

Chapitre 4 Structures covalentes des protéines

1. Détermination de la structure primaire des protéines

- A. Coupure des ponts disulfure et séquençage d'Edman
- B. Réactions d'hydrolyse spécifiques de liaisons peptidiques
- C. Détermination de la séquence

Fonctions des protéines

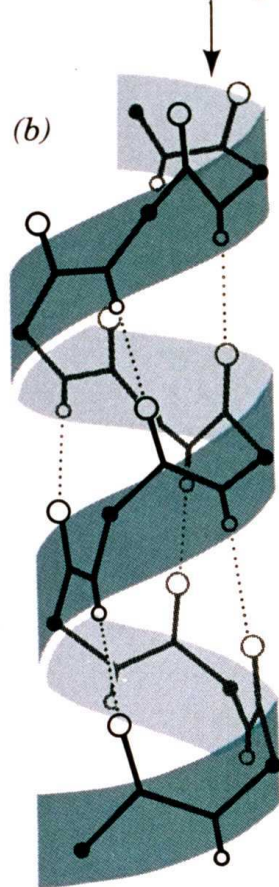
Fonctions :

- catalyse (enzymes)
- transport (hémoglobine, albumine, transporteurs membranaires)
- structure (Kératine, collagène)
- travail mécanique (actine et myosine)
- régulation du code génétique
- hormones, récepteurs (insuline, récepteur de l'insuline)
- immunoglobulines (IgG, IgM)

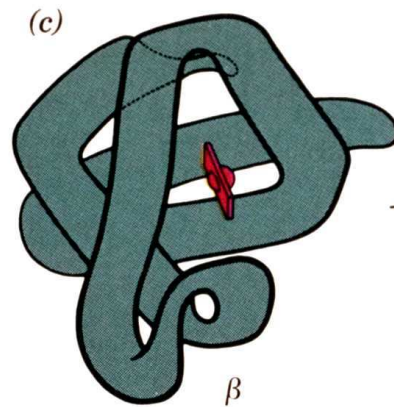
La fonction d'une protéine ne peut être comprise que par sa structure

La description des protéines se fait traditionnellement selon quatre niveaux d'organisation:

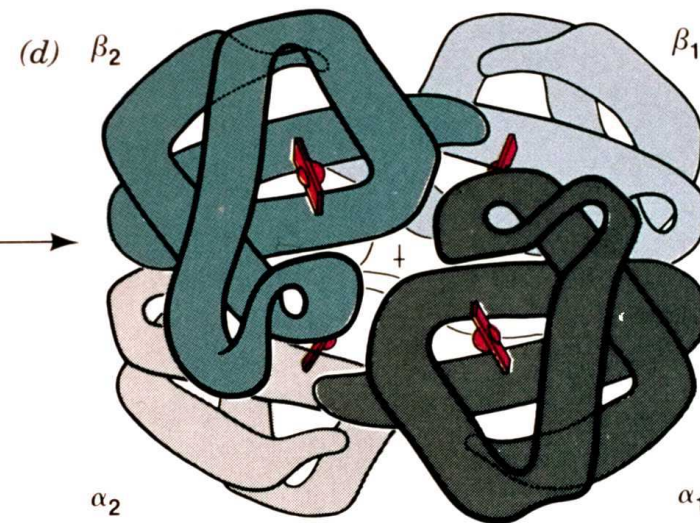
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



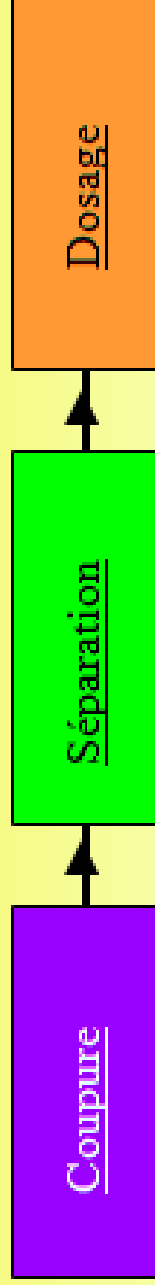
Tertiary structure:
one complete protein chain
(β chain of hemoglobin)



Quaternary structure:
the four separate chains
of hemoglobin assembled
into an oligomeric protein

