

# L1 - TD de Biochimie Structurale 2007-2008

## Rappels unités

1 mol/L = 1M

$N = \text{Nombre d'Avogadro} = 6,02 \cdot 10^{23}$

Solution à 10 %  $\Rightarrow$  10 g de soluté / 100 ml

## TD 1 - Calculs utiles et fréquents en biologie

Les toxines botuliques (BoNT) produites par la bactérie *Clostridium botulinum* sont à l'origine d'une maladie paralytique grave appelée botulisme. Celle-ci est la plus puissante de toutes les toxines et reste à ce jour le poison le plus sévère. Son mécanisme d'action est une inhibition de la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires, ce qui bloque la transmission entre nerf et muscle et conduit à la paralysie respiratoire et locomotrice.

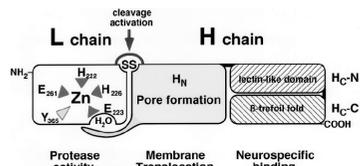


Figure 1

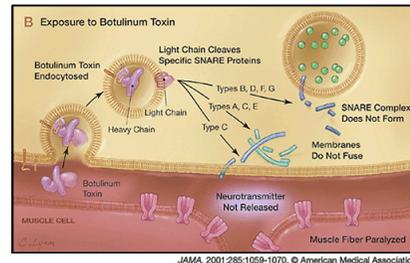


Figure 2

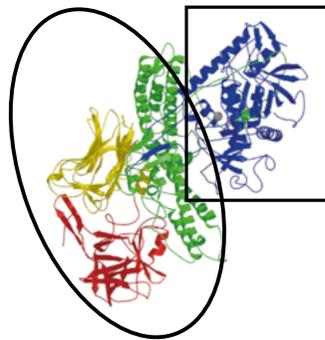


Figure 3 : Structure 3D de la BoNT(A).

## 1. Préparation d'une solution saline

Vous devez préparer 20mL de la solution S, de composition suivante :

Ces sels se trouvent sous forme de poudre (hydratée ou non). Dans un premier temps, vous choisissez de préparer une solution stock pour chacun des sels. Quelle masse de poudre allez vous peser dans chaque cas ?

CaCl <sub>2</sub>	5mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28mM

	solution stock à préparer	formule de la poudre	Masse molaire g/mol du composé en poudre
A	25mL de CaCl <sub>2</sub> 50mM	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	147,02
B	250mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10%	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	358,14

Dans un deuxième temps, vous préparez la solution S à partir de ces solutions stocks. Quel volume de chaque solution stock et d'eau devez-vous mesurer ?

2. La tyrosine libre présente dans une solution peut être mesurée par une réaction chimique qui donne un produit coloré dans le bleu. L'intensité de la coloration, mesurée à 750 nm, est fonction de la concentration en tyrosines libres de la solution. Une application de ce test coloré est la détermination du nombre de tyrosines présentes dans une molécule de toxine botulique. Il faut pour cela :

- avoir une courbe d'étalonnage permettant d'établir une correspondance entre une concentration connue de tyrosine libre et une intensité de coloration bleue.
- hydrolyser la toxine (car seule les tyrosines libres sont accessibles à la réaction colorée) et procéder ensuite à la réaction colorée sur l'hydrolysate, dans les mêmes conditions que pour la courbe d'étalonnage.

### A - Préparation de la courbe d'étalonnage

Vous disposez d'une solution de tyrosine libre à 5 g/L pour réaliser la courbe étalon dont les mesures d'absorbance vous sont données dans le tableau ci-dessous.

**A-1** Compléter le tableau en calculant les volumes de solution à prélever pour avoir les concentrations données. *Faire en TD les points 2 et 4 g/L et les autres en travail personnel. Le terme QSP signifie "quantité suffisante pour", et "QSP 1 ml" est donc le volume à prélever pour un volume final de 1 ml.*

**A-2** Pour ces deux points, calculer la concentration de tyrosine en mol/L (la masse molaire de la tyrosine est de 181 g/mol).

