

# LES PROTEINES

## PLAN DU COURS

- I. INTRODUCTION-DEFINITION
- II. FONCTIONS DES PROTEINES
- III. CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES
- IV. NIVEAUX D'ORGANISATION DES PROTEINES
- V. LES LIAISONS IMPLIQUEES DANS LA STRUCTURATION DES PROTEINES
- VI. STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES
- VII. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTÉINES
- VIII. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES.
- IX. DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES.

# LES PROTEINES

## PLAN DU COURS (première partie)

- I. INTRODUCTION-DEFINITION
- II. FONCTIONS DES PROTEINES
- III. CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES
- IV. NIVEAUX D'ORGANISATION DES PROTEINES
- V. LES LIAISONS IMPLIQUEES DANS LA STRUCTURATION DES PROTEINES
- VI. STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES
- VII. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTÉINES
- VIII. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES.
- IX. DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES.

# *OBJECTIFS PEDAGOGIQUES*

- ✓ Connaitre les différents niveaux d'organisation structurale des protéines
- ✓ Connaitre la relation structure-fonction
- ✓ Montrer l'importance biologique

# I. INTRODUCTION-DEFINITION

- 1835 aux Pays-Bas par le chimiste organicien Gerardus Johannes Mulder → **wortelstof** = substance racinaire
- en 1838 le suédois Jöns Jacob Berzelius → **protéine: prôtos** = *premier importance*
  - *Qtt : +1/2 du poids sec des  $\text{C}$*
  - *Qlt : participent à presque toutes les  $F(X)$   $\text{C}$*
- Macromolécules type polymère (Aa) : composée 1 ou +ieurs chaînes chaines polypeptidiques
- Structure déterminée génétiquement( traduction ARNm) +Taille prédéfinie
- Modification post-traductionnelles
- \$ et dégradées en permanence dans les  $\text{C}$



# II. Fonctions des protéines

- Les protéines (ou les protides) sont des éléments essentiels car elles ont des rôles très variés au sein d'une  $\mathcal{C}$  et au sein d'un organisme, chaque protéine joue un rôle particulier:
  - Structurale
  - Enz : catalysent les R
  - Hormone
  - Anticorps
  - Mvt ou contraction : actine et myosine  $\rightarrow$  contraction musculaire
  - Transport substances
  - Substrat énergétique

# III. CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES

❑ On classe les protéines selon leur composition en:

- **Monomérique** = 1 chaîne peptidique
- **Multimérique** = +sieurs chaînes peptidiques
- **Homomultimérique** = +ieurs chaînes peptidiques identiques
- **Hétéromultimérique** = +sieurs chaînes peptidiques différentes
- **Haloprotéine** = composée uniquement Aa
- **Hétéroprotéine** : comporte
  - Une partie protéique : apoprotéine
  - Une partie non protéique (appelée groupement prosthétiques)

□ On classe les protéines selon leur forme globale en:

➤ **Protéines fibreuses:** allongée / mince

- **Exemples:** le collagène, la kératine
- **Fx:** mécaniques et structurales

➤ **Protéines globulaires:** sphérique / compacte

- **Exemples:** Hb, Enz, Hne
- **FX:** activité biologique ∅

# Les protéines peuvent être liées

- **Lipide**=lipoprotéine
- **Glucide**=glycoprotéine
- **Métal**= métalloprotéine

# IV. NIVEAUX D'ORGANISATION DES PROTEINES

**La structure des protéines est définie à plusieurs niveaux :**

- ❑ **Structure primaire** : la séquence d'Aa (enchaînement Aa)
- ❑ **Structure secondaire** : structure 3D locale (interactions Aa voisins)
- ❑ **Structure tertiaire** : structure 3D globale (interactions Aa éloignés)
- ❑ **Structure quaternaire** : associations de plusieurs chaînes peptidiques  
/interactions entre sous unités

❖ La structure d'une protéine lui confère sa fonction  
(IIIaire, IVaire)

# I. Structure laire

- Séquence **linéaire** : l'enchaînement successif Aa nb > 100 reliés / **L .covalente = liaison peptidique = liaison amide**



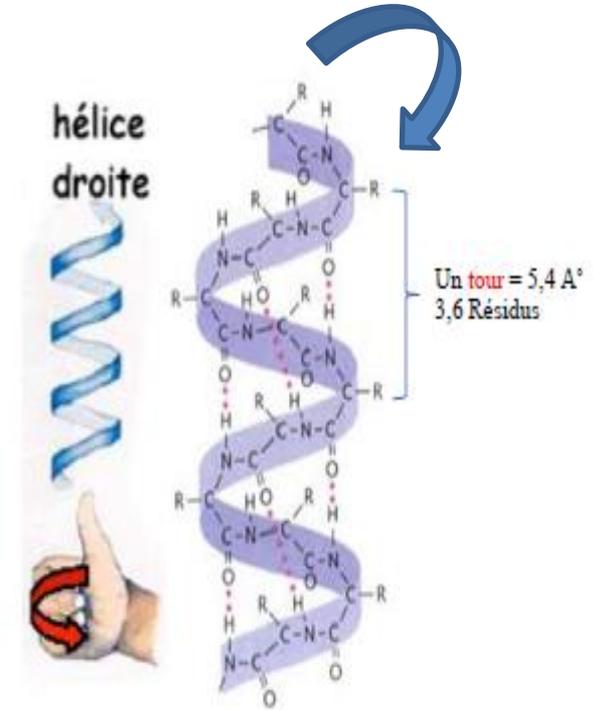
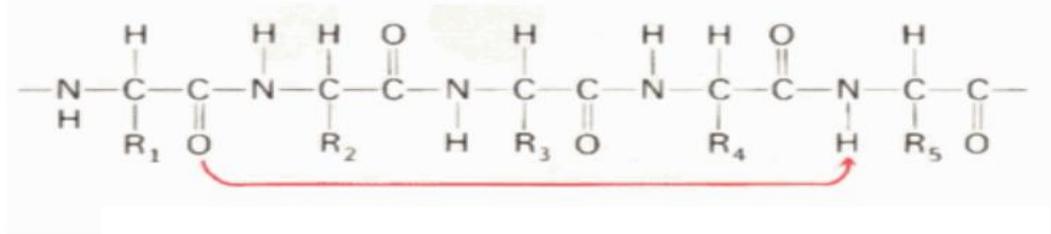
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	V	H	L	T	P	E	E	K	S	A	V	T	A	L...
Met	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu ...
N-term														C-term

## 2. Structure locale : structure 3D locale

- 1er stade de l'organisation **Toute la chaîne peptidique** ou d'une **séquence courte**
- Structure **non linéaire**
- **Stabilisées / L. hydrogènes** entre **CO** et **NH** L. peptidique
- +ieurs types de structures locale:
  - **Hélices  $\alpha$**
  - **Feuillet  $\beta$**
  - **Coude  $\beta$**

# 2-A/hélice $\alpha$

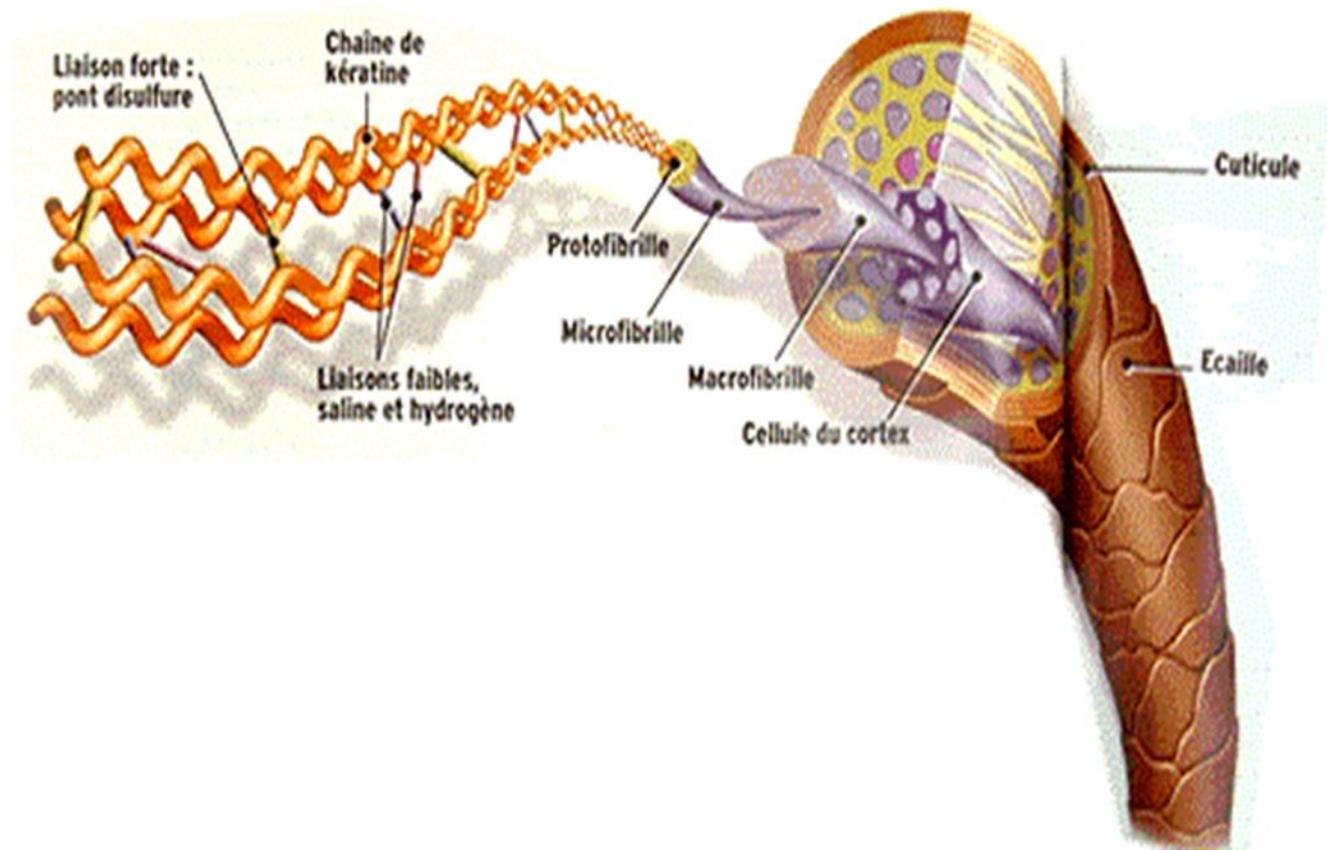
- **Rotation régulière** sur elle-même ( **en spirale** )  $\rightarrow$  **hélice droite** : Sens des aiguilles d'une montre
- **L. hydrogènes (LH)** établis à intervalles réguliers entre : **O** du **-C=O** (n) et **H** du **-NH** (n+3)
- **L. hydrogènes** : même direction hélice
- Les **R(Aa)** /orientés vers Ext de l'hélice



Les hélices  $\alpha$

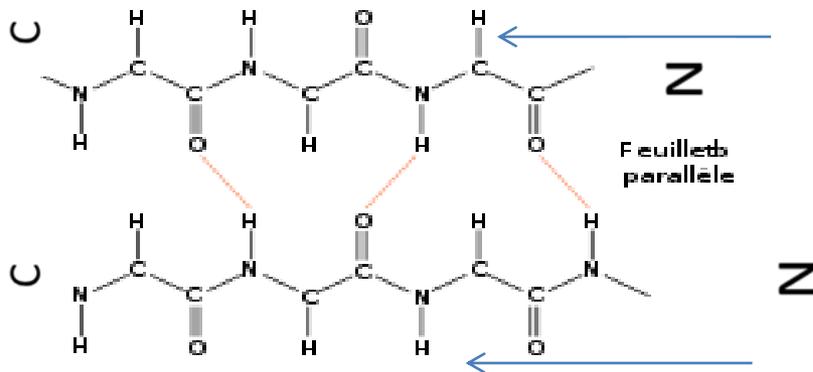
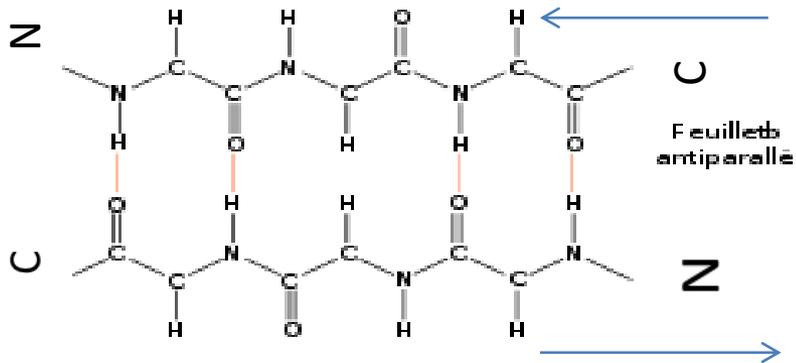
# Exemple

la **kératine** des **cheveux** : Pr<sup>-</sup> **fibreuse** en **hélice  $\alpha$**  sur toute sa longueur



