

Chapitre 9

Les grandes familles biochimiques

Cours

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Les lipides
- 2 Les oses et les polysides
- 3 Les nucléotides et les acides nucléiques
- 4 Les acides α -aminés et les protéines

ZOOM

- 1 Stockage des lipides chez les êtres vivants
- 2 Lipides et propriétés des membranes
- 3 Le glucose sous toutes ses formes
- 4 Les fonctions des nucléotides
- 5 La structure des acides nucléiques
- 6 La liaison peptidique : éléments structuraux et conséquences fonctionnelles

INTRODUCTION

La plupart des constituants organiques des êtres vivants peuvent être classés en **grandes familles biochimiques** que sont les lipides, les glucides, les nucléotides et leurs dérivés (acides nucléiques), et les acides α -aminés et leurs dérivés (les protéines).

- ➔ Quelles sont les propriétés de ces quatre grandes familles de molécules ?
- ➔ Quelle est leur importance fonctionnelle pour les êtres vivants ?

1 Les lipides

1.1 Les lipides : des molécules organiques hydrophobes

Les lipides constituent un ensemble hétérogène de molécules organiques à caractère hydrophobe et de faible poids moléculaire (quelques centaines de Da tout au plus). Cette définition repose sur les propriétés physiques des lipides plus que sur leur structure chimique. Ils ne possèdent pas de groupements fonctionnels permettant leur polymérisation, ce qui explique qu'il n'existe pas de polymères lipidiques.

Pour tout lipide, une grande partie de la molécule est hydrophobe, souvent parce qu'elle est riche en groupements alkyle (chaîne carbonée), bien qu'une grande diversité de groupements hydrophobes non-alkyle puissent exister. Pour certains lipides, une petite partie de la molécule peut être hydrophile : ils sont alors dits amphiphiles. L'hydrophobie des lipides permet leur regroupement en gouttelettes lipidiques en milieu aqueux, par **effet hydrophobe**.

Voir chapitre 8, § 1.3

ZOOM 1

Stockage des lipides
chez les êtres vivants

L'hydrophobie des lipides a des conséquences sur leur transport, puisqu'ils ne peuvent pas être transportés en solution dans les fluides circulants (sève, hémolymphe ou sang).

Une autre conséquence importante de l'hydrophobie des lipides est l'imperméabilité à l'eau et aux molécules hydrophiles de structures composées de lipides, comme les membranes biologiques (voir § 1.4) ou les cuticules de feuilles des végétaux.

1.2 Les acides gras : des molécules à la base de nombreux lipides

Les **acides gras** sont des acides carboxyliques à chaîne carbonée linéaire, c'est-à-dire non ramifiée (figure 9.1). La plupart du temps, le nombre de carbones est pair, ce qui est en lien avec leur synthèse à partir d'acétyl-CoA.

Les acides gras ont une grande homogénéité chimique. Leur diversité réside dans le nombre de carbones de leur chaîne, et dans la présence d'**insaturations** (c'est-à-dire de doubles liaisons carbone-carbone). La plupart du temps, les acides gras insaturés ont une conformation dite cis (ou Z), ce qui forme un coude de la chaîne carbonée. Les acides gras insaturés trans (ou E) sont rares.

Remarque

Le terme *insaturation* sous-entend *insaturation en hydrogènes*. Un alcane ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) est en effet plus saturé en hydrogènes qu'un alcène ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

La nomenclature des acides gras insaturés fait référence à la position de l'insaturation par rapport au dernier carbone, appelé conventionnellement ω (oméga). Un acide gras $\omega 3$ (oméga 3) possède donc une insaturation entre le troisième et le quatrième carbone en partant du carbone ω .

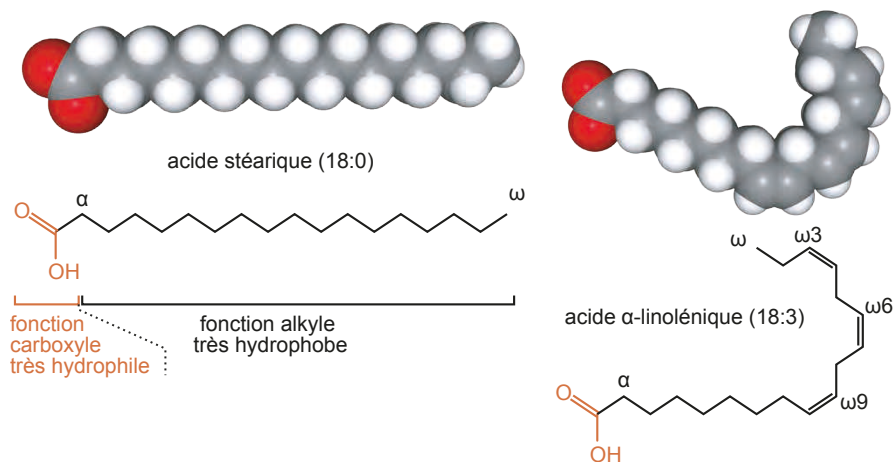


Figure 9.1 Formule de deux acides gras courants : l'acide stéarique (18 C, 0 insaturations), et l'acide α -linolénique (18 C, 3 insaturations, dit polyinsaturé).

Pour chaque acide gras, on donne la formule développée et la conformation tridimensionnelle. Chaque atome est représenté par une boule (gris : carbone ; rouge : oxygène ; blanc : hydrogène). Traitement sur <https://libmol.org>.

La formule d'un acide gras saturé peut être écrite ainsi : $\text{CH}_3-[\text{CH}_2]_n-\text{COOH}$. Les acides gras sont des molécules **très réduites**. Leur oxydation par le dioxygène, qui a lieu dans la mitochondrie, libère une grande quantité d'énergie, qui est convertie en ATP et utilisable par les cellules vivantes.

Voir chapitre 11, § 2

Voir chapitre 11, § 4

Remarque

Voir chapitre 1,
Zoom 2.

Dans certains domaines de la biologie, notamment dans l'étude des fermentations symbiotiques qui ont lieu dans la panse des ruminants, les acides carboxyliques à très courte chaîne (2, 3 ou 4 atomes de carbone) sont appelés acides gras volatils, en raison de leur capacité à s'évaporer aisément à température ambiante.

1.3 Les triglycérides : des lipides à rôle de stockage énergétique

Voir chapitre 8,
Zoom 3 et figure 8.6

Le glycérol, déjà rencontré dans le chapitre 8, est un triol simple composé d'une chaîne de trois carbones portant chacun un groupement hydroxyle –OH. Chacun de ses hydroxyles est susceptible de réagir avec un carboxyle pour former un ester.

Un **glycéride** (ou **acylglycérol**) est un ester de glycérol et d'acide gras. Les triglycérides (ou triacylglycérols) sont constitués d'un glycérol lié à trois acides gras par une fonction ester au niveau de chacun de ses trois carbones (figure 9.2).

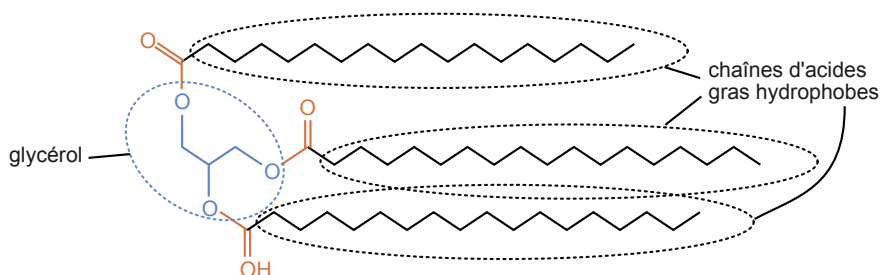


Figure 9.2 Un triglycéride, triester formé d'un glycérol et de trois acides gras, ainsi que sa conformation tridimensionnelle.

Ici les trois acides gras sont identiques (acide stéarique), ce qui est possible mais pas systématique.

Les triglycérides sont des molécules très hydrophobes qui sont stockées sous forme de gouttelettes, séparées de la phase aqueuse, dans des tissus spécialisés. Les acides gras qui les constituent sont très énergétiques, car leur carbone est très réduit. Ce sont donc d'excellentes molécules de stockage énergétique. Ce sont les principaux constituants des **graisses** animales et végétales (ou huiles végétales).

ZOOM 1

Stockage des lipides
chez les êtres vivants

1.4 Les membranes : des bicouches de lipides amphiphiles

L'observation d'une membrane plasmique d'entérocyte (cellule de l'épithélium de l'intestin grêle) au microscope électronique à transmission (figure 9.3) permet de constater qu'elle est constituée de deux couches, d'une épaisseur totale de l'ordre de 7 nm. Toutes les membranes ont cette même structure universelle, et sont fondamentalement composées de **lipides**. Ces lipides membranaires ont la particularité commune de posséder un pôle très hydrophile, en plus de présenter une large partie hydrophobe, comme tous les lipides ; ils sont donc **amphiphiles**.

Les lipides membranaires sont de nature variable :

- Les **phospholipides** sont des glycérides comportant deux acides gras, saturés ou non, et un groupement phosphoryle sur le 3^e carbone du glycérol. Ce phosphate porte lui-même un groupement hydrophile (choline, éthanolamine, sérine).
- Les sphingolipides sont constitués d'un acide gras et d'une molécule amphiphile originale, la sphingosine. Ils comportent également un pôle phosphorylé très hydrophile.
- Le **cholestérol** est une molécule constituée de 4 cycles hydrocarbonés, et comporte un unique groupement –OH qui lui confère un pôle hydrophile.

Voir chapitre 7, § 1.1

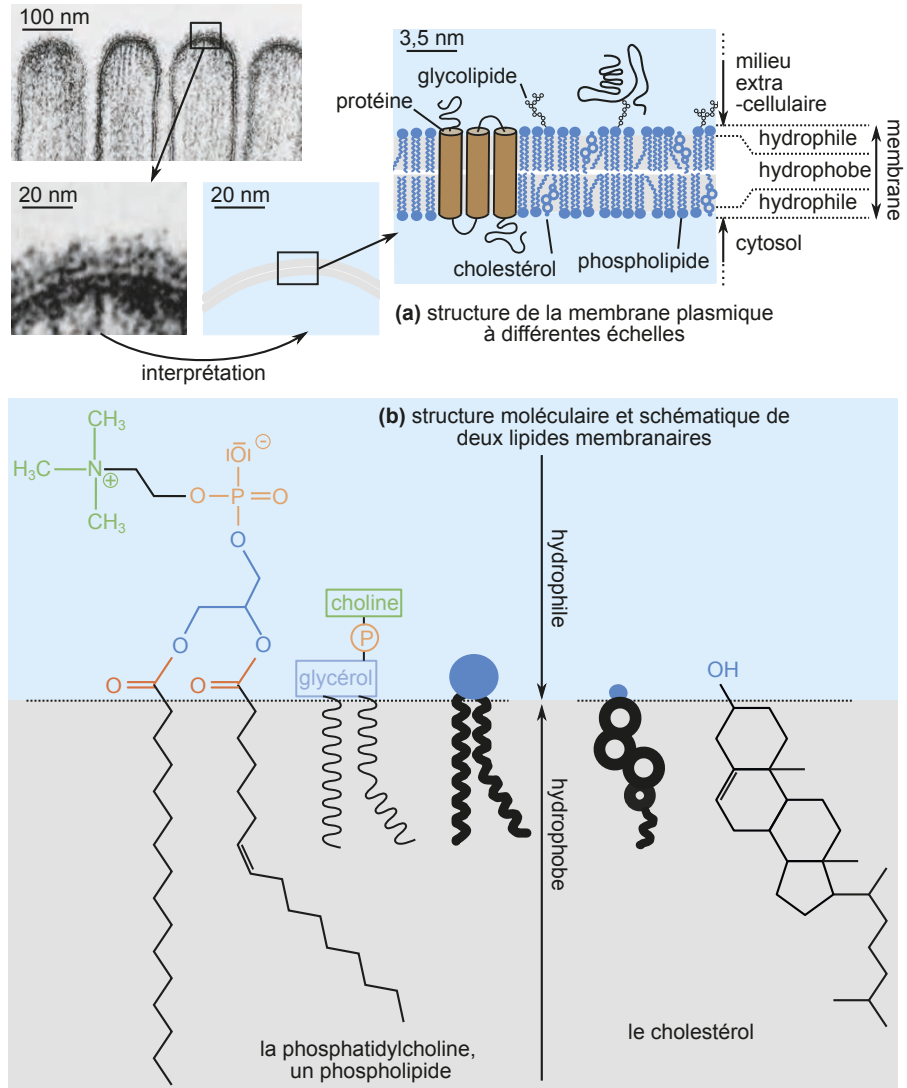


Figure 9.3 (a) La structure de la membrane plasmique d'un entérocyte au niveau d'une microvillosité et son interprétation à différentes échelles ; (b) deux lipides membranaires (la phosphatidylcholine et le cholestérol).

(Micrographie électronique : d'après Labo. B.C. 4, Orsay, « Atlas de biologie cellulaire », S.-C. Roland, J.-C. Callen, A. et D. Szöllösi, 5e éd. Dunod, 2001).

L'amphiphilie de ces lipides leur permet une structuration spontanée en bicouches, lorsqu'ils sont en milieu aqueux :

- Les parties hydrophobes, relativement allongée (dites « queues hydrophobes »), se disposent spontanément côte à côte, par **effet hydrophobe**, formant un espace excluant toute molécule d'eau.
- Les parties hydrophiles, relativement petites (dites « têtes hydrophiles ») se disposent vers l'extérieur de la bicouche, en interaction avec l'eau (liaisons H ou liaisons ions dipôle).

Des glucides peuvent être fixés de façon covalente sur les lipides membranaires (phospholipides comme sphingolipides), formant des **glycolipides**. Les glycolipides sont présents quasiment

Voir chapitre 8,
Zoom 1

exclusivement au niveau du feuillet extracellulaire de la membrane plasmique ; le réseau de polymères glucidiques extracellulaires ainsi formé est le **glycocalyx**. Ils exhibent des polymères glucidiques hydrophiles pouvant avoir divers rôles. Ces glucides peuvent également être liés de façon covalente à des protéines (cas du glycosylphosphatidylinositol, ou ancre GPI, voir figure 9.4) : c'est un des modes d'ancrage de protéines à la membrane.

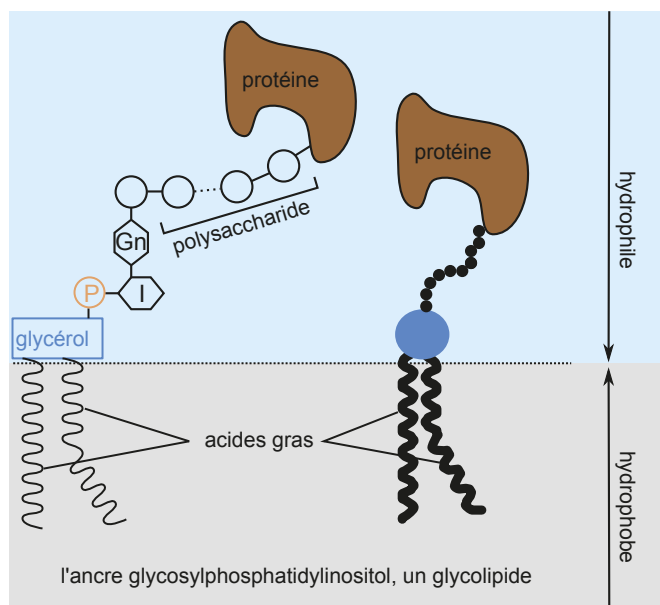


Figure 9.4. Deux représentations schématiques d'une ancre GPI. Comme tous les glycolipides, une queue hydrophobe permet l'enchâssement dans la membrane, alors que la partie extramembranaire est constituée de divers groupements très hydrophiles.

P : phosphate ; I : inositol (polyol très hydrophile) ; Gn : glucosamine ; polysaccharide : polymère glucidique très hydrophile (voir § 2).

ZOOM 2

Lipides et propriétés des membranes

2 Les oses et les polyosides

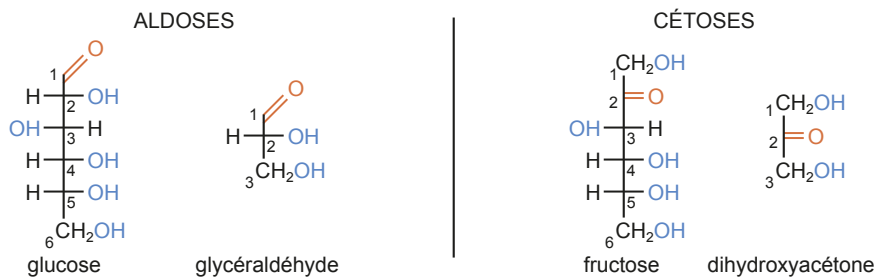
2.1 Les oses : des polyalcools portant un carbonyle

a) Les oses : des molécules à chaîne carbonée linéaire

Les oses sont les plus simples des glucides et tous les autres glucides sont dérivés des oses. Ce sont des petites molécules organiques composées uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Les oses les plus courants chez les êtres vivants comportent 3, 5 ou 6 carbones (ils sont appelés respectivement **trioses**, **pentoses** et **hexoses**). Un **ose** est une molécule organique linéaire (chaîne carbonée non ramifiée) de faible poids moléculaire, portant un hydroxyle sur chaque carbone, à l'exception d'un, qui porte un carbonyle (figure 9.5). Ce sont donc des polyalcools portant un carbonyle. La numérotation des carbones obéit à la même règle que pour les autres molécules organiques : c'est l'extrémité la plus oxydée (côté carbonyle) qui porte le carbone n° 1.

Comme ils comportent de nombreux groupements très polaires, les oses sont très hydrophiles, et donc très solubles dans l'eau. Le glucose, par exemple, a une solubilité aqueuse de 900 g.L⁻¹ (5 mol.L⁻¹) ce qui est considérable.

(a) deux aldoses et deux cétooses en représentation de Fischer



(b) l'oxydation du glucose par la liqueur de Fehling

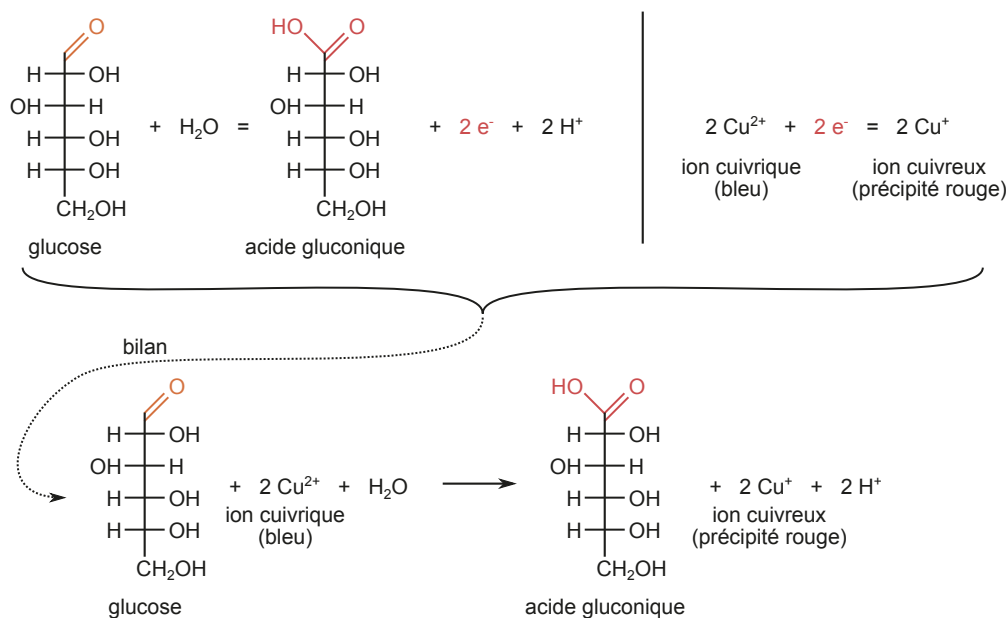


Figure 9.5. (a) Formule de deux aldoses et de deux cétooses (on donne également la numérotation des carbones de chaque glucide) ; **(b)** réactivité redox d'un aldose.

Le carbonyle peut être terminal (aldéhyde) ou non (cétone). On parlera d'**aldose** pour les oses à carbonyle terminal et de **cétose** pour les oses à carbonyle non terminal. Les aldoses étant des aldéhydes, ils peuvent être oxydés en acides carboxyliques, et sont donc des réducteurs (figure 9.5). Les cétooses, en revanche, n'ont pas cette propriété. On parlera parfois d'ose réducteur (ou sucre réducteur) pour désigner les aldoses, et d'ose non réducteur pour les cétooses. Parmi les oxydants courants permettant de distinguer les cétooses des aldoses, on pourra citer la liqueur de Fehling, qui est une solution basique bleue d'ions Cu^{2+} . En présence d'un aldose, et suite à un léger chauffage, les ions Cu^{2+} sont réduits en Cu^+ , formant un précipité rouge brique caractéristique.

Les oses linéaires sont habituellement représentés par la projection de Fischer, qui permet d'en préciser la stéréochimie. La chaîne carbonée est alors représentée verticalement, le carbone n° 1 vers le haut, et les substituants disposés comme des barreaux d'échelle. C'est ce mode de représentation qui a été choisi dans la figure 9.5.

Voir chapitre 8,
§ 3.2.e

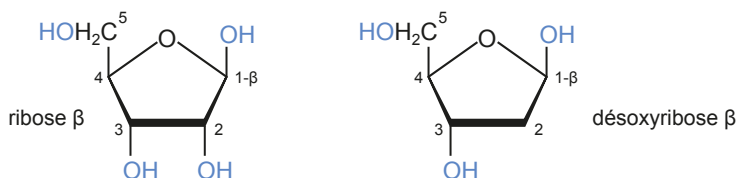
Quelques molécules dérivées d'oses sont parfois considérées par abus de langage comme étant des oses ; c'est notamment le cas du désoxyribose, qui est un ribose désoxygéné sur le carbone n° 2 (figure 9.6).

b) L'hémiacétalisation et les oses cycliques

Beaucoup de glucides, dont le glucose, sont capables de se cycliser spontanément grâce à une réaction intramoléculaire : l'**hémiacétalisation**. Cette réaction, qui implique un groupement $-OH$ et le carbonyle, crée un cycle contenant un oxygène, qui peut contenir 5 atomes (cycle furanose) ou 6 atomes (cycle pyranose). L'hémiacétalisation se traduit également par l'apparition d'un nouveau groupement $-OH$ au niveau du carbone portant le carbonyle, qui peut se situer d'un côté ou de l'autre du cycle, ce qui est à l'origine des deux isomères α et β . Ce carbone est appelé **carbone anomérique**.

La figure 9.6 présente les formes cyclisées de quelques glucides importants, qui seront revus à de nombreuses occurrences.

(a) le ribose β et le désoxyribose β en représentation de Haworth



(b) quatre hexoses en représentation de Haworth

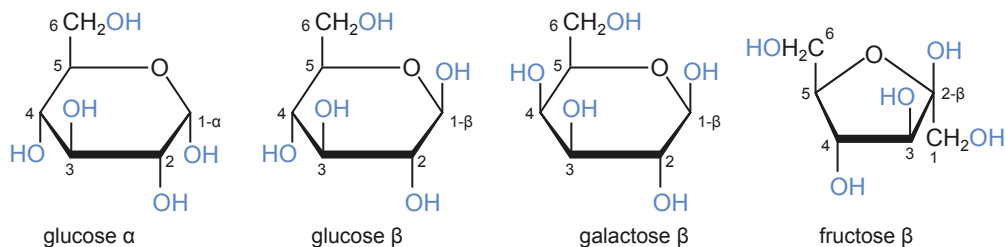


Figure 9.6. (a) Formule de deux pentoses cycliques ;
(b) formule de quatre hexoses cycliques.

Les oses, comme toutes les molécules organiques, sont des molécules réduites. Leur oxydation peut libérer de l'énergie, qui est convertie en ATP (adénosine triphosphate). Le glucose en particulier est un substrat énergétique qui peut être oxydé par de nombreuses cellules au cours du catabolisme oxydatif.

2.2 La liaison osidique permet de lier deux ou plusieurs oses entre eux

Les oses possèdent, par définition, plusieurs fonctions hydroxyle. Ils peuvent donc potentiellement subir des réactions de condensation. On appelle **liaison osidique** la liaison covalente entre :

- le carbone anomérique (n° 1 pour les aldoses, n° 2 pour les cétooses) d'un ose, d'une part ;
- un atome électronégatif d'une autre molécule (en général, oxygène ou azote), d'autre part.

Une condensation peut donc avoir lieu entre deux oses : deux groupements $-OH$ réagissent pour former une **liaison osidique** ($C-O-C$), en libérant une molécule d'eau. Cette condensation permet de former des dimères glucidiques, aussi appelés **diosides** (ou diholosides) (figure 9.7).

