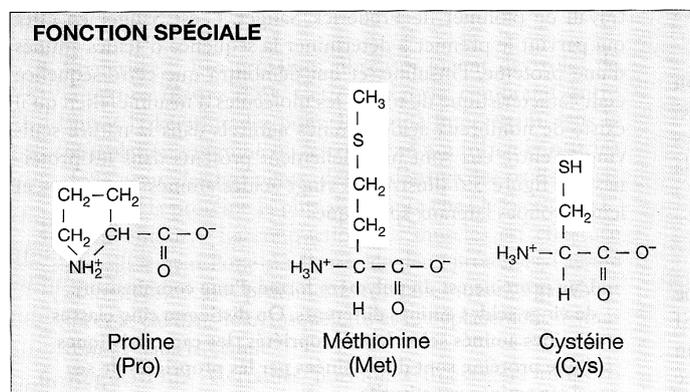
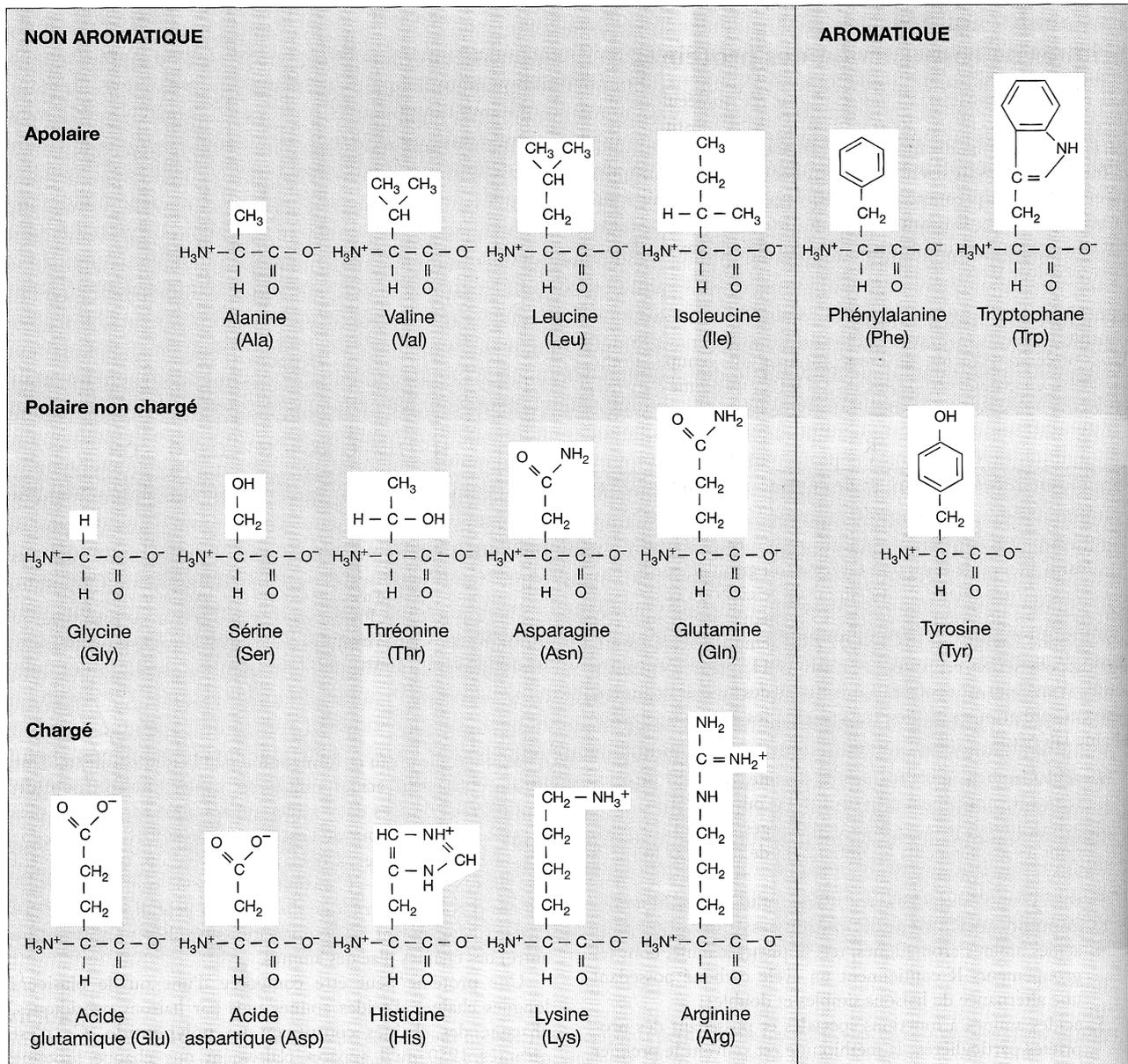
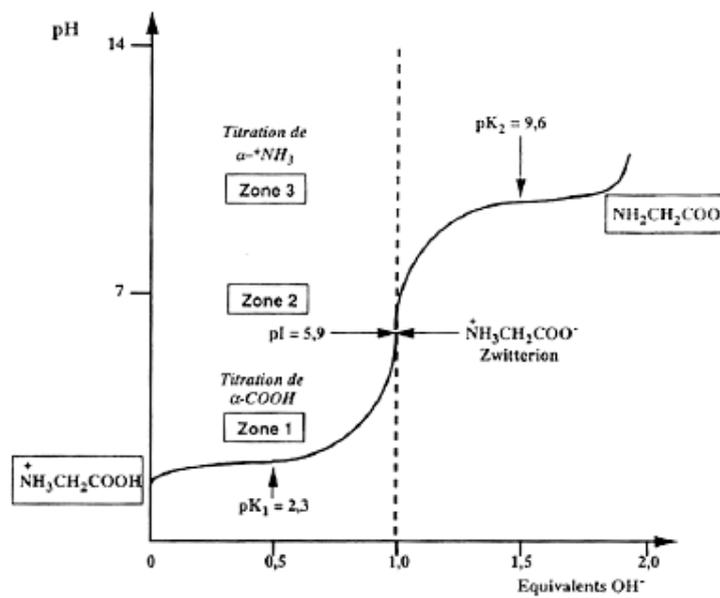


Figure 1 : Les 20 acides aminés des protéines
(in Raven De Boeck, 2007)

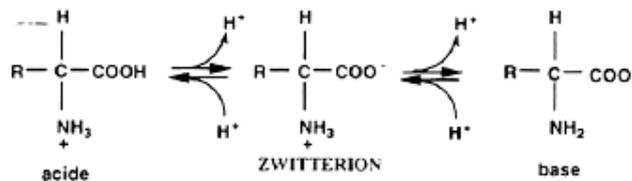


Les vingt acides aminés communs. Tous les acides aminés intervenant dans la constitution des protéines ont une structure de base commune; ils ne diffèrent que par leur groupement latéral R. Six de ces acides aminés sont apolaires parce que leur groupement R est composé essentiellement de $-\text{CH}_2$ et de $-\text{CH}_3$. Deux d'entre eux possèdent une structure cyclisée de type aromatique et sont particulièrement volumineux. Six autres acides aminés sont polaires car leur chaîne latérale comporte de l'oxygène ou seulement de l'hydrogène; ces acides aminés, qui ne sont pas chargés, diffèrent entre eux par leur degré de polarité. Cinq autres acides aminés polaires possèdent une extrémité acide ou basique et peuvent donc se charger en s'ionisant. Les trois derniers acides aminés ont des propriétés chimiques qui leur permettent de former des liens entre protéines ou d'assurer des repliements au sein d'une protéine.

Figure 2 : courbe de titration de la glycine
(in Guilloton et al., Dunod 1999)



Courbe de titration de la glycine. La forme entièrement protonée présente aux pH acides se transforme en forme dipolaire (ou zwitterion), majoritaire au pH isoélectrique (pI = 5,9) ; la neutralisation de cette dernière forme donne finalement la molécule entièrement déprotonée :



La courbe de neutralisation fait apparaître deux zones de faible pente (zones tampon) autour des pK caractérisant la fonction acide carboxylique (pK₁ = 2,3) et la fonction amine (pK₂ = 9,6).

Figure 3 : hydrophobicité des acides aminés
(in Augere B, Ellipses, 2001)

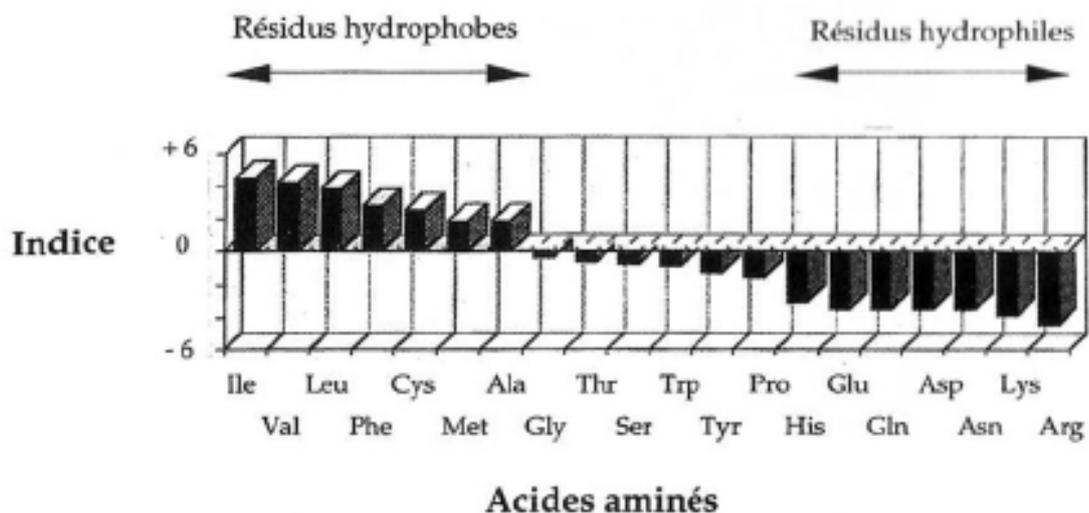


Figure 4 : Un polypeptide est une succession de plans dans lesquels s'inscrivent les liaisons peptidiques.

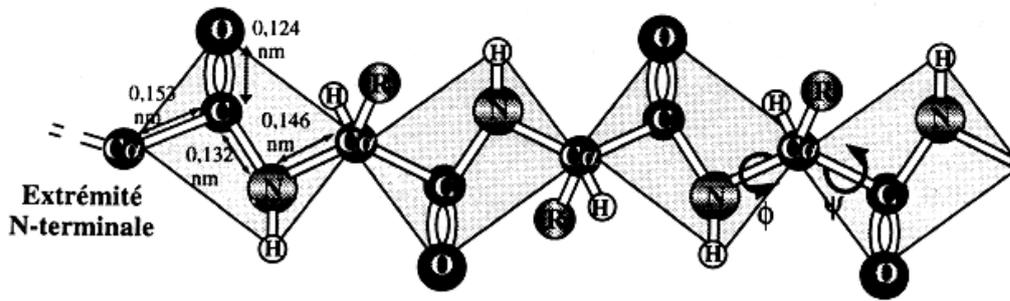


Figure 5 : la liaison peptidique est polaire

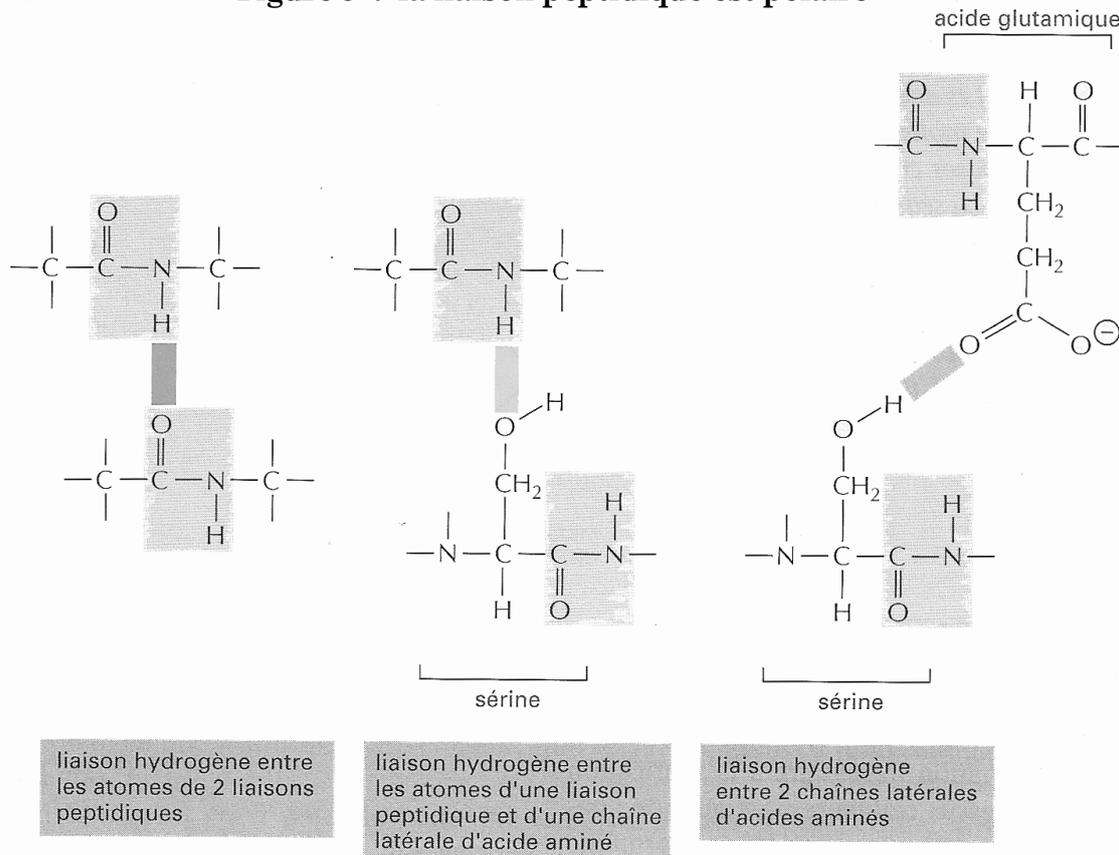
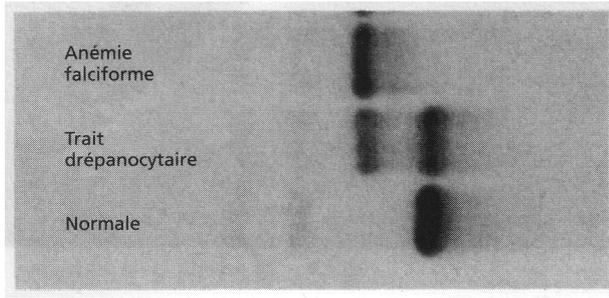
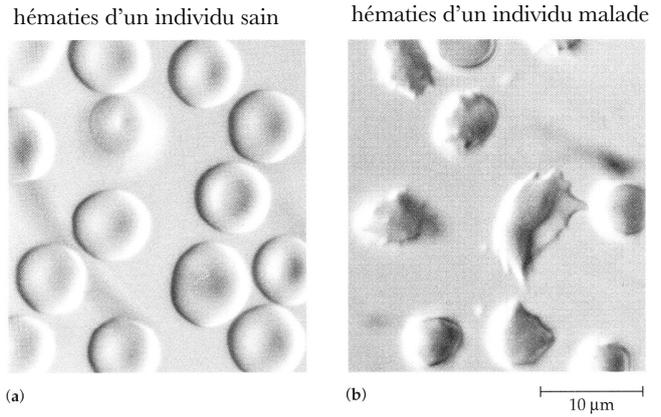