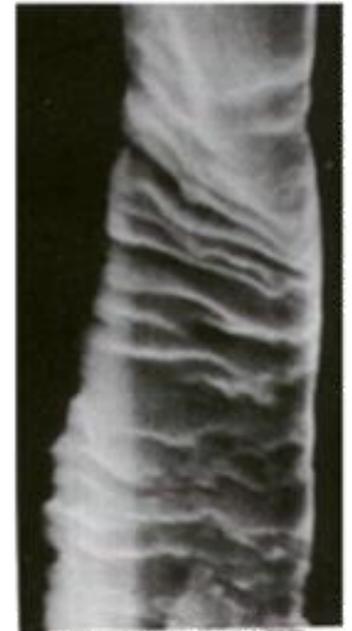


- On parle de feuillet  $\beta$  :
  - **Parallèles** : même sens
  - **Antiparallèles** : directions opposées ( + stable )



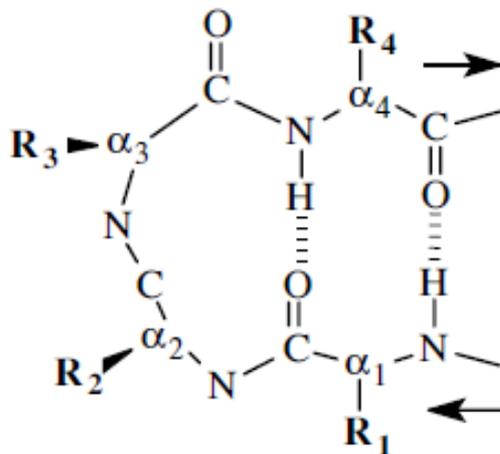
# Exemple

✓ **Fibroïne** : le ver à soie → Fil de soie → **Feuillets plissés  $\beta$** .

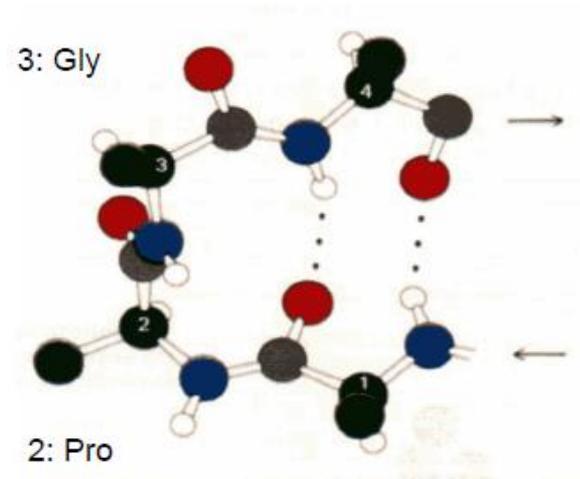


feuillets plissés  $\beta$  

- **2-C/Coude $\beta$** : permet le changement de direction des chaines poly peptiques des **Feuillets  $\beta$  anti-//**
- La chaine tour en **U** formée de 4 résidus : **L.H** entre O du -C=O du R<sub>n</sub> et H du N-H du R (n+3).
- Gly et Prol +++



Coude  $\beta$  à 4 résidus

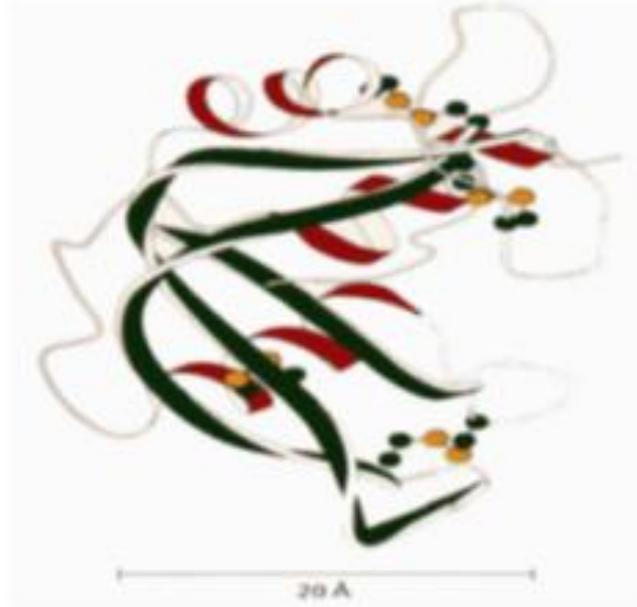


# 3-Structure tertiaire

- Organisation des **structures tertiaires** entre elles → **molécule gd taille**
- Elle est stabilisée par :
  - liaisons non covalentes:
    - hydrogènes
    - ioniques
    - hydrophobes
    - Van Der Waals
  - /X L.covalentes :ponts disulfure
- N'est pas figée : se modifier (tordre, déformer) / ligands ,pH , T°= **Forme native(biologiquement active)**
- Exemple :**myoglobine, ribonucléase**

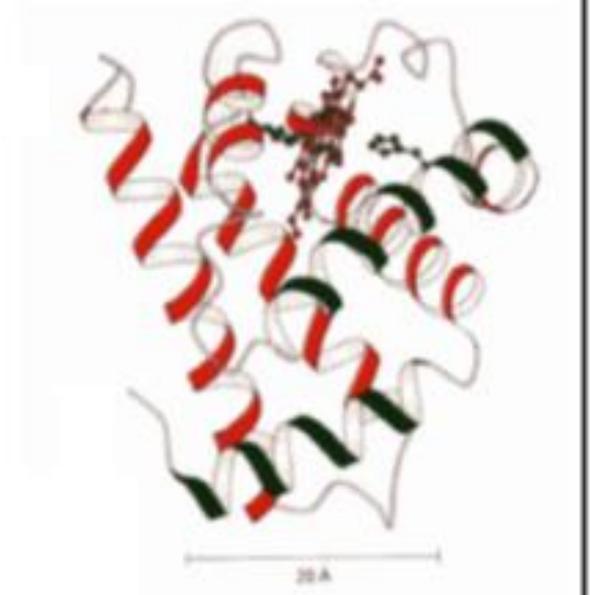
- **la ribonucléase:**

- 124 Aa
- 3 Hélices  $\alpha$
- +ieures Feuilletts  $\beta$
- 4 S-S



- **la myoglobine Mb :** Métalloprotéine

- **Pr-** (>70 % Mb) :8 Hélices
- **Non Pr-** : **Héme**



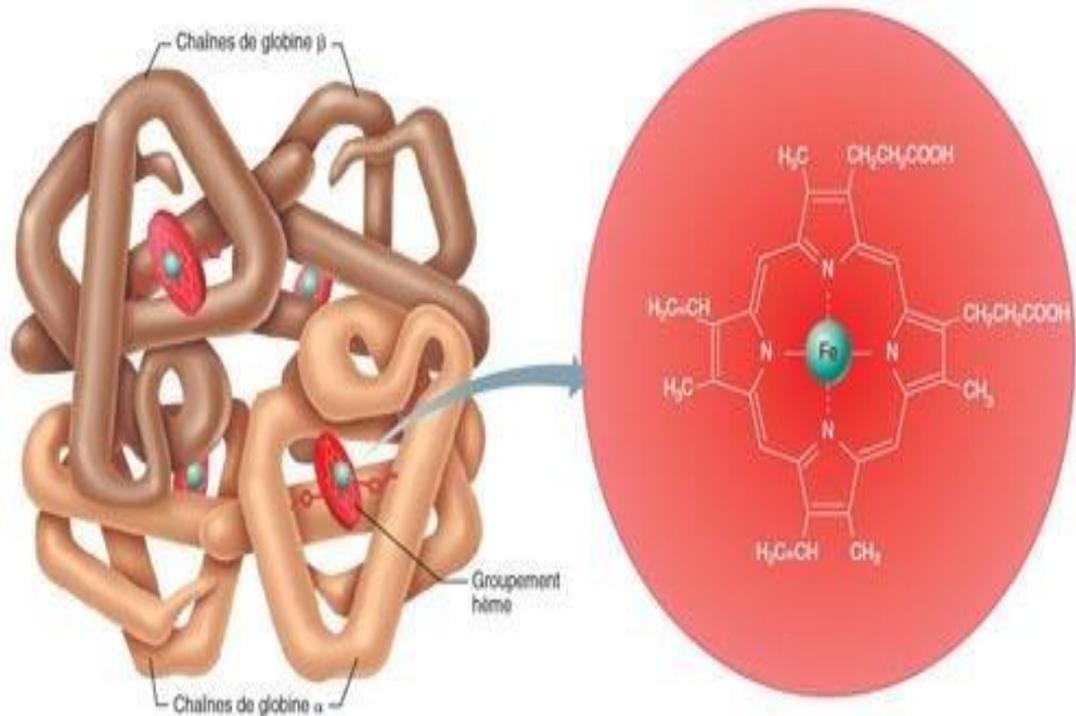
# 4-Structure quaternaire

- Association **+ieurs** chaines polypeptidiques ( **Illaire** ) =**sous-unités** = **protomères**
- **1 Pr** ayant **F(X) unique** (enz , ribosomes)
- Les sous-unités :
  - Identiques → **homopolymères**
  - Différentes → **hétéropolymères**
- sous-unités Unies /
  - **L. faibles** :
    - L. hydrogène
    - L. hydrophobe
    - L. ionique
    - Force (L. )de van der waals
  - **L. covalentes** : **ponts disulfures**

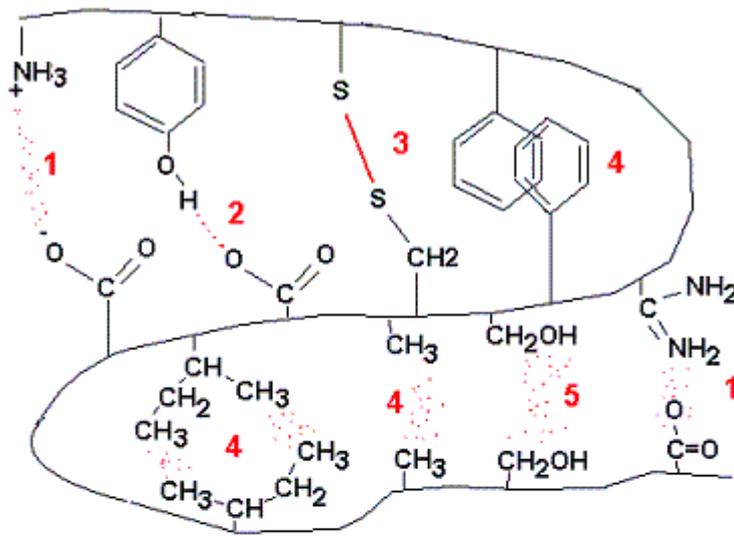
# Exemple de structure quaternaire Hb

## Hémoglobine Hb

- Adulte **HbA** (95%) : **Métalloprotéine**
  - partie **Pr-** : 4 sous-unités ( globine ) : **Hétérotétramères**  $2\alpha 2\beta$
  - partie non **Pr-** : **Hème**
- F(x) Hb transport de l' O<sub>2</sub>



- Quels sont les forces d'interactions, quelles sont les liaisons qui peuvent s'établir entre les acides aminés constitutifs d'une protéine ?



