



Faculté  
de Médecine  
d'ALGER



# *Les protéines*

**Dr OTMANE**

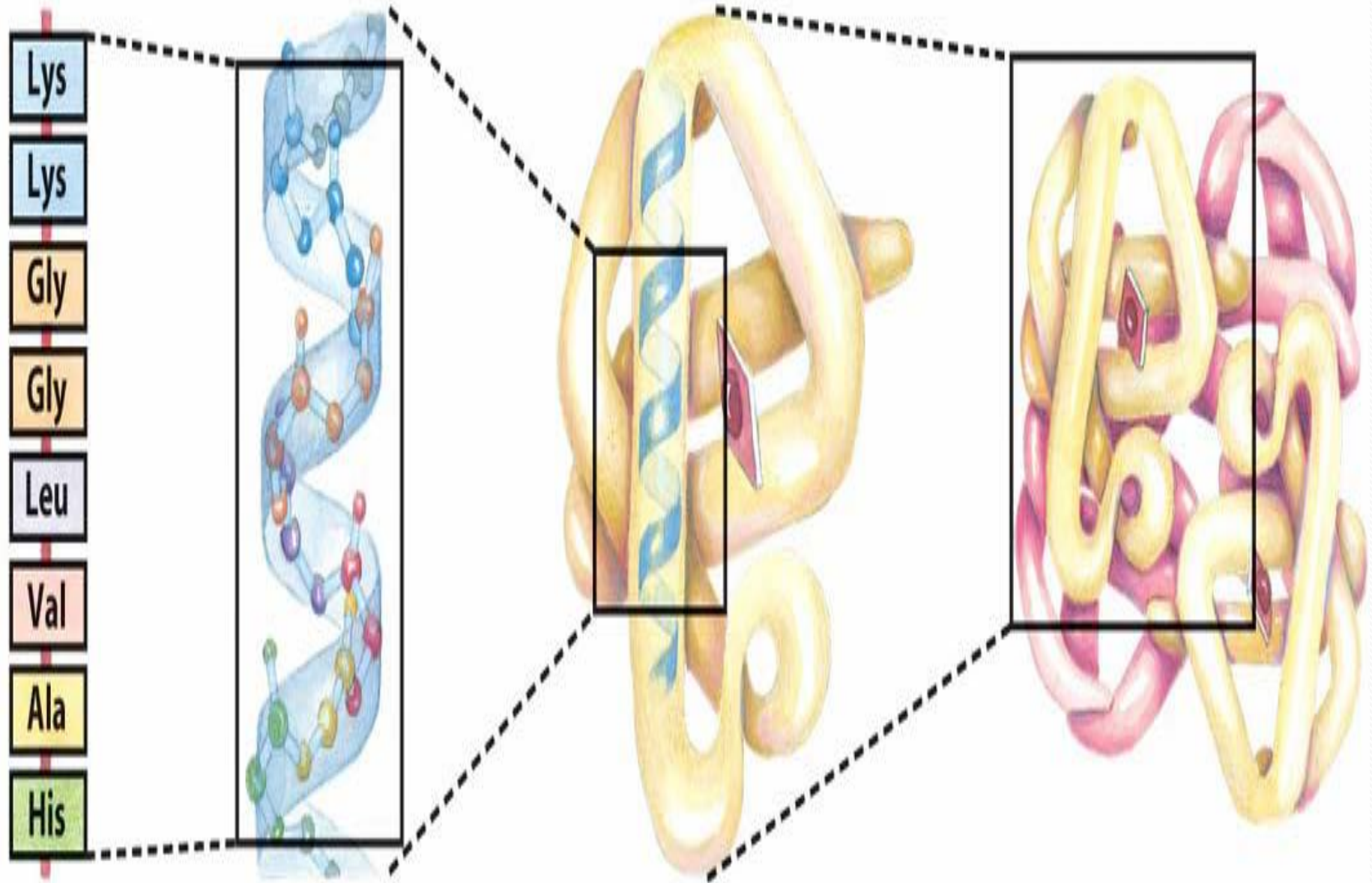
**2<sup>ème</sup> Année pharmacie**

# Définition

- Les protéines sont des biopolymères d'acides aminés (de la série L), qui sont reliés entre eux par une liaison peptidique.
- L'ordre de la séquence des acides aminés distingue une protéine d'une autre.
- La structure d'une protéine comporte plusieurs degrés de complexité croissante.
- Le processus biologique qui permet l'obtention d'une protéine à partir d'acides aminés est appelé **traduction**: traduction de l'ARNm par le ribosome.

# Rôles

- Les Protéines ont de nombreux **rôles** dans la cellule:
  - catalyseurs de réactions (enzymes)
  - intégrité structurale: kératine, fibroïne, protéines du cytosquelette...
  - Transport de molécules,
  - Maintien de la pression oncotique (Albumine)
  - Contraction musculaire
  - Défense immunitaire (anticorps, complément)
  - Messagers cellulaire (certaines hormones)



# Types

- **Protéines globulaires**
- **Protéines fibreuses**

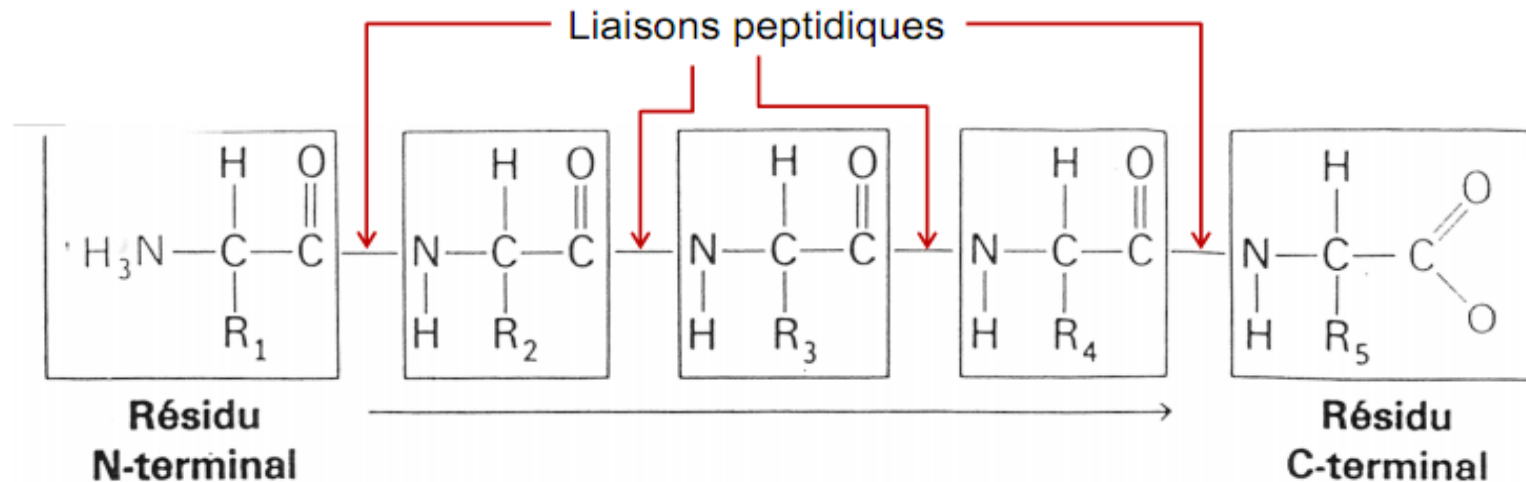


# Les protéines globulaires

# Structure primaire

## Structure primaire des peptides et protéines

- C'est la séquence en acides aminés
- Déterminée par les gènes
- Elle commence du côté N-terminale



**Extrémité N-terminale**  
**Ou Nt de la protéine**

**Extrémité C-terminale**  
**Ou Ct de la protéine**

# Structure secondaire

- Elle décrit le **repliement local** de la chaîne principale d'une protéine.
- Ces repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités, seules certaines conformations sont possibles.
- Ces conformations sont stabilisées par des **liaisons hydrogènes** entre les groupements (-NH) et (-CO) du squelette peptidique.
- Il existe des méthodes physiques pour déterminer la structure secondaire comme:
  - la résonance magnétique nucléaire
  - le dichroïsme circulaire
  - La diffraction par les rayons X
  - la spectroscopie infrarouge.



# Structure secondaire

Il existe trois principales catégories de structures secondaires :

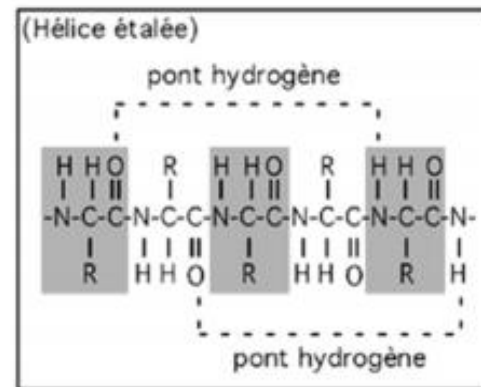
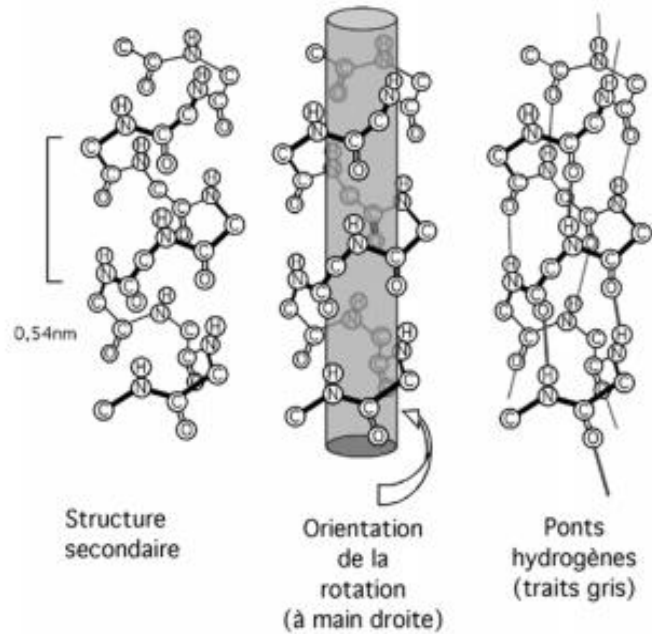
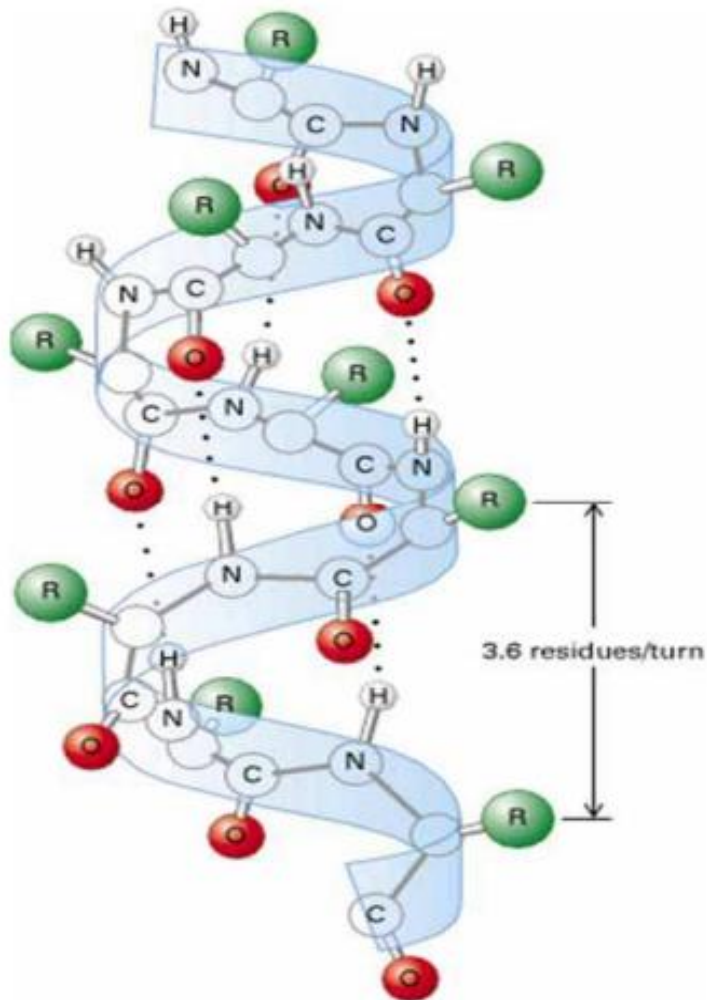
- les hélices,
- les feuilletts
- et les coudes.

# Structure secondaire

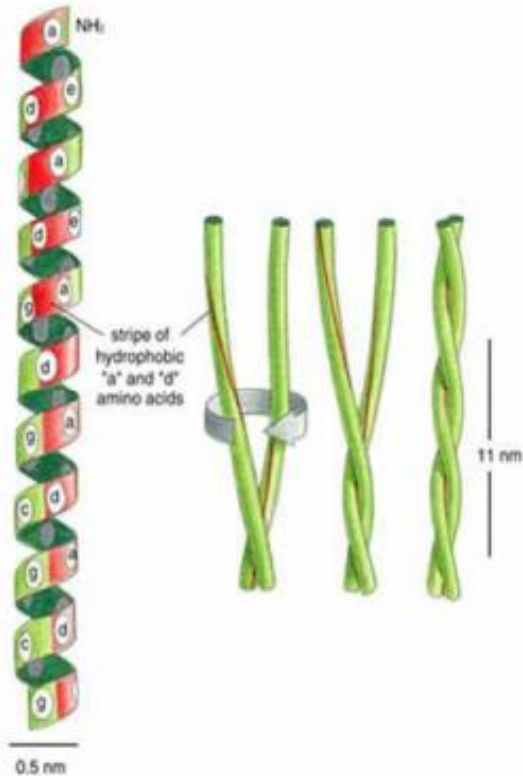
1/ Hélice  $\alpha$ : **Linus Pauling** et **Robert Corey** en 1951.