Figure 6 : la drépanocytose

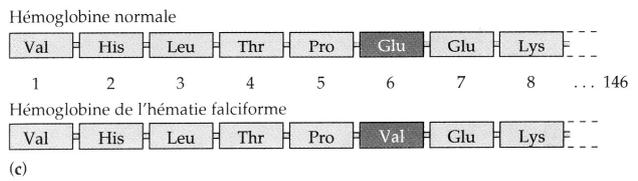


Électrophorèse d'hémoglobine d'individu sain et d'individus atteints d'anémie falciforme (=drépanocytose) ou ayant le trait drépanocytaire



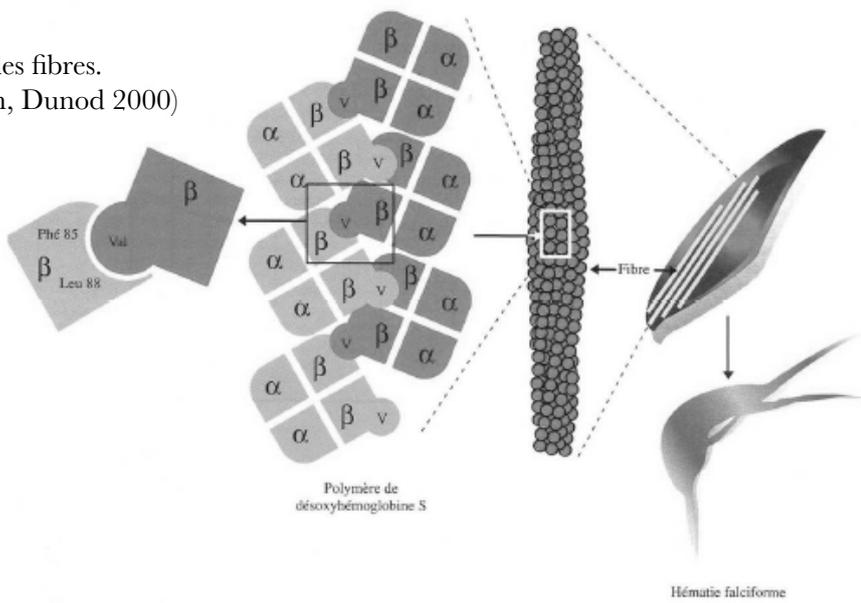
chaîne normale (début de séquence) :
 ATGGTGCACCTGACTCCTG**A**GGA
 GAAGTCTGCCGTTA

chaîne mutée (début de séquence):
 ATGGTGCACCTGACTCCTG**T**GGA
 GAAGTCTGCCGTTA



Structure primaire de l'hémoglobine normale et de l'hémoglobine mutée de l'hématie falciforme

Formation des fibres.
 (in Weinmen, Dunod 2000)



A partir de l'ensemble des documents, expliquez l'origine du phénotype de la drépanocytose.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

La drépanocytose, ou anémie falciforme : exemple d'une mutation et de ses conséquences aux différentes échelles.

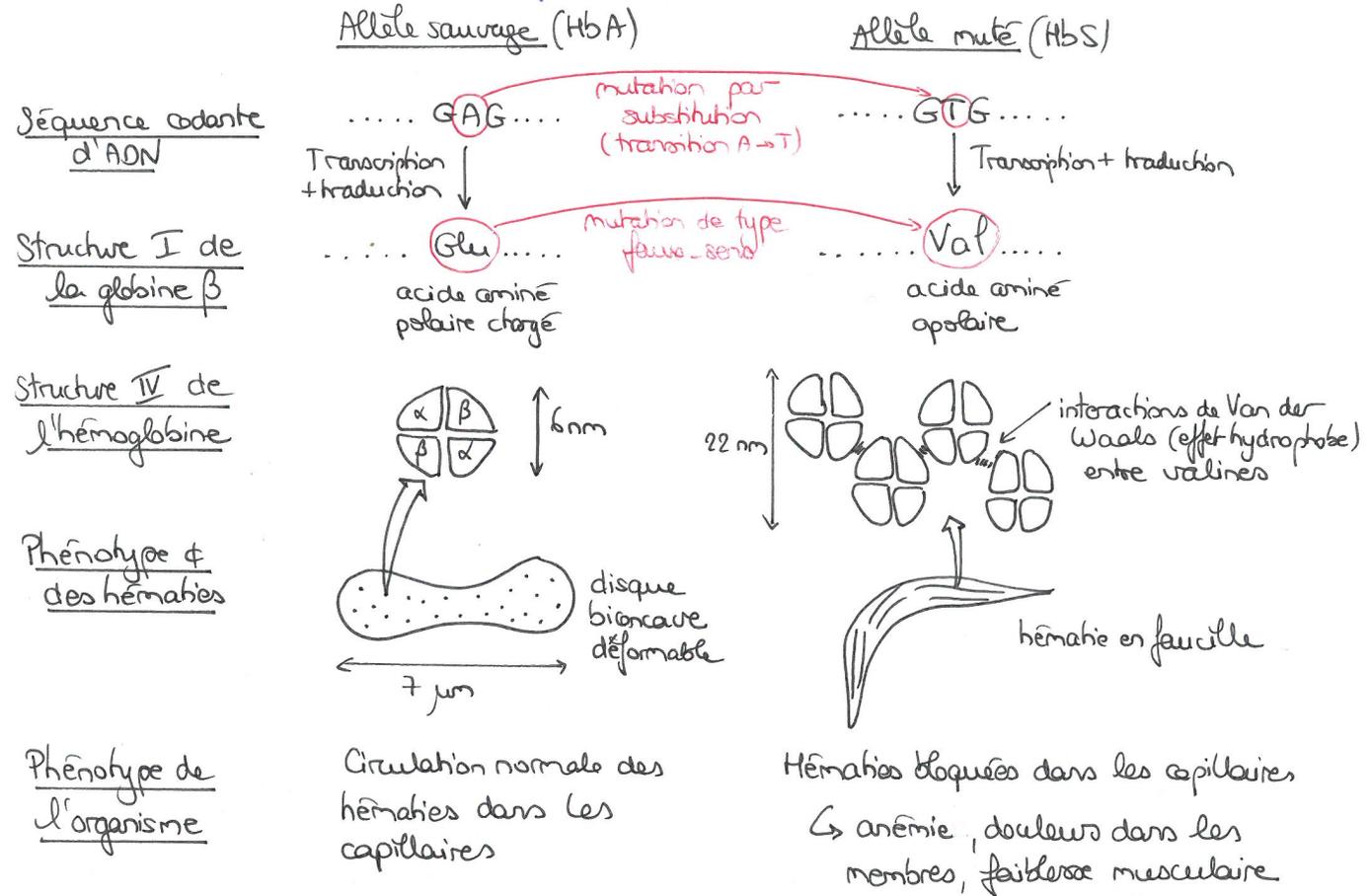
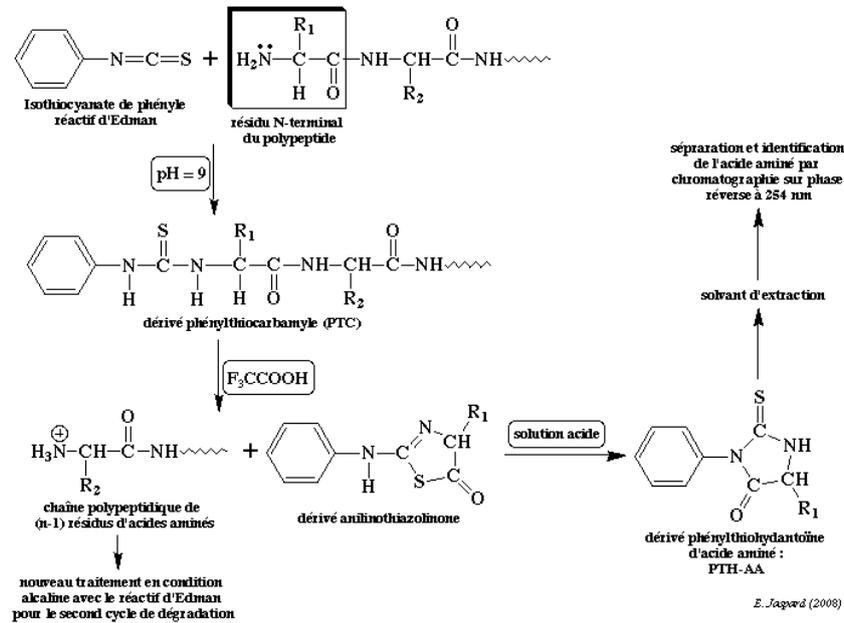


Figure 7 : Détermination de la séquence d'une protéine par la méthode d'Edman

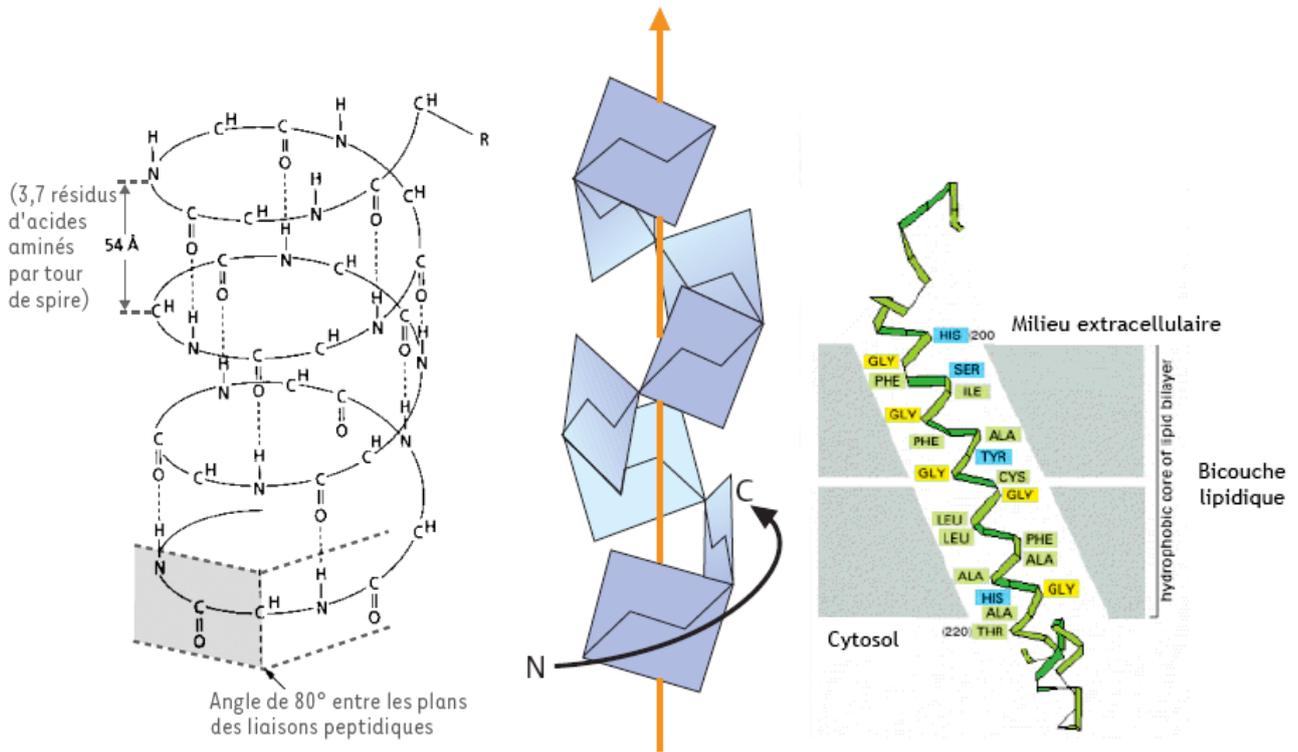
Mise au point en 1949 puis automatisée en 1967.