- 1 —————> Liaison ionique
- 2 —————> Liaison hydrogène
- 3 —————> Liaison dissulfure
- 4 —————> Liaison hydrophobe



# V. LES LIAISON IMPLIQUES DANS LA STRUCTURATION DES PROTEINES

- **Liaisons covalentes:**
  - liaison peptidique
  - pont disulfure
- **Liaisons non-covalentes: 4 types**

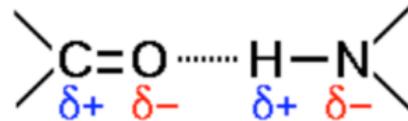
- Hydrogène → **IIaires**
- Hydrophobe
- Ionique
- Liaison de van der waals



# 1. Liaison hydrogène

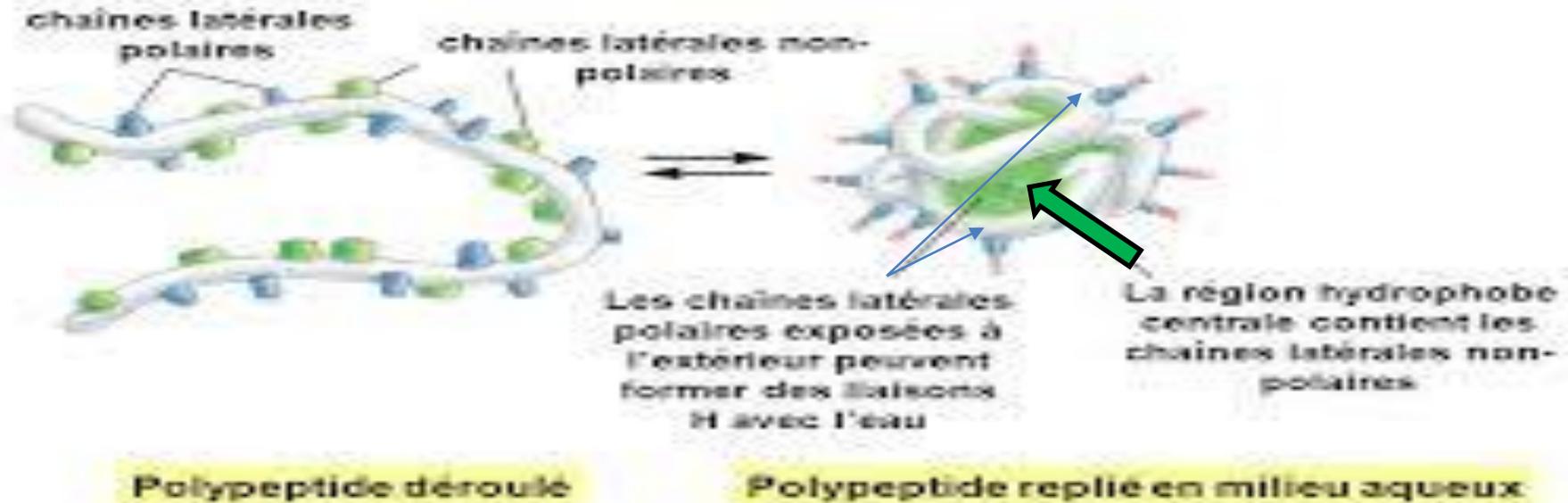
- H lié à un atome **électronégatif** se lie à **atome électronégatif** situé à proximité

Ponts hydrogènes



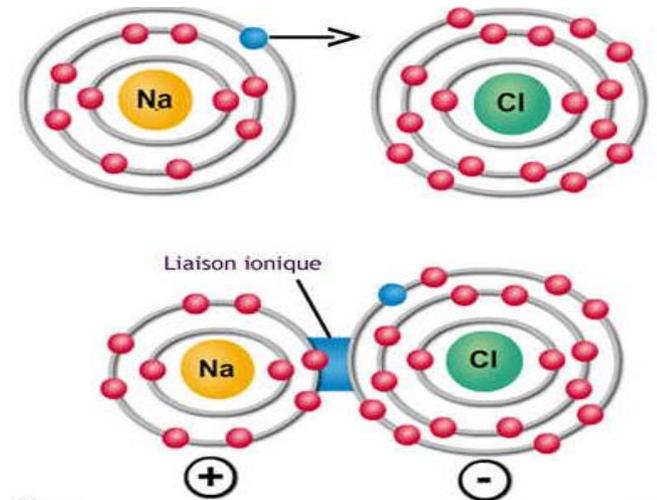
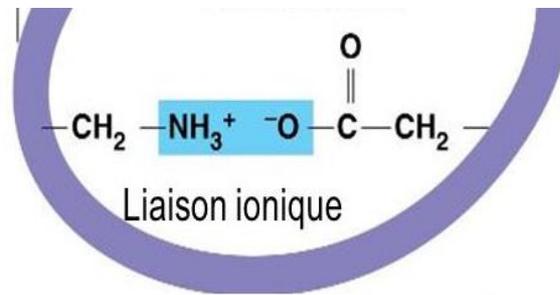
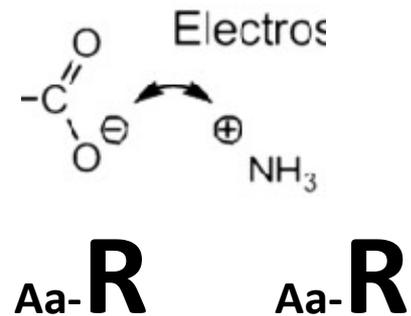
# 2. Liaison hydrophobe

Les forces hydrophobes participent au repliement des protéines



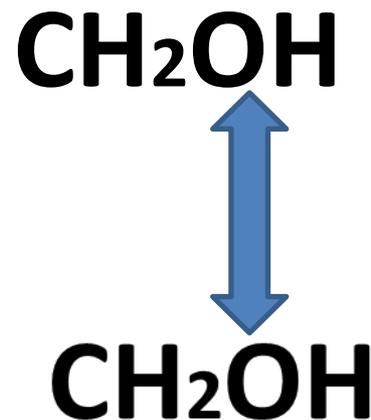
# 3. Les liaisons ioniques

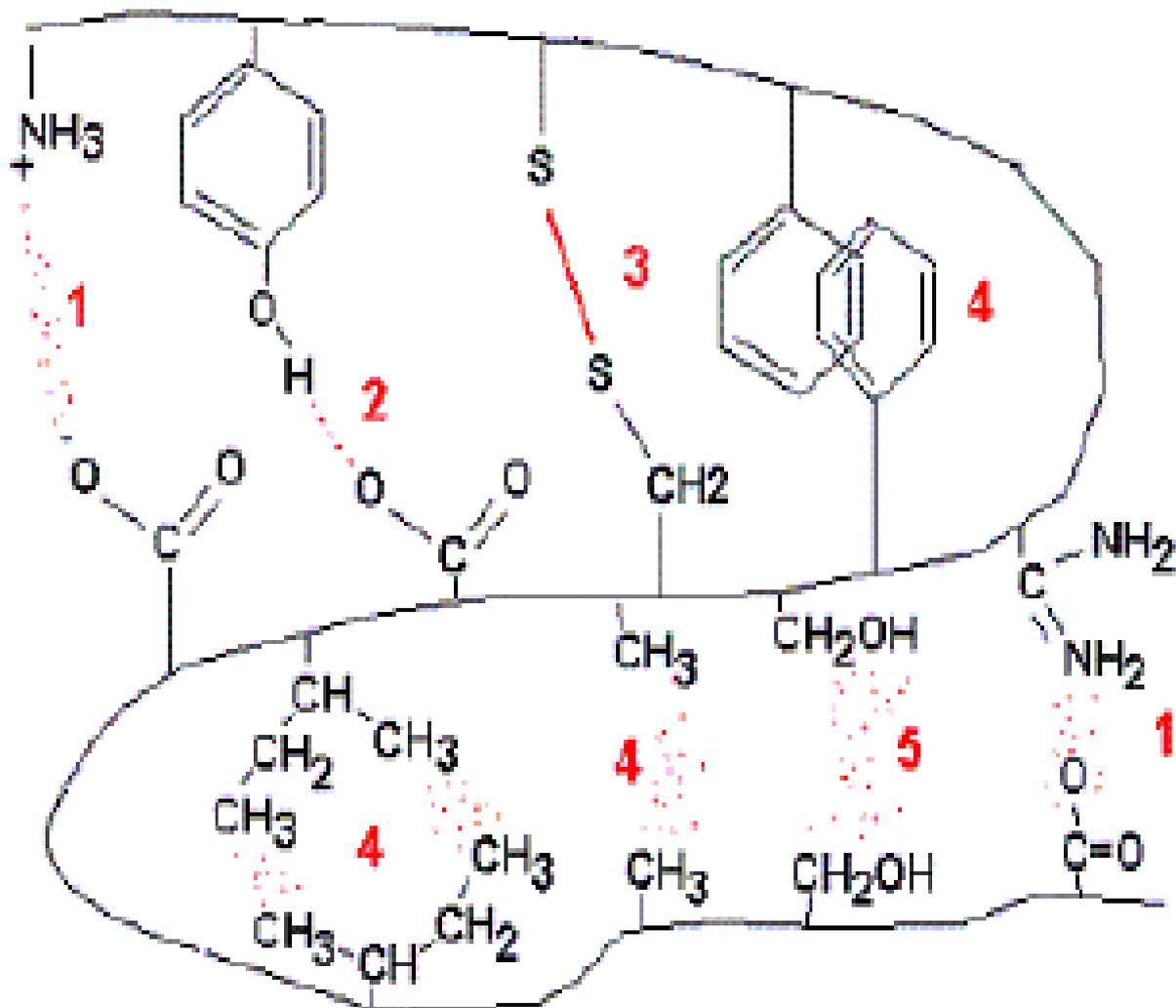
- Entre 2 Ions de charge opposée
- Atome chargé + (cation) cède 1 ou plusieurs électrons (oxydation)
- Atome chargé - (anion) capte électrons (réduction)



## 4. Liaison ou force de van der waals

- Un dipôle temporaire
- Atomes plus près possible → structure très compacte du cœur Pr-





# **VI.STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES**

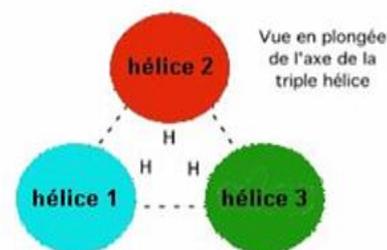
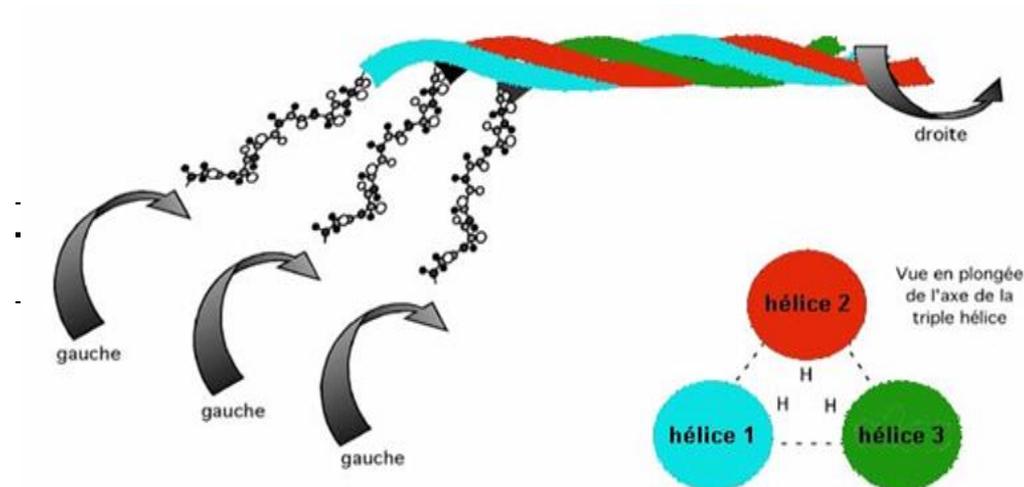
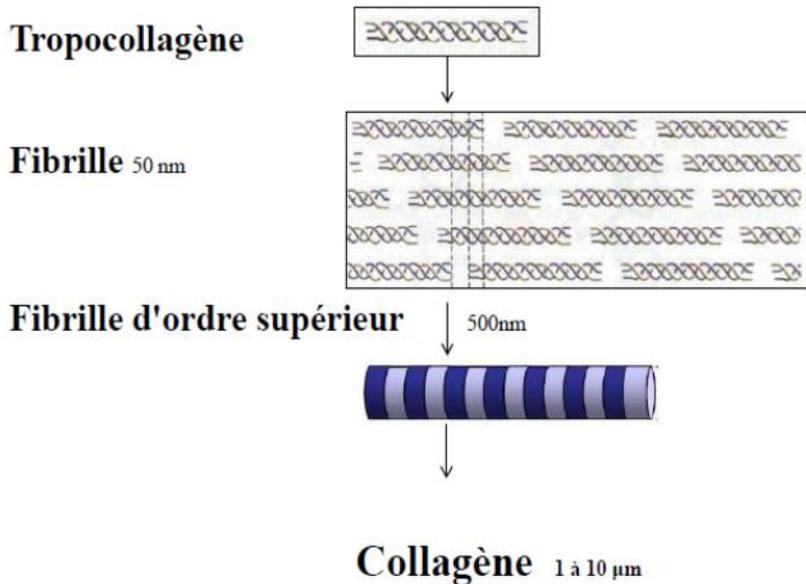
**1.Le Collagène**

**2.La Kératine**

# 1. Le collagène

- Pr- de la matrice **extra C** du **T. conjonctif** (**peau, os, tendons cartilage, Vx sanguins**)
- Protéine sécrétée par :
  - Fibroblastes (peau)
  - Chondroblastes (cartilage)
  - Ostéoblastes (os)
- ≠ types de collagène : type I, II, III (+90% collagène corps **type I** )

