

Correction des exercices du TD 3

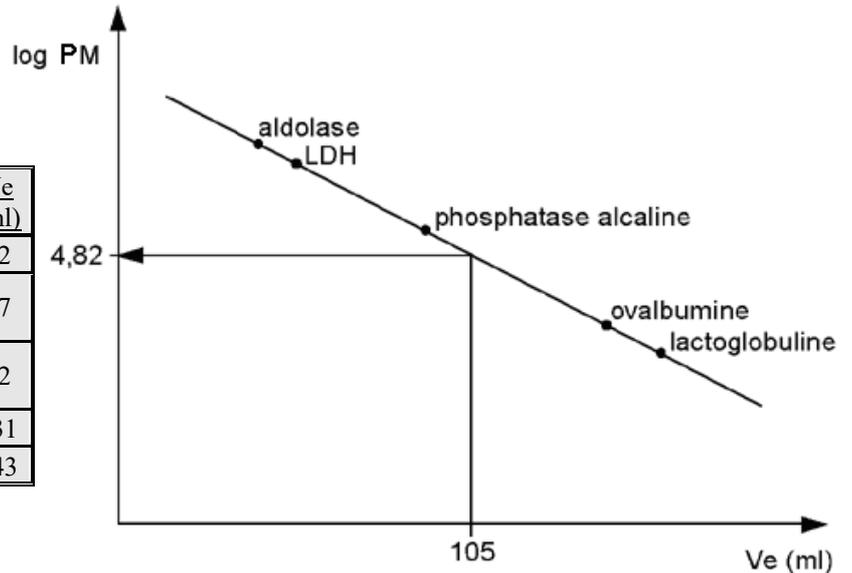
Correction exercice 1

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie d'exclusion (encore appelée : tamisage moléculaire, gel filtration). La connaissance du débit de la colonne (5 ml / min) et des différents temps de rétention nous permet de calculer le volume d'éluion pour chaque composé (voir tableau), selon la relation :

$$V_e \text{ (volume d'éluion)} = d \text{ (débit)} \times t_r \text{ (temps de rétention)}$$

La représentation graphique du Log du poids moléculaire (Log PM) qu'il faut calculer préalablement (voir tableau) en fonction du volume d'éluion (V_e) nous donne une droite :

	PM	Log PM	tr (min)	V_e (ml)
Aldolase	145000	5,16	10,4	52
Lactate déshydrogénase	135000	5,13	11,4	57
Phosphatase alcaline	80000	4,9	18,4	92
Ovalbumine	45000	4,65	26,2	131
Lactoglobuline	37100	4,57	28,6	143

