

UNIVERSITÉS 3 DE CONSTANTINE**FACULTÉ DE MÉDECINE****MODULE DE BIOCHIMIE****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. LES METHODES D'ETUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTEINES**
- VII. STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES.**
- 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 : Les protéines furent découvertes à partir de 1835 aux Pays-Bas par le chimiste organicien Gerardus Johannes Mulder (1802-1880), sous le nom de wortelstof (qui signifie substance racinaire). C'est son illustre confrère suédois, Jöns Jacob Berzelius, qui lui suggéra en 1838 le nom de protéine.

Le terme protéine vient du grec ancien **protos** qui signifie première importance :

- Quantitative : elles constituent plus de la moitié du poids sec des cellules.
- Qualitative : elles participent à presque toutes les fonctions cellulaires.
- Ce sont des macromolécules de type polymère composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés (chaînes polypeptidiques).
- La structure d'une protéine est déterminée génétiquement et possède une taille prédéfinie (modifiée parfois après traduction).
- Les protéines sont synthétisées et dégradées en permanence dans les cellules.

II.FONCTIONS DES PROTEINES : Les protéines (ou les protides) sont des éléments essentiels car elles ont des rôles très variés au sein d'une cellule et au sein d'un organisme, chaque protéine joue un rôle particulier :

- Structurale.
- Enzyme.
- Hormone.
- Anticorps.
- Mouvement ou contraction : actine et myosine de la contraction musculaire.
- Transport de substances.
- Substrat énergétique.

III.CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES : on classe les protéines selon :

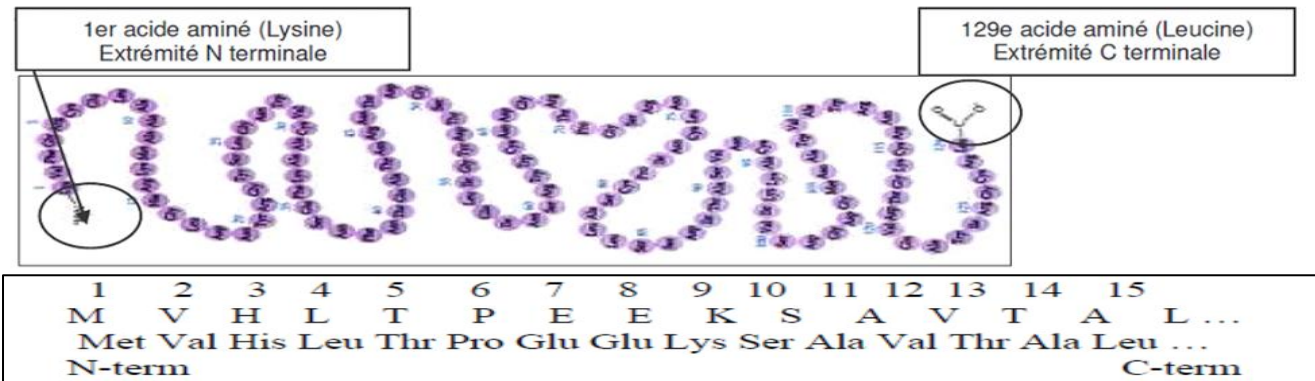
- ✚ Leur composition en protéine :
 - Monomérique = une seule chaîne peptidique
 - Multimérique = plusieurs chaînes peptidiques.
 - Homomultimérique = plusieurs chaînes peptidiques identiques
 - Hétéromultimérique = plusieurs chaînes peptidiques différentes.
 - Haloprotéine : dont la molécule n'est composée que d'acides aminés.
 - Hétéroprotéine dont la molécule comporte :
 - Une partie protéique : apoprotéine.
 - Une partie non protéique : appelée groupement prosthétique.
- ✚ Selon leur forme globale en :
 - Protéines fibreuses : forme allongée et mince, exemples : le collagène, la kératine (à fonction structurale ou protectrice)
 - Protéines globulaires : forme sphérique et compacte, exemples : hémoglobine, myoglobine.
- ✚ Les protéines peuvent être liées à d'autres molécules (par liaison covalente), il peut s'agir :
 - De lipide ; on parle de lipoprotéine.
 - De glucide ; on parle de glycoprotéine.
 - D'un métal ; on parle de métalloprotéine.

