

TD 2 de Biochimie Structurale

Exercice n°1

Un mélange d'acide glutamique et d'histidine à pH 5 est soumis à une électrophorèse sur papier et à une chromatographie sur résine échangeuse d'anions.
Quels sont respectivement le profil électrophorétique et l'ordre d'élué obtenu ?

Solution :1

On n'a pas besoin de connaître avec précision les valeurs des pH_i , on sait que celui de Glu est inférieur à 5 et celui de His est supérieur à 5.

Donc à pH 5, Glu est chargé négativement et His est chargé positivement.

En électrophorèse à pH5, Glu (-) migre vers l'anode (borne qui attire les anions), et His (+) migre vers la cathode (borne qui attire les cations).

Lors d'une chromatographie échangeuse d'anions, His (+) est élué et Glu (-) est retenu. Pour éluer Glu (-), il faut baisser le pH jusqu'à une valeur inférieure ou égale à son pH_i .

Exercice n°2

Soit un tetrapeptide T dont la séquence est : Glu-Met-Ser-Lys.

1- Déterminer le pH_i de T connaissant les pK suivants :

Fonction ionisable

Acide aminé

COOH NH₂ R

Glu 2,19 9,67 4,25

Met 2,23 9,21 -----

Ser 2,21 9,15 -----

Lys 2,18 8,95 10,53

2- Traité par le CNBr, T est ensuite soumis à une électrophorèse à pH 7.

Représenter schématiquement la migration du (ou des) composé (s) obtenus en précisant la forme ionique.

3- On fait agir la trypsine sur T, puis on procède à une électrophorèse dans les mêmes conditions que précédemment. Représenter la migration en précisant la forme ionique à ce pH.

Solution :2

Glu-Met-Ser-Lys

Les fonctions COOH α de Glu, Met et Ser, ainsi que les fonctions NH₂ α de Met, Ser et Lys sont toutes engagées dans les 3 liaisons peptidiques de ce peptide. Les fonctions qui sont accessibles (donc ionisables) sont NH₂ α de Glu, NH₂R de Lys, COOH α de Lys et COOHR

de Glu.

La forme la plus acide de ce tetrapeptide est T₂⁺. La plus basique est T₂⁻.

En partant de la forme la plus acide et en titrant par OH⁻, les 4 fonctions ionisables sont titrées par ordre d'acidité décroissante. Le pHi est la moyenne des 2 pK qui encadrent la forme zwitterion :

$$pHi = 1/2 (pK_r \text{ Glu} + pK_{NH_2\alpha} \text{ Glu}) = 6,96$$

On trouve le même résultat en partant de la forme la plus basique vers la forme la plus acide et en traitant par H⁺

Exercice n°3

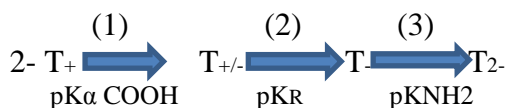
Le tripeptide T Glu-Val-Ala, présente les pK suivants : 3,12 ; 4,25 et 9,32.

- 1- Attribuer aux différentes fonctions ionisables de T les pK correspondants.
- 2- Ecrire les différentes formes de T aux pH remarquables puis déterminer son pHi

3- Sachant qu'une solution molaire de T est à 20% neutre, calculer le(s) pH(s) qui permet(tent) d'obtenir ce pourcentage

Solution :3

1- Les fonctions qui ne sont pas engagées dans les liaisons peptidiques de ce peptide sont : NH₂α (Glu), COOHα (Ala) et COOH_R (Glu). Les pK de ces 3 fonctions sont respectivement : 9,32 ; 3,12 et 4,25.



$$pHi = (pK_{\alpha} \text{COOH} + pKR) / 2 = 3,68$$

3- La forme neutre de T existe dans les situations (1) et (2) :

$$(1) : pH = pK_{\alpha} \text{ COOH} + \log ([T_{+/-}] / [T_+]) = 3,12 + \log (20/80) = 2,51$$

$$(2) : pH = pKR + \log ([T^-] / [T_{+/-}]) = 4,25 + \log (80/20) = 4,85$$

Exercice n°4

La composition globale en acides aminés d'un peptide P, obtenue par hydrolyse totale (HCl 6N à 100°C pendant 24 à 72 heures), est : Arg 1, Asx 1, Cys 1, Lys 1, Thr 1, Val 1.

Asx signifie qu'on ne peut savoir si le peptide contient Asp ou Asn, car dans les conditions d'hydrolyse totale, Asn est transformé en Asp et NH₃.