# 1. Le collagène

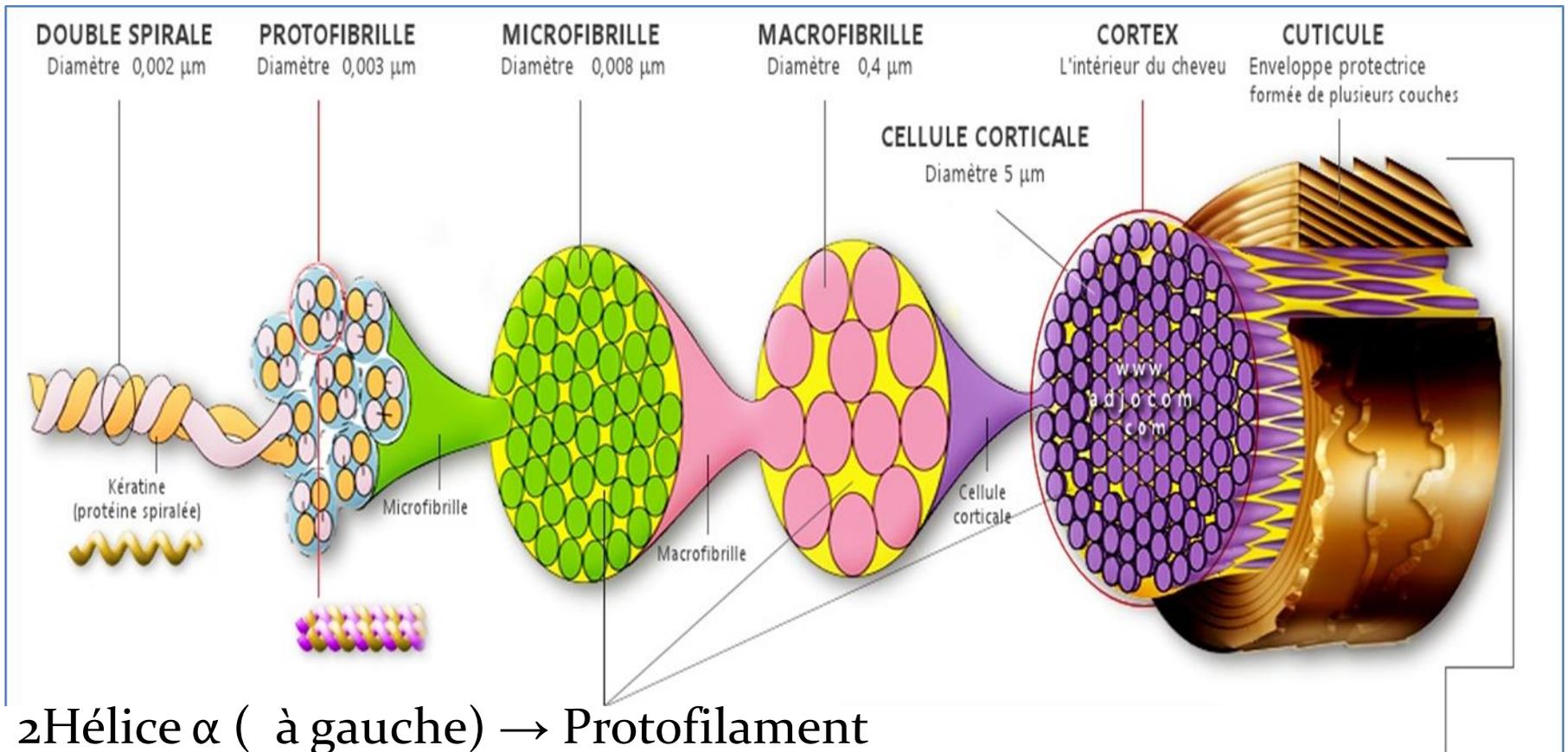


La chaîne latérale d'un résidu sur trois pointe à l'intérieur de la triple hélice: il faut donc que ce soit une glycine en raison du peu d'espace disponible

- **laire**: Réplétion 3Aa :Gly-X-Y (X= Pro, Y = **Hyp**)
- **laire Hélice** (pas à gauche)
- **3 Hélices** : super hélice → **Tropocollagène**

## 2. La Kératine

- ❑ Pr-résistante : chez les vertébrés supérieurs
- ❑ Constitue couche cornée externe de l'épiderme , ongles , cheveux , cornes et plumes
- ❑ 2 Types:
  - La kératine  $\alpha$ : hélice  $\alpha$  = mammifères et l'être humain (cheveux et ongles)
  - La kératine  $\beta$ : feuillet  $\beta$  plissés // =oiseaux (plumes) et reptiles(cornes)
- ❑ le cheveu:
  - ✓ Iaire : Chaîne polypeptidique 310Aa : Cys 14% (ponts S-S →rigidité + résistance)
  - ✓ IIaire : kératine  $\alpha$  : Hélice  $\alpha$  pas à droite
  - ✓ 2Hélice  $\alpha$  à gauche Protofilament



2 Hélice  $\alpha$  ( à gauche)  $\rightarrow$  Protofilament  
 2 Protofilament  $\rightarrow$  Protofibrille  
 04 Protofibrilles  $\rightarrow$  Microfibrille

**CHEVEU**

# VII. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTÉINES

- La diffraction des Rayons X
- La spectrophotométrie UV et IR
- La dispersion rotatoire optique (ORD)
- Le dichroïsme circulaire
- La fluorescence résonance paramagnétique électronique (RPE)
- La résonance magnétique nucléaire RMN

# VIII. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES.

- 1-MASSE MOLECULAIRE
- 2-CARACTERE AMPHOTERE DES PROTEINES
- 3-SOLUBILITE
- 4- STABILITE THERMIQUE DES PROTEINES
- 5-AUTRES PROPRIETES

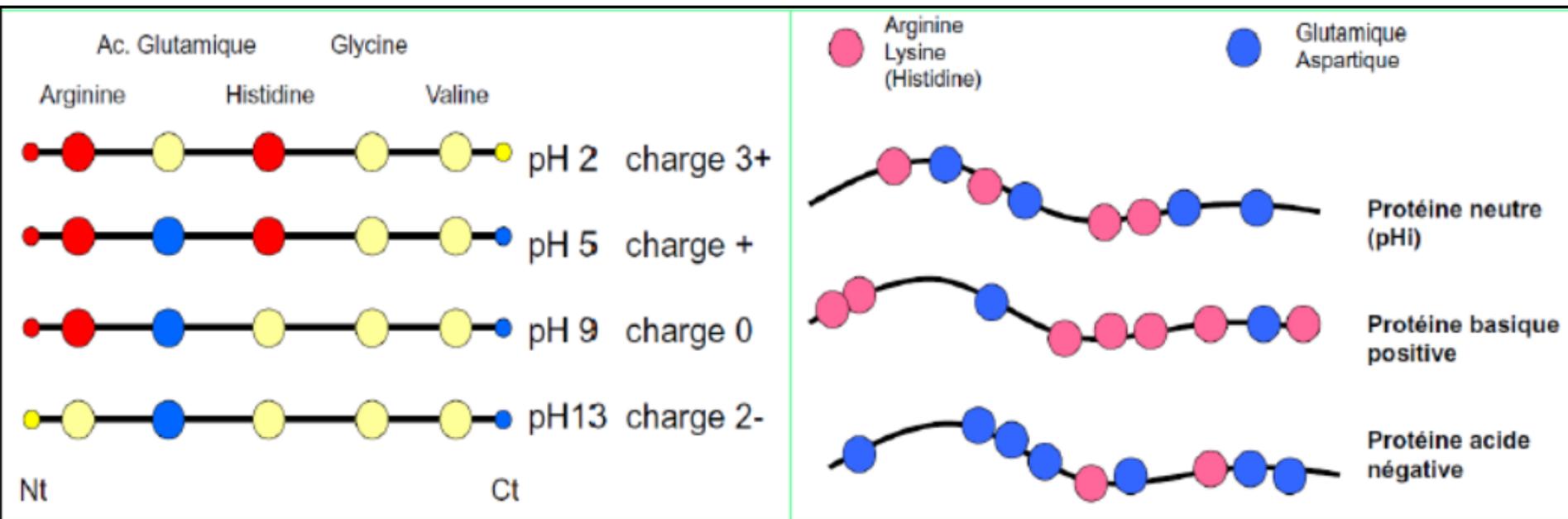
# 1-MASSE MOLECULAIRE.

- Mm exprimé en dalton (Da) ou kilodalton (KDa)
- Mm  $\approx$  10KDa (kilodalton) à plusieurs millions KDa
- Moyen de caractérisée ou de nommer une Pr-
- Exp : **Albumine** Mm = 67 000 (67 kDa)

Protéine	Masse moléculaire (dalton)
Cytochrome c	12300
Myoglobine	17200
Anhydrase carbonique	30000
Ovalbumine	42700
Albumine	66250
Ovotransferrine	76-78000

# 2-CARACTERE AMPHOTERE DES PROTEINES

- Les Aa constitutants de chaque Pr- sont des ampholytes:
  - ✓ NH<sub>2</sub> et COOH terminaux
  - ✓ Gp R (chaines latérales) Aa ionisables (Asp, Glu, His..)
- ❖ La charge nette globale Pr ≈ en F(X) du pH :
  - ✓ 1/2 acide : gp dissociés =NH<sup>2</sup> charge (+)
  - ✓ 1/2 basique : gp dissociés =COOH charge (-)
  - ✓ À pH = pHi la charge nette Pr=0



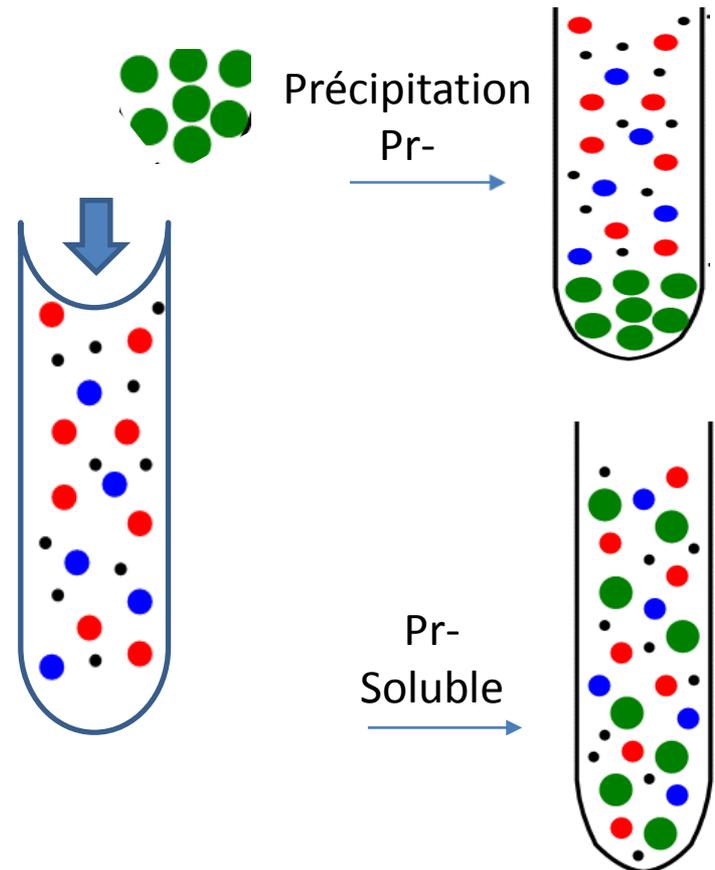
# 3-SOLUBILITE

## Définition:

Qtt Max du composé qui peut se dissoudre 1L de solvant considéré

-Elle est influencée  $\neq$  facteurs :

