

UNIVERSITE 3 CONSTANTINE
FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE MEDECINE
I^{ERE} ANNEE MEDECINE

DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

- I. INTRODUCTION.**
- II. Détermination de la COMPOSITION.**
 1. Hydrolyse chimique.
 2. Hydrolyse enzymatique.
- III. Détermination de la séquence.**
 1. DETERMINATION DE L'EXTREMITE C TERMINALE.
 2. DETERMINATION DE L'EXTREMITE N TERMINALE.
 - a. Dansylation.
 - b. Réaction de Sanger.
 - c. Méthode d'Edman.
 3. COUPURE SELECTIVE DE LIENS PEPTIDIQUES.

I. INTRODUCTION :

Toutes les protéines de toutes les espèces, quelques soient leurs fonctions (enzymes, hormones, protéines de structure...) sont formées d'un même ensemble de 20 acides aminés. Elles diffèrent les unes des autres simplement parce qu'elles ont un nombre distinct et une séquence distincte de résidus d'acides aminés.

La connaissance de la séquence en acides aminés d'une protéine c'est-à-dire de sa structure primaire est fondamentale en biochimie.

En effet, en 1953 Frederick Sanger a découvert la séquence des acides aminés composant les deux chaînes polypeptidiques de l'insuline.

L'étude de la structure primaire d'une protéine consiste à déterminer :

- **quels sont les acides aminés?**
- **combien ?**
- **quelle est la séquence?**

II. Détermination de la composition :

Le but est de connaître la nature et le nombre des acides aminés constitutifs qui passe par une hydrolyse de toutes les liaisons peptidiques.

- Hydrolyse chimique.
- hydrolyse enzymatique.

1. Hydrolyse chimique.

- L'hydrolyse de la protéine est catalysée par l'acide chlorhydrique (HCl-H₂O) 6N à 110°, 24 heures) et dans un tube sans air pour empêcher les réactions d'oxydation
- L'hydrolyse complète fournit un mélange des acides aminés.
- Ces derniers sont analysés (par chromatographie à échange d'ions) : la chromatographie les sépare par passage à travers une colonne et "élution" par des mélanges tampons à pH croissants (analyseur d'acides aminés).
- On enregistre, à la sortie de la colonne, la succession des acides aminés qui sont identifiés et dosés par comparaison avec des acides de référence.

■ Inconvénients de la méthode :

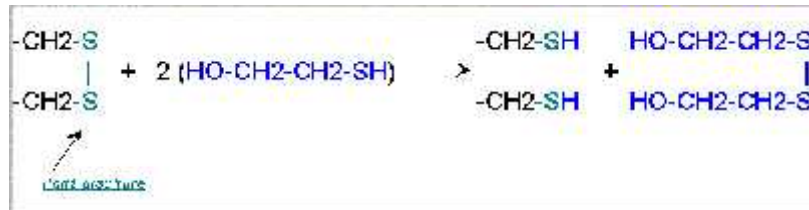
- Certains acides aminés sont **transformés (GLN en GLU et ASN en ASP)**.
- L'acide aminé tryptophane est **entièrement détruit**
- Certains aminoacides (Tyr, Ser, Thr) peuvent être **partiellement détruits** (un temps d'hydrolyse plus faible permet de résoudre le problème).

2. Hydrolyse enzymatique

- l'hydrolyse peut être catalysée par un **mélange de protéases**.
- **L'analyse de l'hydrolysate passe par une séparation des acides aminés (par chromatographie et par leur détection.**
- **Remarque :**



- Les ponts disulfures entre deux résidus cystéine d'une même chaîne ou entre deux chaînes doivent être rompus.
- Ce clivage doit s'effectuer dans des conditions qui ne permettent pas le rétablissement des ponts d'origine.
- Il se fait généralement par réduction en utilisant un composé à fonction thiol -SH le β -Mercaptoéthanol.



III. Détermination de la séquence :

1. Détermination de l'extrémité C-terminale:

La détermination de l'acide aminé c terminale se fait en général en utilisant une dégradation limitée à l'aide des carboxypeptidases.