IV.NIVEAUX D'ORGANISATION DES PROTEINES : Les caractéristiques spatiales des protéines sont la clé de leurs fonctions. La structure des protéines est définie à plusieurs niveaux :

- 1. Structure primaire :** la séquence d'acides aminés (enchaînement d'acides aminés).
- 2. Structure secondaire :** structure tridimensionnelle locale (interactions entre acides aminés voisins).
- 3. Structure tertiaire :** structure tridimensionnelle globale (interactions entre acides aminés éloignés).
- 4. Structure quaternaire :** associations de plusieurs chaînes peptidiques (interactions entre sous unités).

1. Structure primaire : C'est une séquence linéaire qui résulte de l'enchaînement successif des acides aminés (dont le nombre est supérieur à 100) reliés entre eux de façon covalente par liaison peptidique (liaison amide) selon une séquence de codons d'ARNm suite à la traduction de l'information contenue dans le gène codant.

-La séquence en acides aminés se lit et s'écrit par convention, de l'extrémité N-terminal vers le l'extrémité C-terminal en utilisant le code à une lettre ou le code à trois lettres.

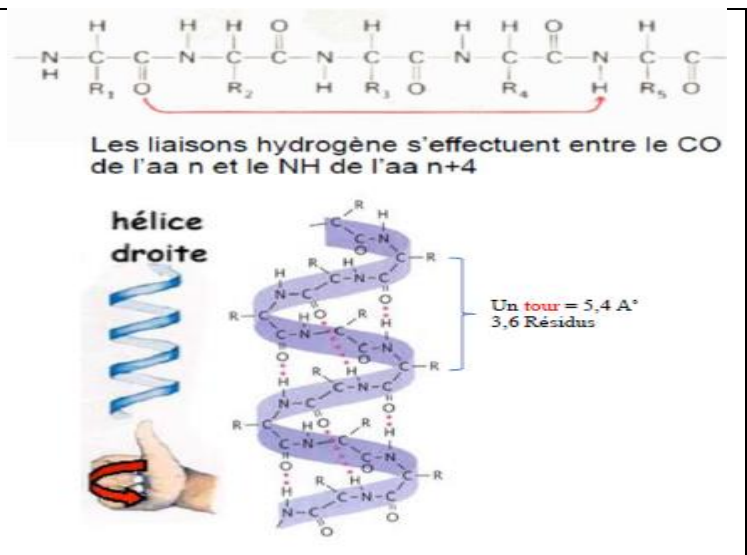


2. Structure secondaire :

- Premier stade de l'organisation dans l'espace de toute la chaîne peptidique ou d'une séquence courte de la chaîne peptidique.
- C'est une structure non linéaire stabilisées par des liaisons hydrogènes entre le CO et NH des liaisons peptidiques.
- Les structures secondaire les plus fréquente sont : l'hélice α , le feuillet β et le coude β .