Concentration g/L	1	2	3	4	5
Volume de solution de tyrosine					
Volume d'eau QSP 1 ml					
A 750 nm	0,106	0, 205	0, 306	0,412	0,508

### B - Calcul du nombre de tyrosine par molécule de protéine.

La masse moléculaire de la toxine botulique est de 150 kDa (ou 150 000 Da). La solution de toxines hydrolysées (voir le cours pour la technique d'hydrolyse) est à 400 g de toxine/L.

L'hydrolyse a été totale et toutes les tyrosines présentes dans les toxines sont accessibles au dosage. Le tableau ci-dessous vous indique les résultats du dosage obtenus avec deux échantillons dilués de cette solution de protéine.

Solution de protéine hydrolysée	A 750	concentrations massiques de tyrosine libre
diluée au 1/10	3,57	
diluée au 1/20	1,78	

- Quelle est la masse molaire de la toxine ?
- Quelle est la concentration (en mol/L) de cette solution de toxine ?
- A partir des résultats d'absorbance, déterminer les concentrations massiques de tyrosine libre des deux solutions diluées.
- Calculer le nombre de tyrosine présent dans une molécule de toxine.

*Données : l'unité de masse moléculaire est le dalton (Da), lequel correspond à  $N^{-1}$  g.*

## TD 2 - Acides nucléiques : nomenclature, charge, structure et séquençage

### A - Nomenclature et charge

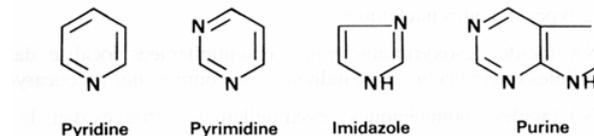


figure 1 : pyrimidine et purine

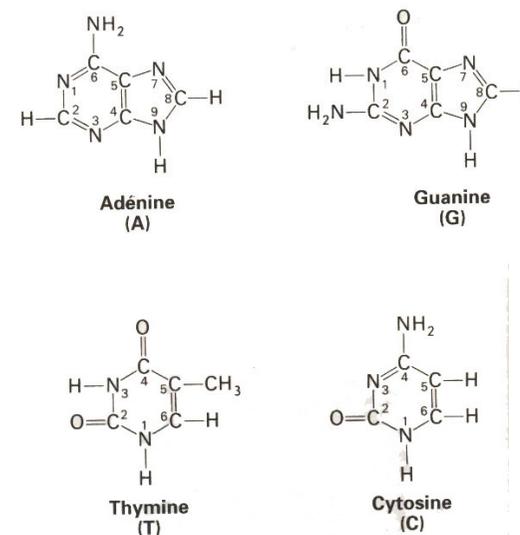


figure 2 : Les bases azotées.

**A-1** Qu'est-ce qu'un nucléotide ?  
Ecrire la structure d'un nucléoside 3' monophosphate, d'un nucléoside 5' triphosphate.

**A-2** Les bases et le ribose peuvent être chargés à certains pH. Le tableau 2 vous donne les valeurs des  $pK_a$  des groupements dissociables. Quelle est la charge des bases et du ribose au pH physiologique ?

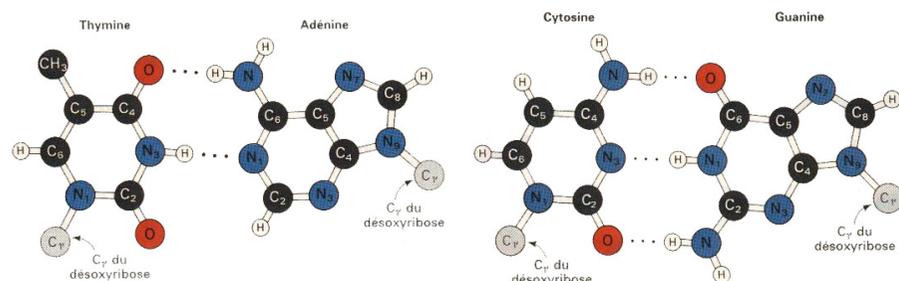
Les  $pK_a$  des trois fonctions dissociables de l'acide O-phosphorique sont de 1,9; 6,8 et 11,7. Quel est le  $pK_a$  de la fonction dissociable entre deux résidus nucléotidyl adjacents ? En déduire la charge d'un polynucléotide en solution aqueuse à pH 7.