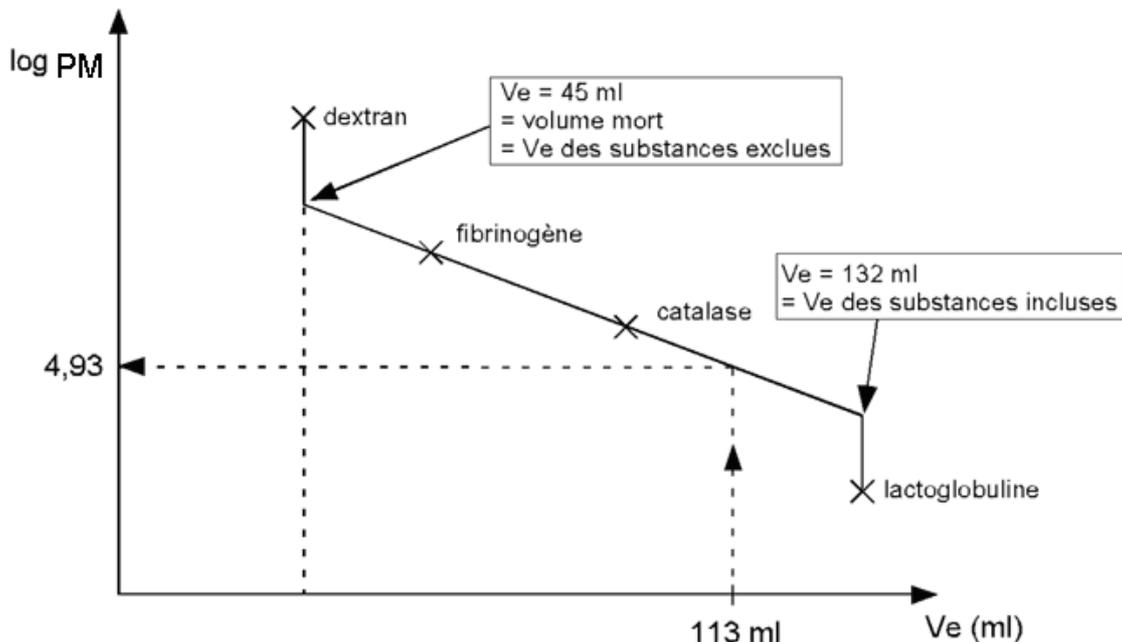


Le fait de visualiser une droite signifie qu'aucune protéine n'est exclue du gel.

2 - La glucokinase, avec un temps de rétention de 21 min, est éluée à un volume d'éluion de $5 \times 21 = 105$ ml. Il suffit de se reporter au graphe pour déterminer un Log de PM = 4,82 environ, soit un poids moléculaire de 66070 Da (ou 66,07 kDa), environ.

Correction exercice 2

- Afin de déterminer le poids moléculaire (PM) de la protéine p ($V_e = 113$ ml), il faut au préalable tracer la représentation du $\text{Log (PM)} = f(V_e)$. Le schéma ci-dessous représente le tracé de $\text{log (PM)} = f(V_e)$ pour les composés suivants : Dextran, Fibrinogène, Catalase et Lactoglobuline.



Une colonne a été rajoutée dans le tableau pour le calcul du Log du poids moléculaire :

	PM (Da)	Ve (ml)	Log PM
Dextran	2000000	45	6,3
Fibrinogène	340000	60	5,53
Catalase	230000	75	5,36
Lactoglobuline	19000	132	4,28

Il suffit de reporter sur le tracé : $\text{Log (PM)} = f(\text{Ve})$, le volume de 113 ml pour en déduire un $\text{Log PM} = 4,93$, soit une poids moléculaire de **85114 Da** ou **85114 g/mol** pour la protéine p.

Il est très important de noter que :

- 45 ml représente le volume mort de la colonne, c'est à dire le volume d'élution des substances exclues (ici, le dextran).
- 132 ml représente le volume d'élution des protéines totalement incluses.
- la droite a été tracée en ne tenant compte que des points correspondants au fibrinogène et à la catalase, car le dextran est un composé totalement exclu, alors que la lactoglobuline est une protéine totalement incluse dans le gel. Ainsi, il aurait été totalement faux de tracer une droite à partir des points correspondant à la catalase et la lactoglobuline (qui sont les protéines dont les volumes d'élution encadrent celui de la protéine p).

Correction exercice 3

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions. Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations.

Lorsque le pH est supérieur au pHi ($\text{pH} > \text{pHi}$), l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique).

Lorsque le pH est inférieur au pHi ($\text{pH} < \text{pHi}$), l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à $\text{pH} = 2$ et à $\text{pH} = 7$.

<u>acide aminé :</u>	<u>pHi :</u>	<u>charge à pH = 2 :</u>	<u>charge à pH = 7 :</u>
Acide L-Glutamique (Glu)	3,22	+	-
L-Leucine (Leu)	5,98	+	-
L-Lysine (Lys)	9,74	+	+

Ainsi, à $\text{pH} = 2$, les trois acides aminés sont chargés positivement, et seront retenus lors du passage sur la colonne.

A $\text{pH} = 7$, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne.

Glu est élué en premier ($\text{pHi} = 3,22$) puis Leu l'est ensuite ($\text{pHi} = 5,98$).