Principe de la méthode : méthode récurrente dans laquelle on détermine la nature de l'acide aminé du côté N-terminal.



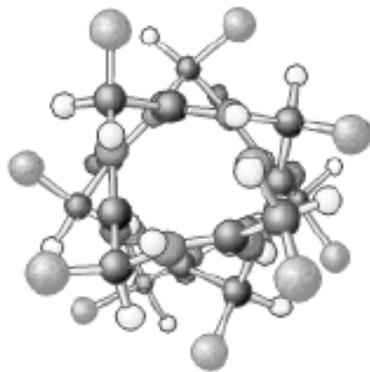
Schématisation de l'expérience

Figure 8 : les hélices alpha, une structure secondaire

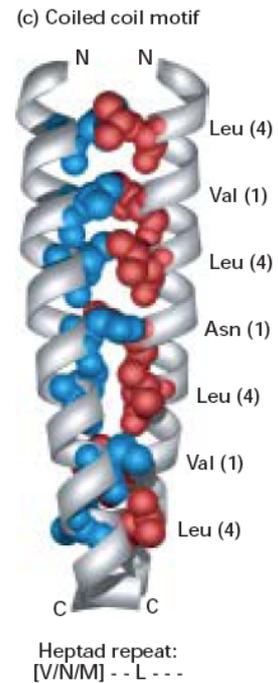


Hélice alpha : une succession de plans en hélice dont sortent les chaînes latérales

Hélice alpha transmembranaire



Vue polaire



Structure coiled coil : deux hélices cytosoliques mettent en commun des acides aminés hydrophobes.

Représentation schématique

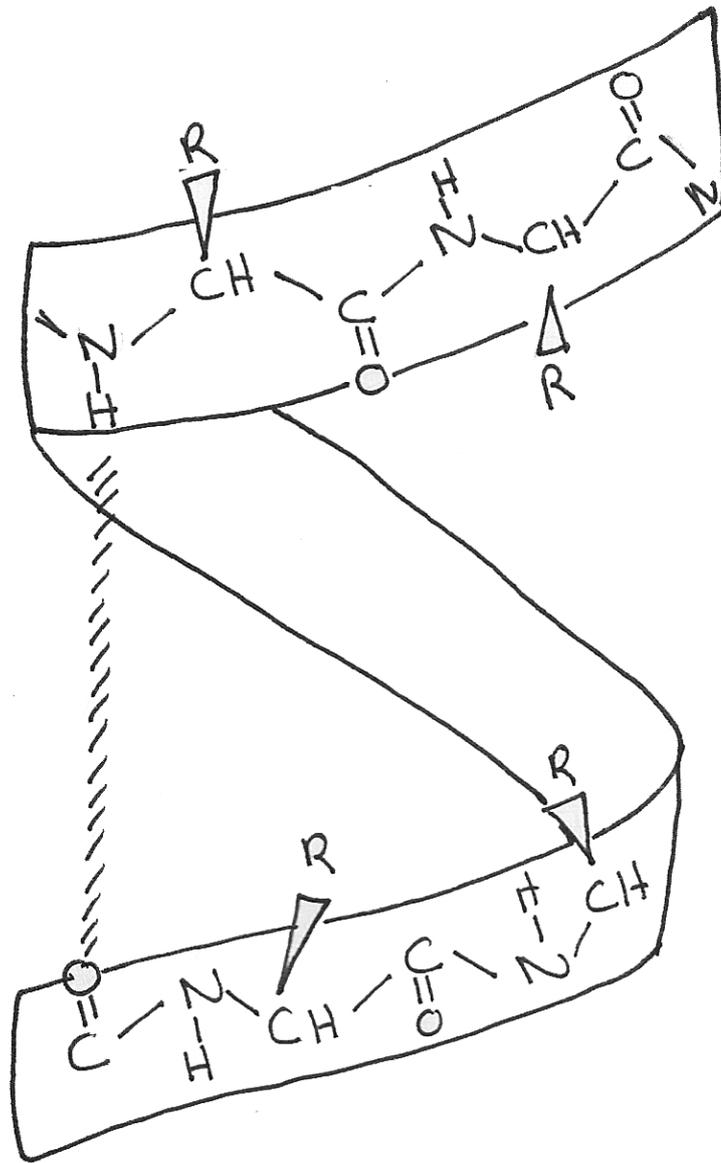


Figure 9 : structure du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (in CAPES 2003)
A : profil d'hydrophobicité
B : Modèle du récepteur

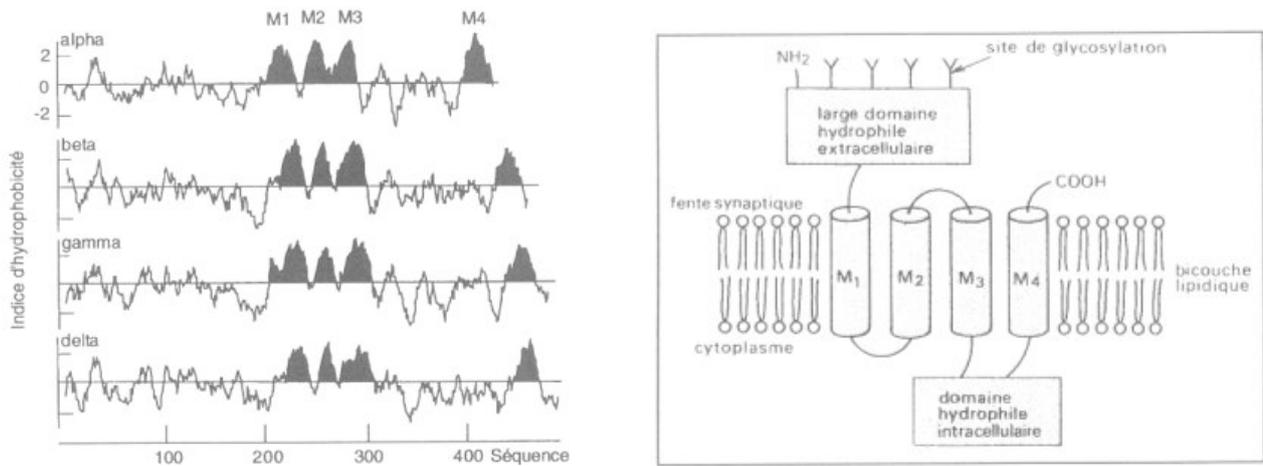
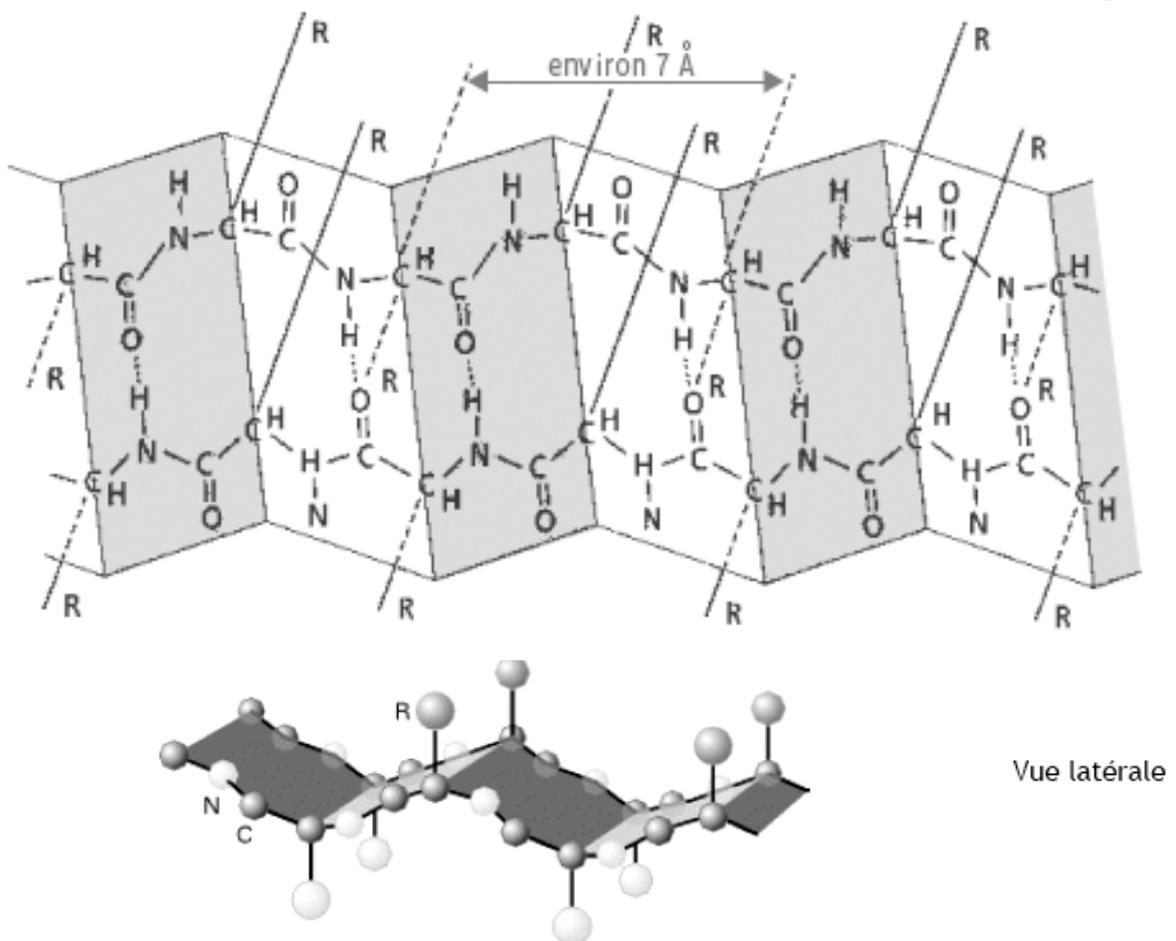
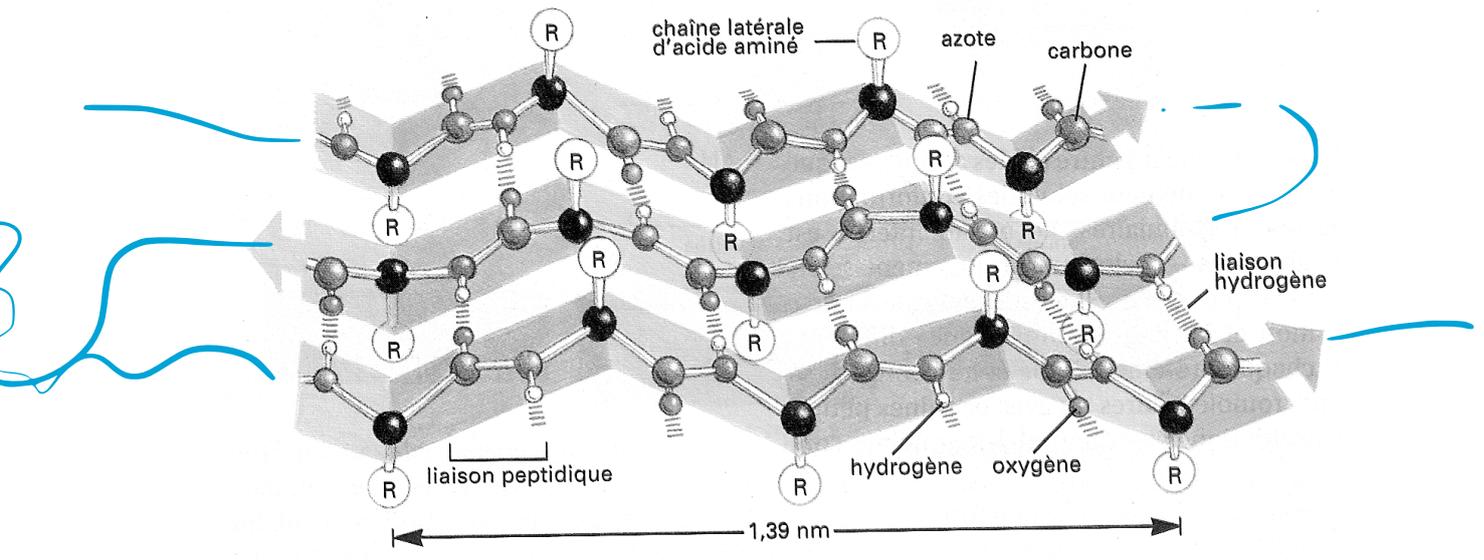