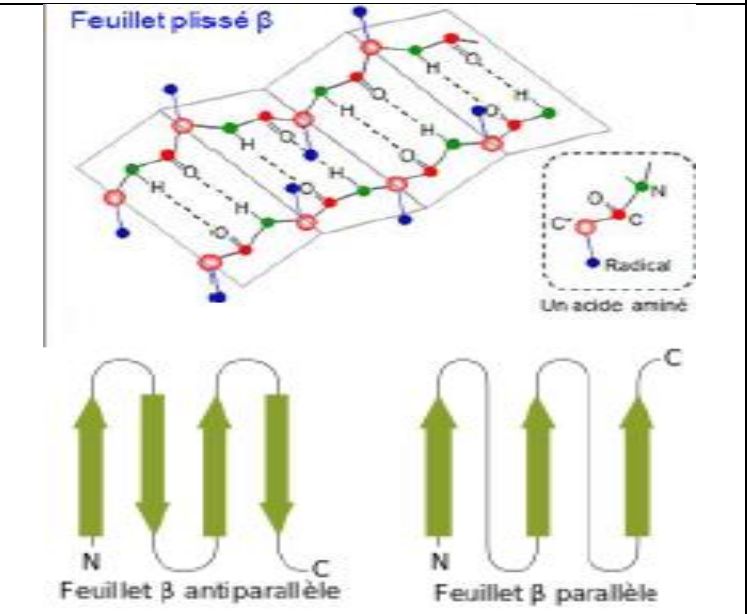
2-A/Hélice α : Rotation régulière d'une chaîne polypeptidique sur elle-même (en spirale) vers la droite (dans le sens des aiguilles d'une montre) stabilisée par des ponts hydrogènes établis (à intervalles réguliers) entre l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O (n) et l'hydrogène d'un groupement aminé -NH situé quatre résidus plus loin (n+3).

- Les ponts hydrogènes vont dans la même direction que l'hélice.
- Les chaînes latérales R sont orientées vers l'extérieur de l'hélice.
- Exemple : la kératine des cheveux est une protéine fibreuse en hélice α sur toute sa longueur.



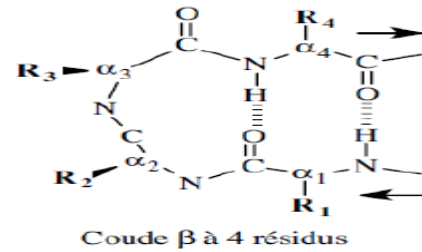
2-B/ Feuillet β : les chaînes polypeptidiques (ou une partie) se lient côte à côte au moyen de liaisons hydrogène entre les groupements C=O et NH en forme de zigzag.

- Les liaisons hydrogènes sont perpendiculairement à l'axe de la chaîne polypeptidique.
- Les chaînes latérales R sont rejetées tantôt vers le haut, tantôt vers le bas.
- On parle de feuillet β :
 - Parallèles quand les chaînes vont dans le même sens.
 - Antiparallèles quand elles vont dans des directions opposées (plus stable étant moins distordues).
- Exemple : La fibroïne est une protéine sécrétée par le ver à soie qui donnera le fil de soie, Constituée essentiellement de feuillets plissés β .



2-C/Coudesβ : permet le changement de direction de deux feuillets β antiparallèles.

- La chaîne principale de la protéine fait un tour en U formée de 4 résidus avec liaisons hydrogènes établis entre l'oxygène du C=O d'un résidu et l'atome l'hydrogène du résidu (n+3).
- Les acides aminés glycine et proline apparaissent souvent dans ce coude.



3. Structure tertiaire : La structure tertiaire consiste en une organisation des structures secondaires entre elles en une molécule de grande taille.

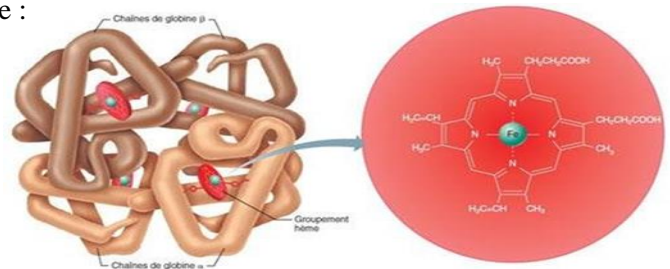
- Elle est stabilisée par de nombreuses liaisons non covalentes (liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes, Van Der Waals) et parfois par des liaisons covalentes type ponts disulfures.
- Elle n'est pas figée, se modifie (se tordre, se déformer) sous l'effet de la fixation d'une molécule (ligand) ou sous l'effet de la variation d'un paramètre physico-chimique (pH, T°).
- Exemple : la myoglobine et la ribonucléase.