ZOOM 3

Le glucose sous toutes ses formes

Voir chapitre 11, § 3.1

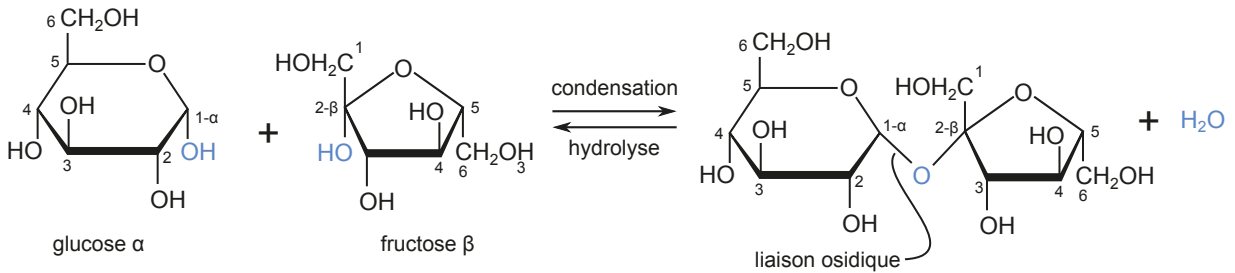


Figure 9.7 Formation du saccharose, un dimère de glucose ($\alpha 1 \leftrightarrow \beta 2$) fructose.

Le saccharose est un des diosides les plus courants chez les végétaux. L'implication du carbone n° 1 du glucose dans la liaison osidique rend le saccharose non réducteur, donc très stable. De plus, il est de petite taille et riche en groupements hydrophiles, donc très soluble. Pour ces raisons, il est tout à fait adapté à la fonction de transport par la sève élaborée, et de stockage dans les vacuoles.

La liaison osidique peut être détruite par **hydrolyse**, ce qui restitue les deux molécules qui constituaient le dimère.

2.3 Des polymères de réserve plus ou moins ramifiés

La multiplicité des sites de polymérisation chez les glucides (en particulier chez les hexoses et leurs dérivés) permet la formation de **polymères glucidiques** (aussi appelés **polyosides** ou **poly-saccharides**), chaque monomère étant lié à son voisin par une liaison osidique. Beaucoup de polymères glucidiques sont monotones, c'est-à-dire qu'ils sont formés d'une répétition d'un même motif à l'identique ; ce sont alors des **homopolymères** (polymères dont tous les monomères sont identiques).

Remarque

On appelle oligomère un polymère dont le poids moléculaire ne dépasse pas 5 kDa. Si les monomères sont des glucoses (de masse moléculaire 162 Da), cela équivaut donc à une trentaine de monomères. Au-delà de 5 kDa, on considère que le polymère est un **macromolécule**.

Voir chapitre 4, § 3.2

Certains polymères glucidiques ont un rôle de **réserve** : ils peuvent être hydrolysés par des enzymes, libérant ainsi les monomères dont ils sont composés. Ces monomères peuvent alors être utilisés par la cellule, selon ses besoins.

Parmi les polymères de réserve, on retiendra deux exemples.

- L'**amidon** : cette substance est constituée de deux polymères relativement proches :
 - l'amylose est un homopolymère linéaire de glucose $\alpha(1 \rightarrow 4)$;
 - l'amylopectine est un homopolymère de glucose $\alpha(1 \rightarrow 4)$, avec des ramifications $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

On compte une ramification tous les 25 à 30 monomères en moyenne.

L'amidon est le principal glucide de réserve chez les végétaux. Il est produit au cours de la photosynthèse par le chloroplaste, et mis en réserve durablement dans les amyloplastides des organes puits (tubercules, fruits, graines...).

- Le **glycogène** : comme l'amylopectine, il s'agit d'un homopolymère de glucose $\alpha(1 \rightarrow 4)$, avec des ramifications $\alpha(1 \rightarrow 6)$; les ramifications sont cependant plus fréquentes (tous les 8 à 12 monomères). On le rencontre chez les opisthokontes (groupe qui comprend notamment

Voir chapitre 11, § 1.2

les animaux et les champignons). Chez les mammifères, il est stocké en particulier dans les cellules musculaires (où il permet de fournir le glucose nécessaire à la respiration du muscle) et dans le foie (où il stocke le glucose excédentaire de la digestion, et le libère en situation d'**hypoglycémie**).

L'amidon et le glycogène sont tous deux détectables à l'eau iodée (solution alcoolique de diiode et d'iodure de potassium, aussi appelée *lugol*). L'amidon se colore en bleu nuit à l'eau iodée, même diluée, et le glycogène se colore en brun-acajou à l'eau iodée concentrée.

La **figure 9.8** présente la structure tridimensionnelle de l'amylopectine.

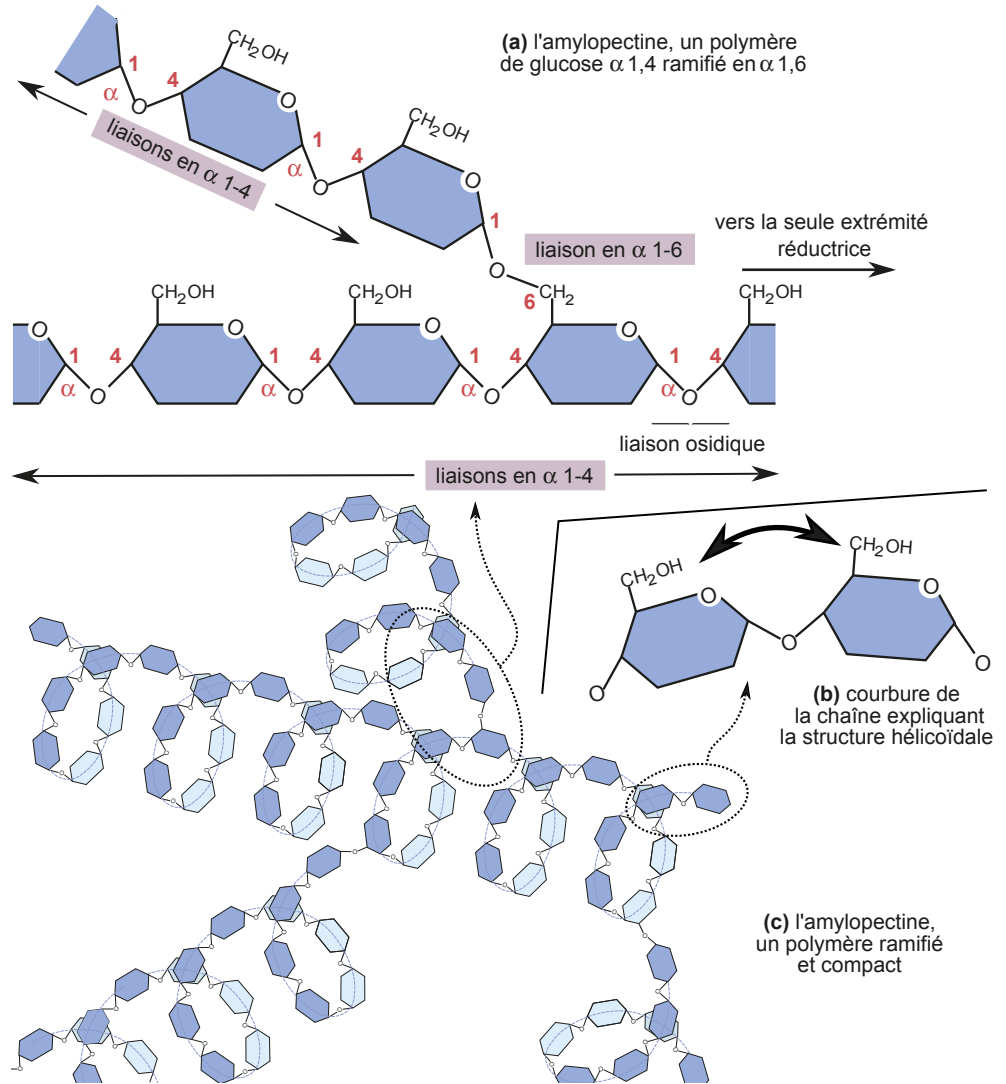


Figure 9.8 L'amylopectine, un polymère de glucose ramifié, adapté à sa fonction de réserve.

En raison de l'encombrement stérique lié aux groupements $-\text{CH}_2\text{OH}$ du carbone n° 6, deux unités de glucose successives sont non coplanaires, et le polymère prend donc une forme héli-

coïdale. Les nombreuses ramifications rendent l'amylopectine très compacte. De nombreuses liaisons H intra- et intermoléculaires sont possibles, permettant la formation d'agrégats compacts, interagissant peu avec l'eau. Ces propriétés structurales ont plusieurs conséquences.

- Contrairement aux glucides solubles, les polymères glucidiques ne créent pas d'appel d'eau, et permettent un stockage en grande quantité et compact. On dit qu'ils ont un faible effet osmotique.
- L'implication du carbone anomérique de chaque monomère (carbone 1) dans la liaison osidique rend le retour des oses à leur forme linéaire (rétrohémiacétalisation) impossible, et stabilise donc les monomères.
- Les nombreuses ramifications multiplient le nombre de monomères terminaux, qui sont autant de points de polymérisation ou de dépolymérisation, permettant un stockage et un déstockage rapide de ces polymères, ce qui est adapté à leur fonction de réserve.

Voir chapitre 4,
Zoom 2

ZOOM 3

Le glucose sous toutes
ses formes

2.4 Des polymères de structure

a) Des polymères rectilignes s'associent en fibres résistantes par des liaisons faibles intermoléculaires

La [figure 9.9](#) présente une observation microscopique d'une cuticule d'arthropode. On y voit des structures fibreuses. Ces fibres sont des polymères glucidiques.

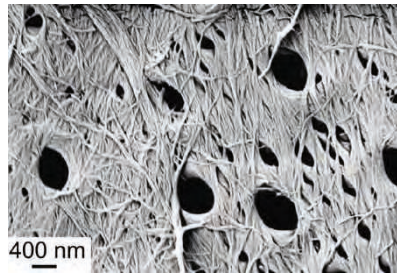


Figure 9.9 Une cuticule de crevette observée au microscope électronique à balayage.

(Reproduit avec l'aimable autorisation de Dennis LaJeunesse, Ph.D., Department of Nanoscience, University of North Carolina Greensboro, USA).

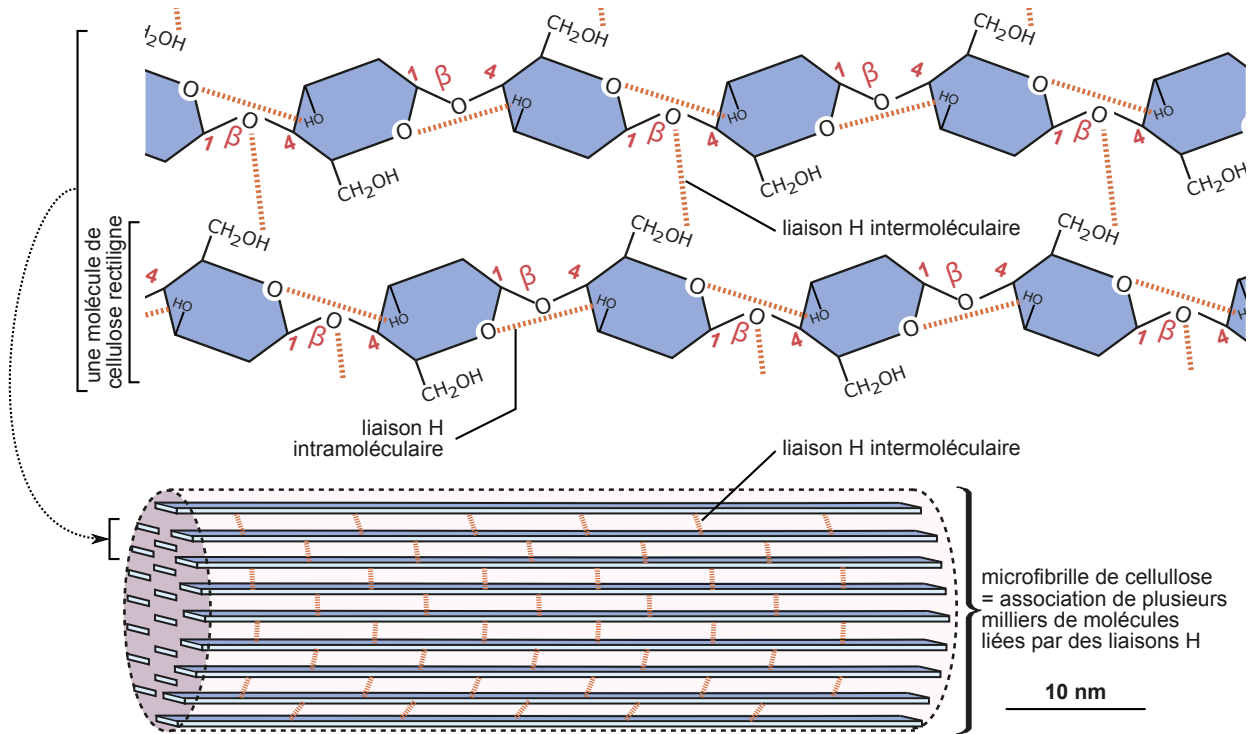
La **cellulose** ([figure 9.10](#)) est un polymère de glucose $\beta(1\rightarrow4)$ non ramifié. Contrairement à l'amidon, chaque monomère de glucose présente alors une disposition renversée de 180° par rapport au précédent, ce qui rend le polymère totalement rectiligne. Du fait de cette structure rectiligne et non ramifiée, des centaines de molécules de cellulose peuvent s'assembler en microfibrilles, grâce à des liaisons H qui unissent les hydroxyles des monomères de glucose. Cette structure est donc analogue à un câble, et permet une grande résistance à l'étirement. La cellulose est le principal composant de la paroi des végétaux. Elle impose sa forme à la cellule, et, en s'opposant à la pression exercée par la vacuole, contribue à la **turgescence** des cellules végétales, essentielle au port des végétaux non ligneux.

La **chitine** ([figure 9.10](#)) est un polymère de N-acétylglucosamine $\beta(1\rightarrow4)$ non ramifié. Comme pour la cellulose, on observe un renversement de 180° des monomères successifs, ce qui a pour conséquence que le polymère est totalement rectiligne. Les molécules de chitine s'associent également en microfibrilles. Chez les arthropodes, la chitine est le principal composé de la cuticule, qui joue un rôle de squelette externe pour l'organisme. La chitine est également le principal composant de la paroi des champignons, où elle joue un rôle analogue à celui de la cellulose chez les plantes.

Voir chapitre 5,
§ 2.2.b

Voir TP3

(a) structure de la cellulose et liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires



(b) structure de la chitine. Les liaisons inter- et intramoléculaires sont similaires à celles observées dans la cellulose

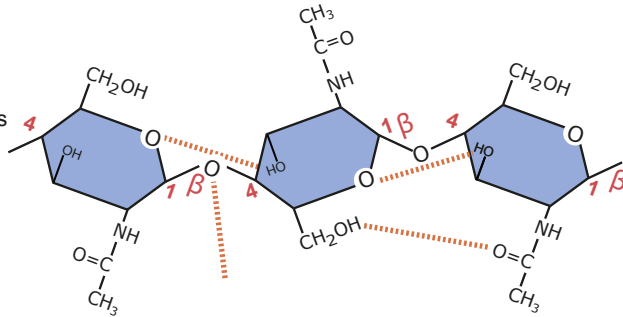


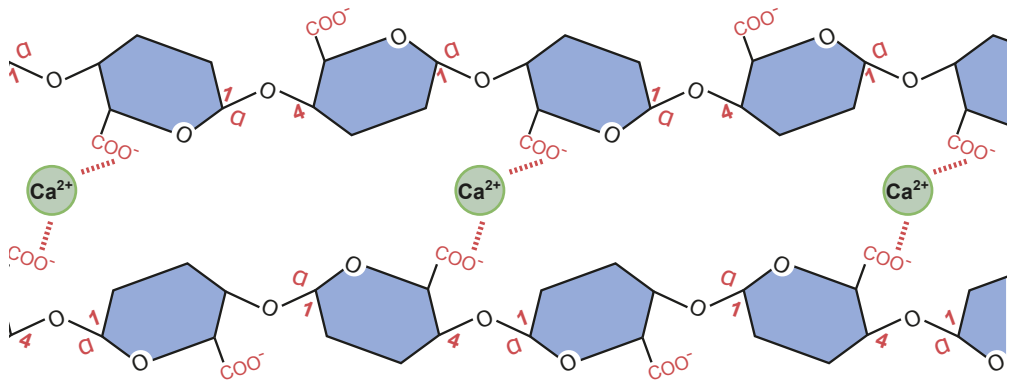
Figure 9.10 La cellulose (a) et la chitine (b).

Deux polymères rectilignes formant des fibres stabilisées par des liaisons H inter- et intramoléculaires. Le monomère du glucose est un glucose β , et celui de la chitine est un N-acétylglucosamine β .

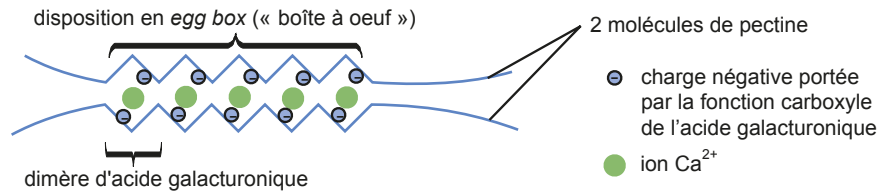
b) Des polymères chargés forment des gels hydratés

La cuisson prolongée de certains fruits, comme les coings ou les pommes, ou de certains tissus animaux, comme les os ou la peau des vertébrés, permet d'extraire un liquide, qui gélifie en refroidissant. Des tissus végétaux et animaux contiennent donc des substances gélifiantes : les **pectines** dans les parois des végétaux et les **glycosaminoglycane**s dans les matrices extracellulaires des vertébrés.

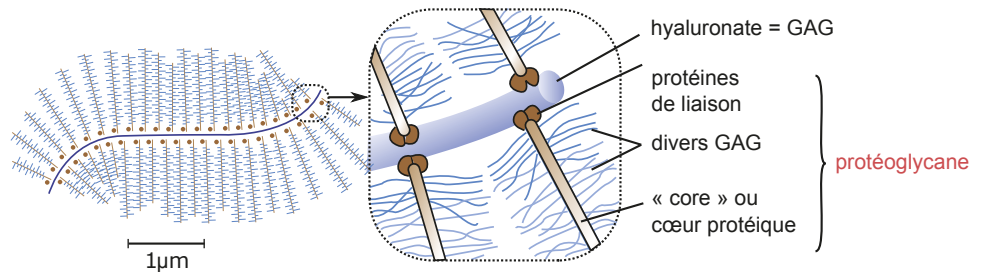
(a) structure des molécules de pectine et interaction avec le calcium à l'échelle des monomères



(b) structure de la pectine et interaction avec le calcium à l'échelle du polymère



(c) structure du protéoglycane



(d) quelques exemples de monomères rencontrés dans les glycosaminoglycans

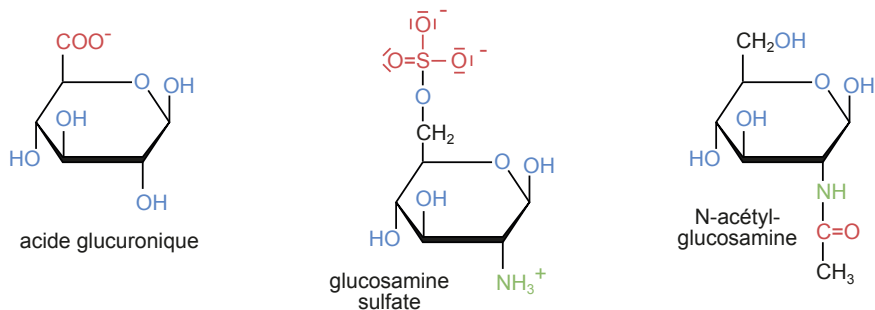


Figure 9.11 La pectine et les glycosaminoglycans, des polymères chargés gélifiants.

(a) et (b) La pectine, polymère d'acide galacturonique en interaction avec le Ca^{2+} dans la paroi des végétaux ; (c) et (d) les glycosaminoglycans (GAG), des polymères chargés de monomères divers, et entrant dans la composition des matrices extracellulaires des animaux.

Un **gel** est une substance composée essentiellement d'eau, mais qui a malgré tout la consistance d'un solide plus ou moins déformable. Cette structure gélifiée est expliquée par la présence de polymères très hydrophiles formant un maillage tridimensionnel suffisamment fin pour emprisonner les molécules d'eau.

Les pectines (figure 9.11) sont des **polymères** essentiellement constitués d'acide galacturonique $\beta(1\rightarrow4)$. Ce monomère, dérivé du galactose, porte un groupement carboxyle qui est déprotoné au pH de la paroi. La chaîne de pectine exhibe donc de nombreuses charges négatives, qui permettent des liaisons ioniques avec des ions Ca^{2+} . De plus, la molécule de pectine adopte une forme en dents de scie, qui a été décrite comme ressemblant à une **boîte à œuf** (*egg box* en anglais). Ce maillage moléculaire riche en ions piège les molécules d'eau par des liaisons ions-dipôle, formant un gel. Les glycosaminoglycanes sont des polymères glucidiques variés, dont les monomères sont des hexoses modifiés :

- des acides uroniques (acides carboxyliques formés par oxydation du dernier carbone d'un ose), comme l'acide glucuronique ;
- des hexoses aminés (dont le carbone n° 2 porte une amine au lieu d'un hydroxyle), comme la glucosamine ;
- des hexoses sulfatés (c'est-à-dire portant un groupe SO_3^-).

On trouve les glycosaminoglycanes dans la majeure partie des **matrices extracellulaires** des tissus animaux. Les glycosaminoglycanes peuvent être liés par des liaisons faibles ou covalentes à des protéines, formant les **protéoglycanes** (figure 9.11). Très hydrophiles, les glycosaminoglycanes forment des gels.

Le caractère gélifié des pectines ou des glycosaminoglycanes a de nombreuses conséquences fonctionnelles. Il permet une libre diffusion des molécules hydrophiles dans les matrices extracellulaires (importante par exemple pour la circulation apoplasmique de l'eau et des ions dans les parois des cellules racinaires chez les angiospermes). Il confère aux tissus des propriétés mécaniques intéressantes : résistance aux chocs, élasticité et déformabilité (comme dans le cartilage articulaire), viscosité importante (permettant une lubrification, comme le liquide synovial des articulations).

Voir chapitre 4, § 1.3

3 Les nucléotides et les acides nucléiques

3.1 Les nucléotides

Les **nucléotides** sont des petites molécules organiques constituées de trois parties (figure 9.12) :

- un **pentose**, qui peut être le ribose ou le désoxyribose ;
- une **base azotée**, liée par une liaison osidique au carbone n° 1 du pentose ;
- un ou plusieurs phosphates, liés au carbone n° 5 du pentose.

Un pentose non phosphorylé lié à une base azotée est appelé nucléoside.

Selon que le pentose est un ribose ou un désoxyribose, on parlera de ribonucléotide ou de désoxyribonucléotide.

Remarque

Le terme *nucléotide*, qui dérive du latin *nucleus* qui signifie *noyau*, vient du fait que les nucléotides sont les constituants des acides nucléiques, et en particulier l'ADN, qui se trouve dans le noyau des eucaryotes.

Afin de ne pas confondre la numérotation des carbones de la base azotée et du pentose, les carbones du pentose sont numérotés de 1' à 5' plutôt que de 1 à 5.

Les bases azotées sont des molécules organiques cycliques aromatiques contenant de l'azote. Les cinq bases azotées les plus courantes et qui entrent dans la composition de l'ADN et de l'ARN (guanine – G, adénine – A, cytosine – C, thymine – T et uracile – U) sont représentées dans la [figure 9.12](#). Elles sont basées sur un noyau commun :

- la purine pour la guanine et l'adénine, qui sont des **bases puriques** ;
- la pyrimidine pour la cytosine, la thymine et l'uracile, qui sont des **bases pyrimidiques**.

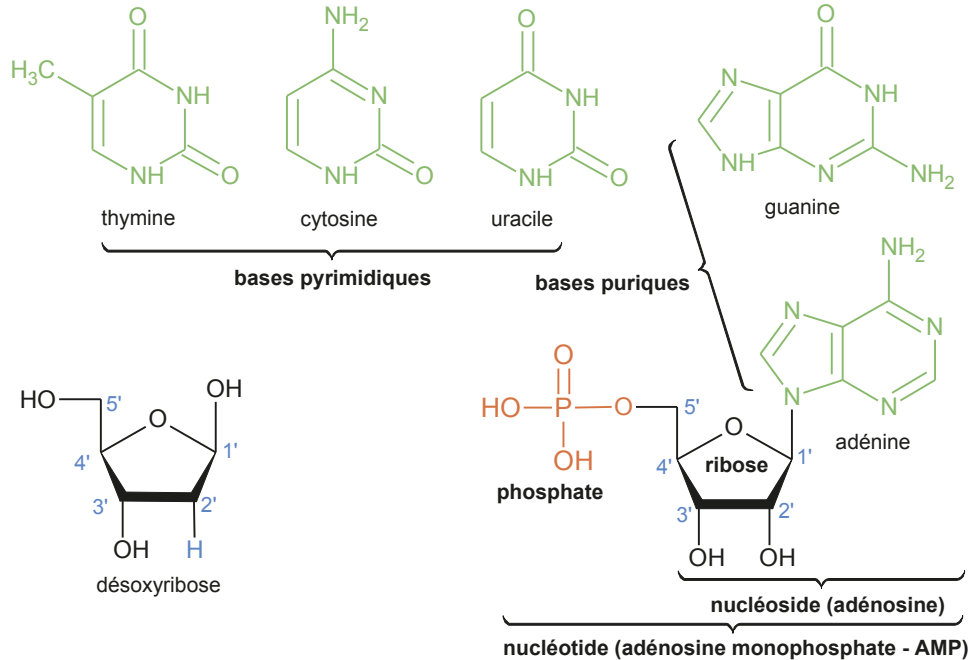


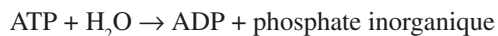
Figure 9.12 Structures des 5 bases azotées de l'ADN et de l'ARN, et structure d'un nucléotide (exemple de l'adénosine monophosphate ou AMP).