Les échanges de protons dans les nucléotides et les polynucléotides :			
Les structures écrites ci-dessus sont celles qui prédominent au pH physiologique. Selon le pH les groupes phosphate, amino, lactame, et 2'hydroxyle (pour les ARN) des « résidus » nucléotidyl sont sous forme acide (protonée) ou basique (déprotonée). Ci-dessous les $pK'a$ des groupes ionisables :			
<b>groupes phosphate :</b>			
doublement liés (liaisons phosphodiester) :		$pK'a1$ # 1	
une liaison simple (extrémités 3' ou 5')		$pK'a$ # 1 et $pK'a2$ # 6	
<b>groupes amino :</b>			
adénosine	en position 6	$pK'a$ # 3,5	
guanosine	en position 2	$pK'a$ # 1,6	
uridine	néant		
thymidine	néant		
cytidine	en position 4	$pK'a$ # 4,1	
<b>groupes lactame :</b>			
adénosine	néant		
guanosine	en position 1	$pK'a$ # 9,2	
uridine	en position 3	$pK'a$ # 9,1	
thymidine	en position 3	$pK'a$ # 9,1	
cytidine	néant		
<b>groupes 2'-OH :</b>	quelle que soit la base	$pK'a$ # 12,5 - 13	
<i>Toutes ces valeurs sont celles observées en « moyenne ». Des variations sont possibles selon le milieu et l'environnement moléculaire.</i>			

Tableau 2

### B - Structure secondaire des acides nucléiques et dénaturation

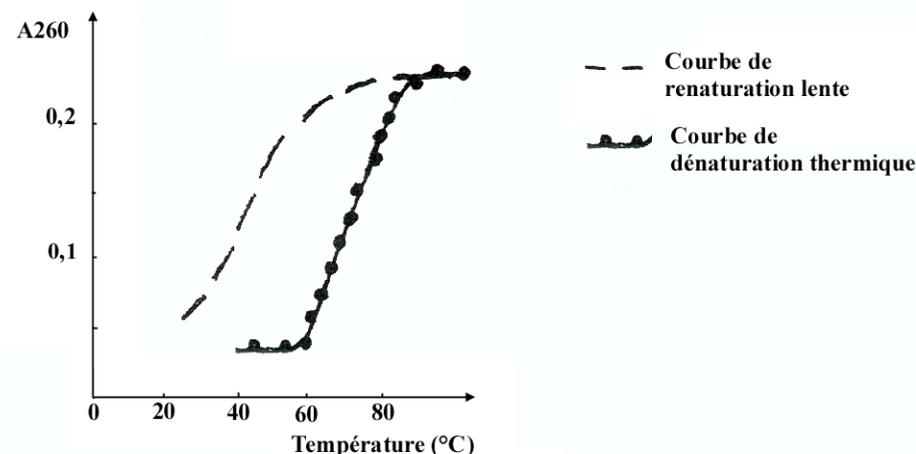
Les acides nucléiques sont organisés en double hélice formée par appariement entre les bases complémentaires A-T et G-C. Ces appariements se font par liaisons hydrogènes. Ci-dessous, la figure 3 vous indique les groupements impliqués dans la formation des liaisons hydrogènes.



**B-1** Quel sera l'effet d'un pH acide sur la stabilité d'une double hélice ? Pour répondre à cette question vous devez vous reporter aux valeurs des  $pK'a$  données dans le tableau 2.  
Thymine

**B-2** Après une hydrolyse complète d'une solution d'ARNt<sup>Phe</sup>, on a pu identifier dans l'hydrolysate : le nucléoside A, le nucléoside diphosphate pGp et des nucléotides Ap, Gp, Cp, Up. On en déduit que les extrémités 5' et 3' de l'ARN sont pGp... et ...A<sub>OH</sub>. Pourquoi ?

