

mini **manuel**

Biochimie

Cours + Exos + QCM/QROC

5^e édition

Paul-François Gallet

Maître de conférences à l'université de Limoges

Stéphanie Durand

Maître de conférences à l'université de Limoges

Sébastien Legardinier

Maître de conférences à l'université de Limoges

Michel Guilloton

Professeur honoraire à l'université de Limoges

DUNOD



Pour aller plus loin et mettre toutes les chances de votre côté, des ressources **complémentaires** sont disponibles sur le site www.dunod.com

Connectez-vous à la page de l'ouvrage (grâce aux menus déroulants, ou en saisissant le titre, l'auteur ou l'ISBN dans le champ de recherche de la page d'accueil). Sur la page de l'ouvrage, sous la couverture, cliquez sur le lien « LES + EN LIGNE ».

NOUS NOUS ENGAGEONS EN FAVEUR DE L'ENVIRONNEMENT :



Nos livres sont imprimés sur des papiers certifiés pour réduire notre impact sur l'environnement.



Le format de nos ouvrages est pensé afin d'optimiser l'utilisation du papier.



Depuis plus de 30 ans, nous imprimons 70 % de nos livres en France et 25 % en Europe et nous mettons tout en œuvre pour augmenter cet engagement auprès des imprimeurs français.



Nous limitons l'utilisation du plastique sur nos ouvrages (film sur les couvertures et les livres).

Comment utiliser ce Mini-Manuel ?

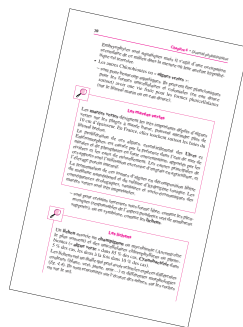
La page d'entrée de chapitre



Elle donne le plan du cours, ainsi qu'un rappel des objectifs pédagogiques du chapitre.

Le cours

Le cours, concis et structuré, expose les notions importantes du programme.



Les rubriques



Une erreur à éviter



Un peu de méthode

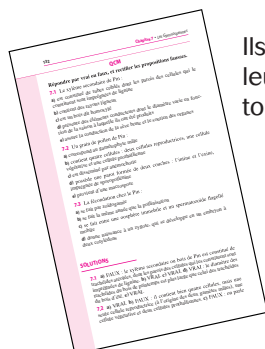


Un exemple pour comprendre



Les points clés à retenir

Les exercices, QCM



Ils sont proposés en fin de chapitre, leur solution est en ligne, pour se tester tout au long de l'année.

Table des matières

1	Protéines	1
1.1	Introduction : la diversité des protéines	1
1.2	Acides aminés	3
	a) Constitution des acides aminés	3
	b) Isomérisie optique des acides aminés	7
	c) Propriétés liées aux chaînes latérales (ou radicaux)	8
	d) Propriétés dues à la présence des fonctions amine et carboxyle	10
1.3	Les protéines : des polymères d'acides aminés	13
	a) La liaison peptidique	13
	b) Détermination de la composition en acides aminés	15
	c) Détermination de la structure primaire des polypeptides	15
	d) Structure secondaire des protéines	15
	e) Conformation des protéines globulaires (structure tertiaire)	23
	f) Structure quaternaire des protéines	26
1.4	Propriétés des protéines	27
	a) Solubilité des protéines globulaires	28
	b) Purification des protéines	28
	c) Stabilité des protéines	30
	Points clés	35
	Exercices	36

2	Acides nucléiques	38
2.1	Introduction	38
2.2	Les nucléotides	40
	a) Constitution d'un nucléotide	40
	b) Conformation d'un nucléotide : la liaison N - β -glycosidique	42
	c) Conformation d'un nucléotide : stéréochimie du sucre	43
	d) Modification des nucléotides	44
2.3	Les acides nucléiques : des polymères de nucléotides	44
	a) La liaison phosphodiester	44
	b) L'appariement des bases	45
	c) Les éléments structuraux déterminant la conformation des acides nucléiques	46
2.4	La structure secondaire des acides nucléiques	47
	a) La découverte de la double hélice d'ADN	47
	b) L'ADN-B (la structure de Watson et Crick)	49
	c) L'ADN-A	49
	d) L'ADN-Z	49
	e) Les structures secondaires des ARN	50
2.5	La structure tertiaire des acides nucléiques	52
	a) Bases moléculaires de la structure tertiaire	52
	b) Les superstructures de l'ADN	53
2.6	Les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques	56
	a) Solubilité et purification des acides nucléiques	56
	b) Propriétés optiques des acides nucléiques	57
	c) Stabilité des acides nucléiques	58
	Points clés	64
	Exercices	66

3	Glucides	67
	3.1 Les oses	67
	a) Dénomination des oses	67
	b) Isomérisation des oses	68
	c) Structure cyclique des oses	70
	d) Conformation des oses	71
	e) Oses modifiés	72
	3.2 Les osides	76
	a) Formation de la liaison osidique	77
	b) Holosides	77
	c) Hétérosides	85
	Points clés	86
	Exercices	86
4	Lipides, membranes biologiques et transports	88
	4.1 Les acides gras	89
	a) Les acides gras saturés	89
	b) Les acides gras insaturés	90
	c) Les dérivés des acides gras poly-insaturés	93
	d) Les acides gras hydroxylés et méthylés	94
	e) Les propriétés physiques des acides gras	95
	f) Les acylglycérols	95
	4.2 Les lipides des membranes biologiques	97
	a) Les glycérophospholipides	97
	b) Les sphingolipides	100
	c) Le cholestérol	103
	4.3 Les membranes biologiques	107
	a) Propriétés des lipides membranaires	107
	b) Les protéines membranaires	108
	c) Les mouvements moléculaires dans la membrane	109

4.4	Le transport membranaire	110
a)	Le transport passif facilité	110
b)	Les canaux ioniques	112
c)	Le transport actif	113
	Points clés	116
	Exercices	117
5	Propriétés et cinétiques enzymatiques	119
5.1	Propriétés générales des enzymes	119
a)	Constitution des enzymes	119
b)	Classification des enzymes	121
5.2	Catalyse enzymatique	122
a)	Notion de site actif	122
b)	Caractères communs à tous les catalyseurs	122
c)	Caractères spécifiques de la catalyse enzymatique	125
d)	Un exemple de catalyse : l'hydrolyse de la liaison peptidique	127
5.3	Cinétique enzymatique	131
a)	Conditions expérimentales	131
b)	Notion de « vitesse initiale »	132
c)	Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale	133
d)	Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale	133
e)	Expression algébrique de la vitesse d'une réaction enzymatique	135
f)	Interprétation des paramètres cinétiques	136
g)	Détermination graphique de K_m et V_{max}	140
5.4	Inhibitions des réactions enzymatiques	142
a)	Inhibitions réversibles	142
b)	Inhibitions irréversibles	147

5.5	Contrôle de l'activité des enzymes	149
a)	Changements de structure par protéolyse limitée	149
b)	Modification covalente des résidus	150
c)	Modifications non covalentes : régulation de l'activité des enzymes allostériques	150
5.6	Coopérativité et allostérie	151
a)	Cinétiques coopératives	151
b)	Effecteurs allostériques positifs et négatifs	153
c)	Simulation des courbes de saturation	155
d)	Modèles de transitions allostériques	157
	Points clés	162
	Exercices	163
6	Dégradations et production de l'énergie	167
6.1	Vue d'ensemble des voies de dégradation	167
6.2	Glycolyse et fermentations	170
a)	Déroulement général de la glycolyse	170
b)	Phase préparatoire de la glycolyse : investissement d'énergie et formation des trioses phosphates	170
c)	Phase de remboursement de la glycolyse : récupération de l'énergie et formation du pyruvate	173
d)	Équation bilan de la glycolyse : du glucose au pyruvate	173
e)	Glycolyse anaérobie et fermentations	173
f)	Régulation de la glycolyse	175
6.3	Catabolisme digestif et tissulaire des glucides	177
a)	La dégradation tissulaire du glycogène (ou glycogénolyse)	177
b)	Le catabolisme digestif des glucides	180
6.4	La voie des pentoses phosphates	182
a)	Rôles métaboliques de la voie des pentoses phosphates	182
b)	Les deux phases de la voie des pentoses phosphates	183
c)	Bilan de la voie des pentoses phosphates	183

