

# UE1 – Biochimie : Fonctions des protéines, bases moléculaires

Les **protéines** : premières actrices du vivant

**Pratiquement pas** de processus biologique non régi par une protéine

Assurent l'**ensemble** des **fonctions** du vivant

Fonctions	Structures
<b>Créer et maintenir une structure</b>	- Protéines du cytosquelette - Protéines des tissus de soutien
<b>Reconnaître et se défendre</b>	- Immunoglobulines
<b>Transporter</b>	- Transporteurs de petites molécules (dont l'oxygène) - Transporteurs trans-membranaires
<b>Transformer</b>	- Enzymes catalysent l'essentiel des réactions chimiques du vivant
<b>Bouger / se déplacer</b>	- Protéines à fonction motrice - Protéines des mouvements intracellulaires
<b>Informier / signaler</b>	- Récepteurs et leurs ligands - Interrupteurs moléculaires

## Stratégies d'étude des protéines

Etapes à suivre :

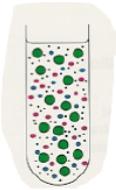
1) **Isoler le tissu ou collecter les sécrétions**

2) **Isoler l'organe par centrifugation différentielle**

### Chymotrypsine

Enzyme pancréatique  
produite dans tube digestif,

Centrifugation  
basse vitesse  
(1000xg, 10 min)



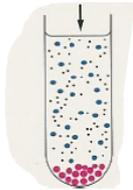
Homogénéat  
cellulaire

Centrifugation  
moyenne vitesse  
(20 000xg, 20 min)



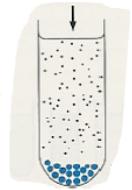
Le culot contient  
cellules entières  
noyau  
cytosquelette

Centrifugation  
haute vitesse  
(80 000xg, 1h)

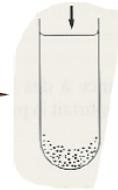


Le culot contient  
mitochondries  
lysosomes  
peroxysomes

Centrifugation  
très haute vitesse  
(150 000xg, 3h)



Le culot contient  
microsomes  
petites vésicules  
RER



Le culot contient  
ribosomes  
virus  
macromolécules  
de grande taille

Le surnageant  
contient le cytosol

3) **Extraire les protéines totales**

L'extraction des protéines totales repose sur leurs **propriétés d'insolubilité** dans des solutions **salines**.

4) **Séparer les protéines par chromatographie et électrophorèse**

**Point isoélectrique (pI)** : pH auquel la charge globale de la protéine est **nulle**. C'est la base de la séparation des protéines par **électrofocalisation**.

**Chromatographies** :

- Selon la **charge** : par échange **d'ions**
- Selon la **taille** : par **filtration** sur gel
- Par **absorption spécifique** : **d'affinité**

**Electrophorèse (SDS-Page)** :

**Electrophorèse mono-dimensionnelle** sert à déterminer le **poids moléculaire**

**$\beta$ -mercapto-éthanol** : coupe les ponts **disulfure covalents**. Puis traitement avec le **SDS** (détergent) qui ouvre la chaîne **polypeptidique** et **dénature** la protéine (de haut en bas : du - vers +)

**Electrophorèse bi-dimensionnelle** :

**1<sup>ère</sup> dimension** : **électrofocalisation** (pI)  
(horizontal : **gradient** de pH de gauche à droite)

**2<sup>nd</sup>e dimension** : **électrophorèse** en **SDS** (haut en bas : croissance de la taille)

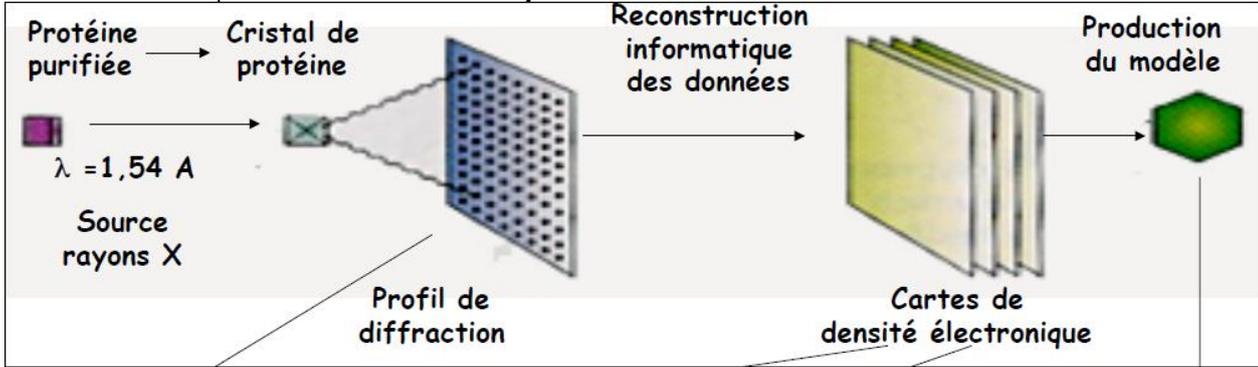
- 5) Isoler et purifier l'enzyme par affinité
- 6) Découper la protéine en petites unités
- 7) Analyser la composition chimique des peptides

On utilise la **spectroscopie de masse** pour déterminer la **masse** d'une molécule ( $10^{-12}$  à  $10^{-15}$ ). Elle permet aussi :

- Déterminer **composition en acides aminés** des protéines
- Déterminer la **séquence des peptides** et des protéines
- Caractériser des **mutations**

- 8) Déterminer la **séquence de la protéine entière**
- 9) Etudier la **structure 3D de la protéine**

L'étude se fait par diffraction des **Rayons X**



### 10) Dédire son mécanisme d'action

## Structure des protéines : de l'acide aminé à la macromolécule

Dans les molécules biologiques existent des **interactions moléculaires non covalentes réversibles**.

