

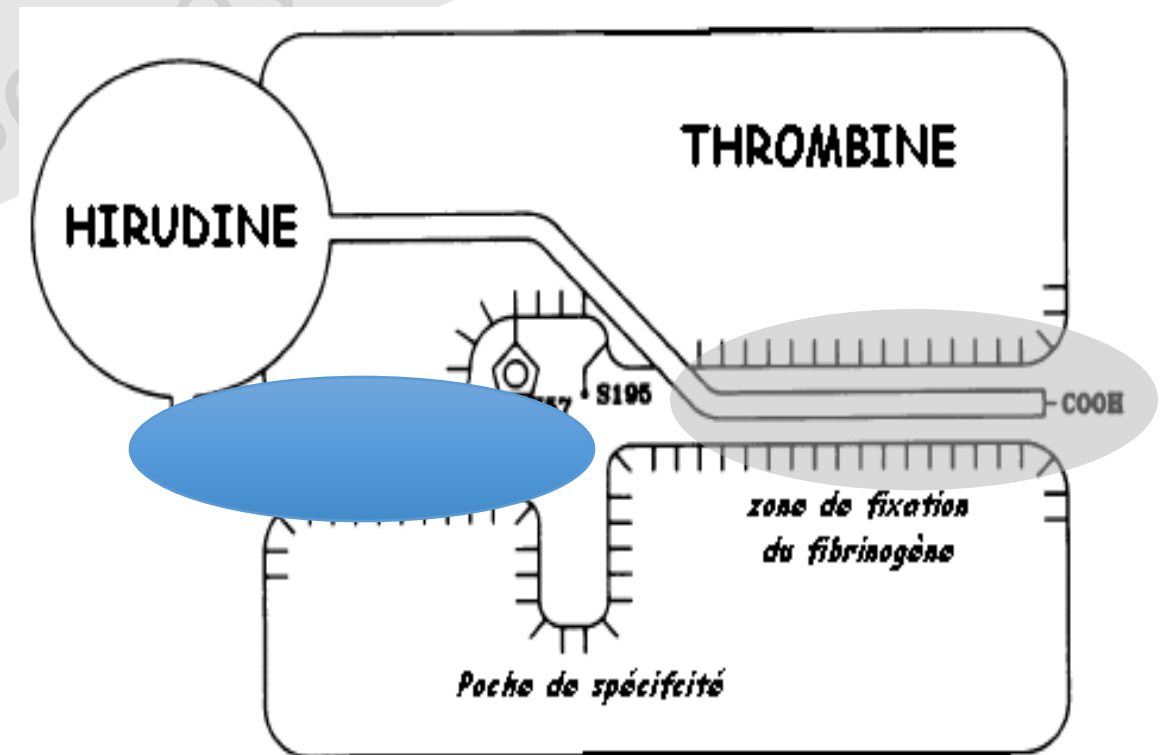
But de l'exercice : description du mode d'activation du récepteur de la thrombine par la thrombine

- Enzyme = thrombine. **Protéase à sérine** qui hydrolyse la liaison peptidique après Arg et Lys.
- **Substrat naturel de la thrombine = récepteur de la thrombine.**
- **Inhibiteur naturel de la thrombine = hirudine** ($K_i = 6,3 \cdot 10^{-11} \text{ M}$).

1^{ère} partie : étude de certaines propriétés physico-chimiques de l'hirudine.

2^{ème} partie : mécanisme d'activation du récepteur de la thrombine (RCPG).

- Les 3 acides aminés N-terminaux de l'hirudine se fixent au site actif de la thrombine.
- La partie C-terminale de l'hirudine (résidus 55 à 65) se fixe au site de fixation supposé du fibrinogène.