**B-3** Du fait de la présence des bases hétérocycliques, les acides nucléiques absorbent la lumière ultra-violette avec un maximum à 260 nm. L'appariement des bases diminue leur pouvoir d'absorption à 260 nm (effet hypochrome) de 40 % environ. Cette propriété permet de suivre par l'effet inverse (effet hyperchrome) la dénaturation de l'ADN. La figure 4 ci-dessous donne la courbe de dénaturation thermique de l'ADN d'*Escherichia coli*. On remarque que par refroidissement lent le phénomène de dénaturation de l'ADN est réversible. Déterminer la  $T_m$  de cet ADN.



Tous les ADN ne contiennent pas la même proportion de bases AT/GC. Connaissant les interactions qui maintiennent la structure en double hélice, dites quel effet aura la proportion en bases GC sur la valeur de la  $T_m$ . La relation ci-dessous (empirique) prend en compte l'effet sur la stabilité de la double hélice du % (G+C) et de la concentration molaire en NaCl. Le NaCl a-t-il un effet stabilisant ou déstabilisant sur la double hélice. Comment expliquez-vous cet effet ?

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \% (G+C) + 16,6 \times \log [Na^+]$$

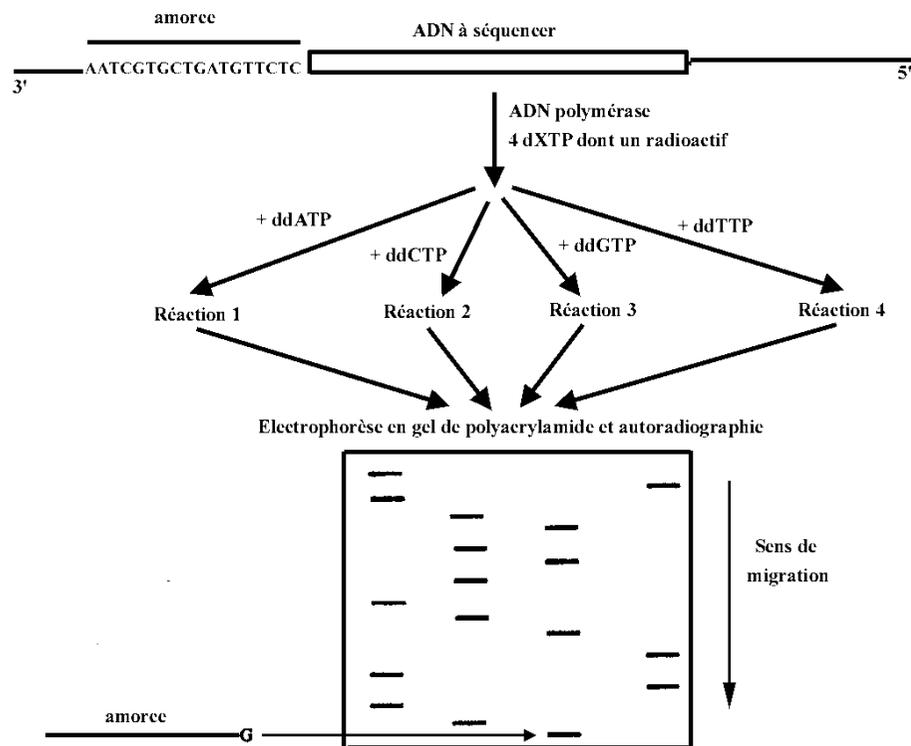
## C - Séquençage d'ADN

Le schéma ci-dessous illustre le principe de la méthode de séquençage de l'ADN des didésoxynucléotides (ou terminateurs de chaînes). On rappelle que cette méthode est basée sur l'incorporation aléatoire d'analogues des désoxynucléosides triphosphates (les didésoxynucléosides triphosphates) dans des brins néo-synthétisés par l'ADN polymérase. La chaîne d'ADN monocaténaire est schématisée dans le sens 3' → 5' ; le détail de sa séquence est donnée dans la partie où est initiée la réaction de polymérisation. L'amorce est schématisée par une ligne noire.

Donner la séquence de l'amorce utilisée en précisant bien les extrémités 5' et 3'.