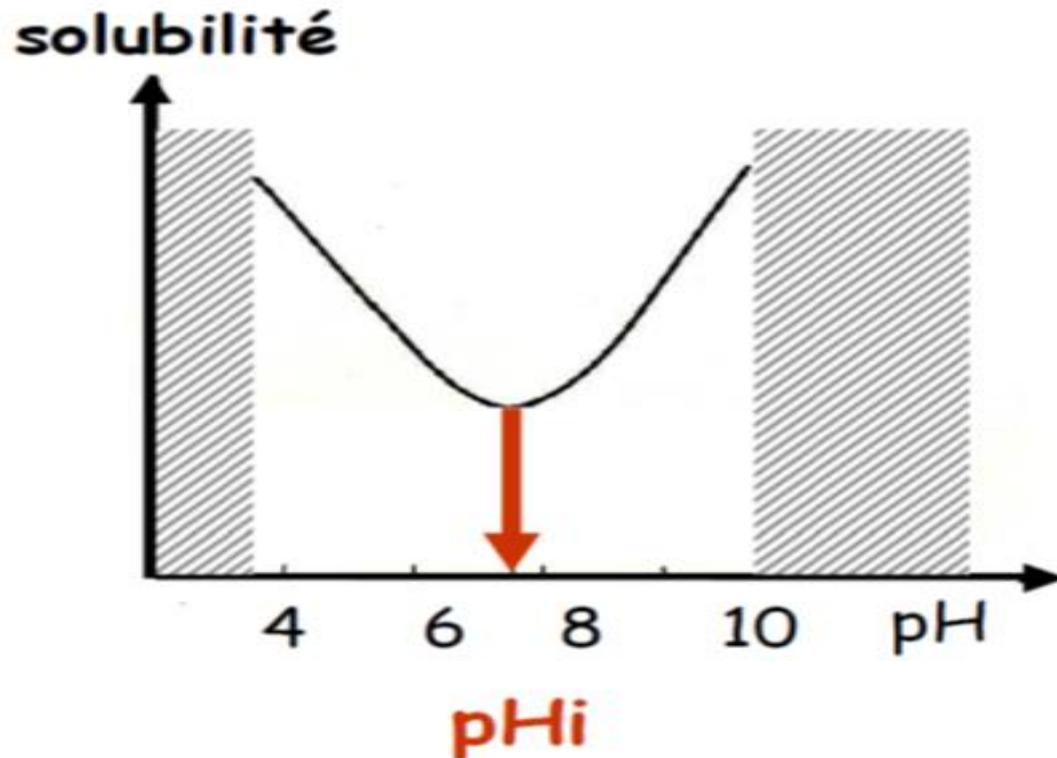
- A. pH
- B. Solvants organiques
- C. [sels] ou [Ions]



# 3-SOLUBILITE

## A. Influence du pH :

Au voisinage  $pH_i$  → formation d'agrégats Pr- = Pr-insolubles



# 3-SOLUBILITE

## B. Influence des solvants organiques :

H<sub>2</sub>O ⇒ effet solubilisant (Pr- soluble)

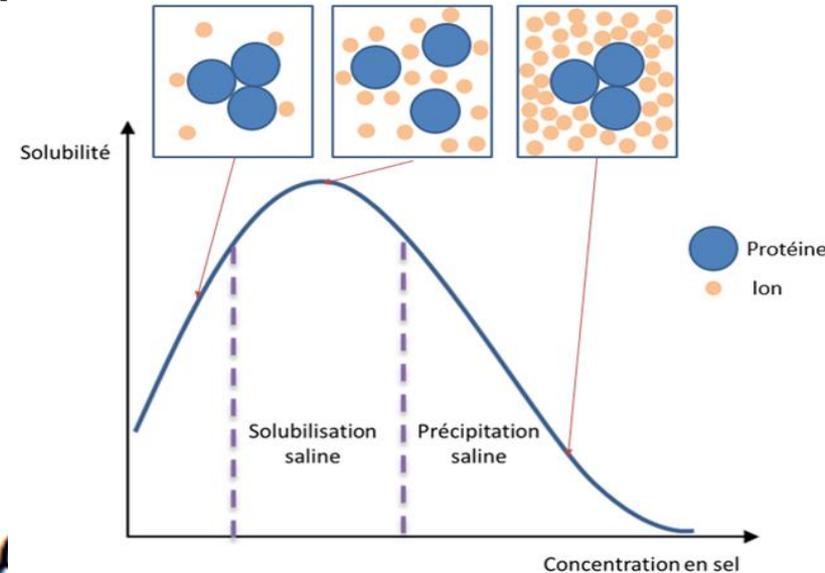
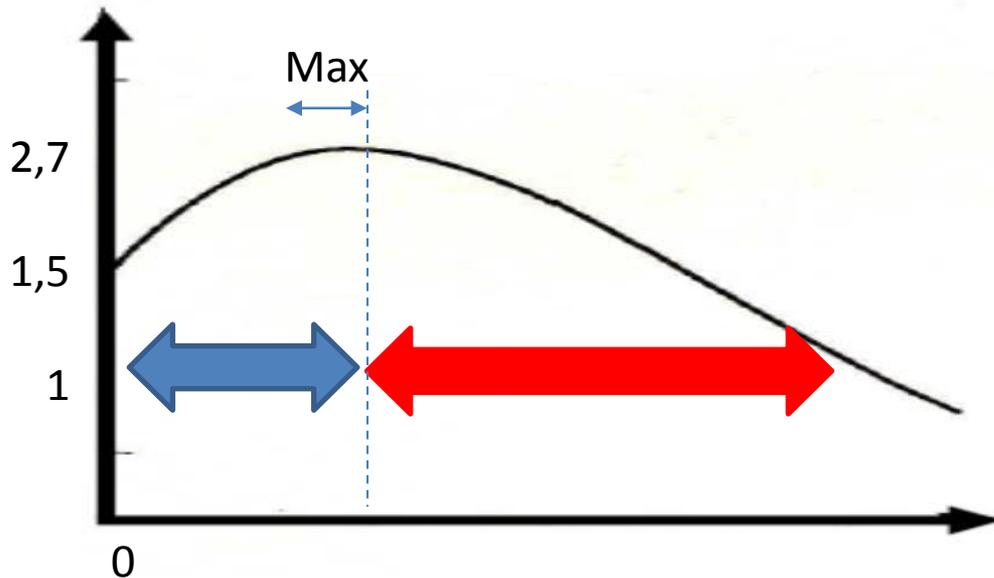
Ethanol , Acétone ( ALCOOL) → Agents de précipitant Pr-

# 3-SOLUBILITE

**C. Influence de la concentration en sels : la solubilité**  
Pr- en solution dépend : [sels] ou **Force ionique** ( $\mu$ )

[sels] ↓ **Force ionique faible** => Solubilisation

[sels] ↑ **Force ionique élevée** => Précipitation saline



## 4- STABILITE THERMIQUE DES PROTEINES

↑  $T^{\circ} > 40^{\circ}$  ou ↓  $T^{\circ}$  (froid) → dénaturation = perte d'activité biologique

La dénaturation : modification de la structure 3D sans modification de la structure primaire

# 5-AUTRES PROPRIETES :

- Absorption en UV:
  - 220 à 230 nm (liaison peptidique).
  - 260-280 nm : Aa aromatiques
- Révélation des protéines par fixation de colorants
  - Rouge ponceau
  - Noir d'amidoschwarz,
  - Bleu de coomassie
  - Vert lissamine
- Dosage des protéines / R colorante
  - Réaction du biuret
  - Lowry

# LES PROTEINES

## PLAN DU COURS

- I. INTRODUCTION-DEFINITION
- II. FONCTIONS DES PROTEINES
- III. CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES
- IV. NIVEAUX D'ORGANISATION DES PROTEINES
- V. LES LIAISONS IMPLIQUEES DANS LA STRUCTURATION DES PROTEINES
- VI. STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES
- VII. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTÉINES
- VIII. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES.
- IX. DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES.

# XI. Détermination de la structure primaire

- 1.Stratégie générale
- 2.Technique de séparation et de purification
- 3.Preparation de la protéine pour le séquençage
- 4.Séquençage.

# **IX. Détermination de la structure primaire**

1.Stratégie générale

2.Technique de séparation et de purification

3.Preparation de la protéine pour le séquençage

4.Séquençage

# 1.Stratégie de détermination de la structure primaire

- ✓ Extraire, séparer et purifier la protéine.
- ✓ séquençage proprement dit de la protéine :
  - Rompre les sous unités et les ponts disulfures
  - Fragmenter et hydrolyser la protéine (analyse =composition en Aa).
  - Identification des Aa aux extrémités Ct et Nt
  - Fragmentation et réarrangement de la séquence polypeptidique de la protéine

# VIII. Détermination de la structure primaire

- 1.Stratégie générale.
- 2.Technique de séparation et de purification.
- 3.Preparation de la protéine pour le séquençage
- 4.Séquençage.

## **2. Technique de séparation et de purification**

**A-Ultracentrifugation.**

**B-Chromatographie d'exclusion ou chromatographie gel filtration**

**C-Chromatographie d'affinité**

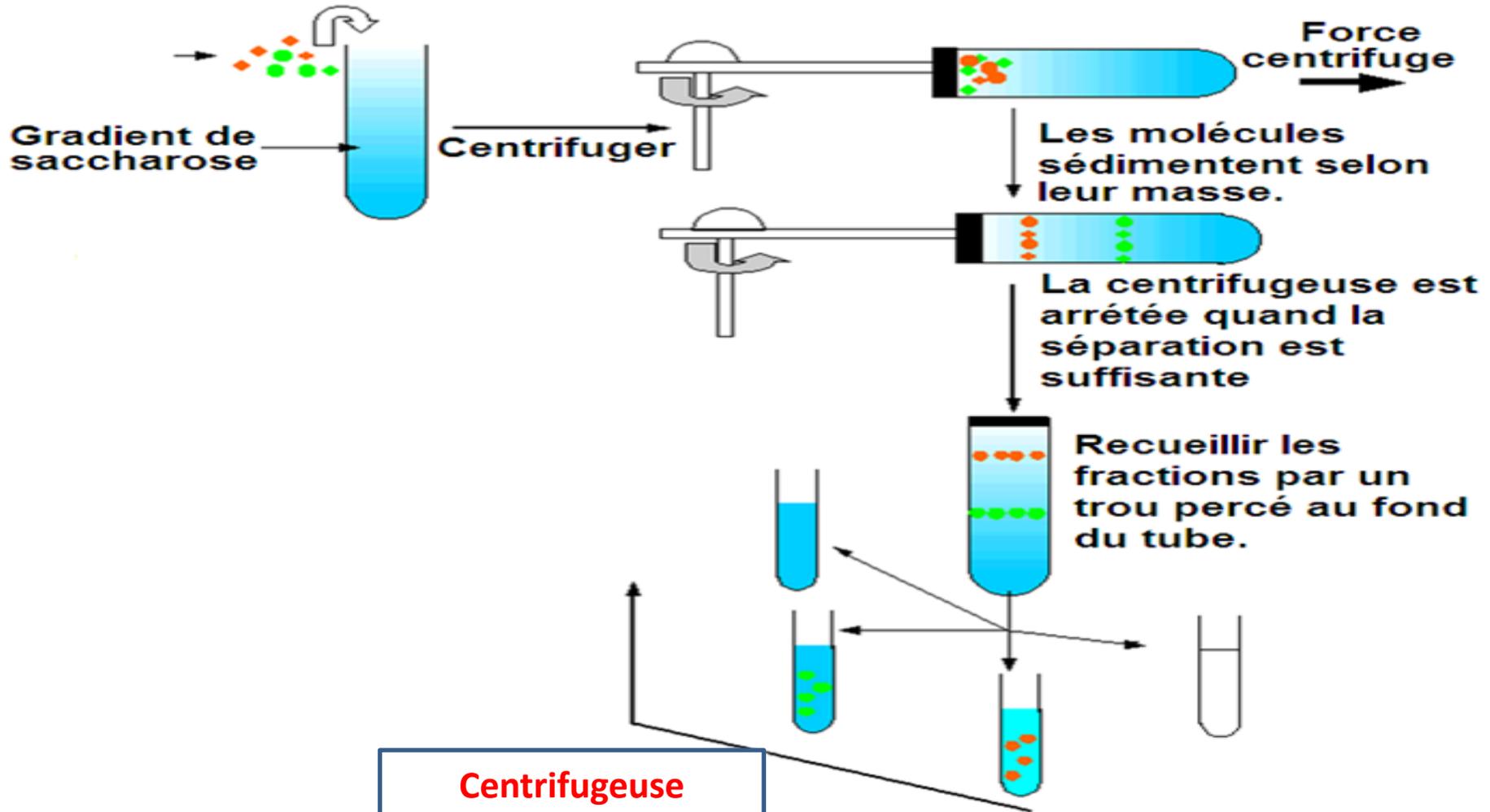
**D-Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec SDS (le Sodium dodécylsulfate) :**

