

Modèles en Sciences de la Vie
Chapitre 2
Modèles
Mesure des fonctions des protéines

V. Garlatti
virginie.garlatti@univ-tln.fr
Bureau U 025

2023

Les fonctions des macromolécules du vivant

Lipides

Glucides

ADN

ARN

Protéines

Compartimentation

Stockage énergie

Information
génétique :

Structure

Médiateurs

Interaction

Transfert

EnzymesMétabolites
secondaires

Information

Régulation

Transporteur

Stockage énergie

Stockage

Récepteur

Ribozyme (ARN)

Médiateur

Fonctions des protéines : une approche historique

19^{ème} siècle

- ◇ Fermentation alcoolique des levures
- ◇ Digestion

20^{ème} siècle

- ◇ 1930 : Nature protéique
- ◇ 1963 : Ribonucléase A (laire)
- ◇ 1965 : Lysosyme (3D)

Enzymologie :

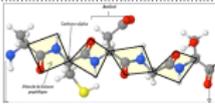
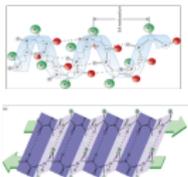
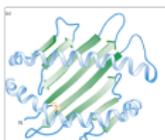
"ferments" : Justus Liebig
Enzyme : 1878, F. W. Kühne

Fonctions des protéines : une approche historique

Objectifs du cours :

- ◇ Etudier et quantifier les interactions protéines-ligands
- ◇ Etudier et quantifier l'activité enzymatique
- ◇ Mesure des flux à travers les transporteurs : Neuro

Repliement des protéines : vue globale

Structure	Type association	Types de liaisons	"Moteur"
<p>Structure Primaire</p> 	<p>Séquence acides-aminés</p>	<p>Liaisons covalentes (peptidique)</p>	<p>Moteur : Traduction</p>
<p>Structure Secondaire</p> 	<p>Repliement local en hélice</p> <p>Repliement local en brins association des brins en feuillet</p>	<p>Liaisons non covalentes</p> <p>hydrogènes chaîne principale</p>	<p>Moteur : Liaisons polaires</p>
<p>Structure Tertiaire</p> 	<p>Repliement global association régions éloignées</p> <p>Formation de domaines</p>	<p>Liaisons non covalentes</p>	<p>Moteur : forces hydrophobes</p>
<p>Structure Quaternaire</p> 	<p>Association entre polypeptides</p>	<p>Liaisons non covalentes</p>	<p>Moteur : Liaisons polaires Van der Waals</p>

Repliement des protéines : Méthodes

- ◇ Analyse par coupure enzymatique
- ◇ Observation en microscopie électronique
- ◇ Observation par la méthode de cristallographie et diffraction aux rayons X
- ◇ Observation par RMN
- ◇ Les modélisations de structures