Ces liaisons sont **affectées par la présence de l'eau** :

- Liaisons de VDW, dépendent de la distance inter-atomique
- Liaisons électrostatiques (=ioniques, salines), entre molécules chargées
- Liaisons hydrogène entre molécules polaires (2 types dans les protéines)
  - O-H...N
  - N-H...O
- Liaisons hydrophobes, principalement dues à la forte affinité de l'eau pour elle-même

Les molécules **apolaires** interagissent **entre elles** pour laisser le plus de **l° hydrogène**.

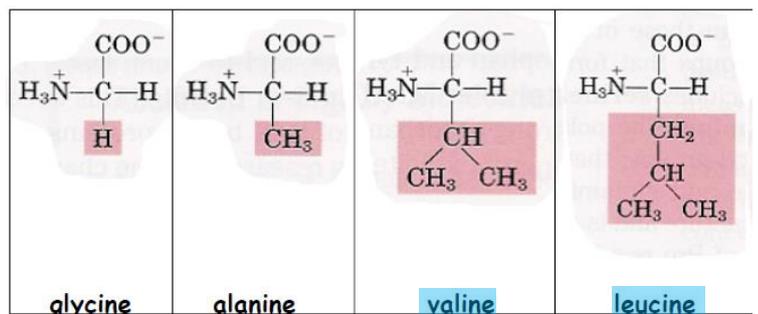
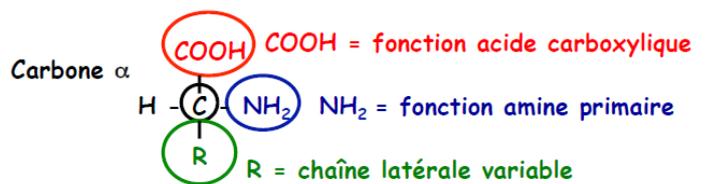
### Les acides aminés :

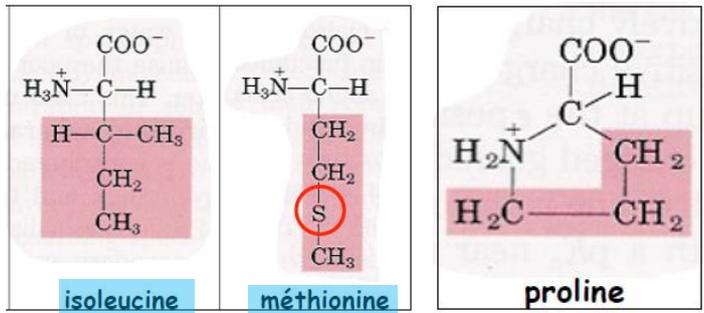
Il existe **2 stéréoisomères**. Les protéines ne contiennent que des **L** acides aminés. Il existe **20 acides aminés naturels**.

**Acide aminé essentiel** = non synthétisé par l'Homme

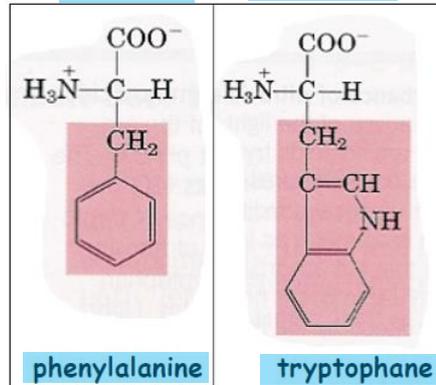
*Acides aminés apolaires :*

*A chaîne aliphatique :*



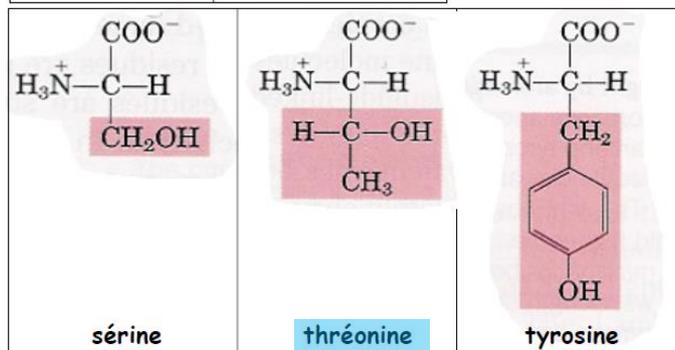


A chaîne aromatique :

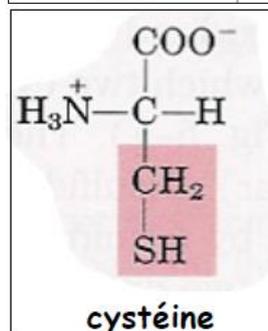


Acides aminés polaires neutres :

