

## **TD 4 de Techniques d'Analyse Biologiques**

### **Exercice 1**

On veut séparer 3 acides aminés : l'acide glutamique, la leucine et la lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonates ( $-\text{SO}_3^-$ ). Les pH isoélectriques de ces acides aminés sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74 à 25°C.

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

1. Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acides aminés-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

### **Exercice 2**

On veut séparer l'acide aspartique, la valine et la lysine présents dans un mélange sur une résine polystyrénique substituée par des groupements  $\text{NH}_3^+$ . On dépose ce mélange sur la colonne de résine à pH 12 et on amène progressivement le pH à 4.

1. Quel type de chromatographie est illustré ici ?
2. Quel est le type d'interactions qui ont lieu entre les acides aminés et le support de la colonne ? Faites un schéma de l'intérieur de la colonne rendant compte de ces interactions à pH 12.
3. Quels sont les acides aminés élués et dans quel ordre ? Ont-ils été séparés ? Tracez le diagramme d'élution illustrant vos résultats : quantité d'acides aminés=f (volume d'élution).

### **Exercice 3**

Un mélange de protéines est traité par le SDS et le  $\beta$ -mércaptoéthanol, après ce traitement, ce mélange est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 7.

On mesure la distance de migration  $d$  de ces protéines dont les poids moléculaires sont connus.

	Ovalbumine	Trypsine	Myoglobine	Cytochrome
<b>PM (Da)</b>	43000	23000	17200	13500
<b>d (mm)</b>	37,6	59,9	70	79

1. Donner le rôle du SDS et du  $\beta$ -mércaptoéthanol

**2.** Tracer log de PM en fonction de d. Que remarquez-vous ?

**3.** Le poids moléculaire de l'hémoglobine est de 64000. On a trouvé après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, une seule bande dont la distance de migration est de 73mm. Quelle est la structure de cette protéine ?

## Corrigé type de la série 4 de TD

### Exercice 1

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 pH = 2 et à pH = 7.

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

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

À 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 ( $\text{pHi} = 5,98$ ).