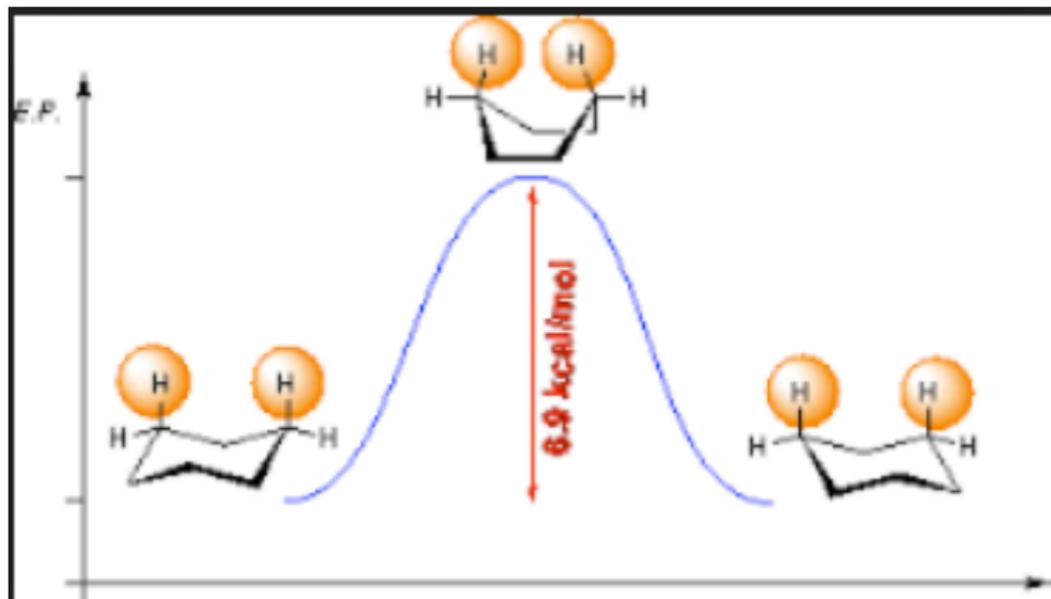
D. et J., 2011 ; BRUCH et al., 2017

Repliement des protéines : notion de conformation

Définition : Configuration : pour passer d'une configuration chimique à une autre, il faut rompre des liaisons covalentes

Définition : Conformation : pour passer d'une conformation à une autre, seules des liaisons non covalentes peuvent être modifiées

Repliement des protéines : notion de conformation



Repliement des protéines : notion de conformation

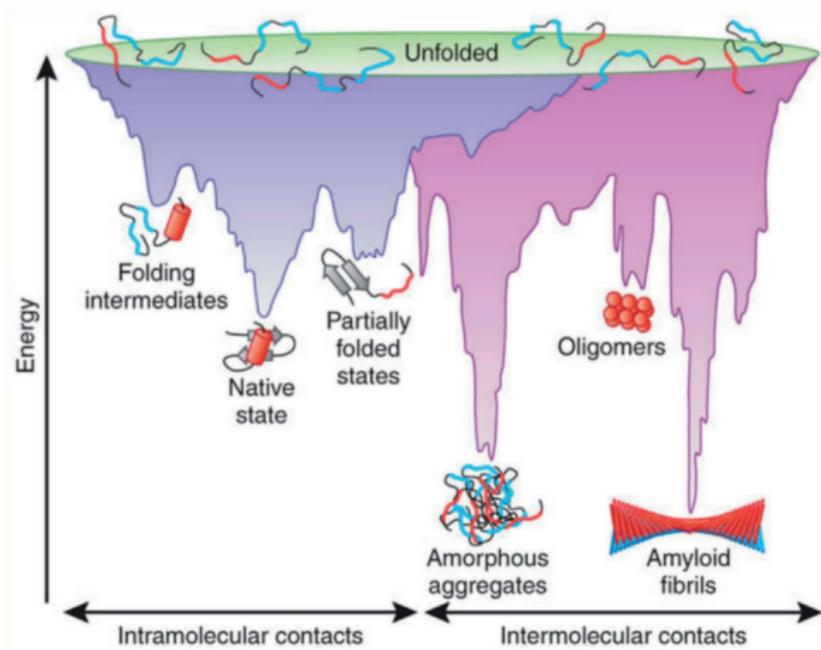


Figure – **Notion de conformation** : les conformations lors du repliement d'une protéine BRUCH et al., 2017

Les protéines de structure : exemple du cytosquelette



Actin



Microtubule



Intermediate
Filament

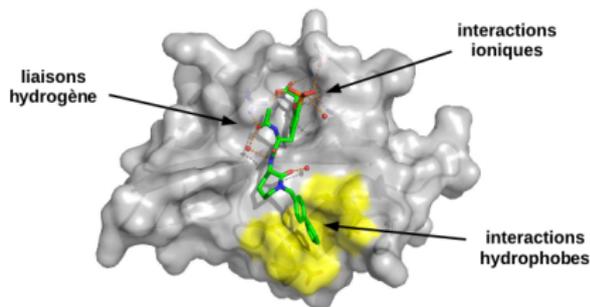
Activité : lier un ligand : définition

Définition : Un ligand est un corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine mais qui n'est pas transformé au cours de la réaction.

Activité : lier un ligand : le site de fixation

Le site de fixation

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



Les caractéristiques chimiques sont à l'origine de l'affinité du ligand pour le site de fixation.