Les cinq nucléotides de l'ADN et de l'ARN portent des noms dérivés de celui des bases ([tableau 9.1](#)).

Tableau 9.1 Nom des bases des nucléosides et des nucléotides correspondants.

Type de base	Nom de la base	Nom du nucléoside	Nom du nucléotide
Purine	Adénine	Adénosine	Adénosine mono-, di- ou triphosphate
	Guanine	Guanosine	Guanosine mono-, di- ou triphosphate
Pyrimidine	Thymine	Thymidine	Thymidine mono-, di- ou triphosphate
	Uracile	Uridine	Uridine mono-, di- ou triphosphate
	Cytosine	Cytidine	Cytidine mono-, di- ou triphosphate

Les nucléotides peuvent porter un, deux ou trois groupement phosphate successifs. L'hydrolyse de la liaison entre deux phosphates est exergonique (c'est-à-dire qu'elle libère une énergie utilisable). L'**adénosine triphosphate** (ou **ATP**) peut être hydrolysée en adénosine diphosphate (ADP), libérant de l'énergie, et constitue une monnaie énergétique pour les cellules.



Les nucléotides peuvent également jouer un rôle de coenzymes (petites molécules organiques impliquées dans une réaction enzymatique), qui peuvent transférer des électrons ou des groupes chimiques. Ils peuvent également jouer le rôle de signalisation intracellulaire.

Voir chapitre 11,
Zoom 1

ZOOM 4

Les fonctions des
nucléotides

Tous ces nucléotides partagent la caractéristique commune d'être des petites molécules organiques très hydrophiles, et donc à la fois très solubles et facilement mobilisables, tout à fait adaptées à leur fonction de transfert (de groupement, d'énergie, électrons, d'information, etc.).

3.2 Les acides nucléiques, des polymères de nucléotides séquencés et vecteurs d'information

Les nucléotides possèdent un groupement $-OH$ au niveau du carbone 3' et un groupement phosphate au niveau du carbone 5' : ces deux fonctions sont donc potentiellement des **sites de polymérisation**. La condensation de deux nucléotides forme une **liaison phosphodiester**, ce qui signifie qu'un même phosphate permet de relier chacun des deux pentoses par une liaison phosphoester. Les **acides nucléiques** sont des polymères de nucléotides reliés par des liaisons phosphodiester au niveau des carbones 3' et 5'. Il s'agit de :

- l'**acide ribonucléique (ARN)**, qui est un polymère de ribonucléotides ;
- l'**acide désoxyribonucléique (ADN)**, qui est un polymère de désoxyribonucléotides.

L'ARN a une moindre stabilité que l'ADN, en particulier en raison de l'hydroxyle présent au niveau du carbone 2'. Cette stabilité différentielle doit être reliée à la fonction de support pérenne de l'information génétique qu'assure l'ADN dans l'immense majorité des cas, contrairement à l'ARN, qui assure des fonctions transitoires liées en particulier à l'expression de cette information.

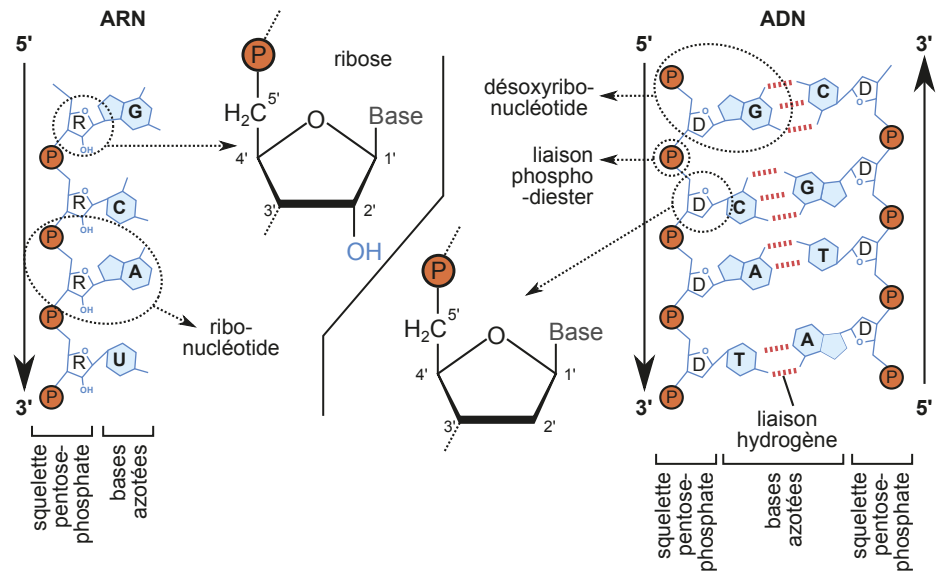


Figure 9.13 Structure simplifiée de l'ARN et de l'ADN.

Les bases azotées complémentaires des acides nucléiques peuvent former des liaisons hydrogène, ce qui permet la formation de structures bicaténares (double brin). La complémentarité des bases est une propriété fondamentale dans la compréhension de la réplication de l'ADN et de l'expression de l'information génétique.

L'ARN est souvent simple brin, mais peut former des structures double brin pérenne ou non, comme dans l'ARN de transfert par exemple. Chez les cellules vivantes, l'ADN est toujours double brin.

Formés de monomères différents, les acides nucléiques sont des **hétéropolymères**. De plus, chaque acide nucléique possède une extrémité 5' et une extrémité 3' : ce sont donc des hétéropolymères orientés. On peut alors définir une **séquence** comme l'enchaînement ordonné des

ZOOM 5

La structure des acides nucléiques

DÉCOUVERTE 1

La découverte du rôle et de la structure de l'ADN

Voir chapitre 13, § 5.2 et chapitre 14, § 1.2

Voir chapitre 15, § 2.2

Voir chapitre 14, § 1.3 et 3.2d

Voir chapitre 15, § 2.3

nucléotides (ou des bases) le long de la chaîne dans le sens 5' → 3'. Cette séquence peut porter une **information** transmissible, qui est donc une **information génétique**.

Les acides nucléiques peuvent interagir par des liaisons faibles, spécifiques ou non, avec des protéines.

- Les acides nucléiques sont synthétisés par des polymérases (ADN-polymérase et ARN-polymérase), la plupart du temps à partir d'un acide nucléique existant avec lequel interagit l'enzyme.
- Des enzymes peuvent modifier les acides nucléiques ; par exemple, les nucléases hydrolysent les acides nucléiques, les méthyltransférases méthylent certaines cytosines de l'ADN.
- Des séquences d'acides nucléiques sont reconnues spécifiquement par des protéines permettant la transcription (fixation de protéines appelées facteurs de transcription sur l'ADN) ou la traduction (fixation sur l'ARN messager de protéines initiatrices de la traduction).
- Les histones sont des protéines qui interagissent avec l'ADN chez les eucaryotes (indépendamment de sa séquence), interaction indispensable à la conservation et à l'expression du génome nucléaire.

4

Les acides α -aminés et les protéines4.1 Unicité et diversité des acides α -aminés

Les **acides α -aminés** sont des petites molécules organiques portant un groupement **carboxyle** et un groupement **amine** sur le même carbone, qui est par définition le carbone α (figure 9.14). Ce carbone porte également un hydrogène et un **radical** (souvent noté R). Les acides α -aminés diffèrent par leur radical. Le carbone α porte quatre substituants différents, et est donc asymétrique.

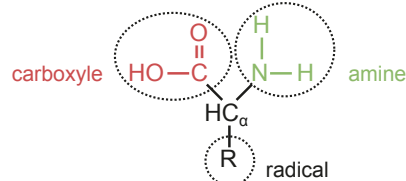


Figure 9.14 Formule générale d'un acide α -aminé.

La fonction carboxyle et la fonction amine ont toutes deux une activité acido-basique, et leur état de protonation dépend donc du pH. On peut montrer (figure 9.15) que les acides aminés sont chargés quel que soit le pH. La forme majoritaire au pH cellulaire (neutre) fait apparaître deux charges (carboxylate -COO^- et amine protonée -NH_3^+) ; cette molécule, dite **zwitterion**, est donc globalement neutre, mais très susceptible d'interagir avec l'eau. Les acides aminés libres sont donc très solubles dans l'eau.

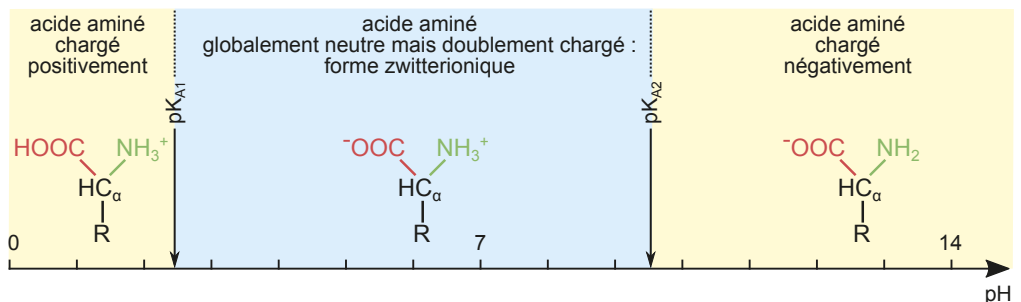


Figure 9.15 Diagramme de prédominance d'un acide α -aminé.

Voir chapitre 8, § 8.2.2.b

Les radicaux des acides aminés sont très variés, et peuvent être regroupés en quatre familles biochimiques :

- les acides aminés apolaires : leur radical est essentiellement constitué par des groupements alkyle ou aromatiques très hydrophobes ;
- les acides aminés polaires : leur radical contient des groupements hydrophiles non ionisables (hydroxyle, amide, sulfhydryle) ;
- les acides aminés acides (parfois inclus dans la famille des acides aminés polaires) : leur radical contient un groupement carboxyle $-\text{COOH}$, qui est ionisable en $-\text{COO}^-$, très hydrophile ;
- les acides aminés basiques (parfois inclus dans la famille des acides aminés polaires) : leur radical contient un groupement amine $-\text{NH}_2$, ionisable en $-\text{NH}_3^+$, très hydrophile.

Voir la liste des acides α aminés et leur structure rabat 3 de couverture

Ces catégories ne permettent cependant pas de nuancer les propriétés des radicaux, et en particulier le degré d'hydrophilie ou d'hydrophobie. L'**index d'hydrophobicité** (figure 9.16) le quantifie, pour chaque radical : un index négatif indique un radical hydrophile et un index positif indique un radical hydrophobe (voir § 4.3.b).

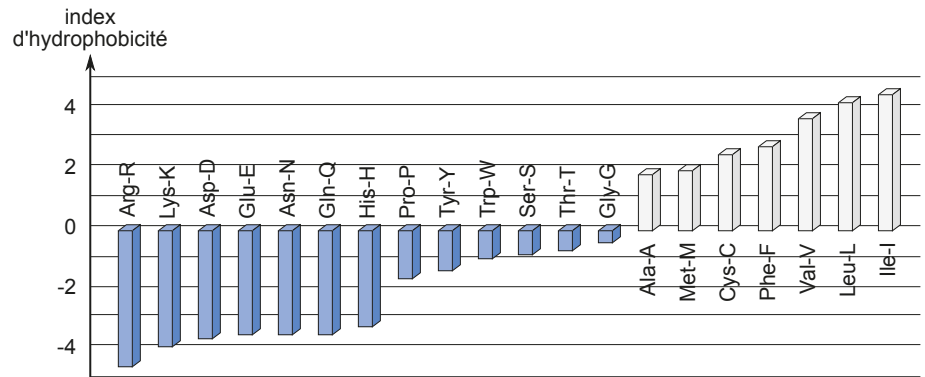


Figure 9.16 L'index d'hydrophobicité des vingt acides aminés.

Les acides aminés sont identifiés par leur code à une lettre et à trois lettres (D'après Kyte et Doolittle).

4.2 La liaison peptidique unit les acides aminés selon une géométrie qui conditionne les structures d'ordre supérieur

Le carboxyle et l'amine de deux acides aminés différents peuvent subir une réaction de condensation, formant un groupement amide $-\text{CO}-\text{NH}-$; la liaison C-N est alors appelée **liaison peptidique** (figure 9.17). Un **peptide** (ou chaîne polypeptidique) est un polymère d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Chaque peptide présente donc deux extrémités :

- l'extrémité portant une amine libre, dite extrémité N-terminale ;
- l'extrémité portant un carboxyle libre, dite extrémité C-terminale.

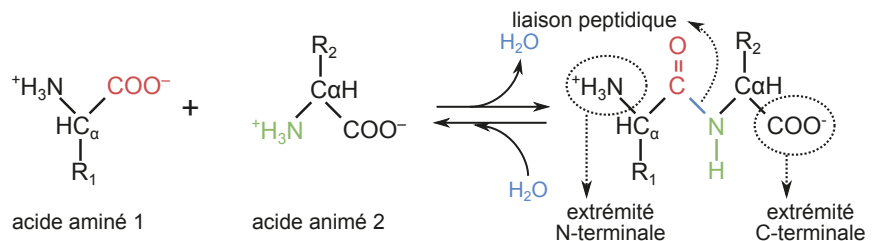


Figure 9.17 Formation et hydrolyse de la liaison peptidique.



Comme les acides nucléiques, les peptides (et donc les protéines qui en dérivent) sont des hétéro-polymères séquencés. On appelle **niveau primaire de structuration** (ou **structure primaire**) la **séquence** d'un peptide ou d'une protéine ; il s'agit de l'agencement ordonné des acides aminés, défini de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale.

↳ Remarque

L'acide α -aminé N-terminal est le premier acide α -aminé intégré à la protéine lors de la traduction, et l'acide α -aminé C-terminal est le dernier. C'est la raison pour laquelle on a retenu le sens N-terminal \rightarrow C-terminal pour définir la séquence d'une protéine.

Les peptides sont synthétisés par la cellule lors de la traduction de l'ARN messager par le ribosome : chaque codon (triplet de nucléotide de l'ARN messager) correspond à un acide aminé. La séquence d'acides aminés d'une protéine est donc déterminée par la séquence de nucléotides de la partie codante du gène correspondant.

La structure primaire d'une protéine est très stable, dans la mesure où les monomères sont liés par des liaisons covalentes. Elle ne peut être modifiée que par une hydrolyse enzymatique (par une protéase). Les structures d'ordre supérieur (secondaire, tertiaire et quaternaire), essentiellement stabilisées par des liaisons faibles, n'ont généralement pas cette stabilité.

↳ Remarque

On pourra parler de peptide pour un polymère d'acides aminés non structuré, ou quand on cherchera à mettre l'accent sur la séquence plutôt que sur les niveaux supérieurs de structuration. On parlera plutôt de protéine lorsque le peptide est structuré tridimensionnellement et a acquis sa fonction.

4.3 Un repliement de la chaîne peptidique à l'origine d'une conformation tridimensionnelle particulière

a) Le niveau secondaire de structuration : un repliement local de la chaîne peptidique

L'analyse de la structure des protéines montre l'existence de deux structures locales très courantes : les **hélices α** et les **feuilletés β** . Elles sont expliquées par un repliement sur elle-même de la chaîne peptidique selon une configuration particulière et stable. Le repliement local de la chaîne peptidique est stabilisé par des liaisons hydrogène entre les groupements C=O et N-H de la chaîne peptidique. En première approximation, ce repliement est relativement indépendant de la nature des radicaux. Il est appelé **niveau secondaire de structuration** (ou **structure secondaire**). En plus des hélices α et des feuilletés β , les **boucles** et les **tours** sont des structures courtes (de 1 à 20 acides aminés pour les boucles, de 2 à 4 pour les tours) qui relient feuilletés et hélices.

Les dispositions des radicaux dans l'espace sont imposées par les structures secondaires. On verra que cette disposition conditionne la structuration tridimensionnelle des protéines (structure tertiaire et quaternaire).

b) Le niveau tertiaire de structuration : un repliement global dû aux interactions entre radicaux des acides aminés

Le **niveau tertiaire de structuration** (ou **structure tertiaire**) correspond à un repliement global du peptide, qui fait intervenir des liaisons faibles ou covalentes entre radicaux d'acides aminés. La structure tertiaire est donc extrêmement dépendante de la structure primaire (séquence) et de la structure secondaire.

ZOOM 6

La liaison peptidique :
éléments structuraux
et conséquences
fonctionnelles

Divers types d'interactions faibles entre acides aminés peuvent avoir lieu (figure 9.19) :

- liaisons hydrogène entre radicaux d'acides aminés polaires (par exemple, sérine et glutamine) ;
- liaisons ioniques entre radicaux d'acides aminés chargés (par exemple : lysine et glutamate) ;
- rapprochement par effet hydrophobe d'acides aminés apolaires (par exemple, phénylalanine et valine).

Les protéines présentes dans les milieux aqueux ont tendance à exhiber vers la périphérie les acides aminés hydrophiles, alors que les parties hydrophobes se regroupent au cœur de la protéine, formant des **poches hydrophobes**. De larges portions hydrophobes peuvent cependant permettre également l'enchâssement des protéines dans les membranes (voir § 1.4). C'est le cas notable des hélices α transmembranaires.

Le profil d'hydrophobicité (figure 9.18) est un diagramme qui représente l'hydrophobicité de chaque acide aminé (figure 9.16) en fonction de sa position le long de la séquence. Il permet d'identifier des portions très hydrophobes, susceptibles d'être à l'origine d'hélices α transmembranaires. Une moyenne de 25 acides aminés consécutifs à radicaux hydrophobe est nécessaire pour traverser une membrane.

! Attention !

Une hélice α n'est pas forcément hydrophobe. Les hélices α dont les radicaux sont hydrophobes sont cependant des structures privilégiées d'enchâssement dans la membrane.

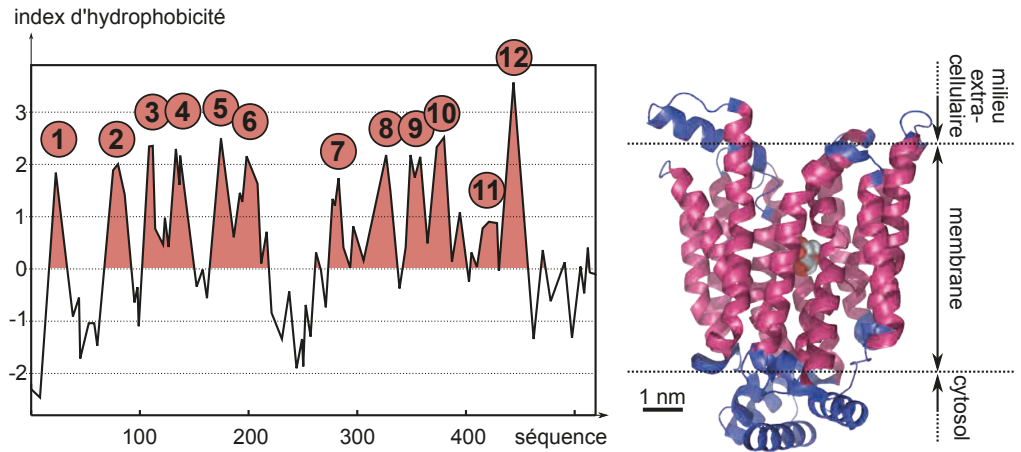


Figure 9.18. Profil d'hydrophobicité de GLUT3 et hélices α transmembranaires.

Chaque domaine hydrophobe sur le profil d'hydrophobicité (numéroté de 1 à 12) correspond à une hélice α transmembranaire, identifiable sur la structure moléculaire de droite (Profil d'hydrophobicité d'après <https://web.expasy.org/>).

Image obtenue avec pymol à partir de la structure moléculaire 4zw9.pdb sur <https://www.rcsb.org>.

Voir chapitre 8, figure 8.7

Voir chapitre 8, § 8.1.3a

Les radicaux de deux **cystéines** peuvent également former une liaison covalente, le **pont disulfure**. C'est la seule liaison covalente autre que la liaison peptidique qui est impliquée dans la structure des protéines. Elle permet de stabiliser très fortement un repliement tridimensionnel, en raison de l'énergie de liaison importante de la liaison covalente.

c) Le niveau quaternaire de structuration : une association de sous-unités de structure tertiaire formant une protéine fonctionnelle

Certaines protéines n'acquièrent leur fonction que lorsqu'elles sont regroupées en structures impliquant plusieurs chaînes peptidiques, qui sont alors appelées sous-unités, reliées entre elles par des liaisons faibles entre radicaux (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, effet hydrophobe). Le **niveau quaternaire de structuration** (ou **structure quaternaire**) correspond à l'association de plusieurs sous-unités (elles-mêmes de structure tertiaire) pour former une structure pérenne fonctionnelle.

Remarque

Les interactions transitoires entre protéines doivent être distinguées des interactions entre sous-unités d'une protéine de structure quaternaire (qui sont pérennes), en ce que les sous-unités n'ont aucune fonction si elles sont séparées les unes des autres.

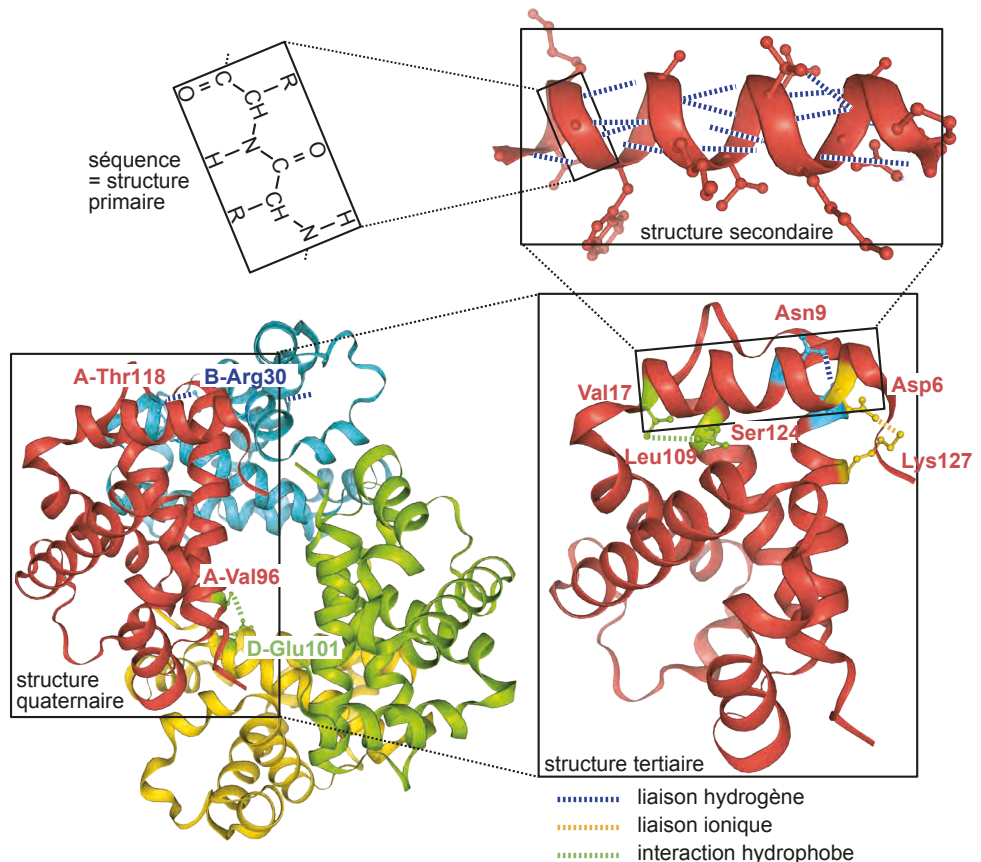


Figure 9.19 Les quatre niveaux de structuration d'une protéine.

L'exemple utilisé ici est celui de l'hémoglobine humaine, protéine transportant les gaz respiratoires dans le sang. On notera les liaisons hydrogène entre atomes du squelette du peptide (structure secondaire), les liaisons faibles entre radicaux d'acides aminés de la chaîne A (structure tertiaire), et les liaisons faibles entre radicaux d'acides aminés de chaînes différentes (structure quaternaire). (Traité avec <https://libmol.org>, à partir de la structure moléculaire 1a3n.pdb sur <https://www.rcsb.org>).

4.4 La forme des protéines détermine leur fonction

a) Une dénaturation à l'origine d'une perte de fonction de la protéine

La **dénaturation** est la perte de la structure tridimensionnelle d'une protéine. Dans l'immense majorité des cas, une dénaturation, même partielle provoque une perte de la fonction de la protéine.

