

CHAPITRE

2

MODÈLES : MESURE DES FONCTIONS DES PROTÉINES

La cellule est constituée de quatre grands groupes de macro-molécules : les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les glucides. Si les propriétés biochimiques diffèrent, les fonctions de ces molécules sont fondamentalement liées à leur structure. Les acides nucléiques portent l'information génétique de l'individu. L'ADN tout particulièrement stocke cette information. Il porte le génotype. Ce génotype s'exprime de deux façons : la synthèse d'ARN et la synthèse de protéines qui vont former le phénotype de la cellule. Les protéines sont formées d'un assemblage d'acides aminés dont la séquence dépend de la séquence génétique associée. Cette séquence en acide aminé a un repliement tridimensionnel statistiquement stable. La forme repliée active de la protéine lui permet d'assurer une fonction précise. Cette fonction peut être fondamentalement structurale pour la cellule (cytosquelette). Les protéines permettent également le transport de molécules, la transformation chimique de molécules ou encore la fixation de ligands. L'enzymologie, l'étude des enzymes, a été la première discipline étudiée en biochimie avec les études sur la fermentation alcoolique des levures ainsi que les études sur la digestion au 19^{ème} siècle. Appelées "ferments" par Justus Liebig, le terme enzyme (en « dans » et zyme « levure » grec) a été introduit en 1878 par Friedrich Wilhelm Kühne. La nature protéique des enzymes n'a été acceptée que dans les années 30 et l'existence d'ARN à activité enzymatique a été montrée par la suite (Ribozyme). La première structure primaire d'enzyme a été obtenue en 1963 (ribonucléase A du pancréas bovin) et la première structure tridimensionnelle date de 1965 avec le lysosyme du blanc d'œuf de poule ([3]).

L'objectif de ce chapitre est de comprendre la diversité fonctionnelle des protéines et de comprendre comment ces fonctions peuvent être mesurées.

Nous allons revenir rapidement dans un premier temps sur le repliement des protéines puis nous verrons de façon succincte les différentes activités protéiques et les mesures biochimiques associées.

I. Le repliement des protéines : une étape essentielle

A. Rappel de L1 : les étapes et les types de repliement

Vous reverrez votre cours de première année sur les protéines. Les protéines sont composées de l'enchaînement d'acides aminés *via* une liaison peptidique. La séquence orientée de cet enchaînement (du N-terminal vers le C-terminale) est appelée structure primaire et celle-ci est codée par le génome (cours de biologie moléculaire). Localement, les acides aminés consécutifs de cette séquence s'organisent dans l'espace selon deux modes : hélice α ou brin β : c'est la structure secondaire. Ces structures secondaires interagissent entre-elles rapprochant des acides aminés éloignés dans la séquence : c'est la structure tertiaire. Dans cette structure tertiaire, des domaines peuvent être identifiés. Ce sont des unités de repliement autonomes liés les un aux autres par des boucles flexibles. Parfois, une protéine est composée de différents polypeptides : l'agencement de ces polypeptides est la structure quaternaire (figure 2.1).