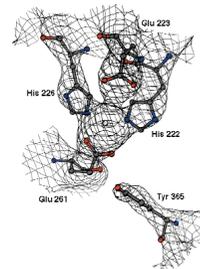
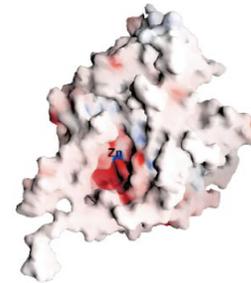
Quelle est la Tm de l'hybride ADN/amorce, en solution aqueuse saline contenant 0,025M NaCl.

L'électrophorèse est réalisée à pH7 en présence d'urée 6M. On supposera que le produit le plus rapide, indiqué par une flèche sur l'autoradiogramme ci-dessus et schématisé sur la partie gauche, correspond à l'amorce additionnée du 1<sup>er</sup> nucléotide G. Lire la séquence ci-contre en précisant les extrémités 5' et 3'.



## TD 3 - Echanges acide-base en milieu aqueux

Afin de pouvoir être active et exercer sa fonction protéolytique, le botox a besoin de lier un ion Zinc  $Zn^{2+}$ . Quelques acides aminés de cette protéine sont essentiels pour lier cet ion, Glu261, Glu 223, His222, His226. Pour cela, ils doivent se trouver dans un état de charge particulier (voir ci-dessous).



### 1. Propriétés acido-basiques des acides aminés en solution

Les acides aminés ont, au minimum, 2 groupements dissociables. Chaque groupement peut exister sous un état chargé ou non chargé. L'état de charge d'un groupement va dépendre de la relation entre son pKa et le pH de la solution. Cette relation est décrite par la relation d'Henderson-Hasselbalch.

En partant de l'équilibre de dissociation d'un acide faible (AH) en sa base conjuguée (A) ou d'une base (comme R-NH<sub>2</sub>) en son acide conjugué (R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), reprenez les définitions de la constante d'acidité Ka et du pKa, et établissez l'équation d'Henderson-Hasselbalch :  $pH = pKa + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right)$

En déduire la forme :  $pH = pKa + \log\left(\frac{x}{100-x}\right)$  où x est le % de forme basique.

Représentez graphiquement cette fonction. Recherchez les valeurs de x lorsque pH est :

- 1 unité en dessous ou en dessus du pKa
- 2 unités en dessous ou en dessus du pKa
- égal au pKa.

Repérez la zone où le pouvoir tampon est maximum.

La glycine a 2 fonctions dissociables ( $\alpha$ COOH pKa 2,34 et  $\alpha$ NH<sub>2</sub> pKa 9,60)

- Ecrire les 2 équilibres de dissociation
- Calculer la charge nette de la glycine en solution à pH=2,34 et à pH=8,6.

Certains acides aminés, comme Asp et Lys, ont trois fonctions dissociables (pKa(Asp) : 2,0 ; 3,9 ; 9,8 ; pKa(Lys) : 2,2 ; 8,9 ; 10,5)

- Ecrire les fonctions dissociables de ces deux acides aminés.
- Calculer leur charge nette à pH7 et leur pHi.

## 2. Comment faire un tampon ?

### a- Choix de la zone tampon

- Quel doit être le pH d'une solution pour que les acides aminés du site actif de la chaîne légère puissent lier le zinc et ainsi conserver l'activité protéase ?
- Pour cela, parmi les tampons ci-dessous, lequel choisiriez-vous ?

MES, pKa=6,15 à 20°C

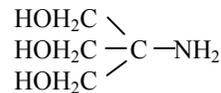
Tris, pKa=8,3 à 20°C

CHES, pKa=9,3 à 20°C

### b- Préparation

- De manière expérimentale, à l'aide d'un pHmètre, en ajoutant dans une solution d'acide faible une solution de base forte (ou dans une solution de base faible une solution d'acide fort), jusqu'à atteindre le pH souhaité.
- En calculant les proportions d'acide (fort, faible) et de base (forte, faible) à mélanger.