- C'est une structure compacte très fréquente dans le repliement des protéines.
- Elle se caractérise par la formation de liaisons hydrogènes entre le groupement **-CO** d'un résidu et le groupement **-NH** d'un résidu séparé du 1<sup>er</sup> par **3AA** .
- Un tour d'hélice  $\alpha$  moyen contient **3,6** résidus Aa et mesure 0.54 nm.
- Dans une hélice  $\alpha$ , les chaînes latérales des Aa sont localisées en périphérie de l'hélice et pointent vers l'extérieur .
- Elle ne représente pas toute la structure de la protéine, on définit alors le **taux d'hélicité (%)**

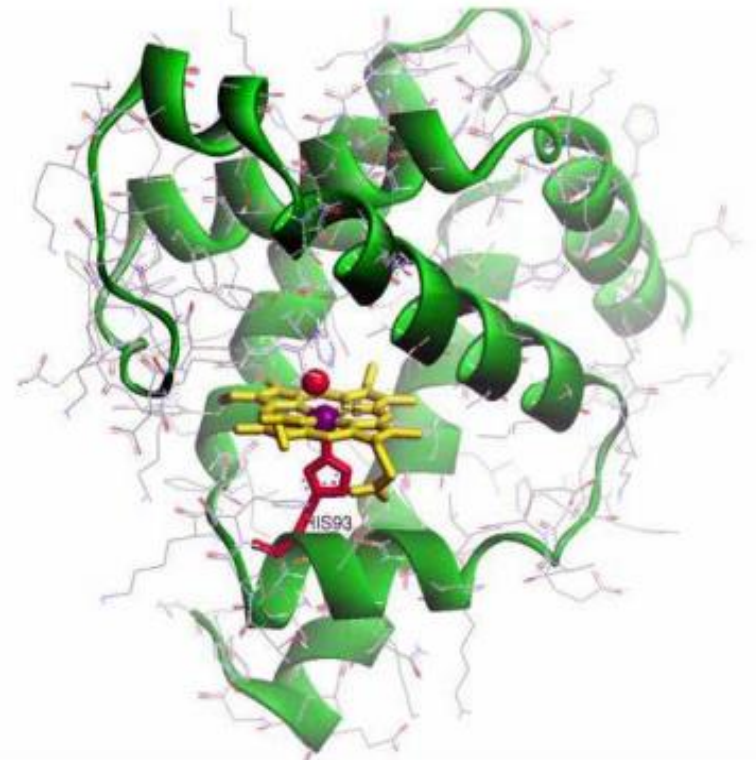
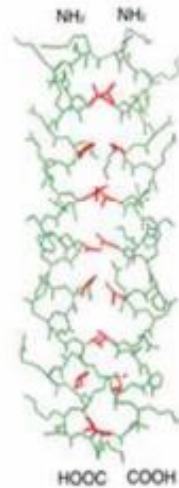
# 1. L'hélice alpha



# Exemple de protéines riches en hélices alpha



**Leucine Zipper**

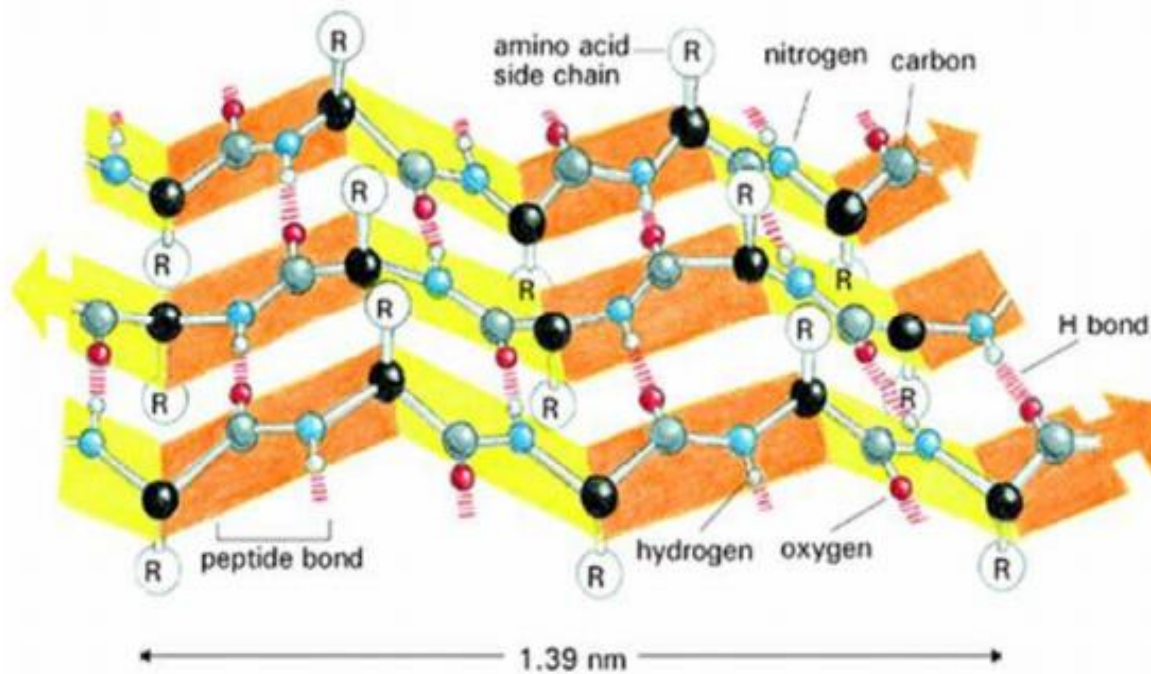
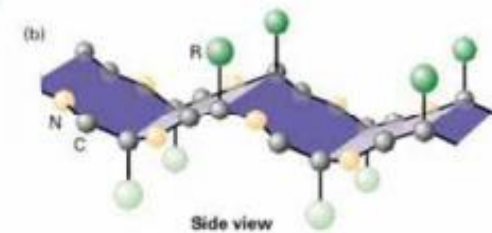
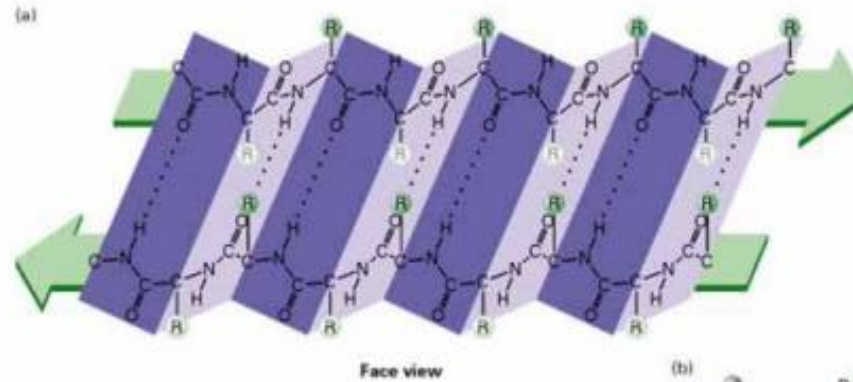


**Myoglobine**

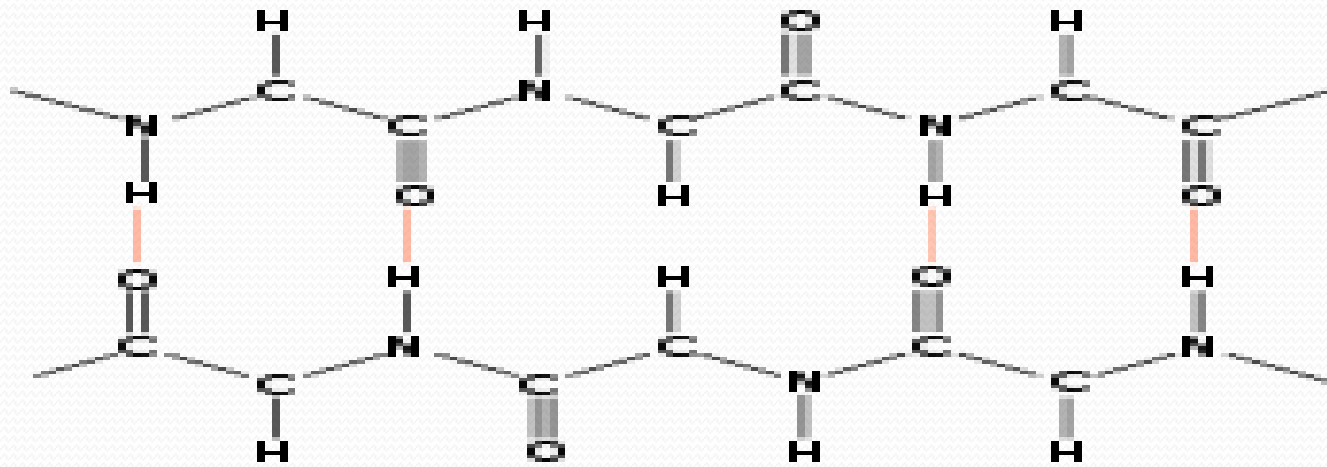
## 2/Brin et feuillet $\beta$

- Le brin  $\beta$  est une structure périodique étendue. Les liaisons hydrogènes qui le stabilise se font entre résidus distants .
- En fait, un brin  $\beta$  seul n'est pas stable, il a besoin de former des liaisons hydrogènes avec d'autres brins  $\beta$  pour se stabiliser. On parle alors de **feuillet  $\beta$** .
- Les feuillets  $\beta$  ne sont pas plans, ils présentent un **plissement** sur leur surface.
- Si les deux brins ont la même orientation: **brins parallèles**  
S'ils ont des orientations opposées: brins **antiparallèles**.

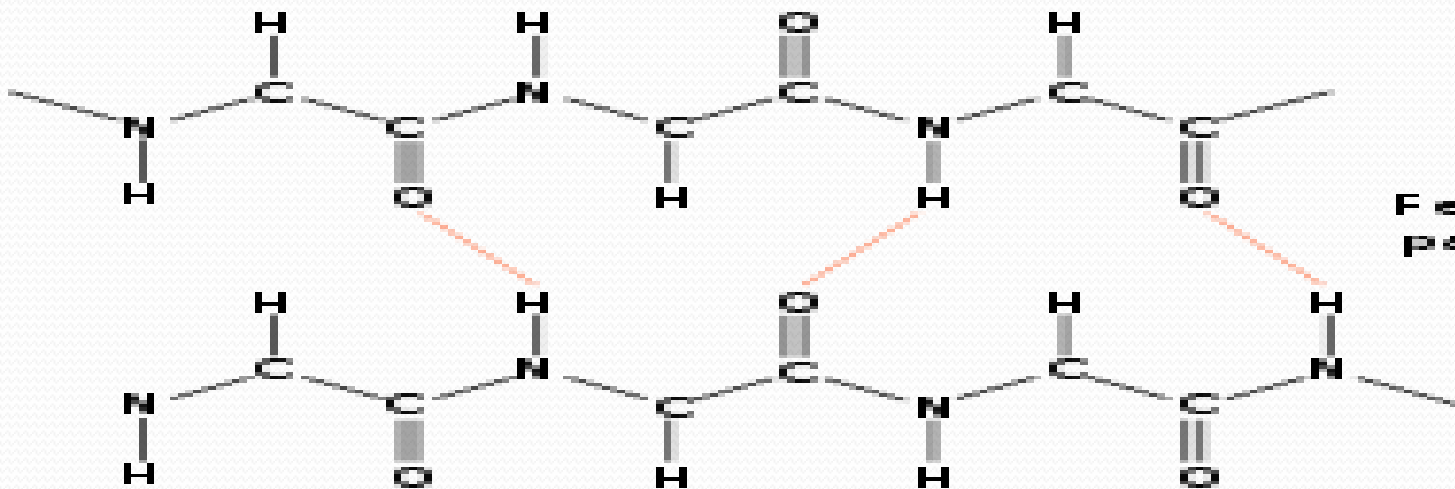
## 2. Brins bêta et le feuillet bêta



# feuillet $\beta$



Feuillet  $\beta$   
antiparallèle



Feuillet  $\beta$   
parallèle

# Coudes

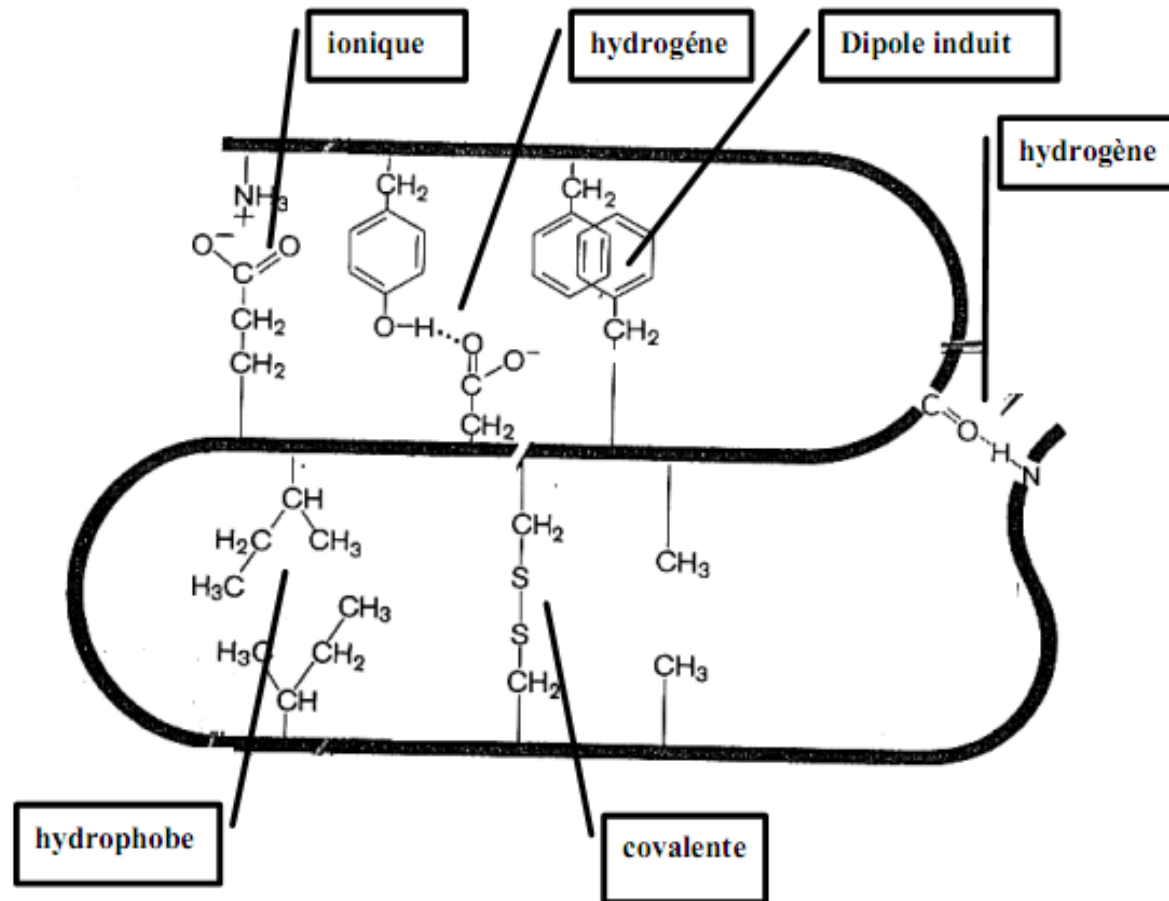
- Les coudes ne sont pas des structures périodiques.
- Ils permettent souvent de relier 2 structures secondaires périodiques (hélices et/ou brins).