6.5	Décarboxylation oxydative du pyruvate	186
a)	Le complexe multi-enzymatique de la pyruvate déshydrogénase	187
6.6	Catabolisme oxydatif de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs	190
a)	Réactions du cycle de Krebs	190
b)	Régulation du cycle de Krebs	193
c)	Bilan de l'oxydation complète du glucose	193
d)	Rôles des intermédiaires du cycle et réactions anaplérotiques	194
6.7	Catabolisme des acides gras par bêta-oxydation	195
a)	Activation et transport des chaînes d'acides gras	195
a)	β -oxydation	197
b)	Bilan de la β -oxydation des acides gras	199
c)	Rôle central de l'acétyl-CoA	199
	Points clés	200
	Exercices	201
7	Les oxydations phosphorylantes	204
7.1	La chaîne respiratoire	204
7.2	Transporteurs d'électrons	206
7.3	Chaîne des transporteurs mitochondriaux	208
7.4	Couplage du transfert d'électrons avec l'établissement de la force proton-motrice	210
a)	Mise en évidence du couplage énergétique	210
b)	Théorie chimio-osmotique de Mitchell	211
c)	Propriétés et organisation de la membrane interne	212
d)	Stœchiométries des transferts de protons	213
e)	Calcul de la force proton-motrice	217

7.5	Utilisation de la force proton-motrice pour la production d'ATP	220
a)	L'ATP synthase mitochondriale	220
b)	Rendement de la production d'ATP	222
7.6	Régulation des oxydations phosphorylantes	223
	Points clés	226
	Exercices	227
8	Biosynthèses et mise en réserve de l'énergie	230
8.1	Vue d'ensemble des voies de biosynthèse	230
8.2	Biosynthèse des glucides	231
a)	La néoglucogenèse	231
b)	Synthèse du glycogène	238
c)	Cycle du glyoxylate	243
8.3	Biosynthèse des acides gras	245
a)	Caractères généraux de la synthèse des acides gras	245
b)	Formation du malonyl-CoA	246
c)	Les enzymes et les réactions de synthèse des acides gras	247
d)	Modifications des chaînes d'acides gras	252
e)	Biosynthèse des triacylglycérols	252
	Points clés	253
	Exercices	254
	Index	255

Protéines

PLAN

- 1.1 Introduction : la diversité des protéines
- 1.2 Acides aminés
- 1.3 Les protéines : des polymères d'acides aminés
- 1.4 Propriétés des protéines

OBJECTIFS

- Structure et propriétés des acides aminés constituant les protéines.
- Comprendre les principes de l'organisation structurale des protéines.
- Connaître les propriétés générales des protéines.
- Faire le lien entre leur relative stabilité et leurs rôles biologiques.

1.1 INTRODUCTION : LA DIVERSITÉ DES PROTÉINES

Le terme **protéine** (du grec *prôtos*, de premier rang) fut proposé en 1839 par le chimiste suédois **Jöns Jakob Berzelius** pour souligner l'**importance quantitative** des composés organiques azotés dans la matière vivante. Les protéines représentent en effet plus de la moitié de la masse sèche des cellules animales. Toutefois, l'importance des protéines vient surtout de l'**extrême diversité** de leurs fonctions biologiques (*tableau 1.1*). Quelles sont les raisons d'une telle variété ?

Tout d'abord, les protéines sont des polymères d'acides aminés de longueur variable allant de quelques dizaines à quelques milliers d'acides aminés (la titine, la plus grande protéine humaine, comporte plus de 35 000 acides aminés). Dans le monde vivant, environ 500 acides aminés ont été identifiés, mais au niveau des protéines, seulement vingt sont retrouvés (ces acides aminés sont dits **protéinogènes**). Les possibilités théoriques de combinaison sont donc considérables (20^n pour des polymères constitués de n acides aminés).

Ensuite, les protéines sont produites par la traduction des ARN messagers (ARNm). Chez les eucaryotes, ces derniers peuvent, après leur synthèse (mécanisme appelé transcription), subir des épissages alternatifs. Ainsi, pour un même gène, on peut avoir plusieurs ARNm, qui, s'ils diffèrent au niveau de leur séquence codante,

TABLEAU 1.1 DIVERSITÉ DE LA FONCTION DES PROTÉINES.

Catégorie	Fonction générale	Exemple	Rôle biologique
Enzymes	Catalyse des réactions	Anhydrase carbonique	Accélération des échanges de CO ₂ .
Protéines de structure	Organisation, consolidation ou protection des tissus	Collagène	Constituant des tendons, du cartilage, des os
Protéines de transport	Faciliter le transport des ions ou des molécules (à travers les membranes ou dans les milieux intra et extracellulaire)	– Lactose perméase – Albumine	– Assure le passage et l'accumulation du lactose dans les bactéries (<i>Escherichia coli</i>) – Transport d'acides gras dans le sang
Protéines de défense	Reconnaissance et neutralisation des structures étrangères	Immuno-globulines (anticorps)	Reconnaissance des structures étrangères (antigènes) et activent leur élimination
Protéines de stockage	– Mise en réserve – Nutrition	– Ferritine – Ovalbumine	– Stockage du fer intracellulaire – Source énergétique
Communication – Hormones	– Communication chimique entre les tissus/organes	– Insuline	– Homéostasie du glucose
– Récepteurs	– Détection et transmission de signaux (chimiques, électriques, mécaniques, lumineux)	– Rhodopsine	– Captage des photons dans les bâtonnets de la rétine
– Facteurs de transcription	– Modulation de l'expression des gènes	– Gcn4p	– Contrôle du métabolisme des molécules azotées chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Moteurs moléculaires	– Conversion de l'énergie chimique en mécanique	– Myosine	– Contraction musculaire

permettront la production de différentes isoformes protéiques. Chez l'humain, l'épissage alternatif concerne 75 % des 20 000 gènes codants des protéines, avec en moyenne 4 ARNm produits (au moins 5 pour 1/3 des gènes !). Ainsi, le nombre de protéines potentielles dépasse les 200 000, mais ce chiffre est encore largement sous-estimé. En effet, les protéines peuvent être modifiées après leur synthèse (**modifications post-traductionnelles**) ce qui multiplie encore la diversité potentielle des structures. Ces modifications concernent majoritairement les chaînes latérales des acides aminés, mais, très souvent, les protéines seront associées à d'autres types de

molécules. On distinguera donc les **holoprotéines** composées uniquement d'acides aminés, des **hétéroprotéines** comprenant également des molécules non protéiques (**groupements prosthétiques**) comme des glucides, lipides, acides nucléiques ou ions métalliques (*tableau 1.2*). Avant de commencer l'étude des protéines proprement dites, nous nous intéresserons à leurs constituants de base, les **acides aminés**.

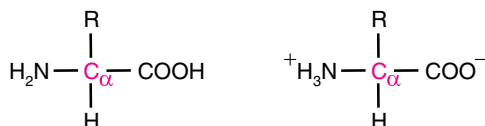
TABLEAU 1.2 HÉTÉROPROTÉINES.

Classe	Groupement prosthétique (exemple)
Glycoprotéines	Glucides (immunoglobulines)
Lipoprotéines	Lipides (lipoprotéines du sang)
Phosphoprotéines	Phosphate (caséine du lait)
Hémoprotéines	Hème (hémoglobine)
Flavoprotéines	Coenzymes flaviniques : FMN, FAD (succinate déshydrogénase)
Métalloprotéines	Fe^{2+} (aconitase) Fe^{3+} (transferrine) Cu^{2+} (céruleoplasmine) Ca^{2+} (calmoduline) Zn^{2+} (anhydrase carbonique) Mn^{2+} (catalase) Ni^{2+} (uréase) Mo^{6+} (nitrate réductase)