1- Le traitement de P par le réactif d'Edman donne le PTH-Cys et par la carboxypeptidase (en mélange A et B) donne l'Arg.

3- La trypsine catalyse l'hydrolyse de P en 2 peptides T1 et T2.

a- T1 absorbe fortement la lumière à 280 nm. Après hydrolyse chlorhydrique totale, il donne 3 acides aminés, et après hydrolyse alcaline totale (NaOH 5N à 100°C pendant 4 à 8 heures), il donne 4 acides aminés. Après traitement de T1 par le chlorure de dansyl, suivi d'une hydrolyse totale, on isole 2 composés et on identifie l'un d'eux à la dansyl-Cys par chromatographie sur papier.

b- T2 donne 3 acides aminés après hydrolyse chlorhydrique ou alcaline totale. Le traitement de T2 par le chlorure de dansyl suivi d'hydrolyse acide totale donne la dansyl-Thr.

3- La chymotrypsine hydrolyse P en 2 peptides. Le traitement de l'un de ces 2 peptides par le DNFB, suivi d'hydrolyse totale, donne la DNP-Val et la DNP-Lys. Quelle est la séquence de P ?

4- T2 est élué avant T1 quand on élève le pH au cours d'une chromatographie sur résine échangeuse de cations. Peut-on en déduire la nature de Asx ?

Solution :4

L'analyse après hydrolyse acide totale du peptide P met en évidence 6 acides aminés différents (un résidu de chaque). Sachant que l'hydrolyse acide détruit Trp, on peut conclure de cette première expérience que P contient au moins 6 acides aminés (existence de Trp ?)

1- P donne PTH Cys avec le réactif d'Edman. Cys est en position N terminale de P

L'action des carboxypeptidases montre que Arg est en position C terminale de P

2- La trypsine hydrolyse P en 2 peptides T1 et T2. On ne sait pas pour l'instant si c'est T1 qui est en amont de T2 ou si c'est l'inverse. Mais on est sûr que le peptide qui est en amont se termine par Lys, car la trypsine coupe après les acides aminés basiques.

2a- T1 absorbe à 280 nm. Donc T1 contient au moins un résidu Trp

T1 donne 3 résidus après hydrolyse acide totale et 4 résidus après hydrolyse alcaline. Donc T1 ne contient qu'un seul Trp. On peut signaler au passage que le peptide initial contient au moins 7 acides aminés, car on ne sait pas encore si T2 contient du Trp.

Le traitement de T1 par le chlorure de dansyl montre que la Cys est en position Nt de T1. Cette extrémité est la même que celle du peptide initial. Donc c'est T1 qui est en amont de T2.

Séquence connue à ce stade : Cys-aa2-aa3-Lys-----Arg

2b- T2 donne 3 résidus après hydrolyse totale acide ou basique. T2 est donc

constitué de 3 résidus et ne contient pas de tryptophane. Le peptide P initial est donc un heptapeptide (constitué de 7 acides aminés).

L'action du chlorure de dansyl permet de conclure que Thr est en position Nt

de T2

A ce stade on peut dire que la séquence de P est : Cys-aa2-aa3-Lys-Thr-aa6-Arg, avec Trp en position 2 ou 3

3- L'action de la chymotrypsine sur P donne 2 peptides. Elle a hydrolysé la liaison peptidique située après Trp (seul acide aminé aromatique).

Le traitement par le DNFB montre que l'un des 2 peptides a Val-Lys en position Nt. On peut conclure à ce stade, que la séquence de P est : Cys-Trp-Val-Lys-Thr-Asx-Arg.

4- T1 : Cys-Trp-Val-Lys

T2 : Thr-Asx-Arg

Sachant que la résine échangeuse de cations retient les cations et que T2 est élué avant T1 lorsqu'on élève le pH, on peut conclure que T2 est plus acide que T1 (T2 perd sa charge (+) avant T1).

La nature des acides aminés de T1 montre qu'il est basique. Pour que T2 soit plus acide que T1, il faut qu'il contienne Asp et non Asn

En conclusion, la séquence de P est : Cys-Trp-Val-Lys-Thr-Asp-Arg

Exercice n°5

Soit un oligopeptide O constitué de 10 acides aminés. Donner sa séquence sachant que :

1- Son hydrolyse acide totale donne la composition suivante en acides aminés : Ala, Arg, Glu, Met, Ser, Thr, Tyr.

2- Son traitement par les carboxypeptidases A et B libère successivement Ala puis Tyr.

3- Le réactif d'Edman libère respectivement PTH-Tyr et PTH-Ala.