Figure 10 : les feuilletts β, une structure secondaire formée de 2 brins β





Représentation schématique

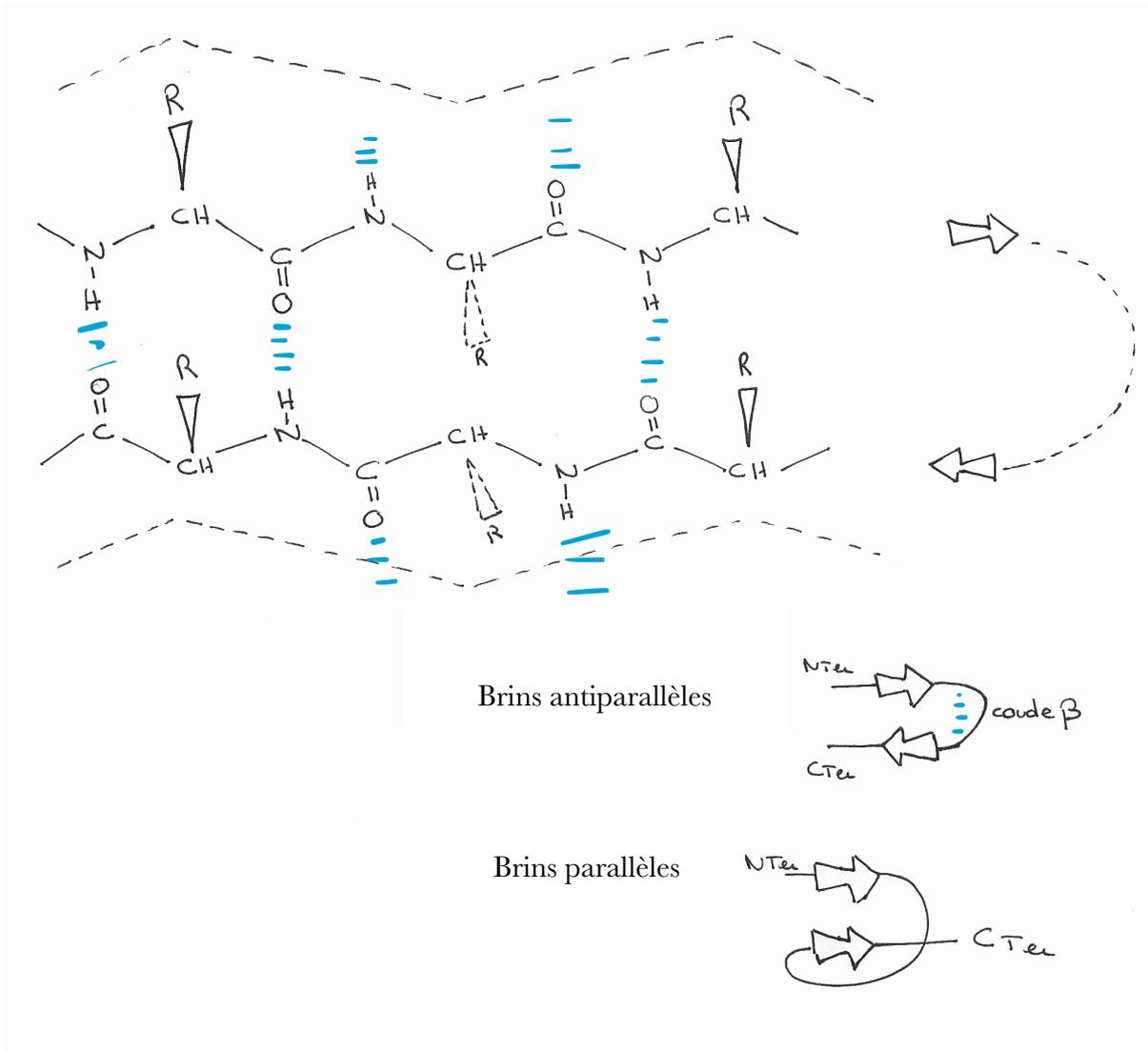
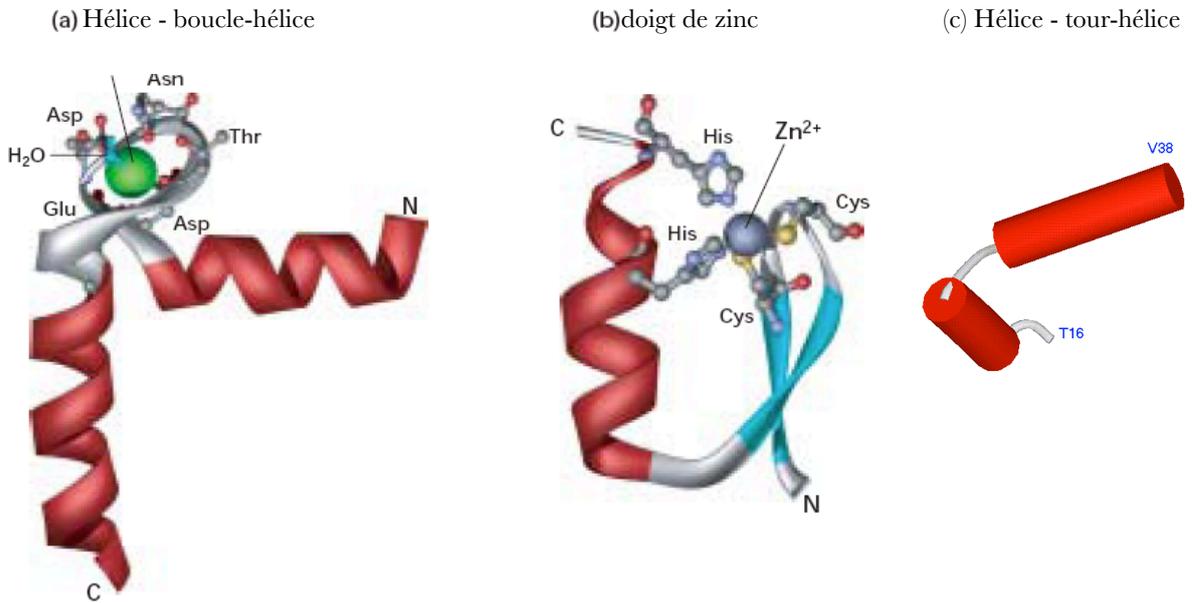
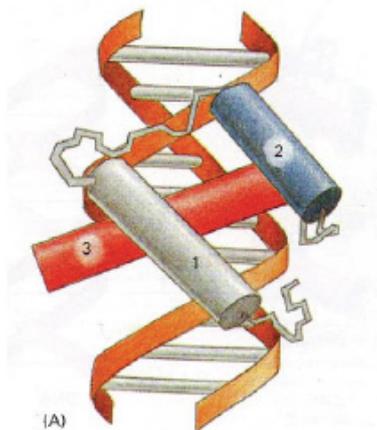


Figure 11 : associations des structures secondaires en motifs
(in Lodish)

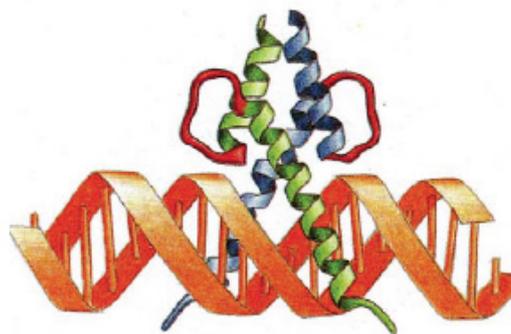


Deux hélice formant une boucle capable de fixer du calcium.
Exemple : calmoduline

Une hélice associée à deux brins β antiparallèles
Exemple : facteurs de transcription

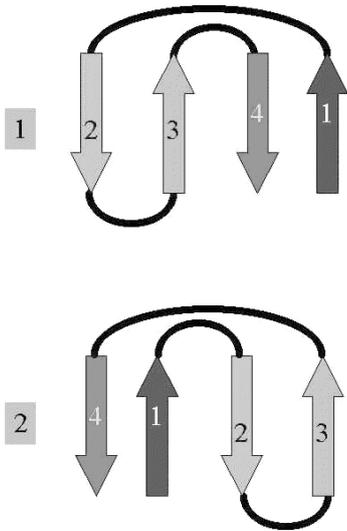


Homéodomaine
Classe particulière de
protéines hélice-tour-
hélice



Hélice-boucle-hélice

(d) clé grecque



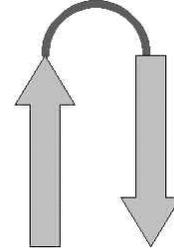
Formée de 4 feuillets β antiparallèles.
Fonction non connue

(e) Motif β - α - β



Deux feuillets β sont connectés par une
hélice α . L'hélice est au-dessus du plan
des feuillets.
Exemple : sites actifs d'enzymes

(f) Epingle



Un coude de 2 à 5 acides aminés
fait la liaison entre deux feuillets
 β .

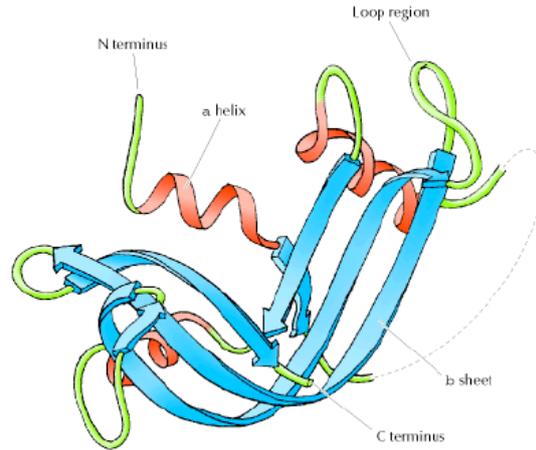
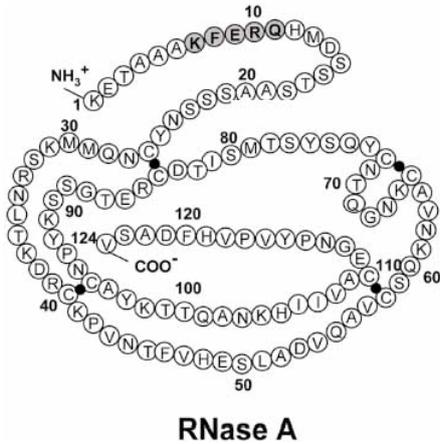
**Figure 12 : expérience de dénaturation / renaturation de la ribonucléase A
Anfinsen 1961**

Matériel d'étude : une petite enzyme formée d'une chaîne repliée sur elle-même

La **ribonucléase A** est une petite enzyme formée d'une seule chaîne polypeptidique de 124 acides aminés possédant 4 ponts disulfure qui relient des portions différentes de la chaîne.

Intérêt :

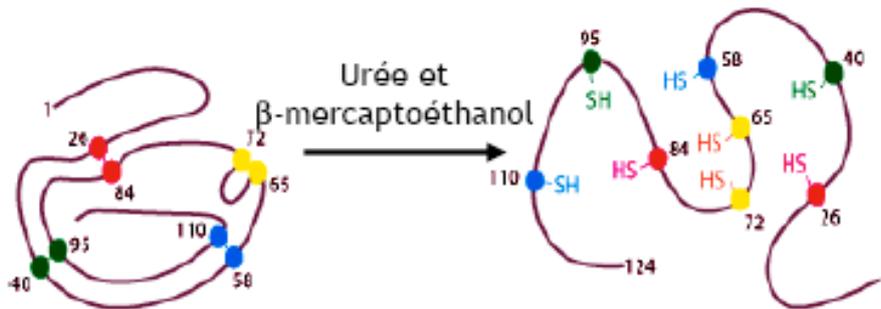
- une protéine de petite taille dont la structure est connue par cristallographie
- une activité facilement mesurable *in vitro* : cette enzyme a une activité estérase
- une structure III reposant sur des liaisons disulfure facilement rompues en présence d'un agent réducteur comme le mercaptoéthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$).



Première expérience : dénaturation

La **dénaturation** (déplieement de la molécule) est réalisée en présence d'urée concentrée ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ agent dénaturant : déstabilise les interactions hydrophobes et hydrogènes) et de mercaptoéthanol (rupture des liaisons disulfure).

La protéine est totalement dépliée et elle ne présente **aucune activité** enzymatique.



Interprétation :

.....

.....

.....

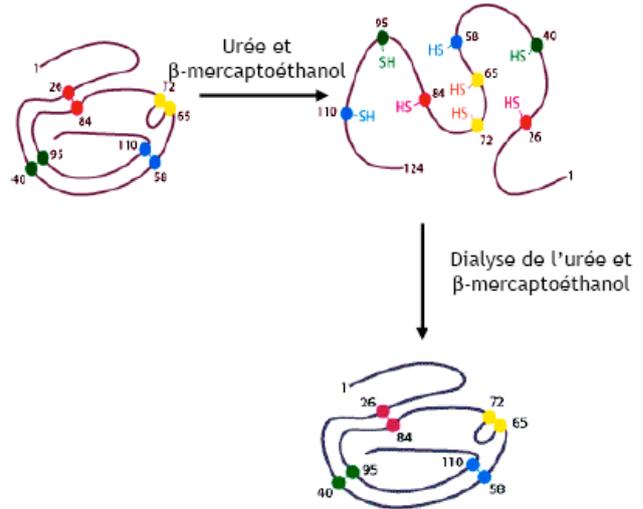
.....

Deuxième expérience : renaturation en absence d'urée et de mercaptoéthanol

La solution contenant l'enzyme dénaturée (expérience 1) est dialysée pour éliminer les agents dénaturants. On observe que la solution **recouvre** son **activité** estérase.

Ceci suggère donc que les ponts disulfure se sont reformés (par oxydation) et à des positions correctes.

Une étude minutieuse montre qu'il n'est pas possible de distinguer, ni par leur structure, ni par leur fonctionnement les enzymes actives formées à partir des enzymes dénaturées des enzymes correctement repliées (= protéines natives) présentes au début de l'expérience.