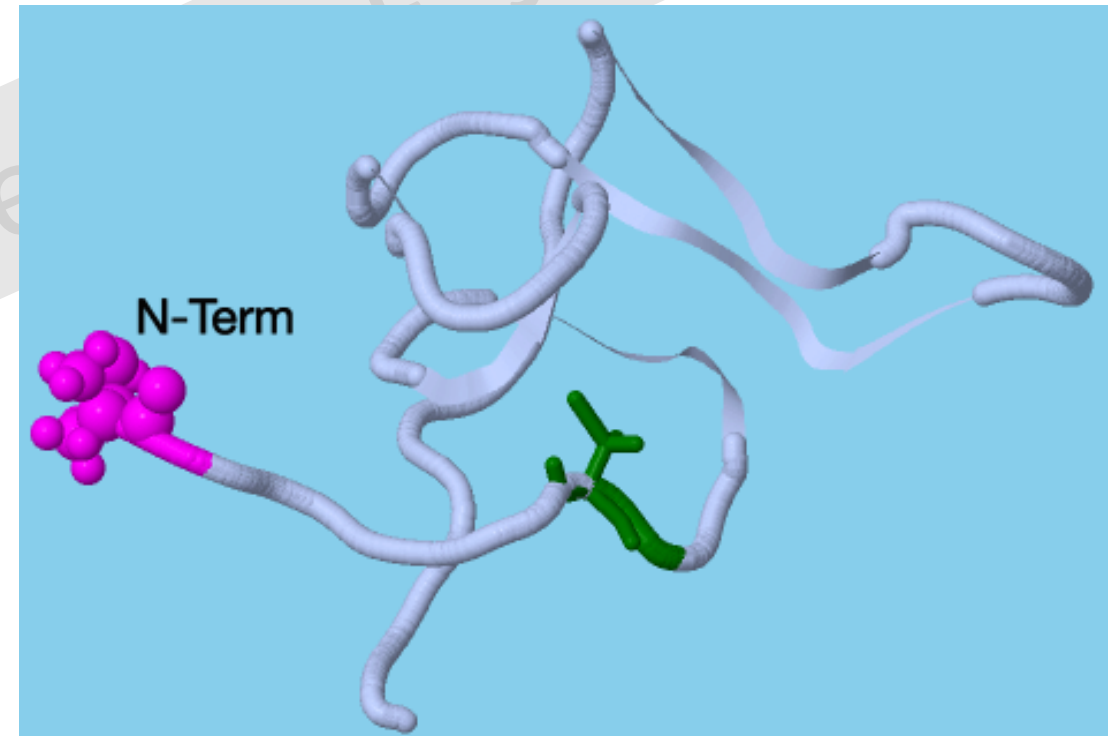
1^{ère} partie : étude de l'hirudine

1. L'hirudine est une protéine très **acide** comme l'indique les acides aminés 4 D, 6 C, 8 E, 3 K, 0 R auxquels il faut ajouter la fonction α -carboxylique C-terminale.

Le point isoélectrique de l'hirudine ($pI = 3,9$) confirme ce caractère acide.

2. L'hydrolyse de l'hirudine native par une **amino**peptidase (EC 3.4.11.2) ne libère aucun acide aminé : cela indique un **encombrement stérique** autour de l'acide aminé **N-terminal**.

- Cet encombrement stérique peut-être dû à une conformation "globulaire" de cette extrémité de la chaîne polypeptidique qui serait stabilisée par un **pont disulfure**.
- On peut donc supposer qu'une **Cys** (en vert sur la figure ci-contre) se trouve proche de l'extrémité N-terminale dans la séquence en acides aminés.