Activité : lier un ligand : mesure

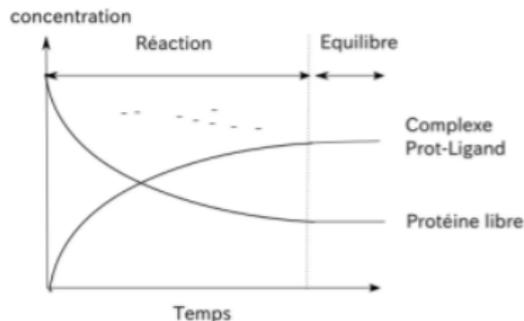
Affinité : mesure de la force d'interaction.

Spécificité deux significations :

- ◇ **Définition** : un site spécifique est un site saturable (cf plus loin)
- ◇ une mesure relative : l'affinité du ligand considéré pour ce site est bien supérieure à celle d'autres ligands structuralement proches.

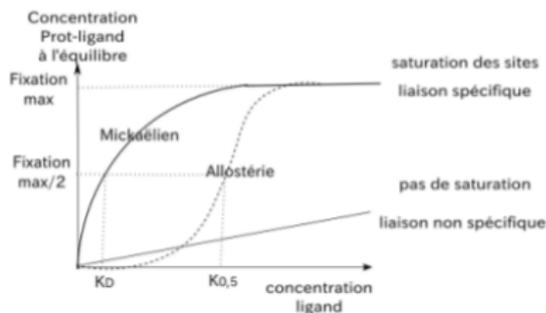
Activité : lier un ligand : mesure

Mesure cinétique



Obtention :
constantes cinétiques k_1 ou k_{-1}

Mesure à l'équilibre



Obtention : constante
thermodynamique : K_D ou $K_{0,5}$

$$L - lie = \frac{(L - lie)_{max} * L - libre}{K_d + L - libre} \quad (1)$$

Les enzymes : activité, catalyser une réaction

Définition : 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.

Les enzymes : le site actif

Définition : Site actif = site catalytique + site de reconnaissance

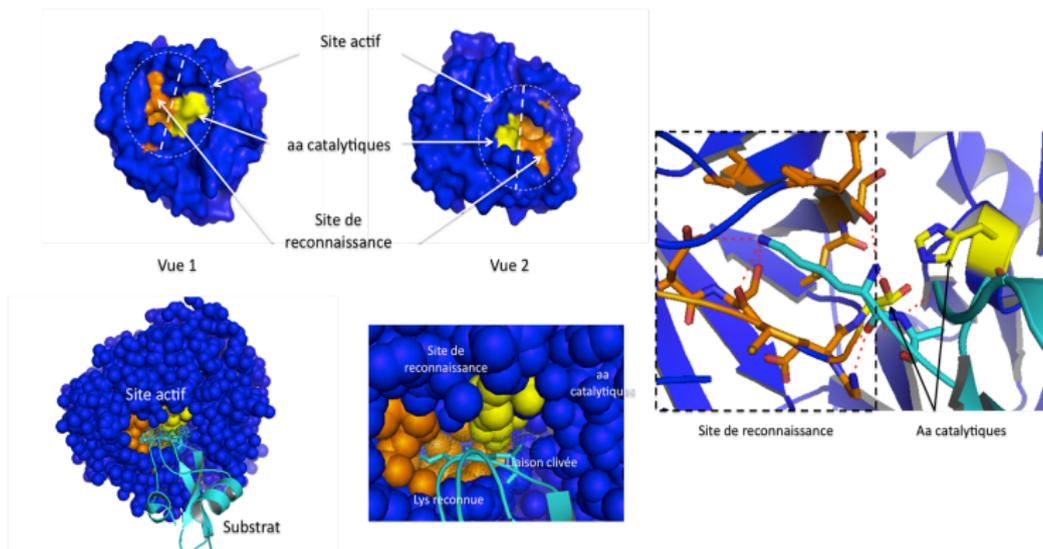


Figure – Le site actif de l'enzyme

Les enzymes : le site actif

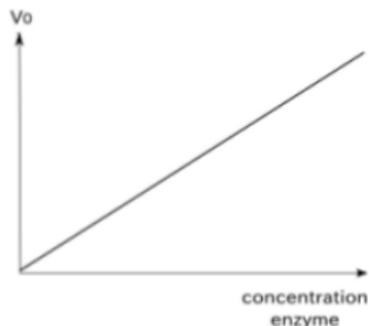
Définition : Site actif = site catalytique + site de reconnaissance