- Le pH a une incidence importante sur la structure tridimensionnelle des protéines, en ce qu'il influence la protonation des radicaux des acides aminés à radicaux acides et basiques. Une protéine donnée est généralement active à un pH donné, et tout écart de cette valeur provoque sa dénaturation, et donc la perte de sa fonction.
- Les températures élevées peuvent provoquer des ruptures de liaisons faibles à l'origine de la perte de la structure tridimensionnelle des protéines. Cela explique que la plupart des organismes ne peuvent survivre à des températures trop élevées. Les protéines chaperonnes permettent à des protéines mal conformées ou dénaturées d'être correctement repliées. Certaines chaperonnes (dites protéines de choc thermique) sont activées par les températures élevées.

On peut expérimentalement provoquer la dénaturation des protéines, notamment par des agents dénaturants :

- le SDS (sodium dodecylsulfate) est un détergent qui fait perdre la structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines, tout en leur conférant une charge négative, il est très utilisé en recherche (voir § 4.6) ;
- le β -mercaptoéthanol est un réducteur qui peut détruire les ponts disulfure, et donc dénaturer les protéines, il est également très utilisé en recherche.

Voir TP7, § 1.1a

Remarque

Certains microorganismes vivent dans des eaux dont la température avoisine 100 °C. Leurs protéines sont adaptées à ces températures extrêmes. Une enzyme - la Taq-polymerase - a été extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* et est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR), qui nécessite des températures très élevées.

Voir chapitre 13, zoom 7 et chapitre 15, zoom 3

b) Des sites responsables d'une interaction protéine-ligand

Une **affinité** désigne la capacité d'interaction entre deux molécules par des liaisons faibles. Lorsque cette affinité concerne un couple particulier de deux molécules, elle est dite spécifique. De nombreuses protéines ont des affinités plus ou moins spécifiques pour d'autres molécules, qui sont alors appelées ligands.

Un site de fixation est une cavité formée par le repliement tridimensionnel de la protéine, qui a une forme complémentaire de celle du ligand. Les radicaux des acides aminés qui s'y trouvent sont responsables d'une complémentarité chimique (possibilité d'interactions faibles spécifiques avec le ligand). Cette double complémentarité permet une reconnaissance spécifique protéine-ligand. La fixation d'un ligand sur une protéine change localement les interactions entre les radicaux des acides aminés, ce qui change généralement plus ou moins la conformation tridimensionnelle de la protéine (voir § 4.5.a).

La **figure 9.20** présente un exemple de fixation du glucose (ligand) sur la protéine transmembranaire GLUT3, une perméase pour le glucose. Une autre molécule que le glucose ne serait pas en mesure de réaliser exactement les mêmes liaisons hydrogène, et aurait une affinité bien moindre pour cette protéine. Ces liaisons faibles expliquent donc la spécificité de l'interaction entre GLUT3 et son ligand.

Voir chapitre 7, Zoom 3

L'affinité d'un ligand pour une protéine peut être quantifiée par une grandeur sans unité appelée constante de dissociation (K_D). Il s'agit de la constante d'équilibre de la réaction :



$$K_D = \frac{[\text{complexe protéine-ligand}]}{[\text{protéine}][\text{ligand}]}$$

K_D est d'autant plus grand que le ligand et la protéine ont une forte affinité l'un pour l'autre. Les interactions protéines-ligand permettent une reconnaissance moléculaire spécifique, et sont essentielles à la fonction de nombreuses protéines. Elles sont impliquées entre autres dans l'activité enzymatique, dans les transports transmembranaires et l'expression génétique.

Voir chapitre 12, § 2.1

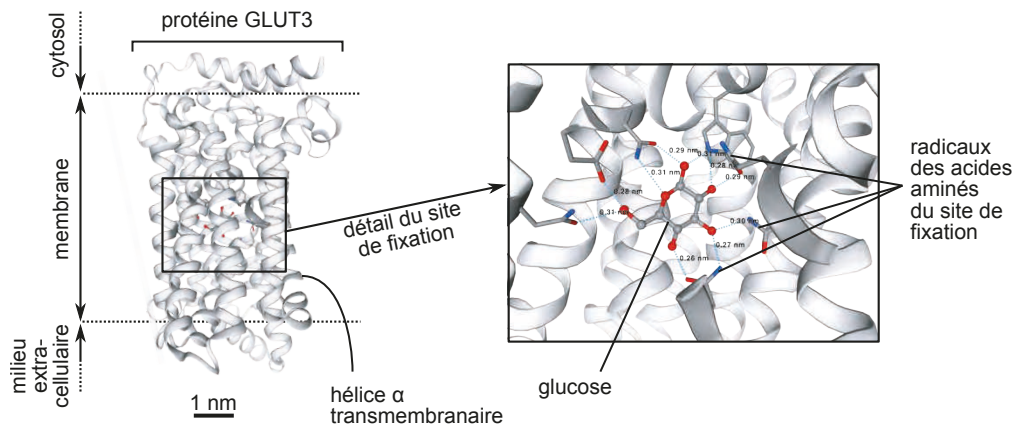


Figure 9.20 L'interaction entre le glucose et son transporteur transmembranaire GLUT3.

L'image de droite présente les liaisons hydrogène existant entre le glucose et des radicaux d'acides aminés de la protéine (Image obtenue avec <https://libmol.org> à partir de la structure moléculaire 4zw9.pdb sur <https://www.rcsb.org>).

c) Des protéines fibrillaires aux propriétés mécaniques

Chez les mammifères, les tendons sont des organes permettant la transmission au squelette de la force de la contraction musculaire. Ils ont une grande résistance à la traction. Cette résistance est permise par une protéine de la matrice extracellulaire de ce tissu, le **collagène** de type I. Le collagène est une fibre formée par l'association de plusieurs unités de tropocollagène (figure 9.21). Chaque unité de tropocollagène est une protéine constituée d'une structure secondaire originale impliquant trois chaînes peptidiques (une triple hélice) ; l'allongement de la triple hélice dans le sens d'allongement de la fibre de collagène lui confère une résistance mécanique importante. Les unités de tropocollagène sont elles-mêmes liées les unes aux autres par des liaisons faibles et des liaisons covalentes. Ces structures à plusieurs échelles permettent à la fibre de collagène de résister à la traction exercée par le muscle et de la transmettre à l'os. Plus généralement, le collagène est un constituant majeur des matrices extracellulaires animales.

De nombreuses autres protéines ont également un rôle mécanique :

- des protéines fibrillaires qui partagent la caractéristique commune d'être formées d'unités dont l'association forme des fibres (protéines du cytosquelette, comme les filaments d'actine, les microtubules ou les filaments intermédiaires, mais également les lamines nucléaires) ;
- des ligands de ces protéines fibrillaires, qui les relient entre elles, voire se déplacent en suivant leur réseau (les protéines marcheuses kinésine et dynéine, qui se déplacent sur les microtubules, ou la fibronectine qui relie les fibres de collagène entre elles et aux cellules).

Voir chapitre 5,
§ 2.1.a

Voir chapitres 6, § 3

On notera que les protéines fibrillaires, bien qu'étant de nature chimique très différente des polymères glucidiques structuraux, ont un rôle qui leur est analogue ; comme la chitine ou la cellulose, elles peuvent jouer elles aussi un rôle structural de fibre résistante à l'étirement.

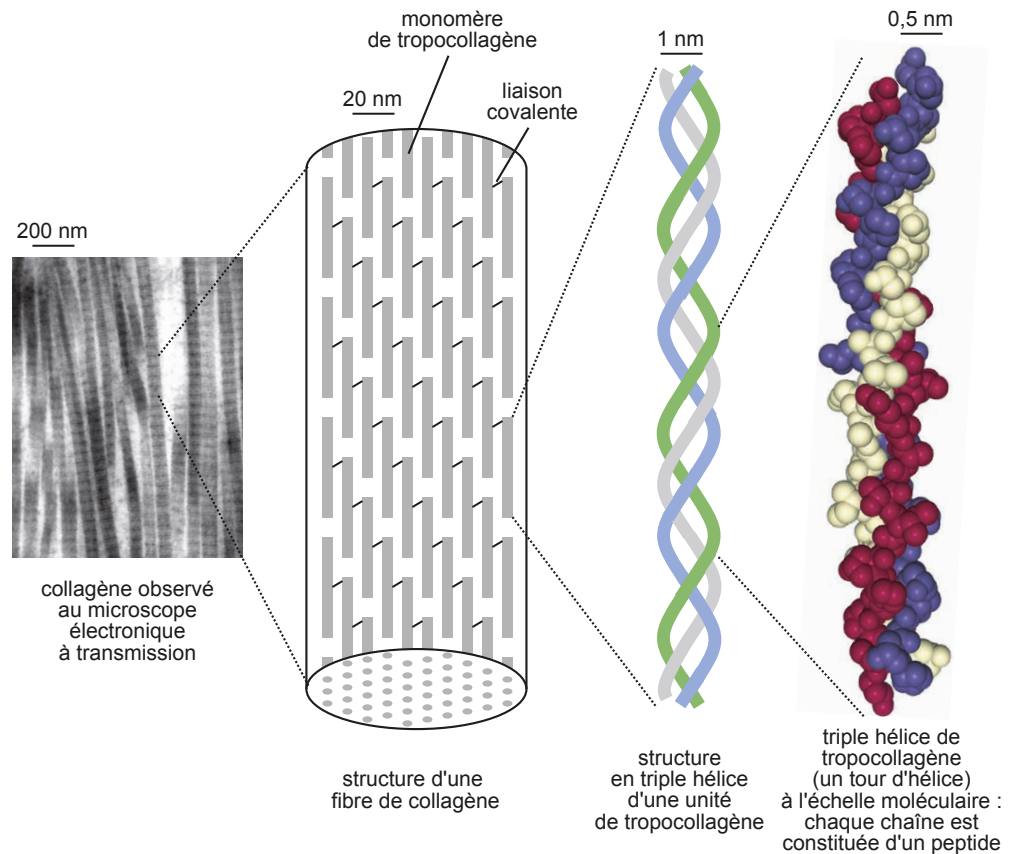


Figure 9.21 Le collagène, une protéine fibrillaire résistant à l'étirement.

Image obtenue avec <https://libmol.org> à partir de la structure moléculaire 1bkv.pdb sur <https://www.rcsb.org>.

Cliché de fibres de collagène fourni par Nacer Benmeradi, plateau de microscopie électronique, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes CNRS Toulouse ; $\times 30\,000$.

4.5 Les protéines sont des structures dynamiques

a) Des changements de conformation participent à la fonction de la protéine

On l'a vu, la structure des protéines est stabilisée par des liaisons faibles, qui sont labiles. Toute modification des interactions entre acides aminés peut donc potentiellement provoquer des changements de conformation. Beaucoup de protéines ont une fonction directement dépendante de ces changements de conformation :

- c'est par changement de conformation que les perméases permettent à des molécules de traverser les membranes (figure 9.22) ;
- l'ajustement induit est une modification de la conformation d'une enzyme provoquée par la fixation du substrat au niveau du site actif, et qui permet la réaction enzymatique ;
- dans le cas de nombreuses protéines de structure quaternaire, on observe un effet coopératif, qui consiste en un changement de conformation de l'ensemble des sous-unités de la protéine

Voir chapitre 12,
Zoom 1

Voir chapitre 3,
zoom 2
et chapitre 12, § 2

Voir chapitre 7,
Zoom 3

de façon coordonnée. Un tel effet est en particulier observé sur l'hémoglobine et sur les enzymes dites allostériques ;

- des apports d'énergie (par hydrolyse d'ATP par exemple) peuvent modifier la forme d'une protéine et induire un déplacement (moteurs moléculaires) ou un transport membranaire (transporteurs actifs primaires).

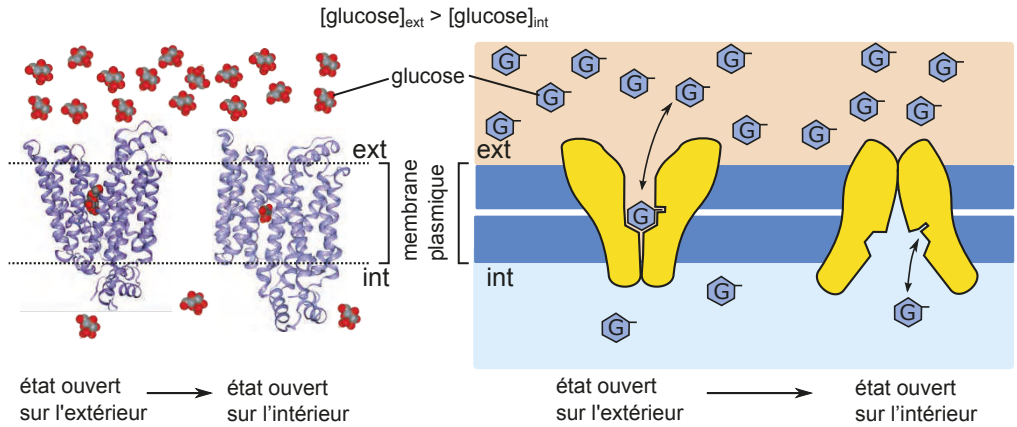


Figure 9.22 Deux états (ouverts sur l'extérieur ou sur l'intérieur) du transporteur GLUT.
(a) visualisation moléculaire ; (b) schématisation.

b) Les protéines peuvent subir des modifications covalentes qui modifient leur fonction

• La glycosylation des protéines

La fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire des animaux, est une **protéine glycosylée** (ou **glycoprotéine**) : des oligomères glucidiques sont liés par des liaisons osidiques à certains radicaux d'acides aminés. Les glucides qu'elle exhibe lui permettent à la fois d'être très hydrophile, propriété importante pour une protéine de la matrice, mais également de réaliser des interactions avec d'autres molécules de la matrice et avec les cellules. La glycosylation est une modification covalente des protéines, qui a lieu dans l'appareil de Golgi après la traduction (modification post-traductionnelle), et qui concerne de nombreuses protéines, en particulier des protéines extracellulaires. Souvent, les glycosylations sont pérennes.

• La phosphorylation des protéines

Les radicaux d'une protéine portant un oxygène ou un azote (sérine, thréonine, tyrosine, lysine) peuvent être phosphorylés par transfert d'un phosphate depuis un ATP. La phosphorylation d'une protéine entraîne un changement de sa conformation, qui provoque un changement de son activité.

! Attention !

On ne peut pas prévoir *a priori* quelle forme d'une enzyme (phosphorylée ou non phosphorylée) est active.

4.6 Les méthodes d'étude des protéines

Les protéines peuvent être étudiées grâce à de nombreuses techniques, qui doivent être connues. Le **tableau 9.2** présente les principales caractéristiques de ces techniques, dont les détails seront développés en séance de travaux pratiques.

Voir chapitre 14, § 4.2

Voir chapitre 12 § 3.4

Voir TP7

Tableau 9.2 Techniques d'étude des protéines.

Nom de la technique	Principe	Objectif
Chromatographie d'affinité	Percolation d'un mélange à travers un milieu poreux ayant une affinité pour une protéine d'intérêt	Séparer les constituants d'un mélange
Électrophorèse non dénaturante	Migration d'une protéine dans un champ électrique	Séparer des protéines tout en conservant leurs propriétés physico-chimiques
Électrophorèse dénaturante	Migration d'une protéine dénaturée dans un champ électrique	Séparer des protéines pour déterminer leur poids moléculaire
Western blot	Électrophorèse dénaturante suivie d'un transfert sur membrane et d'une détection spécifique par un anticorps	Identifier formellement une protéine dans un mélange
Immunomarquage	Détection d'une protéine dans des cellules ou des tissus	Identifier et localiser une protéine dans des cellules ou des tissus
Mutagenèse	Provoquer une mutation d'une séquence d'ADN	Identifier le rôle d'une protéine par l'étude du phénotype du mutant
Transgénèse	Intégrer à un génome une séquence d'ADN étrangère	Soigner une maladie (thérapie génique), produire un médicament, étudier le rôle d'une protéine...

ZOOM 1

Stockage des lipides chez les êtres vivants

Stockage sous forme de gouttelettes cytoplasmiques dans des tissus spécialisés

Chez les animaux, les lipides sont stockés dans les tissus adipeux. Chez les plantes, ils sont stockés dans le parenchyme lipidique, que l'on le trouve essentiellement dans l'albumen des graines (exemple : graine de ricin) ou l'embryon (exemples : arachide, tournesol, colza...), mais également dans le péricarpe de certains fruits charnus (exemples : olive, fruit du palmier à huile).

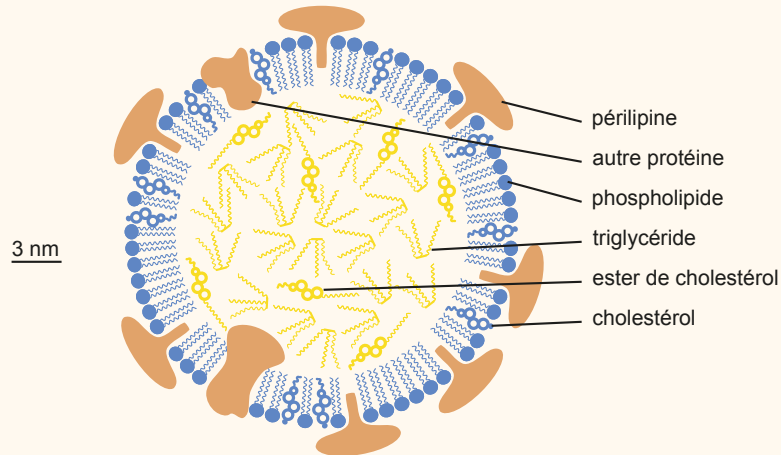
Les tissus animaux comme végétaux stockent leurs lipides, essentiellement des triglycérides, sous forme de gouttelettes lipidiques qui se situent dans le cytoplasme des cellules. La structure des gouttelettes lipidiques est sensiblement identique chez les animaux et les végétaux :

- un cœur de triglycérides, contenant éventuellement également des stérols estérifiés par des acides gras, qui constitue la majeure partie de la gouttelette ;
- une périphérie constituée d'une monocouche de phospholipides, dont la partie hydrophile est en contact avec l'eau du cytosol ;
- des protéines diverses, permettant la stabilisation, mais également la synthèse et l'hydrolyse des lipides.

Les triglycérides ont une composition en acides gras variable chez les animaux et les végétaux, et selon les espèces :

- Les organismes dont la température est élevée (animaux homéothermes, mais également plantes vivant en climat chaud) ont des triglycérides souvent riches en acides gras saturés, particulièrement énergétiques. Ces lipides sont solides à température ambiante en raison de la possibilité de nombreuses liaisons de van der Waals. Ex. : saindoux (graisse de porc), huile de palme...

- Les organismes dont la température est basse (plantes et animaux ne contrôlant pas leur température interne, et vivant en climat tempéré) ont des triglycérides souvent riches en acides gras insaturés, un peu moins énergétiques, mais liquides même à température basse. Ex. : huile d'olive, huile de foie de morue.



Une gouttelette lipidique dans un tissu adipeux de mammifère.

La pérlipine est la principale protéine de la surface des gouttelettes lipidiques, et permet la régulation de leur utilisation par la cellule.

Le stockage des lipides : un mode de stockage condensé et de faible effet osmotique

En moyenne, les oses libèrent par oxydation 17 kJ par gramme de matière ; les lipides libèrent 37 kJ par gramme, ce qui est en lien avec le fait que les acides gras sont plus réduits que les oses. De plus, leur densité est de l'ordre de 0,9 contre 1,3 environ pour l'amidon. À volume égal, les lipides sont donc environ trois fois plus énergétiques que les glucides : ils constituent une réserve de très haute densité énergétique.

Les petites molécules organiques hydrophiles, comme le saccharose, sont couramment utilisées comme réserve dans la vacuole chez les végétaux (parenchyme cortical de la tige de betterave, parenchyme médullaire de la racine de canne à sucre...). L'interaction forte de l'eau avec le saccharose entraîne un appel d'eau, dit effet osmotique, qui provoque une forte pression de la vacuole contre la paroi de la cellule. C'est la pression de turgescence. Au contraire, les lipides, étant hydrophobes, n'interagissent pas avec l'eau, et la présence dans les cellules de réserves lipidiques ne provoque donc pas d'effet osmotique. Cette propriété est particulièrement intéressante chez les animaux, qui ne disposent pas de parois à même de s'opposer à une éventuelle pression de turgescence.

Les lipides de réserve sont hydrolysés par des lipases

Les triglycérides des réserves lipidiques peuvent être mobilisés par hydrolyse catalysée par des lipases, situées à la surface des gouttelettes lipidiques. Elles permettent la libération de glycérol et d'acides gras.

Dans les cellules adipeuses des animaux, les acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides sont utilisés pour la synthèse de lipoprotéines, agrégats de lipides et de protéines permettant le transport par le sang. Ces lipides sont alors utilisables, après leur transport, par l'ensemble des cellules de l'organisme, tout comme les lipides issus de la digestion.

Voir chapitre 11, § 4.1b

Chez les végétaux, il n'existe pas de forme circulante des lipides au sein de l'organisme. Cependant, les acides gras libérés par hydrolyse des triglycérides de réserve peuvent être convertis en saccharose, qui pourra être transporté par la sève élaborée jusqu'aux organes consommateurs (organes puits). Les plantes sont en effet capables, grâce à une voie métabolique originale (le cycle du glyoxylate) de synthétiser des oses à partir d'acides gras (ce dont les animaux sont incapables). Cette conversion est particulièrement importante lors de la germination des graines.

ZOOM 2

Lipides et propriétés des membranes

Les lipides membranaires se structurent spontanément en bicouche lipidique

En agitant dans un tube un mélange d'eau et de phosphatidylcholine (un des phospholipides membranaires les plus abondants), on peut montrer qu'il y a formation spontanée de liposomes, c'est-à-dire de bicouches lipidiques emprisonnant de l'eau. C'est l'amphiphilie importante des phospholipides qui permet cette structuration spontanée. L'existence des membranes biologiques est donc en grande partie expliquée par les seules propriétés d'interaction avec l'eau des lipides qui les composent.

Lipides membranaires et forme des membranes

Tous les phospholipides et sphingolipides possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Pour autant, une grande variabilité structurale existe :

- la taille du groupement hydrophile en elle-même peut être plus ou moins grande ;
- la coque de solvation au niveau de la tête hydrophile induit un encombrement stérique d'autant plus important que la charge du pôle hydrophile est importante ;
- certains lipides membranaires n'ont qu'une seule queue hydrophobe (un seul acide gras).

En conséquence, la forme de la surface des lipides membranaires est variable :

- les lipides ayant un pôle hydrophile de petite taille et/ou peu chargé, comme l'acide phosphatidique, ont une forme en cône évasé vers l'intérieur de la membrane (ou cône renversé) ;
- les lipides ayant un pôle hydrophile de taille moyenne et/ou moyennement chargé, comme la phosphatidylcholine, ont une forme cylindrique ;
- les lipides ayant un pôle hydrophile de grande taille et/ou très chargé, ou un seul acide gras, comme la lysophosphatidylcholine, ont une forme en cône évasé vers l'extérieur de la membrane.

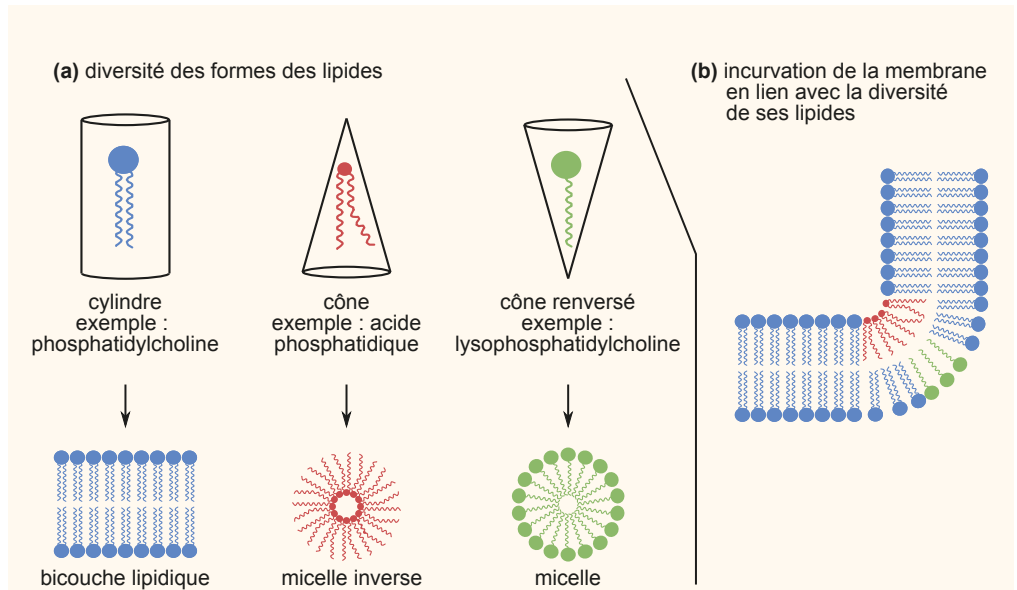
La structuration spontanée de ces lipides montre que seuls les lipides en cylindres ont la capacité à former une bicouche. Les lipides en cône renversé ont tendance à former des micelles, qui sont des agrégats sphériques en monocouche, la tête hydrophile dirigée vers l'extérieur. Les lipides en cône ont tendance à former des micelles inverses, emprisonnant des gouttelettes d'eau.

La majeure partie des lipides membranaires sont de forme cylindrique. Cependant, un faible pourcentage de lipides en cône ou en cône renversé dans une membrane biologique, peut contribuer à modifier sa forme.