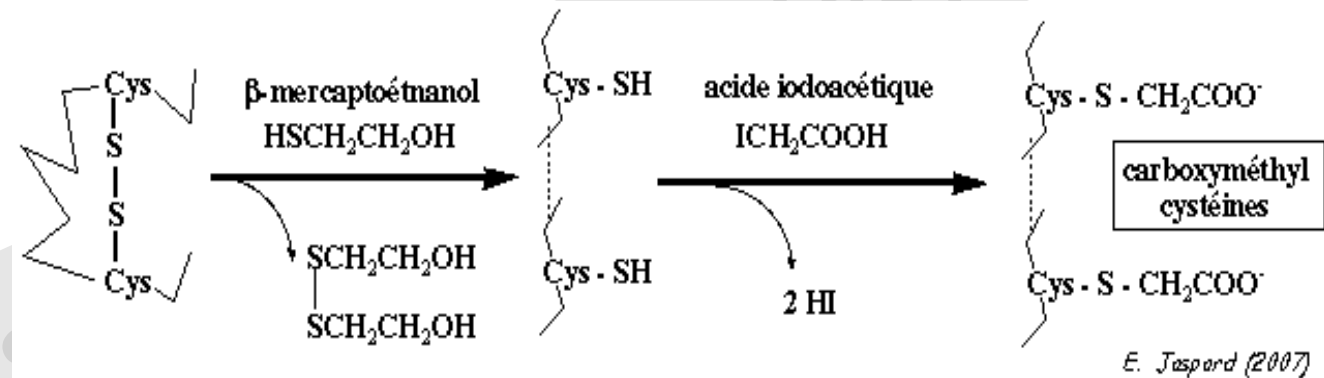


1^{ère} partie : étude de l'hirudine

L'hydrolyse de l'hirudine préalablement réduite et carboxyméthylée par l'aminopeptidase libère une valine.

1. Les ponts disulfures sont **rompus** par **réduction**.

1. Le groupement thiol de la chaîne latérale des Cys est **méthylé** (S-CH₂-COO⁻) **irréversiblement** : les ponts disulfure ne peuvent pas se reformer.



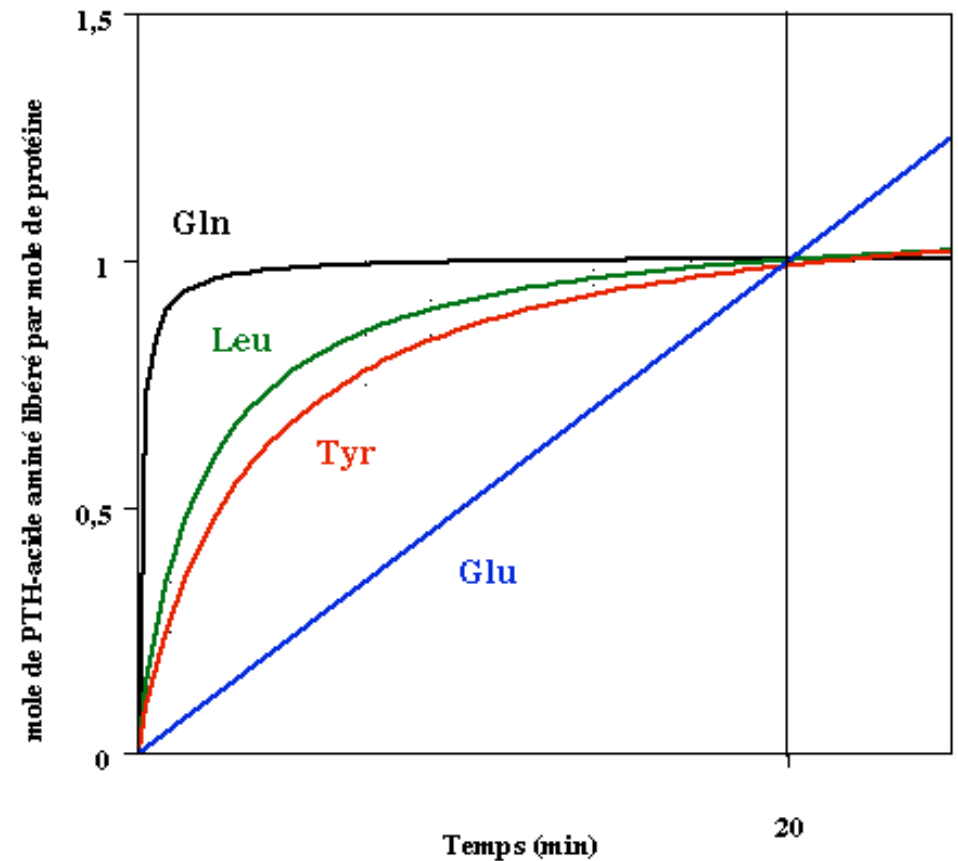
L'extrémité N-terminale de l'hirudine **perd ainsi sa conformation globulaire encombrante**.

