑ L'urée est une molécule très hydrosoluble et facilement éliminable au niveau rénale.
- ❑ On peut doser l'urée, comme indicateur de l'insuffisance rénale et non pas comme indicateur de fonctionnement du cycle de l'urée

3- Biosynthèse des AA ou synthèse endogène des AA

- ❑ L'homme ne peut pas synthétiser les AA dits indispensables et qui doivent être apportés par l'alimentation: **Lys, Met, Thr, Ile, Val, Leu, Phe, Trp.**
- ❑ Les acides aminés non indispensables peuvent être synthétisés par l'organisme par des réactions simples en utilisant des précurseurs métaboliques:
- ❑ Les voies de Biosynthèse des AA sont diverses cependant; elles ont un caractère commun important:
- ✓ **Le squelette carboné des AA provient des intermédiaires de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate ou du cycle de l'acide citrique.**
- ❑ Il ya seulement 06 familles biosynthétiques.

Les voies de biosynthèse des AA

- 1- **L' α -cétoglutarate**: précurseur du Glutamate, glutamine, proline et arginine *
- 2- **L'oxaloacétate** précurseur de: l'aspartate, asparagine, méthionine*, thréonine*, lysine*, Isoleucine*.
- 3- **Le 3-phosphoglycérate** : précurseur de la: sérine, cystéine et glycine.
- 4- **le pyruvate** : précurseur de: l'alanine, valine* et leucine*.
- 5- **Le phosphoénolpyruvate et l'érythrose -4-phosphate** : précurseurs du: tryptophane*, phénylalanine*, tyrosine.
- 6- **Le ribose 5 phosphate** : précurseur de

Vue générale de la biosynthèse des AA