ACIDES AMINES - PROTEINES

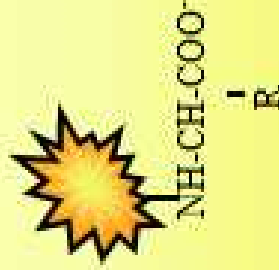
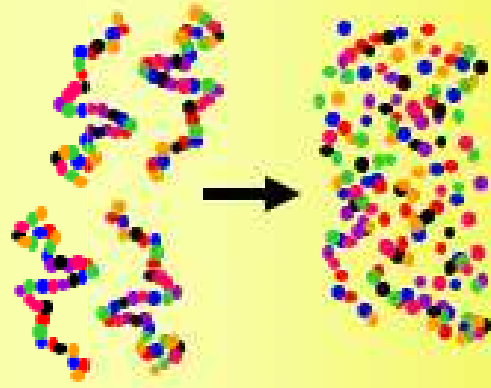
Analyse d'acides aminés - La question est : quels acides aminés, dans quelles proportions?



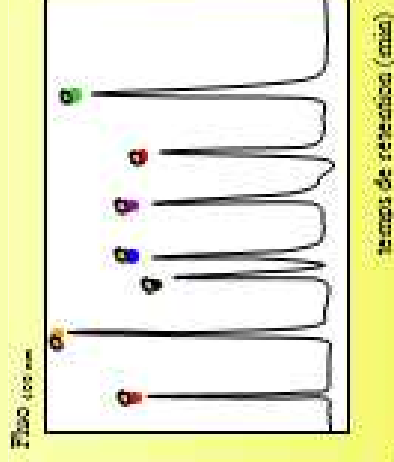
HCl 6N
110°C

HPLC { phase inv.
éch. ion

U.V. fluo



Dérivatisation pré-colonne



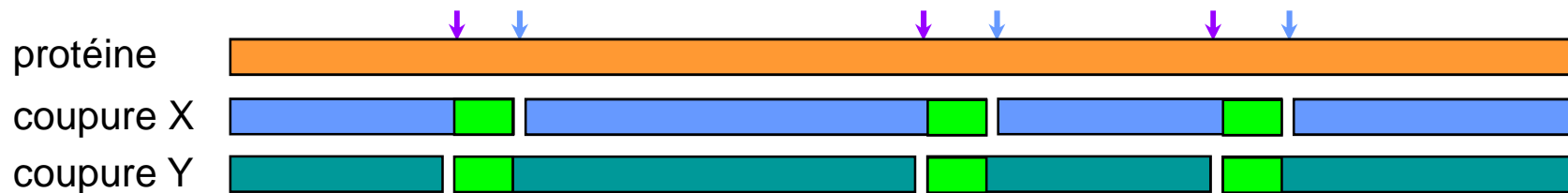
ACIDES AMINES - PROTEINES

Lorsque l'on a affaire à un polypeptide **de plus de 50 résidus**, on ne peut déterminer directement sa séquence.

On va :

- le **couper** en peptides plus petits
- purifier ces peptides
- les séquencer individuellement
- puis on reconstruit le puzzle.