Elle peut se fixer dans le site actif de l'aminopeptidase qui hydrolyse l'acide aminé en position N-terminale de l'hirudine : Val₁.

1^{ère} partie : étude de l'hirudine

La séquence C-terminale de l'hirudine est obtenue par action de la **carboxypeptidase Y**.

- On prélève une fraction aliquote du milieu réactionnel à différents temps d'action de l'enzyme : chaque échantillon est traité par l'isothiocyanate de phényle (**PITC**).
- On sépare le phénylthiohydantoïne acide aminé (PTH - acide aminé) libéré par l'action de l'enzyme par chromatographie en **phase reverse**.
- On enregistre la **cinétique** de libération des PTH - acides aminés en position C-terminale de l'hirudine (figure ci-contre).



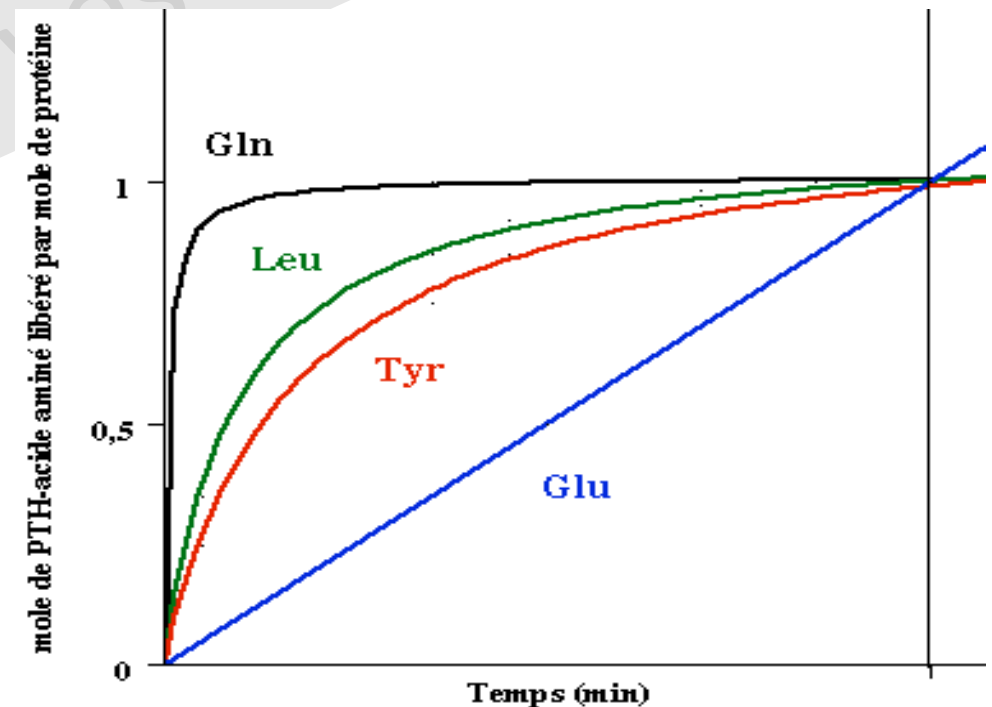
1^{ère} partie : étude de l'hirudine

La carboxypeptidase Y (EC 3.4.17.1) possède environ **la même spécificité pour tous les acides aminés**.

La cinétique de libération est **identique** avec l'hirudine préalablement **réduite et carboxyméthylée** : l'extrémité C-terminale de l'hirudine n'est pas bloquée par encombrement stérique puisque la carboxypeptidase Y peut agir.