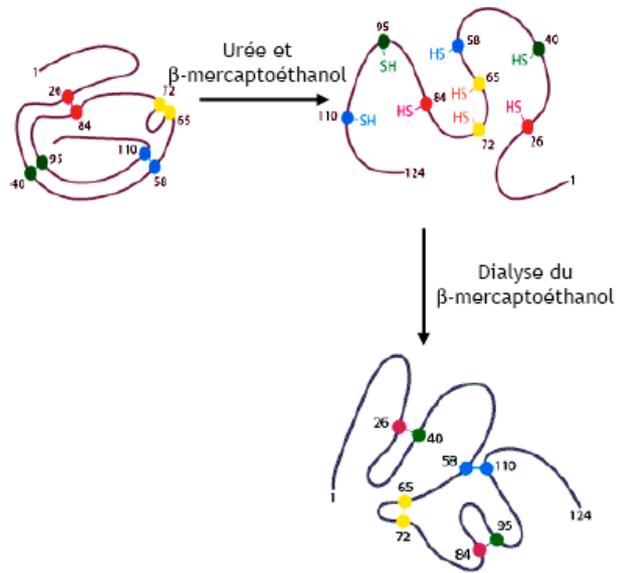


Bilan :

Troisième expérience : renaturation en présence d'urée

Lorsque l'urée n'est pas éliminée (et donc la protéine reste dénaturée), les ponts disulfure ne se forment pas correctement.

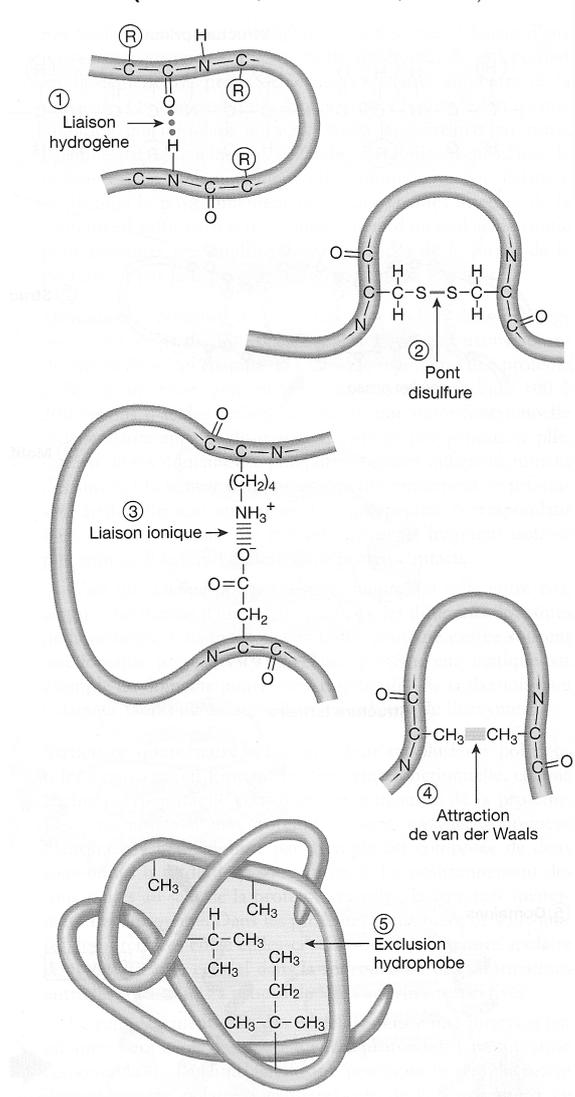
Interprétation :



Bilan : Postulat d'Anfinsen

All the information necessary to achieve the native conformation of a protein in a given environment is contained in its amino acid sequence

Figure 13 : stabilisation de la structure III par différents types de liaisons
(in Raven, De Boeck, 2007)



Interactions au sein des protéines contribuant à leur conformation. Outre les liaisons entre acides aminés qui assurent la structure primaire de la protéine plusieurs autres forces, plus faibles, entrent en jeu pour déterminer la conformation de la protéine. (1) Des liaisons hydrogène peuvent se réaliser entre résidus d'acides aminés. (2) Des ponts disulfure, relativement forts, peuvent se former entre chaînes latérales d'acides aminés cystéine. (3) Des liaisons ioniques peuvent également se réaliser. (4) Des forces de van der Waals se développent; il s'agit d'attractions faibles entre atomes dont les nuages d'électrons sont inversement polarisés. (5) Des portions polaires de la protéine tendent à se disposer en périphérie de la protéine et à interagir avec l'eau, alors que les portions hydrophobes de la protéine, en ce compris les chaînes d'acides aminés apolaires s'orientent vers le centre.

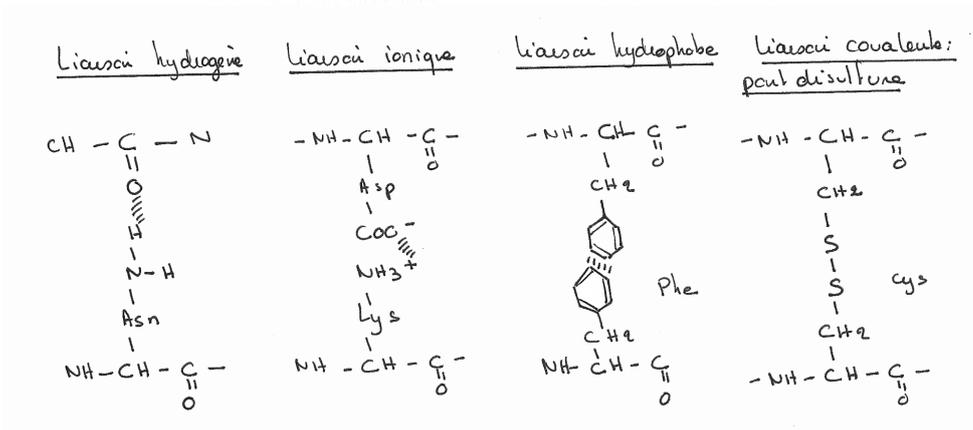


Figure 14 : L'hexokinase, une enzyme allostérique à structure tertiaire

1. Réaction catalysée

L'hexokinase est une enzyme **michaelienne** (la courbe $v_i = f([\text{glucose}])$ est une **hyperbole**) : elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique formant deux domaines reliés par une hélice alpha (figure 1) :

- C^{ter} = domaine catalytique
- N^{ter} : domaine régulateur

L'hexokinase se trouve dans toutes les cellules qui consomment du glucose : elle catalyse le transfert du phosphate terminal d'ATP sur une molécule de glucose (fig.2) :



Elle permet ainsi la formation du G6-P, un carrefour métabolique qui est le précurseur de 3 voies métaboliques : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la synthèse de glycogène = glycogénogenèse.

Cette enzyme présente une forte affinité pour le glucose : $K_M = 0,05 \text{ mM}$.

Différentes hexokinases existent chez l'homme : elles sont exprimées dans des tissus spécifiques. Nous nous intéressons ici à l'HK1, exprimée dans les hématies et le cerveau.

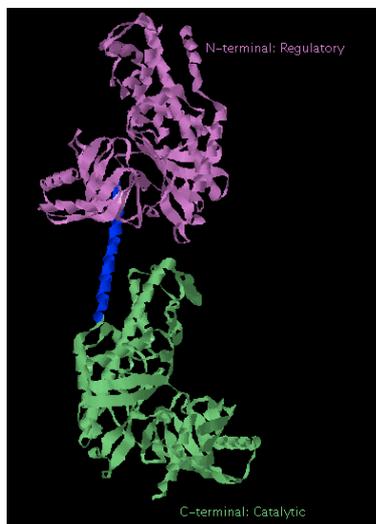


Figure 1 : structure de l'HK (cristallisation et diffraction aux rayons X)

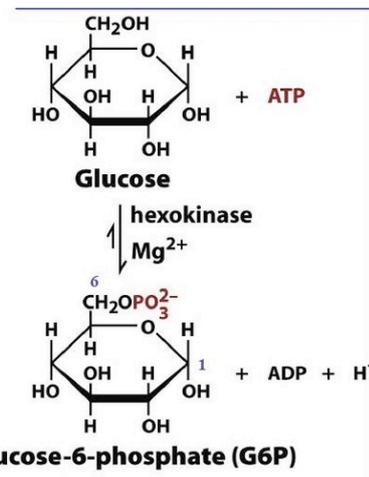


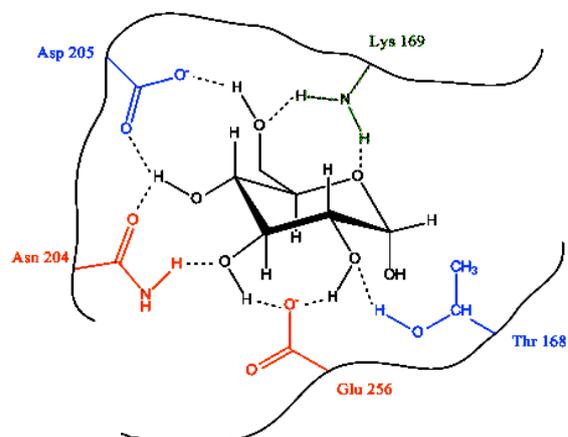
Figure 2 : réaction catalysée par l'hexokinase

2. Site actif

Le site actif stabilise le glucose au niveau du **site fixation**. Cette stabilisation met en jeu 9 liaisons hydrogène.

5 acides aminés interviennent dans la formation de liaisons H : la Thréonine 168 (Thr), la Lysine 169 (Lys), l'Asparagine 204 (Asn), l'Aspartate 205 (Asp) et Glutamate 256 (Glu).

Un acide aminé, l'Aspartate 205 situé dans le site actif, impliqué dans le **mécanisme réactionnel**.



3. Mécanisme réactionnel

Pourquoi l'hexokinase catalyse-t-elle le transfert d'un groupement phosphoryle de l'ATP au glucose pour donner du G6P et non à l'eau pour donner de l'ADP + Pi ?

La molécule d'eau est certainement bien assez petite pour pouvoir s'insérer dans le site enzymatique impliqué dans la liaison du groupement phosphoryle. De plus, le transfert du groupement phosphoryle de l'ATP à l'eau est plus exergonique que le transfert au glucose.

Malgré cela, l'hexokinase catalyse le transfert du groupement phosphoryle sur le glucose à une vitesse 40.000 fois supérieure à celle du transfert du groupement phosphoryle sur l'eau.

Cela s'explique par le fait que le glucose induit un **changement conformationnel** important de la région C^{ter} de l'hexokinase ou **adaptation induite (figure 4)**. Les deux lobes entre lesquels le site actif forme une sorte de poche, pivote l'un vers l'autre, englobant ainsi le glucose. Ce mouvement amène l'ATP tout près du groupement hydroxyle porté par le C₆ du glucose tout en chassant l'eau du site actif.

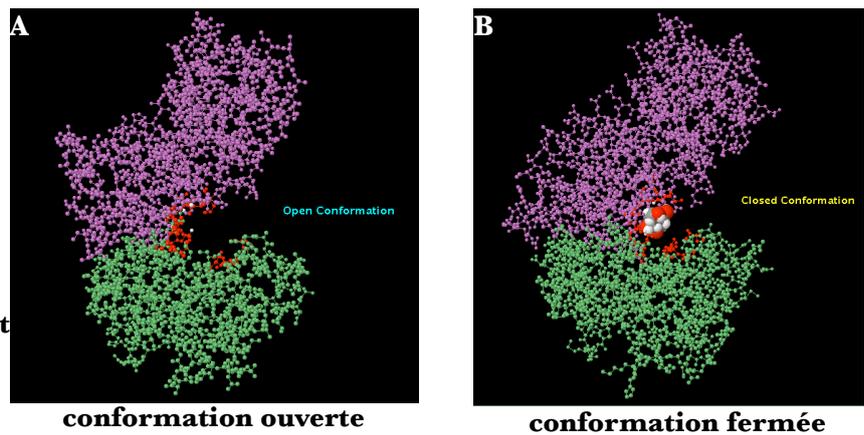


Figure 4 : adaptation induite

A : sans glucose fixé

B : glucose fixé sur le site actif

Seule la région catalytique est présentée

4. Contrôle de l'activité par fixation de régulateurs (G6P et Pi)

(<http://www3.interscience.wiley.com>)

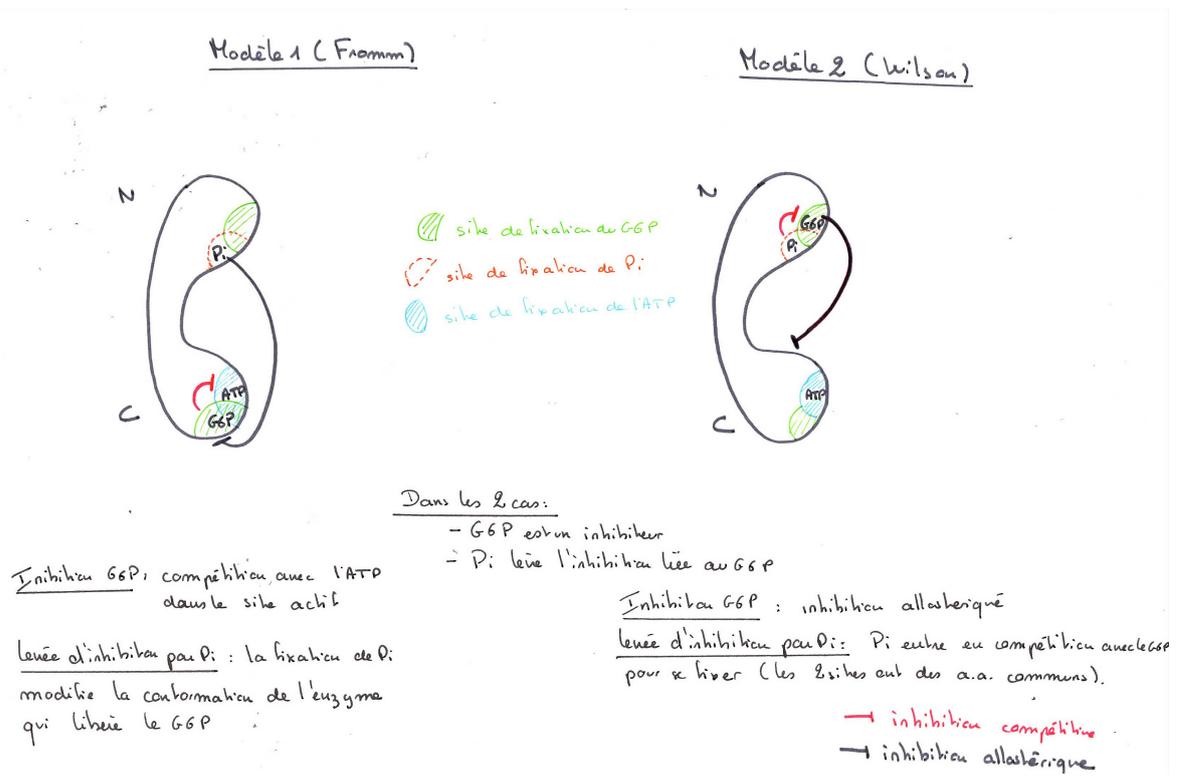


Figure 15 : rôle des chaperons
(in Lodish)