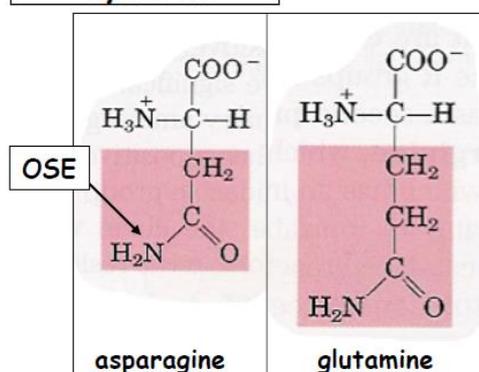
A fonction alcool :  
Ces fonctions peuvent fixer un groupement **phosphate** :  
principe de la **phosphorylation**



A fonction soufrée :  
Pont **disulfure** possible => cystine

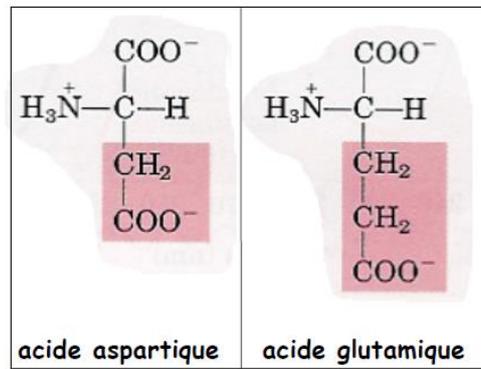


A fonction amide :  
Dans les glycoprotéines, oses fixent sur l'atome d'azote de l'asparagine : **N-glycosylation**

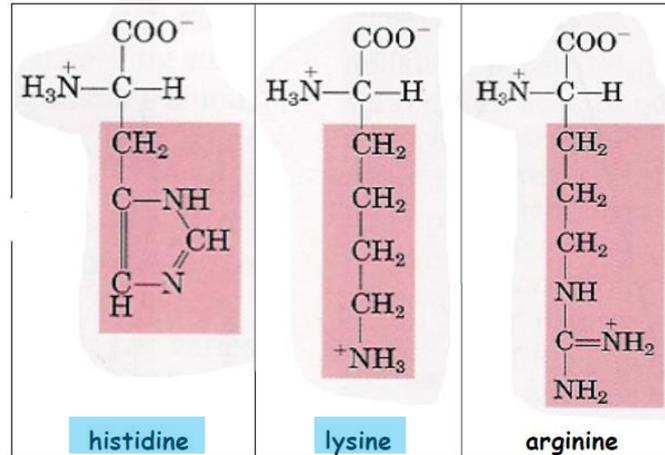


Acides aminés  
polaires ionisables :

A fonction acide :



A fonction basique :  
Arginine : fonction  
guanidinium



- Cycle phényl : phénylalanine et tyrosine
- Groupe indol : tryptophane

**Liaison peptidique :**

C'est une liaison **covalente** qui se forme par **condensation** du groupe **a-aminé** avec le groupe **a-aminé** d'un autre acide aminé et **élimination d'eau**. C'est une liaison **amide particulière** et un « **hybride de résonance** » entre 2 formes extrêmes :

- 1<sup>ère</sup> forme extrême : C-O est une double liaison, C-N est une simple liaison, N de amide possède paire d'e-
- 2<sup>nde</sup> forme extrême : C-O est une simple liaison, C-N est une double liaison, O de acide possède paire d'e- non partagés
- Forme hybride : e- sont partagés entre les atomes O, C et N et sont distribués sur une orbitale moléculaire  $\pi$  qui recouvre les 3 atomes

**3 propriétés de la liaison peptidique** : plane, polaire et rigide

Ses dimensions sont pratiquement **fixes**.

Il existe **3 angles** pouvant prendre des **valeurs variables** :  $\Omega, \Psi, \Phi$

$\Omega$  = angle de torsion **autour** de la liaison **C-N**,

soit  $\Omega = 0^\circ$  (**Cis**), soit  $\Omega = 180^\circ$  (**Trans**) (presque tjs trans)

Dans une chaîne polypeptidique, il n'existe que **2 types de liberté de rotation** permettant de modifier la conformation spatiale : angle  $\Phi$  autour de la liaison entre le **C $\alpha$**  et l'**azote amidique**, l'angle  $\Psi$  autour de la liaison entre le **C $\alpha$**  et le **groupe carbonyle**.

N-terminale (à gauche) et C-terminale (à droite)

**Groupements chargés** : charges portés par les chaînes latérales des résidus d'acides aminés.

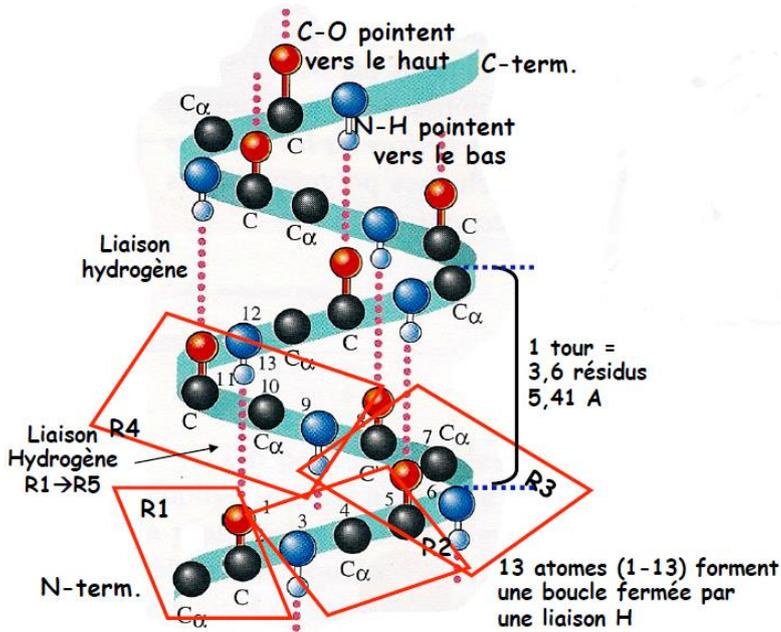
**Clivage des chaînes polypeptidiques :**