4. Structure quaternaire : Résulte de l'association de plusieurs chaînes peptidiques ou sous unités (de structure tertiaire) en une seule protéine fonctionnelle ayant une fonction unique (enzymes, ribosomes)

- Les sous-unités peuvent être :
 - Identiques : homopolymères.
 - Différentes : hétéropolymères.
- Unies selon une géométrie bien particulière par des liaisons faibles (hydrogènes, hydrophobes, ioniques, Liaison de van der waals) et parfois par des ponts disulfures.
- Exemple : **l'hémoglobine Hb**

- Chez l'adulte l'hémoglobine A (95%) est constituée :

- D'une partie protéique formée 4 sous-unités : Hétérotétramères 2α2β.
 - 2 Sous-unités α.
 - 2 Sous-unités β.
- D'une partie non protéique : l'hème (chaque
 - Sous unité est associé à une molécule d'hème).

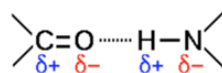


V. LES LIAISONS IMPLIQUEES DANS LA STRUCTURATION DES PROTEINES : Les liaisons qui peuvent s'établir entre les acides aminés constitutifs d'une protéine peuvent être classées en :

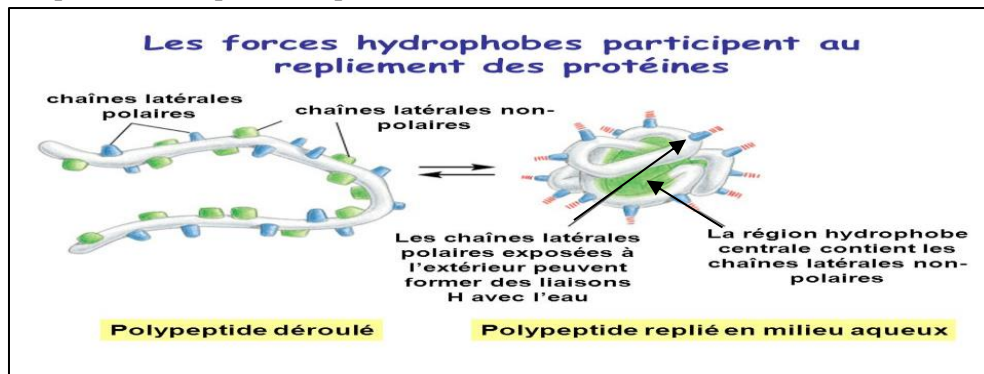
- Liaisons covalentes :
 - Liaison peptidique.
 - Pont disulfure.
- Liaisons non-covalentes (ou liaisons faibles) : 4 types
 - Liaison hydrogène.
 - Liaison hydrophobe.
 - Liaison ionique.
 - Force de Van Der Waals ou liaison de de Van Der Waals.

1-Liaison hydrogène : Se forme quand un atome d'hydrogène est lié à un atome électronégatif (le plus souvent l'azote) se trouve à proximité d'un atome électronégatif (le plus souvent l'oxygène).

Ponts hydrogènes

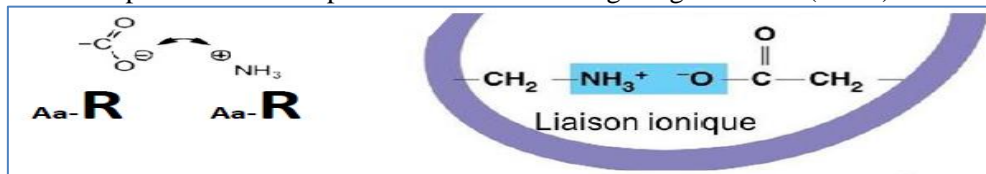


2-Liaison hydrophobe : les chaînes latérales des acides aminés apolaires (non polaires) s'associent les unes aux autres au cœur de la protéine de façon à ne pas interagir avec l'eau et les résidus les plus polaires eux sont au contact du solvant responsable du repliement compact de la protéine.



3-liaison ionique : Elle s'établit entre ions de charge opposée :

- Un atome chargé positivement (cation) cède un ou plusieurs électrons (réalisant une oxydation).
- Un autre atome capte ces électrons pour former un ion chargé négativement (anion) réalisant une réduction.



