

## **Chapitre 2. Techniques d'études des séquences des protéines.**

### Rappels sur le catabolisme des protéines

1. Etude de la structure primaire des protéines
2. Fragmentation des chaînes peptidiques
3. Séparation de plusieurs chaînes peptidiques
4. Exercices

### **Rappels sur le catabolisme des protéines (protéolyse)**

Les protéines sont catabolisées en acides aminés par des enzymes protéolytiques, appelés protéases.

Ces enzymes ont une spécificité plus ou moins grande vis-à-vis de la position de la liaison peptidique dans la chaîne et / ou de la nature des acides aminés engagés dans cette liaison.

Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne,

Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques en bout de chaîne,

Les protéines sont catabolisées en acides aminés et peptides. Les enzymes protéolytiques, synthétisés par les cellules exocrines de l'appareil digestif, sous la forme de pro enzymes inactifs sont :

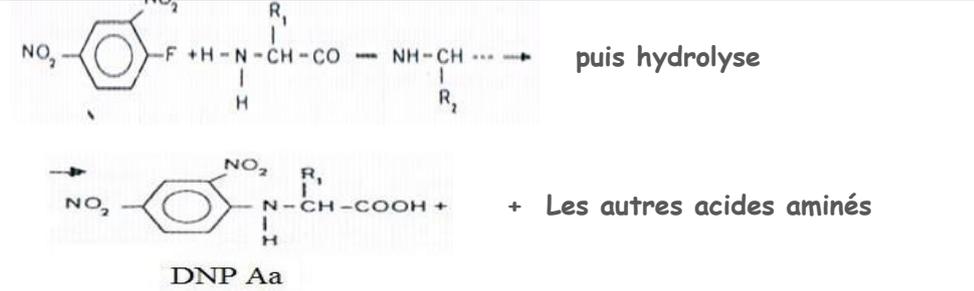
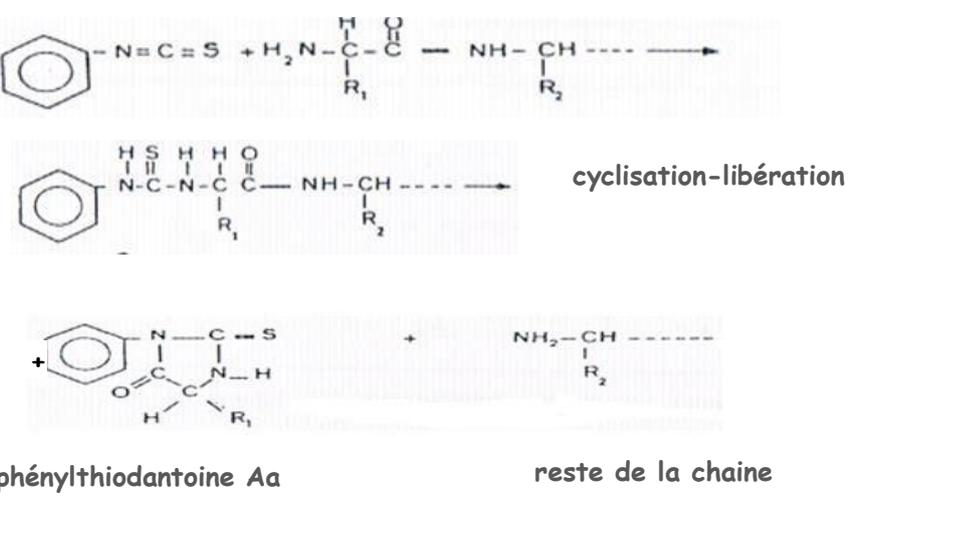
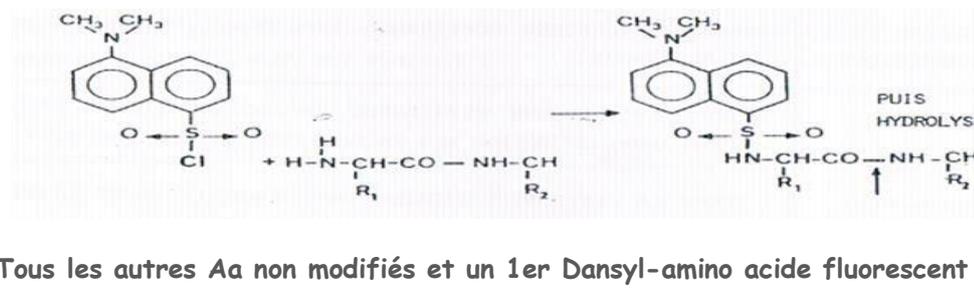
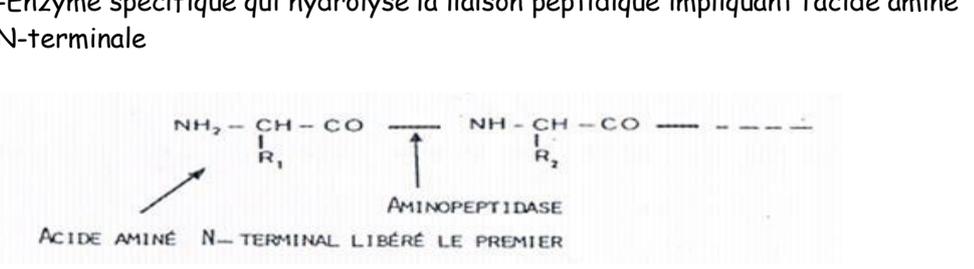
- sécrétés par l'estomac : la pepsine ;
- sécrétés par le pancréas : la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et des carboxypeptidases ;
- sécrétés par l'intestin grêle : des aminopeptidases.