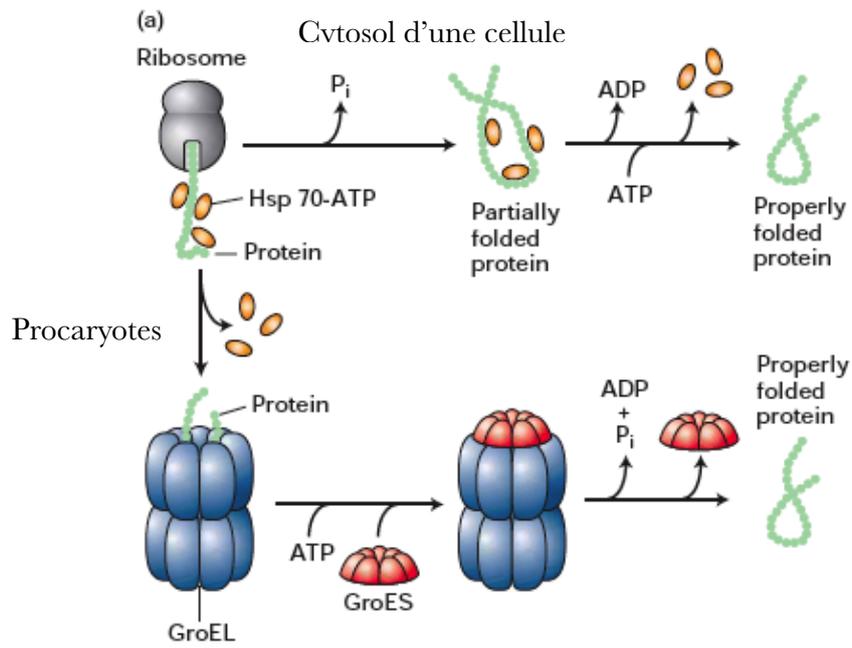


Figure 16 : scénario probable pour le repliement des protéines
(in Benhabiles et al., Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2000 4 (2), 71–81)

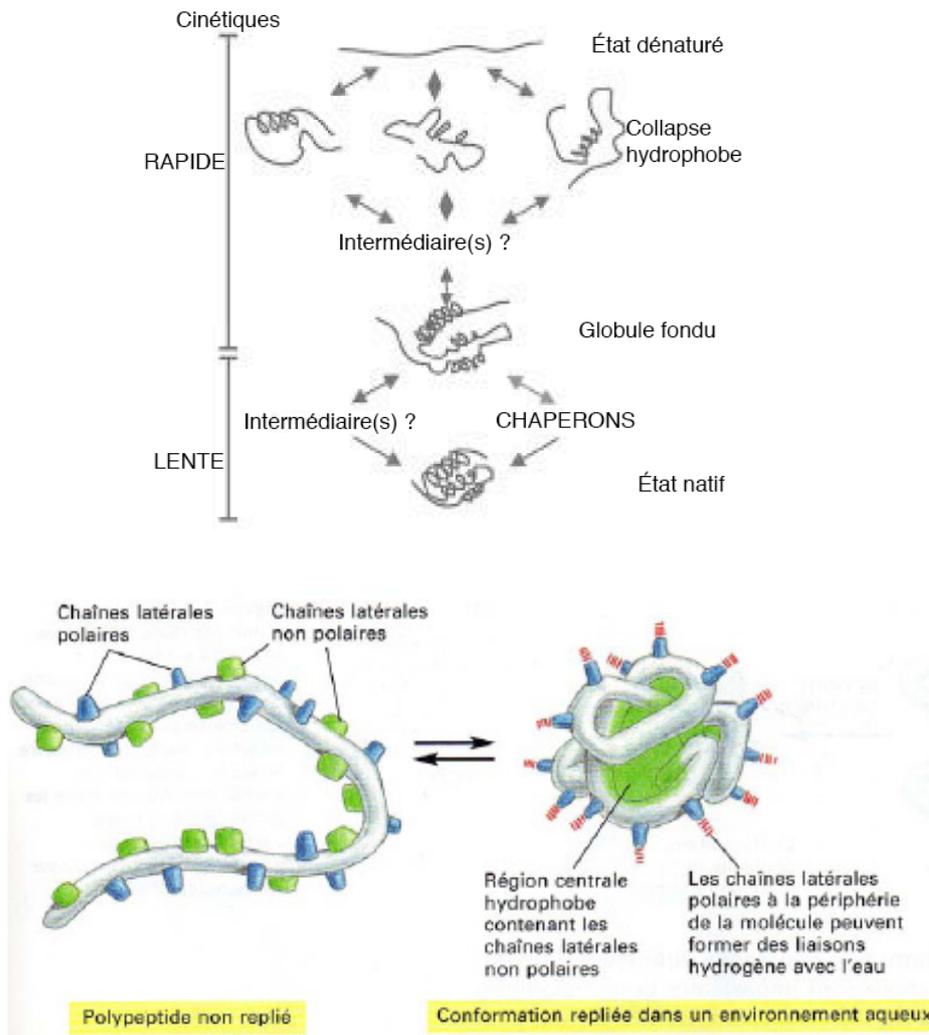


Figure 17 : mise en évidence d'une structure IV par SDS page

La structure d'une enzyme (la dopamine- β -hydroxylase) est étudiée par électrophorèse.

- A : marqueurs de masse moléculaire
- B et C : SDS avec β -mercaptoéthanol
- D et E : SDS sans β -mercaptoéthanol
- C et D : enzyme humaine
- B et E : enzyme de rat

En comparant de manière judicieuse les résultats obtenus, déterminer si cette enzyme possède une structure IV.

Quel type d'électrophorèse permettrait d'affiner les résultats?

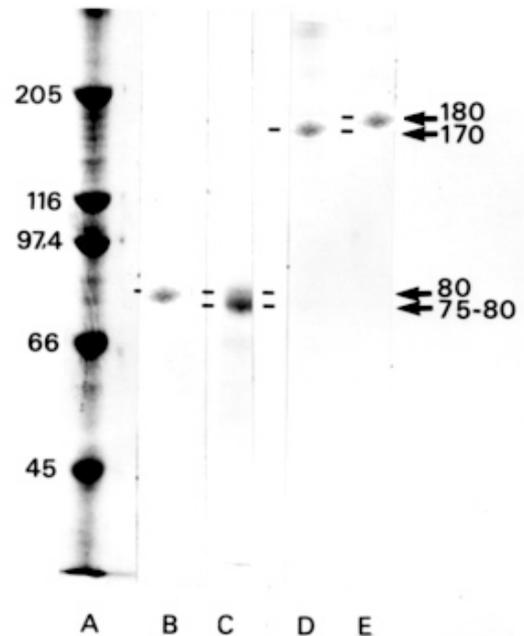


Figure 18 : structure de la fibroïne

Un "mille feuilles" de feuillets β

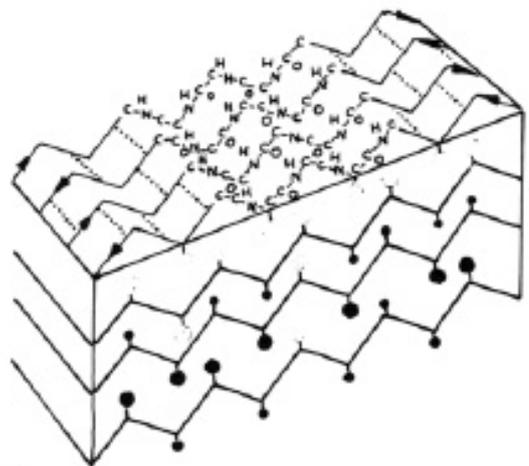
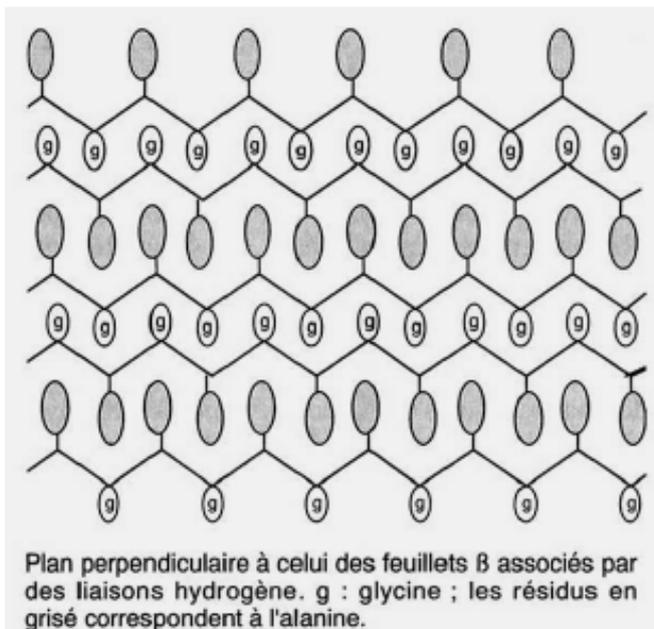


Figure 19a : N-glycosylation (dans le RE d'une cellule Eucaryote)

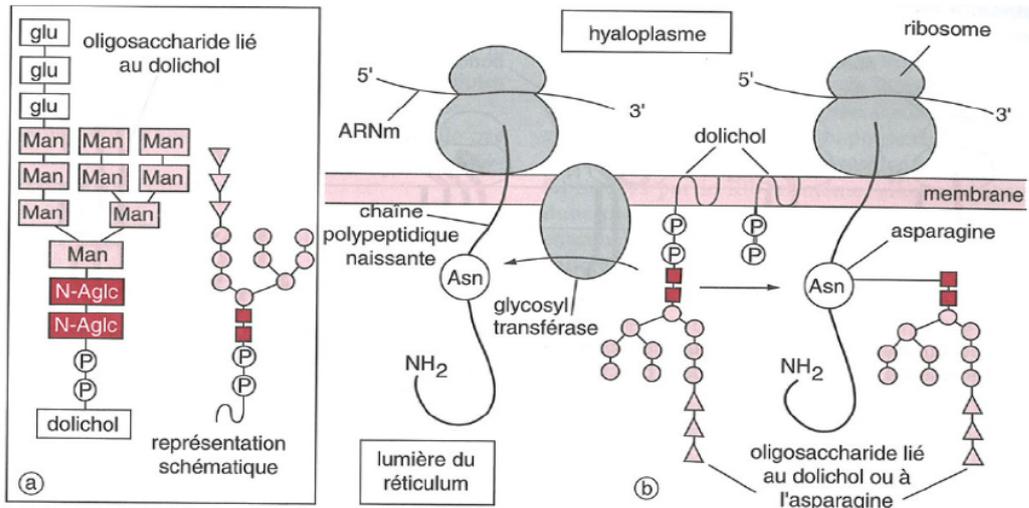


Figure 19b : Maturation des protéines dans l'appareil de Golgi
(in Breuil, Tec et doc)