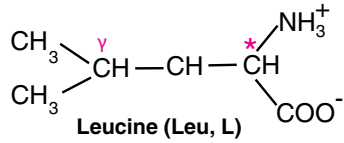
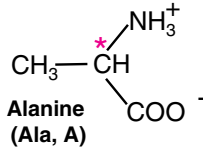
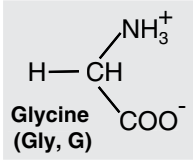
1.2 ACIDES AMINÉS

a) Constitution des acides aminés

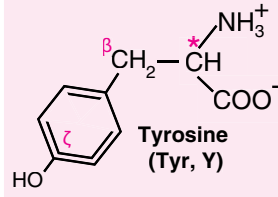
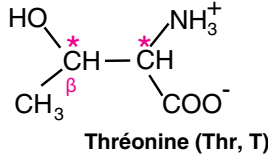
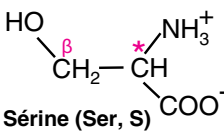
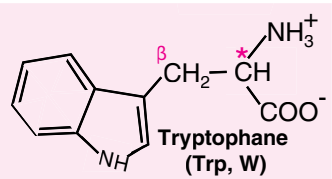
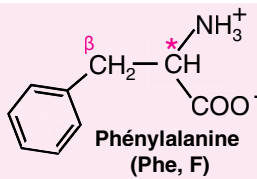
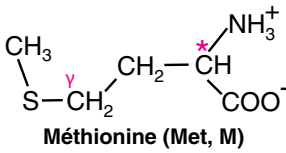
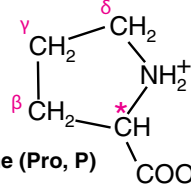
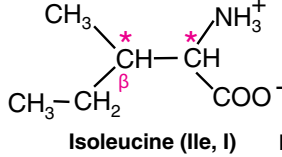
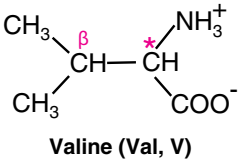
Les protéines sont constituées de vingt acides aminés (ou aminoacides) ayant des caractères structuraux communs. Ils possèdent une fonction **amine primaire** (ou, dans le cas de la proline, une fonction **amine secondaire**) et une fonction **carboxyle** liées au même carbone, le **carbone α** . Les aminoacides diffèrent les uns des autres par la nature de la chaîne latérale, appelée également **radical** (ou groupement) **R**. La formule générale d'un acide aminé et celle retrouvée à pH physiologique peuvent être représentées comme suit :



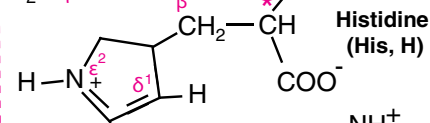
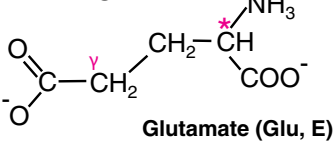
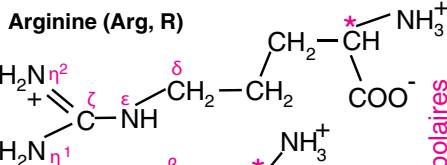
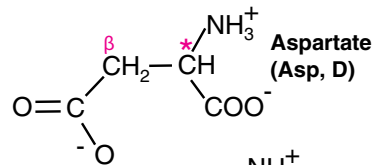
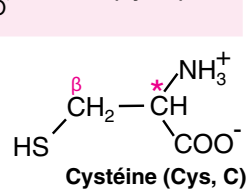
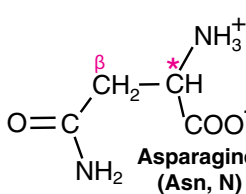
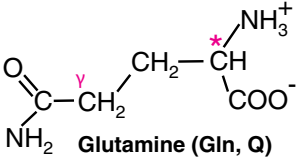
La nature de la chaîne latérale conditionne les propriétés physiques et chimiques de l'acide aminé, en particulier sa solubilité dans l'eau et sa charge à un pH donné. Les vingt acides aminés sont décrits dans le *tableau 1.3* et la *figure 1.1*. Leur succession dans les polypeptides est spécifiée par la reconnaissance des codons portés par



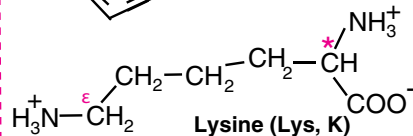
Chaînes latérales non polaires
(hydrophobes)



Chaînes latérales
polaires non chargées (pH 7)



Chaînes latérales polaires
chargées négativement (pH 7)
(Acides aminés acides)



Chaînes latérales polaires
chargées positivement (pH 7)
(Acides aminés basiques)

les ARN messagers d'après le code génétique ; à ces 20 acides aminés, il faut ajouter deux aminoacides rares, la **sélénocystéine** et la **pyrrolysine** (fig. 1.2).

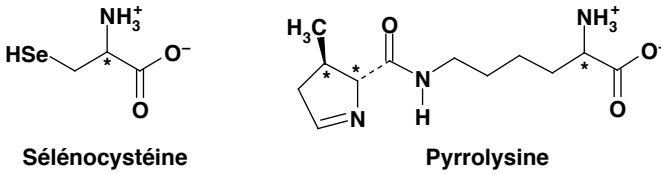


Figure 1.2 Sélénocystéine et pyrrolysine.

On rencontre la sélénocystéine dans le site actif d'un petit nombre d'enzymes, par exemple des enzymes responsables de la destruction des peroxydes chez les animaux et chez un petit nombre de bactéries ; la sélénocystéine est inconnue dans les protéines des plantes ou des levures. La distribution de la pyrrolysine semble encore plus restreinte. Ce résidu fait partie du site actif d'enzymes produisant du méthane à partir de la méthylamine chez certaines **archéobactéries** méthanogènes du genre *Methanosarcina*. Portés chacun par un ARN de transfert spécifique, respectivement ARNt^{Sec} et ARNt^{Pyl}, ces deux aminoacides partagent un second point commun par le fait que l'anticodon de leur ARNt reconnaît un codon stop sur l'ARN messager, UGA pour ARNt^{Sec} et UAG pour ARNt^{Pyl}. Dans les deux cas, l'introduction du résidu nécessite une discrimination par la machinerie de traduction de ces codons et des « véritables » codons stop. Le recrutement spécifique des ARNt^{Sec} et ARNt^{Pyl} se fait par la reconnaissance d'une structure secondaire particulière présente sur l'ARNm au niveau de ces codons.

Dans le but de simplifier l'écriture de la formule des protéines, les acides aminés ont reçu des dénominations abrégées, de trois lettres et d'une lettre (*tableau 1.3*). Les séquences protéiques stockées dans les bases de données sont écrites avec l'abréviation à une lettre, facilitant l'algorithmique bio-informatique lors de la comparaison de séquences par alignement (voir *encart en fin de chapitre*).



D'autres acides aminés existent également dans la nature, et ils sont nombreux ; ce sont des produits intermédiaires ou terminaux de voies métaboliques, mais ils ne sont pas incorporés dans les protéines au cours de leur assemblage par les ribosomes. On retrouve dans certaines protéines des acides aminés non standards qui sont produits suite à des modifications « post-traductionnelles » de la protéine (hydroxyproline, acétylsérine, N-formyl méthionine etc.).

Figure 1.1 Formules développées des vingt acides aminés constituant les protéines.

Les vingt aminoacides canoniques sont regroupés en fonction de la nature de leurs chaînes latérales (voir *tableau 1.3*). Les carbones asymétriques (carbone α) sont indiqués par un astérisque ; les lettres grecques soulignent les atomes porteurs de fonctions particulières. Les acides aminés à chaînes latérales aromatiques sont surlignés en rouge.

TABLEAU 1.3 PROPRIÉTÉS DES ACIDES AMINÉS CONSTITUANT LES PROTÉINES.

Acide aminé (AA)	Codes		Masse de l'AA en Da	Fréquence moyenne dans les protéines (%)	pK ₁ (α COOH)	pK ₂ (α NH ₃ ⁺)	pK ₃ (R)	pI
	3 lettres	1 lettre						
Glycine	Gly	G	75	7,1	2,30	9,60		5,95
Chaîne latérale (R) non polaire								
Alanine	Ala	A	89	8,3	2,35	9,87		6,1
Valine	Val	V	117	6,9	2,29	9,74		6,0
Leucine	Leu	L	131	9,7	2,33	9,74		6,0
Isoleucine	Ile	I	131	6,0	2,32	9,76		6,0
Proline	Pro	P	115	4,7	1,95	10,64		6,3
Méthionine	Met	M	150	2,4	2,13	9,28		5,7
Phénylalanine *	Phe	F	165	3,9	2,2	9,31		5,75
Tryptophane *	Trp	W	204	1,1	2,46	9,41		5,9
Chaîne latérale (R) polaire non chargée à pH = 7								
Sérine	Ser	S	105	6,5	2,19	9,21	> 13,0 (hydroxyle)	5,7
Thréonine	Thr	T	119	5,3	2,09	9,1	> 13,0 (hydroxyle)	5,6
Cystéine	Cys	C	121	1,4	1,92	10,70	8,37 (sulfhydryle)	6,3
Asparagine	Asn	N	132	4,0	2,14	8,72		5,6
Glutamine	Gln	Q	146	3,9	2,17	9,13		5,65
Tyrosine *	Tyr	Y	181	2,9	2,2	9,21	10,46 (phénol)	5,7
Chaîne latérale (R) polaire chargée négativement à pH = 7 (Acides aminés acides)								
Aspartate	Asp	D	132	5,4	1,99	9,9	3,9 (β-carboxyle)	2,95
Glutamate	Glu	E	146	6,8	2,1	9,47	4,07 (γ-carboxyle)	3,1
Chaîne latérale (R) polaire chargée positivement à pH = 7 (Acides aminés basiques)								
Lysine	Lys	L	147	5,9	2,2	9,2	10,6 (ε-amine)	9,9
Arginine	Arg	R	175	5,5	1,82	8,99	12,48 (guanidino)	10,7
Histidine	His	H	155	2,3	1,8	9,33	6,04 (imidazole)	7,7

Les acides aminés possédant une chaîne latérale aromatique sont indiqués par un astérisque *.