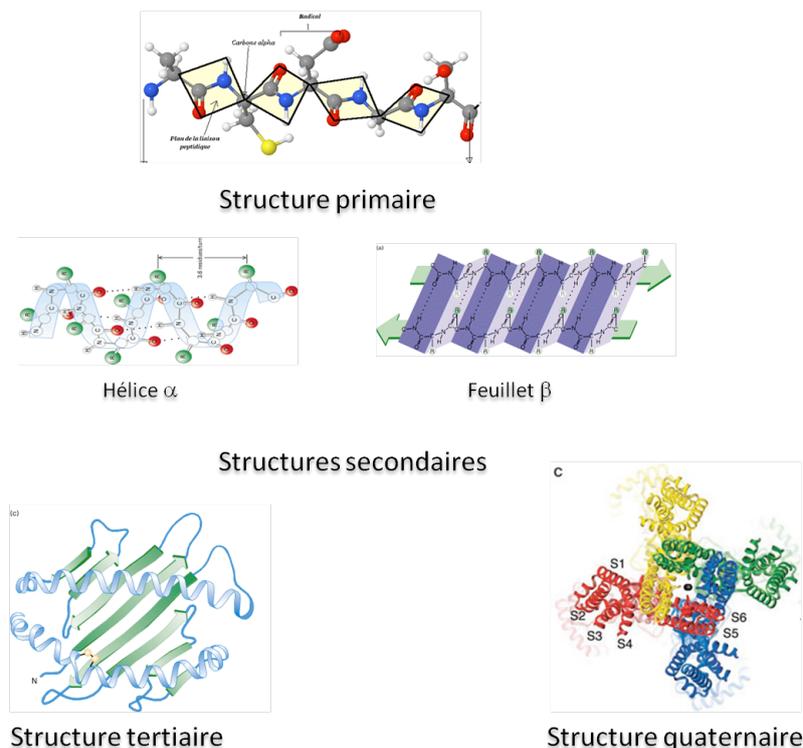


FIGURE 2.1 – Rappels sur le repliement des protéines

B. Observation du repliement des protéines

L'obtention de la structure d'une protéine peut se faire par différentes méthodes [3, 2] :

- **Analyse par coupure enzymatique** : c'est notamment une méthode d'analyse des protéines membranaires (B11). Les seules régions de la protéine exposées à l'enzyme sont les parties extra-membranaires. Pour une protéine soluble, la sensibilité aux enzymes peut aussi dépendre du repliement : les boucles flexibles entre deux domaines sont plus exposées à une

coupure.

- **observation en microscopie électronique** : La microscopie électronique permet d'observer de grosses structures protéiques. Longtemps limitée à la description de la structure globale d'un virus ou de grosses protéines, elle permet maintenant des observations de plus en plus proches du niveau atomique.
- **Observation par la méthode de cristallographie et diffraction aux rayons X** : Cette méthode permet d'observer les protéines organisées dans un cristal par une méthode de diffraction (cours de physique). Elle permet d'avoir la structure de protéines de toutes tailles au niveau atomique. Souvent les grosses structures macromoléculaires sont difficiles à observer. En effet, cette méthode nécessite des structures figées, immobiles.
- **Observation par RMN** : La RMN bi-dimensionnelle permet d'obtenir des structure de petites protéines en solution. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'obtenir toutes les conformations possibles d'une protéine.
- **Les modélisations de structures** : Certaines structures sont difficiles à obtenir. Des modèles informatiques peuvent être obtenu à partir de la séquence primaire de la protéine. Ce sont des méthodes prédictives basées sur les structures connues de protéines de séquence primaire proche.

C. La conformation des protéines

Comme un chimie organique, des conformations sont des organisations dans l'espace différentes d'une molécule dont le passage de l'une à l'autre ne nécessite aucune rupture de liaison. Le changement de conformation que vous connaissez bien sont les différentes des cycles des sucres : forme chaise, forme bateau, forme enveloppe, forme twist. Chacune de ces formes se décline en plusieurs organisations : chaise en position équatoriale ou en position axiale. Ces conformations ne sont pas toutes énergétiquement équivalentes. Certaines entraînent des gênes stériques plus importantes. En solution, il y aura donc statistiquement des conformations plus présentes. Par exemple, le glucose en cycle pyrane est à 60 % en conformation chaise (figure ??) [3].