Liaisons faibles, fluidité et perméabilité membranaire

Les lipides de la membrane sont aptes à se déplacer latéralement de façon aléatoire (on parle de **fluidité membranaire**). Cette fluidité est expliquée par l'absence de liaisons fortes entre les phospholipides, ce qui leur permet de se déplacer les uns par rapport aux autres.

Voir chapitre 7,
zoom 1



Influence du type de lipides sur la forme des membranes.

Les liaisons de van der Waals entre queues hydrophobes, et plus généralement l'effet hydrophobe, ont pour conséquences que la bicouche lipidique a une très faible perméabilité pour les molécules hydrophiles, qu'elles soient chargées ou non. La cellule est un système thermodynamique ouvert, qui échange de la matière avec son environnement. L'imperméabilité de la bicouche lipidique est donc indissociable de la possibilité d'échanges contrôlés, grâce aux protéines transmembranaires (perméases, transporteurs actifs, canaux, aquaporines).

ZOOM 3

Le glucose sous toutes ses formes

L'hémiacétalisation et la cyclisation du glucose

Les oses linéaires peuvent se cycliser spontanément via une réaction intramoléculaire : l'hémiacétalisation. Il s'agit d'une attaque nucléophile d'un oxygène d'un des hydroxyles sur le carbone portant le carbonyle (chez le glucose, le carbone n° 1).

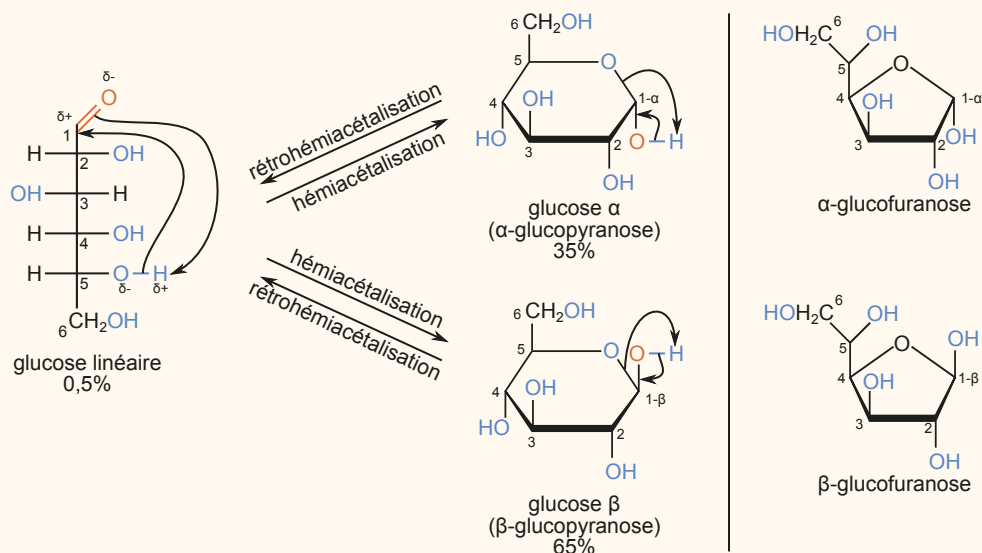
Cette réaction s'accompagne de la formation de plusieurs isomères, en proportions variables selon leur stabilité. On notera que dans tous les cas, le carbonyle devient un hydroxyle, et le carbone n° 1, initialement non asymétrique, le devient : pour chaque réaction d'hémiacétalisation, deux positions sont possibles pour l'hydroxyle formé :

- si l'hydroxyle formé est du côté opposé au dernier carbone (le C6) par rapport au cycle, cette forme est dite α ;
- si l'hydroxyle formé est du même côté du cycle que le dernier carbone (le C6), cette forme est dite β .

Plusieurs hydroxyles différents peuvent être impliqués dans l'hémiacétalisation, formant deux types de cycles :

- un furanose est un ose cyclisé dont le cycle contient 5 atomes (1 oxygène et 4 carbones) ;
- un pyranose est un ose cyclisé dont le cycle contient 6 atomes (1 oxygène et 5 carbones).

Les quatre formes cycliques (furanose ou pyranose, α ou β) sont appelées anomères, et le carbone portant le carbonyle (le n° 1 chez le glucose) est le carbone anomérique.



Gauche : hémiacétalisation du glucose linéaire à l'origine des deux formes α et β , qui peuvent à nouveau se convertir en glucose linéaire par rétrohémiacétalisation.

Droite : les deux formes furanose, rares pour le glucose.

La projection de Haworth est une projection particulièrement adaptée à la représentation des glucides hémiacétalisés (cyclisés) :

- comme dans la représentation topologique, la chaîne carbonée est représentée par une ligne brisée, et les hydrogènes liés à un carbone ne sont pas représentés ;
- le cycle est représenté à plat en perspective, les liaisons vers l'observateur étant en gras ;
- les substituants des carbones cycliques, qui sont alors soit au-dessus soit en dessous du cycle, sont représentés par un trait vertical vers le haut s'ils sont au-dessus, et par un trait vertical vers le bas s'ils sont en dessous.

Rétrohémiacétalisation et équilibre entre formes cycliques et forme linéaire

L'hémiacétalisation est une réaction réversible : chaque forme cyclique est susceptible de se transformer à nouveau en forme linéaire (rétrohémiacétalisation). Il existe donc un équilibre entre la forme linéaire et chacune des cinq formes cycliques. Chacune des cinq formes cycliques constitue donc un isomère distinct des autres, mais ne peut pas être isolé. La proportion relative de ces formes pour le glucose en solution est expliquée par la stabilité relative des différentes formes.

On trouve les valeurs suivantes :

Forme	Proportion
D-glucose linéaire	~ 0,5 %
α -D-glucopyranose (glucose α)	~ 36 %
β -D-glucopyranose (glucose β)	~ 64 %
α -D-glucofuranose	traces
β -D-glucofuranose	traces

On notera que les formes α -pyranose et β -pyranose sont ultra-majoritaires. Cette observation n'est cependant pas généralisable à l'ensemble des oses : pour les pentoses et les céto-hexoses, comme le fructose, c'est la forme furanose qui est majoritaire.

À cause de la rétrohémicétylisation, la forme linéaire et les formes cycliques sont toujours présentes dans une solution de glucose. La réactivité de la molécule de glucose s'entend donc comme la réactivité de chacune de ses formes. Ainsi :

- La liqueur de Fehling réagit avec le carbonyle du glucose, présent uniquement sur la forme linéaire. Pourtant, la totalité du glucose d'une solution est oxydable par la liqueur de Fehling : la forme linéaire est constamment formée par rétrohémicétylisation au fur et à mesure qu'elle est détruite par la réaction d'oxydation.
- L'UDP- α -glucopyranose (ou UDP-glucose) est formé par réaction de l'UTP (uridine triphosphate) avec du glucose- α . Pourtant, la totalité du glucose d'une solution peut réagir avec un excès d'UTP : le glucose- α est constamment formé par l'équilibre de l'hémicétylisation à partir des autres formes de glucose au fur et à mesure qu'il est détruit par la réaction avec l'UTP.

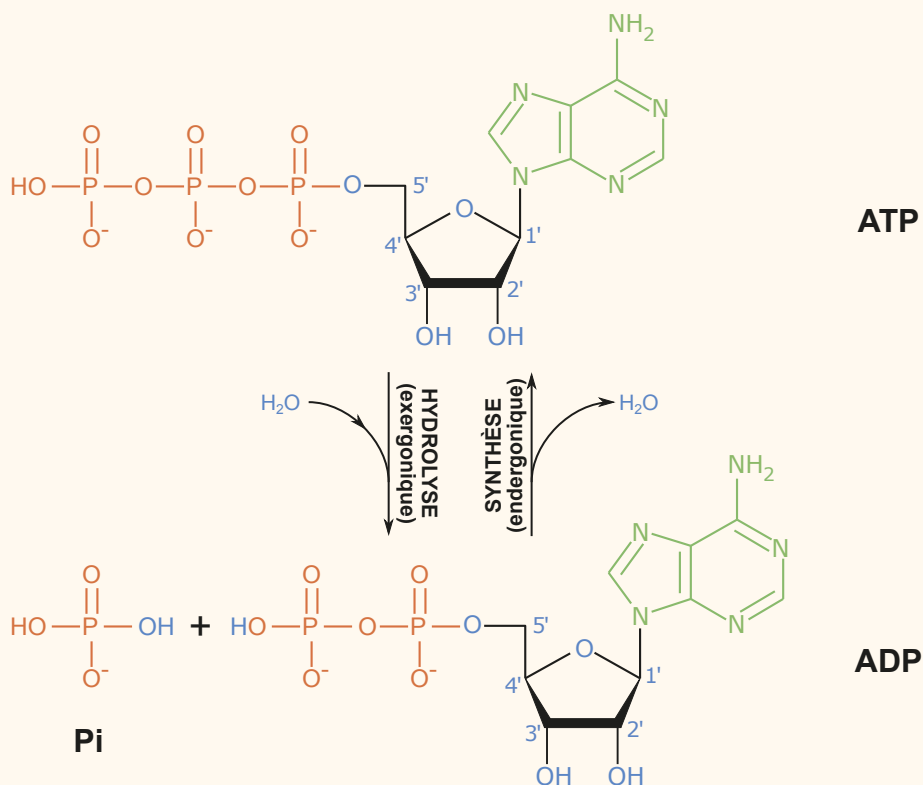
Après formation d'une liaison osidique, la rétrohémicétylisation est impossible, en raison de la disparition de la fonction -OH normalement portée par le carbone anomérique dans la forme cyclique, et désormais impliquée dans la liaison osidique. La dimérisation (et *a fortiori* la polymérisation) stabilise donc la forme cyclique des monomères, en empêchant la réactivité redox que confère le carbonyle porté par la forme linéaire. Cette stabilité est adaptée au stockage et au transport des sucres, et elle explique que beaucoup de glucides qui sont transportés dans l'organisme ou qui ont un rôle de réserve sont des diosides (comme le saccharose chez les plantes) ou des polyosides (comme l'amidon ou le glycogène).

ZOOM 4

Les fonctions des nucléotides

L'ATP, une monnaie énergétique

L'hydrolyse de l'ATP permet la libération d'un ADP et d'un phosphate inorganique. Elle est exergonique, et s'accompagne de la libération d'une énergie moyenne ($\Delta_r G^{0'} = -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), utilisable par de nombreux processus (contraction musculaire, transports actifs primaires, couplage avec des réactions chimiques non spontanées, etc.).



Synthèse et hydrolyse de l'ATP.

De nombreuses coenzymes sont des nucléotides

Une **coenzyme** est une petite molécule organique présente dans le site actif d'une enzyme, qui y est liée par des liaisons faibles, et qui participe à la réaction catalysée par cette enzyme (on parle de cofacteur) ; c'est donc un substrat particulier d'une réaction enzymatique. De nombreux nucléotides jouent un rôle de coenzyme :

- Les ribonucléotides triphosphates (en particulier ATP et GTP) peuvent être utilisés pour transférer des groupements phosphate à d'autres molécules, et sont alors les cofacteurs d'une kinase. Ex. : étape 1 de la glycolyse.
- Le nicotinamide adénine dinucléotide (couple NAD^+/NADH) est un dinucléotide qui peut participer à une réaction redox comme cofacteur d'une oxydoréductase, en fournissant ou en récupérant des électrons. Le couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, qui diffère par un groupement phosphate, et la flavine adénine dinucléotide (FAD/FADH_2) ont le même rôle. Ex. : transferts d'électrons au cours de la respiration et de la photosynthèse.
- La coenzyme A est un nucléotide portant un groupement thiol qui peut former avec un acide carboxylique une acyl-coenzyme A (ou acyl-CoA, qui est un thioester). Elle joue le rôle de coenzyme de transfert d'acyle, et est alors le cofacteur d'une acyltransférase. Une des acyl-CoA les plus courantes est l'acétyl-CoA (*acétyl* désigne le radical de l'acétate, un acide carboxylique à deux carbones). Exemple : transfert de groupements acétyle en amont du cycle de Krebs, au cours du catabolisme oxydatif.

Voir chapitre 11, § 3.1

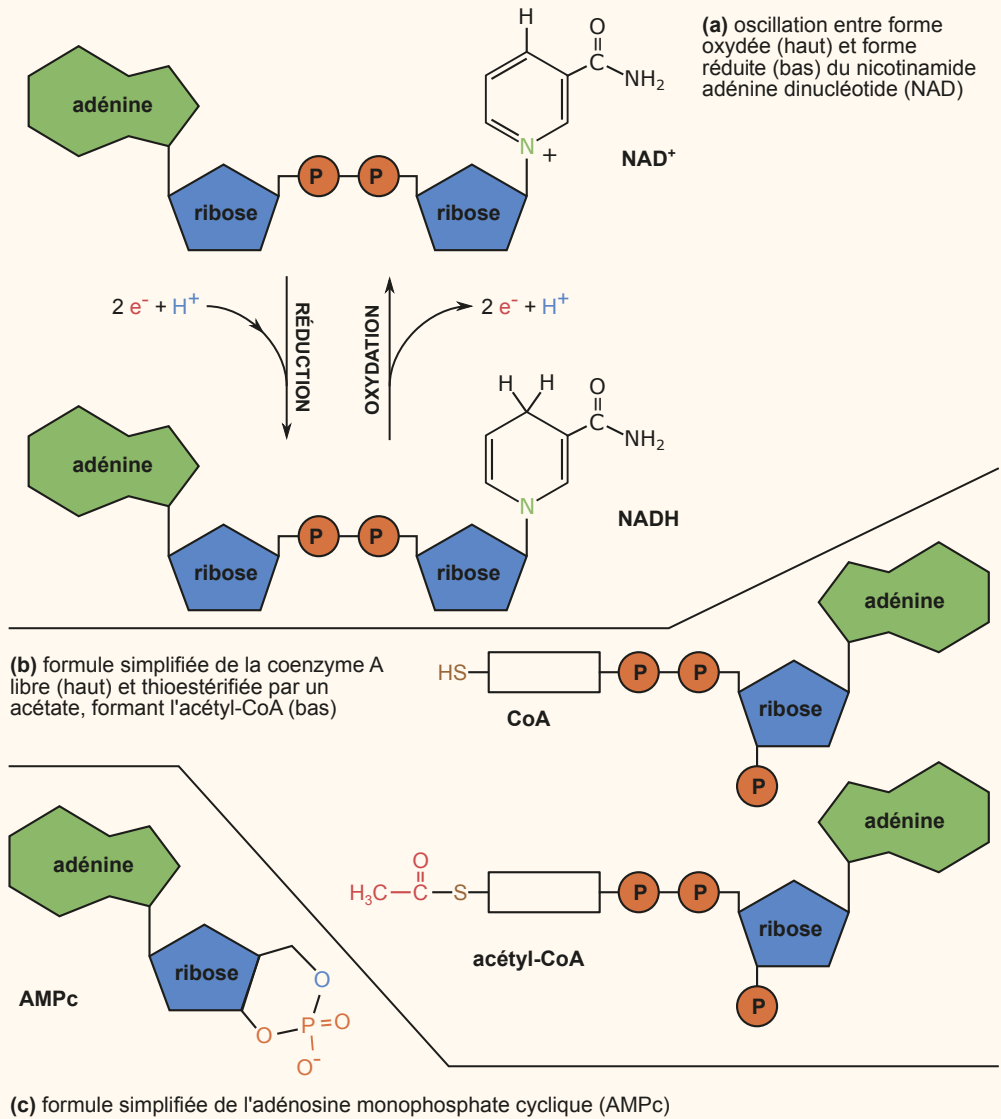
Voir chapitre 11, § 4
Voir chapitre 10, § 1

Voir chapitre 11, § 4

Voir ouvrage de 2^e année : communications intercellulaires chez les animaux

L'AMPc, un nucléotide à rôle de signalisation

L'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique, ou AMPc) est une molécule de signalisation intracellulaire (dit second messenger), produite à partir d'ATP en réponse à certains stimuli extérieurs, comme par exemple une stimulation hormonale.



Formules simplifiées de quelques nucléotides.

(a) Couple NAD⁺/NADH ; **(b)** Coenzyme A libre et acétyl-Coenzyme A ; **(c)** AMP cyclique.

ZOOM 5

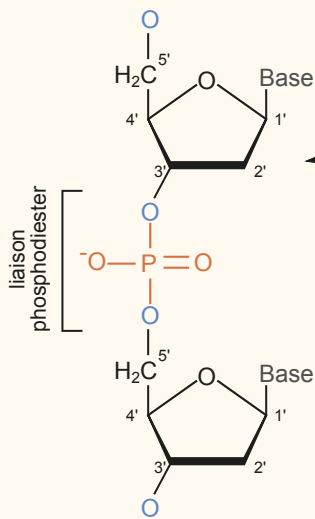
La structure des acides nucléiques

ARN et ADN sont des polymères de nucléotides. Les nucléotides de l'ARN (ribonucléotides) sont constitués fondamentalement de quatre types de bases azotées (A, C, G et U), mais certains ARN (comme les ARN de transfert) peuvent contenir une faible proportion de nucléotides à thymine, voire d'autres bases azotées rares. Les nucléotides de l'ADN (désoxyribonucléotides) sont strictement constitués des quatre bases azotées A, C, G et T. Les bases azotées sont susceptibles d'établir des liaisons hydrogène, formant des paires de bases :

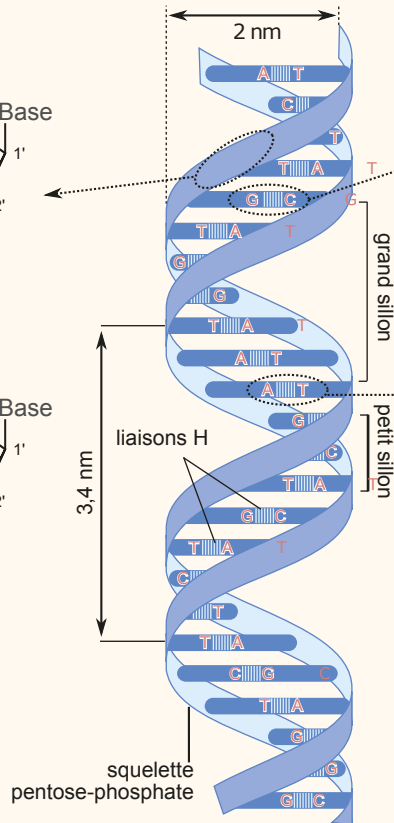
- C s'apparie avec G (trois liaisons H) ;
- A s'apparie avec T ou U (deux liaisons H).

Cet appariement est parfois appelé appariement Watson-Crick, du nom des deux biochimistes qui l'ont découvert en 1953.

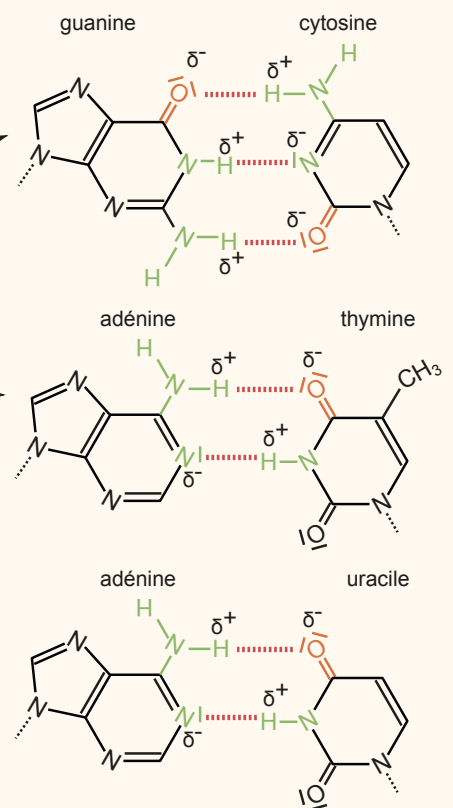
(a) la liaison phosphodiester entre deux nucléotides



(b) topologie et dimensions de l'ADN



(c) la complémentarité des bases



La structure de l'ADN.

Liaison phosphodiester entre deux nucléotides successifs, topologie et dimensions de l'ADN-B, et liaisons hydrogène entre bases azotées. Pour information, on a également représenté la complémentarité adénine-uracile.

Voir chapitre 13, § 5.2
et chapitre 14, § 1.1
et 3.2c

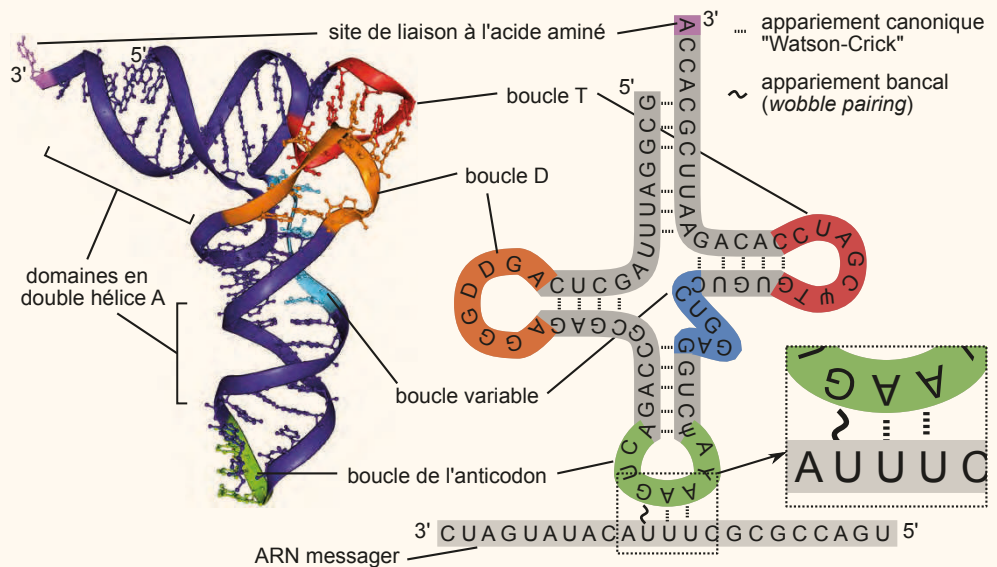
Cet appariement est extrêmement spécifique, et il est à l'origine de la capacité de deux acides nucléiques à former deux brins complémentaires deux à deux. Les molécules d'ADN sont la plupart du temps bicaténaires (c'est-à-dire à deux brins appariés). L'ADN bicaténaire adopte en milieu aqueux une structure caractéristique, dite ADN-B, en double hélice droite antiparallèle :

- c'est une hélice : les brins s'enroulent autour d'un axe central ;
- l'hélice est double : elle est constituée de deux brins ;
- l'hélice est antiparallèle : les deux brins ont des sens 5'→3' opposés ;
- l'hélice est droite : vue du dessus, elle monte dans le sens anti-horaire.

Cette hélice a un pas de 10 nucléotides (10 nucléotides permettent un tour d'hélice complet), correspondant à 3,4 nm, et une largeur de 2 nm. Les plans des bases azotées sont orientés perpendiculairement à l'axe d'allongement de la molécule, tels des barreaux d'échelle, et sont disposés de façon légèrement dissymétrique par rapport à cet axe, ce qui permet l'existence d'un petit et d'un grand sillon.

Les ARN ont une structuration tridimensionnelle à la fois plus diverse et plus complexe que l'ADN. Elle peut être décrite en plusieurs niveaux de structuration :

- le niveau primaire (ou structure primaire) est la séquence de nucléotides ;
- le niveau secondaire (ou structure secondaire) est constitué par des repliements locaux, dus aux appariements entre bases azotées. Les boucles (qui peuvent être terminales, internes ou multiples) sont des conséquences de la mise en place de ces appariements, et sont donc des éléments de structure secondaire ;
- le niveau tertiaire (ou structure tertiaire) est constitué par le repliement global des structures d'ordre secondaire, qui donne une forme tridimensionnelle à l'ARN, y compris la structuration en hélice quand elle existe.



Structure d'un ARN de transfert (ARNt).

Droite : structure secondaire. **Gauche** : structure tertiaire. Il s'agit ici de l'ARNt portant l'acide aminé phénylalanine, qui peut reconnaître les deux codons UUU ou UUC au niveau de la boucle de l'anticodon. On notera les domaines en hélice A, qui diffèrent de la forme B observée couramment dans l'ADN. Bases et nucléotides particuliers : T = thymine ; ψ = pseudouridine ; D = désoxyribouridine ; Y = inosine.

La structure de nombreux ARN conditionne leur fonction, en particulier pour les ARN de transfert (ARNt) ou les ARN ribosomiques (ARNr).

Dans l'ARN, on observe des appariements dit non canoniques, ou bancals (appelés en anglais *wobble pairing*) qui expliquent des repliements tridimensionnels particuliers. On notera en particulier l'appariement G-U, important pour expliquer la redondance du code génétique. La figure page précédente présente la structure d'un ARNt dont l'anticodon AAG peut reconnaître le codon UUU, par *wobble pairing*.

Certains ARN possèdent des bases azotées non canoniques, ou des nucléotides modifiés (pseudouridine, hypoxanthine, thymine).