Da : Dalton ; pI : point isoélectrique.

b) Isomérisie optique des acides aminés

Dix-neuf acides aminés sur vingt possèdent **quatre substituants** différents sur le carbone α : la fonction α amine, la fonction α carboxyle, un atome d'hydrogène et la chaîne latérale. La glycine fait exception, avec deux atomes d'hydrogène sur le carbone α . Chez tous les autres acides aminés, le carbone α est un **centre chiral** ; on peut donc concevoir une molécule d'acide aminé comme, par exemple, l'alanine, de deux manières différentes, qui représenteront les deux isomères optiques ou **énantiomères** (fig. 1.3). On distingue la **L-alanine** et la **D-alanine**, l'image l'une de l'autre dans un miroir.

Les lettres D et L font référence au **D-glycéraldéhyde** et au **L-glycéraldéhyde**, plus précisément aux positions des fonctions amine (dans l'alanine) et alcool secondaire (dans le glycéraldéhyde), les molécules étant représentées selon la **projection de Fischer** (fig. 1.3) : si la fonction prend place à droite de la chaîne carbonée, la molécule appartient à la série D ; si la fonction apparaît à gauche de la chaîne carbonée, le composé est de la série L. Les lettres D et L rappellent le sens de la déviation du plan de la lumière polarisée par les solutions de glycéraldéhyde : **D pour dextrogyre** (sens des aiguilles d'une montre), **L pour lévogyre** (sens inverse des aiguilles d'une montre). Les solutions d'acides aminés dévient également le plan de la lumière polarisée, mais le sens et l'ampleur de la déviation sont différents pour chaque acide aminé et dépendent également du pH (en raison de la modification de l'ionisation des fonctions amine et carboxyle).

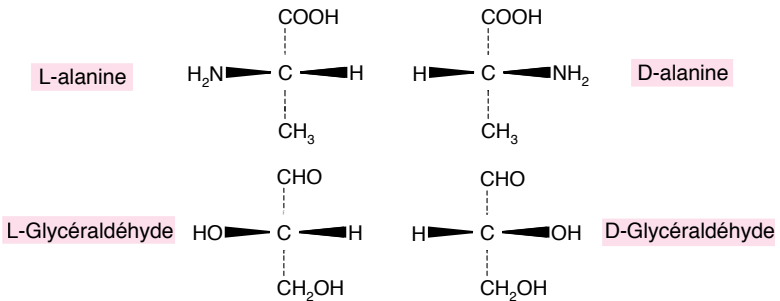


Figure 1.3 Configuration absolue des isomères optiques de l'alanine et du glycéraldéhyde.



Tous les acides aminés constitutifs des protéines appartiennent à la **série L**. On trouve des acides aminés de la série D, par exemple dans des antibiotiques (gramicidine) ou dans les constituants des parois cellulaires bactériennes (peptidoglycane).

La **thréonine** et l'**isoleucine** possèdent deux carbones chiraux, et peuvent donc exister sous la forme de quatre **diastéréoisomères** (fig. 1.4) ; dans les deux cas, un seul isomère est représenté dans les protéines.

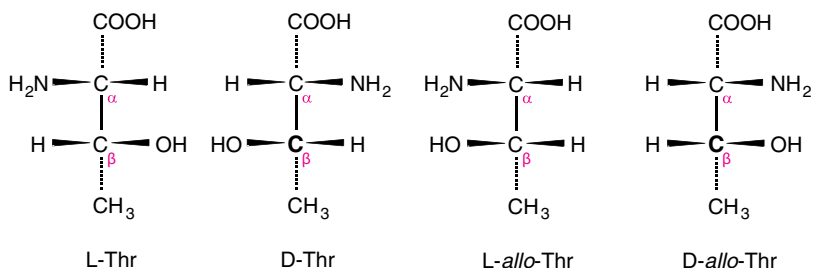


Figure 1.4 Configuration absolue de diastéréoisomères de la thréonine.

c) Propriétés liées aux chaînes latérales (ou radicaux)

La glycine

La « chaîne latérale » de la glycine consiste en un simple atome d'hydrogène. En raison de ce faible encombrement, les protéines présenteront une flexibilité importante au niveau de cet aminoacide ; on trouvera souvent la glycine au niveau des **coudes** ou **tournants** effectués par les chaînes polypeptidiques.

Chaînes latérales non polaires, aliphatiques

Cette classe d'acides aminés comprend l'**alanine**, la **valine**, la **leucine**, la **proline**, l'**isoleucine** et la **méthionine**. Les chaînes latérales de ces aminoacides interviendront pour maintenir la structure des protéines grâce à des interactions hydrophobes. La proline, avec une fonction amine secondaire incluse dans une structure cyclique rigide, imposera des contraintes conformationnelles aux chaînes polypeptidiques. Ces chaînes aliphatiques ne présentent aucune réactivité chimique si l'on excepte la fonction thioéther de la méthionine, par exemple sensible à l'oxygène (formation de sulfones) ; par ailleurs, la méthionine, sous forme d'acide aminé libre est à l'origine de la formation de la **S-adénosylméthionine (SAM)**, substrat impliqué dans des réactions de méthylation.

Chaînes latérales aromatiques

Les protéines absorbent la lumière ultraviolette autour de 280 nm ; cette absorption est due à la présence de trois aminoacides aromatiques, la **phénylalanine**, la **tyrosine** et le **tryptophane**. En fait, l'absorption de la lumière par le tryptophane est, de loin, la plus importante (fig. 1.5). On utilise souvent l'absorbance à 280 nm pour déterminer la concentration des protéines dans une solution. Toutefois, le tryptophane

étant un acide aminé peu fréquent dans les protéines (*tableau 1.3*), l'absorption à 280 nm est surtout due aux tyrosines. La phénylalanine et le tryptophane ont une chaîne latérale non polaire, tandis que la tyrosine a une chaîne latérale polaire non chargée.

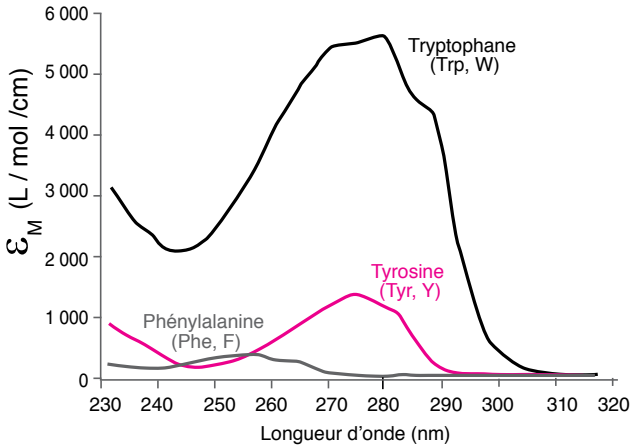


Figure 1.5 Spectres d'absorption des aminoacides aromatiques.