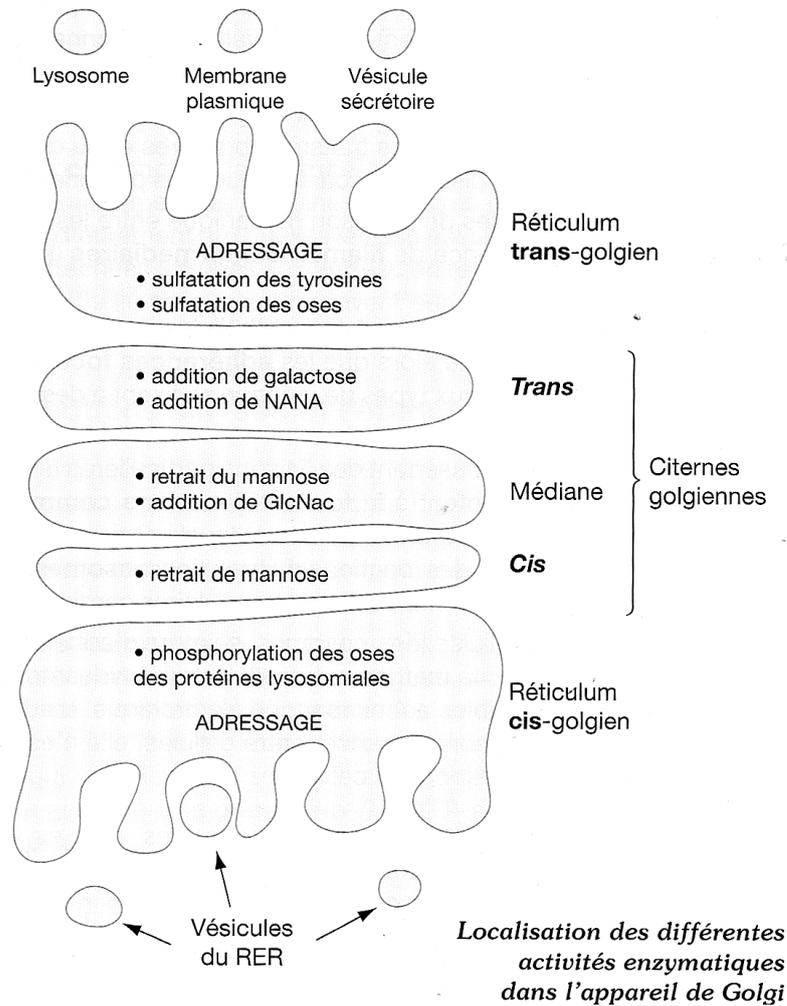
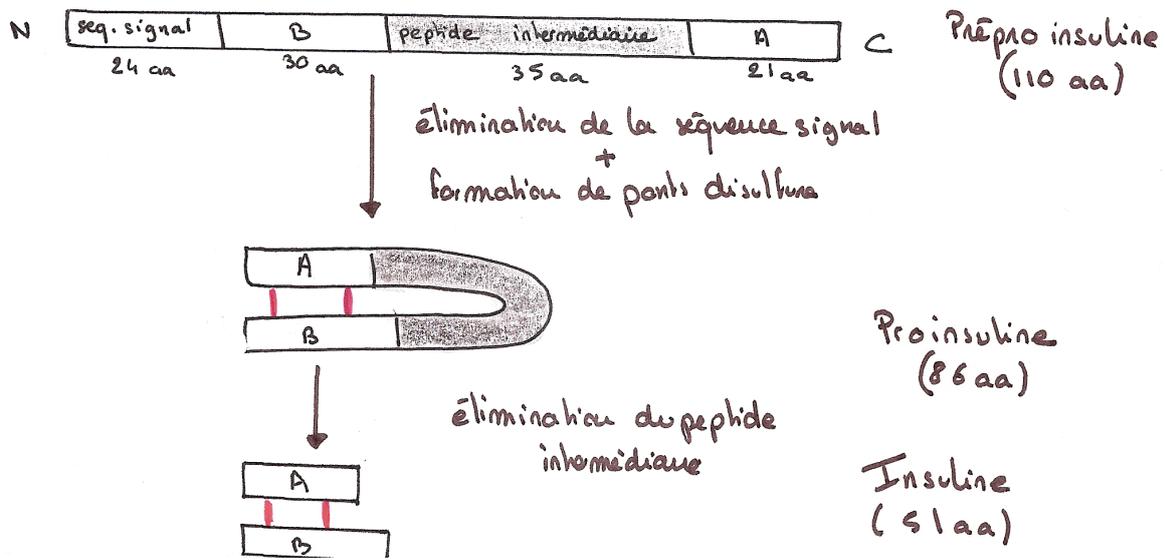


Figure 20 : Maturation de l'insuline



Niveaux structuraux de l'insuline

L'insuline est formée de 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 2 ponts disulfures et 1 pont disulfure intrachaîne dans la chaîne A : une chaîne A de 21 acides aminés une chaîne B de 30 acides aminés. Les deux chaînes sont issues d'une même chaîne polypeptidique (= proinsuline) qui est ensuite clivée.

Rq : la forme IV correspond à des hexamères stabilisés par du zinc. Cette forme est la forme de stockage de l'insuline .

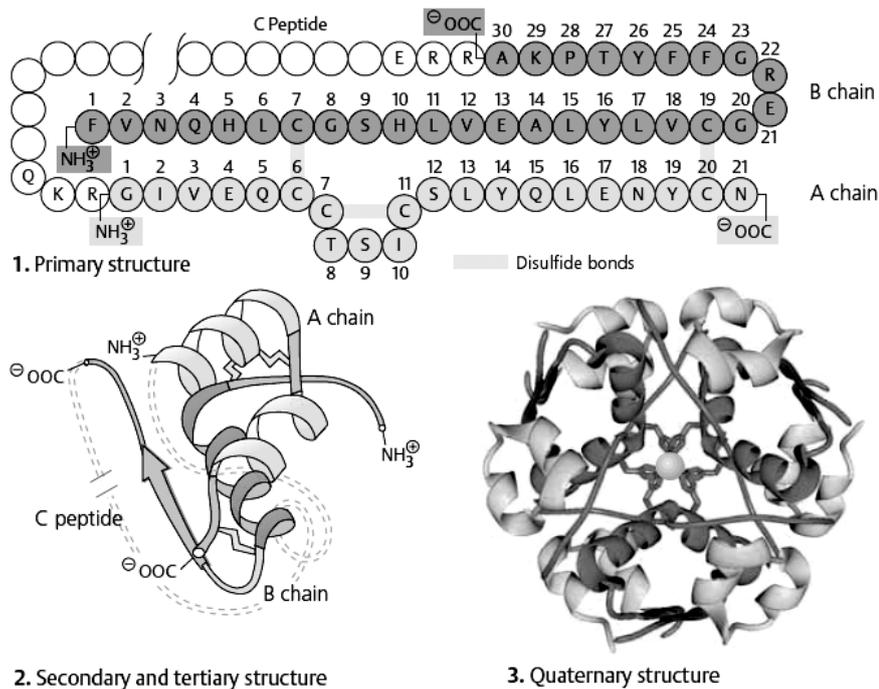


Figure 21 : les collagènes, des protéines fibreuses au rôle de soutien

Les **collagènes** sont les molécules les plus abondantes du règne animal. Leur nom vient de la possibilité d'obtenir des colles en les extrayant par ébullition. Les gélatines alimentaires sont constituées de collagènes. La propriété essentielle des collagènes est leur résistance à la traction.

Il existe une vingtaine de collagènes différents : nous étudierons uniquement :

- le collagène de **type I** : on le trouve dans le tissu conjonctif lâche où il forme des fibres résistantes à la traction
- le collagène de **type IV** présent dans la lame basale où il forme un réseau bidimensionnel.

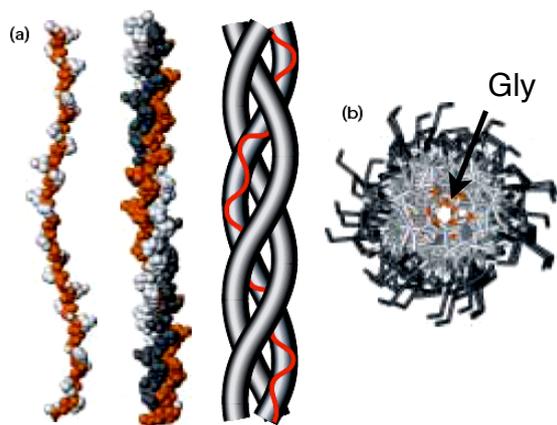
➤ Structure commune aux différents types de collagènes :

Le collagène est une **protéine fibrillaire** constituée de **3 chaînes** polypeptidiques appelées **chaînes α** .

Structure I : séquence riche en **glycine**, **proline** et **hydroxyproline** (proline modifiée : un H est remplacé en OH sur le C₂ : possibilité de liaisons H en plus). Chaque chaîne fait 100 Kda environ et est composée d'environ 1000 acides aminés. Il existe plus de 20 chaînes α différentes.

Structure II : Chaque chaîne s'enroule en une **hélice gauche** (**≠hélice alpha**), non stabilisée par des liaisons H comme pour l'hélice alpha.

Structure IV : Les chaînes sont associées par 3 et sont entrelacées en hélice droite. Les 3 chaînes sont identiques ou non pour un type de collagène donné. Chaque triple hélice a un diamètre de 0,5 nm. Cette hélice est appelée **tropocollagène**.



The collagen triple helix. (a) (Left) Side view of the crystal structure of a polypeptide fragment whose sequence is based on repeating sets of three amino acids, Gly-X-Y, characteristic of collagen α chains. (Center) Each chain is twisted into a left-handed helix, and three chains wrap around each other to form a right-handed triple helix. The schematic model (right) clearly illustrates the triple helical nature of the structure. (b) View down the axis of the triple helix. The proton side chains of the glycine residues (orange) point into the very narrow space between the polypeptide chains in the center of the triple helix. In mutations in collagen in which other amino acids replace glycine, the proton in glycine is replaced by larger groups that disrupt the packing of the chains and destabilize the triple-helical structure. [Adapted from R. Z. Kramer et al., 2001. *J. Mol. Biol.* 311(1):131.]

➤ Relation structure-fonction :

Les **glycines** sont essentielles pour la structure du collagène : en effet, elles ont une **petite** chaîne latérale (un R=H) : elles se placent au centre de l'hélice de collagène (voir figure ci-dessus).

Les **hydroxyprolines** permettent de former des **liaisons H** entre les 3 chaînes α et permettent donc de **stabiliser la triple hélice**.

➤ Mode d'assemblage : les triples hélices s'assemblent et le mode d'association dépend du type de collagène :

- **Collagène de type I** (tissu conjonctif lâche) sécrété par les fibroblastes : association du tropocollagène (= triple hélice) en fibrilles de collagène : **collagène strié**.
- **collagène de type IV** (lame basale) : les triples hélices forment un **réseau bidimensionnel** (formation de mailles comme dans un filet)

Synthèse et assemblage du collagène de type I (TC lâche) (in Koolman, 2005)

➤ Synthèse : les chaînes α du collagène sont synthétisées sous forme de **précurseurs** présentant des peptides terminaux appelés **propeptides** qui seront clivés dans la MEC.

La molécule issue de la traduction dans le REG est appelée **chaîne pré-pro- α** (“pré” car a encore un peptide signal, “pro” car contient des propeptides).

La chaîne **pré-pro- α** subit des **modifications** post-traductionnelles (comme des hydroxylations, des N et O glycosylations) dans le REG et l’appareil de Golgi. Des protéines chaperon se fixent aux chaînes de façon à éviter des liaisons entre elles et donc la formation d’agrégats.

Les chaînes pro- α s’assemblent en triples hélices dans l’appareil de Golgi et sont sécrétées : les molécules formées sont appelés **pro-collagène**. Les propeptides terminaux sont clivés dans la MEC : il se forme des molécules de **tropocollagène**. Les propeptides permettraient l’assemblage en triple hélice.

➤ Assemblage : les microfibrilles de collagène de type I ont un aspect strié au MET; la striation résulte de l’assemblage des molécules de tropocollagène entre elles.

L’extrémité C terminale d’une molécule de tropocollagène se lie à **l’extrémité N-terminale** de la molécule de tropocollagène sous-jacente, en se **décalant** d’environ 1/4 de leur longueur. Longitudinalement un petit espace sépare la tête d’une molécule de tropocollagène de la queue de la suivante.

Les fibrilles s’assemblent ensuite en fibre de collagène (0,5 à 3 μ m de diamètre)

➤ Relation structure-fonction :

- les liaisons latérales sont des liaisons **covalentes** d’où une **résistance** à la **traction** et une **inextensibilité**. Le nombre de liaisons covalentes est variable en fonction du tissu (bcp de liaisons dans le tendon d’Achille par exemple).
- **l’assemblage** des triples hélices en microfibrilles, puis des fibrilles en fibres permet de former des **câbles résistants** à la traction