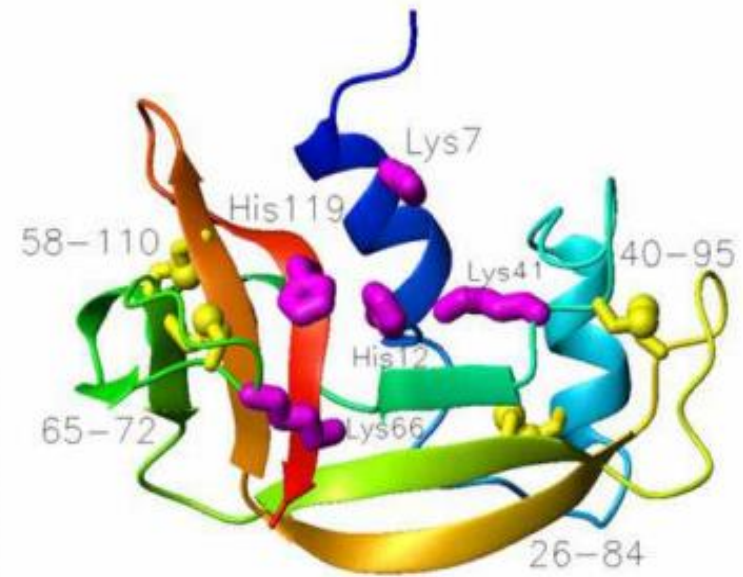
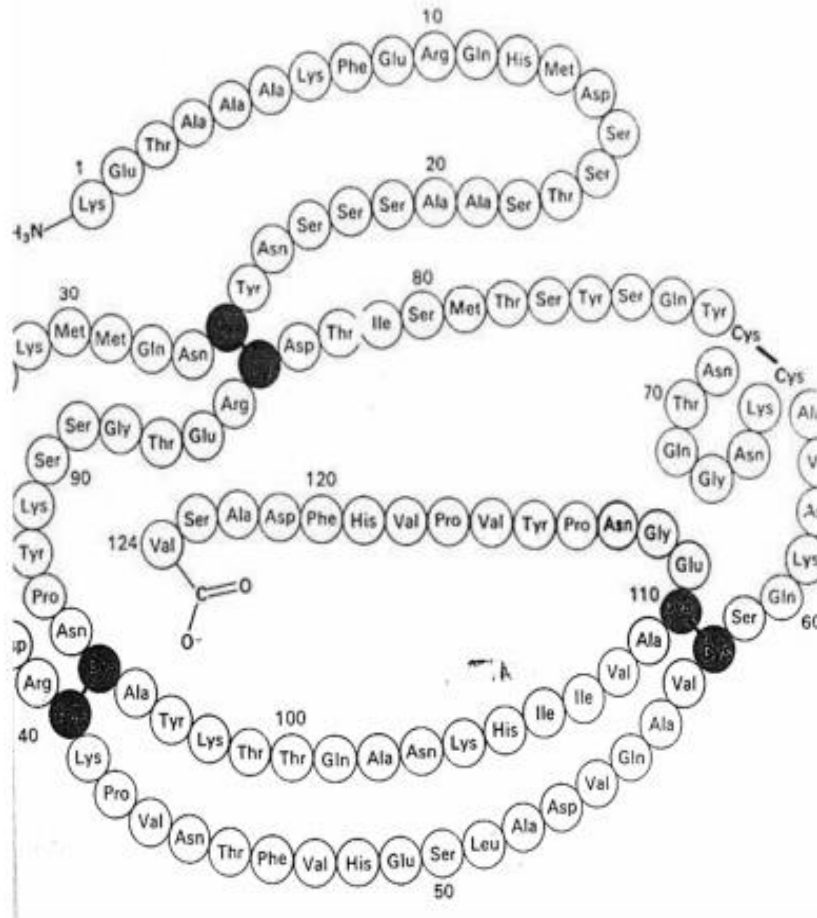
# Structure tertiaire

- Correspond au **repliement** de la chaîne polypeptidique dans l'espace. On parle plus couramment de structure tridimensionnelle.
- La structure tridimensionnelle d'une protéine est étroitement liée à sa fonction: lorsque cette structure est cassée par l'emploi d'agent dénaturant, la protéine perd sa fonction: elle est dite: **dénaturée.**

# Bases moléculaires de la structure tertiaire



# Liaisons covalentes: Ponts disulfures



*Ribonucléase*

# Structure tertiaire

## Conséquences:

- **Enzymes:** Les acides aminés non polaires auront tendance à éviter l'eau; inversement les résidus polaires vont chercher à rester à proximité du solvant aqueux. Ainsi il se forme un cœur hydrophobe au centre (**zone hydrophobe interne: site actif**)
- **Protéines transmembranaires:** les acides aminés hydrophiles vont se retrouver au cœur de la protéine tandis que les acides aminés hydrophobes vont se retrouver en surface.

# Exemples de protéines à structure tertiaire

## Le lysozyme:

C'est une enzyme (1,4-N-acétylmuramidase C)

Le nom de lysozyme a été donné en 1922 par

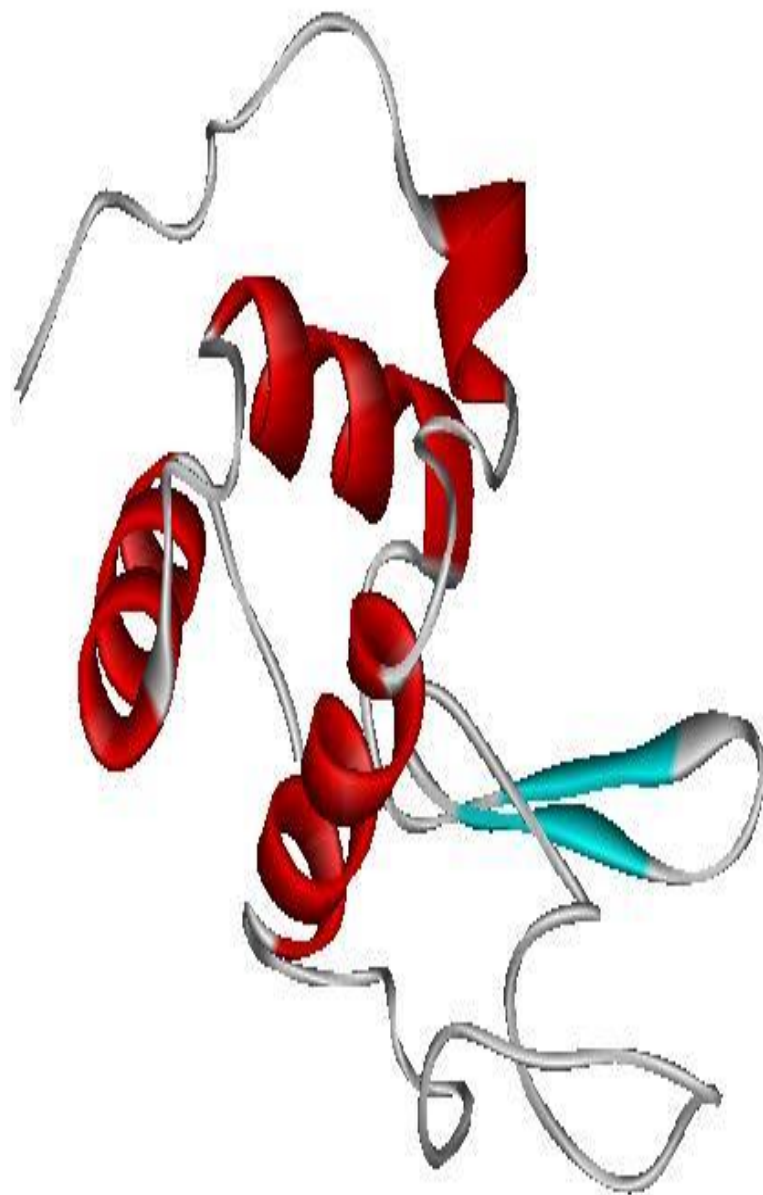
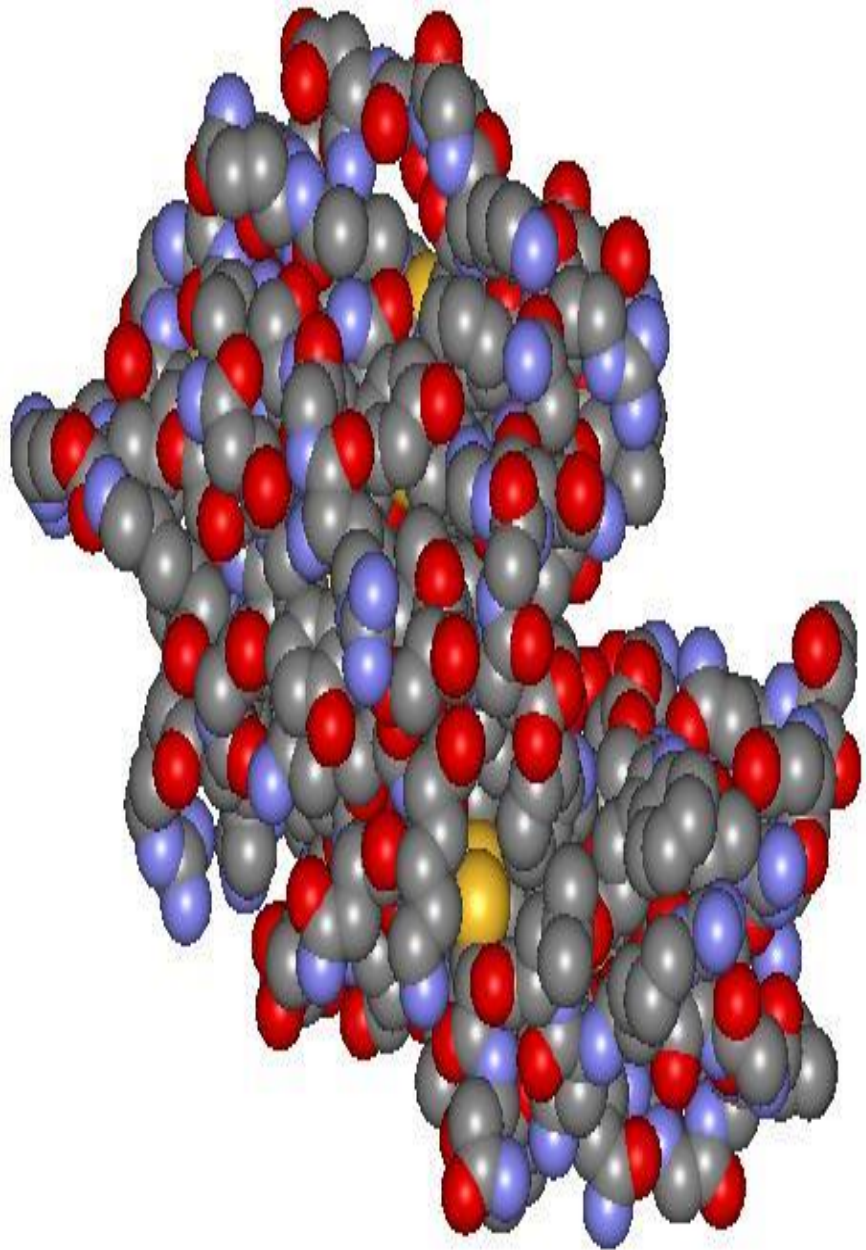
**Alexander Fleming.**

- appartient à la famille des **O-glycosyl hydrolases.**
- Fonctionne sans coenzyme
- Le lysozyme est trouvé dans de nombreux fluides biologiques: les sécrétions nasales, lacrymales et salivaires. Elle hydrolyse les polysaccharides des parois des cellules bactériennes (défense non spécifique)

# Le lysozyme

La structure du lysozyme est d'une très grande stabilité:

- **Structure primaire:** Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de **129** AA [Lysine NH<sub>2</sub>/Leucine COOHt ]
- **Structure secondaire et tertiaire:** par repliement sous forme de 'grain de blé gonflé', stabilisée par des forces de Van Der Waals, liaisons H<sub>2</sub>, forces d'attractions ioniques et surtout **4 ponts disulfure** (8 résidus de Cystéine)
- Le taux d'hélicité= **42%**
- La zone hydrophobe interne contient: Val, Leu, Phe, Trp



# Le lysozyme

- Le substrat: un polysaccharide composés d'unités alternées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM),
- le lysozyme hydrolyse la liaison osidique entre le carbone C<sub>1</sub> du NAM et le carbone C<sub>4</sub> de la NAG



# Autres Exemples

- **La ribonucléase**
- **La myoglobine**
- **La chymotrypsine**
- **L'anhydrase carbonique**

# Structure quaternaire

- Regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques (identiques ou différentes) par des liaisons non-covalentes, de faible énergie (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals), mais rarement par des ponts disulfures.
- L'effet hydrophobe est un facteur prépondérant dans l'assemblage **des sous-unités**.
- Chacune de ces chaînes est appelée **monomère** (ou sous-unité) et l'ensemble **oligomère**
- **Souvent présence d'axe de symétrie**

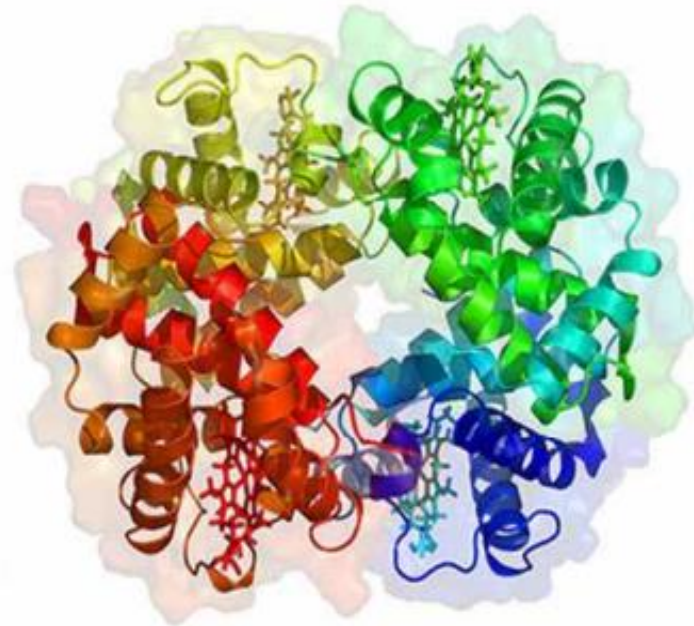
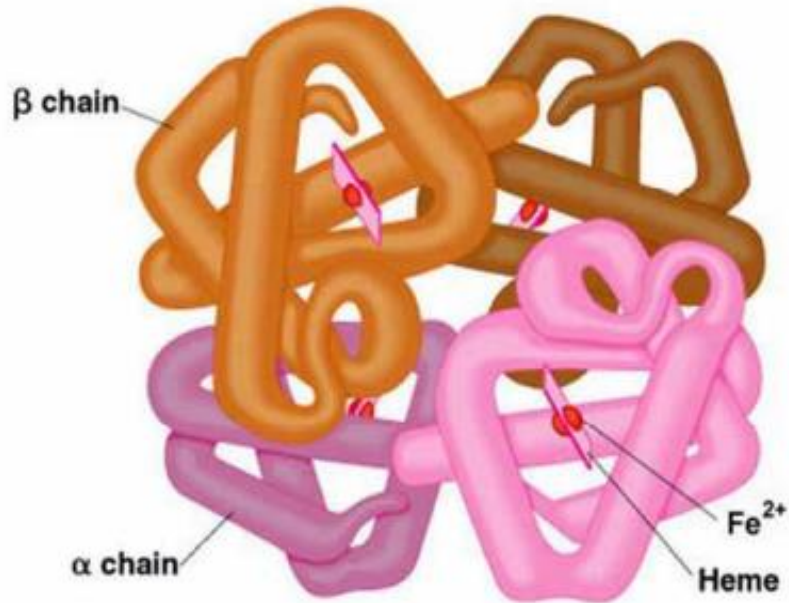
**Exemple:** Enzymes allostériques et l'hémoglobine.