Les maximums d'absorption sont obtenus dans l'ultra-violet aux longueurs d'onde suivantes : phénylalanine, 257 nm ($\epsilon_M = 180 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ; tyrosine, 275 nm ($\epsilon_M = 1\,350 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ; tryptophane, 279 nm ($\epsilon_M = 5\,600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Chaînes latérales non chargées

La **sérine**, la **thréonine**, la **cystéine**, l'**asparagine** et la **glutamine** possèdent des groupements polaires qui pourront établir des liaisons hydrogène, soit avec les molécules d'eau du milieu, soit avec d'autres aminoacides de la chaîne protéique, soit avec les éventuels substrats ou ligands. Les **fonctions alcool** de la **sérine** et de la **thréonine** sont très peu réactives ; à l'opposé, lorsqu'elle est présente dans des sites actifs d'enzymes comme la trypsine ou la chymotrypsine (protéases à sérine), la fonction alcool de la sérine devient particulièrement réactive (voir *chapitre 5*, § 5.2). La fonction thiol de la cystéine s'oxyde facilement au contact de l'oxygène dissous dans les solutions, deux molécules de cystéine forment alors un pont disulfure pour donner la **cystine**. On retrouve ce composé très peu soluble dans certains calculs des voies urinaires (d'où le nom cystine, du grec *kustos*, vessie). La formation de **ponts disulfure** entre résidus cystéine est, par ailleurs, un facteur important dans le maintien de la conformation des protéines. On les rencontre essentiellement dans des protéines exposées à un environnement oxydant, soit, principalement, les protéines de surface exposées au milieu extra-cellulaire et les protéines excrétées (exemple, la **ribonucléase A**, enzyme pancréatique déversée dans l'intestin grêle au cours de la digestion).

Chaînes latérales chargées négativement à pH 7

L'**acide aspartique** et l'**acide glutamique** sont le plus souvent nommés, respectivement, **aspartate** et **glutamate** pour rappeler que leurs chaînes latérales comprennent une fonction carboxyle chargée négativement à pH neutre. L'asparagine et la glutamine en dérivent par amidation de ces fonctions carboxyle.

Chaînes latérales polaires chargées positivement à pH 7

La **lysine**, qui porte une fonction amine en position ϵ , et l'**arginine**, une fonction **guanidinium** en position δ sont chargées positivement à pH neutre. L'**arginine** possède la fonction la plus basique de tous les groupements d'acides aminés. En revanche, le groupement **imidazole** de l'**histidine** peut exister à l'état protoné ou déprotoné à pH 7. Pour cette raison, l'imidazole de l'histidine peut agir soit comme nucléophile (ayant une forte affinité pour un noyau), soit comme électrophile (ayant une forte affinité pour les électrons) à pH neutre. On le rencontre ainsi souvent dans les sites actifs d'enzyme, participant aux réactions catalytiques (transfert de protons).

d) Propriétés dues à la présence des fonctions amine et carboxyle

Propriétés amphotères des acides aminés

Les acides aminés sont des molécules **amphotères** : elles peuvent se comporter à la fois comme des **acides (donneurs de protons)** ou des **bases (accepteurs de protons)**. Cette propriété résulte de la présence des fonctions amine et carboxyle portées par le carbone α mais également les chaînes latérales. Mis en solution, un acide aminé comme la glycine se présente comme une molécule électriquement neutre, bien que totalement chargée : un **zwitterion** (de l'allemand *zwitter*, hybride) ou ion intermédiaire entre ion négatif et ion positif. Cette molécule pourra réagir comme un acide ($-\text{NH}_3^+ \rightarrow -\text{NH}_2 + \text{H}^+$) ou comme une base ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$). Les pH pour lesquels on observe ces différentes réactions sont mis en évidence par les courbes de titration des acides aminés.

Courbes de titration des acides aminés

Si, à une solution de chlorhydrate de glycine ($\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$, Cl^-) on ajoute une solution de soude (équivalents de NaOH ou OH^-), et que chaque addition est suivie de la mesure du pH (fig. 1.6), on peut construire la courbe $\text{pH} = f(\text{équivalents de } \text{OH}^-)$; cette courbe présente trois zones remarquables.

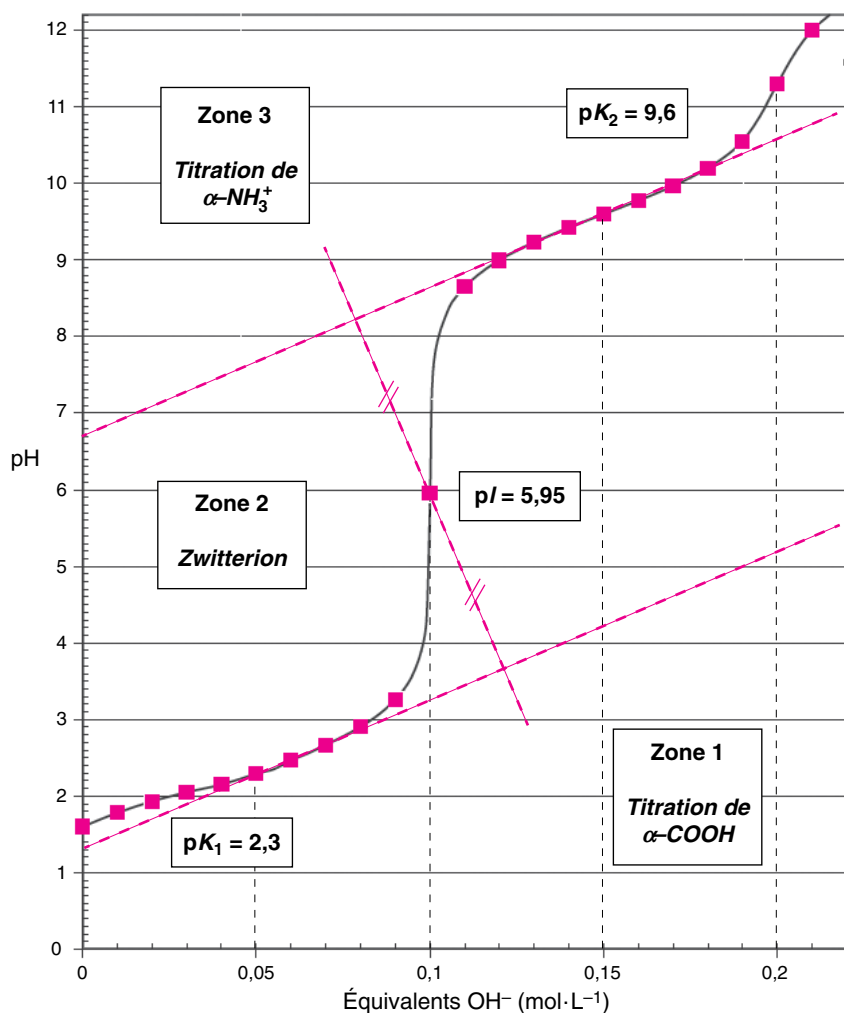


Figure 1.6 Courbe de titration de la glycine.

La courbe reproduit la titration d'une solution de chlorhydrate de glycine 0,1 M par la soude. Le point isoélectrique (pI) correspond au pH auquel l'acide aminé ne présente aucune charge électrique nette (ici $\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{p}K_1 + \text{p}K_2)$).

Dans la zone des pH acides (**zone 1**), l'addition de soude neutralise progressivement les protons donnés par la fonction dont le $\text{p}K_a$ est le plus faible ($\alpha\text{-COOH}$) ; lorsque le nombre d'équivalents de soude avoisine le nombre de moles d'acide aminé présent, le pH augmente brusquement car la fonction carboxylique est alors totalement

neutralisée. Le pH pour lequel on neutralise la moitié des fonctions carboxyliques est égal au pK_1 . En effet, si la fonction est titrée à 50 %, $[-COO^-] = [-COOH]$; l'expression de la constante de dissociation K_1 s'écrit :

$$K_1 = \frac{[-COO^-][H^+]}{[-COOH]} \quad (1.1)$$

et se résume à : $K_1 = [H^+]$, et donc $pH = pK_1$.

La courbe de titration possède une pente relativement faible autour de pK_1 (2,3). Cette propriété, commune à tous les acides faibles, est largement exploitée pour stabiliser le pH, c'est-à-dire pour confectionner des **solutions tampon**. Dans cette zone le pH de la solution est donné par la formule :

$$pH = pK_1 + \log \frac{[-COO^-]}{[-COOH]} \quad (1.2)$$

La **zone 2** présente la pente la plus élevée. Elle correspond à la fin de la titration de la fonction carboxyle et au début de la titration de la fonction amine. C'est dans cette zone que l'on rencontre la plus forte concentration de **zwitterion** ($NH_3^+-CH_2-COO^-$), et plus précisément pour un pH égal à la demi-somme des deux pK . Ce pH est appelé **pH isoélectrique** ou **pI (5,95)** ; c'est le pH pour lequel la **charge nette de l'acide aminé est rigoureusement nulle**. Dans ces conditions, l'acide aminé ne sera sollicité par aucune force si on le soumet à l'action d'un champ électrique.