4-Force de Van Der Waals : il s'agit de dipôle temporaire de faible force. Elle permet aux atomes de se positionner le plus près possible les uns des autres permettant une structure très compacte du cœur des protéines.



- ✚ Les interactions non-covalentes sont responsables de l'établissement de structures secondaires (liaison hydrogène) mais aussi tertiaires et quaternaires (liaison hydrogène, hydrophobe, ionique et force de Van Der Waals).

VI. LES METHODES D'ETUDE DE LA CONFIGURATION SPATIALE DES PROTEINES : Sont la diffraction des Rayons X, La spectrophotométrie ultra-violet (UV) et infrarouge (IR), La dispersion rotatoire optique (ORD), Le dichroïsme circulaire, La fluorescence résonance paramagnétique électronique (RPE) et La résonance magnétique nucléaire RMN.

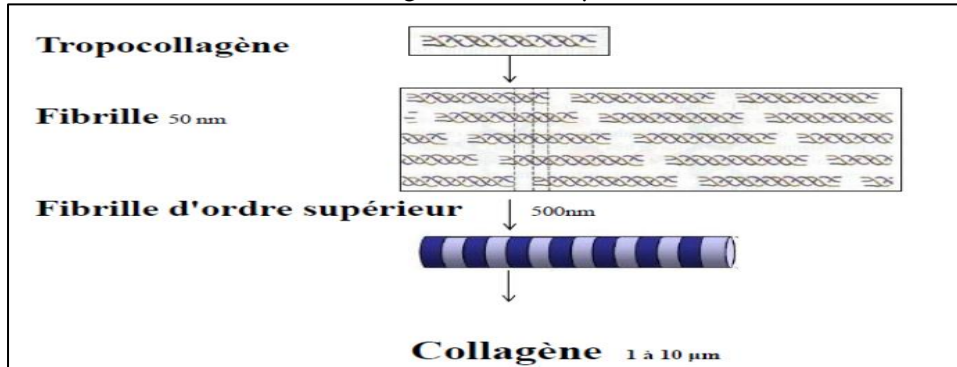
VII. STRUCTURE DES PROTEINES FIBREUSES :

- 1. Le collagène :** principale protéine de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif (peau, os, tendons cartilage, vaisseaux sanguins). Secrétée par les fibroblastes (peau), les chondroblastes dans le cartilage et les ostéoblastes dans l'os.
 - Il existe différents types de collagène : type I, II, III (plus de 90% type I dans le corps).
 - **La structure primaire :** séquence en acides aminés avec répétition de 3 acides aminés Gly-X-Y (X et Y sont en majorité la proline et l'hydroxyproline **Hyp**).

Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-....

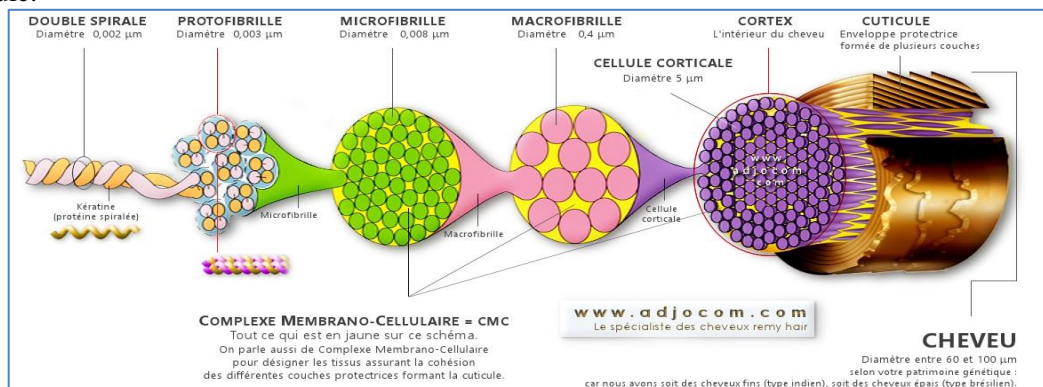
- **La structure secondaire :** Hélice gauche (sens des aiguilles d'une montre).
- Les trois hélices tournent l'une autour de l'autre en une superhélice formant le tropocollagène.
 - Les molécules de tropocollagène s'assemblent côte à côte mais avec un décalage et s'assemblent en une fibrille de 50 nm de diamètre. Ces fibrilles s'agrègent en une fibrille d'ordre supérieur de 500nm, qui peuvent à

leur tour former une fibre de collagène de 1 à 10 µm de diamètre.



