

SÉQUENÇAGE DES PROTÉINES

plan

- ⦿ **Introduction**
- ⦿ **Définition**
- ⦿ **intérêt**
- ⦿ **Détermination de la séquence en acides aminés**
 - I. Préparation de la protéine pour le séquençage:
 - II. Séquençage des chaînes polypeptidiques:
 - III. Reconstitution de la séquence complète

Introduction:

Rôles des
protéines

structure

La chaîne
polypeptidique

Acides aminés

séquençage

Définition:

La nature

Le nombre

L'ordre

La stratégie de base

Frederick Sanger 1953

**La première séquence:
l'insuline**

Intérêt du séquençage:



Comprendre le mécanisme d'action au niveau moléculaire

Comparaison des séquences de protéines analogues}fonctionnement


Clinique, diagnostique des mutations

Le séquençage est un procédé classiquement décrit en 06 étapes :

1. Déterminer la composition en aa
2. Identifier les bouts
3. Fragmenter la chaîne polypeptidique
4. Séquencer les fragments engendrés
5. Utiliser un 2^{eme} procédé pour fragmenter la chaîne polypeptidique avec un outil différent
6. Agencer les fragments obtenus et rechercher les chevauchements grâce au second procédé.

Détermination de la séquence en acides aminés :

**Préparation
de la
protéine
pour le
séquençage**



```
graph LR; A[Préparation de la protéine pour le séquençage] --> B[Séquençage des chaînes polypeptidiques]; B --> C[Reconstitution de la structure complète];
```

**Séquençage
des chaînes
polypeptidi-
ques**

**Reconstitution
de la structure
complète**

I. Préparation de la protéine pour le séquençage:

1. Déterminer le nombre de chaînes polypeptidiques: analyse des groupements terminaux

```
graph LR; A[insuline] --> B[Résidus N terminaux Phe et Gly]; B --> C[2 types de chaînes polypep];
```