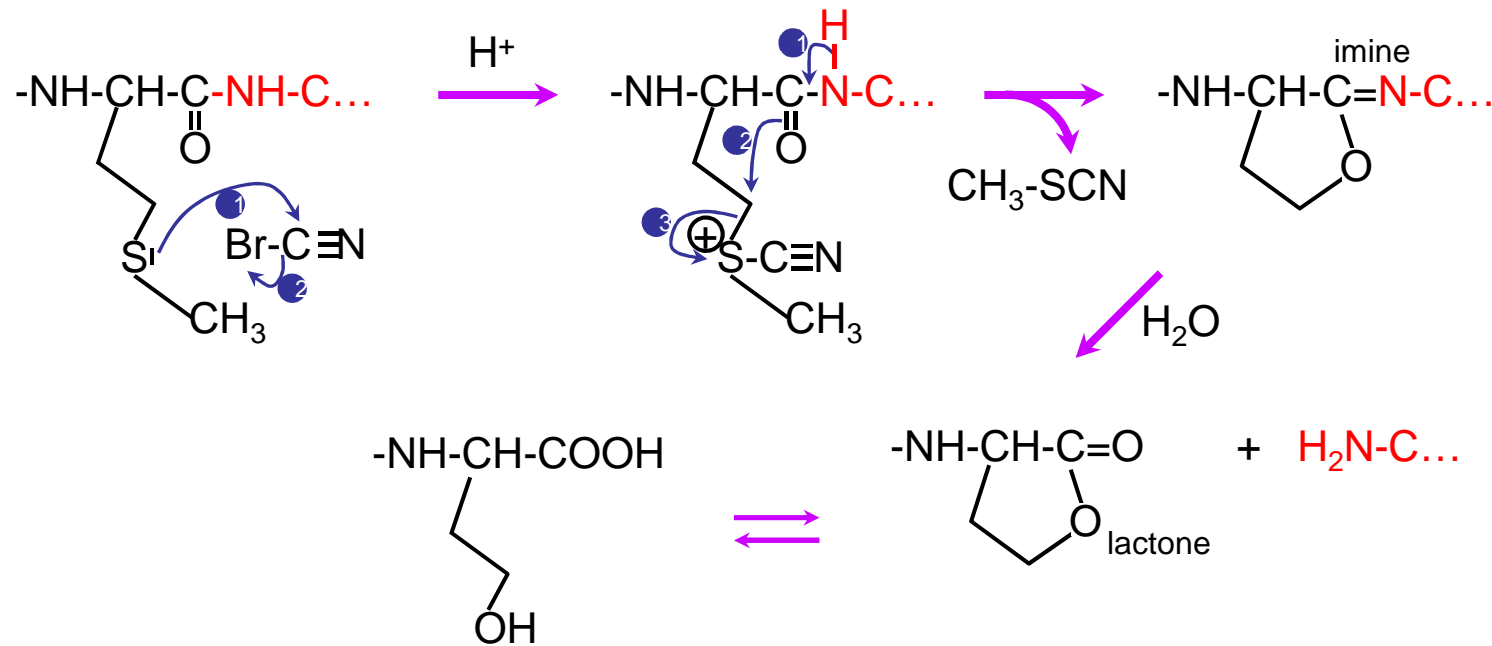
Protéine → n peptides $\left\{ \begin{array}{l} \text{purifiés} \\ \text{séquencés} \end{array} \right. \rightarrow$ on reconstruit en identifiant les portions communes



Il existe plusieurs méthodes de coupures spécifiques au niveau d'acides aminés donnés.

ACIDES AMINES - PROTEINES

- o Bromure de cyanogène (BrCN) : coupure en C-terminal des méthionines



En général, il y a peu de méthionines dans une protéine ce qui génère un nombre limité de coupures par le bromure de cyanogène.

ACIDES AMINES - PROTEINES

- Hydrolyse acide ménagée

La vitesse d'hydrolyse acide d'une protéine dépend de la nature de ses acides aminés : Val-Gly est coupé 100 fois plus vite que Gly-Gly.

Cette méthode n'est pas utilisable de façon pratique sauf exception :
liaison Asp-Pro.

Les liaisons Asp-Pro sont clivées **spécifiquement** par l'acide formique (HCOOH 70% pendant 24 à 96h et entre 20 et 40° C).

Il y a au bout d'un certain temps des coupures non spécifiques (dues au faible pH). En outre, les coupures n'étant pas complètes, il existe des **peptides chevauchants**.

ACIDES AMINES - PROTEINES

Il existe de nombreux enzymes protéolytiques **spécifiques** de l'hydrolyse de liaisons peptidiques entre acides aminés particuliers.

- Trypsine : coupe en C-terminal des **acides aminés basiques** Lys-Arg

Attention : parfois coupures partielles



→ 1 tripeptide, 1 tétrapeptide et 1 pentapeptide

- Chymotrypsine : coupe en C-terminal des **a.a. aromatiques** Phe, Tyr, Trp



→ 1 dipeptide et 2 pentapeptides

- endoprotéase V8 (*Staphylococcus aureus*) : côté C-terminal de **Glu**, parfois de **Asp**



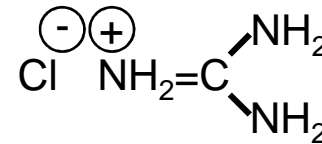
→ 1 tétrapeptide et 1 octapeptide

ACIDES AMINES - PROTEINES

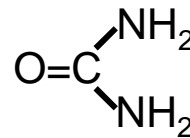
En général, les protéines **résistent** à l'action des protéases lorsqu'elles sont sous leur forme native.