4- L'action de la trypsine donne un tetrapeptide A et un hexapeptide B.

a- L'étude de A montre qu'il absorbe fortement la lumière à 280 nm. Avec le b-

DNFB on obtient DNP Glu. Enfin, A traité avec la chymotrypsine libère Tyr, Ala et un dipeptide acide.

b- Le traitement de B par le DNFB donne DNP-Tyr. Avec le CNBr, B se scinde

en un dipeptide basique et un tetrapeptide.

5- L'action de la chymotrypsine sur O libère 2 Tyr, 1 Ala et un heptapeptide C. Ce dernier donne avec le réactif d'Edman, PTH-Ala puis PTH-Thr. Avec le CNBr, C se scinde en un tripeptide et un tetrapeptide

Solution :5

O : oligopeptide de 10 acides aminés (décapeptide)

1- l'hydrolyse totale de O donne 7 résidus différents. Donc soit des résidus répétés (0 à

3), soit il existes des résidus Trp (3 au maximum) qui ont été détruits par l'hydrolyse acide totale.

2- Le traitement par les carboxypeptidases montre que l'extrémité Ct est : ----Tyr-Ala

3- Le traitement le réactif d'Edman montre que l'extrémité Nt est : Tyr-Ala-----

Séquence de O : Tyr-Ala-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-Tyr-Ala

4- L'action de la trypsine donne A (tetrapeptide) + B (hexapeptide). Comme pour l'exercice précédent, on a 2 possibilités : A-B ou B-A. Le peptide qui est en amont est : Tyr-Ala--- ? ---Arg. Il suffit de comparer l'une des extrémités de l'un des 2 peptides avec une extrémité de O pour savoir s'il s'agit de l'ordre A-B ou B-A.

4a- A absorbe à 280 nm, donc A contient du Trp (1 seul)

L'action du DNFB sur A montre qu'il possède Glu en position N terminale.

Cette extrémité étant différente de l'extrémité Nt de O. On en conclut que B est en amont de A.

A ce stade on peut dire que la séquence est :

Tyr-Ala-aa3-aa4-aa5-Arg-Glu-Trp-Tyr-Ala.

L'action de la chymotrypsine sur A confirme des données qu'on connaît déjà.

4b- L'action du DNFB confirme la position du résidu Tyr.

L'action du CNBr permet de conclure que Met est en position 4 du peptide O

Tyr-Ala-aa3-Met-aa5-Arg-Glu-Trp-Tyr-Ala.

5- L'action de la chymotrypsine confirme la position des résidus aromatiques et libère, entre autres, un heptapeptide C.

L'action du réactif d'Edman sur C libère PTH-Ala puis PTH-Thr. On conclut que Thr est situé en position 3, juste après Ala. Le seul acide aminé qui reste à caser est Ser.

En conclusion, la séquence de O est : Tyr-Ala-Thr-Met-Ser-Arg-Glu-Trp-Tyr-Ala

Exercice n°6

Une solution protéique est composée de 3 protéines A, B et C. B et C sont des monomères alors que A est composée de 2 sous unités A1 et A2 de même masse moléculaire. A et C ont le même pHi 4,2. Celui de B est de 8,3.

A, B et C ont la même masse moléculaire mais des propriétés antigéniques différentes.

Quel sera l'ordre d'éluion des protéines de la solution lorsqu'elle est soumise à :

1- une chromatographie échangeuse d'anions ?

2- une chromatographie d'exclusion (limite d'exclusion : 300 000) ?

3- une chromatographie d'exclusion après traitement des 3 protéines par l'urée 8 M ?

Représenter le profil de migration de ces protéines quand on procède à :

4- une électrophorèse sur gel en présence de SDS.

5- une électrophorèse sur gel se présence de SDS de la solution préalablement traitée au β -mercaptoéthanol.

6- Citer la ou les techniques qui permettent de séparer le plus efficacement les 3 protéines en même temps. Justifier la réponse.

Solution :6

1- Les protéines A et C ont un pHi inférieur à 7. Elles seront chargées (-), donc retenues par la colonne.

Le pHi de B est supérieur à 7. Elle sera chargée (+) et ne sera donc pas retenue.
Pour éluer les protéines A et C, il faudrait faire baisser le pH au moins jusqu'à 4,2 où les 2 protéines seront neutres et ne seront plus retenues par la résine.

2- Les 3 protéines ont la même MM. Elles seront éluées en même temps.