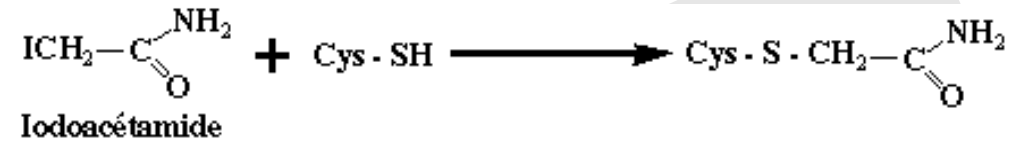
La séquence C-terminale de l'hirudine est :

- X₆₀ - Glu₆₁ - Glu₆₂ - Tyr₆₃ - Leu₆₄ - Gln₆₅ - COO⁻



1^{ère} partie : étude de l'hirudine

Les **cystéines** sont marquées par l'iodoacétamide radioactif.



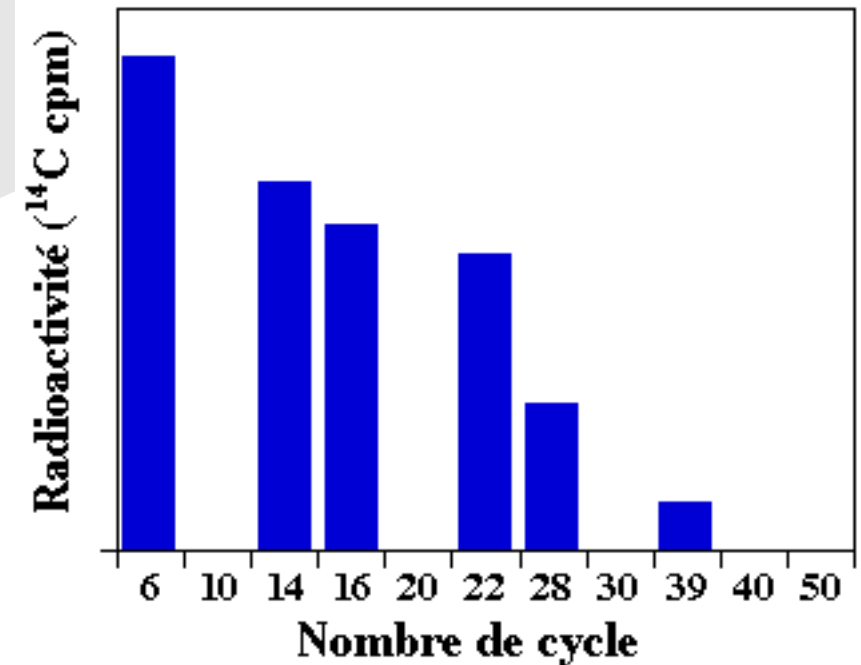
E. Jaspard (2007)

Les cycles de dégradation où la radioactivité est détectée indiquent la position des Cys dans la séquence de l'hirudine.

Celle-ci contient donc 6 Cys aux positions 6, 14, 16, 22, 28 et 39.

La séquence N-terminale de l'hirudine est :

NH_3^+ - Val₁ - V - Y - T - D - Cys₆ - T - E - S - G - Q - N - L



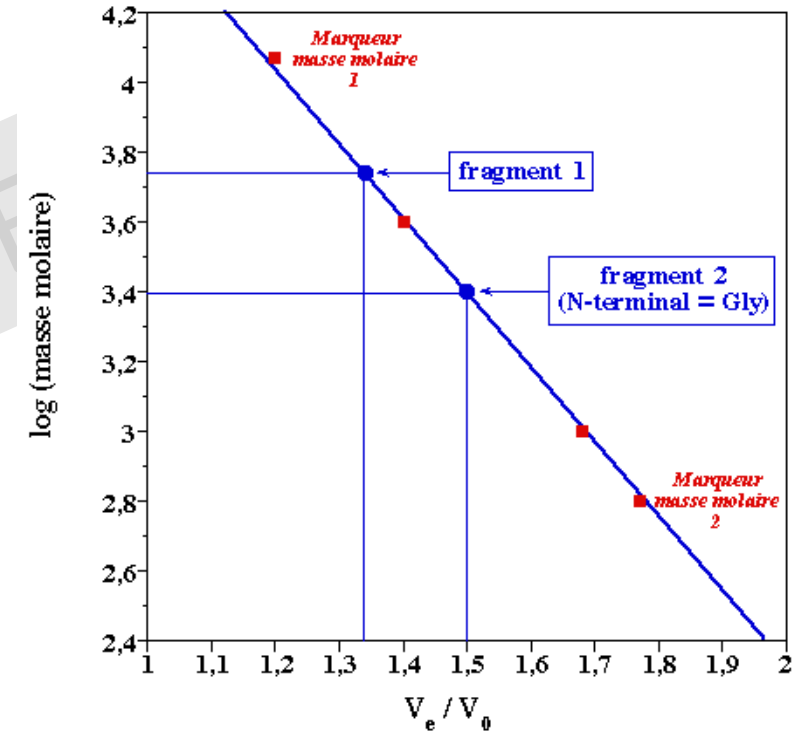
La décroissance de la quantité de radioactivité détectée en fonction du nombre de cycle est due à la dénaturation des chaînes polypeptidiques à chaque cycle de dégradation d'Edman : il y a de moins en moins de chaînes polypeptidiques susceptibles d'être traitées, donc de moins en moins de cystéine libérée.