Il est donc nécessaire d'utiliser des **agents dénaturants** (vont désorganiser la structure de la protéine) :

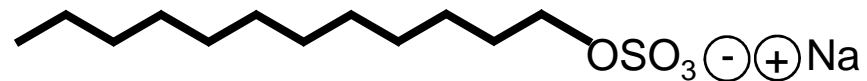
- chlorure de guanidinium 6 M



- urée 8 M



- SDS



1 DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES

1. Séquençage de la protéine elle-même

- clivage d'une protéine en peptides
protéases
réactifs chimiques

- **méthode d'Edman**

cycles de réaction permettant
l'enlèvement de l'acide aminé N-terminal

Intérêts de la détermination de la séquence en acides aminés d'une protéine

1. La séquence d'une protéine est son identité:

-indispensable pour comprendre son mécanisme d'action au niveau moléculaire et essentielle pour la détermination de la structure tridimensionnelle

2. Permet d'identifier le gène

3. Comparaisons de séquences:

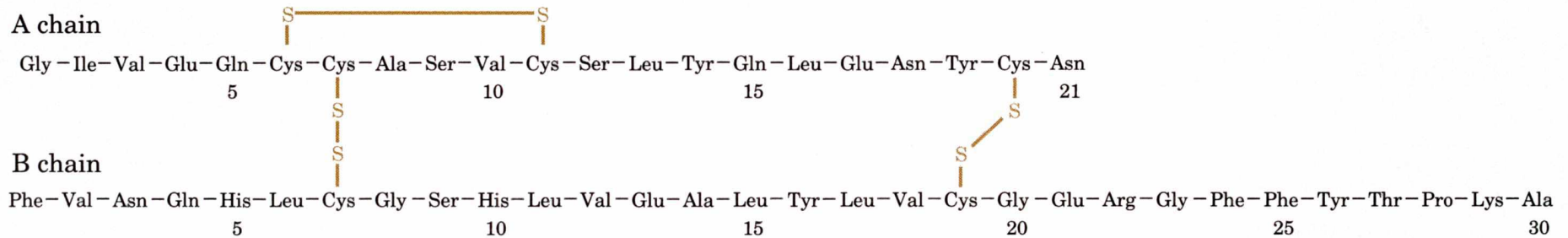
-identification des résidus les plus conservés (les plus importants pour la fonction)

-étude de l'évolution

-applications cliniques car beaucoup de maladies héréditaires sont dues à des mutations qui modifient la nature d'un acide aminé dans une protéine

La première détermination de la séquence complète en acides aminés d'une protéine - l'insuline de boeuf par Fred Sanger en 1953

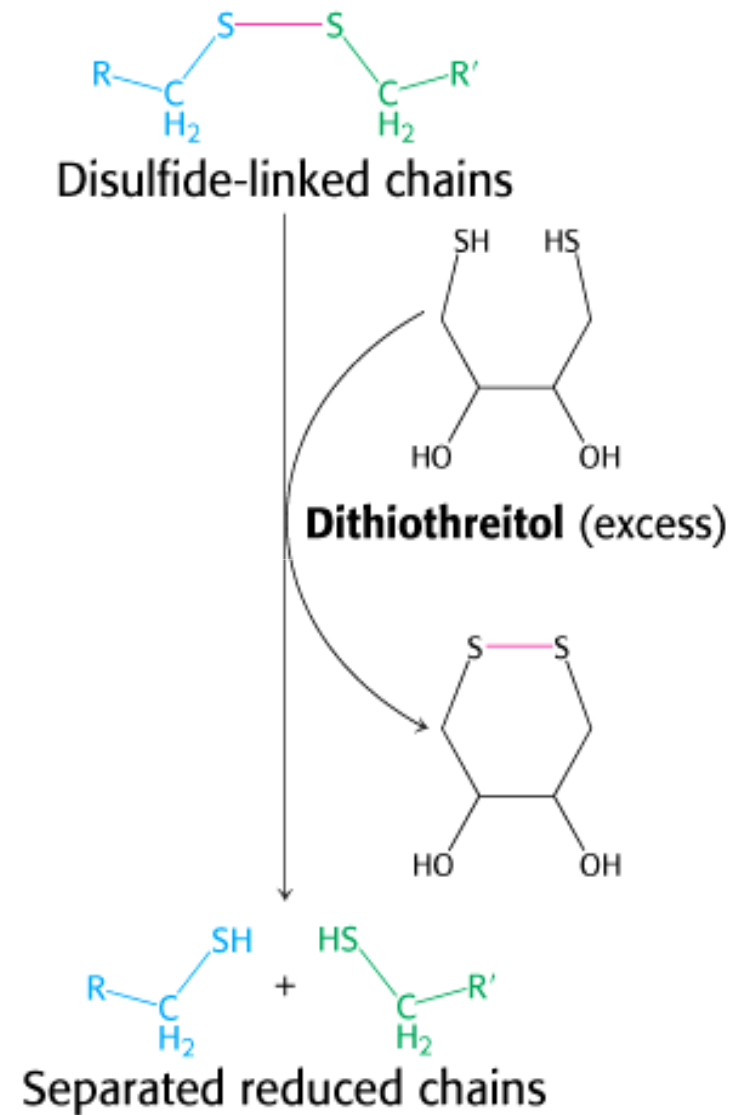
L'élucidation de la structure primaire a nécessité plus que 10 ans de travail et environ 100g de protéine!