3- Après traitement par l'urée 8M les 2 sous unités de A seront séparées. On aura donc 2 protéines B et C de même MM, et 2 protéines A1 et A2 de MM égale à la moitié de celle de B et C. L'ordre d'élution est B,C ensemble, ensuite A1 et A2 ensemble.

4- Lors d'une électrophorèse sur gel en présence de SDS, toutes les protéines sont chargées négativement. Elles migrent de la borne (-) vers la borne (+) et sont selon leurs tailles.

5- Le rôle du β -mercaptoéthanol est de réduire les ponts dissulfures. Il n'y a pas de ponts dissulfures entre les sous unités qui constituent la structure quaternaire (A1, A2). On obtiendra également une seule bande.

6- A, B et C ont des propriétés antigéniques différentes. Il faudrait donc utiliser une technique qui fait intervenir les interactions antigène-anticorps : Chromatographie d'affinité, Immunoblot...

Exercice n°7

Pour l'ensemble de la molécule d'hémoglobine normale HbA, on ne trouve que la valine en résidu N terminal. Pour 100 μg d'HbA, on a 0,73 μg de valine.

1- Sachant que la MM d'HbA est de 64000 et celle de la valine est de 117, combien y a-t-il de chaînes polypeptidiques par molécules de HbA ?

Par ailleurs, on sait qu'à pH 4, les chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine se dissocient en 2 et 2, alors qu'à pH 7, l'hémoglobine reprend sa structure associée. Une hémoglobine anormale HbC diffère de HbA par la présence sur l'une des chaînes d'un résidu lysyl à la place d'un glutamyl. Une autre hémoglobine HbI diffère également de HbA par le remplacement d'un acide aminé par un autre.

Une solution contenant HbC et HbI est ramenée à pH4. Après neutralité on trouve que la solution contient 4 types d'hémoglobine HbC, HbI, HbA et un nouveau type HbX.

2- Quelle est la chaîne mutée dans HbI ?

3- Quelle est la formule du nouveau type d'hémoglobine ?

Solution :7

1- Les protéines A et C ont un pHi inférieur à 7. Elles seront chargées (-), donc retenues par la colonne.

Le pHi de B est supérieur à 7. Elle sera chargée (+) et ne sera donc pas retenue.
Pour éluer les protéines A et C, il faudrait faire baisser le pH au moins jusqu'à 4,2 où les 2 protéines seront neutres et ne seront plus retenues par la résine.

2- Les 3 protéines ont la même MM. Elles seront éluées en même temps.

3- Après traitement par l'urée 8M les 2 sous unités de A seront séparées. On aura donc 2 protéines B et C de même MM, et 2 protéines A1 et A2 de MM égale à la moitié de celle de B et C. L'ordre d'élution est B,C ensemble, ensuite A1 et A2 ensemble.

4- Lors d'une électrophorèse sur gel en présence de SDS, toutes les protéines sont chargées négativement. Elles migrent de la borne (-) vers la borne (+) et sont selon leurs tailles.

5- Le rôle du β -mercaptoéthanol est de réduire les ponts dissulfures. Il n'y a pas de ponts dissulfures entre les sous unités qui constituent la structure quaternaire (A1, A2). On obtiendra également une seule bande.

6- A, B et C ont des propriétés antigéniques différentes. Il faudrait donc utiliser une technique qui fait intervenir les interactions antigène-anticorps : Chromatographie d'affinité, Immunoblot...

Exercice n°8

Une protéine A contient du fer (MA = 56) dans une proportion de 0,35 %
Pour déterminer sa MM, on mélange A à une protéine B de MM 50 000 et une protéine C de MM 75 000. Le mélange des 3 protéines est déposé sur colonne pour chromatographie d'exclusion. La protéine A est éluee dans une fraction intermédiaire entre B et C.

1- Combien d'atomes de fer, la protéine A contient-elle ?

2-

2- Quelle est la MM de la protéine A ?

3- Quel est l'ordre d'élution des protéines A, B et C ?

L'ultracentrifugation de la protéine dans un milieu contenant de l'urée 8M montre l'existence d'un seul pic, correspondant à une MM égale au quart de celle de A. On obtient le même résultat en présence d'urée 8M et de β -mercaptoéthanol.

L'électrophorèse de la protéine A en présence d'urée 8M montre 2 bandes de même intensité et de charges différentes.

4- Quel est le nombre de sous-unités de la protéine A ?

5- Sont-elles identiques ou non ?

6- Quels types de liaisons existent entre les sous-unités ?

Solution :8

Quelle serait la MM de la protéine si elle ne contenait qu'un seul atome de fer ?