Le Tris-base ou tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (ci-contre) (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>; MW=121,14 g/mol; pKa=8,3 à 20°C) est une molécule couramment utilisée pour préparer des tampons. Elle se trouve en poudre (sous sa forme basique). Vous devez préparer 1L de tampon Tris-HCl 0,25M, pH 7,5 :

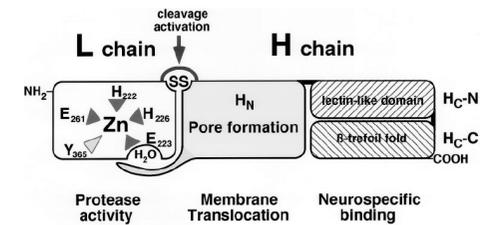


- Quelle quantité de Tris-base devez-vous peser ?
- Quel volume de HCl 1M devez-vous ajouter ? (calculez d'abord la proportion de molécules de Tris dissociées à ce pH, et déduisez-en la quantité, en moles, de HCl à ajouter pour obtenir le pH désiré)

## TD 4 – Protéines : purification du botox

La toxine botulique de type A (BoNTA) ou Botox® est utilisée dans le traitement de maladies neurologiques comportant une trop grande activité musculaire (contractions et mouvements anormaux, crampes, spasticité, dystonie). Elle est aussi employée en cosmétique, par exemple pour réduire les rides faciales ou la transpiration excessive.

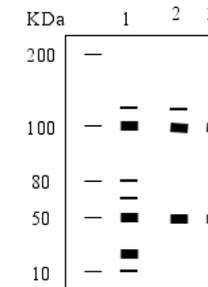
La BoNTA est composée d'une chaîne lourde de 100 kDa et d'une chaîne légère de 50 kDa, liées par un pont disulfure. L'activité protéasique du Botox est portée par la chaîne légère et nécessite un ion Zn<sup>2+</sup> lié aux chaînes latérales de deux acides glutamiques et de deux histidines (figure 1).



**Figure 1**

### Preparation and Characterisation of Homogeneous Neurotoxin Type A from *Clostridium botulinum*, *Eur. J. Biochem* 122, 493-500, 1982.

Dans cet article, les auteurs rapportent les différentes étapes du protocole de purification du Botox. Dans ce cas, la protéine d'intérêt est obtenue à partir de cultures de *Clostridium botulinum*. Après la lyse cellulaire, le botox est obtenu en complexe avec l'hémagglutinine (voir le gel dénaturant SDS-PAGE Figure 2 Piste 1).



**Figure 2**

- Quel est le principe d'un gel dénaturant SDS-PAGE ?
- A quoi correspondent les différentes bandes observées en piste 1 ?
- Deux protéines forment le complexe. Pourquoi voit-on 3 bandes majoritaires ?

### 1° étape : chromatographie d'affinité

- Donner le principe.
- Sachant qu'il existe un inhibiteur irréversible de l'hémagglutinine, proposez un protocole de purification du botox à partir du complexe botox-hémagglutinine.

Après le dépôt des protéines sur la colonne, celle-ci est lavée par une grande quantité de tampon de charge (50 mM Phosphate pH 6.3). Puis le botox est élué par variation du pH avec le tampon 0.1 M Phosphate pH 7.9, 1M NaCl.

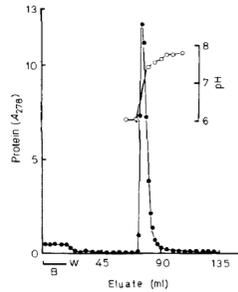


Fig. 4. Affinity chromatography of haemagglutinin-neurotoxin complexes on p-aminophenyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside-Sephrose 4B. The sample was reacted with the gel in 50 mM phosphate buffer pH 6.3 for a total of 2.5 h at 25 °C, breakthrough (B) collected, washed with equilibrating buffer (W), and then eluted with 0.1 M phosphate buffer pH 7.9/1 M NaCl. pH (○) and  $A_{278}$  (●) of the fractions were measured

**Figure 3**

- Pourquoi lave-t-on la colonne après le dépôt des protéines ?
- Décrire la figure 3. Comment est éluée la protéine ?

Le pic de la figure 2 est analysé par gel dénaturant SDS-PAGE (figure 2 piste 2).

- Qu'en concluez-vous ?