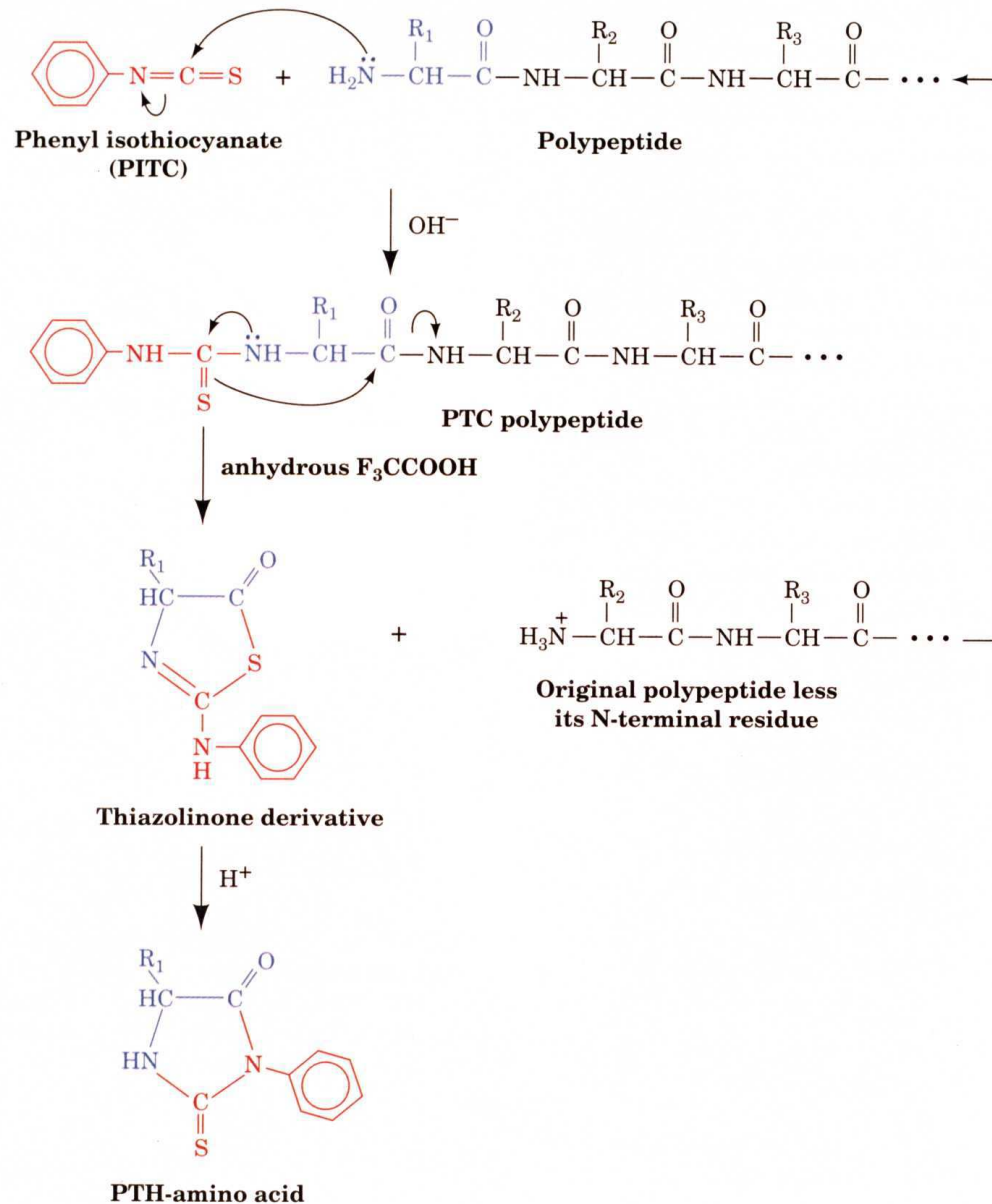
Structure primaire de l'insuline bovine. Remarquez les ponts disulfure intra- et intercaténaire