#### **1. Eude de la structure primaire d'une protéine :**

La détermination de la structure des chaînes peptidiques met en jeu des agents chimiques et des enzymes. Pour connaître la séquence des acides aminés il faut d'abord déterminer les acides aminés N- et C- terminaux, puis l'ordre d'enchaînement des autres acides aminés.

Les tableaux 1 et 2 donnent les principales méthodes utilisées.

**Tableau 1.** Détermination de l'acide aminé en position N-terminale.

Méthodes chimiques	Réactions
<p>Sanger par le dinitro-fluoro benzene</p> <p>DNFB + aa → DNP-aa</p>	 <p>puis hydrolyse</p> <p>+ Les autres acides aminés</p> <p>DNP Aa</p>
<p>EDMAN ou méthodes par récurrence par le phényl-isothiocyanate</p> <p>PTHo + aa → PTH-aa</p>	 <p>cyclisation-libération</p> <p>phénylthiodantoine Aa</p> <p>reste de la chaîne</p>
<p>Dansyl ou chlorure de diméthyl amino 1- sulfonyl 5-naphtalène</p>	 <p>Tous les autres Aa non modifiés et un 1er Dansyl-amino acide fluorescent</p> <p>PUIS HYDROLYSE</p>
<p>Méthodes enzymatiques :</p> <p>Amino-peptidase N terminal</p>	<p>-Enzyme spécifique qui hydrolyse la liaison peptidique impliquant l'acide aminé N-terminale</p>  <p>AMINOPEPTIDASE</p> <p>ACIDE AMINÉ N-TERMINAL LIBÉRÉ LE PREMIER</p>