Clivage enzymatique :

- **Trypsine** : après un résidu **lysine** ou **arginine**
- **Chymotrypsine** : après **phénylalanine**, **tyrosine**, **tryptophane**, **leucine** ou **méthionine**

Clivage chimique : **bromure de cyanogène** après résidu de **méthionine**

## Structures secondaires



- **Hélice alpha droite** est la structure secondaire la plus **fréquente**.

- **Feuillets bêta** : **parallèle** et **antiparallèle**.

- **Boucles et coudes** : structures **non régulières, non répétitives** permettant des **connections** entre les structures. Coudes ou tours ne possèdent que **quelques résidus**, les boucles une **vingtaine**. Les boucles ont tendance à se situer vers **l'extérieur** des protéines et à engager des **liaisons hydrogènes** avec l'eau.

**Nouveaux outils bioinformatiques** : permettent de faire des **prédictions** sur la **structure conformationnelle** de certains acides aminés.

### Motif et domaine

Il s'agit de **combinaisons** de **structures**

**secondaires**, apportant à des protéines différentes une **fonction commune**.

*Exemple* : hélice-coude-hélice présent dans *beaucoup de protéines se fixant à l'ADN* ; motif immunoglobuline : feuillet bêta.

### Différents niveaux de structure

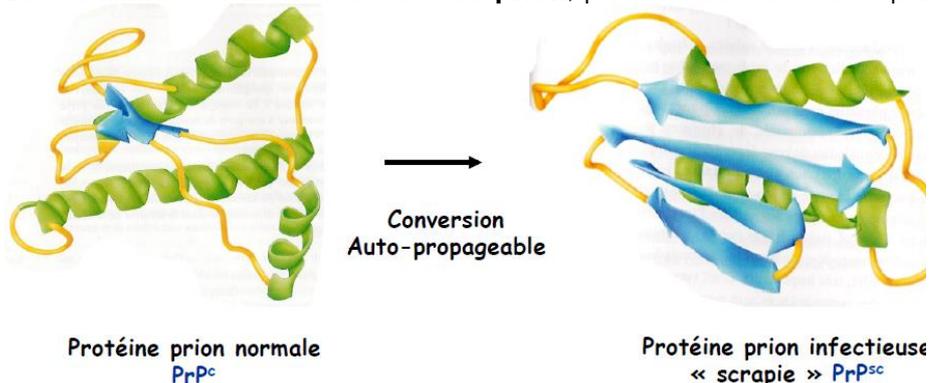
- 1) **Structure primaire** : séquence des acides aminés, qui va déterminer la structure tridimensionnelle. La séquence des aa est déterminée par le gène.
- 2) **Structure secondaire** : hélice alpha, coude, feuillet bêta = motifs structuraux de base
- 3) **Structure tertiaire** : organisation interne d'une protéine monomérique (ou sous-unité)
- 4) **Structure quaternaire** : organisation complexe d'une protéine multimérique

### Dénaturation = perte d'activité

**Agents dénaturants** : urée 8M, chlorure de guanidine (rupture de liaison non covalente)

### Pathologie : le prion et la vache folle

La modification de la structure du **prion**, peut lui conférer une pathologie.



### Transport de l'oxygène

On extrait **18 fois plus d'NRJ** du glucose avec **oxygène** qu'en son absence.

**Myoglobine** : structure **compacte**, riche en **hélice alpha**, 153 résidus, forme **globulaire**

Oxygène est fixé grâce à **l'hème**, groupement **prosthétique plan et polaire**. Le **fer** a un rôle **majeur** dans cette fixation, il est sous forme **ferreuse** ( $Fe^{2+}$ ) (ferromyoglobine) et dispose de **6 liaisons de coordination**. Son **oxydation** sous forme **ferrique** ( $Fe^{3+}$ ) (ferrimyoglobine) rend la molécule **inactive**. L'hémoglobine s'appelle alors respectivement **ferrohémoglobine** et **ferrihémoglobine** ou **methémoglobine**. **Fixation** de l'oxygène **déplace**

**Groupement prosthétique** : molécule non peptidique nécessaire à la fonction  
**Apoprotéine** : protéine dépourvue de groupement prosthétique

l'atome de **fer** par rapport au plan de l'hème. Liaison de l'hème à la myoglobine dépend principalement de **2 résidus histidine**.

**CO** se lie au fer de façon **compétitive** avec l'O<sub>2</sub> avec affinité **bcq plus forte**, ce qui bloque le transport de l'O<sub>2</sub> d'où l'effet **toxique**.

