

TD N°3: Les acides aminés et les protéines

Exercice 1:

Soient les acides aminés suivants: Ala, Asp, Lys.

- 1- Indiquer la charge nette globale de ces acides aminés à pH 1, à pH 7 et à pH 10.
- 2- Calculer leur pHi.

Exercice 2:

Soient le mélange d'acides aminés suivant: Ala, Tyr, Glu, Asp, Arg, Lys.

- Le mélange est déposé sur une colonne échangeuse d'anion à un certain pH. Indiquer ce pH.
- Quel est l'ordre d'élution de ces acides aminés ? Expliquer.

Exercice 3:

On donne les peptides suivants: Lys-Ala-His-Glu-Met, Tyr-Leu-Asp-Cys.

- 1- Ecrire la formule développée de ces peptides. Donner le nom de chacun d'eux.
- 2- Etudier la variation de leur charge nette en fonction du pH et déterminer leur pHi.

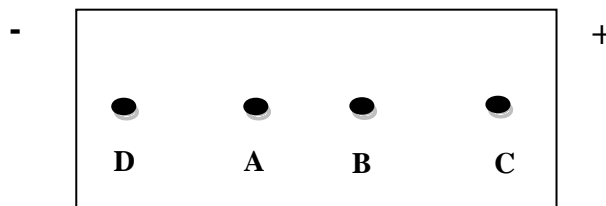
On utilise les valeurs suivantes pour le p^K des différentes fonctions ionisables.

Fonctions	α COOH	β ou δ COOH	α NH ₂	γ NH ₂	Imidazole	Thiol
p ^K	3	4.5	8.5	10.5	6.5	10

Exercice 4:

On donne un mélange de quatre protéines A, B, C, D.

L'électrophorèse réalisée sur ce mélange à pH =7 a donné le résultat suivant:



Le calcul du pHi de ces quatre protéines a donné les valeurs suivantes:

pHi = 5.1, pHi = 6.2, pHi = 8, pHi = 8.5.

- 1- Indiquer le pHi correspondant à chaque protéine.
- 2- Ce mélange est déposé au sommet d'une colonne de résine échangeuse d'anions éluée par un tampon de pH 7. Parmi les quatre protéines données, quelles sont celles qui s'accrochent la plus fortement à la résine.
- 3- Comment doit-on faire varier le pH afin de faciliter la libération de ces protéines ? Justifier votre réponse.
- 4- Indiquer l'ordre d'éluion des protéines. Justifier votre réponse.

Exercice 5:

L'étude de la structure d'un peptide a donné les résultats suivants :

- 1- Composition en acides aminés : Ala, Arg, Cys, Lys, Ser.
- 2- L'hydrolyse par la trypsine donne un dipeptide et un tripeptide.
- 3- L'hydrolyse acide ménagée donne un tripeptide composé de : Ala, Arg, et Cys.
- 4- L'action du dinitrofluorobenzène (DNFB) sur le tripeptide précédent donne un dinitrophényl-Alanine (DNP-Ala).

Parmi les réponses suivantes, choisir la ou les séquence(s) compatible(s) avec les données ci-dessus:

- | | |
|------------------------|------------------------|
| a- Lys-Ala-Arg-Cys-Ser | b- Ala-Arg-Cys-Ser-Lys |
| c- Ala-Arg-Cys-Lys-Ser | d- Ser-Ala-Arg-Cys-Lys |
| e- Ser-Lys-Ala-Arg-Cys | f- Ala-Arg-Ser-Cys-Lys |

Exercice 6:

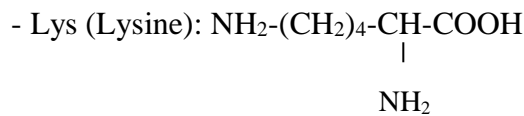
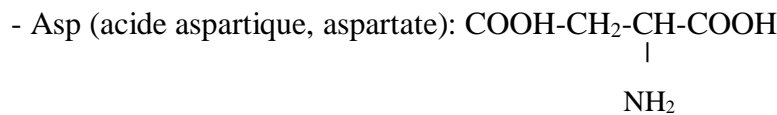
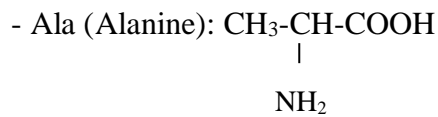
On veut déterminer les poids moléculaires d'une protéine.

- 1- Sachant que la protéine contient 0.2 % de His et que le PM de His est de 155, calculer le PM minimum de la protéine.
- 2- L'ultracentrifugation de la protéine a donné un PM de 390.000. Indiquer le nombre de molécules d'His rentrant dans la composition de ce peptide.