A. Coupure des ponts disulfure

1. Permet la séparation des chaînes polypeptidiques si elles sont liées par ponts disulfure
2. Empêche la conformation native qui pourrait résister à l'action des agents protéolytiques



Séquençage d'Edman



- Ne permet pas de d'aller au delà d'une cinquantaine de résidus d'acides aminés
- Protéine "moyenne" contient 500 acides aminés

B. Réactions d'hydrolyse spécifiques de liaisons peptidiques

a. La trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques après des résidus chargés positivement

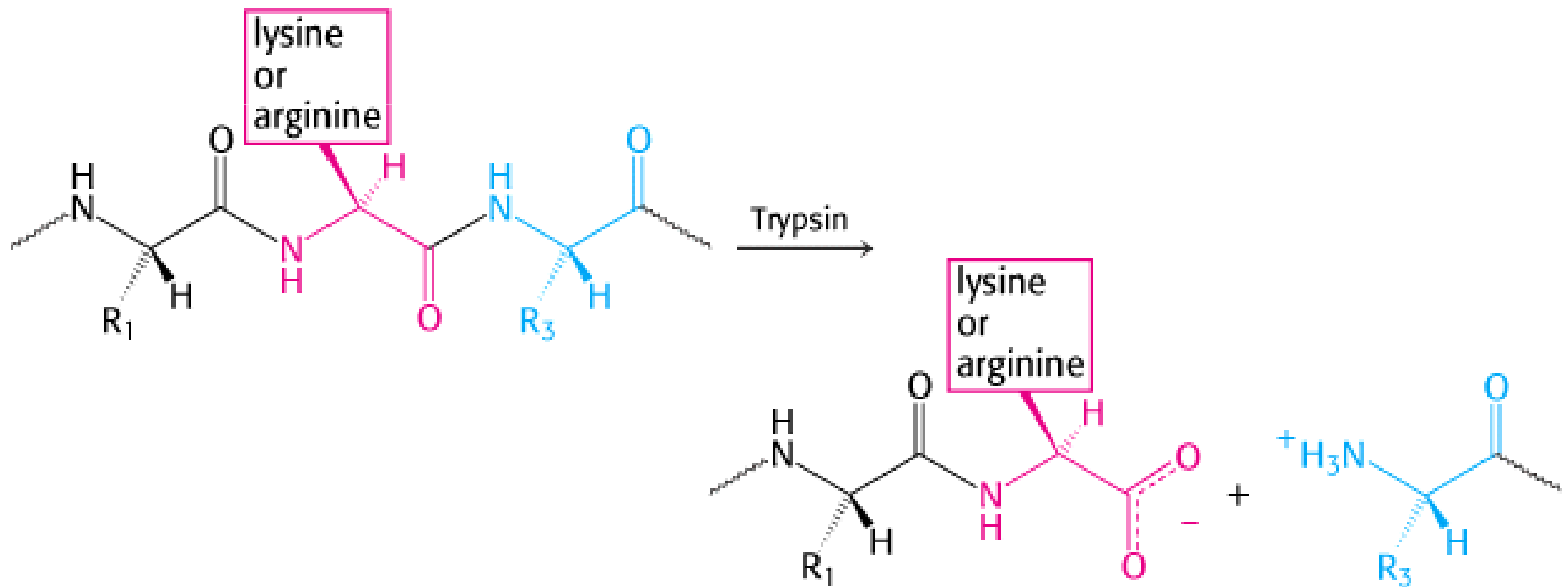
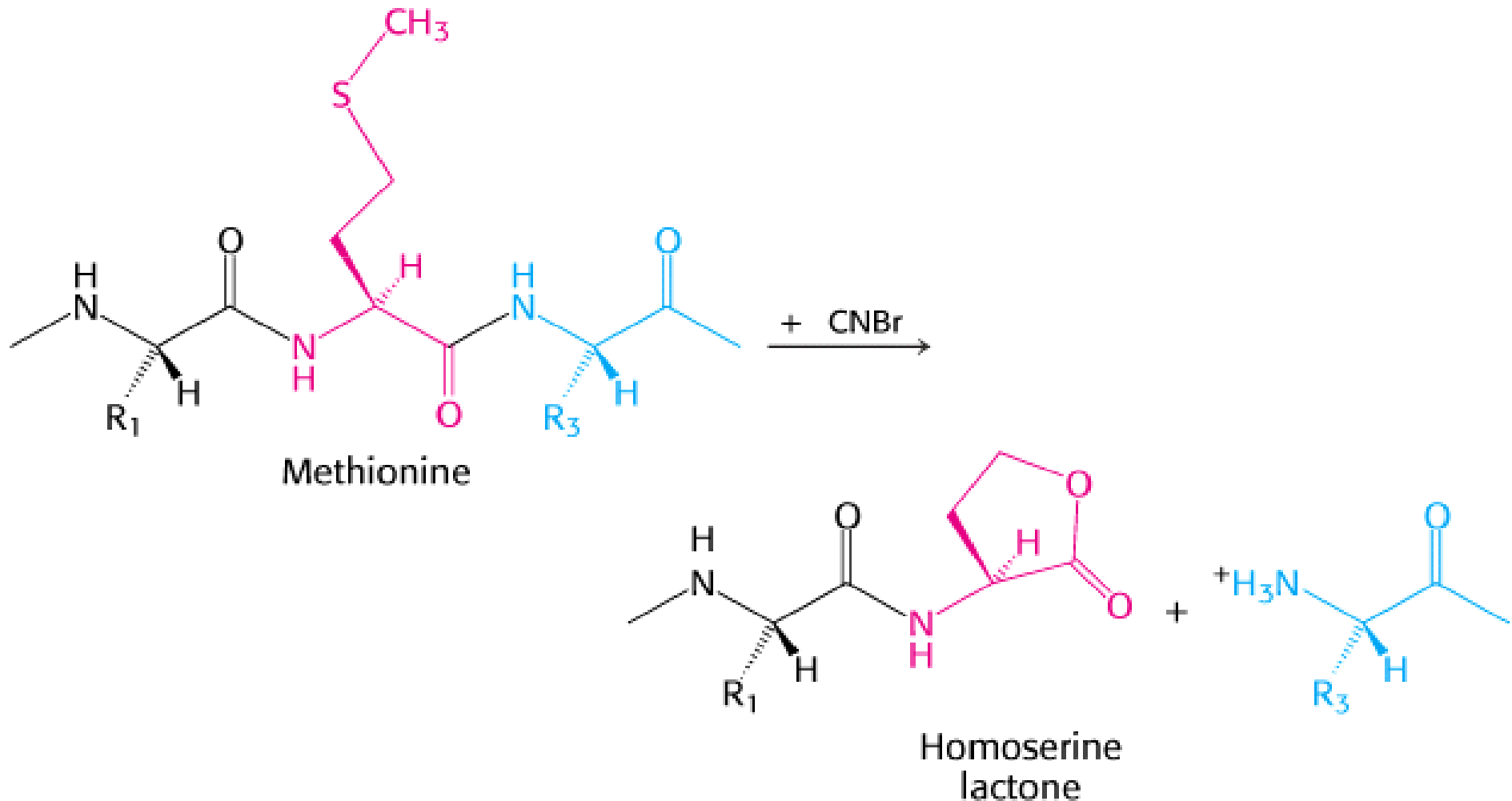