La **zone 3** correspond à la titration des protons venus de la dissociation de la fonction ($-NH_3^+$) La demi-titration de cette fonction est obtenue pour la valeur du pK_2 , car :

$$K_2 = \frac{[-NH_2][H^+]}{[-NH_3^+]} \quad (1.3)$$

soit $K_2 = [H^+]$, et donc $pH = pK_2$. Une **zone tampon** s'obtient également pour les valeurs de pH voisines de pK_2 (9,6) ; dans cette zone, la valeur du pH est donnée par la formule :

$$pH = pK_2 + \log \frac{[-NH_2]}{[-NH_3^+]} \quad (1.4)$$

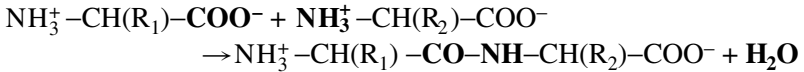
La courbe de titration des acides aminés possédant plus de deux fonctions ionisables fait apparaître un nombre correspondant de zones de titration. Par exemple, la titration d'une solution de chlorhydrate de lysine par la soude permet de déterminer les trois pK de l'acide aminé. Le pH isoélectrique de cet acide aminé se situe dans la zone de pH où

l'on trouve le maximum de concentration de la molécule non chargée ; une bonne estimation dans le cas de la lysine consiste à calculer la demi-somme de pK_2 et pK_3 , soit 9,9. Un raisonnement semblable peut être appliqué aux autres acides aminés dont la chaîne latérale est ionisable (tableau 1.3).

1.3 LES PROTÉINES : DES POLYMÈRES D'ACIDES AMINÉS

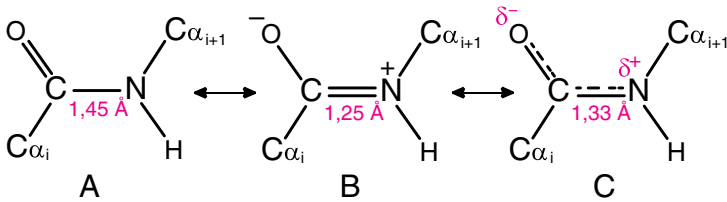
a) La liaison peptidique

La formation de la liaison peptidique préside à la polymérisation des aminoacides pour former les chaînes polypeptidiques. Il s'agit d'un processus cellulaire très complexe qui peut néanmoins se résumer par la réaction chimique suivante, entre la fonction α carboxyle et la fonction α amine de deux aminoacides différents :



La liaison peptidique est une fonction amide substituée ; les caractéristiques géométriques de cette liaison conditionnent en grande partie la conformation des protéines.

La liaison peptidique est plane. Du point de vue électronique, la liaison peptidique présente une structure intermédiaire (la forme C) entre les deux formes de résonance A et B :



Dans la **forme A**, le carbone du carbonyle et l'azote sont réunis par une liaison simple : le carbone est dans l'état d'hybridation sp^2 (plan) et l'azote, sp^3 (pyramidal) ; dans la **forme B**, ces deux atomes sont sp^2 et donc coplanaires. La liaison peptidique est en fait un hybride de résonance dans lequel les électrons du doublet p de l'azote et les électrons π de la liaison C = O occupent la même orbitale délocalisée, entre l'azote et l'oxygène (**forme C**). Ainsi, la longueur de la liaison C-N entre les groupes C = O et N-H est de 1,33 Å. Cette longueur est intermédiaire entre une liaison simple C-N (1,45 Å) et une liaison double C = N (1,25 Å).

On peut donc représenter la liaison peptidique par un parallélogramme dont deux sommets opposés sont occupés par les carbones α , les deux autres par l'hydrogène et l'oxygène. Ces deux derniers atomes

sont presque toujours en position *trans* par rapport à la liaison C–N ; l'isomérisie *cis* est défavorisée car elle rapproche les carbones α , porteurs des chaînes latérales (R) encombrantes (fig. 1.7).

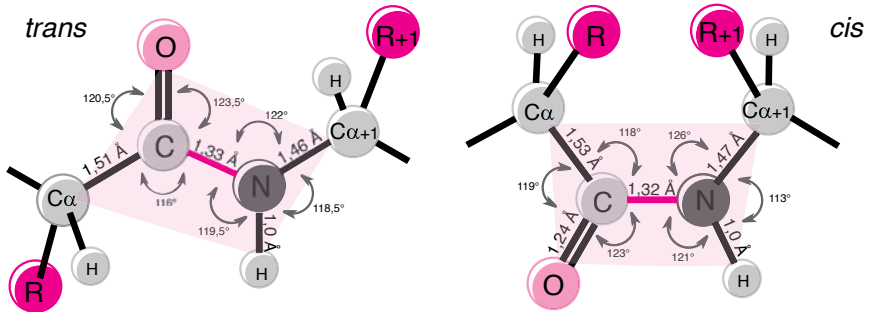
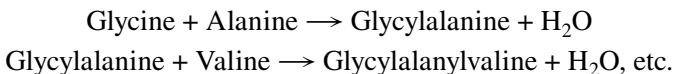


Figure 1.7 Isomérisie *trans* et *cis* de la liaison peptidique.

Les valeurs de longueur de liaison (en angströms) et d'angle indiquées sont des moyennes issues de structures 3D de peptides obtenues par diffraction aux rayons X.

Toutefois, lorsqu'un résidu proline se trouve en position $i + 1$, les deux conformations présentent des stabilités très voisines et la forme *trans* n'est que légèrement favorisée. Ainsi, environ 10 % des résidus proline sont en conformation *cis*. Cette caractéristique permet aux résidus proline d'induire des coudes dans la chaîne peptidique sans contraintes stériques.

Les polypeptides se présentent comme des condensations linéaires de molécules d'acides aminés ; on n'observe jamais de ramification. Lorsqu'un acide aminé est incorporé dans une protéine, il perd son identité car les fonctions α amine et α carboxyle disparaissent en tant que telles. L'acide aminé qui engage sa fonction α carboxyle dans une liaison peptidique est dénommé « **résidu** » ; le nom de chaque résidu rappelle la combinaison de la fonction acide carboxylique de l'acide aminé ; par exemple :



La succession des résidus d'acides aminés réunis par les liaisons peptidiques constitue la séquence, ou **structure primaire des protéines**. Par convention, le résidu porteur de la fonction α amine libre porte le n° 1 de la séquence. Il correspond à l'extrémité N-terminale (sa fonction amine n'étant pas engagée dans la liaison peptidique). De même, le dernier acide aminé est situé à l'extrémité C terminale, sa fonction carboxyle étant libre.

b) Détermination de la composition en acides aminés

L'étude de la composition d'une protéine passe par la libération des aminoacides, et donc par la rupture des liaisons peptidiques. La méthode la plus courante consiste en l'hydrolyse de la protéine par HCl 6N à 110 °C, pendant au moins vingt-quatre heures. La séparation des aminoacides par une méthode chromatographique est ensuite couplée à la formation de dérivés colorés (réaction à la ninhydrine), ce qui permet leur dosage photométrique.

c) Détermination de la structure primaire des polypeptides

La **réaction d'Edman**, décrite dans la *figure 1.8*, est à la base d'une méthode de détermination de la séquence des polypeptides. Cette réaction présente l'avantage de libérer l'acide aminé de l'extrémité N-terminale d'un polypeptide sous la forme d'un dérivé identifiable par chromatographie. Le polypeptide se trouve alors amputé de l'acide aminé n° 1. Un nouveau cycle de réactions fournira le dérivé du deuxième acide aminé. Comme les rendements des cycles réactionnels successifs sont inférieurs à 100 %, des sous-produits s'accumulent et conduisent à des erreurs d'interprétation ; aussi, dans la pratique, cette méthode se limite-t-elle à la détermination de quelques dizaines de résidus. La détermination de la séquence complète d'une protéine nécessite la fragmentation de la chaîne en peptides de taille réduite, au moyen de protéases (trypsine, chymotrypsine) ou de réactifs spécifiques (bromure de cyanogène, qui coupe les peptides au niveau de la méthionine) ; le séquençage des peptides isolés permet, à la manière d'un puzzle, la reconstitution finale de la séquence entière.