2. **La kératine** : c'est une protéine résistante retrouvée chez les vertébrés supérieurs, constituant principal de la couche cornée externe de l'épiderme, ongles, cheveux, cornes et plumes.

- On distingue 2 types :
 - La kératine α : formée d'hélice α = mammifères et l'être humain (cheveux et ongles).
 - La kératine β : formée de feuillet β plissés antiparallèles =oiseaux (plumes) et reptiles.
- La structure d'un cheveu est composée à 95% de kératine : protéine fibreuse dont la structure moléculaire passe par plusieurs niveaux complexes :
 - **La structure primaire** : la chaîne polypeptidique est faite d'environ 310 acides aminés riche en résidus Cys (14% des acides aminés) avec présence de ponts disulfures (à l'origine de rigidité et résistance du cheveu).
 - **La structure secondaire (kératine α)** : hélice α droite (sens des aiguilles d'une montre).
 - Le protofilament : résulte de l'association de deux molécules de kératine α qui s'enroulent l'une autour de l'autre avec un pas à gauche.
 - La torsade de 02 protofilament est appelé protofibrille.
 - L'association de 04 protofibrilles constitue une microfibrille.
 - Les microfibrilles s'assemblent en macrofibrilles.
 - Les macrofibrilles à leur tour constitues le cortex qui est enveloppé par une fine couche protectrice : c'est La cuticule.



VIII. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES.

1-MASSE MOLECULAIRE.

- La masse moléculaire varie de 10 KDa (kilodalton) à plusieurs millions.
- Elle est souvent utilisée comme élément caractéristique servant à la définir ou à la nommer une protéine.
Exemple : Albumine Mm (mass molaire) = 67 000 D (67 KDa).

2-CARACTERE AMPHOTERE DES PROTEINES

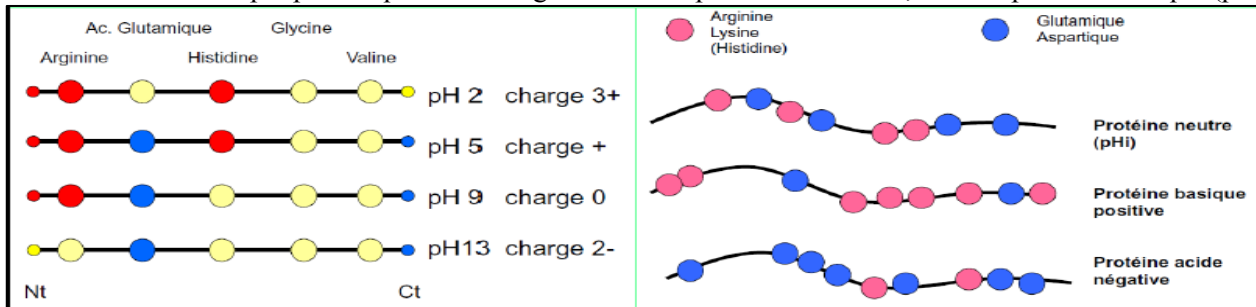
Les acides aminés constituant de chaque protéine sont des ampholytes qui lui confèrent un caractère amphotère par :

- ✓ Les groupements α amines NH_2 et α carboxyliques COOH terminaux qui s'ionisent.
- ✓ La nature ainsi que le nombre des groupements R (chaînes latérales) ionisables de certains acides aminés (Asp, Glu, His..).

RQ : les groupements αNH_2 et αCOOH restants (pas terminaux) unis par covalence pour former des liaisons peptidiques qui ne peuvent s'ioniser et ne contribuent pas à ce caractère.