TABLE 6-2. SPECIFICITIES OF VARIOUS ENDOPEPTIDASES

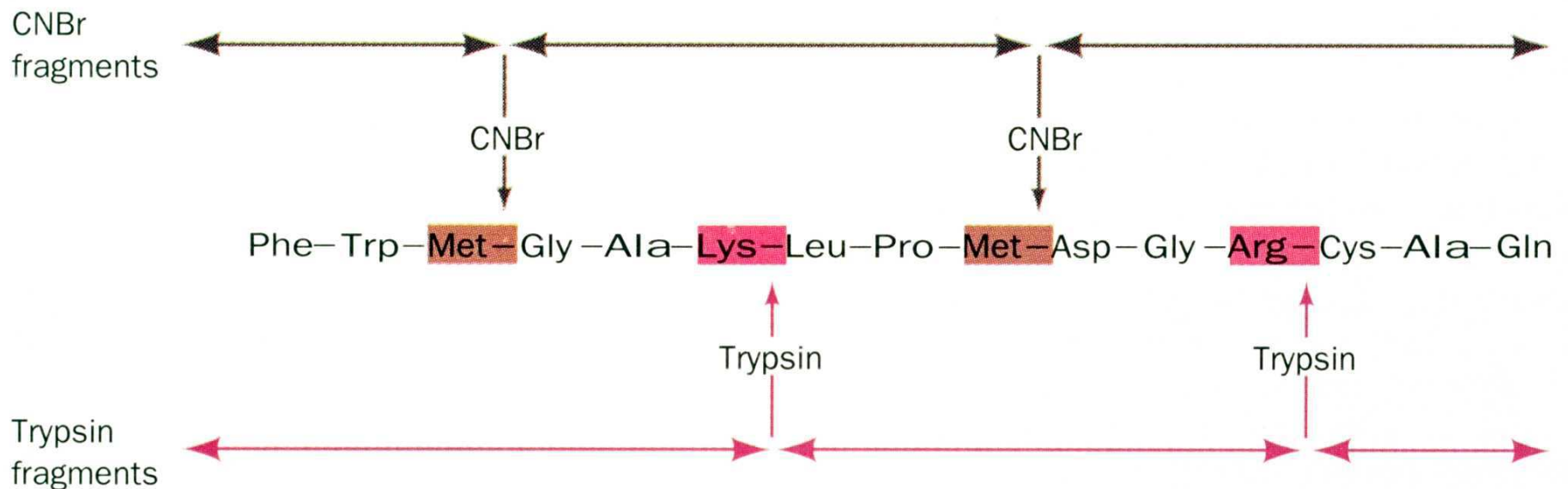
Enzyme	Source	Specificity	Comments
		$ \begin{array}{c} R_{n-1} \quad O \\ \quad \parallel \\ -NH-CH-C-NH-CH-C- \\ \quad \quad \\ R_n \quad O \\ \text{Scissile} \\ \text{peptide bond} \end{array} $	
Trypsin	Bovine pancreas	R_{n-1} = positively charged residues: Arg, Lys; $R_n \neq$ Pro	Highly specific
Chymotrypsin	Bovine pancreas	R_{n-1} = bulky hydrophobic residues: Phe, Trp, Tyr; $R_n \neq$ Pro	Cleaves more slowly for R_{n-1} = Asn, His, Met, Leu
Elastase	Bovine pancreas	R_{n-1} = small neutral residues: Ala, Gly, Ser, Val; $R_n \neq$ Pro	
Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	R_n = Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val; $R_{n-1} \neq$ Pro	Occasionally cleaves at R_n = Ala, Asp, His, Thr; heat stable
Pepsin	Bovine gastric mucosa	R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr; $R_{n-1} \neq$ Pro	Also others; quite nonspecific; pH optimum = 2
Endopeptidase V8	<i>Staphylococcus aureus</i>	R_{n-1} = Glu	

b. Le bromure de cyanogen (CNBr) hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques après les résidus méthionine



C. Détermination de la séquence

La protéine est tout d'abord coupée en fragments par des protéases avant leur séquençage par la méthode d'Edman. La séquence du polypeptide original est obtenue en comparant les séquences en acides aminés d'une série de fragments peptidiques avec celles d'une deuxième série dont les sites d'hydrolyse recouvrent ceux de la première série:



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



K

F - A - M - K

K - F - A - M

Q - M - K

D - I - K - Q - M

G - M - D - I - K

Y - R - G - M

Y - R

Le CNBr hydrolyse
spécifiquement après
Met i.e M - X

D - I - K - Q - M

K

K - F - A - M

Y - R - G - M

La trypsine hydrolyse les
liaisons peptidiques après
des résidus chargés
positivement (K, R)

Q - M - K

G - M - D - I - K

F - A - M - K

Y - R