ZOOM 6

La liaison peptidique : éléments structuraux et conséquences fonctionnelles

La liaison peptidique et les degrés de liberté du repliement de la protéine

La longueur de la liaison chimique entre le carbone et l'azote de la liaison peptidique est de 133 pm, soit une longueur intermédiaire entre celle d'une liaison simple C-N (de l'ordre de 147 pm) et une liaison double C=N (de l'ordre de 128 pm). On peut montrer qu'il existe deux formes mésomères en résonance :

- l'une, majoritaire, présente un groupement amide ;
- l'autre, minoritaire, comporte une double liaison C=N.

La forme effective peut être vue comme une moyenne pondérée de ces deux extrêmes.

On dit que la liaison peptidique est partiellement double. Cette résonance a deux conséquences :

- comme pour une liaison double, la rotation autour de la liaison peptidique est impossible : le carbone et l'azote de la liaison peptidique, ainsi que les quatre atomes qui y sont liés, sont coplanaires.
- l'oxygène de l'amide a une charge partielle négative particulièrement importante, ce qui le rend particulièrement apte à réaliser des liaisons H.

Pour chaque acide aminé de la protéine, la rotation autour de chacune des liaisons C α -N et C α -C est possible, et on associe à chacune de ces liaisons un angle : ϕ (« phi ») pour la liaison C α -N, et ψ (« psi ») pour la liaison C α -C. Ces angles, qui peuvent prendre en théorie n'importe quelle valeur entre -180° et 180° , constituent les deux seuls degrés de liberté concernant le repliement du peptide sur lui-même.

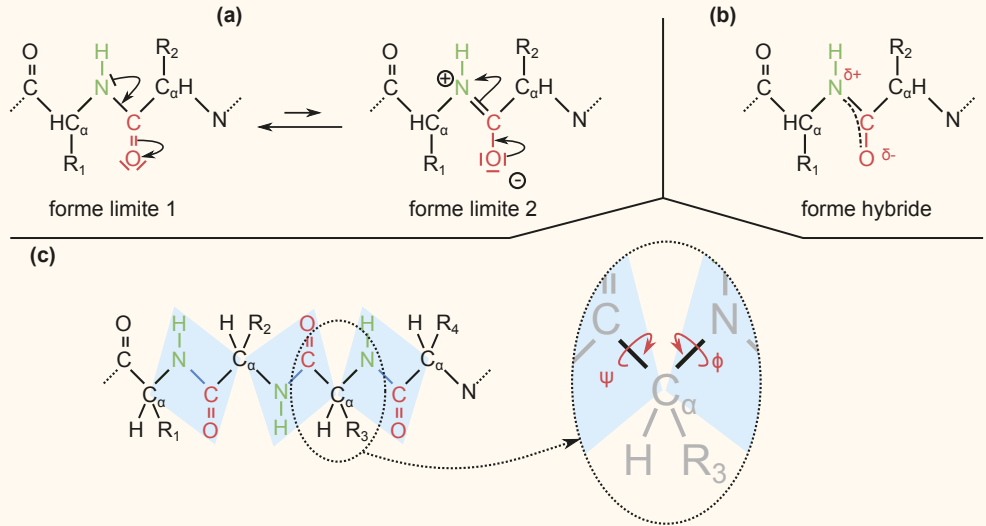
On peut mesurer exhaustivement l'ensemble des valeurs de ϕ et ψ pour chaque acide aminé de nombreuses protéines, et placer les couples de valeurs obtenus dans un diagramme. Un tel diagramme est appelé diagramme de Ramachandran. Il permet de constater que deux domaines correspondant à des valeurs particulières de ϕ et ψ sont ultramajoritaires : certaines valeurs sont donc favorisées par rapport à d'autres. Ces deux zones du diagramme permettent de minimiser l'encombrement stérique entre les atomes de la liaison peptidique et ceux des radicaux. Les deux domaines ainsi définis correspondent aux hélices α et feuillets β .

Hélices α et feuillets β : deux repliements locaux stables

Les hélices α et les feuillets β correspondent à des repliements locaux de la chaîne peptidique.

- Les hélices α sont extrêmement homogènes. Ce sont des hélices droites d'un diamètre de 12 Å (1,2 nm) pour un pas de 3,6 acides aminés. Les radicaux des acides aminés sont toujours disposés vers l'extérieur de l'hélice.

- Les feuillets β sont constitués de deux ou plusieurs brins plissés, dits brins β , disposés de façon parallèle ou antiparallèle, et qui interagissent entre eux par des liaisons faibles.



La résonance de la liaison peptidique et la définition des deux angles ϕ et ψ .
Les plans des liaisons peptidiques sont indiqués par les parallélogrammes bleus.

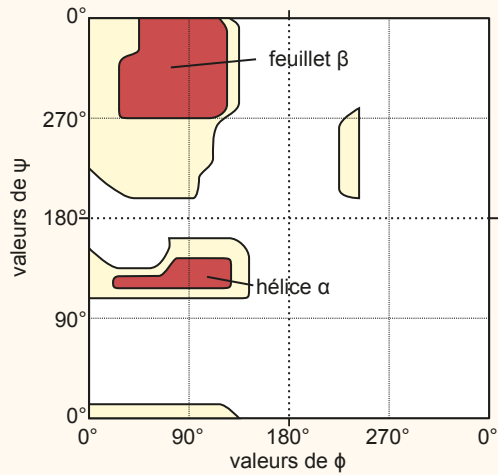
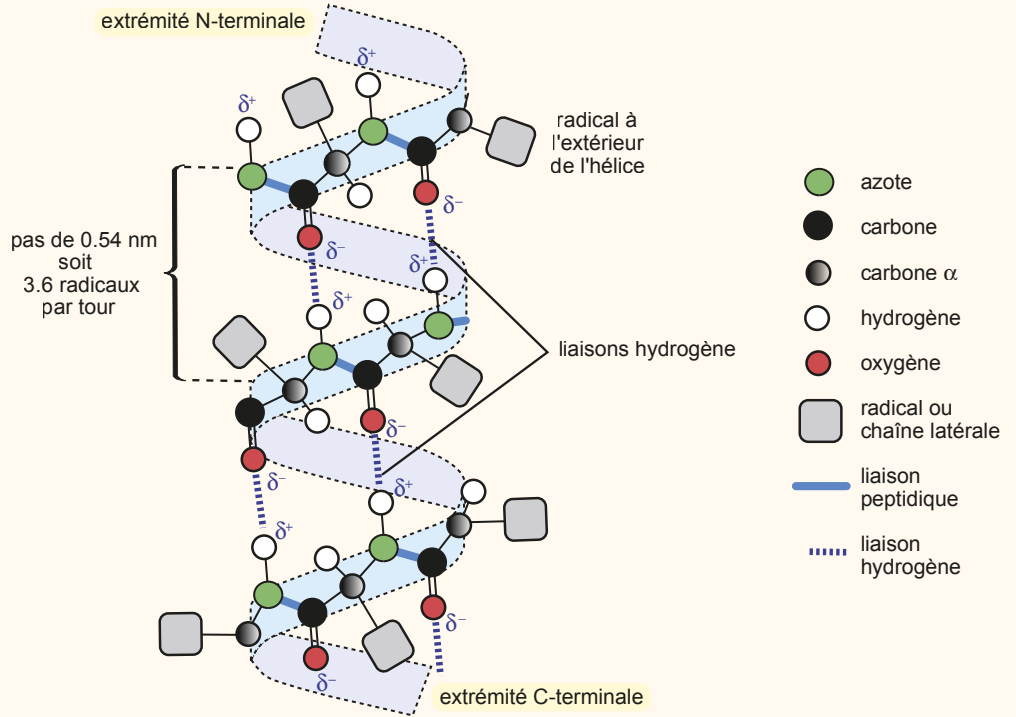


Diagramme de Ramachandran.

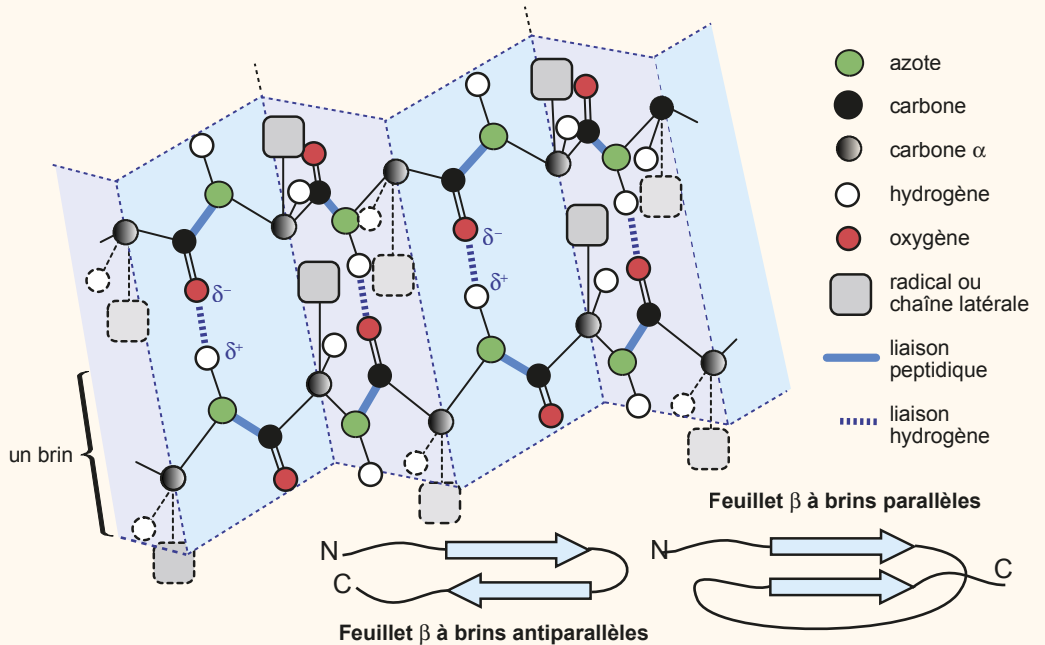
La zone rouge correspond à des positions du couple ϕ - ψ très courante, et la zone jaune à des positions moins courantes. En dehors de ces deux zones, les configurations sont très défavorisées et ne s'observent jamais.

Hélices α et feuillets β sont stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires, directement entre les groupements de la liaison peptidique ; les radicaux des acides aminés n'interviennent pas dans cette stabilisation, ce qui explique que ces structures secondaires soient relativement indépendantes de la séquence de la protéine.



Structure d'une hélice α .

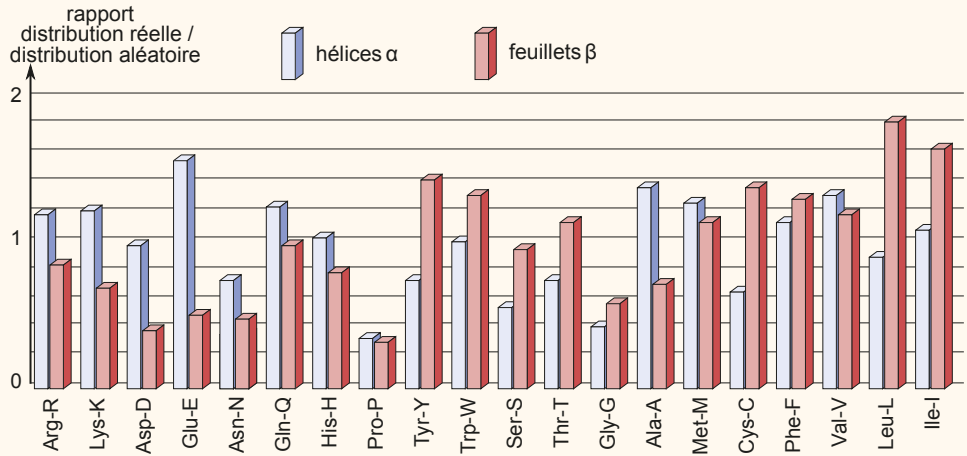
La structure est stabilisée par des liaisons H. Notez que les radicaux sont orientés vers l'extérieur de l'hélice.



Structure d'un feuillet β .

La structure est stabilisée par des liaisons H. Notez que les radicaux sont orientés de part et d'autre du feuillet.

On a déterminé, pour chaque acide aminé, sa probabilité d'être impliqué dans des hélices α ou des feuillets β .

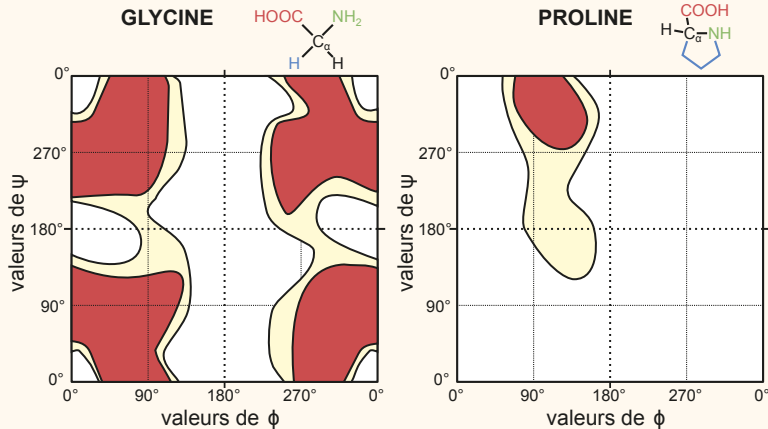


Pour chaque acide aminé, on évalue sa fréquence dans les hélices α ou les feuillets β , que l'on compare à une distribution aléatoire. Un rapport supérieur à 1 pour les hélices α indique un acide aminé ayant tendance à former des hélices α , et vice-versa. Les acides aminés sont ici identifiés par leur code à trois lettres et à une lettre.

On constate que les hélices α et les feuillets β ne sont pas équiprobables pour chaque acide aminé. Certains acides aminés, comme le glutamate (Glu), forment beaucoup plus souvent des hélices α . D'autres, comme la leucine (Leu), forment beaucoup plus souvent des feuillets β . D'autres, comme la proline (Pro) ou la glycine (Gly), ne forment qu'exceptionnellement l'une ou l'autre de ces structures. La séquence d'acides aminés détermine donc en partie le type de structure secondaire, et donc les structures d'ordre supérieur (structure tertiaire et éventuellement quaternaire).

Deux acides aminés particuliers : la glycine et la proline

Comme on vient de le voir, la glycine et la proline sont singulières en ce qu'elles forment rarement des hélices α et les feuillets β . Le diagramme de Ramachandran pour ces deux acides aminés donne des profils très différents des autres acides aminés.



Diagrammes de Ramachandran spécifiques de la glycine (gauche) et de la proline (droite).

Les formules de ces deux acidesaminés sont données au dessus de chacun des deux diagrammes.

Les valeurs de stabilité de φ et ψ pour la glycine sont quasiment symétriques. Elles sont expliquées par le fait que le radical de la glycine est un hydrogène, et que son carbone α n'est donc pas asymétrique. La glycine est donc un acide aminé offrant beaucoup de liberté au repliement de la protéine.

Les valeurs de stabilité de φ et ψ pour la proline sont en revanche plus étroites que pour les autres acides aminés, avec en particulier une très faible variabilité de φ . Elle est expliquée par le fait que l'amine de la proline est secondaire, et son azote fait donc à la fois partie de la liaison peptidique et du radical, imposant des contraintes supplémentaires. Les protéines riches en glycine et en proline, comme le collagène, ont pour ces raisons des formes particulières.

DÉCOUVERTE

Découverte du rôle et de la structure de l'ADN

De Mendel à Morgan : l'hérédité discrète et les chromosomes

Au milieu du XIX^e siècle, dans le but d'améliorer les variétés végétales, Gregor Mendel réalise des **croisements** de variétés différentes chez le pois. Divers croisements de pois ridés et de pois lisses, sur plusieurs générations, montrent que les descendants sont soit ridés, soit lisses, mais qu'**il n'existe pas de phénotype intermédiaire**. Donc, les caractères sont transmis à la descendance de façon **discrète** : il existe une *information génétique* [lisse] et une *information génétique* [ridé], qui ne peuvent pas se mélanger ni s'atténuer.

Au début du XX^e siècle, on connaît l'existence des chromosomes, mais on ne connaît pas leur rôle. On sait également que les drosophiles femelles possèdent deux grands chromosomes identiques (X), alors que les mâles possèdent un chromosome X, et un petit chromosome appelé Y. Le biologiste américain Thomas Hunt Morgan remarque que certains mâles aux yeux blancs transmettent ce caractère à tous leurs descendants mâles, mais jamais à leurs descendants femelles. Il postule que c'est le chromosome Y, absent chez les femelles, qui porte ce caractère. De nombreuses autres expériences confirment que **ce sont les chromosomes qui portent les éléments discrets de l'hérédité** découverts par Mendel. Ils sont appelés **gènes** en 1909.

1928 : le principe transformant

En 1928, Frederick Griffith se pose la question de savoir quelle molécule porte l'information génétique, c'est-à-dire l'information codant les caractères observables et transmissibles. Il identifie deux souches de pneumocoques (bactéries responsables de pneumonies), qui diffèrent par la morphologie et par l'aspect des colonies, mais également par leur pathogénicité. La souche R est non pathogène, mais la souche S est mortelle pour des souris. Griffith réalise des injections à des souris de diverses souches, dans différentes conditions :

Expérience	Souche injectée	Résultat
1	Souche R	La souris survit
2	Souche S	La souris meurt
3	Souche S tuée par la chaleur	La souris survit
4	Souche R, ayant été mise au contact de la souche S préalablement tuée par la chaleur	La souris meurt

Les expériences 1 et 2 sont des témoins : elles confirment la pathogénicité de la souche S, et l'absence de pathogénicité de la souche R. De l'expérience 3, on déduit que la bactérie S tuée perd sa pathogénicité. De l'expérience 4, on déduit que la souche R est capable d'acquérir une pathogénicité en étant placée au contact des molécules constitutives de la souche S.

Griffith déduit l'existence d'une molécule, dite *principe transformant*, provenant de la bactérie S, et capable de modifier l'information génétique de la bactérie R en la rendant pathogène.

1944 : l'ADN est le support de l'information génétique

En 1944, Avery, MacLeod et McCarty réitérèrent le protocole de Griffith en modifiant l'expérience 4. La souche S est tuée par la chaleur, puis est mise en contact avec diverses enzymes (des protéases, des RNases, ou des DNases, détruisant respectivement les protéines, l'ARN ou l'ADN). La souche R est alors mise au contact de ces digestats de bactérie S.

Expérience	Souche injectée	Résultat
4a	Souche R, ayant été mise au contact de la souche S préalablement tuée par la chaleur puis traitée par des protéases	La souris meurt
4b	Souche R, ayant été mise au contact de la souche S préalablement tuée par la chaleur puis traitée par des RNases	La souris meurt
4c	Souche R, ayant été mise au contact de la souche S préalablement tuée par la chaleur puis traitée par des DNases	La souris survit

Par l'expérience 4a et 4b, on montre que le principe transformant n'a pas été altéré : la molécule responsable de la transmission de l'information génétique de pathogénicité de la souche S à la souche R n'est ni une protéine, ni un ARN. En revanche, on déduit de l'expérience 4c que le principe transformant permettant la transmission d'information génétique entre les deux souches a été détruit : l'information génétique est donc portée par l'ADN.

De nombreuses expériences ont par la suite montré que l'ADN était le support universel de l'information génétique chez tous les êtres vivants.

La règle de Chargaff et le postulat de la complémentarité des bases

Le calcul du rapport molaire $[A]/[T]$ et $[C]/[G]$ montre que ces rapports valent 1 chez tous les êtres vivants, alors que les rapports $[A]/[C]$, $[A]/[G]$, $[T]/[C]$ et $[T]/[G]$ sont variables. Ce constat, dit règle de Chargaff en l'honneur du biochimiste du même nom, permet de postuler que les bases $[A]$ et $[T]$ d'une part, et $[C]$ et $[G]$ d'autre part, sont complémentaires deux à deux.

1953 : l'ADN est une hélice de deux brins antiparallèles complémentaires

En 1953, par la nouvelle technique de la cristallographie par diffraction de rayons X, Watson, Crick et Franklin ont déduit de nombreuses caractéristiques structurales de l'ADN-B : c'est une hélice, constituée de deux brins antiparallèles et complémentaires deux à deux (voir Zoom 5. La structure des acides nucléiques).

Réviser

Résumé

Les lipides sont des molécules carbonées hydrophobes, qui constituent notamment la bicouche lipidique des membranes. Ils sont également des réserves énergétiques importantes. Les oses sont des polyols susceptibles de former des polymères glucidiques par condensation et création de liaisons osidiques. Les polymères glucidiques de réserve peuvent être hydrolysés et libérer des monomères utilisables par les cellules. Les polymères glucidiques structuraux forment des fibres et des gels qui sont impliqués dans la structuration des matrices extracellulaires des organismes vivants.

Les nucléotides sont constitués d'une base azotée et d'un pentose phosphorylé une à trois fois ; très hydrophiles, ils ont de nombreux rôles, notamment celui de coenzyme. Ils sont également les monomères des acides nucléiques (ADN et ARN), des polymères séquencés. L'ADN est le support universel de l'information génétique ; les ARN sont impliqués dans l'expression de cette information.

Les protéines sont des polymères d'acides α -aminés, dont les monomères sont liés par des liaisons peptidiques. Leur repliement tridimensionnel à plusieurs échelles, dépendant de leur séquence, leur confère une forme qui conditionne leur fonction. Les fonctions des protéines sont extrêmement diverses : transports transmembranaires, structure, catalyse enzymatique, récepteur d'hormones...

S'entraîner

QCM de connaissances

- 1 Les lipides :
 - a. Sont constitués d'acides gras.
 - b. Sont toujours entièrement hydrophobes.
 - c. Ne contiennent que du carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène.
 - d. Sont constitués d'une partie hydrogène-carbonée hydrophobe.
 - e. Peuvent polymériser pour former des membranes.
- 2 Les phospholipides :
 - a. Sont des esters de phosphate et d'acides gras.
 - b. Sont constitués d'une tête hydrophobe et d'une queue hydrophile.
 - c. Peuvent être constitués de cholestérol.
 - d. Constituent l'essentiel de la fraction lipidique des membranes.
 - e. Sont liés à leurs voisins par des liaisons de van der Waals au sein des membranes.
- 3 Le glucose :
 - a. Est un sucre réducteur.
 - b. Possède un groupement aldéhyde.
 - c. Est un hexose.
 - d. Peut être oxydé pour libérer de l'énergie sous forme d'ATP.
 - e. Existe sous plusieurs formes : glucose α et β , fructose α ou β , galactose, linéaire...

- 4** Les polymères glucidiques :
- a. Sont définis comme des polymères dont les monomères sont constitués d'oses.
 - b. Sont hydrophiles.
 - c. Sont structuraux lorsqu'ils sont linéaires.
 - d. Servent de réserves.
 - e. Constituent une importante famille de macromolécules structurales du milieu intracellulaire.
- 5** L'amidon :
- a. Peut libérer du glucose par réduction catalysée une enzyme.
 - b. Est un polymère d' α -glucopyranose.
 - c. Peut être ramifié ou non.
 - d. A la même formule que le glycogène.
 - e. Est le principal glucide de réserve chez les végétaux.
- 6** Les nucléotides :
- a. Contiennent du ribose, et sont donc des oses.
 - b. Contiennent un groupement phosphate.
 - c. Sont les monomères de l'ADN et de l'ARN.
 - d. Peuvent transférer des radicaux d'acides, des électrons, de l'énergie, des ions minéraux.
- 7** Concernant l'ADN et l'ARN :
- a. Ce sont des polymères de bases azotées.
 - b. Ces molécules diffèrent notamment par le fait que l'ADN est double brin et l'ARN simple brin.
 - c. Les deux brins de l'ADN sont antiparallèles, ce qui signifie qu'ils ne sont pas parfaitement alignés, expliquant ainsi la forme en hélice.
 - d. Les bases azotées sont complémentaires deux à deux grâce à des liaisons covalentes A-T et G-C.
 - e. Ce sont des molécules séquencées, et qui peuvent donc porter une information.
- 8** Les acides α -aminés :
- a. Sont des acides, donc chargés négativement à pH neutre.
 - b. Sont liés à leurs voisins par une liaison peptidique au sein des protéines.
 - c. Peuvent être hydrophiles ou hydrophobes.
 - d. Ont des radicaux plus ou moins polaires.
- 9** La liaison peptidique :
- a. Unit deux acides aminés adjacents (structure primaire) ou éloignés (structure secondaire et tertiaire) au sein d'une protéine.
 - b. Peut être soit simple soit double, selon les acides aminés.
 - c. Est une liaison covalente.
 - d. Est le fondement de la structure primaire des protéines.
 - e. Impose une certaine rigidité du squelette peptidique.
- 10** Concernant les niveaux structuraux des protéines :
- a. Les hélices α et feuillets β sont des éléments de structure secondaire.
 - b. La structure quaternaire ne concerne que les très grosses protéines.
 - c. Les liaisons hydrogène entre radicaux sont responsables de la stabilisation des hélices α et feuillets β .

- **d.** Les hélices α sont constituées de radicaux hydrophobes et permettent l'enchâssement des protéines dans les membranes.
- **e.** Les structures secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines sont permises par des liaisons faibles uniquement, contrairement à la structure primaire qui est permise par des liaisons covalentes.

QCM à partir de documents

- 1 La figure 9.23 présente le profil d'hydrophobicité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), impliquée dans la régulation de la pression artérielle et l'entrée des coronavirus dans les cellules humaines.