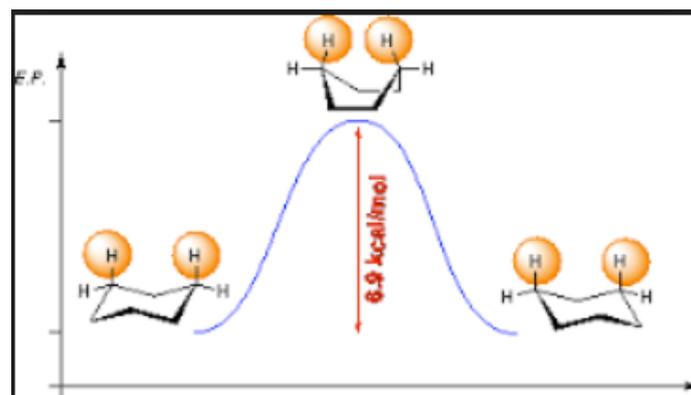


FIGURE 2.2 – **Notion de conformation** : les conformations d'un cycle pyrane (http://perso.numericable.fr/chimorga/Niveau_L1/conf/or/conf.php – 15juin2018)

Les protéines peuvent aussi adopter plusieurs conformations qui peuvent concerner l'ensemble de la structure ou juste des modifications au sein d'un domaine. Ces différentes conformations co-existent et sont statistiquement plus ou moins présentes selon les conditions. Des modifications covalentes (phosphorylation par exemple) ou des interactions avec des ligands (calcium par exemple) peuvent entraîner une modification de la forme majoritaire voire la possibilité d'adopter une nouvelle conformation. Certains repliements sont non fonctionnels (figure ??) [Voet, 2].

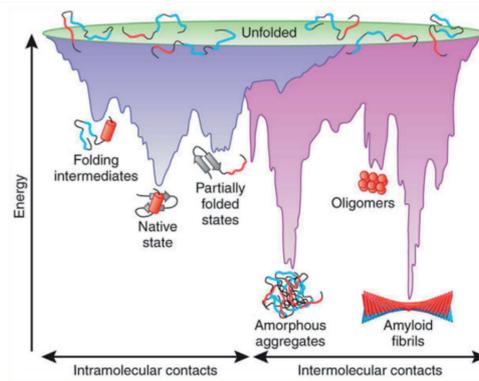


FIGURE 2.3 – **Notion de conformation** : les conformations lors du repliement d’une protéine [2]

D. Notion de protéine de structure

Les textes opposent protéines de structure et protéines ayant une fonction. Les protéines dites de structure sont souvent des protéines impliquées dans la cohérence tissulaire ou la forme des cellules. Ce ne sont pas pour autant des protéines figées qui ne portent jamais d’activité enzymatique. Parmi ces protéines, les protéines du cytosquelette vues en premier semestre sont de bons exemples [1].

II. L'activité d'une protéine

Le terme "activité" est un terme générique qui sert à désigner ce que "fait" la protéine. Néanmoins, son sens varie selon le type de protéine et il peut se rapporter à des conditions de mesure très précises.

A. Les protéines fixant des ligands

Un ligand est un corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine mais qui n'est pas transformé au cours de la réaction. Certaines protéines fixent d'autres protéines. Les mécanismes chimiques sont les mêmes mais les méthodes de mesure ne sont pas toujours réalisables. Les protéines qui fixent les ligands appartiennent à différentes familles de protéines : les récepteurs, les protéines de transports ou encore les enzymes. Pour certaines protéines la fixation du ligand constitue leur activité principale (fixation du fer par la transferrine). Pour d'autres protéines, la fixation du ligand est un processus secondaire souvent impliqué dans des mécanismes de régulation (les enzymes) [3].

Le site de fixation d'un ligand sur une protéine possède des caractéristiques chimiques qui lui permettent d'interagir avec celui-ci (figure 2.4)

- complémentarité de forme
- liaisons polaires
- liaisons ioniques
- forces de Van Der Waals
- interactions hydrophobes

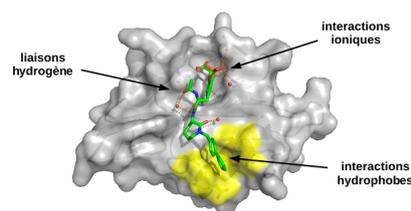


FIGURE 2.4 – Exemple d'un site de fixation

Ces propriétés chimiques sont à l'origine de l'affinité mais aussi de la spécificité du site de fixation. L'affinité est une mesure de la force d'interaction. La spécificité peut signifier deux choses :

- un site spécifique est un site saturable (cf plus loin)
- cela peut être une mesure relative : l'affinité du ligand considéré pour ce site est-elle bien supérieure à celle d'autres ligands structurellement proches.