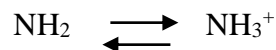
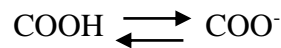
Résolution des exercices

Exercice 1:

1- Ecrire la formule chimique des acides aminés donnés:



- La charge nette globale des acides aminés est obtenue en appliquant une titration, réalisée par un gradient de pH croissant de pH=1 à pH>10. Sachant que l'ionisation des fonctions acide et amine sont comme suit:



- Le pH de la demi dissociation (ionisation) de la fonction acide est appelé: p_a . C'est le pH au niveau du quel la moitié de la fonction acide est ionisée (50% COO^-).

- Le pH de la demi dissociation (ionisation) de la fonction amine est appelé: p_k . C'est le pH au niveau du quel la moitié de la fonction amine est ionisée (50% NH_3^+).

	pH 1	pH 7	pH 10
Ala	+1	0	-1
Asp	+1	-1	-2
Lys	+2	+1	0

2- Calcul des pH_i (pH isoélectrique)

- $pH_i \text{ Ala} = pK_a + pK_b/2 = 6,02$.

- $pH_i \text{ Asp} = pK_a + pK_r/2 = 2,97$.

- $pH_i \text{ Lys} = pK_b + pK_r/2 = 9,74$.

Exercice 2:

- Une colonne de résine échangeuse d'anion est une colonne qui fixe les anions (les acides aminés chargés négativement (aa^-)).

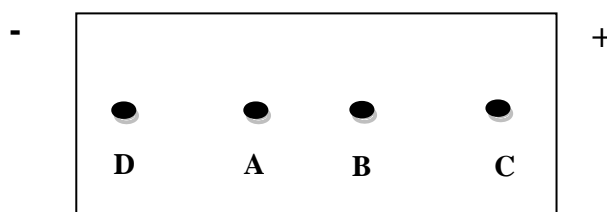
1- Pour qu'un acide aminé soit un anion, il faut que le pH du milieu soit supérieur à son pH_i ($pH > pH_i$). Par conséquent, le pH de la colonne doit être supérieur à tous les pH_i des acides aminés donnés. Le pH de la colonne soit supérieur à 10,76 ($pH > 10,76$).

2- Pour l'éluion, il faut annuler la charge des acides aminés (aa^0). C'est-à-dire atteindre leurs pH_i . A chaque fois qu'on atteint le pH_i d'un acide aminé, il devient sans charge et sort de la colonne. Dans notre cas, pour l'éluion de ces acides aminés, il faut faire un gradient de pH décroissant à partir de pH 11. L'ordre d'éluion sera: Arg, Lys, Ala, Tyr, Glu, Asp.

Exercice 3:

Travail de maison.

Exercice 4:



1- Selon le résultats de l'électrophorèse, la protéine A et D migrent vers la cathode (-). Se sont des cations dont le pH de l'électrophorèse (pH 7) est inférieur à leurs pH_i . pH_i A = 8, pH_i D = 8,5 (selon la distance de la migration).

- Selon le résultats de l'électrophorèse, la protéine B et C migrent vers l'anode (+). Se sont des anions dont le pH de l'électrophorèse (pH 7) est supérieur à leurs pH_i . pH_i B = 6,2, pH_i C = 5,1 (selon la distance de la migration).

2- Si le mélange est déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anions, seules les protéines B et C se fixent à la colonne. Tandis que les protéines A et D ne sont pas fixées, elles sortent de la colonne avant l'éluion. La protéine C se fixe plus fortement que la protéine B car elle est plus chargée négativement que B.

3- La libération de ces protéines (l'éluion) est réalisée par un gradient de pH décroissant à partir de pH 7.

4- L'ordre d'éluion est : B ensuite C.

Exercice 5:

1- Le peptide est constitué de cinq (5) acides aminés qui sont: Ala, Arg, Cys, Lys et Ser.

2- La trypsine coupe après les acides aminés basiques. Dans notre cas elle coupe après l'arginine et la lysine.

3- L'hydrolyse acide ménagée donne le tripeptide Ala-Arg-Cys. L'ordre de ces trois acides aminés est toujours présent.

4- Le DNFB se fixe à la fonction NH₂ terminal libre, donc il se fixe sur le premier acide aminé d'un peptide. L'alanine est le premier acide aminé qui compose notre peptide.

La séquence compatible avec les données de l'exercice est la séquence b: Ala-Arg-Cys-Ser-Lys.

Exercice 6:

1- PM protéine = 77500.

2- Nombre de molécules d'His est: 5 molécules.