La charge nette globale d'une protéine varie en fonction du pH :

- En milieu acide : les groupements dissociés sont les groupes basiques, donc la protéine aura une charge positive (+).
- En milieu basique : les groupements dissociés sont les groupes acides, donc la charge résultante est négative (-).
- Il existe une valeur de pH pour laquelle la charge nette de la protéine est nulle ; c'est le pH isoélectrique (pHi).



3-SOLUBILITE : La solubilité d'une protéine est influencée par divers facteurs :

- A. Influence du pH :** La solubilité d'une protéine est minimale au voisinage de son pH isoélectrique ce qui favorise la formation d'agrégats insolubles de la protéine (précipitation).
- B. Influence des solvants organiques :**
 - L'eau ⇒ effet solubilisant.
 - A l'inverse si on ajoute de l'éthanol ou de l'acétone → excellents agents de précipitation des protéines.
- C. Influence de la concentration en sels :** la solubilité des protéines en solution dépend de la concentration des sels dissous exprimée par ce qu'on appelle la force ionique μ .
 - o A force ionique faible (concentration faible en sels) ⇒ Solubilisation.
 - o A force ionique élevée (forte concentration en sels) ⇒ précipitation de la protéine (précipitation saline).

4- STABILITE THERMIQUE DES PROTEINES : une élévation importante de la température au-delà de 40° et le froid induit une dénaturation (perte d'activité biologique de la protéine).

-La dénaturation : modification de la structure tridimensionnelle sans modification de la structure primaire.

5-AUTRES PROPRIETES :

- Absorption de la lumière en UV :
 - Absorption de 220 à 230 nm (liaison peptidique).
 - Acides aminés aromatiques : absorption 260 ou 280 nm.
- Coloration par fixation des colorants : Les protéines fixent des colorants (le rouge Ponceau, le noir d'amidoschwarz, le bleu de Coomassie, le vert lissamine).
- Coloration par réaction permettant le dosage des protéines :
 - Réaction du biuret.
 - Lowry.

IX. DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES.

- 1. Stratégie générale :** La détermination de la séquence complète en acides aminés d'une protéine passe par les étapes suivantes :
 - ✓ Extraire, séparer et purifier la protéine.
 - ✓ Séquençage proprement dit de la protéine :
 - Rompre les ponts disulfures (sous unités), fragmenter la protéine, et hydrolyser la protéine (analyse = composition en acides aminés).
 - Séquençage de la protéine et identification des Aa aux extrémités Ct et Nt.
 - Réarrangement de la séquence de la protéine.
- 2. Technique de séparation et de purification :** diverses techniques de séparation des polypeptides en fonction de :
 - La densité : Ultracentrifugation.
 - La solubilité : Précipitation au sulfate d'ammonium.
 - La taille : Chromatographie gel filtration.

- La charge : $\left\{ \begin{array}{l} \text{-Chromatographie d'échange d'ions.} \\ \text{-Electrophorèse.} \\ \text{-Isofocalisation.} \end{array} \right.$
- L'affinité : Chromatographie d'affinité.

❖ Les techniques de séparations des protéines :

A-Ultracentrifugation : Technique d'extraction des protéines d'un mélange en fonction de la tendance des particules à se déplacer dans une solution sous l'effet d'une force centrifuge à grande vitesse par différence de densité.

-L'appareil utilisé est une centrifugeuse.

B-Chromatographie d'exclusion ou **chromatographie gel filtration** : méthode de séparation basée sur la taille des protéines. Le gel est composé de billes trouées avec des trous de différents diamètres ; les petites molécules pénètrent dans les trous et sortent tardivement et les grandes sortent les premières.

C-Chromatographie d'affinité : Séparation fondée **des** interactions spécifiques entre protéines et ligands fixés (ligands pour la protéine recherchée) sur un support solide .elle plus efficace que la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par gel filtration.