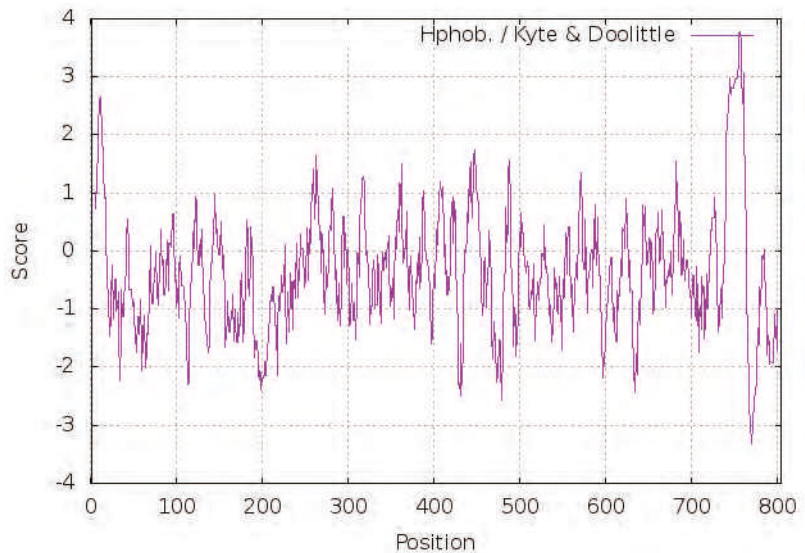


Figure 9.23 Profil d'hydrophobicité de la protéine ACE.

Profil obtenu avec <https://web.expasy.org>

Quelle(s) est (sont) la (les) affirmation(s) correcte(s) ?

- **a.** Cette protéine possède deux hélices α transmembranaires.
- **b.** Chaque acide aminé dont l'index d'hydrophobicité est positif est transmembranaire.
- **c.** On peut faire l'hypothèse que la région située entre les acides aminés 730 et 760 correspond à un domaine transmembranaire.
- **d.** Chaque zone dont l'hydrophobicité est suffisamment grande (supérieure à 1) est une hélice α transmembranaire.

- 2 La figure 9.24 présente la structure d'un filament d'actine, une protéine du cytosquelette des cellules eucaryotes.

Quelle(s) est (sont) la (les) affirmation(s) correcte(s) ?

- **a.** Cette protéine est formée de plusieurs sous-unités liées entre elles par des liaisons faibles.
- **b.** Cette protéine contient de nombreuses hélices α , et est donc probablement transmembranaire.
- **c.** Cette protéine est une enzyme, car elle contient de l'ADP.
- **d.** Chaque sous-unité est de forme globulaire, mais leur association forme une protéine fibrillaire.

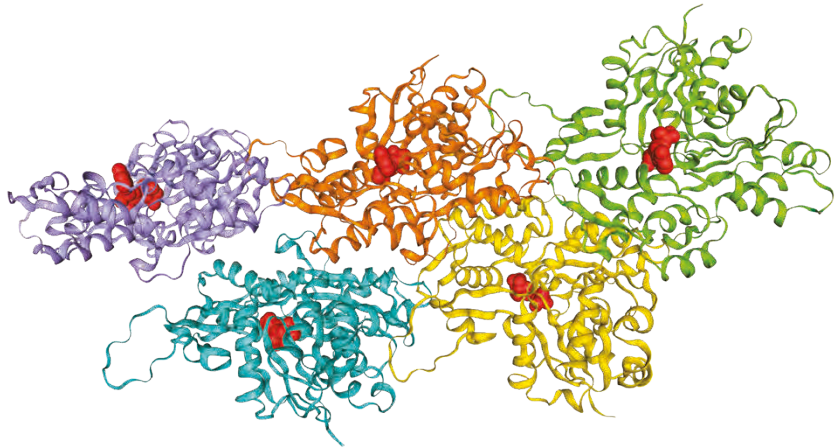


Figure 9.24 Structure d'une portion de filament d'actine.

Les parties rouges représentent des molécules d'ADP, et chaque chaîne peptidique est représentée sous forme d'un ruban de couleur différente.

- 3 La figure 9.25 présente la structure d'une molécule.
- a. C'est un lipide, car elle contient une partie hydrophile et une partie hydrophobe.
 - b. C'est un phospholipide.
 - c. Elle contient un phosphoester formé d'un acide α -aminé et d'un groupement phosphate.
 - d. Elle est probablement membranaire.
 - e. Son hydrolyse peut libérer un phosphate, deux acides gras, un glycérol et un acide α -aminé.
 - f. Elle contient un acide α -aminé et a une forme complexe, donc c'est un peptide.

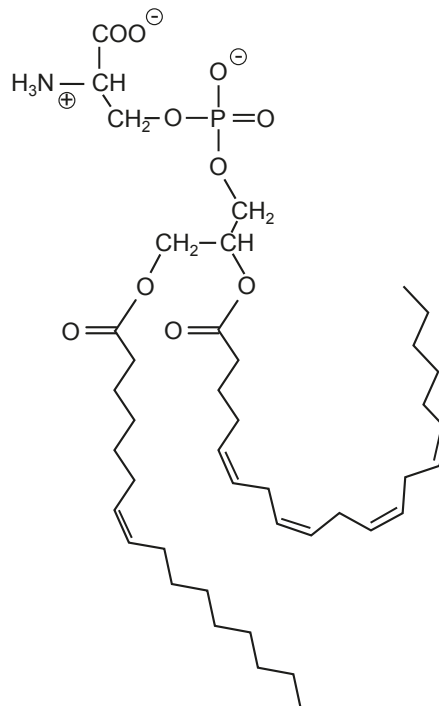


Figure 9.25 Une molécule de la famille des phosphatidylsérines.

Question de synthèse courte

Homopolymères et hétéropolymères.

Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

(Documents modifiés à partir du sujet du concours G2E de 2012)

La tremblante du mouton est une maladie neurodégénérative mortelle. L'injection à un rongeur sain d'un broyat de cerveau d'un mouton mort de cette maladie provoque la maladie : il s'agit donc d'une maladie causée par un agent infectieux, et transmissible d'une espèce à l'autre. On cherche à identifier cet agent infectieux.

Sur un broyat de cerveau de mouton infecté, on a réalisé divers traitements (tableau 9.3).

Tableau 9.3. Effet de divers traitements sur la capacité à infecter de broyats de cerveau de moutons morts de tremblante.

Traitement	Effet
sodium dodecyl sulfate	perte de la capacité à infecter
protéinase K	perte de la capacité à infecter
ribonucléase	conservation de la capacité à infecter
désoxyribonucléase	conservation de la capacité à infecter

- À l'aide du tableau 9.3, déterminez la nature de l'agent infectieux de la tremblante du mouton. La protéine PrP est présente dans le cerveau des moutons sains et infectés. On note cependant que la structure tridimensionnelle de la protéine PrP est différente chez les individus sains ou infectés. On notera PrP^C la forme saine et PrP^{Sc} la forme anormale. On a réalisé un *western blot* (figure 9.26) sur des extraits de cerveau de hamster sain ou malade, avec ou sans protéinase K, en utilisant des anticorps anti-PrP. On donne également la structure tridimensionnelle de PrP^C et PrP^{Sc}.
- Décrivez et interprétez les résultats du *blot* de la figure 9.26.
- À l'aide de la structure des protéines PrP^C et PrP^{Sc}, proposez une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats.

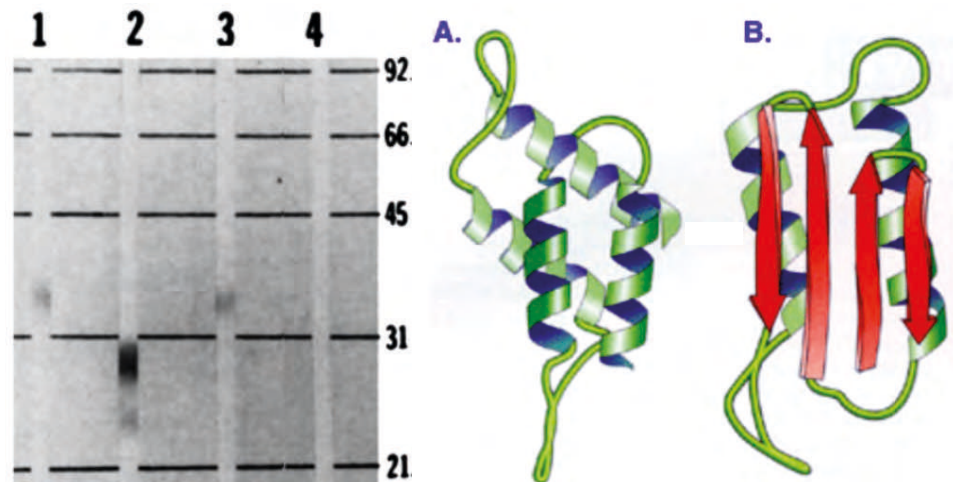


Figure 9.26 Gauche : *western blot* sur des extraits de cerveau de hamster ; droite : structure de PrP^C (A) et de PrP^{Sc} (B).

1 et 2 : individus infectés ; 3 et 4 : individus sains. 1 et 3 : extraits non traités à la protéinase K ; 2 et 4 : extraits traités à la protéinase K.

La [figure 9.27](#) présente un immunomarquage de cerveaux de souris infectées par des extraits de cerveau de mouton malade.

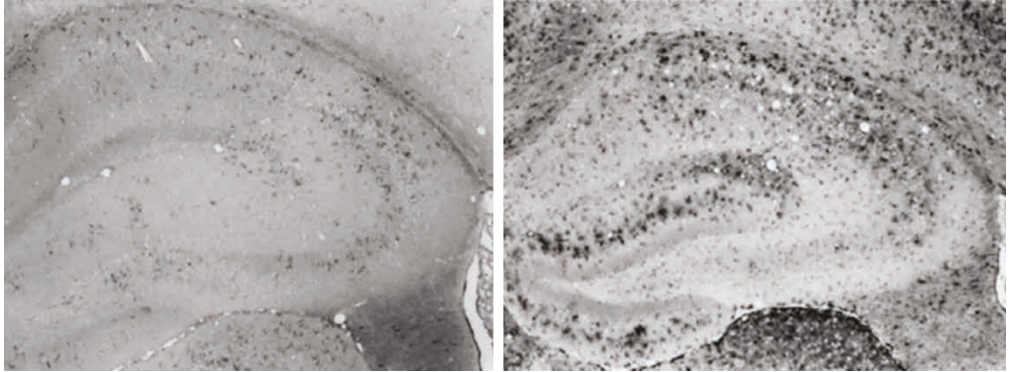


Figure 9.27 Immunomarquage de cerveaux de souris infectées.

Gauche : 60 jours après infection ; droite : 105 jours après infection. L'anticorps primaire anti-PrP détecte PrP^C, PrP^{Sc}, ainsi que d'éventuels produits de la dégradation incomplète de ces deux protéines. L'anticorps secondaire est couplé à une enzyme permettant la formation d'un composé sombre. Échelle : 1 cm = 250 μ m.

- 4 À l'aide de la [figure 9.27](#) et des réponses aux questions précédentes, formulez des hypothèses pouvant expliquer la neurodégénérescence observée dans la tremblante du mouton.

Méthodes d'étude des protéines

Activités pratiques

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Extraction et purification des protéines
- 2 Détermination de la localisation et de la fonction d'une protéine

INTRODUCTION

Les protéines sont des biomolécules aux multiples fonctions, dont l'étude est importante pour comprendre le fonctionnement des cellules et des êtres vivants. On abordera ici quelques-unes des techniques permettant l'extraction, la purification, la détermination de la localisation et de la fonction des protéines. Seules certaines de ces techniques sont réalisables en séances de travaux pratiques en BCPST. D'autres doivent cependant être connues de façon à analyser les documents scientifiques qui s'y réfèrent.

1 Extraction et purification des protéines

1.1 Principes de l'électrophorèse et du *western blot*

a) L'électrophorèse : séparation des protéines par un champ électrique

Une **électrophorèse** est une migration d'une molécule dans un gel soumis à un champ électrique. Elle est applicable à toute molécule chargée, qui subit alors la force :

$$\vec{F} = q\vec{E}$$

où \vec{F} désigne la force (en newton), q la charge de la molécule (en coulomb) et \vec{E} le champ électrique en ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$).

Une protéine est en général chargée du fait de ses radicaux acides (charge négative) ou basiques (charge positive). Elle peut donc migrer au cours d'une électrophorèse. La mobilité électrophorétique d'une protéine dépend de sa charge, mais également de sa taille (nombre d'acides aminés).

- L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Une électrophorèse peut être réalisée en conditions non dénaturantes, aussi appelées conditions natives. Dans ce cas, la protéine ne subit pas de modifications avant l'électrophorèse. Son sens de migration dépend de sa charge (positive ou négative selon la nature de ses acides aminés et le pH).

On appelle **point isoélectrique**, ou **pH isoélectrique** (noté pHi) la valeur de pH pour laquelle la protéine est électriquement neutre. Cette valeur est très variable selon la protéine :

- pour $\text{pH} < \text{pHi}$: la protéine a une charge nette positive ;
- pour $\text{pH} > \text{pHi}$: la protéine a une charge nette négative.

Voir chapitre 9, § 4.1
et Rabat de
couverture 3

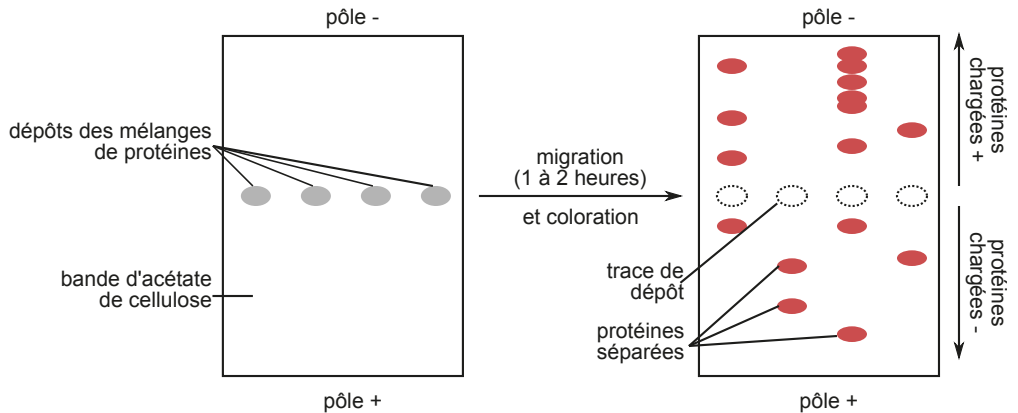


Figure TP7.1 Principe de l'électrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose en conditions non dénaturantes.

Application : migration électrophorétique des protéines du blanc d'œuf de poule en conditions non dénaturantes.

Objectif : on cherche à déterminer le nombre de protéines présentes dans le blanc d'œuf de poule, et les valeurs de leur point isoélectrique.

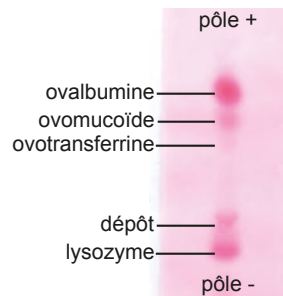


Figure TP7.2 Résultat de l'électrophorèse non dénaturante de blanc d'œuf sur gel d'acétate de cellulose sur tampon tris-véronal à pH 9,2.

Le dépôt a été réalisé au centre de la bande, car des protéines peuvent potentiellement migrer dans les deux directions. À l'issue de la manipulation, les protéines ont été colorées au rouge ponceau. Les identifications de protéines (légendées sur le gel) ne sont possibles que par migration concomitante de protéines témoin purifiées (non représentées ici). On observe quatre bandes : trois protéines chargées négativement (ovalbumine, ovomucoïde et ovotransferrine, de $pH_i < pH = 9,2$) et une protéine chargée positivement (lysozyme, de $pH_i > pH = 9,2$)

• L'électrophorèse en conditions dénaturantes

Une électrophorèse peut être réalisée en conditions dénaturantes. La protéine subit alors au préalable une dénaturation totale par un détergent anionique, qui lui confère une charge négative (figure TP7.3). Grâce à ce traitement, les protéines migrent uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Cette technique permet donc de déterminer la longueur d'une protéine.

La distance de migration des protéines en électrophorèse dénaturante est une fonction affine du logarithme de leur poids moléculaire. La détermination du poids moléculaire d'une protéine donnée requiert donc :

- la mesure de la distance de migration de plusieurs protéines-marqueurs de poids moléculaires connus ;
- la construction d'une droite d'étalonnage dans un repère semi-logarithmique.

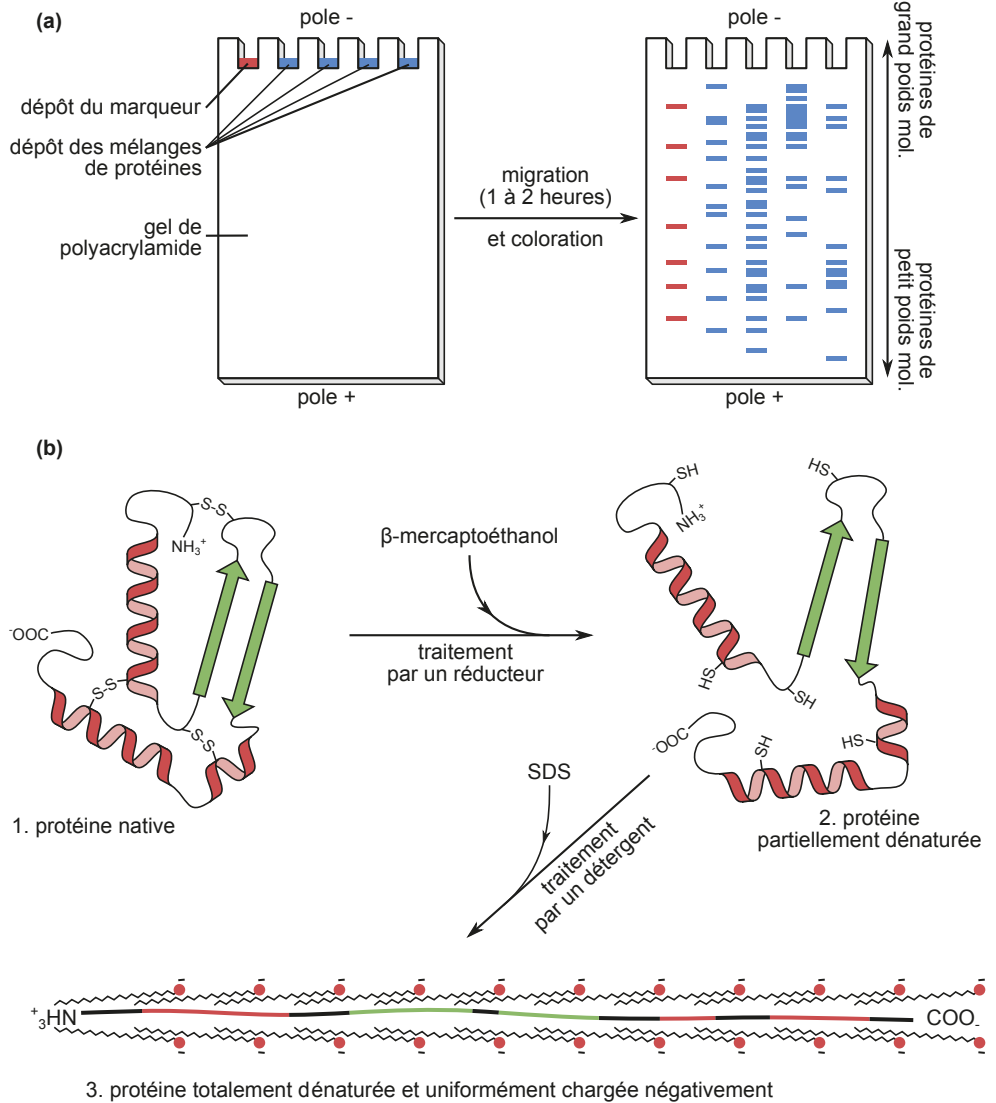


Figure TP7.3 Principe de l'électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide.

(a) Principe de l'électrophorèse. Des protéines sont déposées dans un puits dans le gel, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (en rouge) permettant de déterminer le poids moléculaire des fragments.

(b) Principe du double traitement dénaturant préalable à l'électrophorèse. Les protéines sont traitées par un réducteur (ici le β -mercaptoéthanol) de façon à détruire les ponts disulfure, puis dénaturées grâce à un détergent (ici le dodécylsulfate de sodium, ou SDS) qui fait perdre à la protéine sa structure tridimensionnelle et la charge négativement. L'acronyme anglais *SDS-PAGE* (pour *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, c'est-à-dire électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes) est couramment utilisé, y compris par des francophones.

Voir chapitre 8, § 3.2d

La construction de la droite d'étalonnage de la [figure TP7.4](#) permet de déduire la taille des trois protéines étudiées, qui est donnée dans le [tableau TP7.1](#).

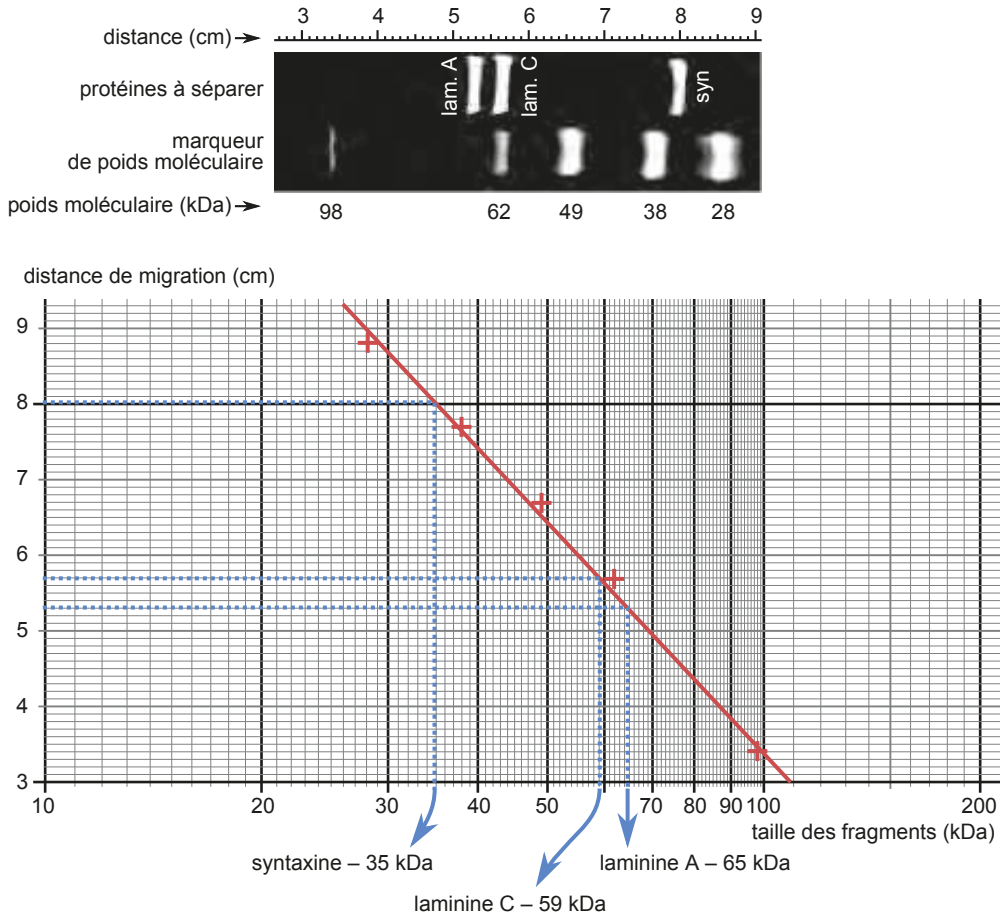


Figure TP7.4 Détermination du poids moléculaire de trois protéines (la laminine A, la laminine C et la syntaxine).

Des extraits cellulaires contenant ces trois protéines ont subi une électrophorèse dénaturante, en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire contenant cinq protéines de taille connue.

On a construit le graphe de la distance de migration (mesurée sur le gel) en fonction de la taille des fragments. Il est fait sur un papier semi-logarithmique. Les points sont alignés (résultat qui peut être vérifié par une régression linéaire), ce qui permet de déterminer la taille des trois protéines étudiées par lecture graphique.

(Avec l'aimable autorisation d'Armel Nicolas, Mass Spectrometry Proteomics Service, Life Science Facilities, Institute of Science and Technology, Klosterneuburg, Autriche).

Tableau TP7.1 Poids moléculaire déterminé et théorique pour les trois protéines étudiées dans l'électrophorèse de la figure TP7.4.