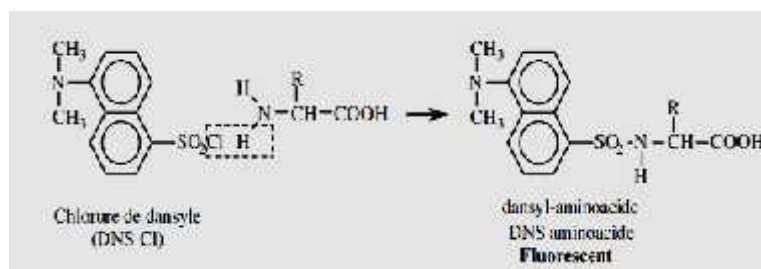
2. Détermination de l'extrémité N terminale:

L'acide terminal est identifié par:

- Dansylation.
- la réaction de SANGER.
- B. Dégradation d'EDMAN.

a. Dansylation.

On utilise en général le chlorure de Dansyl et après hydrolyse chimique complète du peptide, on identifie le Dansyl-aminoacide).

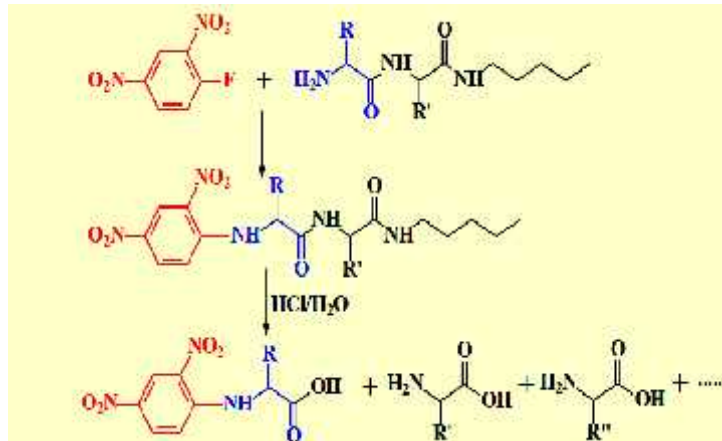


Inconvénients:

- Cette technique ne permet de connaître que le premier acide aminé.
- L'hydrolyse finale peut fournir **la composition** et pas l'ordre d'assemblage des acides aminés. La présence de **lysine** dans le peptide va perturber cette méthode puisque **la chaîne latérale** de ce résidu porte un **groupe -NH2** qui réagira avec le **DNS-Cl**.

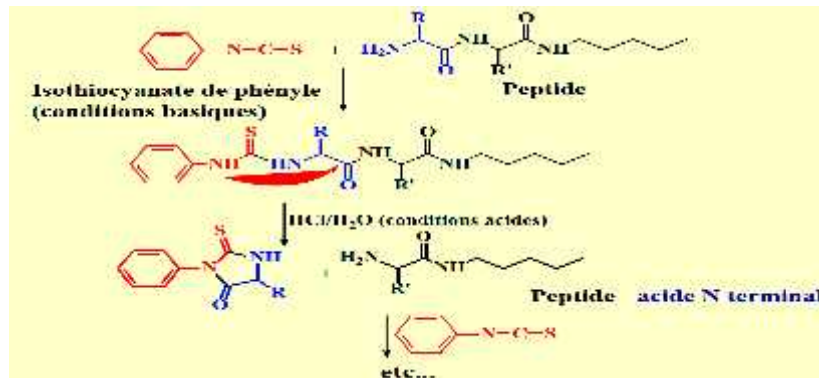
b. la réaction de SANGER :

L'acide aminé N terminal est reconnu par son produit de condensation avec le réactif de Sanger et l'ensemble des produits est analysé par chromatographie.



c. La méthode d'Edman

- L'isothiocyanate se fixe sur l'acide N terminal du peptide en milieu basique, et après une réaction de cyclisation, se décroche en milieu acide, en formant une hydantoïne qu'on peut identifier par son temps de rétention sur une colonne de chromatographie.
- Le reste du peptide peut recommencer la réaction avec une nouvelle molécule d'isothiocyanate pour identifier l'acide aminé suivant.
- Cette opération est applicable environ 60 fois de suite et permet de déterminer la séquence de peptides courts.