Liaison de l'oxygène à la myoglobine = courbe **hyperbolique** qui traduit la **très haute affinité** de la myoglobine pour l'oxygène

**Hémoglobine** : 4 sous-unités de structure=2 chaînes **alpha** et 2 chaînes **bêta** maintenues par interactions **non covalentes**, chaque chaîne possède un **hème** ; protéine **allostérique**

**Ptés remarquables** :

- Coopérativité de la liaison O<sub>2</sub>
- Possibilité de modulation physiologique de la fixation de l'oxygène : pH, CO<sub>2</sub>, BPG

Hémoglobine adulte : HbA α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>      Hémoglobine fœtale : HbF α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>

Hémoglobine est parfaitement adaptée pour la **captation**, le **transport** et la **libération** de l'oxygène dans les tissus : effet **coopératif**. Affinité de Hb pour O<sub>2</sub> plus faible que celle de myoglobine. **Courbe sigmoïde**

**Effet Bohr** : affinité de Hb pour O<sub>2</sub> est diminuée par **réduction du pH** et **augmentation du CO<sub>2</sub>**

Affinité de Hb pour O<sub>2</sub> est **diminuée** par le **2, 3 diphospho-glycérate (DPG)**, qui est un intermédiaire de la **glycolyse**, libéré dans les tissus périphériques et à **même concentration** que l'Hb, **en l'absence de DPG**, l'Hb **perd ses propriétés de coopérativité**. Affinité de **HbF** est **supérieure** à celle de **HbA**, ce qui est dû à la plus **faible affinité** de la chaîne **gamma** de HbF pour le **DPG** comparée à la chaîne **bêta** de HbA.

### Mécanisme moléculaire du fonctionnement de l'Hb

Lors de l'**oxygénation**, l'atome de fer se **déplace** vers le plan de l'hème. Ce mouvement est transmis à l'**histidine** proximale et à l'**ensemble** de la chaîne polypeptidique par déplacement de **proche en proche**.

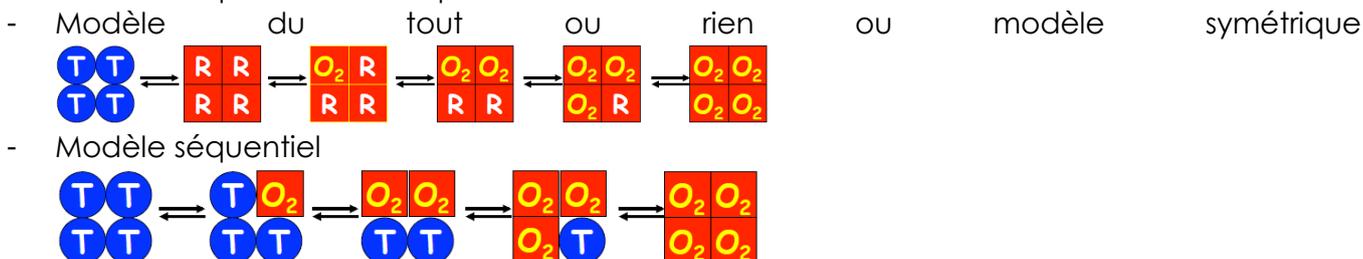
Les interactions entre **chaînes adjacentes** sont principalement réalisées par des **ponts salins** entre résidus **chargés**. Résultante globale => mouvement du dimère α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> par rapport à α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>.

Il existe **2 états moléculaires distincts** entre l'**oxyHb** et la **désoxyHb** :

- **Etat relâché R** : forte affinité pour O<sub>2</sub>
- **Etat tendu T** : faible affinité pour O<sub>2</sub>

**DPG bloque l'Hb** en position **T** en se fixant dans l'**espace libre** entre **4 sous-unités** : il interfère donc avec la coopérativité.

**Transition** allostérique entre T et R peut suivre **2 voies** :



### Drépanocytose

**Hb S** : mutation d'un aa sur la **sous-unité β**

OxyHbS **libère** son O et devient un désoxyHbS => **changement conformationnel** favorisant la formation d'une **poche hydrophobe** => hématie **falciforme**

2 exemples de pathologies :

- **CO** : blocage du site actif de l'Hb
- **Drépanocytose** : pas d'atteinte du site actif

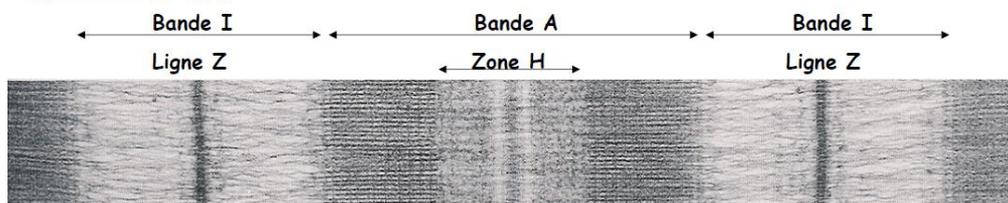
### Protéines motrices : actine, myosine et les autres...