Protéine	Poids moléculaire déterminé	Poids moléculaire théorique
laminine A	65 kDa	70 kDa
laminine C	59 kDa	62 kDa
syntaxine	35 kDa	34 kDa

On notera des différences importantes entre les valeurs mesurées expérimentalement et les valeurs théoriques. Elles peuvent être expliquées par le fait que la loi affine qui relie la distance de migration au logarithme du poids moléculaire des protéines n'est qu'une approximation correcte de la réalité. En effet, si la longueur d'un peptide et son poids moléculaire sont fortement corrélés, une certaine variabilité existe quant au poids moléculaire des différents acides aminés, ce qui peut expliquer les difficultés à déterminer le poids moléculaire d'une protéine par une simple électrophorèse.

b) Le *western blot* : une détection spécifique d'une protéine après une électrophorèse

Le *western blot* (figure TP7.5) est une technique permettant la séparation et la détection d'une protéine à partir d'un mélange. Il consiste en une électrophorèse dénaturante suivie d'un transfert sur une membrane poreuse ; la protéine d'intérêt est par la suite détectée spécifiquement par l'utilisation d'anticorps. Le *western blot* permet d'identifier formellement la présence d'une protéine dans un mélange. Il est utilisé quotidiennement en recherche et a de nombreuses applications, notamment dans l'analyse médicale.

Remarque

Le terme *blot* signifie « tache » ou « buvard » en anglais ; il fait référence au transfert des protéines sur la membrane. Le *western blot* dérive du *Southern blot*, inventé par Edwin Southern ; le nom *western blot* est donc un jeu de mot basé sur le nom de l'inventeur de ce type de techniques.

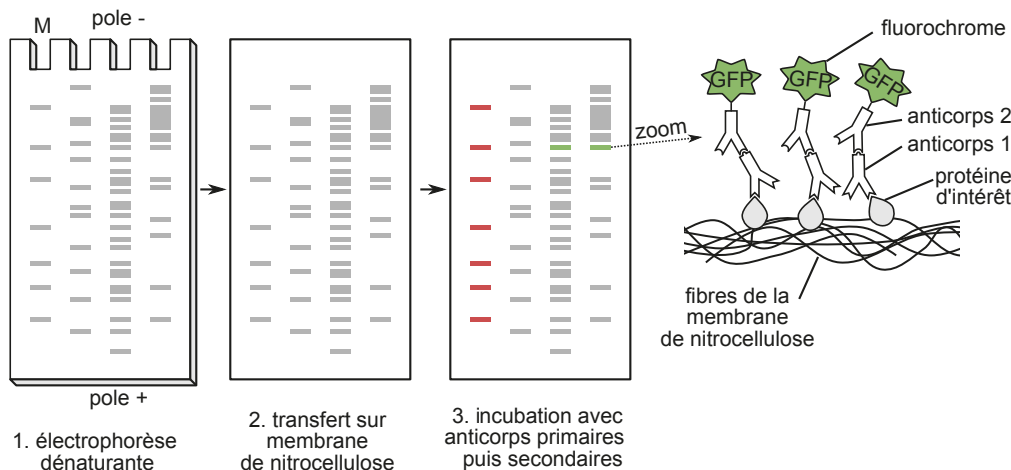


Figure TP7.5 Principe du *western blot*.

L'étape 3 correspond à la détection de la protéine d'intérêt par des anticorps. On notera qu'un marqueur de poids moléculaire est toujours présent et révélé (ici noté M) bien que ce point ne soit pas détaillé dans le protocole. NB : les protéines représentées en gris sur l'électrophorégramme et sur la membrane sont invisibles avant toute révélation.

1.2 Principe de la chromatographie d'affinité

La **chromatographie d'affinité** est une technique de purification d'une protéine d'un mélange basée sur son affinité pour un ligand. Elle consiste en la percolation du mélange à travers un gel ayant une affinité pour cette protéine d'intérêt (figure TP7.6). Contrairement aux chromatographies dites sur couche mince, qui permettent une séparation de très petites quantités de molécules dans un seul but d'analyse, les chromatographies d'affinité permettent la purification d'une grande quantité d'une protéine, et peuvent être utilisées à l'échelle industrielle.

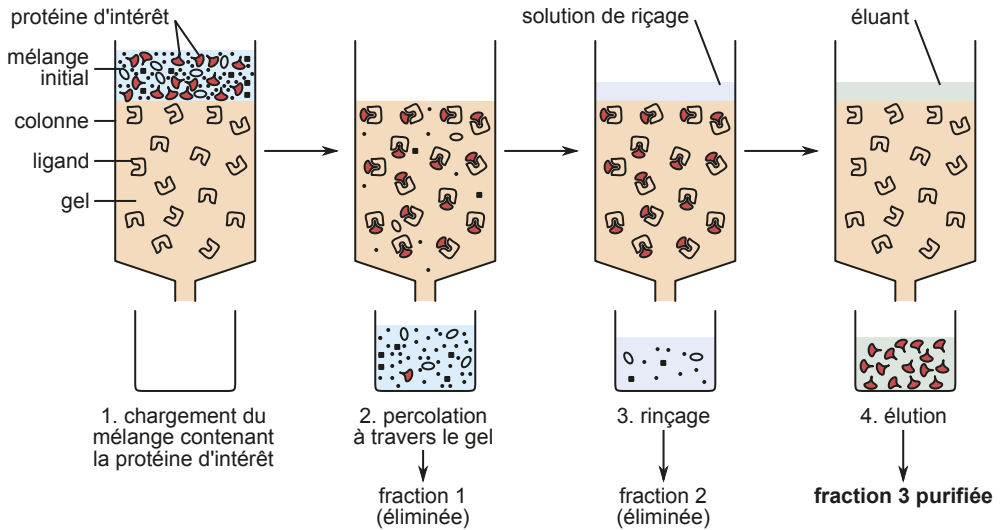


Figure TP7.6 Principe de la chromatographie d'affinité.

Un mélange de protéines à séparer (1) est mis à percoler (2) à travers un gel poreux qui contient une molécule (ligand) ayant une affinité pour une protéine d'intérêt présente dans le mélange. Cette protéine est spécifiquement séquestrée par le gel après lavage (3), et on la récupère après traitement par un éluant, qui rompt les interactions protéine-ligand (4). On récupère ainsi une fraction contenant la protéine d'intérêt purifiée.

Voir chapitre 9,
§ 4.4b

1.3 Application : purification de la protéine NOV

Chez les mammifères, NOV (*nephroblastoma overexpressed*) est une protéine extracellulaire de 48 kDa interagissant avec la matrice extracellulaire, et en particulier avec les glycosaminoglycane. Elle est impliquée dans la prolifération de cellules cancéreuses.

a) Chromatographie d'affinité

On cherche à produire et purifier la protéine NOV. On suit le protocole suivant :

- On cultive des cellules préalablement modifiées de façon à produire la protéine NOV, en milieu liquide, dans une boîte de Petri.
- Après 48 h de culture, on récupère le surnageant de la culture cellulaire. Il devrait normalement contenir la protéine NOV, qui est une protéine sécrétée.
- On fait subir à ce surnageant une chromatographie d'affinité en utilisant un gel constitué d'héparine, un glycosaminoglycane pour lequel la protéine NOV a une affinité.
- L'élution utilise une solution de NaCl à $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$.

b) Analyse du résultat de la chromatographie d'affinité par SDS-PAGE et western blot

Chaque fraction récupérée lors de la chromatographie d'affinité est analysée à la fois par SDS-PAGE (électrophorèse dénaturante) et par *western blot*. Le résultat est présenté dans la [figure TP7.7](#).

On observe dans la [figure TP7.7](#) que la protéine NOV est présente dans le surnageant total mais pas dans le filtrat primaire (*western blot*) : elle a donc été totalement fixée dans le gel. En revanche, elle est présente dans la fraction issue de l'élution, en particulier les fractions 1 et 2. La fraction « élution 1 » contient beaucoup d'autres protéines (SDS-PAGE), et n'est donc pas pure. La fraction « élution 2 » en revanche ne contient quasiment que la protéine NOV : **il s'agit donc de la fraction purifiée.**

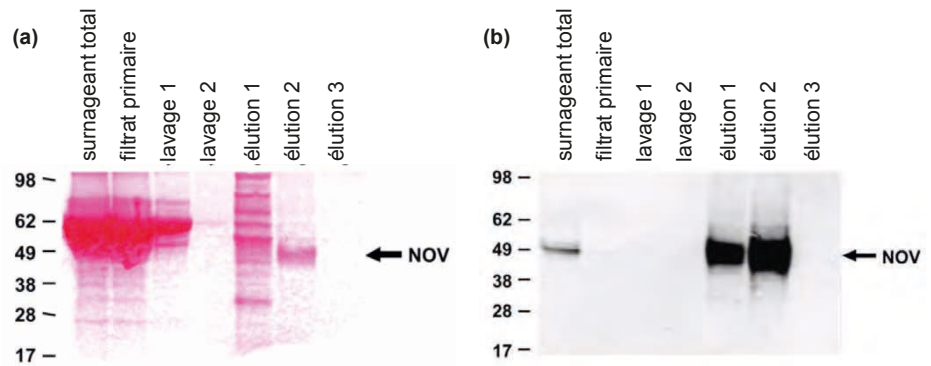


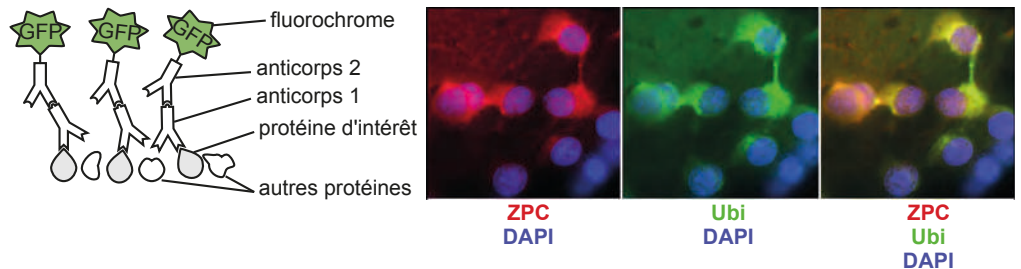
Figure TP7.7. Analyse par SDS-PAGE (a) et par *western blot* (b) de la composition des diverses fractions isolées par chromatographie d'affinité.

Surnageant total : échantillon initial non purifié. Filtrat primaire : première fraction récupérée. Lavages 1 et 2 : deux fractions successives obtenues après un ou deux lavages à l'eau. Élution 1, 2 et 3 : trois fractions successives obtenues après un, deux ou trois lavages avec une solution de NaCl à 0,8 mol.L⁻¹. Les tailles des protéines, en kDa, sont données à gauche de chacune des deux images. Les anticorps utilisés pour le *western blot* sont des anticorps anti-NOV. (Modifié d'après Bohr et al., 2010, *PLoS ONE* 5(12): e16000).

2 Détermination de la localisation et de la fonction d'une protéine

2.1 Principe de l'immunomarquage

L'**immunomarquage** (figure TP7.8) consiste en une détection spécifique d'une protéine par un **anticorps *in situ***, c'est-à-dire directement sur une préparation biologique (habituellement une coupe fine).



(a) principe de l'immunomarquage. (b) immunomarquage de ZPC et de l'ubiquitine.

Figure TP7.8 Principe et exemple d'immunomarquage.

(a) Après fixation des tissus et perméabilisation des membranes, les tissus sont traités par un anticorps primaire qui se fixe spécifiquement à la protéine d'intérêt. Après lavage, les tissus sont traités par un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire a été au préalable modifié de façon à être détectable (radioactif, couplé à une enzyme, à une bille métallique, ou comme ici, à un fluorochrome). (b) Exemple d'immunomarquage. Dans des cellules d'ovaire, on a détecté les protéines ZPC (fluorochrome rouge) et ubiquitine (fluorochrome vert), ainsi que les noyaux, par coloration de l'ADN au DAPI (bleu). La 3^e image présente la superposition des deux fluorescences. La localisation des deux protéines est cytoplasmique, et le marquage jaune (droite) indique que les deux protéines colocalisent, donc sont probablement en interaction. (Modifié d'après Zimmerman et al., 2011., *PLoS ONE* 6(2): e17256).

Remarque

Dans le cas où l'anticorps est lié à un fluorochrome, c'est un microscope à fluorescence qui permet la visualisation de la localisation de la protéine, et on parlera alors d'immunofluorescence.

2.2 Principe et intérêt de la mutagenèse et de la transgénèse

La **mutagenèse** consiste à modifier la séquence de nucléotides d'un gène. L'organisme portant la séquence modifiée est dit mutant. La comparaison du phénotype d'un organisme portant une mutation pour laquelle le gène est non fonctionnel (mutation dite *perte de fonction*) au phénotype d'un témoin non muté, dit sauvage, permet de déduire la fonction du gène, c'est-à-dire la fonction de la protéine produite par expression du gène considéré.

La **transgénèse** consiste à introduire un gène étranger (dit *transgène*) dans le génome d'un organisme. On parlera alors d'organisme transgénétique, ou génétiquement modifié. Comme pour la mutagenèse, la comparaison du phénotype de l'organisme transgénétique à celui du témoin sauvage permet de déduire la fonction du gène introduit, c'est-à-dire la fonction de la protéine produite par expression artificielle du gène considéré.

2.3 Application : les protéines des globules rouges

a) La protéine AHSP et la conformation de l'hémoglobine

Les globules rouges des vertébrés sont des cellules spécialisées dans le transport du dioxygène grâce à l'hémoglobine. Cette protéine est constituée de deux sous-unités α et deux sous-unités β .

- Analyse de la fonction de la protéine AHSP par mutagenèse

ASHP est une protéine du cytosol des globules rouges. Par mutagenèse aléatoire on a engendré des souris **mutantes homozygotes** pour le gène codant ASHP. Le génotype mutant est noté $-/-$, et le génotype sauvage $+/+$.

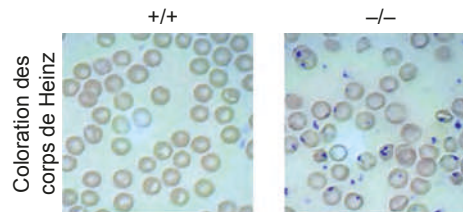


Figure TP7.9 Observation d'un frottis de sang d'une souris sauvage (gauche) et mutée (droite).

Les frottis ont été colorés au cristal violet, qui permet de colorer les corps de Heinz (structures formées par des agglomérats de chaînes dénaturées d'hémoglobine). (Modifié d'après le sujet de l'épreuve B du concours A-BCPST de 2012).

Sur la [figure TP7.9](#), on observe que les hématies des souris mutées présentent des corps de Heinz (en moyenne, un corps de Heinz par hématie), alors que les hématies des souris sauvages n'en contiennent pas. On en déduit que la protéine AHSP est impliquée dans l'acquisition ou le maintien de la forme tridimensionnelle de l'hémoglobine. On peut donc faire l'hypothèse que ASHP est une chaperonnine.

- **Analyse du mode d'action de AHSP par électrophorèse non dénaturante**

On a réalisé une électrophorèse non dénaturante de globine α et de AHSP dans les conditions décrites dans la [figure TP7.10](#).

Voir chapitre 9,
§ 4.4a

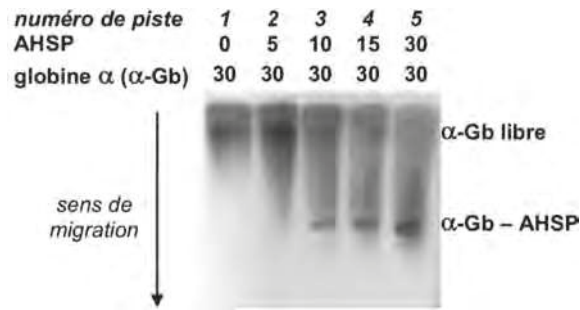


Figure TP7.10 Électrophorèse de globine α et AHSP en conditions non dénaturantes.

On incube la protéine AHSP avec des quantités variables de globine α . Les interactions entre AHSP et les globines α sont analysées par électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose en conditions non dénaturantes. Une fois la migration achevée, les bandes sont colorées avec de la benzidine, un composé qui se fixe uniquement à la globine α . Les concentrations (exprimées en $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en AHSP et en globine α (α -Gb) sont indiquées au-dessus de chaque piste. (Modifié d'après le sujet de l'épreuve B du concours A-BCPST de 2012).

La globine α seule (piste 1) migre à une distance donnée, identifiée sur le gel (α -Gb libre). Lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de AHSP (pistes 2 à 5), on constate :

- que la bande correspondant à l' α -Gb libre est de moins en moins intense ;
- l'apparition d'une autre bande, à une distance de migration plus grande (identifiée comme « α -Gb libre – AHSP »).

On déduit de ces observations que la migration de l' α -Gb est modifiée par la présence de AHSP : AHSP se fixe donc sur la α -Gb.

On a vu précédemment que AHSP permet le repliement tridimensionnel correct de l'hémoglobine. C'est donc par une **fixation sur l'hémoglobine** que AHSP joue ce rôle.

On notera que ce résultat n'a pu être obtenu que parce que l'électrophorèse réalisée est **non dénaturante**, ce qui a préservé les interactions entre AHSP et la globine.

b) Le paludisme et l'infection des hématies par *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum (*P. f.*) est un eucaryote unicellulaire qui parasite les globules rouges, ce qui cause une maladie grave : le paludisme. Certaines personnes possédant l'allèle β^C du gène de la globine β sont moins sensibles au paludisme que les personnes homozygotes pour l'allèle β^A sauvage. On cherche à comprendre cette sensibilité différente. Parmi les nombreuses protéines produites par *P. f.* figure la protéine PfEMP1, qui pourrait être impliquée dans cette résistance.

- **Identification par immunofluorescence de la localisation subcellulaire de PfEMP1 dans les globules rouges infectés (figure TP7.11)**

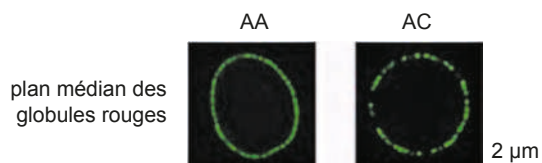


Figure TP7.11 Immunofluorescence sur des globules rouges infectés.

On utilise un anticorps primaire dirigé contre la protéine PfEMP1, et un anticorps secondaire fixé de façon covalente à la GFP (pour *green fluorescent protein*, la protéine fluorescente verte). On observe le résultat au microscope confocal ; ce type de microscope à fluorescence permet d'étudier une coupe plane donnée de l'échantillon (coupe optique). AA et AC désignent respectivement les génotypes homozygote β^A/β^A et hétérozygote β^A/β^C . (Modifié d'après le sujet de l'épreuve B du concours A-BCPST de 2012).

On constate que le marquage fluorescent est localisé au niveau d'une structure très fine (de l'ordre d'une dizaine de nanomètres tout au plus) et entourant totalement la cellule, de façon continue. Cette zone correspond probablement à la membrane plasmique de la cellule. Pour le génotype β^A/β^A , le marquage est continu alors que pour le génotype β^A/β^C , il est discontinu et moins intense. PfEMP1 est donc une **protéine membranaire** présente en plus grande quantité chez le sauvage que chez l'individu β^A/β^C . L'allèle β^C provoque donc une diminution de la production et/ou de l'adressage de la protéine PfEMP1 à la membrane plasmique du globule rouge.

- **Identification d'un ligand de PfEMP1 par transgénèse**

La défense de l'organisme contre une infection par *P. f.* passe notamment par l'activation de lymphocytes NK (*natural killer*) par les globules rouges infectés. On va ici aborder quelques aspects de cette activation.

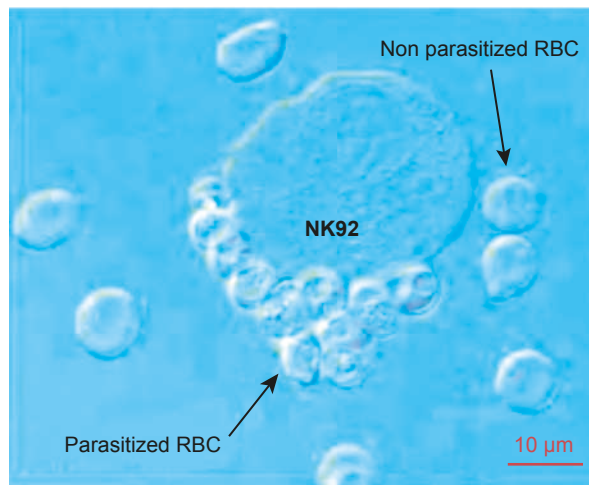


Figure TP7.12. Observation au microscope optique de lymphocytes NK mis au contact de globules rouges infectés (parasitized RBC) et non infectés (non parasitized RBC) par *P. f.* (D'après Baratin et al., 2007, *PLoS ONE* 2(2): e228).

Dans la [figure TP7.12](#), on observe que les globules rouges infectés se fixent sur les lymphocytes NK, alors que les globules rouges non infectés ne s'y fixent pas. Il existe donc une reconnaissance par les lymphocytes NK des cellules infectées.

De nombreuses protéines de la membrane des lymphocytes NK sont impliquées dans l'adhérence cellulaire. Parmi elles, on suspecte la protéine ICAM (*intercellular adhesion molecule*) d'être impliquée dans l'interaction entre les lymphocytes NK et les globules rouges infectés. Pour tester cette hypothèse, on met au point une stratégie expérimentale basée sur la transgénèse. Le protocole et les résultats sont présentés dans la [figure TP7.13](#).

On observe une radioactivité faible dans les deux cas où les cellules CHO n'ont pas été mises en contact avec des hématies infectées, qui correspond à la radioactivité basale des échantillons (témoin négatif, qui n'a donc pas à être interprété).

On observe une radioactivité de 100 % (par définition) quand les cellules CHO transgéniques sont en contact avec les hématies infectées, mais cette radioactivité n'est que de 30 % quand les cellules CHO ne sont pas transgéniques, et n'expriment donc pas le gène *ICAM*. On en déduit que **l'expression de ICAM est responsable de la fixation des hématies infectées** sur les cellules CHO.

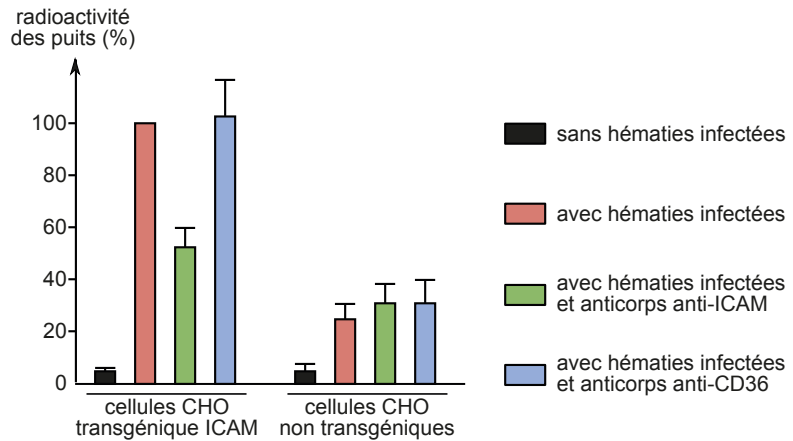


Figure TP7.13. Interactions entre la protéine ICAM et des hématies infectées.

On a engendré une lignée de cellules d'ovaire de hamsters transgéniques (cellules CHO), qui expriment le gène humain *ICAM* ; les cellules CHO sauvages n'expriment pas *ICAM*. Parallèlement, on a infecté des hématies humaines avec *P. f.* dans un milieu radioactif. On fixe les cellules CHO au fond d'un puits ; on met en contact les hématies avec les cellules CHO pendant 2 h, puis on rince le milieu pour éliminer les cellules non fixées. Cette expérience est réalisée dans plusieurs conditions : avec des cellules CHO transgéniques ou non transgéniques, avec des hématies infectées ou non, en présence ou non d'anticorps anti-*ICAM* ou anti-*CD36* (*CD36* est une protéine non produite par les cellules CHO ni par les hématies). Les résultats sont donnés en pourcentage de radioactivité par rapport à la situation avec hématies infectées et cellules transgéniques, sans anticorps (barre rouge). On admettra que le non recoupement des barres d'erreur est nécessaire et suffisant pour affirmer que les différences observées sont significatives. (Modifié d'après Joergensen et al., 2010, *PLoS Pathog* 6(9): e1001083).

On teste l'influence de deux anticorps sur la fixation des hématies infectées. Dans le cas où les cellules CHO sont transgéniques, on constate avec traitement par un anticorps anti-*ICAM* une diminution de moitié de la radioactivité par rapport au témoin non traité. L'anticorps empêche donc la fixation des hématies infectées. On n'observe pas de diminution de la radioactivité par rapport au témoin dans le cas où l'anticorps est dirigé contre une autre protéine (*CD36*). C'est donc bien **la fixation spécifique de l'anticorps anti-*ICAM* sur *ICAM*** qui provoque la diminution de la fixation des hématies sur les cellules CHO transgéniques.

Bilan : c'est bien la protéine ICAM qui permet la fixation des lymphocytes sur les hématies infectées par *Plasmodium falciparum*.

Pour les cellules CHO non transgéniques, on observe une radioactivité de l'ordre de 30 %, bien plus élevée que la radioactivité basale sans hématies (5 %). Les hématies sont donc capables de se fixer sur les cellules CHO sans protéine *ICAM*. On peut interpréter ce résultat en formulant l'hypothèse selon laquelle *ICAM* ne serait pas la seule protéine potentiellement impliquée dans une interaction entre les globules rouges infectés et les lymphocytes NK. Il manque cependant un témoin avec hématies **non infectées**, qui permettrait de vérifier si l'adhérence entre cellules CHO non transgéniques et hématies est provoquée par l'infection, ou si elle correspond à un niveau basal indépendant de l'infection.

D'autres expériences permettent de montrer que *ICAM* interagit avec PfEMP1.