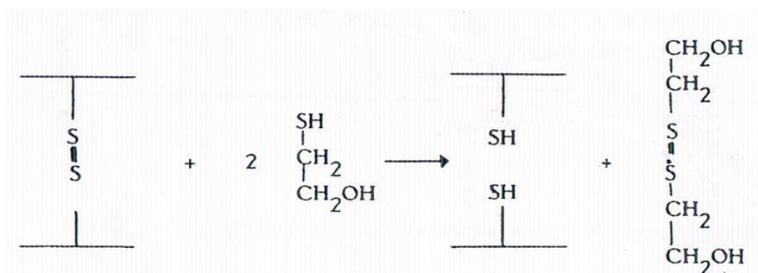
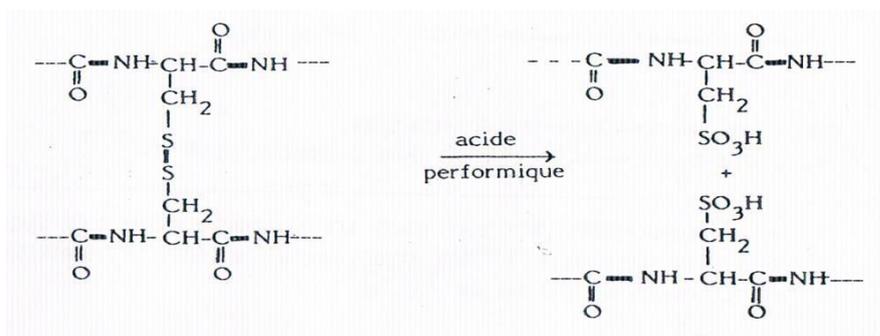


**Tableau 3.** Fragmentation des chaînes peptidique.

Enzymes	Spécificité
Chymotrypsine Coupe après Phe, Tyr, Trp.	Elle attaque spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le -CO- d'un acide aminé aromatique.  $\text{--- NH-CH(R}_1\text{)-CO} \begin{array}{c} \updownarrow \\ \updownarrow \end{array} \text{NH-CH(R}_2\text{)-CO ---}$ <p style="text-align: right;">R<sub>1</sub>= Phe, Tyr, Trp</p>
Pepsine	Spécificité plus faible, elle coupe la liaison peptidique impliquant le -NH- d'un acide aminé aromatique.  $\text{--- NH-CH(R}_1\text{)-CO} \begin{array}{c} \updownarrow \\ \updownarrow \end{array} \text{NH-CH(R}_2\text{)-CO ---}$ <p style="text-align: right;">R<sub>2</sub>= Phe, Tyr, Trp</p>
BrCN	Coupe la liaison peptidique impliquant le -CO- d'une Met et transforme le résidu Met en HSL (homosérine lactone).

### 3. Séparation de plusieurs chaînes peptidiques

Fréquemment les chaînes peptidiques sont unies entre elles par des points disulfures. Les liaisons disulfures sont scindées par des agents oxydants.



On utilise aussi des agents réducteurs tels que le β mercaptoéthano

#### 4. Exercices sur l'étude de la séquence des protéines

1/ On désire déterminer la séquence d'un décapeptide dont la composition est la suivante : Asp ; Val ; Gly 2 ; Tyr ; Ile ; Cys ; Arg ; Leu ; Ala. La méthode d'Edman donne Gly, puis Leu et ensuite un acide aminé soufré. La carboxypeptidase libère Ala. L'hydrolyse trypsique donne un térapeptide basique et un hexapeptide. La chymotrypsine hydrolyse de l'hexapeptide et donne un dipeptide qui possède un acide aminé à 2 carbones asymétriques et un térapeptide donnant un DNP-acide aminé acide par la méthode de Sanger puis DNP-Val. Donner la séquence de ce peptide.

2/ L'analyse en acides aminés d'un oligopeptide formé de 7 acides aminés donne : Asp ; Leu ; Lys ; Met<sub>2</sub> ; Phe ; Tyr. Le traitement avec la trypsine n'a aucun effet apparent. La dégradation Edman donne Phe. Un traitement avec la chymotrypsine donne un acide aminé libre, un dipeptide et un térapeptide. La composition en acides aminés du térapeptide est Leu, Lys et Met<sub>2</sub>. Le bromure de cyanogène donne un térapeptide, un dipeptide, une lysine. Donner la séquence de l'oligopeptide.