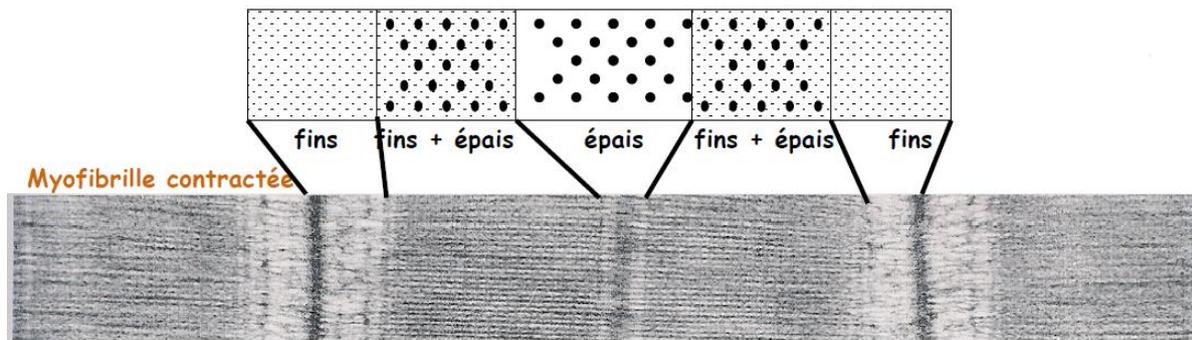
**Structure** d'un **Myofibrille au repos**

**sarcomère**

Filaments **fins** = **actine**

Filaments **épais** = **myosine**





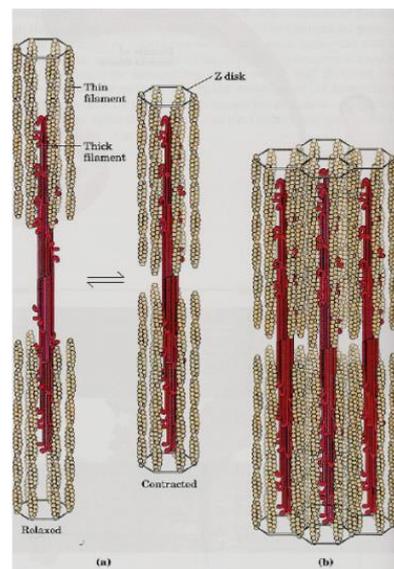
**Actine** = polymère constitué de sous-unités

Molécules de myosine sont regroupées en **faisceaux** desquels émergent des **ponts**

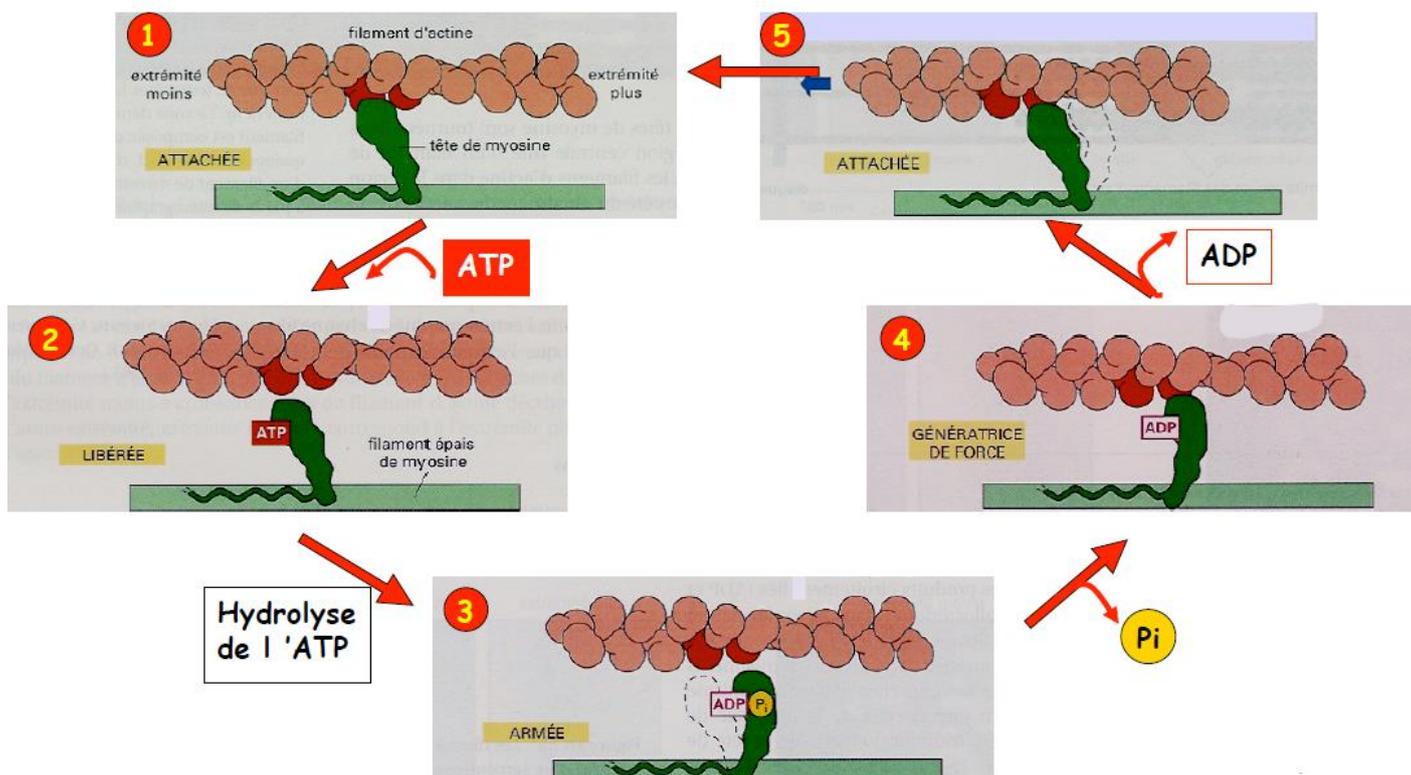
Les filaments fins d'**actine** « couissent » sur les filaments épais de **myosine**. Dans le muscle, de très nombreuses unités (**sarcomères**) sont **juxtaposées**.