1^{ère} partie : étude de l'hirudine

L'hirudine est hydrolysée par la protéase V8 qui hydrolyse spécifiquement la liaison peptidique du côté carboxyle des acides aminés Glu & Asp.
Parmi les produits de digestions majeurs, deux ont été détectés après séparation par chromatographie de filtration sur gel.

La masse molaire d'un **résidu d'acide aminé** est donc, en moyenne : $MM = 140 \text{ Da} - 18 \text{ Da} = 122 \text{ Da}$.

L'hirudine est constituée de 65 acides aminés qui correspondent à une masse molaire d'environ 7930 Da.



D'après la droite d'élution on détermine :

Fragment 1 : masse molaire = 5490 Da \Rightarrow soit un fragment d'environ : $(5490 / 122) = 45$ acides aminés

Fragment 2 : masse molaire = 2440 Da \Rightarrow soit un fragment d'environ : $(2440 / 122) = 20$ acides aminés

On peut **supposer** que la protéase V8 coupe la liaison : Val₁ ---Glu₄₃ / Gly₄₄ --- Gln₆₅

1^{ère} partie : étude de l'hirudine

Hirudine	Inhibition de la thrombine	Interprétation
<i>native</i>	<i>100 %</i>	<i>Témoin positif</i>
réduite	10 %	Sans pont disulfure, l'hirudine perd sa structure native (mais n'est pas dénaturée). Les 10 % d'activité résiduelle sont dûs aux molécules non réduites.
désulfatée à 60%	87 %	La Tyr ₆₃ est de plus en plus désulfatée. Indique l'importance d'au moins une charge négative du côté C-terminal pour l'interaction avec la thrombine.
désulfatée à 100%	45 %	
réduite & protéase V8	3 %	L'hirudine est sous la forme de 2 fragments. Souligne que l'interaction avec la thrombine se fait du côté C-terminal mais aussi du côté N-terminal.
native carboxypeptidase Y - 20 min	8 %	L'hirudine n'a plus l'extrémité C-terminale : -E ₆₂ -Y ₆₃ -L ₆₄ -Q ₆₅ -COO ⁻ Ce résultat souligne l'importance d'un ensemble de charges négatives à l'extrémité C-terminale pour les interactions avec la thrombine.
après estérification des COOH	0 %	Toutes les charges négatives ont disparu (formation d'ester) : ce résultat confirme le résultat ci-dessus. Réaction d'estérification : R- COO ⁻ + R'-OH -> R-CO-O-R' + H ₂ O