insuline

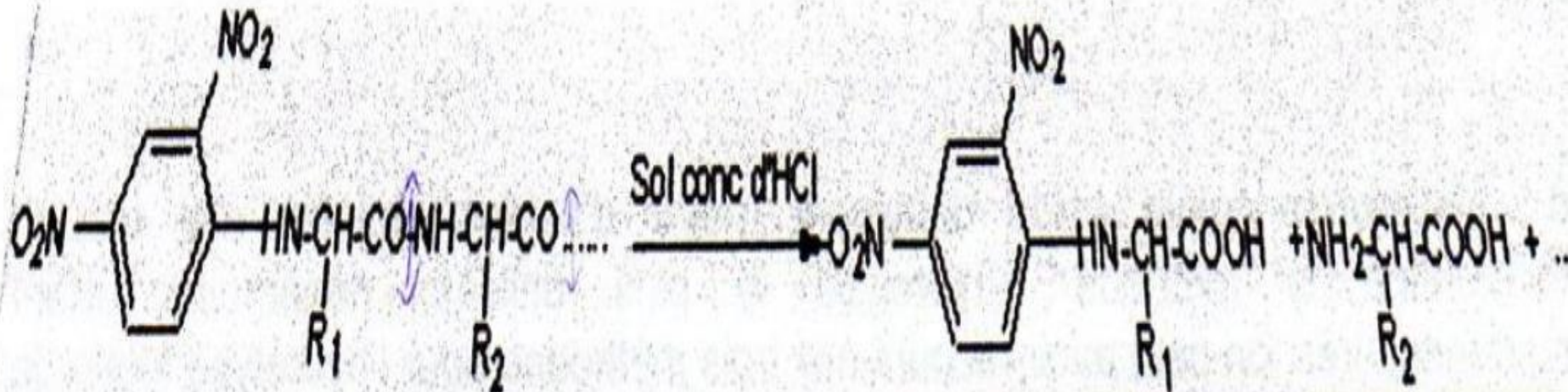
Résidus N
terminaux
Phe et Gly

2 types de
chaînes
polypep

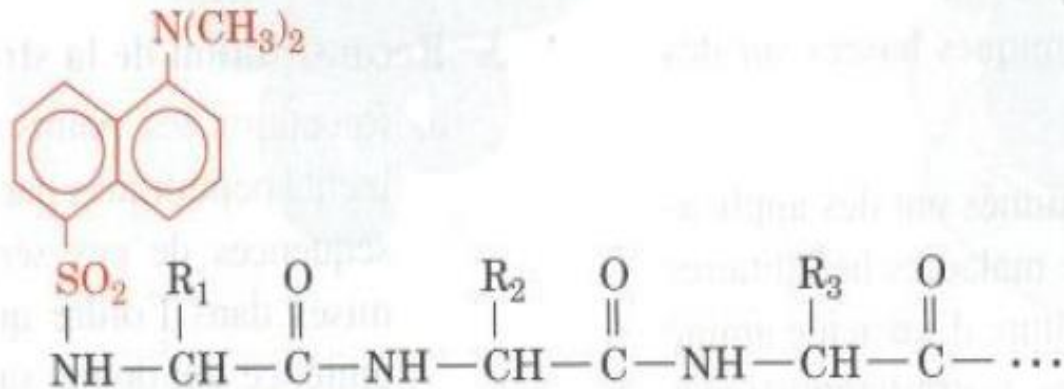
Identification des résidus Nterminaux:

● Méthode de Sanger (FDNB)

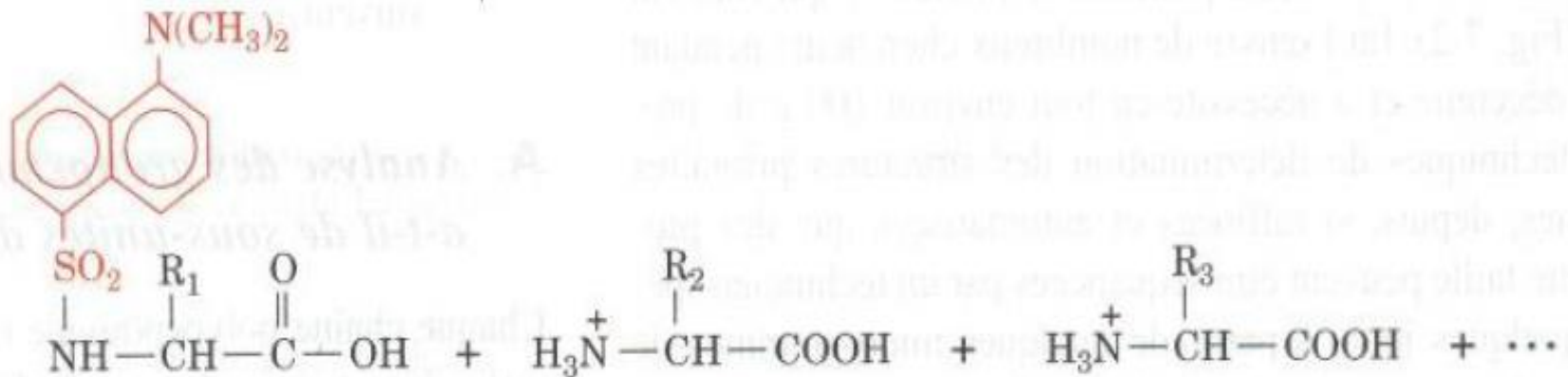
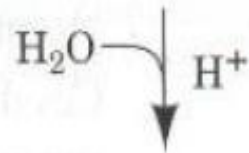
On hydrolyse ensuite le peptide



● Méthode des dansylaminoacides:



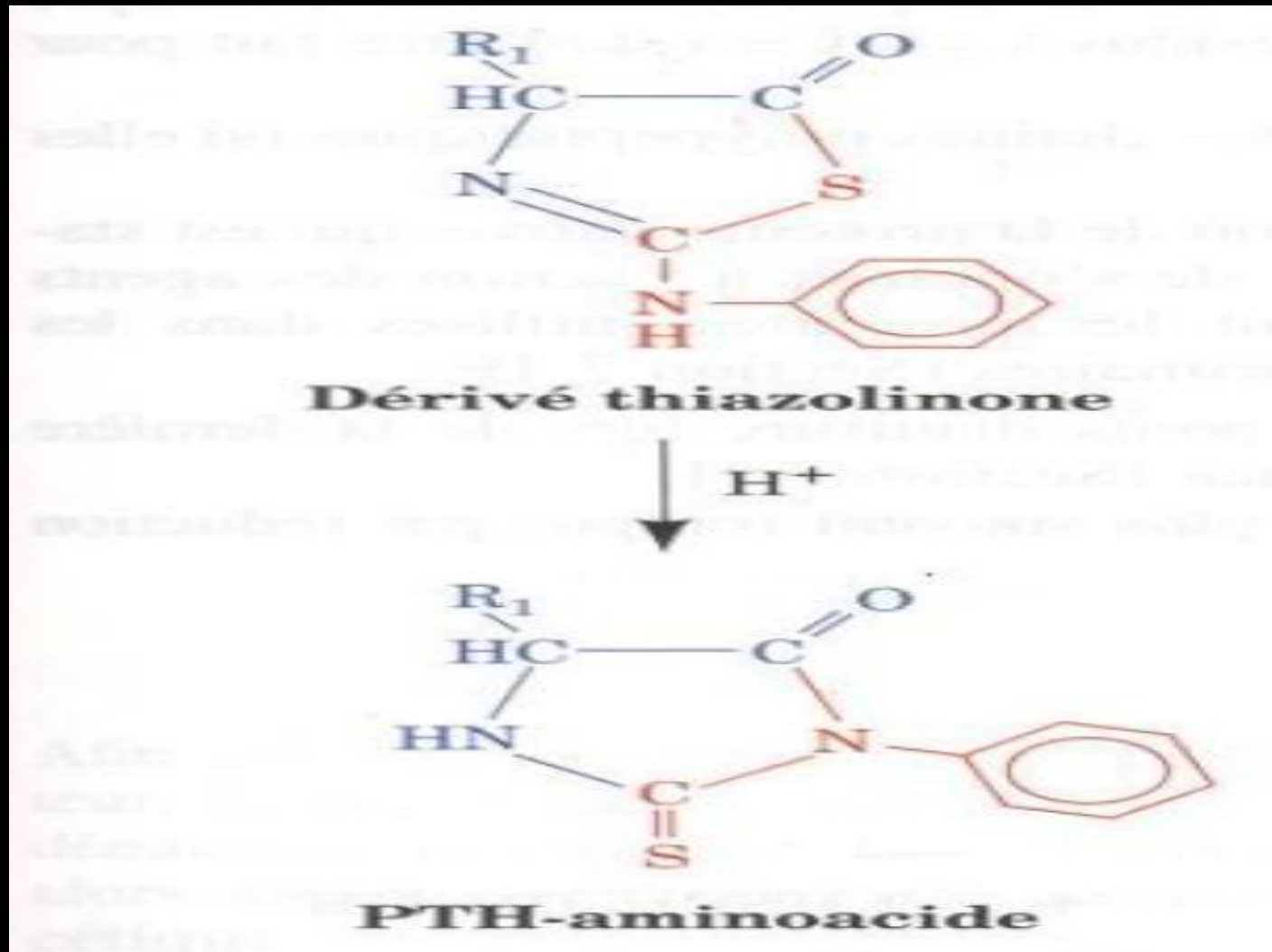
Polypeptide dansylé



**Acide aminé dansylé
fluorescent**

Acides aminés libres

● Méthode d'Edman:



- Méthodes enzymatiques: exopeptidase ; aminopeptidase :

hydrolysent séquentiellement les acides aminés depuis l'extrémité N-terminale d'un polypeptide

Identification des résidus C terminaux:



Polypeptide

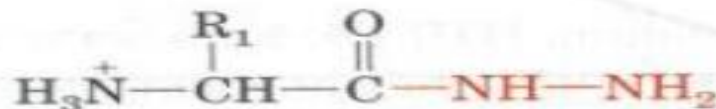
+



Hydrazine



Résine échangeuse d'ions
acide (catalyseur)