# L'hémoglobine

C'est une chromoprotéine formée par:

- **Hème** (fraction non protéique): porphyrine, structure tétrapyrrolique, au centre un atome de fer (protoporphyrine IX).
- **Globine**: est un exemple de structure quaternaire ; elle est constituée de **4 sous-unités** : 2 sous-unités  $\alpha$  (de 141 acides aminés) et 2 sous-unités  $\beta$  (de 146 acides aminés); **HbA1**

# Exemples de structures quaternaires « L'hémoglobine »



# Allostérie

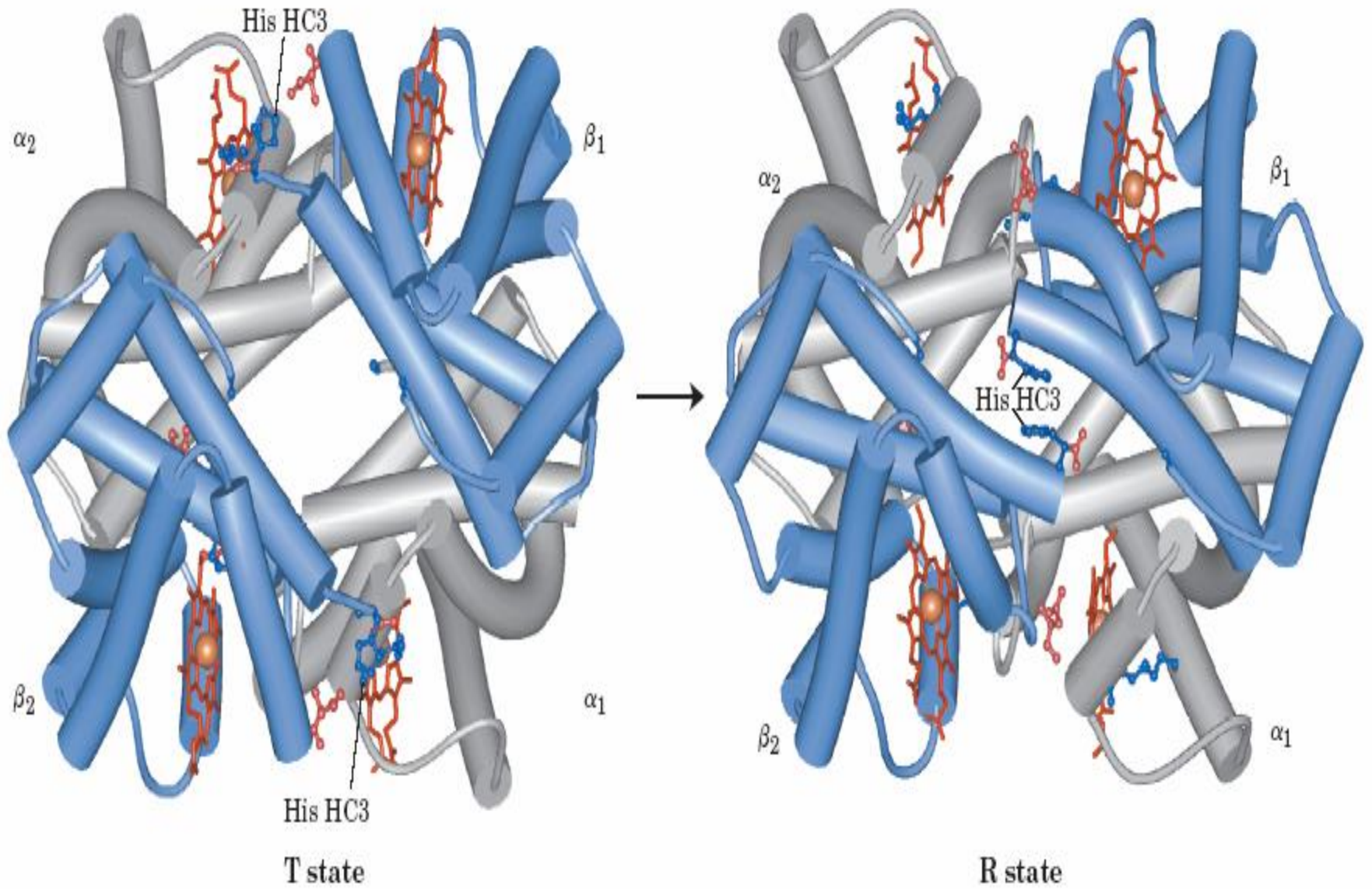
- La fixation de l'O<sub>2</sub> à l'Hb est **coopérative**
- L'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> dépend du pH, et de certains composés (2,3 Biphosphoglycérate)

L'Hb est une **protéine allostérique**; elle existe sous 2 formes:

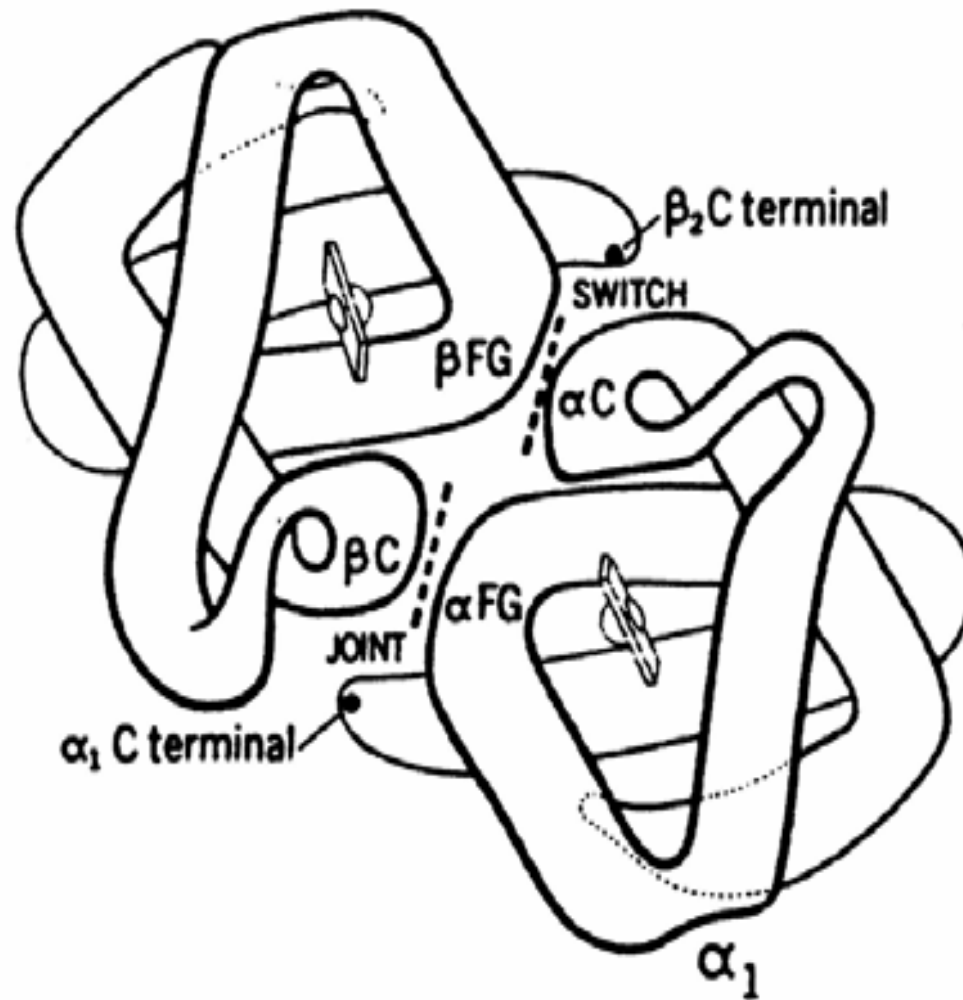
- **Forme T: tendue** (cohésion des protomères, 8 liaisons salines): faible affinité pour l'O<sub>2</sub>, (tissus: pH acide) c'est la désoxyHb.
- **Forme R: relâchée** (de haute affinité pour l'O<sub>2</sub>)(poumons): c'est l'oxyHb

[l'atome de fer rejoint le plan du noyau porphyrine, les liaisons salines sont rompues entre les s/u  $\alpha$  et B]

# Transition R-T



# Zones d'interaction entre les sous-unités $\alpha_1$ et $\beta_2$ de l'hémoglobine.



# Protéines fibreuses

Peuvent être classées en 2 groupes:

- ❑ les structures de type  $\alpha$ : Kératine naturelle, la myosine, le fibrinogène (**cordage**).
- ❑ Les structure de type B: fibroïne de soie.



# *Propriétés physico-chimiques des protéines*

# Propriétés physico-chimiques des protéines

1/ Solubilité: varie d'une protéine à une autre, elle est sous l'influence:

- Du pH: minimale au voisinage du pHi
- De la force ionique: quand elle est élevée les protéines précipitent: **phénomène de relargage** (exp de sel: sulfate d'NH<sub>4</sub>)
- de la température: la t° ↗ est un facteur de dénaturation des protéines (insolubles)
- Des solvants organiques: les protéines sont insolubles.
- Les détergents: solubilisent les protéines intra-cellulaires
- Certains réactifs chimiques dénaturent les protéines, exp: le TCA (Acide trichloracétique)

# Propriétés physico-chimiques des protéines

**2/ caractère amphotère:** constituées d'AA (ampholytes) les protéines ont un caractère amphotère. On parle de **charge nette**.

En milieu acide: charge +

En milieu alcalin: charge –

Le pHi est déterminé par électrophorèse

**3/ la masse moléculaire (MM):** déterminée par plusieurs méthodes:

- filtration sur gel
- Ultracentrifugation
- électrophorèse sur gel de polyacrylamide+SDS.

# Propriétés physico-chimiques des protéines

## 4/les méthodes de dosage:

- **La méthode de Biuret:** En milieu alcalin, les protéines sériques forment avec le sulfate de cuivre un complexe coloré en **bleu-violacé** qui absorbe à 546nm, l'intensité de la DO obtenue est proportionnelle à la [protéines] dans le sang. **VN: 65-75g/L**
- **La méthode de Lowry:** sensible, utilise le réactif de Folin (spécifique aux AA aromatiques: Tyr, Trp), donne une coloration bleue (750nm).
- **Les Méthodes immunologiques:** basées sur la formation du complexe **Ag-Ac**, elles sont nombreuses:  
Immunoprécipitation/ méthodes radio-immunologiques/  
méthodes immunoenzymatiques.

*Méthodes de séparation  
et de purification des  
protéines*

# Introduction

La purification des protéines est une étape importante;

- lorsqu'une protéine est extraite d'un tissu, ce dernier doit être broyer, homogénéiser et désintégrer par **ultrasonation**.
- Si la protéine est dissoute au sein d'un liquide biologique (sérum, plasma, urines, LCR,.....), cette étape est inutile.

Deux critères permettent d'évaluer une méthode de purification:

- Le degrés de pureté
- Le rendement

# Méthodes chromatographiques

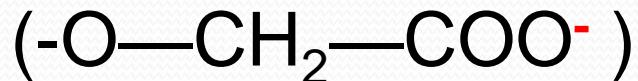
## 1/Chromatographie sur échangeur d'ions:

On utilise la cellulose ou le Dextran comme support sur lequel sont fixés des fonctions polaires, les plus utilisés sont:

- La diéthylaminoéthyle (DEAE): échangeur d'anions



- La carboxyméthyle (CM): échangeur de cations



Les protéines fixées seront éluées par variation du pH et de la force ionique des tampons d'éluion.

# Méthodes chromatographiques

## 2/ Chromatographie d'exclusion-diffusion (gel filtration):

Chromatographie sur colonne remplie de billes de Sephadex (phase stationnaire); Elle permet de séparer les protéines en fonction de leur MM; les protéines se répartissent en deux phases:

Celles qui ont une taille  $<$  à celle des billes de Sephadex pénètrent à l'intérieur des grains (**diffusent**); leur sortie est retardée.

Celles de plus grosse taille sont **exclues** du gel et sont éluées les 1ères de la colonne



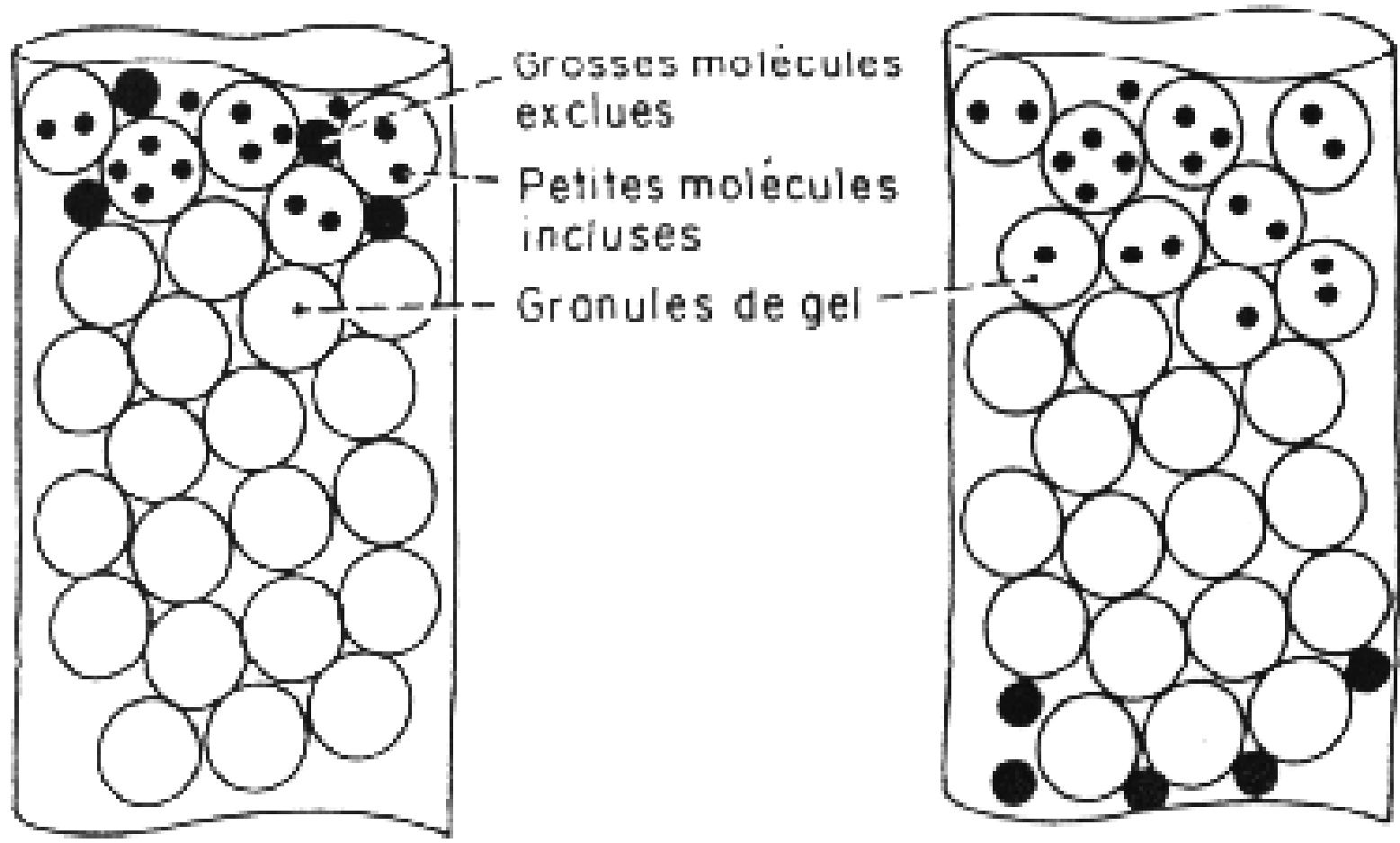


Schéma du tamisage moléculaire.