### 2° étape : échange d'ions

La deuxième étape de purification est un échange d'ions sur colonne DEAE-Sephadex. Les groupements actifs DEAE (DiéthylAminoEthyl) sont chargés positivement à pH basique. Avant le dépôt des protéines, la résine est équilibrée dans le tampon 0.1 M Phosphate pH 7.9.

- Quel est le principe d'une échangeuse d'ions ?
- Quel est l'intérêt d'équilibrer la colonne ?
- D'après la figure 3, comment sont éluées les protéines ?

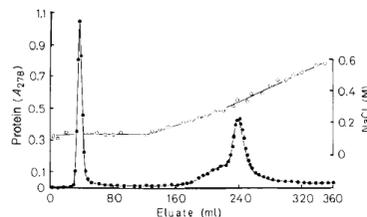


Fig. 6. DEAE-Sephacel chromatography of toxin purified by affinity chromatography. Haemagglutinin-free toxin (44.8 mg) eluted from the affinity gel (Fig. 4) was dialyzed against 0.15 M Tris/HCl, pH 7.9, and applied to the ion-exchange column (50 x 1 cm). After washing with two bed volumes, a linear NaCl gradient (0-0.5 M) in the same buffer was applied.  $A_{278}$  (●) and chloride concentration (○) were monitored, in the latter case by a Hg(CNS)<sub>2</sub> colorimetric method

**Figure 4**

Le pic de la figure 4 est analysé par gel dénaturant SDS-PAGE (figure 2 piste 3).

- Qu'en concluez-vous ?

### 3° étape : calcul de concentration

Nous voulons connaître la concentration de notre protéine purifiée.

Suivant la Relation de Beer-Lambert  $A_\lambda = \epsilon l c$  avec A, l'absorbance de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$ , c (en M) est la concentration du soluté, l (en cm) est la longueur du trajet optique et  $\epsilon$  (en  $M^{-1} cm^{-1}$ ) le coefficient d'extinction molaire qui dépend de la nature du soluté et de la longueur d'onde

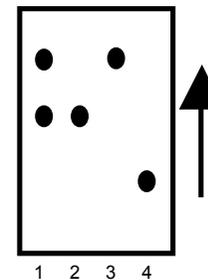
- Sachant que coefficient d'extinction molaire de BoNTA est  $\epsilon_{\text{botox}, 280\text{nm}} = 193260 M^{-1} cm^{-1}$ , calculer la concentration de protéine purifiée.

## TD 4 - Peptides

### 1. Liaison peptidique et résidus aminoacyls

- Ecrire dans le sens conventionnel la formule développée d'un térapeptide de séquence Lys-Val-Asp-Gly.
- Quels autres enchaînements linéaires de ces quatre acides aminés, par liaison amide, peut-on imaginer ?

2. On fait migrer, sur une plaque de silice en contact avec un solvant acide acétique/butanol, quatre échantillons différents contenant 2  $\mu$ l d'alanine, 2  $\mu$ l d'arginine, 2  $\mu$ l du dipeptide alanine-arginine ou 2  $\mu$ l d'un hydrolysats du dipeptide. Le résultat de l'expérience est donné dans le schéma suivant :



Quel est le nom de cette technique de séparation ?

Sur quel critère s'effectue-t-elle ?

A quels échantillons correspondent les pistes 1, 2, 3 et 4 ?

### 3. pHi des peptides et protéines

Les valeurs moyennes des pKa observés dans les polypeptides (et protéines), sont données ci-dessous :

carboxyles C-terminal et latéraux	3,1
imidazole de l'histidine	6,5
amine N-terminale	8
amine latérale de la lysine	10
phénol de la tyrosine	10
guanidinium de l'arginine	12

Un peptide isolé du cerveau à la séquence suivant :

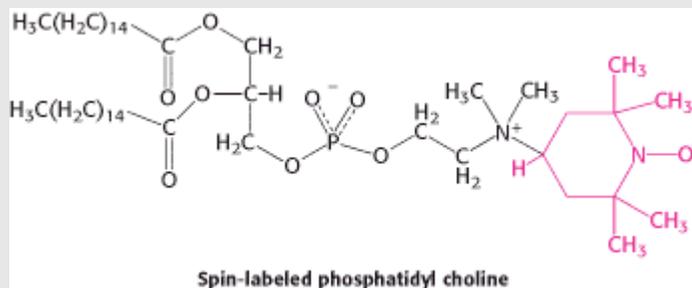
Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly. En utilisant les pKa donnés plus haut, calculer la charge nette de ce peptide à pH 3,1 ; 6,5 ; 8 et 12. Estimer son pHi.