+

**Aminoacyl
hydrazides**



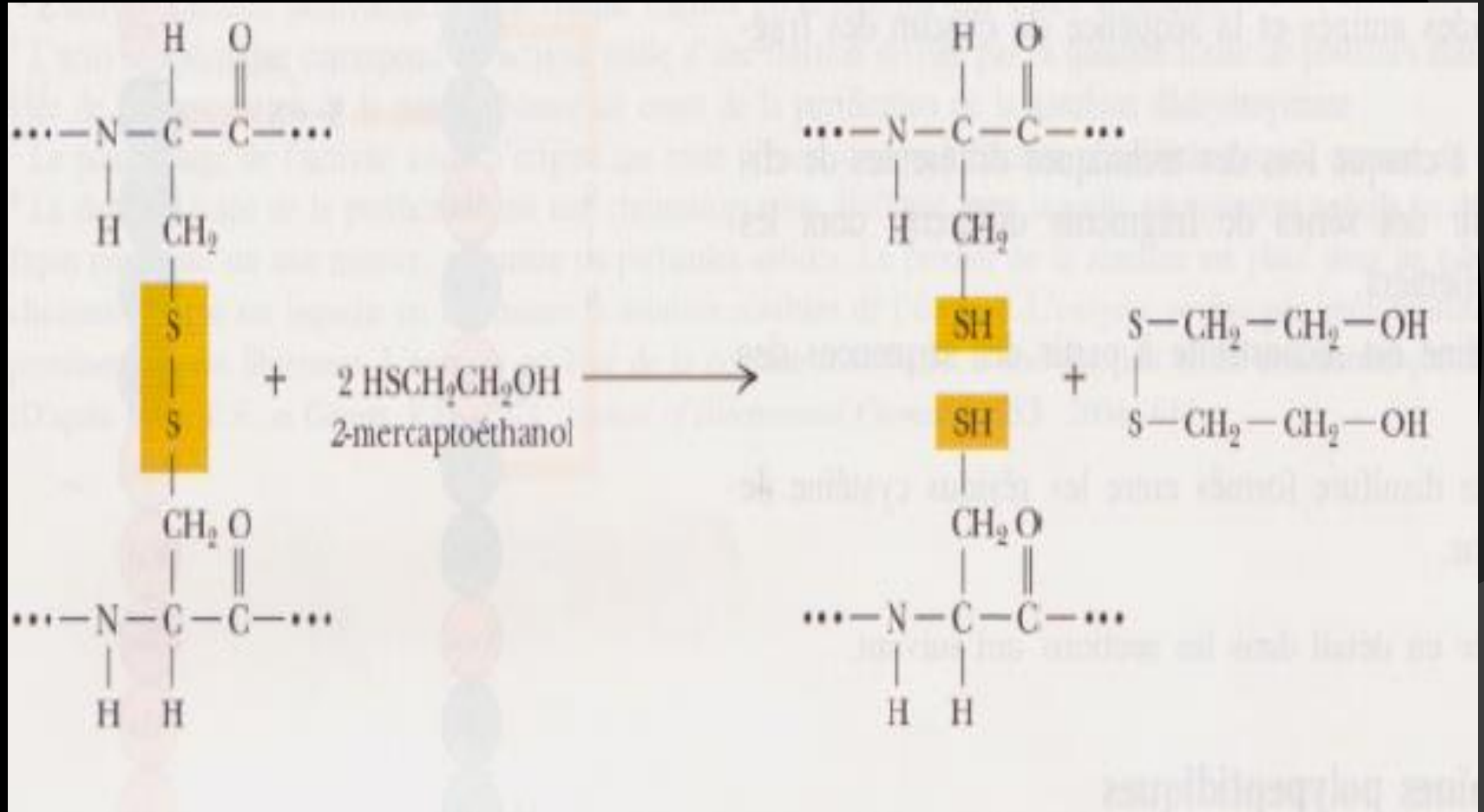
Acide aminé libre

● Méthode enzymatiques : carboxypeptidase

Enzyme	Origine	Spécificité ^a
Carboxypeptidase A	Pancréas de bœuf	$R_n \neq \text{Arg, Lys, Pro}; R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase B	Pancréas de bœuf	$R_n = \text{Arg, Lys}; R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase C	Feuilles de citron	Tous les résidus C-terminaux libres; pH optimum = 3,5
Carboxypeptidase Y	Levure	Tous les résidus C-terminaux libres mais lent avec $R_n = \text{Gly}$
Leucine aminopeptidase	Rein de porc	$R_1 \neq \text{Pro}$
Aminopeptidase M	Rein de porc	Tous les résidus N-terminaux libres

2. Coupures des ponts disulfures:

Réduction par le 2-mercaptoéthanol:



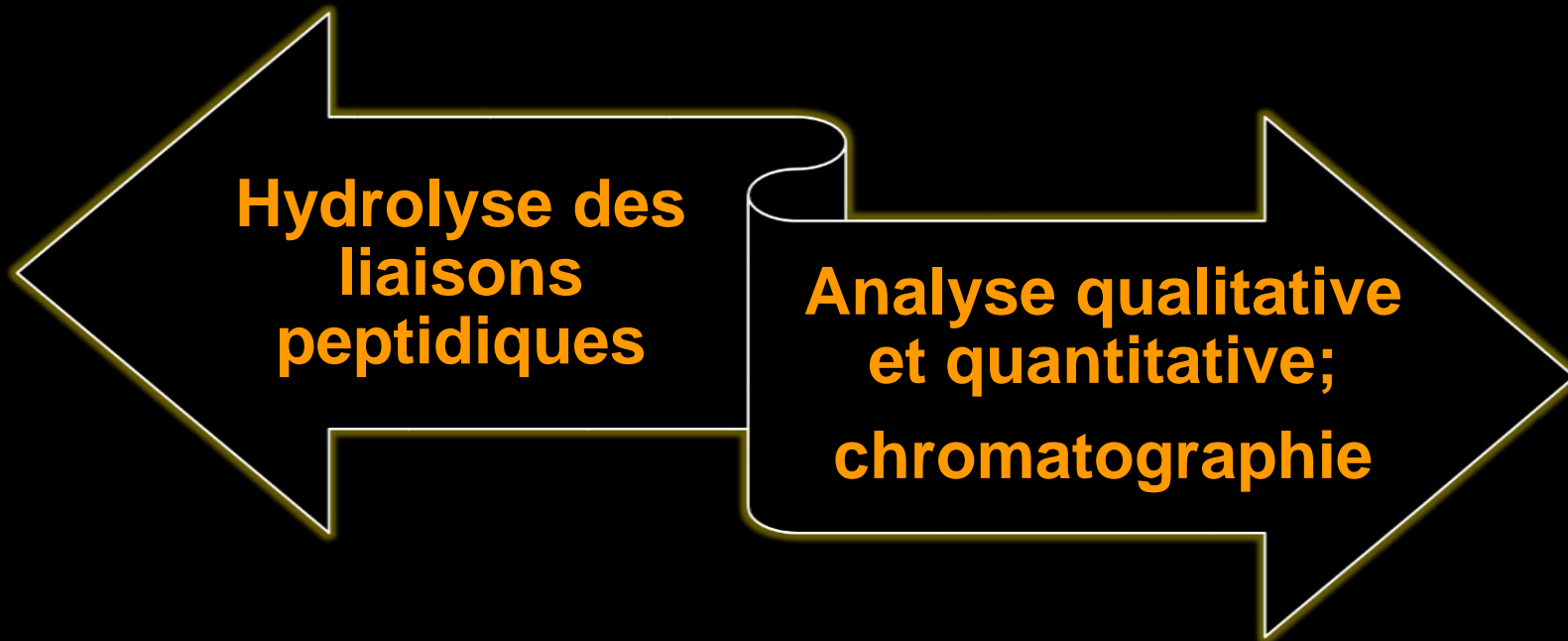
3. Séparation purification des chaines polypeptidiques

Milieu acide ou
basique,
C saline élevée,
T° élevée

Urée
Ion
Guanidinium
SDS

chromatographie

4. Détermination de la composition en acides aminés:



Enzyme	Origine	Spécificité	Remarques
Trypsine	Pancréas de bœuf	R_{n-1} = Résidus chargés positivement : Arg, Lys ; $R_n \neq$ Pro	Très spécifique
Chymotrypsine	Pancréas de bœuf	R_{n-1} = Résidus hydrophobes encombrants : Phe, Trp, Tyr ; $R_n \neq$ Pro	Hydrolyse plus lente avec R_{n-1} = Asn, His, Met, Leu
Elastase	Pancréas de bœuf	R_{n-1} = résidus neutres de petite taille : Ala, Gly, Ser, Val ; $R_n \neq$ Pro	
Thermolysine	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	R_n = Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val ; $R_{n-1} \neq$ Pro	Hydrolyse parfois quand $-R_n$ = Ala, Asp, His, Thr ; thermostable
Pepsine	Muqueuse gastrique de bœuf	R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr ; $R_{n-1} \neq$ Pro	Également avec d'autres résidus ; vraiment non spécifique
Endopeptidase Arg-C	Glande sous-maxillaire de souris	R_{n-1} = Arg	Peut hydrolyser à R_{n-1} = Lys
Endopeptidase Asp-N	<i>Pseudomonas fragi</i>	R_n = Asp	Peut hydrolyser à R_n = Glu
Endopeptidase Glu-C	<i>Staphylococcus aureus</i>	R_{n-1} = Glu	Peut hydrolyser à R_{n-1} = Gly
Endopeptidase Lys-C	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	R_{n-1} = Lys	Peut hydrolyser à R_{n-1} = Asn