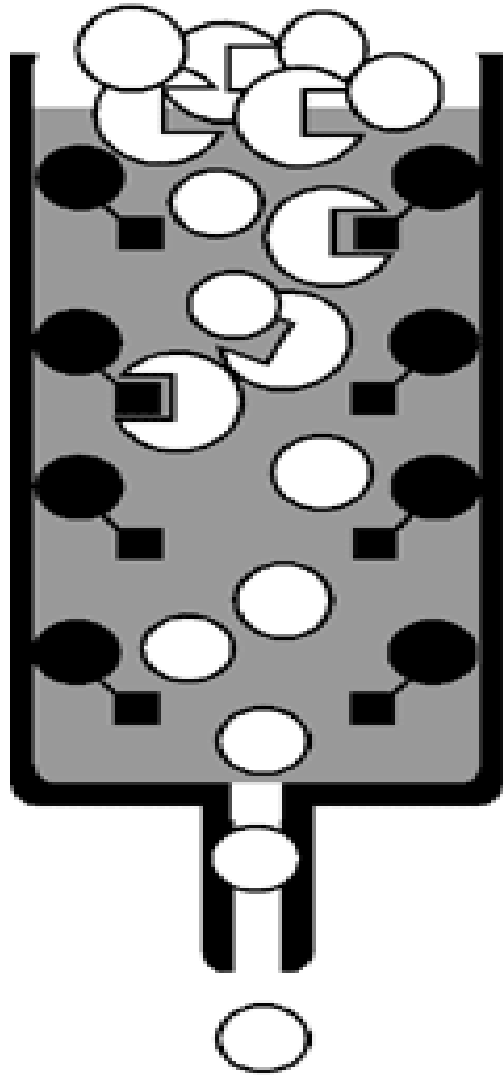
# Méthodes chromatographiques

## 3/ Chromatographie d'affinité:

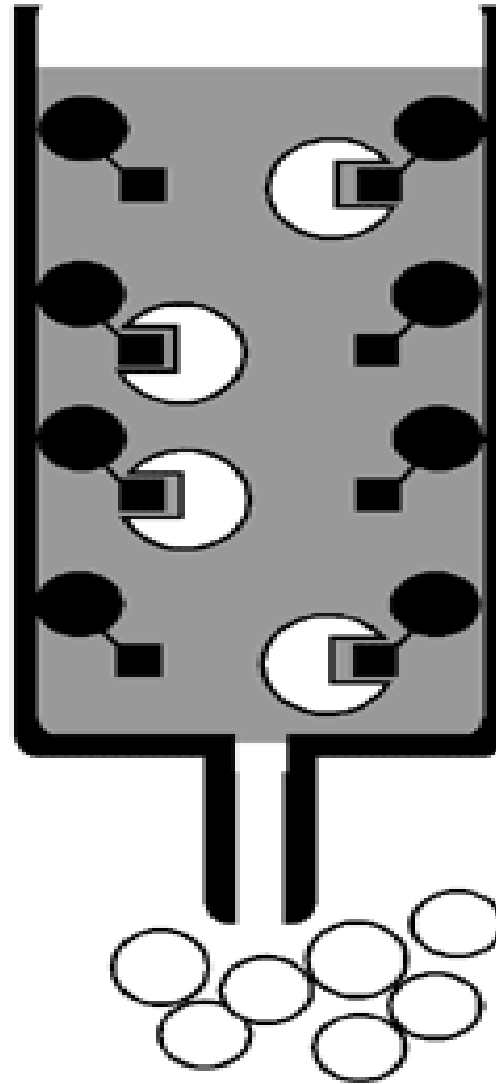
Repose sur les interactions spécifiques qui peuvent exister entre 2 molécules.

- On fixe par liaison covalente l'effecteur sur un support inerte dans la colonne à chromatographie;
- on fait passer la solution qui contient la protéine ayant une affinité pour cet effecteur, on observe la formation d'un **complexe stable mais réversible**, alors que les autres impuretés et protéines sortent librement de la colonne.
- On dissocie cette liaison protéine-effecteur par des éluants appropriés, la protéine sort **pure** de la colonne.

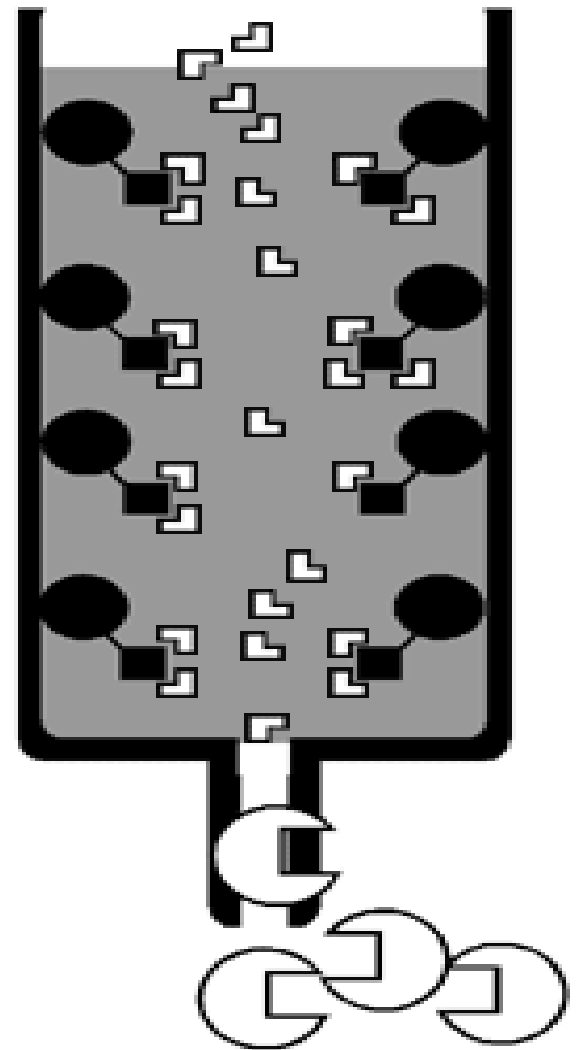
Dépôt



Lavage



Élution



# Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse des protéines est une méthode d'analyse qui repose sur la capacité des protéines chargées à migrer au travers les pores d'un gel lorsqu'on applique un courant électrique.

- Elle est pratiquée sur du **sérum sanguin** (le plasma ne convient pas car il contient du **fibrinogène**).
- Les supports qui peuvent être utilisés sont:
  - l'acétate de cellulose (séparation selon la charge)
  - Le gel d'agarose (séparation selon la charge et la taille)
  - Le gel de polyacrylamide (séparation selon la charge et la taille:PM)
  - Le gel de polyacrylamide avec SDS (Dodécyl sulfates de sodium) (séparation selon la taille)

# Etapes de l'EPP:

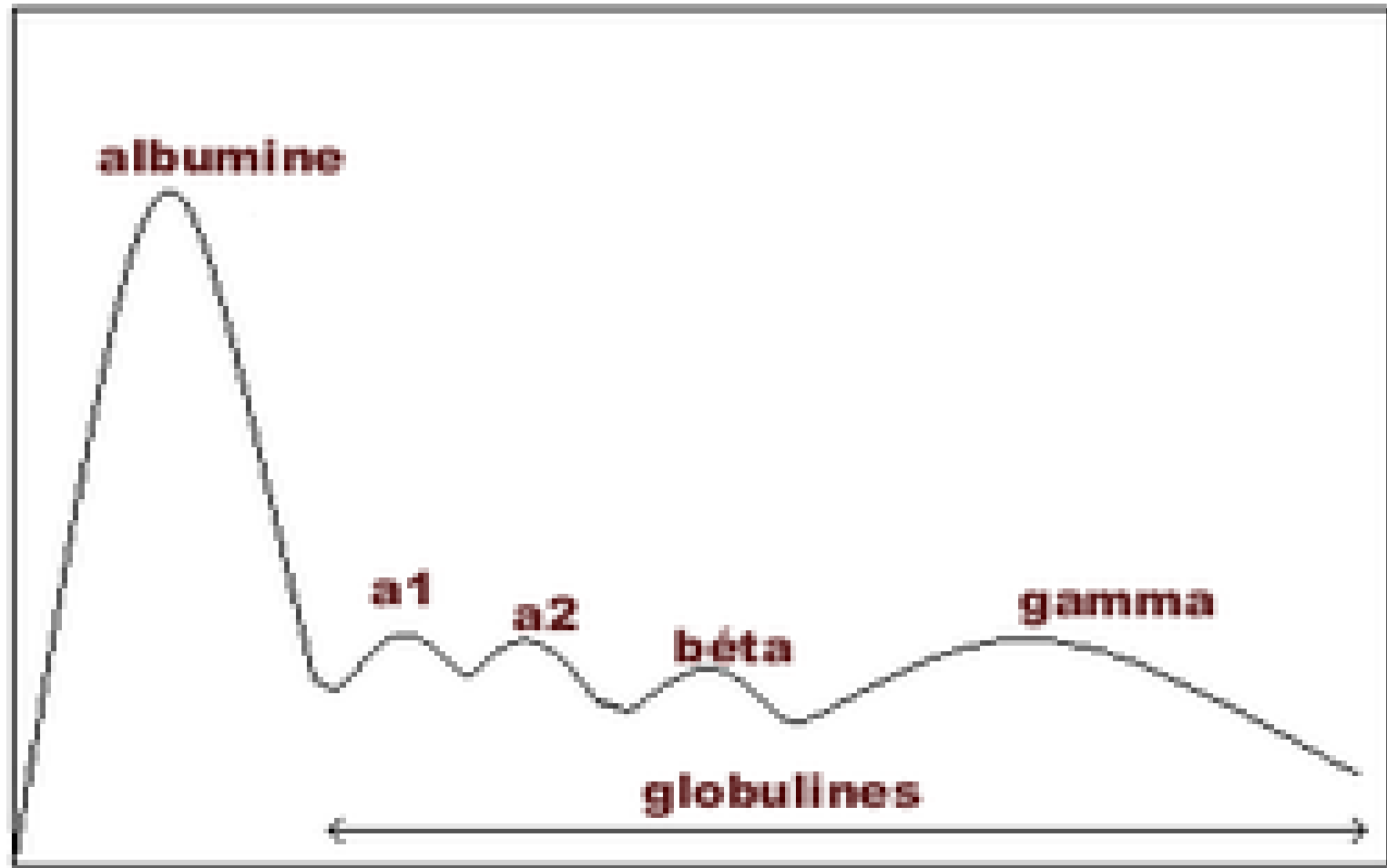
- La plaque d'acétate de cellulose est trempée 15 minutes dans le tampon d'électrophorèse: tampon Veronal (Tris-barbital), pH=8.2
- La cuve d'électrophorèse est remplie par le même tampon.
- On dépose à l'aide d'un applicateur **5 $\mu$ l** des sérums à analyser, plus un sérum de **contrôle**.
- On place la plaque dans la cuve fermée, et on applique un champs électrique 150 volts pendant 13-15min (les protéines sont chargées négativement).
- À la fin de la migration, la plaque est colorée par passage dans un bac qui contient du rouge ponceau (colorant des protéines) pd 3 min.
- décoloration par passage dans 3 bacs successifs d'acide acétique (5%): 5 min dans chaque bac.

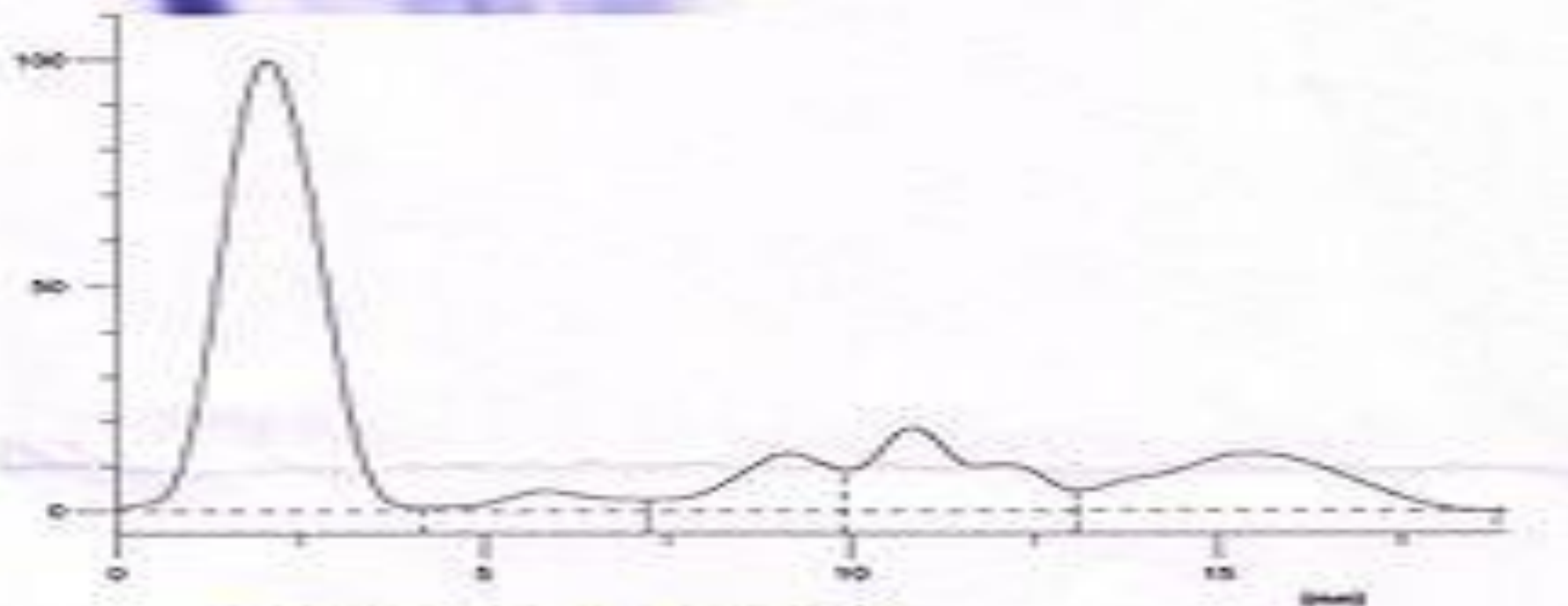
# Etapes de l'EPP:

- Transparisation (clarification) de la plaque par une solution appropriée (méthanol,...) pd 3min
- Séchage à l'air libre ou dans une étuve.
- Lecture au densitomètre spécial électrophorèse, après introduction de la [protéines] en g/l pour chaque sérum.

Obtention des profils électrophorétiques:

**(protidogramme)**





## Technique sur gel d'agarose

Index	Fraction	% Relatif	Conc. (g/l)	Normales (g/l)
1	Albumine	59.50%	39.86	35.00 ... 50.00
2	Alpha 1	2.98%	2.00	1.00 ... 4.00
3	Alpha 2	7.94%	5.32	5.00 ... 11.00
4	Beta	13.99%	9.37	6.00 ... 13.00
5	Gamma	15.60%	10.45	7.00 ... 16.00
Total			67.00	60.00 ... 80.00

Rapport A/G

1.47



# Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE)

(*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

- Cette technique permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire.
- C'est une méthode **dénaturante** en raison de l'ajout du SDS.

Le SDS est un détergent anionique fort, en se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère **une charge nette négative**. Cela signifie que seul le poids moléculaire apparent des protéines sera le facteur de leur séparation.

leur visualisation peut être effectuée en les colorant directement par le **Bleu de Coomassie** ou **le nitrate d'argent**.

les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migrent plus rapidement.