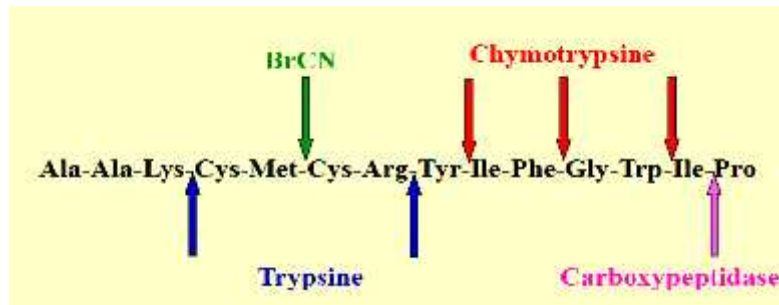


3. Coupure sélective de liens peptidiques :

- Pour les peptides à longue chaîne, on fragmente en morceaux plus petits qui sont ensuite séquencés par d'autres méthodes (par exemple Edman).
- Les réactifs de fragmentation, parmi lesquels des enzymes appelés protéases, catalysent la rupture de la chaîne protéique en des endroits spécifiques.

Points de rupture:

- Chymotrypsine : le CO de Tyr, Phe et Trp.
- Trypsine : le CO de Lys et Arg.
- BrCN : le CO de Met.

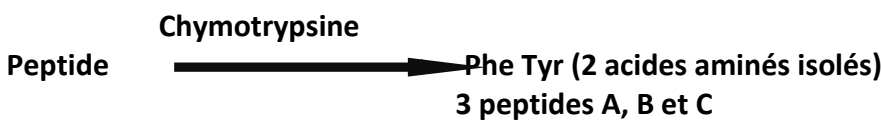


Exemple :

Un échantillon du peptide inconnu est d'abord hydrolysé totalement (HCl 6N, 110°, 24 H) et par l'analyseur d'acides aminés fournit la composition suivante :
20 acides aminés.

Ala Arg Cys Glu Gly Leu Lys Phe Pro Thr Tyr Val
2 1 2 1 2 2 1 2 1 1 2 3

La chaîne totale (20 acides aminés) est séquençable par la méthode d'Edman. Pour cet exemple, nous procédons cependant à la fragmentation par la chymotrypsine:



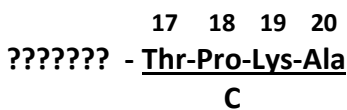
A, B et C sont séquençés par la méthode d'Edman:

A = Val-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe

B = Val-Cys-Ala-Leu-Tyr

C = Thr-Pro-Lys-Ala

La chymotrypsine ne coupe pas à droite de Ala: le fragment C est donc la séquence terminale. La carboxypeptidase confirme que Ala est bien l'acide C terminal.



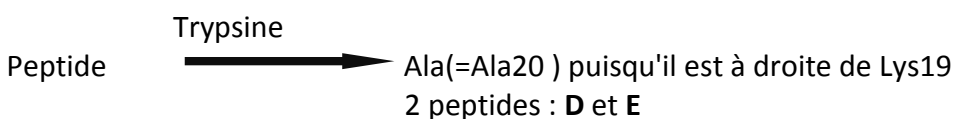
Un nouvel échantillon du peptide initial est soumis au clivage par la trypsine et il en sort 3 fragments.

D est séquençé par méthode d'Edman et on trouve :

D = Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys

E = Val-Cys-Ala-Leu-Tyr-Val-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg

Comme D se termine par Lys, il s'agit de Lys29 et la comparaison des séquences de C et D permet de mieux préciser l'extrémité du peptide.



La reconstitution de la séquence complète est aisément réalisée en partant du peptide porteur du C terminal et en cherchant les recouvrements des fragments.

Val-Cys-Ala-Leu-Tyr

Val-Cys-Ala-Leu-Tyr-Val-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg

Val-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe

Phe

Tyr

Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys

Ala

Thr-Pro-Lys-Ala