Les techniques de **spectrométrie de masse**, associées ou non à la fragmentation préalable, permettent également le séquençage et l'identification des protéines. En fait, l'immense majorité des séquences protéiques dont on dispose aujourd'hui dans les banques de séquences proviennent du séquençage de l'ADN constitutif de gènes isolés, et de l'interprétation, grâce au code génétique, des cadres de lecture ouverts (ORF, pour Open Reading Frame) en séquences d'acides aminés (voir *Encart en fin de chapitre*).

d) Structure secondaire des protéines

Contraintes géométriques induites par la liaison peptidique

Bien que la liaison peptidique soit rigide et plane, les polypeptides sont néanmoins flexibles, car les plans successifs dans lesquels s'inscrivent les liaisons peptidiques peuvent pivoter autour des carbones α . Aussi, une représentation schématique des polypeptides (*fig. 1.9*) consiste-t-elle en une succession de parallélogrammes (liaisons peptidiques) articulés sur les sommets opposés (carbones α).

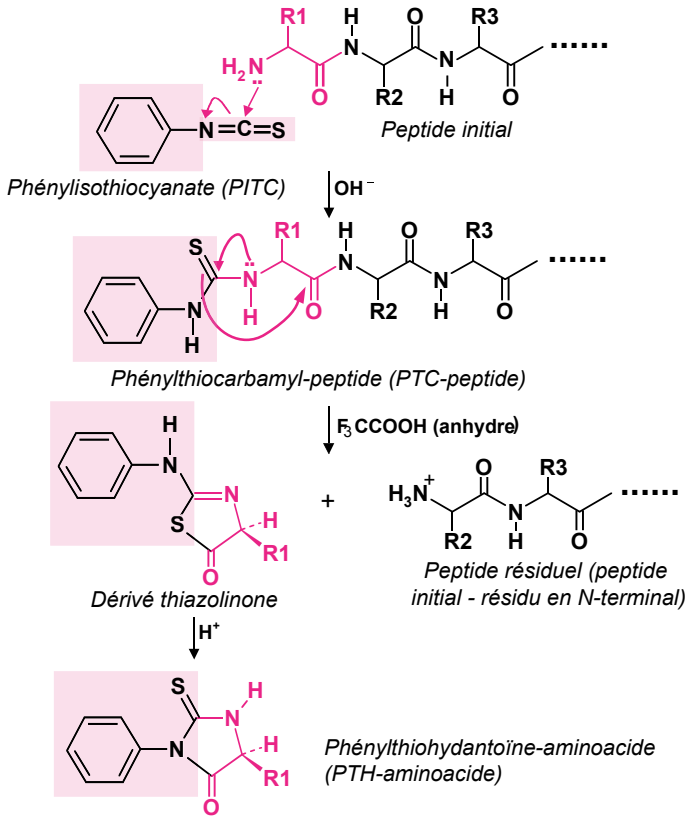


Figure 1.8 Principe du séquençage d'un polypeptide au moyen de la réaction d'Edman.

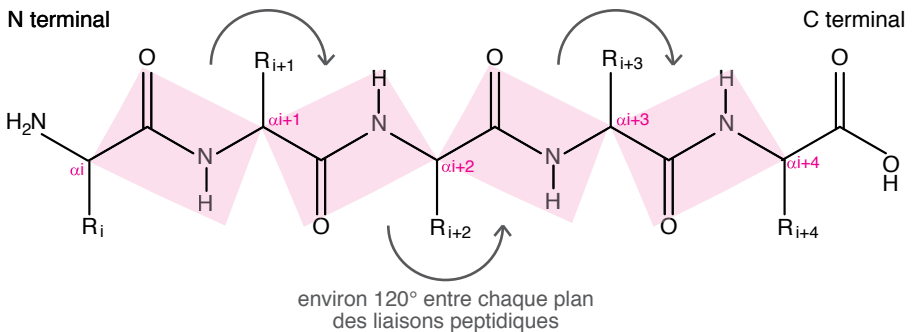


Figure 1.9 Un polypeptide peut être considéré comme une succession de plans dans lesquels s'inscrivent les liaisons peptidiques.

La conformation d'un polypeptide peut être décrite en indiquant l'orientation relative de tous les plans des liaisons peptidiques. Par convention, on désigne par la lettre Φ l'angle de rotation (ou de torsion) autour de la **liaison C α -N** et par la lettre Ψ l'angle de rotation autour de la **liaison C α -carbonyle** (fig. 1.10).

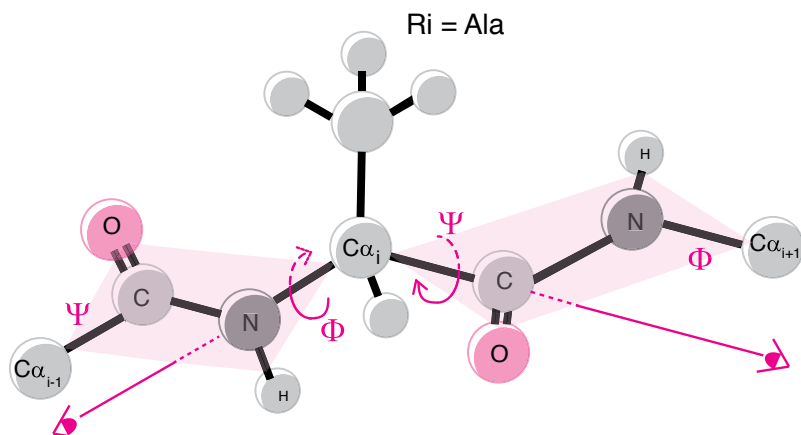


Figure 1.10 Libertés de rotation autour du carbone α .

Les angles Φ et Ψ sont comptés positivement dans le sens des aiguilles d'une montre par un observateur placé au niveau du carbone α , lorsqu'il dirige son regard vers l'azote (angle Φ) ou vers le carbone du carbonyle (angle Ψ) du résidu i . La conformation illustrée par cette figure correspond à $\Phi = 180^\circ$ et $\Psi = 180^\circ$. Les valeurs positives d'angles Φ , et plus spécialement comprises entre 60 et 180° , sont défavorisées en raison de la proximité de l'oxygène du carbonyle $i - 1$ et de la chaîne latérale du résidu i (alanine dans le cas présent). Le faible volume occupé par l'hydrogène de l'azote $i + 1$, diminue d'autant son interaction avec la chaîne latérale; cette interaction ne deviendra problématique que pour des valeurs de Ψ autour de -120° . Ces interactions sous-tendent le diagramme de Ramachandran (fig. 1.11). Par ailleurs, certaines combinaisons (Φ , Ψ) conduisent à des contacts étroits entre atomes et sont donc très peu favorisées, par exemple $(180,0)$, $(0,180)$, et $(0,0)$.

Diagramme de Ramachandran

Toutes les combinaisons des angles Φ et Ψ ne sont pas réalisables, en raison du rapprochement excessif des groupements atomiques – ou même de leur superposition pure et simple. Le diagramme de Ramachandran (fig. 1.11) montre que les valeurs permises des angles Φ et Ψ se retrouvent dans des zones de moindre énergie, nommées « **puits de stabilité** ». En fait, comme les atomes ne se comportent pas tout à fait comme des sphères rigides, certaines combinaisons des angles Φ et Ψ rencontrées dans des protéines se retrouvent parfois en bordure de ces puits de stabilité.



Tracer un diagramme de Ramachandran est utile quand on veut évaluer la qualité d'une structure protéique nouvellement identifiée par les techniques de biochimie structurale (diffraction aux rayons X, Résonance Magnétique Nucléaire ou RMN). À partir des combinaisons (Φ , Ψ) identifiées pour chaque résidu, on obtient l'emplacement des résidus sur le diagramme. Si plus de 80 % des résidus se retrouvent dans les zones de stabilité, on peut considérer que la structure est de bonne qualité. De même, on peut également évaluer la proportion de chaque structure secondaire présente dans la protéine et la classer (« all α », « all β », « α/β »). Cette analyse peut être réalisée avec l'outil bio-informatique VADAR (<http://vadar.wishartlab.com/>).

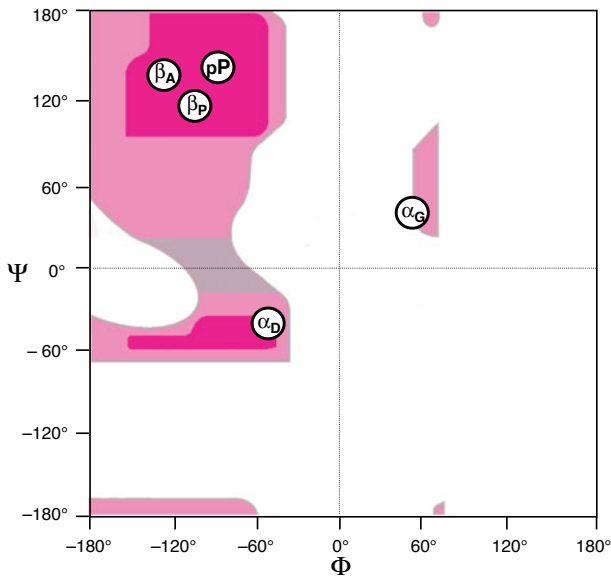


Figure 1.11 Diagramme de Ramachandran.