Le pHi de la pepsine (contenue dans le suc gastrique) est très acide. Quels groupements dissociables (et donc quels acides aminés) doivent être présents en proportion importante dans cet enzyme ?

## TD 6 - Lipides / Glucides

*Le premier exercice est à traiter de manière optionnelle.*

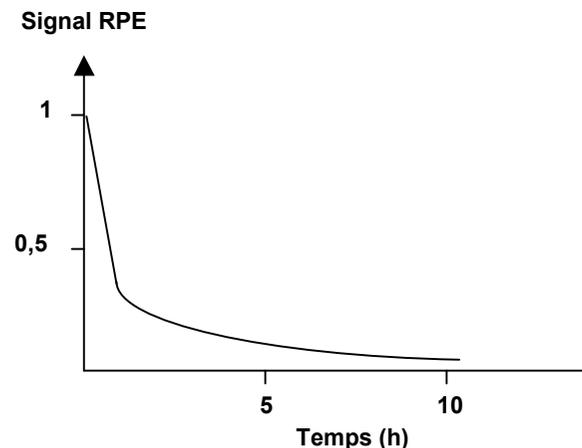
1. La diffusion transversale des phospholipides dans une bicouche membranaire peut être étudiée en utilisant un analogue paramagnétique de la phosphatidyl-choline appelée « spin-labeled phosphatidyl choline » (fig. ci-dessous) :



Le groupement nitroxy (NO), localisé sur le domaine polaire de cette molécule, donne un spectre particulier qui peut être mesuré grâce à une technique de résonance paramagnétique (RPE). L'addition d'un réducteur tel que l'ascorbate, incapable de diffuser à travers la bicouche lipidique, élimine le caractère paramagnétique des lipides modifiés localisés sur la face externe de la bicouche.

Des vésicules phospholipidiques contenant de la phosphatidyl-choline (95%) et l'analogue marqué (5%) ont été préparées par sonication et purifiées sur un gel de chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire). Le diamètre externe de ces vésicules est d'environ 25 nm. Au temps 0, on ajoute de l'ascorbate dans la solution de

vesicules précédemment préparée, et on suit le signal du spectre de RPE en fonction du temps. On obtient le graphe suivant :



Comment interprétez-vous ces changements d'amplitude dans le spectre de résonance paramagnétique?

2. La distribution des lipides entre feuillet interne et feuillet externe des membranes biologiques n'est pas totalement figée, sauf dans le cas des glycolipides. Quelles interactions s'opposent à la diffusion transverse (flip-flop) des lipides en général et des lipides glycosylés en particulier.

3. Les acides gras insaturés présents dans les lipides sont préférentiellement dans la conformation *cis* et non dans la configuration *trans*. Quels sont les conséquences d'une telle distribution ? Dessinez la structure d'un acide gras à 16 carbones dans ses formes saturées, mono-insaturées *trans* et mono-insaturées *cis*.

4. Combien d'isomères un disaccharide constitué de 2 molécules de glucose (en conformation cyclique) peut-il former ? Comparer ce résultat à celui du nombre d'isomères d'un dipeptide composé de L-alanine.

5. Une molécule de glycogène, constituée de résidus de glucose, est ramifiée en moyenne tous les 10 résidus.

a. Ecrire la structure de la molécule dans son enchaînement linéaire et à ses points de ramification.

b. Combien d'extrémités réductrices possède cette molécule ?

6. Une unité trisaccharidique d'une glycoprotéine de surface cellulaire jouerait un rôle essentiel dans l'adhésion cellule-cellule d'un tissu particulier. Imaginez une expérience simple qui permette de tester cette hypothèse.