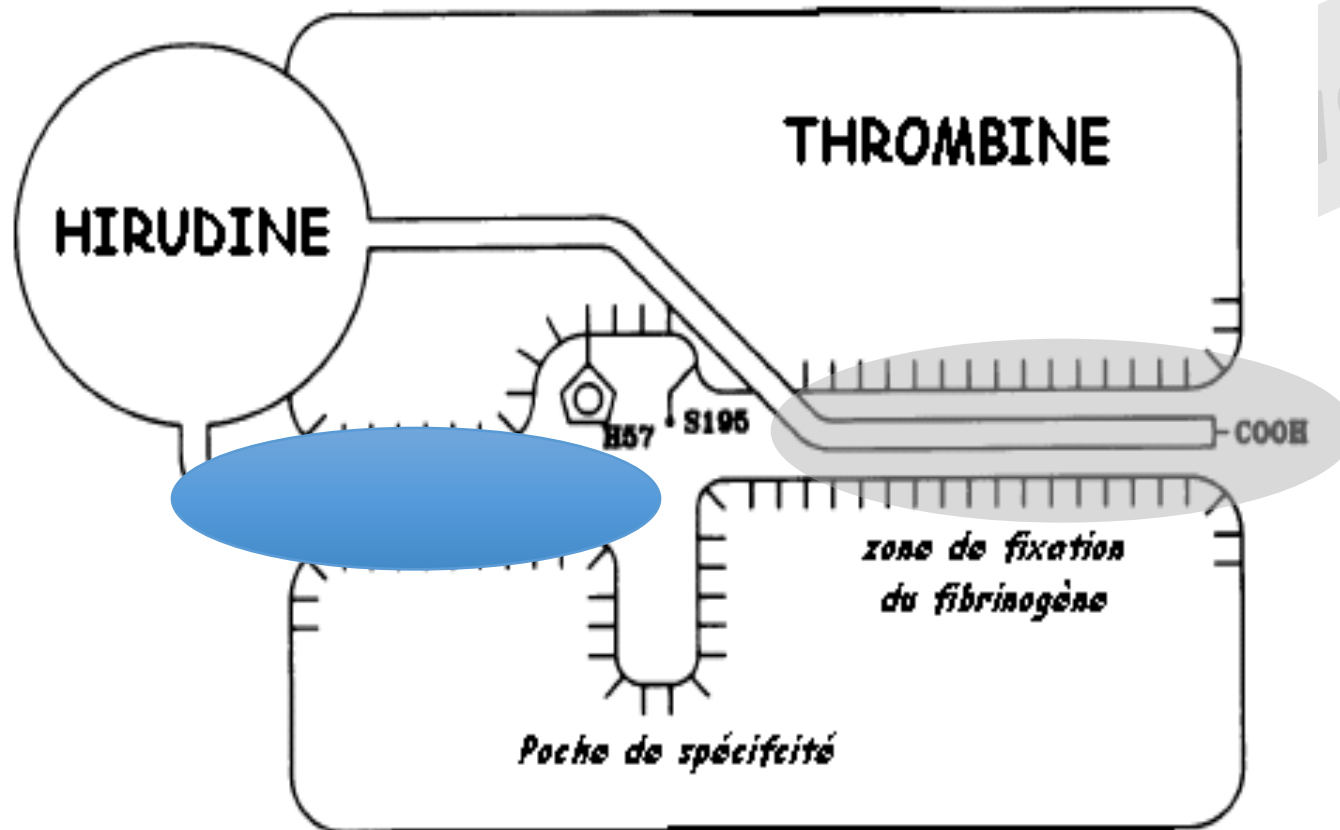
Résumé de la 1^{ère} partie : étude de l'hirudine

Séquence de l'hirudine de sangsue (*Hirudo medicinalis*) - 65 acides aminés

(⁺₃HN-)V₁VYTD C₆TESG₁₀QNLCLCEGSN₂₀VCGQGNCIL₃₀GSDGE K₃₆NQCV₄₀TG E₄₃G₄₄TPKPQS₅₀HNDGDFEEIP₆₀EE Y₆₃LQ₆₅(-COO-)

Regroupement de 8 charges négatives pour 13 résidus d'acides aminés

Schéma des interactions établies lors de l'inhibition de la thrombine par l'hirudine.



- Les acides aminés de l'extrémité N-terminale de la séquence de l'hirudine interagissent avec les acides aminés proches du site catalytique.
- Les charges négatives des acides aminés à l'extrémité C-terminale de la séquence de l'hirudine interagissent avec les acides aminés de la poche de fixation du substrat de la thrombine (le fibrinogène).