**E-Focalisation isoélectrique**

## 2. Technique de séparation et de purification

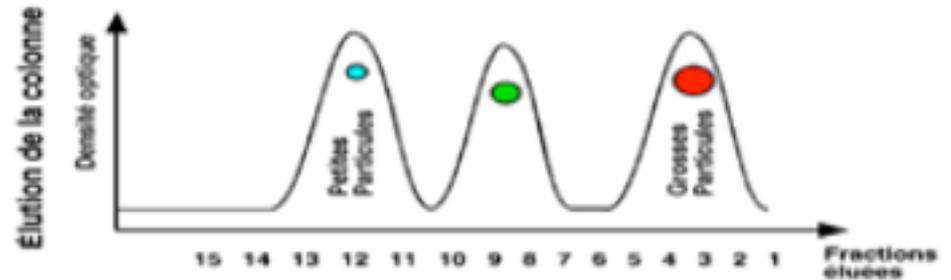
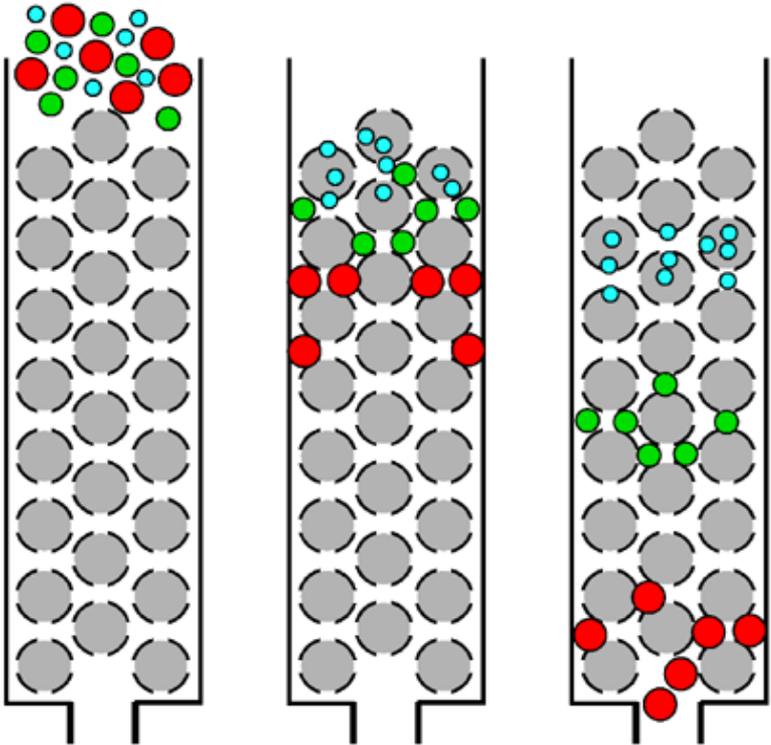
### A-Ultracentrifugation: → Densité

Mélange de protéines  
de masses différentes



## 2. Technique de séparation et de purification

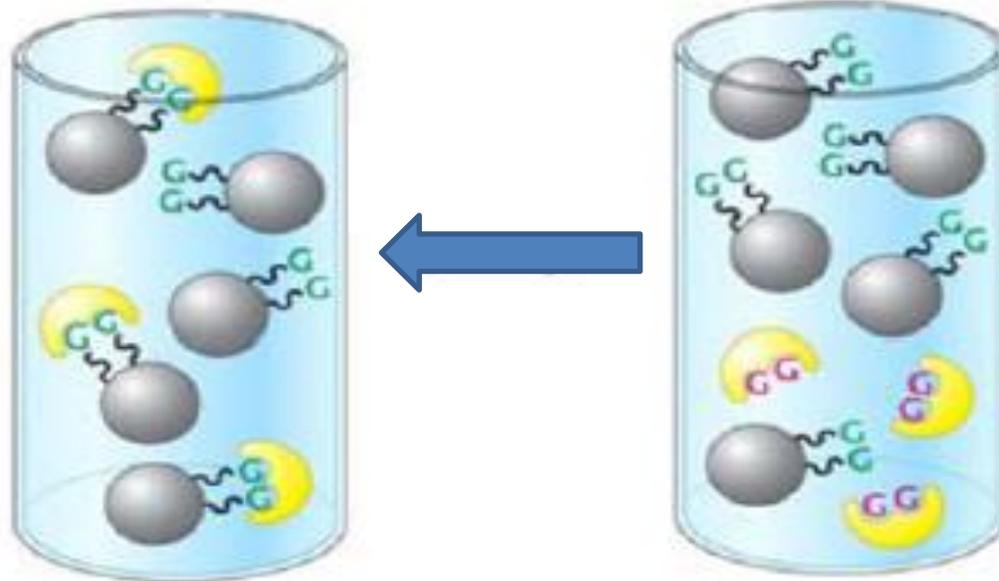
### B-Chromatographie d'exclusion ou chromatographie gel filtration: → Taille



## 2. Technique de séparation et de purification

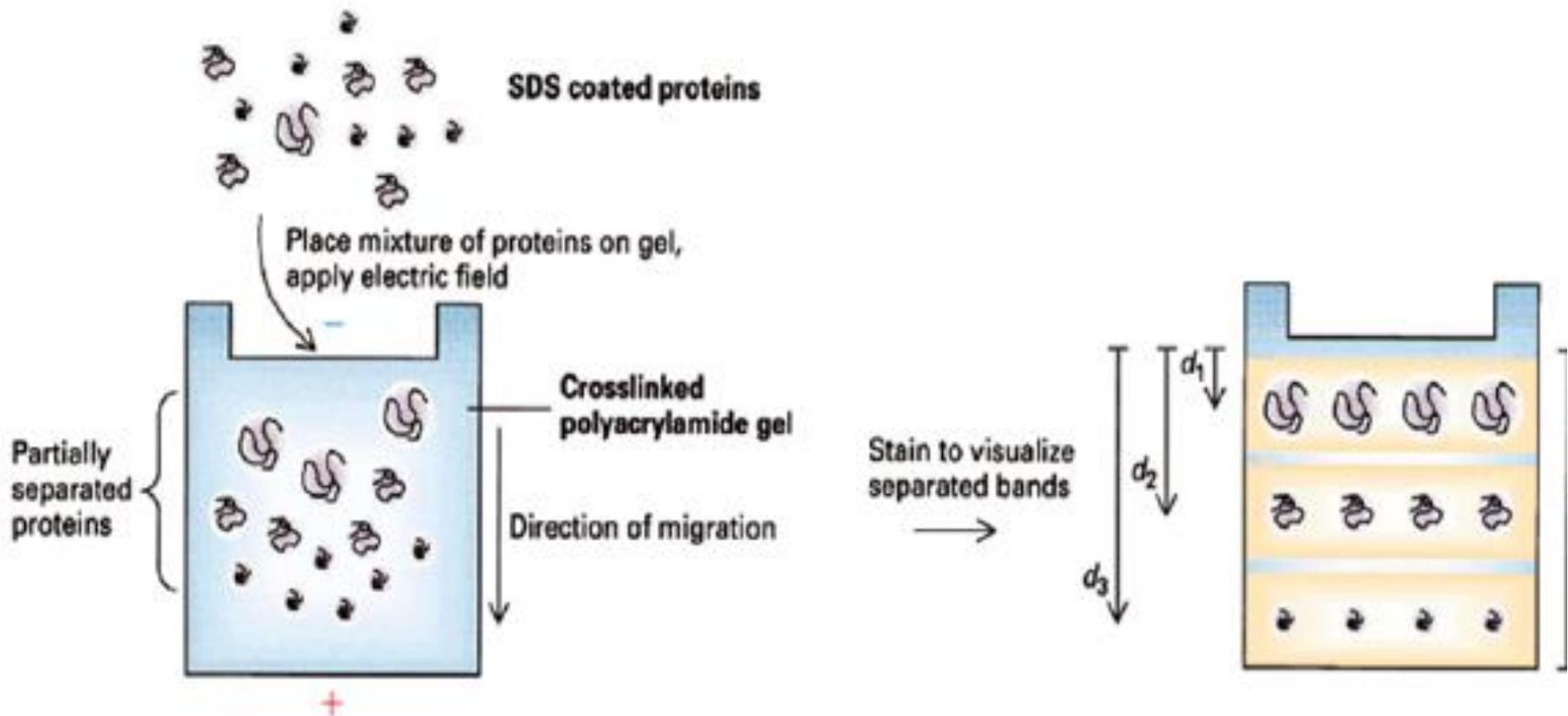
### C-Chromatographie d'affinité:

→ Interaction entre ligands et Pr-



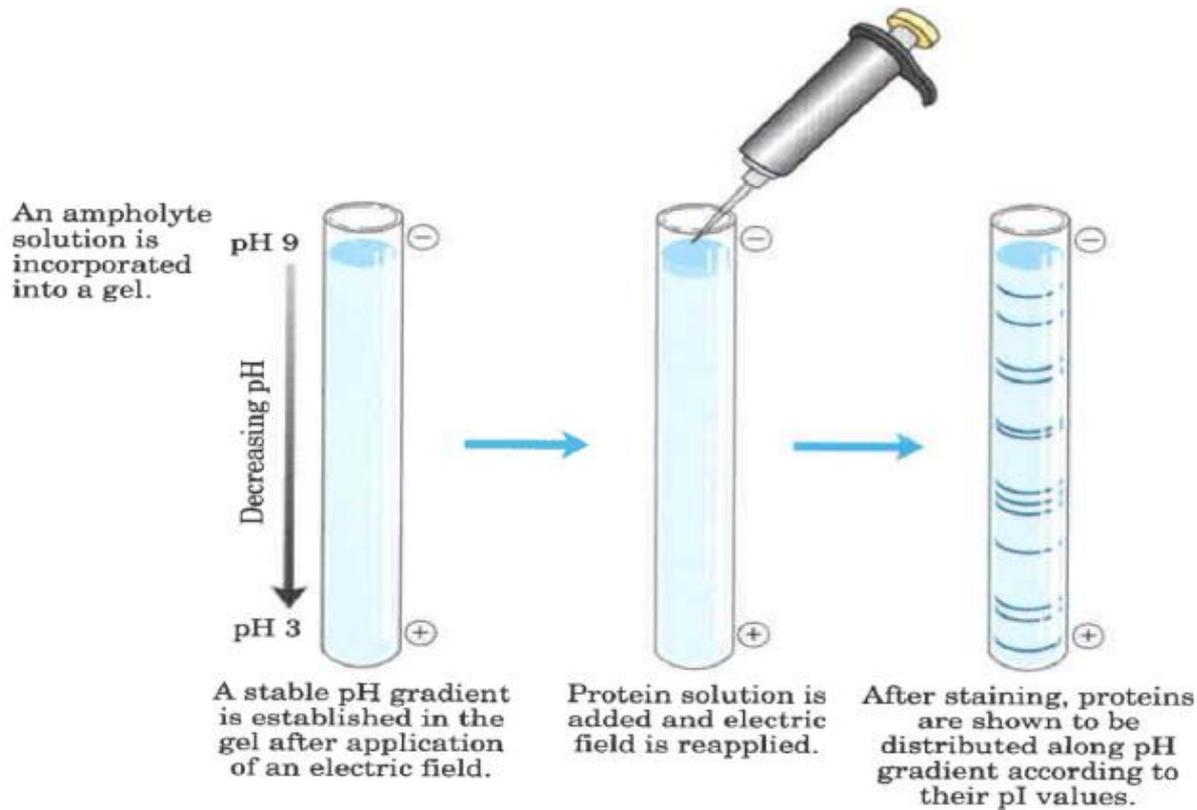
## 2. Technique de séparation et de purification

### D-Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec SDS (Sodium dodécylsulfate) : Mm



## 2. Technique de séparation et de purification

### E-Focalisation isoélectrique(pHi)



## 2. Technique de séparation et de purification

Diverses techniques de séparation en FX

- ❑ La densité : Ultracentrifugation
- ❑ La solubilité : Précipitation au sulfate d'ammonium
- ❑ La taille : Chromatographie gel de Filtration
- ❑ La charge :
  - Chromatographie d'échange d'ions
  - Electrophorèse
  - Isofocalisation
- ❑ L'affinité: Chromatographie d'affinité

# VIII. Détermination de la structure primaire

- 1.Stratégie générale.
- 2.Technique de séparation et de purification.
- 3.Preparation de la protéine pour le séquençage
- 4.Séquençage.