# *Catabolisme des Acides aminés*

# Digestion des protéines

- Enzymes secrétées sous forme de Zymogènes inactifs
- **Pepsinogène : donne la pepsine**
- **Trypsinogène: donne la trypsine (activée par l'entérokinase)**
- **Chymotrypsinogène : donne la chymotrypsine**
- **pro-enzymes: procarboxypeptidases.**

Phase de la digestion	Localisation	Agents	Produits formés
1 – Gastrique	Estomac	Acidité gastrique Pepsine	Hydrolyse des protéines en polypeptides
2 – Protéase pancréatique	Lumière intestinale	Trypsine chymotrypsine élastase carboxypeptidase	Oligopeptides (2 à 8AA) et acides aminés libres
3- Bordure en brosse de l'intestin	Epithélium intestinal	Endopeptidases et aminopeptidases	Acides aminés et di/tripeptides
4- Absorption	Epithélium bordure en brosse	Transporteur	Absorption des AA et di/tripeptides
5- Clivage intracellulaire des di/tripeptides	Cellule épithéliale	Dipeptidase Tripeptidase	AA libérés à partir des di/tripeptidase

# Dégradation des Acides aminés

## A/ Élimination du $\alpha$ NH<sub>2</sub> des AA:

se fait par:

- Transamination
- Désamination oxydative:

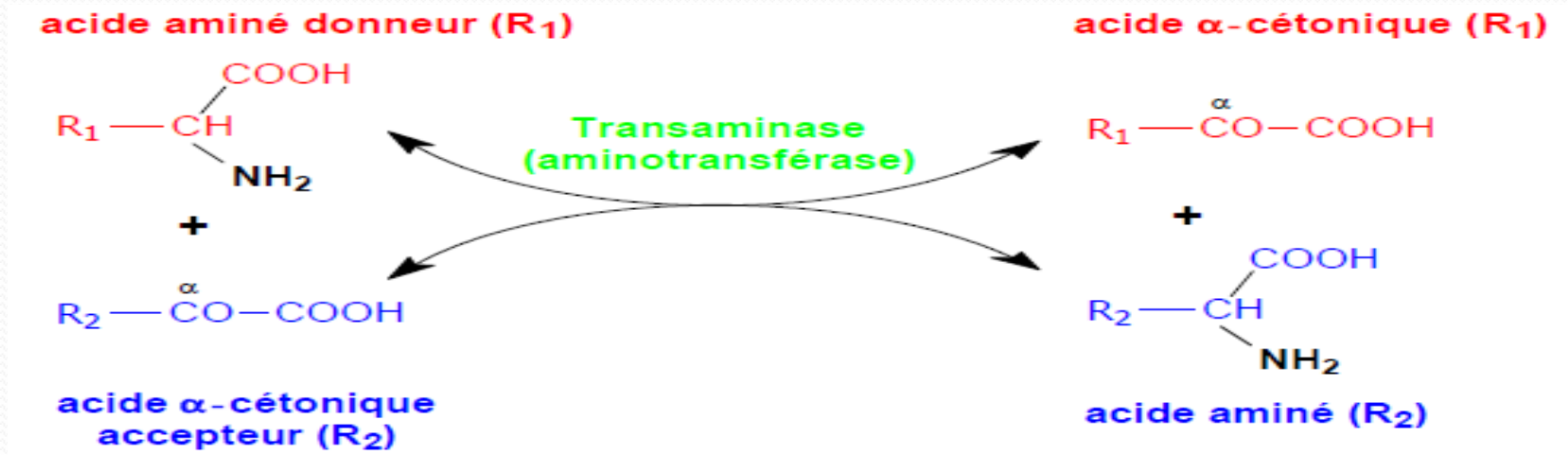
# 1/ La transamination:

C'est le transfert du groupement  $\alpha\text{NH}_2$  des AA à l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique pour former du Glutamate, ce dernier pénètre dans la mitochondrie et subit une réaction de désamination oxydative.

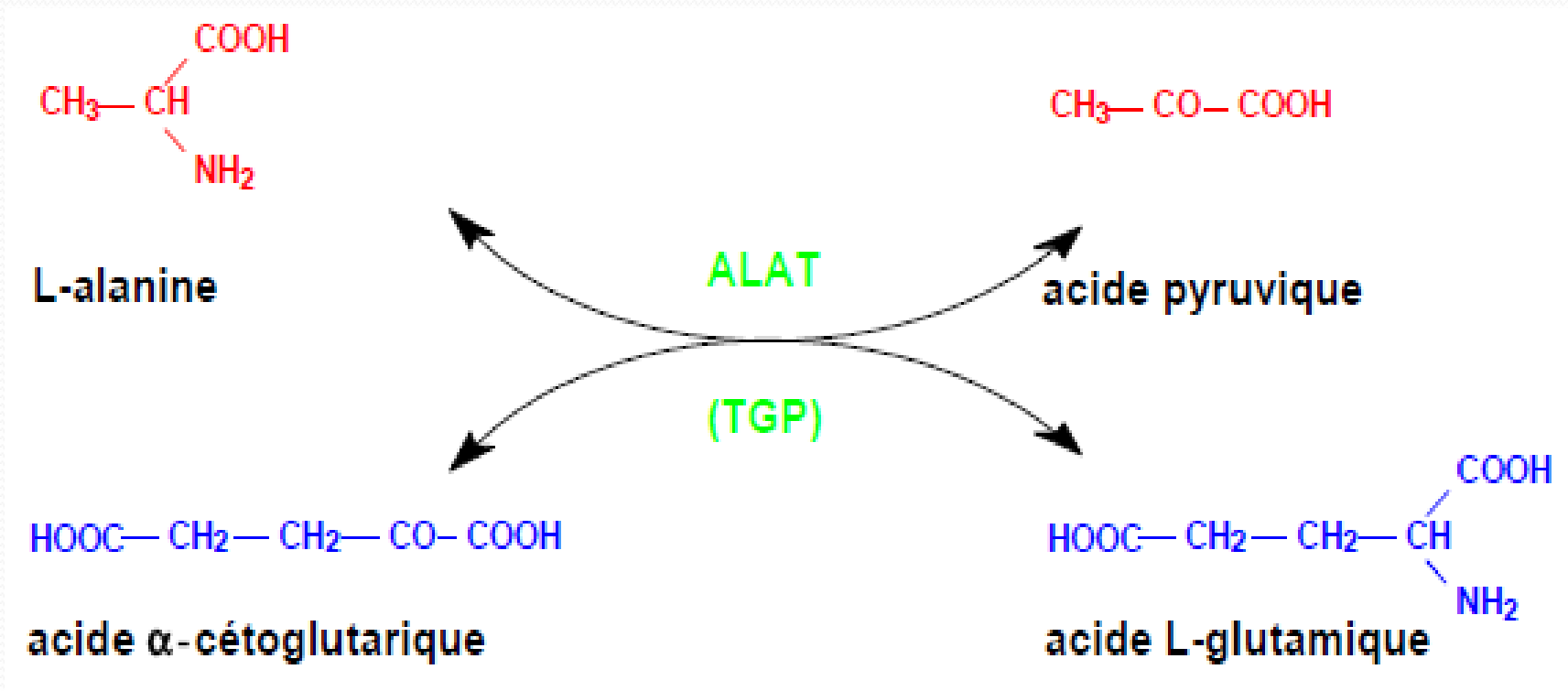
Ce transfert est catalysé par des enzymes appelées:

**Transaminases (amino-transférases)**, qui nécessitent un coenzyme : **le phosphate de Pyridoxal** (dérivé de la Vitamine B6)

Ez présente dans tous les tissus



# Les principales sont: ASAT/ALAT

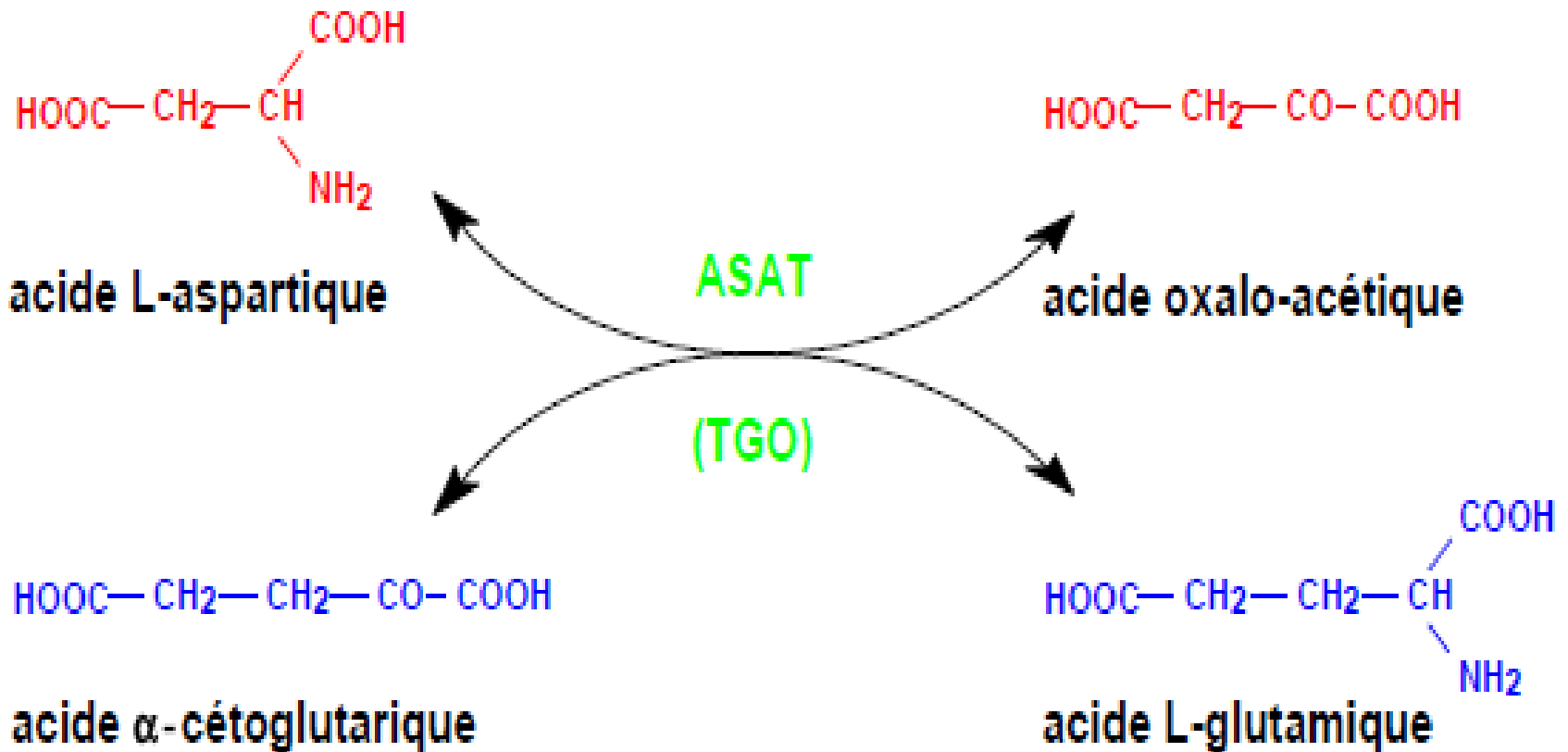


ALAT: Alanine amino-transférase ( $\text{B}_6\text{PO}_4$ )  
=(TGP): Transaminase Glutamo pyruvique  
- Prédomine au niveau du foie

# ASAT: Aspartate amino-transférase

(TGO): Transaminase glutamo oxaloacétique

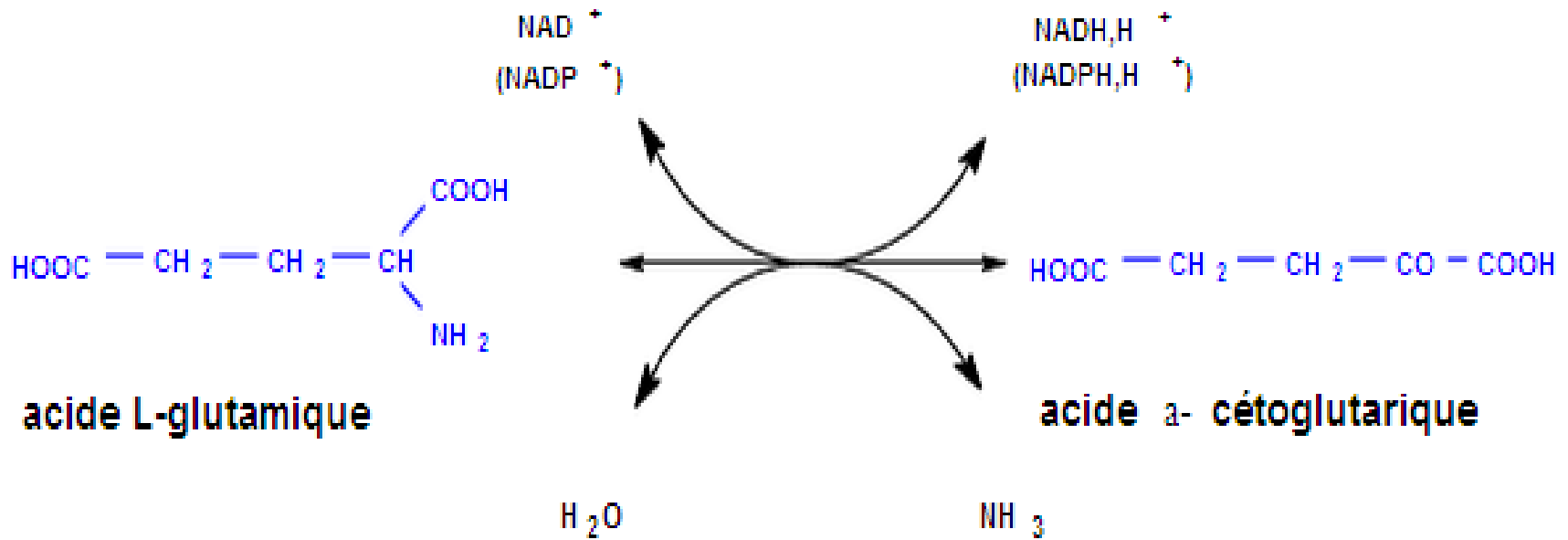
- prédomine dans le muscle, coeur





## 2/Désamination Oxydative:

### L-Glutamate déshydrogénase



La GLDH est soumise à une **régulation allostérique**:

- Stimulée par le GDP, ADP (baisse de la charge énergétique dans la cellule)
- inhibée par le GTP, ATP (augmentation de la charge énergétique dans la cellule)

### 3/Uréogénèse:

- C'est l'ensemble des réactions qui assurent la synthèse de l'urée à partir de  $\text{NH}_3$  (toxique) issu des groupement  $\text{NH}_2$  des acides aminés.
- C'est un cycle **exclusivement** hépatique proposé par **Krebs et Henseleit (1932)**

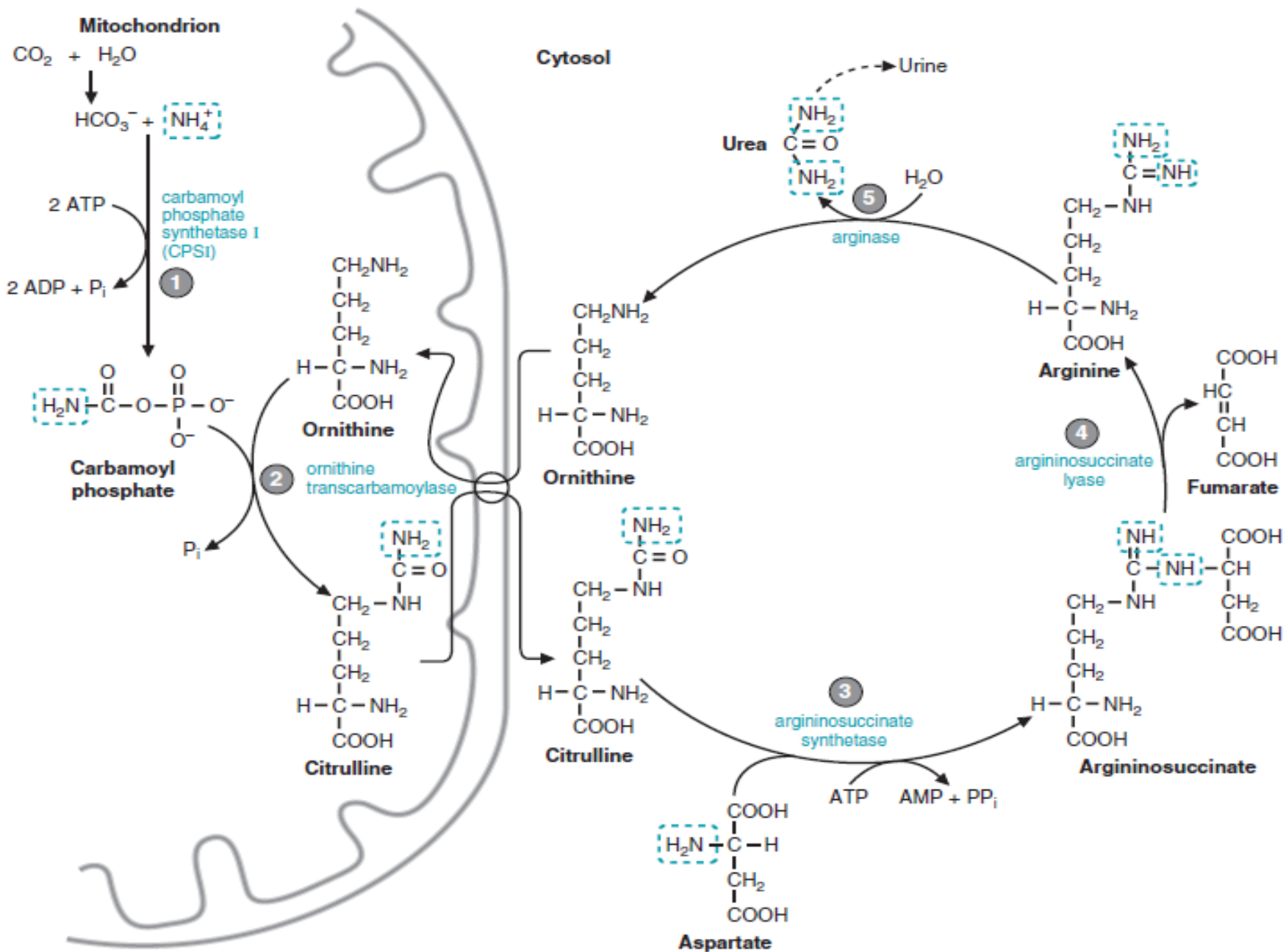
permet :

- la détoxification de  $\text{NH}_3$  en urée
- La synthèse de certains intermédiaires du cycle de Krebs (Fumarate)

L'urée est une molécule hydrosoluble et facilement éliminée au niveau rénal.