Le site de reconnaissance :

- ◇ Mesure de K_D comme n'importe quel site de fixation
- ◇ Difficulté : le ligand est transformé

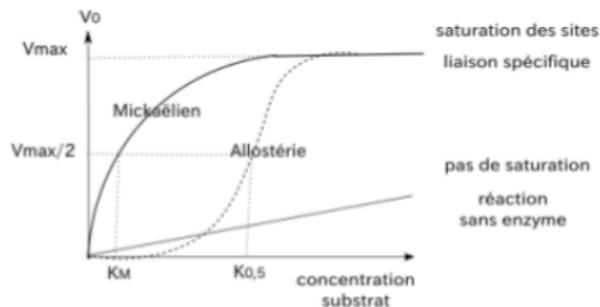
Les enzymes : Mesure de la vitesse de réaction

[S] fixe, [E] variable :



Si [S] à saturation, la pente vaut k_{cat} .

[S] variable, [E] constant :



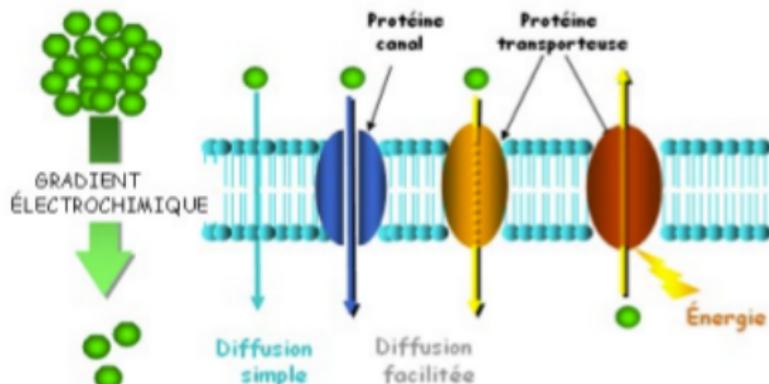
Pour un enzyme Mickaélien :

$$v_0 = \frac{V_{max} * [S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

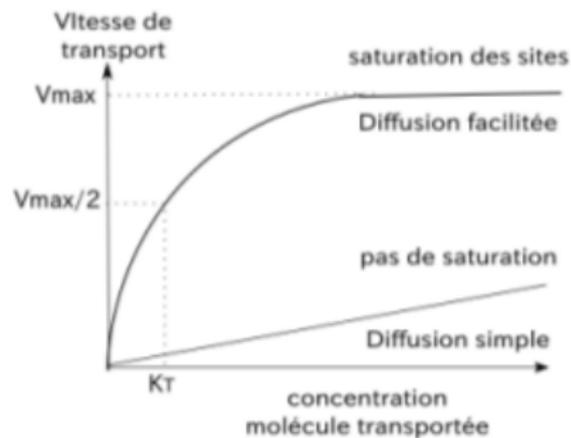
Obtention : k_{cat} et K_M ou $K_{0,5}$

Transport : types de mesures

- ◇ Transporteurs solubles (Hb) : mesure de fixation
- ◇ Transporteurs membranaires : mesure du flux à travers le transporteur
- ◇ Transporteur actif primaire : mesure consommation ATP en plus



Transport : types de mesures



$$\vec{v} = \frac{\vec{V}_{max} * [S]_{int}}{[S]_{int} + \vec{K}_T} \quad (3)$$

-  BRUCH, Jean-Frédéric et al. (2017). “Étude historique de la visualisation des protéines”. In : *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* 59.488.
-  D., Voet et Voet J. (2011). Sous la dir. de WILEY. 4th.