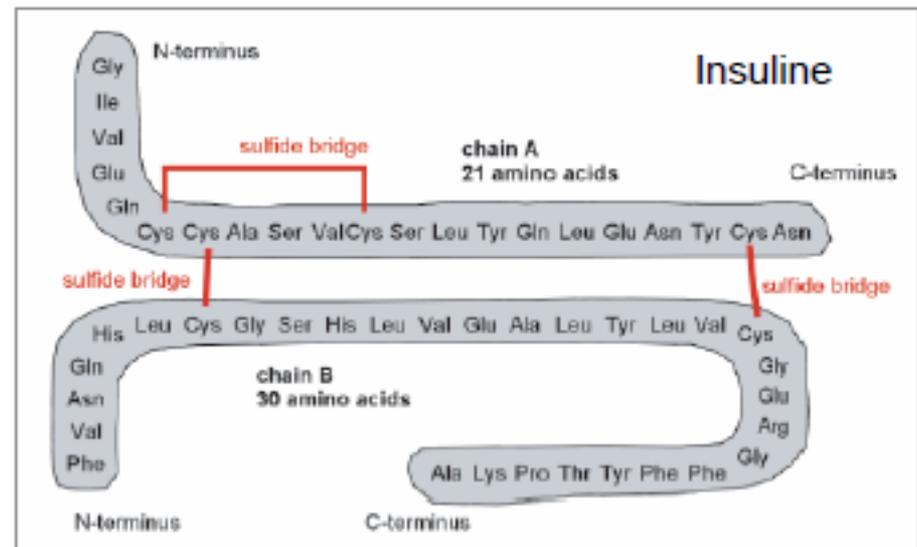
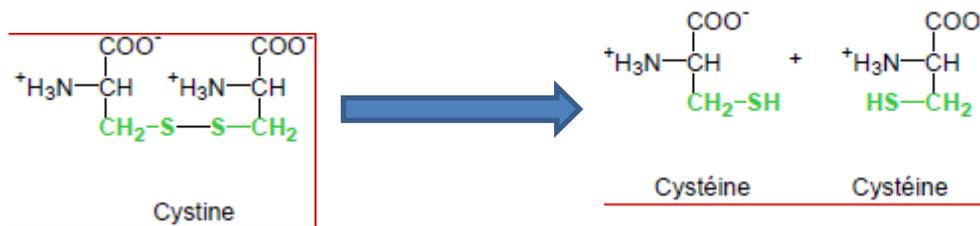
### 3.Préparation de la protéine pour le séquençage

1.si la Pr- comprend + 1 chaine polypeptidique ou des sous unités ou groupements prosthétique

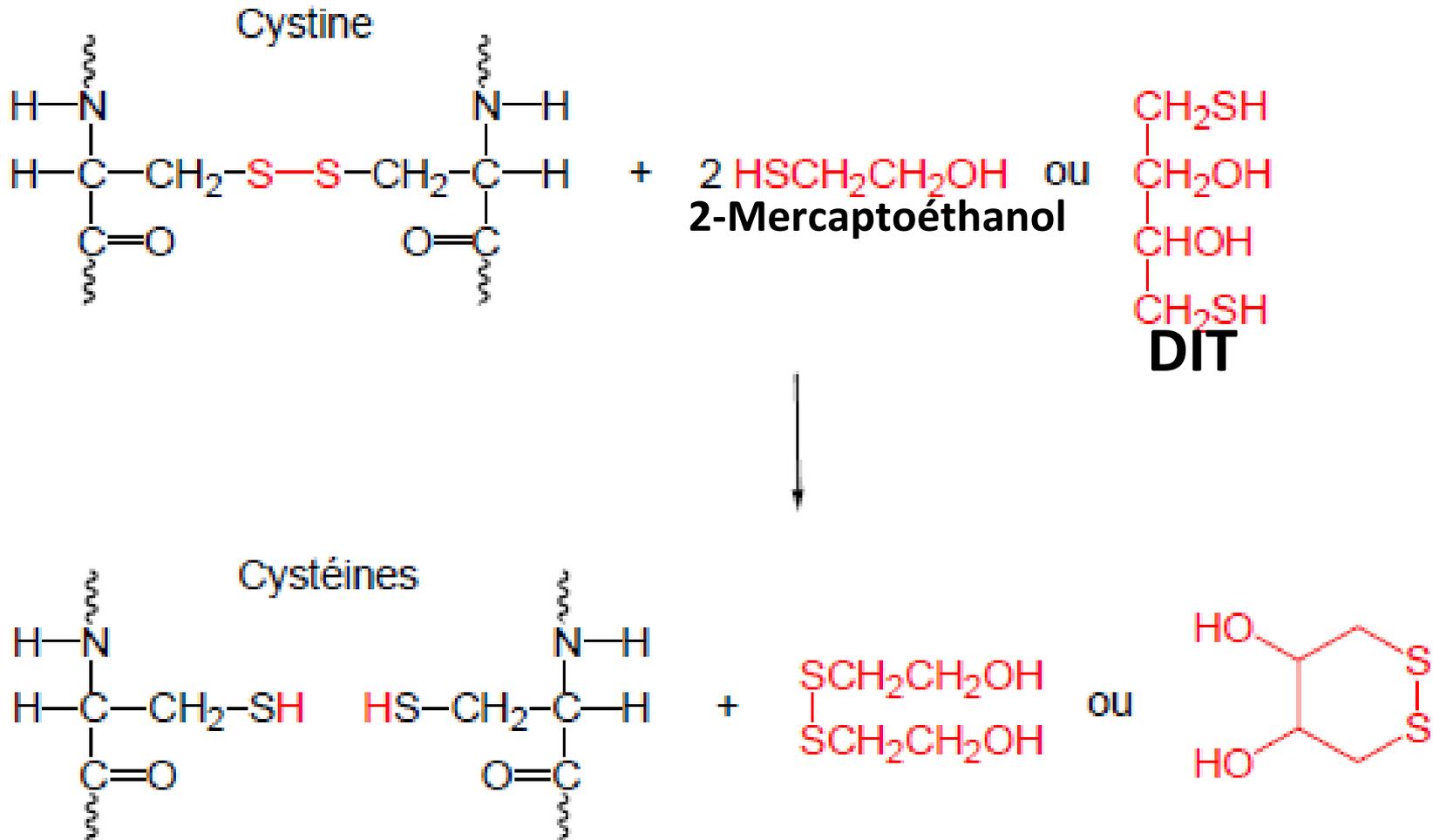
→ Séparation et dissociation :Chaines polypeptidiques

# 3. Préparation de la protéine pour le séquençage

## 2. Clivage des ponts disulfures S-S: intrachâînes ou interchâînes



❑ Réduction avec le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DIT)



**RQ:** Si les ponts S-S inter-chaînes l'étape 2 doit précéder l'étape 1

## VIII. Détermination de la structure primaire

- 1.Stratégie générale.
- 2.Technique de séparation et de purification.
- 3.Preparation de la protéine pour le séquençage
- 4.Séquençage.

# 4. Séquençage

1. Analyse de la composition en Aa
2. Identification des résidus N et C terminaux
3. Fragmentation de la chaîne polypeptidique en séquence de 40-60Aa
4. Reconstitution de la séquence total
5. Localisation des ponts disulfure S-S

# 4.Séquençage

**1.Analyse de la composition en Aa**

2. Identification des résidus N et C terminaux

3.Fragmentation de la chaine polypeptidique en séquence de 40-60Aa

4.Reconstitution de la séquence total

5. Localisation des ponts disulfure S-S

## 4-1 /Analyse de la composition en Aa

### A. Hydrolyse des liaisons peptidiques

**Chimique**

**Enzymatique**

### B. Analyse qualitative et quantitative des Aa après hydrolyse

# A. Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

## 1. Chimique:

- **Hydrolyse totale acide/** HCl à 6 Mol/L à 110°C : 24 h
  - ✓ La plus utilisée
  - ✓ Détruit Trp
  - ✓ Transforme Gln → Glu et Asn → Asp
- **Hydrolyse totale alcaline/** NaOH à 4 Mol/L à 110°C : 4-8h
  - ✓ Détruit : Ser, Arg, Thr, Cys
  - ✓ Détermination de la teneur en Trp

# A. Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

**1. Enzymatique:** Protéolyse totale / **Pronase** = mélange de protéases extrait de *Streptomyces griseus*

- Détermination de la teneur en Asn, Gln, Trp (détruits par les méthodes chimiques)
- Inconvénient : risque de contamination par l'autodégradation des Enz protéolytiques

## **B. Analyse qualitative et quantitative des Aa après hydrolyse**

- Chromatographie sur résines échangeuses d'ions → Séparation des Aa**
- Réaction colorée à la ninhydrine → Dosage de chaque Aa**

## **4-2. Identification des résidus N et C terminaux**

- A. Analyse de l'extrémité N-terminale
- B. Analyse de l'extrémité C-terminale

**Chimique**

**Enzymatique**

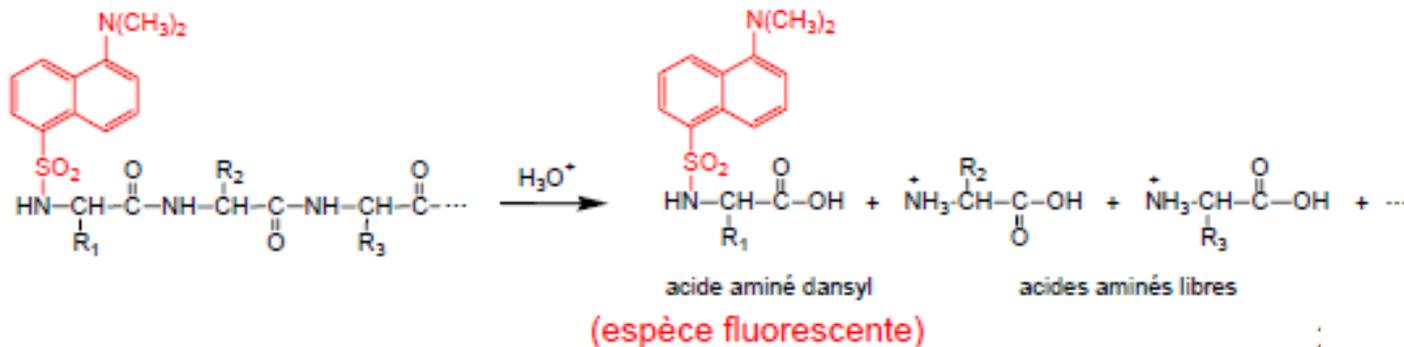
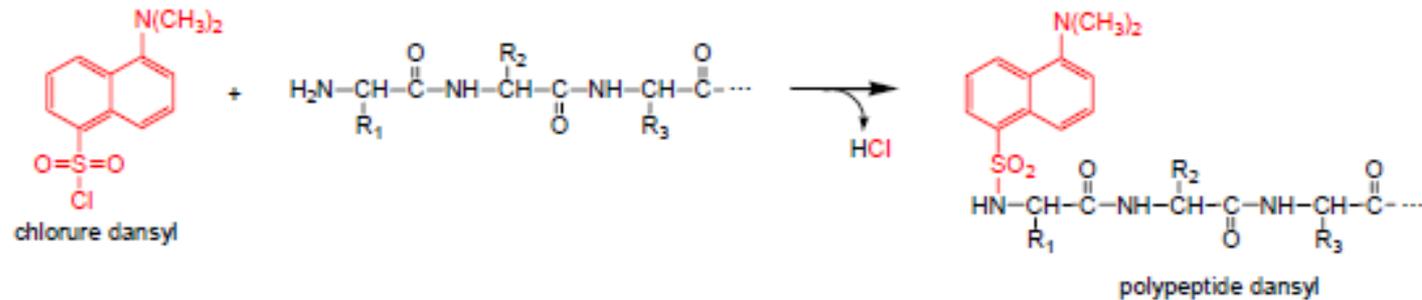
# A. Analyse de l'extrémité N-terminale

- **Méthode chimique :**
  - Méthode de Sanger (FDNB)
  - Méthode de dansylation
  - Méthode récurrente d'Edman
- **Méthode enzymatique ( exopeptidases )**
  - Leucine aminopeptidase
  - Aminopeptidase