Cette interaction entre la protéine et son ligand n'est pas figée : en permanence un ligand se fixe puis se sépare du site de fixation. C'est une interaction dynamique caractérisée par une vitesse de liaison et une vitesse de dissociation. A l'équilibre de la réaction, le rapport entre ligand lié et ligand libre dépend de la constante d'équilibre (chapitre 2).

Afin de suivre la fixation, la quantité de ligand lié ou de complexe protéine ligand est mesurée. Cette mesure peut se faire de différentes façon (figure 2.5) :

- soit dans le temps : cela permet souvent d'accéder aux vitesses de fixation
- soit à l'équilibre : la mesure des concentration en complexe et en ligand/protéine libre à l'équilibre dans différentes conditions. L'équation ci-dessous correspond à l'équation de fixation Mickaëlienne du substrat.

$$Ligand - lié = \frac{(ligand - lié)_{max} * ligand - libre}{K_d + ligand - libre} \quad (2.1)$$

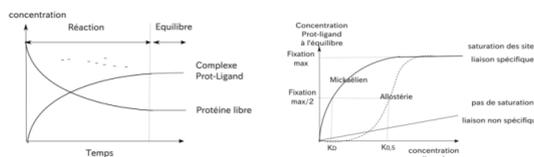


FIGURE 2.5 – Mesure de la fixation soit en fonction du temps (gauche) soit à l'équilibre de la réaction (droite)

La figure 2.5 montre l'obtention de types de courbes caractérisées par des constantes thermodynamiques K_D ou $K_{0,5}$. Les courbes hyperboliques montrent une fixation non coopératives du ligand dites Mickaëliennes (chapitre 2) alors que les courbes sigmoïdes montrent une fixation coopératives des ligands dite allostérique (L3).

B. Les enzymes : des catalyseurs biologiques

Un enzyme est un catalyseur biologique c'est-à-dire une molécule synthétisée par les êtres vivants qui, à très faible concentration, augmente la vitesse de réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme reste inchangée.. Le propre des enzymes n'est donc pas de "faire" une réaction chimique qui n'existerait pas mais d'accélérer une réaction chimique déjà possible.

Les enzymes possèdent un site spécifiques de fixation du substrat à proximité d'un site dit catalytique qui contient des acides aminés impliqués dans la catalyse. Le tout forme le site actif (figure 2.6). Comme toute protéine capable de fixer un ligand, le site de fixation du substrat peut être caractérisé par son K_D soit sa constante de dissociation.

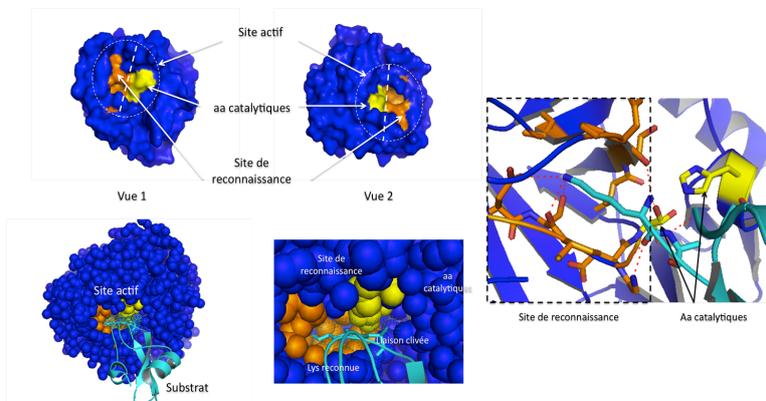


FIGURE 2.6 – Le site actif de l'enzyme

A l'instar des protéines de fixation, les enzymes ne se contentent pas de fixer le substrat mais elles accélèrent une réaction qui le modifie. C'est cette activité qui est mesurée. Pour caractériser les

enzymes, une mesure de la vitesse de réaction est donc réalisée pour différentes concentrations en substrat et en enzyme. Le substrat est le nom donné aux réactifs d'une réaction catalysée par un enzyme. L'équation ci-dessous présente l'équation obtenue pour un enzyme Mickaëlien (figure 2.7).