[Sang]: 0.15-0.45 g/l: **urémie**

[urines]: 15-30 g/24h



# Cycle de l'urée

- Bilan énergétique:

La synthèse d'une molécule d'urée nécessite l'hydrolyse **de 4 liaisons phosphate** riches en énergie.

- Réaction **1**: hydrolyse de 2 liaisons phosphate riches en énergie (2ATP)
- Réaction **4**: : hydrolyse de 2 liaisons phosphate riche en énergie (1 ATP  $\longrightarrow$  AMP+PPi)  
(PPi  $\longrightarrow$  2Pi)

# Cycle de l'urée: régulation

- Le site principal de régulation allostérique est la réaction 1 catalysée par la Carbamyl phosphate synthétase (**CPS**), qui est stimulée par le N-acétyl glutamate (NAG).
- Il est synthétisé dans la mitochondrie à partir du Glutamate + acétyl COA, catalysée par une Ez: **N-acétylglutamate synthétase** (stimulée par le Glucagon)

# ANOMALIES ENZYMATIQUES D'ORIGINE GENETIQUE du cycle de l'urée

- Hyperammoniémie Congénitale type I : déficit en Carbamyl-Phosphate Synthétase I
- Hyperammoniémie Congénitale type II : déficit en Ornithine Transcarbamylase (OCT)
- Citrullinémie : déficit en Arginino-Succinate Synthétase
- Argininosuccinurie : déficit en Argininosuccinase
- Argininémie-Argininurie : déficit en Arginase

# Intérêts

## **1/Intérêt du dosage sanguin de l'urée:**

- Altération de la fonction du rein => augmentation du taux sanguin de l'urée ,
- mais paramètre moins pertinent pour l'évaluation de la fonction du rein que le taux sanguin de la créatinine

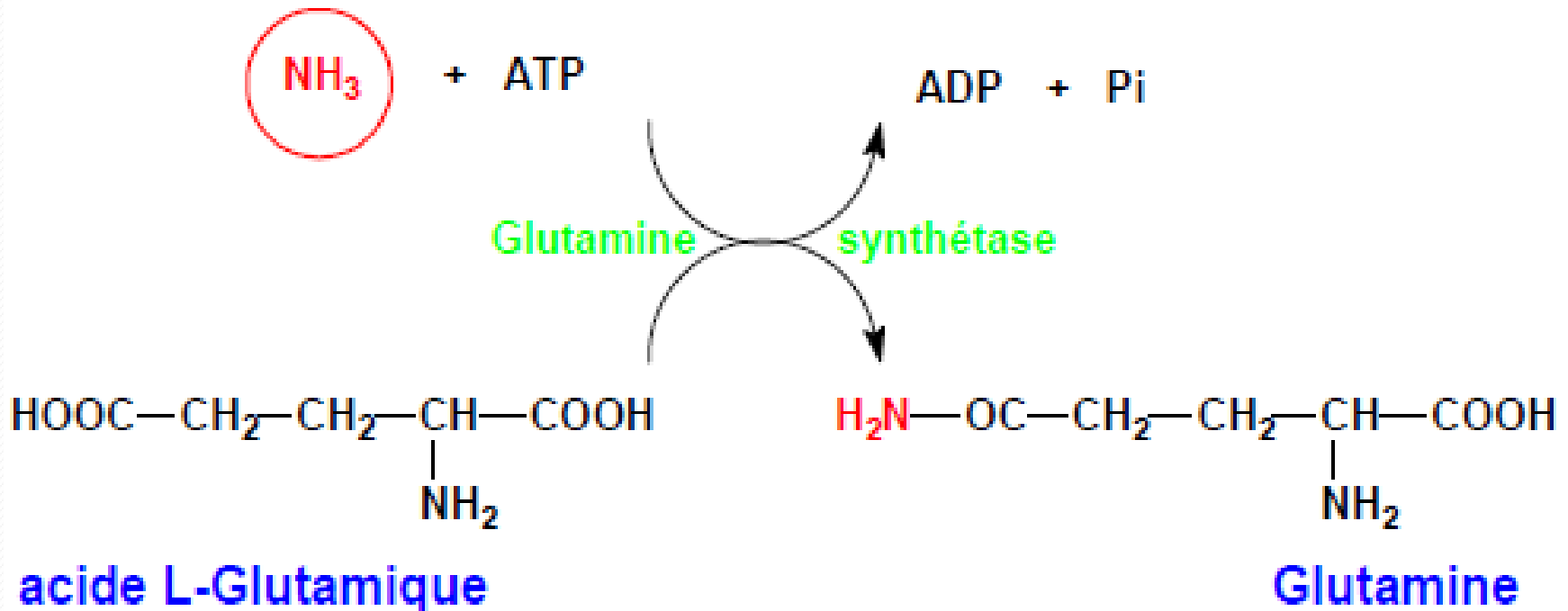
Car elle augmente aussi en cas d'hypercatabolisme protidique.

## **2/Intérêt du dosage sanguin des transaminases:**

- En cas de cytolyse hépatique (hépatites, cirrhose), augmentation de la TGP plus que la TGO
- En cas de nécrose myocardique augmentation de la TGO surtout et aussi de la TGP, mais non spécifique et tardive.

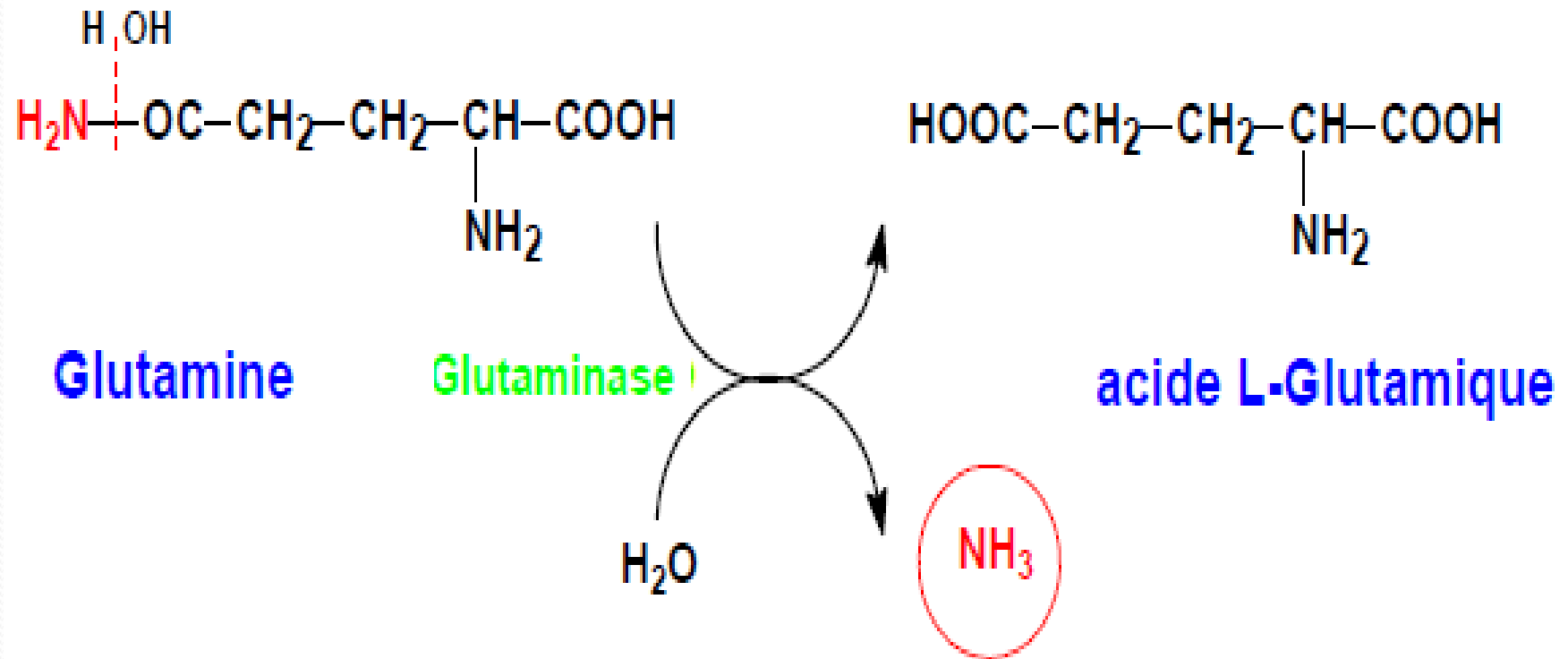
# Transport sanguin de l'NH<sub>3</sub>:

- L'NH<sub>3</sub> produit dans les autres tissus (extra-hépatique) étant toxique, il est transporté dans le sang vers le foie sous forme de Glutamine (**Glutaminogénèse**)