# A. Analyse de l'extrémité N-terminale

## Méthode de dansylation



**Chlorure de dansyle DNS CL** → dansyle Aa = **DNS Aa** → fluorescent

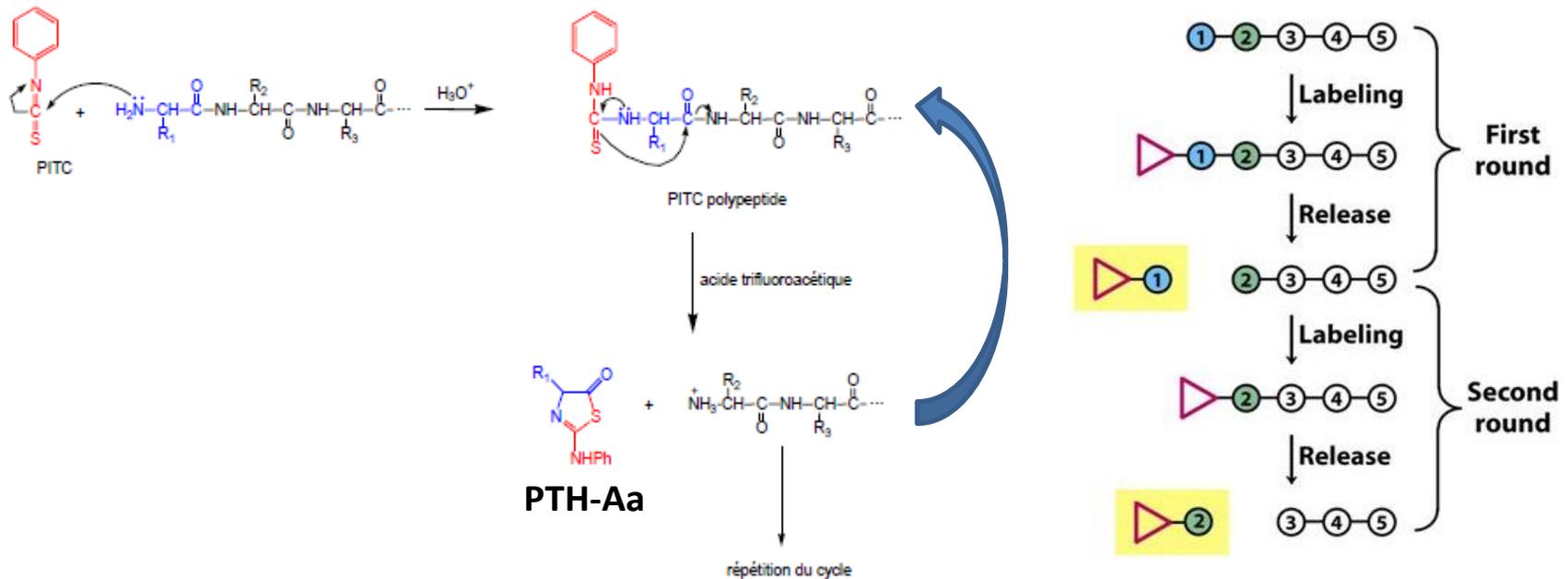
Identification / chromatographie

**Dans la méthode Dansylation et Sanger :**

-Le reste de la chaîne peptique (n-1) totalement dégradé en Aa libres

# A. Analyse de l'extrémité N-terminal

## Méthode récurrente d'Edman : phénylthiocyanate (PITC)



- Identification de l'extrémité N-terminale (sans ruptures des liaisons peptidiques)
- L'action séquentielle d'Edman: séquençage de peptides constitués de 40 à 60 résidus d'Aa
- Identification/ HPLC(chromatographie liquide haute performance)
- PTH-Aa phenylthiohydantoin Aa

# A. Analyse de l'extrémité N-terminale

## Méthode récurrente d'Edman

- **Méthode enzymatique:**

<b>L'enzyme</b> <b>exopeptidase</b>	<b>Extrémité</b> <b>attaquée</b>	<b>Spécificité</b>
<b>Leucine</b> <b>aminopeptidase</b>	<b>N-ter</b>	<b>Pro</b>
<b>Aminopeptidase</b>	<b>N-ter</b>	<b>Tous</b>

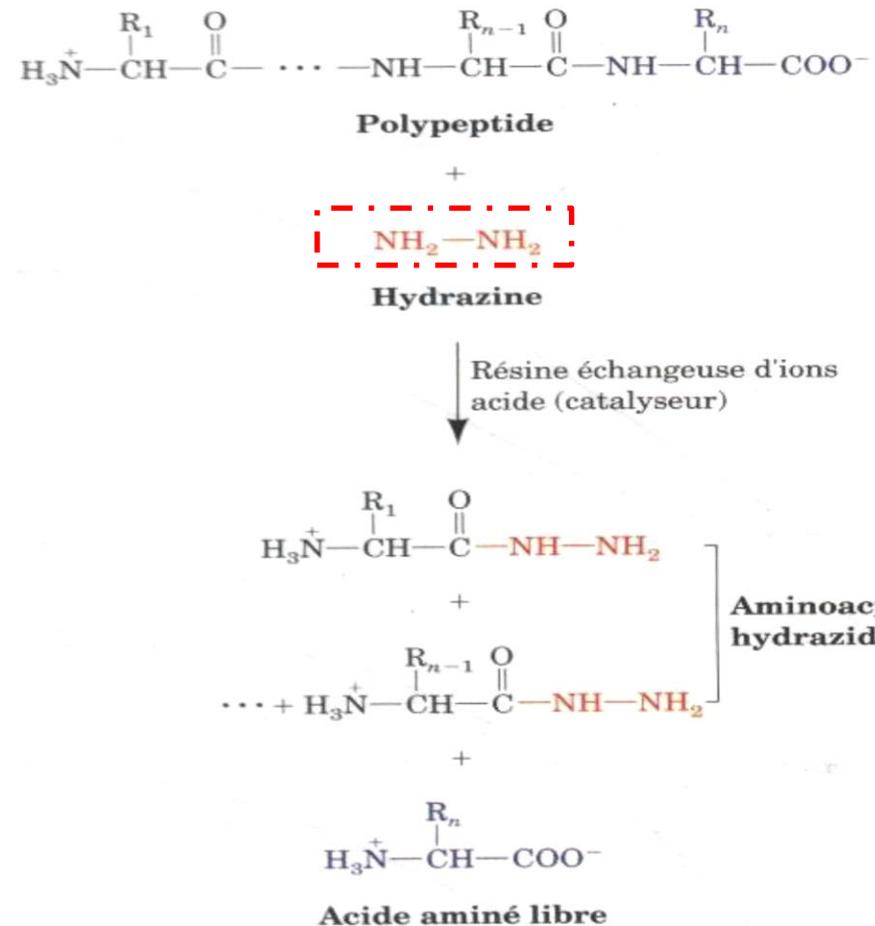
## B. Analyse de l'extrémité c-terminale

- **Méthode chimique**
  - Hydrazine
- **Méthode enzymatique ( exopeptidases)**
  - Carboxypeptidase A
  - Carboxypeptidase B
  - Carboxypeptidase C
  - Carboxypeptidase Y

# B. Analyse de l'extrémité C-terminale

## • Méthode chimique :Hydrazinolyse

- Hydrazine à 100° C
- Attaque toutes les liaisons peptidiques
- Aminoacyl hydrazides + Aa C-terminal libre



## B. Analyse de l'extrémité C-terminale

- Méthode enzymatique par des exopeptidases

L'enzyme 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 Gly

## 4. Fragmentation de la chaîne polypeptidique

- **Intrachaine en séquences ( 20-60Aa)**
  - **Chimique**
  - **Enzymatique (endopeptidases)**

# Fragmentation intra-chaîne

## □ Chimique

<b>Solution</b>	<b>Lieu de coupure</b>
<b>Bromure de cyanogène (BrCN)</b>	<b>C-terminal des méthionines</b>
<b><i>N</i>-bromosuccinimide (NBS)</b>	<b>Après Tyr et Trp</b>
<b>Hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH)</b>	<b>Liaisons Asp-Gly</b>

# Fragmentation intra-chaîne

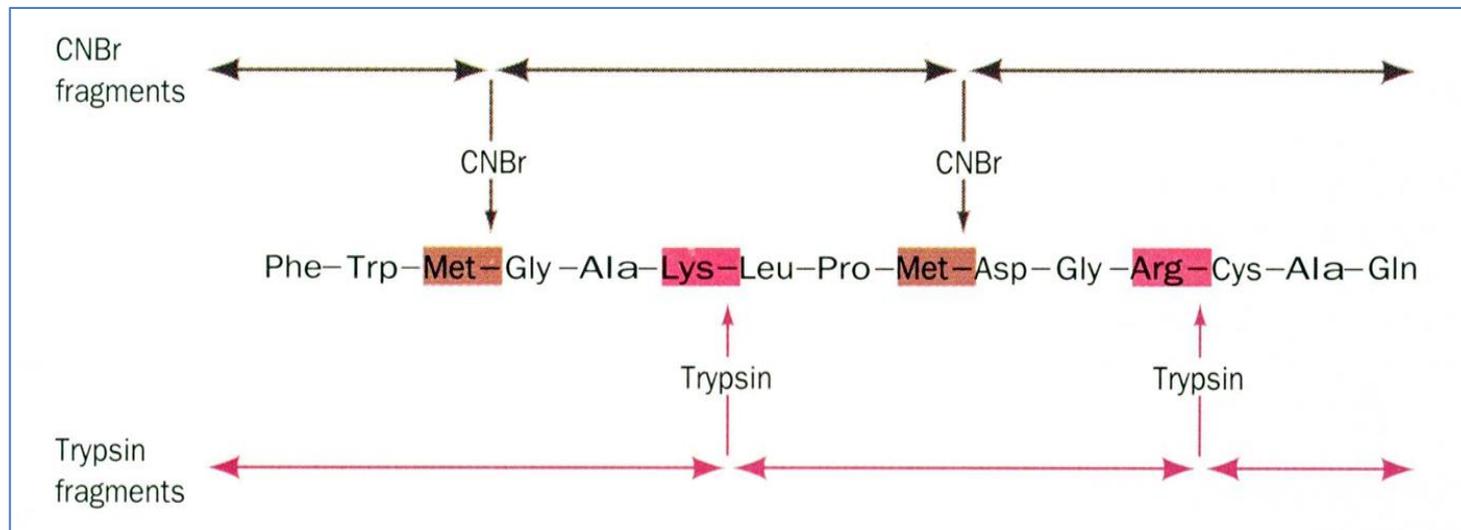
## □ Enzymatique par endopeptidases

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 Aa aromatiques: Phe, Tyr, Trp
Endoprotéase V8	Après le C de Glu, parfois de Asp

- **Séparation des fragments (20-60Aa) / électrophorèse ou chromatographie**
- **Chaque fragment :**
  - **identification des extrémités**
  - **Séquençage :dégradation d'EDMAN ( réaction récurrente d'EDMAN)**

## 4. Reconstitution de la séquence total par détermination de l'ordre des fragments peptidiques

- Comparaison des séquences en Aa d'une série de fragments peptidiques avec celles d'une 2ème série dont les sites de coupure (d'hydrolyse) sont  $\neq$  mais recouvrent ceux de la 1ère série.
- Le chevauchement de séquence entre les segments obtenus par les deux procédés de clivage permet de retrouver leur ordre au sein de la protéine



## **5. Localisation des ponts disulfure S-S**

- **Dernière étape**
- **Déterminer les positions des ponts disulfure**

## Pepsine

.....Ala-Val-Arg-Leu-**Phe**-Met-Lys-**Tyr**-Ile-Cys-Asp-Glu-**Trp**-Arg....

## Asp N protéase

...Ala-**Cys**-Tyr-Arg-Leu-**Glu**-Phe-Met-Tyr-Ile-**Asp**-Trp-Arg....

## Pepsine

.....Ala-Val-Arg-Leu-**Phe**-Met-Lys-**Tyr**-Ile-Cys-Asp-Glu-**Trp**-Arg....

## Asp N protéase

...Ala-**Cys**-Tyr-Arg-Leu-**Glu**-Phe-Met-Tyr-Ile-**Asp**-Trp-Arg....

## Pepsine

NAla-Phe-Arg-Leu-Phe-Met-Lys-Tyr-Ile-Cys-Asp-Glu-Trp-ArgC

## Pepsine

NAla-Phe-Arg-Leu-Phe-Met-Lys-Tyr-Ile-Cys-Asp-Glu-Trp-ArgC

## Trypsine:

**Ala-Val-Leu-Phe-Met-Lys-Tyr-Ile-Cys-Glu-Trp-Arg-Ala**

## Chymotrypsine

**Ala-Val-Leu-Phe-Met-Lys-Tyr-Ile-Cys-Asp-Glu-Trp-Arg**

## Trypsine:

Ala-Val-Leu-Phe-Met-**Lys**-Tyr-Ile-Cys-Glu-Trp-**Arg**-Ala

## Chymotrypsine

Ala-Val-Leu-**Phe**-Met-Lys-**Tyr**-Ile-Cys-Asp-Glu-**Trp**-Arg

endoprotéase V8 (*Staphylococcus aureus*)

Ala-Val-Arg-Leu-Glu-Phe-Met-Tyr-Ile-Cys-Asp-Trp-Arg

Bromure de cyanogène (BrCN)

Ala-Cys-Tyr-Arg-Glu-Phe-Met-Lys-Tyr-Arg

endoprotéase V8 (*Staphylococcus aureus*)

Ala-Val-Arg-Leu-**Glu**-Phe-Met-Tyr-Ile-Cys-**Asp**-Trp-Arg

Bromure de cyanogène (BrCN)

Ala-Cys-Tyr-Arg-Glu-Phe-**Met**-Lys-Tyr-Arg

**N-Bromosuccinimide(NBS):**

**Ala-Val-Trp-Arg-Leu-Met-Lys-Tyr-Ile-Cys-Asp- Arg**

**Hydroxylamine(NH<sub>2</sub>OH)**

**Ala-Val-Trp-Asp-Gly-Leu-Phe-Met-Lys-Asp-Glu-Arg**

## N-Bromosuccinimide(NBS):

Ala-Val-**Trp**→Arg-Leu-Met-Lys-**Tyr**-Ile-Cys-Asp- Arg

## Hydroxylamine(NH<sub>2</sub>OH)

Ala-Val-Trp-**Asp**→**Gly**-Leu-Phe-Met-Lys-Asp-Glu-Arg