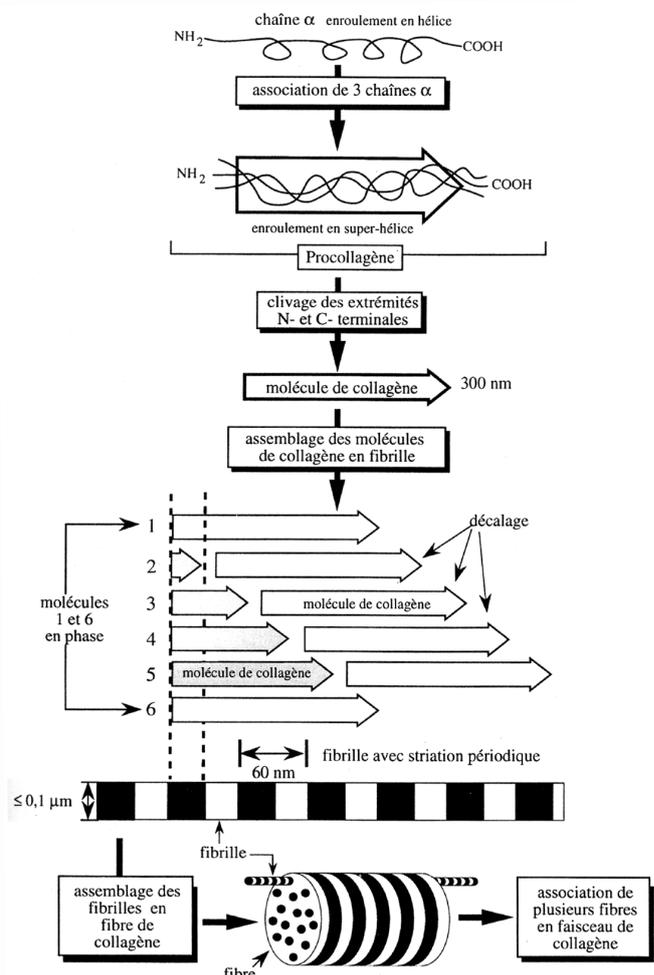


Figure 22 : formation d'un complexe enzyme-substrat

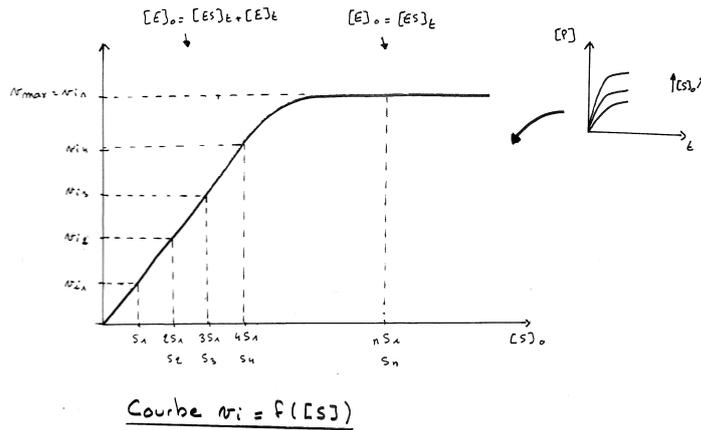


Figure 23 : rôle des acides aminés de la protéine enzymatique

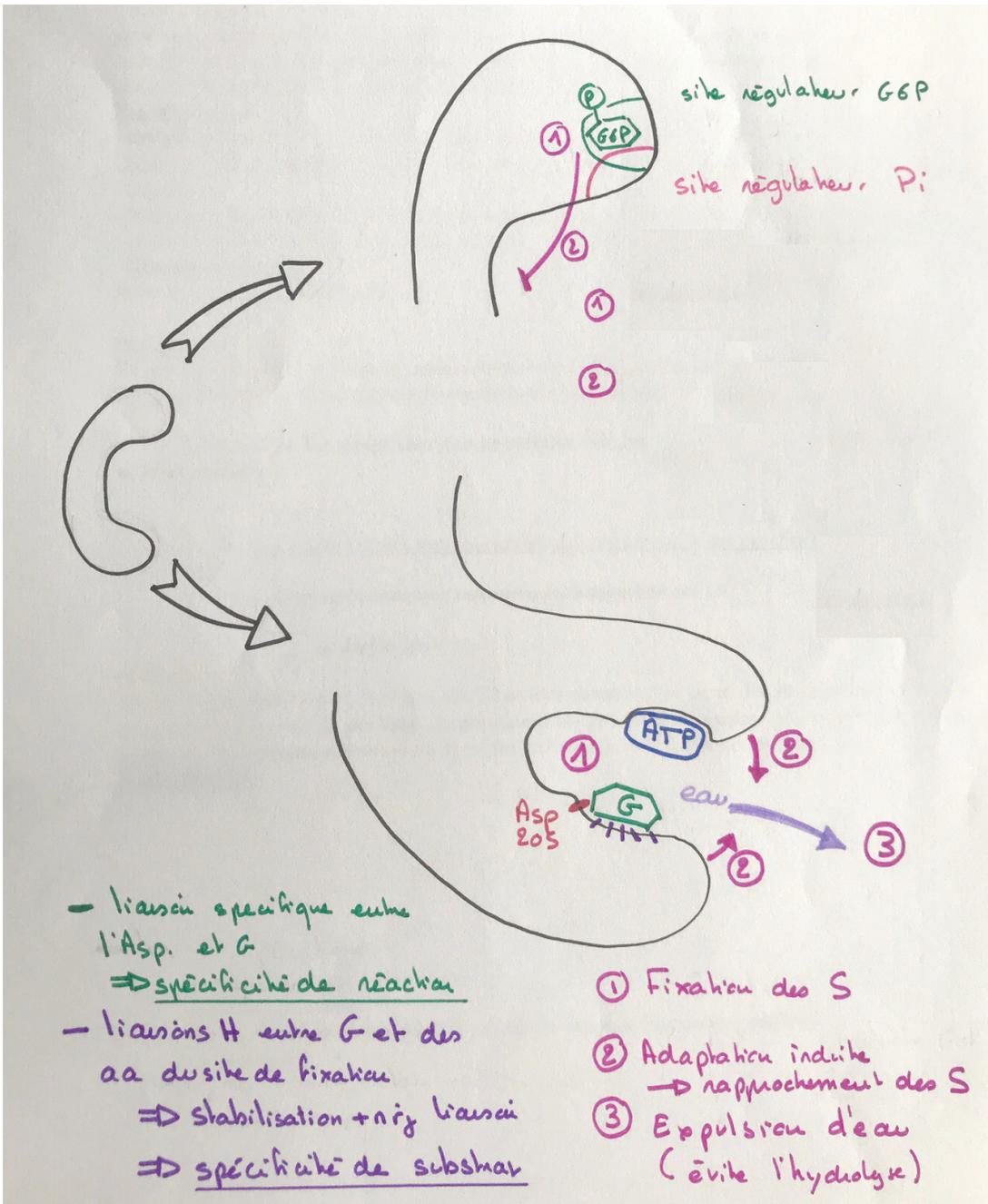
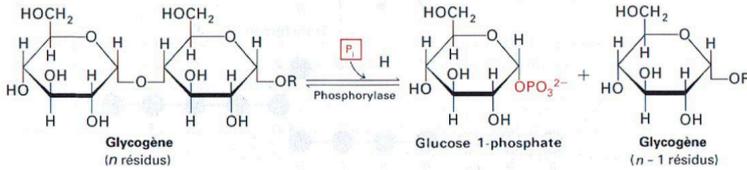
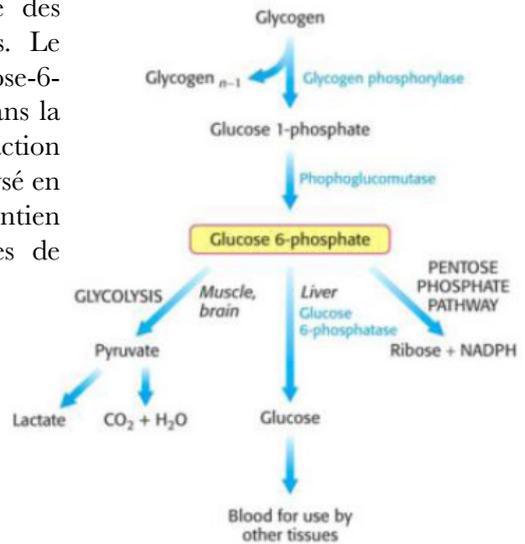


Figure 24 : les glycogène phosphorylases

Les glycogène phosphorylases sont des enzymes qui catalysent la première réaction de la **glycogénolyse** dans le cytoplasme des **cellules hépatiques** ou **musculaires** striées squelettiques. Le glucose-1-phosphate (G1P) libéré est ensuite isomérisé en glucose-6-phosphate (G6P). Dans la cellule **musculaire**, le G6P entre dans la **glycolyse** et permet la régénération d'ATP utilisé dans la contraction des myofibrilles. Dans la cellule **hépatique**, le **G6P** est hydrolysé en glucose, puis **exporté**. Le glucose plasmatique participe au maintien de la glycémie et sert de métabolite pour les autres cellules de l'organisme.

Métabolisme du glycogène



Ces enzymes possèdent une **structure IV** : les enzymes **musculaires** possèdent **4 sous unités**, les enzymes hépatiques en possèdent 2 (figure ci-dessous).

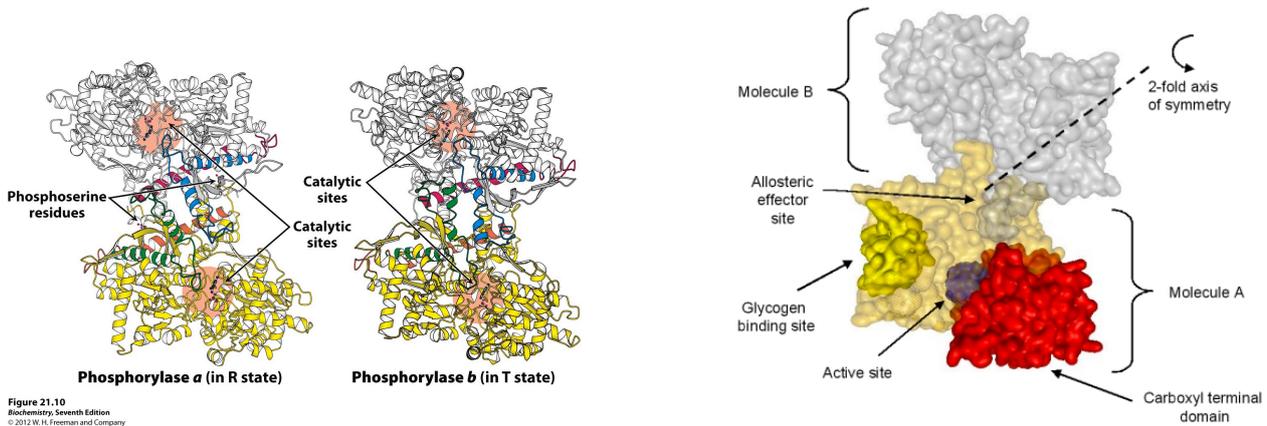
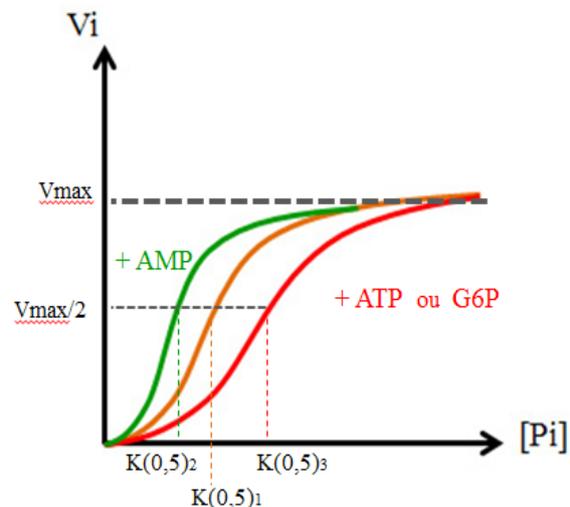


Figure 21.10 Biochemistry, Seventh Edition © 2012 W. H. Freeman and Company

L'étude de la **cinétique enzymatique** de l'enzyme musculaire montre que la courbe $v_i = f([S])$ (en orange) n'est pas une hyperbole comme dans le cas de l'hexokinase : c'est une **sigmoïde**.



Des études de cristallographie ont montré que l'enzyme existe sous deux formes :

- **une forme T = tendue** : le site catalytique présente une **faible affinité** pour le substrat. Les **liaisons** faibles sont **nombreuses** à l'interface des deux sous unités et le tétramère présente une certaine rigidité. L'enzyme est **inactive**.
- **une forme R = relâchée** : le site catalytique possède une bonne affinité pour le substrat. Les liaisons faibles sont moins nombreuses. L'enzyme est plus active

Le passage de la forme T à la forme R repose sur la rupture de liaisons faibles impliquées dans le maintien de la structure IV. Le **changement de conformation** qui fait passer de la forme T à R est appelé **transition allostérique**.

Contrôle de l'activité de l'enzyme musculaire

Deux types de régulation interviennent dans le cas de cette enzyme :

- une régulation mettant en jeu des **activateurs et inhibiteurs allostériques**
- une régulation impliquant la **phosphorylation** de l'enzyme.

Nous détaillerons ici la régulation de l'enzyme présente dans les **muscles**

Régulation allostérique par le G6P, l'ATP et l'AMP :

Des études de cristallographie montrent que l'enzyme possède des sites de fixation à l'ATP, l'AMP et le G6P qui sont différents du site actif. L'ajout de ces facteurs déplace la sigmoïde comme le montrent la figure de la cinétique enzymatique ci-dessus.

Régulation par phosphorylation

La glycogène phosphorylase existe sous deux niveaux de phosphorylation (=modification covalente) :

- un état **inactif** : état **b**, l'enzyme n'est **pas phosphorylée**
- un état **actif** : **a**, l'enzyme est **phosphorylée**

Sous la forme a, l'enzyme est stabilisée sous forme R donc elle est active en permanence.

le contrôle par le G6P, l'ATP et l'AMP n'a plus lieu dans ce cas.

La **modification covalente** est sous contrôle **hormonal** Elle est comme une transition allostérique permanente qui devient indépendante de la concentration en effecteurs allostériques.

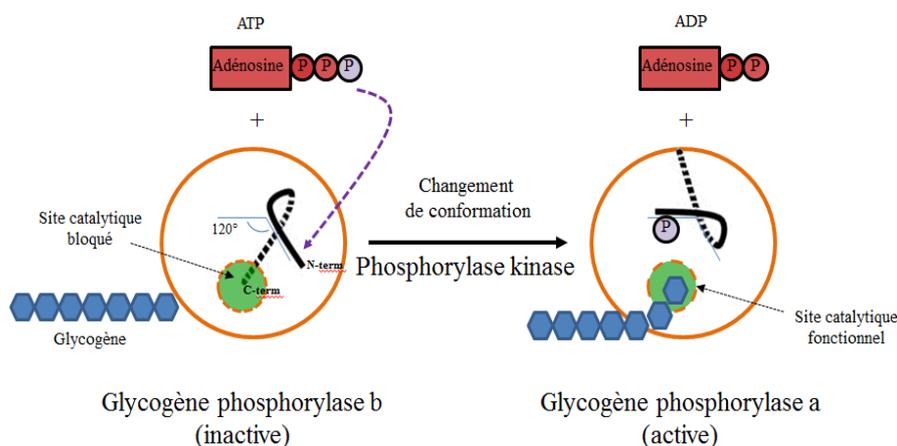


Figure 25 : organisation d'un LDL