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

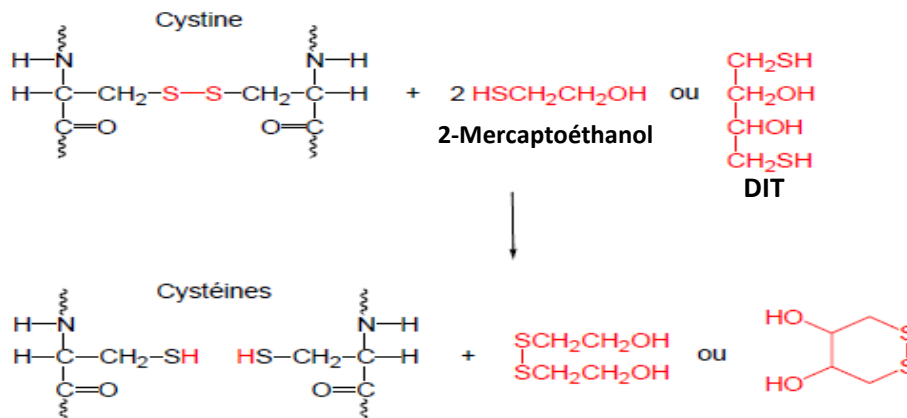
La séparation des protéines en fonction de la masse molaire car toutes les molécules sont chargées de la même façon (le SDS apporte des charges négatives aux protéines).

E-Focalisation isoélectrique : séparation basée sur le pHi des protéines.

3. Préparation de la protéine pour le séquençage.

A/ Séparer les chaines polypeptidiques les chaines polypeptidiques doivent être dissociées pour être séquencées individuellement.

B/ Clivage des ponts disulfures S-S : Clivage des ponts disulfures S-S entre les résidus cystéine (intra -chaines ou inter-chaînes) par le dithiothréitol (DTT) ou du 2-mercaptoéthanol.



REMARQUE : Si les ponts disulfures sont établis entre deux chaines l'étape B doit précéder l'étape A.

4. Séquençage :

4-1/Analyse de la composition en acides aminés :

4-1-A/Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

A1/Chimique :

A1-1/Hydrolyse totale acide : Par HCl à 6 Mol/L, à chaud (110°C), pendant 24 h environ.

- Inconvénients : détruit le Tryptophane et transforme la Glutamine en Glutamate et l'Asparagine en Aspartate.
- Méthode la plus utilisée.

A1-2/Hydrolyse totale alcaline : Par NaOH à 4 Mol/L à chaud (110°C) pendant 4 à 8 heures environ.

- Inconvénients : détruit la Sérine, l'Arginine, la Thréonine et la Cystéine.
- Utilisation limitée à la détermination de la teneur en Tryptophane.

B1/Enzymatique : Protéolyse total par la pronase= mélange de protéases extrait de Streptomyces griseus.

- Intérêt : Détermination de la teneur en Asparagine, en Glutamine et en Tryptophane d'un peptide, acides aminés (détruits par les méthodes chimiques plus sévères).
- Inconvénient : risque de contamination par l'autodégradation des enzymes protéolytiques.

4-1-B/Analyse qualitative et quantitative des acides aminés après hydrolyse : comporte une séparation d'acides aminés par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, suivie du dosage de chaque acide aminé par la réaction colorée à la ninhydrine.

4-2. Identification des résidus N et C terminaux :

A. Identification des résidus N et C terminaux par 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
Leucine aminopeptidase	N-ter	Pro
Aminopeptidase	N-ter	Tous

B. Identification des résidus N et C terminaux par méthode chimique :

B1- Identification des résidus N

- **Par méthode de Sanger (FDNB) :** une hydrolyse acide totale libère l' α -dinitrophényl-amino-acide (DNP-amino-acide) correspondant à l'acide aminé N-terminal marqué qui sera identifié par chromatographie.
- **Par méthode de dansylation.**
- **Par méthode récurrente d'Edman :** permet l'identification de l'extrémité N-terminale sans ruptures des liaisons peptidiques et le séquençage du peptide constitués de 40 à 60 résidus d'acides aminés (libération des PTH-Aa se fait cycle par cycle détecter par chromatographie liquide haute performance : HPLC).