### Mécanisme de transformation d'énergie chimique en énergie mécanique

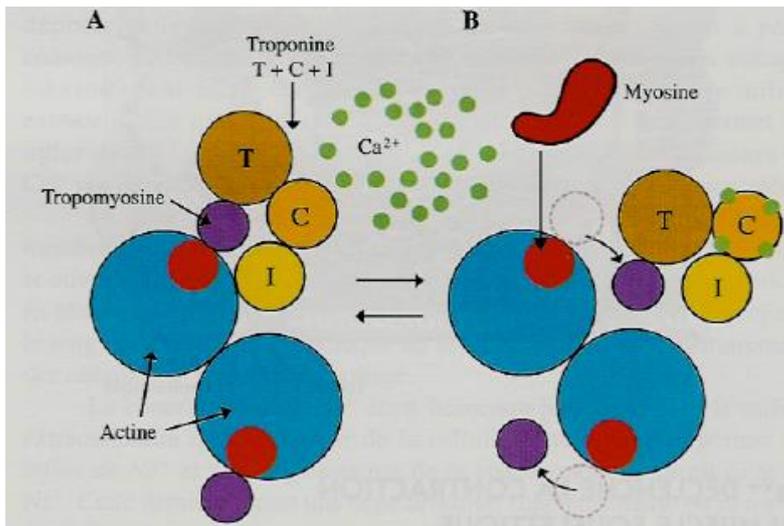
- **Actine** : Monomère d'actine G (43 kDa) présente une **polarité** qui permet la formation du polymère. Le monomère d'actine est formé de **2 domaines** qui présentent respectivement plusieurs types de **structures secondaires**. Chaque monomère contient une **molécule d'ATP** et un ion **Ca<sup>2+</sup>**.
- **Myosine** : 520 kDa, protéine polymérique composée de **2 chaînes lourdes (220 kDa)** et de **2 paires de chaînes légères (20 kDa chacune)**. La **digestion** de la myosine génère des fragments permettant l'**étude** de sa structure et de ses fonctions.



La **tête** de la **myosine** (S1) est responsable de l'**activité motrice**. La myosine est une **ATPase catalysant** la réaction qui produit de l'**NRJ**. L'hydrolyse de l'ATP entraîne un **changement conformationnel** (augmentation de l'angle). L'interaction de la myosine avec l'actine est **réversible** et dépend de la **fixation** de l'ATP et de l'activité de l'ATPase.