100 g de A contient 0,35 g de Fe

MM g ----- 56 g de Fe

MM = $(56 \times 100)/0,35 = 16\ 000$: Masse molaire minimum de A

1- La protéine A est éluée entre B et C de masses molaires respectives 50 000 et 75 000.

Sa MM est donc comprise entre celles de B et C.

Le nombre d'atomes de fer est compris entre $50\ 000/16\ 000$ et $75\ 000/16\ 000$

n est compris entre 3,12 et 4,69.

n est un nombre entier, donc $n = 4$

Une molécule de protéine A contient 4 atomes de fer

2- MM de A : $4 \times 16\ 000 = 64\ 000$

3- Ordre d'éluion des 3 protéines dans une chromatographie d'exclusion : C, A, B

4- En détruisant les liaisons faibles, l'urée 8M permet de séparer les sous unités qui constituent la structure quaternaire d'une protéine. Dans notre cas, l'ultracentrifugation en présence d'urée 8M montre un pic correspondant à une MM de 16 000 (le quart de la MM de la protéine A). Ceci signifie que la protéine A est constituée de 4 sous unités de MM = 16 000.

5- L'ultracentrifugation montre que les 4 sous-unités sont identiques par leur taille (16 000).

L'électrophorèse montre qu'elles sont différentes par leurs charges.

6- Les sous unités sont reliées par des liaisons faibles de types Vander Wall'S

Exercice n°9

On veut déterminer quelques caractéristiques physiques et chimiques de la protéine Histone T bovine (P).

On a ainsi déterminé le pourcentage pondéral de 3 acides aminés entrant dans la composition de P. Glu : 8,3 % ; Lys : 24,1 % ; Tyr : 2 %. Les MM respectives sont : 147, 146 et 181

1- Quels renseignements apportent ces pourcentages sur la nature chimique de P ?

2- Déterminer sa masse moléculaire minimale.

3- Déduire le nombre minimal de ces trois résidus acides aminés dans P.

Soumis à une chromatographie d'exclusion, P est élué entre deux protéines globulaires A et B

de MM respectives 5700 et 12600.

4- Préciser l'ordre d'élution de ces 3 protéines.

5- En déduire la MM de P.

6- La protéine P est soumise à une électrophorèse à pH 7. Migrera-t-elle vers l'anode ou vers la cathode. Justifier votre

7- Soit une protéine P' différente de P par deux acides aminés. Citer une technique appropriée pour mettre en évidence ces différences.

8- Compte tenu de la nature de P, quelle zone de pH faut-il choisir pour précipiter cette protéine en solution

Solution :9

1- La protéine est constituée par 24,1 % de Lys (basique), 8,3 % de Glu (acide) et 2 % de Tyr. On peut dire cette protéine est à priori basique.

2- Masse moléculaire minimale : L'acide aminé le moins contenu dans cette protéine est la tyrosine. La protéine contient au moins un résidu Tyr. Dans ce cas, sa masse moléculaire serait égale à : $(181 \times 100)/2 = 9050$. C'est la masse moléculaire minimale

3- Nombre minimal de résidus :

Tyr : Le pourcentage pondéral de Tyr est 2%, le nombre minimal de résidus Tyr est 1 (la protéine ne peut contenir moins d'un résidu Tyr)

Nombre de Glu (8,3 %)

Masse de Glu présente dans 1 mole de T = $(9050 \times 8,3)/100 = 751$ g

1 mole de Glu pèse 147 g

x ----- $751 \text{ g} \times = 751/147 = 5,1$

T contient au minimum 5 résidus Glu

Nombre minimal de Lys (24,1 %)

Avec la même démarche, on trouve que T contient au minimum 15 résidus Lys

3- Ordre d'élution : B, ensuite P et enfin A

4- La masse molaire de P, égale à 9600, est bien comprise entre 5700 et 12600

6- La protéine P étant basique, son pHi est supérieur à 7. à pH 7, elle sera chargée positivement. Elle migrera donc vers la cathode.

7- P et P' sont soumis séparément à une hydrolyse totale. Les produits de l'hydrolyse sont ensuite analysés par chromatographie bidimensionnelle (empreinte digitale). La superposition des chromatogrammes permet de mettre en évidence les acides aminés qui diffèrent entre les 2 protéines.

8- La nature des acides aminés connus qui constituent la protéine P ($2 + 8,3 + 24,1 = 34,4$ en pourcentage pondéral), suggère qu'elle est basique. Il faudrait se placer à un pH

REALISER PAR :ZAKI
BIOLOGIE