II. séquençage des chaînes polypeptidiques:

- 1. Réaction d'hydrolyse spécifique:**
- 2. Séparation purification des fragments:**
- 3. Détermination de la séquence en AA des fragments:**

⦿ Réaction d'hydrolyse spécifique:

**Bromure de
cyanogène:
après Met**

**N-
Bromosuccinimide
HOBr:après Tyr
Try**

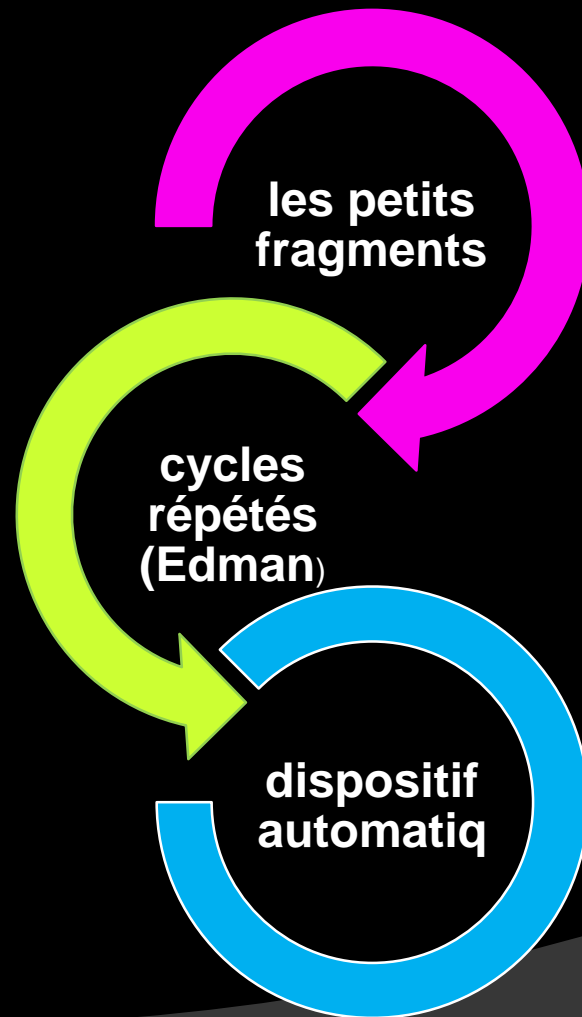
**HydroxylamineNH₂
OH: hydrolyse les
liaisons Asn-Gly**

◎ **Séparation purification des fragments:**

Dénaturant :
Urée , SDS
Support de
Chromato

HPLC
Phase inverse

Détermination de la séquence en AA des fragments:



Reconstitution de la séquence complète:

Mise en ordre des fragments

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE CHU CNE

- Pr. ALLOUI. AS
- Dr. BENDJAZIA

2019

RECAPITULATIF DU COURS

SEQUENCAGE DES PROTEINES

- ▶ STRATEGIE DU SEQUENCAGE D'UNE PROTEINE :
La stratégie de base a été développée par Frederick Sanger en 1953 (prix Nobel en 1958).

- ▶ Les outils nécessaires :
 1. identification des résidus N terminaux :
 - chlorure de Dansyl
 - dégradation d'Edman : PITC (phényl isothiocyanate)
 - enzymatique : exopeptidase
 - DNFB : dinitrofluorobenzène.
 2. identification des résidus C terminaux :
 - hydrazine
 - carboxypeptidase
 3. coupure des liens dissulfures : 2 mercaptoéthanol

4. coupures spécifiques des liaisons peptidiques :
- Endopeptidases : coupure des liens à l'intérieur d'1 chaîne :
 - trypsine : coupure après lys ou arg
 - pepsine : « « « « « « leu et val
 - chymotrypsine : « « « « « « trp, tyr et phe
 - Exopeptidases : coupure d'1 aa N ou C terminal d'1 chaîne polypeptidique :
 - aminopeptidases M : tous les résidus N terminaux
 - carboxypeptidases C : tous les résidus C terminaux
5. fragmentation chimique : le CNBr coupe les liens peptidiques du côté C terminal d'un résidu met
6. rétablir l'ordre des fragments en cherchant les chevauchements.