$$v_0 = \frac{V_{max} * [S]}{[S] + K_M} \tag{2.2}$$

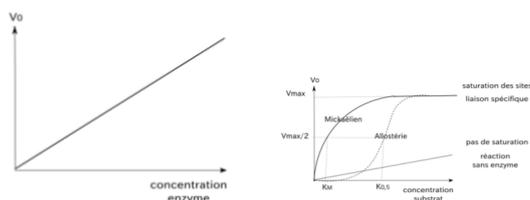


FIGURE 2.7 – Mesure de la vitesse d'une réaction catalysée par un enzyme

La figure 2.7 montre les résultats obtenu lorsque la concentration en substrat ou en enzyme est modifiée. La vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme. Par contre, la vitesse suit une hyperbole ou une sigmoïde en fonction de la concentration en substrat et cela dépend du type d'enzyme. Les courbes hyperboliques montrent une cinétique non coopérative dite Mickaëlienne (chapitre 3) alors que les courbes sigmoïdes montrent une cinétique coopérative dite allostérique (L3). Toutes deux sont caractérisées par une vitesse maximale V_{max} et une constante thermodynamique (K_M ou $K_{0,5}$).

C. Les protéines de transport

L'activité mesurée va dépendre du type de protéines de transport. Les protéines de transport en milieu liquide comme la transferrine, l'albumine ou l'hémoglobine dans le sang sont caractérisées par leur capacité de fixation. Par contre, les protéines de transport transmembranaire sont caractérisées par la vitesse de passage des molécules transportées à travers la membrane. Cette vitesse est un flux. La fixation spécifique de la molécule transportée sur son transporteur peut être également mesurée. Certaines protéines de transport nécessitent la consommation d'ATP (Transport actif primaire) et dans ce cas l'activité enzymatique peut être mesurée.

Afin de caractériser un transporteur protéique, la vitesse de transport (ou le flux) est mesuré pour différentes concentrations en molécules transportées (figure 2.8). Les équations associées à la mesure du flux de transport sont équivalentes dans leur structure aux équations que nous verrons pour les enzymes.

$$\vec{v} = \frac{\vec{V}_{max} * [S]_{int}}{[S]_{int} + \vec{K}_T} \tag{2.3}$$

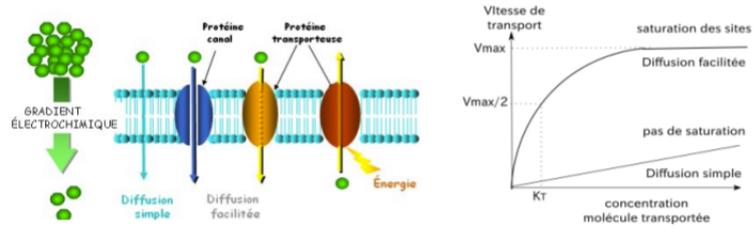


FIGURE 2.8 – Mesure de flux

WHOLE BIBLIOGRAPHY

- [1] Bruce ALBERTS et al. Sous la dir. de Garland SCIENCE. 6th english edition. 2015.
- [2] Jean-Frédéric BRUCH et al. “Étude historique de la visualisation des protéines”. In : *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* 59.488 (2017).
- [3] Voet D. et Voet J. Sous la dir. de WILEY. 4th. 2011.
- [4] Cheng Y. et WH. PRUSOFF. “Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction.” In : *Biochem. Pharmacol* 22.23 (1973).

Temporary page!

\LaTeX was unable to guess the total number of pages correctly. As there was some unprocessed data that should have been added to the final page this extra page has been added to receive it.

If you rerun the document (without altering it) this surplus page will go away, because \LaTeX now knows how many pages to expect for this document.