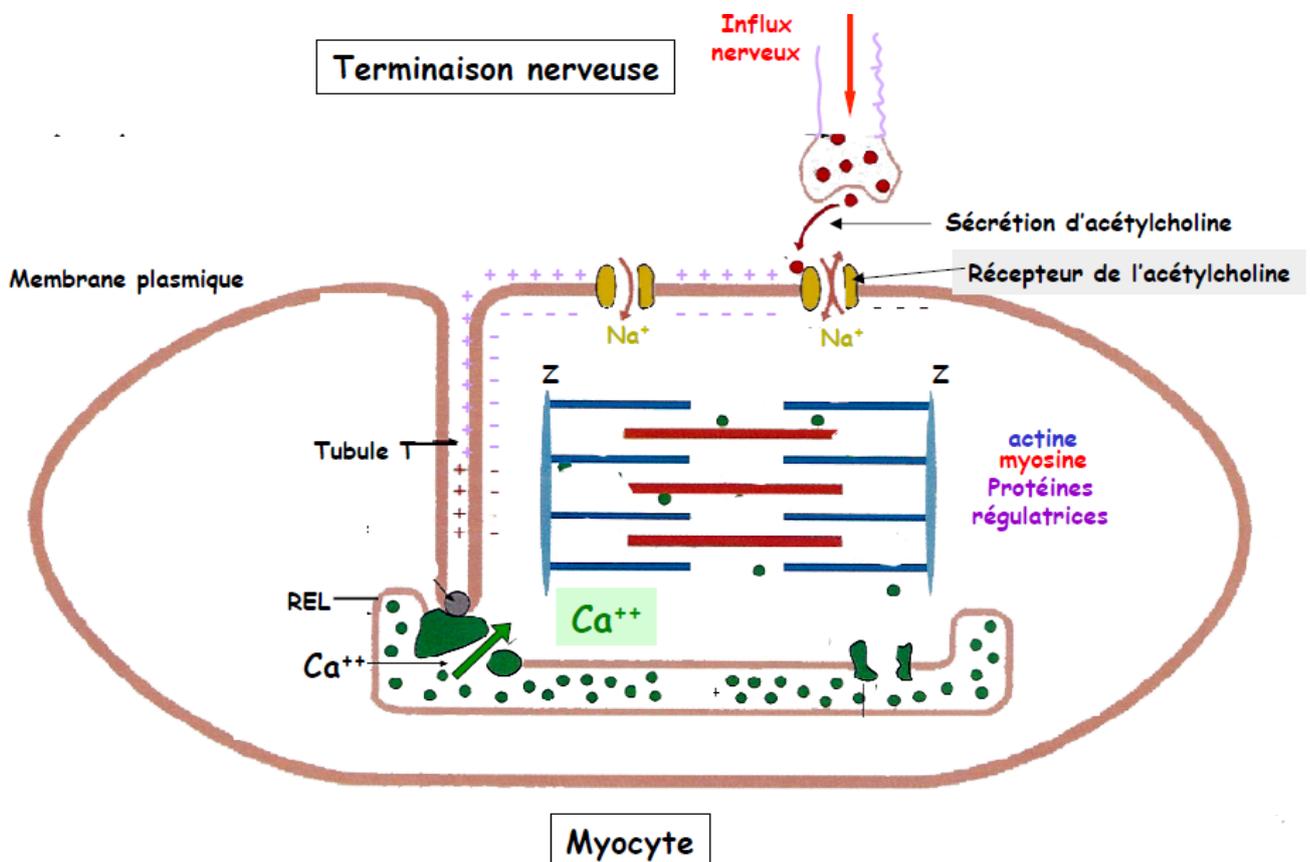


## Contrôle de la contraction musculaire



Il existe un **complexe de protéines régulatrices** : **troponine** et **tropomyosine** ; fixé sur les filaments **d'actine** : notion **d'édifice macromoléculaire**. La **troponine** est une protéine **sensible** aux ions **Ca<sup>2+</sup>**. Elle change de **conformation** en présence de **Ca<sup>2+</sup>**, ce qui induit le **déplacement** de la **tropomyosine** et **démasque** le site de **fixation** de la **myosine** sur l'**actine**.

La contraction musculaire est donc sous **contrôle direct** de la concentration en ions **Ca<sup>2+</sup>**. L'augmentation de la concentration en ions **Ca<sup>2+</sup>** dans le **cytoplasme** du myocyte est **déclenchée** par l'**arrivée de l'influx nerveux**.



## Exemple de protéine membranaire : récepteur nicotinique de l'acétylcholine

C'est une **protéine intégrale** de la membrane plasmique : protéine **immergée** dans la **bicouche** lipidique et entrant en **interaction** avec les chaînes **hydrocarbonées** et **hydrophobes** des **lipides**. Cette protéine transmembranaire comprend **3 domaines** :

- 1 domaine **extracellulaire**
- 1 domaine **intramembranaire**
- 1 domaine **cytoplasmique**

**C'est un canal cationique régulé** : protéine contenant un **pore** réalisant un **pont aqueux** entre les faces **intra-** et **extra-cellulaires** de la membrane plasmique. C'est une **protéine-canal** : le pore laisse passer l'**eau** et certains **ions** => **canal ionique**. Le récepteur de l'acétylcholine est **sélectif** pour les **cations Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>** => **canal cationique**.

Il existe au moins **2 conformations** du pore :

- Conformation **fermée**
- Conformation **ouverte**

Le **passage** d'une conformation à l'autre est sous le **contrôle** de la **fixation** de l'**acétylcholine** sur un site **spécifique**.

**Protéine pentamérique** : 5 sous-unités : **2 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ , 1 $\delta$** . Elles présentent une **organisation générale commune** : chaque sous-unité contient **4 hélices** transmembranaires => au total **20 hélices**, constituant la région **transmembranaire** :

- Les régions des hélices qui sont en contact avec les chaînes **lipidiques**, sont **riches** en **résidus hydrophobes**
- Les régions des hélices qui constituent la **paroi** du pore sont **hydrophiles**

**Sélectivité ionique du pore** :

**2 paramètres** contrôlent la **sélectivité** des cations :

- **Diamètre** du pore dans sa partie la plus étroite « **filtre de sélectivité** » : 9-10 Å
- **5 hélices du M2** formant la paroi interne du pore contiennent des **aa** dont les chaînes **latérales** portent des charges **négatives**. Il y a **3 anneaux de charges négatives**

**Ce canal est aussi un récepteur** : il lie **spécifiquement** l'**acétylcholine**

Chaque récepteur porte **2 sites de liaison**, un sur chaque sous-unité  **$\alpha$**

Chaque site est situé sur la face **interne** de l'entrée du pore et constitue une sorte de **poche** où vient se fixer la molécule d'**acétylcholine**

**Somme de liaisons de faible NRJ** : interaction **réversible**

Fixation de **2 molécules** d'**acétylcholine** induit l'**ouverture** du pore par changement conformationnel de la protéine, au niveau de la région **transmembranaire** et au niveau du **domaine cytoplasmique**.

L'**ouverture** du pore dans le domaine intra-membranaire est le résultat d'une **rotation** des **hélices M2**. Chaque hélice a la forme d'un **coude**.

**3 fonctions** du récepteur nicotinique de l'**acétylcholine** :

- \* **Réception** d'un signal spécifique
- \* **Transport passif** et **sélectif** de cations
- \* **Régulation** de ce transport par l'**acétylcholine**

**Pathologie humaine touchant le récepteur nicotinique** : **myasthénie**

Maladie **neuromusculaire** :

- Se traduit sur le plan clinique par une **fatigabilité musculaire**
- Production d'**auto-anticorps** anti-récepteur nicotinique (maladie auto-immune)
- **Blocage** et **internalisation** des récepteurs
- **Diminution** de la transmission neuromusculaire

### Blocage du récepteur par des auto-anticorps