Le diagramme de la figure établit les combinaisons permises des angles Φ et Ψ mesurés autour d'un carbone α portant un groupement méthyle (L alanine). Les couples (Φ , Ψ) permis définissent les deux zones de stabilité (surfaces rouge foncé) dans lesquelles on retrouve les combinaisons d'angles caractéristiques des structures secondaires des polypeptides : β_A (feuillet plissé antiparallèle ; -140° , $+135^\circ$), β_P (feuillet plissé parallèle, 120° , 115°), pP (polyproline, -78° , $+150^\circ$), α_D (hélice α à pas droit, -57° , -47°). Les surfaces rouge clair présentent des zones de plus faible stabilité et la zone grise n'est autorisée qu'au prix de déformations. Les valeurs positives de Φ sont en principe défavorisées, excepté une région dans laquelle on trouve la combinaison (Φ , Ψ) correspondant à l'hélice α à pas gauche (α_G) ; néanmoins, cette dernière, moins stable que l'hélice α à pas droit, n'est pas observée naturellement dans les protéines.

Motifs de structures secondaires des protéines

L'étude de la diffraction des rayons X par des protéines fibreuses, telles que la **kératine** et la **séricine**, a révélé deux types (motifs) de **structure périodique** dans les protéines : l'**hélice α** et les **feuilletts β** . Ces structures sont dites « périodiques » car, dans chacune d'entre elles, les mêmes angles Φ et Ψ se répètent d'un aminoacide à l'autre, sur toute la longueur de la structure. Dans l'un et l'autre cas, la disposition régulière des résidus d'acides aminés se trouve stabilisée par des liaisons hydrogène.

Dans la structure hélicoïdale α (fig. 1.12), la chaîne polypeptidique s'enroule autour d'un axe selon une hélice à pas droit, et les chaînes latérales sont rejetées à l'extérieur du motif. Pour chaque résidu d'acide aminé, on observe $\Phi = -57^\circ$ et $\Psi = -47^\circ$. Le point le plus remarquable est la stabilisation de la structure par les **liaisons hydrogène**, pratiquement parallèles à l'axe de l'hélice et établies entre les groupements N-H et C=O des liaisons peptidiques. L'atome d'hydrogène de chaque liaison peptidique établit un pont avec l'oxygène de la liaison peptidique située à 4 aminoacides du côté N. Un tour d'hélice s'obtient pour 3,6 résidus d'acides aminés, le pas de l'hélice mesurant 0,54 nm (5,4 Å) et chaque résidu étant distant de 0,15 nm (1,5 Å).

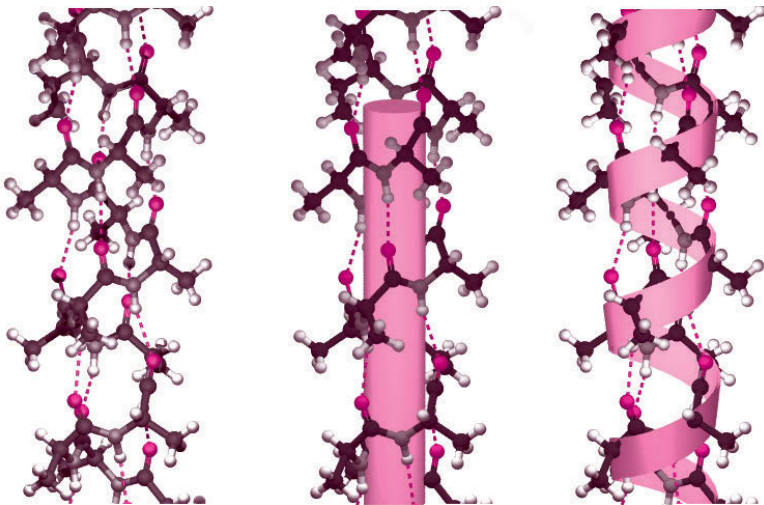


Figure 1.12 Hélice α .

Les liaisons hydrogène (pointillés rouges) qui stabilisent la structure sont pratiquement parallèles à l'axe de l'hélice. Le cylindre de l'image centrale souligne l'enroulement à pas droit (pour mémoire : pas droit \rightarrow escalier hélicoïdal que l'on gravit en plaçant la main droite sur la rampe). On symbolise souvent l'hélice par un ruban hélicoïdal qui symbolise la succession des liaisons peptidiques et souligne la projection des chaînes latérales à l'extérieur de la structure (chaînes d'alanine dans le cas présent).

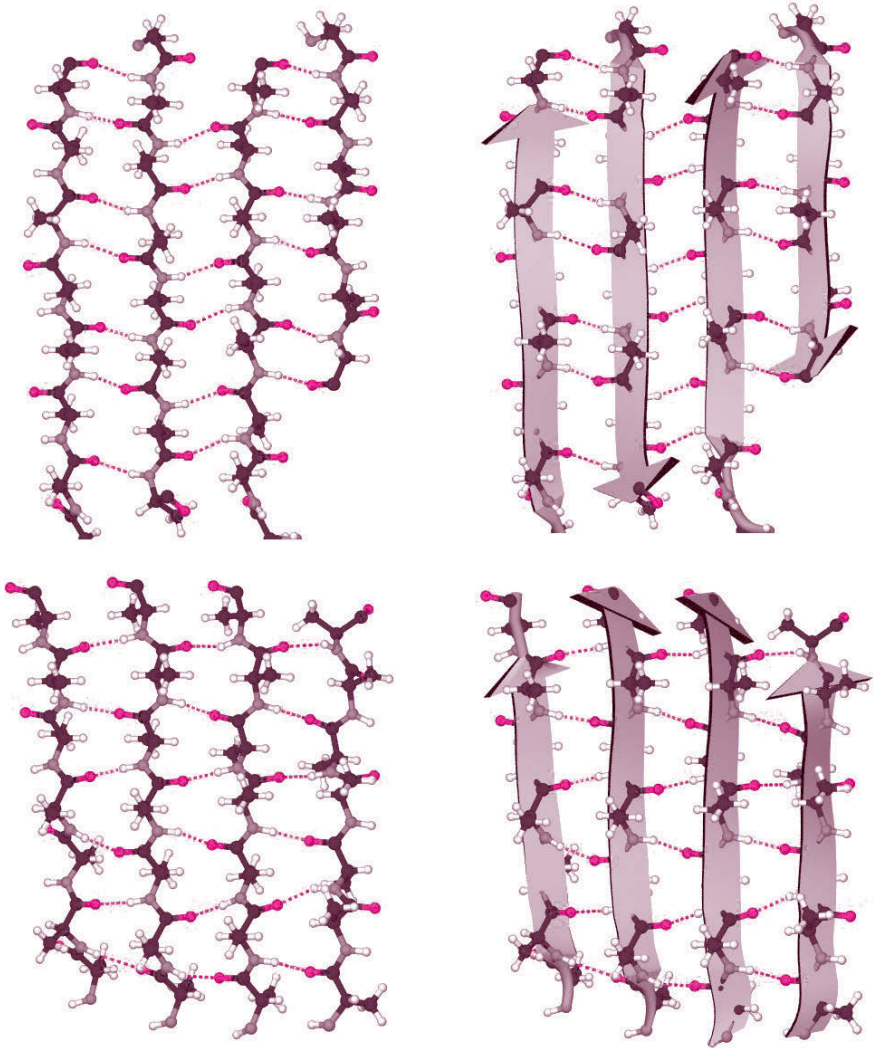


Figure 1.13 Structures en feuillets β .

Les structures en feuillets β sont stabilisées par des liaisons hydrogène transversales (pointillés rouges) contractées mutuellement par les brins β . On symbolise les structures en feuillet β par un ruban plat orienté dans le sens N terminal \rightarrow C terminal, qui matérialise la succession des carbonés α ; on notera que les chaînes latérales (alanine dans le cas présent) se disposent alternativement en dessus et en dessous du plan moyen de la structure. **Haut** : feuillets β anti-parallèles ; **Bas** : feuillets β parallèles