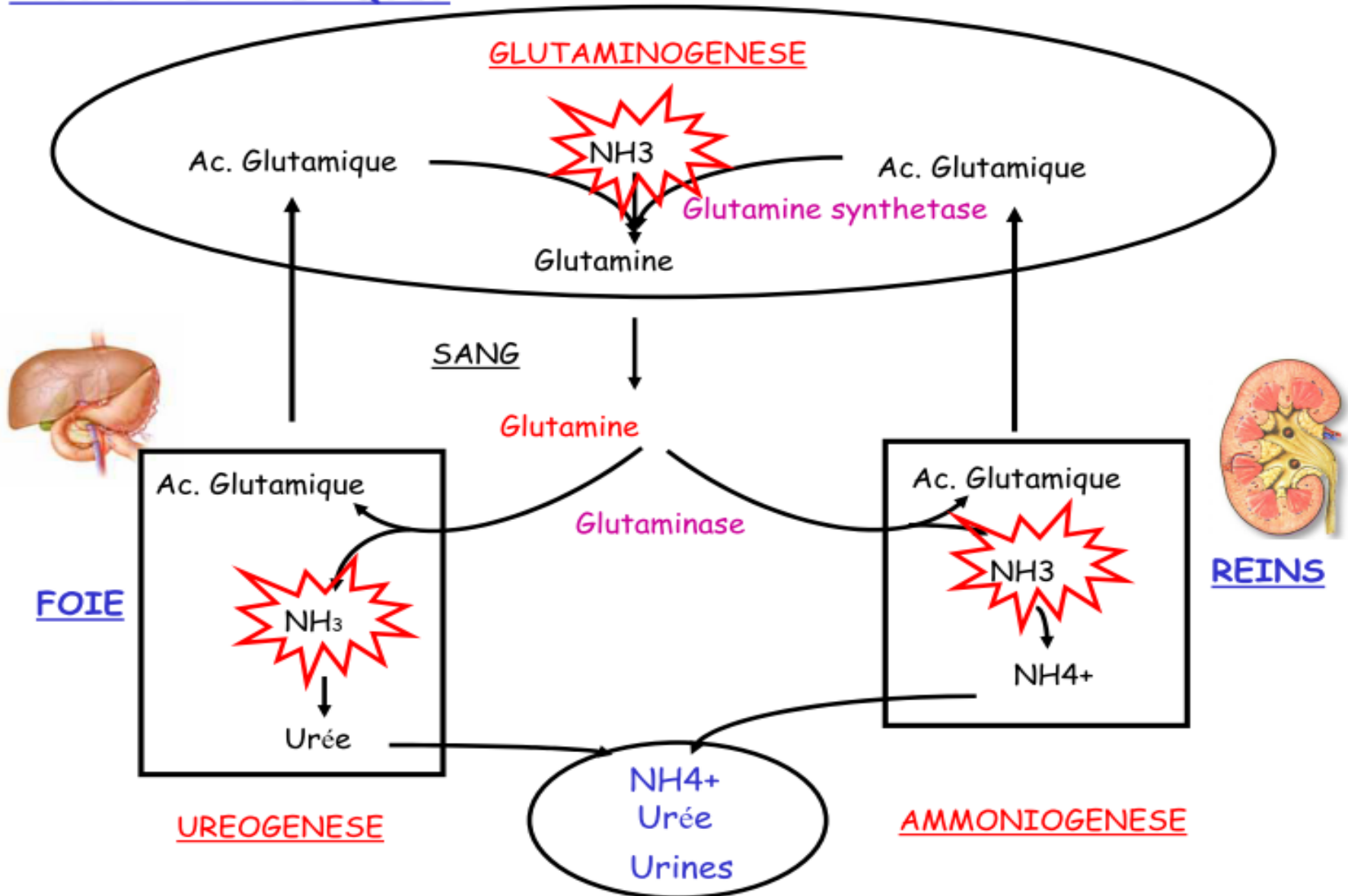




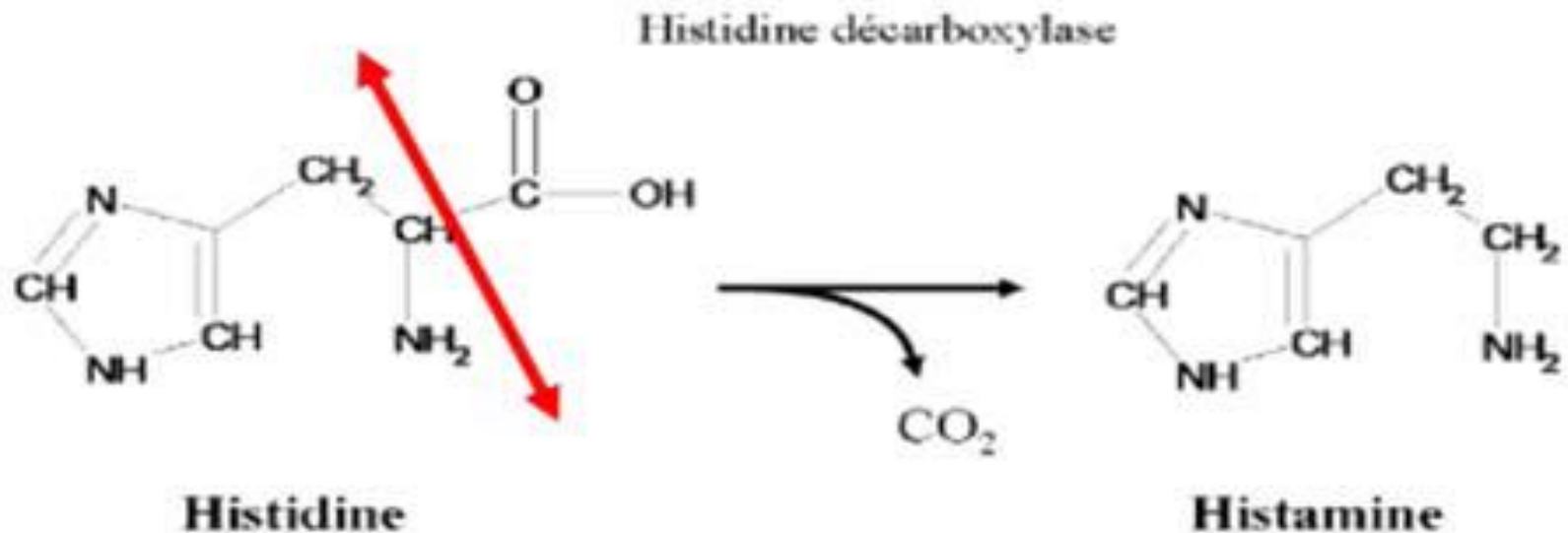
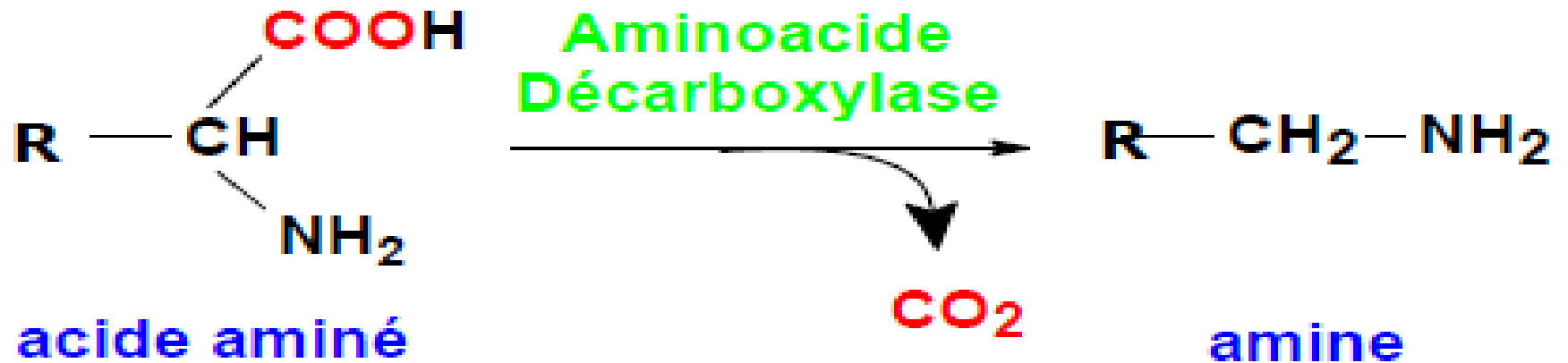
# Hydrolyse de la Glutamine (Foie, Reins)



# TISSUS PERIPHERIQUES

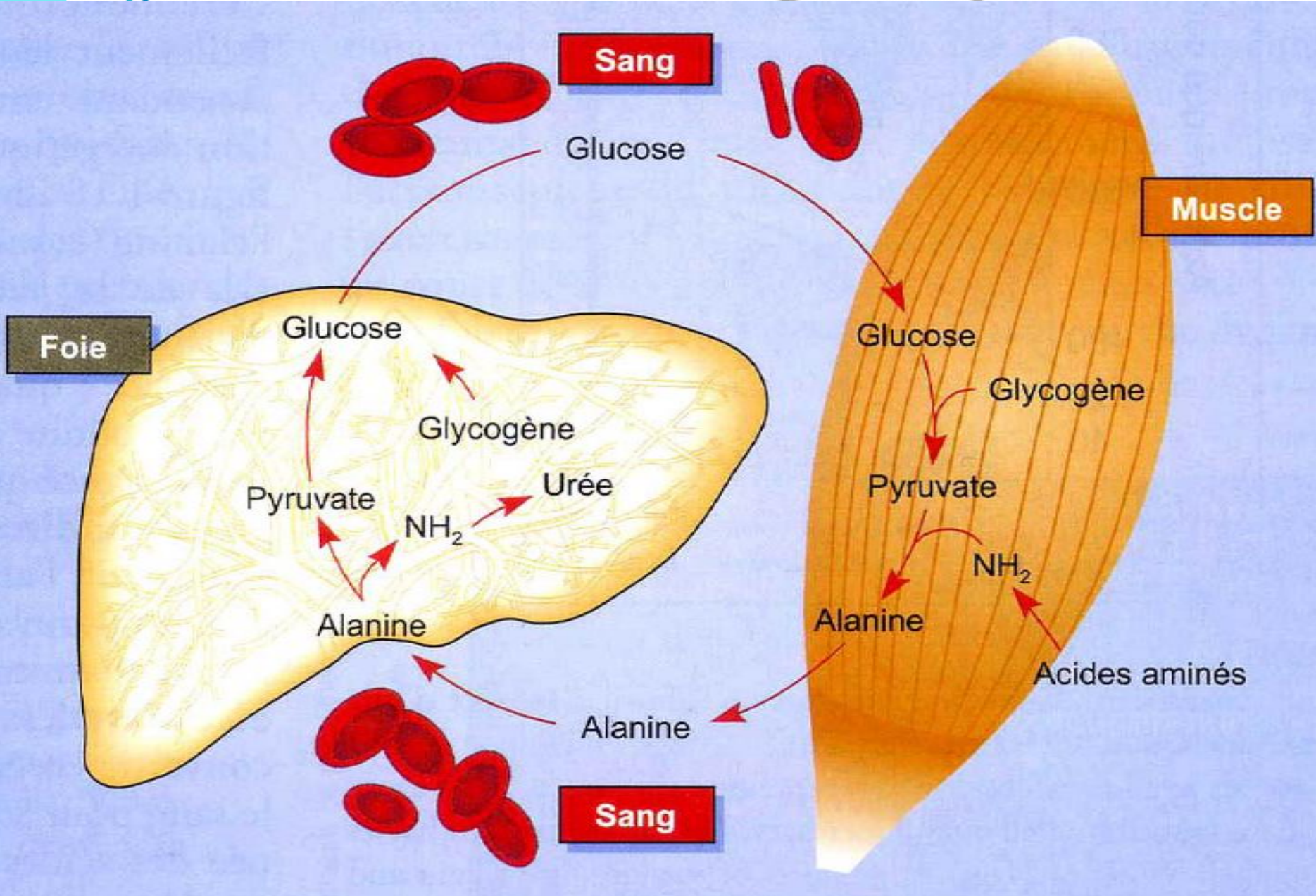


# B/élimination des groupements COOH: décarboxylation des AA

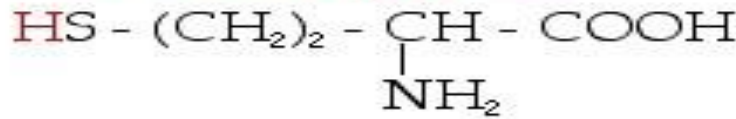




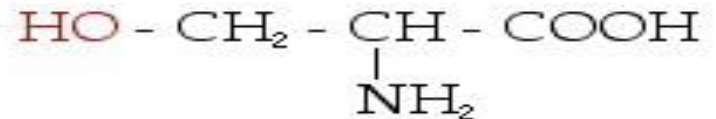
# Le cycle glucose - Alanine (cycle de Cori)



## Homocystéine



## Sérine

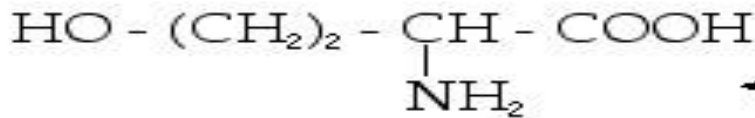


Trans-sulfuration  
Cystathionine-β synthétase  
Vit B6

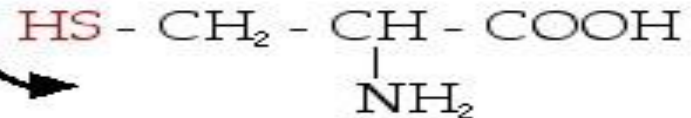


-H<sub>2</sub>O

## Cystathionine



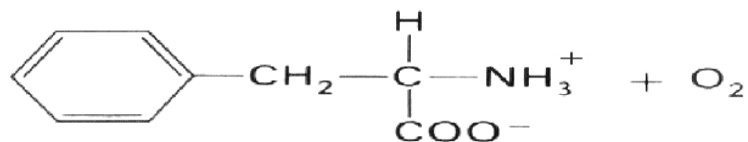
## Homosérine



## Cystéine

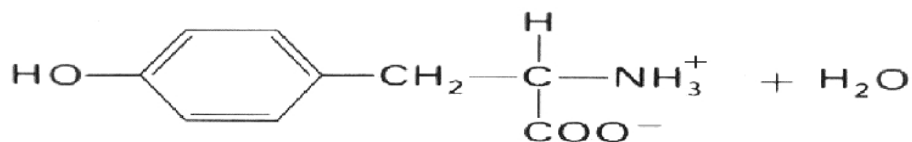
Déficit en CBS (Cystathionine B synthase): **Homocystinurie congénitale**; augmentation de la [Homocystéine] dans le sang et les urines

# Hydroxylation de la Phe en Tyr: par la Phénylalanine hydroxylase



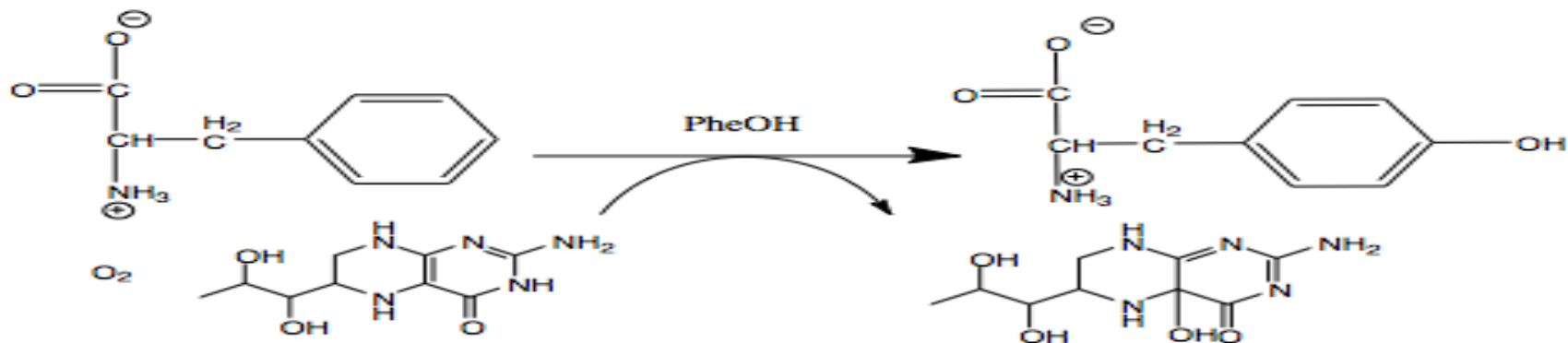
Phénylalanine

Tétrahydrobioptérine

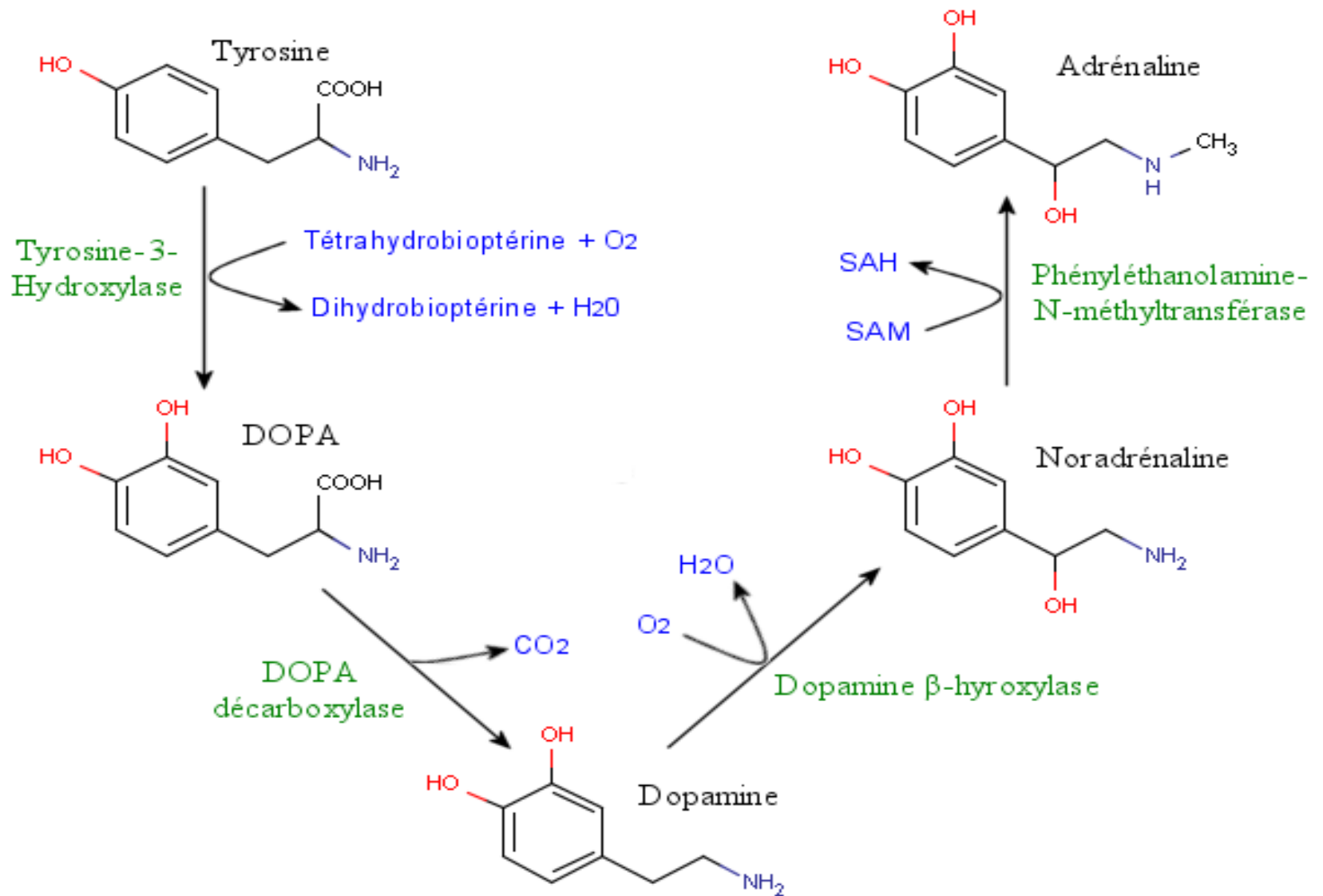


Tyrosine

Quinonoïde dihydrobioptérine



PheOH generates tyrosine from phenylalanine with concomitant hydroxylation of tetrahydrobiopterin.





# PCU:

- Déficit en Phe hydroxylase: **Phénylcétonurie**; augmentation de la [Phe] dans le sang et les urines, ce qui entraîne une toxicité cérébrale:
- encéphalopathie sans malformations, un retard mental +++, convulsions, épilepsie.

*d'où la nécessité du dépistage systématique à la naissance*